



# 核酸分子杂交技术

## 一、概述

前面已经介绍了核酸分子单链之间有互补的碱基顺序，通过碱基对之间非共价键（主要是氢键）的形成即出现稳定的双链区，这是核酸分子杂交的基础。杂交分子的形成并不要求两条单链的碱基顺序完全互补，所以不同来源的核酸单链只要彼此之间有一定程度的互补顺序（即某种程度的同源性）就可以形成杂交双链。分子杂交可在 DNA 与 DNA、RNA 与 RNA 或 RNA 与 DNA 的二条单链之间进行。由于 DNA 一般都以双链形式存在，因此在进行分子杂交时，应先将双链 DNA 分子解聚成为单链，这一过程称为变性，一般通过加热或提高 pH 值来实现。使单链聚合双链的过程称为退火或复性。用分子杂交进行定性或定量分析的最有效方法是将一种核酸单链用同位素或非同位素标记成为探针，再与另一种核酸单链进行分子杂交。

核酸杂交技术基本上是 Hall 等 1961 年的工作开始的，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 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 DAN 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<sup>+</sup>），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。通常该实验可比较不同来源生物 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，消化非特异性结合的 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有兴趣。固相化的 Poly U - Sepharose 和寡 (dT) - 纤维素使人们能从总 RNA 中分离 Poly A+ RNA。用 mRNA 的经纯化技术可从网织红细胞总 RNA 中制备  $\alpha$ - 和  $\beta$ - 珠蛋白 mRNA 混合物。这些珠蛋白 mRNA 首次被用于合成特异的探针以分析珠蛋白基因的表达。由于制备 cDNA 探针很繁琐，所获得 cDNA 的长度和纯度也不稳定。所以寻求新的探针来源是使分子杂交技术进一步推广的基础。

70 年代末期到 80 年代早期，分子生物学技术有了突破性进展，限制性内切酶的发展和应用使分子克隆成为可能。各种载体系统的诞生，尤其是质粒和噬菌体 DNA 载体的构建，使特异性 DNA 探针的来源变得十分丰富。人们可以从基因组 DNA 文库和 cDNA 文库中获得特定基因克隆，只需培养细菌，便可提取大量的探针 DNA。迄今为止，已克隆和定性了许多特异 DNA 探针。

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。

尽管取得了上述重大进展，但分子杂交技术在临床实用中仍存在不少问题，必须提高检测单拷贝基因的敏感性，用非放射性物质代替放射性同位素标记探针以及简化实验操作和缩短杂交时间，这样，就需要在以下三方面着手研究：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，只有这样，才能使 DNA 探针实验做到简便、快速、低廉和安全。

## 二、探针-靶反应

从化学和生物学意义上理解，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-配基 (ligand) 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。因为有机溶液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能进行碱基配对，这取决于修饰的部位和修饰的性质。这一特性有助于理解非放射性核酸探针标记物的设计和 <sup>125</sup>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。而胞嘧啶的 C-4 和腺嘌呤的 N-6 就不能被修饰，否则会影响碱基配对，尽管 C 的 N-4 位和 A 的 N-6 位参与了氢键形成，但它们也是标记位点。这是因为标记的探针每 1kb 只掺入 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，但对整个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  $^{32}\text{P}$  和  $^{35}\text{S}$  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' 端的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检测的基团，所以，对长的克隆探针不适用。

此外，还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。因为次黄嘌呤和鸟嘌呤间只形成 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。这是由核酸的化学结构和性质所决定的。只有在对核酸分子的探针-靶反应的化学本质有了深入了解之后，才能更好地理解后面的内容。

### 三、核酸探针的种类

基因探针根据标记方法不同可粗分为放射性探针和非放射性探针两大类，根据探针的核酸性质不同又可分为 DNA 探针，RNA 探针，cDNA 探针，cRNA 探针及寡核苷酸探针等几类，DNA 探针还有单链和双链之分。下面分别介绍这几种探针。

#### （一）DNA 探针

DNA 探针是最常用的核酸探针，指长度在几百碱基对以上的双链 DNA 或单链 DNA 探针。现已获得 DNA 探针数量很多，有细菌、病毒、原虫、真菌、动物和人类细胞 DNA 探针。这类探针多为某一基因的全部或部分序列，或某一非编码序列。这些 DNA 片段须是特异的，如细菌的毒力因子基因探针和人类 Alu 探针。这些 DNA 探针的获得有赖于分子克隆技术的发展和运用。以细菌为例，目前分子杂交技术用于细菌的分类和菌种鉴定比之 G+C 百分比值要准确的多，是细菌分类学的一个发展方向。加之分子

杂交技术的高敏感性，分子杂交在临床微生物诊断上具有广阔的前景。细菌的基因组大小约  $5 \times 10^6$ bp，约含 3000 个基因。各种细菌之间绝大部分 DNA 是相同的，要获得某细菌特异的核酸探针，通常要采取建立细菌基因组 DNA 文库的办法，即将细菌 DNA 切成小片段后分别克隆得到包含基因组的全信息的克隆库。然后用多种其它菌种的 DNA 作探针来筛选，产生杂交信号的克隆被剔除，最后剩下的不与任何其它细菌杂交的克隆则可能含有该细菌特异性 DNA 片段。将此重组质粒标记后作探针进一步鉴定，亦可经 DNA 序列分析鉴定其基因来源和功能。因此要得到一种特异性 DNA 探针，常常是比较繁琐的。探针 DNA 克隆的筛选也可采用血清学方法，所不同的是所建 DNA 文库为可表达性，克隆菌落或噬斑经裂解后释放出表达抗原，然后用来源细菌的多克隆抗血清筛选阳性克隆，所得到多个阳性克隆再经其它细菌的抗血清筛选，最后只与本细菌抗血清反应的表达克隆即含有此细菌的特异性基因片段，它所编码的蛋白是该菌种所特有的。用这种表达文库筛选得到的显然只是特定基因探针。

对于基因探针的克隆尚有更快捷的途径。这也是许多重要蛋白质的编码基因的克隆方法。该方法的第一步是分离纯化蛋白质，然后测定该蛋白的氨基或羟基末端的部分氨基酸序列，然后根据这一序列合成一套寡核苷酸探针。用此探针在 DNA 文库中筛选，阳性克隆即是目标蛋白的编码基因。值得一提的是真核细胞和原核细胞 DNA 组织有所不同。真核基因中含有非编码的内含子序列，而原核则没有。因此，真核基因组 DNA 探针用于检测基因表达时杂交效率要明显低于 cDNA 探针。

DNA 探针（包括 cDNA 探针）的主要优点有下面三点：①这类探针多克隆在质粒载体中，可以无限繁殖，取之不尽，制备方法简便。②DNA 探针不易降解（相对 RNA 而言），一般能有效抑制 DNA 酶活性。③DNA 探针的标记方法较成熟，有多种方法可供选择，如缺口平移，随机引物法，PCR 标记法等，能用于同位素和非同位素标记。

## （二）cDNA 探针

cDNA (complementary DNA) 是指互补于 mRNA 的 DNA 分子。cDNA 是由 RNA 经一种称为逆转录酶 (reverse transcriptase) 的 DNA 聚合酶催化产生的，这种逆转录酶是 Temin 等在 70 年代初研究致癌 RNA 病毒时发现的。该酶以 RNA 为模板，根据碱基配对原则，按照 RNA 的核苷酸顺序合成 DNA（其中 U 与 A 配对）。这一途径与一般遗传信息流的方向相反，故称反向转录或逆转录。携带逆转录酶的病毒侵入宿主细胞后，病毒 RNA 在逆转录酶的催化下转化成双链 cDNA，并进而整合入宿主细胞染色体 DNA 分子，随宿主细胞 DNA 复制同时复制。这种整合的病毒基因组称为原病毒。在静止状态下，可被复制多代，但不被表达，故无毒性。一旦因某种因素刺激而被活化，则该病毒大量复制，如其带有癌基因，还可能诱发细胞癌变，后来发现逆转录酶不仅普遍存在于 RNA 病

毒中，而且哺乳动物的胚胎细胞和正在分裂的淋巴细胞也含有逆转录酶。逆转录酶的作用是以 dNTP 为底物，RNA 为模板，tRNA（主要是色氨酸 tRNA）为引物，在 Trna3' -OH 末端上，5' -3' 方向，合成与 RNA 互补的 DNA 单链，称为互补 DNA（cDNA），单链 cDNA 与模板 RNA 形成 RNA-DNA 杂交体。随后在逆转录酶的 RNase H 活性作用下，将 RNA 链水解成小片段。cDNA 单链的 3' 末端回折形成一个小引物末端，逆转录酶又以第一条 cDNA 链为模板再合成第二第 cDNA 链，至此，完成逆转录全过程，合成双链 cDNA。

逆转录现在已成为一项重要的分子生物学技术，广泛用于基因的克隆和表达。从逆转录病毒中提取的逆转录酶已商品化，最常用的有 AMV 逆转录酶。利用真核 Mrna3' 末端存在一段聚腺苷酸尾，可以合成一段寡聚胸苷酸（oligo(dT)）用作引物，在逆转录酶催化下合成互补于 mRNA 的 cRNA 链，然后再用 RNase H 将 mRNA 消化掉，再加入大肠杆菌的 DNA 聚合酶 I 催化合成另一条 DNA 链，即完成了从 mRNA 到双链 DNA 的逆转录过程。

