

林万明 主编

上海科学技术出版社

临床基因探针诊断实验技术

临床基因探针诊断实验技术

LIN CHUANG JI YIN TAN ZHEN
ZHEN DUAN SHI YAN JI SHU

96847

临床基因探针诊断实验技术

林万明 主编

上海科学技术出版社

12312

内 容 简 介

该书是一本较全面、较详细地介绍传染病和遗传病临床基因探针诊断实验技术方面的书。全书分总论和各论，共57章。总论具体地描述了与基因探针诊断有关的各种实验操作技术和方法。各论主要介绍微生物（细菌、病毒、衣原体、支原体、螺旋体和真菌）和寄生虫的基因探针诊断；介绍常见人类遗传病的基因探针诊断和产前诊断。本书编写的宗旨是，力求使读者参照本书就能在一般实验室比较容易地开展疾病的基因探针诊断。

本书可供临床医师、检验师；医学微生物学、分子遗传学和分子生物学工作者；高等院校有关专业的师生；各级卫生防疫和食品卫生检验人员等参考。

责任编辑 柯如仙

特邀编辑 李卫雨

临床基因探针诊断实验技术

林丁明 主编

上海科学技术出版社出版、发行

(上海瑞金二路450号)

新华书店上海发行所经销 北京四环科技印刷厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张 37 字数 900 000

1993年6月第1版 1993年6月第1次印刷

印数 1-2 500

ISBN 7-532-3033-8/R·906

定价: 30.00 元



(沪)新登字 108 号

主 编 林万明

编写者(按章序排列)

林万明	空军总医院临床分子生物研究中心
黄尚志	中国医学科学院医学基础研究所
周志江	解放军农牧大学卫检系
陈锦光	军事医学科学院生物工程研究所
李银太	军事医学科学院微生物流行病学研究所
杨瑞馥	军事医学科学院微生物流行病学研究所
刘明远	解放军农牧大学卫检系
祝道成	第四军医大学西京医院
李 倩	军事医学科学院微生物流行病学研究所
刘纯杰	解放军农牧大学卫检系
王 虹	吉林省临床检验中心
巩 方	中国进出口商品检验技术研究所
欧阳应斌	军事医学科学院生物工程研究所
石成华	军事医学科学院生物工程研究所
金利民	军事医学科学院微生物流行病学研究所
李元浩	中国药品生物制品检定所
秦鄂德	军事医学科学院微生物流行病学研究所
郭光明	第二军医大学微生物教研室
刘尔翔	中国协和医科大学
张兆松	南京医学院寄生虫教研室
李 佳	中国医学科学院医学基础研究所
方炳良	中国医学科学院医学基础研究所
陈 凡	中国医学科学院医学基础研究所
刘国仰	中国医学科学院医学基础研究所
戚 豫	北京医科大学生化教研室
王申五	北京医科大学人民医院血研所
金坤林	北京医科大学人民医院血研所
卞美路	中国医学科学院协和医院
郭玉凤	中国医学科学院医学基础研究所

序 言

在我国，医学生物学的研究已从细胞水平向分子水平和基因水平发展，分子生物学的基本理论和实验技术已在医学各个领域得到了广泛的应用，并取得了令人瞩目的成就。近年来，由于分子生物学向医学诊断方面的渗透，推动了临床基因探针诊断技术的迅速发展。在国外，各种基因探针诊断盒和试剂盒已在市场销售；在国内，为了适应这一发展的需要，林万明等组织编写出版了《临床基因探针诊断实验技术》一书。该书内容较全面，实用性强，基本反映了当今国内外临床基因探针诊断研究的新技术、新成就和新进展，是一本基础理论和实验方法相结合的参考书。本书的问世，对尽快把我国临床医学诊断和检测技术提高到分子水平做出了有益的贡献。

李景泰

1992年8月 北京

前 言

现在流行着一种观点：21世纪将是生物科学的世纪。的确，近20年来生物科学取得了惊人的进步，尤其是以分子生物学为标志的现代生物科学。它是从分子水平上研究和解释一切生物现象，并在分子水平上改造和利用生物的一门新兴学科。所以分子生物学的发展不仅使人们在分子水平上看到了生命的奥秘，而且也确实在医学、农业、工业等各方面为我国现代化建设带来了越来越多的利益。

