

基因诊断研究新进展

马立人 王全立 主编

5'—GATGAGTTC—3' GAAAAAACTT
GAACCTCGGGTG—5' GTCCGTACAACTGG—3'

5'—GATCGTTTTTTTGA—3' TTTTGGAGCCAC—3'

3'—GAAAAAACTT—5' GAACCTCGGGTG—5'
5'—TTTATCGAATCAGCCACA—3' TTTTGGAGCCAC—3'

新 时 代 出 版 社

R446.7
MLR
0.3

105202

基因诊断研究新进展

马立人 王全立 主编

新 时 代 出 版 社

· 北京 ·

图书在版编目(CIP)数据

基因诊断研究新进展/马立人,王全立主编. —北京:
新时代出版社,1997.7
ISBN 7-5042-0350-5

I. 基… II. ①马… ②王… III. 人类基因-诊断-进展
IV. R446.9

中国版本图书馆 CIP 数据核字(97)第 03386 号

21/00/3735

新时代出版社出版发行

(北京市海淀区紫竹院南路 23 号)

(邮政编码 100044)

北京怀柔新华印刷厂印刷

新华书店经售

*

开本 787×1092 1/16 印张 10 224 千字

1997 年 7 月第 1 版 1997 年 7 月北京第 1 次印刷

印数:1—2000 册 定价:14.00 元

(本书如有印装错误,我社负责调换)

基因诊断研究新进展

编 委 会

主 编

马立人 王全立

副主编

刘耀清 蒋中华 步恒富 黄文杰 李月娟

编 委

(按姓氏笔划顺序)

丁晓萍 王升启 王 军 从玉文 刘志红 杜芝燕
杨景庚 毕建进 张泽云 高志英 彭瑞云 童 新

序

时值世纪交替之际,医学领域的一个重要分支——实验诊断学面临着机遇与挑战。分子生物学的蓬勃发展使其能够以崭新的面貌跨入 21 世纪。

诊断学的发展经历了三个阶段,即生化指标检查、免疫学或血清学检测和基因检测。基因诊断的核心是分子杂交和聚合酶链反应(PCR)技术,由此衍生的技术方法与日俱增。这一新一代的诊断技术优于传统诊断学方法主要体现在它是在基因水平上反映异常,因而可以对疾病作出早期诊断,更有利于及时防治。对于病原体而言,免疫学诊断往往只能判断其感染史或既往接触史,而基因诊断则可以判断其传染性,并且不受抗生素使用的影响。基因诊断的另一优越性是其高灵敏度,可达 fg 甚至 ag 级水平,在某些场合可以检测到单个基因、一个病毒或细菌。根据严格的碱基配对互补原理,基因检测的特异性也比免疫学方法好。所以,基因诊断是免疫学诊断的一项补充、换代乃至替代技术。

本书的作者都是从事基因诊断研究的第一线科技工作者,字里行间凝聚着他们的智慧与经验的结晶。另外,对于基因诊断领域的发展前沿也在书中作了比较系统的介绍,相信广大读者会从中受益。

中国科学院院士
军事医学科学院院长

吴祖泽

1996 年 9 月 10 日

内 容 简 介

本书重点介绍基因诊断方面及其相关技术方法的最新研究进展,集理论与应用为一体,内容新颖,充实可靠,实用性强。在基础理论方面,深入浅出地详细介绍了基因诊断的基础——分子生物学及其相关学科的理论和发展。对基因诊断的两大核心——核酸探针的分子杂交和聚合酶链反应(PCR)技术的原理,其本身和相关技术的进展,新概念和新模式均加以阐述。作者结合自己的研究成果和工作经验,对非同位素核酸探针标记的新方法,光敏生物素探针标记试剂盒,原位 PCR,定量 PCR,核酸的体外扩增,PCR 诊断试剂盒的研制和基因诊断相关仪器的研究进展等方面都有比较实用的总结介绍。另外,对基因诊断领域的发展前沿如阵列杂交,荧光原位染色体杂交(FISH),mRNA 的差异显示和程序性死亡(PCD)的检测等,也做了比较系统的介绍。

