科学通报
第41卷 第14期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1996年7月

新型核酸相减杂交用载体及其杂交效率*

倪晓东** 刘定干*** 李载平
(中国科学院上海生物化学研究所，上海 200031)

关键词 相减杂交 SESA 糖原 Sephadex

核酸分子杂交广泛用于特定序列的核酸的检验、纯化，尤其用于基因或其表达产物的分离、纯化和在基因组上的定位等方面. 从各种组织和细胞系中选择群特异的(分化表达的)核酸种类的杂交，即相减杂交，它在肿瘤分子生物学和抗癌基因的研究中是一种非常重要的研究工具[1,2].

目前使用的相减杂交技术都是在液相进行两群DNA，或一群DNA与另一群RNA(其中含待分离的群特异DNA的称为靶[target]，而用于除去同源序列的DNA和RNA称为推动剂[driver])的杂交，使具同源序列的核酸形成杂合双链. 然后用不同方法除去双链核酸，在溶液中留下未杂交的单链核酸. 这些方法包括：(1)羟基磷灰石柱层析，(2)用生物素标记的推动剂去与靶杂交，再向反应液中加入链霉菌生物素结合蛋白，然后用酚抽提[3]. 然而，这两种方法存在的缺点妨碍了它们的使用，或者效率不高(如(1))，或者试剂价格较昂贵，步骤较多(如(2)). 对-β-硫酸酯乙砜基苯胺(SESA)是活性染料合成的中间体，国内已大量生产. 我们曾经用它制备过对-重氮苯砜乙基纤维素纸(DBSE纸)[4]共价固定核酸进行固相杂交，取得了满意的结果. 因此我们考虑用SESA作偶联剂，把推动剂共价固定在易于分离的高分子载体上，再与靶杂交. 我们制备了对-氨基苯砜乙基葡聚糖凝胶(ABSE-Sephadex，固相载体)和对-氨基苯砜乙基糖原(ABSE-glycogen，液相载体)，并进行了相减杂交的模型试验. 本文介绍试验的结果.

1 材料和方法

1.1 材料

SESA(工业用)购自上海染化八厂. pBR322质粒为本组保存. 昆明小鼠由本所动物房供给. 糖原(动物淀粉)为第二军医大学辉辉药厂产品. Sephadex G-75 Superfine为Pharmacia产品. 5′[α-^{32}P]dCTP为北京亚辉生物工程公司产品. 牛血清白蛋白为SIGMA产品. 蛋白酶K为Boehringer-Mannheim产品. Nick Translation Kit为Promega产品. 化学试剂为进口reagent级或国产分析纯以上级.

1995-07-25收稿，1995-10-26收修改稿
* 国家"八六三"高技术研究发展计划资助项目
** 93级硕士研究生
*** 联系人

1.2 方法

1.2.1 ABSE-糖原与ABSE-Sephadex的制备 基本参照文献[4]. 反应液冷却后,对于加糖原的反应液,加1体积0.1 mol/L Tris. HCl pH 8饱和的酚,旋涡混合,5 000 r/min离心5 min,去上清. 橙红色沉淀溶于H_2O后再用1体积无水乙醇沉淀之,沉淀用70%, 95%乙醇分别洗1次,在50℃烘干,存4℃备用. 对于加Sephadex的反应液则用重蒸水反复洗涤,使洗脱液OD_{260}接近零,再用70%和95%乙醇分别洗1次,悬浮于重蒸水,在4℃保存.

1.2.2 鼠肝DNA的抽提 按文献[5]进行. 高分子DNA用灭菌匀浆器打断,乙醇沉淀,50℃烘干,溶于重蒸水至1 μg/μL,保存于−20℃. 临用前100℃水浴变性.

1.2.3 pBR322质粒的处理 将pBR322质粒用Hind Ⅲ酶解为线型,纯化后烘干,溶于重蒸水至1 μg/μL,保存于−20℃. 临用前100℃水浴变性.

