

邢文岳,苏乐乐,李朝炜,等.地高辛标记对旱稻进行 southern 杂交分析主要影响因素的优化和验证[J].江苏农业科学,2017,45(8):41-43.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.08.011

地高辛标记对旱稻进行 southern 杂交分析 主要影响因素的优化和验证

邢文岳,苏乐乐,李朝炜,魏景芳,朱 昀

(河北科技大学,河北石家庄 050018)

摘要:以转基因旱稻和野生型旱稻为材料,对通过地高辛随机引物标记法进行的旱稻基因组 Southern 杂交条件进行了优化分析,包括探针制备效率、DNA 样品量、酶切体系及转膜时间等。结果表明:影响探针制备效率的首要因素是温度而不是时间;DNA 上样量在 10 ~ 30 μg 均可以获得高质量的杂交图;60 μL 体系 15 h 即可酶切彻底并获得良好的杂交效果;转膜时间 6 h 即可。本研究所优化的地高辛标记的旱稻杂交分析结果稳定重复性好,具有较高的灵敏度和信噪比。

关键词:旱稻;地高辛;Southern 杂交方法;优化;验证

中图分类号: S511.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)08-0041-03

Southern blotting 技术于 1975 年由英国科学家 Southern 创立,随着该技术的不断发展与普及,目前已成为分析基因结构和检测特定 DNA 片段的经典技术方法之一^[1]。该技术能够在 DNA 水平检测外源目的基因是否已经转入并成功整合到植物的染色体上,同时对外源片段的拷贝数目进行分析。目前,Southern 杂交中标记探针的方法有同位素和非同位素 2 种。使用同位素标记是最经典的方法,其灵敏度高,能检测出极其微量的信号源,但对试验的条件有比较严格的要求,且会对环境以及实验者的身体造成放射性辐射危害。非同位素标记又分为生物素标记和地高辛标记。由于生物体中并没有地高辛,所以相比于生物素而言,地高辛可以更好地消除内源性背景,应用前景也更为广阔^[2]。据报道,棉花^[3]、烟草^[4]、小麦^[5]、油菜^[6]、甘蔗^[7]、橡胶树^[8]、热带果树^[9]等植物用地高辛标记的杂交技术均可获得良好的杂交效果。

目前,虽然有地高辛标记探针试剂盒大大方便了试验,但是试剂盒说明书更多地侧重于步骤流程的描述,至于一些技术要点、操作细节、实验注意事项的介绍并不很多。这也直接导致许多试验没能得到满意的结果。本研究以 8 个不同的 LEA 家族抗逆旱稻品种为材料,参考前人成功经验,结合本实验室的实际情况,对地高辛标记探针的 Southern 杂交方法进行探索改进和优化,取得了理想效果,现作一总结。

1 材料与方法

1.1 试验材料

转基因的 T₃ 代旱稻由本实验室通过农杆菌侵染法获得。

收稿日期:2016-02-02

基金项目:国家转基因生物新品种培育科技重大专项(编号:2016ZX08001003-006);河北科技大学五大平台开放基金课题(编号:SW21)。

作者简介:邢文岳(1990—),男,河北沧州人,硕士,主要研究方向为植物细胞工程。E-mail:15233631756@163.com。

通信作者:朱 昀,博士,副教授,主要研究方向为植物抗逆基因工程。E-mail:xiaozhuhome@163.com。

1.2 试验方法

1.2.1 探针标记 反应管中加 1 μg 纯化的目的基因 DNA 片段,加 ddH₂O 至终体积 16 μL 。沸水浴 10 min 变性,迅速插入冰水混合物中,取混匀的地高辛高效引物 4 μL 到变性的 DNA 中,混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 h。加入 2 μL 0.2 mol/L EDTA (pH 值 8.0)或 65 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 终止反应。

1.2.2 旱稻基因组 DNA 的提取及纯化 采用改良的 CTAB^[10] 法对旱稻基因组进行提取,略加改动。65 $^{\circ}\text{C}$ 预热 15 mL 提取缓冲液[CTAB 30 mg/mL,NaCl 1.4 mol/L,EDTA (pH 值 8.0)20 mmol/L,Tris-HCl (pH 值 8.0)100 mmol/L, β -巯基乙醇 0.2% (V/V)];液氮研磨 2.5 g 植物叶片成粉末后刮入离心管的提取缓冲液中,65 $^{\circ}\text{C}$ 保温 40 ~ 60 min,每 10 min 轻取出轻摇混匀;加入等体积的酚/氯仿/异戊醇,充分混匀,静置 15 min,12 000 r/min 离心 15 min;转移上清至一新的 Eppendorf 管,加等体积的氯仿/异戊醇,混匀 10 min,静置 10 min,12 000 r/min 离心 10 min;将上清液转移到新的离心管中,加 1 倍体积的异丙醇,混匀;-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h 或过夜,将絮状沉淀转移至一新的离心管中,70% 乙醇洗涤,无水乙醇洗涤,吹干溶解;加入适量 RNase 对样品进行消化,之后分别用酚/氯仿/异戊醇以及氯仿/异戊醇抽提 1 次,乙醇洗涤沉淀,超净台上吹干,溶于适量 TE。用分光光度计测定样品 DNA 浓度以及 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值。