为方便读者,本书还附有基因诊断中的常用数据资料和常用试剂配制。

本书可供医学院校师生、检验工作人员、临床医生和相关专业的科研人员参考使用。

目 录

绪论	1
第一章 分子生物学的基础和发展	5
1.1 分子生物学是各基础学科综合形成的新学科	5
1.2 原核细胞与真核细胞	12
1.3 核酸的化学与中心法则	14
1.4 重组 DNA 技术	20
1.5 分子生物学的发展及其向临床医学的渗透	21
第二章 核酸提取方法与进展	29
2.1 核酸分离提取的原则	29
2.2 真核细胞染色体 DNA 的制备	30
2.3 质粒 DNA 的提取与纯化	34
2.4 RNA 的提取与纯化	36
2.5 待测样品中核酸的提取方法	38
第三章 分子杂交类型及新模式	42
3.1 探针制备与非同位素标记新方法	42
3.2 分子杂交新模式	48
3.3 增强化学发光(ECL)技术	50
3.4 核酸传感器	59
3.5 染色体荧光原位杂交(FISH)技术	64
3.6 程序性细胞死亡(PCD)及检测	71
第四章 核酸的体外扩增	79
4.1 聚合酶链反应(PCR)及其相关技术的发展	79
4.2 定量 PCR	83
4.3 原位 PCR	90
第五章 差异显示技术	99
5.1 mRNA 差别显示技术	99
5.2 呈现性差异分析	106
5.3 PCR-SSCP 和 PCR-ddF	107

第六章 基因诊断技术的应用实践	113
6.1 长臂光敏生物素核酸探针的标记与检测	113
6.2 PCR 诊断试剂盒的研制	120
6.3 基因扩增技术及相关仪器的进展	128
6.4 核糖核酸(RNA)的体外扩增	134
附录 A 基因诊断中的常用数据资料	142
附录 B 基因诊断中常用试剂的配制	146

绪 论

一、诊断学的发展简史与基因诊断的现实意义

医学诊断技术由第一代的生化指标检查发展到第二代的免疫诊断技术,到 70 年代末期,由于基因重组技术日趋成熟,形成了基因诊断技术,即第三代基因诊断技术。此技术到本世纪末估计将会有成百倍的增长,经济效益将会超过免疫诊断技术,见下表。

	免疫诊断	基因诊断
原理	抗原抗体反应	核酸碱基配对
检测对象	病原体包膜蛋白或机体响应	病原体核酸
诊断意义	反映接触史	反映传染性
灵敏度	ng(10^{-9})HBsAg	基因探针法 pg(10^{-12})HBV-DNA 扩增基因+探针法 fg(10^{-15})HBV-DNA
适用范围	蛋白或免疫范围	基因特性及变异

任何疾病的发生,不外乎内、外因素的综合作用,而任何疾病的发生基础和早期病变乃是基因的变化,即内源基因的变异和外源基因的侵入。内源基因的变异包括扩增(如脆性 X 综合症)、转位(如慢性髓性白血病的癌基因 C-abl 及 BCR 的转位)和点突变(如 p53 基因点突变与某些肿瘤发生的关系)等等。各种病原体感染人体,造成特异的外源基因的侵入并在体内增殖,引起各种传染性疾病。某些病毒核酸可以与宿主染色体基因组整合或激活癌基因、封闭抑癌基因而导致肿瘤的发生,如 HBV 与肝细胞癌,EBV 与鼻咽癌等。通过基因检测寻找内源基因的异常变化和发现外源基因的存在,从而达到对有关疾病快速、敏感和特异的诊断,这就是基因检测的内容和目的。

基因诊断是利用核酸中碱基序列特性来作临床诊断的一项新技术,它在原理上不同于当前使用的免疫学和血清学诊断方法。目前,基因诊断技术正在迅速发展,有人估计,它的发展将于本世纪末达到高峰,将取代大部分现用的血清学方法而进入临床实用阶段。

众所周知,核酸中碱基序列是编码它所表达的酶和蛋白质分子中氨基酸的品种和排列顺序的。对各种生物来说核酸序列是严格地遵循孟德尔遗传定律并有显著的种族特异性,甚至个体特异性的。机体内的核酸多数是双股核酸链形成的螺旋结构,这两股核酸链间的碱基以严格的互补规律(A=T, C≡G)由氢键缔合。如果我们以一段特定序列的核酸(用同位或非同位素加以标记)制备核酸探针,就可以通过分子杂交探测到样品中是否有互补的碱基序列存在。如果探针有一定长度而核酸序列选择得当的话,则探针杂交诊断就有相当惊人的特异性。有人计算一个长 17 个核苷酸的序列,在人的全基因组 3×10^9 个碱基中,只会找到一个互补序列。因此,用乙肝病毒探针可以特异地检查出乙肝病毒核酸而

不会与结核菌核酸发生杂交。

二、探针杂交检测技术的进展

从 70 年代中期以来,核酸探针杂交技术就已经在科研和临床中被广泛应用,成为一项直接检查病原体、癌基因和遗传病中基因突变的重要手段。有 80% 以上工作是用放射性同位素标记的探针完成的。80 年代以后,人们致力于非同位素标记技术的建立,其中应用广泛的是生物素标记的核酸探针以及后来发展的以地高辛酞元为标志物,以抗体酶系统显示的试剂盒。在生物素标记系列中,初期出现的是以 Bio-11-dUTP 替代 TTP 在缺口平移中掺入的标记法,随后又改进为随机引物掺入标记法。至 1987 年澳大利亚推出光敏生物素标记法之后,使标记方法大为简化,不论双链或单链 DNA 或 RNA 都可以标记,只要用一种试剂——光敏生物素加入,光照 20min 即可标记成功。我们又进一步发展了长臂光敏生物素,克服了生物素与亲和素——酶结合时的空间位阻,使灵敏度提高近百倍。迄今已有 200 多个单位使用,标记了数十种细菌和病毒探针、20 余种癌基因和其他基因探针。用碱磷酶显色法一般可以检测到 1~4pg 目的 DNA。

不论用掺入法或光标记法的核酸探针,其长度最好在 100bp 以上。近年来 DNA 自动合成技术有飞速的发展,它可以方便地合成任意序列的寡核苷酸探针,尤其是只差一个碱基的可用于鉴别点突变的探针对。探针长度为 15~50 个碱基。寡核苷酸探针可以在 5' 或 3' 端标记上氨基或巯基,然后再生物素化或直接酶标,再用发光检测。据称灵敏度可达到 250zepto(10^{-21})Mole,已经是比同位素更高的灵敏度了。

在显示系统方面,近年来也有许多进展,酶标显示仍是最常用的方法。胶体金显示法,不仅可用光学显微镜观察,也可以用电子显微镜观察,因此在原位杂交中特别受重视。最近推出的辣根酶和碱磷酶的发光显示系统,以其高灵敏度和能产生与放射自显影相似的转印显示效果(减少本底干扰)而受到人们的欢迎。

三、PCR 技术的发展

如果待检材料很少或样品中只含单一拷贝的基因,则应用探针法检测往往会感到灵敏度不能达到要求,因而还会有一定数量的样品漏检或呈假阴性。1985 年开始提出的基因体外扩增技术又称聚合酶链反应(简称 PCR)使基因诊断方法发生了革命性的变化。PCR 技术可使待检样品中的目的基因片段在几小时(甚至十几分钟)内扩增上百万倍。

如果标本中原来的目的基因达到 fg 级水平,就可以通过简单电泳和溴化乙锭(EB)显示扩增后的核酸片段区带。从检测区带的电泳位置看它是否符合引物设计的扩增长度,就可以省略探针杂交的繁琐操作而得到确切的检测结果。但如果样品中模板量低于 fg 级水平,则在 EB 显示时就不能看到明亮的区带(出现明显 EB 检测带的量是 ng 级)。但若做印迹,并用探针杂交就可以看到杂交带。这种 PCR—SB 方法的模式检测灵敏度可达 ag 级水平,即可以查明几个病毒的存在。

PCR—SB 虽然灵敏、特异,但操作费时,一次完整的 PCR—SB 约需三天才能完成,这将不适应临床医生及时决定治疗措施的需要,所以随即有套式 PCR 出现。套式 PCR 是指

