

用. 这种方法适合于短状杆菌乃至其他细菌的分类与鉴定的研究.

致谢 日本松前国际友好基金会慷慨提供方呈祥先生的留日资助; 本项研究得到了日本大阪发酵研究所所长 Toru Hasegawa 博士的支持与指导; Tomohiko Tamura 先生在技术上予以一定的协助.

参 考 文 献

- 1 Bolton E T, Mc Carthy B J. *Pro Natl Acad Sci USA*. 1962; 48: 1390
- 2 Gillespie D, Spiegelman S. *J Mol Biol*, 1965; 12: 829
- 3 de Ley J, Cattoir H, Reynaerts A. *Eur J Biochem*, 1970; 12: 133
- 4 Renz M, Kurz C. *Nucleic Acids Res*, 1984; 12: 3435
- 5 Gebeyehu G, Rao P Y, SooChan P *et al*. *Nucleic Acids Res*, 1987; 15: 4513
- 6 Forster A C, McInnes J L, Skingle D C *et al*. *Nucleic Acids Res*, 1985; 3: 745
- 7 Ezaki T, Hashimoto Y, Yabuuchi E *et al*. *Int J Syst Bacteriol*, 1989; 39: 224
- 8 Collins M, Brown J, Jones D. *Int J Syst Bacteriol*, 1988; 38: 45
- 9 Gvozdyak O R, Nogina T M, Schumann P. *Int J Syst Bacteriol*, 1992; 42: 74
- 10 Schleifer K-H, Lang K. *FEMS Microbiol Lett*, 1980; 9: 223
- 11 Saito H, Miura K. *Biochim Biophys Acta*, 1963; 72: 619

The Study of DNA Molecular Hybridization and Taxonomy of *Brachybacterium*. Fang Chengxiang (*School of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China*); Akira Yokota, Mariko Takeuchi (*Institute for Fermentation, Osaka, Japan*).

Abstract DNA molecular hybridization of chromosomal DNA among 15 strains of *Brachybacterium* were carried out by the method in which DNA labeled with nonradioactive photobiotin was binded to heat denatured single-stranded DNA in microdilution plates. Homology values among bacteria were obtained by measuring fluorescence intensity in the microdilution wells. The strains which is difficult to further classify at the species level with morphological, physiological and biochemical characteristics were determined their appropriate taxonomic positions on the basis of the genetic relatedness among microorganisms. This method is a rapid and accurate hybridization technique and plays diagnostic role on the taxonomic study of *Brachybacterium*.

Key words photobiotin, microdilution plate, *Brachybacterium*, DNA homology values, taxonomy

克隆化反向杂交探针的制备*

李卫国 栾旭东 黄涛 朱宁宁 秦学斌 黄尚志 龙桂芳¹⁾ 沈岩²⁾ 吴冠芸²⁾

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005)

摘要 反向斑点杂交是将寡核苷酸探针固定在膜上, 用标记的靶序列与固定在膜上的探针进行杂交. 与正向杂交相比, 它通过一次杂交即可确定多种基因型, 是一种快速筛查 DNA 点突变的诊断方法. 我们选择 β -地中海贫血基因 -28 (A $\rightarrow$ G)、CD17 (A $\rightarrow$ T)、CD 41~42 (-TTCT) 三种点突变为模型. 采用 PCR 扩增产生串联多拷贝序列探针并将其克隆化. 将克隆化探针固定于尼龙膜上, 与同位

* 863 计划和美国中华医学基金 (CMB) 资助. ¹⁾ 广西医学院, 南宁 530027; ²⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1995-07-26, 修回日期: 1995-10-26

