

^{35}S - α -dATP 用于缺口转移标记探针 DNA 及蓖麻蚕核型多角体病毒 (ArNPV) 多角体蛋白基因的初步定位

陈蔚梅 林栖凤 马延高 卢文钧

(武汉大学病毒研究所)

提 要

本文用苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒的多角体蛋白基因 mRNA 的 cDNA 为探针,用 ^{35}S - α -dATP 为标记化合物,经缺口转移体外标记探针 DNA,用旋转柱层析法分离出标记探针,由膜上 DNA-DNA 杂交,将 ArNPV 的多角体蛋白基因定位,确定是在其 EcoRI-II 片段上。

前文报告了 ArNPV DNA 的物理图谱^[1]。定位其多角体蛋白基因是进一步研究 ArNPV

过量。

根据包装后测定结果说明我们获得了 3.3×10^5 个重组子。按 Clarke 和 Carbone^[10] 的公式 $N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-F)}$, 我们按克隆片段平均大小为 17kb 计算,水稻 ctDNA 基因组大小是 130kb, 33 个重组子就可以使水稻 ctDNA 基因文库的完整性达到 99%。而我们获得的重组子数大大超过此数值,所以基因文库的完整性是不容怀疑的。

从已构建的文库中任意挑取 10 个噬菌斑,并以简易方法提取噬菌体的重组 DNA,利用限制性内切酶 SalI 切除两臂,释放出插入片段。经鉴定此 10 个均为重组子,插入片段大小在 14—21kb 之间,所以大小完全在克隆片段范围之内(图 3,见图版 II)。

为了进一步证实文库的有效性,我们用比放射性为 $10^7\text{cpm}/\mu\text{g}$ 的烟草叶绿体核糖体 S14 蛋白基因片段作探针,经原位杂交挑选出 3 个阳性斑点,分别命名为 $\lambda\text{Rps14-1}$, $\lambda\text{Rps14-2}$ 和 $\lambda\text{Rps14-3}$ 。以快速抽提法制取重组 DNA 后,用 SalI 酶解,经 Southern 杂交,结果表明重组子 $\lambda\text{Rps14-3}$ 的插入 DNA 中有 rps14 基

因(图 4,见图版 II)。

基因文库的构建成功将为今后进一步研究水稻叶绿体基因组的结构,探测与光合作用、抗病和抗逆境功能有关基因并研究它们的结构与功能准备了条件。

本工作承我系沈志伟同志提供 ctDNA 样品,复旦大学遗传所有关同志提供某些菌种及 λ 噬菌体,生化专业八二届毕业生黄跃和蒋进参加了部分工作,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Hirai, A. et al.: *Theor. Appl. Genet.*, 1985, 70, 117.
- [2] Frischang, A. M. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1983, 170, 824.
- [3] Silhavy, T. J. et al.: *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1984, 93—96.
- [4] Salts, Y. and Beckman, J.: *PMB Newsletter*, 1981, 11, 73.
- [5] Scalenghe, F. et al.: *Chromosoma*, 1981, 82, 205.
- [6] 曹凯鸣等:《复旦学报》, 1988.
- [7] Rigby, P. W. J. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1977, 113, 237.
- [8] Benton, W. D. et al.: *Science*, 1977, 196, 180.
- [9] Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, 1975, 98, 503.
- [10] Clarke, L. and Carbon, J.: *Cell*, 1976, 9, 91.

[本文于 1987 年 8 月 17 日收到]

的结构与功能的重要环节。 ^{32}P 标记的核苷酸常用于标记探针和基因定位的研究^[2-4]。 ^{32}P 的半衰期太短(14.3 天),而 ^{35}S 则具有半衰期适中(87.3 天)和发射的 β^- 粒子能量适中等优点,西方各国自 1983 年以后已日趋广泛选用此标记化合物。1986 年国产 ^{35}S - α -dATP 开始供应市场。本文报道采用国产 ^{35}S - α -dATP 经体外缺口转移获得了高比放的含有苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)的多角体蛋白基因 mRNA 的 cDNA 的质粒(pMA-VI)DNA 的 ^{35}S 标记的探针,并经由膜上 DNA-DNA 杂交,在 ArNPV DNA 的限制性内切酶图谱上,将其多角体蛋白基因定位在它的 EcoRI 酶切片段 II 上。

