

HESUAN TANZHEN
ZAJIAO SHIYAN
JISHU

核酸探针杂交实验技术

林万明 主编

中国科学技术出版社

1991年·北京

核酸探针杂交实验技术

林万明 主编

编写人员 (以文章先后为序):

林万明 杨瑞馥 王 津 刘纯杰

阚劲松 郭兆彪 祝道成 李银太

宋欣明 程知义 王 虹 周志江

中国科学技术出版社

1991年·北京

内 容 简 介

本书主要内容包括各种核酸标本制备, 探针研制和标记, 各种杂交类型和检测方法以及杂交作用机理和最佳反应条件的选择等。其特点是方法具体详细、内容新颖、理论简明、实用性强, 是一本理论和方法相结合的实验参考手册。

本书读者对象为高等院校有关专业师生、微生物学和分子生物学工作者、医院检验师、各级卫生防疫和检验人员等。

(京)新登字 175 号

核酸探针杂交实验技术

*

林 万 明 主 编

责任编辑: 李春德 苗立新

中国科学技术出版社出版 (北京海淀区魏公村白石桥路 32 号)

新华书店总店科技发行所发行 各地新华书店经售

北京四环科技印刷厂印刷

开本: 787×1092 毫米 1/16 印张: 13 字数: 324 千字

1992 年 3 月第 1 版 1992 年 3 月第 1 次印刷

印数: 2 500 册 定价: 8.90 元

ISBN 7-5046-0705-3/Q·24

序 言

分子生物学技术是从分子水平上研究并揭示一切生命奥秘的主要手段之一，该技术的不断发展直接促进了生命科学研究的深入。近些年来将分子生物学技术应用于临床医学中，研究人类某些疾病的发生、发展和转归，弄清并解决一些难题，大大地提高了疾病防治水平。随着分子生物学技术的不断应用与发展，必将促进医学发展到新的水平。《核酸探针杂交实验技术》一书所包含的内容是分子生物学技术中重要组成部分。

本书囊括了国内外核酸探针杂交实验技术的主要内容和最近发展。编者以从事此项研究工作的经验和创新、理论与实践结合，使内容新颖、方法详尽具体、简明易懂、实用性强，并按普及和提高相结合原则，编成此书。它的出版必将对我国核酸探针杂交实验技术起到积极的推动作用。

本书不仅适用于微生物学和分子生物学工作者、医院各级卫生防疫检验人员，同时也是高等院校和研究单位有关人员有价值的参考书，非常值得推荐谨识。

马复先

1991年5月14日

前 言

近年来，以分子生物学为标志的现代生物高技术已取得惊人的进展。从分子水平上揭示一切生命奥秘，并在分子水平上改造和利用生物为人类造福的生物科学新世纪即将到来。与此同时，人们为开展分子生物学研究而设计和建立的新技术、新方法不断涌现，《核酸探针杂交实验技术》一书所包含的内容就是其中的一部分。

虽然本书介绍了许多实验方法，但方法再多也不可能适用于所有的实验目的，然而它们的某些基本原理和基本操作是相同的，所以应强调掌握基本原理和实验技能。只有了解其原理，并根据原理优选最佳实验条件，完善现行实验方案，启发设计和发展最新的实验技术，才能有针对性地解决实验中遇到的难题。

本书所介绍的实验技术大都是近几年新建立的，内容新颖，方法详尽具体，简明易懂，实用性强，并附有许多实验方案和有益的建议，是一本理论和方法相结合的实验参考手册。对初学者可参考本书进行操作，对有经验的工作者也能开拓思路。

在本书编写过程中，杨晓峰、巩方两位同志给予了大力支持，在此深表感谢。

由于编者水平所限，书中错误之处在所难免，热诚欢迎读者批评、斧正。

林万明

1991年4月10日

目 录

第一章 总 论.....	(1)
第一节 分子杂交技术.....	(1)
第二节 探针实验主要因素的优化.....	(3)
第三节 核酸探针的应用.....	(6)
第二章 核酸样品的制备.....	(9)
第一节 核酸的提取与沉淀.....	(9)
第二节 从血液中提取 DNA	(12)
第三节 从组织中提取 DNA	(14)
第四节 细菌 DNA 的提取	(15)
第五节 RNA 的提取	(16)
第六节 从其他来源标本中提取核酸	(22)
第七节 原位杂交中组织和细胞标本的制备	(24)
第三章 DNA 重组和核酸探针的制备	(33)
第一节 载体-受体系统	(33)
第二节 目的基因的获得	(35)
第三节 DNA 分子的体外重组	(36)
第四节 转化与感染	(39)
第五节 重组克隆的筛选	(40)
第六节 核酸探针的制备	(41)
第四章 放射性标记核酸探针	(53)
第一节 酶促标记 DNA	(54)
第二节 寡核苷酸探针的标记	(60)
第三节 放射性标记探针的纯化	(64)
第五章 非放射性标记核酸探针	(69)
第一节 酶促修饰	(69)
第二节 化学修饰	(76)
第三节 寡核苷酸探针的标记	(82)
第六章 杂交类型和检测方法	(89)
第一节 杂交膜的制备	(89)
第二节 DNA Southern 印迹杂交	(92)
第三节 RNA Northern 印迹杂交	(95)
第四节 菌落和噬菌斑筛选法	(97)
第五节 膜杂交方法	(98)
第六节 原位杂交方法	(105)
第七节 检测液相靶序列的杂交类型	(116)

