

细菌分类学中日益重要的 DNA 体外杂交方法*

蔡妙英

(中国科学院微生物研究所,北京)

由于微生物分类学中日益广泛应用分子生物学和遗传学成就,例如 DNA 中 G + C 克分子%、核甙酸序列的相似性和基因组大小等,使人们对微生物的认识从表型相似性逐步深入到遗传本质的相关性,从而探索其间的亲缘关系。

DNA 链由腺嘌呤 (A)、胸腺嘧啶 (T)、鸟嘌呤 (G) 和胞嘧啶 (C) 四种碱基和脱氧核糖及磷酸相连而成,其中碱基的组成和排列直接关系着决定性状的“遗传密码”。因此,这些测定项目是本质性的。从最近的细菌鉴定手册^[1]来看,DNA 碱基组成的测定已成为细菌分类鉴定中必测项目之一。但它仅反映 GC 碱基对在总碱基中的比例,因此在应用上有一定的局限性。能反映碱基序列的 DNA-DNA 或 DNA-RNA 分子体外杂交则是现代分类学中较有说服力的手段之一,尤其在细菌分类学中应用更广泛。一般杂交百分率(常以同源性百分率表示)越高,说明菌间 DNA 中碱基序列相同的部份越多,它们的关系也就越密切,所以它的应用在分类学中更具有决定意义。

在细菌分类学上的应用

1. 在老属的重新划分和新属的建立方面: De Ley^[2] 根据野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) 和荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 的 DNA 杂交**试验结果,它们有 45—75% 的同源性,因此,提出前者应合并于假单胞菌属中,成为它的一个种,定名为野油菜假单胞菌 (*Ps. campestris*)。Jordan 和 Allen^[3] 发现根瘤菌属 (*Rhizobium*) 中的第 1 部份周生鞭毛的菌和土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) 除转化、GC% 和数值分类的资料之外,二者还有较高的杂交百分率,所以提议将这两个属合并为一。Swings 等^[4] 根据 100 个表型特征、蛋白电泳及 DNA-rRNA 杂交资料提出将不同于醋酸杆菌 (*Acetobacter*) 和葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter*),而又相似于假单胞菌的一群醋酸菌命名为弗拉特氏菌属 (*Frateriia*)。

2. 阐明种间关系方面: Ballard 等^[5] 用 DNA 杂交证明了鼻疽假单胞菌 (*Ps. malleri*) 和类鼻疽假单胞菌 (*Ps. pseudomalleri*) 关系最为密切,其次与麝香石竹假单胞菌 (*Ps. caryophyllii*) 相近,与洋葱假单胞菌

(*Ps. cepacia*) 和划界假单胞菌 (*Ps. marginata*) 也有一定的同源性,这与表型划分的检索表^[1] 极为一致。前三个具有精氨酸双水解酶为一群,而后二个种无精氨酸双水解酶另归一群。施氏假单胞菌 (*Ps. stutzeri*) 虽然以既不积累亦不水解聚-β-羟基丁酸盐为特征,分属于荧光假单胞菌群中,但与该群中各个种的关系是不同的,根据 DNA 杂交试验表示与其中的门多萨假单胞菌 (*Ps. mendocina*) 最为密切^[6],这也与表型特征相一致,这二个种都不产荧光色素和能反硝化硝酸盐。在新建立的固氮螺菌属 (*Azospirillum*) 中的两个种——生脂固氮螺菌 (*A. lipoferum*) 和巴西固氮螺菌 (*A. brasilense*) 基本上是根据杂交百分率而确定的^[7]。在芽孢菌中也有类似的情况,据 Takusji 等^[8] 报道以 DNA-DNA 杂交百分率资料阐明的种间关系与以表型特征所得的种间关系有很高的一致性(见图 1)。枯草

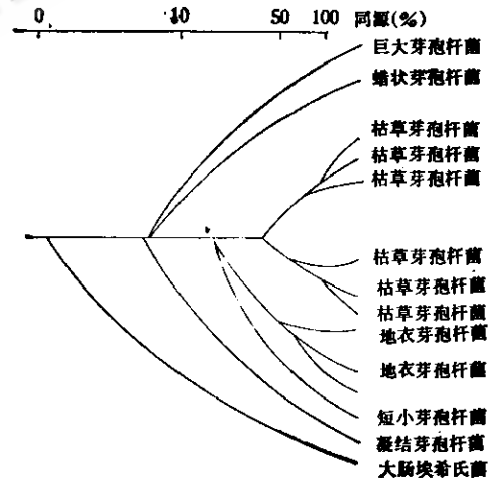


图 1 芽孢菌以 DNA-DNA 杂交所得的种间关系。

芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和短小芽孢杆菌三者关系最为密切,其次它们与凝结芽孢杆菌稍远,更远的是菌体宽度 0.9 微米以上和胞内贮有 β-羟基丁酸盐颗粒的巨大芽孢杆菌和腊状芽孢杆菌。与无芽孢、革兰氏阴性的大肠埃希氏菌无同源性。同一个种的菌株一般具

