

中多种方法对多种组织和细胞进行实验,结果发现,不同的方法仅适用于某一定的组织和细胞,分配条件的选择、柱层析过程中洗脱液的变化等都直接关系着实验的成败。为了寻求一种较为方便、通用的方法,我们对 Ueno 等人^[1]的方法进行了以下改进: a. 在 DEAE-Sephadex A-25 离子交换层析中,用 B 液代替 Ueno 方法中的含 0.2 mol/L NaAc 的甲醇溶液洗脱 GIs。因为 GIs 更易溶解于含有一定水分的氯仿-甲醇 1:2 的混合液中^[4]。另外, B 液盐浓度较低,有利于进一步纯化。 b. 用透析除盐和 C_{18} 反相柱层析代替 Sephadex

G-50 凝胶过滤除盐和 Iatrobeads 吸附层析, 这样不仅操作简便, 而且可节省进口 Sephadex G-50 和 Iatrobeads 的昂贵开支及洗脱用的大量有机溶剂。 c. 有人报道用 Sep-Pak C_{18} 反相柱除盐^[2]。我们则先将样品透析除盐, 再过 C_{18} 反相柱。实验结果表明, 过 C_{18} 反相柱前, 样品的 HPTLC 分离效果很差, 甚至难以进行, 而过 C_{18} 反相柱后, HPTLC 效果很好 (图 1), 说明 C_{18} 反相柱也能除去许多杂质 (小样品及盐浓度低时可不透析, 直接 C_{18} 反相柱层析)。

本方法是对多种 GIs 分离纯化方法^[1-3] 的重新组合。实验结果与已报道的大鼠肝脏、睾丸组织的 HPTLC 图谱基本一致^[1], 无拖带现象。因此, 它是一种较为通用并适合于国内实验条件的方法。

参 考 文 献

- 1 Ueno, K, Ando S, Yu R K. *J Lipid Res*, 1978; **19** (7):863
- 2 Ledeen R W, Yu R K. *Methods in Enzymology*, 1983; **83**:139
- 3 Yu R K, Ledeen R W. *J Lipid Res*, 1972; **13**(5): 680
- 4 Svennerholm L, Fredman P. *Biochim Biophys Acta*, 1980; **617**(1): 97
- 5 张新波, 崔肇春, 朱正美. 生物化学与生物物理进展 1990; **17**(3):243

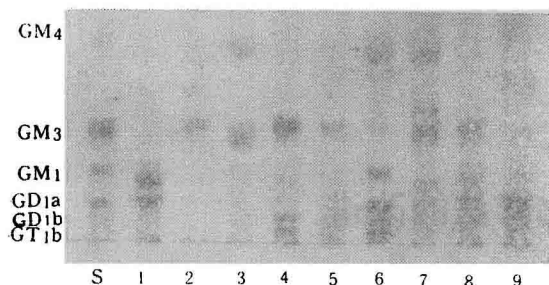


图 1 大鼠九种组织 GIs 的 HPTLC 图谱

S, 标准(牛脑混合 GIs + 狗红细胞 GM3); 1, 红细胞; 2, 心肌; 3, 小肠粘膜; 4, 肝脏; 5, 胰腺; 6, 脑; 7, 肾; 8, 脾; 9, 睾丸。箭头所指为间苯二酚阴性条带

生物素标记 DNA 探针杂交条件探讨

刘钟瑛 杨贵贞* 王文余

(哈尔滨医科大学免疫学教研室, 哈尔滨 150086)

关键词 生物素标记 DNA 探针, DNA 杂交

DNA 探针技术正越来越广泛地应用于医学基础研究和临床检测^[1]。生物素标记探针已在某些领域部分取代同位素标记探针而发挥作用。杂交是 DNA 探针技术中重要一环。各种杂交条件的变化均会对杂交结果并最终对检测结果产生影响。文献中关于杂交条件的报道常常不一致, 而国内尚未见对杂交条件作系统探讨的文章。而且生物素探针和常用的同位素探针由于标记物不同, 两者的杂交条件也存在一定差异, 为此我们在用化学方法制备了生物素化 DNA 探针的基础上, 对生物素探针的杂交条件进行了探讨, 以为生物素探针的进一步应用提供必要的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