所得到的双链 cDNA 分子经 S1 核酸酶切平两端后接一个有限制酶切点的接头（linker），再经特定的限制酶消化产生粘性末端，即可与含互补末端的载体进行连接。常用的克隆载体是  $\lambda$  噬菌体 DNA，如  $\lambda$  gt, EMBL 和 Charon 系列等。用这类载体可以得到包含 10<sup>4</sup> 以上的转化子的文库，再经前面介绍的筛选方法筛选特定基因克隆。用这种技术获得的 DNA 探针不含有内含子序列。因此尤其适用于基因表达的检测。

### （三）RNA 探针

RNA 探针是一类很有前途的核酸探针，由于 RNA 是单链分子，所以它与靶序列的杂交反应效率极高。早期采用的 RNA 探针是细胞 mRNA 探针和病毒 RNA 探针，这些 RNA 是在细胞基因转录或病毒复制过程中得到标记的，标记效率往往不高，且受到多种因素的制约。这类 RNA 探针主要用于研究目的，而不是用于检测。例如，在筛选逆转录病毒人类免疫缺陷病毒（HIV）的基因组 DNA 克隆时，因无 DNA 探针可利用，就利用 HIV 的全套标记 mRNA 作为探针，成功地筛选到多株 HIV 基因组 DNA 克隆。又如进行中的转录分析（nuclear run on transcription assay）时，在体外将细胞核分离出来，然后在  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP 的存在下进行转录，所合成 mRNA 均掺入同位素而得到标记，此混合 mRNA 与固定于硝酸纤维素滤膜上的某一特定的基因的 DNA 进行杂交，便可反映出该基因的转录状态，这是一种反向探针实验技术。

近几年体外转录技术不断完善，已相继建立了单向和双向体外转录系统。该系统主要基于一类新型载体 pSP 和 pGEM，这类载体在多克隆位点两侧分别带有 SP6 启动子和 T7 启动子，在 SP6RNA 聚合酶或 T7RNA 聚合酶作用下可以进行 RNA 转录，如果在多克隆位点接头中插入了外源 DNA 片段，则可以此 DNA 两条链中的一条为模板转录生成 RNA。这种体外转录反应效率很高，在 1h 内可合成近 10  $\mu$ g 的 RNA 产生，只要在底物中加入适量的放射性或生物素标记的 NTP，则所合成的 RNA 可得到高效标记。该方法能有效地控制探针的长度并可提高标记物的利用率。

值得一提的是，通过改变外源基因的插入方向或选用不同的 RNA 聚合酶，可以控制 RNA 的转录方向，即以哪条 DNA 链为模板转录 RNA。这种可以得到同义 RNA 探针（与 mRNA 同序列）和反义 RNA 探针（与 mRNA 互补），反义 RNA 又称 cRNA，除可用于反义核酸研究外，还可用于检测 mRNA 的表达水平。在这种情况下，因为探针和靶序列均为单链，所以杂交的效率要比 DNA-DNA 杂交高几个数量级。RNA 探针除可用于检测 DNA 和 mRNA 外，还有一个重要用途，在研究基因表达时，常常需要观察该基因的转录状况。在原核表达系统中外源基因不仅进行正向转录，有时还存在反向转录（即生成反义 RNA），这种现象往往是外源基因表达不高的重要原因。另外，在真核系统，某些基因也存在反向转录，产生反义 RNA，参与自身表达的调控。在这些情况下，要准确测定正向和反向转录水平就不能用双链 DNA 探针，而只能用 RNA 探针或单链 DNA 探针。

综上所述，RNA 探针和 cRNA 探针具有 DNA 探针所不能比拟的高杂交效率，但 RNA 探针也存在易于降解和标记方法复杂等缺点。

#### （四）寡核苷酸探针

前述三种探针均是可克隆的，一般情况下，只要有克隆的探针，就不用寡核苷酸探针。在 DNA 序列未知而必须首先进行克隆以便绘制酶谱和测序时，也常应用克隆。克隆探针一般较寡核苷酸探针特异性强，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因更多。但是，较长的探针对于靶序列变异的识别能力又有所降低。对于仅是单个碱基或少数碱基不同的两序列，克隆探针不能区分，往往杂交信号相当。这既是其优点，又是其缺点。优点是当用于检测病原微生物时，不会因病毒或细菌 DNA 的少许变异而漏诊，缺点则是不能用于点突变的检测。这种情况下，通常要采用化学合成的寡核苷酸探针。

合成的寡核苷酸探针具有一些独特的优点：①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，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 16h。②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。③一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方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 18~40 个碱基，目前的合成仪可有效地合成至少 50 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-CCCC-。

⑤一旦选定某一序更符合上述标准，最好将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个或更多的碱基的同源，否则，该探针不能用。

按上述原则选出的探针会增加成功的机会，选定后进行合成与标记，并摸索合适的杂交条件。方法是制备几张点有特异靶DNA和不相关DNA的膜，各膜分别在不同温度下与探针杂交，特异靶DNA杂交信号强而非特异DNA不产生任何杂交反应的就是最适杂交温度。在进行点突变检测杂交的反应时，洗膜条件和温度物选择往往更为重要。所选漂洗条件必需使野生型靶DNA与探针产生强的杂交信号而突变型靶DNA则不产生杂交信号，这可以通过逐渐提高洗膜温度来完成。

寡核苷酸探针还有一个重要用途。在用于检测单个碱基差异时尚可采用一种称为寡核苷酸限制（oligonucleotide restriction）的技术。该技术只有在突变点位于某一限制性内切酶识别位点时才有效。例如，镰刀状红细胞贫血是因 $\beta$ 珠蛋白基因的第6个寡码子由GAG变成GTG，从而导致所编码氨基酸由酪氨酸变成缬氨酸。突变的 $\beta$ -珠蛋白功能异常，称作S珠蛋白，而野生型称为A珠蛋白，其基因型分别为 $\beta$ S和 $\beta$ A。恰好突变点A $\rightarrow$ T位于DeI I的识别序列CT-NAG之内，这就为设计寡核苷酸限制实验创造了条件。方法是合成一个长40个碱基的寡核苷酸探针，其5'末端距突变碱基有11个碱基，该探针与 $\beta$ A基因的非编码链互补。将此探针的5'末端标记上 $^{32}\text{P}$ 。杂交方法采用液相杂交法，即在液相中将靶DNA变性解链，然后与探针退火，产生杂交体。如靶DNA为 $\beta$ A型，则两条链完全互补，并产生Dde I的酶切位点；如待检DNA为 $\beta$ S型，则所形成的杂交体中两条链在突变碱基处不配对，从而不能被DeI I所识别。用DeI I消化杂交DNA，显然 $\beta$ A会被切开而 $\beta$ S不被切开。 $\beta$ ADNA杂交体被切开后，5'端探针序列因只有8个碱基，与杂交链结合不紧而解离，从而产生游离的5'端标记8核苷酸单链。不被切开的 $\beta$ S杂交体尚可被另一个限制酶Hinf I消化，该酶的识别位点紧靠DeI I识别位点上游。 $\beta$ S杂交DNA经Hinf I消化后，将释出探针DNA的5'末端3核苷酸小片段。 $\beta$ ADNA杂交体因已无Hinf I识别序列，故而不能被Hinf I消化。这样 $\beta$ A和 $\beta$ SDNA经此寡核苷酸探针杂交和DeI I及Hinf I消化后，分别产生游离的8核苷酸（8nt）和3核苷酸（3nt）片段，它们可以经电泳分离后进行放射自显影而获证实。藉此策略，可轻易将各种 $\beta$ 珠蛋白突变型鉴别开，如纯合野生型AA结果为仅有8nt片段，纯合突变型SS则仅可检出3nt片段，而杂合子AS型则两种片段均存在。

#### 四、核酸探针的标记和检测

分子杂交是核酸链间碱基配对规则的一种结合方式，是核酸的重要理化特性。利用分子杂交这一特性来对特定核酸序列进行检测，必须将杂交链中的一条用某种可以检测的分子进行标记，这条链就称为核酸探针。因此，核酸探针的制备是分子杂交技术的关键。最早采用的也是目前最常用的核酸探针标记方法是放射性同位素标记。常用的放射性同位素有 $^{32}\text{P}$ 和 $^{35}\text{S}$ 前者能量高，

