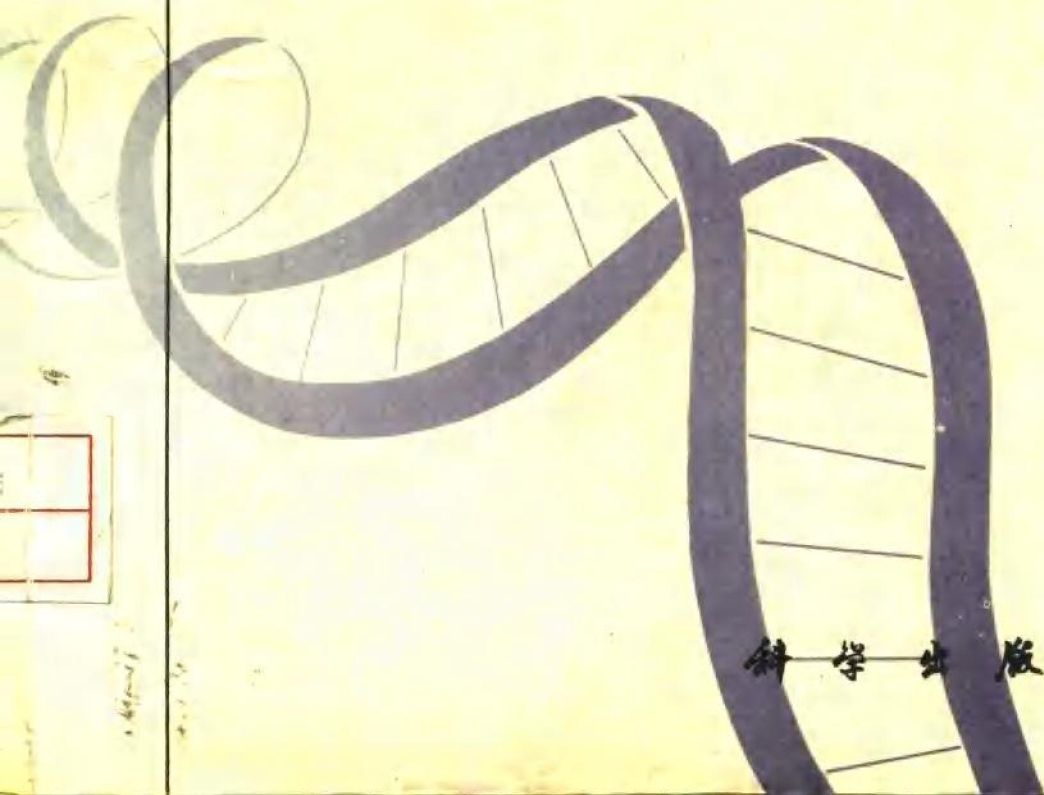


DNA

探针技术

(美) G. H. 凯勒 M. M. 马纳克 著



科学出版社

172F 103

DNA 探 针 技 术

[美] G. H. 凯勒 M. M. 马纳克 著
孙士勇 汪 洛 邹 卫 王培京 译
张 廼 衡 校

科 学 出 版 社



A0011989



(京)新登字 092 号

内 容 简 介

本书系统地介绍了核酸的杂交技术。全书共分六章。主要阐述核酸杂交的理论和背景知识,样品的制备,探针的放射性标记和非放射性标记,杂交方式和检测过程以及靶分子和探针的扩增等等。详述了与核酸杂交有关的实验方法、操作技术和注意事项。

这是一本系统而全面的手册,可供基因工程、分子生物学、遗传学、基础医学和临床工作者,以及高等院校有关专业师生参考。

G. H. Keller M. M. Manak

DNA PROBES

Stockton Press, 1989

DNA 探针技术

〔美〕G. H. 凯勒 M. M. 马纳克 著

孙士勇 汪 洛 邹 卫 王培京 译

张迺衡 校

责任编辑 赵甘泉

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100707

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1992 年 9 月第 一 版

开本:787×1092 1/16

1992 年 9 月第一次印刷

印张:13

印数:1-0 000

字数:282 000

ISBN 7-03-003173-3/Q·412

定价:9.60 元

译者的话

分子生物学技术的飞速发展给现代生命科学带来了一场革命,而核酸杂交技术作为分子生物学最基本的技术已广泛应用于生物学、微生物学、遗传学、肿瘤学、病因学、法医学等与基础和临床医学有关的研究领域,为了面对和接受这一挑战,科研人员必须了解和掌握这方面的知识。在这种情况下,一本专门介绍有关核酸杂交技术和实验方法的手册无疑对科研人员将有极大的帮助。我们认为凯勒等著的《DNA 探针技术》一书完全符合这种需要和要求。

本书作者根据自己的实际经验,围绕核酸杂交技术从杂交理论到有关背景知识、各种样品制备方法、探针的放射性和非放射性标记、各种杂交方式和检测方法以及靶分子和探针扩增等方面详细、系统地介绍了有关的技术原理、实验方法及注意事项,并探讨了核酸杂交技术在临床诊断方面应用的可能性。另外,作者还以不少的篇幅介绍了非放射性标记探针的发展现状、应用前景和实验技术。目前现有的关于分子生物学技术的书如《分子克隆》(Molecular Cloning)和《分子生物学实验方法》(Methods in Molecular Biology)则很少包括或涉及这方面的内容。因此,本书不失为一本系统、全面的关于核酸杂交技术的拿来即用的必备实验手册。

感谢北京医科大学生化教研室基因工程研究组的全体同志为本书翻译给予的鼓励和帮助。限于译者水平,敬请读者对书中的不妥之处给予指正。

译者

1992. 1.

