



西昌学院“质量工程”资助出版系列专著

动物疫病分子诊断技术

DONGWU YIBING FENZI
ZHENDUAN JISHU

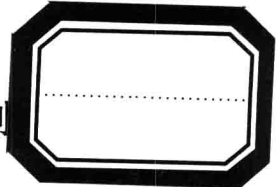
邓 宇 主编



四川大学出版社



西昌学院“质量工程”资助出版系列



动物疫病分子诊断技术

DONGWU YIBING FENZI
ZHENDUAN JISHU

主 编 邓 宇

副主编 何学谦 徐 睿

参 编 李凤琴 王雪梅



四川大学出版社

特约编辑:张 宇
责任编辑:朱辅华
责任校对:龚娇梅
封面设计:墨创文化
责任印制:王 炜

图书在版编目(CIP)数据

动物疫病分子诊断技术 / 邓宇主编. —成都: 四川大学出版社, 2013. 12
(西昌学院“质量工程”资助出版系列专著)
ISBN 978-7-5614-7398-6

I. ①动… II. ①邓… III. ①兽疫—诊断
IV. ①S855

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 299386 号

书名 动物疫病分子诊断技术

主 编	邓 宇
出 版	四川大学出版社
地 址	成都市一环路南一段 24 号 (610065)
发 行	四川大学出版社
书 号	ISBN 978-7-5614-7398-6
印 刷	郫县犀浦印刷厂
成品尺寸	170 mm×240 mm
印 张	10.5
字 数	218 千字
版 次	2014 年 4 月第 1 版
印 次	2014 年 4 月第 1 次印刷
定 价	22.00 元

版权所有◆侵权必究

◆读者邮购本书,请与本社发行科联系。

电话:(028)85408408/(028)85401670/
(028)85408023 邮政编码:610065

◆本社图书如有印装质量问题,请
寄回出版社调换。

◆网址:<http://www.scup.cn>

总 序

为深入贯彻落实党中央和国务院关于高等教育要全面坚持科学发展观，切实把重点放在提高质量上的战略部署，经国务院批准，教育部和财政部于 2007 年 1 月正式启动“高等学校本科教学质量与教学改革工程”（简称“质量工程”）。2007 年 2 月，教育部又出台了《关于进一步深化本科教学改革 全面提高教学质量的若干意见》。自此，中国高等教育拉开了“提高质量，办出特色”的序幕，从扩大规模正式向“适当控制招生增长的幅度，切实提高教学质量”的方向转变。这是继“211 工程”和“985 工程”之后，高等教育领域实施的又一重大工程。

在党的十八大精神的指引下，西昌学院在“质量工程”建设过程中，全面落实科学发展观，全面贯彻党的教育方针，全面推进素质教育；坚持“巩固、深化、提高、发展”的方针，遵循高等教育的基本规律，牢固树立人才培养是学校的根本任务，质量是学校的生命线，教学是学校的中心工作的理念；按照分类指导、注重特色的原则，推行“本科学历（学位）+职业技能素养”的人才培养模式，加大教学投入，强化教学管理，深化教学改革，把提高应用型人才培养质量视为学校的永恒主题。学校先后实施了提高人才培养质量的“十四大举措”和“应用型人才培养质量提升计划 20 条”，确保本科人才培养质量。

通过 7 年的努力，学校“质量工程”建设取得了丰硕成果，已建成 1 个国家级特色专业，6 个省级特色专业，2 个省级教学示范中心，2 个卓越工程师人才培养专业，3 个省级高等教育“质量工程”专业综合改革建设项目，16 门省级精品课程，2 门省级精品资源共享课程，2 个省级重点实验室，1 个省级人文社会科学重点研究基地，2 个省级实践教学建设项目，1 个省级大学生校外农科教合作人才培养实践基地，4 个省级优秀教学团队，等等。

为搭建“质量工程”建设项目交流和展示的良好平台，使之在更大范围内发挥作用，取得明显实效，促进青年教师尽快健康成长，建立一支高素质的教学科研队伍，提升学校教学科研整体水平，学校决定借建院十周年之机，利用