乙二醇(分析纯、沈阳试剂二厂), 亚硫酸氢钠(分析纯, 天津塘沽新华化工厂), λ 噬菌体 DNA (华美公司), 硝酸纤维素膜 (NC 膜, 浙江黄岩化工厂), 生物素- α -氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯、碱性磷酸酶标记亲和素、5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸盐 (BCIP)、硝基蓝四氮

* 白求恩医科大学免疫学教研室

收稿日期: 1991-08-12 修回日期: 1991-12-23

唑 (NBT) 均购自 Sigma 公司。

1.2 探针标记^[2,3]

新鲜配制亚硫酸氢钠-乙二醇混合液, 两者含量分别为 1mol/L 和 3mol/L (pH6.0), 加入对苯二酚, 使终浓度为 1mg/ml。将 λ DNA 用超声打成 500—800 bp 长度的片断, 煮沸法变性, 取 1 份 DNA 与 9 份上述混合液混合, 42℃ 水浴 3.5h。用 5mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH8.5) 在 4℃ 下充分透析, 经透析并浓缩的 DNA 溶于 200 μ l 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH8.5) 中, 再加入 4mmol/L 生物素- ϵ -氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯, 室温反应 2h, 用含 150 mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA 的 10mmol 磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 在 4℃ 下充分透析。

1.3 斑点杂交

煮沸变性的 λ DNA 片断用 5 $\times$ SSC (1 $\times$ SSC 为 150mmol/L NaCl, 15 mmol/L 柠檬酸钠) 作 4 倍稀释, 用减压抽滤法在 NC 膜上点样, 每斑点 5 μ l, 室温凉干, 80℃ 烤膜 2h, 于 42℃ 预杂交 4h, 预杂交液组成: 5 $\times$ SSC, 5 $\times$ Denhardt [1 $\times$ Denhardt 为: 0.02% Ficoll, 0.02% 聚乙烯吡咯烷酮, 0.02% 牛血清白蛋白 (BSA)], 50% 甲酰胺, 0.2mg/ml 鱼精子 DNA, 0.1% SDS (十二烷基硫酸钠), 20mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.5), 1 mmol/L EDTA。杂交液的基本不变成分为 6 $\times$ SSC, 50% 甲酰胺, 0.1 mg/ml 鱼精子 DNA, 0.5% SDS, 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.5), 1 mmol/L EDTA, 其余根据所需探讨条件作适当变更。杂交温度为 42℃。

1.4 显色检测

洗膜、封闭、显色均按文献^[3]方法进行, 显色时间约 3h。

2 结 果

2.1 杂交时间对检测结果的影响

杂交液不含 Denhardt 和硫酸葡聚糖, 探针浓度为 0.15 μ g/ml。从图 1 结果可见, 当杂交时间为 10h, 斑点显色较浅, 检测敏感性约为 4pg, 杂交时间延至 16h, 斑点显色加深, 检测敏感性提高到约 1pg, 杂交时间

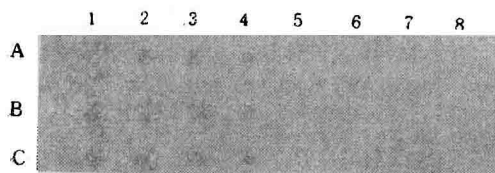


图 1 杂交时间对检测结果的影响

杂交时间: A, 10h; B, 16h; C, 20h。

1—7 各斑点 λ DNA 含量: 1. 1ng; 2. 250pg; 3. 63pg; 4. 16pg; 5. 4pg; 6. 1pg; 7. 0.25 pg。第 8 点是作为阴性对照的 10ng 小牛胸腺 DNA

