

核酸探针中放射性同位素的快速检测

罗文永^{1,2}, 胡 骏^{1,2}, 刘文华², 陈建伟¹, 毛兴学¹, 李晓方^{1*}

(¹广东省农业科学院水稻研究所农业部水稻遗传改良重点实验室及广东省水稻育种新技术重点实验室, 广州 510640; ²中山大学植物基因工程教育部重点实验室, 广州 510275)

摘要: 利用尼龙膜作为介质, 以 0.4 mol/L 的 NaOH 为层析液, 进行膜上层析, 分离经放射性同位素标记的核酸探针和未掺入的放射性游离单核苷酸, 再经放射性强度测定即可计算出标记后的核酸探针的放射性比活。方法简单快捷, 产生的放射性废物少, 完全可以替代经典的三氯乙酸沉淀法及滤膜吸附法。

关键词: 放射性活性; 核酸探针; 尼龙膜

中图分类号: Q5-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)03-324-03

利用放射性同位素标记的探针进行核酸杂交时, 探针中放射性同位素的比活是实验成败的关键之一, 检测探针中放射性掺入比率的常规方法主要有三氯乙酸沉淀法和滤膜吸附法^[1]。然而, 这些方法步骤较多, 而且, 操作过程中造成二次污染的可能性也较大。

本实验利用带正电荷的尼龙膜进行膜上层析分离经放射性同位素标记的核酸探针与未掺入的单核苷酸, 其原理是: 尼龙膜通常可以吸附长度大于 50 个碱基的双链及单链 DNA 或 RNA^[2], 层析过程中, 核酸被吸附在膜上, 不能随着层析液迁移而留在原点, 未掺入的单核苷酸和长度较短的寡核苷酸则可以随着层析液迁移而迁移, 经过一段时间的层析后, 有效标记的核酸探针便与未掺入的单核苷酸分离开来, 此时, 分别检测点样原点和溶剂前沿的放射性强度, 即可计算出有效探针的放射性同位素比活^[1], 该方法操作简单, 并且层析后的废物中只有尼龙膜带有放射性。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

Hybond N+ 尼龙膜、随机引物标记试剂盒, 购于 Amersham-Pharmacia Biotech 公司; 比活为 3000 Ci/mmol 的 [α -³²P]dCTP 为北京亚辉公司产品; 600 bp DNA 片段为本实验室制备; 其余为国产试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 单核苷酸层析对照 取 1 cm 宽、15 cm 长

的尼龙膜, 在距尼龙膜一端 1 cm 处作一标记作为点样原点, 将放射性单核苷酸原液稀释 10 000 倍, 取 1 μ l 点在原点处, 晾干备用。层析时, 将 0.4 mol/L 的 NaOH 溶液盛于广口瓶中作为层析溶剂, 在尼龙膜的两端夹上回型针, 将尼龙膜原点处朝下垂直悬挂在广口瓶上方, 使层析液液面超过下方的回型针但又不接触原点进行层析, 层析结束后按常规方法进行放射自显影, 测定不同时间内单核苷酸分离效果, 根据层析结果确定适当的层析时间。

1.2.2 核酸层析对照 取 1 ng 未经标记的 DNA 点在尼龙膜上作为核酸的层析对照进行层析, 层析结束后, 按常规方法进行核酸杂交及放射自显影。

1.2.3 标记后的核酸探针混合物的层析 按试剂盒说明进行 DNA 探针的标记, 取 1 μ l 标记后经稀释 200 倍的探针 DNA 溶液, 点在原点, 按上面的方法进行层析及压片、放射自显影。同时, 按同样的方法准备另一份层析样品, 层析结束后, 从原点到溶剂前沿连线的中点处剪开, 用液闪仪测定点样原点的放射性强度, 按 Sambrook 等介绍的公式计算探针的比活^[1]。同时, 用三氯乙酸沉淀法作为测定探针放射性强度的标准对照^[1]。

