

## $^{125}\text{I}$ 标记病毒 DNA 探针制备方法的研究

谌济国\* 吴远明

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉430071)

### 提 要

本文报道以油桐尺蠖核型多角体病毒 (BsNPV) DNA、单纯疱疹病毒 (HSV) DNA、 $\lambda$  DNA 为材料, 用国产  $^{125}\text{I}$ -碘化钠制备探针。探讨了离子强度、pH 值、反应温度及时间诸因素对以三氯化铊为氧化剂核酸标记的影响。在 pH 值为 4.8—4.9, 离子强度 (以  $\text{Na}^+$  计) 为 0.1 mol/L、反应温度为 70°C、时间为 30 分钟条件下, 可获得高比活性的产物。 $^{125}\text{I}$  的掺入率在 10—30% 之间, 探针的比活性可超过  $10^6 \text{cpm}/\mu\text{gDNA}$ 。点杂交结果显示, 探针最低可检测出 1 pg 同源 DNA, 探针的特异性强, 存放于 -20°C 冰箱的探针在两个月内最低检测量没有明显变化。

**关键词:**  $^{125}\text{I}$ -碘化钠 油桐尺蠖核型多角体病毒 (BsNPV) DNA 单纯疱疹病毒 (HSV) DNA  $\lambda$  DNA 探针

随着分子生物学的迅速发展, 核酸杂交技术已广泛应用于各种病毒的检测和理论研究中。目前核酸探针基本上是应用缺口翻译法  $^{32}\text{P}$  标记而成的。其制备较复杂, 需多种工具酶, 价格昂贵, 而且半衰期短, 因而在实际应用中受到一定限制。

核酸的体外  $^{125}\text{I}$  直接标记法由 Commerford 于 1971 年首次建立<sup>[1]</sup>。此方法通过  $^{125}\text{I}$ -碘化钠在三氯化铊参与下与核酸链中胞嘧啶形成稳定的共价化合物——5-碘-胞嘧啶而使  $^{125}\text{I}$  掺入核酸链中。此过程不明显改变核酸的分子量、溶解曲线及复性能力, 而伴随着在 CsCl 中密度梯度的增加及紫外吸收波长的增加。随后, Getz<sup>[2]</sup>、Prensky<sup>[3]</sup>、Tereba<sup>[4]</sup>、Scherber<sup>[5]</sup> 等人分别将此技术应用于 DNA、RNA 及某些病毒核酸的标记中。

国产同位素  $^{125}\text{I}$ -碘化钠比活性较低, 又含有 0.1 mol/L NaOH 以及小包装还含有还原剂等因素, 因此反应条件与文献报道不尽相同。本文以三种病毒 DNA 为材料, 报道在使用国产  $^{125}\text{I}$ -碘化钠条件下制备 DNA 探针的最适反应条件, 以求该技术得以广泛应用。

## 材 料 与 方 法

### 一、试剂

1.  $^{125}\text{I}$ -碘化钠: 北京原子能研究所产品。
2. 三氯化铊: 西德 E. Merck 产品。

本文于 1990 年 1 月 16 日收到

\* 现在地址, 江西医学院微生物教研室, 邮编 330006。

3. Sephadex G50: Pharmacia产品。
4. 油桐尺蠖核型多角体病毒 (*Buzura suppressaria* NPV) DNA: 提取方法见后述。
5. 单纯疱疹病毒 (*Herpes Simplex Virus*, HSV) DNA EcoRI A片断: Huang, E.S. 提供。
6.  $\lambda$ DNA: 中国科学院上海生物化学所产品。
7. 小牛胸腺DNA: 华美公司产品。

### 二、油桐尺蠖核型多角体的提纯及 DNA 的抽提

多角体的提纯参考 Summers<sup>[6]</sup> 方法进行。BsNPV 感染致死的油桐尺蠖虫尸匀浆液经三层纱布过滤后, 差速离心去细胞碎片等杂质, 经 PBS、生理盐水及 0.1% SDS 交替洗涤, 然后置 40—60% (w/w) 蔗糖梯度上, 4000r/m 离心 30 分钟, 收集多角体带, 经洗涤沉淀后的提纯多角体贮存于 4℃ 冰箱备用。

