

一种简捷的 Southern 印迹杂交方法^{*}

朱华晨, 许新萍, 李宝健

(中山大学生物工程研究中心//基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 在综合前人方法的基础上, 发展了一种简捷、灵敏、廉价、效果可靠的 Southern 印迹杂交方案。使用 0.4 mol/L NaOH 溶液将琼脂糖凝胶上的 DNA 在变性的同时转移到尼龙膜上, 晾干膜后无需固定就可以直接用于杂交。预杂交液和杂交液选用 Church 缓冲系统, 该缓冲系统中仅需 10 g/L BSA 作为封闭剂即可。整个洗膜过程可简化为一种溶液、2~3 次洗涤。碱变性及转移后的尼龙膜, 也可以用于地高辛 (DIG) 等非放射性检测系统, 并可耐多轮杂交和洗脱。本方法可适用于包括高等植物基因组在内的多种生物材料的 DNA 检测。

关键词: Southern 印迹; DNA; 杂交; 植物基因组

中图分类号: Q-33; Q503 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 04-0128-03

Southern 印迹杂交是分子生物学中一种常用的关键性 DNA 检测技术。传统的 Southern 杂交, 步骤繁琐, 试剂昂贵, 配方复杂, 操作起来既费时费力费钱还容易出错。本文吸收了前人文献^[1-8]中各种实验方案的优点, 结合新一代尼龙膜的优良特性, 发展了一种简便、快速、灵敏、廉价, 且重复性强的 DNA 印迹杂交方法。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

预杂交液成分: 10 g/L BSA (组分 V, 上海生工), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0), 0.5 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.8~7.5), 70 g/L SDS;

洗膜液成分: 磷酸钠缓冲液 (40 mmol/L) — EDTA (1 mmol/L) — SDS (1 g/L) 或 0.1×SSC — SDS (1 g/L); 有关缓冲液的配制参见文 [4]。

1.2 方法 以下操作程序中, 标有“(推荐)”字样的步骤可以省略不做。

(1) 将 DNA 点样于琼脂糖凝胶上, 待电泳至所需程度后, 将凝胶取出, EB 染色, 观察;

(2) 倾斜容器, 用 0.2 mol/L HCl 浸泡凝胶的上半部分 (高相对分子质量 DNA 区) 8~15 min, 再用去离子水漂洗数秒 (当待检测 DNA>15 kb 时, 推荐);

(3) 在凝胶上加入数倍体积 0.4 mol/L NaOH 溶液, 室温下在摇床上轻摇变性 20 min (推荐);

(4) 剪一块长宽比凝胶大 1 cm 的尼龙膜 (Hybond-N⁺ (Amersham), 或 Nytran[®] SuPerCharge (Schleicher & Schuell)), 在膜上做好位置标记, 依次用双蒸水和新鲜 0.4 mol/L NaOH 溶液浸泡, 充分

湿润和平衡;

(5) 按照说明书安装好真空转膜装置 (Biometra VB21 型或 Pharmacia VacuGene XL Vacuum Blotting System), 取出凝胶置于膜上, 排除气泡;

(6) 在凝胶上加满 0.4 mol/L NaOH 溶液 (此溶液回收后可重复使用), 开动真空泵, 50 mbar (相当于 5×10³ Pa) 转膜 0.5~2 h, 随时补加溶液以保持凝胶上有足量的 NaOH 溶液;

(7) 转移结束后, 关闭真空泵, 将凝胶取下, 取出尼龙膜;

(8) 用预热到 60~68 °C 的 0.1×SSC—SDS (1 g/L) 溶液浸泡尼龙膜 5 min, 除去膜上的杂质和附着的琼脂糖碎片 (推荐);

(9) 用 0.1×SSC 略加浸洗, 除去膜上的杂质 (琼脂糖碎片或残存的 SDS);

(10) 在家用微波炉里以中火烤膜 3 min (注意同时在炉里放一小杯水, 以保护微波炉不致损坏) (推荐);

(11) 转有 DNA 的尼龙膜如暂不使用, 可存放于 4 °C 备用 (存放时间最好不要超过半年);

(12) 在尼龙膜上加入适量预杂交液 (8~15 mL/100 cm²), 仔细排除气泡, 65 °C 缓慢旋转预杂交 0.5~4 h;

(13) 倒出适量预杂交液, 在管中留 3~8 mL 预杂交液, 加入已标记好的变性同位素探针, 充分混匀, 65 °C 缓慢旋转杂交 8~16 h;

(14) 取出杂交膜, 用洗膜液冲洗一次, 再浸于数倍体积洗膜液中, 65 °C 水浴摇动洗膜 1~3 次, 每次 15~40 min, 直至膜上与洗脱液中的同位

^{*} 收稿日期: 2004-02-11

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化专项资助项目 (J00-A-009); 广东省科技计划资助项目 (B201)