1.2.3 样品酶切 60 μL 酶切体系中含 30 μg 纯化的旱稻 DNA,250U 限制性内切酶(Thermo),6 μL 10 \times buffer,补 ddH₂O 至终体积 60 μL 。酶切 15 h 后取 2 μL 电泳,观察旱稻基因组是否酶切彻底。

1.2.4 转膜及固定 酶切充分的 DNA 加 loading buffer 混匀,80 V 电泳约 4 h,直至溴酚蓝位于凝胶的 2/3 处。电泳结束后凝胶不做脱嘌呤处理,经 NaOH 碱变性后参照分子克隆采用毛细管虹吸印迹法转膜,注意为了分清膜的正反面,要在尼龙膜的一角提前做好标记。将转膜之后的琼脂糖凝胶进行检测,若无核酸残留,证明转膜成功。将尼龙膜 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 2 h 进行核酸的固定。

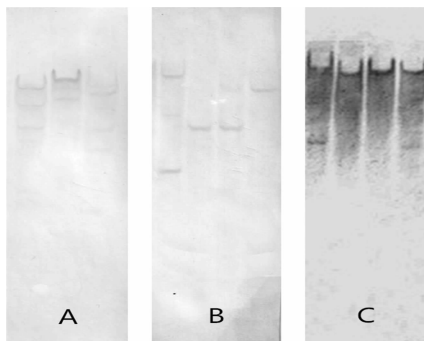
1.2.5 杂交洗涤 将探针沸水浴 5 min 进行变性,之后快速放入冰水混合物中冷却,按照 25 ng/mL 杂交液的量将变性探针加入预热的杂交液中。预杂交 30 min 后将预杂交液更换成带有探针的杂交缓冲液,45 ℃ 杂交 16 h。2 × SSC、0.1% SDS 室温洗膜 5 min,之后 0.5 × SSC、0.1% SDS 68 ℃ 洗膜 15 min。

1.2.6 免疫检测 将洗涤过的杂交膜用洗涤缓冲液冲洗 5 min,封闭液孵育 30 min,抗体溶液孵育 30 min,接着用洗涤缓冲液漂洗 2 次,每次 15 min,检测缓冲液中平衡 5 min,避光条件在显色液中静置显色 20 min。染色完成后 ddH₂O 冲洗杂交膜 5 min,晾干拍照即可。

2 结果与分析

2.1 转膜 DNA 样品量对杂交结果的影响

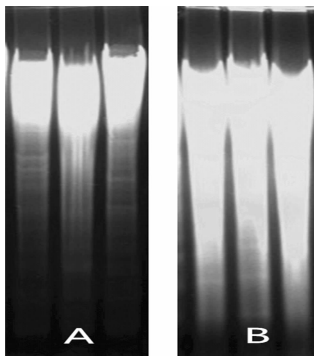
为了获得较强的杂交信号,分别以 10、30、60 μg 的 DNA 量进行杂交。结果显示,DNA 上样量并非越多越好,高质量的 DNA 样品在 10 μg 的时候也能够得到很好的杂交信号,30 μg 的上样量同样可以洗脱干净,而样品量过大形成的较深背景难以在洗脱阶段处理干净(图 1)。



A—10 μg; B—30 μg; C—60 μg
图1 不同 DNA 量的 Southern 杂交图

2.2 酶切体系对杂交结果的影响

选择目标基因内不存在的 3 个常用限制性酶 *EcoR* I、*Xba* II、*Sac* I 消化转基因早稻植株的基因组。30 μg 的 DNA 量在 60 μL 酶切体系中需 15 h 才可获得好的酶切结果,时间较短会导致酶切不充分(图 2),影响杂交结果,甚至出现非特异性杂交条带。酶切后如果进一步纯化,会造成 DNA 量的损耗,而前期获得的纯度高、质量好的 DNA 酶切消化后可以直接转膜用于后续杂交试验。

