

实验技术

硝基纤维素滤膜上 DNA-DNA 的杂交

谢德贞 林应锐

(中国科学院微生物研究所)

分子杂交技术是核酸研究中常用方法之一,利用两条核酸单链之间的同源性进行各种研究,在硝基纤维素滤膜上进行杂交反应,是比较方便可靠的方法。可用于原位杂交,将凝胶电泳得到的核酸谱带直接转移到滤膜上,进行杂交反应,可免除在溶液中进行杂交时,由于放射性标记的探针 DNA 自身复性成双链,并且混杂于杂交分子之中,不易分开而造成的误差。

1963 年 Nygarrd 和 Hall^[2] 在研究 RNA-DNA 杂种分子时,发现存在于氯化钾溶液中的变性 DNA (单链) 和 RNA-DNA 杂种分子,通过滤膜时能被滤膜吸收,变性 DNA 的吸收率达 90% 以上。而未与 DNA 杂交的 RNA 以及天然的未变性 DNA,则不被滤膜吸收。

1965 年 Gillespie 和 Spregelman^[3] 利用这一现象,设计了在滤膜上进行 RNA-DNA 杂交的方法。随后 Denhardt^[4] 又将此项技术引进到 DNA-DNA 杂交研究中。

在滤膜上杂交操作的一般步骤是,溶解在盐溶液中的 DNA 经过加热或使用碱液变性之后,在预先经盐溶液浸泡洗涤过的滤膜上滤过。变性的 DNA 便吸收在滤膜上。洗涤滤膜,经过室温干燥之后,再真空加热至 80℃ 进一步干燥。将此滤膜浸入含有放射性同位素标记的已变性的探针 DNA 混合液中,在保温下进行杂交反应,反应完毕,充分洗涤滤膜,干燥后计数测定或用放射自显影检查结果。

滤膜上杂交遇到的最大问题,是在杂交反应时,一些未与滤膜上 DNA 杂交的探针 DNA,也被滤膜吸收,造成本底过高导致结果不可靠。

Denhardt^[4] 曾将不含 DNA 的空白滤膜,浸入探针 DNA 的杂交反应混合液中,保温一定时间之后,发现占探针总数 80% 的 DNA 被吸收至滤膜上,见表 1。

表 1 各种预保温溶液的影响

预保温溶液	杂交率 %	空白本底 %
没有	65	80
0.1% Ficoll, 0.1 × ssc	7.1	2.9
0.1% Ficoll, ssc	31	5.1
0.1% Ficoll, 10 × ssc	47	5.3
0.1% 牛血清白蛋白	26.5	0.64
0.1% 聚乙烯吡咯烷酮, ssc	31	1.1
Denhardt 溶液*	52	0.64

* 由 Ficoll (平均分子量 400000), 聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone, 平均分子量 360,000) 和牛血清白蛋白分别以 0.02% 浓度溶于 3 × ssc 中配制而成。

为尽可能的减少探针 DNA 非杂交的吸收在滤膜上,许多研究者摸索了多种办法,已取得良好的效果。现归纳为三个方面。

1. 处理滤膜 在杂交反应之前,将已含有 DNA 的滤膜先浸入 Denhardt^[4] 溶液(表 1)中,在 65℃ 保温 6 小时,经过这样处理的滤膜,本底可由原来的 80% 降低至 0.64%,而且对杂交反应影响不大,杂交率仍达 52%。这一方法目前使用较多,但需要预保温处理,比较麻烦。也曾有在杂交反应溶液中分别加入焦磷酸盐、蔗糖、聚硫酸乙烯酯以及聚尿苷酸等物质,对降低本底都无效果^[4]。

2. 使用合适的杂交反应溶液,以期达到尽量减少本底又不妨碍杂交反应的目的, Demare^[5] 在对探针 DNA 的 2 × ssc 杂交溶液中,加入终浓度为 30% 的二甲亚砷,再以此溶液洗涤

杂交后的滤膜，本底可降至 0.4%。Dawid^[6] 将终浓度为 50% 的甲酰胺加至杂交反应溶液中，并用 50% 甲酰胺的 2 × ssc 溶液洗涤滤膜，本底可降低至 0.01%。杂交反应温度由原来的 65℃ 降低至 37℃。Kourilsky^[7] 使用含 8 M 尿素或 50% 甲酰胺的 2 × ssc 溶液，于 40℃ 进行杂交反应也取得良好效果。

