

法制备,读 250 bp 左右是易于做到的。

3 讨 论

3.1 CTAB 法具有快速、简便、可行的特点

用于制备 DNA 进行序列分析的方法,随着研究的深入已开发出几种。一般地说,单链 DNA 作模板,读序长度及二级结构带比双链 DNA 无疑好得多,而且退火反应之前不必经过变性拆链;但是制备单链 DNA 目前靠 *help phage* 感染上带有 F_1 因子的受体菌,才能释放出单链 DNA。尽管其间操作程序没有什么难点,可感染的机率并不太高;即使感染上去,有时释放出的 DNA 却是噬菌体 DNA,加上这个过程至少需要 3 天时间;所以除非需要测定几个 kb 的 DNA,一般不必花费这么长时间制备单链 DNA。相比之下,采用双链 DNA 进行序列分析,最明显的优点是省时。当然制备质粒 DNA 的方法,除了通常实验室使用的煮沸法、碱法、SDS 法之外,还有 CTA B 法,DEPC 法等;用于纯化质粒 DNA 的柱除了常见的 Sephadex 4B, NACS-52 等外,还有 Sephacryl s-400 或 s-1000 等,甚至还有专利产品 QIAGEN tip,各有各的特点。如果打算少花钱多办事,使用

CTAB 法是比较合适的。它具有快速、简便的特点。利用该法制备 DNA, 1.5—5ml 培养菌液均可,仅需台面小型高速离心机,一天至少可制备 50 个样品,从培养细菌开始到制备 DNA 完毕均可在 24 h 内完成;提取的 DNA 可供 2—3 次测序;既省时间又省试剂,尤其是仅需要读 1—200bp 的样品,该法更显得优越。

3.2 进一步改进 CTAB 法的效果

从图 3a 和图 3b 可以看出,利用 CTAB 法制备的质粒 DNA,读序背景比走柱样品的背景黑暗,这是样品中蛋白等杂质导致的结果。对此采用二种措施之一就可以加以改进。其一是样品用冷乙醇沉淀之前,加进等体积的氯仿:异戊醇(24:1)处理一次,可弃去大部分杂质;其二是用商品化 QIAGEN 吸嘴处理一次,其效果大为改观,如图 4 所示。

参 考 文 献

- 1 Giannino Del *et al.* *Nucleic Acids Research*, 1988; 16 (20): 9878;
- 2 Jing Chun Chen *et al.* *Nucleic Acids Research*, 1990; 18(13): 4017
- 3 Donald E. Gene, 1989; 75: 193
- 4 Sambrook J *et al.* *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 1.33—1.35

一种改良的快速筛选重组 DNA 噬菌体噬斑的原位杂交技术*

陈书琨** 沈正达 胡永浩 王 蒲

(甘肃农业大学兽医系,兰州 730070)

提 要

报道了一种从表达型噬菌体载体—— λ gt11 构建的基因文库中筛选重组 DNA 噬菌体噬斑的改良蛋白质-蛋白质原位杂交技术。此法可使噬菌体在硝酸纤维素薄膜上增殖至原噬斑大小,经适当处理后,即可用特异性抗体探针进行原位筛选,以

* 国家自然科学基金资助项目 ** 现在通讯处: 中华人民共和国深圳动植物检疫所,深圳 518001
收稿日期: 1991-07-10 修回日期: 1991-10-21