信号强，最常用。放射性同位素标记探针虽然敏感度高，但却存在辐射危害和半衰期限制（ $^{32}\text{P}$  半衰期为 14.3 天， $^{35}\text{S}$  半衰期为 87.1 天， $^{125}\text{I}$  的半衰期为 60 天）， $^3\text{H}$  的半衰期长达 12.3 年，但它所释放  $\beta$  放射线能量太低（0.018MeV），只能用于组织原位杂交。由于同位素标记的探针在使用过程中存在着上述缺点，近些年来，人们在寻找非放射性标记物方面取得了很大进展，国际上已有多家公司相继推出多种非放射性探针标记试剂盒，在国内也已具备生物素类标记物的生产能力，并有相应试剂出售。目前，非放射性标记物有下述几类：金属如 Hg，荧光物质如 FITC；半抗原如地高辛；生物素；酶类如辣根过氧化物酶（HRP）。半乳糖苷酶或碱性磷酸酶（AKP）等。不同的标记物，所标记探针的方法及检测方法也各异。下面仅就国际上较常用的，有实用价值或发展前景的几种核酸标记方法及其显示方法分两方面简述如下。

#### （一）核酸探针的常用酶促标记技术

1. 缺口平移 该技术由 Kelly 等于 1970 年创立。其原理是首先用 DNA 酶在双链 DNA 探针分子的一条链上制造一些缺口（nick），缺口处会形成 3'—羟基末端，这时再在大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的催化下将核苷酸残基加在 3'—羟基上，同时，根据大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 5'→3' 核酸外切酶活性，此酶将缺口 5' 侧核苷酸依次切除。其结果是在缺口平移（nick translation）。根据这个原理，如果用高强度的放射性核苷酸（通常为  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ dATP）置换先前存在的核苷酸，则可制备比活性高达 108cpm（每分钟计数）/ $\mu\text{g}$  的  $^{32}\text{P}$  标记 DNA。用缺口平移法标记的 DNA 探针能满足大多数杂交要求。

2. DNA 快速末端标记 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 经枯草杆菌蛋白酶切割可得到两条多肽链，其中分子量为 76kd 的大片段称为 Klenow 片段。该酶具有完整聚合酶 I 的 5'→3' 聚合酶活性和 3'→5' 核酸外切酶活性，但缺乏 5'→3' 核酸外切酶活性。利用 Klenow 片段可以填补由限制酶消解 DNA 所产生的 3' 凹陷末端。因此，用这种方法可以标记双链 DNA 的凹陷 3' 末端。用 Klenow 片段标记末端一般只用一种  $[\alpha$ - $^{32}\text{P}]$ dNTP，加入反应的  $[\alpha$ - $^{32}\text{P}]$ dNTP 取决于 DNA 末端延伸的 5' 末端序列，例如，用 Ecor I 切割 DNA 所产生的末端用  $[\alpha$ - $^{32}\text{P}]$ dNTP 标记。标记反应可在一种限制酶消解 DNA 后立即进行，不需去除限制酶或使其失活，也不需更换缓冲液，具有 3' 延伸的 DNA 末端不能被 Klenow 片段有效在标记，欲标记这类分子可用 T4DNA 聚合酶。

选用这种标记方法是为了产生可用于凝胶电泳时作大小参照物的 DNA 片段。因为标记的 DNA 片段与其摩尔浓度成比例，而不与片段大小成比例，在限制酶消化物中，小的和大的片段都以相同程度被标记。因此，可使用放射自显影术确定不被溴化乙锭染色所观察到的大小 DNA 带，尤其适用于 Southern 吸印杂交时分子量标志物的标记。通过选择相应标记的 dNTP，该法还可以只标记 DNA 分子的一端。例如，若 DNA 片段的两个末端分别是 Bam H I 和 Hind III 粘末端，在反应中只加入  $[\alpha$ - $^{32}\text{P}]$ dNTP 或  $[\alpha$ - $^{32}\text{P}]$ dGTP，使可选择性标记两末端之一。

3. 用 T4 多核苷酸激酶标记 DNA 5' 末端 寡核苷酸探针或短的 RNA 和 DNA 探针可选用此法

标记，寡核苷酸探针一般多用这种标记。T4 多核苷酸激酶 (polynucleotide kinase, PNK) 是由 T4 噬菌体感染的大肠杆菌中提取的，此酶能催化 ATP 的  $\gamma$ -磷酸转移至 DNA 或 RNA 的 5' -OH 末端。在过量 ADP 存在时，也可促进磷酸交换反应，使 PNK 将 DNA 末端 5' 磷酸转移到 ADP 上生成 ATP，然后催化  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$  上的标记磷酸转移至 DNA 的 5' 末端，从而使 DNA 重新磷酸化，并藉此得到标记。显然，PNK 标记 DNA 末端需要  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$ ，这与前述酶促标记方法不同。通常，对于 5' 磷酸化的 DNA 探针，要先用碱性磷酸酶去掉磷酸基团，然后再用于 PNK 催化的 5' 末端标记，这样标记效率较高。

4. 随机引物延伸 这是以单链 DNA 或 RNA 模板合成高比活性  $^{32}\text{P}$  标记探针所选用的方法。原理是使长 6~8nt 的寡核苷酸片段与变性的 DNA 或 RNA 模板退火，在 DNA 聚合酶 I 或反转录酶的作用下，以每一个退火到模板上的寡核苷酸片段为引物引发 DNA 链的合成，在反应时将  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$  掺入合成链，即得到标记。变性处理后，新合成链（探针片段）与模板解离，即得到无数各种大小的探针 DNA。因为所用寡核苷酸片段很短，在低温条件下可与模板 DNA 随机发生退火反应，因此被称为随机引物 (random primer)。这种随机引物可用小牛胸腺 DNA 或鱼精 DNA 制备。

用随机引物法标记的 DNA 探针或 cDNA 探针比活性显著高于缺口平移法，且结果较为稳定。这种方法尤其适用于真核 DNA 探针，因为随机引物来自真核 DNA，其与真核序列的退火率要高于原核序列。因此，对于克隆的 DNA 探针，常先将插入探针 DNA 切下来回收后再标记，而缺口平移法可直接用于全质粒的标记。

5. 聚合酶链反应 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是一种分子生物学新技术，由美国 Cetus 公司人类遗传学部的 Kary. B. Mullis 于 1985 年创立。该技术利用两个与相反链杂交并随着于靶 DNA 两侧的寡核苷酸引物经酶促合成特异的 DNA 片段，包括模板变性，引物退火和引物延伸三个步骤的反复循环，最终两引物所夹靶 DNA 得到千万倍以上的扩增。因此，PCR 技术已成为一项极为有价值的技术并已迅速推广应用。

PCR 技术有许多重要用途，其中之一便是可用来标记高比活性 DNA 探针。PCR 技术具有很高的特异性，可在 1~2h 之内在量合成探针 DNA 片段，如果在底物中加入  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$  或其它标记的 dNTP，则探针 DNA 合成过程中可得到很好的标记，标记物的掺入率可高达 70%~80%。因此，PCR 标记技术特别适用于大规模检测和非放射性标记。该法的缺点是要合成一对特异性 PCR 引物。使用从探针 DNA 上制备的小片段作引物也能取得较好的标记效果。

## (二) 核酸探针的非放射性标记技术

1. 光敏生物素标记核酸 目前使用的光敏生物素试剂有两种：光生物素（乙酸盐）和补骨脂生物素。它们都是由一个光敏基团、一个连接臂和一个生物素基团组成。光生物素的光敏基团是-N3，它在光作用下可与核酸中的碱基结合。补骨脂生物素中的光敏基团补骨脂素在光照

(320~400 μm) 下，可与单链或双链核酸发生反应，反应主要在 T 上，C 上也有一定程度的反应。光敏生物素的连接臂含 6~12 个碳原子，用以减少探针杂交时的空间位阻。光敏生物素标记核酸，方法简单，灵敏度也可达到 pg 水平，可用于外源基因的检测。最近出现了一种新的光敏活性 DNA 生物素试剂，即生物素-聚乙二醇-当归素 (BPA)。BPA 的 DNA 结合部分是一个活性糖香豆素衍生物，在长波 UV 下它可与 DNA 碱基共价键结合。BPA 反应物与 DNA 结合比光敏生物素更特异，在可见光下它不与核酸反应，这个特性可使 BPA 只标记粗制细胞裂解物中的核酸，而不标记蛋白、多糖和其他细胞大分子。

2. 酶促生物素标记核酸 以生物素化的脱氧核苷三磷酸 (Bio-11-dUTP, Bio-7-dATP、Bio-11-dCTP) 等代替相应 32P 标记的脱氧核苷三磷酸，经 DNA 聚合酶作用掺入 DNA。Bio-dUTP 代替 dTTP, Bio-dATP 代替 dATP, Bio-dCTP 代替 dCTP。Bio-11-dUTP 的 11 是指生物素基团与脱氧核苷酸之间连接臂的碳链长度。常用的酶促生物素标记 DNA 的方法有缺口平移法和随机引物延伸法。

3. 寡核苷酸的生物素末端标记 有 5'-磷酸的化学标记法和 3'-OH 的酶促标记法。前者将寡核苷酸的 5'-磷酸接上一个乙二胺，然后用琥珀酰亚胺生物素，将生物素基团连接在磷酸酰胺基上。后者是用末端转移酶将 Bio-11-dUTP 加于其 3'-OH 端 (脱去一个焦磷酸)。

