

实时检测限制性内切酶活性的发夹型荧光探针

张永有 李庆阁* 梁基选 朱艳冰

(厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘要 基于分子信标的原理, 设计了一种发夹型荧光探针作为限制性内切酶作用的专一底物, 来研究限制性内切酶的剪切作用。检测 *Bgl*II 和 *Nco*I 表明, 这种探针不仅可以灵敏、实时地指示内切酶的活性, 采用不同荧光标记的探针还可以同时特异地显示双酶切反应中两个酶各自的活性。并且以 Rotor-Gene 2000 实时荧光 PCR 仪作仪器检测, 实现了高通量的操作。利用其特有的作变温曲线的功能, 能很好的区分限制性内切酶与发夹型荧光探针的特异剪切与非特异的结合。

关键词 限制性内切酶; 发夹探针; 实时检测

限制性内切酶的发现与应用是基因工程技术迅速发展的关键, 限制性内切酶不仅在 DNA 重组中发挥作用, 在基因结构分析中也是不可缺少的工具。因此, 其活性检测意义显著, 并可进一步用于研究核酸损伤和核酸酶抑制剂等方面, 以及作为药物筛选的靶点。然而目前对限制性内切酶的活性普遍缺乏定量描述, 因为传统检测限制性内切酶活性的方法是将标准的 DNA 与限制性内切酶反应, 凝胶电泳观察酶切效果, 这种方法至多给出半定量结果, 而且操作麻烦, 重复性差, 更不能实时给出不同条件下的酶活性变化。近年来, 基于荧光共振能量转移原理标记的寡核苷酸探针检测限制性内切酶的方法得到一定的发展^[1~3], 但灵敏度仍较低, 且无法同时检测多个酶切反应。因此, 发展一种快速、准确、灵敏的定量检测限制性内切酶活性的方法, 将有重要价值。

本文提出一种新的探针设计, 可以满足上述检测要求。该探针基于分子信标的原理^[4], 将分子信标的“臂”设计成限制性内切酶识别位点区, 在“环”

上引入少量无关碱基, 使探针在常态下保持闭合状态而不发荧光; 限制性内切酶作用后, 随着“臂”被酶切, 发夹探针结构受到破坏而发出荧光。根据荧光动力学曲线, 可以定量指示酶的活性。由于标记的荧光物质可以是不同颜色的荧光物质, 因此针对不同的限制性内切酶可以合成出不同荧光标记的探针, 据此可以同时检测多个限制性内切酶的活性(图 1)。

1 材料和方法 (Materials and Methods)

1.1 试剂

限制性内切酶 *Bgl*II 和 *Nco*I 及其配套试剂购自大连宝生物技术公司。荧光探针 P(*Bgl*II): Fam-5-CA GATCTCAAAA GA GATCTG-3-Dabcyl 和 P(*Nco*I): Tet-5-ACCA TGGAAAAAATCCA TGGT-3-Dabcyl 分别表示 *Bgl*II 和 *Nco*I 的探针, 由上海博亚生物技术公司合成, 用酶切反应溶液配成 50 mmol/L 备用。两种荧光探针的茎部分别带有两种酶的酶切位点, 如图 2 所示。

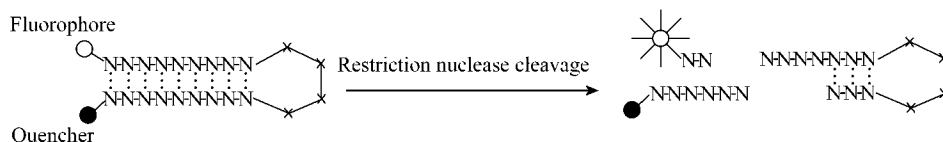


Fig. 1 Principle of hairpin probes for restriction nuclease

收稿日期: 2001-11-09 接受日期: 2002-01-16

福建省自然科学基金资助 (No. C97013)

