

“缺口翻译”法制备 ^{32}P 标记 DNA 探针 和几种核酸杂交技术

袁建刚 黄秉仁 王丹平 蔡良琬

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

定性或定量检测天然 DNA 或重组 DNA 中某些特殊的顺序片段, 分子杂交是最常用的方法。近几年, 核酸的分子杂交技术日趋完善, 以不同材料为支持物的固相杂交技术取得了更为迅速的发展^[1-6]。核酸分子杂交方法的灵敏性主要取决于同位素标记杂交探针的比放射性强度。因此制备高比放射性探针是提高灵敏性的关键。用缺口翻译方法制备较稳定的高比放射性强度的杂交探针, 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 是一个理想的工具^[7,8]。

本文介绍我们建立并改进“缺口翻译”制备 ^{32}P 标记的探针方法, 以及几种重要的核酸固相杂交技术。

一、材料和方法

1. 试剂和材料

4 种 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ 标记的 dNTP (Amersham 公司); 4 种非标记的 dNTP (Sigma 公司); DNase I (BRL 公司); 大肠杆菌聚合酶 I (BRL 公司); 蛋白酶 K (Emerk 公司); 牛血清蛋白 (Sigma 公司); 硝酸纤维素膜 (Schleicher and Schiill 公司)。其它化学试剂为国产。

2. “缺口翻译”方法制备 DNA 探针

取 50 微居的两种 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dNTP 乙醇溶液于一硅化并灭菌的 Eppendorf 管内, 冷冻抽干。

将 0.5 微克 DNA 样品和试剂按以下顺序加入另一硅化和灭菌的 Eppendorf 管内: $10\times$ 反应缓冲液 (500 Tris-HCl, 50mM MgCl_2 100 mM 2-巯基乙醇 pH 7.5) 2 微升, 两种或三种非标记的 dNTP 混合液 (各为 0.1 mM) 2 微升 (在反应体系中, 包括标记的必须含 4 种 dNTP),

DNA 样品 (0.5 微克) 2 微升, 灭菌无离子水 8 微升, DNase I 2 微升 (30 pg), *E. coli* DNA 聚合酶 I 2 微升 (5 单位)。

将以上总体积 20 微升的反应混合液混匀后转入抽干的 ($\alpha\text{-}^{32}\text{P}$) dNTP 管内, 14°C 反应 1.5—2 小时, 然后加入等体积的蛋白酶 K 溶液 (1 毫克/毫升), 60°C 保温 30 分钟, 或加入反应终止缓冲液终止反应。

将已标记的反应液加到用 TE 缓冲液 (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5) 平衡好的 Sephadex G50 柱上 (床体积为 $0.8\text{cm} \times 20\text{cm}$), 用 TE 缓冲液洗脱, 收集洗脱液, 每管 1 毫升, 测定每管计数, 第一个洗脱峰为标记的 DNA 样品。

3. 斑点杂交:

(1) 点样 将各个含有待测 DNA 的样品用微量点样器点到已标号的硝酸纤维素膜上, 保证点样的斑点不超过 0.5 cm。最后用吹风机吹干。

(2) 碱变性 将硝酸纤维素膜点样面向上, 漂浮在碱溶液 (0.5M NaOH, 1.5 M NaCl) 上, 使碱溶液慢慢浸湿硝酸纤维素膜。待全部浸湿后, 继续浸泡 30 分钟, 保证 DNA 完全变性。

(3) 中和与干燥 碱变性后, 将硝酸纤维素膜轻轻取出, 控干碱液后, 点样面向上浸入中和缓冲液 (0.5M Tris-HCl, 3M NaCl, pH 7.0) 中, 中和两次, 每次 45 分钟。然后将膜取出放在滤纸上, 室温晾干, 80°C 真空干燥 2—3 小时。

(4) 预杂交 把上述处理后的膜放入含有

6 × SSC, (1 × SSC 为 0.015 M 柠檬酸钠, 0.15 M NaCl) 和 1 × Denhardt 溶液(含非可, 聚乙烯吡咯烷酮和牛血清清蛋白各为 0.02%) 的预杂交缓冲液中, 65℃ 保温 6 小时。

(5) 杂交 预杂交后, 把膜转移到含 1 × 10⁶ cpm 计数/毫升的 ³²P 标记的杂交探针的溶液(含有 2 × SSC, 1 × Denhardt 溶液, 0.5% SDS, 25 mM 磷酸钾缓冲液, 2 mM EDTA, pH 7.2) 中, 65℃ 保温 16—24 小时。杂交时尽可能用小体积容器。