随着分子生物学的发展，70年代初基因工程应运而生。基因工程不仅为人类改造生物世界提供了新的手段，也使基因操作技术日益发展和完善，进而促使生物学家、医学家、农学家和工业生物学家开始设计从前不能想象的研究计划，实现以前无从着手的研究目标。

在医学研究中，基因通常要涉及两个方面：其一是外源基因对人体的入侵，即一些微生物和寄生虫侵入机体后也将它们的基因带入机体，从而使人致病；其二是人体的内源基因的功能异常，例如各种遗传病的基因。因此，如何直接地检测出外源基因的类型和探测出内源基因的异常，就是临床基因探针诊断所要解决的问题。

近几年，基因探针诊断技术在广度和深度上都有了飞速发展，并已从研究室逐步向临床实验室和现场应用过渡，各种基因探针诊断盒和试剂盒已在市场出现。为了使基因探针诊断技术从基础到临床逐步开展起来，加速这一新技术在我国的推广和普及，并尽快把我国的检验和诊断技术提高到分子水平，我们编写了这本《临床基因探针诊断实验技术》，期望为尽可能多的有志于这一工作的人们提供一本基础理论和实验方法学上的参考书。

本书介绍的实验技术，看起来不难，但做起来却不易。一项实验包含着繁多步骤，其中任何一步发生问题，都会导致实验者处于困境。对待这些问题，重要的是充分理解每一程序的基本原理，进行周密思考、精心设计、严格操作。

经过诸位编写者的共同努力和辛勤耕耘，这本内容较全面，实用性较强和反映当今国内外临床基因探针诊断研究新技术、新成就和新进展的书已问世。我们期望与读者一道共同努力，使基因探针诊断技术在我国医学领域尽快开展起来。如经过诸多同仁若干年的不懈努力之后，事实证明这本书对大家的工作有所启迪，我们将感到无限欣慰。只是由于基因探针诊断技术是近几年发展起来的新技术，对我们来说经验不多，再者由于本人水平有限，对医学中不少学科理解不够，在编写中错漏之处在所难免，希望读者热心给予批评指正。

在本书编写中，佟加恩、朱庆义、杨晓峰、吴均、邓毅康和郭兆彪等同志给予了大力支持，在此深表谢意。

本书出版得到中国人民解放军空军总医院学术著作出版基金委员会的大力支持，深表谢意。

林万明

1992年4月 北京

目 录

总 论

第一章	概述	3
第二章	基因探针的制备	22
第三章	基因分析操作技术	63
第四章	基因探针的标记和检测	88
√第五章	基因探针在传染病诊断中的应用	121
第六章	基因探针在遗传病诊断中的应用	131

各 论

第七章	毒素原性大肠杆菌基因探针及其应用	157
第八章	志贺菌属和侵袭性大肠杆菌基因探针诊断	165
第九章	霍乱弧菌肠毒素基因探针诊断	179
第十章	军团杆菌基因探针的制备及应用	187
第十一章	分枝杆菌基因探针的制备和应用	200
第十二章	流感嗜血杆菌基因探针	208
第十三章	单核细胞增生李斯特菌的基因探针检验	213
第十四章	斯氏普罗威登斯菌的基因探针	218
第十五章	淋球菌基因探针	222
第十六章	拟杆菌基因探针及其应用	228
第十七章	艰难梭菌及其相关种的寡核苷酸探针	243
√第十八章	葡萄球菌质粒图谱分析和耐药性基因定位	247
第十九章	沙门菌 DNA 探针	253
第二十章	耶尔森菌核酸探针诊断	260
第二十一章	应用核酸探针检测副溶血性弧菌的耐热溶血素基因	268
第二十二章	弯曲菌属的非放射性探针鉴定和分类法	273
第二十三章	衣原体感染的基因探针诊断	277
第二十四章	肺炎支原体基因探针	290
第二十五章	莱姆病基因探针诊断	296
第二十六章	钩端螺旋体病的基因探针诊断	299
第二十七章	密螺旋体病的基因探针诊断	305
第二十八章	念珠菌基因探针	308
第二十九章	耐药基因探针及其应用	313
第三十章	遗传聚类群特异的寡核苷酸探针	318
第三十一章	血清中 HBV-DNA 的检测	324