* 联系人: Tel, 0592-2187363; e-mail, qgli@xmu.edu.cn

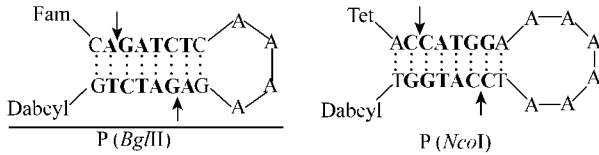


Fig. 2 Hairpin probes used in this study

The stem of hairpin probe P (*Bgl*II) contains the *Bgl*II recognition site (in bold), and the stem of hairpin probe P (*Nco*I) contains the *Nco*I recognition site (in bold). The cleavage sites indicated are shown by arrows.

1.2 仪器

Rotor Gene 2000 实时荧光 PCR 仪 (Corbett Research, Australia), 该仪器可同时检测吸收发射波长位 492/517 nm (Fam) 以及 520/540 nm (Tet) 两种荧光物质的信号, 可容纳 32 个反应管。

1.3 方法

按照酶的使用要求, 每个反应管分别加入 5 μ l 10 \times 酶切缓冲溶液、0.5 μ l 荧光探针、0.5 μ l BSA、43 μ l 双蒸水, 最后加 1 μ l 酶液至管壁上, 反应时靠离心作用与管内物质混合。*Bgl*II 和 *Nco*I 的反应用量分别为 3 u 和 2 u。使用两种探针时, 探针溶液各加 0.5 μ l, 反应总体积保持 50 μ l。空白对照管中, 酶液用双蒸水代替。反应温度为 37 $^{\circ}$ C, 循环数为 67, 每个循环 2 min (相当于 37 $^{\circ}$ C 恒温反应 2 h, 每隔 2 min 测定一次荧光); 反应后的熔解曲线的变温范围设为 40 ~ 90 $^{\circ}$ C, 每隔 2 $^{\circ}$ C 测定一次荧光值。

2 结果 (Results)

2.1 P(*Nco*I) 与 *Nco*I 的特异反应

首先考察了 P (*Nco*I) 分别与 *Nco*I 和 *Bgl*II 反应的情况。分别研究了反应动力学以及反应后探针的热变性情况。从图 3 中可以看出, P (*Nco*I) 探针在无限制性内切酶存在时, 荧光未发生变化, 说明

探针保持完整。加入 *Bgl*II 后, 荧光值与空白管一样未发生任何变化, 说明 *Bgl*II 对探针无作用。当加入 *Nco*I 后, 荧光值不断上升, 显示探针发生了解离, 导致荧光分子与猝灭分子分开而荧光增加。从相应的熔解曲线中看出, 在高温时, 探针完全熔解后空白管与 *Bgl*II 反应管的荧光值完全相等, 而 *Nco*I 管荧光信号则明显高于空白管, 证明升高的部分来源于酶切片段。从熔解曲线可以得到 P (*Nco*I) 的熔点为 71 $^{\circ}$ C, 这个熔点就是所谓发夹探针的“环熔点”, 在反应温度 (37 $^{\circ}$ C) 下, 发夹完全闭合, 因此探针本身的荧光背景很低。而同样组成的线性双链的熔点为 35.7 $^{\circ}$ C (% GC 方法), 这就是说, 在反应温度下 (37 $^{\circ}$ C) 线性双链结构已经解链。因此如果设计成线性的双链探针, 必须在酶切序列基础上增加更多的无关碱基才能确保双链结构。据此可见发夹探针的优点。

2.2 P(*Bgl*II) 与 *Bgl*II 的特异反应

同样考察了 P (*Bgl*II) 与两个酶分别反应的动力学曲线以及反应产物的热变性曲线。结果如图 4 所示, P (*Bgl*II) 只有在 *Bgl*II 存在时才有明显的荧光升高现象, 说明探针被酶切而解离。值得注意的是, *Nco*I 的存在亦引起轻微的荧光变化, 但从熔点曲线可以看出, 高温时 *Nco*I 管与空白管的荧光值相同, 说明 *Nco*I 导致的荧光增加可能来源于该酶与探针的非特异结合而非酶切, 高温变性后这种非特异结合不复存在, 使得保持完整的探针的荧光与空白管相同。从溶解曲线可以得到 P (*Bgl*II) 的“环熔点”为 75 $^{\circ}$ C, 而同样组成的线性双链的熔点为 35.7 $^{\circ}$ C (% GC 方法)。