3. 用合适的溶液洗涤杂交后的滤膜，除了上述用含有二甲亚砜或甲酰胺的溶液洗涤外，Warrnaar^[8] 还采用低离子强度，高 pH 溶液 (3 × 10⁻³ M tris-HCl, pH 9.4) 洗涤滤膜，本底降低至 0.04% (Millipore H. A. 滤膜) 和 0.1% (MF 30 滤膜)。也有使用大肠杆菌核酸外切酶 I 来洗涤处理滤膜^[9]。

上述办法基本上克服了探针 DNA 未经杂交即被滤膜吸收的困难。Flavell 等人^[12] 指出产生另一个误差的因素，就是探针 DNA 长短不一，长链与短链复性之后必然留下单链“尾巴”，如果此单链“尾巴”有足够的长度，则有可能与滤膜上的 DNA 杂交而造成误差，这种误差可达杂交分子的 10%，只有通过减少复性作用来避免。

为了使杂交反应得到满意的结果，除了降低本底之外，还要求杂交后的滤膜上能留下足够的放射性强度，以便于测量结果，同时也要求有较高的杂交率，以便在进行比较研究中，得到较大的相差数值来表现同源性的差异。也可以提高杂交率对本底的比值，有利于减少本底引

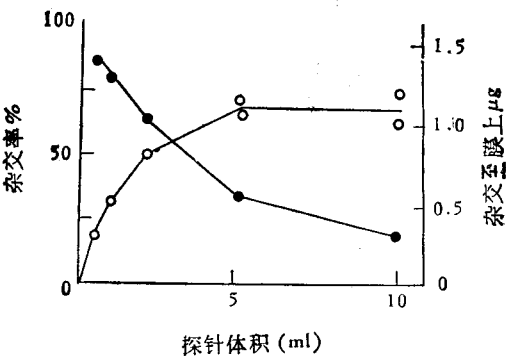


图 2 探针体积对杂交率影响
 探针: ³²P-T₇ DNA 0.6 μg/ml
 滤膜: T₇ DNA 5 μg
 “○” 杂交至滤膜上数量
 “●” 杂交率

起的误差。

除了提高探针 DNA 本身的比活性能够有效地增强滤膜留下的放射性外，还须提高探针 DNA 杂交至滤膜上的数量。现对影响杂交率和影响杂交数量的因素讨论如下：

1. 探针 DNA 数量

(1) 浓度变化，从图 1^[10] 可以见到体积恒定，探针由 0.1 μg 逐渐增加至 2 μg 时，杂交率由 75% 减少至 50%，而杂交至滤膜上的探针则由 0.75 μg 增加至 1 μg。

(2) 体积变化：从图 2^[10] 可见，当浓度保持不变，随着体积的增加，杂交率相应下降，而滤膜上的探针数量则逐渐增加。与浓度变化时所得到的结果一致。这种情况与滤膜上吸收的 DNA 数量无关。图 3^[8] 表明滤膜含有 40, 4, 0.4 μg T₄ DNA 的三条曲线形状相似，它们的杂交率都随着探针溶液体积的增加而减少。

从上面讨论可清楚地看到，无论是通过提高浓度或是增大体积来增加杂交反应的探针数量，只能增加杂交至滤膜上探针的绝对数量，而相对数量即杂交率反而下降。

不断地增加探针的数量，也不可能使滤膜上的全部 DNA 都转成杂交分子。图 4 中显示出当探针与滤膜上 DNA 之比达到 87.5% 时，滤膜上成为杂交分子的 DNA 只占全部 DNA 的 60%。曲线趋向于水平方向。

