

DNA-膜固相核酸分子杂交技术及其应用

张玉砚 徐永华 徐亚男 彭素芬

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

我们曾采用液相核酸分子杂交竞争抑制实验,比较了小鼠正常肝和小鼠腹水肝癌的细胞核 RNA 和细胞质 RNA^[1]。液相核酸分子杂交技术具有其优点,如 DNA-RNA 杂交率比较高,但也存在有不足之处,如变性 DNA 的自我“退火”,直接影响到 DNA-RNA 杂交分子的形成等。有鉴于此,我们又采用了 Gillespie 和 Spiegelman (1965 年)^[2] 的 DNA-膜固相核酸分子杂交技术,分析比较了我所建立的二乙基亚硝酸 (DENA) 诱发的移植性大鼠肝癌 (BERH-2) 的细胞核和细胞质 RNA,为进一步开展大鼠肝癌发生过程核酸转录和转录后的调节控制研究打下了基础。

下面着重介绍实验方法和初步结果。

一、实验材料和方法

1. 实验动物

Wistar 正常大鼠,鼠龄 3 月左右,饥饿过夜,取肝脏。移植性大鼠肝癌 (BERH-2) 癌组织 (第 20 代)。

2. 核酸抽提

提取细胞核和细胞质 RNA,方法基本同前文^[1],略有改变。即将分离的细胞核悬于 0.15M NaCl-0.05M HAc 缓冲液 (pH5.1) 中抽提 RNA。抽提细胞核 RNA 的方法亦同前文。RNA 样品中, DNA 含量为 0—1.9%。DNA 样品中, RNA 含量小于 3%。核酸样品的蛋白质含量小于 2.5%。

3. 体外 ¹²⁵I 标记细胞核 RNA

按 Getz 等方法^[4]略有改变。取 1.5 毫克细胞核 RNA 溶于 0.1M NaAc-0.04M HAc (pH5.0) 中,依次加 KI $6.25 \times 10^{-5}M$ — $1.25 \times 10^{-4}M$,

Na ¹²⁵I 或 Na ¹³¹I 约 1.5 毫居里,混合后,用浓 HAc 调节 pH 到 5.0,最后加 TiCl₃ $3.25 \times 10^{-3}M$ — $6.50 \times 10^{-3}M$,总反应体积可为 1 毫升或 2 毫升。反应混合液在 60℃ 水浴中温育 20 分钟。之后在冰水中冷却 5 分钟,再加新鲜配制的 0.1M Na₂SO₃ 0.4—0.5 毫升,在冰水浴中继续放置 3—5 分钟。用 1M NH₄Ac-0.5M NH₄OH 调节 pH 到中性或 8.7,60℃ 水浴中再温育 20 分钟。冷却后上 Sephadex G-50 柱,1×100 厘米,或上 Sephadex G-75 柱,1.2×35 厘米,用蒸馏水洗脱,收集洗脱液 3 毫升/管。用井型 γ 计数器测定洗脱液的比放射性,用 751 型分光光度计测定洗脱液的 E₂₆₀。收集比放射性和 O. D. 值比较集中的几管洗脱液,用水饱和酚抽提 1—2 次,去掉一些杂质,对水透析过夜。通过 HAWP (0.45 微米,25 毫米)微孔滤膜过滤 1—2 次,电吹风或用干冰浓缩。标记 RNA 样品置冰箱备用。

4. DNA 膜的制备和检测^[2]

(1) DNA 的变性 将 DNA 溶液用 0.01×SSC (氯化钠-柠檬酸钠溶液) 或蒸馏水稀释到 50 微克/毫升左右。加 6N NaOH 使 NaOH 最终浓度为 0.1N,室温变性 10 分钟,用酸调节 pH 到 7—8,再在沸水浴中加热煮 10 分钟,之后立即倒入等体积的,预先冷却的 12×SSC 中,使 DNA 变性完全,用来制备 DNA-膜。

(2) DNA-膜的制备 将微孔滤膜 (TM-2, 0.45 微米,49 毫米或 HAWP, 0.45 微米,25 毫米) 浸于 6×SSC 中 5 分钟,装于过滤装置上,用 6×SSC 抽滤洗之。加一定量变性 DNA 溶液,轻度减压过滤。过滤后用 6×SSC 抽滤洗一次。取下膜,在室温中使干。用打洞器将制备好的

膜打成直径为 6 毫米的小膜,再将 DNA-膜置于 80℃ 烘箱内烘 4 小时,保存于真空干燥器内备用。

(3) DNA-膜上 DNA 含量的测定 将 6 毫米 DNA-膜用氯仿抽提三次,每次 15 分钟,再用 0.5N 过氯酸在 75℃ 水浴中抽提 15—30 分钟,抽提液测定其 O. D. 260, 计算核酸量。平均 DNA 含量为 10 微克/膜左右。

