

基于地高辛标记对小麦进行 Southern 杂交分析 主要影响因素的优化和验证

刘 禄^{1,2}, 牛焱焱^{2,3}, 雷 昊⁴, 林志珊², 赵翔宇¹, 叶兴国², 张宪省¹

(¹ 山东农业大学发育分子生物学实验室/国家重点实验室, 山东泰安 271200; ² 中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物
基因资源与基因改良重大科学工程/农业部作物遗传改良与育种重点开放实验室, 北京 100081;

³ 中国科学技术大学, 合肥 230026; ⁴ 北京城市学院, 北京 100083)

摘要:以转基因小麦和野生型小麦 DNA 为材料, 对利用地高辛标记对小麦基因组 DNA 进行 Southern 杂交分析的影响因素进行了优化研究, 包括探针制备与纯化、样品 DNA 量、酶切体系、真空转印条件、杂交条件、免疫检测方法等。结果表明, 对随机引物标记的模板和标记后的探针进行纯化可明显提高探针的标记效率, 10 μg 高质量的 DNA 样品在 80 μl 的体系中, 酶切 8 ~ 12h 可获得良好的效果; 真空转膜时使用碱性液比中性液获得的转膜效果更干净; 试剂纯度、杂交温度及杂交炉转速等均对杂交效果产生重要影响; 配合改进的 CSPD 涂布方法, 使用化学发光检测系统比单纯使用 X 光片显像更易操作, 背景更干净; 本研究所优化的地高辛标记的小麦 Southern 杂交分析显示出较高的灵敏度和信噪比, 结果稳定, 可克服同位素标记对实验条件、设备及实验人员身体状况等限制, 在普通实验室推广应用。

关键词:小麦; 地高辛标记; 随机引物; PCR 法标记探针; 免疫检测; Southern 杂交

Optimizing and Confirming of Digoxigenin Based Southern Blotting for Wheat Genome Analysis

LIU Lu^{1,2}, NIU Yan-yan^{2,3}, LEI Hao⁴, LIN Zhi-shan², ZHAO Xiang-yu¹, YE Xing-guo², ZHANG Xian-sheng¹

(¹ State Key Laboratory, Shandong Agricultural University Development of molecular biology laboratory, Shandong Taian 271200;

² National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/ Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding
of ministry of Agriculture /Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

³ University of Science and Technology of China, Hefei 230026; ⁴ Beijing City University, Beijing 100083)

Abstract: The Southern blot analysis based on isotope labeling technique has some shortages such as facility limitation, environmental pollution, and poor stability. Therefore, establishing a safe, stable and efficient Southern hybridization protocol is very important to detect the integration of exogenous genes in transgenic wheat. In this study, by using the DNAs from wild-type wheat and transgenic wheat as material, the DIG-labeled Southern blot analysis was improved through modifying several key steps, including probe preparation and purification, usage of DNA samples amount, digestion system, vacuum transfer conditions, stringent hybridization conditions, and immunoassay detect. The results showed that the purifications of DNA template and probe-labeled could significantly improve the efficiency of the probe labeling when random prime labeling method was used. Desirable digestion result could be achieved when 10 μg DNA samples with high quality was enzymed in 80 μl reaction system for 8 ~ 12 hours. In the vacuum transfer step, alkaline liquid was better than neutral liquid to obtain clean transmembrane effect. Reagent purity, the temperature and the rotation speed in hybridization inside the hybridization oven impacted on the hybridization results greatly. Application of chemiluminescence detection system combining with improved coating CSPD

收稿日期: 2011-08-08 修回日期: 2011-11-17

基金项目: 转基因专项 2008ZX08002

作者简介: 刘禄, 硕士研究生。研究方向: 小麦生物技术。E-mail: liu1985lu@126.com

通讯作者: 林志珊, 副研究员。研究方向: 小麦遗传育种。E-mail: linzs@caas.net.cn

method was not only easier to operate but also cleaner in background comparing X-ray imaging optimized. The improved digoxigenin-labeled Southern blot technique showed good sensitivity and high ratio of signal to noise for wheat DNA analysis, can be used stably and widely in ordinary laboratory, overcoming restrictions of isotope labeling to experimental conditions, equipments and physical status of researcher.