1.2.4 ABSE-糖原与ABSE-Sephadex与核酸的偶联 1% ABSE-糖原或ABSE-Sephadex 100 μL冰中冷却之后,加1%的$NaNO_2$ 40 μL,再加入1 *N* HCl 20 μL,冰中保温10 min使氨基基团重氮化(重氮化后的ABSE-糖原和ABSE-Sephadex特称为DBSE-糖原和DBSE-Sephadex),用pH 7.0的1 mol/L NaH_2PO_4缓冲液调pH至5(试纸检验)后,分别快速加入热变性的冰冷的DNAs(鼠肝DNA或pBR322质粒DNA)各100 μL,混匀,用上述磷酸盐缓冲液调pH至接近7. 此时溶液变为棕红色. 有时当pH调至5时溶液即变色,加入核酸后色泽变深. 反应混合物在室温放置30 min.

偶联后,DBSE-糖原直接用等体积酚抽提,沉淀用乙醇洗涤;DBSE-Sephadex与DNAs偶联后,加入5 μL 20 μg/μL牛血清白蛋白,室温放置半小时,用重蒸水反复洗涤之. 二者均溶于(或悬浮于)蒸馏水或杂交液,在4℃保存. 偶联的DNA量系通过测定反应后剩余的DNA量来估算.

1.2.5 用缺口平衡法标记质粒pBR322 用Promega公司的Nick Translation Kit. 按厂商的使用说明标记. 一般标记比放射性可达107/min μg DNA.

1.2.6 ABSE-糖原与ABSE-Sephadex与标记DNA的相减杂交模型试验 在模型试验中,我们用含有pBR322 DNA的鼠肝DNA作为靶,用pBR322或鼠肝DNA为推动剂. 将ABSE-糖原和ABSE-Sephadex分别与pBR322 DNA或鼠肝DNA偶联后如上纯化. 这些DNA衍生物分别溶于杂交液(6×SSPE/0.5% SDS; 1×SSPE = 0.15 mol/L NaCl/20 mmol/L NaH_2PO_4 pH 7.4/1 mmol/L EDTA),并分别在其中加入由质粒DNA:鼠肝DNA = 1:1或1:10(均为质量比)的混合靶DNA,再加1 μL标记的pBR322 DNA. 每个反应中靶DNA的总量为1 μg. 将反应液总体积用杂交液加至40 μL. 糖原反应液中加入20 μL石蜡油密封,100℃ 2 min, 迅速放入已调好温的68℃水浴中. Sephadex各反应管则用固态石蜡封口,装入一个旋转装置,使各管浸入水浴以1 r/min旋转,杂交48h.

杂交完成后取出各管,除去密封. 糖元杂交管中加入40 μL pH 8的Tris·CHl饱和的酚,混匀, 15 000 r/min离心10 min, 酚相用40 μL H_2O反抽,合并水相,再用40 μL酚抽,上清与沉淀分别测放射性. Sephadex杂交管内容物加入底部刺有细孔并装有玻璃棉的0.5 mL离心管,其外套上1.5 mL离心管,1 000 r/min离心3 min,滤液和滤渣分别测放射性.

第二轮杂交系将首轮杂交液中的DNAs纯化,用与首轮杂交相同方法使之与DNA-DBSE-glycogen或DNA-DBSE-Sephadex再次杂交.

2 结果

2.1 糖原和 Sephadex 的 ABSE-化及与核酸的交联

两种载体均能顺利地被 ABSE-化并能与 DNA 和 RNA 偶联. 我们发现 ABSE-和 DBSE-糖原,当用 pH 7～8 的水饱和酚抽提后,离心时 ABSE-和 DBSE-衍生物在离心管底形成沉淀;而没有反应的糖原则留在水相. 它们偶联了 DNA 或 RNA 的衍生物仍保留此性质;而未偶联的核酸留在水相中. 这一性质对于分离纯化核酸-ABSE 糖原衍生物是极其有用的.

偶联反应的最适 pH 在 7 左右[4],因此,加入核酸前,需要把重氮化反应液的 pH 调到接近中性. 有时,pH 刚调到 5,反应液就变成橙色. 这可能是由于 ABSE-基团和 DBSE-基团间反应生成重氮氨基化合物造成的. 增加 HCl 和/或 $NaNO_2$,即可解决.