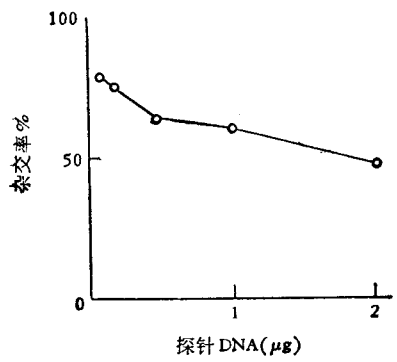


图 1 探针浓度对杂交率影响

探针: ³H-PM₂ DNA 1ml, 滤膜: PM₂ DNA 5 μg

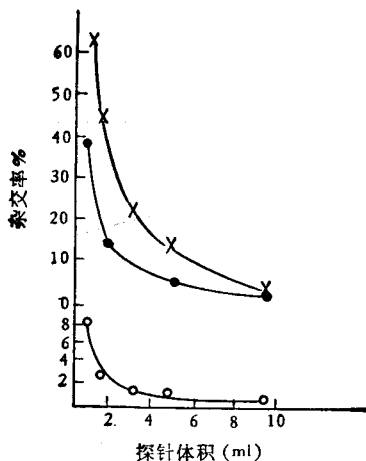


图3 探针体积对杂交率影响

探针: ^{32}P -T4 DNA $1\mu\text{g}$ 滤膜: T4 DNA
“X” $40\mu\text{g}$ “●” $4\mu\text{g}$ “○” $0.4\mu\text{g}$

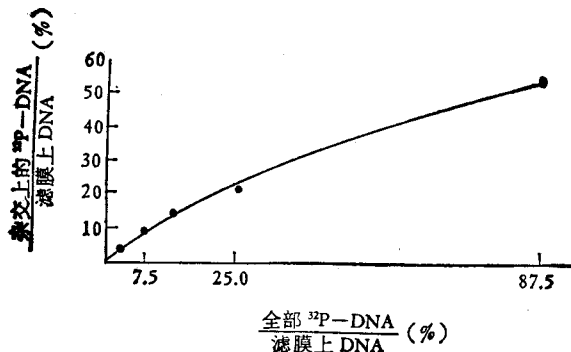


图4 探针与滤膜上 DNA 比率对杂交率影响

探针: ^{32}P -T4 DNA 滤膜: T4 DNA $0.4\mu\text{g}$

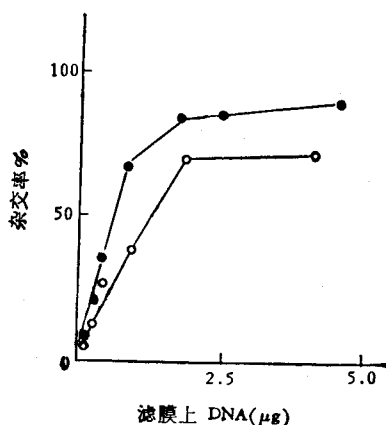


图5 滤膜上 DNA 对杂交率影响

探针: ^{32}P -T7 DNA $0.5\mu\text{g}$ 滤膜: ^3H -T7 DNA
“●” ^{32}P -T7 DNA 轻链
“○” 已变性 ^{32}P -T7 DNA 双链

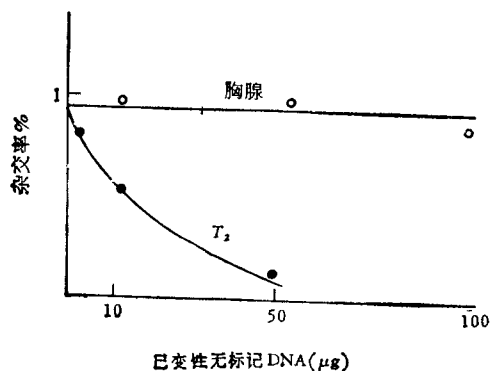


图6 探针中杂质对杂交率影响

探针: ^{32}P -T₂ DNA $1\mu\text{g}$, 加入杂质
“○” 小牛胸腺 DNA “●” T₂ DNA
滤膜: ^3H -T2 DNA $20\mu\text{g}$

2. 滤膜上 DNA 数量 在探针溶液保持不变情况下, 杂交率随着滤膜上 DNA 的增加而增加。杂交率增加至一最大值之后就不再受滤膜上 DNA 数量的影响了(图5)^[12]。

3. 无标记的变性 DNA 杂质 图6^[5]表明, 在杂交反应溶液里, 与滤膜上的 T₂ DNA 没有互补性的小牛胸腺 DNA, 虽然浓度等于探针的 100 倍, 也不会影响杂交率。而有同源性的 T₂ DNA 的存在, 则严重地降低杂交率, 同样, 存在于滤膜上的 DNA 杂质, 只要它与探针无同源性也不影响杂交率, 见表 2。

