

生物素标记核酸探针技术

马 凤 森

(浙江医科大学, 杭州)

提 要

通过缺口移位反应和多种化学标记方法合成生物素化核酸探针, 并配以酶化学检测手段的新技术, 可以代替放射性同位素标记探针作各种探测和分析。它具有灵敏、快速和安全、简便、经济的特点。

生物素标记的核酸探针技术是近几年发展起来的一种非放射标记技术。由于它克服了放射性同位素探针标记与检测方法的许多缺点, 加之标记方法不断改进, 已日益显示其优越性和广泛的应用价值。本文拟就这一技术的最新进展作一综述与评论。

一、生物素标记探针技术的基本原理

生物素标记核酸探针技术主要是利用了生物素 (biotin, 图 1. a) 和亲和素 (avidin) 这两种分子的独特性质。亲和素是一种碱性的四聚体糖蛋白 (MW 68000, pI 10.5), 每个亚基都能结合一个生物素分子。生物素与亲和素的结合具有专一、迅速和稳定 ($K_D = 10^{-15}$) 的特点, 并且这种结合只需要生物素的脲基环部分^[1]。因此可将其戊酸侧链通过酰胺键与核酸分子相连, 构成生物素标记的核酸探针 (图 1b)。标记探针与固定在滤膜 (硝酸纤维素滤膜或尼龙膜) 上或固定在组织细胞或染色体原位的核酸分子之同源顺序互补杂交, 探针和待测核酸在杂交前若为双链则应先变性成单链。然后用偶联有酶或荧光物质的亲和素识别待测核酸中与探针互补杂交的片段, 使杂交部位显色 (加入相应的酶底物) 或产生荧光, 后一方法多用于原位杂交。常用的酶化学显色检测方法有两类。

亲和素-HRP (辣根过氧化物酶) 检测方

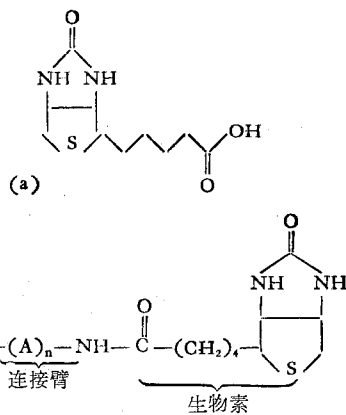


图 1 (a) 生物素分子结构, (b) 生物素化核酸探针的结构示意图 (A 代表连接臂原子)

法, 如常用的 ABC 试剂即是亲和素-生物素化 HRP 复合物。以 DAB (四氢氯化二氨基联苯胺)/ H_2O_2 为底物, 结果成棕色; 或以 4-氯-1-萘酚/ H_2O_2 为底物, 结果成蓝色。也可以利用生物素的半抗原性质先制备兔抗生物素抗体, 再将 HRP 偶联在羊抗兔第二抗体上来进行识别检测。

亲和素-磷酸酯酶检测系统以 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。常见试剂有亲和素-AKP (碱性磷酸酯酶) 连接物 (Sigma 产品), 链霉亲和素-生物素化酸性磷酸酯酶复合物 (Enzo Biochem 产品) 和链霉亲和素-生物素化多聚 AKP (BRL 产品)。就提高灵敏度与分辨率而言,

AKP 比酸性磷酸酯酶效果要好: 链霉亲和素 (streptavidin) 比亲和素的效果好(分析见后)。AKP 的灵敏度为 HRP 的十倍。

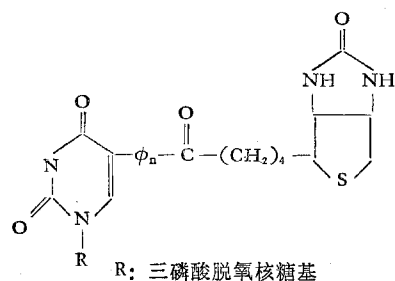
二、核酸探针的生物素标记方法

生物素标记探针的方法有很多, 如缺口移位法, 化学偶联法, 光化学标记法和末端标记法等。以下只就目前已较普遍使用的缺口移位法和光生物素标记法作一介绍分析, 其他方法(包括新建立的一些灵敏的方法) 列于表 1 中扼要

