

奶粉用于核酸分子杂交

郭晓军 王申五 左 瑾 韩日才 汪兆琦 吴冠芸

(中国协和医科大学基础部, 北京)

提 要

以低脂奶粉和 SSC 组成简单的核酸分子杂交体系进行核酸斑点杂交、Southern 及 Northern 印迹杂交以及 Benton 菌斑原位杂交, 并与传统的杂交体系进行了比较。说明该体系简单、可靠和价廉, 很适于一般实验室采用。

近年来, 核酸分子杂交技术已越来越广泛地应用于重组 DNA 的筛选、基因分析、染色体的基因定位以及各种遗传病和传染病的基因诊断^[1]。核酸分子杂交多在固相膜上进行, 为了降低膜的非特异吸附、增加单链分子核酸间的碰撞机率, 即提高灵敏度和降低本底, 在杂交液中常加入 Denhardt 试剂、鲑鱼精子 DNA (或其它 RNA) 以及右旋糖苷硫酸盐等大分子。尽管其杂交效果很满意, 但所需试剂很多, 在推广基因诊断技术中常遇到一定困难。为此我们试图寻找一种更简便、可靠而价廉的方法。

1984 年, Danid. A. Johnson 等人介绍了一种用 Bettelo 作核酸、蛋白等生物大分子相结合时的反应介质, 取得了很好的结果^[2]。Bettelo 的主要成份是脱脂奶粉。随后国外一些实验室将脱脂奶粉应用于 DNA 分子杂交^[3]。

我们用北京产低脂奶粉对核酸杂交体系和方法进行了一些试探和改进, 取得了比较满意的结果。

材 料 和 方 法

一、奶粉及其有关试剂 低脂奶粉, 北京南郊乳制品厂, 万年青牌。

1. 奶粉贮液 5% (W/V) 奶粉水悬液。于一 20℃ 存放。

2. 奶粉预杂交液 0.25% 奶粉, 6 × SSC

(0.15mol/L NaCl + 0.015mol/L 柠檬酸钠), 使用时新鲜配制。

3. 奶粉洗膜液 0.25% 奶粉, 0.1% SDS (十二烷基硫酸钠), 2 × SSC, 使用时新鲜配制。

二、核酸杂交探针的制备 以碱变性法^[4]及羟基磷灰石法^[5]制备含特异基因片段的重组质粒。重组质粒以限制性内切酶酶切后, 经电泳-DE81 滤纸法^[6]回收特异的基因片段。重组质粒或特异的基因片段经 ³²P 或 ³⁵S 缺口平移法^[7]标记, 以 Sephadex G₅₀ 小柱离心法^[8]回收探针, 其体积为 100 μl。

三、硝酸纤维素膜 0.45 μ 孔径, 西德 S&S 公司或上海医药工业研究所及北京化工学校附属工厂产品均可。用前经蒸馏水漂洗 15 分钟两次, 检查膜的吸水性是否均匀(选取吸水均匀者)。再经 6 × SSC 浸过后, 点样或转移。

点样或转移核酸的方法见图 1—4 图注。

四、杂交方法

1. 预杂交 将载有待测 DNA 或 RNA 的硝酸纤维素膜装在塑料袋中, 加入 3—10ml 预杂交液, 热封后于 60℃ 水浴预杂交 2 小时。

2. 杂交 将 ³²P 或 ³⁵S 标记的 DNA 探针液 100 μl 经 100℃ 煮沸 3 分钟, 冰浴骤冷后直接加入留有少量 (1—5ml) 预杂交液的塑料袋中。组成杂交液的放射性比活约为 2 × 10⁶ cpm/ml。

封口后于 68℃ 水浴杂交过夜 (16 小时以上)。

3. 洗膜 将杂交液倒出存放起来以备重复使用 (— 20℃)。由塑料袋中取出杂交膜进行下述漂洗:

(1) 0.25% 奶粉洗膜液室温漂洗 15 分钟, 两次。

(2) 0.1% SDS, 0.1 × SSC, 68℃ 水浴漂洗 30 分钟, 两次。

4. 放射自显影 将杂交膜用滤纸吸干后, 以上海保鲜膜包裹, 与 X 光片 (国产) 紧贴放入带增感屏的曝光夹中, 于低温 (^{32}P , — 20℃; ^{35}S , — 70℃) 曝光 6—72 小时后显影。