Warnaar^[8] 曾指出, 当滤膜上的 DNA 与探针没有互补性时, 探针被吸收到滤膜上的数量比吸收至空白对照滤膜上的数量更少。即比本底数值更小。

表2 滤膜上杂质对杂交率的影响

滤膜上的杂质 (小牛胸腺 DNA)	滤膜上 T ₄ DNA (μg)		
	4	0.4	0
0	5.2	0.8	
10 μg	8.9	1.2	0.04
40 μg	6.2	0.95	0.04

探针: ^{32}P -T4 DNA, $1\mu\text{g}$, 表中数字是杂交率(%). 小牛胸腺 DNA 是变性后固定到滤膜上的。

4. 探针扩散作用 Flavell 等人^[10]认为 DNA-DNA 在滤膜上的杂交反应有二种形式,

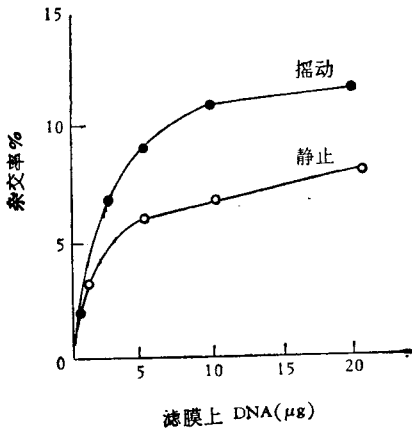


图 7 摇动对杂交率的影响

探针: 重链 ^{32}P -T7 DNA 0.25 μg 1 ml
滤膜: T7 DNA

当探针 DNA 与滤膜上 DNA 比值较小时, 杂交反应速度受到探针扩散速度限制。可能是因为一定时间内, 扩散到达滤膜上的探针分子数目, 少于同一时间内滤膜上可能与探针完成杂交反应的分子数目。另外一种形式是探针 DNA 与滤膜上 DNA 比值较大, 这种情况与前一种情况完全不同。杂交速度与探针扩散速度无关。实际使用时, 常常采用尽可能低的比值, 使杂交反应受扩散作用控制, 增加探针扩散速度有利于加速杂交反应, 提高杂交率。影响扩散速度的因素有以下几个方面:

(1) 摇动: 在低比值的情况下, 摇动反应容器, 直接加快扩散速度, 无论探针是纯粹的重链(不存在复性反应)(图 7^[10])或是已变性的双链(图 8^[10]), 都将加快杂交速度, 表现为有较

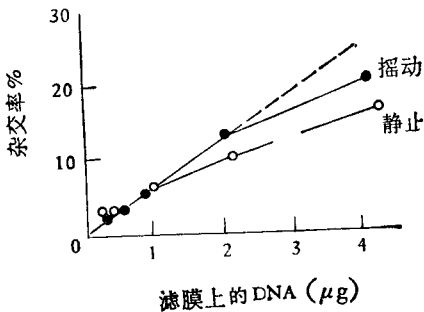


图 8 摇动对杂交率的影响

探针: ^{32}P -T7 DNA 0.25 μg 滤膜: T7 DNA
杂交反应 20 分钟

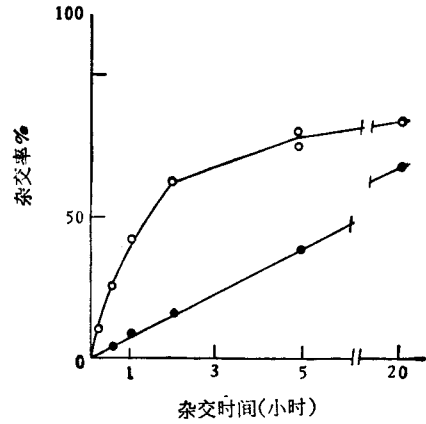


图 9 分子量对杂交率的影响

探针: ^{32}P -T7 DNA 0.25 μg
“○” 轻链 3×10^5
“●” 重链 8×10^6
滤膜: T7 DNA 2.5 μg

高的杂交率。但是当比值减低到一定程度之后(图 8 中为 0.25 μg 比 2 μg), 杂交速度的加快程度已不再随滤膜上的 DNA 增加而增加。在图 8 中表现为摇动曲线已不再沿虚线延伸而是与静止曲线平行。

(2) 探针分子量: 分子量越小, 扩散速度越大。另一方面 Wetmur^[11] 等证明分子量变小将降低复性速度, 有利于提高杂交率。图 9 和 10^[10]充分反映出这种情况。而且当探针是有复性可能的变性 DNA 双链时(图 11), 降低分子

