

核酸杂交的二次酶放大镧系元素发光时间分辨荧光分析

宋娜玲 赵启仁 李美佳 褚丽萍 庄湘莲 颜廷东 贺欣 周伟玲 张春明

【摘要】 目的 建立一种超灵敏的用于核酸杂交分析的方法。方法 通过二次酶放大、PCR扩增、Tb螯合物和时间分辨测量技术,测定前列腺特异抗原(PSA)DNA。结果 靶PSA DNA测定的标准曲线线性范围大于两个数量级;灵敏度为10pmol/L(0.5fmol/孔);当靶PSA DNA为10、30和60pmol/L时,准确度和精密度分别为77%~95%和12.9%~15.3%。结论 本法是一种超灵敏的、简捷和快速的全新分析方法,有很好的应用前景。

【关键词】 核酸杂交; 铽; 酶放大; 时间分辨荧光分析

【中图分类号】 Q503 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4114(2007)02-0070-04

Two-round enzyme-amplified lanthanide luminescence time-resolved fluorescence assay for nucleic acid hybridization

SONG Na-ling, ZHAO Qi-ren, LI Mei-jia, CHU Li-ping, ZHUANG Xiang-lian, YAN Ting-dong, HE-Xin, ZHOU Wei-ling, ZHANG Chun-ming

(Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

【Abstract】 Objective To investigate a supersensitive for nucleic acid hybridization assay. **Methods** Using the two-round enzyme-amplified action, PCR amplification, Tb chelate and time-resolved detection technology, target PSA DNA was detected. **Results** The range of the standard curve for detecting target PSA DNA is more than two order of magnitude; the sensitivity was 10pmol/L (0.5fmol/well); the accuracy and the precision was 77%~95% and 12.9%~15.3% respectively when the target PSA DNA was 10,30 and 60pmol/L. **Conclusion** The method is a supersensitive and new assay technology which has a good prospect of applications.

【Key words】 Nucleic acid hybridization assay; Terbium; Enzyme amplified; Time-resolved fluorescence assay

DNA 探针技术学已在基础研究中获得很大进展,而且在传染病、遗传病和肿瘤等疾病的诊断应用中有重要意义。目前,对核酸杂交分析测定系统的研究主要集中在提高分析灵敏度和非同位素两方面,镧系元素发光时间分辨荧光分析因其一系列优点倍受关注^[1-4]。本研究旨在建立一种超灵敏的非同位素的核酸杂交测定方法—二次酶放大镧系元素发光时间分辨荧光分析法。

1 材料和方法

1.1 材料

碱性磷酸酶标记链霉亲和素(alkaline phosphatase-labeled streptavidin, ALP-SA)、辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(horseradish peroxidase-labeled streptavidin, HRP-SA)、生物素化酪胺(biotin-tyramine, B-T)、5-氟水杨酸磷酸酯(phosphate ester of 5-fluorosalicylate, 5-FSAP)、铽-乙二胺四乙酸二钠(terbium-ethylenediaminetetraacetic acid, Tb-EDTA)螯合物、前列腺特异抗原(prostate-specific antigen, PSA)寡核苷酸探针和洋地黄毒苷(digoxigenin, DIG)标记 PSA DNA,均为本室研制⁹。

包被缓冲液(0.1mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6)、洗液(50 mmol/L Tris、0.15mol/L NaCl 和 0.1% (v/v) Tween-20, pH 7.5)、封闭液[10mmol/L Tris, pH 7.8, 1mmol/L EDTA 和 1g/L 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)]、DIG-DNA 稀释液(同封闭液)、杂交缓冲液(60 mmol/L 柠檬酸盐, 0.6 mol/L

包被缓冲液(0.1mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6)、洗液(50 mmol/L Tris、0.15mol/L NaCl 和 0.1% (v/v) Tween-20, pH 7.5)、封闭液[10mmol/L Tris, pH 7.8, 1mmol/L EDTA 和 1g/L 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)]、DIG-DNA 稀释液(同封闭液)、杂交缓冲液(60 mmol/L 柠檬酸盐, 0.6 mol/L

