

直接酶标——化学发光分子杂交体系的建立*

杨晓林 王申五

(北京医科大学血液病研究所, 北京 100044)

摘要 本文通过调整发光剂、氧化剂、发光增强剂的浓度, 并加入一组辅助剂, 改进了依赖过氧化物酶化学发光液的配方。并通过比较实验证明: 该发光液的检测灵敏度高于其它原有的发光液, 同时还发现合成后的酶标复合物可经CM-32离子交换柱阶段洗脱纯化, 以提高杂交灵敏度。从而建立了一套直接酶标DNA探针——化学发光自显影分子杂交体系。其狭缝杂交灵敏度可达0.03pg。并利用该体系进行了单拷贝基因分析, Western印迹杂交及检测血清HBV DNA等的应用研究。

关键词: 直接酶标DNA探针; 化学发光自显影

核酸分子杂交是基因分析与分子生物学研究的重要手段。多年来主要使用³²P标记DNA探针——放射自显影分子杂交体系。近年来兴起了一系列的新型非放射性标记和检测体系^[1], 基本上满足了单拷贝基因分析的要求。非放射性标记探针多采用间接酶联检测, 1984年Benz等人报告^[2]了直接酶标DNA的方法, 以显色法检测。用此方法我们分析了Y染色体特异序列^[3], 其后又发展了增敏化学发光自显影技术^[4], 由此提高了灵敏度, 克服了显色法的一些缺点。是非放射性分子杂交技术的重要进展。本文立足国内条件, 建立并改进了该项生物技术, 以利分子杂交技术的开展。

材 料 和 方 法

一、材料与试剂

鲁米诺(Luminol) Sigma公司出品; H₂O₂天津生化试剂厂浓度为30%; 辣根过氧化物酶(HRP)上海生化所产品250U/mg RZ=3.0; 对苯醌(PBQ)为Sigma公司出品, 聚乙烯亚胺(PEI)为polysciences公司出品 MW=1200; 戊二醛Sigma公司产品; CM-32离子交换纤维素Whatman公司产品; 尼龙膜(Zeta-Probe)Bio-rad公司产品; 硝酸纤维素膜; 北京化工学校附属工厂出品; HBV DNA阳性及阴性血清标本; 分别由北医肝病所及北京生化免疫制剂中心提供。

* 国家“八六三”高科技研究项目资助。

收稿日期: 1992-10-09, 修回日期: 1992-12-18

二、方法

1. 化学发光液的配制：按本室研制的“超高敏酶促化学发光液配方”配制^[5]。
2. 直接酶标复合物 (HRP-PBQ-PEI) 的合成，按文献报道^[2]进行。
3. 酶标复合物使用 CM-32 离子交换柱纯化，其柱的活化及阶段洗脱均按常规进行^[6]。收集有色组分，测403nm光密度值，以标准曲线法计算 HRP 含量。
4. DNA 探针制备：按文献^[2]方法进行。
5. 化学发光光电流——HRP 浓度曲线的建立及检测膜上 HRP 均按本室已建立的方法^[5]进行。(发光检测仪 Pharmacia 1202型)
6. 斑点(狭缝)杂交及 Southern 印迹杂交方法同文献^[2]。
7. 血清标本处理按文献^[1]的方法进行。
8. Western-印迹实验按常规方法^[6]进行。

结果与讨论

一、超高敏酶促化学发光液的研究

Fig.1 是本室研制的“超高敏酶促化学发光液”与现有文献报道提供的配方^[4]，各自的化学发光光电流——HRP 浓度关系曲线。可以看出：前者的光电流值在各个酶浓度下均高于后者10—15倍，Fig.2是用该发光液与某国外公司产品同时检测膜上 HRP 的结果，显示该发光液检测灵敏度略高于国外公司的产品。

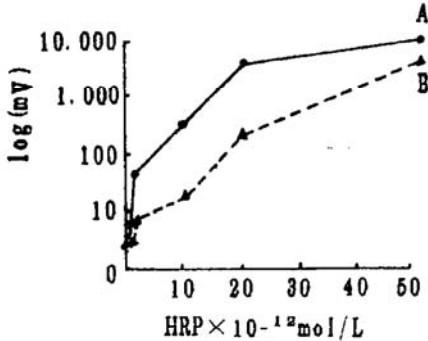


Fig.1 A comparison of two chemiluminescent solutions
A, Improved
B, from J. A. Matthews

