

经验交流

核酸探针与酶免疫反应板定向结合的方法

刘吉荣 吴婉芳 秦雨春 张 玉 马官福

(首都儿科研究所, 北京 100020)

摘要 为了制备一种可供寡核苷酸探针定向结合的酶免疫反应板, 利用部分水解的尼龙包被酶免疫反应板, 通过尼龙所含的氨基基团与寡核苷酸探针所含的 5' 磷酸基团, 在水溶性碳二亚胺的催化下, 与酶免疫反应板发生 5' 端特异性定向共价结合, 并对肺炎支原体的 PCR 扩增产物进行了重复检测, 结果重复性好, 方法稳定. 利用该方法制备的酶免疫反应板可用于核酸探针的临床检测.

关键词 寡核苷酸探针, PCR, PCR-ELISA

寡核苷酸探针由于杂交达到平衡所需要的时间短, 因此在临床检验中多倾向于使用寡核苷酸探针. 在传统的方法中, 如尼龙膜或硝酸纤维素膜, 均是通过核酸探针与固相载体的非特异性吸附而进行杂交. 这对含有数百或数千碱基对的核酸探针来说, 对杂交结果不会有太大影响, 但对只有 20~ 50 个核苷酸的寡核苷酸探针来说, 因为杂交的特异性和灵敏度均有赖于探针与互补 DNA 链的碱基之间的配对结合, 这种非特异性结合会影响其与底物结合的特异性和强度, 进而影响检测的结果. 为此, 通过寡核苷酸探针与固相载体进行特异性的定向结合, 可以克服上述缺点.

国外已经有公司生产可供核酸探针定向结合的、含有氨基基团的酶免疫反应板. 本文参考国内外有关文献^[1~ 3], 通过盐酸部分水解尼龙, 将其包被于酶免疫反应板上, 就能否利用尼龙所含的氨基基团结合寡核苷酸探针, 进行了探讨, 现报道如下:

1 材料和方法

1.1 材料

尼龙购自北京化学试剂公司, 酶标板购自华美试剂公司; 5' 磷酸修饰的寡核苷酸探针和

生物素标记的探针均由北京赛百盛公司合成; 其他的有关试剂均购自华美, 原平等生物工程公司.

1.2 方法

1.2.1 尼龙包被酶免疫反应板: 用浓盐酸水解尼龙 16~ 20 h, 倾倒入上清液, 用蒸馏水反复洗涤至中性后, 溶于间甲酚中, 再加入 6 倍体积左右的 70% 酒精, 混匀后, 将其加入酶免疫反应板中. 每孔加入 100 μ l, 使其中尼龙-6 的含量为 50~ 100 μ g. 室温下放置 1~ 2 h, 倾倒入上清, 用高压蒸馏水洗涤 2~ 3 遍, 吸干备用.

1.2.2 寡核苷酸探针与包被有尼龙的酶免疫反应板的结合: 将人工合成的含有 5' 磷酸基团的寡核苷酸探针溶于 0.01 mol/L 的 1-甲基咪唑中, 每孔加入 75 μ l, 100 ng 的探针, 然后加入 25 μ l 0.2 mol/L 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC 溶于 0.01 mol/L 的 1-甲基咪唑中), 于振荡器上混匀后, 用封口膜包被酶免疫反应板. 置 4℃ 24 h 或 50℃ 5 h. 倾倒入上清液, 用 DNA 结合/洗涤液洗涤 3 次, 再加入 DNA 结合/封闭液于 37℃ 封闭 30 min. 倾倒入上清液, 加入预杂交液于 42℃

反应 1 h, 倾倒入上清, 于滤纸上吸干后, 用封口膜密封或低温干燥后密封置 4℃或- 20℃备用.

1.2.3 结合有寡核苷酸探针的酶免疫反应板在核酸检测中的应用: 将目标 DNA 于 95℃水浴 5 min, 立即置于冰水中 3~ 5 min, 然后加入适量变性的 DNA 于预杂交液中 (所加的量因标本中目标 DNA 的量而定), 混匀后每孔加入 100 μl, 于 42℃杂交 1 h, 用 2×SSC, 0.25% SDS 于 42℃洗涤 3 次, 每次 3 min, 于滤纸吸干后加入人工合成的用生物素标记的检测探针, 于 42℃反应 1 h, 再洗涤 3 遍. 用 3% BSA/1×洗涤缓冲液于 37℃封闭 30 min, 倾倒入上清, 再加入辣根过氧化物酶标记的卵清蛋白, 于 37℃反应 30 min, 倾倒入上清, 用 1×洗涤缓冲液于 37℃洗涤 3 次, 每次 3 min. 加入底物液, 于 37℃反应 10~ 30 min, 加入硫酸终止反应, 于 620 nm 比色.

1.2.4 肺炎支原体的 PCR 扩增: 根据原核生物 16S rDNA 的保守序列合成了一对通用 PCR 引物, 用来扩增肺炎支原体 16S rDNA 得到 550 bp 左右的核酸片段; 利用已知的肺炎支原体 16S rDNA 序列合成了其特异性的寡核苷酸探针, 用来与酶免疫反应板共价结合, 并与 PCR 扩增产物进行特异性的杂交反应; 利用原核生物 16S rDNA 序列合成了生物素标记的寡核苷酸探针, 用来检测上述杂交产物.

2 结果和讨论

2.1 结果

2.1.1 肺炎支原体 PCR-ELISA 敏感性试验: 将实验室培养的肺炎支原体纯菌株, 经 10 倍稀释, 再进行 PCR 反应. 于 10⁻⁷倍稀释时仍可见到扩增产物, 相当于 10~ 100 个支原体每毫升. 用上述扩增产物进行杂交反应, 测定 620 nm 处的 A 值肺炎支原体为 0.13~ 0.17, 大肠杆菌为 0.045, 空白为零, A 比值大于 2.0.

