

基因 诊断 技术

——非放射性操作手册——

主编 王申五



北京医科大学中国协和医科大学联合出版社

基因诊断技术——非放射性操作手册

北京医科大学中国协和医科大学联合出版社
R446.9/MSW
出版社

96886

基 因 诊 断 技 术

——非放射性操作手册

主编 王申五

北京医科大学
中国协和医科大学 联合出版社

(京)新登字147号

内 容 提 要

通过基因分析以诊断疾病、研究发病的分子机制是DNA重组技术应用于医学的重要进展。本书将近几年来行之有效的基因诊断非放射性操作方法汇集成册。内容有核酸的分离,基因探针的制备和非放射性标记,应用非放射性标记探针做分子杂交包括原位杂交的各种方法,显示非放射性标记的各种手段,以及基因扩增技术等。便于实际工作者在操作过程中查阅。本书适于医、农、法医,各个基础生物学科做基因分析以及做分子遗传学的研究人员使用和参考。

基因诊断技术

——非放射性操作手册

王申五 主编

责任编辑:梁 康

* * *

北京医科大学 联合出版社出版
中国协和医科大学

(社址:北京医科大学院内)

新华书店总店科技发行所发行 各地新华书店经销

北京密云华都印刷厂印刷

* *

开本: 787×1092 1/16 印张: 12 字数: 284千字

1993年7月第1版 1993年7月第1次印刷 印数: 1—5000册

ISBN 7-81034-229-0/R·229

定价: 9.00元

前 言

随着分子生物学及分子遗传学的进展而发展起来的生物技术，主要有两大类：单克隆抗体——免疫技术，主要解决对蛋白质分子的识别、分离和分析的问题；DNA重组技术，主要解决对核酸分子的识别、分离、分析和表达的问题。后一种生物技术应用医学：分析基因的存在，基因的突变以诊断各种感染性疾病和遗传性疾病，进行肿瘤分子水平的研究，即基因诊断；克隆已知基因，进行基因的转移以治疗与基因缺陷有关的疾病即基因治疗。基因诊断涉及的技术有：目的基因物质的分离、基因探针的制备，基因的体外扩增及核酸分子杂交等。这些生物技术的进展将有利于基因诊断在临床中广泛的开展。

四年前，我们曾编著了一本小册子——基因诊断。该书除了介绍了基因诊断的一些概念、原理和应用外，还着重描述了有关基因诊断的技术，其分析基因的手段主要靠放射性同位素标记的方法完成。近年来国内外在发展非放射性同位素标记进行基因诊断有了不少进展，我们对这种非放射性基因诊断技术也做了种种研究和尝试，取得了一些进展和经验，初步满足了基因分析的要求。

为了推广这一生物技术，1990年5月，我们举办了以DNA和寡核苷酸标记生物素及PCR技术为主的基因诊断技术学习班。同时我们把几年来应用于基因诊断的各种非放射性操作方法，整理成册，作为学习班讲义印发。我们发现学习班内外诸同道对此讲义颇感兴趣。然而，我们印刷册数较少，难以满足要求；同时因时间仓促，校对不仔细，有很多错误之处。为此，我们决心重新改写，尽量增加一些我们实践过的新技术，希望对读者开展基因诊断有所补益。

在非放射性基因诊断技术中，近些年来进展，主要表现在人工合成寡核苷酸和PCR技术的广泛应用，以及化学发光技术引入基因分析。PCR技术已有不少专著，在这方面本书只做了简单的叙述。人工合成寡核苷酸的应用克服了高分子DNA探针的种种限制，它也是PCR引物和产物分析不可缺少的工具。本书对寡核苷酸的合成，分离纯化，非放射性标记和检测技术等作了较多的描述。对目前较常用的酶标探针的化学发光自显影技术，也分别作了介绍，以适应于基因诊断技术发展的这一趋势。

本书的特点在于其实践性，尽量选用我们实践过的方法；还在于其实用性，适于做基因诊断和基因分析的实际工作者操作时参考。尽管我们经过上述种种努力，还是难免在理论上，技术上和文字上有不足之处，欢迎诸同道批评指正。

编者

1992·元月

目 录

第一章	概论	(1)
第一节	非放射性基因诊断技术的概述	(1)
第二节	DNA探针的非放射性标记	(10)
第三节	寡核苷酸的人工合成	(23)
第二章	染色体DNA的制备	(36)
第一节	染色体DNA分离的原理	(36)
第二节	外周血(骨髓)的DNA提取	(36)
第三节	培养细胞的DNA提取	(39)
第四节	组织DNA的提取	(40)
第五节	由微量及特殊标本中制备染色体DNA	(41)
第六节	DNA的浓度测定	(43)
第三章	细胞总RNA的制备	(46)
第一节	非超离心一步法	(46)
第二节	氯化锂沉淀法	(48)
第三节	超离心法	(49)
第四节	由血清中提取病毒RNA	(51)
第五节	总RNA制品的质量控制	(52)
第四章	重组质粒DNA的制备与DNA片段的回收	(54)
第一节	质粒DNA的转化	(54)
第二节	质粒DNA的提取	(61)
第三节	DNA片段的回收	(68)
第五章	DNA的非放射性标记	(73)
第一节	光促DNA的生物素标记	(73)
第二节	酶促DNA的生物素标记	(74)
第三节	生物素DNA探针的分离纯化	(76)
第四节	生物素探针的显色灵敏度的检测	(77)
第五节	地高辛标记DNA	(79)
第六节	DNA非放射性标记法	(79)
第六章	寡核苷酸的非放射性标记	(94)
第一节	酶促生物素标记寡核苷酸	(94)
第二节	酶促地高辛标记寡核苷酸	(94)
第三节	化学法生物素标记寡核苷酸	(95)
第四节	酶标寡核苷酸	(97)
第五节	生物素(地高辛)寡核苷酸的显色灵敏度测定	(99)
第六节	非放射性标记寡核苷酸探针	(101)
第七章	非放射性探针的斑点杂交	(109)
第一节	生物素DNA探针杂交灵敏度测定	(109)

