

评论

生物素标记核酸技术

何笑松

(复旦大学遗传学研究所, 上海)

核酸分子杂交法是当今分子生物学研究中不可缺少的一项技术。其基本原理是利用放射性同位素标记的DNA或RNA探针,与固定在滤膜或玻片上的单链核酸中的同源序列进行杂交复性,经过放射自显影,即可在X光片或感光乳胶中看到特定的核酸片段的踪迹。由于分子杂交法具有灵敏度高、专一性强的特点,不仅已经成为分子遗传学与基因工程研究中的一项常规技术,而且在临床医学诊断方面也开始得到应用。

由于放射性同位素的应用存在着不够安全方便、实验周期长等固有的缺点,分子杂交法的推广受到了一定的限制。长期以来,各国研究人员一直在致力于发展非放射性的核酸标记方法。近年出现的生物素标记核酸技术就是这方面的一大进展。本文对这项技术的基本原理及应用范围作一简要介绍。

一、生物素与亲和素的相互作用

生物素(biotin)是一种B族维生素。早已发现,生物素与鸡蛋清中的一种抗生物素蛋白——亲和素(avidin)具有很强的结合作用。亲和素是一种糖蛋白,每个分子由四个相同的亚基组成,每个亚

基都能专一性地结合一个生物素分子。这种结合高度紧密(解离平衡常数为 10^{-15}),其机理至今仍不清楚。而且,这种结合只需要生物素分子的脲基环部分,其戊酸侧链通过酰胺键与其他分子连接之后,脲基环仍然保持着与亲和素的结合能力。生物素与亲和素的这种独特作用很早就受到注意,并被用于探测细胞表面及内部的具有特定功能的蛋白质、脂类、糖类等大分子,取得许多成果^[1]。这种方法的关键在于怎样用生物素去专一性地标记所要探测的目标。实现了这一步之后,就可以利用与荧光物质、酶或高电子密度蛋白偶联的亲和素,去寻找被生物素标记了的目标,然后在光学显微镜或电子显微镜下将它们显示出来。

后来发现,亲和素分子表面的寡聚糖基可能与细胞的各种复杂组份起副反应,于是又从一种土壤链霉菌 *Streptomyces avidinii* 的发酵液中得到另一种抗生物素蛋白——链霉亲和素(Streptavidin),它和生物素的专一性结合性质与亲和素相同,但不含寡糖基,而且等电点为5.0,接近中性(亲和素的 $pI=10.5$),用来代替亲和素,能降低非专一性的结合,减轻背景,从而提高检测的分辨率。

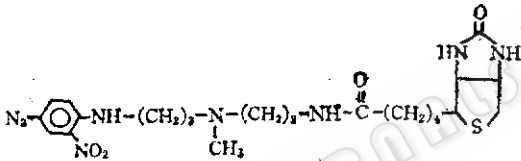
本文于1985年6月3日收到。

承沈仁权、郑兆鑫老师审阅,特此致谢。

二、生物素标记核酸探针的制备

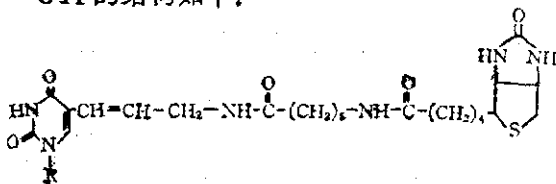
生物素在标记蛋白质方面的成功, 启发人们将它用于核酸探针的标记。标记的方法不外两大类, 即化学法和酶促法, 现分述如下。

化学法一般是先用带有易于接受生物素的活性基团的核苷酸类似物聚合成多核苷酸, 再通过化学反应将生物素转移到活性基团上^[2]。最近有人报道了一种光化学反应标记法, 利用化学合成的光生物素 (photobiotin) (结构式如下) 来直接标记DNA和RNA。将光生物素与核酸混合, 用可见光照射, 光生物素分子上的选氮取代硝基苯基即被激活, 与核酸分子发



生反应, 从而得到生物素标记的核酸探针^[12]。

酶促法是目前应用较广的方法, 这种方法是用生物素标记的核苷酸类似物作为酶促合成探针分子的底物。显然, 酶促法的关键在于得到生物素标记的核苷酸类似物, 而且要求这样的类似物参入核酸后不影响互补双链的配对。美国耶鲁大学的Langer等人^[3]用化学方法合成了几种这样的胸腺嘧啶核苷酸类似物, 彼此的差别仅在于生物素与嘧啶环之间连接臂的长度。其中最常用的Bio-11-dUTP及Bio-11-UTP的结构如下:



上述胸腺嘧啶核苷酸类似物可以作为多种DNA或RNA聚合酶的底物(但不能作为AMV反转录酶的底物)。分别通过有关的酶促反应就可以得到生物素标记的各类探针分子:

1. 以大肠杆菌DNA聚合酶I作缺口移位反应(Nick Translation), 可以得到双链DNA探针。

2. 利用DNA末端转移酶, 可以在缺口移位反应所得探针的3'端加上生物素标记的寡核苷酸尾巴, 将检测灵敏度提高5—10倍。

3. 利用M13单链克隆载体作为DNA聚合酶I(Klenow片段)合成DNA的模板, 可以得到单链DNA探针。

4. 利用SP6 RNA聚合酶对克隆在带有该酶启动子的载体SP64或SP65上的插入片段作体外转录, 可以得到单链RNA探针。

5. 利用AMV反转录酶, 制备cDNA探针。由于Bio-dUTP不能作为反转录酶的底物, 可以首先采用烯丙基标记的dUTP(AA-dUTP)代替dTTP作反转录, 得到AA-dUMP参入的cDNA, 再与活化生物素(生物素酰羟基丁二酰亚胺)作用, 即可将AA-dUMP转变为Bio-dUMP, 得到生物素标记的cDNA探针。

6. 利用DNA聚合酶I(Klenow片段)作引物延伸反应, 可以对化学合成的寡核苷酸探针加上生物素标记。由于寡核苷酸形成的双链稳定性(T_m值)受生物素基团的影响较大, 可以通过限制模板链5'端的长度以及所加底物核苷酸的种类, 使得每个探针分子的3'端仅仅加上一个生物素标记的核苷酸。为了提高标记的效率, 反应时应使模板链的浓度相对于引物链大大地过量。据报道, 用这种方法得到的长度为23个核苷酸的探针用于Southern

blot, 探测互补链的灵敏度达到 0.5fmol , 而且互补链上只需改变 5 个核苷酸, 即不能与探针杂交^[4]。

生物素标记的 DNA 和 RNA 探针保持了生物素与亲和素以及抗生物素的免疫球蛋白的专一性结合能力。而且经生物素标记后, 核酸的 T_m 值一般变化不大, 说明引入的生物素基团对双链配对的影响很小。这两个性质对于杂交以及杂交后的检测是不可缺少的。生物素标记探针的化学性质十分稳定, 在冰箱中存放数月、甚至数年仍不影响活性。但是生物素标记的探针溶液不能用酚抽提, 这一点在使用时必须注意。

三、杂交后的检测手段

生物素标记的核酸探针与互补序列杂交后, 有多种检测方法, 可以根据不同的实验对象及要求, 灵活地运用各种组织化学及免疫学手段, 以期达到最高的灵敏度和分辨率, 最低的背景。所用的探测系统不外乎荧光物质(如异硫氰酸荧光素 FITC)和酶(如碱性磷酸酯酶、酸性磷酸酯酶、过氧化物酶、葡萄糖氧化酶等)。为了提高灵敏度, 还可以采用各种生物反应放大方法, 例如将酶共价联接成多聚物分子, 或者采用中间抗体搭桥, 将探针上标记的每一个生物素分子所能产生的颜色或荧光信号放大许多倍。下面举两个例子加以说明。

1. 多聚碱性磷酸酯酶法, 即 ABAP 法 (Avidin-Biotin-Alkaline Phosphatase)^[5]。杂交后, 洗去多余的探针分子, 加入亲和素(或链霉亲和素), 这时每个生物素分子各结合一个亲和素分子。然后加入生物素标记的碱性磷酸酯酶多聚体(每个多聚体由若干个酶分子共价联接

而成), 由于亲和素分子有四个生物素结合部位, 因此每个亲和素可再结合三个酶的多聚体。最后加入底物 NBT (氮蓝四唑) 和 BCIP (5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸盐), 即可在杂交的位置呈现蓝紫色的反应产物。这种方法可用于滤膜上的杂交, 例如 Southern blot、菌落或噬菌斑的原位杂交等, 也可用于培养细胞或染色体的原位杂交。