4. 酶标 DNA 标记试剂是辣根过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸酶 (AP)。通过对苯醌 (PBQ) 与聚乙烯亚胺 (PEI) 连接而成 (HRP-PBQ-PEI+)，此试剂在戊二醛的作用下与变性的 DNA 结合，使 HRP 与 DNA 连接在一起，组成 HRP 标记的 DNA 探针。

5. 酶标寡核苷酸 包括核苷酸 5' 末端标记 HRP 法和内部标记 AP 法。前者是在 HRP 中产生一个 -HS 反应基团，在寡核苷酸合成终了加在 5' 端，带一个 C6 的 -HS 基，与活化的 HRP 反应生成 5' -HRP 寡核苷酸。后者是在全成寡核苷酸过程中将一个 5' 带连接臂及 CF<sub>3</sub> 基团的尿苷 3' 亚磷酰亚胺合成在寡核苷酸链中，合成后此活化的寡核苷酸与 AP 反应即得到 AP 标记的寡核苷酸。

6. DNA 半抗原标记 其原理与 Bio-11-dUTP 相同，只是用毛地黄甙代替生物素形成 Dig-11-dUTP，酶促掺入 DNA 分子。用抗毛地黄甙抗体检测标记在 DNA 上的半抗原分子 Digoxigenin (地高辛)

### (三) 非放射性探针的显示体系

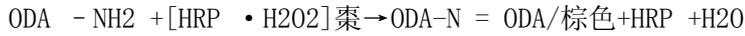
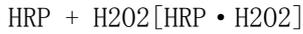
#### 1. AP 显色体系

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

BCI - OH + NBT → 紫色

ASO: 等位基因特异的寡核苷酸, BCIP: 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸, NBT: 四氮唑蓝, Pi: 磷酸。

2. HRP 显色体系



ODA: 邻-联茴香胺。

3. ABC 显色体系



经上述两反应，把 AP 连接在 DNA 上以后，再进行 AP 酶显色。这里 SA 为 Streptavidin (链酶亲合素)，BAP 为生物素化的磷酸酶，B 为生物素 (biotin)，ABC 为 Avidin - Biotin - Enzyme complex，即亲合素-生物素-酶复合物。

以上反应 AP 亦可用 HRP 代替。

表 18-3 甲核酸探针的标记分子

标记物性质	标记分子	标记方法	杂交体的检测法
放射性分子	[ $\alpha$ -32P]dNTP	NT、PCR、RPI	放射自显影或计数
	[ $\gamma$ -32P]dNTP	TL	放射自显影或计数
	125I	碘化	放射自显影或计数
	35S	NT	放射自显影或计数
	3H	NT	放射自显影或计数
非放射性分子			
生物素	Bio-11-dUTP	NT、TL、PCR	酶标亲合素或酶标抗生物素抗体显色
	光敏生物素	600W 可见光照	同上
	生物素化补骨脂素	365nm 紫外线照	同上
	生物素酰-e-氨基乙酸	化学合成法	同上
	N-羟基丁二酰亚胺脂		酶标亲合素或酶标抗生物素抗体显色
	生物素肼	化学合成法	酶标亲合素或酶标抗生物素抗体显色
酶	微过氧化物酶	直接法或合成	直接底物显色或用酶标抗体+底物显

		法	色
	碱性磷酸酯酶	直接法或合成法	同上
荧光素	罗丹明和 FITC	合成法	直接荧光显微镜观察或酶标抗体+ 底物显色
化学发光标记物			化学发光测量或自显影
抗双链单抗	酶标或荧光标记单抗	化学法	直接底物显色
稀有金属	Eu3+	化学法	时间分辨荧光
重金属	Ag	化学法	
	Hg	化学法	
半抗原	磺胺胞嘧啶	化学法	酶标单抗 + 底物显色
	地高辛	RPL	酶标抗体 + 底物显色

\* : NT: 缺口平移; PCR: 聚合酶链反应; RPL: 随机引物标记; TL: 末端标记

4. 非放射发光自显影 若将 AP 或 HRP 的显色底物根据光化学原理换成一种酶解后产生光子的化合物，可用自显影技术暴光 X 线片显示。

(1) HRP 发光自显影: 氨基苯-甲酰肼在 HRP 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的作用下氧化为氨基苯二甲酸，同时放出 N<sub>2</sub> 及发光（波长 428nm）。发光时加入某些酚的衍生物时可增强发光上千倍。反应如下图：

(2) AP 的发光自显影: AP 的发光底物是金刚烷二氧丁环磷酸盐（AMPPD），它含有磷酸酯键在 AP 的作用下水解下一个磷酸，进而由分子内过氧键提供能源分解产生金刚酮和激发态的甲基间-氧苯甲酸阴离子，当此阴离子恢复到基态时发出光子。可用波拉黑白片（621 型）直接暴光显影。显影信号强度比 BCIP/NBP 显色法强两上数量级。是很前景的显示体系。

其发光反应的原理如下：

HRP 的发光原理：

$$t_{1/2} = \frac{500(0.693)}{3.5 \times 10^5(22)6 \times 10^{-10}} = 75000 \text{ s 或 } 20 \text{ h}$$

AP 的发光原理：

$$T_m = \frac{81.5^\circ\text{C} + 16 \cdot \log(\text{mol/L}) + 0.41(G + C\%) - 500}{[n - 0.16(\text{甲酰胺}\%)]}$$

## 五、核酸分子杂交的类型

随着基因工程研究技术的迅猛发展，新的核酸分子杂交类型和方法在不断涌现和完善。核酸分子杂交可按作用环境大致分为固相杂交和液相杂交两种类型。固相杂交是将参加反应的一条核酸链先固定在固体支持物上，一条反应核酸游离在溶液中。固体支持物有硝酸纤维素滤膜、尼龙膜、乳胶颗粒、磁珠和微孔板等。液相杂交所参加反应的两条核酸链都游离在溶液中。

由于固相杂交后，未杂交的游离片段可容易地漂洗除去，膜上留下的杂交物容易检测和能防止靶 DNA 自我复性等优点，故该法最为常用。常用的固相杂交类型有：菌落原位杂交、斑点杂交、狭缝杂交、Southern 印迹杂交、Northern 印迹杂交、组织原位杂交和夹心杂交等。

液相杂交是一种研究最早且操作复合的杂交类型，在过去的 30 年里虽有时被应用，但总不如固相杂交那样普遍。其主要原因是杂交后过量的未杂交探针在溶液中除去较为困难和误差较高。近几年由于杂交检测技术的不断改进，商业性基因探针诊断盒的实际应用，推动了液相杂交技术的迅速发展。下面对固相杂交和液相杂交分别进行介绍。

### （一）固相膜核酸分子杂交方法

固相核酸杂交多是在膜上进行，因此，以下主要介绍固相膜的核酸分子杂交方法：

1. DNA 的变性 DNA 变性解链是杂交成功的关键。Southern 印迹杂交时 DNA 在凝胶中变性，变性方法是将凝胶浸在数倍体积的 1.5mol/l NaCl 和 0.5mol/l NaOH 中 1h 然后用数倍体积的 1mol/l Tris - HCl(pH8.0)和 1.5mol/l NaCl 溶液中和 1h。DNA 受酸、碱、热等处理均能发生变性，但强酸会使核酸降解。一般认为碱变性较好，可避免 DNA 降解。热变性在要低 DNA 浓度（100 μg/ml）和低盐浓度（0.1mol/l SSC 含 15mmol/l NaCl - 1.5mmol/L 柠檬酸三钠，pH7.0）下进行。用 SSC 稀释 DNA 溶液为 50 μg/ml,加 10mol/l NaOH 使最终浓度为 0.1mol/L（pH 约 12.8），室温变性 10min,很快置冰盐水中，用 10min/l HCl 或 5mol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 调 pH 到 7~8[亦可用碱变性后，调至中性，再加热 100. c 10min]，DNA 变怀可用 OD<sub>260</sub> 增加（约 30%~40%）来检测，变性 DNA 醇沉淀呈雪样，完全失去纤维状沉淀。变性后加入等量冷的 12×SSC，冰浴保存。

2. 变性 DNA 在硝酸纤维素膜上的固定 硝酸纤维素滤膜（孔径 0.45 μm）先在蒸馏水中充分浸泡，再用 6×SSC 浸泡 30min~2h，凉干。DNA 样品转移或加至硝酸纤维素膜上后，先室温干燥 4h，然后在 80. C 真空干燥 2h。

3. 预杂交 湿润的滤膜放入可加热封口的塑料袋中，按每平方厘米滤膜加 0.2ml 预热至 60. C 的预杂交液（6×SSC，0.5%,SDS,5×Denhardt 液，100 μg/ml 鲑鱼精 DNA）。鲑鱼精 DNA 需经过剪切和 DNA 酶消化处理，然后酒精沉淀纯化，调浓度至 10mg/ml，用前放 100. C 水浴中煮沸

变性 10min，冰水骤冷。尽可能将袋中气泡赶走，可封口器将袋口封住。将杂交袋浸入 68. C 水浴保温 3~12h。当预杂交液温度升至 68. C 时，在滤膜表面常会形成小气泡。轻轻晃动袋中液体即可除去这些小气泡，这一点对于保证滤膜表面充分浸润预杂交液很重要。

