

## 地高辛配基标记核酸技术及其应用

刘 妙 良

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100730)

### 提 要

核酸探针通过地高辛配基(异羟基洋地黄毒苷配基)标记的脱氧尿嘧啶核苷三磷酸(Dig-dUTP)随机引物插入结合而被标记,然后辅以免疫酶化学检测等新技术。和放射性同位素标记探针一样,它已广泛用于核酸等物的各种探测及分析,具有灵敏、安全、简便、经济及实用等优点。

**关键词** 地高辛配基,核酸杂交,随机引物标记法,酶联免疫反应

基因及分子生物学研究日新月异,但多数技术依赖于 DNA 和 DNA 或 RNA 杂交后核酸探测,以往的检测都依靠放射性核酸探针,而它具有相对不安全、昂贵、放射不稳定等缺陷,在一定程度上限制了其应用。近年来,国内外发展的生物素-亲和素标记检测体系虽已广泛用于基因分析,尤其在原位杂交中得到充分的应用,但它有两个缺点:普遍存在于原核和真核生物中内源性生物素的干扰:链霉亲和素非特异结合非流动性基质的趋势,这样便提高了本底,降低了灵敏度。而地高辛配基化脱氧尿嘧啶核苷(digoxigenin-dUTP)标记的核酸探针技术,是 80 年代末才发展起来的一种新型非放射性标记技术,由于它具有较高的灵敏度,也克服了放射性同位素标记技术所固有的缺陷以及生物素系统的不足之处,加上本身方法的不断改进,已日益显示出优越性和广泛的应用前景。本文就这一方法本身及其应用的最新进展作一综述和评估。

### 1 地高辛配基标记探针的基本原理

地高辛配基又称异羟基洋地黄毒苷配基,这种类固醇半抗原仅存于洋地黄类植物,其抗体与其它任何固醇类似物如人体中的性激素无

交叉反应。它通过间臂联接到脱氧尿嘧啶三磷酸(dUTP)上形成 digoxigenin-11-dUTP (结构见图 1),通过随机引物<sup>[1,2]</sup>或缺口翻译法将后者与核酸分子相连,构成 Dig-配基标记的核酸探针。将这种标记的探针与固定在滤膜或组织细胞或染色体原位核酸分子之间的同源序列在一定条件下互补杂交(待检核酸和探针在杂交前若为双链则必须变性成单链),然后这种杂交复合物用偶联有酶或荧光素的羊抗地高辛抗体 Fab (抗原结合片段)结合物作为酶标或荧光标记,再分别用显色底物使杂交部位显色或产生荧光而达到检测目的。大致过程见图 2。

常用的免疫酶学检测方法有两类: Dig-HRP(辣根过氧化物酶)检测体系:以 DAB(四氢氯化二氨基联苯胺)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (双氧水)为底物,结果为棕色;或以 4-氯-1-萘酚/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为底物结果则为蓝色。

Dig-AKP (碱性磷酸酶)检测体系:以 BCIP/NBT (5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸盐/氮蓝四唑)为底物,结果为蓝紫色沉淀。一般说来,与核酸探针相结合的标记物如能进行放大(如酶促反应)就较单一信号的标记物(如荧光素

