

# 生物素核酸探针的制备及应用

何路红 阎大来 李季伦

(北京农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

随着重组 DNA 技术的兴起, 核酸杂交技术也有很大进展。已往的核酸杂交, 主要使用高比活放射性同位素标记的核酸探针以及放射自显影技术的检测手段。但由于放射性同位素半衰期短, 易扩散和放射性污染等问题, 各种非放射性标记探针及相应的检测方法相继出现, 其中生物素标记的核酸杂交技术比较成熟, 已在国内外得到推广应用。本文结合国内外研究进展及本实验室的应用情况, 介绍生物素核酸杂交技术的基本原理及使用方法。

## 一、基本原理

生物素 (Biotin) 是一种 B 族维生素, 能与抗生物素蛋白——亲和素 (Avidin) 或链霉亲和素 (Streptavidin) 特异性结合, 其解离平衡常数 ( $K_D$ ) 为  $10^{-15}$ , 每个亲和素分子由四个大小相同的亚基组成, 每个亚基都能专一性地识别一个生物素分子的脲基环部分, 当生物素的戊酸侧链通过酰胺键与其它分子相连后, 其脲基环仍保持与亲和素专一结合的能力, 因而可通过生物素的戊酸侧链与待测目标相连, 利用生物素与亲和素专一结合的特点, 加入与荧光物质或酶相偶联的亲和素, 去寻找被生物素标记的目标, 然后检测荧光或酶反应进而检测待测目标。这一原理最早用于细胞表面及内部蛋白质、脂类及糖类的检测和定位<sup>[1]</sup>。80 年代初用于核酸检测<sup>[2,3]</sup>。链霉亲和素与生物素专一结合的能力与亲和素相同, 但不含寡聚糖基, 且等电点为 6.0, 接近中性<sup>[4]</sup>。因此目前常用链霉亲和素代替亲和素, 以降低非特异性结合。图 1 显示了生物素标记的核酸探针检测靶 DNA 的基本原理。

生物素标记法的关键有两点: 即如何用生

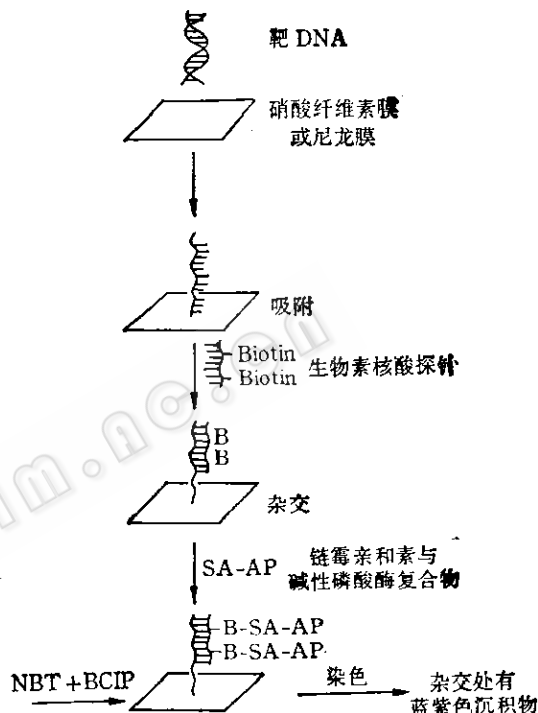


图 1 生物素标记的核酸探针检测靶 DNA 模式图

物素专一性地标记核酸探针及生物素核酸探针杂交后的检测方法, 前者要求掺入生物素后核酸探针的  $T_m$  值变化不大, 不影响杂交反应中互补双链的配对, 而后者则要求操作简便, 灵敏度高。下面分别介绍这两方面的方法原理:

### (一) 生物素核酸探针的制备

生物素标记核酸探针的方法有: 化学法<sup>[5]</sup>、光化学法及酶促法, 其中后两种方法常用, 简介如下:

1. 光化学法: 用能被可见光激活的生物素衍生物——光敏生物素 (Photoactivatable biotin, 简称 PAB, 其结构式见图 2<sup>[6]</sup>), 通过强的可见光照射, 即可将 PAB 上的叠氮基活化, 与 DNA 或 RNA 相连, 形成稳定的共价结合。大

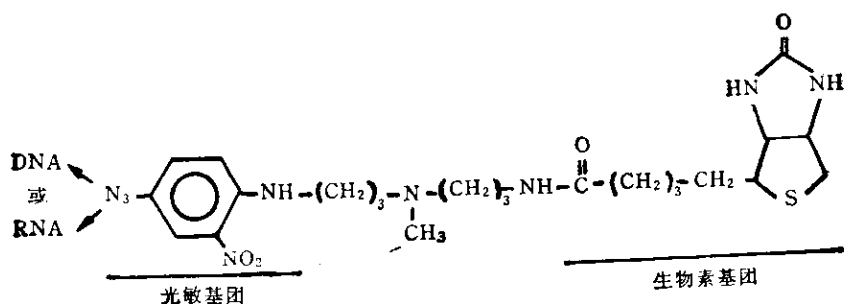


图 2 光敏生物素结构式

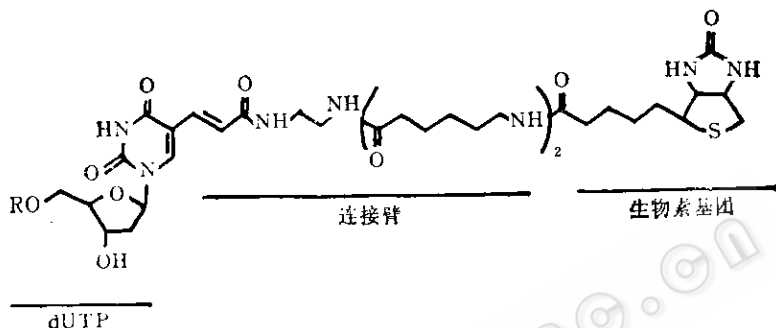


图 3 生物素核苷酸类似物结构式

约每 100—400 个碱基结合一个光敏生物素,这种掺入程度不影响互补双链的配对,因此可作为探针使用。

2. 酶促法: 酶促法是以生物素核苷酸类似物 (Bio-dNTP) 为底物,通过酶促反应将生物素掺入核苷酸中。酶促反应的底物主要有 Bio-7-dATP, Bio-11-dUTP, Bio-21-dUTP 等,其中的数字表示生物素与核苷酸之间连接臂的长度(主要原子个数),见图 3<sup>[3]</sup>。连接臂太短存在空间位阻现象,例如用 Bio-4-dUTP 标记的核酸探针无效,但连接臂长超过 11 个原子后,其长度对检测极限的影响尚无一致的结论<sup>[7]</sup>。根据反应中所用酶的不同,酶促法又包括以下几种方法:

(1) 缺口平移法 (Bio-Nick translation labeling): 该方法与同位素标记法相类似,只需将  $^{32}\text{P}$ -dNTP 换成 Bio-dNTP,标记强度为每千碱基掺入 10—30 个 Bio-dNTP<sup>[3]</sup>。

(2) 用随机引物 (Random primer) 制备生物素核酸探针: 随机引物标记 DNA 最初用于同位素法标记核酸探针<sup>[9]</sup>,后来发现也适用