继续延至 20h, 检测敏感性未见进一步提高。在以下实验中将杂交时间定为 16h。

2.2 不同探针浓度对检测结果的影响

杂交液中含有 Denhardt 和硫酸葡聚糖。从图 2 可见, 当探针浓度由 0.1 μ g/ml 提高到 0.2 μ g/ml, 斑点显色略加深, 但检测敏感性同样为 1pg, 同时背景也有些加深; 继续提高探针浓度至 0.3 μ g/ml, 斑点显色未见明显增强。因此在以下实验中将探针浓度定为 0.15 μ g/ml。

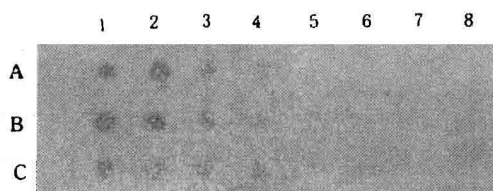


图 2 不同探针浓度对检测结果的影响

探针浓度: A, 0.1 μ g/ml; B, 0.2 μ g/ml; C, 0.3 μ g/ml。各斑点 DNA 含量同图 1

2.3 不同 Denhardt 浓度对检测结果的影响

将杂交液中 Denhardt 浓度分别调为 0, 2 $\times$ Denhardt 和 5 $\times$ Denhardt。结果见图 3, 可见随杂交液中 Denhardt 浓度提高, 斑点显色略减弱, 但背景更加清晰。因此在以下实验中将 Denhardt 浓度定为 2 $\times$ Denhardt。

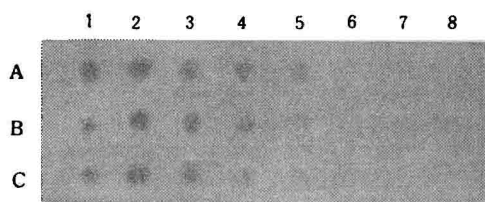


图 3 不同 Denhardt 浓度的比较

A, 0 $\times$ Denhardt; B, 2 $\times$ Denhardt; C, 5 $\times$ Denhardt。各斑点 DNA 含量同图 1

2.4 不同硫酸葡聚糖浓度对检测结果的影响

将杂交液中硫酸葡聚糖浓度分别调为 0, 5%, 10%。从图 4 可见随杂交液中硫酸葡聚糖浓度提高,

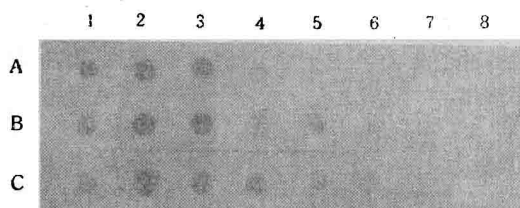


图 4 不同硫酸葡聚糖浓度的比较

硫酸葡聚糖浓度: A, 0; B, 5%; C, 10%。各斑点 DNA 含量同图 1

斑点显色增强,检测敏感性提高。加入 5% 硫酸葡聚糖即可使检测敏感性由 1pg 提高到 0.25pg;当其浓度继续提高到 10%,斑点显色进一步加深,但此时背景也明显增加。

3 讨 论

DNA 探针的杂交条件涉及的因素较多,而各种文献所列杂交条件不甚一致,为此我们用化学方法制备了生物素标记的 DNA 探针,并就各种杂交条件对检测结果影响作了较系统探讨。

关于杂交时间。杂交所需时间显然与探针浓度、杂交温度等因素有关。本文结果表明,当探针浓度为 0.5 μ g/ml,杂交反应在 42 $^{\circ}$ C 进行 10h 尚不完全,进一步延长杂交时间则可使检测敏感性得以提高。因此可认为,在不提高探针浓度的情况下,只要条件允许,应使杂交时间保证在 16h 以上。