第二节	HRP标记DNA探针的RNA斑点杂交	(111)
第三节	生物素(地高辛)寡核苷酸探针的斑点杂交	(114)
第四节	HRP标记寡核苷酸探针的斑点杂交	(115)
第五节	PCR产物的反相杂交	(117)
第八章	非放射性标记探针的Southern印迹杂交	(119)
第一节	DNA的限制性内切酶酶解	(119)
第二节	DNA酶解片段的电泳分离	(120)
第三节	Southern转移	(120)
第四节	生物素探针杂交	(121)
第五节	地高辛标记探针的杂交	(121)
第六节	HRP标记探针作DNA指纹图	(124)
第九章	地高辛标记DNA探针的Northern印迹杂交	(128)
第十章	细胞原位杂交	(131)
第一节	概述	(131)
第二节	细胞原位杂交技术:生物素-抗生物素蛋白-AP显色法	(131)
第三节	细胞核原位杂交技术:生物素-间接免疫荧光法	(131)
第十一章	染色体原位杂交	(139)
第一节	概述	(139)
第二节	染色体原位杂交技术:生物素-抗生物素蛋白-AP显色法	(139)
第三节	染色体原位杂交技术:生物素-间接免疫荧光法	(143)
第四节	有关染色体原位杂交的一些技术问题	(146)
第五节	染色体原位杂交的应用	(147)
第十二章	非放射性核酸标记物的显示	(149)
第一节	生物素-抗生物素蛋白-HRP显色体系	(149)
第二节	生物素-链抗生物素蛋白-AP显色体系	(151)
第三节	地高辛-抗体-AP显色体系	(153)
第四节	碱性磷酸酶化学发光检测体系	(154)
第十三章	聚合酶链反应	(156)
第一节	基本原理	(156)
第二节	耐热DNA聚合酶	(157)
第三节	DNA扩增仪	(157)
第四节	DNA样本	(158)
第五节	PCR试剂的制备	(158)
第六节	引物和探针的选定和纯化	(159)
第七节	PCR的操作	(160)
第八节	注意事项	(161)
第九节	RT/PCR	(162)
第十节	PCR技术的应用	(161)

附 录

一、常用试剂的配制	(166)
-----------------	-------

(一) 饱和酚.....	(166)
(二) 氯仿-异戊醇	(166)
(三) 供配制各种溶液用的贮存母液.....	(166)
(四) 限制酶水解缓冲液.....	(169)
(五) 常用电泳缓冲液.....	(169)
(六) 常用凝胶载样缓冲液.....	(170)
(七) 抗菌素液.....	(170)
(八) 液体培养基.....	(171)
二、有关实验技术	(173)
(一) 玻璃及塑料器皿的硅化.....	(173)
(二) 菌种的保存.....	(173)
三、常用单位的换算	(174)
(一) 重量换算.....	(174)
(二) A ₂₆₀ 单位的换算	(174)
(三) 摩尔的换算.....	(174)
(四) 蛋白质的换算.....	(174)
(五) 常见核酸的分子量.....	(175)
(六) 核酸碱基对与分子量的换算.....	(175)
四、DNA片段标准物	(175)
(一) pBR ₃₂₂ 酶切片段.....	(175)
(二) Lambda噬菌体DNA酶切片段.....	(176)
(三) Φ X174酶切片段	(176)
五、常用名词缩写和简称	(176)
(一) 抗生素.....	(176)
(二) 测量单位.....	(177)
(三) 分子生物学一些名词与试剂.....	(177)
(四) 氨基酸.....	(178)
六、生化技术补充资料.....	(178)
(一) 遗传密码表.....	(178)
(二) 磷酸盐缓冲液.....	(179)
(三) 酸碱浓度.....	(179)
(四) 离心速度与离心力的换算.....	(180)
(五) 限制性内切酶.....	(181)

第一章 概 论

第一节 非放射性基因诊断技术的概述

人类疾病的发生,常涉及内源基因的突变和外源基因的入侵。体细胞(二倍体细胞)内源基因的突变,如基因扩增、基因转位(translocation),基因点突变,常引起肿瘤的发生。95%慢性髓性白血病(CML)病人有细胞癌基因c-abl及BCR的转位,就是一个明显的例证。性细胞(单倍体细胞)内源基因的突变则引起各种遗传性疾病,如 α -珠蛋白基因的缺失造成 α 地中海贫血; β -珠蛋白基因的点突变,导致 β 地中海贫血,凝血因子基因的点突变,导致甲型血友病等。各种微生物、病毒和寄生虫感染机体,从而造成特异的外源基因的入侵并在体内增殖,引起各种传染性疾病。传染性肝炎就是肝炎病毒感染机体,从而也会把肝炎病毒的各类基因(DNA或RNA)引入机体。通过基因分析,找出内源基因的异常和发现外源基因(DNA或RNA)从而快速而敏感地诊断有关的疾病,这就是基因诊断的目的。

基因诊断技术随着生物技术的发展而逐步完善起来,并已经从研究室走向临床。有关的生物技术有DNA重组技术以分离特异的基因探针,基因的分析(分子杂交)和扩增技术以探测致病的基因。此外如何从细胞中分离出足够量的染色体DNA和目的基因,也是基因诊断技术的重要一环。就基因诊断的临床应用而言,首先要得到有关基因的重组质粒,或者从已知基因的核苷酸序列中,选用一段序列以人工合成方法来合成这一段寡核苷酸。而后主要涉及三个方面的技术:染色体DNA或目的基因的分离技术;基因探针的制备和标记技术;以及基因的分析技术。这些技术是随着分子生物学的发展,从七十年代中期开始建立的,并很快应用于传染性疾病和遗传病的基因分析和诊断,特别用于遗传病的产前诊断^[1]。八十年代后随着癌基因与抗癌基因研究的进展,也开始应用于癌症的基因分析。由于分子免疫学的进展,八十年代中期已开始了利用白细胞表面抗原基因的多态性进行组织分型和配型,从而基因诊断技术应用于骨髓和器官移植。基因诊断技术的进展,使得基因分析诊断疾病的方法,更为准确、快速、简便和易于临床应用。