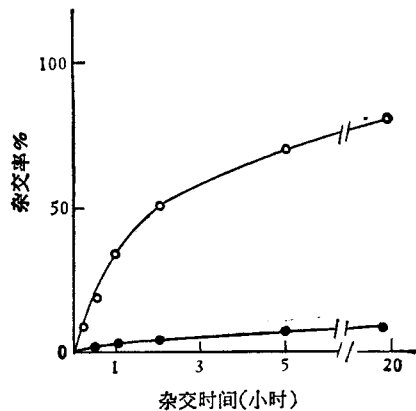


图 10 分子量对杂交率的影响

探针: ^{32}P -T7 DNA 0.5 μg
“○” 小分子 3×10^3
“●” 大分子 8×10^5
滤膜: T7 DNA 2.5 μg

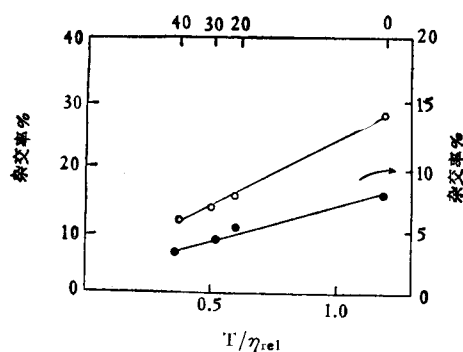


图 11 粘度对杂交率的影响

探针: 声波破碎 ^{32}P -T7 DNA

滤膜: T7 DNA “●” 0.5 μg “○” 5.0 μg

量,既能增加扩散速度又能降低复性速度,皆有利于提高杂交率,使杂交率的提高比纯粹为某种单链探针(图 10)时更为显著。Denhardt^[4] 用 0.06 μg 的 ^3H λ DNA 杂交至含有 1.5 μg λ DNA 滤膜上,经声波粉碎过的 ^3H λ DNA 杂交率为 38% 而未经处理的 ^3H - λ DNA 的杂交率只有 15%,再次表明减少探针分子量对提高杂交率的好处。

(3) 粘度 杂交反应溶液中粘度增加即溶液中探针扩散速度下降,既不利于复性反应也不利于杂交反应,而对杂交反应影响更大。图 11 表明杂交率随着溶液中蔗糖浓度增加即粘度增加而下降的情况。

5. 其他影响 杂交反应时,温度、pH 和时间都会影响杂交率。一般常用的温度在 65 $^{\circ}\text{C}$

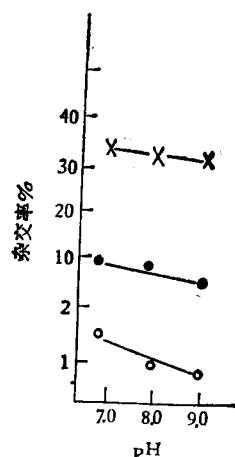


图 13 pH 对杂交率影响

探针: 声波破碎 ^{32}P -T4 DNA 1 μg

滤膜: T4 DNA “X” 40 μg “●” 4 μg “○” 0.4 μg

左右,温度对杂交率影响见图 12^[8]。杂交反应溶液中的成分也将影响杂交的温度。如前所述加入二甲亚砜或甲酰胺时都将降低杂交反应温度。在较低温度下进行杂交反应,为了提高杂交率,可适当延长反应时间。

杂交反应经常是在 pH 7 或稍高一点之下进行的。pH 变化对杂交率的影响见图 13^[8]。

归纳上述各项影响因素,为了做好杂交反应,采取以下几项措施是非常必要的。

1. 采用上述的任何一种方法来降低滤膜底是绝对必要的。

2. 尽可能使探针有较高的放射性强度,尽量降低探针与滤膜上 DNA 的比值。

3. 将探针 DNA 切成较短的片段。

4. 必要时摇动杂交反应容器,减少杂交溶液的粘度。

5. 避免混入未标记而与探针或滤膜 DNA 有互补性的 DNA 或 RNA 杂质。

6. 正确操作,滤膜使用前必需用过滤 DNA 溶液时相同的溶剂浸泡和吸滤洗涤,以便除去滤膜制造过程中加入的润湿剂和甘油等物质。直接使用未浸洗的滤膜有可能造成较高的本底,过滤 DNA 溶液时,吸滤速度要合适,必要时可重复过滤一次,使更多的 DNA 吸收在滤膜上。同时应避免在过滤过程中 DNA 复性。

