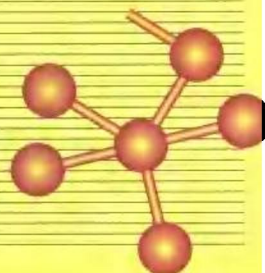
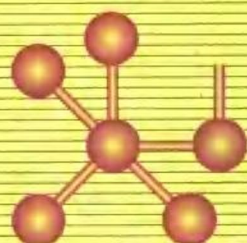


核酸探针的合成、标记及应用

[美] Edge R. Wang 主编
夏令伟



科学出版社

核酸探针的合成、标记及应用

〔美〕 Edge R. Wang 主编
夏令伟

科学出版社

1998

内 容 简 介

本书系统地介绍了核酸的化学合成原理、DNA 自动合成仪、合成 DNA 的纯化方法、核酸探针的制备、非放射性标记及其在医学、生物学、农学、法医学等方面的实际应用和最新进展。

本书图文并茂,实用性强,可供医学、生物化学、分子生物学、法医学、农学等学科有关的研究人员参考,也可作为有关高等学校本科生、研究生及教师的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

核酸探针的合成、标记及应用/[美] Edge R. Wang,夏令伟主编.

-北京:科学出版社,1998.11

ISBN 7-03-006633-2

I. 核… II. ①夏… ②王… III. 脱氧核糖核酸-
生物合成-技术 IV. Q523.03

中国版本图书馆 CIP 数据核字(98)第 07902 号

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

新 世 纪 印 刷 厂 印 刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1998 年 11 月第 一 版 开本:850×1168 1/32

1998 年 11 月第 一 次 印 刷 印张:13 1/2

印数:1 2 400 字数:354 000

定 价: 27.00 元

主 编 [美]Edge R. Wang

夏令伟

副主编 王升启 陈本美

编 委 (按姓氏笔画排)

Edge R. Wang (美国生物技术研究 所, American
Institute of Biotechnology)

王升启(军事医学科学院)

计雅英(Sentinel Biosciences, Inc.)

李志良(湖南大学)

朱宝珍(军事医学科学院)

李景鹏(东北农业大学)

陈本美(湖南医科大学)

陈维多(东北农业大学)

夏令伟(湖南医科大学)

夏 阳(美国休斯顿大学)

前 言

本世纪 80 年代以来,由于 DNA 固相合成自动化方法的建立,人们根据自己的意愿合成各种各样寡核苷酸的梦想变成了现实。将不同的寡核苷酸进行非放射性标记,制成所需的非放射性探针,并广泛地应用在医学、生物学、法医学、农学等科学领域,使这些科学领域获得了惊人的发展,取得了辉煌的成就。如非放射性核酸探针技术在基因分析、疾病诊断、核酸序列分析等方面的应用已成为当今遗传学研究的热点,可以毫不夸张地说:近十年来,这些领域的日新月异,在很大程度上应归功于 DNA 化学合成及探针标记技术的飞速发展。

国内有关科学研究领域中,对于 DNA 化学合成、非放射性核酸探针技术已有所应用,然而,目前国内 DNA 合成仪的生产及有关非放射性核酸探针技术与世界先进水平仍有一定的差距,至今尚没有一本系统介绍这方面知识的专著。为此,本书作者根据当今该方面的进展,结合自己多年在该方面的经验,编成此书,其主要内容是核酸的化学合成、DNA 自动合成仪、合成 DNA 的纯化方法、核酸探针的制备和非放射性标记及其在医学、生物学、法医学、分子生物学及农学等方面的实际应用和最新进展。本书试图避免脱离实际的空谈,又力求克服纯粹描述实验步骤的缺点,希望能达到理论与实际相结合的目的。我们希望本书不论对造诣精深的有关专家,还是对在校学习的研究生和大学生均有所裨益。

本书是中、美学者携手合作编写的,从选材、资料整理到书稿校审,自始至终双方都体现了真诚友好的合作气氛,本书的出版是我们双方友谊的结晶。在编写过程中,得到了美国生物技术研究所有多方面的支持。蒋磊、刘健平二同志作了部分整理工作,在此深表谢意。