Key words: Wheat; Digoxigenin; Random primer; PCR DNA labeling; Immunological detection; Southern blotting

同位素标记法是 Southern 杂交最经典的方法, 具有较高的灵敏性^[1], 但需要在特定的实验室及防护措施辅助下进行。由于同位素的放射性, 实验受研究者的身体状况、安全防护措施和同位素订购及半衰期等因素的严格限制。地高辛标记探针化学发光法检测的 Southern 杂交应用抗体(碱性磷酸酶)结合探针, 再用化学底物结合抗体的级联放大反应原理使检测的灵敏度^[2]明显提高, 同时可在常规实验室安全操作, 实验时间灵活, 周期明显缩短。据报道, 棉花^[2]、烟草^[3]、水稻^[4]、油菜^[5]等植物用地高辛标记的 Southern 杂交技术均获得良好的杂交效果。然而庞大而复杂的六倍体小麦基因组中内、外源基因的 Southern 杂交分析面临着很大的挑战, 尤其是利用该技术对小麦进行转基因检测。因为小麦基因组高达 17000Mb, 是人类基因组的 5 倍, 是拟南芥基因组的 140 倍, 而且基因组内部有大量的冗余重复序列, GC 含量高, 每个内源基因往往含有至少 3 个以上的拷贝。针对转基因小麦的地高辛标记探针的 Southern 杂交技术的成功报导尚不多, 关于方法的介绍更罕见^[6]。本研究主要以转半夏凝集素基因(*Pinellia ternate pta*)小麦及受体为材料, 参考前人的成功经验, 结合本实验室的实际情况, 对地高辛标记探针的 Southern 杂交方法进行了优化, 取得了较好效果。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

转 *pta* 基因的 T₃ 代小麦由本课题利用基因枪介导法获得。

1.2 溶液的配制

主要溶液的配制参照说明书略有改动(最好采用纯度较高的药品, 本实验采用 AMRESCO 公司产品)。国产试剂可经 0.45 μm 滤膜过滤后使用^[2]。

1.3 探针标记

采用随机引物法(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter kit II REF: 11 585 614 910, Roche)标记探针: 以 *pta* 基因的质粒载体 PRTL2 为

模板, PCR 扩增 827 bp 的 *pta* 基因片段(正向引物 Sma1PtaF: 5'-TCC CCC CGG GGC TCC TTC CTC ATG GCC T 3'; 反向引物 Xba1PtaR: 5'-GCT CTA GAG CTC ATT TCG CTT ATT TCA CC 3', 由上海生物工程公司合成), 用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和纯化试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)回收、纯化目的片段, 同时标记 221bp 片段以便于相互比较。

将 300 ~ 500ng 上述纯化好的 DNA 模板加入灭菌去离子水至 16 μl, 混匀, 沸水煮沸 10min, 然后立即冰浴冷却。加 4 μl 的 Dig-High prime(vial 1), 用灭菌去离子水补足到 20 μl, 稍离心, 37 °C 孵育 20 h, 加 2 μl 0.2M EDTA 终止反应, -20 °C 保存。

采用 PCR 法(PCR DIG Probe Synthesis Kit, Cat. No. 11 636 090 910, Roche)标记探针: 50 μl 的反应体系如下: MgCl₂ 的 PCR buffer 10 × conc (vial 3) 5 μl, PCR DIG Probe Synthesis mix (vial 2) 5 μl, forward PCR primer, 10 × conc 5 μl, reverse PCR primer, 10 × conc 5 μl, Enzymemix (vial 1) 0.75 μl, 模板 DNA (基因组 DNA 1 ~ 50ng 或质粒 DNA 10 ~ 100pg); 对照将上述 PCR DIG Probe Synthesis mix (vial 2) 换成 dNTP stock solution(vial 4)。反应条件可采用 PCR 鉴定时的最佳优化条件。分别标记了 424bp 和 827bp 片段以便相互比较。

1.4 探针纯化及标记效率检测

使用探针纯化试剂盒(High pure PCR Product Purification kit REF: 11 732 668 001 Version 15.0 Roche)对随机引物法标记的探针进行纯化。将上述 20 μl 的体系加灭菌去离子水补足至 100 μl, 加 500 μl 结合缓冲液, 混匀, 将混合物加入高度纯化的过滤管中; 13000 × g 30 ~ 60s, 弃废液; 加 500 μl 洗涤缓冲液 13000 × g 60s 弃废液; 再加 200 μl 洗涤缓冲液 13000 × g 60s 弃废液; 最后加入 30 μl 洗脱缓冲液 13000 × g 60s 得到纯化的探针, 对纯化后探针标记效率的检测方法参照说明书, 以期确定探针的加样量, 纯化后的探针小管分装, -20 °C 保存备用。参看周长发等^[2]的方法, 使用 0.22 μm 滤膜过滤纯

