

# 直接杂交法检测基因组的单拷贝基因\*

黄承汉\*\*

(湖南医学院分子生物学研究室, 长沙)

谭荣安 林关绵仙 胡玉娟

(香港大学生化系, 香港)

## 摘要

本文叙述一种用于基因组限制性图谱研究的Southern印迹术的改良方法。正常和地中海贫血DNA经限制性内切核酸酶完全消化及凝胶电泳分离后, 进行干印, 变性与中和处理, 再和相应的珠蛋白基因探针杂交。修改过的凝胶杂交法具有简便、经济和省时等优点, 可对单拷贝基因进行灵敏、可靠的检测, 因此能用于遗传病的产前诊断和DNA多态性的分析。作者还就此法与现存的探针制备系统合用的可行性作了扼要讨论。

**关键词:** 基因组限制性图谱, 凝胶直接杂交, 珠蛋白基因, 产前诊断, 地中海贫血。

Southern印迹术 (Southern blotting technique) 是一项把限制性内切酶消化的DNA, 从电泳分离后的琼脂糖凝胶原位转移到硝基纤维滤膜的重要技术。用标记的基因特异的探针与吸印、固定在膜上的DNA进行分子杂交, 即可通过放射自显影或显色反应, 确定某种基因的限制性图谱<sup>[1]</sup>。

作者在分析人基因组DNA多态性的工作中观察到: (1) 印迹术不能使分子量较大的DNA碎片完全转移到滤膜上; (2) 吸印后的凝胶自然压缩、干燥后, 未能转移的DNA仍滞留于其中。据此, 我们以人染色体上的珠蛋白单拷贝基因为对象, 尝试用直接凝胶杂交法进行检测, 获得满意效果。修改后的方法具有简化操作、节省样品和分析时间、灵敏度高等特点, 适用于单基因病, 如地中海贫血等的产前诊断, 以及人基因组DNA多态性的研究。本文拟就凝胶杂交法应用于人类珠蛋白基因图的分析扼要报道如下。

## 材料和方 法

### 一、DNA的限制性消化与凝胶电泳

所用DNA样品系从人的全血制备。依厂家提供的条件, 用限制性内切酶 (BRL或BioLab

\* 由香港大学资助研究费用, 本文于1985年8月19日收到。

\*\* 为CMB/HKU进修生 (1984.3—1984.11)

产品) 将DNA消化至完全 (37°C保温过夜, 4—5单位酶/ $\mu\text{g}$  DNA)。然后以1/3体积7.5M醋酸胺和两体积冷乙醇沉淀酶解产物, 离心回收, 并溶于适量TE(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) 备点样用。

DNA的酶解产物在自制的水平电泳槽中进行分离。琼脂糖 (Sigma) 凝胶浓度从0.7—1.2%不等, 通常为0.8%; 胶长12cm, 厚0.5cm, 宽度则随点样数目而异。样品池 $5 \times 1.2 \times 5\text{mm}$ 。制胶及电泳缓冲液为TBE系统 (0.089M Tris-硼酸, 1mM EDTA, pH8.3), 电压2—2.5V/cm。

## 二、基因探针的制备与标记

按氯化铯密度梯度离心法<sup>[2]</sup>分离含不同珠蛋白cDNA探针的pMB9质粒<sup>[3]</sup>。纯化的质粒经相应的限制性内切酶消化、低融解温度琼脂糖(LMT agarose, Sigma) 电泳分离后, 切下所需探针片段, 转至微量离心管内, 置65°C保温20分钟左右, 随即用酚、氯仿在室温下抽提数次, 收集上清, 加乙醇沉淀探针, 悬于TE以备标记。

珠蛋白基因探针与分子量标志物(内切酶Hind III消化的 $\lambda$ 噬菌体DNA), 均照缺口平移法<sup>[4]</sup> (nick translation, NT), 用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  (英国Amersham) 和NT商品试剂盒(英国Amersham) 进行标记。标记量为0.1 $\mu\text{g}$  DNA/次, 比活性达 $0.5\text{--}4 \times 10^8\text{cpm}/\mu\text{gDNA}$ 。