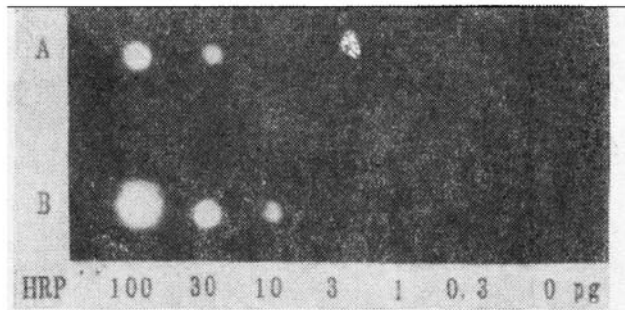


Fig.2 Detection of HRP on the filter membrane by chemiluminescent solution
A, Product of UK B, Improved

以HRP为催化剂的化学发光液一般由发光剂(如Luminol)、氧化剂(H₂O₂等)、发光增强剂^[8,9]以及缓冲体系组成^[4]。其各种成分的浓度对发光灵敏度影响很大^[10,11]。同时发光过程中产生的羟基自由基以及环境中的氢离子、极微量氨离子、重金属离子等对发光反应又具有明显的抑制作用^[11]。我们研究了能产生高光能的发光剂、氧化剂、发光增强剂等合适浓度；还发现同时加入一组发光辅助剂可以有效地控制上述不利于发光的因素并抑制由氧化剂单独作用引起的本底发光^[5]。结果表明该发光液具有较高的发光灵敏度。

二、酶标复合物 (HRP-PBQ-PEI) 的纯化

我们将酶标复合物经CM-32离子交换柱纯化后的二个洗脱峰分别进行狭缝杂交。可以看到,以第一洗脱峰标记的探针未能出现明显的杂交信号;而以第二洗脱峰标记的探针,其杂交灵敏度高达0.03pg,高于国外产品0.2pg的水平。

酶标复合物的合成,首先是将HRP经PBQ氧化,使其产生活化位点,然后通过该位点与PEI缩合,最终形成HRP-PBQ-PEI复合物,在标记探针时,以戊二醛为联接桥,使PEI上的亚胺基与DNA上的氨基共价结合。现有文献均未涉及合成后的纯化方法。而一般情况下,合成HRP-PBQ-PEI复合物的效率仅有25%左右^[1]。故使用未经纯化的酶标复合物时,往往产生较高本底。同时难以提高杂交灵敏度^[2]。

为此我们采用了CM-32离子交换柱及阶段洗脱法纯化酶标复合物,结果显示使用该方法可以将HPR-PBQ-PEI复合物与游离HRP分离,使杂交灵敏度大大提高。同时进一步发现,若适当调整合成过程中PBQ及PEI的浓度,可使酶标复合物第二洗脱峰产率提高到50%以上;当使用纯化后的酶标复合物标记探针时,可将酶标复合物及戊二醛用量降至文献报道^[2]用量的1/5左右,并不影响杂交灵敏度及信号强度(结果未列出)。因此本文中涉及的探针标记条件均按此进行。

三、单拷贝基因分析及Western印迹酶联分析

Fig.3是将上述DNA直接酶标——化学发光自显影杂交体系用于人类单拷贝基因分析的实验结果,其结果表明该系统的检测灵敏度达到该项实验的要求。

Fig.4是利用化学发光液进行Western印迹酶联分析实验的结果,说明该发光液也可用于免疫学检测技术。

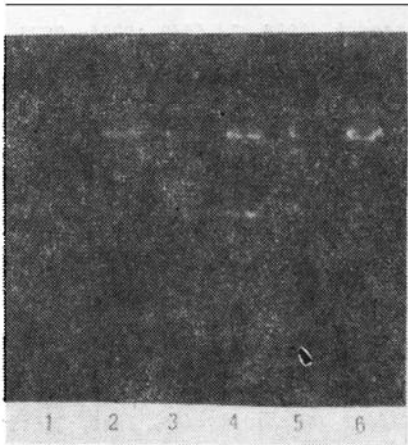


Fig. 3 Analysis of human HLA-DR β single copy gene (RFLPs) by direct labelling-chemiluminescent autographic system. Human DNA was digested by Taq I.PRTV-1/EcoR I linearized plasmid (3.5kb) as probe. 1, 3,5:patient A, 2,4,6:patient B



Fig.4 Detection of Western-blot by chemiluminescent solution expression of CMV shell proteins by gene-transplanted plant

