

直接凝胶杂交法的生物素显色与增色

黄承汉 胡惠廉 袁恬莹

(湖南医学院生化研究室, 长沙)

对于任一核酸样品中靶 DNA (或 RNA) 序列的检测, 均需借助两项基本分析技术: (1) 基因特异探针的掺入标记; (2) 带标探针与待测样品的分子杂交。杂交的结果可借放射自显影^[1]或呈色反应^[2]所产生的信号而加以分辨。

用缺口平移 (nick translation, NT) 法标记的双链 DNA 探针, 依掺入脱氧核苷酸 (dNTP) 性质不同而分为放射性与非放射性两类, 前者多用 [α -³²P]-dNTP、后者常以生物素衍生物 (如 biotin-11-dUTP) 作掺入体。DNA 分子的互补杂交, 按样品在电泳分离后是否进行转移也分为两类, 即 Southern 印迹 (滤膜) 杂交^[1]和直接凝胶杂交^[3]。本文作者曾建立放射性直接凝胶杂交法, 用于正常人、大鼠珠蛋白基因组和克隆 DNA^[3], 以及地中海贫血患者 DNA^[4,5]

灵敏度较差的问题, 可通过延长自显影曝光的时间而得到克服。从本文所给出的实例 (图 4) 来看, 我们认为本文所提供的方法具有广泛的适用性。如果样品中的放射性强度 (cpm) 较低, 可以增加在 -70℃ 中的曝光时间, 自显影图谱的清晰度随着曝光时间的增加而增加, 而条带无明显的扩散现象。

本实验所用的凝胶厚度为 1 mm, 如果胶厚度增加, 则浸泡时间应适当延长, 一般不应超过 60 分钟。为防止高浓度凝胶 (超过 10%) 在干胶时可能发生断裂, 在水杨酸钠溶液中加入 0.5—1% 的甘油较为有利。

为了确定预曝光的光强度, 本文给出一个简单易行的比色经验方法。国产医用 X-光底片的片基略呈蓝色。吸收光谱波长扫描表明片基在 600nm 处有小的吸收峰。因此在比较预曝

的限制性图谱分析, 获得非常理想的效果。本文报道一种非放射性直接凝胶杂交法, 并对如何增强其信号作了初步探索。此法与使用生物素探针的滤膜杂交法^[1]一样, 切实可行, 效果好, 而更经济、简便。

材 料 和 方 法

1. 药品和试剂 限制性内切核酸酶: Bio-Lab 产品; 琼脂糖: BRL 及上海东海制药厂产品; 硝酸纤维素滤膜: S&S 出品; DNA 检测药盒与生物素-11-dUTP: 由 BRL 公司馈赠; 荧光体 EN³HANCE™: New England Nuclear 产品。其余试剂为国产分析纯。

2. λDNA 的分离提取与消化 用 λ噬菌体 cI857ts 感染宿主细胞 (菌株 W3110), 按文献

光引起底片的发黑度时, 在 600nm 处比色是合理的。对预曝光光源的性质及滤光片的种类和质量无严格要求。

参 考 文 献

- [1] Fruscoloni, P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3359, 1983.
- [2] Inasi, B. S. and Brown, I. R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**, 881, 1982.
- [3] Bonner, W. M. and Laskey, R. A.: *Eur. J. Biochem.*, **46**, 83, 1974.
- [4] Bravo, R.: in "Two-Dimensional Gel Electrophoresis of proteins, Methods and Applications" ed by Celis, J. E. and Bravo, R. pp. 3—36, 1984.
- [5] Chamberlain, J. P.: *Anal. Biochem.*, **98**, 132, 1979.
- [6] Laskey, R. A. and Mills, A. D.: *Eur. J. Biochem.*, **56**, 335, 1975.
- [7] Prydz, S. et al.: *Anal. Biochem.*, **42**, 156, 1970.

