

磁珠法分离特异 mRNA*

田小利 徐 堤 陈兰英

(中国医学科学院心血管病研究所生化研究室, 北京 100037)

提 要

以生物素标记的单链 DNA 为探针和 mRNA 液相杂交,再由带抗生物素蛋白的磁珠捕获已杂交的 mRNA,建立了快速、简便捕获特异 mRNA 的方法。磁珠的捕获率为 70.4%,洗脱率为 78.6%,mRNA 的总回收率为 55.2%。

关键词 特异 mRNA 分离,生物素标记,磁珠

特异 mRNA 的分离除多聚核糖体免疫沉淀法外,使用更多的是选择杂交法,如固相杂交法^[1,2]、液相杂交结合梯度离心分离法^[3]等,其不足之处是前者得率低,后者得率虽高,但非特异杂交物难以清除,且分离时间长。本文以生物素标记的探针和靶 mRNA 液相杂交,由于抗生物素蛋白可高效专一地结合生物素分子,故磁珠可通过其携带的抗生物素蛋白和生物素化的探针结合,捕获溶液中的探针-mRNA 杂交物,再通过磁性吸附,一步分离磁珠-杂交物复合体,从而建立了快速、简便、捕获率高、专一性强的特异 mRNA 的分离方法——磁珠法。有报道用琼脂糖代替磁珠^[4],也取得满意的效果,但不如磁珠法简便。

1 材料和方法

1.1 材料

pGEM-2 质粒(携带鼠脑型肌酸激酶基因)由 Du pont 公司的 Benfield 先生提供。磁珠(paramagnetic particles)和末端转移酶(TdT)系 Promega 产品。核苷酸(NTP)、脱氧核苷酸(dNTP)及生物素标记的脱氧尿苷酸(dUTP-11-biotin)为 Sigma 产品。大片段酶(Klenow)和限制性内切酶 XbaI, SphI 和 Pvu II 为华美公司产品。体外转录试剂盒、同位

素标记的尿苷酸(α - ^{32} -UTP, 3000Ci/m mol)及生物素显色试剂分别为 Boehringer Mannheim、福润公司和军科院二所产品。

1.2 方法

1.2.1 鼠脑型肌酸激酶基因(CKba-2)片段的分离 取 pGEM-2 50 μ g, SphI 50 U, XbaI 50U 及 Sph I 缓冲液 10 μ l,补水至 100 μ l。37 $^{\circ}$ C 保温 3h,取 2 μ l 样品电泳检查,待酶切完全后,将反应液于低融点胶(BRL 产品, 1.7%)上电泳(60V, 1.5h, 4 $^{\circ}$ C),从胶中分离出 CKba-2 片段^[5],并悬于 30 μ l TE(10m mol/L Tris, 1m mol/L EDTA, pH8.0)缓冲液中。

1.2.2 CKba-2 片段的生物素标记 100 μ l 反应液中含 CKba-2 片段 7 μ g, 10 $\times$ Klenow 补齐缓冲液 10 μ l, dGTP, dATP 及 dCTP 各 0.2m mol/L, dUTP-11-Biotin 0.16m mol/L 及 Klenow 12U 于 25 $^{\circ}$ C 保温 2h。再加入 10mol/L NH₄Ac 20 μ l、无水乙醇 200 μ l,于 -20 $^{\circ}$ C 静置 2h, 16000 r/min 离心 20 min (4 $^{\circ}$ C),沉淀以 70%冷乙醇洗一次,干燥后悬于 30 μ l TE 缓冲液中。

1.2.3 CKba-2 片段单链的制备 取 800

* 属国家“八五”攻关项目中的方法部分。

收稿日期: 1991-11-19 修回日期: 1992-03-02

μl 混匀的磁珠于离心管中,以 $1 \times \text{HS}$ ($0.5 \times \text{SSC}^{\text{D}}$, 0.5% SDS 及 1 mol/L EDTA) 洗 3 次,再以同样溶液悬至 $80 \mu\text{l}$,加入 $6 \mu\text{g}$ tRNA,混匀后室温放置 30 min (注意混匀)。用磁铁将磁珠吸附于管壁,加入 $30 \mu\text{l}$ 生物素标记的 CKba-2、混匀上清(此时不能让磁珠上浮)取 $2 \mu\text{l}$ 上清点于硝酸纤维素膜 1 号位上。然后将磁珠混匀于溶液中,于 20、40、60、80 和 100 min 时,吸住磁珠,分别取 $2 \mu\text{l}$ 上清点于膜 2—6 号位。最后吸紧磁珠,弃上清,磁珠以 $1 \times \text{HS}$ 洗 4 次并悬至 $90 \mu\text{l}$,取 $2 \mu\text{l}$ 上清点于膜上 7 号位,再弃去上清。磁珠中加入 $36 \mu\text{l}$ H_2O 、 $4 \mu\text{l}$ $10 \times$ 碱变性液 (1.5 mol/L NaOH, 1 mol/L NaCl),混匀后室温放置 5 min,吸住磁珠,小心取出上清(取 $2 \mu\text{l}$ 点膜 8 号位上),乙醇沉淀后,悬于 $30 \mu\text{l}$ H_2O 中,得 CKba-2 片段的单链。