人类的基因大约有 10^5 个,从人的染色体DNA中分析某一特异基因的改变,需要采用灵敏的放射性同位素标记技术,通常用放射性 ^{32}P 标记脱氧核苷三磷酸的 α 磷酸基上,掺入DNA分子作为分析目的基因的探针。对人体内的病毒基因的分析也常使用 ^{32}P 标记探针。而 ^{32}P 放射性同位素半衰期只有14.3天,它的较强的硬 β 射线,对人体有一定的损害,需注意防护。目前我国还没有生产无机 ^{32}P 的原料,生产 ^{32}P 标记的核苷酸需进口无机 ^{32}P 原料,大量 ^{32}P 标记物都依赖于进口,费用昂贵,消耗外汇。所以由于防护,稳定性和安全性等原因,再加上贮存和运输的问题,它只能在京沪等研究部门使用,这就限制了基因诊断技术的推广。为了使基因诊断技术适用于国内任何地方和部门,特别适宜于各医院的开展,研究和开发非放射性基因诊断技术,在我国就有着重要的现实意义;这正是我们编写这一技术操作手册的目的。

一、染色体DNA的分离技术

人的基因组DNA指含有全部人类基因的DNA总和，它存在于细胞核内的染色体，故称染色体DNA。每个性细胞有23个染色体，每个染色体上只有一个双链的DNA分子。染色体有大有小，染色体DNA也长短不一，平均一个染色体DNA分子约为 1×10^8 bp。染色体就是由DNA分子与蛋白质(组蛋白和非组蛋白)经过缠绕折叠和包装组成的。两个性细胞结合后产生了各种体细胞，每个体细胞含有23对染色体，其中父母系各半，其DNA约含 6×10^9 bp。各种细胞的染色体DNA都来源于合子细胞。各种体细胞的DNA复制后经有丝分裂产生更多的体细胞。由于各种体细胞的DNA都是由合子细胞的DNA复制而来，故无论在组织、结构、大小和数量上同一人体中的不同细胞的DNA都是一样的。也就是说，无论从一个个体上采用哪种标本，所分离的每个人的基因组DNA都是相同的，即基因组DNA没有组织特异性。然而由于体细胞突变所致的细微差异，则另当别论。

人的每个体细胞约含染色体DNA 3~5pg，正常人每毫升全血可提取DNA 10~20μg。通常取血5~10ml，得DNA 100~200μg，就足够内源基因分析之用。血液抗凝剂常用的有EDTA(2%，1/10体积)、柠檬酸钠(3.8%，1/10体积或ACD或1×SSC)。也可以用肝素抗凝，但提取DNA前必须将肝素洗除干净，以免影响DNA的限制酶的水解作用。血液存放时，对于提取高分子量DNA，以应用ACD抗凝最佳。此种抗凝血在4℃可存放数天，在-70℃可较长期存放。

从血液中提取DNA的基本过程是：(1)离心去除血浆，(2)取白细胞膜或用漂浮法或溶血法分离白细胞，(3)以含EDTA的等渗液(如TES)洗白细胞悬于此液2~3ml，(4)加入0.5—1%的SDS及蛋白酶K(50—100μg/ml)使细胞膜核膜破裂，蛋白质被水解，DNA与蛋白质分离。EDTA抑制核酸酶活性。在50—55℃保温3—4小时或37℃过夜，使消化彻底，得清晰粘稠液体，(5)用饱和酚、氯仿抽提DNA，或用高盐使DNA沉淀去除蛋白质等其它大分子，(6)用乙醇将DNA沉淀，去除小分子及糖类，收集DNA团块，再以冷乙醇洗后抽干至无醇味，再以0.2—0.5ml TE溶解。(7)以紫外分光光度计测量DNA的浓度(A_{260} 单位=50μgDNA)。

从骨髓细胞中提取染色体DNA的方法与血液同。只是骨髓中有核细胞含量较高，骨髓液用量2—3ml即可。

绒毛或羊水细胞是做产前基因诊断的DNA来源。一般20ml羊水可提出2—10μgDNA。如将部分细胞进行短期培养，离心后按上法提取DNA，可提高其产量。从绒毛细胞中提取胎儿的DNA时，需注意去除绒毛组织中母体蜕膜细胞，绒毛细胞经轻度匀浆后按上述原则提取DNA，一般1mg湿重绒毛细胞，可得1μg胎儿染色体DNA。

由肝、脾、胎盘、肌肉或淋巴结等组织块中提取染色体DNA时，应先将组织块放在液氮中冻存。提取DNA前先将组织块在液氮中研成细粉，然后加入含高浓度EDTA的TES，SDS及蛋白酶K，消化后提取，DNA经乙醇沉出后，再溶解于TE中加50μg/ml RNase消化去除RNA后再抽提，对TE透析得均匀的DNA悬液。一般1—2g组织可得mg水平的DNA。

组织培养细胞中提取DNA的方法基本同血液。离心收集细胞后即可消化抽提，亦可在-70℃以下冻存细胞。一般 10^7 — 10^8 细胞可得DNA 50—300μg。

从提取液中分离DNA需注意去除小分子如酚等及RNA的污染。乙醇沉淀法可以去除小分子但不如透析法好,乙醇沉淀法不能去除RNA。对于血液中提取的DNA,RNA污染较少,常不必经RNase消化,但在估计DNA浓度时,常需用凝胶电泳法检查DNA与RNA的相对量,计算DNA量时应扣除RNA的量。RNA主要存在于细胞浆中,将有核细胞以非离子型去污剂如Triton-X100破细胞膜,而不破核膜,分离细胞核后提取染色体DNA,污染的RNA会很少。由培养细胞中提取染色体DNA常选用分离细胞核的途径。