## 三、凝胶的处理

电泳毕, 凝胶置菲啶溴红 (Ethidium Bromide) 溶液 (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 中染色, 并在UV透射器下观察、照像。然后将凝胶周边修平切齐, 通过干吸术引出胶中的缓冲液。具体作法是, 剪裁两张稍大于凝胶表面积的Whatman滤纸, 分别与凝胶的上、下面贴密合, 若下面不衬滤纸, 可用塑料膜 (Saran Wrap) 代替, 再放到一块玻璃板上。滤纸上叠加灭菌毛巾或纸巾, 并平托一块玻璃和适量重物 (Fig.1)。如此将凝胶压缩0.5—1hr, 胶内液体被迅速吸至毛巾或纸巾上, DNA样品则因凝胶浓度逐渐增大而在原位滞留。压缩后的凝胶既平整且厚薄一致, 可用胶条干燥器 (如BioRad的Slab-dryer) 真空抽干, 或者任之自然干燥。

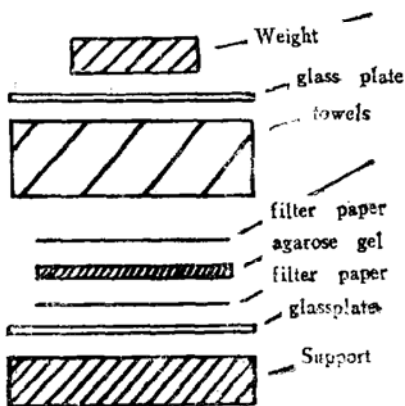


Fig.1 Diagram of the dry blotting technique for the retention of DNA in agarose gel

干燥凝胶的变性与中和, 与Southern吸印术处理湿胶的程序相似。把干胶置变性液 (1.5M NaCl, 0.5M NaOH) 于室温下轻摇30分钟到一小时, 取出用水淋洗片刻, 再转到中和液 (1M Tris-HCl, pH8.0, 1.5M NaCl) 浸泡30分钟左右。最后用 $5 \times \text{SSC}$  ( $1 \times \text{SSC} = 0.15\text{M}$  NaCl, 0.015M 枸橼酸钠, pH7.0) 润洗数分钟, 或者立即进行预杂交, 或者干燥后保存备用。

## 四、分子杂交

凝胶的预杂交和杂交均在68°C水浴中进行, 杂交液的组成是 $5 \times \text{SSC}$ 、 $5 \times \text{Denhart}$  ( $1 \times \text{Denhart} = 0.1\%$  PVP、0.1%菲柯尔、0.1%牛血清白蛋白)、0.1%十二烷基硫酸钠(SDS)、10mM EDTA和0.02%剪切变性的鲑鱼精子DNA。凝胶置塑料袋中, 按 $100\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 的量, 将杂交液预热至68°C后加入袋内。对

于初次使用的凝胶，一般作预杂交4—6小时。杂交时，不另更换杂交液，而直接把加热变性过的放射探针（加热温度 $>95^{\circ}\text{C}$ 、时间10—15分钟），以 $5 \times 10^5$ — $5 \times 10^6$ cpm/ml的量加入袋内，保温过夜。如果是重复使用的凝胶，不再进行预杂交。凝胶重新变性中和（见上）后塞进袋内，依次加入杂交液和变性处理的放射探针，混匀保温过夜。

取出杂交过的凝胶，置洗液（ $2 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ ）内，室温下浸洗片刻，再换同样洗液于 $65^{\circ}\text{C}$ 洗30分钟。最后以 $0.1 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ 洗60分钟左右（ $65^{\circ}\text{C}$ 并温和振摇）。凝胶置室温下晾干或真空抽干，密封于塑料膜内，用两张X光片（柯达XAR-5）夹住，一起放入附有增感片（Dupont Cronex Lighting Plus）的自显影盒中， $-70^{\circ}\text{C}$ 放3—5天后冲片观察结果。

对照凝胶作Southern转移，如上进行分子杂交。

## 实验结果

### 一、凝胶中DNA的滞留

正常人基因组DNA经限制性酶消化和凝胶电泳分离后，进行菲啶溴啶红染色、照像和干燥等处理，再与不同的珠蛋白cDNA探针杂交（见材料和方法）。杂交3—5次后，在同样的染色条件下定性地观察凝胶对DNA的滞留作用。比较EcoRI消化的不同浓度的DNA样品，其同一张凝胶在干燥前（Fig.2a）和杂交五次后（Fig.2b）的染色强度基本上相同，表明DNA能有效地被凝胶固定。

### 二、珠蛋白基因的检测

Fig.2所示干胶经变性中和后，依次与 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\epsilon$ -珠蛋白基因的cDNA探针进行分子杂交，得到的EcoRI限制性内切酶图谱（Fig.3）均与文献记载<sup>[5]</sup>完全相符。两个重复的 $\alpha$

