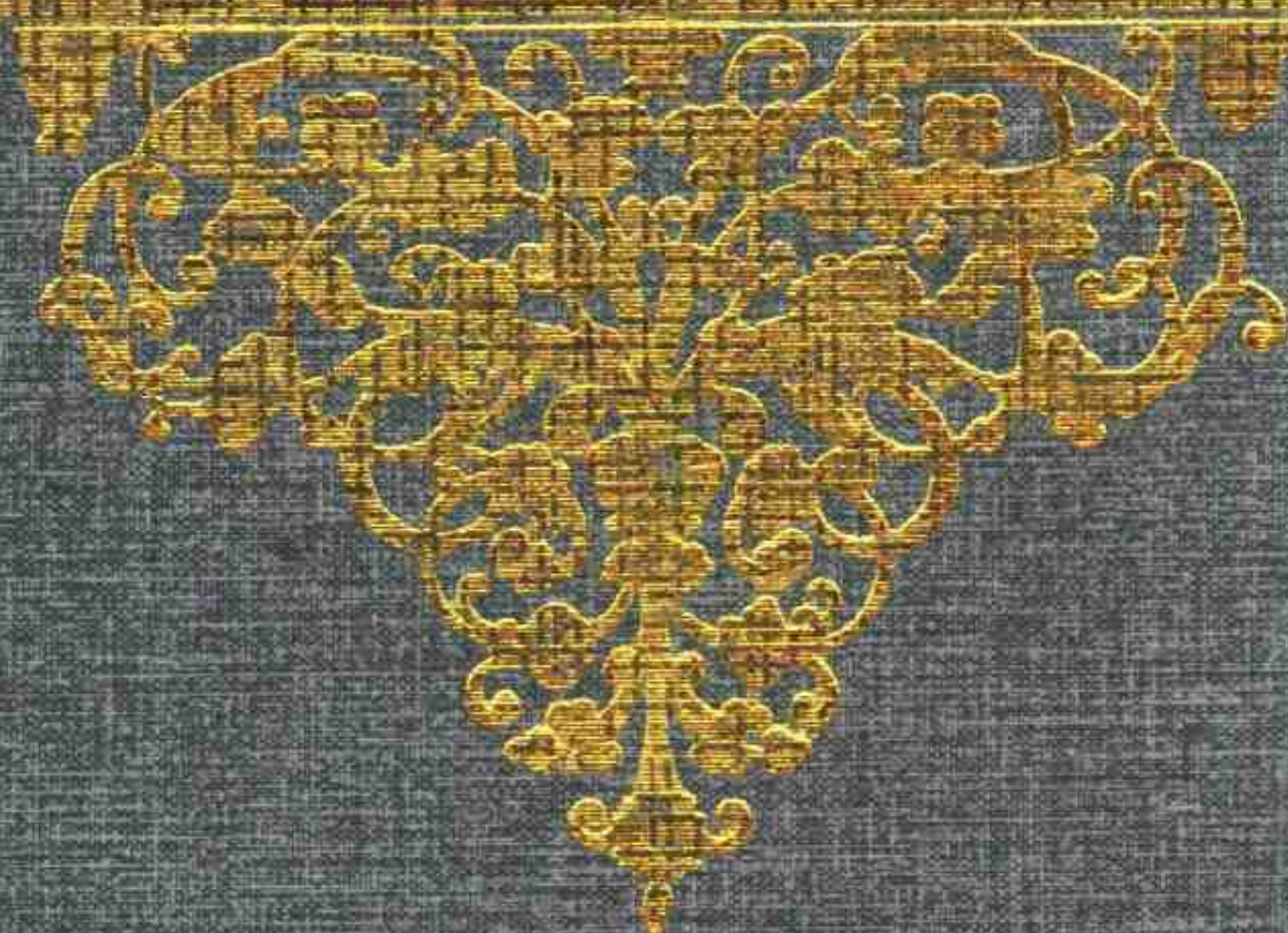


第二版

现代分子生物学实验技术



卢圣栋 主编

中国协和医科大学出版社

现代分子生物学实验技术

CURRENT PROTOCOLS FOR MOLECULAR BIOLOGY

(第二版)

主 编 卢圣栋

编 委 (以姓氏笔画为序)

马清钧	刘德培	李尹雄	陆士新	郑德先
胡晓年	黄尚志	黄秉仁	崔莲仙	惠汝太
鲁桂琛				

编 者 (以姓氏笔画为序)

于 文	于英杰	马清钧	王越英	王新国
卢圣栋	刘玉清	刘彦信	刘海玲	刘强远
刘德培	安海谦	孙 颖	李 涛	李尹雄
李德春	杜 恺	陆士新	吴 军	吴晓林
余 跃	陈昭烈	杨靖轩	明 洪	周宪良
郑德先	胡爱华	胡晓年	敖朝晖	徐晓石
徐雁英	黄尚志	黄秉仁	盛 华	崔莲仙
梁红雁	惠汝太	鲁桂琛		

中国协和医科大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

现代分子生物学实验技术/卢圣栋主编. - 2 版. - 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 9
ISBN 7-81072-006-6

I. 现… II. 卢… III. 分子生物学-实验-技术 IV. 07

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 28313 号

现代分子生物学实验技术 (第二版)

主 编: 卢圣栋
责任编辑: 谢 阳
技术设计: 栾广明
责任校对: 李爱平
责任印制: 姜文祥

出版发行: 中国协和医科大学出版社
(北京市东单三条九号 邮编 100730 电话 65228583)
经 销: 新华书店总店北京发行所
印 刷: 北京市迪鑫印刷厂

开 本: 850×1168 毫米 1/16 开
印 张: 52
字 数: 1448 千字
版 次: 1999 年 12 月第一版 1999 年 12 月北京第一次印刷
印 数: 1—6000
定 价: 148.00 元

ISBN 7-81072-006-6/R·006

(凡购本书, 如有缺页、倒页、脱页及其它质量问题, 由本社发行部调换)

内 容 简 介

本书比较系统、全面地介绍了现代分子生物学常用实验技术与方法。全书共分 32 章，绪论部分对基因工程与分子生物学主要进展进行了鸟瞰式的评述，其它章节包括分子生物学实验室常规仪器设备、分子生物学实验室常用技术、核酸的分离与纯化、核酸分子探针的标记、核酸分子杂交、基因克隆技术、基因组文库、cDNA 文库、DNA 序列测定及其自动测定、外源基因在原核细胞中的表达、外源基因在真核细胞中的表达、基因工程菌的大规模培养、工程菌生产的蛋白复性与纯化、动物细胞的大规模培养、多聚酶链式反应（PCR）技术、DNA 的化学合成、多肽的固相合成、蛋白质氨基酸组成及序列测定、真核基因表达调控、转基因动物、转基因植物、人类基因治疗、体内外转基因方法、非病毒载体基因治疗、细胞凋亡的研究方法、微卫星技术、cDNA 末端快速扩增技术、mRNA 差异显示法、DNA 芯片技术、常用遗传统计分析方法等。全书强调方法学上的严谨、实用与可靠。该书可作为理、工、农、医、药、林、牧、环保、海洋、食品等专业研究生用书，也可供从事生命科学各专业科研人员参考。

再 版 前 言

本书的第一版自 1993 年出版以来,受到了社会的欢迎,并流入世界诸多国家。应读者的要求,现经修改与增删,予以再版。

本书第一版为 17 章,再版为 32 章,增加了 15 章。为了反映当代基因工程与分子生物学研究的主要进展与发展趋势,全文改写了第一章的绪论开篇,以期引起读者对从事本领域研究的兴趣。新增加的技术方法包括基因工程菌的大规模培养、工程菌生产的蛋白的复性与纯化、动物细胞的大规模培养、转基因植物、基因治疗的主要技术 *Ex vivo* 法,多肽的固相合成、蛋白质的氨基酸组成及序列测定、细胞凋亡的研究方法、DNA 序列的自动测定、微卫星技术、mRNA 差异显示技术、cDNA 末端快速扩增技术,常用遗传统计方法等。这些技术方法的提供,仍以实用可行、辅以实验经验介绍为特点。作为相关技术方法研究进展的介绍与述评,还编入了关于高效率感受态细胞的制备、非病毒载体的基因治疗,及 DNA 芯片技术等,以资参考。所有这些技术方法的增补,既为了反映当代本领域新技术方法的前沿进展,更为了满足我国社会的需求。我们深切期望本书的再版对我国从事基因工程与分子生物学研究与开发的青年科技工作者及同行专家有点助益。

为了本书的再版,中国军事医学科学院马清钧教授及其年轻同仁提供了丰厚的支持,本院校一批新的编委与作者、插图绘制人员、校对人员,以及本院校出版社编辑室的专家们付出了辛勤的劳动,在此一并表示深切的感谢。

本书的错误与缺点依然难免,诚恳欢迎批评与指正。

卢圣栋

中国医学科学院

中国协和医科大学

1999 年 3 月于北京

前 言

分子生物学研究,对于认识生命本质和国计民生都具有重大意义。本院校一批青年科学家为推动分子生物学在我国的发展,在老一辈科学家的扶持下,编写了本书并以电教的方式拍摄了教学片。

参加本书写作的青年科学家,主要由近年毕业的分子生物学博士组成,部分是分子生物学硕士,一位是分子生物学副研究员。他们是李尹雄(第二、三、四、七章)、胡晓年(第五、六、十五章)、刘德培(第十六、十七章)、于文(第八章)、杜恺(第十章)、于英杰(第十一章)、敖朝晖(第十三、十四章)、刘强远(第十二章)、吴晓林(第九章)、余跃(第二章,与李尹雄合作)、李德春(第六章,与胡晓年合作)。

这些青年科学家选择了现代分子生物学研究中最重要和最常用的技术方法做了比较详细的介绍。本书的写作和教学片的摄制的指导思想是:既介绍取得实验成功的关键,也分析可能导致实验失败的因素。在国内外现行的为同一个实验目的而设计的不同技术方法中,选择被认为最佳的一种方法作为重点加以介绍。这些,对于初学者是可贵的。上述种种也是本书的特点。本书及教学片所提供的实验技术已初步经受了实践的考验。1992年盛夏,这些青年科学家举办了一期大约有200人参加的全国性讲习班。讲习班上所有分组所进行的14种研究方法的技术练习均取得了成功。我们希望,本书的出版对于同行科学家和初学者小有裨益。

青年科学家朝气蓬勃、精力旺盛、思想活跃、心灵手巧,是一支攻克科学堡垒的劲旅。只要引导得当,在我国科学技术发展的道路上,他们是有可能成就大事业的。为他们提供崭露头角、大显身手的机会,是时代的需要和要求。

本院校基础医学研究所分子生物学研究室梁植权、强伯勤、方福德、王琳芳、缪时英、沈翊珩、琦祖和、邱长春、袁建刚等中老年专家审改了本书的有关章节;石淑贞、秦瑶、杨钧、刘巨洪等同志绘制了本书的插图;吕向东、穆修前、侯忠诚、王明生等同志校对了本书;王安、关淑启、张立新、王茹、曲虹等同志承担了书稿的打字与复印工作;王家腾、江沪沪、王影、岳颖、栾童林、李景和等同志承担了编务工作;高等教育出版社生物学编辑室的编辑们,在本书形成与出版过程中给予了热情的指教、帮助与支持,在此一并表示深切的谢意。

本书的缺点与错误在所难免,欢迎指正。

卢圣栋

中国医学科学院

中国协和医科大学

1993年6月于北京

目 录

1. 绪论	(1)	2.4.5 DNA 合成仪	(54)
1.1 分子生物学与基因工程一瞥	(1)	2.4.6 DNA 测定仪	(54)
1.1.1 Watson 和 Crick 的 DNA 模板学说	(1)	2.4.7 PCR 仪	(55)
1.1.2 Monod 和 Jacob 的操纵子学说	(4)	2.5 核素实验室	(56)
1.1.3 基因工程的工具酶和载体	(5)	2.5.1 放射性核素操作实验室	(56)
1.1.4 基因工程的基本程序	(6)	2.5.2 放射性核素测定室	(57)
1.2 基因工程与分子生物学进 展一览	(7)	2.6 细胞培养室	(57)
1.2.1 基因工程的研究成就	(7)	2.6.1 无菌操作设施	(58)
1.2.2 分子生物学的研究成就	(26)	2.6.2 温育和贮存区	(58)
1.3 基因工程与分子生物学的 发展趋势及展望	(40)	2.6.3 观察和研究室	(59)
1.3.1 蛋白质工程: 改造基因、 改造蛋白质、改造生命	(40)	2.6.4 清洗和消毒	(59)
1.3.2 分子生物电子学的兴起以 及不同学科的相互渗透	(41)	2.7 暗室	(59)
1.3.3 走向海洋, 走向宇宙空间	(42)	2.8 冷室	(60)
1.3.4 大规模深入研究的重大战略 部署	(43)	3. 分子生物学实验室常用技术	(61)
1.4 不结束语	(44)	3.1 核酸的纯化	(61)
2. 分子生物学实验室常规仪器设备	(46)	3.1.1 酚/氯仿抽提核酸溶液 的制备	(61)
2.1 实验室的基本要求	(46)	3.1.2 酚的重蒸馏与水饱和	(62)
2.2 实验室的常规仪器及设施	(47)	3.2 核酸的浓缩	(63)
2.2.1 温度控制系统	(47)	3.2.1 固体聚乙二醇 (PEG) 吸水 浓缩法	(63)
2.2.2 水的净化装置	(47)	3.2.2 丁醇抽提浓缩法	(63)
2.2.3 消毒设备	(48)	3.3 核酸的沉淀	(64)
2.2.4 计量系统	(48)	3.3.1 核酸沉淀的盐类及浓度	(64)
2.2.5 其它设备	(49)	3.3.2 核酸沉淀的温度与时间	(65)
2.3 离心机室的装备	(50)	3.3.3 离心力与离心时间	(66)
2.4 分析仪器室的设置	(50)	3.3.4 有机沉淀剂	(66)
2.4.1 电泳装置	(50)	3.3.5 核酸沉淀的操作方法	(66)
2.4.2 层析装置	(52)	3.4 核酸的定量	(69)
2.4.3 光密度仪	(54)	3.4.1 分光光度法测定核酸的浓度	(69)
2.4.4 真空印迹系统	(54)	3.4.2 荧光分光光度法测定核 酸浓度	(69)
		3.5 核酸的贮存	(70)
		3.6 限制性内切酶及其应用	(71)
		3.6.1 限制性内切酶的功能、 分类及命名	(71)

3.6.2 限制性内切酶的数量单位及质量控制	(72)	4.3.5 噬菌体 DNA 的提取与纯化	(121)
3.6.3 限制性内切酶酶解体系的建立	(73)	4.4 DNA 片段的分离及纯化	(126)
3.6.4 限制性内切酶酶解中常见的问题和解决措施	(75)	4.4.1 从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段的原则	(126)
3.6.5 限制性内切酶的星号活力	(77)	4.4.2 DEAE 纤维素纸插片电泳法	(127)
3.6.6 限制性内切酶的底物位点优势效应	(77)	4.4.3 电泳洗脱法	(128)
3.6.7 琼脂糖包埋完整染色体 DNA 的内切酶酶解	(78)	4.4.4 低熔点琼脂糖凝胶挖块回收法	(132)
3.6.8 限制性内切酶对单链 DNA 的切割	(79)	4.4.5 玻璃粉末洗脱法	(133)
3.6.9 限制性内切酶位点上的甲基化	(79)	4.4.6 琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段的纯化	(134)
3.7 电泳	(80)	4.4.7 聚丙烯酰胺凝胶中回收 DNA 片段	(135)
3.7.1 原理	(80)	4.4.8 蔗糖梯度超速离心分离 DNA 片段	(136)
3.7.2 影响电泳速率的四大因素	(80)	4.5 RNA 的分离与纯化 (真核细胞 RNA 的制备)	(136)
3.7.3 核酸电泳的指示剂与染色剂	(83)	4.5.1 创造一个无 RNase 的环境	(137)
3.7.4 电泳装置	(85)	4.5.2 RNA 的提取方法	(139)
3.7.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(85)	4.5.3 mRNA 的分离与纯化	(149)
3.7.6 琼脂糖凝胶电泳	(88)	5. 核酸分子探针的标记	(155)
3.7.7 脉冲场凝胶电泳	(92)	5.1 概述	(155)
3.7.8 双相电泳	(93)	5.1.1 探针的种类及其选择	(155)
3.8 超速离心分离技术	(94)	5.1.2 各种标记物及其选择	(159)
3.8.1 离心分离物质的原理	(94)	5.1.3 放射性核素的探测	(161)
3.8.2 超速离心的分类	(95)	5.1.4 放射性核素的卫生防护	(162)
3.8.3 超速离心在核酸分离中的应用	(96)	5.1.5 各种标记方法及其选择	(162)
3.9 柱层析	(97)	5.2 探针的放射性核素标记法	(163)
3.9.1 排阻层析	(98)	5.2.1 切口平移法	(163)
3.9.2 亲和层析	(99)	5.2.2 随机引物法	(166)
3.9.3 羟基磷灰石柱层析	(99)	5.2.3 单链 DNA 探针的标记	(169)
3.9.4 离子交换层析	(99)	5.2.4 cDNA 探针的标记	(171)
3.9.5 反相层析	(100)	5.2.5 RNA 探针的制备与标记	(173)
4. 核酸的分离与纯化	(101)	5.2.6 DNA 探针的末端标记	(176)
4.1 核酸分离提取的原则	(101)	5.2.7 寡核苷酸探针的标记	(185)
4.2 真核细胞染色体 DNA 的制备	(102)	5.2.8 碘放射性核素标记法	(186)
4.3 质粒和噬菌体 DNA 的提取与纯化	(109)	5.3 非放射性标记法	(186)
4.3.1 质粒 DNA 的提取与纯化	(109)	5.3.1 酶促标记法	(187)
4.3.2 质粒 DNA 的小量制备	(111)	5.3.2 化学标记法	(187)
4.3.3 质粒 DNA 的大量制备	(115)	5.4 探针的纯化	(191)
4.3.4 质粒 DNA 的纯化	(117)	5.4.1 凝胶过滤柱层析法	(191)

5.4.2 反相柱层析法	(192)	7.5.4 一种快速 DNA 连接技术	(276)
5.4.3 乙醇沉淀法	(193)	7.6 重组子导入受体细胞	(277)
5.5 探针比放射活性的测定	(193)	7.6.1 概述	(277)
5.5.1 三氯乙酸沉淀法	(193)	7.6.2 转化方法	(278)
5.5.2 DE-81 滤膜吸附法	(194)	7.7 重组子的筛选与鉴定	(282)
6. 核酸分子杂交	(195)	7.7.1 针对遗传表型改变筛选法	(282)
6.1 膜上印迹杂交	(195)	7.7.2 分析重组子结构特征的 筛选法	(284)
6.1.1 印迹技术	(195)	7.8 亚克隆技术	(287)
6.1.2 固-液相杂交技术	(207)	7.9 高效率感受态细胞的制备	(290)
6.1.3 杂交信号的检测	(213)	7.9.1 感受态细胞制备的影响因素	(291)
6.1.4 滤膜的重复使用	(217)	7.9.2 高效率感受态细胞制备方法	(292)
6.2 液相杂交技术	(217)	8. 基因组文库	(295)
6.2.1 核酸酶 S ₁ 保护分析法	(217)	8.1 构建基因组文库的载体	(295)
6.2.2 RNA 酶保护分析法	(219)	8.2 λ 噬菌体载体	(296)
6.3 核酸原位杂交及其应用	(220)	8.2.1 应用 λ 噬菌体构建基因组 文库的基本步骤	(296)
6.3.1 核酸原位杂交的基本原理	(220)	8.2.2 几种 λ 噬菌体载体	(296)
6.3.2 核酸原位杂交的基本操 作方法	(224)	8.3 载体 DNA 的制备	(302)
6.4 新技术简介	(230)	8.3.1 载体 DNA 的酶解	(302)
6.4.1 亲和捕捉法	(230)	8.3.2 酶切后载体的再连接及 包装后的滴度检测	(303)
6.4.2 夹心杂交法	(230)	8.3.3 载体臂的纯化	(303)
6.4.3 链取代法	(231)	8.3.4 载体的脱磷处理	(305)
7. 基因克隆技术	(233)	8.3.5 λ mda GEM11/ λ mda GEM 12BamHI.XhoI 酶切后载 体臂的部分填充	(305)
7.1 基因工程诞生的历史背景	(233)	8.4 真核细胞 DNA 的制备	(306)
7.2 基因克隆的策略与技术路线	(234)	8.4.1 几种染色体 DNA 的提取方法	(306)
7.2.1 通过建立基因库分离靶基因	(234)	8.4.2 限制性内切酶部分酶解 高分子量真核 DNA	(308)
7.2.2 通过载体在适当宿主中扩增	(235)	8.5 连接和包装	(310)
7.3 目的基因的来源与产生	(235)	8.5.1 连接浓度	(310)
7.4 基因克隆的载体	(236)	8.5.2 连接条件的确定	(312)
7.4.1 质粒载体	(236)	8.5.3 包装抽提物的制备和体外包装	(313)
7.4.2 λ 噬菌体载体	(241)	8.6 基因组文库的保存和扩增	(316)
7.4.3 粘粒	(245)	8.7 粘性质粒为载体的基因组 文库	(317)
7.4.4 丝状噬菌体载体	(249)	9. cDNA 文库	(319)
7.4.5 真核细胞的克隆载体	(251)	9.1 概述	(319)
7.5 DNA 分子的体外连接	(256)		
7.5.1 DNA 连接酶及连接机制	(256)		
7.5.2 DNA 浓度对连接产物构 型的影响	(259)		
7.5.3 DNA 分子连接的策略与 方案	(262)		

9.1.1 mRNA 的分离	(319)	11. DNA 序列的自动测定	(352)
9.1.2 cDNA 第一链的合成	(320)	11.1 概述	(352)
9.1.3 cDNA 第二链的合成	(320)	11.2 自动测序仪及操作原理	(352)
9.1.4 cDNA 与载体连接	(320)	11.2.1 ALF express™ 全自动激	
9.1.5 噬菌体的包装、转染及		光荧光核酸测序仪	(352)
质粒 DNA 的转化	(322)	11.2.2 ABI 最新型全自动 DNA	
9.2 cDNA 库的构建	(323)	测序仪	(354)
9.2.1 mRNA 分离	(323)	11.2.3 ABI PRISM310 型全自动	
9.2.2 第一链的合成	(324)	DNA 测序仪 (遗传分析仪)	(354)
9.2.3 第二链的合成	(324)	11.3 自动测序操作程序	(354)
9.2.4 cDNA 的甲基化	(325)	11.3.1 载体系统	(354)
9.2.5 cDNA 与连接子的连接	(325)	11.3.2 模板 DNA 的制备	(359)
9.2.6 cDNA 的分部分离	(326)	11.3.3 测序胶的制备	(362)
9.2.7 cDNA 的克隆	(326)	11.3.4 测序模板 DNA 聚合酶延	
9.2.8 计算克隆效率	(327)	伸反应	(363)
9.2.9 cDNA 库的扩增	(327)	11.3.5 样品上样和电泳	(364)
10. DNA 序列测定	(329)	11.3.6 核苷酸顺序的阅读	(364)
10.1 概述	(329)	11.3.7 测序全程常见问题和解	
10.1.1 末端终止法	(329)	决办法	(365)
10.1.2 化学裂解法	(331)	12. 外源基因在原核细胞中的表达	(367)
10.2 末端终止法测定 DNA 核苷		12.1 原核生物基因表达的特点	(367)
酸序列	(331)	12.2 外源基因在原核细胞中表	
10.2.1 末端终止法所需的关		达的重要调控元件	(368)
键试剂	(331)	12.2.1 启动子	(368)
10.2.2 末端终止法测定 DNA		12.2.2 SD 序列	(371)
序列方法的选择	(332)	12.2.3 终止子	(371)
10.2.3 大片段待测 DNA 片段		12.3 几种类型的原核表达载体	(372)
的定向连续次级克隆	(332)	12.3.1 非融合型表达蛋白载体	
10.2.4 用噬菌体 M13 克隆待		pKK223-3	(372)
测 DNA 片段	(337)	12.3.2 分泌型克隆表达载体 PIN	
10.2.5 双脱氧末端终止法	(339)	III 系统	(373)
10.2.6 变性聚丙烯酰胺凝胶制备	(343)	12.3.3 融合蛋白表达载体 pGEX	
10.2.7 测序产物的凝胶电泳	(344)	系统	(373)
10.2.8 Taq DNA 聚合酶催化的测序		12.4 用于原核细胞表达的外源	
反应及凝胶的银染色法	(344)	基因	(374)
10.3 Maxam - Gilbert 化学法测		12.5 提高外源基因表达水平的措施	(375)
定 DNA 序列	(347)	12.5.1 提高翻译水平	(376)
10.3.1 待测 DNA 的纯化	(347)	12.5.2 减轻细胞的代谢负荷, 提	
10.3.2 碱基的特异性修饰及裂解	(348)	高外源基因的表达水平	(376)
10.3.3 测序图谱的识读	(350)		

12.5.3 提高表达蛋白的稳定 性,防止其降解	(377)	14.1.1 固体斜面法	(404)
12.6 关于包涵体	(378)	14.1.2 甘油冻存法	(404)
12.7 有关的实验	(379)	14.1.3 冷冻干燥法	(405)
12.7.1 外源基因的诱导表达	(379)	14.2 工程菌培养	(405)
12.7.2 细菌的裂解	(380)	14.2.1 影响工程菌生长和产物 合成的因素	(405)
12.7.3 包涵体的分离	(381)	14.2.2 工程菌培养方法	(408)
12.7.4 包涵体的溶解和复性	(381)	14.2.3 参数检测与控制	(408)
12.8 蛋白质的 SDS-聚丙烯酰 胺凝胶电泳	(382)	14.2.4 工程菌培养设备—发酵 罐及其控制系统	(409)
12.9 表达产物的免疫学及生物 活性的检测	(386)	14.2.5 工程菌培养过程	(410)
13. 外源基因在真核细胞中的表达	(388)	14.3 工程菌培养中的主要分析 方法	(413)
13.1 哺乳动物基因转移的遗传 选择标记	(388)	14.3.1 菌密度的测定	(413)
13.1.1 胸苷激酶基因 (tk) 选 择系统	(388)	14.3.2 发酵液中葡萄糖浓度的测定	(414)
13.1.2 二氢叶酸还原酶基因 (dhfr) 选择系统	(388)	14.3.3 发酵液乙酸浓度的测定	(415)
13.1.3 新霉素抗性选择系统	(389)	15. 工程菌生产的蛋白的复性与纯化 ...	(417)
13.1.4 氯霉素乙酰转移酶基 因检测系统	(389)	15.1 包涵体的制备和溶解	(417)
13.2 外源基因导入哺乳动物细 胞的载体	(389)	15.2 变性蛋白的纯化	(418)
13.2.1 SV40 载体	(389)	15.3 蛋白复性	(418)
13.2.2 其它病毒载体	(391)	15.3.1 影响蛋白复性的因素	(418)
13.3 外源 DNA 导入哺乳动物细 胞的方法	(392)	15.3.2 蛋白复性方法	(419)
13.3.1 磷酸钙转染技术	(392)	15.4 蛋白复性的检测方法	(420)
13.3.2 电穿孔转染技术	(394)	15.4.1 反相高压液相色谱法	(421)
13.3.3 基因显微注射技术	(395)	15.4.2 凝胶高压液相色谱法	(421)
13.3.4 脂质体载体法	(395)	15.4.3 细胞测活法	(422)
13.3.5 DEAE-葡聚糖转染技术	(396)	15.5 蛋白纯化	(423)
13.4 基因表达产物的检测	(397)	15.5.1 蛋白纯化的方法	(423)
13.4.1 免疫荧光抗体法检测表 达蛋白	(397)	15.5.2 蛋白纯化的操作方法	(425)
13.4.2 免疫沉淀法检测表达蛋白	(398)	15.5.3 层析柱的清洗	(427)
13.4.3 Western 印迹检测表达蛋白质	(400)	15.6 蛋白含量测定	(427)
14. 基因工程菌的大规模培养	(404)	15.6.1 紫外分光光度法	(428)
14.1 菌种保藏	(404)	15.6.2 Lowry 法	(428)
		15.6.3 BCA 法	(428)
		16. 动物细胞的大规模培养	(430)
		16.1 培养细胞的特性	(430)
		16.1.1 培养细胞的生长方式及 类型	(430)
		16.1.2 培养细胞的生长特点	(430)
		16.1.3 培养细胞的生长过程	(431)

16.2 培养细胞生长的条件	(433)	17.8.1 遗传性疾病的基因诊断	(467)
16.2.1 细胞的营养需要	(433)	17.8.2 PCR 反应在检测艾滋 病中的应用	(471)
16.2.2 细胞的生存环境	(434)	17.8.3 检测癌基因	(473)
16.2.3 无污染及无毒	(435)	17.8.4 PCR 在法医学上的应用	(475)
16.3 细胞培养的基本技术	(435)	17.8.5 PCR 技术在分子生物 学中的其它应用	(477)
16.3.1 细胞培养基和血清的选择	(435)	18. DNA 的化学合成	(483)
16.3.2 培养基的配制	(435)	18.1 DNA 化学合成原理	(485)
16.3.3 其他常用液体的配制	(437)	18.2 DNA 的合成、纯化及鉴定	(486)
16.3.4 原代培养	(439)	18.2.1 DNA 合成仪的操作	(486)
16.3.5 传代培养和细胞系的维持	(440)	18.2.2 DNA 的切落及去保护	(487)
16.3.6 细胞克隆	(441)	18.2.3 寡核苷酸片段的纯化	(487)
16.3.7 细胞计数	(443)	18.2.4 寡核苷酸片段的鉴定	(488)
16.3.8 细胞的冻存与复苏	(444)	18.2.5 合成产物中 DNA 含量 的测定	(488)
16.3.9 细胞培养的污染及检测	(446)	18.3 DNA 化学合成的应用	(488)
16.4 动物细胞大规模培养	(451)	18.3.1 DNA 合成在基因工程和分子 生物学研究中的应用	(489)
16.4.1 细胞培养规模的放大	(451)	18.3.2 DNA 合成在基因表达 和调控方面的应用	(490)
16.4.2 动物细胞培养生物反应器	(452)	18.3.3 合成基因在医学中的应用	(491)
16.4.3 动物细胞微载体培养	(452)	19. 多肽的固相合成	(493)
16.4.4 生物反应器的操作	(454)	19.1 多肽合成原理	(493)
17. 多聚酶链式反应 (PCR) 技术	(458)	19.1.1 液相多肽合成的简介	(493)
17.1 PCR 技术的原理	(458)	19.1.2 固相多肽合成的简介	(494)
17.2 PCR 反应的成分和作用	(459)	19.2 固相多肽合成	(495)
17.2.1 PCR 反应的缓冲液	(459)	19.2.1 固相多肽合成的策略	(495)
17.2.2 底物 (脱氧核糖核苷 三磷酸, dNTPs) 浓度	(459)	19.2.2 缩合反应	(501)
17.2.3 PCR 反应的酶及其浓度	(460)	19.2.3 反应的监测	(502)
17.2.4 引物	(460)	19.2.4 脱保护	(503)
17.2.5 PCR 反应条件的选择	(460)	19.2.5 合成中应注意的问题	(504)
17.2.6 PCR 反应的产物积累规律	(460)	19.2.6 肽从树脂上的裂解	(505)
17.3 PCR 反应的自动化	(461)	19.2.7 粗肽的纯化	(506)
17.4 PCR 反应引物设计	(461)	19.3 环肽的简介	(506)
17.5 耐热 DNA 聚合酶	(462)	19.4 固相多肽合成	(507)
17.6 PCR 反应模板的准备	(464)	19.4.1 实验材料	(507)
17.7 几种特殊的 PCR	(465)	19.4.2 第一个氨基酸与树脂 的连接	(507)
17.7.1 锚定 PCR	(465)	19.4.3 肽在树脂上的合成	(509)
17.7.2 不对称 PCR	(466)		
17.7.3 反向 PCR	(466)		
17.7.4 多重 PCR	(466)		
17.7.5 着色互补 PCR	(467)		
17.8 PCR 技术的应用	(467)		

19.4.4 肽从树脂上的裂解	(515)	21.2.11 足纹法	(572)
19.4.5 脱盐	(520)	21.2.12 蛋白-核酸紫外交联法	(588)
19.4.6 纯化	(520)	21.2.13 DNA 结合蛋白的分离 纯化	(590)
19.4.7 分析技术	(521)	21.2.14 编码 DNA 结合蛋白的 cDNA 克隆的筛选	(592)
19.5 结束语	(524)		
20. 蛋白质氨基酸组成及序列测定	(525)	22. 转基因动物	(597)
20.1 蛋白质及肽的氨基酸组 成分析	(525)	22.1 转基因方法	(597)
20.1.1 实验前的准备: 蛋白 质水解	(525)	22.2 显微注射 DNA 的制备与纯化	(598)
20.1.2 氨基酸的测定	(526)	22.2.1 DNA 影响基因转移的因素	(598)
20.2 蛋白质 N 末端氨基酸序 列测定	(528)	22.2.2 显微注射 DNA 样品的 制备	(599)
20.2.1 蛋白质(肽链)的选 择性裂解	(528)	22.3 鼠的种类与饲养	(600)
20.2.2 肽段的分离、纯化	(529)	22.3.1 鼠的种类	(600)
20.2.3 肽段氨基酸顺序测定	(529)	22.3.2 鼠的安置与饲养	(601)
21. 真核基因表达调控	(533)	22.4 超排卵与取卵	(601)
21.1 真核基因表达调控基本 理论	(533)	22.4.1 超排卵	(601)
21.1.1 真核基因结构功能特点	(533)	22.4.2 取卵	(602)
21.1.2 真核基因表达调控的策略	(534)	22.5 显微注射	(604)
21.1.3 转录前的表达调控	(534)	22.5.1 制备持卵管与注射针	(604)
21.1.4 转录水平的调控	(538)	22.5.2 显微注射操作	(605)
21.1.5 转录后水平的调控	(547)	22.6 卵的转移	(607)
21.1.6 翻译水平的调控	(549)	22.6.1 输卵管转移	(607)
21.1.7 翻译后水平的调控	(550)	22.6.2 子宫移卵	(608)
21.2 基因表达调控研究方法	(550)	22.7 转基因鼠系的建立	(609)
21.2.1 DNase I 超敏感性分析	(551)	22.7.1 取鼠胚胎	(609)
21.2.2 DNA 甲基化分析	(551)	22.7.2 从胎鼠肌肉或幼鼠尾 巴提取大分子量 DNA	(610)
21.2.3 转录起始位点的测定 (引物延伸法)	(553)	22.7.3 转基因鼠中外源 DNA 的分析	(610)
21.2.4 体外转录	(554)	22.7.4 转基因鼠系	(610)
21.2.5 进行中的核转录分析	(557)	22.8 卵培养液的配制与保存	(611)
21.2.6 差示文库	(558)	22.8.1 配制 M_2 与 M_{16} 的培 养液的贮存液	(611)
21.2.7 氯霉素乙酰转移酶分析	(560)	22.8.2 由贮存液配制 M_2	(612)
21.2.8 凝胶滞留法	(563)	22.8.3 由贮存液配制 M_{16}	(612)
21.2.9 滤膜结合法	(566)	22.9 转基因动物的应用	(612)
21.2.10 Southwestern 印迹	(567)	22.9.1 基因表达调控	(612)
		22.9.2 转基因动物模型	(616)
		22.9.3 用转基因动物产生 物活性物质与药物	(617)

23. 转基因植物 (618)

23.1 转基因植物的基本技术与

方法 (618)

23.1.1 植物转基因基本技术 (618)

23.1.2 植物转基因方法 (619)

23.1.3 根癌农杆菌 Ti 质粒

表达载体 (619)

23.1.4 植物组织培养和培养基 (619)

23.2 PEG 介导的原生质体转染 (622)

23.2.1 烟草悬浮细胞的培养 (622)

23.2.2 原生质体的制备 (622)

23.2.3 原生质体的转染 (622)

23.2.4 报告基因产物的分析 (622)

23.3 根癌农杆菌介导的叶盘转

化法 (623)

23.3.1 烟草无菌苗的培养 (623)

23.3.2 根癌农杆菌感受态的

制备及其转化 (623)

23.3.3 烟草叶盘共培养 (624)

23.3.4 转化植株的筛选 (624)

23.3.5 转化植株的田间移栽 (624)

23.4 基因枪法转化愈伤组织 (624)

23.4.1 水稻愈伤组织的诱导与培养 (625)

23.4.2 金粉制备 (625)

23.4.3 微弹 (microcarrier) 制备 (625)

23.4.4 轰击 (625)

23.4.5 水稻转化细胞的筛选 (625)

23.4.6 植株再生 (625)

23.5 病毒载体表达系统 (626)

23.5.1 病毒 cDNA 的克隆和外

源基因的插入 (628)

23.5.2 体外转录 (629)

23.5.3 重组病毒的小量制备 (629)

23.5.4 病毒的大量繁殖和提纯 (629)

23.6 转基因植株的分析 (629)

24 人类基因治疗 (631)

24.1 基因治疗概述 (631)

24.2 基因转移系统 (632)

24.2.1 反转录病毒 (632)

24.2.2 腺病毒 (633)

24.2.3 腺病毒伴随病毒 (634)

24.2.4 单纯疱疹病毒 (634)

24.2.5 脂质体 (635)

24.2.6 受体介导的蛋白 (635)

24.3 受体细胞与转移基因的表达 (635)

24.3.1 造血细胞 (635)

24.3.2 肌肉细胞 (636)

24.3.3 成纤维细胞 (636)

24.3.4 肝细胞 (637)

24.3.5 其它细胞 (637)

24.4 人类基因治疗的审批程序 (638)

24.5 基因标记与基因治疗 (638)

24.6 遗传病基因治疗 (639)

24.6.1 腺苷脱氨酶缺陷 (639)

24.6.2 血友病 (640)

24.7 肿瘤基因治疗 (641)

24.8 伦理学安全性与社会效应 (641)

24.9 问题与展望 (642)

25 体内外基因转移方法 (645)

25.1 体内外基因转移方法概述 (645)

25.2 体内外基因转移方法实例 (645)

26. 非病毒载体基因治疗 (650)

26.1 完全非病毒的基因转移

方式 (650)

26.1.1 粒子轰击 (基因枪)

- RNA 疫苗 (650)

26.1.2 穿刺方法 (650)

26.1.3 超声介导的转染方法 (651)

26.1.4 脂质体介导的大脑内

连续转移基因 (651)

26.1.5 DNA-合成蛋白 (肽)

复合物 (651)

26.1.6 哺乳动物人工染色体 (652)

26.1.7 厌氧细菌-梭状芽胞

杆菌在癌症基因治疗

中的应用 (652)

26.1.8 抗体作为酶或基因的

载体 (652)

26.2 病毒增强的基因转移方式 (653)

26.2.1 腺病毒的核内体溶解 (653)

26.2.2 多瘤病毒的假衣壳作 为载体	(653)	28. 微卫星技术	(677)
26.2.3 噬菌体显示肽定向转 移基因	(653)	28.1 微卫星技术概述	(677)
27. 细胞凋亡的研究方法	(656)	28.1.1 概念	(677)
27.1 细胞凋亡的形态学检测 方法	(656)	28.1.2 微卫星技术基本特征	(677)
27.1.1 凋亡细胞的显微镜观察	(656)	28.1.3 微卫星产生机制	(677)
27.1.2 凋亡细胞的姬姆萨染色	(656)	28.1.4 微卫星标记的筛选	(677)
27.1.3 凋亡细胞的电子显微 镜观察	(657)	28.2 微卫星多态标记检测技术	(678)
27.1.4 凋亡细胞的碘化丙啶 (PI) 排斥分析法	(657)	28.2.1 扩增片段长度多态性	(678)
27.1.5 双苯并咪唑染料 (Ho echst33342) 活细胞 吸收分析法	(658)	28.2.2 荧光标记 PCR 法 - 采用 373A DNA 序列荧光 标记自动分析仪	(680)
27.1.6 凋亡细胞对胰蛋白酶 和脱氧核糖核酸酶敏 感性分析法	(659)	28.3 统计分析	(681)
27.2 细胞凋亡的生物化学研究 方法	(660)	28.3.1 不同人群之间等位基 因频率计算	(681)
27.2.1 细胞群染色体 DNA 断 裂的测定 I	(660)	28.3.2 人群中 Hardy - Weinberg 平衡推算	(681)
27.2.2 染色体 DNA 断裂的测 定 II	(661)	28.3.3 推算突变率	(681)
27.2.3 同时分析凋亡细胞染 色体 DNA 断裂及其细 胞形态法	(661)	29. cDNA 末端快速扩增技术	(683)
27.2.4 大分子染色体 DNA 断 裂的测定	(663)	29.1 RACE 的原理	(683)
27.2.5 细胞凋亡时钙离子浓度 的测定	(664)	29.2 RACE 的方法	(684)
27.3 细胞凋亡的免疫化学分析 方法	(666)	29.3 RACE 的改良和优化	(687)
27.4 细胞凋亡的分子生物学研 究方法	(668)	29.3.1 反转录	(688)
27.4.1 过氧化物酶标记测定法	(668)	29.3.2 加尾反应	(688)
27.4.2 荧光素标记测定法	(670)	29.3.3 PCR 扩增和 PCR 产物 的克隆	(691)
27.4.3 生物素 - dUTP/酶标亲 和素测定法	(672)	29.4 RACE 的其它应用及其前景	(692)
27.4.4 Cy5 - dCTP 直接荧光标记法	(673)	30. mRNA 差异显示法	(694)
		30.1 mRNA 差异显示法原理	(694)
		30.2 mRNA 差异显示技术	(694)
		31. DNA 芯片技术	(698)
		31.1 DNA 芯片的制作原理	(698)
		31.2 DNA 芯片的应用	(699)
		31.2.1 基因诊断	(699)
		31.2.2 应用 DNA 芯片技术分析 基因组及发现新基因	(699)
		31.2.3 DNA 芯片用于基因表 达的研究	(700)
		31.2.4 利用 DNA 芯片进行 DNA	

序列分析	(700)	32.6.1 只有一个孩子受累的家庭	(716)
31.2.5 利用 DNA 芯片技术进		32.6.2 有两个孩子患病的家庭	(717)
行后基因组研究	(700)	32.6.3 有两个以上受累同胞的	
32. 常用遗传统计分析方法	(702)	家庭	(717)
32.1 Hardy - Weinberg 定律	(702)	32.7 等位基因共享分析	(718)
32.1.1 常染色体基因的 Hardy -		32.7.1 受累同胞对分析	(719)
Weinberg 定律	(702)	32.7.2 不一致同胞对	(720)
32.1.2 X - 连锁基因的 H -		32.7.3 受累亲属对分析	(720)
W 定律	(702)		
32.1.3 近亲婚配和 Hardy -		附录	(722)
Weinberg 定律	(703)	1. 常用限制性内切酶酶切位点	(722)
32.2 多态性	(704)	2. 放射性核素数据	(725)
32.2.1 遗传多态性	(704)	3. 离心机转速与离心力的换算	(726)
32.2.2 基因频率	(707)	4. 核酸及蛋白质数据	(727)
32.2.3 样本取样随机性的验证	(707)	5. 分子克隆中使用的试剂与常	
32.2.4 多态性信息量计算	(707)	用缓冲液的配制	(733)
32.3 多态性连锁分析	(708)	6. 常用贮存液的配制	(740)
32.3.1 连锁分析	(708)	7. 常用酶的配制	(745)
32.3.2 连锁相 - 单体型与重组	(709)	8. 常用层析数据	(747)
32.3.3 连锁不平衡	(711)	9. 细菌培养基、抗生素和菌株	(750)
32.4 优势对数计分法与计算机程序 ..	(711)	英汉分子生物学词汇	(761)
32.5 关联分析	(715)	索引	(801)
32.6 传递不平衡检验	(716)		

1. 绪 论

——基因工程与分子生物学的进展及展望

20 世纪 50 年代 Watson 和 Crick 关于 DNA 双螺旋模板学说的提出, 60 年代 Monod 和 Jacob 关于基因调节控制的操纵子学说的出现, 以及 70 年代初期 DNA 限制性内切酶的发现和一整套 DNA 体外重组技术——基因工程技术的发展, 推动了分子生物学在广度和深度两个方面以空前的高速度蓬勃发展。基因工程研究成果的实际应用, 基因治疗技术在治疗几种疾病方面的初步成功, 人类基因组计划的实施, 意味着生物技术相关产业和生命科学已经出现划时代的突破和历史性的变革。这样的科技进步震撼了人类社会。人们预言, 21 世纪将是生命科学的世纪。以基因工程为主导的生物技术将可能左右一个国家经济前途的命运。生物技术引起了科学革命。生物技术可能会对世界的重大问题——饥饿、疾病、能源、污染等提供切实的解决办法。世界各国都看到, 以分子生物学为理论基础、以基因工程为主导的生物技术, 正以其巨大的活力推动着社会生产力的飞速发展, 并成为国与国之间、特别是大国之间竞争的主要手段之一。世界各国都把发展分子生物学与生物技术, 当作本国的强国之道和新的国策之一。

本文将深入浅出地介绍一些分子生物学与基因工程方面的最起码的知识以及这一领域在当代的主要进展与发展前景, 并期望引起读者对本领域研究的兴趣。

1.1 分子生物学与基因工程一瞥

这一节仅涉及分子生物学与基因工程的最基本的知识。

1.1.1 Watson 和 Crick 的 DNA 模板学说

这个学说指的是作为主要的遗传物质的生物大分子 DNA (脱氧核糖核酸) 的结构及其自我复制的模式, 同时也说明了基因与蛋白质生物合成的关系。

这一学说指出, 构成 DNA 的基本单位是脱氧核糖、核苷酸和磷酸。核苷酸碱基主要有 4 种: A (腺嘌呤)、T (胸腺嘧啶)、G (鸟嘌呤) 和 C (胞嘧啶)。在 DNA 结构中 A-T、G-C 是严格配对的。DNA 大分子以反向互补的两条单链形成双螺旋的立体结构, 如图 1-1 和图 1-2 所示。其形状多少有点像人们常见的小食品“麻花”。DNA 的复制过程即如图 1-3 所示: 先是两链分开, 然后两条亲代链均以各自为模板复制另一条互补链, 之后再形成子 1 代的双螺旋结构, 继之再以同样的方式复制成子 2 代、子 3 代、子 4 代……。这样的复制方式称为半保留复制。DNA 存在于染色体中。因此上述过程是与一对亲代染色体复制成两对子代染色体过程同时发生的。这样的过程也是与 1 个亲代细胞分裂成两个子代细胞的过程同时发生的。DNA 是基因的物质基础, 从化学结构看, 1 个基因就是 DNA 长链上的 1 个结构单位。每一个物种都有各自独特的 DNA 结构; 每一个基因也都有各自独特的 DNA 结构。因此, DNA 的半保留复制方式保证了遗传的稳定性。这就是“种瓜得瓜, 种豆得豆”的缘故。DNA 上 A-T、G-C 排列顺序的无穷无尽的变化, 便是物种多样性无可穷尽的原因。

至于基因 (DNA) 与蛋白质合成的关系, 便是 Watson 和 Crick 所指出的中心法则: DNA $\xrightarrow{\text{转录}}$ mRNA

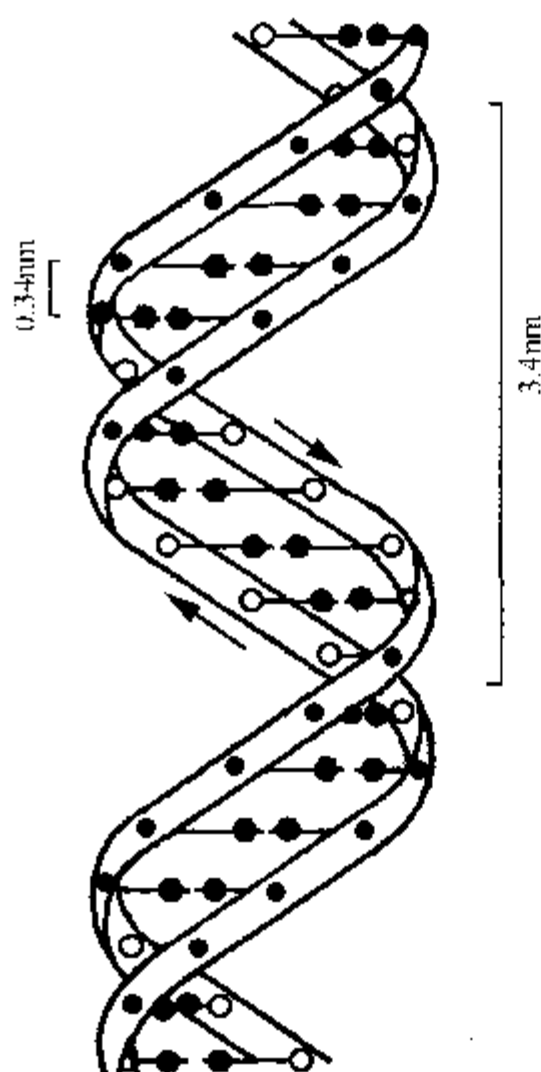


图 1-1 双螺旋 DNA 分子立体模式

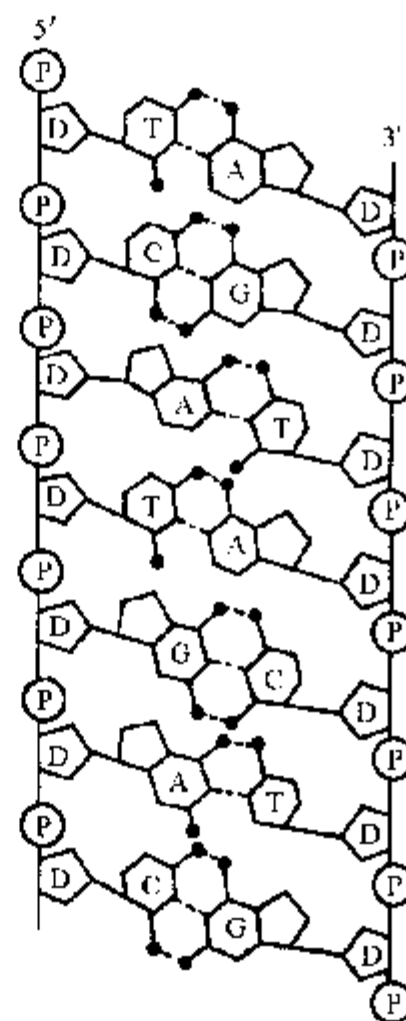


图 1-2 双螺旋 DNA 分子平面结构图

P. 磷酸; D. 脱氧核糖; 4 种碱基
A、T、G、C. (虚线) 表示氢键

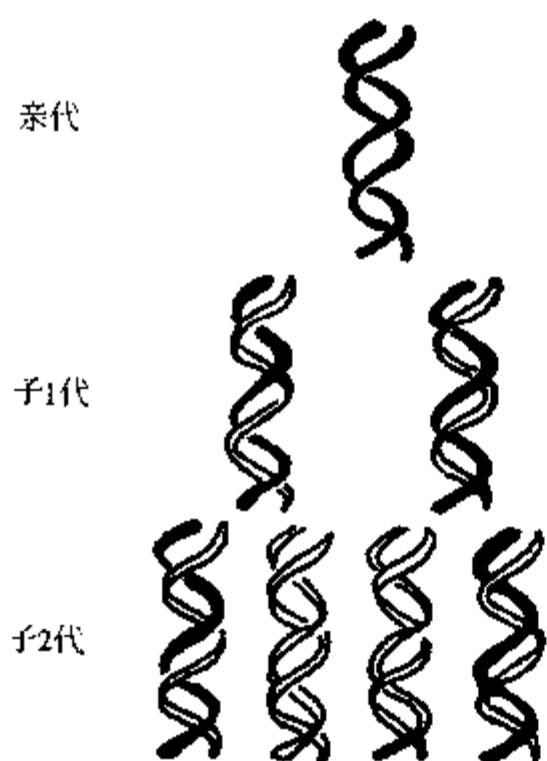


图 1-3 DNA 半保留复制

转译——蛋白质。大家知道，核酸有两大类：一是脱氧核糖核酸，即 DNA；另一是核糖核酸，即 RNA。后者与前者在化学结构上的不同有二：一是 RNA 的核糖是不脱氧的五碳糖；二是在 4 种碱基方面，RNA 为 A、U、G、C。U 是尿嘧啶。RNA 有好几种，mRNA 是其中的 1 种，称信使 RNA。中心法则的意思是 DNA（基因）指导了蛋白质的合成，如表 1-1 和表 1-2 所示。一般说来，先由在细胞核中的 DNA（基因）的碱基以 3 个为 1 组（三联密码）转录成 mRNA 的三联密码之后，mRNA 来到在细胞核外的核糖体（蛋白质合成的场所）上，且每一种三联密码指使一种特定的氨基酸同毗邻的氨基酸连接起来，变成了一种肽链（蛋白质）。这个过程称为转译。如果所合成的肽链很长的话，也可以形成有立体结构的蛋白质。表 1-1 是三联密码的关系表。表中的 U 是尿嘧啶。由此我们可以认识到，这个表讲的是 mRNA 三联密码同所编码的氨基酸的关系。

U 在 DNA 中的对应的碱基是 T（胸腺嘧啶）。怎样看懂这

张表呢？我们可以从 5' 端看到 3' 端，即按第一位——第二位——第三位的关系看：如 UCU（在 DNA 中则为 TCT）是丝氨酸；CCC（在 DNA 中也是 CCC）是脯氨酸；AAG（在 DNA 中也是 AAG）是赖氨酸；GGU（在 DNA 中是 GGT）是甘氨酸；如此类推。表中所确定的关系是经过严格的科学论证的，是固定不变的。

这样，只要知道了任何1个三联密码（不管是RNA的，还是DNA的），你便可以从图表中查到这个三联密码所编码的那个氨基酸了。

表1-2讲的是1个假定的基因（DNA）所编码的蛋白质（肽）的例子。表中ATG（AUG）是转译的起始密码；TAA，是1个无意义的密码，它使1条肽链的合成到此为止，也称为终止密码。终止密码还有两种；TAG和TGA。表1-2中两个组氨酸的三联密码有所不同。这说明一种氨基酸可以有多个的三联密码（这一点从表1-1中也可以看到）。这样的密码称简并密码。但是，必须明确指出，20多种天然氨基酸都有各自特定的三联密码，即使是简并密码也是特定的。三联密码一变，所编码的氨基酸也必定发生改变，除非属于简并密码。当然，这些仅仅是图解式的简明的解释。实际过程要比这样的说明复杂得多。这样的过程有点像打电报的过程：人们把语言文字变成数字编码之后从一地发到另一地，之后另一地再将数字编码转译成语言文字。这样的过程与电脑的工作过程、无线电播出与接收过程以及电视的播出与接收过程都有相似之处。由此也可以看到生命的基本现象——遗传密码的转录和转译现象的奥妙之处。

表1-1 遗传密码

第一位 (5'端)	第二位				第三位 (3'端)
	U	C	A	G	
U	苯丙氨酸	丝氨酸	酪氨酸	半胱氨酸	U
	苯丙氨酸	丝氨酸	酪氨酸	半胱氨酸	C
	亮氨酸	丝氨酸	终止	终止	A
	亮氨酸	丝氨酸	终止	色氨酸	G
C	亮氨酸	脯氨酸	组氨酸	精氨酸	U
	亮氨酸	脯氨酸	组氨酸	精氨酸	C
	亮氨酸	脯氨酸	谷氨酰胺	精氨酸	A
	亮氨酸	脯氨酸	谷氨酰胺	精氨酸	G
A	异亮氨酸	苏氨酸	天冬酰胺	丝氨酸	U
	异亮氨酸	苏氨酸	天冬酰胺	丝氨酸	C
	异亮氨酸	苏氨酸	赖氨酸	精氨酸	A
	甲硫氨酸	苏氨酸	赖氨酸	精氨酸	G
G	缬氨酸	丙氨酸	天冬氨酸	甘氨酸	U
	缬氨酸	丙氨酸	天冬氨酸	甘氨酸	C
	缬氨酸	丙氨酸	谷氨酸	甘氨酸	A
	缬氨酸	丙氨酸	谷氨酸	甘氨酸	G

表1-2 关于中心法则的图示

DNA:	ATG	AAG	AGT		GTC	CAT	...	CAC	TAA
mRNA:	AUG	AAG	AGU	↗	GUC	CAU	...	CAC	UAA
蛋白质	甲硫氨酸	赖氨酸	丝氨酸	↘	缬氨酸	组氨酸		组氨酸	(无意义)

还必须指出,中心法则发现后,科学家们还发现了反中心法则。人们在研究只有 RNA 而无 DNA 的病毒时发现了 1 种酶,称为逆转录酶,该酶能以 RNA 为模板合成 DNA。这样就把中心法则反转了过去。但在这种情况下,在以病毒 RNA 为模板反转成 DNA 之后,依然要遵循中心法则去合成蛋白质。逆转录现象是一种例外,而不是说中心法则不正确。

Watson 和 Crick 使遗传学的研究从细胞、染色体的水平深入到了分子水平。DNA (基因) 的自我半保留复制解释了遗传性状代代相传的稳定性;中心法则所阐明的基因与蛋白质合成的关系深刻地揭示了基因型与表现性、遗传与代谢 (生理现象) 的关系。事实上,基因所提供的是一种潜在的可能性,而只有基因所编码并合成的蛋白质才是代谢活动的主要角色。例如酶,生物体内一切代谢过程都有酶的参与,体内不存在无酶参与的生化过程。而酶是蛋白质。一切酶的合成都受基因的控制。“一个基因——一种酶”的理论是人们所熟知的。同时, Watson 和 Crick 的理论,还从分子水平上解开了基因突变之谜,而且分析可以精细到 1 个碱基。例如 ATG 编码的是甲硫氨酸,但如果发生了基因突变,使 ATG 中的 T 变成了 A,则该三联密码变成 AAG,在所合成的蛋白质长链上与甲硫氨酸对应的位置上就只能是赖氨酸,而不再是甲硫氨酸了,这就是点突变的本质。有时人体就因此而得病了。这就从分子水平上说明了经典遗传学经常谈论的“变异”的主要实质。由于 Watson 和 Crick 理论的出现,人们可从分子水平上十分具体地看到遗传对代谢的控制;可以了解到一切生理现象和病理现象都直接或间接地受到了遗传基因的控制。

1.1.2 Monod 和 Jacob 的操纵子学说

Watson 和 Crick 的伟大理论,其重要性无论怎样高估也不过分,但它仅仅是揭开了生命基本现象的一部分本质,而不是全部。而揭开生命基本现象另一部分本质的是 Monod 和 Jacob。他们从 60 年代至 70 年代提出的操纵子学说几乎同 Watson 和 Crick 的 DNA 模板学说具有同样的重要性。两个理论在说明生命基本现象实质方面可以成为姐妹篇。由于操纵子学说的出现,人们在认识生命基本现象的实质方面才有了基因的调节与控制的概念,有了基因调控的思想。

这里仅以 Monod 和 Jacob 研究得比较透彻的大肠杆菌乳糖操纵子为例,对操纵子学说的基本思想作一简要的介绍。如图 1-4 所示,所谓操纵子就是那些决定酶系的氨基酸顺序的、串连在一起的和转录协调一致的 DNA 区段。乳糖操纵子是由调节顺序 (基因) 和结构基因两部分组成的。调节顺序又分为:抑制基因 (I),它是阻遏物编码区;启动基因 (P 或称启动子),此区段内有 cAMP 受体蛋白 (CRP) 的结合位点和 RNA 聚合酶的结合位点;操纵基因 (O),为阻遏物结合位点。结构基因部分包括了编码 3 种酶的 3 个结构基因: β -半乳糖苷酶结构基因,透过酶结构基因和转乙酰酶的结构基因。乳糖操纵子的转录分为 3 个步骤:①当培养基中乳糖浓度增加而葡萄糖浓度降低时,菌体内 cAMP 含量增高, cAMP 与 CAP (即分解产物的激活蛋白) 结合成 CRP,该复合物与启动基因上对应的位点结合后,使 DNA 双

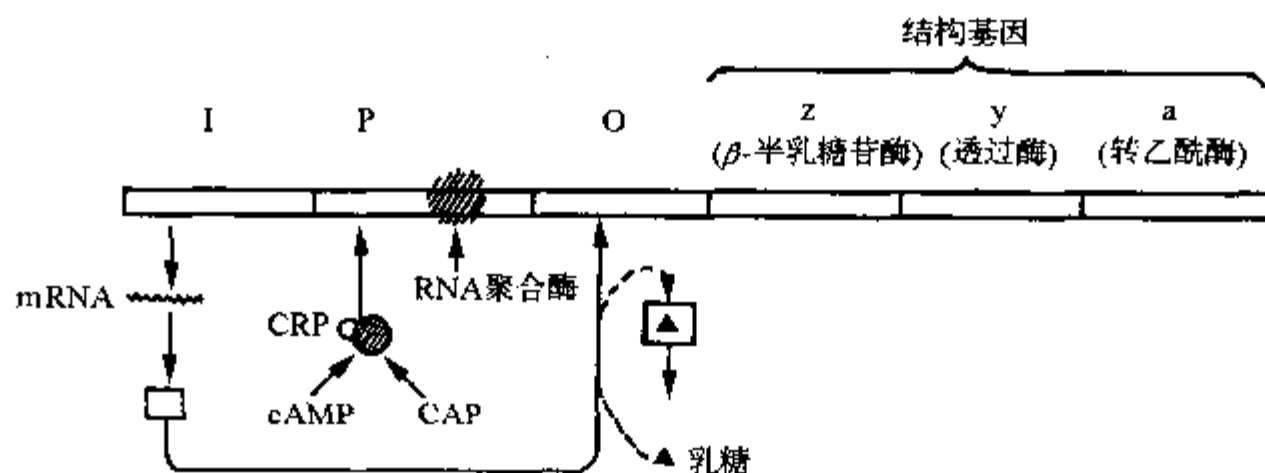


图 1-4 乳糖操纵子结构

CRP: cAMP 受体; CAP: 分解产物的激活蛋白; I: 抑制基因; P: 启动基因; O: 操纵基因

链不稳定；②随后 RNA 聚合酶则容易与启动基因紧密结合；③如此时操纵基因上无阻遏物，则基因被打开，RNA 聚合酶沿 DNA 5'端滑动，即转录开始。若培养基中葡萄糖浓度增高，因葡萄糖中间代谢产物抑制腺苷酸环化酶的活性并激活磷酸二酯酶活性，导致菌体内 cAMP 含量和 CRP 含量减少，RNA 聚合酶则不能与启动基因紧密结合，进而结构基因不能转录， β -半乳糖苷酶等 3 种酶也不能合成了。在另一种情况下，如由抑制基因转录和转译生成阻遏蛋白，并与操纵基因结合，同样会阻止酶滑动而抑制转录，这称为负调节。如果阻遏蛋白与诱导物（此处为乳糖）结合，则这个复合物不能和操纵基因结合，诱导反应就能进行，3 种酶的结构基因则可以转录进而转译生成相应的 3 种酶，也就是说，基因得到了表达。

人们看到，操纵子学说扩大了基因的概念。人们从 Watson 和 Crick 的理论中了解到了基因的自我复制功能，并从中心法则中了解到了基因指导和编码蛋白质的一级结构（氨基酸排列顺序），但并不了解基因的其他功能，或是说，人们并不了解除了能够编码蛋白质一级结构这么一类基因之外，还有具备其他功能的基因。操纵子学说揭示出，还有一类专门起调节和控制蛋白质合成作用的基因，如调节基因（对乳糖操纵子而言，包括了抑制基因、启动基因和操纵基因）。人们理解到，结构基因只提供了编码某种蛋白质一级结构（氨基酸排列）的潜在可能性，而它是否能够真正地起作用，真正编码并合成出某种特定的蛋白质，则受到调节基因的控制。而调节基因如何发挥作用，是否让结构基因编码合成出蛋白质，则取决于细胞内外环境因素（如是否有乳糖来诱导）。由此，人们形成了基因调控和表达的概念。像乳糖操纵子这样一套协调一致的基因，也称基因组。这样的过程，又与无线电发报、无线电广播、电视或电脑等的工作方式相类似：它们也是可以调节和控制的——是开、是关，要哪一频道、不要哪一波段等，都是可以控制的。

当然，乳糖操纵子仅仅是 1 个例子。此外，尚有色氨酸操纵子、组氨酸操纵子等。真核细胞中也存在着基因的调控与表达的机制。自从 Monod 和 Jacob 的理论提出后，科学家们进行了广泛深入的研究，了解到真核细胞基因调节和控制要比大肠杆菌等原核细胞基因的调控机制复杂得多。生长和发育的基因调控问题，细胞癌变过程中的基因调控问题，都是一些十分复杂又十分有兴趣的研究课题。

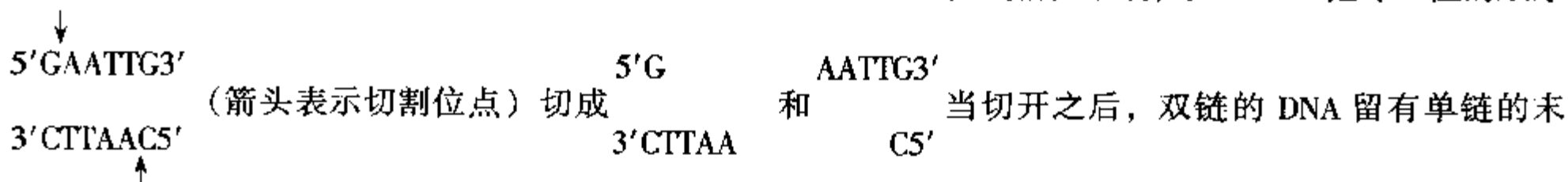
这里，必须补充一点，经典遗传学虽因其研究层次（只涉及细胞和染色体）的局限性而在应用方面不尽人意，但不是说，遗传学发展到了今天的分子水平就不再需要经典遗传学了。操纵子学说的建立，首先是从经典遗传学的技术方法入手的，主要是运用一些突变型及其杂交的手段得出明确的结果，推理认为细胞内存在着起调节和控制作用的基因，存在着作用协调一致的基因组，即乳糖操纵子。之后用生物化学的方法提取和纯化了乳糖操纵子，才完成了该学说的建立。

总之，DNA 模板学说和操纵子学说，二者相辅相成地从分子水平上揭开了遗传密码的复制、转录、转译、突变、调节与控制的奥秘，使人们对于生命基本现象实质的认识大大地具体和深入了一步，这些理论也成为基因工程研究的理论基础，堪称划时代的成就。

1.1.3 基因工程的工具酶和载体

显然，仅有上述这些理论，人们还无法自如地得到基因，更无法随心所欲地移动和改造基因。只有在 DNA 限制性内切酶（简称内切酶）、载体质粒、连接酶及其他修饰酶的发现之后，人类才有可能实现这一理想。DNA 和蛋白质顺序测定方法、基因体外快速突变、DNA 人工合成等方法的出现，则加快了基因工程在研究技术方面的成熟和发展。

70 年代初期发现，许多细菌都能产生内切酶，但种类不同。现在已经知道的内切酶有数百种。内切酶的共同特点是，它们都有专一性的 DNA 识别顺序，都能在 DNA 链当中（而不是末端）切开 DNA，故称“内切”的酶。但切开的方式又分为两种：主要的一种是切成粘性末端，如 EcoR1 把专一性的顺序



端。这些具有互补的核苷酸顺序的末端相遇时可以重新连接成为双链，这样的末端称为粘性末端。基因工程研究也就是利用了内切酶可以专一性地把 DNA 切割成特定的粘性末端的特点，根据研究工作的实际需要，把一些不同来源的、具有相同粘性末端的 DNA 片段重新连接或组合起来。这就是 DNA 体外重组技术的来由。内切酶切开 DNA 的另一种方式是切成平末端。这些内切酶同样具有专一性的识别顺序，

如 Hae III 可把专一性的顺序 $\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{GGCC} 3' \\ 3' \text{CCGG} 5' \end{array}$ 切成 $\begin{array}{c} 5' \text{GG} \quad \text{CC} 3' \\ 3' \text{CC} \quad \text{GG} 5' \end{array}$ ，即切开之后只有平末端，而无单链末端，但这样的末端相遇时在连接酶（另一类酶）的帮助下仍然可以再连接起来，虽然连接的效率远比粘性末端低得多。总之，由于 DNA 限制性内切酶的发现，才有可能发展出 DNA 体外重组的新技术，进而导致了基因工程这一生物高技术的产生。由于 DNA 重组技术在生物学理论研究和实际应用两个方面的极端重要性，它把生命科学的研究推上了一个新的高峰，因而 DNA 限制性内切酶的发现也是一个划时代的突破。

就基因工程研究而言，DNA 限制性内切酶等一类酶统称为工具酶（基因工程研究的技术工具），它还包括 DNA 连接酶、末端转移酶、单链核酸酶、反转录酶等。

虽然内切酶的发现解决了异源 DNA 体外重组的技术问题，但是重组之后的异源 DNA 还必须回到细胞内（生物体中）才能显示出其生物活性。这就要求有一种运送载体（简称载体）来充当这样的角色。研究工作发现，在微生物中有 1 种非染色体（或称染色体外）的环状 DNA（称为质粒）以及一些噬菌体（寄生在细菌中的病毒）、动植物病毒等可以作为这样的载体。这样的载体的共同特点是：①它们都是环状 DNA；②都能专一性地感染某一类细胞，如大肠杆菌、枯草杆菌、放线菌、酵母或哺乳动物细胞等；③都具有某种选择性标记，如耐某种抗生素的基因（耐氨苄青霉素、耐四环素、耐卡那霉素）或其他一些选择性标记；④都具有一些内切酶的酶切位点；⑤都可以随着染色体的复制而独立复制，随着细胞的分裂而扩增。在进行基因工程研究时，人们既可以利用内切酶把异源 DNA 片段连接起来，也可以利用

同种内切酶把质粒载体切开，把异源 DNA 片段连接到载体上去，重新构建成为较大的环状 DNA，之后利用质粒对细胞的感染力把这样的杂合质粒送到细胞（称寄主细胞）中去，并利用质粒上的选择标记把带有这种杂合质粒的细胞查找出来，再依靠载体上可能存在的启动子使异源基因获得表达，合成出所需要的蛋白质。

总之，分子遗传学的重大突破为基因工程高技术的产生提供了理论基础，而限制性内切酶的发现、质粒作为载体的应用，从而发展出一套 DNA 体外重组的新技术。这样，基因工程研究才真正地出现了。

1.1.4 基因工程的基本程序

这个程序包括取得所需要的基因（或称目的基因），将目的基因同载体连接，再将这个经过重组的环状 DNA 引入受体细胞（或称寄主细胞），并使目的基因和载体上其他基因的性状得以表达（即基因转录和转译为蛋白质）等几个环节。这个过程如图 1-5 所示。图中的环状 DNA 是作为外源 DNA 载体的质粒，称 pBR322，标记 Amp^r 为耐氨苄青霉素基因。标记

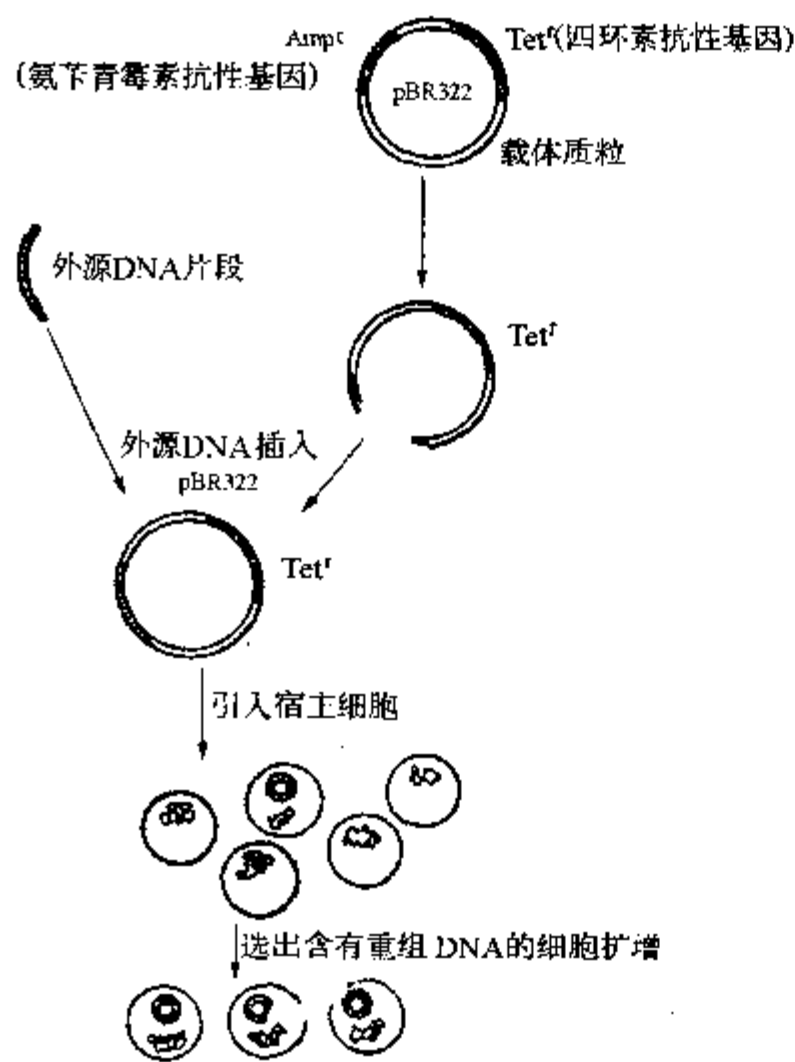


图 1-5 基因工程基本程序示意图

Tet^r 为耐四环素基因。质粒 pBR322 经内切酶 (如 PstI) 水解开环, 并带有该内切酶 (PstI) 特有的粘性末端, 而外源 DNA 片段也带有同样的 (PstI) 的粘性末端。之后, 将它们混合在一起, 加入 DNA 连接酶, 经一定温度保温之后, 外源 DNA 片段便可以插入到质粒 pBR322 中去, 并重新成为带有外源 DNA 片段的环状 DNA (杂合质粒)。这就是 DNA 重组过程。之后, 将重组的质粒转化 (引入) 寄主细胞, 再把这些细胞培养在含有四环素的固体培养基上, 便可以选出和扩增所需要的重组质粒 (重组体)。如果该外源 DNA 片段带有目的基因, 并在该基因的前面 (称上游) 带有启动子, 则在一定的培养条件下 (如进行诱导), 则可以使目的基因合成所需要的蛋白质。大家所熟知的人生长素抑制激素、人生长激素、胰岛素、干扰素等都是大致按照这样的技术路线研制成功的。但实际情况要比这个过程复杂得多, 每一步具体的技术方法也不尽相同。

在基因工程研究中, 操作的对象是单个基因。只要把所研究的某个基因同载体质粒连接起来, 就可以使这个目的基因在细胞中扩增达到几十个甚至上百个之多; 而且不难将亲缘关系很远的生物体的基因, 例如人的基因或植物的基因引入到细菌细胞中去。在育种工作中就可能创造出崭新的生物品种。在基础理论研究中, 则因容易获得大量的含有某一基因的 DNA 从而使过去无法进行研究的问题得以进行研究, 如基因的核苷酸顺序测定等。这些事实说明, DNA 体外重组技术的出现从根本上克服了经典遗传学所固有的许多研究的盲目性和局限性。

1.2 基因工程与分子生物学进展一览

以 DNA 体外重组 (分子克隆) 技术的出现为契机, 分子生物学在应用 (基因工程) 和理论两个方面的研究均取得诸多极其重要的进展, 充分展示了这一学科的巨大生命力及其广阔的发展前景。全面的介绍是不可能的, 这里仅择其要者略加说明。

1.2.1 基因工程的研究成就

基因工程研究涉及国民经济的诸多领域, 如农林牧副渔、医药、环境监测与净化、食品、石油、化工等应用领域。实践表明, 基因工程研究将为人类社会带来难以估量的社会效益与经济效益。已经取得的成就是振奋人心的。

1.2.1.1 植物基因工程

1. 植物基因工程的主要成就:

当前已鉴定和克隆化的植物基因有数百个。它们分别与农业中的抗除草剂、抗昆虫、抗病、抗不良环境因素、提高产量的光合作用、雄性不育以及蛋白质含量等有关。

植物基因工程的关键是将目的基因导入植物细胞并使之表达。广泛的探索, 推动了技术进步。最初应用比较广泛的是农杆菌介导的基因转移, 继之, 发展出以原生质体或细胞为受体的直接基因转移, 如聚乙二醇法、电击法、脂质体法、磷酸钙 - DNA 共沉淀法、微注射法、激光微束法、超声波法等; 同时发展出种质系统的基因转移法, 即子房注射、种胚等导入基因法。1987 年, 出现了基因枪 (particle bombardment, PB) 法, 可将基因直接导入有壁的植物细胞; 也可通过叶绿体膜将基因直接导入叶绿体。

(1) 抗除草剂作物: 草甘磷 (glyphosate) 是一种广谱除草剂, 它具有无毒、易分解, 无残留和不污染环境等特点, 得到广泛的应用。它的靶位点是植物叶绿体中的一种重要酶——EPSP 合成酶 (5-enolpyruvylshikimate - 3-phosphate synthetase)。草甘磷通过抑制 EPSP 合成酶活性, 而阻断了芳香族氨基酸的合成, 最终导致受试植株的死亡。目前已从细菌中分离出一个突变株, 它含有抗草甘磷的 EPSP 合成酶突变基因。把抗草甘磷基因引入植物, 可使这种基因工程作物获得抗草甘磷的能力。此时若用草甘磷除草, 则可选择性地除掉杂草, 而这种作物因不受损害而生长。各国科学家对此十分重视。美国科学家已成功地将抗草甘磷的 EPSP 合成酶基因引入烟草中, 转化植株已获得抗草甘磷的能力, 现正进行大田试

验。

PPT (phosphinothricin) 用作非选择性的除草剂, 是植物谷氨酰氨合成酶 (glutamine synthetase, GS) 的抑制剂。GS 在氨的同化作用和氨代谢过程中起关键作用, 而且也是唯一的一种氨解毒酶 (detoxifying enzyme)。它在植物细胞的代谢过程中也非常重要。抑制 GS 的酶活性将导致植物体内氨的迅速积累, 并最终引起其死亡。现已从 *streptomyces hyrscopicus* (一种链霉菌) 中分离得到 bialaphos (含有 PPT 的三肽) 的 bar 基因编码的抗 PPT 的 PAT, 在 CaMV35s 启动子的控制下, 嵌合的 bar 基因在烟草、马铃薯和西红柿的细胞内得到了表达, 转化植株对高剂量的 PPT 和 bialaphos 具有耐受性。这是因为, bar 基因的表达产物 PAT 通过对 PPT 和 bialaphos 的乙酰化而使其失去抑制 GS 活性作用, 并最终使转化植物对除草剂产生抗性。

(2) 改良蛋白质贮存的种子: 目前对水稻谷蛋白、菜豆贮存蛋白、小麦贮存蛋白、巴西豆种子蛋白和玉米醇溶蛋白基因的研究较为深入。利用这些基因进行转化会使受体植物的蛋白质量得到改良。特别是巴西豆种子蛋白富含硫氨基酸, 而大多数麦类种子蛋白则缺乏此种氨基酸。目前美国科学家已成功地将玉米醇溶蛋白基因导入向日葵的细胞内, 在转化植株内得到了部分表达。

(3) 抗昆虫作物: 苏云金杆菌 (*B. thuringiensis*) 毒蛋白是苏云金杆菌在形成芽孢时产生的一种蛋白质, 以结晶方式出现, 被称之为伴孢晶体 (parasporal protein crystal)。这种毒蛋白对鳞翅目昆虫有特异的毒性作用。它在昆虫消化道内的碱性条件下, 裂解成为活性多肽并造成昆虫消化道的损伤, 最终可使昆虫死亡, 而对其他生物则无害。目前已获得含有毒蛋白基因的烟草转化植株, 对鳞翅目害虫有一定的特异性抗性。在美国已获准进行大田试验。该毒蛋白抗昆虫谱较窄, 昆虫也可产生抗性, 限制了其应用范围。而苏云金杆菌以色列变种 (*B. thuringiensis varisraeliensis*) 所产生的毒蛋白则具有抗同翅目昆虫的作用, 从而扩大了毒蛋白基因的应用范围。西德科学家已分离出了抗鞘翅目昆虫的苏云金杆菌变株。苏云金杆菌毒蛋白基因研究已为大家所关注。

豇豆胰蛋白酶抑制因子 (cowpea trypsin inhibitor) 基因 (CpTI) 已被成功地引入烟草的植株, 并使转化植株获得了抗昆虫能力。CpTI 是一个大约由 80 个氨基酸组成的小肽, 属于 Bowman - Birk 类型的丝氨酸蛋白酶抑制剂。它的作用位点是酶的催化中心。这一位点的突变可能性甚小。因此可能排除害虫通过突变而产生对 CpTI 的耐受性, 而且 CpTI 抗昆虫谱广, 能抗鳞翅目、鞘翅目等, 几乎对所有的害虫有效。CpTI 对人畜无害。因此, CpTI 比苏云金杆菌更有应用价值。英国现正把 CpTI 导入甘薯内, 以期 CpTI 基因能保护甘薯免受甘薯蛾的危害。

(4) 抗真菌作物: 几丁质是真菌细胞壁的组分之一。几丁质酶 (chitinase) 可破坏几丁质。美国科学家已从灵杆菌 (*S. marcescens*) 中分离出几个几丁质酶基因并导入烟草中。大田试验结果表明, 这种转基因烟草抗真菌感染与施用杀真菌剂同样有效, 而且收获更好。目前, 已将几丁质酶基因导入番茄、马铃薯、莴苣和甜菜, 并正准备进行大田试验。这一技术将对蔬菜和果实类植物抗真菌感染具有重要意义。

(5) 抗重金属镉的作物: 用哺乳动物基因组编码的金属硫因蛋白 (metallothionein) 基因转化植物, 可使受体植物获得抗重金属镉的能力。镉对植物的污染会影响植物的固氮过程, 降低植物体内水分和养分的运输能力, 最终抑制植物细胞的光合作用。加拿大科学家将中国仓鼠金属硫因蛋白基因插入到 CaMV 的衍生质粒中, 然后用这种质粒感染野生油菜叶片, 受感染的叶片能高水平地产生金属硫因蛋白, 并且产生对镉的抗性。

(6) 抗病毒作物: 抗病毒作物的研究已取得多方面的成就。

应用烟草花叶病毒外壳蛋白。烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus, TMV) 是一种 RNA 病毒, 由单链 RNA 和外壳蛋白所组成, 它主要感染烟草等植物。受 TMV 感染的植物组织部分具有抵抗 TMV 再感染的能力。据认为, 这种免疫力是因为感染病毒后的产物可抑制新侵入病毒释放 mRNA 所致。TMV 的外壳蛋白 (TMV coat protein) 在此起缓解感染作用。最近, 已成功地将 TMV 外壳蛋白基因引入到了烟草细胞

中,转化植株细胞可以产生这种外壳蛋白,并表现出对 TMV 感染一定的抗性。

应用苜蓿花叶病毒 (alfalfa mosaic virus, AMV) 外壳蛋白基因。AMV 是一种较为复杂的 RNA 病毒,具有交叉保护功能,由 3 条 RNA 所组成。它们分别包装在不同长度的杆状颗粒内。美国科学家利用 Ti 质粒作为载体,成功地将 AMV 外壳蛋白基因转移到烟草细胞内。外壳蛋白基因在 CaMV35s 启动子的控制下,在转化植株中所产生的外壳蛋白可以有效地防止 AMV 的侵染。

应用黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV) 卫星 RNA。CMV 可以广泛地感染瓜类作物。含有 CMV 的卫星 RNA 基因拷贝的转化植物在受到 CMV 感染时产生大量的卫星 RNA。植物细胞内过量的卫星 RNA 可以抑制病毒 RNA 的复制,还可能显著减轻病状的发展。含有 CMV 卫星 RNA 的基因工程植物还具有一定的抗蕃茄病毒 (tomato aspermy virus, TAV) 的能力。

应用烟草环斑病毒 (tobacco ringspot virus, TobRV) 卫星 RNA。TobRV 含有两个单链 RNA 分子,它可以广泛感染双子叶植物,并可引起大豆的芽枯病。感染期间有 1 种小分子量的 RNA 在细胞内大量复制。这种 RNA 分子与病毒基因组 RNA 没有同源性,它的复制也不依赖于病毒基因 RNA 的复制,因此被命名为 TobRV 卫星 RNA (STobRV)。STobRV 可以包装在成熟的病毒颗粒内。据认为,它很可能是病毒的寄生物。在感染期间 STobRV 的存在具有改善病状的作用。已将 TobRV 的序列引入烟草的植株中,在病毒侵染时 STobRV 得到高效表达,并表现出对侵染病毒的抗性。

另外,据报道,将编码得自 TMV 蛋白 (分子量 54kD) 的 DNA 序列导入植物时,可对高浓度的 TMV 产生抗性。为了赋予植物以病毒抗性,此特殊的 DNA 序列要比迄今利用的外壳蛋白基因更为有效。54kD 蛋白被认为与控制病毒复制的酶有关。

(7) 被改良的药用植物:日本科学家以重组 DNA 技术提高了镇痛药莨菪胺生物合成的效率。研究发现,莨菪胺的合成速率取决于 H6H 酶。因此,首先克隆了茄科植物的天仙子 H6H 酶的 cDNA (分子量为 38 000,含 344 个氨基酸)。接着,构建了在椰菜花叶病毒的 35S 启动子下游插入 H6H 的 cDNA 和 Ti 质粒的缬氨酸合成酶的终端质粒,并导入茄科的颠茄。通常,颠茄天仙子胺转化为莨菪胺的量很少;但导入 H6H cDNA 后几乎 100% 转变为莨菪胺,使产量从 0.3% 提高到 1% 左右,该特性且可传至下一代植物。

2. 国外植物基因工程的主要成就:

总的看来,植物基因工程发展最快,成就最大的是美国。它包括改良的作物和生物农药。其概况列于表 1-3。

另外,6 年内可望投放市场的产品还有 25 种。再,1994 年世界大田试验的转基因植物已达 1467 例。又及,三年内可望投放市场的生物农药还有 13 种 (表 1-4)。

3. 我国植物基因工程的主要成就:

我国已在植物基因工程方面展开了广泛的研究,取得了比较显著的成绩。

(1) 抗虫棉:

人工合成苏云金芽胞杆菌 BT 杀虫蛋白基因 3 种;

克隆豇豆胰蛋白酶抑制剂 (cpTI) 基因 5 种;

构建单价或多价重组体,杀虫率达 80% 以上,已进入田间试验。

(2) 抗病小麦育种:

杂交育种获抗黄矮病,农业性状优良,兼抗白粉病普通小麦新品系,国际领先;

将大麦黄矮病毒中国 GPV 株系外壳蛋白基因导入小麦,获转基因株,正进行田间试验;

抗赤霉病小麦 (生物技术与常规育种),已进入田间;

簇毛麦中的抗白粉病基因 (pm21) 导入小麦获得一批易位系。

表 1-3 美国已获准上市的工程农产品 (21 种)

公 司	品 种	特 点
Calgene	BXN TM 棉花	需较少化学除草剂
MONsanto	Bollgard 抗虫棉花	抗虫棉花、棉铃虫、烟夜蛾
Monsanto	Roundup Ready 棉花	耐除草剂
Calgene	FLAYR SAVR TM 番茄	保鲜、缓熟 (反义技术)
DNA Plant Tech	Fresh World Farms 番茄	色、味、质佳, 货架期 10~14 天
DNA Plant Tech	Fresh World Farms Endless Summer 番茄	色、味、质佳, 货架期 30~40 天
DNA Plant Tech	Fresh World Farms TM 樱桃番茄	色、味、质俱佳
Zeneca Plant Scie	Increased Pectin 番茄	改良种, 可保存果胶于番茄酱中
CIBA Seeds	CIBA Maximizer TM 杂交玉米	抗欧洲玉米蛾 (最大害虫之一)
Monsanto	Natur Card 玉米	含对多种害虫有害的蛋白质
Asgrow	Freedom TM 南瓜	对植物病毒有天然抗性
Calgene	高月桂酸油菜	含油 40%, 肥皂、清洁剂、 可可脂廉价原料
Monsanto	New Leaf 抗虫马铃薯	含 BT 基因, 抗科罗拉多马铃薯瓢虫
DNA Plant Tech	Fresh World Farms TM Carrot Bites	多汁即食胡萝卜
DNA Plant Tech	Vegi Snax ^R Carrot Bites	即食胡萝卜条
DNA Plant Tech	Fresh World Farms TM Sweet Mini-peppers	甜味、无籽、深红色
Monsanto	Roundup Ready TM 大豆	耐除草剂
Genencor Interl	Chymogen ^R 凝乳酶	制备乳酪, 占美 60% 产品
Pfizer FSG	Chy Max ^R 凝乳酶	高纯度、高质量、高活性
Monsanto	Pusilac ^R 牛生长激素	增产乳量 10%~15%, 美 30% 乳牛用之
Vinifera	Vitro Graft Grapevine plants	优质葡萄植株

表 1-4 美国已投放市场的生物农药产品 (13 种)

公 司	产 品	特 点
Crop Genetics	Disease Free Kleentek TM	增加糖产量
International	Spox-X TM	用天然昆虫病毒控制甜菜夜蛾
Ecogen	Aspire TM	生物杀菌剂, 防柑橘、梨、葡萄收 获后腐烂
Ecogen	Foil ^R Bioinsecticide	杀科罗拉多马铃薯瓢虫, 欧洲玉米 蛾、粘虫
Ecogen	Condor 生物杀虫剂	杀菸夜蛾、棉铃虫、大豆藜豆苜蓿 绿等夜蛾, 卷叶蛾、云杉卷叶蛾
Ecogen	Curtass 生物杀虫剂	广谱。杀甜菜及粉纹夜蛾, 菜蛾菜 螟、菜青虫。
Ecogen	Onim ^R Insecticide	
Ecogen	Bee-Screen ^R No-Mate ^R AQ-10 ^R 生物杀菌剂	防治草莓、葡萄、番茄、瓜类、观 赏植物白粉病
Mycogen	MVP ^R	玉米、果树、棉花、葡萄和蔬菜防 治食叶鳞翅目害虫
Mycogen	M-Trak ^R	马铃薯、番茄、茄子防治科罗拉多 马铃薯瓢虫
Mycogen	M-Pede TM	果树、蔬菜、葡萄、观赏植物防治 软体昆虫和白粉病
Mycogen	M-Peril TM	玉米防治欧洲玉米蛾
Mycogen	DeMoss TM	房屋、温室防止苔藓和地衣

(3) 转抗菌肽基因的抗青枯病马铃薯株系:

设计与合成了 ShivaA 等三种抗菌肽基因导入 7 个马铃薯品系, 抗性提高。

(4) 水稻抗白叶枯病菌毒性缺失突变株 XooDu728:

室外试验了 3 年, 防治效果为 68%, 增产 4.6% ~ 10.5%, 与农药叶枯灵相似。

(5) 抗盐及品质改良:

克隆了脯氨酸合成酶 ProA 等 4 种耐盐基因, 经转山菠菜 BADH 基因 BetB, 获耐 1% NaCl 的苜蓿, 耐 0.8% NaCl 的草莓, 耐 2% NaCl 烟草;

水稻耐盐突变体研究, 已找到了主效基因。

(6) 重组农业微生物:

分离出特有的粪产碱菌 (联合固氮菌), 转移 *nifA* 基因与 *ntr-nifA* 双基因, 构建了 12 株水稻粪产碱菌耐碱工程菌, 已进入田间试验, 可节约化肥 1/5, 增产 5% ~ 12.5%;

田间试验: 阴沟肠杆菌, 催娩克氏杆菌工程菌可使水稻总氮等分别增加 8.6% 和 14.4%;

耐铵泌铵工程菌 E7 对植物氮素供应达 12%, 使玉米和水稻增产 10% ~ 15%;

构建一批大豆和花生根瘤菌工程菌, 已进入田间, 增产 16.5%;

花生工程根瘤菌已进入田间, 可使增产 19.9%。

总的看来, 当前植物基因工程研究涉及的门类繁多, 规模宏大, 成绩显著。与此同时, 人们始终没有放弃对固碳、固氮、优质、高产新品种的追求。为了远期的目标, 在植物基因调控的研究方面投入了巨大的人力物力。在组成型表达调节方面, 如胭脂合成酶 (*nopaline synthetase*, *nos*) 和基因启动子 (*p_{nos}*)、CaMV35S 启动子、肌动蛋白 (*actin*) 启动子、玉米基因的启动子 Z4、水稻谷蛋白基因启动子 *Gt3* 等; 在诱导型调节方面, 如光诱导调节序列、热诱导基因调控序列、蛋白酶抑制因子 II (*P12*) 基因调控序列等; 在组织特异性基因调控方面, 如种子特异基因的表达调控、马铃薯块茎贮藏蛋白 (*pata-tin*) 基因的表达调控等方面的研究均取得了令人瞩目的进展, 特别是对顺式作用元件的反式作用因子的深入研究, 必将揭示出许多新的规律。因此, 植物基因工程研究的重大突破是可以指望的。

1.2.1.2 动物基因工程

动物基因工程研究最突出的技术进步便是转基因动物及其发展。1983 年美国将大白鼠的生长激素基因注射到小白鼠的受精卵内, 并经移植和胚胎发育成功地培育出“超级鼠”, 其体重比一般品种鼠增加 2 倍。这个成就引起了广泛的注意, 人们起而效颦。许多研究运用缺陷型反转录病毒为载体携带生长激素基因导入动物, 试图培育出快速生长的各类动物。近年相继培育出转基因猪、羊、鸡、兔、牛等。美国培育的转基因鲤鱼可增产 20% ~ 40%, 并已进行室外放养。美国还把生长激素基因和耐寒基因转入鲟鱼, 试图培育出快速生长并可北移养殖的新品种。澳大利亚将羊毛成分蛋白质 α -角蛋白的主要成分半胱氨酸基因导入山羊, 繁殖出转基因山羊; 又用富含编码含硫氨基酸基因的工程紫苜蓿喂羊, 可使羊毛增产 5%。

近几年来转基因动物研究的技术方法有较大的改进。新出现的方法如电转移法、胚胎干细胞法、精子载体法、基因直接导入法等。意大利首先利用小鼠精子作为载体。使精子与 CAT (氯霉素乙酰转移酶) 基因混合, 待精子头部吸收 CAT 基因后, 用该精子使大鼠卵子体外受精, 之后移入雌鼠体内。在出生的 30% 小鼠中检出了 CAT 基因。该方法在青蛙和海胆的实验中也得到了成功。我国用鱼精子作载体, 将外源人生长激素基因导入鱼卵, 表达率为 50%。高表达幼苗生长速度为不表达幼苗的 2 倍。

我国培育出的生长激素转基因猪 (二、三代), 生产水平提高 20%; 乳腺特异表达外源基因的羊, 其乳汁分泌生长激素已达 400mg/L; 生长激素转基因鱼 (红鲤共 6 种), 生长速度快 10% ~ 50%, 增量快 20%, 节约饲料 10%, 遗传稳定性达 80%。

为预防家畜免遭传染病的危害, 传统办法是采取免疫接种, 但其效果并不都是很理想的。当前提出了一种新的办法: 用胞内免疫法培育抗病的转基因家畜。

胞内免疫法指的是,在宿主体内表达某种病毒蛋白的突变型,以便有效地干扰野生株病毒的复制。用此方法已培育出抗鸡白细胞组织增生病毒的转基因鸡新品种和抗烟草花叶病毒的烟草新品种。另一种胞内免疫法是,在转基因动物体内表达受干扰素诱导的细胞 MxJ 蛋白(来自粘病毒抗性基因),培育出一种对流感病毒有高度抗性的转基因小鼠。应用这一办法也可望培育出抗鸡瘟病毒的家禽新品种。

转基因动物的出现引导人们试图把转基因动物作为一种生物反应器去生产各种有用的蛋白质,特别是医用活性肽。转基因动物技术又是医学生物学基础理论研究的一种有用的方法。这些均留待下文的介绍。

转基因动物技术的缺点乃在于其盲目性。由于外源 DNA 引入受体细胞后可以随机地插入受体细胞基因组中的任意位置,容易导致内源有利基因结构的破坏和失活,或激活有害基因(如癌基因)。另外,导入人的外源基因,其表达水平也难以预料。所以,如何提高基因正常转化的效率,实现目的基因的定位整合,一直是人们追求的目标。为此,80 年代初发展起来的基因定位整合技术或称基因打靶(site-directed integration of gene 或 gene targeting),以及同期建立的小鼠胚胎多能干细胞系(ES 细胞系)的体外培养方法,为基因定位整合从而为哺乳动物种系的改造工作开拓了前景。概括地说,它是利用 DNA 体内同源重组的原理,将外源基因稳定地插入特定的位点,再经适当的筛选,从而得到既定的转化细胞。这一技术在动物育种、缺陷基因(遗传性疾病与恶性肿瘤)的修复以及生命科学的理论研究等方面,将有很大的应用价值。

1.2.1.3 基因工程多肽药物与疫苗

基因工程多肽药物与疫苗研究是当代生物技术研究与发展最为活跃,成就最大的领域,其突出进展主要包括 DNA 体外重组技术及其发展研制的产品和转基因动、植物技术所研制的产品,以及运用点突变、盒式突变、基因区段拼接等蛋白质工程技术所研制或改进的产品等。

目前在世界范围内正在开发的医用活性多肽和疫苗估计在 500 种左右。多肽药物中有人胰岛素、人生长激素(HGH)、干扰素、白细胞介素 1~15、组织血纤维蛋白溶酶原激活剂(tPA)、肿瘤坏死因子(TNF)、集落刺激因子(GM-CSF 和 G-CSF)、B 细胞生长因子(BCGF)、巨噬细胞激活因子(MAF)、免疫球蛋白(Ig)、表皮生长因子(EGF)、人受孕激素、松弛素、肾素、心钠素、血管紧张素、降钙素、内啡肽、消化酶、凝血Ⅷ因子、红细胞生成素(EPO)、尿激酶、胸腺素等等。疫苗:细菌方面有麻风杆菌、百日咳杆菌、淋球菌、脑膜炎球菌、传染性腹泻菌、链球菌、绿脓杆菌、梅毒螺旋体菌等;病毒方面有乙型肝炎、甲型肝炎、带状疱疹、巨细胞病毒、单纯疱疹、流感、轮状病毒、人免疫缺陷病毒、乳头状瘤等;寄生虫方面有疟原虫、利什曼原虫、血吸虫、锥虫等;真菌方面有组织胞浆菌、曲霉菌、念珠菌等。

下面是美国、日本、中国截至 1997 年已上市的基因工程药物(表 1-5, 1-6, 1-7)。

尽管基因工程疫苗研制的进展不如基因工程多肽药物,但世界各国,特别是大国坚持不懈地努力工作。如美国,现正进行临床试验的抗艾滋病疫苗便有 13 种,进入临床试验的其他疫苗还有 62 种。我国进入临床试验的,也还有 8 种。

与此同时,在基因工程疫苗研制中,出现了不少创新性的探索,如双特异性抗体、多价卡介苗(BCG)及瘤苗等。

应用单克隆抗体作为治疗药物的一个主要问题,是人体血液中出现大量的抗体与巨噬细胞上的受体结合。这种现象称为抗体封闭。为解决这一问题正研制双特异抗体。曾研制一种与巨噬细胞和靶细胞(或蛋白)结合的双末端抗体。结合后,巨噬细胞就能清除靶细胞。现正应用这一方法研制治疗艾滋病、其他传染病、癌症、自身免疫性疾病和心血管疾病的药物。还试图应用双特异性抗体激发天然 T 细胞去杀伤细胞内的艾滋病病毒(HIV)。还使用一种单个杂合抗体交叉地连接受 HIV 感染的细胞表面上的 gp120 分子和 T 细胞上的 CD3 分子。当受 HIV 感染的细胞与 CD3 分子结合时,杀伤性 T 细胞就受到激活而杀伤被 HIV 感染的细胞,从而消除入侵的 HIV。

表 1-5 美国已批准上市的基因工程药物 (39 种, 17 类)

中文名称	商品名称	英文名或缩写	开发生产公司
胰岛素	Humulin	Insulin	Lilly
	Novolin		Novo Nordisk
	Humalog	Lisproinsulin	Lilly
人生长激素	Protropin	rhHGH	Genetech
	Humatrope		Lilly
	NutropinAQ		Genetech
干扰素	Intron A	rhIFN α 2b	Schering
	Referon A	rhIFN α 2a	Roche
	Avonix	rhIFNB	Biogen
	Betaseron	rhIFNB1b	Chiron
	Actimmune	rhIFN γ 1b	Genetech
	Alferon - N	rhIFN γ 3	Interferon Science
白细胞介素 - 2	Proleukin	rhIL - 2	Chiron
粒细胞集落刺激因子	Neupogen	rhG - CSF	Amgen
粒细胞巨噬细胞集落刺激因子	Leukine	rhGM - CSF	Immunex
红细胞生成素	Epogen	rhEPO	Amgen
	Procrit		Orho
组织纤溶原激活剂	Activase	rhTpA	Genetech
生长激素	Serostim	Somatotropin	Serono
促生长素	Nutropin	Somatopin	Genetech
	Saizen		Seron
	Genotropin		Pharmacia/Upjohn
	Norditropin		Novo Nordisk
	Bio - Tropin		Biotech - General
抗血友病因子 VIII	Kogenate	Factor VIII	Bayer
	Recombinate		Baxter
葡糖脑苷脂酶	Cerezyme	Glucocerebrosidase	Genzyme
脱氧核糖核酸酶	Pulmozyme	Dornase	Genetech
乙型肝炎疫苗	RecombavaxHB	Hepatitis B Vaccine	Merck
	EngerixB		Smith Kline
	Comvax		Merck
甲型肝炎疫苗	Havrix	Hepatitis A Vaccine	Smith Kline
体内用单克隆抗体	Reopro	MAB, Blood Clots	Centocor
	Ortho OKT - 3	MAB, Kidney Sup	Ortho Biotech
	Onco Scint CR/OV	MAB, diag inject	Cytogen
	Onco Scint OV103		Cytogen
	Onco Scint CR103		Cytogen
	Prostascint		Cytogen
	Panorex	Murine MAB	Glaxo Wellcome

表 1-6 日本已上市的基因工程药物 (24 种, 15 类)

品 名	开发现状	开发公司	适 应 证
rhIL-2	92, 批准上市	盐野义制药	血管肉瘤
rhIFN α 2a	88, 批准上市	武田制药	抗癌 HBV, HCV 等
rhIFN α 2b	88, 批准上市	日本先灵	HBV, HCV 抗癌
rhIFNB	87, 批准上市	协和发酵	抗癌, 多发硬化症
rhIFN γ	90, 批准上市	盐野义制药	肾癌, 慢性肉芽肿
rhG-CSF	91, 批准上市	中外制药	再障贫血
rhG-CSF	91, 批准上市	麒麟啤酒	骨髓移植, 抗癌
rhGM-CSF	91, 批准上市	绿十字	中性粒细胞减少
rhEPO	90, 批准上市	中外制药	肾衰贫血
rhEPO	91, 批准上市	麒麟啤酒	再障贫血等
rhTNF	90, 批准上市	大日本制药	皮肤癌局部注射
rh (Insulin)	86, 批准上市	盐野义制药	糖尿病
rh 样生长因子	94, 批准上市	藤泽药品	糖尿病, 胰岛素受体异常
rh HGF (去 Met)	88, 批准上市	住友制药	矮小病
rh TPA	91, 批准上市	协和发酵	心梗溶栓
	94, 批准上市	住友制药	心梗溶栓
心钠素	95, 批准上市	Santory	心功能不全
乙型肝炎疫苗	88, 批准上市	盐野义制药	预防 HBV
(CHO 表达)	91, 批准上市	三菱化学	预防 HBV
(酵母表达)	92, 批准上市	绿十字	预防 HBV
(结合 PreS 为抗原)	94, 批准上市	武田制药	预防 HBV

表 1-7 我国已经批准上市的基因工程药物 (12 种)

药品名缩写	开发单位	批准时间	适 应 证
rhIFN α 1b (外用)	长春生研所	89, 试生产	病毒性角膜炎
rhIFN α 1b	上海生研所	96, 生产	HBV, HVC 等
	深圳科兴	96, 生产	HBV, HVC
rhIFN α 2a	长春生研所	96, 生产	尖锐湿疣, 疱疹等
	长生药业	97, 生产	HBV, HVC
	三生药业	97, 生产	HBV, HVC
	大洲药业	97, 生产	HBV, HVC
rhIFN α 2b	里亚哈达	96, 生产	HBV, HVC
	华立达	97, 生产	HBV, HVC

续表

药品名缩写	开发单位	批准时间	适 应 证
rhulFNr	安科	97, 试生产	HBV, HVC
	华新	97, 试生产	HBV, HVC
	上海生研所	94, 试生产	类风湿
	克隆	95, 试生产	类风湿
	丽珠生物工程	95, 试生产	类风湿
rhull-2	长春生研所	97, 生产	癌症辅助治疗
	长生药业	97, 生产	癌症辅助治疗
	四环制药	97, 生产	癌症辅助治疗
	华新	97, 生产	癌症辅助治疗
	三生药业	97, 生产	癌症辅助治疗
	深圳科兴	97, 生产	癌症辅助治疗
	中化合通	95, 试生产	癌症辅助治疗
	金丝利	95, 试生产	癌症辅助治疗
	康利制药	95, 试生产	癌症辅助治疗
	九源	97, 试生产	化疗生白细胞
rhulG-CSF	待宝	97, 试生产	化疗生白细胞
rhulGM-CSF	医大实业	96, 试生产	心梗溶栓
rhk (链激酶)	华欣	97, 试生产	再障贫血
rhul EPO	永铭维沃	97, 试生产	再障贫血
碱性成纤维细胞	珠海东大	96, 试生产	创伤, 烧伤
生长因子 bFGF (外用)			
另有: 乙型肝炎疫苗。			

关于多价 BCG 疫苗。曾在 BCG 中插入 20 种病毒、细菌和寄生虫等病原体的基因。一次免疫接种极低剂量的重组 DNA 的 BCG 疫苗, 使 VAlB/c 小鼠产生了体液免疫 (抗体形成) 和细胞免疫 (辅助性和细胞毒性 T 细胞两种) 反应。这意味着接种一种多价 BCG 疫苗有可能同时预防多种疾病。

研制恶性肿瘤疫苗 (瘤苗) 是一种大胆的设想。最初, 曾大胆地将癌细胞经照射灭活使之失去增殖能力, 之后注入体内, 发现能够诱生抗癌抗体, 但效果很差。现在, 已经发现了肿瘤抗原, 如癌基因表达产物、突变的抗癌基因产物, 分化基因的表达产物、胚胎性抗原等, 都可以作为肿瘤抗原。而且, 进一步发现肿瘤抗原须与 HLA 的 class I 或 MHT (组织复合相容性) 共用, 导致抗原小肽提呈到细胞外, 才有作用。事实上, 细胞受体识别的是抗原小肽与 class I (或 MHT) 的复合物。这也可称为“共刺激”分子。否则, 将引起肿瘤对抗原的耐受。进一步的发展, 是基因瘤苗。如以 γ -干扰素、GM-CSF、IL-2 等基因先导入 (与 class I、MHT 共刺激) 肿瘤细胞, 之后照射灭活, 再注入病人 (或实验动物) 体内, 效果较好。

下面是一些公司研制瘤苗的简要情况 (表 1-8)。

表 1-8 开发癌疫苗的公司 (16 种)

公 司	产 品	特 点	癌 目 标	开 发 状 况	
Bionira (加拿大)	THERATOPE	癌糖类合成模拟物	乳腺癌	Ⅲ期	
			卵巢癌	Ⅱ期	
			结直肠癌	Ⅱ期	
	BP1-7	MUC1 粘蛋白合成肽	乳腺癌	I 期	
	BLP-25	MUC1 + 脂质体传递系统	肺癌	临床前期/ I 期	
Cell Genesys (美国)	BLP-25 + 脂质体 IL-2	MUC1 + IL-2	肺癌	临床前期	
	GVAX 系列	同种细胞 + GM-CSF	前列腺癌、肺 I / II 期		
			癌、黑素瘤和		
			肾癌		
	Intracel (美国)	自体细胞 + GM-CSF	肺癌、黑素瘤、I / II 期		
肾癌					
自体细胞 + BCG 佐剂			结肠癌	Ⅲ期	
Ribi 免疫化学 研究 (美国)	Melacine	黑素瘤细胞株胞溶物 + Detox 佐剂	黑素瘤	Ⅲ期	
	Melacine + 干扰素 α-2b	黑素瘤细胞株胞溶物 + 干扰素 α-2b	黑素瘤	Ⅲ期	
	Detox	疫苗增强剂 (佐剂)	乳腺, 肺, 胃肠, 卵巢, 子宫, 结肠 前列腺等癌症	I / II 期和临床 前期	
	rF-MART-1	鸟痘病毒 + MART-1	黑素瘤	I 期	
	rV-MART-1	牛痘病毒 + MART-1	黑素瘤	I 期	
	Therion (美国)	rF-GP100	鸟痘病毒 + GP100	黑素瘤	I 期
		rV-GP100	牛痘病毒 + GP100	黑素瘤	I 期
PROSTVAC		牛痘病毒 + PSA	前列腺癌	I / II 期	
	TBC-CEA	牛痘病毒 + CEA	结直肠癌/肺癌	I / II 期	

另外,正在临床试验的基因工程药物,美国有 276 种,日本有 25 种,中国有 21 种。

关于转基因动、植物产生的多肽药物。据报道,曾将鼠抗体重链基因插入 1 株烟草植物中,将鼠抗体轻链基因插入另 1 株烟草植物中。培养植物至开花时,使其杂交形成第二代植株。该第二代植株中含有重链和轻链 DNA 的植株可产生高水平有完全功能的抗体,占叶蛋白的 1.3%。如改用黄豆则更好。据计算,用普通方法生产 1g 抗体成本为 2 000~5 000 美元,而用黄豆生产 1 000g 抗体只需 100 美元。另有报道:用转基因马铃薯生产人血清蛋白,并从提取淀粉的废液中提取人血清蛋白。曾用转基因烟草或蕃茄生产出胰岛素;转基因油菜籽生产出活性肽;转基因烟草细胞生产出白细胞介素-2;合成的脑啡肽基因同 TMV 外壳蛋白基因融合后导入烟草细胞(或叶)产生出脑啡肽。经经济核算,认为前景乐观。如改用转基因大豆来生产,则更便宜。还有报道,美国一个大学把控制乳腺的 DNA 和编码 tPA 的 DNA 合并成一个杂合基因,然后采用转基因动物技术使雌性后代山羊乳腺出现 tPA 基因,也就使山羊分泌出人 tPA;还使转基因小鼠从乳中分泌出 tPA。另一公司已成功培育出了 3 头能大量生产人血红蛋白的基

因工程猪。荷兰一公司已培育出一批转基因牛，这种奶牛携带有在奶中表达了人乳铁蛋白（human lactoferrin, hLF）基因。我国学者也曾将乙肝病毒表面抗原基因注入家兔受精卵获得了表达。这些研究盖源于把动植物看成是合成多肽药物的反应器或工厂的指导思想而进行的大胆试验。它将可能是今后研制活性多肽或疫苗的一条新颖而廉价的技术路线。

关于抗体工程。如前所述，单克隆抗体（简称单抗）用于临床疾病治疗是不尽人意的。原因在于目前用于治疗的单抗，绝大多数为小鼠单抗。小鼠单抗是小鼠免疫球蛋白，对人而言，是一种异体蛋白，会引起人体产生人抗鼠抗体（human anti-mouse antibodies, HAMA），此时再度使用小鼠单抗，HAMA 与小鼠单抗结合后，不但会中和单抗使之失效，还会产生有害的过敏反应。为解决这一问题，人们着手运用 DNA 重组技术对抗体进行改造，出现了抗体工程。它包括嵌合抗体、重构抗体、单链抗体、单区抗体及全套抗体的研究。

嵌合抗体是应用 DNA 重组技术将鼠源单抗的可变区（V 区）基因与人免疫球蛋白（Ig）的恒定区（C 区）基因相连接，构建成嵌合基因，导入受体细胞进行表达，制成嵌合抗体。目前国内外已制备了数种嵌合抗体。由于该抗体已“人源化”，其免疫原性已大大降低。

重构抗体（reshaped antibody）：是将动物抗体中的 3 个发夹结构所形成的环区（称互补决定区“CDR 区”、或高可变环区）与人抗体相应的环区交换从而重构抗体的抗原结合区，以进一步“人源化”、降低单抗的免疫原性。现已构建成功 3 个这种重构抗体。当然它们的抗原结合能力得以保持。

单链抗体（single-chain antigen binding proteins）：是由 1 个短的人工设计的多肽接头将轻链 V 区的 C 末端与重链 V 区的 N 末端相连接，如果多肽接头设计合理，能保证 β 片层结构的正确构型，同时保留了如 CDRs 序列，则在 *E. coli* 表达系统中可表达具有抗原结合活性的融合蛋白。当前已构建成 3 种单链抗体。

单区抗体（single domain antibody）的研制：1 个抗体是由轻、重两个 V 区基因装配而成，但可以分离到具有抗原结合活性的单一重链 VH 区基因。基此，英国学者用 PCR 法扩增出了具有抗原结合活性的 VH 区。这一方法虽在抗原结合活性方面存在某些问题，但它一反过去单抗研制的繁琐程序，以其快速、多样与有效性预示着巨大的应用和商业价值。

但据新近一些临床试用人源化嵌合抗体的结果表明，在初期临床试验中，人源化嵌合抗体效果较好，且半衰期延长多倍，但不能全部解决其免疫原性问题，有的嵌合抗体出现免疫反应，有的则产生抗独特型抗体。

被称为“抗体的突破”的研究是所谓全套抗体（immunoglobulin repertoire）。其原理是，将某一免疫反应的全套 VH 基因与有限数目的 VL 基因排列为方阵，经过排列组合构建抗体，必能产生相当一批有功能活性的抗体，进而从中筛选出具有特殊作用的抗体。这套设计原来用以筛选有强催化作用的抗体（预示着巨大的商业价值），后亦被用于筛选并克隆表达人单抗或其他单抗，如破伤风类毒素单抗。

必须指出，新近发展起来的以 λ 噬菌体为载体克隆人 Ig 全部 DNA、从而研制单克隆抗体的技术路线一旦成熟起来，则原来以杂交瘤技术为基础研制单克隆抗体的技术路线有可能完全过时。噬菌体抗体是指在膜表面表达有单链抗体或 Fab 段的单链噬菌体。用 DNA 重组技术将 B 细胞全套可变区基因克隆出来，组装到表达载体内并表达在噬菌体表面成为噬菌体抗体群，即为噬菌体抗体库。通过“吸附—洗脱—扩增”的富集过程，从中筛选特异性抗体的可变区基因。运用这一技术就可以直接研制人原单抗。