2 结果

收稿日期: 2003-10-13; 修回日期: 2003-12-11

农业部“948”项目(20020201)和广东省自然科学基金重点项目(036745)资助

* 通讯作者, E-mail: lixiaofang38@163.net

层析过程中, 溶剂迁移速度早期较快, 随着时间的延长, 迁移速度逐渐减慢, 经放射性自显影发现, 5min后, 单核苷酸层析对照中仍有部分放射性单核苷酸留在原点, 到10min时, 几乎全部的放射性单核苷酸都已离开原点, 而且随着时间的延长, 分离效果更好(图1)。

常规标记的探针DNA经层析15min, 分别在原点和溶剂前沿出现强放射性区(图2a); 而点在原点处的DNA层析后, 经杂交检测仍留在原点(图2b), 因此说明, 经标记的探针DNA层析后留在原点的是标记后的核酸片段, 而出现在溶剂前沿区的是未掺入的单核苷酸。

用液闪仪测定放射性强度, 分别按三氯乙酸沉淀法和尼龙膜层析法检测本实验所用探针的比活, 三氯乙酸沉淀法的测定结果为 1.351×10^9 cpm/ μ g,

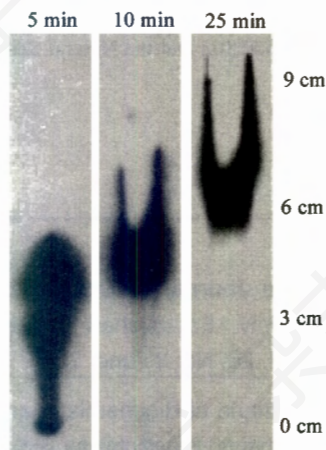


图1 层析时间对单核苷酸迁移效果的影响

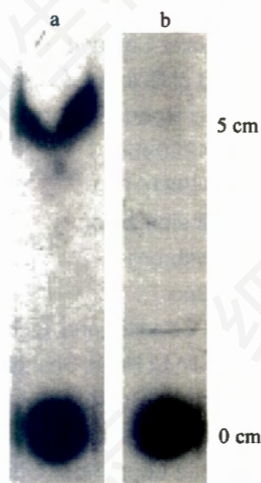


图2 尼龙膜层析法分离核酸与单核苷酸

a: 正常标记的探针DNA溶液层析结果; b: 点在原点的DNA层析后杂交检测结果。

而尼龙膜层析法的测定结果为 1.423×10^9 cpm/ μ g, 后者略高, 可能与三氯乙酸沉淀法需经过漂洗有关, 但也有可能是取样误差。

3 讨论

利用尼龙膜进行膜上层析可以有效地将核酸和单核苷酸分离开来, 与经典的三氯乙酸沉淀法以及滤膜吸附法相比, 本方法简单快捷, 无需特殊的化学试剂, 无需沉淀、洗膜等步骤, 整个层析过程可以在30min内完成。此外, 按本方法层析后, 含有放射性的同位素仍然留在尼龙膜上, 因此, 产生的有害废物也比三氯乙酸沉淀法以及滤膜吸附法少。

在这3种方法中, 只有滤膜吸附法可以检测小于50 nt的寡核苷酸, 但根据经验公式计算^[3], 50 nt以内的寡核苷酸, 其 T_m 值较低, 不适合于常规的核酸杂交。因此, 测定常规探针的标记强度时, 完全可以用本方法进行替代。而且, 由于活化纸可以通过共价连接的方式吸附5 nt以上的寡核苷酸及核酸^[3], 如果需要检测片段长度小于50 nt的寡核苷酸时, 可以用它来替代尼龙膜进行膜上层析。

在本试验中, 采用0.4 mol/L的NaOH溶液作为层析液, 目的是利用带正电荷的尼龙膜在碱性条件下可以共价结合DNA的特点, 提高核酸与尼龙膜的结合强度^[2], 从而更加有利于核酸与单核苷酸的分离。如果以不带电荷的尼龙膜作为层析介质, 或者测定RNA探针的放射性强度时, 可以采用 $20 \times$ SSC溶液作为层析溶剂。而在尼龙膜下方加上回型针可以防止尼龙膜发生卷曲, 但操作时需确保回型针与原点之间有一定的距离, 从而使层析液可以完全浸过回型针而又不与原点直接接触。此外, 采用本方法时, 应保证有足够的层析时间, 以利于单核苷酸和核酸的充分分离。

