

乙型肝炎病毒 DNA 克隆的菌落原位杂交

苏国富 徐永强 刘传暄 王嘉玺 马清钧

(军事医学科学院基础医学研究所,北京)

在遗传工程的 DNA 重组试验中,需从大量的转化子中筛选含特殊 DNA 序列的克隆,尤其是当被克隆的基因中无选择标记时,应用菌落原位杂交进行筛选是最理想的。其主要优点是特异性强,因此它成为 DNA 体外重组实验的重要方法之一。为了便于使 Grunstein 等^[4]的菌落原位杂交法在我国推广应用,我们对 Grunstein 等的方法作了适当修改,并对影响实验结果的几个主要因素作了初步比较。采用本修改方法筛选含乙型肝炎病毒 DNA 的克隆的结果表明,此法是特异而可靠的。

材料和方法

材料

含 pA₀₁-HBV 重组质粒的菌株由本室马贤凯教授馈赠。该质粒已重组入全长乙型肝炎病毒(HBV)DNA(3,200bp),限制性内切酶 *EcoRI* 能将 HBV DNA 从该质粒上切离。

Na¹²⁵I (北京原子能研究所), TiCl₃ (中国科学院微生物所赠), [α-³²P] dATP (Amersham), 牛血清白蛋白 (Seravac Laboratories), 胸苷三磷酸 (TTP)、脱氧鸟苷三磷酸 (dGTP)、脱氧胞苷三磷酸 (dCTP) (均为 Boehringer 产品), 脱氧核糖核酸酶 I (DNase I) (Sigma), 大肠杆菌多聚酶 I (BRL), 葡聚糖 G-50 (Pharmacia), 硝酸纤维素滤膜 (Millipore corporation 和上海第十制药厂), 小牛胸腺 DNA (上海牛奶公司), 聚蔗糖 (Pharmacia), 聚乙烯吡咯烷酮 (Fluka AG.), *EcoRI* (由本实验室制备)。

方法

1. pA₀₁-HBV 质粒 DNA 的制备 将含有 pA₀₁-HBV 重组质粒的菌株置 37°C 培养,离心收集菌体,然后参照 Zaslloff^[9] 报道的酸酚方法、Strongin 等^[7],的制备电泳方法,以及氯化铯密度梯度超速离心法^[2],获得纯的 pA₀₁-HBV 质粒 DNA。

2. 琼脂糖凝胶电泳 采用垂直板电泳装置。电泳缓冲液为: 400 mM Tris-HAc(pH8.0), 5 mM NaAc, 1 mM EDTA。琼脂糖浓度为 0.7%。50 伏电泳 6—8 小时。

3. *EcoRI* 酶解条件 1 μg pA₀₁-HBV 质粒 DNA 对 1 单位 *EcoRI*。反应缓冲液为: 100 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM MgCl₂。37°C 反应 1 小时。

4. HBV DNA 的制备 用 *EcoRI* 分别酶解经氯化铯密度梯度超离心法、酸酚法和制备电泳法分离纯化的质粒 pA₀₁-HBV DNA,经制备电泳后,置凝胶于含 1 μg/ml 溴化乙锭的电泳缓冲液内 5 分钟,在紫外灯下切取含 HBV DNA 的凝胶带,然后用电泳洗脱法^[7]从含 HBV DNA 的凝胶中回收 DNA 片段。用同位素标记的 DNA 试验证明 DNA 从凝胶上的回收率为 75—80%。

5. Na¹²⁵I 标记 HBV DNA 在 200 μl 反应体积内,含 2.5 × 10⁻⁵ M KI, 0.5—1 mCi Na¹²⁵I, 10 μg 经热变性处理的 HBV DNA, 0.1 M NaAc-0.04 M HAc (pH5.0), 3.25 mM TiCl₃。其余基本上参照 Commerford 等^[1,3]已报道的方

Su Guofu et al.: Colony Hybridization in situ for Screening for Clones Containing HBV DNA