BsNPV DNA 的抽提参照李敏棠<sup>[7]</sup> 方法进行。多角体经碱解后加 SDS 至终浓度 1%, 苯酚和氯仿抽提, 无水酒精沉淀 DNA, 最后用 TE (50mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH7.0) 溶解, 分装后置于 -20℃ 冰箱保存备用。

### 三、DNA 探针的制备

透析过的 DNA 先经 100℃ 水浴变性 10 分钟后, 迅速冷却至 0℃ 使之成为单链。反应总体积为 100 $\mu$ l, 含 2 $\mu$ g DNA, 0.24mmol/L KI, 2mCi Na<sup>125</sup>I, 10 $\mu$ l 0.04% 溴甲酚绿, 不同浓度的醋酸缓冲液, 用 1mol/L 醋酸调至所需 pH 值后, 最后加入终浓度为 1.5mmol/L TiCl<sub>3</sub> (新鲜配制)。反应混合物置于不同温度 (60℃ 及 70℃) 水浴中保温一定时间后 (15—40 分钟), 置于冰浴中, 加入 25 $\mu$ l 0.1mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (新鲜配制) 以还原过剩的 TiCl<sub>3</sub>, 加 50 $\mu$ l 1mol/L NH<sub>4</sub>Ac-0.5mol/L NH<sub>4</sub>OH 使 pH 升高到 9 以中止反应, 然后在 60℃ 水浴中保温 15 分钟。

反应混合物经 TE (50mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH7.0) 平衡过的 Sephadex G50 (Medium) 柱 (柱床体积  $\Phi$ 4 × 190mm) 层析。上样后, TE 洗脱, eppendorf 管收集, 每管 3 滴 (约 200 $\mu$ l), 共 20 管。用 FT-603 井型  $\gamma$  闪烁探头及 FH-408 自动定标器 (定标器电压 0.6V, 10 秒计数) 测定每管放射性强度。出现的第一个峰为 <sup>125</sup>I 标记 DNA 峰, 第二个峰为未标记的游离 <sup>125</sup>I。

### 四、DNA-DNA 斑点杂交 参考 Maniatis<sup>[8]</sup> 方法。

#### 1. 样品的处理及点样

样品 DNA 经 100℃ 水浴变性后用 6 × SSC 稀释成不同浓度, 直接点于硝酸纤维素膜上。

BsNPV 感染致死的油桐尺蠖虫尸匀浆液经碱解后稀释成不同浓度依次点到硝酸纤维素膜上。晾干后经变性液 (0.5mol/L NaOH, 1.5mol/L NaCl) 室温变性 20 分钟后, 用中和液 (1mol/L Tris-HCl, 1.5mol/L NaCl, pH7.0) 中和 2—3 次, 每次 30 分钟。

点样后的硝酸纤维素膜晾干后, 80℃ 干燥固定 2 小时。

#### 2. 预杂交

硝酸纤维素膜放入塑料袋中, 加入 5—10ml 预杂交液 (5 × Denhardt's solution, 6 × SSC, 0.5% SDS, denatured calf thymus DNA 100 $\mu$ g/ml), 封口后 68℃ 水浴中预杂交 6 小时以上。

#### 3. 杂交

倾去预杂交液, 加入杂交液 (5 × Denhardt's solution, 6 × SSC, 0.5% SDS, 0.1mol/L EDTA, 25mmol/L PBS (pH7.2), denatured calf thymus DNA 100 $\mu$ g/ml, denatured DNA probe (10<sup>7</sup>cpm/ml)。封口后 68℃ 水浴中杂交 48 小时。