2013年的“质量工程建设资金”资助实施“百书工程”，即出版优秀教材80本，优秀专著40本。“百书工程”原则上支持和鼓励学校具有副高职称的在职教学和科研人员，以及成果极为突出的具有中级职称和获得博士学位的教师出版具有本土化、特色化、实用性、创新性的专著，结合“本科学历（学位）+职业技能素养人才培养模式”的实践成果，编写实验、实习、实训等实践类的教材。

在“百书工程”实施过程中，教师们积极响应，热情参与，踊跃申报：一大批青年教师更希望借此机会促进和提升自身的教学科研能力；一批教授甘于奉献，淡泊名利，精心指导青年教师；各二级学院、教务处、科技处、院学术委员会等部门的同志在选题、审稿、修改等方面做了大量的工作。北京理工大学出版社和四川大学出版社给予了大力支持。借此机会，向为实施“百书工程”付出艰辛劳动的广大教师、相关职能部门和出版社的同志等表示衷心的感谢！

我们衷心祝愿此次出版的教材和专著能为提升西昌学院整体办学实力增光添彩，更期待今后有更多、更好的代表学校教学科研实力和水平的佳作源源不断地问世，殷切希望同行专家提出宝贵的意见和建议，以利于西昌学院在新的起点上继续前进，为实现第三步发展战略目标而努力！

西昌院校长 夏明忠

2013年6月

前 言

20 世纪 50 年代, DNA 双螺旋结构模型的提出标志着分子生物学成为了一门独立学科。自 20 世纪 70 年代以来, 分子生物学已成为生命科学最具有活力的学科前沿领域。随着分子生物学理论、技术和方法不断地被应用于临床医学, 分子生物学在疾病的预防、预测、诊断、治疗和疗效评价等方面发挥着愈来愈重要的作用。分子生物学与临床医学的广泛交叉和渗透产生了一个崭新的学科方向——分子医学。自 20 世纪 80 年代以来, MR 技术、核酸杂交技术、DNA 测序技术、生物芯片技术、生物质谱技术等的发展, 特别是 21 世纪以来, 基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢物组学等的快速崛起, 循证医学和系统生物学观点的引入, 兽医临床检验诊断学被赋予了自动化、简便化、分子化、标准化、信息化、安全化等新的特点。随着基因诊断从核酸等生物大分子拓展到基因表达的产物及其代谢产物等生物小分子, 分子诊断学随之出现。分子诊断学作为分子医学的重要组成部分, 从研究人体内源性或外源性生物分子和生物分子体系的存在、结构及表达调控的变化, 发展到为动物疫病病因诊断以及疾病预测提供信息和依据, 动物疫病分子诊断技术已迅速发展成为一门具有广阔应用前景并逐渐走向成熟的学科。

鉴于动物疫病分子诊断技术正越来越多地被应用于临床检验诊断, 国内大多数动物医学等相关专业开设了分子生物学检验技术的课程。近年来, 经典的分子诊断技术越来越成熟, 许多新技术不断涌现、发展, 并应用于临床检验诊断和动物医学的研究。

全书共 10 章。第一章概论, 由邓宇编写。第二章、第三章为动物疫病分子诊断技术基础知识, 着重描述了原核生物基因组、病毒基因组、真核基因组, DNA 与 RNA 等生物分子的分离与纯化、分子克隆等基础理论, 由王雪梅、邓宇编写。第四章至第七章介绍 PCR 技术、核酸分子杂交技术、生物芯片技术等, 由李凤琴、邓宇、徐睿等编写。第八章介绍生物信息学在动物疫病分子诊断中的应用, 由李凤琴编写。第九章详细介绍了部分动物疫病的分子生物学特征、分子诊断方法及其临床诊断意义, 由邓宇编写。第十章概要介绍了分子诊断实验室的质量管理及标准化, 由邓宇编写。