第三十二章	轮状病毒核酸分子的检测方法	332
第三十三章	肾综合征出血热病毒核酸探针诊断技术	341
第三十四章	乳头瘤病毒核酸分子杂交检测	347
第三十五章	腺病毒核酸分子杂交检测	364
第三十六章	通用肠道病毒核酸探针的研制及其在诊断中的应用	371
第三十七章	核酸探针在 EB 病毒诊断中的应用	378
第三十八章	类病毒的核酸杂交检测	384
第三十九章	艾滋病的基因诊断	389
第四十章	DNA 杂交技术在人细小病毒诊断中的应用	396
第四十一章	单纯疱疹病毒核酸杂交检测	403
第四十二章	人巨细胞病毒的核酸杂交检测	411
第四十三章	水痘-带状疱疹病毒核酸杂交检测	423
第四十四章	疟原虫的 DNA 探针诊断	427
第四十五章	利什曼原虫 DNA 探针诊断	437
第四十六章	锥虫、丝虫和血吸虫的 DNA 探针诊断	447
第四十七章	α 地中海贫血的基因诊断	456
第四十八章	β 地中海贫血的产前基因诊断	464
第四十九章	血友病的产前基因诊断	472
第五十章	苯丙酮尿症	477
第五十一章	杜氏进行性肌营养不良	485
第五十二章	成人型多囊肾病	492
第五十三章	Wilson 病的基因分析	497
第五十四章	成视网膜细胞瘤易感基因及其 cDNA 探针在临床医学上的应用 ...	500
第五十五章	人性别的基因分析	510
第五十六章	DNA 指纹图	518
第五十七章	HLA-D DNA 分型及临床应用	530
附 录		
一	抗双链 DNA 单克隆抗体的制备	543
二	产前诊断的样品采集	548
三	细胞培养技术	555
四	常用缓冲液和储存液的浓度及配制方法	559
五	蛋白酶和核苷酸	563
六	限制性内切酶的识别特异性	564
七	限制性内切酶保温缓冲液用表	568
八	DNA 片段长度标准物	569
九	RNA 凝胶电泳分子量标记物	570
十	几种常用的宿主菌(大肠杆菌)的特性	570
十一	大肠杆菌遗传学中常见的基因型	572
十二	抗生素作用机制及细菌抗性原理	573

十三	常用的同位素及标记化合物	574
十四	几种常用的克隆载体和表达载体	579
十五	常用的数据	581
十六	缩略语注释	583

总 论

第一章 概 述

第一节 基因探针诊断技术的发展

一、探针诊断技术的优点

二、探针诊断技术的现状和改进

三、探针的进一步发展

第二节 基因探针杂交的基础理论

第三节 基因探针的特性

一、敏感性高

二、特异性强

三、简便快速

第四节 基因探针的类型

一、用菌种的全部 DNA 或部分 DNA 作为探针

二、由单一基因或一个小基因区构成的探针

三、由全部或部分保守基因作为探针

第五节 基因探针分子杂交类型和方法

一、基因探针分子杂交类型

二、基因探针分子杂交方法

近十几年来,随着分子遗传学的不断发展和基因工程技术的广泛应用,人们清楚地认识到,核苷酸序列含有生命有机体构建、维持和繁殖生命所必须的遗传信息。不同种生物体含有不同的 DNA 序列,同种生物体含有相同的 DNA 序列,并且这种核苷酸顺序是相对稳定的。所以,我们可以利用核苷酸碱基顺序互补的原理,用特异的基因探针,通过核酸杂交技术,来检测遗传病和鉴定样品中的微生物。所谓基因探针,是能识别特异碱基序列(基因)的有标记的一段单链 DNA(或 RNA)分子,也可以说是一段与被测定的核苷酸序列(靶序列)互补的带标记的单股核苷酸。

基因探针技术的发展和应用于传染病诊断、流行病学调查、食品卫生检验、肿瘤和人类遗传病早期检测等工作打开了一个新的局面,达到了特异性强、敏感度高、简便和快速的目的。

由于疾病诊断到了最根本的地步往往是一个遗传学问题。从病人或传染性微生物的基因着手进行的医学诊断,也许是最直接的诊断方法。所以,目前一项既能鉴定致病性生物体,又能探出遗传疾病的基因探测新技术正在临床医学诊断中得到全力开发和应用,其前景是很有可能取代传统的检测方法,这是诊断技术方法上的革命。人们预言:在生物技术市场竞争中,下一个突破口和具有吸引力的将是基因探针。目前,在临床诊断中使用的几个基因探针已经制成商品出售。可以肯定,在今后的几年中,各种基因探针诊断盒将会越来越多地出现。并必将推动我国诊断技术迅速提高到分子水平。