4. 洗膜 硝酸纤维素膜置于平皿中, 倒入洗膜液 (2 × SSC, 0.5% SDS, 1 × Denhardt's solution), 室温下洗两次 (5 分钟和 10 分钟), 68℃ 水浴中洗两次 (每次 1 小时), 室温下晾干。

5. 放射自显影 硝酸纤维素膜用薄膜包好后, 在暗室中将膜的两边各夹一张X光片, 固定, 放入增感屏内, 放射自显影7~15天。

## 结 果

### 一、离子强度对标记的影响

反应混合物总体积100 $\mu$ l 含2 $\mu$ g DNA、2mCi Na<sup>125</sup>I、0.24mmol/L KI、1.5mmol/L TiCl<sub>3</sub>, 醋酸缓冲液浓度分别为0.02mol/L, 0.05mol/L, 0.1mol/L, 0.2mol/L及0.5 mol/L, pH4.7, 60 $^{\circ}$ C保温30分钟后的标记结果, 如图1所示。

根据曲线可以看出, 醋酸缓冲液浓度在0.05—0.2mol/L之间较为适宜, 而以0.1 mol/L为最适反应条件。

### 二、反应 pH 值对标记的影响

反应混合物100 $\mu$ l 含2 $\mu$ g DNA、2mCi Na<sup>125</sup>I、0.24mmol/L KI、1.5mmol/L TiCl<sub>3</sub>, 0.1mol/L HAc-NaAc buffer, 10 $\mu$ l 0.04%溴甲酚绿(变色范围pH3.8—5.4, 黄—蓝)在不同pH条件下60 $^{\circ}$ C保温30分钟后的标记结果, 如图2所示。从图中可看出, 标记时反应混合物的pH值应控制在4.5—5.0之间, 当pH值为4.8—4.9时达到最大值。

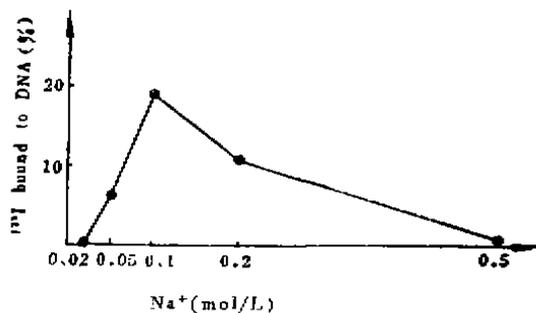


图1 离子强度对 DNA 标记的影响

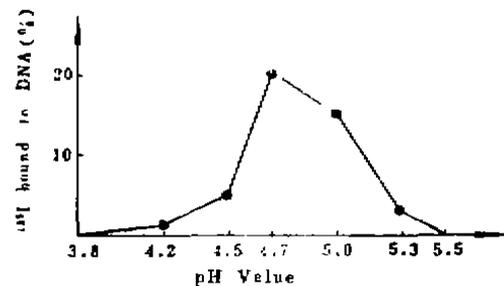


图2 反应 pH 值对 DNA 标记的影响

Fig 1 The influence of ionic strength on DNA labeling Fig 2 The influence of pH on DNA labeling<sup>8</sup>

### 三、反应温度及时间对标记的影响

反应混合物100 $\mu$ l 含2 $\mu$ g DNA、2mCi Na<sup>125</sup>I、0.24mmol/L KI、1.5mmol/L TiCl<sub>3</sub>, 0.1mol/L HAc-NaAc buffer, 10 $\mu$ l 0.04%溴甲酚绿, pH值4.8—4.9, 分别于60 $^{\circ}$ C和70 $^{\circ}$ C保温30分钟, 结果如下。

表1 反应温度对 DNA 标记的影响  
Table 1 The influence of temperature on DNA labeling

温 度( $^{\circ}$ C)	<sup>125</sup> I 掺入率(%)	探针比活 (cpm/ $\mu$ gDNA)
Temperature( $^{\circ}$ C)	Percentage of <sup>125</sup> I bound(%)	Probe specific activity (cpm/ $\mu$ g DNA)
60	18.3	$4.0 \times 10^8$
70	28	$6.2 \times 10^8$