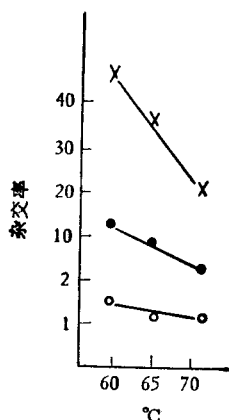


图 12 温度对杂交率影响

探针: 声波破碎 ^{32}P -T4 DNA 1 μg

滤膜: T4 DNA “X” 40 μg “●” 4 μg “○” 0.4 μg

吸收了 DNA 的滤膜,必须先于室温下干燥之后再在真空下加热进一步干燥。以避免在干燥过程中滤膜上 DNA 自身复性。干燥过的滤膜与 DNA 结合得更紧,可减少在杂交保温反应过程中从滤膜上失去,杂交后滤膜必须彻底洗去未杂交的探针。

本文承蒙周光宇先生审阅,谨此志谢。

参 考 文 献

- [1] Nygaard, A. P. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **12**, 98, 1963.
- [2] Nygaard, A. P. et al.: *J. Mol. Biol.*, **9**, 125, 1964.
- [3] Gillespie, D. et al.: *J. Mol. Biol.*, **12**, 829, 1965.

- [4] Denhardt, D. T.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **23**, 641, 1966.
- [5] Demare, J. L., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **28**, 550, 1967.
- [6] Dawid, L. B.: *Biochem. Biophys. Acta*, **477**, 191, 1977.
- [7] Kourilsky, P. et al.: *Biochimie* **53**, 1111, 1971.
- [8] Warnaar, S. O. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **24**, 555, 1966.
- [9] Rioharel, O. C.: *Proc Nat. Acad Sci U.S.* **57**, 156, 1967.
- [10] Flavell, R. A., et al.: *Eur. J. Biochem.*, **47**, 535, 1974.
- [11] Wetmur, J. G. et al.: *J. Mol. Biol.*, **31**, 349, 1968.
- [12] Flavell, R. A.: *Eur. J. Biochem.*, **47**, 545, 1974.

[本文于 1981 年 7 月 2 日收到]

*PEI-纤维素薄层层析法在分离单核苷酸上的应用

吴冠芸 方福德 杨善蓉

(中国医学科学院基础医学研究所生化及分子生物学研究室)

碱基、核苷和核苷酸的分离及定量分析在核酸代谢、核酸结构和药物作用原理的研究中以及核苷酸(包括标记物)的制备,纯化和鉴定等方面都十分重要。但是对于象 NDP, NTP, dNDP、dNTP 的复杂混合物的分离,用纸层、柱层、电泳等方法均有一定困难。应用高压液相层析虽能得到满意的分离效率,但所需的仪器价格昂贵,设备条件要求严格,一般实验室难以具备。因此到目前为止,PEI*-纤维素薄层层析法^[1,2],分离这样复杂核苷酸的混合物仍是公认的理想方法。关于该法的建立和应用,国内尚未见专文报道。我们在研究药物对细胞核苷酸代谢的影响的工作中,建立了本方法,并在原法基础上,摸索了一些更适宜的条件,还就国产微晶纤维素和进口纤维素对层析效果的影响做了对比,提出了使用国产纤维素的方法。

材 料 和 方 法

1. 材料和试剂

(1) 纤维素: Cellulosepuler MN 300, 西德

产品;薄层用微晶纤维素:上海试剂二厂产品和中国科学院生物物理所试剂厂产品,使用前需经预处理,方法是:100 ml 0.1 N HCl 浸泡 20 g 纤维素 1 小时,倾去上清,弃去残渣,用蒸馏水将纤维素洗至中性再使用。

(2) PEI: Polymin P 含量 100% BASF (西德)产品。

Polymin P 50% 水溶液 SERVA (西德)产品。

(3) PEI-Cellulose 分析纯 SERVA (西德)产品。

(4) 核苷酸(钠盐): ATP、ADP、AMP 为上海生化所东风试剂厂产品,其它均为西德 SERVA 产品。

(5) 溶剂系统所用试剂均为分析纯。

2. PEI-纤维素薄层板的制备

1 g 100% PEI 加水至 100 ml, 用浓 HCl 数

* PEI: 聚乙烯亚胺。