第一节 基因探针诊断技术的发展

一、探针诊断技术的优点

与常规检测技术比较,利用 DNA 探针技术诊断疾病具有明显的优点。它可代替许多常规诊断方法,标本只需做简单处理收集到膜上,即可用几种 DNA 探针杂交方法进行检测。制好的膜可由基层实验室或边远地区邮递到中心实验室进行检测。同样,基层或边远地区医学单位也可利用诊断盒对某一特殊传染病就地进行检测。

由于探针可直接对标本进行检测,所以费时的细菌培养和生化试验可以免做,特别是病毒做组织分离培养需要 3~6 周,而 DNA 探针可快速对其进行鉴定。若用原位杂交,

探针还可对细胞内病毒颗粒进行定位。同样,对可疑病毒标本体外诊断,探针可代替病毒的常规免疫学和血清学试验,代替起决定作用的电镜技术,即使病人临床症状还没有出现,探针诊断也能获得较好的结果。

探针技术不但能对传染病做出快速诊断,而且对人类遗传病的产前诊断也非常重要。人类遗传病有3000多种,若能开展遗传病的产前诊断,可以减少疯、呆和低能儿的出生,这不但减轻了国家和家庭的巨大经济负担和沉重的精神压力,而且对计划生育国策和优生优育政策的贯彻落实,对提高我国全民族人口素质将有重要的意义。

DNA探针技术的发展也带来很大的经济效益。由于能对病人做出快速准确的诊断,有利于早期用药,减少并发症,减少病人痛苦,改善病人管理,使病人更早地痊愈出院。缩短了病人住院时间,缓解病床紧张问题,可为国家和个人节约大量费用。

DNA探针在法医上的应用可为移民血统关系、民事纠纷、强奸和凶杀等各种刑事案件提供可靠的证据。总之探针诊断技术不但特异、敏感、经济,而且操作简便快速,实验室技术人员只要经过短期培训即可在日常工作中掌握使用。

二、探针诊断技术的现状和改进

(一) 实验室检测技术的现状

现在临床实验室仍采用培养法、血清学或单克隆抗体实验。培养阳性是判定传染病致病因子的可靠方法,但培养法也有许多缺陷:①培养结果出现缓慢。因许多微生物必须过夜培养,如分枝杆菌初次培养需要一个多月。对症状不典型的疾病,如军团杆菌病,由于培养结果出现太缓慢,以致无助于医生的诊疗。②有些微生物只能在动物体内或组织细胞内培养,这在一般实验室是很难进行的。③实验室技术人员经常接触活培养物,有被感染的危险,而进行探针实验时标本中的微生物已被杀死。④单克隆抗体与培养法比较虽不需要细胞培养而快速完成,但该法的特异性常常受到限制,交叉反应的出现和某些抗原变异可造成检测能力的消失,使技术人员难以判定结果。经过改进的探针诊断技术可克服和弥补上述不足。

(二) 探针诊断技术的现状和改进

1. 选择 rRNA 为探针杂交的靶子,以提高检测的敏感性 细菌细胞内含有大量核糖体 RNA (平均每个细胞内含有 10 000 个 rRNA), 利用 rRNA 的基因, 即以 rDNA 为探针, 以 rRNA 为靶子进行杂交, 可大大提高探针的敏感性 (一般可提高敏感性 10^3 倍)。由于 rRNA 的某些序列是所有生物共有的, 有的序列是所有细菌普遍存在的, 有些小的序列片段可能是单一菌属或菌种所特有的, 所以 rRNA 可作为一种理想的细菌分类的有用指征, 利用 rRNA 基因探针可以检测上述某些序列, 从而达到鉴定细菌科、属、种的目的。

2. 提高杂交反应速率 为了提高杂交反应的速率: ①可将固相杂交改用液相杂交。②加入加速剂增加杂交反应的速率。③利用吸附剂羟基磷灰石快速 (2~3min) 分离杂交后的双链和单链, 然后进行计数。探针检测和单克隆抗体均比培养法快, 因两者均不需要活的微生物, 其中探针又比单抗更敏感、更特异、更适合做定量分析。