结果显示, 在70 $^{\circ}$ C条件下, <sup>125</sup>I 的掺入率约为60 $^{\circ}$ C条件下的1.5倍。

相同条件下的反应混合物于70°C分别保温15、30及40分钟, 结果与Commerford<sup>[1]</sup>报道基本相同, 即保温30分钟后, <sup>125</sup>I 掺入率不再有明显增加。

#### 四、最适反应条件下的 DNA 洗脱曲线

反应混合物100 $\mu$ l 含2 $\mu$ g DNA, 2mCi Na<sup>125</sup>I, 0.24mmol/L KI, 1.5mmol/L TiCl<sub>3</sub>, 0.1mol/L HAc-NaAc buffer, pH4.8—4.9, 10 $\mu$ l 0.04% 溴甲酚绿, 70°C 保温30分钟, 反应中止后, 经 Sephadex G50 柱分离, 测定每管洗脱液放射性强度, 并换算成每分钟计数(cpm), 结果如表2及图3所示。

表2 反应混合物的Sephadex G50柱层析

Table 2 Sephadex G50 chromatography of reaction mixture

tube			tube				
CPM			CPM				
No.	Bs NPV DNA	HSV DNA	$\lambda$ DNA	No.	Bs NPV DNA	HSV DNA	$\lambda$ DNA
1	"	"	"	11	$3.4 \times 10^6$	$1.3 \times 10^8$	$2.0 \times 10^4$
2	"	"	"	12	$7.2 \times 10^6$	$2.7 \times 10^8$	$5.7 \times 10^4$
3	$2.4 \times 10^4$	$1.7 \times 10^4$	$2.7 \times 10^7$	13	$9.0 \times 10^6$	$7.1 \times 10^8$	$9.4 \times 10^4$
4	$8.2 \times 10^4$	$5.1 \times 10^4$	$4.7 \times 10^7$	14	$6.0 \times 10^6$	$10 \times 10^8$	$8.3 \times 10^6$
5	$1.8 \times 10^4$	$1.0 \times 10^8$	$7.6 \times 10^8$	15	$2.6 \times 10^4$	$8.1 \times 10^8$	$4.5 \times 10^4$
6	$1.6 \times 10^7$	$1.6 \times 10^7$	$6.3 \times 10^7$	16	$9.2 \times 10^7$	$3.1 \times 10^8$	$1.6 \times 10^4$
7	"	"	"	17	$3.2 \times 10^7$	$1.2 \times 10^8$	$5.7 \times 10^7$
8	"	"	"	18	$1.4 \times 10^7$	$4.9 \times 10^7$	$2.7 \times 10^7$
9	"	"	"	19	$1.1 \times 10^7$	$1.9 \times 10^7$	$1.6 \times 10^7$
10	$1.1 \times 10^8$	$.3 \times 10^7$	$3.8 \times 10^7$	20	"	"	$1.7 \times 10^4$

"——本底计数

按最适反应条件标记, 探针的比活性稳定在  $1 \sim 5 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g DNA, 最高可达  $6.3 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g DNA。

#### 五、探针灵敏度

BsNPV DNA 及 HSV DNA 变性后稀释成不同浓度, 与探针进行点杂交, 结果见图4、图5所示, 在1pg处仍可显示出杂交斑点。

#### 六、探针特异性

BsNPV 感染致死的油桐尺蠖虫尸匀浆液经碱解变性后按10倍稀释, 分别点于硝酸纤维素膜上, 茶毛虫核型多角体病毒(EpNPV)经碱解变性, HSV DNA 及  $\lambda$  DNA 经变性后, 按每点1 $\mu$ g的量点于硝酸纤维素膜上, 与BsNPV DNA 探针杂交, 结果如图6所示, 证明BsNPV DNA 探针可实际应用, 并具有特异性。

