

杂交选择的离体翻译

杨 岐 生

(中国科学院生物物理研究所)

在基因工程技术中,鉴定一个克隆的 DNA 片段对于了解它的性质是十分重要的。“杂交选择的离体翻译”是鉴定一个 DNA 片段的有效方法之一,已被广泛应用。如鉴定从人的柯斯质粒基因库分离的一种类似 α_1 (I) 胶原蛋白的基因^[1], 分析了小白鼠胚胎肝的一种新的 β -珠蛋白 cDNA 基因的序列^[2]、兔肝 $\alpha 2\mu$ 球蛋白基因^[3]和小白鼠红系细胞非珠蛋白 cDNA 的一些克隆^[4]等。

方法的原理是一已知或待测 DNA 片段被固定在滤纸上,与总的 mRNA 群体杂交,挑选出与此 DNA 互补的 mRNA,再在离体翻译系统对选择出来的 mRNA 进行离体翻译反应,对产物蛋白质作凝胶电泳或免疫反应等分析,鉴定其产物,从而了解原来 DNA 片段的编码情况。与“杂交阻碍翻译 (HART)”相反,杂交选择的方法是 mRNA 的杂交正选择。所以根据这一原理,可以从一个复杂的总 mRNA 群体中选择得到某种基因所产生的 mRNA 分子,成为分离和纯化某种 mRNA 的很好手段。

目前,杂交选择 mRNA 有采用硝基纤维素滤纸^[5-7]和活化的纤维素滤纸等两种方法,活化的滤纸有 DBM-滤纸^[8,2]和 DPT-滤纸^[9]。这些方法各有优缺点。硝基纤维素滤纸来源方便,结合 DNA 的容量大,能得到较多的 mRNA,但 DNA 容易从滤纸上脱落,特别当较长的 mRNA 分子杂交时, DNA 脱落得更严重。DBM 滤纸制备手续较复杂,容量比硝基纤维素滤纸要小,结合反较缓慢,但 DNA 共价结合到 DBM 基团上后很不容易脱落,滤纸可以重复使用多次,因此同一滤纸可用于几个不同探针的杂交。DPT 滤纸的制备比 DBM 更容易,

稳定性更好。

本文主要介绍用 DBM-滤纸进行“杂交选择离体翻译”的基本步骤。它主要包括下述五个方面。

一、DBM-滤纸的制备

原理可参考文献(10)(11)。

Whatman 540 号滤纸切成 14×25 cm, 放在平底玻璃盘 (25×25 cm) 内。下面的操作应戴乳胶手套和在通风柜中进行。用含有 1.6 克 N-(3-硝基苯甲氧)-吡啶盐酸盐(NBPC)和 0.5 克乙酸钠的 20 毫升溶液处理滤纸,注意除去滤纸下面的气泡,浸泡十分钟以上。然后滤纸在 60°C 烘箱中加热 10 分钟,使滤纸变干。转移到 135°C 烘箱中加热 30—40 分钟, 135°C 以下会使反应不完全。室温下 (20°C), 滤纸在玻璃盘中用蒸馏水振荡洗涤数次,共 20 分钟。用丙酮洗三次,共 20 分钟,空气干燥,这样得到硝基苯氧基 (NBM)-滤纸是稳定的。可在 -20°C 贮存数月。

NBM-滤纸用 300 ml 20% (W/V) 连二亚硫酸钠的水溶液在 60°C 水浴中缓慢振荡处理 30 分钟,使 NBM 还原。室温下用大量蒸馏水振荡洗涤 20 分钟,换用数百毫升 30% (V/V) 乙酸洗 20 分钟,再用蒸馏水洗若干次,直到没有 H_2S 气味为止。得到的氨基型 (ABM-) 滤纸在 4°C 只可贮存二星期。滤纸切成直径 10 mm 的小圆片。

ABM-滤纸小圆片 20 张用 33 毫升冷却的含 1.2M 盐酸和 0.9 毫升新制备的亚硝酸钠 (10 mg/ml) 混合液浸没,在冰浴中振荡 30 分钟或稍长时间。然后用 20 毫升冷蒸馏水洗 5 分钟,

换水洗5次。再用20毫升4℃1M乙酸钠(pH 4.0)溶液振荡洗涤2次,每次20分钟。这时滤纸变得越来越黄褐色,得到活化了的重氮苄氧基(DBM)滤纸。制备成的DBM-滤纸必须在15分钟内使用。否则需用1.2M HCl洗涤,再用4℃乙醇和乙醚洗涤,滤纸变干后贮存在-20℃可达1个月,使用前再用1M乙酸钠浸泡即可。

