

技术与方法

用双向 Southern 转移-杂交法进行克隆的基因分析

张 红

(上海医科大学生物物理教研室)

提 要

用双向 Southern 转移和分子杂交方法,分析证明了 SRSV 有关的克隆 pSF11 插入子含有 LTR 结构、非编码区、gag 基因和部分 env 基因。并讨论了该方法的优缺点。

分子克隆是获取所需基因材料的现代方法。体外重组完成后,对所筛选到的克隆进行分析、鉴定插入子所含有的基因是必不可少的。小鼠 SRS 白血病病毒 (SRSV) 是由我国 T-S-Z 系统中 L 6565 小鼠白血病胸腺细胞悬液接种于正常昆明种小鼠腹腔后形成的淋巴型腹水瘤株,于 1985 年感染 NIH/3T3 细胞后,建立了 SRSV 感染的细胞株^[1]。SRSV 是一株逆转录病毒,完整的逆病毒基因组均有 5'LTR-gag-pol-env-LTR3' 的结构和排列^[2]。在完成 SRSV 全长 DNA 的大片段分子克隆的基础上,利用双向 Southern 同时转移法,将已知基因片段转移到两张混合纤维素酯滤膜上,分别与放射性同位素标记的插入子 DNA 及已知基因 DNA 进行分子杂交。由于两张滤膜上 DNA 片段的高度对称性,所以直接比较杂交膜的放射自显影结果,便可了解重组子中插入 DNA 所含的基因。

材 料 与 方 法

一、分子克隆的建立: (详见另文发表)

从小鼠 SRS 白血病病毒(上海医科大学病理生理教研室提供)新鲜感染的 NIH/3T3 (美国加州大学, Irvine 分校, Hung Fan 教授提

供)中提取游离的,由 SRSV mRNA 逆转录而成的前病毒 DNA。经凝胶电泳纯化后,利用 BamHI 粘性末端,将一 5.0 kb 的前病毒 DNA 片段重组入 pBR322 BamHI 位点,筛选到一克隆 pSF 11。

二、双向 Southern 转移和分子杂交

1. pMLV1a 重组质粒 (Hung Fan 教授提供,内含有 Moloney 小鼠白血病病毒完整基因组)中 MMLV 所有基因和调控部分 DNA 用 HindIII, PvuII, PstI, BamHI 四个限制性内切酶完全酶解,经 1.4% Agarose 凝胶电泳过夜 (1 V/cm),按通常的 Southern 转移法要求预处理凝胶。

2. 预处理过的凝胶两面依次、对称地铺上与凝胶面积同样大小的混合纤维素酯滤膜 (上海医药工业卫生研究院生产)、普通滤纸、6 cm 厚的吸水纸。实际操作是在一水平的瓷盘中由底往上铺。铺完后在上部压约 500g 的平底物。转移进行 6 小时,其间不更换吸水纸。

3. 转移后的滤膜按一般方法处理后,一张与 ³²P-标记的 MMLV DNA 探针杂交,另一张与 ³²P-标记 pSF II 重组质粒插入子 DNA 探针杂交。杂交采用甲酰胺系统,42℃预杂交 4 小时,杂交 16 小时,洗脱用 2 × SSC + 0.1%

SDS 室温洗两次,每次 15 分钟,42℃洗两次,每次 20 分钟。杂交后的滤膜分别对 X 光片曝光 1 天和 5 天。DNA 针标记采用缺口标记法 ($^{32}\text{PdcTP}$, Amersham, 800Ci/mmol)^[3]。

结 果

MMLV 基因结构如图 1 左所示。纯化的 MMLV DNA 经 HindIII, PvuII, PstI, BamHI 完全酶解后,在紫外灯下可见凝胶电泳后的酶解片段(右图中 2),其大小由图左中限制性内切酶位点间的数字表示。片段经双向 Southern 转移到两张混合纤维素酯滤膜上,而得到两张镜像对称的转移膜。分别与 ^{32}P -标记

MMLV DNA 探针杂交(图中 5, 6),与 ^{32}P -标记的 pSF 11 重组质粒的插入子 DNA 探针杂交(图中 3, 4)。直接比较同源性杂交结果,后者有 1643 bp, 977 bp, 306 bp, 272 bp 等四条带不杂交,而 MMLV 基因中,这四条片段为 pol 基因的大部及 env 基因的部分区域,表明克隆的 SRSV 片段中不含有相应的基因部分。杂交的片段有 1793 bp, 693 bp (MMLV DNA 上为 gag 基因和 pol 部分基因)和 819bp,190 bp (MMLV DNA 上为非编码区和 LTR) 以及 1210 bp (MMLV DNA 上为 env 部分基因)。表明克隆的 5.0 kb SRSV DNA 片段中含有 LTR 结构,非编码区,gag 基因和部分

