

地高辛标记探针在 Southern 杂交分析中的技术要点

陆小平 周文军 (苏州大学生命科学学院 江苏苏州 215006)

小島峰雄 (日本信州大学纤维学部)

Q18 B

外源基因是否成功导入受体材料的基因组中,必须从转化植株中找到分子生物学的检测证据。目前,PCR、Southern 杂交等作为常用检测手段而被广泛采用。虽然 PCR 技术可以快速得到结果,但是,以农杆菌介导的材料必须慎重这一结论,以免由于农杆菌污染造成假阳性。而 Southern 分析由于操作程序繁琐,对植物基因组 DNA 的提取、纯化、酶切等技术要求较高,有时使杂交结果不甚理想。我们在植物基因转化的研究中,对荞麦、桑树、紫景天、洋麻等基因组 DNA 的提取、纯化、酶切进行了探讨,对流程中的有关步骤进行技术改良,使酶切后的 PNA 在凝胶板上是涂布状完全达到了 Southern 杂交的技术要求,并用地高辛(Dig)标记探针对外源 DNA 进行分析,取得了较好的效果。现简述如下:

1 植物基因组 DNA 的提取及纯化

1) 提取高纯度的 DNA 是 Southern 杂交的关键, DNA 的粗提物中,往往含有大量的蛋白质、多糖、单宁、色素等大分子杂质。这些杂质通常与 DNA 共同沉淀或与 DNA 聚合成大分子复合物。一旦复合物形成,即便在以后的操作中用酚、氯仿多次纯化,也很难将其除去。我们的经验是:当用液氮破碎新鲜样品的细胞壁后,先用蒸馏水洗脱两次(洗脱温度为 42℃),每次 5 min。以达到洗脱多糖的目的。每次洗脱后离心 5 min (13000 r/min),弃去上层液。该上层液中含有粘度较高的胶状体,其主要成分可能是粘性多糖。在提取桑树基因组 DNA 时,最好用叶柄或幼茎、幼叶作提取材料。在样品有限时,也可用成熟叶甚至老叶代替。据 Clark MS (1998)介绍,取样前对材料进行除淀粉处理(减少光照、黑暗处理 24 h),可以抑制多糖的污染。但我们采用除淀粉处理后的实验结果并不理想,其效果远不及用蒸馏水洗脱。另外,该方法不仅可以用于桑树 DNA 提取,而且也适用于其他植物材料(果树、花卉)。

2) 由于桑叶中也含有酚类、色素,提取 DNA 时,常有茶褐色物质混入 DNA 中,由此而影响 DNA 的纯度。为了防止 DNA 的褐变,我们在液氮磨碎后,立即置冰箱下层或 4℃ 条件下任其自然解冻,待粉末完全解冻后再加入 DNA 提取液。

3) 做一次 Southern 杂交所需 10 μg 纯 DNA,一般取 0.2 g 新鲜样品即可得到 10 μg 以上纯 DNA。因此,用该方法提取 DNA 无论是产量还是质量都能满足一定要求。为了保证 DNA 的纯度,每管加样量不要太多,以 0.2~0.25 g 新鲜样品为宜,用 30 mL 液氮研磨成粉

末,置 4℃ 条件下解冻后分别加 600 μL 提取液 I 和 200 μL 提取液 II,再稍稍研磨后全部转入 2 mL 的离心管中,其余步骤仍按试剂盒要求操作。

4) 在去除蛋白质的干扰时,我们仍用蛋白酶 K,但其中添加了 80 μL 酶解缓冲液(60 mmol Tris-HCl, 60 mmol EDTA, 3% SDS, pH 7.8),置 55℃ 条件下酶切过夜。结束后再用苯酚、氯仿处理。

5) 纯化后的 DNA 可以通过测定波长为 230、260、280 的紫外吸收光谱来确定其浓度,但这些数据只能作为参考,因即便有较高的 OD 值,仍会存有影响酶切的干扰物质,我们建议最好采用凝胶电泳检测。

2 酶切

DNA 的酶切时间一般是 1~3 h,但结束前最好取 10 μL (总量为 200 μL) 酶切产物在小孔胶上检测是否完全酶切,即 DNA 片段弥散于各泳道中,若加样孔下方仍有亮度较强的条带出现(重复序列例外),这表明 DNA 尚未完全酶切,需继续延长酶切时间。

3 Southern 印迹

将完全酶切的 DNA 上大孔胶电泳,若 DNA 在胶板上呈涂布状,便可进行 Southern 印迹。若近加样孔一侧的泳带,其前沿参差不齐;加样孔变形;孔内残留物较多;泳道中 DNA 分布不均匀,这些均为干扰物存在所致。在条件许可时应重新酶切。Southern 印迹可按常规方法操作,将胶板分别用 0.25 mol HCl、变性液、中和液浸泡 15~30 min 后,用 20XSSC 溶液将变性 DNA 全部转移至尼龙膜(Hybord N+membrane)上。但印迹操作时,须戴手套作业,以免污染尼龙膜而影响 DNA 的固定。吸水纸上的重量要逐次添加,以防泳道变形和凝胶毛细管过早堵塞。

4 杂交

1) 固定 印迹结束后,取下尼龙膜,置室温中自然干燥 1 h,用紫外仪[FUNA-UV LIKER (FS-1500)]将 DNA 固定到尼龙膜上(约 30 s)。

2) 预杂交 将尼龙膜装入小塑料袋中,加入 10 mL 预杂交液后,驱尽袋中的气泡,封口后置 65℃ 杂交炉(EYELA HYBRIDZATION OVEN MHS-301)中孵育 1 h。

3) 杂交 剪开小塑料袋的一角,直接加入 10 μL 变性 Dig 探针,赶尽气泡后重新封口,继续置 65℃ 杂交炉中慢速振摇过夜。

该步骤的关键是小塑料袋中不能留有气泡,否则,

果蝇唾腺染色体的几种染色方法比较

部 刚 (山西师范大学生命科学学院 山西临汾 041004)

Q96 B

《生物学通报》编委:

您好。笔者对贵刊 2002 年第 37 卷第 2 期第 23 页刊登的“用 Feuglen 染色法制作果蝇唾腺染色体”一文感兴趣,但笔者认为文中几处不妥,比如 1)水浴温度波动偏高;2)染色时间不确定;3)试剂配方不全;4)盐酸的浓度单位有误, mol?M?;5)注意事项影响实验结果表述不清。特撰写下文与各位读者商榷。

双翅类昆虫如黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)的唾腺染色体(Salivary chromosome)比普通染色体大的多,处于体细胞同源染色体的配对状态,是由于唾腺染色体经过多次复制而并不分开形成的,大约有 1000~4000 根染色体丝的拷贝,故又称为多线染色体(Polytene chromosome)。它是观察染色体形态、研究染色体结构变异等的好材料。制作果蝇唾腺染色体标本的染色方法一般有 3 种:醋酸洋红法、苯酚品红法和孚尔根(Feuglen)染色法(除此之外还有其他方法)。各种方法都有其自身的特点及适用的条件,因此没有 1 种染色方法是普遍适用完美无缺的。现将 3 种常用方法的优缺点分述如下,并提出 1 个实用的永久封片制作方法。

1 醋酸洋红法

杂交信号将被冲散。加探针时不要碰到尼龙膜,以免膜与高浓度探针发生特异性结合而出现污染斑点。

5 洗膜

取出尼龙膜,置漂洗液(2X、1X、0.1X SSPE/0.1%SDS)中逐级漂洗 10~15 min,以洗脱未杂交的 Dig 探针和非特异性结合。

6 显影

将尼龙膜按下列程序再次浸洗:

1)80 mL 缓冲液 I (0.1 mol 马来酸/0.15 mol 氯化钠/pH7.5)10 min;

2)80 mL 缓冲液 II (72 mL 缓冲液 I / 8 mL 10%阻断剂 Blocling Roaget)60 min;

3)20 mL 缓冲液 III (20 mL 缓冲液 I / 3U Anti-Dig-AP)30 min;

4)80 mL 缓冲液 I 2 次,每次 10 min;

5)20 mL 缓冲液 IV (0.1 mol 氯化钠/0.1 mol Tris-HCl/50 mmol 氯化镁/pH9.5)5 min;

6)20 mL 显影液(3.76 mg 磷酸溴氯吡啶/7.5 mg 氯化氮蓝四唑/20 mL 蒸馏水)黑暗中 3~6 h。

7 膜的保存

杂交信号在 3 h 可达到高峰,并可稳定 24 h。若信

2003 年第 38 卷第 1 期

洋红的常用浓度为 0.5%~1.0%,醋酸常用浓度为 45%~50%,一般现配现用较好。洋红是从胭脂虫(*Coccus cacti*)的雌虫中提取的作为染料的提取物,提取物的品质因胭脂虫的种类而异,是一种混合物,其中具有染色活性的是洋红酸。洋红酸是一种二元弱酸,如果溶于碱性溶液中,则具有酸性染料的性质,可使细胞质着色;如果溶于酸性溶液中,则具有碱性染料的性质,可使染色质(体)着色。此法多用滴染法,快速简便,为改进其染色效果,也可采用浸染法,并辅以火焰微热(即滴加醋酸洋红盖片后在酒精灯火焰上微热),增加本底清晰度,加大反差。

醋酸洋红的配制和染色都比较简单,对细胞穿透力较强,这是其主要优点,此外它对染色体和核仁均可染色,故也适用于减数分裂的细胞染色。但其染色强度和分色效果不及其他染色剂,通常只作临时染色观察,不用于制作永久性装片。

也可以用醋酸地衣红替代洋红,这样细胞质着色较少,效果较好。

2 孚尔根染色法

孚尔根染色法是常用于鉴别细胞中 DNA 的一种组织化学方法,细胞核经过温和的盐酸的水解作用

号过强,可缩短显影时间,当信号强度达到要求后,即可停止显影。保存时取出尼龙膜,用 TE 漂洗 2 次后封膜保存。膜干燥或久置后,信号将有所减弱或褪色,但经 TE 湿润后仍会重现原有的杂交信号。

用³²P 标记探针分析转化株中的外源 DNA 是分子杂交的常用手段,但³²P 保存时间有限,对操作人员有一定辐射,废液对环境污染严重,而 Dig 探针可以弥补这些不足。因 Dig 标记属生物素类,其主要成分(洋地黄毒苷配基)是由植物洋地黄中提取的半抗原类固醇物质,经 PCR 反应制作的探针没有辐射污染; -20℃ 中可保存 12 个月;杂交液可重复使用 2~3 次;敏感性高、检测速度快。因此,目前世界一些研究组织提倡用地高辛代替³²P 标记。

参考文献

- 1 Clark MS 主编 顾红雅 翟礼嘉主译,植物分子生物学实验手册.北京:高等教育出版社,1998.
- 2 陈丙莺,陈子兴主编,分子生物学基础与临床,南京:东南大学出版社,2000,2.
- 3 王关林,方宏筠主编,植物基因工程原理与技术,北京:科学出版社,1998.

(BH)

生物学通报

— 53 —