前 言

《DNA 探针技术》是适用于从在校本科生到有兴趣发展和使用核酸杂交测定的专业和非专业研究人员的一本指导或参考手册。本手册与同类书有两个方面的区别。首先,我们寄希望本书为一本包括背景知识、经验忠告和特殊实验方法的既紧凑又完整的手册,而不像其它书那样是由不同作者写成的章节合并而成的。其次,本书提供了大量关于非放射性 DNA 探针的信息,而这方面在其它书中很少详述。由于核酸探针作为克隆工具的使用已在以前的工作中广泛涉及,故本书的重点在于探讨这些探针可能的商业应用和诊断应用。

放射性标记核酸探针已广泛应用二十多年了。然而,用非放射性标记物修饰的 DNA 探针则正在变革分子生物学和临床诊断。这不仅是因为可以消除使用放射性同位素本身的一些问题(如污染、运输、半衰期短、检测时间长、记录和监测等),也因为它们通常使用方便而被用于一些不适合用放射性 DNA 探针的测定。这些探针的发展需要分子生物学、生物化学、有机化学、免疫化学和细胞学等技术知识。由于很少有人有精力在这些方面都面面俱到,故在使用时多感到不那么得心应手。本书将在这方面提供有价值的帮助。

尽管标记和检测方法是本书的核心,但其它章节将为那些尚不熟悉核酸杂交测定的人们提供额外的见识和鼓励。对于那些希望了解商品化 DNA 探针测定并可能拿来就用或稍加改变用于特殊目的人员,这些额外材料或信息将使本手册成为一本很有用的参考书。

如果你仅仅想着手进行一个实验(像我们大多数人那样),首先选择一个适合于你特殊样品的标记方法和杂交方式,然后选择一个相应的检测系统。最后根据本书附录中的供应厂家订购这些试剂并进行实验。以后若有时间,则可以阅读本手册的其它部分,以综合理解标记、检测过程和杂交方法的结合应用。你可能会发现一种大大简化你工作的结合方案,或者发现一种你以前从没考虑过的检测核酸的途径。总之,这些都是你的选择。

非常感谢在过去和现在为本书中许多实验方法做出贡献的同事们。C. Cumming, K. Moore 和 C. Overholt 帮助发展非放射性标记技术、检测技术和杂交方法, T. Moore 和 B. Sisson 为原位杂交方法做了大量工作以及 D. P. Huang, D. Petersen 和 M. Fisher 帮助建立基于 PCR 的诊断测定方法。

我们也将感谢帮助我们完成本书的其他人员: S. Dusing 在第三章中付出的辛勤劳动, L. Jagodzinski 对 PCR 引物选择的建议, D. P. Huang 对 PCR 样品制备和条件优化的建议, S. Vogel 打印大部分手稿和 L. Sanders 细心的计算机绘图工作。此外,还要感谢 C. Overholt 对本书的校对和建议,以及出版商 R. Foster 为我们编写和完成此书提供的机会和鼓励。

目 录

译者的话	(i)
前 言	(xi)
第一章 背景知识	(1)
分子杂交技术	(1)
探针-靶分子的相互作用	(1)
杂交技术新进展	(3)
一般原则	(8)
探针选择和特异性	(8)
杂交速率	(8)
探针浓度	(10)
严格性	(10)
杂交促进剂	(11)
应用范围	(12)
重组 DNA 实验室技术	(12)
细菌检测	(12)
病毒检测	(13)
哺乳类序列	(14)
参考文献	(15)
第二章 样品制备	(20)
引 言	(20)
核酸的提取与沉淀	(20)
方法 2.1 DNA 的苯酚抽提	(21)
乙醇沉淀	(22)
方法 2.2 DNA 的乙醇沉淀	(22)
高分子量 DNA 的乙醇沉淀	(23)
方法 2.3 缠绕法分离高分子量 DNA	(23)
乙醇沉淀的替代方法	(24)
DNA 产率及纯度的测定	(24)
血液 DNA 的提取	(24)
方法 2.4 肝素化全血中单核淋巴细胞的分离	(25)
血液白细胞核的快速分离	(26)
血清 DNA 的提取	(26)
方法 2.5 人血清中 HBV DNA 的提取	(26)
组织 DNA 的提取	(27)
方法 2.6 新鲜或冰冻组织 DNA 的提取	(28)