3. 探针标记技术的改进 目前探针标记技术的主要问题是同位素标记。由于放射性同位素昂贵, 半衰期短, 操作防护和废物处理麻烦, 对人有一定的损害, 故不适用于在临床中推广应用。非放射性标记系统如生物素标记等正在发展, 因它的标记方法更简单, 稳定

(1~2年), 显色反应快, 利于临床应用, 但其敏感性还不如同位素高, 有时出现非特异本底, 有待继续改进。

4. 探针的制备问题 当前使用的探针大都是通过基因工程方法研制的大片段, 很难获得高浓度和高纯度的探针, 因此会影响杂交反应的速度和特异性, 这可通过合成寡核苷酸探针来做进一步的改进。最近使用寡核苷酸自动合成机, 可很便宜和简单地制备寡核苷酸探针(如15~50bp长), 合成探针有几个优点:

(1) 短的核酸探针杂交速度快, 全部杂交反应仅需30min, 而在相同浓度的同样条件下, 3400bp探针全部杂交需要6h。

(2) 寡核苷酸在一夜之间就可合成很高的浓度。

(3) 寡核苷酸探针能够在合成中标记。

(4) 由双链DNA片段制备的探针比单链的寡核苷酸探针杂交效率低, 因探针本身自我复性, 降低了与标本反应的有效浓度。

(5) 寡核苷酸探针可以检测小DNA片段, 在严格的杂交条件下, 可用于检测在序列中单碱基对的错误配对。

5. 临床标本的前处理问题 探针诊断技术碰到的另一个问题就是临床标本和环境标本直接用于探针检测, 需要有一个好的标本前处理方法, 包括集菌, 特别是使用生物素标记探针, 若标本处理不好, 会出现本底水平增高和敏感性降低的情况。因此急需研究合适的标本前处理方法、集菌和改进杂交方法。如采用夹心杂交法有利于污染标本的特异性杂交, 用蛋白酶K消化可消除生物素标记探针杂交的非特异, 利用扩增技术聚合酶链反应(PCR), 可增加鉴定所需要序列的有用拷贝数量, 提高标本检测的敏感性。

三、探针的进一步发展

目前, 用于研究和临床实验室常规检测病人、血液和供体组织的市售探针诊断盒有: 沙眼衣原体、军团杆菌属、人 α 疱疹病毒、分枝杆菌属、结核杆菌、鸟结核杆菌、支原体属、弯曲杆菌、人免疫缺陷病毒等; 正在发展的诊断盒有: 人乳头瘤病毒、巨细胞病毒、淋球菌等; 牙科诊所检测牙周炎病的牙龈拟杆菌、中间型拟杆菌和伴放线杆菌诊断盒也正在试用。

随着各种新技术的发展, DNA探针诊断技术必将越来越快的发展, 目前主要是研究更多的非同位素标记方法和杂交方法, 如使诊断盒改进得更简单, 即便不经过训练的人员也能做出正确的结果; 通过显色反应或其他终点反应可直接检测杂交反应, 缩短现有方法的反应时间; 发展自动化的DNA探针技术可快速筛选大量临床标本或同时检测几种不同的微生物病原体。可见在生物技术市场的开发和利用的竞争中, 下一个突破和具有吸引力的将是基因探针。

第二节 基因探针杂交的基础理论

生物的遗传物质是核酸。核酸分两大类: 脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。DNA含有一个磷酸分子, 一个脱氧核糖和四个碱基。四个碱基是胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)、腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G); RNA除核糖代替脱氧核糖和尿嘧啶(U)代替胸腺嘧啶外, 其他与DNA相同。碱基和糖缩合生成核苷, 核苷与磷酸缩合生