说明。

缺口移位法

由美国耶鲁大学的 Ward 小组建立^[2-4], 是目前最成熟的生物素标记核酸方法。美国的 BRL 和 Enzo Biochem 都生产用于这种标记的成套试剂。标记反应的基本原理与以放射性核苷三磷酸为底物的缺口移位反应(nick translation) 一样^[5]。此处代替放射性底物的是生物素化 dUTP (Bio-11-dUTP, 图 2)。Bio-11-dUTP 作为 TTP 的结构类似物, 可通过 DNase I



Bio-4-dUTP: $\phi_4 = -CH=CHCH_2NH-$

Bio-11-dUTP: $\phi_{11} = \phi_4 - C(=O) - (CH_2)_8 - NH-$

Bio-16-dUTP: $\phi_{16} = \phi_4 - C(=O) - (CH_2)_8 - NH - C(=O) - (CH_2)_8 - NH-$

图 2 生物素化 dUTP 的结构

和 DNA 聚合酶 I 的作用有效地掺入双链 DNA 中(但掺入速度较 TTP 慢些^[2])。实验使用时一般以它替换 20—30% 的 TTP 构成生物素标记探针。标记探针与互补顺序杂交的时间一般只需 3—5 小时。此法的优点是技术成熟, 标记均匀, 灵敏度高 (1—10pg) 和重复性好; 标记探针稳定 (—20℃ 贮存 1—2 年活性不变)。缺点是标记反应为模板依赖性, 缺口移位反应能被核酸制品中的琼脂糖抑制(随机启动法则否^[6]), 故用于标记的 DNA 必须很纯净, 所需酶和底物(四种脱氧核苷三磷酸, 其中一种为 Bio-11-dUTP) 都较昂贵, 不便于普及应用。

对本方法作某些改进后, 可提高检测的信噪比和灵敏度^[7,8], 最好能检出少至 32fg 的 λ DNA(斑点杂交)或 82 fg λ DNA(Southern 印迹杂交), 可从 0.25 μ g 人类基因组 DNA 中检出相当于 150 fg 的 β 珠蛋白基因 DNA^[9]。另外, 生物素尿苷三磷酸是一种很有用的标记底物。例如, 利用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段以重组 M13 DNA 为模板可合成含有 Bio-11-dUMP 的单链 DNA 探针; 利用 SP6 RNA 聚合酶对克隆在质粒 pSP64 或 pSP65 (均带有

SP6 启动子) 的插入基因片段作体外转录, 可以将 Bio-11-dUTP 掺入新生链内制备生物素

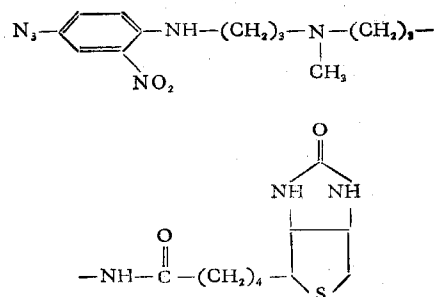


图 3 光生物素分子结构式

标记的单链 RNA 探针; 或是通过末端核苷酸转移酶将 Bio-11-dUTP 标记在寡核苷酸的 3' 末端, 构成末端标记探针(见表 1)。

光生物素标记法

光生物素 (photobiotin, 图 3) 是一种化学合成的生物素衍生物。分子中含有可光活化的叠氮代硝基苯基, 在可见光的短暂照射下即能与核酸的碱基反应, 生成光生物素标记核酸探针^[9]。单、双链 DNA 和 RNA 都能以此法标记。用于标记反应的光生物素醋酸盐已有澳洲

的 BRESA 和英国的 Vector Labs 生产供应。该法的优点是简便易行,且生成的标记探针为红色,便于观察反应结果。用光生物素化探针可检出 0.5pg 滤膜结合 DNA。此外,标记探针也很稳定(—20℃ 贮存 8 个月活性不改变)。缺点是光生物素受紫外光照射即分解,在操作上有些不便。

除表 1 和上面介绍的两种方法外,还有另外几种较独特的标记方法,效果也不错。例如,

Renz 等^[10]的方法是先以 p-苯醌使 AKP (或 HRP) 与聚乙炔亚胺 (PG35, MW 1400) 1:1 偶联,复合物因 PG35 的正电性而易于亲和单链 DNA (ss DNA)。用戊二醛即可有效地交联酶复合物与 ss DNA,生成酶标记探针。若将单链 HBV (乙型肝炎病毒) DNA 与 M13 DNA 重组,重组 DNA 分子以上述方法标记 (标记酶为 HRP)^[11],可以检出 0.4 pg HBV DNA (斑点杂交)。重组分子若以光生物素标

