

分子信标用于核酸连续复制过程的体外实时监测

孟祥贤, 羊小海, 王柯敏, 郭秋平, 李 军, 唐志文

(湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室, 化学化工学院, 生物医学工程中心,
生物纳米与分子工程湖南省重点实验室, 长沙 410082)

摘要 利用分子信标核酸探针实时监测了核酸连续复制过程. 分子信标不仅作为模板参与复制反应, 而且同步将复制过程的信息转换为荧光信号, 实现复制过程的体外实时监测. 该方法不仅为 DNA 复制检测提供了一种实时研究手段, 而且为核酸复制动力学及与复制相关疾病的深入研究提供了一种新的思路.

关键词 分子信标; 核酸复制; 实时监测; 荧光信号

中图分类号 O657 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2009)08-1538-05

核酸 DNA 是遗传物质的载体, 核酸复制是物种保持稳定性的需要, 是生命繁衍、生存和进化的基础. 自从 1953 年 Watson 和 Crick^[1,2] 发现 DNA 双螺旋结构并提出 DNA 复制的可能模型后, DNA 复制已成为国内外研究的焦点. 1958 年, Meselson 及 Stahl^[3] 用同位素标记和超速离心分离实验研究 DNA 半保留复制模型; 1968 年, Okazaki 等^[4] 用同位素标记证实 DNA 半保留复制模型. 核酸复制过程一般是在 RNA 引物的引导下, 聚合酶催化复制反应从 5'→3' 延伸, 合成新生的子链, 先导链进行连续复制, 滞后链进行不连续复制^[5]. 传统研究 DNA 复制的方法一般采用放射性同位素标记和变性聚丙烯酰胺凝胶电泳相结合的方法^[6-11], 操作过程复杂, 且放射性元素容易对人体健康造成伤害. 近来有研究者发展了一些荧光方法用于核酸复制的研究^[12-14]. 如 Hellman 等^[12] 用原位荧光杂交研究复制延迟; Nishio 等^[13] 用绿色荧光蛋白技术研究复制抑制.

分子信标是一种设计巧妙的荧光核酸探针, 它将核酸的序列结构信息转化为荧光信号^[15,16], 具有高的灵敏度与选择性, 近年来越来越广泛应用于核酸和蛋白质研究领域^[17-25]. 本实验室利用分子信标技术, 实时监测了核酸之间的连接过程^[26,27]、DNA 磷酸化^[28] 及生物活性核酸分子的超灵敏检测^[29]. 在此基础上, 本文利用分子信标核酸探针发展了一种实时监测 DNA 先导链的连续复制过程的荧光方法, 把 DNA 体外复制过程的信息用荧光信号实时表征并以此建立了一种聚合酶活性的快速定量检测法.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

分子信标 [5'-(FAM)-CGTCGATGGAGCACTTACGAGACCTCGACG-(DABCYL)-3']、RNA 引物 (5'-AGGUCUCGUA-3')、cDNA (5'-GGTCTCGTAAGTGCTCCA-3') 和序列 N1 (5'-GGTCTCGTTAGTGCTCCA-3') (与 cDNA 单碱基差异) 均由大连 Takara 公司合成. 分子信标的 5' 端标记荧光基团 6-羧基-荧光素 (FAM), 3' 端标记熄灭基团 4-(二甲基对氨基偶氮苯) 苯甲酸 (DABCYL), RNA 引物与分子信标的环部 3' 端互补. cDNA 与分子信标的环部互补. dNTP, Tris, Klenow Fragment (exo-) 聚合酶 (简称 KF⁻), 二硫苏糖醇 DTT 和焦碳酸二乙酯 (DEPC) 购自 Sigma 公司, 其它试剂均为国产分析纯.

LS-55 荧光分光光度计 (美国 Perkin Elmer 公司), 恒温水浴 (美国 Amersham 公司).

收稿日期: 2009-03-10.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 20505007, 90606003) 和湖南省自然科学基金 (批准号: 08JJ1002) 资助.