把分子生物学、结构生物学（晶体学）和计算机生物学结合起来，从分析基因产物蛋白质的结构与功能的关系入手，重新设计基因及其蛋白质，再运用 DNA 重组技术研制出更能满足人类需求的蛋白质。这一发展称为蛋白质工程。蛋白质工程是基因工程发展的高级阶段。改造基因的主要方法是点突变与盒式突变。点突变、盒式突变技术的应用已被证明具有良好的发展前景。如 α -抗胰酶可抑制水解结缔组织的中性弹性蛋白酶，经应用点突变技术把 385 位的甲硫氨酸变为缬氨酸，则具有完全的中性弹性蛋白酶抑制剂的活力，有很强的抗氧化能力，有希望用于肺气肿的治疗。现有的百日咳疫苗是由包特百日咳

杆菌的整个细胞组成的,有严重脑损伤的副作用,其危险性约为 1/30 万。分子克隆研究发现,百日咳杆菌诱导免疫反应的部分和导致副作用的部分在基因组上的位置十分接近。对此,则在毒性区域进行点突变,改变该区的 1 个氨基酸,结果使毒性失去作用,而整个分子与天然分子极相近,仍能诱导免疫反应。白细胞介素-2 在医学上具有广泛的用途,其多肽链有 3 个半胱氨酸,在产品纯化过程中它们之间易发生硫键的错配,致使整个多肽失活。对此,科学家把其中不应配对的 1 个半胱氨酸通过点突变改为丝氨酸,从而避免了硫键的错配,而把活性提高 7 倍。应用蛋白质工程技术研制人工降钙素,在氨基酸组成上与天然降钙素有 60% 的不同,但在治疗骨骼疾病时,疗效却超过天然降钙素,其生产成本低,又可耐受蛋白消化酶的作用,可以口服。新近又发展出一种称为构象模拟的新的技术方案,即肽模拟物(peptidomimetics)构象库药物筛选方法,可以从中筛选出具有更好药理活性的新的肽类药物。我国已对胰岛素、尿激酶原、凝血酶、葡萄糖异构化酶、蛋白酶抑制剂、金属硫蛋白、天花粉蛋白、胰蛋白、枯草杆菌蛋白酶、抗体酶进行了比较深入的结构与功能关系的研究,研制出了一系列突变型,具有良好的开发前景。

关于分子导向多肽药物的设计与研制。由于特异性单抗与药物、核素、毒素的耦合物经试验表明,这类药物不像人们预想那样能够准确地把药物、核素或毒素带到靶位置上去。虽然有可能,但不理想。对此,人们应用蛋白质工程关于“重新设计”的思想,以 DNA 重组技术为手段,对具有不同的功能的基因区段进行重新拼接,通过这种杂合基因的克隆与表达,研制出杂合蛋白质,以期更好地解决药物(蛋白质)的导向性(或选择性或特异性)问题。如把白细胞介素-2 的基因同白喉毒素的第 II 与第 III 区段、或同绿脓杆菌毒素的 II 与 III 区段(PE40)拼接,通过基因工程获得白细胞介素-2-白喉毒素(或 PE40)的杂合蛋白。试验表明,该杂合蛋白可被细胞表面的白细胞介素-2 的受体结合并准确地携带到活化的辅助 T 细胞细胞表面,再依靠毒素的第 II 区段穿透并进入细胞,最后,毒素的第 III 区段蛋白破坏 T 细胞蛋白质合成的延长从而杀死该活化 T 细胞。这样的杂合蛋白已被证明可用于治疗 T 细胞白血病,也可用于抑制器官移植的免疫排斥作用和治疗某些自身免疫病,如类风湿性疾病,而对其他细胞或组织却无毒副作用。因为它只结合并进入那些 IL-2 受体富集的活化 T 细胞。这一方面的研究当前已有大的发展。据报道, α 转化生长因子(TGF- α)与 PE40 杂合蛋白能明显地延长荷瘤裸鼠的生存期(表面有 TGF 的受体)。该杂合毒素却不杀死不带此受体的细胞。乳癌、脑癌、宫颈癌、结肠癌和口腔鳞状上皮癌细胞表面都有表皮生长因子受体。美国有 30 多万病人可望用此法治疗。

根据这一分子导向的设计原理,多年来,世界各国进行了广泛的探索与尝试。所使用的毒素基因除白喉毒素基因与绿脓杆菌毒素基因及其重排之外,还有蓖麻毒素、商陆等等动、植物及微生物的毒素基因。多数的设计是根据基因区段所编码的蛋白质片段与受体结合的原理,如运用 EGF 基因、CD4 基因的 V1、V2 区段等等,也有根据酶与底物结合的原理而设计的分子导向融合基因。但是,这一领域的研究,有一技术难关难以突破。这就是,所使用的毒素对人体而言都是外源的异体蛋白,导入人体后容易引起免疫中和反应,以致失效,甚至引起过敏反应,严重时可能引起休克与死亡。

为了克服或降低免疫原性,已尝试使融合蛋白糖基化以避免与体内 IgG 发生免疫中和效应的策略。如从 IgG 基因上分离出 lysin 富集的编码区段(其蛋白质片段应无免疫原性),并克隆到 PE40(或 PE38)的适当位置上,使所表达的融合蛋白带有更多的 lysin、之后用 PEG 加以修饰(PEG 结合到 lysin 的游离 NH_2^+ 上)。这样的修饰结果,就像在融合蛋白的周围筑起了一道稀疏的篱笆,从而阻挡 IgG 与融合蛋白的结合,进而避免发生中和反应;而期望与 PE 起作用的较小的分子依然可以穿过 PEG 与 PE 起作用。这一设计,从原理上说是可行的,但实践的结果并不十分理想,修饰不够,则不能明显降低融合蛋白的免疫原性;修饰过了头,将导致融合蛋白无法发挥其生物或药理活性。总之,这一策略尚不成熟,还须进一步的改进,也还期待新的策略的出现。

1.2.1.4 基因诊断与基因治疗

所谓基因诊断,原指从基因水平上诊断遗传性疾病。这种技术后来也被用于诊断其他疾病。因此,

基因诊断,也可以认为是从分子水平上对疾病的诊断。主要方法有 RFLP 法, DNA 探针 (Probe) 法和 PCR 法等。这三种方法经常结合起来使用以方便对疾病的诊断。

RFLP 法,是指 DNA 限制性片段长度多态性的基因连锁分析。主要是应用 DNA 内切酶对不同 DNA 样品中的等位基因进行酶切分析,正常人与病人的这一等位基因被酶切的结果在长度上不同,再结合基因连锁分析,可以了解某种疾病在某一特定基因上的变化。

DNA 探针法,是指单股 DNA 小片段用核素、或酶、或荧光分子或化学催化剂等进行标记,之后同被检测的 DNA 中的同源互补序列杂交,从而检出所要查明的 DNA 或基因的变化情况。

PCR 法,就是多聚酶链式反应法。首先针对所要检查的基因的 DNA 序列,设计并合成出两端的引物 (Primer),再遵循 PCR 实验的步骤进行实验操作,从而扩增分离出特定的 DNA 片段,继之按特定的方法进行电泳 (如 SSCP 等)。从电泳所获得的不同带型,可以了解到该片段的异常情况。

不管是 RFLP 法, DNA 探针法还是 PCR 法,如要彻底了解相关基因的变化情况,均要对之进行 DNA 序列分析。其结果将清楚而明确地表明基因上的哪一个或哪几个碱基发生了突变。

当前,运用上述技术方法对遗传性疾病已能明确诊断 (包括产前诊断) 的有镰刀型贫血症, β 地中海贫血、Duchenne 肌营养不良症等 110 多种。已能明确诊断的病毒、细菌、真菌及寄生虫引起的感染性疾病有腹泻病原菌、性病病原体、巨细胞病毒、乙型肝炎病毒、疱疹病毒、艾滋病毒 (HIV) 等约 40 种。应用抑癌基因 RB、p53、DCC 及基因重排分析等,已可对某些白血病及恶性肿瘤进行基因诊断或产前诊断。对某些动脉粥样硬化易感性、职业病、中枢神经系统的疾病,也可进行基因诊断。DNA 指纹图谱技术,也是在上述技术的基础上发展起来的,已广泛应用于法医领域。

所谓基因治疗,指的是将正常的外源基因导入生物体或人体靶细胞内以弥补所缺失的基因、或关闭或降低异常表达的基因,以达到治疗遗传性疾病的目的。简言之,用基因治病的办法,就叫做基因治疗。

世界上,第一次真正在临床上进行基因治疗的,是美国加州大学的一位科学家。他试图用基因治病的想法,在当时,几乎成了天方夜谭。他给两名晚期 β 地中海贫血的病人导入了相关的基因,进行了基因治疗,但最终归于失败。他因事先未履行必要的审批手续而给自己带来了很大的麻烦。但许多人称赞他是一位勇敢的开拓者。世界上第二次真正在临床上进行基因治疗的是,美国国立卫生研究院 (NIH) 的 Blaese 和 Anderson。他们在 1990 年 9 月用重组逆转录病毒表达 ADA (腺苷酸脱氨酶) 基因,将之导入一名 ADA 基因缺陷症女孩的 T 淋巴细胞,之后分批回注该重组淋巴细胞到患者血液中。3 个月后的结果表明,回注体内的携带重组基因的淋巴细胞分泌了 ADA 酶,使这名患者先天缺损的免疫系统趋于正常。这是世界上基因治疗成功的第一个事例。继后又以基本相同的办法治疗了几位病人。这一成功事例激励了全世界的医学科学家。自此全世界风起云涌,掀起了基因治疗研究的狂澜。

基因治疗最初针对的是遗传性疾病。在当代基因治疗研究的浪潮中,除遗传性疾病外,该疗法已波及恶性肿瘤、心血管疾病、感染性疾病、自身免疫病、内分泌疾病、中枢神经系统疾病等。

从技术路线上说,当代的基因治疗研究可以区别为性细胞 (germ cells) 基因治疗和体细胞 (somatic cells) 基因治疗。

顾名思义,性细胞基因治疗的战略目标是,通过基因治疗使非正常 (或缺损失活、或过量表达某个或某些基因) 的性细胞恢复正常,希求不仅治愈被治疗的病人、而且纠正其错误的遗传背景,使其子孙后代不再罹患这一疾病。这是一个志在根治遗传性疾病的策略。主要是应用同源重组或基因打靶的方法,以实现目的基因对细胞染色体的定位整合、或定点修复、或定点突变,克服了盲目性,且可遗传给后代子孙。但其效率很低,技术难度较大,以致当前还未能进入临床试验。

当代广泛开展研究的是体细胞基因治疗。由此又派生出 DNA 直接注射 (in vivo) 和体内外基因转移 (ex vivo) 两种方法。后者包括从病人身上取出细胞加以培养,克隆带有目的基因的表达性载体,并将之包装成假病毒;通过转染,将目的基因导入所培养的细胞,筛选并培养大量的阳性细胞,回注或移植

回病人身上。体细胞基因治疗针对具体患者的基因缺失失活、或某基因过量表达的实际情况,把相应的正常基因导入患者的体细胞,之后回注或移植回病人身上(如对 ADA 基因缺陷病人的治疗),以达到治愈该患者相关疾病的目的。由此人们应当理解到,这个疗法只可能治愈被治疗的具体患者,而不能纠正其错误的遗传背景。这个疗法也可以被认为是一个“治标而不治本”的疗法。导入 ADA 基因可以使 ADA 基因缺陷的患者获得足够的 ADA 酶而获得痊愈;但这一患者所缺陷的 ADA 基因并未得到修复。这样,在其子孙后代中还会有人罹患 ADA 基因缺陷症。这类不尽人意的疗法盖受制于当代的科学与技术水平。但它的优越性是不可否认的。首先,它使一向认为不可治愈的遗传性疾病变成可以治愈的疾病。这是一个历史性的突破。其次,即使是每 3 个月治疗一次,也比天天打针吃药的传统办法简便经济得多,更主要的是方便了病人,应当认为这是临床医学上的一大进步。

在 ADA 基因缺陷病基因治疗取得成功的激励下,世界各国迅速开展了广泛的研究。下面是当时开展研究的一些情况。

遗传性疾病的基因治疗。这一方面的研究多半属于单基因缺陷引起的疾病的基因治疗。主要有血友病:Ⅷ-C(促凝成分)和Ⅸ因子缺陷症;免疫缺陷病:腺苷酸脱氨酶(ADA)缺陷症、嘌呤核苷磷酸酶(PNA)缺陷症;尿素循环障碍:鸟氨酸转氨甲酰酶(OT)缺陷症、精氨酸琥珀酸盐合成酶(AS)缺陷症;贫血: β 地中海贫血、镰刀型细胞贫血;肺气肿: α_1 -抗胰蛋白酶缺陷症;溶酶体贮藏障碍:葡萄糖苷脂酶缺陷症(Ganohar 病);其他代谢病如苯丙氨酸羟化酶(PAH)缺陷症、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGP)缺陷症等。

恶性肿瘤的基因治疗。在美国和德国科学家进行了大量的预备性实验后,美国 NIH 的科学家进一步构建重组的 TIL(肿瘤浸润淋巴细胞),它们能表达 100 倍于正常水平的 TNF。1990 年 11 月,他们获准用表达 TNF 和 TIL 治疗黑色素瘤,临床试验的人数由开始的 2 例增至 50 例。另外,用表达 IL-2、IFN- α 2a 和 IL-1 的 TIL 治疗神经细胞瘤及白血病等的工作也开展了起来。美国还应用反转录病毒将毒素基因(蓖麻毒素和脊髓灰质炎病毒毒素中所含的一种蛋白酶的基因)导入癌细胞内,在靶细胞内表达毒素并发挥杀伤作用,但对其他细胞毒性较低。而且这类载体已被改造成只攻击带有特殊标志的细胞。这些载体也可运送常规的治疗蛋白。这个研究,在基因治疗上发挥了分子导向的思想,给人以启示。

传染病的基因治疗。对于不治之症艾滋病,美国科学家用重组反转录病毒将 CD4 分子的基因导入人上皮细胞及小鼠成纤维细胞使之表达,试图抑制艾滋病病毒 HIV。类似的方法还被用于治疗人乳头瘤病毒、巨细胞病毒及肝炎病毒的感染。此外,还研究了一种药物作用系统,将一段酶序列基因插入受感染细胞,所表达的酶可催化无活性的药物原体转化为有毒性作用的形式,从而有选择性地杀伤受染细胞以避免毒性对全身的作用。还有将编码可使艾滋病毒 HIV RNA 降解的核酶基因转染人淋巴细胞,从而抑制 HIV 的传播。又将 HIV LTR-2', 5'寡核苷酸合成酶杂合基因转染 HeLa-T4⁺ 细胞,结果经修饰的带有 CD4 受体的这种细胞具有抗 HIV 感染的作用。

此外,还有人就基因治疗的新方法、新途径,进行了一些大胆的探索。这些研究虽仍不成熟,但对于启发思路、推动基因治疗研究的发展,颇有益处。

美国科学家曾使用两头带气囊的导管将携带半乳糖苷酶基因的重组反转录病毒载体、或使用脂质体包装该基因,并经手术转染 10 头猪的动脉内壁,结果仅在动脉内壁转染部位的内皮细胞中有 β -半乳糖苷酶的表达,时间长达 10 日至 21 周,而猪的其他脏器则无此酶的表达。人们认为这一方法对于将 tPA 等植入动脉壁以防治栓塞可能有重要意义。

在糖尿病治疗研究中,日本科学家将表达人胰岛素的组织培养细胞植入患糖尿病小鼠的腹腔内,结果植入的细胞存活并分泌胰岛素,使小鼠血糖水平明显下降。用基因治疗技术治疗肌营养不良、骨质疏松、类风湿性关节炎及中枢神经系统疾病等研究亦在进行中。

还有报道,不用反转录病毒,将功能基因直接注射入人或动物体内而实现基因治疗。通过直接注射非复制质粒 DNA 序列获得表达的方法主要有 3 种:①直接注射非感染性、非致癌性、由脂质体或免疫

脂质体或脂质体与红细胞膜杂交体包装的质粒 DNA, 从而获得体内基因表达; ②通过给新生大鼠腹腔内直接注射经多种磷酸钙沉淀的基因序列并获得表达; ③有实验显示, 缺乏唾液酸基的血清粘蛋白或聚赖氨酸耦合物与质粒报告基因的复合物, 可通过静脉给药获得专一性地靶向表达于肝脏。直接注射基因的方法在免疫调节、遗传疾病以及治疗用分泌蛋白等方面的应用研究已经取得了一些肯定的结果。人们认为, 功能基因可以以“药品”形式给药, 并可根据需要反复使用。当治疗需要额外基因产物时, 可给予更多的基因, 而当不再需要治疗或有副作用时, 可停止给药。直接注射基因的办法, 不但方法上比较简单易行, 更重要的是人们试图放弃以反转录病毒作载体的经典的技术路线。这是因为人们担心反转录病毒载体可能有低频率的致癌危险性或与内源性病毒发生重组导致突变病毒的感染。

另一种独特的技术路线称为“生血管的移植物”(vascularizing implant, 也叫半生物体)的方法。主要使用肝素结合生长因子-1 (HBGF-1), 吸附在胶原蛋白上经手术植入腹壁, 生出血管, 表达所携带基因的产物。该方法将可能用于缺乏某种天然物质(如第8因子)的患者或需要持续释放某种治疗物质的患者身上。其作用类似植入人工泵, 但功能更多。生血管移植物还可由机体的自然机制进行维持。

事实上, 自1990年以来, 在探索应用基因疗法治疗的各种疾病中, 对恶性肿瘤进行基因治疗的探索最为广泛。总的看来, 其最大优点是, 由于现实了靶向性设计, 避免了传统的化疗或放疗所导致的严重的毒副作用; 但是, 疗效不能令人满意。具体的治疗方案可以分为两类。一是杀灭肿瘤细胞的基因疗法。采取这一疗法时, 一般都进行了导入基因的靶向性设计。但除了导入 p53 抗癌基因在某些情况下有一定的疗效之外, 大部分的临床试验结果不理想。而且, 可能用于靶向性设计的, 能够强烈杀灭癌细胞的可用基因并不多。另一种办法是把可提高机体免疫力的基因导入体内, 希求提高机体的免疫力而控制肿瘤的发展、或逐步缩小肿瘤。但往往在动物模型上进行的试验, 效果较好; 同样的方案用于肿瘤病人的临床试验, 则效果不佳。对此, 据认为, 人为造成的荷瘤实验动物, 一般说来, 其免疫系统尚未遭到严重的破坏, 以提高免疫力为目标的基因疗法能够得到较好的结果。而患有恶性肿瘤的病人, 往往其免疫系统已经遭到了比较严重的破坏, 以致采取提高免疫力的疗法, 不能取得如期的效果。因此, 有人主张, 在采用这一疗法之前, 要首先研究具体治疗对象本身的免疫系统的实际状况, 再来分析与决定采取提高免疫力的基因疗法是否可取。这就是说, 提高免疫力的基因疗法要个体化。

多年来的探索, 取得较为满意结果的, 除了 ADA 基因缺陷病之外, 还有 LDLR (低密度脂蛋白受体基因) 缺陷症、B 型血友病等的基因治疗效果较为满意。对于前者, 主要办法是导入 LDLR 正常基因并使之表达, 以弥补该受体的缺如, 进而使 LDL 经受体结合与介导而被降解。对于后者, 主要是导入病人所缺少的Ⅷ因子基因并使之表达, 从而取得疗效。应用 TK 基因直接导入脑瘤病灶, 也有较好的效果。

当前普遍认为, 基因疗法的效果不佳的原因, 主要在于对有关疾病发生的机制的了解尚属粗浅, 治疗方案在技术上也亟待改进。

据认为, 原来所阐明的遗传性疾病, 大多指的是单基因缺陷的疾病。原以为与遗传基因无关的疾病, 当前认为, 不仅与基因有关, 而且往往同多个基因有关、甚至同某一个或某几个基因网络相关, 并被称为多基因疾病, 如恶性肿瘤、心脑血管疾病、自身免疫病、内分泌疾病等等。这些疾病, 都是当代医学所无法根治的疾病。所谓多基因疾病, 指的是这类疾病中的某一疾病同多个基因相关, 或同某一个、某几个基因网络相关; 是一种导致疾病发生的易感性、或倾向性, 而又不遵循孟德尔遗传法则。基此, 在考虑基因治疗的方案时, 事先需要考虑的问题, 其涉及面将深广得多。如家族性高血压, 当前已知同多达 30 多个基因有关。而且, 有的同肾素-血管紧张素-醛固酮代谢系统相关; 有的则同糖代谢系统相关, 如胰岛素受体缺陷, 有的则同循环系统、甚至同神经系统相关。在大约 6 000 种遗传性疾病中, 单基因疾病仅占 30%, 而多基因疾病, 却占了 70%。基因治疗是一种基于分子遗传学的生物高技术, 对于相关的基础理论知识如果掌握得不够, 也就很难设计出可以达到十分满意疗效的技术方案。

与此同时, 当前已应用的基因治疗方案, 在技术上也还存在不少问题。如目的基因的载体问题。普

遍采用的逆转录病毒载体,虽然其致癌基因已经被缺失,但它在随机整合入病人细胞的染色体时,依然存在着低频率的激活有害基因(如癌基因)和缺失有用人体基因的危险性。未经彻底改造的腺病毒载体,在导入人体细胞之后,将出现严重的免疫原性。

在这种情况下,当前普遍认为,为了推动基因疗法的发展,强化基础理论与改进已有技术的研究,都是十分重要的。为此,在大力推进人类基因组的研究计划中,研究疾病、特别是多基因疾病与相关基因的关系的命题悄然兴起,而且研究得如火如荼。在技术研究方面,已经发展出多种目的基因载体,各有优缺点。而且,着力发展非病毒载体的基因疗法。关于这一点,本书以下章节将有专文简介,这里就不再赘述了。

总的看来,基因治疗的探索尚处在初步阶段,通向真正成功的道路是漫长的。但它标志着临床医学的一次历史性变革。人们预期,它将可能在下一个世纪成为临床医学中的一种常规疗法,前景光明。

下面是美国基因治疗与反义治疗进入临床试验的一些情况,提供于此以为参考(表1-9,表1-10)。

表1-9 美国基因治疗(29种)

产品名称	公 司	适 应 证	开发阶段
AAVCFTR 基因治疗	Targeted Genetics	囊性纤维变形、窦炎	I 期
AD-P53	Introgen Therapeutics	非小细胞型肺癌 头颈部癌症	I 期
抗 HIVT 细胞治疗	Cell Genesys	HIV 感染	I/II 期
CFTR 腺病毒载体	Genetics Therapy	囊性纤维变性	I/II 期
CFTR 基因治疗	Genzyme	囊性纤维变性	I 期
抗化疗骨髓	Genetize	化疗癌症患者	I 期
胞嘧啶脱氨酶基 因-腺病毒载体	GenVec	结肠癌	I 期
DA/Hu (r). 15 转导自 体肿瘤细胞; ITAT	Chiron Viagene	转移性肾细胞癌	I 期
DA/Hu (r). 15 转导自 体肿瘤细胞; ITAT	Chiron Viagene	扩散的恶性黑 色素瘤	I 期
DA/Hu (r). 15 转导 自体肿瘤细胞和 表达 r-干扰素的 自体肿瘤细胞	Chiron Viagene	扩散的恶性黑 色素瘤	I 期
DA/Hu (r). 15 转导自 体肿瘤细胞; ITAT	Chiron Viagene	成神经细胞癌	I 期
hIFN- γ 逆转录病 毒载体	Chiron Viagene	转移性黑色素瘤	I 期
葡糖脑苷脂酶基 因-逆转录酶病 毒载体	Genetic Therapy	Gaucher's 病	I 期
GV-10	GenVec	囊性纤维变性	I 期
HIV-IT III B env/re V 逆转录病毒载体	Chiron Viagene	无症状 HIV 感染	I 期
HIV-IT (V) Retro	Chiron	无症状 HIV 感染	I 期

续表

产品名称	公 司	适 应 证	开发阶段
vector TM 转导的 自体成纤维细胞	Viagene		
HIV - IT (TAF)	Genetic	成人脑瘤	I/II/III期
HS - tk	Therapy	儿童脑瘤、 寄生虫病	I / II / 期 I 期
IC - imm 逆转录 病毒载体	Targeted Genetics	HIV 感染	I 期
IL - 2 基因修饰的肿瘤	RPR Gencell	乳腺癌	I 期
Lg - GC 逆转录病毒	Targeted Genetics	Gaucher's 病	I 期
LN - CTL 逆转录病毒		HIV 感染	I 期
MDR 逆转录病毒载体	Genetech Therapy	乳腺癌	I 期
MDR ^Δ	Ingenex	保护造血干细胞 免受化疗毒性	I 期
携带 TNF 逆转 录病毒载体	Chiron	黑色素瘤	I 期
RGG - 0853, ELA (脂复合物)	Chiron	卵巢和乳腺癌	I 期
RV - AS - KRAS	Introgen Therapeutics	非小细胞型肺癌	I 期
RV - p53	Introgen Therapeutics RPR Gencell	非小细胞型肺癌	I 期
tgAAVCF	Targeted Genetics	囊性纤维变性	I / II 期

表 1 - 10 美国反义治疗产品 (6 种)

产品名称	公 司	适 应 证	开发阶段
GEM91	Hybridon	HIV 感染, AIDS	II 期
ISIS2302	Isis Pharmaceutical	炎症性疾病	II 期
ISIS2922	Isis Pharmaceutical	AIDS 患者的巨细胞病毒 (CMV) 视网膜炎	III 期
ISIS3521	Isis Pharmaceutical	癌症	I 期
ISIS5132	Isis Pharmaceutical	癌症	I 期
LR - 3001	Lynx Therapeutics	慢性骨髓性白血病进展期	I 期

1.2.1.5 环境监测与净化

环境监测与净化是预防医学中的一大领域。基因工程技术在这一领域的研究与应用中已经发挥了重大作用,预示着十分光明的前景。

首先是环境监测。已有报道,可应用基因探针检测出水中、特别是饮用水中的病毒。使用一个特定的核酸片段(DNA或RNA)作为探针,使之同被检测的病毒相互补的碱基结合,从而把病毒检测出来。这种方法的特点是快速灵敏。传统的方法检测一次将耗时数天或几个星期,准确性也差;而用探针只需不到一天,且能在1000L水中检测出10个病毒来。现在已有用于检测数十种病毒的不同探针。另有关于基因跟踪技术的报道。它实际上也是一种DNA杂交法,即用单链DNA片段作为探针,并使探针同环境中分离出来的细菌DNA杂交,从而确定某种有危害性细菌的存在。有人应用DNA探针在400个不同地方检测沙门氏杆菌获得成功,说明在鉴定带菌者及预防流行病方面可应用基因跟踪法。

基因工程技术也可以应用于被污染环境的净化。早有报道,把4种不同假单胞杆菌的质粒重组成一个“超级质粒”,由OCT(降解辛烷、己烷、癸烷)、XYL(降解二甲苯和甲苯)、CAM(分解樟脑)和NAH(降解萘)构建成一个质粒并送入细菌,获得了“超级菌”。这种“超级菌”能在原油中迅速繁殖,因为它代谢碳氢化合物的活性比任何一种含单个上述基因的细菌都强大得多。这种“超级菌”能够在浮游过程中除去污染了水面的石油,几小时就可以降解2/3的烃类物质,而天然菌则需耗时1年以上才能达到同样的效果。把嗜油酸单胞杆菌的耐汞基因转移入腐臭假单胞杆菌中,该菌株能把剧毒的汞化物吸收到细胞内,还原成金属汞,然后可通过气化的方法从菌体中回收金属汞。此法可用于净化汞污染。关于净化镉污染:把原在中国仓鼠中的屏蔽基因(即可将重金属离子排去的基因)植入一种十字花科——芜菁的体内。此种植物可将土壤中的镉留在植物根部,阻止它到达植物的茎、叶、果实部位。这对保护人畜的健康很有好处。关于净化农药DDT残留问题:可从抗DDT的害虫中分离出的抗DDT基因转移到细菌中去。用这种“超级菌”投入到土壤中可把农田中残留的DDT降解掉。

关于分解四氯联苯乙烷(TGE,它可引起癌症和肝病),*Pseudomonas cetacia*(一种假单胞菌)能产生一种酶,可使TGE分解成单盐离子和二氧化碳。另外,还培育出可做为降解氯化物溶剂、表面活性剂、硫化物和多氯联苯的新菌种。已发现一种细菌的突变株能够“吃”矿山产生的含氰废物。还开发出一种“Phostrip”技术,利用天然微生物浓缩磷,并可清除废水中的99.3%的磷。已分离出一种微生物能清除地下贮罐溢出的原油。在加入营养物和空气后,在6个月内该微生物能把溢油分解成二氧化碳和水。生物降解法比污染土壤的填埋法可节省75%费用。运用基因工程的方法已构建了能分解煤炭中硫成分的微生物和能降解四氯联苯乙烷的微生物。还有一些科学家通过基因重组构建新的生物杀虫剂以取代化学农药。现在已有多种生物杀虫剂进入了大田试验,如前列表所述。

1.2.1.6 基因工程促进酶工业、微生物工业的技术进步

1. 酶工程:

已知酶种类约有8000多种,至少有2500种有可能被应用。目前国际上工业用酶超过50种,研究用酶超过360种。从产量和销售金额看,工业用的蛋白酶、葡萄糖淀粉酶、 α -淀粉酶和葡萄糖异构酶等所占比重最大。国际上酶产量已达约5万吨,产值约10亿美元。酶制剂主要应用于洗涤剂、淀粉加工、甜味剂、乳制品、啤酒、果汁、葡萄酒、酒精、糖果、面包、皮革、造纸及纺织等工业。此外,在精细化学、医药品、香料、生物转化等领域中还有参与氧化还原、分子重排和特殊化合物生物合成反应等方面的反应酶。预期这些酶的工业生产将有较大发展。

DNA重组技术对酶工业的渗透,导致了酶工业质的飞跃。已有多个国家实现了 α -淀粉酶的克隆化。日本将嗜热脂肪芽孢杆菌的中性蛋白酶基因克隆到一个不产酶的突变菌株中,将质粒重组,再将两个新质粒分别引入嗜热脂肪芽孢杆菌和枯草杆菌,可使蛋白酶活力分别为原菌的18倍和10倍,青霉素酰胺酶基因和耐热菌亮氨酸合成酶基因都已在大肠杆菌中表达成功。此外,运用DNA重组技术,提高葡萄糖异构酶、木糖异构酶、反丁烯二酸还原酶、木聚糖酶、纤维素酶、葡萄糖淀粉酶等酶的活力,均已取

得成果。其中葡萄糖异构酶和木糖异构酶的活力比原菌种提高 5 倍。

医药方面,第一代克隆成功的是溶血栓剂尿激酶、链激酶;第二代是溶血栓剂组织血纤维蛋白溶酶原激活剂(tPA)。经过改造的第三代 tPA 比尿激酶、链激酶更安全,是治疗冠心病、脑、肺、肾、肝的血栓症和动脉、静脉血栓症等病的特效药。tPA 的市场很大,仅美国每年可达 5 亿美元。目前世界上已有数十家公司或药厂竞相研究、开发此项技术。

英国已将大肠杆菌的谷氨酸脱氢酶途径的基因转入到谷氨酰胺合成酶缺失的甲醇蛋白产生菌的突变株,从而得到利用谷氨酸脱氢酶同化氮的突变株。在同化氮方面大大节约了能量,现已投产,每年产量可达 5 000~7 000 吨干菌体,节约了大量的氮,降低了成本,提高了产量。

有报道,从普通面包酵母菌培养出能够生产小牛凝乳酶的新菌株。此酶可用于干酪的制造。也有人将木霉 L27 菌株的纤维二糖酶和末端葡萄糖苷酶的基因引入酿酒酵母,获得表达。该菌株能够同时生产这两种纤维素酶。

蛋白质工程技术的兴起,给构建新型酶提供了新的途径。如 T4 溶菌酶,曾将第 3 位的异亮氨酸变成半胱氨酸,因而可同第 97 位的半胱氨酸形成二硫键。新酶与天然酶的活性相同,但在高温下稳定性大大增加了。又将该酶的第 51 位苏氨酸变成脯氨酸,结果酶对 ATP 的亲合力增强,酶活力提高 25 倍。

当前已商品化的基因工程酶还有枯草杆菌蛋白酶(2 种,去污作用),水解酶,脂酶(去污)、 α -淀粉酶(2 种,淀粉改性),凝乳酶(2 种,乳制品工业)等。

此外,随着基因工程的兴起,为这一领域研究所用的酶品种愈益增多。仅就 DNA 限制性内切酶,便有 100 多种,逐渐形成了一门新兴的产业。这类酶多半由细菌产生。我国学者发现识别 8 个碱基的新型 DNA 内切酶,对于研究人类基因组具有重要的意义。当前应用 DNA 重组技术已使多种内切酶基因克隆化,大大提高了产量。我国已使多种内切酶或甲基化酶基因克隆化,使产量提高 10~100 倍。

2. 微生物工程:

微生物工程又称发酵工程,是利用微生物的特定性状,通过现代生化工程技术,使微生物产生有用物质或直接用于工业化生产的技术。主要包括菌种选育、菌体生产、代谢产物的发酵和微生物功能的应用等技术。70 年代以来,由于细胞融合、基因工程和细胞固定化技术的建立,使微生物工程进入了一个崭新的阶段。

以微生物工程为基础发展起来的现代微生物发酵工业体系,涉及医药、食品、饲料、生物能源等各个方面,在国民经济中发挥着巨大的作用。在整个生物技术中,微生物工程是一个十分重要的组成部分,基因工程、细胞工程和酶工程的研究成果,均须通过微生物工程,才能转化为生产力,取得经济效益和社会效益。因此,世界各国均有巨大的投入,以促进生物技术研究成果转化成为生产力。

应用 DNA 重组技术创造抗生素新品种已获进展。将放线紫红素全部生物合成基因转入曼得霉素或榴霉素产生菌,得到了曼得紫红素(曼得霉素羟基化)和二氢榴红霉素(兼有放线紫红素和榴霉素的化学结构)。将竹桃霉素产生菌的总体 DNA 导入红霉素产生菌的阻断变株,产生了一种新的红霉素:2-去甲红霉素。利用碳霉素 4'-异戊酰化酶基因改造螺旋霉素,获得了二酰螺旋霉素。将放线紫红素基因导入道诺霉素产生菌,产生了大黄酚(chrysophanol)结构的物质。将同样的基因导入 Tetracenomycin C 产生菌,产生三、四种新的化合物。另外,将外源基因导入菌体可导致“沉默”基因的表达。“沉默”基因是指菌株内未表达的基因。分子杂交研究表明,在变青链霉菌中存在放线菌素产生菌 *S. antibioticus* 的吩噻嗪酮合成酶基因,但不表达。将 *S. antibioticus* 的一段非编码该酶的基因转入变青链霉菌中,该酶获得了表达。人们预期,运用 DNA 重组技术可能创造结构全新的抗生素。此外,应用基因工程技术还可能提高抗生素的产量。将红霉素的调节基因转入红霉素产生菌菌体中,可使单位产量提高 10~15 倍。十一烷基红霉素生物合成的最后阶段由 O-甲基转移酶催化,将该酶基因转入阻断变株,酶活性比原株提高 5 倍,抗生素产量也相应提高。另外,提高菌体对自身产生的抗生素的抗性,有可能提高抗生素的产量。如将氨基糖苷-6-乙酰转移酶基因转入卡那霉素和新霉素产生菌,结果转化子对多种氨

基糖苷类抗生素的抗性增加,卡那霉素及新霉素产量提高2~6倍。

在氨基酸工业方面,目前国外用发酵法和酶法生产的氨基酸达18种。目前全世界产量约为50万吨,1985年的市场销售额为25亿美元。国外采用基因工程和细胞融合技术,培育苏氨酸、色氨酸、精氨酸、组氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、异亮氨酸的优良产生菌,在提高产量和缩短发酵周期方面已取得显著成就。

在酒精发酵方面,日本将根霉的葡萄糖淀粉酶基因导入酵母细胞,所获得的基因工程酵母,可直接由淀粉发酵生成13%的酒精,可望用于工业生产。

此外,美国和法国分别将鸡的卵清蛋白的基因引入大肠杆菌,并获得表达。这一成果表明,可能利用发酵技术培养出含卵清蛋白的菌株。法国又将该基因导入酵母,并获得表达。酵母本身富含维生素、消化酶和蛋白质,现又添加了卵清蛋白,更适于作为人类食品 and 高级饲料,发展前景诱人。

1.2.1.7 关于代谢工程的新概念

必须指出,随着微生物工业的发展,特别是基因工程技术对微生物工业的渗透,当前提出了代谢工程的概念。这是一个十分值得重视的发展方向。

大家知道,基因工程技术发展到今天,人们所能够操作的,实质上只能是单个基因。从产品角度看,实质上只能操作蛋白质(活性多肽、疫苗、酶等)。这就是说,当前的科学技术水平实际上还没有能力操作多个相关基因或非蛋白质产物。这就是基因工程技术不尽人意之处。许许多多非蛋白质产物,不是基因的直接产物(一级代谢产物),而是基因的间接产物(二级代谢产物),如抗生素、维生素、氨基酸、糖、脂肪等都属于二级代谢产物。为了提高二级代谢产物的产量和为了获得新产品,人们试图操作生物(首先是微生物)的代谢途径,使之服从人类的意志,企求改变代谢途径以满足人类的需要,并进行了广泛的尝试,这就是所谓的代谢工程。

人们多半从代谢途径各个环节上的酶入手加以改变,以求改变代谢途径,获得新的产物。根据“一个基因——一种酶”的古老理论,实际上人们从操作酶基因入手试图控制和改变代谢途径。本节所列举的关于抗生素的基因操作各例以及其他例子,便是这一方面努力的初步尝试。我们看到,这些研究的目标不仅仅包括抗生素产量的提高,而且包括抗生素新品种的获得,即产物在质的方面的改变。而且,已发现有7种抗生素控制其生物合成的基因是以基因簇形式存在的。这就为转移控制某种抗生素生物合成的一系列基因提供了方便。

从改变产物的性质(新品种)角度看,代谢工程的目标同蛋白质工程有异曲同工之妙。不过,蛋白质工程只有能力改造蛋白质产物,而代谢工程从理论上说则有能力改造一切产物。当然,顺利进行蛋白质工程设计的前提是对所研究的蛋白质的结构与功能关系的透彻了解;而顺利进行代谢工程设计的前提则是对所研究的代谢途径的透彻了解。二者都是十分复杂而艰巨的命题。

人们认为,代谢工程是一个前景广阔、十分诱人的发展方向。

1.2.2 分子生物学的研究成就

当代,几乎所有关于生命的分支学科均已被分子生物学所渗透。这是当代生命科学的一大特点。因此在这一命题之下涉及到了许多难以穷尽的方方面面。这里仅只介绍一些重要的关于分子生物学的理论研究和应用基础研究的成就。

1.2.2.1 关于原核生物

生命科学的发展引导多数科学家把注意力转向真核生物,但是对原核生物的生命规律的研究并没有终结。所谓原核生物主要指的是细菌、噬菌体和病毒等。人们应当承认,基因工程技术的产生主要是对原核生物遗传学和分子生物学研究所取得的突破。因而当代世界上仍有一批生命科学家以孜孜不倦的精神探索着原核生物的生命规律。人们正在致力于绘制大肠杆菌、 λ 噬菌体、P系列噬菌体、以及病毒(主要是反转录病毒、特别是艾滋病病毒HIV)的基因图谱,同时试图查明不同生物体内基因之间的调

控关系。对大肠杆菌基因组的研究几乎在 70 年代初期出现 DNA 体外重组技术的同时, 就开展了深入的分析。它主要包括揭示新基因, 查明 DNA 序列和基因结构特点以及该基因的功能与基因间的调控关系。这一技术路线也就成了当代人类基因组研究的技术路线。至 1997 年 9 月, 大肠杆菌的完整的基因图谱已被绘制成功。资料表明: 在大肠杆菌单个圆染色体上共有 4 288 个基因, 同时阐明了所有这些基因的氨基酸序列。62% 的基因功能已经阐明, 仍有 38% 的基因功能尚未完全搞清。

表 1-11 是现已完成的基因组研究的主要内容, 12 种中, 11 种为原核生物, 1 种 (啤酒酵母) 属真核生物, 它已成为真核生物基因组研究的模式。

表 1-11 已完成基因组计划的主要内容 (12 种)

基 因 组	意 义	单 位
1. 人类病原菌		
布氏疏螺旋体	Lyme disease	TIGR, 1997
大肠杆菌	研究用菌种	univ. Wisconsin, JESG 1997
大肠杆菌致病菌	机会感染	HGS
流感嗜血杆菌	脑炎、会厌炎	TIGR
幽门螺杆菌	胃溃疡	TIGR, univ. Wisconsin
生殖道支原体	肺炎	TIGR
金黄色葡萄球菌	机会感染	HGS, GT
2. 非病原菌		
闪烁古生球菌	厌氧高温病	TIGR
产液菌	耐极高温	Recombinant Biocatalysis
詹氏甲烷球菌	甲烷	TIGR
集胞兰细菌	光合细菌	Kazusa DNA Res. Inst.
3. 真核生物		
啤酒酵母	模式	TIGR, 1996, 4

对于原核生物基因组的阐明, 不仅对寻求疾病防治的新策略是必要的, 而且对于新基因的应有开发以及对分子生物学本身的进一步发展, 也都是重要的。

1.2.2.2 关于肿瘤发生

正常细胞增殖的调控信号分正和负两大类。正信号促使细胞进入增殖周期, 阻止其发生分化; 负信号抑制细胞进入周期, 促进其发生成熟分化。体细胞在增殖、分化和死亡的整个生命历程中都受到这两类信号的精确控制。如果这种控制发生了差错, 就有可能不断增殖, 破坏周围组织, 直到把整个机体毁坏。

肿瘤起源于细胞增殖和分化调控的失常和细胞同它周围组织关系的紊乱。前者表现细胞持续增殖, 不能及时分化与死亡 (apoptosis), 于是形成肿瘤。后者表现为瘤细胞侵入周围正常组织 (浸润) 和发生转移。

近 15 年来, 对于产生正信号的基因及其作用机制的研究取得了丰硕的成果。这些研究属于癌变原理范围。最大的突破是发现了癌基因。到 1990 年, 已经发现的癌基因大约有 100 个。它们的功能各不相同, 大体上可归纳为生长因子、生长因子受体、信号转导物、蛋白激酶和转录激活物几大类。

进一步的研究还证明, 每一种脊椎动物都携带有癌基因, 但它在正常情况下并不引起细胞癌变, 而只有在某些化学、物理因素或病毒的作用下才被激活从而导致细胞癌变。进一步发现, 基因的点突变、

染色体易位、癌基因的扩增、癌基因中甲基基团的丢失都是导致细胞癌变的重要原因。反转录病毒的插接及整合活化作用也是导致细胞癌变的重要原因。

当前对癌变原理的研究已深入到分子的空间结构。如对被称为 *ras* 的癌基因的蛋白质三维空间结构的研究表明, 正常的 (不致癌的) *ras* 蛋白质高级结构中有 4 个环可与鸟苷三磷酸 (GTP) 结合, 从而使后者水解成鸟苷二磷酸 (GDP), 并导致一系列反应, 最终使细胞停止分裂。而活化的 *ras* 蛋白质空间结构几乎与正常的相同, 只是 1 个环中的 1 个氨基酸发生改变, 以至于不能使 GTP 变为 GDP, 进而阻止了这种蛋白质关闭细胞分裂的信号, 最终导致正常细胞变为癌细胞。这些理论研究的结果, 对于最终走向根治恶性肿瘤都是极其重要的。

肿瘤分子生物研究的另一突出进展是发现了抑癌基因 (tumor suppressor gene), 同义词有抗癌基因 (antioncogene)、肿瘤易感基因 (tumor susceptibility gene) 和隐性癌基因 (recessive oncogene) 等。这一方面的研究属于细胞增殖产生负调节作用范围。

已发现的抑癌基因大约有 15 种。如 RB1 基因, 涉及成视网膜细胞瘤、骨肉瘤、肺癌、乳癌、膀胱癌, 其主要作用是编码磷蛋白和 -p105RB。p53 基因, 涉及星形细胞、肺癌、乳腺癌、骨肉瘤和肝癌, 其主要作用是编码核磷蛋白 p53。WT1 基因, 涉及 Wilms 肾母细胞瘤, 主要作用是编码 GAP 族蛋白。DCC 基因, 涉及结肠癌, 主要作用是编码细胞表面糖蛋白。15 种抑癌基因均已被定位在染色体上。初步研究的结果表明, 往往在细胞癌变或恶性变的同时, 抑癌基因便丢失、失活或突变。提示抑癌基因多半是在更加错综复杂的调控网络系统中, 在核内发挥其对细胞分裂和分化的调控作用。当前在遗传咨询和产前预测某种遗传性肿瘤方面, 已经利用了 RB、p53 和 DCC 探针。将 RB 基因或含有特定抑癌基因的整条染色体导入培养的癌细胞系, 可使后者失去恶性表型。抑癌基因用于癌症的基因治疗的前景是光明的。

在肿瘤分子生物学的研究中, 还揭示了可能阻止癌扩散的基因。主要有 3 种。一是组织抑制剂金属蛋白酶-2 (tissue inhibitor metal proteinase-2, TIMP-2)。它对胶原酶 IV 有特异作用, 胶原酶是转移细胞分泌的一种金属蛋白酶, 可溶解结缔组织促使癌细胞扩散。如果将 TIMP-2 加入胶原酶 IV, 后者便失去对组织降解能力。二是 NM-23 基因, 它位于染色体 17 上。临床观察表明, 癌已扩散的病人, NM-23 表达低; 未扩散者, NM-23 表达高。癌已扩散的病人往往缺少雌激素受体, 因而癌细胞容易扩散。三是 DCC 基因, 它属于抑癌基因, 但也具有阻止癌扩散的功能。它位于染色体 18Q 上, 即删除结肠癌 (deleted colon cancer, DCC) 基因。DCC 主要是在细胞分化中起作用。它在正常组织中有表达, 而在结肠癌中无表达或低表达。

近期在癌基因与抑癌基因研究方面的新发现颇为引人注目。原因是随着这些新基因的发现, 揭示出了一些过去为人们所未知的癌变原理的新机制。

在乳癌基因的研究中, 发现了 BRCA-1 基因。在乳癌患者中约有 85% 的患者有此基因的突变。

BHL1 基因的发现是一重要的发现。已查明大约 50% 的恶性肿瘤同该基因的激活有关。

检查站基因 Chk1 的发现揭示了癌变的新机制。Chk1 基因合成的蛋白质有制止细胞异常分裂、阻止受损细胞恶化的作用。它甚至可以协调细胞的修复作用, 以防止癌变的发生。

我国发现的抑癌新基因 Cx26, 是一种合成细胞连接蛋白的基因, 是属于第二类抑癌基因。它是与细胞的增殖、分化、发育密切相关的基因。这类基因由 13 个成员组成家族, 在细胞间起通讯联络作用。

1.2.2.3 关于艾滋病

当代的另一种不治之症是艾滋病。它是一种免疫缺陷综合征 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS)。它的出现引起了世界的恐慌, 被认为是 20 世纪的瘟疫。自 80 年代初发现艾滋病以来, 世界各国对它开展了广泛而深入的研究, 但迄今仍未能拿出特效的根治办法。与此同时, 其传播与流行的形势越发严峻, 世界各国均极为忧虑。据世界卫生组织估计, 1998 年全世界已有 3060 万艾滋病病毒携带者, 其中 580 万是在 1997 年被感染的。据我国政府宣布, 中国 1998 年已有 30 万左右的艾滋病毒携带者。某

些专家估计,如防治不力,到2010年,我国的艾滋病毒携带者可能达到1000万人。我国行将成为艾滋病的大国。对艾滋病的研究与防治,是摆在我国医学科学工作者面前的一项极其尖锐而又艰巨的任务。

艾滋病的病原体即人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)是一种逆转录病毒。根据其生物学特征,可分为两大类:HIV-1和HIV-2。它们的基本结构大致相同:病毒颗粒呈球形,外壳由嵌有脂蛋白(壳蛋白)的脂质双层体构成,内层为蛋白质(结构蛋白),内核为双拷贝的单链RNA及逆转录酶等。表面的膜蛋白gp120作为抗原可与靶细胞表面的特异性受体CD4、CXCR4及CCR5等复合受体结合。

HIV的生命周期与大多数逆转录病毒一样,以与靶细胞表面的受体蛋白结合开始,然后与细胞膜融合,脱去外壳,病毒的核心部分(RNA)进入细胞,双拷贝的单链RNA基因组经逆转录复制成双链DNA,进入细胞核,由于其LTR(长末端重复序列)的作用,随机整合到宿主细胞的染色体中,以前病毒的形成存在于宿主细胞内。此时,病毒的基因组成为细胞的基因组的一部分而永久性地潜伏于宿主染色体中。这样看来,艾滋病也可以认为是一种“遗传性疾病”。它与经典的遗传性疾病不同之处在于它是后天获得的。

以前病毒形成存在于宿主细胞染色体内的HIV基因组,转录时形成具有双重功能的病毒RNA:既可作为信使RNA指导蛋白质的合成,又可作为基因组被组装,成为成熟的病毒颗粒而释出细胞,再去感染别的靶细胞。

HIV的序列和结构已基本清楚,其基因组全长为9749个碱基对,当前已知有9个基因编码9类蛋白,包括结构蛋白、调节蛋白、酶蛋白等。结构基因有gag、pol、env,调节基因有tat、rev、nef、vif、vpr和vpr。

gag基因编码的gag蛋白有p55/p17/p7,是特异性抗原或包膜蛋白。

pol基因编码的pol蛋白有p66/p51/p32,是病毒酶蛋白:蛋白酶、逆转录酶和整合酶。

env基因编码的env蛋白有gp160/gp120/gp41,都是病毒的外壳糖蛋白。

调节基因tat编码的tat蛋白有p16/p14,是病毒转录时的反激活蛋白。

rev基因编码的rev蛋白称p19,起促进病毒mRNA向核外转移并使之稳定的作用。

nef基因编码的nef蛋白称p25,可增加体内的病毒负载。

vif基因编码的vif蛋白称p23,可增加病毒颗粒的感染力。

vpr基因编码的vpr蛋白称p16,可促进病毒的释出,并调节外壳糖蛋白的加工。

vpr基因编码的vpr蛋白是p10~15,可促进病毒的转录。

与其他逆转录病毒比较,HIV自有其生物学特点:

(1)病毒基因组的复制、转录、表达,其强度受自身编码的一些蛋白或因子的正向或反向的调节,如tat、rev、nef等。

(2)病毒基因组极易发生突变。其进化率为真核细胞DNA基因的 10^7 倍,DNA聚合作用的错误率为 $10^{-10} \sim 10^{-9}$ 。由此,造成了抗HIV疫苗与特效药物研制的极端困难。

(3)一般逆转录病毒只侵入处于分裂状态的细胞,而HIV同时也能侵入非分裂状态的细胞;即HIV不仅侵犯CD4⁺的T淋巴细胞,而且侵犯如巨噬细胞,树突状细胞、胶质细胞等。

(4)HIV特异性地侵犯人体的免疫系统,逐渐摧毁人体的免疫功能,使之丧失对病毒或细菌的抵御能力。

显然,对HIV生物学特点的了解,有助于防治HIV策略的研究与制订。应当认为,当前对HIV生物学特点的了解,以及人体受HIV感染之后从基因水平到病理生理水平变化的了解,还是十分肤浅的,以致无法找到特效的根治艾滋病的最佳策略与技术方案。

自80年代初发现艾滋病以来,世界各国在广泛开展其基础研究的同时,对其防治也开展了广泛的探索。虽然进展迅猛,但至今尚无堪称特效的良药,较为值得注意的是下面的一些研究。

人们首先考虑到疫苗的研制。HIV 病毒是一种极易发生变异的病毒,因此,沿袭传统的办法用整个 HIV 病毒研制疫苗的技术路线显然是行不通的。这样,人们改用 HIV 上具有免疫原性的基因片段的蛋白质来研制疫苗。当前正在研制的疫苗约有 30 种: gp120、RP335 (它是 RP135 区的一部分,后者又是 gp120 的一部分)、gp41、无糖链的 gp120 (p120)、HGP30、gp160、p24, ALLVAC-HIV1, Genevax-HIV, HIV1 免疫治疗肽, TBC-3B 等,以及一种杂交抗体或称双特异抗体。这些疫苗均已进入临床试验。当前认为应用前景看好的是 gp41。它是一种隐藏的蛋白,可能其编码基因不易发生突变。该疫苗一旦有效,则可能对各种 HIV 突变型引起的艾滋病均有效。

另一引人注目的是 CD4 蛋白和一些毒素的应用研究。CD4 原是辅助 T 细胞表面的 HIV 受体, HIV 感染时通过其表面糖蛋白 gp120 与 CD4 结合进入 T 细胞。人们克隆了 CD4 基因并运用基因工程办法生产了 CD4 蛋白。动物试验表明,它能中和体内游离的 HIV 病毒。而 CD4-PE40 杂合毒蛋白,被认为既可中和体内游离的 HIV,又可杀灭被 HIV 感染的 T 细胞,而不杀伤其他种类的细胞。这是因为只有感染了 HIV 的 T 细胞表面才出现 gp120,才可被 CD4 所结合,进而被毒素杀伤;而正常细胞表面不产生 gp120,则不被杀伤。人 IgG 的 Fc 片段与 PE40 杂合蛋白,对于阻断 HIV 的母婴传播有着肯定的作用。这是因为该杂合蛋白可进入子宫并杀死那里的 HIV 病毒。还有关于应用白喉毒素和商陆杀灭 HIV 的报道。

另一种防治艾滋病的尝试是运用反义技术。所谓反义技术,就是利用细胞核物质片段、也就是反义寡核苷酸或反义基因和细胞中的 DNA 或 RNA 相结合,从而控制这些 DNA 或 RNA 的功能。反义技术的一种主要用途,就是阻止细胞产生某一细胞基因所编码的特定蛋白质。美国 Antivirals 公司的开发活动主要是用反义 RNA 抑制病毒感染。它有两种关键技术:一是中性基因 (neu-genes),这种基因和单股核酸相结合;一是反基因 (anti-genes),这种基因和细胞基因组中 DNA 的双股相结合。这种反基因和基因本身相结合使其根本转录不成 mRNA。由于艾滋病毒是将其细胞核物质渗进寄主 DNA 中,所以最好的方法是把它阻止在寄生基因组中,而不是等它转录成 mRNA 或转译成蛋白质时再来消灭它。这类尝试目前仍在继续中。

日本科学家还研制了一种新的抗 HIV 单抗。他们发现,感染了艾滋病毒的细胞表面存在着 FAS 抗原,而正常细胞表面却无此抗原。研究组用遗传工程的方法制造出抗 FAS 的单抗,它具有识别 FAS 抗原并结合 FAS 抗原的功能。该抗体一旦与被 HIV 感染的细胞结合,就能连同细胞一起将细胞中 HIV 杀死。因为正常细胞中没有与其结合的 FAS 抗原,因此受攻击的机率很低。在试管试验中,添加单克隆抗体 3 天后,艾滋病感染细胞几乎 100% 死亡。该单抗将进行临床试验。

关于应用缺陷 (突变) 的病毒蛋白来终止 HIV 的复制。研究表明,3 种 HIV 突变株的 Rev 蛋白引入受 HIV 感染的细胞,可以阻止 HIV-1 的繁殖;几种 HIV 突变株的 tat 蛋白引入 HIV-1 细胞,也可以阻止 HIV-1 的繁殖。

艾滋病的基因治疗研究广泛而深入,但主要在于考察这些治疗方案的可行性,而不在于证明这些方案是否能够真正根治艾滋病。这类研究基本上可以分为两类:一类是针对 HIV 的直接抗病毒治疗,属于细胞内免疫。所选择的基因包括 HIV 基因组片段 (RRE, TAR 等)、反义 RNA、核酶、突变 HIV 的编码蛋白以及某些细胞蛋白等的基因导入。另一类旨在提高机体的免疫功能或清除受 HIV 感染的细胞,包括在靶细胞内表达病毒抗原,如导入自杀基因、输入标记的特异性 CTL 等。一些结果显示了良好的应用前景。但这些方案距真正征服艾滋病,尚有很大的距离。然而,有志于攻克艾滋病的学者们,以其坚韧不拔的精神,顽强进取,必能在征服艾滋病这一世纪性顽症中,取得最后的成功。

1.2.2.4 关于心血管疾病

1. 高脂血症和动脉硬化:

早已证明血浆脂蛋白代谢障碍与心血管疾病关系密切。当前的研究主要在于阐明基因突变、基因调控同脂蛋白代谢障碍的关系。还有一些与脂蛋白代谢障碍无关的基因同心血管病疾病的发生与发展有关。这里主要介绍脂蛋白代谢障碍的基因背景与心血管疾病的关系以及家族性高血压的遗传分析。

在高脂血症和动脉粥样硬化 (AS) 的发展和形成过程中包含着众多基因的变化, 为研究 AS 的成因, 包括在脂代谢中的所有基因都应作为“候选基因”加以研究。在脂蛋白运转和代谢过程中下列多种蛋白质起着关键作用:

第一是载脂蛋白类: 其中包括载脂蛋白 A - I, A - II, A - IV, B, C - I, C - II, C - III E 和 apo (a)。

第二是脂蛋白酶类: 其中包括脂蛋白脂肪酶 (lipoprotein lipase, LPL), 肝脂酶 (hepatic lipase, HL), 卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (LCAT) 和胆固醇脂转移蛋白 (CETP)。

第三是脂蛋白受体, 包括低密度脂蛋白受体 (LDL - R), 乳糜微粒残核受体 (remnant - R), 和清道夫受体 (scavenger - R)。

上述各种蛋白质的基因都已经分离, 其中大部分基因的核苷酸序列都进行了分析, 并确定了它们在染色体的位置。目前多数实验室特别注意研究某些基因的变异引起的高脂血症和 AS 形成的关系。在未来数年内有可能找出某一基因的多个变异以及这些变异与疾病形成的相互关系。目前之所以不能给予脂代谢紊乱的原因以充分的解释, 可能是由于更多的因素, 如新的基因或新的变异还没有被发现。因此, 只有在获得更多的遗传变异信息时, 例如血管壁细胞在遇有致 AS 的脂蛋白时发生什么反应? 这些反应又受哪些因子所控制? 等等, 才能比较全面地了解 AS 敏感性的遗传基础。根据现有的研究资料, 可以把群体中经常发生的脂蛋白紊乱分为四种类型。

(1) 低密度脂蛋白胆固醇 (LDL - C) 水平升高: LDL - C 水平增加与 apoB, apoE 及 LDL - R 三种基因的变异有密切关系。apoB 基因全长 43kb, 含有 29 个 Exons 和 28 个 introns, 编码 apoB - 100 多肽链, 该肽链包括 27 个氨基酸的信号肽和 4536 个氨基酸的成熟肽, 人肝脏主要合成 B - 100, 小肠合成 B - 48, 与 LDL - R 的结合区域位于该蛋白的羧基末端。apoB 基因最普遍的变异是单碱基取代和小片段缺失, 导致形成不完整的肽段。许多低 β 脂蛋白血症 (hypobetalipoproteinemia) 都是由于这种变异引起的。到目前为止, 至少有 21 种 apoB 基因变异与此症状有关, 这些变异基因分别被称为 Truncated apoB89, Truncated apoB87, 等等。

apoB 基因的变异也可引起高胆固醇血症 (hypercholesterolemia)。apoB 基因第 26 外显子中第 10708 位的 G 为 A 取代, 使第 3500 位的谷酰胺变为精氨酸, 这个氨基酸残基的取代大大减弱了 LDL 受体与 apoB - 100 的亲合力, 大约只相当于正常 LDL 受体结合力的 5%, 导致临床上出现高胆固醇血症。

LDL - 受体基因变异极大地影响 LDL - C 水平, 该基因的变异是家族性高胆固醇血症的主要原因, 已经鉴定的 LDL - 受体基因变异有 40 多种, 其中约 1/2 是大片段缺失和重排。

影响 LDL - C 水平的另一个遗传因素是 apoE 基因的变异。apoE 有三个等位基因, E2 与受体的结合活性只相当于 E4 和 E3 的 1% ~ 2%。因此群体研究指出, 具有 E4/3 表型的个体 LDL - C 水平比具有 E3/3 表型的个体高 10 ~ 20mg/dl, 而具有 E3/2 表型的个体则低于 E3/3 表型个体约 10 ~ 20mg/dl。家系分析结果表明, 编码 E2 蛋白的等位基因与低胆固醇个体的特征有密切的关系, 该等位基因可能就是科学家目前正在全力进行寻找的人体内具有降低胆固醇水平功能的重要基因。

(2) 高密度脂蛋白胆固醇 (HDL - C) 降低与甘油三酯水平升高: 编码 apoA - I 的基因位于一个多基因位点之中, 其中还包括 C - III 和 apoA - IV 基因。这一位点中任一基因的变异都可能引起 apoA - I 的缺失。一般来讲, 大片段缺失或重排可能出现极低的 apoA - I 和 HDL - C 水平以及早发性 AS。apoA - I 基因的无意义突变也引起低 HDL - C 水平。最近发现 LCAT 缺乏是由于该基因突变引起的, 其中一种疾病叫鱼眼病 (fish - eye disease, FED) 也是由于 LCAT 多种形式变异的结果。如在 LCAT 基因第 123 位苏氨酸变为异亮氨酸的点突变就可引起鱼眼病。

HDL - C 水平的提高与两个酶蛋白有关联, 即 CETP 和 hepatic lipase 的缺乏。在 CETP 基因中第 14 内含子的第 1 个核苷酸的点突变破坏了基因转录过程中的正常剪切。因此带有这种变异的纯合子个体在其血浆中检查不到 CETP, 而杂合子个体血浆中大约只有正常个体 CETP 水平的 60%。CETP 的缺乏引起体

内 HDL-C 升高也已经被证明。因此像低 β 脂蛋白血症一样, CETP 缺乏可能是抗动脉硬化而发生的一种变异。最近, 在两个高脂蛋白血症个体中检查到 C-III 结构变异, 其血浆中 C-III 浓度较低; HDL 颗粒大小呈非典型状。

(3) 乳糜微粒残核和中间密度脂蛋白 (IDL) 胆固醇水平升高: 一般情况下, 含甘油三酯丰富的脂蛋白 (乳糜微粒和 VLDL) 被 LPL 水解产生乳糜微粒残核和 IDL, 这些颗粒主要由肝细胞上识别 apoE 的受体清除。因此 apoE 的结构变异便影响了对乳糜微粒残核和 IDL 的清除。apoE2/2 纯合子个体难于清除餐后血流中乳糜微粒残核。在 50 个具有 E2/2 表型的个体中可能有 1 个表现出空腹高脂血症和 III 型高脂蛋白血症。

(4) 脂蛋白 (a) 增加是另一种紊乱的表现: Lp (a) 是冠心病的独立危险因子。apo (a) 靠一个二硫键与被修饰的 LDL apoB-100 相结合。它的结构与纤维蛋白原 (plasminogen) 极其相似。纤维蛋白原含 5 个 Kringle 区和一个蛋白酶区, 而 apo (a) 包含 15~40 个类似于 Kringle IV 区域的结构, 以及一个类似于 Kringle V 的结构和一个变异的蛋白酶结构。从家族和双胞胎研究结果证明, Lp (a) 在体内的水平是极具遗传性的。血浆中 Lp (a) 含量和 apo (a) 蛋白分子的大小以及 Kringle IV 结构的数量呈负相关关系。它可能通过干扰 LDL 和纤维蛋白原代谢两个途径引起动脉粥样硬化。

为解释引起血浆中血脂水平变化的原因, 还有很多的工作需要深入, 还有一些控制着细胞内胆固醇代谢和吸收的新基因等待发现, 一些新的基因位点可能需要利用反向遗传学技术才能加以揭示。高胆固醇和高甘油三酯血症以及 AS 是由于多个基因之间, 基因与环境之间相互作用的结果。但是, 就患者个体而言, 一种基因的变异就可能使其患有致命的疾病。

(5) 新的研究动向

1) 研究家系遗传学, 寻找体内存在的控制胆固醇合成和降解的基因, 除 LDL-R 基因以外, 体内还可能存在控制胆固醇水平升高的基因, 因为发现某些 LDL-R 基因有缺失的患者, 血液中胆固醇水平与其年龄相匹配的个体相比并没有升高, 因此, 推测可能有某种未发现的基因起着这种作用。

2) 发现了 apoB mRNA 的编辑蛋白基因——人的 apoB mRNA 编辑蛋白基因位于十二号染色体 p13.1~p13.2 的位置, 基因全长 28kb。实验证明, 把该基因转入到肝细胞中, 可以使其产生 apoB-48 蛋白, 而不产生致 AS 的 apoB-100 蛋白。该基因的发现对于高胆固醇血症的基因治疗可能有着重要的应用价值。

3) 关于癌基因与心血管疾病的关系。人们发现, 癌基因与抑癌基因不仅仅同恶性肿瘤的发生有关, 而且它们是控制细胞内细胞分裂与分化的基因族, 是细胞增殖、分化、个体发育和再生所必须的“看家基因” (house keeper genes)。在不同的条件下, 它们表现了不同的调控功能。因此逐步形成了新的概念, 认为这类基因是细胞分裂与分化的调控基因, 认为在各种病理改变过程中, 凡涉及细胞分裂与分化的过程, 均势必涉及癌基因与抑癌基因的表达及其异常调控。肿瘤和一些心血管疾病 (如动脉粥样硬化等) 都是以细胞增生为主要病理特征的, 可以认为这些疾病的发生也必然同癌基因和抑癌基因的异常表达与调控有关。这一方面的研究, 可看成是心血管疾病发生的机制研究的一个侧面。但就恶性肿瘤发生机制与心血管疾病发生机制而言, 应当认为, 二者之间的不同点远远大于相似点。

2. 高血压病:

高血压病是一种与多种因素有关的主要表现为体循环动脉血压高于正常 (18.7/12kPa, 140/90-mmHg) 的常见病和多发病。高血压病中的 20%~40% 有家族遗传背景, 弄清导致高血压的遗传因素可以帮助我们理解高血压的发病机理。

最简单的高血压是由单基因突变引起的孟德尔式高血压, 如 1996 年由 Sutherland 等人首次发现的可用糖肾上腺皮质激素治疗的醛固酮过多症 (glucocorticoid-remediable aldosteronism, GRA) 是由于染色体间发生了不等交换, GRA 病人的 8 号染色体上有一个多余的由 11- β -羟化酶基因与醛固酮合成酶基因形成的嵌合基因, 导致 GRA 和高血压的发生。另一种按照孟德尔方式遗传的高血压是 Liddle 综合征;

病人的 16 号染色体上编码上皮 Na^+ 通道 β 亚基的基因发生点突变, 把一个 Arg 密码子变成了终止密码子, 合成的蛋白因此减少了 75 个氨基酸。单基因改变对血压造成决定性影响的还有 Gitelman 综合征 ($\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ 转运基因)、Bartter 综合征 ($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ 共转运子) 等疾病。

单基因突变引起的高血压早期诊断比较容易, 可以及时采取措施抑制高血压的发展, 但是这种高血压所占比例很小, 绝大多数高血压的发生与发展牵涉到许多系统, 如肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS)、激肽释放酶-激肽系统 (kallikrein-kinin system, KKS)、一氧化氮-内皮-一氧化氮合成酶系统 (NO-eNOS system)、利钠多肽家族 (natriuretic peptides, NPs) 和内皮素 (endothelin, ET) 等。

(1) 肾素-血管紧张素系统: RAS 在原发性高血压病人和高血压动物模型 (如 SHR) 的高血压的发展和维持中起重要作用, 如果用药物阻断 RAS, 可以产生降低血压的效应。RAS 主要包括血管紧张素原 (angiotensinogen)、肾素、血管紧张素 I (Ang I)、血管紧张素 II (Ang II) 和 I 型血管紧张素 II 受体 (type I angiotensin II receptor, AT1-R) 等。血管紧张素原是一种糖蛋白, 在体内主要由肝脏合成, 在肾素作用下水解生成 Ang I, 这个反应是 RAS 的限速步骤。在肺循环中的血管紧张素转换酶 (angiotensin-converting enzyme, ACE) 的作用下, Ang I 转化成 Ang II。Ang II 与血管的 AT1-R 结合, 使血管收缩, 血压升高。Ang II 与肾上腺的 AT1-R 结合, 刺激醛固酮的分泌增加, 醛固酮结合盐肾小腺皮质激素受体, 使得通过肾小管远端集合管的上皮 Na^+ 通道的钠重吸收加强, 导致体内水与钠潴留。ACE 还有降解缓激肽 (bradykinin, BK) 的作用, 通过使 BK 失活致使血压升高。

RAS 是调节钠钾平衡、血容量和血压的重要环节, 已经发现编码 RAS 的基因中, 至少有两个突变与高血压有关, ACE 基因的缺失突变和血管紧张素原 T235 变异体。插入额外的肾素基因的转基因动物, 动物的血压很高。与之相对应的方法是基因敲除 (gene knock out), 敲除血管紧张素原基因产生了低血压的转基因小鼠。

除了上面所说的外周循环系统的 RAS 外, 心脏和脑内 (胶质及神经元组织) 也存在所有 RAS 成分, 并能合成 Ang II。Ang II 可能直接或间接刺激心肌细胞蛋白合成和细胞生成, 从而影响原发性高血压患者的左室顺应性, 增强心肌收缩性。Ang II 直接注射入脑内或脑室, 能直接升压, 并导致加压素、促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 的释放及口渴反应。

(2) 激肽释放酶-激肽系统: 与 RAS 相反, KKS 具有血管扩张作用。肾脏组织激肽释放酶是丝氨酸蛋白酶, 将低分子量的激肽原 (kininogen) 水解成为有生物活性的激肽, 又在氨肽酶 (aminopeptidase) 作用下转变成 BK。BK 与其特异性受体如人缓激肽 B_2 受体 (human bradykinin B_2 receptor, HBKR) 结合, 产生一系列生物反应: 血管舒张、平滑肌收缩和舒张、离子运输和葡萄糖代谢等。

早在 1934 年, Elliot 和 Nuzum 就发现原发性高血压病人尿中激肽释放酶水平低于正常值, 自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR) 的尿和肾的激肽释放酶水平也明显偏低。临床实验发现口服猪胰激肽释放酶能短期降低高血压病人的血压。过量表达人组织激肽释放酶的转基因小鼠一生都维持低血压状态。

(3) 一氧化氮-内皮-一氧化氮合成酶系统: 内皮衍生的 NO 是血管紧张性的调节子。最初叫做内皮衍生扩血管因子 (endothelium-derived relaxing factor, EDRF)。在内皮细胞, 内皮-一氧化氮合成酶 (endothelial NO synthase, eNOS) 将 L-精氨酸分解成为 L-瓜氨酸和 NO。乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 在兔的、BK 在豚鼠的心脏诱导 NO 的合成, 使血管扩张。缺乏 eNOS 基因的小鼠表现为高血压症状。正常血压的 Wistar-Kyoto 大鼠 (WKY) 的肾皮质中的 NOS 活性与 SHR 的相差很大。急性注射 L-精氨酸导致正常人和原发性高血压病人的血压都迅速降低。缓慢注射 L-精氨酸可以缓解 SHR 的心脏肥大现象。

(4) 利钠多肽家族: 1981 年 de Bold 等人率先发现心房提取物具有利钠利尿活性, 分离出心钠素或心房利钠多肽 (atrial natriuretic peptide, ANP)。后来又从猪脑分离到脑钠素 (brain of B-type natriuretic peptide, BNP) 和 C 型利钠多肽 (C-type natriuretic peptide, CNP)。ANP、BNP、CNP 共同构成 NPs 家族,

近年来在心血管生理方面的研究十分活跃。

NP_s都是以一个大分子的 NP_s 前体原 (propro - NP) 的形式合成的。前体原进入内质网后它的信号肽被切除形成 NP_s 前体,这是 NP_s 在细胞内合成后、分泌前的主要贮存形式。人的 NP_s 分泌时被蛋白酶分别水解成由 28 (ANP)、32 (BNP) 和 22 (CNP) 个氨基酸组成、并由二个 Cys 形成 1 个二硫键的环状活性分子。ANP 主要由心房肌细胞合成和分泌,分布非常广泛。BNP 的主要合成部位是心室。CNP 基因似乎主要在中枢神经系统中表达。

心房张力增加或血压升高是刺激 ANP 分泌的主要因素。ANP 的作用主要包括:①增加肾血流、肾小球滤过率和尿钠、钾、钙排出;②对 RAS 的拮抗作用,抑制肾素和醛固酮的释放,扩张血管。BNP 也有利尿利钠作用和 RAS 抑制效应,它的利钠和降压作用大于 ANP。CNP 作为利钠多肽的作用明显较 ANP 和 BNP 的弱,可能是由于血浆浓度较低。

静脉注射 ANP、BNP、CNP 都能产生明显的利钠利尿作用和降低血压效应。带有 Transthyretin (TTR) 启动子的小鼠 ANP 基因的转基因小鼠,可在肝脏中高水平、持续表达 ANP,与非转基因小鼠相比,血压降低 20 ~ 30mmHg。BNP 转基因小鼠的 BNP 基因也在肝中定位高水平表达,降低血压约 20mmHg。ANP 基因敲除小鼠基因组中缺少正常的 ANP 基因,明显表现为高血压。

(5) 内皮素:自从 1980 年发现 EDRF 即 NO 的扩张血管作用以来,越来越多的证据表明血管内皮是调节血管紧张的重要因子。1985 年,Highsmith 等人发现了一种内皮衍生的缩血管因子 (endothelium - derived constricting factor)。两年后,Yanagisawa 等人纯化出这种因子,是一个 21 肽,命名为 ET。人基因组存在 3 个不同的 ET 基因,编码 3 种不同的肽,ET - 1、ET - 2 和 ET - 3。正常人血中 ET - 1 含量非常低,约为 1pg/ml,说明 ET 可能不是循环激素,而是局部激素。一些高血压如血管内皮瘤 (hemangioendothelioma) 诱导的高血压是 ET 依赖性的。一部分原发性高血压患者的血浆 ET - 1 水平与血压呈正相关。ET 可能是在高血压的发生中发挥作用。

动物静脉注射 ET 产生持续的加压效应。同源重组产生的 ET - 1 基因缺失的纯合子小鼠出生时死于呼吸系统衰竭。杂合子小鼠 ET - 1 水平低于野生型小鼠,发展成为高血压,原因尚不清楚,可能是心肺中枢改变所致。

原发性高血压是遗传与环境因素交互作用的产物。诱发高血压的遗传因素除以上介绍的几种外,还有许多。例如高血压与脂类代谢异常密切相关。在 Dahl 盐敏感大鼠 (Dahl salt - sensitive rat, DS) 和 SHR 中使用抗脂类血症药物,可以防止或延缓高血压的发生和发展。原发性高血压患者和啮齿类高血压动物模型 (如 SHR) 经常伴发胰岛素耐受 (insulin resistance)、高胰岛素血症 (hyperinsulinemia) 和异常脂类血症 (dyslipidemia)。糖尿病患者的肝葡萄糖激酶 (glucokinase, GCK) 基因的启动子上游第 258 个核苷酸由 G 突变成 A,容易并发胰岛素耐受。Chiang 等人用 PCR 限制性片段长度多态性方法检测到原发性高血压病人 G → A 的突变率显著高于正常人 ($P = 0.001$),等位基因为 A 的人患高血压的风险比等位基因为 G 的人高 2.52 倍。

SHR 和正常血压大鼠的比较研究提示血压的定量特性位点 (quantitative trait locus or loci, QTL) 可能存在于多条常染色体上,如染色体 1, 2, 4, 8, 10, 13, 16, 19 和 20。然而,不能确定到底是染色体的哪段区域导致自发性高血压的发生。St. Lezin 等人发现 SHR 1 号染色体长臂靠近 Sa 基因和编码上皮钠通道的 β 和 γ 亚基 (Scnn1b 和 Scnn1g) 的基因的区域存在一个血压 QTL,此区域替换成正常大鼠的相应区域后,SHR 的收缩压降低 10 ~ 15mmHg,舒张压降低 6 ~ 10mmHg。这段区域与人的 11、16 号染色体的短臂和小鼠的 7 号染色体同源,在这些染色体上可能也存在类似的 QTL。

1.2.2.5 生长、发育与进化的统一理论

有机体如何从单个细胞发育成为一个复杂的个体?通过分析调控基因在引导和调控发育过程方面的作用,对这个问题可以得到进一步的了解。卵与精子的分化,它们在受精时和受精后所发生的生物化学变化,发育过程中基因表达的特殊调节,凡此种种,都在近年的研究中取得了显著进展。

基因表达日益显示出在组织、时间和位置方面的调控特异性。这方面的研究, 对于一个信息如何在分子水平上得到利用提供了清晰的图像。关键之点是主导调控的基因。例如果蝇控制机体轮廓的同源异形基因已被发现, 这类基因也在哺乳动物身上发现。它们的 DNA 序列很相似, 称为同源异形基因盒。这些基因的突变可以剧烈地改变有机体的形态。现已发现 HOX 基因与四肢形态发育及生殖缺陷的关系。每一个人都有 39 个 HOX 基因, 排列成 4 组平行的等位基因。HOX 基因的突变, 则引起手畸型和生殖系统异常, 拇指与人脚指短于正常者, 轻度翘向肘部和膝部, 有的形成狐形脚和蝴蝶指。经分子生物学分析, 这是因为编码色氨酸的一个密码子被一个终止子取代, 导致 HOX13 蛋白不全, 缺了 20 个氨基酸, 以致结合 DNA 的能力低, 改变了靶基因的转录状况, 最终导致了形态的改变。

细胞运动和细胞粘着的控制机制正在被阐明。正是这些机制决定了细胞在有机体里的位置和细胞形成组织形态的发生过程。细胞有选择地相互粘着和细胞粘着于细胞外的环境的能力, 部分地控制着细胞在形态发生过程中准确移动的能力。现已发现不同的细胞粘着分子, 其中有些分子以及它们的基因已经得到初步的阐明。对这些分子以及细胞间基质的研究, 有助于了解细胞运动、细胞聚集的选择性、以及它们在形态发生中的作用等。

物种之间不但细胞类型不同, 而且细胞类型的排列的图式也不同。图式形成保证细胞、组织、器官在发育中空间排列的正确。图式形成一直是发育生物学的中心课题。细胞谱系、成形基因等外部分子, 以及局部的细胞与细胞间的相互作用, 均被视为图式形成中的重要因素。个体成长后, 发育并没有停止。发育过程调节着成长的个体里不同组织的细胞数量, 以及整个成长的有机体和各个细胞的寿命。

进化问题是一个复杂的问题。现已从细胞、分子, 以及系统学、古生物学、生态学等多方面进行了探索。现在已经确定 DNA 序列的物种已达 1500 万种以上, 显示了基因和蛋白质的分子结构, 以及它们之间详细的进化关系。应用分子生物学和遗传学技术使人们有可能比以往更精细地分析物种之间的遗传差异, 从而更好地了解这些差异和它们的产生。基因组的组织和组成的研究刚刚起步, 但是利用克隆和绘制 DNA 基因图谱, 可获得更多的知识。

分子生物学技术已在 DNA 变异研究及其分析中揭示了极多的细节。突变是进化的动因。这是经典进化论的观点。但发现了中性突变, 如异构同工酶等。这种突变被认为对进化没有意义, 于是形成了非达尔文主义的进化论。它作为一种进化论的流派已在学术界存在了许多年。与此同时, 已经出人预料地发现了染色体组经由转座因子 (transposable element) 活动而进化的途径。这就开拓了单个基因各自在种间转位作为研究物种形成和形成后的变化的主要手段。已运用线粒体 DNA 多态性研究生物的居群结构和迁移。还利用古细菌以研究原核生物与真核生物之间的关系。

分子技术的应用带来了系统学的革命。DNA 和蛋白质分析可用以区分物种和评价亲缘间的系统发生的关系。

当大分子在不同谱系、不同时间都以几乎一致的速率进化时, 大分子的全面相似性, 可能准确地量度进化时间。

从分子水平上看问题, 一些研究结果使人相信, 依照特异的机体程序表安排了早期胚胎发育并指导细胞自身的形成。代代相传的遗传信息, 包含了一个控制个体发生的精确的发育程序, 也在相当程度上反映了进化的历程。发育基于遗传信息在精确的时空模型上的分化表达。发育着的机体各部位的相互依赖基本上是按多级控制模式进行的, 而不可能是结构基因独立地被调节, 而是控制基因的相互作用以调节许多基因组的结构基因协调一致地起作用。

1.2.2.6 脑和神经的生物学

脑神经细胞如何指挥行动, 是未来研究最具潜力的一个领域, 是生物学中最富挑战性、最复杂的问题之一。神经细胞是大脑的加工和信号单位。它们通过电和化学的方式联系。当前关于神经细胞信号的研究工作集中于各种类型的神经递质和神经调质、它们的受体、以及转导成的电活动或第二信使活动 (second-messenger activity)。一种称为补丁-夹子 (patchclamp) 的测量技术, 使神经学家可以研究作为

信息传递和加工的基础发生在神经细胞里的每个生理过程。DNA 重组技术使有可能研究某些神经递质和神经调质的基因以及它们受体的辨认和进行顺序测定。

研究工作进展至今,对于神经系统的发育仅有大致的了解。关于神经感应、神经元再生、移动、细胞集合、细胞分化、轴突长出、神经细胞死亡、突起的消失等方面的研究,为了解早期神经系统发育提供了线索。

引人入胜的领域之一是对神经元内物质运输(包括缓慢和快速的轴突运输)机制的研究。微量注射、定量荧光显像显微镜、以及抗体探针用于光学显微镜术和电子显微镜术的样品标记等技术,有助于了解缓慢与快速运输所分别运送的物质,运输机制的本质,轴突运输的作用等。

脑是如何工作的?运动时脑是怎样作出决定的?脑如何选择目标?各个运动的速度、准确性和力量是什么样的?要对这些问题做出最本质的回答,还在于基因的作用。脑分子生物学研究结果显示,脑中约有3万个基因处于表达状态,其中脑特异的 mRNA 约占总 mRNA 的 6.5%,且均长约 2 640 个碱基对。这些 mRNA 编码的蛋白质承担着神经的特异功能。研究脑组织不同功能区、mRNA 的分布、从 cDNA 推知这些蛋白质的结构,结合抗体标记这些蛋白质在脑中的分布将会最终导致在分子水平上揭示思维、记忆和学习诸功能。

神经网络的一个重要的课题是了解各种神经病学和心理学的失调所造成的行动失常。有关神经网络的研究将为神经病学和精神病学提供治疗的科学基础。例如已可应用分子遗传学的方法诊断神经病,已可利用现代生物化学和成像技术诊断和治疗精神病。

1.2.2.7 人类基因组计划

DNA 体外重组技术出现之后的 10 多年来,人们以空前的广度和深度揭示着生命现象以及疾病的本质,但是,一些科学家并不以此为满足,认为当前这样地进行生命和疾病奥秘的揭示依然是片面的、孤立的和支离破碎的。他们希望实施一项一次性的一揽子解决问题的宏伟计划。这就是人类基因组计划。这些科学家认为,自古以来,人类一直在企求认识自身,力图穷究生、老、病、死、思维、意识和行为的本质。他们希望也像 16 世纪进行人体解剖以全面了解自身那样进行另一次对人体全部基因组的解剖,以期从分子水平上全面认识人类自身。这是因为人体各个器官、组织和细胞的结构与功能,都是源于细胞内基因组所包含的遗传信息。这项研究将为进一步了解人的全部基因构成提供一个可资查找的完整的基因信息库。

人类遗传信息贮存在 30 亿碱基的直线序列中。碱基的数目之大,被比作地球上所有的人口或 200 本美国纽约曼哈顿电话本上的数字。在 30 亿碱基排列成的漫长序列中,估计有 (10~30) 万个基因。这些基因决定着人体的构成和活动。

在这样的知识基础上,美国率先提出了一个为期 15 年、耗资 30 亿美元的人类基因组作图和测序的计划。DNA 双螺旋模板学说提出者之一、美国的 Watson 教授认为这个计划堪与阿波罗飞船载人登月的壮举相提并论,但预算不及后者的 1/10,而意义和影响则更为重大和深远。迄今,还有日、英、法、意和前苏联已建立机构拨款开展这项研究。我国虽起步晚了些,但已建立南北两个研究中心,迅速取得了可喜的进展。

人类基因组研究包括两个方面:定位和排列。基因定位时,先把每条染色体打断成一些大约 4 万个碱基对组成的片段,然后确定这些片段的排序。基因定位还包括识别染色体上某些短序列的标记,最后在图上将已知的基因位置标示出来。

排列是确定 DNA 中碱基对的具体排列顺序。DNA 必须先被打断成一些片段,然后进行分析,最后再将片段中的每一段短序列按染色体原来的顺序连结起来。

为适应这项规模宏大的研究,一系列分子生物学的新技术涌现了出来。本书将着重介绍一些主要的技术方法。这里说明的仅在于该项研究的基本情况。

首先是 DNA 测序技术。原来的手工测序法,大致电泳 1.5 小时,可以测得 200~300bp (碱基)。现

在已使用较普遍的激光测序仪, 一个泳道 4 种标记, 电泳 1.5 小时, 可测得 400 ~ 500bp, 并可同时测定 20 多个样品, 最多可测得 1 500bp。正在试用的超薄凝胶电泳、或毛细管电泳、或高效毛细管电泳, 进行多泳道电泳, 每小时分别可出得 500 ~ 600bp, 500 ~ 900bp, 500 ~ 600bp。每天可测定 2 000 个样品, 总计每天可测得 1Mb (百万个碱基)。新开发出的 DNA 芯片杂交法, 可以进行更大规模的测序, 但有时结果模糊, 可能发生错配, 出现 DNA 二级结构的障碍, 尚须改进。还正研究一种大规模的平行测序法, 用酶将 DNA 单个碱基剥离, 用 CCD 照像检测, 预期一天可测出 16Mb。DNA 测序是基因组研究的基础, 其快速、大规模测序方法的出现, 将有力地推动工作的进展。

第二方面, 是新基因的分离与克隆。当前所使用的方法, 主要是利用微卫星 (microsatellite) DNA 多态性标记, 构建高分辨率的遗传连锁图。它是基因组全序列测定和基因分离克隆的基础。这一技术方法出现之前, 曾经使用过简单重复序列 (SSR) 技术, 小卫星 (minisatellite) 技术 (其核心序列为 6bp ~ 70bp) 和 VNTR 技术, 主要利用个数可变的串联重复序列作为标记。微卫星技术利用了 1 ~ 6bp 的重复串连序列, 最常见的有 (CA)_n 和 (TG)_n, 人类总共约有 $5 \times 10^4 \sim 10^5$ (CA)_n 型序列, 一般 6 ~ 60kb DNA 出现一个。生物体中广泛分布着此类重复序列, 真核生物中占 5%, 散在基因组中约有 5 万 ~ 100 万个, 主要特点是基本构成 (核心序列) 单一, 一般 2 ~ 70bp, 串连重复不等次数, 但每微卫星 DNA 的核心序列结构相同, 重复次数一般为 10 ~ 60 个。高度多态性主要来源于串联个数的不同。

利用微卫星 DNA 多态性标记的策略, 是一个逐步缩小包围圈的策略, 直至最后找到所要找到的新基因。当前可以买到这类实验的引物 Kit, 自行设计实验方案, 一般使用多种含 (CA)_n 的引物对一个总 DNA (染色体) 样品进行 PCR 扩增, PCR 产物电泳的结果, 可据以进行基因分型 (genotyping), 以了解某等位基因是否有家族遗传背景, 找出一个 10cm M (10cm Morgan = 1Mb = 10^6 bp) 的位点。之后进行连锁分析 (linkage analysis): 以确定某等位基因是否与性状 (或疾病) 相关。总的看来, 遵循孟德尔遗传规律的单基因的检出, 较为容易; 而多基因疾病的相关基因, 或数量遗传基因的确定, 则相当困难。确定一个 10cm Morgan 的宽位点的相关性, 是第一步。

继之, 是再回头进行微卫星 PCR 扩增: 选取小范围高密度 Marker 为引物, 重复上述实验, 确定离位点最近的 Marker。不断重复这样的 PCR 扩增, 直至找到一个 0.1 ~ 1cm M 的位点 (至少缩小 10 倍)。

第三步, 办法之一, 是进行上述找到的 0.1 ~ 1cm M 大片段的 DNA 测序; 办法之二, 是对上述候选片段进行定位克隆 (position cloning): 先从文献资料中找出该在 0.1 ~ 1cm M 位点上的已知的正常基因, 再克隆出该位点上的相关基因, 加以比较。这就是进行突变检测 (mutation detection), 可有多种办法: SSCP 电泳 (带型不同), 探针杂交、酶切图谱 (限制性分析)、DNA 测序, 从而找出突变基因, 进而克隆出该基因。

进一步的验证, 是将所克隆的基因转入细胞或动物, 验证其功能与性状 (或疾病) 的相关性。最后回到群体 (动植物或人群): 从群体采集总 DNA 样品, PCR 扩增出相关基因, 检测其功能或其功能的改变, 以确认所分离克隆出的基因是否与某性状 (或疾病症状) 具有相关性。

在今后的 10 ~ 20 年内, 随着高密度的物理图谱的建成, 可加快基因的分离与分析, 可提供更多的目标基因, 进而可能分析数量较大的基因, 和多基因疾病的相关基因网络。

第三方面的研究, 是新基因的功能研究。人体大约有 10 万个基因, 在一定的时空条件下, 大致有 15% 得以表达。这些基因的表达涉及细胞分裂、生长发育、分化、衰老和凋亡; 也涉及到健康与疾病, 疾病的发生、发展及转归。一个细胞中, 作为基因表达的第一产物的 mRNA, 有 2 ~ 3 万种; 但 99% 是微量的, 1% 表达量较高, 大约只有 300 多种。这样, 对 mRNA 的监测, 则要求技术方法有很高的灵敏度。当前, 较为灵敏的常用方法是差异显示 (differential display)。每次试验, 可以检测几十个样品。美国 Affymetrix 公司, 应用 DNA 芯片建立了高密度核苷酸点阵杂交法以监测 mRNA 的表达。它可利用已知的基因序列或 EST 序列 (已知可以表达的 DNA 序列) 设计寡核苷酸探针, 进行点阵杂交, 以检出可表达的功能基因。

表 1-12 是截至 1996 年底统计数据库中不同物种的 EST 数目。

表 1-12 1996 年底统计数据库中 EST 数目

种	EST 数	基因组大小 (Mb)
人类	465 858	3000
小鼠	62 404	3000
斑马鱼	128	1700
果蝇	8	165
线虫	23 438	100
拟南芥菜	28 951	100
水稻	11 313	300
酵母	2944	12

当前还发展出一种虚拟的基因组学 (virtual genomics)。它利用计算机以处理基因组计划所提供的大量信息 (cDNA 序列或 EST)，检测基因差别表达和基因功能，从而替代实验的方法。这一方面的研究，已经取得了显著的进展。如已揭示出前列腺肿大与前列腺癌二者基因表达的差别；比较已知的和未知的蛋白质的结构与功能，利用计算机技术以研究组织中蛋白质的组分，结构与功能及表达差异 (bioinformatic analysis 的主要工作)；已从流感嗜血菌的 DNA 全序列中鉴定出 76 个基因，其中 32 个 (与其他病原菌同源) 均编码细胞表面蛋白；已从生殖道支原菌全序列中鉴定出 16 个基因与其他病原菌的胞外膜蛋白同源。同时，这些新揭示出的功能基因，均可作为新药筛选的靶位点。

当前还利用突变型以研究基因的表达及功能差异。已被研究得比较透彻的一些生物，可以作为模式生物进行比较分析。如酵母，可作为细胞循环和 DNA 复制修复的模式；线虫，可作为细胞分化发育的模式；果蝇，可作为信号传递的模式；小鼠有 500 多种突变型编码的蛋白与人的同源性达 90%，因而可以作为模型以研究相应的人的基因及其蛋白质。

同时，根据概算，基因组研究可以提供 3 000 个 (或更多) 的新药筛选的药靶。应用计算机技术与机器人技术，已建立了药物高效筛选系统 (high through put system)，以促进组合化学的发展，先进行单元合成，然后以单元进行组合，以研制高效新药。

总的看来，新基因的功能研究 (包括其生物功能及其与其他基因之间的调控关系，基因调控网的确立等)，是一项艰巨的任务。据预计，在人类基因组大约 10 万个基因被揭示之后，基因功能研究尚需持续 50~100 年才能完结。

当前已完成的基因组研究已有 12 种，如表 1-11 所示。下面是当前正在进行基因组研究的生物 (表 1-13)。

在当前的基因组学研究中，一些研究结果引人入胜；一些研究结果令人惊讶。

在人类 DNA 测序研究中，人们发现了一种类似原核生物的普遍现象，即在染色体 DNA 的长序列中，有的区段基因密集，甚至有二个或三个基因重叠的现象；有的区段、一段很长的 DNA 序列，运用当前的知识加以识别，则认为没有基因存在。对于原核生物中普遍存在的基因重叠现象，人们曾经认为如噬菌体、病毒、细菌等原核生物，由于其小，进化的进程迫使其基因的重叠以求生存。而对于人类的基因重叠现象，如套用这一观点加以解释，则难以自圆其说。再者，无基因存在的 DNA 长序列，其功能与作用又是什么呢？无功能或无作用的说法，恐怕不能成立；起支撑作用的说法，也不尽合理。长期的进化历程，总的结果是利于生存与发展而又合情合理。这说明，对于生命奥秘的研究与揭示，还有许多研究工作需要开展，它是难以穷尽的。

表 1-13 进行中的基因组计划主要内容 (22 种)

基 因 组	意 义	单 位
1. 人类病原菌		
沙眼衣原体	沙眼	Univ. of California
粪链球菌	机会感染	TIGR
尿链球菌	机会感染	GT
肺炎支原体	肺炎	TIGR
淋病奈瑟球菌	淋病	Univ. Oklahoma
绿脓杆菌	机会感染	GT
斑疹伤寒	伤寒	Univ. Uppsala
肺炎链球菌	肺炎	TIGR, HGS
酿脓链球菌	脓疮病	Univ. Oklahoma
梅毒螺旋体	梅毒	TIGR, Univ. Texas
霍乱	霍乱	TIGR
2. 非病原菌		
丙酮丁酸梭菌	丙酮丁醇	GT
耐放射异常球菌	抗放射性	GT
3. 真核生物		
线虫	模式	
果蝇	模式	
拟南芥菜	模式	
水稻	模式	
番茄	经济作物	
玉米	经济作物	
小鼠	经济作物	
大鼠	经济作物	
人类		

老年性痴呆早已引起国际社会的关注。早已阐明 14 号染色体上的 $\epsilon 182$ 基因与 80% 家族性老年性痴呆病例相关, 现还发现 1 号染色体上一基因片段也与之相关, 且二者具有高度的同源性。后者所编码的蛋白质含 450 个氨基酸。早先发现患者 21 号染色体上有产生淀粉样的前体蛋白 APP 的基因突变。现又发现 1 号染色体上的基因突变导致提高 β -淀粉样蛋白生成速度而致病。

关于人的性格与行为, 早期的经典遗传学研究表明, 它是一个复杂的问题, 既与遗传背景相关, 也与社会生活的环境有关。现以性格基因 D4DR 为基础进行了深入的分析, 已查明个性特征, 行为举止与特定基因相关。先天本性与后天教养对塑造性格均产生了影响。已研究了几千对孪生儿, 结果表明: 在武断个性中有 60% 源于遗传基因, 在幸福愉快感中, 有 80% 源于遗传基因。11 号染色体上的“惊险基因”表达, 导致大脑释出多巴胺, 引起追求险境、寻找新刺激的欲望, 以满足欣快感, 其遗传率达 59%。已从 X 染色体上识别并分离出与男性同性恋行为相关的几个基因。11 号染色体上的“性格基因”D4DR 有长短各异的 DNA 序列, 分别对形成外向型和内向型性格产生不同的影响。焦虑情绪与指令调节脑化学物质血清素基因相关联, 可能有 10 个基因共同影响导致忧虑基因的不同组合, 以致忧虑程度不同。先天与后天各占 50%。

烟瘾也与遗传基因有关。CYP2A6 基因缺陷的吸烟者上瘾可能性比正常者要小得多。烟中的尼古丁通常由肝中的 CYP2A6 酶帮助进行新陈代谢；该基因的作用能影响尼古丁的代谢速度。该基因正常，尼古丁的分解就快，并促使抽更多的烟以补充尼古丁的消耗。如果该 CYP2A6 基因缺陷，则尼古丁分解变慢，抽烟的欲望降低，患肺癌与心脏病的机会也相应减少。人群调查发现，在不吸烟者中，CYP2A6 基因缺陷的占 20%；在吸烟者中，该基因缺陷的，仅占 10%。

另外，现已找出造成耳聋的突变基因即 GJB2 基因突变。在耳聋家系调查中，GJB2 基因突变，一个家系占 49%；另一家系占 37%。现已找出侏儒的软骨发育不全基因，以及躁狂抑郁症、精神分裂症、糖尿病、前列腺癌等一些相关的基因。

在进行人类基因组测定的同时，一些发达国家为了取得基因工程研究的战略性突破，以便改良作物和开发新品种，近年来已悄然兴起阐明作物遗传信息序列和绘制基因图谱的热潮。英国正绘制小麦、黑麦和白芥菜的基因图谱。德国正绘制马铃薯基因图谱。美国正绘制水稻、玉米、蕃茄和大豆的基因图。日本计划绘制水稻、其他作物和树木、家畜及鱼蚌类动物的基因图。美国已初步绘制出一张水稻基因图。日本已初步绘制出一张水稻染色体图。

1.3 基因工程与分子生物学的发展趋势及展望

这里略谈基因工程与分子生物学的发展趋势和前景，以展望未来。

1.3.1 蛋白质工程：改造基因、改造蛋白质、改造生命

DNA 体外重组这一崭新的技术使人们能够在试管里直接操作基因，并使基因的传递打破了种属的界限，不仅微生物、植物、动物和人类本身不同种属之间的基因可以随意拼接和传递，而且微生物、植物、动物和人类之间的不同来源的基因也可以随意地进行组合，拼接和传递。这预示着人类可以随意地改变物种的基因构成和机能。从工程技术的意义上说，它意味着人类可能随意地创造新的品种和产品。不仅如此，如上所述，80 年代初期蛋白质晶体学、计算机技术与基因工程手段的结合，则出现了第二代基因工程——蛋白质工程。这是一个新的飞跃。如果说基因工程技术使可能直接操作基因的话，那指的是操作单个或数个完整的基因，操作的层次基本上没有深入到基因内部，而蛋白质工程的研究与操作层次则深入到了基因内部。基因区段 (domain) 的结构与功能的分析，基因内部一个或数个碱基的结构与功能改变的分析，进而人为地进行不同来源基因区段的拼接，或进行点突变和盒式突变，都说明了蛋白质工程的研究层次已经深入到基因内部；而且所进行的一切改变都是理性的、有目的的和有根据的，结果一般地说是可以预期的，而不是盲目的。这就是说，蛋白质工程才真正从理论上和原则上实现了科学家长久以来梦寐以求的愿望，即按照人类的意志创造出适合人类需要的不同功能和性能的蛋白质。这还意味着人们已有可能根据不同的需要设计并创造出世界上原来不存在的新基因、新蛋白质以及为数众多、用途不同的新产品。

事实上，就生命科学而言，结构与功能关系的分析，几乎可以认为是一个永恒的命题，只是分析的层次不同而已。当代有了电子计算机、X 衍射、核磁共振等手段，使得对基因及其产物的结构与功能的分析深入到生物大分子的内部，深入到生物大分子的三维空间结构与功能的关系。许多未知的客观规律必然不断地被揭示出来。这样的科技进步发展到了对生命基本结构的分子设计或重新设计。这样的科学高度不仅预示着人类社会物质上极大丰富和经济上的极大高涨，而且预示着新的生命形态总有一天会被设计和创造出来。

当然，这样的推断意味着真善美与假恶丑的新的生命形态都可能被创造出来，它既可能是令人鼓舞的，也可能是令人忧虑的。但是，我们要相信，科学技术的发展与繁荣从总的趋势看是同人类的物质文明和精神文明联系在一起的。良知与法制将同科学技术一起引导社会发展的总趋势：人类总是要进步

的。

1.3.2 分子生物电子学的兴起以及不同学科的相互渗透

生物技术发展的一大趋势是不同类型生物技术的相互渗透,而基因工程处于主导地位。这类相互渗透的一个十分引人注目的发展,是超越了生物学的学科范围,而同其他学科相结合,首先是同电子学的结合,这就是生物电子学(bioelectronics)、或称分子生物电子学(biomolecular electronics)。它研究生物材料、生物系统和生命过程的电学特征,并用以研究各种电子仪器。当前该学科集中研究生物芯片(biochip)和生物传感器(biosensor)。

生物芯片是利用生物高分子作为骨架,包裹与稳定具有半导体功能的特殊有机物从而制造成具有集成电路功能的电子元件。生物芯片可用于制造逻辑单元和记忆单元。利用电子计算机辅助设计蛋白质的结构,采用重组DNA技术来生产这类蛋白质,为生物芯片的制造开辟了新途径。

早在1970年,一些研究者已着手研究蛋白质作为半导体骨架的用途。这是生物传感技术中一个最有戏剧性的应用。现在美国许多企业正不惜工本地在研究生物芯片。美国国防部1984~1989年财政年度为生物芯片研究拨款300~400万美元。日、法、英及前苏联均表现对生物分子计算机的兴趣,因为用蛋白质构成的生物芯片计算机,将是比硅片更小、更快、更节能、更高效和更可靠的计算机。这种计算机有可能被广泛应用于各个领域,以至机器人的生产。

单克隆抗体已被用于构建三维的生物芯片。从二维到三维结构,就微电子的运动而言,不仅增加电路的复杂性,而且还可大大减少体积。三维蛋白质骨架的应用,要求被设计的蛋白质以正确的方式及角度与其它蛋白质相互作用,这将有利于人工智能计算机的设计。但三维芯片提供实用之前尚有许多问题有待解决,如环境稳定性、记忆的贮藏、开关装置等。同时,生物芯片的实用化,要求了解更多蛋白质的结构与功能间的相互关系、生物装配过程及生物逻辑和记忆的分子机制。

尽管生物电子学的研究尚处于起步阶段,但这一方面的成功将对电子工业发生革命性的影响。据称,由生物芯片组装起来的被称为第六代的电子计算机,将比第五代超大规模集成电路的电子计算机(有256千位存储器)的信息存量还要大几倍到10几倍,而且将具有自我学习、自我判断、进行逻辑推理、可用自然语言与人类交谈等功能。人们预期21世纪将实现人工智能商品化。

生物芯片亦可应用于医学方面。未来可能的应用如植入到人脑内防治失明和耳聋;植入心脏,调节心脏的跳动;植入血管,调节药物的释放;植入体内,控制假肢的活动等。

关于生物传感器,美国市场预测每年将增长100%。美国1991年的投资为3.65亿美元。最早商品化的是医用生物传感器,用于糖尿病患者家庭监测的葡萄糖传感器,1990年投资为2000万美元,1995年为7500万美元。

顺便提及,生物传感器和生物芯片问题讲的是生物材料问题。从上述的介绍中,人们已经看到了材料问题的极端重要性和广泛的应用价值。生物技术对材料科学的渗透,也将可能使之发生革命性变革。日本TDK公司正研究应用微生物生产新的磁性材料;美国军方正研究应用蛋白质工程技术生产一种韧性和强度为其他材料所无法比拟的新蚕丝蛋白质,为制造降落伞之用。这两个人们难以想象的例子,说明了生物技术所涉及的领域何其广泛。生物传感器和生物芯片的出现,还宣告了生物技术对生物医学工程的渗透。后者的主要使命是研制人工脏器和人工假肢,材料问题是一个突出而尖锐的问题。生物技术将可能为解决这一问题作出积极的贡献。另如生物活性材料、超精细生物材料、创造具有新功能的材料、类似活生物体材料等新型材料,特别要利用海洋生物研制高性能材料。显然,研制这些新材料的知识基础与技术,首先必然是分子生物学与基因工程及蛋白质工程。

分子生物学与基因工程的发展必然同更多的学科领域相互结合、相互渗透,诸如同电子技术、机械电子技术、信息科学、数学、语言学、固体物理等。不仅要冲破生物学各领域的内部的壁垒,而且要超越一切知识屏障,将各学科、各领域的智慧和知识融为一体,分子生物学与基因工程将攀上新的高峰。

1.3.3 走向海洋, 走向宇宙空间

当代分子生物学与基因工程研究的另一个趋势是, 超越了陆地, 走向海洋; 超越了地球, 走向宇宙空间。

尚未利用的海洋与海岸有效面积比陆地大 5~10 倍, 海水中含有生物生长和繁殖所必需的无机物。海洋不仅能利用太阳能进行光合作用, 而且还有多种多样未被利用的生物。海洋将是分子生物学与生物技术开发研究的新的广阔场所。

当前, 在海洋生物学研究方面有着巨大投入的国家是美国、日本和法国。

海洋生物学研究的主要内容是: ①有用海洋生物的探索。主要对象是微生物、微藻类、大型藻类、无脊椎动物和脊椎动物。特别是热带、亚热带地区与极地寒冷地区、深海与热水矿床等特殊环境, 估计那里存在着特殊功能的海洋生物; ②海洋生物的育种。海洋微生物与微藻类的研究重点是基因重组, 而大型藻类是细胞融合。对于鱼类等海产动物, 初试可通过染色体操作进行育种, 但这不是绝对的。所有研究均将被 DNA 重组技术所渗透, 基因工程技术必占主导地位; ③利用海洋生物生产有用物质。主要利用海洋生物生产医药品、食品、饲料、化学品、电子材料, 以及化妆品等; ④海洋生物机能的阐明及其利用。海洋生物具有耐盐、耐寒、耐热、耐压、光合成、固氮、硝酸还原、浮游、发光和吸磁等机能。人们期待在基因水平上阐明这些机能并加以利用; ⑤海洋生态系统的阐明与控制。主要是考察红潮发生的机制, 研究其控制方法; ⑥海洋生物利用系统的建立。建立大规模培养与养殖新技术, 构筑海洋生物的综合系统; ⑦海洋生物技术辅助系统。开展与海洋生物技术有关的设施、传感器、遥测等方面的研究。

海洋生物学研究的主要进展。美国正运用分子生物学的方法大力开展神经生物学、感觉生物学、发生学和生理学的基础研究, 对枪乌贼的神经系统、蜃属的视觉、海胆的发生和分化等进行深入的研究。

海洋微生物的研究重点是生理活性物质。据报导, 河豚毒素可用弧菌属 *Alteromonas* 进行生产。还发现了生产蛋白质酶抑制剂与抗菌物质的海洋微生物。在海藻表面, 发现一种可用于制备植物激素的海洋细菌, 并正研究影响其增殖与分化的因子。在重金属回收和超微磁粒子的生成方面, 已发现在海洋细菌体内存在着可形成一种覆盖着有机薄膜的超微磁粒子。还发现可在海水中产生能源的产甲烷和产氢光合菌。其发展方向是基因工程。已分离出海洋光合菌的质粒, 并与大肠杆菌质粒组建成穿梭质粒。

海洋微藻类可作为蛋白质源、油脂源、维生素源, 在食品和饲料中应用。微藻类可应用于生产 α -亚麻油酸、二十碳五烯酸等有生理活性作用的脂肪酸和藻青苷色素等。微藻类经固定化后可利用其机能生产氢、氨和谷酰胺酸等。现已建立了蓝藻的基因工程载体。固碳、光合成、固氮和浮游性等基因已可用大肠杆菌进行大量复制。红潮机理的阐明已取得进展。同时, 藻类毒素(主要是神经毒素)的研究, 藻类毒素基因的克隆化, 以及藻类毒素的应用研究, 已有引人注目的进展。

大型藻类的利用。日本已有海带的综合利用系统, 在海洋中设置海带栽培设施, 批量生产海带, 以生产甲烷、肥料、饲料和藻酸等。美国正培育大型墨角藻, 作为甲烷发酵的能源生产原料。关于紫菜等海藻类, 正制备原生质体, 进行引入外源基因的研究。

海洋无脊椎动物主要研究重点是从贝类、海绵和海参提取生理活性物质。从蟹壳提取的壳质和脱乙酰壳多糖已用作医疗材料。

海洋脊椎动物研究, 已从大马哈鱼、金枪鱼、狮鱼和鳗鱼等分离出生长激素, 搞清其化学结构, 正进行其基因克隆化研究。鱼卵的研究, 已建立了只产生雌鱼的技术。成鲑鱼籽和干鲱鱼卵是高附加价值的产品。

人造卫星和航天飞机出现之后, 敏感的生物学家立即抓住了利用宇宙空间特殊物理条件以从事分子生物学及生物技术研究, 开拓了宇宙空间生物技术的研究方向, 取得了在地球上所无法取得的科学成就。

人造卫星和航天飞机上所形成的宇宙空间的主要特点是形成了微重力的环境条件。微重力的主要特征是,减小环境的总加速度;减少浮力所造成的对流,并消除沉积作用,表面张力大于引力,提供“无容器”加工的可能性。通俗地说,就是利用在宇宙空间失重的情况下出现的特殊物理环境条件进行生物技术研究。当前已出现的技术,主要有生物分离、蛋白质结晶、微胶囊、空间反应器设计等。投入较多的国家有美国、前苏联、法国和德国。

美国利用基因工程技术在医药生产上的一个特点,就是利用了宇宙空间技术。美国国家航空和航天管理局(NASA)的宇宙空间生物反应技术实验室利用航天飞机,进行了一系列实验,取得了引人注目的成果。他们利用连续流动电泳系统,在失重条件下操作与地球上操作相比,能够分离出多达750种的蛋白质。采用这种技术提纯酶、激素和医药用蛋白质,已进入商品化阶段。

1984年9月,美国利用航天飞机“挑战者”号在太空中用基因工程菌生产胰岛素。在此之前,“哥伦比亚”号、“发现者”号和“挑战者”号都在太空中进行尿激酶的实验。在太空中,由于失去重力,蛋白质分子电泳时泳动加快,并可分离大量的分子,因此生产周期短,产品纯度高,生产成本低。在地球上生产一个疗程的尿激酶要1000美元,而在太空中只要75美元。两者相差十多倍。太空药厂已于1987年由航天飞机送入太空。工厂是自动操作的,飞行员每隔几个月去收集产品,装入原料即可。

美国还在宇宙空间试验用再循环等电点聚焦等分离技术分离生物制品取得良好效果。在航天飞机上,还进行了体细胞生物合成药品等试验。他们预期在空间有可能生产12种生物制品,包括干扰素、免疫球蛋白和B细胞等。同时,进行了生物合成和细胞动力学的研究。此外,美国和前苏联联合使用空间试验站完成了23种蛋白质的结晶。

据预测,部分在空间加工的生物产品约占生物技术市售产品的4%。到本世纪末,空间加工生物产品的年销售额可达20亿美元。美国波士顿空间政策中心的估计更高,到2000年,全世界生物技术产品为3500亿美元,其中空间加工的生物产品可达149亿美元。这个预测告诉人们:生物技术将为社会积累巨额的财富,太空的利用将可能研制出空前高效、优质、低成本的新型药物。

1.3.4 大规模深入研究的重大战略部署

由于分子生物学与基因工程研究取得的前所未有的成就的引导和激励,促使各国科学家和政府相信,生命科学的进一步发展将在更深层次上的突破将为人类文明带来质的飞跃。要实现这一崇高的新的目标,最根本的一个途径就是在生命科学基础理论研究方面实行战略性的投入,开展规模宏大的战略性研究。当前的实际情况是,各国纷纷制定重大规划,部署具有战略意义的研究。

在分子生物学方面,较突出的如人类基因组研究,脑与思维,生长、发育与进化的统一理论,染色体的结构与功能,染色体上遗传信息的构建规律,“遗传语言”,细胞间识别、通讯与物质传输,卵的成熟、受精和着床,细胞分化,细胞周期的调控,癌变原理,细胞骨架及核基质,细胞膜与膜系及受体等方面的研究。此外,还有在物理学关于非线性、非平衡态动力系统的物理学、耗散结构和自组织理论、混沌态等新理论的影响下,复杂系统如生物体、生态系统的研究等。

上述这些研究的理论依据,都是当代分子生物学的基本理论,一部分研究引入了当代物理学的最新理论作为起步的基础。但其分析与综合的角度有所不同。看问题角度的变化将可能在更新的层面上看清事物的本质。生命系统是一个最复杂的系统,从多方面透视生命的本质,是必要的,它必将推动生命科学的发展。就技术方法而言,一整套分子克隆的技术方法是个基础,但引进了许多新的技术方法。最突出的是结晶学的应用,以揭示大分子三维结构与功能的关系。物理学的基础是数学。在生命科学的研究中,各种数学模型的建立和计算机的普遍应用,是深层次生命科学研究特色。应当认为,科学研究发展到在数学模式基础上的严格论证,才称得上是真正的科学。人们可以期待一些全新理论的涌现,以阐明生命活动最本质的机理。

1.4 不结束语

本文对当代基因工程与分子生物学概况的介绍,虽不是全面的,但人们看到,它展示了一个波澜壮阔的局面。人们可以设想,21世纪基因工程与分子生物学的发展将是怎样地得益于化学、物理学与数学最新理论的引进,又将会是怎样地走向新的高峰和推动着其他学科的发展,将会是怎样地改变着农林牧副渔、医药、石油、化工、食品等产业以及环境监测与净化技术等诸多领域的面貌,将会是怎样地改变着人类的生产方式、生活方式以及思维方式,人类文明将会进入一个怎样的光辉灿烂的新时期。21世纪,将会以其巨大的科学成就和技术成果向人们展示:21世纪真正是生物科学的世纪。

所幸生物技术与分子生物学的重要性已被我国领导人和社会各界所认识。我国生物技术与分子生物学将会在知识经济的发展中显示出巨大的威力。正确的科学政策将会确保其顺利发展。关键之点在于一步一个脚印的实践。分清轻重缓急的投入的增加,将会随着国民经济的发展而更加鼓舞人心。基础研究人才、生物技术上游与下游人才以及自动化生产工程人才的培养与引进,将强化这支对国民经济的发展举足轻重的队伍。生物技术研究成果的产业化和规模生产及其所带来的效益将会造就一个良性循环的大好局面。以创新为己任的科技队伍将不愧时代的召唤。国际交流与国际合作将会使我国生物技术与分子生物学的发展锦上添花。我国生物技术与分子生物学的新成就将会与锦绣中华的大好江山一样壮丽辉煌,并展示于21世纪的五洲四海。壮我中华,耀我祖国,是中国科学工作者的共同心声。