表 1 用生物素标记核酸的几种方法

方法	主 要 特 点	灵敏度 (pg)	参 考 文 献
1.	通过乙二胺交联已活化的生物素(生物素酰基-e-氨基戊酸 N-羧基琥珀酰亚胺酯)与核酸,标记位置是胞嘧啶 N ⁴ 。N ⁴ 氨基参与 C, G 碱基之间的氢键结合。	1—2 (斑点杂交)	Draper, et al: <i>NAR</i> , 1984, 12, 989. Viscidi, et al: <i>JCM</i> , 1986, 23, 311.
2.	生物素酰肼取代胞嘧啶的 N ⁴ 氨基,HSO ₃ 催化反应。	0.3—0.9 (斑点杂交)	Reisfeld, et al: <i>BBRC</i> , 1987, 142, 519.
3.	用戊二醛等作交联剂将生物素化碱性大分子 (以聚乙炔亚胺 PG35 效果最好)偶联在 G 碱基的 N ⁷ 位。	0.01—0.05 (斑点杂交)	Al-Hakim, et al: <i>NAR</i> , 1986, 14, 9965.
4.	以戊二醛交联生物素化 SSB (ssDNA 结合蛋白)与重组 M13DNA, 标记率可高达 28—42%。	0.5* (斑点杂交)	Syvänen, et al: <i>NAR</i> , 1985 13, 2789.
5.	探针标记为非保护性液相反应。用二胺交联活化生物素 (N-羧基琥珀酰亚胺基生物素) 与 5' 末端磷酸基已活化的合成寡核苷酸。	500—5000 (斑点杂交)	Chollet, et al: <i>NAR</i> , 1985, 13, 1529. Chu, et al: <i>DNA</i> , 1985, 4, 327.
6.	通过末端核苷基转移酶 (TdT) 将 Bio-11-dUTP 加在合成寡脱氧核苷酸的 3' 末端-OH 上。	25000 (Southern 印迹杂交)	Riley, et al: <i>DNA</i> , 1986, 5, 333.
7.	加尾标记。先通过有保护剂和缩合剂存在的固相反应合成 5' 末端磷酸基生物素化的寡核苷酸,再以 T ₄ 连接酶将其连接到合成寡核苷酸上。	40—400* (Southern 印迹杂交)	Kempe, et al: <i>NAR</i> , 1985 13, 45.

* 根据文献报告推算。

记,灵敏度为 4pg,而若以光生物素标记 HBV DNA(未与 M13DNA 重组),则灵敏度只有 40pg HBV DNA。显然,这与重组分子中的大部分标记物是在 M13 DNA (7.2 kb) 而不是在 HBV DNA 上 (3.2kb) 有直接关系。Flugstad 等^[12]也曾将探针核苷酸序列克隆到 M13 DNA 上。然后在重组分子上造成局部双链但留下杂交区域为单链。在紫外光激活下使生物素化补骨脂素 (psoralen) 与 M13 双链区的嘧啶碱基共价连接,生成标记探针。用这种探针能够从 2.5 μg 人类基因组 DNA 中检出通过 Southern 印迹固定在滤膜上的限制性酶切片段,灵敏度与用放射性探针的相当。

三、生物素标记探针技术的实验分析

在生物素标记探针技术中,对灵敏度和专

一性影响最大的是标记探针的性质 (其次是检测系统的性能)。因此在合成标记探针时就必须考虑标记反应对核酸分子和生物素基团本身的影响。从已有实验证据来看,主要受影响的是前者,包括生物素标记基因的大小,长度,电荷以及标记位置等对核酸分子的杂交性质和变性、复性的影响。Al-Hakim 等(表 1)曾发现作为连接生物素与核酸的基团(由交联臂,碱性大分子和生物素桥连接而成)与检测灵敏度之间存在如下关系:交联臂和生物素桥越长,碱性大分子越小,灵敏度就越高。这种现象可以用标记基团对核酸分子杂交的空间位阻效应来解释。在下面的情况中,除了存在标记基团的空间位阻作用外,还与标记位置有密切关系。以 dbioah CTP (dCTP 类似物,由 1, 6-己二胺将生物素连接在胞嘧啶 N⁴ 上构成)作缺口移位反应制备