1.2.4 CKba-2 单链的加尾标记 取 CKba-2 单链 $30 \mu\text{l}$,加 $5 \times \text{TdT}$ 缓冲液 $10 \mu\text{l}$, dCTP 0.1 mol/L , dUTP-11-biotin 0.1 mol/L 和 TdT 25U,总反应体积 $50 \mu\text{l}$, 37°C 反应 1 h 后,加 0.5 mol/L EDTA $5 \mu\text{l}$, $30 \mu\text{g}$ tRNA, H_2O $25 \mu\text{l}$ 和 10 mol/L NH_4Ac $16 \mu\text{l}$, -20°C 过夜,乙醇沉淀后悬于 $40 \mu\text{l}$ TE 缓冲液中,取 $2 \mu\text{l}$ 点膜 9 号位上,其余置 -20°C 保存备用。

1.2.5 生物素显色反应 操作同军科院二所试剂盒说明,显色 30 min 后,色斑清晰,取出膜置于终止液中 (TE 缓冲液) 10 min,晾干后照像。

1.2.6 体外转录合成 CKba-2 mRNA 操作同试剂盒说明, pGEM-2 被 Pvu II 切成线状,转录(用 SP_6 RNA 聚合酶)反应至 1.5 h,加 $30 \mu\text{l}$ H_2O ,以酚(酚:氯仿:异戊醇 = 24:24:1)抽提一次,加 $10 \mu\text{l}$ 10 mol/L NH_4Ac , $20 \mu\text{g}$ tRNA 和 $100 \mu\text{l}$ 无水乙醇, -20°C 过夜,离心沉淀后悬于 $50 \mu\text{l}$ 无 RNA 酶水中,检查其掺入率及长度均一性。

1.2.7 mRNA 和生物素标记的 CKba-2 单链杂交 取 $10 \mu\text{l}$ $2 \times \text{HS}$, $2 \mu\text{l}$ 转录合成的

mRNA、 $3 \mu\text{l}$ CKba-2 单链及 $5 \mu\text{l}$ H_2O , 石蜡油封顶,先于 85°C 5 min,再于 50°C 水浴杂交 10 h。

1.2.8 磁珠分离 mRNA 取 $300 \mu\text{l}$ 磁珠,以 $1 \times \text{HS}$ 洗 3 次,悬于 $30 \mu\text{l}$ $1 \times \text{HS}$ 中,加入 $5 \mu\text{g}$ tRNA,室温放置 30 min 后,吸住磁珠并加入 $18 \mu\text{l}$ 上述杂交液,混匀上清后,取 $3 \mu\text{l}$ 点于滤纸上测 cpm (A); 再混匀磁珠 20 min,吸住磁珠,取 $3 \mu\text{l}$ 上清点于滤纸上测 cpm (B); 弃上清,磁珠以 $1 \times \text{HS}$ 洗 3 次,悬于 $32 \mu\text{l}$ 无 RNA 酶水中,于 90°C 3 min 并迅速移于冰浴中,5 min 后吸住磁珠,得上清即 mRNA,取 $3 \mu\text{l}$ 上清点样测 cpm (C)。为检查磁珠捕获的时间,加入杂交液后,分别于 0, 2, 5, 10, 15, 20 及 40 min 吸住磁珠,取 $3 \mu\text{l}$ 上清点样测 cpm,并取捕获前和捕获 20 min 时的上清以及洗脱后的 mRNA 溶液各 $3 \mu\text{l}$ 于甲酰胺变性胶上电泳,经放射自显影检查捕获结果。

2 结果与讨论

本文以分离体外转录的鼠脑型肌酸激酶 (CKba-2) mRNA 为例,建立了快速、简便分离特定 mRNA 的方法,其原理(图 1)是先制备末端被生物素标记的探针分子,然后以此和靶 mRNA 液相杂交,再以带抗生物素蛋白的磁珠捕获杂交物,经洗脱分离,得到所需 mRNA。

图 2 显示了双链 CKba-2 片段的补齐标记及其被磁珠捕获和单链 CKba-2 的制备及加尾标记的结果。1 号位的色斑说明 CKba-2 片段通过补齐反应掺入生物素的标记是成功的;2—6 号位均无色斑,说明在本实验条件下,磁珠在 20 min 内即已完全捕获了溶液中被生物素标记的 CKba-2 基因片段;7,8 号位也无斑点,说明磁珠被 $1 \times \text{HS}$ 和碱变性液洗涤后,不释放已捕获的,被生物素标记的那条 DNA 链;9 号位的斑点说明从磁珠上分离单链 DNA 和其加