联系人简介: 王柯敏, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事纳米及分子水平上的生物分析化学及纳米生物技术研究.

E-mail: kmwang@hnu.cn

1.2 荧光检测

荧光检测在 Perkin Elmer LS-55 荧光分光光度计上进行, 并连接恒温水浴使反应温度恒温 37 °C (除特别指出外). 分子信标所标记的荧光基团为 FAM, 选择 469 nm 为激发波长, 518 nm 为发射波长. 波长扫描用 469 nm 光激发, 在 518 nm 处检测. 仪器的人射狭缝为 5 nm, 发射狭缝为 10 nm, 样品体积为 80 μ L.

1.3 分子信标性能

反应液包括 KF^- 反应缓冲液 [50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) + 10 mmol/L $MgCl_2$ + 1 mmol/L DTT] 和终浓度为 200 nmol/L 的分子信标. 在反应液中分别加入终浓度为 200 nmol/L 的 cDNA 和 N1 杂交, 进行波长扫描.

1.4 DNA 连续复制过程的实时监测

依次往石英比色池中加入 KF^- 反应缓冲液、终浓度为 200 nmol/L 分子信标、300 nmol/L RNA 引物和 25 μ mol/L dNTP, 荧光稳定后, 加入 2.5 U/ μ L 的 KF^- 溶液 1 μ L, 进行荧光强度的实时扫描.

1.5 KF^- 活性的定量分析

用酶稀释液依次稀释配制酶浓度为 2.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.1 和 0.025 U/ μ L 的 KF^- 标准溶液, 所有操作在 0~4 °C 下进行, 酶溶液配制好后置于 -20 °C 保存备用. 在 KF^- 反应缓冲液、终浓度为 200 nmol/L 分子信标、300 nmol/L 引物和 25 μ mol/L dNTP 中, 分别加入不同浓度的 KF^- 溶液 1 μ L, 实时扫描荧光强度.

2 结果与讨论

2.1 实验原理

分子信标 (MB) 体外实时监测 DNA 连续复制过程原理示意图 1. 分子信标的环部被设计成与 RNA 引物互补, 在聚合酶的作用下, 以分子信标为模板, dNTP 被依次加在 RNA 引物的 3' 末端, 发生延伸反应, 形成与分子信标互补的链, 破坏分子信标茎环部结构, 使分子信标荧光基团和熄灭基团分开, 发出荧光, 实现复制过程的实时监测.

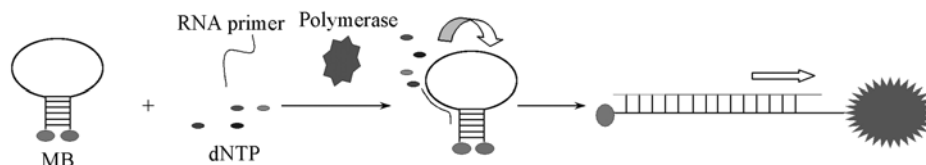


Fig. 1 Schematic diagram of real-time monitoring continuous replication of DNA leading strand

2.2 分子信标性能考察

分子信标是否具有高灵敏和高特异性是 DNA 复制监测的关键. 图 2 是 MB 与完全互补 cDNA 和单碱基差异 N1 的发射光谱, 图 2 中曲线 a 为分子信标与 cDNA 杂交后的发射光谱, 曲线 b 为分子信标与 N1 杂交后的发射光谱. 分子信标与 cDNA 杂交后的荧光强度 (曲线 a) 是分子信标本底的 11 倍, 而分

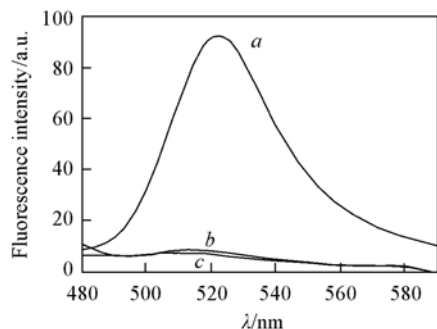


Fig. 2 Emission spectra of MB hybridized with cDNA and N1

a. MB + cDNA; b. MB + N1; c. MB.