四、血清HBV DNA检测

Fig.5 是 将该杂交体系用于检测人血清 HBV-DNA的实验结果。

由于血清中某些物质可以引起非特异性化学发光,因而使用血清直接点膜法时,往往出现假阳性结果^[7],我们发现若只将血清标本进行酚、氯仿抽提后再经热变性处理,则可消除这种现象(Fig.5 b,c);而采用碱变性法时仍有部分标本呈现假阳性。(Fig.5b)说明碱性环境下某些干扰物质仍可在酚-氯仿抽提时进入水相。

总之,由于化学发光系统灵敏度较高,又容易受众多因素干扰。因此,若用于直接检测生物材料中的特异基因片段,仍存在一些困难,需要今后进一步研究解决。

由于直接酶标及化学发光技术不论用于 Southern 印迹杂交, Western 印迹检测及斑点杂交,与其它非同位素显色技术相比,均具有其显著的优越性。如:省略了间接酶联及显色过程,因此使操作更简单、快速,并避免了有害显色剂的危害。同时实验结果也易于复制和永久保存;与同位素技术相比,不仅可以防止放射性物质的危害,而且自显影时间大大缩短,仅需1—60min,而检测灵敏度却基本接近同位素技术的水平;另外还有一个突出的优点在于将标本滤膜经简便冲洗后,即可进行重复杂交或抗体检测,便于回顾性研究及同一标本的多项研究。因此,近年来该技术在国内外得到越来越广泛的应用。相信上述体系的建立,将会对该技术在国内的推广应用起到一定的推动作用。

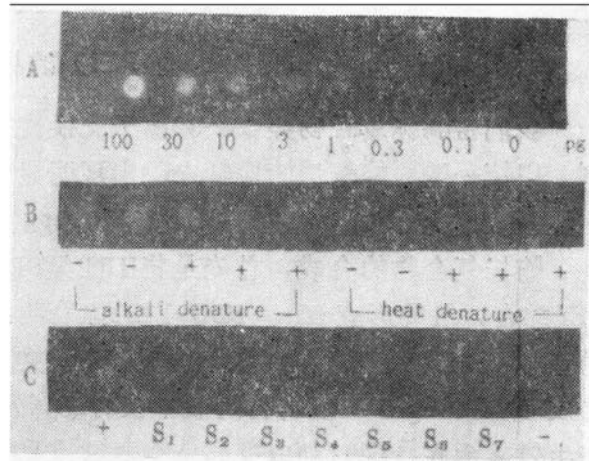


Fig.5 Detection of HBV-DNA in sera
A, standard HBV-DNA
B, a comparison of two denature methods for HBV-DNA positive and negative sera
C, HBsAg positive sera

参 考 文 献

- 1 Ali H Al-Hakin, Roger Hull. *Nucleic Acids Research*, 1986, 14 (24) :9965—9973
- 2 Manfred Renz, Christina Kurz. *Nucleic Acids Research*, 1984, 12 (8) :3435—3449
- 3 王申五, 姚红. *生物化学杂志*, 1987, 3:147—152
- 4 Matthews J A, et al. *Analytical Biochemistry*, 1985, 151:205—209
- 5 杨晓林, 王申五. 中华人民共和国技术发明专利, 1991, 申请号: 91110621.9
- 6 王琳芳, 潘华珍. *分子生物学基本技术*, 北京生理科学会出版, 1991, 29—35
- 7 Cuo K J, et al. *Journal of Clinical Microbiology*, 1991, 29(3):506—510
- 8 Kricka L J, et al. *Eur Patent Pub*, 1984, 118454
- 9 Carter T J N, et al. *Eur Patent Pub*, 1982, 87959
- 10 Cary H G, et al. *Clinical Chemistry*, 1985, 31(8):1335—1341
- 11 Misra H P, Sgenatritc P M. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1982, 215:59—61

Direct Labelling Chemiluminescent Hybridization System

Yang, Xiao-Lin Wang, Shen-wu

(Beijing Medical University, Institute of Hematology, Beijing 100034)

Abstract By adjusting the concentration of illuminant, oxidant, enhancer and adding the auxiliaries, the effect of chemiluminescent solution which depended on peroxidase was improved. After a comparison, it was proved that this solution had higher sensitivity for peroxidase than the others. Meanwhile, it was discovered that the enzyme complex could be separated from the non-linked enzyme by CM-32 ion-exchange column, so as to improve the sensitivity of hybridization. Thus, the hybridization system of enzyme direct labelling DNA probe chemiluminescent autographic assay was established. Its detectable limit of slot-blot hybridization was 0.03 pg. Then it was applicated to analysis of human single copy gene, western-blot and detection of HBV DNA in sera.

Key words: Enzyme direct labelling DNA probe, Chemiluminescent autographic assay