本书的出版得到西昌学院的大力支持，何学谦教授为本书审稿，在此一并致谢！

动物疫病分子诊断技术是一个正在快速发展的学科，尽管本书的编写人员均具有丰富的教学和研究经验，但由于出版时间仓促，难免有疏忽和不足之处，恳请读者和同仁批评指正。

编 者
2013 年 10 月

目 录

第一章 概 论	(1)
一、动物疫病的概念	(1)
二、分子诊断学的概念	(1)
三、分子诊断学的发展简史	(2)
四、分子诊断的策略及其在临床兽医学中的应用	(3)
五、展 望	(3)
第二章 核酸的分离与纯化	(5)
一、核酸分离与纯化的设计和原则	(5)
二、基因组 DNA 的分离与纯化	(5)
三、质粒 DNA 的提取与纯化	(8)
四、RNA 的分离与纯化	(9)
第三章 重组 DNA 技术	(11)
一、工具酶	(11)
二、重组 DNA 技术常用的载体	(15)
三、重组 DNA	(16)
第四章 动物疫病病原体基因扩增检验技术	(21)
一、DNA 聚合酶链式反应	(21)
二、分子诊断技术的临床应用	(31)
三、临床基因扩增检验实验室的管理规范	(34)
第五章 荧光定量 PCR 技术	(39)
一、荧光定量 PCR 概念	(39)
二、荧光定量 PCR 与普通 PCR 的主要区别	(39)
三、荧光定量 PCR 相关概念	(40)
四、荧光定量 PCR 的方法	(42)
五、荧光定量分析方法	(44)
第六章 核酸分子杂交技术	(46)
一、探针 - 靶分子反应	(47)
二、核酸探针的种类	(48)



三、核酸探针的标记和检测	(52)
四、核酸分子杂交的类型	(56)
五、核酸分子杂交实验因素的优化	(64)
第七章 生物芯片技术	(69)
一、生物芯片概述	(69)
二、基因芯片	(70)
三、蛋白质芯片	(77)
四、芯片实验室	(83)
第八章 生物信息学在动物疫病分子诊断中的应用	(86)
一、生物信息学概论	(86)
二、生物信息数据库	(86)
三、核酸数据分析	(92)
四、蛋白质数据分析	(96)
第九章 动物疫病的分子诊断	(102)
一、猪 瘟	(102)
二、非洲猪瘟	(103)
三、口蹄疫	(105)
四、小反刍兽疫	(106)
五、猪水疱病	(108)
六、猪繁殖与呼吸综合征	(110)
七、羊 痘	(111)
八、鲤春病毒血症	(113)
九、禽流感	(115)
十、牛病毒性腹泻	(118)
十一、牛结核病	(119)
十二、布鲁菌病	(121)
十三、狂犬病	(122)
十四、马立克病	(124)
十五、新城疫	(126)
十六、鸭 瘟	(128)
十七、猪传染性胃肠炎	(129)
十八、猪圆环病毒感染	(130)
十九、猪链球菌病	(132)
二十、猪囊尾蚴病	(134)
第十章 分子诊断实验室的质量管理及标准化	(137)
一、分子诊断实验室的质量管理	(137)
二、分子诊断实验的标准化	(148)

第一章 概 论

我国畜牧业增长迅速，但与此同时，重大动物疫病给畜牧业造成的风险也日趋突出，尤其是近几年发生的禽流感、猪链球菌病和猪蓝耳病，不仅使畜牧业遭受重大冲击，而且危及公共卫生安全，直接影响到我国畜牧业当前和未来的健康发展，因此必须从战略高度加以反思和解决。新中国成立以来，我国在动物疫病的控制方面取得了很大成绩。但随着畜牧业生产的高速发展，动物疫病呈现出越来越为复杂的局面。危害我国畜牧业的主要传染病已由原来的 7 种增至 38 种，其中有 12 种为 20 世纪 80 年代以来的新发病。国外动物疫病控制难度也不断加大。上述 12 种疫病多属于国外引入，而牛海绵状脑病（疯牛病）已经从欧洲步步逼近国门，动物疫病形势非常严峻。