从人体细胞中或分泌物中分离病毒或细菌的基因组DNA,或RNA,因标本不同方法各异。由于外源基因有序列的特异性,与内源基因有很大的差异,常经简单的去污剂处理脱去蛋白质外壳,将其基因组游离,而不必分离即可进行分子杂交分析。这里不再赘述。

染色体DNA分离技术的进展,与近年来基因分析技术的改进有关。由于基因体外扩增技术的发展,待分析的DNA用量可少至 $1\mu\text{g}$ 。甚至可以用耳血(20—100 μl)即可完成某些基因诊断。从而发展起来由耳血、毛发(带根)、口腔细胞(漱口水)、尿上皮细胞等标本分离DNA的技术。为基因分析适应于法医检材,精斑、混合斑及血痕的DNA分离技术相继出现。对于常规血白细胞DNA的分离也有不少改进,以适于临床分析的需要。如全血分离DNA的方法,不用蛋白酶消化细胞的方法^[2]以及凝胶过滤分离DNA的方法^[3]等。最近我们还研究了从凝血块或煮过的组织中提取DNA的方法,这些具体技术将在有关章节中介绍。DNA分离方法的改进使基因诊断工作更适于实际应用的目的,对于小儿科,法医和少数采血困难的对象做基因诊断将大有裨益。

二、基因探针的制备

具有一定已知序列的核酸片段,再带上一定的探测标记,就构成核酸探针。它可以通过分子杂交与待测基因的DNA序列结合,产生杂交信号,从而把待测基因的质和量显示出来。所谓非放射性基因诊断技术,主要指核酸探针的标记和显示标记的过程都是非放射性的,基因探针及其制备有以下几种:

(一) cDNA探针:从人的相应组织中分离出特异的mRNA,经反转录酶作用合成与它互补的DNA即cDNA,再合成cDNA的另一条链后,将双链cDNA重组到适当质粒DNA中,得到含特异cDNA的重组质粒。现在cDNA探针常是从cDNA文库中筛选后,再经次级克隆到质粒中得到的^[4],最近又发展了用PCR分离特异cDNA并克隆到载体上,得到cDNA重组体的方法^[5]。用于基因诊断的cDNA探针有两种形式,一种是重组质粒,一种是载有重组质粒的细菌(通常是大肠杆菌)。如得到的是重组质粒还需要经过转化,把它转化至适当的细菌体中去,使之成为后一种形式。保存重组质粒DNA比保存细菌更容易更稳定,一般冷存在 -20°C 以下的环境即可。有了载有特异cDNA质粒的细菌,经繁殖扩增后,可以制得无限量的cDNA质粒,从而也就得到了相应的cDNA探针序列,再经适当标记后制成特异的cDNA探针。这类探针的特点是DNA序列中不含基因的非编码序列(内含子),它是分析内源基因缺陷常用的分子工具。

(二) 基因组探针:将人的染色体DNA切割成15~20kb的片段,以 λ DNA为载体,组成包括所有人类基因的基因文库。从基因文库中可以筛选出所需要的含特定基因的重组体,再经次级克隆,将一段特异基因序列重组到适当的质粒上从而得到该基因的重组质粒。从含基因组序列的重组质粒制备探针与制备cDNA探针一样,经转化、扩增、提取质粒和限制酶

切回收特异基因组片段,然后标记成基因组DNA探针。基因组DNA探针的特点是它是基因上的一段序列;可以是编码序列,也可以是内含子序列,也可以是两者兼有的一段序列,也可以是基因的全序列。内含子序列对区别同源性高的基因,例 β -珠蛋白基因与 δ -珠蛋白基因,更具有较高的特异性。较小的DNA病毒探针,常用其基因组全序列。

制备上述两种探针时,最好是将特异的DNA片段,从重组质粒上切割下来,以提高其灵敏度和特异性。由于质粒DNA来自细菌,与人或人类病毒的基因组同源性较低,有些基因分析,也可以用整个质粒制备探针,例如DNA指纹图分析。

外源基因探针:反转病毒基因组是RNA,常是分离其RNA基因组,经反转录制成cDNA探针;DNA病毒,先分离其基因组DNA,取其全部或一部分序列克隆后制成基因组探针。细菌和病毒的基因组一般不含内含子序列。

得到上述两类重组质粒,是制备基因探针的关键。可以用DNA重组技术自己制备,但由于常见的重组质粒都已克隆化,临床工作基因诊断所用的探针多是从国内外的作者处引进或从收集探针的公司(如美国ATCC公司)购买。

(三)人工合成DNA探针:主要指寡核苷酸探针。如果被测基因的序列是已知的,可以选择一段与被测基因互补20—30bp的序列,用DNA合成仪人工合成这段寡核苷酸,纯化后标记上适当的标记物,就制成了寡核苷酸探针。此类探针上的标记物分子较少,通常是一个寡核苷酸分子只有一个标记物分子。分子杂交时是一个探针分子与一个DNA的单链分子结合,故比起上述两种大分子探针,寡核苷酸探针的灵敏度较差。目前多用于分析细菌基因、拷贝数较高的基因表达产物或经DNA扩增后的内源基因和病毒基因。寡核苷酸探针分析病毒基因时,一种类型的病毒,只选用一个探针即可做基因分析,而用它分析内源基因的点突变则需合成两种寡核苷酸探针:一个与正常序列互补,一个与缺陷序列互补。通过分子杂交将两者区别开来。选择寡核苷酸序列可以是与有意义链(与mRNA序列互补)也可以是反意链(与mRNA序列相同)。因为被测DNA是双链的,无论哪种序列都能与DNA杂交。而有意链序列还可以用于mRNA的分析。用寡核苷酸作HLA的分型,是分析HLA基因的微多态性,需合成各型特异的寡核苷酸探针。一种遗传病可以由一个基因的多种缺陷引起(即遗传的异质性)。故分析此类遗传病时,则需要多种寡核苷酸探针, β -地中海贫血的点突变就是这种情况。