素标记的 β -珠蛋白基因 PCR 片段进行杂交, 检测 β -地贫患者的基因型。

关键词 反向杂交, 克隆, β -地中海贫血

等位基因特异性寡核苷酸 (allele specific oligonucleotide, ASO) 探针^[1]已广泛应用于遗传病和肿瘤基因点突变的检测, 以及传染病的基因诊断等研究。传统的斑点杂交是将待测靶序列固定在膜上, 使用标记的 ASO 探针与靶序列进行杂交。为确定被测 DNA 中是否存在某一突变必须使用一对正常和突变探针进行两次杂交。当基因点突变或 DNA 多态性类型较多时, 需要多对探针反复操作, 因而检测未知样品的基因型颇为费时费力。Saiki 等^[2]1989 年建立了反向斑点印迹 (reverse dot blot), 又称反向斑点杂交或反向杂交方法, 把 ASO 探针固定在膜上, 以标记的靶序列与膜上的 ASO 探针进行杂交。一张膜上固定多种已知类型 ASO 探针, 与带可检测信号的靶序列进行杂交, 一次即可确定样品的突变类型。反向杂交的关键步骤是把探针固定在膜上, 文献报告的固定方法有: 在寡核苷酸末端加上一条长的多聚 dT 尾, 紫外照射固定^[2]; PCR 扩增形成串联多拷贝序列加长探针固定^[3,4]; 寡核苷酸探针合成时 5' 端核苷酸引入氨基“桥”, 与膜上的羧基共价结合固定^[5]等。

β -地中海贫血是由 β -珠蛋白基因突变造成的遗传性溶血性疾病。 β -珠蛋白基因 (HBB)

是目前研究得最为清楚的人类基因之一, 基因的突变类型多且突变区域集中。我国南方的 β -地中海贫血发病率较高, 突变类型有 16 种, 其中 -28 (A→G)、-29 (A→G)、CD17 (A→T)、CD41~42 (-TTCT) 以及 IVS-II 654 (C→T) 占全部病例的 90% 以上^[6,7]。本文报告用 PCR 扩增产生串联多拷贝探针重复序列, 并将其克隆化, 制备 β -地贫基因诊断反向杂交探针, 获得 -28、CD17、CD41~42 三种突变及正常反向杂交探针, 与同位素标记的 β -珠蛋白基因 PCR 扩增片段进行杂交, 检测 β -地贫患者的基因型。

1 材料与方法

1.1 β -地贫样品

研究中所用标本系医学科学院基础医学研究所生化室和医学遗传室, 以及广西医学院近年来累积的 β -地贫患者 DNA。所有标本均经正向斑点杂交^[8]确定基因型。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增反向杂交的多聚探针链: 针对 β -珠蛋白基因 -28 (A→C)、CD17 (A→T)、CD41~42 (-TTCT) 突变, 我们设计了 3 组寡核苷酸。其序列如表 1 所示。

表 1 3 组基因探针的核苷酸序列及用量

引物*	序 列	浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	用量/ μl
-28N	5' GCCCTGACTTTTATGCCCCAT 3'	66	10
-28T	5' GCCCTGACTTCTATGCCCCAT 3'	66	10
-28C	5' AAGTCAGGGCATGGGCAT 3'	66	10
17N	5' ACGTTCACCTTGCCCCACA 3'	44	4
17T	5' ACGTTCACCTAGCCCCACA 3'	50	4
17C	5' GGTGAACGTTGTGGGGC 3'	50	8
41~42N	5' CCAGAGGTTCTTTGAGTCCT 3'	23	10
41~42NC	5' GAACCTCTGGAGGACTCAA 3'	26	10
41~42T	5' ACCCAGAGGTTGAGTCCTTT 3'	30	6
41~42TC	5' ACCTCTGGGTAAAGGACTCA 3'	15	12

注: N: 正常基因探针; T: 突变基因探针; C: 公用反义链; NC: 正常基因探针反义链; TC: 突变基因探针反义链。

100 μl 扩增体系中加入 $10\times$ 缓冲液 10 μl 、2.0 mmol/L dNTPs 10 μl 、N 与 C 或 T 与 C 引物用量见表 1、Taq 聚合酶 (中国科学院遗传研究所) 5U, 混匀. 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后, 开始循环: 93 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 27 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 15 个循环; 接着 93 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 30 个循环; 循环完成后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 10 min, 冰中骤冷 5 min.

