维普资讯 http://www.cqvip.com

第6卷第1期
1991年3月

病毒学杂志
VIROLOGICA SINICA

Vol.6 No.1
Mar.1991

生物素标记核酸探针的分子杂交技术及其应用

曹先维　　张鹤龄

（内蒙古大学生物系，呼和浩特 010021）

The Technique of Molecular Hybridization with Biotin Labelled Nucleic Acid Probe and its Applications

Cao Xian-wei　　Zhang He-ling

(*Biology Department, Inner Mongolia University, Huhhot* 010021)

关键词：生物素标记的核酸探针　分子杂交　核酸斑点杂交

Key words: Biotin labelled nucleic acid probe　Molecular Hybridization　Nucleic acids spot hybridization(NASH)

核酸分子杂交是基于核酸链间互补碱基对的特异性结合，测定核酸碱基顺序同源性的一种现代技术，是基因工程、分子遗传及医学诊断中常用的方法。该法较常规诊断法灵敏度高、特异性强，目前，已广泛应用于重组DNA的筛选、基因分析、染色体基因定位及病毒病诊断等方面。

目前，用于分子杂交的cDNA探针，普遍采用同位素标记，放射自显影方法检测。然而由于放射性同位素存在半衰期短，致使探针寿命短，价格昂贵，实验周期长，而且对人体有一定危害等缺点，由此限制了放射性探针的广泛应用。因此，长期以来，研究人员又一直致力于非放射性标记核酸探针的研究。八十年代初发展起来的生物素-亲和素系统用于核酸探针的标记、杂交及检测技术，就是这方面的一大进展。本文试图就生物素-亲和素系统用于核酸探针的标记、分子杂交及检测技术的进展，其优点及应用等方面作一综述。

一、生物素-亲和素系统简介

生物素（Biotin）是一种B族维生素，广泛分布于天然食物（如花生、西红柿等）中，分子量244.31道尔顿，分子中含有脲基环和戊酸侧链（结构式如图1）。生物素与抗生物素蛋白—亲和素（Avidin）具有很强的结合作用。亲和素是一种糖蛋白，存在于禽蛋，多种鸟的输卵管和蛙卵胶冻中。分子量67,000道尔顿，等电点10.5。每个分子由四个相同亚基组成，每个亚基都能专一性地结合一个生物素分子，这种结合作用很强

维普资讯 http://www.cqvip.com

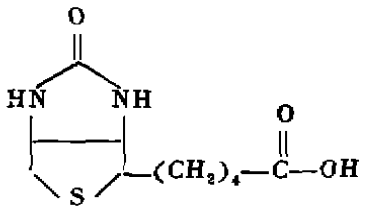


图1 生物素结构式

Fig 1. The structural formula of biotin

（解离平衡常数$K_D=10^{-15}$），一般，这种结合作用是不可逆的，只有在高温（120℃，15分钟）下，才能在盐溶液中完全解离；另外，在6mol/L盐酸胍溶液（pH1.5）中也可解离[1]。生物素与亲和素的结合机理不清楚，只知道这种结合只需要生物素分子的脲基环。当生物素的戊酸侧链通过酰胺键与其他分子连接后，脲基环仍保持与亲和素的结合能力。早期，人们利用二者的这种独特作用进行细胞学研究，探测细胞表面及内部具有特定功能的蛋白质、脂类和糖类等大分子[2]。

亲和素分子表面的寡聚糖基可能与细胞的各种复杂组分起付反应，于是，二十多年前，从一种土壤链霉菌*Streptomyces avidin*的发酵液中得到另一种抗生物素蛋白一链（霉）亲和素（*Streptavidin*），它与亲和素具有极相似的理化特性[3,4]，尤其是与生物素的专一性结合性质与亲和素相同，但不含寡聚糖基，等电点为5.0。用以代替亲和素能降低非专一性结合，减轻背景，提高检测的分辨率。

生物素在标记蛋白质方面的成功，启发人们用于标记核酸，于是建立了非放射性标记核酸的分子杂交技术。

生物素-亲和素系统用于核酸分子杂交的关键在于：如何将生物素标记到核酸分子上。八十年代初终于解决了这一难题，并发展起来各种生物素标记核酸的方法。主要有化学法和酶促法。

二、生物素标记核酸探针技术

（一）化学法：主要用化学法将生物素活化，并将核酸链中的碱基残基进行修饰，然后二者进行化学反应即制得生物素-核酸探针。具体标记方法有下列几种：

1. 最早于1975年、1978年，Davidson等利用化学法通过细胞色素C或多胺桥将生物素交联到RNA上，制得RNA探针[5-7]。

2. Ruth.J.L.于1984年用化学法制成了生物素-DNA探针[8]。首先制成带有易接受生物素的活性基团的核苷酸类似物，并将这些核苷酸类似物聚合成多核苷酸，然后通过化学反应将生物素转移到活性基团上。

3. Forster A.C.于1985年通过光化学反应法，用化学合成的光生物素（Photobiotin，结构式如图2）直接标记DNA和RNA[9]。

标记方法大致为：首先利用Fleet等的方法[10]合成的4-荧光-3-硝基叠氮〔Ⅰ〕在无水乙醚中与N-(3-氨丙基)-N-甲基-1,3-丙二胺〔Ⅱ〕反应30分钟，制得N-(3-氨丙基)-N-(4-叠氮-2-硝基苯)-N-甲基-1,3-丙二胺〔Ⅲ〕；同时用Bayer和Wilchek的方法[2]将d-生物素和N-羟基琥珀酰胺酯在DCCI(二环己基碳二亚胺)催化下，合成d-生物素-N-羟

