

生物检测技术

陈朝银 赵声兰 主编



科学出版社

应用于药物基因组学,主要是利用 DNA 芯片进行基因

效应及药物吸收、代谢、排泄等相关的基因,并查明这些基因的多态性;另外,DNA 芯片因型将人分群,以实现药物基因组学研究的目的和价值。

DNA 芯片可以自动、快速地检测那些可以影响药物效应的基因(如药物代谢酶、靶靶和致病因子的编码基因)和决定个人对药物毒性敏感性的基因。借助这种芯片可以者的基因型对药物分群,为临床医生选择合理的治疗药物和药物剂量。

生物检测技术

主 编 陈朝银 赵声兰

副主编 余旭亚 夏雪山 魏大巧



科学出版社

示 00.38, 付宝

(编辑责任书) 北京 (出版单位)



北航

C1691610

Q81
73

014004425

内 容 简 介

生物检测是近年来高速发展的学科之一。本书以现代生物工程技术为主线,系统介绍了生物过程及其生物产品的理化性质、功效与代谢等分析检测的原理、技术、手段、方法、应用及发展。主要内容包括基因及基因组学、蛋白质及蛋白质组学、次生活性成分、酶、细胞、功效与代谢、生物安全性评价等的分析检测技术,以及生物传感器及生物芯片技术。内容系统、新颖,具有较强的集成性和实用性。

本书可作为综合性院校、农林院校、师范院校、医学院校等相关专业的本科生、研究生的教材和教学参考书,也可作为相关科研和教学工作者的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

生物检测技术/陈朝银,赵声兰主编. —北京:科学出版社,2013

ISBN 978-7-03-038475-1

I. ①生… II. ①陈… ②赵… III. ①生物技术-检测 IV. ①Q81

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 202603 号

责任编辑:席 慧 刘 晶 / 责任校对:胡小洁

责任印制:阎 磊 / 封面设计:迷底书装

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

骏立印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013 年 9 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2013 年 9 月第一次印刷 印张:16 1/4

字数:427 000

定价:38.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

生物检测是近年来高速发展的学科之一,其概念和范围也在不断变化。狭义的生物检测技术是利用生物体对被检测物质的特有反应而鉴定被检物质的质量和功效的方法,其所用生物体主要是各种微生物和某些动物,检测的范围主要是生物效价测定和安全性的试验。广义的生物检测技术是以现代生物工程技术产品的质量安全控制为核心,研发生物过程及其产品的理化及功能的分析检测手段和方法。

由于现代生物工程技术产品除了传统的糖、氨基酸、酶、脂肪及脂肪酸、有机酸、醇、酮等之外,尚有基因、次生代谢物(如抗生素等)、细胞因子、免疫制剂(单抗、抗原等)、工程菌和工程细胞、试剂盒、生物芯片等,其质量安全控制也由传统的以产品为核心转变为以过程为核心,故现代生物工程技术产品的分析检测除了传统的理化分析和利用生物体检测产品特有功能 and 安全性之外,尚需强调其生产的本质过程和基因工程、蛋白质工程、组学(如基因组学、蛋白质组学、肽组学、代谢组学)等的检测,以及传统理化分析尚难以重点涉足的新兴分析检测技术(如激光共聚焦、高通量测序、流式细胞术、生物传感器、生物芯片等)。

本书是在十多届本科生和研究生使用的生物检测技术讲义的基础上陆续修订而成。全书共8章,阐述了各生物检测技术的基本原理、基础理论和基本技术,内容系统、新颖,具有较强的集成性和实用性,既能为读者的日常工作提供方便,又能为读者从事科学研究提供指导和思路。本书可以作为相关专业的本科生、研究生的教材和教学参考书,也可作为相关科研和教学工作者的参考用书。

由于编者水平和精力所限,书中难免有疏漏和不足之处,敬请读者给予批评指正。

编 者

2013年4月16日

目 录

前言

第 1 章 基因及基因组学检测技术	1
1.1 核酸制品的理化指标及其检测	1
1.1.1 核酸分离纯化的原则	1
1.1.2 核酸分离纯化的技术路线	2
1.1.3 基因组 DNA 的分离与纯化	3
1.1.4 质粒 DNA 的分离与纯化	4
1.1.5 RNA 的分离与纯化	4
1.1.6 全自动核酸提取纯化工作站	5
1.2 DNA 的变性与复性及其 T_m 值和 C_0t 值测定	6
1.2.1 DNA 变性及其 T_m 值的意义与测定	6
1.2.2 DNA 复性及其 C_0t 值的意义和测定	7
1.2.3 核酸杂交分析及核酸探针技术	8
1.3 常规 PCR 原理与步骤	9
1.3.1 PCR 的基本原理	9
1.3.2 操作过程	9
1.3.3 热稳定性 DNA 聚合酶	10
1.3.4 PCR 引物的设计	10
1.3.5 PCR 扩增的模板	10
1.3.6 常规的 PCR 扩增方案	10
1.4 实时荧光定量 PCR 检测技术	11
1.4.1 CT 值	12
1.4.2 荧光信号和定量数据的归一化	14
1.4.3 污染的预防和热启动	14
1.4.4 标准	14
1.4.5 TaqMan 探针技术原理	15
1.4.6 SYBR Green I 荧光染料	15
1.4.7 定量 PCR 仪	16
1.5 其他非常规扩增技术	16
1.6 核酸的序列测定技术	18
1.6.1 双脱氧末端终止法测序	18
1.6.2 全自动测序	20
1.6.3 测序策略	21
1.6.4 高通量测序	22