1) $20 \times \text{SSC}$: 3 mol/L NaCl, 0.3 mol/L 柠檬酸钠, pH 7.0。

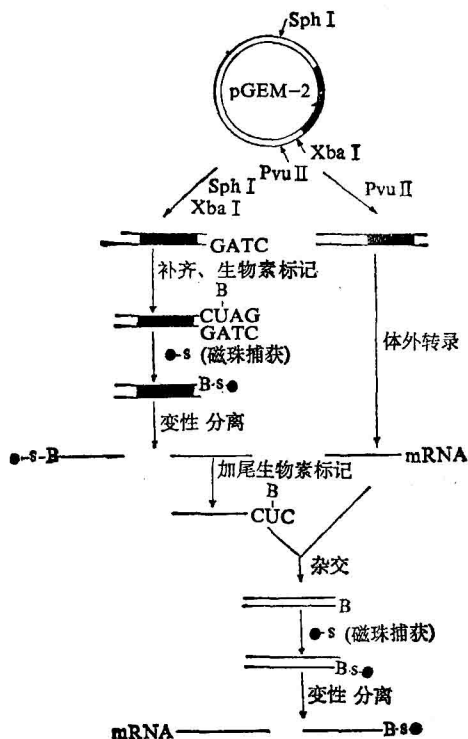


图 1 磁珠法分离特异 mRNA 示意图

尾标记都是成功的。但应注意，加尾标记时要掺入 dCTP，阻止 oligodU 的形成，以免因 oligodU 和 polyA 杂交分离出非特异的 mRNA。

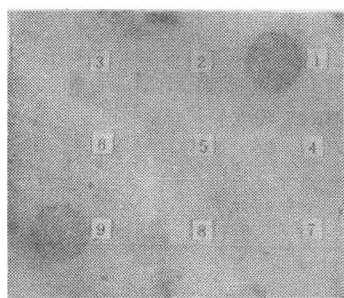


图 2 生物素显色反应结果

1—6 号位分别表示磁珠捕获 0, 20, 40, 60, 80 和 100min 时上清的显色反应；7, 8 号位分别表示捕获后的磁珠以 1×HS 和碱变性洗涤后所得上清的显色反应；9 号位为单链 Ckba-2 加尾标记的显色反应

图 3 中 A 和 C 带明显强于 B 带，表明磁珠对 mRNA 的杂交分离是有效的，杂交捕获率 $\left(\frac{A_{cpm} - B_{cpm}}{A_{cpm}}\right)$ 、洗脱率 $\left(\frac{C_{cpm}}{A_{cpm} - B_{cpm}}\right)$ 及总

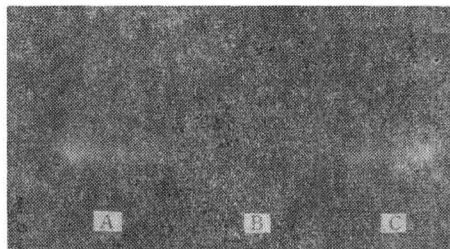


图 3 磁珠捕获前、后 mRNA 的电泳检查
A, B 分别表示捕获前、后上清中的 mRNA, C 带是捕获后从磁珠洗下的 mRNA

回收率 $\left(\frac{C_{cpm}}{A_{cpm}}\right)$ 见表 1, 说明本法具有较好的重复性。在本实验条件下，杂交捕获率不再增加的原因之一可能是 mRNA 的降解，此外杂交条件及杂交率也是影响因素。由于杂交时间随杂交物浓度和杂交条件而改变，故本文没有探讨杂交时间对分离的影响。

表 1 磁珠对 mRNA 的捕获率、洗脱率及总回收率

编号	捕获率 (%)	洗脱率 (%)	总回收率 (%)
1	70.9	79.1	56.1
2	73.1	73.8	53.9
3	66.6	84.8	56.2
4	70.9	77.0	54.6
均值	70.4	78.6	55.2

图 4 显示了磁珠对生物素化的 DNA-mRNA 杂交物捕获与时间的关系，捕获 2min 后剩余的 mRNA 约为 50%，10min 则仅剩约 26% 并达最大捕获量，延长至 40min，捕获率无明显改变。