的生物素化探针不能进行滤膜杂交^[13]；生物素标记率为 4.3—10.3% 的 λ DNA 之复性有严重困难 (Viscidi 等, 表 1)。这两种探针的生物素基团都是偶联在胞嘧啶的 N⁴ 位置。由于 N⁴ 氨基是胞嘧啶跟鸟嘌呤互补配对的氢键键合基因, 这一部位的修饰将对核酸的杂交性质造成较大影响。相比之下, 在尿嘧啶 C⁵ 位的生物素标记探针 (即以 Bio-11-dUTP 作缺口移位标记生成的探针), 标记率高达 12.5% 也只引起 T_m 值下降 5°C^[2]。探针短的时候 (如合成的寡核苷酸探针), 即使只在探针末端 (3' 或 5' 末端) 标记上一个生物素基团, 也可能给探针带来显著的性质改变, 如 T_m 值下降 (Kempe 等, 表 1) 或不能与互补顺序在滤膜上稳定结合 (Chu 等, 表 1) 等。为了减少标记基团对核酸探针的影响, 尤其在广泛或密集标记时, 可以采用间接标记法。即先在一种大分子 (如 PG35, SSB, 补骨脂素等) 上连接多个生物素基团, 然后将生物素化大分子偶联在探针上。这种方法已被证明非常有效。例如 Al-Hakim 等构造一种生物素标记率为 2% 的标记探针。由于先将生物素连接在 PG35 上 (15—20 个生物素/PG35), 使探针上生物素化 PG35 的标记率只为 1—1.33%。配以其他措施, 可使检测灵敏度高达 10fg DNA。

至于标记基团的带电性质, 多数生物素标记基团在中性 pH 下都带正电荷, 这使标记物分子容易密集在核酸分子附近, 从而有利于标记反应的有效进行。另一方面, 标记基团带有较多的电荷也可能影响核酸分子的正常结构和杂交复性, 并增加标记探针的非专一吸附作用。

标记率

从原理部分可知, 检测的灵敏度与杂交分子中生物素基团的多少有直接关系。因此, 较高的标记率对提高灵敏度是有利的。但标记率的提高受多种因素限制。主要是标记率提高会使探针的杂交专一性与稳定性受到的影响增大, 严重时不能有效地用于杂交。其次受标记方法本身的限制 ([14] 及 Reisfeld 等, 表 1)。即使能作密集标记, 也不等于就有高灵敏度, 因

为存在有空间障碍, 并不是每个标记在探针上的生物素基因都能被亲和素-酶复合物有效地识别与结合。一般说来, 探针的生物素标记率以每 50nt 一个生物素为宜。但也有高标记率探针仍能用于杂交的例子。如通过缺口移位反应以 Bio-11-dUTP 替换 30% TTP^[7,15] 或用随机启动法 (random priming) 替换 40% 以上 TTP^[14] 生成的标记探针; 用化学偶联法 (Viscidi 等) 合成生物素标记率为 10.3% 的 λ DNA 探针, 和 Syvänen 等 (表 1) 制成的标记率高达 28—42% 的重组 M13 DNA 探针都能有效地用于滤膜杂交。在这些情况下, 杂交和洗涤条件均有相应改变。

灵敏度与分辨率

生物素标记探针技术的杂交分子检测系统是酶化学反应 (或荧光检测)。由于酶促反应本身的特点, 使得检测快速并具有显著的信号放大作用。用生物素化探针作杂交然后以酶化学反应检测, 无论是滤膜杂交还是原位杂交, 一般都能在一个工作日内就完成。因而大大优越于使用放射性探针和放射自显影分析, 后者尤其在原位杂交时, 因标记同位素 ³H 的射线穿透力弱而常需数周甚至数月的曝光时间。将生物素标记探针用于原位杂交分析, 还能产生比放射性探针方法更高的分辨率和较低的背景干扰, 定位也更精确^[16,17]。