(四)RNA探针:有些病毒的基因组是RNA,例如轮状病毒,分离后加上适当标记可制成RNA探针。RNA探针还可通过SP6和T7体外转录体系制备。RNA探针的特点是DNA结合更牢,它是单链的,杂交效率高,可用RNase处理以降低本底。不过用上述DNA探针已可完全满足基因分析的要求,RNA探针的应用还不够广泛。

三、基因探针的非放射性标记技术

目前发展的非放射性标记核酸的方法很多。在核酸分子上可以标记金属,如Hg或Eu。Eu标记核酸探针,以时差荧光分析法检测,灵敏度较高,是一种有前途的非放射性标记方法。核酸分子上标记荧光物质如FITC常用于细胞原位杂交。核酸上标记半抗原如异羟基毛地黄毒苷配基(digoxigenin)用酶联抗体检测。标记生物素用酶联抗生物素蛋白检测。还有直接标记酶,如辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶或半乳糖苷酶等,用酶显色或化学发光检测。较普遍应用的是生物素和酶标记探针。

(一) 光促生物素标记核酸

目前使用的光标生物素试剂有光生物素(乙酸盐)^[6]和补骨脂生物素^[7]两种,它们都是由光敏基团,连接臂和生物素组成。光敏基团在光的照射下与核酸的碱基结合,连接臂可降低生物素基团对核酸杂交的空间位阻,生物素作为标记物。

1. 光生物素标记核酸:将待标记的核酸(DNA或RNA)1—10 μ g/10 μ l与光生物素乙酸盐10 μ g/10 μ l混合后在近紫外的光源(如高压汞灯,碘钨灯)照射15—20min。然后用正丁醇提取,乙醇沉淀标记物;检查其标记灵敏度和杂交灵敏度。前者约1pg后者2—5pg(以HBV DNA为探针)。

光生物素法可以与单链、双链核酸结合,也可以与蛋白质结合。可以大量标记探针,其标记率较低,灵敏度也相对差些。但标记方法简单,可用于多拷贝基因的分析。

2. 补骨脂生物素标记核酸:补骨脂素(psoralen)在紫外光(360nm)照射下,可与双链或单链核酸结合,结合部位多在DNA的T或RNA的U。对双链DNA结合力较强,对单链DNA结合力较差。其标记方法亦与光生物素法相似。国外用它标记双链DNA,保留单链部位参与分子杂交反应^[8]。国内用补骨脂生物素标记变性的HBV DNA已做成试剂盒^[9]。

(二) 酶促生物素标记DNA

常用的标记底物是生物素脱氧核苷三磷酸有:bio-11-dUTP、bio-16-dUTP或bio-7-dATP。前两种在掺入DNA链X替代T,后一种替代A。

1. 缺口平移法:生物素化的脱氧核苷三磷酸可以像³²P标记的 α dNTP一样,在大肠杆菌DNA聚合酶I的催化下,在缺口的DNA的模板上掺入该DNA。但其掺入的速度较慢,掺入率也比³²PdNTP低。为了达到较高的掺入率以提高其灵敏度,可将缺口反应与聚合反应分开,使缺口反应适当,聚合反应延长。以不同的DNase I浓度先进行缺口反应,用变性电泳检查DNA的缺口程度,一般每6—800bp一个缺口为适,然后再进行聚合反应,延长或过夜。这样其掺入率可达30%以上,(相当于³²PdNTP的掺入率),杂交灵敏度可达亚pg水平。此探针可以分析单拷贝基因^[10]。

2. 随机引物延伸法:^[11]将小牛胸腺DNA经DNase I水解后,产生大小不等的多聚脱氧核苷酸,经柱层析分离得到六聚体的混合物,其序列是随机的。它作为随机引物与待标记的DNA片段混合变性后退火,引物在单链DNA的多个部位结合,在Klenow大段酶的催化下,由引物的3'起发生5'→3'的延伸反应。底物中的bio-11-dUTP和其它dNTP一并掺入新合成的DNA链中,其掺入率与上述缺口平移二步法差不多。以NaOH或DNase I将双链DNA(质粒)切成较短的片段可提高掺入率。实验结果表明在dNTP中加入适当的dTTP,延长反应时间,可进一步提高其掺入率,显色灵敏度可达0.1pg以下。

(三) 寡核苷酸的生物素末端标记

目前以生物素标记寡核苷酸都是在其末端进行的,这里介绍两种标记方法:5'末端化学标记法^[12]和3'末端酶促标记法^[13]。

1. 5'末端化学标记法:人工合成的寡核苷酸5'末端是OH基,首先用多核苷酸激酶和ATP使之磷酸化,然后在5'磷酸上,以乙二胺或环己胺连接上一个带NH₂的集团,它与生物素-N-羟基琥珀酰亚胺(NHS-biotin)反应,将生物素连接在寡核苷酸的5'端。此反应在水溶液中进行,不需寡核苷酸的侧链保护,简便,易行,一次可标记10 μ g以上的寡核苷酸。其缺点是产率低只有20%左右,标记后需进一步纯化分离。

此外,亦可在合成寡核苷酸的过程在5'端加上一个NH₂-修饰物。然后再与NHS-生物素反应,完成5'端生物素标记寡核苷酸。

2. 3'末端酶促标记法:人工合成的寡核苷酸3'末端为OH基,标记物bio-11-dUTP(或bio-11-UTP)经末端转移酶的催化,将一个带生物素的核苷酸加在寡核苷酸的3'端。反应很容易进行,每次标记的寡核苷酸用量少(20mg),很适于基因诊断的应用。其显色灵敏度可达5pg,若在其掺入体系中加入适当的dCTP,可提高生物素化核苷酸的掺入率。