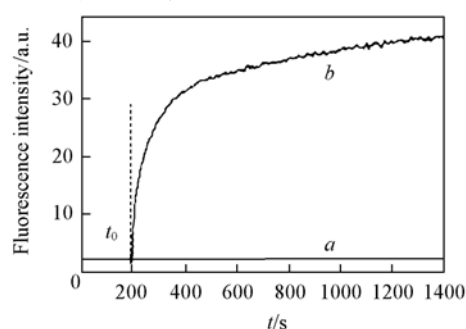


Fig. 3 Real-time monitoring replication of DNA leading strand

a. Without KF^- ; b. adding KF^- at t_0 time.

子信标与单碱基差异 N1 杂交后的荧光强度(曲线 *b*) 仅为本底的 0.17 倍, 这说明分子信标能有效识别单碱基差异的核酸序列, 具有高灵敏高特异性。

2.3 DNA 连续复制过程的体外实时监测

DNA 连续复制过程的体外实时监测结果如图 3 所示, 由图 3 中曲线可见, 反应物中没有 KF^- 存在时, 荧光强度随着扫描时间的延长无明显变化, 加入 KF^- 后, 荧光强度迅速增强(曲线 *b*), 随着时间的推移, 荧光信号逐渐增加. 表明在聚合酶的作用下, RNA 引物以分子信标为模板, 发生了延伸反应, 产生了与分子信标互补的链, 使分子信标逐渐打开, 荧光信号上升, 从而实现了 DNA 连续复制过程的体外实时监测。

2.4 复制过程的影响因素

2.4.1 分子信标模板浓度的影响 在反应缓冲液中加入终浓度为 300 nmol/L 的 RNA 引物和 25 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 分别加入不同量的分子信标模板, 使其终浓度分别为 0, 100, 150, 200 和 300 nmol/L, 实时监测反应, 依据文献[24]方法, 计算出反应初速度. 归一化初速度后对分子信标模板浓度作图, 结果如图 4(A) 所示, 由图 4(A) 可知, 当不加分子信标模板时, 聚合反应不发生, 说明模板是 DNA 复制的必不可少的条件, 随着模板浓度增加, 反应初速度持续上升. 考虑到成本, 本实验选用 200 nmol/L 分子信标作为模板浓度。