方法 2.7 从石蜡包埋的组织中提取 DNA	(28)
细菌 DNA 的提取	(29)
方法 2.8 细菌细胞 DNA 的提取	(29)
RNA 的提取	(30)
RNA 操作注意事项	(30)
氧钒核糖核苷复合物-苯酚抽提法	(30)
方法 2.9 氧钒核糖核苷复合物(RVC)的制备	(31)
方法 2.10 细胞浆 RNA 的分离	(31)
利用异硫氰酸胍分离 RNA	(32)
方法 2.11 异硫氰酸胍分离 RNA 的方法 I	(33)
方法 2.12 异硫氰酸胍分离 RNA 的方法 II	(34)
方法 2.13 胍-氯化锂抽提 RNA 的方法	(35)
方法 2.14 多聚(A ⁺)RNA 的纯化	(36)
其它来源样品核酸的提取	(37)
粪便	(37)
方法 2.15 粪便标本的制备 I ——DNA 的提取	(38)
方法 2.16 粪便标本的制备 II ——直接斑点印迹法	(38)
尿液	(39)
方法 2.17 尿样 CMV 的提取	(39)
其它样品	(40)
原位杂交所用细胞和组织的制备	(41)
封固细胞或组织之前载玻片的预处理	(41)
方法 2.18 载玻片的酸洗	(42)
方法 2.19 用 APES 预处理载玻片	(42)
方法 2.20 用聚 L-赖氨酸预处理载玻片	(42)
用于原位杂交细胞的制备	(43)
用于原位杂交细胞的固定	(43)
方法 2.21 乙醇:乙酸固定	(43)
方法 2.22 4% 副甲醛固定	(44)
方法 2.23 载玻片的福尔马林固定	(44)
用于原位杂交的组织制备	(45)
方法 2.24 冷冻组织切片的制备	(45)
方法 2.25 组织的福尔马林固定与石蜡包埋	(46)
染色体原位杂交	(46)
方法 2.26 中期扩散相的制备	(47)
方法 2.27 吉姆萨(Giemsa)分带	(47)
参考文献	(48)
第三章 放射性标记方法	(52)
引言	(52)
一般原则	(52)

通过酶学修饰标记 DNA	(55)
DNA 的缺口平移	(55)
方法 3.1 通过缺口平移用放射性核苷酸标记 DNA	(56)
DNA 酶 I 消解作用的优化	(57)
通过随机引物标记 DNA	(57)
方法 3.2 通过随机引物法用放射性核苷酸标记 DNA	(59)
从 M13 模板合成探针	(60)
放射性标记的 RNA 探针	(61)
方法 3.3 ^{35}S 标记 RNA 探针的转录	(62)
寡核苷酸探针	(63)
由寡脱氧核苷酸模板产生 RNA 探针	(63)
方法 3.4 从合成的单链寡核苷酸转录 [^{35}S]RNA 探针	(63)
“接尾”寡核苷酸探针的制备	(64)
方法 3.5 利用末端脱氧核苷酸转移酶进行寡核苷酸接尾	(65)
寡核苷酸 5' 端的标记	(65)
方法 3.6 用 T4 多聚核苷酸激酶标记 5' 端	(66)
其它标记方法	(66)
方法 3.7 用 TCA 沉淀法测定比活性	(67)
放射性标记探针的纯化	(68)
凝胶过滤法	(68)
方法 3.8 利用 Sephadex 柱纯化标记探针	(68)
方法 3.9 利用 QuickSpin 柱纯化 DNA	(69)
标记探针的乙醇沉淀	(69)
方法 3.10 用乙醇沉淀纯化标记探针	(69)
方法 3.11 变性聚丙烯酰胺凝胶	(70)
疏水层析—Nensorb 柱	(71)
方法 3.12 用 Nensorb 柱纯化克隆的 DNA	(71)
方法 3.13 三苯甲基寡核苷酸探针的纯化	(72)
参考文献	(73)
第四章 非放射性标记方法	(75)
引言	(75)
酶学修饰	(77)
方法 4.1 通过缺口平移法用修饰的核苷酸标记 DNA	(78)
探针检查	(81)
方法 4.2 靶分子检查条的制备	(81)
方法 4.3 通过随机引物法用修饰核苷酸标记克隆的 DNA	(82)
克隆 DNA 片段的接尾	(82)
方法 4.4 用修饰核苷酸给克隆 DNA 片段接尾	(83)
方法 4.5 8-氨基- γ -ATP(AH- γ -ATP)的合成	(85)
生物素化的 RNA 探针	(86)

