

3 讨 论

体内 O_2^- 产生于微粒体并依赖于还原型辅酶 II 的酶促反应、线粒体电子传递及一些物质的自氧化等过程。 O_2^- 的产生与清除处于动态平衡。动物体内不同组织中 CuZn-SOD 及 Mn-SOD 的分布及其活性不同是与各组织亚细胞结构形成 O_2^- 的量不同有关。它们属于同工酶,具有组织器官和细胞部位特异性,它们的这一特性在体内自由基代谢调节方面以及生物学和医学研究方面均具有重要意义。测定不同组织中这两种 SOD 比活性有助于衰老机理研究及心血管疾病、肿瘤、肾病等病因探讨。Oberley 等人^[1]报道,几乎所有肿瘤组织 Mn-SOD 活性均降低或缺少,这一现象可作为判断肿瘤的基本特征之一。不同类型的肝癌组织 T-SOD 和 Mn-SOD 均低于正常肝组织。急性心肌梗塞患者在发病 24h 内,血浆 Mn-SOD 活性升高,阳性率达 100%^[1]。另有文献^[9]报道衰老的大、小鼠肝脏中 T-SOD 比活性明显降低。

将肾上腺素自氧化法与 KCN 抑制法区分两种 SOD 的方法相结合,应用于 Mn-SOD 活性测定尚未见报道。本实验结果提示:在反应液中 KCN 终浓度为 0.2 mmol/L 时红细胞 CuZn-SOD 活性被抑制 92%,组织匀浆上清液 SOD 活性被抑制 85—92%,这与文献报道^[1,4]基本相符。该方法重复性、稳定性良好,而且操作简便。

参 考 文 献

1 方允中,李文杰主编. 自由基与酶——基础理论及其在

生物学和医学中的应用. 北京: 科学出版社, 1989: 71—80

- 2 Marklund S L. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, Catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell Lines and normal human tissues. *Cancer Research*, 1982; 42:1955
- 3 Tyler D D. Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. *Biochem J*, 1975; 147: 493
- 4 Mennella M R F, Jones R. Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metalion-catalysed lipid-peroxidation reaction in semen. *Biochem J*, 1980; 191: 389
- 5 魏重琴, 艾建芳. 超氧化物歧化酶肾上腺素自氧化测定法的研究. *生物化学与生物物理进展*, 1988; 15(2): 124
- 6 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248
- 7 Oberley L W, Buettner G R. Role Superoxide Dismutase in Cancer: A Review. *Cancer Research*, 1979; 39: 1141
- 8 石湘芸等. 急性心肌梗塞患者血清超氧化物歧化酶动态变化的观察. *中华内科杂志*, 1989; 12: 714
- 9 Reiss U Gershon D. Comparison of cytoplasmic superoxide dismutase, in liver, heart and brain of aging rats and mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976; 73: 255

化学法标记高敏感性生物素化基因探针

刘钟瑛 杨贵贞*

(哈尔滨医科大学免疫学教研室, 150086)

关键词 生物素化基因探针, Southern 杂交, 菌落原位杂交

非同位素 DNA 探针由于具有可长期保存、对人体无害、能缩短检测时间等优点,因而应用潜力很大。其缺点是检测敏感性较差,故在检测特定基因,特别是人基因组单拷贝基因时受到限制。我们曾报道运用化学方法将生物素标记在 λ DNA 上,探针检测敏感性达到 4pg^[1],在此基础上我们对一系列实验条件进行了探讨和改进,又用该法制备了生物素化 IL-2R。基因探针和 IL-6 cDNA 探针,探针敏感性高达 pg 以

下水平,将它们用于 Southern 杂交和菌落原位杂交,均获良好结果,并可从人基因组 DNA 中清楚检测出单拷贝基因。

1 材料和方法

1.1 材料

* 白求恩医科大学免疫学教研室。

收稿日期: 1991-12-05 修回日期: 1992-01-09

生物素- δ -氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺(BAHS)、链霉素亲和素(sA)、碱性磷酸酶标记生物素(B-Ap)、5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐(BCIP)、硝基蓝四氮唑(NBT)均为 Sigma 产品,生物素购自 Serva 公司,其余标记用化学试剂均为国产产品(分析纯)。