书中疏漏与错误之处在所难免,敬请各位专家学者及广大读者赐教指正。

编者

1997. 10

目 录

第一章 DNA 的化学合成方法	(1)
第一节 DNA 合成的化学原理	(2)
第二节 保护脱氧核糖核苷的制备	(30)
第二章 DNA 合成仪的原理及使用	(44)
第一节 硬件系统概述	(44)
第二节 自动 DNA 合成仪的操作要点	(58)
第三节 ABI 3948 DNA 合成与纯化系统	(70)
第三章 合成寡核苷酸的分离和评价	(110)
第一节 粗产品的分析	(112)
第二节 DNA 的 PAGE 分析及纯化	(124)
第三节 高效液相色谱法(HPLC)分析和纯化寡核苷酸	(145)
第四节 寡核苷酸纯化柱芯	(163)
第五节 微量凝胶毛细管电泳分析寡核苷酸	(172)
第六节 DNA 纯化与分析的其他常用方法	(191)
第四章 非放射性核酸探针分析方法基础	(202)
第一节 从植物中分离 DNA	(203)
第二节 从动物细胞中分离高分子量 DNA	(209)
第三节 限制酶消化、凝胶电泳及 DNA 的真空印迹	(216)
第四节 植物 RNA 的分离	(227)
第五节 从动物细胞中分离总的和 PolyA ⁺ RNA	(231)
第六节 凝胶印迹	(237)
第七节 RNA 点印迹	(242)
第五章 核酸探针的制备	(246)
第一节 分离质粒制备探针	(246)
第二节 用地高辛修饰的核苷酸通过 PCR 制备杂交探针	(253)
第三节 随机六核苷酸引发地高辛修饰的核苷酸制备 DNA 杂交 探针	(257)

第四节	多位点和单位点 DNA 小卫星探针 RNA 转录物的地高辛 标记	(260)
第五节	用生物素标记双链 DNA 探针	(264)
第六节	辣根过氧化物酶标记探针的制备	(270)
第七节	用荧光素-11-dUTP 随机引发标记 DNA 探针	(273)
第八节	用荧光素标记寡核苷酸	(280)
第六章	核酸探针的杂交及检测	(284)
第一节	地高辛标记探针的 Southern 印迹杂交及化学发光检测	(284)
第二节	地高辛标记的 RNA 小卫星探针的 Southern 印迹杂交 及染色测定	(289)
第三节	RNA 印迹上地高辛探针的杂交和检测	(296)
第四节	辣根过氧化物酶标记探针的杂交及增强化学发光检测	(301)
第五节	荧光素标记的 DNA 探针的杂交及其增强的化学发光 检测	(307)
第六节	荧光素标记寡核苷酸探针的杂交及其增强的化学发光 检测	(313)
第七章	核酸探针的应用	(320)
第一节	根尖分生组织切段染色体扩展物的制备及其与生物素 标记探针的原位杂交	(320)
第二节	植物材料酶处理扩展染色体的原位杂交	(322)
第三节	生物素标记的探针在植物染色体上的应用	(329)
第四节	荧光色素标记的 DNA 探针与染色体的直接荧光原位 杂交	(334)
第五节	与植物染色体原位杂交的地高辛标记 DNA 探针的检测	(343)
第六节	mRNA 杂交的组织切片及玻片的制备	(350)
第七节	地高辛标记探针检测组织切片中的 mRNA	(355)
第八节	用地高辛核糖探针检测整体鼠胚胎的 mRNA	(362)
第九节	用 DNA 探针和探测杆检测食物中的病原体	(369)
第八章	核酸探针的新进展	(377)
第一节	PACE(探针检测-增强化学发光技术)	(377)

第二节	反转点印迹法	(385)
第三节	RAPD 分析——一种新的基因诊断技术	(396)
第四节	非放射性寡核苷酸探针检测连接酶链反应产物	(401)
第五节	核酸片段扩增(NASBA™)	(410)
附 录 1	本书中应用的缩写及中英文对照	(419)
附 录 2	常用度量单位	(422)

