

的人成纤维细胞的影响。在 0—500 cGy 钴-60 γ 射线照射剂量范围内, 细胞 ^3H -TdR 掺入计数与照射剂量呈线性关系。 $y = 33745.4 e^{-0.0038x}$ 。低浓度 $\alpha_2\text{M}$ 对细胞 ^3H -TdR 掺入没有影响, 高浓度 $\alpha_2\text{M}$ 能抑制细胞 ^3H -TdR 掺入。 4×10^5 细胞经钴-60 γ 射线 500 cGy 照射后加 $\alpha_2\text{M}$ 制剂, 细胞 ^3H -TdR 掺入计数与不照射对照组相比有明显升高 ($P < 0.05$)。在照射前加 $\alpha_2\text{M}$ 制剂与对照组相比无明显差别。

参 考 文 献

- [1] Hanna, M. G. et al., 1967, *Science.*, 157
1458—1462.
[2] 翁志根等, 1981, 中华放射医学与防护杂志

- 1: 33—36.
[3] Mosher, D. F. et al., 1977, *J. Clin. Invest.*, 60: 1036—1045.
[4] Saksela, O. et al., 1984, *Cancer Res.*, 44: 2942—2946.
[5] Dickson, R. B. et al., 1982, *J. Biol. Chem.*, 257: 3454—3459.
[6] Maxfield, F. R. et al., 1986, *Biochemistry.*, 20: 5353—5358.
[7] Hanover, J. A. et al., 1984, *Annals NY Academy Science*, 410—423.
[8] Mosher, D. F. et al., 1983, *Annals NY Academy Science.*, 327—331.
[9] Borth, W., 1984, *Cell Relat Res.*, 4: 83—94.
[10] Hoffman, M, et al., 1983, *Biochim. Biophys. Acta.*, 760: 421—423.

实验技术

生物素标记检测在基因探查中的应用

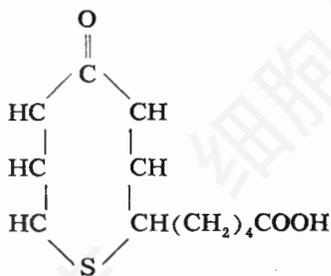
熊 辛* 郭 征

(北京市肿瘤所细胞遗传室)

从 1969 年分子原位杂交技术问世以来^[1], 为检测其杂交结果, 形成了以放射自显影技术为主的检测手段。但因此技术涉及到对人体有害的同位素, 而促使人们寻找其他的方法以代替同位素的使用。为此, 生物素标记检测体系的建立和发展受到了人们的青睐。本文拟就生物素标记检测体系的建立、应用及前景作一概述。

生物素特性 属于脂溶性维生素 B 族。具有噻吩与尿素相结合的骈环, 并带有戊酸侧链。为小分子水溶性物质^[2]。

生物素的分子结构式如下:



生物素(Biotin)可与存在于鸡蛋清中的一种碱性蛋白质——抗生物素蛋白(Avidin)相结合。和(Avidin)理化特性相似, 存在于链霉菌中的链抗生物素蛋白(Streptavidin)亦能与生物素结合。生物素与这两种蛋白之间的结合极为牢固, 其亲和力为 $\text{KD} = 10^{-15}\text{M}$ ^[3,4]。而且这种结合是特异性的^[5]及不可逆的^[6]。

生物素检测原理 其原理可以认为是基于免疫酶组织化学及分子杂交原理。前者属于抗原抗体反应范畴, 即籍助于酶、荧光素等标记抗体与待检标本中的相关抗原相结合。由于酶经过一定的显色处理, 可呈现醒目的阳性色彩, 而荧光素则可发出荧光, 这样, 在显微镜下即可根据颜色反应和所发荧光来准确定位待检抗原物质。它将显微镜的高度精确性和抗原抗体反应的高度敏感性融为一体^[7]。而分子杂交原理则是: 溶液中的 DNA 分子被加热变性后, 两