中国生物技术与分子生物学的科技工作者迎来了为祖国的繁荣昌盛大显身手的好时光。

(卢圣栋)

参 考 文 献

1. Chaudhary VK, et al. Arecombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to *Pseudomonas* exotoxin. *Nature*, 1989, 339:394
2. Ashorn P, et al. Anti-HIV activity of CD4-*Pseudomonas* Exotoxin on infected primary human lymphocytes and monocyte/macrophages. *J Infect Dis*, 1991, 163:703
3. Ashorn P, et al. Elimination of infectious human immunodeficiency virus from human T-cell cultures by synergistic action of CD4-*Pseudomonas* exotoxin and reverse transcriptase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:8889
4. Lorberbourn-Galski H, et al. Cytotoxin activity of an interleukin 2-*Pseudomonas* exotoxin chimeric protein produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad sci USA*, 1988, 85:1922
5. Ogata M, et al. IL-2-PE40 is cytotoxic for activated T lymphocytes expressing IL-2 receptors. *J Immunol*, 1988, 141:4224
6. Case JP, et al. Chimeric cytotoxin IL-2-PE40 delays and mitigates adjuvant-induced arthritis in rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86:287
7. Beidler CB, et al. Cloning and high level expression of a chimeric antibody with specificity for human carcinoembryonic antigen. *J Immunol*, 1988, 141:4053
8. Steplewski Z, et al. Biological activity of human-mouse IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 chimeric Monoclonal antibodies with antitumor specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85:4852
9. Shearman CW, et al. Construction, expression, and biologic activity of murine/human chimeric antibody with specificity for the human α/β T cell receptor. *J Immunol*, 1991, 146:928
10. Bird RE, et al. Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 1988, 242:423
11. Chaudhary VK, et al. A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to *Pseudomonas* exotoxin. *Nature*, 1988, 339:394
12. Ward ES, et al. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*, 1989, 341:544

13. Sastry L, et al. Cloning of the immunological repertoire in *Escherichia coli* for generation of monoclonal catalytic antibodies: construction of a heavy Chain variable region-specific cDNA library. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86:5728
14. Huse WD, et al. Generation of a large combinational library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science*, 1989, 246:1275
15. Johnson RS et al. Targeting of nonexpressed genes in embryonic stem cells via homologous recombination. *Science*, 1989, 245:1234
16. Blaese RM, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-seid: initial trial results after 4 years. *Science*, 1995, 270 (5235) :475 ~ 480
17. Bordignon C, et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science*, 1995, 270 (5235) :470 ~ 475
18. Hogan JC, et al. Combinatorial chemistry in drug discovery. *Nature-Biotechnology*, 1997, 15 (4) :328 ~ 330
19. Antisense' 97. a roundtable on the state of the industry. *Nature-Biotechnology*, 1997, 15 (6) 519 ~ 524
20. Robson PR, et al. Genetic engineering of harvest index in tobacco through overexpression of a phytochrome gene. *Nature-Biotechnology*, 1996, 14 (8) :995 ~ 998
21. Caetano AG. Scanning of nucleic acids by in vitro amplification: new developments and applications. *Nature-Biotechnology*, 1996, 14 (13) :1668 ~ 1674
22. Douglas JT, et al. Targeted gene delivery by tropismmodified adenoviral vector. *Nature-Biotechnology*, 1996, 14 (11) :1574 ~ 1578
23. Drews J. Genomic sciences and the medicine of tomorrow. *Nature-Biotechnology*, 1996, 14 (11) :1516 ~ 1518

2. 分子生物学实验室常规仪器设备

2.1 实验室的基本要求

在今日的科学界中,每时每刻都有新技术的诞生和新仪器设备的出现,而它们的诞生和出现,又推动着各个领域不断前进,甚至产生较大的飞跃。

50多年前现代分子生物学才刚刚起步,而今已在医学、工业、农业、林业、畜牧业、渔业以及国防等各个领域中大放异彩,这些都是以分子生物学的实验方法及研究技术的建立和发展为前提的,而这些方法和技术的建立和发展,又都以数学、物理学、化学、生物学的基础理论和实验技术,以及先进的仪器设备为基石。譬如,20世纪30年代,电子显微镜的出现,揭示了生命科学中微观世界的奥秘,使细胞内部的亚显微结构和病毒等超大分子生物的内部构造清晰地展现在我们面前;40年代,层析和电泳技术的兴起,大大地推动了化学、物理、生物、医药、公安、法医等各个领域不同分子的分离、纯化、分析与结构测定的工作;核素示踪技术的应用,是显微镜发明以来最伟大的成就之一,使人们看到生物体内新陈代谢的情景;70年代以来,DNA重组技术、单克隆抗体技术、DNA合成、DNA序列分析、微量纯化技术以及电子计算机在生物学科各领域中的应用,不仅使分子生物学的研究进入一个崭新的时代,同时,积累了大量的实验数据和材料;PCR技术问世仅数年,却以惊人的速度,覆盖了与核酸有关的各个领域,称得上方法学上的又一次革命。以上种种新仪器、新技术的产生,使分子生物学迅速地发展成为一门具有独立的基本概念和原理的学科,并不断向其他学科渗透,促进许多边缘学科的产生与发展。

事实证明,在科学飞速发展的今天,无论从事哪个领域的研究,要想有所突破,除了良好的理论设计之外,更重要的是要依赖于先进的技术和优良的仪器设备以及良好的研究环境。

以DNA重组技术为核心发展起来的分子生物学技术,不但是人们认识生命本质的有力工具,并且迅速渗透到农业、工业、医学和国防等科学的各个领域,越来越得到广泛的应用,创造出巨大的经济效益和社会效益,影响并改变人们某些传统的生活方式。

1975年,DNA重组技术刚诞生两年,美国国立卫生研究院(NIH)就成立了一个专门委员会,特别负责处理有关对DNA重组技术的诉讼事宜;1976年制定了“通用重组DNA分子研究准则”(Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules)。准则中第一项第二条,对重组DNA分子作出了以下定义:“将天然的或人工合成的DNA片段在细胞外连接,构建成在活体细胞内能复制的新分子,即为重组DNA分子。”准则还特别规定:对DNA的重组技术以及与之相关的微生物应用,还有一切涉及此类技术的实验室的建立和进行的工作都必须事先申报,待审批认定后,方可在允许范围内按准则进行工作。

准则还通过两个方面对此类实验室加以约束。第一类是生物学的约束:对研究的对象及采用的生物材料严格加以限制。根据DNA重组采用宿主(host)和载体(vector)划分为两个级别:HV₁和HV₂。HV₁级只能使用大肠杆菌(*E. coli*)和K12株类和非整合的质粒或λ噬菌体(如pSC101, Co E1);HV₂级涉及HV₁级以外的宿主与载体。在正式启用上述体系之前,必须呈报其生物学性状等详细资料,经DNA重组咨询委员会(RACI)批准方可应用。

第二类是物理学的约束:根据实验室的特殊建筑设施(如空气过滤)、实验装备及安全防护、实验条件、实验环境以及操作规则等方面,并依照生物安全性水平(biosafety level)分为四个级别,即BL1

到 BL4。通过这类限制以防止新的重组杂种生物从实验室逸出, 保护实验操作人员和外部环境。

大多数实验室处于 BL1 或 BL2 级, 此类实验室可开窗, 不需过滤空气; 实验台面应防碱、防酸、较耐热; 具有通风柜; 严禁用嘴抽吸刻度吸管; 必须使用机械微量移液装置; 所有生物材料在排放以前必须高压消毒; 在实验室内需穿工作服, 不准在实验室内饮食、吸烟; 离开实验室需要洗手等规则。

BL3、BL4 级实验室的规定非常严格, 其中必须有高效特殊空气双过滤系统 (high efficiency particulate air filter) 和排放液体的消毒系统等。通过十几年的发展证明, 该准则在生物学方面, 对研究对象与材料采用 HV 级别约束, 有些过于死板的条例现已放宽。但在物理学的约束方面, 还是正确的、必须的。我国目前尚没有这方面的法规或准则, 可参照“通用重组 DNA 研究准则”, 进行分子生物学实验室的修建。

一个标准的分子生物学实验室大致可以分为: 实验室、仪器分析室、离心机室、细胞培养室、放射性核素操作室、冷室、暗室、消毒室、洗涤室和动物饲养室等。

2.2 实验室的常规仪器及设施

2.2.1 温度控制系统

一个正规的分子生物学实验室应该是一个恒温、恒湿的环境, 因为许多生物实验是在恒温、恒湿条件下进行操作才较为理想, 所以实验室应具备空调装置, 有的还需空气加湿器。但大多数实验室, 尤其是仪器分析室要求保持干燥。这样才能保证一年四季不因温度和湿度的变化而影响实验的操作和实验结果。

根据药品、试剂以及多种生物制剂保存的需要, 必须具备不同控温级别的冰箱, 其中最常使用的有: 4℃、-20℃和-80℃冰箱。有些实验应在低温环境下进行操作, 如电泳、层析、离心和保存琼脂菌板等, 所以还须有一个体积较大的冷室或冷柜, 温度在 0~10℃左右为宜。

某些实验材料, 如细胞株、菌株、某些器官组织, 以及纯化的样品等, 要求速冻和长期保存在超低温环境下, 这就需要有一个中等容量的液氮罐, 像 35L 和 50L 的液氮罐。由于 35L 和 50L 的液氮罐不便于移动, 所以还需要准备一个 10L 的液氮罐, 用于往大液氮罐中定期添加液氮, 千万要防止液氮罐里的液氮干了或过少致使实验材料变质。

37℃恒温箱主要应用于细菌的固体培养和细胞培养; CO₂ 培养箱适用于培养各种细胞; 利用 37℃恒温空气摇床可以进行液体细菌的培养; 25~100℃水浴摇床可用于分子杂交试验、各种生物化学酶反应等试验的保温; 25~100℃水浴箱用于常规实验; 循环式或恒温水浴箱是可以制冷也可以加热的水浴箱, 主要用于 DNA 探针缺口标记、酶反应试验、电泳冷却循环用水等。

烤箱主要应用于烘干实验器皿, 有些需要温度高些, 有些需要温度低些, 如应用于 RNA 方面的实验用具, 就需要在 250℃烤箱中进行烘干, 而有些塑料用具只能在 42~45℃的烤箱中进行烘干。

2.2.2 水的净化装置

随着分子生物学的飞速发展, 许多实验对水的纯度要求越来越高。第一次蒸馏的水 (即单蒸水) 常常难以满足实验要求, 要进行第二次蒸馏 (即双蒸水), 它可以去除水中的大部分有机杂质, 但制作时间较长, 而且无机杂质仍然很多。许多实验还需要去离子水, 这就需要阴阳离子交换树脂进行处理。

目前, 许多国家的实验室都使用高质量的超纯水。应用超纯水在高精度的仪器分析中是不可缺少的。美国微孔滤膜公司 (Millipore Corporation) 的 Milli-Q 超纯水制造系统所制造的超纯水, 符合美国材料试验学会 (ASTM)、美国病理学会 (CAP) 和临床医学学会 (NCC-LS) 的 I 型 (试剂等级) 的规格, 可用蒸馏水、离子交换水或反渗透纯水作为生产超纯水的供水, 通过磁铁耦合齿轮泵使供水不断地循

环,在需要时能立即采水使用。采水量为 1500ml/min,出水电阻率(25℃)为 18MΩ/cm³。供水经过 Nuclear-Grade 的临床离子交换树脂柱和活性炭柱,可以除去溶解无机粒子和吸附有机物,出水的终端使用 40 层的 0.22μm 的微孔滤膜,可完全除去孔径以上的粒子微生物。

这种高质量的超纯水适用于许多学科领域,如分子克隆、各种色谱分析、氨基酸分析、DNA 测序、酶反应、组织和细胞培养等实验都需要高质量的超纯水。

2.2.3 消毒设备

细菌和细胞培养以及核酸等有关实验,所用的试剂、器皿及实验用具,应严格灭菌,有的实验还要求没有核酸酶的污染,故应将实验器械、试剂等进行高压消毒。对于经过导入 DNA 重组分子的菌株,操作后必须进行严格的高压消毒灭活处理,有些动物材料应在实验后进行焚毁。

大批实验物品、试剂、培养基可以使用大型消毒器定时进行消毒,但是在实验中还经常需要一个 1.56kg/cm² 的高压消毒锅,以进行小批量的物品等随时消毒。

一些不能经受高压、高温消毒的试剂可用滤器滤膜除菌,器皿可用紫外线照射、75%乙醇或 0.1% 的十二烷基硫酸钠(SDS)浸泡消毒。

所有的细胞培养、细菌培养的操作,都应在紫外线消毒后的超净工作台中进行。

2.2.4 计量系统

1. 称量系统:

常用的天平可备有台秤、架盘药物天平、扭力天平、摆动天平、尼阻分析天平、电光分析天平(全自动、半自动)、上皿电子天平和精密电子分析天平等。

2. 液体体积的度量:

量筒:常用的量筒有 2 000ml、1 000ml、500ml、250ml、100ml、50ml、25ml、10ml 和 5ml。

移液管:玻璃移液管应有 10ml、5ml、2ml、1ml、0.5ml、0.2ml 和 0.1ml。

可调式微量移液器:5 000μl、1 000μl、200μl、50μl、20μl 和 1μl。

微量液体处理系统:汉美顿(Hamilton)公司的系列微量液体处理系统是由电脑软件控制下,进行微量移液和液体稀释的由针筒和气阀组成的可程序化稀释器/喷注器,可处理 1~10 000μl 范围的液体。将预注稀释剂吸入左边的针筒内,同时把样品液吸入右边的针筒内,样品液与试剂或稀释剂混合后一起喷出,且有不同的记忆程序。

还应备有一些用于粗量液体体积的刻度试管、刻度离心管、刻度烧杯以及刻度锥形瓶等。

3. pH 计:

是测定溶液中氢离子的直接电位的仪器,它主要是通过一对电极,在不同的 pH 值溶液中产生不同的电动势,把电压表测得的电池电动势用 pH 值表示出来。

pH 试纸只适用于培养液、酚饱和液、缓冲液或其他试剂溶液的 pH 值的粗略估计,而大部分试剂的配制要求严格的 pH 值,因此应具有一台精确度高的(小数点后两位数的)电脑 pH 计。目前精确的 pH 计基本上都是在微处理机控制下进行酸度测定,测定范围也很广泛,从 pH 0~16,分辨率随仪器的性能而有粗有细,有些还带错误信息指示、连续记忆等功能。值得注意的是,许多缓冲液的 pH 值与温度有密切关系,所以在调 pH 值时,要将 pH 计的指示温度调至以后反应所需温度,这样才能保证在所需的反应温度条件下溶液的精确 pH 值。应当记住,不是所有的试剂的配制都是在 37℃ 或室温下进行 pH 调整的。

4. 分光光度计:

是利用物质在可见光和紫外线区域中的吸收光谱来鉴定该物质的性质及其含量的一种仪器。它是由光源、单色器、吸收池、接收器、测量仪表或显示屏幕所组成。光密度是许多溶液中的溶质定量的方便

指标之一,通过所产生的单色光而测定某一溶液对该单色光的吸收值,利用它可进行核酸溶液定量和纯度的初步判断。实验室经常使用的大都是紫外与可见光合并在一起的紫外与可见光分光光度计。

2.2.5 其它设备

微波炉便于一些溶液的快速加热与定温加热,如配制的电泳琼脂凝胶液进行溶化,68℃核酸杂交洗膜液的定点加温等。对于核酸溶液不要用微波炉加热,以防止对核酸链的破坏。

真空加热干燥箱广泛应用于核酸在硝酸纤维素膜和尼龙膜上的固定,用于 Southern、Northern 及 Scot 杂交等实验。

目前, Bio-Rad 公司的紫外交联仪 (GS Gene Linker UV Chamber) 是一台使样品与膜经紫外线而交联在一起的仪器,其速度既快且膜不变脆。其工作原理是将紫外线直接照射在膜上的样品(蛋白质、核酸等),使光波转换成热能,而把样品固定在膜上,当累积热能量达到要求时,仪器中的传感器自动关掉紫外线而停止工作。该传感器可受 200~400nm 光波的热能,交联时间少于 2 分钟。适应于 Southern、Northern、Western、Southwestern 狭缝和斑点印迹以及菌落和噬斑的筛选等杂交膜的样品交联。

电泳凝胶干燥器是将电泳后的凝胶进行脱水干燥的仪器,一般可将凝胶干燥到一张玻璃纸上,干燥后的凝胶易于保存。

液氮冷冻干燥适用于活性蛋白质样品的干燥与结晶。例如,提纯后的蛋白质如酶、膜蛋白、脂蛋白、免疫球蛋白、抗原和受体等样品溶液,由于量大且不易保存,所以应进行冷冻干燥成为干品,更易保存且不易变质。

许多实验都需要抽真空,例如,用于细胞培养的血清需要在真空泵抽负压的情况下过滤灭菌;乙醇沉淀后核酸样品的干燥;电泳凝胶的干燥;Southern、Northern 转移及斑点及狭缝杂交的核酸样品点样制膜的固定。

制冰机:用于制造大多数核酸、蛋白的实验操作所需要的低温环境,以减少核酸酶或蛋白酶的降解。

对于电泳后含溴乙锭的核酸样品需要在紫外线灯下进行观察,其波长一般为 254nm、366nm 两种,前者灵敏度高,但对核酸链有损害作用,并引起褪色,长时间照射,影响观察和照像效果,更重要的是回收的 DNA 片段质量不佳,所以应尽可能减少照射时间;后者对核酸损伤小,但灵敏度不如前者。最近出产的一个 302nm 的 Macro Vire 紫外线照射器 (pharmacia),其灵敏度与 254nm 波长无区别,可将褪色与断链效应减至最低。辐射式紫外灯对观察者照射少,而透射式紫外灯的照像效果好,但必须配戴有机质防护面罩。

磁力搅拌器、多角度旋转混匀器、快速振荡混匀器,均为很实用的小型设备。

在进行样品分离提纯的实验中,还应准备组织匀浆、或超声组织及细胞破碎器。

可调式电加热帽和玻璃蒸馏器用于酚等有机试剂的蒸馏。

常规的玻璃或塑料器皿,应包括平皿、试管、烧杯、量瓶、试剂分液漏斗等。有些需避光的试剂,应使用棕色试剂瓶保存,如饱和酚、巯基乙醇等。

微量移液器 Tip 头与 Eppendorf 管可洗涤、硅化,消毒后反复使用,但对于一些要求严格的实验,如 RNA 的提取、保存等操作,应使用新的消毒 Tip 头与 Eppendorf 管。其它应备有 1000ml、500ml、250ml、50ml、7ml 等常用规格的离心管以及 96 孔、24 孔、12 孔和 6 孔的细胞培养塑料平板等。

另外还有以下一些小型设备及用具:定时器、封口蜡膜 (plastic wrap saranwrap)、3mm 滤膜、塑料热封膜机、记号笔、一次性塑料或乳胶手套、防酸橡胶手套、防护眼镜和鸭嘴镊等。

2.3 离心机室的装备

在研究生物的结构与功能中,离心技术是不可缺少的一种物理技术手段。因为各种物质在沉降系数、浮力和质量等方面有差异,可利用强大的离心力场,使其分离、纯化和浓缩。目前有各式各样的离心机,可供少于0.05ml到几升的样品离心之用。有些离心机的转速和温度控制是粗略的;有些则很精确,可将这些参数控制在5%以内。离心技术的应用相当广泛,包括收集和分离细胞、细胞器和生物大分子等。下面介绍几种实验室常用的离心机。

普通离心机:最大转速为6 000r/min。

最大离心力为6 000g。

高速离心机:最大转速为25 000r/min。

最大离心力为89 000g。

超速离心机:最大转速为90 000r/min。

最大离心力为694 000g。

台式超速离心机:最大转速为120 000r/min。

最大离心力为625 000g。

(1) 医用或台式离心机是离心机中最简单而廉价的。它们最常用于压紧或收集小量快速沉降的物质(如红细胞、粗大的沉淀物、酵母菌和细菌)。大多数台式离心机的最大速度每分钟不超过3 000转,并且都在室温下运转。

(2) 低速冷速离心机主要用于细胞、细胞核、细胞膜、细菌的沉淀、收集。

(3) 台式离心机有常温和冷冻两种,最大转速大约12 000~15 000r/min,主要用于生物大分子的微量操作。

(4) 高速离心机是指转速高达20 000~25 000r/min的一些离心机。它们多数用于制备、收集微生物、细胞碎片、细胞、大的细胞器、硫酸铵沉淀物以及免疫沉淀物等。

(5) 超速离心机以其能超过500 000g(75 000r/min, $r=8\text{cm}$)的离心力,开辟了完全崭新的研究领域。此法已成为分离、提纯、鉴定、分析生物大分子的技术之一。应用差速离心、等密梯度离心、密度梯度离心等方法,可以分离制取线粒体、微粒体、染色体、溶酶体、质粒、肿瘤病毒等各种亚细胞物质;用强大向心力、长时间离心,可以获得具有生物活性的大分子核酸、各种与蛋白质合成有关的酶系和蛋白因子等,用分析性超离心可以检测生物大分子的构象变化、测定分子量及计算沉降系数。因此,超离心的应用不仅为遗传工程、酶工程、蛋白质工程、细胞工程、分子生物学工程和生物工程的发展提供了物质基础,而且已成为生物化学、分子生物学理论进展的动力。

2.4 分析仪器室的设置

仪器室是放置公用的大型或高精密度仪器的场所。大多数仪器都怕热、怕阳光、怕灰尘、怕潮湿、怕震动。仪器室安装的玻璃窗都是双层的,而且还配有百叶窗帘、空调设备,而且有的仪器室还需要几道门,以缓冲不必要的空气流动和灰尘。分子生物学实验室的精密分析仪器一般有以下几种:电子分析天平、各种电泳装置、各种层析装置、DNA合成仪、DNA顺序仪、多肽合成仪、氨基酸顺序仪、激光扫描仪、分光光度计、酶标仪等等。下面我们着重介绍一些分子生物学研究中常用的仪器设备。

2.4.1 电泳装置

自从1937年Tiselius利用电泳现象制造了界面电泳仪,用于蛋白质的研究,此后各种电泳仪器相继

诞生。

目前,电泳技术是检测、鉴定各种生物大分子的纯度、含量及描述它们特征,甚至还是分离、纯化、回收和浓缩样品的主要工具之一。我们知道,核酸和蛋白质等分子都带有电荷,当它们被置于电场中时,它们能够移动。电泳装置由两部分组成:电源装置、电泳装置。

电源装置:电源需经整流后通过稳压器,既能提供稳定的直流电,又能输出稳定的电压。电源装置可分为常压稳压电泳仪、中压稳压电泳仪和高压稳压电泳仪。常压稳压电泳仪一般为输出 0~500V 和 0~150mA 的电源装置。中压稳压电泳仪一般为 400~1 000V 的电源装置。高压稳压电泳仪一般为在 1000V 以上的电源装置。

电泳槽装置:一般可分为水平电泳槽装置和垂直电泳槽装置。

水平电泳槽装置可用于纸上电泳、醋酸纤维薄膜电泳、薄层电泳、琼脂糖凝胶电泳等等。

垂直电泳槽装置又可分为垂直平板电泳槽装置和圆柱形电泳槽装置等。

一般的电泳仪在每个实验室都能见到,在这里只介绍一些新型的或是人们不太熟悉的电泳装置。

2.4.1.1 毛细管电泳分析仪

缩短传统的电泳分离时间,提高其精确度,一直是研究人员的期望。目前,世界上许多公司都竞相推出自己在电泳仪器设备方面的崭新科技,毛细管电泳分析仪就是万花丛中之一葩。

在自由溶液中,由于电泳迁移率的差异能把分子量不同的物质相互分开,这就提供了一种强有力而又简单的分离方法。

毛细管微小的内径(50~100 μm)使热量能快而有效地散发,所以能应用较高的电压达到更快速的分离效率及效能。

毛细管原理是将 50 μm ×50cm 的毛细管,放在正负两极的溶液中,加上高达 30 000V 的高压电源,产生强大的电动渗透流,带动样品作分离,再作定性和定量检测,检测方法可有紫外/可见光、荧光、电化学、激光及同位素检测等,适合各种多样品之测试。

一般分离只需 1 至 30 分钟,最低可检测 10^{-16} 摩尔浓度的分子,特别适合分离氨基酸衍生物、肽、蛋白质、核酸、药物、病毒、水溶性维生素、糖类衍生物及其有极性的有机物质及无机离子化合物。同其他技术相比,ACE (analytical capillary electrophoresis) 有其独特的优点:分辨率高、塔板数高、定量准确、所需进样量小。ACE 是对传统电泳技术的一次革命,是一种比传统电泳更优越的分离分析技术。同时,ACE 以其独特的选择性,为高效液相色谱(HPLC)提供了一种补充技术,使 HPLC 的结果得到进一步确认。通过毛细管,还可以进行样品的浓缩,以达到微量组分的分析。浓缩 250 倍后,可测低至 5ng/ml 的多肽样品,灵敏度可明显提高。

美国生物系统公司的 HPEC 自动电泳仪 230A。高效电泳色谱仪是将凝胶电泳解析度和快速液相色谱技术的优点溶为一体的自动电泳仪,是由美国生物系统公司在电泳方面开创的又一个新性能的仪器。这种世界首创的新技术产品,为 DNA 片段、蛋白质及多肽等生物大分子的分离、回收的定量纯化技术提供了新的方法。

它既具有凝胶电泳固有的高分辨率、生物相容性的优点,又可方便地连续洗脱样品,随时观察定量和自动收集样品。在从凝胶中洗脱样品时,连续的洗脱液流载着分离好的成分,通过一个连机的检测器,并且进入积分部分收集器,检测器的定量输出在标准实验室记录器、打印器或数据系统上显示出来。

2.4.1.2 蛋白质分析仪

蛋白质分析仪(phast system)是快速高分辨分离蛋白及核酸的电泳系统,是世界上唯一的全自动化的电泳系统,它利用微型电脑自动操作,可以进行电泳过程中的各个工序,包括电泳、染色、记录及扫描。

它与其他电泳的区别:在高场强(20~2 000 VDC)下,泳动距离虽短,但分辨率较高。在电泳时

B7-33
LSD
=2

有冷却系统, 染色时有加温系统, 大大缩短了实验时间。例如, 常规 PAGE 电泳、等电聚焦电泳、SDS - PAGE 电泳只需 30 分钟; 2D - PAGE 电泳只需 40 分钟; 考马斯亮蓝染色只需 25 分钟; 银染色只需 60 分钟; 电转移只需 10 ~ 30 分钟。因为它有电脑控制分离染色过程及均匀的 Peltier element 电子冷却恒温设备, 电泳可编程序在 0 ~ 70℃ 内任何温度进行, 所以可以确保实验结果的高分辨率和高重复性。凝胶或转移膜上的二维影像, 根据电脑软件 Phast Image™ 计算, 可化作三维图谱处理, 获取最广泛的分析资料。每一次操作也可对两块胶板或膜进行分析或比较。

蛋白质分析仪可供进行各种分析性蛋白电泳及核酸电泳 (10 ~ 2 000bp), 加样量可低至 0.3 μ l, 一次可同时跑两块凝胶及进行两块凝胶的染色。电泳时, 每块凝胶可加样达 12 个。

2.4.1.3 双向电泳仪

当各种蛋白质进行分离的时候, 若应用单向分离技术, 那只是按不同的分子量进行分离, 所以有一定的局限性; 而双向分离技术, 则能很出色地去对来自同源分子量的条带按不同的电荷而分成不同的品种。

Millipore (密理博) 公司的双向电泳仪系一台整合式的系统, 而不是一般组合应用的个别装置。对于那些比较复杂的蛋白质的混合液, 需要以较大的分辨力才能去分离同形异构样品, 或是对于那些被检样品在电泳之后所生的细微变化的鉴定, 尤其适用。在进行双向 PAGE 电泳时, 它的分辨率比标准凝胶高 4 倍。

由于电泳时, 凝胶的温度和电泳的条件都经过电脑程序的精确控调, 因此能保证蛋白质的斑点恒速移动。

2.4.1.4 脉冲电场凝胶电泳系统

脉冲电场凝胶电泳系统是“高分辨”分离 DNA 大片段的有效电泳分离系统。自 Pharmacia 公司首先研制出世界上第一台脉冲电场凝胶电泳系统之后, 各厂家又相继推出不同型号的脉冲电泳仪。此类仪器主要由电源、控制单元、电泳仪和恒温水浴组成。其中控制单元可编辑及贮存许多程序。Schwarz 等于 1982 年首次用脉冲电泳仪分离了 50kb DNA 片段, 随着技术设备的逐步完善, 迄今可应用脉冲电场凝胶电泳系统有效地分离 20bp ~ 12 000kb 的 DNA 片段。电场角度可以根据需要选择从 0 ~ 360° 各种角度进行变换。脉冲交变时间由 2 毫秒至 18 小时, 可作恒定、阶段梯度或线性等变化。六角形电极套装即使在分离 DNA 片段非常大的情况下, 也能确保样品道笔直。为使实验结果的重复性较好, 在电泳仪中附加冷却系统以保证温度的恒定。

其应用范围较为广泛, 例如染色体 DNA 的分离、基因图谱分析、大分子量 DNA 的印迹和探针杂交、染色体异常的检出、各种细菌及酵母 DNA 的特征确定、肿瘤细胞的基因诊断、酵母人工染色体的电泳分析、质粒和病毒 DNA 的分析、核型电泳分析、寄生虫 DNA 的分析、限制性内切酶长度多态性分析等等。

2.4.2 层析装置

层析分离法又称色谱分离法, 是一种分离多组分混合物的有效物理方法。

层析法的种类很多:

(1) 根据其作用机理的不同, 可分为吸附层析、分层层析、离子交换层析、凝胶排阻层析和亲和层析等。

(2) 根据所使用的固定相和流动相的不同, 可分为气 - 固色谱、气 - 液色谱、液 - 固色谱、液 - 液色谱等。

(3) 根据操作条件的不同, 又可分为柱层析、纸层析、薄层层析、高效液相层析等。

由于层析法操作简便, 设备不复杂, 样品量可大可小, 易与光学仪器组成自动化系统, 所以早已成为生化分析中常用的分离分析方法。

上面简单介绍几种层析仪器装置。

2.4.2.1 气体层析仪器装置

它是一种以气体为流动相的柱层析分离装置, 它根据被气化的混合物中各组分在液相和气相之间的不同分配系数, 即溶解-解析、吸附-脱附及其亲合作用的差异而进行分离。

它适合于分析分离脂肪酸、氨基酸、糖类、甾类以及激素等物质。

它的特点:

(1) 分离效率高: 可以分离性质十分相近的组分及复杂的混合物。用毛细管柱一次可分离1 000多个组分。

(2) 灵敏度高: 可检测出 10^{-14} g 的物质。

(3) 分析速度快: 在已知分析条件下, 仅用几分钟到十几分钟即可完成一次分析, 某些快速分析只需几秒钟。目前, 由于电子计算机的应用, 色谱的操作和数据处理已完全自动化, 所以在很短时间内给予样品组分定性、定量的测定已成为现实。

2.4.2.2 标准液相层析系统

它又称低压液相层析系统, 一个完整的自动化的低压液相层析系统包括蠕动泵、紫外监测器、缓冲液选择器、梯度控制器、部分收集器、记录仪, 以及各种各样的预装柱子、收集管、阀和其它附件。它可以提纯分离蛋白质、多肽、核苷酸、激素、单克隆抗体、免疫球蛋白等。

2.4.2.3 高压液相层析装置

它是在高压条件下, 以液体流动相对样品进行柱层析的高效能分离分析的一种仪器。

色谱级的溶剂由高压泵(最高 $500\text{kg}/\text{cm}^2$, 一般输出压力为 $150 \sim 300\text{kg}/\text{cm}^2$) 压入装有细目分配物质(固定相)的层析柱。样品常用微量注射器注入(注入量一般为 $1 \sim 10\mu\text{l}$, 1%样品), 或用高压进样阀注入。加样后, 经高压泵将梯度洗脱液流经检测系统, 由记录仪自动记录, 测定后的各组分溶液流入部分收集器。

高效液相层析法分离能力强, 测定灵敏度高, 可在室温下进行, 应用面极广, 极性到非极性的、小分子到大分子的、热稳定与不稳定的化合物都可用此法测定。对于挥发性低、极性高、热稳定性差、分子量大的高分子化合物以及离子型化合物, 如蛋白质、氨基酸、生物碱、类固醇、类脂、核酸等, 尤为有利。

2.4.2.4 快速蛋白液相色谱系统(FPLC)

生物分子的纯化是目前生命科学、医学及医药工业、食品工业等中最常遇到的问题, 以前利用沉淀、离心或高效液相方法解决了部分问题, 但当遇到有活性的生物分子尤其是生物大分子时, 利用高效液相方法往往令生物分子失活, 大大的降低其回收率。这是由于高效液相系统一般利用有机溶剂, 而某些生物分子在有机溶剂下容易变性失活。另外, 一般高效液相系统的流路均为非惰性的不锈钢, 往往会在工作时脱落金属离子。而这些金属离子对很多生物分子有影响。FPLC 是根据生物分子的特性而设计的系统, 能有效而快速地纯化各种蛋白、多肽、核酸等生物分子。其应用广泛、分辨率高、重复性强。

其系统的流路均采用全惰性材料, 来确保生物分子活性不受影响, 分离速度一般在 20 分钟内完成, 流速范围 $1 \sim 499\text{ml}/\text{h}$, 最大压力为 4.0MPa 。

FPLC 能纯化各种蛋白质、酶、膜蛋白、免疫球蛋白、核酸、质粒等, 在医学中可做快速诊断检定工作, 尿蛋白、脑脊液蛋白、血液中蛋白分析; 在医药工业中, 可以进行药物下游方法的建立及放大, 瞬时检定生产情况, 产品质量检测。

2.4.2.5 微量纯化层析系统

随着生物化学及分子生物学的飞速发展, 生化研究者渐渐集中于有活性生物分子的研究。但是, 由于这些分子很多都是不太稳定的物质, 而且其含量相当小, 故要提纯这些分子并对其结构和功能等进行研究是十分困难的。不论科技人员起初有多少原材料可供使用, 但在纯化过程中, 在量和生物活性方面

的损耗,往往会使科技人员无法纯化出足够的物质作进一步的研究。

由于新的微量纯化技术的不断发展,科技人员希望有一天能得到这些含量低而极有用的生物活性分子。

Pharmacia 公司于 1991 年生产出世界上第一台专为微量纯化生物分子而设计的层析系统——“SMART” system,它是一种包括凝胶、层析柱、仪器、软件 and 智能资讯知识结合的新技术。利用微量层析方法,SMART system 可以提纯低至微克和纳克水平的分子,并能保持分子的生物活性和获得高的回收率。使科研人员能获得足够的生物活性分子,来作以后的研究。

它的流速为 $10 \sim 2\,000\mu\text{L}/\text{min}$ 。

2.4.3 光密度仪

激光光密度计是一部适用于多种电泳结果分析的仪器。无论是凝胶(凝胶块或圆盘凝胶)、印迹膜,还是放射自显图、负片、图片皆可以利用其进行精确定量及定性分析。它采用激光为光源,透射性强,线性范围广,为一般光密度计所不能比拟,而且激光光束又窄,仪器的分辨率因此而提高了。其不但能进行单向电泳结果分析,也可以进行双向电泳结果分析。该仪器在电脑的处理下,可以进行一维、二维的图像处理,二维图像还可以进行彩色打印。

2.4.4 真空印迹系统

核酸真空印迹系统是一种利用真空原理将已经分离的 DNA 片段和 RNA 从凝胶转移到膜上的仪器。它是由印迹仪和真空印迹泵组成,印迹效率接近 100%,重复性强,程序简易快捷,全部过程只需 30 分钟。核酸变性、中和、印迹等所有步骤均在印迹仪中完成,既简便又避免凝胶受损。

2.4.5 DNA 合成仪

DNA 合成仪是利用各种核苷酸合成寡核苷酸链的全自动仪器。

经典的 DNA 合成方法都是液相合成方法,费时、费力而又难掌握,固液相合成技术与磷酸三酯法和亚磷酰胺三酯法相结合后,使 DNA 的化学合成跃上一个新的台阶,尤其是 DNA 合成仪的出现,更是使 DNA/RNA 的合成成为简单易得的事情。

它的基本工作原理是:将要合成的 DNA 片段 3'末端的第一个核苷酸固定于不溶性载体上(厂家提供的载体上含有要的第一个核苷酸),然后从此核苷酸开始与另一个核苷酸进行缩合反应,其后用洗涤法除去多余的反应物和副产物,再用同样的步骤重复与下一个进行核苷酸循环的反应。每循环反应一次就接长一个核苷酸,一般一个循环只需几分钟,接长的链始终被固定在不溶的固相载体上,合成结束后,将寡核苷酸链从固相载体洗脱下来,再进行去保护基以及进一步纯化过程。

Pharmacia 公司生产的 Gene Assembler Special 是专为合成特殊寡聚核苷酸而设计的,内置标准程序供合成 DNA/RNA、荧光标记寡核苷酸、生物素标记寡核苷酸、反义寡核苷酸,以至 5'或 3'端含修饰碱基的寡核苷酸。

该公司生产的 Gene Assembler 4 Primers 上有 4 个柱子可以同时合成 4 条寡核苷酸,特别适合于需要大量寡核苷酸的实验室使用。

2.4.6 DNA 测定仪

第一台 DNA 全自动测序仪是由 ABI 公司制造的。其工作原理是:在 A、C、G、T 各反应中,引物以 4 种不同的荧光物标记于 5'端或 ddNTP 上。电泳进样时,将 4 个反应物先混合并加入同一个样品槽中。在仪器中,凝胶较下的部分是区带检测区,此检测区的检测系统由一个激光光源、一个带有 4 种波长滤光片的滤光轮片(fitter wheel)及一个光电倍增管检测器组成。激光光源来回扫描于检测区,当激

光打在进入检测区的电泳带上时, 荧光标记被激发并放出荧光讯号, 该讯号经过滤光轮片(对应波长的滤光片), 最后被检测器接收并输入计算机中。其优点是由于4种不同的碱基加在同一样品槽中, 所以加入不同样品的数量多(可达32个); 4套反应的电泳均在同一样品槽中, 电泳结果受凝胶的不均匀性影响可减到最低。

Pharmacia公司的A. L. F.TM DNA自动激光荧光测序仪, 是根据西德海德堡(Heidelberg)欧洲分子生物学实验室(EMBL)的Wilhelm Ansorge和Brian Sproat博士提出的设计方案而制造的全自动DNA测序仪。一套完整的A. L. F.系统由一个电泳单元、一个电源单元、一台运行A. L. F.管理软件的计算机以及一个包括灌胶和运行测序仪所需各种物品在内的附件盒组成。

A. L. F.TM DNA自动激光荧光测序仪的原理是基于普通的Sanger双脱氧法, 测序反应仍和手工测序一样进行, 不过DNA片段是由荧光标记的引物或dUTP来作标记的, 而不是采用放射性标记。测序时再将4种反应物加载到4个分开的样品槽上, 不同大小的片段则在从胶上电泳下去的过程中被分开。在胶底部有一个由激光源和探测器阵列组成的探测系统。每个电泳通道前都有一个光探测器, 激光则在由40个光探测器组成的探测器阵列前从凝胶的一侧穿越到另一侧。当片段(电泳带)迁移到探测区域并遇上激光时, 荧光标记便会被激发, 由电泳带发出的光被光探测器检测到并被作为一个信号传送给计算机收集和保存。由于是按特定的顺序上样的。如A、C、G、T, 所以由第一个(最左边)探测器检测到的信号代表“A”, 而由第二个探测器检测到的信号则代表“C”, 等等。电泳结束后, 计算机便可以搜到一套完整的信号(原始数据), 加以处理后就可以得到最终的序列。无论是打印或是屏幕显示, 原始数据和处理后的数据均能以彩色的色谱图形式显示出来, 表示4种碱基的曲线还可以被叠在一起。与手工测序时4条电泳带在放射自显影底片上彼此分开的情况相比, 色谱图可以使数据被更好地加以分辨并且更容易解释。其优点: 电泳时间短, 只需3.5小时, 凝胶的质量仍可保持得相当完好, 故可以再作一次电泳而不必担心损失分辨率; 仪器使用的是固定的激光源和灵敏度的探测器, 而且因为只用了一种染料, 无需像旋转滤光片轮等来分辨不同波长的发射荧光, 所以不必使用强激光激发荧光标记来获得最大强度的信号, 激光源的输出功率可以设置得低到3mW, 激光源的寿命可长达10 000小时; 因为采用了获得专利的恒温板设计, 使整个测序凝胶的温度保持均匀与恒定, 从而消除了任何由于温度变化对片段迁移所造成的不良影响, 保证了结果的高度重复性。

Base Satation系统运用单一荧光引物自动进行双脱氧链终止法分析顺序, 电泳、检测条带以及碱基分析都自动进行, 工作人员需做的只是进行反应及制胶。

它的工作原理: 荧光素标记的DNA上样至胶上后与标准电泳方法一样, 按其大小分离, 泳动中的DNA通过CCD(charged couplad device, 电荷耦合元件)照相机前, 从而得到一张显示条带的照片。

为使DNA条带显色, 100W白炽灯源, 先过滤至荧光素的激光波长, 然后照向胶面。受激发的荧光素发出的光被照相机的CCD晶片接收, CCD晶片是由25 000个独立的检测器组成的列阵, 每一个检测都能捕获被释放的光子, 其结果使照相机获得一条条水平的DNA条带荧光信号——也就是顺序的阶梯。

照相机在电泳过程中摄取胶上条带图像, 合并成一行条带图。每个图像得到后, 仪器自动进行条带定位, 分析形式, 校正胶中条带, 非常精确的确定碱基。为保证测定时间尽量快, 该系统在分析运行同时收集数据, 仪器运行结束后, 数据分析也完成, 整个胶就显示成一张荧光图, 它就和传统顺序阶梯放射自显影图一样。另一个优点是无需等到运行结束后才看到数据结果, DNA条带向胶下端移动过程中所得到的条带图, 即时显示在屏幕上, 从屏幕上可获知顺序化学反应的质量情况。

2.4.7 PCR仪

PCR(polymerase chain reaction)仪; 也称DNA热循环仪、基因扩增仪, 它是使一对寡核苷酸引物结合到正负DNA链上的靶序列两侧, 从而酶促合成拷贝数为百万倍的靶序列DNA片段, 它的每一循环包括在三种不同温度进行DNA变性、引物复性、DNA聚合酶催化的延伸反应的三个过程。

PCR 仪从操作上可分为两大类：一类是安装机器手的半自动化，一类是用微处理机控制的自动化。

各类 PCR 仪的温度控制又有几种不同：①用液体加热和冷却：在 PCR 仪上设有三个不同温度的水浴槽；②电阻加热/液体冷却：在 PCR 仪上的加热块是电阻丝，它用微机来控制恒温，冷却部分是液体循环在启动压缩泵工作下来实现的，可快速致冷；③电阻加热/半导体致冷。

PCR 仪主要应用于基础研究和应用研究等许多领域，如基因分析、序列分析、进化分析、临床诊断、法医学等等。

现国内外许多厂家都有 PCR 仪，例如美国帕金·埃尔默 (Perkin Elmer) 公司生产的 TCI、480、9600，瑞典发玛西亚 (Pharmacia) 公司的 Gene ATAQ™ 基因扩增仪等，其中以 PE 公司的 9600 PCR 系统最为先进，特殊设计的薄壁微型 (0.2 μl) 反应管在反应过程中，使得热能可以在瞬息间从加热元件被输送至样品内，系统平衡时间亦因此而相应得到缩减，无须添加油层以杜绝蒸发，同时减少了悬浮气溶胶的交叉污染，其控温范围在 4~99℃ 间 (增量 0.1℃)，以多区域薄膜发热组件对样品均匀加热，并以多道冷却剂流动管路装置提供均衡冷却，还设有温度核实系统，以精确地控制样品温度，而不是像以前的仪器单纯地控制加热或冷却元件的温度。

2.5 核素实验室

人们把放射性核素作为示踪原子，应用于医学界，从而揭开了生物体内和细胞内的理化过程的奥秘，阐明了生命活动的物质基础，例如蛋白质的生物合成、核酸结构测定、生物大分子代谢转变的化学途径、转变的速度、代谢产物在体内及细胞内的位置，以及维生素、激素等重要物质的定量、定性测定，药物在体内的代谢及途径。放射性核素是自显微镜发明以来，成为生物学领域研究的非常有效的工具之一，同时也是生物科学史上的一个里程碑，现在它不仅仅应用于医学、农林界，而且还广泛地应用于工业、食品、国防等其他科学领域。

由于放射性核素具有极不稳定的原子核，能发射出射线，而它又很容易地被探测器所检测，利用这一特征来研究生命细胞的新陈代谢、物质的运动和规律。

标准的放射性核素实验室基本分为放射性核素操作实验室、放射性核素测定室。

放射性核素操作实验室的仪器设备一定要与一般实验室的仪器设备分开，单有自己的一套仪器设备。

2.5.1 放射性核素操作实验室

放射性核素操作实验室是进行与放射性核素有关的实验操作区域，例如 DNA 序列的测定、分子的杂交、核酸的体外标记等实验。

放射性核素操作实验室的仪器基本与常规实验室相同。其主要有：DNA 序列测定的电泳系统、纯化标记探针的层析系统、离心机、分子杂交仪、恒温水浴、多用振荡摇床、封膜机、射线警报探测器、X 射线曝光盒等。

1. 分子杂交仪：

是专门用来进行已知比放射性强度的核素标记核酸和已知量的同一起来源的变性核酸膜杂交的仪器，它有滚筒式和板式两种，可定时、定温、定旋转速度等功能。

2. 射线警报探测器：

自动检测空气中射线强度的警报探测器，它是用在薄云母目的窗口的 GM 管自动检测电离射线。GM 管是完全封闭在仪器内的，当一种射线或电离射线的粒子撞击 GM 管时，被自动检测，由闪光计数灯和计量表显示出来。它应用范围较广，可以用于跟踪探测放射性核素的强度和位置。

3. X 射线曝光盒：

是广泛应用于放射自显影中的器械。在放射性核素蜕变过程中,其放射出的核射线可以与照像机乳胶片发生作用而产生电子,其电子使乳胶中的化学成分溴化银还原成金属银。根据这一原理,在放射性核素示踪实验中将带有放射性的样品杂交膜与感光灵敏的X线片紧密接触而使后者感光,经化学显像后,在乳胶片中出现一定形态的黑色影像,这便是核射线在X线片留下的痕迹。其放射性杂交膜与感光材料是在X射线曝光盒中进行感光过程的。这样,在分子生物学中,利用放射性标记的探针去寻找印迹载体上能与之结合的杂交分子带。

2.5.2 放射性核素测定室

1. 液体闪烁计数器:

是根据辐射线与某种化合物(闪烁剂或荧光剂)相互作用而产生荧光的闪烁或闪烁现象,利用光电倍增管把闪烁的光转变为电脉冲,经过放大并用定标器记录下的一种探测器。它的主要特点是闪烁体为液体,由有机闪烁剂溶于适当的溶剂中而组成。放射性样品溶于或吸附于固体支持物上浸泡在由溶剂以及第一闪烁剂和第二闪烁剂组成的闪烁计数体系中。放射性粒子在与溶剂分子碰撞时,射线的大部分先被溶剂分子所吸收并使之受激,溶剂分子从激发态回到基态时,所释出能量传给闪烁剂,闪烁剂从激发态复原时将多余的能量以光子形式释出。不同闪烁剂有不同的发射光谱,若发射光谱与光电倍增管的光谱响应相匹配则光子到达光阴极后形成光电子,经放大后输出脉冲至记录系统,如光谱匹配不良可加第二闪烁剂,后者吸收第一闪烁剂发出的光子释放出本身的特征光子,使光谱匹配改善。

Pharmacia的1400液闪计数器,对样品的全部能谱数码化处理后加以分析计算,有与传统的能窗法完全两样的测量标准。根据探头及样瓶材料中的闪烁与液体中的闪烁所表示的不同特性,脉冲形状分析器(PSA)可以分清本底脉冲和样品脉冲。另外,还应用脉冲高度比较器(PAC)来防止串音信号进入本底,进一步提高了仪器的性能。测量各种类型的样品,使用不同规格的样瓶,如小体积、低活性、多标记、微型管等。以往的计数器产品,须加适配管才能测量微型离心管或Eppendorf管,这样就会引起本底计数的增加。现在可以直接对微型离心管或Eppendorf管进行计数,降低实验成本,一次可测样品量为336~1248个。

2. 数字式放射自显影分析仪:

数字式放射自显影分析仪(the digital autoradiograph, DAR)是一台新型的测定非常灵敏的电离放射探测器。它可用于放射性核素标记的TLC板、醋酸纤维素薄膜、电泳胶、以及任何表面带有放射性电离的分布中,例如,HPLC柱的馏分、结合在滤纸上的受体分析、印迹、DNA序列、蛋白质的分布和组织切片等的测定、定量、定位、放射性电离的二维分布的强度。DAR是一个二维的、定位灵敏的电网均衡室,大小有20cm×20cm,能测定极其灵敏的区域,空间分辨力非常高。由 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^{32}P 以及 γ 射线发射体(^{99}Tc 、 I)标记的化合物,其 γ 射线被内部探测器的光电效应和康普顿效应转变成电子。

探测器由三层水平网组成,即X、Y和Z面。中间水平面(Z面)处于大约1800V的高压位置,该室充满了10磅的气体(90%氩和10%甲烷)。实际上从电离射线进入该室中Z面产生电荷信号,该电荷信号相互垂直地穿过高于和低于Z面的另外两个X和Y面,探测器从X和Y面接收 α 粒子、 β 粒子和 γ 射线。信号从三网面穿过进入前置放大器(PA)、脉冲发生器(PS)、数字电路检测器(DL)到数字模拟变换器(ADC),最后将数字贮存于计算机内。

该仪器还可以进行多样品的三维放射性分布的检测,即,放射性斑点在X和Y面的位置,以及在Z范围内斑点散射出放射线总量的彩色模样。X-Y面可以在任何角度和任何距离中进行观察。探测器系统的效率是非常高的,可以检测到接近100%的像 β 和 α 粒子。

2.6 细胞培养室

细胞培养室不同于其他实验室,由于细胞培养是在无菌条件下进行操作,这就要求工作环境和实验

条件保证无微生物污染并不受其它有害因素的影响。

细胞培养实验室包括：无菌操作室、实验培养室、清洗消毒室，如有必要的话还要增加同位素和暗室。

由于许多实验室的条件有限，在一间房内划分几个不同功能区亦可进行实验操作。但要将无菌操作室设在室内较少走动的里侧，实验和观察活动可与培养在同一室内，而清洗和消毒最好装置在另一室中，如难做到也应设在靠出入口侧。

2.6.1 无菌操作设施

主要有无菌操作室、超净工作台。

无菌操作室：用于进行细胞培养和各种无菌操作的实验室，与外界隔离一般为5平方米左右，最小也要能容下两人同时操作。该室密闭不能通风，湿度和温度很高，紫外线消毒后生产的臭氧，有害于工作人员的身体健康，所以该室要装恒温恒湿的空气调节器。

缓冲间是其它实验室与无菌操作室隔离的中间区域，它能保护无菌操作的环境，可与更衣间为同一间，其间设有吹风机，可将操作人员进入无菌操作室之前进行吹风消尘。还可设有恒温培养箱和小型低速离心机等，它可以同时和几个操作间相通。

另外无菌操作室应避免日光直射，天花板不宜过高，一般为2.5米左右，以确保紫外线的消毒作用。

超净工作台：是细胞培养不可缺少的无菌操作装置。其原理是利用鼓风机驱动空气，经过高效滤器净化后，而通过工作台面，使实验操作区域成为无菌的环境。超净台按气流方向的不同大致有几种类型：

(1) 侧流式：净化后的气流，从左侧或右侧通过工作台面，流向对侧，也有从上往下或从下往上流向对侧流动，它们都能形成气流屏障而保持台面无菌，它的缺点是：在净化气流和外边气体交界处，可因气流的流动出现负压，使少量的未净化气体混入，而造成污染。

(2) 外流式：气流是面向操作人员的方向流动，从而保证外面的气体不能混入。它的缺点是：在进行有害物质实验时，对操作人员不利，但可采用有机玻璃把上半部遮挡起来，使气流经下方流出。

2.6.2 温育和贮存区

该区主要为CO₂培养箱、旋转温箱、冰箱、烘干箱、液氮罐等区域。其环境要求虽不如无菌操作区那么严格，但也需清洁、无灰尘，空气湿度不能大。

(1) 电热恒温培养箱：哺乳动物离体细胞和体内细胞一样，都需要在恒定温度下才能生存，温差变化一般不应超过0.5℃，因此要求培养箱应具有较高的灵敏度。

(2) 二氧化碳培养箱：它能恒定地提供一定量的CO₂，通常为5%，用来维持培养液的酸碱度，也就是pH值。培养室内与外界应保持通气。

(3) 电热烘干箱，主要用于烘干和干热消毒玻璃器皿。在干热消毒时，温度一般要达到160℃，有的如核酸用具要升温到250℃，由于升温高，而且所需消毒的玻璃器皿数量较多，因此应选择比较大型规格的电热烘干箱(650mm×500mm×500mm)。

(4) 冰箱：

普通冰箱：温度为4℃，主要贮存细胞培养用的溶液和药品，如培养液、血清、生理盐水、消化液等。

低温冰箱：温度为-20℃，主要贮存血清、酶、消化液和配制好的抗生素。注意：冰箱内禁止存放挥发、易燃、易爆以及有害的药品。

(5) 液氮罐：液氮温度为-196℃，主要用于冷冻贮存细胞、细胞株、菌株、组织和器官标本，它

具有经济、省力和较好地保持细胞生物学特性的优点。

根据实验室的需要,应备置 35L 或 50L 为长期贮存罐,10L 的小型液氮罐由于行动方便,为定期添补液氮时之用或临时贮存之用。

2.6.3 观察和研究室

根据研究内容的需要,可设置不同的实验室。培养细胞要每天进行观察、了解细胞的生长状况,所以需配置显微镜,根据需要还可配制破碎细胞组织的匀化器、基因导入装置等。

(1) 显微镜:用于观察了解细胞的生长状况,以便进行调整,如发现污染,要及时采取补救措施和处理方法。显微镜最好为倒置显微镜,上面要附带照相装置,便于摄下细胞的生长状况。

(2) 匀化器:用于破碎组织和细胞的装置。这些装置有手动的玻璃匀浆器或电动的玻璃匀浆器、叶片式(搅拌刃)匀浆器、超声波式的匀化器,由于这些匀浆器速度慢、破碎不均匀,时常摩擦产热。现在出现一种新型的匀化器,它可以连续柔软破碎细胞和组织,大块的组织被稳定而柔软地匀化,匀化后的细胞核、线粒体、细胞质溶胶内的酶、蛋白质等的破坏与变性极少。

转速最高可达 1 200r/min,为数码控制。

(3) 基因导入装置:是一种高压电脉冲仪。通过高压电脉冲穿孔打洞,将 DNA、蛋白质等生物大分子物质高效地转入宿主细胞中(包括真核细胞、原核细胞)。众所周知,将 DNA 转入细胞中,是研究基因结构与功能的重要前提条件之一。其与用化学方法进行 DNA 分子转化相比较,脉冲电穿孔法具有操作简便、节省时间、重复性好、转化效率高等优点,因而在分子生物学研究领域,逐渐受到人们重视。

(4) 离心机:培养细胞,经常需要制备成细胞悬液,对细胞进行洗涤,为了去除不需要的药物或不利于细胞生长的悬液进行离心处理。离心速度一般 1 000r/min。

(5) 天平:对于细胞培养来说,天平是必不可少的,一般需要有普通天平、扭力天平、电子分析天平。

2.6.4 清洗和消毒

主要进行培养器皿的洗刷、浸酸、消毒、蒸馏水制备等。注意,清洗室、消毒室要与其它室分开,避免因潮湿和洗液酸气而影响其他实验。

(1) 纯化水装置:细胞培养对水的质量要求极高,现代的实验室都使用高纯度的水来配制各种培养用液。即使玻璃器皿的冲洗也要使用纯化水。在细胞培养中,过去很少使用离子交换纯水装置,因为它不能有效去除有机物,超纯水制造装置采用了紫外灯后净化柱,并最大限度地除去水中的有机物,经纯化后的水电阻率为 18.2MΩ/cm³,终端因使用 0.22μm 孔径的过滤器,所以能将细菌和 0.22μm 以上的微粒子完全除去。

(2) 洗刷装置:在细胞培养工作中,大量的玻璃器皿需要洗刷,由人工洗刷,既费时又费力,超声波洗涤器和洗刷装置有效地解决了这一问题。

(3) 抽滤装置:各种培养液和许多药液,由于不能高压消毒,只能使用过滤的方法进行除菌消毒处理。这就需要真空压力泵以及与其连接的各种滤器。滤器有 Zeiss 滤器、玻璃滤器、微孔滤膜滤器。目前,许多实验室都使用微孔滤膜滤器、针夹式细菌过滤器。

真空过滤装置可以快速有效地消毒去除缓冲液、染料或生物介质等水溶性液体中的细菌并使之澄清。

2.7 暗室

在分子生物学的研究领域中,暗室不仅是处理照像乳胶和感光材料的场所,例如,凝胶照像、冲洗

放大和放射性自显影的 X 线片的处理；它还能进行核酸与荧光物质溴化乙锭结合后在紫外线下电泳结果的观察操作等等。

暗室中用于分子生物学实验的仪器和用具有：照像装置、放大机、曝光箱、翻拍仪、自动冲片机、紫外线照射设备、X 线曝光盒、Ceiger 计数器、显影罐和暗袋等等。

2.8 冷室

在生物化学和分子生物学实验中，例如，蛋白质等生物大分子的提取、分离、纯化，都要求在低温环境下进行操作。可是在冰浴中、在冷柜中，有时地方太小，这就需要一个冷室，一般的温度为 4℃ 左右。

在冷室中可以进行柱层析、电泳、生物大分子的提取和分离、硫酸铵沉淀蛋白质、各种物质的透析以及暂时贮存生物制品等等。

(李尹雄 余 跃 文 邱长春 审)

参 考 文 献

- [1] 张立名, 等. 现代生物生化分析原理. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1992
- [2] 陈惠黎, 等. 生物化学检验技术. 北京: 人民卫生出版社, 1990
- [3] 曹凯鸣, 等. 核酸化学导论. 上海: 复旦大学出版社, 1991
- [4] 张启元, 等. 现代生物学实验技术. 北京师范大学出版社, 1991
- [5] 张德安, 等. 生物大分子实验手册. 吉林大学出版社, 1991
- [6] 杨守礼, 等. 液体闪烁测量技术的进展与应用. 北京: 科学出版社, 1987
- [7] 鄂 征, 等. 组织培养技术. 北京: 人民卫生出版社, 1986
- [8] 朱 平, 等. PCR 基因扩增实验操作手册. 北京: 中国科学技术出版社, 1992

3. 分子生物学实验室常用技术

为了避免重复,本章将包括分子生物学实验中的常用技术以及较普遍应用的实验方法,由于这些技术方法,在一般生化书籍中可以查到,本书仅作扼要介绍。

3.1 核酸的纯化

分离提取的核酸样品,由于不同的实验要求,需用不同的方法进一步纯化,例如超速离心、柱层析、分子杂交、免疫沉淀、凝胶电泳等,这些方法将在核酸分离、提取的有关章节加以介绍。在此仅介绍从核酸溶液中去除蛋白质的酚/氯仿抽提法。这个方法的标准程序,是酚抽提一次,酚/氯仿(1:1)抽提一次,氯仿抽提一次,如果情况需要可再重复几次。

这个方法的基本原理是:交替使用酚、氯仿这两种不同的蛋白质变性剂,以增加去除蛋白杂质的效果。因为酚虽可有效地变性蛋白质,但它不能完全抑制 RNA 酶(RNase)的活性,而且酚能溶解 10%~15%的水,从而能溶解一部分 poly(A) RNA。为了克服这两方面的局限,混合使用酚与氯仿,对于 RNA 提取,显得更加重要,氯仿还能加速有机相与液相分层。去除植物色素和蔗糖。在氯仿中加入少许异戊醇的目的在于减少蛋白质变性操作过程中产生气泡。最后用氯仿抽提处理,是为了去除核酸溶液中的微量酚。如果下一步骤中酶反应的条件要求严格,最可靠的方法是再用水饱和的乙醚抽提一次,以彻底去除核酸样品中的微量酚与氯仿,然后在 68℃水浴中放置 10 分钟使微量乙醚蒸发掉。

3.1.1 酚/氯仿抽提核酸溶液的制备

如果制备好的 DNA 或 RNA 样品容积较小,一般置于 1.5ml 的 Eppendorf 离心管中,若容积较大,可置于 7ml 到 50ml 的离心管中。试验前应准确测量样品的容积。

(1) 在每一样品中加入等容积的酚或酚/氯仿溶液。

(2) 将管中内容物混合成乳状液,若 DNA 片段小于 10kb,可以振荡混合;若大于 10kb,为了获取较大片段的完整 DNA,应避免机械剪切。对于大容积样品,应先封严离心管的管盖,然后反复轻柔地转动离心管,使之形成乳状液。在 Eppendorf 管中的小容积样品,可用手指反复弹动管壁或上下颠倒试管使之充分混合,切勿使用高速的振荡器。

(3) 室温下,于 Eppendorf 离心机中 12 000r/min 离心 1 分钟或 1 600g 离心机离心 3 分钟;如果蛋白质较多,或分层不清时,可 10 000r/min 离心 10 分钟。

(4) 吸取上层水相层移置于一个新的离心管中,对于大分子量 DNA 样品应使用特制的稍大口径的吸管吸取。若样品容积小于 200 μ l,可用一个套在移液枪枪头上的拉长细硅胶管,吸弃下层的有机相。为增加核酸回收量,可以返抽提,在有机相中加入等容积的 TE 溶液(pH7.8),充分混匀后,离心,吸取上层水相层,与第一次水相层混合。

(5) 加入等容积酚/氯仿(体积比 1:1)溶液,重复步骤(2)、(3)、(4)。如果水相层和有机层的界面不甚清楚,说明其中含蛋白量较高,可采用多次酚/氯仿溶液抽提,并可适当加大离心速度和/或延长离心时间。

(6) 加入等容积氯仿溶液,重复步骤(2)、(3)、(4)。

(7) 加入等容积的水饱和乙醚,混匀,静止 2~5 分钟待有机相与水相分层,此时分界面是一个向上的凸形液面。注意:由于乙醚比水轻,此时含核酸样品的水相在下层(乙醚高度挥发、易燃,应在通

风橱中工作)。

(8) 移弃上层乙醚。

(9) 重复步骤 (7)、(8)。

(10) 将核酸样品溶液置于 68℃ 水浴中, 保温 5 ~ 10 分钟, 不时用手指弹动管壁, 可见许多小气泡冒出, 使乙醚充分蒸发掉; 也可在溶液表面吹氮气流 10 ~ 30 分钟, 以去除乙醚。

(11) 乙醇沉淀核酸 (后述)。

注意事项:

(1) 若是大分子量 DNA 可以将样品在预冷的 STE (pH7.8) 中充分透析。以减少对大分子量核酸的机械损伤。

(2) 乙醚在室温下应贮存在通风橱中或试剂架上。千万不能放入冰箱中, 因为冰箱自动化霜后启动打火, 可引起挥发的乙醚发生爆炸。

3.1.2 酚的重蒸馏与水饱和

一般酚是透明无色的结晶。酚结晶如呈现粉红色或黄色, 表明其中含有酚的氧化产物如醌、二酸等。变色的酚溶液不能用于实验, 因其中的酚氧化物可破坏核酸的磷酸二酯链, 并引起 DNA 链的交联。在使用前必须进行重蒸馏以除去氧化产物。

3.1.2.1 酚的蒸馏

酚具有高度腐蚀性, 易引起严重的烧伤, 故在涉及酚的所有实验操作中, 试验者应该戴塑料或乳胶手套和防护眼镜。一旦皮肤沾污了酚, 应立即用水彻底冲洗, 并用肥皂或稀释的苏打液洗涤。切记不要用酒精擦洗。

材料:

2 000ml 的磨口长颈瓶
适合大小的电热帽
200℃ 温度计
尖端接头可插温度计的蒸馏接合器
约 45cm 长的冷凝器
可调变压器
石棉布 (用于包裹长颈瓶上端)
沸石 50 颗左右

操作步骤:

- (1) 在通风橱内安装固定好蒸馏装置。
- (2) 65℃ 水浴中, 将固体酚溶解, 加水至 10% (200ml 水/2kg 酚) 可加速酚溶解。
- (3) 用漏斗将 2kg 酚倒入蒸馏瓶中, 加入 50 颗沸石。
- (4) 将石棉布缠绕长颈瓶的上端, 开始加热, 通过变压器、调节加热的效力。
- (5) 在 120℃ 时, 蒸馏冷凝管中流出较混浊的液体, 弃之。
- (6) 到 160℃ 时, 出现清澈的液体纯酚, 开始收集, 维持加热, 调节变压器控制电热帽的加热功率, 温度不能超过 180℃。
- (7) 当蒸馏瓶中剩下约 100ml 酚时, 应停止加热, 逐渐冷却。要小心, 蒸馏残留物易爆炸。
- (8) 停止蒸馏后拆除装置, 将残留物倒掉, 用热水洗刷瓶底的残渣, 然后用酒精洗净。重蒸馏的酚以 200ml 一瓶进行分装, -20℃ 保存, 可在几年内保证酚无氧化。

3.1.2.2 酚的水饱和

酚的水饱和液应是抽提核酸样品所溶解的缓冲液, 一般常用 0.5mol/L Tris·Cl (pH8.0) 缓冲液配制。

材料:

重蒸馏的酚

0.5mol/L Tris·Cl (pH8.0)

0.1mol/L Tris·Cl (pH8.0), 0.2% β -巯基乙醇

8-羟基喹啉。

操作步骤:

(1) 从低温冰箱中取出重蒸酚后, 室温放置一段时间, 移至 68℃ 融化, 勿立即放入 68℃ 水浴中, 以防玻璃炸裂。

(2) 加 8-羟基喹啉至终浓度为 0.1% (W/V), 溶解混匀, 此时溶液呈黄色, 小心将酚倒入分液漏斗中。

(3) 加入等容积的 0.5mol/L Tris·Cl (pH8.0), 反复混匀后, 静置分层; 放出下层的黄色酚液, 弃上层。

(4) 加入 0.1mol/L Tris·Cl (pH8.0), 0.2% β -巯基乙醇溶液, 重复步骤 3。

(5) 反复重复步骤 4, 直至酚相中的 pH > 7.6 ~ 7.8 (以 pH 试纸测定)。

(6) 将酚装入棕色试剂瓶中, 加入 10% 的缓冲液 (0.1mol/L Tris·Cl, pH8.0); 置 4℃ 保存 1 个月以上。如液内黄色消失或呈粉红色, 表明 8-羟基喹啉耗尽并有酚氧化物存在, 不能再使用。

酚的氧化随着 pH 值的增高而增加, 若平衡缓冲液的 pH 值大于 8, 应该根据实验需要临时饱和酚, 不要贮存。对于 RNA 的提取, 也应使用新鲜饱和的酚。

在酚中加入 10% 的间甲酚 (需先进行重蒸去除邻甲酚), 可使酚的熔点降低并能加强酚对蛋白质的变性能力。因此酚溶液最好按下面的容积比例配制: 酚: 水: 8-羟基喹啉: 间甲酚 = 50:10:0.05:7。

在酚溶液中添加 8-羟基喹啉有以下优点: ①减少酚的氧化; ②提供颜色 (黄色) 指示, 使酚抽提时分层界面易于鉴别, 同时也指示酚的贮存时间与质量; ③抑制 RNA 酶活力; ④螯合金属离子并抑制 DNA 酶作用; ⑤在 RNA 提取时, 使用 RNA 酶抑制剂氧钒核糖核苷复合物 (vanadylribonucleoside complex, VRC) 可与 8-羟基喹啉反应, 使酚溶液由黄色变成黑色, 这样可以从酚的颜色变化判断 VRC 是否被除净。

3.2 核酸的浓缩

若溶液中 DNA 含量低, 并且容积较大, 不易进行乙醇沉淀。此时可以采用以下两种方法, 减少溶液容积并浓缩核酸。

3.2.1 固体聚乙二醇 (PEG) 吸水浓缩法

(1) 将 DNA 溶液装入透析袋, 透析完毕后, 置于一平皿中。

(2) 加入适量 PEG (polyethyleneglycol, 分子量 6 000 ~ 12 000) 包埋透析袋。

(3) 待 PEG 吸湿 (大约 10 分钟) 后, 再换新的 PEG 颗粒包围透析袋, 重复步骤 (2)、(3), 直到容积合适。

(4) 用 TE 悬浮透析袋, 漂洗净表面的 PEG。

(5) 取出透析袋中的 DNA 溶液, 分装贮存备用, 或再用乙醇沉淀回收 DNA。

3.2.2 丁醇抽提浓缩法

正丁醇或仲丁醇抽提水溶液时, 可将溶液中的水吸入有机相, 而溶液中的溶质 (DNA) 则不会分配到正丁醇中去。利用该特性, 可以显著减少 DNA 溶液的容积。

(1) 在 DNA 溶液中, 加入等容积丁醇, 充分混合。注意: 加入过多的丁醇会使溶液中的水迅速丢

失, 而导致 DNA 沉淀。

(2) 以 1 600g 离心 1 分钟, 弃上层有机相。

(3) 重复步骤 (1)、(2), 以达到所需容积。

(4) 用水饱和的乙醚抽提两次, 可去除微量丁醇, 然后在 68℃ 条件下, 蒸发去除微量乙醚。

注意: 采用丁醇抽提, 并不能去除溶液中盐类, 盐浓度会随着水的减少而升高。故抽提后需要透析调节缓冲液中的盐浓度或直接利用乙醇沉淀回收 DNA, 再溶于所需的缓冲液中。

3.3 核酸的沉淀

沉淀是浓缩核酸最常用的方法, 其最大优点是通过核酸沉淀来改变核酸的溶解缓冲液及重新调节核酸在溶液中的浓度, 可去除溶液中某些盐离子与杂质, 在一定程度上纯化核酸。

核酸是多聚阴阳离子的水溶性化合物, 它与钠、钾、镁形成的盐在许多种有机溶剂中不溶解, 但也不会被有机溶剂变性, 常用的有机溶剂有乙醇、异丙醇、聚乙二醇等。

虽然核酸的沉淀操作非常简单, 但在实际工作中, 许多实验者在一些小问题上失误, 常可导致整个实验的失败。因此, 有必要对核酸沉淀涉及的原理、要素、各种方法的应用, 以及某些操作经验等做扼要的介绍。

3.3.1 核酸沉淀的盐类及浓度

核酸可与许多 1 价、2 价阳离子形成盐类, 在核酸沉淀中使用最多的是阳性 1 价离子, 其中包括钠、钾、铵和锂等离子, 但 2 价离子镁的沉淀效力最高。每一种离子的选择均有各自的优缺点和应用范围, 并且在不同的有机溶剂中其使用的浓度也不一样 (表 3-1)。

表 3-1 核酸沉淀各种盐类的使用浓度

盐	贮存液 (mol/L)	终浓度 (mol/L)
MgCl ₂	1	0.01
NaAc	3.0 (pH5.2)	0.3
KAc	3.0 (pH5.2)	0.3
NH ₄ Ac	10.0	2.0~2.5
NaCl	5.0	0.2
LiCl	8.0	0.8

醋酸钠为沉淀 DNA、RNA 的最常用的盐类, 终浓度为 0.3mol/L (pH5.0)。

氯化钠对于含有 SDS (十二烷基硫酸钠) 的 DNA 样品, 最好选用 NaCl 沉淀, 终浓度为 0.2mol/L。SDS 在 70% 的乙醇中可保持溶解状态, 不与 DNA 共沉淀, 从而可通过弃上清去除这种去污剂, 避免对以后酶促反应的影响。

醋酸铵 (10.0mol/L): 四种三磷酸脱氧核糖核苷酸 (dNTP) 在醋酸铵盐溶液中, 具有较高的溶解度, 通过乙醇沉淀 DNA, 可去除大部分 dNTP。有人证明, 在 2~2.5mol/L 醋酸铵存在下, 连续两次乙醇沉淀, 可从 DNA 制品中去除 99% 的 dNTP, 而 DNA 回收量在 90% 以上。所以对于反转录酶、DNA 聚合酶、Taq 酶及末端转移酶、磷酸化酶催化的生化反应, 为去除未掺入核酸的 dNTP 和 NTP, 普遍使用铵离子沉淀核酸。尤其是在 DNA 探针缺口翻译后, 用以去除 α -³²P-dCTP 或 α -³²P-dATP, 非常方便、有效。但需要注意的是, 铵盐是 T₄ 噬菌体多核苷酸激酶的抑制剂, 在 DNA 需进行磷酸化和末端补平反应前, 不能采用铵盐沉淀。

氯化锂 (LiCl, 8.0mol/L): LiCl 在乙醇中的溶解度非常好, 即使在样品与 2~3 倍于它的乙醇混合液中, 0.8mol/L 的 LiCl 也不与 DNA 共沉淀, LiCl 的另外一个优点, 是高浓度 (0.8mol/L) 时可直接沉淀大分子量的 RNA (包括 rRNA 与 mRNA); 故常应用于 RNA 的沉淀。在质粒 DNA 提取分离时, 可利用该特性去除 RNA。注意: Li^+ 对反转录酶有抑制作用, 而 Cl^- 能抑制蛋白质合成的起始步骤, 所以在 mRNA 反转录和体外翻译实验前不要使用 LiCl 沉淀 DNA 和 RNA。

醋酸钾 (KAc): KAc 的沉淀效果与 NaAc 相同, 但核酸的钾盐形式很难溶于含 SDS 的溶液, 在下一步溶解核酸沉淀的缓冲液中含有 SDS 的情况下, 则不要选钾盐的方法沉淀核酸。例如用 Oligo (dT)_n 纤维素树脂柱分离 mRNA 时, 有 SDS 存在时需要使用醋酸钠沉淀。而在体外翻译实验前的 RNA 沉淀应选用 KAc, 对含 SDS 的 RNA 在进行体外翻译前沉淀, 需要分两步进行: 先用 NaAc 沉淀, 去除 SDS; 然后用 KAc, 用 K^+ 取代 Na^+ 。

氯化镁: Mg^{2+} 是核酸沉淀中的有效离子, 当核酸浓度低于 $0.1\mu\text{g/ml}$ 或长度小于 100 个核苷酸时, 加入 10mmol/L Mg^{2+} , 可明显提高核酸沉淀的回收率。有文献资料证明, Mg^{2+} 对核酸的沉淀, 并不需要低温条件, 即使在室温条件下, 10 分钟以内也比 NaAc 在 0°C 沉淀 DNA 效率高 2 倍。人们不太习惯应用 Mg^{2+} 沉淀 DNA 可能有两个原因: 其一是 MgCl_2 沉淀的 DNA 很难溶解, 尤其是对哺乳动物细胞的大分子量 DNA; 其二是含微量 Mg^{2+} 的 DNA 溶解后在保存过程中易降解, 因为 Mg^{2+} 是 DNA 酶的激活剂。事实上, 按以上操作, 则这两种情况极少发生。即 DNA 沉淀后用 75% 酒精漂洗两次, 基本上可以去除微量 Mg^{2+} , 对于大量的 DNA, 可先用恰当体积的水溶解, 然后补充 Tris·Cl 与 EDTA 至 TE 浓度即可解决, 因此, 可使用 Mg^{2+} 沉淀核酸, 操作方便且效率高。

另外, DNA 溶液中高于以上表格的盐浓度, 应该用 TE (pH8.0) 进行稀释, 以避免盐与 DNA 的共沉淀。而大于 10mmol/L 浓度的 EDTA 或磷酸盐肯定会在乙醇中沉淀, 对于这两种情况, 需要先透析或过柱去除盐离子, 然后再沉淀。

3.3.2 核酸沉淀的温度与时间

几乎所有书籍都强调, 核酸沉淀均应严格地在低温条件下进行, 并推荐要在 -20°C 或 -70°C 条件下放置几小时, 甚至过夜。目前认为, 此点并无必要。因为低温可限制 DNA 分子的布朗运动, 所以在沉淀时低温条件并不是至关重要的因素。即使 DNA 浓度低到 20ng/ml , 长度短至 20~30bp, 在没有载体存在的情况下, 在 0°C 甚至室温条件下, 10 分钟即可形成沉淀。另外, 低温与长时间的沉淀, 很易导致盐与 DNA 共沉淀, 影响以后的实验。在一般条件下的 DNA 沉淀, 使用 0°C 冰水, 10~15 分钟足可达到实验的要求 (表 3-2)。

表 3-2 核酸沉淀的温度与时间

方法	DNA 浓度	离子浓度	温度	沉淀效率 (%)
乙醇沉淀	$0.1\mu\text{g/ml}$	10mmol/L MgCl_2	0°C	35
		10mmol/L MgCl_2	室温	72
		1mol/L NaCl	0°C	18
	$10\mu\text{g/ml}$	10mmol/L MgCl_2	0°C	95
		10mmol/L MgCl_2	室温	95
		1mol/L NaCl	0°C	95
乙二醇沉淀	$0.1\mu\text{g/ml}$	10mmol/L MgCl_2	0°C	45
		10mmol/L MgCl_2	-20°C	40
		10mmol/L MgCl_2	室温	82
	$10\mu\text{g/ml}$	10mmol/L MgCl_2	0°C	89
		10mmol/L MgCl_2	-20°C	88
		10mmol/L MgCl_2	室温	91

3.3.3 离心力与离心时间

大多数的 DNA 沉淀可在 0~4℃, 12 000g 离心 10 分钟即可, 对于浓度低于 20ng/ml 的 DNA 沉淀, 上述离心条件也可完成。如 DNA 片段小于 100 个核苷酸时, 则需要超速离心: 如 Beckman SW28, 4℃; 27 000r/min 超速离心机离心 1~2 小时, 或用 SW 50.1, 转头 30 000r/min, 离心 30 分钟, 4℃ 条件下进行。对于 pg 水平的核酸沉淀, 则应加入 tRNA 作为载体进行共沉淀。

3.3.4 有机沉淀剂

乙醇: 沉淀 DNA 乙醇是首选的有机溶剂, 它对盐类沉淀少, DNA 沉淀中所含的微量乙醇易蒸发去除, 不影响以后的实验。在适当的盐浓度下, 2 倍样品容积的 95% 乙醇可有效沉淀 DNA, 对于 RNA 则需要将乙醇量增至 2.5 倍。

异丙醇: 其优点在于所需容积小且速度快, 适用于浓度低, 而体积大 DNA 样品的沉淀。0.54~1.0 倍的异丙醇可选择性地沉淀 DNA 和大分子 rRNA 和 mRNA; 但对 5S RNA、tRNA 及多糖不产生沉淀, 一般不需在低温条件下长时间放置。其缺点是易使盐类 (如 NaCl、蔗糖) 与 DNA 共沉淀; 在 DNA 沉淀中的异丙醇难以挥发除去, 所以常规需要用 70% 的乙醇漂洗 DNA 沉淀物数次。

聚乙二醇 (PEG): 可用不同浓度的 PEG 选择沉淀不同分子量的 DNA 片段。应用 6 000 分子量的 PEG 进行沉淀时, 其使用浓度与 DNA 片段的大小成反比。例如, 5% 浓度能沉淀出大于 1.65kb 的 DNA 片段, 6% 时可沉淀 1.2kb 的 DNA 片段。采用碱法大量提取的质粒 DNA 时, 可用 13% 浓度 (W/V) 分子量 8 000 的 PEG 沉淀质粒 DNA, 可达到一定程度的纯化, 对有些实验并不需要超速离心。PEG 沉淀一般需要加入 0.5mol/L NaCl 或 10mmol/L MgCl₂。除去 DNA 沉淀中 PEG 有很多方法: 如氯仿抽提、透析、凝胶电泳和 DEAE-纤维素柱分离等, 最简便有效的办法是用 70% 的酒精漂洗 2 次, DNA 的质量可以满足内切酶反应和转化实验。

精胺: 精胺不是有机溶剂, 但可快速有效地沉淀 DNA, 其原理是精胺与 DNA 结合后, 使 DNA 在溶液中结构凝缩, 而发生沉淀; 并可单核苷酸和蛋白质杂质与 DNA 分开, 达到纯化 DNA 的目的。例如, 对含 4%~5% 牛血清蛋白样品, 精胺可从中将 DNA 沉淀出而不与蛋白质共沉淀。对于大于 60bp 的 DNA 片段, 浓度在 0.1~100μg/ml 的 DNA 溶液, 也有很好的效果。精胺沉淀 DNA 的要求是在溶液中无盐或低盐 (小于 0.1mol/L)。在不同浓度的溶液中沉淀 DNA 所需要精胺的浓度相差近 100 倍, 如对 TE 溶液, 精胺只需要 0.1mmol/L; 而对含 0.1mol/L KCl 10mmol/L MgCl₂ 或 15mmol/L EDTA 的 DNA 样品, 精胺则需 10.0mmol/L。因为大于 10mmol/L 的 Mg²⁺ 和大于 1mmol/L 的 EDTA, 可抑制精胺沉淀 DNA 的效率, 需要加大精胺的浓度。用 70% 的乙醇漂洗沉淀或透析, 以去除 DNA 沉淀中的微量精胺。

3.3.5 核酸沉淀的操作方法

3.3.5.1 乙醇沉淀 DNA

试剂:

SS-酚: 氯仿: 95% 及 70% 乙醇; 3mol/L NaAc (pH5.2)

准备工作:

DNA 沉淀前, 常规使用酚/氯仿抽提纯化, 测定或估计 DNA 溶液的容积, 400μl 以下的可在 1.5ml 的 Eppendorf 管中进行沉淀; 大于 400μl 可分装几个微型离心管中进行。

操作步骤:

(1) 在 DNA 溶液中加入 1/10 容积的醋酸钠, 终浓度为 0.3mol/L, 或其它盐离子终浓度见表 3-1, 若原 DNA 溶液中盐离子浓度高, 则用 TE (pH8.0) 稀释使终浓度至表 3-2 所示。

(2) 混匀溶液, 对于大片段 DNA 不能振荡, 应轻轻反复翻动离心管, 以免机械切剪力损伤 DNA

链,加入准确的2倍容积的冰冷无水乙醇或95%的乙醇,再将溶液混匀,置于冰上15~30分钟,让DNA沉淀。

(3) 在4℃离心回收DNA,对于大多数样品,12 000g离心10分钟可使DNA沉于管底。当样品浓度小于20ng/ml或DNA片段小于100bp时,需加大离心力和延长离心时间。

(4) 手持Eppendorf管成45度角,DNA沉淀面朝外,用微量移液枪从另一面紧贴管壁轻轻吸出乙醇,不要搅动DNA沉淀。在DNA沉淀回收结果鉴定以前,应该用另一个Eppendorf管保存吸出的乙醇。

(5) 加入70%的乙醇至管中2/3体积,混匀漂洗以去除残余的盐,4℃,12 000g离心2分钟,吸去上清。若盐杂质较多,可以重复该步骤几次。

(6) 不盖管盖,室温中10~15分钟让乙醇挥发,也可以放在真空中2分钟,加快乙醇蒸发,撤除真空时应缓慢放气,以防气流搅动DNA沉淀。现在认为不必要真空冻干,因为真空冻干会导致小于400bp的DNA片段的变性,且妨碍大片段DNA的回收。基因组DNA和λ噬菌体样品冻干后,再溶解非常困难。

(7) 重新悬浮DNA在适当容积的所需缓冲液TE(pH7.6~8.0)中,用微量移液枪反复吸打DNA沉淀,以加快其溶解。如果向沉淀中直接加入含有MgCl₂或大于0.1mol/L NaCl,溶解较困难,应先用加入小容积低盐缓冲液,待溶解后,补足所需盐浓度。DNA沉淀仍不溶解,则需加入较多缓冲液使DNA溶解后,再用乙醇沉淀一次,以去除多余的盐和妨碍DNA溶解的物质。加热至45℃,并不时搅拌有助于溶解。

3.3.5.2 乙醇沉淀RNA

在0.8mol/L LiCl、0.3mol/L NaAc或5mol/L NH₄Ac的终浓度盐条件下,加入2.5~3.0倍容积的乙醇可沉淀RNA,其它操作同DNA沉淀,但加入RNA溶液中的盐溶液必须无RNase(RNA酶)。

3.3.5.3 沉淀大分子量RNA

在0.8mol/L LiCl的强离子浓度条件下,可溶解tRNA与5S RNA,而大分子量的mRNA、rRNA则不溶解,可通过离心进行分离。

(1) 测定RNA溶液容积,加入1/10容积经高压消毒无RNase的8mol/L LiCl。

(2) 充分混匀后,置于冰上,至少2小时。

(3) 在0℃下,15 000g离心20分钟,弃上清,将沉淀溶于水中,重复用0.8mol/L LiCl沉淀、离心一次。

(4) 将大分子量RNA悬浮于水中,加NaAc至0.3mol/L终浓度,再用乙醇沉淀一次。

LiCl对体外翻译及反转录反应均有抑制作用,所以最好用NaAc再沉淀一次。

3.3.5.4 PEG沉淀DNA

试剂:

40%PEG8000(Sigma); 1mol/L MgCl₂; 70%乙醇

操作步骤:

(1) 准确测量DNA样品的容积。

(2) 加入0.01倍DNA样品容积的1mol/L MgCl₂,混匀。

(3) 加入0.5倍DNA样品容积的40%PEG,充分混匀。

(4) 室温放置10分钟。

(5) 12 000g,室温离心10分钟。

(6) 弃上清,加入70%乙醇漂洗沉淀,12 000g离心5分钟弃上清。

(7) 重复一次步骤(6)。

(8) 重新悬浮DNA于所需缓冲液中。

本方法不但盐与DNA共沉淀少,而且对于浓度0.1μg/ml,长度26bp以上的DNA片段均有很理想的

回收率,其质量完全可以满足 DNA 内切酶实验和质粒转化实验。

3.3.5.5 精胺沉淀纯化 DNA

试剂:

精胺: 100mmol/L 贮存液 (Sigma)

HS 缓冲液: TE 含 0.5mol/L NaCl

抽提缓冲液: 75% 乙醇

0.3mol/L 醋酸钠

10mmol/L 醋酸镁

操作步骤: 待纯化样品的 DNA 浓度需在 0.1 ~ 100 μ g/ml 之间, 溶液为无盐或低盐 (≤ 0.1 mol/L)。

(1) 根据 DNA 缓冲液的盐浓度, 加精胺贮存液至所需终浓度, 见表 3-3。

表 3-3 精胺在各类缓冲液中的终浓度

DNA 缓冲液盐浓度	精胺终浓度 (nmol/L)
低缓冲液 (如 TE)	0.1
0.1mol/L KCl	2.0
0.01mol/L KCl 含 6mmol/L MgCl ₂ 或 10mmol/L EDTA	1.0
0.1mol/L KCl 含 10mmol/L MgCl ₂ 或 15mmol/L EDTA	10.0

(2) 充分混匀后放置冰上 15 分钟。

(3) 4℃, 12 000g 离心 15 分钟。

(4) 弃上清, 用 80% 乙醇漂洗, 再 12 000g 离心 5 分钟, 弃上清。

(5) 对于 10 μ g 以上的 DNA 样品, 将 DNA 沉淀溶于 500 μ l HS 缓冲液中, 溶解后装入透析袋, 在 100 倍容积的 HS 缓冲液中透析 24 小时, 其中换两次透析液, 然后用乙醇沉淀 DNA, 再溶于所需缓冲液中备用。

(6) 对于小量制备的 DNA, 从第 4 步后, 溶于 50 μ l 核酸洗涤液中, 置冰浴上 1 小时, 在此期间剧烈振荡 2 次, 然后用 10 000g, 4℃, 离心 10 分钟, 将沉淀溶于所需要的缓冲液中。

本法优点: 能将 DNA 与蛋白质杂质, 单核苷酸分开, 纯化 DNA。

3.3.5.6 纳克水平 DNA 沉淀的回收。

使用线性聚丙烯酰胺作为纳克 (ng) 水平的 DNA 沉淀载体物非常有效, 并且能使小至 8 个碱基对的 DNA 片段沉淀, 其质量能满足酶切和其它分子克隆试验的要求, 尤其是在研究 DNA 与蛋白质相互作用中, 具有更大的优点。

1. 聚丙烯酰胺的制备:

(1) 配制出 5% 的丙烯酰胺溶液 (含 40mmol/L Tris·Cl, 20mmol/L NaAc, 1mmol/L EDTA, pH7.8)。

(2) 在以上溶液中加入 1/100 容积的 10% 过硫酸铵, 1/1 000 容积的 TEMED, 让丙烯酰胺聚合 30 分钟。

(3) 当溶液变成粘稠时, 用 2.5 倍容积乙醇沉淀, 离心后去上清, 沉淀溶于 20 倍容积的水中, 振荡过夜, 再用乙醇沉淀, 制备 0.25% 聚丙烯酰胺的贮存液。

2. DNA 沉淀:

(1) 0.1mol/L 盐浓度的 DNA 溶液中, 加入 10 ~ 20 μ g 线性聚丙烯酰胺, 混匀。

(2) 加入 2.5 倍容积的乙醇, 放置于 -70℃, 10 ~ 20 分钟。

(3) 15 000g, 4℃, 离心 10 分钟, 小心弃去上清。

(4) 70% 乙醇漂洗沉淀, 15 000g 离心 5 分钟, 室温干燥。

(5) 沉淀溶于所需容积的缓冲液中。

线性聚丙烯酰胺还可以用于微量 RNA 乙醇沉淀和微量蛋白质丙酮沉淀。

3.4 核酸的定量

组成核酸分子的碱基,均具有一定的吸收紫外线特性,最大吸收值在波长为 250~270nm 之间。例如腺嘌呤的最大紫外线吸收值在 260.5nm,胞嘧啶:267nm,鸟嘌呤:276nm,胸腺嘧啶:264.5nm,尿嘧啶:259nm。这些碱基与戊糖,磷酸形成核苷酸后,其最大吸收峰不会改变,但核酸的最大吸收波长是 260nm,吸收低谷在 230nm,这个物理特性为测定核酸溶液浓度提供了基础。

在波长 260nm 紫外线下,1OD 值的光密度相当于双链 DNA 浓度为 50 μ g/ml;单链 DNA 或 RNA 为 40 μ g/ml;单链寡聚核苷酸为 20 μ g/ml。可以以此来计算核酸样品的浓度。

分光光度法不但能确定核酸的浓度,还可通过测定在 260nm 和 280nm 的紫外线吸收值的比值(A₂₆₀/A₂₈₀)估计核酸的纯度。DNA 的比值为 1.8, RNA 的比值为 2.0。若 DNA 比值高于 1.8,说明制剂中 RNA 尚未除尽。RNA、DNA 溶液中含有酚和蛋白质将导致比值降低。270nm 存在高吸收表明有酚的干扰。当然也会出现既含蛋白质又含 RNA 的 DNA 溶液比值为 1.8 的情况,所以有必要结合凝胶电泳等方法鉴定有无 RNA,或用测定蛋白质的方法检测是否存在蛋白质。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。

对于很稀的核酸溶液,核酸的另一物理特性提供了另一方法,那就是荧光光度法。DNA、RNA 本身并不产生荧光,但在荧光染料溴乙锭(ethidium bromide, EB)嵌入碱基平面之间后, DNA 样品在紫外线照射激发下,可以发出红色荧光,其荧光强度与核酸含量成正比。使用一系列已知的不同浓度 DNA 溶液作标准对照,可比较出被测 DNA 溶液的浓度。灵敏度可达 1~5ng。此法的比较是基于目测,所以是估计水平。另外在比较时,应该考虑 DNA 或 RNA 样品中分子大小与标准对照中核酸分子的长度。

3.4.1 分光光度法测定核酸浓度

仪器:

带氘灯的分光光度计,使用前预热稳定 10 分钟。

操作步骤:

(1) 吸取 5 μ l DNA 样品或 4 μ l RNA 样品,加水至 1ml 混匀后,转入分光光度计的石英比色杯中。如果样品很少,可以用 0.5ml 的比色杯,上述核酸样品与水容积均缩小一半。

(2) 分光光度计先用 1ml 水校正零点。

(3) 在 260nm 和 280nm 分别读出光密度, DNA 样品的浓度为 $OD_{260} \times \text{核酸稀释倍数} \times 50/1\ 000$; RNA 样品的浓度为: $OD_{260} \times \text{核酸稀释倍数} \times 40/1000$; 浓度单位为 μ g/ μ l。按步骤(1)的稀释方式, DNA 或 RNA 的浓度(μ g/ μ l)均为 OD_{260} 的 200 倍;如 OD_{260} 为 0.1,则样品的浓度就为 1 μ g/ μ l DNA 或 RNA。这样稀释倍数非常便于计算。

(4) 若为 DNA 样品, OD_{260}/OD_{280} 比值大于 1.8,说明仍存在 RNA,可以考虑用 RNA 酶处理样品;小于 1.6,说明样品中存在蛋白质或酚,应再用酚/氯仿抽提,用乙醚抽提后,以乙醇沉淀纯化 DNA。RNA 样品 OD_{260}/OD_{280} 比值小于 2,也应考虑再用酚/氯仿抽提。

3.4.2 荧光分光光度法测定核酸浓度

本方法不但能测定浓度小于 0.25 μ g/ml 的核酸样品,也可用于了解核酸样品中严重污染干扰核酸紫外线吸收物质的情形。此法核酸用量小,可迅速判定结果。

3.4.2.1 塑料薄膜 (saran wrap) 法

- (1) 将一张塑料薄膜平展铺在透射型紫外线灯玻璃上, 或一张硬黑纸片上 (使用直射型紫外线灯)。
- (2) 点 1~5 μ l 待测样品点于膜上。
- (3) 取与样品等容积的一系列 DNA 浓度标准品 (0.5~20 μ g/ μ l) 依次点在膜上 (DNA 样品与标准品对照的分子量应接近)。

对于 RNA 样品应使用 RNA 或单链 DNA 作标准对照, 对于 RNA 的最低检出量为 0.5 μ g 左右。

- (4) 在每一点 DNA 溶液上加等容积的 TE (pH7.6, 含溴乙锭 2 μ g/ml), 小心混匀。
- (5) 用短波紫外线 (254nm) 进行照相, 比较样品与标准品溶液之间的荧光强度, 以此估计 DNA 的浓度。

3.4.2.2 琼脂糖平板法

为了避免 DNA 样品中含有增强或猝灭荧光的污染物干扰, 可采用琼脂糖平板法。

- (1) 制备 1% 的琼脂糖平板, 含溴乙锭 0.5 μ g/ml。
- (2) 将 DNA 样品溶液 1~5 μ l 及相应体积的 DNA 对照样品 (浓度为 0.5~20 μ g/ml) 点在琼脂糖表面。
- (3) 将凝胶在室温下放置数小时, 让小分子污染物充分扩散出去。
- (4) 将琼脂凝胶置于紫外线 (254nm) 下照像, 与标准对照比较, 估计样品浓度。

3.4.2.3 微型凝胶电泳法

若 DNA 样品中含 RNA 或其它杂质, 微型凝胶电泳是一种方便而较准确的定量方法。

- (1) 取 2 μ l DNA 样品, 加 0.4 μ l 电泳上样缓冲液 (含溴酚蓝), 混匀后加样于含 0.5 μ g/ml 溴乙锭的琼脂糖微型电泳凝胶的孔格内。
- (2) 取一系列浓度不同的 2 μ l 标准 DNA 样品 (0.5~50 μ g/ml) 与 0.4 μ l 上样缓冲液混合上样。标准 DNA 溶液中, 应含有一种与样品 DNA 分子量大小相近似的 DNA 分子。
- (3) 电泳: 使 DNA 移入琼脂糖胶内。一般为溴酚蓝迁移 2cm 左右。
- (4) 将凝胶浸入含 0.01mol/L $MgCl_2$ 的电泳缓冲液中 5 分钟, 进行背景脱色。
- (5) 用短波紫外线 (254nm) 进行拍照, 比较样品 DNA 与 DNA 标准品的荧光强度, 并计算出待测样品中 DNA 浓度。

荧光法灵敏快速。但它的荧光强度决定于溴乙锭嵌入碱基中的多少, 这与 DNA 的超螺旋程度密切相关, 标准品与样品难以完全一致, 并且还受其它影响荧光发光污染物的影响, 所以对该方法褒贬不一。但作者认为, 在一些基因克隆中 DNA 样品非常珍贵的情况下, 仍不失之作为一种行之有效的定量方法。

3.5 核酸的贮存

DNA 与 RNA 样品贮存条件各异, 对于 DNA 来说, 最好是溶于 TE 中于 4 $^{\circ}$ C 保存, 其中 EDTA 是通过螯合金属 2 价离子, 而抑制 DNA 酶的活性。TE 的 pH 为 8, 是为了减少 DNA 的脱氨反应, 放在 -70 $^{\circ}$ C 能保存 5 年以上。对于哺乳动物细胞 DNA 的长期保存, 可在 DNA 样品中加入 1 滴氯仿, 避免细菌和核酸酶污染。

RNA 溶 0.3mol/L 醋酸钠 (pH5.2) 或双蒸消毒水中, 贮放于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱。

RNA 的长期保存可以以沉淀形式贮存于乙醇中, 在 -20 $^{\circ}$ C 的情况下, 非常安全。

另一种形式是在 RNA 溶液中, 加一滴 0.2mol/L VRC (氧钒核糖核苷复合物) 冻贮于 -70 $^{\circ}$ C, VRC 可抑制 RNase 对 RNA 的降解, VRC 对 RNA 的大多数实验没有干扰作用。但对于体外翻译实验, 使用前最好用酚/氯仿抽提, 以去除 VRC。低于 5mmol/L 的 VRC 对体外翻译就没有影响, VRC 中的 RNA 样品可在 -70 $^{\circ}$ C 条件下保存数年。

3.6 限制性内切酶及其应用

毫不夸张地说,没有限制性内切酶的发现和应用,很难有今天以至将来分子生物学的兴旺发展。在基因工程和分子生物学中,没有任何一种酶象 DNA 限制性内切酶这样举足轻重和应用广泛。在 DNA 限制性内切酶的应用过程中,经常出现的一些问题,涉及对内切酶特性的理解、切割条件的要求、底物的变化和基因克隆组建的设计等,因此有必要进行扼要的介绍。

3.6.1 限制性内切酶的功能、分类及命名

核酸限制性内切酶,是一类能识别双链 DNA 中特定碱基顺序的核酸水解酶。这些酶都是从原核生物中发现的,它们的功能犹似高等动物的免疫系统,用于抗击外来 DNA 的侵袭。到 1985 年后已从 350 多种不同微生物中发现了 498 种限制酶,识别 108 种不同的特定顺序,以内切方式水解核酸链中的磷酸二酯键,产生的 DNA 片段 5'端为 P,3'端为 OH。

根据限制酶的识别切割特性、催化条件及是否具有修饰酶活性可分为 I、II、III 型三大类。

I 型限制酶属于复合功能酶,兼有修饰和切割 DNA 两种特性,需要 Mg^{2+} 、ATP 和 S-腺苷酰甲硫氨酸作为催化的辅助因子,在 DNA 降解时伴随有 ATP 的水解。即它具有核酸内切酶、甲基化酶、ATP 酶和 DNA 解旋酶四种活性。若酶的识别位点上两条 DNA 链均未甲基化,就行使内切酶功能,并在切割 DNA 同时或以后转变为 ATP 酶;如果位点上只有 1 条链被甲基化则发挥修饰功能,使另 1 条链也甲基化;若位点上 DNA 两条链均已甲基化就与位点解离。它的显著特点是在 DNA 链上的识别位点和切割部位不一致,没有固定的切割位点,一般在识别位点以外的 1kb (不少于 400bp) 到几 kb (最多可达 7000bp) 处随机切割,不产生特异片段,所以在基因重组中没有应用价值。III 型酶与 I 型酶特性类似,也有甲基化功能,但无 ATP 酶和 DNA 解旋酶活力。不同的是它能在 DNA 链上的特异位点切割,其切割位点在识别位点以外,对基因工程的意义也不大。

II 型酶就是通常指的 DNA 限制性内切酶,II 型酶限制修饰系统分别由限制酶和修饰酶两种不同的酶组成,II 型限制酶分子量小,仅需 Mg^{2+} 作为催化反应辅助因子,它们能识别双链 DNA 的特异顺序,并在这个顺序内进行切割,产生特异的 DNA 片段。II 型酶的识别顺序一般为 4~6 个碱基对,识别的顺序为反转重复顺序,即具有 180 度的旋转对称性,且富含 GC。II 型酶的靶顺序大小决定了它切割 DNA 后产生的 DNA 片段的长短。若 DNA 链上的碱基随机分布,在 1 条很长的 DNA 链上,对于识别 4 个核苷酸的内切酶,平均 4^4 个核苷酸长度就出现 1 个靶顺序;而 6 个特异核苷酸出现的机率为 $1/4^6$ 。我国强伯勤教授首次发现了能识别切割 8 个核苷酸的 II 型内切酶,这种特异顺序出现的机率则为 $1/4^8$,这种识别 8 个核苷酸顺序的限制性内切酶,在人体基因组大片段克隆等技术中,发挥着重要的作用。

II 型内切酶切割双链 DNA 产生 3 种不同的切口;①在识别顺序的对称轴上,对双链 DNA 同时切割形成平末端(如 Alu, Hpa II);②在识别顺序的两侧末端切割 DNA 双链,于对称轴的 5'末端切割产生 5'端突出的粘性末端(如 EcoR I);③反之产生 3'端突出的粘性末端(如 Pst I)。常用限制性内切酶酶切位点参见附录 1。

II 型限制性内切酶不具有甲基化修饰活性,这一功能由相应的修饰酶承担。它们识别同一 DNA 特定顺序,发挥不同的作用。如 EcoR I 限制性内切酶与 EcoR I 甲基化酶,两者均识别 GAATTC,前者切割 $G \downarrow AATTC$,后者使 A(嘌呤)甲基化,现已纯化的甲基化酶为数不多。

另外还有一些特殊性质的少数 II 型酶已归化为四小类:

(1) 异源同工酶(isoschizomer)又称同裂酶,是不同来源分离出来的不同酶,但具有相同的识别顺序,切割 DNA 的方式可以相同,也可不同,如 Hpa II 与 Msp I,它们的识别与切割顺序均相同,但 Msp I 还可以识别切割已甲基化的顺序例如 $GG \downarrow mCC$ 。Sma I 与 Xma I 识别顺序相同,但切割位点与方式不

同。前者产生平末端,后者产生 5'粘性末端。

(2) Subset 酶:识别与切割顺序相互有关的酶互称为 Subset 酶,如 Sma I 的 6 核苷顺序中包含有 Hpa II 的 4 个核苷酸顺序。Subset 酶之间可以代替使用,2 个 Subset 酶消化的 DNA 片段,可以相互连接,连接后的重组 DNA 分子,可以被其中一种酶识别,也可能原来的任何 1 个 Subset 酶均不能识别。

(3) 远距离裂解酶 (distant cleavage):这类酶的识别位点与切割位点不一致,它们在某一核苷酸区域与识别顺序结合,然后滑行到识别顺序以外的另一个位点进行切割,这一点与 I 型酶相似,不同的是其切割位点与识别位点的距离是一定的,而且没有 I 型酶那么遥远,一般为 10 个碱基左右。如 Mbo II 识别顺序为 GAAGA,切割位点在识别位点下游的第 8 个核苷酸。故在基因工程中具有一定的应用价值。

(4) 可变酶:这类酶是 II 型酶中的一个特例,它们的识别顺序中的 1 个或几个核苷酸是可变的,并且其识别顺序一般大于 6 个碱基对,如 Bgl I 识别 GCC (N₅) GGC11 个 bp 的序列,其中 5 个碱基可变。

限制性内切酶的命名:首先由 Smith 和 Nathans 于 1973 年提出的,1980 年 Roberts 在此基础上进行了系统分类。总规则是以内切酶来源的微生物学名进行命名,多采用 3 个字母,微生物种名的第一个字母大写,属名的前两个字母小写;若该微生物有不同的变种和品系,再加上该变种或品系的第一个字母,需大写;从同一种微生物中发现多种限制酶,则依照发现和分离的前后顺序用罗马数字表示。例如从淀粉液化芽胞杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) H 株分离的第一种限制性内切酶,命名为 BamH I。

限制性内切酶的最大特点是识别 DNA 特异顺序并进行切割,因而在基因重组、DNA 序列分析、基因组甲基化分析及基因物理图谱等技术中广泛应用。近年来,虽然相继出现 DNA 链上化学法定位爆破技术和 ribozyme 定点切割新技术,但是由于人工合成连接子 (linker) 和适应子 (adaptor) 在基因克隆技术与内切酶配合使用,使得限制性内切酶的应用更为广泛和方便,成为分子生物学技术中难以替代的角色。

3.6.2 限制性内切酶的数量单位及质量控制

在适当反应条件下 (包括温度、pH、离子强度等),1 小时内完全酶解 1 μ g 特定 DNA 底物所需要的限制性内切酶的量,定为 1 个活性单位。目前大多数公司售出的几乎所有的内切酶,均以 λ 噬菌体 DNA (λ DNA) 作为底物测定其活性单位。所以理论上计算酶解靶 DNA 所需的某种限制酶的活性单位时,可以根据它在 λ DNA 上的酶切位点进行推算。

限制性内切酶的质量要求主要包括,不存在任何核酸内切酶或外切酶的污染、长时间酶解不出现识别顺序特异性的下降,以及酶解的 DNA 片段再连接后能被重新识别并切割等技术指标。初步鉴定内切酶的纯度与质量的实验有以下几种。

(1) 过夜消化实验:虽然限制性内切酶的活性单位限定时间为 1 小时,从理论上认为,只要该限制性内切酶的纯度高,即使是长时间酶解也不会发生识别与切割 DNA 特异顺序能力的降低,一般以消化过夜 (12 小时左右) 进行质量鉴定。

在 50 μ l 的反应容积中,以酶解 1 μ g DNA 底物过夜与酶解 1 小时的结果比较,两者不应出现带型数目的区别。值得注意的是,有些内切酶在过量的情况下,会产生星号活力,所以一般在产品说明书中,均应标明该酶最大量过夜消化的数据,对该酶最大活性单位的具体应用有很大的参考价值。

(2) 鉴定有无特异内切酶活性:在 50 μ l 容积中切割 1 μ g RF I (超螺旋) DNA,4 小时,若 RF I 变为有缺口的环状 DNA RF II 可用电泳鉴别,并可以计算出 RF I 转变成 RF II 形式的百分比率。

(3) 鉴定有无外切酶活性:在适当条件,50 μ l 体积中,1 个单位的限制性内切酶与单链、双链的 *E. coli* DNA (³H 标记,2 \times 10⁵cpm/ng) 混合物保温 4 小时,通过 TCA 沉淀,再测定 *E. coli* DNA 的 cpm 值,比较酶解前后的 cpm 值,判断有无外切酶的污染,一般应以不超过 0.05% 为准。

(4) 重连 DNA 片段的酶解:限制性内切酶酶解后的 DNA 片段,在 T₄ 连接酶催化下,应重新连接成酶解前的 DNA 片段的长度,然后再加入该内切酶,产生的片段大小、数目与第一次酶解的结果应完全

一样。因为只有酶解后 DNA 片段的顺序以及各片段的 3' - OH 与 5' - P 基团完好才能连接, 连接后的顺序又为酶提供了识别位点才能切开。故此实验可查明内切酶中是否存在其它的内切酶和磷酸酶。

(5) 磷酸酶活性检定: 以³²P 末端标记的寡聚胸腺核苷酸 [oligo (dT) 8] 为底物, 在 50 μ l 体积中, 适当条件下, 反应 4 小时, 然后用 20% 的聚丙烯酰胺凝胶 (含 7mol/L 尿素) 进行电泳, 检定八聚胸腺核苷酸的放射性变化, 其指标 (cpm 值) 下降标志着存在磷酸酶的污染。

3.6.3 限制性内切酶酶解体系的建立

限制性内切酶对于 DNA 底物的酶解是否完全与正确, 直接关系到 DNA 连接、基因克隆分子筛选和鉴定等实验结果, 而酶解体系的建立是其中的一个关键步骤, 它所涉及的各种因素都应加以考虑与注意。

3.6.3.1 标准的酶解体系

一般是 1 μ g 底物 DNA, 在 50 μ l 终反应体系中, 用 1 个单位的内切酶催化, 在推荐的反应缓冲液和温度下反应 1 个小时。

酶解 1 μ g 以上的 DNA, 可按上述标准体系的比例进行放大。加入过量的内切酶, 可以缩短反应时间并达到酶解完全的效果, 但是不能过分加大酶的用量。除了酶贮存液中的甘油会影响反应以外, 许多内切酶过量本身就会导致识别顺序的特异性下降, 所以我们推荐稍过量的酶 (2~5 倍) 较长的反应时间。

3.6.3.2 酶解体系的组成及注意事项

(1) 内切酶: 根据实验的目的选择限制性内切酶, 若有多个候选酶位点存在时, 对于基因克隆, 选择粘性末端可提高连接效率, 一侧为平末端, 一侧为粘末端, 或者两侧为不同酶的粘性末端可以进行定向克隆; 两侧为同一内切酶位点或均为平末端的连接, 插入重组子中片段的方向需要重新鉴定。已知 DNA 顺序或内切酶图谱的 DNA 片段亚克隆方案, 可通过计算机的相应程序, 选择符合最佳克隆方案的内切酶。

对于基因组的 DNA 酶切, 应该考虑到内切酶识别顺序的长短决定该顺序在基因组上出现的机率, 并将影响酶切后 DNA 片段的大小。

限制性内切酶从冰箱中取出后, 应置于冰中。一般总是在其它试剂加完后, 再加入内切酶。加入酶量的多少也应根据 DNA 的状况变化, 对于超螺旋 DNA、琼脂糖包埋的 DNA、基因组 DNA 的酶解, 使用的酶单位活性应比常规适当加大。

稀释的内切酶, 应遵照说明书要求, 用贮存缓冲液进行稀释; 若用反应缓冲液稀释, 不能保存过长的时间, 应该尽快用完。

每次取酶必须使用新的灭菌微量吸管, 1 个吸管不能反复使用, 更不可交叉使用, 交叉污染可导致整管内切酶报废。用同一种内切酶消化多个 DNA 样品时, 应先计算出所需酶的总量, 然后取出确切容积的酶液与适量的水和 10 倍反应缓冲液混合, 再将酶与缓冲液分配到各个反应管中, 以减少酶液贮存管的污染机会。使用的水必须是去离子双蒸消毒水。

(2) DNA: 作为内切酶的底物, DNA 应该具备一定的纯度, 其溶液中不能含有微量酚、氯仿、乙醚、大于 10mmol/L 的 EDTA、去污剂如 SDS 以及过量的盐离子浓度, 这些因素的存在均可不同程度地影响限制性内切酶的活性。DNA 碱基上的甲基化修饰也是影响酶切的一个重要因素, 所以转化实验所选择的受体菌株, 应该考虑到使用的菌株中的酶修饰系统。

(3) 反应缓冲液: 每一种限制酶都有其一系列最佳反应条件, 甚至来源于不同厂家的同一种限制酶的反应缓冲液也不尽相同, 应该严格遵照产品说明书进行操作。目前, 许多生产内切酶的厂商在出售内切酶时同时配有该厂家不同类型的 10 倍酶解缓冲液, 并且根据内切酶反应要求的离子浓度, pH 等条件不同, 一般备有 4 种以上不同的缓冲液。有些酶可同时在同一种反应缓冲液中酶解同一种 DNA。厂商提供有关各种酶在不同缓冲液中活性发挥程度的百分率, 对于实验者选择缓冲液, 或在同一缓冲液中同时

加入 2~3 种内切酶进行反应, 具有相当重要的参考价值。

反应缓冲液中的成分主要是 Tris·Cl、NaCl 和 Mg^{2+} 。所有的内切酶均需要 Mg^{2+} 作为辅助因子, 大多数的活性 pH 范围在 7.2~7.6 之间。对离子强度的要求可分为 3 个级别; 即低盐 (10mmol/L NaCl)、中盐 (50mmol/L NaCl) 和高盐 (100mmol/L NaCl)。另外在缓冲液中添加 2-巯基乙醇目的是防止酶的氧化, 以保持其活性。牛血清白蛋白对于某些内切酶是必需的, 终浓度为 100 μ g/ml, 最好用 100 倍的 BSA 贮存液 (10mg/ml), 在使用前再添加, 因为 BSA 在 10 倍的反应缓冲液中容易沉淀。对于那些不需要 BSA 即可达到最高活性程度的内切酶, 在反应缓冲液中加入 BSA, 对其活性不会造成影响。

另有一种 10 倍中心缓冲液: 内含 500mmol/L Tris·Cl (pH8.0), 100mmol/L $MgCl_2$, 500mmol/L NaCl 等, 适合于许多酶反应。如: Ava I、Ava II、Bcl I、Bgl II、Mbo I、Hind III、Pst I、Taq I、Xho I、Hha I 及 Hinf I 等。对于 DNA 多酶切反应, 最保险的方法还是单个酶切后, 酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀, 改变缓冲液后再进行下一个酶切反应。

3.6.3.3 酶解温度与时间

绝大多数限制酶的反应温度为 37 $^{\circ}$ C, 但从 *Thermophilic* 菌中提取的限制酶其反应温度需要在 50 $^{\circ}$ C~65 $^{\circ}$ C 之间, 如 Bcl I 需要在 50 $^{\circ}$ C 下进行反应, 37 $^{\circ}$ C 时只有其最高活性的 50%; Taq I 需 65 $^{\circ}$ C, 在 37 $^{\circ}$ C 只能达到其最高活性的 10%。有关资料在各公司的产品目录中均有详细说明。

酶解时间可通过加大酶量而缩短。反之, 酶量较少可通过延长酶解时间以达到完全酶解 DNA 的目的。在标准反应条件与体系中, 16 小时内, 0.13 个单位的 Apa I、Hind III、EcoR I; 0.25 个单位的 Kpn I 及 0.5 单位 Pst I, 可完全酶解 1 μ g λ DNA。不同的 DNA 底物在一定酶量和一定时间内, 其酶解效率不一, 这些可以根据 DNA 底物上酶切位点的多少, 与 λ DNA 存在位点的数目进行比较后, 再决定酶量和酶解的时间。