* 本文承王大稻先生审阅并修改,特此致谢。

** 本文所用的杂交指同源 DNA 间的重新配对。

有70%以上的同源性。从本文资料还提出枯草芽孢杆菌分成二群,它们分别由70%同源性的菌所组成,这与血清等其它的测定完全吻合。

有关研究的回顾

DNA 结构由 Watson 和 Crick^[9] 提出后, Delbrück 等^[10] 对亲代分子在子代中如何分配提出了假设。但他的推测在实验室中得到证明的工作是由 Meselson 和 Stahl^[11] 完成的。他们用 ¹⁵NH₄Cl 培养的大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 连续传代于含 ¹⁵NH₄Cl 的培养基上所得的 DNA, 用 CsCl 梯度密度的方法, 可看到全是 ¹⁵N 的 DNA 逐步变换成 ¹⁴N 的 DNA 的详细过程, 有力地证实了 DNA 裂解后分成对称的二股, 并由此作模版的复制机理, 以前的研究大都是用液相的梯度密度离心法, 但它具有时间长和对仪器要求高的缺点。在缩短时间和改用仪器方面, 第一个成功的是 Bautz 和 Hall (1962)^[12] 引用了硝化纤维素柱。同年, Bolton 和 Mc Carthy^[13] 用物理法将高分子量的 DNA 固定在纤维素乙酸盐胶或洋菜胶上, 然后进行杂交反应。于 1965

年 David Gillespie 等^[14] 改进用硝化纤维微孔滤膜固定变性的 DNA, 并在膜上交联, 这样可克服液相中复性的干扰。为了降低非专一性的结合对 DNA 膜的污染, Denhardt^[15] 提出在杂交前用蛋白聚合物溶液预先处理已固定变性 DNA 的膜, 可收到很好的效果。也有人提出在杂交后, 用低离子、高 pH 的缓冲液洗膜, 也可达到类似的结果^[16]。虽然固相膜方法比较方便, 但杂交率低。因此, 有些工作者仍选用液相法。1965 年 Bernardi 等^[17] 首先提出用羟基磷灰石方法分开相结合的双链 DNA 和未结合的单链 DNA, 从而计算出杂交或复性*的程度, 但一次不能处理大量样品。Brenner^[18] 设计出一次可进行 10 个样品的羟基磷灰石法。除上述方法之外, 七十年代又发展了 S₁ 核酸单链专一酶测定法和复性速度测定法等, 但目前普遍应用的还是液相的羟基磷灰石和固相膜过滤法, 故本文仅介绍这二种方法。