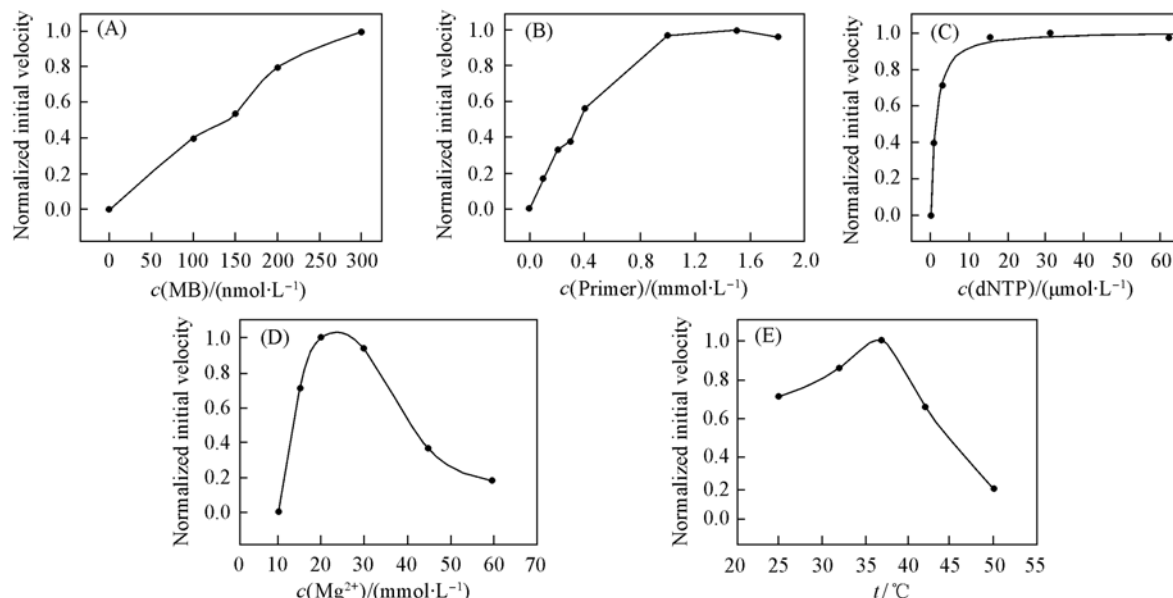


Fig. 4 Effects of different factors on DNA replication

(A) Template; (B) primer; (C) dNTP; (D) Mg^{2+} ; (E) temperature.

2.4.2 RNA 引物浓度的影响 固定分子信标和 dNTP 的终浓度分别为 200 nmol/L 和 25 $\mu\text{mol/L}$, 改变 RNA 引物的浓度, 使其终浓度分别为 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 1.0, 1.5 和 1.8 mmol/L, 实时监测反应, 计算反应初速度并归一化初速度后对 RNA 引物浓度作图, 结果如图 4(B) 所示. 可见, 当不加引物时, 聚合反应初速度为 0, 随着引物浓度增加, 反应初速度持续上升, 当引物浓度高于 1 mmol/L 时, 反应初速度基本达到平衡, 高于 1.5 mmol/L 时, 引物浓度对反应初速度有一定抑制作用. 本实验选用 300 nmol/L RNA 作为引物浓度。

2.4.3 dNTP 浓度的影响 固定分子信标和引物的终浓度分别为 200 和 300 nmol/L, 改变 dNTP 的量, 使其终浓度分别为 0, 0.78, 3.1, 15.6, 31.3 和 62.5 $\mu\text{mol/L}$, 实时监测复制反应, 图 4(C) 是归一化初速度后对 dNTP 浓度作图所得曲线. 可见, 当不加 dNTP 时, 初速度为 0, 复制反应不能进行, 但随着 dNTP 浓度的增加, 反应初速度逐渐增加, 当浓度达到 25 $\mu\text{mol/L}$ 时, 反应的初速度基本达到平衡。

2.4.4 Mg^{2+} 离子浓度的影响 Mg^{2+} 是生物体中的重要金属离子, 参与许多酶的激活和催化^[26-29], 实验考察了不同浓度的 Mg^{2+} 对复制反应的影响. 图 4(D) 是归一化初速度后对 Mg^{2+} 浓度作图所得曲线。

由图4(D)可见, Mg^{2+} 作为 KF^- 激活剂, 不加 Mg^{2+} 时, 反应不能发生, 当 Mg^{2+} 浓度在 1 ~ 10 mmol/L 范围时, 反应初速度随着 Mg^{2+} 浓度的增加而增加, 当 Mg^{2+} 浓度为 10 mmol/L 时, 反应初速度达最大值, 当浓度继续增加时, 反而会抑制复制反应。

2.4.5 温度的影响 分别考察了实验温度为 25, 32, 37, 42 和 50 °C 时对复制反应的影响, 图4(E)是归一化初速度后对温度作图所得曲线, 可以发现, 反应温度在 37 °C 时复制反应初速度最大。

2.5 监测体系用于聚合酶定量分析

图5(A)给出了不同浓度的 KF^- 催化 DNA 连续复制过程的实时监测曲线, KF^- 的浓度从上至下分别为 2.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.1 和 0.025 U/ μ L。可见, 随着反应体系中酶量的增加, 荧光强度依次增强。按文献[24]方法计算反应初速度, 将反应初速度对聚合酶浓度作图, 结果见图5(B), 从图中发现, 酶浓度在 0.025 ~ 2.5 U/ μ L 范围内, 反应初速度与酶浓度成正比, 得线性方程 $v_0 = 12.5c$ (v_0 为反应初速度, c 为聚合酶浓度, U/ μ L)。根据此方程, 可以方便快捷地从反应初速度计算出聚合酶浓度, 实现聚合酶活性的快速定量分析。