(6) 放射自显影 杂交反应结束后, 将膜取出, 用含 2 × SSC, 1 × Denhardt 溶液, 0.5% SDS 的洗涤液于 65℃ 洗膜, 每次 1 小时, 洗四次。洗完后, 滤纸吸干, 夹入塑料薄膜中, 然后放射自显影(冰箱内)。

4. 吸印转移杂交

(1) 变性 待检测的 DNA 样品经限制性内切酶消化和凝胶电泳后, 取出凝胶, 先浸入碱溶液中 (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) 中, 使 DNA 变性 30 分钟, 倒出碱溶液, 用蒸馏水洗两次, 再浸入酸溶液 (0.25 M HCl) 中, 变性 30 分钟; 倒出酸溶液, 用蒸馏水洗两次, 然后放入中和液 (0.5 M Tris-HCl, 3 M NaCl, pH 7.0) 中和两次, 每次 45 分钟。

(2) 吸印转移 将一块与凝胶大小相同的硝酸纤维素膜先在 2 × SSC 中浸泡 2—4 小时, 将含有变性 DNA 的凝胶平板放在已铺好一层用 20 × SSC 浸湿的 Whatman 3 号滤纸的有机玻璃转移架上, 转移架放入一搪瓷盘内, 盘需保持水平。浸泡好的硝酸纤维素膜放在凝胶上面, 膜上再放一块相同大小的 Whatman 1 号滤纸。注意各层之间都不能有气泡。最上面放 10 厘米厚的干滤纸, 再压 1 公斤的重物。搪瓷盘内加入 20 × SSC, 使最下面的 Whatman 3 号滤纸能浸入液面中, 吸印过夜。次日取出硝酸纤维素膜, 放入 2 × SSC 中洗 10 分钟; 放在滤纸上, 80℃ 真空干燥 2—3 小时。

以下步骤同方法 3 的 (4)、(5)、(6)。

5. 电转移

电转移用的电泳槽一般为 18 × 24 cm, 电

泳缓冲液容量为 4 升。电泳槽中央有沟槽, 可嵌入两块一套的有机玻璃板, 板上布满微孔。电转移时, 将变性处理过的凝胶和用电泳缓冲液 (25 mM 磷酸钠, pH 6.8) 浸泡的滤膜贴紧后, 夹于两块浸透电泳缓冲液的泡沫海绵或厚滤纸之间, 再用微孔有机玻璃板夹紧后插入电泳槽的沟槽内, 然后接通电源。电场强度为 2—8 伏/厘米, 电泳 2 小时。结束后, 取出 DNA 滤膜, 放在滤纸上, 80℃ 真空干燥 2 小时。

以下步骤同方法 3 的 (4)、(5)、(6)。

6. 菌落杂交

(1) 膜的制备及菌落参考系 以下均为无菌操作。硝酸纤维素膜用前消毒用双蒸水煮 10 分钟, 也可用紫外灯每面照射 30 分钟, 或 120℃ 烘烤 15 分钟。

将硝酸纤维素膜平铺于琼脂固体培养基平皿上, 除去膜与平皿之间的气泡, 将待测菌落转种于膜上, 37℃ 培养 2—3 小时, 待菌落直径大约 1.0 mm 时, 将硝酸纤维素膜菌落面向上移至另一块含氯霉素 (170 微克/毫升) 的琼脂平皿上, 37℃ 培养 15—20 小时以扩增质粒。同时, 在另一块平皿上按相同位置转种, 制备菌落参照系 (Reference Set)。37℃ 培养过夜后, 2—4℃ 保存。

(2) 菌体裂解 DNA 变性及固定 为了防止菌落或 DNA 从原位移动, 所用试剂均从硝酸纤维素膜下方加入, 借扩散进入菌落。

将 0.5 N NaOH 滴加在水平放置的塑料薄膜上。硝酸纤维素膜菌落面向上, 小心地放在液滴上进行碱变性; 5 分钟后移至干滤纸上吸干碱液, 于 1.0 M Tris-HCl, pH 7.5 液滴上中和两次, 每次 10 分钟。用干滤纸吸干, 再放在 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.5 液滴上 10 分钟, 2 × SSC 轻轻漂洗, 室温晾干后, 80℃ 真空烘干, 使 DNA 固定在硝酸纤维素膜上。

