

技术与方法

两种末端标记的寡聚核苷酸探针的比较研究

甘立霞 陈鸿书

(第三军医大学基因工程实验室,重庆 630038)

提 要

本文利用 [α-32P]-dATP 和 [γ-32P]-ATP 分别对寡聚核苷酸的 3'-末端及 5'-末端进行标记,研究这两种标记方法的技术途径,并结合斑点杂交,比较这两种末端标记的探针的灵敏度及特异性.结果表明:[α-32P]-dATP 虽可在寡聚核苷酸的 3'-OH 末端标上多个 [32P]-dAMP 分子,但所得标记探针的杂交灵敏度及杂交体的稳定性均不及 [γ-32P]-ATP 标记 5'-末端制备的寡聚核苷酸探针.因此,当实验需要极高灵敏度的寡聚核苷酸探针时,以选择 [γ-32P]-ATP 标记其 5'-末端为宜.

关键词 寡聚核苷酸探针,3'-末端标记,5'-末端标记,斑点印迹杂交.

核酸探针一般是以克隆的 cDNA,经“缺口平移”法标记而成.自从 DNA 合成仪问世后,以合成的寡聚核苷酸作为分子探针逐渐应用起来.寡聚核苷酸探针因具有克隆的 cDNA 探针所不可替代的独特用途^[1-4],并且制备方便,在分子生物学的基础研究及临床诊断中将会得到日益广泛的运用.合成的寡聚核苷酸由于是单链的短片段,不宜用缺口平移法进行标记,通常采用的方法是 3'-端或 5'-端标记.虽然这两种方法已广泛应用,但二者的优劣如何,尚缺乏详细报道.本文选择高放射比强的 [γ-32P]-ATP 及 [α-32P]-dATP,对寡聚核苷酸的 5'-OH 端及 3'-OH 端进行标记,研究这两种标记方法获得高比活性探针的技术途径,并对这两种末端标记的探针的杂交灵敏度及特异性等进行比较,探讨制备高灵敏度寡聚核苷酸探针的适宜方法.

材 料 和 方 法

一、试剂和材料

[α-32P]-dATP, [γ-32P]-ATP 均为北京福瑞诊断用品联营公司产品;脱氧核糖核苷酸末端转移酶系 Boehringer 产品;T4 多聚核苷酸激酶,Boehringer 产品;硝酸纤维素滤膜,Bio-Rad 产品;尿素(超纯)Sigma 产品;聚乙烯吡咯烷酮系 Serva 产品.

其余试剂均为分析纯级,所用溶液均用消毒双蒸水配制.

斑点杂交所用的待测 DNA 样品取材于正常人外周静脉血;作为 DNA 对照的 PBR322 DNA 取材于大肠杆菌 HB101 (PBR322).

二、探针的制备及标记

(一) 探针的合成及纯化

采用固相异丙基亚磷酰胺法,以美国应用生物系统公司生产的 381A 型 DNA 合成仪及其全套合成试剂,根据 Coussens, L. 等人^[5]报道的人蛋白激酶 C(hpKC) 基因序列,合成了 25 聚体 (25-mer) 的 hpKC 基因的寡聚核苷酸探针,其序列为:

5'CCC AGC CAA CAT TTCATACAGCAGG 3'

(简称 hpKC 25-mer)。

合成的寡聚核苷酸按常规方法进行脱保护及粗制,并辅之以 20% 聚丙烯酰胺变性凝胶(含 8mol/L 尿素)电泳纯化之。

(二) 寡聚核苷酸探针的 3'-末端标记

1. [α - 32 P]-dATP 标记 3'-末端

基本参照 Collins 的反应缓冲体系⁶⁰: 反应总体积 10 μ l, 取 [α - 32 P]-dATP (2244Ci/mmol) 90pmol, 加入 hpKC25-mer 9pmol, 脱氧核糖核苷酸末端转移酶 50U, 于 140mmol/L 二甲基胍酸钠 (pH7.5), 1mmol/L CoCl₂, 0.1mmol/L DTT, 牛血清白蛋白 100 μ g/ml 的反应缓冲系统中, 37 $^{\circ}$ C 保温 1h。反应完毕, 加入 25 μ l 去离子甲酰胺, 1mmol/L EDTA 溶液, 测定探针的比放射性。将标记探针置 -20 $^{\circ}$ C 贮存。