1.2.2 多聚探针链的克隆: PCR 产物经氯仿抽提、乙醇沉淀. 25 μl 修平体系中加入 18 μl 纯化产物、2.5 μl $10\times$ T4 多核苷酸激酶缓冲液、4 μl 25 mmol/L dNTPs、2.5 U Klenow 酶 (Biolabs). 室温中修平 10 min, 65 $^{\circ}\text{C}$ 30 min 灭活 Klenow 酶. 在该体系中再加入 1.5 μl $10\times$ T4 多核苷酸激酶缓冲液、4 μl 10 mmol/L ATP、10 U T4 多核苷酸激酶 (Biolabs). 双蒸水补齐体积至 40 μl . 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h, 使之磷酸化. 磷酸化产物在 1% 低熔点琼脂糖凝胶中电泳分离, 回收 600~800 bp 之间的片段, 65 $^{\circ}\text{C}$ 熔化, 加入 β -琼脂糖酶 I (Biolabs) 1 U, 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中消化 2~3 h. 10 μl 连接体系中加入 T4 DNA 连接酶 (Promega) 5 U、pUC18 Sma I/BAP 载体 (50 mg/L) 1 μl (Pharmacia)、 β -琼脂糖酶消化后凝胶 2 μl . 在 16 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中连接 16~20 h. 转化至 *E. coli* DH5 α 中, 挑取转化后的单菌落接种于 5 ml LBA 培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 4~6 h. 取 1 μl 菌液在 25 μl PCR 体系中用 pUC18 m 13 R 和 F 引物扩增插入片段, 筛选插入片段适宜的克隆继续培养 3~5 h, 提取质粒 DNA. 经正向杂交^[8]和 DNA 序列分析 (GIBCO BRL 双链循环测序试剂盒) 证实插入片段确为探针链的串联多聚体.

1.2.3 反向杂交检测样品基因型: PCR 标记样品 β -珠蛋白基因 (HBB) 片段的引物 108 和 B 以及热循环条件见文献 [8]. 体系中 dNTP 为 200 $\mu\text{mol/L}$ d (A、G、T) TP, 40 $\mu\text{mol/L}$ dCTP, 及 α -³²P-dCTP 0.74 MBq (6 nmol). 以含多聚探针的重组质粒 DNA 为模板, PCR

扩增多聚探针片段. 取适量 PCR 产物, 经紫外照射 (Bio-Rad 紫外交联仪, 30 mJ) 将多聚探针固定于尼龙膜上 (Zeta Probe GT, Bio-Rad). 42 $^{\circ}\text{C}$, $6\times$ SSPE/0.1% SDS, 预杂交 1~2 h. 将标记好的 HBB 片段 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 加入预杂交液中, 42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 4~5 h 或过夜. 室温下用 $2\times$ SSPE-0.1% SDS 漂洗 10 min, 重复 2 次. 再用 $5\times$ SSPE-0.1% SDS, 60 $^{\circ}\text{C}$ 洗膜 30 min. 吸去膜表面水分, 用保鲜膜包好, 与 X 光片在 -70 $^{\circ}\text{C}$ 中感光 6~8 h.

2 结 果

2.1 PCR 扩增长探针链

通过 PCR 的方法, 我们获得了探针串联多拷贝序列混合体. 电泳检查时, 在泳道上出现从电泳最前端直至加样孔的弥散影像. 调整参加反应的引物用量可以改变产物长度, 减少引物用量时 PCR 产物的长度增加 (图 1).

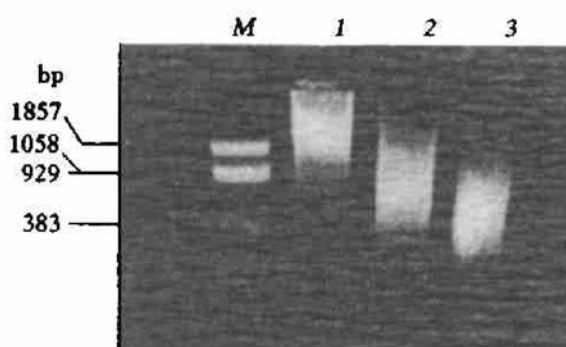


图 1 调整引物加入量改变 PCR 扩增探针的长度

M: PBR322/BstN I; 引物加入量: 1: 60 ng, 2: 105 ng, 3: 150 ng.