以下步骤同方法 3 的 (4)、(5)、(6)。

二、结果和讨论

1. “缺口翻译”标记 DNA 探针

(1) 掺入率 标记反应结束后, 经过

Sephadex G 50 柱洗脱, 洗脱曲线见图 1。第一洗脱峰在第 4 管附近, 第二洗脱峰在第 10 管附近。第一洗脱峰为标记的 $[^{32}\text{P}]$ DNA, 第二洗脱峰是未掺入的 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dNTP, 若以两峰面积的大小计算掺入率, 一般是 40—60%。

因反应混合物的体积比较小, 为避免洗脱峰脱尾加样上柱时不宜沿管内壁滴加, 而应尽可能用微量加样器加在柱子中央部分, 即可得到比较满意的分离效果。

(2) 标记 DNA 的比放射性强度 由图 2 可以看到在我们的实验条件下, ^{32}P 标记 DNA 的比放射性, 反应 2 小时左右达到最高峰。反应时间再增加, 标记的比放射性强度反而降低。这说明所用的 DNA 聚合酶 I 和 DNase 中污

染有少量 DNA 降解酶, 因此, 反应体系中所加酶量不宜过大。

我们的实验结果表明, 使用一种 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dNTP 时, 标记的比放射强度可达 $3\text{--}6 \times 10^7$ cpm/微克 DNA, 如果使用两种 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dNTP, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dNTP 的量增加一倍, 标记的 DNA 比放射性强度可增加约 0.5 倍。

2. 斑点杂交

斑点杂交是一种简便、快速的检测方法, 样品比较集中, 灵敏度高。我们用含有 HBV DNA 的重组质粒和 ^{32}P 标记的同源 DNA 进行斑点杂交, 图谱见图 3 a。从杂交结果看, 可测出 4—8 pg 的待测 DNA。有人报道, 用斑点杂交方法可检测出一个 pg 的待测 DNA^[6]。

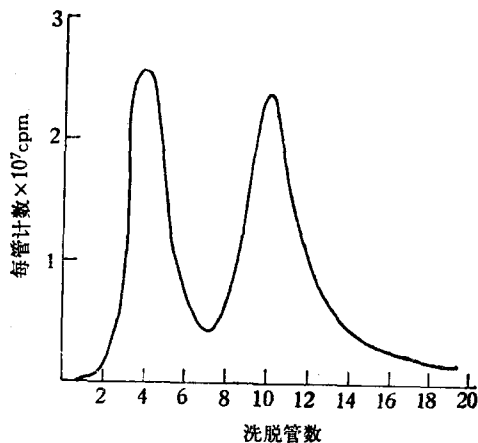


图 1 “缺口翻译法”的 $[^{32}\text{P}]$ DNA 的洗脱曲线

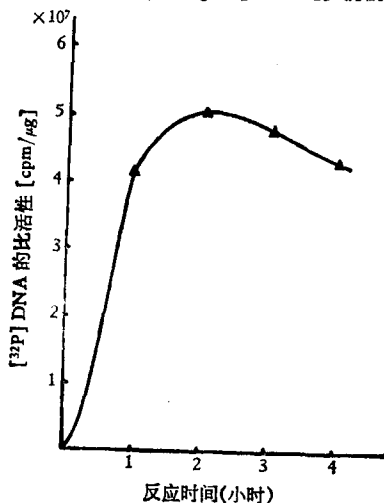


图 2 标记 DNA 的比活性和反应时间关系

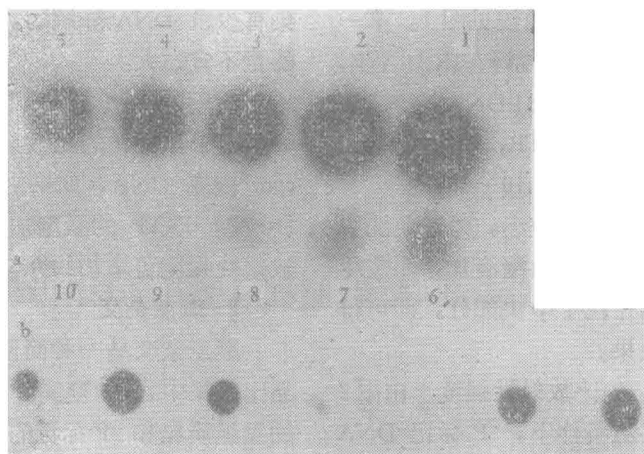


图3 a: 斑点杂交的敏感性实验
从1到10各斑点的DNA点样量为: 1000, 500, 250, 125, 63, 32, 16, 8, 4, 2pg
b: [^{32}P] HBV DNA 探针与乙型肝炎患者血清的杂交结果