寡核苷酸-生物素探针的杂交灵敏度较DNA生物素探针差1—2个数量级。这是由于每个杂交的分子带有的标记信号较少所致。而标记物过多又有时影响杂交体的结合。所以此类探针尽管很易得到,通常多用于检测多拷贝基因或经基因扩增后的单拷贝基因^[13]。

(四) 酶标寡核苷酸探针

此类探针是将辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶连接在寡核苷酸的5'末端或其内部。用于分析HBV、HSV、疟原虫及大肠杆菌内毒素基因的酶标寡核苷酸探针是用碱性磷酸酶标记的。合成寡核苷酸时在合成到中部,相当于T的部位换上一个尿苷3'亚磷酸亚胺。此尿苷碱基的C5'位上加一个连接臂及一个CF₃活泼基团。然后再合成寡核苷酸的其余序列。将此寡核苷酸与碱性磷酸酶反应,把酶连在寡核苷酸内部的长臂上,得碱性磷酸酶标记的特异寡核苷酸。其杂交灵敏度可达2 amol优于³²P标记物(5 amol),比生物素化的寡核苷酸强5—100倍,而且杂交起来手续简单,易于操作,只需把杂交温度控制在42°C以下^[14]。

用于分析β地中海贫血基因或HLA基因的扩增产物的酶标寡核苷酸探针是用辣根过氧化物酶标记的,标记位置在寡核苷酸的3'末端。其基本原理是在合成寡核苷酸的最后一个核苷酸后,加上一个C₆-巯基修饰物或NH₂修饰物。然后再去掉保护基。对寡核苷酸5'上连接的SH基或NH₂基再以双功能试剂与辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶连接起来^[15]。

使用此类探针进行基因诊断,由于省去了许多酶连接剂,其非特异信号较低,要求杂交,洗膜的温度不能过高(42°C以下),杂交时间不宜过长(1—2小时)以防标记酶的失活,灵敏度可达0.25pg。

(五) 半抗原的DNA标记^[16]

如上面所述,若将bio-11-dUTP中的生物素换成其他有半抗原作用的化合物,例如,异羟基毛地黄毒苷(digoxigenin)或三硝基苯酚等,可以参照生物素标记DNA或寡核苷酸的方法制备探针。用光敏异羟基毛地黄毒苷,经260—300nm的紫外光照射标记核酸;用dig-11-dUTP经六聚体引物延伸法标记DNA或经末端转移酶标记寡核苷酸3'末端,都可以制成[dig]标记的探针。实际上生物素也是一种半抗原。半抗原探针在杂交后可应用酶联抗体的原理进行检测。检测[dig]标记物,加入碱性磷酸酶酶联dig抗体,进行碱性磷酸酶显色,其优点是特异性较高。亦可用于寡核苷酸的末端标记,其制备探针的方法与生物素探针相似。只是在检测标记物时,使用的是酶联抗体。

(六) 酶标DNA探针

将酶(辣根过氧化物酶,HRP或碱性磷酸酶,AP)与一个能与单链DNA结合的碱性基团(高聚物)联结后,可直接把酶连在DNA分子上制成酶标DNA探针。目前应用灵敏度和稳定性较好的是HRP-对苯醌-聚乙烯亚胺酶标DNA体系^[17],它与单链DNA混合保温后以戊二醛将盐键还原为共价键的结合,组成较稳定的HRP标记DNA探针。此类探针标记手续简单,在有变性剂的42°C体系中杂交,用化学发光法检测,灵敏度可达0.3pg。

四、非放射性分子杂交技术

基因诊断主要的分析材料是DNA和RNA。用基因探针分析DNA的分子杂交技术有：斑点(或狭缝)杂交、Southern印迹杂交、细胞及染色体原位杂交。用基因探针分析RNA的分子杂交技术有RNA斑点杂交、Northern印迹杂交和细胞原位杂交。这些都是用放射性同位素如 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^{35}S 和 ^3H 等建立的，现在几乎都可以用非放射性方法进行。用非放射性探针做分子杂交的技术基本与放射性探针相同，可参照放射性探针分子杂交技术进行^[4]。所不同的是非放射性探针的显示是酶联显色或酶联化学发光。关于非放射性探针的技术特点，常因标记物的不同而异，现仅就以生物素和酶标探针做分子杂交的特点加以说明。

(一) 生物素探针的杂交条件较低，例如在50%甲酰胺杂交体系中， ^{32}P 探针为42°C，而生物素探针只需45%甲酰胺42°C。不加甲酰胺时 ^{32}P 探针为68°C，而生物素探针65°C即可。生物素探针杂交后洗膜的严格性也低些。这是由于生物素的取代影响氢键的键力所致。

酶标探针，由于高温可使酶活性消失，杂交，洗膜的温度都不宜过高。为了达到核酸特异杂交，须在杂交洗膜液中加入变性剂，如甲酰胺(50%)或尿素(6mol/L)等。

(二) 杂交信号的显示， ^{32}P 探针需用放射自显影的方法显示，而生物素或酶标探针则是用显色或化学发光方法显示。因此，后者对标本的处理要求较高，DNA中不能有蛋白质或其它杂质污染(特别是内源酶)。显色的介质，缓冲液等也不能有细胞或细菌的污染，还应注意重金属离子或还原物质的污染，否则会产生非特异的显色与发光。