1.2 方法

1.2.1 生物素-N-羟基琥珀酰亚胺(BHS)的制备见文献[2]。

1.2.2 探针标记 以碱法^[1]提取 pJSB 15 质粒(含人 IL-2 R α cDNA)及含鼠 IL-6 cDNA 重组质粒(pJEM + mL-6),并以常规方法将质粒纯化后,先后用 Hind III 和 EcoRI 限制性内切酶进行消化,用透析袋法^[3]回收 673bp 的 IL-2R α cDNA 片断和 637 bp 的 IL-6 cDNA 片断。采用化学方法^[1]对探针进行标记。所不同的是标记时分别采用了 BHS 和 BAHS,乙二胺的修饰时间为 3.5h。

1.2.3 人基因组 DNA 的提取 见文献[4]。

1.2.4 Southern 杂交膜的制备 人基因组 DNA 用 Hind III 限制性内切酶消化完全,用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳,将凝胶浸泡于 0.5mol/L NaOH-0.5mol/L NaCl 中,轻摇 45min,用双蒸水漂洗两遍,再将其浸泡于 1mol/L Tris-HCl (pH7.5)-1.5 mol/L NaCl 中,轻摇 30min,更换同样液体后再作用 15min。DNA 转移前先将硝酸纤维素膜(NC 膜)浸入双蒸水中数 min,再于 6 $\times$ SSC 中浸泡 5min,用 15 $\times$ SSC 将凝胶中 DNA 转移至 NC 膜,膜用 6 $\times$ SSC 漂洗,凉干后置 80 $^{\circ}$ C 烤膜 2h。

1.2.5 菌落原位杂交膜的制备 取一灭菌 NC 膜,覆盖在菌落上,NC 膜润湿后将其揭下,菌落面朝上铺在另一培养基上,37 $^{\circ}$ C 2h。将 NC 膜依次作以下处理:0.5 mol/L NaOH,5 min 2 次;1 mol/L Tris-HCl (pH7.4),2 min 2 次;0.5 mol/L Tris-HCl-1mol/L NaCl (pH 7.4),4min;2 $\times$ SSC,5min 2 次,凉干;1mg/ml RNase 室温 40min;500 μ g/ml 蛋白酶 k,室温 50min;氯仿,5min 2 次;2 $\times$ SSC,1min 3 次;室温凉干,80 $^{\circ}$ C 烤膜 2h。

1.2.6 预杂交和杂交 NC 膜在含 5 $\times$ SSC,5 $\times$ Denhardt (1 $\times$ Denhardt 为 0.02% Ficoll, 0.02% 聚乙烯吡咯烷酮、0.02% BSA),50% 甲酰胺,0.2mg/ml 鱼精子 DNA,0.1% SDS,20 mmol/L PBS (pH 6.5),1mmol/L EDTA 的预杂交液中于 42 $^{\circ}$ C 预杂交 4h,再置含 6 $\times$ SSC,50%甲酰胺,2 $\times$ Denhardt,0.2 mg/ml 血精子 DNA,0.1% SDS,20 mmol/L PBS (pH6.5),1 mmol/L EDTA,0.15 μ g/ml 探针的杂交液中于 42 $^{\circ}$ C 杂交约 20h。

1.2.7 显色检测 洗膜和封闭见文献[1]。先作预实验摸索出 sA 和 B-Ap 两者最佳配比浓度。正式检测前先将 sA (1 μ g/ml) 和 B-Ap (0.5 μ g/ml) 溶