图3b是 ^{32}P 标记的HBV DNA探针与患乙型肝炎病人的血清的杂交结果。这几例病人血清检测都是阳性反应,说明他们的血清中都有HBV DNA。

3. 吸印转移杂交

图4是我们用吸印转移杂交技术的一个实例。将人和恒河猴DNA用限制性内切酶XbaI消化和琼脂糖凝胶电泳后,将DNA吸印转移到硝酸纤维素膜上,然后用标记的 ^{32}P 类 α -DNA顺序片段做探针进行杂交。从图4(封2)的电泳和杂交图谱可以看到,人和恒河猴的基因组非常庞大,只依靠酶切和凝胶电泳得不到清晰的高重复顺序类 α -DNA的区带,经过吸印转移杂交后,即可看到清晰的区带。类 α -DNA探针能与恒河猴DNA杂交,但不能与作为对照的牛DNA杂交,从而验证了类 α -DNA在灵长类生物进化过程中的作用(见封2)。

吸印方法能将电泳结果按原位转移到硝酸纤维素膜上,从而保证了杂交和电泳结果的一致性。吸印转移杂交在研究基因组织,基因定位,外源DNA对寄主细胞DNA的整合,以及重组DNA等都是十分有用的工具。

4. 电转移杂交

电转移是吸印转移技术的改良,它以电流为动力使所要分离的待测DNA从凝胶中转移

到硝酸纤维素膜或其它合适的固相膜上,然后用同位素标记探针杂交。

图5(见封2)是电转移杂交的结果。我们将重组的恒河猴类 α -DNA的RB(Bam HI)-1顺序片段用Hind III酶切得到6个片段,它们的长度分别为340,290,220,170,120,50个碱基对。电泳结束后,电转移到硝酸纤维素膜上,再与 ^{32}P 标记的同源DNA杂交,6个片段都呈现较清晰的杂交区带。这说明,和吸印转移比较,电转移不但速度快(一般两小时即可完成),而且转移得更为有效和彻底。在许多情况下,丙烯酰胺凝胶的吸印转移结果不太理想,而电转移通常可得到令人满意的结果,可见电转移更适用于丙烯酰胺凝胶。

5. 菌落杂交

菌落杂交是重组DNA研究中最常用的方法,它可使菌落筛选工作大大简化。我们曾将树鼩DNA高重复顺序Bgl II酶解片段克隆到质粒PHE₂上,转化到大肠杆菌中,挑选出Ap^r Km^s的单抗性菌落。用此法制备了硝酸纤维素膜,再与 α - ^{32}P 标记的树鼩DNA Bgl II克隆片段PTS(Bgl II)-1杂交。放射自显影结果(图6)显示对照组的不含插入片段的PHE₂质粒处没有杂交。这说明,这些菌落都含有特异性的树鼩DNA高重复顺序片段。

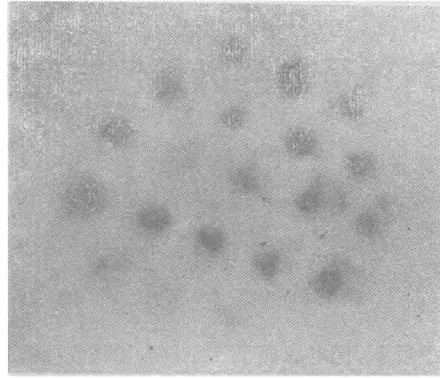


图6 ^{32}P 标记的树鼩高重复顺序 (Bgl II)-1 片段与单抗性菌落的原位杂交
(最下面一行是不含重组 DNA 的空白对照)