一、动物疫病的概念

所谓动物疫病，是指动物传染病、寄生虫病。对人与动物危害严重，需要采取紧急、严厉的强制预防、控制、扑灭等措施的为一类疫病。

在分子生物学的发展过程中，脱氧核糖核酸（DNA）重组、转基因、蛋白质组学、生物芯片、基因治疗等分子生物学技术不断渗透到医学领域。对现代兽医学诊断技术产生了深刻影响。兽医科学的研究从整体和细胞水平汇集到分子水平，对动物疫病的诊断和对病情、治疗的判断亦逐渐进入分子水平。一种全新的临床诊断新学科——动物疫病分子诊断学，开始从实验室研究走向临床应用。

二、分子诊断学的概念

分子诊断学是利用分子生物学技术来研究机体外源性和内源性生物大分子和大分子体系的存在、结构或表达调控的改变，从而为疾病的预测、预防、诊治、转归提供分子水平信息的学科。

动物疫病分子诊断学的主要任务是：利用基础兽医学和相关生命科学的理论和方法，探讨动物疫病发生、发展及转归的分子机制；为整个动物疫病过程寻求准确、特异的分子诊断指标；利用分子生物学技术为这些分子诊断指标建立临床实用、可靠的检测方法。

动物疫病分子诊断的主要特点是：直接以动物疫病的病原基因为探查对象，属于病因学诊断，对基因的检测结果不仅具有描述性，更具有准确性；可准确诊断疾病的基因型变异、基因表型异常，以及由外源性基因侵入引起的疾病。

三、分子诊断学的发展简史

分子诊断学的发展是与分子生物学的发生发展紧密相关的。1953年，Watson与Crick提出DNA双螺旋结构模型，成为现代分子生物学诞生的里程碑，使整个生物学研究进入分子时代。中心法则的建立，使分子生物学作为一门学科初步形成了自己的理论体系，即生物大分子的结构和功能、遗传信息的复制、遗传信息的表达以及基因表达的调控。

1978年，美籍华裔科学家简悦威（Yuet Wai Kan）等应用液相DNA分子杂交进行镰形细胞贫血症的基因诊断，标志着分子诊断学的诞生。随着基因重组技术的建立及基因组研究的发展，分子诊断学进入了初级阶段，即利用DNA分子杂交的方法进行遗传性疾病（以下简称遗传病）的基因诊断。

分子诊断学的第二阶段是在1985年聚合酶链式反应（PCR）技术创建之后。PCR技术由于其操作简便、快捷、适用性强，已广泛应用于分子诊断学领域。以PCR技术为基础，还衍生出了很多分子诊断方法，其中比较成熟的方法有：等位基因特异性PCR（allele specific PCR, AS-PCR），可针对等位基因设计引物，根据PCR产物来鉴定基因型；限制性酶切片段长度多态性分析（restriction fragment length polymorphism, RFLP），是检测与特异酶切位点相关突变的简便方法；PCR单链构象多态性技术（PCR single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP），可揭示PCR产物序列内的多态性等。另外，定量PCR、实时PCR（real-time PCR, RT-PCR）可检测患病动物细胞中信使核糖核酸（mRNA）的表达量及患病动物的标本中特异的病原体DNA或者RNA（核糖核酸）的滴度，实现了诊断从定性至定量的突破。

2001年2月开始，随着首张人类基因组序列图谱以及随后其他物种基因组序列的公布，分子生物学研究进入了基因组与后基因组时代。基因组学、蛋白质组学等方面的巨大技术进步促使分子诊断学进入第三阶段，即以生物芯片（biochip）技术为代表的高通量密集型技术。生物芯片技术具有样品处理能力强、用途广泛、自动化程度高等优点，具有广阔的应用前景与商业价值，现已成为整个分子生物学技术领域的一大热点。

根据芯片上固定的探针类型，生物芯片可分为基因芯片（DNA芯片）、蛋白质芯片、组织芯片等。它将极大量的探针同时固定于支持物上，一次可以对大量的生物分子进行检测与分析；而且通过设计不同的探针阵列、使用特定的分析方法可使该技术具有多种不同的应用价值，如基因多态性分析、表达谱测定、突变