2.2 PCR 产物克隆及序列鉴定

用 PCR 扩增长探针 -28N、-28T、17N、17T、41~42N、41~42T 经纯化、修平, 磷酸化后, 低熔点胶回收 600~800 bp 的片段. 用琼脂糖酶消化凝胶后直接与 pUC-18 Sma I/BAP 载体进行连接, 并转化 DH5 α . PCR 扩增筛选出插入片段长度适宜的克隆, 结果见图 2. 进一步用 -28N、-28T、17N、17T、41~42N、41~42T ASO 探针斑点杂交, 阳性克隆进行序列分析, 确认插入序列的

正确性.

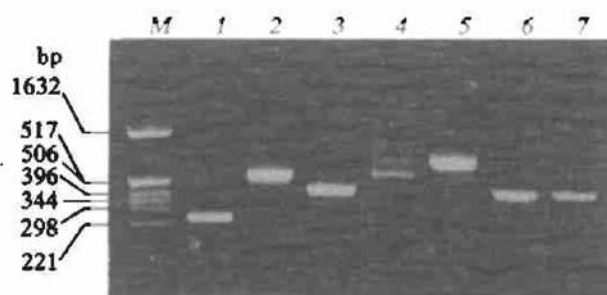


图2 PCR扩增重组质粒中的插入片段(部分结果)

M: pBR322/Hinf I; 1~7: 部分重组质粒所含插入片段的PCR检测结果.

2.3 反向斑点杂交

以一定量的反向杂交探针固定在尼龙膜上, 与PCR扩增标记的HBB片段杂交, 在同一条件下洗膜, 自显影. 以不同 β -地贫基因型样品进行反向杂交. 图3为正常(N/N)和17/-28突变遗传复合体样品的反向杂交的结果.

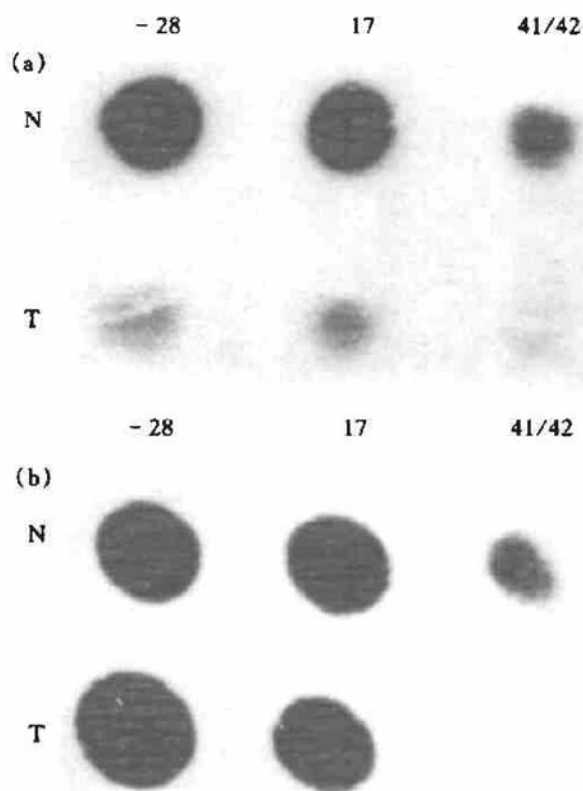


图3 反向斑点杂交检测 β -地贫突变基因型

(a) N/N; (b) -28/17.

3 讨 论

ASO 探针的长度一般只有 20 个碱基左

右, 与尼龙膜结合的效率很低. 反向杂交的关键在于如何将探针固定在膜上. 我们选择了PCR扩增串联多拷贝序列的方法加长探针链. 针对 β 珠蛋白基因-28和CD17突变, 我们分别设计了三个寡核苷酸序列. 其中两个序列分别为正常和突变探针, 突变位点位于探针中部. 另一个寡核苷酸是通用序列. 通用序列与探针序列交错互补(图4), 以突变点为界, 但不包含突变位点本身. 使用这样的一对交错互补序列进行PCR反应时, 它们在3'端形成双链, 5'端是单链, 因此可以互为引物、互为模板, 由5'向3'延伸. 在进行下一轮PCR循环时3'端仍形成局部双链, 互为引物, 以5'端为模板进行延伸. 经过多次循环之后, 形成以探针序列为单元的串联多拷贝链混合体. CD41-42突变与正常序列相差4个碱基, 故分别设计了互补链.