作者简介: 朱华晨 (1976 年生), 女, 博士生; 通讯联系人: 李宝健; E-mail: lsslbj@zsu.edu.cn

素计数都基本保持稳定；

(15) 用 0.1×SSC 或蒸馏水略加冲洗，除去膜上残存的 SDS 颗粒（推荐）；

(16) 将尼龙膜置于滤纸上吸去膜上的液体，并用保鲜膜包好。对于比活度较高的新鲜 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ ，一般 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ X-光片显影 1~24 h；磷屏显影 15 min~6 h。过长的显影时间可导致背景过强，无法分清杂交主带，需予以特别注意。

(17) 若将煮沸的 5 g/L SDS 溶液倒在膜上，待溶液自然冷却至室温，可除去膜上已杂交的 DNA 探针。洗脱后的尼龙膜，可反复用于其他探针的杂交（至少可耐 5 轮杂交与洗脱）。

如果使用地高辛非放射性检测系统，从步骤 (12) 开始，有关的实验操作请参照非放射性 DNA 检测试剂盒（DIG Hight Prime DNALabeling and Detection Stater Kit I，Roche 公司）的说明书进行。

2 结果示例

图 1 为使用上述方法得到的一个 Southern 印迹结果。在泳道 2~11 中，转基因水稻基因组 DNA 的上样量为 10 μg；在泳道 1 中，质粒正对照的上样量约为 0.5 ng。图 2 为另一个转基因水稻基因组 DNA（未酶切）的 Southern blot 结果，水稻总 DNA 的上样量为 5 μg。所检测的基因都为使用基因枪法导入的外源基因 GNA（雪花莲凝集素）。

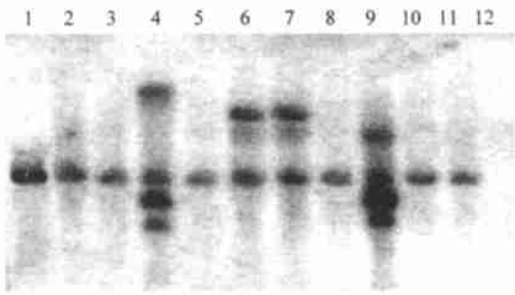


图 1 转基因水稻基因组 DNA Southern blot 分析
Fig 1 Southern blot of genomic DNA from transgenic rice
1: 质粒 pKC-3/*Hind*III+*Kpn* I
2~11: 转基因水稻基因组 DNA/*Hind*III+*Kpn* I
12: 未转基因水稻基因组 DNA/*Hind*III+*Kpn* I

我们已经用本文所发展的简化 Southern blot 方法得到了大量 DNA 检测结果，图 1 和图 2 仅是其中的两个例子。实践证明，上述方法不仅简单可行，而且重复性和灵敏度也非常好。本方法可适用于各种基因组大小的物种（如微生物、大型真菌、高等植物等）的 DNA 检测（结果未全部显示）。

3 讨论

本实验方案是在综合以往文献^[1-8]的基础上加以改进而建立起来的。与前人的报导相比，本方法



图 2 转基因水稻（R1 代）基因组 DNA Southern blot 分析
Fig 2 Southern blot of genomic DNA from transgenic rice (R1)
1: 质粒 pKC 3; 2: 未转基因水稻基因组 DNA;
3~13: 转基因水稻基因组 DNA

的特点是：

(1) 使用 0.4 mol/L NaOH 溶液同时进行 DNA 片段的变性、转移、固定等步骤。根据 Amersham Hybond N⁺ 尼龙膜的产品说明，确立了碱转移的可行性，并在此基础上，将产品说明书上的试剂和方法简化为使用 0.4 mol/L NaOH 溶液^[1-3]，在转移的同时进行变性，省略了传统做法中变性、中和、平衡（20×SSC 浸泡）及 DNA 固定等步骤，大大节省了试剂和时间；同时，由于转移前处理步骤的简化，使 DNA 的扩散减少到较低程度；采用碱转移，由于变性彻底，固定良好（避免了紫外处理中时间、强度难以把握的缺点），因此可以提高杂交的灵敏度^[2]；

(2) 以成分较简单的 Church 缓冲系统作为预杂交和杂交缓冲液。据文献 [4]，使用碱转移法，由于尼龙膜长时间接触高浓度的碱溶液，杂交背景几乎总是明显升高，因而使特异性杂交信号与背景反差太小，无法区分。根据我们的实践，使用经典的 Denhardt 杂交系统或其他杂交系统检测高等植物基因组中的低拷贝基因时，的确经常出现上述情况；如果提高洗膜强度和时间，则经常出现杂交信号过弱的情形。为此，我们在反复比较、改进各种方法的基础上，确立了使用 Church 预杂交/杂交缓冲液的方案^[5-7]，得到了满意的效果。不仅如此，使用本杂交系统，所需试剂成分更为简单易得，不再需要去离子甲酰胺、Ficoll、PVP 360 和鲑鱼精 DNA 等昂贵的进口试剂，也不需要去对预杂交液进行变性，母液的配制和保存也更为方便；