基金项目:天津市自然科学基金项目(043610211)

作者单位:300192 天津,中国医学科学院中国协和医科大学放射医学研究所,天津市分子核医学重点实验室

通讯作者:宋娜玲(E-mail: naling702000@yahoo.com.cn)

NaCl 和 30 g/L BSA, pH 7.6)、HRP-SA 稀释液 (50mmol/L Tris, pH 7.8, 0.15mol/L NaCl 和 30g/L BSA)、ALP-SA 稀释液 (同 HRP-SA 稀释液)、HRP 的底物溶液 (50mmol/L Tris, pH 8.0, 7.5mmol/L H_2O_2 , 92.5 μ mol/L B-T, 0.16mol/L NaCl)、ALP 的底物溶液 (0.1mol/L Tris, pH 9.0, 1mmol/L 5-FSAP, 0.1mol/L NaCl 和 1 mmol/L $MgCl_2$)、荧光发展溶液 (0.4mol/L NaOH, 5mmol/L Tb^{3+} 工作液、5mmol/L EDTA 工作液和 2.5mol/L Tris, pH 12.5), 均为本室配置; anti-DIG 由 Roche 公司提供。

甲基硅油由中外合资绿色特种化学品公司提供; Tris 由瑞典 Pharmacia Biotech 公司提供; H_2O_2 由天津市大茂化学试剂厂提供; 万分之一电子分析天平(R-2000型)由德国 Sartorius 公司提供; 紫外分光光度计(DU 800型)由美国 Beckman 公司提供; 12孔微滴定板条由芬兰 Labsystem 公司提供; 时间分辨荧光仪(Arcus 1230型)由芬兰 LKB-Wallac 公司提供。

1.2 方法

1.2.1 靶 DNA 的制备

本研究应用的靶 DNA 是靶 PSA DNA。

用包被缓冲液稀释 anti-DIG 成 5mg/L anti-DIG 包被液, 微滴定板的每孔加入 50 μ l, 室温下过夜反应。用前, 用洗液洗孔 3 次。每孔加入预热至 42 $^{\circ}C$ 的封闭液 50 μ l, 封闭非特异结合位点。把 DIG-DNA 在 95 $^{\circ}C$ 下加热 10min 后, 立即放到冰水中冷却。用 DIG-DNA 稀释液把标记的 PSA DNA 稀释为 5、10、30、60、100、300、500 和 1000 pmol/L 的不同浓度系列(5 μ l/孔), 42 $^{\circ}C$ 下振荡反应 40min。用洗液洗孔 3 次, 紫外灯照射, 使靶 DNA 更牢固地固定在固相上。

1.2.2 分析系统的研究

用预热至 42 $^{\circ}C$ 的杂交缓冲液稀释生物素化寡核苷酸探针至 2.5nmol/L, 每孔加入 50 μ l, 在 42 $^{\circ}C$ 下反应 20min, 完成杂交。用洗液洗 3 次, 除去过量探针。用 HRP-SA 稀释液稀释 HRP-SA 为 1mg/L, 每孔加入 50 μ l, 并与杂交物室温反应 20min。用洗液洗 3 次, 加入 50 μ l HRP 的底物溶液, 室温反应 15min, 然后用洗液洗 3 次, 终止反应, B-T 就共价结合到固相上。每孔加入 330U/L ALP-SA 50 μ l, 反应 20min 后加入 50 μ l ALP 的底物溶液, 42 $^{\circ}C$ 下保温 30min。最后每孔加入 50 μ l 荧光发展溶液停止酶反应。在板式振荡器上振荡 1min, 加入

硅油 30 μ l/孔, 用时间分辨荧光仪测荧光强度。

1.2.3 分析系统实验条件的最佳化

用杂交缓冲液稀释生物素化 PSA DNA 探针溶液, 制成浓度分别为 164、82 和 55 μ g/L 的杂交液, 测不同质量浓度的生物素化探针对标准曲线的影响。