考虑到应尽量使不同反向探针在与标记靶序列杂交后可在同一条件下洗膜, 因此我们在引物设计过程中, 注意控制了探针单元的长度或采用插入外来碱基的方法, 使不同探针与靶基因的杂交序列具有相近的 T_m 值. 最初我们使用了与HBB序列完全相同的一段核苷酸作为-28N、T探针序列, 但通过计算机检索发现这样的探针多聚体与HBB序列杂交的部分超过了探针单元的碱基数, T_m 值会增高许多. 于是我们在这个引物的一端强插入一个碱基T, 使得除探针单元外的互补碱基发生错位, 从而降低 T_m 值, 回到60℃左右(图5).

无论是末端转移加尾还是PCR扩增长, 每次反应获得的产物都是一组长度不同的混合体. 这些探针混合体与膜结合和与靶序列杂交的效率不尽相同. 实验结果重复性不佳. 克隆的探针具有以下几个优点: a. 具有固定的长度. 克隆之后每个重组质粒中所含的插入片段长度是固定不变的, 探针与膜结合的效率相对恒定, 这对于实验的重复性将起到很重要的保证作用; b. 可进行片段长度选择. 克隆化后每个重组质粒只有一个一定长度的多聚探针片段, 因此可以选择插入片段长度适宜的克隆

进行研究, 寻找最适宜的固膜和杂交条件; c. 灵敏度高. 由于 PCR 扩增后形成多拷贝探针序列, 膜上探针数目会增加, 与靶序列杂交的机会亦随之增加; d. 保存方便. 重组质粒中的插入片段可保持其完整性, 且易于保存.

反向杂交可以减少正向杂交时繁琐的工作量, 缩短检查时间, 有着很大的临床应用前

景. 随着人类基因组计划的开展, 越来越多的基因序列被阐明, 反向杂交这一技术将成为基因突变分析的重要方法. 克隆化探针的优点使我们相信它不仅可用于遗传病的检测, 还将在多态性分析、病原微生物鉴定、癌基因突变分型等多个领域里逐渐发挥其作用.

第一次循环:

17N 5' ACGTTCACCTTGCCCCACAacgttcacc 3'
3' tgcaagtggaa CGGGGTGT TGC AAGTGG 5'

17T 5' ACGTTCACCTAGCCCCACAacgttcacc 3'
3' tgcaagtggaa CGGGGTGT TGC AAGTGG 5'

第二次循环:

17N 5' ACGTTCACCTTGCCCCACAacgttcaccttgccccacaacgttcacc 3'
3' tgcaagtggaacgggggtgttgcaagtggaaCGGGGTGTTGCAAGTGG 5'

17T 5' ACGTTCACCTAGCCCCACAacgttcacctagccccacaacgttcacc 3'
3' tgcaagtggaacgggggtgttgcaagtggaaCGGGGTGTTGCAAGTGG 5'

图 4 PCR 扩增长探针示意图

大写字母为引物序列; 小写字母为合成序列; 划线部分为第一次循环后的序列; 斜体字母为突变位点.

-28N 5' CAGCCCTGACTTTTATGCCAGCCCTGACTTTTATGCCCA 3'
HBB 5' CTGCCCTGACTTTTATGCCAGCCCTGCTCCTG 3'

探针序列与 HBB 完全相同时, 相同的碱基为 25 个, $T_m = 80^\circ\text{C}$

28N 5' ATGCCCTGACTTTTATGCCCA TGCCCTGACTTTTATGCCCA T 3'
HBB 5' CTGCCCTGACTTTTATGCCCA GCCCTGGCTCCTG 3'

插入一个 T 后错开六个碱基, 相同的碱基为 20 个, $T_m = 60^\circ\text{C}$

图 5 -28N 探针设计思路

下划线碱基为互补碱基; 小号字为较探针单元多出的互补碱基; 斜体字母为强插入碱基.