1.7 基因组学检测技术	24
1.7.1 结构基因组学检测技术	24
1.7.2 功能基因组学检测技术	25
1.7.3 比较基因组学检测技术	26
1.7.4 宏基因组学检测技术	26
主要参考文献	27
第2章 蛋白质及蛋白质组学检测技术	28
2.1 蛋白质的理化性质	29
2.2 蛋白质一级结构测定	31
2.2.1 水解分析	31
2.2.2 蛋白质分子中末端氨基酸的分析	32
2.2.3 质谱测序	34
2.2.4 蛋白质的非共价复合物研究	35
2.3 蛋白质高级结构分析测定	35
2.3.1 仪器分析方法	35
2.3.2 理论分析方法	37
2.4 蛋白质组学检测技术	46
2.4.1 电泳分析法	47
2.4.2 层析技术	47
2.4.3 质谱技术	48
2.4.4 蛋白质修饰及其分析方法	52
主要参考文献	55
第3章 酶检测技术	56
3.1 基础酶学检测技术	56
3.1.1 酶反应的解析	56
3.1.2 酶学常数测定	57
3.2 应用酶学检测技术	66
3.2.1 酶产品质检	66
3.2.2 酶法检测	79
3.2.3 常见酶活力测定方法	85
主要参考文献	103
第4章 次生活性成分检测技术	104
4.1 生物碱	104
4.1.1 生物碱的分类	104
4.1.2 生物碱的理化性质	105
4.1.3 生物碱的提取分离	106
4.1.4 生物碱定性鉴别	109
4.1.5 生物碱的含量测定	111
4.2 醌类化合物	114

4.2.1	醌类化合物的主要理化特性	115
4.2.2	醌类化合物的提取分离	116
4.2.3	醌类化合物的定性鉴别	117
4.2.4	醌类化合物的含量测定	119
4.2.5	蒽醌类化合物的结构测定	120
4.3	黄酮类化合物	123
4.3.1	黄酮类化合物的主要理化特性	123
4.3.2	黄酮类化合物的分离	123
4.3.3	黄酮类化合物的定性鉴别	125
4.3.4	黄酮类化合物的定量分析	127
4.4	香豆素和木脂素类	130
4.4.1	香豆素类成分的主要理化性质	130
4.4.2	香豆素类的提取分离	131
4.4.3	香豆素类的检识	132
4.4.4	木脂素类的理化性质	132
4.4.5	木脂素类的提取分离	132
4.4.6	木脂素类的检识	133
4.5	皂苷类	133
4.5.1	皂苷的性质	133
4.5.2	皂苷的提取分离	134
4.5.3	皂苷类成分的定性分析	135
4.5.4	皂苷类成分的定量分析	136
4.6	强心苷类	137
4.6.1	强心苷类的主要性质	137
4.6.2	强心苷类的检识反应	139
4.6.3	强心苷类的提取分离	140
4.7	挥发油	141
4.7.1	挥发油的主要性质	141
4.7.2	挥发油成分的提取	141
4.7.3	挥发油成分的分离	142
4.7.4	挥发油的鉴定	143
4.8	抗生素	143
4.8.1	抗生素的种类	143
4.8.2	抗生素的效价测定	144
	主要参考文献	147
第5章	细胞分析检测技术	148
5.1	细胞的分离与培养	148
5.1.1	细胞培养技术的特点与应用	148
5.1.2	培养细胞生长的条件	149

5.1.3 原代培养细胞的取材与分离	150
5.2 细胞形态与活性的常规检测法	151
5.2.1 普通显微染色观察法	151
5.2.2 MTT 法	153
5.3 数字显微及激光共聚焦显微分析法	155
5.3.1 数字显微分析法	155
5.3.2 激光扫描共聚焦显微观察分析法	155
5.4 流式细胞术检测技术	158
5.4.1 流式细胞术的发展简史	158
5.4.2 流式细胞术的基本结构和工作原理	159
5.4.3 流式细胞术的应用	165
主要参考文献	168
第6章 功效与代谢检测技术	169
6.1 保健食品功效检测与评价	169
6.1.1 保健食品概述	169
6.1.2 保健食品功能检测	171
6.2 药理检测技术	183
6.2.1 药效学检测技术	183
6.2.2 药物代谢动力学检测技术	191
主要参考文献	198
第7章 生物安全评价方法与技术	199
7.1 生物安全性评价基本方法	199
7.1.1 急性毒性试验	199
7.1.2 蓄积毒性试验	199
7.1.3 亚急性毒性试验	200
7.1.4 慢性毒性试验	201
7.1.5 致癌试验	203
7.1.6 致突变试验	204
7.1.7 代谢试验	205
7.2 各主要制品生物安全性评价	205
7.2.1 食品安全性评价	205
7.2.2 药物毒理及安全性评价	207
7.2.3 化妆品毒理及安全性评价	212
7.2.4 转基因产品的安全性评价	222
7.3 质量安全认证	223
7.3.1 HACCP 认证	223
7.3.2 GMP 认证	224
7.3.3 QS 认证	226
7.3.4 其他与生物技术产品相关的认证	228