(4) 变性 DNA 在微孔滤膜上的固定、分布和稳定性 通过体内 ^{32}P 掺入法制备抽提 ^{32}P -DNA。用 ^{32}P -DNA 如上述方法制备 ^{32}P -DNA-膜。测定 ^{32}P -DNA-膜和滤液的比放射性和 O. D. 260, 计算固定情况和分布情况。将制备好的 6 毫米 ^{32}P -DNA-膜浸于杂交反应混合液中,在杂交反应温度和时间范围内温育,之后测 DNA-膜上脉冲数,以计算 DNA 在膜上的稳定性。

5. 核酸分子杂交方法^[2,4-5]

系采用 Gillespie 和 Spiegelman^[2] 的固相膜杂交技术,以及 Bonner 等的甲酰胺降低反应温度的方法。反应在小试管内进行。在 0.2 毫升杂交反应混合液内含有甲酰胺 30%, SDS 0.1%, ^{125}I 或 ^{131}I -核 RNA4—6 微克,盐浓度为 $2\times\text{SSC}$ 。在杂交竞争抑制实验中,杂交反应液中另含有不同量的非标记的竞争 RNA。对照组和竞争抑制组在 0.2 毫升反应液中各加入 2 张变性 DNA 膜,空白对照组则在 0.2 毫升反应液中加入 2 张空白膜(无变性 DNA)。小试管塞紧后,在 45℃ 温箱内反应 24 小时。加入 $2\times\text{SSC}$ 稀释反应液以终止反应。杂交膜用 $2\times\text{SSC}$ 洗两次后,浸于 1 毫升 RNase (20 微克/毫升,溶于 $2\times\text{SSC}$ 中,沸水内处理 10 分钟) 溶液中,37℃ 温育 1 小时,之后用 $2\times\text{SSC}$ 洗膜三次,烘干后用井型 γ 计数器测比放射性。

6. 杂交分子 T_m 值的测定

杂交反应后,将空白对照组和对照组的膜各 4 张,分别浸于含有 1.5 毫升 $1\times\text{SSC}$ 的小管内,在 55℃ 水浴中平衡后继续温育洗脱 10 分钟;将膜取出,置于另一小管预热到 60℃ 的 $1\times\text{SSC}$ 中,平衡 2 分钟后继续温育洗脱 10 分钟,如

此逐步递增洗脱温度,一直到 95℃ 为止。测定各步洗脱液的脉冲数。依温度递增顺序将各洗脱液的脉冲数累积相加,绘制曲线,计算 T_m 值。

二、结 果

1. DNA-膜

以一定量的 ^{32}P -变性 DNA 通过微孔滤膜过滤后,测定滤液内 O. D. 数,由此计算变性 DNA 停留于膜上的百分数,8 个样品的平均值为 $71.2\pm 7.8\%$ 。测定微孔滤膜上脉冲数,由此计算变性 DNA 在膜上的百分数,8 张膜的平均值为 $65.2\pm 5.5\%$ 。取两个测定方法的平均值计算变性 DNA 固定于膜上的百分数平均为 68.2%。以后在实验过程中,多次测定变性 DNA 固定于微孔滤膜上的百分数均为 70% 左右。

将 ^{32}P -变性 DNA-膜用打洞器打成直径为 6 毫米的小膜后,测定 6 毫米膜的脉冲数,8 张膜的相应部位的 6 毫米膜的脉冲数的平均值见图 1。在 2 张膜中,有邻近的两张 6 毫米膜的脉冲数大大低于平均值,这显然是由于膜的这部分孔径不均一所致。所以在过滤变性 DNA 前,将空白膜浸于 $6\times\text{SSC}$ 中,如发现膜有不均一现象时,则弃之不用。但有些规格的微孔滤膜比较厚一些,如果直接浸于 $6\times\text{SSC}$ 中是不均一的,则可先浸于蒸馏水中,然后再浸于 $6\times\text{SSC}$ 中。

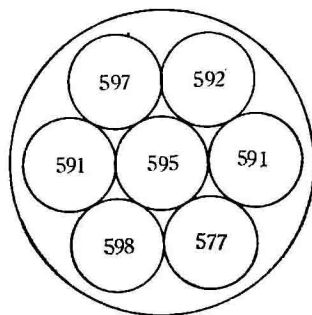


图 1 变性 DNA 在微孔滤膜上的分布
(数字是平均脉冲数)