第一章 DNA 的化学合成方法

分子生物学发展到今天,非放射性核酸探针技术已被广泛应用于基因分析、疾病诊断以及序列分析等领域。这在很大程度上应归功于 DNA 化学合成及标记技术的飞速发展。实际应用中的核酸探针,大部分都是通过合成的 DNA 直接或间接制备的。可以毫不夸大地说,DNA 合成的自动化奠定了今天核酸探针发展的基础。为此,在本书的前一部分,我们首先介绍 DNA 合成化学反应、自动合成仪的原理以及合成 DNA 的纯化和分析。

80 年代以来,寡核苷酸固相合成自动化方法的建立已经在分子生物学、生物技术及生物化学领域产生了巨大的影响^[1]。在核酸化学方面的进展很快,包括骨架的修饰、非标准碱基的合成以及在 3' 或 5' 末端上进行非放射性标记^[2]。DNA 序列分析新技术已经完全自动化,聚合酶链反应(PCR)有利于检测和放大很小量的天然 DNA^[3]。对寡核苷酸的全新的富有想象力的修饰及应用,以惊人的速度出现,这显然是核酸化学家非常激动人心的年代。

固相合成的原理早在 50 年代已由 Bruce Merrifield 在洛克菲勒研究所(现在的洛克菲勒大学)建立^[4]。这种简单而独创的技术最开始是用于多肽合成的。Merrifield 将第一个氨基酸固定在不溶的聚合物载体上,然后使其他的氨基酸一个接一个地连接到固定的目标上。在片段终止时,完成的链可以从不溶的聚合物上分开,并进行纯化。历史证明该过程对研究激素、酶和许多多肽商品性药物有着极其深远的意义。由于 Merrifield 工作的影响和贡献,使他获得了 1984 年度的诺贝尔化学奖。固相方法成功合成多肽后不久,该技术就被用于合成寡核苷酸^[2]。在过去的 20 多年中,已经有了许多重要的发展,使得合成脱氧寡核苷酸成为一件非常简单易行的工作^[5,6]。

第一节 DNA 合成的化学原理

在合成 DNA 之前,考虑其结构和化学反应性对以后的化学合成策略很有用。从实践的观点出发,可以将 DNA 的特性总结成几条重要的原则,如果有些读者喜欢查找更全面的资料,请见文献〔7,8〕。

一、DNA 的一级和二级结构

DNA 的一级结构是很熟悉的。它是由磷酸二酯通过 $3' \rightarrow 5'$ 连接的 2-脱氧-D-核糖环的链组成,在糖的 $1'$ 位置以 β 构型带有四种杂环碱基中之一。DNA 的高水溶性是由于存在可离解的磷酸部分以及胞嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤上环外一级氨基,它们对溶剂和其他极性分子有较强的形成氢键的能力。同样的原因,DNA 在有机溶剂和非极性溶剂中是相当难溶的。因此,DNA 的纯化必须在水溶液中进行,其多离子特性可以被离子交换色谱或电泳利用。然而,对于 DNA 的化学合成,必须完全地应用非水条件。要达到这一点,DNA 就必须以修饰的形式制备,磷酸酯和一级氨基都可被化学保护,然后保护基选择性地除去,释放出未修饰的 DNA。

一级氨基形成氢键能力的另一后果是形成二级结构。特别是鸟嘌呤与胞嘧啶,腺嘌呤与胸腺嘧啶之间的特异性碱基配对,可以出现在分子内部(形成发夹环)或分子间(形成双链,DNA 的天然形式)。在这种结构中的另一种稳定力是碱基的堆积,垂直碱基-碱基之间的相互作用,在嘌呤-嘌呤之间的作用特别强。开始合成前,仔细考虑这种结构是非常重要的。