维普资讯 http://www.cqvip.com

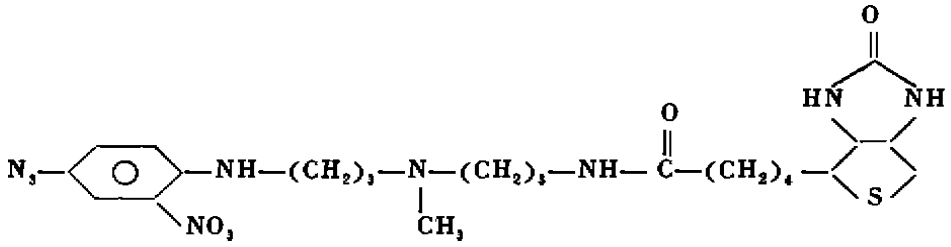


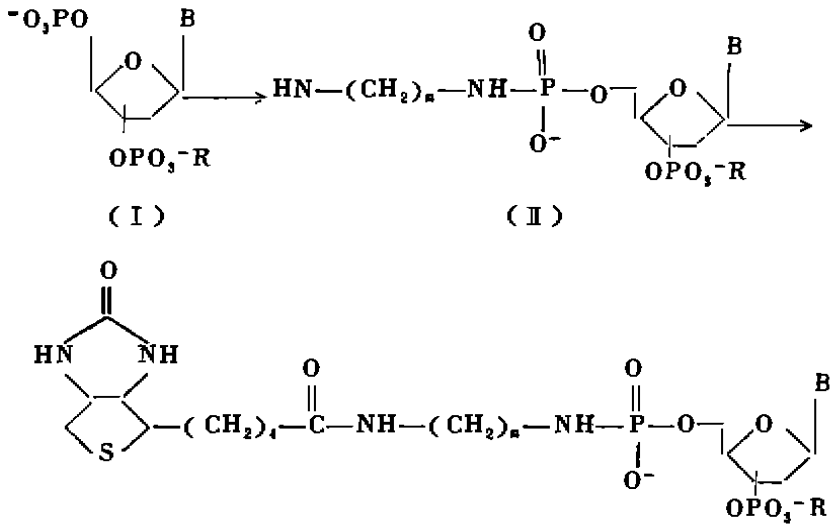
图2　光化生物素结构式

Fig 2. The structural formula of photobiotin

基琥珀酰胺酯〔Ⅳ〕；将Ⅲ和Ⅳ在吡啶-水(7:3，v/v)中混合，置37℃反应2小时，得到光化生物素〔N-(4-叠氮-2-硝基苯)-N-(N-d-生物素-3-氨丙基)-N-甲基-1,3-丙烷二胺〕。最后将光化生物素溶于醋酸，经冷冻除去过量的醋酸，即制成醋酸光化生物素。

避光下将1～25μl醋酸光化生物素水溶液(1μg/μl)与等体积核酸-水或核酸-0.1mmol/L EDTA(pH7.0)溶液(1μg/μl)混合，封闭于硅化的毛细玻璃管(Brand微管，5～50μl)中，以避免紫外线对光解作用的破坏。然后在冰水浴中置于300W荧光灯(Philips Ultraphil MLU，300W)下10cm处，照射15秒，完成光化生物素标记核酸的反应。作者用该法制备了生物素-M_{13} DNA探针，并指出该法可有效地标记双链DNA和单链RNA。常规标记反应中，醋酸光化生物素和核酸的浓度均应为0.5μg/μl。作者用该法制备的生物素-M_{13} DNA探针在硝酸纤维素膜(Nitrocellulose Mambrane，NCM)上进行自我杂交，并用亲和素-碱性磷酸酯酶(Avidin-Alkaline Phosphatase)及氮兰四唑(Nitro blue tetrazolum，NBT)和5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐(5-Bromo-4-Chloro-3-iodolyl-Phosphate，BCIP)检测，灵敏度达4pg。该法制备的生物素核酸探针在－15℃下可贮存5个月。

4. Andre Chollet等用化学法将生物素标记到寡聚脱氧核糖核苷酸的5′末端[11]。



R：5′寡DNA；　B：四种碱基A,T,G,C；　n：2,6

图3　化学法将生物素引入寡聚脱氧核糖核苷酸5′末端示意图

Fig 3. The sketch for introducing biotin to oligodeoxyribonucleotide 5′ end by chemical method

维普资讯 http://www.cqvip.com

首先用A法或B法[12]将激活的寡聚脱氧核糖核苷酸〔Ⅰ〕(1～1000pmol，0.1μmol/L～10μmol/L)转变成5′氨烷基磷光酰胺衍生物〔Ⅱ〕，然后回溶于50μl 0.01mol/L K_3PO_4 (pH7.5)和50μl40mmol/L的生物素-N-羟基琥珀酰胺酯[13]的N,N′-二甲基甲酰胺(DMF)溶液中，置20℃反应2小时，经纯化制得5′末端带有生物素的寡DNA探针〔Ⅲ〕。标记过程如图3所示。

作者用该法制备的探针在NCM上与靶DNA杂交，并经链亲和素-多聚碱性磷酸酯酶〔SA poly(AP)〕检测，其灵敏度达2 fmol(0.5ng)。

5. 1986年Viscid R. P. 等提出一种化学法标记核酸探针的新方法[14]。主要步骤为：先以亚硫酸氢钠和乙二胺对多核苷酸中非成对胞嘧啶残基进行修饰，产生转氨作用，然后以胞嘧啶衍生物上的氨基基团与生物素-e-氨基己酸-N-羟基琥珀酰胺酯反应，