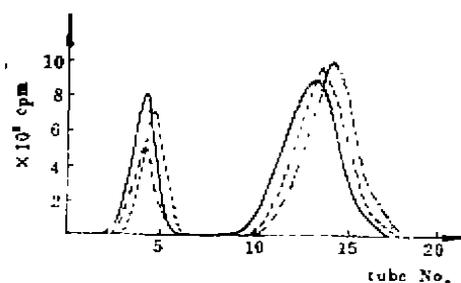


图3 Sephadex G50 柱分离标记DNA  
Fig 3 Sephadex G50 chromatography of reaction mixture —: BsNPV DNA  
---: HSV DNA .....:  $\lambda$  DNA

制备的探针经 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存60天后,进行点杂交,经7天放射自显影后,斑点不明显,继续延长至15天后,仍可检测到2pg DNA。

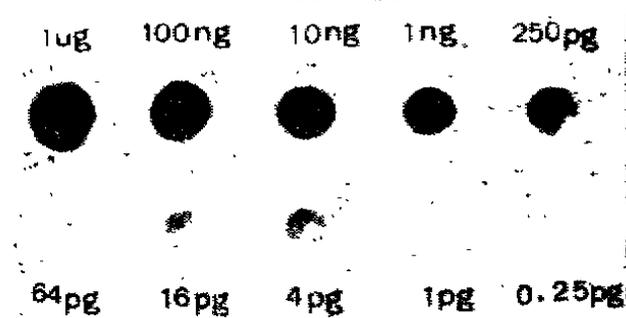


图4 BsNPV DNA 探针点杂交结果

Fig 4 Dot hybridization with BsNPV DNA probe

10ng 1ng 100pg 10pg 1pg



图5 HSV DNA 探针点杂交结果

Fig 5 Dot hybridization with HSV DNA probe

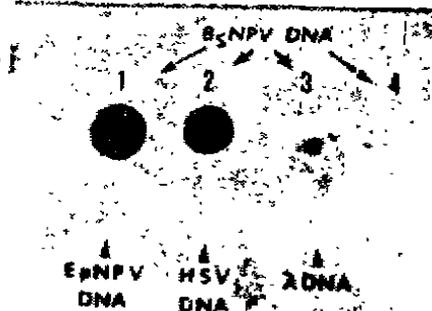


图6 BsNPV DNA 探针特异性杂交结果

Fig 6 Speciality of BsNPV DNA probe

## 讨 论

为了获得高比活性的 DNA 探针,标记时必须注意几个关键因素:(1)碘离子(包括放射性 $^{125}\text{I}^-$ 与非放射性 $\text{I}^-$ )与核酸内胞嘧啶的分子比率应为1:1左右,放射性 $^{125}\text{I}^-$ 与非放射性 $\text{I}^-$ 的分子比率应为1:21。 $\text{TlCl}_3$ 与碘离子的分子比率应为6:1。我们曾将 $^{125}\text{I}^-$ 与 $\text{I}^-$ ,以及 $\text{TlCl}_3$ 与 $\text{I}^-$ 的分子比率分别增加到1:2.5及20:1进行标记,结果并不理想。此外, $\text{TlCl}_3$ 的纯度也起着很重要的作用,并应在使用前临时配制,配制过夜的 $\text{TlCl}_3$ 溶液会产生沉淀,对标记效果有很大的影响。对此实验结果表明,使用 $\text{HAc-NaAc}$ 缓冲液( $\text{pH}5.0$ )配制的 $\text{TlCl}_3$ 溶液与蒸馏水配制的效果相同,这一点与文献<sup>[9]</sup>报道不符。(2)反应 $\text{pH}$ 值对标记有很大的影响,最适反应条件下的 $\text{pH}$ 值应在4.8—4.9之间,这一点与文献<sup>[10]</sup>报道( $\text{pH}4.7$ )略有差异。我们还注意到,标记反应结束时反应液的 $\text{pH}$ 值有所下降,其可能原因是由于碘离子被氧化形成 $\text{I}_2$ ,进而生成 $\text{HIO}_3$ ,同时 $\text{TlCl}_3$ 被还原。(3)反应液的离子强度应尽可能低,以防止标记反应过程中DNA的复性。由于国产同位素 $^{125}\text{I}$ 的比活较低,一次反应用量较多,因此反应液的离子强度不容易控制在很低的水平。同时,缓冲液浓度太低,其缓冲能力下降,从而 $\text{pH}$ 值不容易维持在最适水平。根据我们的实验结果,缓冲液( $\text{HAc-NaAc}$  buffer)的浓度控制在0.1