获得含目的基因编码的特异抗原蛋白的阳性克隆株。与已报道的筛选方法相比,此法具有简便快速、灵敏可靠的特点;也可试用于由表达型质粒载体构建的基因文库之菌落原位筛选。

关键词 噬斑筛选, 抗体探针, 融合蛋白

用抗体探针从表达型噬菌体载体构建的基因文库中筛选含目的基因的重组噬菌体噬斑, 其结果取决于吸附在硝酸纤维素薄膜(以下简称 NC 膜)上的噬斑表达产物——融合蛋白质的量。以前各家采用的方法^[1-4]大体是: 将 NC 膜覆盖于待筛选的长有噬菌斑的平板上, 37℃ 培养 4h 左右, 揭下 NC 膜, 经适当处理后, 分别与第一抗体和第二抗体温育。由于仅有一部分噬菌体和融合蛋白质被转移并吸附在 NC 膜上, 降低了检测的灵敏度。我们在应用 λ gt11 噬菌体载体克隆与表达禽源巴氏杆菌抗原蛋白基因^[5]的过程中, 建立了一种改良的噬斑原位杂交技术, 现介绍如下。

1 试验方法

1.1 NC 膜的预处理 将国产 NC 膜裁剪成直径为 8.4cm 左右的圆片(略小于直径为 9cm 培养皿的内径), 用铅笔在其非光泽面标以记号, 浸泡于蒸馏水中约 30—40min, 取出放在新华 1 号滤纸上晾干, 装于干燥洁净的铝盒或培养皿内(膜与膜之间用软纸片隔开), 用纸包裹后 8 磅高压灭菌 30min。

1.2 噬斑印渍与噬菌体增殖 将灭菌 NC 膜浸入(光泽面朝下)盛有 10ml 噬菌体宿主菌(本试验使用 *E. coli* Y1090 菌株)培养悬液($A_{600} = 0.5$)的培养皿内, 2min 后取出, 放在灭菌的新华 1 号滤纸上(光泽面朝上)晾干, 小心地将其平铺到欲筛选的长有噬菌斑的 LB 平板上(光泽面朝下), 待均匀湿润后(约需 5min), 用灭菌 5 号注射针头在膜边缘处垂直穿刺三点, 并用记号笔在平皿底部的反面标出穿刺眼所在的位置。小心地将 NC 膜从 LB 平板上揭下, 平铺到一块新鲜的 LB 平板上(光泽面朝上), 置 37℃ 培养 12—16h。

1.3 用抗体探针筛选含抗原蛋白基因的重

组 DNA 噬菌体 将表面长有噬菌斑的 NC 膜从 LB 平板上揭下, 置滤纸上于室温下晾干 30min, 然后置含 0.1% NP40 的 TEN 缓冲液中, 在室温下摇转漂洗 3 次(每次 10min, 下同), 移置含 1—2 μ g/ml DNase I 的 TEN 缓冲液中, 37℃ 下慢转 (~60r/min, 下同)漂洗 15min。将漂洗过的 NC 膜放入盛有 5ml 15% 脱脂奶粉液(用 TEN 缓冲液溶解, 下同)的聚乙烯塑料袋内, 排除气泡, 封口, 37℃ 下慢转封闭 1h, 弃封闭液, 向袋内加入 5ml 含兔源一抗的 15% 脱脂奶粉液, 排除气泡, 封口。37℃ 下慢转温育 6h, 取出 NC 膜, 置于含 0.05% Tween-20 的 TEN 缓冲液中, 37℃ 下摇转漂洗 3 次后移置盛有 5ml 含二抗(羊抗兔 IgG-HRP)的 15% 脱脂奶粉液的聚乙烯塑料袋内, 排除气泡, 封口, 37℃ 慢转温育 2h, 取出 NC 膜, 用含 0.05% Tween-20 的 TEN 缓冲液于 37℃ 下摇转漂洗 3 次后, 置于预热到 25—30℃ 的显色液(DAB-H₂O₂)中, 避光慢转 10—30min, 取出 NC 膜, 置于干净滤纸上在室温下晾干, 与原来长有噬斑的 LB 平板比较, 从该平板上找出含抗原蛋白基因的重组 DNA 噬菌体噬斑。