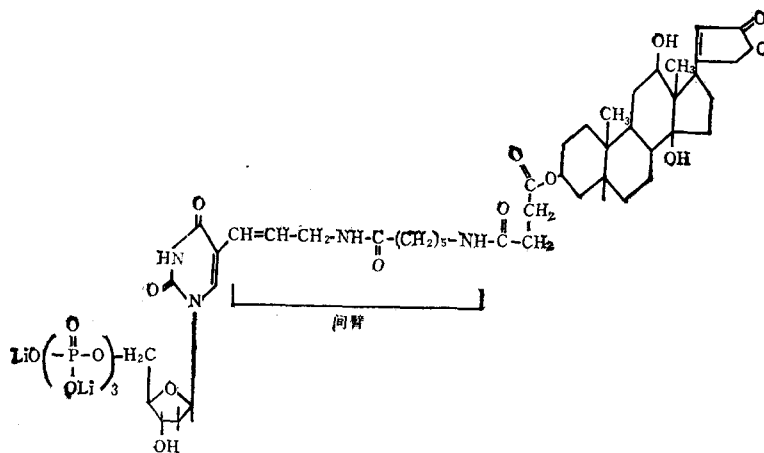


图 1 Digo-11-dUTP 结构

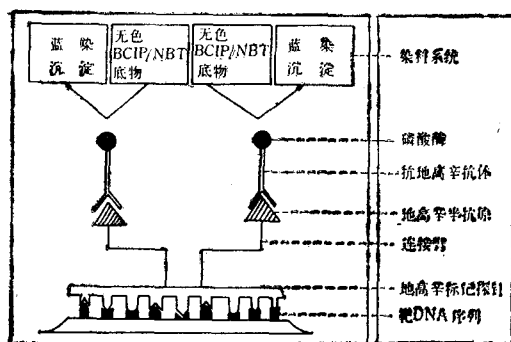


图 2 地高辛标记的探针检测——酶联免疫反应

等) 具有更高的灵敏度。而同样是酶促化学反应, 在 AKP 和 HRP 之间也不一样, 前者灵敏度和分辨率较高, 但价格昂贵且稳定性不如后者, 后者灵敏度和分辨率不如前者(低 10 倍左右), 但价廉且较稳定<sup>[3]</sup>。

## 2 标记方法

地高辛配基标记的核酸探针, 虽然方法很多如随机引物法、缺口翻译法、光化学标记法及末端标记法等多种, 但目前以随机引物法用得较多, 且也是标记效率较高的一种。随机引物法由美国 Johns-Hopkins 大学医学院的 Feinberg 等<sup>[1,2]</sup>创立。其基本原理与放射性核苷三磷酸为底物的随机引物合成一样。此处代替放射性底物的是 Dig-dUTP, 这种方法将地高辛配基通过一臂联接到 dUTP 上。Dig-dUTP 作

为 TTP 的结构类似物, 通过大片段 DNA 聚合酶和随机六聚核苷酸引物, 随机掺入标记 DNA 探针。该法<sup>[4]</sup>一般可允许 10ng—3μg 范围内探针有效地标记。与缺口翻译法不同的是, 在标记之前, DNA 必须变性成线性单链, 且标记效率较高, 一般每 20—25 个核苷酸中带一个 Dig-dUTP<sup>[4]</sup>, 而标记探针的长度则依模板 DNA 的长度不同而不同。如以 pBR322DNA 模板为 DNA 探针, 则标记探针长度可为 200—2000bp 不等。该法优点是: 标记效率极高, 灵敏度也高; 标记用 DNA 没有缺口翻译法那样高要求; 标记反应不受琼脂糖抑制; 不因标记时间延长聚合酶本身外切酶活性导致标记好探针的降解, 所以适当延长标记反应时间可提高标记效率; 标记好的探针也较稳定(−20℃贮存达二年); 使用过的含有探针的杂交液也可反复多次使用。

## 3 Dig-标记检测体系的实验分析

**3.1 标记率** 从前述可知标记率是灵敏度高的重要前提, 标记率提高又受很多因素影响, 如标记方法、标记探针的杂交专一性及稳定性等。同时我们应注意即使是作密集标记也不等于就有很高的灵敏度, 因为在标记分子之间还存在着空间位阻效应, 即所有标记上的 Dig-dUTP 并不都能被抗地高辛配基-酶/荧光素抗体复合物所识别, 目前最常用的随机引物法使每 20—25 个核苷酸中带有有一个 Dig-dUTP, 这

已是灵敏度很高的标记率了。

**3.2 灵敏率及分辨率** Dig-配基标记检测系统是免疫酶促化学反应或荧光检测,它们既特异又快速,并且有显著的放大作用。无论是滤膜或原位杂交,所需时间周期短且安全,克服了生物素系统的二个缺点,灵敏度和放射性标记相近,对于 Southern 印迹可检出同源 DNA 0.1pg。