(3) 使用的洗膜液成分简单，洗膜的流程也被简化。我们在长期的实践中发现，只要同位素比活度足够，显影时间合理，使用本方法得到的杂交信号总是很强，杂交主带清晰。因此可以直接用成分更为简单的洗膜液（见 1.1）于 65℃进行洗膜操作（与经典的洗膜方法^[7]相比，除了溶液中离子强度、SDS 浓度降低、无需再加入 BSA 等试剂之外，洗膜液的种类也减少为一种）。

(4) 可以方便彻底地去除探针并进行多轮杂交

和洗脱。以往的文献显示:使用碱转移法,将导致杂交后探针的去除困难(80%~90%的探针难以洗脱^[2])。本文结果表明,通过步骤 17 的处理,可以将膜上的探针完全洗去,并且不影响后面其它探针的杂交。利用本方法,至少可以对尼龙膜进行 5 轮以上的杂交和洗脱;

(5) 提供了多个可选的推荐步骤。步骤 2、3、8、10、15 为可选的推荐步骤。在大多数实验中,做与不做都不会明显影响实验结果,但从提高本方法的适用性和可重复性,建议尽量使用推荐步骤。

步骤 2 的脱嘌呤操作,可以提高大分子 DNA 片段(> 15 kb) 的转移效率。但脱嘌呤过度易导致低相对分子质量区的 DNA 被打断成过小的片段而难以和尼龙膜结合^[4]。因此,特别作出了倾斜容器、仅使凝胶上半部分浸泡入 HCl 的设计;步骤 3 的设计,是为了使凝胶与 NaOH 溶液充分平衡。事实上,只要在 2 h 的转膜过程中随时补充转移液(或在凝胶上倒满足量的 NaOH 溶液),那么这个步骤是完全可以省略的;步骤 8 虽然不是必要的,但却是我们想大力推荐的。在杂交前先用 68 °C 的洗膜液短时间浸泡尼龙膜,可以除去膜上的杂质,大大降低杂交后膜上非特异的背景;步骤 15 的作用与步骤 9 类似,旨在除去膜上残存的 SDS 颗粒,避免杂交和显影中出现多余的斑点;尽管有文献指出,碱转移结束后无需对尼龙膜上的 DNA 进行专门的固定^[2],但考虑到转移结束后的尼龙膜潮湿不利于保存,因此我们设计了步骤 10,将其用微波炉进行快速、低强度的烘烤^[8]。

此外,还尝试把碱转移法同地高辛非放射性 DNA 检测系统结合起来,同样取得了良好的效果

(数据未显示)。在部分实验中,使用其它公司的尼龙膜产品(如 Schleicher & Schuell 公司的 Nytran® 尼龙膜),也可以得到类似的良好结果。因此,上述这一 DNA 印迹杂交方法是通用、简便、节约而可靠的,适于在一般的实验室中推广和应用。

致谢:实验中得到了中山大学生物工程研究中心方向平、冯道荣、林莉、范钦等同学的帮助;程度、肖建勇、金华南等同学协助对本方法在酵母及多种真菌中的应用进行了验证;刘秋云博士、徐增富博士认真细致地审阅了本文,并提出了许多宝贵的建议。在此特表谢忱!

参考文献:

- [1] 王关林,方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京:科学出版社,1998:598—624.
- [2] REED K C, MANN D A. Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes[J]. Nucleic Acids Res, 1985, 13: 7207—7221.
- [3] 奥斯伯 F,布伦特 R,金斯顿 R E,等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖,王海林,译. 北京:科学出版社,1999:55—71.
- [4] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning, a laboratory manual[M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [5] CHURCH G M, GILBERT M. Genomic sequencing[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81: 1991—1995.
- [6] 陈汉春,卿科云,杨友云. 一种简易的预杂交体系[J]. 湖南医科大学学报,1995,20(1):94.
- [7] SAMBROOK J, RESSELL D W. Molecular cloning, a laboratory manual[M]. 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [8] ANGELETTI B, BATTILORO E, PASCALE E, et al. Southern and northern blot fixing by microwave oven[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 879—880.

A Simple, Rapid Method of Southern Blot Analysis

ZHU Hua chen, XU Xin ping, LI Bao jian

(Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education //

Biotechnology Research Center, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A simple, rapid, sensitive, low cost and reproducible protocol of Southern blot analysis was developed based on a comprehensive analysis of the previous reports. With a solution of 0.4 mol/L NaOH, DNA in the agarose gel can be denatured and transferred onto the nylon membrane in a single step. The air dry membrane can be hybridized directly without fixation. 10 g/L BSA is used as the only blocking reagent in the Church buffer system during the course of pre-hybridization and hybridization. The whole process of washing the membrane can be simplified as one solution, and 2~3 times of washing. The membrane prepared by alkali transferring method can also be used in the non-radioactive DNA detection system such as DIG. Moreover, the blot can be stripped and reprobed for several times. The method described here can be applied to detect target DNA in different species, including higher plants which hold comparatively large genome.

Key words: Southern blot; DNA; hybridization; plant genome