第七章 核酸的体外扩增技术	(126)
第一节 聚合酶链反应	(126)
第二节 转录依赖的扩增系统	(136)
第三节 3SR 系统	(137)
第四节 连接酶链反应	(138)
第五节 探针的扩增——Q β 复制酶系统	(139)
第六节 信号的放大	(141)
第八章 核酸杂交的电镜观察	(143)
第一节 杂交体的形成	(143)
第二节 核酸在蛋白膜上的展开	(146)
第三节 电镜观察	(149)
第九章 液相杂交的定量分析	(151)
第一节 二级反应	(151)
第二节 二级理论在核酸复性反应中的应用	(153)
第三节 多元复性反应	(156)
第四节 RNA-DNA 滴定曲线的分析	(159)
第五节 影响反应速率的因素	(160)
第六节 复性反应的测定技术	(163)
第十章 膜杂交的定量分析	(168)
第一节 膜杂交的简要动力学	(168)
第二节 膜杂交速率的影响因素	(169)
第三节 影响杂种稳定性的因素	(171)
第四节 相关序列间的辨别	(172)
第五节 核酸与膜的结合	(174)
第六节 杂种的检测和定量测定	(177)
第七节 最佳反应条件的确定	(178)
第八节 T_m 值的测定及意义	(180)
第九节 滤膜和探针的再使用	(181)
第十节 放射性膜杂交的问题及分析	(181)
第十一章 分析 RNA 的杂交法	(183)
第一节 Northern 印迹杂交	(183)
第二节 RNA 点印迹杂交法	(185)
第三节 核酸酶 S1 绘图法	(185)
第四节 引物延伸法	(188)
附录 A 试剂	(191)
附录 B 附加方案	(198)

第一章 总 论

目前, 采用放射性标记探针和核酸固定在膜上进行的杂交, 其反应过程的基本原理没有引起人们的注意, 但研究人员应懂得杂交的基本原理和定量间的关系。在某些情况下, 这些知识有助于研究人员获得定量的结果。

单拷贝 DNA 是指每个单倍体基因组中仅出现一次的 DNA 序列, 而重复 DNA 序列则出现一次以上。通常实际区分两者不容易, 所以, 单拷贝 DNA 一般是指含有少量重复序列的样品。

复杂度是指核酸样品中含有不同序列的总长度。在没有重复序列的情况下, 复杂度等于基因组大小, 当然, 它也是单倍体互补的染色体 DNA 的复杂度。由于多数基因组的 DNA 序列千变万化, 此定义缺少严格性。实际上, 复杂度是指 DNA 序列的长度。

复性是指两个完全分开的互补链相应的碱基配对结合在一起, 复性一开始, 可用“拉链”来形容连续的碱基配对。杂交是指任何来源的核酸片段重组后, 其序列经特异的碱基配对形成的双链复合物 (通常在体外)。融解温度 (T_m) 是用来测量双链 DNA 复合物或 RNA-DNA 复合物的稳定性的一种指标, 即在此温度, 有一半双链复合物解离或变性。

第一节 分子杂交技术

一、探针-靶分子的相互反应

从化学和生物意义上理解, 探针是一种分子, 它带有供反应后检测的合适标记物, 并仅与特异靶分子反应。抗原-抗体、外源凝集素-碳水化合物、亲和素-生物素、受体-核酸以及互补核酸间的杂交均属于探针-靶分子反应。蛋白质探针 (如抗体) 与特异靶分子是通过混合力 (疏水、离子和氢键) 的作用在少数特异位点上的结合, 而核酸探针与互补链的反应则是根据杂交体的长短不同, 通过氢键在几十、几百甚至上千个位点上的结合。因为有机溶剂可降低杂交体的稳定性, 所以, 疏水反应对互补核酸链的结合也有一定的作用, 但对其特异性影响甚微。

核苷酸经某一原子、功能基团或长侧链修饰后仍可进行碱基配对, 这取决于修饰的部位与修饰物的性质。这一特性有助于理解非放射性核酸探针标记物的设计和 ^{125}I 与 DNA 探针的化学结合。能与核酸结合的单一原子有银、溴和碘等, 这些元素可与嘧啶 (胸腺嘧啶除外) 环的 C-5 位或嘌呤环的 C-8 位反应而不影响氢键的形成。溴亦可与胸腺嘧啶的 C-6 位结合。而胞嘧啶(C)的 C-4 位和腺嘌呤(A)的 N-6 位就不能被修饰, 否则影响碱基配对。尽管 C 的 N-4 位和 A 的 N-6 位参与了氢键形成, 但它们也是一实用位点。这种明显差异可能是因为标记的探针每 1kb 掺入了 10~30 个修饰碱基, 即仅 4%~12% 的单个碱基被修饰的类似物取代了。尽管掺入位点处的碱基配对较弱或不存在, 但对杂交分子的稳定性影响很小。防止氢键破坏的一种方法就是修饰探针, 即将探针克隆入 M13 载体中, 只修饰载体区而不修饰插入片段。当用放射性同位素 ^{32}P 和 ^{35}S 标记核酸时, 由于同位素是掺入核酸骨架的磷酸二酯键中, 因此, 碱基未发生任何修饰。在 5'端磷酸基团上可进行化学修饰, 这是