参照原反应体系, 改变寡核苷酸与 [α - 32 P]-dATP 的克分子比例, 即加入 [α - 32 P]-dATP 比 hpKC 25-mer 探针克分子数过量 5 倍, 复标记一次。

2. [γ - 32 P]-ATP 标记 5'-末端

基本参照 Maxam⁶¹ 的方法: 反应总体积 10 μ l, 取 [γ - 32 P]-ATP 53pmol (3740Ci/mmol), 加入 hpKC 25-mer, 53pmol, T4 多聚核苷酸激酶 30U, 于 70mmol/L Tris·HCl (pH7.6), 10mmol/L MgCl₂, 0.1mmol/L KCl, 5mmol/L DTT, 1mmol/L 亚精胺的反应缓冲液中, 37 $^{\circ}$ C 保温 1h, 反应完毕, 加入 25 μ l 去离子甲酰胺, 1mmol/L EDTA 溶液, 测定探针的比放射性, 将标记探针置 -20 $^{\circ}$ C 贮存。

参照上述反应体系, 维持 [γ - 32 P]-ATP 与 hpKC 25-mer 的克分子数为 1:1, 适当增加 T4 多聚核苷酸激酶量, 并延长保温时间至 2h, 复标记一次。

探针放射比活性的测定方法参照王吉伟的工作⁶², 不同之处是用 NC 膜代替原法的醋酸纤维素膜。

三、待测 DNA 样品的制备

(一) 人白细胞 DNA 的提取与纯化

正常人外周静脉血用 EDTA-Na₂ 1—2

mg/ml 抗凝, 于 37 $^{\circ}$ C 直立静置 3h, 吸取血浆及交界层, 2000g 离心 10min, 用生理盐水洗细胞沉淀一次, 复用生理盐水悬浮细胞, 加入 SDS-EDTA 溶液 0.01mol/L Tris, 0.5mol/L EDTA (pH9.5), 2% SDS, 于 55 $^{\circ}$ C 保温 20min, 加入蛋白酶 K (终浓度 50 μ g/ml), 混匀, 于 55 $^{\circ}$ C 保温 4h, 加入 0.1 \times SSC (1 \times SSC 为: 15mmol/L NaCl, 1.5mmol/L 柠檬酸钠, pH7.0), 用等体积的饱和酚、酚-氯仿 (1:1, V/V) 及氯仿-异戊醇 (24:1, V/V) 各抽提 1 次, 吸取上层水相, 乙醇沉淀 DNA, 所得人白细胞 DNA 置 -20 $^{\circ}$ C 贮存备用。

(二) PBR322 DNA 的制备与纯化

大肠杆菌 HB101 (PBR322) 经培养和质粒 PBR322 扩增后, 按本室的常规方法进行 PBR322 DNA 的提取与纯化。

四、斑点杂交及检测

(一) NC 膜上的斑点杂交

DNA 样品用碱性甲醛溶液变性⁶³, 即 DNA 样品溶液与等体积 10 \times SSC, 2mol/L NaOH, 15% 甲醛变性液混匀, 经 70 $^{\circ}$ C 水浴保温 10min 后, 取出用于点样。

杂交反应体系参照 Albretsen, C⁶⁴, 预杂交液与杂交液相同, 含 5 \times SSC, 25mmol/L NaH₂PO₄, pH6.5, 5 \times Denhardt's (50 \times Denhardt's 为: 1% Ficoll, 1% 聚乙烯吡咯烷酮, 1% 牛血清白蛋白), 0.1% SDS, tRNA (0.1mg/ml), 于 42 $^{\circ}$ C 预杂交 2h 后, 弃去预杂交液, 加入含标记探针的杂交液, 于 42 $^{\circ}$ C 杂交 24h。

(二) 杂交斑点的检测

杂交后的 NC 膜在 2 \times SSC, 0.1% SDS 溶液中室温漂洗 2 次, 每次 15min; 提高漂洗强度, 于 0.5 \times SSC, 0.1% SDS 中, 不同温度下 (见结果) 复漂洗 2 次, 每次 15min, 膜片晾干后夹于增感屏中, 于 -70 $^{\circ}$ C 自显影 7d。