为了提高检测的灵敏度, 特别是在探针只标记上少数生物素时, 可采用链霉亲和素-生物素化多聚 AKP (简称 ABAP 复合物) 代替简单的亲和素-生物素化 AKP。ABAP 复合物的合成根据 Leary 等^[4] 的方法, 先以琥珀酰亚胺辛二酸单酯为交联剂交联 AKP 分子成为多聚 AKP 链, 后者再与活化的生物素 (生物素酰-ε-氨基戊酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯) 反应生成生物素化多聚 AKP。将生物素化多聚 AKP 与一定比例的链霉亲和素结合就可得到 ABAP 复合物。控制一定比例是为了保证 ABAP 的链霉亲和素分子上留有可供生物素结合的位置。理想的情况是每个链霉亲和素连接三个生物素多聚 AKP 链 (因每个链霉亲和素分子有

四个生物素结合位置)。用 ABAP 复合物识别结合杂交分子上的生物素时,相应于每个生物素基团的就是许许多多 AKP 分子,其信号放大作用显而易见。Pinkel 等^[15]最近建立了另一种具有信号放大作用的检测方法。他们在生物素化探针与目标顺序杂交后加入荧光素标记的亲合素(每个亲合素连接约六个荧光素分子)。洗涤后不是马上观察结果而是再加入生物素化的羊抗亲合素抗体,洗涤后又加入荧光素标记的亲合素。重复后二步骤,即形成含三层亲合素的检测复合物。经过这样两级放大作用,可使每个标记在探针上的生物素基团相应于约 200 个荧光素。每一级放大都可将荧光信号增强六倍。

亲和素-酶(或荧光染料)检测系统除有快速与信号放大等特点外,也有某些缺点。最突出的是亲和素对滤膜及样本中目标顺序以外的成分的非特异性吸附结合。为改善这一方面,可用链霉亲和素代替亲和素。前者分子近中性且不含寡糖基,因而非特异性吸附作用要比碱性含寡糖基的亲合素小很多^[9,17],能使背景减轻,分辨率提高。不过即使是链霉亲和素,也会对待测分子伴存的某些糖蛋白以及生物素类似物(可能是一些 tRNA 的修饰碱基)产生亲和作用。此外,样本中还可能存在内源性生物素(结合在丙酮酸羧化酶和乙酰 CoA 羧化酶等上),这些分子的存在都会产生背景干扰,使信噪比降低。在制备样本 DNA 或作原位杂交预处理时,可采用链霉蛋白酶(pronase)或蛋白酶 K 适度消化^[3,18]并洗涤等措施来消除这些影响。在杂交分子检测一步,若是将链霉亲和素与生物素化多聚 AKP 分步加入(每步加入结合后都充分洗涤),也能使背景减轻一些^[8],而灵敏度与一步加入 ABAP 复合物的相同。此外,还有人完全以 Tween 20 代替 BSA 作封闭剂^[8],在加入亲和素前预先饱和滤膜上可能非特异结合蛋白质的位点,发现前者封闭效果更好,能有效地减轻背景而又不影响亲和素与生物素之间的结合。

跟放射性探针不同,生物素化探针的非专

一吸附能力一般很弱,因此可以通过提高探针浓度来缩短杂交时间。但应注意到,在高浓度时生物素化探针也不可避免有非特异性结合作用,尤其是当探针的生物素标记基团中含有碱性大分子时。为增加探针对于目标顺序的专一性,必要时可在杂交后采用严格洗涤条件或提高杂交和洗涤的温度^[19]。

实验应用通过缺口移位反应或光化学反应制备的生物素化探针,并以酶化学方法作检测,灵敏度与放射性探针方法(1—10pg^[20])相近。对它们作某些改进后,或是一些新建立的方法,灵敏度甚至可以超过放射性探针方法。生物素标记探针技术的灵敏度和专一性完全能满足对动植物和病毒基因组的基因进行探测分析的要求。近几年已成功地用它代替放射性探针方法作 DNA 顺序测定,重组质粒筛选,细胞遗传学分析,遗传性与病毒性疾病的诊断以及对细菌和病毒的识别鉴定等研究。鉴于生物素标记探针技术的其他许多优点:快速、简便、安全和经济,特别是将它用于原位杂交分析时所表现的优越性,可以预期今后将在更多的研究领域普及应用这一新技术。