将 6 毫米 ^{32}P -变性 DNA-膜浸于杂交反应混合液内,在杂交反应温度和时间条件下

处理,然后烘干测定 6 毫米膜上保留的脉冲数,由此观察 DNA 在膜上的稳定程度,8 张 6 毫米膜的脉冲数的丢失数平均为 $6.6 \pm 2.4\%$ 。

在实验条件保持恒定情况下,如此制备的 DNA-膜是可以用于核酸分子杂交实验的(以 2—4 张膜的结果的平均值计算杂交百分数)。

2. 标记 RNA

如图 2 所示,标记样品通过 Sephadex 柱是能将标记 RNA 和自由碘分开。¹²⁵I-RNA 的比放射性可达 $4-8 \times 10^4$ 脉冲数/分钟/微克, ¹³¹I-RNA 的比放射性可达 10^5 脉冲数/分钟/微克。

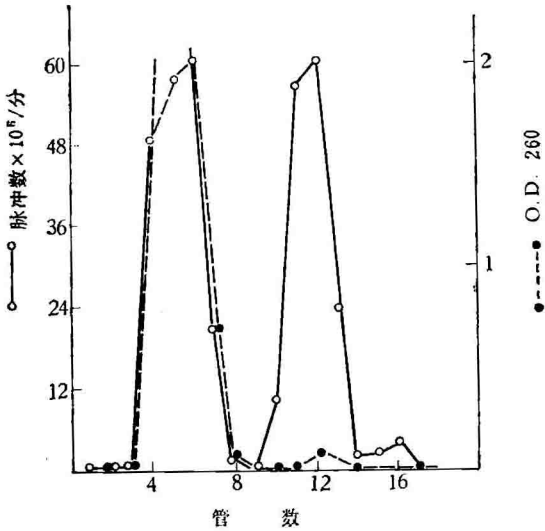


图 2 ¹²⁵I-RNA 的 Sephadex G75 柱洗脱曲线

RNA 回收率平均为 70% 左右。碘标记 RNA 样品水解后纸层析,用 X 光片显影,表明碘标记在嘧啶类碱基上。

每次制备的标记 RNA 样品,在做正式杂交试验前,必须先进行空白污染试验(即先做一组空白对照组和一组对照组)。在碘源较好的情况下,空白对照组的空白污染可以做到 0.05% 以下。对照组脉冲数为空白对照组的 10 倍以上。

3. 杂交竞争抑制实验

杂交反应混合液中含有 30% 甲酰胺和 40% 甲酰胺,杂交结果差不多。反应时间最少需要 24 小时。所以,我们采用了 30% 甲酰胺浓度和 24 小时反应时间。

BERH-2 大鼠肝癌细胞和大鼠正常肝细胞的细胞核和细胞质 RNA 的比较结果见图 3 和图 4。

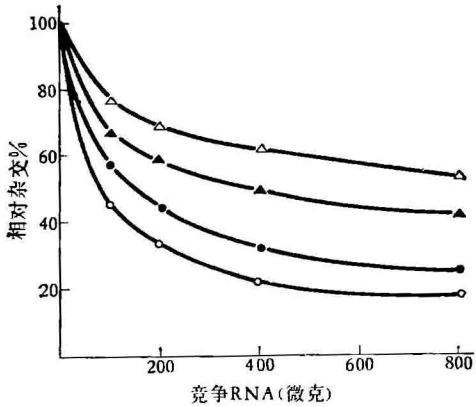


图 3 大鼠正常肝 DNA 与标记的大鼠正常肝细胞核 RNA 杂交竞争抑制实验

竞争 RNA: 大鼠正常肝细胞核 RNA ○——○, 大鼠 BERH-2 肝癌细胞核 RNA ●——●, 大鼠肝癌细胞质 RNA ▲——▲, 大鼠正常肝细胞质 RNA △——△