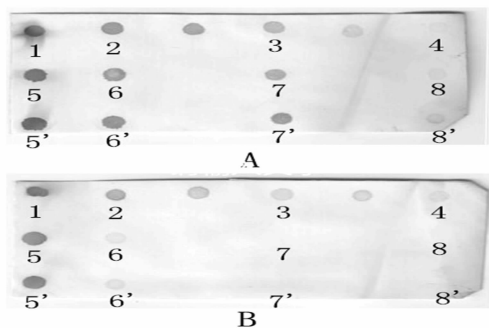


A—酶切不充分; B—酶切充分

图2 酶切结果检测

2.3 探针标记效率的影响因素

探针标记效率对杂交有着重要的影响。而标记效率就试剂盒说明书描述和时间相关度并不很大,以 3 000 ng 模板 DNA 为例,标记 1 h 可获得 1 350 ng 探针,而当标记时间延长到 20 h 后获得的探针也只有 2 650 ng,因此时间并不是探针标记效率的主要影响因素。本试验发现,标记初期的温度对标记效率有绝对的影响。刚刚进行标记的反应体系要严格遵守标记温度,标记初期的温度不准确会导致最终的标记效率大幅度降低。如图 3 所示,A 图为严格遵守孵育温度 37 ℃ 的探针标记效率检测:第 1 排为对照样品,浓度从左到右依次为 1 ng、10 pg、3.3 pg、1 pg、0.3 pg、0.1 pg;第 2 排为试验样品,从左到右依次进行梯度稀释,第 3 排为试验样品的重复,稀释浓度同第 2 排相应位置的点。B 图为标记初期温度略低的探针标记效率检测(32 ℃ 进行):第 1 排为对照样品,浓度从左到右依次为 1 ng、10 pg、3.3 pg、1 pg、0.3 pg、0.1 pg;第 2 排为试验样品,依次进行梯度稀释,第 3 排为试验样品的重复,稀释浓度同第 2 排相应位置的点。A、B 2 张图中试验样品的稀释梯度完全相同。由图 3 还可见,A 图中 8 号点的量与 4 号点的量相等,均为 0.1 pg;B 图中 6 号点的量与 B 图中 4 号点的量相等,均为 0.1 pg,而 A 图点 8 和 B 图点 6 的稀释倍数相差 100 倍。由此可见温度对标记效率的影响极大,探针标记初期 5 ℃ 的浮动导致 2 次探针标记效率相差有 100 倍之多。标记后的探针不需要纯化即可用于后续试验。



A—37 ℃ 标记探针效率检测; B—标记初期 32 ℃ 对探针效率检测; 1、2、3、4 等 4 个点为标准样品的参照,其点样浓度分别为 1 ng、10 pg、1 pg、0.1 pg; 5 号点为原始标记探针稀释 200 倍,6 号为 5 号样品稀释 100 倍,7 为 6 号样品稀释 10 倍,8 号为 7 号样品稀释 10 倍; 5'、6'、7'、8' 分别为 5、6、7、8 的重复点样

图3 温度对标记效率的影响

2.4 转膜时间的控制

以往的试验为了保证充分转膜都是采用过夜转膜,但过夜转膜耗时较长,延长了整个试验的时间,影响了试验进度。在转膜时分别对 2、4、6、8 h 的转膜情况进行了观察,发现转膜时间在 6 h 的时候,琼脂糖凝胶上面已经看不到 DNA 片段(图 4),表明转膜已经完全,大大缩短了整个试验的时间。

2.5 杂交温度的选择

适宜的杂交温度是根据 GC 含量和探针与靶片段的相似百分数计算获得的,具体公式如下: $T_m = 49.82 + 0.41 (\%G + C) - (600/I)$, I 是能够杂交上的片段的长度,以碱基对进行计算。 $T_{opt} = T_m - (20 \sim 25 \text{ } ^\circ\text{C})$ 。本试验 $\%G + C = 53.7$, $I = 806$, $T_m = 49.82 + 0.41 (\%G + C) - (600/I) = 71.1$ 。计算结果 $T_{opt} = 46.1 \sim 51.1 \text{ } ^\circ\text{C}$ 。由于说明书建议杂交在 37 ~ 42 ℃