3.6.3.4 酶解过程

(1) 酶解容积: 酶的活性单位为 1 小时内在 50 μ l 容积中, 酶解 1 μ g λ DNA 所需要的酶量。使用的内切酶单位、DNA 量及反应容积的大小, 对于 1 μ g DNA 以上的酶解体系的建立是个最佳参照模式。值得提醒的是加入内切酶的容积不能超过反应总容积的 10%, 否则使甘油终浓度达到 5% 将会抑制酶在该体系中的活性。

(2) 混匀: 混匀这么一个小动作易被人们忽视。事实上, 有许多酶切的失败皆源于省略此步骤。可用移液枪反复吸打几次或用手指轻弹管壁, 使酶切体系中所有成分混匀, 若 DNA 底物分子量很大, 如基因组 DNA 应避免强烈的旋转性振荡, 强烈的振荡可导致 DNA 大分子断裂, 还可使内切酶变性。最后用 Eppendorf 离心机短暂 (5 秒钟) 离心, 使管壁上吸附的液滴全部沉至管底。

(3) 反应终止: 终止内切酶反应的方法大致有以下 3 种: ①若 DNA 酶切后不需进行进一步的酶反应时, 可加入 EDTA 至终浓度 10mmol/L, 通过 EDTA 螯合内切酶的辅助因子 Mg^{2+} 而终止反应, 或加入 0.1% SDS (W/V), 使内切酶变性以终止反应; ②若 DNA 酶解后仍需进行下一步反应 (如连接、内切酶反应等), 可将酶切后的 DNA 溶液置于 65 $^{\circ}$ C 保温 20 分钟, 通过加热失活内切酶; 这个简便的终止办法对于大多数最适反应温度为 37 $^{\circ}$ C 的限制酶是有效的, 但此法对有些酶并不能完全失活, 如: Acc I、BamH I、Hae II、Hinf I、Hpa I、Kpn I、Pst I、Pvu I 和 Sca I 等; ③用酚/氯仿抽提, 然后乙醇沉淀, 此法最为有效且有利于下一步 DNA 的酶学操作。

(4) 酶解结果鉴定: 酶解完成后, 不必立即终止反应, 先取出适量反应液进行快速的微型琼脂糖凝胶电泳, 在紫外线灯下观察酶解结果后, 再决定是否终止反应。对于环状质粒, 电泳后 EB 染色, 一般可以在紫外线灯下见到 2~3 个条带; 超螺旋型、线性质粒、有缺口的环状质粒, 三者的迁移速度依次递减 (EB 浓度 $\leq 0.5\mu$ g/ml), 环状质粒上单酶切位点完全消化后变成单一的均匀条带, 此时分子量可与 λ DNA/Hind III 分子量标准进行比较。若切割两个以上的酶切位点产生两条以上的线性带, 对于重组 DNA 分子鉴定将更为准确。

3.6.4 限制性内切酶酶解中常见的问题和解决措施

在实验操作中,限制性内切酶对于 DNA 的消化,往往会出现一些问题,产生的原因不外乎于上述酶解体系中各个要素的非最佳状态,包括 DNA 的纯度与特性、反应缓冲液、反应体积大小、反应时间及温度等。表 3-4 列举一些可能碰到的问题以及推荐的解决办法。

表 3-4 限制性内切酶酶解中常见的问题、原因和解决措施

问 题	原 因	解 决 办 法
DNA 完全没有被内切酶切割	1. 内切酶失活	1. 用内切酶切割 λ DNA, 检测其活性单位。
	2. DNA 不纯, 含有 SDS、酚、ED-TA 等内切酶抑制因子	2. 将 DNA 过柱纯化, 再加入 1/2 容积的 7.5mol/L NH_4Ac , 2 倍容积的 95% 乙醇, -70°C , 30 分钟, 沉淀 DNA
	3. 非内切酶最佳反应条件	3. 重新配制反应缓冲液, 检查反应温度。
	4. DNA 酶位点上的碱基被甲基化 (如 EcoR I 不能切割 pBR322 质粒 DNA)	4. 将底物 DNA 与 λ DNA 混合, 再酶切, 观察切割情况换用对 DNA 甲基化不敏感的同裂酶酶解; 重新将质粒 DNA 转化至 dcm^- 、 dam^- 基因型的细菌菌株进行扩增
	5. DNA 酶切位点上没有甲基化 (如 Dpn I 需要甲基化位点)	5. 用不同切割甲基化位点的同裂酶消化 DNA 样品 (如用 Sma3A I 代替 Dpn I), 重新将质粒在 dcm^+ 、 dam^+ 菌株中扩增
	6. DNA 位点上存在其它修饰	6. 将 DNA 底物与 λ DNA 混匀进行切割
	7. DNA 不存在该酶的识别顺序	7. 用 10 倍的过量酶进行切割, 用其它的酶切割 DNA, 逐条排除以上的原因
DNA 切割不完全	1. 内切酶活性下降	1. 同 5~10 倍的过量酶进行切割
	2. 内切酶稀释不正确	2. 重新滴定酶的活力单位, 用反应缓冲液和水稀释贮存管中的酶
	3. DNA 不纯, 反应条件不佳	3. 见上
	4. 内切酶识别的 DNA 位点上的碱基被甲基化或存在其它修饰	4. 见上
	5. 部分 DNA 溶液粘在管壁上	5. 反应前离心 1~2 秒钟
	6. 内切酶溶液粘度大, 取样不准	6. 将内切酶稀释到大于 5 μl 体积, 再加入反应管内
	7. 酶切后 DNA 粘末端退火	7. 在电泳前, 将 DNA 在 65°C 保温 5 分钟
	8. 由于反应溶液、温度、强烈振荡使内切酶变性	8. 使用出产公司推荐的反应缓冲液与温度, 避免强烈振荡
	9. 由于过度稀释而酶活性降低	9. 对于大倍数稀释, 最好使用厂商推荐的贮存液进行, 水和反应缓冲液稀释后的酶不能贮存, 应一次使完
	10. 不适应的反应条件	10. 使用新的反应缓冲液; 检查反应温度; 过夜消化; 加入 Triton-100 至终浓度为 0.01% 以增加酶的稳定性
	11. 识别位点两侧插入了可影响酶切效率的核酸顺序	11. 将酶量加大 5~10 倍

续表

问 题	原 因	解 决 办 法
顽固性部分酶切	1. 识别位点上甲基化修饰 2. 识别位点连接了可影响酶切效果的新核酸顺序	1. 使用无甲基化修饰系统的菌株重新转化、扩增质粒 2. 加大酶量
DNA 片段数目多于理论值	1. 内切酶呈号活力 2. 存在第二种内切酶污染 3. DNA 底物中含其它 DNA 杂质	1. 检查反应条件, 是否甘油过量; 含 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} ; 用 NH_4Ac 沉淀 DNA; 减降酶的使用量 2. 用 λ DNA 作为底物检查酶切结果 3. 电泳检查 DNA; 换用其它内切酶切割, 柱层析或电泳后回收纯化 DNA 片段
酶切后没有观察到 DNA 片段存在	1. DNA 定量错误 (如含有较多的 RNA) 2. 在酶切反应液中形成非特异的沉淀	1. DNA 提取后用 $100\mu g/ml$ 不含 DNA 酶的 RNA 酶 A 消化, 酚抽提后再沉淀, $260nm$ 重新测定 DNA 样品的 OD 值 2. 在反应前透析 DNA 样品, 或用酒精沉淀 DNA 2 次
内切酶在保存期内快速失活	1. 保存温度不合适 2. 以稀释形式保存 3. 贮存缓冲液不适当 4. 低蛋白浓度	1. 内切酶应保存在所推荐的含 50% 甘油的贮存缓冲液中, 最好保存在不结霜的 $-20^{\circ}C$ 冰箱中 2. 内切酶最好是以厂商推荐的浓度保存, 稀释液 1 次用完 3. 使用厂商推荐的贮存缓冲液, 其中 pH 值应为贮存温度 ($-20^{\circ}C$) 时的 pH 值 4. 内切酶与 $500\mu g/ml$ 的无 DNA 酶的牛血清蛋白一起保存
电泳后 DNA 片段的带型弥散, 不均	1. DNA 上结合有蛋白质 2. 内切酶中含有 DNA 外切酶	1. 在电泳上样前将上样液 $65^{\circ}C$ 加热 5 分钟并加入 0.1% 的 SDS; 酚/氯仿抽提纯化 2. 减少用酶量或保温时间; 换用新开包装的酶
乙醇沉淀出现较大沉淀物	$Mg_3(PO_4)_2$ 沉淀	1. 缓冲液中尽量减少或不用磷酸盐; 将沉淀物透析 2. 用乙醇多次漂洗沉淀前加入过量 EDTA 螯合 Mg^{2+}
酶切后的 DNA 回收片段连接效率低	1. 含磷酸盐的浓度高 2. 内切酶失活不全或含有 ATP 酶 3. 平末端连接 4. 污染 DNA 外切酶 5. 连接缓冲液不适合	1. 透析、层析或多次乙醇沉淀, 75% 乙醇漂洗去除磷酸盐 2. 使用酚/氯仿抽提, 终止内切酶反应, 然后乙醇沉淀回收 DNA 3. 加大 T_4 DNA 连接酶 ($1 \sim 2U/\mu mol$ 游离末端) 4. 减少酶量或缩短保温时间, 酚/氯仿抽提, 终止内切酶反应 5. 重新配制连接缓冲液
磷酸激酶反应效率低	1. 含磷酸盐 2. 富含 GC, 末端退火	1. 层析、透析或乙醇沉淀去除磷酸盐 2. 激酶反应前将 DNA 样品 $65^{\circ}C$ 处理 5 分钟

3.6.5 限制性内切酶的星号活力

限制性内切酶在非标准反应条件下,能够切割一些与其特异识别顺序类似的序列,这种现象称星号活力。每一种内切酶在特别条件下均会产生这种活力。星号活力一般在相应限制酶的名称右上角加一个星号(*)表示,如EcoR I*代表EcoR I的星号活力。星号活力的识别形式常对标准识别顺序中两侧的碱基没有特异性,EcoR I在高pH值或低盐离子强度情况下,其识别顺序由G↓AATTC变为N↓AATTN,另有一种情况是对AATT中的A、T分辨不严格。

1. 诱发星号活力出现的,常见原因有以下几种情况:

- (1) 高甘油含量(>5%, V/V)。
- (2) 内切酶用量过大,一般为>100U/μg DNA。
- (3) 低离子强度:<25mmol/L。
- (4) 高pH值:pH8.0。
- (5) 含有机溶剂:如二甲基亚砜(DMSO)、乙醇、乙烯二乙醇、二甲基乙酰胺等。
- (6) 有Mn²⁺、Cu²⁺、Co²⁺、Zn²⁺等非Mg²⁺的二价阳离子存在。

每一种酶对以上条件诱发产生星号活力的敏感性不同,如EcoR I*对甘油敏感,Pat I*对pH敏感。

而内切酶之间出现星号活力的阈值也不一样,常见容易发生星号活力的酶有:EcoR I、Hind III、Kpn I、Pst I、Sca I、Sal I、Taq I、Xmn I、Hinf I、BssH II及EcoR V等。

2. 防止星号活力产生有以下一些措施:

- (1) 尽量使用在一定时间内能达到完全切割底物DNA的最小酶量,以减少酶反应体系中的甘油含量。
- (2) 尽量避免反应混合物中存在有机溶剂。
- (3) 将反应混合物中的盐离子强度提高到100~150mmol/L。
- (4) 将缓冲液pH值降至7.0。
- (5) 只使用Mg²⁺作辅助因子,排除其它二价金属离子的存在。

3.6.6 限制性内切酶的底物位点优势效应

限制性内切酶对同一个DNA底物上的不同酶切位点的切割速率不同,这种现象称内切酶的底物位点优势效应。这种情况的产生并非由于不同位点上的碱基甲基化修饰差异而产生的,其具体机制目前尚不清楚。

最常见到的这种现象是Hind III对λDNA的切割,其中3.6kb带的着色往往比2.3kb,甚至2.0kb的带还浅,这是由于该位点的切割速率大大低于其它位点的速率,形成位点优势效应(低14倍)所致。值得注意的是在用λDNA/Hind III分子量标准电泳估计实验样品的DNA浓度时,不要以3.6kb的带型深浅作为对照。

最早发现位点优势效应的是Thomas和Davis,1975年他们注意到EcoR I对λDNA的5个靶位点的切割速率不一样,其中在λDNA左侧的位点比分子中间的位点切割速率快10倍;Sac II在λDNA分子中间的3个位点,比靠分子右侧的那个位点(40386bp)速率快50倍。

在鉴定有些内切酶的质量时,不能都用λDNA作底物。如Nar I和Nae I以腺病毒DNA-1作底物测定的1个单位,完全不能消化λDNA上的位点,原因在出现位点优势效应。

有几个内切酶还没有发现位点优势效应,如Sma I(CCCGGG)和Apa I(GGGCCC),它们的识别顺序全由G和C组成。

有人推测位点优势效应可能与识别顺序以外的某些修饰及DNA空间结构有关。

3.6.7 琼脂糖包埋完整染色体 DNA 的内切酶酶解

制作染色体内切酶物理图谱的先决条件有两个：①是切割产生 10^6 bp 的 DNA 片段；②是能分辨这些大片段 DNA。脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 可以解决大分子量 DNA 的分辨问题，而识别 6~8 个核苷酸的内切酶 (如 Not I、Sfi I 等) 能切割产生 10^6 bp 以上的 DNA 片段。由于染色体 DNA 提取过程及提取后贮存在溶液里容易受到机械剪切力作用，使染色体 DNA 断裂产生非特异酶切片段，可干扰实验结果。为了解决这一问题，近来发展了琼脂糖包埋完整染色体 DNA 技术。

首先将完整细胞包埋在琼脂糖凝胶中，然后破开细胞，去除蛋白质。凝胶中的孔隙能够让内切酶到达裸露的 DNA，产生大片段 DNA 且不受物理剪切，最后进行脉冲场凝胶电泳分离，可得到染色体物理图谱。

试剂：

细胞悬浮液：

10mmol/L Tris·Cl (pH7.2)

20mmol/L NaCl

100mmol/L EDTA

琼脂糖水溶液：

1% 低熔点琼脂糖 (LMP)

溶菌酶溶液：

10mg/ml 溶菌酶

10mmol/L Tris·Cl (pH7.2)

50mmol/L NaCl

100mmol/L EDTA

0.2% 脱氧胆酸钠

0.5% N-laurylsarcosine 钠盐

蛋白酶 K 溶液：

1.0mg/ml 蛋白酶 K

100mmol/L EDTA (pH8.0)

1% N-laurylsar-osine 钠盐

0.2% 脱氧胆酸钠

漂洗液：

20mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

50mmol/L EDTA

贮藏液：

2mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

0.5mmol/L EDTA

操作步骤：

进行哺乳动物细胞染色体琼脂糖包埋操作之前，应制备 1ml 琼脂糖包埋 DNA (约 0.1mg/ml DNA)。

第一天：

(1) 收集 2.5×10^7 个细胞 (组织匀浆或培养细胞)，用无小牛血清的细胞培养液漂洗两次，800g，4℃ 离心 15 分钟，弃上清，尽量除去沉淀细胞中的水份。

(2) 将细胞悬浮于 0.5ml 的细胞悬浮液中 (5×10^7 个细胞/ml)，42℃ 预热平衡 10 分钟。

(3) 将预热至 42℃ 的 1% 低熔点琼脂糖 0.5ml 加至细胞悬浮液中，快速混匀，将凝合物倒入 1 个适

当的容器中(栓块模型)室温下凝固 15 分钟以上。

(4) 小心地从容器中起出已凝固的琼脂细胞栓块, 浸入 3ml 蛋白酶 K 溶液中, 42℃ 保温 18 ~ 20 小时, 轻柔摆动。

第二天:

(5) 配制 100ml 漂洗液和 10ml 贮存液。

(6) 用 5ml 漂洗液浸泡细胞琼脂糖栓块, 轻轻摇荡 15 分钟, 反复用漂洗液漂洗 20 次, 以彻底去除痕量的蛋白酶 K。也可在漂洗两次后, 在漂洗液中加入 1mmol/L 的 PMSF (苯甲磺酰氟) 使蛋白酶 K 失活。漂洗 1 小时后, 继续漂洗栓块两次以上, 这样可以节省时间, 注意 PMSF 有毒。

(7) 用 5ml 贮存液漂洗栓块两次, 每次 15 分钟。琼脂糖细胞栓块能在贮存液中 4℃ 保存 6 个月以上。其它生物组织如细菌、酵母、植物等细胞亦可按此法包埋 (详见 New England Biolabs 公司的 ImBed¹⁰ 试剂盒)。

(8) 切下 1.0 ~ 2.0μl (1mm × 3mm × 5mm) 的细胞琼脂糖栓块 (含 1 ~ 2μg DNA), 浸泡于含 1ml TE 的 Eppendorf 管中, 置冰上 15 ~ 30 分钟, 不时颠倒试管混匀, 以减低栓块中的 EDTA 含量。

(9) 吸弃上清 TE, 轻弹管壁使栓块落入管底, 加入 100μl 内切酶反应缓冲液, 置冰上 15 ~ 30 分钟, 使栓块的内环境与内切酶反应条件平衡。

(10) 去除反应缓冲液, 再加入酶切缓冲液和适量的内切酶, 在内切酶所需的温度下反应过夜。琼脂糖包埋 DNA 酶切比在溶液中反应需要有更多的酶量及更长的保温时间, 一般为 20 活性单位的内切酶, 反应 4 小时或 5 个单位的酶进行保温过夜。

(11) 酶切完毕后, 将 Eppendorf 管置于冰上, 吸去酶和缓冲液, 加入 1ml 脉冲电泳缓冲液与栓块, 冰上平衡 15 ~ 30 分钟, 不时颠倒微型离心管混匀。

(12) 加脉冲电泳缓冲液 100μl, 便于栓块上样, 进行脉冲电泳分析染色体 DNA 物理图谱。

3.6.8 限制性内切酶对单链 DNA 的切割

虽然限制性内切酶定义为切割双链 DNA 特异位点的核酸内切酶, 但是实际上仍有一些限制性内切酶的底物, 除双链 DNA 以外, 还可以特异识别并切割单链 DNA 的相应位点, 只是切割效率比双链 DNA 的效率要低。以下例举的是对单链 φX174 和 M13mp18DNA 能够特异切割的内切酶: Hha I、Hinc II 和 Mnl I 切割单链 DNA 效率, 比切割双链 DNA 效率低 50%; Hae III 低 90%; BstN I、Dde I、Hga I、Hinf I 和 Taq I 的单链切割效率比双链低 100 倍。而 Alu I、Bbv I、Dpn I、FnuD II、Fok I、Hpa II、Hph I、Mbo I、Mbo II、Msp I、Sau3A、SfaN I 等内切酶没有切割单链 DNA 的能力。

3.6.9 限制性内切酶位点上的甲基化

DNA 甲基化酶可以通过甲基化修饰 DNA 顺序上某些位点, 拮抗相应限制性内切酶的切割, 这一特性为分子克隆操作中提供了一个改变内切酶位点的方便工具。体外甲基化的方式有 3 种: ①利用内切酶与甲基化酶的识别顺序的重迭性, 如 Hinc II 识别 GTPyPuAC, 其中有 1 个顺序—GTCGAC, 而甲基化酶 M. Taq I 识别的 TCGA 正是该顺序中的一部分。通过对 TCGA 中的 A 进行甲基化, 使 Hinc II 不能切割, 从而改变了 Hinc II 的切割顺序范围; ②利用内切酶与甲基化酶识别顺序的邻接性。如 BamH I 识别 GGATCC, 若在 CC 后面紧邻 GG, 则为甲基化酶 M. Msp I 提供了甲基化位点 CCGG, 修饰后的顺序 GGAT^mCCGG 能拮抗 BamH I 的切割; ③修饰 CG 中的 C, 这一功能由 CpG 甲基化酶完成, 许多内切酶识别顺序中包含 CG 顺序, 所以它有较广泛的应用。下面介绍 DNA 体外甲基化的操作。

3.6.9.1 利用内切酶的反应缓冲液进行甲基化

(1) 依次添加以下试剂: 混合成终容积为 50μl: 相应内切酶缓冲液, 1 ~ 2μg 底物 DNA, 80μmol/L SAM (S-adenosylmethionine) 和 3 ~ 10 单位的甲基化酶。

- (2) 37℃保温 1 小时。
- (3) 65℃, 15 分钟使甲基化酶失活。
- (4) 取出 10 μ l 反应液加入 2 个单位的相应内切酶进行酶切, 鉴定甲基化效果。

3.6.9.2 甲基化反应缓冲液中含有 EDTA

操作步骤:

- (1) 依次添加以下试剂, 混合成终容积为 50 μ l。

甲基化反应缓冲液 (50mmol/L Tris·Cl pH8.0, 50mmol/L NaCl, 10mmol/L EDTA, 80 μ mol/L SAM, 50 μ g/ml BSA)

1 μ g DNA

1~5U 甲基化酶

- (2) 37℃保温 1 小时。

(3) 65℃, 10 分钟失活甲基化酶后, 加入含 20mmol/L Mg²⁺ 的内切酶缓冲液; 或加入 50 μ l 10mmol/L Tris·Cl (pH7.5), 0.2mol/L NaCl, 再进行酚抽提, 异丙醇沉淀后, 溶于 50 μ l 内切酶缓冲液中。

- (4) 加入 5~10 个单位的相应内切酶, 37℃保温 1 小时, 电泳鉴定甲基化的效果。

3.7 电泳

带电荷的物质在电场中的趋向运动称为电泳。1937 年首创纸电泳技术后, 电泳的种类和应用在深度和广度两方面均发展迅速, 已成为分子生物学技术中分离生物大分子的重要手段。其中, 凝胶电泳由于其操作简单、快速、灵敏等优点, 使它成为分离、鉴定和提纯核酸的首选的标准方法。

本章节主要介绍凝胶电泳的原理及其在核酸研究中的应用。

3.7.1 原理

迁移率 (又称泳动率) 是带电荷颗粒在一定电场强度下, 单位时间内在介质中的迁移距离, 可用以下公式计算:

$$U = \frac{V}{E} = \frac{d/t}{L} = \frac{dL}{Ut}$$

其中泳动距离 d (cm) 除以电泳时间 t (秒或分) 是泳动速度 V (cm/s 或 min); 电压 U 除以支持物的长度 L 为电场强度 (V/cm); 迁移率 (也称泳动率) 的单位是 cm/(V·s) 或 cm/(V·min)

泳动率与样品分子所带的电密度、电场中的电压及电流成正比, 与样品的分子大小、介质粘度及电阻成反比。不同大小的带电分子具有不同的泳动率, 在不同的介质条件下又具有不同的分辨率。

与蛋白质分子类似, 核酸分子也是两性解离分子。在 pH3.5 时, 碱基上的氨基基团解离, 而三个磷酸基团中只有第一个磷酸解离, 整个核酸分子带正电荷, 在电场中向负极泳动; 在 pH 值为 8.0~8.3 时, 碱基几乎不解离, 磷酸全部解离, 核酸分子带负电荷, 向正极移动。不同大小和构象的核酸分子的电荷密度大致相同, 在自由泳动时, 各核酸分子的迁移率区别很小, 难以分开。所以采用适当浓度的凝胶介质作为电泳支持物, 发挥分子筛的功能, 使得分子大小和构象不同的核酸分子泳动率出现较大差异, 达到分离的目的。值得注意的是, 等长度的单链 DNA 和双链 DNA 在中性或碱性凝胶中的迁移率大致相等。

3.7.2 影响泳动率的四大因素

3.7.2.1 样品的物理性状

影响泳动率的首要因素是电泳样品的物理性质, 包括分子大小、电荷多少、颗粒形状和空间构型。

一般来说颗粒带电荷的密度愈大, 泳动速率愈快; 颗粒物理形状愈大, 与支持物介质摩擦力越大, 泳动速度愈小。即泳动率与颗粒的分子大小, 介质粘度成反比; 与颗粒所带电荷成正比。可用以下公式表示:

$$U = \frac{Q}{6\pi\gamma V\eta}$$

其中 U : 泳动率; V : 泳动速度; Q : 颗粒带电荷量; η : 介质粘度; γ : 颗粒分子半径

对于线性双链 DNA 分子, 在凝胶电泳中, 分子量的常用对数与泳动率成反比关系 (图 3-1), 这是 1974 年 Helling 等人的实验结果。基于这一发现, 利用 DNA 分子长度 (bp) 的负对数与泳动距离作图, 对于 DNA 片段的分子量测定非常方便且较准确。

在检测未知 DNA 分子量时, DNA 分子的空间构型不同, 即使相同的分子量其迁移率也不相同。如质粒 DNA 存在闭环 (I 型, CC)、单链开环 (II 型, OC) 和线性 (III 型, L), 三者之间的迁移速率, 一般为 I 型 > III 型 > II 型。但是有时也会出现相反的情况。因为与琼脂糖浓度、电流强度、离子

强度及溴乙锭染料含量有关。当胶浓度较高或电场强度较大时, I 型 DNA 与 III 型 DNA 互换位置, 而 II 型 DNA 总是迁移最慢。如: SV 40 病毒 DNA, 在 2V/cm 电场强度下, 迁移率为 I 型 > III 型 > II 型; 在 20V/cm 时, 迁移率为 III 型 > I 型 > II 型。小鼠线粒体 DNA; 在 0.6% 胶中, 迁移率为 III 型 > I 型 > II 型, 在 1.0% 胶中, 则 III 型 > I 型 > II 型。I 型的共价闭环质粒 DNA 常态下为负超螺旋。当染料溴乙锭嵌合在 DNA 碱基对之间时, I 型 DNA 的负超螺旋解旋, DNA 迁移率下降, 当溴乙锭浓度达到临界游离浓度时, 即所有的负超螺旋全部消失, I 型 DNA 不再存在超螺旋结构, 这时迁移率达到最小值, 并且接近 III 型 DNA 的迁移率。一般情况下, 绝大多数 I 型 DNA 的游离溴乙锭的临界浓度为 0.1 ~ 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 这就是为什么凝胶电泳时, 胶中加入的 EB 浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的理论依据。当 I 型 DNA 在大于 EB 游离临界浓度的情况下, I 型 DNA 又会产生正超螺旋, 迁移率迅速增加。EB 能中和 II、III 型 DNA 的电荷并使分子的刚性增加, 从而使它们的迁移率有不同程度的下降。EB 使线性双链 DNA 分子的迁移率下降 15% 左右, 所以在无 EB 的状况下进行电泳, 电泳完毕后再染色, 这对 DNA 分子量的计算较为准确。

DNA 的碱基组成对迁移率的影响不明显。

3.7.2.2 支持物介质

DNA 的凝胶电泳常使用两种支持材料, 琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶 (polyacrylamide gel, PAG)。通过这两种介质的浓度变化调整所形成凝胶的分子筛网孔大小, 分离不同分子量的核酸片段。琼脂糖凝胶的孔径大, 可以分离长度为 100bp 至近 60kb 的 DNA 分子; 聚丙烯酰胺凝胶的孔径小, 可分离小片段 (5 ~ 500bp) DNA, 效果最好。DNA 的迁移率 (U) 的对数与凝胶浓度 (T) 之间存在反平行线性关系, 可用以下方程式表示:

$$\log U = \log U_0 - KrT$$

U : 迁移率; U_0 : 自由迁移率; T : 凝胶浓度; Kr : 介质阻滞系数, 是一个与凝胶性质、样品分子大小、形状有关的常数。

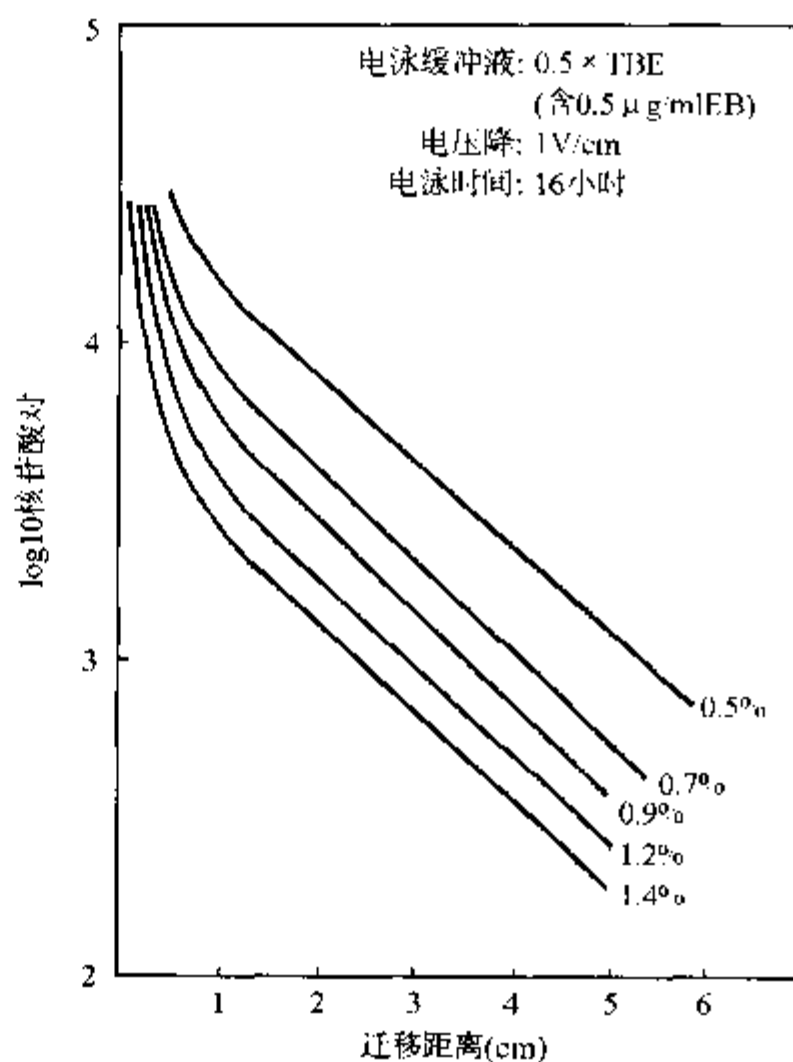


图 3-1 DNA 片段大小与电泳迁移率的比较

因此,选用不同的凝胶种类和浓度可以分辨大小不同的 DNA 片段,表 3-5 列出不同凝胶浓度与其分离 DNA 分子大小的范围。

表 3-5 凝胶浓度和 DNA 分子的有效分离范围

凝 胶	胶浓度 (%)	线性 DNA 分子大小
PAG	3.5	1000 ~ 2000 (bp)
	5.0	80 ~ 800
	8.0	60 ~ 400
	12.0	40 ~ 200
	20.0	6 ~ 100
琼脂糖	0.3	5 ~ 60 (kb)
	0.6	1 ~ 20
	0.7	0.8 ~ 10
	0.9	0.5 ~ 7
	1.2	0.4 ~ 6
	1.5	0.2 ~ 4
	2.0	0.1 ~ 3

PAG 浓度小于 2.4% 的不能凝结,可加入一定量的琼脂糖辅助成胶。如 2.2% 的 PAG 与 0.7% 的琼脂糖混合凝胶,可有效分离 150bp ~ 5.7kb 大小的核酸分子。低浓度的 PAG 凝胶易碎,添加琼脂糖可加强其机械强度。

在电场中,液体对于固体支持物的相对运动称为电渗。凝胶电泳的电渗作用很小,这是核酸电泳常用凝胶的理由之一。电泳有时出现 DNA 带型的拖尾现象,常常是由于 DNA 样品含有蛋白质易被凝胶介质吸附所致。但 DNA 带型拖尾与不均匀,甚至呈颗粒状,不应用电渗作用解释。

3.7.2.3 电场强度

电泳场两极间单位支持物长度的电压降即为电场强度或电压梯度。电场强度愈大,带电颗粒的泳动速度愈快,但凝胶的有效分离范围随电压的增大而减小。在低电压时,线性 DNA 分子的泳动率与电压成正比。一般凝胶电泳的电场强度不超过 5V/cm;对于大分子量真核基因组 DNA 片段的电泳常采用 0.5 ~ 1.0V/cm 电泳过夜,以取得较好的分辨率和整齐的带型。电压 1 000 ~ 2 000V,电场强度 20 ~ 600V/cm 的电泳为高压电泳,必须用 PAG 做介质。

3.7.2.4 缓冲液离子强度

缓冲液是电泳场中的导体,它的种类、pH 值、离子浓度直接影响电泳的效率。Tris·Cl 缓冲体系中,由于 Cl⁻ 的泳动速度比样品分子快得多,易引起带型不均一现象,所以常利用 Tris·醋酸 (TAE)、Tris 硼酸 (TBE) 和 Tris·磷酸 (TPE) 三种缓冲体系。人们喜欢使用 TAE 缓冲液,因为 TAE 缓冲液较其它两种缓冲液价格低,其实 TAE 的缓冲能力很低,长时间电泳会导致电泳阴极变为碱性,阳极变成酸性,使缓冲能力丧失殆尽,所以 TAE 电泳需在两个贮液槽之间使用蠕动泵进行液体循环。而且 TAE 需要经常更新。TBE 与 TPE 均有较高的缓冲能力,不需要缓冲液循环即可获得良好的 DNA 分离效果。用 TPE 配制的凝胶,尤其是低熔点琼脂糖凝胶电泳,回收的 DNA 片段含有较高的磷酸盐,易与 DNA 一起沉淀,而影响一些酶反应。故作者推荐以 TBE 作为首选 DNA 电泳缓冲液。这些缓冲液中均应加入 EDTA,目的在于螯合二价离子,抑制 DNA 酶,以保护 DNA。

缓冲液的 pH 值直接影响 DNA 解离程度和电荷密度,缓冲液 pH 值与 DNA 样品的等电点相距越远,样品所携电荷量越多,泳动速度愈快。DNA 电泳缓冲液,常采用偏碱性或中性条件,使核酸分子带负电荷,向正极泳动。缓冲液的离子强度与样品泳动速度成反比,电泳的最适离子强度一般在 0.02 ~ 0.2

之间。离子强度的计算公式如下：

$$I = \frac{1}{2} \sum CZ^n$$

1: 离子强度; C: 溶液的克分子浓度; Z: 原子价; n: 原子数目

3.7.3 核酸电泳的指示剂与染色剂

3.7.3.1 指示剂

电泳过程中, 常使用一种有颜色的标记物以指示样品的迁移过程。核酸电泳常用的指示剂有两种: 溴酚蓝 (bromophenol blue, Bb) 呈蓝紫色; 二甲苯青 (xylene cyanol, Xc) 呈蓝色。

溴酚蓝的分子量为 670, 在不同浓度凝胶中, 迁移速度基本相同, 它的分子筛效应小, 近似于自由电泳, 故被普遍用作指示剂。在 0.6%, 1%, 2% 的琼脂糖凝胶电泳中, 溴酚蓝的迁移率分别与 1kb, 0.6kb 和 0.15kb 的双链线性 DNA 片段大致相同。在 5% 的聚丙烯酰胺凝胶含 7~8mol/L 尿素 PAG 中, 分别与 65mer 和 35mer 的寡聚核苷酸迁移率相同。

二甲苯青的分子量为 554.6, 携带的电荷量比溴酚蓝少, 在凝胶中迁移率比溴酚蓝慢, 在 5% PAG 含 7~8mol/L 尿素 PAG 的胶中迁移率分别相当于 260mer 和 130mer 的寡核苷酸。所以根据分离样品中 DNA 分子的大小, 可以参照指示剂 Bb 和 Xc 的迁移情况决定是否停止电泳。

表 3-6 与指示剂迁移相当的 DNA 大小与凝胶浓度的关系

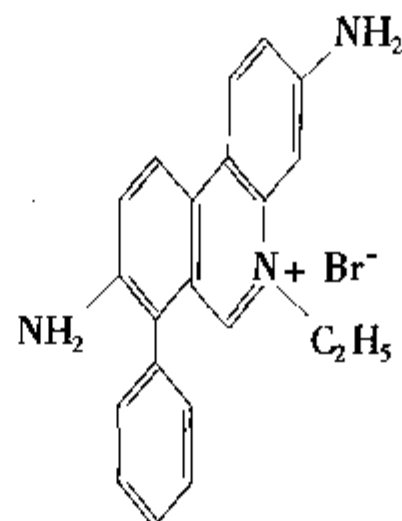
琼脂糖凝胶 (%)	二甲苯青 (bp)	溴酚蓝 (bp)
1.0	2 000	
1.4	1 600	200
聚丙烯酰胺凝胶 (%)		
5	280	65
8	105	25
10	95	25~30
7mol/L 尿素聚丙烯酰胺凝胶 (%)		
6	110	30
8	70	18
10	60	15
15	46	12
20	29	9

指示剂一般加在电泳上样缓冲液中, 为了使样品能沉入胶孔, 还要加入适量的蔗糖、聚蔗糖 400 或甘油以增加比重。

3.7.3.2 染色剂

电泳后, 核酸需经过染色才能显示出带型, 已有 4 种, 最常使用的是溴乙锭染色法。

1. 溴乙锭 (ethidium bromide, EB);



溴乙锭是一种荧光染料, 这种扁平分子可以嵌入核酸双链的配对碱基之间, 在紫外线激发下, 发出红色荧光。激发荧光的能量来源于两个方面, 一是核酸吸收波长为 260nm 的紫外线后将能量传送给溴乙锭, 二是结合在 DNA 分子中的 EB 本身, 主要吸收波长为 300nm 和 360nm 的紫外线的能量, 来源于这两方面的能量, 最终激发 EB 发射出波长为 590nm 的可见光谱红橙区的红色荧光。EB-DNA 复合物中的 EB 发出的荧光, 比游离的凝胶中的 EB 本身发射的荧光强度大 10 倍, 因此不需要洗净背景就能较清楚地观察到核酸的电泳带型。若核酸量很少, 而 EB 的背景太深致使带型不清, 可将凝胶浸泡于 1mmol/L MgSO₄ 中 1 小时或 10mmol/L MgCl₂ 中 5 分钟, 使非结合的 EB 褪色, 减少未结合的 EB 产生的背景荧光, 这样可检查到 10ng (纳克) 的 DNA 样品。

染色一般是在凝胶或电泳缓冲液中加入终浓度为 0.5μg/ml 的 EB, 可以在电泳过程中随时观察核酸的迁移情况, 这种方法适用于一般性的核酸监测。但是由于 EB 带正电荷, 中和核酸分子的负电荷, 同时它的嵌入增加了核酸分子的刚性, 使迁移率减慢, 故不宜用于凝胶电泳测定核酸分子的大小的。利用

凝胶电泳比较估计或测定样品 DNA 的含量, 也不适合在凝胶中直接加入 EB, 因为在凝胶中, 游离的 EB 分子向负极泳动, 会使样品中前后各带染色不均匀, 影响定量。故应在电泳后, 将凝胶浸入 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 EB 水溶液中 10 分钟进行染色。

EB 见光易分解, 故应存棕色试剂瓶中于 4°C 条件下保存, 染色时也应避光。电泳后应立即染色观察或拍照记录。若不能马上拍照, 可用保鲜膜或塑料袋封好置于 4°C 下过夜, 核酸带型改变不大。单链 DNA、RNA 分子中常存在自身配对的双链区, 也可以嵌入 EB 分子, 但嵌入量少, 因而荧光较低, 其最低检出量为 $0.1\mu\text{g}$ 。

Clifford 等人在 1977 年, 比较鉴定了三种不同的紫外线光源激发 EB 产生荧光的灵敏度、褪色效应和 DNA 损伤作用, 结果列于表 3-7 中。短波 254nm 的紫外线是由核酸吸收后传递给 EB, 灵敏度较高, 对核酸的损害作用最大, 会造成核酸链断裂或形成嘧啶二聚体, 照射时间过长还会引起褪色效应; 300nm 和 360nm 的紫外线主要由 EB 分子直接吸收, 对核酸的断链和嘧啶二聚体形成等效应小, 褪色反应轻微, 灵敏度为 $300\text{nm} > 254\text{nm} > 360\text{nm}$ 。故一般电泳后需回收的 DNA 样品, 应在 360nm 波长的紫外线灯下操作, 以减少对 DNA 的损伤。 300nm 波长紫外线对于观察样品 (灵敏度最好) 和长时间紫外线下操作 (如切割含所需 DNA 片段的凝胶进行回收) 均为最佳的选择。Pharmacia 公司生产的 Macro Vise 紫外线透照器, 采用 302nm 波长紫外线, 正是基于以上理由设计的, 其形成嘧啶二聚体等损伤 DNA 效应很低, 与 360nm 波长类似 (表 3-7)。

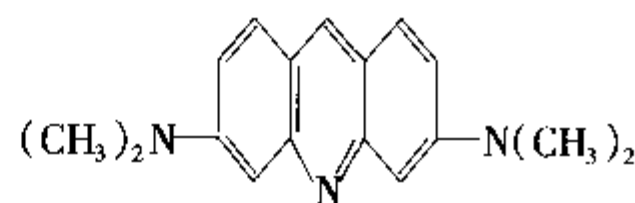
表 3-7 3 种不同波长紫外线在相同条件下照射 EB-DNA 复合物的不同结果

波长 (nm)	灵敏度	光损害效应		褪色效应
		产生断链缺口	形成嘧啶二聚体	
254	较高	多	多	严重
300	最高, 是 254nm 的 1.5 倍	较少, 是 254nm 的 $1/15$	是 254nm 的 $1/84$	轻微
366	低, 是 254nm 的 $1/5$	最少, 是 254nm 的 $1/75$	无	几乎不褪色

2. 吖啶橙 (acridine orange, AO):

吖啶橙与核酸的结合情况比较复杂, 也是扁平分子的荧光染料。

一般认为吖啶橙可以嵌入核酸双链碱基对之间, 在 254nm 紫外线激发下发出 530nm 的绿色荧光; 它还通过静电与单链核酸的磷酸基结合, 在 254nm 紫外线激发下产生 640nm 的红色荧光。吖啶橙染色操作要求严格, 一般是在 22°C , 0.01mol/L 的磷酸钠缓冲液 ($\text{pH}7.0$) 中避光浸泡 30 分钟, 然后在该缓冲液中, 4°C 脱色过夜或 22°C 脱色 1~2 小时, 脱色在搪瓷盘中进行。虽然吖啶橙染色可以区别单链和双链核酸, 检测灵敏度分别为 $0.1\mu\text{g}$ 和 $0.05\mu\text{g}$, 但染色效果与吖啶橙的浓度、 pH 、温度、离子强度及脱色等因素密切相关, 不易掌握。



3. 银 (Ag^+) 试剂:

Ag^+ 与核酸形成稳定复合物, 然后用甲醛使 Ag^+ 还原成银颗粒。硝酸银等试剂可使聚丙烯酰胺凝胶上的单链、双链 DNA 及 RNA 都染成黑褐色。

银染法的灵敏度比 EB 染色高 200 倍左右, 比亚甲蓝染色高 100~1 000 倍, 在小于 0.5mm 厚的凝胶中, 能检测出 0.5ng 的 RNA。其缺点是专一性不强, 能与蛋白质和去污剂反应产生类似 DNA 被染成的颜色。而且对 DNA 的染色与其碱性组成有关, 与核酸的含量不成正比, 定量不准确。银与 DNA 稳定结合, 对 DNA 有破坏作用, 不适于 DNA 回收的制备型电泳。

4. 亚甲蓝 (methylene blue):

它可将 RNA 染成蓝色, 但灵敏度不高, 而且操作时间很长。

染色: 胶浸泡于 0.02% 的亚甲蓝, 10mmol/L Tris·Ac (pH8.3), 4℃ 放置 1~2 小时, 用净水洗 5~8 小时 (反复换水), 带型肉眼可见, 最低检测量为 250ng, 由于操作繁琐, 使用较少。

3.7.4 电泳装置

根据不同的需要, 可以选择不同的电泳装置。总的来说, 电泳设施应包括电泳仪 (电源)、电泳槽 (水平式、垂直式、盘状等) 以及灌胶模具等几个部分。

电源: 提供 200V 电压、200mA 直流电的电源, 即可满足除核酸序列分析以外的常用实验。一般要求具备恒压功能。

电泳槽: 水平式电泳槽几乎为当今所有琼脂糖凝胶电泳所采用, 具有以下优点: 灌胶、制板、加样等操作方便; 可制备不同大小的凝胶; 凝胶机械压力小; 即使是低浓度的琼脂糖凝胶也不易碎裂, 器材廉价耐用。

垂直装置电泳多用于聚丙烯酰胺凝胶, 前后凝胶板最好是玻璃的, 因为有机玻璃对丙烯酰胺的聚合有抑制作用。

有关 DNA 序列测定中使用的特殊装置, 见本书有关章节。

在购置或自制电泳设施, 尤其是电泳槽和灌胶体系时, 应该考虑以下因素:

(1) 电泳过程中可方便地进行紫外线下观察。

(2) 灌胶使用的梳子, 应配备数个具有不同大小和数目的梳孔。1 个电泳槽用两排梳子制胶, 适用于数目较多样品的同时电泳。

(3) 电泳槽两端的电极接头包裹应用绝缘外套以防止漏电, 以不同颜色区别正、负极便于换取铂金丝。

(4) 电泳槽正、负两极的电泳缓冲液循环方便, 对于 RNA 电泳非常重要。

为了使缓冲液在阴、阳极槽间循环, 必须备有蠕动泵, 1ml/分钟流速的蠕动泵完全可以满足使用要求, 用 Tris 醋酸缓冲液电泳时, 也应使用蠕动泵。

3.7.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳可根据电泳样品的电荷, 分子大小及形状的差别分离物质。这种介质既具有分子筛效应, 又具备静电效应, 所以分辨力高于琼脂糖凝胶电泳, 它适用于低分子量蛋白质 (低于 100 道尔顿, 1 道尔顿 = 0.9921 原子质量单位)、寡聚核苷酸的分离和 DNA 的序列分析。聚丙烯酰胺凝胶电泳具备分离只相差 1 个核苷酸的不同 DNA 片段的特性, 是 DNA 序列分析因素中的关键技术之一。

丙烯酰胺 (Acr) 单体, 在催化剂 N, N, N', N' - 四甲基乙二胺 (TEMED) 和过硫酸铵 (AP) 的存在下, 丙烯酰胺产生聚合反应, 形成长链, 加入交联剂 N, N' - 亚甲双丙烯酰胺 (Bis), 聚丙烯酰胺链就会交叉连接而形成凝胶。凝胶的网孔大小取决于聚合链的长度及交连的程度。

1 个交叉连接的聚丙烯酰胺分子, 量少包含 29 个丙烯酰胺单体。聚合链的长度决定于聚合反应中的单体丙烯酰胺浓度。凝胶中网格的孔径由 Acr 与 Bis 的相对比例决定, 调节单体与交联剂的浓度比例, 可形成不同交联度的网状聚合物。其中亚甲双丙烯酰胺的浓度愈高, 孔径愈大。适用于分离大分子物质。表 3-8 列出含不同浓度丙烯酰胺的非变性凝胶, 分辨 DNA 的能力以及相当于二甲苯青与溴酚蓝两种指示剂同样迁移率的双链 DNA 分子的大小 (bp)。

聚丙烯酰胺凝胶常规灌制于两块封闭的平板之间, 然后进入垂直电泳。其理由主要是氧能抑制丙烯酰胺的聚合反应, 在封闭的双玻璃平板的夹层中灌胶后, 仅有顶层的部分凝胶与空气中的氧气接触, 从而大大减低了氧对聚合的抑制作用。

表 3-8 聚丙烯酰胺凝胶对 DNA 的分辨范围

丙烯酰胺 (% [W/V] ^a)	分离范围 (bp)	二甲苯蓝 ^b	溴酚蓝 ^b
3.5	100 ~ 2000	460	100
5.0	80 ~ 500	260	65
8.0	60 ~ 400	160	45
12.0	40 ~ 200	70	20
15.0	25 ~ 150	60	15
20.0	6 ~ 100	45	12

a: 其中含有 N, N' - 亚甲双丙烯酰胺, 浓度为丙烯酰胺的 1/30。

b: 表中给出的数目为与指示剂迁移率相等的双链 DNA 分子中所含的碱基对数目 (bp)。

虽然聚丙烯酰胺凝胶的灌制比琼脂糖凝胶繁杂, 但有以下几种优点是琼脂糖凝胶所不具备的:

(1) 分辨率极高, 在同一 DNA 混合物中, 即使最大的片段比最小的片段长 500 倍 (如 1bp 与 500bp) 也能很好地分离。

(2) 比琼脂糖凝胶的载样量大, 在 1cm × 1mm 的胶孔中能上样到 10 μ g 的 DNA 样品, 而分辨率并无明显下降。

(3) 回收的 DNA 样品纯度极高, 可用于要求非常严格的实验, 如转基因动物实验。

(4) 在聚丙烯酰胺凝胶分子的交联网状结构中, 带有酰胺侧链的 C - C 聚合物, 不带或少带离子侧链基团。

(5) 聚丙烯酰胺凝胶无色透明, 比琼脂糖凝胶的紫外线吸收低, 抗腐蚀性强, 机械强度高, 韧性好。

〔聚丙烯酰胺凝胶 (PAG) 的制备〕

一般制成 0.5mm ~ 2mm 厚度, 过厚的凝胶因产热而导致 DNA 电泳的带型不整。灌胶的玻璃平板一般为 20cm × 40cm。丙烯酰胺是一种神经毒素, 可通过皮肤吸收, 会因多次积蓄而中毒。操作时应极其小心, 需戴手套和面罩。

专用仪器:

垂直电泳槽、两块制胶玻璃板、垫条、梳子、夹子若干。

试剂:

30% 丙烯酰胺 (丙烯酰胺: 亚甲双丙烯酰胺 = 29:1);

丙烯酰胺 29g

N, N' - 亚甲双丙烯酰胺 1g

H₂O 加至 100ml

①有些批号的丙烯酰胺中含有金属离子, 应进行去离子处理; ②丙烯酰胺与亚甲双丙烯酰胺在贮存过程中, 因光或碱的催化, 会慢慢转变成丙烯酸或双丙烯酸, 故应该经常检查丙烯酰胺溶液的 pH 值是否小于 7.0。为此, 常将它装入棕色瓶中, 并于 4℃ 保存。新配制的溶液一般使用 2 个月。

1 × TBE (Tris·硼酸·EDTA 电泳缓冲液):

89mmol/L Tris·硼酸

2mmol/L EDTA (pH8.0)

TBE 用 5 倍的母液稀释成 1 倍的即可, 缓冲液的 pH 值约为 8.3。聚丙烯酰胺凝胶电泳常用 1 × TBE, 比琼脂糖凝胶使用的 0.5 × TBE 高 2 倍, 这是由于垂直电泳的槽较小, 需加强离子浓度, 提供适当高一点的电流。

10% 过硫酸铵:

过硫酸铵 1g

H₂O

加至 10ml

该溶液在 4℃ 可贮存数周。

准备工作:

灌胶玻璃和垫条的清洗: 若情况需要, 先用 KOH/甲醇液清洗, 溶液配制为将 5g KOH 加入至 100ml 甲醇中溶解, 操作时必须戴手套与面罩。接着用热的去污剂清洗, 自来水彻底冲洗然后用去离子蒸馏水漂洗干净。取板时应握住板的边缘, 以避免手上的油脂印在板的工作面上, 造成灌胶时容易产生气泡。最后用乙醇擦洗玻璃板后, 竖直安放待干。

硅化: 目的是减少灌胶时形成气泡, 还可以防止凝胶与两块玻璃板的过分粘连, 电泳后撤除玻璃板时不至于将凝胶撕裂。硅化时可先将玻璃板置于熏蒸器皿中的垫纸上, 用少量 Sigmacote 硅化液涂匀在玻璃板工作面上, 关上熏蒸器皿半小时, 取出玻璃板用去离子水漂洗净, 空气中室温晾干即可, 硅化操作过程中应戴手套。

制胶方法:

(1) 灌胶玻璃板的安装与密封: 将较大的 (或无耳) 板平放在桌上, 两条长边缘先涂上适量凡士林, 将垫条竖直粘固于两侧, 然后将在相应位置涂上凡士林的內板放在垫上, 条对齐安置。

模具的两侧与底部用 1% 的琼脂糖 (冷至 50℃) 封堵住缝隙。操作要仔细, 防止缝隙封闭不严而使聚丙烯酰胺漏出。也可用适当胶封带 (3mm 的黄色电器胶带) 封闭, 医用橡胶带或粘胶纸带也可使用。

(2) 根据模具体积计算所需配制胶液的容积, 每 100ml 的配方见表 3-9。

表 3-9 聚丙烯酰胺凝胶电泳的配制

试 剂	不同浓度 (%) 的凝胶中各成分的添加量 (ml)				
	3.5	5.0	8.0	12.0	20.0
30% 丙烯酰胺	11.6	16.6	26.6	40.0	66.6
水	67.7	52.7	62.7	39.3	12.7
5 × TBE	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
10% 过硫酸铵	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7

(3) 将配制的溶液真空抽气 (开始时要缓慢) 以去除气泡, 或用超声去除气泡。

(4) 加 35μl TEMED 至 100ml 已去气泡的丙烯酰胺混合液中, 混匀, 将溶液抽至 50ml 的注射器中, 排出气泡, 戴上针头, 将玻璃模具倾斜成 60°角, 缓慢注入两玻璃板空隙中, 不时轻敲玻璃板让气泡上浮, 直至灌满至模具顶部。将剩下的丙烯酰胺溶液于 4℃ 保存, 减缓聚合速度, 将模具放置成 10°角, 以减少泄漏。

(5) 立即插入适当的梳子, 小心勿使梳齿下带进气泡, 梳顶部应比玻璃板的顶部稍高些。若需要可将剩下的丙烯酰胺液将模具灌满, 检查是否有丙烯酰胺液泄漏。

(6) 室温聚合 1 小时, 若凝胶有明显回缩, 再添加些丙烯酰胺。梳齿下出现 Schlieren 线时, 标志聚合反应已经完成, 这是由于光线通过透明介质不同密度不同折射率的区域时, 光线折射产生的波纹。若凝胶不立即使用, 可用纱布或滤纸 (浸湿 1 × TBE) 包盖凝胶顶部置于 4℃ 保存 1~2 天。

(7) 小心取出梳子, 立即用水冲洗孔格, 将模具底部的胶带撕去。用水冲洗孔格这一操作步骤不能省略, 因为梳子取出后, 梳子上吸附的和胶顶部未聚合完的丙烯酰胺会流入孔格内, 再聚合后使孔底形状不整齐, 将导致以后电泳带型的不整。

(8) 将凝胶放入电泳槽, 內板与电泳缓冲液槽接触处可用大号黑夹夹住侧边, 并将三叉夹固定两肩角。

3.7.6.1 琼脂糖凝胶的制备及电泳

仪器:

应包括水平凝胶电泳槽, 稳压电泳仪, 微波炉, 紫外线检测仪

试剂:

琼脂糖, $5\times$ TBE, 10mg/ml 溴乙锭溶液, 电泳样品上样缓冲液

准备工作:

包括制备 DNA 样品以供分析, 如 DNA 的内切酶消化。

制备凝胶:

- (1) 根据所需浓度称取一定量的琼脂糖, 加入 100ml $0.5\times$ 或 $1\times$ TBE 或其它电泳缓冲液。
 - (2) 微波炉加热或沸水浴使琼脂糖溶解, 注意微波炉加热在 2 分钟左右即可使琼脂糖溶解, 时间太长就会使水份蒸发过多而改变凝胶浓度。容器最好用三角瓶, 液体不要超过容器容积的一半, 以 $1/3$ 较好, 用滤纸 (如新华五号) 塞于瓶口, 留出缝隙, 以防瓶盖在加热时被蒸气冲开, 或用两层保鲜膜盖于瓶口。
 - (3) 溶液冷至 60°C 时, 若需要, 则加入溴乙锭至终浓度为 $0.5\mu\text{g/ml}$, 必须戴手套操作。
 - (4) 制胶模具的两端用医用橡皮膏封好, 再在其边缘加上少量琼脂糖溶液, 凝固后有防泄漏作用。
 - (5) 将琼脂糖倒入模具, 凝胶厚度一般为 $0.3\sim 0.5\text{cm}$ 。迅速在模具一端安插上梳子, 检查有无气泡。梳齿直接接触模具底面或它们之间距离太近, 在取出梳子时, 容易将孔底凝胶拉破, 导致样品泄漏到胶与模具之间。
 - (6) 室温下 $30\sim 45$ 分钟后, 琼脂糖溶液完全凝固, 低熔点凝胶应于 4°C 凝固, 小心取出梳子, 并撤除模具两端的橡皮膏, 将凝胶放置于电泳槽中。
 - (7) 加入电泳缓冲液 (如 $0.5\times$ TBE) 至电泳槽中, 让液面高于胶面 1mm, 这样凝胶两端的电压几乎与外加电压相等, 电泳效率高。注意电泳槽中的缓冲液与凝胶配制所用的缓冲液, 应为同一批配制, 若电泳缓冲液与凝胶中的离子强度和 pH 不一致将影响核酸的迁移。
 - (8) 在 DNA 样品中加入 $1/6$ 的上样缓冲液 (配制方法见表 3-10), 混匀后, 用 Eppendorf 离心机离心 5 秒钟, 使溶液全部汇集于管底部。
 - (9) 用移液枪将 DNA 样品加入样品孔中。
- 上样时, 应注意以下几点: ①加样时枪头不要碰坏凝胶孔壁, 否则 DNA 的带型不整齐, 加样前要用枪头吸打凝胶孔中的溶液以赶走样品孔中的气泡; ②每孔最大 DNA 上样量决定于 DNA 样品片段的大小、数目及样品孔形状与容量。对于 0.5cm 宽的样品孔, 电泳后每条 DNA 带最低检测量为 2ng 。若每条 DNA 带含有 500ng 的量, 则会发生带型拖尾, 轮廓不清的超载现象。故对于 0.5cm 宽的样品孔, 单一分子量的 DNA (如 λ 噬菌体、质粒), 每孔加样 $100\sim 500\text{ng}$, 若 DNA 样品中含有许多不同分子量的片段, 则可以上样到 $20\sim 30\mu\text{g}$ 也不至于明显地影响分辨率; ③每孔最大上样容积决定于样品孔体积, 对于标准的 $0.5\text{cm}\times 0.5\text{cm}\times 0.15\text{cm}$ 的样品孔, 最大上样容积为 $37.5\mu\text{l}$ 。若样品容积大于凝胶孔容积会导致样品溢出, 流入邻近样品孔造成样品交叉污染, 影响结果分析。解决的办法一是将凝胶制作厚一点; 二是乙醇沉淀 DNA, 溶于适当容积的 TE; ④在许多实验中, 加样时不必每个样品换 1 个枪头, 可以在阳极槽中反复吸打电泳缓冲液清洗。但对于 Southern 印迹转移和需要回收 DNA 片段的电泳, 则应该每个样品使用 1 个新的枪头加样, 以避免样品交叉污染; ⑤DNA 分子量标准应该在两侧样品孔中均加上, 尤其是对于未知 DNA 片段的分子量测定。在测定未知 DNA 分子大小时, 还应注意所有样品中的缓冲液应该相同, 盐浓度高会减慢 DNA 的迁移速度。如 BamH I、EcoR I 酶切后的 DNA 样品, 含有比溶在 TE 中的分子量标准更高的盐浓度, 将造成分子量测定不准。
- (10) 接通电泳槽与电泳仪的电源, 一般正极为红色, 切记 DNA 样品往正极泳动。电压降选择为 $1\sim 5\text{V/cm}$ (长度以两个电极之间的距离计算)。应注意: ①电源接通前应该核实凝胶的方向是否放置正

确；②电泳仪有电压显示并不一定标志电泳槽已经接通，应该观察正、负极铂金丝是否有气泡出现，如负极的气泡（ H_2 ）比正极的气泡（ O_2 ）多一倍，则表示电泳槽已经接通电源，几分钟后可见到指示剂溴酚蓝向正极移动；③对于电压要求严格的电泳，可用万用表测量电泳槽正负两极之间的电压。因为电泳仪上数字显示的输出电压，不一定就是电泳槽两极之间的实际电压；④电泳过程中，溴乙锭向负极移动，与 DNA 的泳动方向相反，较长时间的电泳会造成靠正极方向的凝胶中 EB 含量很低，对于含量较小的小分子量 DNA 片段检测困难。若有这种情况出现，需在电泳后重新将凝胶在 $0.5\mu g/ml$ 的 EB 溶液中染色 30~45 分钟；⑤凝胶中加入 EB 进行电泳，便于随时紫外线下观察电泳状态，但 EB 会导致线性 DNA 迁移率下降 15%，更重要的是有人认为 EB 会影响 DNA 带型的整齐，为了获得整齐，扁平的 DNA 带型，有人宁愿选择在电泳后进行 EB 染色，如 Southern 杂交试验前的电泳。

(11) 根据指示剂迁移的位置，判断是否中止电泳，切断电源后，再取出凝胶。含 EB 的凝胶可以直接于紫外线灯下观察结果或拍照记录。

凝胶照像：

如图 3-2 所示。

应备有 135 照像机、全色 135 胶卷、照像机固定架、紫外线透射仪（波长为 254、302 和 366nm）、近摄镜和红光滤光镜等仪器。

(1) 在暗室中，将安装好胶卷和近摄镜片（1~3 片）的像机固定在拍摄架上。

(2) 电泳完毕的凝胶放置在紫外线透射仪上适当位置。

(3) 在凝胶旁放好一把有刻度的尺子，并在一张小纸片上写明实验日期，在普通灯光下以纸片上的字迹为参照调好像机的焦距。

(4) 在镜头前加上红光滤光片，关掉普通灯光，打开紫外线灯（最好用 302nm 波长），确认样品的条带在视野中的位置，用像机自动测光，确定曝光时间与光圈大小。

若无自动测光设备，可以将光圈固定在 4 或 5.6 位置，选择不同曝光时间拍摄数张照片，摸索最佳曝光条件，曝光时间一般为 10 秒钟左右。较长的曝光时间可以检测出 $1ng$ 的 DNA 条带。

(5) 拍照完毕后，可立即剪下已拍过数张的胶片，用 D-76 显影液冲洗胶卷，显影 10 几分钟左右，然后定影 10 分钟，检查拍摄效果，若曝光时间不佳，可重新调整条件进行拍摄。

对于含有 EB 的凝胶，操作时应戴手套；紫外线灯下观察或拍摄电泳结果应戴有机玻璃防护面罩。

〔溶液中溴乙锭的毒性淬灭〕

EB 是较强的致突变剂，除操作时应戴手套以外，对于含有 EB 的溶液也不应该直接倒入下水道，以下方法能淬灭 EB 的致突变能力 200 倍左右。

EB 含量大于 $0.5\mu g/ml$ 的溶液处理：

方法一：是 Lunm 和 Sansone 在 1987 年报道的。

(1) 用水将 EB 的浓度稀释至 $0.5\mu g/ml$

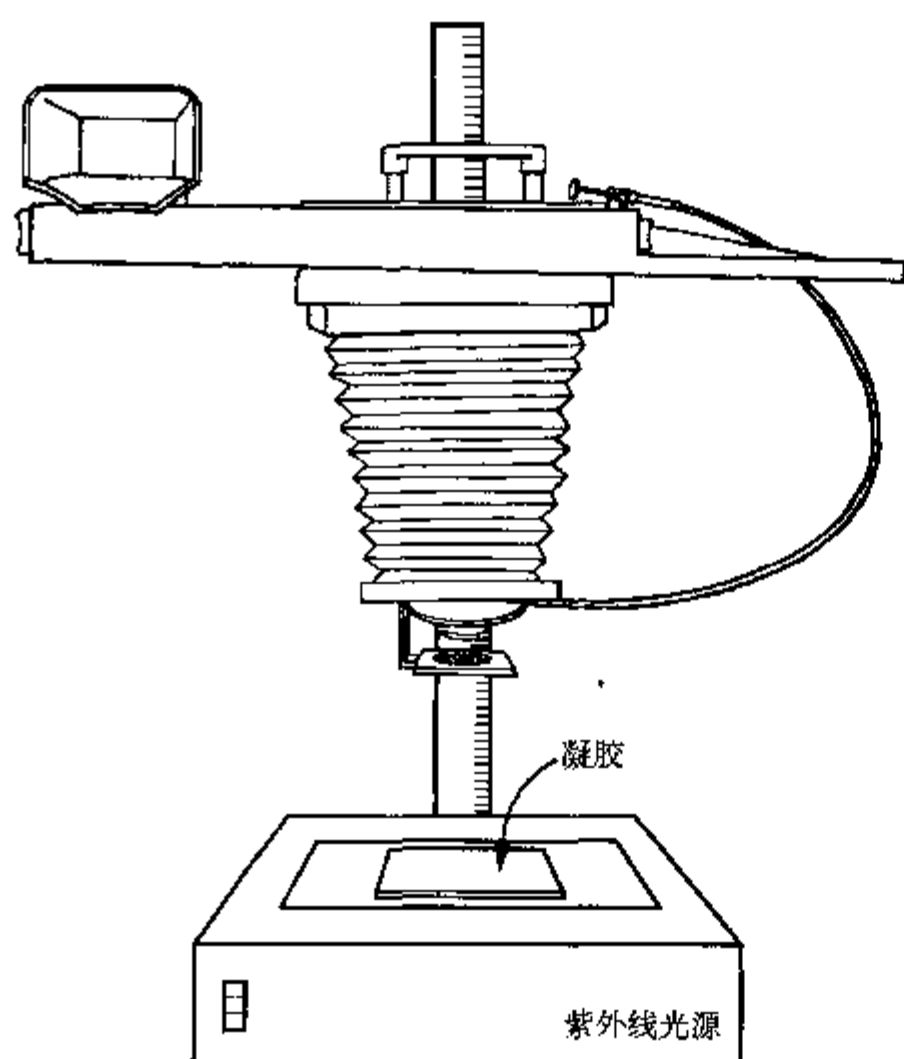


图 3-2 凝胶照相示意图

以下。

(2) 加入 0.2 容积的新配制的 5% 次磷酸和 0.12 容积的新配制 0.5mol/L 的亚硝酸钠, 切记检测溶液 pH 值应小于 3.0 (次磷酸由 50% 的母液新鲜稀释即用, 此液有腐蚀性, 应注意安全)。

(3) 室温放置 24 小时, 然后加入极过量的 1mol/L 焦碳酸盐后, 此溶液即可废弃。

方法二: 由 Quillardet 与 Hofnung 于 1988 年报道。

(1) 用水将溶液中的 EB 浓度稀释至 0.5 μ g/ml 以下。

(2) 加入 1 倍容积的 0.5mol/L KMnO_4 , 小心混匀, 然后加入 1 倍容积的 2.5mol/L HCl, 再小心混匀, 将溶液室温放置数小时。

(3) 加入 1 倍容积的 2.5mol/L NaOH, 混匀后即可废弃。

EB 含量小于 0.5 μ g/ml 的溶液处理:

(1) 每 100ml 溶液加入 100mg 活性碳。

(2) 不时轻轻摇荡混匀, 室温放置 1 小时。

(3) Whatman 1 号滤纸过滤溶液。

(4) 将活性碳与滤纸密封在塑料口袋中, 作为有害废物予以丢弃。

3.7.6.2 微型凝胶电泳

快速分析小量 DNA 样品, 在克隆程序中, 采取下一步操作前, 往往需要快速鉴定上一步的结果, 微型胶电泳是方便、经济、省时的方法。

电泳槽已有许多公司出售, 制胶模具大小为 75cm \times 5cm, 可灌注凝胶为 10~12ml (0.5%~2.0%), EB 直接加在凝胶中, 梳齿长为 2.5mm、宽 1mm, 加样量为 3~12 μ l, 每孔载样 10~100ngDNA。电压降为 5~20V/cm, 电泳 20~60 分钟, 即可观察结果或拍照记录。

3.7.6.3 碱性琼脂糖凝胶电泳

此法可用于①分析抗核酸酶 S_1 的 DNA-RNA, 杂交分子中 cDNA 链的大小; ②检测反转录酶合成第一条和第二条 cDNA 链的大小; ③检测分子克隆中酶制剂中的缺口活性; ④标定 DNA 缺口平移核素标记实验中试剂的用量。

操作方法:

(1) 在已定量的 50mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA 溶液或水中, 加入确切量的琼脂糖。在加热情况下, NaOH 会使琼脂糖的多聚体水解, 故先用中性、无缓冲能力的 NaCl EDTA 溶液或水化胶, 然后再在碱性电泳缓冲液中平衡。

(2) 沸水或微波炉加热使琼脂糖溶解。

(3) 溶液冷至 60 $^{\circ}\text{C}$ 时灌胶。第一步若是用水配制的琼脂糖, 则在灌胶前, 加入 NaOH 至 50mmol/L, EDTA 至 1mmol/L。一般不加 EB, 因为在碱性 pH 情况下, EB 与 DNA 不能结合。

(4) 若第一步中是用 NaCl 与 EDTA 配制的胶, 则在电泳前将胶浸泡在碱性缓冲液中 30 分钟平衡离子浓度, 然后吸去多余的碱性缓冲液至液面高于胶面 1mm。

碱性电泳缓冲液: 30mmol/L NaOH

1mmol/L EDTA

(5) 电泳的样品先用乙醇沉淀, 溶于 10~20 μ l 50mmol/L NaOH, 1mmol/L EDTA 溶液中, 再加入 0.2 容积的 6 \times 碱性上样缓冲液, 混匀, 离心 5 秒钟, 上样。小于 15 μ l 的样品, 不需乙醇沉淀, 可直接加入 EDTA (pH8.0) 至终止浓度为 10mmol/L, 然后加上样缓冲液。

(6) 电泳的电压降为 0.25V/cm, 碱性琼脂糖电泳介质中的电流较大, 发热, 宜采用较低的电压。当溴甲酚绿迁移至胶全长的 3/4 处, 停止电泳。

溴甲酚绿能迅速扩散到电泳缓冲液中, 所以当它从样品孔中迁移入胶中后, 应该在凝胶表面上再加放一块玻璃板。该玻璃板还有防止凝胶在碱性缓冲液中易脱离模具而在电泳液中漂动的功能。

(7) 多数情形下, 碱性凝胶电泳是 $\alpha - ^{32}\text{P}$ 标记的 DNA 样品, 电泳结束后, 室温下将凝胶浸泡于 70% 三氯醋酸中半小时, 然后置于玻璃板上, 盖以多层 3mm 滤纸, 上面再压块玻璃板, 干燥数小时, 再用 saran wrap 膜或保鲜膜包好已干燥的凝胶, 在室温下或 -70°C 附加增感屏进行放射自显影。

若 DNA 未标记, 则将凝胶浸于中和液 (1mol/L Tris·Cl pH7.6, 1.5mol/L NaCl) 1 小时, 然后进行印迹转移 DNA 至硝酸纤维膜上, 通过分子杂交手段检测相应的 DNA 片段。

3.7.7 脉冲场凝胶电泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)

1984 年, Schwartz 和 Cantor 发明了交变脉冲场凝胶电泳技术, 与常规的直流单向电场凝胶电泳不同, 这项技术采用定时改变电场方向的交变电源, 每次电流方向改变后持续 1 秒到 5 分钟左右, 然后再改变电流方向, 反复循环, 所以称之为脉冲式交变电场。

3.7.7.1 PFGE 的原理

脉冲电泳分离大分子 DNA 的介质是琼脂糖, 大于 20kb 的线性双链 DNA 片段, 在琼脂糖凝胶的网孔中的泳动, 就像蛇行式地寻找弯曲蜿蜒的孔隙。普通的单方向恒定电场给 DNA 分子的泳动力其方向确定且不发生变化, 所以严重影响凝胶电泳分离大分子量 DNA 片段的效果 (图 3-3)。

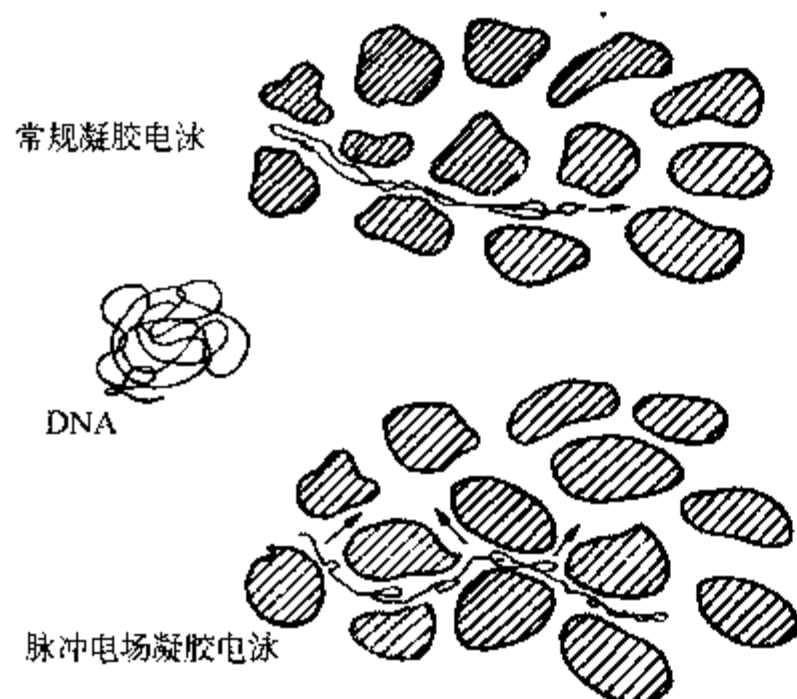


图 3-3 脉冲电场凝胶电泳原理示意图

PFGE 施加在凝胶上至少有两个电场方向、时间与电流大小也交替改变, 使得 DNA 分子能够不断地调整泳动方向, 以适应凝胶中不规则的孔隙变化, 达到分离大分子线性 DNA 的目的, 最大分辨率为 5000kb 大小的线性 DNA 分子。

在交变脉冲电场中, 大分子量线性 DNA 改变泳动方向所需时间比小分子线性 DNA 要长, 因为前者变形能力低于后者, 当某一线性 DNA 在脉冲场中改变形状调整方向进行迁移所需的时间, 大于脉冲场脉冲维持时间时, 该 DNA 的迁移速度将减为最低。线性 DNA 分子改变形状和泳动方向所需时间与其分子量大致成正比, 故 PFGE 也是基于不同 DNA 分子量的差异作为分离不同 DNA 分子的依据。

当 DNA 分子变形转向所需时间与脉冲时间较接近时, 迁移率与 DNA 分子量成反比。

根据被分离 DNA 分子的范围选择适当的脉冲时间, 经过较长时间不断变形转向泳动, 不同大小的 DNA 就得到了分离。DNA 分子的净迁移方向与普通电泳一样, 垂直于样品孔穴。

影响 PFGE 分辨力的因素包括以下几方面: ①两个脉冲场的均一性; ②两个脉冲场的脉冲时间以及它们之间的比率; ③两个脉冲场的强度及方向。

为了增强 PFGE 对大小差异较大的 DNA 样品的分辨率, 可采用交变脉冲梯度电场, 即在电泳过程中, 先用较短的交变脉冲时间, 使较小的 DNA 分子分离, 然后用较长的交变脉冲时间分离较大的 DNA 分子。

3.7.7.2 PFGE 的分类

正交交变电场凝胶电泳 (orthogonal field alternating gel electrophoresis, OFAGE): 两个交变电场的交流电方向相互垂直, 即 45° 、 60° 与 120° 角。

反转电场凝胶电泳 (field inversion gel electrophoresis, FIGE): 交变电场均一并且是 180° 度角反向的。

表 3-11 正交脉冲电泳分辨 DNA 的范围与相应的电泳条件

脉冲时间 (秒)	分离 DNA 的分子范围 (kb)
10	10 ~ 40
5	60 ~ 90
25	200 ~ 300
45	400 ~ 550
100	700 ~ 900

表 3-12 反转电场凝胶电泳分辨 DNA 的范围与相应的电泳条件

正向时间:反向时间	正向时间 (秒)	分离 DNA 的分子范围 (kb)
2:1	0.06 ~ 1.2	10 ~ 50
3:1	0.03 ~ 6	100 ~ 300
3:1	0.3 ~ 30	500 ~ 800
3:1	0.3 ~ 60	700 ~ 1000
3:1	3 ~ 75	1000 ~ 2000

3.7.7.3 PFGE 的电泳条件

凝胶中琼脂糖的浓度一般为 0.8% ~ 1.5%，常用 1%。电泳缓冲液为 0.5 × TBE (5mmol/L Tris Cl, pH8.3, 45mmol/L 硼酸, 10mmol/L EDTA)，也可用 TAE 缓冲液。

在 OFAGE 中对于 20cm × 20cm 的凝胶，选择 330V 以上的电压，在 0.5 × TBE 中的电流为 100 ~ 200mA，以达到 10V/cm 的电压降。

在 FIGE 中，一般选择 140V 的电压，0.5 × TBE 中的电流为 50 ~ 60mA，电压降为 7V/cm。

Vollrath 和 Davis 于 1987 年报道用以下条件：0.6% 琼脂糖凝胶，1.3V/cm 的电压降，脉冲时间 1 小时，电泳 130 小时，可分辨出 5 000kb 以上的 DNA 分子。

注意：电泳宜在 5 ~ 15℃ 的低温条件下进行；电泳缓冲液应在两极槽之间循环；低电压能产生较整齐的带型；交变电场的方向决定的交叉角度越大，分离效果越好。

大分子量 DNA 样品的制备与内切酶消化请参见第 4 章及第 8 章。

分子量较大的噬菌体 DNA 可以作为分子量标准。如 T₁ (40kb)，T₂ (166kb)、G (758kb)，除此之外，还可以将 λDNA 体外连接，形成一系列不同大小的聚合串连分子作为分子量参照标准。

电泳后 DNA 样品染色，采用 0.5μg/ml EB 浸泡 30 ~ 45 分钟。紫外线灯下观察拍照或进行 Southern 印迹杂交。

现在许多公司已有不同设计和型号的成套脉冲电泳设备，使用时可遵照使用说明书进行操作。

3.7.7.4 PFGE 的应用

- (1) 分离原核生物的染色体。
- (2) 人类染色体内切酶物理图谱分析，并将大片段 DNA 分子直接克隆，是人类基因组顺序检定工程中非常有效的方法之一。
- (3) 探测细胞染色体上百万碱基对 (Mb) 以上的基因组 DNA 的缺失。
- (4) 适于单向电场电泳难以分辨的 DNA 物理图谱的制作。

3.7.8 双相电泳

目前已经建立多种双相电泳体系用于分离复杂的核酸混合物，它比单相电泳具有更高的分辨率。

下面扼要介绍三个类型的双相电泳。

3.7.8.1 差异双相电泳

这个电泳系统利用核酸分子之间所带电荷的差异和分子大小不同两个物理性状联合进行分离。酸性 pH 时, DNA 分子中碱基电荷携带量为 $U > G > A > C$; 在 pH5.0 ~ 8.5 范围内, 4 个碱基的净电荷均为 -1; pH > 8.5 时, C, A 静电荷仍为 -1, U、G 进一步解离, 电荷 < -1 。一般第一相首先在 pH3.5 的介质与缓冲液体系中电泳, 在酸性环境中, 由于 DNA 分子间的碱性组成不同, 解离水平不一, 造成所带电荷的差异, 达到初步的分离; 第二相电泳时, pH 值改为中性或偏碱性 (如 pH8.3), 此相凝胶电泳中, 分子筛效应发挥主要作用, 依 DNA 分子大小决定的迁移率进行分离。

3.7.8.2 胶浓度差异双相电泳

通过改变前后两相电泳介质的凝胶浓度, 即分子筛网孔的大小达到高分辨分子大小相差悬殊的核酸混合物, 第一相在低浓度胶中分离大分子 DNA 片段, 然后切下含 DNA 样品的胶条灌制于高浓度的凝胶中进行第二相电泳, 使在第一相电泳中未完全分开的小分子量 DNA 得到分离。

3.7.8.3 变性非变性双相电泳

本系统依照 DNA 分子的大小及其变性的差异进行电泳分离。第一相为普通凝胶电泳, 介质中不含变性剂, DNA 分子按片段大小进行分离; 第二相则在含有变性剂的凝胶中电泳, 并且变性剂形成浓度梯度, 使 DNA 片段按变性难易的程度分离。碱基对中, G-C 配对有 3 个氢键维持, 而 A-T 配对只有 2 个氢键, 变性时, GC 富集区需要较高浓度的变性剂 AT 密集片段则在较低变性剂浓度的区域。双链 DNA 分子在迁移过程中, 分子中部分区域氢键破坏, 导致分子形状不规则, 致使其迁移率大幅度下降, 甚至接近于零。所以在第二相变性剂梯度凝胶电泳时, 由于 DNA 碱基组成不一, 变性所需条件不同, 从而在凝胶中变性时的位置不一, 得到了更高的分辨效果。

上述类型的电泳也可以根据需要进行组合, 如琼脂糖凝胶第一相在低 pH 值缓冲液中电泳, 第二相在聚丙烯酰胺含变性剂浓度梯度的介质中电泳, 可得到较多的电泳分离斑点。

总之, 核酸的凝胶电泳, 在核酸的分离方法中有着举足轻重的地位, 它不但能分离分子量大小不同的核酸分子, 而且能够分离出不同拓扑学构象的 DNA 分子, 还可分离双链 DNA 分子中两条不同互补链, 分离长度只相差 1 个核苷酸范围广泛的单链核酸分子 (核酸顺序测定)。近两年发展的 SSCP 技术, 能分离双链 DNA 中含 1 个点突变的两条互补链 (长度完全一致, 只有 1 个碱基突变), 使得 PCR 技术快速测定基因的点突变, 增添了一个新的检测手段。而与层析技术结合的毛细管电泳系统对于微量的核酸分离及回收具有更大的意义。

凝胶电泳除各种不同的分离功能外, 还可检测核酸制品的纯度, 进一步纯化所需的核酸分子并测定其浓度。核酸凝胶电泳操作较简单, 观察方便, 灵敏快速, 加上 EB 对核酸染色体的特殊性, 使得电泳也难以观察的寡聚核苷酸, 出现用肉眼直观的奇迹。毫不夸张地说, 凝胶电泳为分子生物学的发展做出了巨大的贡献。

3.8 超速离心分离技术

利用物质的质量、密度、形状等物理性状的差异, 在一定介质中, 通过离心力场作用使物质沉降的过程称为离心。许多生物大分子在普通离心力场和一般的介质中不易沉降, 必须在超速旋转的离心力场中才能沉降。一般来说, 转头的转速大于 20 000r/min 时, 称为超速离心。

3.8.1 离心分离物质的原理

首先介绍几个概念:

(1) 离心力 (G): 是离心场中某一点的角速度 (ω , 弧度/秒) 平方与该点到转轴之间距离 (半径

r, cm) 的乘积。

$$G = \omega^2 r$$

其中角速度 ω 可以每分钟的旋转次数表示, 简称为 r/min (转数/分), 每转一周的弧度为 2π , 即:

$$\omega = \frac{2\pi \times \text{转数}}{60}$$

那么,

$$G = \frac{(2\pi \times \text{转数})^2 \times r}{3600}$$

一般离心力的大小以相对于重力常数 g (980cm/s^2) 的倍数表示, 称为相对离心力 (RCF), 单位为 g 。

$$\begin{aligned} \text{RCF} &= \frac{(2\pi \times \text{转数})^2}{3600 \times 980} \times r \\ &= 1.11 \times 10^{-5} \times \text{转速}^2 \times r \quad (g \text{ 的单位为 } 980\text{cm/s}^2) \\ \text{或} \quad &= 1.11 \times 10^{-3} \times \text{转速}^2 \times r \quad (g \text{ 的单位为 } 980\text{cm/s}^2) \end{aligned}$$

(2) 浮力密度: 物质的质量减去在一定介质中所受的浮力即为浮力密度, 也称有效密度。

$$\text{有效密度 (浮力密度)} = m - m \frac{\rho_0}{\rho}$$

式中, m 为物体质量, ρ 为物体密度, ρ_0 为介质密度

只有物体的密度大于介质密度的情况下, 该物体才会发生沉降。

(3) 沉降阻力: 物体在介质沉降过程中, 除浮力以外还受介质的阻力影响, 这种阻力取决于介质的粘度。

$$\text{沉降阻力} = f \frac{dx}{dt}$$

式中, x 为物体的沉降速度, t 为沉降时间, f 为摩擦系数

(4) 沉降速度: 物体所受离心力与介质阻力相等时, 物体沉降再也没有加速度, 而是等速运动, 这种匀速度称为沉降速度, 它与物体的密度成正比, 与介质的摩擦系数成反比。

(5) 沉降系数: 物体在单位离心力场下的沉降速度称为沉降系数。它是物体的瞬间沉降速度与离心力倒数的积。

$$S = \frac{dr}{dt} \times \frac{1}{\omega^2 r}$$

沉降系数的单位是秒, 10^{-13} 秒为 1S, 即一个 Svedberg 单位。

标准沉降系数是 20°C 以纯水为介质的标准状态下物质颗粒离心所得的 S , 以 S_{20w} 表示。在其它介质中, 一定实验条件下测定的 S 为表观沉降系数, 以 S_{ap} 表示。

物体的质量、浮密度、沉降系数是物质特有的物理常数。这是离心分离技术的基本理论数据。离心介质的浮密度、粘度, 阻力, 影响物体的沉降速度、通过对离心力以及离心介质的选择, 可以分离纯化出不同质量大小和物理形状的物质。

3.8.2 超速离心的分类

依据超速离心分离物质所利用的物理特性不同, 可将超速离心分为两大类, 沉降速度超速离心和沉降平衡超速离心。

3.8.2.1 沉降速度超速离心

根据被分离物质在强大离心场中沉降速度的不同进行分离的方法称沉降速度超速离心。

核酸分子的沉降速度与核酸的分子量, 形状、离心力场的大小及介质的粘度有关。对于质粒 DNA,

共价双链闭合环状(CC)、开环双链分子(OC)及线性(L)三种不同形状的DNA分子,即使分子量相同,但由于分子的伸展程度 $L > OC > CC$,因此它们的沉降速度 $CC > OC > L$ 。沉降速度超速离心使用的介质,其密度应该小于被分离物质的密度,才能使被分离物质可以沉降。介质可为均一密度,也可为梯度密度。常用蔗糖形成梯度密度,当被分离沉降到与介质密度相等的区域时,就不再沉降,各种不同分子形成不同的区带,所以又称为速度区带离心。介质的密度梯度在离心前后不变,处于沉降平衡状态。

3.8.2.2 沉降平衡超速离心

根据被分离物质的浮力密度差别进行分离,所用介质的起始密度约等于被分离物质的密度,介质在离心过程中形成密度梯度后,被分离物质沉降或上浮到与之密度相等的介质区域中停留并形成区带。

核酸的浮力密度与其碱基组成、空间结构及溶液介质有关。在以 CsCl 、 Cs_2SO_4 为介质的超速离心中,介质分子的沉降与扩散达到平衡后形成密度梯度,直到核酸到达密度相等的介质区域建立平衡形成区带,故又称浮力密度梯度离心或等密度梯度离心。

沉降速度超速离心与沉降平衡超速离心的比较见表3-13。

3.8.3 超速离心在核酸分离中的应用

超速离心技术广泛应用于物质的分子量、浮力密度、沉降系数、扩散系数等物理特性指标的测定,也用于分子的高级构象及分子纯度的分析,在分子生物学研究中已成为大量制备、纯化核酸的重要手段。

3.8.3.1 RNA分子的分离与纯化

蔗糖密度梯度超速离心也是制备RNA分子常用的方法之一,分离量可达mg级水平,分辨率达4S。
①分离不同种类的RNA,只要沉降系数相差4以上的不同大小RNA分子在蔗糖梯度离心中,即可很好的分离。然后在紫外线监测仪检测下分部收集RNA样品;
②富集纯化mRNA分子,若已知样品细胞中富含某一种mRNA分子,其沉降系数与rRNA、tRNA相差较大,可通过蔗糖梯度离心反复多次富集、纯化,最后可得到单一的该mRNA分子;
③用 Cs_2SO_4 密度梯度超速离心,大多数高分子量单链RNA会沉淀,只有少数单链RNA分子可形成区带,所有的双链RNA/DNA杂交分子都可以在 Cs_2SO_4 中形成离心带。用此法可纯化一些RNA病毒及噬菌体的某些RNA分子;
④用 CsCl 梯度超速离心很容易制备细胞总RNA,因为RNA的浮力密度几乎等于 CsCl 密度梯度中的最大密度,所以经离心后全部沉于管底。

3.8.3.2 DNA分子的分离与纯化

CsCl 沉降平衡离心是纯化DNA分子的主要方法:
①可分离CC、OC、L三种结构的DNA分子,质粒DNA的这三种结构分子与EB结合能力不同($L > OC > CC$),EB插入DNA分子中可使其浮力密度下降,结合EB越多,浮力密度越小,在 CsCl 离心时带型离管底越近,因此用此法可将这三种DNA分子分开;
②分离双链DNA中的两条互补链:DNA在 CsCl 介质中沉降平衡离心时,双链DNA可在pH12~12.5的状态下变性。由于两条分开的互补链之间的碱基组成差异,形成浮力密度的差异,从而得到分离;
③分离浮力密度不同的DNA:在 CsCl 或 Cs_2SO_4 密度梯度离心中,要使DNA分子较好地分离,两者的浮力密度至少要相差0.01~0.02,DNA的浮力密度与其GC含量有密切关系,(G+C)%越大,浮力密度越大。不同生物源的DNA分子,由于其GC含量不同,其分子量相差亦大,故可得到较好的分离;
④分离DNA片段:大片段DNA分子经内切酶酶切后,其中不同大小的DNA片段,可以用密度梯度蔗糖为介质,通过沉降速度超速离心进行分离。在pH12的碱性情况下,该法还成功地检测出DNA复制过程中不同大小的冈崎片段,以及细胞中受损伤未修复的DNA单链片段;
⑤纯化DNA分子:在中性 CsCl 溶液中,DNA的浮力密度为 1.7g/cm^3 ,RNA为 2.0g/cm^3 ,蛋白质为 $1.3\sim 1.4\text{g/cm}^3$ 。在起始密度为 1.7g/cm^3 的 CsCl 溶液中进行超速离心,可以很好地将三者区分开。蛋白质浮在上层液面,DNA分子在离心管中间形成区带,RNA沉于管底,从而达到从DNA样品中去除微量RNA和蛋白质的目的。

表 3-13 两种超速离心的比较

原 理	沉降速度超速离心	沉降平衡超速离心
	沉降与颗粒质量成正比 以物质沉降速度不同进行分离	沉降与颗粒密度成正比 以物质的浮力密度不同进行分离
高介质	密度小, 如蔗糖, 甘油, 聚蔗糖 蔗糖浓度 0% ~ 67%	密度大, 如 CsCl, Cs ₂ SO ₄ CsCl: 浓度 0 ~ 7.355mol/L
	密度 1 ~ 1.3286 (小于核酸密度)	密度 1 ~ 1.9052 (包含 DNA 密度)
	预制梯度, 不连续	自成连续梯度
离心力场	强, 离心速度高, 使被分离物质易沉降	稍强, 速度相对低, 使 CsCl 形成梯度, 建立沉降扩散平衡
离心过程中被分离物质的运动	离心过程中, 样品向离心管底沉降, 没有上浮运动	不论样品在离心开始时在管中的什么位置 离心过程中, 样品沉降或上浮直到停留于介质的等密度位置
离心时间	较短, 一般为几小时到十几小时	较长, 十几小时至数天
		沉降与时间无关
长时间离心的结果	样品分子全部沉降到管底	沉降平衡后样品分子在介质中的位置不变
应用	多用于细胞内器官或亚细胞颗粒分离	多用于 DNA 核酸分子的分离与纯化

3.8.3.3 DNA/RNA 杂交分子的分离

DNA、DNA/RNA 及 RNA, 在中性 CsCl 或 Cs₂SO₄ 中浮力密度为 $\rho_{\text{DNA}} < \rho_{\text{DNA} \cdot \text{RNA}} < \rho_{\text{RNA}}$ 。DNA/RNA 杂交分子可以通过密度梯度沉降平衡法进行分离。当待分离核酸分子的浮力密度相差很小时, 可以通过以下两个途径增大浮力密度的差异, 以提高分辨率。①让金属离子与核酸结合以增高浮力密度, 如 Ag⁺ 结合于 GC 富含区, Hg²⁺ 结合在 AT 富集区, 若两种核酸的密度相近, 而碱基组成情况不同, 则可用此法加以分离, 注意介质不能用 CsCl, 而选用 Cs₂SO₄, 因为 Cl⁻ 与 Ag⁺、Hg²⁺ 形成沉淀; ②用生物染料或抗生素结合 DNA, 降低其密度。例如, 纺锤菌素结合于 AT 富含区, 放线菌素 D 结合于 GC 集中区, 使得浮力密度相近, 但碱基组成不同的核酸分子, 在染料或抗生素存在下, 加大这类分子的浮力密度差别, 达到分离的目的。

总之, 超速离心在分子生物学技术中的应用, 除分离纯化核酸以外, 对蛋白质、多糖等生物大分子的分离及病毒、细胞器的制备均具有重要的作用。其制备数量大 (可达克级水平)、方法简便, 故而得到广泛的应用。

3.9 柱层析

利用物质在静止相和移动相之间分配系数的差异, 进行物质的分离和纯化的技术称为层析。

层析体系中一般由两个互相不溶的介质组成, 静止相多为固体, 移动相多为液体。在这两相之间, 被分离物质浓度不同, 则发生多次分配, 直到浓度平衡, 在一定条件下 (主要指温度), 被分离物质在两相中浓度之商称分配系数 (Kd)。

$$K_d = \frac{C_m}{C_s}$$

C_m 为静止相中的浓度; C_s 为移动相中的浓度; K_d 是物质的特征性物理常数

利用生物大分子之间的不同分配系数, 可采用多种层析方法分离, 但总的操作过程基本相似, 均为在长柱中灌注静止相 (如凝胶或树脂) 制备层析柱, 从柱顶部上样, 不同的缓冲液洗脱, 并利用生物大分子的紫外线吸收特性进行监测。

层析的种类很多,在此仅主要以核酸分子的分离与纯化为例,简要介绍不同类型层析方法的原理和应用。

3.9.1 排阻层析

排阻层析又称凝胶过滤,通透层析或分子筛过滤。

排阻层析柱由不同材料、不同孔径的凝胶灌制而成,发挥分子筛的作用,当溶液通过层析柱时,大于凝胶孔径的分子不能进入凝胶孔内,即被凝胶孔排阻,它们只能在胶外颗粒之间的空隙中流动和分配,流经路程短,所以很快就被洗脱出来。小于凝胶孔的分子进入凝胶孔,它们在凝胶内外分配,在凝胶粒内部穿行,流经路程长,移动速度慢,滞后流出。由于这种分子筛效应,大小不同的分子得以分离,洗脱顺序与分子量成正比。

凝胶介质:凝胶过滤的介质材料很多,常用的有葡聚糖凝胶(Sephadex)、琼脂糖凝胶(Sephacrose)、烯丙基葡聚糖(Allyl dextran)、N, N' - 亚甲双丙烯酰胺共价交联物(Sephacryl)和聚丙烯酰胺凝胶(Biogel - P)等。

Sephadex:由右旋葡聚糖在氯醇催化下交联而成,亲水性强,在水中迅速吸水而膨胀。在碱、弱酸中稳定,可高压灭菌。交联度不同,则凝胶孔径不同,排阻值也不同。根据分离物质的分子量,可查阅相应手册,选择适当型号的Sephadex。如Sephadex G - 50的分离分子量范围(排阻值)为1 500 ~ 30 000,一般核酸分子同放射性核素标记反应完成后,该介质可分离标记好的核酸分子和未掺入的游离 α - 32 P - dNTP分子。

Sephacrose:又称生物凝胶A(biogel - A),由琼脂糖溶液冷却后,通过分子间氢键,自发凝集成束,形成稳定的珠状凝胶。稳定性较差,工作pH值范围在4 ~ 9之间,40℃以上易老化,不能高压和冰冻。其机械强度取决于琼脂糖的含量。有2B、4B、6B三个级别,含琼脂糖的浓度分别为2%、4%、6%。Sephacrose结构开放,排阻极限比Sephadex大,分离范围广泛,适用于DNA大片段分离。

Sephacryl:凝胶为2种分子的共价连接结构,颗粒坚硬,可用有机溶剂洗脱。工作pH值在3 ~ 11之间。用于①分离、纯化生物大分子,如DNA分离;②分级分离,如核酸样品脱盐,去除微量酚,更换缓冲液,去除小分子dNTP等;③溶液浓缩:利用Sephadex干粉,直接加至溶液中1分钟后离心去除凝胶,不但是一个简单温和的浓缩方法,而且还可以吸附去除溶液中的小分子;④细胞及病毒分离,如不同大小病毒颗粒的分离,人血红细胞、血小板制备与分离,去除淋巴细胞中的单核细胞等。

[Sephadex G - 50层析纯化DNA分子]

适用范围:将较大的DNA分子与dNTP或寡聚核苷酸分离,包括DNA缺口平移,3'末端补平的 α - 32 P - dNTP标记实验、cDNA合成以及平端DNA连接连接子等实验中某些步骤中的使用。

Sephadex G - 50柱的准备:

(1) 10g Sephadex G - 50干粉加入250ml去离子消毒水于500ml三角瓶中,充分使粉末分散,室温下过夜使之膨胀,或在65℃1 ~ 2小时。

(2) 在此期间反复漂洗几次,去除可溶性葡聚糖,因为葡聚糖将影响乙醇沉淀DNA和以后的一些酶反应。去上清,用TE pH7.6溶液悬浮,加盖4℃贮存。

(3) 也可高压灭菌,15磅每平方英寸(1磅每平方英寸=47.88帕),15分钟,室温贮存。

(4) 硅化好过滤柱,柱床容积为5ml左右、直径与长度比为1:10的玻璃管,2ml的刻度吸管较为合适,前端用玻璃丝塞上。

(5) 用处理好的Sephadex连续装柱,排除气泡,柱内凝胶不能出现“梯度”等不均匀状况。

(6) 柱上端与贮液瓶相连,用5倍柱床容积的TE洗柱,流速为1ml/min左右。

操作步骤:

(1) 将DNA样品(200 μ l以下),在洗脱液接近凝胶顶面时上柱,避免气泡产生,当DNA溶液几乎

全部入柱时, 再加入 100 μ l TE (pH7.6)。

(2) 当 TE 溶液下降至凝胶顶面时, 用吸管再加入适量 TE 溶液, 柱顶端与 TE 贮液瓶相连, 进行洗脱, 0.3ml/min, 即 10~15 秒钟左右 1 滴。

(3) 用手提微型放射性测试仪测定柱床上放射性峰的移动情况、第一峰接近柱前端时 (一般此时已流出的洗脱物为柱床容积的 30% 左右)、分部收集洗脱物, 每管收集 1~3 滴。

(4) 第一峰收集完毕后, 继续用 TE 洗柱直到第二个放射峰洗脱下来, 然后封住柱顶部, 柱床中保持有 TE 浸泡, 防止干燥。

(5) 用微型放射性测试仪测第一峰所有收集管溶液的 cpm 值, 去除 cpm 很低的收集管, 合并其它管中溶液, 贮存于 -20 $^{\circ}$ C。对于切口平移标记 0.5~1.0 μ g 的 DNA, 只使用 cpm 值最高的 3 个管中, 300~400 μ l 左右的 DNA 样品, 足可完成分子杂交实验。

3.9.2 亲和层析

利用生物大分子之间的特异亲和能力进行分离的层析方法称亲和层析。如酶与底物类似物或抑制剂之间; 抗原抗体之间; 植物凝集素与细胞表面受体之间以及亲和素和生物素之间等。

亲和层析应具备三个条件:

(1) 配体: 配体是亲和层析的关键, 配体一端与凝胶共价连接, 另一端与被分离分子可逆地、专一地非共价结合, 在适当情况下进行洗脱, 可使被分离分子达到较高纯度。

(2) 间臂: 在配体与凝胶之间通过一个适当长度的物质相连接, 这种物质称为间臂, 它的功能是减小空间位阻效应, 提高亲和反应和分离的功效。

(3) 偶联凝胶: 即连接有间臂和配体的凝胶, 常用 Sepharose 4B 作支持物, 其分子上较多的羟基往往是配体共价连接的位点。

亲和层析应用广泛, 主要用于蛋白质、特别是酶的纯化, 以及抗原或抗体的提取与纯化。

亲和层析对于核酸分子纯化常用于含 poly (A) 尾的 mRNA 分离, 将寡聚 dT 或 U 偶联固定在纤维素、琼脂糖 (Sepharose 4B) 等固相载体上, 利用 A-dT 或 A-U 之间的碱基配对, 纯化 polyA RNA 分子 (mRNA)。具体方法参阅本书核酸分离与提取核酸分离与纯化一章。也可用于 mRNA 分子纯化与之互补的 DNA 单链。

连接基因上游顺序的凝胶可分离基因调控的反式作用因子。另外有人用 Hg 与巯基之间的强亲和力, 在 RNA 合成时, 用 5'-Hg-NTP 或 2'-SH-NTP 作为底物掺入, 通过 SH 化或 Hg 化的 Sepharose 纯化 RNA 分子, 用来研究不同物质转录过程的影响。

3.9.3 羟基磷灰石 (hydroxyapatite, HA) 柱层析

羟基磷灰石 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{OH}$ 是一类特殊的层析材料, 它本身对核酸有较大的亲和力, 并在大多数条件下不吸附蛋白质和多糖, 所以能纯化核酸。更重要的是 HA 对空间结构规则的刚性核酸分子亲和力大于柔软空间结构易变的核酸分子, 即 HA 对双链核酸分子的结合力大于单链核酸分子, 从而能分离单链和双链核酸分子。

核酸这一特性不但能应用于 DNA 复性动力学研究, 对于差示 cDNA 文库的建立, 利用 HA 分离差示杂交后的双链和单链核酸分子, 本法已作为经典的方法之一。

3.9.4 离子交换层析 (ion exchange chromatography, IEC)

离子交换层析是根据物质的酸碱度、极性及其分子大小的不同进行分析的层析技术之一。它能从高度复杂的混合物中分离极相似的生物大分子。

IEC 的工作基础决定于带相反电荷颗粒之间的静电吸引, 这是一个包括吸附、吸收、穿透、扩散、

范德华力和静电引力在内的复杂过程, 由于不同的分子携带不同的电荷, 与离子交换剂的亲和能力不同, 混合物中的不同分子按所携带净电荷的性质及总数按先后顺序依次洗脱, 达到分离的目的。

离子交换层析主要用于蛋白质、多肽的分离。核酸也是强极性分子, 用离子交换层析, 也能得到很好的分离效果。

核酸的等电点 pI 为 2~2.5, 在中性 pH 环境中带负电荷, 故可以与阴离子交换体发生离子交换反应而被吸附。不同大小的核酸分子所带负电荷量不同, 与交换体之间的吸附力不同, 在一定条件下依次洗脱分离。

常用的离子交换剂为二乙基氨基乙基纤维素 [DEAE, $(C_2H_5)_2^+NH-CH_2CH_2O-$], 可用于不同大小的核酸和核苷酸分离。对于 tRNA 和 rRNA 的分离, 用 NaCl 梯度洗脱, 先洗下 tRNA, 后洗下 rRNA。BD-DEAE 纤维素 (苯甲酰 DEAE-纤维素) 中, 引入苯甲酰基增强了对疏水基团的亲和力, 因此常用于带有疏水氨基酸的 tRNA 的分离, 如从 tRNA 中分离 phe-tRNA 先用盐溶液洗脱其它的 tRNA, 然后用盐-醇溶液洗下吸附力最强的 phe-tRNA。

3.9.5 反相层析 (reversed phase chromatography, RPC)

反相层析的静止相中富含非极性基因 (如烃类) 移动相用强极性溶剂 (如水、醇), 介质材料耐压, 故可以在高压液相层析仪上使用。

在核酸分离纯化中, 多用含疏水基团的阴离子交换体, 它是将季铵盐溶于有机溶剂, 然后包涂于硅藻土或聚四氟乙烯类颗粒外形成膜, 如 RPC-1 的外层是二甲基二月桂基氯化铵, RPC-2 是三辛甲基氯化铵, 其中 RPC-5 效果最佳。层析时, 携带负电荷多, 碱基暴露好的核酸分子与柱介质外膜上的负电荷压因结合力强, 难洗脱, 反之易洗脱, 故 RPC 本质上是一种特殊的离子交换树脂。

RPC 在核酸分离中应用非常广泛:

- (1) 分离 tRNA, 可分离同一氨基酸 tRNA 的几种异构体。
 - (2) 分离不同大小的寡核苷酸, 对 10~130mer 的 poly (A), 可将相差 1 个核苷酸的不同片段分开, 并且回收率高。
 - (3) 分离 DNA 内切酶片段, 可分离相差 4 个碱基对的片段。若 DNA 分子大小相同, 富含 GC 的片段比富含 AT 的片段易洗脱, 平末端比粘末端易洗脱。
 - (4) 分离双链 DNA 的互补链: RPC 可大量分离 70~4 000bp 的双链 DNA 的两条互补链。
 - (5) 分离纯化 CC 型质粒 DNA, 对 CC 型 DNA 分子的分离, 经济, 省时, 而且纯度高。
- 总之, 层析技术分离生物大分子, 一般条件温和, 可保证生物大分子的活性, 分离量大, 纯度高, 与电泳、超速离心一样是分子生物学常用的技术之一。

(李尹雄 文 方福德 审)

参 考 文 献

- [1] Beger SH, et al. Methods in Enzymology, Vol. 152, Guid to Molecular Cloning Techniques, Academic Press Inc, 1987
- [2] Winnacker E L. From Gene to Clone: Introduction to Gene Technology. VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1987
- [3] Sambrook J, et al. Molecular Cloning, A laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [4] Davis LG, et al. Basic Methods in Molecular Biology. Elsevier Press, 1986
- [5] Wu R, et al. Methods in Enzymology, Vol. 68, Recombinant DNA, part I, Academic Press Inc, 1979
- [6] Wu R et al. Methods in Enzymology, Vol. 216, Recombinant DNA, part G. Academic Press Inc, 1992
- [7] 曹凯鸣等. 核酸化学导论. 上海: 复旦大学出版社, 1991

4. 核酸的分离与纯化

不论是基因工程还是蛋白质工程，核酸分子是这些技术应用所涉及的主要对象，所以核酸的分离与提取是分子生物学研究中很重要的基本技术。核酸样品的质量将直接关系到实验的成败。

4.1 核酸分离提取的原则

核酸包括 DNA、RNA 两种分子，在细胞中都是以与蛋白质结合的状态存在。真核生物的染色体 DNA 为双链线性分子；原核生物的“染色体”、质粒及真核细胞器 DNA 为双链环状分子；有些噬菌体 DNA 有时为单链环状分子；RNA 分子在大多数生物体内均是单链线性分子；不同类型的 RNA 分子可具有不同的结构特点，如真核 mRNA 分子多数在 3' 端带有 poly (A) 结构。至于病毒的 DNA、RNA 分子，其存在形式多种多样，有双链环状、单链环状、双链线状和单链线状等。

95% 的真核生物 DNA 主要存在于细胞核内，其它 5% 为细胞器 DNA，如线粒体、叶绿体等。RNA 分子主要存在于细胞质中，约占 75%，另有 10% 在细胞核内，15% 在细胞器中。RNA 以 rRNA 的数量最多 (80% ~ 85%)，tRNA 及核内小分子 RNA 占 10% ~ 15%，而 mRNA 分子只占 1% ~ 5%。mRNA 分子大小不一，序列各异。总的来说，DNA 分子的总长度一般随着生物的进化程度而增大，而 RNA 的分子量与生物进化无明显关系。

分离纯化核酸总的原则：①应保证核酸一级结构的完整性；②排除其它分子的污染。为了保证核酸结构与功能的研究，完整的一级结构是最基本的要求，因为遗传信息全部贮存在一级结构之内。核酸的一级结构还决定其高级结构的形式以及和其它生物大分子结合的方式。

对于核酸的纯化应达到以下三点要求：①核酸样品中不应存在对酶有抑制作用的有机溶剂和过高浓度的金属离子；②其它生物大分子如蛋白质、多糖和脂类分子的污染应降低到最低程度；③排除其它核酸分子的污染，如提取 DNA 分子时，应去除 RNA 分子，反之亦然。

为了保证分离核酸的完整性和纯度，在实验过程中，应注意以下事宜：①尽量简化操作步骤，缩短提取过程，以减少各种有害因素对核酸的破坏；②减少化学因素对核酸的降解，为避免过酸、过碱对核酸链中磷酸二酯键的破坏，操作多在 pH4 ~ 10 条件下进行；③减少物理因素对核酸的降解，物理降解因素主要是机械剪切力，其次是高温。机械剪切力包括强力高速的溶液震荡、搅拌，使溶液快速地通过狭长的孔道；细胞突然置于低渗液中；细胞爆炸式的破裂以及 DNA 样品的反复冻贮。这些操作细节在实验操作中应备加注意。机械剪切作用的主要危害对象是大分子量的线性 DNA 分子，如真核细胞的染色体 DNA。对分子量小的环状 DNA 分子，如质粒 DNA 及 RNA 分子，威胁相对小一些。高温，如长时间的煮沸，除水沸腾带来的剪切力外，高温本身对核酸分子中的有些化学键也有破坏作用。核酸提取过程中，常规操作温度为 0 ~ 4℃，此温度环境降低核酸酶的活性与反应速率，减少对核酸的生物降解；④防止核酸的生物降解，细胞内或外来的各种核酸酶消化核酸链中的磷酸二酯键，直接破坏核酸的一级结构。其中 DNA 酶，需要金属二价离子 Mg^{2+} ， Ca^{2+} 的激活，使用金属二价离子螯合剂乙二胺四乙酸 (EDTA)、柠檬酸盐，基本上可以抑制 DNA 酶的活性。而 RNA 酶，不但分布广泛、极易污染样品，而且耐高温、耐酸、耐碱、不易失活，所以生物降解是 RNA 提取过程中的主要危害因素。

核酸提取的主要步骤，无外乎破碎细胞，去除与核酸结合的蛋白质以及多糖、脂类等生物大分子，去除其它不需要的核酸分子，沉淀核酸，去除盐类、有机溶剂等杂质，纯化核酸等。

核酸提取的方案，应根据具体生物材料和待提取的核酸分子的特点而定。对于在某特定细胞器中富

集的核酸分子, 事先提取该细胞器, 然后再提取目的核酸分子的方案, 可获得完整性和纯度两方面质量均高的核酸分子。下面分别介绍不同来源的 DNA、RNA 分子的分离提取方案和实验操作过程。

4.2 真核细胞染色体 DNA 的制备

真核细胞的破碎有各种手段, 物理方式包括超声波法、匀浆法、液氮破碎法、 Al_2O_3 粉研磨法等, 但这些物理操作均可导致 DNA 链的断裂。为了获得大分子量的 DNA, 一般采用蛋白酶 K 和去污剂温和处理法。

去除蛋白质常用酚、氯仿抽提, 反复的抽提操作对 DNA 链的机械剪切机会较多, 所以有人使用高浓度甲酰胺解聚核蛋白联合透析的方法, 可以获得 200kb 以上的 DNA 片段, 适用于粘粒 (cosmid) 构建基因组文库。

根据不同的实验要求, 可选择以下不同的实验方法制备真核细胞染色体 DNA。

方法一: 酚抽提法

本方法是在 Blin 和 Stafford 在 Cross - Bellard 等人工作的基础上改进而成, 通过蛋白酶 K 和 SDS 消化, 破碎细胞, 再用酚氯仿去除蛋白质。可以产生 100 ~ 200kb 左右的基因组 DNA 片段, 经适当剪切后, 适用于 λ 噬菌体作为载体的基因组文库的构建。

试剂:

磷酸盐缓冲液 (PBS)

DNA 提取缓冲液:

10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

0.1mol/L EDTA (pH8)

20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 胰 RNA 酶

0.5% SDS

蛋白酶 K

酚 (用 0.5mol/L Tris·Cl, pH8.0 饱和)

10mol/L NH_4Ac

TE

乙醇

透析液:

50mmol/L Tris·Cl, (pH8.0)

10mmol/L EDTA (pH8.0)

样品准备:

(1) 生物组织: 进行大分子 DNA 分离时最好是新鲜的生物组织, 先用剪刀清除组织中筋膜等结缔组织, 吸干血液。若不能马上进行 DNA 提取, 可将生物组织贮存于液氮中或 -70°C 冰箱中。①取 1 ~ 3g 的组织, 用 8 层纱布包好, 再外包多层牛皮纸, 浸入液氮中使组织结冻。取出后用木锤或其它代用品, 敲碎组织块; ②将敲碎的组织块放入搪瓷研钵中, 加入少许液氮, 用研杵碾磨, 反复添加液氮直至将组织碾成粉末状; ③在 1 个 50ml 的离心管中加入 10ml DNA 提取液, 用玻璃棒边搅动液体边加入组织粉末, 然后 37°C 保温 1 小时。

注意事项: ①液氮操作, 应戴保暖手套和防护目镜, 以防溅出的液氮冻伤皮肤; ②组织样品中可能带有致病菌、病毒等, 应视为有害生物材料, 按安全操作规程进行操作。接触这些样品的器械应高压消毒, 废弃物应经灭菌措施处理。

(2) 培养细胞: ①悬浮培养细胞可以直接经 $1500g$ 离心, 4°C 10 分钟以收集细胞, 对于贴壁培养细

胞，用胰酶消化后再离心收集，细胞数应在 5×10^7 左右；②将细胞重新悬浮在冰预冷的 PBS 液（磷酸盐缓冲液）或生理盐水中，漂洗 1 次，再离心，弃上清收集细胞；③重复步骤②，再漂洗细胞 1 次；④用 10ml DNA 提取液将细胞沉淀悬浮，移入 1 个 50ml 离心管中，37℃保温 1 小时。

（3）血液样品：将 20ml 新鲜血液与 3.5ml ACD 抗凝液混匀，0℃下可保存数天或 -70℃下长期冻贮，备用。

ACD 抗凝液的配方由 Gustafson 于 1987 年报道，对于高分子量 DNA 的分离，该溶液保贮血液的效果优于 EDTA。具体配方如下：

柠檬酸	0.48g
柠檬酸钠	1.32g
右旋葡萄糖	1.47g
加水至 100ml	

用做抗凝剂时，每 6ml 新鲜血液加 1ml ACD 液。

按下述方法从血液白细胞中提取 DNA：①新鲜血液：将 20ml 血液 1 300g 离心 15 分钟，弃上清（血浆），将淡黄色下层小心吸出移至 1 个新离心管中，再离心 1 次，弃去上层血浆相，下层白细胞用 15ml DNA 抽提液悬浮，37℃保温 1 小时；②如系冻贮血液：将 20ml ACD 贮冻血液于室温中解冻后移入 1 个离心管中，加入等容积 PBS 混匀后，3 500g 离心 15 分钟，弃去含裂解红细胞的上清，将白细胞沉淀悬浮于 15ml DNA 抽提液中，37℃保温 1 小时。