检测、基因组文库作图与杂交测序等。

四、分子诊断的策略及其在临床兽医学中的应用

从生物中心法则来看,利用分子诊断技术可以判断疾病基因结构异常或基因表达异常。检测基因的存在和基因结构异常主要通过测定 DNA/RNA 来实现,其中核酸的分子杂交、PCR 和 DNA 测序三种基本技术及其联合应用仍然是分子诊断的主流技术,基因芯片技术也开始逐渐应用于疾病的诊断中。基因表达是指基因的转录和翻译,而检测基因表达的异常,在转录水平主要是检测 mRNA 表达的质和量,常用的方法有 Northern blot、荧光原位杂交、反转录(逆转录)PCR、实时荧光定量 PCR、转录谱芯片等;在翻译水平则以检测蛋白质的质和量来反映核酸表达水平的变化。常用的方法有 Western blot、免疫组织化学染色、ELISA、酶分析法、蛋白质芯片等。

病原微生物导致的感染性疾病仍然是严重威胁动物健康的一个重要方面。以前对这些病原体多采用微生物学、免疫学和血液学相关手段进行检测,但是这些方法不易早期诊断,并受灵敏度和特异性的限制。例如,诊断结核分枝杆菌的感染经典的方法是进行体液标本的培养,不仅周期长,而且阳性率不高;丙型肝炎从感染到抗体出现的窗口期较长,用检测抗体的方法很难做到早期诊断。随着各种细菌或病毒等病原体的基因组序列的公布,可以利用分子诊断技术早期、快速、敏感、特异地检测侵入体内的外源性基因(感染性病原体的 DNA 或 RNA)。分子生物学技术不仅可以对微生物感染进行准确的病因学诊断,还可以对感染性病原体进行基因分型和耐药性监测,因此逐渐在动物感染性疾病的临床诊断、流行病学调查、微生物分类分型研究中显示出它独特的功能。

分子诊断技术的不断发展,使分子诊断从传统的 DNA 诊断概念发展到更全面的核酸和蛋白质诊断的新概念;分子诊断的内容也从早期的单一动物疫病的诊断发展到对疫病的易感性判断及提供临床用药指导等领域。

五、展 望

随着动物疫病病原体基因、相关基因的克隆以及功能研究的进展,为建立动物疫病的分子诊断技术带来了空前的机遇。动物疫病分子诊断技术发展趋势:加强疫病发病的分子机制的研究,更强调利用现有基因功能研究的结果,不断扩大可进行分子诊断的疫病的种类或诊断指标,从而将动物疫病控制在最早期阶段;对常见、多发疫病,特别是混合感染疫病,如猪瘟、猪繁殖与呼吸综合征、猪传染性胃肠炎等混合感染疫病进行分子诊断。

未来的分子诊断有 4 个重要的发展方向:①商品化的分子诊断产品,分子诊断学已成为世界范围内临床实验室的重要内容,为了使分子诊断能广泛应用于临

床,必须使分子诊断产品商品化、简单化、易操作化;②个体化医疗,药物基因组学、药物蛋白质组学以及药物代谢组学的飞速发展,使个体化分子诊断将在不久后成为现实;③治疗诊断学,即诊断学与治疗学的有效整合,未来几十年动物健康保健的终极目标是分子诊断学与治疗学的有效整合,而促进二者整合的关键因素正是简便、快捷、精确的分子诊断技术的使用;④纳米诊断学,即使用纳米水平级的设备系统进行分子诊断,它可以大大提高分子诊断的灵敏度和检出限,从而成为未来分子诊断学的发展热点。

动物疫病分子诊断存在的问题主要是实验结果的可比性、操作人员的规范化培训。目前国内分子诊断还没有形成一定的规模,由于缺乏标准化,难以进行质量控制等问题,分子诊断的结果难以进行比较。可喜的是,国内已开始进行分子诊断实验室认证和操作人员的规范化培训。由于分子诊断自身强大的潜力和技术优势,分子诊断势必将逐渐在临床检验诊断中发挥越来越重要的作用。