标记寡核苷酸探针的有效方法。因为这种方法是在一个探针分子上标记一个可检测的基团，所以，对长的克隆探针不适用。

可利用修饰的碱基来增加杂交的稳定性和特异性。2-氨基腺嘌呤可替代寡核苷酸探针中的腺嘌呤通过形成3个氢键以增加杂交体的稳定性。另外，在G-C丰富的RNA探针中，可用次黄嘌呤代替鸟嘌呤以获得特异的杂交。因为次黄嘌呤-鸟嘌呤间只形成2个氢键，有效地降低了杂交体的 T_m 值。这样， T_m 值与杂交温度更接近，杂交的严格性就增加了，因此，也就增加了特异性。

很显然，结合位点的不同和可检测基团与检测系统的不同，可派生出很多核酸探针标记方法。

二、杂交技术进展

核酸杂交技术基本上是从Hall等1961的工作开始的，探针与靶序列在溶液中杂交，通过平衡密度梯度离心分离杂交体。该法很慢、费力且不精确，但它开拓了核酸杂交技术的研究。Bolton等1962年设计了第一种简单的固相杂交方法，称为DNA-琼脂技术。变性的DNA固定在琼脂中，DNA不能复性，但能与其它互补核酸序列杂交。典型的反应是用放射性标记的短DNA或RNA分子与胶中DNA杂交过夜，然后将胶置于柱中进行漂洗，去除游离探针。在高温、低盐条件下将结合的探针洗脱，洗脱液的放射性与结合的探针量呈正比。该法尤其适用于过量探针的饱和杂交实验。60年代末，Britten等设计了另一种分析细胞基因组的方法。该法是研究液相中DNA的复性以比较不同来源核酸的复杂度。典型的方法是：从不同生物体（细菌、酵母、鱼和哺乳动物等）内分离DNA，用水压器剪切成长约450核苷酸(nt)的片段。剪切的DNA液（含0.12mol/L磷酸盐缓冲液或0.18mol/L Na^+ ），经煮沸使dsDNA热变性成ssDNA。然后冷至约60℃，在此温度孵育过程中，测定溶液一定时间内的UV260nm的吸光度（减色效应）来监测互补链的复性程度。通过该实验可比较不同来源生物体DNA的复性速率，并可建立序列复杂度与动力学复杂度间的关系。

60年代中期Nygaard等的不同研究为应用标记DNA或RNA探针检测固定在硝酸纤维素(NC)膜上的DNA序列奠定了基础。如Brown等应用这一技术评估了爪蟾rRNA基因的拷贝数。RNA在代谢过程中被 ^3H 尿嘧啶标记，并在过量的情况下与膜上固定的基因组DNA杂交。继而用RNase处理，消化非特异结合的RNA。漂洗后计数以测定杂交探针的量。通过计算与已知量DNA杂交的RNA量即可评估rRNA基因数。由于当时缺乏特异探针，这种方法不能用于研究其它特异基因的表达。这些早期过量探针膜杂交试验实际上是现代膜杂交实验的基础。

进入70年代早期，许多重要的发展促进了核酸杂交技术的进展。例如，对特异基因转录产物的分析和对动力学杂交实验又产生了兴趣。固相化的polyU-Sephrose和寡(dT)-纤维素使我们能从主要污染核酸中分离polyA⁺RNA。用mRNA的纯化技术可从网织红细胞总RNA中制备 α -和 β -球蛋白mRNA混合物。这些球蛋白mRNA首次被用于合成特异的探针以分析球蛋白基因的表达。

尽管取得了上述重大进展，分子杂交技术在临床实用中仍存在许多问题。如每一反应都需纯化mRNA，探针的合成很繁琐，而合成cDNA的纯度和长度变化较大，这对液相杂交动力学影响很大。进入70年代，又发展了许多相关技术，如限制性核酸内切酶、分子克

隆、基因组 DNA 文库、Southern 印迹和高比活性放射性标记等技术。由于固相化学技术和核酸自动合成仪的诞生，现在可常规制备 18~100 个碱基的寡核苷酸探针。应用限制酶和 Southern 印迹技术，用数微克 DNA 就可以分析特异基因。特异 DNA 或 RNA 序列的量和大小均可用 Southern 印迹和 Northern 印迹来测定，与以前的技术相比，大大提高了杂交水平和可信度。另外，测序技术的进展意味着可分析探针的每个碱基，因此，探针序列与末端就可完整地测定。

