

应用于细菌分类学中的 DNA-DNA 杂交* 方法

蔡妙英 洪俊华

(中国科学院微生物研究所, 北京)

自六十年代以来, 由于分子生物学不断向细菌分类学领域渗透, 使人们有可能在分子水平上研究种间关系, 把以表型特征为主要依据的细菌分类学引向深入。由于碱基对的线性序列决定着生物的“遗传密码”, 控制着生物的表型特征, 因此碱基线性序列和表型特征之间有密切的相关性^[1]。DNA-DNA 杂交技术系研究不同来源的 DNA 之间线性序列的相似程度及同源性。据此, 从遗传学角度估价它们的亲缘关系。DNA-DNA 杂交技术的基本原理是用 DNA 解链的可逆性和碱基配对的专一性, 将不同来源的 DNA 在体外加热解链, 并在合适的条件下, 使互补的碱基重新配对, 测量杂交百分数(常以同源%表示;也有称碱基相似性%)。百分数越高, 杂交的两个 DNA 之间碱基线性序列的相似性就越高, 说明它们之间的亲缘关系也就越近。

有关 DNA-DNA 杂交的方法, De Ley^[2]在 1970 年已进行详细的总结, 本文只介绍使用硝酸纤维素滤膜的固相杂交方法。

材料和方法

一、实验菌株和培养基(见表 1)

二、细胞的培养和收集

接种于上述培养基的摇瓶中。大肠埃希氏菌置 37℃ 振荡培养 16—18 小时; 嗜热脂肪芽孢杆菌于 55℃ 振荡培养 9—10 小时。5000 rpm/半小时离心收集菌体。每个实验菌株需 5—10g 湿细胞。

表 1 菌株和培养基

菌 株	培 养 基 (g)
大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i> AS. 1.365 AS. 1.90	见文献[3]
嗜热脂肪芽孢杆菌 <i>Bacillus stearothermophilus</i> 48	蔗糖 3, 淀粉 3, 酵母膏 3, 蛋白胨 5, Na ₂ HPO ₄ 3, 牛肉汁 1000ml, pH7.0—7.2 5000 rpm/半小时离心去沉淀分装, 8 磅 30 分高压灭菌

三、DNA 的分离和纯化^{[4][5]}

基本按 Michael^[4] 和 Marmur^[5] 方法所得的 DNA, 溶于 0.1SSC (0.015 M NaCl 和 0.0015 M 柠檬酸钠), 以 Specord UV-vis 或 751 型分光光度计于波长 230、260 和 280 μm 测光密度 (O. D. 值)。如果蛋白质和多糖含量过高, 以等体积的氯仿-异戊醇混合, 离心; 收集水相加 0.54 体积异丙醇(于乙酸钠 EDTA 条件下)得纯度较高的 DNA, 含量一般在 500 μg/ml ssc, 加几滴氯仿, 置 4℃ 可保存 2—3 个月。

四、制膜^{[6][7][8]}

取 0.2ml DNA 溶液, 含量约为 100 μg, 加蒸馏水至 2.5ml, 于 106℃ 变性 10', 转入冰浴, 加入予冷的 12 × SSC 2.5ml, 减压慢速滤过微孔膜 (GSWP, 孔径 0.22 μm, 膜径为 25mm, 用前在蒸馏水和 6 × SSC 中分别浸泡半小时), 再

* 在细菌中称“杂合”更为确切, 但为了一致起见, 这里仍用“杂交”。

本文承王大相先生审阅并修改, 并此致谢。

以 25ml 6 × SSC 抽滤洗膜 (收集 DNA 的滤液, 测其 $O. D_{260}$, 与滤前相比较, 可求得吸附率), 滤膜于室温过夜, 然后以不锈钢打孔器刻得 6mm 直径的小膜, 于 80℃ 烘干 4 小时, 最后放入真空干燥器内, 4℃ 保存备用。