为解决溶液 pH 值变化引起荧光不稳定等问题, 检测荧光前分别加入甲基硅油 0、20、40 和 60 μ l, 测不同量的甲基硅油对标准曲线的影响。

制备浓度不同的 HRP-SA, 测 HRP-SA 浓度对信/噪比的影响。制备不同浓度 B-T, 测 B-T 浓度对信/噪比的影响。在 HRP-SA 反应的不同时间测量荧光, 观察反应时间对信/噪比的影响。其他需优化的反应时间, 保温时间等同样处理。

1.2.4 分析系统及其特性鉴定、评价

制备 DIG 标记的靶 PSA DNA 为零的本底孔 4 个, 以校正本底, 求信/噪比。制备不同浓度的 DIG 标记的靶 PSA DNA 样品, 以供测定标准曲线。制备靶 PSA DNA 不同浓度上的平行孔, 测精密性。制备有代表性的几种已知量的靶 PSA DNA, 测准确度。

2 结果

2.1 分析系统实验条件最优化

2.1.1 生物素化探针浓度变化对信/噪比的影响

实验结果显示, 当生物素化探针浓度高时, 在 PSA DNA < 2 ng 时, 虽然总荧光信号有增加, 但本底荧光增加更加明显, 所以信/噪比反而比较低; 在 PSA DNA 含量较高的时候, 生物素化探针浓度增高, 信/噪比也增大。

2.1.2 HRP-SA 浓度对信/噪比的影响

HRP-SA 浓度对信/噪比的影响见图 1。由图 1 可见, 信/噪比随 HRP-SA 浓度的增加而增加, 而且在 1.0 mg/L 处进入坪区, HRP-SA 再增加, 信/噪比增加就慢了。

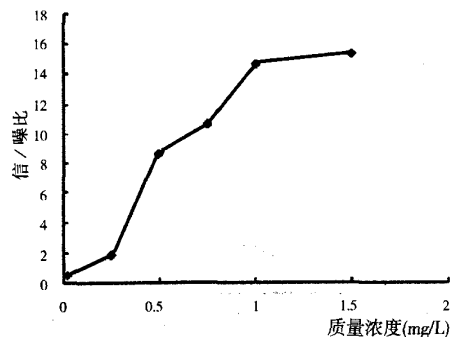


图 1 HRP-SA 浓度对信/噪比影响

2.1.3 B-T 浓度对信/噪比的影响

B-T 浓度对信/噪比的影响见图 2。由图 2 可见, 随 B-T 浓度的增加信/噪比随着很快增加, 在 0.2~0.25mmol/L 范围内信/噪比达到最大值。当 B-T 浓度再增大时信/噪比反而降低。

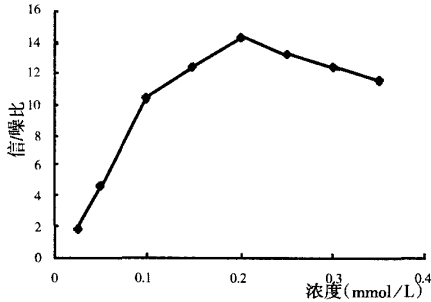


图 2 B-T 浓度对信/噪比的影响

2.1.4 HRP-SA 与固相上的生物素化杂化物的反应时间

实验表明, 在保温的前 10 min 内, HRP-SA 大部分已结合于杂化物, 所以在 15 min 左右时信/噪比达到最高, 时间过长, 信/噪比反而下降。本底荧光受 HRP-SA 浓度的影响不大。