* 昆医附一院肿瘤所。

条单链分离；经退火处理又可以复性，二链重新缔合。不同来源的两条单链DNA，只要它们有一定的互补碱基顺序，也可出现复性现象，形成新的杂种双螺旋分子。这种结合称为分子杂交。同理，DNA单链也可与RNA链杂交成双链。为检测杂交结果，其中一条链必须用同位素标记。杂交后经放射性测定，即可求得这二种单链的杂交程度，在亲缘关系上越近的两条核酸单链，杂交双螺旋的互补程度越高^[8]。

生物素检测系统代替同位素用于基因探查，正是利用生物素标记特异的核酸探针进行分子杂交。杂交后，采用免疫组织化学技术显示杂交结果。

生物素标记DNA探针 生物素环上有一NH基团和羧基，可以成为氢键的提供者，从而不仅能和蛋白质如酶、抗原或抗体结合，也能和糖蛋白中的氨基酸残基或糖残基的羧基侧链共价结合。1981年，Langer利用酶促合成方法将生物素的羧基通过一条丙烯酰胺臂(—NH—O—C—(CH₂)₄—)与脱氧尿嘧啶核苷酸嘧啶环C₅共价连接在一起，成功地制成了生物素标记的单核苷酸(Biotin-11-dUTP)^[9]。次年，Langer及其同事又制备成功(Biotin-11-dCTP)^[10]。上述标记了生物素的脱氧核苷酸，即相当于同位素标记的脱氧核苷酸。由此，可根据缺口翻译原理^[11]制成生物素标记的DNA探针。1982年，L. Manuclidis及其同事制备成生物素标记的鼠随体DNA探针^[12]。1985年L-F Lau用生物素标记药盒(Biotinylation Kit BRL)制备了一个pY 3.4的DNA探针，后者克隆于Y染色体3.4 kb Hae III酶切重复片段^[13]。另外，王申五用3'末端标记方法制成生物素寡聚核苷酸探针。制备好的探针可用Sephadex G-50柱层析将其与未标记的核苷酸分离^[12,14]。

应用 如前述，生物素标记的探针用于分子杂交后，其结果显示可为酶对底物的呈色反应，亦可用荧光显示。

酶底物呈色反应所用的酶可以是辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶及β-半乳糖苷酶等。过氧化物酶的底物系统包括过氧化氢及一个供氢体，如邻苯二胺等，后者被氧化而呈色；而碱性磷酸酶则要求两个显色底物：四氮杂茂硝基兰(NBT)及5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐(BCIP)。1979年Gueston提出让生物素直接结合抗生物素蛋白的方法^[6]。1981年，许世明改进了Guesdon的方法，他先把生物素标记上辣根过氧化物酶，再与抗生物素蛋白结合形成复合物，从而形成了现在的ABC法^[15]。ABC法共用三种抗体，第一抗体为基本抗体，能结合组织中待测抗原；第二抗体为生物素标记的“桥”抗体，能与第一抗体结合；第三抗体是结合了过氧化物酶的生物素——抗生物素复合物(ABC)。第三抗体剩余的自由结合部位可与第二抗体的生物素相结合。通过底物呈色反应即可检测待查抗原。因此法属抗原抗体反应，且有放大效应，已被用来测定某些肿瘤病毒基因组^[16]。

到1983年，Leary不用ABC法，而改用牛肠碱性磷酸酶代替过氧化物酶，杂交后经NBT/BCIP处理，在杂交阳性位置出现紫色沉淀。Leary用此方法进行Southern Blot分析，并检测出单拷贝系列^[17]。1987年，Jeremy A. Garson对Leary的方法又进行了改进。他用偶联了碱性磷酸酶的链抗生物素蛋白(Streptavidin-Alkaline phosphatase)作为桥抗；仍用NBT/BCIP显示杂交结果，并将N-myc癌基因定位于2p 24，将神经生长因子(β-NGF)定位于1p 13。并根据他们的实验提出，用此方法甚至可以对小于1 kb单拷贝系列进行检测^[5]。在此方法中桥抗亦具有放大效应。

