

量的数据一般都能适用。此外求扩散系数时,毋需求所谓[限定参量 β]^[8],而可由 $D = \frac{\omega^2}{4\tau_D}$ 直接求得。

此方法已被应用于测定林蛙卵表面受体的扩散系数^[7]。

参 考 文 献

- [1] Axelrod, D., D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson and W. W. Webb, 1976, *Biophys. J.* 16: 1055—1069.
- [2] Peters, R., 1981, *Cell Biol. Internat. Reports.* 5:733—760.
- [3] Vaz, W. L. C., Derzko, Z. I. & Jacobson, K. A., 1982, in *Membrane Reconstitution*, eds. Poste, G. & Nicolson, G. L. (Elsevier Biomedical Amsterdam), pp. 83—136.
- [4] 张孔华, 孙伟利, 张伯新, 1982, 一台自制的激光漂白荧光恢复测量装置, *细胞生物学杂志*, 4(3): 33—40.
- [5] 孙伟利, 1982, 鼻咽癌上皮细胞表面 ConA 受体复合物侧向运动的研究, *实验生物学报*, 15:209—218.
- [6] 顾国彦, 张孔华, 徐成汤, 1983, 林蛙卵表面凝集素受体在卵割前和卵割时的运动, *实验生物学报*, 16:467—476.
- [7] 徐成汤, 张孔华, 顾国彦, 1984, 激光光漂白恢复技术测定林蛙卵第一次卵裂前卵表面的运动, *实验生物学报*, 17:471—481.
- [8] Yguerabide, J., J. A. Schmidt, and E. E. Yguerabide, 1982, *Biophys. J.* 40:69—75.
- [9] Van Zoelen, E. J. J., L. G. J. Tertoolen, and S. W. de Laat, 1983, *Biophys. J.* 42:103—108.
- [10] 中川徹, 小柳義夫, 1982, 最小二乘法による実験データ解析, 东京大学出版社, 95—99.
- [11] 席少霖, 赵凤治, 1983, 最优化计算方法, 上海科学技术出版社, 27—60.
- [12] Jacobson, K., E. Wu, and G. Poste, 1976, *Biochim. Biophys. Acta.* 433:215—222.

以琼脂糖胶为载体的 DNA 分子杂交*

张志新 顾弥力 陆 溢 孙毓麟

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

以硝基纤维素滤膜或二偶氮苄氧甲基纸(diazobenzoyloxymethyl paper, 简称 DBM 纸)为载体转移核酸分子, 并以此载体进行分子杂交是广为应用的生化技术之一^[1-2]。由于现在使用的各种载体吸附核酸分子的能力都存在一定的局限性, 所以核酸分子转移杂交技术仍在不断改进^[3-5]。尤其引人注目的是 Purrello 以及 Tsao 等人利用琼脂糖(agarose)胶进行核酸分子杂交的报道, 其杂交效果较为显著^[6-7]。最近, 我们采用和上述方法类似的杂交技术, 直接用琼脂糖胶替代硝基纤维素滤膜或 DBM 纸作为载体, DNA 电泳后不经过转移过程而是将胶干燥, 然后用放射标记探针在干燥胶上直接

进行分子杂交, 同样获得了较好的结果。本文以定量分析的方法进一步证明了杂交的专一性, 特别是对单拷贝基因 DNA 顺序的杂交显示了高效、专一的特性。

材 料 和 方 法

一、实验材料

DNA 样品分别从经过小球菌核酸酶(micrococcal nuclease)水解的莱亨鸡红血球细胞核以及经过限制性内切酶 EcoRI 水解的红血球 DNA 制备^[8]。质粒 pBR

* 本工作得到国家科委应用基础理论研究基金和中国科学院研究费用资助。

** 感谢: 周维影同志参加了部分技术工作。

322 DNA 是北京生物物理所生物化学试剂厂产品。 $[^{32}\text{P}-\alpha]\text{dNTP}$ 标记的探针分别从鸡红血球 DNA, 鸡成年型 β -珠蛋白 cDNA 以及 pBR 322 DNA 经缺口翻译 (nick-translation) 制备^[9]。

二、实验步骤

DNA 电泳在 1% 或 2% 的琼脂糖垂直平板胶上进行, 胶的厚度变化在 1—4 毫米之间, 胶的长和宽分别为 170 毫米和 138 毫米, 电泳缓冲液是 40 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM NaAc, 1 mM EDTA, 电压 50—80 伏, 电泳至溴酚蓝染料在样品槽中走到胶的 2/3 距离时停止。被分离的 DNA 电泳带用 0.01% 溴化乙锭 (ethidium bromide) 水溶液染色, 紫外灯下照相记录。

