

Southern 十字转印杂交法

——一个组建 DNA 物理图谱的新技术

齐义鹏 黄永秀

(武汉大学病毒学系)

提 要

New England Nuclear (NEN) 公司 1984 年推出一个组建 DNA 物理图谱的最新方法: Southern 十字转印杂交系统。其构思之巧、效率之高、结果之精为其他方法所望尘莫及。此法是将一个限制酶的消化物制成放射性探针,与另一个酶的消化物分别进行制备性电泳,并转印到特制的膜上。将两膜面对面、垂直的叠合进行固体杂交。经放射自显影后,在一张 X 光片上可直接排出各片段的顺序,组建成这两个酶的物理图谱。一次实验甚至可完成十个酶物理图谱的组建。

一、十字杂交法的特点

标明限制性核酸内切酶在 DNA 分子上的限制位点数目、限制片段大小及其排列顺序的图谱称为 DNA 的物理图谱。第一个物理图谱是 D. Nathans (1977)^[1] 用 HindII 消化 sv40 DNA 得到的。组建物理图谱的常用方法是限制性内切酶的部分消化和双酶消化法^[2,3];此外,还有顺序消化法,内切与外切酶混合消化法^[3],分子杂交法^[4]等。这些方法都不够精确,即使严格控制也有 100bp 左右的误差^[3],而且计算与结果分析十分繁琐。分子杂交法虽然较为精确,但程序复杂。它需要将一个酶消化的所有片段分别回收,用 Nick translation 制备探针;用另一个酶消化物的电泳图谱进行 Southern blot 转移到硝酸纤维膜上,最后,一个探针一个探针的进行杂交,费工费时,操作特别漫长^[4]。

1984 年, NEN 公司^[5] 根据 Potter 和 Dressler^[6] 尚未发表的资料提出了一个组建 DNA 物理图谱的新技术,即 Southern 十字杂交法。此法既保留了分子杂交法的优点,又克

服了其繁琐冗长的缺点,是一个快速、简便、精确的新方法。根据一张 X 光片上的杂交结果,可迅速无误的组建出两种限制酶的 DNA 物理图谱,一次实验,多则可以得到十个酶的结果,速度比普通分子杂交法快 100 倍以上,更为任何其他方法望尘莫及。

二、十字杂交法的程序

1. DNA 样品的制备、消化和标记

十字杂交法需要大量的 DNA 样品,一次限制酶消化的用量为 250 μ g。选一个片段多的酶消化物进行标记,制备放射性探针,称为热消化物。其余酶的消化物不需标记,称为冷消化物。

标记热消化物决不能用 Nick translation 法,只能用多核苷酸磷酸激酶将 ³²P 标记到各个片段的 5' 末端或用末端转移酶将 ³²P 标记到每个片段的 3' 末端,以保证所有片段的完整性。从标记的混合物中除去残余的放射性核苷酸是提高杂交效率的重要措施。为此,可用 Sephadex G-50 离心柱层析^[3] (Spin Column), 以

pH7.5 TE (Tris · EDTA) 缓冲液洗脱, 定量的收集离心液, 即为放射性探针, 以备电泳。

2. 电泳及 DNA 带的转移

热冷消化物都需进行制备性琼脂糖凝胶平板电泳。取消化液 50 μ l (含样品 250 μ g) 加 5 $\times$ 样品缓冲液 (蔗糖溴酚兰混合物) 50 μ l, 点在凝胶的宽齿槽内, 用 1 $\times$ TBE (Tris · 硼酸 · EDTA) 为电极缓冲液, 按常规方法进行电泳。

电泳结束后, 凝胶用溴化乙锭染色并观察, 确定各个 DNA 带的位置。然后, 将凝胶浸入 0.5M NaOH, 1.5M NaCl 溶液中, 室温变性 45 分钟, 使 ds DNA 变性成 ss DNA。

以 Southern blot 法^[3] 将凝胶上的冷片段 (即未标记片段) 转移到特制的基因正膜 (Gene Screen Plus) 上; 热片段 (已标记片段) 转移到基因膜 (Gene Screen) 上。缓冲液为 pH6.8 25mM 磷酸钠缓冲液。室温转移 20 小时, 只要片段在 20kb 以下, 转移是成功的。