[本文于 1986 年 2 月 25 日收到]

[6]稍作修改,分离提取 λ DNA, 其限制性消化依厂家提供的条件进行。

3. 琼脂糖凝胶电泳 称取等量进口和国产琼脂糖混合,用 TBE 缓冲液 (0.089M Tris-硼酸, 1mM EDTA, pH8.3) 配成浓度为 0.8% 的凝胶,如前法^[3]进行水平板电泳。

4. λ DNA 探针的标记和分离 用 biotin-11-dUTP 作掺入物,按缺口平移法^[7]标记 λ DNA,用 Sephadex G50 小柱分离,通过显色反应确定被标探针峰并收集备用。

5. 分子杂交、信号检测与增强 为了比较滤膜和凝胶两种非放射性杂交方法的效果, λ DNA 经限制性消化和电泳分离后,一张凝胶按标准方法^[4]将 DNA 转移至硝基纤维素膜上,另一张凝胶借脱水及干燥作用^[3]而使其中的 DNA 原位固定。二者在同样的条件下进行预杂交和杂交。杂交的温度为 68℃, 杂交液的组成是 5×SSC、5×Denhardt、0.1%SDS、5mMEDTA、100 μ g 鲑精 DNA/毫升。加入的液体量按 100 μ l/cm² 计算。生物素标探针借加热 (95℃, 10—15 分钟) 解链后,直接加入已作预杂交的滤膜和凝胶杂交袋内,保温振荡过夜。滤膜与

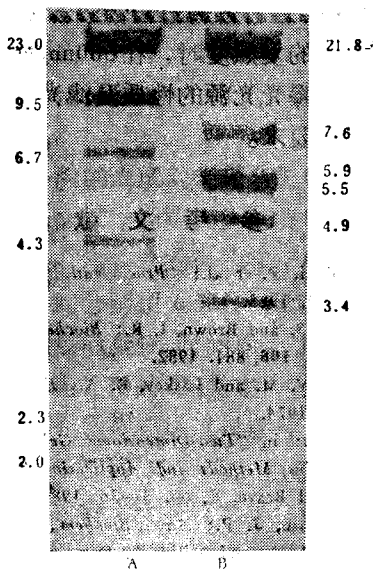


图 1 λ DNA 的直接凝胶杂交与生物素显色

A. Hind III 消化 B. EcoRI 消化

图旁数字为限制性片段大小 (kb) λ DNA 上样量: 500ng

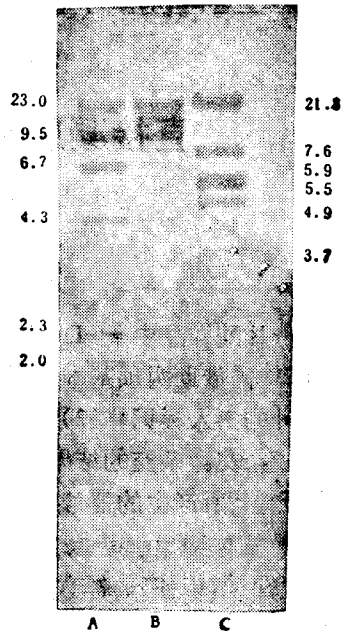


图 2 λ DNA 的印迹滤膜杂交与生物素显色

A. Hind III. B. Bgl II C. EcoRI

Bgl II 的片段大小依次为: 22.7, 12.3, 8.7, 2.7, 0.6kb 其余说明同图 1。

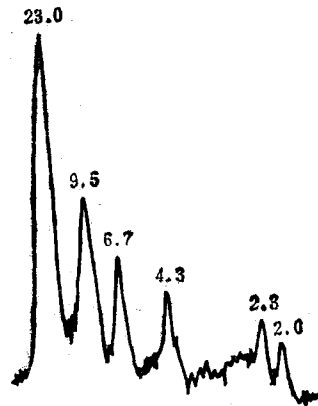


图 3 λ DNA 的 Hind III 限制性片段生物素探针显色强度的扫描测定

波长: 560nm (样品), 700nm (参比) 各峰上方数字示相应片段大小 (kb)

