

一种简便有效的菌落原位杂交法

肖蕾 田园 吴旻

(中国医学科学院肿瘤研究所, 北京)

提 要

本方法采用国产定量滤纸代替硝酸纤维素膜进行菌落杂交筛选。省去了真空烤膜和预杂交操作。末端标记的寡核苷酸探针杂交所得结果具有较好的特异性和较强的放射活性。

关键词 菌落原位杂交, 定量滤纸, 寡聚核苷酸探针, 肿瘤坏死因子

菌落原位杂交法是重组 DNA 技术中最常用的方法之一。通过一定的方法将菌落转到硝酸纤维素滤膜, 将滤膜上的菌落在原位裂解, 使释放出来的 DNA 固定在滤膜上。最后借助同位素标记的探针筛选出带有目的基因的菌落^[1]。由于硝酸纤维素膜的质量会直接影响杂交结果的好坏, 目前国内所用的滤膜大都要依赖进口。

为克服这一不足, 我们摸索了滤纸杂交法, 得到较满意的结果。

材 料 与 方 法

一、材料和试剂

杂交所用滤纸为杭州新华造纸厂生产的双圈牌定量滤纸 (直径 9cm); [γ -³²P] ATP

IV 和 XII, VII 和 XV 号染色体均被分离。II 号染色体从三联体带中分开。XIII 与 XVI, X 和 XIV 号染色体由于长度接近依然未被分开。目前只有 CHEF 分离酵母 YNN 295 得到 16 条带。其它一些菌株在不同条件下一般只能得到 11—13 条带。本工作使酵母 DCo4 的电泳核型从 11 条提高到 14 条。

cystic fibrosis^[11]、MHC^[12] 等许多真核基因组结构的分析研究。对推动分子生物学和分子遗传学研究的发展将产生深远的影响。

参 考 文 献

- 1 Schwartz DC *et al.* *Cell*, 1984; 37: 67
- 2 Carle GF *et al.* *Nucl Acids Res*, 1984; 12: 5647
- 3 Chu G *et al.* *Science*, 1987; 234: 1582
- 4 Gardiner K *et al.* *Somat Cell Molec Genet*, 1985; 12: 185
- 5 Carle GF *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82: 3756
- 6 方福德等, 中华血液学杂志, 1985; 6: 432
- 7 沈岩等, 生物化学与生物物理学进展, (待发表)
- 8 朱怡文, 实验生物学报, 1988; 21: 23
- 9 Burmeister M *et al.* *Nature*, 1986; 324: 582
- 10 Kenricks S *et al.* *Cell*, 1987; 48: 351
- 11 Collins FS *et al.* *Science*, 1987; 235: 1046
- 12 Dunham I *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 7237

进行基因组 DNA 文库构建, 染色体 DNA 限制酶物理图谱分析等许多工作都要求制备高分子 DNA。但以往的凝胶电泳方法无法区分 50kb 以上 DNA 片段的分子量。我们利用 TAFE 分别鉴定了蛋白酶消化法和 TLS 法制备的人基因组 DNA 的长度 (图 2)。这两种方法制备的 DNA 分子主要分布在 200—400kb, 最高可达 1500kb 以上, 但也有部分 DNA 降解, 小于 200kb。

目前 PFGE 技术已应用于 DMD^[9,10],

[本文于 1989 年 4 月 11 日收到]

(3000Ci/mmol) 为英国 Amersham 公司产品;限制性内切酶、聚蔗糖 400 为瑞典 Pharmacia 公司产品;聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 为英国进口分装;牛血清白蛋白为美国 Sigma 公司产品;酵母转移核糖核酸 (tRNA) 为中科院上海生化所东风生化试剂厂产品。其他试剂为国产分析纯。

二、杂交滤纸的制备

滤纸首先在紫外灯下灭菌。将干燥的滤纸覆盖在长有菌落的固体培养基上,使滤纸自然、完全湿润。应避免在滤纸和培养基间产生气泡。用 7 号注射针头在滤纸和培养基上做好标记。快速揭下滤纸,置室温或 68℃ 烤箱干燥。带有菌落的滤纸分别用 0.5mol/L NaOH, 0.5mol/L Tris. Cl(pH7.4)和 2×SSC (0.3mol/L NaCl, 0.03mol/L 柠檬酸钠, pH7.0) 各处理二次,每次 5min。方法可参考硝酸纤维素膜的处理^[2]。经过处理的滤纸在 70℃ 烘烤 30min 后即可用于杂交。

三、寡聚核苷酸探针的制备

探针用美国 Applied Biosystem 公司的 380A 型 DNA 自动合成仪合成。去载体分子和保护基团的粗产物用酚/氯仿 (1:1) 抽提后,乙醇沉淀。最后将寡聚核苷酸溶在适量的去离子双蒸水中, -20℃ 保存。探针用 [γ -³²P] ATP、T₄ 多核苷酸激酶对 5' 端进行标记。醋酸铵终止反应,游离的 [γ -³²P] ATP 经过二次乙醇沉淀除去^[3]。

四、菌落的原位杂交

将待杂交的滤纸放入盛有适量杂交液 (4ml/滤纸) 的培养皿或塑料袋中,在杂交温度 T_H 温热 10min。加入热变性的标记探针,杂交温度 (T_H) 保温、摇动过夜。

杂交温度^[4]: $T_H = T_D - 5^\circ\text{C} = (2^\circ\text{C} \times 8 + 4^\circ\text{C} \times 10) - 5^\circ\text{C} = 51^\circ\text{C}$, $T_D = 2^\circ\text{C} \times (\text{A-T 碱基对数目}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{G-C 碱基对数目})$ 。杂交液组成: 6×NET (20×NET: 3mol/L NaCl, 20mmol/L EDTA, 0.3mol/L Tris. Cl, pH8.0), 5×Denhardt's 溶液 (50×Denhardt's: 1% 聚蔗糖, 1% 聚乙烯吡咯烷酮,