五、标记

在 DNA 杂交技术中, 人们广泛使用 Commerford^[9] 的以三氯化铊为催化剂, 使碘与胞嘧啶结合成为 5-碘胞嘧啶的体外碘化 DNA 的方法。我们也基本采用以此原理的 Getz^[10] 和张玉砚等^[6] 的方法: 取 100 μg 变性 DNA 溶于 0.1M NaAc-0.04M IIAc (pH 5.0), 置冰浴依次加入 KI (2.5mM 水溶液), 使终浓度为 0.25mM; 加 $Na^{125}I$ 200—400 μci 混合, 最后加入三氯化铊 ($6.5 \times 10^{-3}M$ $TiCl_3$ 水溶液), 使其终浓度为 $6.5 \times 10^{-3}M$ 。总的反应体积 0.3—0.4ml。混合物在 60℃ 水浴中保温 20 分钟, 冷却, 加入新配制的 0.1M Na_2SO_3 , 约 0.3ml 终止反应。用 1M NH_4Ac —0.5M NH_4OH 调 pH 至 8.7, 60℃ 保温 20 分钟。冷却。上 Sephadex G50 柱 (32 × 1.5cm), 以重蒸馏水洗脱, 收集 6—7 管 (2—3ml/管)。每管取 10 μl 滴于小滤纸片, 干燥, 投入盛 5ml 闪烁液 [0.4% 2-5-二苯噁唑, 0.01% 1,4-双(苯基噁唑基-2)-苯的甲苯液] 的测量瓶内, 以 NE 8312 液闪测量仪测量放射性强度, 同时用紫外分光光度计测量每管的 $O. D_{260}$ 值。其中二值皆高者为已标上 ^{125}I 的 DNA 溶液, 置冰箱保存备用。

六、杂交

将 6 张载变性 DNA 的小膜和 1 张对照的空白小膜同置瓶 (直径 3cm, 高 4.5cm) 内, 加入 2ml Denhardt^[11] 预温液 (3 × SSC 中含有 0.02% 非可, 0.02% 聚乙烯吡咯烷酮和 0.02% 牛血清白蛋白), 加塞置 37℃ 处理 5 小时, 然后吸出预温液。加入经 4 号针头 (2ml 针管) 反复压挤 15—20 次的 ^{125}I -DNA 液, 含标记 DNA 约 3 μg, 加入 12SSC 和 2% SDS, 使总反应体积约 1ml, 反应液的 SSC 的终浓度为 2 × SSC, SDS 的终浓度为 0.1%。塞紧塞子, 置 60℃ 水浴中反应 15 小时, 吸出反应液, 用 2 × SSC 在

60℃ 下洗膜三次, 干燥小膜, 加 5ml 闪烁液, 置液闪测量仪测量其放射性。

七、同源性%的计算

以参考菌株标记的 DNA 与自身未标记的 DNA 杂交膜 (简称同源膜) 所测得脉冲数减去空白膜脉冲数, 与参考菌株标记的 DNA 和测定菌株未标记的 DNA 杂交膜 (简称异源膜) 脉冲数也减去空白膜的脉冲数, 然后二者相比, 得出参考菌株和测定菌株之间的同源性百分数。如公式所示。

$$\text{同源性 \%} = \frac{\text{异源膜脉冲数} - \text{对照膜脉冲数}}{\text{同源膜脉冲数} - \text{对照膜脉冲数}} \times 100 \%$$

结果和讨论

一、同源性的测定

5—10g 湿细胞约得 3—5ml 纯的 DNA。制膜时可用常压过滤或轻微抽滤 (2.5ml/分钟) 二种方法, 对固着在膜上的 DNA 的量无多大差异, 通常每个小膜 (6 毫米) 含 DNA 约 10 μg 左右。体外标记的 ^{125}I -DNA 的比放射强度一般可达 $1.1—7.5 \times 10^5$ 脉冲数/分/μg。杂交结果表明同种的菌株间有较高的同源性, 例如大肠埃希氏菌 AS. 1.365 和 AS. 1.90 之间可达 93—94% (表 2); 反之, 不同种就不然, 尤其本文涉及的大肠埃希氏菌和嗜热脂肪芽孢杆菌, 因它们分布在二个属中, 二者分类地位相距很远, 因此只有 1.7—5%, 由此可见表型特征与遗传特征间有很高的一致性, 杂交方法就是从遗传学角度阐明菌间的亲缘关系, 现已广泛应用于细菌分类学中^[12]。

二、DNA 的纯度对杂交反应的影响

DNA 的纯度是影响杂交结果的关键因素之一。如果 DNA 中含有较多的蛋白或多糖, 在杂交过程中对照空白膜 (无 DNA 的膜) 就会出现很高的脉冲数即本底很高, 无法计得同源%。根据已有的报道^[13] 和我们的经验表明, 用于杂交实验的大肠埃希氏菌的 DNA 的紫外吸收值应是 $O. D_{230}/O. D_{260} = 0.44$ 左右, $O. D_{260}/O. D_{280} = 1.81$ 左右为适宜。当 $O.$