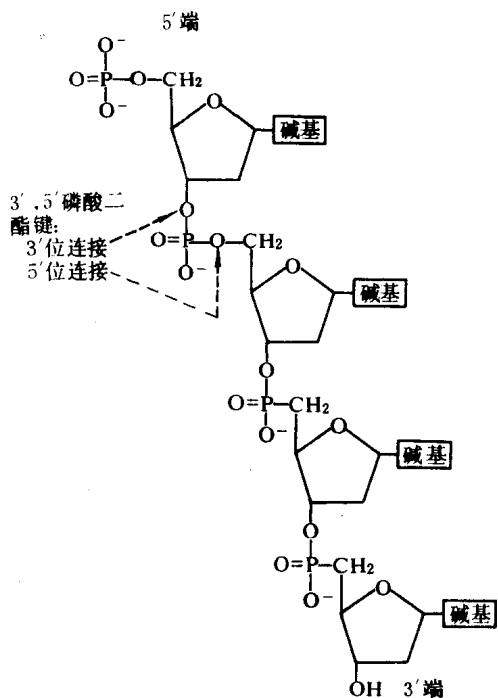


图 1-1 核酸的糖-磷酸骨架

在 DNA 的糖-磷酸骨架中含有脱氧核糖和四个碱基：A、G、C、T。在 RNA 中 T 被 U 代替，脱氧核糖被核糖代替。DNA 通常为双链，RNA 的许多形态 (mRNA) 是单链

结构的特异性。转录可产生三类不同功能的 RNA，即 mRNA (信使 RNA)、rRNA (核糖体 RNA) 和 tRNA (转移 RNA)。在蛋白质合成过程中，mRNA 的功能是传递遗传信息，是 RNA 的中介物。因为 mRNA 的碱基排列顺序与模板 DNA 单链排列顺序互补，所以 mRNA 又称是 DNA 的副本。rRNA 与蛋白质结合，形成蛋白质合成的场所核糖体。tRNA 是运输氨基酸供给蛋白质合成的工具。三个碱基决定一个氨基酸，这三个碱基的组合称为“三联体”密码子。运送活化氨基酸的 tRNA 分子中的反密码子，与 mRNA 分子中的密码子对应配对结合起来，从而使 tRNA 运送活化氨基酸按一定排列顺序在核糖体上井然有序地串联起来，缩合成肽链，这个过程叫转译过程 (图 1-3)。一切生物体都服从这一规律。

DNA 探针是一个含有特异核苷酸序列的带标记的单链 DNA / RNA 片段。利用这个片段可以检测在临床标本中存在的与其互补的序列。DNA 杂交技术因能够检查与探针互补的特异序列而具有高度的特异性。微生物种属的鉴定，完全取决于事先能够获得一个与被鉴定微生物特异序列互补的 DNA 或 RNA 片段。

通常 DNA 是双链，然而在适当的条件下 (离子强度、pH 和温度)，双链能够变性 (分离)，当条件改变，这两条分离的链又可发生复性，即互补序列重新结合 (图 1-4)，

成核苷酸。许多单核苷酸之间通过 3', 5' 磷酸二酯键连接形成一条多核苷酸长链 (图 1-1)。

DNA 碱基之间的配对不是随意的，总是 A 与 T 相配对，G 与 C 相配对，一条链上有一个 G，另一条链上必定有一个 C 与它配对。同样一条链上有一个 A，另一条链上必定有一个 T 与它配对。因此这两条链上的碱基配对是互补的，这样当一条核苷酸链上的碱基顺序固定下来时，按照碱基互补配对的原则，即可决定另一条链上的碱基排列顺序。AT 之间有两个氢键结合，GC 之间有三个氢键结合，两条链根据碱基互补，经氢键连结形成了 DNA 双链结构。碱基互补现象具有十分重要的生物学意义，因为它不仅与核酸结构有关，而且 DNA 的复制、转录及遗传信息的传递都与它有着密切的关系 (图 1-2)。

以 DNA 为模板，通过 RNA 聚合酶酶促合成 RNA 称为转录。经过转录产生的 RNA，它的碱基排列顺序结构是由模板 DNA 碱基排列顺序所决定的。因此 RNA 的结构正确无误地反映了模板 DNA

因此，可采用标记的特异 DNA 序列（DNA 探针），与临床标本培养物或临床标本中的 DNA 互补序列（靶序列）直接进行杂交（形成双链）。在合适的条件下，RNA 也能与互补 DNA 链杂交。应用标记的探针可以检测 DNA 或 RNA 标本中的靶片段。DNA 和 RNA 探针检测的基本步骤如图 1-5 所示。