1982年，L. Manuclidis等发展了一种将生物素标记抗体与免疫学相结合的检测方法，即用生物素标记的DNA探针在细胞学标本上进行杂交后，用纯化过的羊抗兔IgG进行杂交结果检测。羊抗兔IgG作为第三抗体，可以用辣根过氧化物酶标记，亦可用荧光素(如FITC)标记。他们用上两标记物标记的抗体，经原位

杂交后在光镜和电镜水平确定了鼠随体DNA位于中心粒异染色质区^[12]。Y-F Lau亦采用间接免疫酶标及荧光免疫的方法显示了生物素标记DNA探针在染色体标本上的杂交结果,并发现了用常规显带技术难于诊断的Y-常染色质易位^[13]。

Luehrsen等则将生物素标记的RNA和DNA探针应用于Blot和原位杂交^[18]。

Hutchison等还将生物素标记技术和胶体金技术相结合,形成生物素抗体胶体金技术(Biotin-antibody-colloid gold methodology)。此技术较放射自显影术优越的是,能快速而精确地进行染色体或染色质超微结构上的DNA定位^[19]。

Brigati等则将生物素标记的探针用于石蜡包埋组织及培养细胞中病毒基因组的检测^[20]。

值得注意的几个问题 1. 标记率 Biotin-11-dUTP标记DNA探针,可用缺口翻译法。L. Manuelidis等用此方法证明Biotin-11-dUTP的核酸掺入率与TTP者相同^[12]。其方法是用³H-dCTP监测核苷酸掺入三氯乙酸沉淀并进行液闪放射性计数。

王申五等用末端标记法将Bio-11-dUTP连接到寡核苷酸的3'羟基末端^[14]。Schmidt用随机引物标记法进行DNA探针的生物素标记,并获得较缺口翻译法更高的标记率^[21]。

上述结果说明Bio-11-dUTP能很好地取代TTP掺入特定的核酸中。Hunting^[22]及Bullerdick^[23]亦得出相同的结论。但在Manuelidis的方法中仍不得不用放射性同位素,是为美中不足。2. 灵敏度 如本文所述,生物素标记的探针可以和抗生物素蛋白及酶联免疫球蛋白相结合,从而形成多级放大效应,使其检测水平大大高于其它非同位素性探针。但是,由于多方面的原因,生物素标记的核酸探针在基因探查方面,其灵敏度还远不如放射性探针^[14,24]。Reisfeld等亦指出,生物素标记基因探针结合酶标的检测方法,其灵敏度仍低于放射性同位素探针。同时还指出影响灵敏度的因

素如,检测过程中的生物素浓度,pH值以及生物素本身的溶解度等。并且还提出了增加生物素探针灵敏度的方法^[25]。Leary及Garson等亦根据各自的检测目的不同,提出了增加生物素探针灵敏度的方法^[17,5],在此不赘述。3. 本底 我们知道,无论是放射性同位素性探针,还是生物素性探针,如果杂交本底过高,将会影响杂交结果的判断。因而无论何种分子杂交检测体系都要尽力控制其背景或非特异性染色。就目前所知文献报道,生物素标记探针检测技术常常有本底过高而影响杂交结果^[26]。Al-Hakim等则报道了生物素探针杂交体系的两种形式非特异性染色^[27]。Childs等还提出了降低背景染色的几种途径^[28]。4. 稳定性 Biotin-11-dUTP复合物的稳定性稍差,反复冻融会降低其活性。但是Biotin-dUTP标记DNA探针后,-20℃保存,其稳定性可保持9个月甚至更长时间不变,这就有助于保持前后试验的一致性。当然,生物素标记检测体系操作步骤多,而且不少操作都很关键,这在保证本检测体系的稳定性及结果的可重复性上,是一不利的因素。5. 速度 用生物素标记的探针进行杂交反应,其结果可在数小时内显示出来。这明显优于³H;和³²P相比也较之为快。

综上所述,生物素标记检测系统集成快速、准确及非同位素等特性于一体,从石蜡切片到细胞生物学标本直至分子学标本,均可用本系统进行杂交结果的检测。从而将其应用范围拓展到病理学、细胞生物学和分子遗传学等领域。只要不断改进和完善,简化操作,提高稳定性和灵敏度,降低本底,相信有可能取代同位素探针,成为分子生物学、分子病理学等学科研究中的有力手段。