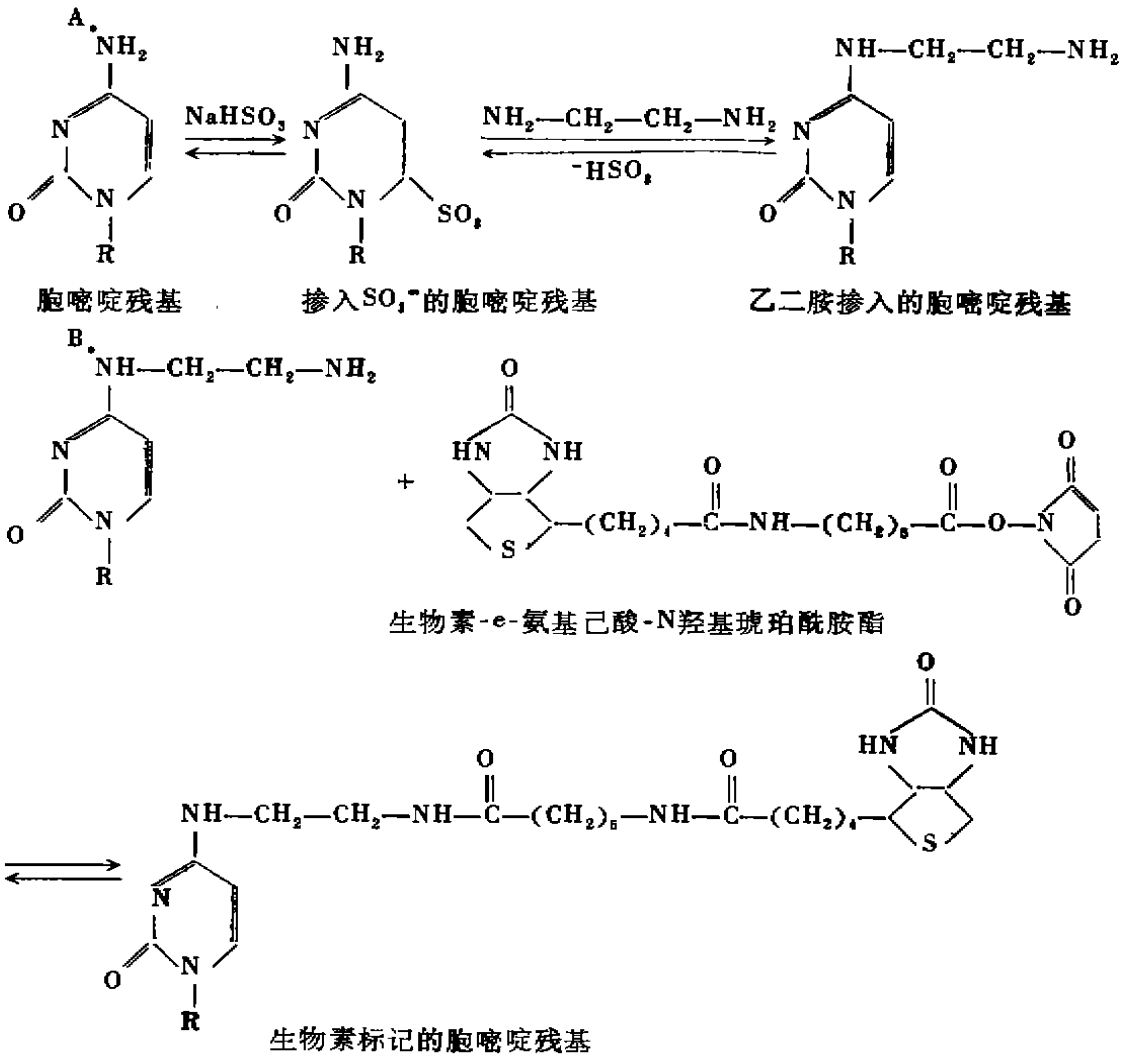


图4 生物素标记核酸示意图

Fig 4 The sketch for nucleic acids labelled by biotin

(A)用$NaHSO_3$和乙二胺催化的转氨作用

(B)生物素化反应 R=RNA或DNA

维普资讯 http://www.cqvip.com

制得生物素标记的核酸探针(见图4)。

用该法制备的探针进行斑点杂交(Spot Hybridizarion)，经亲和素-AP./NBT和BCIP显色，灵敏度可达1～2pg。

6. 目前，生物素标记核酸探针最新法为Reifeld，A.等1987年报道的生物素酰肼法[15]。作者利用肼类化合物可以置换胞苷和单股DNA、RNA中胞嘧啶残基上氨基的原理，用生物素酰肼进行同样的反应，成功地制备了生物素DNA探针(见图5)。

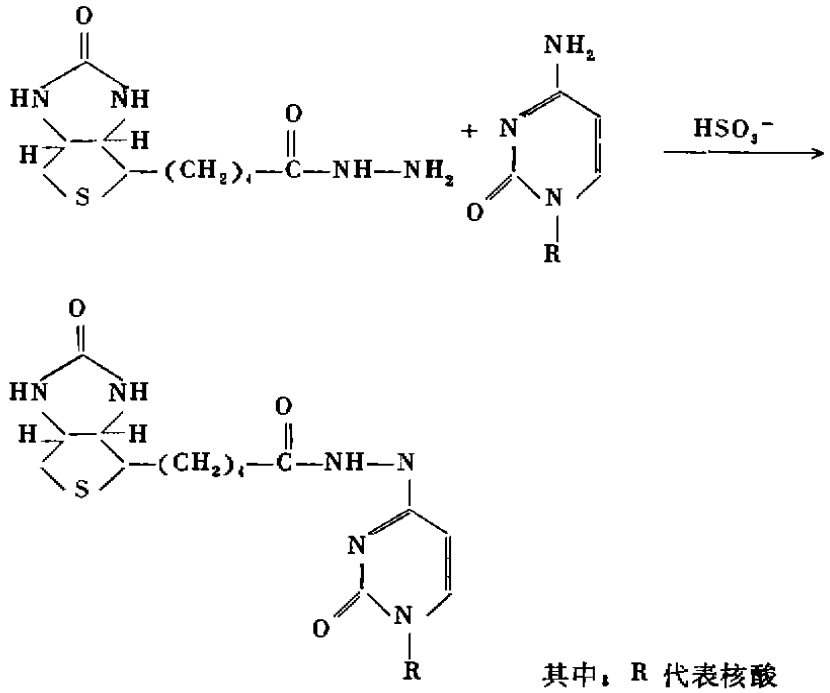


图6 生物素酰肼与胞嘧啶残基的反应示意图

Fig 5. The sketch of reaction of biotin acyl-hydrazide and cytosine residue

作者用该探针通过已知方法进行点杂交、洗涤[16]，继用SA-AP和底物NBT、BCIP显色。结果表明：自我杂交灵敏度为0.3pg；检测靶DNA灵敏度为0.9pg。

以上是用生物素通过化学法标记核酸探针的主要方法。比较而言，Ruth的直接合成法制备的生物素多核苷酸探针长度有限，且操作复杂；Andre Chollet方法过程繁琐且灵敏度极低(0.5ng)；Forster的光化生物素法，虽然醋酸光化生物素的商品化(厂家为：澳大利亚的BRESA，G.P.O. Box 498，Adclaide South Australia 5001)使标记方法大大地简化，但其灵敏度还不够高(4pg)；Viscid标记法与生物素酰肼法虽然都很简单，且灵敏度均较光化生物素法高，但生物素酰肼法的灵敏度最高。由此可见，化学法标记核酸探针，最好用生物素酰肼法。据了解卫生部上海生物制品所的顾克家已成功地用生物素酰肼法制备出生物素-核酸。