DNA 提取步骤：

（1）准备工作中将各种来源的组织细胞经适当处理后，悬浮于 DNA 抽提液（10~15ml）中，37℃保温 1 小时后，加入 20mg/ml 的蛋白酶 K 至终浓度为 100μg/ml，边加边用玻璃棒轻轻搅拌，使溶液至粘稠状。

（2）50℃保温 3 小时，裂解细胞，消化蛋白。保温过程中，应不时轻轻摇匀反应液。

（3）将反应液冷却至室温，加入等容积已饱和的酚溶液，温和地上下转动离心管混匀两相，反复该动作 10 分钟，直至水相与酚相混匀成乳状液，若没有达到这种效果，可用多角度摇荡混匀器温和地混匀 1 小时。

饱和酚的 pH 值应接近 8.0，这样可以减少离心后水酚双相的交界面（主要是蛋白质）上有 DNA 滞留，有利于在下一步吸出水相时不带动界面中的蛋白质。

（4）室温 5 000g 离心 15 分钟，使用大口径（直径 0.3cm）吸管小心吸出上层粘稠水相，移至另 1 个干净离心管中，重复步骤（3）、（4），用酚抽提 2 次。

（5）透析处理：为了提取 200kb 左右的高分子量 DNA，在第三次酚抽提后，将 DNA 溶液装入透析袋中（留出大于样品体积 1.5~2 倍的空间）于 4℃透析，每次透析液 1L，换 4 次透析液，直到透析物 OD₂₇₀ 小于 0.05。接步骤（7）。

（6）沉淀处理：对于 100~150kb 大小的 DNA 提取，在 3 次酚抽提后，将上层水相移入 1 个新离心管中，加入 0.2 倍容积的 10mol/L 乙酸铵和 2 倍容积 95% 乙醇，室温下轻慢摇动混匀，当即可看到乳白色丝状 DNA 沉淀出现，用 1 个自制前端为钩状的玻璃棒捞出 DNA 纤维，立刻放入 70% 乙醇中漂洗 2 次。室温 5 000g，离心 5 分钟，弃上清，室温挥发迹量乙醇，不要使 DNA 沉淀完全干燥，按每 5×10^6 个细胞 DNA 提取物加入 1ml TE（pH8.0）溶解 DNA，一般需要 12~24 小时。

（7）测定 DNA 样品在 260nm 和 280nm 的 OD 值，计算 DNA 含量和 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值，判断 DNA 的纯度，若有必要可用脉冲场电泳（PFGE）观察 DNA 片段的大小。

说明：

（1）对于 5×10^7 个细胞，本法一般提取产量为 200μg，正常人 20ml 血液可提取大约 250μg DNA。

（2）高分子量 DNA 提取过程中，酚抽提离心后，取上层 DNA 液，往往会牵动双相界面中的蛋白质

层。对于这一困难, 以下办法可供参考: 将大口径吸管套在水抽负压装置上, 小心地插入离心管底部, 缓慢开启水抽负压, 缓慢吸出下层的酚相, 吸至中间蛋白质层时, 关闭负压停止吸出。然后将离心管中所剩上层水相和少量蛋白质层, 5 000g 室温离心 20 分钟, 蛋白质及 DNA 与蛋白质凝块可沉积在管底, 再将含 DNA 的水相直接轻缓倒入另 1 个离心管中。

(3) 脉冲场电泳测高分子量 DNA, 可在 0.3% 的琼脂糖中进行, 将 0.3% 的琼脂糖倒在预先灌制好的 1% 琼脂糖胶上以加强其强度。高分子量标准参照物可用 λ 噬菌体 DNA 连接聚合体。连接方法如下: 将溶于 TE (pH7.6) 的 λ 噬菌体 DNA 于 56℃ 处理 5 分钟, 使其粘端溶解, 在含有 1mmol/L ATP 2 个韦氏单位的 T_4 DNA 连接酶缓冲液中, 于 16℃ 温育 30 分钟, 连接反应结束时, 加 EDTA 至终浓度为 0.01mol/L, 并于 65℃ 温育 15 分钟以灭活连接酶。

(4) DNA 抽提液中的 EDTA 浓度为 0.1mol/L, 可有效抑制 DNA 酶且易与酚分层。Blin 和 Stafford 推荐的 EDTA 使用浓度为 0.5mol/L, 由于其密度接近于酚, 在酚抽提后, 水相与酚相不易分层。另外, 该 DNA 抽提液中加入较高浓度的胰 RNA 酶 (20 μ g/ml), 是考虑到 0.5% SDS 的存在, 使 RNA 酶不处于最高活性状态。在 DNA 抽提液中加入较高浓度的 RNA 酶, 可省去传统方法中在 DNA 抽提后再加 RNA 酶处理的步骤。

方法二: 甲酰胺解聚法

本法基于 Kupiec 1987 年的报道, 裂解细胞和消化蛋白质的步骤与方法一相同, 但不进行酚抽提, 而是利用高浓度甲酰胺解聚蛋白质与 DNA 的结合, 然后透析处理 DNA 样品。由于提取过程操作步骤少, DNA 分子量一般可达 200kb, 经适当处理后, 可用于粘粒作为载体的基因组文库的构建。

试剂:

DNA 抽提缓冲液

蛋白酶 K

变性缓冲液: 80% 甲酰胺 (去离子)

0.8mol/L NaCl

20mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

透析液 1: 0.1mol/L NaCl

20mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

10mmol/L EDTA (pH8.0)

透析液 2: 10mmol/L NaCl

10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

0.5mmol/L EDTA (pH8.0)

操作步骤:

(1) 组织细胞的准备及蛋白酶 K 消化等操作与酚抽提法相同。

(2) 50℃ 3 小时, 蛋白酶 K 反应完毕后, 将溶液冷却至 0℃, 加入 10ml 变性缓冲液, 用玻璃棒轻轻搅匀, 放置 15℃ 下过夜。

(3) 将过夜后粘稠的溶液装入 1 个火棉胶袋中, 先用透析液 1 透析, 每次 1L, 换液 4 次, 然后用透析液 2 透析, 换液 6 次, 每次 700ml 左右共 4L。

(4) 直到 DNA 溶液的 A260/A280 的比值稍大于 1.75, 若低于 1.75 则需继续透析。

(5) 根据 OD260 计算 DNA 含量, 用脉冲场电泳分析 DNA 的分子量大小。

说明: ① 5×10^7 个细胞, 使用本法提取 DNA 的产量为 5 ~ 10 μ g 左右, 最终容积约为 20ml 左右; DNA 浓度低于 10 μ g/ml, 其溶液仍然非常粘稠, 说明 DNA 分子量很大; ② 未开包装的甲酰胺, 使用前一般不需要作进一步处理。若甲酰胺溶液呈现黄色, 必须加入 Dowex XG8 树脂, 用磁力搅拌 1 小时, 然后用 3 号新华滤纸过滤两次, 分成小包装于 -70℃ 下保存。

方法三：玻璃棒缠绕法

本法用盐酸胍裂解细胞，提取的 DNA 分子量为 80kb 左右，其长度不适于构建基因组文库，但用于 Southern 杂交，可得出很好的结果。该法简单快速，可同时提取多个样品。

试剂：

细胞裂解液：

6mol/L 盐酸胍（分子量 = 95.6）

0.1mol/L NaAc（pH5.5）

乙醇

TE

操作步骤：

- (1) 组织或细胞的准备工作同酚抽提法，但不加入 DNA 抽提液悬浮细胞。
- (2) 用 7.5 倍细胞容积的细胞裂解液悬浮细胞，如从组织中抽提 DNA 则先将细胞裂解液加在烧杯中，然后边搅拌液体，边缓慢加入组织粉末，直至所有粉末很好地分散于裂解液中，再移入离心管中。
- (3) 盖紧离心管，将离心管固定于多角度摇匀器上，于室温慢速摇动 1 小时。
- (4) 在 1 个新离心管中加入 18ml 乙醇，然后小心将细胞裂解物铺于乙醇之上。
- (5) 用 1 个带钩的或前端为 U 形的玻璃棒在裂解液与乙醇交界面慢慢搅动，沉淀出的胶状 DNA 将挂在玻璃棒上，继续搅拌直到裂解液与乙醇完全混匀。
- (6) 将缠绕 DNA 的玻璃棒重新浸入 1 个含 5ml 乙醇的离心管中，室温下浸泡 2 分钟。
- (7) 将缠绕 DNA 的玻璃棒放在 1 张保水蜡膜上，室温下蒸发乙醇，这时 DNA 由胶状逐渐回缩。
- (8) 再将挂有 DNA 的玻璃棒前端浸入 5ml 乙醇中，室温下 2 分钟，重复步骤 (7)，让 DNA 蒸发乙醇并干燥 DNA，但不能完全干燥。
- (9) 将玻璃棒浸入含有 1ml TE（pH8.0）的 Eppendorf 管中，4℃下过夜，使 DNA 吸水膨胀，以利于与玻璃棒分开。

(10) 过夜后，DNA 呈胶状，仍吸附于玻璃棒上，这时可用 1 个圆端玻璃棒帮助，将胶状的 DNA 从玻璃棒上分离下来，继续使 DNA 在 4℃下至其完全溶解，可不时摇荡，一般需要 24~48 小时。

说明：

- (1) 1.5×10^7 个培养细胞，一般用本法可提取约 70 μ g，80kb 左右的 DNA。
- (2) 提取的 DNA 往往含有少量 RNA，在步骤 9 用 TE 浸泡 DNA 过夜后，若将 DNA 从带钩玻璃棒上分离下来，再溶于另 1 个含 TE 的 Eppendorf 管中，可以将 RNA 的含量减至最少。
- (3) 在步骤 10 中，将 DNA 与玻棒分开的操作应在溶液 TE 中进行，若分离困难，应继续浸泡。
- (4) 从组织匀浆中用本法提取 DNA，有时 DNA 溶液呈现淡红色，可能有血红素等物质的污染，它不影响限制性内切酶对 DNA 的酶切反应。

方法四：细胞核大分子量 DNA 提取法

本方法先从组织细胞中分离细胞核，然后再提取基因组 DNA。其优点为 DNA 纯度极高，分子量很大，可用于 λ 噬菌体基因文库构建和 Southern 杂交试验。缺点是复杂费时。

试剂：

5% 柠檬酸

1 \times RSB 缓冲液：

10mmol/L Tris（pH7.4）

10mmol/L NaCl

25mmol/L EDTA

10% SDS

蛋白酶 K 粉剂

乙醚

SS-酚, 氯仿, 5mol/L NaCl, 3 mol/L NaAc (pH7.4)

RNA 酶 10mg/ml 贮存液, 70℃加热 10 分钟去除 DNA 酶

Tris 盐缓冲液:

10mmol/L Tris·Cl (pH7.4)

25mmol/L EDTA

0.5mol/L NaCl

0.1 × SSC

细胞核制备:

(1) 将新鲜的组织, 去除筋膜等结缔组织, 用生理盐水洗两次, 称取 4~5g 组织, 进一步用剪刀剪碎。

(2) 将剪碎的组织块置于匀浆器中, 加入 30ml 5% 的柠檬酸, 先用 1 根稍细的杵碾磨组织, 直到上下移动不费力气, 然后换成与匀浆器匹配的杆匀浆, 匀浆器一直泡在冰水中, 匀浆的程度应预先摸索条件, 显微镜下应观察到细胞膜裂开, 细胞核完整。一般电压调至 80V 时的匀浆速度, 匀浆杆在匀浆器中上下移动 7 次, 可得到 90% 以上完整的细胞核。保持完整的细胞核是本实验的关键步骤之一。

(3) 叠好 8 层无菌纱布, 预先用 5% 柠檬酸浸湿, 再盖在 50ml 的离心管口上, 将匀浆好的样品, 缓慢经过纱布过滤。

(4) 2 500g, 4℃离心 5 分钟, 弃上清, 加 10ml 5% 的柠檬酸悬浮沉淀物。

(5) 在 50ml 离心管中先加入含 0.88mol/L (30%) 蔗糖的 5% 柠檬酸, 将步骤 4 中悬浮液小心铺于其上。

(6) 5 000g, 4℃离心 5 分钟, 弃上清, 将细胞核沉淀悬浮于 10ml 1 × RSB 缓冲液中。

(7) 2 500g, 4℃离心 2 分钟, 弃上清, 再用 1 × RSB 缓冲液洗涤沉淀物, 反复该步骤直至悬浮液为 pH7.4。

基因组 DNA 提取:

(1) 在 10ml 1 × RSB 缓冲液悬浮的细胞核液中, 加入 SDS 至终浓度为 1%, 轻轻摇匀, DNA 从核中释放出来, 样品逐渐变粘稠。

(2) 加入 11mg 蛋白酶 K 粉剂 (终浓度为 1mg/ml), 混匀后 37℃保温 1~2 小时, 再加入 11mg 蛋白酶 K 继续反应 1~2 小时, 甚至过夜, 完全消化蛋白质。

(3) 加 1ml 5 mol/L NaCl, 再用等容积 SS-酚/氯仿/异戊醇 (10:10:1) 抽提, 反复轻轻倒转离心管, 彻底混合两相, 直至形成乳浊液。

(4) 5 000g 4℃离心 3 分钟, 用大口径吸管移去上层水相至 1 个新试管中, 重复抽提 1 次。

(5) 再用两倍容积水饱和的乙醚抽提水相, 混匀, 离心后, 乙醚在上层 (不要混淆乙醚层与水相), 弃上层乙醚。

(6) 下层水相加 2.5 倍无水乙醇, 轻轻混匀, 可见白色丝状 DNA 沉淀, 用带钩玻璃棒收集成纤维丝状的大片段 DNA 分子, 移入 1 个新管, 在室温下蒸发痕量乙醇。

(7) 加入 10ml 0.1 × SSC, 4℃过夜溶解 DNA 沉淀。

(8) 加入 20ml 不含 DNA 酶的 RNA 酶 A, 37℃保温 30 分钟。

(9) 加 1ml 5mol/L NaCl 后, 用等容积酚和氯仿分别抽提, 反复倒转离心管混匀, 12 000g 离心 10 分钟, 大口径吸管吸出上清。

(10) 加入 25ml 乙醇沉淀 DNA, 同样用带钩玻璃棒收集 DNA 纤维, 室温蒸发乙醇后 (DNA 样品不能完全干燥), 加入 5ml TE, 4℃溶解过夜。

(11) 测定 260nm、280nm OD 值, 计算 DNA 含量和纯度, DNA 在 TE 中, 4℃可保存 6 个月, 加入 1 滴氯仿可长期保存。

方法五: 异丙醇沉淀法

本法由 Steffen 和 Weinberg 等人实践并推荐, 获得的 DNA 不但质量能够满足内切酶操作的要求, 而且大小可以满足构建基因组文库的要求。

其原理是通过 SDS 和蛋白酶 K 消化与 DNA 结合的蛋白质, 并失活 DNA 酶, 酚氯仿抽提去除蛋白质后, 用 2 倍容积的异丙醇沉淀含 0.1mol/L NaCl 的 DNA 溶液, DNA 沉淀是丝状, 而 RNA 在异丙醇溶液中仍为可溶状态, 利用这一物理特性从 DNA 中去除 RNA, 省去了加 RNA 酶 A 消化 RNA 的步骤。

试剂:

TNE:

10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

100mmol/L NaCl

1mmol/L EDTA

10% SDS

酚、氯仿、异丙醇

操作步骤:

- (1) 收集 $5 \times 10^6 \sim 10^7$ 个细胞, PBS 漂洗 1 次。
- (2) 将细胞悬浮在 3ml TNE 缓冲液中, 贮存于 -20℃或 -70℃或直接进行以下步骤。
- (3) 在悬浮细胞中, 加入等容积新鲜配制的含有 400μg/ml 蛋白酶 K 和 1% SDS 的 TNE, 轻缓搅拌至液体变粘稠。若是冻贮细胞, 也可将等容积溶液直接加入冰冻细胞块中, 轻摇直至融化。
- (4) 37℃保存 1~4 小时或过夜。
- (5) 加入等体积饱和酚, 轻摇 15~20 分钟, 5 000g 离心 3 分钟, 用大口径吸管移出上清, 或将离心管慢慢倾斜到一定角度, 直接将上清倒入另 1 个新离心管中。因为此时 DNA 是粘稠相连的, 所以倒出时, 它们会一起相互牵连而流出, 比用吸管吸出法带出的蛋白质要少, 还可避免吸管对 DNA 的剪切力破坏。
- (6) 用氯仿/异戊醇 (24:1) 抽提上层液相 2 次。
- (7) 取出上层液相至 1 个新离心管中, 加入 2.0~2.5 倍的异丙醇 (室温), 轻轻摇匀至像棉絮团样的 DNA 沉淀出现, 再用带钩玻棒捞出 DNA。注意不要让 DNA 沉淀在异丙醇 (或乙醇) 溶液中存留时间太长。脱水的 DNA 沉淀, 溶解时很困难。
- (8) 将玻棒上的 DNA 接触 1 个干净管的内壁, 短暂吸流 DNA 沉淀上的异丙醇, 然后直接将其浸入 1ml 的 TE 缓冲液中溶解。在轻轻摇动的状态下, 几小时就可以完全溶解。

方法六: 少量组织 DNA 提取法

操作步骤:

- (1) 取 0.1g 左右组织, 如 1~2cm 的鼠尾, 剪碎置于 1.5ml Eppendorf 管中。
- (2) 加入 0.7ml 的消化裂解液和 35μl 的 10mg/ml 蛋白酶 K 溶液。
- (3) 55℃摇荡过夜。
- (4) 加入 0.7ml 酚溶液, 温和混合至双相成乳状。
- (5) 离心 10 000g 3 分钟, 取上清至另 1 个管中, 重复用酚/氯仿, 氯仿各抽提溶液 1 次。
- (6) 加入 70μl 3mol/L NaAc (pH6.0), 0.7ml 100% 乙醇室温下摇荡混匀, DNA 马上沉淀出纤维状。NaAc 的 pH 值不能低于 6, 否则会导致 EDTA 沉淀。
- (7) 离心 30 秒钟至 1 分钟使 DNA 沉至管底, 弃上清。注意离心时间不需过长。
- (8) 加 1ml 70% 乙醇, 室温下强力吸打或摇荡, 漂洗 DNA, 以去除过量 SDS 和酚等杂物。

(9) 室温离心 1 分钟, 弃上清, 尽量去除乙醇, 真空蒸发乙醇 2 分钟。

(10) 加入 0.1ml TE, 室温过夜溶解 DNA, 若需要, 可在 65℃ 保温 10 分钟快速溶解 DNA, 取出 10~20 μ l 进行酶切和 Southern 分析。

说明:

(1) 本法提取的 DNA, 只适用于 Southern 印迹分析。

(2) DNA 样品中仍然含有 RNA, 但并不干扰内切酶反应和 Southern 印迹杂交。若不放心, 可在内切酶消化 DNA 时, 加入 5 μ g RNA 酶同时消化 RNA。由于本法有 RNA 污染所以测定 OD 值难以精确地将 DNA 定量, 一般 DNA 浓度为 1 μ g/ml 左右。

(3) 2cm 左右的小鼠尾尖是分析小鼠基因组的较好组织来源。本法还广泛用于果蝇、培养细胞和新鲜或冻存的小块组织基因组 DNA 的提取。

(4) 内源性 DNA 酶含量较高的组织细胞, 本方法可使 DNA 样品降解。

方法七: 血细胞 DNA 快速提取法

本法由 John 等人 1991 年报道, 步骤基本上遵照标准的方法, 采取 NP 40 破碎细胞膜提核, 再分离 DNA, 可用于 Southern 杂交试验, 亦可满足 PCR 实验的要求。

试剂:

溶液 1: 10mmol/L Tris·Cl (pH7.6)

10mmol/L KCl

10mmol/L MgCl₂

溶液 2: 10mmol/L Tris·Cl (pH7.6)

10mmol/L KCl

10mmol/L MgCl₂

0.5mol/L NaCl

0.5% SDS

2mmol/L EDTA

NP40

酚、氯仿、异戊醇

乙醇

操作步骤:

(1) 收集 5ml 血液, 加入 EDTA 混合抗凝。

(2) 用溶液 1 补足容积至 10ml, 然后加入 120 μ l NP 40, 反复颠倒混匀, 裂解细胞膜。

(3) 2 000r/min 离心 10 分钟, 沉淀细胞核, 弃上清, 可于 -70℃ 冻贮, 或按以下步骤提取 DNA。

(4) 加入 800 μ l 溶液 2, 温和混匀, 移至 1.5ml Eppendorf 管中, 不能强烈振荡, 因为溶液 2 已使核膜破裂, DNA 已释放到溶液中。

(5) 用 400 μ l 饱和酚抽提, 反复颠倒混匀, 12 000r/min 离心 1 分钟, 上清用 400 μ l 酚/700 μ l 氯仿分别抽提 1 次。注意: 吸取上清时, 稍微带出一点中间界面物质影响不是很大。微量移液枪的枪头, 最好去掉前面尖嘴部分, 并用火烧一下, 使之圆钝, 减少对 DNA 分子的剪切力。

(6) 上清加入 2 倍容积的冰预冷乙醇, 混匀, 用一适当工具 (如熔封口的塑料吸头), 捞出 DNA 纤维状沉淀, 移到 1ml 70% 的乙醇中漂洗。

(7) 12 000r/min 离心 5 分钟, 倒出上清, 真空蒸发乙醇 2 分钟, 加入 100 μ l 消毒水, 65℃ 溶解 DNA。

注意事项:

如果血液样品已在体外放置 1 周以上, 最后乙醇沉淀时, 只有少量 DNA 沉淀, 这种情况应将样品置 -20℃ 过夜离心沉淀 DNA, 以提高产量。

方法八：玻璃颗粒吸附法

本法由 James 等人于 1990 年报道，由于常用的有机溶剂抽提法，费时费力，受玻璃粉末提取质粒 DNA 及纯化琼脂胶中 DNA 片段的启示，作者摸索出一定大小的玻璃颗粒与真核细胞裂解液中染色体 DNA 结合的最佳条件。此法能从 10^8 个动物细胞中，45 分钟内提取 5 ~ 6 μ g DNA，其质量能够满足内切酶反应的要求。

试剂：

细胞裂解液：

5mol/L 异硫氰酸胍

0.1mol/L EDTA (pH8.0)

玻璃颗粒 - DNA 结合缓冲液 (含 50mg/ml 玻璃颗粒 5 ~ 25 μ m)：

6mol/L 高氯酸钠

50mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

10mmol/L TDTA (Trans - 1,2 - diaminocyclohexane - N,N,N',N' - tetracetic acid)

洗脱缓冲液：

0.2mol/L 高氯酸钠

50mmol/L Tris·Cl, pH8.0

10mmol/L TDTA

乙醇

操作步骤：

- (1) 2×10^6 个细胞悬浮于 200 μ l 细胞裂解液中，混匀室温放置 5 分钟。
- (2) 加入 1ml 玻璃颗粒 - DNA 结合缓冲液，室温振荡混匀 20 分钟。
- (3) 离心 30 秒钟沉淀结合染色体 DNA 的玻璃颗粒。
- (4) 用 500 μ l 结合缓冲液再悬浮漂洗沉淀 1 次，离心 30 秒钟，弃上清。
- (5) 加入 1ml 洗脱液悬浮玻璃颗粒，室温振荡混匀 20 分钟。
- (6) 离心 30 秒钟，吸出上清转移至 1 个新 Eppendorf 管中。
- (7) 加入 2 倍容积 100% 的乙醇，反复颠倒 Eppendorf 管数次，12 000g 离心 5 分钟沉淀 DNA。
- (8) 弃上清，加入 500 μ l 90% 乙醇悬浮漂洗 DNA 沉淀，1 000g 离心 3 分钟，弃上清，室温蒸发乙醇 20 分钟或真空干燥 2 分钟，DNA 可直接溶解于 1 \times 适当内切酶缓冲液中，酶解过夜 (37 $^{\circ}$ C, 16 小时)。

4.3 质粒和噬菌体 DNA 的提取与纯化**4.3.1 质粒 DNA 的提取与纯化**

质粒通过细菌间的接合作用，从雄性体转移到雌性体，是细菌有性繁殖的性因子。1946 年，Lederburg 和 Tatum 发现的 F 因子是最早发现的质粒，因为 F 因子与高等生物细胞质中的染色体外遗传单位极为相似，1952 年，由 Lederburg 正式命名为质粒。

确切地说，质粒是细菌内的共生型遗传因子，它能在细菌中垂直遗传并且赋予宿主细胞一些表型，是比病毒更简单的原始生命。

质粒是携带外源基因进入细菌中扩增或表达的重要媒介物，这种基因运载工具在基因工程中具有极广泛的应用价值，而质粒的分离与提取则是最常用、最基本的实验技术。

4.3.1.1 质粒提取的主要步骤

质粒的提取方法很多，不外乎以下 3 个主要步骤：细菌的培养，细菌的收集和裂解，以及质粒 DNA

的分离与纯化。

1. 细菌的培养:

先分离单个菌落,接种到含少量适当抗生素的培养基中扩增,随着细菌的生长,质粒 DNA 也在自主复制。对于松弛型质粒,由于它的复制在一定程度上受到宿主细胞的控制,故在细菌对数生长后期,加入氯霉素抑制宿主蛋白质的合成和染色体 DNA 的复制,质粒 DNA 的复制不受影响而大量扩增。对于新一代的质粒如 pUC 系列等,由于宿主对这些松弛型质粒的复制控制不严,利用氯霉素对质粒 DNA 的选择性扩增并不十分必要。

有时质粒在细菌中的扩增状况很差,常是由于质粒携带外源基因或质粒分子量过大所致,这种低效率扩增,可利用高营养培养基促进生长,一般可增加质粒产量 4~6 倍。

2. 细菌的收集与裂解:

细胞生长过程中,排出大量代谢产物,为了提高质粒 DNA 的纯度,离心弃上清,细菌沉淀最好用 STE 或生理盐水悬浮,漂洗 1~2 次,离心管壁上的液体也应该仔细去除干净。

细胞的裂解方法很多,如去污剂法、沸水热裂法、碱变性法、有机溶剂法和溶菌酶法等,不同方法各有利弊,一般要根据质粒性质、宿主菌的特性及后继的纯化方法等多种因素综合后加以选择。

3. 质粒 DNA 纯化:

质粒从细菌中分离出来以后,为满足有些实验的要求还应进一步纯化。CsCl 溴乙锭平衡超速离心法是纯化质粒的可靠经典方法。但是由于此法费用昂贵及流程长,近年来,发展了几种不同的方法取代了超离法,如离子交换层析法或排阻层析法,分级聚乙二醇沉淀法等,也可获得较好质量的质粒 DNA。转基因动物,真核细胞转染及 DNA 外切酶删切缺失等实验,对闭合环状双链 DNA 的要求较高,一般还是用超速离心法纯化质粒。对于 DNA 片段酶切回收、内切酶图谱分析、细菌转化、亚克隆及探针放射性标记等实验,直接用少量或中量提取的 DNA 样品,并不需要超速离心纯化,一般可满足实验要求。

4.3.1.2 质粒 DNA 提取方法的选择

常用的煮沸法、碱法、SDS 法均可获得较满意效果。至于有人采用碱法提取少量细菌培养物的质粒,用煮沸法或 SDS 法进行质粒 DNA 的大量分离,只是各个实验室的习惯问题。但是对于不同的菌株和不同大小的质粒 DNA 分子及以后进行的不同实验等具体情况,选择哪种方法制备质粒 DNA,应考虑以下因素:

1. 菌株类型:

大量提取 HB101、TG1 菌株中的质粒。不提倡选择煮沸法,这类细菌富含糖类,在煮沸或去污剂裂解细菌时,大量释放出来。若用 CsCl-EB 梯度平衡超速离心,糖类的密度平衡区域与闭环共价质粒 DNA 带非常邻近,在抽取闭环质粒 DNA 时,不可避免地污染有糖类,它们可抑制许多 DNA 限制性内切酶的活性,另外,HB101 及其它含有 *endA*⁺ 基因型的菌株表达中的核酸内切酶 A,在煮沸时不能完全失活,在以后操作中,只要有 Mg^{2+} 存在(如内切酶反应缓冲液),核酸内切酶 A 就可将质粒 DNA 降解,而影响实验结果。若一定要用煮沸法提取这类菌株的质粒 DNA,不管是大量还是小量制备,必须用酚、氯仿反复抽提几次,以去除该酶。

2. 质粒的大小:

大于 15kb 的质粒 DNA 易被强烈的物理或化学作用损坏,所以常选用操作过程较温和的 SDS 法,细菌悬浮液中含有 10% 的蔗糖以提高溶液的渗透压,减轻细菌裂解时 DNA 泄漏过快产生的机械剪切力。在溶菌酶消化细菌壁与膜后,再加 SDS 解聚蛋白质与 DNA 的结合,整个操作中物理剪切力小,适用于大分子量的质粒 DNA 的提取。

3. 细菌染色体 DNA 变性条件强弱的控制:

碱法是目前实验室中最常用的质粒 DNA 提取方法。它对细菌的裂解,细菌染色体 DNA 及蛋白质变性充分,所以提取的质粒 DNA 产量高、纯度好。但是暴露在强碱性环境中时间过长,共价闭合环状质

粒 DNA 可发生不可逆的变性, 导致内切酶切割困难, 质粒 DNA 迁移速度降低 1 倍左右, EB 染色效率低。1966 年 Vinograd 等人对这个问题作过报道, 但目前, 仍有些实验人员, 对这一关键问题并没有足够的重视。我们也在琼脂糖凝胶电泳时见到这种着色浅的 DNA 形式, 若出现这种状况, 在下次提取时, 可以适当缩短碱变性时间, 不必按某些书籍中规定的 10 分钟时间操作。

在煮沸法中, 过长时间、过高热度也会导致类似问题的出现, 这种影响实验结果的操作细节应根据具体的菌株和质粒情况加以适当改进。

4. 细菌的培养与收集:

细菌生长过程中的代谢废物和脱落的细胞壁成分, 也会影响到质粒的质量和内切酶酶解效果。所以离心收集细菌时, 上清液应去除干净, 最好用 STE 或生理盐水再悬浮、漂洗菌体 1~2 次。

早一代质粒如 pBR322, 在细菌中的拷贝数并不多, 需要用氯霉素选择性地抑制细菌的蛋白合成和细菌分裂, 有利于质粒的进一步扩增。这种选择性扩增, 一般持续十几个小时。对于新一代质粒, 如 pUC、pGEM 系列质粒, 在细菌中扩增拷贝数很多, 这种选择性扩增, 显得不太必要。况且长时间在氯霉素存在下, 质粒 DNA 合成过程中, 复制链中会掺入核糖核苷酸, 对碱性条件敏感, 将会导致大量的缺口环状 DNA 和线性质粒的产生。

即使在使用新型质粒的情况下, 有些人仍然偏爱用氯霉素选择性扩增质粒, 其理由是在中等体积培养物中能获取与大量培养物等同的质粒产量。而且细菌量的减少, 使得裂解物的复杂性和粘稠度降低, 操作更方便、有效, 对煮沸法更是如此。所以使用氯霉素的主要目的, 是在不降低质粒产量的前提下, 减少细菌的培养体积和细菌的数量。

4.3.2 质粒 DNA 的小量制备

质粒 DNA 的小量制备是基因克隆中的常规工作, 可快速提取质粒 DNA 进行各种鉴定或进一步操作。在不同的提取方法中, 均需进行细菌培养(质粒的扩增)及菌体收集, 故首先介绍。

(1) 挑取琼脂培养板上的单菌落, 移至 2~5ml LB 培养液中(含适当的抗生素), 37℃ 强烈摇荡过夜。细菌培养容器最好用 15~20ml 的三角瓶, 瓶口用 8~10 层消毒纱布封口或用适当大小的塑料试管盖盖住瓶口。

(2) 取出 1~1.5ml 培养液移至 Eppendorf 管中, 12 000g, 4℃ 离心 30 秒钟, 弃上清, 用 1ml STE 悬浮菌体沉淀, 再离心回收菌体。

(3) 再重复用 STE 漂洗菌体, 离心后, 去尽上清液。

收集细菌后可选择以下方法提取质粒。

方法一: 碱裂解法

原理: 在 pH12.0~12.6 碱性环境中, 线性的大分子量细菌染色体 DNA 变性, 而共价闭环(CC)质粒 DNA 仍为自然状态。将 pH 调至中性并有高盐浓度存在的条件下, 染色体 DNA 之间交联形成不溶性网状结构。大部分 DNA 和蛋白质在去污剂 SDS 的作用下形成沉淀, 而 CC 质粒 DNA 仍然为可溶状态。通过离心, 可将去除大部分细胞碎片染色体 DNA、RNA 及蛋白质, 质粒 DNA 尚在上清中, 再用酚、氯仿抽提进一步纯化质粒 DNA。

试剂:

STE:

0.1mol/L NaCl

10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

1mmol/L EDTA

溶液 I:

50mmol/L 葡萄糖

25mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

10mmol/L EDTA

该溶液可配制成 100ml, 6.76×10^4 Pa 消毒 15 分钟, 4℃ 贮存。

溶液 II (新鲜配制):

0.2mol/L NaOH

1% SDS

溶液 III: 5mol/L KAc 60ml

冰醋酸 11.5ml

水 28.5ml

配制好的溶液 III 含 3mol/L 钾盐、5mol/L 醋酸 (pH4.8)

酚, 氯仿

乙醇

TE、RNase

操作步骤:

- (1) 将细菌沉淀悬浮于 100 μ l 冰预冷的溶液 I 中, 强烈振荡混匀。
- (2) 加入 200 μ l 溶液 II, 盖严管盖颠倒微型离心管 5 次以混合内容物, 不要强烈振荡, 放置冰上 3 分钟左右 (根据不同菌株, 可适当缩短)。
- (3) 加入 150 μ l 溶液 III, 可以将管盖朝下温和振荡 10 秒钟, 冰上放置 3~5 分钟。
- (4) 12 000g, 4℃ 下离心 5 分钟, 取上清移至 1 个新 Eppendorf 管中。
- (5) 加入等体积酚/氯仿 (1:1), 振荡混匀, 12 000g, 4℃ 下离心 2 分钟, 取上清移至另 1 个 Eppendorf 管中。
- (6) 加入 2 倍容积乙醇 (室温), 振荡混匀, 室温下放置 2 分钟 (不要在 -20℃ 沉淀, 否则有较多盐析出)。
- (7) 12 000g, 4℃ 离心 5 分钟。
- (8) 弃上清, 加入 1ml 70% (4℃) 乙醇振荡漂洗沉淀, 12 000g, 4℃ 离心 2 分钟。
- (9) 弃上清, 用消毒的滤纸小条小心吸净管壁上的乙醇水珠, 将管倒置放在滤纸上, 室温下蒸发痕量乙醇 10~15 分钟, 或真空抽干乙醇 2 分钟。
- (10) 加入 50 μ l TE (pH8.0) (含无 DNA 酶的 RNA 酶 20 μ g/ml), 溶解 DNA, 短暂振荡 5 分钟后可进行内切酶酶切实验或 -20℃ 贮存。

一般用本方法提取 pUC 系列质粒, 每毫升培养物可以获得 3~5 μ g 的质粒 DNA。

若通过酶切体系可分析 DNA, 可取 DNA 溶液加到另 1 个含 8 μ l 水的 Eppendorf 管中, 再加 1 μ l 10 \times 内切酶缓冲液和 1 单位所需内切酶, 在适当反应温度保温 1~2 小时。通过凝胶电泳分析经内切酶消化的 DNA 片段。

方法二: 煮沸法

试剂:

STET:

0.1mol/L NaCl

10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

1mmol/L EDTA (pH8.0)

5% Triton X-100

溶菌酶 10mg/ml (溶于 10mmol/L Tris·Cl, pH8.0, 新鲜配制)

异丙醇、70% 乙醇

RNase A 10mg/ml

TE

操作步骤:

- (1) 将菌体沉淀悬浮在 350 μ l STET 溶液中。
- (2) 加入 25 μ l 新鲜配制的 10mg/ml 溶菌酶溶液 (溶菌酶溶液 pH 值不能低于 8.0) 混匀。
- (3) 将 Eppendorf 管放置于沸水中 40 秒钟。
- (4) 于室温下, 12 000g, 离心 10 分钟。
- (5) 吸出上清移至另 1 个 Eppendorf 管中, 或直接用消毒牙签取出沉淀物, 向上清加入 40 μ l 2.5mol/L NaAc (pH5.2) 和 420 μ l 异丙醇, 振荡混匀, 室温放置 5 分钟。
- (6) 12 000g, 4℃离心 5 分钟。
- (7) 弃上清, 加入 1ml 70%乙醇, 漂洗沉淀物, 12 000g, 4℃离心 2 分钟, 去上清, 用小滤纸条吸净管壁上水珠, 真空干燥 2 分钟。
- (8) 加入 50 μ l TE (pH3.0) (含无 DNA 酶的 RNA 酶 A, 20 μ g/ml), 短暂振荡, 溶解 DNA 后进行内切酶分析及琼脂糖凝胶电泳。

注意事项:

含有 endA⁺ 基因型的菌株, 如 HB101, 不宜使用煮沸法进行质粒的小量提取。因为煮沸并不能使核酸内切酶完全失活, 在内切酶缓冲液中, 有 Mg²⁺ 存在下可使质粒 DNA 降解。

方法三: 小量一步提取法

本法由 Kamal Chowdhury, 1991 年首次报道, 直接将细菌培养物与酚/氯仿混合, 同时完成细胞裂解、蛋白质变性两个过程, 然后离心去除大部分细胞核 DNA 与蛋白质, 含质粒 DNA 的上清用异丙醇沉淀。其优点是操作过程简单、方便、经济。作者将本法与碱裂解法及 TNE 法作了比较, DNA 质量无明显差别, 适合于内切酶图谱分析。

试剂:

酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1), 其中酚用 TE (10mmol/L Tris·Cl, pH7.5, 1mmol/L EDTA) 饱和。

TER (TE, pH7.5, 含 RNA 酶 20 μ g/ml)

操作步骤:

- (1) 取 0.5ml 细菌过夜培养物, 置 1.5ml 的 Eppendorf 管中。
- (2) 加入 0.5ml 酚:氯仿:异戊醇, 用振荡器最大速度振荡 1 分钟, 充分混匀。
- (3) 12 000g, 4℃离心 5 分钟, 取上清 0.45ml 左右, 移至另 1 个 Eppendorf 管中, 加入 0.5ml 异丙醇 (不需要加盐, 也不需冷冻) 混匀, 马上 12 000g, 离心 5 分钟。
- (4) 弃上清, 加 0.5ml 70%乙醇漂洗; 弃上清后再用 70%乙醇漂洗 1 次, 短暂离心 (12 000g, 1 分钟)。
- (5) 弃上清, 真空干燥 DNA 沉淀 2 分钟, 然后加入 100 μ l TER 溶解 DNA, 同时降解 RNA。从中取出 5~10 μ l DNA 样品进行内切酶反应, 可达到琼脂糖电泳的检测水平。

方法四: 菌落裂解鉴定质粒大小

在 Barnes 1977 年报道的方法的基础上, 近年来, 许多人在筛选阳性克隆时, 直接挑取菌落, 裂解后经碱法处理, 不进行内切酶消化而直接电泳, 通过与载体质粒的迁移率比较, 以鉴定质粒中是否存在插入片段。

操作步骤:

- (1) 经 DNA 连接物转化的细菌铺板后, 当 LB 琼脂板上的菌落长至 1~3mm 大小时, 用无菌牙签挑取单个菌落少许涂在另 1 个新 LB 琼脂板上, 并做出位置标记, 37℃增殖培养几小时后, 取出放置 4℃下保存, 直到鉴定后, 挑取所需的菌落。

(2) 将该菌落剩下的部分全部用牙签挑出, 移至 0.5ml Eppendorf 管 (含 50 μ l 10mmol/L EDTA), 在样品数很多的情况下, 可以用洗净的 48 孔或 96 孔塑料培养板代替 Eppendorf 管。

(3) 加入 50 μ l 新鲜配制的 0.2mol/L NaOH, 0.5% SDS, 20% 蔗糖溶液, 振荡 30 秒钟, 或用牙签反复搅匀。

(4) 70℃保温 5 分钟, 然后冷却到室温。

(5) 加入 1.5 μ l 4mol/L KCl, 0.5 μ l 0.4% 的溴酚蓝液, 振荡混匀, 冰上放置 5 分钟, 若容器为塑料培养板, 则静置 15 分钟后接步骤 (7)。

(6) 12 000g, 4℃离心 3 分钟, 以去除细胞碎片及其它杂质。

(7) 取 50 μ l 上清在 0.7% 的琼脂糖凝胶中电泳, 加样孔大小为 5mm \times 2.5mm (长 \times 宽), 凝胶厚度为 5mm。若无适当大小的凝胶梳, 可先沉淀浓缩 DNA。在电泳时要加入不含插入片段的载体 CC 质粒 DNA 为迁移的对照。

(8) 当溴酚蓝迁移至胶总长度的 2/3 时, 停止电泳, 将凝胶在含 0.5 μ g/ml 的 EB 溶液中染色 30~45 分钟, 紫外线下观察或照相记录, 如出现比原载体质粒迁移率慢的条带说明可能携带有插入片段。根据其编号, 挑取贮存琼脂板上的相应菌落培养, 再提取 DNA 进行以后的操作。

CC 质粒在不含 EB 染料的琼脂糖凝胶中电泳, 其迁移率更能真实地反映其分子大小。

方法五: “魔力柱”小量质粒 DNA 制备

Magic Minipreps DNA 提取系统是 Promega 公司获得专利的新产品, 其特有的树脂材料能特异有效地结合 DNA, 比一般的硅酮树脂基质有更高的效力, 并且不需特殊的缓冲液和乙醇沉淀, DNA 用水或 TE 就能洗脱, 整个过程 15 分钟左右, 其提取的 DNA 纯度, 能直接应用于 DNA 序列分析、体外转录、内切酶消化等实验操作。

试剂:

细胞悬浮液: 50mmol/L Tris \cdot Cl (pH7.5)

10mmol/L EDTA

100 μ g/ml RNA 酶 A

细胞裂解液: 0.2mol/L NaOH

1% SDS

中和液: 2.55mol/L KAc (pH4.8)

洗柱液: 200mmol/L NaCl

20mmol/L Tris \cdot Cl (pH7.5)

5mmol/L EDTA

使用前与 99.9% 纯乙醇 1:1 稀释。

TE 缓冲液: 10mmol/L Tris \cdot Cl (pH7.5)

1mmol/L EDTA

魔力微量制备 DNA 提取树脂 (Magic minipreps)

小型制备柱

操作步骤:

(1) 离心 3ml 细菌培养液收集细菌, 悬浮于 200 μ l 细胞悬浮液中, 移至 1.5ml Eppendorf 管里。

(2) 加入 200 μ l 细胞裂解液, 反复颠倒混匀直至液体清亮。

(3) 加入 200 μ l 中和液反复颠倒混匀。

(4) 14 000g 离心 5 分钟, 取出上清。

(5) 加 1ml Magic minipreps 树脂与步骤 (4) 中的上清颠倒几次混匀。

(6) 将小型制备柱装于 1 个 3ml 注射器的接头上, 插上真空装置的吸口部位。

(7) 通过抽真空将步骤 5 中的 DNA 树脂混合物吸入小型制备柱中, 若无真空装置, 可用注射器的内栓将树脂缓慢推进小型制备柱中。

(8) 用 2ml 洗柱液, 在真空抽吸下, 清洗小型制备柱, 若无真空设备, 可用注射器的内栓将洗柱液推压滤过小型制备柱。

(9) 用真空抽干小型制备柱 2 分钟, 若无真空设施, 可将小型制备柱套入 1.5ml Eppendorf 管, 离心 20 秒钟。

(10) 将小型制备柱从注射器管中取出, 置于 1 个新 Eppendorf 管中。

(11) 往小型制备柱中加入已预热至 65~70℃ 的 50 μ l 水或 TE 缓冲液。

(12) 将小型制备柱离心 20 秒钟, 弃去小型制备柱, Eppendorf 管中的液体即含有质粒 DNA, 可 4℃ 或 -20℃ 保存, 其纯度很高, 不含其它生物大分子和盐类, 每个小型制备柱可纯化 10 μ g DNA, DNA 的产量取决于细菌中质粒的拷贝数。

其它用途:

本法对于低熔点琼脂糖凝胶电泳后回收 DNA 片段及 PCR 反应后纯化产物均有效, 并省时、省力, 所不同的是将 Magic minipreps 树脂与 70℃ 融化好的含有 DNA 的琼脂糖或 PCR 反应后混合物直接混合, 洗柱液可用 80% 的异戊醇代替 200mmol/L NaCl, 200mmol/L Tris·Cl, pH7.5, 5mmol/L EDTA 与乙醇混合液 (50:50), 洗脱液仍为 70℃ 的 TE 缓冲液或去离子双蒸水。

4.3.3 质粒 DNA 的大量制备

(1) 取单菌落接种到含适当抗生素的 25ml LB 培养基中, 37℃ 强烈振荡 (220r/min) 培养过夜, 直到 OD₆₀₀ 为 0.6, 也可选用 5ml LB 培养基培养单菌落过夜, 再取 0.1ml 至 25ml TB 培养基中培养至 OD₆₀₀≈0.6。

(2) 取 24ml 对数后期培养物 (OD₆₀₀=0.6) 接种到 500ml LB 培养基 (含适当抗生素) 中, 37℃ 振荡培养 2.5 小时左右至 OD₆₀₀=0.4, 容器最好用 2L 的三角瓶。剩下的 1ml 细菌培养物可快速提取质粒, 以确定菌落中质粒是否正确。

(3) 加入氯霉素至终浓度 170 μ g/ml, 继续 37℃ 220 r/min 振荡, 培养 12~16 小时。氯霉素能抑制细菌生长, 不影响质粒扩增, 对于 pUC 系列扩增拷贝数高的质粒并非必需, 但氯霉素能减少细菌含量, 在以后提取质粒 DNA 时, 操作方便。

(4) 将细菌培养物倒入 500ml 日立离心管中, 4 000g, 4℃ 离心 15 分钟, 弃上清, 倒置离心管放在滤纸上, 让培养基流净;

(5) 将菌体悬浮于 100ml 冰预冷的 STE 中, 如步骤 (4) 离心收集菌体。

可以选择以下方法提取质粒:

方法一: 碱裂解法

本法适用于加氯霉素处理的培养物, 否则裂解物非常粘稠而操作困难。碱法提取的质粒 DNA 可适用 CsCl-EB 密度梯度平衡超速离心法、Sephrose 4B 层析法及聚乙二醇 (PEG) 沉淀法进一步纯化。

试剂:

溶液 I、II、III 按质粒小量提取碱裂解法中的相应试剂配制。

酚、氯仿、乙醇。

操作步骤:

(1) 将收集的菌体用 10ml 溶液 I 悬浮, 再移至 50ml 离心管中。

(2) 加入 1ml 用 10mmol/L Tris·Cl (pH8.0) 新鲜配制的溶菌酶溶液 (10mg/ml) 混匀。

(3) 加 20ml 新鲜配制的溶液 II, 盖紧离心管管盖, 温和地将离心管上下颠倒混匀 5~7 次, 室温放置 5 分钟 (可适当缩短, 切忌延长)。

(4) 加入 15ml 冰预冷的溶液Ⅲ, 上下颠倒混匀, 此步绝对避免强烈振荡。冰浴放置 10 分钟, 此时形成的白色沉淀为细菌染色体 DNA、大分子量 RNA、钾盐/蛋白质/细胞膜的混合物。

(5) 用日立离心机 12 000g, 4℃ 离心 20 分钟。

(6) 将上清通过 4 层消毒纱布滤入另 1 个 50ml 日立离心管, 加入 0.6 倍容积的异丙醇混匀, 室温放置 10 分钟。

(7) 12 000g, 室温离心 15 分钟。4℃ 离心将导致大部分盐析出混入沉淀。

(8) 小心弃上清, 用 70% 乙醇室温漂洗 1 次, 1 200g 离心 5 分钟后小心弃上清, 倒置离心管在滤纸上, 流净乙醇, 或用消毒滤纸条擦净管壁上乙醇, 室温放置 5 分钟使乙醇蒸发。

(9) 加入 3ml TE, pH8.0, 溶解 DNA 沉淀, 进一步纯化可根据具体条件选用超速离心法、层析过柱法或 PEG 法。

一般对于松弛型复制质粒, 如携带 PMB_1 或 $colE_1$ 复制信号的质粒, 500ml 细菌培养物能提取 2~5mg 的质粒 DNA。

方法二: 煮沸法

(1) 500ml 培养物收集的菌体, 悬浮于 10ml 冰预冷的 STET 溶液中, 移至 50ml 的三角瓶中。

(2) 加入 1ml 用 10mmol/L Tris·Cl (pH8.0) 新鲜配制的溶菌酶 (10mg/ml) 混匀。

(3) 用本生灯加热, 不停摇晃, 使三角瓶中的液体恰好沸腾。

(4) 将三角瓶浸入沸水中继续热裂解 40 秒后, 马上移至冰水中使之冷却。

(5) 将三角瓶中粘稠的内容物转移到 Beckman SW41 或相应离心管中, 4℃, 25 000r/min 离心 30 分钟。

(6) 上清可直接用 CsCl-EB 梯度平衡超速离心法纯化质粒 DNA。

注意事项:

(1) HB101 及其衍生菌株如 TG₁ 中的质粒大量提取时, 不要用煮沸法, 因为该菌富含糖类极易污染质粒 DNA 并影响进一步的核酸工具酶反应。

(2) 含 endA⁺ 基因型的菌株也不要用上法提取质粒, 因为即使用煮沸也不能使核酸酶 endA 完全失活。

(3) 高密度生长的细菌裂解物, 在转移到离心管中时极难操作, 除非必需, 不要用注射器过分拉断 DNA 减低溶液粘度。若用氯霉素抑制细菌生长, 选择性地让质粒扩增, 一般不会出现以上情况。

(4) 步骤 (5) 若为 30 000r/min, 离心 30 分钟, 沉淀物仍然不紧密, 可用 35 000g, 离心 20 分钟。

方法三: SDS 裂解法

Godson 与 Vapnek 于 1973 年报道此法, 虽然提取率较低, 但是由于该法的操作条件温和, 机械剪切低, 适用于大于 15kb 的质粒 DNA 的提取。

(1) 收集 500ml 细菌培养物的菌体悬浮于以下 10ml 的溶液中, 并转移至 50ml 离心管。

10% 蔗糖

50mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

(2) 加入 2ml 0.25mol/L Tris·Cl (pH8.0) 新鲜配制的溶菌酶溶液 (10mg/ml), 混匀。

(3) 加入 8ml 0.25mol/L EDTA (pH8.0) 上下颠倒数次混匀内容物, 置冰上 10 分钟。

(4) 加入 4ml 10% SDS, 迅速用玻璃棒温和搅匀溶液。

(5) 立即加入 6ml 5mol/L NaCl (终浓度为 1mol/L), 再次温和搅匀内容物, 冰上放置 1 小时。

(6) 用 Beckman Ti50 转头, 30 000r/min, 4℃, 离心 30 分钟, 沉淀为细菌碎片和大分子量染色体 DNA, 沉淀坚实、紧密。

(7) 倾出上清至 1 个清洁离心管中, 用等容积酚、酚/氯仿、氯仿分别抽提上清 1 次。

(8) 将上清移至 1 个 50ml 日立离心管中, 加入 0.6 倍容积异丙醇, 混匀后室温放置 1 小时。

(9) 12 000r/min, 4℃, 离心 20 分钟, 弃上清, 用室温的 70% 的乙醇漂洗 DNA 沉淀, 再 12 000g, 离心 5 分钟, 弃上清, 离心管倒置放在滤纸上, 流净液滴, 真空抽干蒸发乙醇 2 分钟。

(10) 加入 3ml TE 溶解 DNA, 进一步用 CsCl-EB 梯度超速离心或 PGE 选择纯化质粒。

方法四: Triton-溶菌酶法

细菌经溶菌酶和 Triton 部分裂解后, 质粒 DNA 可以通过细胞壁上的裂孔释放到提取液中, 细菌的染色体 DNA 则被未完全裂解的细胞壁阻挡而留在细胞内。离心去除细胞碎片后, 上清中的质粒 DNA 可以进一步用 CsCl-EB 密度梯度平衡超速离心纯化。本方法对于较大分子量的质粒 DNA 更为适宜。

试剂:

细菌悬浮液:

10% 蔗糖

50mol/L Tris·Cl (pH8.0)

溶菌酶 30mg/ml 使用前用 10mol/L Tris·Cl (pH8.0) 新鲜配制。

1% Triton X-100

操作步骤:

(1) 将 500ml 细菌培养物中收集的细菌, STE 漂洗后, 离心收集菌体, 用 8ml 细菌悬浮液悬浮。

(2) 加入 1ml 新鲜配制的溶菌酶 (30mg/ml), 混匀后置冰上 10 分钟 (溶菌酶消化细胞壁中的肽聚糖使细胞壁上出现孔穴, 让质粒 DNA 漏出, 低温反应是为了保证细胞壁有一定的完整性, 从而阻挡染色体 DNA 的漏出)。

(3) 加入 2ml 0.5mol/L EDTA 混匀, 冰上放置 5 分钟, 抑制 DNA 酶的活性。

(4) 加入 5ml 1% Triton X-100 混匀, 37℃, 2 分钟, 此时细胞进一步裂解, 溶液粘稠度增加。

(5) 4℃, 192 000g, 离心 30 分钟 (Beckman Ti50.2 转头或 DuPont/Sorvall 转头 40 000r/min, 离心)。

(6) 取出上清, 用等体积酚/氯仿抽提 1 次, 上清液直接进行 CsCl-EB 密度梯度平衡超速离心纯化质粒。

4.3.4 质粒 DNA 的纯化

小量制备的质粒 DNA, 经酚/氯仿抽提后可以限制性内切酶分析, 但是对于一些 DNA 纯化要求高的实验, 如哺乳类动物细胞转染、转基因动物操作等, 需要进一步提高质粒 DNA 的纯度。这种纯度要求不但包括细菌染色体 DNA、RNA 及蛋白质的去除, 而且还要选择质粒 DNA 的不同分子构型, 一般为纯化共价闭环 (CCC) 质粒 DNA, 以下方法可以不同程度地达到这一目的。可根据下一步实验对 DNA 的质量要求和具体条件加以选择, 以避免造成不必要的人力、财力和时间的浪费。

方法一: 聚乙二醇沉淀法

本方法经济简单, 纯化的质粒 DNA 可适用于细菌转化、酶切, 尤其对碱裂解法提取的质粒纯化效果更好。

试剂:

5mol/L LiCl

异丙醇

TER (TE, pH8.0 含 20μg/ml 无 DNA 酶的 RNA 酶 A)

1.6mol/L NaCl [含 13% (W/V) 的 PEG]

10mol/L 醋酸铵

乙醇

操作步骤:

(1) 取 3ml 溶于 TE 中的质粒 DNA 溶液移至 15ml 的离心管中, 加入 3ml 5mol/L LiCl 混匀, 然后用

Sorvall SS34 转头 10 000r/min, 4℃ 离心 10 分钟。

(2) 移上清于另 1 个离心管中, 加入等量异丙醇混匀, 室温 2 分钟后, SS34 转头 10 000r/min, 室温下离心 10 分钟。

(3) 弃上清, 70% 乙醇漂洗沉淀及管壁, 去乙醇并将管倒置于滤纸上, 室温下让乙醇蒸发 5~10 分钟。

(4) 用 500 μ l TE, pH8.0, 溶解沉淀, 移至 1~5ml Eppendorf 管中, 室温下让 RNA 酶 A 消化 RNA 30 分钟。

(5) 加入 500 μ l 1.6mol/L NaCl (含 13% 聚乙二醇 8 000), 混匀, 12 000r/min, 4℃ 离心 5 分钟。

(6) 去上清, 沉淀溶于 400 μ l TE (pH8.0) 中, 分别用酚、酚/氯仿、氯仿各抽提 1 次。

(7) 上清移至另 1 个清洁 Eppendorf 管中, 加入 100 μ l 10mol/L 醋酸铵, 2 倍容积乙醇 (95% 或无水) 混匀。室温放置 10 分钟, 12 000g, 4℃ 离心 5 分钟。

(8) 去上清, 用 200 μ l 70% 乙醇 (4℃), 短暂振荡漂洗质粒 DNA, 12 000g, 4℃ 离心 2 分钟。

(9) 弃上清, 倒置 Eppendorf 于滤纸上, 或用消毒滤纸条擦净吸于管壁上的乙醇, 室温蒸发乙醇 5 分钟。

(10) 加入 500 μ l TE (pH8.0) 溶解质粒 DNA, 以 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 确定 DNA 浓度与纯度。

方法二: Sepharose 4B 或 Sephacel S-1 000 柱层析法

此法根据质粒 DNA 与细菌染色体 DNA 的较大分子量差异, 利用分子筛原理, 纯化质粒 DNA, 其质量可满足内切酶分析, 细菌转化实验的要求。

试剂:

上样液:

50mmol/L Tris·Cl (pH7.5)

0.1mol/L NaCl

10mmol/L EDTA

洗脱液:

TE (pH8.0)

操作步骤:

(1) 制备 1cm × 25cm 大小的层析柱, 用 TE 过柱平衡。

(2) 将溶于上样液中的质粒 DNA 上样, 若 DNA 溶于 TE 中, 可用 5mol/L NaCl 补加至终浓度为 0.1mol/L 左右。

(3) 用 TE (pH8.0) 洗脱, 紫外监测记录分部收集洗脱液 (每管 0.5ml), 第一峰为质粒 DNA。

(4) 将第一峰所对应的各管洗脱液合并, 用酚、酚-氯仿、氯仿分别抽提 1 次。

(5) 上清液加入 1/5 容积 10mol/L 醋酸铵, 2 倍容积乙醇, 混匀, 室温放置 10 分钟, 12 000g, 4℃, 离心 10 分钟。

(6) 弃上清, 70% 乙醇漂洗, 12 000g, 4℃ 离心 5 分钟, 弃上清, 真空蒸发乙醇 2 分钟。

(7) 加入适当体积 TE (pH8.0) 溶解沉淀, 以 OD 值确定 DNA 含量。

方法三: 氯化铯-溴乙锭梯度平衡超速离心法

原理: CsCl-EB 超离纯化质粒 DNA 是一种沉降平衡离心, CsCl 介质密度为 1.7g/cm³, 超速离心一段时间后, 形成 1~1.9052g/cm³ 的密度梯度。其一利用质粒 DNA、大肠杆菌染色体 DNA、RNA 及蛋白质的密度不同, 在 CsCl 密度梯度中平衡于各等密度位置, 达到纯化质粒 DNA 的效果。在中性 CsCl 溶液中, 其中 RNA 的密度为 2.0g/cm³, 沉积于管底, 蛋白质密度为 1.3~1.4g/cm³, 浮于液面。不同构型的质粒 DNA 分子及细菌染色体 DNA 的浮力密度均为 1.7g/cm³ 左右, 如大肠杆菌染色体 DNA 为 1.7g/cm³, ϕ X-174 为 1.718g/cm³, 区别不大, 形成的区带较接近, 回收时不易操作, 故需加入 EB 以增加这两者

之间的密度差异。其二,利用不同的分子构型与 EB 的结合能力不一,不但可以较好地分开质粒 DNA 与细菌染色体 DNA,而且可以分开共价闭环(CC)质粒和开环(OC)或线性(L)质粒 DNA。EB 与 DNA 分子结合后,使得 DNA 密度减小,CC 质粒分子具有超螺旋三级结构,EB 不易插入,所以与 EB 的结合量少,密度下降少;而线性(L)和开环(OC)质粒分子为正常的 DNA 双螺旋二级结构,当结合 EB 达到饱和时,在中性 CsCl 溶液中,CC 质粒比线性或开环质粒分子的密度大 0.04,从而可以相互分开,达到纯化闭环质粒 DNA 分子的目的。

试剂:

CsCl

EB 10mg/ml (溶于水中)

操作步骤:

(1) 每 1ml 质粒 DNA 溶液准确加入 1g CsCl 固体,可将溶液置于 30℃ 水浴中促进 CsCl 溶解。
(2) 每 10ml CsCl 质粒 DNA 溶液加 0.8ml 10mg/ml EB,使其浓度为 740 μ g/ml,立即充分混匀,溶液的终密度为 1.55g/ml ($n = 1.3860$)。

(3) 2 000g,室温离心 5 分钟(相当于 Sorvall SS34 转头,8 000r/min)。

(4) 液体顶部的绒苔状物质为细菌蛋白与 EB 形成的复合物,用棉签去除,或用吸管直接将绒苔状物下面的红色清亮液体移至新的离心管中,用石蜡油灌满管内剩余部分,小心平衡对称管之间重量。

(5) 用 Beckman Ti50、Ti65 或 Ti70 转头(根据溶液体积选择离心管的大小和转头类型)或 Dupont/Sorvall TV150 转头,225 000g,20℃,离心过夜(相当于 VTi50,48 000r/min)。

或 VTi50 48 000r/min 16 小时

VTi65 45 000r/min 16 小时

Ti50 45 000r/min 48 小时

Ti65 60 000r/min 24 小时

Ti70 60 000r/min 24 小时

(6) 不使用制动刹车,缓慢停止离心,一般在自然光下就可见到离心管中部有两条红色的区带,上一条带为线性的细菌染色体 DNA 和缺口环状质粒及线性质粒,下一条带为共价闭环质粒,离心管底部深红色的沉淀为 RNA-EB 复合物,顶部 CsCl 溶液与石蜡油交界面为蛋白质-EB 结合物。

(7) 移去离心管管帽心,或用 21 号针头插入管上端让空气进入,收集 CC 质粒带。先用氯化锌医用胶布贴于管壁外侧 CC 质粒位置,用 21 号针头插入 CC 质粒下方,收集该带。或用 1 个特制的微量吸管,顶端套上接乳胶管和 10ml 注射器直接从管顶部小心插至 CC 质粒带下方吸出该带中 DNA。

(8) 按以下步骤去除 EB:①加入等容积水饱和 1-正丁醇或异戊醇,振荡;②室温下 1 500r/min,离心 3 分钟,弃上层;③重复步骤①②4~6 次,直至所有粉红色从水相中消失。

(9) 将水相移入透析袋中,对 TE (pH8.0) 透析,换数次 TE,透析时间 24~48 小时,OD260 定量 DNA,若 DNA 浓度太稀,可用酚/氯仿抽提 1 次后,乙醇沉淀,再溶于适量 TE 中,-20℃ 保存 DNA 溶液。

注意事项:

(1) CsCl-EB 梯度平衡超速离心不在 4℃ 进行离心,有两条理由:①铯盐在 4℃ 容易析出;②CsCl 等介质的许多物理数据(包括 CsCl 溶液密度)都是在 20℃ 的标准条件下定的,故一般在 pH 中性,20℃ 的情况下超速离心。

(2) EB 加入不但可方便 DNA 区带的辨认,更重要的是通过它与不同构型 DNA 分子结合使 DNA 分子的密度产生不同程度的降低,从而分离出不同构型的 DNA 分子。故 EB 的加入量不应小于 740 μ g/ml。

(3) 若超速离心后,只见 1 条较宽的 DNA 区带时,往往标志着 DNA 超载,导致 CC 质粒区带过宽而与染色体 DNA、线性及开环质粒区带重叠。解决的办法是,吸出离心管中间的 DNA 区带与密度为

1.55g/ml 的 CsCl 溶液混匀分成 2 个离心管重新进行超速离心。

方法四：CsCl-EB 预制不连续密度梯度超速离心法

本方法原理与方法三完全相同，只是预先制成不连续的 CsCl 密度梯度，使超速离心形成 CsCl 的连续密度梯度所需时间缩短至 6 小时。

操作步骤：

(1) 将 125g CsCl 固体溶解于 167ml TE, pH8.0 中，制成密度为 1.47g/ml 的 CsCl 溶液。

(2) 先加入 8ml 步骤 (1) 中 CsCl 溶液至 Beckman 封口的离心管中。

(3) 用 TE (pH8.0) 将质粒 DNA 溶液容积调至 3ml。

(4) 加入 8.4g CsCl 固体至 3ml 质粒溶液中，加温至 30℃ 小心地混匀，直至溶解。

(5) 用 TE (pH8.0) 补充至溶液净重为 13.2g。

(6) 加入 0.8ml (10mg/ml) 的 EB 溶液，立即混匀，此时溶液总体积应为 7.5ml，2 000g，室温离心 5 分钟。

(7) 用大口径吸管吸出绒毛状顶层以下的清亮红色溶液，直接插入步骤 (2) 预制的 CsCl 溶液的底部，缓慢加样于预制 CsCl (密度为 1.47g/ml) 溶液的底层，若必要可用密度 1.47g/ml 溶液补足离心管，并使离心对称管重量平衡。

(8) 用 Beckman Ti70.1 或 Dupont/Sorvall 65.13 转头，60 000g，20℃ 离心 6 小时。

(9) 按方法三的操作回收共价闭环质粒 DNA，并去除 EB。

所有接触 EB 的操作中应戴手套防护，EB 的溶液应按有关章节中的方法进行碱毒处理，不可直接排入下水道。

[CsTAF 梯度密度平衡超速离心纯化质粒 DNA]

CsTAF 是 Pharmacia 公司出品的一种新型超速离心介质，它比传统的 CsCl, Cs₂SO₄ 有更好的效果，其最大密度可达 2.6g/ml，分离共价闭环超螺旋质粒 DNA 时，无需用 EB 来增加，不同分子构型的质粒 DNA 之间的密度差异，使得操作安全、方便、简单，省去了去除 EB 的繁杂步骤。离心后回收的 CC 质粒 DNA 可以直接用乙醇沉淀，不需透析去盐处理。

[Dowex AG50 树脂的准备]

(1) 将 20g Dowex AG50 置入 100ml 1mol/L NaCl 溶液中，磁力搅拌 5 分钟后，让树脂沉积，吸去上清。

(2) 加 100ml 1mol/L HCl，继续搅拌 5 分钟，沉积后去上清。

(3) 用 2 × 100ml 去离子蒸馏水重复步骤 (2)，漂洗树脂 2 次，然后又用 TNE 清洗 1 次 (TNE: 0.1mol/L Tris·Cl pH8.0, 1mol/L EDTA pH8.0, 1mol/L NaCl)。

(4) 树脂在含 0.2% 的叠氮化钠的 TNE 缓冲液中 4℃ 贮存。

(5) 在 1 个无刻度吸管中，注入已处理的 Dowex AG50 树脂，灌制柱床容积为 1ml 的层析柱。

[层析去除 EB]

(1) 用 2 倍以上柱床容积的 TE (pH8.0) 上柱平衡层析柱，然后将含 EB 和 CsCl 的质粒溶液直接上样。

(2) 立即收集流出液，当柱上溶液全部进入柱床时，马上加入 1.2 倍柱床容积的 TE pH8.0 洗柱，继续收集洗脱液。

(3) 当柱上液体流干后，再用 2 倍容积的去离子水洗柱。

(4) 收集的洗脱液约为样品上样前容积的 6 倍，加入 2 倍容积乙醇，4℃ 放置 15 分钟沉淀 DNA，日立离心机，50ml 管，12 000r/min，离心 15 分钟。

(5) 去净上清，用 70% 乙醇漂洗 DNA 沉淀，再 12 000r/min，离心 5 分钟，弃上清，用消毒小滤纸擦干管壁，真空干燥蒸发乙醇 2 分钟。

(6) 用 1ml TE (pH8.0) 溶解 DNA 沉淀, OD260 测定 DNA 含量, DNA 溶液 -20℃ 贮存备用。

方法五: NaCl 超速离心去除质粒 DNA 中小分子量 RNA

虽然 CsCl-EB 密度梯度平衡超速离心纯化的质粒, 已去除绝大部分 RNA 分子, 但仍含有少量小分子 RNA, 分子数目仍为可观, 对一些要求不污染小分子量 RNA 的实验, 如核酸酶 BAL31 的消化或用 T₄ 激酶进行 5' 端标记等, 还需要进一步去除小分子量 RNA 的污染。

操作步骤:

(1) 用 0.1 体积 3mol/L 醋酸铵 (pH5.2) 和 2 倍容积乙醇沉淀 DNA 后, 将沉淀溶于 TE (pH8.0) 中, 使其终浓度大于 100μg/ml, 再加无 DNA 酶的 RNA 酶 A 至 10μg/ml, 室温下保温 1 小时。

(2) 在 Beckman SW5 0.1 离心管 (或型号相当的其它转头) 中, 先加入 4ml 含 1mol/L NaCl 的 TE (pH8.0), 再加一层 1ml 的经 RNA 酶 A 处理的质粒 DNA, 于 Beckman SW5 0.1 转头, 20℃, 40 000r/min, 离心 6 小时, 质粒 DNA 沉淀于管底, 而小分子量 RNA 仍在上清中。

(3) 弃上清, 将质粒 DNA 沉淀再溶解于 0.5ml TE (pH8.0) 缓冲液中, 加 50μl 3.0mol/L 醋酸铵 (pH5.2), 移入 1 个新离心管, 加 1ml 乙醇混匀, 4℃, 10 分钟沉淀 DNA, 12 000r/min, 4℃, 离心 15 分钟, 弃上清, 干燥蒸发乙醇, DNA 溶于适量 TE 中。

方法六: 生物凝胶 (Bio-Gel) A-150 层析去除 RNA。

(1) 按照 NaCl 离心法步骤 1 用 RNA 酶 A 处理质粒 DNA 样品。

(2) 用等容积酚抽提质粒 DNA

(3) 以 Bio-Gel A-150m 或 Sepharose CL-4B 层析柱, (1cm×10cm), 用 TE (pH8.0), 0.1% SDS 平衡洗柱。

(4) 将 1ml 左右质粒 DNA 溶液上样, 用含 0.1% SDS 的 TE (pH8.0) 连续洗柱, 立即收集洗脱液, 分部收集, 每 1 管 0.5ml。

(5) 收集 15 管后, 关闭柱底, 每管取 10μl 样品通过 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳进行分析, 确定质粒在收集管中的分布。

(6) 根据电泳结果合并含质粒 DNA 收集管中的溶液, 加 2 倍容积乙醇 4℃ 10 分钟沉淀, 然后用大于 10 000g, 4℃ 离心 15 分钟, 弃上清, DNA 沉淀溶于适当体积的 TE (pH8.0) 缓冲液中。

注意事项:

由于 Bio-Gel A-150m 和 Sepharose CL-4B 层析柱中所含的极微量质粒 DNA 很难除尽, 为避免污染, 每个层析柱只使用一次。

4.3.5 噬菌体 DNA 的提取与纯化

4.3.5.1 噬菌体的效价测定

噬菌斑形成单位 (pfu): 在上层琼脂长好的菌苔上加入噬菌体, 噬菌体感染细胞后使细菌裂解, 1 个噬菌体经反复多次的感染与裂解, 在 1 个很小的区内产生 10⁷ 左右个噬菌体, 并在菌落上形成 1 个清晰的噬菌斑。每 1 个最初感染细胞的噬菌体, 代表 1 个噬菌斑形成单位。

噬菌体效价: 单位体积样品中的噬菌体可形成噬菌斑的数目叫噬菌体效价, 其单位为 pfu/ml, 它表明样品中含有活噬菌体的数量。为了测定样品中的噬菌体效价, 可取少量样品涂在菌苔上, 平板表面划成方格, 数出其中的噬菌斑数目, 从而推算出每 ml 样品的 pfu 数。

试剂:

LB (Luria-Bertani) 培养液

麦芽糖 (20%, W/V), 高压灭菌

10mmol/L MgSO₄

LB 上层琼脂含 10mmol/L MgSO₄

LB 琼脂平板

大肠杆菌 LE392

LB 上层琼脂糖: 100ml LB 培养液中加 0.8g 琼脂糖, 高压灭菌, 冷至 48℃ 加 1ml 灭菌的 1mol/L MgSO_4 至终浓度为 10mmol/L。

TMG 缓冲液: 10mmol/L Tris·HCl (pH7.4)

10mmol/L MgSO_4

0.01% 白明胶

加水至 100ml

操作步骤:

(1) 50ml 灭菌的 LB 培养液加入 0.5 ~ 1ml 无菌的 20% 麦芽糖和 0.5ml 1mol/L 的 MgSO_4 , 接种 1 个单菌落 (如 LE392 菌株适应于 EMBL₃ 噬菌体生长)。

(2) 37℃ 振荡待细菌生长至 OD₆₀₀ 为 0.5 时, 3 000g, 离心 10 分钟, 收集菌体用 25ml 灭菌的 10mmol/L MgSO_4 重新悬浮细胞沉淀物, 即为供倒平板的细胞, 在 4℃ 至少可保存 1 周。

(3) 取 1 μ l 噬菌体用 TMG 缓冲液作出系列 10 倍稀释管, 然后每个稀释度都取 1 μ l 稀释后噬菌体分别加至不同的灭菌培养试管中。所用稀释度应预计在 1ml 含有可以计数的噬菌斑形成单位范围, 即稀释度应覆盖待测样品的预期噬菌体效价。许多噬菌体原液的效价通常为 $10^8 \sim 10^{10}$ pfu/ml。

(4) 分别加 200 μ l 涂布细菌至每只含 1 μ g 已稀释的噬菌体培养试管中, 混匀后, 37℃ 保温 15 分钟。

(5) 高压灭菌的上层琼脂冷至 40 ~ 50℃ 时, 取 2.5ml 加至每只培养试管中, 混匀, 立即铺板于 90mm 培养皿的底层琼脂上。底层琼脂平板应预先制好, 使用前应在 37℃ 预热平衡。平板的底面应划出格子以便于计数。

(6) 室温放置 15 分钟待上层琼脂凝固。

(7) 倒置平板, 37℃ 培养过夜。

(8) 计算每只平板上的噬菌斑数, 推算原待测样品的噬菌体效价, 用 pfu/ml 表示。

注意事项:

(1) 不能让噬菌斑过分生长, 连成一片。

(2) 不加噬菌体的涂布细胞在对照平板上不应出现噬菌斑, 否则说明操作中有噬菌体污染。

4.3.5.2 噬菌体的制备

本法可达到以下两个目的: ①快速鉴定多份样品的噬菌体克隆; ②为以后的大量制备噬菌体提供原液。

按每个克隆 10ml 高效价裂解液准备, 实际操作中可根据具体情况按比例或放大或缩小, 10ml 裂解液中, 一部分可制备几 μ g 噬菌体 DNA 做内切酶分析鉴定, 以决定哪个噬菌体克隆应大规模扩增, 剩余部分作为噬菌体原液 4℃ 贮存, 用于起始大量噬菌体制备。

试剂:

LB 培养液

1mol/L MgSO_4

氯仿

TM 缓冲液: 50mmol/L Tris·Cl (pH7.4)

10mmol/L MgSO_4

1mg/ml DNA 酶 I, 用 TM 缓冲液新鲜配制

聚乙二醇 - 6000 (PEG - 6000)

0.5mol/L EDTA (pH8.0)

5mol/L NaCl

SS - 酚

酵母 tRNA (10mg/ml) 水溶液

准备工作:

(1) 从文库中挑选的噬菌体克隆或噬菌体克隆载体 (如 EMBL₃, EMBL₄ 或 Charon 28 等), 将噬菌体经适当稀释后倒平板以获得单个噬菌斑。

(2) 用 10mmol/L MgSO₄, 新鲜配制的 LE392 细胞 (或相应受体菌株) 供倒平板使用。

[制备 10ml 细菌培养裂解液的操作步骤]

(1) 加 10ml LB 培养液至 50ml 带盖的无菌管中, 再加 MgSO₄ 至终浓度为 10mmol/L。

(2) 用微量移液枪吸少许 LB 培养液, 将原种平板上的单个噬菌斑连同下面的琼脂块移入培养管中, 1 个噬菌斑大约含有 10⁷ 个噬菌体。

(3) 加入 50μl 供倒平板用的 LE392 细胞。

(4) 良好通气条件下, 剧烈振荡 6~12 小时, 培养液先浑浊, 随后由于溶菌而澄清, 裂解液中可见细胞碎片。

(5) 若培养物中细菌不能被裂解, 可改变步骤 (3) 中加入 LE392 细菌的数目进行尝试。

(6) 细菌裂解后, 加入 100μl 氯仿, 37℃ 振荡 2 分钟。

(7) 3 000g, 室温下离心 10 分钟, 去除细胞碎片。

(8) 将上层水相移入新管, 每 10ml 裂解液, 加 100μl 灭菌的 1mol/L MgSO₄。

(9) 连续稀释上清, 按 4.3.5.1 方法倒平板测定裂解液效价, 好的裂解液效价为 5 × 10⁸ ~ 10⁹ pfu/ml, 将裂解液 4℃ 保存。

[小量制备噬菌体 DNA]

(1) 在 10ml 裂解液中加入 10ml TM 缓冲液, 320μl 新鲜配制的 DNA 酶 I 溶液, 温和倒置离心管数次混匀, 室温下放置 15 分钟, 勿剧烈振荡, 注意不要让 DNA 酶 I 污染吸管或其它器具。

(2) 加入 2ml 5mol/L NaCl, 2.2g 固体 PEG - 6000, 使 PEG 完全溶解, 冰上放置 15 分钟。

(3) 4℃, 12 000g, 离心 10 分钟。

(4) 弃上清用 300μl TM 缓冲液悬浮噬菌体沉淀物, 并移入 1.5ml Eppendorf 管中。

(5) 加入 300μl 氯仿, 充分混匀, 12 000g, 离心 5 分钟, 取出上层水相, 再用氯仿抽提 1 次。注意吸上层水相时不要带出水与氯仿两相界面间的 PEG。

(6) 在水相中加入 15μl 0.5mol/L EDTA, pH8.0, 30μl 5mol/L NaCl 混匀。

(7) 加 350μl SS - 酚, 剧烈振荡混匀, 12 000g 离心 5 分钟, 取上层水相移入另 1 个清洁 Eppendorf 管中, 再用等容积氯仿重复抽提 1 次。有时由于盐浓度较高, 酚在上层, 水相在下层。

(8) 上清加 875μl 乙醇, 冰浴 10 分钟后, 4℃, 12 000g 离心 5 分钟, 去上清, 沉淀用 80% 乙醇漂洗, 4℃, 12 000g, 离心 2 分钟, 弃乙醇, 消毒滤纸小条擦净管壁, 真空干燥 2 分钟。

(9) 加 50μl TE 溶解噬菌体 DNA, 可用于内切酶鉴定, 并进行亚克隆操作。

最初效价为 10¹⁰ pfu/ml 的噬菌体, 其每 ml 裂解液可提取 2~5μg DNA。

4.3.5.3 大量提纯噬菌体 DNA

以大量制备 λ 噬菌体为例。λ 噬菌体感染细胞有 2 种方法: ①低系数细菌感染, 先感染小量细菌培养物, 然后再转到大体积培养基中。在噬菌体浓度低时, 未感染的细菌可继续分裂几个小时, 随着噬菌体的感染与扩增, 最后使培养基内的所有细菌感染而完全裂解; ②高系数细菌感染, 与低系数感染不同, 它是 1 次性高浓度噬菌体感染大部分细菌, 使细菌在短时间 (3~5 小时) 内完全裂解。

[低系数感染]

(1) 将 100ml NZCYM 培养基加至 500ml 三角瓶中, 接种适当菌株的单个菌落, 37℃, 300r/min 强烈振

荡培养至 OD600 为 0.5 通过 OD600 计算细菌浓度 ($1\text{OD600} = 8 \times 10^8$ 个细菌/ml)。

(2) 将培养物分成 4 分 (每分 25ml, 含 10^{10} 个细菌)。400g, 室温离心 10 分钟, 弃上清。

(3) 每份培养物用 3ml SM 液悬浮。

(4) 加入噬菌体迅速混匀, 加入噬菌体的数目较为重要。对于生长好的 EMBL3、4, λ gt 系列噬菌体, 每 10^{10} 个细菌加入 5×10^7 pfu; 对于生长较差的 Charon 噬菌体系列, 则要加入 5×10^8 pfu。最好进行预实验确定最佳感染系数。

(5) 37℃ 间歇振荡培养 20 分钟。

(6) 将每份感染的培养物加至含 500ml 37℃ 预热的 NZCYM 培养基的 2L 三角瓶中, 37℃ 强烈振荡培养过夜。

细菌和噬菌体同时伴随生长, 9~12 小时后培养物开始裂解, 完全裂解的培养物中含有大量细菌碎片, 有的呈细片状沉淀, 有的呈丝状团块, 若将培养基透光观察, 不应见到由高密度未被溶解细菌产生的不同折射率的纹线或丝状外观。

(7) 每瓶中加入 10ml 氯仿, 继续振荡培养 30 分钟, 然后提纯噬菌体。

[高系数感染]

(1) 在 50ml 三角瓶中加入 10ml NZCYM 培养基, 接种适当菌株的单个菌落, 37℃, 300r/min 强烈振荡培养过夜。

(2) 将装有 500ml NZCYM 培养液的 2L 三角瓶在 37℃ 下预热, 然后接种 1ml 过夜培养物强烈振荡培养至 OD600 为 0.5, 一般需要 3~4 小时。

(3) 加入 10^{10} pfu λ 噬菌体 37℃ 继续强烈振荡培养, 直到细菌完全裂解, 一般需要 3~5 小时。对于不同的噬菌体, 为了获得最大产率, 应随时调整感染系数和培养时间。

(4) 加入 10ml 氯仿, 继续振荡, 37℃ 培养 10 分钟, 然后进行噬菌体提取。

4.3.5.4 λ 噬菌体的纯化

方法一: 纯化的标准方法

(1) 将细菌裂解液冷却至室温, 加入胰 DNA 酶 I 和 RNA 酶, 二者终浓度均为 $1\mu\text{g/ml}$, 混匀后室温 30 分钟。利用这两种酶的粗制品消化细菌裂解后释放的核酸, 以防噬菌体颗粒被粘稠的细菌核酸包裹。

(2) 每 500ml 裂解液加入 29.2g 固体 NaCl, 至终浓度为 1mol/L。慢慢溶解, 冰浴 1 小时。

(3) 11 000g, 4℃ 离心 10 分钟, 沉淀细菌碎片, 小心吸出上清液。

(4) 加入固体 PEG8000 至最终浓度 10% (W/V), 即 500ml 上清中含 50g PEG, 用磁力搅拌器缓慢搅匀直至 PEG 完全溶解。

(5) 冰浴 1 小时, 让噬菌体沉淀, 11 000g, 4℃ 离心 4 分钟, 弃上清, 将离心管倾斜倒置 5 分钟, 使剩余液体流出沉淀, 吸净液体。

(6) 用 8ml SM 悬浮噬菌体沉淀, 彻底洗涤粘附在管壁上的噬菌体。

(7) 加入等容积氯仿, 振荡 30 秒钟, 抽提去除 PEG 和细菌残余碎片。3 000g, 4℃ 离心 15 分钟, 吸出含噬菌体的上层水相。

(8) 测量上层体积, 每 ml 加入 0.5g CsCl, 轻轻混匀至 CsCl 完全溶解。

(9) 在 Beckman SW41 或 SW28 离心管中, 先按密度渐减的顺序依次铺好 CsCl 溶液 (3 种不同密度的 CsCl 溶液如下表)。最后将已溶好 CsCl 的噬菌体溶液铺于最上层, 在密度 1.50g/ml 与 1.45g/ml 两层界面的管壁外壁作记号, 用 0.5g/ml 的 CsCl 充满离心管并平衡对称管。

(10) 22 000r/min 4℃ 离心 2 小时, 在 1.50g/ml 与 1.45g/ml 两层不同 CsCl 密度的交界面, 可以看见一蓝色噬菌体颗粒带。若噬菌体产量低时, 背景衬以黑色, 从上面照光, 可帮助认识噬菌体带。

表 4-1 用 SM 配制不同密度的 CsCl 溶液 (100ml)

密度 (P) g/ml	CsCl (g)	SM (ml)	折射率 (η)
1.45	60	85	1.3768
1.50	67	82	1.3815
1.70	95	75	1.3990

附: SM 缓冲液: 5.8g NaCl, 2.0g MgSO₄, 50ml Tris·Cl, pH7.5, 5ml 2% 明胶, 加入至 1000ml。

(11) 用乙醇擦净离心管外壁, 干燥后, 贴上橡皮膏, 用 21 号针头从噬菌体带下方穿入管内, 收集噬菌体带, 不要混入其上方带中的溶液, 否则会污染细菌碎片和噬菌体解聚物。也可用带长乳胶管的细长弯口的玻璃吸管、套上 10ml 注射器从离心管管口插入噬菌体带下方抽出噬菌体。

(12) 将收集液移入 Beckman Ti50 或 SW50.1 转头的相应离心管, 加入密度为 1.5g/ml 的 CsCl 溶液混匀。Ti50 转头: 38 000r/min, 4℃ 离心 24 小时或 SW50.1 转头: 35 000r/min, 4℃ 离心 24 小时。按步骤 (11) 收集噬菌体带。将噬菌体溶液移入 1 个紧盖管帽的试管中 4℃ 贮存。

注意事项:

(1) λ 噬菌体对螯合剂非常敏感, 为防止噬菌体外壳蛋白质解聚, 在操作中必须加入镁离子 (10 ~ 30mmol/L)。

(2) 若噬菌体产量低, 应测定各阶段样品中噬菌体效价单位颗粒的数目, 找出原因。

方法二: 沉淀噬菌体颗粒

(1) 按标准方法提取至步骤 (7), 不加入 CsCl 进行以下步骤。

(2) 用 Beckman SW28 转头, 25 000r/min, 4℃ 离心 2 小时。

(3) 弃上清, 管底可见噬菌体沉淀, 再加入 1 ~ 2ml SM 溶液, 4℃ 静置过夜。若有可能, 则固定于摇床上低速振荡过夜。

(4) 第二天, 温和吹吸溶液, 保证所有噬菌体颗粒悬浮。

(5) 按后述 4.3.5.5 方法步骤 (5), 提纯噬菌体 DNA。

本法制品不如 CsCl 梯度离心所得样品纯净, 但对于制备 λ 噬菌体亚克隆或制备 M13 载体和 λ 噬菌体双臂等都是一个简易的方法。

方法三: 甘油分级梯度法

(1) 按标准提取方法进行至步骤 (5), 接以下步骤。

(2) 用 5 ~ 10ml TM 液悬浮 1L 培养物中的噬菌体沉淀。

TM 液: 50mmol/L Tris·Cl (pH7.8), 10mmol/L MgSO₄

(3) 加入等容积氯仿, 振荡 40 秒钟, 3 000g, 4℃ 离心 15 分钟, 吸出含噬菌体的上层水相。

(4) Beckman SW41 离心管中按以下方法制备甘油分级梯度:

①3ml 含 40% 甘油的 TM 溶液铺入管底; ②在其上小心铺一层 4ml 含 5% 甘油 TM 溶液; ③在甘油层上小心加入步骤 (3) 抽提后的噬菌体溶液; ④用 TM 溶液补满全管, 平衡对称离心管。

(5) Beckman SW41 转子, 35 000r/min, 4℃ 离心 60 分钟。

(6) 弃上清, 按每升原培养物中噬菌体加 1ml TM 重新悬浮噬菌体沉淀。

(7) 加入胰 DNA 酶 I 和 RNA 酶, 终浓度分别为 5μg/ml 和 1μg/ml, 37℃ 消化 30 分钟。

(8) 加入 0.5mol/L EDTA, pH8.0 至终浓度 20mmol/L, 混匀。

(9) 按下节介绍的 λ 噬菌体 DNA 提取方法步骤 (5) 继续进行。

方法四: CsCl 平衡梯度离心法

当噬菌体制备量在 1L 或 1L 以内时, 可以不用 CsCl 分级梯度离心。

(1) 按标准方法至氯仿抽提后 (步骤 7), 测量水相体积, 每毫升加入 0.75g CsCl, 轻轻混匀至溶解。

(2) 用 TM (含 0.75g/ml CsCl) 补满全管, Beckman Ti50 转头, 38 000r/min 或 SW5 0.1 转头 35 000r/min, 4℃离心 24 小时。

(3) 按标准方法中步骤 (11) 收集噬菌体颗粒带, 移入 1 个紧盖的试管中, 与 CsCl 一起在 4℃下贮存。

[噬菌体 λDNA 的提取]

(1) 用噬菌体制品 1 000 倍容积的以下溶液, 室温下透析去 CsCl:

10mmol/L NaCl₂

50mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

10mmol/L MgCl₂

(2) 换上缓冲液再透析 1 小时。

(3) 将透析完毕的噬菌体溶液移至 1 个离心管中, 使之仅占离心管容积的 1/3。

(4) 加入 0.5mol/L EDTA (pH8.0) 至终浓度 200mmol/L。

(5) 加链霉蛋白酶 (自身消化) 至终浓度为 0.5mg/ml, 或蛋白酶 K 至终浓度 50μg/ml。

链霉蛋白酶粉末溶于 10mmol/L Tris·Cl (pH7.5), 10mmol/L NaCl 溶液中至其浓度为 20mg/ml, 溶解后, 37℃保温 1 小时, 小剂量分装贮存于 -20℃。

(6) 加 10% (W/V) 的 SDS 至终浓度为 0.5%, 将管反复倒置数次混匀。

(7) 37℃ (链霉蛋白酶) 或 65℃ (蛋白酶 K) 保温 1 小时。

(8) 冷至室温后, 加等体积酚 (50mmol/L Tris·Cl, pH8.0 平衡) 反复倒置管数次混合, 室温下, 3 000g, 离心 5 分钟, 用广口吸管将水相移入 1 个清洁管中。

(9) 用酚/氯仿、氯仿各抽提 1 次。

(10) 将水相移至透析袋中, 4℃对 1 000 倍容积的 TE (pH8.0), 换液 3 次透析过夜。

4.4 DNA 片段的分离及纯化

在含有各种不同大小的 DNA 混合物中 (如内切酶酶解的 DNA), 分离纯化特定分子量的 DNA 片段, 是基因工程技术中的基础工作。虽然层析、选择性沉淀等方法可达到上述目的, 但是实验室中最常采用的, 还是凝胶电泳分离和回收的方法。下面主要介绍琼脂糖凝胶电泳等几种回收 DNA 片段的方法。

4.4.1 从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段的原则

1. 去除 DNA 样品中的杂质:

琼脂糖是从琼脂中提取出来的, 其中含有较多的酸根和羟基多糖。目前大多数级别的琼脂糖中混有硫酸酯多糖, 这种物质能抑制基因克隆中使用的多种工具酶的活性, 如 DNA 限制性内切酶、连接酶、激酶及聚合酶, 在回收 DNA 时应尽量减少这些酶抑制剂的污染。不管用哪种方法, 回收 DNA 片段的溶液, 要用 2.5mol/L 醋酸铵和乙醇沉淀, 再用 70% 乙醇漂洗数次, 这样处理, 可以很有效地去除一些有害的有机分子和无机盐沉淀。已被列为实验操作常规。近年来琼脂糖的质量有较大提高, 如低熔点琼脂糖, 不但熔点降低到 65℃左右, 更重要的是, 其中 DNA 工具酶的抑制物含量很少, 所以有些低熔点琼脂糖可以直接在其溶液中对 DNA 进行内切酶消化和 DNA 片段之间的连接反应。

2. 提高 DNA 片段的回收率:

DNA 的回收率与 DNA 片段的大小有一定关系, 随着 DNA 分子量的增大, 回收率明显下降, 大于 20kb 时, 回收率低于 20%。这是由于大的 DNA 片段与 DEAE 纤维素纸的结合力强, 很难洗脱下来。

DNA 片段的含量与回收率也有较密切关系, 量越少回收率越低, 若 DNA 片段量小于 500ng 时, 几乎很难回收。

回收 DNA 片段应该注意以下事项: ①提高 DNA 上样量; ②减小 DNA 回收时的洗脱容积, 若容积过大时, 可先用正丁醇进行溶液浓缩; ③正确选择回收 DNA 片段的方法。DEAE 纤维素纸电泳法适用于 500bp 到 5kb 大小的 DNA 片段的回收; 电洗脱法适用于回收 5kb 以上的 DNA 片段; 低熔点琼脂糖回收法较前两类方法的回收率低, 但操作简单, 甚至加一定缓冲液融化后即可直接进行反应。

4.4.2 DEAE 纤维素纸插片电泳法

本法是 Dretzen 于 1981 年 Girvitz 的方法基础上改进而成。DEAE 纤维素即二乙基氨基乙基 (diethylaminoethyl) 纤维素, 在它的纤维骨架链上, 连接有许多阳离子交换基团, 是一种吸附阴离子基团的阴离子交换纤维素, 它能结合带负电荷的 DNA 分子。DNA 片段经琼脂糖凝胶电泳分离后, 将感兴趣的电泳 DNA 片段转移至 DEAE 纤维素纸上, 然后再用高离子缓冲液从 DEAE 滤膜上洗脱 DNA。

本法的优点是操作较简单, 可以同时进行多个 DNA 片段的回收, 对于 5kb 以下的 DNA 片段回收率好, 回收 DNA 样品的纯度非常高, 可用于转基因动物实验, 在以后的 DNA 工具酶操作前, 不需进一步用 DEAE-Sephacel 柱纯化。此法的缺点是对 5kb 以上的 DNA 片段的回收率较低, 结合在 DEAE 滤膜上的单链 DNA 也很难洗脱, 不宜用于 15kb 以上的双链 DNA 片段及任何大小的单链 DNA 回收。

试剂:

DEAE 纤维素纸 (如: Schleicher & Schuell NA-45)

10mmol/L EDTA (pH8.0)

0.5mol/L NaOH

低盐漂洗缓冲液:

50mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

0.15mol/L NaCl

10mmol/L EDTA (pH8.0)

高盐洗脱液:

50mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

1mol/L NaCl

10mmol/L EDTA (pH8.0)

酚/氯仿:

10mol/L NH_4Ac

3mol/L NH_4Ac (pH5.2)

TE (pH7.6)

乙醇

操作步骤:

(1) 内切酶酶解 DNA 样品, 使感兴趣的 DNA 片段量在 500ng 以上, 适当浓度的琼脂糖凝胶 (含 $0.5\mu\text{g/ml}$ EB) 电泳分离 DNA 片段, 用手提式长波紫外线灯观察确定所需 DNA 片段的带型位置。

(2) 在所需 DNA 带的前缘, 用眼科解剖刀切开凝胶, 切口长度略宽于 DNA 区带的宽度 (两侧各长出 2mm)。

(3) 戴上手套, 剪下一长方形小片 DEAE 纤维素纸, 宽度略大于琼脂糖凝胶的厚度, 长度与凝胶上的切口相当, 将 DEAE 纤维纸片浸入 10mmol/L EDTA (pH8.0) 溶液中 5 分钟, 再浸入 0.5mol/L NaOH 溶液中 5 分钟, 然后用无菌水漂洗 6 次。处理好的 DEAE 纤维素纸若不马上使用, 可以在无菌水中 4°C 保存几周。使用过大的 DEAE 纤维素纸片, 会减低 DNA 的回收率。

(4) 用扁头镊(鸭嘴镊)轻轻分开凝胶切口,小心插入 DEAE 纤维素纸片,撤出镊子,小心使切口紧密合拢,不要在 DEAE 滤膜与凝胶之间留下气泡。

(5) 用 5V/cm 的电压继续电泳,直到所需的带全部迁移到 DEAE 纤维素纸片上为止。不时用手提式长波紫外线灯观察电泳进展情况。其间应注意:①电泳缓冲液只需刚好遮盖凝胶表面,过多的缓冲液应用吸管吸去;②当所需 DNA 带迁移入滤膜上后,不必再延长电泳时间,否则则会带上一些琼脂糖中的杂质;③最好在所需 DNA 区带的后面插入 DEAE 纤维素纸片,以防止不需要的 DNA 分子电泳至滤膜上。

(6) 停止电泳,用鸭嘴镊取出所需的 DEAE 纤维素纸片,室温下,浸于 5~10ml 低盐漂洗缓冲液中,洗去滤膜表面粘附的琼脂糖颗粒。不要让 DEAE 纤维素纸干燥,否则会导致 DNA 不可逆地结合在纤维素纸上而洗脱不下来,影响回收率。

(7) 将 DEAE 纤维素纸片转移至 Eppendorf 管中,加入适量的高盐洗脱液淹没纸片,纸片可轻柔折叠或挤压,但不能过度挤紧,65℃保温 30 分钟,不时振荡并检查纸片是否完全浸没在液体中。

(8) 吸出洗脱液再加入适当容积的洗脱液,65℃保温 15 分钟,合并两次洗脱液,用紫外线灯检查纸片上是否还有溴乙锭染色的 DNA。

(9) 洗脱液用酚/氯仿抽提 1 次,上清用 0.2 倍容积的 10mol/L 醋酸铵和 2 倍容积的乙醇(4℃预冷)室温沉淀 10 分钟,12000g,室温离心 20 分钟,弃上清,DNA 沉淀用 70%乙醇漂洗数次,12000g,再离心 5 分钟,去乙醇,真空干燥 2 分钟,加 3~5μl TE (pH7.6) 溶解 DNA。应注意①加入 10μg 的载体 RNA(酵母 tRNA)可以增加低浓度 DNA 的沉淀回收率;②若 DNA 样品用于小鼠卵细胞的显微注射,步骤(9)中沉淀应悬浮在 200μl TE (pH7.6) 缓冲液中,再加入 25μl 3mol/L 醋酸钠 (pH5.2),2 倍容积乙醇重新沉淀 DNA 1 次,然后加溶于 3~5μl TE (pH7.6) 缓冲液中备用。

(10) 取 50ng 左右的 DNA 进行电泳,检查回收的质量并参照分子量标准的相近区带,估计 DNA 样品的浓度。

操作中应注意:①为了从 DEAE 纤维素纸片中充分洗脱 DNA,可适当增加高盐洗脱液的用量,再用未经水饱和的正丁醇抽提浓缩洗脱液,同时去 EB,然后用乙醇沉淀 DNA;②若滤膜面积较大,可采用以下方法洗脱:A,在 1 只 0.5ml Eppendorf 管底部穿 1 个细孔,套在 1 个 1.5ml 的 Eppendorf 管中;B,DEAE 滤膜放入小 Eppendorf 管中,用防水蜡膜从管外面封住管底细孔,加入高盐洗脱液,将滤膜用玻璃棒搅成碎片,65℃保温 30 分钟;③将 0.5ml Eppendorf 管底的蜡膜去掉,套上 1 个去盖的 1.5ml Eppendorf 管,离心 30 秒钟,再加高盐洗脱液,离心 1 次,合并两次洗脱液,以后操作同步骤(9)、(10)。

4.4.3 电泳洗脱法

这种方法是特定的 DNA 片段电泳迁移出凝胶介质,进入 1 个可以回收的固定的小容积溶液中。再从该溶液中纯化 DNA 片段。其中,有许多不同的操作方法,主要是透析袋和非透析袋两大类。电泳洗脱 DNA 片段的最大特点在于用其它方法回收率差的 DNA 有较好的回收效果,其质量可以满足 DNA 酶切反应和 DNA 连接反应的要求。在此,介绍 5 种方法。

方法一:透析袋电泳洗脱法

试剂:

1×TAE

0.5×TBE (或 0.2×TBE)

TE (pH8.0)

酚/氯仿 (50:50)

乙醇 (无水乙醇及 70%乙醇)

准备工作:

透析袋处理:①剪下许多段长度为 25cm,直径为 13mm 的透析袋;②将透析袋浸没于 2% NaHCO₃

和 1mmol/L EDTA 溶液中加热至沸腾, 在沸水中放置 10~15 分钟; ③用蒸馏水反复彻底冲洗袋内壁; ④乙醇冲洗两遍, 然后用 1mmol/L EDTA (pH8.0) 冲洗 2 次; ⑤将透析袋完全浸没在 1mmol/L EDTA (pH8.0) 中, 4℃保存。

操作步骤:

(1) 在长波紫外线灯下检查电泳 DNA 分离的结果, 确定需要回收 DNA 区带的位置, 用比较清洁的解剖刀切下含所需 DNA 区带的凝胶。凝胶尽可能小, 照像记录切胶前后结果。一定要用长波 (300~360nm) 紫外线, 观察的时间应尽可能短, 以减少紫外线对 DNA 片段的损伤。操作时应注意个人防护。

(2) 用透析袋夹夹紧处理好的透析袋一端, 用 1×TAE 或 0.5×TBE 充满透析袋至外溢程度, 将切下的凝胶块放入透析袋中。

(3) 去掉透析袋中大部分电泳缓冲液, 同时排出气泡, 透析袋中的液体量应以凝胶块恰好浸没于液体为好。用透析夹夹紧另一端, 不要带入气泡, 并检查透析袋两端的是否夹紧。

(4) 将透析袋刚好浸泡于 1×TAE 的电泳槽中, 使凝胶条块的纵长对电场方向垂直。

(5) 用 4~5V/cm 电压降进行电泳, 使 DNA 分子迁移出凝胶, 进入透析袋的溶液中, 不时用手提式长波紫外线灯监视胶块内 DNA 残存量, 一般需要 2~3 小时。

(6) 当凝胶内看不到 DNA 区带, 而在透析袋内侧可以观察到红色荧光时, 应停止电泳洗脱, 倒置变更电极 (阴、阳两极互换)。电泳 1 分钟, 以解离透析袋上的 DNA 分子。

(7) 打开透析袋, 吸出缓冲液, 再用少量 1×TAE 或 0.5×TBE 冲洗透析袋, 合并两次液体。

(8) 凝胶块置于含 0.5μg/ml EB 的 TAE 或 TBE 中染色 30 分钟, 以确认 DNA 已全部洗脱。

(9) 将透析袋中的 DNA 溶液先在 Eppendorf 离心机上离心 15 秒钟, 以去除凝胶碎片。

(10) 上清用酚/氯仿抽提 2 次, 用乙醇沉淀, 70%乙醇漂洗 DNA 沉淀 1 次。

(11) 弃上清, 真空干燥 2 分钟, 加入 25μl TE (pH8.0) 溶解 DNA。

(12) 取 5μl DNA 样品电泳以测定 DNA 样品的浓度和纯度, -20℃保存样品备用。

方法二: 槽沟电泳洗脱法

本法不需特殊的电洗脱设备, DNA 混合物经凝胶电泳分离后, 在感兴趣的 DNA 区带前挖 1 槽沟, DNA 电泳迁移到槽沟电泳液中, 收集沟内电泳液回收 DNA 片段。此法操作简单、快速、回收率高, 但需在洗脱过程中不时吸出沟内溶液并补充适量电泳液, 这一缺陷可通过在槽沟的正极面加 1 单层透析袋解决。

(1) DNA 样品经琼脂糖凝胶电泳分离后, 用长波紫外线确定所需 DNA 片段的区带位置。

(2) 用眼科解剖刀或其它锋利刀片, 在所需 DNA 带前缘凝胶挖出 1 条槽沟, 槽沟长度以每侧比 DNA 带宽 2mm 左右为宜, 宽度为 0.5~1cm 左右。

(3) 使电泳槽中电泳缓冲液平面刚好与凝胶表面相平, 在槽沟阳极面加贴适当大小的单层透析袋, 以防止 DNA 迁移到槽沟的电泳液出溶液后又很快进入凝胶, 然后在槽沟内注入电泳缓冲液恰好与凝胶表面相平。

(4) 恢复电泳, 可见 DNA 迁移入槽沟电泳液中, 若 DNA 量较多, 吸出沟内电泳液, 再补充新的缓冲液, 继续电泳直至所需 DNA 带全部进入溶液, 交换电极, 电泳 30 秒钟, 以便透析袋壁上的 DNA 释放下来, 吸出沟内所有溶液, 再用 1/2 槽沟内容积的电泳液冲洗槽沟, 合并全部 DNA 回收溶液。

(5) 用酚、酚/氯仿、氯仿分别抽提 DNA 回收液, 乙醇沉淀 DNA, 溶于适当体积的 TE 中, 或用 DE-AE-Sephacel 柱层析纯化回收的 DNA。

注意事项:

(1) 在所需 DNA 带前挖槽沟时, 凝胶切割应整齐, 去掉沟内凝胶后, 应用电泳液反复冲洗去除沟内剩余的凝胶颗粒。

(2) 若槽沟内的阳极面不加贴单层透析袋, 电洗脱时应每 2~3 分钟回收槽内溶液, 以防溶液中的

DNA 又迁移至阳极面凝胶降低 DNA 回收率。透析膜只用一层即可。

方法三：“V”字形内槽电洗脱法

原理：

本法使用 1 个特殊的电洗脱装置（图 4-1），其原理是在 V 字内槽的底部加入高离子浓度的电泳缓冲液，其上部分及整个电泳外槽中加入低离子浓度电泳液，DNA 迁移至高离子浓度溶液部分时，由于此处电荷多，电阻极小，电压降很小，DNA 迁移率急剧下降，在 2 小时内，DNA 几乎不能迁移出该高离子浓度溶液，从而达到回收并浓缩 DNA 的目的。其优点是：不需透析膜，同时可以回收多个不同的 DNA 样品，回收率高，也可以用于 RNA 及蛋白质特定分子的回收，洗脱体积小（50 μ l），具有浓缩功能，洗脱时间短（30 分钟），操作简单安全。回收的 DNA 的纯度适用于分子生物学中大多数工具酶反应。这种“V”字槽回收装置可以从 Pharmacia 公司及国内北京东方仪器厂购得。

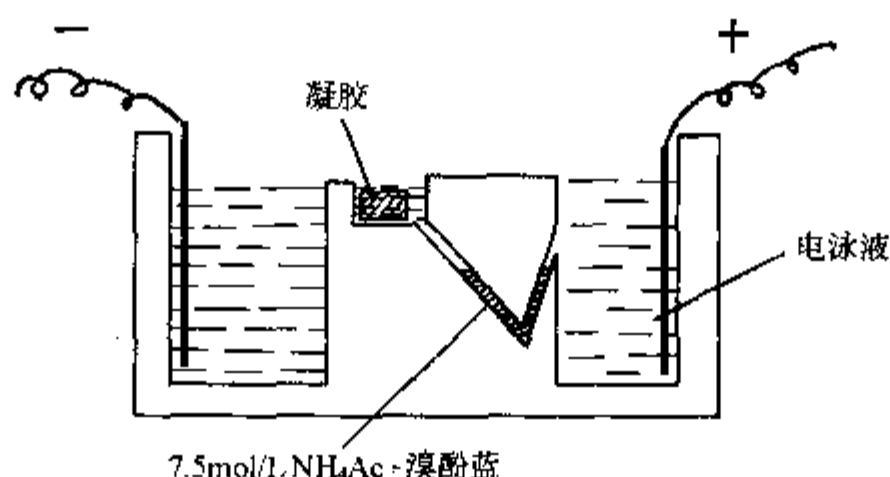


图 4-1 “V”字形槽电洗脱法示意图

试剂：

高盐电洗脱缓冲液：

7.5mol/L 醋酸铵

1% 甘油

10mmol/L Tris·Cl (pH7.8)

0.05% 溴酚蓝

0.1 或 0.5 \times TBE 电泳缓冲液

酚、氯仿、乙醇

操作步骤：

(1) 在长波紫外线灯下，切割下含所需 DNA 带的凝胶条，将凝胶条置于“V”字内槽负极端贮胶室中。

(2) 用带长针头的注射器或枪头上套细长硅胶管的微量移液枪，向“V”字内槽管底加入 50~100 μ l 高盐电洗脱液，然后用 0.1 或 0.5 \times TBE 充满“V”字内槽，最后在电泳装置中灌入 0.1 或 0.5 \times TBE 至恰好与置胶室中凝胶表面相平，注意不要使 TBE 溢过中央隔板。

(3) 接通电源，100V 电源洗脱 20~40 分钟，用手提式长波紫外线灯检查凝胶条中 DNA 带是否完全洗脱。若需长时间电洗脱，“V”字内槽底部的高盐洗脱液中溴酚蓝，在 2 小时内也不会迁移或扩散至 TBE 中。

(4) 放出电泳装置中的 TBE，用微量加样器吸出“V”字内槽中的上层 TBE，然后吸出下层含溴酚蓝的高盐洗脱液移至 1 个清洁的 Eppendorf 管中，加入 1 倍容积 TE 冲洗“V”字槽，合并两部分液体。

(5) 用酚、酚/氯仿、氯仿分别抽提 DNA 电洗脱液各 1 次。

(6) 上清加 2 倍容积的无水乙醇, -20°C 放置 30 分钟, $12\,000g$, 室温离心 10 分钟。70% 乙醇漂洗 DNA 沉淀 1 次, $12\,000g$, 室温离心 5 分钟, 弃上清, 真空干燥乙醇 2 分钟, 加入适当容积的 TE (pH.7.6) 溶解 DNA。

注意事项:

(1) 在 V 字内槽中加入上层 $0.1\times\text{TBE}$ 时, 应小心勿搅动下层的高盐电洗脱液, 最好是 V 字槽两侧同时加入, 也可以先在“V”字内槽中充满 $0.1\times\text{TBE}$, 然后用针头插入“V”字内槽底部缓慢加入高盐电洗脱液, 在“V”字内槽中不应有气泡存在。

(2) 溴酚蓝是指示剂, 若下层高盐电洗脱液中溴酚蓝没有迁移至 TBE 中, 标志着该溶液中离子浓度未扩散稀释, DNA 分子不会迁移出去。

方法四: “眼镜”槽电洗脱法

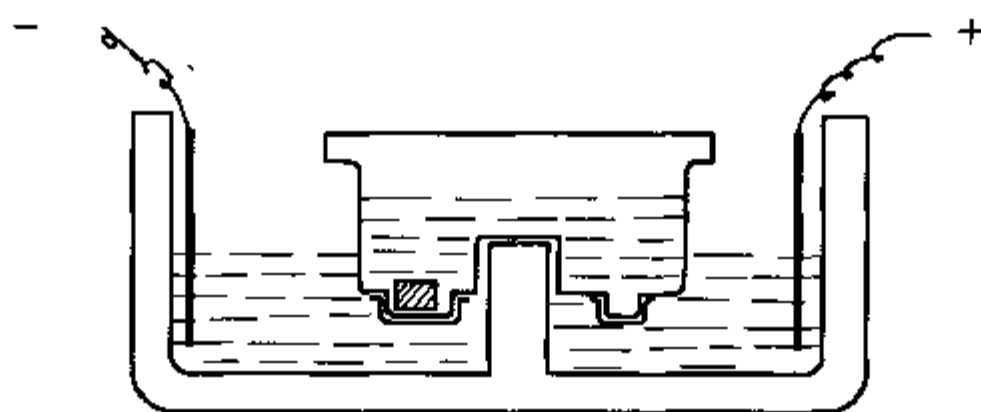


图 4-2 “眼镜”槽电洗脱法示意图

本装置如图 4-2 所示, 由左右 2 个相连的槽组成, 槽底均用单层透析袋封严。1 侧放切割下来含所需 DNA 带的凝胶, 另 1 侧为 DNA 回收槽, 回收槽槽底突出部分容积为 $400\mu\text{l}$ 。本装置回收 DNA 的特点为, 电流只经过“眼镜”槽连通正负极, 故洗膜时间短, 回收 DNA 的质量好, 回收率也高。

操作步骤:

(1) 在“眼镜”槽两侧突出部分底部, 套上单层透析膜, 架于电泳槽隔板上, 如图, 置胶槽在负极, 回收槽在正极。

(2) 向电泳槽和眼镜槽中加入 $0.1\times\text{TBE}$ 。务必使电泳槽中的液面不高过中隔板, 避免左右两槽直接相通。眼镜槽中液面将正好浸没中央桥板, 使左右槽相通。

(3) 在长波紫外线灯下, 切下所需 DNA 带的凝胶条置于负极的置胶槽中。

(4) 接通电源, 150V 电洗脱 30 分钟, 可用手提式长波紫外线灯检查凝胶条中 DNA 是否已完全洗脱。将正负极倒换, 电泳 30 秒钟。

(5) 关闭电源, 小心取下眼镜槽, 缓慢吸弃该槽中 $0.1\times\text{TBE}$, 直到液面至回收槽突出部分 (回收室) 表面, 然后将回收槽中的回收液吸出移至 1 个清洁的 Eppendorf 管中, 加 $200\mu\text{l}$ TE, 冲洗回收槽, 合并回收 DNA 液。

(6) DNA 回收液经酚/氯仿标准抽提程序抽提后, 用乙醇沉淀回收 DNA 片段。

方法五: 自制快速高效电洗脱法

上述电洗脱法中, 透析袋法容积较大, 挖槽法需不时吸出槽内液体, 其它方法皆需购买特殊的回收装置, 下面介绍一种自制的简单体系, 方便、实用、经济, 不受条件限制, 回收率高 (达 80%)、质量好。

操作步骤:

(1) 在长波紫外线灯下确定并切下所需 DNA 带的凝胶条。

(2) 将凝胶条放入 1 个 1.5ml 的微量移液枪枪头中, 0.6% 的琼脂糖 (用相应的 $1\times$ 电泳缓冲液配制), 化胶后冷却至 50°C , 加入含凝胶条的 1.5ml 枪头中, 使 0.6% 琼脂糖液面高出凝胶条 $1\sim 2\text{mm}$, 避免产生气泡, 室温下使琼脂糖凝固。1.5ml 枪头中灌入的琼脂糖量决定于该枪头顶端所需留下多少空间, 可根据所需洗脱的 DNA 量多少而定, 一般为 $300\mu\text{l}$ 左右。

(3) 切除灌好胶的 1.5ml 枪头尖端 (2cm 左右), 顶端加入 $1\times$ 电泳缓冲液 (TBE、TAE 均可)。

(4) 取另 1 个 1.5ml 枪头, 切除尖端部分 3.2cm 左右前端放置 1 个单层透析膜, 插入步骤 3 准备好的枪头顶端, 避免产生气泡, 检查是否有液体从透析袋周围析漏。

(5) 将准备好的电洗脱装置, 浸入电泳槽的电泳缓冲液液面以下, 用胶布固定。

(6) 接通电源, 100V、150mA 电泳 15~20 分钟。DNA 应全部迁移至凝胶和透析袋之间的溶液中可用长波紫外线灯监测, 倒置正、负极电泳 30 秒。

(7) 停止电泳, 取出电洗脱装置, 用手纸吸干外面的液体, 垂直 (凝胶端朝下) 小心取出上端 1.5ml 枪头, 去掉透析袋, 吸出电洗脱液移入另 1 个新 Eppendorf 管中。

(8) 用 2.5mol/L 醋酸铵, 2 倍容积乙醇沉淀 DNA, DNA 溶于 TE 中备用。

注意事项:

(1) 步骤 2 操作中, 可以先切除 1.5ml 枪头尖端, 然后用胶布封住切口, 灌入适量 0.6% 琼脂糖, 使液面高于原凝胶条 $1\sim 2\text{mm}$, 并且留出 $300\sim 400\mu\text{l}$ 体积的顶端空隙, 凝固后, 加入 $300\sim 400\mu\text{l}$ $1\times$ TBE, 再去掉尖端封口的胶布。

(2) 将自制电洗脱装置在电泳槽中固定, 可以切下 1 长块 1.5ml 枪头贮存盒中的插板, 先用氯仿将插板粘合固定在电泳槽中, 然后将自制电洗脱装置插入板中。

(3) 制作如图 4-3。

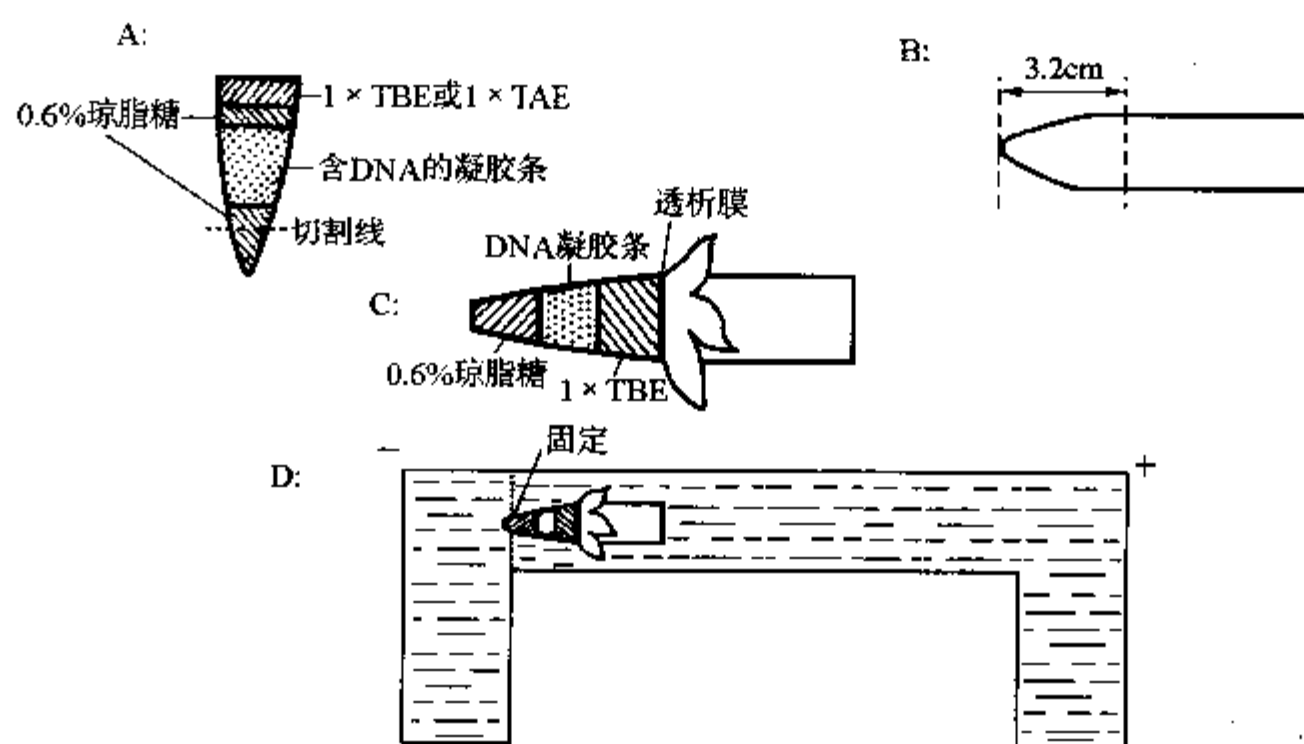


图 4-3 简便快速电洗脱法示意图

4.4.4 低熔点琼脂糖凝胶挖块回收法

在琼脂糖主链导入羟乙基修饰后, 其凝固温度降为 30°C , 融化温度为 65°C , 这一融化温度低于绝大多数双链 DNA 的变性温度。利用这类凝胶纯度高熔点低特点, Wieslander 等人发展了一项颇为简单的 DNA 片段回收技术, 回收 DNA 质量对于 DNA 的连接、探针标记以及内切酶消化等反应完全适合。

操作步骤:

(1) 先灌制普通凝胶, 然后在离加样孔适当距离处切下一定大小的普通凝胶, 用相应浓度的低熔点琼脂糖填充, 室温中凝固, 4℃可加速凝固, 凝胶中含 0.5μg/ml 溴乙锭。

(2) 将待分离的 DNA 样品上样电泳, 当感兴趣的 DNA 片段迁移至低熔点凝胶内, 停止电泳、电泳最好在 4℃下进行, 以防低熔点凝胶溶化。

(3) 在长波紫外线灯下, 切下含所需 DNA 片段的低熔点凝胶, 移入 1 个 1.5ml 的 Eppendorf 管中。

(4) 加入凝胶条 5 倍容积的 20mmol/L Tris·Cl (pH8.0), 1mmol/L EDTA (pH8.0), 65℃水浴中加温 5 分钟融化凝胶。

(5) 冷到室温时加入等容积的 0.1mol/L Tris·Cl (pH8.0) 饱和的酚, 强烈振荡混匀 20 秒钟, 室温下 4 000g, 离心 10 分钟, 有机相与水相交界面为白色的低熔点琼脂糖粉末。

(6) 用等容积酚/氯仿、氯仿各抽提 1 次。

(7) 上层水相转移至 1 个清洁的 Eppendorf 管中, 加入 0.2 容积的 10mol/L 醋酸铵, 2 倍容积在预冷的无水乙醇, 混匀后, 室温下放置 10 分钟。4℃, 12 000r/min, 离心 20 分钟, 回收沉淀 DNA, 弃上清。DNA 用 70%乙醇漂洗 1 次, 12 000g, 离心 5 分钟, 去乙醇, 真空干燥 2 分钟, 加适当容积 TE 溶解。若必要, 可进一步经 DEAE-Sephacryl 柱层析纯化。

近年来, 此法有些经验和改进值得借鉴。Parker 与 Struhl 等的经验表明, 含 DNA 的低熔点凝胶条经融化后, 可直接加入酶反应缓冲液中进行 DNA 连接、探针标记及内切酶消化等反应, 大大简化了 DNA 回收的操作程序。1989 年 Burneister 等报道另一种从低熔点琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段的方法: ①将低熔点凝胶条 (含所需 DNA 片段) 移入 20 倍容积的 10mmol/L Tris·Cl (pH7.6), 5mmol/L EDTA (pH8.0), 0.1mol/L NaCl 溶液中, 室温放置 30 分钟; ②取出凝胶条移入 1 个清洁的 Eppendorf 管中, 加入 1 倍容积的 10mmol/L Tris·Cl (pH7.6), 5mmol/L EDTA (pH8.0), 0.1mol/L NaCl 溶液; ③加入无 DNA 酶的琼脂糖酶 (agarase Cal Biochem 公司), 100ml 的凝胶用 2 个单位, 37℃消化 12~61 小时, 使琼脂糖裂解成单糖。此时可以直接用于连接, 补平酶切等反应及转化实验。④若需要, 经酚/氯仿、氯仿分别抽提后, 上清中加入 2 倍容积的 TE (pH7.6), 然后加入 0.05 容积的 5mol/L NaCl, 2 倍容积乙醇混匀, 0℃放置 15 分钟沉淀 DNA, 12 000g, 4℃离心 15 分钟。小心吸弃上清, DNA 沉淀用 70%乙醇漂洗 1 次。12 000g, 离心 5 分钟, 弃上清。室温下蒸发乙醇, DNA 溶于适当容积的 TE (pH7.6) 中。

4.4.5 玻璃粉末洗脱法

本法利用琼脂糖凝胶溶于 NaI, 其中 DNA 可专一性地与玻璃粉末结合, 经洗涤去杂质后, 再用低盐洗脱液从玻璃粉末上将 DNA 洗脱下来, 达到回收 DNA 片段的目的。溶液中的 DNA 也可用本法纯化, 如准备作序列分析的 M_{13} DNA。

试剂:

预洗过的 325 目粉状燧石玻璃粉末 (IBI 公司)

TE 缓冲液

碘化钠溶液:

90.8g NaI

1.5g Na₂S

用水调容积至 1 000ml Whatman 1 号滤纸或 0.45μm 滤膜过滤, 再加 0.5g 碘化钠至饱和, 4℃下, 用铝铂纸包住避光保存。

乙醇洗涤溶液:

50ml 乙醇中含:

20mmol/L Tris (pH7.4)

1mmol/L EDTA

0.1mol/L NaCl

于 -20℃ 贮存。

3mol/L NaAc (pH7.4)

乙醇

操作步骤:

(1) 琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 后, 在长波紫外线灯下, 切下含所需 DNA 带的凝胶条 (体积尽可能小)。

(2) 按每克琼脂糖凝胶条, 加 2ml NaI 溶液的比例加入 NaI 溶液, 37℃ 保温 60 分钟溶解凝胶。应注意: 保温过程应避免光, TBE 配制的凝胶不易溶解。

(3) 用水将玻璃粉末稀释成 50% 的糊状 (V/V), 摇匀, 按每 1μg DNA 加 3μl 玻璃糊状液的比例, 向溶解好的凝胶 DNA 混合液中加入玻璃糊状液混匀, 冰浴放置 90 分钟。

(4) Eppendorf 离心机, 5 000r/min, 4℃ 离心 1 分钟, 弃上清。

(5) 加入 4℃ 预冷的 400μl 乙醇洗涤溶液, 悬浮玻璃粉末, 5 000r/min, 离心 1 分钟, 重复漂洗 2 次。

(6) 在玻璃沉淀物中, 加入 25μl TE 混匀, 37℃ 保温 30 分钟。

(7) 5 000r/min, 离心 1 分钟, 上清液移入 1 个清洁的 Eppendorf 管中, 此时样品可再用乙醇沉淀。

(8) 加 3μl 3mol/L NaAc, 75μl 乙醇混合, 于冰上 10 分钟。

(9) 12 000r/min, 4℃ 离心 10 分钟, 倾弃液体, 沉淀室温挥发乙醇后, 溶于适当容积的 TE 缓冲液中。

注意事项:

(1) 若选用玻璃粉末回收法进行凝胶电泳分离 DNA 时, 不能使用 TBE 缓冲液, 因为硼酸缓冲液配制的凝胶 (琼脂糖或丙烯酰胺) 在 NaI 溶液中均不能完全溶解。

(2) 步骤 (3) 中加入过量的玻璃粉末, 并不能增加 DNA 的回收率。

4.4.6 琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段的纯化

以下两种方法, 主要应用于从琼脂糖中回收的 DNA 溶液中去除污染的凝胶, 尤其是针对于透析袋电洗脱和凝胶电洗脱法回收的 DNA。

方法一: 有机溶剂直接抽提法

(1) 在巴斯德吸管前端装入硅化好的玻璃丝, 将 TBE 或 TAE 回收的 DNA 溶液通过该柱, 去除凝胶碎片。

(2) 用等容积的 2-丁醇抽提 DNA 溶液, 经多次浓缩直至容积为 0.5ml 左右。

(3) 用等容积酚、酚/氯仿、氯仿分别抽提 DNA 溶液 1 次, 上清移入 1 个清洁的 Eppendorf 管中。

(4) 加上 0.2 容积 10mol/L 醋酸铵, 2 倍容积 4℃ 预冷的无水乙醇混匀, 室温放置 10 分钟, 12 000g, 室温离心 20 分钟。应注意当 DNA 片段太小 (<100bp), 浓度过低 (<0.5μg) 时, 可加入 10μg 酵母 tRNA 作载体, 以提高 DNA 沉淀率。

(5) DNA 沉淀重新悬浮于 200μl TE (pH7.6) 中, 溶解后加入 20μl 3mol/L NaAc (pH5.2), 混匀; 再加入 2 倍容积 4℃ 预冷的乙醇, 室温中沉淀 DNA 10 分钟, 12 000g, 室温离心 10 分钟, 用 70% 乙醇漂洗沉淀, 去乙醇后, DNA 沉淀溶于 50μl TE (pH7.6) 缓冲液中。

(6) 取 50ng 左右的回收 DNA 进行电泳, 参照分子量标准, 估计 DNA 样品的浓度和质量。

方法二: DEAE-Sephacel 柱层析法

本法是通过 DNA 的负电荷与阳离子交换树脂结合, 去除 DNA 溶液的杂质, 然后用高盐洗脱液将 DNA 洗脱下来。DEAE-Sephadex 和 DEAE-Sephacel 柱均能很好地完成这一任务。现在许多公司有这类

层析柱出售, 操作时应按厂方说明书进行。

操作步骤:

- (1) 用 20 倍容积的 TE (pH7.6) [含 0.6mol/L NaCl] 溶液悬浮 DEAE Sephacel, 吸去上清, 再用该溶液悬浮, 重复几次平衡树脂, 于 4℃ 贮放在以上溶液中。
- (2) 用 0.6ml DEAE - Sephacel 糊状物灌制成一小柱。
- (3) 依次用以下溶液洗涤层析柱。

TE (pH7.6) 含 0.6mol/L NaCl	3ml
TE (pH7.6)	3ml
TE (pH7.6) 含 0.1mol/L NaCl	3ml
- (4) 直接将含 DNA 的电泳缓冲液上柱, 收集流出液再上样 1 次。
- (5) 用含 0.3mol/L NaCl 的 1.5ml TE (pH7.6) 洗柱 2 次。
- (6) 用含 0.6mol/L NaCl 的 1.5ml TE (pH7.6) 洗柱 3 次, 每份 0.5ml 收集洗脱液 (含有 DNA)。
- (7) 合并步骤 6 中的洗脱收集液, 用等容积酚/氯仿抽提 1 次, 上清用 2 倍容积乙醇沉淀, 70% 乙醇漂洗。干燥后, DNA 沉淀溶于 10μl TE (pH7.6) 中, 取 50ng 左右 DNA 通过凝胶电泳判断回收 DNA 的浓度和质量。

4.4.7 聚丙烯酰胺凝胶中回收 DNA 片段

前面介绍的从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段的方法, 大多数都适用于聚丙烯酰胺凝胶中的 DNA 片段回收。下面再介绍一种从 PAG 中回收 DNA 片段碾碎浸泡法, 本法对大于 3kb 的 DNA 片段回收率小于 30%, 但 PAG 中电泳的 DNA 片段多数为小分子量, 故回收的 DNA 纯度非常高, 对核酸工具酶无抑制作用, 对 DNA 传染细胞及微注射动物细胞没有毒性作用, 对双链、单链 DNA 均可回收。

试剂:

洗脱液:

- | |
|-------------------------------|
| 0.5mol/L NH ₄ Ac |
| 10mmol/L Mg (Ac) ₂ |
| 1mmol/L EDTA |
| 乙醇 100%, 70% |
| TE (pH7.6) |
| 3mol/L NaAc (pH5.2) |

操作步骤:

- (1) DNA 经聚丙烯酰胺凝胶电泳、染色后, 用长波紫外线灯确定所需 DNA 带, 切下该区凝胶, 在玻板或保鲜膜上将凝胶切碎, 然后将凝胶碎片移至 Eppendorf 管中。
- (2) 用微量加液枪枪头继续在 Eppendorf 管中将凝胶碎片碾碎。
- (3) 加入 1 ~ 2 倍容积的洗脱液 (最好是不要超过 0.5ml, 这样可以在 1 个 Eppendorf 管中沉淀 DNA)。
- (4) 盖严 Eppendorf 管后, 在 37℃ 或室温下于多角度振荡平台上洗脱 DNA。小于 500bp 的 DNA 片段, 3 ~ 4 小时即可洗出, 大片段 DNA 则需洗脱过夜 (12 ~ 16 小时)。
- (5) 12 000g, 4℃ 离心 1 分钟, 将上清移至另 1 个清洁的 Eppendorf 管中, 小心避免带入凝胶碎末。
- (6) 将离心后的凝胶碎末沉淀用 0.5ml 洗脱液悬浮漂洗 1 次, 短暂振荡, 12 000g, 4℃, 离心 1 分钟, 吸出上清, 与步骤 (5) 中上清合并。
- (7) 上样于经装有硅化玻璃丝或 Whatman GF/G 滤膜纸的巴斯德管 (或 1.5ml 加样枪头), 去除 DNA 洗脱液中的凝胶碎末, 然后将溶液平分于 2 个 Eppendorf 管中。

(8) 加入 2 倍容积 4℃ 乙醇混匀, 冰浴 30 分钟, 12 000g, 4℃ 离心 10 分钟, 弃上清, DNA 沉淀再溶解于 200 μ l TE (pH7.6) 中, 加 20 μ l 3mol/L 醋酸钠 (pH5.2), 2 倍容积乙醇沉淀 DNA, 离心后, 去上清, 用 70% 乙醇漂洗 DNA 沉淀。12 000g, 离心 5 分钟, 弃上清, 真空干燥乙醇 2 分钟, 加入 10 μ l TE (pH7.6) 溶解 DNA。

(9) 取 50ng 左右 DNA 行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 判断回收 DNA 的浓度和质量。

4.4.8 蔗糖梯度超速离心分离 DNA 片段

该法不能像凝胶电泳一样, 确切地回收每一特定大小的 DNA 分子, 但可以分离大小在一定范围内的 DNA 片段, 尤其适用于“鸟枪法”进行的染色体 DNA 基因组文库的构建, 若期望基因组文库插入 DNA 片段为 20kb, 可以在 Sau 3A 或 Mbo I 等内切酶酶切后, 用本法回收 10~30kb 的 DNA 片段。

试剂:

100 μ g 染色体 DNA

Mbo I 或 Sau 3A I 限制性内切酶及其相应的酶切缓冲液

10% 和 40% 的蔗糖 (用 TNE 配制)

TNE:

10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

1mmol/L DETA (pH8.0)

1mol/L NaCl

TE 缓冲液

酵母 tRNA

异丙醇

75%, 100% 乙醇

操作步骤:

(1) 用 1 单位的 Mbo I 或 Sau 3A 在 37℃ 酶解 2 μ g 染色体 DNA, 分别在 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90 及 120 分钟, 65℃, 保温 15 分钟以终止酶切反应, 各取出 200ng, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 确定产生 10~30kb DNA 片段的最佳条件。

(2) 用以上确定的最佳条件对 100 μ g 染色体 DNA 进行酶解, 再取 200ng 电泳检查酶切状况。

(3) 制备蔗糖梯度: 在相应离心管中加入 6ml 40% 的蔗糖, 再在其上小心铺加 6ml 10% 的蔗糖, 封严管口, 缓慢将管子倾斜成水平位置, 室温下放置 3~4 小时, 然后缓慢把管子回复成垂直位置。

(4) 将酶切好的 DNA 溶液加在 10%~40% 蔗糖梯度上。

(5) 用 Beckman SW41 水平头, 17℃, 35 000r/min, 离心 16 小时, 按 400 μ l 分部收集管内液体。

(6) 从每个收管集中取 5 μ l, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 确定 10~30kb 片段大小的 DNA 分子的分布。

(7) 将含所需 DNA 片段收集管中的溶液合并, 再加入 1/2 容积 TE, 并加入 tRNA 至最终浓度为 20 μ g/ml, 混匀。

(8) 加入等容积异丙醇, 混匀, 室温下放置 10 分钟, 12 000g, 室温下离心 5 分钟, 弃上清。加 75% 乙醇漂洗 DNA 沉淀, 12 000g, 离心 5 分钟后, 弃上清, 再用 75% 乙醇漂洗离心后洗 1 次, 弃上清, 室温干燥乙醇, 用适当缓冲液溶解 DNA。

4.5 RNA 的分离与纯化 (真核细胞 RNA 的制备)

从细胞中分离 RNA 的纯度与完整性对于许多分子生物学实验至关重要。如 Northern 印迹及杂交分析、寡聚 (dT) 纤维素选择分离 mRNA、cDNA 合成及体外翻译等实验的成败, 在很大程度上决定于

RNA 的质量。

哺乳动物中, 平均每个细胞内大约含有 $10^{-5} \mu\text{g}$ RNA。理论上认为每克细胞可分离出 5 ~ 10mg RNA, 对于培养细胞而言, 1g 细胞相当于 1ml 压积的细胞, 大约 10^8 个细胞。

RNA 主要由以下几类分子组成: rRNA (占 RNA 总量的 80% ~ 85%)、tRNA 和核内小分子 RNA (占 10% ~ 15%)、mRNA (占 1% ~ 5%)。

rRNA 在总 RNA 分子中含量丰富, 由 28S、18S、5S 及 4S 几类组成, 它们之间同源性大, 分子量变化不大, 所以可根据它们的密度和分子大小, 通过密度梯度离心, 凝胶电泳或离子交换层析进行分离。

而 mRNA 分子种类繁多, 分子量大小不均一, 在细胞中含量少, 绝大多数 mRNA 分子 (除血红蛋白及有些组蛋白 mRNA 以外), 均在 3' 端存在 20 ~ 250 个多聚腺核苷酸 poly (A)。利用此特征, 可很方便地从总 RNA 中, 用寡聚 (dT) 亲和层析柱分离 mRNA。因为在物理特性上不均一的 mRNA 分子群体编码细胞内所有的多肽和蛋白质, 而 mRNA 是分子生物学的主要研究对象之一。

RNA 分离的最关键因素是尽量减少 RNA 酶的污染。

4.5.1 创造一个无 RNase 的环境

RNA 酶, 尤其是胰 RNA 酶是一类生物活性非常稳定的酶类。除细胞内 RNase 以外, 环境中灰尘、各种试验器皿和试剂、人体的汗液、以及唾液中均存在 RNase。这类酶耐热、耐酸、耐碱, 如煮沸也不能使之完全失活, 蛋白质变性剂可使之暂时失活, 但变性剂去除后, 又可恢复活性。RNase 的活性不需要辅助因子, 二价金属离子螯合剂对它的活性无任何影响, 故在提取 RNA 时, 应尽力减少 RNA 酶对 RNA 的降解作用。

创造一个无 RNase 的环境主要包括两个方面的工作: 即极力避免外源 RNase 的污染和尽力抑制内源性 RNase 的活力。前者主要来源于操作者的手、实验的器皿和试剂; 后者主要来源于样品中的组织细胞。

4.5.1.1 去除外源性 RNase 的污染

(1) 操作者的手直接触摸之处, 毫无疑问会留下 RNase, 说话带出的唾液也富含 RNase。故整个操作过程中, 应戴口罩和手套。

(2) 空气中飞尘携带的细菌、霉菌等微生物, 也是污染外源 RNase 的一条途径, 所以操作过程应在比较洁净的环境中进行。

(3) 玻璃器皿常规洗净后, 应用 0.1% 二乙基焦碳酸盐 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 浸泡处理 (37℃, 2 小时), 再用双蒸灭菌水漂洗几次。高压消毒去除 DEPC, 然后 250℃ 烘烤 4 小时以上或 200℃ 干烤过夜。

(4) 塑料器材最好使用灭菌的一次性塑料制品, Eppendorf 管、微量加样吸头最好是新的, 使用前进行高压消毒。

(5) 所有溶液应加 DEPC 至 0.05% ~ 0.1%, 室温处理过夜, 或室温下磁力搅拌 20 分钟, 然后高压处理 (1.034×10^5 pa, 15 ~ 30 分钟); 或加热至 70℃ 1 小时或 60℃ 过夜, 以去除所有残留的 DEPC。

DEPC 易与 Tris 反应, DEPC 在 Tris 中的半衰期只有 1.25 分钟, 所以配制 Tris 溶液的水应先用 0.1% DEPC 处理, 配液的用水亦应高压消毒, 配好后再经高压消毒。

(6) 严格地说, RNA 提取所使用的酚, 应该单独配制和使用, 在配制饱和酚用的盐溶液时, 使用的水应预先以 DEPC 处理且高压消毒, 酚饱和后, 加入 8-羟基喹啉至 0.1%, 8-羟基喹啉不但抗氧化, 且有一定的 RNA 酶抑制作用。

(7) RNA 试验中使用的甲酰胺, 应用 5g/100ml 的 AG 501-X8 (D) 树脂彻底去离子, Whatman 1 号滤纸滤过后, 然后以 0.45 μm 的滤膜滤过除菌。

(8) 所用的化学试剂应为新包装, 称量时使用干烤处理的称量勺, CsCl 晶体最好先经紫外线消毒,

200℃干烤 6~12 小时。所有操作均应在冰浴中进行, 低温条件可减低 RNA 酶的活性。

说明:

DEPC 的分子式为 $C_2H_5-O-CO-O-CO-O-C_2H_5$, 为粘性液体, 是很强的核酸酶抑制剂。作用机制是通过与蛋白质中的组氨酸结合, 使蛋白质变性。DEPC 也能与 RNA 或单链 DNA 反应, 破坏单链核酸中大部分腺嘌呤环, 但它破坏单链核酸的浓度要比使蛋白质变性的浓度大 100~1000 倍。DEPC 在 Tris 中, 易分解成为 CO_2 和乙醇, 使 pH 值下降。在 0.1mol/L Tris·Cl, pH7.5, 溶液中极不稳定, 半衰期仅为 1.25 分钟。DEPC 不能用聚苯乙烯器皿存放。保存在 4℃或液氮中, 可防止 DEPC 降解。DEPC 与 0.1~1mg/ml 的肝素联合使用, 具有极强的 RNase 抑制效果。

4.5.1.2 抑制内源性 RNase 的活性

细胞裂碎的同时, RNase 释放出来, 这种内源性的 RNase 是降解 RNA 的主要危险之一。所以原则上要尽可能早地去除细胞内蛋白, 加入 RNase 抑制剂, 力争在提取的起始阶段对 RNase 活力进行有效地抑制。

不同组织细胞中内源性 RNase 的数量不同, 胰腺、脾组织细胞中 RNase 的含量极为丰富, 在 RNA 提取时需要联合使用强有力的 RNase 抑制剂。

1. 低特异性 RNase 抑制物:

不同类型的低特异性 RNase 抑制物均可不同程度地抑制 RNase 的活性, 其中包括皂土、Macaloid、肝素、氧钒基-核苷复合物、多胺等, 但都不能完全抑制 RNase 的活性。在 RNase 特异抑制剂出现后, 现在已不大使用。

(1) 皂土 (bentonite): 分子式为 $Al_2O_3 \cdot 4SiO_2 \cdot H_2O$ 是膨润的钠盐, 带有负电荷, 可以结合金属离子及包括 RNase 在内的碱性蛋白质。皂土用量要适宜, 太多会吸附 RNA 分子, 它对 RNase 的抑制作用与 pH 有密切关系, 一般在溶液的 pH 值为 6.0 时, 需用皂土 35 μ g/ml; 而 pH7.4, 则需用皂土 3500 μ g/ml 才能有效地抑制酵母或胰脏中的 RNase。

皂土配制: 皂土干粉以 50mg/ml 的浓度悬浮于灭菌蒸馏水中, 分级离心, 收集 6000g、10 分钟和 10000g、15 分钟部分; 再用 0.1mol/L (pH7.5) 的 EDTA 悬浮, 25℃搅拌 48 小时以去除金属离子, 然后如前分级离心。10000g, 离心的沉淀, 用消毒水漂洗去除 EDTA, 最后将处理后好的皂土以 5% 的浓度悬浮于 NaAc (pH6.0) 溶液中备用。加入 RNA 提取液中的皂土与 RNase 结合后, 可通过离心去除。

(2) 复合硅酸盐 (Macaloid): Macaloid 带负电荷, 能吸附 RNA 酶和 DNase。对于真菌和植物组织, 其抑制 RNase 的能力强于皂土。

将 Macaloid 粉末悬浮于 0.05mol/L Tris·Cl (pH7.6), 0.01mol/L Mg (Ac)₂ 溶液, 用捣碎机高速捣碎 5 分钟, 离心, 沉淀, 去除上清及下层粗颗粒沉淀, 将成胶的中层取出, 以终浓度为 10mg/ml 再悬浮于 0.05mol/L Tris·Cl (pH7.5) 溶液中备用。

一般使用浓度是: 0.015% (W/V), 通过离心去除。

(3) DEPC 前面已有介绍。

(4) 肝素: 肝素是医学中常用的血液抗凝剂, 为多糖类物质。使用 0.1~10g/ml 肝素, 在 37℃能抑制 95% 的 RNase 活力。免疫法制备 mRNA 时常用肝素。

(5) 多胺: 多胺类如精胺、肉胺和尸胺等对 RNA 酶的活力也有一定的抑制作用。

(6) 共聚酪氨酸-谷氨酸: 在 pH5.4 时, 该物质能有效地抑制 RNA 酶的活力, 但在 pH7.4 时, 则无抑制作用。

2. 去除蛋白质物质:

蛋白质变性剂、蛋白酶 K、阴离子去污剂, 常与 RNA 酶抑制物质联合使用, 以加强对 RNA 酶活力的抑制。

(1) 酚、氯仿: 这类有机溶剂不但能使核蛋白质与核酸解聚, 而且可以利用其对蛋白质的变性作用抑

制 RNase 的活力。酚不能完全抑制对 RNase 的活性,但可溶解一定数量 3'端带有 poly (A) 结构的 RNA 分子,其中加入 0.1% 的 8-羟基喹啉,与氯仿联合使用可增强对 RNase 的抑制。重蒸酚在使用前需用相应缓冲液饱和,是为了减少核酸,(尤其是 mRNA) 的丢失。

蛋白酶 K 及其它蛋白质变性剂(如尿素)也能抑制 RNase 的活性。蛋白酶 K 在 1%~2% 的 SDS 存在下,其活性反而会增加。

(2) 去污剂: SDS、十二烷基肌氨酸钠(sarkosyl)、脱氧胆酸钠(DOC)是阴离子去污剂,不但可解聚核酸与蛋白质的结合,还可与蛋白质带正电荷的侧链结合,在高浓度 KCl 存在下,形成 SDS-蛋白质复合物而沉淀。

SDS 在 Na^+ 浓度大于摩尔水平及高浓度 CsCl 溶液中容易析出, RNA 提取时若需 CsCl 密度梯度超速离心法则不应使用 SDS,而应改用 sarkosyl,否则 SDS 的析出会破坏离心形成的 CsCl 梯度。

DOC 的作用与 SDS 相似,在乙醇中的溶解度比 SDS 的溶解度高。

(3) 解偶剂(胍类): 盐酸胍、异硫氰酸胍是一类强力的蛋白质变性剂,可溶解蛋白质,并使蛋白质二级结构消失,细胞结构降解,核蛋白迅速与核酸分离,所以又称解偶剂。在 4mol/L 异硫氰酸胍和 β -巯基乙醇(破坏 RNase 蛋白质中的二硫键)一类还原剂存在下, RNase 的活性极度地受到抑制,它们的使用能从胰腺这样富含 RNase 的组织细胞中分离出完整的 RNA 分子,故目前这类物质成为制备 RNA 的常规试剂。

3. RNase 的特异抑制剂:

(1) RNase 阻抑蛋白(RNasin): 这是一类从大鼠肝或人胎盘中提取出来的酸性糖蛋白质,鼠肝 RNasin 分子量为 40kD; 来源于人胎盘的 RNasin 分子量为 51kD,等电点为 4.7,最适 pH 为 7~8。RNasin 能与 RNase 非共价结合($K_i \approx 3 \times 10^{10}$)从而抑制它们的活力, RNasin 是 RNA 酶的一种非竞争性抑制剂。1mmol/L 的二巯基乙醇对于 RNasin 发挥抑制 RNase 的最大活性非常重要。RNasin 最好不要与某些蛋白质变性剂(如 7mol/L 尿素)同时使用,因为尿素能使 RNasin-RNase 复合物分离,并释放出活性的 RNase。

RNasin 贮存于 50% 甘油或 5mmol/L 二巯基乙醇溶液中, -20°C 保存,反复冻融或贮存于有氧化剂的溶液中, RNasin 极易被破坏,不宜继续使用。RNasin 对其它核酸工具酶无影响,对 RNase 有强的特异性抑制效果,很容易被酚抽提除去,故日益被广泛采用。常用于体外翻译体系、mRNA 反转录合成 cDNA 及体外转录实验。RNasin 可从 Promega 公司购买。

(2) 氧钒核糖核苷复合物(vanadyl-ribonucleoside complex): 这是 Berger 和 Birkenmeier 于 1979 年发现的 1 种 RNA 特异性抑制剂,该复合物由氧化钒离子与 4 种核苷之一形成。它们能与多种 RNase 结合形成过渡态类似物,几乎可完全抑制 RNase 的活性。在 RNA 制备中,使用浓度一般为 10mmol/L。提取的 mRNA 产量很高,其质量能满足反转录实验,还可在蛙卵细胞中翻译合成蛋白质。氧钒核糖核苷复合物对 mRNA 的无细胞翻译系统具有很强的抑制作用,必须用含 8-羟基喹啉饱和酚进行反复多次抽提,以去除之。前几次抽提时,酚相由黄色变为黑色,继续抽提,当黄色不再改变时,标志已被除尽。

4.5.2 RNA 的提取方法

4.5.2.1 异硫氰酸胍氯化铯超速离心法

原理:

使用蛋白质强变性剂异硫氰酸胍有效抑制 RNA 酶的活性,经过起始密度为 1.78g/ml 的 CsCl 介质,进行密度梯度超速离心, RNA 沉淀于管底,而 DNA 与蛋白质在上清液中。使用这种方法,不但能得到高质量的 RNA,而且能同时分离出细胞染色体 DNA。

本法对于冷冻时间长、细胞质和细胞核不易分离的组织标本及富含 RNA 酶的组织细胞(如胰腺)的 RNA 提取尤为适宜。此法提取 RNA 的质量好和成功率高,已成为提取哺乳动物细胞 RNA 的常规方

法。其缺点是操作复杂、流程长，一次提取的样品数量有限。

试剂：

异硫氰酸胍匀浆缓冲液 (GIT)

4.0mol/L 异硫氰酸胍 (分子量 = 118.1)

0.1mol/L Tris·Cl (pH7.5)

1%β-巯基乙醇

称取 50g 异硫氰酸胍溶于 10ml 1mol/L 的 Tris·Cl (pH7.5) 缓冲液中，加入已被 DEPC 处理过的双蒸水至 100ml，用 Whatman 1 号滤膜过滤，室温贮存。使用前加 β-巯基乙醇至终浓度 1% (0.14mol/L)。

5.7mol/L 氯化铯溶液：

5.7mol/L CsCl

0.01mol/L EDTA (pH7.5)

称取 96.0g CsCl 溶于 90ml 0.01mol/L EDTA (pH7.5) 溶液中，加入 DEPC 至浓度为 0.1%，混匀后，室温放置 30 分钟， 1.014×10^5 Pa 高压消毒，冷却至室温后，用 DEPC 处理过的双蒸水将容积补至 100ml。

TE (含 0.1% SDS)

TE (pH7.6)

3mol/L NaAc (pH5.2)

100%、70% 乙醇

准备工作：

(1) 组织标本：取新鲜的组织样品称重后，剪碎成约 1cm^3 的组织块直接加入匀浆液中做 RNA 提取或液氮中速冻后 -70°C 保存。

(2) 贴壁培养细胞：用 PBS 洗细胞一次，吸干溶液后将培养板快速移至液氮中冷冻后转到 -70°C 保存；或加入 1ml 匀浆液至培养板中直接裂解细胞，然后将粘稠的裂解液进一步匀浆。或者另一种方法是将贴壁培养细胞用胰酶消化后，离心收集，PBS 漂洗沉淀 1 次，再离心收集细胞，液氮速冻后转至 -70°C 保存。

(3) 悬浮培养细胞：离心收集细胞，用 PBS 悬浮漂洗再离心收集，若不立即提取 RNA，则可经液氮速冻后转至 -70°C 贮存备用。

操作步骤：

(1) 加 5~7 倍于组织细胞体积的异硫氰酸胍匀浆液 (GIT) 至含样品的匀浆器中。

(2) 高速匀浆 1~2 分钟，此步的目的在于将染色体 DNA 剪切断，以防止形成致密网层阻碍 RNA 的沉淀。培养细胞时可用组织匀浆器匀浆，若有多个样品，每个样品操作后匀浆器应用大量水冲洗，再用 GIT 溶液洗净。

(3) 匀浆完毕后，加入十二烷基肌氨酸钠 (SLS) 至终浓度 0.5%，混匀， $5000g$ ，室温离心 10 分钟。用 SLS 代替 SDS 是因为 SDS 在高盐溶液中溶解度低，易析出而影响到 CsCl 的密度梯度；本步骤若是培养细胞可以省去离心。

(4) 在 Beckman 离心机相应离心管中，先加入表 4-2 中列出相应容积的 CsCl 溶液，然后在其上面小心铺加组织细胞匀浆液或步骤 (3) 的上清液，平衡离心对称管， 20°C 按表 4-2 条件进行超速离心。

(5) 小心吸弃离心管中上 2/3 GIT 溶液，下 1/3 的溶液因含 DNA 而粘稠，用大孔径吸管吸出移至 1 个清洁管中，用于染色体 DNA 的提取，管底清晰的胶状沉淀便是总 RNA。

(6) 将离心管倒置倾斜，用 70% 乙醇先清洗管壁上粘附的盐类和蛋白质，然后用 70% 乙醇 (室温) 短时间轻轻洗 RNA 沉淀，2 分钟后，弃去乙醇，倒置离心管让乙醇挥发。70% 乙醇洗 RNA 沉淀时，不要用吸管吸吹液体，以防 RNA 沉淀漂浮起来。

表 4-2 氯化铯超速离心提取 RNA 的条件

转头	匀浆体积 (ml)	CsCl 溶液 (ml)	离心速度 (r/min)	离心时间 (h)
SW60	1.2	3.1	40 000	12
SW41	3.5	9.7	32 000	24
SW28	12.0	26.5	25 000	24

水平头比角头超速离心效果好, 因为水平预超速离心后, RNA 整齐地沉淀在管底中心, 不会与上层的细胞其它裂解物接触。停止离心时, 不要使用刹车以防扰乱离心管中已分离的内容物。

(7) 用 300 μ l TE, pH7.6 (含 0.1% SDS) 溶解 RNA 沉淀, 转移至 Eppendorf 管中, 用等容积酚、酚/氯仿、氯仿各抽提 1 次。

(8) 上清加入 0.1 容积 3mol/L NaAc (pH5.2), 2 倍容积乙醇混匀后 -70℃ 放置 30 分钟。

(9) 12 000g, 4℃ 离心 10 分钟, 弃上清, 70% 乙醇室温漂洗 RNA 沉淀, 12 000g, 离心 5 分钟, 弃上清, 真空抽干乙醇 2 分钟。

(10) 加入适量 DEPC 处理好的双蒸去离子水, 溶解 RNA, 测定 OD260 与 OD280, 判断 RNA 的质量和浓度。 -20℃ 贮存。若长时间保存 RNA, 可用小容积水悬浮溶解 RNA 后, 再加入 3 倍容积的乙醇, -70℃ 保存。使用前, 再离心回收 RNA, 溶于 0.3mol/L NaAc (pH5.2) 或适当缓冲液中。

注意事项:

(1) 本法不适于小分子 RNA (如 5S RNA, tRNA) 的提取, 因为在 5.7mol/L CsCl 溶液中, 这些小分子 RNA 大多数在超速离心时并不能被沉淀出来。本法适用于 1g 组织或 10^8 个细胞的 RNA 的提取, 在 10ml 的离心管中, 大于以上数量的样品会超量而影响 RNA 的提取产量与质量。

(2) 对于培养细胞, 步骤 (7) 中的酚、氯仿抽提可以省略。

(3) 对于动物 (如大鼠) 肝脏中的组织细胞的总 RNA 的提取, 动物应在实验前一天禁食, 以减低肝糖原。肝糖原也可以用高盐沉淀 RNA 的方法去除: 加入 3 倍容积的 4mol/L NaAc (pH7.0), 混匀, 0℃ 过夜, 8 000g, 4℃ 离心 15 分钟后沉淀 RNA。

(4) 所有操作步骤中, 应该注意在无 RNase 的环境中进行。

(5) 一般情况下, 步骤 (5) 中 RNA 沉淀为半透明的或看不见的, 若沉淀为白色颗粒大团, 说明 CsCl 已析出, 多半是因为离心温度低于 14℃ 或离心速度太快所致, 应该反复用 70% 乙醇漂洗或反复乙醇沉淀回收 RNA, 以去除 CsCl。

[DNA 提取]

(1) 将步骤 5 中吸出的粘稠 DNA 溶液移至 50ml 离心管, 加入等容积水及 2 倍容积乙醇混匀, 室温下 DNA 立即沉淀, 用玻璃棒捞出 DNA 沉淀移入 1 个新离心管中。

(2) 10ml 70% 乙醇洗涤 DNA 纤维, 3 000g 离心回收 DNA 沉淀, 弃上清, 空气中干燥后, 加入 10ml PK 缓冲液, 37℃ 溶解 DNA 数小时 (间隔摇晃离心管, 使 DNA 溶解)。

(3) 加入 10mg 蛋白酶 K 混匀, 65℃ 保温 15 分钟后, 移置 37℃ 保温过夜。

(4) 用等体积酚、酚/氯仿、氯仿各抽提 1 次。

(5) 上清加入 0.1 倍容积 3mol/L NaAc (pH5.2) 和 2 倍容积乙醇混匀, 冰浴 10 分钟。4℃, 12 000g, 离心 10 分钟。弃上清, 70% 乙醇漂洗 DNA 沉淀, 12 000g, 离心 5 分钟, 弃上清, 室温倒置离心管挥发乙醇。

(6) 加入适量 TE 缓冲液溶解 DNA 后, OD260 测定 DNA 浓度。

应用本方法回收提纯的 DNA 样品可用于内切酶消化与 Southern 印迹杂交分析。

附：GTC - CsTFA RNA 提取试剂盒是 Pharmacia LKB 公司产品。该试剂盒的最大特色是将 4.5.2.1 方法中所使用的传统密度梯度超速离心介质 CsCl，用 CsTFA (cesium trifluoroacetate) 取代。更重要的是 CsTFA 具有抑制 RNA 酶活性、促进细胞裂解物溶解、维持中性 pH 值，促使 RNA 与其它分子分离等多项功能，可获得高纯度、高产量的 RNA 分子，适于绝大部分动、植物组织标本和培养细胞的 RNA 提取。 5×10^6 个 HeLa 细胞可提取 600 μ g RNA，质量可满足于 Northern 分析、体外翻译、cDNA 合成等多项实验。CsTFA 溶液 $P_{25} = 1.51\text{g/ml}$ ，超速离心后形成密度梯度，能有效地使 RNA 沉积于管底。

4.5.2.2 盐酸胍 - 有机溶剂法

本法由 MacDonald 1987 年在 Strohman 报道的方法基础上改进而成，适用于没有超速离心设施的情况下提取细胞总 RNA。它利用盐酸胍抑制 RNA 酶，匀浆裂解细胞，有机溶剂抽提去除蛋白质，通过选择性沉淀 RNA 分子而去除 DNA，提取的 RNA 质量较好，但整个操作过程繁杂费时。

试剂：

盐酸胍匀浆液 I：

8mol/L 盐酸胍 (分子量为 95.6)

0.1mol/L NaAc (pH5.2)

5mmol/L 2 - 巯基乙醇

0.5% 十二烷基肌氨酸钠 (SLS)

取 191g 盐酸胍，加 8.35ml 3mol/L NaAc (pH5.2) 和 6.25ml 0.2mol/L 2 - 巯基乙醇溶液中，再加水至 237.5ml，混匀后加 12.5ml 10% SLS 振荡混匀溶解。

盐酸胍匀浆液 II：

8mol/L 盐酸胍

0.1mol/L NaAc (pH5.2)

1mmol/L 2 - 巯基乙醇

20mmol/L EDTA (pH8.0)

称取 191g 盐酸胍，加 8.35ml 3mol/L NaAc (pH5.2) 和 1.25ml 0.2mol/L 2 - 巯基乙醇，再加入 10ml 0.5mol/L EDTA (pH8.0)，加水至 250ml 混匀。

乙醇：100%、70%

氯仿：正丁醇 (4:1)

4mol/L NaAc, pH7.0

3mol/L NaAc, pH5.2

RNA 溶解液：

0.2% SDS

0.05mol/L EDTA, pH8.0

操作步骤：

- (1) 样品细胞的准备同 4.5.2.1 方法。
- (2) 加 10 倍容积盐酸胍匀浆液 I 至准备好的样品细胞中，高速匀浆 1 分钟。
- (3) 匀浆液 5 000g，室温离心 10 分钟。
- (4) 取上清移至 1 个清洁离心管中，加入 0.1 倍容积的 3mol/L NaAc (pH5.2)，混匀，再加 2.5 容积预冷的乙醇充分混匀，0℃放置至少 2 小时。
- (5) 5 000g，0℃离心 10 分钟沉淀核酸，弃去上清，室温干燥。
- (6) 每个提取 RNA 的组织或细胞样品中，加入 10~15ml 盐酸胍匀浆液 II，搅拌溶解。
- (7) 加入 2.5 倍容积冰预冷的乙醇，立即充分混匀，-20℃至少放置 2 小时。
- (8) 5 000g，0℃离心 10 分钟沉淀核酸，去上清，室温挥发乙醇。
- (9) 重复步骤 (7)、(8) 两次 (即总共用 7.5 倍容积乙醇沉淀 3 次)。
- (10) 按每克组织细胞加 5ml 的比例，加 0.02mol/L EDTA (pH8.0) 溶解核酸。即先加 1/2 容积 EDTA

振荡 1~2 分钟, 3 000g, 离心 2 分钟, 吸出上清, 再用另 1 个 1/2 容积 EDTA 振荡核酸 1~2 分钟, 此时核酸应完全溶解, 合并两次核酸溶解液。

(11) 用等容积氯仿/正丁醇 (4:1) 抽提核酸溶液, 5 000g 室温离心 10 分钟, 吸出上清至另 1 个清洁离心管中。

(12) 加 3 倍容积 4mol/L NaAc (pH7.0) 混匀, -20℃放置 1 小时以上, 此时 RNA 将选择地沉淀, 而 DNA 仍为溶解状况。

(13) 5 000g, 0℃离心 20 分钟, 沉于管底的是 RNA。

(14) 吸出上清液, 必须时按 4.5.2.1 方法提取 DNA, 用 4℃预冷的 3mol/L NaAc (pH7.0) 漂洗 RNA 沉淀, 然后 20℃5 000g, 离心 20 分钟, 回收 RNA。

(15) 尽量去除上清液, 按每 g 组织细胞/1ml 的比例加入 0.2% SDS, 0.05mol/L EDTA (pH8.0) 溶解 RNA 沉淀。注意: 若有 SDS 沉淀析出, 滴加 0.1mol/L NaOH 滴定溶液调 pH 至 7.5。

(16) 加入 2 倍容积冰预冷乙醇混匀, 0℃放置至少 2 小时, 5 000g, 4℃离心 10 分钟, 弃上清。RNA 沉淀用 70%乙醇漂洗, 短暂离心后, 去上清, 室温干燥蒸发乙醇。

(17) 用适当小容积双蒸去离子水溶解 RNA 沉淀, 加入 3 倍体积乙醇, -70℃保存 RNA 备用。若需要回收 RNA, 加 3mol/L NaAc (pH5.2) 至终浓度为 0.3mol/L, 混匀, 12 000g, 4℃离心回收 RNA。

注意事项:

若提取 RNA 的组织细胞样品曾被 DNA 转染或被 DNA 病毒感染过, RNA 制品中可能含有这些 DNA 分子, 它们会干扰 RNA 的翻译、cDNA 合成、Northern 杂交。应该加入无 RNase 的 DNase I 至终浓度为 2μg/ml, 37℃保温 60 分钟消化 DNA 分子, 纯化 RNA 制品。

4.5.2.3 氯化锂-尿素法

本法首先由 Auffray 报道, 利用高浓度尿素变性蛋白质同时抑制 RNA 酶, 3mol/L LiCl 选择沉淀 RNA。其缺点是有时会存在 DNA 污染, LiCl 沉淀 RNA 会丢失一些小分子量的 RNA, 如 5S RNA 等。优点是快速简捷, 尤其适用于大量样品少量组织细胞的 RNA 提取, 其质量可以满足 Northern 分析, Oligo (dT) 提取 mRNA, SI 核酸酶或 RNase 保护试验等。本法每 10⁷ 个细胞能提取总 RNA 约 10μg。

试剂:

LiCl/尿素溶液:

LiCl 126g (3mol/L)

尿素 360g (6mol/L)

加水至 1 000ml 滤过灭菌。

悬浮液:

10mmol/L Tris·Cl (pH7.6)

1mmol/L EDTA (pH8.0)

0.5% SDS

酚/氯仿

3mol/L NaAc (pH5.2)

100%、70%乙醇

操作步骤:

(1) 每克组织或培养细胞, 加入 5~10ml 3mol/L LiCl 6mol/L 尿素溶液, 用匀浆器高速匀浆 2 分钟。若是细胞较少 (小于 10⁷ 个细胞), 可加入 0.5ml 3mol/L LiCl 6mol/L 尿素, 用小组织匀浆器, 手工反复匀浆, 然后转移至 Eppendorf 管中。

(2) 将匀浆液在 0~4℃至少放置 4 小时。

(3) 大体积的制备, 则用 50ml 离心管, 2 000g, 4℃离心 30 分钟; 小体积制备, 则用 Eppendorf 离心

机, 12 000r/min 离心 30 分钟。

(4) 弃上清, 加入原匀浆液 1/2 容积的预冷 3mol/L LiCl 6mol/L 尿素振荡充分混匀, 再按步骤 (3) 条件离心, 弃上清。若沉淀不紧密, 而是粘稠松散状, 则用套上 21 号针头的注射器, 反复抽吸溶液剪切 DNA 分子。

(5) 用 1/2 原匀浆液容积的悬浮液, 溶解沉淀物, 加入等容积酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 反复颠倒离心管混匀, 5~10 分钟, 或放置室温 15~30 分钟不时混匀。有时 RNA 沉淀较难溶解, 故常在加入酚/氯仿后, 振荡至其完全溶解。

(6) 3 000g, 室温下离心 5 分钟, 吸出上清, 若中间交界处较厚, 可以用悬浮液返抽提 1 次, 合并两次上清液移入 1 个清洁离心管中。

(7) 加入 0.1 容积 3mol/L NaAc (pH5.2) 和 2 倍容积乙醇混匀, -20℃放置 10~15 分钟。5 000g 离心 20 分钟沉淀 RNA, 弃上清, 沉淀用 70%乙醇漂洗 1 次, 短暂离心后, 弃上清, 真空干燥蒸发乙醇 2 分钟。

(8) 加入适量的 DEPC 处理好的双蒸水溶解 RNA, OD260、OD280 测定 RNA 含量及判断 RNA 纯度。

注意事项:

若乙醇沉淀离心后, 可见沉淀物且体积较大, 往往标志着存在 DNA 的污染。可以用以下方法去除 DNA: 用 TE 溶解沉淀物, 加 LiCl 至终浓度为 2mol/L, 4℃过夜。离心沉淀 RNA, 弃上清, 再用 TE 溶解沉淀, 重新用乙醇沉淀 1 次。

4.5.2.4 热酚法

本法主要用于少量细胞样品 RNA 提取, 其产量并不高 (5~10μg/10⁶ 个细胞), 但简单易行。

试剂:

PBS

10% SDS

3mol/L NaAc (pH5.0)

酚 (用 50mmol/L NaAc, pH5.2 饱和)

裂解液:

1% SDS

50mmol/L NaAc (pH5.0)

100%、70%乙醇

操作步骤:

(1) 离心收集培养细胞, 用 1ml PBS 悬浮洗涤 1 次, 离心 5 秒钟回收细胞沉淀。

(2) 小心吸弃上清, 勿搅动细胞沉淀, 用 0.5ml 裂解液悬浮细胞, 加入 0.5ml 酚, 强烈振荡 1 分钟, 然后 60℃水浴 15 分钟。

(3) 冰浴 15 分钟后, 室温下 2 000g, 离心 10 分钟, 回收水相, 再用等容积酚/氯仿、氯仿各抽提 1 次。

(4) 吸出上清移至 1 个清洁 Eppendorf 管, 加入 40μl 3mol/L NaAc (pH5.2), 1ml 100%乙醇混匀, 冰上放置 15 分钟, 弃上清。沉淀用 70%乙醇漂洗 1 次, 短暂离心, 弃上清, 真空蒸发乙醇。

(5) 加入 50μl DEPC 处理好的双蒸水溶解 RNA, OD260 测定 RNA 含量。

4.5.2.5 快速提取法

本法主要用于培养细胞, 通过 0.5% SDS 裂解细胞, 酚抽提去蛋白质和 DNA 沉淀, 而快速纯化 RNA。

试剂:

裂解液:

10mmol/L EDTA (pH8.0)
 0.5% SDS
 0.1mol/L NaAc (pH5.2)
 10mmol/L EDTA
 酚
 1mol/L Tris·Cl (pH8.0)
 5mol/L NaCl
 TE (pH8.0)
 100% 乙醇、70% 乙醇

操作步骤:

(1) 吸弃培养瓶中的培养基, 用预冷 PBS 洗涤细胞 1 次, 尽量吸净 PBS, 倒置培养瓶流净液体, 若是悬浮细胞, 离心收集细胞, 用 PBS 洗涤 1 次, 离心收集细胞。

(2) 加入 4ml 细胞裂解液或加 2ml 裂解液至 90mm 的培养瓶中 (贴壁细胞), 刮下贴壁细胞, 将裂解细胞移入离心管中, 再用 2ml 0.1mol/L NaAc (pH5.2), 10mmol/L EDTA (pH8.0) 溶液洗涤培养瓶, 吸至离心管中。

(3) 加入 4ml 酚混匀, 室温振荡 2 分钟, 细胞 DNA 此时呈现出白色纤维沉淀。

(4) 5 000r/min, 4℃ 离心 10 分钟 (Sorvall HB-4 或 SS34 转头), DNA 与蛋白应在两相交界面形成致密层。

(5) 小心吸出上清, 加入 440μl 冰预冷的 1mol/L Tris·Cl (pH8.0), 180μl 5mol/L NaCl, 混匀, 0℃ 放置至少 30 分钟。

(6) 用 Sorvall HB-4 或 SS34 转头, 5 000r/min, 4℃ 离心 10 分钟, 弃上清, 倒置离心管, 室温挥发乙醇。

(7) 用 200μl 冰预冷的 TE (pH8.0) 溶解 RNA, 移入 Eppendorf 管中, 加入 4μl 5mol/L NaCl, 500μl 冰冷乙醇混匀, 0℃ 放置至少 30 秒钟。

(8) 12 000g, 4℃ 离心 5 分钟, 弃上清, 室温蒸发乙醇。

(9) 加适当容积的相应缓冲液溶解 RNA。

注意事项:

(1) 本法对于 90mm 培养瓶中的单层铺盖贴壁细胞 (10^7 个细胞左右) 可以提取出 100 ~ 200μg RNA。

(2) 步骤 (4) 中, 用 2ml 10mmol/L EDTA (pH8.0) 0.5% SDS 反复抽提有机相可提高 RNA 产量。

4.5.2.6 细胞质 RNA 提取法

本法主要适用于培养细胞, 首先去除细胞核, 然后用蛋白酶 K 消化蛋白质, 酚/氯仿抽提去除蛋白质。操作简单, 同时能进行多个样品操作, 多数步骤在室温下进行, 提取的 RNA 质量较高, 可满足体外无细胞翻译系统、cDNA 合成、引物延伸及核酸酶 SI 保护实验。本法提取 RNA 的产量一般为 30 ~ 500μg/ 10^7 细胞。

试剂:

RNA 提取缓冲液:

0.14mol/L NaCl
 1.5mmol/L MgCl₂
 10mmol/L Tris·Cl (pH8.6)
 0.5% NP-40
 1mmol/L 2-巯基乙醇
 1 000U/ml 胰 RNasin 或 20mmol/L 氧钒核糖核苷复合物

蛋白酶 K 消化缓冲液:

0.2mol/L Tris·Cl (pH8.0)

25mmol/L EDTA (pH8.0)

0.3mol/L NaCl

2% SDS

蛋白酶 K 20mg/ml

异戊醇

乙醇

无 RNase 的 DNase I

TE

操作步骤:

(1) 培养细胞的收集

1) 贴壁细胞:

a. 吸出培养液, 用冰预冷的 7ml PBS 洗涤细胞, 重复 1 次, 倒置培养瓶流净液体。

b. 加少量 PBS, 用乳胶细胞刮匙, 刮下贴壁细胞, 移至 Eppendorf 管中。

2) 悬浮细胞:

a. 2 000g, 4℃ 离心 5 分钟, 弃上清, 用 10 倍容积的 PBS 洗涤细胞沉淀 2 次。

b. 用 1ml PBS 悬浮细胞移至 Eppendorf 管中。

(2) 12 000g, 4℃ 离心 30 秒钟, 弃上清, 用 200 μ l RNA 提取缓冲液悬浮细胞, 振荡 15 秒钟, 冰上放置 5 分钟。

(3) 12 000g, 4℃ 离心 1.5 分钟, 吸上清移至另 1 个清洁管中。沉淀包括细胞核和未裂解的细胞。

(4) 加 200 μ l 蛋白酶 K 消化液, 振荡混匀, 再加蛋白酶 K 至终浓度为 50 μ g/ml, 37℃ 反应 30 分钟。

(5) 用等体积酚/氯仿抽提去除蛋白质, 5 000g, 室温离心 10 分钟。

(6) 吸取上清移入另 1 个 Eppendorf 管中, 加入 400 μ l 预冷的异戊醇中, 混匀后冰上放置 30 分钟。

(7) 12 000g, 4℃ 离心 10 分钟, 弃上清, 用 70% 乙醇 (室温) 短暂振荡漂洗 RNA 沉淀, 弃上清, 室温干燥蒸发乙醇。

(8) 用 200 μ l TE (pH7.6) 溶解 RNA 后, 再加入 500 μ l 乙醇, -70℃ 保存备用。

若提取 RNA 的细胞曾用 DNA 转染或 DNA 病毒感染过, 本方法提取的 RNA 往往含有较多的这种转染或感染的 DNA, 应用以下方法去除, 以避免干扰 RNA 制品的 cDNA 合成, 翻译及 Northern 杂交实验。

(1) 上述步骤 (7) 中 RNA 沉淀溶于 20 μ l 50mmol/L Tris·Cl (pH7.8), 1mmol/L EDTA, (pH8.0) 溶液中。

(2) 加 MgCl₂ 与 2-巯基乙醇分别至终浓度为 10mmol/L 和 0.1mmol/L, 再加 RNasin 或氧钒核糖核苷复合物分别至终浓度为 1 000U/ml 或 10mmol/L。

(3) 加入无 RNase 的胰 DNase I 至终浓度 2 μ g/ml, 37℃ 保温 60 分钟。

(4) 加 EDTA 和 SDS 分别至终浓度为 10mmol/L 和 0.2%。

(5) 加等体积酚/氯仿混匀, 12 000g, 室温离心 5 分钟, 吸上清移至另 1 个 Eppendorf 管, 加 0.1 容积 3mol/L NaAc (pH5.2) 和 2 倍容积冰预冷乙醇, 混匀, 冰浴 30 分钟。

(6) 12 000g, 4℃ 离心 5 分钟, 弃上清, 室温蒸发乙醇, 用 200 μ l TE 溶解 RNA, 加 500 μ l 乙醇, -70℃ 贮存备用。

4.5.2.7 酚-氯化锂法同时提取细胞 RNA 与 DNA

本法是在 Elion 和 Warner 报道的方法基础上, 由 Sandeep 等人于 1990 年改进而成。它通过酚和 SDS 裂解细胞, 变性, 解聚蛋白, 抑制 RNase, 并用 EDTA 保护 DNA, 最后根据 RNA 和 DNA 在 Li⁺ 中的不同

沉淀速度，而分离 DNA 和 RNA。整个过程在 2 小时内完成。RNA 可用于 Northern 分析，DNA 可用于内切酶消化及 Southern 杂交实验。

试剂：

STEL 缓冲液：

0.2% SDS

10mmol/L Tris·Cl (pH7.5)

10mmol/L EDTA

100mmol/L LiCl

必须用 DEPC 处理好的双蒸水配制，SDS 预先配制母液（10%或 20%），其它三种成分高压消毒后，再加 SDS。

酚/氯仿（1:1）

重蒸酚与氯仿 1:1 混合后，用 STEL 缓冲液饱和，直至上清中 pH 为 6.0。

操作步骤：

(1) 细胞准备：悬浮细胞离心收集后，用 PBS 洗涤细胞，再离心收集，贴壁细胞用 0.125% 胰蛋白酶 37℃ 消化 10 分钟，细胞脱落后，离心收集，PBS 漂洗再离心收集，弃上清。细胞量为 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 个。

(2) 将细胞悬浮于 10ml PBS 中，移入 15ml 离心管，800g，离心 3 分钟，弃上清。

(3) 加入 5ml STEL 缓冲液，5ml 酚/氯仿溶液，用吸管吹打使细胞悬浮，盖紧管盖，反复颠倒离心管 2~3 分钟（不要强烈振荡，避免 DNA 剪切），充分混匀后，再加入 3ml STEL 缓冲液，继续混匀 1 分钟。

(4) 10 000g，20℃ 离心 5 分钟，吸出上清液移入另 1 个清洁离心管。

(5) 用等容积酚/氯仿分别抽提 2 次，上清液移入另 1 个清洁离心管。

(6) 加入 0.1 倍容积 5mol/L LiCl，2 倍容积 4℃ 预冷乙醇，上下颠倒离心管几次，大分子量 DNA 即可马上沉淀，用带钩的玻璃棒捞出 DNA 沉淀，用 70% 乙醇中漂洗后，移入 TE (pH8.0) 溶液中溶解。

(7) 将捞出 DNA 沉淀后的混合液，-70℃ 放置 30 分钟沉淀 RNA，然后 12 000g，4℃ 离心 15 分钟。弃上清，沉淀用 70% 乙醇漂洗，短暂离心后，弃上清，倒置离心管，室温蒸发乙醇，加入适量 DEPC 处理好的消毒双蒸水溶解 RNA，OD260、OD280 测定 RNA 含量与 RNA 纯度，-70℃ 贮存备用，或长期贮存于乙醇溶液中。

4.5.2.8 一步快速热酚抽提法

基于 Shomeczynski 和 Sacchi 两人于 1987 年报道的 RNA 快速提取法，美国 Promega 公司有机地将这些试剂组合成总 RNA 试剂盒，使操作更为简单方便，并突出体现以下几个优点。①将已知最强的 RNase 抑制剂异硫氰酸胍、β-巯基乙醇和去污剂 N-十二烷基肌氨酸钠联合使用，抑制了 RNA 的降解，增强了对核蛋白复合物的解离，使 RNA 与蛋白质分离并进入溶液，提高了 RNA 的提取产量；②RNA 选择性地进入无 DNA 和蛋白质的水相，容易被异丙醇沉淀浓缩，对大量或少量组织的细胞 RNA 提取，均甚合适；③可在 3 小时以内处理大批样品，省略了氯化铯密度梯度超速离心步骤及其它方法使用的长时间选择性乙醇沉淀或 LiCl 沉淀。LiCl 沉淀不但会导致小 RNA (<5.8S) 的丢失，而且 Li⁺ 盐的残留还会抑制 DNA 的合成反应。

该方法提取的 RNA 可用于 Northern 印迹、cDNA 合成及体外翻译。

试剂盒组成：

50g 异硫氰酸胍 (2 × 25g)

75ml CSB (柠檬酸/十二烷基肌氨酸钠/β-巯基乙醇) 缓冲液

10ml 2mol/L NaAc pH4.0

100ml 酚:氯仿:异戊醇

100ml 异丙醇

25ml 无 RNase 水

试剂盒可室温贮存, 其中酚:氯仿:异戊醇最好在 4℃ 保存。所提供的试剂足够完成 6 次 1 克组织样品或 10^8 个培养细胞的 RNA 提取。

其它材料:

65℃ 水浴

组织匀浆器

50ml 厚壁聚丙烯离心管 (DEPC 处理)

75% 冰冷乙醇

10 × PBS (11.5g Na_2HPO_4 , 2g KH_2PO_4 , 80g NaCl, 2gKCl 溶于 1L 灭菌去离子水中, 1 × PBS 的 pH 为 7.4)。

准备工作: ①用 0.05% DEPC 室温预处理 50ml 聚丙烯离心管 1 小时, 然后高压灭菌 30 分钟, 去除残留 DEPC; ②从试剂盒中取出水饱和酚在室温下放置 15 分钟, 让各相分离, 因为运输过程中两相可能混合分相不好; ③变性液配制: 加 33ml CSB 缓冲液于 25g 异硫氰酸胍中, 充分混匀直至所有成分完全溶解, 65℃ 加热有助于溶解, 配制好后可贮存于 4℃。

[样品准备]

(1) 悬浮培养细胞: 300g, 4℃ 离心收集 1×10^8 个细胞; 用 25ml 预冷的 1 × PBS 漂洗细胞, 离心收集; 去上清, 加 15ml 预冷的变性液, 匀浆, 可用 Brinkman Polytron 匀浆器高速匀浆 15 ~ 30 秒钟。

(2) 贴壁培养细胞: 计算好 1×10^8 个细胞所需培养瓶数后, 用胰酶消化, 离心收集细胞, 细胞裂解同上。

或者在 1 × PBS 洗细胞后, 直接将 8ml 预冷变性溶液加入培养瓶中, 摇动使细胞裂解 (溶液变粘稠), 再将此溶液吸入下一瓶待裂解细胞。完毕后再用 4ml 变性液依次冲洗每一培养细胞瓶, 使所有细胞洗下, 然后匀浆。

(3) 植物组织或动物组织: 将 1g 新鲜或液氮冻冰组织置于陶瓷研钵中, 加入液氮研磨成细粉末, 转移至含有 12ml 变性液的容器中匀浆。

[RNA 抽提]

(1) 匀浆后的组织细胞移至 50ml 聚丙烯离心管中, 加入 1.2ml 2mol/L NaAc (pH4.0), 加盖并反复颠倒离心管。

(2) 加入 12ml 酚:氯仿:异戊醇, 混匀, 强力振荡 10 秒钟, 冰浴 15 分钟。

(3) 4℃, 10 000g 离心 20 分钟。

(4) 小心吸取上层水相 (含 RNA) 至一个新的 50ml 离心管中 (经 DEPC 处理)。注意不要吸出中间层, 该层富含蛋白质和 DNA。

(5) 加等容积异丙醇与样品混匀置 -20℃ 沉淀 RNA 30 分钟。对于 RNA 含量极少的样品可沉淀过夜提高回收率。

(6) 4℃, 10 000g, 离心 15 分钟沉淀 RNA。

(7) 弃上清, 将 RNA 沉淀重新悬浮于 5ml 变性溶液中, 置旋转摇床上多角度摇晃直至 RNA 溶解, 也可加热至 65℃ 促进溶解 (时间尽可能短)。

(8) 加入等体积酚:氯仿:异戊醇重新抽提 1 次, 即重复步骤 (2) ~ (4)。

(9) 加等容积异丙醇沉淀 RNA, 重复步骤 (5) ~ (6)。

(10) 离心后, 弃上清, 加 75% 预冷乙醇 10ml, 漂洗沉淀, 离心同上, 弃上清。

(11) 真空干燥去除样品中的乙醇, 不宜完全干燥, 否则沉淀难以溶解。

(12) 将 RNA 溶于 1 ~ 3ml 无 RNase 的去离子双蒸水中, 用紫外线分光光度仪分别测定样品在

260nm、280nm、230nm 波长上的光密度及初步估算 RNA 的纯度，-20℃保存备用。

对于长期保存，RNA 应重新补充 NaAc (pH5.0) 至 0.25mol/L，再加入 2.5 倍容积乙醇，-70℃保存。

注意事项：

(1) 纯 RNA 样品的 A260/A280 比值为 1.7~2.0，若低于该值，表明存在蛋白质污染，可重新用酚/氯仿抽提。

(2) RNA 的 A260/A280 比值应大于 2.0，若比值低于该标准，提示有异硫氰酸胍残留，应重新用乙醇沉淀 RNA，然后用 75% 乙醇洗涤两次，以去除异硫氰酸胍。

4.5.3 mRNA 的分离与纯化

真核细胞的 mRNA 分子是单顺反子，最显著的结构特征是具有 5' 端帽子结构 (m⁷G) 和 3' 端的 poly (A) 尾巴。绝大多数哺乳动物细胞 mRNA 的 3' 端存在 20~300 个腺苷酸组成的 poly (A) 尾，通常用 poly (A⁺) 表示。这种结构为真核 mRNA 分子的提取，提供了极为方便的选择标志，寡聚 (dT) 纤维素或寡聚 (U) 琼脂糖亲和层析分离纯化 mRNA 的理论基础就在于此。

mRNA 的提取已有许多成功的方法，如超速离心法、免疫法等，目前以寡聚 (dT) - 纤维素柱层析法最为有效，已成为常规方法。

4.5.3.1 寡聚 (dT) - 纤维素柱层析法 (分离 mRNA 的标准方法)

试剂：

0.1mol/L NaOH

1× 上样缓冲液

20mmol/L Tris·Cl (pH7.6)

0.5mol/L NaCl

1mmol/L EDTA (pH8.0)

0.1% 十二烷基肌氨酸钠 (SLS)

使用的 Tris·Cl, pH7.6, NaCl 和 EDTA (pH8.0) 母液，均高压消毒后加入各成分确切含量，混合后再高压消毒，冷却至 65℃ 时，加入 65℃ 水浴 30 分钟的 10% SLS 至终浓度为 0.1%。若其中 Tris·Cl 用柠檬酸钠代替，则整个缓冲液可直接用 DEPC 处理。

洗脱缓冲液：

10mmol/L Tris·Cl, pH7.6

1mmol/L EDTA, pH8.0

0.05% SDS

Tris·Cl、EDTA 贮存液及双蒸水使用前应高压灭菌处理，最后加 10%~20% SDS 至所需浓度。洗脱缓冲液不宜直接高压消毒，否则会产生大量气泡。

3mol/L NaAc, pH5.2

乙醇

操作步骤：

(1) 将 0.5~1.0g 寡聚 (dT) - 纤维素悬浮于 0.1mol/L 的 NaOH 溶液中。

(2) 用 DEPC 处理的 1ml 注射器或适当的吸管，再高压消毒，将寡聚 (dT) - 纤维素装柱 0.5~1ml，用 3 倍柱床容积的消毒水洗柱。

(3) 用 1× 上样缓冲液洗柱，直到洗出液 pH 值小于 8.0。

(4) 将 RNA 溶于消毒水中，65℃ 加热 5 分钟，用水将其冷至室温，加入等容积 2× 上样缓冲液，混匀后直接上柱，马上收集流出液，当 RNA 上样液全部进入柱床后，再用 1 柱床容积的 1× 上样缓冲液洗

柱,继续收集流出液。

(5) 所有液体流出后,将收集液 65℃加热 5 分钟,冷至室温重新上柱,再收集流出液。

(6) 用 5~10 倍柱床容积的 1×上样缓冲液洗柱,每管 1ml 分部收集,OD260 测定 RNA 含量。前部分收集管中洗脱液的 OD260 值很高,其内含物为无 poly(A) 尾的 RNA,后部分收集管中洗脱液的 OD260 值很低或无吸收。

有人用含 0.1mol/L NaCl 5 倍柱床容积的 1×上样缓冲液继续洗脱,目的是彻底洗脱 poly(A) - RNA,一般可以省略。

(7) 用 2~3 柱容积的洗脱缓冲液洗脱 poly(A⁺) RNA,分部收集,每部分为 1/3~1/2 柱容积。

(8) OD260 测定 poly(A⁺) RNA 分布,合并含 poly(A⁺) RNA 的收集管,加入 1/10 容积的 3mol/L NaAc, pH5.2 混匀后,加 2.5 容积的预冷无水乙醇,混匀, -20℃沉淀 RNA 30 分钟。比色杯须用浓盐酸/甲醇 (1:1) 溶液浸泡 1 小时,然后用 DEPC 处理好的双蒸水反复洗涤。

(9) 10 000g, 4℃离心 15 分钟,小心吸弃上清, poly(A⁺) RNA 沉淀此时往往看不见,用 70%乙醇漂洗沉淀, 10 000g, 室温离心 5 分钟,弃上清,室温蒸发乙醇。

(10) 用适量无 RNase 双蒸水溶解 RNA,加入 3 倍体积的乙醇混匀后, -70℃长期保存。使用前,加入 0.1 容积的 3mol/L NaAc, pH5.2 混匀, 12 000g, 4℃离心 5 分钟,回收 poly(A⁺) RNA。

注意事项:

(1) 整个操作过程必需严格遵守 4.5.1 中无 RNase 操作环境规则。

(2) 步骤 (4) 中将 RNA 溶液 65℃加热 5 分钟,冷至室温上样有两个目的。其一破坏 RNA 的二级结构,尤其 mRNA poly(A) 尾处的二级结构,使 poly(A) 尾充分暴露,提高 poly(A⁺) RNA 回收率;其二能解离 mRNA 与 rRNA 的结合,否则会导致 rRNA 的污染,故加热这一步不能省略。

(3) 十二烷基肌氨酸钠盐在 18℃以下时,溶解度下降会阻碍柱内液体流动,若室温低于 18℃最好用 LiCl 代替 NaCl。

(4) 步骤 (7) 中,可将洗脱液中 NaCl 浓度调至 0.5mol/L, 65℃保温, 5 分钟后,速冷至室温,重复步骤 (5)~(7),能进一步纯化 poly(A⁺) RNA。

(5) 寡聚(dT) - 纤维素柱可 4℃贮存,反复使用,每次使用前,应该依次用 NaOH, 消毒水、上样缓冲液洗柱。

(6) 有人主张用寡聚(U) - 琼脂糖凝胶 [poly(U) - Sephadex] 代替寡聚(dT) - 纤维素。其实两者分离 poly(A⁺) RNA 效果均良好,不同的是前者流速快,适宜于大容积的 RNA 分离 mRNA,后者则经久耐用。

(7) 1OD260 相当于 40μg/ml RNA。一般 10⁷ 哺乳动物培养细胞能提取 1~5μg poly(A⁺) RNA,即相当于上柱 RNA 量的 1%~2%。

4.5.3.2 寡聚(dT) - 纤维素液相结合离心法

本方法原理与 4.5.3.1 方法完全相同,只是不用柱层析,而是用寡聚(dT) - 纤维素直接加至 RNA 溶液中与 poly(A⁺) RNA 结合,离心收集寡聚(dT) - 纤维素/poly(A⁺) 复合物,再用洗脱液分离 poly(A⁺) mRNA,最后离心去除寡聚(dT) - 纤维素。

试剂:

2×结合缓冲液:

0.02mol/L Tris·Cl (pH7.5)

1mol/L NaCl

2mmol/L EDTA

1.0% SDS

漂洗缓冲液:

0.01mol/L Tris·Cl (pH7.5)

0.1mol/L NaCl

1mmol/L EDTA

洗脱缓冲液:

0.01mol/L Tris·Cl (pH7.5)

1mmol/L EDTA

TE 缓冲液:

10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

1mmol/L EDTA

操作步骤:

(1) 加入等体积的 $2\times$ 结合缓冲液至 RNA 溶液中 (一般为 $100\sim 300\mu\text{l}$) 混匀, 65°C 加热 10 分钟, 冷至室温。

(2) 加入 1ml 悬浮于 $1\times$ 结合缓冲液中的寡聚 (dT) - 纤维素。

(3) 混匀后, 室温温和摇荡 15 分钟, 让 poly (A^+) RNA 与寡聚 (dT) - 纤维素结合。

(4) $1500g$, 室温离心 5 分钟, 弃上清, 加入 $500\mu\text{l}$ 漂洗缓冲液温和混匀数秒钟, $1500g$ 离心 2 分钟, 弃上清, 重复漂洗 3 次。

(5) 加入 $200\mu\text{l}$ 洗脱缓冲液, 温和摇荡混合 2 分钟, $1500g$, 离心 5 分钟, 吸出上清移至 1 个清洁的 Eppendorf 管中, 重复洗脱 2 次, 将 3 次洗脱上清液合并。

(6) 洗脱液中, 加入 0.1 容积的 3mol/L NaAc, pH5.2, 2.5 倍容积乙醇, 混匀后, -20°C 放置过夜。

(7) $12000g$, 4°C 离心 15 分钟, 弃上清, 室温蒸发乙醇, 将 Poly (A^+) RNA 沉淀溶于适当体积的 TE 缓冲液中, OD260 定量, -70°C 保存。

注意事项:

(1) 离心力大于 $1500g$ 会导致寡聚 (dT) - 纤维素的破坏。

(2) 一般 0.5mg RNA 使用 $0.3g$ 寡聚 (dT) - 纤维素为适当的结合比率。

3.5.3.3 磁性球珠分离 mRNA

polyAT tract^R mRNA 分离系统是 Promega 公司的专利产品, 它基于寡聚胸腺嘧啶脱氧核糖核苷 [Oligo (dT)] 与 mRNA 3'端 poly (A) 尾的互补配对特性, 用生物素标记 Oligo (dT), 通过它与 mRNA 3'端 poly (A) 的退火形成杂交体, 然后用标有亲合素的顺磁球珠和磁性分离架捕获并洗涤生物素 Oligo (dT) / mRNA 杂交体, 最后用无 RNase 的去离子水将之洗脱下来, 达到从总 RNA 中分离 mRNA 的目的。

polyAT tract^R mRNA 分离原理与过程概况如下:

该系统可在 45 分钟内分离出纯 poly (A^+) 的 mRNA 组分, 操作简单, 快速灵敏, 其 mRNA 的质量适用于所有分子生物学的实验应用, 如 cDNA 合成和体外翻译。

系统组成:

(1) 生物标记的 Oligo (dT) 探针 ($50\text{pmol}/\mu\text{l}$)

(2) $20\times$ SSC 溶液

(3) 亲合素磁性球珠 TM

(4) 无 RNase 的水

(5) 供 $12\text{mm}\times 75\text{mm}$ 试管用的磁珠 TM 磁性分离架, 或 1.5ml 微型离心管用的磁球珠磁性分离架。该试剂盒贮存于 4°C 6 个月其中各成分保持稳定, 但亲合素磁性球珠不能冰存 (即不宜低于 0°C), 以免降低其效能。总 RNA 量为 $1\sim 5\text{mg}$ 为大量分离, 1mg 以下为少量分离, 可根据情况选择不同的系统, 下面以少量的 mRNA 的分离为例, 介绍其操作程序。

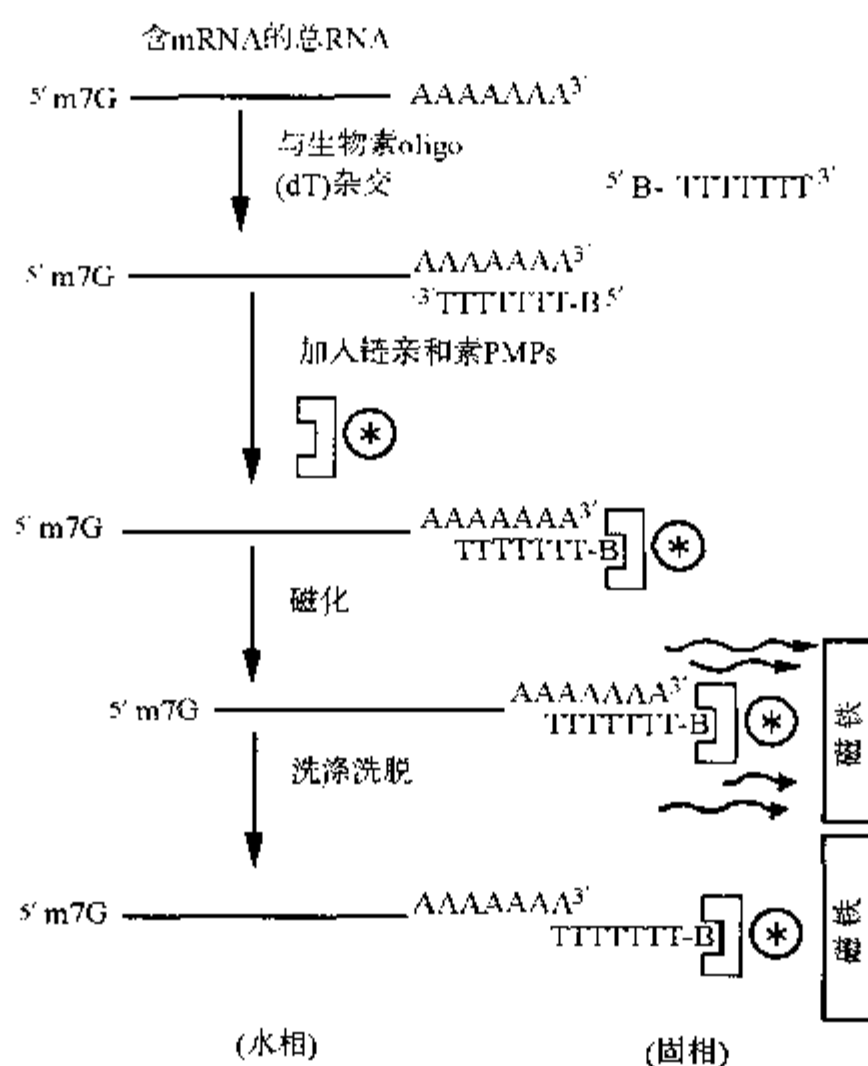


图 4-4 磁珠法分离 mRNA 原理示意图

仪器与材料:

65℃水浴

无 RNase 的移液管吸量头

1.5ml Eppendorf 管

操用步骤:

(1) 在无 RNase 的 1.5ml Eppendorf 管中, 加入 0.1 ~ 1.0mg 的总 RNA 和无 RNase 的水至最终容积为 500 μ l。注意: 最小量 (60 μ g) 的总 RNA 也可以进行分离 mRNA, 只是捕获的 mRNA 难以用紫外线分光光度法查测。

(2) 65℃, 加热 10 分钟。

(3) 加入 3 μ l 的生物素标记 Oligo (dT) 和 13 μ l 的 20 \times SSC 于 RNA 中, 轻轻混合, 室温放置逐渐冷却平衡至室温, 一般需 10 分钟左右。该步是让 Oligo (dT) 与 mRNA 的 poly (A) 进行退火。

(4) 在退火处理的同时, 配制 0.5 \times SSC, 0.1 \times SSC 溶液。

(5) 亲和素顺磁球珠冲洗: 将磁珠 (SA - PMPS) 轻轻散开后, 放入磁性分离架中, 使 SA - PMPS 集中于试管一侧 (约 30 秒钟), 小心去除上清。不要用离心方法沉淀磁珠, 用 0.3ml 0.5 \times SSC 漂洗 SA - PMPS, 用磁性分离架集中磁珠, 去除上清, 重复漂洗 3 次。

(6) 将漂洗后的 SA - PMPS 重新悬浮于 0.1ml 的 0.5 \times SSC。注意, 漂洗后的 SA - PMPS 应于 30 分钟内使用, 因为漂洗后的 SA - PMPS 在无蛋白质的环境中稳定性下降。

(7) 将步骤 (3) 中的 Oligo (dT) /mRNA 退火反应物, 全部加入到含漂洗好的 SA - PMPS 1.5ml Eppendorf 管中, 轻轻混匀, 室温放置 10 分钟。

(8) 用磁性分离架捕获 SA - PMPS, 此时 SA - PMPS 已与 Oligo (dT) 上的生物素相连。小心吸去上清, 不要搅乱 SA - PMPS。注意, 在 mRNA 分离结果尚未证实以前, 不要丢弃上清。

(9) 用 $0.1 \times \text{SSC}$, 每次 0.3ml 洗磁珠 3 次, 每次都要转晃管底使颗粒全部悬浮, 最后一次漂洗后, 尽可能多地移去水相而不扰乱 SA - PMPS。

(10) 将 SA - PMPS 重新悬浮在 0.1ml 无 RNA 酶水中, 反复颠倒 Eppendorf 管使 SA - PMPS 悬浮散开, 此步为洗脱 mRNA。

(11) 用磁性分离架捕获 SA - PMP, 将洗脱 mRNA 的水相吸至 1 个新 Eppendorf 管中。

(12) 将 SA - PMPS 再悬浮于 0.15ml 无 RNA 酶水中, 重复洗脱 1 次, 与 (11) 步的洗脱液合并 (总量 0.25ml)。

(13) 若 mRNA 用于 cDNA 克隆, 可加 0.1 体积的 3mol/L NaAc 和 1.0 容积的异丙醇于洗脱液中, -20°C 沉淀过夜; 若 mRNA 将用于体外翻译可用 0.1 容积的 3mol/L KAc 或 NH_4Ac , 1.0 容积的异丙醇于洗脱液中, -20°C 沉淀过夜, 然后 12000g 离心 10 分钟, 用 1ml 预冷的 75% 乙醇洗涤沉淀物, 12000g 离心 5 分钟后, 弃上清, 真空干燥 mRNA 沉淀。若为短期贮存, 可将 mRNA 溶于无 RNase 去离子水中, 至浓度为 $0.5 \sim 1.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, -70°C 保存。

4.5.3.4 寡聚 (dT) - 纤维素离心柱快速分离法

为了克服常规寡聚 (dT) - 纤维素层析柱流速慢, 易阻塞等麻烦, Pharmacia 与 LKB 公司将其预先制备成一系列可离心的分离柱, 分为 3 类产品: ①mRNA 提纯试剂盒 (mRNA Purification kit); ②快速制备 mRNA 提纯盒 (Quickprep™ mRNA Purification kit); ③快速微量 mRNA 提纯盒 (Quickprep™ mRNA Purification kit)。它们共有的特点是省时快速、分离范围广、产量高, 适宜于同时操作多个样品, 其 mRNA 质量能满足 Northern 分析、cDNA 合成、PCR 实验和体外翻译实验。

表 4-3 问 题 分 析

问 题	可能的原因	解决的措施
无 mRNA 洗出	1. 退火过程中忽略了适合的盐浓度而导致无 mRNA 结合	重复退火步骤, 加 $20 \times \text{SSC}$ 至最终浓度为 $0.5 \times$
	2. 探针捕获及冲洗前退火过程冷却不够	将步骤 (8) 中吸出的上清重新退火, 然后加入 SA - PMPS 继续分离
	3. 洗脱前未脱盐	用去离子水再次洗脱最后的 SA - PMPS 沉淀, 测定该洗脱液的 A260
	4. 总 RNA 中有 RNase 污染	琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 的质量
RNA 降解	在 mRNA 分离过程中存在 RNA 酶的污染	重复全部过程, 严格按照无 RNase 环境的要求操作

其中第一类产品适用于 25mg ~ 1g 组织细胞分离的 RNA 中提取 mRNA, 后两类产品可以不经过总 RNA 提取的中间过程, 一次完成直接提取 mRNA。第二类适于 100mg ~ 0.5g 组织细胞直接提取 mRNA。第三类适于 $1 \sim 10^7$ 个细胞的 mRNA 提取。一般每个柱能提纯大约 $6 \mu\text{g}$ 具有 poly (A⁺) 的 RNA, 15 分钟以内完成整个操作过程。

其原理是先用异硫氰酸胍和十二烷基肌氨酸钠直接裂解细胞或匀浆裂解组织细胞并抑制 RNase 活性, 细胞裂解液直接上寡聚 (dT) - 纤维素柱, 用不同盐浓度缓冲液洗涤上柱物, 最后洗脱下 poly (A⁺) RNA, 并且不需要用乙醇沉淀, 而用糖原沉淀回收微量 RNA。有关操作步骤参照产品说明书。

(李尹雄 文 沈珥珩 审)

参 考 文 献

1. Sambrook J, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
2. Wu R, et al. Methods in Enzymology, Vol 216. Recombinant DNA, part G. Academic Press Inc, 1992
3. Beger SH, et al. Methods in Enzymology, Vol 152, Guide to Molecular Cloning Techniques. Academic Press Inc., 1987
4. Davis LG, et al. Basic Methods in Molecular Biology. Elsevier Press, 1986
5. John SWM, et al. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. Nucleic Acid Res, 1991, 19 (2) :408
6. 彭秀玲, 等. 基因工程实验技术. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1987
7. Wu R, et al. Methods in Enzymology Vol 68, Recombinant DNA, part I. Academic Press Inc, 1979
8. Wu R, et al. Methods in Enzymology Vol 100, Recombinant DNA, part B, part C. Academic Press Inc, 1983

5. 核酸分子探针的标记

5.1 概述

在化学及生物学意义上的探针 (probe), 是指能与特定的靶分子发生特异性相互作用的分子, 并可以被特殊的方法所探知。例如抗体-抗原、生物素-抗生物素蛋白、生长因子-受体等的相互作用都可以看作是探针与靶分子的相互作用。所谓核酸分子探针则是指特定的已知核酸片段, 能与互补核酸序列退火杂交, 因此可以用于待测核酸样品中特定基因顺序的探测。要实现核酸探针分子的有效探测, 必须将探针分子用一定的示踪物 (即标记物) 进行标记。标记的核酸分子探针是核酸分子杂交、DNA 序列测定等技术的基础, 已被广泛应用于分子生物学领域中克隆筛选、酶切图谱制作、DNA 序列测定、基因点突变分析以及疾病的临床诊断等方面。

5.1.1 探针的种类及其选择

根据核酸分子探针的来源及其性质可以分为基因组 DNA 探针、cDNA 探针、RNA 探针及人工合成的寡核苷酸探针等几类。根据目的要求的不同, 可以采用不同类型的核酸探针。值得注意的是, 并不是任意一段核酸片段均可作为探针。探针选择正确与否, 将会直接影响到杂交结果的分析。因探针选择不当而导致的杂交结果的解释含糊不清、结论不可信的实例, 在文献中是屡见不鲜的。因此探针的选择应引起高度重视。探针选择最基本的原则是应该具有高度特异性。兼而考虑来源是否方便等其它因素。

5.1.1.1 基因组 DNA 探针

克隆化的各种基因片段是最广泛采用的核酸探针。几乎所有的基因片段都可被克隆到质粒或噬菌体载体中, 为获得大量高纯度的 DNA 探针提供了甚为方便的来源。近年来发展起来的聚合酶链反应 (PCR) 也为 DNA 探针提供了另一方便的来源。但在选择此类探针时, 要特别注意真核生物基因组中存在的高度重复序列 (如人类基因组中的 Alu 序列)。要尽可能使用基因的编码顺序 (外显子) 作为探针, 而避免使用内含子及其它非编码顺序, 否则探针中可能因高度重复序列存在引起非特异性杂交而出现假阳性结果。

5.1.1.2 cDNA 探针

cDNA 中由于不存在内含子及其它高度重复序列, 因此是一种较为理想的核酸探针。但 cDNA 探针不易获得, 从而限制了它的广泛应用。另外, 还须注意其中的 poly (dT) 产生的非特异性杂交问题。

5.1.1.3 RNA 探针

mRNA 作为核酸分子杂交的探针是较为理想的。这是因为: ①RNA/RNA 和 RNA/DNA 杂交体的稳定性较 DNA/DNA 杂交体的稳定性高, 因此杂交反应可以在更为严格的条件下进行 (杂交温度可提高 10℃ 左右), 因而杂交的特异性更高; ②单链 RNA 分子由于不存在互补双链的竞争性结合, 其与待测核酸顺序杂交的效率较高; ③RNA 中不存在高度重复序列, 因此非特异性杂交也较少; ④杂交后可用 RNase 将未杂交的游离探针消化掉, 从而使本底降低。但是, 大多数 mRNA 中存在一多聚腺苷酸尾, 有时也会影响其杂交的特异性, 此缺点可以通过在杂交液中加入 poly (A) 将待测核酸序列中可能存在的 poly (dT) 或 poly (U) 封闭而加以克服。另外, RNA 极易被环境中大量存在的核酸酶所降解, 因此不易操作, 也是限制其广泛应用的重要原因之一。事实上, 我们极少使用真正的 mRNA 作为探针, 因为其来源极不方便, 一般大多是通过 cDNA 克隆、甚至基因克隆经体外转录而得到 mRNA 样或 anti-mRNA 样探针。

5.1.1.4 寡核苷酸探针

1. 寡核苷酸探针的特点:

近年来,随着 DNA 合成仪的问世及其使用的逐步推广,越来越多的研究者更热衷于采用人工合成的寡聚核苷酸片段作为分子杂交的探针,其优点是可根据需要随心所欲地合成相应的序列,避免了天然核酸探针中存在的高度重复序列所带来的不利影响;由于大多数寡核苷酸探针长度只有 15~30bp,其中即使有一个碱基不配对也会显著影响其溶解温度 (T_m),因此它特别适合于基因点突变分析;另外,由于序列的复杂性降低,因此杂交所需时间也较短。需要注意的是,短寡核苷酸探针所带的标记物较少,特别是非放射性标记时,其灵敏度较低,因此当用于单拷贝基因的 Southern 印迹杂交时,以采用较长的探针为好。

2. 寡核苷酸探针的选择:

设计寡核苷酸序列用于分子杂交时应遵循以下几个原则:

(1) 探针长度:一般要求 10~50bp。设一段寡核苷酸的长度为 n ,则其在 DNA 中随机出现的频率 (P) 为 $1/4^n$ 。因此可以计算出,分析大肠杆菌基因只需 12 碱基长的寡核苷酸探针(大肠杆菌基因组 DNA 含量为 4×10^6 bp, 12-mer 碱基顺序的随机频率为 1.7×10^{-7});而对于人基因组则需 17~18-mer (人基因组 DNA 含量为 2.9×10^9 bp, 17-mer 和 18-mer 碱基顺序随机出现的频率分别为 1.7×10^{-10} 和 6.9×10^{-10})。过短则特异性降低,过长则不仅合成较困难,而且延长杂交时间。

(2) G:C 对含量应为 40%~60%,超出此范围则增加非特异性杂交。

(3) 一定不要含有探针内部互补顺序,即不应有 >4bp 的碱基反向互补配对,否则会形成探针内部“发夹”状结构。

(4) 避免有同一碱基的连续出现 (>4 个,如—GGGG—)。

(5) 最好在计算机中与已知的各种基因序列进行同源性比较,如果此寡核苷酸序列与非靶基因序列有 70% 以上的同源性或连续 8 个以上的碱基序列相同,则最好不用,重新设计。

3. 从蛋白质多肽序列推测寡核苷酸序列:

现在,已有大量的基因被克隆化并进行了序列测定,而且美国 NIH 等机构正在进行一个庞大的研究计划,对人类基因组的全部序列进行测定,因此对相当多的基因而言,查阅一下基因库 (gene bank) 以合成一段寡核苷酸已不是一件难事。对于一些尚未克隆的基因,可根据其蛋白质氨基酸序列合成相应的寡核苷酸序列作为探针进行探测。

由于氨基酸密码的简并性,同一氨基酸可由多种密码子编码,使得我们根据蛋白质的氨基酸序列来推测其基因的碱基顺序的工作变得甚为困难,因此寡核苷酸探针的设计是一个极为重要而又复杂的工作。事实上,要完全准确地将其基因顺序推测出来几乎是不可能的,但有以下几个原则可供参考:

(1) 要尽量选择那些含只有一种编码的氨基酸(如色氨酸和甲硫氨酸)的多肽作为合成寡核苷酸探针的参照。

(2) 尽管同一氨基酸可由多种密码子编码,但其使用频率是不一样的,因此应优先考虑使用频率最高的密码子。表 5-1 所列是分析了 50 个人类基因后得出的各种氨基酸密码子的使用频率。

(3) 前一种氨基酸的密码子也会影响下一种氨基酸密码子的使用,这是因为在真核基因中,极少有 5'-CpG-3'序列的出现,从表 5-1 中也可以看出,在密码子内部凡是存在 CG 顺序的密码子其使用频率也较低。在两个密码子间的情况也是同样,因此在设计寡核苷酸探针时,当两个相邻的氨基酸的最高频密码子相连会导致 CG 顺序的出现时,则应将其中一种氨基酸的密码子换为次高频密码子。通常是将前一个密码子 NNC 换成 NNT。甘氨酸与苏氨酸除外。

表 5-2 列举了各种氨基酸密码子的最佳选择:

表 5-1 各种氨基酸密码子的使用频率

氨基酸	密码子	使用频率	氨基酸	密码子	使用频率
苯丙氨酸	UUU	0.42	酪氨酸	UAU	0.41
	UUC	0.58		UAC	0.59
亮氨酸	UUA	0.06	组氨酸	CAU	0.44
	UUG	0.11		CAC	0.56
	CUU	0.10	谷氨酰胺	CAA	0.26
	CUC	0.22		CAG	0.74
	GUA	0.06	天冬酰胺	AAU	0.41
	CUG	0.45		AAC	0.59
异亮氨酸	AUU	0.30	赖氨酸	AAA	0.36
	AUC	0.56		AAG	0.62
	AUA	0.14	天冬氨酸	GAU	0.41
蛋(甲硫)氨酸	AUG	1.00		GAC	0.59
缬氨酸	GUU	0.16	谷氨酸	GAA	0.40
	GUC	0.25		GAG	0.60
	GUA	0.10	半胱氨酸	UGU	0.44
	GUG	0.49		UGC	0.56
丝氨酸	UCU	0.18	色氨酸	UGG	1.00
	UCC	0.25		CGU	0.05
	UCA	0.12	精氨酸	CGC	0.20
	UCG	0.06		CGA	0.09
	ACU	0.12		CGG	0.15
	AGC	0.27		AGA	0.23
脯氨酸	CCU	0.30		AGG	0.27
	CCC	0.34	甘氨酸	GGU	0.16
	CCA	0.24		GGC	0.37
	CCG	0.12		GCA	0.25
苏氨酸	ACU	0.24		GGG	0.22
	ACC	0.41	终止型	UAA	0.32
	ACA	0.25		UAG	0.08
	ACG	0.09		UGA	0.59
丙氨酸	GCU	0.29			
	GCC	0.42			
	GCA	0.19			
	GCG	0.09			

表 5-2 密码子的最佳选择及其正确率

氨基酸	正确率	当随后的密码子以下列碱基开始时的最佳密码子	
		A 或 C 或 T	G
甲硫氨酸	1.00	ATG	不变
色氨酸	1.00	TGG	不变
酪氨酸	0.93	TAC	TAT
半胱氨酸	0.93	TGC	TGT
谷氨酰胺	0.91	CAG	不变
苯丙氨酸	0.90	TTC	TTT
天冬氨酸	0.90	GAC	GAT
天冬酰胺	0.90	AAC	AAT
组氨酸	0.89	CAC ^a	CAT
谷氨酸	0.87	GAG	不变
赖氨酸	0.85	AAG	不变
丙氨酸	0.84	GCC	GCT
异亮氨酸	0.84	ATC	ATT
苏氨酸	0.84	ACC	ACA
缬氨酸	0.83	GTG ^b	不变
脯氨酸	0.81	CCC ^c	CCT
甘氨酸	0.81	GCC	不变
亮氨酸	0.69	CTG	不变
精氨酸	0.65	CGG	不变
丝氨酸	0.60	TCC	TCT

注: a. 当继之以 C 时, 组氨酸的最佳密码子为 CAT; b. 当继之以 T 时, 缬氨酸的最佳密码子为 GTC; c. 当继之以 T 时, 脯氨酸的最佳密码子为 CCA。

(4) 参考同一基因家族的基因顺序, 对于密码子的正确选择也是有所帮助的。

(5) 采用上述原则合成的寡核苷酸探针一般错配率较低, 选择合适的杂交条件 (如适当降低杂交温度等), 可基本满足克隆筛选等工作的需要。为了尽可能减少假阴性结果, 也可合成各种可能的寡核苷酸探针分别或混合进行探测。当混合进行杂交探测时, 由于各探针的 (G+C)% 含量不同, 因此需分别在不同的温度下进行探测或采用适当的方法使其 T_m 值基本趋于相同 (详见分子杂交章)。

(6) 寡核苷酸探针设计方法实例:

如人肿瘤坏死因子中第 104~116 位氨基酸的顺序为:

glu - thr - pro - glu - gly - ala - lys - pro - trp - tyr - glu

按表 5-1 选择最高频密码子, 则其碱基序列为:

5' - GAG ACC CCC GAG GGC GCC GAG GCC AAG CCC TGG TAC GAG - 3' (1)

按表 5-2 修改其中出现的 CpG 序列 (划线碱基), 则其碱基序列为:

5' - GAG ACC CCT GAG GGA GCT GAG GCC AAG CCC TGG TAT GAG - 3' (2)

其实际顺序为:

5' - GAG ACC CCA GAG GGG GCT GAG GCC AAG CCC TGG TAT GAG - 3' (3)

比较 (2) 与 (3) 可以看出, 在长达 13 个氨基酸残基、39 个碱基的序列中, 设计的寡核苷酸序列与实际顺序仅相差 2 个碱基 (划线碱基), 符合率近 95%。这个寡核苷酸片段作为核酸分子杂交的探针

是毫无问题的。如果此多肽中含有色氨酸或甲硫氨酸, 则其符合率将会更高。

5.1.2 各种标记物及其选择

核酸分子杂交技术能在分子生物学范畴得到如此广泛的应用, 在很大程度上得益于高度灵敏的示踪物——放射性核素。应用放射性核素可以检测出 $1 \sim 10\mu\text{g}$ 高等生物基因组 DNA 中的单拷贝基因。近年来, 众多的科学工作者由于不满意于放射性核素的半衰期短、污染环境等缺点, 而不断致力于新的探针标记物的研制工作, 现已有不少非放射性标记物得到应用, 当前虽仍不能完全替代放射性核素, 但相信在不久的将来会有更好的放射性核素替代物问世。

一种理想的探针标记物, 应具备以下几种特性: ①高度灵敏性; ②标记物与核酸探针分子的结合, 应绝对不能影响其碱基配对特异性; ③应不影响探针分子的主要理化特性, 特别是杂交特异性和杂交稳定性, 杂交体的解链温度 (T_m , 参见第 6 章) 应无较大的改变; ④当用酶促方法进行标记时, 应对酶促活性 (K_m 值) 无较大的影响, 以保证标记反应的效率和标记产物的比活性, 当标记探针还继续作为下一步酶促反应的底物 (如用于 DNA 序列测定) 时, 应不能影响此步骤的酶活性; ⑤检测方法除要求高度灵敏性外, 还应具有高度特异性, 尽量减低假阳性率。如果要求更严一些, 它还应具有较高的化学稳定性, 保存时间较长, 标记及检测方法简单; 对环境无污染, 对人体无损伤; 价格低廉等。

下面简要介绍几种常见的探针标记物。

5.1.2.1 放射性核素

放射性核素是目前应用最多的一类探针标记物。放射性核素的灵敏度极高, 可以检测到 $10^{-14} \sim 10^{-18}\text{g}$ 的物质, 在最适条件下, 可以测出样品中少于 1 000 个分子的核酸含量, 而一般光谱分析法只能鉴定 10^{-9}g 的物质。而其最大的优点是, 放射性核素与相应的元素具有完全相同的化学性质, 因为二者之间的差别只在中子数目上, 质子和电子数完全一致, 而元素的化学性质是由其核外电子决定的, 因此对各种酶促反应无任何影响, 也不会影响碱基配对的特异性与稳定性和杂交性质。另外放射性核素的检测具有极高的特异性, 少数假阳性结果的出现, 极少是由于放射性核素引起的, 而主要是由杂交过程本身导致的。按严格规程操作 (主要是预杂交和洗膜) 则假阳性率极低。其主要缺点是易造成放射性污染。另外, 当标记活性极高时, 放射线可以造成核酸分子结构的破坏; 此外, 多数放射性核素的半衰期都较短, 因此必须随用随标, 标记后立即使用, 不能长期存放 (^3H 与 ^{14}C 除外)。

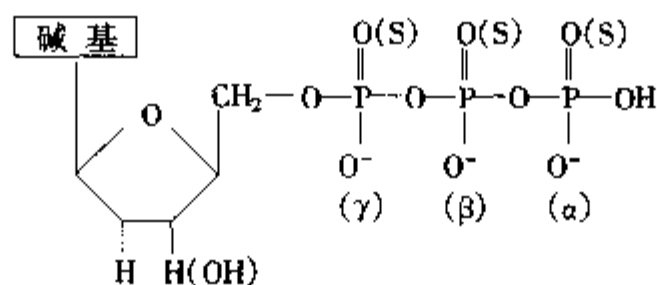
常用于标记核酸探针的放射性核素有 ^{32}P 、 ^3H 和 ^{35}S , 另外亦有人使用 ^{14}C 、 ^{125}I 以及 ^{131}I 等。各种放射性核素的适用范围是由其物理特性所决定的, 表 5-3 列举了上述几种放射核素的物理特性。

表 5-3 常用放射性核素的物理性质

核素	半衰期	100%纯度时的 核素放射活性 (specific activity) (Ci/mmol)	射线粒子的最大能量 E_{max} (keV)	
			β	γ
^3H	12.1 年	29	18.5	—
^{14}C	5 100 年	62	156	—
^{32}P	14.3 天	9 120	1 710	—
^{35}S	87.1 天	1 490	169	—
^{125}I	60 天	2 400	34.6	35.4
^{131}I	8.6 天	16 100	608	365

1. ^{32}P :

^{32}P 放射性强,其所释放的 β -粒子能量高,穿透力较强,因此放射自显影所需时间短,灵敏度高,被广泛应用于各种滤膜杂交以及液相杂交中,特别适合于基因组中单拷贝基因的检测。其缺点是半衰期短;射线散射严重,导致X线片上带型轮廓不清,有时会影响到结果的分析,特别是当要求高分辨率时(如DNA序列测定和细胞原位杂交)。 ^{32}P 大多是以标记的各种核苷酸(^{32}P -NTP)和脱氧核糖核苷酸(^{32}P -dNTP)的形式提供的。要注意选择适宜的核苷酸分子。特别要注意 ^{32}P 是标记在三磷酸核苷酸分子的哪一个位置的磷酸上,有些标记方法需要 α -位标记的(如切口平移法),有些则需要 γ -位标记的(如多核苷酸激酶末端标记法)(图5-1)。另外还须注意其比放射活性,比放射活性反映了分子中 ^{32}P 取代的比例,一般实验室常用比放射活性为3000Ci/mmol的(d)NTP。但要注意的是,在同等放射活性时,其比放射活性越高,则其中核苷酸分子的浓度(摩尔数)越低,而核苷酸的浓度是多数酶促反应的重要限速因素。因此当需要全长均匀标记的核酸探针而对其放射活性要求不高时,可以采用比放射活性较低的标记核苷酸分子(如400~800Ci/mmol)。其剂型有水溶液和乙醇:水(1:1)溶液两种,前者可直接使用,而后者在使用前须进行浓缩干燥处理。

图5-1 ^{32}P 及 ^{35}S 标记的三磷酸核糖核苷酸结构图2. ^{35}S :

S原子可以取代磷酸分子上的一个氧原子,从而形成 ^{35}S 标记的核苷酸分子(图5-1)。核苷酸分子结构上的这种改变,对于大多数核酸修饰酶(如DNA和RNA聚合酶、激酶和磷酸酶等)的活性没有太大的影响,是其适宜的反应底物,可以直接替代 ^{32}P -标记的核苷酸用于探针标记,其标记程序毋需改变。也有报导表明,这种结构上的改变会抑制DNA聚合酶的活性,使其掺入速率下降。

^{35}S 的放射性亦较强,但 β -粒子能量较低,因此其检测灵敏度较 ^{32}P 稍低,由于其射线的散射作用较弱,在X线胶片上成影分辨率较高,因此越来越多的研究者更乐于用它进行核酸序列测定及细胞原位杂交研究。另外, ^{35}S 的半衰期较 ^{32}P 长,也是其受欢迎的原因之一。其灵敏度也基本达到检测单拷贝基因的要求。 ^{35}S 放射的粒子穿透力极弱,一张薄薄的保鲜膜即可将之阻断,这是在放射自显影时所必须注意的问题。

3. ^3H :

^3H 释放的 β -粒子能量极低,散射极少,因此在感光乳胶上的成影分辨率最高,本底较低,最适用于细胞原位杂交,但放射自显影所需时间较长。目前亦有较多的人用 ^{32}P 和 ^{35}S 代替 ^3H 进行原位杂交。 ^3H 的另一优点是半衰期长,标记的探针可存放较长时间反复使用。

4. ^{125}I 和 ^{131}I :

碘放射性同位素在70年代曾被广泛用于核酸探针的标记,但随后由于高放射活性的 α - ^{32}P -(d)NTP的研制成功,现已极少被采用。但碘放射性同位素仍然有其特有的优点:①可以用化学方法直接进行标记,操作简单,特别适合于RNA探针的标记;②放射线的散射作用较弱,分辨率较高,与 ^3H 差不多,而曝光时间则短得多,比较适合于细胞原位杂交;③其来源方便,价格低廉。比较而言, ^{125}I 较 ^{131}I 好,因为 ^{125}I 的半衰期较长、射线的能量较低。碘同位素最大的缺点是具有挥发性,而且被吸入后蓄积

在甲状腺中不易被排出,致使机体接受长期照射。虽然碘同位素一般是以不具有挥发性的碘化钠形式提供的,但在反应过程中还是有可能产生挥发性碘。

5.1.2.2 非放射性标记物

多年以来,科学家们致力于寻找一些安全可靠,灵敏度高的物质以替代放射性核素用于核酸分子杂交,并取得了一定的进展,部分非放射性标记物已开始在国内外逐步推广使用。其优点是无放射性污染,稳定性较好,可以较长时间存放,从而更便于临床诊断等方面的应用。但此类非放射性标记物的缺点是灵敏度及特异性都不太高,目前大多数尚处于试用阶段,有待进一步的改进。

根据其检测方法,非放射性标记物可分为以下几类:

(1) 半抗原:目前使用得较多的非放射性标记物是生物素和地高辛,它们都是半抗原,可以利用这些半抗原的抗体进行免疫检测。

(2) 配体:生物素还是一种抗生物素蛋白(卵白素, avidin)和链霉菌类抗生物素蛋白(streptavidin)的配体,可以利用亲和法进行检测。

(3) 荧光素:如 FITC、罗丹明类等,可以被紫外线激发出荧光进行观察,主要适用于细胞原位杂交。

(4) 还有一些标记物可与另一物质反应而产生化学发光现象;可以像放射性核素一样直接对 X 线胶片进行曝光,如 Promega 公司生产的 Lightsmith™ II Luminescence Engineering System 及 Amersham 公司的 ECL 等。这类标记物可能是今后研究的主流。

(5) 光密度或电子密度标记物:如金、银等,适用于细胞原位杂交,可以在光镜下或电镜下进行观察。

5.1.3 放射性核素的探测

5.1.3.1 盖革-弥勒计数管(简称盖革管, Geiger-Müller counter tube):盖革管是核素实验室必备的探测仪器,其主要用途是随时进行放射性污染的探测、放射自显影曝光时间的估计及探针柱层析时探针部位的跟踪等。虽然其对放射活性的测量并不十分准确,但也可对标记探针放射活性进行粗略估计。其测量原理是利用 α -射线和 β -射线的电离作用使气体电离而进行测量。盖革管为一抽尽空气的玻璃管,并充入两种气体,一是惰性气体如氩、氖、氦等,供气体电离之用;另一种是淬灭气体,如乙醇、乙醚、溴、氯等,其作用是防止计数管在一次放电后发生连续放电。密封管的中间有一钨丝作为阳极,玻璃内壁涂有一层导电物质作为阴极。由玻璃制成的厚端窗管可用于高能 β -粒子(如 ^{32}P)的检测,测定效率甚至可达到 100%。而对于 ^{14}C 那样的低能 β -射线,可用云母或聚酯薄膜制成的纤维薄端窗管。由于 γ -射线不能直接产生电离作用,因而其对 γ -射线的探测效率极低。应注意盖革管记录的数据并不是放射性核素的真实衰变数(每分钟衰变数 dpm,或每秒衰变数 dps),而是在单位时间内记录的脉冲数,以 cpm(每分钟脉冲数)或 cps(每秒钟脉冲数)表示。

5.1.3.2 固体闪烁计数器

不常用,从略。

5.1.3.3 液体闪烁计数器

液体闪烁计数器(简称液闪, liquid scintillation counter):闪烁计数的原理是:粒子射到某种闪烁体上时,闪烁体产生荧光,然后经光电倍增管转变为电子脉冲而被记录下来。液闪计数的闪烁体是一些有机溶剂(如甲苯、甲氧苯、二甲苯等),溶剂经射线轰击产生波长极短的荧光,然后经第一荧光剂(如 PPO, 2, 5-二苯基噁唑)和第二荧光剂(如 POPOP, 1, 4-二[2-(5-苯基噁唑)-苯])逐级转换成长波荧光,从而被光电倍增管有效地探测到。液闪的计数效率很高,是现代分子生物学实验室中主要的辐射探测器。表 5-4 是液闪和盖革管测量效率的比较:

表 5-4 液闪与盖革管探测效率的比较

	^3H	^{14}C	^{32}P	^{125}I
盖革管 (%)	—	10	40	2
液 闪 (%)	50~60	95	95	90

5.1.3.4 放射自显影

在第 6 章中详细介绍。

5.1.4 放射性核素的卫生防护

按照有关放射卫生防护条例规定,放射性核素可分为极毒、高毒、中毒和低毒四类。 ^{131}I 属于高毒类, ^{32}P 、 ^{35}S 为中毒,而 ^3H 和 ^{14}C 则属于低毒类。因此在进行放射性核素操作时决不能掉以轻心,否则有可能造成严重的人身伤害和环境污染。只要严格按照操作规程操作,就可将损伤降低到最低限度。

(1) 工作场所:核素操作应在专用的核素室内进行。核素工作实验室应分为清洁区、中间区(缓冲室)和活性区三部分。室内墙壁、天花板、地面应光滑无缝、不透水。室内应有良好的通风设备。放射性污水应有专用的下水系统,水龙头开关最好采用长臂式或脚踏式。

(2) 个人防护:进行核素操作应穿戴专用的工作服、工作帽、防护手套、口罩、防护鞋及防护眼镜。尽量在有机玻璃防护屏后进行操作。操作台上应铺有吸水纸。操作结束后要及时清理用具,并用盖革管对工作台、器械及身体进行探测,确保无污染。长期进行核素操作的工作人员应定期进行体检及化验检查。孕妇严禁进行核素操作。

(3) 废物处理:放射性核素废物必须贮存在专门的容器内,并用铅玻璃屏障。容器上必须有标签,注明核素种类、剂量及使用日期。对于 ^{32}P 等半衰期小于 15 天的放射性废物可采用放置法处理,即放置约 10 个半衰期的时间,然后倒入下水道或按一般废物处理。一般应集中收集交由专门单位再进行焚化法或掩埋法处理。