以上简单介绍了我们常用的几种固相杂交技术。在此尚需指出的是,杂交反应需选择合适的温度。温度过高,杂交双链难以形成,温度过低,非特异性杂交增加。 $T_m-25^\circ\text{C}$ 较为适宜。一般情况下选用 55°C (如加变性剂甲酰胺,则每加 1% 的甲酰胺,杂交温度降低 0.65°C)。但是,即使在外界条件一定时,杂交双链的 T_m 值还要受到片段长度、碱基错配程度等因素的影响。因此,进行小片段核酸分子杂交,或进行碱基趋异程度较高的异源核酸分子杂交时,要相应降低杂交时的反应温度。

近年来,多聚核苷酸合成技术取得了很大进展,人工合成的寡核苷酸片段已应用于核酸的分子杂交中^[9]。通过合成制备 10—20 个核苷酸的寡核苷酸片段,进行末端标记即可作为杂交探针。合成的杂交探针一般都很短,杂交时形成的短双链的 T_m 值很低,因此,杂交时的温度必须相应地降低。这种短双链的 T_m 值可通过下式计算^[10]。

$$T_m = 16.6 \log [\text{Na}^+] + 0.41(\%G + C) + 81.5 - \frac{500}{\text{短双链的碱基对数目}}$$

目前,许多具有重要生理功能的蛋白质或多肽的氨基酸序列已分析清楚。因此,可以参照已知的氨基顺序,部分合成相应结构基因的核苷酸序列,再用它作杂交探针。这种方法可以从基因库中筛选需要的基因克隆,所以合成的寡核苷酸探针在未来的基因工程研究中具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, **98**, 503, 1975.
- [2] Reiser, J. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **74**, 5350, 1977.
- [3] Benton, W. et al.: *Science*, **96**, 180, 1977.
- [4] Grunstein, M. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **72**, 3961, 1975.
- [5] Towbin, H. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **76**, 4350, 1979.
- [6] Berninger, M. et al.: *J. Med. Virol.*, **9**, 57, 1982.
- [7] Rigby, P. W. J. et al.: *J. Mol. Biol.*, **113**, 237, 1977.
- [8] Mackey, J. K. et al.: *Biochemistry*, **16**, 4478, 1977.
- [9] Szostak, J. W. et al.: *Methods in Enzymology*, **68**, 419, 1979.
- [10] Davis, R. W. et al.: *Advanced Bacterial Genetics*, **222**, 1980.

[本文于1984年4月13日收到]

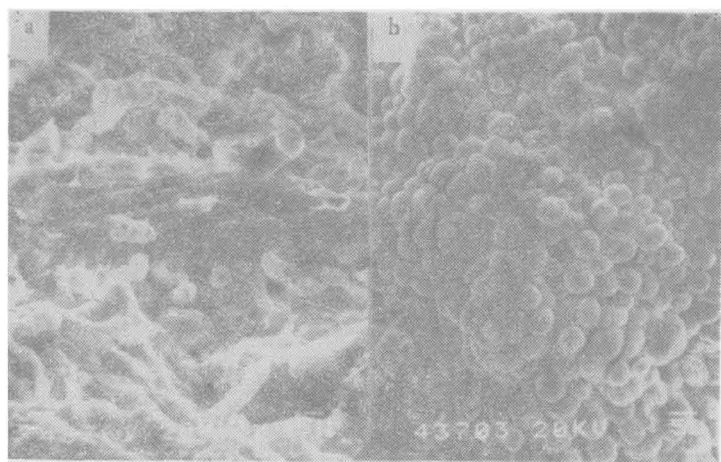


图 1 人体胃组织离子刻蚀前(a)和(b)的 SEM 电镜图 ($\times 1000$)

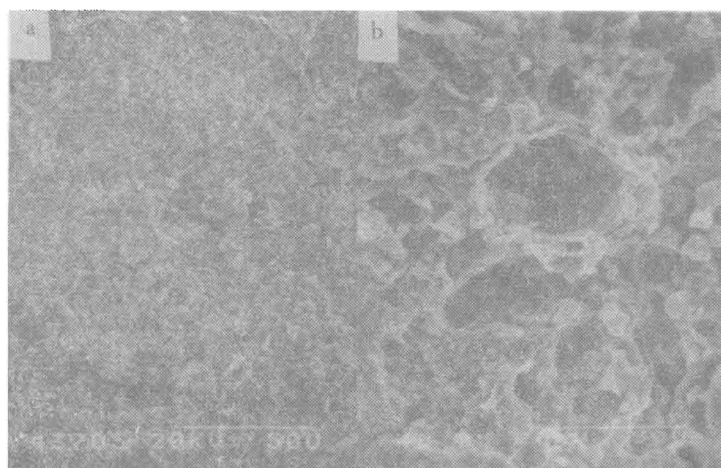


图 2 小白鼠肝组织离子刻蚀前(a)和(b)的 SEM 电镜图 ($\times 500$)