于制备生物素核酸探针,其原理如下:以一种六聚寡核苷酸为引物,待标记的 DNA 片段为模板,加入 Bio-dNTP 和其它三种 dNTP,在 DNA 聚合酶 Klenow 片段催化下,作引物延伸反应,即可将生物素掺入核酸探针中。由于这种六聚寡核苷酸能与变性的 DNA 模板随机配对,因此在新合成链中, Bio-dNTP 掺入量很高,标记生物素探针可直接用于杂交反应,而不必除去未掺入的 Bio-dNTP。与 Bio-Nick 标记法相比,随机引物标记法有三个优点:①在标记反应中不需要加入核酸酶 (DNase I) 使 DNA 分子出现缺口,因此可用于小分子片段的标记;②由于标记物掺入率高,所以只需要少量的 DNA 模板 (20—200ng);③低熔点琼脂糖凝胶中的 DNA 片段不必回收,可直接作为模板<sup>[10]</sup>,这样大大减少了 DNA 模板量的损失,同时缩短了操作时间,这种标记法制备的生物素探针特别适用于从基因文库中筛选目的基因。

(3) 寡核苷酸 3' 末端标记法: 寡核苷酸探针能区分单一核苷酸点突变顺序<sup>[11]</sup>,可用于

分析含有单一碱基置换的基因,该方法主要利用 DNA 末端转移酶将 Bio-dNTP 直接加到寡核苷酸的 3'-末端上,也可用 Klenow 片段作引物延伸反应,进行 DNA 3'-末端标记。

(4) 用 PCR 方法制备生物素核酸探针: Bio-dNTP 还可作为 Taq 酶的底物,经聚合酶链反应 (PCR) 掺入 DNA 模板中<sup>[12]</sup>,掺入 Bio-dNTP 后,PCR 产物的电泳迁移率降低。

除了以上介绍的几种制备方法外, Bio-dNTP 还可作为 RNA 聚合酶的底物,通过体外转录得到 RNA 探针。制备 Bio-cDNA 探针则比较复杂<sup>[13]</sup>。

## (二) 生物素核酸探针的检测

生物素核酸探针与互补序列杂交后,杂交位点可用多种方法检测,常用的有:① 通过与亲和素——异丁烯酸盐的结合,在电泳下观察;② 与亲和素——荧光染料结合,在紫外光下检测;③ 与亲和素——过氧化物酶结合,通过过氧化物酶对 DAB (3,3'-二氨基联苯胺) 或 EAC (乙基氨基咔唑) 的催化反应,显色观察;④ 与亲和素——碱性磷酸酶结合,通过碱性磷酸酶对 NBT (氮蓝四唑) 和 BCIP (5'-溴-4'-氯-3'-吲哚磷酸盐) 的催化反应(产生蓝紫色斑点) 显色观察等等。以上方法的检测灵敏度分别为:② 1ng DNA ③ 150—200pg DNA ④ <100pg DNA<sup>[3]</sup>。如果将偶联的酶共价连接成多聚体或采用中间抗体搭桥,将生物反应放大,可使探针上标记的每个生物素分子所产生的颜色或荧光信号放大许多倍,如用多聚碱性磷酸酶可使检测灵敏度提高到 1-2pgDNA<sup>[14]</sup>。

近两年来,人们就进一步提高检测灵敏度及简化检测程序又开展大量的工作,主要进展如下:

1. 建立新的碱性磷酸酶检测反应,即用 PPD, 4-methoxy-4-(3-phosphatophenyl) spiro [1,2 dioxethane phosphate] 代替 NBT 和 BCIP 作为碱性磷酸酶的底物,PPD 在该酶的催化作用下脱磷酸,同时放出光波,因此可用光度计或普通 X-光片显影进行检测,灵敏度达到 0.1pg DNA<sup>[15]</sup>,达到同位素探针检测限。据美

国生命技术公司 (Life Technologies) 介绍, PPD 在碱性磷酸酶催化下,5—20 小时内发光强度即可达到高峰,因此大大缩短了 X-光片显影的时间,在此期间发光强度基本不变(图 4),每个发光反应位点可多次曝光,制成多个拷贝,便于保存。