(4) 意外事故的处理:少量放射性物质污染工作台或地面,应立即用吸水材料吸干,然后再用清水反复擦洗,但应注意不要使污染面积扩大,直到放射性接近本底。如污染严重,则经初步控制污染后,应暂时封闭现场。放射性物质污染皮肤时,应立即用吸水纸吸去污物,然后用软毛刷和肥皂反复刷洗,直到放射性接近本底,刷洗过程中也应注意不要使污染范围扩大,切不可擦破皮肤。如误服放射性物质,应立即进行漱口、洗胃和催吐等方法处理,以促使其在未吸收前排出体外,另外应根据不同的放射性核素选择不同的促排剂以加速已吸收的放射性物排出体外。

5.1.5 各种标记方法及其选择

5.1.5.1 体内标记法

体内 (*in vivo*) 标记是将放射性标记的化合物作为代谢底物加到活细胞中去,经细胞的代谢处理而将生物大分子加以标记。例如将 ^3H -胸苷加入到活细胞培养基中,可将 DNA 标记;而 ^3H -尿苷则可将 RNA 标记。体内标记技术对于追踪某些分子在细胞中的代谢途径是极其有效的手段。但由于此方法受到多种因素的限制(如前体物的通透性、代谢酶活性及放射线对细胞的损伤等),使标记化合物的比放射活性不高。另外,不同生物细胞的代谢途径不一样,要选择不同的标记底物才能得到有效的标记。

5.1.5.2 体外标记法

分子生物学领域中普遍使用的核酸分子探针几乎都是用体外 (*in vitro*) 标记法标记的。体外标记法有化学法与酶促法两种:

(1) 化学标记法:利用标记物分子上的活性基因与探针分子上的基因(如磷酸基团)发生的化学反

应而将标记物直接结合到探针分子上,如光敏生物素的标记等。此法的优点是简单、快速,标记均匀。但每种标记物都有各自不同的标记方法。本书将只简单介绍各种标记法的基本原理,具体标记方法请参照生产厂家的操作说明书。

(2) 酶促标记法:将标记物预先标记在核苷酸分子上,然后利用酶促方法将核苷酸分子掺入到探针分子中去,或将核苷酸分子上的标记基团交换到探针分子上。此法适用于所有放射性核素标记的核苷酸的标记方法。部分非放射性标记的核苷酸分子也可用此法进行标记,如生物素、地高辛标记的核苷酸等。

酶促标记法是本文介绍的重点。酶促标记方法的种类繁多,应根据不同的需要进行选择。一般分子杂交的探针常规采用切口平移法和随机引物法进行标记。而寡核苷酸探针则多采用末端标记法。

5.2 探针的放射性核素标记法

以下主要以放射性核素 ^{32}P 为例介绍核酸探针的标记方法。其它核素的标记方法与之相似,可参照此方法进行。

5.2.1 切口平移法 (nick translation)

原理:

切口平移法是目前实验室中最常用的一种脱氧核糖核酸探针标记法。它利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (*E. coli* DNA polymerase I) 的多种酶促活性将标记的 dNTP 掺入到新形成的 DNA 链中去,从而合成高比活的均匀标记的 DNA 探针。

线状、超螺旋及带缺口的环状双链 DNA 均可作为切口平移法的模板。

首先,极微量的 DNase I 在 Mg^{2+} 的存在下,在 DNA 链上随机形成单链切口。利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 $5' \rightarrow 3'$ 核酸外切酶活性在切口处将旧链从 $5'$ -末端逐步切除。同时,在 DNA 聚合酶 I 的 $5' \rightarrow 3'$ 聚合酶活性的催化下,顺序将 dNTP 连接到切口的 $3'$ -末端-OH 上,以互补的 DNA 单链为模板合成新的 DNA 单链。如果在反应液中含有一种或多种标记的核苷酸(如 ^{32}P -dCTP),则这些标记的核苷酸将替代原来的核苷酸残基,从而形成高放射活性的 DNA 探针(图 5-2)。

试剂及设备:

DNAase I: 贮备液浓度 1mg/ml, 溶于 0.15mol/L NaCl 和 50% 甘油中。使用前稀释 10 000 ~ 100 000 倍,即 0.01 ~ 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$

大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (*E. coli* DNA polymerase I): 浓度 5U/ μl

dNTP (dATP, dGTP, dTTP) 溶液: 浓度 20mmol/L

α - ^{32}P -dCTP: >800Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$

10 \times NTB (切口平移缓冲液 Nick Translation Buffer):

0.5mol/L Tris \cdot Cl (pH7.2)

0.1mol/L MgSO_4

1mmol/L 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT)

500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 牛血清白蛋白 (BSA Pentax Fraction V)

0.5mol/L EDTA

缓冲液 A:

50mmol/L Tris \cdot Cl (pH7.5)

50mmol/L NaCl

5mmol/L EDTA (pH8.0)

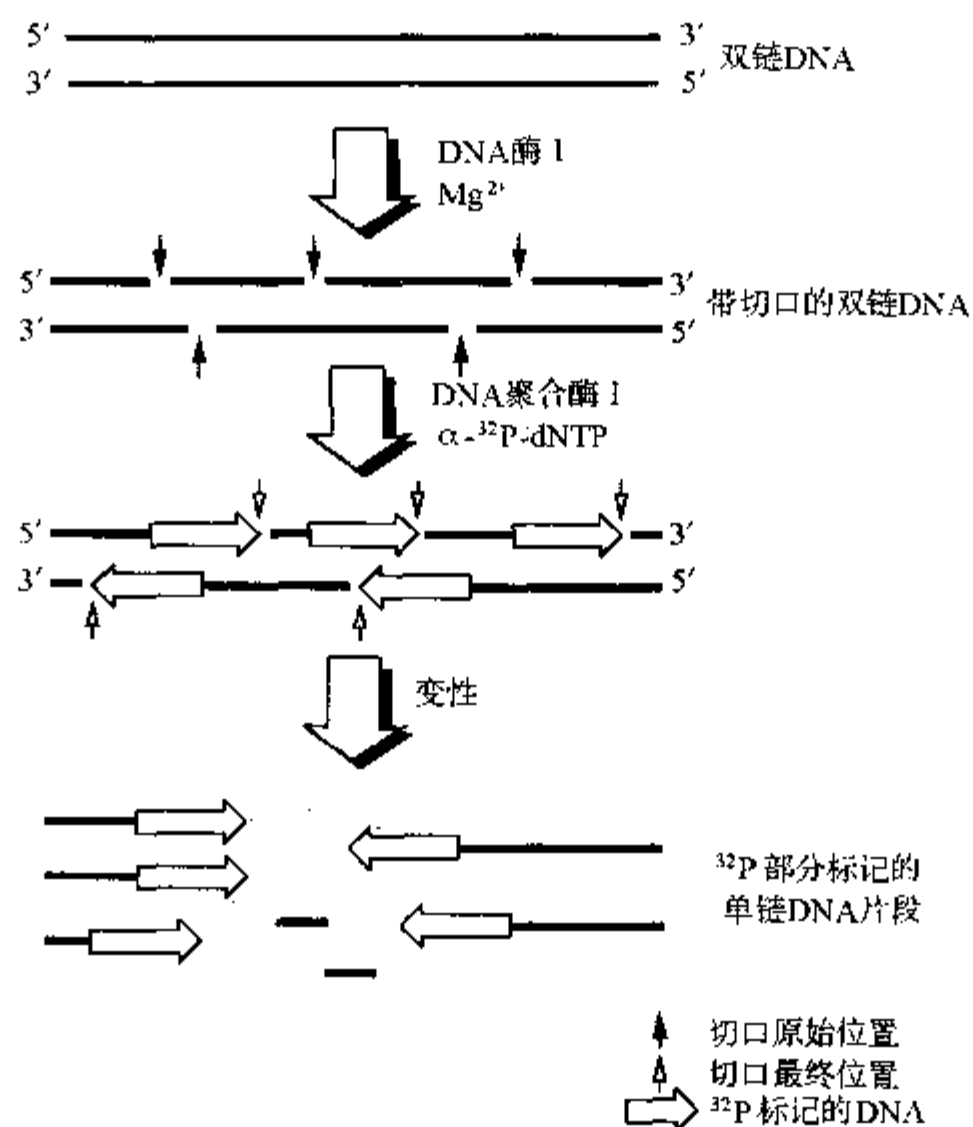


图 5-2 切口平移法原理示意图

0.5% SDS

恒温水浴

高速台式离心机

有机玻璃防护屏

其它实验室常规仪器及试剂

操作步骤:

方法一:

(1) 取 1 μ g DNA 探针溶于少量无菌蒸馏水中。(2) 加入 5 μ l 10 \times NTB, 混匀。(3) 加入除标记核苷酸外的其它三种脱氧核糖核苷酸溶液, 20mmol/L 溶液各 1 μ l。

以下操作均应在核素工作室中并在有机玻璃防护屏的保护下戴手套进行。

(4) 加入 100 μ Ci (10 μ l) 标记的核苷酸 (如 α -³²P-dCTP) 溶液。标记的核苷酸溶液贮存在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中, 使用前在室温下放置 15~30 分钟使融化。注意尽量减少冻融的次数。(5) 加入无菌蒸馏水, 至终体积为 46.5 μ l。混匀。(6) 加入 0.5 μ l 稀释的 DNase I 溶液, 涡旋混匀。(7) 加入 1 μ l (5U) *E. coli* DNA 聚合酶 I。混匀。

以上操作均在冰浴中进行。

(8) 置 14~16 $^{\circ}$ C 水浴中保温 1~2 小时。(9) 加入 2 μ l 0.5mol/L EDTA 以终止反应。

(10) 抽取 1 μ l 反应液用于 5.5 方法进行液闪计数。

(11) 按方法 5.4 纯化标记的 DNA 探针。

根据要求的不同, 上述各步骤试剂的量可按比例增减。

方法二:

在切口平移反应中, DNase I 的浓度是其最主要的限速因素。DNase I 对多种杂质的污染较为敏感。特别是用小量抽提的质粒 DNA 作为模板时, 有时用上述方法标记的效果不太理想。下述方法是将 DNase I 和 *E. coli* DNA 聚合酶 I 分别进行反应。首先用较高浓度的 DNase I 在最适温度下进行反应, 形成足够的缺口。然后将其稀释, 再在低温下进行聚合酶反应。由于 DNase I 被充分稀释, 不会在聚合反应时降解 DNA。因此标记反应可持续进行较长时间而不会有严重的副作用, 探针的标记效率亦相应提高, 放射性核素掺入率可达到 90% 以上, 比放射活性可达 10^8 cpm/ μ g 以上。

(1) 0.5 μ g DNA 溶于 1 μ l 水中。

(2) 加入 1 μ l 3 \times NTB。

(3) 加入 0.5ng DNase I (1 μ l)。

(4) 置 37 $^{\circ}$ C 保温 15 分钟。

(5) 在冰浴中加入 1 μ l 10 \times NTB。

(6) 加入 1 μ l 三种非标记的 dNTP (各 5mmol/L)。

(7) 加入 5 μ l α - 32 P-dNTP。

(8) 加入 1 μ l (5U) *E. coli* DNA 聚合酶 I。混匀。稍稍离心。

(9) 置 16 $^{\circ}$ C 保温数小时。

(10) 加入 20 μ l 缓冲液 A, 置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

注意事项:

(1) 标记物应在脱氧核苷三磷酸的 α -磷酸位上。

(2) 多数 32 P-dNTP 是以浓缩的水溶液形式, 不需处理可直接应用。但有些是以 50% 乙醇水溶液形式提供的, 必须用冷冻干燥法将之干燥浓缩后才能使用。

(3) 切口平移法所用的 DNA 聚合酶必须是 *E. coli* DNA 聚合酶 I 全酶, 由于此聚合酶的 Klenow 片段 (大片段聚合酶) 不具有 5' \rightarrow 3' 酸外切酶活性, 所以不能用大片段酶代替进行。

(4) DNase I 的浓度一定要适当。DNase I 浓度过大, 则将导致 DNA 链上形成的切口过多, 从而使探针长度过短, 影响下一步杂交反应的效率; 如 DNase I 量过小, 则不足以形成足量的缺口, 将会使标记效率下降。由于不同厂家、不同批号的 DNase I 的活性各不相同, 因此每当换用另一批号的 DNase I 时, 都应进行预试验, 摸索出适当的 DNase I 用量。理想的结果应使 30%~60% 的核苷酸掺入到 DNA 中, 最后形成的单链 DNA 探针的理想长度为 400~800bp。此长度范围的探针能在以后的杂交反应中获得较理想的杂交信号与噪音比, 这可能是由于探针 DNA 可通过其末端互相串联杂交而形成一杂交网络, 从而使杂交信号增强。

(5) 反应温度一定要控制在 14~16 $^{\circ}$ C 之间。可在恒温水浴中进行反应。条件不允许时, 可用碎冰块随时进行调节。温度过高则会使 DNase I 的活性增强, 导致切口过多, 从而使探针的长度变短; 同时还会导致链延伸至末端后自身回折形成发夹状结构, 影响标记和杂交的效率 (图 5-3)。温度过低, 则使 DNA 聚合酶活性降低, 标记效率下降。

(6) 理想结果的获得, 取决于以下几个因素:

1) 放射性核素的比活: 一般要求 α - 32 P-dNTP 的比活至少应在 800Ci/mmol 以上。实验室中常采用比活为 3000Ci/mmol 的 α - 32 P-dCTP。

2) 核素的量: 一般要求将 1 μ g DNA 标记至 1×10^8 cpm, 需 100 μ Ci 核素。一般只须用一种标记的脱氧核糖核苷酸。当必要时, 可采用两种以上标记的核苷酸混合同时使用。

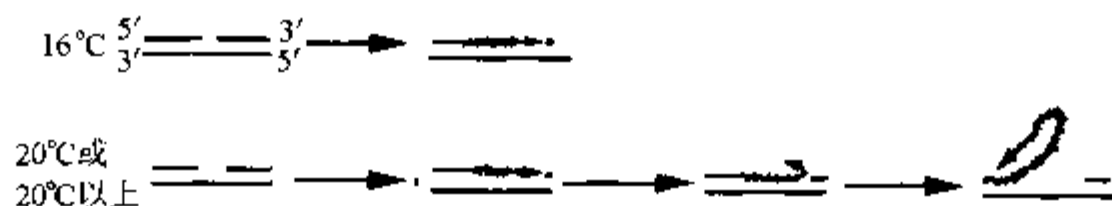


图 5-3 发夹结构示意图

3) 酶量: 在一定的范围内, DNA 聚合酶 I 的量与标记率 (掺入率) 成正比关系。加大酶量可相应提高标记活性。一般以每 $1\mu\text{g}$ DNA 加入 5~20U DNA 聚合酶为宜。

4) DNA 的纯度: DNA 聚合酶对某些物质的污染较敏感, 如苯酚、琼脂糖等。因此, DNA 样品应认真纯化, 乙醇反复沉淀。电泳回收的 DNA 片段需经 DEAE-Sephacel 离子交换柱层析纯化后再进行标记。按本实验室的经验, 在实验前将 DNA 用乙醇沉淀再用少量蒸馏水溶解较好, 尽量不用 TE。

(7) 用本法得到的探针长度一般较短, 大多为 400~800bp。当需要较长片段的 DNA 探针时 (如用于 S1 作图时), 可联合应用 DNA 连接酶使各 DNA 片段互相连接。方法如下: 标记反应结束后, 加入 $2\mu\text{l}$ 0.5mol/L EDTA, 70°C 加热 5 分钟灭活 DNase I 和 DNA 聚合酶。加入 $300\mu\text{l}$ 10mmol/L MgCl_2 , $40\mu\text{l}$ 10mmol/L ATP 和 $40\mu\text{l}$ 10× 连接缓冲液 (0.5mol/L Tris·Cl, pH7.6, 100mmol/L MgCl_2 , 100mmol/L DTT, $500\mu\text{g/ml}$ BSA)。再加入 1~2U T_4 DNA 连接酶。室温反应 2 小时。Sephadex G-50 柱层析分离纯化。如需要可进行碱性琼脂糖电泳, 并回收适当长度的单链 DNA 探针。

(8) 反应时间一般以 1~2 小时为宜, 特别是对于方法一。如时间过长, DNase I 持续作用使 DNA 片段缩短, 同时 DNA 聚合酶 I 的 $3'\rightarrow 5'$ 外切酶作用也会使 DNA 片段降解, 同时从 DNA 链上切下来的非标记核苷酸会与掺入的标记核苷酸形成交换, 使标记产物放射活性反而下降。

适用范围:

各种螺旋状态 (超螺旋、闭环及开环) 及线性的双链 DNA 均可作为缺口平移法标记的底物。但单链 DNA 和 RNA 不能采用此方法进行标记。双链 DNA 小片段 (特别是当其长度小于 100~200bp 时) 也不是此法标记的理想底物。

5.2.2 随机引物法

随机引物法 (random priming) 是近年来发展起来的一种较理想的核酸探针标记方法, 并大有取代缺口平移法而作为实验室中 DNA 探针标记的常规方法的趋势。

基本原理:

所谓随机引物 (random primer) 是含有各种可能排列顺序的寡聚核苷酸片段的混合物, 因此它可以与任意核酸序列杂交, 起到聚合酶反应的引物的作用 (图 5-4)。实验室中所用的随机引物可以用 DNase I 降解小牛胸腺 DNA 获得。目前市售的试剂盒中的随机引物是用人工合成方法得到的, 寡核苷酸片段长度为 6 个核苷酸残基, 含有各种可能的排列顺序 ($4^6 = 4096$ 种排列顺序)。

将待标记的 DNA 探针片段变性后与随机引物一起杂交, 然后以此杂交的寡核苷酸为引物, 在大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 大片段 (*E. coli* DNA polymerase I Klenow Fragment) 的催化下, 合成与探针 DNA 互补的 DNA 链。当在反应液中含有 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dNTP}$ 时, 即形成放射性核素标记的 DNA 探针。

试剂及仪器:

随机引物: 用 TE 配制成浓度为 $75\mu\text{g/ml}$ 溶液。

10× RP 缓冲液:

900mmol/L HEPES (用 4mol/L NaOH 调至 pH6.6)

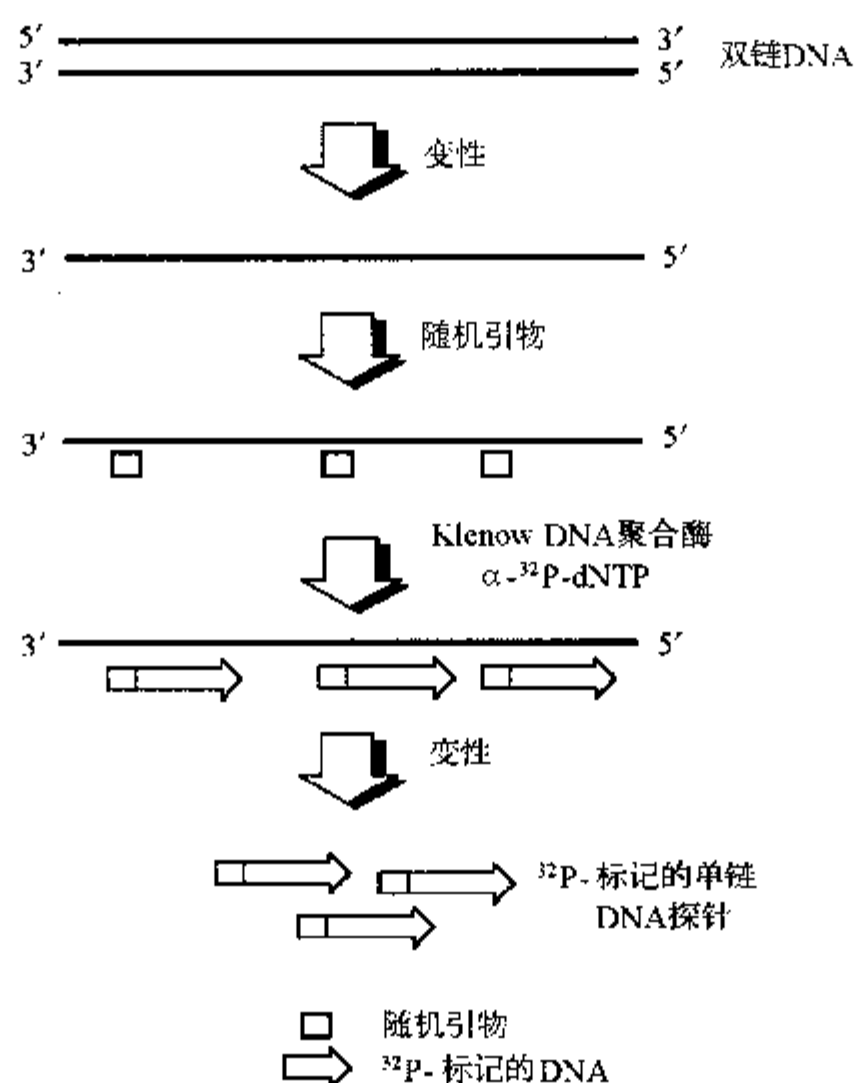


图 5-4 随机引物标记法原理示意图

100mmol/L MgCl_2

5mmol/L dATP, dGTP, dTTP 溶液。

Klenow DNA 聚合酶 I : 5U/ μl

α - ^{32}P -dCTP (3 000Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)

缓冲液 A:

50mmol/L Tris·Cl (pH7.5)

50mmol/L NaCl

5mmol/L EDTA (pH8.0)

0.5% SDS

5 \times 随机引物缓冲液 (琼脂糖法用):

250mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

25mmol/L MgCl_2

5mmol/L β -mercaptoethanol (2-巯基乙醇)

2mmol/L dATP, dGTP, dTTP

1mol/L HEPES (用 4mol/L NaOH 调至 pH6.6)

1mg/ml 随机引物

其它实验室常规仪器及试剂

操作方法:

(1) 冰浴中, 在一微量离心管中顺序加入下列溶液, 并混匀:

20mmol/L DTT

1 μl

5mmol/L dNTP (dATP, dGTP, dTTP)	1 μ l
10 \times RP 缓冲液	1 μ l
α - ³² P-dCTP	3 μ l
水	1 μ l

(2) 取 200ng 双链 DNA 溶于 1 μ l 蒸馏水中, 在蜡膜 (parafilm) 上与 1 μ l (75ng) 随机引物充分混匀。然后吸入一毛细玻璃管或硅胶管中。用火封严两端。置沸水浴中 3 分钟, 然后迅速置冰水浴中 1 分钟。将 DNA 溶液转入上述离心管中。

(3) 加入 1 μ l (5U) Klenow DNA 聚合酶, 混匀, 稍稍离心, 室温保温 3 小时以上。

(4) 加入 10 μ l 缓冲液 A, 置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

另外, 随机引物法还可直接在低熔点琼脂糖溶液中进行。方法如下:

(1) 探针 DNA 经限制性内切酶酶切后, 在低熔点琼脂糖凝胶中电泳 (电泳分离缓冲液为 TAE), 切取所需 DNA 片段。

(2) 将琼脂糖置微量离心管中, 每克胶加入 3ml 水。

(3) 置沸水浴中 7 分钟。然后置 37 $^{\circ}$ C 水浴中。

(4) 顺序加入下列溶液, 混匀:

5 \times 随机引物缓冲液 (琼脂糖法)	10 μ l
BSA (Fraction V) (10mg/ml)	2 μ l
DNA 琼脂糖溶液 (体积不大于 32 μ l)	20 ~ 50ng
α - ³² P-dCTP (> 3 000Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l)	5 μ l
Klenow DNA 聚合酶 I (5U)	1 μ l

加水至 50 μ l

室温放置 3 ~ 12 小时。

(5) 加入 200 μ l 缓冲液 A, 置 -20 $^{\circ}$ C 备用。

注意事项:

(1) 与切口平移法相比, 随机引物法具有以下几个优点:

1) 除能进行双链 DNA 标记外, 也可用于单链 DNA 和 RNA 探针的标记。当以 RNA 为模板时, 操作方法同上, 但必须采用反转录酶, 得到的产物是标记的单链 cDNA 探针。切口平移法只适用于双链 DNA 的标记。

2) 操作简单方便, 避免了因 DNase I 处理浓度掌握不当所带来的一系列问题。

3) 标记活性高, 只需 25ng 样品 DNA 可在 3 小时内使 40% ~ 60% 以上甚至 90% 的标记 dNTP 掺入到探针 DNA 链上, 标记活性可达到 10⁸ cpm/ μ g DNA 以上。

采用本法标记探针的活性除取决于标记核苷酸的比放射活性及加入量外, 还取决于 DNA 的拷贝数。实际上, 可用加大寡核苷酸引物的方法使拷贝数增加, 从而提高 DNA 探针的放射活性。

4) 可直接在低熔点琼脂糖溶液中进行标记。

(2) 反应产物 (即新形成的标记 DNA 单链) 的长度与加入寡核苷酸引物的量成反比, 因为 DNA 合成是从多个起点开始的, 加入寡核苷酸数量越多, 合成起点也越多, 得到片段的长度也越短。按标准方法得到的标记产物长度一般为 200 ~ 400bp, 足以满足 Southern、Northern、*in situ* 杂交以及克隆筛选的需要。当需要较长片段探针, 可适当减少随机引物的加入量。

(3) 所得到的标记产物是新合成的 DNA 单链。与切口平移不同, 所加入的 DNA 片段本身并不能被标记。因此, 当采用单链 DNA 片段或 RNA 作为模板时, 必须注意所得到的标记探针并不是其本身。而是与其互补的单链 DNA 片段。如果需要其本身作为探针, 则必须采用其互补链或双链 DNA 作为模板。

(4) 必须注意的是, 加入同等放射活性的标记核苷酸, 随着其比放射活性的提高, 其在反应液中的

实际浓度随之降低，而 dNTP 的浓度是此反应过程的一个重要的限速因素。核苷酸浓度过低，不仅使标记反应速度降低，也使得到的探针长度变短。

(5) 由于反应条件控制在 pH6.6，抑制了 Klenow DNA 聚合酶的 3'→5' 外切酶活性，因此延长反应时间也不会造成 DNA 的降解。必要时可将反应时间延长到 12~16 小时，使更多的核苷酸掺入到 DNA 中，提高标记活性。

(6) 由于此方法的核苷酸掺入率极高，因此可不经 Sephadex G-50 纯化而直接用于杂交。

(7) 此法得到的探针放射活性极高，而高放射性会造成 DNA 链的破坏，因此标记的 DNA 探针应马上使用。

5.2.3 单链 DNA 探针的标记

单链 DNA 探针与双链 DNA 探针相比，其杂交效率更高。这是由于双链 DNA 探针在杂交时，除与目的基因序列杂交外，双链 DNA 探针两条链之间还会形成自身的无效杂交；而单链 DNA 探针则避免了这种缺点。

原理：

一般采用 M13 噬菌体体系进行单链 DNA 探针的标记。人工合成的寡核苷酸作为引物首先与克隆了特异基因片段的 M13 噬菌体 DNA 杂交，在 α - ^{32}P -dNTP 的存下，利用 *E. coli* DNA polymerase I Klenow 片段的链延伸反应合成高放射性的单链 DNA 探针。用适当的限制性内切酶切取所需探针序列，然后用变性胶电泳分离得到单链 DNA 探针。双链 RF 型 M13DNA 也可方便地用于单链 DNA 探针的制备，选择适当的引物（上游或下游引物）可得到相应的正链或负链 DNA 单链探针（图 5-5）。作为引物的寡核苷酸一般采用互补于 M13 噬菌体多克隆位点 3' 端序列的“通用引物”（universal primer，正链引物：5'-CACAATTCCACACAAC-3'，负链引物：5'-TCCCAGTCACGACGT-3'）；也可以人工合成一段互补于插入序列的寡核苷酸片段作为引物。

试剂及仪器：

寡核苷酸引物

10× Klenow 缓冲液：

0.5mol/L NaCl

0.1mol/L Tris·Cl (pH7.5)

0.1mol/L MgCl_2

100mmol/L DTT

α - ^{32}P -dATP (3 000Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)

20mmol/L dCTP, dGTP, dTTP

20mmol/L dATP

0.5mol/L EDTA

大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段 (5U/ μl)

适当的限制性核酸内切酶

恒温水浴

电泳装置

其它实验室常规仪器及试剂

操作步骤：

(1) 在一微量离心管中加入下列试剂，并混匀：

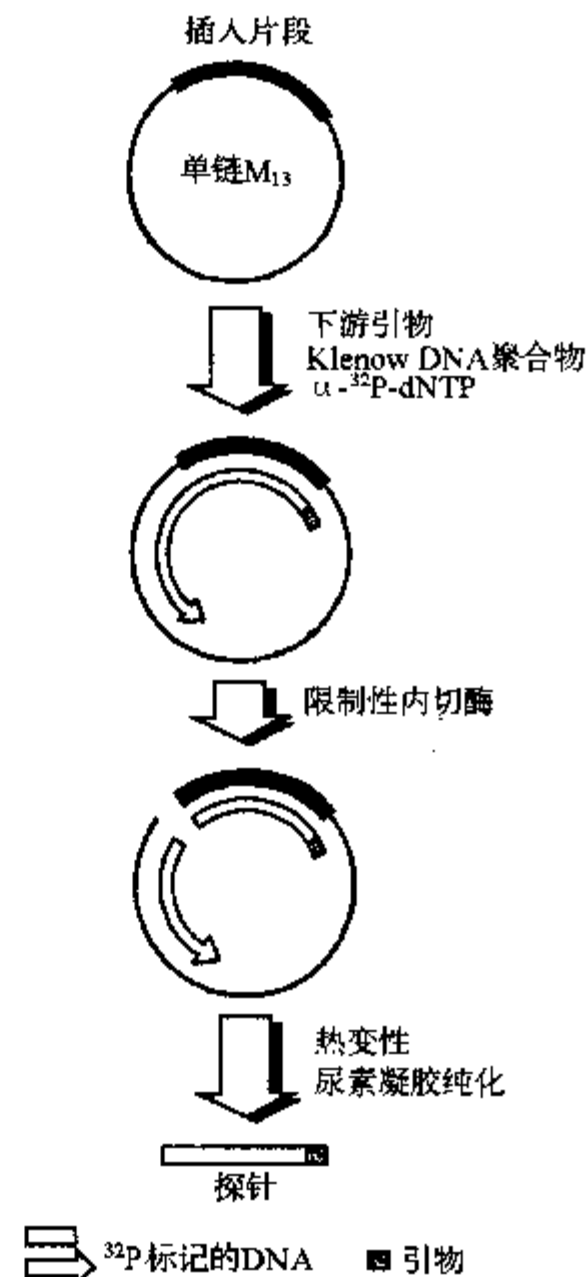


图 5-5 单链 DNA 探针制备原理示意图

单链 DNA 模板 (M13 DNA) (0.5pmol)

1 μ g

寡核苷酸引物

5pmol

10 \times Klenow 缓冲液

3 μ l

加水至 20 μ l

(2) 将离心管盖好, 并用 parafilm 封严, 然后完全浸入恒温水浴中, 加热至 85 $^{\circ}$ C, 5 分钟。然后使其漂浮在一装满 85 $^{\circ}$ C 水的 250ml 烧杯中, 使温度缓慢下降到 37 $^{\circ}$ C。

(3) 加入:

0.1mol/L DTT

2 μ l

α -³²P-dATP

5 μ l

40 μ mol/L dATP

1 μ l

20mmol/L dCTP, dGTP, dTTP

1 μ l

混匀, 稍稍离心。

(4) 加入 1 μ l (5U) klenow DNA 聚合酶, 混匀。置室温 30 分钟。

(5) 加入 1 μ l 20mmol/L dATP, 混匀。置室温 20 分钟。

(6) 加热至 68 $^{\circ}$ C, 10 分钟。

(7) 调节 NaCl 浓度使适合相应限制性内切酶。加入 20U 合适的限制性核酸内切酶。在适当温度下保温 1 小时。

(8) 酚/氯仿抽提。Sephadex G-50 柱层析分离标记的 DNA 探针 (方法 5.4)。加入 0.5mol/L EDTA 至终浓度为 10mmol/L。

(9) 琼脂糖 NaOH 变性凝胶电泳分离。放射自显影。根据放射自显影图谱切取并回收相应的 DNA 条带。

对于小于 150bp 的单链 DNA 探针可方便地用下述碱性色谱法进行分离:

(1) 制备一 10cm \times 0.5cm Sepharose CL-4B 层析柱。用 0.1mol/L NaOH, 0.3mol/L NaCl, 1mmol/L EDTA (pH8.0) 平衡。

(2) 在样品中加入 0.5mol/L EDTA 使终浓度为 10mmol/L。

(3) 加入 0.1 体积的 1mol/L NaOH, 置室温 5 分钟。

(4) 将样品加入到上述层析柱上。用盖革管跟踪放射性物质的进程。

(5) 收集第一个放射性峰。

(6) 加入 0.5 倍体积 2mol/L Tris \cdot Cl (pH8.0) 和等体积 0.1mol/L HCl。

(7) 5% 聚丙烯酰胺电泳检查探针的长度。

注意事项:

(1) 一定要注意选择适当的单链模板, 特别是用于 Northern 杂交时。要选择与所要杂交的序列相同的链, 这样得到的探针才能与之互补杂交。

(2) 标记产物的长度、放射活性及其产量受到寡核苷酸引物、模板 DNA 及 dNTP 浓度的影响, 因此要特别注意其适当的比例。Klenow DNA 聚合酶 I 对 4 种 dNTP 底物的 K_m 值是不同的, 其中以 dATP 为最低, 因此选用核素标记的 dATP 为宜。其它 3 种非标记的 dNTP 浓度必须过量。

降低模板 DNA 的浓度可相应地使产物长度增加。

为达到最佳模板效率, 引物的量必须过量, 模板及引物的浓度必须足够大以使其充分杂交。一般要求引物要 10 倍过量 (摩尔数), 其浓度须大于 200pmol/ml。有时有人采用放射性核素标记的引物进行链延伸反应, 则要求模板要过量 5~10 倍。

应根据不同的需要选择适当的条件。当用于 Southern、Northern 杂交时, 探针的放射活性高低是首要

问题, 因此模板浓度要尽可能低, 而放射性核素的浓度要尽可能高。但当需要均匀标记的探针 (如用于 S1-mapping 时), 探针的长度及标记的均匀度是较放射性高低更为紧要的问题, 因此, 应加入适量与标记核苷酸同种的非标记的核苷酸使其浓度达到 K_m 值。

此种链延伸反应一般不适宜于同时使用多种放射性核素标记的核苷酸。因为标记核苷酸加入量不可能很大, 而核苷酸浓度过低会限制链延伸反应的速度。但在特殊需要时也可采用多种大量的标记 dNTP 进行标记, 如用于单拷贝基因的基因组 foot-printing 检测时。

(3) 此法得到的探针在杂交前不需变性。

(4) 双链 M13 噬菌体 DNA 及质粒 DNA 亦可用此法标记并得到单链探针。

适用范围:

主要适用于克隆于 M13 噬菌体中的 DNA 片段的标记。选用适当的引物也可用于质粒 DNA 中插入顺序的标记。

5.2.4 cDNA 探针的标记

来源于鸟类髓母细胞病毒 (avian myeloblastosis virus, AMV) 的反转录酶是一种依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶, 具有多种酶促活性, 包括 $5' \rightarrow 3'$ DNA 聚合酶活性及 RNA/DNA 杂交体特异的 RNase H 酶活性。此酶主要应用于将 mRNA 反转录成 cDNA 而应用于 cDNA 克隆, 亦可用于 RNA 或单链 DNA 模板的 ^{32}P -标记探针的制备。

当以 poly (A) mRNA 为模板时, 反转录酶的引物可以是 oligo-dT, 也可采用特异的寡核苷酸引物, 还可采用随机寡核苷酸作为引物 (图 5-6, 5-7)。

反转录得到的产物 RNA/DNA 杂交双链经碱变性后, RNA 单链可被迅速降解成小片段, 经 Sephadex G-50 柱层析即可得到单链 DNA 探针。

5.2.4.1 随机引物法

试剂及仪器

随机引物 (参见 5.2.2 节随机引物法)

20mmol/L dGTP, dATP, dTTP

20mmol/L dCTP

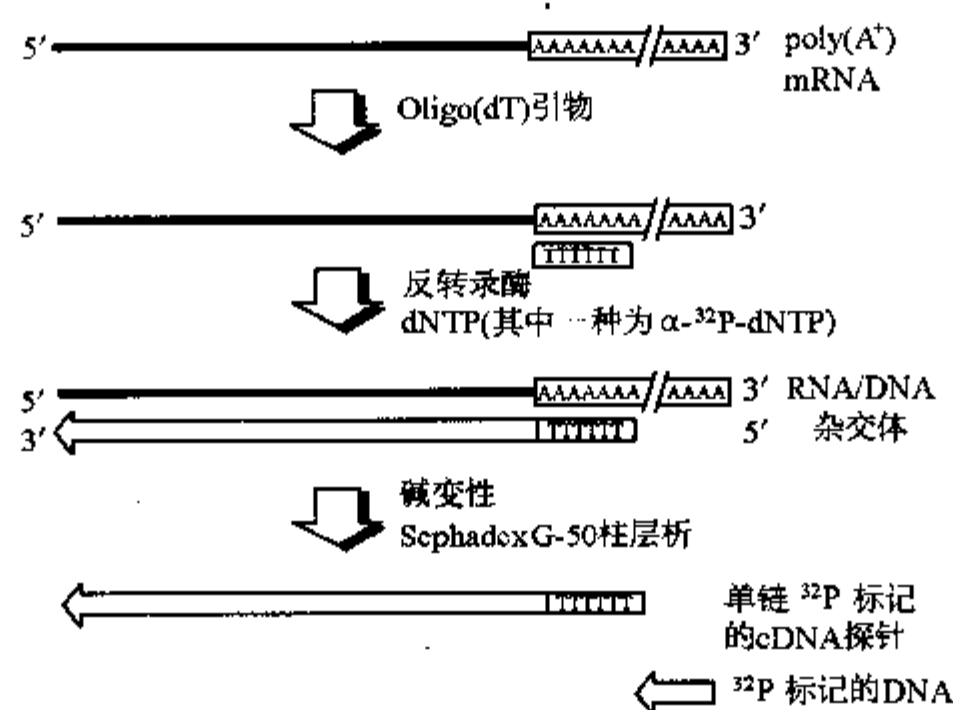


图 5-6 ^{32}P -标记的单链 cDNA 探针的制备, 以 poly (A)⁺ mRNA 为模板时, 引物为 oligo (dT)

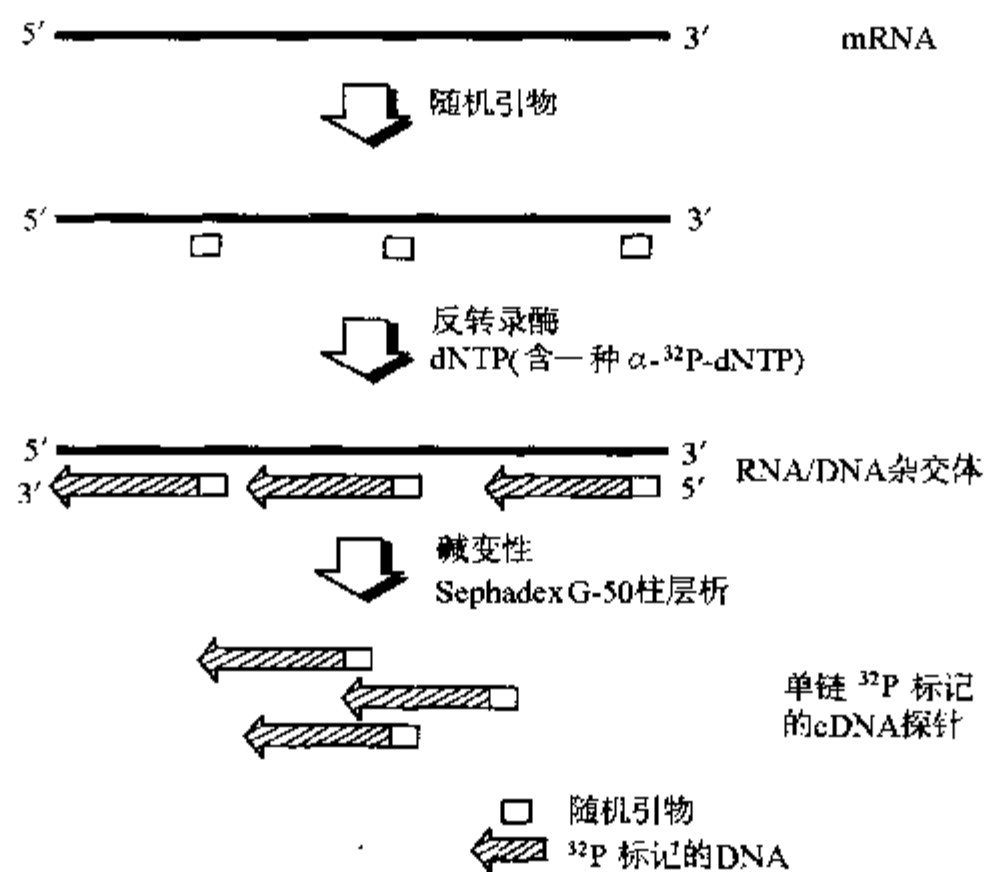


图 5-7 ^{32}P -标记的单链 cDNA 探针的制备, 以随机引物作为反转录反应的引物

α - ^{32}P -dCTP ($> 3\,000\text{Ci}/\text{mmol}$, $10\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)

反转录酶 (200 000U/ml)

10 × RP 缓冲液:

0.5mol/L Tris·Cl (pH7.6)

20mmol/L DTT

50mmol MgCl_2

0.4mol/L KCl

0.5mol/L EDTA (pH8.0)

10% SDS

RNasin

其它常规试剂及仪器

操作步骤:

(1) 在一消毒微量离心管中, 溶解 $1\mu\text{g}$ RNA 于 $3\mu\text{l}$ 无 RNase 污染的水中。加热至 70°C 5 分钟, 然后迅速置冰浴中。

(2) 顺序加入:

RNasin	20U
随机引物 (2.5mg/ml)	5.0 μl
10 × RP 缓冲液	2.5 μl
20mmol/L dGTP, dATP, dTTP	1.0 μl
20mmol/L dCTP	1.0 μl
α - ^{32}P -dCTP	10.0 μl
反转录酶 (200 000U/ml)	0.5 μl

混匀, 尽量不要形成气泡。稍稍离心。 37°C 保温 1 小时。

(3) 加入:

0.5mol/L EDTA (pH8.0)	1 μ l
10% SDS	1 μ l

混匀。

(4) 加入 3 μ l 3mol/L NaOH。68℃保温 30 分钟以水解 RNA。

(5) 冷却至室温后, 加入 10 μ l 1mol/L Tris·Cl (pH7.4); 混匀。然后加入 3 μ l 2mol/L HCl。

(6) 酚/氯仿抽提。

(7) Sephadex G-50 柱层析或乙醇沉淀法分离标记的探针 (方法 5.4)。

5.2.4.2 Oligo (dT) 引物法

试剂及仪器:

Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (1mg/ml)
5mmol/L dATP, dGTP, dTTP, dCTP
其它同上

操作步骤:

(1) 冰浴中在消毒的微量离心管中顺序加入下列试剂, 并混匀:

poly (A ⁺) RNA (1mg/ml)	10.0 μ l
oligo (dT) ₁₂₋₁₈ (1mg/ml)	10.0 μ l
1mol/L Tris·Cl (pH7.6)	2.5 μ l
1mol/L KCl	3.5 μ l
250mmol/L MgCl ₂	2.0 μ l
5mmol/L dNTP (全部 4 种)	10.0 μ l
α - ³² P-dCTP	10.0 μ l
0.1mol/L DTT	2.0 μ l
RNasin	25U
加水至 48 μ l	
反转录酶 (200 000U/ml)	2U

混匀, 尽量不要形成气泡。稍稍离心。37℃保温 2 小时。

(2) 加入下列试剂, 并混匀:

0.5mol/L EDTA (pH8.0)	2 μ l
10% SDS	2 μ l

(3) 用上述同样方法水解 RNA。Sephadex G-50 柱层析分离纯化。

注意事项:

RNA 极易被环境中污染的 RNA 酶降解, 必须采取一系列相应的措施加以预防, 详细方法参见核酸提取相关章节。

5.2.5 RNA 探针的制备与标记

5.2.5.1 SP6 RNA 聚合酶体系

将感兴趣的基因序列克隆到 SP6 表达载体 (如 Promega 公司产品 pSP64 和 pSP65 等) 的 SP6 启动子下游的多克隆位点 (polylinker) 中, 用适当的限制性内切酶在插入序列的下游将质粒线性化。SP6 噬菌体的 RNA 聚合酶对 SP6 启动子序列具有高度的亲和性, 从而启动其下游序列的转录 (图 5-8)。因此如在 4 种 NTP (其中 1 种用³²P-标记) 的存在下, 利用 SP6 RNA 聚合酶的 Run-off 转录活性, 即可得到高放射活性的 RNA 探针, 最后 DNA 模板可用无 RNase 污染的 DNase 处理而清除掉。

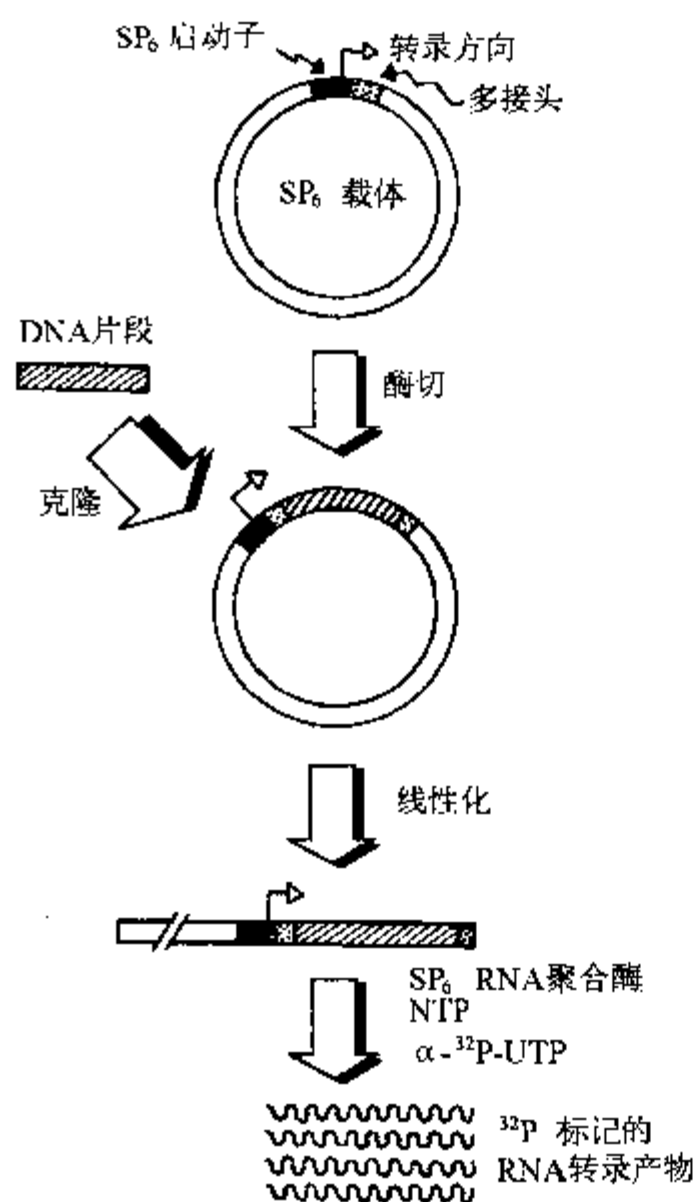


图 5-8 采用 SP6 DNA 载体体外转录体系合成 ^{32}P -标记的 RNA 探针

试剂与设备:

含插入序列的 SP6 表达载体 DNA (0.2pmol/10 μl)

RNasin

SP6 RNA 聚合酶

无 RNase 的 DNase I (1mg/ml)

10 \times 转录缓冲液

400mmol/L Tris \cdot Cl (37 $^{\circ}\text{C}$ 时 pH7.5)

60mmol/L MgCl_2

20mmol/L spermidine \cdot HCl

50mmol/L NaCl

rNTP 溶液: 各种 rNTP 分别配成 20mmol/L 溶液, 用 0.05mol/L Tris 碱调节 pH 至 7.0

α - ^{32}P -rGTP: 400 ~ 3 000Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$

其它各种实验室常规试剂及仪器

操作步骤:

(1) 将探针 DNA 片段克隆入 SP6 表达载体中 (pSP64 和 pSP65 的多克隆位点与 pUC12 和 pUC13 的多克隆点相同)。用适当的限制性核酸内切酶在插入序列的下游将 2pmol DNA 模板线性化。必要时, 可将 3' 突出末端用 Klenow DNA polymerase I 的填平反应填平。

(2) 酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀。重溶于 TE (pH7.5) 中, 浓度 250 ~ 500nmol/L。

(3) 室温下, 在一无菌的微量离心管中依次加入下列

试剂:

无 RNase 污染的水	0.4 μl
模板 DNA (1 μl)	0.2pmol
1mol/L DTT	0.1 μl
5mmol/L rATP, rCTP, rUTP	1.0 μl
10 \times 转录缓冲液	1.0 μl
RNasin (10U)	0.5 μl
2mg/ml BSA (fraction V)	0.5 μl
α - ^{32}P -rGTP	5.0 μl
SP6 RNA 聚合酶	1.0 μl

小心混匀, 避免形成气泡。稍稍离心。置 40 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 ~ 2 小时。

(4) 加入 1 μl 无 RNase 的 DNase I (1mg/ml)。混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 15 分钟。

(5) 加入 100 μl 无 RNase 污染的水, 酚/氯仿抽提。

(6) 在上清中加入 20 μl 5mol/L 乙酸铵, 混匀, 加入 250 μl 冰冷的乙醇。置 -20 $^{\circ}\text{C}$, 30 分钟。然后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 在 12 000g 离心 10 分钟, 收集 RNA 沉淀。

(7) 尽量去除残留的乙醇。RNA 重溶于 100 μl 无 RNase 污染的水中。加入 2 倍体积冰冷的乙醇, 贮存于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

使用时, 取适量的乙醇溶液, 加入 0.1 倍体积的 5mol/L 乙酸铵。置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 15 分钟以上。4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000g 离心 10 分钟。去除乙醇, 溶解于适量的无核酸酶污染的缓冲液中。

注意事项:

(1) 此方法的优点是: SP6 RNA 聚合酶稳定性高; 标记产物产量高, 可以得到多拷贝数的 RNA 探针 (一般情况下, $1\mu\text{g}$ 模板 DNA 可以得到 $10\mu\text{g}$ RNA 探针); 标记活性高, 当采用比放射活性为 $3000\text{Ci}/\text{mmol}$ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-rGTP}$ 为底物时, 产物的放射活性可达 $10^9\text{cpm}/\mu\text{g}$ 以上。另外, RNA 探针用于杂交探测也具有更为优越的特点, RNA 探针的探测效率较 DNA 探针高, 因为 RNA 探针不存在 DNA 双链探针那样的互补双链的竞争性抑制, 并且 RNA/RNA 和 RNA/DNA 杂交体的稳定性较 DNA/DNA 杂交体的稳定性高, 因此杂交体的稳定性高, 因此杂交和洗膜反应可以在更为严格的条件下进行, 杂交的特异性增强, 信号/噪音比提高。

(2) RNA 探针极易被降解, 因此在操作过程中要特别注意防止 RNase 的污染 (参见核酸提取章)。

(3) 由于克隆于载体中 DNA 序列的方向不同, 所得到的 RNA 探针可以是 mRNA 样或 anti-mRNA 样。

(4) 由于 SP6 RNA 聚合酶对底物 UTP 和 GTP 的 K_m 值较低、亲和性较高, 因此应优先选择放射性核素标记的 GTP 和 UTP 进行标记, 而尽量不要用 ATP 和 CTP。

(5) 无 RNA 合成的原因有多种可能: 试剂或试管被核酸酶污染是最常见的原因之一; 另外, 高浓度的 spermidine 会导致 DNA 模板的沉淀, 因此应在室温下严格按照上述操作顺序操作; $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-rGTP}$ 有时会降解, 要尽量避免反复冻融, 必要时可换用新的试剂或换用 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-rUTP}$; NaCl 浓度过高 ($>30\text{mmol/L}$) 可导致模板 DNA 沉淀, NaCl 可用柱层析法去盐, 乙醇沉淀 DNA 时不要用 NaCl, 沉淀要用 70% 乙醇洗 1~2 次; RNA 聚合酶失活也是可能原因之一。

(6) 有时会错误地从另一条链进行转录。模板 DNA 须线性化, 因为环状 DNA 易导致从互补链的转录; 带有 3' 突出末端的线性 DNA 模板也是另一种原因, 因此必要时可将 3' 末端填平。

(7) 转录产物过短的原因可能有两种: 底物浓度过低或模板中存在可导致特定 RNA 聚合酶转录终止的序列。解决的办法是提高底物浓度 (特别是放射性标记的 rNTP 的浓度); 降低反应温度至 30°C ; 尽量减少模板的长度; 换用另一种载体用另一种 RNA 聚合酶, 因为导致一种 RNA 聚合酶终止的序列可能并不被另一种 RNA 聚合酶所识别。

适用范围:

只适用于克隆在 SP6 启动子之下流的 DNA 模板, 模板 DNA 必须线性化。得到的单链 RNA 探针特别适合于 Northern 及细胞原位杂交反应。

5.2.5.2 T7 RNA 聚合酶体系

基本原理与 SP6 RNA 聚合酶体系基本相同。只不过 T7 RNA 聚合酶特异性识别 T7 启动子。现已有多种含有 T7 启动子序列的克隆载体可供选用。

操作方法基本与 SP6 RNA 聚合酶体系相同, 参考上节。反应温度相应降低至 37°C 。

Eperon 和 Krupp 等设计出两种利用单链 M13 载体进行 RNA 探针标记的新方法, 现简单予以介绍。

第一种方案: 当单链 M13 DNA 的插入序列中含有 T7 启动子序列时, 可采用位于插入序列下游的通用引物作为引物, 在 DNA 聚合酶的作用下形成局部双链, 然后由 T7 RNA 聚合酶从 T7 启动子起始进行转录 (图 5-9)。

第二种方案: 此方案是为不含有 T7 启动子的 M13 载体设计的。它利用了两个人工合成的寡核苷酸链。第一个称为 T7 oligo, 全长 66bp, 它又分为 4 个部分, 第 1、3 部分各长 20bp 倒转互补形成 T7 启动子, 第 2 部分长 6bp, 形成一环状结构, 第 4 部分长 20bp, 为单链, 可与 M13 载体上位于插入序列上游的序列杂交, 从而形成局部双链而起到 T7 启动子作用。其 3' 末端掺入了 2', 3' - 双脱氧核苷酸 (2', 3' - dideoxynucleotide) 以防止 Klenow DNA 聚合酶从此进行链延伸反应。第二个寡核苷酸是与 DNA 插入序列下游序列杂交的通用引物, 或与插入序列中特定顺序杂交的引物。标记时, 以通用引物为引物先合成局部双链, 然后利用 T7 oligo 的启动子作用启动 RNA 的转录 (图 5-10)。

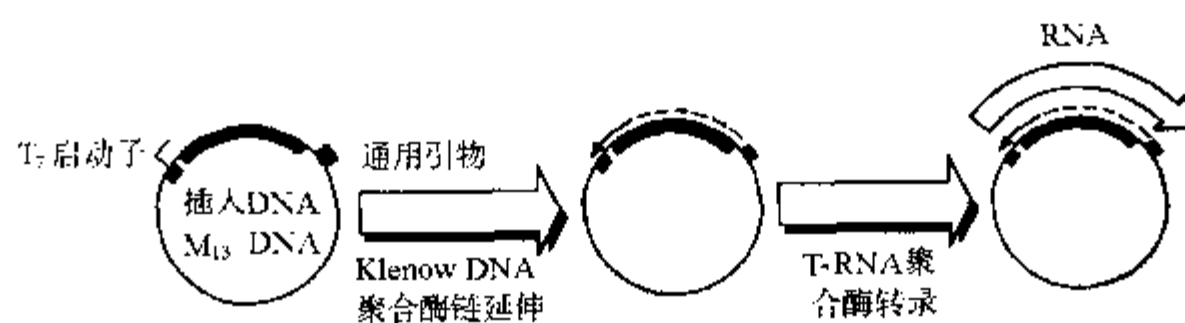


图 5-9 利用含 T7 启动子的 M13 DNA 载体进行 RNA 探针的标记

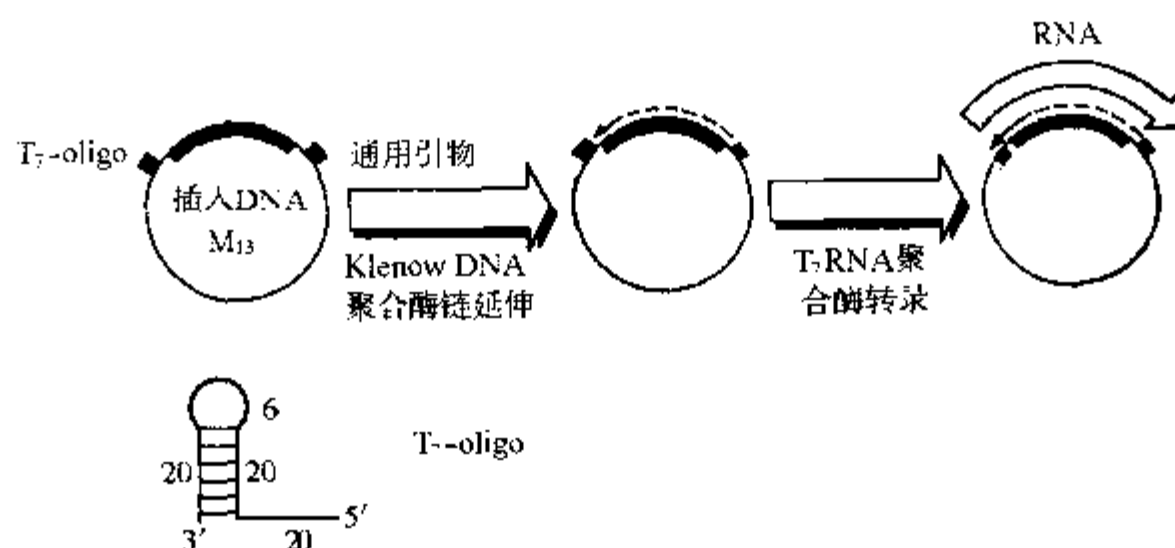


图 5-10 利用 T7 oligo 从不含 T7 启动子的 M13 DNA 载体合成标记的 RNA 探针

5.2.5.3 成对启动子体系 (paired-promoter system)

近年来发展了一系列在同一载体上含有两种启动子 (如 SP6/T7, SP6/T3, T7/T3 等) 的克隆载体。例如 Promega 公司生产的 pSP70 ~ pSP73 和 pGEM 系列载体含有成对的 SP6 和 T7 启动子; pGEMEX 含有成对的 SP6、T7 和 T3 三种启动子。选择不同的 RNA 聚合酶即可得到从不同方向启动的 RNA 单链 mRNA 或 anti-mRNA。

5.2.5.4 利用 T4 RNA 连接酶进行 RNA 的末端标记

T4 RNA 连接酶的作用是将具有 3'-OH 和 5'-磷酸的两个寡聚核糖核苷酸片段 (oligoribonucleotide) 连接起来, 形成磷酸二酯链。虽然底物之一——带有 3'-OH 的寡核苷酸 RNA 必须是 3 个核苷酸残基以上, 但磷酸供体 (带有 5'-磷酸基团的寡核苷酸) 可以是短至只需一个 3', 5'-二磷酸核苷 (nucleotide 3', 5'-biphosphate) 分子。因此, 可利用 T4 RNA 连接酶的此种活性进行 RNA 的 3'末端标记。其反应式为:



此方法在一般实验室中不常用, 具体操作过程略。

5.2.6 DNA 探针的末端标记

与切口平移法和随机引物法不同, DNA 末端标记法并不将 DNA 片段的全长进行标记, 而是只将其一端 (5'或 3'端) 进行部分标记。其特点是可得到全长 DNA 片段, DNA 片段并非均匀标记, 标记活性不高。一般极少作为分子杂交探针的标记, 主要用于 DNA 序列测定等方法所需片段的标记。

多种酶促反应可用于 DNA 的末端标记, 如 T4 DNA 聚合酶、T4 多核苷酸激酶、末端脱氧核苷酰转

移酶及 Klenow DNA 聚合酶等。

5.2.6.1 Klenow DNA 聚合酶末端标记法

E. coli DNA 聚合酶 I 大片段保留了 *E. coli* DNA 聚合酶 I 全酶的 5'→3' DNA 聚合酶和其微弱的 3'→5' 核酸外切酶活性, 但失去了 5'→3' 核酸外切酶活性。因此可利用它进行残缺 3' 末端的填充标记 (图 5-11)。

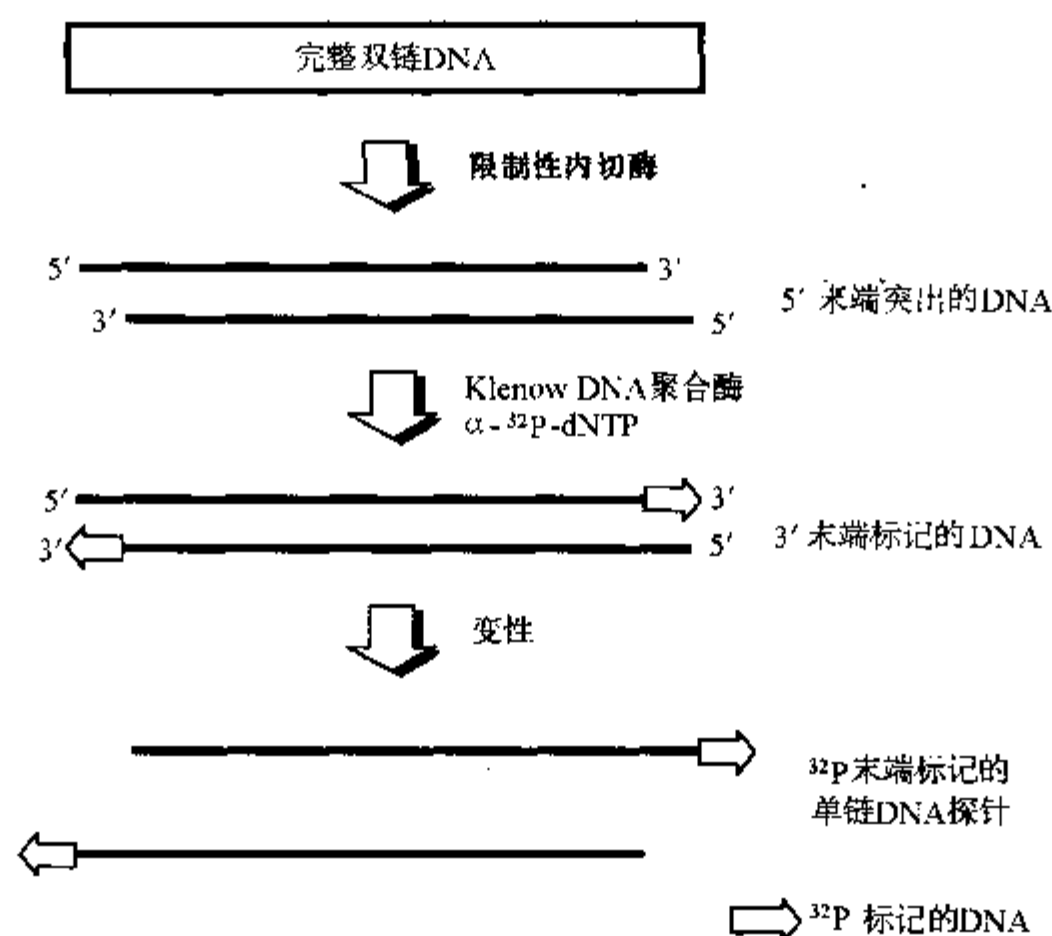


图 5-11 利用 Klenow DNA 聚合酶进行 3' - 末端填充标记

试剂及仪器:

10 × NT 缓冲液:

0.5mol/L Tris·Cl (pH7.2)

0.1mol/L MgSO₄

1mmol/L DTT

500μg/ml BSA (fraction V)

2mmol/L dNTP (不含所标记的核苷酸)

α-³²P-dNTP (400 ~ 3 000Ci/mmol, 10μCi/μl)

其它实验室常规试剂及仪器

操作步骤:

(1) 依次加入下列试剂并混匀:

DNA	1μg
10 × NT 缓冲液	2μl
2mmol/L 3 种 dNTP	1μl
α- ³² P-dNTP	适量
加水至 25μl	

(2) 加入 1U Klenow DNA 聚合酶 I。室温保温 30 分钟。

(3) 加入 1μl 2mmol/L 第 4 种核苷酸溶液。继续保温 15 分钟。

(4) 加入 $1\mu\text{l}$ 0.5mol/L EDTA 以终止反应。酚/氯仿抽提 1 次。

(5) Sephadex G-50 柱层析或乙醇沉淀法分离标记的 DNA 片段 (方法见后文 5.4)。

注意事项:

(1) 要根据不同限制性内切酶产生的不同粘性末端选用不同的标记核苷酸。如 EcoR I 酶切得到的粘性末端是 TTAA, 因此可选用 ^{32}P -dATP 或 dTTP 进行标记; 而 BamH I 酶切得到的粘性末端是 CTAG, 因此任意一种 dNTP 均可将之标记。

(2) 精心设计选用适当的限制性核酸内切酶及适当的 ^{32}P -dNTP, 利用 Klenow DNA 聚合酶 I 的末端填充活性, 可以选择性地将 DNA 双链之中一条单链特异地标记。例如一段 DNA 的两端分别用 EcoR I 及 BamH I 酶切, 其粘性末端分别为 TTAA 和 CTAG, 可选用标记的 dCTP 或 dGTP 将其中一条链选择性地标记 (图 5-12)。

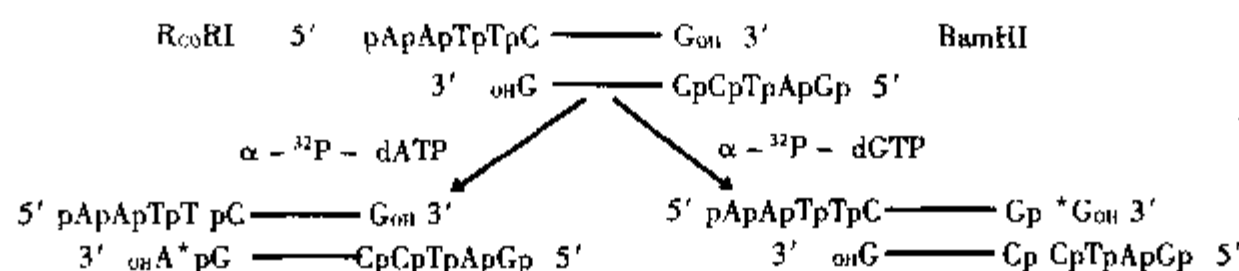


图 5-12 DNA 链的单末端选择性标记

(3) 此方法较稳定可靠, 对于相对粗提的 DNA 标记效果亦较为满意。其活性不像 T4 多核苷酸激酶那样受多种因素的抑制。一般说来, 标记反应和限制性内切酶酶切反应可在同一反应体系中进行。如结果不满意, 可分两步进行, 首先在适当的反应条件下进行酶切反应, 酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀, 然后换适当的缓冲液进行标记反应。

(4) 此反应主要适用于 DNA 分子量参照物的标记。较少用于分子杂交探针的标记。当用于 DNA 序列测定及分子杂交时, 标记核苷酸的加入量应相应提高到 250pmol ; 酶量适当提高; 反应时间相应延长。

(5) 此方法不能直接用于 3'-突出末端 DNA 的标记。对于这种模板 DNA 可以先用核酸外切酶 III (exonuclease III) 处理, 利用此酶的 3'→5'核酸外切酶活性产生 3'残缺末端, 然后利用 Klenow DNA 聚合酶的填充作用使 DNA 标记。

适用范围:

主要用于 3'残缺末端 DNA 片段的 3'末端标记。对于 3'突出末端 DNA 片段, 可以与核酸外切酶 III 联合应用。

5.2.6.2 T4DNA 聚合酶标记法

方法一: 快速末端标记法 (3'-末端填充标记法)

T4 DNA 聚合酶像 Klenow DNA 聚合酶一样具有 5'→3' DNA 聚合酶活性, 因此可利用 T4 DNA 聚合酶的填充活性进行 DNA 的 3'末端标记 (图 5-11)。

试剂及仪器:

10×T4 DNA 聚合酶缓冲液:

0.33mol/L Tris-乙酸 (pH8.0)

0.66mol/L 乙酸钾

0.1mol/L 乙酸镁

5mmol/L DTT

1mg/ml BSA (fraction V)

适当的限制性核酸内切酶

20mmol/L dNTP 溶液

α - ^{32}P -dNTP (400 ~ 3 000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)

T4 DNA 聚合酶

操作步骤:

(1) 在一微量离心管中依次加入下列试剂, 并混匀:

DNA	0.1 ~ 2 μg
10 \times T4 DNA 聚合酶缓冲液	2 μl
加水至 19 μl	

(2) 加入适量适当的限制性核酸内切酶, 在适当的温度下保温一定的时间。

(3) 加入 1 μl 2mmol/L 3 种 dNTP 溶液。

(4) 加入 2 ~ 10 μCi α - ^{32}P -dNTP。

(5) 加入 1 μl (2.5U) T4 DNA 聚合酶。

(6) 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 分钟。

(7) 加入 1 μl 2mmol/L 非标记的 dNTP 溶液。继续保温 10 分钟。

(8) 70 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 分钟以终止反应。

(9) Sephadex-G50 柱层析或乙醇沉淀分离标记的 DNA (方法见后文 5.4)。

注意事项:

(1) 要根据不同限制性核酸内切酶产生不同粘性末端选用不同的标记核苷酸。如 EcoR I 酶切得到的粘性末端是 TTAA, 因此可选用 ^{32}P -dATP 或 dTTP 进行标记; 而 BamH I 酶切得到的粘性末端是 CTAG, 因此任意一种 dNTP 均可将之标记。

(2) 与 Klenow DNA 聚合酶末端标记法一样, 精心设计选用适当的限制性核酸内切酶及适当的 ^{32}P -dNTP, 利用 T4 DNA 聚合酶的填充活性, 可以选择性地将 DNA 双链之中一条单链特异性进行标记 (图 5-12)。

(3) 此反应主要适用于 DNA 分子量参照物的标记。较少用于分子杂交探针的标记。当用于 DNA 序列测定及分子杂交时, 标记核苷酸的加入量应相应提高到 250 pmol; 酶量适当提高; 反应时间相应延长。

方法二: 替代合成标记法 (replacement synthesis)

T4 DNA 聚合酶具有 5' \rightarrow 3' DNA 聚合酶活性外, 还具有较强的 3' \rightarrow 5' 核酸外切酶活性。当在反应体系中缺乏 dNTP 时, T4 DNA 聚合酶主要表现为 3' \rightarrow 5' 核酸外切酶活性。这样就会形成 3'-末端残缺 (5'-末端突出) 的部分单链 DNA 片段。当加入 dNTP 后, 其核酸外切酶活性被抑制而表现为 DNA 聚合酶活性, 以填充方式将残缺的 DNA 末端填平。如在反应体系中含有标记的 dNTP, 则得到 3' 末端标记的 DNA 探针 (图 5-13)。

试剂及仪器:

同上

操作步骤:

(1) 加入下列试剂并混匀:

DNA	0.2 ~ 0.5 μg
10 \times T4 聚合酶缓冲液	2 μl
加水至 20 μl 。	

(2) 加入适量适当的限制性核酸内切酶, 在适温下保温一定的时间。

(3) 加入适量 T4 DNA 聚合酶。酶量与 DNA 量的比率决定了酶切的速度:

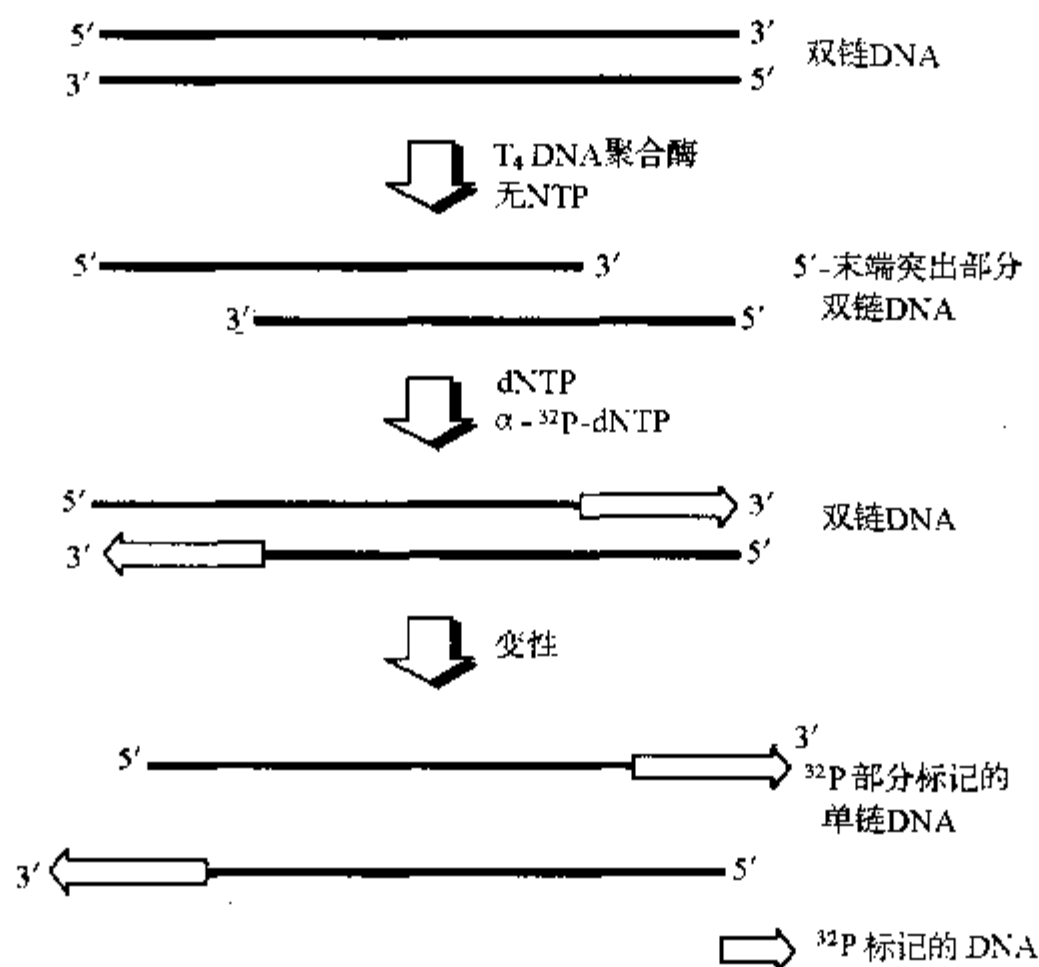


图 5-13 T4 DNA 聚合酶的替代合成标记法

酶量 (U/ μ g DNA)	酶切速度 (核苷酸数/分钟)
0.62	10
1.25	20
1.75	30
2.5	40

注意当酶量超过 2.5U/ μ g DNA 后，酶切速度不正比于酶量的增加。

(4) 当切除了所需数量的核苷酸后，加入 1 μ l 2mmol/L 3 种核苷酸溶液。

(5) 加入 32 P 标记的第 4 种核苷酸，加入量应不少于切除的核苷酸数。37℃保温 1 小时。

(6) 加入 1 μ l 2mmol/L 非标记的第 4 种核苷酸溶液。37℃保温 15 分钟。

(7) Sephadex G-50 柱层析分离标记的 DNA (方法见后文 5.4)。

注意事项：

参见上节。另外，利用 T4 DNA 聚合酶只将 3' 末端一半标记的特点，在标记反应结束后，选用适当的限制性核酸内切酶在 DNA 片段中间切断，电泳分离，也可选择性地将 DNA 双链中一条标记。

适用范围：

此方法只适用于线状 DNA 的 3' 末端标记，不能用于单链 DNA 和 RNA 模板的标记，环状双链 DNA 必须用适当的限制性核酸内切酶线性化后才能进行标记。用填充反应进行标记时，只能标记带 5' 末端突出粘性末端的 DNA 限制性片段；平末端片段的标记效率较低；而 3' 末端突出的限制性片段不能采用填充方法标记，可采用替代合成法。

此方法一般不作为制备核酸分子杂交探针的常规方法。其优点是可以得到标记的全长 DNA 片段，但一般说来，全长序列对于核酸分子杂交并非必须的。制备核酸分子杂交探针时，主要用于小片段

DNA 的标记,特别是长度只有几十至几百个核苷酸残基的 DNA 小片段;而这种短序列 DNA 片段对于切口平移等方法是不太适宜的。另外在需要选择性单链 DNA 探针而不具备 M13 克隆时,亦常用此方法进行标记。

5.2.6.3 T4 多核苷酸激酶 (T4 polynucleotide kinase) 标记法

T4 多核苷酸激酶的作用是催化 ATP 分子上的 γ -磷酸基团转移到 DNA 或 RNA 分子的 5'-OH 基团上。因此,采用 γ - ^{32}P -ATP 为底物,即可将 DNA 样品 5'末端标记。

T4 多核苷酸激酶催化以下两种反应:

向前反应 (forward reaction): T4 多核苷酸激酶催化 γ - ^{32}P -ATP 上的 γ -磷酸基团转移到 DNA 或 RNA (单链或双链) 5'末端游离 -OH 基团上。核酸样品必须预先进行脱磷酸处理 (图 5-14)。

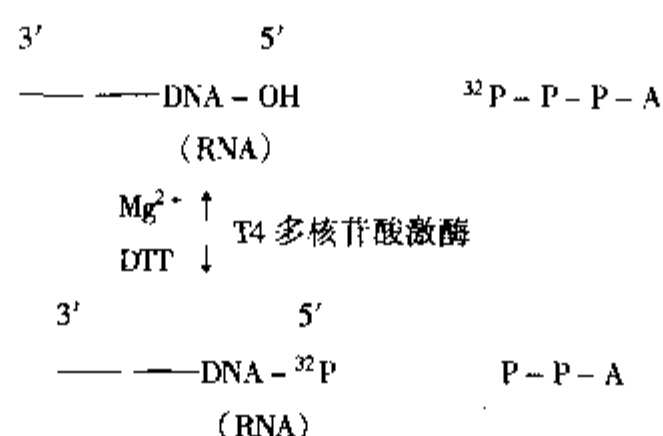


图 5-14 T4 多核苷酸激酶的同前反应标记法

交换反应 (exchange reaction): T4 多核苷酸激酶催化 ATP 分子上的 γ -磷酸基团与 DNA 5'-末端的磷酸基团进行交换。核酸样品毋需预先进行脱磷酸处理。但此反应的效率较之向前反应为低 (图 5-15)。

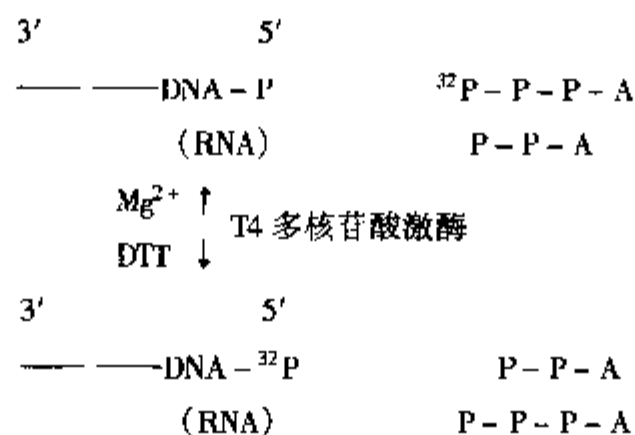


图 5-15 T4 多核苷酸激酶交换反应标记法

方法一: 5'突出末端模板的向前反应标记法

试剂及仪器:

10 × CIP 缓冲液:

0.5mol/L Tris·Cl (pH 9.0)

10mmol/L MgCl_2

1mmol/L ZnCl_2

10mmol/L 亚精胺

碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase; 来自细菌, BAP; 或来自小牛肠, CIP)

10 × STE:

100mmol/L Tris·Cl (pH 8.0)

1mol/L NaCl
 10mmol/L EDTA
 10× 激酶缓冲液 I:
 0.5mol/L Tris·Cl (pH 7.6)
 0.1mol/L MgCl₂
 50mmol/L DTT
 1mmol/L 亚精胺
 1mmol/L EDTA
 γ -³²P-ATP (3 000 Ci/mmol; 10 μ Ci/ μ l)
 T4 多核苷酸激酶 (polynucleotide kinase)
 其它各种实验室常规试剂及仪器

操作步骤:

(1) 碱性磷酸酶的预处理: 碱性磷酸酶硫酸铵悬液 4℃下在 Eppendorf 离心机中离心 1 分钟。弃去上清, 沉淀重溶于少量水中。4℃下此溶液可保存一个月以上。

(2) 将 DNA 样品溶解于少量 10mmol/L Tris·Cl (pH8.0) 溶液中, 然后加入:

10× CIP 缓冲液 5 μ l
 加水至 48 μ l
 适量碱性磷酸酶 (CIP)

置 37℃保温 30 分钟。加入第二份 CIP, 继续保温 30 分钟, 即可脱去 5'末端磷酸基团。0.01U 的 CIP 可脱去 1pmol 5'末端磷酸基团 (1.6 μ g 4kb 线性 DNA 的 5'末端数相当于 1pmol)。

(3) 加入 40 μ l 水, 10 μ l 10× STE, 5 μ l 10% SDS。加热至 68℃, 15 分钟。

(4) 酚/氯仿及氯仿各抽提两次。

(5) Sephadex G-50 离心柱层析 (方法见后文 5.4)。

(6) 乙醇沉淀。

(7) 1~50 pmole 脱磷酸的 DNA 溶于少量水中, 然后加入下列试剂并混匀:

10× 激酶缓冲液 I 10 μ l
 γ -³²P-ATP 50pmol (150 μ Ci)
 T4 多核苷酸激酶 10~20U
 加水至 50 μ l

混匀, 37℃保温 1 小时。

(8) 加入 2 μ l 0.5mol/L EDTA。酚/氯仿抽提 1 次。乙醇沉淀。

(9) DNA 沉淀重溶于 50 μ l TE (pH7.9)。

(10) Sephadex G-50 柱层析分离标记的 DNA 探针 (方法 5.4)。

方法二: 平末端或 5'残缺末端模板的向前反应标记法

试剂及仪器:

10× 平末端激酶缓冲液:
 0.5mol/L Tris·Cl (pH9.5)
 0.1mol/L MgCl₂
 50mmol/L DTT
 50% 甘油

溶液 A:

0.2mol/L Tris·Cl (pH9.5)

10mmol/L 亚精胺

1mmol/L EDTA

其它试剂同方法一

操作步骤:

(1) 碱性磷酸酶处理方法同方法一。

将 DNA 样品溶解于少量 10mmol/L Tris·Cl (pH8.0) 溶液中, 然后加入:

10 × CIP 缓冲液 5 μ l

加水至 46 μ l

适量碱性磷酸酶 (CIP)

置 37℃ 保温 15 分钟, 然后置 56℃ 水浴保温 15 分钟。加入第二份 CIP, 继续按此两种温度保温同样时间, 以脱去 5' 末端磷酸基团。

0.01U 的 CIP 可脱去 1pmol 5' 末端磷酸基团。(1.6 μ g 4kb 线性 DNA 的 5' 末端数相于 1 pmole)

(2) 加入 40 μ l 水, 10 μ l 10 × STE, 5 μ l 10% SDS。加热至 68℃, 15 分钟。

(3) 酚/氯仿及氯仿各抽提两次。

(4) Sephadex G-50 离心柱层析 (方法见后文 5.4)。

(5) 乙醇沉淀。

(6) 加入下列试剂并混匀:

脱磷酸的 DNA 1 - 50 pmol

溶液 A 4 μ l

加水至 40 μ l

加热至 70℃, 然后迅速置冰浴中。

(7) 加入 5 μ l 10 × 平末端激酶缓冲液。

(8) 加入 50pmol (5 μ l) 以上 γ -³²P-ATP (3 000Ci/mmol)。

(9) 加入 20U T4 多核苷酸激酶。混匀, 37℃ 保温 30 分钟。

(10) 加入 2 μ l 0.5mol/L EDTA。

(11) 酚/氯仿抽提一次。乙醇沉淀。

(12) DNA 重溶于 50 μ l TE (pH7.6) 中。

(13) Sephadex G-50 柱层析, 分离标记的 DNA 探针 (方法 5.4)。

方法三: 5' 磷酸末端模板的交换反应标记法

试剂及仪器:

10 × 交换反应缓冲液:

0.5mol/L 盐酸咪唑 (imidazole·Cl) (pH6.6)

0.1mol/L MgCl₂

50mmol/L DTT

1mmol/L 亚精胺

1mmol/L EDTA

5mmol/L ADP

γ -³²P-ATP (3 000Ci/mmol, 10Ci/ μ l)

T4 多核苷酸激酶

其它各种实验室常规试剂及仪器

操作步骤:

(1) 加入下列试剂并混匀:

DNA (5' - PO ₄)	1 ~ 50 pmol
10 × 交换反应缓冲液	5 μl
5mmol/L ADP	3 μl
γ- ³² P - ATP	100pmol (30 μl)

加水至 50 μl

(2) 加入 1 μl (20U) T4 多核苷酸激酶。置 37℃ 保温 30 分钟。

(3) 加入 2 μl 0.5mol/L EDTA。

(4) 酚/氯仿抽提一次。

(5) 加入 5 μl 3mol/L 乙酸铵 (pH5.2), 乙醇沉淀。

(6) DNA 沉淀重溶于 50 μl TE (pH7.6)。

(7) Sephadex G - 50 柱层析 (方法见后文 5.4)。

注意事项:

(1) T4 多核苷酸激酶对多种杂质非常敏感, 如琼脂糖、NH₄⁺ 等。因此, 要特别注意 DNA 的纯度。大多数碱性磷酸酶是以硫酸铵悬液的形式提供的, 因此 DNA 样品在脱磷酸后要经过 Sephadex G - 50 柱层析, 否则铵离子会与 DNA 一起被乙醇沉淀下来。经乙醇沉淀后, 必须用 70% 乙醇反复洗涤。

(2) Harrison 等报道, 加入高浓度非特异性高分子多聚物 (如 polyethylene, glyco 8 000, Ficoll 70 等) 可提高激酶的活性。亚精胺不但可促进 γ - ³²P - ATP 的掺入, 还可抑制某些多核苷酸激酶制剂中可能存在的核酸酶活性。

(3) 脱磷酸的 DNA 样品最好经电泳纯化以除去其中存在的低分子量核酸, 因为它们的存在会提供大量 5' 末端, 竞争性地抑制 DNA 的标记。

适用范围:

可用于单链及双链 DNA 和 RNA 样品的 5' 末端标记。此方法较少用作制备核酸分子杂交探针, 主要用于核酸序列测定时的末端标记。

5.2.6.4 末端脱氧核苷酰转移酶标记法

末端脱氧核苷酰转移酶 (terminal deoxynucleotidyl transferase, 简称末端转移酶) 催化 dNTP 在单链 DNA 3' 末端的多聚化。在 Co²⁺ 替代正常的辅助因子 Mg²⁺ 存在的情况下, 也可利用双链 DNA 作为底物 (图 5-16)。



图 5-16 利用末端转移酶进行 DNA 3' 末端标记

本法的缺点是不能控制增加核苷酸的数量, 使得到的标记产物长度不均一。因此近年来发展了以 α - ³²P - ddNTP 为底物, 用末端转移酶对 DNA 进行标记的方法。双脱氧核苷酸的掺入, 使 DNA 的 3' - 末端仅增加了一个无 3' - OH 的核苷酸, 而进一步的聚合反应不能继续下去, 从而得到末端都只延伸了一个核苷酸的均一的标记 DNA, 此改进后的方法使 DNA 的 3' 末端标记比 5' 末端标记更简便易行。

5.2.6.5 单末端选择性标记法

在多种试验方法中 (如 Maxam - Gilbert 化学测序法, DNase I 足纹法等) 都需要一种单末端标记的 DNA 探针。所谓单末端标记是指选择性地仅将双链 DNA 片段中一条链的一个末端 (3' 或 5') 标记, 而另一单链不被标记。

有以下几种方案可用于 DNA 单末端标记:

(1) 如 5.2.6.1 和 5.2.6.2 所述, 根据 DNA 片段两粘性末端所含碱基的不同, 选用适当的标记核苷酸可将其一条单链标记。

(2) DNA 片段首先进行 3' 或 5' 末端标记, 然后选用适当的限制性内切酶, 在片段的中间切断, 分离两 DNA 片段, 亦可得到单末端标记的 DNA 探针。

(3) 利用双脱氧核苷酸进行单末端标记。如 Bgl II 和 EcoR I 消化产生的粘性末端分别为 3' - CTAG - 5' 和 3' - TTAA - 5', 可选用 α - 32 P - dTTP 同时加入双脱氧 CTP (ddCTP, dideoxy CTP), 选择性地将 EcoR I 末端标记, 而 Bgl II 末端可按方法 (1) 进行选择标记。

5.2.7 寡核苷酸探针的标记

人工合成的寡核苷酸片段作为分子杂交的探针已日益为更多的研究者所青睐。利用寡核苷酸探针可以检测到靶基因上单个核苷酸的点突变。

上文所介绍的 DNA 末端标记法大多可以用于寡核苷酸探针的末端标记。但由于寡核苷酸探针的特殊性, 现将主要注意事项分述如下。

5.2.7.1 T4 多核苷酸激酶标记法

标准反应条件如下:

- (1) 100ng 寡核苷酸溶于 30 μ l 水中。置 65℃ 变性 5 分钟, 迅速置冰浴中。
- (2) 加入 5 μ l 10 \times 激酶缓冲液 (0.5mol/L Tris·Cl, pH7.5, 0.1mol/L MgCl₂, 50mmol/L DTT, 1mmol/L 亚精胺, 1mmol/L EDTA)。
- (3) 加入 100 μ Ci γ - 32 P - ATP (7 000Ci/mmol)。
- (4) 加入 2 μ l T4 多核苷酸激酶 (10U/ μ l)。
- (5) 加水至 50 μ l, 混匀。
- (6) 置 37℃ 水浴 20 分钟。
- (7) 再加入 20U T4 多核苷酸激酶, 置 37℃ 水浴 20 分钟。
- (8) 置冰浴中。
- (9) Sephadex G - 50 柱层析。

此方法的缺点是在每个探针的 5' 末端多加了一个磷酸, 理论上, 这会影响其与 DNA 的杂交。因此, 有人建议使用 Klenow DNA 聚合酶的链延伸法获得高放射活性的寡核苷酸探针。

5.2.7.2 Klenow DNA 聚合酶标记法

对于带粘性末端的双链寡核苷酸可利用 Klenow DNA 聚合酶的填充反应进行末端标记。而对于单链寡核苷酸, 则可预先合成一小段 (如 8 - mer) 与此探针互补的寡核苷酸作为引物, 然后利用 Klenow DNA 聚合酶的链延伸反应获得标记的寡核苷酸探针。此法的特点是模板 DNA 与标记的 DNA 探针的长度不相同。因此如果需要的话, 可采用电泳方法将它们分离开来。

5.2.7.3 末端转移酶 (terminal deoxynucleotidyl transferase) 标记法

标准反应:

- (1) 10ng 寡核苷酸溶于 10 μ l 反应液中 (100mmol/L potassium cacodylate, pH7.0, 1mmol/L CoCl₂, 1mmol/L β - mercaptoethanol, 200 μ Ci α - 32 P - dATP, 5 000Ci/mmol, 100 μ g/ml BSA, 20U 末端转移酶), 置 37℃ 水浴 60 分钟。
- (2) 置 65℃ 水浴 5 分钟终止反应。冰浴冷却。用 oligo (dT) - cellulose 层析法纯化加尾的寡核苷酸探针。

此法制备的标记寡核苷酸可适用于克隆筛选点突变分析及细胞原位杂交等, 其缺点是片段长度不均一; 在进行杂交时必须将样品用过量的 poly (A) 或 poly (dT) 预杂交。优点是标记活性高, 可达 1×10^{10} cpm/ μ g 以上。

5.2.8 碘放射性核素标记法

目前碘放射性核素 (^{125}I 和 ^{131}I) 标记法已极少被采用, 本文仅做简要介绍。

5.2.8.1 酶促标记法

放射性碘标记的 dCTP 和 CTP 是大肠杆菌 DNA 聚合酶 I、反转录酶及 DNA 聚合酶的良好底物, 可以如上所介绍的 ^{32}P 标记的核苷酸一样采用酶促方法进行探针的标记。应注意的是, 放射性碘是标记在胞嘧啶碱基上, 因此不能像 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ 那样用多核苷酸激酶进行探针的末端标记。

5.2.8.2 DNA 直接标记法

碘化钠在适当的温度和 pH 条件下, 在氧化剂 TiCl_3 (三氯化钛, thalium trichloride) 的存在下, 可以转变为碘 I_2 和 IOH , 后者可与核酸分子中的胞嘧啶碱基共价结合。

操作方法:

(1) 核酸片段 ($3\sim 1\,000\mu\text{mol/L}$ 胞嘧啶) 与 $30\sim 100\mu\text{mol/L}$ 放射性碘盐在适量的缓冲液中 (碘盐浓度 $4\sim 10$ 倍的三氯化钛, $30\sim 200\text{mmol/L}$ 乙酸钠缓冲液, $\text{pH}4.7$) 共热至 60°C , $5\sim 20$ 分钟。

(2) 调节 pH 至 $7\sim 8$, 并继续在 60°C 保温 $20\sim 30$ 分钟。

注意第一步反应中缓冲液的 pH 要求较严格, 如 $\text{pH} > 5.5$ 则碘化反应不能进行; 如小于 4.5 则会导致 DNA 的脱嘌呤。第二步反应的目的是使在第一步反应中形成的不稳定反应产物转化为稳定的 5-碘胞嘧啶。

加入 5.8mol/L NaClO_4 可使 DNA 双链部分解链, 从而使标记更均匀。但 DMSO 等变性剂由于会干扰碘化反应则不可以使用。

5.2.8.3 RNA 的直接标记法

RNA 的碘同位素标记法与 DNA 标记法基本相同, 但由于在 pH 大于 7 时加热会导致 RNA 的不稳定, 因此有人不进行第二步的加热反应。在第一步的加热反应中可加入 $10\mu\text{g/ml}$ 肝素钠作为 RNA 酶抑制剂。

5.3 非放射性标记法

按照标记方法的不同, 现有的非放射性标记物主要有两种类型, 一种是预先已连接在 NTP 或 dNTP 上, 因此可像放射性核素标记的核苷酸一样用酶促聚合方法掺入到核酸探针上, 如生物素、地高辛等; 另一类是直接与核酸进行化学反应而连接在核酸上。此后一类标记物标记过程更为简单, 可能是今后研究发展的主流。

目前应用最广的非放射性标记物是生物素 (biotin)。生物素是一种小分子水溶性维生素, 通过一条碳链臂, 可与 UTP 或 dUTP 嘧啶环的 5 位碳相连。生物素与尿嘧啶 5 位碳的相连不会影响其通过氢键形成碱基配对的能力与特异性, 而且仍然是许多 DNA 修饰酶的良好底物。此碳链臂可长可短, 但臂长为 16 或 11 个原子时, 其随后的检测效果较臂长为 4 个原子的效果为佳 (图 5-17)。

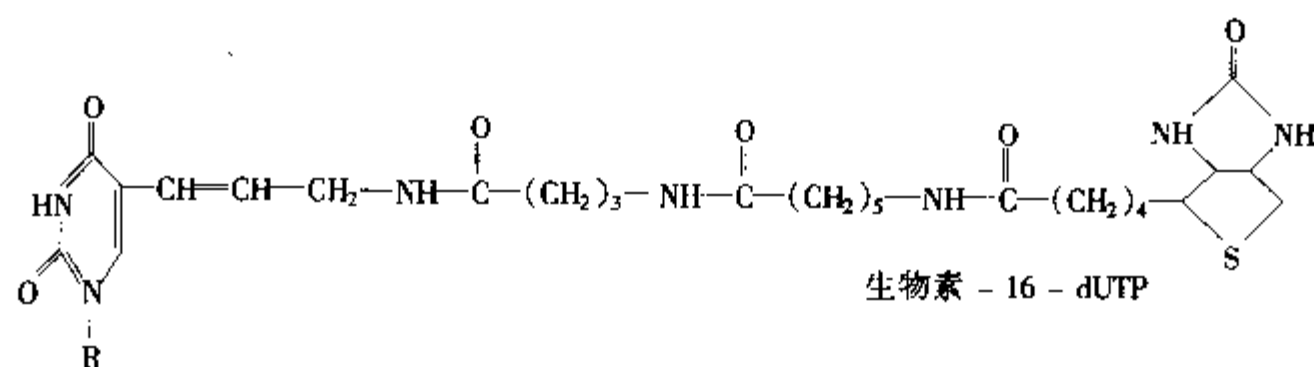


图 5-17 生物素 - UTP 的结构

除 dUTP 外, 一系列生物素标记的 dATP 和 dCTP 也已被研制和应用。

德国 Boehringer Mannheim 公司生产的地高辛 (digoxigenin) 标记物也已被逐步推广使用。

5.3.1 酶促标记法

生物素和地高辛标记的 dNTP 可以完全像放射性核素标记的 dNTP 一样, 用多种酶促方法 (如切口平移法、随机引物法及末端转移酶末端标记法等) 进行核酸探针 (包括 DNA、RNA 和寡核苷酸探针) 的标记。由于操作方法与前文所介绍的放射性核素标记法基本相同, 不再赘述。但要注意, 由于生物素等标记物是连接在碱基上, 而不是磷酸基团, 因此不能用多核苷酸激酶法进行末端标记。

5.3.2 化学标记法

酶促标记方法最大的缺点是需根据不同的需要选用不同的标记核苷酸底物和不同的酶, 并且当需要大量的核酸探针时, 耗费极巨。而化学标记方法则简单迅捷, 价格低廉。当然, 不同的标记物其标记方法亦不同, 本文仅简要介绍其标记原理, 具体操作方法按厂家使用说明书进行。

5.3.2.1 N - Acetoxy - N - 2 - Acetylaminofluorene (AAF)

此化合物是第一种被采用的用化学标记法标记的非放射性标记物。AAF 可在 37℃ 中性 pH 下迅速与单链及双链 RNA 或 DNA 反应 (主要部位是鸟嘌呤的 C8 位, 如图 5-18)。可用此化合物的特异抗体和酶联第二抗体进行间接酶联免疫检测法检测。可用于 Southern、原位、斑点杂交及克隆筛选。标记的探针至少在 6 个月内是稳定的。但此化合物是一种致癌物, 使用时要特别注意。

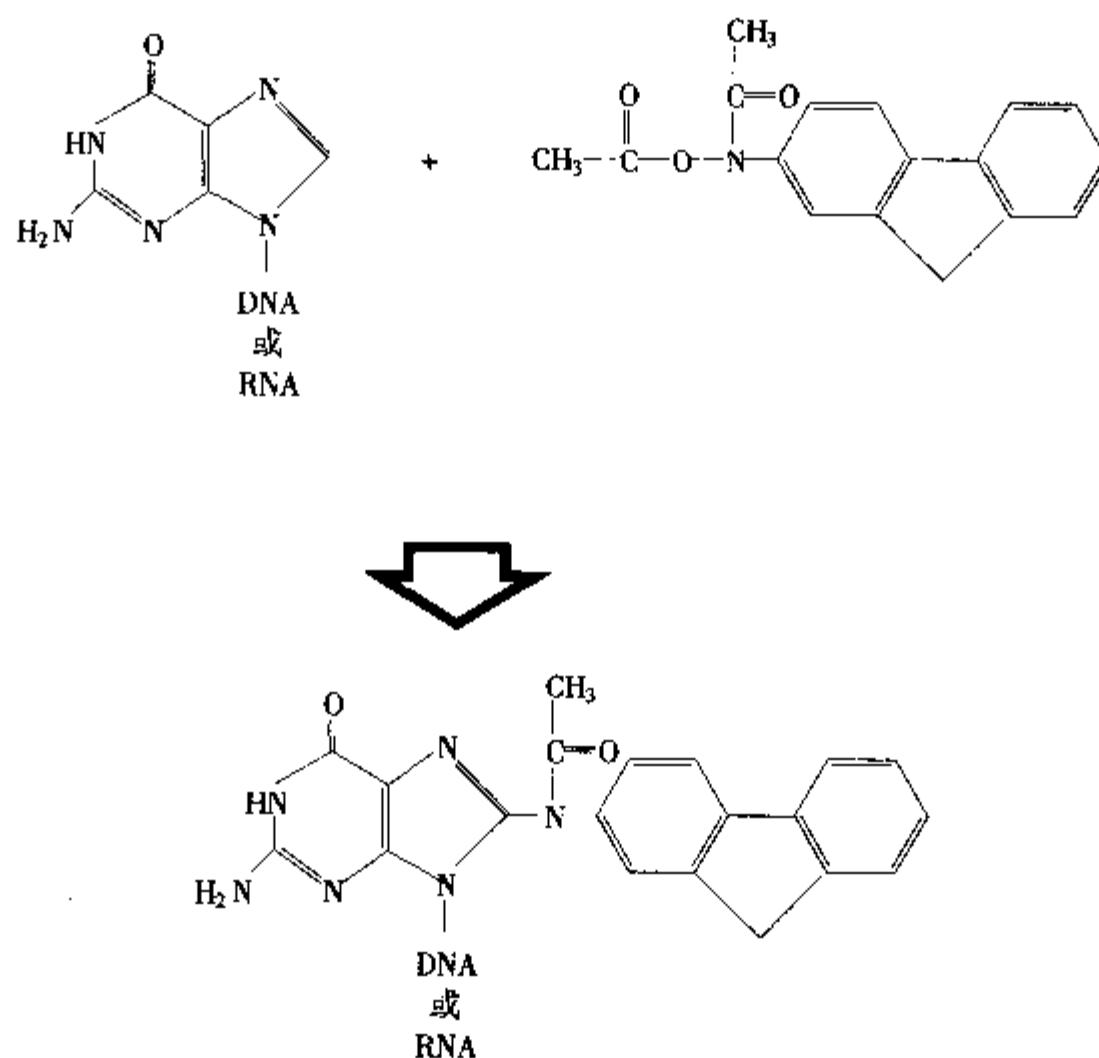


图 5-18 AAF 标记原理示意图

5.3.2.2 生物素的化学标记法

由于生物素已被广泛认可为较理想的非放射性标记物, 然而酶促标记操作复杂, 价格昂贵, 因此有人设计了一系列方法直接将生物素标记到核酸探针上。其主要思路是: 将生物素与另一类化学性质较活泼的基团相连, 在特定的条件下使活泼基团活化而与核苷酸特定部位共价结合。下面介绍几种此类化合

物:

1. 光敏生物素 (photobiotin):

其结构如图 5-19。

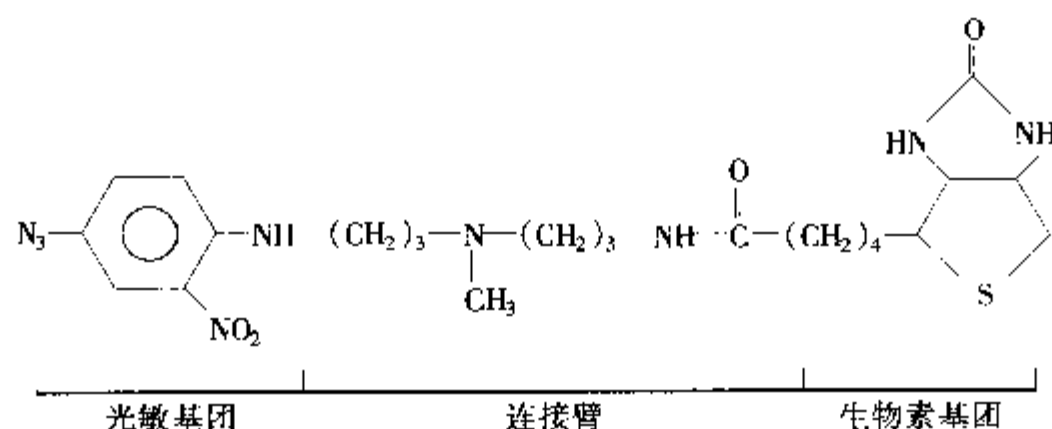


图 5-19 光敏生物素结构

Photobiotin 与核酸探针混合后,在一定条件下强可见光照射 10~20 分钟后,即可与核酸共价相连,成为生物素标记的核酸探针。单链及双链 DNA 及 RNA 均可被标记,探针可在 -20℃ 下保存 8~10 个月以上。

试剂及仪器:

photobiotin: 在暗室中,向 500 μ g 包装的 photobiotin 中加入 500 μ l 消毒水,使完全溶解。按每管 100 μ l 分装,置暗室中于 -20℃ 保存(可保存 4 个月)

300~500W 汞灯或钨灯

其它实验室常规仪器及试剂

操作步骤:

(1) 双链 DNA 必须线性化或用 NaOH 处理形成缺口,单链 DNA 或 RNA 毋需处理。样品必须溶于水中。不要含 Tris,因为 Tris 所含的氨基会干扰标记。

(2) 暗室下在微量离心管中加入:

DNA (带缺口)	10 μ g
1mg/ml photobiotin	20 μ l
加水至 50 μ l	

混匀。

(3) 离心管置冰浴中,打开离心管盖,在 300~500W 灯下照射 10 分钟(液面离灯泡 10cm)。

(4) 加入 100 μ l 0.1mol/L Tris·Cl (pH8.0)。

(5) 加入 100 μ l 2-丁醇抽提两次,离心,弃上层 2-丁醇。

(6) 乙醇沉淀。70%乙醇漂洗。真空抽干。

注意事项:

(1) 样品 DNA 要纯,不要含有蛋白,不要用 Tris 溶液溶解。

(2) 此法只适于大于 200nt 的核酸片段的标记,小片段标记效率不高。

(3) 标记反应规模可按比例增减,每 1 μ gDNA 需加入 2 μ g 光敏生物素。

2. 生物素 Psoralen 衍生物 (biotinlated psoralen):

此化合物结构如图 5-20A。其标记程序为:用限制性内切酶将不含插入序列的 RF 型 M13 DNA 线性化,然后与含有插入序列的环状单链 M13 DNA 退火杂交。此带有缺口的 DNA 杂交体在适当的条件下(紫外线照射)可与生物素标记的 Psoralen 反应而在 DNA 双链间形成共价结合,形成生物素标记的 DNA 探针。其中的插入序列保持单链,可与靶基因杂交,而生物素则可用亲和法或免疫法检测(图 5-20B)。

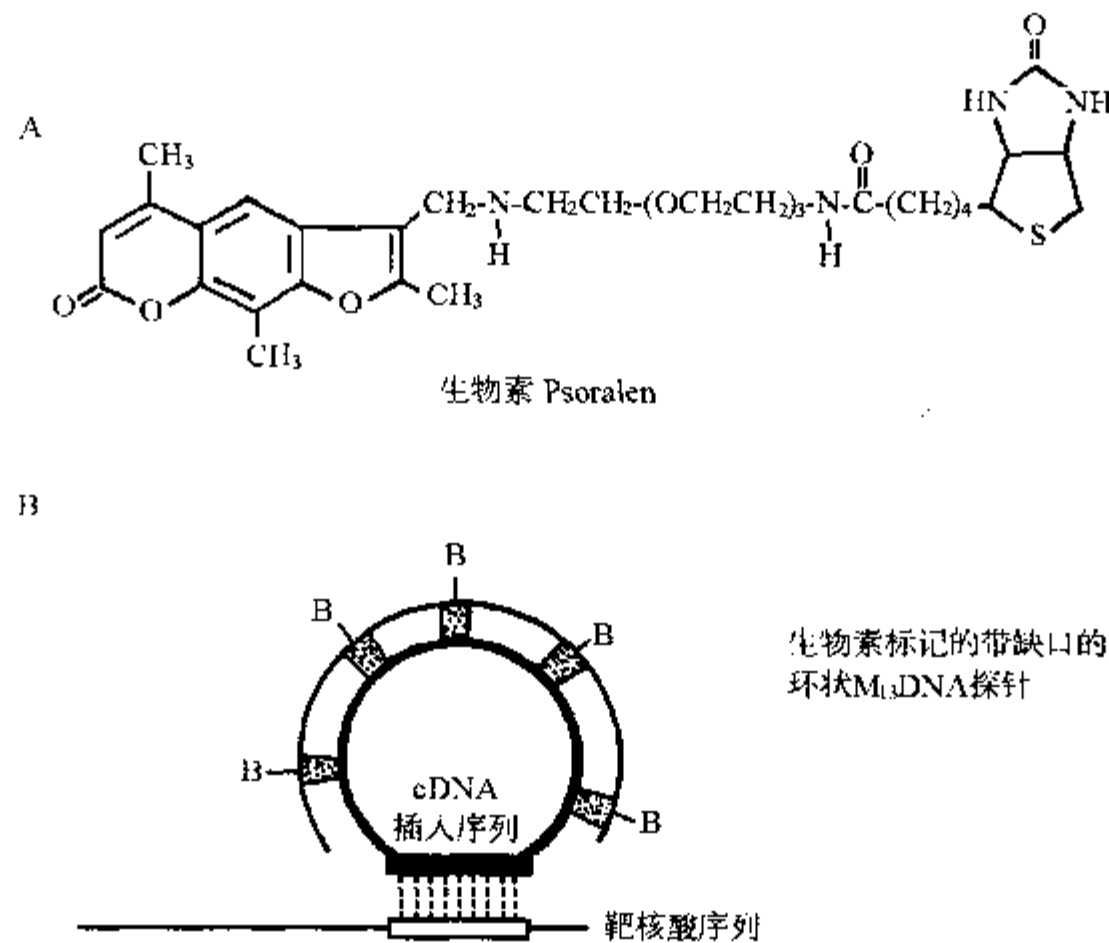


图 5-20 Biotinylated Psoralen 标记法

此法灵敏度较高，在 Southern 杂交中能检测出 $0.5\mu\text{g}$ 人基因组 DNA 中的单拷贝基因。

3. 胞嘧啶生物素标记法：

基本原理如图 5-21 所示。单链核酸中的胞嘧啶在亚硫酸氢钠 (sodium bisulphite) 的作用下形成亚硫酸化中间物，然后与乙二胺发生转氨基作用而形成胞嘧啶胺类衍生物，此衍生物再与生物素酯反应形成生物素酰胺衍生物。

此法只适于单链 DNA 探针的标记。

4. 生物素肼标记法：

生物素肼 (biotin hydrazine) 在磺酸的催化下与单链核酸中的胞嘧啶反应，形成 N⁴-位生物素标记的胞嘧啶衍生物 (图 5-22)。

5. 交叉相连法 (cross-linking protocol)：

利用一些高分子化合物 (如细胞色素 C、组蛋白 H1 及 *E. coli* 单链结合蛋白等) 能与核酸结合的特性，可用来制备非放射性标记的探针。生物素标记的这些高分子蛋白质首先与聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, 分子量 60 000 和 1 400 等) 交联而带上大量正电荷。带负电荷的 DNA 探针可与这种蛋白质相互作用，然后在交联剂 (如甲醛、戊二醛) 的作用下，使蛋白质与 DNA 探针共价交连 (图 5-23)。这种单链 DNA-蛋白质复合物仍可作为分子杂交的探针。

5.3.2.3 磺化 (sulfonation) 法

单链 DNA 与 1mol/L NaHSO_3 和 1mol/L 甲基氢氧化铵 (methyl hydroxylamine) 反应形成 N⁴-methoxy-5, 6-dihydrocytosine-6-sulfonate 衍生物，然后用免疫法检测。

5.3.2.4 汞化 (mercuration) 法

在嘧啶碱基 C6 位引入汞，杂交后，再在汞上引入配体或半抗原 (如生物素等) (图 5-24)。

5.3.2.5 酶的直接交联法

将辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶通过化学方法直接交联到核酸探针上。Amersham 公司产品 ECL 即是 将辣根过氧化物酶直接标记到探针分子上，然后通过 HRP 的酶促活性进行化学发光法检测。

