

判断基因中点突变使用的寡聚核苷酸探针

史 天 良

(山西省肿瘤研究所 太原)

提 要

本文简明扼要地介绍了人工合成寡聚核苷酸探针的设计原则, 以及用 ^{32}P 标记等方法。同时还从理论上阐述了 19 聚体探针在生物实验使用中的合理性, 并强调在检测基因的点突变时, 设计人工合成的寡聚核苷酸探针应将点突变位点置于探针序列的中间为宜。在选择序列时, 要注意避免发生 G-T 错配, 这样有利于鉴别基因的点突变。

DNA 合成仪的问世, 为人们合成寡聚核苷酸提供了方便。人们可以有的放矢地合成各种寡聚核苷酸, 用于生物科学实验研究中去。人工合成的寡聚核苷酸, 经 ^{32}P 标记后, 作为探针, 在分子生物学的研究中, 更能充分地体现出它的优越性: 即快速、简便、经济等特点。本文参考有关文献并结合我们工作的实践, 将寡聚核苷酸探针的设计、标记等作如下总结。

一、寡聚核苷酸探针的设计

根据实验工作的需要设计一定结构的寡聚核苷酸探针是可行的。但所设计的寡聚核苷酸探针是否合理, 是关系到实验工作的成功与否, 因此, 合理地设计实验中需要的寡聚核苷酸探针是应首先考虑的问题之一。从理论上计算, 19 聚体在 $4^{19} = 2.75 \times 10^{11}$ 个核苷酸的序列中才有可能出现一次相同序列, 大于人类基因组 3×10^9 碱基对的序列, 因此, 人工合成 19 聚体探针, 从理论上讲是合理的, 并且实践上也证明是有效的。ras 基因家族和 β 珠蛋白基因等都是点突变型使其发生改变, 所以设计这种类型基因探针时, 应以点突变位点为中心的 19 聚体探针较适宜。但也有人使用 18 聚体或 20 聚体探针^[1,2]。已有研究表明, 19 聚体探针与被测 DNA, 只要有一个核苷酸发生错配, 那

么 5% 的错配率将使 T_m 值降低 2—6℃。预期出现的杂交错配的核苷酸, 若位于寡聚体探针的中间部位, 可以使由错配造成的热不稳定性达到最大, 有利于鉴别基因的点突变^[3]。由于 G-T 碱基错配比其它碱基错配的热稳定性要高, 常常不易与完全正常的碱基匹配区分, 因此, 在设计时, 应选择适当的序列, 要避免发生 G-T 错配^[4]。近期, 以寡聚体序列为模板, 与其 3' 端对应的互补的一段核苷酸序列为引物, 采用引物延伸法合成的探针, 也由许多工作者用于实验, 获得成功。此方法的优点是可以较低比放射性的前体, 得到高比放射性的寡聚体探针。采用此方法制备寡聚体探针时, 更应注意设计寡聚体探针的策略性。Rabin 等在检测镰状细胞性贫血中的 β 珠蛋白基因点突变时, 设计的寡聚体模板为 5'CTCCTGaGGAGAAG3', 引物为 5'GCAGACTTCTCCtC3'。该反应中正确地选择 dNTP, 可以控制仅有引物延伸。因为这个模板延伸时所必需的第一个核苷酸是 dTTP, 这样在合成时只加入 dGTP、dATP 和 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{dCTP}$, 其结果是引物充分延伸而模板不延伸, 获得 ^{32}P 标记的 19 聚体探针。由于延伸的 19 聚体与其 14 聚体模板双链的 T_m 值较低, 因此, 在杂交温度为 50℃ 时, 延伸的 19 聚体与 14 聚体模板双链极不稳定。这样 14 聚