转膜后, 晾干冷膜备用。热膜需保持湿润状态并立即使用。

3. 杂交程序

Southern 十字杂交法的最大特点是固体杂交, 与普通杂交法的程序完全不同。其基本原理是, 用热膜上的放射性片段作探针, 冷膜上的未标记片段作受体, 当热冷膜相互接触, 热膜上的探针渗透到冷膜上, 具有同源序列的片段就能实现 DNA 的分子杂交。

杂交前, 需用如下溶液洗涤冷膜。

杂交基础缓冲液 (BLotTTO) 含有 2 $\times$ 0.5% 干奶粉 (dry Milk), 12 $\times$ SSC。用杂交缓冲液 a (HB_a: BoLTTO 100ml, 2% SDS 2ml, 水 100ml) 漂洗所有的冷膜 65 $^{\circ}$ C 几分钟。取其中任一张冷膜再用 HB_b (BoLTTO 25ml, 10% SDS 0.5ml, 10% 焦磷酸钠 0.5ml, 水 25ml) 室温漂洗几分钟。用 HB_c (BLotTTO 125ml, 甲酰胺 125ml, 10% SDS 2.5ml) 室温再次漂洗其余所有的冷膜 (除用 HB_b 漂洗的一张冷膜外)。

将热膜在已去气的 25mM pH6.8 磷酸钠缓冲液中浸润, 面向上放在玻板上, 将 HB_b 漂

洗的那张冷膜面向下放在热膜上, 务必使两张膜的电泳方向互相垂直。

以同样方式将在 HB_c 中漂洗的其余所有冷膜一张一张的放在第一张冷膜上面, 逐出膜间气泡。另外, 用制备热片段的酶消化样品, 不标记制一张冷膜, 同样漂洗, 放在最上面, 作为杂交的阳性对照。

冷膜多少, 可根据实验要求而定。据 NEN 公司介绍, 一次实验可使用十个酶, 即 9 张冷膜。当然, 也可只用两个酶, 一个作为热膜, 另一个用于冷膜, 阳性对照也可省去。

取一张滤纸在 HB_c 中浸湿, 铺在顶部, 再用 HB_b 5—8ml 淋在滤纸上, 并用几毫升 HB_c 喷洒在膜的边缘, 压一块玻板, 加重约 400 克压紧 (图 1)。室温放置 1—2 小时后, 移至 37 $^{\circ}$ C—42 $^{\circ}$ C 过夜。

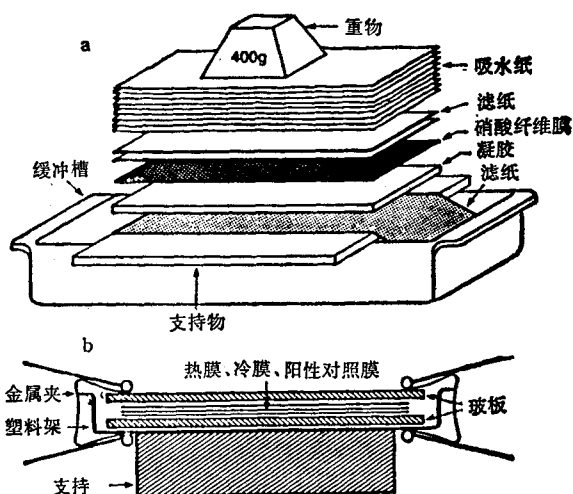


图 1 Southern 十字杂交法装置图

a. Southern 转印 b. Southern 杂交

4. 后处理和放射自显影

杂交结束后, 取出所有冷膜, 放在一个磁盘中, 用 2 $\times$ SSC 加 0.1% SDS 室温洗涤三次, 每次 30 分钟; 再用 0.1 $\times$ SSC 和 0.1% SDS, 50 $^{\circ}$ C 洗涤 40 分钟。晾干, 铺 X 光片进行放射自显影。曝光时间与冷膜的位置有关。若 32 P 为 1 $\times 10^6$ dpm, 冷膜上的片段在 0.5—23kb 之间, 以 kodax XAR-5 号胶片, 在 -80 $^{\circ}$ C 条件下,

表 1 十字杂交法的曝光参考时间

冷膜 NO	曝光时间
1	<17hr
2	17hr
3	17hr
4	24—30hr
5	48hr
6	2—3 天
7	3—5 天
8	4—7 天
9	5—8 天
10	5—8 天