(二)酶促法：是目前用生物素标记核酸的最主要的方法。它用于生物素标记核酸约比化学法早三年。该法基本上基于^{32}P标记核酸的方法，不同的是用生物素标记的核苷酸类似物代替^{32}P标记的核苷酸类似物作为酶促标记探针的底物。显然，其关键在于制

维普资讯 http://www.cqvip.com

得生物素标记的核苷酸类似物，而且要求这样的类似物掺入核酸后，不影响互补双链的配对。1981年Langer等人用化学法合成了生物素-11-dUTP和生物素-11-UTP[17]；以后Brigati等又相继合成了Bio-4-dUTP和Bio-16-dUTP等[18]。从而为酶促法合成生物素核酸探针奠定了基础。其中Bio-4-dUTP，Bio-11-dUTP和Bio-16-dUTP之间的差别，仅在于生物素与嘧啶环之间连接臂长度的不同。最常用的Bio-11-dUTP和Bio-11-UTP的结构式如图6所示。

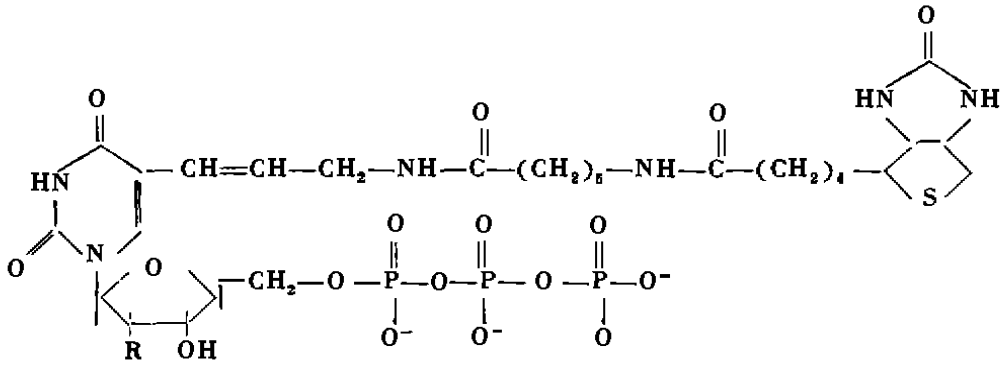


图6 Bio-11-dUTP(R=H)和Bio-11-UTP(R=OH)结构式

Fig 6 Structural formula of Bio-11-dUTP(R=H)and Bio-11-UTP

Langer等合成生物素核苷酸类似物之后，经Rigby等的"缺口翻译"(Nick Translation)反应[19]和Bourguignon等的"填补缺口"反应[20]证明，所合成的这些生物素核苷酸类似物，在体外可以作为多种核酸聚合酶的底物，但不能作为AMV反转录酶的底物。Bio-UTP标记效率低于Bio-dUTP，故标记时常用Bio-dUTP。Leary(1983年)实验表明：杂交后用免疫方法检测时，若生物素与dUTP之间连接臂长度增加4～11个原子，则可使靶的检测力增加约4倍[16]。用Hsu等介绍的亲和素-生物素-辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)复合物(ABC)不能检出生物素-4-DNA，但ABC在一步法反应中却显示了Bio-11-DNA与Bio-16-DNA的同等效力及小于100pg的灵敏性[21]。可见Bio-11-dUTP和Bio-11-UTP标记效率高于Bio-4-dUTP，故人们常采用Bio-11-dUTP进行酶促法标记核酸。

1. 缺口翻译(Nick Translation)：是目前普遍应用的方法。其原理为：先利用DNase I在双链DNA分子上产生缺口，然后利用DNA多聚酶I(DNA polymerase I)以另一条DNA链为模板，将反应液中的核苷酸(含Bio-dUTP)加到缺口链的3′端一侧，同时此酶又由缺口的5′端外切，结果使缺口沿着DNA链移动[22]。1981年Langer合成生物素-核苷酸类似物后，即利用Rigby等的用于^{32}P标记的"缺口翻译"法[19]，用Bio-11-dUTP代替α-^{32}P-dATP成功地制备出生物素标记的核酸探针，以研究生物素-核苷酸类似物的性质[17]。

Langer-Safer P.R.等(1982年)利用改进的缺口翻译法，用Bio-dUTP制得生物素标记的果蝇染色体基因探针[23]。制得的生物素-DNA中，约有8%～40%的胸腺嘧啶残基被Bio-dUTP所代替。目前，"缺口翻译"中一般不加牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin)[24]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Leary，J.J.等(1983年)分别用Bio-4-dUTP，Bio-11-dUTP和Bio-16-dUTP通过Brigati的"缺口翻译"反应[18]制得Bio-4-DNA，Bio-11-DNA和Bio-16-DNA，用于NCM上的斑点杂交，所得最高灵敏度达1～10pg[16]。

目前，美国BRL公司出售制备生物素标记核酸探针的试剂盒，并采用"缺口翻译"法标记核酸[24]。商品化使生物素标记探针技术简便易行，有利于在各方面推广应用。

就缺口翻译本身而言，有两种不同的操作：一是先加入DNase I作用10～60分钟，再加入DNA多聚酶I。二是将两种酶同时加入。另外，在选择反应条件上也不相同[25]（见表1）。一般情况下是温度低作用时间延长。注意：反应温度不能高于20℃，否则DNA多聚酶I会以新合成的DNA链为模板拷贝出发夹状的DNA新链。

表1　缺口翻译反应条件举例

Tab 1. The conditions of nick translation

	缺口翻译反应体系中		
	先加DNase I	后加DNA多聚酶I	实验者
反应时间与温度	13℃　10′	13℃　90′	Rutgers waksman Institute[25]
	37℃　10′	20℃　60′	复旦遗传所五室[25]
	14℃　10′	14℃　60′	CSH1984年[25]
	两种酶同时加入		实验者
温度与总时间	16℃　60′		[26]
	14℃　90′		[23]