主要参考文献·····	228
第 8 章 生物传感器及生物芯片技术 ·····	229
8.1 生物传感器 ·····	229
8.1.1 生物传感器的结构和原理 ·····	230
8.1.2 生物传感器的定义与分类 ·····	230
8.1.3 几种主要的生物传感器 ·····	230
8.2 生物芯片 ·····	237
8.2.1 生物芯片的制造 ·····	238
8.2.2 生物芯片的使用和阅读 ·····	241
8.2.3 各种生物芯片 ·····	244
8.2.4 生物芯片的应用 ·····	247
主要参考文献·····	249

第 1 章

基因及基因组学检测技术

基因(gene)的概念随着遗传学、分子生物学、生物化学等领域的发展而不断完善。从遗传学的角度看,基因是生物的遗传物质,是遗传的基本单位——突变单位、重组单位和功能单位;从化学本质来看,基因是负载特定遗传信息的核酸分子片段,包括 DNA 和 RNA,在一定条件下能够表达特定遗传信息,形成特定的生理性状与功能。

从分子水平来说,基因有三个基本特性:①可自我复制;②可决定性状,即基因通过转录和翻译决定多肽链的氨基酸顺序,从而决定某种酶或蛋白质的性质,最终表达为某一性状;③可突变,即基因虽很稳定,但有一定的突变概率。

基因按其功能可分为两类。结构基因(structural gene)是指某些能决定某种多肽链(蛋白质)或酶分子结构的基因。结构基因的突变可导致特定蛋白质(或酶)一级结构的改变或影响蛋白质(或酶)量的改变。调控基因(regulator and control gene)是指某些可调节、控制结构基因表达的基因。调控基因的突变可以影响一个或多个结构基因的功能,或导致一个或多个蛋白质(或酶)的改变。

此外,还有一些只转录而不翻译的基因,如核糖体 RNA 基因(ribosomal RNA gene),也称为 rDNA 基因,它们专门转录 rRNA;还有转运 RNA 基因(transfer RNA gene),也称为 tRNA 基因,是专门转录 tRNA 的。

基因组(genome)一般是指单倍体细胞中遗传物质的总和。基因组学(genomics)是指对其全部遗传物质进行基因组作图(包括遗传图谱、物理图谱、转录图谱)、核苷酸序列分析、基因定位和基因功能分析的一门科学。

1.1 核酸制品的理化指标及其检测

天然存在的核酸有两类,即 DNA 与 RNA。对核酸性质与功能的研究,必须首先对核酸进行分离与纯化,其过程控制是产物质量的关键。

1.1.1 核酸分离纯化的原则

细胞内的核酸包括 DNA 与 RNA 两类分子,均与蛋白质结合成核蛋白(nucleoprotein)。DNA 与蛋白质结合成脱氧核糖核蛋白(dexyribonucleoprotein, DNP),RNA 与蛋白质结合成核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)。真核生物的 DNA 又有染色体 DNA 与细胞器 DNA 之分,前者位于细胞核内,约占 95%,为双链线形分子;后者存在于线粒体或叶绿体等细胞器内,约占 5%,多为双链环状分子。除此之外,在原核生物中还有双链环状的质粒 DNA。在非细胞型的病毒颗粒内,DNA 的存在形式多种多样,有双链环状、单链环状、双链线状和单链线状之分。DNA 分子的总长度在不同的生物间差异很大,一般随生物的进化程度而增长。与

DNA 相比, RNA 分子比 DNA 分子要小得多。由于 RNA 的功能是多样性的, 因此 RNA 的种类、大小和结构都具有多样化。DNA 与 RNA 性质上的差异决定了两者的最适分离与纯化的条件不同。

核酸分离与纯化的方法很多, 各有特点, 应根据具体生物材料的性质与起始量、待分离核酸的性质与用途而采取不同的方案。总的原则: 一是保证核酸一级结构的完整性, 因为完整的一级结构是核酸结构和功能研究的最基本要求; 二是尽量排除其他分子的污染, 保证核酸样品的纯度。

1.1.2 核酸分离纯化的技术路线

破碎细胞、释放核酸 → 除去非核酸成分 → 浓缩 → 分析、鉴定 → 分装、保存

1) 破碎细胞、释放核酸 正常情况下, 无论是 DNA 还是 RNA 均位于细胞内, 因此核酸分离与纯化的第一步就是破碎细胞、释放核酸。细胞的破碎方法非常多, 包括机械法和非机械法两大类。机械法又可分为液体剪切法与固体剪切法。机械法不适于大分子质量 DNA 的分离与纯化。非机械法可分为干燥法与溶胞法, 溶胞法采用适宜的化学试剂与酶, 能有效地裂解细胞, 方法温和, 并保证较高的得率, 较好地保持核酸的完整性, 因而得到广泛应用。

2) 分离除杂 细胞裂解物是含核酸分子的复杂混合物, 核酸分子本身可能仍与蛋白质结合在一起。利用核酸与其他物质在一个或多个性质上的差异使核酸得以分离。应该分离去除的主要包括三个部分, 即非核酸的大分子物质、非需要的核酸分子和在核酸的分离纯化过程中加入的对后继工作有影响的溶剂与试剂。非核酸大分子物质主要包括蛋白质、多糖和脂类物质; 非需要的核酸分子是指制备某一特定核酸分子时, 其他的核酸分子均为污染物, 如制备 DNA 时, RNA 为污染物; 至于在核酸分离纯化过程中加入的有机溶剂和某些金属离子, 由于对后续实验有影响, 往往需要很好地去除。通常采用蛋白质变性法除蛋白质、采用特异吸附法吸附提取核酸及盐析等方法分离除杂。一般分离除杂步骤越多, 核酸的纯度越高, 但得率会逐渐下降, 完整性也难以保证。