法进行。用本标记方法放射性比强可达 $5 \times 10^6/\mu\text{g DNA}$ 。

6. 缺口翻译法(Nick Translation)标记 DNA
根据 Rigby 等^[6,7]报道的方法, 预先将 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ ($250 \mu\text{Ci}$) 经真空干燥, 然后分别加入 50 mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.9$), 5 mM MgCl_2 , 10 mM 巯基乙醇, $5 \mu\text{g}$ 牛血清白蛋白, dGTP 、 dCTP 、 TTP 各 $20 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{g}$ HBV DNA。待加入 $100 \mu\text{g}$ 脱氧核糖核酸酶 I 后, 置反应液于 28°C 水浴 1 分钟, 再加入 10 单位大肠杆菌 DNA 多聚酶 I, 14°C 温育 3 小时, 然后在 $100 \mu\text{l}$ 反应总体积中加入 $60 \mu\text{l}$ 0.25 M EDTA ($\text{pH } 8.0$) 终止反应。经葡聚糖 G-50 脱盐收集 ^{32}P -HBV DNA。放射性比强为 $2 \times 10^8/\mu\text{g DNA}$ 。

7. 菌落原位杂交 基本参照 Grunstein 等^[4]的方法, 作了某些修改。具体操作步骤如下: 将硝酸纤维素滤膜经 15 磅高压灭菌 15 分钟, 待干燥后, 置于 LB 固体培养基上, 注意在滤膜和培养基之间不应有空气泡。用灭菌牙签将待筛选的菌落点种于滤膜上, 置 37°C 培养过夜, 揭下滤膜, 置于用 0.5 N NaOH 浸湿的 3 张新华滤纸上, 10 分钟后再重复一次。用同样方法以 1 M Tris-HCl ($\text{pH } 7.4$) 处理 3 次, 每次 10 分钟, 使滤膜 pH 值达中性。再以 1.5 N NaCl - 0.5 M Tris-HCl ($\text{pH } 7.4$) 处理 10 分钟, 空气干燥后置 80°C 4 小时。将滤膜浸泡于预杂交液 (50% 甲酰胺, 0.2% SDS, $5 \times \text{SSC}$, 聚乙烯吡咯烷酮、聚蔗糖和牛血清白蛋白的浓度均为 0.02% , 每 ml 含 $0.5\text{--}1 \text{ mg}$ 经超声和热变性处理的小牛胸腺 DNA) 内, 38°C 预杂交过夜。再将探针 HBV DNA (比强 $5 \times 10^6\text{--}1 \times 10^8 \text{ cpm}/\mu\text{g DNA}$) 加入预杂交液内, 使最终放射性强度达 $(1\text{--}3) \times 10^6 \text{ cpm/ml}$, 混匀后, 38°C 杂交 12—24 小时。取出滤膜, 以 $2 \times \text{SSC}$ 、 0.5% SDS 洗液在 56°C 漂洗滤膜 3 小时, 每 30 分钟更换洗液一次。待滤膜干燥后, 在 -10°C 或室温自显影。

结果与讨论

我们在建立本方法时, 先用含重组质粒

pA_{01} -HBV 的菌株和大肠杆菌 C600 以及含 pBR325 的菌株作试验材料, 分别用经 Na^{125}I 和 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 标记的 HBV DNA 作探针, 按“材料和方法”所述进行菌落原位杂交, 结果见图 1。

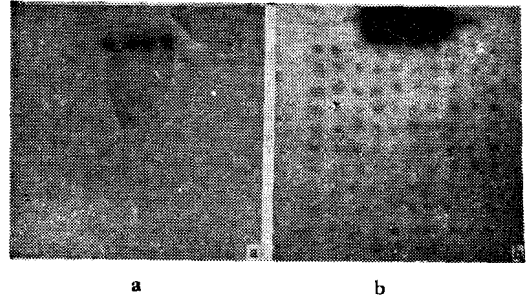


图 1 菌落原位杂交图谱

图上方的 4 个黑点为含 pA_{01} -HBV 的菌株, 其余的浅色斑点为大肠杆菌 C600 或含载体 pBR325 的菌株。(a) Na^{125}I 标记的 HBV DNA 探针; (b) $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 标记的 HBV DNA 探针。