随着后基因组研究的不断深入和分子诊断技术的不断更新,尤其是兽医临床医学各学科与分子遗传学、分子生物学和仪器分析学等其他学科不断交叉和互相渗透,人们对生物大分子和动物疫病关系的理解也会越来越深入,分子诊断技术将在动物疫病的诊断、预防和治疗方面发挥日益重要的作用,推动现代兽医诊断学的发展。

第二章 核酸的分离与纯化

一、核酸分离与纯化的设计和原则

在细胞中核酸一般与各种蛋白质结合在一起，而核酸的分离就是指将核酸与其相结合的蛋白质、多糖、脂肪等生物大分子分开。

细胞内的核酸包括 DNA 与 RNA 两种分子，它们与蛋白质结合成的复合体称为核蛋白（nucleoprotein）。其中，蛋白质与 DNA 结合称为脱氧核糖核蛋白（deoxyribonucleoprotein, DNP），与 RNA 结合称为核糖核蛋白（ribonucleoprotein, RNP）。真核生物的 DNA 除了有染色体 DNA，还有细胞器 DNA。染色体 DNA 位于细胞核内，约占 95%，为双链线性分子；细胞器 DNA 存在于线粒体或叶绿体等细胞器内，约占 5%，为双链环状分子。在原核生物中不同的是还有双链环状的质粒 DNA；而在非细胞型的病毒颗粒内，DNA 的存在形式有双链环状、单链环状、双链线状和单链线状等多种形式。此外，在不同生物间 DNA 分子的总长度的差异很大，一般随生物的进化程度而增长。如人的 DNA 长度约为 3.0×10^9 个碱基对（base pair, bp），而乙肝病毒（HBV）的长度仅为 3 200 bp。相对来说，RNA 分子要比 DNA 分子小得多。但 RNA 的功能的多样性，决定了 RNA 的种类、大小和结构都较 DNA 要多样化。因此，由于 DNA 与 RNA 性质上的差异，两者的最适分离与纯化的条件也不一样。

核酸分离与纯化的方法很多，一般需根据具体生物材料的性质与起始量、待分离核酸的性质与用途而选择不同的方案。

二、基因组 DNA 的分离与纯化

（一）技术路线的设计

进行核酸的分离与纯化一般都包括了以下几个主要步骤：材料的选择、核酸的释放、核酸与其他生物大分子的分离、核酸的纯化与鉴定、核酸的浓缩、核酸的保存等。每一步骤又可采用多种不同的方法或方法的组合。通常分离纯化步骤越多，所核酸样品的纯度也越高，但产率会逐渐下降，完整性也愈难以保证。反之，分离纯化步骤较少的提取方案，可以获得较多的完整性较好的核酸分子，但

纯度不一定高。因而方法的选择需要结合核酸的用途来确定。

1. 材料的选择

常见的分离核酸的原料有血液、尿液、唾液、组织及培养细胞等,应根据实验的目的来确定具体材料的选择。核酸分离与纯化的方法非常多,要根据材料选择适宜的分离与纯化方法,因此应先设计如何收集与准备材料。首先应该根据不同的实验研究与应用考虑对核酸的产量、完整性、纯度和浓度可能的要求;其次应考虑分离与纯化核酸所需的时间与成本,在不影响核酸质量的基础上,应尽量选择安全无毒的试剂与方案。近年来,随着相关试剂盒和自动化仪器的开发与应用,使核酸样品能批量制备,大大提高了分离纯化的效率。

2. 核酸的释放

DNA、RNA 均位于细胞内,因此要获得核酸首先应该破碎细胞、释放核酸。细胞的破碎方法非常多,主要可以分为机械法与非机械法两大类。非机械法包括干燥法与溶胞法,目前一般采用溶胞法。其中应用最广的是采用适宜的化学试剂或酶裂解细胞的溶胞法,因为这些方法裂解效率高、方法温和,能保证较高的得率与较好地保持核酸的完整性。