3) 浓缩 随着核酸提取试剂的逐步加入, 以及除杂过程中核酸分子不可避免的丢失, 样品中核酸的浓度会逐渐下降, 当浓度太低不能满足需要时, 应对核酸进行浓缩。沉淀是核酸浓缩最常用方法。常用乙醇、异丙醇和乙二醇沉淀, 且往往需用 70%~75% 的乙醇反复洗涤去除少量共沉淀的盐。另有离心冷冻浓缩、吸附解析等方法。

4) 浓度、纯度鉴定 紫外分光光度法是基于核酸分子成分中的碱基均具有一定的紫外线吸收特性, 其最大吸收波长为 250~270nm。在波长 260nm 的紫外线下, OD 值等于 1 时的光密度大约相当于 50 μ g/ml 的双链 DNA、38 μ g/ml 的单链 DNA 或单链 RNA、33 μ g/ml 的单链寡聚核苷酸。紫外分光光度法只用于测定浓度大于 0.25 μ g/ml 的核酸溶液。纯度的测定主要是通过 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值来判定有无蛋白质的污染, 在 TE 缓冲液中, 纯 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值为 1.8, 纯 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 2.0, 值升高与降低均表示不纯。

5) 完整性鉴定 以荧光染色的核酸凝胶电泳结果可用于判定核酸的完整性。基因组 DNA 的分子质量很大, 在电场中泳动很慢, 如果有降解的小分子 DNA 片段, 电泳图呈拖尾状。完整的无降解或降解很少的总 RNA 电泳图中, 三个条带的荧光强度积分应呈特定的比值。一般 28S(或 23S)RNA 的荧光强度约为 18S(或 16S)RNA 的 2 倍, 否则提示有 RNA 降解。另外, 随着毛细管电泳与生物芯片技术的飞速发展, 有关核酸的分离、纯化、鉴定与回收的技术日益丰富。

DNA 的保存:双链 DNA 因结构上的特点而具有很大的惰性,在 4℃ 条件下可保存较长时间。在 DNA 样品中加入少量氯仿,可以有效避免细菌与核酸的污染。DNA 溶于 TE 缓冲液中,在 -70℃ 可以贮存数年,但频繁冻融会损伤 DNA 分子,故冻存前应根据需要适当分装。

RNA 的保存:RNA 可溶于 0.3mol/L 的乙酸钠溶液或双蒸水中,在 -80℃ 至 -70℃ 保存。另外,RNA 沉淀溶于 70% 的乙醇溶液或去离子的甲酰胺溶液中,可在 -20℃ 中长期保存。同样,因反复冻融会对核酸有破坏作用,故冻存前应根据需要适当分装。

1.1.3 基因组 DNA 的分离与纯化

不同生物种属的 DNA 在分子质量和理化性质上存在差异。同一生物的不同组织器官来源的 DNA,其样品准备与处理的方法不尽相同。通常动物细胞的裂解多采用化学溶胞法,而细菌的裂解由于细胞壁的存在,常需要用溶菌酶(lysozyme)处理。尽管基因组 DNA 因来源、性质以及用途不同,其分离纯化的方法不尽相同,但有关分离纯化的原则、主要步骤、主要试剂及作用原理是一样的。常规方法分离基因组 DNA 时,大于 150kb 的 DNA 分子很容易发生断裂。

1) 酚抽提法 本法最初于 1976 年由 Stafford 及其同事提出,通过改进,以含 EDTA、SDS 及无 DNA 酶的 RNA 酶裂解缓冲液裂解细胞,经蛋白酶 K 处理后,用 pH8.0 的 Tris 饱和酚抽提 DNA,重复抽提至一定的纯度后,根据不同需要进行透析或沉淀处理,获得所需的 DNA 样品。透析处理可得到 200kb 的高分子质量 DNA;沉淀处理最后得到的 DNA 大小为 100~150kb。

2) 甲酰胺解聚法 1987 年 Kupiec 等报道了甲酰胺解聚法,其中细胞裂解与蛋白质水解步骤同酚抽提法相似,但不进行酚的抽提,而是以高浓度的甲酰胺裂解 DNA 与蛋白质的复合物(即染色质),然后通过火棉胶袋的充分透析以除去蛋白酶和有机溶剂。此方法适于制备高分子质量的 DNA 样品(一般可得到大于 200kb 的 DNA 样品),缺点是所需时间长且所得 DNA 浓度低。

3) 玻璃棒缠绕法 用缠绕法收集高分子质量 DNA 的沉淀始于 20 世纪 30 年代,现今的缠绕法是以 1987 年 Bowtell 的方法改进而来。玻璃棒缠绕法有两个关键步骤:一是基因组 DNA 沉淀于细胞裂解液与乙醇液的界面;二是把沉淀的 DNA 缠绕于带钩玻棒上,通过带钩玻棒将高分子质量 DNA 沉淀从无水乙醇溶液中转移到 pH8.0 的 TE 溶液中重溶。该方案以盐酸胍裂解细胞,制备的 DNA 分子大约只有 80kb。