参 考 文 献

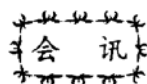
- 1 Saiki P K, Bugawan T L, Erlich H A *et al.* Nature, 1986; 13: 163
- 2 Saiki R K, Waish P S, Erlich H A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 86: 6230
- 3 Rudert W A, Trucco M. Nucleic Acids Research, 1990; 18: 6460
- 4 Rudert W A, Trucco M. Nucleic Acids Research, 1992; 20: 1146
- 5 Zhang Y, Coyne M Y, Kawasaki E S *et al.* Nucleic Acids Research, 1991; 19: 3929
- 6 吴冠芸, 宋 昉, 刘敬忠等. 中华血液学杂志, 1992; 13: 507
- 7 刘敬忠, 吴冠芸, 高庆生等. 中国医学科学院院报, 1990; 12: 90
- 8 吴冠芸, 方福德. 基因诊断技术及应用, 第一版. 北京: 中国协和医科大学北京医科大学联合出版社, 1992: 206~208

Preparation of Cloned Probes for Reverse Dot Blot. Li Weiguo, Luan Xudong, Huang Tao, Zhu Ningning, Qin Xuebin, Huang Shangzhi, Long Guifang¹⁾, Shen Yan, Wu Guanyun (*Institute of Basic Medical Sciences, CAMS/PUMC, Beijing 100005, China; ¹⁾ Guangxi Medical College, Nanning 530027, China*).

Abstract Reverse dot blot is featured by hybridization of labeled target DNA with immobilized probes. In conventional dot blot, each probe requires a separate hybridization, while in reverse dot blot all known allelic variants at sev-

eral loci in a sample can be screened simultaneously. PCR was used to generate tandem polymers of ASO sequences for three β -thalassemia mutations [- 28 (A $\rightarrow$ G), CD17 (A $\rightarrow$ T) and CD41~42 (- TTCT)], and then inserted the amplified probe polymers into plasmid. The final probes, which were amplified by PCR, were applied to the nylon membrane and hybridized with radioactive labeled HBB PCR products to detect the genotype of sample DNA.

Key words reverse dot blot, cloning, β -thalassemia



中国生物化学与分子生物学会

第六届四次常务理事扩大会议消息

中国生物化学与分子生物学会第六届四次常务理事扩大会议于1996年3月19日至20日在北京召开。

会议对学会各工作委员会1995年的工作进行了总结并对1996年的工作进行了部署。本次会议的一项重要议题是讨论并决定中国生物化学与分子生物学会第八届全国生物化学与分子生物学学术会议暨第七届中国生物化学与分子生物学会会员代表大会的有关事宜。

由于1996年中国科学技术协会召开第五届代表大会并同时产生中国科学技术协会第五届委员会。讨论协商一致推杨福愉教授为中国科协第五届委员会委员候选人,同时作为“五大”代表。

经中国生物化学与分子生物学会常务理事会议决定,1995年度“生物化学、生物物理学和分子生物学杰出研究奖”授予王志珍教授。

1997年将召开第八届全国生物化学与分子生物学学术会议暨第七届中国生物化学与分子生物学会会员代表大会,并同时产生中国生物化学与分子生物学会第七届理事会。经讨论和协商决定,下届理事会由59人组成,其中包括香港1名(如果1997年的代表大会香港不能派代表参加会议,名额仍保留)。理事会

的组成要老、中、青结合,特别强调使工作上有成就并热心学会工作的青年科技工作者入理事会。大会代表共173人,本届理事及下届理事候选人为当然代表。

经过认真讨论,决定第八届全国生物化学与分子生物学学术会议暨第七届中国生物化学与分子生物学会会员代表大会由海南省生化学会承办,并于1997年10月至11月在海南省海口市召开。具体分工:海南省生化学会负责大会接待工作,包括会议期间与会代表的生活安排,会场条件的保证及会议经费的筹措;《生物化学杂志》编辑部负责论文的征集、编审、录排,并在1997年6月底以前以胶片形式交海南省生化学会,在海南印刷;学会秘书处负责学术活动的安排及有关换届的筹备工作。大会成立筹备委员会,筹委会由副理事长兼秘书长杨福愉教授负责,成员有常务理事夏寿萱、张迺衡、刘树森、王琳芳、姚仁杰、学会秘书处杜连芳、海南省生化学会林栖凤、李刚。筹委会负责协调各部分工作及整个大会议程的安排。大会的各项准备工作立即着手进行。

[中国生物化学与分子生物学会秘书处]