在我们的实验条件下,一般每 mg 糖原或 Sephadex 可偶联 10～20 μg 的核酸. 偶联量和核酸浓度成正比. 我们用 0.5 mg/mL 的高浓度 RNA,曾得到 100 μg/mg 糖原的高偶联量(数据未示出).

2.2 相减杂交模型试验

我们进行了以分离 pBR322 DNA 为目的的相减杂交模型试验. 推动剂分别为同源 DNA (pBR322)和非同源的 DNA(来自鼠肝). 后者为前者的对照. 实验系统见表 1. 其中具有下标 m 的各反应是有下标 p 的反应的对照. 首次实验结果示于表 2. 重复实验和二次杂交的结果示于表 3 和表 4.

表 1　相减杂交模型试验的设计

反应编号	G_p1	G_p10	G_m1	G_m10	S_p1	S_p10	S_m1	S_m10
靶[a)]	A	B	A	B	A	B	A	B
推动剂[b)]	a		b		a		b	
载　体	ABSE-糖原				ABSE-Sephadex			

a) A—pBR322：鼠肝 DNA = 1∶1；B—pBR322∶鼠肝 DNA = 1∶10(均为质量比)

b) a—pBR322 DNA；　b—鼠肝 DNA

表 2　初次实验结果

编号	偶联 DNA 量 /μg	上清中剩余的目的 DNA 的量 $10/min^{-1}$	沉淀中的目的 DNA 的量 $10/min^{-1}$	杂交效率[a)] /%	非专一杂交 /%[b)]
G_p1	14	10.4	13.6	43.8	/
G_p10	14	11.7	17.4	51.1	/
G_m1	17	23.7	3.51	/	13.0
G_m10	17	23.9	2.28	/	8.7
S_p1	10	24.4	9.97	17.3	/
S_p10	10	23.1	11.7	17.2	/
S_m1	11	22.3	2.95	/	13.2
S_m10	11	28.5	5.60	/	19.6

a) 计算公式(以 G_p1/G_m1 组为例,其它组类同):

$$\text{杂交效率}(\%) = \frac{G_p1\ \text{沉淀}\ min^{-1} - G_m1\ \text{沉淀}\ min^{-1} \times (G_p1\ \text{总}\ min^{-1}/G_m1\ \text{总}\ min^{-1})}{G_p1\ \text{总}\ min^{-1}} \times 100\%,$$

其中总 min^{-1} = 上清 min^{-1} + 沉淀 min^{-1}

b) 定义为：编号中有 m 的反应(鼠肝 DNA 为推动剂)的沉淀 min^{-1} 与各该次反应总 min^{-1} 的百分比

表3 二轮杂交试验(1)

编号	首轮杂交				二轮杂交			
	偶联的DNA量/μg	上清中剩余DNA量/10 min^{-1}	沉淀中的DNA量/10 min^{-1}	首轮杂交效率/%	偶联的DNA量/μg	上清中剩余DNA量/10 min^{-1}	沉淀中的DNA量/10 min^{-1}	二轮杂交效率/%
G_p1	13	6.98	7.09	41	15	3.39	2.90	37
G_p10	13	7.21	10.2	48	15	3.75	2.20	30
G_m1	15	20.0	2.00	/	16	15.0	1.38	/
G_m10	15	17.7	2.00	/	16	13.7	1.01	/

表4 二轮杂交试验(2)

编号	首轮杂交				二轮杂交			
	偶联的DNA量/μg	上清中剩余DNA量/10 min^{-1}	沉淀中的DNA量/10 min^{-1}	首轮杂交效率/%	偶联的DNA量/μg	上清中剩余DNA量/10 min^{-1}	沉淀中的DNA量/10 min^{-1}	二轮杂交效率/%
G_p1	13	10.5	12.8	45.5%	15	3.50	3.34	33.6
G_p10	13	8.50	10.3	40.1	15	3.70	2.83	29.8
G_m1	15	18.4	1.93	/	16	10.4	1.87	/
G_m10	15	17.7	3.04	/	16	9.20	1.44	/
S_p1	8.2	23.6	12.1	23.1	7.4	12.2	5.51	23.0
S_p10	8.2	27.3	11.4	20.9	7.4	19.6	5.55	14.4
S_m1	8.7	38.1	4.59	/	8.2	35.5	3.12	/
S_m10	8.7	39.0	4.71	/	8.2	36.0	2.99	/