4) 其他方法 常用的一些分子生物学技术(如 PCR),并不需要分子质量很大的 DNA 样品,20~50kb 的 DNA 足以作为 PCR 的模板或用于克隆等。因此,步骤简化、操作简便的各种 DNA 快速提取法应用十分广泛,如异丙醇沉淀法、玻璃珠吸附法等。并且,现在已有许多商品化的快速抽提 DNA 试剂盒上市。

电泳法由于具有简单、快速、易于操作、分辨率高、灵敏度好、易于观察及便于回收等优点,在 DNA 的进一步纯化中占有重要地位。其中聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)分辨率较高,有效分离 5~500bp,故 PAGE 仅适合于小片段 DNA 的分离与纯化。琼脂糖凝胶电泳(agarose gel electrophoresis, AGE)的分辨率比 PAGE 低,可以分离从 50bp 到几百万个碱基对的 DNA。

从支持介质中回收 DNA 片段,要注意两个原则:一是要提高 DNA 片段的回收率;二是要去除回收 DNA 样品中的污染。从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段的方法主要包括二乙基氨基

乙基(diethylaminoethyl, DEAE)纤维素膜插片电泳法、电泳洗脱法、冷冻挤压法及低熔点琼脂糖凝胶挖块法等。从聚丙烯酰胺凝胶中回收 DNA 的标准方法是压碎与浸泡法。

1.1.4 质粒 DNA 的分离与纯化

大多数质粒都是双链的共价闭环环状质粒,简称闭环质粒(closed circular plasmid, CCplasmid)。作为携带外源基因在细菌中扩增或表达的重要载体(vector),质粒在基因工程中应用十分广泛。有关质粒的提取与纯化是必须掌握的基本技术。

质粒 DNA 的提取与纯化方法很多,经典的方法包括碱裂解法、煮沸裂解法和 SDS 裂解法等。这些方法主要由细菌的培养、细菌的裂解及质粒 DNA 的分离与纯化等三个步骤组成。按制备量的不同,质粒 DNA 的提取与纯化可分为少量(1~2ml)、中量(20~50ml)和大量(500ml)制备。

1) 碱裂解法 碱裂解法简单、重复性好而且成本低,是使用最广泛的方法。在 NaOH 存在的强碱性条件下,用强阳离子去垢剂 SDS 破坏细胞壁和裂解细胞,并使宿主细胞的蛋白质与染色体 DNA 发生变性,释放出质粒 DNA。尽管碱溶液能破坏核酸的碱基配对,但闭环环状质粒 DNA 因缠结紧密而不易解链。只要不在碱性条件下变性太久,当 pH 调至中性时,质粒 DNA 就可重新恢复其天然状态。细胞被裂解后,细胞壁碎片与变性的蛋白质和染色体 DNA 形成大的复合物,这些大的复合物在高盐条件下可有效沉淀,而质粒 DNA 则保留于上清中。通过无水乙醇沉淀上清中的质粒 DNA,并用 70%乙醇洗涤,如此制备的核酸其纯度可满足 DNA 测序与 PCR 等试验的要求。

2) 煮沸裂解法 煮沸裂解法是将细菌悬浮于含 TritonX-100 和溶菌酶的缓冲液中, TritonX-100 和溶菌酶能破坏细胞壁,再用沸水浴裂解细胞,使宿主细胞的蛋白质与染色体 DNA 变性。质粒 DNA 因结构紧密不会解链,当温度下降后,可重新恢复其超螺旋结构。通过离心去除变性的蛋白质和染色体 DNA,然后回收上清中的质粒 DNA。

3) SDS 裂解法 大于 15kb 的质粒 DNA 容易因细胞裂解和后续操作而遭到破坏,因此需要温和的裂解方法。SDS 裂解法是将细菌悬浮于等渗的蔗糖溶液中,用溶菌酶和 EDTA 处理以破坏细胞壁,再用 SDS 裂解去壁细菌,从而温和地释放质粒 DNA 到等渗液中,然后用酚/氯仿抽提。

4) 其他方法 其他方法如少量一步提取法和牙签少量制备法等。

对有比较严格的后续工作要求的质粒 DNA,其初提物必须进一步纯化。纯化的方法非常多,效果好且适用范围广的方法主要有氯化铯-溴化乙锭密度梯度超速离心法(简称 CsCl-EB 法)、聚乙二醇沉淀法和柱层析法。为获得一定纯度的质粒 DNA,常通过凝胶电泳分离并回收。

1.1.5 RNA 的分离与纯化

包括 Northern 杂交在内的许多分子生物学实验均以 RNA 为材料, RNA 的数量、纯度与完整性将直接影响实验的结果。RNA 容易被 RNase 水解,除细胞内的 RNase 外, RNase 还广泛存在于人的皮肤、唾液、汗液及周围环境中。在 RNA 的制备过程中,排除 RNase 污染是 RNA 制备成功与否的关键因素。目前对 RNA 的分离与纯化主要指总 RNA 与 mRNA 的分离与纯化。