材 料 和 方 法

一、探针的制备

将约 2.0 μg pMA-VI DNA^[3](美国爱德华大学, L. K. Miller 教授惠赠)转化进入经 Ca^{2+} 处理过的大肠杆菌 *E. coli* RR₁ 细胞中。经抗菌素抗性筛选后,又用放射性探针(^{35}S -ArNPV DNA 的 EcoRI 片段)与菌落杂交筛选确证,选出了含有 pMA-VI DNA 的重组质粒菌株。然后在 L. B. 培养基(每升含蛋白胨 10g, 牛肉膏 5g, NaCl 10g, pH7.5)中增殖。经氯霉素扩增,终浓度达到 170 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。用 Holmes^[5] 的方法提取质粒 DNA,用改进的电洗脱回收法^[6]获得纯净的,不含细胞染色体 DNA 的 pMA-VI DNA 作探针,待标记。

二、缺口转移标记 pMA-VI DNA

反应总体积 100 μl ,其中含 ^{35}S - α -dATP(购自上海生化所东风试剂厂) 1.85Bq (50 μCi); dCTP, dGTP, dTTP 各为 0.1mmol/L; pMA-VI DNA 2 μg ; DNase I 30pg; DNA polymerase I 8u。于 14 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 小时。反应结束后,反应液用旋转柱层析法分离。其 Sephadex G-50 层析柱的床体积分约 0.9ml,每次加 200 μl 淋洗液(10mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA, pH 7.5), 2000rpm 离心 1 分钟,分别收集淋洗液。每管取出 5 μl 点在醋酸纤维素滤膜上,吹干后

在 FH-408 定标器上,或在 FJ-353 液体闪烁计数器上(用纸片法)测定其放射性。截取第一个洗脱峰(第一管),即为标记好的 DNA 样品(图 1)。

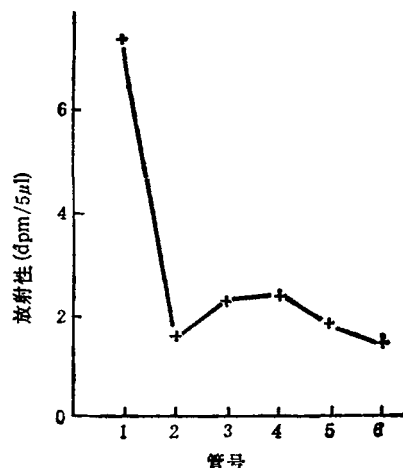


图 1 ^{35}S -DNA 的洗脱曲线

三、ArNPV DNA 的限制性内切酶酶切图谱及其吸印转移

ArNPV DNA 的纯化方法同前文^[7]。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 用 EcoRI, BglII, XhoI 及 BglII + XhoI 酶切二小时,在 0.7% 琼脂糖胶板上电泳展开,然后在 254nm 波长的紫外灯下拍照,作好标志(图 2a)。

按 Southern 转移法^[8]将 DNA 变性后吸印到硝酸纤维素(NC)滤膜上,80 $^{\circ}\text{C}$ 烘干。

四、NC 膜上的 DNA-DNA 杂交

将上述标记好的 DNA 探针热变性备用。

将上述吸印有 ArNPV DNA 的 NC 滤膜置预杂交液(含 5 $\times$ SSC 溶液, 50% 甲酰胺, 5 $\times$ Denhardt's 溶液, 50mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.5), 1mg/ml 变性小牛胸腺 DNA, 1% 甘氨酸)中, 42 $^{\circ}\text{C}$ 预杂交 3 小时。然后转入 10ml, 含有 1.5 $\times 10^7$ cpm 的 ^{35}S -DNA 探针的杂交液(含 5 $\times$ SSC 溶液, 50% 甲酰胺, 1 $\times$ Denhardt's 溶液, 20mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.5), 10% 硫酸葡聚糖钠)中,于 42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 24 小时。