第三节 基因探针的特性

构建一个 DNA 探针的设想是非常重要的，这包括要选择一个适当的靶和探针分子，使能获得最理想的结果，达到诊断的目的。常用的探针是一段单链 DNA 分子，这段核苷酸碱基序列可以是已知的，或未知的，探针本身不能自我复性，它必须与靶核酸杂交，而不与本底任何所能存在的核酸杂交，长度一般是十几个碱基到几千个碱基不等。通常认为探针分子长，特异性略差，反之，特异性较好，甚至可

测出一个碱基对的点突变。DNA 探针可以特异地识别待测生物体的 DNA 序列，探针 DNA 与靶序列杂交后，通过探针上带有的标记和信号放大系统进行检测。一个好的探针应该具有敏感性高，特异性强和简便快速等特点。

一、敏感性高

敏感性是指探针能精确检出 DNA 或 RNA 的最小量，从临床观点讲，是指探针能精确检出微生物的最小数量。这可通过探针对不同浓度的微生物检测来确定。DNA 探针具有非常高的敏感性，如检测一个单基因仅需要 10^4 拷贝，而用单克隆测定至少需要 10^7 抗原分子；应用肠毒素 LT（不耐热毒素）和 ST（耐热毒素）DNA 探针，检测毒源性大肠杆菌引起的腹泻，其敏感性比 Y-1 肾上腺细胞和乳鼠试验高 1 万倍。另外，由于探针很短（20 个核苷酸），结合生物素化的位点少，只能结合有限的信号量。为了提高探针的敏感性，通过酶学方法，可在探针上加上生物素化的核苷酸长尾，这个长尾可长达几千个核苷酸，甚至可比探针本身长 300 倍，这种加尾法将提高生物素探针系统的敏感性达 10 倍