1.1.5.1 总 RNA 的分离与纯化

1) (异)硫氰酸胍法-酚/氯仿一步法 用于从培养细胞和大多数动物组织中分离纯化总 RNA。它以含 4mmol/L 的(异)硫氰酸胍与 0.1mmol/L 的 β -巯基乙醇变性溶液裂解细胞,然后在 pH4.0 的条件下,用酚/氯仿抽提裂解溶液,最后通过异丙醇沉淀与 75% 的乙醇洗涤而获得 RNA。

2) 同时制备 RNA、DNA 与蛋白质的一步法 本方法是(异)硫氰酸胍法-酚/氯仿一步法的改进方法。它是以(异)硫氰酸胍-酚的单相裂解试剂裂解细胞,再加入氯仿后形成两相。变性的 DNA 与蛋白质位于两相的界面,保留于上层水相的 RNA 在 RNA 沉淀溶液中通过异丙醇沉淀与 75% 乙醇洗涤而获得。RNA 沉淀溶液的成分为 1.2mmol/L NaCl 与 0.8mmol/L 柠檬酸二钠。

3) 其他方法 RNA 的分离纯化方法还有许多,如(异)硫氰酸胍-CsCl 超速离心法、盐酸胍-有机溶剂法等。

1.1.5.2 mRNA 的分离与纯化

与大小和序列明确的 rRNA、tRNA 及核内小分子 RNA 不同,真核生物的 mRNA 在细胞中含量少、种类多、分子质量大小不一。除血红蛋白及某些组蛋白外,绝大多数 mRNA 在其 3' 端带有一个长短不一的多聚腺苷酸(polyadenylic acid)的结构,即 poly(A) 尾巴。以总 RNA 制品为起始材料,利用核酸的碱基配对原理,通过 oligo(dT)-纤维素或 poly(U)-琼脂糖凝胶的亲和层析,可以很容易同时分离不同种类与大小的 mRNA 分子群体。

1) oligo(dT)-纤维素柱层析法 是 mRNA 制备的一个标准方法。它是以 oligo(dT)-纤维素填充层析柱,加入待分离的总 RNA 样品,其中 poly(A)RNA 在高盐条件下,通过碱基互补,与 oligo(dT)-纤维素形成稳定的 RNA-DNA 杂交体,洗去未结合的其他 RNA,在低盐缓冲液中洗脱并回收 poly(A)RNA。

2) oligo(dT)-纤维素液相结合离心法 该法不用填柱,而是直接将 oligo(dT)-纤维素加入到一系列含不同 RNA 样品的微量离心管中,通过离心收集吸附有 poly(A)RNA 的 oligo(dT)-纤维素。经漂洗后,用含 70% 的乙醇洗脱液将吸附的 poly(A)RNA 从 oligo(dT)-纤维素上洗脱并沉淀出来。

3) 其他方法 除上述方法外,还有 oligo(dT)-纤维素柱离心法、磁珠分离法等。

1.1.6 全自动核酸提取纯化工作站

利用全自动的机械手臂和特制的提取试剂盒,可实现从复杂的生物样本中自动提取和纯化核酸,包括总 RNA、总 DNA,并可将 mRNA 自动转录成 cDNA。制备好的核酸样品可用于基因表达的定量分析、等位基因点突变检测、序列分析等。目前达到的水平如下。

(1) 提取范围广:原始样品可以是菌落、细胞培养液、动植物组织等;提取核酸包括 RNA、DNA 或 mRNA。

(2) 自动化程度高:可自动完成核酸样品的制备、mRNA 的反转录及 PCR 反应体系的建立。

(3) 产率高:总 RNA 提取产率高于 50%,1ml 质粒培养液中提取 5.0mg DNA,每个样品量只需 1.8ml。

(4) 纯度高:RNA 样品的 $A_{260}/A_{280} > 1.9$, DNA/RNA $< 0.5\%$,严格的防交叉污染体系

可直接用于下游的应用,如酶切、测序、PCR、Southern 杂交等,同时制备成本低,无需昂贵的一次性滤膜或柱子。

(5) 快速:每小时可处理 4 个 96 孔板的样品。

(夏雪山 陈朝银)

1.2 DNA 的变性与复性及其 T_m 值和 C_0t 值测定

变性(denaturation)和复性(renaturation)是双链核酸分子的两个重要物理特性。双链 DNA、RNA 双链区、DNA:RNA 杂种双链(hybrid duplex)及其他异源双链核酸分子(hetero-duplex)都具有此性质。

1.2.1 DNA 变性及其 T_m 值的意义与测定

DNA 变性是指双螺旋之间氢键断裂,双螺旋解开,形成单链无规则线团,因而发生性质改变(如黏度下降、沉降速度增加、浮力上升、紫外吸收增加等),称为 DNA 变性。加热、改变 DNA 溶液的 pH、受有机溶剂(如乙醇、尿素、甲酰胺及丙酰胺等)等理化因素的影响,均可使 DNA 变性。通常,可利用 DNA 变性后 260nm 波长处紫外吸收的变化追踪变性过程,因为 DNA 在 260nm 处有最大吸收值这一特征是由于含有碱基组成的缘故。在 DNA 双螺旋结构模型中碱基藏于内侧,变性时由于双螺旋解开,于是碱基外露,260nm 紫外吸收值因而增加,这一现象称为增色效应(hyperchromic effect)。一般以 260nm 下的紫外吸收光密度作为观测此效应的指标,变性后该指标的观测值通常较变性前有明显增加,但不同来源 DNA 的变化不一,如大肠杆菌 DNA 经热变性后,其 260nm 的光密度值可增加 40%以上,其他不同来源的 DNA 溶液的增值范围多为 20%~30%。

如果升高温度使 DNA 变性,以温度对紫外吸收作图,可得到一条曲线,称为溶解曲线(图 1-1),由图可见,当温度升高到一定范围时, DNA 溶液在 260nm 处的吸光度突然明显上升至最高值,随后即使温度继续升高,其吸光度也无明显变化。由此说明 DNA 变性是在一个很窄的温度范围内发生,增色效应是暴发式的。从而也说明当达到一定温度时, DNA 双螺旋几乎是同时解开的。通常人们把 50% DNA 分子发生变性的温度称为变性温度(即溶解曲线中点对应的温度),由于这一现象和结晶的熔解相类似,故又称熔点或熔解温度(melting temperature, T_m)。因此 T_m 是指消光值上升到最大消光值一半时的温度。

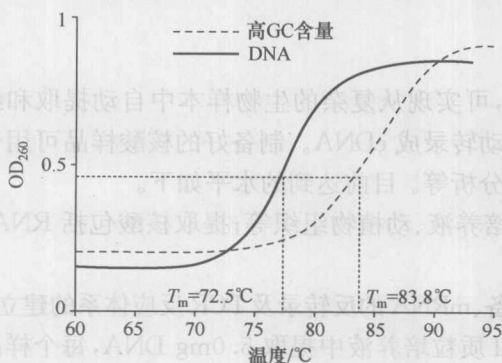


图 1-1 DNA 的增色效应

综上所述, T_m 值和增色效应是目前描述 DNA 特性所常用的两个量。假定一个 DNA 大分子最初全部是双螺旋结构,在热变性后消光系数上升 30% 以上,如果 DNA 原先局部就处于单链状态(如在分子末端),则变性后上升较少。增色效应的大小是 DNA 性质的一个简单指标,与分子质量无关。 T_m 不是一个固定的数值,它与很多因素有关,如 pH、离子强度和 DNA 的碱基比例。随着溶剂内离子强度上升, T_m 值也随着增大。在一定离子强度 (10^{-3} mol/L) 以下,无需加热就使溶于其中的 DNA 出现不可逆

变性。与 A-T 碱基配对比较, DNA 双螺旋内的 G-C 配对更为牢固。在相同条件下, DNA 内 G-C 配对含量高, 其 T_m 值也高。

DNA 的 T_m 值与以下因素有关。

(1) DNA 的均一性: 均一 DNA 如病毒 DNA, 解链发生在很窄的范围内; 而不均一 DNA 如动物细胞 DNA, T_m 值的范围则宽。

(2) DNA 分子中(G+C)的含量(图 1-2): 一定条件下 DNA 的 T_m 值由 G+C 含量所决定, 因为 G+C 之间有 3 个氢键, 因此 G+C 含量较高的 DNA, T_m 值较高, 二者的关系可以表示为

$$GC\% = (T_m - 63.0) \times 2.44$$

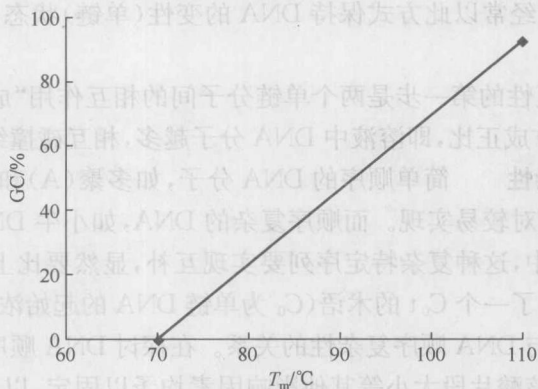


图 1-2 DNA 的 T_m 与 G-C 含量的关系

(3) 溶剂的性质: T_m 不仅与 DNA 本身性质有关, 而且与溶液的条件有关, 通常溶液的离子强度较低时, T_m 值较低, 熔点范围也较宽; 离子强度增高时, T_m 值升高, 熔点范围也变窄。因此, DNA 制剂不应保存在离子强度过低的溶液中, 一般保存在 1mol/L 的 NaCl 溶液中较稳定。

1.2.2 DNA 复性及其 C_0t 值的意义和测定

变性 DNA 只要消除变性条件, 两条互补链还可以重新结合, 恢复原来的双螺旋结构, 这一过程称为复性(renaturation)(图 1-3)。通常 DNA 热变性后, 将温度缓慢冷却, 并维持在比