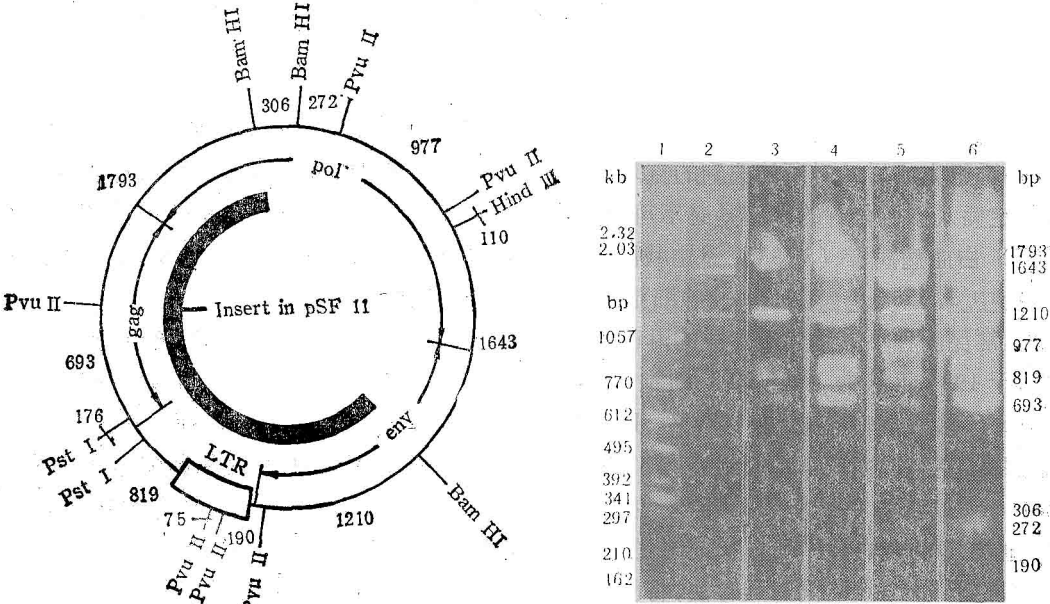


图 1

图左: MoMLV 基因组: 全长为 8264 bp, LTR 长度为 594 nt。图右: 双向 Southern 转移限制性内切酶解的 MoMLV DNA。MoMLV DNA 用 HindIII + PstI + PvuII + BamHI 酶解(2),同时转移至两张混合纤维素酯膜上并且与 ^{32}P -标记的 pSF11 DNA (3) 和与 ^{32}P -标记的 MoMLV DNA (5) 杂交。(4, 6) 为经 5 天曝光的放射自显影。(1) 是 λ DNA-HindIII + ϕ XRF DNA-HincII 酶解物作为标准。

env 基因。

讨 论

本方法所得到的两张转移膜来源于同一电泳凝胶,因而 DNA 片段在两张膜上保持有高度的同一性。用不同的放射性 DNA 探针进行同源杂交,直接对照比较杂交结果,可迅速、可

靠地检出待分析克隆 DNA 所含有的基因或顺序。该方法可作为定性分析手段而应用于其它 DNA 分析的实验。转移是依赖胶中所含溶液进行,无需其它转移溶液。0.7% Agarose 凝胶中的 DNA 一般在 3—4 小时内即可转移完全^[4],本实验证明对浓度为 1.4% 厚度为 0.8 cm 的 Agarose 凝胶在 6 小时内亦可转移完全。本方

凝胶柱层析测定半乳糖苷转移酶的简易方法

陈玲妹

Finn Wold

(上海医科大学法医学教研室)

(美国德克萨斯大学医学院生物化学与分子生物系)

提 要

半乳糖苷转移酶催化转移 UDP-半乳糖上的半乳糖苷到葡萄糖或乙酰氨基葡萄糖上,形成乳糖类化合物。本法采用一根 Bio-gel P-2 小玻璃柱 (0.3×45 cm) 可以将产物乳糖与底物清楚地分开,为该酶活性的测定提供了一个简便的精确的新方法。

半乳糖苷转移酶 (UDP-galactose; D-glucose-4- β -galactosyl Transferase, EC2.4.1.22) 能催化转移半乳糖苷到葡萄糖、乙酰氨基葡萄糖和复杂寡糖链的末端乙酰氨基葡萄糖残基上。该酶活性的测定,在实验室内有着广泛的应用。因为它是高尔基体的标记酶^[1,2];它出现在许多组织与体液中^[3-6];该酶的血清同功酶与某些类型的肿瘤有关^[7]。

目前测定该酶的方法有:(1)用高压电泳法将放射标记的底物 UDP-半乳糖与形成的放射产物分开^[2,8]。但底物的化学分解产物半乳糖与产物如乙酰氨基乳糖电泳时均停留在原点附近,干扰了测定结果。(2)用酶反应偶联的方法,根据 NAD 或 NADH 生成的多少来估计产物 UDP 的生成量^[9,10]。(3)用 HPLC 法将产物与底物分开,用紫外吸收测量 UDP 的生成量^[11]。在测定组织提取液或血清中该酶活性

时,后面两种方法都难以排除由其他酶催化生成或分解 UDP 反应的干扰。

本文采用 Bio-gel p-2 小玻璃柱 (0.3×45 厘米)凝胶柱层析,可以将放射标记的底物 UDP-半乳糖和产物乙酰氨基乳糖,以及副产物半乳糖 1, 2-环磷酸和半乳糖清楚地分开,根据放射标记的产物与底物的比例,可以准确地算出酶的活性。由于使用的设备、材料较简单,操作方便,因此更适合我国实验室内应用。

材 料 与 方 法

材料 UDP-D[U-¹⁴C] 半乳糖 (302 毫居里/毫克分子)(美国 New England Nuclear 公司产品) UDP-半乳糖、N-乙酰氨基葡萄糖、半乳糖 1, 2 环磷酸、N-乙酰氨基乳糖、MES [2 (N-morpholino) ethanesulfonic acid]、去污剂 triton x-100、考马氏亮蓝 G-250 和 Bio-

法与一般 Southern 转移-杂交方法一样,小片段 DNA 的转移效率(与滤膜联结的效率)和杂交效果(一定程度还取决于同源性)相对较低,本实验中小于 190 bp 的 DNA 片段未能检测到。

参 考 文 献

[1] 程立等:上海医科大学学报,1986,13(2),91

- [2] Beveren, C. V. et al.: *RNA Tumor Virus*, Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd ed., 1985, 567.
- [3] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, 109.
- [4] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, 383.

[本文于 1988 年 1 月 29 日收到]