化探针,效果较好。

1.5 小麦基因组 DNA 的提取及纯化

采用改良的 CTAB 法^[7,8]进行提取,略加改动,细节如下: 60 ~ 65℃ 预热 CTAB 提取缓冲液 (100mmol/L Tris-Cl (pH8.0), 20mmol/L EDTA, 1.5 mol/L NaCl, 2% (m/v) PVP40, 2% (m/v) CTAB, 临用前加 2% (v/v) 的 β -巯基乙醇), 每 20ml 提取液加入 4g 样品, 水浴 30 ~ 60min; 用苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 和氯仿: 异戊醇 (24: 1) 各抽提一遍, 室温下 4000 rpm 离心 20min 或 10000r/min 离心 10min, 以除净蛋白; 用剪过的黄色灭菌枪尖小心移取上清液, 用预冷的异丙醇沉淀出絮状 DNA; 小心挑取絮状 DNA, 用 70% 的乙醇清洗两遍, 再用 100% 乙醇洗一遍, 清洗过程不用离心以保持 DNA 的完整性, 超净工作台中吹干乙醇, 加 1ml ddH₂O 回溶。

样品纯化: 每管加 20 μ l RNaseA (10mg/ml), 37℃ 水浴 1h, 除去 RNA; 再用苯酚/氯仿和异戊醇 (25: 24: 1) 混合液抽提 2 遍。如上述, 乙醇清洗后吹干, ddH₂O 回溶; 用分光光度计 (Thermo SCIENTIFIC MANODROP 2000 Spectrophotometer) 测定样品 DNA 浓度及 A260/A280、A260/A230 的 OD 值。

1.6 样品酶切及电泳

80 μ l 酶切体系中含 10 μ g 纯化的小麦 DNA (大约含有 10pg 单拷贝^[9])、80U 限制性内切酶 (Promega)、8 μ l 10 \times buffer, 1 μ l BSA (10mg/ml), 加 ddH₂O 补至 80 μ l, 酶切 8 ~ 12 h 后取 5 μ l 电泳, 观察小麦 DNA 是否酶切彻底。酶切充分的 DNA 加 5 μ l 10 \times loading buffer 轻轻混匀, 质粒 DNA 的上样量 < 1ng, 将 DNA 直接上样到 0.7% 的琼脂糖凝胶的样品孔中, 40 V 电泳 12 h 或 60V 电泳 7 ~ 8h (注意: 跑电泳前 1h 开始制胶效果较好, 胶不宜太厚)。

1.7 真空转膜及固定

前处理。将凝胶浸泡在 0.25M HCL 中脱嘌呤 15 ~ 20min, 室温下轻轻震荡至溴酚蓝带变黄, 用蒸馏水洗涤 2 次; 之后将胶泡入碱转液 (0.4mol/L NaOH, 1mol/L NaCl) 中待转膜时用。裁剪大小合适的带正电荷尼龙膜 (Hybond2N+, Amersham Pharmacia biotech) 将膜浸入 ddH₂O 中至完全浸湿 10min, 然后转入碱性转移液中至少 5min, 切去一角做方位标记。

转膜参照周长发等^[2]的方法用 785 型真空转印仪 (Bio-Rad) 进行, 碱性转移可不用固定^[9]。用滤纸将膜吸干, 保鲜膜包裹后置 4℃ 冰箱保存。

1.8 杂交及显影

参照说明书, 根据实际情况略有改动。细节如下: 水浴锅 (37 ~ 42℃) 中预热预杂交液 1h, 取 10ml 加入杂交管 (Robbins scientific 140℃ MAX), 杂交炉 (Robbins scientific MODEL 1000 JAPAN) 中预杂交 30min 至 2h; 取适量探针加 100 μ l 杂交液, PCR 仪 94℃ 5min, 迅速置于冰上 5min; 将变性的探针加入到 5 ~ 7ml 42℃ 预热的预杂交液, 轻轻混匀, 防止气泡产生; 在灭菌孵育托盘中用低严谨洗膜液 15 ~ 25℃ 漂洗 2 \times 5min; 65 ~ 68℃ 高严谨洗膜液中漂洗 2 \times 15min; 后续步骤参照说明书即可。

上述所用的试剂中, 严谨洗涤液可去除非特异性的杂交, 减少非同源性探针的结合^[9], 降低实验背景。Washing Buffer 主要是清洗严谨洗涤液, 同时为封阻液的加入做准备; Blocking Solution 用于封阻膜上的非特异性结合位点; Anti-Dig-AP 使得碱性磷酸酶与地高辛标记的探针结合; 再次使用 Washing Buffer 去除未结合的多余抗体; 碱性磷酸酶的缓冲液 Detection Buffer 在适宜条件下 CSPD 与碱性磷酸酶作用去磷酸化化学发光^[10-11], 以便于信号的收集。

CSPD 的涂布。避光条件下, 戴手套在孵育托盘反面铺一层保鲜膜, 放上尼龙膜, 用移液器将 CSPD 均匀滴加到尼龙膜一端, 将托盘立起使 CSPD 自然流淌至整个尼龙膜; 再用保鲜膜覆盖, 玻璃棒擀压出多余的 CSPD。室温下反应 5min, 37℃ 孵育 30 ~ 60min。