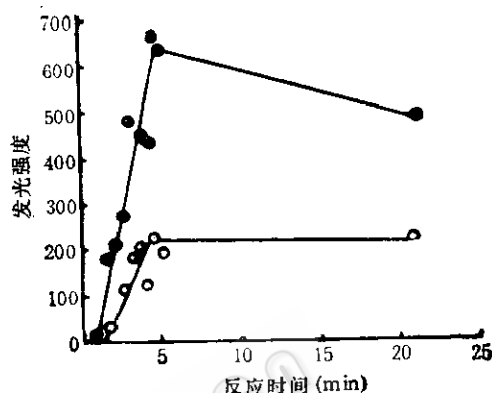


图 4 PPD 在碱性磷酸酶催化下的发光强度时间曲线  
●: 1pg Bio-DNA ○: 0.5pg Bio-DNA

2. 用生物素标记的 RNA 探针检测靶 DNA: 与 DNA 探针不同, RNA 探针是链特异性的,而且 RNA 探针与靶 DNA 形成的杂交链 RNA/DNA 比 DNA/DNA 稳定,因此用 RNA 探针可缩短杂交时间,并能更严格地控制杂交后的洗膜条件,杂交后用 RNase 处理滤膜,可进一步降低本底,该方法可检测到 pg 级靶 DNA<sup>[16]</sup>。

3. 用 TMAC 1 洗膜的快速杂交法<sup>[17]</sup>: TMACI (Tetramethylammonium chloride) 可使生物素寡核苷酸探针的解链温度不受其 GC 含量的影响,因此可在同一温度下同时严格洗涤经多个长度相同的寡核苷酸探针分别杂交后的滤膜。

4. 通用探针系统 (Universal probe system)<sup>[18]</sup>: 该系统由两个单链 DNA 探针组成: ① 第一探针 (Primary probe) 是与靶 DNA 有互补序列的单链 DNA,制备的方法是将该段序列克隆到质粒 pUCf1 上,该质粒在帮助噬菌体 (Helper phage) M13K07 的感染下,产生单链 DNA; ② 第二探针 (Secondary probe),它是与第一探针载体有互补序列并用生物素标记的单链 DNA,即 pUCRf1-Biotin,因此通

过两步杂交, 然后检测生物素即可检测靶 DNA。第二探针 pUCrf1-Biotin 可用于检测任何克隆在 pUC 及其衍生质粒载体上的第一探针, 避免了分别标记不同的探针。后来, 为了简化生物素检测程序的繁琐性, 人们将可检测的蛋白(如碱性磷酸酶)直接标到第二探针上<sup>[19]</sup>, 并用发光底物及 X-光片自显影技术, 使检测灵敏度大大提高, 甚至优于同位素探针<sup>[20]</sup>。

5. 用单克隆抗体检测 RNA/DNA 杂交链<sup>[7]</sup>: 首先用生物素 DNA 探针与待测样品在液相中杂交, 然后用抗生物素抗体将杂交链吸附在测试板上, 再用抗 DNA/RNA 杂交链的酶标单抗检测杂交链, 该方法适用于检测临床样品中的 RNA 病毒, 检出限为每毫升 10pgRNA。

## 二、具体操作

一般可参阅产品应用指南, 此处仅结合本实验室的实际应用提供如下注意事项供参考。

### (一) 制备生物素核酸探针

生物素标记的核酸探针可经乙醇沉淀或 Sephadex-G50 柱层析纯化(G50 柱应预先用 50—100ng 变性的鱼精 DNA 饱和, 以减少柱对探针的吸附), 除去未掺入的 Bio-dNTP, 但不能用酚抽提, 因为生物素核酸能溶于苯酚中。制备好的生物素核酸探针, 贮于 -20℃ 冰箱中可保存一年以上; 另外, 用过的生物素核酸探针贮于 4℃, 可重复使用, 用前将含有探针的杂交液于沸水浴中变性 5 分钟, 立即置于冰浴中即可。切记不能用碱变性法处理生物素核酸探针, NaOH 能破坏生物素核苷酸探针。本实验室制备的生物素核酸探针至少可重复使用 3—4 次, 对杂交结果无明显影响。

