

经验交流

标记基因探针的快速简易制备

何 彬 范 明 甘思德

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

关键词 基因探针, 标记探针的制备, DNA 片段

在基因探针制备过程中, 常通过琼脂糖电泳分离目的 DNA 片段和载体, 然后采用电洗脱、冻融等方法回收并纯化目的片段, 再作同位素或非同位素标记, 为减轻非特异性本底, 往往还需要分离出标记探针, 以去除游离标记物, 整个过程比较繁琐费时。我们在工作中尝试了一种简便的方法, 将探针的制备、回收、纯化等操作简化合并, 省去了繁琐的 DNA 片段回收纯化过程, 收到较好的效果(图 1)。

实验所用的探针为细胞骨架 α -管蛋白 cDNA 探针, 经随机引物法标记 $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, 对从大鼠脊髓中提取的细胞总 RNA 进行 RNA 印迹分析^[1,2]。含 α -管蛋白 cDNA 片段的重组质粒 pT1 在光照下标记光敏生物素从而获得光敏生物素标记的探针, 与质粒 pT1 进行常规点杂交^[3]。实验所有的杂交过程均在不加甲酰胺的体系中进行。

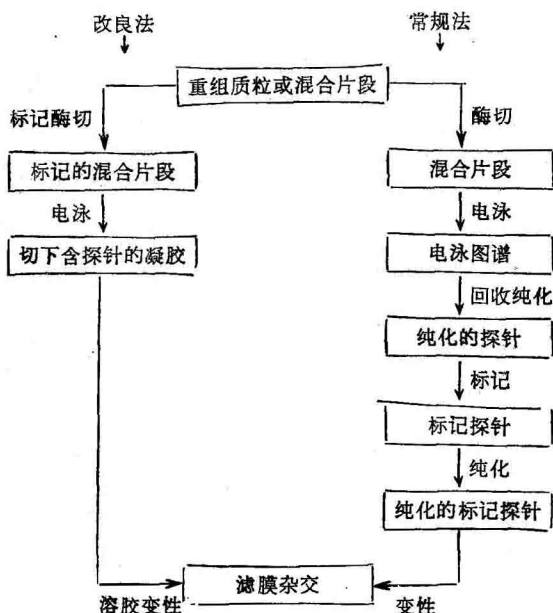


图 1 标记探针快速简易制备法的操作过程与常规方法的比较

1 改良法在制备光敏生物素标记探针中的应用

将质粒 pT1 直接用光敏生物素标记后, Pst I 酶切, 琼脂糖电泳分离, 电泳胶经溴化乙锭染色后在长波紫外灯下切出含 cDNA 片段的琼脂糖凝胶块, 尽量剔除 DNA 带周围无关的琼脂糖, 置于 Eppendorf 管中, 加入 1ml 杂交液后在水-甘油浴 105℃ 3min 使琼脂糖块完全溶解, 此时探针已经变性。再将探针加入已完成预杂交的 65℃ 预热的杂交袋中, 并充分混匀, 65℃ 下杂交 20—24h, 检测显示后所呈阳性结果与常规法的结果一致(图 2)。

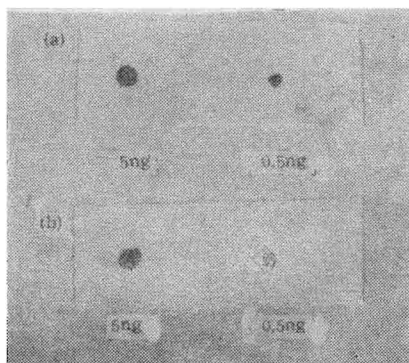


图 2 用改良法与常规法制备光敏生物素探针的斑点印迹
(a) 改良法 (b) 常规法

2 琼脂糖或聚丙烯酰胺对杂交过程的影响

为观察改良法中引入的琼脂糖对分子杂交的影响, 将用常规法制备的 ^{32}P - α 管蛋白 cDNA 探针与脊髓细胞总 RNA 进行 RNA 印迹分析, 杂交液中预先加入终浓度为 0.1% 的琼脂糖。杂交后, X 光胶片曝光, 所呈带形良好, 与杂交液中未加琼脂糖的结果一致(图 3)。说明杂交液中引入少量的琼脂糖对杂交结果