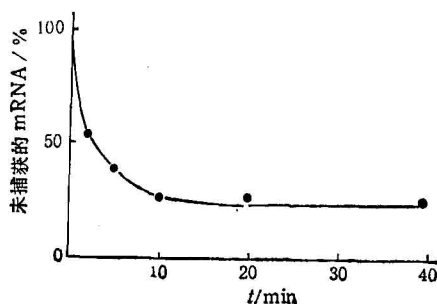


图 4 捕获时间曲线

磁珠的非特异性吸附实验表明（结果未列出），磁珠对 mRNA 的非特异吸附可不予考虑。

（下转第 142 页）

指纹分析,而分析鸭时,用 33.6、33.15 和 M13 较好。分析鹌鹑时,用 33.6 和 3HVR 最好。

2.3 DNA 指纹图的重复性

我们在实验中发现:同一样品从酶切开始分成几份平行处理,同胶或不同胶电泳,同次或不同次杂交,得到的 DNA 指纹图谱几乎是一致的(如图 2)。主要差异表现在同一条带在不同胶中的迁移率不同(但相对位置不变),以及个别极浅的带的增减。影响前者的因素是电泳条件(如缓冲液的浓度、温度、电压、时间),影响后者最主要因素是杂交条件。我们建议:

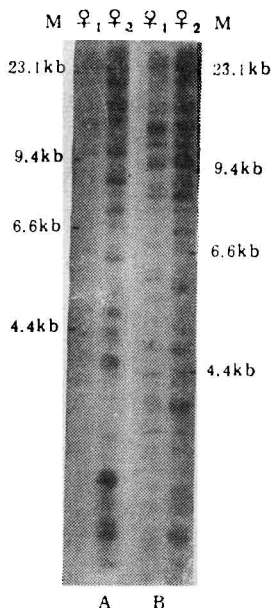


图 2 DNA 指纹图的重复性

将两只鸡(♀₁和♀₂)的 DNA 各取两份,每份约 8 μg,用 *Hinf*I 酶切后,在不同胶(A, B)上电泳,胶浓度和电泳的电压及时间相同。DNA 片段转移到膜上后,将膜放在同一杂交盒中与探针 33.6 杂交。M 注明的是分子量标志,为 λDNA *Hind*III 酶切片段

当用 DNA 指纹技术进行群体分析时,所有样品应同次杂交;在计算 DNA 指纹图的带数时,图中太浅的带不应计数。由于不同批次杂交和洗脱时的温度和离子强度很难控制到完全一致,采取上述措施可以降低实验误差。

参 考 文 献

- 1 Jeffreys A J, Wilson V, Thein S L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 1985; 314: 67
- 2 Jeffreys A J, Wilson V, Thein S L. Individual specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 1985; 316: 76
- 3 Jeffreys A J, Brookfield J F Y, Semeonoff R. Positive identification of an immigration test-case using DNA fingerprints. *Nature*, 1985; 317: 818
- 4 Thein S L, Jeffreys A J, Gooi H C *et al.* Detection of somatic changes in human cancer DNA by DNA fingerprint analysis. *British J Cancer*, 1987; 55: 353
- 5 Kuhnlein U, Dawe Y, Zadwony D *et al.* DNA fingerprinting, a tool for determining genetic distances between strains of poultry. *Theor Appl Genet*, 1989; 77: 669
- 6 Gilbert D A, Lehman N, O'Brien S J *et al.* Genetic fingerprinting reflects population differentiation in the California Channel Island fox. *Nature*, 1990; 344: 764
- 7 Reeve H K, Westneat D F, Noon W A *et al.* DNA "fingerprinting" reveals high levels of inbreeding in colonies of the eusocial naked mole rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 2496
- 8 李伯龄,倪锦堂,叶健等. α-珠蛋白-3'HVR 探针 DNA 指纹图法医应用的研究. *遗传学报*, 1991; 18(3): 200
- 9 Vassart G, Georges M, Monsieur R *et al.* A sequence of M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science*, 1987; 235: 683
- 10 Higgs D R, Goodbourn S E Y, Wainscoat J S *et al.* Highly variable regions flank the human alpha-globin genes. *Nucleic Acids Res*, 1981; 9: 4213
- 11 Fowler S J, Gill P, Werrett D J *et al.* Individual specific DNA fingerprints from a hypervariable region probe: alphaglobin 3'HVR. *Human Genetics*, 1988; 79: 142
- 12 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 1.21

(上接第 145 页)

参 考 文 献

- 1 Nagata S, Taira H, Hall A *et al.* Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity. *Nature*, 1980; 284: 316
- 2 McCandless R, Sloma A, Pestka S. Use of DNA bound to filters for selection of interferon-specific nucleic acid sequence. *Methods Enzymol*, 1981; 79: 618

- 3 Lubbert H, Hoffman B J, Snutch T P *et al.* cDNA cloning of a serotonin 5-HT_{1c} receptor by electrophysiological assays of mRNA injected xenopus oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 4332
- 4 Thomas D, Surdin-Kerjan Y. An improved strategy for generating a family of unidirectional deletions on large DNA fragments. *GATA*, 1990; 7(4): 87
- 5 徐 洵,刘震乾主编. DNA 重组技术. 北京: 科学出版社, 1990: 63—64