### (二) 杂交条件的选择

杂交前电泳胶的处理, DNA 的吸印转移, 滤膜的烘烤固定及菌落或噬菌斑的转移, 裂解, 变性同 <sup>32</sup>P-探针的常规方法<sup>[21]</sup>。应注意下列几点:

#### 1. 杂交前膜的处理

(1) 用生物素核酸探针进行 Southern-Blot 和 Dot-Blot 时, 在预杂交前增加洗膜(50

mmol/L Tris · Cl pH8.0, 1mol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, 0.1% SDS, 42℃ 洗 30 分钟), 可减少本底。

(2) 菌落及噬菌斑原位杂交: 为了防止细菌及噬菌体的各种杂蛋白非特异性地吸附亲和素, 导致假阳性, 杂交前需增加用蛋白酶 K 处理(200 μg/ml 37℃ 预热的蛋白酶 K 溶液, 37℃ 处理 1 小时), 将杂蛋白降解, 然后洗去蛋白酶溶液; 对菌落杂交, 最好在蛋白酶 K 处理后再用氯仿处理(100ml 氯仿浸泡滤膜), 进一步除去细菌蛋白的干扰。

#### 2. 杂交体系的选择

(1) 甲酰胺体系: 生物素掺入核酸探针后, 探针与靶 DNA 杂交的  $T_m$  值略有下降<sup>[22]</sup>, 为了补偿  $T_m$  值的降低, 将杂交液中甲酰胺浓度降为 45%, 控制杂交温度为 42℃。

(2) 无甲酰胺体系: 一般在 60℃ 预杂交和杂交, 杂交时加入热变性的 1—200ng/ml 生物素探针。

(3) 生物素寡核苷酸探针的杂交条件可参照文献<sup>[22, 23]</sup>。

杂交后洗膜(洗去未杂交上的生物素探针)条件的关键是控制洗膜温度, 一般先在室温下进行, 然后在 50℃ 中洗半小时。由于生物素探针与硝酸纤维素膜的非特异性结合低于 <sup>32</sup>P-探针, 因此可以提高杂交液中生物素探针的浓度(100—200ng/ml 甚至 1—2 μg/ml), 而不会导致强的本底出现。如果在杂交液中加入 5% 硫酸葡聚糖, 可提高探针的有效浓度, 缩短杂交时间(硫酸葡聚糖为大分子物质, 需先配成 50% 母液, 加热溶解后备用)。

以上各体系的杂交反应可在较厚的国产食品塑料袋中进行, 含探针的杂交液回收后贮于 4℃ 冰箱中, 可重复使用 3—4 次; 一般每 100cm<sup>2</sup> 滤膜需杂交液 10ml。

### (三) 杂交后的检测

此处仅介绍最常用的 Biotin-streptavidin-Alkaline phosphatase 系统检测法。

1. 膜的封闭: 为了防止滤膜对链霉亲和素及碱性磷酸酶的非特异性吸附, 加入链霉亲和

素之前,先加 3% BSA 或 1% 白明胶,预先饱和滤膜上可能非特异地吸附蛋白的位点。封闭液回收后可重复作用。

2. 加入链霉亲和素-碱性磷酸酶混合物,所加酶量可根据产品浓度适当稀释,此时该混合物被吸附到滤膜上结合有生物素探针的位点处。

3. 洗膜:用含有非离子去污剂的 Tris-NaCl 溶液洗涤滤膜(0.1mol/L Tris · Cl pH7.5, 0.2mol/L NaCl, 0.05% Triton X-100, 或 0.2mol/L Tris · Cl pH7.5, 0.5mol/L NaCl, 0.05% Tween-20) 洗去未被吸附的酶混合物。