结 果

一、斑点杂交

图 1 显示用奶粉核酸杂交体系, 经 ^{35}S 探针 对已知 DNA 杂交后产生的信号。特异 DNA 与非特异 DNA 的杂交点有明显的区别, 探测水平可达 10pg 水平。

图 2 显示用奶粉核酸杂交体系, 以 ^{32}P 标记

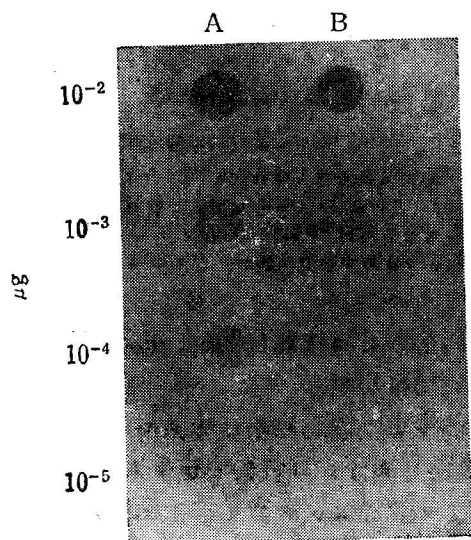


图 1 ^{35}S 探针斑点杂交图谱

不同稀释度的 HBV DNA 和鲑精 DNA 加等体积 0.4M NaOH 在室温混合 1 分钟, 再加 2 倍 DNA 液体体积的 20 × SSC, 以抽滤点样器点在硝酸纤维素膜上。以 ^{35}S 标记的 HBV DNA 3.2kb 片段为探针, 经奶粉杂交体系杂交洗膜后, 于 — 70℃ 曝光 4 天。A 为 HBV DNA; B 为鲑精 DNA。

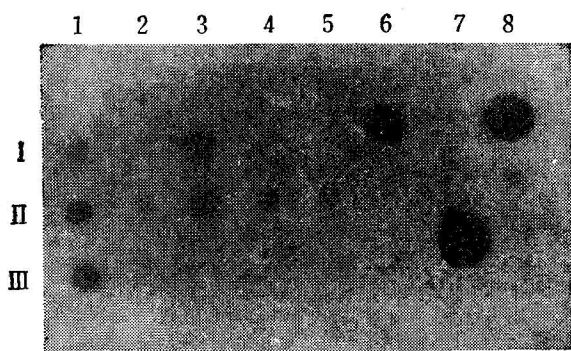


图 2 ^{32}P 探针斑点杂交图谱

I₁₋₃, II₁₋₃ 及 III₁₋₃ 共 19 例人宫颈癌活检组织基因组 DNA 点样, 2.5μg。以 ^{32}P 标记的 pHPV-16 为探针, 在奶粉体系中杂交, 于 — 70℃ 曝光 15 小时后显影。III₄, 为人宫颈癌培养细胞 DNA 2.5μg。III₅ 为鲑精 DNA 阴性对照, 2.5μg。III₆ 为 pHPV-16 (含乳头状瘤病毒 DNA 重组质粒), 1ng, 阳性对照。

的特异探针探测患者基因组 DNA 的结果。同源性 DNA 阳性对照信号最强, 鲑精 DNA 阴性对照无显影信号, 19 例病人的基因组 DNA 有程度不等的显影信号。表明该体系有较高的特异性。

二、Southern 印迹杂交

图 3 A, B, C 是同一张硝酸纤维素膜, 用传统的杂交体系和不同条件奶粉杂交体系的结果。由于洗膜造成的膜上 DNA 量减少, 三者的显影信号逐渐减弱, 但其图像是完全一致的。用奶粉杂交体系时, 68℃ 和 42℃ 加 50% 甲酰胺结果也完全一致。

三、Northern 印迹杂交^[10]

将人红细胞总 RNA 与阴性对照 RNA 同时经琼脂糖电泳, 经 Northern 转移至硝酸纤维素膜上, 以人 β-珠蛋白特异的 ^{32}P 探针, 在奶粉杂交体系中杂交。图 4 的结果显示出清晰的特异区带。

四、Benton 噬斑原位杂交^[9]

图 5 显示以奶粉杂交体系对 λ 噬菌体文库的形成噬斑, 用特异的探针筛选时的杂交图像。我们已经用这种方法从 β-地贫病人脾 DNA 中筛选出一个 β-地贫基因克隆株。这充分说明该杂交体系的实用性。