2. 在缺口翻译基础上，利用DNA末端转移酶，可以在缺口翻译反应所得Bio-探针的3′末端再加上生物素标记的寡核苷酸尾巴，使检测灵敏度提高5～10倍[27]。

3. 利用DNA多聚酶I大片段(klenow)作引物延伸反应，可以对化学合成的寡核苷酸探针或3′末端凹缺的DNA探针片段进行生物素标记。

Murasugi等（1984年）用该法制得了长度为23个核苷酸的生物素-探针，并通过Southern blot探测互补链的灵敏度达0.5fmol(0.125ng)[28]。

Andre Chollet（1985年）在利用化学法合成Bio-多核苷酸的同时，又利用这种方法合成了Bio-寡核苷酸。纯化探针在NCM上自我杂交，其灵敏度达0.5pg[11]。

此外，利用M_{13}单链克隆载体作为DNA聚合酶I大片段合成DNA的模板，可制得生物素标记的单链DNA(ssDNA)探针。

4. 通过T_4核酸(DNA或RNA)连接酶可以将3′或5′生物素寡核苷酸连接到核酸探针片段上。

Richardson等(1983年)利用T_4 RNA连接酶将用Bio-ADP标记的3′末端寡核苷酸连接到RNA上，制得Bio-RNA探针[29]。

Tomas Kempe(1985年)受生物素标记RNA寡核苷酸[6-7,30]的启示，用该法制得生物素-DNA探针[31]。首先用化学法合成寡聚脱氧核糖核苷酸[32]，并使之磷酸化，然后加入已制备好的2-(生物素氨基)-乙醇，经化学反应制成生物素-寡脱氧核糖核苷酸，最后

维普资讯 http://www.cqvip.com

经DNA连接酶将其连接到DNA片段上。

5. 利用SP6 RNA聚合酶，对克隆在带有该酶启动子的载体 pSP64或pSP65（参见 Lakshman et al, 1986）上的插入片段作体外转录，可以得到单链 RNA 探针。1984 年 D.A.Melton等用该法制成了 ^{32}P-RNA探针[33]。在体外转录反应中，若以 Bio-核苷酸代替^{32}P-核苷酸，便有可能制成 Bio-RNA探针。

6. 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，可先采用烯丙基标记的dUTP(AA-dUTP)代替 dTTP 作反转录，得到含有 AA-dUTP 的 cDNA，再与活化生物素(生物酰羟基丁二亚胺)作用，即可将 AA-dUMP 转变为 Bio-dUMP，用以标记核酸[27]。

比较以上酶标记法，方法 4 和 6 均需先制成一中间物，然后才能标记到核酸上，操作步骤比较复杂；方法 3 操作简单但灵敏度低(0.125ng)；方法 2 虽然在缺口翻译基础上使灵敏度提高 5～10倍，但由于增加了末端转移反应，使成本增加，操作复杂化；缺口翻译反应较简便且灵敏度高，因此是目前普遍采用的方法。

酶法与化学法相比，灵敏度相近，最高均可达 0.5pg 水平；但酶法成本高：所用生化试剂尤其是酶制剂均比化学试剂昂贵；而且酶法操作复杂，要求严格，因此，生物素标记核酸的化学法将会得到更快发展。

三、生物素标记核酸探针的回收与纯化

为提高杂交的专一性，降低背景，标记反应终止后，生物素-核酸探针须从反应混合液中分离出来，迄今有如下几种方法：

1. 乙醇沉淀法：是目前普遍应用的一种较简便的方法。标记反应终止后，在0.1～0.25mol/L 盐浓度下，用 2.5 体积冷无水乙醇－20℃ 沉淀过夜，然后经 高速 离心，沉淀即为 Bio-核酸探针。为提高纯度，有时可用乙醇沉淀两次。该法可得到满意效果[24]。

2. Sephadex G-50 柱层析：该法虽然操作复杂，但提纯效率高。BRL 提供的方案中还用该法纯化Bio-探针[24]。具体过程为：制备一个5ml或 10ml Sephadex G50柱，样品溶解液及洗脱液均为1×ssc(20×ssc：3mol/L NaCl，0.3mol/L柠檬酸钠，pH7.0) 0.1%SDS，在0.5%兰色葡聚糖追踪下，按每管 150μl 收集，最后取各管收集液 1～2μl 点于NCM上，经SA-AP/NBT和BCIP显色，即可确定回收部分。Langer Safer 也用该法纯化探针，不同的是洗脱液为10mmol/L Tris-HCl(pH7.5)溶液[23]。

3. 透析法：是最简单的方法，一般用于化学法制备标记探针的回收。当标记反应完成后，将反应液对水透析24小时或对 NaCl-磷酸盐-EDTA 溶液透析过夜[14]。透析过程中换液三次。

4. 亲和层析法：利用生物素标记的寡核苷酸可以选择性地结合于亲和素-琼脂糖柱上而进行纯化。[11,34]首先制备亲和素-琼脂糖柱，并用含有生物素的缓冲液 A(1mol/L NaCl，0.01mol/L Na_3PO_4 pH7.0) 平衡柱，以封闭柱上的强结合位点；然后将经乙醇沉淀而回溶于缓冲液A的生物素-寡核苷酸上柱，此时，在缓冲液A这种中性pH、高盐浓度条件下，Bio 寡核苷酸结合到亲和素-琼脂糖凝胶上；接着用缓冲液A和B(2mol/L尿素-

维普资讯 http://www.cqvip.com

缓冲液A)洗去未参与反应的成分；最后用6mol/L 盐酸胍(pH2.5)洗涤，由于6mol/L盐酸胍(pH2.5)可以使生物素和亲和素的结合键断裂，从而使Bio-寡核苷酸被洗脱，最后透析收集液。该法回收率约为15～25%[11]。