迄今为止，已克隆和定性了许多特异 DNA 探针，特异探针的唯一要求是发展一实用核酸检测系统。实验室研究应着手于：提高检测少见核酸靶分子的敏感性，放射性标记物的替代，搭起实验室研究与临床实际应用间的桥梁。DNA 探针实验必须简单、快速和低廉。换言之，速度、复杂性与费用必须与抗体实验相当，而敏感性却较高。只有这样才能促进这一技术的临床应用。因此，现在简化和发展杂交技术的目标有三：第一，完善非放射性标记探针；第二，靶序列和探针的扩增以及信号的放大；第三，发展简单的杂交方式。

第二节 探针实验主要因素的优化

一、核酸探针

核酸探针可以是克隆的，也可以是合成的，这主要取决于该探针是否能满足特异性要求。如果有特异的克隆，或当 DNA 序列未知而又必须首先进行克隆以便绘制酶谱和测序时，常常应用克隆探针。克隆探针一般较寡核苷酸探针的特异性强，复杂度也高。从统计学角度而言，较长的序列随机碰撞互补序列的机会较短序列少。克隆探针的另一优点是，可获得较强的杂交信号，因为克隆探针较寡核苷酸探针掺入的可检测标记基团更多。

合成的寡核苷酸探针具有一些独特优点。第一，由于链短，其序列复杂度低，分子量小，所以，和等量靶位点完全杂交的时间比克隆探针短。例如，20nt 的寡核苷酸探针在浓度为 100ng/ml，靶序列为 1~100pg、1kb 片段或 $3 \times 10^{-18} \sim 3 \times 10^{-16}$ mol/L 时，达到最大程度的杂交只需 10min。而用 2kb 的克隆探针在同样条件下达到完全杂交则需 161h。第二，寡核苷酸探针可识别靶序列内 1 个碱基的变化，因为短探针中碱基的错配能大幅度地降低杂交体的 T_m 值。第三，一次可大量合成寡核苷酸探针 (1~10mg)，使得这种探针价格低廉。与克隆探针一样，寡核苷酸探针能够用酶学或化学法修饰以进行非放射性标记物的标记。尽管克隆探针较特异，但通过细心筛选序列和 / 或选择相对长的序列 (>30nt) 亦可设计出非常特异的寡核苷酸探针。最常用的寡核苷酸探针有 18~30 个碱基，目前的合成仪可有效地合成至少 100 个碱基的探针。下面是筛选寡核苷酸探针的一些原则。

(1) 长 18~50nt，较长探针杂交时间较长，合成量低；较短探针特异性会差些。

(2) 碱基成分：G+C 含量为 40%~60%，超出此范围则会增加非特异杂交。

(3) 探针分子内不应存在互补区，否则会出现抑制探针杂交的“发夹”状结构。

(4) 避免单一碱基的重复出现 (不能多于 4 个)，如 -GGGGG-。

(5) 一旦选定某一序列符合上述标准，最好将该序列与核酸库中核酸序列比较。探针序列应与含靶序列的核酸杂交，而非靶区域的同源性不能超过 70% 或有连续 8 个或更多碱基的同源，否则，该探针不能用。

按上述原则选出的探针会大大增加成功的机会。选定后进行合成与标记，并摸索合适的

杂交条件。

二、杂交率

传统杂交率分析法赖以 DNA 复性的研究, 这种情况下, 探针和靶链在溶液中的浓度相同, 而现代杂交实验无论是液相杂交还是固相杂交均在探针过剩的条件下进行。实际上, 固相杂交中靶序列不在液相, 故其浓度不能精确计算。因此, 本文不讨论通常用于杂交反应的传统二级速率公式, 而叙述一级动力学公式。

在探针过量的条件下, 杂交率主要依赖于探针长度(复杂度)和探针浓度。下面列出的公式适用于过剩单链探针对靶序列杂交的情形, 双链探针开始时(1~4h), 杂交动力学相同, 但长时间杂交后, 由于探针本身的复性, 可用于杂交的探针浓度会逐渐降低。公式(1.1)可用于估计半数探针与固定靶序列杂交所需的时间。

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{KC} \quad (1.1)$$

t = 保温(杂交)时间(s); K = 形成杂交体的速率常数[mol / (L · nt · s)]; C = 溶液中的探针浓度(mol / L)。速率常数 k 决定于探针长度(L)、探针复杂度(N)、温度、离子强度、粘度和 pH。不含重复序列的探针, $L = N$ 。例如, 对一个含两个 20nt 序列的 40mer 探针而言, $L = 40$, $N = 20$ 。 K 与这些变量的关系为:

$$Kn = 3.5 \times 10^5 \quad K = \frac{KnL^{0.5}}{N} \quad (1.2)$$

Kn 是缔结常数, $Kn = 3.5 \times 10^5$ 。 Na^+ 浓度为 0.4~1.0mol / L, pH5~9 和杂交温度低于探针-靶序列杂交体 T_m 值 25℃ 时。公式(1.1)和(1.2)可合并为(1.3), 用于计算半数探针与靶序列的杂交率(以秒计)。

$$t_{1/2} = \frac{N \ln 2}{3.5 \times 10^5 (L^{0.5}) C} \quad (1.3)$$

对一长 500 个碱基探针而言, 此值为:

$$t_{1/2} = \frac{500(0.693)}{3.5 \times 10^5 (22) 6 \times 10^{-10}} = 75\,000s \text{ 或 } 20h$$