显像方法如下。方法 1: 暗室中压 X 光片 (Kodak 公司), 压片时间根据信号强弱而定, 1h 至数小时不等; 洗片时, 显影 15s 至 1min, 清水简单漂洗, 定影 15s 至 1min, 清水冲洗即可。方法 2: 直接用化学发光检测系统 (Chemi DOC-IT Imaging system, UVP) 扫描上述尼龙膜, 37℃ 孵育反应 30min 至 1h, 扫描 30min 至 1h。曝光时间根据孵育时间和信号强度来确定。

1.9 探针的洗脱和再次杂交

探针的洗脱和再次探针杂交参照说明书进行。先用双蒸水充分洗涤膜, 然后在 37℃ 条件下用含有 0.1% SDS 的 0.2mol/L NaOH 洗涤两次, 每次 5min, 以去除地高辛标记的探针, 最后用 2 \times SSC 充分洗涤 5min 后即可用另一个探针进行预杂交和杂交。一般再杂交最好换新的不同长度的探针。

2 结果与分析

2.1 探针标记效率检测及探针纯化对 Southern 杂交效果的影响

2.1.1 随机引物法标记效率检测 图 1 A 和 B 分别显示模板和探针纯化前、后的标记效率。显然, 标记效率受模板和探针纯度影响^[12], 探针纯化除去了随

机标记的小片段, 使标记效率得到较大提高。如图 1B 所示, 探针稀释后的量(对照行浓度由左到右: 10pg、3pg、1pg、0.3pg、0.1pg、0.03pg、0.01pg、0) 达 0.1pg 的点(箭头所指)与对照点均可见, 说明标记的探针达到了预期的标记效率(表 1), 能够满足杂交所需的探针浓度。参照下表, 当杂交液为 6ml 时, 根据说明书通过计算加入 2 μ l 的 *pta* 探针即可。

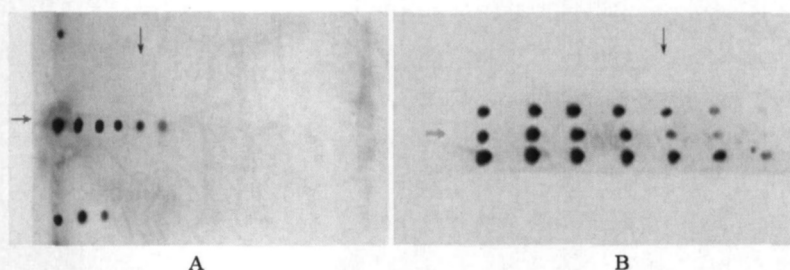


图 1 随机引物法探针标记效率的检测

Fig. 1 Detection of probe labeling efficiency by random primed labeling method

A 探针纯化前, 上(出现 1 个点): 地高辛标记的 221bp 探针; 中(横箭头所指): 地高辛标记的对照 DNA; 下(出现 3 个点): 地高辛标记的 827bp DNA; B 探针纯化后, 上(出现 6 个点): 地高辛标记的 221bp 探针; 中(横箭头所指): 地高辛标记的对照 DNA; 下(出现 7 个点): 地高辛标记的 827bp DNA
A probe before purification upper row (one spot): the 221bp digoxigenin-labeled probe; middle row (three spots pointed with horizontal arrow): digoxigenin-labeled DNA. lower row (six spots): digoxigenin labeled 827bp DNA; B probes after purification: upper row: digoxigenin labeled 221bp probe; middle row (pointed with horizontal arrow): digoxigenin labeled control DNA; lower row (seven spots): digoxigenin labeled 827bp DNA

表 1 理想条件下 20 μ l 反应体系中标记产量

Table 1 The newly synthesized DNA amount in 20 μ l labeling reaction system under optimal conditions

纯化的模板 DNA 量(ng) Amount of purified template	新合成的 DNA 量(ng) Amount of newly synthesized DNA	
	1h	20h
10	45	600
30	130	1050
100	270	1500
300	450	2000
1000	850	2300
3000	13500	2650

2.1.2 PCR 法标记效率检测 采用电泳方法对标记效率进行检测(图 2)。地高辛标记的探针比相应未标记的对照 DNA 分子量增大, 电泳时跑得相对较慢; 亮度相当时, 一般每毫升杂交液加 2 μ l PCR 标记产物, 产物条带特别亮时可酌情减少到 0.5 μ l/ml 杂交液, 反之, 产物条带暗时可酌情增加到 4 μ l/ml 杂交液。

