

经验交流

一种切口平移法制备生物素标记核酸探针的简便方法*

李柏青** 田志刚 刘 杰 孙 沛 张建华 张 捷 崔正言

(山东省医学科学院, 济南 250001)

关键词 生物素, 核酸探针, 切口平移法

用切口平移法制备生物素标记的核酸探针, 其所用试剂质量稳定、可靠, 标记重复性好, 且制备的探针易长期保存。我们在制备人 IL-6 cDNA 等基因探针的实验中, 对常规的切口平移法制备生物素标记核酸探针的方法作了简化改进, 省略了分离步骤, 经斑点杂交试验证明效果良好。

1 材料和方法

1.1 试剂及配制

1.1.1 试剂: 携带人 IL-6 cDNA 全长片段 (600bp) 的 pGEM₃ (由 Hind III 和 Eco RI 两位点插入), 由日本大阪大学细胞工学中心赠送。λDNA, c-myc 基因, Bio-11-dUTP, dATP, dCTP, dGTP, DNase I, DNA 聚合酶 I, 牛血清白蛋白 (BSA, 组分 V) 和亲和素-碱性磷酸酶及其显色剂均购自华美生物工程公司 (SABC)。

1.1.2 切口平移试剂配制: 用 50mmol/L Tris-HCl (pH7.5) 将 Bio-11-dUTP 配为 0.4mmol/L, 将 dATP, dCTP, dGTP 配成 0.5mmol/L 的混和液; 10×切口平移缓冲液: 0.5mol/L Tris-HCl (pH 7.5), 0.1mol/L MgCl₂, 1mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT), 0.5mg/ml BSA (组分 V), DNase I 用 50% 甘油及 1×切口平移缓冲液配成 1mg/ml 贮液, -20℃ 保存, 用前以 1×切口平移缓冲液稀释至 100 pg/μl; DNA 聚合酶 I 10U/μl。

1.1.3 分子杂交及显色试剂配制: 1×SSC: 0.15mol/L NaCl, 0.015mol/L 枸橼酸钠; 1×Denhardt's 试剂: Ficoll (400 型), 聚乙烯吡咯烷酮, BSA 各 0.02% (W/V); 预杂交液: 6×SSC, 50% 甲酰胺, 5×Denhardt's 试剂, 0.5% SDS, 0.1mg/ml 新鲜热变性鲑鱼精 DNA; 杂交液: 除 2×Denhardt's 试剂、0.2% SDS 外, 其余成分同预杂交液。STMT: 1mol/L NaCl, 0.1mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 2mmol/L MgCl₂, 0.05% Triton X-100; STM: 1mol/L NaCl,

0.1mol/L Tris-HCl pH9.5, 5mmol/L MgCl₂; 氮蓝四唑 (NBT) 用 70% 二甲基甲酰胺配成 75mg/ml 贮液; 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸 (BCIP) 用二甲基甲酰胺配成 50mg/ml 贮液; 底物反应液: 0.1mol/L NaCl, 0.1mol/L Tris-HCl pH9.5, 5mmol/L MgCl₂, NBT 0.3mg/ml, BCIP 0.2mg/ml。

1.2 切口平移法制备生物素核酸探针

在 Eppendorf 管中加入待标记 DNA 如 λDNA 或 pGEM₃-IL-6 cDNA 1—5μl, dNTP 混和液 2.5μl, Bio-11-dUTP 3μl, DNase I 2μl, DNA 聚合酶 I 1μl, 10×切口平移缓冲液 5μl, 消毒三蒸水加至 50μl, 混匀后置 14℃ 水浴 2h, 加 0.5mol/L EDTA (pH8.0) 2μl 终止反应。生物素标记的核酸探针以下列三种方法收获: a. Sephadex G-50 离心小柱分离法^[1]。b. 乙醇沉淀法, 反应终止后加 5mol/L NaCl 1μl 和 2 倍体积的冷无水乙醇, 混匀置 -20℃ 2h 以上, 离心沉淀, 用 70% 和 80% 乙醇各洗一次, 负压抽干后用 TE 液溶解。c. 不作任何处理, 置 4℃ 保存待用。实验中设一模拟探针, 即除不加 DNase I 外, 其余均相同。