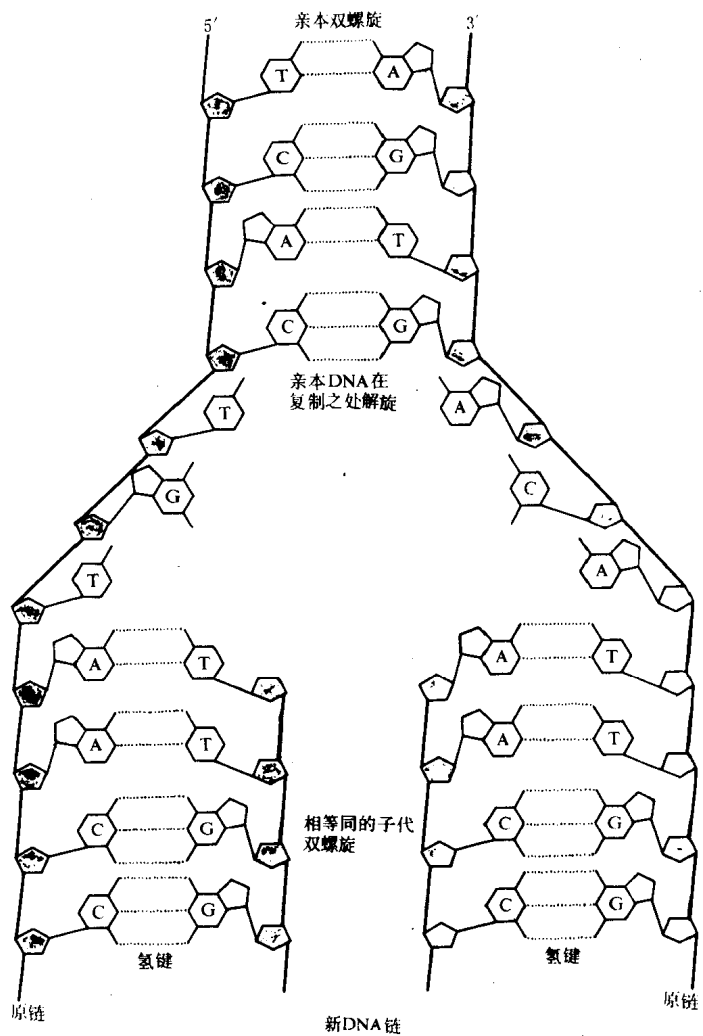


图 1-2 碱基配对、氢键连结和 DNA 复制

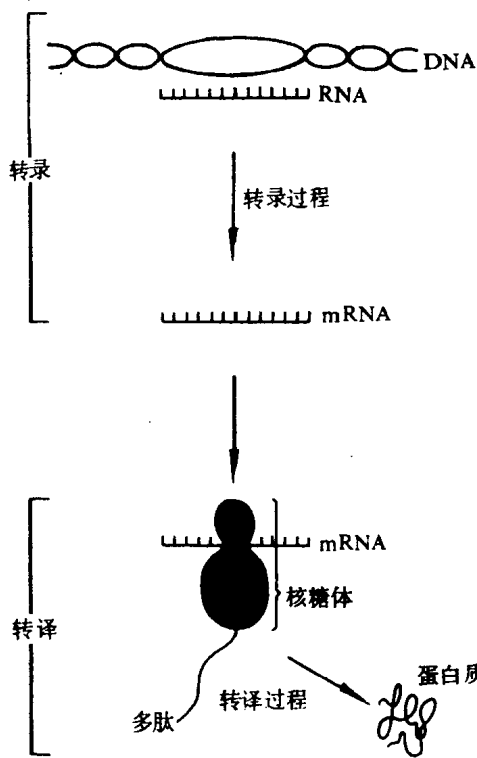


图 1-3 遗传信息的传递

DNA 双螺旋解链，以 DNA 的一条链为模板合成 RNA (转录)，新形成的 RNA 接着在合成多肽的核糖体上翻译 (转译)，一个三联体编码一个氨基酸

之多，能检测低至 10^{-13} g DNA，或单个基因的 10 万个拷贝 (图 1-6)。此外，也可将许多酶分子制备成多聚物连接到生物素或抗体分子上，这可检测 10^{-14} g DNA，或单个基因的 1 万个拷贝。

为提高探针的敏感性，Kohne 等设计了一个 DNA 探针与 rRNA 杂交的快速敏感的新方法。用这个方法测定靶序列 rRNA 比测定 DNA 的敏感度提高几千倍，可特异地检测少到 1~10 个细菌，因此，对许多微生物的检测可不需要进行细菌分离培养。

二、特异性强

在临床上，特异性是指探针能够从混合标本中正确鉴定目的微生物的能

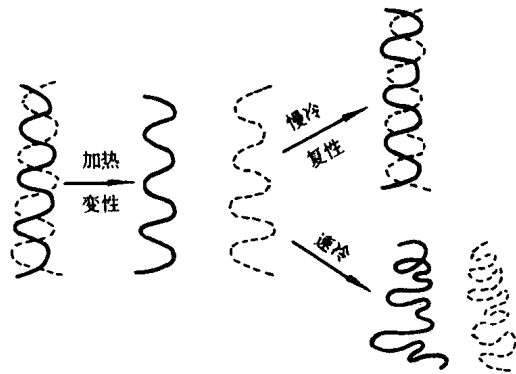


图 1-4 DNA 的变性和复性

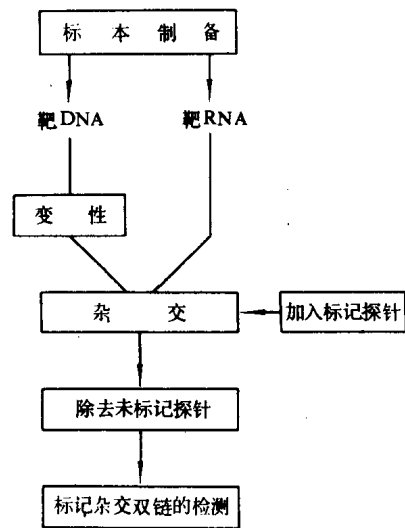


图 1-5 DNA/RNA 探针检测技术的基本步骤图解

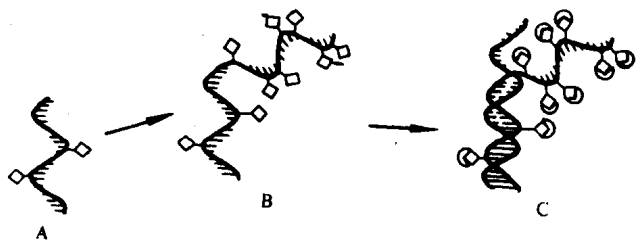


图 1-6 通过接尾法提高探针的敏感性

A. 生物素标记的 DNA 探针 B. 在 DNA 探针上接上一个生物素标记的核苷酸长尾 C. DNA 探针与样品中靶序列杂交后，再加入吸附荧光抗体的亲和素或吸附显色酶的亲和素，与探针上的生物素结合