杂交后的滤膜,洗净吹干(杂交液回收可再次利用),用保鲜纸包好,移入暗室,用 X 光胶片

夹盖,包上黑纸,置 -40°C 曝光。所需曝光时间用下式估算^[9]:

$$\text{所需曝光时间(分)} = \frac{10^8}{\text{单位面积杂交带上的dpm数}}$$

曝光结束后移入暗室用X光片显影液显影。自显影图片与前述酶切图谱对照阅读,以确定同源片段(图2,见图版III)。

结果与讨论

一、 ^{32}P 的半衰期很短,尽管起始比放射性较高,但经过数周后就下降很多,以至不能使用;而 ^{35}S 的比放射性却下降很慢,可以从容进行实验。本文所用的 ^{35}S - α -dATP比放射性从 $21.7\text{TBq}/\text{mmol}$ ($587\text{ci}/\text{mmol}$)到 $10.6\text{TBq}/\text{mmol}$ ($287\text{ci}/\text{mmol}$),均能获得满意的结果。回收的杂交液经变性后再用于杂交,通过适当延长曝光时间等办法,亦获得满意结果。不但提高标记化合物的利用率,还简化了操作步骤。

二、由图1可见,本文所采用的旋转柱层析法对分离标记探针DNA是可行的,操作较柱层析法简便。参入率的测定显示 ^{35}S 标记DNA的参入率为38%—57%,本文所用的标记反应条件是可行的。若参入率低于20%,通常不能得到满意的杂交结果。

三、 ^{35}S 发射的 β^- 粒子能量较 ^{32}P 的低约10倍,这一方面使 ^{35}S 标记的探针具有分辨率高,放射危害低等优点,另一方面在探测技术上又有一些与 ^{32}P 不同的特点:

^{32}P 可借助手提式计数器跟踪层析分离等实验过程, ^{35}S 一般难以用同样方法跟踪监测。采用抽取样品,点在滤膜上,吹干后测定,解决了整个实验过程中对标记化合物的监测问题。

^{35}S 发射的 β 射线最大能量为 0.167Mev ,此时介质的吸收,样品的自吸收均对射线的探测产生明显的影响,在测定时应充分考虑:与用 ^{32}P 时不同,在用 ^{35}S 作自显影时,滤膜或琼脂糖胶板均应充分干燥,以减轻样品的自吸收;滤膜的正面与反面也因自吸收的影响而导致自显影的探测效率不同,所需的曝光时间也略有不同。

^{35}S 发射的 β^- 粒子大多数不能穿透X光胶片,所以胶片正反面的银粒密度有很大差异,实验证明,此时在作自显影时,夹盖增感屏对提高探测效率无益,相反会增加本底。有效的办法是适当延长曝光时间。这与使用 ^{32}P 不同。

四、ArNPV属昆虫杆状病毒属,其特点是许多病毒粒子被包埋在一个大的拟晶体包涵体,即多角体中。多角体蛋白由病毒基因所编码,它约占病毒包埋体总蛋白的95%以上^[10],定位此基因显然具有重要的生物工程意义。已通过提取mRNA合成cDNA的途径研究了AcNPV的多角体蛋白基因及其表达的蛋白^[2,10]。已证明AcNPV的多角体蛋白基因与家蚕的多角体蛋白基因有同源性,并以AcNPV DNA的多角体蛋白基因为探针定位了家蚕多角体蛋白基因^[4]。本实验结果表明(图2),以 ^{35}S -pMA-VI DNA为探针,在ArNPV DNA的限制性内切酶图谱上获得了与之有同源性的片段ArNPV DNA-EcoRI-II, ArNPV DNA-XhoI-IV, ArNPV DNA-BglII-I此结果与前文^[1]的ArNPV DNA物理图谱一致。据此,我们初步推断,ArNPV的多角体蛋白基因正在此片段上。