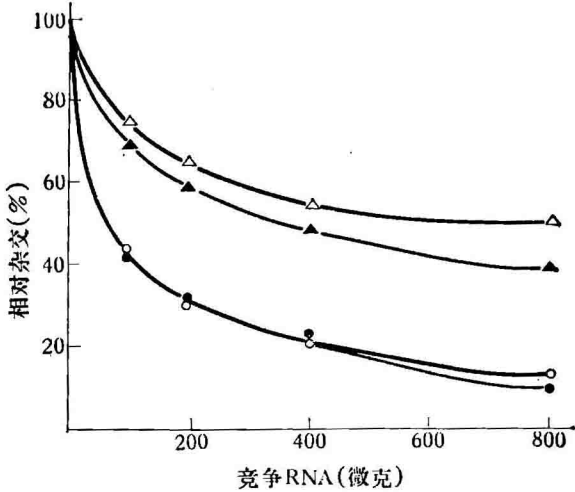


图 4 大鼠正常肝 DNA 与标记的大鼠肝癌细胞核 RNA 杂交竞争抑制实验

竞争 RNA: 大鼠肝癌细胞核 RNA ●——●, 大鼠正常肝细胞核 RNA ○——○, 大鼠肝癌细胞质 RNA ▲——▲, 大鼠正常肝细胞质 RNA △——△

当变性 DNA 和标记的正常肝细胞核 RNA 杂交,以正常肝细胞核、质 RNA 和 BERH-2 肝癌细胞核、质 RNA 为竞争 RNA,结果指出,在正常肝细胞核 RNA 所具有的,与 DNA 重复顺序互补的碱基顺序,在肝癌细胞核 RNA 中有部

分丢失,而在肝癌细胞质 RNA 中,比正常肝细胞质 RNA 却有所增加。见图 3。

当变性 DNA 和标记的肝癌细胞核 RNA 杂交,以正常肝细胞核、质 RNA 和 BERH-2 肝癌细胞核、质 RNA 为竞争 RNA,结果指出,在肝癌细胞核中所具有的、与 DNA 重复顺序互补的碱基顺序,在正常肝细胞核 RNA 中几乎均具有之见图 4。

4. 杂交分子的 T_m 值

^{131}I -正常大鼠肝细胞核 RNA 与 DNA 杂交分子的 T_m 值为 70.0°C (见图 5)。 ^{125}I -大鼠肝癌细胞核 RNA 与 DNA 杂交分子的 T_m 值为 71.5°C (见图 6)。

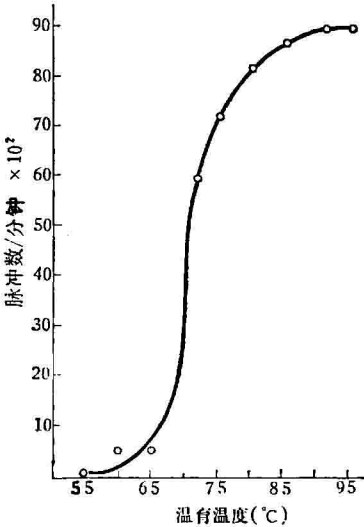


图 5 变性 DNA 与 ^{131}I -大鼠正常肝细胞核 RNA 杂交分子的熔解曲线

三、小 结

与液相核酸分子杂交技术相比, DNA 膜固相核酸分子杂交技术的杂交率是比较低的。但是, DNA-膜固相核酸分子杂交技术又有其优点: (1) 能避免由于变性 DNA 自我“退火”所造成的影响; (2) 能同时分析比较大量的样品, 特别是竞争抑制实验, 避免由于多次操作造成的实验误差; (3) 从理论上讲, 能进行预饱和和杂交竞争实验, 即变性 DNA 先与未标记的竞争 RNA 饱和杂交, 然后再与标记的待测 RNA 杂交, 以

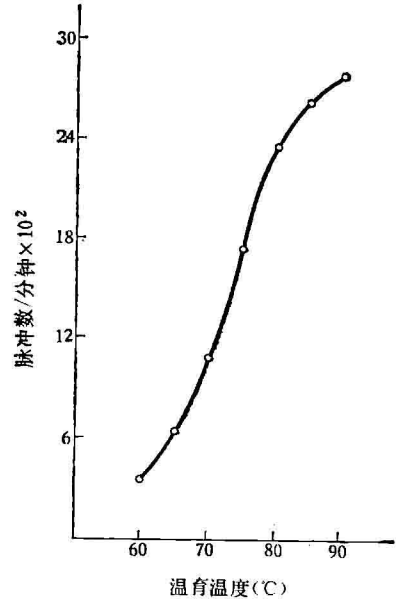


图 6 变性 DNA 与 ^{125}I -大鼠肝癌细胞核 RNA 杂交分子的熔解曲线

了解待测 RNA 是否有与竞争 RNA 不同的碱基顺序的存在。但是, 在实际上还存在一定的问题, 由于杂交分子的不稳定, 直接影响预饱和的效果。现在, 我们正试图在一定的条件范围内克服这个问题。

