

一种简便的 DNA 斑点杂交法

王 壬 学

史 瀛 仙

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071) (中国科学院发育生物学研究所)

摘要 本文介绍了一种简便、快速的动物 DNA 斑点杂交法。本方法省略了常规方法中的 DNA 提取步骤, 与常规方法相比较, 结果完全一致。

DNA 斑点杂交 (Dot blot) 是分子生物学的基本实验手段之一。在遗传学、发育生物学、细胞生物学等许多学科中有广泛的应用。常规的动物组织的 DNA 斑点杂交都要先经 DNA 提取, 即要将动物组织捣碎消化后经酚抽提去蛋白, 将提取的 DNA 经酒精沉淀、真空干燥后重新溶解。然后将溶解后的 DNA 点到杂交膜上进行分子杂交。本文介绍一种勿须经过 DNA 提取而直接进行斑点杂交的简化方法。

(一) 材料与方 法

1. 材料 实验动物 子一代转抗冻蛋白基因 (opAFP-pUC19 重组质粒, 4.7kb)^[1] 的金鱼, 平均每细胞含 100 个拷贝的外源抗冻蛋白基因。

探针 DNA opAFP-pUC19 重组质粒, 4.7kb。

2. 方法 标记方法 $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP 缺口平移

法标记^[2]。 $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP 购自美国 INC 公司。标记强度在 $10^7\text{cpm}/\mu\text{g}$ 。

组织消化和 DNA 定量 材料主要用鱼鳍。各剪鱼鳍若干, 蒸馏水洗, 称重, 加 10 倍体积消化液 (0.1mol/L EDTA, 1% SDS, 50mmol/L Tris-Cl, pH8.0), 各加蛋白酶 K (Proteinase K, Boehringer) $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 55°C 消化 5hr。取消化液各 $0.5\mu\text{l}$, 标准量 DNA 一起进行电泳, 溴化乙锭染色。对比标准 DNA 的荧光强度, 在紫外光下确定其 DNA 的含量。

变性 取含有 $10\mu\text{g}$ DNA 的组织匀浆液, 加 0.2mol/L NaOH/2mol/L NaCl 和蒸馏水使最终体积为 $20\mu\text{l}$, 终浓度 NaOH 为 0.1mol/L/NaCl 为 1mol/L。

点样 取硝酸纤维素膜 (Millipore 产品), $2\times\text{SSC}$ 浸透, 干燥, 将组织匀浆点于膜上。阴干后 80°C 烘烤 2hr。剩下的组织匀浆液在 4°C

保存,个别样品如需要可进一步抽提纯化。

杂交^[1] 预杂交(预杂交液: $6 \times \text{SSC}$, $100 \mu\text{g}$ 单链鲑鱼精子 DNA, $5 \times \text{Denhart's}$, $0.5\% \text{SDS}$), 65°C 杂交 4—6hr。然后加入变性的标记探针, 65°C 杂交 16hr。杂交完毕后洗膜: 1) $2 \times \text{SSC}$, 室温 15', 两次; 2) $2 \times \text{SSC}/0.1\% \text{SDS}$, 65°C 30', 一次; 3) $0.1 \times \text{SSC}$, 室温 10', 一次。杂交膜取出后稍稍阴干, 压上 X 光片曝光 7 天。

(二) 结果与讨论 取子一代转抗冻蛋白基因金鱼的组织用蛋白酶 K 消化, 将消化后的组织匀浆直接点样杂交的结果和经常规的酚、酚/氯仿/异戊醇, 氯仿/异戊醇三步提纯后的 DNA 点样进行斑点杂交的结果如图。从图中可以看出, 用组织匀浆直接点样进行 DNA 斑点杂交的结果和用提纯后的 DNA 进行杂交的结果基本一致: (1) 阴性对照并不因为杂蛋白的存在而增加斑点的杂交强度; (2) 阳性样品的杂交强度和作为比较的阳性 DNA 杂交的

强度相当; (3) 用组织匀浆点的斑点扩散略大于纯化的 DNA 所点的样。

本方法主要省略了组织 DNA 的酚抽提步骤。在常规的斑点杂交法中, 动物组织经匀浆后须经酚抽提, 这一步骤耗时耗力, 样品损失大。而且酚等有机溶剂有毒性, 对操作者有一定损害。再者, 用常规方法提取的 DNA 溶解比较困难, 一般至少要过夜甚至一两天后 DNA 才能溶解完全。本方法大大简化了这些复杂程序, 而并不影响杂交的效果。在样品量很少时, 本法尤其显示出优越性。如同一种组织多个样品进行斑点杂交时, 本方法在定量上也可以简化, 只须在消化前称取相同量的组织, 加同样体积的消化液消化。然后在电泳后荧光定量时, 只定量其中一个样品便可推知其它样品的 DNA 含量。

从本实验的结果看, 简化后的斑点杂交法可靠、简便, 可以节约药品并减少对操作者的损害。

参 考 文 献

- [1] Hew C. L. et al. 1988 Multiple genes provide the basis for antifreeze protein diversity and dosage in the Ocean Pout, *Macrozoarces americanus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(24): 12049.
- [2] Rigby P. W. J. et al. 1977 Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113: 237.
- [3] Southern E. 1975 Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503.

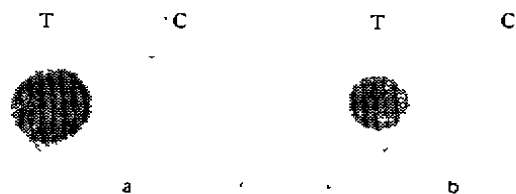


图 1 同一样品的简易法 DNA 斑点杂交和常规法 DNA 斑点杂交的结果比较。

a. 简易法 DNA 斑点杂交; b. 常规法 DNA 斑点杂交; T. 阳性, 即子一代转基因金鱼的样品; c. 阴性对照。