结果与讨论

一、标记条件与探针的放射比活性

由表 1, 可见, 在 5'-末端标记时适当增加

表 1 标记条件与探针的放射比活性

标记方法	标记物	酶	克分子比 (标记物/ 寡核苷酸 探针)	探针的放射 比活性 (cpm/ μ g)
5'-末端 标记	[γ - 32 P]-ATP	T4K	1:1 1:1	1.7×10^8 2.25×10^8
3'-末端 标记	[α - 32 P]-dATP	TDT	10:1 5:1	6.5×10^8 3.3×10^8

注: T4K: T4 多聚核苷酸激酶; TDT: 脱氧核糖核苷酸末端转移酶; ¹⁾ 参见方法中所述第二次标记条件

激酶量并延长反应时间使同位素掺入率提高, 探针的放射比活性随之提高。在 3'-末端标记时, 增加 [α - 32 P]-dATP 的量能有效地提高探针的比活性, 而且二者似乎有数量关系。

二、两种末端标记探针的观察



图 1 两种末端标记的寡聚核苷酸探针, 经 PAGE 后的放射自显影图

样孔 1 和 2 是 5'- 32 P-标记的探针; 样孔 3 和 4 是 3'- 32 P-标记的探针

5'-末端标记因是在激酶催化下, 将 [γ - 32 P]-磷酸残基转移至寡聚核苷酸 (hpKC 25-mer) 的 5'-OH 上的反应, 因此, 在放射自显影图片上, 5'-末端标记的探针代表 25 个核苷酸的电泳迁移距离。从图 1 可见, 用 [α - 32 P]-dATP 进行 3'-末端标记, 可以在寡核苷酸的

3'-OH 端接上多个 [32 P]-dAMP 分子。

三、两种标记探针的灵敏度及杂交体的稳定性

从图 2 的结果可以比较出两种探针的灵敏

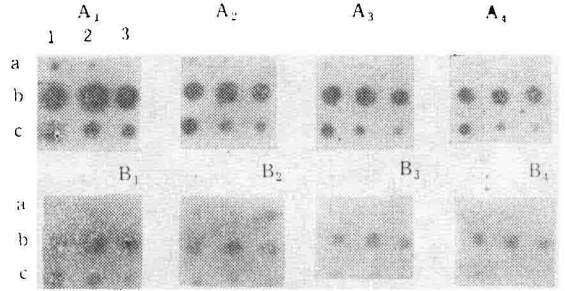


图 2 两种末端标记的寡聚核苷酸探针杂交后, 经不同温度漂洗后的放射自显影图

- (a) 滤膜 A₁-A₄ 代表在 5'- 32 P-标记的探针中杂交 (杂交液中探针浓度 = 7.6×10^6 cpm/ml, 探针的放射比活性 = 2.25×10^8 cpm/ μ g)。滤膜 B₁-B₄ 代表在 3'- 32 P-标记的探针中杂交 (杂交液中探针浓度 = 1.3×10^7 cpm/ml, 探针的放射比活性 = 3.3×10^8 cpm/ μ g)。
- (b) 滤膜的斑点印迹如下: 第①排 (a₁-a₃) 为 PBR322 DNA 10, 5, 2.5 μ g; 第②排及第③排 (b₁-b₃ 及 c₁-c₃) 为人白细胞 DNA 中含 32, 16, 8, 4, 2, 1pg 的 hpKC 基因
- (c) 滤膜下标注的温度为杂交后的不同漂洗温度。

度及其杂交体的稳定性 (见表 2)

表 2 两种探针的灵敏度及其杂交体的稳定性比较

探针	漂洗温度			
	30 $^{\circ}$ C	45 $^{\circ}$ C	55 $^{\circ}$ C	65 $^{\circ}$ C
5'- 32 P-探针	<1pg	<1pg	<1pg	\leq 1pg
3'- 32 P-探针	<1pg	1pg	2pg	8pg

表中检出量的定量分析结果基于图 2 的杂交显影结果。

由此可见, 5'- 32 P-探针, 当其放射比活性及在杂交液中的浓度均低于 3'- 32 P-探针时, 杂交灵敏度却高于后者; 且其与待测靶 DNA 序列形成的杂交体亦较 3'- 32 P-探针的更为稳定。从图 2 可看到, 3'- 32 P-探针与待测 DNA 形成的杂交体随漂洗温度的升高迅速从膜片上脱落, 杂交信号急剧减弱, 在 65 $^{\circ}$ C 漂洗后, 仅能检出 8pg 的样点, 而 5'- 32 P-探针此时仍可清晰检出 1pg 的样点。这是由于不同方法标记的探针具有不同的序列特性所致。5'-末端标记的探针因只能在 5'-OH 端接上一分子 [32 P]-磷酸残