利用此方法分析比较我所建立的大鼠移植性肝癌 (BERH-2) 和大鼠正常肝细胞核 RNA 的同一性和差异性, 结果与大鼠 3924A 肝癌、大鼠 H₃₅TCL 肝癌以及大鼠 9121 肝癌相似^[6]。即在大鼠正常肝细胞核 RNA 中所具有的, 与 DNA 重复顺序互补的碱基顺序, 在一些大鼠移植性肝癌细胞核 RNA 上有所丢失。相反, 这几株移植性肝癌细胞核 RNA 所具有的, 与 DNA 重复顺序互补的碱基顺序, 在大鼠正常肝细胞核 RNA 中几乎均具有之。在大鼠肝癌细胞中比大鼠正常肝细胞有更多的细胞核 RNA 出现于细胞质中^[6]。现在, 我们在这些工作基础上, 利用 DNA-膜固相核酸分子杂交技术, 对用二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌发生过程的肝脏 RNA 也做了初步分析, 观察到一些碱基顺序的变化趋势。

上述工作结果告诉我们, 尽管肝癌发生过程是个非常复杂的过程, 至今所采用的研究方

法和手段都有一定的局限性,但是,在一定范围内,用固相核酸分子杂交技术,分析比较肿瘤细胞核酸的变化,能为癌变本质的探讨提供一些有一定参考价值的数据。

参 考 文 献

[1] 张玉砚等《生物化学与生物物理进展》1975年,第3期,第20—24页。

- [2] Gillespie, D. et al.: *J. Mol. Biol.*, 12, 829, 1965.
 [3] Getz, M. J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 287, 485, 1972.
 [4] Bonner, J. et al.: *Biochemistry*, 6, 3650, 1967.
 [5] Church, R. B.: *Molecular techniques and approaches in developmental biology*, 1973. P. A. Wiley-Interscience Publication.
 [6] Drews, J. et al.: *J. Biochem.*, 3, 284, 1968.

[本文于1978年5月24日收到]

等电聚焦载体两性电解质的合成

中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组

等电聚焦是一种分离和鉴定蛋白质的新技术。它能迅速而准确的测定蛋白质的等电点;并根据蛋白质等电点的不同而把蛋白质混合物中各个成份互相分离开来。此技术要求在正、负极之间有一个从酸到碱连续变化的pH梯度。形成这种梯度的物质称为载体两性电解质(瑞典LKB厂专利商品名为“Ampholine”),它实际上是一系列多氨基多羧酸的混合物。对此载体两性电解质要求^[1]:

(1) 能在电场中形成一个均匀、连续而稳定的pH梯度。这些载体两性电解质pI值之差要小于0.05pH单位,才能分辨pI值很接近的蛋白质。

(2) 在等电点时要有足够大的电导性,而且在整个电场中的电导要均匀。

(3) 在280毫微米处有较低的光吸收,1%溶液的光密度值要低于0.05,使不干扰蛋白质洗脱峰的测定。

(4) 要易溶于水,其分子应明显亲水,以免与蛋白质的疏水键发生作用。

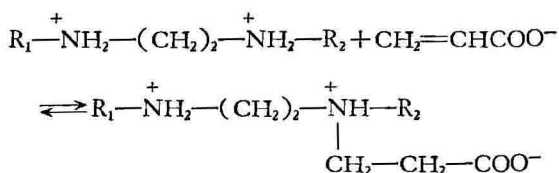
(5) 在等电点时要有足够的缓冲能力。即使有0.5%的蛋白质存在,也不会改变pH。也就是说,在等电点处至少有0.3微克当量/毫克pH的缓冲能力(即于每毫克载体中加入0.3微克当量的碱或酸,pH改变为1)。

(6) 要有比较低的平均分子量,以便于把

蛋白质从载体两性电解质中分离出来。

1966年, O. Vesterberg 人工合成了载体两性电解质^[2-4]。它在等电聚焦中形成自然pH梯度,基本满足了对载体两性电解质的上述要求,从而大大推动了等电聚焦技术的应用。

用多乙烯多胺与丙烯酸加成,生成一系列多氨基多羧酸的混合物^[4]:



这里R₁和R₂是氢或带有氨基的脂肪基。由于α-β不饱和双键和脂肪胺上不同部位的一级氨基或二级氨基间发生加成,而且由于酸和胺比例的不同,则形成一系列具有不同氨基与羧基比例的异构物和同系物的混合物,从而形成一系列具有不同等电点(pI)值的多氨基多羧酸混合物。它们的pI值随着羧基与氨基比例的不同而分布在pK₃(大多数羧基的pK值)到pK₁₀(大多数碱性氨基的pK值)之间的不同区间。

我们用丙烯酸分别与四乙烯五胺及三乙烯四胺进行加成反应,合成了pH3—10及pH3—6两种载体两性电解质。并用密度梯度聚焦法制备了pH3.5—4.5窄范围的载体两性电解质。并