2.1.5 不同体积甲基硅油对信/噪比稳定性的影响

实验显示, 随着添加的甲基硅油体积的增加, 因为隔离空气效果增加, 所以荧光的信/噪比随着增大。

2.2 分析系统的主要特性

2.2.1 分析系统的标准曲线

图 3 给出了信/噪比随靶 PSA DNA 浓度变化的标准曲线。其所用的分析系统的最佳条件如下: 紫外照射时间为 40 min, HRP-SA 为 0.6 mg/L, HRP-SA 与固相上的生物素化杂化物的反应时间为 15 min, 生物素化 PSA 探针 82 μ g/L, B-T 0.1mmol/L (或 0.15 mmol/L), ALP-SA 500 U/L, 过氧化物酶底物溶液中的 H_2O_2 2 mmol/L, 5-FSAP 2 mmol/L, 靶 PSA DNA 60 pmol/L (即 3 fmol/孔)。

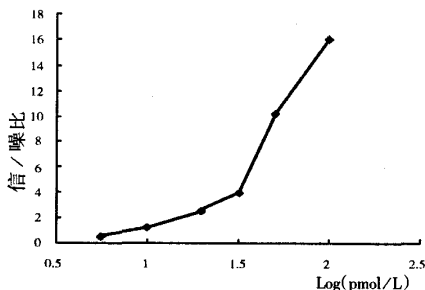


图 3 信/噪比随靶 PSA DNA 浓度变化的标准曲线

由图 3 可见, 在 5~100 pmol/L 靶 PSA DNA 时, 未见曲线有饱和趋势, 因此, 标准曲线范围至少在两个数量级。

2.2.2 探测限

以靶 PSA DNA 为零时, 测得的荧光为本底荧光, 本底荧光均数+2s 所对应靶 PSA DNA 为探测限, 本分析系统的探测限为 10pmol/L (0.5fmol/孔) 靶 PSA DNA。

2.2.3 精密度

在靶 PSA DNA 为 10、30、60 和 100pmol/L 时, 精密度分别为 15.3%、13.2%、12.9%和 12.4%。

2.2.4 准确度

在靶 PSA DNA 为 10、30 和 60pmol/L 时, 准确度分别为 23%、5.3%和 8.6%。

3 讨论

本分析系统的荧光光谱学研究已较透彻, 在全部反应完成后, 待测微孔溶液中有 5-FSA:EDTA:Tb 三元复合物、少量游离的 5-FSA、过量的 5-FSAP 和 Tb-EDTA。在 336 nm 波长的激发光的激发下, 三元复合物发射谱有半宽度为 10~20 nm、波长分别为 487、547、584 和 623 nm 的 4 个谱带, 其中 547 nm 谱带的强度最强, 而且其荧光寿命长达 (1.05±0.1)ms, 这是我们测量的目标信号荧光, 用 (547±5)nm 的窄通带滤光片, 只允许它通过, 供测量, 而其他 3 个谱带则被滤除。过量的 5-FSAP 本身不发荧光, 也不能与 Tb-EDTA 结合成复合物。游离的 5-FSA 只发射 420 nm 波长的荧光, 也被滤光片滤掉。另外, 在所有的镧系元素中, 只有 Tb 可以和 5-FSA、EDTA 形成发射高产额、长寿命的荧光三元复合物, 可用时间分辨荧光仪直接测量荧光强度, 确定靶 DNA 的量, 不需另行分离。

本研究以 PSA DNA 为测定的靶 DNA, 需要用 DIG 标记靶 PSA DNA, 再加上上游引物和下游引物、DNA 聚合酶和 PSA cDNA 模板, 对 PSA DNA 进行 PCR 扩增。在此过程中, 既实现 DIG 对靶 PSA DNA 的标记, 又扩增了靶 PSA DNA, 提高了分析灵敏度。

非匀相 DNA 杂交分析需要应用过量的 DNA 探针和固相, 以便分离结合的和游离的(未杂交的)探针, 这种分析的灵敏度主要受两种因素的影响^[6]: 一是所使用的报告分子, 二是探测试剂(如: 探针、