鉴于ArNPV DNA-EcoRI-II片段的分子量为 11.5×10^6 道尔顿,ArNPV的多角体蛋白基因的更精确的定位,尚待进一步研究。

参考文献

- [1] 马延高等:《生物化学与生物物理进展》,1985,2,39。
- [2] Smith, G. E. et al.: *J. Virol.*, 1983, 45, 215。
- [3] Adang, M. J. and Miller, L. K.: *J. Virol.* 1982, 182, 782。
- [4] Latrou, K. et al.: *J. Virol.*, 1985, 54, 436。
- [5] Holmes, D. S. et al.: *Anal Biochem.*, 1981, 114, 193。
- [6] 马延高等:《生物化学与生物物理进展》,1985,1,73。
- [7] 马延高等:《病毒学集刊》,1983,3,141。
- [8] Smith, G. E. et al.: *Anal Biochem.*, 1980, 109, 123。
- [9] 冯胜彦等:《核技术》,1987,10(5),46。
- [10] Vlak, J. M. et al., *J. Virol.*, 1981, 40, 762。
- [11] 王珩等:《中国科学(B辑)》,1985,3,245。

【本文于1987年8月22日收到】

陈蔚梅等:《 ^{35}S - α -dATP 用于缺口转移标记探针 DNA 及蓖麻蚕核型多角体病毒 (ArNPV) 多角体蛋白基因的初步定位》一文的附图 2 图版 III

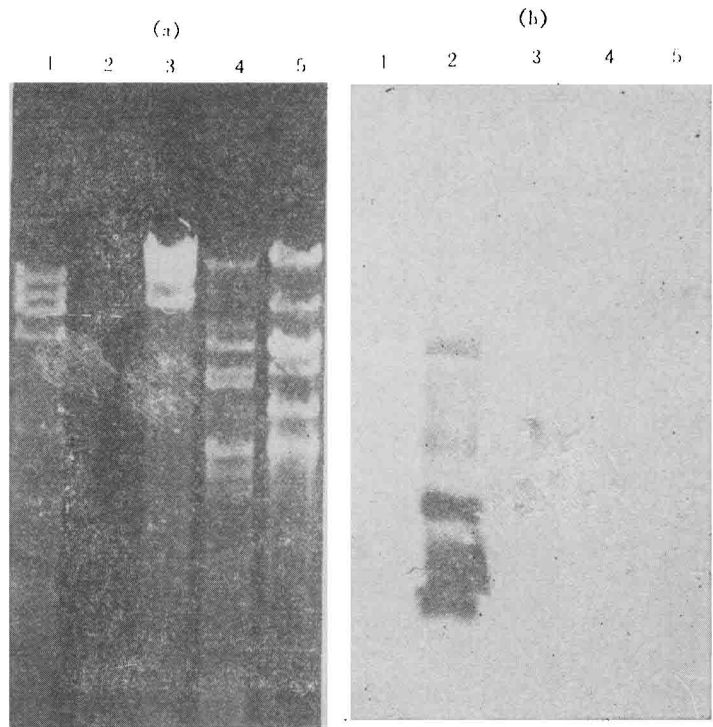


图 2 ArNPV DNA 的限制性内切酶酶切图谱及其与 ^{35}S -pMAVI DNA 的杂交图谱

(a) 酶切图谱

(b) 杂交图谱

1. ArNPV DNA+XhoI; 2. pMAVI DNA; 3. ArNPV DNA+BglII; 4. ArNPV DNA+(BglII+EcoRI); 5. ArNPV DNA+EcoRI

费正等:《一种测定血脂的简便方法——薄层层析法》一文的附图



图 1 硫酸铵硅胶板层析血脂图谱

(1) 磷脂 (PL); (2) 游离胆固醇 (FC); (3) 甘油三酯 (TG); (4) 胆固醇酯 (CE)

陈俊杰等:《 ^{35}S 标记 DNA 探针检测真核单拷贝基因》一文的附图



图 1 人血 DNA 酶解片段与 ^{35}S 标记人载脂蛋白 AI 基因探针杂交的放射自显影图谱

1. Pst I、消化; 2. Hind III 消化; 3. BamHI 消化; 4. EcoRI 消化