4. 杂交 从水浴中取出塑料袋，用剪刀剪开一角，尽可能挤净预杂交液。用吸管或大枪头将杂交液加入袋中，用恰好是足量的液体保持滤膜湿润（50  $\mu$  l/cm<sup>2</sup>）。溶液的组成是 6 $\times$ SSC，0.01mol/l EDTA，变性的标记核酸探针，5 $\times$ Denhardt 液，0.5%SDS，100  $\mu$  g/ml 变性的鲑鱼精 DNA。尽可能赶走气泡后，将塑料袋严密封口，杂交反应在 68 $^{\circ}$ C 水浴中进行，所需时间视探针和检测靶 DNA 的性质及探针的比活性等情况而定，一般 4~20h。

5. 洗膜 取出塑料袋，用剪刀剪开，小心取出滤膜，立即浸入盛有 2 $\times$ SSC 和 0.5%SDS 溶液的盘中，室温下漂洗 5min。再将滤膜移入 2 $\times$ SSC 和 0.1%SDS 溶液中，室温下洗涤 15min（轻轻摇动）。然后将滤膜移入 0.1 $\times$ SSC 和 0.5%SDS 溶液中；68 $^{\circ}$ C 轻轻摇动保温 2h，更换缓冲液后继续保温 30min。

洗膜的温度一般应控制在低于 T<sub>m</sub> 值 12 $^{\circ}$ C 以上。（T<sub>m</sub> = 69.3 + 0.41x(G + C) %）。双链 DNA 的 T<sub>m</sub> 值随错配碱基对数每增加 1% 而递减 1 $^{\circ}$ C。

6. 结果显示 非放射性检测方法前已述及，此处主要介绍放射性测定方法。固相膜的放射性杂交结果显示有两种方式，一是放射性自显影法，另一种是液闪计数法。前一种方法比较简单，只需将杂交膜与 X 光片在暗盒中曝光数小时至数天，再显影、定影即可。对于杂交信号较弱的固相膜，用一块增感屏可显著增强曝光强度。此外，为了减弱 32P 的散射，曝光通常在 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C 下进行。液闪计数法主要用于打点和狭缝杂交及为了比较两个杂交信号的强弱等情形。方法是将完成杂交的膜在漂洗结束后剪成小块（每份样品 1 块），80 $^{\circ}$ C 真空干燥后装闪烁瓶。加入 2~5ml 闪烁液，剪 2~3 块无样品膜块作为本底对照。在液体闪烁计数器上自动计数。液体计数测定放射性强度也可在放射自显影之后进行。

## （二）固相核酸分子杂交类型

1. 菌落原位杂交（Colony in situ hybridization） 菌落原位杂交是将细菌从培养平板转移到硝酸纤维素滤膜上，然后将滤膜上的菌落裂菌以释出 DNA。将 NDA 烘干固定于膜上与 32P 标记的探针杂交，放射自显影检测菌落杂交信号，并与平板上的菌落对位。

实验步骤如下：

①将硝酸纤维素滤膜置于含抗生素的平皿琼脂培养基上，用无菌牙签挑取单菌落种于滤膜和主琼脂平板上，排列成方格栅，膜和板上菌落位置相同。

②培养细菌至产生 1~2mm 大小的菌落。

③在一块平皿中置 4 张滤纸，用 10%SDS 浸透，倒掉多余液体。将带有菌落的滤膜取下，轻轻置于滤纸上，菌落面上在，注意防止在滤膜底面存有气泡。

④5min 后，将滤膜转至用变性溶液（0.5mol/l NaCl , 0.5mol/L Tris • NaCl）浸湿的滤纸上，放置 10min。

⑤将滤膜转至中和溶液（1.5mol/l NaCl , 0.5mol/L Tris • HCl , pH8.0）浸湿的滤纸上，放置 10min。重复中和 1 次。

⑥将滤膜移至用 2×SSPE 溶液浸过的滤纸上，放置 10min。SSPE 配成 20×贮备液：3.6mol/l NaCl, 0.2mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH7.4), 20mmol/L EDTA(pH7.4)。

⑦将滤膜用滤纸吸干，80℃真空烘干 2h。

以下操作参考前述。

2. 斑点杂交 (Dot blot) 斑点杂交法是将被检标本点到膜上，烘烤固定。这种方法耗时短，可做半定量分析，一张膜上可同时检测多个样品。为使点样准确方便，市售有多种多管吸印仪 (manifolds)，如 Minifold I 和 II、Bio-Dot (Bio - Rad) 和 Hybri - Dot, 它们有许多孔，样品加到孔中，在负压下就会流到膜上呈斑点状或狭缝状，反复冲洗进样孔，取出膜烤干或紫外线照射以固定标本，这时的膜就可以进行杂交。

#### (1) DAN 斑点杂交

①先将膜在水中浸湿，再放到 15×SSC 中。

②将 DNA 样品溶于水或 TE，煮沸 5min，冰中速冷。

③用铅笔在滤膜上标好位置，将 DNA 点样于膜上。每个样品一般点 50 μl (2~10 μg DNA)。

④将膜烘干，密封保存备用。

(2) RNA 斑点杂交：与上法类似，每个样品至多加 10 μg 总 RNA (经酚/氯仿或异硫氰酸胍提取纯化)。方法是将 RNA 溶于 5 μl IDEPC 水，加 15 μl 甲醛/SSC 缓冲液 (10×SSC 中含 0.15mol/l 甲醛) 使 RNA 变性。然后取 5~8 μl 点样于处理好的滤膜上，烘干。

培养细胞，标本处理技术可以简化，不用提取和纯化 RNA。方法是用含 0.5% Nonidet P40 的低渗缓冲液对多种动物细胞作简单处理，离心去掉细胞核和细胞碎片，就得到基本不带 DNA 而富含 RNA 的细胞质提取物，这一粗 RNA 在高盐下用甲醛变性，不需加工直接点到硝酸纤维素膜上。本法可以快速检测大量标本，而只需极少量的细胞 (5×10<sup>4</sup>) 或组织。

整个 RNA 实验中，要防止激活内源性 RNase，有许多种预防措施，有一种是在样品中加入核糖核苷氧砒基复合物 (RVC)。

(3) 完整细胞斑点杂交：应用类似检测细菌菌落的方法，可以对细胞培养物的特异序列进行快速检测。将整个细胞点到膜上，经 NaOH 处理，使 DNA 暴露、变性和固定，再按常规方法进行杂交与检测。有人曾用此法从 10<sup>5</sup> 个培养细胞中检测到少至 5pg 的 Epstein - Barr 病毒 DNA。完整细胞斑点印迹法可以用于筛选大量标本，因为它是使细胞直接在膜上溶解，所以 DNA 含量甚至比常用的提取法还高，又不影响与 32P 标记的探针杂交。但它不适于非放射性标记探针，

因为 DNA 纯度不够，会产生高本底。

3. Southern 印迹杂交 (southern blot) Southern blot 是研究 DNA 图谱的基本技术，在遗传诊断 DNA 图谱分析及 PCR 产物分析等方面有重要价值。Southern 印迹杂交基本方法是将 DNA 标本用限制性内切酶消化后，经琼脂糖凝胶电泳分离各酶解片段，然后经碱变性，Tris 缓冲液中和，高盐下通过毛吸作用将 DNA 从凝胶中转印至硝酸纤维素滤膜上，烘干固定后即可用于杂交。凝胶中 DNA 片段的相对位置在 DNA 片段转移到滤膜的过程中继续保持着。附着在滤膜上的 DNA 与  $^{32}\text{P}$  标记的探针杂交，利用放射自显影术确定探针互补的每条 DNA 带的位置，从而可以确定在众多酶解产物中含某一特定序列的 DNA 片段的位置和大小。

(1) 琼脂糖凝胶电泳：利用琼脂糖凝胶电泳可以很容易地将 DNA 限制酶消化片段 (0.3~25kb) 分离开。分离大分子 DNA 片段 (800~12000bp) 用低浓度琼脂糖 (0.7%)，分离小分子片段 (500~1000bp) 用高浓度琼脂糖 (1.0%)，300~5000bp 的片段则用 1.3% 的琼脂糖凝胶，根据分离样品量、分离速度和分辨率要求的不同，可选用不同规格的电泳槽。

电泳时，同时将标记物加到旁边孔中，便于确定样品 DNA 的分子量。20 伏恒压电泳过夜。电泳毕，将胶浸到含  $0.5 \mu\text{g/ml}$  EB 的 TBE 缓冲液中染色 30min，也可将 EB 直接加到电泳缓冲液中或在配胶前加入胶中，在 254nm 短波透射灯下拍照，加橙黄色滤色镜，使用高速一次成像胶片，光圈 f4.5，曝光 20~40s。