2.1.2 肺炎支原体 PCR-ELISA 重复试验: 利用上述方法, 重复检测肺炎支原体的 PCR

扩增产物, 每次结果均相当稳定, 实验结果重复性好, 见表 1.

表 1 肺炎支原体 PCR-ELISA 试验重复性比较

	A ₆₂₀		
	肺炎支原体	大肠杆菌	空白
第一次 ¹⁾	0.165	0.06	0.00
第二次	0.17	0.05	0.00
第三次	0.162	0.045	0.00

¹⁾ 每次均做双份, 取其均值.

2.2 讨论

利用酶免疫反应板进行核酸杂交反应具有许多优点^[4], 可以对一种标本采用多种探针检测, 或对不同的标本用同一种探针检测, 一次处理的标本量大, 可以进行自动化操作等. 在传统的酶免疫反应板杂交中, 核酸大部分都是经非特异性吸附的方式与酶免疫反应板结合, 这种方法的缺点为非特异性吸附的 DNA 在杂交过程中可以被洗脱, 非特异性吸附的 DNA 与标本 DNA 的杂交也受到一定的影响. 为此, 我们参照酶免疫反应中的一些方法制备了可用于寡核苷酸探针定向结合的含有氨基基团的酶免疫反应板, 其可广泛应用于分子生物学特别是临床分子生物学的检测.

参 考 文 献

1 Verschoor J A, Vermeulen N M J, Visser L. Haptenated nylon coated polystyrene plates as a solid phase for ELISA. J Immuno Meth, 1990, 127: 43~ 49
2 Hendry R M, Herrmann J E. Immobilization of antibodies on nylon for use in enzyme-linked immunoassay. J Immuno Meth, 1980, 35: 285~ 296
3 Keller G H, Manak M M. DNA probes. New York: Stockton Press, 1989. 147~ 150
4 Jomas D, Rosenbaum A, Weyrich S *et al.* Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of legionella in bronchoalveolar fluid. J Clin Microbiol, 1995, 33: 1247~ 1252

A Method for Site-specific Conjugation of Oligonucleotide Probe on ELISA Plate . LIU
(下转第 382 页, Continued on page 382)

的受体之间的相互作用将会减弱或消失, 反之细胞因子与受体的结合将不受影响. 结合选用具多通道测定的 BIAcore 2000, 将不同的受体分别偶联于 3 个通道上, 那么一次上样可同时测定筛选物对三个细胞因子的拮抗性 (图 1).

图 2 显示用 BIAcore 从 96 孔平板中筛选细胞因子 IL-4 拮抗物的结果. 96 个样品中有 4 个化合物可能对 IL-4 具有拮抗作用, 可用 BIA 技术来进一步鉴定其结合特性.

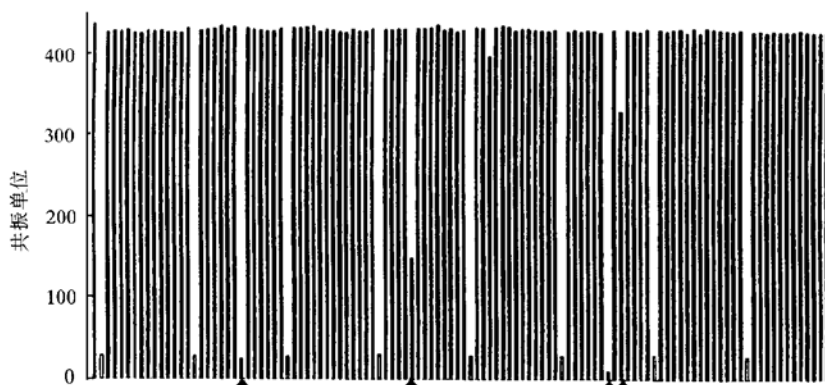


图 2 从 96 孔平板中筛选人类细胞因子 IL-4 的拮抗物

筛选方法如图 1 所示. 阳性对照上样为 huIL-4(■), 阴性对照上样为 huIL-4 加 IL-4 受体(□). 实验组上样为 huIL-4 加候选药物分子(□). 箭头所指为具 IL-4 拮抗性的分子.

参 考 文 献

- 1 Taremi S S, Proise W, Durkin J *et al.* Small molecular drug screening based on surface plasmon resonance technology. *J Molecular Interaction Analysis*, 1996, 3: 20~ 21

Research Application Using Biomolecular Interaction Analysis Technology: Small Molecular Drug Screening and Evaluation. SHEN Ping

(Pharmacia Biotech (China) Ltd. Beijing 100080, China).

Abstract Schering-Plough Pharmaceutical company successfully conducted small molecular drug screening with BIA technology. Using competitive methods they develop a high throughput assay for screening cytokine antagonism.

Key words drug screening, cytokine, antagonism

(上接第 380 页, Continued from page 380)

Jirong, WU Wanfang, QIN Yuchun, ZHANG Yu, MA Guanfu (*Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China*).

Abstract In order to prepare an ELISA plate which can be used for site-specific conjugation of oligonucleotide probe, partially hydrolysed nylon was used to coat ELISA plate, oligonucleotide probes were conjugated to ELISA plate by covalent conjugation of 5' phosphate group of the

probe with the amino groups of the hydrolysed nylon under the catalysis of water soluble carbodiimide. The method was used to detect PCR product of *Mycoplasma pneumoniae*, and reproducible result was acquired. The reported method can be used in molecular detection of clinical pathogens.

Key words oligonucleotide probe, PCR, PCR-ELISA