将电泳后的琼脂糖胶平放于两层定性滤纸中间, 在一只自制的不锈钢干燥器(上海细胞所工厂加工制造)中, 用水泵抽气减压, 脱水干燥(如图 1 所示)。大约 4—5 小时后, 胶完全干燥, 自动与粘着的滤纸分离, 呈一张薄纸状, 坚实牢固。如要加快胶的干燥速度, 则将电泳后的胶浸泡在 95% 乙醇及丙酮中脱水数

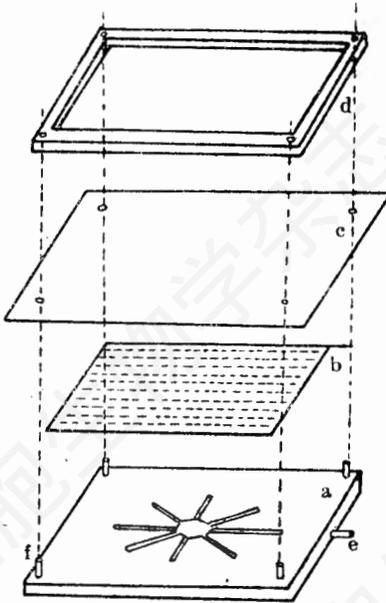


图 1 琼脂糖胶干燥装置

不锈钢底板 220×220×10(长、宽、高)毫米,(a)上的“米”字形为一凹陷槽,槽深 5 毫米,并与抽气管(e)相连,不锈钢网孔薄板 170×170 毫米(b)覆盖于(a),欲干燥之胶铺于(b)上,将橡皮(c)盖严在胶上。最后用铝制方框(d)压紧橡皮四周,(e)出气口接真空泵,减压脱水,即可达到干燥之目的。(f)是螺丝钉。

次,每次 10—20 分钟,然后在减压下进行脱水干燥。胶干燥后可直接进行碱变性处理,也可贮于室温保存备用。碱变性处理过程是将胶浸于 0.4 N NaOH-1 M NaCl 中温和振荡 20 分钟,然后水洗 4 次,每次振荡 10 分钟。

最后琼脂糖干胶用 $[^{32}\text{P}-\alpha]\text{dNTP}$ 标记的 DNA 探针按照 DBM 滤纸的杂交条件进行分子杂交反应^[9],用 X 光底片(上海 P-5 F)作放射自显影。

实验结果

一、在琼脂糖胶上的高效率 DNA 分子杂交

DNA 从经过小球菌核酸酶不同时间水解后的鸡红血球细胞核中抽提,在 1 毫米厚的 1% 琼脂糖-50% 甲酰胺垂直胶上电泳,EB 染色图谱如图 2 a 所示。DNA 分子按照染色质核小体结构被小球菌核酸酶水解成一系列不同长度的 DNA 片段。电泳胶被干燥和经碱变性处理后,与 300 毫微克 $[^{32}\text{P}-\alpha]\text{dNTP}$ 标记的红血球细胞核总 DNA 杂交,放射自显影图谱如图 2 b 所示。与图 2 a 比较看出,小球菌核酸酶水解的 DNA 样品电泳的 EB 染色图谱和分子杂交的放射自显影图谱基本上相似,说明虽然琼脂糖胶经干燥、碱变性以及杂交反应处理过

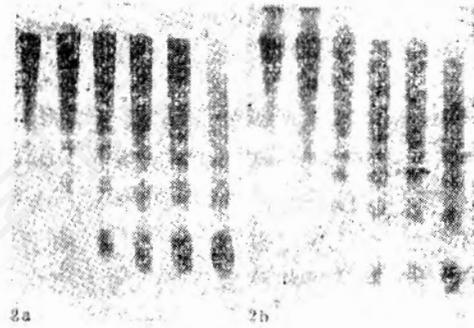


图 2 DNA 分子在琼脂糖胶上电泳的 EB 染色图谱和分子杂交后的放射自显影图谱

a. 莱亨鸡红血球细胞核经小球菌核酸酶水解(水解时间分别为 4、8、16、28、40、80 分钟)后抽提的 DNA 样品在 1 毫米厚的 2% 琼脂糖-50% 甲酰胺垂直平板胶上电泳,EB 染色,紫外灯下照相;

b. 胶经脱水干燥,碱变性,以 $[^{32}\text{P}-\alpha]\text{dNTP}$ 标记的同一 DNA 样品作为探针进行分子杂交的放射自显影图谱。