2.3 P(*Nco*I) 和 P(*Bgl*II) 同时检测 *Nco*I 和 *Bgl*II 双酶切反应

由于 P (*Nco*I) 和 P (*Bgl*II) 分别标记不同颜色

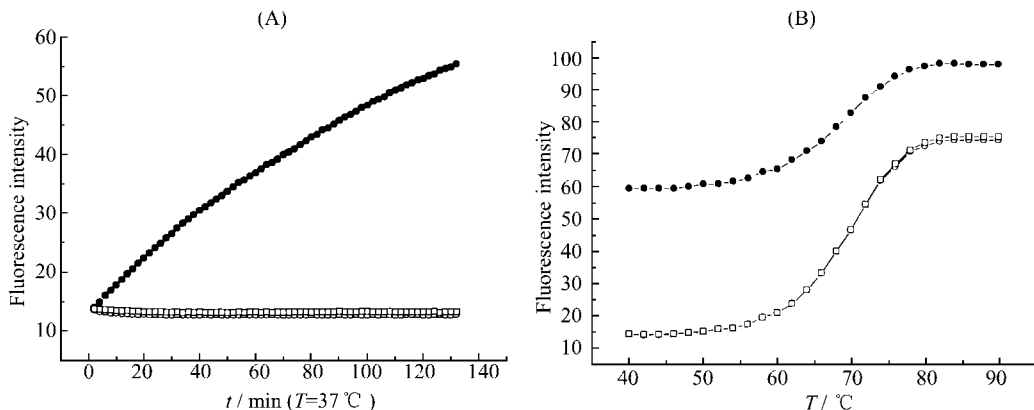


Fig. 3 Reaction of P (*Nco*I) with *Bgl*II and *Nco*I

, *Nco*I; , *Bgl*II; , blank. (A) Reaction kinetics of different reactions. (B) The melting curves after reaction.

的荧光物质, 可以将两探针混合, 采用多色同时测定方式, 研究 *NcoI* 和 *BglII* 共存时的反应活性。如图 5 所示, 和一般的实验经验相一致, 双酶切反应中每个酶的反应速率都低于相应的单酶切反应速率。另外可以观察到, 存在两种底物时, *NcoI* 的酶切速率与其在双酶切反应中的酶切速率几乎相等, 但都小于只有一种底物存在的单酶切反应速率[图 5(A)]。同样情况下, *BglII* 的单酶切速率甚至小于双酶切反应[对照图 4 的结果可知, 双酶切反应速率的增加很大程度上应归于 *BglII* 与 P(*NcoI*) 的非特异结合作用], 但两者的酶切速率都小于只有一种底物存在的单酶切反应速率。这就说明, 双酶切反应中, 一个酶的存在并不影响另一个酶的反应速率, 而另一个底物的存在是导致酶切速率降低的原因。

3 讨论 (Discussion)

本文设计的发夹探针由于具有很高的“环熔

点”, 在正常酶切反应温度条件下保持发夹结构, 荧光本底极低; 酶切后的几个互补碱基片不足以再次结合, 发夹结构完全解离而使荧光大为增加。在具体设计过程中, 通过添加尽量少的腺苷酸以形成发夹结构, 同时在酶切位点的两端分别添加一个核苷酸, 目的在于一方面缩短环长, 延长臂长, 以获得高的“环熔点”; 另一方面, 如果将染料直接标记于属于酶切位点的核苷酸, 探针就丧失了指示能力。