DNA 提取、纯化和保存

1. 培养细胞: 有液体和固体二种方法, 前者虽然

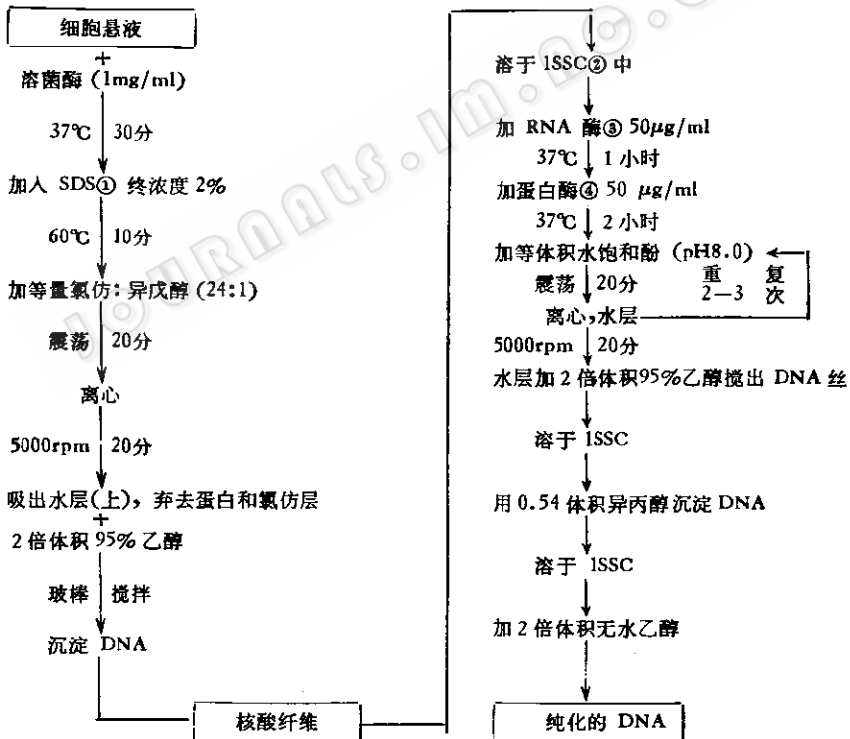


图 2 DNA 提取与纯化步骤

注: ① 十二烷基硫酸钠: 母液 20%, 使终浓度为 2%。 ② 1SSC: 0.15 M NaCl + 0.015 M 柠檬酸钠。 ③ RNA 酶: 2mg/ml 0.1M NaAc (pH5.0), 于 100°C 予处理 10 分钟, 使 DNA 酶失活, 终浓度为 50µg/ml。 ④ 蛋白酶 5mg/ml 蒸馏水, 37°C 预处理 1—2 小时, 终浓度为 50 µg/ml。

* 本文所用的复性指同源 DNA 的结合。

有通气好、便于标记等优点,但需用大容量离心机。因此,固体平板培养法仍较常用。培养至对数期的细胞以 0.15M NaCl 和含 0.1M EDTA 的缓冲液 (pH8.0) 收集和洗涤,悬浮浓度为 2—3g 湿细胞/20—25ml 缓冲液。

2. 破碎细胞: 因菌而异,大多数菌能用溶菌酶 (1mg/1ml) 和 2% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 联合作用,有些革兰氏阳性细胞例如棒状杆菌等则需改用超声波或加压室等方法。

3. DNA 提取和纯化: 最常用的是 Marmur^[19] 的方法,许多工作者在此基础上修改和增加某些步骤,例如: ①用氯仿和异戊醇去蛋白,常常不能完全去除,可用等体积的水饱和的苯酚 (重蒸馏、以 Tris 粉调至 pH8.0) 代替,但苯酚还需以氯仿去除。②除 RNA 酶处理之外,还增加蛋白酶 (Pronase) 处理,先经 37℃ 2 小时自溶之后,加入 DNA 中于 37℃ 处理 2 小时,用量为 50μg/ml。以上修改步骤综合于图 2,按此程序提取与纯化 DNA,可获得较为满意的结果。

标记的 DNA 有时还需要进一步的纯化,De Ley 和 Smedt^[20] 推荐用固定一定角度的 CsCl 梯度密度离心法可得到更纯的 DNA; Marc-Andre Lachance^[21] 介绍用羟基磷灰石纯化碘标记的 DNA 方法。

4. DNA 的贮存: 在 1SSC 或 0.1SSC 高浓度 (1mg/ml 左右) DNA 液加几滴氯仿作防腐剂于 4℃ 可贮存几个月。在 -70℃ 快速冷冻,于 -20℃ 贮存可长达一年之久。

DNA 的标记

有体内和体外二种标记的方法,前者容易标记,但放射性操作较多;后者人工标记,标记百分率低,但放射性操作可大大减少,因此,这二种方法各有利弊。

1. 体内标记^[22]: 最常用的同位素是 ¹⁴C 和 ³H,以 2-¹⁴C-胸腺嘧啶和甲基-³H-胸腺嘧啶的形式加入。培养基: M, 溶液 10ml, 0.1M MgSO₄ 1ml, 0.01M CaCl₂ 1ml, 胰胨 1g, 40% 麦芽糖 2.5 ml, 硫酸素 (单独灭菌) 200μg, 蒸馏水 1000ml, M, 溶液由 Na₂HPO₄ 60g, KH₂PO₄ 30g, NaCl 5g, NH₄Cl 10g, 蒸馏水 1000ml 所配成。菌株接种于 5ml 的上述培养基中, 37℃ 培养过夜,再转入 10ml 新鲜培养基, 37℃ 通气培养。脱氧腺苷 (2.5mg) 和甲基-³H-胸腺嘧啶 (50μCi) 在早期对数生长期加入, 1.5 小时后再加一次。10ml 溶菌产物可产生约 30μg 高度纯化的、并具有 4.0×10⁶ 脉冲数/分/μg 比放射强度的标记 DNA。