(1) 机械法:机械法可分为液体剪切法与固体剪切法,包括低渗裂解、冻融裂解、微波裂解、超声裂解和颗粒破碎等物理方法。这些方法的基本原理是利用机械力使细胞破碎,但由于机械力也可引起高分子量线性分子如染色体 DNA 的断裂,因此该类方法不适用于染色体 DNA 的分离纯化。

(2) 化学法:化学法是通过加入的表面活性剂或强离子剂在一定的 pH 值环境下,细胞裂解释放出蛋白质、多糖和核酸。同时为保护核酸不被降解,需向缓冲液中加入一些金属离子螯合剂以抑制核酸酶的活性。

(3) 酶法:酶法常用溶菌酶或蛋白酶(如蛋白酶 K)使细胞破裂,进而释放出核酸。其中蛋白酶还能够降解与核酸结合的蛋白质,利于核酸的分离。以蛋白酶 K 为例,其能催化水解多种肽键,且在 65℃ 及有乙二胺四乙酸(EDTA)、尿素和去垢剂[如十二烷基磺酸钠(SDS)或聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)]等存在时仍保留有酶活性,故其在高分子量核酸的提取中有很大的应用价值。溶菌酶的主要作用是催化细菌细胞壁的蛋白聚糖 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸残基间的 β -1,4 键水解,以达到水解细胞壁的作用。

3. 核酸的分离与纯化

细胞破碎后,所释放出来的是含核酸分子的复杂混合物,核酸分子可能仍与蛋白质等生物大分子结合在一起。因此,在保证核酸分子完整性的前提下,需要进一步分离出一定量的、符合纯度要求的核酸分子。这需要结合核酸分子有关性质,利用核酸与其他物质在一个或多个性质上的差异,而设计有效方案加以分离。这些差异是多方面的,如细胞定位与组织分布上的差异、物理化学性质上的

差异,以及各自独特的生物学特性。需要去除的污染物主要包括:非核酸的大分子污染物、非需要的核酸分子和在核酸的分离纯化过程中加入的对后继实验与应用有影响的溶液与试剂。非核酸大分子污染物主要有蛋白质、多糖和脂类物质等;非需要的核酸分子,常是指制备 DNA 时的 RNA,制备 RNA 时的 DNA,当制备某一特定核酸分子时,其他的核酸分子均为非需要的核酸分子;在核酸分离纯化过程中常需要加入的有机溶剂和某些金属离子,由于对后继实验有影响,所以也需要很好地去除。

去除蛋白质可采用氯仿/异戊醇抽提,氯仿可使蛋白质变性并有助于液相与有机相的分离,异戊醇则有助于消除抽提过程中出现的气泡。此外,还可用 SDS、异硫氰酸胍等作为变性剂使蛋白质变性、高盐洗涤和蛋白酶处理等。

去除多糖可采用高盐法,即用乙醇沉淀时,在带沉淀溶液中加入 1/2 体积的 5 mol/L 的 NaCl 使多糖溶解。使用多糖水解酶也可将多糖降解。此外,在提取缓冲液中加一定量的氯苯(1/2 体积),氯苯可以与多糖的羟基作用,从而去除多糖。

去除酚类物质,可在抽提液中加入防止酚类氧化的试剂,如 β -巯基乙醇、维生素 C(抗坏血酸)、半胱氨酸、二硫苏糖醇等;或加入易与酚类结合的试剂,如 PVP、聚乙二醇(PEG),它们与酚类有较强的亲和力,可防止酚类与 DNA 的结合。