mol/L 左右较为适宜, 这一点与文献<sup>[10]</sup>报道 (1mol/L HAc-NaAc buffer) 有很大差异。此外, DNA 标记前应先变性成单链状态。双链 DNA 的 <sup>125</sup>I 掺入率很低, 大约只有单链 DNA 的 5%<sup>[11]</sup>。

我们所制备的 DNA 探针的比活性超过 10<sup>8</sup>cpm/ $\mu$ g DNA, 达到 <sup>32</sup>P-缺口翻译法标记的水平<sup>[11]</sup>, 超过目前所见文献报道<sup>[12]</sup>, 但由于 <sup>125</sup>I 标记探针的复性能力稍为降低, 因而其检测灵敏度尚达不到 <sup>32</sup>P 标记探针的水平。尽管如此, 由于 DNA 的 <sup>125</sup>I 标记法既简便又直接, 而且 <sup>125</sup>I 的半衰期(60 天)比 <sup>32</sup>P 要长约 4 倍, 因而比 <sup>32</sup>P 标记探针更具有实用价值。

### 参 考 文 献

- (1) Commerford, S.L., 1971, *Biochemistry*, 10: 1993—2000.
- (2) Getz, M.J. et al., 1972, *Biochem. Biophys. Acta*, 287: 485—497.
- (3) Prensny, E. et al., 1973, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70: 1860—1864.
- (4) Tereba, A. et al., 1973, *Biochemistry*, 12: 4675—4679.
- (5) Seherberg, N.H., 1974, *J. Biol. Chem.*, 249: 2143—2150.
- (6) Summers, M.D. et al., 1976, *J. Virol.*, 17: 962—972.
- (7) 李敏棠, 1981, *科学通报*, 22: 1391.
- (8) Maniatis, T. et al., 1982, *Molecular Cloning*, 309—363.
- (9) Huang, E.S. et al., 1977, *Methods in Virology*, Academy Press N.Y., 457—497.
- (10) 蔡良婉, 1987, *核酸研究技术*, 234—245.
- (11) Kelly, R.G. et al., 1970, *J. Biol. Chem.*, 245: 39.
- (12) 钟雄林等, 1989, *微生物通报*, 16: 98—100.

## Studies on the Methods of Preparation of <sup>125</sup>I-Labeling Viral DNA Probes

Chen Ji-guo\* Wu Yuang-ming

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

By using BsNPV DNA, HSV DNA and  $\lambda$ DNA, the paper reported the results of the influence of ionic strength, pH value, reaction temperature and time on the labeling process of DNA with radioactive iodine in the presence of thallic chloride. When pH value was 4.8—4.9, ionic strength ( $\text{Na}^+$ ) was 0.1mol/L, the temperature was 70°C and the reaction time was 30 minutes, very high specific activity can be yielded. The percentage of <sup>125</sup>I bound to DNA is 10—30% and the specific activity of DNA probe is over 10<sup>8</sup> cpm/ $\mu$ g DNA.

The DNA probes can detect as little as 1pg target DNA with high specificity. After stored in -20°C for two months, the detecting ability of probes will not significantly change.

**Key Words:** <sup>125</sup>I-NaI BsNPV DNA HSV DNA  $\lambda$ DNA Probe

\* Present address, Jiangxi Medical college, Nanchang 330000.