方法 4.6 RNA 转录体中生物素核苷酸的掺入	(86)
化学修饰	(87)
用生物素进行化学标记	(88)
方法 4.7 DNA 的光化生物素标记	(88)
用半抗原进行化学标记	(89)
方法 4.8 DNA 的光化 DNP 标记	(90)
方法 4.9A 光化 DNP 的合成	(91)
方法 4.9B DNP-二氨基己烷的合成	(92)
DNA 的连接臂修饰	(93)
方法 4.10 用亚硫酸氢盐和二氨基己烷修饰 DNA	(93)
溴介导的 DNA 修饰	(95)
方法 4.11 用溴和二氨基己烷修饰 DNA	(96)
寡核苷酸探针	(97)
方法 4.12 寡核苷酸探针的酶促接尾	(98)
方法 4.13 氨基-寡核苷酸探针的合成和纯化	(99)
将检测基团加到氨基寡核苷酸上	(100)
方法 4.14 寡核苷酸探针的生物素标记	(101)
酶联反应 I	(102)
方法 4.15 利用均一的双功能连接臂酶标寡核苷酸探针	(103)
酶联反应 II	(105)
方法 4.16 利用非均一双功能连接臂酶标寡核苷酸探针	(105)
参考文献	(106)
第五章 杂交方式和检测方法	(110)
引 言	(110)
滤膜杂交	(111)
斑点印迹杂交	(111)
方法 5.1 DNA 的斑点印迹	(112)
方法 5.2 RNA 的斑点印迹	(113)
胞浆斑点杂交	(113)
方法 5.3 胞浆斑点杂交	(113)
完整细胞的斑点印迹	(114)
方法 5.4 利用斑点印迹快速筛选培养细胞的 DNA 序列	(114)
Southern 印迹杂交	(115)
琼脂糖凝胶电泳	(116)
方法 5.5 琼脂糖凝胶电泳	(116)
方法 5.6 Southern 印迹转移至硝酸纤维素膜	(117)
Southern 转移至尼龙膜	(118)
方法 5.7 DNA 从琼脂糖转移至尼龙膜	(118)
RNA 的 Northern 印迹	(119)
方法 5.8 RNA 的羟甲基汞凝胶电泳和转移条件	(120)

方法 5.9 RNA 的甲醛凝胶电泳和转移条件.....	(121)
菌落和噬斑筛选.....	(122)
方法 5.10 从平板上复制克隆	(122)
方法 5.11 裂解细胞并将 DNA 固定到滤膜上	(123)
滤膜杂交方法.....	(124)
方法 5.12 滤膜与放射性标记探针的杂交	(124)
放射自显影	(125)
方法 5.13 放射自显影	(126)
滤膜的再探测	(126)
方法 5.14 从滤膜上洗脱放射性标记的探针	(127)
非放射性滤膜杂交条件	(127)
方法 5.15 非放射性探针的一般滤膜杂交条件	(127)
半抗原检测	(129)
方法 5.16 滤膜上半抗原标记探针的比色检测	(129)
生物素检测	(130)
方法 5.17 滤膜上生物素标记探针的一步法比色检测	(130)
替代方法	(131)
方法 5.18 滤膜上生物素标记探针的两步法比色检测	(131)
化学发光检测	(132)
方法 5.19 滤膜的化学发光检测	(132)
过氧化物酶的检测.....	(132)
碱性磷酸酶的检测.....	(133)
方法 5.20 尼龙膜上生物素标记探针的去除	(133)
原位杂交.....	(133)
方法 5.21 用 Denhardt 溶液预处理载玻片	(135)
方法 5.22 使用非放射性探针时福尔马林固定、石蜡包埋载玻片的预处理.....	(136)
方法 5.23 使用 ³⁵ S 标记探针的原位杂交	(137)
预杂交	(137)
杂交	(137)
杂交后处理	(138)
放射自显影	(139)
载玻片染色	(139)
方法 5.24 杂交后载玻片的苏木精染色	(139)
方法 5.25 使用半抗原或生物素标记探针的原位杂交	(140)
方法 5.26 半抗原标记探针的显色	(141)
方法 5.27 生物素标记探针的显色	(141)
检测溶解的靶分子的杂交方式.....	(142)
亲和捕捉	(142)
均质溶液杂交测定	(143)

夹心式(sandwich)杂交	(146)
方法 5.29 微滴度孔中的夹心杂交	(147)
微滴度孔的准备	(148)
预杂交(8孔)	(149)
夹心杂交	(149)
孔条显色	(150)
其它方式	(153)
参考文献	(154)
第六章 探针和靶分子扩增系统	(159)
引 言	(159)
靶核酸扩增	(159)
聚合酶链式反应	(159)
方法 6.1 用于 PCR 的样品制备方法	(162)
方法 6.2 从全血中快速制备 PCR 样品	(162)
方法 6.3 利用 PCR 酶促扩增靶 DNA	(163)
产物的杂交分析	(163)
基于转录的扩增系统	(165)
探针扩增	(166)
Q β 复制酶系统	(166)
探针网络	(167)
参考文献	(168)
附录 A 试剂	(171)
缓冲液和试剂	(171)
配制方法	(174)
方法 A.1 杂交缓冲液的大量制备	(174)
方法 A.2 用于碱性磷酸酶的 NBT 和 BCIP 底物溶液	(175)
方法 A.3 用于碱性磷酸酶的 INT 和 BCIP 底物溶液	(176)
方法 A.4 用于碱性磷酸酶的坚牢红底物	(176)
方法 A.5 乙酰化牛血清清蛋白(BSA)的制备	(177)
方法 A.6 5 $\times$ 接尾缓冲液的配制	(177)
参考文献	(178)
DNA 换算表	(178)
换算系数	(178)
DNA 的编码能力	(179)
DNA 和 RNA 的定量	(179)
米制前缀	(179)
核苷酸的消光系数	(179)
换算公式	(179)
缩略语表	(180)

附录 B 其它方法	(181)
方法 B.1 兔抗 DNP 抗体的制备	(181)
NHS-氨基己酸-DNP 的合成	(181)
DNP-BSA 的制备	(182)
家兔的免疫	(182)
血清的处理	(182)
方法 B.2 碱性磷酸酶与抗体的结合	(183)
方法 B.3 FITC-二氨基己烷的合成	(184)
方法 B.4 FITC 与 BSA 的偶联	(184)
参考文献	(185)
附录 C 国外厂商地址及产品介绍	(186)

第一章 背景知识

分子杂交技术

探针-靶分子的相互作用

就化学或生物学意义而言，探针是指一种只和某种特异靶分子明显相互作用，并且在这种相互作用后有方法检测到的分子。这些明显而且特异的探针-靶分子相互作用的例子有：抗原-抗体、凝集素-碳水化合物，抗生物素蛋白-生物素、受体-核酸和互补核酸间的相互作用。蛋白质探针（如抗体）仅在少数特定部位通过一系列力即疏水、离子和氢键与其特异靶分子作用。相反，核酸探针则根据其杂交分子的长度不同，可在十个、百个或上千个部位主要通过氢键与其互补链发生作用。疏水键也起一定的作用，这一点可通过用有机溶剂处理降低其杂交分子稳定性加以证明，但可能与特异性关系不大。

碱基配对的特异性在于核苷酸碱基的大小和环中氨基（ $-NH_2$ ）与羧基（ $-COOH$ ）部分的位置（图 1.1）。只有嘌呤-嘧啶配对，才能以合适的氢键距离掺入到双螺旋中。也

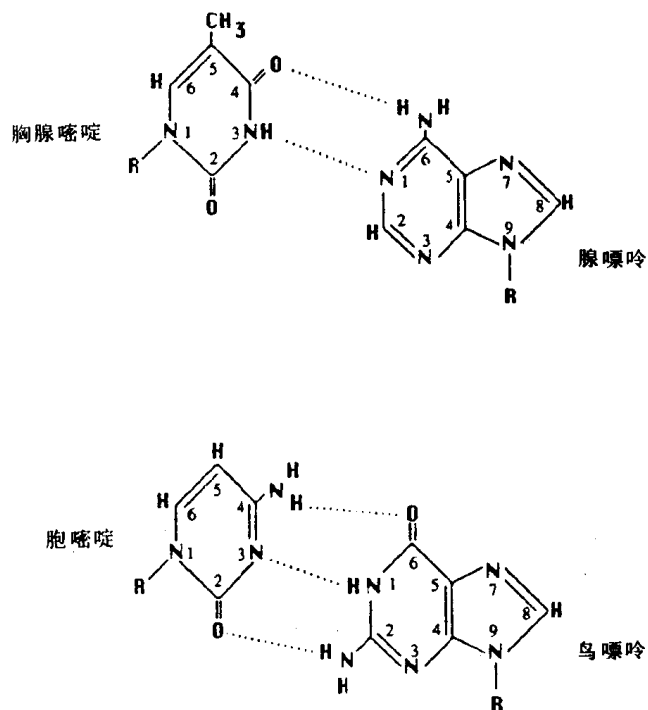


图 1.1 G-C 和 A-T 碱基对间氢键的定位

R 代表脱氧核糖磷酸骨架。

只有鸟嘌呤—胞嘧啶或腺嘌呤—胸腺嘧啶配对才能在适当的位置有氢键形成的区域。嘌呤—嘌呤环配对太大而不适合于双螺旋，嘧啶—嘧啶环配对则距离太远。由于 G 和 C 间形成三个氢键，而 A 和 T 间形成二个氢键，故 G—C 配对要比 A—T 配对稳定。鉴于这种原因，富含 G 和 C 的双链 DNA 比 A—T 丰富的 DNA 有较高的融解温度（需更多能量以解开双链）。图 1.2 表明一些 DNA 中 G—C 含量对融解温度 (T_m) 的影响。 T_m 的计算将在本章“一般原则”中讨论。

对于由单一原子、功能基团或长侧链修饰的核苷酸而言，碱基配对也是可能的，这取决于连接的部位和侧链的性质。这种特性对于理解非放射性核酸探针的设计和将 ^{125}I 化学连接到 DNA 探针上是重要的。能够和核酸碱基偶联的单一原子有汞 (Dale 和 Ward, 1975)、溴 (Jones 和 Woodhouse, 1959) 和碘 (Commerford, 1971) 等。这些元素和嘧啶 (胸腺嘧啶除外) C-5 位或嘌呤 C-8 位发生作用 (图 1.3)。溴也可能和胸腺嘧啶 C-6 位发生作用 (Keller 等, 1988)。