体模板不与被测 DNA 竞争探针,杂交溶液中的有效探针浓度远远超过双链同时延伸的情况^[5]。

用限制酶引物延伸法制备寡聚核苷酸探针也是一种较好的设计方案。该方案是在 19 聚体序列的 3' 末端,额外增加一段序列,而这段额外的序列中,包含有一个限制性内切酶的识别位点。用这个增长的序列为模板,再用那段额外增加的序列的互补序列为引物,经引物延伸法合成后,用这个特定的限制性内切酶酶解,

然后采用聚丙烯-尿素胶分离,得到所要求的寡聚核苷酸探针,即可用于实验中去。在检测 c-Ha-ras 基因第 12 位密码子点突变和 β -珠蛋白基因点突变时,所使用的探针,就是在这个原则的指导下设计的。 β -珠蛋白基因点突变探针的 25 聚体模板是以它的点突变位点为中心的 19 聚体的序列,再额外加上 Pst I 限制性内切酶的识别切点的一段序列;而 c-Ha-ras 基因第 12 位密码子点突变探针也是以它的点突变位点为中心的 19 聚体序列,再额外加上 Sac I 限

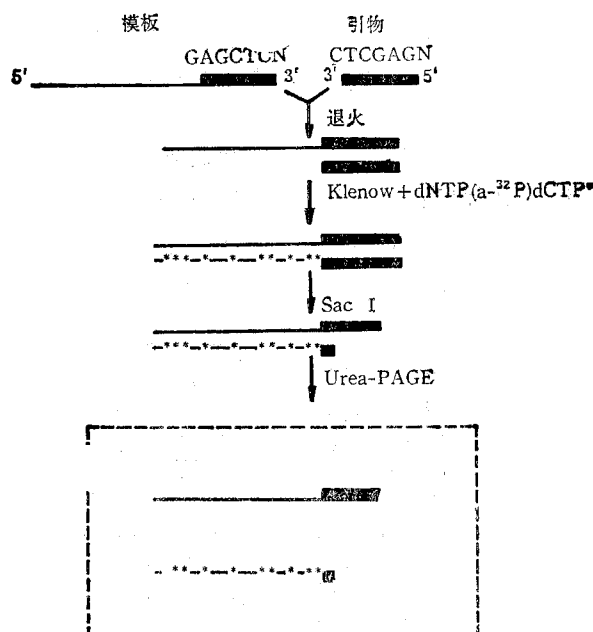


图 1 检测 c-Ha-ras 基因第 12 位密码子点突变的寡聚核苷酸探针的设计原理和制备途径

制性内切酶的识别切点的一段序列(图 1)。

二、寡聚核苷酸探针的标记合成

1. 末端标记法

取 10 μ l 寡聚体(6ng/ μ l 水溶液)、2 μ l 10 $\times$ 缓冲液(500mmol/L Tris·HCl, pH7.4, 100mmol/L MgCl₂, 50mmol/L β -巯基乙醇和 1mmol/L EDTA)、50 μ Ci [γ -³²P] ATP (75000 Ci/mmol) 和 10U T₄ 多聚核苷酸激酶。混匀,在 37 $^{\circ}$ C 反应 70 分钟,然后用 10% 聚丙烯酰胺-7mol/L 尿素胶电泳分离,收集产物部分^[1,6]。有人也不经分离直接使用于实验,并获得成功。

2. 引物延伸标记法

(1) 在 10 μ l 反应液含有 5p mol 模板、5p mol 引物、60mmol/L Tris·HCl(pH7.6)、60mmol/L MgCl₂、60mmol/L β -巯基乙醇、500mmol/L NaCl、20 μ Ci [α -³²P] dATP、100 μ mol/L dCTP、100 μ mol/L dGTP、100 μ mol/L dTTP 和 3U DNA 聚合酶 I (大片段)。混匀,置于 0 $^{\circ}$ C 冰水浴中反应 60 分钟^[2]。然后用限制性内切酶酶解,再经 12% 聚丙烯酰胺-7 mol/L 尿素凝胶电泳分离,收集产物部分。

(2) 在 10 μ l 反应液中含有 86pmol 模板(5'CTCCTGaGGAGAAG3'), 43pmole 引物

脂质过氧化作用与动脉粥样硬化¹⁾

陈 媛 周 玫

(第一军医大学, 广州)