另外，Andre Chollet还用15%的变性聚丙烯酰胺凝胶(含7mol/L尿素)电泳，进一步纯化经乙醇沉淀回收的Bio-寡核苷酸，也得到满意结果[11]。

值得注意的是，生物素标记的核酸探针不能用酚抽提，否则生物素核酸会进入酚层而损失[17,24]。

生物素标记的核酸探针，仍保持着生物素与亲和素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值虽有一定变化（当引入20biotin分子/1000碱基时，T_m几乎不变，而当引入250 biotin分子/1000碱基时，T_m最多只降低5℃，通常经缺口翻译法可引入约50 biotio分子/1000碱基[17]），但变化不大，况且这种微小变化可由杂交液中45%甲酰胺所补偿，由此说明引入的生物素分子对双链配对几无影响。这两个性质对于杂交及其检测是不可缺少的。生物素标记核酸探针的化学性质十分稳定，－20℃可贮存一年。因此生物素核酸探针完全可用于目的基因的探测，并具有推广之优势。

四、固体支持膜上的斑点杂交(Spot Hybridization)及后处理

1. 杂交支持膜：现常用硝酸纤维素膜(NCM)，重氮苯甲基氧甲基膜(DBM)和尼龙膜也可以使用，但DBM价格昂贵，且使用前需步骤繁琐的精心处理[35]，尼龙膜测定灵敏度虽与NCM几乎相同，但其有时背景高[24]，故最好用NCM。

2. 杂交条件及后处理：使用生物素标记探针在NCM上杂交时，预杂交及杂交等方法[16,24,36,37]都与^{32}P标记探针的常规方法相同。不同之处在于：①核酸探针由于生物素的引入而使T_m值略微降低[16,17,29]，而将杂交液中甲酰胺浓度由50%降至45%及杂交后温和洗涤，即可予以补偿。Leary认为：当杂交缓冲液中含45%甲酰胺并配合杂交后用0.16×ssc，0.1%SDS液在50℃洗涤时，杂交显色会得到最好的信噪比[16]。BRL公司提供的杂交、洗涤方案[24]即吸取了这一优点。②探针浓度的不同：为缩短杂交时间，需加大探针浓度。^{32}P-探针杂交时，其浓度不得超过25ng/ml，否则导致曝光后产生较深背景；而生物素-探针杂交时，当浓度高达750ng/ml时，也无明显背景[16]。但Bio-M_{13}

表2　预杂交及杂交的温度及其对应时间

Tab 2　The temperature and duration of prehybridization and hybridization

作　者	预杂交		杂　交	
	温度	时间	温度	时间
Leary, J.J.(1983)[16]	42℃	2小时	42℃	20小时
Viscid, R.P.(1986)[14]	37℃	4小时	37℃	过夜
BRL [24]	42℃	2小时	42℃	过夜
Reisfeld A.(1987)[15]	42℃	4小时	42℃	过夜
Andre Chollet(1985)[11]	50℃	3小时	50℃	12小时
Melton D.A.(1984)[33]	55—60℃	1—4小时	55—60℃	—

维普资讯 http://www.cqvip.com

DNA探针，当浓度达100～1000ng/ml时，则背景明显，只有将浓度降至20ng/ml时，才无明显背景。这也许是 Bio-M_{13} DNA 探针的特性[9]。③杂交后，滤膜需用 3% BSA 封闭[15,16,24]，以预先封闭滤膜上可能非特异地吸附蛋白分子的位点，从而减轻背景。为减少成本，也有用奶粉[38]及动物血清代替 BSA进行封闭的。

此外，预杂交及杂交的温度、时间都有一定范围，具体见表 2。

五、杂交后检测

生物素标记核酸探针的目的，正是为了检测。因此，根据生物素的特性，杂交后可以用化学和免疫学手段进行检测。理想的检测方法，可以得到最高的灵敏度、最好的分辨率及最低背景。主要检测方法有：

(一)生物素-亲和素酶联法：利用生物素标记核酸探针中，生物素仍保持着与亲和素的专一性结合能力，杂交后，加入亲和素，使与掺入探针中的生物素结合，然后利用亲和素能与酶、荧光物质(如：异硫氰酸荧光素，FITC)等结合，发展了生物素-亲和素-酶联法。1983年，Leary 等制成了亲和素-多聚〔生物素-碱性磷酸脂酶〕复合物(A-poly〔B-AP〕)[18]；Sigma 公司又利用 Leary 之法制成(链)亲和素-碱性磷酸脂酶复合物(SA-AP)[9]；Enzo Biochem公司合成了链亲和素-生物素化酸性磷酸脂酶复合物(SA-BAcP)[9]。这些复合物的制成，使检测步骤大大地简化。

1983年Leary，J.J.制成A-Poly(B-AP)的同时，将它与其他检测方法比较后，得出如下结果[18]：①ABC 复合物（亲和素-生物素-辣根过氧化物酶复合物）及底物联苯二胺显色系统的检测灵敏度<100Pg。②Avidin DH-生物素化-AP及NBT 和 BCIP 系统，检测靶DNA的灵敏度为20～30pg。③A poly(B-AP)及NBT和BCIP检测灵敏度最高为 1～2 pg。

1985年Forster分别试验了Sigma的AV-AP，BRL 的SA-poly(B-AP)和 Enzo 的 SA B-AcP 的检测法，结果表明：灵敏度均为 4pg(2×10^{-18}mol)，但达到该灵敏度所需时间，碱性磷酸酯酶的(5小时)比酸性磷酸酯酶的(过夜)快得多[8]。

1987年马大龙等实验表明：用 NBT和 BCIP 同样的底物显色，则SA+P(APB)法，SA-AP法和双标记法(AV-AP+P〔APB〕)的检测灵敏度分别为：0.1ng，1ng，0.01ng。证明双标记法灵敏度最高，但在高浓度 DNA(10ng)时，双标记法显色程度反而不及 SA+P(APB) 法[30]。

目前，生物素标记核酸探针杂交后的检测主要用A-poly(B-AP)及NBT和BCIP 显色系统，其灵敏度高，可达 1～2pg。因 A-poly(B-AP) 具有很强的放大作用。为降低背景，显色反应须在避光下进行，显色时间一般 1～2 小时，当延长至 24 小时，可增强斑点颜色；检测灵敏性还可通过透明滤膜(二甲苯浸泡)而增加4～5倍。另外，还可通过用两种或更多种生物素化核苷酸标记 DNA探针的方法放大检测信号。

(二)生物素-亲和素免疫标记技术：该技术借助于生物素标记核酸中的生物素仍保持与抗生物素免疫球蛋白的专一性结合能力而创立。主要有：

1. 免疫酶标技术：Guesdon等建立了两种用于定量的免疫酶标分析法[11]。一种称为亲和素-生物素桥新技术(BRAB)，亲和素在生物素标记的抗体和生物素标记的酶之