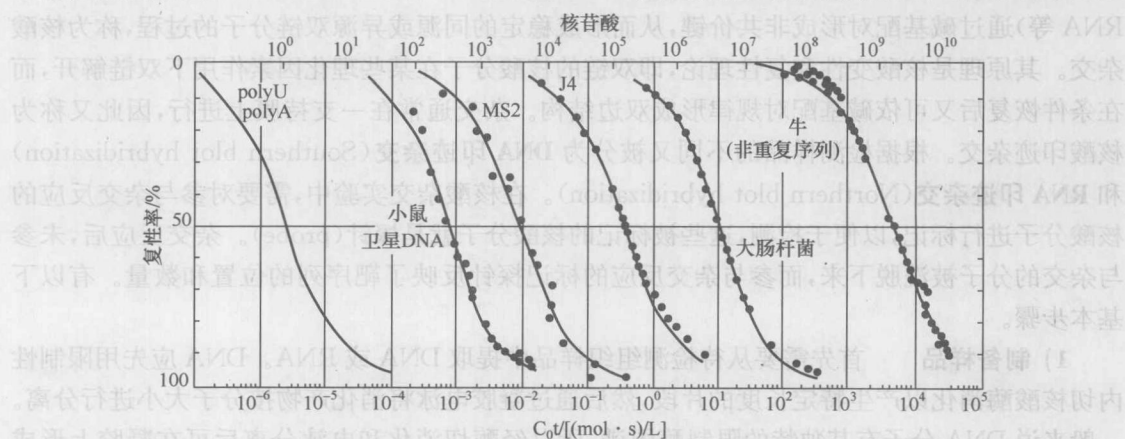


图 1-3 DNA 复性过程

T_m 低 $25\sim 30^{\circ}\text{C}$ 时,变性后的单纯 DNA 即可恢复双螺旋结构,因此,这一过程又叫做退火(annealing)。复性后的 DNA,理化性质都能得到恢复。倘若 DNA 热变后快速冷却,则不能复性。DNA 的复性不仅受温度影响,还受 DNA 自身特性等其他因素的影响。

1) 温度和时间 变性 DNA 溶液在比 T_m 低 25°C 的温度下维持一段长时间,其吸光率会逐渐降低。将此 DNA 再加热,其变性曲线特征可以基本恢复到第一次变性曲线的图形。这表明复性是较完全的。一般认为比 T_m 低 25°C 左右的温度是复性的最佳条件,越远离此温度,复性速度就越慢。在很低的温度下(如 4°C 以下),分子的热运动显著减弱,互补链结合的机会自然大大减少。从热运动的角度考虑,维持在 T_m 以下较高温度更有利于复性。复性时温度下降必须是一缓慢过程,若在超过 T_m 的温度下迅速冷却至低温(如 4°C 以下),复性几乎是不可能的,核酸实验中经常以此方式保持 DNA 的变性(单链)状态。说明降温时间太短以及温差大均不利于复性。

2) DNA 浓度 复性的第一步是两个单链分子间的相互作用“成核”。这一过程进行的速度与 DNA 浓度的平方成正比,即溶液中 DNA 分子越多,相互碰撞结合“成核”的机会越大。

3) DNA 顺序的复杂性 简单顺序的 DNA 分子,如多聚(A)和多聚(U)这两种单链序列复性时,互补碱基的配对较易实现。而顺序复杂的 DNA,如小牛 DNA 的非重复部分,一般以单拷贝存在于基因组中,这种复杂特定序列要实现互补,显然要比上述简单序列困难得多。在核酸复性研究中,定义了一个 C_0t 的术语(C_0 为单链 DNA 的起始浓度, t 是以秒为单位的时间),用以表示复性速度与 DNA 顺序复杂性的关系。在探讨 DNA 顺序对复性速度的影响时,将温度、溶剂离子强度、核酸片段大小等其他影响因素均予以固定,以不同程度的核酸分子重缔合部分(在时间 t 时的复性率)取对数后对 C_0t 作图,可以得到如图 1-3 所示的曲线,用非重复碱基对数表示核酸分子的复杂性。在标准条件下(一般为 0.18mol/L 阳离子浓度,400 核苷酸长的片段)测得的复性率达 0.5 时的 C_0t 值(称 $C_0t_{1/2}$),与核苷酸对的复杂性成正比。对于原核生物核酸分子,此值可代表基因组的大小及基因组中核苷酸对的复杂程度。真核基因组中因含有许多不同程度的重复序列(repetitive sequence),所得到的 C_0t 曲线要比图 1-3 中的 S 曲线复杂。

1.2.3 核酸杂交分析及核酸探针技术

核酸杂交(hybridization)是指互补的核苷酸序列(DNA 与 DNA、DNA 与 RNA、RNA 与 RNA 等)通过碱基配对形成非共价键,从而形成稳定的同源或异源双链分子的过程,称为核酸杂交。其原理是核酸变性和复性理论,即双链的核酸分子在某些理化因素作用下双链解开,而在条件恢复后又可依碱基配对规律形成双边结构。杂交通常在一支持膜上进行,因此又称为核酸印迹杂交。根据检测样品的不同又被分为 DNA 印迹杂交(Southern blot hybridization)和 RNA 印迹杂交(Northern blot hybridization)。在核酸杂交实验中,需要对参与杂交反应的核酸分子进行标记,以便于检测,这些被标记的核酸分子就是探针(probe)。杂交反应后,未参与杂交的分子被洗脱下来,而参与杂交反应的标记探针反映了靶序列的位置和数量。有以下基本步骤。

1) 制备样品 首先需要从待检测组织样品中提取 DNA 或 RNA。DNA 应先用限制性内切核酸酶消化以产生特定长度的片段,然后通过凝胶电泳将消化产物按分子大小进行分离。一般来说 DNA 分子有其独特的限制酶图谱,所以经酶切消化和电泳分离后可在凝胶上形成特定的区带。再将含有 DNA 片段的凝胶进行变性处理后,直接转印到支持膜上并使其牢固