(三) 生物素的分子较大，酶分子就更大，掺入DNA或结合DNA的数量也不宜过高，否则会影响杂交，而 ^{32}P 探针则不受此限制。非放射性标记物掺入过低其灵敏度就会降低。如何掌握适度的掺入率是此类探针应用中的重要环节。最好经过选择条件的实验包括显色灵敏度(即标记物能显示出来的最低量)和杂交灵敏度(即目的DNA杂交后能显示出来的最低量)。然后制成试剂盒使用，以保证探针制备条件的稳定性。一般，显色灵敏度越高，表示标记物掺入越多，而杂交灵敏度则表示掺入率与杂交率的综合结果。若一个人单倍体基因组含 $3.3 \times 10^8 \text{bp}$ ，一个单拷贝基因是1.0kb，则10 μg ，5 μg 和2 μg 的基因组DNA应有单拷贝基因分别为3.3pg，1.7pg和0.7pg。故为检出单拷贝基因，非放射性探针的杂交灵敏度应 $<1.0 \text{pg}$ 。在标准条件下，生物素、半抗原及酶标探针是可以达到此灵敏度的。

(四) 生物素探针杂交过的硝酸纤维素膜，很难处理后再重复杂交。尼龙膜经蛋白酶K、去污剂和变性剂处理后还可以再杂交，但处理起来很麻烦。酶标DNA探针的杂交膜，可以二次杂交甚至三次杂交。 ^{32}P 探针杂交后的膜，经过简单变性处理即可再杂交，甚至可以反复杂交5次之多。

(五) 生物素探针用于细胞或染色体原位杂交已取得满意结果^[13]，而用放射性探针做原位杂交还存在一定困难。例如 ^3H 标记的探针作染色体原位杂交要求比放射性 $10^7-10^8 \text{cpm}/\mu\text{g}$ ，需要3—4个 ^3H dNTP才能达到标记的要求。

(六) 非放射性DNA探针，可以反复使用，无半衰期问题，保存在50%的甘油中，在-20°C可存放半年之久。

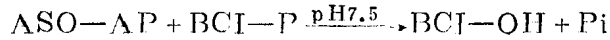
五、非放射性探针的显示体系

由于非放射性探针的标记物不同，其显示体系和方法也不同，其基本原理则与酶联免疫

反应的显示基本一致。主要有下列显示体系。

(一) 碱性磷酸酶(AP)显色体系

例如在寡核苷酸的内部连接上一个AP分子, 杂交后的显示:



(固相)



式中ASO是等位基因特异性寡核苷酸 (allele-specific oligonucleotide); BCIP为5溴-4氯-3吲哚磷酸 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate); NBT为硝基蓝四氮唑 (nitro blue tetrazolium)。

探针上间接地连接上AP, 亦应用此原理显示。

(二) 辣根过氧化物酶(HRP)显色体系

HRP标记DNA探针或HRP·5'标记寡核苷酸探针杂交后都可以应用下述显色体系, 其原理是:



式中ODA为邻-联茴香胺(O-dianisidine)。

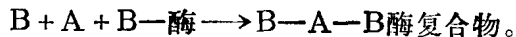
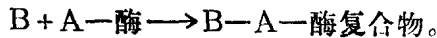
邻-联茴香胺, 可以用二氨基联苯胺和3,3',5,5'四甲基联苯胺代替, 后者产生蓝色沉淀。四甲基联苯胺致癌性较低。

上述两种酶显示体系, AP体系的灵敏度高于HRP体系约10倍, 但后者较稳定、经济。

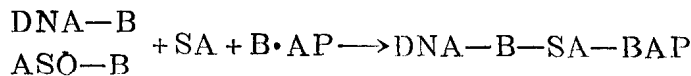
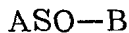
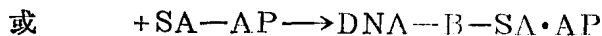
(三) ABC显色体系

A指抗生物素蛋白(avidin), B指生物素(biotin), C指酶复合物(enzyme complex)。

三者的结合方式有:



这个体系是显示生物素探针时应用与之非常有效结合的抗生物素蛋白把酶连在生物素探针上。然后再用上述(二)的显色反应显示。其原理是:



经上述反应把AP连在生物素探针上, 然后用AP酶反应显色。

式中ASO-B为生物素标记的寡核苷酸; SA为链抗生物素蛋白(streptavidin)。

上述反应中AP亦可用HRP代替。SA是由链霉菌中提取的一种抗生物素蛋白; 比由蛋清中分离的抗生物素蛋白, 其等电点接近中性, 而且不含糖基, 故其非特异的结合低, 目前多使用SA-AP或SA-HRP检测生物素探针。

(四) 化学发光体系

若将AP或HRP的显色底物, 根据化学发光原理, 把它换成一种酶促分解后产生光子的

化合物,即构成酶促化学发光体系。所发出的光子与酶量成正比,用高级的波拉片或X光片可进行照像或发光自显影。其发光原理如下:

1. HRP化学发光

发光底物3-氨基苯二甲酰肼(luminol)在HRP及 H_2O_2 的作用下氧化后发出蓝光,发光作用经增强剂(enhancer)可放大近1000倍^[18],从而提高了对HRP检测的灵敏度。增强剂多为酚类的衍生物。此类发光称为增强的化学发光(enhanced chemiluminescence)简称ECL。

2. AP化学发光

这是专门用于AP化学发光的体系,发光底物是金钢烷环氧磷酸酯(adamantyl-1,2,1-dioxetene phosphate),简称AMPPD,是最新研制的一种专利产品。

在相同杂交条件下它所显示的杂交信号,较BCIP/NBT的显色强度高100倍^[19]。用dig-11-dUTP/dig抗体-AP/AMPPD标记发光显示体系可检测到0.1pg的目的基因,完全达到分析单拷贝基因的水平(参见本章第二节)。

六、基因扩增技术^[20]