(2) 硝酸纤维素滤膜吸印。

①将胶切成合适大小，切去右上角作为记号。

②将胶放进盛有变性缓冲液 (1.5mol/l NaCl, 0.5mol/L NaOH) 的盘中轻摇动 15min。

③换到中和缓冲液 (1mol/L Tris · HCl, pH8.0, 1.5mol/L NaCl) 中轻摇动 30min。

④裁一张硝酸纤维素膜，2~4 张 3MM 滤纸和一些吸印纸 (可用卫生纸)，都与胶的大小相同 (硝酸纤维素膜和吸印纸不能比胶大，否则易形成旁路)，先将硝酸纤维素膜浸到水中，再放入  $10\times\text{SSC}$  中，接触胶和硝酸纤维素膜时都要戴橡胶手套操作。

⑤平盘上放一块比胶大的平板 (盛胶槽翻过来即可)，上面铺一张 3MM 滤纸，起灯芯作用，盘中加少量  $10\times\text{SSC}$  缓冲液 (2.5cm 厚)，不能没过平板，使 3MM 滤纸充分饱和。

⑥将胶倒扣到 3MM 滤纸上。

⑦浸湿的硝酸纤维素铺在胶上，对齐，铺膜时从一边逐渐放下，防止产生气泡，有气泡时，可用吸管赶出，不能让膜与胶下的滤纸直接接触。

⑧膜上放一张 3MM 滤纸，不能与胶接触。

⑨上面加吸印纸及重物 (500g 左右)。

⑩通过滤纸的灶芯作用，平盘中的缓冲液就会通过胶上移，从而将 DNA 吸印到膜上，及时更换浸湿的吸印纸。在室温下转印过夜。

(11) 去除上面的东西，用镊子将膜取出，在  $6\times\text{SSC}$  中洗一下（也可不洗）。

(12) 自然干燥， $80^{\circ}\text{C}$  烤 2h。

(13) 这时的膜就可进行杂交，或室温密封保存。

4. Northern 印迹杂交 (Northern blot) 这是一种将 RNA 从琼脂糖凝胶中转印到硝酸纤维素膜上的方法。DNA 印迹技术由 Southern 于 1975 年创建，称为 Southern 印迹技术。RNA 印迹技术正好与 DNA 相对应，故被趣称为 Northern 印迹杂交，与此原理相似的蛋白质印迹技术则被称为 western blot。Northern 印迹杂交的 RNA 吸印与 Southern 印迹杂交的 DNA 吸印方法类似，只是在进样前用甲基氧化汞、乙二醛或甲醛使 RNA 变性，而不用 NaOH，因为它会水解 RNA 的 2'-羟基基团。RNA 变性后有利于在转印过程中与硝酸纤维素膜结合，它同样可在高盐中进行转印，但在烘烤前与膜结合得并不牢固，所以在转印后不能用低盐缓冲液洗膜，否则 RNA 会被洗脱。在胶中不能加 EB，因为它影响 RNA 与硝酸纤维素膜的结合，为测定片段大小，可在同一块胶上加标记物一同电泳，之后将标记物胶切下，上色、照像。样品胶则进行 Northern 转印，标记物胶上色的方法是在暗室中将其浸在含  $5\mu\text{g/ml}$  EB 的  $0.1\text{mol/L}$  醋酸铵中 10min，在水中就可脱色。在紫外光下用一次成像相机拍照时，上色的 RNA 胶要尽可能少接触紫外光，若接触太多或白炽灯下暴露过久，会使 RNA 信号降低。从琼脂糖凝胶中分离功能完整的 mRNA 时，甲基氧化汞是一种强力、可逆变性剂，但是有毒，因而许多人喜用甲醛作为变性剂。所有操作均应避免 RNase 的污染。

下面介绍 RNA 甲醛凝胶电泳和吸印方法：

#### (1) 试剂

$10\times\text{MSE}$  缓冲液： $0.2\text{mol/L}$  吗啉代丙烷磺酸 (MOPS)， $\text{pH}7.0$ ， $50\text{mmol/L}$  醋酸钠， $1\text{mmol/L}$  EDTA， $\text{pH}8.0$ 。

$5\times$  样品缓冲液： $50\%$  甘油， $1\text{mmol/l}$  EDTA， $0.4\%$  溴酚蓝。

甲醛：用水配成  $37\%$  浓度 ( $12.3\text{mol/L}$ )。应在通风柜中操作， $\text{pH}$  高于  $4.0$ 。

去离子甲酰胺。

$50\text{mmol/L}$  NaOH(含  $10\text{mmol/l}$  NaCl)。

$0.1\text{mol/L}$  Tris · HCl,  $\text{pH}7.5$ 。

#### (2) 步骤

①  $40\text{ml}$  水中加  $7\text{g}$  琼脂糖，煮沸溶解，冷却到  $60^{\circ}\text{C}$ ，加  $7\text{ml}$   $10\times\text{MSE}$  缓冲液、 $11.5\text{ml}$  甲醛，加水定容至  $70\text{ml}$ ，混匀后倒入盛胶槽。

② 等胶凝固后，去掉梳子和胶布，将盛胶槽放入  $1\times\text{MSE}$  缓冲液的电泳槽。

③ 使 RNA 变性 (最多  $20\mu\text{g}$ )：RNA  $4.5\mu\text{l}$ ， $10\times\text{MSE}$  缓冲液  $2.0\mu\text{l}$ ，甲醛  $3.5\mu\text{l}$ ，去离子甲酰胺  $10.0\mu\text{l}$ 。

- ④55℃加热 15min，冰浴冷却。
- ⑤加 2 μl 5×载样缓冲液。
- ⑥上样，同时加 RNA 标记物。
- ⑦60 伏电泳过夜。
- ⑧取出凝胶，水中浸泡 2 次，每次 5min。
- ⑨室温下将胶浸到 50mmol/L NaOH 和 10mmol/l NaCl 中 45min，水解高分子 RNA，以增强转印。
- ⑩室温下将胶浸到 0.1mol/L Tris · HCl (Ph7.5)中 45min，使胶中和。
- (1)20×SSC 洗胶 1h。
- (2)20×SSC 中过夜，转印到硝酸纤维素膜上。
- (3)取出硝酸纤维膜，80℃真空烘烤 2h。

5. 组织原位杂交 (Tissue in situ hybridization) 组织原位杂交简称原位杂交，指组织或细胞的原位杂交，它与菌落的原位杂交不同。菌落原位杂交需裂解细菌释出 DNA，然后进行杂交。而原位杂交是经适当处理后，使细胞通透性增加，让探针进入细胞内与 DNA 或 RNA 杂交。因此原位杂交可以确定探针的互补序列在胞内的空间位置，这一点具有重要的生物学和病理学意义。例如，对致密染色体 DNA 的原位杂交可用于显示特定的序列的位置；对分裂期间核 DNA 的杂交可研究特定序列在染色质内的功能排布；与细胞 RNA 的杂交可精确分析任何一种 RNA 在细胞中和组织中的分布。此外，原位杂交还是显示细胞亚群分布和动向及病原微生物存在方式和部位的一种重要技术。

用于原位杂交的探针可以是单链或双链 DNA，也可以是 RNA 探针。通常探针的长度以 100~400nt 为宜，过长则杂交效率减低。最近研究表明，寡核苷酸探针 (16~30nt) 能自由出入细菌和组织细胞壁，杂交效率明显高于长探针。因此，寡核苷酸探针和不对称 PCR 标记的小 DNA 探针或体外转录标记的 RNA 探针是组织原位杂交的优选探针。

探针的标记物可以是放射性同位素，也可以是非放射性生物素和半抗原等。放射性同位素中，<sup>3</sup>H 和 <sup>35</sup>S 最为常用。<sup>3</sup>H 标记的探针半衰期长，成像分辨率高，便于定位，缺点是能量低。<sup>35</sup>S 标记探针活性较高，影像分辨率也较好。而 <sup>32</sup>P 能量过高，致使产生的影像模糊，不利于确定杂交位点。

原位杂交中，标本的固定条件是影响杂交效率的重要因素，标本组织蛋白质的消化程度对探针进入细胞极为重要。去除蛋白的方法是，用 0.2mol/l HCl 处理载玻片，用蛋白酶 K 消化，然后用不同浓度的乙醇脱水，原位杂交还是一种新技术，发展很快，在敏感性、特异性和稳定性上还需要进一步完善和提高。

6. 固相夹心杂交 Dunn 等最早介绍了夹心杂交类型，Ranki 等又作了进一步的改进。夹

心杂交法比直接滤膜杂交法有两个主要的优点：①样品不需要固定，对粗制样品能做出可靠的检测；②用夹心杂交法比直接滤膜杂交法特异性强，因为只有两个杂交物都杂交才能产生可检测的信号。

固相夹心杂交需要两个靠近而不互相重叠的探针，一个作固相吸附探针，另一个作标记检测探针。样品基因组内核酸只有使这两个探针紧密相连才能形成夹心结构。需注意的是两个探针必须分别亚克隆进入两个分离的非同源载体内，以避免产生高的本底信号（如一个克隆人 Puc19，另一克隆人 pBR322）。