由于带正电荷的尼龙膜与DNA之间是共价结合的方式, 层析分离的探针难以回收, 因此, 本方法只适合于测定常规探针的放射性同位素标记强度。

参 考 文 献

- [1] 萨姆布鲁克J, 弗里奇EF, 曼尼阿蒂斯T. 分子克隆实验指南(第二版)[M]//金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1989: 963 - 964.
- [2] 奥斯伯F, 布伦特R, 金斯顿RE, 等. 精编分子生物学实验指南[M]//颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 1998: 55.
- [3] 吴冠芸, 潘华珍, 吴翠. 生物化学与分子生物学实验常用数据手册[M]//北京: 科学出版社, 1999: 338 - 339.

A Simple Method for Detection of Radioactivity of Nucleic Acid Probes

LUO Wen Yong^{1,2}, HU Jun^{1,2}, LIU Wen Hua², CHEN Jian Wei¹, MAO Xin Xue¹, LI Xiao Fang^{1*}

(¹The Key Laboratory of Rice Genetic Improvement of Ministry of Agriculture and Guangdong Key Laboratory of New Technology in Rice Breeding, Rice Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; ²The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: We reported here a new method for detection of radioactivity of radiolabeled nucleic acid probes. In this method, nylon filter and 0.4 mol/L of NaOH were used as chromatography media and chromatography solvent respectively. After chromatography, radiolabeled nucleic acid probes stayed at origin, while free nucleotides migrated to solvent front. Thus the radioactivity of radiolabeled nucleic acid and nucleotide could be measured respectively. This method is very simple, and could be finished in 30 min. On the other hand, this method leads to less contamination for the only radioactive waste was nylon filter itself after detection.

Key words: radioactivity; nucleic acid probes; nylon filter

This work was supported by "948" Project of the Ministry of Agriculture of China (20020201) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province (036745)

*Corresponding author, E-mail: lixiaofang38@163.net

细胞生物学杂志
双月刊 1979年创刊
第26卷 第3期 2004年6月

Chinese Journal of Cell Biology
Bimonthly Established in 1979
Vol. 26 No. 3 June 2004

主 办 中国科学院上海生命科学研究院
生物化学与细胞生物学研究所
中国细胞生物学学会

协 办 厦门大学生命科学学院
赛达生物技术研究中心

编 辑 《细胞生物学杂志》编辑委员会
上海岳阳路320号 邮政编码: 200031
电 话: 021-54920950
传 真: 021-54921011
电子信箱: cjcb@sibs.ac.cn
网 址: www.cjcb.org

主 编 郭 礼 和

出 版 上海科学技术出版社
上海瑞金二路450号 邮政编码: 200020

印 刷 上海图字印刷有限公司

发 行 上海市报刊发行局

订 阅 全国各地邮局

广告代理 上海高精广告有限公司
广告经营许可证: 沪工商广字3101031000061

Sponsored by Institute of Biochemistry and Cell Biology
Shanghai Institutes for Biological Sciences,
Chinese Academy of Sciences
Chinese Society for Cell Biology

Joint-sponsored by School of Life Sciences, Xiamen University
Celstar Center of Bio-Tech Research

Edited by Editorial Board of Chinese Journal of Cell Biology
320 Yue-Yang Road, Shanghai 200031, China
Tel: 86-21-54920950
Fax: 86-21-54921011
E-mail: cjcb@sibs.ac.cn
Http: //www.cjcb.org

Editor-in-Chief Li-He Guo

Published by Shanghai Scientific and Technical Publishers
450 Rui-Jin Er Road, Shanghai 200020, China

Distributed by Shanghai Bureau for Distribution of
Newspapers and Journals

Subscribed by Domestic Local Post Offices