2. 抗体搭桥过氧化物酶法 (Antibody Sandwich Peroxidase)。杂交后, 先加羊抗生物素抗体(第一抗体), 其次加生物素标记的兔抗羊抗体(第二抗体), 然后加预先制备好的亲和素与生物素标记的过氧化物酶的复合物(ABC 复合物), 最后加底物。由于每个第二抗体分子上可标记许多个生物素, 通过第二抗体与亲和素的中介搭桥作用, 大大增加了与探针分子上的生物素结合的酶分子数量, 从而提高了灵敏度。此法可用于培养细胞及染色体展片原位杂交。

四、应用举例

1. Southern blot

使用生物素标记的探针作 Southern blot 时, 电泳胶的处理、吸印转移、滤膜的烘烤固定、预杂交等, 都与使用 ^{32}P 标记探针的常规方法相同。不同之处主要在于杂交条件, 有以下两点应当注意:

(1) 为了补偿由于引入生物素标记造成 T_m 值略为降低的影响, 可将杂交液中甲酰胺的浓度由 50% 降低到 45%, 杂交后的洗涤条件也应略为温和一些, 可以适当提高洗涤液的离子强度, 降低洗涤的温度。

(2) DNA 双链复性的完全程度可通过 Cot 值来估计。在使用 ^{32}P 标记的探针时, 杂交液中高浓度的探针将导致曝光

后产生严重的背景,因此实际上只能使用很低的探针浓度,一般不超过10ng/ml,相应地就需要较长的杂交时间。而生物素标记的核酸探针与硝酸纤维素滤膜的非专一性结合能力很低,因此如果希望缩短杂交时间,只需提高探针浓度,甚至可高达1—2 μ g/ml。例如,选用700ng/ml的探针浓度探测人基因组中的单拷贝基因时,杂交一个小时,即可得到足够强的信号。

杂交后滤膜的染色,用ABAP法效果较好。为了防止滤膜对亲和素及碱性磷酸酯酶的非特异吸附造成的背景染色,在加入亲和素之前应先用较高浓度(3%)的牛血清白蛋白处理滤膜,预先饱和滤膜上可能非特异地吸附蛋白质分子的位点。

据报道,应用缺口移位法制备的生物素标记DNA探针,以ABAP法染色,可以检出pg数量级的DNA电泳带,也就是达到了能从高等真核生物的基因组中探测到单拷贝基因的灵敏度。目前,美国BRL公司已有了可供生物素标记探针的Southern blot实验使用的成套试剂供应,用法可参阅产品说明书或有关文献^[5]。经我们实验室里初步试用效果良好。同时应用³²P-dGTP及Bio-11-dUTP作缺口移位反应,制备³²P和生物素双重标记的探针,杂交后先用X光片作放射自显影,再用ABAP法对滤膜染色。染色后的滤膜上条带的清晰程度及检出灵敏度均优于放射自显影的结果。

2. 菌落及噬菌斑的原位杂交

将菌落或噬菌斑转移到滤膜上,裂解、变性等操作方法与使用³²P标记的探针基本相同。为了防止细菌及噬菌体的各种杂蛋白非特异地吸附亲和素,造成假阳性结果,在杂交之前必须增加一道步骤,用链霉蛋白酶(Pronase)或蛋白酶K(Proteinase K)处理滤膜,将杂蛋白降

解,然后将蛋白酶洗去。滤膜的杂交、洗涤及染色方法均与Southern blot相同。

3. 细胞及染色体的原位杂交^[6-9]

细胞及染色体的原位杂交是一种直接探测固定在玻片上的组织切片、单个细胞或染色体中特定的DNA或RNA序列的手段,其特点是保持了细胞或染色体的形态特征,因此只要有相应的DNA或RNA探针,就可能对特定的基因及其转录产物进行细胞水平或亚细胞水平的定位和定量测定,还可以探测感染细胞的病毒。

传统的原位杂交法使用同位素标记的探针,有其固有的缺点。由于感光乳胶层复盖于固定细胞之上,二者不在同一平面,而且乳胶层总有一定的厚度,同位素衰变时射出的粒子在乳胶中可形成一条径迹,这就大大影响了分辨率,不利于精确的形态学研究。为了尽可能避免这个缺点,一般都使用穿透力弱的同位素,如³H,来标记探针,这就使得所需的曝光时间长达数十天。而使用生物素标记的探针,则可以根本消除上述弊病。

