

# 用生物素标记 DNA 探针进行菌落原位杂交\*

蒋三亮 张思仲

(华西医科大学医学遗传研究室,四川成都 610041)

**摘要** 将生物素标记的 DNA 探针用于菌落原位杂交,结合链霉菌抗生物素蛋白和生物素碱性磷酸酶系统检测显示信号。结果证明该法快速方便,杂交信号清晰,高度特异,完全可以取代同位素用于细菌分析和克隆筛选。

**关键词** 生物素标记的 DNA 探针;菌落原位杂交;克隆筛选

细菌菌落原位杂交作为一种经典的方法,已在基因工程领域中普遍应用,特别是近年来利用反向遗传学 (Reverse Genetics) 进行人类基因克隆、文库筛选,更发挥了十分重要的作用。菌落原位杂交到目前为止仍沿用同位素标记探针。而用同位素标记除具有潜在的危害性和半衰期短等缺点外,在国内许多地区尚不易获得,因而其应用受到限制。生物素标记的 DNA 探针虽被个别作者用于菌落原位杂交<sup>[1]</sup>,但所述方法繁琐,且效果不佳。为此我们根据生物素化 DNA 探针免疫检测的特点<sup>[2]</sup>结合传统的方法加以改进,建立了一种快速、简便的菌

落原位杂交方法。报道如下。

## 材料和方法

### (一) 材料

生物素 11-dUTP、缺口转译药盒和 DNA 检测药盒为 BRL 公司产品;蛋白酶 K、溶菌酶为 Sigma 公司产品;限制性核酸内切酶为华美生物工程公司产品;硝酸纤维素膜 (Hybond-C) 为 Amersham 公司产品。

含重组质粒 pMR 104/g、Cy5g $\gamma$  的 HB101

\* 国家自然科学基金,计划生育委员会基金资助课题。

菌株由英国牛津大学 Craig 博士馈赠。两个重组质粒均为 PUC g 质粒中插入不同的人 Y 染色体 DNA 片断所构成的重组体。

## (二) 方法

1. 质粒提取与插入片断的分离: 采用碱裂解法提取质粒 DNA<sup>[3]</sup>。插入片断的回收按照冻融回收法进行。将限制性内切酶消化后的重组质粒在 0.6% 的琼脂糖凝胶上电泳。待插入片断和载体分开后, 切下含插入片断的凝胶块, 置 1.5ml 离心管内, 加 200 $\mu$ l 饱和苯酚, 于 -70 $^{\circ}$ C 冰冻 20 分钟, 在 Eppendorf 离心机上全速离心 15 分钟。取上清液, 加入乙醇沉淀插入片断, 真空抽干后, 用 TE 缓冲液溶解沉淀, 凝胶电泳定量。

2. 生物素标记 DNA 探针: 以插入片断为探针, 经缺口翻译用生物素 11-dUTP 进行标记<sup>[4]</sup>。标记反应在 16 $^{\circ}$ C 水浴中 100 分钟。标记后的探针无需沉淀或过柱除去游离的核苷酸, 可直接用于杂交。

3. 细菌培养和滤膜制备: 含重组质粒 pMR 104/g、Cy5gr 的 HB101 菌株分别接种于 3ml LB 液体培养基中活化, 然后划线于含有氨苄青霉素 (50 $\mu$ g/ml) 的 LB 固体平板上培养 15—20 小时。用灭菌牙签转移单菌落于硝酸纤维素膜上。将已转移菌落的滤膜再转移至含氯霉素 (170 $\mu$ g/ml) 的琼脂平板上, 继续培养 15—20 小时, 取下滤膜备用。

4. 质粒 DNA 的游离与吸附: 将已转移菌落的滤膜依次放在浸饱了 10% SDS、变性液 (0.5mol/L NaOH, 1.5mol/L NaCl)、中和液 (1.5mol/L NaCl, 0.5mol/L Tris-HCl) 的新华滤纸上分别处理 15 分钟, 用冰冻 (4 $^{\circ}$ C) 的 STE 缓冲液 (10mmol/L Tris-HCl, 100mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0) 漂洗 3 次, 每次 2 分钟。然后在裂解缓冲液 (含 2mg/ml 溶菌酶的 STE 缓冲液) 中, 4 $^{\circ}$ C 裂解细菌 7 分钟。用 STE 缓冲液洗膜 2 次, 每次 3 分钟。加入 100 $\mu$ g/ml 蛋白酶 K, 37 $^{\circ}$ C 去蛋白 40 分钟。用 6 $\times$ SSC 洗膜 5 分钟后, 于 80 $^{\circ}$ C 真空烤膜 2 小时备用。

5. 预杂交和杂交: 将制好的膜放入杂交袋中, 加入 0.5ml/cm<sup>2</sup> 的预杂交液 (6 $\times$ SSC、5 $\times$ Denhardt's 液、1%SDS、0.15mg/ml 鱼精 DNA) 65 $^{\circ}$ C 预杂交 3 小时。倒掉预杂交液, 加入 40 $\mu$ l/cm<sup>2</sup> 的杂交液 (6 $\times$ SSC、5 $\times$ Denhardt's 液、0.5% SDS、0.15mg/ml 鱼精 DNA、10% 硫酸葡聚糖、100ng/ml 的生物素化探针) 68 $^{\circ}$ C 杂交过夜。杂交后的滤膜在 2 $\times$ SSC/0.1% SDS 溶液漂洗 2 次, 每次 5 分钟; 再经 0.1SSC/0.1% SDS 65 $^{\circ}$ C 漂洗 2 次, 每次 15 分钟。