1.3 生物素标记核酸探针的显色检测

取生物素标记的探针用 5×SSC 稀释成不同浓度点于硝酸纤维素 (NC) 膜上, 干燥后 80℃ 烤膜 2h, 先后用 2×SSC-0.1% SDS, 0.1×SSC-0.1% SDS 和 0.1×SSC 各漂洗 3 次, 每次 3min。将 NC 膜放于塑料袋中, 加入含 3% BSA 的 STMT, 39℃ 水浴 30min, 倒去上述封闭液, 加入亲和素-碱性磷酸酶 (A-AKP) 反应液 (STMT 中含 1/1000 A-AKP), 室温 20min 后取出膜, 先后用 STMT 和 STM 各洗 2 次, 每次 5min。再将膜置一新塑料袋中, 加新鲜配制的底物反应液, 室温暗处 4h 后用 TE 液漂洗终止反应。

1.4 生物素标记核酸探针的斑点杂交试验

* 国家自然科学基金资助项目

** 蚌埠医学院

收稿日期: 1991-07-18 修回日期: 1991-12-04

取与标记探针同源的 DNA 和作阴性对照的牛胸腺 DNA 置 100℃ 水浴 5 min, 立即冰浴冷却作变性处理后用 5×SSC 稀释成不同浓度, 点样于 NC 膜上, 干燥后 80℃ 烤膜 2 h。将 NC 膜放塑料袋中加入预杂交液, 42℃ 水浴 4 h 后取出预杂交液, 放入含有不同浓度新鲜热变性的生物素标记探针的杂交液, 42℃ 水浴 18 h (或其他不同时间) 后取出膜, 用 2×SSC-0.1% SDS 室温洗 3 次, 每次 5 min; 0.1×SSC-0.1% SDS, 42℃ 洗 3 次, 每次 15 min; 0.1×SSC 室温洗 3 次, 每次 10 min, 然后加 3% BSA-STMT 封闭液, 以下步骤与显色检测过程相同。

2 结 果

2.1 用生物素标记核酸探针的显色检测

用切口平移法标记的生物素探针用 Sephadex G-50 离心小柱分离, 或乙醇沉淀法分离, 或直接应用不作分离, 分别点于 NC 膜上, 经 A-AKP 显色表明, 此显色系统能检出 0.5 pg 的生物素探针。而模拟生物素探针和未标记 (阴性对照) DNA 在同样条件下点膜和显色检测, 未出现显色 (图 1)。

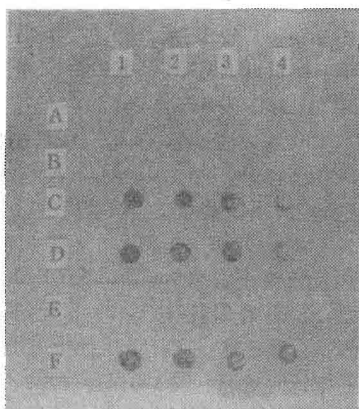


图 1 不同分离方法制备的生物素核酸探针的显色反应
A. λDNA; B. pGEM₃-IL-6 cDNA; C. Sephadex G-50 离心小柱分离的生物素标记 pGEM₃-IL-6 cDNA (Bio-pGEM₃-IL-6 cDNA); D. 乙醇沉淀法收获的 Bio-pGEM₃-IL-6 cDNA; E. 模拟探针 pGEM₃-IL-6 cDNA; F. 未作分离的 Bio-pGEM₃-IL-6 cDNA
1, 2, 3, 4 表示 DNA 含量分别为 500 pg, 50 pg, 5 pg, 0.5 pg。

2.2 生物素标记核酸探针的斑点杂交试验

取不同分离方法制备的生物素探针, 对点于膜上的同源 DNA 进行杂交, 结果表明用 Sephadex G-50 离心小柱分离的生物素标记 pGEM₃-IL-6 cDNA 在 30—500 ng/ml 时能检出 32 pg 或 6 pg 的同源 DNA, 未作分离的探针在 200 ng/ml 时也能检出 6 pg 的同源 DNA (图 2)。