利用生物素标记的探针进行细胞的原位杂交,关键是怎样在保持细胞的形态特征,并且防止细胞内源DNA、RNA渗漏出来的前提下,使细胞具有良好的通透性,以利于探针分子和染色所用的亲和素、抗体、酶等大分子物质进入细胞。提高细胞的通透性可以用蛋白酶消化或液氮冻融处理。由于不同细胞的性质差异很大,所以必须对所用的材料进行仔细试验,选择最佳的处理条件及染色方法,才能取得理想的结果。摸索条件时,可以采用原位缺口移位法(in situ nick translation),也就是在经过固定及提高通透性处理的细胞上加入DNA聚合酶I和Bio-11-dUTP,以及其余三种三磷酸脱氧核苷酸,直接以细胞核内的染色体DNA

作为模板来合成生物素标记的 DNA, 然后进行染色。如果看到细胞核被染上颜色而细胞质不着色, 就说明细胞的处理恰到好处, 染色的方法也是选择得当的。

4. 核酸序列分析

以生物素代替³²P 标记作核酸序列分析, 不论是化学降解法或末端终止法, 都有人作过成功的尝试。用化学法^[10]时, 可将电泳胶中的 DNA 片段转移、固定到尼龙滤膜上, 用待测 DNA 序列的一端作为模板合成生物素标记的单链 DNA 或 RNA 探针, 与滤膜杂交, 染色后即可显示出所有的电泳带, 读出待测序列。采用末端终止法时, 则可先合成生物素标记的 30 至 60 个核苷酸的 M13 引物, 与单链 M13 载体形成双链后, 按一般方法作末端终止合成, 电泳后, 将 DNA 转移到尼龙滤膜, 即可直接进行染色, 读出序列。

五、主要优点

与同位素标记法比较, 生物素标记法的主要优点是: 安全、经济、方便、快速。

生物素标记法不存在使用放射性同位素时必须考虑的人身防护、污染物处理以及半衰期的问题。生物素标记法所用的试剂价格低于同位素的价格。而且生物素标记的探针性质十分稳定, 一次制备后可以

长期使用; 如果是单链 DNA 或 RNA 探针, 由于杂交前无须再经加热变性, 杂交液还可以回收后重复使用。染色时所用的亲和素及多聚碱性磷酸酯酶溶液也都可以反复使用, 更进一步降低了成本。

如前所述, 采用生物素标记的探针作杂交时, 可以通过提高探针浓度来缩短杂交时间。另外, 杂交后的染色步骤一般也只需几个小时, 比起放射自显影所需的数十小时、甚至几个月来, 显然大大节省了时间。由于这两方面的因素, 使得进行一次 Southern blot 实验, 从处理电泳胶、吸印转移开始 (采用 Smith 和 Summers^[11]的方法, 吸印转移 3—4 小时), 到完成杂交、染色, 得出结果, 全部过程可以在一个工作日里完成。

由于生物素标记核酸技术具有上述突出的优点, 它不仅适用于生物工程、分子遗传学的理论研究, 尤其适合于作为临床医学上的常规化验手段, 用于遗传病的诊断, 致病细菌及病毒的鉴定等。目前各国研究人员对于推广这项新技术都十分重视, 前不久欧洲分子生物学组织 (EMBO) 和亚洲分子生物学组织 (AMBO) 分别为此举办了专题讲习班。根据我国的实际情况, 尽快地推广运用这项新技术, 组织生产有关的成套试剂, 更具有重大的意义。

参 考 文 献

- [1] Bayer, E.A. & Wilchek, M.: *Methods of Biochemical Analysis*, 26:1, 1980.
- [2] Ruth, J.L.: *DNA*, 3:123, 1984.
- [3] Langer, P.R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:6633, 1981.
- [4] Murasugi, A. & Wallace, R. B.: *DNA*, 3:269, 1984.
- [5] Leary, J.J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:4045, 1983.
- [6] Singer, R.H. & Ward, D.C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:7331, 1982.
- [7] Langer-Safer, P.R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:4381, 1982.
- [8] Brigati, D. J. et al.: *Virology*, 126:32, 1983.
- [9] Lawrence, J.B. & Singer, R.H.: *Nucleic Acids Res.*, 13:1777, 1985.
- [10] Church, G. M. & Gilbert, W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1991, 1984.
- [11] Smith, G.E. & Summers, M. D.: *Anal. Biochem.*, 109:123, 1980.
- [12] Forster, A. C. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 13:745, 1985.