采用不对称 PCR 标记法得到的标记探针大多为单链, 将探针加入杂交液之前, 探针可不经过去

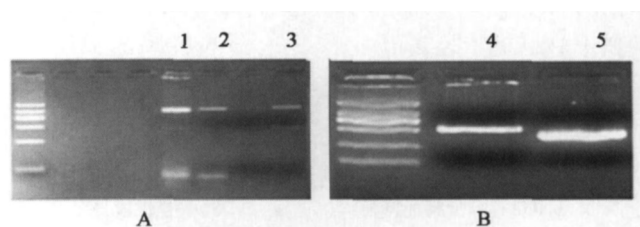


图 2 PCR 法探针标记效率的检测

Fig. 2 Detection of the probe labeling efficiency by PCR labeling method

A 采用不对称 PCR 标记法标记的 827bp 的探针, 1: 非地高辛标记的阳性对照; 2: 下游引物稀释 10 倍; 3: 下游引物稀释 20 倍; B 采用常规优化后 PCR 标记法标记的 424bp 的探针 4: 地高辛标记的探针; 5: 非地高辛标记的阳性对照
A Using asymmetric PCR labeled 827bp probe: 1 Non-dig-labeled positive control; 2 downstream primers diluted 10 times; 3 downstream primers diluted 20 times; B PCR-labeled 424bp probe in optimized condition: 4 dig-labeled probes; 5 non-dig-labeled positive control

性处理; 而采用常规 PCR 标记法标记的探针大多为双链, 将探针加入杂交液之前, 探针需经过变性处理。

2.1.3 探针纯化对杂交结果的影响 本实验采用纯化试剂盒纯化模板, 探针纯化试剂盒进行探针纯化, 通过纯化前后杂交结果的对比(图 3 A 和 3B), 发现纯化后杂交背景干净, 信噪比和灵敏度都有很

大提高,因此,为了保证实验的成功与结果的清晰,有必要进行模板与探针的纯化。

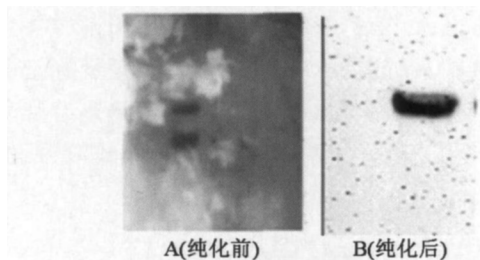


图3 探针纯化前后杂交结果比较

Fig. 3 Comparison of hybridized results before and after probe purification

A: before purification; B: after purification

2.2 小麦 DNA 质与量及酶切体系对 Southern 杂交效果的影响

2.2.1 小麦 DNA 的质量

Southern 杂交要求提取的 DNA 具有较高的质量。可通过电泳对提取的基因组 DNA 的完整性进行检查,完整性好的 DNA 电泳条带主带明显,无拖尾(如图 4A 和 4B)。借助分光光度计检测样品的 OD 值,OD260/280 在 1.7 ~ 1.9 间样品中蛋白含量较少,OD260/230 大于 2.0 一般说明无机盐小分子杂质较少。本试验中大部分样品的 DNA 质量达到上述标准(表 2)。

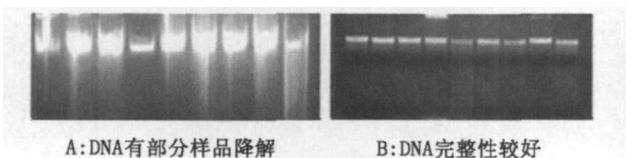


图4 小麦基因组 DNA 的电泳图谱

Fig. 4 Electrophoresis patterns of wheat genomic DNA

A: some samples with degradation;

B: DNA samples with better integrity

表2 部分小麦试验材料的 DNA 浓度及 OD 值

Table 2 DNA concentration and OD values of some wheat samples

材料编号 Material number	浓度(ng/μl) Concentration	OD260/OD280	OD260/OD230
11Fa975	692.3	1.78	2.01
11Fa978	712.8	1.81	2.03
轮选 978	1129.7	1.83	2.10
CL152-3	434.5	1.84	2.07
CL205-6	342.8	1.91	2.05
CL205-7	608.8	1.82	2.13
石 4185	575.5	1.97	2.02
CL443-6	692.5	1.85	2.07
CL443-8	757.9	1.99	2.06
CL451-7	629.8	1.85	2.01
CL451-10	1027.5	1.79	2.10
Kn199	530.3	1.91	2.19

Southern 杂交前最好对待测材料再进行一次 PCR 扩增,一般如果提取的 DNA 质量比较好,则 PCR 扩增的目的条带很明显,DNA 的亮度还可能与基因的拷贝数有关。