夹心杂交法可用滤膜和小珠固定吸附探针，使用小珠可更好地进行标准化试验和更容易对小量样品进行操作。Dahlen 等利用微孔板进行夹心杂交，可同时进行大量样品检测，他们先吸取 DNA 探针加到凹板中，然后用紫外线照射使其固定到塑料板上。用微孔板进行夹心杂交还可直接用于 PCR 技术。应用光敏生物标记探针检测 PCR 产物的敏感性和用  $^{32}\text{P}$  标记探针 ( $3 \times 10^8 \text{cpm}/\mu\text{g}$ ) 作 16h 放射自显影的 Southern 杂交的敏感性一样。用微孔板杂交的其它优点还包括同时做多份样品，加样、漂洗和读结果等步骤可以自动化。

## 7. 其它杂交类型

(1) 固化探针杂交：该法较少使用，原理是使未标记固化探针通过杂交与靶 RNA 或 DNA 结合，漂洗后，用酶标抗 DNA: RNA 抗体或抗 DNA: DNA 抗体与杂交物结合。将乳胶颗粒收集，吸附到膜上后漂洗，加入底物显色并进行测定。探针浓度  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $80^\circ\text{C}$  杂交，可在 10~15min 完成，检测的敏感性为  $5 \times 10^8$  靶序列。

(2) 反向杂交：这个杂交类型是用标记的样品核酸与未标记的固化探针 DNA 杂交，故称为“反向杂交”。这种杂交方法的优点是在一次杂交反应中，可同时检测样品中几种核酸。这种杂交方式主要用于进行中的核酸转录试验和多种病原微生物的检测。前者是在转录过程中标记 RNA 探针，后者可用光敏生物素制剂 BPA 标记样品核酸。

### (三) 固相膜核酸杂交的几点说明

1. 杂交膜的选用 杂交膜是一种多孔、表面积很大的固相载体，核酸一旦固定在上面，就可用杂交法进行检测。最常使用的膜是硝酸纤维素膜，用于放射性和非放射性标记探针都很方便，产生的本底浅，与核酸结合的化学性质不是很清楚，推测为非共价键结合。经  $80^\circ\text{C}$  烤干 2h 和杂交处理后，核酸仍不会脱落。硝酸纤维素膜的另一特点是只与蛋白有微弱非特异结合，这在使用非同位素探针中尤为有用。硝酸纤维素膜的缺点是结合核酸能力的大小取决于转印条件和高浓度盐 ( $>10 \times \text{SSC}$ )，与小片段核酸 ( $<200\text{bp}$ ) 结合不牢，质地脆，不易操作。

尼龙膜在某些方面比硝酸纤维素膜好，它的强度大、耐用，可与小至 10bp 的片段共价结合。在低离子浓度缓冲液等多种条件下，它们都可与 DNA 单链或 RNA 紧密结合，且多数膜不需烧烤。尼龙膜韧性好，可反复处理与杂交，而不丢失被检标本。它通过疏水键和离子键与核酸结合，结

合力为 350~500  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，比硝酸纤维素膜（80~100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）强许多。尼龙膜的缺点是对蛋白有高亲和力，不宜使用非同位素探针。

2. “噪音”的排除 “噪音”（noise）是固相膜杂交方法常遇到的问题，指标记 DNA 结合到空白膜上的放射性计数，即本底。这个问题的克服一是使用高纯度的核酸制品和充分严格的杂交条件；二是选择合适的杂交反应液和对膜进行处理。研究发现，随着离子强度的增加，空白膜（未固定 DNA 对照膜）上的“噪音”水平增加，而在 50%甲酰胺 6×SSC 的杂交反应液中充分封闭膜上的多余非特异结合位点。

#### （四）液相核酸分子杂交类型

##### 1. 吸附杂交

（1）HAP 吸附杂交：羟基磷灰石（HAP）层析或吸附是液相杂交中最早使用的方法。在液相中杂交后，DNA: DNA 杂交双链在低盐条件可特异地吸附到 HAP 上。通过离心使吸附有核酸双链的 HAP 沉淀，再用缓冲液离心漂洗几次 HAP，然后将 HAP 置于计数器上进行放射性计数。

（2）亲和吸附杂交：生物素标记 DNA 探针与溶液中过量的靶 RNA 杂交，杂交物吸附到酰化亲和素包被的固相支持物（如小球）上，用特异性抗 DNA: RNA 杂交物的酶标单克隆抗体与固相支持物上的杂交物反应，加入酶显色底物，这个系统可快速（2h）检测 RNA。

（3）磁珠吸附杂交：Gen - probe 公司最近应用吡啶翁酯（acridinium ester）标记 DNA 探针，这种试剂可用更敏感的化学发光来检测。探针和靶杂交后，杂交物可特异地吸附在磁化的有孔小珠（阳离子磁化微球体上）。溶液中的磁性小珠可用磁铁吸出，经过简单的漂洗步骤，吸附探针的小珠可用化学发光测定。

##### 2. 发光液相杂交

（1）能量传递法：Heller 等设计用两个紧接的探针，一个探针的一端用化学发光基团（供体）标记，另一个探针的一端用荧光物质标记，并且这两个探针靠得很近。两个靠得很近的探针用不同的物质标记（标记光发射），当探针与特异的靶杂交后，这些标记物靠得很近。一种标记物发射的光被另一种标记物吸收，并重新发出不同波长的光，调节 检测器使自动记录第二次发射光的波长。只有在两个探针分子靠得近时，才能产生受激发光，因此这种方法具有较好的特异性。

（2）吡啶翁酯标记法：吡啶翁酯标记探针与靶核酸杂交后，未杂交的标记探针分子上的吡啶翁酯可以用专门的方法选择性除去，所以杂交探针的化学发光是与靶核酸的量成比例的。该法的缺点是检测的敏感度低（约 1ng 的靶核酸），仅适用于检测

扩增的靶序列，如 rRNA 或 PCR 扩增产物。

### 3. 液相夹心杂交

(1) 亲合杂交：在靶核酸存在下，两个探针与靶杂交，形成夹心结构，杂交完成后，杂交物可移到新的管或凹孔中，在其中杂交物上的吸附探针可结合到固相支持物上，而杂交物上的检测探针可产生检测信号。用生物素标记吸附探针，用  $^{125}\text{I}$  标记检测探针，这个系统的敏感性可检测出  $4 \times 10^6$  靶分子。该试验保持了固相夹心杂交的高度特异性。

(2) 采用多组合成探针和化学发光检测：第一类探针是未标记的检测探针和液相吸附探针，它们有 50 个碱基长，其中含有 30 个细菌特异序列碱基和 20 个碱基的单链长尾；第二类探针是固相吸附探针，它可吸附在小珠或微孔板上。未标记检测探针的单链长尾用于结合扩增多个标记探针，液相吸附探针和靶杂交物从溶液中分离并固定在小珠或微板上，典型的试验可用 25 个不同的检测探针和 10 个不同的吸附探针。第一个标记检测探针上附着很多酶（碱性磷酸酶或过氧化物酶）可实现未标记检测探针的扩增。使用化学发光酶的底物比用显色反应酶的底物更敏感。这个杂交方法已用于乙肝病毒、沙眼衣原体、淋球菌以及质粒抗性的检测，敏感性达到能检测  $5 \times 10^4$  双链 DNA 分子。

4. 复性速率液相分子杂交 这个方法的原理是细菌等原核生物的基因组 DNA 通常不包含重复顺序。它们在液相中复性（杂交）时，同源 DNA 比异源 DNA 的复性速度要快。同源程度越高，复性速率和杂交率越快。利用这个特点，可以通过分光光度计直接测定变性 DNA 在一定条件下的复性速率，进而用理论推导的数学公式来计算 DNA-DNA 之间的杂交（结合）度。

## 六、核酸分子杂交实验因素的优化

### （一）探针的选择

根据不同的杂交实验要求，应选择不同的核酸探针。在大多数情况下，可以选择克隆的 DNA 或 cDNA 双链探针。但是在有些情况下，必须选用其它类型的探针如寡核苷酸探针和 RNA 探针。例如，在检测靶序列上的单个碱基改变时应选用寡核苷酸探针，在检测单链靶序列时应选用与其互补的 DNA 单链探针（通过克隆人 M13 噬菌体 DNA 获得）或 RNA 探针，寡核苷酸探针也可。长的双链 DNA 探针特异性较强，适宜检测复杂的靶核苷酸序列和病原体，但不适宜于组织原位杂交，因为它不易透过细胞膜进入胞内或核内。在这种情况下，寡核苷酸探针和短的 PCR 标记探针（80~

150bp) 具有较大的优越性。

在选用探针时经常会受到可利用探针种类的限制。如在建立 DNA 文库时，手头没有筛选特定基因的克隆探针，这时就可用寡核苷酸探针来代替。但必须首先纯化该基因的编码蛋白，并测定 6 个以上的末端氨基酸序列，通过反推的核苷酸序列合成一套寡核苷酸探针。如果已有其它动物的同种基因克隆，因为人类和动物间在同一基因的核苷酸顺序上存在较高的同源性，因此可利用已鉴定的动物基因作探针来筛选人类基因克隆。对于基因核苷酸序列背景清楚而无法获得克隆探针时，可采用 PCR 方法扩增某段基因序列，并克隆入合适的质粒载体中，即可得到自己的探针。这种方法十分简便，无论基因组 DNA 探针还是 cDNA 探针都可以容易地获得，而且，可以建立 PCR 的基因检测方法，与探针杂交方法可作对比，可谓一举两得。