在寡聚脱氧核苷酸的化学合成中,这种二级结构的形成,其主要的困难不是在合成本身,而是在脱保护寡核苷酸的最后纯化。用色谱纯化时,必须应用较强的变性条件(如甲酰胺、尿素),同时提高温度。在某些特殊情况下,只有聚丙烯酰胺凝胶电泳才能分辨寡

核苷酸。而变性剂和高温往往危害到寡核苷酸的具体应用,因而不能用来消除二级结构。高嘌呤含量的寡核苷酸,特别是含有较长的连续鸟嘌呤的寡核苷酸,纯化时需要较强的变性条件^[9]。这是由于这种链在水溶液中有聚集的倾向,特别是在高离子强度溶液中。这种聚集物的结构还不清楚,但它们的稳定性大概是由于碱基之间相互堆积作用,而不是特殊的氢键。因为有关寡聚物(dG)聚集对分子间杂交(涉及许多合成 DNA 应用的特殊链内碱基配对)影响的研究还没有报道,所以最好要避免较长鸟嘌呤的连续排列。

较常见的一个问题是形成不必要的碱基对。估计一下熔融温度 T_m (双螺旋体与单链形式之间转换的中点温度)并与其他双螺旋体的 T_m 值进行比较是很有用的。对于长达 200 个碱基的长链, T_m^{-1} (Kelvin) 大约与 n^{-1} 成正比, n 是寡核苷酸的碱基数。根据这一关系式可得出所谓“Wallace 规则”的经验式,即在高离子强度 ($6 \times \text{SSC}$) 下,对于约 15~20 单位的完整的双螺旋体,每个 dA : dT 为 2K,每个 dG : dC 为 4K。DNA 双螺旋体升高温度 5~10K,可使一个错配的或小的外环不稳定而调整构形。

当寡核苷酸用作杂交探针时,一般最好用计算机寻找与中间宿主 DNA 形成的不必要的双螺旋体。通常可以应用 DNA 测序实验所得资料建立的软件进行研究。在短的双螺旋 DNA 结构中,目视检查通常就足够了。

预测较长的单链寡核苷酸 (>25) 的二级结构是较复杂的,因为可能存在分子内的碱基配对和分子间相当大的或多个外环结构,而且很难准确地定位。

二、DNA 的化学反应性

磷酸二酯氧阴离子和环外一级氨基必须加以化学保护,以增加 DNA 在有机溶剂中的溶解性,因为这些基团是主要的亲核中心,将干扰一个核苷酸脱氧核糖的羟基与另一个核苷酸的磷酸基之间形成核苷酸间键的过程。而且杂环碱基(核碱基)容易进行许

多的化学反应,甚至最弱的氧化剂也能引起腺嘌呤和胞嘧啶形成N-氧化物,或者更严重的破坏。杂环上所有的氮及氧原子都是潜在的亲电进攻部位(嘌呤的N-7位特别容易受到进攻)。这就排除了烷基化反应(除那些有高空间位阻的外),但弱的酰化反应可适当的进行。因此可以用来保护环外氨基。与此相似,杂环上大多数非桥键碳原子都是水解的进攻部位,要避免应用强酸或强碱水溶液,较弱的酸性条件也应排除,因为嘌呤脱氧核苷中的N-C'₁糖苷键是不稳定的(脱嘌呤作用),而且当腺嘌呤和鸟嘌呤被酰基保护时甚至会更不稳定。只有极其弱的酸时,常常是非水溶液的酸才可以应用。相反,DNA不容易受弱碱条件影响,唯一的例外是在高pH时的OH⁻离子使胞嘧啶缓慢脱氨基形成尿嘧啶。而DNA中的磷酸二酯键对酸和碱水解都是相当稳定的。但是,保护的形式(磷酸三酯)是不稳定的。因此,成功合成DNA的关键是在脱保护基时不引起核苷酸间分解。

下面是DNA合成化学反应考虑的适合范围:

- (1)弱碱水解;
- (2)非常弱的酸水解;
- (3)弱亲核置换反应;
- (4)碱催化消除反应;
- (5)某些弱氧化还原反应(如I₂或Ag⁺氧化,Zn²⁺还原性消除)。