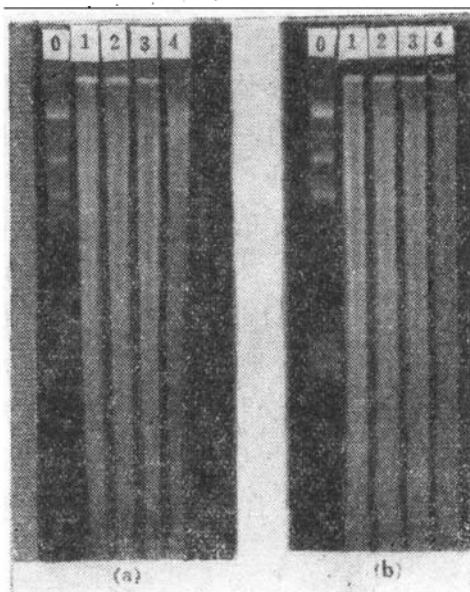


Fig.2 Comparison of ethidium bromide staining of the same gel before drying (a) and after hybridization for five times (b). The DNA was EcoRI digested and electrophoresed in 0.8% agarose gel. Lane 0,  $\lambda$ DNA marker (Hind III cut). DNA concentrations were 10.0, 7.5, 5.0, and  $2.5 \mu\text{g}$  from lanes 1—4 respectively.

基因5'- $\alpha 2$ - $\alpha 1$ -3' 位于一个23.0千碱基对 (Kilobase pair, kb) 的片段之内 (Fig.3a)。基因由5.5kb和3.7kb两个片段所包含 (Fig.3b)；3b中的2.3kb片段系 $\delta$ 基因，由于它与 $\beta$ 基因在编码序列上有很高的同源性，可和 $\beta$ c DNA杂交而得以检出。两个重复的 $\gamma$ 基因5'- $\gamma^c$ - $\gamma^a$ -3' 则被断成7.0Kb(含 $\gamma^c$ ) 和2.6Kb (含 $\gamma^a$ ) 两个主要片段，以及1.65Kb等含很少编码序列的片段 (Fig.3c)。 $\epsilon$ 基因由3.8Kb这个单一片段所组成 (Fig.3d)。从 Fig.3可见，在本文所述的条件下，2.5 $\mu$ g的DNA 量已够检出入基因组上的珠蛋白单拷贝基因。同一张凝胶经过五次连续的杂交 (其中 $\alpha$ 探针两次)，放射自显影图依然区带整齐、背景清晰。