高灵敏、高特异性心钠素放射免疫测定方法及应用

汪家瑞 徐宝钢 何士大 温绍君 于仲元* 陈建军 王宏燕

(首都医学院宣武医院高血压实验室,北京 100053)

提 要

本法应用戊二醛连结 α -人心钠素 (α -hANF) 和牛血清白蛋白,产生的复合物免疫家兔,获得抗 α -hANF 血清,其最终效价为 1:35 万,亲和常数 $K_a = 4.94 \times 10^{-10} \text{mol/L}$. α -hANF 应用氯胺-T 氧化法进行 ^{125}I 标记,再经 DEAE-Sephadex A25 柱层析纯化,得到单碘 ^{125}I - α -hANF,比放射性为 $300 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 左右.最小检出量为 $1.8 \text{pg}/\text{管}$.与 8 种肽交叉反应为: α -rANF 98%、心房肽 III 40%,其它 6 种元交叉反应.样品变异系数,批内: 4.4%,批间: 16.3%.

关键词 心钠素,抗血清,放射免疫分析

α -人心钠素 (α -human atrial natriuretic factor, α -hANF) 是由 28 个氨基酸(99—126) 所组成立的一种肽类激素,主要储存在心房心肌细胞中,它对体液电解质平衡,血压调节有着密切的关系^[1]. 建立测定心钠素 (ANF) 的放射免疫分析方法 (radioimmunoassay, RIA),

基,故所得的标记探针的序列并未改变,仍与靶 DNA 序列完全互补,而 [α - ^{32}P]-dATP 标记 3'-末端则是在脱氧核糖核苷酸末端转移酶催化下,在 3'-OH 端随机连接一串核苷酸的反应,所以探针的放射比活性往往因在每分子探针上接上了多个 [^{32}P]-dAMP 分子而增高,但是接上的标记核苷酸数目多,虽然增加了探针的放射比活性,却因这段 poly(dA) 的序列与样品中靶基因的相应序列没有互补关系,在较高漂洗温度下,杂交体稳定性降低,导致检出灵敏度的降低.而漂洗温度的提高在许多情况下是必要的甚至是必须的,它既能有效地降低探针的非特异吸附,还能除去探针非特异杂交本底,从而提高信噪比,增强探针的特异性.从本实验结果看到,在 55°C 下漂洗,基本上能消除非特异杂交本底,此时, $5'$ - ^{32}P -探针的检出灵敏度显著地高于 $3'$ - ^{32}P -探针.

首先需制备较理想的抗血清.国内虽已有报道^[2,3],但由于其抗血清的效价及灵敏度均不高,影响了测定的准确性.另外,血浆 ANF 的测定,目前国外一般都采用样品前处理法,步骤

* 现于北京人民医院内科.

此外,标记 $5'$ -端用的 [γ - ^{32}P]-ATP 与被标记的探针以等克分子比例进行反应,比标记 $3'$ -端用的 [α - ^{32}P]-dATP 的量少得多,因而成本较后者便宜.所以,当实验需要高灵敏度的寡聚核苷酸探针时,建议采用 $5'$ -末端标记的方法.

参 考 文 献

- Wallace R B *et al.* *Nucl Acids Res*, 1981; 9: 879
- Gough N M *et al.* *Nature*, 1984; 309: 763
- Conner B J *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983; 80: 278
- Landegren U *et al.* *Science*, 1988; 241: 1077
- Coussens L *et al.* *Science*, 1986; 233: 859
- Collins M L *et al.* *Anal Biochem*, 1985; 151: 211
- Maxam A M *et al.* *Methods Enzymology*, 1980; 65: 499
- 王吉伟. 生命的化学, 1988; 8(6): 31
- Walter E *et al.* *Hepatology*, 1987; 7(3): 557
- Albretsen C *et al.* *Anal Biochem*, 1988; 170: 193

【本文于1990年7月25日收到,11月14日修回】