**3.3 特异性** 通过一系列试验,异源性 DNA 即使提高  $10^4$ — $10^5$  倍,也得不出阳性反应。

**3.4 改善标记及检测体系的手段** 对于标记反应来说,提高标记效率可以采取如下措施:(1)适当延长标记时间,尤其是标记分子量较高的 DNA 或其纯度不太高或探针片段是从琼脂糖凝胶回收时;(2)提高模板 DNA 量,但应该注意在微克级水平比毫微克级水平合成产率的提高相对较低;(3)保持模板 DNA 量和标记反应时间一定,扩大反应体系,合成探针的量增加;(4)Dig-dUTP/TTP 合适的比例,以 35% 为宜;(5)一定的 DNA 纯度;(6)沸水浴变性比干热变性效果好;(7)乙醇沉淀回收标记片段时加入一定载体 DNA 或酵母 tRNA 或糖原可以减少已标记的探针 DNA 的丢失,沉淀用盐溶液以 4mol/L LiCl<sub>2</sub> 效果最佳,而醋酸铵最好不要使用,因为它将导致标记好探针难于重新悬浮。对于杂交过程,则与放射性标记杂交法没有什么大区别,但对于滤膜杂交来说,结果的好坏还与滤膜的生产厂家、规格、型号有关,且专门的封阻试验也必不可少。检测体系:该过程最关键的是有效的封阻,另外,提高结合抗体浓度也可以适当提高信号强度并减少抗原和抗体反应时间,也可以适当延长显色过程利于结果的观察。但是时间延长后,本底有可能加深。至于结果的观察,可以干膜保存或浸湿

密封保存或摄影记录。考虑到西德柏林格尔曼哈姆公司已有各种配套试剂盒出售,为了更充分地利用,使用过的杂交液可重复使用多次,可先标好探针以更好地安排时间;尼龙膜可在脱色之后,洗掉探针反复使用多次;杂交过的膜煮掉探针后可以用于放射性探针检测,便于比较,反之亦然。另外欲获得较好的效果,在脱去探针之前杂交膜最好避免干燥。

## 4 应用及展望

目前地高辛配基检测体系已广泛用于核酸研究分析的各个方面,如 Southern 印迹检测特定基因组序列<sup>[5]</sup>、进行 RFLP 分析用于基因诊断<sup>[6]</sup>、基因表达<sup>[7]</sup>、菌落或噬菌斑原位杂交<sup>[8]</sup>、固定细胞及中期染色体原位杂交<sup>[9]</sup>以及生物体液中病毒 DNA 序列的检测。该体系正在发展为 SP6 及 T7RNA 多聚酶酶促 RNA 标记以及末端转移酶寡核苷酸标记。光敏地高辛配基标记检测体系也在探索之中,此外,这一技术也应用于检测 DNA 标记物及测序,为人类染色体连锁图谱的构建及基因图谱分析也都发挥了重要作用。

衷心感谢刘国仰教授的悉心校阅。

## 参 考 文 献

- 1 Feiberg A P *et al.* *Anal Biochem*, 1983; **132**:6
- 2 Feiberg A P *et al.* *Anal Biochem*, 1984; **137**:266
- 3 马凤森,生物化学与生物物理进展,1989;**16**: 101
- 4 Boehringer Mannheim. *Genius Nonradioactive DNA labeling and Detection kit*, Cat. No. 1093657
- 5 Kimpton C P *et al.* *J of Virological Methods*, 1989; **24**:335
- 6 刘国仰等,中国医学科学院学报,1990;**12**:120
- 7 Tautz G *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1989; **17**:4405
- 8 Biochemica Boehringer Mannheim. *Dig-DNA labeling and detection nonradioactive application manual*, p28—31
- 9 Heino P *et al.* *J of Virological Methods*, 1989; **26**:331
- 10 Hallegot P H, Galle P. *Radiat Environ Biophys*, 1988; **27**: 67
- 11 Galle P. *La Recherche*, 1986; **17**: 766
- 12 Galle P, Berry J P. *Scan Electron Microsc*, 1983; **11**: 827
- 13 Schaumann L, Galle P, Thellier M *et al.* *J Histochem Cytochem*, 1988; **36**(1): 37
- 14 Galle P. *Ann Phys Fr*, 1985; **10**: 287

(上接第 40 页)