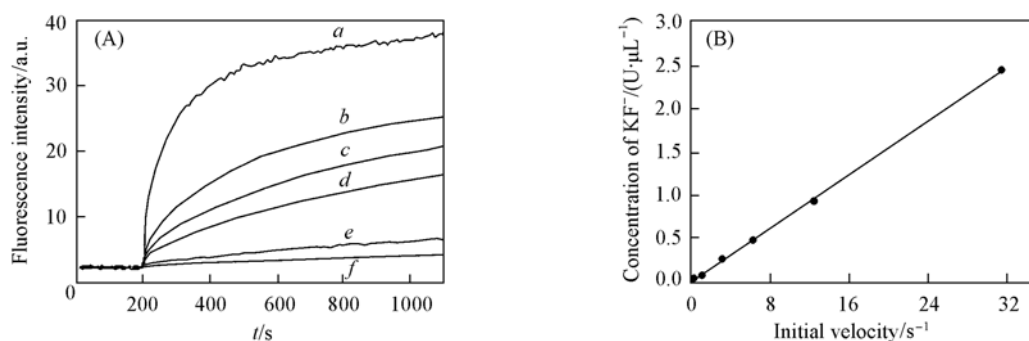


Fig. 5 Quantitative analysis of KF^-

(A) Reaction under different concentrations of KF^- . Concentration of KF^- /(U· μ L $^{-1}$): a. 2.5; b. 1; c. 0.5; d. 0.25; e. 0.1; f. 0.025. (B) The relationship between initial velocity and KF^- concentration.

3 结 论

基于分子信标核酸探针, 发展了一种体外实时监测 DNA 连续复制过程的方法。利用分子信标作为 DNA 复制反应的模板和检测分子, 在 RNA 引物引导下, 与模板互补的 dNTP 被依次加到 RNA 引物 3' 末端, 使分子信标茎部打开, 荧光逐渐恢复。该方法在 DNA 复制反应的同时检测荧光信号, 准确地获取了 DNA 复制过程的信息。通过荧光信号的变化, 方便快捷地研究 DNA 复制过程, 不需放射性同位素标记和变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 操作简单安全。该方法不仅为 DNA 的复制研究提供了一种新的思路, 而且为复制动力学过程及与复制相关疾病的深入研究提供了可能。

参 考 文 献

- [1] Watson J. D., Crick F. H.. Nature[J], 1953, **171**(4361): 964—967
- [2] Watson J. D., Crick F. H.. Nature[J], 1953, **171**(4356): 737—738
- [3] Meselson M., Stahl F. W.. Proc. Natl. Acad. Sci. USA[J], 1958, **44**: 671—682
- [4] Okazaki R., Okazaki T., Sakabe K.. Proc. Natl. Acad. Sci. USA[J], 1968, **59**: 598—605
- [5] CHEN Yue-Zeng(陈阅增). General Biology(普通生物学)[M], Beijing: Higher Education Press, 2001: 412—436
- [6] Berndt M., Jane B., Carmen F., et al.. J. Cell Biol. [J], 2007, **179**: 1385—1398
- [7] Tonatiuh R. S., Irina P., Olga L., et al.. Nucleic Acids Res. [J], 2009, **37**(1): 38—46
- [8] Tsurimoto T., Stillman B.. J. Biol. Chem. [J], 1991, **266**(3): 1950—1960
- [9] Minden J. S., Marians K. J.. J. Biol. Chem. [J], 1985, **260**(16): 9316—9325
- [10] Huang T., Chen C. W.. J. Bacteriol. [J], 2008, **190**: 755—758
- [11] Toshiki T., Bruce S.. J. Biol. Chem. [J], 1991, **266**(33): 1950—1960
- [12] Hellman A., Rahat A., Scherer A. W., et al.. Mol. Cell. Biol. [J], 2000, **20**: 4420—4428
- [13] Nishio M., Ohtsuka J., Tsurudome M., et al.. J. Virol. [J], 2008, **82**: 6130—6137