二、DNA 结合到 DBM 滤纸上

要研究的DNA是含有某一基因片段(如cDNA)的重组质粒,先用限制性内切酶酶切成线状分子,或碱处理打开几个缺口,用限制性内切酶酶切时,要考虑到不要把完整的基因序列切断,应选用在基因DNA中没有切点的酶。酶解后需用苯酚-氯仿除去蛋白质,并用乙醇沉淀。

一张直径10mm的DBM-滤纸小圆片可用20微克左右的DNA处理(每平方厘米DBM滤纸能结合15—25微克单链DNA)。每20微克DNA沉淀溶于75微升水中,在100℃加热5分钟,投入干冰-乙醇浴中冷却,使DNA变性成单链。再加入75微升1M乙酸钠(pH 4.0)溶液。在平底小试管(或多孔培养板, Eppendorf管)内4℃振荡处理18小时,使DNA与DBM-滤纸充分结合。DNA的结合也可以改用点滴法,即将DNA溶于小体积的水,直接点滴到已用20mM乙酸钠(pH4)处理过的DBM圆纸片上,空气中干燥,再置于Eppendorf管保存12—16小时,使充分结合。

DNA-DBM-滤纸片用蒸馏水洗二次,然后用0.4M NaOH在37℃简短处理滤纸4次,以除去未结合的DNA(或上一次杂交后未洗脱的残留mRNA),蒸馏水洗数次,用3mm滤纸吸干。

三、DNA-DBM-滤纸与 polyA⁺-mRNA 杂交

杂交方法见文献[2]。

DNA-DBM-滤纸小圆片分别用预杂交溶

液进行预杂交。预杂交溶液为0.75M NaCl-0.1M Tris-HCl(pH7.5)-1mM EDTA-0.5% SDS-200微克/ml酵母(或小麦胚)tRNA-100微克/ml多聚核糖核酸A-50%甲酰胺(去离子)。

其中NaCl、Tris-HCl(pH7.5), EDTA和SDS等四个组分可以在一起配成三倍浓度的母液,使用前加入100%去离子的甲酰胺和其它组分。

在1.5ml Eppendorf管或多孔培养板的小孔内,每一滤纸片分别用150微升预杂交溶液在42℃振荡培养5小时,然后吸去此溶液。

滤纸片用总polyA⁺-mRNA制备物进行杂交。杂交溶液与预杂交相同,只是在预杂交溶液中加入polyA⁺-mRNA。每一张纸片的杂交溶液含有10—15微克mRNA,溶液应尽量减小体积,不超过150微升。有人把含mRNA的杂交溶液先在70℃水浴加热10分钟,投入DNA-DBM-滤纸再在42℃时振荡18小时。或者把mRNA样品滴加到DNA-DBM-滤纸上,再在上述小体积的预杂交溶液中振荡培养。

四、洗脱 PolyA⁺-mRNA

杂交后,滤纸片转移到干净的1.5ml Eppendorf管内,用0.6—1ml下述的洗涤溶液按次序振荡洗涤。已用过的mRNA杂交溶液可以保存供下次杂交时再使用。

滤纸片先用1×SSC-0.5% SDS-2mM EDTA溶液在20℃洗涤二次各5分钟;用相同洗涤溶液在60℃洗三次各5分钟;再用0.1×SSC-0.1% SDS-2mM EDTA溶液在60℃洗涤三次各5分钟;最后用10mM Tris-HCl(pH7.5)-2mM EDTA溶液在60℃洗涤二次各5分钟。

上述的洗涤步骤也可改为用50%甲酰胺-4mM Tris-HCl(pH7.5)-0.2mM EDTA-20mM NaCl-0.1% SDS溶液,在37℃洗10次,每次1ml。

洗涤后用洗脱溶液把polyA⁺-mRNA从RNA·DNA杂交的DBM滤纸片上洗脱下来。洗脱缓冲液含有95%甲酰胺(去离子)-

12 mM Tris-HCl (pH7.5)-2mM EDTA, 或者 99% 甲酰胺-10pmM Tris-HCl (pH7.8)。

每一纸片先用 100 微升洗脱缓冲液在 42℃ 振荡 15 分钟,再用 100 微升进一步洗涤。两次被洗脱的 mRNA 溶液合并在 1.5 ml Eppendorf 管内。加入 1/15 体积的 4M 乙酸钠 (pH6), 3 微克小麦胚 tRNA 和 5 倍体积冷的无水乙醇 (1毫升)。在 -70℃ 放置 20 分钟或过夜。