参 考 文 献

- [1] Bayer, E. A. and Wilchek, M.: *Methods Biochem. Anal.*, 1982, **26**, 1—45.
- [2] Langer, P. R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, **78**, 6633.
- [3] Brigati, D. J. et al.: *Virology*, 1983, **126**, 32.
- [4] Leary, J. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, **80**, 4045.
- [5] Dillon, J.-A. R. et al.: *Recombinant DNA Methodology*, 1985.
- [6] Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.: *Anal. Biochem.*, 1983, **132**, 6.
- [7] Gregersen, J. K. N. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 1986, **14**, 7133.
- [8] Chan, V. T.-W. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 1985, **13**, 8083.
- [9] Forster, A. C. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 1985, **13**, 745.
- [10] Renz, M. and Kurz, C.: *Nucl. Acids Res.*, 1984, **12**, 3435.
- [11] Inoue, H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, **143**, 323.
- [12] Flugstad, C. et al.: *DNA*, 1985, **4**, 92.
- [13] Gillam, I. C. and Tener, G. M.: *Anal. Biochem.*,

(下转第 129 页)

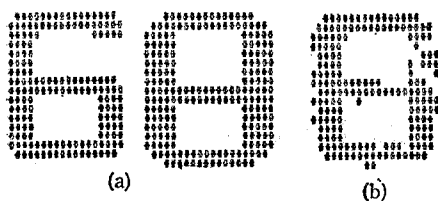
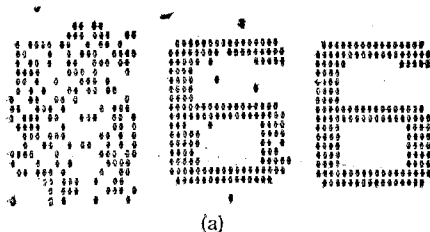
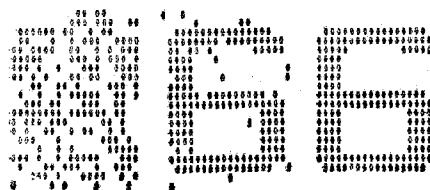


图4 Hopfield 模型中两相近记忆产生混乱

(a) 两相近记忆态字符“6”和字符“8”，Hamming 距离为 $d = 0.23$ (b) 演化的结果给出一混乱态



(a)



(b)

图5 两相近记忆态间联想主态字符“6”的恢复

(a) 带有 37% 噪声的主态为初态，经 2 步演化出纯主态字符“6” (b) 带有 37% 噪声的辅态为初态，经 2 步演化出纯主态字符“6”

型中，对一定的 $\alpha = M/N$ ，当 $d(0)$ 太大而越过“相边界”时^[2]，那么演化的结果将输出一“伪记忆”(图 3 a)。在我们的模型中一般情况也相似。但如果某一带有较大噪声 ($d(0) \geq 50\%$) 的主态正好落在和它相联系的辅态附近，那么通过联想能演化出主态(图 3 b)。这一结果可通过图 3 c 加以理解。

3. 在 Hopfield 模型中，当存在两个记忆态非常接近时，就会产生混乱^[1]，这时这两个态都不能恢复出来(图 4)。但如果让这两态相联系，就能演化出主态来(图 5)。因为图样间联想算法，实际上对辅态进行了抑制，从而解除了由于两态接近时产生的混乱，使主态得以恢复。

参 考 文 献

- [1] Hopfield, J. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79, 2554.
- [2] Tank, D. W., Hopfield, J. J.: *IEEE Trans.*, 1986, CAS-33, 533.
- [3] Hopfield, J. J., Tank, D. W.: *Biol. Cybern.*, 1985, 52, 141.
- [4] Kinzel, W.: *Z. Phys. B-Condensed Matter*, 1985, 60, 205.
- [5] Shinomoto, S.: *Biol. Cybern.*, 1987, 57, 197.

[本文于 1988 年 7 月 20 日收到]

(上接第 111 页)

- 1986, 157, 199.
- [14] Bialkowska-Hobrzanska, H.: *J. Clin. Microbiol.*, 1987, 25, 338.
- [15] Pinkel, D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 2934.
- [16] Rayburn, A. L. and Gill, B. S.: *J. Hered.*, 1985, 76, 78.
- [17] Meselidis, L. et al.: *J. Cell Biol.*, 1982, 95, 619.

- [18] Smith, G. H. et al.: *Anal. Biochem.*, 1986, 156, 17.
- [19] Khan, A. M. and Wright, P. J.: 1987, *J. Virol. Methods*, 15, 121.
- [20] Kulski, J. K. and Noval, M.: 1985, *Arch. Virol.*, 83, 3.

[本文于 1987 年 12 月 15 日收到]