程,也未见明显的 DNA 分子的丢失。

当使用硝基纤维素滤纸作为 DNA 分子杂交的载体时,长度小于 1000 碱基对(以下称 bp)的 DNA 分子片段,杂交效率随 DNA 分子长度的减少而下降^[4,8]。然而,琼脂糖胶作为载体时,在一定程度上克服了硝基纤维素滤纸的上述缺点。图 2 指出一系列寡聚核小体 DNA 片段的电泳染色和分子杂交图谱,电泳迁移率最快的 DNA 分子为 140—180 bp,随后依次为 400、600、800 bp...等。分子杂交结果指出属于 140—180 bp 长度的 DNA 分子亦显示出清晰的杂交带。尽管与 EB 染色带比较显得弱一些,然而这种弱可能是由于 EB 染色和杂交显影方法本身的差别,也可能是由于小分子 DNA 的低杂交效率,还可能是由于在杂交前处理过程中造成小分子 DNA 的部分丢失;而分子长度大于 140—180 bp 的 DNA 分子片段均定量地通过分子杂交过程显示出来。根据图示推算杂交的最大片段大致有数 + kb,并且 EB 染色和分子杂交所反映出的带子强度基本相似。由此可见,干胶直接杂交法甚至显示了比硝基纤维素滤纸更大的优越性。

在干燥的琼脂糖胶上之所以能进行高效率的分子杂交,可能由于电泳胶被干燥后 DNA 分子更紧密地被埋藏在压缩了的由琼脂糖分子构成的网架中,因而在实验处理过程中,它们不易脱落丢失。我们将图 2 b 经杂交后的干胶重新用 EB 染色发现,其染色图谱与杂交前 EB 染色图谱(图 2 a)仍然一致。

二、通过检测单拷贝基因和定量的 DNA 样品对分子杂交效率的分析

为了定量分析在琼脂糖干胶载体上进行分子杂交反应的效率,将已知微量 pBR 322 DNA 样品与大剂量异源的鸡红血球 DNA 样品混合,如前所述进行电泳分离以及胶体干燥和碱变性过程,然后用 [³²P-α]α-NTP 标记的 pBR 322 探针与干燥胶进行分子杂交。结果如图 3 所示, a 指出三个样品槽中各都含有 70 微克从小球菌核酸酶水解过的鸡红血球细胞核制备的

DNA 样品,然而从左至右分别加入了 1 毫克、0.1 毫克和 0.01 毫克的 pBR 322 DNA,这样微量的 DNA 样品在 EB 染色的电泳图谱中是绝对显示不出来的; b 指出 a 干燥胶以 50 毫克 [³²P-α]dNTP 标记的 pBR 322 DNA 探针进行分子杂交后的放射自显影图谱,杂交效果是高度专一的,没有受到大剂量存在的异源 DNA 的任何干扰,而且杂交效率也很高,即使在总加样量 70 微克 DNA 中仅含有 0.01 毫克的、可以被专一杂交的 pBR 322 DNA 分子(仅占七百万分之一!),其杂交带也明显地显示出来。

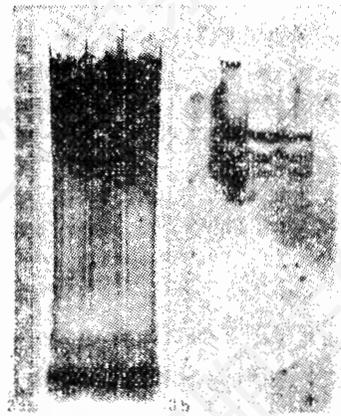


图 3 以琼脂糖干燥胶为载体的分子杂交反应的专一性以及定量分析

a) 三个样品槽分别加入 70 微克经小球菌核酸酶水解鸡红血球细胞核后抽提的 DNA 样品,同时每个电泳槽从左至右还分别加入 1、0.1 和 0.01 毫克 pBR 322 DNA。电泳胶为 4 毫米厚的 1% 琼脂糖,电泳后 EB 染色。

b) 将 a) 胶经干燥处理和碱变性后,以 50 毫克 ³²P 标记的 pBR 322 DNA 探针进行分子杂交和放射自显影。

按照上述实验结果指出的杂交效率,属于单拷贝基因的 DNA 顺序也应该可以通过同样的分子杂交过程显示出来。分别取 10、20、40、80 微克鸡红血球 DNA,经限制性内切酶 EcoRI 水解后,在 4 毫米厚、1% 琼脂糖垂直胶上电泳,胶体经干燥和碱变性后,与 ³²P 标记的鸡成年型 β-珠蛋白 cDNA 探针杂交,放射自显影图谱如图 4 所示。图中所示 a 杂交带代表 10 kb 鸡