2. 体外标记: 自 1971 年 Commerferd^[23] 介绍体外碘化 DNA 作放射性探针之后,由 Getz 等探索用于 DNA-RNA 杂交试验^[24],随之国内也开展了大量的 DNA-RNA 杂交技术的应用^[25,26]。取 100 μg DNA 溶

于 0.1M NaAc-0.04M HAC 缓冲液 (pH 5.0), 依次加入 KI 至终浓度为 2.5×10⁻³M, Na¹²⁵I 约 200μCi, 混和后,最后加入 TiCl₄ 至终浓度为 6.5×10⁻³M, 总体积为 0.5ml 左右。反应混合物于 60℃ 水浴保温 20 分钟。以新配制 0.1 M Na₂SO₄ 0.2ml 终止反应。以 1M NH₄AC-0.5M NH₄OH 调 pH 至 8.7 左右,重新放入 60℃ 水浴处理 20 分钟,稳定反应去除非专一性的碘。冷却后,使通过 Sephadex G50 (或 75) 的 1×50cm 的柱,用重蒸馏水洗脱,分离结合 ¹²⁵I 的 DNA 和未结合的游离 ¹²⁵I, 收集 10 管 (每管 2—3ml), 分别测其 260 nm 波长的吸收值 (A₂₆₀) 和放射强度 (cpm), 取二者皆高的管留下,即是已标记的 DNA, 置冰箱备用。如体积过大,应于低温下浓缩。

DNA-DNA 的杂交

1. DNA 片段的长度: 杂交时, 标记 DNA 的片段不宜过长。可用超声波或加压室等方法切割, Owen 等^[27] 置 400μg/ml DNA 溶液 (溶于 0.1 SSC) 于 MSE 超声波粉碎机 (100 W 型) 20—25 千赫兹, 2—5μA 条件下超声三次 (1 分/次), 温度不超过 4℃, 可切得 2×10⁵—3×10⁵ 道尔顿分子量的片段。如用法国加压室在 21,000 磅的条件, 可切得片段达 4×10⁵ 道尔顿的 DNA。

2. 杂交温度: 据 Gillis 等公式计算

T_{or} (最适复性温度) = [0.51(G + C) + 47.0]℃
基本上相当于 T_m (熔解温度) - 25℃ 的温度。

3. 杂交形式: 可分液相和固相二种。前者杂交较充分, 杂交率高, 一般可达 75—95%, 但存在复性的干扰, 为降低复性的影响, 可采用固相, 但一般杂交率只能达 70%。二种方法各有利弊, 可根据各自要求选用。

① 液相杂交——以小量、切割的标记 DNA 对大大超量的非标记 DNA, 常用比例为 1:3000, 这可使标记 DNA 的复性降至最低程度。标记和非标记 DNA 的混合物于 100℃ 变性 15 分钟, 然后以 0.5M 磷酸缓冲液调至 0.28M, 并于 Cot 100 (C₀ 为 DNA 最初浓度, t 为保温时间, Cot 为二者乘积) 的条件下杂交。在最适复性温度下, 经一定时间后, 杂交混合液先用 0.03 M 磷酸缓冲液 (PB) 洗脱未标上的 ¹²⁵I, 然后于 60℃ 下以 0.16 M PB 洗脱未结合的单链 DNA, 于 60℃ 下以 0.5 M PB 洗脱已结合的双链 DNA; 另一方法也可将杂交反应液于减压条件下, 慢速通过微孔膜收集杂交分子, 然后用大量 2×SSC 洗除未结合的单链和未标上的游离 ¹²⁵I^[28], 测量双链 DNA 的放射强度, 计算出杂交百分率。

② 固相杂交——是指非标记的一股 DNA 固定于滤膜后, 与标记的另一股 DNA 在滤膜上进行杂交。

可分以下步骤进行。

1) 取非标记 DNA 100 μg 以上 (含量视膜大小而定, 最终使每张 6mm 直径的小膜达 10 μg 左右) 加入 5ml 蒸馏水中, 置 100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 分钟, 立即加入等量的 12SSC, 减压慢速通过微孔膜 (先在蒸馏水和 6SSC 中浸泡, 再用 6SSC 减压冲洗), 然后用冷却的 25ml 6SSC 洗涤。测量过滤前后 DNA 的 A_{260} 吸收值, 计算吸附率。将含 DNA 的滤膜置室温过夜, 次日用不锈钢管打成 6mm 直径的小片, 置 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘 4 小时, 移至干燥器内抽真空, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2) 据 Denhardt^[13] 推荐在杂交前, 先将上述制成的膜经过预温育处理, 预温液由含 0.02% 菲可、0.02% 牛血清蛋白和 0.02% 聚乙烯吡咯烷酮的 3SSC 所组成, 在此液中置 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 4 小时。