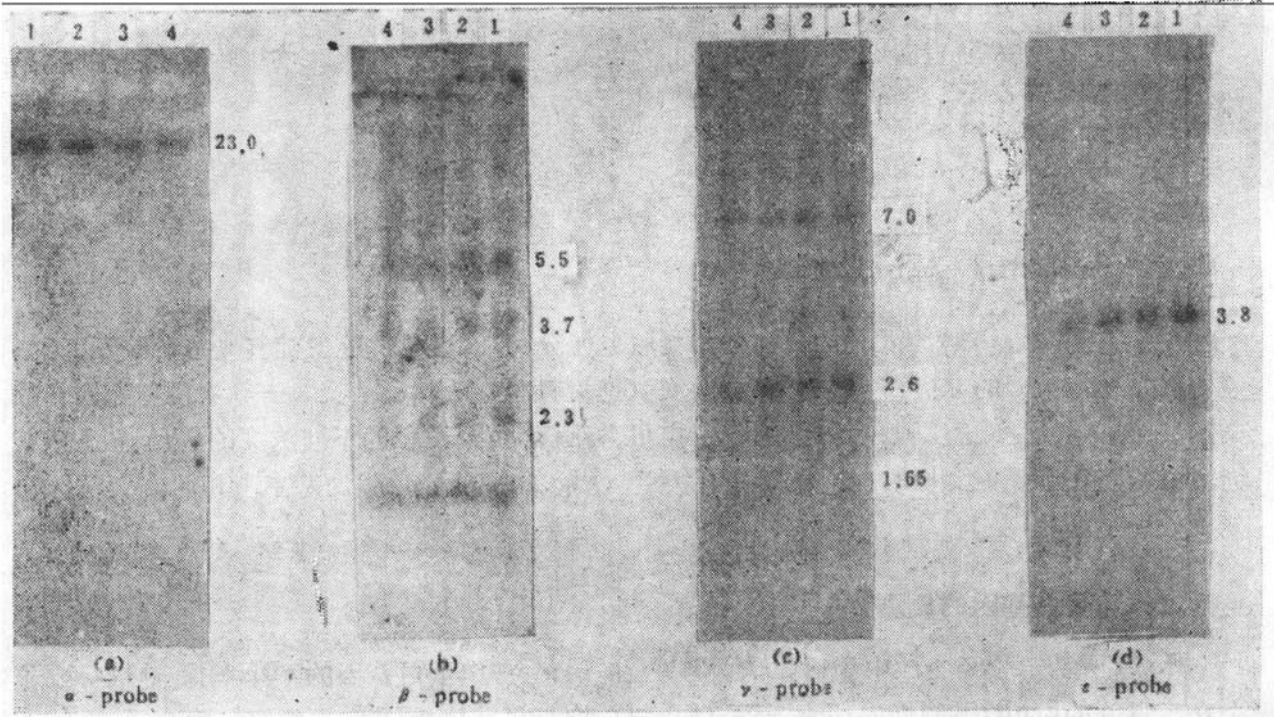


Fig.3 Autoradiographs of the gel shown in Fig.2 The normal DNA was digested with EcoRI and hybridized with four globin gene probes. Other legend see Fig.2 Sizes of DNA fragments are represented in kilobases. See the text for details.

### 三、一例 Hb QH 病的珠蛋白基因图分析

正常人的 $\alpha$ 基因结对排列在16号染色体的短臂上<sup>[6]</sup>。在双倍体状态，四个 $\alpha$ 基因均有活性。作者以正常DNA作对照，用本文方法分析了在我国发现的一例Hb QH病<sup>[7]</sup>的基因图，结果如下 (Fig.4和Fig.5)：正常 $\alpha$ 基因的BamHI片段为14.0Kb，而患者的为10.0Kb，表明其存在基因缺失。为了确定是哪一个 $\alpha$ 基因发生缺失，我们用 Bgl II 和 Pvu II 这两种限制性内切酶，对正常与患者的DNA限制性片段进行了比较，发现患者DNA没有Bgl II的12.0Kb和Pvu II的2.1Kb两个片段 (Fig.4b和Fig.5a)，从而证实其染色体的左侧5'  $\alpha 2$ 基因缺失，右侧的 $\alpha 1$ 为 $\alpha^Q$ 基因。此外，从放射自显影区带的强度可知，患者另一个染色体的两个 $\alpha^A$ 基因也发生了缺失。根据以上结果，患者的 $\alpha$ 基因型可认定为-,-/-, $\alpha^Q$ ，这是 $\alpha$ 链一级结构异常 ( $\alpha^Q$ ) 复合三个 $\alpha$ 基因缺失 (即HbH病) 的双重缺陷，因此称Hb QH病。同一张凝胶依次与 $\beta$ 和 $\gamma$ cDNA探针杂交的结果还证实，患者 $\beta$ 和 $\gamma$ 基因片段的大小、自显影强度，与正常人完全相同 (Fig.5b、C)。

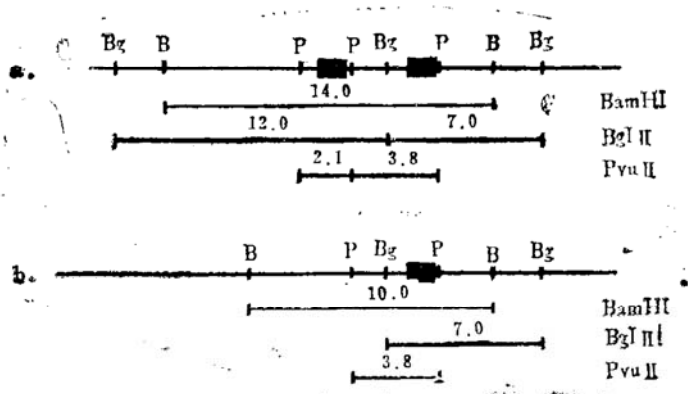


Fig.4 Diagrams of the expected d-specific fragments after complete digestion of genomic DNA with restriction enzymes BamH I (B), BgI II (Bg) and Pvu II (P). a. Normal haplotype ( $\alpha A$ ,  $\alpha A$ ). b. Abnormal haplotype with leftward deletion and point mutation on rightward  $\alpha$  gene ( $\alpha Q$ )