曝光所需时间见表 1。

三、十字杂交法的结果分析

以限制性内切酶 HindIII 消化 λ 噬菌体 DNA 得到的 a, b, c, d, e, f, g 等 7 个片段作热片段和阳性对照的冷片段,并用 EcoRI 消化

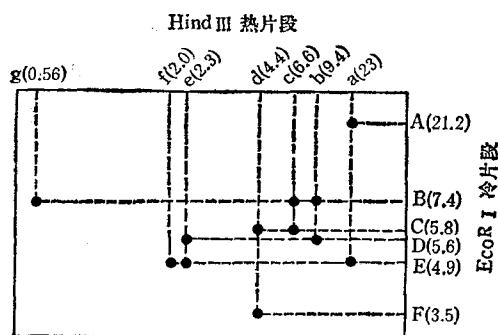


图 2 用 HindIII/EcoRI 消化 λ DNA 的十字杂交放射自显影图

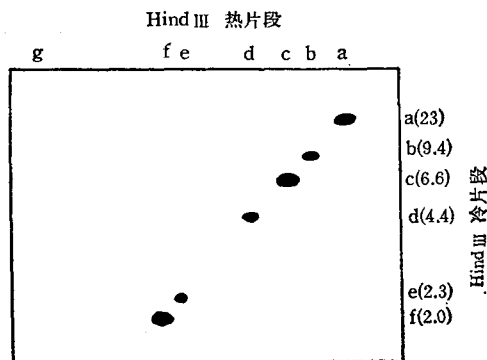


图 3 λ DNA HindIII 阳性对照的放射自显影图

得到的 A, B, C, D, E, F 等 6 个片段作冷片段,进行 Southern 十字杂交,放射自显影的结果见图 2, 3。

根据上述杂交结果,依次排出 λ DNA 各个片段的顺序(见图 4A-G),最后,便能迅速无误的组建出 λ DNA 的 HindIII 和 EcoRI 物理图谱(见图 4H)。

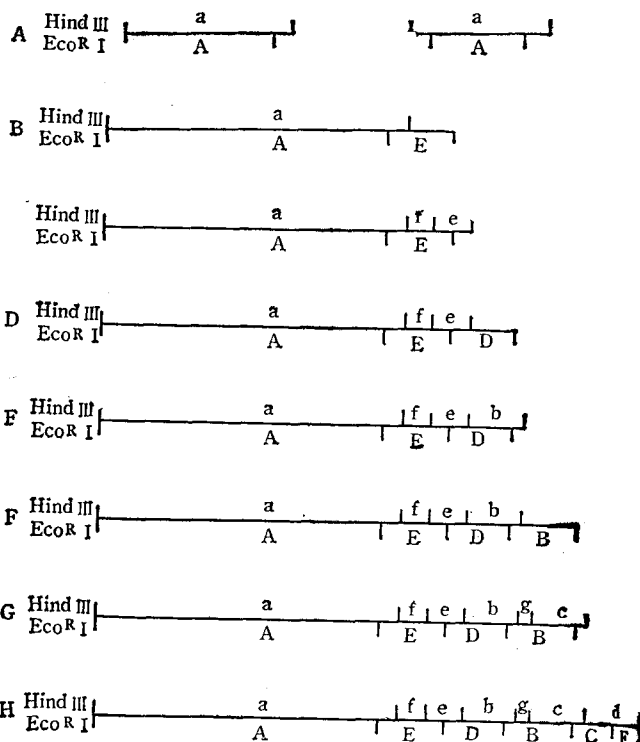


图 4 λ DNA HindIII 和 EcoRI 片段的顺序排列

参 考 文 献

- [1] Denna, K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 2913, 1977.
- [2] Dean, D. H. et al.: *Spores*, VII, 144, 1978.
- [3] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- [4] 齐义鹏等,《武汉大学学报》, **1**, 100, 1986.
- [5] E. I. du Pont de Nemours and Company, Inc.: *Southern Cross Restriction Mapping System*, New England Nuclear, Instruction, Manual, 1984.
- [6] Potter, H. et al.: *Manuscript Submitted for Publication*, 1984.

[本文于 1987 年 2 月 2 日收到]