目前, 基于荧光能量转移设计的探针采用互补的一对寡核苷酸, 荧光供受体分别标记于双链的两端, 为使双链探针足够稳定, 需要在限制性内切酶识别位点的两端添加足够多的无关碱基, 造成荧光供体和受体距离增加, 牺牲了很大部分能量转移效率, 因此灵敏度低^[2]。Vitiello 等^[5]用荧光能量转移单链 RNA 探针检测 RNA 酶, 同样存在灵敏度不高问题。而发夹探针在闭合状态下荧光猝灭可达 99% 以上, 发夹开启后荧光又几乎 100% 恢复^[4], 因此

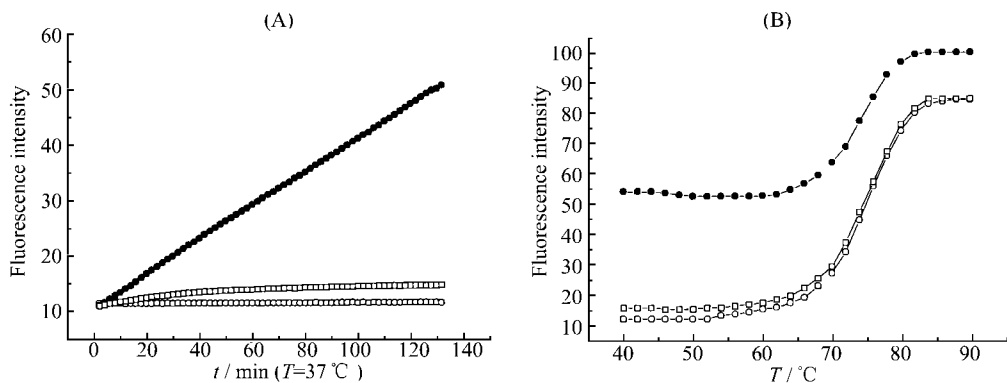


Fig. 4 Reaction of P(*BglII*) with *BglII* and *NcoI*
 , *BglII*; , *NcoI*; , blank. (A) Reaction kinetics of different reactions. (B) The melting curves after reaction.

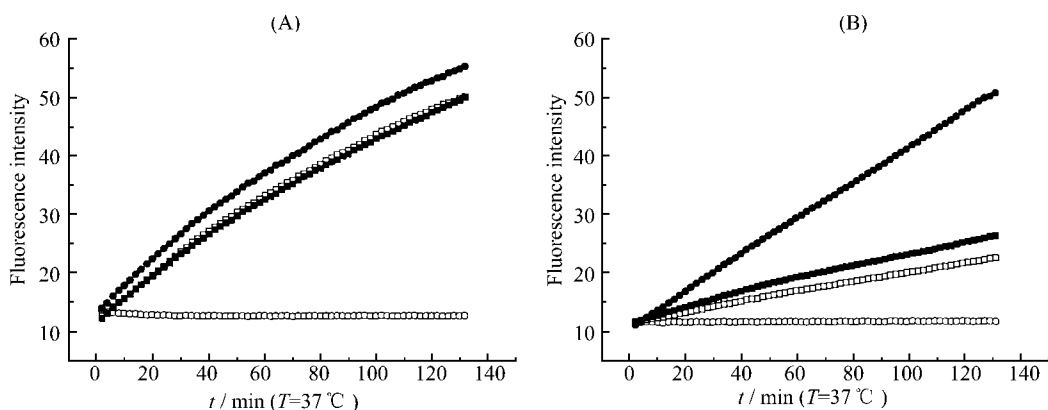


Fig. 5 Comparison of single-enzyme and double-enzyme reaction detected with hairpin probes
 (A) Reaction detected with P(*NcoI*). , *NcoI*; , *NcoI* and P(*BglII*); , *NcoI*, *BglII* and P(*BglII*); , no enzyme. (B) Reaction detected with P(*BglII*). , *BglII*; , *BglII* and P(*NcoI*); , *BglII*, *NcoI* and P(*NcoI*); , no enzyme.