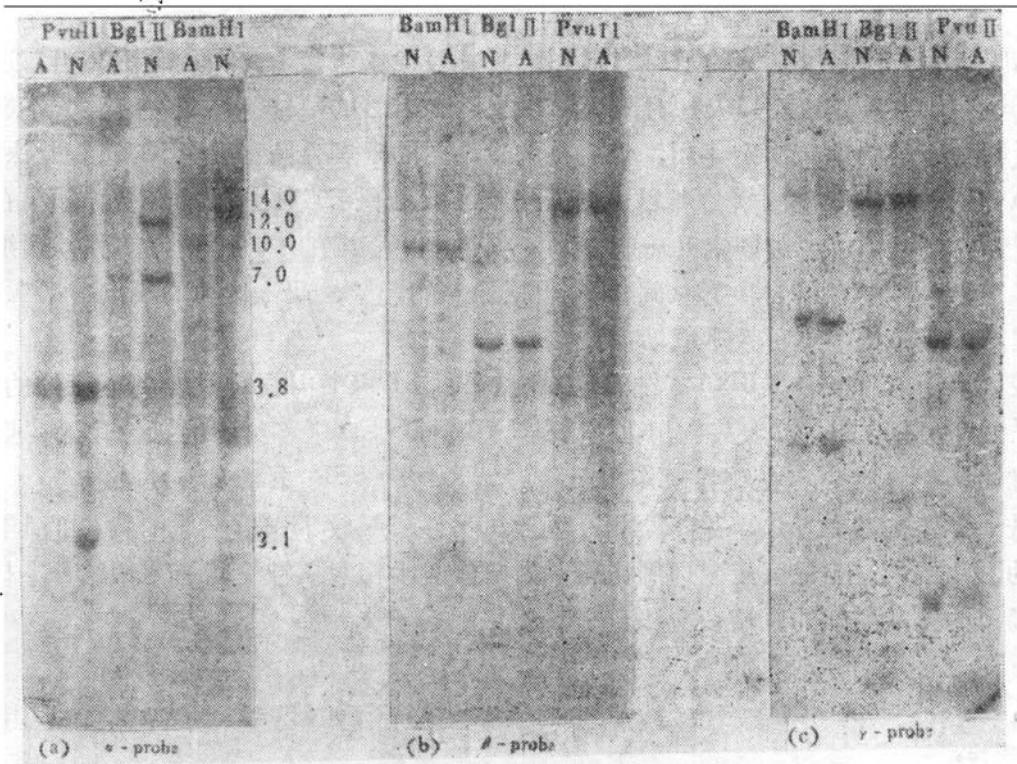


Fig.5 Autoradiographs of the DNA from a case of Hb QH patient (A) and a normal subject (N). The DNA was digested with BamH I, BgI II and Pvu II, and gel-hybridized with globin gene specific Probes under the conditions described in Materials and Methods. Sizes of DNA fragments are represented in kilobases (kb).

## 讨 论

利用Southern印迹术和特异的基因探针，目前已能在DNA水平上对某些严重的遗传病（如地中海贫血）施行成功的产前诊断。但作为一种研究DNA限制性图谱的常规方法，印迹术仍嫌耗资费时：（1）印迹材料硝基纤维素膜价格偏贵，各批号之间质量也相去甚远；膜缺乏韧性，容易破碎。（2）人基因组DNA的限制性消化产物从凝胶转移到膜上需12—24小时，此过程要用掉大量高浓度SSC溶液。更重要的是，DNA样品尤其是大分子量片段，常难以完全、均一地转移到膜上，因而有时使检测的灵敏度甚至结果的准确性受到影响。

为了克服上述滤膜印迹的弱点，建立一种既简便、经济和便于推广，又不失检测灵敏度

的基因组限制性图谱分析方法, 作者对Shinnick等<sup>[8]</sup>所创的检测纯 DNA 克隆的直接杂交法加以修改, 将之应用于人 DNA 样品。这使我们仅用2.5 $\mu$ g DNA 就检出了珠蛋白单拷贝基因, 并成功地确定了一例地中海贫血的基因缺陷。结果表明, 凝胶法作为滤膜法的一种改良, 同样能满足 DNA 限制性图谱分析所提出的一般要求, 用于遗传病的产前诊断和基因组 DNA 多态性的研究。