- [14] Ono H. A. , Le L. P. , Davydova J. G. , *et al.* . Cancer Res. [J] , 2005 , **65** : 10154—10160
- [15] Tyagi S. , Kramer F. R. . Nat Biotech. [J] , 1996 , **14** : 303—306
- [16] Fang X. , Li J. J. , John P. , *et al.* . Anal Chem. [J] , 2000 , **72** : 747A—753A
- [17] MENG Xiang-Xian(孟祥贤) , WANG Ke-Min(王柯敏) , TAN Wei-Hong(谭蔚泓) , *et al.* . Chinese Sci. Bull. (科学通报)[J] , 2003 , **48** : 2132—2136
- [18] Vitko J. , Rujan I. , Androga L. , *et al.* . Biophys. J. [J] , 2007 , **93**(9) : 3210 — 3217
- [19] Lin Y. W. , Ho H. T. , Huang C. C. , *et al.* . Nucleic Acids Res. [J] , 2008 , **36**(19) : e123
- [20] Chen A. K. , Behlke M. A. , Tsourkas A. . Nucleic Acids Res. [J] , 2008 , **36**(12) : e69
- [21] LIU Ling-Feng(刘凌风) , TANG Zhi-Wen(唐志文) , WANG Ke-Min(王柯敏) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J] , 2003 , **24**(10) : 1761—1764
- [22] Li J. J. , Chu Y. , Lee B. Y. , *et al.* . Nucleic Acids Res. [J] , 2008 , **36**(6) : e36
- [23] Horejsh D. , Martini F. , Poccia F. , *et al.* . Nucleic Acids Res. [J] , 2005 , **33**(2) : e13
- [24] Li J. J. , Geyer R. , Tan W. H. , *et al.* . Nucleic Acids Res. [J] , 2000 , **28**(11) : e52
- [25] Waltz T. L. , Marras S. , Rochford G. , *et al.* . J. Clin. Microbiol. [J] , 2005 , **43** : 254—258
- [26] TANG Zhi-Wen(唐志文) , WANG Ke-Min(王柯敏) , TAN Wei-Hong(谭蔚泓) , *et al.* . Chinese Sci. Bull. (科学通报)[J] , 2003 , **48** : 1030—1035
- [27] Tang Z. W. , Wang K. M. , Tan W. H. , *et al.* . Nucleic Acids Res. [J] , 2003 , **31**(23) : e148
- [28] Tang Z. W. , Wang K. M. , Tan W. H. , *et al.* . Nucleic Acids Res. [J] , 2005 , **33**(11) : e97
- [29] MENG Xiang-Xian(孟祥贤) , TANG Zhi-Wen(唐志文) , WANG Ke-Min(王柯敏) , *et al.* . Chinese Sci. Bull. (科学通报)[J] , 2006 , **51** : 2733—2737

Real-time Monitoring Continuous Replication of DNA Leading Strand *in vitro* Based on Molecular Beacon

MENG Xiang-Xian, YANG Xiao-Hai, WANG Ke-Min* , GUO Qiu-Ping, LI Jun, TANG Zhi-Wen
(State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, College of Chemistry and Chemical Engineering,
Biomedical Engineering Center, Key Laboratory for Bio-Nanotechnology and Molecular
Engineering of Hunan Province, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract Real-time monitoring of replication of DNA leading strand using molecular beacon *in vitro* was reported. DNA replication plays a pivotal role in life process. DNA replication is usually assayed by denatured gel electrophoresis and autoradiography, which are complex, time-consuming, and incapable of acquiring the dynamic data in real time. We employed molecular beacon as the probe and template for DNA replication and converted directly replication information into fluorescence signal. The replication information of DNA leading strand was obtained conveniently and accurately using molecular beacon. This method would provide a strategy for real-time monitoring DNA replication and for further research of replication dynamic data and some diseases associated with DNA replication.

Keywords Molecular beacon; DNA replication; Real-time monitoring; Fluorescent signal

(Ed. : F, G)