维普资讯 http://www.cqvip.com

间起桥梁作用。另一种称为亲和素-生物素标记技术(LAB)，即用生物素标记抗体和用酶标记亲和素。这两种酶联免疫吸附法均需采用生物素标记的第一抗体。

受 Guesdon工作的启发，Hsu,S.等发展了亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(ABC)技术[21][41]。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ABC，最后加过氧化物酶的底物进行显色。由于每个第二抗体分子上可标记许多个生物素分子，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，从而提高灵敏度。

2. 免疫荧光技术：该法由Nerurkar等于1984年建立[4]。主要利用生物素标记的抗生物素抗体和亲和素标记的荧光素为系统。Leary J.J.认为：间接免疫荧光法不敏感，灵敏度只有 1ng(uv 照射)[16]。

间接免疫过氧化物酶法，用 3,3-二氨基联苯胺-四羟基氯化物(DAB)或乙胺咔唑(EAC)为底物，可检测150～200pg的靶DNA。

Sternberge 等 1970 年的过氧化物酶-抗过氧化物酶测定法灵敏度比间接免疫过氧化物酶技术提高了 2 倍[42]。

六、生物素标记核酸探针用于核酸分子杂交的优点

该技术不但灵敏度与同位素标记法相当，而且克服了同位素标记探针杂交法的弊端。其优点为：①安全：不需采用同位素操作的防护措施；②经济：所用试剂价格低于同位素价格，且显色酶液回收后可反复使用；③稳定：生物素标记探针 -20℃至少可贮存一年，一次制备可长期使用；④快速：通过增大探针浓度(750ng/ml 时背景仍不明显)而缩短杂交时间。如：选用700ng/ml探针浓度探测人基因组中单拷贝基因时，杂交 1 小时，即可得到足够强的信号[27]。以上优点可能使今后的核酸探针标记中以生物素取代同位素。

七、问题和展望

就目前从同位素标记实验来看，许多实验表明，RNA 探针的制备比缺口翻译 DNA 探针的制备简便，且灵敏度高[43-46]。Melton比较了二者的灵敏度，前者为0.5pg，后者为5pg。体外杂交中单链RNA探针比双链 RNA探针或缺口翻译DNA探针更加有效[46,47]。因此，单链RNA探针在某些情况下可能比DNA探针的制备更加常规化。由此推测，Bio-RNA探针也可能具有上述优点，因此，今后用SP6系统制备 Bio-RNA探针的研究可能会得到迅速发展。

目前，核酸分子杂交多在固相膜上进行。为了降低膜的非特异性吸附，在杂交液中常加入Denhardt's液、鱼精DNA(或其他RNA)及右旋糖苷硫酸盐等大分子试剂，尽管杂交效果很满意，但所用试剂繁多，价格昂贵，在推广应用中常遇到一定困难。为此，人们试图寻找一种简便、可靠而价廉的方法。1984年 Danid,A.J.等介绍了一种用Bettelo(主要成分是脱脂奶粉)作为核酸，蛋白质等生物大分子相结合时的反应介质，取得了很好的效果[48]。随后国外一些实验室将脱脂奶粉应用于放射性同位素标记的 DNA 探针的分子杂交[49]。郭晓军(1987年)以低脂奶粉为杂交液主要成分，用于放射性探针的杂交，

维普资讯 http://www.cqvip.com

取得了满意结果[38]。将这种简化杂交液用于非放射性标记核酸探针的分子杂交中，相信也一定能获得成功，则该技术更易推广应用。

八、应用

近几年，生物素标记核酸探针技术发展迅速，在核酸研究的许多方面都有着广泛应用。

1. 基因定位：用生物素标记的特定基因探针，通过原位杂交，可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序列[50]。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，就可以对特定的基因及其转录产物进行细胞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。目前，这一技术不但已应用于果蝇多线染色体基因定位[23]，还成功地用于哺乳动物间期染色体特异性DNA序列定位[51-53]和多种病毒DNA的定位研究[18]。

2. 核酸序列分析：以生物素代替^{32}P标记做核酸序列分析，不论是化学降解法或末端终止法都有过成功的尝试。用化学法时[49]，可将电泳胶中的DNA片段转移，固定到尼龙膜上；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30～60个核苷酸的M_{13}引物，与单链M_{13}载体形成双链后，按一般方法作末端终止合成，电泳后，将DNA转移到尼龙膜上，即可直接进行染色，读出序列[34]。

3. 基因分离、提纯：首先将纯RNA生物素化，然后与总DNA制品杂交，只有能识别这种RNA的DNA分子才能接上这种Bio-RNA。这时可通过亲和素Sepharose亲和吸附柱富集特定的DNA片段。用此法获得的基因产量高，纯度可达42—80%[42]。此外，该技术还用于分离E.coli 23s核糖体RNA的寡聚核苷酸片段[54]。

4. 植物病毒及类病毒的鉴定：用生物素标记的某种植物病毒或类病毒的核酸探针与点有样品的NCM进行斑点杂交，最后经亲和素-酶联检测系统将杂交结果显示出来。Forster A.C.等(1985)利用光化生物素标记的M_{13} DNA探针，成功地鉴定了提纯的鳄梨日斑类病毒(ASBV)[9]；成卓敏等(1988年)使用Forster A.C.等的方法，用光化生物素标记了插入puc8中的大麦黄矮病毒(BYDV)cDNA探针，成功地鉴定了BYDV，鉴定结果表明，对于病毒提纯液，其测定灵敏度至少可达1ng；对病株汁液，其可测最高稀释度为800倍。张鹤龄及本作者等(1989年)，用生物素-11-dUTP通过缺口翻译法，将克隆于pST-B_{14}质粒中的马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTV)cDNA探针进行标记，制备了生物素标记的PSTV-cDNA探针。在硝酸纤维素膜上进行核酸斑点杂交，并利用BRL的显色系统[24]，检测了提纯的PSTV-RNA，带有PSTV-cDNA的质粒及感染PSTV的马铃薯植株粗提液，结果表明，前两者可检出的最低含量分别为8pg/斑点和0.35pg/斑点，可测出的侵染PSTV的马铃薯植株粗提液的最高稀释倍数为243倍[55]。