2.2.2 杂交所需 DNA 样品量

由于小麦基因组大,重复序列多,为了获得较强的杂交信号,我们曾以 30、60、90、120 μg 的 DNA 量进行杂交,但结果并不十分理想(图 5),并非 DNA 量越多越好,当高质量的样品 DNA 在 10 μg 左右时也可得到很好的杂交信号,与之相比,样品量太大容易造成较深的背景。

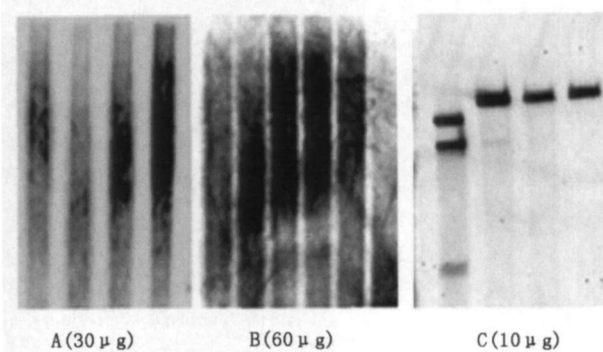


图5 不同 DNA 量的 Southern 杂交图谱

Fig. 5 Southern hybridization patterns with different amount of DNA

2.2.3 酶切体系

本试验选择目标基因内不存在的 2 个常用限制性酶 *EcoR* I、*Hind*III 消化转 *pta* 基因的小麦植株基因组(图 6)。

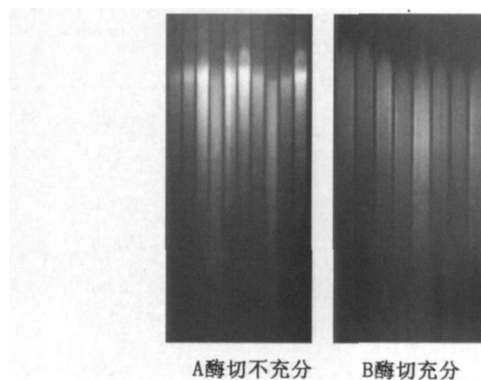


图6 酶切结果检测

Fig. 6 Results of enzyme digestion

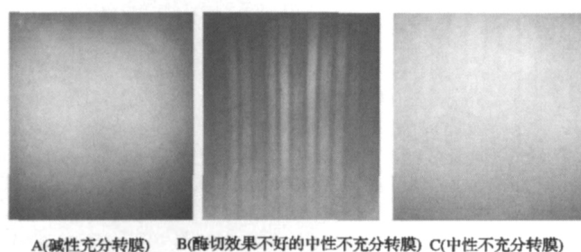
A: incomplete digestion; B: completed digestion

10 μg 的 DNA 量,在 80 μl 酶切体系中,大约需 8 ~ 12h 即可获得好的酶切结果。如果酶切体系比较大(>200 μl),且 DNA 量较大,最好用乙醇或异丙醇沉淀,但离心后,细碎的 DNA 容易粘在管壁,不容易被收集,操作不当,易造成 DNA 损失。因此,在保证提取 DNA 质量的前提下,先进行纯化再进行酶

切 酶切产物直接上样,可避免 DNA 损失,且基本不影响杂交结果。

2.3 转膜方式对 Southern 杂交效果的影响

分别尝试了中性转膜(10 × SSC)和碱性转膜(0.4mol/L NaOH、1mol/L NaCl)两种方法。如图 7 所示,采用带正电荷尼龙膜的同时运用碱转液进行转膜容易获得干净的转膜效果。



A(碱性充分转膜) B(酶切效果不好的中性不充分转膜) C(中性不充分转膜)

图 7 两种转膜方法比较

Fig. 7 Comparison of two methods of membrane transferring

A: fully transfer (alkaline condition);

B and C: incompleted transfer (neutral condition)

2.4 杂交条件对 Southern 杂交结果的影响

2.4.1 杂交液用量 对于面积为 12cm² 的尼龙膜,建议用 10ml 预杂交液预杂交 1~2h,再用 5~7ml 小体积的杂交液,同时采用小的杂交转速(4r/min)均有助于探针与样品 DNA 的杂交结合。

2.4.2 免疫检测 CSPD 涂布不均匀(图 8B 和 D)将导致整个图像信号强弱不均,利用改进后的底物滴加方法(1.5.7.9),方便快捷,效果较好(图 8A 和 C)。使用化学发光检测系统比使用 X 光片显像背景干净,操作更方便,因此有条件的实验室可使用化学发光检测系统显像。