于 Tris 缓冲液 (0.1 mol/L Tris-HCl pH7.5-0.15 mol/L NaCl-5mmol/L MgCl₂-0.5% 小牛血清)中作用 20min,以形成复合物,再将 NC 膜浸入其中于室温轻摇 20min,取出用含 0.05% 吐温的上述缓冲液洗膜 3 遍,每遍 10min,再用 STM 溶液 (0.1mol/L NaCl-0.1mol/L Tris-HCl pH9.5-5mmol/L MgCl₂) 洗 2 遍,每遍 5 min,置 NBT-BCIP 溶液中避光显色 3h。

2 结 果

2.1 BHS 和 BAHS 标记的 IL-2R α cDNA 探针的敏感性

分别用 BHS 和 BAHS 对 IL-2 R α cDNA 作了标记,用斑点杂交法对探针作敏感性测定。图 1 中 a,b 分别表示用 BHS 和 BAHS 标记的 IL-2R α cDNA 探针作斑点杂交检测结果,图中待检 IL-2R α cDNA 的含量从 1 至 7 点分别为 1ng, 250pg, 63 pg, 16 pg, 4pg, 1pg, 0.25pg, 第 8 点是作为阴性对照的 10 ng λ DNA。可见用 BHS 和 BAHS 标记的 IL-2R α cDNA 探针的检测敏感性分别为 16pg 和 1pg。图中 c 表示用同一方法标记的生物素化 λ DNA 探针与同样样品作斑点杂交检测结果,可见除最后 λ DNA 的斑点显色外,其余各点均不显色,这有力说明杂交是特异的。

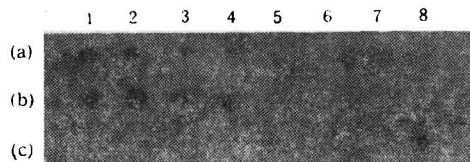


图 1 BHS (a) 和 BAHS (b) 标记的 IL-2R α cDNA 探针的敏感性

2.2 BHS 和 BAHS 标记的 pJSB 15 探针的敏感性

分别用 BHS 和 BAHS 对 pJSB 15 质粒进行标记,然后用斑点杂交法对探针作敏感性测定。图 2 中 A, B 分别表示用 BHS 和 BAHS 标记的 pJSB15 质粒探针作斑点杂交检测结果。图中各点待检 IL-2R α cDNA 的含量同图 1,第 8 点是作为阴性对照的 10ng λ DNA。可见用 BHS 和 BAHS 标记的 pJSB 15 质粒探针的敏感性分别为 1pg 和 0.25pg,后者可获得更好的标记效果。

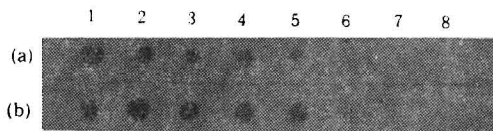


图 2 BHS (a) 和 BAHS (b) 标记的 pJSB 15 探针的敏感性

2.3 Southern 杂交检测 IL-2R_α 单拷贝基因

分别用 BAHs 标记的 IL-2 R_α cDNA 探针和 pJSB15 质粒探针与经 Hind III 酶切的人基因组 DNA 作 Southern 杂交,结果它们均能从人基因组 DNA 中检测出 IL-2R_α 单拷贝基因(见图 2a, b)。为了便于对测出的基因条带进行定位,我们又同时将生物素标记的 λ DNA 探针与电泳时作分子量标记之用的 Hind III 酶切 λ DNA 作了 Southern 杂交(图 2c)。从图 2 可见测出的 IL-2R_α 基因条带位于同一位置,均在约 4.2kb 处。

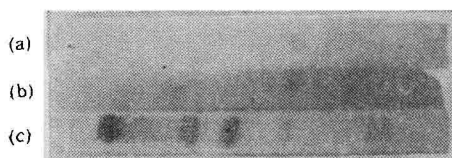


图 3 生物素标记的 IL-2R_α cDNA 探针和 pJSB15 探针作 Southern 杂交检测 IL-2R_α 单拷贝基因

2.4 菌落原位杂交检测 IL-6 cDNA 阳性菌落

为探索生物素化 DNA 探针作基因克隆筛选的效果,将含不同重组质粒的大肠杆菌培养后,把菌落原位转移至 NC 膜,用同样方法标记的生物素化 IL-6 cDNA 探针作菌落原位杂交,图 3 中“1”为 IL-6 cDNA 阳性菌落,“2—5”均为阴性菌落,检测结果表明,除 IL-6 cDNA 阳性菌落呈明显显色外,阴性菌落均基本不显色。