离心 13,000—15,000 rpm, 15 分钟。沉淀用 70% 乙醇洗二次。真空干燥除去残余的乙醇。每个管内的 mRNA 样品溶于 2 微升灭菌重蒸馏水中。可暂时保存在 -20℃, 准备下一步离体翻译。

已洗去 mRNA 的 DNA-DBM 滤纸经水洗两三次后,空气干燥,在室温下真空贮存。可以用于同一种 polyA⁺-mRNA 的杂交选择。也可以用 0.4 M NaOH 在 37℃ 洗 5 分钟,共洗 4 次,除去残留的 mRNA,再用水洗 5—6 次。保存在 -20℃ 预杂交溶液内或真空干燥,可以重复使用数次仍不失去结合能力。

五 polyA⁺-mRNA 的离体翻译

离体翻译可用兔网织细胞提取物^[12,13]和小麦胚提取物^[14,15]作为反应体系。关于它们制备方法可参考有关的资料。

翻译反应一般用 ³⁵S-甲硫氨酸作标记或同时使用 ³H-亮氨酸和 ³⁵S-甲硫氨酸两种标记。如果 ³H-亮氨酸的体积较大,可以先冷冻干燥,再加入其它组分。从每一滤纸片洗脱得到的 mRNA,分别组成一个离体翻译反应,各需 15 微居里 ³H-亮氨酸和 20 微居里 ³⁵S-甲硫氨酸。

以小麦胚提取物为例。每个反应体积为 15 微升,组成可以如下:

杂交选择的 polyA ⁺ -mRNA	2 微升
除甲硫、亮氨酸外的其它氨基酸混合物	1 微升
翻译的盐溶液	3 微升
³⁵ S-甲硫氨酸 20μCi	2 微升
³ H-亮氨酸 15μCi	0
小麦胚提取液 S-30	8 微升

其中翻译的盐溶液含有 0.3 M KCl, 5mM 乙酸镁, 2mM ATP, 1mM GTP, 40mM 磷酸肌酸, 10mM DTT, 120 Hepes (pH7.6), 3mM 亚精胺(游离碱)。

整个翻译反应的实验需要设置适当的对照,如不加 polyA⁺-mRNA 以及不含 mRNA 编码 DNA 片段的质体运载体 DNA (如 pBR 322, pAT153 等),也经过杂交选择的同样操作步骤,得到 mRNA 空白的样品,分别作为离体翻译反应的对照组。这些对照用于测定放射性计数的本底和排除可能存在的系统误差。

反应在 30℃ 保温 60 分钟。反应结束后,要对产物进行鉴定,首先要根据 ³⁵S-甲硫氨酸的掺入量测定 polyA⁺-mRNA 的翻译活性,然后通过单向及双向凝胶电泳找出 mRNA 的翻译产物蛋白质的电泳点,并且对这个蛋白质产物作免疫反应的分析。这里只简单地介绍放射性标记掺入的测定和单向凝胶电泳的方法。

从每管样品取 1—2 微升测定 ³⁵S-甲硫氨酸和 ³H-亮氨酸的掺入量 (cpm), 其余 13—14 微升进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1 或 2 微升翻译混合物的样品分别加入到含 1 毫升蒸馏水的小试管中(玻璃管经过硅烷化处理),加入 0.5 毫升 1MNaOH 溶液(含有非同位素标记的 1 mg/ml 甲硫氨酸和 1mg/ml 亮氨酸),混匀后在室温 (20℃) 放置 5 分钟。加入 50 微升 30% (V/V) 过氧化氢,室温下再放置 10 分钟,使 tRNA 携带的 ³⁵S-甲硫氨酸和 ³H-亮氨酸与 tRNA 分子脱离。

各个样品用 300 微升 100% TCA 沉淀蛋白质,冰浴保温 10 分钟。沉淀的蛋白质用玻璃滤纸 (Whatman GF/B) 抽气过滤,接着用 2×5ml 10% TCA 和 2—5 ml 无水乙醇洗涤滤纸。滤纸烘干后进行液闪测定。

剩余的 13—14 毫升翻译混合物中加入等体积 2 倍浓度的样品缓冲液(1×样品缓冲液=4M 尿素-1.4 Mβ-巯基乙醇-5% (V/V) 乙酸-15% 蔗糖-0.5% 溴酚蓝)。沸水中处理 30 秒钟,冰浴迅速冷却。在含有 12.5% 丙烯酰胺, 6.25M 尿素, 5.4% (V/V) 乙酸的聚丙烯酰胺