但是,这些没有一个被认为是完全安全的。杂环碱基上有如此多的亲核和亲电中心,绝对的专一性实际上是不可能的。通过仔细控制反应条件可以达到适当的选择性,但是主要的原则是反应条件稍微改变(如溶剂、聚合物载体、催化剂)就可以引起副产物量的较大改变。

三、DNA的化学合成

DNA合成的概念非常简单,一个核苷上的活性3'磷酸基团

与另一核苷的 5' 羟基偶联。前者是在溶液中传送的单体。后者被固定在固相载体上,核苷酸间的键因此形成,为了下步偶联,使 DNA 链增长,必须有另外三个化学反应。用这种方法,每完成一个合成循环,就增加一个核苷单体。所需要的序列及长度通过在合成仪上的操作来控制^[10]。当链完成时,粗 DNA(寡核苷酸)必须从载体上切下来,并脱保护。寡核苷酸的合成过程要可靠,并保证有生物活性。本节将帮助读者理解合成的化学过程以及怎样达到这一目的。

寡核苷酸合成的亚磷酰胺方法由于其有效和快速的偶联以及开始物质的稳定性^[11],是大多数实验室选择的方法。合成的 DNA 链连接在载体上,使液相中过量的试剂过滤去掉^[12]。因此,在每个循环间不需要进行纯化。这种载体是一种硅胶形式的控制微孔玻璃(CPG)珠^[13]。颗粒和微孔大小都已被优化,液体传输及其机械强度为最佳。合成循环如图 1-1。开始物质是与固相载体结合的核苷,它将成为核苷酸的 3'-OH 末端。核苷通过一连接臂以 3'-OH 与载体相连。5'-OH 被 -DMTr 基团封闭。

合成循环的第一步是用酸处理衍生的固相载体以除去 DMT 基团(图 1-4)。产生的游离 5'-OH 是为了下步的偶联反应(图 1-6)。同时加入亚磷酰胺核苷单体和弱酸四唑到反应柱中,产生活性的中间体。这一中间体非常活泼,偶联在 30 秒钟内就可以完成。如图 1-6 所示,亚磷酰胺的 5'-OH 被 DMT 基团封闭。

下一步是封闭、终止所有的链,使其不能再加成。因为未反应的链有一个游离的 5'-OH,他们可以通过乙酰化而被终止或封闭。这些未反应的链也被称为“失败产物”(failure products)。封闭是用乙酸酐与 1-甲基咪唑完成的^[14]。因为在前面步骤中与亚磷酰胺反应的链仍被 DMT 基团封闭,所以,它们不受这步的影响。

尽管封闭对于 DNA 合成不是必不可少的,但是,因为封闭缩短了杂质的长度,因此,使他们很容易从最后产物中分离(图 1-7),所以平常还是建议进行封闭。

最后,核苷酸间的键从亚磷酸转变成更稳定的磷酸三酯。碘作

为氧化剂,水作为氧的供体。这些反应都在 30 分钟内完成(图 1-8)。

氧化后,DMT 基团可以用一种质子酸(protic acid,三氯乙酸或二氯乙酸)除去。重复这个循环,直到延伸完成。在这时,寡核苷酸还连在载体上,磷酸酯和碱基 A,G,C(T 没有环外氨基)的环外氨基上带有保护基团。用浓 NH_4OH 处理 1 小时将寡核苷酸从载体上切下。氨处理也可以除去氰乙基磷酸酯保护基。

用 NH_4OH ,55℃处理粗 DNA 溶液除去碱基环外氨基上的保护基(图 1-9)。如果应用标准的亚磷酰胺,脱保护在 55℃需 1 小时,在室温下需 8 小时才能完成。

(一) 固相载体-CPG

392 和 394 型 DNA 合成仪应用固相合成法,在反应中,所有的试剂和溶剂都流过合成柱内的载体,增长的 DNA 链一直与不溶的载体共价结合。

用于 DNA 合成的载体是控孔玻璃(CPG)^[7]和聚苯乙烯。当应用珀金-埃尔默产 392/394 型 DNA 合成仪及其试剂时,通过测量 DMT 阳离子所估计,载体产生大约 98%的偶联效率。这使寡聚体的合成在长度上达到 175 个碱基^[14]。CPG 是一种多孔非膨胀的颗粒,颗粒直径大约 150 μm ,孔径 500 Å。大孔 CPG 载体(1000 Å)也可用于合成 60 个碱基以上的寡核苷酸^[15],聚苯乙烯^[16]是一种多孔非膨胀颗粒的疏水载体,颗粒直径 50~70 μm ,孔径 1000 Å。载体与四种核苷 A,G,C,T 共价结合(见 CPG 反应例子)。在这些核苷上的反应基团被封闭或被保护,防止不必要的副反应。它们的 5'-OH 都被 DMT 基团封闭,腺苷(A)、胞苷(C)和鸟苷(G)上环外氨基也与保护基键合。对于标准的和快速寡核苷酸脱保护(FOD)亚磷酰胺的保护基是不同的,标准亚磷酰胺应用苯甲酰基保护腺苷和胞苷(A^{bz} , C^{bz}),而用异丁酰基保护鸟苷(G^{ibu})。FOD 亚磷酰胺应用二甲基甲脒基保护腺苷和鸟苷(A^{dmf} , G^{dmf}),用异丁酰基保护胞苷(C^{ibu}),所有这些结构如图 1-3(a)和(b)所示。胸苷不需要保护



CPG 有一个连接臂通过硅氧烷键连接到其表面。所有的游离硅醇基都被封闭,以防发生副反应。聚苯乙烯有一个氨基甲基连接臂连接到其表面。因为聚苯乙烯表面是惰性的,所以很少发生副反应。核苷的 3'-OH 通过琥珀酸酯键共价地结合到载体的连接臂上。这个琥珀酸酯键对碱不稳定,用氨可以从载体上切去。合成完

成后,寡核苷酸被定量地切下,保留一下游离 3'-OH。

根据测定 DMT 释放的量估计,核苷的加入量一般为 27~40 μ mol/g(对于 40nmol 柱为 8~12 μ mol/g)。预装柱有 40nmol(仅聚苯乙烯),0.2 μ mol,1 μ mol 或 10 μ mol 的初始核苷四种规格。40nm CE 合成循环与 40nmol 柱(任何长的寡聚体)或 0.2 μ mol 柱(少于 50 碱基的寡聚体)结合应用。因为这一循环应用 0.05mol 的亚磷酰胺,所以它提供了最经济的寡核苷酸合成方法。40nmol 或 0.2 μ mol 规模,为大多数用途提供了足够量的纯寡聚核苷酸。当需要较大量的 DNA 时,应用 1 μ mol 合成规模。10 μ mol 规模对于物理学研究如 X 射线晶体学,核磁共振(NMR),或反义寡核苷酸应用是有用的。大孔径(1000 Å)CPG 载体仅用在 0.2 μ mol 的规模。1000 Å 载体的核苷加样量是较低的,大约 15 μ mol/g 载体。在 CPG 上合成长寡核苷酸(bigmers),已经表明低核苷加样量和大孔径载体是成功的关键。合成长寡核苷酸,聚苯乙烯也是有用的。

从不同合成规模获得的标准寡核苷酸量如下:

合成	粗得率 ^① (OD)
循环 (20mer)	
40nm ^②	20~25 0.2 μ mol 规模
	5~10 40 μ mol 规模
0.2 μ m	29~25
1 μ m	100~120
10 μ m	800~1000

由于自动化的合成,DNA 的延伸从 3'到 5'(但在合成仪上输入的是从 5'到 3')。在合成开始前,必须将装满四种载体结合的核苷(A,C,G 或 T)之一的柱子安装在仪器上,这一核苷将是片段的 3'末端。

① 产量的数字是根据一个 20-mer 片段,260nm 测定吸收,假设 33 μ g/ODU。

② “40nmCE”是用在 0.2 μ mol 和 40nmol 规模的低试剂消耗循环。