长 500 个碱基的探针杂交时间很长(20h), 应用短探针和使用杂交促进剂有其优越性(见下文)。由于实际应用的探针长度变化较大(对 > 1kb 的探针, 因扩散与粘度效应不可能使因素 L 得到合适的补偿), 另外, 固定靶序列也不可能都用于杂交, 所以, 由公式(1.3)预计的随探针长度增加的杂交率不一定总是正确的。

三、探针浓度

总的来说, 随探针浓度增加, 杂交率也增加。另外, 在较窄范围内, 随探针浓度增加, 敏感性亦增加。依我们的经验, 要获得较满意的敏感性, 膜杂交中, ^{32}P 标记探针与非放射性标记探针的用量分别为 5~100ng / ml 和 25~1 000ng / ml, 而原位杂交中, 无论应用何种标记探针, 其用量均为 0.5~5.0μg / ml。探针的任何内在物理特性均不影响其使用浓度, 但受不同类型标记物和固相支持物的非特异结合特性的影响。

四、严格性

影响杂交体稳定性的因素决定着杂交条件的严格性。因为在低于杂交体 T_m 值 25℃ 时杂

交最佳，所以，首先要根据公式 (1.4) 计算杂交体 T_m 值。由此式可见，通过调节盐浓度、甲酰胺浓度和杂交温度可控制所需的严格性。对用 20 个碱基以上的探针做 DNA: DNA 杂交的 T_m 值计算如下：

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6 \log \text{mol/L} + 0.41(\text{G}+\text{C}\%) - 500/n - 0.61(\text{甲酰胺}\%) \quad (1.4)$$

n = 杂交体中最短链的长度。因此，对一个 G+C 为 42% 的 500 个碱基探针于 $5 \times \text{SSC}$ (0.75mol/L Na^+) 和 50% 甲酰胺中杂交的 T_m 值为：

$$T_m = 81.5 + (-2.07) + 17.22 - 1 - (30.5) = 65^\circ\text{C}$$

$$T_{\text{杂交}} = 65^\circ\text{C} - 25^\circ\text{C} = 40^\circ\text{C}$$

影响 T_m 值的其它因素：

(1) 对克隆或合成探针而言，同源性每下降 1%， T_m 值就降低 1.5°C ，15~150 个碱基的寡核苷酸探针的这种作用更明显。

(2) RNA: DNA 杂交体的 T_m 值较同样 DNA: DNA 杂交体的高 $10 \sim 15^\circ\text{C}$ 。

(3) RNA: RNA 杂交体的 T_m 值较同样 DNA: DNA 杂交体的高 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 。

显然，当用 RNA 探针或以 RNA 为靶序列时，要使用甲酰胺来降低 T_m 值以保证合适的杂交温度。当以克隆的探针进行膜杂交时，在最后的漂洗步骤中应达到最严格的条件。对一个 500 个碱基探针而言，典型最终漂洗条件为 $0.1 \times \text{SSC}$ (0.015mol/L Na^+)， 55°C 。代入公式 (1.4) 可得：

$$T_m = 81.5 + (-30.3) + 17.22 - 1 - 0 = 67^\circ\text{C}$$

$$67^\circ\text{C} - 55^\circ\text{C} = 12^\circ\text{C}$$

因此，较 T_m 低 12°C 的漂洗条件比较 T_m 低 25°C 的杂交条件更严格了。

对寡核苷酸探针而言，杂交温度往往低于 T_m 值 5°C ，因此，对一个 G+C 为 50% 的 30nt 寡核苷酸探针来说， T_m 值为：

$$T_m = \frac{81.5 + (-30.3) + 20.5 - 500}{30 - 0} = 55^\circ\text{C}$$

$$T_{\text{杂交}} = 55^\circ\text{C} - 5^\circ\text{C} = 50^\circ\text{C}$$

下面一个经典的公式适于 14~20 个碱基的寡核苷酸探针：

$$T_m = 4^\circ\text{C}(\text{G}+\text{C}) + 2^\circ\text{C}(\text{A}+\text{T})$$

实际应用中，寡核苷酸探针的最佳杂交温度必须精确确定。最方便的一种方法是制备一张含不同稀释度靶 DNA 和非特异靶 DNA (如鲑鱼精或大肠杆菌 DNA) 的膜。在不同温度下使膜与探针杂交，特异靶结合探针信号很强而非特异靶序列与探针无任何反应的温度就是最适温度。在某些条件下，可用二甲亚砜 (DMSO) 代替甲酰胺来降低 T_m 值。

在一个以上的探针 (如夹心杂交) 系统中，估计 T_m 值更复杂。可用上述公式估计每一探针的 T_m 值，然后求其均值作为杂交温度。

五、杂交促进剂

隋性多聚体可用来促进 250 个碱基以上的探针的杂交率。对单链探针可增加 3 倍，而对双链探针、随机剪切或随机引物标记的探针可增加高达 100 倍。而短探针不需促进剂，因

其复杂度低和分子量小，短探针本身的杂交率就高。

硫酸葡聚糖是一种广泛用于较长双链探针杂交的促进剂。这是一种多聚胺，平均分子量为 500 000，使用终浓度为 5%~10%。使用该分子的缺点是因分子量大而引起溶液粘度大大增加。另一种常见促进剂是聚乙二醇 (PEG)，其分子量小(6 000~8 000)、粘度低，价格低廉，但它不能完全取代硫酸葡聚糖。根据我们的经验，在某些条件下 5%~10%硫酸葡聚糖效果较好，若用 5%~10%PEG 则可产生很高的本底。因此，使用促进剂时有必要优化条件。另一种多聚体促进剂是聚丙烯酸，用其钠盐，浓度为 2%~4%。与硫酸葡聚糖相比，其优点是价格低廉，粘度低 ($MW=90\ 000$)。

酚和硫氰酸胍也能促进杂交率，但它们不是多聚体。它们可能通过增加水的疏水性和降低双链和单链 DNA 间的能量差异而发挥作用。酚作为杂交促进剂，只能在低 DNA 浓度的液相杂交中观察到，该方法曾被称为酚乳化复性技术。该法不能用于固相杂交，因酚可引起核酸与膜的非特异吸附作用，即使在液相杂交中的应用也是有限的。而硫氰酸胍可通过降低双链 DNA 的 T_m 值而起作用。此外，该分子还可以促进 RNA 的杂交，有裂解细胞和抑制 RNase 的作用。总之，硫酸葡聚糖和聚乙二醇是最常用的杂交促进剂，这可能是由于它们能用于固相杂交之故。

第三节 核酸探针的应用

一、重组 DNA 实验技术

重组 DNA 技术与多种不同杂交方法的结合可使核酸探针在该领域内广泛应用。例如重组菌落和噬菌体空斑的筛选，用 Southern 印迹或狭缝印迹杂交筛选重组质粒等均为靶过量杂交的实例。在这种条件下，采用低探针浓度和短杂交时间，因此时评价探针特异性较其敏感性更重要。Southern、Northern 和狭缝印迹杂交均为探针过量杂交的实例，此时高浓度探针和过夜杂交可获得最高的敏感性。靶 RNA 过量杂交亦有应用，如用 S1 核酸酶法绘制 RNA 转录物的图谱。

二、细菌的检测

许多杂交方式都可用于细菌的检测 (表 1-1)。许多实验室研究都用膜杂交，而市售探针试剂盒多采用新的杂交方式以获得高敏感性，速度快，方便以及受专利保护。这些杂交方式和探针标记以及检测方法见本书有关章节。

表 1-1 核酸探针检测特定细菌感染举例

研制公司	靶序列	杂交类型	杂交方式	标记物	敏感性
Research Lab	结核杆菌基因组 DNA	滤膜探针过剩	直接	^{32}P	10^6 个细菌
Gen-probe	肺炎支原体 rRNA	试管	液相杂交, HAP 吸附	^{125}I	40pg rRNA, 2 500 个菌体
	淋球菌 rRNA	试管	液相杂交, 磁珠吸附	吖啶荧光(发光)	25pg rRNA, 1 500 个菌体
Chiron	淋球菌质粒 DNA	微孔板	夹心杂交, 3 个检测 探针, 1 个捕获探针	AP(发光)	50 000 个菌体
Orion	衣原体基因组 或质粒 DNA	探针过剩	夹心杂交	^{32}P	10^5 个分子
Miles	大肠杆菌和枯 草杆菌 rRNA	磁珠固化探针	直接	AP(显色)	500 个菌体

表 1-1 中许多实验是以 rRNA 为靶核酸的。因为每个菌体有 10^4 个 rRNA 拷贝，检测 rRNA 较检测单基因拷贝的敏感性大大提高了。另外，rRNA 以单链形式存在于胞浆中，杂交前不需变性步骤。另一种自然扩增的靶序列是质粒携带的基因（耐药基因等），如可用 β -内酰胺酶基因检测抗青霉素的淋球菌。DNA 探针也常常用来鉴定菌落，这种情况下主要是强调其特异性。例如，产肠毒素大肠杆菌的鉴定以区分产 ST 和产 LT 以及不产毒素的菌株。核酸探针也可通过核酸（毒素基因或 rDNA）多态性来精确鉴定菌株。

三、病毒的检测

病毒内无自然扩增的序列，必须用其他手段来达到最高检测敏感性。表 1-2 列出了一些例子。一种方法是通过原位杂交直接感染细胞。当病毒复制时，每一细胞都含有成百上千个病毒颗粒。某些情况下，原位杂交的敏感性可满足临床标本中病毒的直接检测，如宫颈活检标本中人乳头瘤病毒（HPV）的检测。另外，此法也可用于培养物的鉴定。

表 1-2 核酸探针检测特异病毒感染举例

研制公司	靶序列	杂交类型	杂交方式	标记物	敏感性
Research Lab	CMV DNA	膜杂交,探针过剩	直接	^{32}P	10^6 病毒颗粒
Enzo Biochem	CMV DNA	原位,探针过剩	直接	生物素(显色)	1 个感染细胞,200~500 拷贝
Molecular	CMV DNA	原位,探针过剩	直接	AP(显色)	感染细胞,500~1 000 拷贝
Biosystems	轮状病毒 RNA	膜,探针过剩	直接	AP(显色)	10^6 拷贝
ENZO	HPV DNA	原位,探针过剩	直接	生物素(显色)	1 个感染细胞,200~500 拷贝
Gene-Trak	HIV-1 RNA	磁珠	夹心,捕获	^{125}I	1 000 个细胞
Abbott	HBV DNA	试管和柱层析, 探针过剩	直接	^{125}I	0.1pg, 60 000 个分子

另外一种直接检测临床标本中病毒的方法依赖于用 ^{125}I 高活性标记探针 ($> 10^9 \text{cpm} / \mu\text{g}$)。虽然这种高能量的放射性同位素可提供高敏感性的要求，但是它半衰期短，使用者会受相当剂量的放射照射。第三种杂交方式是应用大量二级分支探针和四级酶标探针以使探针扩增和信号放大。

另外，应用靶或探针扩增技术，可使探针或靶序列扩增 10^6 倍，使检测相对简单。但这些方法又存在污染与高本底的问题，有关技术细节请参考本书第七章。

四、哺乳动物核酸序列分析

多数情况下是通过 Southern 印迹杂交分析哺乳动物基因组序列的。结果常常是检测特异大小的限制片段。除检测特异基因外，该法还可提供特异基因两侧序列的信息，如限制位点的突变。用 DNA 指纹图谱分析来决定亲本或比较细胞系是将细胞 DNA 用特定限制性核酸内切酶消化，电泳分离不同大小的带并印迹硝酸纤维素或尼龙膜。再以特异重复序列探针与膜上 DNA 杂交，显影或显色后可观察到该重复序列的多态性——即指纹图，其带型是特异的，可精确地比较人和许多其他哺乳动物 DNA 标本。

现已有 4 000 多个克隆的人 DNA 序列，其中包括 1 000 个不同蛋白编码序列，假基因序列、重复序列和未定性的 DNA 片段。用这些可能的人类杂交探针，可以精确地分析人类基因组的某些区域。若将靶序列扩增技术与等位基因特异寡核苷酸探针相结合可以快速分析

微量 DNA, 这种结合已成功地用于 HLA 基因的分析。

(林万明 杨瑞馥)

参 考 文 献

- (1) Amasino RM, et al. *Anal Biochem* 1986; 152:304.
- (2) Dular R, et al. *J Clin Microbiol* 1988; 26:1086.
- (3) Eisenach KD, et al. *J Clin Microbiol* 1988; 26:2240.
- (4) Saiki RK, et al. *Science* 1988; 239:487.
- (5) Schmidtke J, et al. *Nucleic Acid Res* 1988; 16:403.
- (6) Urdea MS, et al. *Gene* 1988; 61:253.
- (7) Varshney U, et al. *Nucleic Acid Res* 1988; 16:4162.
- (8) Yogev D, et al. *J Clin Microbiol* 1988; 26:1198.

第二章 核酸样品的制备

杂交技术为检测特异基因和分析基因功能提供了有效手段。重组 DNA 技术和核酸化学合成方法的进展使人们能随意地制备特异核酸探针。该技术已广泛用于病毒、细菌和寄生虫感染的诊断，人类遗传病和癌症的检测以及法医学上的案例分析。上述应用中所需的核酸可以从血液、唾液、尿、粪便、鼻咽分泌物、组织及其它来源的样品中制备。根据杂交方法不同，样品的制备方法也不相同。如，斑点杂交可以应用核酸粗制品，若用放射性标记探针进行初筛，可以使用含蛋白和其它污染物的粗制样品。若用于逆转录反应，PCR 或非放射性标记探针则需较纯的核酸，样品中应没有蛋白质、脂类、碳水化合物和其他细胞杂质的污染。应用纯核酸制品也会增加检测的敏感性。总之，核酸样品的制备是核酸杂交技术应用过程中的第一步，对检测成功与否影响很大。

第一节 核酸的提取与沉淀

最常用的核酸提取法是以有机溶剂(如酚和氯仿)对核酸和蛋白质的不同变性作用为基础的。经酚提取并离心后，样品中的蛋白质成分就变性，成为不可溶状态，而核酸仍在水相中。从洗下的纯细胞中提取核酸较容易，而从组织中提取核酸则需预处理步骤。在培养瓶中吸附培养的细胞可用 PBS 洗下，经胰蛋白酶消化后离心收集。用 SDS 和蛋白酶 K 处理有助于细胞和细胞核的裂解，释放出与染色质紧密结合的 DNA。然后，用酚-氯仿-异戊醇混合液提取，这种混合物较直接用酚提取蛋白变性效果更佳，且有利于 RNA 的稳定。离心后，含一些蛋白质和脂质的酚层为下层，而上层水相中含有核酸，变性的蛋白质在中间形成一不溶层。需注意的是，当提取浓缩的盐溶液(如 CsCl 液)时，上述分层可能正好相反！如果在酚相-水相间的不溶蛋白层较厚，说明核酸提取不完全。需要再提取水相，有时还要再提取中间变性蛋白层。提取后，必须用氯仿-异戊醇(24:1, v/v)混合液提取水相以除去残存的酚。最后，用乙醇沉淀 DNA，此步亦可除去残存的氯仿。