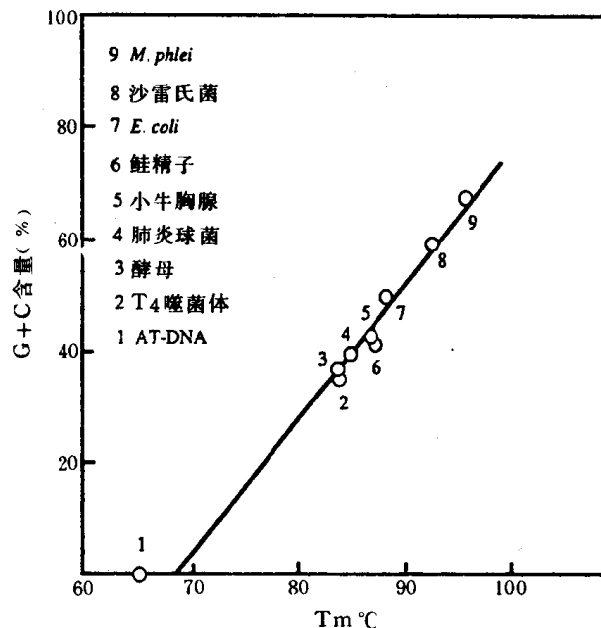


图 1.2 G—C 含量对融解温度的影响。不同来源的双链 DNA 被加热逐渐升温后，在 260nm 处测定光吸收变化以监测 DNA 的变化 (Marmur 和 Doty, 1959)。

图 1.3 说明了在核酸探针中遇到的 5 个常见碱基上最方便的修饰部位。胞嘧啶和尿嘧啶的 C-5、胸腺嘧啶的 C-6 和腺嘌呤、鸟嘌呤的 C-8 位都是非氢键形成部位，因此也成为有用的连接部位。而胞嘧啶的 N-4 位 (Viscidi 等, 1986) 腺嘌呤的 N-6 位 (Gebeychu 等, 1987) 也是实用的修饰部位，即使它们和氢键形成有关。这种明显差别的原因在于要获得有用的探针，每 1 000 个碱基有必要只掺入 10—30 个修饰的碱基，以对应 4—12% 被其修饰碱基取代的不同碱基 (Keller 等, 1988)。尽管在这种掺入部位可能有弱的或不存在碱基配对，但杂交分子通常还是比较稳定的。一种可避免氢键断裂的方式就是改造探针，然后再克隆到一种载体如 M13 中，以保持插入碱基不被修饰。当用放射性同位素 ^{32}P 和 ^{35}S 标记核酸时，由于同位素掺入在核酸磷酸二酯键“骨架”上，故不存在碱基的修饰。也有可能 5' 末端磷酸区域进行化学修饰 (Chu 等, 1983; Chu 和 Orgel, 1985)，这种修饰对于寡核苷酸探针是最有效的。由于每个探针分子只能引入一个可检测

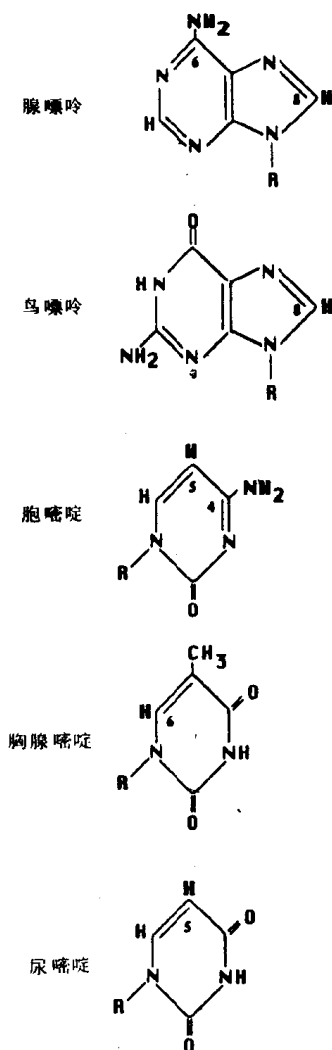


图 1.3 可能的碱基修饰部位。腺嘌呤和鸟嘌呤的 C-8 位、胞嘧啶和尿嘧啶的 C-5 位都可能被修饰而不干扰对碱基的氢键形成。胞嘧啶的 C-4 位和腺嘌呤的 N-6 位修饰后不再形成氢键。

基，故一般来说该部位对于长的克隆探针无多大用处。

利用碱基修饰提高杂交分子的稳定性和特异性也是可能的。2-氨基腺嘌呤可被引入到寡核苷酸杂交探针中，它通过和胸腺嘧啶形成三个氢键（通常为二个氢键）来提高杂交分子的稳定性（Chollet 和 Kawashima, 1988）。此外，次黄嘌呤核苷（I）已被用于代替富含 G-C 的 RNA 探针中的鸟嘌呤（Varshney 等, 1988），以获得更好的杂交特异性。由于 I-C 碱基对仅含二个氢键而非 G-C 对的三个氢键，故可有效地降低杂交分子的 T_m 。而融解温度与杂交温度接近，可增加杂交的严格性，因而也就增加了特异性。