凝胶中进行电泳。电泳结束后,凝胶用500毫升10% TCA-10% 乙酸-30% 甲醇-2.5% 甘油溶液固定过夜。再用放射自显影增强剂(如EN³HANCE)在通风柜中处理1小时,水洗两次(2×15分钟),最后,真空干燥使凝胶平板成为透明薄膜。—70℃放射自显影数天。当在凝胶电泳中可以观察到杂交选择的 polyA⁺-mRNA 出现新的蛋白质带之后,才可以通过其它方法对它进一步作鉴定。

参 考 文 献

- [1] Weiss, E. H. et al.: *Nucleic Acids Res.* 10, 1981, 1982.
- [2] Aftara, N. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 9, 3061, 1981.
- [3] Kurtz, D. T. and Nicodemus G. F.: *Gene*, 13,

145, 1981.

- [4] Aftara, N. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 11, 931, 1983.
- [5] Ricciardi, R. P. et al.: *PNAS.*, 76, 4927, 1979.
- [6] Cleveland, D. W. et al.: *Cell.*, 20, 95, 1980.
- [7] Parnes, J. R. et al.: *PNAS.*, 78, 2253, 1981.
- [8] Goldberg, M. L. et al.: "*Methods in Enzymology*" Vol. 68, 206, 1979.
- [9] Seed, B. *Nucleic Acids Res.*, 10, 1799, 1982.
- [10] Alwine, J. C. et al.: *PNAS.*, 74, 5350, 1977.
- [11] Alwine, J. C. et al.: "*Methods in Enzymology*" Vol. 68, 220, 1979.
- [12] Pelham, H. R. B. and Jackson, R. J. *Eur. J. Biochem.*, 67, 247, 1976.
- [13] Berns, A. J. M. and Bloementhal, H.: "*Methods in Enzymology*" Vol. 30F. 675, 1974.
- [14] Kurtz, D. T. et al.: *Biochemistry*, 15, 1031, 1976.
- [15] Robert, B. E. and Paterson, B. M.: *PNAS.*, 70, 2330, 1973.

(本文于1983年3月30日收到)

限制性内切酶 MboI 的提取与纯化

蔡良琬 熊伟军

(中国医学科学院基础医学研究所)

限制性内切酶 MboI 切开序列为 5'-G-T-A-C-3', 因为它只识别这四个碱基对, 所以它的切点比较多, 片段比较小, 在核酸结构分析中是一种比较常用的限制性内切酶。关于 MboI 的提取主要根据 Gelinis R. E., Brown, N. L. Endow, S. A. 等人报道的方法^[1,2,3], 并进行了一定的改进。我们成功的配制了适用的脑心浸出液, 适用于国内生产的需要。所得到的 MboI 经过鉴定证明能用于核酸结构的分析。

一、材料和方法

1. 材料

菌种 *Moraxella, bovis* ATcc10900 (来源于英国)。

试剂 磷酸纤维素 p11 [Whatman p11] Bio-GelA-0.5M [BioRad], 其余均为国产分析纯试剂。

2. 脑心浸出液的配制

取 200 克去组织的小牛脑组织切成小块加水 200 毫升, 4℃ 浸泡过夜。8 磅(116℃) 20 分钟, 冷却后用纱布过滤, 0.1 N HCl 调 pH 到 4—5。使混合物沉淀为絮状后, 快火煮沸, 冷却过滤, 取滤液备用。另取 250 克心肌肉搅碎, 加入 250 毫升水, 4℃ 过夜, 用 8 磅(116℃) 20 分钟灭菌后, 快火煮沸, 冷却后过滤, 取滤液备用。将以上二种滤液混合后, 加入蛋白胨 10 克, 葡萄糖 2 克, NaCl 5 克, Na₂HPO₄ 2.5 克, 辅酶 I 每毫升 2 微克, 氯高铁血红素每毫升 10 微克, 用 NaOH 调节 pH7.4, 定容为 1000 毫升, 然后 8 磅灭菌(116℃) 30 分钟。

3. 氯高铁血红素的制备

将脱纤羊血 100 毫升, 滴加在煮沸含有 0.1 克 NaCl 的 400 毫升冰醋酸溶液中, 温度保持在 100—105℃, 然后继续加热 10 分钟, 放置过