本文所述方法无需特殊设备, 经简单的压缩、干印作用便使凝胶很快地脱水。由于省去滤膜处理、印迹转移和真空烘烤等步骤, 使操作大为简化、分析时间大为缩短。此法的另一个优点是凝胶能反复用于分子杂交而不影响分辨效果。因为凝胶一旦干燥, 不仅便于长期保存, 而且其中的DNA不再容易发生损失。另外, 凝胶能耐受强碱的作用, 与它杂交的放射探针, 经变性液处理即可有效地除去。

在相同条件下, 凝胶杂交的放射自显影结果一般优于滤膜杂交, 或两法相当。这种差异与前者 DNA 的有效滞留使损失相对减少, 以及后者DNA的转移不够完全有关。本文虽未定量研究凝胶对DNA的原位固定作用, 但通过大量不同的限制性图谱分析观察到, 此法对500bp以上DNA片段的固定和检测颇为理想。提高凝胶浓度有利于较小片段的滞留。如果在干燥前将凝胶置95%或无水乙醇中固定30—60分钟, 先脱水再压缩抽干, 可明显增强基因组小片段DNA的检出, 并缩短放射自显影时间<sup>[9]</sup>。根据作者的经验, 此法成功的要点在于掌握凝胶干燥的程度, 干燥得不够可致本底增高。

凝胶杂交法还可与合成RNA探针的SP6系统<sup>[10]</sup>, 以及标记和显色生物素探针的非放射性检测系统<sup>[11]</sup>相结合, 扩大其应用范围。RNA探针较缺口平移标记的探针比活度提高10倍以上, 且比DNA探针更容易受强碱作用而除去。因此, 籍SP6系统来合成凝胶杂交用的探针, 将进一步简化本文方法, 提高检测灵敏度。另外, 凝胶干燥后呈透明状, 可赋予显色反应较好的对比度, 对酶促反应无抑制作用。因此能与生物素探针检测系统相结合, 提供一种简单、经济的非放射性的直接杂交法。

**致谢。**香港大学生化系C.C.Hui (许志忠) 先生大力支持本工作, 上海儿童医院曹滋滔大夫惠赠Hb QH样品, 特此致谢。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Southern, E.M. (1975) , *J. Mol. Biol.*, **98**, 503—517.
- [ 2 ] Maniatis, T., et al. (1982) , *Molecular Cloning*, pp93—94. Cold Spring Harbor, New York.
- [ 3 ] Wilson, J. T., et al. (1978) , *Nucl. Acids Res.*, **5**, 563—581.
- [ 4 ] Rigby, P.W.J., et al. (1977) , *J. Mol. Biol.*, **113**, 237—251.
- [ 5 ] Collin, F. S., and Weissman, S. M. (1984) , *Prog. NAR Mol. Biol.*, **31**, 315—458.
- [ 6 ] Deisseroth, A., et al. (1977) , *Cell*, **12**, 205—218.
- [ 7 ] Tam, J. W. O., et al. (1985) , Submitted for publication.
- [ 8 ] Shinnick, T. M., et al. (1975) , *Nucl. Acids Res.*, **2**, 1911—1929.
- [ 9 ] Hui, C.C. (1985) , Personal communication.
- [10] Melton, D.A., et al. (1984) , *Nucl. Acids Res.*, **12**, 7035—7056.
- [11] Leary, J.J., et al. (1983) . *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **80**, 4045—4049.



# THE DETECTION OF SINGLE COPY GENES IN GENOME BY DIRECT HYBRIDIZATION TECHNIQUE

Huang, Chen-han

*(Laboratory of Molecular Biology, Hunan Medical College, Changsha)*

J.W.O.Tam V.M.S.Lam and Y.K.Woo

*(Department of Biochemistry, University of Hong Kong, Hong Kong)*

## ABSTRACT

This paper describes an alternative of Southern blotting technique for the genomic restriction mapping studies. The normal and thalassemic DNAs are completely digested with restriction endonucleases and electrophoresed on agarose gel. The resulting gel is then dry-blotted, denatured, neutralized, and hybridized with appropriate globin genespecific probes. The modified direct gel hybridization procedure has the advantage of simplicity, inexpensiveness, and time-saving. It can provide sensitive and reliable detection for single copy genes thereby being applicable to the prenatal diagnosis of genetic diseases and the analysis of DNA polymorphisms. The potential combination of this method with existing probe-making systems has also been discussed.

**Key words:** Genomic restriction mapping, Direct gel hybridization, Globin genes, Prenatal diagnosis, Thalassemia