在体外经酶促反应将一段基因序列的拷贝数增加至百万倍,这一技术称之为聚合酶链反应(polymerase chain reaction)简称PCR。其基本原理是按已知序列的基因组DNA(人的基因组或病毒的基因组)某个区的上下游合成两个与其两股链的3'端互补的寡核苷酸,一般长度为20个bp,用作合成DNA的引物。将0.1—1 μ g的基因组DNA,加入50pmol的寡核苷酸引物,在95°C左右,热变性5—10分钟,然后冷至室温。此时,DNA双链变性分开,引物在其欲扩增序列的3'端退火。然后在37°C进行聚合酶反应:以单DNA为模板,加入0.2—1mmol/L的四种脱氧核苷三磷酸,在DNA聚合酶I的大段酶(又称KF大段酶)的催化下,从引物的3'进行5'→3'方向的DNA子链的合成。如此反复将反应体系升温(模板变性)→降温(引物与DNA退火)→保温(进行延伸反应),每次加入KF酶,经简单的温度变化循环20—30次,可产生 10^6 以上拷贝的由两引物限定的基因片段(一般长度在100bp—1.5kb之间)。1988年将KF酶改为Taq DNA聚合酶;此酶能耐高温,反应循环30次只需一次加入此酶1—2.5单位。由于耐热聚合酶应用于PCR,循环温度一般是72°C→94°C→55°C,反应和退火温度提高了,特异性和灵敏度都有所提高,简化了手续,使PCR技术走上了自动化^[21]。

这种体外基因扩增技术的重要性在于它能从一个含上万个基因的混合体中,把一段特定基因片段扩增后分离出来,使在细胞中含量极少(甚至1—2个拷贝/细胞)的基因物质扩增出来,使得制备和分析它们更加简单易行。使原来需要数十 μ g DNA标本才能做基因分析,减少到ng水平。甚至能用单个细胞进行基因分析。这就大大提高了基因诊断的灵敏度和准确性。进一步结合分子杂交技术或限制酶切割,使非放射性基因诊断技术有了长足的进展。目前PCR技术又有了进一步发展,如分析细胞RNA的RT/PCR,PCR直接DNA测序,PCR/cDNA克隆,PCR/指纹图等。目前PCR技术已广泛应用于病毒的早期诊断、艾滋病毒的携带者检查、癌基因分析、DNA的性别分析、遗传病的基因缺失和点突变分析、移植物的HLA配型、残存白血病细胞分析以及基因表达等有关基因研究的各个领域。

(王申五)

第二节 DNA探针的非放射性标记

非放射性基因诊断技术中,最关键的是在分子杂交过程使用非放射性标记的DNA作探针。

正如放射免疫法(RIA)可以用非放射性的方法即酶连结免疫吸附法(ELISA)代替一样,放射性标记的DNA探针也可以用非放射性标记。但是非放射性标记DNA要比在抗体或抗原上引入检测基团更困难,因为蛋白质中含有较多的可以进一步与检测基团连结的功能基如 $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{CO}_2\text{H}$ 等,而DNA分子中直接可以利用的功能基较少,往往需要经过进一步的反应,首先引入一些可以反应的基团,再与一些检测基团连接。本文将综述DNA探针和寡核苷酸探针的一些非放射性标记的方法。

一、DNA探针的生物素标记

生物素(biotin)和抗生物素蛋白(avidin)有较高的结合常数($K_{\text{dis}} = 10^{-15}$)[22],因此抗生物素蛋白与某种指示剂分子结合后,就可用来检测微量存在的生物素。指示剂分子可以是荧光素、染料、抗体或酶。最常用的是抗生物素蛋白和碱性磷酸酶组成的检测系统,其工作原理如下图所示(图1-1)。

a. 杂交(hybridization):

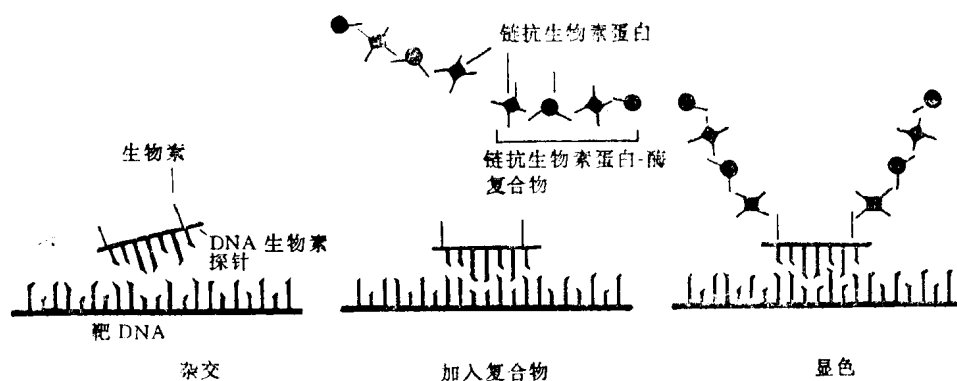


图1-1 生物素探针杂交显色原理示意图

经过以上连结步骤后的碱性磷酸酶,可以使底物BCIP的磷酸基水解,水解产物与NBT生成一蓝紫色沉淀(图1-2)。

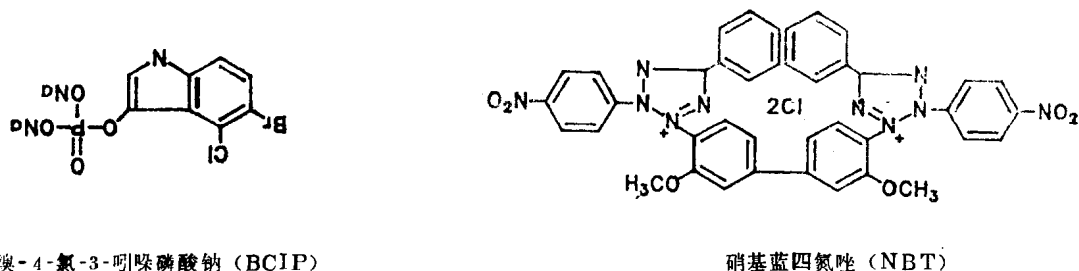


图1-2 BCIP与NBT结构图