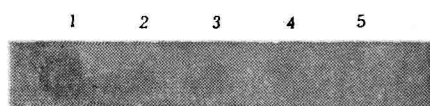


图 4 菌落原位杂交检测 IL-6 cDNA 阳性菌落

3 讨 论

基因探针的标记方法以同位素标记法最为常见,其最大优点是检测敏感性高,但由于同位素半衰期短,操作不安全,放射自显影时间长,价格较昂贵等弊端,非同位素基因探针标记方法正日益受到人们重视。在诸多非同位素标记方法中,生物素标记探针是目前被认为很有发展潜力的一种方法。基因探针的生物素标记法目前最多用的是“缺口翻译法”,其次有光敏生物素法,据报道这两种方法均有较高的检测敏感性^[3],但它们各自也存在一些缺点。“缺口翻译”标记法,由于它是一种酶促反应,故要求被标记核酸有较高纯度,否则影响标记效果,另外试剂本身性质也不稳定;光敏生

物素也有试剂性质不够稳定的缺点,遇光和紫外线易分解,这给保存和运输均带来不便。相比之下,本文的化学标记法有以下几点优点: a. 对于待标记核酸的纯度要求较低,因而标记效果稳定,重复性好; b. 标记用试剂性质比较稳定,可长期存放; c. 生物素可自行活化,其它标记用化学试剂均为国产试剂,价格低廉; d. 由于采取化学标记法,适合于大批量制备探针,因而为基因探针试剂盒的生产创造了有利条件。

Southern 杂交技术广泛用于对特异基因序列的检测和分析,但这一方法要求探针有较高敏感性,特别是要从人基因组 DNA 中检测出单拷贝基因,对探针的敏感性要求就更高。为此许多非同位素探针在这一方法的运用上受到了限制。从本文实验结果看,化学法标记生物素基因探针的方法已能胜任这一要求,由此它可望取代或部分取代同位素标记方法而发挥作用。

在标记 IL-2 R_α 基因探针时,我们对 BAHs 和 BHS 这两种不同的活化生物素进行了比较,结果表明,前者可获得更高的检测敏感性,这可能由于前者是一种“长臂生物素”,以它作标记物,可进一步延长生物素与探针之间的连接臂,利于生物素同亲和素结合,从而提高探针检测敏感性。实验结果还表明,无论用 BHS 还是用 BAHs 进行标记,质粒探针均较 cDNA 探针有更高敏感性,其原因可能同探针长度有关。为此我们认为,如果已证实质粒载体序列中无人基因组 DNA 的同源序列,直接制备质粒探针是一条简便高效的途径。

生物素探针的检测系统较多,我们曾报道用碱性磷酸酶标记亲和素作为检测系统^[1],本文应用 sA 和 B-Ap 作为检测系统,也获得良好结果。

参 考 文 献

- 1 刘钟琅,杨贵贞. 化学法标记生物素核酸探针的实验研究. 中国免疫学杂志, 1990; 6(4): 244
- 2 Al-Hakin A H. Studies towards the development of chemically synthesized non-radioactive biotinylated nucleic acid hybridization probes. *Nucleic Acids Res*, 1986; 14(24):9965
- 3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al*. *Molecular Cloning*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989: 1.21—1.52, 6.28
- 4 Peasse M J, Morency C A, Holm M *et al*. Preparation of both DNA and RNA for hybridization analysis from limiting quantities of lymphoid cells. *Immunol Letter*, 1988; 18: 219
- 5 Wilchek M, Bayer E A. The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Anal Biochem*, 1983; 171:1