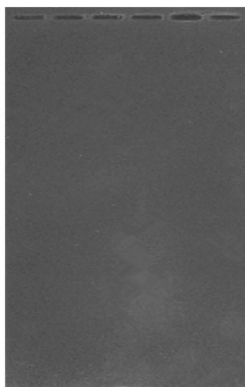


图4 转膜 6 h 琼脂糖凝胶电泳结果

进行,因此我们在 37、42、45 ℃ 均进行了杂交,差别不大。最终杂交选择在 45 ℃ 进行。

2.6 显色液对结果的影响

地高辛杂交试剂盒里面的显色液(5 号管)平时贮藏在 -20 ℃ 的冰箱中,一般情况下底部会出现棕褐色颗粒状沉淀,配制显色液时要事先吹吸数次混匀。需要注意的是沉淀悬浮起来后不要立即使用,一定要使颗粒完全溶解,在溶液中看不到有颗粒状物质,溶液均匀清澈为止。否则杂交膜的背景颜色较深,且呈现颗粒状(图 5),严重影响结果的观察。

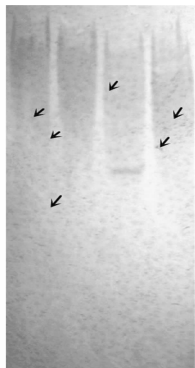


图5 显色液溶解不完全

3 讨论

阳性对照是杂交体系中的重要组成部分。以质粒为模板进行 PCR 扩增的产物作为阳性对照。转膜时的电泳上样量并非越多越好,样品量过大容易出现非特异条带,试验显示不超过 50 ng 的纯化后的 PCR 产物可以获得良好的杂交效果。

尼龙膜在杂交中应尽量与杂交管贴合,不要有气泡出现,否则会严重影响杂交结果。一般赶走气泡的工具采用玻璃棒,将膜小心放入有杂交液的杂交管中后用玻璃棒仔细赶走杂交膜与杂交管之间的气泡。由于杂交液中成分的影响,杂交膜与杂交管之间经常出现大量的微小气泡,很难彻底驱赶干净,并在此操作过程中对杂交膜和转移的 DNA 样本造成伤害,严重影响杂交结果(图 6)。本试验采用宽底试管去挤压膜与管之间的气泡,由于试管底面积宽,不易对膜造成损伤,可以获得良好的杂交效果。

杂交中,足够的探针用量是保证杂交成功的必要条件。但是,过量的探针会导致背景颜色过重,难以洗涤干净。说明书中建议探针使用量为 25 ng/mL 杂交液,为了获得更清晰的



图6 玻璃棒赶气泡对尼龙膜的损伤

杂交结果,笔者做了不同探针用量的杂交。试验结果显示,探针浓度提高到 50 ng/mL 杂交液时对杂交背景影响不大,仍然可以获得清晰背景的杂交条带。

以往报道认为,农杆菌侵染法进行的植物转化,转入基因多以单拷贝或较低拷贝数插入^[11-13],在本试验中,进行了 8 个样品的 Southern 杂交分析,仅有 2 个样品鉴定为单拷贝,其余 6 个样品中最多甚至出现了 8 个拷贝。这说明对于农杆菌侵染法获得的转基因植株后代而言,低拷贝并不是绝对的,可能与愈伤组织的状态、侵染条件都有一定关系。

参考文献:

- [1] Southern E M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis[J]. Journal of Molecular Biology, 1975,98(3):503-517.
- [2] Kruchen B, Rueger B. The DIG system - nonradioactive and highly sensitive detection of nucleic acids[J]. Biochemia,2003,7(3):13-15.
- [3] 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,2009,11(4):123-128.
- [4] 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.
- [5] 刘禄,牛焱焱,雷昊,等. 基于地高辛标记对小麦进行杂交分析主要影响因素的优化和验证[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(2):182-188.
- [6] 刘炬,郑文杰,赵卫东,等. 转基因油菜地高辛标记探针杂交检测方法的建立[J]. 口岸卫生控制,2005,10(4):10-12.
- [7] 崔学强,张树珍,沈林波,等. 转基因甘蔗植株 Southern 杂交体系的优化[J]. 生物技术通报,2015,32(12):105-109.
- [8] 李季,鲁旭,黄天带,等. 橡胶树转基因植株 Southern 杂交体系的优化[J]. 生物技术通报,2014(8):76-81.
- [9] 彭军,曾凡云,龙海波,等. 热带果树基因组提取方法的改良及分析[J]. 热带生物学报,2012,3(3):252-257.
- [10] 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 大量提取[J]. 遗传,2004,26(4):529-531.
- [11] 杨晓杰,刘传亮,张朝军,等. 不同转化方法获得的转基因棉花外源基因拷贝数分析[J]. 农业生物技术学报,2011,19(2):221-229.
- [12] 程在全,黄兴奇. 基因枪法和农杆菌介导法对水稻转基因拷贝数和基因重排概率的影响[J]. 植物学报,2001,43(8):826-833.
- [13] 龙丹凤. 农杆菌及基因枪法介导的 BAR 基因在高羊茅中的遗传转化效率研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2008:42-45.