在第一对引物(外引物)扩增之后,加入一对位于外引物内侧的内引物,再行扩增数十个循环,然后用电泳观察扩增结果。这种套式二次 PCR 扩增,可将标本的检测时间压缩在 8~10h 内完成,也就是说可以在第二天拿出高灵敏度的检测结果,其灵敏度大致与 PCR—SB 相当,即达到 ag 级水平。

若将套式 PCR 的内外引物稍加改变,延长外引物长度(至 25~30bp),同时缩短内引物长度(至 15~17bp)使外引物先在高退火温度下做双温循环扩增,然后改换至三温循环,使内引物在外引物扩增的基础上在低退火温度下做三温循环直至扩增完成,这样就可以使两套引物一次同时加入,两种循环一气呵成,等于只做一次 PCR,而灵敏度与套式二次 PCR 无异,在我们最近推出的 PTC—51B 型气流式 DNA 热循环仪上就可以完成全部程序。

套式一次 PCR 的成功,使 PCR 检测的全过程可以在 5h 内完成,使当天出检验报告成为现实,也使 PCR 检测走入临床有了现实的基础。

PCR 的微量化(反应体积减少至 10~20 μ L)降低了 PCR 检测的成本,在一次 PCR 中加入多对精心设计的引物同时扩增可用于病毒、细菌等分型和多种病原体基因的一次同时检测。PCR 扩增产物用专为检测双链 DNA 而设计的微量荧光计定量,就可以从标准模板系列稀释扩增产物量曲线上读出样品中模板 DNA 的量或拷贝数,达到 PCR 定量的目的。

四、基因诊断技术的应用

以基因探针杂交和基因体外扩增两项技术为主干,以转印、电泳、限制性酶切乃至 DNA 测序、基因拼接等技术为辅助,使基因诊断逐步成长为一套有广泛用途的、高灵敏度(ag 级)、高特异性(能查明一个核苷酸的差异)的医学生物学诊断手段,不同模式的基因诊断可以随需要而任意选用,例如:

(1)斑点或条状杂交模式。适用于大批量标本的检测,如普查、献血员初筛等场合,每人每天的检测可以达到 1000 个标本以上,如果辅以半自动的样品处理、分子杂交仪等检测数则可增加数倍,对含多拷贝重复序列的疟原虫检测可达高灵敏度。

(2)探针杂交模式将不可替代地用于原位杂交、菌落或细胞群落的转印杂交筛选,用于检测片段中的点突变(示差杂交),用作探针来亲和(杂交)分离含互补序列的片段等。

(3)PCR—EB,PCR—SB,套式二次 PCR,套式一次 PCR,则可用于需要不同灵敏度和特异性的检测。

基因诊断的应用范围正在不断扩大之中,在以下几个领域中已具有实用价值:

(1)遗传病的产前诊断。用胎儿羊膜细胞、羊水甚至母血可以检测胎儿的性别,这在与性染色体关联遗传病诊断中是必要的。对于高发的遗传病如地中海贫血、镰刀状贫血、凝血因子缺乏、DMD 等已在临床应用多年,为优生优育作了贡献。对于有遗传倾向的疾病尤其是老年性疾病,如糖尿病、高血脂症,甚至部分肿瘤,均是当前研究的重点,近期内可有突破。

(2)致病病原体的检测。这些外源入侵的基因,一旦阐明其部分核酸序列,就可以设计引物和探针,用 PCR、RT—PCR 或杂交方法来检测,其范围包括细菌、病毒、原虫及寄生

虫、霉菌、立克次体、衣原体和支原体等一切微生物。基因诊断的特点是可以选择其基因中的保守区做通用检测,也可以选定差异较大的基因部位做分型检测;即可以做单一病原体的专用检测,也可以将有关的病毒、细菌中不同的品种做一次多元检测,而且检测的灵敏度和特异性都远高于当前的免疫学方法,所需时间也已达到临床要求。这对于难以培养的病毒(如 HBV)、细菌(如结核、厌氧菌)和原虫(如梅毒螺旋体)等来说尤为适用。