去除盐离子使用 70%乙醇洗涤即可。

4. 核酸的浓缩、沉淀与洗涤

随着核酸提取试剂的加入以及污染物的去除,核酸分子不可避免丢失,样品中核酸的浓度会逐渐下降,当浓度低至影响到后面的实验操作或不能满足后继研究与应用的需要时,就需要对核酸进行浓缩。核酸浓缩最常用的方法是沉淀法,其优点在于核酸沉淀后,可以很容易地改变溶解缓冲液和调整核酸溶液至所需浓度。另外,核酸沉淀还能去除部分杂质与某些盐离子,有一定的纯化作用。具体方法可以在加入一定浓度的盐类后,用有机溶剂沉淀核酸。常用的盐类有醋酸钠、醋酸钾、醋酸铵、氯化钠、氯化钾及氯化镁等,常用的有机溶剂有乙醇、异丙醇和聚乙二醇。核酸沉淀往往含有少量共沉淀的盐,需用 70%~75%乙醇进行洗涤去除。对浓度低并且体积较大的核酸样品,可在有机溶剂沉淀前,采用固体的聚乙二醇或丁醇对其进行浓缩处理。

(二) 基因组 DNA 分离与纯化的方法

制备基因组 DNA 是进行基因结构和功能研究的重要步骤,通常要求 DNA 片段的长度不小于 100 kb。但由于 DNA 是很长的线性分子,而且缺乏横向的稳定性,因此很容易断裂。在 DNA 提取过程中应尽量避免使 DNA 断裂和降解的各种因素,以保证 DNA 的完整性,为后继实验打下基础。提取植物基因组

DNA 最经典的方法是 CTAB 方法,而提取动物基因组 DNA 常用的方法包括酚抽提法、甲酰胺解聚法、玻棒缠绕法、异丙醇沉淀法、玻璃珠吸附法等。

(三) DNA 片段的回收

某些限制性内切酶的消化、基因克隆、转染以及基因组文库的构建等对 DNA 的纯度与完整性要求较高,此时需对 DNA 样品做进一步的纯化处理。纯化的方法常用的包括透析、层析、电泳、选择性沉淀等。

此外,还可以购买回收试剂盒进行 DNA 片段的回收。回收试剂盒的原理是在特定溶液环境下(高盐、低 pH 值)使核酸吸附在固相介质(一般是硅胶膜)上,洗涤去除杂质后,洗脱得到纯化的 DNA 片段。

目前的回收试剂盒主要有离心柱型和磁珠型两种。离心柱型主要是将硅胶膜固定在离心管中,用离心力或者负压让含有核酸的溶液通过硅胶膜,使核酸在特定溶液环境中吸附在硅胶膜上,经过洗涤、洗脱等步骤得到纯化的核酸。目前大多数的生物试剂公司生产的回收试剂盒主要是采用该方法来回收核酸,这种方法操作简单、时间短。目前也有很多公司采用磁珠法来提取,该法不需要离心,可以用于自动化操作。

三、质粒 DNA 的提取与纯化

质粒是原核生物中染色质以外的遗传物质,携带的基因包括耐药性基因、毒力基因等,已知的大多数质粒均是双链的共价闭合环状质粒 DNA,简称闭环质粒(CCC plasmid),可作为携带外源基因的重要载体(vector)在细菌中进行扩增或表达。提取质粒的常用方法有碱裂解法、煮沸法、SDS 裂解法等。

除了传统的方法,提取质粒的试剂盒也发展得比较成熟,市场上可根据需要购买到各种质粒提取试剂盒。如 Omega 公司的质粒提取试剂盒将经典的碱裂解法与硅胶柱结合起来,去除了传统抽提过程中有毒的酚氯仿抽提过程和耗时的醇类沉淀过程,让操作者可以在 20 min 内完成质粒的提取工作,大大加速了实验效率。纯化的质粒可直接用于 PCR、酶切、自动测序等。

通过各种裂解法制备的质粒 DNA 通常有较多 RNA 与不等量的染色体 DNA 污染。可用的纯化方法非常多,而效果好且适用范围广的方法主要有氯化铯-溴乙锭等密度梯度超速离心法、聚乙二醇沉淀法和柱层析法等。

为获得一定纯度的某一特定修饰的质粒 DNA,常通过凝胶电泳分离并回收。

无论用何种方法制备的质粒 DNA,其质量都应该满足下一步实验的要求。必须严格控制质粒提取纯化的全过程,并重视细菌的培养、收集与裂解等环节,回收的质粒 DNA 必须进行含量、大小、纯度及完整性的鉴定,必要时进行测序分析。