关于探针浓度。马大龙等所用生物素标记探针浓度为 1ng/ml^[4],Reisfeld 等报道则为 0.5 μ g/ml^[5],两相比较,相差达 500 倍。从本文结果看,当杂交时间为 16h,0.1 μ g/ml 的生物素探针已基本可使杂交反应进行完全,进一步提高探针浓度仅略增强显色信号,而未能明显提高检测敏感性,反使背景增加。因此我们认为,杂交时可将其探针浓度控制在 0.1—0.2 μ g/ml 之间。

Denhardt 的作用是封闭 NC 膜上与探针非特异

结合部位。关于其浓度,报道中多有为 5 $\times$ Denhardt,但也有用 1 $\times$ Denhardt^[5], 2 $\times$ Denhardt^[6,7],甚至 10 $\times$ Denhardt^[2]。从本文结果看,即使杂交液中不含 Denhardt,探针的特异性也基本不受影响,NC 膜的背景也仍较清晰,这可能是经过预杂交,NC 膜上非特异结合部位已基本被封闭之故,加入一定量的 Denhardt,则可进一步降低背景,为此我们在实验中将其 Denhardt 浓度定为 2 $\times$ Denhardt。

本文结果表明,在杂交液中加入一定量硫酸葡聚糖即可使检测敏感性进一步提高。加入 5% 硫酸葡聚糖即可使检测敏感性从 1pg 提高至 0.25pg。但过高浓度的硫酸葡聚糖将使背景明显增加。因此杂交时可根据检测需要控制其在杂交液中的一定含量。

可以认为,以上实验结果不但对生物素标记探针,而且对其它非同位素探针和同位素探针杂交条件的选择和控制也有一定参考意义。

注:上述各项实验,曾重复一次,结果基本类似。

参 考 文 献

- 1 刘钟瑛,杨贵贞. 医学与哲学, 1991;3: 10
- 2 Viscidi R P et al. *J Clin Microbiol*, 1986;23:311
- 3 刘钟瑛,杨贵贞. 中国免疫学杂志, 1990;6(4): 244
- 4 马大龙等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1987;7(2): 77
- 5 Reisfeld A et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987; 142(2): 519
- 6 张鹤龄等. 病毒学报, 1989;5(1): 72
- 7 Keller G H et al. *Anal Biochem*, 1989; 177:392

一种快速微量的双温 PCR 法

阎小君 苏成芝 吉昌华

(第四军医大学生化教研室,西安 710032)

关键词 三温 PCR, 双温 PCR, DNA 扩增

PCR 技术能特异、直接和高效的扩增各种对象的基因。本文建立了一种快速、微量的双温度点法 PCR,并探讨了该 PCR 法的最适条件。旨在使 PCR 技术常规化。

1 PCR 方法

PCR 特异引物为 HIV-1Pr₁ 和 HIV-1Pr₂, 模板为 pARV-2/7A 质粒(内含 HIV-1 全长 cDNA)。反应总体积分别为 10, 20, 50, 100 μ l, 其中主要含有 HIV-1Pr₁ 和 HIV-1Pr₂ 各 50pmol/L, dNTP 为 200

μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 10 和 20 μ l 反应体积加 1U, 50 和 100 μ l 反应体积中加 2U; 模板 DNA 50—500ng; 加适量的反应缓冲液和双蒸水。煮沸 3—5 min, 加酶后进入循环。三温度点 PCR (简称 3tPCR) 反应条件为: 72 $^{\circ}$ C, 80s, 91 $^{\circ}$ C, 40s, 55 $^{\circ}$ C, 60s, 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min; 双温度点 PCR (简称 2tPCR) 是将延伸与退火温度合并(退延温度), 故反应管只在退延及变性两个温度点下进行, 具体条件见下文。

收稿日期: 1991-08-12 修回日期: 1991-12-24