(3)癌基因的检测和诊断。虽然对癌基因的研究大部分还属于基础阶段,但癌变是由基因变化所导致的这一基本事实已毋庸置疑。所以癌基因、抗癌基因及癌转移基因的研究,离开分子水平的诊断手段是无法进行的。临床上已可应用的例子有白血病残留细胞的定量(包括慢粒和急淋);肺癌中 p53 及 Rb 等抗癌基因的失活;神经胶质瘤中 N—mic 基因的激活和表达。通过原位杂交观察特定癌基因及抗转移基因的植入和反义寡核苷酸对强表达癌基因的阻断均已成为近代基因治疗的着眼点。

(4)DNA 指纹,个体识别,亲子关系鉴别及法医物证。这一为公、检、法部门所瞩目的课题已经在某些国家取得法律认可。肌红蛋白小卫星体基因、珠蛋白基因、ApoB 基因等的多态性和重复次数的差异都被应用于鉴定,其灵敏度已达到一根头发、一个细胞、一个精子取得个体特征图谱。这一领域也已发展到骨髓或脏器移植配型乃至动物种系的研究等。

(5)动、植物检疫。灵敏、特异、快速诊断检测方法是我国进出口口岸的门卫。检查出入国门的人员、动植物(种畜、种籽)等是否携带烈性传染病(艾滋、动植物病毒等)病原体,食品、饲料等是否带沙门氏菌等,均需要基因诊断手段将这些病菌拒之国门之外,基因诊断是提高我国综合国力的必要保证。

(6)高科技生物学领域中的应用。在转基因动植物中检查植入基因的存在。PCR 技术尚可应用于基因拼接、测序等领域。

随着基因诊断手段的日益完善,它的自动化已指日可待。届时它在临床应用中的地位也将发生明显改变,而将处于举足轻重的位置。

(马立人 王全立)

第一章 分子生物学的基础和发展

1.1 分子生物学是各基础学科综合形成的新学科

1945 年 Astbury 首先提出了分子生物学这一名词,当时主要是指生物大分子的化学和物理结构的研究,研究对象主要是核酸和蛋白质。分子生物学是一门综合性学科,近年来它的发展十分迅速。它的基础是微生物学、遗传学、化学、生物化学、物理学和各种技术科学。正像一颗树,从基础吸取营养,在各个应用领域开花结果。我们现将各基础学科为分子生物学的发展作出重要的贡献重点地概括于表 1.1.1 中。

表 1.1.1 对分子生物学的发展有重要贡献的基础学科

学科名称	重要发现或著名实验	学 者	时 间	内 容
遗传学	豌豆试验	Mendel G (孟德尔)	1856~1866	提供了遗传的物质基础及规律的设想
	果蝇试验	Morgan TH	1910	染色体上携带的基因是遗传基础,基因连锁图
	肺炎球菌转型试验	Avery OT	1944	确立 DNA 是遗传信息携带者
微生物学	噬菌体试验	Hershey	1952	核酸作为模板复制,新拷贝作为增殖基础
	限制性核酸内切酶	Smith	1967	基因切割重组工具酶
	细菌质粒研究			遗传工程中将基因携带入宿主菌的载体
物理学	X 线衍射 超离心分析 电镜观察	Watson, Crick	1953	DNA 双螺旋模型的提出 核酸分子量测定 核酸形态及结构确定
细胞生物学	原核与真核细胞研究 细胞器的组成与功能			确定细胞内各部分功能 确定细胞功能发生部位
核酸的化学 及生物化学	核酸碱基分析	Chagaff E	1949	核酸中碱基比例及配对规律
	同位素,半保留复制	Meselson M	1958	DNA 复制模式确定
	DNA 体外酶促合成	Kornberg A	1959	DNA 合成所需模板,引物,酶,4×dNTP
	核酸中碱基序列测定	Sanger F, 等	1977	核酸一级结构测定
	核酸化学合成技术	Khorana	1956	合成 DNA 片段,1970 年合成酵母丙氨酸 tRNA
	中心法则提出	Crick	1956	信息传递的基本法则
	遗传密码破译	Nirenberg	1961	核酸与蛋白信息关系
	核酸变性复性研究			分子杂交原理确定
	核酸的突变和变异			遗传病的发现,肿瘤与突变关系

1.1.1 遗传学

孟德尔豌豆试验、肺炎球菌转型试验和摩尔根果蝇的研究为近代遗传学提供了物质基础和一些基本概念。

一、孟德尔豌豆试验

孟德尔(1822~1884年)是奥地利僧士,在他当代理教师时,在修道院的一小块地里进行了豌豆试验,试验的结果为近代遗传学奠定了基础,被称为孟德尔遗传定律。

豌豆是1年生植物,易于培植和杂交(异株授粉)。最初他选择的表型特征是高株(TT,高182.88~213.36cm)和矮株(tt,高22.86~45.72cm)。高矮株杂交所得1064株子一代豌豆株中高787株、矮277株,高矮株比约为3:1。

要观察豌豆株的高矮,从亲本种植、授粉、结实到子代成长显示出高矮特征周期需1年,做上面的试验要2年时间。所以后来选用种子的形状(圆、皱)和颜色(黄、绿)作双基因杂交试验。这样,在当年即可以知道结果了。在圆黄和皱绿为表型特征的双基因杂交中共得556颗子二代豌豆,其中黄圆315颗,黄皱101颗,绿圆108颗,绿皱32颗,其比例约为9:3:3:1。

孟德尔的豌豆试验得出以下启示:

(1)豌豆的遗传性状作为离散的单位(以后被称为基因)被携带到子代中去。每一颗豌豆都含有这种同源的对子,其一来自花粉(雄),另一来自胚(雌)。花粉与胚珠结合成种子,就从父本和母本各取得一半基因。

(2)对立性状的两个同源基因如圆、皱,一个是显性的(圆),一个是隐性的(皱)。在子一代中有时表型是圆的,但隐性单位虽不显示其特征,也是存在的,只有显示性基因才表现出来。因此,在子一代中才出现3/4:1/4的比例。

(3)在形成生殖细胞时体细胞中的二倍体进行减数分裂,只把其中的一半染色体带入选入生殖细胞中,传入子代。

孟德尔的豌豆试验为遗传学提供了设想的物质基础和规律。

二、肺炎球菌转型试验

实验指出以下事实:

(1)肺炎球菌培养时形成两种形态的菌落,一种是光滑型(S),一种是粗糙型(R)。

(2)光滑型菌可使小鼠致死,粗糙型菌不能使小鼠致死。

(3)光滑型菌加热后会失去小鼠致死的能力。

(4)菌中加入煮过的光滑型菌,培养后又可使小鼠死亡。说明煮过的光滑型中含有一种转型物质,可使粗糙型转变成光滑型。经过分离分析研究,这种物质已被证明是DNA。

这种物质可以被磷酸酶处理而失转型活力,确立了DNA是遗传信息携带者这一概念,否定了以前认为蛋白是遗传物质而核酸只是蛋白的辅基的观点。

三、摩尔根果蝇试验

果蝇作为遗传的研究对象有许多优点:

①易饲养,从出生到性成熟约需2周。

②染色体基因组简单,只含4对染色体(豌豆14,人46),摩尔根通过大量果蝇的遗传

观察,证明:

①果蝇的性别由 XX 及 XY 染色体所决定,凡在性染色体上携带的基因,有性别特异性。

②从杂交后子代的遗传性状表型出现的比例可以推算出该基因在染色体上的相对位置,绘制基因连锁图。

以上早期的遗传试验使我们明确了以下各点:

(1)遗传特性决定于染色体(真核细胞)或 DNA(原核细胞)上一定的结构单位,称为基因。从亲代至子代,从而保证了种瓜得瓜,种豆得豆。

(2)基因决定表型,也决定性别。性别决定于 XX 及 XY 染色体。

(3)染色体上各特定部位有各种基因,可以构建成基因连锁图。

1.1.2 微生物学

分子生物学中许多基础知识来自微生物学。

一、细菌和噬菌体

细菌:是自由生活的单细胞生物。它具有单个染色体,但并不包在核中。它结构简单、生长容易、迅速,对营养的需求明确。分子生物学中最常用的是大肠杆菌(E. Coli)。在最适条件下它于 37℃ 时每 20min 分裂一次成 2 个细菌,约在 20h 培养后,一个细菌可变成 10^9 个细菌。大肠杆菌染色体只含 1 个 DNA 分子,分子量为 2×10^9 。