提 要

本文根据新近文献和作者工作, 从动脉粥样硬化患者和实验性动脉粥样硬化动物的抗氧化能力变化以及与动脉粥样硬化发生有关的某些环节的脂质过氧化损伤因素, 说明动脉粥样硬化的发生发展与脂质过氧化损伤有关。

高脂血症作为冠心病发生的主要危险因子已日益引起人们的注意。高脂血症与血浆脂质过氧化物 (LPO) 含量密切相联。脂质过氧化作用与动脉粥样硬化 (AS) 的发生发展相关的事实正在不断增加。

一、AS 患者和实验性 AS 动物机体抗脂质过氧化能力降低和受到脂质过氧化损伤 Vladimirov^[1] 报道了 AS 患者血浆 LPO 含量增加, Loeper^[2] 则进一步观察到高脂血症患者血浆 LPO 含量的增加与血浆胆固醇和甘油三酯含量的升高呈正相关, 伴有 AS 的高脂血症患者血浆 LPO 含量明显地较不伴有动脉损伤者为高, 其中又以最近有梗死者增加更为明显。

(5'GCAGACTTCTCCtC3'), 130 pmol dGTP, 82 pmol [α -³²P] dATP 和 3U 逆转录酶。缓冲液为 40mmol/L KCl、50mmol/L Tris·HCl (pH8.1)、2mmol/L 二硫苏糖醇和 5mmol/L MgCl₂。在 15℃ 反应 90 分钟。由于未反应的 dATP 要产生高背景, 可以通过 (α) 加入 2 倍体积 0.1mol/L Tris·HCl (pH8.7) 和 50U 小牛小肠碱性磷酸酶, 室温下孵育 20 分钟, 或 (b) 用 200 μ l 葡聚糖凝胶 (Sephadex) G-25 过柱分离纯化去除^[3]。

上文将寡聚核苷酸探针的设计、标记等作了简要的概述, 对此方面的实验工作具有一定的指导作用。至于某项具体工作, 则需根据实

我们对冠心病患者的研究^[3]说明, 不但血浆 LPO 含量升高, 而且硒谷胱甘肽过氧化物酶 (SeGSHP_x) 活性明显降低, 若以 SeGSHP_x/

表 1 冠心病患者血浆 LPO 含量和血浆、红细胞 SeGSHP_x 活性变化 ($\bar{x} \pm sE$)

分组	血 浆			红细胞
	LPO	SeGSHP _x ($\times 10^{-7}$)	SeGSHP _x / LPO ($\times 10^{-7}$)	SeGSHP _x
正常组	4.32 $\pm$ 0.14	2.64 $\pm$ 0.17	0.61 $\pm$ 0.05	3.55 $\pm$ 0.56
冠心病组	5.28 $\pm$ 0.35*	1.45 $\pm$ 0.20**	0.31 $\pm$ 0.05**	4.53 $\pm$ 0.27

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

1) 本文在 1988 年 4 月北京自由基生物学与自由基医学学术会议上报告。

际情况, 作具体的分析, 确定符合实际的方案。

致谢: 承蒙北京市肿瘤防治研究所邓国仁老师审阅, 谨此致谢!

参 考 文 献

- [1] Youssoufian, H. et al.: *Nature*, 1986, 324, 308.
- [2] Bos, J.L. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1984, 12, 9155.
- [3] Berent, S.L. et al.: *Biotechniques*, 1985, May/June, 209.
- [4] Agarwal, K.L. et al.: *J Biol Chem.*, 1981, 256, 1023.
- [5] Rabin, D. et al.: *Hum. Genet.*, 1987, 75, 120.
- [6] Zarbl, H. et al.: *Nature*, 1985, 315, 382.
- [7] Bos, J.L. et al.: *Blood*, 1987, 69, 1237.

[本文于 1988 年 4 月 14 日收到]