HRP-SA、ALP-SA等)对固相的非特异结合。在杂交分析中引入多次信号放大的目的是为了减少本底的增加,改进信/噪比。这要求测定试剂的浓度以及它们与固相的反应时间的最佳化,或许应用化学计量学(chemometrics)可使这种最佳化实验更方便。

本分析系统与其他镧系元素发光分析系统比较有几大优点:①灵敏度非常高,这是因为把二次酶放大、PCR扩增、镧系元素螯合物固有优点以及时间分辨和波长分辨测量技术集为一体;②分析系统非常简捷,全过程操作一管到底,不需要电泳、Southern转移和膜杂交等复杂费时的步骤,分析快速,易于自动化;③试剂的有效期长;④安全无污染,抗干扰能力强,环境改变和猝灭体对荧光特征发射影响极小。这些优点使本分析系统进入常规应用成为可能,具有很大发展潜力和实用价值。已用于前列腺癌早期诊断,具有临床意义^[7]。

参 考 文 献

1 O'Sullivan PJ, Burke M, Soini AE, et al. Synthesis and evaluation of

phosphorescent digo-nucleotide probes for hybridization assays. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(21): 114.

2 Wu M, Lakowicz JR, Geddes CD, et al. Enhanced lanthanide luminescence using silver nanostructures: opportunities for a new class of probes with exceptional spectral characteristics. *J Fluoresc*, 2005, 15(1): 53-59.

3 Johansson MK, Cook RM, Xu J, et al. Time gating improves sensitivity in energy transfer assays with terbium chelate/dark quencher oligonucleotide probes. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(50): 16451-16455.

4 Campbell CN, Gal D, Cristler N, et al. Enzyme-amplified amperometric sandwich test for RNA and DNA. *Anal Chem* 2002, 74(1):158-162.

5 宋娜玲,赵启仁,李美佳,等.酶放大镧系元素发光时间分辨荧光分析中关键试剂的研究. *中华医学研究杂志*, 2006, 6(12):1321-1323.

6 ZHONG Wei-de, HE Hui-chan, BI Xue-cheng, et al. cDNA macroarray for analysis of gene expression profiles in prostate cancer. *Chin Med J*, 2006, 119(7): 570-573.

7 Ylikoski A, Elomaa A, Ollikka P, et al. Homogeneous time-resolved fluorescence quenching assay (TruPoint) for nucleic acid detection. *Clin Chem*, 2004, 50(10): 1943-1947.

(收稿日期: 2007-01-08)

实验性近视眼视网膜多巴胺神经系统研究进展

赵娟 刘兴党

【摘要】近视眼是一种最常见的屈光不正。动物实验模型主要包括形觉剥夺性近视和离焦性近视两种,应用的实验动物主要为鸡和哺乳类。视网膜多巴胺系统与视觉经验对出生后眼球生长发育的调控密切相关,而视网膜多巴胺转运体的变化可能更为直接地反映了突触间隙多巴胺的变化。

【关键词】近视;模型;动物;视网膜;受体;多巴胺;多巴胺转运体;放射性核素显像

【中图分类号】R-332 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1673-4114(2007)02-0073-04

Study and development of retinal dopamine nervous system in experimental myopia

ZHAO Juan, LIU Xing-dang

(Department of Nuclear Medicine, Hua Shan Hospital, Fudan University, Shanghai, 200040, China)

【Abstract】 Myopia is the most familiar ametropia. Animal experimental models include form deprivation myopia and defocus myopia. Experimental animals we often use are chicken and mammals. The retinal dopamine system and vision experience have close relations with the regulation of eyeball's growth after birth, while the change of dopamine transporter may reflect the change of dopamine in the synaptic cleft more directly.

【Key words】 Myopia; Models, animal; Retina; Receptor, dopamine; Dopamine transporter; Radionuclide imaging

近视眼是一种最常见的屈光不正。随着现代社

会的文明化进程,近视眼的发病率不断增长,成为当今世界范围内发病率最高的一种眼病,WHO已把它列入亟待解决的致盲性眼病之一。近期统计