1% 牛血清白蛋白), 1% SDS, 250μg/ml 热变性的 tRNA。探针比活为 $5-10 \times 10^3 \text{cpm}/\mu\text{gDNA}$, 用量为 1ng/ml 杂交液。

杂交后的滤纸用 6×NET, 0.5% SDS 在室温漂洗 10—15min, 随后在杂交温度洗 1min。更换漂洗液,重复漂洗三次。室温干燥滤纸。根据放射活性计数的高低,确定曝光时间。

* 按缺口平移法标记的探针使用量为 $1 \times 10^4 \text{cpm/ml}$ 杂交液;杂交液组成: 2×Denhardt's 溶液, 1mmol/L EDTA (pH7.0), 6×SSC, 0.5%SDS。杂交温度为 68℃。滤纸漂洗按常规方法。

结果与讨论

我们所要筛选的目的基因为肿瘤坏死因子 (TNF)cDNA。为此,选择了一长度为 18 个核苷酸的序列 3'-TCACTGTTTCGACATCGG-5' (编码 TNF 第 9 到第 14 个氨基酸) 作为杂交探针。按常规方法将目的基因 (TNF cDNA) 与克隆载体 pTL/EcoRI, Hind III 连接后,转化大肠杆菌 HB101。形成的转化菌落与转有质粒 pBR322 的菌落同时杂交。杂交结果如图 1 所示: 转有 pBR322 的菌落和载体自身的转化菌落 (箭头所示) 呈阴性结果。随机挑选 12 个阳性菌落和 1 个载体转化菌落进行快速质粒分析,经 EcoRI, Hind III 双酶解后的电泳

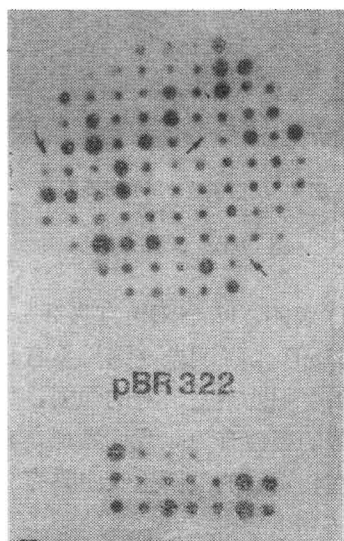


图 1 菌落杂交的放射自显影

“匀浆互补法”测试杂种优势的研究 (IV)

——对水稻杂种优势的测试

杨福愉 邢菁如 陈文雯 张靖溥

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

提 要

前曾报道,应用“匀浆互补法”替代“线粒体互补法”可以作为测试谷子、玉米和棉花杂种优势的一个生化方法。本文报道应用“匀浆互补法”测试八个水稻组合的杂种优势也获得理想的结果,准确率达 85%。

关键词 匀浆互补, 杂种优势, 水稻, 氧化活性

杂交育种仍然是选育优良品种有效途径之一,但强优势杂交种的获得一般都是在大量杂交组合与多年产量比较的基础上才能实现。为

了减少育种工作的盲目性,缩短育种周期,减轻工作量,人们都试图找出一些有效的生理生化指标来进行预测,1966 年美国 McDaniel 等^[1,2]曾

想,而滤纸则可完全将菌落转移。由于大菌落所包含的质粒拷贝数多于相应的小菌落,因此产生的杂交信号较强,减少了曝光时间(室温,2h)。此外,由于滤纸法省去了真空烤膜和预杂交操作,缩短了整个分析时间。

虽然滤纸法具有上述优点,但它并不能完全代替硝酸纤维素膜杂交法。尤其是对高密度菌落的杂交筛选。另外,滤纸的强度较差,操作过程中要仔细、小心。我们的结果表明,滤纸菌落原位杂交法在低密度菌落杂交筛选中,确为一种经济、有效的方法。

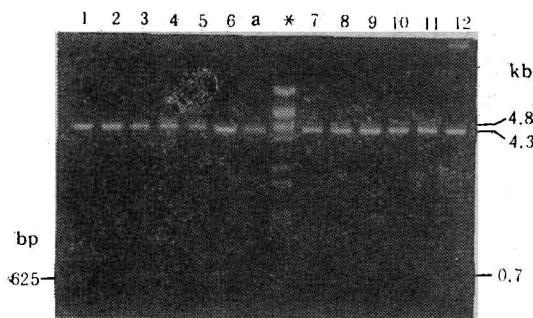


图 2 快速质粒分析的电泳图谱
a: 载体转化菌落; 1—12: 杂交阳性菌落;
*: λ DNA-BstE II

图谱(图 2)表明,12 个阳性克隆都带有 TNF cDNA (625bp)。说明杂交结果具有较好的特异性。图 1 中阳性杂交信号的强弱,可能与每一转化菌落的特性有关。我们发现具有较强信号的菌落在转膜后的重新生长中具有较快的生长速度。

硝酸纤维素膜对较大菌落的转移并不理

参 考 文 献

- 1 Grunstein M, Hogness D. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975; 72: 3961
- 2 Maniatis T *et al.* *Molecular cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982: 314—315
- 3 Maxam A M, Gilbert W. *Methods enzymol.* New York: Academic Press, 1980; 65: 499—560
- 4 Berent S L *et al.* *BioTechniques*, 1985; 3: 208

[本文于 1989 年 4 月 12 日收到]