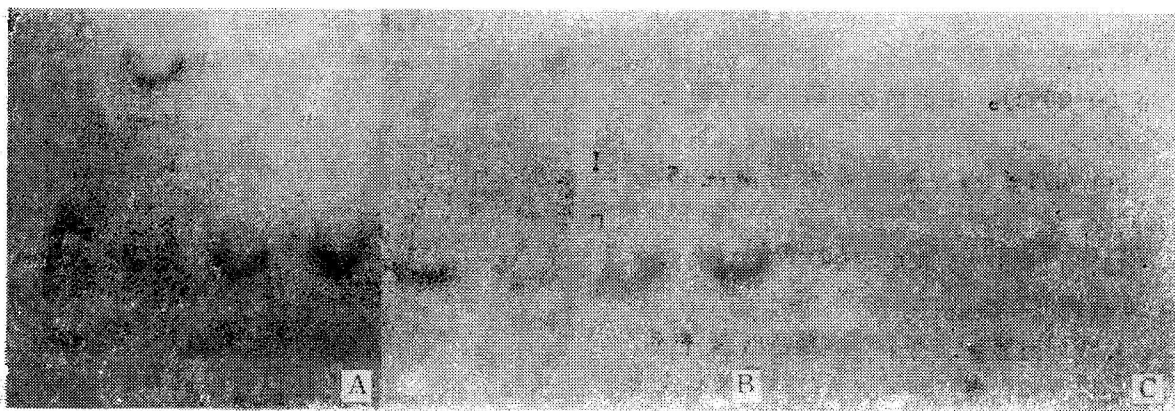
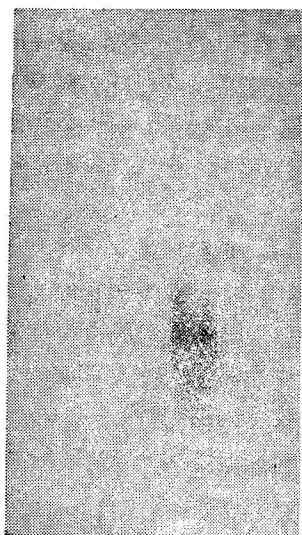


图3 ^{32}P 探针 Southern 印迹杂交

A. β -地中海贫血病人白细胞 DNA $10\ \mu\text{g}$ 经 Hinc II 消化后电泳, Southern 转移, 以传统杂交法^[11]杂交。探针为 ^{32}P 标记的 ϵ -珠蛋白基因特异的 1.3Kb 片段。 B. 将 A 膜 100°C 水煮 3 分钟后, 以同样探针, 在奶粉体系中杂交。 C. 将 B 膜水煮处理后, 以同样探针, 在含 50% 甲酰胺的奶粉杂交体系 42°C 杂交。



β 球蛋白
mRNA

A B

图4 ^{32}P 探针 Northern 印迹杂交

小鼠浆细胞瘤总 RNA (A) 与人网织红细胞总 RNA (B) 各 $18\ \mu\text{g}$, 经 Northern 转移后^[10], 以含 50% 甲酰胺奶粉杂交体系 42°C 预杂交 2 小时, 加入 α - ^{32}P 标记的人 β -珠蛋白基因探针 (100°C 3 分钟变性处理后) 在 42°C 杂交 16 小时。洗膜, -70°C 曝光过夜后显影。

讨 论

为了便于使用奶粉杂交体系, 我们采用离心法制备小体积探针。预杂交后不必更换杂交液, 将探针直接加入奶粉杂交体系。若用其它

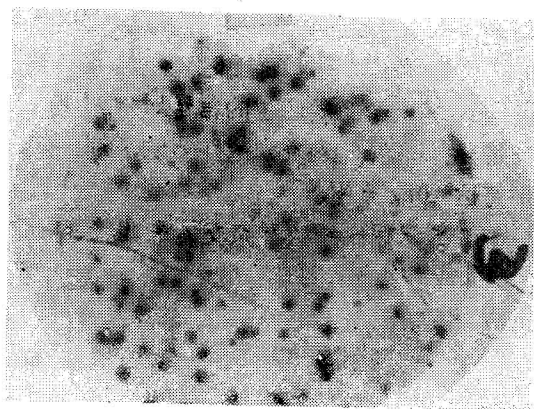


图5 Bentonite 原位杂交

β -地中海贫血病人脾 DNA, Hind III 7.5Kb 片段与 λ charon 28 DNA 重组包装筛选后, 阳性噬菌斑增殖后再与 ^{32}P 标记 β -珠蛋白 cDNA 探针在奶粉杂交体系中杂交洗膜, -20°C 曝光 6 小时后显影。