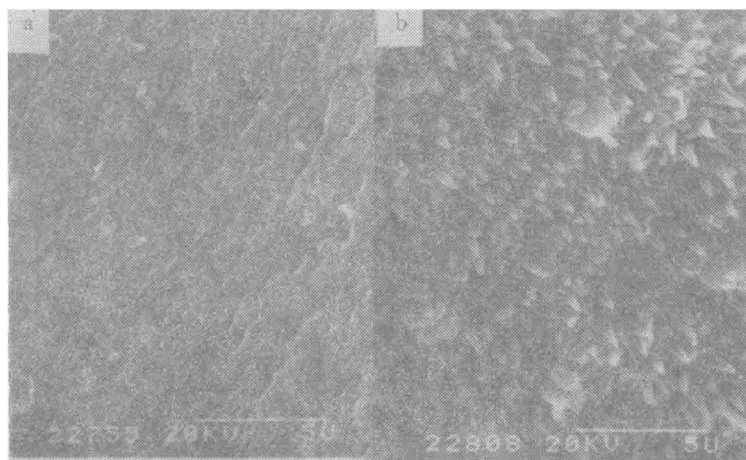


图 3 日本血吸虫离子刻蚀前(a)和后(b)的表面皮棘的 SEM 电镜图 ($\times 5000$)

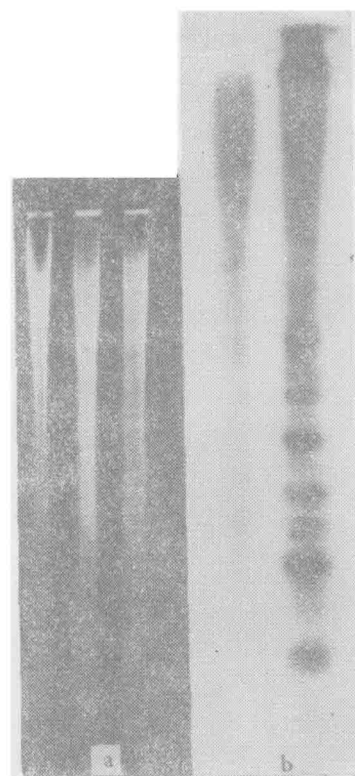


图 4 吸印转移杂交图谱

- a. 人、恒河猴、牛 DNA 经 NbaI 酶切后的图谱 (1.2%琼脂糖胶)
b. 人、恒河猴、牛 DNA 经 NbaI 酶切和电泳吸印转移到硝酸纤维素膜上,然后与人的类 α DNA 顺序的杂交图谱

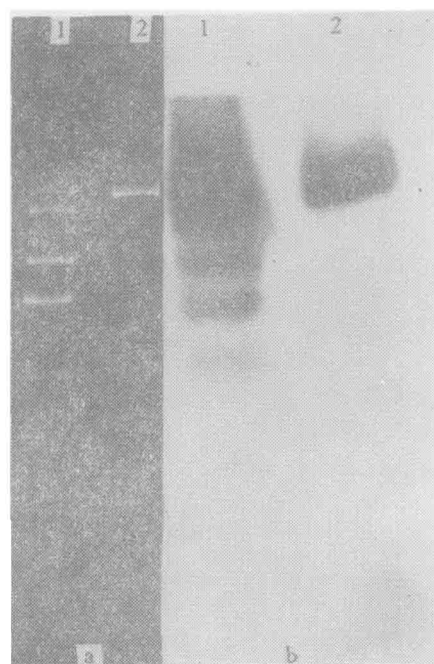


图 5 电转移杂交图谱

- a. 恒河猴类 α DNA (BamHI)-I 片段的电泳图谱 (6% 丙烯酰胺胶)
b. 图 a 的电泳结果经电转移到硝酸纤维素膜后与 ^{32}P 标记的相同 DNA 的杂交图谱 其中: 1.恒河猴类 α DNA 顺序 (BamHI)-I 片段经 HindIII 酶切后的图谱 (片段长度从上到下为 340, 290, 220, 190, 120, 50bp) 2. 长度为 340bp 的恒河猴类 α DNA 片段