

DNA 探针体外标记及其应用

彭 腾 刘宗定

(华西医科大学生化教研室, 成都)

提 要

本文介绍了 DNA 探针在体外标记的几种方法, 主要包括同位素标记法和非同位素标记法两大类。并介绍了标记的 DNA 探针在细胞原位杂交、Southern 转印杂交、分子克隆筛选、核酸的分离和鉴定以及遗传性疾病的分析和诊断等方面的应用。

核酸分子杂交技术已广泛地应用于核酸的定位、定量和顺序分析以及临床诊断等许多方面。核酸分子杂交技术中, 制备特异的、灵敏的标记核酸探针无疑是至关重要的。下面介绍几种 DNA 探针体外标记方法以及标记 DNA 的应用。

一、DNA 探针体外标记方法

到目前为止, 已建立了多种 DNA 探针体外标记方法。其中大致可分为同位素标记和非同位素标记两大类方法。

(一) 同位素标记方法

1. ^{32}P 标记 DNA 探针 一般多采用“缺口翻译”技术制备 ^{32}P 标记 DNA 探针^[1]。其原理是: 双链 DNA 在 DNase I 的作用下, 产生缺口。在 *E. coli* DNA 聚合酶 I 的催化下, 从缺口处 5'-末端逐个水解下核苷酸, 而同时, 此聚合酶在缺口处 3'-羟基末端以其互补链为模板, 逐个将其底物—dNTPs (脱氧核苷三磷酸 其中一种或两种为 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dNTP) 加上。反应一定时间后, 标记核苷酸便取代了双链 DNA 中部分未标记的核苷酸, 合成了 ^{32}P 标记 DNA。本方法简单, 标记 DNA 的比放射性高。 ^{32}P -DNA 探针已广泛的用于原位、斑点和 Southern

转印等各种分子杂交实验。但所用 ^{32}P 标记单核苷酸价格昂贵、半衰期短, 是其美中之不足。

最近, J. Koch^[2] 对上述方法作了改进。其改进基于两个事实: (1) DNase I 活性在 37°C 比在 14°C 高 8 倍。(2) 稀释 DNase I/DNA 混合物也大大降低了 DNase I 的活性。所以他将 DNase I 和 DNA 聚合酶 I 所催化的反应分成两步进行。第一步是在 DNase I 的最佳反应条件下对 DNA 进行缺刻; 第二步是在 DNA 聚合酶 I 的最佳反应条件下进行水解和合成反应。这样, 提高了“缺口翻译”的效率, 并且使整个反应更易控制, 并能得到最佳标记的特定长度的 DNA 片段。

除上述“缺口翻译”方法外, T₄ DNA 聚合酶也可催化 DNA 3'-末端 ^{32}P 的标记。如此制得的标记 DNA 不及前法的均匀。而且, 当 DNA 片段较长时, 其灵敏度不高。

2. ^3H 标记 DNA 探针 ^3H 也可用“缺口翻译”技术, 以 dNTP, (其中一种或两种为 $[\text{}^3\text{H}]$ dNTP) 为底物标记 DNA^[3]。具体方法同于 ^{32}P 标记 DNA。如果用荧光素浸泡硝酸纤维膜, 再将 X-光胶片预曝光, 那么, ^3H 标记的 DNA 探针便可用于 Southern 转印技术。本方法标记的 ^3H -DNA 稳定, 耗费低。延长曝光时间, 可

得到分辨率高的杂交带。但 ^3H 放射性能量太低,所以检测灵敏度低,而且需要特殊的检测仪器。

3. ^{35}S 标记 DNA 探针 以 dNTPs 和 ^{35}S dATP 为底物,用“缺口翻译”也可制得 ^{35}S 标记 DNA 探针^[4]。此处, ^{35}S dATP 是 ^{35}S 取代了 dNTPs 分子中磷酸根中氧原子而生成的。由于 $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]$ dATP 用 DNA 聚合酶 I 掺入到 DNA 中的速度非常慢,所以具体方法是将 DNase I 和 E. coli DNA 聚合酶 I 所催化的反应分两步进行。 ^{35}S 标记 DNA 可用于 Southern 转印杂交技术。当含杂交带的硝酸纤维膜对 X-光胶片曝光时,使用一种增强闪烁液可提高显影灵敏度。 ^{35}S 的半衰期比 ^{32}P 的长,所以 ^{35}S 标记 DNA 比 ^{32}P 标记 DNA 稳定,这样可减缓实验工作的紧张性。而且 ^{35}S -DNA 所获杂交带比 ^{32}P 的清晰、分辨率高,但其放射线能量低,灵敏度比 ^{32}P 的低。

4. ^{125}I 标记 DNA 探针 碘可以稳定的共价键形式与单链 DNA 分子中的胞嘧啶 5'-位碳原子结合,以 5'-碘胞嘧啶的形式存在于 DNA 分子中。其反应机理为: I^- 在三氯化铊(TiCl_3)的氧化下生成 I_2 ,后者又在水溶液中转变成 IOH 。 IOH 便在胞嘧啶的 5', 6' 碳原子间的双键发生加成反应,生成不稳定的 5'-碘-6-羟二氢嘧啶,这种不稳定的中间产物在加热下转变成稳定的 5'-碘胞嘧啶。 ^{125}I 以 NaI 的形式按这种化学法可掺入 DNA 分子,制备标记 DNA 探针^[5]。最近,也有用酶催化 ^{125}I 结合到胞嘧啶上的报道^[6]。这种酶法催化的 ^{125}I 标记 DNA,速度比前述的化学法快,标记过程中, DNA 自身的降解也较少。 ^{125}I 半衰期较长,标记方法简单,试剂易得,但其放射线能量高,对操作者危害较大。而且 ^{125}I -DNA 用于分子杂交实验的报道很少,这可能与 ^{125}I -DNA 的比放不够高、标记时 DNA 有降解有关。

以上用同位素标记方法所制得的标记 DNA,除 ^{32}P -DNA 的比放比较高,可用于各种分子杂交实验,特别是可用于真核生物单拷贝 DNA 的 Southern 转印杂交实验以外,其余几

种同位素标记 DNA 的比放都不够高。同位素半衰期短,不但使实验工作紧张,而且标记的 DNA 也不稳定,不宜保存。所以人们从 70 年代末就开始寻找一种能代替同位素的稳定的、检测灵敏度高的非同位素标记方法。目前已有多种非同位素标记方法相继问世。它们可归纳为直接标记法和间接标记法两大类。直接标记法是指那些将特定酶或蛋白直接标记在 DNA 分子上,然后以酶促显色反应或特异的蛋白染色作检测系统的标记法。间接标记法是指将生物素标记在 DNA 分子上,以连接有特定酶、蛋白质、荧光素或双抗体的抗生物素蛋白作检测系统的标记法。

(二) 非同位素标记法

1. 间接标记法 酶法制备生物素标记的 DNA 探针^[7]。本方法以 dNTPs (其中一种为生物素-dUTP) 为底物,用“缺口翻译”合成生物素标记的 DNA。然后,用连接有抗生物素蛋白的亲合柱层析或双抗体沉淀法分离生物素标记 DNA。由此方法制备的生物素标记 DNA 与未标记 DNA 具有相同的变性、复性和杂交性质。本方法可得到均匀的标记物。

最近,Chollet 建立了生物素标记寡聚脱氧核苷酸片段(Oligo-dNTP 片段)的化学法^[8]。其原理是:磷酸化的 Oligo-dNTPs 片段首先转变成 5'-氨基烷基磷酸酰胺衍生物,再与生物素-N-羟基琥珀酰亚胺酯反应生成生物素标记的 Oligo-dNTPs 片段。本方法只在 Oligo-dNTPs 片段的 5'-末端标记上一个生物素分子。所以不影响其杂交性质。但如果多核苷酸链增长,其检测灵敏度要受影响。

上述两种方法制备的生物素标记 DNA,解决了同位素标记 DNA 所遇到的困难。其检测灵敏度较高。最低可检测 2fmole DNA。可作原核细胞 DNA 的斑点、Southern 转印杂交和真核细胞基因组的斑点杂交分析。但生物素标记 DNA,如果使用一般的检测系统,其检测灵敏度仍不够高,不能检测出真核细胞单拷贝 DNA。所以人们在其检测系统上作了改进。具体方法^[9]是用二琥珀酰亚胺辛二酸作交联剂,