2.3 不同杂交时间对杂交试验结果的影响

用未分离的 Bio-pGEM₃-IL-6 cDNA 对点于膜上

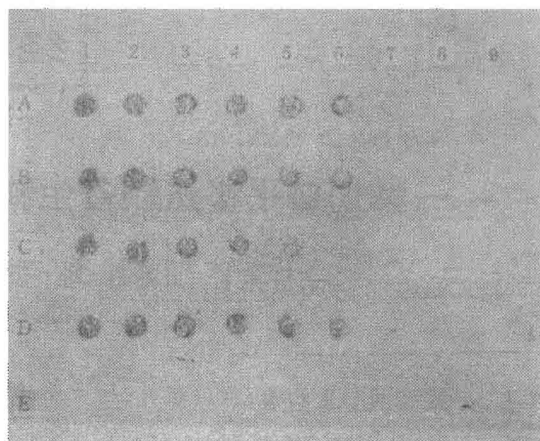


图 2 生物素标记核酸探针斑点杂交试验

A, B 和 C 表示 Sephadex G-50 离心小柱分离的 Bio-pGEM₃-IL-6 cDNA 杂交浓度分别为 500 ng/ml, 200 ng/ml 和 30 ng/ml; D. 未作分离的 Bio-pGEM₃-IL-6 cDNA, 200 ng/ml; E. 模拟探针, 500 ng/ml. 1—8 分别表示点于膜上的 DNA 为 100 ng, 20 ng, 4 ng, 800 pg, 160 pg, 32 pg, 6.4 pg, 1.3 pg; 9 为点于膜上的牛胸腺 DNA 100 ng

的 DNA 进行斑点杂交检测, 发现杂交 0.5 和 1 h 即可检出 160 pg 的同源 DNA, 杂交 2, 4 至 18 h 均可检出 32 pg 或 6 pg 的同源 DNA (图 3)。

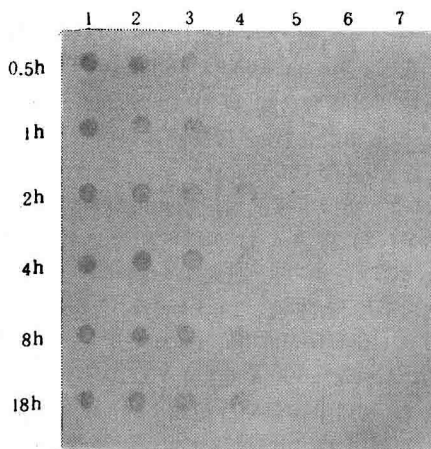


图 3 不同时间的斑点杂交结果

1—6 表示 DNA 量分别为 4 ng, 800 pg, 160 pg, 32 pg, 6.4 pg, 1.3 pg, 7 为牛胸腺 DNA 100 ng。

3 讨 论

用切口平移或其他方法制备生物素标记核酸探针时, 通常在标记后, 把标记探针与游离标记物分开, 以获得较纯的标记探针^[1-3]。但分离方法较为繁琐, 我们比较了不同分离方法及不分离^[4]制备的生物素探针在显色及杂交试验中的结果, 表明不分离的与分离的

相同。故我们认为可省略分离这一步,以缩短时间,并可完全回收探针。实验中发现乙醇沉淀法及 Sephadex G-50 离心小柱法都不能完全回收标记探针。

应用放射性同位素标记核酸探针杂交时,一般在 16h 以上,如提高探针浓度以缩短杂交时间,则使本底增高;而生物素标记探针在高浓度时亦不会加深本底^[1]。我们发现生物素探针在 200 ng/ml 浓度时,杂交 0.5 和 1h 即可检出 160pg 的同源 DNA,杂交 2h 至 18h,可检出 32pg 至 6pg 的同源 DNA,2 至 4h 杂交时间即可达到原来 18h 的检测水平。因此,只要稍提高探针浓度 (200ng/ml),就可缩短杂交时间 (2 至 4h),这样即可在一天内完成整个分子杂交试验,这对