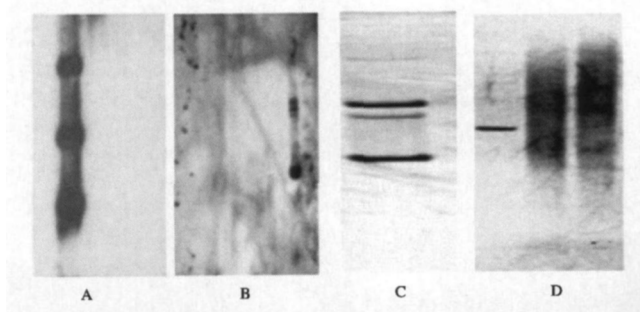


图 8 CSPD 涂布均匀(A,C)与不均匀

(B,D)及不同显像方法(A,B:X 光片显像;

C,D:化学发光检测)的 Southern 杂交结果

Fig. 8 Southern hybridization patterns with CSPD uniform (A,C) or uneven (B,D) coating with different imaging methods (A,B X-ray; C,D chemi luminescence)

2.5 小麦外源基因的 Southern 杂交检测

对 10ug 基因组 DNA 分别进行 *EcoRI*、*HindIII* 酶切,应用上述优化后的地高辛杂交体系,对 2 个不同的转 *pta* 基因的小麦株系进行 Southern 杂交。图 9A 和 B 分别显示随机引物法和 PCR 法标记标记探针的杂交图谱,可见,杂交带较清晰,背景浅。

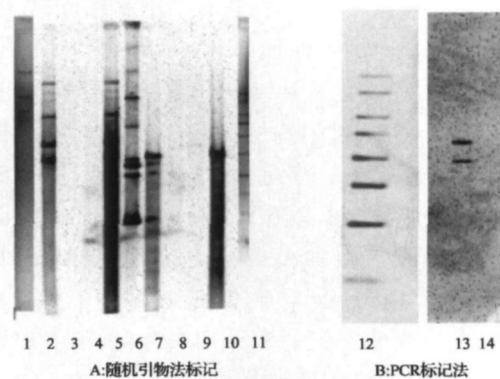


图 9 不同探针标记方法的杂交结果

Fig. 9 Hybridization patterns of different probe labeling methods

1: marker (λ HindIII); 2,3,4,5: *EcoRI* 酶切的样品;
6: 质粒(未酶切); 7,8,9,10: *HindIII* 酶切的样品; 2 和 7,5 和 10: 分别同一个样品对; 11: Marker (1kb ladder); 3 和 8,4 和 9: 同一个阴性样品; 12: marker (1kb ladder); 13: 阳性植株; 14: 阴性植株
1: marker (λ HindIII); 2 3 4 5: digestion with *EcoRI*; 6: plasmid (not digested); 7 8 9 10: digestion with *HindIII*; 2 和 7 5 和 10: the same sample pair; 11 marker (1kb ladder); 3 和 8 4 和 9: the same negative sample pare; 12: marker (1kb ladder) 13: positive sample; 14: negative sample

3 讨论

本实验发现 DNA 的质量是后续试验顺利进行的关键,只有良好的 DNA 质量才容易获得酶切彻底、转膜充分的效果。本实验尝试了 SDS 和改进的 CTAB 法,发现改进的 CTAB 法比较适合多糖含量较高的小麦基因组 DNA 的提取。如果选用大的酶切体系,后面选用苯酚氯仿抽提,损失会比较大;针对大体系也有直接加乙醇或异丙醇沉降^[2]的报道,损失不可避免,往往导致最终的样品量不确定。本试验在保证 DNA 良好质量的前提下,采用小体系酶切,直接点样,实验结果基本不受影响。毛细管向上转膜^[1]是比较经典的转膜方法,但耗时较长(24h 左右),中间需要多次更换滤纸,操作比较繁琐,充分性不能有效保证,使用真空碱性转膜^[2]省时省力,大约需 2h 就可以充分转膜,有效地缩短了转膜时间。

同位素标记法是 Southern 杂交最经典的使用方

法,具有较高的灵敏性,但需要在特定的实验室及防护措施辅助下进行;与之相比,地高辛标记法^[13-14]可在常规实验室安全的进行操作,实验时间灵活,周期明显缩短,大约一周可以进行2次,每次3~4张尼龙膜。本试验用10ug的DNA样品便可得到较为清晰的杂交带,说明该方法同样具有较高的灵敏性。

随机引物标记法可标记的DNA长度范围为300~1500bp,常见的如800bp,可检测0.10~0.03pgDNA,10μg的样品DNA大约含有10pg的单拷贝基因^[9];但随机引物标记法需要高纯度的模板DNA用于探针标记。相对而言,PCR标记法一般更适于小一些片段,可检测0.10~0.03pgDNA,标记效率较高,需要少量的模板如质粒DNA 10pg,基因组DNA 10ng即可,且对模板纯度要求不大。PCR标记法,若模板和标记的探针均未纯化,可能导致杂交结果带有一些模糊的背景(图9B)。