方法制得的探针液体积较大时, 也可以按预杂交液成份另行配制。

有的学者^[3]在奶粉杂交体系中加入鲑鱼精子 DNA 以降低本底。从我们的结果看, 似乎也可以不加。本底过高, 通常是由于硝酸纤维素膜不均匀所致。

根据 Johnson 等人的报道, 奶粉体系也可以用于蛋白-蛋白免疫测定中的介质。我们尚未做这方面的尝试。美国贝勒医学院还用此体系作蛋白-核酸探针结合的研究, 称为 South-

(下转第 69 页)

品分子所获得的标准曲线偏离较大,如分子量 6214 的肌红蛋白片段。此时可再选用一些分

子量与它相近的其它标准品来测试,如我们又选用了分子量为 6500 的胰蛋白酶抑制剂(肺)。总之,如果尽可能多地选用一些标准样品,其所获得的标准曲线也必然更接近实际。

最后应该指出的是,不合适的固定染色液有时会使小分子量多肽的谱带丢失。如我们曾选用含 30% 乙醇、7.5% 醋酸的水溶液配制染液,结果发现分子量约 2,000 的标准多肽的谱带丢失。但在同样的样品量及电泳条件下,换用由 50% 甲醇、10% 醋酸配制的固定染色液,进行固定和染色,这条谱带就能较好地显示。

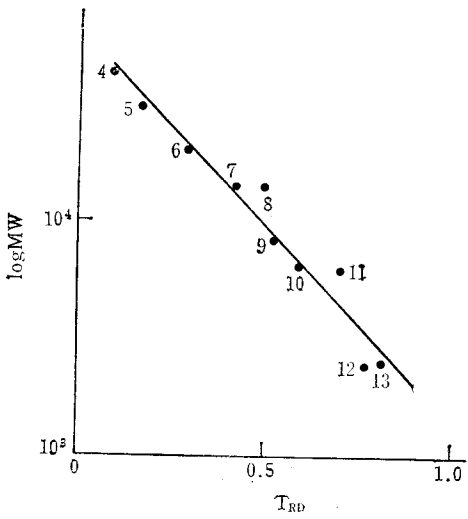


图 4 分子量对数与电泳迁移率的关系

$T = 12.8\%$ $C = 5\%$ 8M 尿素
样品: 13. 为胰岛素 A 链 MW2532 其余蛋白名称及分子量同图 1。

参 考 文 献

[1] Shapiro A. L. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28, 815, 1967.
[2] Weber K. and Osborn M.: *J. Biol. Chem.*, 244, 4406, 1969.
[3] Weber K. and Osborn M.: in *The Protein* (Third ed.), Vol. 3, 179—223, 1980.
[4] Anderson B. L. et al.: *Anal. Biochem.*, 132, 365, 1983.

[本文于 1986 年 7 月 4 日收到]

(上接第 72 页)

Western 印迹杂交,得到满意结果。

低脂奶粉能用于核酸杂交的机理,还不清楚。根据传统的杂交体系的原理,我们推测可能有两个作用:(1)占位效应:预杂交时奶粉中的生物大分子被吸附在硝酸纤维素膜的空白部分,从而降低了膜对探针 DNA 的非特异性吸附;(2)体积排阻效应:在杂交液中探针大分子间加入奶粉大分子时,可使探针的相对浓度增加,减少了探针 DNA 的复性,从而使特异性杂交的程度有所提高。

参 考 文 献

[1] Miller, J. A.: *Science News*, 126, 104, 1984.

[2] Johnson, D. A. et al.: *Gene Anal. Techn.*, 1, 3—8, 1984.
[3] Reed, K. C. and Mann, D. A.: *Nucleic Acid Res.*, 13, 7207, 1985.
[4] Brinboin, H. C. and J. Doly.: *Nucleic Acid Res.*, 7, 1513, 1979.
[5] Shoyab, M. and A. Sen: *Method in Enzy.*, 68, 191, 1979.
[6] Danner, D. B.: *Anal. Biochem.*, 125, 139, 1982.
[7] Rigby, P. W. et al.: *J. M. B.*, 113, 237, 1977.
[8] T. Manialis. et al.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 446, 1982.
[9] Benton, W. D. and R. W., Davis.: *Sciences*, 196, 180, 1977.
[10] Thomas, P. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77, 5201, 1980.
[11] Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, 93 503, 1975.

[本文于 1986 年 8 月 2 日收到]