使碱性磷酸酶交联成多聚物,然后再与生物素- ϵ -氨基己酸-N-羧基琥珀酰亚胺酯反应,生成生物素标记的碱性磷酸酶多聚物 [Poly (BAP)],此 Poly (BAP) 与抗生物素蛋白 (Avidin) 结合成 APoly (BAP), APoly (BAP) 与生物素标记 DNA 结合,再与其特定底物反应可检测目的 DNA。本检测系统可提高生物素 DNA 的检测灵敏度,可检测 1—10pg 的目的 DNA。

2. 直接标记法 一般用碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶直接标记 DNA。两种酶的标记方法大同小异。下面主要介绍碱性磷酸酶的标记方法。

1984 年, Manfred Renz^[10] 建立了碱性磷酸酶标记 DNA 的方法。该方法是: 在苯醌作用下,碱性磷酸酶与 Polymin G₃₅ (一种低分子量的聚乙烯亚胺) 交联,然后在戊二醛的作用下,再与 DNA 交联制成标记探针。此标记 DNA 分子中可含多个碱性磷酸酶。如此制得的探针与目的 DNA 杂交后,可通过碱性磷酸酶催化其底物 NBT (硝基蓝四唑) 和 BCIP (5-溴-4-氯-3-吲哚酚-磷酸-4-甲苯胺盐) 发生的颜色反应进行检测。如果杂交是在 6% 聚乙二醇存在下进行,检测灵敏度可提高到 1—5pg。可通过 Southern 转印杂交检测真核细胞的单拷贝基因。

近年, Jablanski^[11] 用碱性磷酸酶在二琥珀酰辛二酸作交联剂下,与末端连续接有核苷-3'-磷酸酰胺的短链脱氧多核苷酸片段连接,以制备碱性磷酸酶标记的短链脱氧多核苷酸片段探针。这种方法简便,制得的探针检测灵敏度高,可作斑点和 Southern 转印杂交分析。

另外,还有将蛋白质如组蛋白直接标记到 DNA 分子上作探针^[12]。这种组蛋白-DNA 可作斑点杂交,然后,用“印度墨水”(india ink) 染色检测杂交带。此方法简易,耗费很少。

二、标记 DNA 探针的应用

(一) 细胞原位杂交 例如: 用同位素和非同位素标记 DNA 探针检测感染细胞或包埋组

织中病毒基因进行原位杂交,然后用放射自显影或免疫荧光法和酶催化显色法等进行检测^[13-15]。使用同位素标记 DNA 探针作细胞原位杂交,其灵敏度高。而生物素标记 DNA 探针用免疫荧光法或铁蛋白-抗生物素蛋白作检测系统,可直接在显微镜下观察杂交结果。目前,单克隆抗体技术已开始应用于临床诊断,它主要是检测感染基因的蛋白产物。但是,单克隆抗体的制备十分复杂,如果用 DNA 探针去直接检测感染细胞的基因,可作为单克隆抗体诊断的辅助工具。

(二) 检测 Southern 转印膜上 DNA 顺序

DNA 经聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转移至硝酸纤维素膜上,然后与标记探针杂交,可检测其存在。³²P-标记的 DNA 探针可检测到真核细胞单拷贝 DNA 片段^[16]。据报道用生物素标记核酸探针,链霉菌抗生物素蛋白,辣根过氧化物酶等酶检测系统,可检测鼠和人的多拷贝 DNA 序列。如检测鼠和人的 28S RNA 的基因序列存在^[17]。

(三) 克隆筛选 按常规方法制得重组 DNA 的克隆后,含有重组 DNA 的克隆可先经过载体所携带的特征基因进行初筛,然后用标记 DNA 探针进行菌落杂交选择^[18]。

(四) 分离和鉴定核酸 使用生物素标记 DNA 和结合有抗生物素蛋白的琼脂糖亲和柱层析,可分离纯化能与之互补的 DNA 或 RNA^[7]。最近, Syvanen^[19] 建立了一种“夹心面包”式杂交法 (Sandwich hybridization)。其原理是将目的 DNA 同时在溶液中与两个与之同源的探针结合。其探针之一是用生物素标记的,另一探针用 ¹²⁵I 标记。当结合反应完毕之后,可通过抗生物素蛋白-琼脂糖亲和柱层析分离目的 DNA;通过测定 ¹²⁵I 的放射性,可定性定量检测初步处理而未经分离纯化的样品 DNA。如对 E. coli HB101 细胞、Vero 细胞及人血清样品初步处理后的 DNA 的分析。

(五) 遗传性疾病的分析和诊断 DNA 分子中某个碱基的替换或核苷酸的插入、缺失以及重排都有可能引起遗传性疾病。一般可根据

免疫测定的电分析化学方法

刘 杰

(南通医学院化学教研室)

提 要

本文对于晚近发展起来的电化学免疫分析技术按免疫电化学传感器和伏安免疫法两大类作了简要的评述。

免疫测定在生化研究和临床检验中日益增加的重要性,推动人们努力开发新的免疫分析技术。值得提出的是,晚近电分析化学方法开

始向免疫测定领域渗透。本文打算简要地介绍电化学免疫分析中目前比较引人注目的两个方面——免疫电化学传感器和伏安免疫法。

遗传基因产物的改变来分析遗传疾病的发生。但对于那些不能用蛋白产物进行分析的遗传疾病,可用 DNA 杂交技术进行分析。对于那些因点突变引起的限制性内切酶作用部位的增加或消失,或因 DNA 顺序的增加、缺失或重排使各位点之间 DNA 长度发生改变而引起的遗传性疾病,可用 DNA 探针直接分析之。用 DNA 杂交技术已直接分析了动脉粥样硬化、糖尿病和生长激素缺陷等遗传病。目前,化学合成的寡核苷酸链探针也能进行基因内点突变的直接分析,其原理是根据寡核苷酸链和给定的等位基因之间的一个碱基对的错配来鉴别基因型(这个等位基因在此条件下完全不能杂交)。这种方法已用于分析 α_1 -抗胰蛋白酶缺陷、镰状细胞贫血和地中海贫血。但如果在没有适宜的限制性内切酶时,这种点突变常常不能被检测出。这可用另一种方法,即以研究位点侧翼的 DNA 限制性片段长度多态性(RFLP)作遗传标志来研究。应用这种方法检出的与 RFLP 紧密连锁的遗传病有载脂蛋白 C_{II} 缺陷、高脂血症、II 型糖尿病、血友病和镰状细胞贫血等等^[20]。

以上两种分析方法都需要特定的标记探针。现在,除 ^{32}P -标记的寡核苷酸链可作 DNA 分子的点突变分析外,生物素和碱性磷酸酶标

记的寡核苷酸也可作相同的分析。

参 考 文 献

- [1] Peter, W. J. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1977, **113**, 237.
- [2] Koch, J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1986, **14**, 7132.
- [3] Mackey, J. K. et al.: *Biochemistry*, 1977, **16**, 4478.
- [4] Radford, A. J. et al.: *Analytical Biochemistry*, 1983, **134**, 269.
- [5] Commerford, S. L. et al.: *Biochemistry*, 1971, **10**, 1993.
- [6] Gladek, A. et al.: *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1983, **31**, 541.
- [7] Lance, P. R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, **78**, 6633.
- [8] Chollet, A. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1985, **13**, 1529.
- [9] Leary, J. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, **80**, 4045.
- [10] Renz, M. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1984, **12**, 3435.
- [11] Jablonski, E. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1986, **14**, 6115.
- [12] Bulow, S. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1986, **14**, 3973.
- [13] Franzen, L. G. et al.: *The Lancet*, 1984, **I**, 525.
- [14] Myerson, D. et al.: *J. Inf. Dis.*, 1984, **150**, 272.
- [15] Brigati, D. J. et al.: *Virology*, 1983, **126**, 32.
- [16] Karathanasis, S. K. et al.: *Nature*, 1983, **304**, 371.
- [17] Brakel, C. et al.: *DNA*, 1984, **3**(2), 195.
- [18] 刘宗正:《分子生物学在医学中的应用》,科学出版社,北京,1986,57。
- [19] Syvanen, A. C. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1986, **14**, 5037.
- [20] Cooper, D. N. et al.: *Hum. Genet.*, 1986, **73**, 1.

[本文于 1987 年 6 月 23 日收到]