生物素标记的核酸探针的分子杂交技术除上述应用外，还适于作为临床医学上的常规化验手段，用于各种遗传病和传染病的基因诊断等[57]。目前，各国研究人员对于推广应用这项技术都十分重视。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

〔1〕 Green, N.M., 1975, *Advance Protein Chemistry*, 29 : 85.
〔2〕 Bayer, E.A.et al., 1980, *Methods of Biochem Anal*, 26 : 1.
〔3〕 Chaiet, L.et al., 1963, *Antimicrob Agent Chemther*, 3 : 28.
〔4〕 Nururkar, L.S.et al., 1984, *J Clin Micro*, 17 : 149.
〔5〕 Manning, J.E.et al., 1975, *Chromosome*(Berlin)53 : 107.
〔6〕 Borker, J.R.et al., 1978, *Nucl Aci Res*, 5 : 363.
〔7〕 Sodja, A.et al., 1978, *Nucl Aci Res*, 5 : 385.
〔8〕 Ruth, J.L., 1984, *DNA* 3 : 123.
〔9〕 Forster, A.C.et al., 1985, *Nucl Aci Res*, 13 : 745.
〔10〕 Fleet, G.W.J.et al., 1972, *Biochem J*, 128 : 499.
〔11〕 Andre Chollet et al., 1985, *Nucl Aci Res*, 13 : 1529.
〔12〕 Chu, C.F.B.et al., 1983, *Nucl Aci Res*, 11 : 6513.
〔13〕 Heitzmann, H.et al., 1974, *Proc Natl Acad Sci. USA*, 71 : 3537.
〔14〕 Viscid, R.P.et al., 1988, *J Clin Microbiol*, 23(2) : 311.
〔15〕 Reisfeld, A.et al., 1987, *Biochem Biophys Res Commun*, 142(2) : 519.
〔16〕 Leary, J.J.et al., 1983, *Proc Natl Acad Sci USA*, 80 : 4045.
〔17〕 Langer, P.R.et al., 1981, *Proc Natl Acad Sci USA*, 78 : 6633.
〔18〕 Brigati, D.J.et al., 1983, *Virology*, 126 : 32.
〔19〕 Rigby, P.W.J.et al., 1977, *J Mol Biol*, 113 : 237.
〔20〕 Bourgnignon, G.J.et al., 1978, *J Virol*, 20 : 290.
〔21〕 Hsu, S.M.et al., 1981, *J Histochem Cytochem*, 29 : 577.
〔22〕 Kelly, R.G.N.et al., 1970, *J Biol Chem*, 245 : 39.
〔23〕 Langer-Safer, P.R.et al., 1982, *Proc Natl Acad Sci USA*, 79 : 4381.
〔24〕 BluGENE-Nonradioactive Nucleic Acid Detection Syst, BRL
〔25〕 彭秀玲等；1988，基因工程实验技术 第一版，湖南科技出版社，上海。
〔26〕 Maniatis, T.et al., 1982, Molecular Cloning, CSH Lab, N.Y.
〔27〕 何笑松，1986，生物工程学报 2(1) : 10.
〔28〕 Murasugi, A.et al., 1984, *DNA*, 3 : 269.
〔29〕 Richardson, R.W.et al., 1983, *Nucl Aci Res*, 11 : 6167.
〔30〕 Richards, O.C.et al., 1979, *Proc Natl Acad Sci USA*, 76 : 676.
〔31〕 Tomas, K.et al., 1985, *Nucl Aci Res*, 13 : 45.
〔32〕 Chow, F.et al., 1981, *Nucl Aci Res*, 9 : 2807.
〔33〕 Melton, D.A.et al., 1984, *Nucl Aci Res*, 12 : 7035.
〔34〕 Broker, T.R.et al., 1978, *Nucl Aci Res*, 5 : 363.
〔35〕 Owens, R.A.et al., 1981, *Science*, 213 : 670.
〔36〕 Meinkoth, J.et al., 1984, *Annal Biochem*, 138 : 267.
〔37〕 Wahl, G.M.et al., 1979, *Proc Natl Acad Sci USA*, 76 : 3683.
〔38〕 郭晓军等，1987，生物化学与生物物理学进展 2 : 70.
〔39〕 马大龙等，1987，中华微生物学和免疫学杂志，7(2) : 77.
〔40〕 Guesdon, J.L.et al., 1979, *J Histochem Cytochem*, 27 : 1131.
〔41〕 Hsu, S.M.et al., 1981, *Am J Clin Pathol*, 75 : 734.
〔42〕 Sternberger, L.A.et al., 1970, *J Histochem Cytochem*, 18 : 315.

维普资讯 http://www.cqvip.com

〔43〕 Diaz, M.et al., 1981, *Cell*, 24 : 649.
〔44〕 Brahic, M.et al., 1978, *Proc Natl Acad Sci USA*, 75 : 6125.
〔45〕 Cox, K.H.et al., 1984, *Dev Biol*, 101 : 485.
〔46〕 Zinn, K.et al., 1983, *Cell*, 34 : 865.
〔47〕 Church, G.M.et al., 1984, *Proc Natl Acad Sci, USA*, 81 : 1991.
〔48〕 Johnson, D.A.et al., 1984, *Gene Anal Techn*, 1 : 3.
〔49〕 Reed, K.G.et al., 1985, *Nucl Aci Res*, 13 : 7207.
〔50〕 Lawrence, J.B.et al., 1985, *Nucl Aci Res*, 13 : 1777.
〔51〕 Singer, R.H.et al., 1982, *Proc Natl Acad Sci USA*, 79 : 7331.
〔52〕 Hutchison, N.J.et al., 1982, *J Cell Biol*, 95 : 609.
〔53〕 Manuelidis, L.et al., 1982, *J Cell Biol*, 95 : 619.
〔54〕 Eckermann, D.J.et al., 1978, *Eur J Biochem*, 82 : 225.
〔55〕 成卓敏等, 1988, 病毒学报 4(1) : 57.
〔56〕 张鹤龄等, 1989, 病毒学报 5(1) : 72。
〔57〕 Miller, J.A., 1984, *Science News*, 126 : 104.