摘 要

生物素标记检测技术用于分子杂交已有数年历史,并有很多成功的报道。其原理是用生物素标记的核酸探针进行分子杂交,尔后用免疫组化技术显示杂交结果。它具有快速、准确

等优点,特别是避免了使用放射性同位素。它可用于细胞学、染色体及分子学标本,甚至石蜡切片。当然,此方法的灵敏度尚不及放射性探针,且常有本底过高。

参 考 文 献

- [1] Gall, J. G., et al., 1969, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 63: 378—383.
- [2] 《生物化学》, 1978, 全国高等医药院校试用教材, pp. 515.
- [3] 郑志明等, 1984, 《国外医学》分子生物学分册, 6, pp. 79—83.
- [4] Hoffman, K., et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77: 4666—4669.
- [5] Garson, J. A., et al., 1987, *Nucleic Acids Research.*, vol 15, No 12, pp. 4761—4770.
- [6] Guesdon, J. L., et al., 1979, *J. Histochem. Cytochem.*, 27: 1131—1139.
- [7] 石善溶等, 1986, 《免疫组织化学技术》, pp. 9.
- [8] 张昌硕等, 1982, 《生物化学》, 全国高等医药院校试用教材, pp. 64.
- [9] Langer, P. R., et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78: 6623—6637.
- [10] Langer-Safer, P. R., et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79: 4381—4385.
- [11] Rigby, P. W. J., et al., 1977, *J. Mol. Biol.*, 113: 237—251.
- [12] Manuelidis, L., et al., 1982, *The Journal of Cell Biology.*, vol 95, Nov, pp. 619—625.
- [13] Lau, Y. F., 1985, *Cytogenet. Cell Genet.*, 39: 184—187.
- [14] 王申五等, 1988, 中国医学科学院学报, 10, 229.
- [15] Hsu, S. M., et al., 1981, *J. Histochem. Cytochem.*, 29: 577—580.
- [16] 谷淑燕, 1984, 《癌症》, 3: 233—236.
- [17] Leary, J. J., et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80: 4045—4049.
- [18] Luehrsen, C. K., et al., 1987, *Biotechniques.*, 5(7): 660, 664, 667.
- [19] Hutchison, N. J., et al., 1982, *The Journal of Cell Biology.*, vol 95, No 2, pp. 609—618.
- [20] Brigati, D. J., et al., 1983, *Virology.*, 126: 32—50.
- [21] Schmidt, E. R., et al., 1988, *Chromosoma.*, 96: 353—359.
- [22] Hunting, D. J., et al., 1985, *Biochemistry.*, 24(21): 5729—5734.
- [23] Bullerdiek, J., et al., 1986, *Cytobios.*, 47(188): 33—44.
- [24] Brähic, M., et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75: 6125—6129.
- [25] Reisfeld, A., et al., 1987, *Biochem Biophys Res Commun.*, Jan 30, 142(2): 519—526.
- [26] Pittman, D. L., 1985, *Am J Clin Pathol.*, 83(1): 134.
- [27] Al-Hakim, A. H., et al., 1986, *Nucleic Acids Res.*, Dec 22, 14(2): 9965—9976.
- [28] Childs, G. V., et al., 1986, *Am J Anat.*, Feb-Mar, 175(2—3): 307—355.

高鲜锐度显像在显微摄影中的应用

金 建 中

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

一般细胞或生物组织的显微摄影通常都使用 D-76 微粒显影液来显影加工。虽然这种显影液能获得较细的颗粒,但存在酸碱缓冲性小和对溴离子较敏感的缺点,因之往往新配药液在冲洗一、二卷后,就难再获得效果一致的底片。

常用的微粒显影液都是低活性显影液,显影速度慢,显影可以深入到乳剂层深处,从而使由光渗引起感光的卤化银也得到充分的显影。同时由于加有大量亚硫酸钠作保护剂与卤化银溶剂,使微粒显影的影像结构比较松软,因而细部反差降低,影像细部扩散,产生模糊