由图 1 可见, 用 HBV DNA 作探针进行杂交时, 含 pA_{01} -HBV DNA 的菌株均显阳性结果, 而大肠杆菌 C600 和含载体 pBR325 的菌株均呈阴性, 两者有非常显著的差别, 与预计的相一致。用两种不同同位素标记的 HBV DNA 作探针, 都能得到满意的结果。但用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 制备的探针要比用 Na^{125}I 制备的探针理想得多。它不仅能获得强阳性结果, 而且由于其比强度高, 还可大大缩短预杂交、杂交和自显影的时间。但其不足之处是目前国内没有高比强的 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 供应, 需从国外进口, 来源不便, 再加上价格较贵, 半衰期短等缺点, 对试验都带来很大影响。而 Na^{125}I 标记的探针, 虽所得结果不如 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 好, 但有来源方便、价格便宜、半衰期长等优点, 便于在国内采用。

我们用上述的菌落原位杂交方法, 用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 标记的 HBV DNA 作探针, 对在 HBV DNA 重组试验中得到的转化子进行筛选, 从大量转化子中筛选出含 HBV DNA 的克隆 (图 2)。再从用本法挑选出的阳性菌落中抽提重组质粒, 用 EcoRI 酶解和琼脂糖凝胶电泳检查, 发现其中均含 HBV DNA 的重组质粒 (图 3)。实验结果表明, 用本法筛选含特殊 DNA 序列的克隆是特异而可靠的。

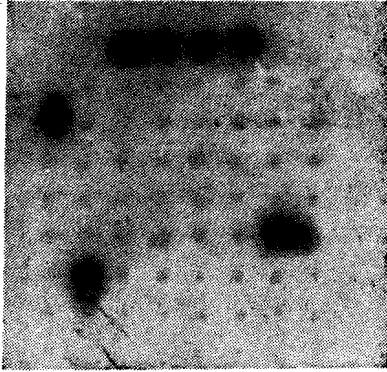


图2 菌落原位杂交筛选 HBV DNA 克隆

图上方4个黑斑点为已知含 pA₀₁-HBV 重组质粒的菌落,其余3个黑斑点为 pBR325-HBV DNA 重组克隆。



- 1 pBR325 + *Eco*RI
- 2 pA₀₁-HBV + *Eco*RI
- 3 pBR325-HBV
- 4 pBR325-HBV + *Eco*RI

图3 琼脂糖凝胶电泳图

在试验过程中,我们曾对影响试验结果的几个主要因素作了初步观察。试验结果表明,用 *Eco*RI 消化氯化铯密度梯度超离心、酚和制备

电泳法纯化的 pA₀₁-HBV 质粒后经制备电泳回收到的 HBV DNA 作探针都获得满意结果,所以不必经超离心法纯化质粒 pA₀₁-HBV DNA。用国产硝酸纤维素滤膜所得结果与进口滤膜相比没有明显差别。在我们的试验条件下,发现用 6×SSC, 0.5% SDS, 0.1% 牛血清白蛋白、聚蔗糖和聚乙烯吡咯烷酮杂交溶液,在 65°C 杂交时,本底偏高,不如用本法所得结果理想。在预杂交液和杂交液内随加入小牛胸腺 DNA 的含量增加,本底逐渐下降,当小牛胸腺 DNA 含量达 0.5—1 mg/ml 时,获得如图 1、2 所示结果。当 DNA 被固定于硝酸纤维素滤膜后,用蛋白酶处理^[5]与否,结果没有明显差别。菌落在滤膜上生长 5—6 小时后用氯霉素扩增^[4]与否,所得结果也无明显差别。

参 考 文 献

- [1] Anderson, D. M. et al.: 1976. *Biochem.*, 15: 1022.
- [2] Bazaara, M. et al.: 1968. *J. Mol. Biol.*, 36: 185.
- [3] Commerford, S. L.: 1971. *Biochem.*, 10: 1993.
- [4] Grunstein, M. et al.: 1978. *Methods in Enzymology*, 68: 220.
- [5] Humphries, P. et al.: 1978. *Nucleic Acids Res.*, 5: 910.
- [6] Rigby, P. W. et al.: 1977. *J. Mol. Biol.*, 113: 237.
- [7] Strongin, A. Ya. et al.: 1977. *Anal. Biochem.*, 79: 1.
- [8] Weinstock, R. et al.: 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76: 1299.
- [9] Zaslhoff, M. et al.: 1976. *Nucleic Acids Res.*, 5: 1139.