2 试验结果

图 1 及图 2 分别显示用上述改良法从原始文库的平板上得到的阳性杂交信号和从经纯化、扩增后的平板上得到的阳性杂交信号。用改良法(即噬斑增殖法)和原来的噬斑转移法各筛选了 20 张 NC 膜(各约 7000 个噬斑), 前者共得到 7 个阳性杂交信号, 且色泽较深, 明显可见, 而后者仅得到 3 个色泽较淡, 轮廓不甚清晰的阳性杂交信号。这显然与改良法提高了 NC 膜上单个噬斑抗原物质的绝对含量有关。

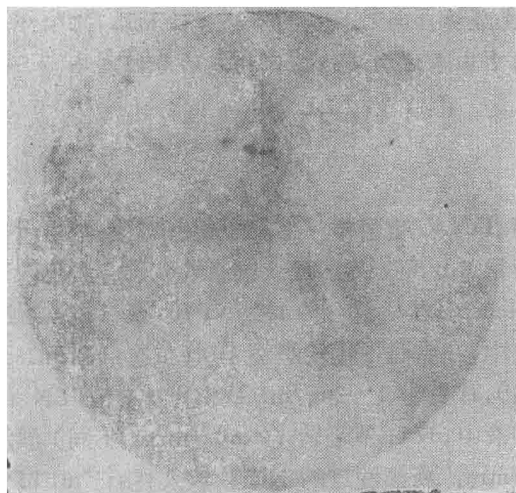


图 1 用抗体探针从原始文库平板上筛选出的融合蛋白质-抗体蛋白质原位杂交信号(箭头所示)

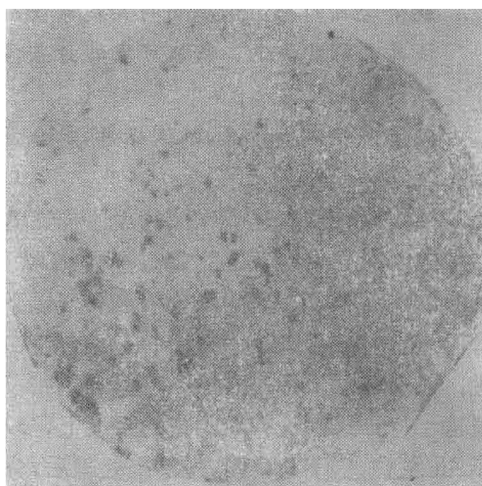


图 2 阳性噬菌斑经两次纯化、扩增后,用抗体探针筛选出的融合蛋白质-抗体蛋白质原位杂交信号

参 考 文 献

- 1 Young R A *et al.* *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1983; 80: 1194
- 2 Young R A *et al.* *Science*, 1983; 222:778
- 3 Mierendorf R C *et al.* *Methods in Enzymology*, 1987; 152:458
- 4 沈正达,甘肃农大学报,1987;1: 1
- 5 沈正达,陈书琨,胡永浩,王 蒲,中国兽医科技,1991; 21(11): 43

油菜叶绿体 4.5S rRNA 与高粱 ctDNA 杂交及作为探针的应用

周 强 韩晓光 许卫东 蒋五玲 程振起*

(清华大学生物科学与技术系,北京 100084)

李 御 宇 赵 微 平

(北京师范大学生物系,北京 100037)

提 要

提取纯化了油菜叶绿体核糖体 4.5S RNA (4.5S rRNA) 并在其 5' 端标记 ^{32}P , 作为探针与高粱叶绿体 DNA (ctDNA) 进行分子杂交。结果证明油菜 4.5S rRNA 可作为公用探针,对一般植物,特别是高等植物进行分子杂交研究。杂交的结果得到两条带。

关键词 分子杂交, 4.5S rRNA, ctDNA

4.5S rRNA 是高等植物叶绿体核糖体上的独有成分,一般组成为 80—106 个核苷酸之间,5' 端为游离羟基,且其中不含稀有碱基,它

在叶绿体蛋白质合成过程中起重要作用^[1]。

* 联系人: 程振起

收稿日期: 1991-06-12 修回日期: 1991-08-11