考虑到连接部位的多样性和检测基团与检测系统的多样性，标记一种核酸探针很明显就有多种途径。各种选择将在第三和第四章有关标记方法中详细讨论。

杂交技术新进展

核酸杂交技术基本上以 Hall 和 Spiegelman (1961) 的工作为开端，即探针和靶核酸在溶液中杂交，然后利用平衡密度梯度离心法分离杂交分子。这种方法费时、费力且不准确。Bolton 和 McCarthy (1962) 首先建立了一种简单的固相杂交分析即 DNA-琼脂技术。将变性 DNA 固定在琼脂上，此时的 DNA 不再复性，但能和其它互补核酸序列杂交。一般而言，短的、脉冲标记的 DNA 或 RNA 分子和凝胶上的 DNA 杂交过夜，随后将凝胶加到柱子上，再洗去未结合的探针。结合的探针在高温和低盐条件下被洗脱，所洗脱的放射性与结合的探针量成正比（McCarthy 和 Bolton, 1963）。这种方式也很适合于过量探针饱和杂交实验。另一种早期的努力是分析涉及溶液中 DNA 再结合研究（DNA-DNA 杂交）的细胞基因组，以比较不同来源核酸的复杂性（Britten 和 Kohne, 1968）。这种研究能够进行 DNA 退火作用的详细动力学分析。一般而言，从不同

生物体（细菌、酵母、鱼、哺乳动物）分离 DNA，再利用一种液压腔（hydraulic pressure cell）切割成长度约为 450 个核苷酸的片段。煮沸这种切割后的 DNA 溶液（含 0.12mol/L 磷酸缓冲液或 0.18mol/L Na^+ ）使 DNA 解链，然后冷却至大约 60℃。通过测定数小时到数天内溶液在 260nm 处的光吸收的降低（减色效应）来检测 60℃ 温育过程中互补链的再结合程度。以这种方式就可以比较不同来源 DNA 的再结合速率，并且可以建立序列复杂性（sequence complexity）和动力学复杂性（kinetic complexity）之间的关系。

一种 DNA 分子的序列复杂性可定义为单一序列的总长度，而该分子的动力学复杂性是指其再结合速率的能力。图 1.4 很好地说明了序列复杂性和再结合速率间的关系。将

各种序列复杂性为 1 到 10^9 的 DNA 变性，然后让它们再结合到给定的 Cot 值。再结合程度与 Cot 之间作图，这里 C_0 是起始 DNA 浓度 (mol/L)， t 是温育时间 (秒)。

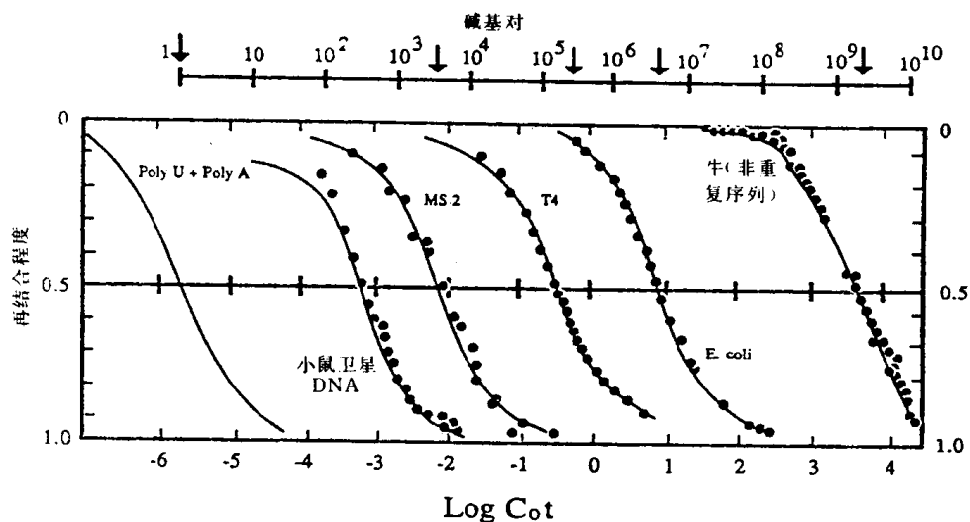


图 1.4 各种 DNA 的再结合速率。来源于小鼠、大肠杆菌、T4 和牛的变性 DNA 在 60°C 于 0.12mol/L

磷酸缓冲液中复性，以 A_{260} 变化与 Cot 值作图。用羟基磷灰石层析法分离牛非重复序

列 DNA。多聚 (U) 的多聚 (A) 的再结合速率估计和 $E. coli$ 的 Cot 曲线以双螺

再结合速率 (reassociation rate) 被定义为 DNA 再结合一半时的 Cot 值或 $Cot_{1/2}$ 。该图说明再结合速率如何与序列复杂性成反比关系。随序列复杂性的增加，再结合速率降低。多聚 (U) : 多聚 (A) 与牛单一序列 DNA 之间的再结合速率相差约 10^9 ，这和序列复杂性上的 10^9 倍差异相平行。