无明显影响。

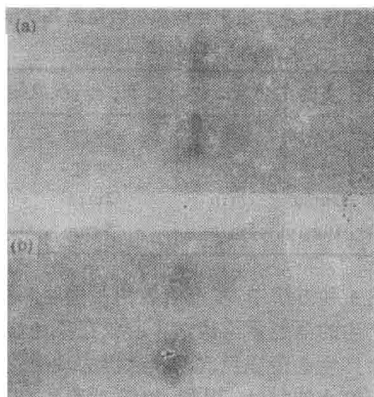


图 3 琼脂糖对 ^{32}P 探针 RNA 印迹分析结果的影响

(a) 改良法, 杂交液中加入 0.1% 琼脂糖

(b) 常规法, 杂交液中不加琼脂糖

琼脂糖凝胶中的标记探针在 105°C 3 min 后, 变性为单链, 可散在于 65°C 预热的杂交液中, 由于琼脂糖在 65°C 呈溶解状态, 故不影响核酸单链之间的特异性配对, 而且杂交体系内含有少量的琼脂糖有增强信号的作用, 其原理可能与杂交液中加入硫酸葡聚糖类似^[4]。

在改良法中试用聚丙烯酰胺凝胶代替琼脂糖, 将切下的聚丙烯酰胺凝胶块溶于 1 ml 含 7.5% β -巯基乙醇的 TBE 中, 加热助溶和变性后直接用于杂交, 也得到较好的结果。以聚丙烯酰胺凝胶分离标记探针, 是利用巯基乙醇破坏聚丙烯酰胺中的二硫键, 使网状凝胶成为可溶性的线性聚丙烯酰胺单链, 释放出探针而直接用于杂交^[4]。

3 改良法与常规法的比较

改良法制备分离探针有许多优点(图 1)。在常规

制备分离探针的方法中, 为获得纯化的目的核酸片段, 必须经过回收和纯化过程, 以消除琼脂糖等杂质对标记过程的抑制作用, 特别是在光敏生物素标记探针时, 对待标物的纯度要求较高, 因为待标物中的一些非目的 DNA, RNA 或蛋白质都能同时为光敏生物素标记, 从而直接影响到杂交结果的特异性^[5,6]。此外, 按常规法取得标记的探针后, 仍需进一步纯化以除去游离标记物, 减轻本底, 这一系列冗长的回收、纯化再纯化过程, 费时、费力, 并不可避免地造成探针量的损失。然而利用改良法, 先对混合片段全部标记, 然后再电泳分离, 选择目的片段经溶胶变性处理直接用于各种滤膜杂交。整个过程可在较短时间内完成, 步骤简单, 操作方便, 既省去了繁琐的回收纯化过程, 又避免了因此带来的探针损失, 而且标记后再电泳分离也起到纯化探针的作用。若在一个反应体系中需同时标记几个长度不等的探针, 按改良法先标记后电泳分离再选择使用, 亦将简化重复的标记过程, 带来方便和效率。

因此, 本文介绍的标记探针的快速简易制备方法, 省时省力, 不仅有利于实验室操作, 而且在临床基因诊断, 尤其光敏生物素探针快速诊断疾病的工作中会有较大的应用价值。

参 考 文 献

- 1 Cleveland D W *et al.* *Cell*, 1980; 20: 95
- 2 Chomczynski P *et al.* *Anal Biochem*, 1987; 162: 156
- 3 张贺秋等. 军事医学科学院院刊, 1990; 14(4): 309
- 4 Marotta R *et al.* *Anal Biochem*, 1983; 130: 27
- 5 Keller G H. *DNA Probes*. New York: M Stockon Press, 1990
- 6 McInnes J L. *Biotechnology*, 1987; 5: 269

凝胶上测定酪氨酸酶活性的几种方法

陈拔盛* 刘望夷

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

关键词 酪氨酸酶, 凝胶上测定酪氨酸酶活性

酪氨酸酶广泛存在于动植物及人体中, 是生物体合成黑色素的关键酶。如果人体缺乏酪氨酸酶, 或酪氨酸酶的活性不能表达, 则会导致白化病^[1]。因此, 酪氨酸酶活性的检测对于研究白化病发病的分子机制具有重要意义。

酪氨酸酶具有氧化酶的功能, 能将 L-多巴氧化成多巴醌, 多巴醌进一步变成黑色素。根据这个特性, 将

凝胶浸泡在多巴溶液里, 凝胶上的酪氨酸酶催化氧化溶液中的多巴, 在凝胶上有酶的部位形成黑色条带, 据此可检测出凝胶上的酪氨酸酶。酪氨酸酶还能把邻苯二酚氧化成邻苯醌。苯醌与酶蛋白结合, 生成红褐色

* 浙江大学生物科学与技术系 87 级毕业实习生。

收稿日期: 1991-06-25 修回日期: 1991-11-04