表 2 大肠埃希氏菌和嗜热脂肪芽孢杆菌的种内和种间杂交的结果

实验菌株	杂交后同源%		
	参考菌株标记的 DNA		
	大肠埃希氏菌		嗜热脂肪芽孢杆菌
	<i>E. coli</i> 1.365	<i>E. coli</i> 1.90	<i>B. stearothermophilus</i> 48
<i>E. coli</i> 1.365	100	93	2.7
<i>E. coli</i> 1.90	94	100	1.7
<i>B. stearothermophilus</i> 48	4	5	100

表 3 DNA 的纯度对杂交反应的影响

(自身杂交的结果)

实验菌株	O. D ₂₃₀ /O. D ₂₆₀	O. D ₂₅₀ /O. D ₂₈₀	空白膜脉冲/分	DNA 膜脉冲/分	结 果
<i>E. coli</i> AS. 1.365	0.52	2.30	5.6×10^4 — 5.3×10^5	1.2×10^5	本底过高,无法计算
	0.43	1.75	2.3 — 5.3×10^5	1.6 — 2.4×10^5	
<i>E. coli</i> AS. 1.90	0.57	2.20	6.4×10^4 — 1.3×10^5	9.0×10^4 — 1.2×10^5	本底过高,无法计算
	0.46	1.89	1.0×10^4	2.4 — 3.0×10^5	

D₂₃₀/O. D₂₆₀ > 0.5 和 O. D₂₅₀/O. D₂₈₀ > 2.0 时, 结果杂交失败(表 3)。

三、预温育对杂交反应的影响

在我们的实验中预温育是必不可少的一步, 在杂交前不论空白膜或 DNA 膜都需经预温处理, 37℃ 预处理至少要 5 小时, 如果不经预处理, 其结果是不会令人满意的(表 4)。

表 4 预温育对杂交反应的影响

处理方法	空白对照膜 (脉冲/分)	DNA 膜 (脉冲/分)	结 果
预温处理	6×10^3	4.7×10^3	
未经预温处理	4.1×10^3	1.7×10^3	本底过高,无法计算

四、洗膜液对杂交反应的影响

杂交后, 用 $2 \times \text{SSC}$ 或低离子强度、高 pH 的 $3 \times 10^{-3} \text{M}$ Tris-HCl pH9.2 的缓冲液洗膜, 以去除非特异性粘连在膜上的标记 DNA, 两者效果相当(我们实验中均采用 $2 \times \text{SSC}$)。

五、切割对杂交的影响

杂交前, 将标记的 DNA 切割成适当长度的片段, 可以降低由于 DNA 丝互相缠绕所引起的非特异性结合。据报道^[14], 用超声波或法国细胞压碎器等方法, 可得到切割成 2 — 4×10^5 道尔顿的 DNA 片段用于杂交。根据文献

[15], 我们用 4 号注射针头 (2ml 针筒) 反复挤压 15—20 次标记 DNA 的方法切割 DNA 链。由于试验中未专门考查, 因此未能肯定其效果。

参 考 文 献

- [1] De Ley, J.: *Evolutionary Biology*, 2: 103—156, 1968.
- [2] De Ley, J.: *Methods in Microbiology*, 5A, 311—329, 1970.
- [3] 范云六等: *微生物学报*, 16: 277—281, 1976.
- [4] Michael, Z. et al.: *Nucleic Acid Research*, 5: 1139—1152, 1978.
- [5] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.* 3: 208—218, 1961.
- [6] Sharp, R. J. et al.: *J. Gen. Microbiol.* 117: 201—210, 1980.
- [7] David Gellespie and S. Spiegelman: *J. Mol. Biol.* 12: 829—842, 1965.
- [8] 张玉砚等: *实验生物学报*, 11: 97—104, 1978.
- [9] Commerford, S. L.: *Biochemistry*, 10: 1993—1999, 1971.
- [10] Getz, M. J. et al.: *Biochem. Biophys. Acta.* 287: 485—494, 1972.
- [11] Denhardt, D. T.: *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 23: 641—664, 1966.
- [12] 蔡妙英: *微生物学通报*, 10 (1): 24—27, 1983.
- [13] I. Baess: *Genetics of the Actinomycetales p.* 225—229, *Proceedings of the international Cllouquium at the Forschungsinstitu Borstel September 29-October 1, 1976*, New York.
- [14] Owen, R. J. et al.: *J. Gen. Microbiol.* 93: 89—102, 1976.
- [15] Barksdale, L. et al.: *Inter. J. Syst. Bact.* 29: 222—233, 1979.