可以看出,DNA-DBSE-糖原和DNA-DBSE-Sephadex均能有效地与溶液中的DNAs杂交.而在本文实验中,前者的效率高于后者.另一方面,这两种载体的非专一杂交率均相近,约10%左右;但这也许表明pBR322 DNA与鼠肝DNA仍有某些同源性.与糖原相比,Sephadex的非专一杂交率稍高,虽然做了牛血清白蛋白处理.重复实验证实了这些结论(重复结果未示出).

由于在相减杂交实验中往往需要反复杂交几次,为确定在多轮连续杂交时,两种杂交载体的效率有何变化,我们又做了二轮杂交试验.

可见二轮杂交的效率总是低于首轮,这显然是由于可杂交的DNA量减少所致.对于ABSE-糖原,二轮杂交效率在30%左右;而对于ABSE-Sephadex,这一效率在20%左右.

总之,ABSE-糖原和ABSE-Sephadex都能有效地用于核酸杂交,特别是相减杂交.在现有实验条件下,两种载体中ABSE-糖原显得更加优越.单次杂交,ABSE-糖原可达到50%的杂交效率.其二轮杂交效率约为30%.相比之下,ABSE-Sephadex的杂交效率较低.

3 讨论

我们提出利用SESA制备新的相减杂交载体,主要是由于工作的实际需要.抗癌基因的研究,要求分离在正常细胞中表达而在恶变细胞中几乎不表达的基因产物;因此,我们希望有一种方便易得,性能优良,容易使用的杂交载体,而不是单纯依靠streptavidin之类很昂贵的进

口试剂．本文所述的 ABSE-糖原和 ABSE-Sephadex 都能满足要求．

这两种化合物都属于聚葡萄糖一类．糖原易溶于水，在通常的杂交温度(80℃以下)下稳定．Sephadex 的稳定性众所周知．二者被 ABSE-基化和活化后的性能基本相同．ABSE-糖原在用酚抽提时能够沉淀的性质极大地方便了它的提纯，而 ABSE-Sephadex 是固体，杂交后只需离心即可与未杂交的核酸分离．但是，用后者进行相减杂交时要用机械振动器，以使它与溶液中的核酸充分接触．

在我们的实验条件下，DNA-DBSE-糖原单次杂交能除去同源序列的 50%，DNA-DBSE-Sephadex 的效率稍低．然而需要指出，我们的实验条件(杂交液的成分和杂交温度)没有经过优化．另外，我们用的自制振动器也未起作用；这可能是 ABSE-Sephadex 表现较低效率的原因．可以预期，在最优化的实验条件下，二者的杂交效率都会进一步提高．

像 DBSE-纸[4]一样，这两种载体的稳定性都很好，在 4℃下可长期保存．活化的 DBSE-糖原或 DBSE-Sephadex，在 −20℃下至少能保存 1 个月，而偶联能力不显著降低(未发表)．

参　考　文　献

1 Rubenstein J L R, Elizabeth A, Brice J *et al*. Subtractive hybridization system using single-stranded phagemids with directional inserts. Nucleic Acids Res, 1990, 18 (16): 4 833～4 842

2 Timblin C, Battey J, Kuehl W M. Application for PCR technology to subtractive cDNA cloning: identification of genes expressed specifically in murine plasmacytoma cells. Nucleic Acids Res, 1990, 18(6): 1 587～1 593

3 Gruber C E, Li Wu-bo, Lin Jhy-jhu *et al*. Subtractive cDNA hybridization using the multifunctional plasmid vector pSPORT 2. Focus, 1993, 15(3): 59～65

4 .刘定干，李载平．用对-重氮苯砜乙基纤维素纸(DBSE 纸)共价固定核酸的分子杂交方法．科学通报，1982, 27(16): 1 011～1 014

5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989