#### (二) 探针的标记方法

在选择探针类型的同时，还需要选择标记方法。探针的标记方法很多，选择什么标记方法主要视个人的习惯和可利用条件而定。但在选择标记方法时，还应考虑实验的要求，如灵敏度和显示方法等。一般认为放射性探针比非放射性探针的灵敏度高。放射性探针的实际灵敏度不依赖于所采用的标记方法，如随机引物延伸法往往得到比缺口平移法更高的比活性。在检测单拷贝基因序列时，应选用标记效率高、显示灵敏的探针标记方法。在对灵敏要求不高时，可采用保存时间长的生物素探针技术和比较稳定的碱性磷酸酶显示系统。

#### (三) 探针的浓度

总的来说，随探针浓度增加，杂交率也增加。另外，在较窄的范围内，随探针浓度增加，敏感性增加。依我们的经验，要获得较满意的敏感性，膜杂交中  $^{32}\text{P}$  标记探针与非放射性标记探针的用量分别为 5~10ng/ml 和 25~1000ng/ml，而原位杂交中，无论应用何种标记探针，其用量均为 0.5~5.0  $\mu\text{g/ml}$ 。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的固相支持物的非特异结合特性的影响。

#### (四) 杂交率

传统杂交率分析主要用于 DNA 复性研究，在这种情况下，探针和靶链在溶液中的浓度相同。现代杂交实验无论在液相杂交还是固相杂交均在探针过剩的条件下进行，此外，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）可用于估计半数探针与固定靶序列杂交所需的时间。

$$t_{1/2} = \ln 2 / kc$$

t=保温（杂交）时间（s）；k=形成杂交体的速率常数[mol/(Lxntxs)]；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：

$$K_n = 3.5 \times 10^5 \quad K = K_n L^{0.5} / N \quad (2)$$

$K_n$ 是缔结常数， $K_n = 3.5 \times 10^5$ 。Na<sup>+</sup>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<sub>m</sub>值2.5℃时，公式（1）和（2）可合并为（3），用于计算半数探针与靶序列的杂交率（以秒计）。

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

对一个长500个碱基的探针而言，此值为：

$$t_{1/2} = \frac{500(0.693)}{3.5 \times 10^5 (22) 6 \times 10^{-10}} = 75000 \text{ s 或 } 20 \text{ h}$$

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。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，固靶序列也不可能都用于杂交，所以，由公式预计的随探针长度增加的杂交率不一定总是正确的。

### （五）杂交最适温度

杂交技术最重要的因素之一是选择最适的杂交反应温度。若反应温度低于T<sub>m</sub> 10~15℃，碱基顺序高度同源的互补链可形成稳定的双链，错配对减少。若反应温度再低（T<sub>m</sub>-30℃），虽然互补链之间也可形成稳定的双链，但互补碱基配对减少，错配对增多、氢键结合的更弱。如两个同源性在50%左右或更低些的DNA，调整杂交温度可使它们之间的杂交率变化10倍，因此在实验前必须首先确定杂交温度。通常有三种温度可供试验，即最适复性温度、苛刻复性温度及非苛刻复性温度。温度的选择及温度对杂交的影响见表18-3。最适复性温度（Optimum renaturation temperature, TOR）：Tor = T<sub>m</sub> - 25℃

苛刻复性温度： $T_s = T_m - (10 \text{ 或 } 15^\circ\text{C})$

非苛刻复性温度： $T_{ns} = T_m - (30 \text{ 或 } 35^\circ\text{C})$

在  $2\times\text{SSC}$  反应液中，可以根据下列公式计算最适复性温度： $T_{Or} = 0.51 (G+C\%) + 47^\circ\text{C}$ 。

表 18-4 DNA—DNA 杂交温度的选择范围 ( $2\times\text{SSC}$ )

DNA 中 G+C mol%	杂交反应温度 ( $^\circ\text{C}$ )		
	T <sub>Or</sub>	T <sub>s</sub>	T <sub>ns</sub>
30	62.3	73.3	52.3
35	64.9	74.9	54.9
40	67.4	77.4	57.4
45	70.0	80.0	60.0
50	72.5	82.5	62.5
55	75.1	85.1	65.1
60	77.6	87.6	67.6
65	80.2	90.2	70.2
70	82.7	92.2	72.7
75	85.3	95.3	75.3

可以看出 DNA 复性和 DNA-RNA，DNA-DNA 杂交通常要在高温反应条件下进行，其反应的最大速度是在低于  $T_m$  值约  $25^\circ\text{C}$ 。然而对于那些反应时间需要延长，或对生物活性必须保护的复杂生物的核酸研究(如哺乳动物)，核酸长时间处于高温下很显然是不利的。这会引起核酸链的断裂、胞嘧啶的作用，结合到膜上的 DNA 脱落也会增多。这个问题可以通过使用高浓度盐溶液(如  $6.2\text{mol}/1 \text{ NaCl}$ )，或使用某些有机溶剂的水溶液降低反应温度来解决。常使用的有机溶剂有两类，甲酰胺和二甲亚砜(DMSO)。在杂交液中加入 30%二甲亚砜可使 T2 噬菌体 DNA 的  $T_m$  值比原先降低  $14^\circ\text{C}$ ，而使用酰胺甚至可使 DNA 在室温下变性和复性。Mc-Conaughy 等发现，反应液中每增加 1%的甲

酰胺浓度， $T_m$  值可降低  $0.72^\circ\text{C}$ 。

现在认为，适当选择甲酰胺和盐水浓度及合适的反应温度，可使 DNA 复性和 DNA-RNA 杂交获得高特异性和更快的反应速度。

#### (六) 杂交的严格性

影响杂交体稳定性的因素决定着杂交条件的严格性。一般认为在低于杂交体  $T_m$  值  $25^\circ\text{C}$  时杂交最佳，所以首先要根据公式 (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来控制所需的严格性。对用 20 个碱基以上的探针做 DNA: DNA 杂交的  $T_m$  值计算如下：

$$T_m = \frac{81.5^\circ\text{C} + 16 \cdot \log \text{mol/L} + 0.41(G + C\%) - 500}{[n - 0.16(\text{甲酰胺}\%)]}$$

$n$  = 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  $5 \times \text{SSC}$  ( $0.75 \text{mol/l Na}^+$ ) 和 50% 甲酰胺杂交的  $T_m$  值为：

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

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

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  $1.5^\circ\text{C}$ ，15~50 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  $T_m$  值较同样的 DNA: DNA 杂交体的高  $10 \sim 15^\circ\text{C}$ 。

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

显然，当用 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，典型最终漂洗条件点  $0.1 \times \text{SSC}$  ( $0.015 \text{mol/l Na}^+$ )， $55^\circ\text{C}$ 。代入公式 (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  $12^\circ\text{C}$  的漂洗条件比  $T_m$  低  $25^\circ\text{C}$  的杂交相比条件更严格了。

对寡核苷酸探针而言，杂交温度往往低于  $T_m 5^\circ\text{C}$ ，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用于 14-20 个碱基的寡核苷酸探针：

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

在实际应用中，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，特异靶序列结合探针信号很强，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。

用一个以上的探针的（如夹心杂交）杂交系统中，估计  $T_m$  值更加复杂。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。

#### （七）杂交反应时间

在条件都得到满足的情况下，杂交的成败就取决于保温时间。时间短了，杂交反应不完全；时间长了也无益，会引起非特异结合增多。一般杂交反应要进行 20h 左右。1966 年 Britten 和 Kohne 推荐用  $Cot$  值来计算杂交反应时间。 $Cot$  值实际上是杂交液中单链起始浓度 ( $C_0$ ) 和反应时间 ( $t$ ) 的乘积。实验表明  $Cot = 100$  时，杂交反应基本完成。 $Cot = 0$ ，基本上没有杂交。例如在液相杂交中未标记的 DNA  $400 \mu\text{g/ml}$ （按单股 DNA 每微克紫外吸收值为 0.024 计算，总的吸收值为 9.6），如果反应时间为 21h，那么对于未标记的 DNA 来说， $Cot = 9.6/21 = 100.8$ ，杂交完成了。对标记 DNA（浓度为  $0.1 \mu\text{g/ml}$ ）来说  $Cot$  值为 0.05，这就充分排除了标记 DNA 的自我复性。

#### （八）杂交促进剂

惰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。而短探针不需用促进剂，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 500000。另一种常见的促进剂是聚乙二醇（PEG），PEG 分子量小（6000~8000）、粘度低、价格低廉，但它不能完成取代硫酸葡聚糖。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（ $MW=90000$ ）。

小分子化学试剂酚和硫氰酸胍也能促进杂交，它们可能是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，有裂解细胞而抑制 RNase 的作用。总之，硫酸葡聚糖和聚乙二醇因能用于固相杂交是目前最常用的杂交促进剂。



## 上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市闵行区北桥镇吴河路328号A栋2楼

邮编：201109

联系：市场部

电话：021-5446 0832 800-988-1995

E-mail: master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn

