

TRF检测法在核酸分析中的应用

第二军医大学放射医学核医学研究所(上海,200433) 游冬青 陈 杞综述 赵启仁^①审

摘 要: 综述了镧系离子时间分辨荧光检测法在核酸分析技术中的应用概况,介绍了 DELFIA 系统、FIAgen 系统、EALL 系统和 TBP 系统的使用特点,包括时间分辨荧光分析原理、镧系离子标记 DNA 探针和运用时间分辨荧光技术检测 PCR 产物的技术和方法。

关键词: 镧系离子 时间分辨荧光 核酸分析

镧系离子时间分辨荧光 (TRF) 分析技术是一种新颖的非放射性标记技术,它在核酸定量定性分析中已得到广泛的应用,在检测的灵敏度、特异性、测量速度以及标记物稳定性方面显示出一定的优越性^[1,2]。目前,时间分辨荧光法用于核酸分析领域中主要包括两个方面:一是应用镧系离子标记的 DNA 探针技术进行杂交分析;二是将镧系离子标记技术引入聚合酶链式反应 (PCR) 中,使 PCR 产物的鉴定简便易行。本文综述该方法

在核酸分析领域中的应用及发展前景。

1 时间分辨荧光分析方法原理

在时间分辨荧光分析中所使用的示踪剂是镧系离子如铕离子 (Eu^{3+})、铽离子 (Tb^{3+})、镝离子 (Dy^{3+}) 和钐离子 (Sm^{3+}) 等。与传统荧光标记物相比,镧系离子的标记物具有斯托克斯位移大、荧光寿命长、荧光发射峰窄等特点,有利于降低本底和提高分析灵敏度^[3]。

表 1 四种时间分辨荧光检测类型

	DELFLIA系统	FIAgen系统	EALL系统	TBP系统
镧系离子	Eu^{3+} 、 Sm^{3+}	Eu^{3+} 、 Sm^{3+}	Tb^{3+}	Eu^{3+}
螯合剂	DTPA EDTA DTTA等	BCPDA	EDTA	TBP
荧光复合物	TOPO-NTA- Eu^{3+}	BCPO A- Eu^{3+}	5-FSA- Tb^{3+} -EDTA	TBP- Eu^{3+}
检测形式	均相	固相	液相、固相	固相、均相

目前,应用于时间分辨荧光法的分析技术主要有四种类型(表 1),即 DELFLIA 系统 (Wallac-Pharmacia 公司)、FIAgen 系统 (Cyber Fluor 公司)、EALL 系统和 TBP 系统。

DELFLIA 系统的特点为形成 Eu^{3+} (NTA)₃ (TOPO)₃ 型的荧光复合物,其中 NTA 为 2-萘酰三氟丙酮,TOPO 为三辛基

氧化膦。 Eu^{3+} 螯合剂(聚羧酸型)标记的探针与靶 DNA 杂交后洗涤,在低 pH 条件下, Eu^{3+} 可解离出来与增强液中的 NTA 及 TOPO 结合,形成最终的荧光复合物^[4]。

FIAgen 系统用铕离子螯合剂 4,7-双(氯磺苯基)-1,10-二氮杂菲-2,9-二羧酸 (BCPDA) 作标记物与 Eu^{3+} 螯合后固相测

^① 中国医学科学院放射医学研究所

量,避免了外源性 Eu^{3+} 的污染^[5]。将生物素-链霉亲和素(SA)引入该系统可取得满意的结果。常见的标记 SA 所形成的复合物有三种,一为 BCPDA 直接标记 SA,形成复合物 SA(BCPDA)₁₄,检测灵敏度为 $10^{10} \sim 10^{11}$ mol/L^[6];二为 SA 与标记有 160 个 BCPDA 的甲状腺球蛋白(TG)相连,形成一个大分子的复合物 SA(TG)(BCPDA)₁₆₀,检测灵敏度为 $10^{11} \sim 10^{12}$ mol/L^[7];三为活化的 SA(TG)(BCPDA)₁₆₀ 复合物非共价连上两个 BCPDA-TG,形成一个大分子复合物(SBMC),检测灵敏度为 $10^{12} \sim 10^{13}$ mol/L^[8]。

EALL 系统为酶促放大时间分辨荧光检测系统,是以碱性磷酸酶为标记物,底物为 5-氟水杨酸磷酸酯(5-FSAP),底物水解后所生成的 5-氟水杨酸(5-FSA)在高 pH 条件下与 Tb^{3+} -EDTA 形成高强度荧光复合物,可进行时间分辨荧光测定^[9]。

TBP 系统所使用的镧离子螯合剂为三联吡啶类穴状化合物(trisbipyridine cryptate)简称 TBP,可与 Eu^{3+} 螯合形成 TBP- Eu^{3+} , TBP 是一种大分子多吡啶环组成的环状结构,中空似“穴状”,与 Eu^{3+} 相匹配, Eu^{3+} 发射的长寿荧光可被吡啶环所接受并传播出来,不会因为反应媒介而猝灭。以 TBP 为螯合剂,反应体系可直接固相或均相测量^[10,11]。

2 镧系离子标记核酸探针检测 DNA 杂交技术

镧系离子标记核酸探针是 80 年代末发展起来的新技术。它克服了放射性核素标记的半衰期短、放射性危害等缺点,越来越广泛地应用于核酸杂交分析。现将几种镧系离子标记 DNA 探针及检测方法简述如下。

2.1 免疫化学测定法

Syvanen 等人应用 TRF 发展了一种斑点印迹杂交(dot blot)技术^[12]。该法是用半抗原 AAIF(7-碘-N-乙酰基-N-2-乙酰氨基苄

或 Sulfone(砒)修饰 DNA 探针,与固定在硝酸纤维素膜上的靶 DNA 杂交,而后用二步免疫法,先加入抗半抗原抗体与半抗原结合,再加入 Eu^{3+} 标记的第二抗体 IgG-DTPA- Eu^{3+} 进行检测,其最小可测值为 20pg Ad2DNA,相当于 5×10^5 个分子。

2.2 生物素-链霉亲和素(BAS)法

Dahlen 等^[13]将生物素-链霉亲和素系统引入 TRF 中,简称 BAS-TRF 法。用 PBSM 缓冲液将变性的 Ad2DNA 稀释至适宜浓度,取 100 μ l 加至微孔条中室温过夜,洗二次,在 254nm 紫外灯下按 250W/cm² 照射 5 分钟。预杂交后,每孔加入 100 μ l (100ng/ml) 通过缺口转移制备的生物素化 Ad2DNA 探针杂交,洗涤后,加入 200 μ l (2 μ g/ml) SA-异硫氰酸苯基-EDTA- Eu^{3+} , 进行时间分辨荧光测量,线性范围为 10pg \sim 10ng,变异系数在 5% 以下,分析灵敏度为 10pg Ad2DNA。Dahlen 等还发现以夹心杂交反应代替上述直接杂交方法可提高检测灵敏度。他们用 Eu^{3+} -SA 及夹心杂交法检测大肠杆菌 DNA 的灵敏度达 1.9pg。夹心杂交法需要两个相邻但不重复的探针,一个是固定吸附探针,另一个是生物素化检测探针。将吸附探针固定在微孔板中,与靶 DNA 探针杂交后,再加入生物素化探针进行杂交。这样,经过二步骤杂交反应,形成吸附探针-靶 DNA-生物素化检测探针的夹心结构,再用 Eu^{3+} -SA 进行时间分辨荧光检测。该方法中,待测样品不必经过严格的纯化处理,检测方法快捷、简便、稳定和灵敏。

2.3 Eu^{3+} 化学直接标记法^[14]

DNA 分子中的胞嘧啶碱基在 pH 6.0 的亚硫酸钠溶液中可与乙二胺发生转氨基反应,使 DNA 分子掺入一个活化氨基基团并与 Eu^{3+} 螯合物共价结合形成 Eu^{3+} -DNA 荧光标记物。 Eu^{3+} 的螯合剂为一种异硫氰酸盐的衍生物: 4-[2-(4-异硫氰酸基)乙基]-2,6-双[N,N-双(羧甲基)氨基]吡啶

Eu^{3+} 直接标记 DNA 的比率,与转氨基

反应的程度有关 DNA 在 45°C 时,转氨基反应 2 小时, Eu^{3+} 标记率为 5% 的核苷酸;在 98°C 时,转氨基反应 7 分钟, Eu^{3+} 标记率可达 10%。 Eu^{3+} 直接标记核酸探针会干扰杂交时的碱基配对,导致杂交效率下降,但通过提高杂交体系中的探针浓度,仍可获得满意的效果。此法可应用于夹心杂交分析及斑点杂交分析,可测范围为 10-100pg DNA

2.4 酶促放大时间分辨荧光法 (EALL)^[15]

将靶 DNA 固定到微孔条表面,各孔加 100 μ l (125ng/L) 生物素化探针,杂交,洗涤,加入浓度为 5g/L 的脱脂奶粉封闭,再加浓度为 500 μ g/L 碱性磷酸酶 (AP) 标记的亲合素,温育后,洗涤去除游离的 AP,加入 5 氟水杨酸磷酸酯 (5-FSA) 底物液,再温育 2 小时,即脱去磷酸,生成 5-FSA,它可与 Tb^{3+} -EDTA 螯合物形成荧光复合物,即可用时间分辨荧光显像仪系统测量,最小可测值为 3pg。此法还可用于以尼龙膜做固相载体的斑点杂交和 Southern 印迹杂交分析。

2.5 Psoralen 介导的钕标记方法^[16]

Oser 等用一种新的方法标记 DNA 探针:将一个质粒克隆的探针用限制性内切酶消化成部分单链,载体部分保持双链状态。富含巯基基团的补骨酯素衍生物 psoralen 在紫外光照射下可与呈双链状态的载体 DNA 共价结合, DTPA 通过多聚的 L 赖氨酸 (pLL) 与 psoralen 结合,最后形成复合物 Eu^{3+} -DTPA-pLL-psoralen。这种用 psoralen 介导的 Eu^{3+} 标记核酸探针方法,由于探针杂交区域未被修饰,杂交效率很高。杂交区域的 DNA 序列呈单链状态,无需在杂交前变性处理 DNA,还可阻止杂交反应中 DNA 探针的自身重组而导致的杂交效率下降。

3 镧系离子标记的 PCR 技术

时间分辨荧光分析技术与 PCR 技术相结合,可用于检测特异的靶 DNA 序列^[17],该技术简称为 PCR-TRF

3.1 套叠式 PCR-TRF 法^[18]

套叠式 (nested) PCR-TRF 法的原理是在扩增特定的靶 DNA 序列之前,先设计两对引物,其中一对为普通引物,作为外引物,另一对为内引物,插入在两个外引物之间,并分别标记有 Eu^{3+} 和生物素。PCR 反应分两步进行,第一步以普通引物进行扩增,第二步以内引物对第一步 PCR 产物进行扩增。这样, Eu^{3+} 和生物素可掺入到 PCR 反应终产物中,并结合在包被有 SA 的微粒滴板中,即可进行时间分辨荧光检测。此法可检测到 5 个拷贝的 HIV-1 DNA。该方法可用于检测某些改变了限制性内切酶酶切位点的碱基突变。例如,镰状细胞性贫血是由于 β 球蛋白基因的第六位密码子中的碱基 A 突变为 T 而引起的遗传性疾病。这种点突变改变的同时也改变了 DdeI 酶切位点,使突变的 DNA 不能被 DdeI 酶切,而正常人的 DNA 可被 DdeI 酶切。这样,两步扩增后的 PCR 产物固定到微板孔中后加入 DdeI 酶进行酶切反应,洗涤后,应用 DELFIA 系统即可进行检测。正常人仅测得本底值,杂合体的测量值仅为纯合体的一半。

3.2 双标记 PCR-TRF 法^[19]

由于不同镧系离子 (Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Sm^{3+}) 螯合物的荧光波长不同,可利用相应的波长测量不同离子的荧光强度。PCR 产物可同时与标记有不同镧系离子的 DNA 探针杂交。这样,只需一次杂交反应,就可检测出 PCR 产物中两个不同的等位基因。该法称为双标记的 PCR-TRF。Litia 等对囊性纤维病变的突变基因与正常等位基因进行双标记 PCR-TRF 分析,该病变在一个 138bp 长的区域内缺失 Δ F508 位点,因此在缺失区域内可设计一对由 Sm^{3+} 标记的等位基因特异探针,并用 Eu^{3+} 标记正常等位基因的特异探针,再设计一个生物素标记的非等位基因的普通探针。先将靶 DNA 按标准程序扩增,再与上述三种探针杂交。所有的 PCR 产物都可杂交上生

物素标记探针,并结合在包被有 SA 的微孔条中,其中,在正常基因上杂交结合的探针为 Eu^{3+} 标记的,杂合子上结合的探针为 Sm^{3+} 和 Eu^{3+} 标记的,纯合子上仅结合有 Sm^{3+} 标记的探针。根据 Sm^{3+} 、 Eu^{3+} 不同的发射光谱分别测定其荧光计数,可筛查出囊性纤维病变杂合子与纯合子。

3.3 PCR-TREFS 直接定量法^[20]

Chan 介绍了一种在凝胶中直接对 PCR 产物进行定量的方法:在一个 PCR 引物的 5-末端标记上 BCPDA, PCR 扩增后,用凝胶电泳分离 PCR 产物,然后将凝胶浸入到一种含有 Eu^{3+} 的溶液中,在浸泡过程中 Eu^{3+} 可扩散到凝胶内,与 BCPDA 结合形成荧光复合物,然后用一种特制的时间分辨荧光扫描仪进行定量分析。

4 结束语

DNA 探针杂交技术与 PCR 扩增技术对于基础医学研究以及临床各科传染病、遗传病、癌症等疾病诊断均是一项强有力的手段。用时间分辨荧光法检测镧系离子标记的核酸探针及 PCR 产物,集快速、简便、高灵敏度、安全为一体,并可进行自动化分析,是一种理想的非同位素标记测定方法。这项新技术已引起生物学工作者的广泛重视,其在生物领域中的应用将会越来越广。

参 考 文 献

1 Christopoulos TK et al. *Nucleic Acids Res*,

1991; 19(21): 6015
 2 Diamandis EP. *Electrophoresis*, 1993; 14: 866
 3 Hemmila I et al. *Anal Biochem*, 1984; 137: 335
 4 Hemmila I et al. *Eur Patent*, 0064, 484, 1982
 5 Evangelista RA et al. *Clin Biochem*, 1988; 21(3): 173
 6 Diamandis EP, Morton RC. *J Immunol Methods*, 1988; 112(10): 43
 7 Diamandis EP et al. *Anal Chem*, 1989; 61(1): 48
 8 Morton RC, Diamandis EP. *Anal Chem*, 1990; 62: 1841
 9 Evangelista RA et al. *Anal Biochem*, 1991; 197: 213
 10 Mathis G. *Clin Chem*, 1993; 39(9): 1953
 11 Mathis G, Lehn JM. 5th International symposium on quantitative luminescence spectrometry in biomedical sciences, University of Ghent, Belgium, 1993
 12 Syvanen AC et al. *Nucleic Acids Res*, 1986; 14(2): 1017
 13 Dahlen P. *Anal Biochem*, 1987; 164: 78
 14 Hurskainen P et al. *Nucleic Acids Res*, 1991; 19(5): 1057
 15 Templeton EF et al. *Clin Chem*, 1991; 37(9): 1506
 16 Oser A et al. *Nucleic Acids Res*, 1988; 16(3): 1181
 17 Lopez EC et al. *Clin Chem*, 1993; 39(2): 196
 18 Dahlen P et al. *Molecular Cellular Probes*, 1991; 5: 143
 19 Litia A et al. *Molecular Cellular Probes*, 1992; 6: 505
 20 Chan A et al. *Anal Chem*, 1993; 65: 158

(收稿日期: 1995-09-22)