4. 染色:碱性磷酸酶对 NBT 和 BCIP 的催化反应在 pH9.5 时进行,故先用 pH9.5 的溶液稀释 NBT 和 BCIP,再加入到滤膜上。BCIP 和 NBT 在碱性磷酸酶催化下形成蓝紫色不溶性物质,故滤膜上吸附有碱性磷酸酶亦即吸附有生物素探针的位置上就会出现蓝紫色杂交斑点。染色反应非常迅速,一般加入 NBT 和 BCIP 后 2—5 分钟即显色,较弱的信号需 3—4 小时(暗处反应)。膜在 80℃ 烘干保存,滤膜干燥后杂交信号减弱,加水润湿可使信号基本恢复。

以上各步均可在塑料袋中进行,如能温和振荡,效果更好。如需重新染色,可用 N, N-二甲基甲酰胺(注意有毒)于密闭容器中 60—65℃ 洗膜,每 15 分钟换一次溶液,直至蓝紫色褪去为止,取出滤膜,凉干,然后再重新染色(从封闭开始)。

### 三、小 结

综上所述,生物素标记的核酸探针主要有以下优点:

1. 无需考虑人身防护、污染物处理及半衰期问题。

2. 生物素探针性质稳定,一次制备后可长期使用(一年以上),杂交液可重复使用,降低了

成本。

3. 用新的检测系统,灵敏度达到同位素的水平(0.1pg),而且操作快速、安全,更适合于现代分子生物学研究。

生物素核酸探针可用于细菌或噬菌斑的原位杂交,斑点及 Southern 印迹杂交,检测真核生物单拷贝基因、病毒 DNA 及 RNA 检测,一些遗传病诊断, DNA 限制性内切酶谱多态性分析及核苷酸序列分析等诸多方面。随着检测手段的不断改进,生物素核酸探针必定有更广阔的应用前景。

### 参 考 文 献

1. Wilchek M et al.: *Anal. Biochem.*, 171: 1—32, 1988.
2. Broker T R et al.: *Nucleic Acids Res.*, 5: 363—384, 1978.
3. Langer P R et al.: *PNAS USA*, 78: 6633, 1981.
4. Haeuptle M T et al.: *J. Biochem.*, 258: 305, 1983.
5. Turchinsky M F et al.: *Mol. Biol.*, 22: 1545—1553, 1988.
6. Forster A C et al.: *Nucleic Acids Res.*, 13(3): 745—761, 1985.
7. Countee F et al.: *Anal. Biochem.*, 181: 153—162, 1989.
8. Vener T I et al.: *Anal. Biochem.*, 198: 308—310, 1991.
9. Feiberg A P et al.: *Anal. Biochem.*, 132: 6—13, 1983.
10. Feinberg A P et al.: *Anal. Biochem.*, 137: 266—267, 1984.
11. Murasugi A et al.: *DNA* 3(3): 269—277, 1984.
12. Lo Y M D et al.: *Nucleic Acids Res.*, 16: 8719, 1988.
13. 何笑松: 生物工程学报, 2(1): 10—14, 1986.
14. Leary J J et al.: *PNAS USA*, 80: 4045—4049, 1983.
15. Pollard-knight D et al.: *Anal. Biochem.*, 185: 353—358, 1990.
16. Folsom V et al.: *Anal. Biochem.*, 182: 309—314, 1989.
17. Sorg U et al.: *Nucleic Acids Res.*, 19(17): 4782, 1991.
18. Nakagami S et al.: *Anal. Biochem.*, 192: 11—16, 1991.
19. Nakagami S et al.: *Anal. Biochem.*, 198: 75—79, 1991.
20. Cate R L et al.: *GATA*, 8(3): 102—106, 1991.
21. Sambrook J et al.: *Molecular Cloning*, CSH Lab. Press, 1989.
22. Jablonski E et al.: *Nucleic Acids Res.*, 14: 6115, 1986.
23. 吴冠芸等: 基因诊断, 第 175 页, 人民卫生出版社, 北京, 1988.