在某些情况下，如 Southern 印迹，基因组分析和克隆中，均需要高分子量(>10kb)的 DNA 分子。此时，在提取和转移 DNA 上清液时尤应小心以防机械剪切力使 DNA 断裂。所有混合步骤均应轻柔摇匀，用大口吸管转移 DNA 上清液。提取后，可用冷乙醇沉淀 DNA，以玻璃棒搅出大分子量 DNA。乙醇沉淀后，DNA 应缓慢溶于 TE 缓冲液中。该法使 RNA，低分子量 DNA 和 DNA 片段留在上清液中，仅搅出大分子量的 DNA 分子。

在检测 DNA 片段和狭缝杂交中则不需要高分子量的 DNA。提取时可以剧烈振摇，这样可以提取完全并节约时间。提取液需经 RNase 处理以防凝胶电泳中 RNA 对小分子 DNA 的干扰以及 UV 吸收定量时的错估。

下面的程序适于少量细胞($5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7$)的提取，在微量离心管中容易操作。对大量细胞的提取，可按下述方法中各液的加量成比例增加。

一、DNA 的酚提取

酚具有腐蚀性，可腐蚀皮肤，经皮肤吸收后对人体有毒。故操作时应在通风橱中进行，

并戴手套、安全镜，穿好工作服。只使用玻璃或聚丙烯管或吸头，按有毒物操作规程处理酚和氯仿废物。

1. 试剂

- (1) 磷酸盐缓冲盐水(PBS 见附录 A)。
- (2) 细胞裂解缓冲液：10mmol/L Tris·HCl, pH7.4; 10mmol/L NaCl; 10mmol/L EDTA。
- (3) 10% SDS。
- (4) 25mg/ml 蛋白酶 K, 分装-20℃保存。
- (5) 酚：氯仿：异戊醇 (25:24:1), 见附录 A。
- (6) 氯仿：异戊醇 24:1。
- (7) TE 缓冲液: 10mmol/L Tris·HCl, pH7.6; 1mmol/L EDTA。

2. 方法

- (1) 用 1~10ml 冷 PBS 洗新培养的细胞一次, 1 000 r/min 离心 10min。
- (2) 弃上清, 用裂解缓冲液悬浮细胞, 使之浓度为 1×10^8 个/ml, 至少应用 100 μ l 裂解缓冲液。
- (3) 加入 SDS 至终浓度 1%。如果悬浮细胞前就加入了 SDS, 则细胞会集结成块, 不易分散, 会使 DNA 产量降低。尤其在大于 10^7 个细胞时, 这种现象会更加明显。
- (4) 加入蛋白酶 K 至终浓度 200 μ g/ml。
- (5) 在轻轻振荡条件下, 50℃保温 1h 或 37℃过夜。
- (6) 用等体积酚：氯仿：异戊醇混合液提取, 10 000 r/min 离心 10min。
- (7) 吸出水相至另一新管中。如中间变性蛋白层较厚, 再加入 1/4 体积裂解缓冲液至含酚和中间层的管中, 如上步骤再提取一次, 合并两次的水相。
- (8) 加入等体积氯仿：异戊醇提取, 10 000 r/min 离心 10min。
- (9) 将含 DNA 的水相转移至另一新管中。

二、DNA 的乙醇沉淀

在 DNA 用于酶学反应或点膜前, DNA 液中残存的酚和氯仿必须除去。最常用的方法是在高盐条件下用冷乙醇沉淀核酸。沉淀的核酸用离心法收集。沉淀片用 70%乙醇洗可除去残存的盐离子, 盐离子的存在增加了 DNA 间的排斥力, 使之不易溶解, 并可抑制酶反应。

当沉淀少量 DNA (<1 μ g) 或 DNA 稀释液 (10 μ g/ml) 时, 加入 3 倍体积的无水乙醇, 在干冰上放置 1h 或 -20℃过夜后再离心。离心应在 4℃进行, 转速越高越好, 离心时间一般为 15~20min。少量 DNA 亦可通过载体核酸的协同沉淀来有效地回收。在加乙醇前就应加入载体核酸, 而且该核酸的存在不影响杂交实验。需注意的是 tRNA 可抑制某些酶反应。

下述沉淀方案适于少量 DNA 液的沉淀, 大量 DNA 液沉淀可在 15~50ml 聚丙烯管内进行。

1. 试剂

- (1) 2mol/L 醋酸钠, pH6.5。
- (2) 冷无水乙醇。