因此，特定 DNA 的 $Cot_{1/2}$ 值就是其动力学复杂性，并与其序列复杂性成反比。动力学成分 (kinetic component) 一词被用于描述在相同细胞浓度时一组不同的序列。一个动力学成分可由单一序列组成，每个细胞有 2 个拷贝；而另一种成分也可能由重复序列组成，每个序列在每个细胞中存在 10—50 个拷贝。仅含一个动力学成分的 DNA 可在两个数量级别的 Cot 值内再结合。这是图 1.4 中所有 DNA 的情况，尚没有曲线超过两个对数 Cot 值。

在图 1.5 的实验中，Britten 和 Kohne (1968) 利用羟基磷灰石层析法研究了非分级牛胸腺 DNA 的再结合。大肠杆菌 DNA 被当作一种含有单一动力学成分的 DNA。羟基磷灰石在低盐条件下特异地结合双链核酸分子；这些分子可用高盐洗脱并通过紫外吸收定量。和测定杂交碱基部分的减色法不同，羟基磷灰石层析法测定杂交的碱基部分，能更准确地评价反应结果。

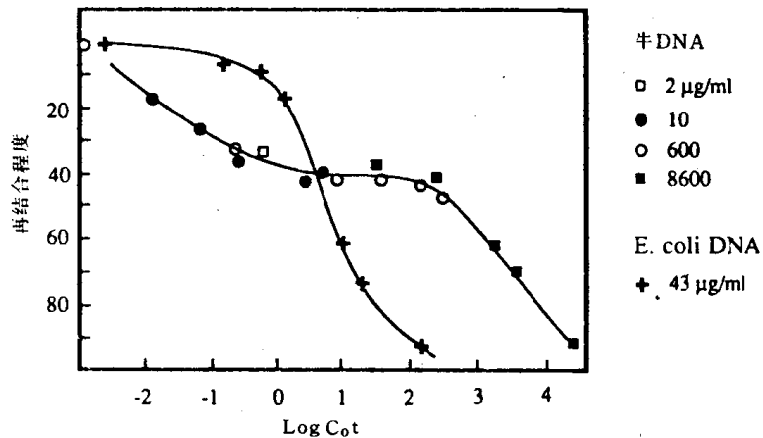


图 1.5 未分级小牛胸腺 DNA 的再结合。反应如图 1.4 所述。用羟基磷灰石层析法监测再结合 (Britten 和 Kohne, 1968)。

该实验表明，未分级哺乳类 DNA 要完全再结合至少需要七个数量级别的 Cot ，以与至少三个动力学成分相对应。这些动力学成分由快速再结合成分（高度重复序列），中速再结合成分（中度重复序列）和一种慢速再结合成分（单一序列）组成 (Davidson 和 Britten, 1973)。这类实验首次暗示哺乳类 DNA 在结构上是不同的，并比微生物 DNA 更复杂。利用现代分子克隆和杂交技术已确定这类成分的有：卫星 DNA（高度重复），Alu 家族序列（中度重复）以及结构或蛋白质编码序列（非重复或单一序列）等。

随后在杂交技术上的进展则和另一种固定杂交过程联系在一起。Nygaard 和 Hall (1964), Gillespie 和 Spiegelman (1965) 以及 Denhardt (1966) 等人的工作使利用标记的 DNA 或 RNA 探针检测固定在硝酸纤维膜上的 DNA 序列成为可能。例如，Brown 和 Weber (1968) 利用这种技术确定了非洲蟾蜍 (*Xenopus*) 核糖体 RNA (rRNAs) 的基因拷贝数。用 [3H] 尿苷代谢性地标记 RNA，以过量探针与结合在膜上的基因组 DNA 杂交。接着用 RNA 酶处理以消解非特异结合的 RNA，再洗膜和计数确定杂交上的探针量。通过计算能和已知量 DNA 杂交的 RNA 的量（从其比活性）就可以确定 rRNA 基因的数目。由于缺乏特异的探针，有些特殊基因的表达不能用此法研究。这些早期的过量探针、膜杂交实验最终导致了现代以膜为基础的分析方法。

许多重要的发展大大促进了杂交技术，这使得分析特殊基因转录产物成为可能，并重新引起人们对动力学杂交实验的兴趣。固定配基如多聚 (U)-琼脂糖和寡聚 (dT)-纤维素使得从核糖体 RNA 中分离多聚 (A)⁺RNA（信使 RNA 即 mRNA 的特征部分）成为可能 (Aviv 和 Leder, 1972)。利用 mRNA 纯化过程可以从总的网状细胞 RNA 中制备一种 α 和 β 珠蛋白 mRNA 的混合物。以这种珠蛋白的 mRNA 制备物用作模板首次合成了一种用于分析珠蛋白的基因表达的特异基因探针 (Weiss 等, 1976)。利用一种寡聚 (dT) 引物和一种依赖 RNA 的 DNA 聚合酶（反转录酶）能制备一种放射性标记的互补 DNA (cDNA) 探针。

由于链特异核酸酶取代了羟基磷灰石层析技术，因此杂交程度的测定就变得更准确。核酸酶使用方便，可使多个反应（时间点）同时进行。而用于分离含量相对丰富的 mRNA (>总 RNA 的 1%) 的物理或免疫技术（蔗糖梯度和聚合体免疫沉淀）与反转录酶的结合，