于大量筛选性试验以及在实际应用时建立快速检测方法均有实用意义。

参 考 文 献

- 1 Sambrook J *et al.* *Molecular Cloning*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989:E37
- 2 马凤森. 生物化学与生物物理进展, 1989;16(2):107
- 3 刘钟瑛,杨贵贞. 中国免疫学杂志, 1990;6(4):244
- 4 Dillon J R *et al.* *Recombinant DNA Methodology*. New York: John Wiley and Sons Inc. 1985: 76
- 5 Leary J J *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983; 80:4045

神经节苷脂纯化方法的改进

张新波 汤乃梅* 张席锦

(北京医科大学生理教研室, 北京 100083)

程 时

(北京医科大学生物物理教研室, 北京 100083)

关键词 神经节苷脂, 神经节苷脂纯化方法, 层析

神经节苷脂 (ganglioside, Gl_s) 的分离与纯化是研究组织细胞 Gl_s 组成、含量及代谢的基本手段。由于 Gl_s 在神经以外组织中含量甚微,而且因组织、细胞的不同,影响 Gl_s 纯化的因素也不同。在实验过程中常常由于方法选择不当致使实验失败。本文介绍一种改进的方法,它操作简单,适用于大鼠多种组织,因此具有通用性。

1 材料与方 法

1.1 材料 DEAE-Sephadex A-25, 瑞典 Pharmacia; 高效薄层层析板 (硅胶 60), 德国 E. Merck Darmstadt; Sep-Pak C₁₈ 反相层析柱, 美国 Waters Associates; 所用试剂均为分析纯。标准 Gl_s 为牛脑混合 Gl_s 和狗红细胞 GM3, 均自提。

1.2 Gl_s 的分离纯化 取大鼠红细胞 2—3ml 及不同组织各 1—2g 分别用少量水匀浆,加 10 倍体积的氯仿-甲醇 (1:1, V/V) 混合液,室温超声,离心 (3 000 r/min, 10min), 反复抽提三次,合并上清液,调整使氯仿、甲醇和水的体积比为 30:60:8 (A 液)。按 Ueno 等方法^[1]进行 DEAE-Sephadex A-25 离子交换层析,洗脱过程改为:先用 100ml A 液洗柱,再用 100ml 甲醇洗柱,最后用 200ml B 液 (氯仿、甲醇和 0.8mol/L NaAc 的混合液,三者体积比为 30:60:8) 洗脱,收集洗

脱液,减压蒸干。用 0.1mol/L NaOH 甲醇液 10ml,于 35—40℃水浴中水解 2—3h,用 0.5mol/L HAc 甲醇液中和,然后加入 30ml 正己烷分配 2—3 次,以除去脂肪酸甲酯,减压蒸干。蒸干物用水溶解,并对三蒸水透析除盐。再加入甲醇使甲醇与水的比例为 1:1 (V/V)。

将 Sep-Pak C₁₈ 反相柱用 15ml 氯仿-甲醇 (2:1, V/V) 和 10ml 甲醇分别洗三次,并用 10ml 甲醇与水为 1:1 的溶液平衡,透析除盐后的溶液上柱,流速为 2ml/min,用 10ml 三蒸水洗柱,用 2ml 甲醇和 15ml 氯仿-甲醇 (1:1, V/V) 溶液洗脱 Gl_s。C₁₈ 反相柱再用 10ml 甲醇洗,甲醇与水为 1:1 (V/V) 的混合液平衡后可重复使用^[2]。

1.3 高效薄层层析 (HPTLC) 将纯化好的 Gl_s 样品进行 HPTLC,以氯仿、甲醇和 0.25% CaCl₂ 为 60:40:9 的混合液展开,间苯二酚 (resorcinol) 试剂显色。

2 结果与讨论

Gl_s 的纯化方法已有许多报道^[1-3]。我们曾用其

* 大连医学院生化教研室。

收稿日期: 1991.07-31

修回日期: 1991-10-11