

· 实验方法与技术 ·

放射性同位素探针在生物技术上的应用

I. 三氯化铊的制备及用 ^{125}I 标记DNA探针林丽宽¹ 李胜文² 龙紫新² 丘泉发³

放射性同位素探针在生物技术及医学上的应用, 已从多方面显出广阔的前景, 但存在各种各样的限制^[1-4]。目前国内外制备放射性同位素探针, 多数采用标记核苷三磷酸的缺口转移法(Nick Translation)^[5]。这是一个在DNase I 和DNA Polymerase 共同作用下的酶促反应, 它受生物酶特性的影响, 反应不稳定, 价格也昂贵。Cormmerford (1971) 创造了放射性碘标记法^[6]。这是一个直接化学修饰, 条件易控制, 价格也低, 并开始应用于标记DNA 及细胞, 进行杂交^[7-8], 而且也已经用于医学检测疾病^[4]。但是 TlCl_3 来源困难, 标记效率不高, 一直限制碘标记的应用。

我们在实验室条件下用氯化铊(TlCl) 制备出 TlCl_3 结晶, 即在 KMnO_4 中加入浓 HCl , 产生的氯气经过水洗, 浓 H_2SO_4 等的处理后, 引入 TlCl 溶液中, 多余的氯气用 NaOH 吸收, 反应持续6—8小时, 然后冷冻干燥, 即得结晶的 TlCl_3 制品。

图1 ^{125}I 标记 SINV genome DNA 电泳图谱及自显影

1, 2: DNA 电泳图谱

A. 0点, B. SINV genome DNA 带
1', 2': 上述 DNA 电泳凝胶干燥后的放射自显影图(0.6%琼脂糖)

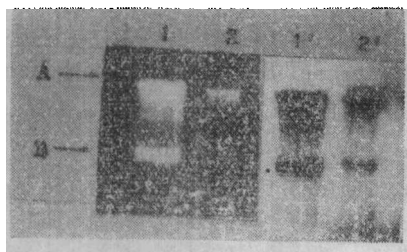


Fig. 1 Electrophoretic pattern and autoradiograph of SINV genome DNA probe labelled by ^{125}I radioiodination

Notes: 1, 2: A. 0; B. electrophoretic pattern of SINV genome DNA band, 1', 2': Autoradiographs of SINV genome DNA probe (0.6% Agarose)

用所制备的 TlCl_3 标记DNA探针^[9,10]: 取0.5—1 微克纯DNA, 经 100°C 水浴5—10分钟, 迅速冰浴5—10分钟。依次加入0.7 mM KI, 0.45mM NaAc—HAC, 100 微居里 Na^{125}I , 42mM TlCl_3 , 反应总体积控制在60—100微升。混合后在 60°C 水浴30分钟。然后取出反应物速冷(0°C) 5 分钟, 再加入 K_2HPO_4 终止反应。冷却后上Sephadex

本文1987年5月收到。

1. 生物学系, 2. 昆虫学研究所, 3. 生物工程中心, 刘振声参加了实验工作

G—50柱,用STE洗脱,用旋转柱层析法^[5]收集DNA,再测定洗脱液的放射性强度。从中取出5—10微升进行琼脂糖凝胶电泳,最后用放射自显影检定。

DNA膜固相分子杂交^[11]:取斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)核型多角体(SINPV) DNA及小牛胸腺DNA,100℃水浴处理10分钟,速冷(0℃),分别滴在同一张硝基纤维素膜上,固定后与¹²⁵I标记的SINPV—DNA探针杂交,最后进行放射自显影(图1)。

结果表明,所制备的TlCl₃用于¹²⁵I标记效率较高,只用少量DNA(0.5—1微克)和少量的同位素(100微居里),标记比活性可达 $4—6 \times 10^6 \text{ cpm}/\mu\text{gDNA}$ 。分子杂交证实(图2),¹²⁵I—SINPV—DNA探针具有特异性(SINPV—DNA呈阳性结果,小牛胸腺DNA呈阴性结果)。电泳后的放射自显影可见到出现“核酸谱带”。因此可用此探针进行交叉吸印杂交技术^[12],而缺口转移法标记的探针,因反应系统加入DNase I易造成缺刻断链,成为混乱的放射性DNA片段(图3)。

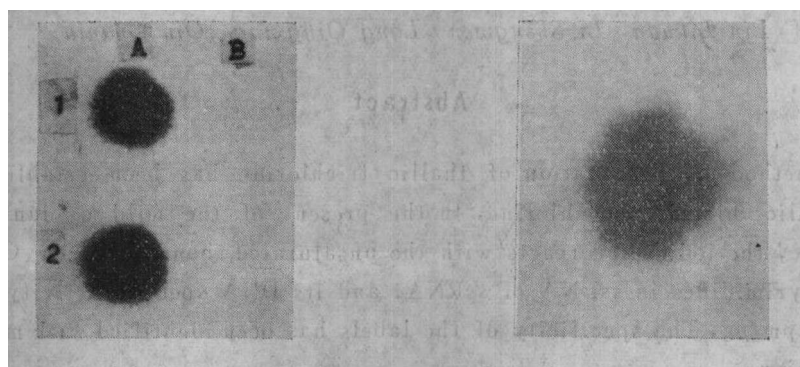


图2 ¹²⁵I 标记探针与 SINPV genome DNA打点杂交自显影
A. 1, 2, SINPV genome DNA;
B. 小牛胸腺 DNA
Fig. 2 Autoradiograph of dot hybridization of SINPV genome DNA,
Notes: A. 1, 2, SINPV genome DNA
B. calf thymus DNA

图3 α —³²p-dATP 标记 SINPV genome DNA 自显影
Fig. 3 Autoradiograph of SINPV genome DNA probe labelled by Nick Translation with α —³²p-dATP

参 考 文 献

- [1] Lewis C. et al., In "Methods in Cell Biology", Vol. X(1975), 325.
- [2] Hauswirth W.W. et al., *Gene*, 8 (1980), 193.
- [3] 张玉视等, 实验生物学报, 11 (1978), 1, 97.
- [4] 陈渊卿等, 中华传染病杂志, 1 (1983), 2, 63.
- [5] Maniatis T. et al., In Molecular Cloning Cold Spring Harbor, N. Y., 1982.
- [6] Commerford. S. L., *Biochem.*, 10 (1971), 1993.

- [7] Scherberg, N. H., *J. Biol Chem.*, 249 (1974), 2143.
[8] Gall J. G. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 63 (1969), 378.
[9] Roberson, H. D. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 70 (1973), 3260.
[10] Schmid F. J. et al., *Biochem.*, 12 (1973), 4980.
[11] David G. et al., *Mol. Biol.*, 12 (1965), 829.
[12] Loh, L. c. et al., *J. Virol.*, 38 (1981), 922.

Applications of Radioactive Label in Biotechnology

1. Preparation of Thallic Trichloride and Radioiodination of Nucleic Acids as Probe

Lin Likuan Li Shengwen Long Qingxing Qiu Quanfa

Abstract

The method of preparation of thallic trichloride has been established by using thallic chloride and chlorine. In the present of the mild oxidant thallic trichloride, the iodide ion reacts with the unsaturated bond between C—5 and C—6 of pyrimidines in ssDNA or ssRNA, and its DNA specific activity reached $4-6 \times 10^6$ cpm/ μ g. The specificity of the labels has been identified with molecular hybridization.

Keywords preparation, thallic trichloride, label, radioiodination