6. 杂交信号的免疫检测: 首先用 3% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭 30 分钟; 然后加入链霉菌抗生物素蛋白 (Streptavidin) 处理 10 分钟; 再加入多聚碱性磷酸酶 (Poly AP) 处理 10 分钟。最后用 NBT 和 BCIP (NBT) 和 5 溴 4 氯 3 吲哚磷酸 (BCIP) 混合液显色<sup>[4]</sup>。

## 结 果

从生物素标记的 pMR 104/3 插入片断(图 1) 和 Cy5gr 插入片断(图 2) 与滤膜上菌落的原位杂交结果可以看出, 当用 pMR 104/3 插入片断杂交时, 含 pMR104/3 重组质粒的 HB101 菌落(图 1-1、2、3) 为阳性, 含 Cy5gr 重组质粒的 HB101 菌落 (图 1-4、5、6) 为阴性。当用 Cy5gr 插入片断为探针杂交时, 结果则相反(图 2)。位于滤膜上的这两种菌落在菌株、载体方面都相同, 唯有其重组质粒中所含的插入片断不同。所以在使用这两种插入片断

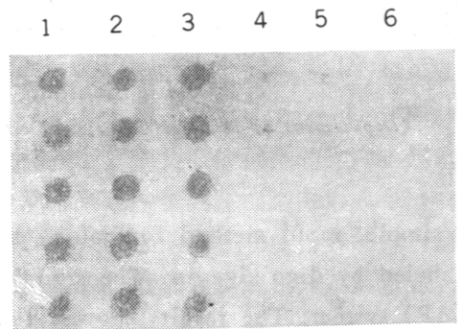


图 1 生物素标记 pMR 104/3 插入片断与滤膜上菌落原位杂交结果  
1—3. 含 pMR 104/3 的 HB101 菌落  
4—6. 含 Cy5gr 的 HB101 菌落

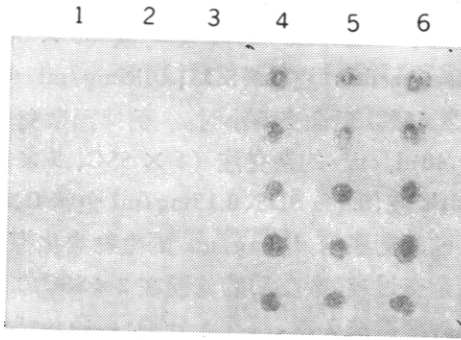


图2 生物素标记 Cy5gr 插入片断与滤膜上菌落  
原位杂交结果  
图注同图1

为探针进行杂交时,只有含相应插入片断的菌落显示阳性。实验重复多次,均无假阳性出现,显示出该方法的高度特异性。

## 讨 论

自1981年 Langer 等首次合成了含有生物素分子的 dUTP 以来<sup>[1]</sup>,用生物素标记 DNA 探针进行分子杂交的方法很快就被建立起来。虽然生物素标记的 DNA 探针其敏感性还不足以稳定的检测哺乳动物单拷贝基因序列,但在细菌、病毒等微生物的研究中则已充分显示出其应用前景<sup>[2]</sup>。然而,用生物素标记 DNA 探针进行菌落原位杂交的报道尚少。这可能是由于该系统要依靠免疫反应进行检测,易受蛋白

去除不净的影响。1986年 Haas 等根据生物素标记探针的免疫检测特点,建立了一种改进的菌落原位杂交法<sup>[3]</sup>。该法虽然能有效的去除蛋白质,但所述步骤冗繁,文中用乙醇、氯仿处理易使膜变形和质粒脱落,影响杂交效果。本文方法在 Haas 方法的基础上加以改进,建立了一种快速、敏感的方法。经上述结果证明,杂交信号高度特异,完全可取代同位素用于文库筛选和细菌分析。和传统方法比较,该方法在滤膜处理时增加了使用溶菌酶、蛋白酶 K 等步骤,便于去除蛋白质和质粒 DNA 的释放;在杂交液中增加了鱼精 DNA 的含量 (150 μg/ml),更加有效的减少了非特异性结合。上述改进均有利于生物素标记探针的杂交和显色,避免假阳性。克服了 Haas 方法的一些缺点。与同位素方法比较,既节省实验费用和时间,又无放射性污染和半衰期短之虑,有利于实验的操作和安排。

## 参 考 文 献

1. Haas, M. J. and D. J. Fleming: *Nucleic Acids Res.*, 15: 3976, 1986.
2. Langer, P. R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 6633—6637, 1981.
3. Maniatis, T. et al.: *Molecular cloning: a laboratory manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p.368—369, 1982.
4. 王 勤等: *遗传与疾病*, 6: 74—77, 1989.
5. Viscidi, R. P. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 23:311—317, 1986.

## COLONY HYBRIDIZATION WITH BIOTIN LABELED DNA PROBE

Jiang Sanliang Zhang Sizhong

(Department of Medical Genetics, West China University of Medical Sciences, Sichuan  
Chengdu 610041)

A simple, rapid method for colony hybridization has been developed. The DNA probes were labeled by digoxigenin. The signal of hybridization was detected by streptavidin and poly (AP) system. The results showed that this method is sensitive, specific and reproducible, it can be used for colony hybridization instead of isotopic.

**Key words** Biotin labeled DNA probe; Colony hybridization; Colony screening