虽然地高辛标记探针具有碱不稳定性,但据本研究的结果,我们依然建议采用碱性转膜方法,再用中和缓冲液(0.5mol/L Tris-Cl (pH7.5), 1mol/L NaCl)和2×SSC进行中和处理。该方法转膜效果较好,对灵敏度影响不大^[2]。由于DNA本身带有负电荷,采用带正电荷尼龙膜的同时采用碱性转膜,有利于DNA与尼龙膜的共价结合^[9]。此外转膜前处理也很有必要,盐酸脱嘌呤使DNA双螺旋结构松散有助于后续的碱变性使DNA形成单链。小麦基因组庞大,脱嘌呤有助于转膜,过犹不及,脱嘌呤(0.25M)时间15~20min,以二甲苯青条带刚刚变黄为宜,时间太长会导致DNA条带的断裂^[7]。

酶切不充分的杂交可能与DNA提取的质量和酶切体系有关^[15]。酶切不充分并伴有非特异性的杂交,则可能还与杂交温度太低有关,可参照说明书根据公式进行计算: $T_m = 49.82 + 0.41(\%G + C) - (600/l)$ [l = length of hybrid in base pairs]
 $T_{opt} = T_m - 20$ to 25℃ 本实验: $(G + C)\% = 61\%$ $l = 827$, $T_m = 49.82 + 0.41 \times 61 - (600/827)$
 计算结果: T_{opt} 是 49~54℃, 本实验选用 50℃。

合理的曝光时间根据孵育时间和信号强度来确定,一般2h后信号最强,24h内信号都存在。

致谢: 生物技术研究所在抗虫棉课题组研究生史计、张晓在技术上提供了很多指导,作物科学研究所大豆分子生物学课题组在仪器使用上提供了便利,小麦分子育种课题组陈明博士、徐琼芳副研究员给予了许多建议、启发和帮助。

参考文献

- [1] Southern E M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. [J] Mol Biol, 1975, 98 (3): 503-517
- [2] 周长发, 张锐, 张晓, 等. 地高辛随机引物法标记探针的 Southern 杂交技术优化 [J]. 中国农业科技导报, 2009, 12(4): 123-128
- [3] 梁海泳, 夏秀英, 高晓蓉, 等. 反义4CL与UGPase双价基因在烟草中的转化及表达分析 [J]. 植物学通报, 2007, 24(4): 459-464
- [4] Saika H, Sakamoto W, Maekawa M, et al. Highly efficient visual selection of transgenic rice plants using green fluorescent protein or anthocyanin synthetic genes [J]. Plant Biotechnol, 2011, 28 (1): 107-110
- [5] 刘烜, 郑文杰, 赵卫东, 等. 转基因油菜地高辛标记DNA探针杂交检测方法的建立 [J]. 口岸卫生控制, 2005, 10(4): 10-12
- [6] Cui C J, Song F, Tan Y, et al. Stable chloroplast transformation of immature scutella and inflorescences in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2011, 43(4): 284-291
- [7] 陈昆松, 李方, 徐昌杰, 等. 改良CTAB法用于多年生植物组织基因组DNA的大量提取 [J]. 遗传, 2004, 26(4): 529-531.
- [8] 柴建芳, 刘旭, 贾继增. 一种适合于PCR扩增的小麦基因组DNA快速提取法 [J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(2): 246-248
- [9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W, 黄培堂, 等. 译. 分子克隆实验指南(第7版) [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 487-512
- [10] 刘凤娟, 陈清, 俞守义. 化学发光技术在 Southern 印迹杂交中的应用 [J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(6): 997-998
- [11] Kruchen B, Rueger B. The DIG system nonradioactive and highly sensitive detection of nucleic acids [J]. Biochemica, 2003, 7 (3): 13-15
- [12] 涂知明, 陈玲, 杨广笑, 等. 酶标探针在转基因植物检测中的应用 [J]. 遗传, 2007(12): 1533-1537
- [13] McCabe M S, Power J B, de Laat A M M, et al. Detection of single-copy genes in DNA from transgenic plants by nonradioactive Southern blot analysis [J]. Mol Biotechnol, 1997, 7(1): 79-84
- [14] Heltke H J, Ankenbauer W, Muhlegger K, et al. The digoxigenin (DIG) system for nonradioactive labeling and detection of nucleic acids an overview [J]. Cell Mol Biol, 1995, 41(7): 883-905
- [15] 陆小平, 周文军, 小岛峰雄. 地高辛标记探针在 Southern 杂交分析中的技术要点 [J]. 生物学通报, 2003, 38(1): 52-53