胚胎型 β -珠蛋白基因的酶切片段。结果指出,在加样量仅有10微克DNA分子时,上述分子杂交过程仍然十分有效地显示出其中存在的单拷贝基因。



图4 通过在琼脂糖干燥胶上的分子杂交专一地显示单拷贝基因

10、20、40、80微克鸡红细胞DNA分别经过EcoRI限制性内切酶水解后在4毫米厚的1%琼脂糖垂直胶上电泳,在电泳胶被干燥、碱处理和水洗后与 $[^{32}\text{P}-\alpha]$ dNTP标记的鸡成年型 β -珠蛋白cDNA杂交和放射自显影。a、b带分别代表胚胎型和成年型 β -珠蛋白基因的EcoRI酶切片段,DNA长度分别为10Kb和6Kb。

讨 论

在标记探针与被杂交DNA进行反应之前,必须将后者先行碱变性、解开双链。Purrello等人主张胶干燥过程应在碱变性之前进行;Tsao等人则指出胶的干燥在碱变性处理过程之后。我们经过多次实验指出,碱处理的先与后对于杂交效率没有明显的影响。事实上,在干燥胶之后处理则更为简单,因为胶的厚度大大减少,从而可减少处理的时间;另外胶干燥后可以储藏任意长时间,使用时只要在杂交前经过一次碱处理即可。本文以定量分析过程进一步证明了杂交的专一性,特别是对单拷贝基因DNA顺序的杂交,以及指出对0.01毫微克DNA的高效、专一性杂交。因此,本文所讨论的结果与Purrello等人的报道是一致的。

正如Purrello以及Tsao等人所报道的那样,直接在琼脂糖胶上进行分子杂交是一个行之有效的办法,我们的上述实验同样证实了这一点。此法好处在于不必将DNA分子从电泳

胶转移到其它载体上,实验过程简便、快速,效果好。经过电泳胶干燥后的DNA分子牢固地固定在琼脂糖分子的网架中,因此不会造成杂交过程中DNA分子从干燥胶上丢失。尤其对于长度在1kb以下的DNA分子,杂交效率明显高于使用硝基纤维素滤膜作为载体^[7],但是对更小的DNA分子片段(如140—180bp)的杂交效率则有所降低。

琼脂糖胶的干燥方法,除了已经叙述的直接抽干法或经乙醇、丙酮处理后抽干法外,还可以用加热抽干法。如使用Slab gel dryer(HSI)仪器,边加热边减压脱水,干燥时间可以大大缩短。为了避免分子杂交及放射自显影后出现深背景,应适当控制胶的浓度与厚度之间的关系。根据我们的经验,琼脂糖胶的浓度可选择在1—2%之间,同时胶的厚度可选择在2—4毫米之间。过稀和过薄的琼脂糖胶在干燥后,由于胶的厚度太薄而难于操作,过浓和过厚的琼脂糖凝胶,在干燥后,由于干胶过厚,往往需要较长的杂交时间,也会给杂交后去除非专一性杂交的洗涤带来困难。

参 考 文 献

- [1] Southern, E. M., 1975, *J. Mol. Biol.* 98: 503—517.
- [2] Alwine, J. C., D. J. Kemp and G. R. Stark, 1977, *Proc Nat. Acad. Sci. USA*, 74:5350—5354.
- [3] 许远钟, 孙毓麟, 1984, *实验生物学报*, 17:211—217.
- [4] Wahl, G; M., M. Steren and G. R. Stark, 1979, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76: 3683—3687.
- [5] Smith, G. E. and M. D. Summers, 1980, *Anal. Biochem.* 109:123—129.
- [6] Purrello, M and I. Balazs, 1983, *Anal. Biochem.* 128:393—397.
- [7] Tsao, S. G. S., C. F. Brunk and R. E. Pearlman, 1983, *Anal. Biochem.* 131: 365—372.
- [8] Sun, Y. L., Y. Z. Xu and P. Chambon, 1982, *Nucleic Acid Res.* 10:5753—5763.
- [9] Breathnach, R., J. L. Mandel and P. Chambon, 1977, *Nature*, 270:314—319.