在琼脂培养基上一个细菌培养后形成一个菌落。用此法可以测定培养基上细菌数,并可用特殊的培养基来筛选营养缺陷型细菌。

噬菌体:比细菌更小,能侵染细菌并在其中生长。噬菌体通常仅含 1~10 种蛋白质的几百个分子和 1 个核酸分子。蛋白质构成噬菌体的外壳、头部及尾部,核酸包在头部内。

噬菌体繁殖很快,细菌大概 30min 倍增 1 次,而噬菌体在相同时间内可产生 100 多个子代。经四个循环 1 个细菌变成 2^4 即 16 个菌,而噬菌体可增至 100^4 即 10^8 个。

噬菌体只能寄生在细菌体内,可以用噬菌斑或空斑来计数。

用 ^{35}S 标记菌体蛋白, ^{32}P 标记噬菌体核酸,用标记的噬菌体侵染细菌,证明噬菌体蛋白不进入细菌,只有噬菌体核酸通过尾管注入细菌体内,在细菌体内复制并包装成 20~500 个噬菌体,最后破壁逸出,再感染新的细菌。

二、质粒及表达载体

质粒是大多数细菌和某些真核生物中发现的染色体外的环状 DNA 分子。除酵母的杀伤质粒是 RNA 外,其余都是 DNA,分子量在 $10^6 \sim 10^8$ 之间。每个细菌中存在的质粒拷贝数从 1~2 个至 10~60 个。

质粒较易从细菌中分离,其步骤是:

细菌培养 → 去污剂溶菌 → 离心沉淀(染色体, RNA 及蛋白) →
CsCl 密度梯度离心 → 质粒 DNA

当前对质粒的主要兴趣集中在遗传工程中的实用意义。它们主要被用作携带目的基因进入工程菌的载体,再由工程菌表达出希望获得的蛋白。

携带目的基因的质粒,可以通过 CaCl_2 处理大肠菌而再次进入细菌体内(转染)。目前所用的质粒载体大多经过结构改造,使之携带许多酶切点、启动子及耐抗菌素筛选标志,

使整合了目的基因的质粒,在克隆后易于被筛选出来。最常用的大肠杆菌质粒 pBR322 是环状双链 DNA,含 4363 个碱基对(bp)。

三、限制性核酸内切酶、连接酶、合成酶等工具酶

上述工具酶多数来自细菌,一部分来自噬菌体等原核生物,是分子生物学中的有力工具,目前已有 100 多种,有不少已用基因工程生产。

1972 年发现大肠杆菌含有一种核酸特定序列识别性的双链内切酶——EcoR1,从此展开了广泛的探索,取得了各种能识别核酸不同序列的限制性核酸内切酶。其特点是:

(1)可以在特定的双链 DNA 序列中产生切口,切口两侧呈中央对称。

(2)依据酶的不同可以生成两种类型的切口(图 1.1.1):

交错型切口:沿对称轴对称排列,切口形成粘性末端。

平齐型切口:呈中央对称,例如 Alu 1 酶。

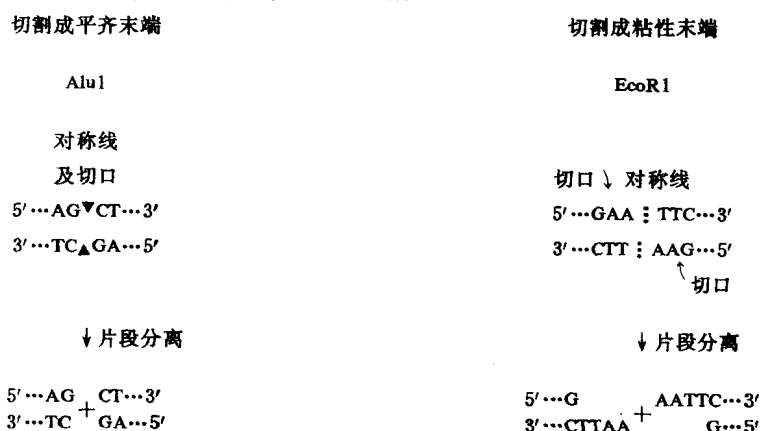


图 1.1.1 限制性核酸内切酶及酶切口

限制性核酸内切酶的用途很多,例如:

(1)它是使不同来源的 DNA 双链,切出粘性末端,然后互联接,形成重组 DNA。

(2)对特定生物的 DNA 用限制性内切酶充分酶切,切断后每种生物可得出特异的电泳谱,称为限制性酶切谱。这是识别个体 DNA 的特征性谱图。

(3)用酶切法制备基因文库,克隆后可筛选出需要的基因片段。

由互补的粘性末端拼接起来的接口并不牢固。若再用大肠杆菌连接酶处理,使 3'-OH 与 5'-磷酸成酯键联接,就可形成牢固的无缝接口。

许多种 DNA 合成酶以及反转录酶也都来自细菌或病毒,这些都是重要的工具酶。

1.1.3 核酸的化学和生物化学

一、核酸的化学研究

(一)核酸的碱基配对理论

1949 年 Chargaff 将得自各种生物的 DNA 进行碱基分析(色谱法)证明不论来源如何,四种碱基之间的比例总是嘌呤:嘧啶=1, A:T=1 及 G:C=1,由此推理出碱基配对的理论(见表 1.1.2)。

表 1.1.2 核酸(DNA)中碱基比例规律

DNA 来源	A/G	T/G	A/T	G/C	嘌呤/嘧啶
牛	1.29	1.43	1.04	1.00	1.1
人	1.56	1.75	1.00	1.00	1.0
鸡	1.45	1.29	1.06	0.96	0.99
蛙	1.43	1.43	1.02	1.02	1.02
小麦	1.22	1.18	1.00	0.97	0.99
酵母	1.67	1.92	1.03	1.20	1.0
流感嗜血杆菌	1.74	1.54	1.07	0.91	1.0
大肠杆菌 K2	1.05	0.95	1.09	0.99	1.0
禽结核菌	0.4	0.4	1.09	1.08	1.1
灵杆菌	0.4	0.7	0.95	0.86	0.9
蒋氏杆菌	0.7	0.6	1.12	0.89	1.0

1955 年 Chargaff 公布了分析各种脏器细胞中的 DNA 含量,证明每一体细胞中 DNA 的含量是恒定的,总是 6.6pg,而生殖细胞中只含此量的一半,为 3.3pg。这一事实说明每一个细胞含有该生物的全部信息,而生殖细胞中则在经过减数分裂后,只含染色体对的一半(见表 1.1.3)。

表 1.1.3 牛的各种脏器组织细胞核中 DNA 含量

脏器	DNA 含量/pg	可能的染色体状态
胸腺	6.6	二倍体
肝	6.4	二倍体
胰	6.9	二倍体
肾	5.9	二倍体
精子	3.3	单倍体

(二)细胞中的核酸分 DNA 及 RNA

在化学组成上两类核酸的主要区别有:

(1)所含核糖不同, RNA 含核糖,而 DNA 含脱氧核糖。

(2)所含碱基不同, RNA 为 AGCU, DNA 为 AGCT。

两种核酸均由相应的核苷酸为构建单元,核苷酸通过核糖上的 3' 及 5' 羟基与磷酸成酯而形成链,而两链上相应碱基之间形成氢键。

二、同位素标记技术的应用

最早用于标记的同位素是稳定同位素 ^{15}N 及 ^2H , 标记化合物的测定靠比重之差即超离心法,以后又用质谱法。著名的 DNA 半保留复制试验是用超离心法完成的,将在 1.1.4 中介绍。

核酸序列的测定目前多用放射性同位素 ^{32}P 或 ^{35}S 来完成。

三、核酸序列的测定

遗传信息以核苷酸顺序和形式贮存在 DNA 分子中,它们以功能单位在染色体上占据一定的位置构成基因(gene)。因此,搞清 DNA 顺序无疑是非常重要的。1975 年 Sanger 发