凝胶的洗涤以及生物素的特异显色均照厂家的说明书。凝胶显色后,用 ENHANCE™ 浸泡至背景变白,观察、比较杂交的结果。

6. 限制性片段的显色强度 用附有积分仪的 CS-910 型双波长扫描仪 (日本 Shimadzu 产) 测定。

结果与讨论

1. 非放射性凝胶和滤膜杂交法的比较

λ DNA 经限制性消化后,在相同条件下,其凝胶杂交(图1)和滤膜杂交(图2)显色所得的各个限制性片段的大小,与文献报道的结果完全相符。扫描法测得的各片段显色的强度,也基本与其大小成比例。图3说明了 λ DNA 经 Hind III 消化和凝胶杂交后各片段显色的相对强度。我们的结果表明,直接凝胶杂交法可与检测 DNA 的生物素探针标记系统结合,从而提供了一种非放射性凝胶杂交技术。此法由于省硝基纤维素的使用以及印迹转移等过程,同时借显色反应直接检测特异性片段,从而简化了操作,缩短了分析时间。

2. 凝胶杂交信号的增色

非放射性滤膜杂交的显色信号,可借甲苯浸泡滤膜而增强^[2]。干燥凝胶虽呈透明状,但其显色的对比度不如硝基纤维素膜明显,照像的效果也不如后者。由于琼脂糖凝胶经荧光体 ENHANCETM 浸泡后变成白色背景,我们尝试用此类荧光体处理已显色凝胶,获得了令人满意的增色效果;不仅对比度良好,而且观察到显色区带由紫蓝色逐渐转变成鲜蓝色,用水漂洗凝胶去掉荧光体后又恢复原状。其增色机理尚待进一步探讨。

3. 几点经验体会

国产琼脂糖凝胶由于机械强度不够,缺乏韧性,容易破碎。但若与一定量进口琼脂糖混合使用,则效果良好,便于操作。再者我们观察到凝胶显色反应的速度要比滤膜显色慢,因此需延长显色保温时间。这可能与压缩、干燥后

的凝胶孔径变小,从而限制大分子显色复合物的扩散有一定关系。另外,凝胶干燥也是一个重要环节,否则可能导致非特异的显色,干扰待检信号的辨识。最后一点是,生物素标双链 DNA 探针需借加热变性解链,因强碱(如 NaOH)可破坏生物素-11-dUTP,降低检测的灵敏度。

4. 非放射性直接凝胶杂交法与其它方法结合的可行性

本文所述方法还可与其它非放射探针标记系统结合,进一步扩大其应用。例如生物素标寡核苷酸探针^[8],以及 SP6 系统的单链 RNA 探针^[9]等。此外,最近报告的光化生物素(photo-biotin)^[10],可望大大改善这类非放射性分析技术的灵敏度。

参考文献

- [1] Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, **98**, 503—517, 1975.
- [2] Leary, J. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4045—4049, 1983.
- [3] Huang, C. H. et al.: *Proceedings of International Conference on Thalassemia*, March of Dimes, New York, 1986 (in press)
- [4] Liu, V. W. S. et al.: *ib. id.*
- [5] 黄承汉等:《生物化学杂志》,1986年(印刷中)
- [6] Maniatis, T. et al.: *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor, New York, pp. 76—85, 1982.
- [7] Rigby, P. W. J. et al.: *J. Mol. Biol.*, **113**, 237—251, 1977.
- [8] Chollet, A. et al.: *Nucleic Acid Res.*, **13**, 1579—41, 1985.
- [9] Melton, D. A. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **12**, 7035—56, 1984.
- [10] Forster, A. C. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **13**, 745—61, 1985.

〔本文于1986年4月1日收到〕