具有很高的灵敏度。用于酶切反应时,发夹探针的这种优点被充分发挥。本文利用两个不同荧光标记的探针用于研究双酶切反应,体现了发夹探针的多色检测优势,为基因操作中比较棘手的双酶切反应条件的选择问题提供了直观定量的检测手段。实际上,利用目前的仪器条件,完全可以实现6种以内的限制性内切酶的混合作用的同时检测。

最近Li等人^[6]采用分子信标检测单链核酸酶时,显示了该探针在灵敏度上的优越之处,然而单链核酸酶数量少,并可用线形探针直接检测,采用分子信标并未能充分展示该探针的优点。在本文成文过程中,注意到Biggins等^[7]同样提出采用发夹探针检测一些具有核酸酶活性的依赖铁的小分子化合物,也证实了该类探针的灵敏度明显高于荧光能量转移探针以及需要特殊仪器手段的荧光相关光谱技术。

采用发夹探针不仅适用于限制性内切酶的活性检测、酶切最适反应条件的建立及DNA结构对酶切效率的影响等,也为定量研究限制性内切酶活性的各种影响因素提供了简便可靠的手段。对高通量筛选具有限制性内切酶活性的物质,研究抑制、激

活限制性内切酶活性的物质以及核酸与蛋白质的相互作用,以及生产中的质量控制等方面,都具有重要应用价值。

References

- 1 Geselowitz DA, Cramer H, Wondrak EM, Player MR, Torrence PF. Fluorescence resonance energy transfer analysis of RNase L-catalyzed oligonucleotide cleavage. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2000, **10**(1): 45—51
- 2 Ghosh SS, Eis PS, Blumeyer K, Fearon K, Millar DP. Real time kinetics of restriction endonuclease cleavage monitored by fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**(15): 3155—3159
- 3 Lee SP, Censullo ML, Kim HG, Knutson JR, Han MK. Characterization of endonucleolytic activity of HIV-1 integrase using a fluorogenic substrate. *Anal Biochem*, 1995, **226**(2): 295—301
- 4 Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*, 1996, **14**(3): 303—308
- 5 Vitiello D, Pecchia DB, Burke JM. Intracellular ribozyme-catalyzed trans-cleavage of RNA monitored by fluorescence resonance energy transfer. *RNA*, 2000, **6**(4): 628—637
- 6 Li JJ, Geyer R, Tan W. Using molecular beacons as a sensitive fluorescence assay for enzymatic cleavage of single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(11): E52
- 7 Biggins JB, Prudent JR, Marshall DJ, Ruppen M, Thorson JS. A continuous assay for DNA cleavage: The application of "break lights" to enediynes, iron-independent agents, and nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(25): 13537—13542

Hairpin Probes for Real-time Assay of Restriction Endonucleases

ZHANG Yong-You, LI Qing-Ge^{*}, LIANG Ji-Xuan, ZHU Yan-Bing

(The Key Laboratory of Cell Biology and Tumor Cell Engineering of Ministry of Education, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract New fluorogenic probes for restriction endonucleases based on molecular beacons were developed. These hairpin probes were single-stranded oligonucleotides that had stem-and-loop structure and carried 5'-fluorophore moiety and 3'-quencher moiety. Their stem sequences were designed as recognition sites for restriction endonucleases and loop sequences were unrelated nucleotides. Upon cleavage by endonuclease, these probes became fluorescent and thus could trace the enzyme activity continuously. Two probes were designed for *Bgl*II and *Nco*I, respectively, and each was labeled with a fluorophore of different color. The results showed that the two probes could specifically assay for the corresponding enzymes either individually or simultaneously in a real-time mode. Considering the simplicity, quantification and high throughput, these probes could be extended to other applications such as drug screening, protein-nucleic acid interaction study and searching for small molecule DNA cleavage agents.

Key words restriction endonuclease; hairpin probe; real-time detection

Received: November 9, 2001 Accepted: January 16, 2002

This work was supported by Fujian Natural Science Foundation (No. C97013)

^{*} Corresponding author: Tel, 86-592-2187363; e-mail, qgli@xmu.edu.cn