3) 将切割的标记 DNA 溶于 2SSC 和 0.1% SDS 反应液中, 并加入经预温育处理的含 DNA 的膜及空白对照膜, 置最适复性温度下保温 20—24 小时。为了减少高温处理的损失, Bonner 等提出用甲酰胺可将杂交 (复性) 温度降至 37—50 $^{\circ}\text{C}$ ^[14, 20]。

4) 杂交膜用 2SSC, 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 洗三次, 第一次 1 小时, 后二次皆为半小时, 这样能将未结合上的 ¹²⁵I 和未结合的 DNA 去除。也有人主张^[16] 用 3.10⁻³ M Tris-HCl (pH 9.4) 的缓冲液洗膜。也可达到同样目的, 据称还可代替预温育处理。

放射性测量及杂交率的计算

干燥杂交膜后, 用井型 γ 计数管或液闪计数器测量比放射性。前者可直接将杂交膜置测量管计数; 而后者按每管加 5ml 闪烁液 [由 0.4% 2,5 二苯基噁唑、0.01% 1,4-二-[2-(4 甲基-5 苯噁唑)]-苯的甲苯液组成] 测量脉冲数, 计算得比放射强度。以同源的 DNA 的杂交 (复性) 作为 100%, 异源 DNA 的杂交与同源 DNA 的杂交相比, 而求得它们之间的杂交百分率。

参 考 文 献

- [1] Buchanan, R. E. & N. E. Gibbons et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Eighth Edition), 1974.
- [2] De Ley et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 42(1): 43—56, 1966.
- [3] De Ley et al.: *ibid* 42(1): 263, 1966.
- [4] Swings, J. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30(3): 547—556, 1980.
- [5] Ballard, R. W. et al.: *J. Gen. Microbiol.* 60(2): 199—214, 1970.
- [6] Palleroni N. J. et al.: *J. Gen. Microbiol.* 60(2): 215—231, 1970.
- [7] Tarrand, J. T. & R. K. Noel.: *Can. J. Microbiol.* 24: 967—980, 1978.
- [8] Tatsuji, Seki et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 25(3): 258—280, 1975.
- [9] Watson, J. D. & F. H. C. Crick.: *Nature*, 171: 964 & 737, 1953.
- [10] Deldruk, M. & G. S. Stent.: *The Chemical Basis of Heredity* p. 699. Baltimore: Johns Hopkins Press. 1957.
- [11] Meselson M. & F. W. Stahl.: *Pro. Nat Acad. Sci. U. S. A.* 44(7): 671—682, 1958.
- [12] Bautz, E. K. F. & B. D. Hall.: *Pro. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 48: 400, 1962.
- [13] Bolton, E. T. & B. J. Mc Carthy.: *Pro. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 48 (8): 1390, 1962.
- [14] David Gillespie et al.: *J. Mol. Biol.* 12: 829—842, 1965.
- [15] Denhardt, D. T.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 23: 641—646, 1966.
- [16] Warnaar, S. O. & J. A. Cohen.: *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 24(4): 554, 1966.
- [17] Bernardi, G. et al.: *J. Mol. Biol.* 11: 141—143, 1965.
- [18] Brenner, D. J. et al.: *Analy. Biochem.* 28: 447—459, 1969.
- [19] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.* 3: 208—218, 1961.
- [20] De Ley & De smedt.: *Antonie van Leeuwenhoek* 41: 287—307, 1975.
- [21] Mare-Andre Lachance, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30 (2): 433—436, 1980.
- [22] Skinner, F. A. & D. W. Lovelock.: *Identification Methods For Microbiologists* (Second Edition) Academic Press. 1979.
- [23] Commerford, S. L.: *Biochem.* 10: 1993—1999, 1971.
- [24] Michael, J. Getz et al.: *Biochem. et Biophys. Acta* 287, 485—494. 1972.
- [25] 张玉砚等: 生物化学和生物物理进展 3: 20—24, 1975.
- [26] 张玉砚等: 实验生物学报 11 (1): 97—104, 1978.
- [27] Owen, R. J. & J. S. Snell.: *J. General Microbiol.* 93: 89—102, 1976.