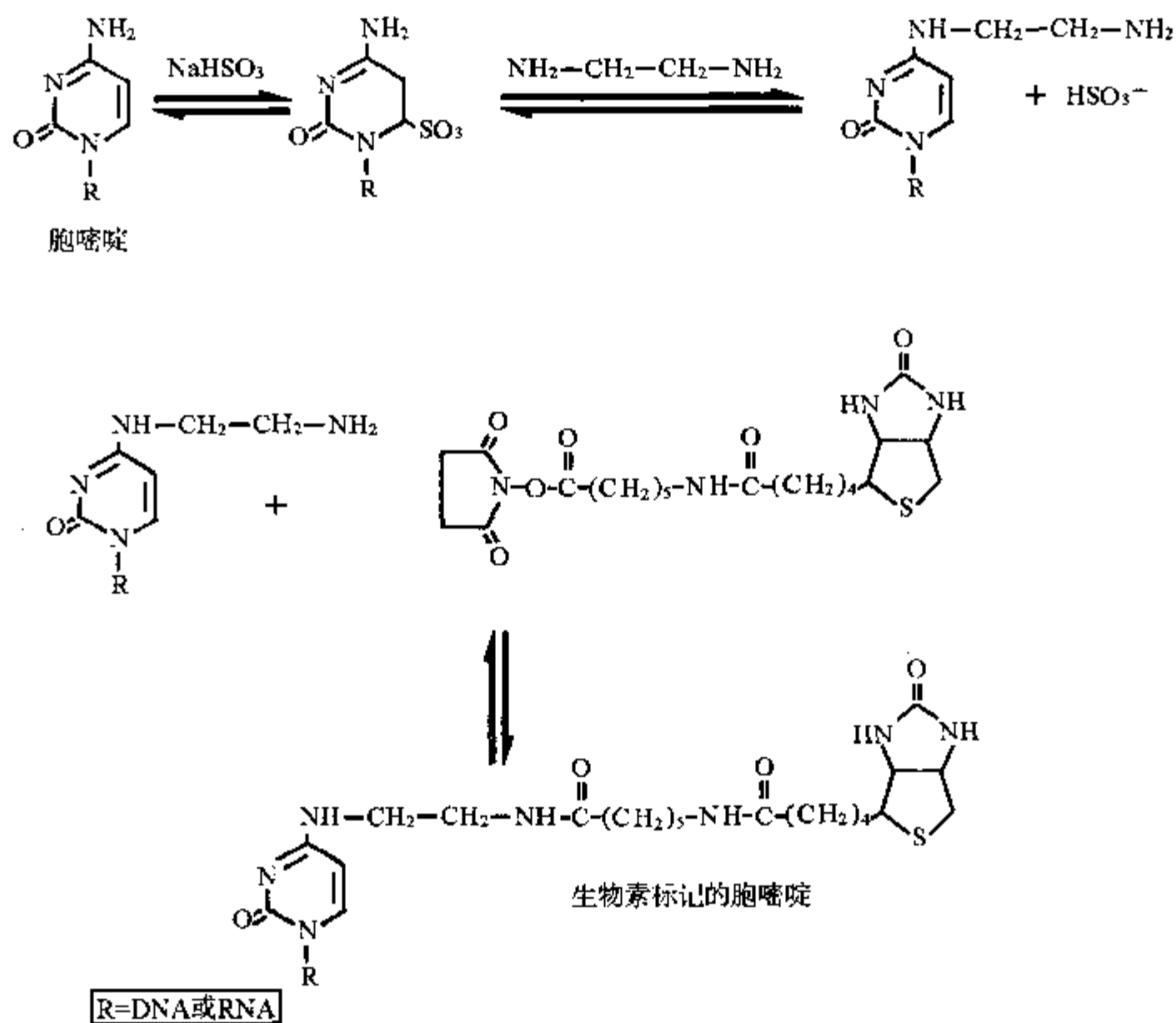


图 5-21 胞嘧啶生物素标记法

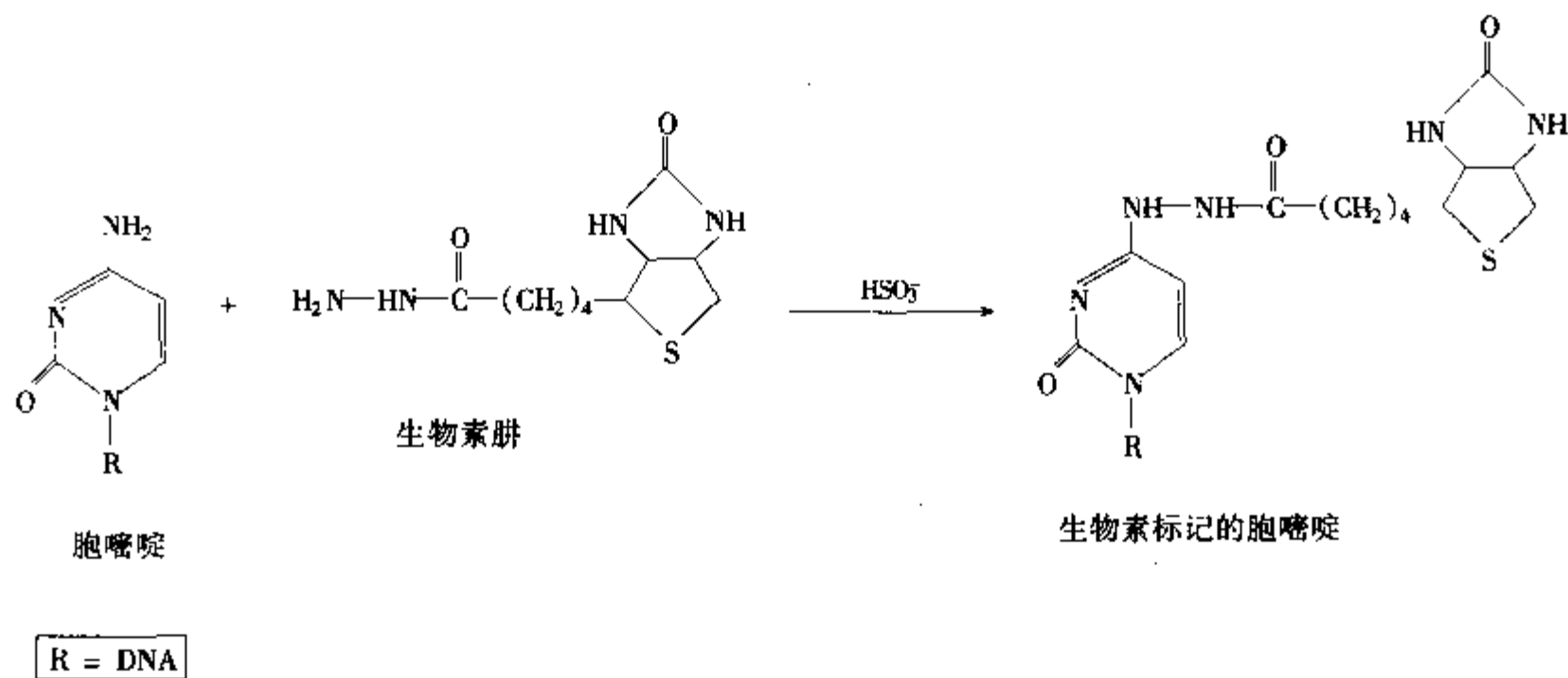


图 5-22 生物素肼标记法

此法的优点是可用不同的酶标记不同的探针，在同一个样品上同时检测两种不同的靶基因。

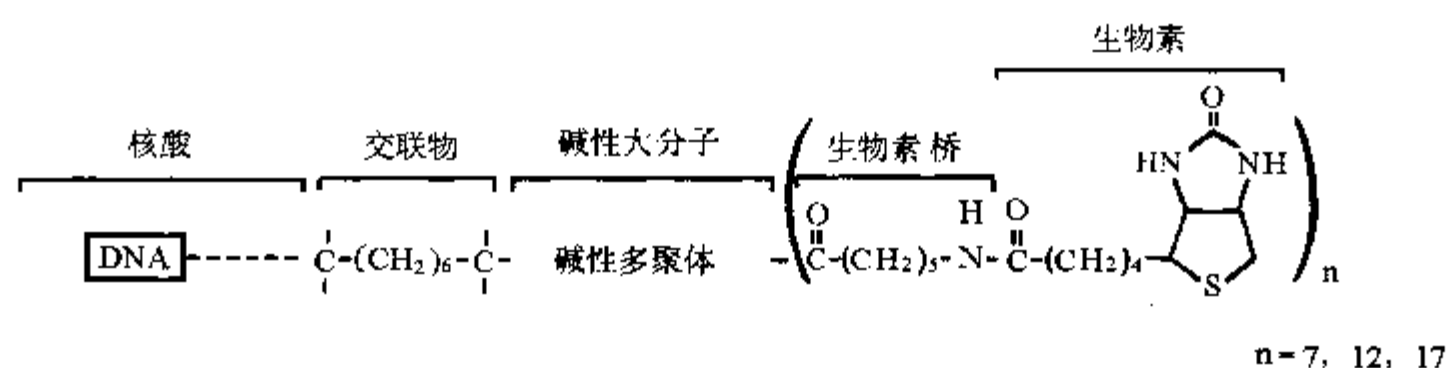


图 5-23 生物素交叉相连标记法

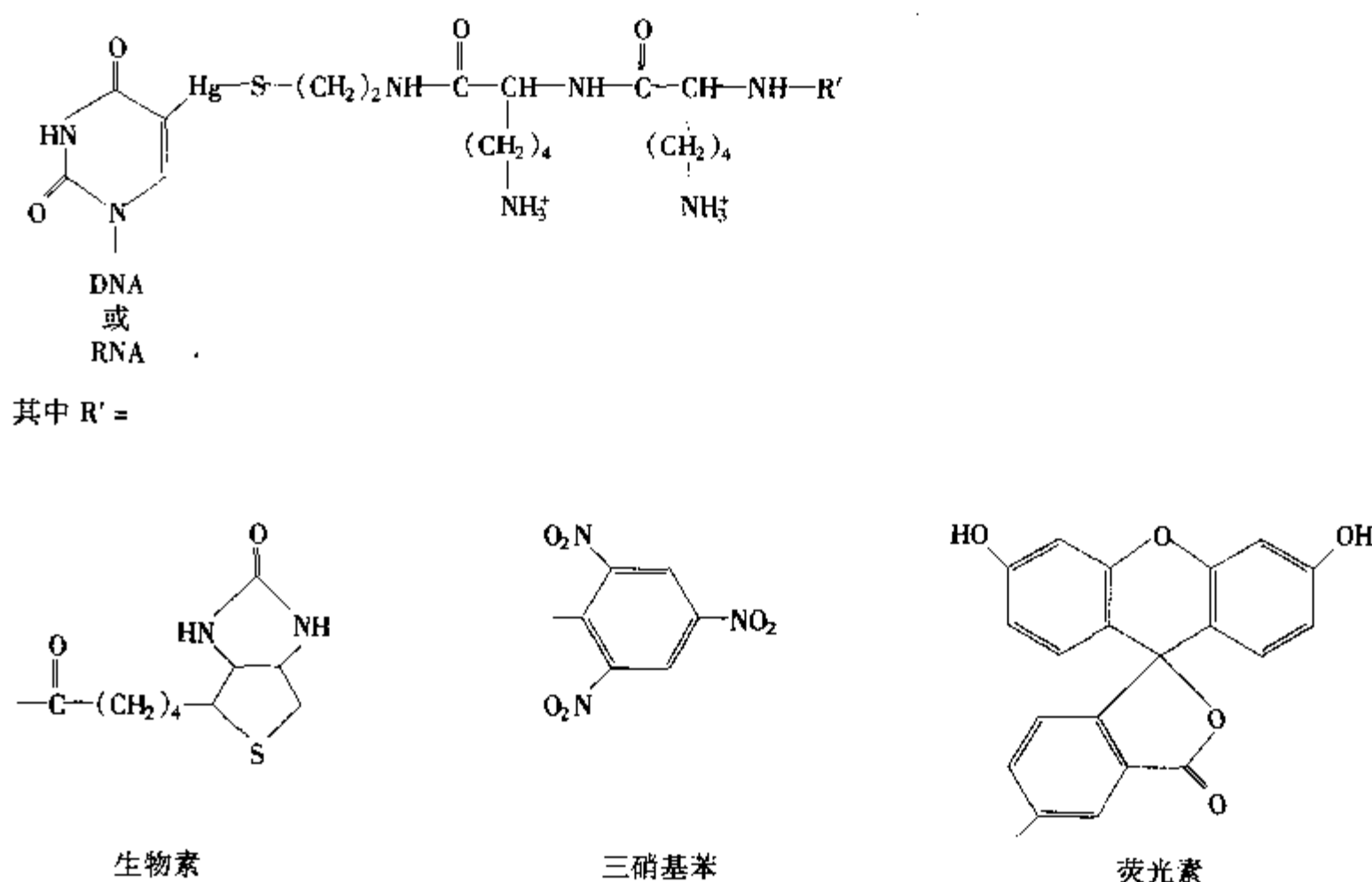


图 5-24 汞化标记法

5.4 探针的纯化

DNA 探针标记反应结束后，反应液中仍存在未掺入到 DNA 中去的 dNTP 等小分子。如不将之去除，有时会干扰下一步反应。

5.4.1 凝胶过滤柱层析法

利用凝胶的分子筛作用，将大分子 DNA 和小分子 dNTP、磷酸根离子及寡核苷酸 (<80bp) 等分离。大分子 DNA 流出，而小分子则滞留于凝胶层析柱中。常用的凝胶基质是 Sephadex G-50 和 Bio-Gel P-60。

5.4.1.1 Sephadex G-50 柱层析法

试剂及仪器：

Sephadex G-50

层析柱 (可用 5ml 吸管代替)

STE 缓冲液:

10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

1mmol/L EDTA (pH8.0)

100mmol/L NaCl

盖革计数器

操作步骤:

(1) 将 10g Sephadex G-50 加入到 500ml TE 中, 待其充分膨胀后, 弃上清。换新鲜 TE 缓冲液, 静置过夜, 或 15bf/in^2 ($1.034 \times 10^5 \text{ Pa}$) 高压灭菌 15 分钟。

(2) 取一 5ml 玻璃或塑料吸管, 管口用硅化的玻璃纤维塞住。

(3) 在吸管中装填 Sephadex G-50 凝胶。用数倍床体积 STE 缓冲液洗柱。

(4) 将标记的 DNA 样品上样于层析柱上, 待样品进入凝胶后, 补加 STE 缓冲液。

(5) 收集流出液, 每管 $200\mu\text{l}$ 。随时添加 STE 缓冲液, 可用盖革计数器监测放射性物质的进程。DNA 存在于第一个放射性峰中, 而后一放射性高峰为未掺入 DNA 分子中去的 dNTP。

(6) 合并第一放射性峰流出液, -20°C 保存。如体积过大, 可乙醇沉淀。

5.4.1.2 离心柱层析 (spun column chromatography)

试剂及仪器:

1ml 一次性注射器

低速离心机 (甩平头)

余同上法

操作步骤:

(1) 取 1ml 一次性注射器, 去除内芯推杆。在注射器底部用硅化的玻璃纤维塞住。

(2) 在注射器中装填 Sephadex G-50 凝胶。

(3) 将注射器放入一支 10~15ml 离心管中, 注射器把手架在离心管口上。置台式离心机甩平头上, $1600g$ 离心 4 分钟。凝胶将被压紧, 应继续补加 Sephadex G-50 凝胶悬液。重复此步骤, 直至凝胶柱高度达注射器 0.9ml 刻度处。

(4) 用 $100\mu\text{l}$ STE 缓冲液洗柱, $1600g$ 离心 4 分钟。重复 2 次。

(5) 弃去离心管中的流出液。将一去盖的 1.5ml 微量离心管置于此离心管中, 然后将装填了 Sephadex G-50 凝胶的注射器插入离心管中, 注射器口对准微量离心管 (图 5-25)。

(6) 标记的 DNA 样品用 STE 稀释至 $100\mu\text{l}$, 上样于层析柱上。

(7) $1600g$ 离心 4 分钟。DNA 将流出被收集在去盖的离心管中, 而未掺入 DNA 的 dNTP 则保留在层析柱中。

注意事项:

有些凝胶不能用于此法。如 DEAE-Sephacel 在离心后堆积起来, DNA 分子不能穿透; Sephadex G-100 以上的凝胶在离心后会被压碎。

5.4.2 反相柱层析法

反相层析法是一种分离效果极好的层析方法。下面介绍的是一种商品化的反相层析柱 - Nensorb 柱。

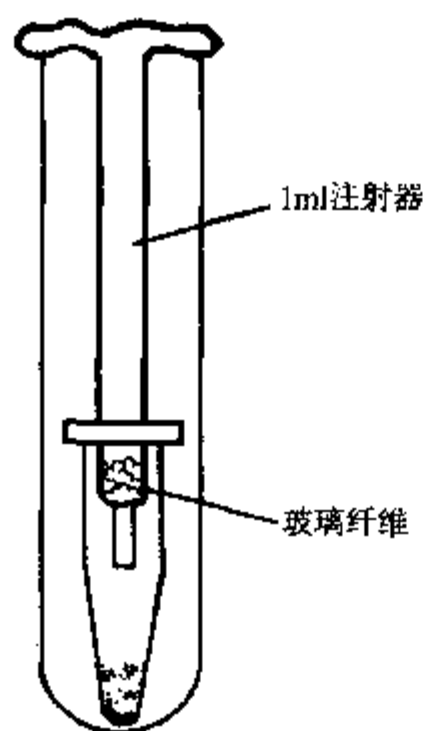


图 5-25 离心柱层析示意图

试剂及仪器:

Nensorb 柱 (DuPont 产品)

甲醇

0.1mol/L Tris·Cl (pH8.0)

注射器

操作步骤:

- (1) 将注射器套在 Nensorb 柱上, 吸取 1ml 甲醇洗柱, 活化树脂。
- (2) 用 2ml 0.1mol/L Tris·Cl (pH8.0) 平衡层析柱。
- (3) DNA 样品用 0.1mol/L Tris·Cl (pH8.0) 稀释至 1ml, 推过层析柱。收集流出液重新过柱 1 次。
- (4) 用 2ml 0.1 mol/L Tris·Cl (pH8.0) 洗柱。
- (5) 用 2ml 水洗柱。
- (6) 用 0.5ml 50% 乙醇洗脱层析柱, 收集流出液。
- (7) 乙醇或异丙醇沉淀。70% 乙醇洗涤。DNA 沉淀重溶于 TE 中。

注意事项:

- (1) 在每步洗柱过程中, 不要使柱干涸, 要保留部分液体不进入凝胶。树脂活化后, 即不可接触空气, 否则会影响产率。
- (2) 每个层析柱可结合 20 μ g DNA 和蛋白质。

5.4.3 乙醇沉淀法

DNA 可被乙醇沉淀, 而未掺入 DNA 的 dNTP 则保留于上清中, 因此, 反复乙醇沉淀可将两者分离。

用 2mol/L 乙酸铵和乙醇沉淀效果较好, 连续沉淀两次, 可去除 99% 的 dNTP。蛋白质在此条件下多不会被沉淀。

如 DNA 浓度较稀 ($< 10\mu\text{g/ml}$), 可加入 10 μg 酵母 tRNA 共沉淀。

5.5 探针比放射活性的测定**5.5.1 三氯乙酸沉淀法****5.5.1.1 抽滤法****试剂及仪器:**

10% TCA (三氯乙酸)

玻璃纤维滤膜 (Whatman GF/C)

500 $\mu\text{g/ml}$ 鲑精 DNA (溶于 20mmol/L EDTA)

抽滤器

闪烁液

液体闪烁计数器

操作步骤:

- (1) 标记反应结束后, 取适量样品, 并等分为两份。
- (2) 取其中一份点在一块玻璃纤维膜上, 使干燥。此膜用于测量总放射活性。
- (3) 将另一份样品加入至 100 μl 500 $\mu\text{g/ml}$ 鲑精 DNA 溶液中。加入 5ml 冰冷的 10% TCA 溶液。混匀。置冰浴中 15 分钟。
- (4) 将此溶液通过玻璃纤维滤膜负压抽滤。用 5ml 10% TCA 抽滤洗滤膜 6 次。5ml 95% 乙醇洗 1 次。

(5) 两张滤膜干燥后, 分别置含闪烁液的闪烁瓶中, 液体闪烁计数器上计数每分钟脉冲数 (cpm)。

(6) 比较两者的计数值, 计算掺入率和比放射活性。

$$\text{掺入率 (\%)} = \frac{\text{洗涤膜的计数值 (cpm)}}{\text{未洗涤膜的计数值 (cpm)}} \times 100\%$$

$$\text{已掺入总计数 (cpm)} = \text{洗涤膜的计数值 (cpm)} \times \text{稀释倍数}$$

$$\text{比放射活性 (cpm/\mu gDNA)} = \frac{\text{已掺入计数总量 (cpm)}}{\text{DNA 总含量 (\mu g)}}$$

5.5.1.2 漂洗法

试剂及仪器:

洗膜液:

5% TCA

20mmol/L 焦磷酸钠

余同上法

操作步骤:

(1) 取 DNA 样品, 等份分别点样于两张玻璃纤维素膜上。使干燥。

(2) 将其中一张滤膜置于 200 ~ 300ml 冰冷的洗膜液中, 摇晃 2 分钟。转至另一盛冰冷洗膜液的容器中洗涤。重复此步骤 2 次。

(3) 滤膜转至 70% 乙醇中漂洗片刻, 使干燥。

(4) 按上述同样方法进行液闪计数, 并计算掺入率和比放射活性。

5.5.2 DE-81 滤膜吸附法

DE-81 滤膜带正电荷, 可吸附核酸, 对 TCA 不能有效沉淀的寡核苷酸亦能吸附; 而对未掺入的 dNTP 的吸附则不牢, 可用大量 0.5mol/L Na_2HPO_4 (pH7.4) 将之洗脱下来。操作方法与 TCA 漂洗法基本相同。只需将上述 Na_2HPO_4 溶液代替 TCA/焦磷酸钠洗膜液即可。

(胡晓年 文 方福德 审)

参 考 文 献

- [1] Symons RH. Nucleic Acid Probes. CRC Press, 1989
- [2] Keller GH, et al. DNA Probes. Stockton Press, 1989
- [3] Sambrook J, et al. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [4] Winnacker EL. From Genes to Clones: Introduction to Gene Technology. VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1987

6. 核酸分子杂交

核酸分子杂交技术是分子生物学领域中最常用的基本技术方法之一。其基本原理是：具有一定同源性的两条核酸单链在一定的条件下（适宜的温度及离子强度等）可按碱基互补原则退火形成双链。此杂交过程是高度特异性的。

杂交的双方是待测核酸序列及探针。待测核酸序列可以是克隆的基因片段，也可以是未克隆化的基因组 DNA 和细胞总 RNA。将核酸从细胞中分离纯化后可以在体外与探针杂交（膜上印迹杂交），也可直接在细胞内进行（细胞原位杂交）。

用于检测的已知核酸片段称之为探针（probe）。为了便于示踪，探针必须用一定的手段加以标记，以利于随后的检测。常用的标记物是放射性核素，近年来也发展了一些非放射性标记物。检测这些标记物的方法都是极其灵敏的。

由于核酸分子杂交的高度特异性及检测方法的高度灵敏性，使得核酸分子杂交技术在分子生物学领域中被广泛应用于基因克隆的筛选和酶切图谱制作、基因组中特定基因序列的定量和定性检测、基因突变分析以及疾病的诊断等方面。它的应用也大大推进了分子生物学的迅猛发展。分子生物学得以发展到今天这种水平，核酸分子杂交技术起着重要的作用。

本章重点介绍固相杂交（包括膜上印迹杂交和细胞原位杂交）的基本原理和方法及操作注意事项。对液相杂交仅作简要介绍。

6.1 膜上印迹杂交

膜上印迹杂交是指将待测核酸序列片段结合到一定的固相支持物上，然后与存在于液相中标记的核酸探针进行杂交的过程，是目前最常用的一种核酸分子杂交方法。其操作基本流程是：首先用凝胶电泳方法将待测核酸片段分离，然后用印迹技术将分离的核酸片段转移到特异的固相支持物上，转移后的核酸片段将保持其原来的相对位置不变。再用标记的核酸探针与固相支持物上的核酸片段进行杂交。最后洗去未杂交的游离的探针分子，通过放射自显影等检测方法显示标记的探针的位置。由于探针已与待测核酸片段中的同源序列形成杂交分子，探针分子显示的位置及其量的多少，则反映出待测核酸分子中是否存在相应的基因顺序及其量与大小。

6.1.1 印迹技术

印迹技术是指将待测核酸分子结合到一定的固相支持物上的方法，这些结合在固相支持物上的核酸分子即可与存在于液相中的探针分子进行杂交。

选择良好的固相支持物与有效的转移方法是此项技术成败的两个关键因素。

1. 固相支持物的选择：

固相支持物的种类很多。一种良好的固相支持物应具备以下几个特性：①具有较强的结合核酸分子的能力，一般要求每平方厘米结合核酸分子的量不应低于 $10\mu\text{g}$ ，最好能达到数十微克；②与核酸分子结合后，应不影响其与探针分子的杂交反应；③与核酸分子的结合稳定牢固，能经受杂交、洗膜等操作过程而不至于脱落或脱落极少；④非特异性吸附少，在洗膜条件下能将非特异性吸附在其表面的探针分子洗脱掉；⑤具有良好的机械性能，如柔软性好、韧性强等，以便于操作。以下介绍最常用的几种固相支持物。

(1) 硝酸纤维素滤膜 (nitrocellulose filter membrane): 硝酸纤维素滤膜具有较强的吸附单链 DNA 和 RNA 的能力, 特别是在高盐浓度下, 其结合能力可达 $80 \sim 100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。吸附的单链 DNA 或 RNA 经真空中烘烤后, 依靠疏水性相互作用而结合在硝酸纤维素膜上。另外, 硝酸纤维素膜还具有杂交信号本底较低的优点。因此被广泛应用于 Southern、Northern、斑点印迹及克隆筛选中。硝酸纤维素膜非特异性地吸附蛋白质的作用较弱, 因此特别适合于那些涉及蛋白质作用 (如抗体和酶等) 的非放射性标记探针的杂交体系。

硝酸纤维素膜虽是应用最广泛的一种固相支持物, 但是它并不十分理想。因为硝酸纤维素膜是依靠疏水性相互作用结合 DNA 的, 这种结合并不十分牢固, 随着杂交及洗膜的进程, DNA 会慢慢脱离硝酸纤维素膜, 特别是高温情况下, 从而使杂交效率下降。因此不太适宜于在同一膜上重复进行杂交。再者, 硝酸纤维素膜质地较脆, 特别是经烘烤后, 操作不方便, 须特别小心。硝酸纤维素膜与核酸的结合有赖于高盐浓度 ($> 10 \times \text{SSC}$), 在低盐浓度时结合 DNA 效果不佳, 因此不适宜于电转印迹法。另外, 硝酸纤维素膜对于小分子量 DNA 片段 (特别是 $< 200\text{bp}$ 的 DNA 片段) 结合能力不强。因此现在更多的人倾向于使用尼龙膜。

(2) 尼龙膜 (nylon membrane): 尼龙膜是目前较理想的一种核酸固相支持物, 它有多种类型, 除网眼大小不一样外, 有的尼龙膜未经特殊处理, 有些则是经过了正电荷基团的修饰。这种修饰的尼龙膜结合核酸的能力更强。如 Amersham 公司产品 Hybond - N 是普通尼龙膜, 而 Hybond - N⁺、Bio - Rad 产品 Zeta - Probe、DuPont 产品 Gene - Screen Plus 及 Pharmacia 产品 GeneBind 是正电荷修饰的尼龙膜。

尼龙膜结合单链及双链 DNA 和 RNA 的能力较硝酸纤维素膜更强, 可达 $350 \sim 500 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。而且经烘烤或紫外线照射后, 核酸分子可牢固地结合在尼龙膜上, 这种结合较之硝酸纤维素膜强, 特别是用短波紫外线照射后, 核酸中的部分嘧啶碱基可与膜上的带正电荷的氨基相互交联, 从而使结合更加牢固。碱处理也可使 DNA 牢固结合在尼龙膜上, 因此使 DNA 的变性、吸印和固定可以一步完成。有报道微波处理也可使 DNA 结合在尼龙膜上, 此方法特别适合于菌落原位吸印法, 使细菌的裂解、DNA 变性与固定可一步完成 (注意, 硝酸纤维素膜不能用微波处理, 否则会引起燃烧)。另外, 它的韧性较强, 操作较方便; 对于小分子量的核酸片段亦有较强的结合能力, 甚至短至 10bp 的核酸片段也能结合; 在低离子强度条件下也可较好地结合 DNA, 因此比较适合于电转印迹法; 再者, 尼龙膜可重复用于杂交, 一次杂交后, 探针分子可经碱变性而被洗脱下来, 从而可用于与第二探针进行杂交。其缺点是杂交信号本底较高, 可以用加大预杂交液中的非特异性封闭试剂的方法克服。

(3) 化学活化膜 (chemical activated paper): 将滤纸用一定的化学物质处理后即形成化学活化膜 (如 ABM 和 APT 纤维素膜)。这种化学活化膜经特殊处理而活化后, 产生一种活性基团, 如重氮盐 (diazonium salt), 此活性基团即可以与 DNA 或 RNA 分子共价结合。化学活化膜的优点是: ① DNA 与膜共价结合, 因此反复多次使用不会有太多的损耗; ② 对不同大小的核酸片段都具有同等的结合能力, 这是硝酸纤维素膜及尼龙膜都不具备的。但其结合能力一般较硝酸纤维素膜要低, 活化过程较复杂, 因此较少为人们所使用。大多用于 Northern 印迹法。

(4) 滤纸: 普通滤纸也具有一定的结合 DNA 能力, 但结合能力不大, 也不牢固。一般不推荐使用。于基因文库粗筛时的菌落原位杂交有时使用。优点是较为经济。

2. 印迹方法:

印迹的方法也有多种: ① 可直接将核酸样品点样于固相支持物上, 称为斑点或狭缝印迹法; ② 利用毛细管虹吸作用由转移缓冲液带动核酸分子转移到固相支持物上; ③ 利用电场作用的电转法; ④ 利用真空抽滤作用的真空转移法。

根据核酸品种的不同, 又可分为 Southern 印迹法和 Northern 印迹法。Southern 印迹法是指将电泳分离的 DNA 从凝胶中转移到固相支持物上的过程; Northern 印迹法则指 RNA 的印迹过程。

6.1.1.1 Southern 印迹

Southern 印迹是指将电泳分离的 DNA 片段转移到一定的固相支持物上的过程。

DNA 分子经限制性核酸内切酶酶切，经琼脂糖凝胶电泳将所得 DNA 片段按分子量大小分离，然后将含 DNA 片段的琼脂糖凝胶变性，并将其中的单链 DNA 片段转移到硝酸纤维素膜或其它固相支持物上，而各 DNA 片段的相对位置保持不变。这种滤膜即可用于下一步的杂交反应。利用 Southern 印迹法可进行克隆基因的酶切图谱分析、基因组基因的定性及定量分析、基因突变分析及限制性片段长度多态性分析 (RFLP) 等。

方法一：虹吸印迹法

试剂及仪器：

适当的限制性核酸内切酶

琼脂糖

变性液：

1.5mol/L NaCl

0.5mol/L NaOH

中和液：

1mol/L Tris·Cl (pH8.0)

1.5mol/L NaCl

转移液 (20 × SSC) pH7.0:

3mol/L NaCl

0.3mol/L 柠檬酸钠

硝酸纤维素滤膜 (Schleicher & Schuell BA 85 或 Millipore HAHY) 或尼龙膜 (Amersham Hybond - N, Bio - Rad Zeta - probe 或 Pharmacia GeneBind)

琼脂糖凝胶电泳装置

真空泵

真空烤箱

其它实验室常规仪器及试剂

操作步骤：

(1) 取一定量的待测 DNA 样品，用适当的限制性内切酶酶切。DNA 的量根据样品的种类及目的不同而异，对于克隆片段的限制性内切酶图谱分析，取 0.1 ~ 0.5 μg 即可；而对于鉴定基因组 DNA 中的单拷贝基因顺序，则需要 10 ~ 20 μg；当采用寡核苷酸探针或探针的比放射活性较低时，则需要多至 30 ~ 50 μg。酶切完毕，在琼脂糖凝胶中电泳，在其中一孔中加入适当的 DNA 分子量标准参照物。电泳结束后，溴乙锭 (EB) 染色，长波紫外线下观察电泳结果。用一张保鲜膜覆盖在凝胶上，复制下各分子量参照物及各 DNA 样品带的位置。在凝胶旁置一厘米尺照像。

(2) 切除无用的凝胶部分。将凝胶的左下角切去，以便于定位。然后将凝胶置于一搪瓷盆中。

(3) 将凝胶浸泡于适量的变性液中，置室温 1 小时，不间断地轻轻摇动。注意不要让凝胶漂浮起来，可用滴管等物将之压下。对于较大的 DNA 片段 (如大于 15kb)，可在变性前用 0.2mol/L HCl 预处理 10 分钟使脱嘌呤后，再进行碱变性处理。

(4) 将凝胶用去离子水漂洗一次，然后浸泡于适量的中和液中 30 分钟，不间断地轻轻摇动。换新鲜中和液，继续浸泡 15 分钟。

(5) 如图 6-1 所示，在一塑料或玻璃平台上铺一层 Whatman 3MM 滤纸，此平台要求比凝胶稍大。将此平台置于一搪瓷盆或玻璃缸中，搪瓷盆中盛满 20 × SSC 或 10 × SSC (也可用 10 × 或 20 × SSPE 代替)。滤纸的两端要完全浸没在溶液中。将滤纸用 20 × SSC 湿润，用一玻璃棒将滤纸推平，并排除滤纸

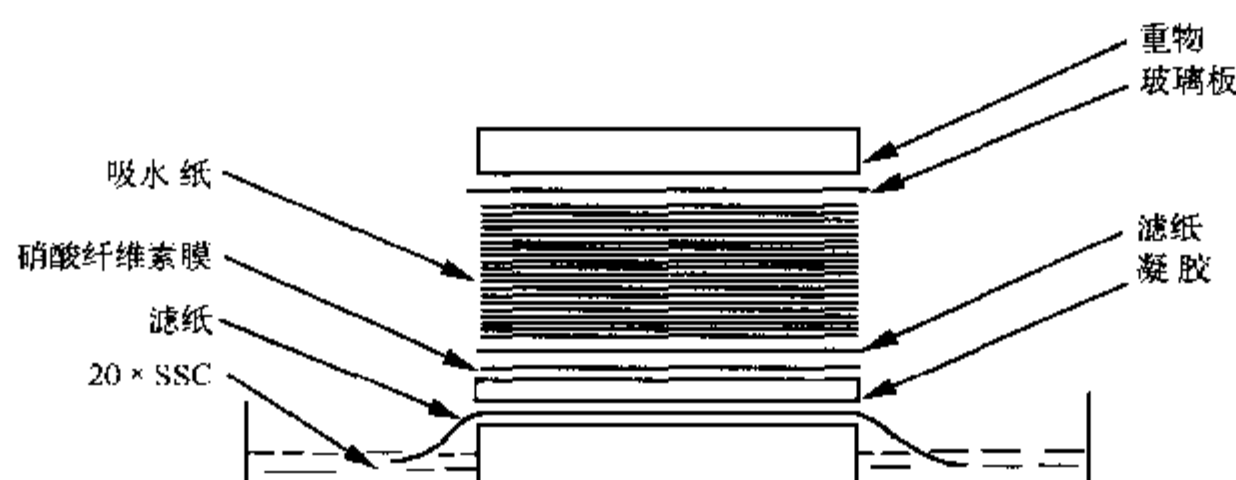


图 6-1 Southern 印迹示意图

与玻璃板之间的气泡。

(6) 裁剪下一块与凝胶大小相同或稍大的硝酸纤维素膜。注意操作时要戴手套，千万不可用手触摸，否则油腻的膜将不能被湿润，也不能结合 DNA。

(7) 将硝酸纤维素滤膜漂浮在去离子水中，使其从底部开始向上完全湿润。然后置于 $20 \times \text{SSC}$ 中至少 5 分钟。注意如果滤膜不能被湿润则不能用。

(8) 将中和后的凝胶上下颠倒后，置于上述铺了一层 Whatman 3MM 滤纸的平台中央。注意两者之间不要有气泡。

(9) 在凝胶的四周用 Parafilm 蜡膜封严，以防止在转移过程产生短路（转移液直接从容器中流向吸水纸而不经凝胶），从而使转移效率降低。

(10) 将湿润的硝酸纤维素膜小心覆盖在凝胶上，膜的一端与凝胶的加样孔对齐。排除两者之间的气泡。相应地将膜的左下角剪去。注意膜一经与凝胶接触即不可再移动，因为从接触的一刻起，DNA 已开始转移。

(11) 将两张预先用 $2 \times \text{SSC}$ 湿润过的与硝酸纤维素膜大小相同的 Whatman 3MM 滤纸覆盖在硝酸纤维素膜上，排除气泡。

(12) 裁剪一些与硝酸纤维素膜大小相同或稍小的吸水纸，约 5~8cm 厚。将之置于 Whatman 3MM 滤纸之上。在吸水纸之上置一玻璃板，其上压一重约 500g 的物品（图 6-1）。转移液将在吸水纸的虹吸作用下从容器中转移到吸水纸中，从而带动 DNA 从凝胶中转移到硝酸纤维素膜上。

(13) 静置 8~24 小时使其充分转移。其间换吸水纸 1~2 次。

(14) 弃去吸水纸和滤纸，将凝胶和硝酸纤维素膜置于一张干燥的滤纸上。用软铅笔或圆珠笔标明加样孔的位置。

(15) 凝胶用溴乙锭染色后紫外线下检查转移的效率。硝酸纤维素膜浸泡在 $6 \times \text{SSC}$ 溶液中 5 分钟以去除琼脂糖碎块。

(16) 硝酸纤维素膜用滤纸吸干。然后置于两层干燥的滤纸中，真空下 80°C 烘烤 2 小时，此过程使 DNA 固定于硝酸纤维素膜上。

(17) 此硝酸纤维素膜即可用于下一步的杂交反应。如果不马上使用，可用铝箔包好，室温下置真空中保存备用。

注意事项：

(1) 选择限制性内切酶是否适当直接影响到结果的分析，这一点常被人们忽视。选择适当内切酶的目的是得到合适长度的 DNA 片段。如果酶解后待测 DNA 片段过短，则影响其印迹的效率，因为大多数固相支持物结合小片段的能力较差；而片段过长，不但影响其转移时的效率，而且也会影响对其分子量

的准确判断。较理想的片段长度为 0.5 ~ 10kb。当然也应考虑不同的情况所需。当进行基因突变位点分析（如限制性片段长度多态性分析等）时，应选用适当的内切酶将待测 DNA 片段降解成多个较小的片段，以便于突变位点的准确定位；而进行定量分析（如基因扩增研究）时，则最好将之降解成较大片段，使待测基因全长集中于一条或少数几条带之中，以便于其准确的定量。

(2) 电泳结束后，应在紫外线下仔细观察酶切是否完全、电泳分离效果是否良好、DNA 样品有无降解、DNA 带型是否清晰、有无拖尾及边缘是否模糊等现象，是否有因电场强度不均匀导致的各 DNA 样品带泳动速度不一致以及各 DNA 样品量是否一致等。

(3) 有两种孔径的硝酸纤维素膜可供选用。普通采用 0.45 μ m 孔径的硝酸纤维素膜，但当 DNA 片段较小时（如 < 300bp），可选用 0.22 μ m 孔径的硝酸纤维素膜，或采用尼龙膜。

(4) 上述操作过程也完全适用于转移到尼龙膜上。Southern 印迹后的尼龙膜除可像硝酸纤维素一样用真空烘烤固定外，还可用短波紫外线（波长 254nm）照射几分钟进行固定。后一种固定方法更有效。注意不要照射过头。还可在碱性情况下（如 7.5mmol/L NaOH 作为转移液）将 DNA 转移到尼龙膜上，转移结束后，再对尼龙膜进行中和处理。碱转移时已将 DNA 固定在尼龙膜上，转移后毋需再进行固定处理。碱性转移的另一优点是结合力强，限制了 DNA 的扩散，使 DNA 带更清晰，分辨率提高。

(5) DNA 片段的大小决定了其转移的速度。小于 1kb 的 DNA 片段，1 小时即可基本完成转移过程。大片段 DNA，其转移速度和效率则慢得多，如大于 15kb 的 DNA 片段需要 18 小时以上，而且转移尚不完全。因此对于大片段 DNA 的转移，可预先对 DNA 用稀盐酸（0.2mol/L HCl）进行脱嘌呤处理（10 分钟），随后用强碱处理使之降解成较小的片段，从而提高转移效率。但脱嘌呤处理不能过头，否则 DNA 片段过小，结合能力下降，而且小片段 DNA 会因扩散使杂交带模糊。

传统的利用毛细管虹吸作用的转移法转移效率不高，特别是对于分子量较大的 DNA 片段。近年来发展起来了一些新的转移方法，转移效率提高，操作简单、节省时间，现已被广泛采用，且有取代传统方法而成为常规方法的趋势。下面简单予以介绍。

方法二：电转法（electrophoretic transfer）

利用电场的电泳作用将凝胶中的 DNA 转移到固相支持物上，是近年来发展起来的一种简单、迅速、高效的 DNA 转移法。一般只需 2 ~ 3 小时，至多 6 ~ 8 小时即可完成转移过程。特别是对于用毛细虹吸法不理想的大片段 DNA 的转移较为适宜。

电转法要注意以下两个问题：①不能选用硝酸纤维素膜作为固相支持物。因为硝酸纤维素膜结合 DNA 依赖于高浓度盐溶液，而高盐溶液的导电性极强，会产生强大的电流使转移体系的温度急剧升高、破坏缓冲体系，从而使 DNA 受到破坏。因此，可选用化学活化膜（如 ABM 或 ATP 纤维素膜）和正电荷修饰的尼龙膜（如 Bio-Rad 公司产品 Z-probe）作为固相支持物。转移缓冲液可采用 TAE 或 TBE；②因为转移过程在强电流中进行，电转体系的温度不可避免地将会升高，因此必须不间断地使用循环冷却水。如果效果仍不理想，则应在冷室中进行。

目前市场上有两种类型的电转仪可供选用，一种是以铂金丝作为电极的电转仪，一种是石墨电极电转仪。铂丝电极电转仪在两极间充满了大量的电泳缓冲液，因此电转过程较为温和，DNA 损伤较小，但转移效率较后者稍低，另外电场强度不太均匀。石墨电极电转仪的优点是电场强度均匀，转移较充分完全迅速，但其缺点是由于在两极间没有充分的电转液，没有有效的冷却系统，因此对 DNA 的损伤较大。

操作步骤：

下面以铂丝电极电转仪为例简单介绍电转过程：

- (1) 按上述虹吸印迹法操作步骤（1）~（4）进行酶切、电泳、变性和中和。
- (2) 将凝胶浸泡于 1 \times TBE 或 TAE 电泳液中。
- (3) 取出并打开电转装置的凝胶支持夹，将其中的海绵浸泡于 1 \times TBE 或 TAE 中，尽量排除其中的

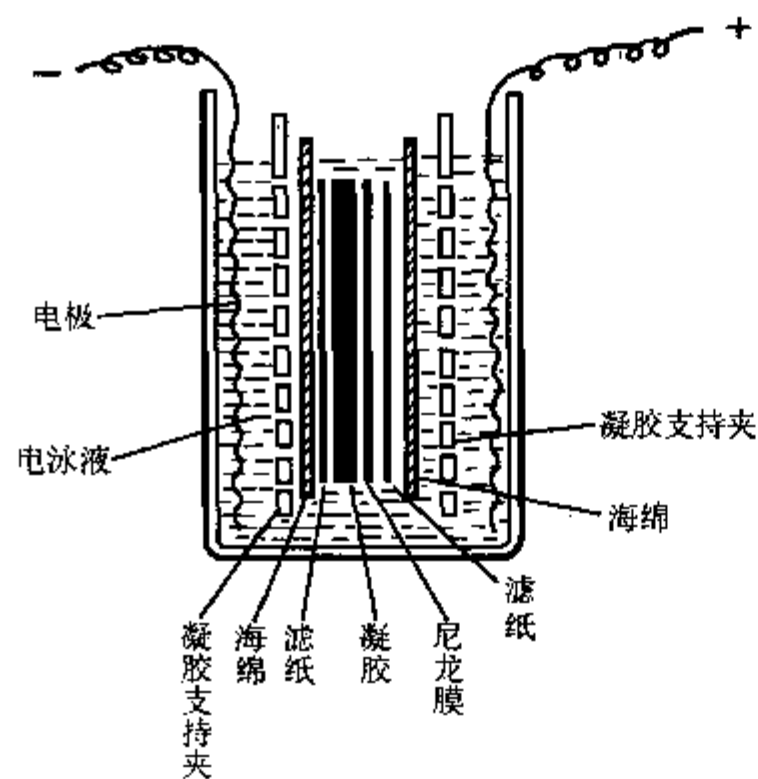


图 6-2 电转装置示意图

海绵。合上凝胶支持夹。

(9) 将凝胶支持夹重新安置在电转仪中，其中充满 $1 \times \text{TBE}$ 或 TAE 。注意应尼龙膜一侧置于正极，凝胶一侧置于负极（图 6-2）。

(10) $300 \sim 600\text{mA}$ 恒流电泳， $4 \sim 8$ 小时。循环水冷却，必要时置冷室中。

(11) 电转完毕，尼龙膜用 $1 \times \text{TBE}$ 或 TAE 漂洗，用干燥的滤纸吸干。然后用短波紫外线照射几分钟以固定 DNA 于膜上。

此尼龙膜即可直接用于下一步杂交反应。如不立即使用，可用铝箔包好，室温下真空中保存。

方法三：真空转移法 (vacuum transfer)

真空转移法是近年来兴起的又一种简单、迅速、高效的 DNA 和 RNA 印迹法。其原理是利用真空作用将转膜缓冲液从上层容器中通过凝胶抽到下层真空室中，同时带动核酸片段转移到置于凝胶下面的尼龙膜或硝酸纤维素膜上（图 6-3）。

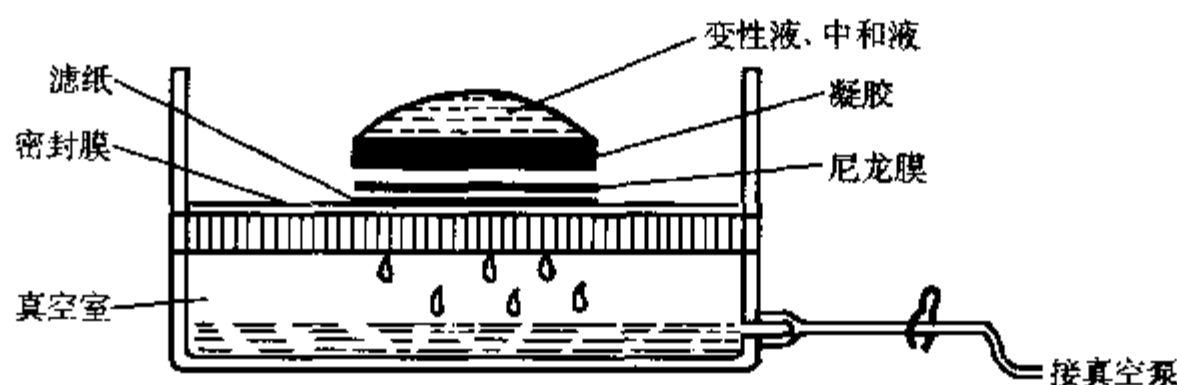


图 6-3 真空转移装置示意图

真空转移法的最大优点是迅速，可在转膜的同时进行 DNA 的变性与中和，整个过程只需 30 分钟至 1 小时左右。

操作步骤：

(1) 电泳完毕，凝胶可预先脱嘌呤、碱变性，也可直接进行转移。

气泡。

(4) 裁剪 4 张与凝胶大小相同或稍大的 Whatman 3MM 滤纸，浸泡于 $1 \times \text{TBE}$ 或 TAE 中。取 2 张置于一海绵上。

(5) 将凝胶置于滤纸上，注意两者之间不要有气泡。

(6) 裁剪一张与凝胶大小相同的尼龙膜，置水中使其从底部开始向上浸润，并完全浸泡于水中数分钟。然后置于 $1 \times \text{TBE}$ 或 TAE 中浸泡，注意整个操作过程中都不要用手触摸尼龙膜。

(7) 将充分湿润的尼龙膜覆盖在凝胶上，一端与加样孔对齐，排除两者之间的气泡，剪掉尼龙膜的左下角以便定位。注意尼龙膜一经与凝胶接触即不可再移动。

(8) 在尼龙膜上再覆盖上两张湿润的 Whatman 3MM 滤纸，排除两者之间的气泡，然后盖上另一张

- (2) 在真空转移仪的真空密封膜上剪一与凝胶大小相同或稍小的窗口。
- (3) 裁剪一与凝胶大小相同或稍大的 Whatman 3MM 滤纸, 用去离子水湿润, 置于真空转移仪的上述窗口上。
- (4) 裁剪一与凝胶大小相同的尼龙膜或硝酸纤维素膜, 用去离子水充分湿润, 置于上述滤纸上, 排除两者之间的气泡。
- (5) 将凝胶置于尼龙膜或硝酸纤维素膜上, 排除气泡。
- (6) 将真空转移仪封严, 用 parafilm 封牢凝胶周围, 使不会漏气。
- (7) 接通真空泵, 真空压约为 5.88kPa (60cmH₂O)。压力不可过高, 如压力超过 5.88kPa (60cmH₂O), 则凝胶被压缩, 转移效率反而下降。用变性液覆盖满凝胶, 抽气约 15 分钟。随时添加变性缓冲液。
- (8) 换用中和液, 继续抽气约 15 分钟。
- (9) 转移完毕, 硝酸纤维素膜或尼龙膜用去离子水漂洗。然后用适当的方法固定。

6.1.1.2 Northern 印迹

Northern 印迹是指将 RNA 变性及电泳分离后, 将其转移到固相支持物上的过程, 从而用于杂交反应以鉴定其中特定 mRNA 分子的量与大小。

基本原理与 Southern 印迹相同。但 RNA 变性方法与 DNA 不同, 不能用碱变性, 因为碱会导致 RNA 的水解, 以下将介绍三种 RNA 变性电泳方法。

方法一: 聚乙二醇和二甲基亚砜变性电泳

试剂及仪器:

DEPC (焦碳酸二乙酯, diethylpyrocarbonate)

6mol/L glyoxal (聚乙二醇): 使用前, 必须用混合床阴阳离子交换树脂 (Bio - Rad AG 501 - X8) 去离子, 直至其 pH 大于 5.0。然后小量分装, 密闭, 置 -20℃ 保存。

DMSO (二甲基亚砜, dimethylsulfoxide)

0.1mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH7.0), 用 DEPC 预处理。

琼脂糖

碘乙酸钠 (sodium iodoacetate)

载样缓冲液 (用 DEPC 预处理):

50% 蔗糖

10mmol/L 磷酸钠 (pH7.0)

0.25% 溴酚蓝

0.25% 二甲苯青 (xylene cyanol FF)

电泳仪及电泳槽

磁力搅拌器

蠕动泵

其它各种实验室常规试剂及仪器

操作步骤:

(1) 在一消毒的微量离心管中加入下列试剂并混匀:

6mol/L 聚乙二醇	5.4μl
DMSO	16.0μl
0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0)	3.0μl
RNA	5.4μl

RNA 的加入量取决于 mRNA 的丰度。对于 mRNA 丰度较高的, 可加入 10 ~ 20μg 细胞总 RNA, 对于

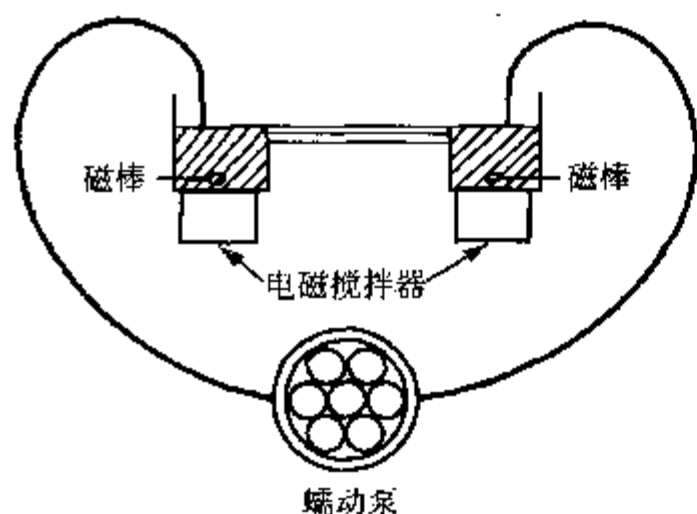


图 6-4 RNA 电泳装置示意图

低丰度 mRNA 的检测，则每孔中应追加 0.5 ~ 3.0 μg poly (A)⁺ RNA。

(2) 置 50℃ 保温 1 小时。然后迅速置冰水浴中。稍稍离心。

(3) 根据 RNA 分子量大小制备相应浓度的琼脂糖凝胶（对于小于 1kb RNA，用 1.4% 琼脂糖凝胶；大于 1kb RNA，用 1% 琼脂糖凝胶）。琼脂糖溶于 10mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 中，冷却至 70℃ 后，加入固体碘乙酸钠，其终浓度为 10mol/L，以灭活核酸酶。

注意：由于溴乙锭会与聚乙二醛起反应，因此凝胶及电泳液中不能含有溴乙锭。

电泳槽必须用去污剂洗干净，蒸馏水冲洗，乙醇干燥，然后用 3% 双氧水处理 10 分钟，最后用 DEPC 处理

过的蒸馏水彻底冲洗。

(4) 在 RNA 样品中加入 4 μl 载样缓冲液。然后上样于凝胶加样孔中。在另一孔中加入分子量标准参照物。

(5) 在 10mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 中电泳，恒压 3 ~ 4V/cm。用磁力搅拌器不间断地搅拌，并用蠕动泵使阴阳极电泳液不断循环对流（图 6-4）。

(6) 电泳结束后，切下分子量标准参照物条带，溴乙锭染色，紫外线下照像。

(7) 此凝胶可用于方法四进行 Northern 印迹。

方法二：甲醛变性胶电泳法

试剂及仪器：

5 × 甲醛胶电泳缓冲液：

0.1mol/L MOPS (pH7.0)

40mmol/L 乙酸钠

5mmol/L EDTA (pH8.0)

制备方法：20.6g MOPS (3 - [morpholino] propanesulfonic acid) 溶于 800ml 用 DEPC 预处理过的 50mmol/L 乙酸钠液中。用 2mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0。然后加入 10ml 0.5mol/L EDTA。用 DEPC 预处理过的蒸馏水调节体积至 1 000ml。通过 0.2 μm 的微孔滤膜过滤。室温下避光保存。

37% 甲醛

甲酰胺：一般不须特殊处理，但如呈现黄色，可用混合床阴阳离子交换树脂 (Bio - Rad AG 501 - x8) 处理，然后小量分装，密闭置 - 70℃ 保存。

载样缓冲液 (用 DEPC 预处理)：

50% 蔗糖

1mmol/L EDTA (pH8.0)

0.25% 溴酚蓝

0.25% 二甲苯青

琼脂糖

电泳装置

分子量标准参照物

其它各种实验室常规试剂及仪器

操作步骤:

(1) 将琼脂糖在一定量的水中溶化, 冷却至 60℃ 后, 加入一定量的 5× 甲醛胶电泳缓冲液和甲醛, 使其终浓度分别为 1× 和 2.2mol/L (37% 甲醛为 12.3mol/L)。然后灌注电泳胶。电泳槽必须用去污剂洗干净, 蒸馏水冲洗, 乙醇干燥, 然后用 3% 双氧水处理 10 分钟, 最后用 DEPC 处理过的蒸馏水彻底冲洗。

(2) 在一微量离心管中加入下列试剂并混匀:

RNA	4.5 μ l
5× 甲醛胶电泳缓冲液	2.0 μ l
37% 甲醛	3.5 μ l
甲酰胺	10.0 μ l

置 65℃ 保温 15 分钟, 然后迅速置冰浴中。稍稍离心。

此法每孔中可加入 30 μ g RNA。RNA 的加入量取决于 mRNA 的丰度。对于 mRNA 丰度较高的, 可加入 10~20 μ g 细胞总 RNA, 对于低丰度 mRNA 的检测, 则每孔中应追加 0.5~3.0 μ g poly (A⁺) RNA。

(3) 加入 2 μ l 载样缓冲液。

(4) 上样前凝胶预电泳 5 分钟。然后将 RNA 样品立即上样于加样孔中, 同时在另一样品孔中加入分子量标准参照物。

(5) 在 1× 甲醛胶电泳缓冲液中电泳, 恒压 3~4V/cm。每 1~2 小时将阴阳极电泳液混合一次。

(6) 电泳结束后, 切下分子量标准参照物条带, 溴乙锭染色, 紫外线下照像。

(7) 此凝胶可用于方法四进行 Northern 印迹。

方法三: 甲基氢氧化汞电泳**试剂及仪器:**

甲基氢氧化汞 (methylmercuric hydroxide)

1× 甲基汞凝胶电泳缓冲液:

50mmol/L 硼酸
5mmol/L Na₂B₄O₇·10H₂O
10mmol/L Na₂SO₄
调节 pH 至 8.1。

2× 上样缓冲液:

1mol/L 甲基氢氧化汞	25 μ l
4× 甲基汞凝胶电泳缓冲液	500 μ l
100% 甘油	200 μ l
水	275 μ l
溴酚蓝	0.2%

琼脂糖

电泳装置

其它实验室常规设备及试剂

操作步骤:

(1) 琼脂糖溶于 1× 甲基汞凝胶电泳缓冲液中。冷却至 55℃, 然后加入甲基氢氧化汞, 使终浓度为 5mmol/L。

(2) 在一微量离心管中等量混合 RNA 溶液与 2× 上样缓冲液。每孔可加入 10 μ g RNA。

(3) RNA 样品上样于凝胶中。在 1× 甲基汞凝胶电泳缓冲液中电泳, 恒压 5~6V/cm, 12~16 小时。
注意: 电泳缓冲液中不含有甲基氢氧化汞。为防止凝胶中的甲基氢氧化汞扩散到电泳液中, 电泳液

不要浸没凝胶，只须刚好能与之接触即可。待 RNA 已进入到凝胶后，用保鲜膜覆盖于凝胶表面，以防其干燥。

(4) 电泳结束后，切下分子量标准参照物条带，溴乙锭染色，紫外线下照像。

(5) 此凝胶可用于方法四进行 Northern 印迹。

方法四：Northern 印迹

操作步骤：

Northern 印迹法基本与 Southern 印迹法相同。

(1) 上述电泳后的凝胶一般不需进行处理即可直接进行印迹。含有甲醛的凝胶可用 DEPC 预处理过的水漂洗以去除所含的甲醛。如果凝胶较浓（大于 1%）、较厚（如大于 0.5cm）或待测 RNA 片段较大（大于 2.5kb），可预先将凝胶置 0.05mol/L NaOH 溶液中浸泡 20 分钟，然后用 DEPC 处理过的水漂洗，最后用 20×SSC 浸泡 45 分钟。

(2) 切除无用的凝胶部分。将凝胶的左下角切去，以便于定位。然后将凝胶置于一搪瓷盆中。

(3) 参见图 6-1 所示，在一塑料或玻璃平台上铺上一层 Whatman 3MM 滤纸，此平台要求比凝胶稍大。将此平台置于一盛满 20×SSC 的搪瓷盆中。滤纸的两端要完全浸泡在溶液中。将滤纸用上述溶液浸润，用一玻璃棒将滤纸推平，并排除滤纸与玻璃之间的气泡。

(4) 裁剪下一块与凝胶大小相同或稍大的硝酸纤维素膜。注意操作时要戴手套，注意不可用手触摸滤膜，否则油腻的膜将不能被湿润，也不能结合 RNA。

(5) 将硝酸纤维素膜漂浮在去离子水中，使其从底部完全湿润。然后置于 20×SSC 中至少 5 分钟。注意如果滤膜不能被湿润则不能用。

(6) 将中和后的凝胶上下颠倒后，置于上述铺上了 Whatman 3MM 滤纸的平台中央。注意两者之间不要有气泡。

(7) 在凝胶的四周用 Parafilm 封严，以防止在转移过程产生短路（转移液直接从容器中流向吸水纸），从而使转移效率降低。

(8) 将湿润的硝酸纤维素膜小心覆盖在凝胶上，膜的一端与凝胶的加样孔对齐。排除两者之间的气泡。相应地将膜的左下角剪去。注意膜一经与凝胶接触即不可再移动，因为从接触的一刻起，RNA 已开始转移。

(9) 将两张预先用 2×SSC 湿润过的与硝酸纤维素膜大小相同的 Whatman 3MM 滤纸覆盖在硝酸纤维素膜上，排除气泡。

(10) 裁剪一些与硝酸纤维素膜大小相同或稍小的吸水纸，厚 5~8cm。将之置于 Whatman 3MM 滤纸之上。在吸水纸之上置一玻璃板，其上压一重约 500g 的物体（图 6-1）。转移液将在吸水纸的虹吸作用下从容器中转移到吸水纸中，从而带动 RNA 从凝胶中转移到硝酸纤维素膜上。

(11) 静置 6~18 小时使其充分转移。其间换吸水纸 1~2 次。

(12) 弃去吸水纸和滤纸，将凝胶和硝酸纤维素膜置于一干燥的滤纸上。用软铅笔或圆珠笔标明加样孔的位置。

(13) 凝胶用溴乙锭染色后紫外线下检查转移的效率。硝酸纤维素膜浸泡在 6×SSC 溶液中 5 分钟以去除琼脂糖碎块。

(14) 硝酸纤维素膜用滤纸吸干。然后置于两层干燥的滤纸中，真空下 80℃烘烤 2 小时。

(15) 此硝酸纤维素膜即可用于下一步的杂交反应。如果不马上使用，可用铝箔包好，室温下置真空中保存备用。

(16) 对于聚乙二醛电泳的 RNA，在杂交前必须在 65℃下用 20mmol/L Tris·Cl (pH8.0) 溶液清洗，以去除聚乙二醛分子。

注意事项:

(1) RNA 极易被环境中存在的 RNA 酶所降解, 因此须特别注意 RNA 酶的污染问题, 请参阅核酸提取章。

(2) 上述转膜方法也基本适用于将 RNA 转移到尼龙膜上。但在印迹前, 含甲醛的凝胶必须用水将甲醛冲洗掉。另外, 尼龙膜可在碱性条件下与 RNA 结合, 因此可用 7.5mmol/L NaOH 作为转移液, 碱性条件下转移的优点是可将 RNA 部分降解, 从而提高转移效率; 而且碱可以去除聚乙二醇与 RNA 形成的加合物; 并且碱性条件下 RNA 可不可逆地与尼龙膜结合, 因此转移后不须经烘烤或用紫外线照射固定。碱性转移后, 尼龙膜须用 $2 \times \text{SSC}$ 及 0.1% SDS 漂洗, 然后置室温干燥即可。尼龙膜的缺点是杂交本底较高, 特别是对于 RNA 探针。一般此问题可用提高杂交液中封闭物质的量来加以克服。

前面介绍的电转法及真空转移法也同样适用于 RNA 的转移。

6.1.1.3 斑点及狭缝印迹法 (dot and slot blot)

将 RNA 或 DNA 变性后直接点样于硝酸纤维素膜上, 用于基因组中特定基因及其表达的定性及定量研究, 称为斑点印迹。也是实验室中常用的技术之一。与 Southern 及 Northern 印迹法相比, 其优点是简单、迅速; 可在同一张膜上同时进行多个样品的检测; 对于核酸粗提样品的检测效果也较好。但其缺点是不能鉴定所测基因的分子量, 而且特异性不高, 有一定比例的假阳性。

方法一: 标准方法**试剂及仪器:**

硝酸纤维素膜

$20 \times \text{SSC}$

甲酰胺

37% 甲醛

抽滤加样器 (Dot 或 Slot Filtration Manifold)

真空泵

其它实验室常规试剂及仪器

操作步骤:

(1) 将硝酸纤维素膜在水中湿润后, 置 $20 \times \text{SSC}$ 中浸泡 1 小时。同时, 将抽滤加样器用 0.1mol/L NaOH 清洗, 然后用消毒水洗净。

(2) 将两张预先用 $20 \times \text{SSC}$ 湿润的滤纸铺在抽滤加样器的下部分上。然后将湿润的硝酸纤维素膜贴在加样器上部分的底部, 小心排除气泡。将硝酸纤维素覆盖不到的部分用 Parafilm 封闭。重新安装好加样器, 并接通真空室与真空泵。

(3) 在加样孔中装满 $10 \times \text{SSC}$, 真空抽滤至所有液体被抽干。关闭真空泵。在加样孔中重新加满 $10 \times \text{SSC}$ 。

(4) 样品的处理:

对于 RNA 样品, 在微量离心管中混合下列试剂:

RNA	10 μl
甲酰胺	20 μl
37% 甲醛	7 μl
$20 \times \text{SSC}$	2 μl

置 68℃ 保温 15 分钟, 并迅速置冰浴中。对于 DNA 样品, 可直接置沸水浴中变性 10 分钟, 然后迅速置冰浴中。DNA 及 RNA 量视情况而定, 一般可加 10 ~ 20 μg 。

(5) 样品中加入 2 倍体积 $20 \times \text{SSC}$ 。

(6) 将样品孔中的 $10 \times \text{SSC}$ 抽干。关闭真空泵。

(7) 将样品上样于加样孔中, 真空抽滤。待全部样品均被抽干, 用 $10\times$ SSC 抽滤两次。为防止杂交后形成圆圈样形态而不是实心的圆点, 加样时可将样品加在样品孔中央, 而不要沿孔壁加样, 要避免形成气泡。

(8) 继续施真空 5 分钟使硝酸纤维素膜干燥。

(9) 取下硝酸纤维素膜, 室温下使其充分自然干燥。然后在真空下于 80°C 烤干。

方法二: 胞浆 RNA 的快速提取及点样法

此方法的原理是用小量的 NP-40 将胞膜破碎而不破碎核膜, 从而达到快速提取胞浆 RNA 的目的。此法优点是操作简单、快速; 样品用量少 (只需 5×10^4 个细胞即可); 适合于大量样品的快速分析。

试剂及仪器:

无钙镁的磷酸盐缓冲液 (PBS)

NP-40 (Nonidet P40)

余同方法一。

操作步骤:

(1) $1\ 000g$ 离心 5 分钟收集细胞 ($10^6\sim 10^7$)。细胞沉淀重悬于 1ml PBS (无钙镁离子)。 4°C 下离心 15 秒。

(2) 弃去上清。细胞重悬于 $45\mu\text{l}$ 冰冷的 TE (pH7.2) 中, 加入 $5\mu\text{l}$ 5% NP-40, 混匀。置冰浴中 5 分钟。如细胞中富含核酸酶, 可加入氧矾核糖核苷酸复合物 (vanadylribonucleoside complexes) 至终浓度为 0.1mol/L 。

(3) 再加入 $5\mu\text{l}$ NP-40, 混匀。在显微镜下观察细胞破碎程度, 调节 NP-40 用量, 使 95% 以上细胞破碎。

(4) 4°C 下于 $12\ 000g$ 离心 3 分钟以沉淀细胞核, 将上清转移到另一试管中。

(5) 在上清中加入 $30\mu\text{l}$ $20\times$ SSC, 混匀, 再加入 $20\mu\text{l}$ 37% 甲醛。混匀。

(6) 置 60°C 保温 15 分钟。

(7) 取 $5\sim 10\mu\text{l}$ 用 $200\mu\text{l}$ $20\times$ SSC 稀释, 按方法一点样于硝酸纤维素膜上。

方法三: 完整细胞斑点吸印法

就像菌落原位吸印法一样, 完整细胞也可直接点样于硝酸纤维素膜上, 经碱处理使细胞释放出 DNA 并变性和固定于膜上。用于细胞中特异 DNA 序列的快速筛选检测。

此法优点是: 细胞用量少, 只需 10^5 个细胞; 细胞直接在膜上裂解, DNA 产量高; 简单、快速, 适合于大量样品的快速粗筛分析。

仪器及试剂:

磷酸盐缓冲液 (PBS) pH7.0:

0.15mol/L NaCl

35mmol/L NaH_2PO_4

30mmol/L NaH_2PO_4

0.5mol/L NaOH

中和缓冲液 I:

0.6mol/L NaCl

1.0mol/L Tris·Cl (pH6.8)

中和缓冲液 II:

1.5mol/L NaCl

0.5mol/L Tris·Cl (pH6.8)

0.3mol/L NaCl

抽滤加样器

真空泵

硝酸纤维素滤膜

其它实验室常规仪器及试剂

操作步骤:

- (1) 用 PBS 洗涤细胞, 2 000g 离心沉淀。
- (2) 细胞沉淀重悬于 PBS 中, 1×10^6 细胞/ml。
- (3) 按方法一将 200 μ l (2×10^5 细胞) 细胞悬浮液加样于加样乳中, 真空抽滤。
- (4) 小心取下滤膜, 置于一张预先用 0.5mol/L NaOH 湿润的 Whatman 3MM 滤纸上, 细胞面向上, 注意不要有气泡。使细胞裂解并变性 DNA, 10 分钟。
- (5) 将滤膜转移至另一张用中和缓冲液 I 湿润的滤纸上, 中和 5 分钟。
- (6) 滤膜转移至用中和缓冲液 II 湿润的滤纸上, 5 分钟。
- (7) 空气干燥 20 分钟。
- (8) 滤膜漂浮于 95% 乙醇中脱水, 空气干燥 5 分钟。
- (9) 滤膜浸没于氯仿: 异戊醇 (24:1) 中漂洗, 空气干燥 1.5 分钟。
- (10) 用 0.3mol/L NaCl 清洗, 并轻轻摇晃, 洗去细胞碎块。可以戴手套将细胞碎块轻轻刮去。
- (11) 空气干燥, 80℃ 真空烘烤 2 小时。

注意事项:

- (1) 印迹斑点为圆形, 而狭缝印迹为线状。一般说来, 前者更为清晰, 定量更为准确。
- (2) 如果条件不允许, 可采用手工直接点样。将核酸变性后, 用微量加样器直接点样于干燥的硝酸纤维素膜上。注意必须采用小量多次法加样, 待第一次样品完全干燥后, 再在原来的位置第二次点样, 使其直径不超过 1cm 为宜。

6.1.1.4 菌落原位印迹法

在基因克隆筛选章中详细介绍。

6.1.2 固-液相杂交技术

6.1.2.1 核酸分子杂交的基本原理

DNA 分子杂交实质上是双链 DNA 的变性和具有同源序列的两条单链的复性过程。

1. 变性 (denaturation):

维持 DNA 螺旋的力主要是氢键和疏水性相互作用。氢键是一种次级键, 能量较低, 因此, 加热、有机溶剂及高盐浓度等都可导致 DNA 二级结构发生破坏, DNA 二级双螺旋解旋, 两条链完全解离, 但未破坏其一级结构。此过程称为 DNA 的变性。

DNA 的变性伴随着 DNA 一系列理化性质的变化, 如浮密度增加、粘度降低、旋光性的改变及 260nm 紫外吸收值增加等。变性 DNA 紫外吸收增加的现象称为碱基的增色效应或 DNA 的减色效应。据此可用紫外吸收的变化跟踪 DNA 的变性过程。

缓慢加热 DNA 溶液, 在达到一定温度前, 其 260nm 吸光率基本维持不变; 继续升温, 其紫外吸收率在一狭窄的温度范围内急剧上升, 最高约增加 40%; 继续升温, 其紫外吸收率基本维持此状态不变, 反映了溶液中 DNA 双链已完全解离为单链。当增色效应达到最大值的 50% 时的温度称为熔解温度 T_m (melting temperature)。 T_m 值反映了 DNA 溶液中一半的 DNA 双链已解离为单链。

多数 DNA 的 T_m 值在 85 ~ 90℃ 左右, 事实上 T_m 值并不是一个固定的常数, 它受到以下几个因素的影响:

- (1) DNA 的碱基组成: 由于 A:T 碱基对间只有两个氢链, 而 G:C 碱基对间有三个氢链, 因此 G:C

碱基对较 A:T 碱基对的热稳定性高,需要较高的温度才能解链。因此 DNA 中 (G+C)% 愈高, T_m 值也愈高。在 $1 \times \text{SSC}$ 溶液中,两者之间的关系可用以下经验公式来表示:

$$(G+C)\% = (T_m - 69.3) \times 2.44$$

$$\text{或 } T_m = (G+C)\% \times 0.41 + 69.3$$

其中, 69.3 为无 G+C 存在时 T_m 值。由此可看出, (G+C)% 含量每增加 1%, T_m 值约上升 0.41°C 。

(2) 溶液的离子强度: DNA 链骨架上的磷酸基团带有较多的负电荷, 它们之间的静电排斥作用是其双链的不稳定因素之一。在无盐的水中, DNA 在室温下就会变性, 加入盐后, 正离子可以封闭磷酸基团的负电荷, 使 DNA 双链的稳定性增加, T_m 值亦升高。

(3) pH 值: pH 值在 5~9 范围内, T_m 值变化不明显。在高 pH 值下, 可使碱基失去形成氢链的能力。当 pH 大于 11.3 时所有氢链均被破坏, DNA 完全变性。

(4) 变性剂: 变性剂可以干扰碱基堆积力和氢链的形成, 因此可以降低 T_m 值。常用的变性剂是甲酰胺和脲, 通常用 50% 的甲酰胺以使 T_m 值降低 30°C 。

2. 复性 (renaturation):

变性的 DNA 两条互补单链, 在适当条件下重新缔合形成双链的过程称为复性或退火。

复性并不是变性反应的一个简单逆反应过程。复性的过程是相当复杂的。变性过程可以在一个极短的时间内迅速完成, 而复性则需要相对较长的时间才能完成。如果使热变性的 DNA 溶液迅速冷却, 则只能形成一些不规则的碱基对, 而不会完全恢复 DNA 双链结构。而将此变性 DNA 溶液在低于 T_m 值 25°C 的温度下维持相当长的一段时间, 则可使之回复到天然的双链结构状态。

复性过程的第一步是两条 DNA 单链随机碰撞形成局部双链的过程, 遵循二级反应动力学。这种随机碰撞形成的局部双链是暂时的, 如果此局部双链的周围的碱基不能配对则会重新解离, 继续随机碰撞。一旦找到了正确的互补区, 则首先形成的局部双链就形成核, 核两侧的顺序迅速配对, 形成完整的双链分子。此后一步反应是一个自发过程, 而第一步反应 (即成核反应) 是整个过程的限速步骤, 对于单链 DNA 减少的二级反应速度方程式是:

$$\frac{dC}{dt} = kC^2$$

k 是缔合反应速度常数, C 是时间 t 时的单链 DNA 浓度 (mol/L)。若时间 $t=0$ 时, DNA 浓度为 C_0 , 时间 t 时剩下的单链 DNA 的量可用下式表示:

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + kC_0t}$$

当反应完成一半时, 则 $C/C_0 = 0.5$, $t = t_{1/2}$

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{2} = \frac{1}{1 + kC_0t_{1/2}}$$

$$C_0t_{1/2} = 1/k$$

此公式表明, 控制复性反应的参数 $1/k$ 是 DNA 浓度和保温时间的乘积, $C_0t_{1/2}$ 越大意味着反应越慢。

复性的速度受到诸多因素的影响:

(1) DNA 的浓度: DNA 浓度直接影响到 DNA 单链间碰撞的几率, DNA 浓度越大, 复性速度越快。

(2) DNA 的分子量: 大分子量的 DNA 扩散速度较慢, 也难于形成正确配对, 因此复性速率较慢。

(3) 温度: 温度过高, 有利于 DNA 变性而不利于复性; 而温度过低, 则少数碱基配对形成的局部双链不易解离, 难以继续寻找正确配对。适宜的复性温度是较 T_m 值低 25°C 。

(4) 离子强度: 离子强度过低, 不利于复性, 常采用 $0.15 \sim 1.0 \text{ mol/L}$ 溶液进行复性研究。

(5) DNA 分子的复杂性: DNA 总量一定时, 基因组越复杂, 其中特定顺序的拷贝数就越少, 互补

顺序的浓度就越低,因而复性反应速度越慢。 $C_0t_{1/2}$ 与反应体系中 DNA 的复杂性成正比。复杂性是指存在于反应体系中的不同顺序的总长度,以碱基对来表示。在真核生物基因组中,除含有单拷贝顺序外,还含有大量的高度重复顺序和中度重复顺序,因此其复性过程是相当复杂的。在人基因组中,单拷贝 DNA 顺序约占 65%,而高、中、低度重复顺序分别约占 10%、12%和 13%。

3. 杂交体系的建立:

分子杂交过程,实质上是 DNA 的复性过程。与上面所讨论的复性过程的区别只是 DNA 的来源不同。只要待测 DNA 样品中存在与加入的 DNA 探针同源的互补顺序,在一定的条件下,即可退火而形成异源 DNA 双链,即 DNA 杂交体。上述复性原则也同样适用于杂交。建立杂交体系应考虑到以下几个因素:

(1) 离子强度:一般杂交体系中离子强度为 $5\times$ 或 $6\times$ SSC ($1\times$ SSC 为 0.15mol/L NaCl 和 0.015mol/L 柠檬酸钠)。

(2) DNA 浓度:DNA 浓度愈高,复性速度愈快。为保证足够的 DNA 浓度,除应加入足够的 DNA 量外,还应尽量减少杂交体积,一般以每平方厘米滤膜面积加 $50\sim 100\mu\text{l}$ 杂交液为宜。

(3) DNA 探针的长度:探针片段越大,其扩散的速度越慢,因此复性的速度越慢。

(4) 温度:选择适当的杂交和洗膜温度是核酸分子杂交成败最关键的因素之一。通常杂交反应在低于 T_m 值 $15\sim 25^\circ\text{C}$ 温度下进行。 T_m 值除受 (G+C) 含量影响外,还与杂交体系中离子的强度,探针的复杂性(长度)、是否含甲酰胺及错配率等多种因素影响。准确确定 T_m 值是比较困难的,也无必要。以下经验公式对于帮助判断 T_m 值很有用处:

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6\lg M + 0.41 (G+C)\% - 500/n - 0.61 (\text{甲酰胺}\%)$$

其中 M 为 Na^+ 摩尔浓度, n 为探针的复杂性(没有重复序列时,复杂性即为探针的长度,单位为 bp)。

例如:一个长度为 500bp 的探针, (G+C) 含量为 50%, 杂交体系中含 $5\times$ SSC (0.75mol/L Na^+) 和 50% 甲酰胺, 则其 T_m 值为:

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} + (-2.07) + 20.5 - 1 - 30.5 = 68.4^\circ\text{C}$$

那么其杂交温度 (T_{hyb}) 应为:

$$T_{\text{hyb}} = 68.4 - 25 = 43.4^\circ\text{C}$$

一般情况下,在不含变性剂甲酰胺时,大多数杂交反应在 68°C 进行,当含 50% 甲酰胺时,在 42°C 进行。

杂交后的最终洗膜强度一般应在低于 T_m 值 $5\sim 12^\circ\text{C}$ 下进行。对于多数杂交体系而言,最典型的终洗膜强度为 $0.1\times$ SSC (0.015mol/L Na^+) 在 55°C 下洗膜。假如一探针长 500bp, G+C 含量为 42%, 则在 $0.1\times$ SSC 中,不含甲酰胺时的 T_m 值为:

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

则其洗膜温度为:

$$67^\circ\text{C} - (5\sim 12^\circ\text{C}) = 55\sim 62^\circ\text{C}$$

杂交温度除受上述因素影响外,还应考虑以下几点:

- 1) 错配率每增加 1%, T_m 值相应下降 $1\sim 1.5^\circ\text{C}$ 。
- 2) RNA/DNA 杂交体的稳定性较 DNA/DNA 的稳定性高, T_m 值应相应增加 $10\sim 15^\circ\text{C}$ 。
- 3) RNA/RNA 杂交体的 T_m 值应相应增加 $20\sim 25^\circ\text{C}$ 。因此,采用 RNA 探针时,加入适量的甲酰胺以降低 T_m 值是必需的。
- 4) 由于寡核苷酸探针的特殊性,杂交温度的选择显得更为重要。上述公式同样也适用于寡核苷酸探针 T_m 值的估计,但下述公式更为方便:

$$T_m = 4^\circ\text{C} \times \text{G:C 对数量} + 2^\circ\text{C} \times \text{A:T 对数量}.$$

如 20-mer 寡核苷酸, 含 50% (G+C), 则其 T_m 值为:

$$T_m = 4^{\circ}\text{C} \times 10 + 2^{\circ}\text{C} \times 10 = 60^{\circ}\text{C}$$

寡核苷酸探针杂交反应一般在低于 T_m 值 5°C 下进行, 如上述探针杂交应在 55°C 进行。

寡核苷酸探针杂交温度不易很好控制, 应进行预试验反复摸索。

5) 碱基修饰对 T_m 值的影响: 某些非放射性标记的侧链较长, 对碱基配对的稳定性有一定影响, 使 T_m 值稍稍下降。但一般来说, 这种影响不大, 可以忽略不计, 因为大多数标记物都是结合在嘌呤或嘧啶碱基的非氢键形成部位上 (如胞嘧啶 C-5 位, 嘌呤 C-8 位及胸腺嘧啶 C-6 位等), 不干扰碱基配对。

6) 寡核苷酸探针混合物的杂交温度问题: 由于遗传密码的简并性, 同一氨基酸可由多种密码子编码, 根据多肽氨基酸顺序推断其核酸顺序较困难, 有时必须用含多种不同序列的寡核苷酸探针混合物进行杂交。此混合物的长度相同, 大部分序列一致, 只有个别碱基不同, 但即使是极少数碱基的不同, 也会显著影响其 G+C 含量, T_m 值会有很大不同, 给杂交温度的选择带来困难。解决办法有以下几种:

a. 在不同温度下分别进行杂交。

b. 用 2-氨基腺嘌呤 (2-aminoadenine) 代替腺嘌呤掺入到寡核苷酸探针中。2-氨基腺嘌呤上的 2-氨基可与胸腺嘧啶 2-羰基 ($\text{C}=\text{O}$) 形成氢键, 这样 A:T 对与 G:C 对一样也有三个氢键, 从而使所有探针的 T_m 值趋于一致 (升高)。

c. 用次黄嘌呤 (inosine) 代替鸟嘌呤, 可使 G:C 对的氢键减少为 2 个, 也可使 T_m 趋于一致 (下降)。

d. 另一种更为简单有效的方法是在杂交体系中加入 3mol/L 氯化四甲胺 (Me_4NCl , tetramethylammonium chloride), Me_4NCl 可选择性地与 A:T 对结合, 并使其稳定性升高, T_m 值升高, 使 A:T 对的解链温度趋同于 G:C 对。达到寡核苷酸探针的 T_m 值只与探针长度有关而与碱基组成无关的效果。

(5) 杂交时间: 一般应为 C_0t 1/2 的 1~3 倍, 下列经验公式可作为杂交时间选择的参考:

$$\frac{YZ}{5 \times 10X} \times 2 = \text{小时}/C_0t \text{ 1/2 (完成一个 } C_0t \text{ 1/2 所需时间)}$$

其中 X 为探针 DNA 的量 (μg), Y 为探针 DNA 的复杂性, 即片段的大小 (kb), Z 为杂交体系的体积 (ml)。

(6) 为减少非特异性杂交反应, 在杂交前应进行预杂交, 将非特异性 DNA 位点封闭。常用的封闭物有两类: 一类是变性的非特异性 DNA, 大多采用鲑鱼精子 DNA (salmon sperm DNA) 或小牛胸腺 DNA (calf thymus DNA); 另一类是一些高分子化合物, 其作用除也可封闭 DNA 上的非特异位点外, 更主要的是将滤膜上的非特异性位点进行封闭, 减少其对探针的非特异性吸附作用, 一般多采用 Denhardt 氏溶液 (含聚蔗糖 400、聚乙烯吡咯烷酮和牛血清白蛋白), 近年来有人采用 Blotto 系统 (即脱脂奶粉) 代替 Denhardt 溶液, 也取得了较好的效果。

(7) 硫酸葡聚糖 (dextran sulfate, mw 500 000) 能促进 DNA 链间的缔合, 其微粒的表面可吸附 DNA 探针分子, 从而使 DNA 接触面积增大, 有利于杂交反应。在 10% 硫酸葡聚糖存在时, 杂交速度可提高 10~100 倍。也有人使用聚乙二醇 (PEG, mw 6 000~8 000) 和聚丙烯酸 (polyacrylic acid, mw 90 000), 此两者的优点是粘稠度较硫酸葡聚糖低。使用硫酸葡聚糖的缺点是使杂交背景加深, 一般不主张使用。还有人曾发现苯酚和硫氰酸胍也可加速核酸杂交反应。

6.1.2.2 放射性核素探针杂交

核酸分子杂交的方法有多种, 其原理基本相同, 只是依各人操作习惯不同而有所差别, 例如是否加甲酰胺、不同的非特异性杂交基质等。本文仅介绍其中最常用的一种方法, 实际使用时可视情况根据上述原则进行适当调整。

试剂及器材:

塑料袋

50 × Denhardt 溶液:

1% Ficoll 400

1% polyvinylpyrrolidone (聚乙烯吡咯烷酮, PVP)

1% BSA (pentex fraction V)

过滤后置 - 20℃ 保存

放射性核素标记 DNA 探针

0.5mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0)

硫酸葡聚糖

20 × SSC:

3mol/L NaCl

0.3mol/L 柠檬酸钠

10% SDS

10mg/ml 鲑精 DNA: 超声法或用注射器反复抽打将 DNA 打断。煮沸后置 - 20℃ 保存。使用前置沸水浴中煮沸 5 分钟, 然后迅速置冰浴中。

甲酰胺: 使用前用 Dowex XG8 混合床阴阳离子交换树脂处理 1 小时, 小量分装后置 - 70℃ 保存。

盖革计数器

操作步骤:**1. 预杂交:**

预杂交的目的是用非特异性 DNA 分子 (鲑精 DNA 或小牛胸腺 DNA) 及其它高分子化合物 (Denhardt 溶液) 将待测核酸分子中的非特异性位点封闭。否则这些非特异性位点会在杂交时与探针非特异性地结合。

(1) 制备预杂交液:

5 × SSC

5 × Denhardt 溶液

50mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0)

0.2% SDS

500μg/ml 变性的鲑精 DNA 片段

50% 甲酰胺 (也可不用)

(2) 将结合了 DNA 的硝酸纤维素膜或尼龙膜浸泡于 6 × SSC 溶液中, 使其充分湿润。

(3) 将此硝酸纤维素膜或尼龙膜置于一塑料袋中。加入适量的预杂交液 (约每平方厘米膜面积 0.2ml)。尽量排除其中的气泡。用塑料封口机将口封牢。

(4) 将此塑料袋浸没入恒温水浴中保温, 当加入了 50% 甲酰胺时, 恒温 42℃; 当不加甲酰胺时, 恒温 68℃。保温时间可短至 1~2 小时, 也可长至 12~16 小时。

保温过程中应不时地将塑料袋摇动几次, 以排除其中残存的少量气泡, 否则这些气泡将阻碍预杂交液与滤膜的接触。在加入到塑料袋中之前, 将预杂交液加热到适当温度, 可以减少小气泡所引起的问题。

2. 杂交:

杂交反应是单链核酸探针与待测核酸分子中的特异基因顺序在一定的温度下杂交复性的过程。

(1) 配制杂交液:

5 × SSC
 20mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0)
 5 × Denhardt 溶液
 10% 硫酸葡聚糖
 100μg/ml 变性的鲑精 DNA 片段
 50% 甲酰胺 (也可不用)

(2) 如果放射性标记的探针是双链 DNA, 则需经变性处理。一般将 DNA 样品在沸水浴中加热 5 分钟, 然后迅速置冰浴中。也可用碱变性处理: 室温下加入 0.1 倍体积 3mol/L NaOH, 5 分钟后置冰浴中, 并加入 0.05 倍体积的 1mol/L Tris·Cl (pH7.2) 和 0.1 倍体积的 3mol/L HCl。如果是单链 DNA 或 RNA 探针, 则不需变性。

(3) 将变性后的标记的探针加入到上述杂交液中。探针的加入量视情况而定, 一般为 1 ~ 2ng/ml, 对于检测基因组中单拷贝基因, 探针的加入量应相应加大, 而对于检测克隆的基因片段, 则探针的量可大大减少。

(4) 从水浴中取出塑料袋, 剪去一角, 去除预杂交液, 加入杂交液及探针。排除气泡后, 重新封好口。为防止放射性污染, 应将此塑料袋套在另一塑料袋之中。

(5) 在适当的温度下保温。保温时间一般为 8 ~ 16 小时。

3. 洗膜:

洗膜过程是将滤膜上未与 DNA 杂交的及非特异性杂交的探针分子从滤膜上洗去的过程。由于非特异性杂交的杂交体稳定性较低, 解链温度较低, 在一定的温度下, 非特异性杂交体解链而被洗掉, 而特异性杂交体则保留在滤膜上。杂交体的解链温度主要取决于杂交体的同源性和溶液的离子强度两个要素, 同源性越高稳定性也越高; 离子强度越低, 稳定性也越低。

(1) 杂交完毕, 取出塑料袋, 剪去一角, 弃去所有的杂交液。然后取出滤膜, 并迅速浸泡于大量 2 × SSC 和 0.5% SDS 溶液中, 室温下不断振荡。注意在此操作过程中, 一定不要使滤膜干燥。

(2) 5 分钟后, 将滤膜转移至一盛有大量 2 × SSC 和 0.1% SDS 溶液的容器中, 室温下振荡漂洗 15 分钟。

(3) 将滤膜转移至一盛有大量 0.1 × SSC 和 0.1% SDS 溶液的容器中, 37℃ 下振荡漂洗 30 分钟至 1 小时。

(4) 将滤膜转移至一盛有大量 0.1 × SSC 和 0.1% SDS 溶液的容器中, 置 65℃ 水浴中振荡洗涤 30 分钟至 1 小时。直至用盖革计数器在无 DNA 区域检测不出放射信号为止。

(5) 室温下, 滤膜用 0.1 × SSC 稍稍漂洗。然后置滤纸上吸去大部分的液体。按 6.1.3 方法放射自显影。

6.1.2.3 非放射性标记探针杂交

非放射性标记探针的缺点是杂交后本底信号较强, 因此杂交条件与放射性标记探针稍有差别以减少本底, 主要改变是用甘氨酸代替杂交液中的 BSA, 并减少硫酸葡聚糖用量, 此法也可用于放射性探针杂交。

试剂与仪器:

50 × FPG:
 1% Ficoll 400
 1% PVP (polyvinylpyrrolidone 360)
 1% 甘氨酸
 过滤, 分装于 -20℃ 保存
 余同 6.1.2.2.

操作步骤:**(1) 配制杂交液:**

50% 甲酰胺
 5 × SSC
 1 × FPG
 25mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0)
 0.2% SDS
 25 μ g/ml 变性鲑精 DNA
 5% 硫酸葡聚糖

(2) 用上述杂交液于 42℃ 预杂交 2 小时以上。

(3) 探针 DNA 变性, 加入到预杂交液中, 于 42℃ 保温 16 小时。

(4) 按 6.1.2.2 同样方法洗膜, 按 6.1.3 方法进行杂交信号检测。

6.1.3 杂交信号的检测**6.1.3.1 放射自显影**

利用放射线在 X 线片上的成影作用来检测杂交信号, 称为放射自显影。

(1) 用放射性墨水在滤膜上一定部位进行标记, 以利于以后的定位。此步骤一般可以省略, 因为滤膜的放射性本底一般可在 X 线片上将滤膜清晰地显示出来。

(2) 将滤膜用保鲜膜包好。置暗盒中。

(3) 在暗室中, 将磷钨酸钙增感屏前屏置滤膜上, 光面向上。再压一至两张 X 线片, 再压上增感屏后屏, 光面向 X 线片。盖上暗盒。置 -70℃ 曝光适当的时间。

(4) 根据放射性的强度曝光一定的时间后, 在暗室中取出 X 线片, 显影, 定影。如曝光不足, 可再压片重新曝光。

6.1.3.2 非放射性核素探针的检测

除酶直接标记的探针外, 其它非放射性标记物并不能被直接检测, 而需经两步反应将非放射性标记物与检测系统偶联。第一步称为偶联反应, 第二步称为显色反应。

1. 偶联反应:

大多数非放射性标记物是半抗原, 因此可以通过抗原-抗体免疫反应系统与显色体系偶联。

另一类非放射性标记物如生物素, 作为抗生物素蛋白 (卵白素, avidin) 的配体, 则可通过亲合法进行检测。avidin 是一种糖蛋白, 其分子中有 4 个与生物素结合的位点, 与生物素的亲合力极高。但是, 由于体内存在内源性生物素的干扰, 同时, 由于 avidin 为糖蛋白, 等电点偏碱 (pI=10.5), 中性环境下带正电荷, 易与其他带负电荷的生物大分子非特异性结合, 导致假阳性结果, 特别是细胞原位杂交时。近年来大多使用链亲和素 (streptavidin), 它不是糖蛋白, 等电点为中性, 因此较少形成非特异性结合, 特异性较高。

根据偶联反应的不同, 可分为直接法、间接免疫法、直接亲和法、间接亲和法和间接免疫-亲和法几类 (图 6-5)。

2. 显色反应:

通过连接在抗体或抗生物素蛋白上的显色物质 (如酶、荧光素等) 进行杂交信号的检测。常用的检测物质与方法有以下几类:

(1) 酶法检测: 这是最常用的检测方法。通过酶促反应使其底物形成有色反应产物。最常用的酶是碱性磷酸酶和辣根过氧化酶, 也偶见有使用酸性磷酸酶和 β -半乳糖苷酶。

碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase) 可使其作用底物 BCIP (5-bromo-4-chloro-4-indolyl phosphate)

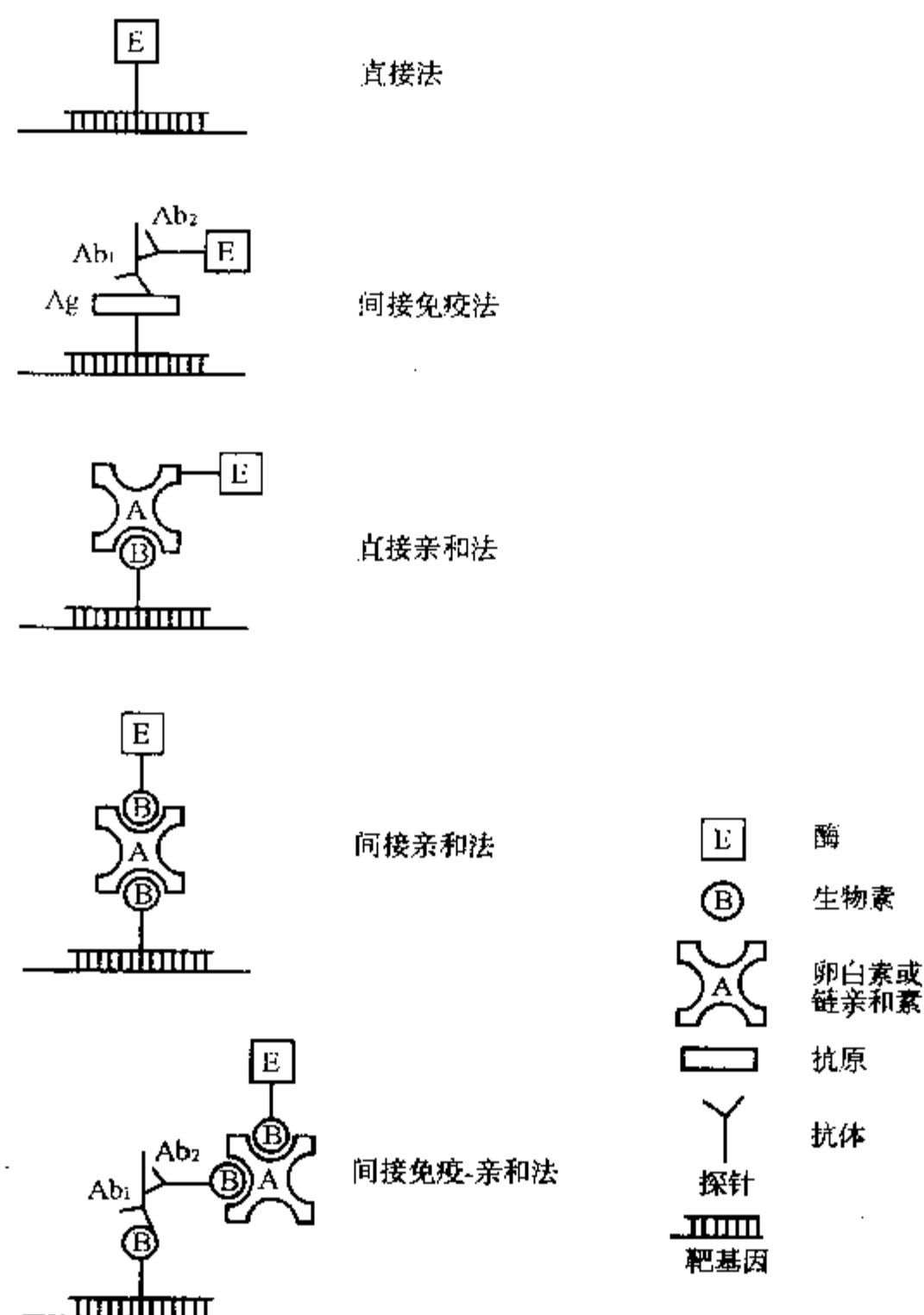
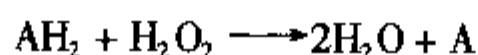


图 6-5 非放射性探针检测法示意图

脱磷并聚合，在此过程中释放出的 H^+ 使 NBT (nitroblue tetrazolium, 硝基蓝四氮唑) 还原而形成紫色化合物 (图 6-6)。

辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 催化下列反应:



因此可采用一种能产色的氢供体化合物作为 HRP 的底物，在 HRP 的作用下氧化脱氢从而在杂交部位生成一种不溶于水有色物质，除可用滤膜杂交外，亦可用于原位杂交的显微镜下检测。

通常用作 HRP 的显色底物有 DAB (3, 3'-diaminobenzidine, 二氨基联苯胺) 和 TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine, 四甲基联苯胺)。此外还有人采用 phenylenediamine, O-dianisidine (3, 3'-dimethoxybenzidine), 以及 4-chloro-1-naphthol 等 (图 6-7)。

此外，还有人设计了一系列反应 (主要涉及银) 增强上述显色反应。

DAB 经 HRP 催化反应后形成一种红棕色沉淀物。TMB 的反应产物为蓝色，较之红棕色的 DAB 产物更易于观察，特别是在显微镜下。而且 DAB 是一种致癌物质，而 TMB 无致癌性。

酸性磷酸酶 (acid phosphatase) 可作用于其底物/色素混合物 (如 naphenol ASMX phosphate/Fast Violet B salt) 而形成紫色沉淀。

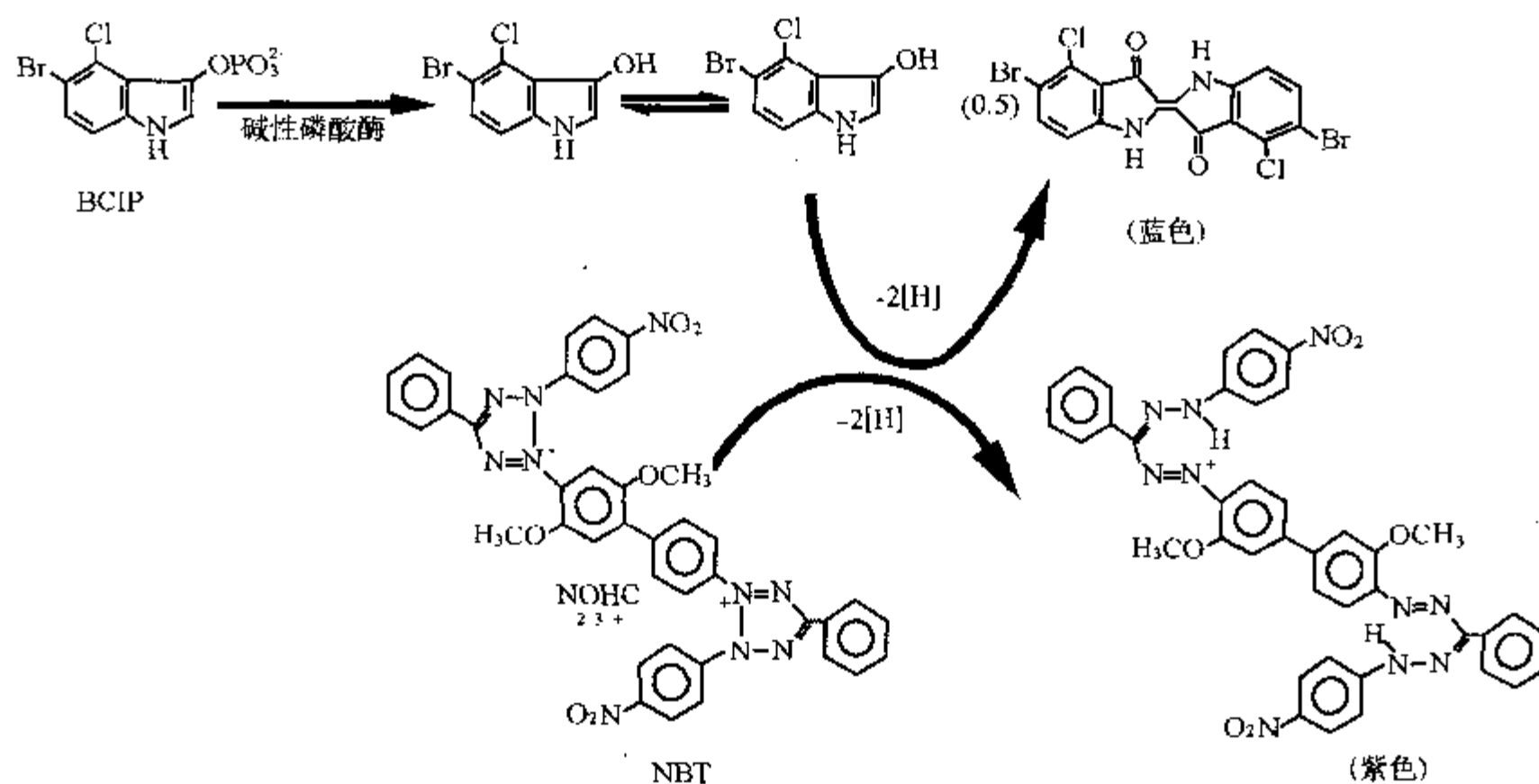


图 6-6 碱性磷酸酶显色反应示意图

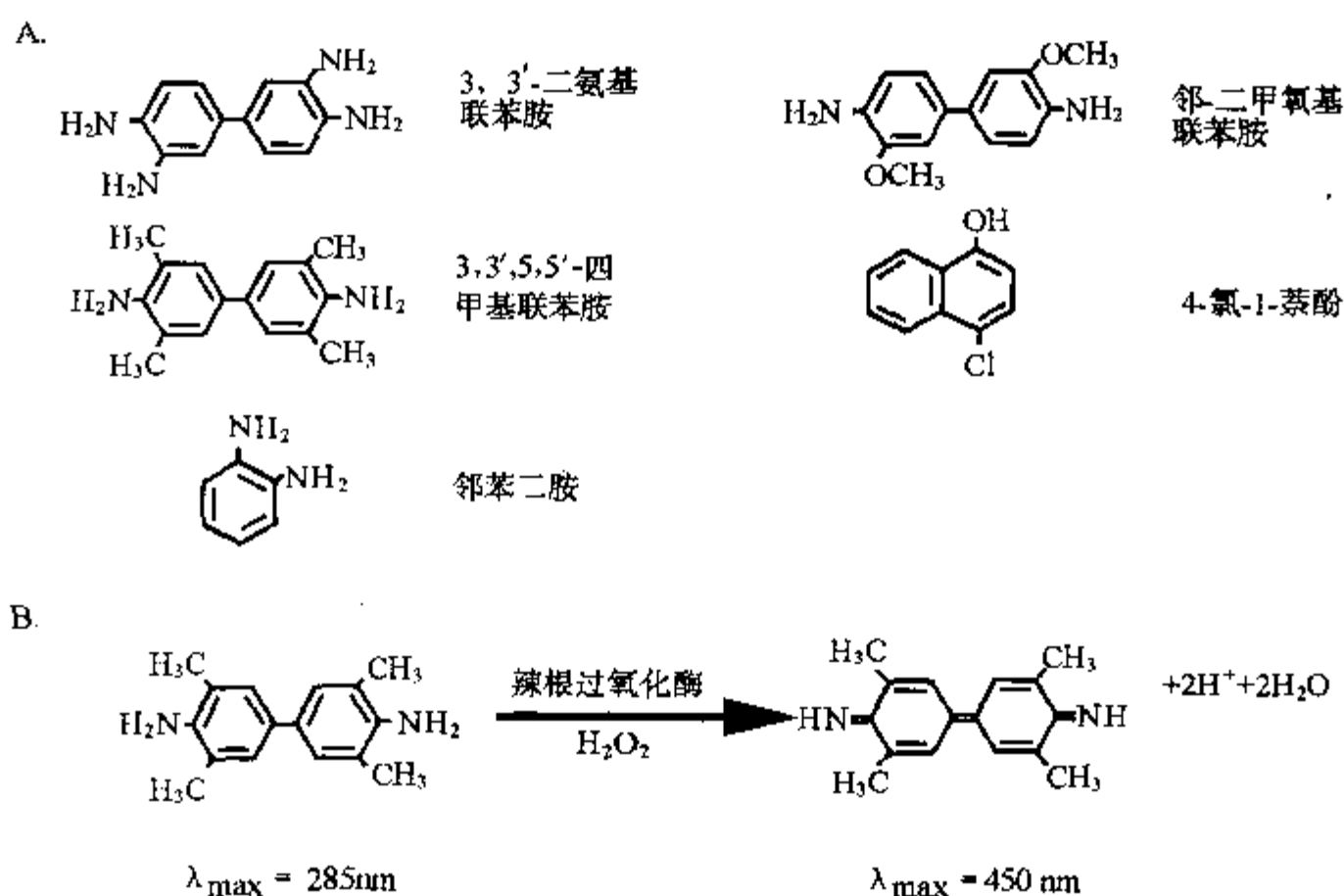


图 6-7 HRP 显色反应原理示意图

β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 作用于其底物 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, BCIG) 形成蓝色沉淀产物 (5,5'-dibromo-4,4'-dichloroindigo) 积累在反应部位。

(2) 荧光检测：荧光检测法主要使用于非放射性探针的原位杂交检测。在目前应用的荧光素中，

FTTC (isothiocyanate) 是应用最广的, 其它荧光素如罗丹明 (rhodamine) 类 (如 rhodamine B isothiocyanate, RBITC); tetramethyl rhodamine isothiocyanate, TMRITC 等) 也常被采用, 但荧光强度较低。新一代的荧光素德克萨斯红 (Texas Red) 现已被广泛采用。

Rhodospirillum rubrum phycoerythrin (RPE) 是一种重要的荧光蛋白 (fluorescent phycobiliprotein), 它的吸收光谱广, 荧光强度高 (大约为荧光素的 20 ~ 50 倍)。

(3) 化学发光法 (chemiluminescence): 化学发光是指在化学反应过程中伴随的发光反应。应用化学发光反应对于检测固相支持物上的 DNA 杂交体最为适宜。目前最有前途的是辣根过氧化物酶催化 luminol (3-aminophthalate hydrazine) 伴随的发光反应 (图 6-8):

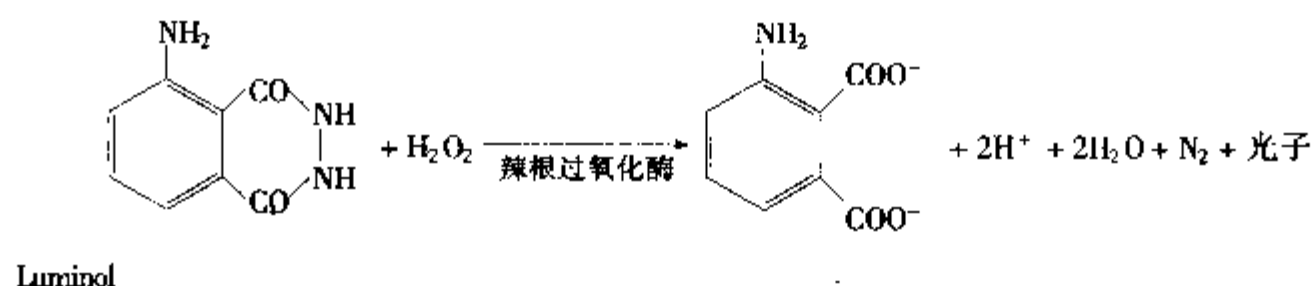


图 6-8 辣根过氧化物酶催化的化学发光反应

p-hydroxycinnamic acid 可增强其发光反应。

最近, Boehringer Mannheim (德国) 生产了一种利用化学发光作用进行滤膜杂交检测的试剂盒 - ECL, 灵敏度高, 特异性强, 操作简单可靠, 其在线胶片的显影清晰、快速, 可适用于 Southern, Northern 及斑点杂交的检测。

(4) 电子密度标记 (detection via electron-dense labels): 利用重金属的高电子密度, 在电子显微镜下进行检测。主要适合于细胞原位杂交检测。

非放射性标记探针的检测方法繁多, 请参照各生产厂家产品说明书进行。以下仅简单介绍一种最常用的方法。

方法一: 生物素探针直接亲和检测法 (一步法)

试剂及仪器:

洗膜缓冲液:

50mmol/L Tris·Cl (pH7.4)

200mmol/L NaCl

6% Tween-20

0.01% thimerosal

3% BSA (溶于洗膜缓冲液中)

链亲和素-碱性磷酸酶交联物 (SA-AP)

10× NBT 溶液: 2g NBT (硝基蓝四氮唑, nitroblue tetrazolium) 溶于 60ml 二甲基甲酰胺和 24ml 水中, 然后加入 516ml 水。4℃避光保存。

10× BCIP 溶液: 1g BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) 溶于 100ml 二甲基甲酰胺中, 缓慢加入 400ml 水。4℃避光保存。

10× 底物缓冲液:

1mol/L Tris·Cl (pH9.0)

1mol/L NaCl

0.1mol/L MgCl₂

NBT/BCIP 底物工作液: 取 $1\times$ 底物缓冲液 8ml, $10\times$ NBT 溶液 1ml, $10\times$ BCIP 溶液 1ml, 混合。于使用前配制。避光室温下可保存 24 小时。

操作步骤:

- (1) 杂交结束后, 适当强度下洗膜。
- (2) 在塑料袋中加入 10ml 3% BSA, 室温下保温 15 分钟。
- (3) 弃去上述溶液, 加入 5ml $1\mu\text{g/ml}$ SA-AP 溶液 (溶于 3% BSA 溶液中)。室温下保温 10 分钟, 不间断摇晃。
- (4) 弃去 SA-AP 溶液, 用洗膜缓冲液洗 3 次, 每次 5 分钟。
- (5) 将滤膜置一新塑料袋中, 加入 5ml NBT/BCIP 底物工作液。室温下避光显色, 一般需 15 分钟至 2 小时, 直至出现所需结果。不要显色过度, 否则本底加深。
- (6) 水冲洗终止反应, 干燥保存。

6.1.4 滤膜的重复使用

结合了待测核酸的滤膜经与第一种探针杂交后, 可经碱或热变性方法将探针洗去, 可反复使用与其它探针杂交。

由于尼龙膜和化学活化膜与核酸的结合较牢固, 比较适合于反复使用; 而硝酸纤维素滤膜与核酸的结合不牢, 一般不适宜于反复使用。

需特别注意的是, 如果滤膜在保存过程中干燥, 则探针将与滤膜呈不可逆性结合, 则不能再洗脱下来。因此, 在洗膜、放射自显影和保存过程中, 均应保持其湿润, 并密封在塑料袋中。

6.1.4.1 尼龙膜的反复使用

(1) 以下两种方法任选一种:

1) 将尼龙膜浸泡于大量 1mmol/L Tris·Cl (pH8.0)、 1mmol/L EDTA (pH8.0)、 $0.1\times$ Denhardt 溶液中, 置 75°C 保温 2 小时。

2) 尼龙膜浸泡于 50% 甲酰胺、 $2\times$ SSPE 溶液中, 置 65°C 保温 1 小时。

(2) 室温下于 $0.1\times$ SSPE 溶液中漂洗, 用滤纸吸除大部分液体, 但注意勿使其干燥。

(3) 湿润的滤膜用保鲜膜包好, 放射自显影, 检查探针是否已被洗掉。

(4) 如已洗净, 则可使其干燥, 用铝箔包好, 置室温下真空中保存。

6.1.4.2 硝酸纤维素膜的反复使用

(1) 大量 $0.05\times$ SSC, 10mmol/L EDTA (pH8.0) 溶液加热煮沸, 加入 SDS 至终浓度为 0.1%, 将硝酸纤维素滤膜置此热洗脱液中浸泡 15 分钟。

(2) 重复上述步骤 1 次。

(3) 余步骤同尼龙膜洗法步骤 (2) ~ (4)。

6.2 液相杂交技术

6.2.1 核酸酶 S_1 保护分析法

核酸酶 S_1 保护分析法 (nuclease S_1 protection assay) 是近年来发展起来的一种检测 RNA 的杂交技术, 其灵敏度较之 Northern 杂交法更高, 并可对之进行较为准确的定量。选择适当的探针, 还可进行基因转录起始位点分析及内含子剪切位点分析等。

利用 M13 噬菌体体系合成高放射活性的单链 DNA 探针。探针与待测 RNA 样品在液相中进行杂交, 形成 DNA/RNA 杂交双链。核酸酶 S_1 能专一性地降解未形成杂交的 DNA 和 RNA 单链, 而 DNA/RNA 杂交

双链则受到保护而不被降解。

试剂及仪器:

Klenow DNA 聚合酶

M13 噬菌体通用引物

α - ^{32}P -dCTP (3 000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)

核酸酶 S_1

杂交缓冲液:

40mmol/L PIPES (pH6.4)

0.4mol/L NaCl

1mmol/L EDTA (pH8.0)

80% 甲酰胺 (去离子)

核酸酶 S_1 酶解缓冲液:

280mmol/L NaCl

50mmol/L NaAc (pH4.5)

4.5mmol/L ZnSO_4

20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 变性鲑精 DNA

核酸酶 S_1 中止缓冲液:

4mol/L 乙酸铵

50mmol/L EDTA (pH8.0)

60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 酵母 tRNA

聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂及装置

其它实验室常规设备及试剂

操作步骤:

按第 5 章介绍的方法制备标记的单链 DNA 探针。经乙醇沉淀回收, 用适当的限制性内切酶酶切, 电泳分离, 回收相应的单链 DNA 探针。用少量杂交缓冲液溶解回收的探针。

(1) 在一微量离心管中, 加入适量 RNA 样品 (10 ~ 15 μg), 补加适量酵母 tRNA, 至 RNA 总量为 25 μg 。

(2) 加入适量标记的单链 DNA 探针 (约 50 000cpm), 乙醇沉淀, 弃上清。沉淀置室温干燥。加入杂交缓冲液 30 μl , 重溶核酸沉淀, 混匀。盖紧管盖。最好用螺口的 Eppendorf 离心管。将离心管完全浸没于 85 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中, 保温 15 分钟。

(3) 迅速将离心管转入 52 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 12 ~ 16 小时。在转移过程中注意不要使其温度下降到杂交温度以下。

(4) 用冰冷的核酸酶 S_1 酶解缓冲液稀释核酸酶 S_1 , 至浓度为 100 ~ 1 000U/ml。在上述杂交液中加入 30 μl 含核酸酶 S_1 的酶解缓冲液。注意在加样过程中, 不要使离心管离开水浴。混匀后, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 30 分钟。

(5) 酶解完毕, 加入 75 μl 中止缓冲液及 750 μl 冰冷的 95% 乙醇。酚/氯仿抽提 1 次, 2 倍体积乙醇沉淀, 置 -70 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

(6) 此样品上样于 8mol/L 脲-聚丙烯酰胺凝胶中电泳。放射自显影。

注意事项:

(1) RNA 样品的加入量取决于其中待测序列的丰度, 如果其丰度极低, RNA 量最大可加大至 250 μg , 此时反应体积可相应加大到 50 μl 。

(2) 双链 DNA 探针也可以采用。因为在此方法所选定的温度下, 不利于 DNA/DNA 杂交, 而 DNA/RNA 杂交仍可形成。在 80% 甲酰胺存在下, 一般采用的杂交温度是 52℃, 但必要时应根据其碱基组成进行适当的调整:

G + C	杂交温度
41 %	49℃
49 %	52℃
58 %	60℃

6.2.2 RNA 酶保护分析法

RNA 保护分析法 (RNase protection assay) 的原理与核酸酶 S_1 保护分析法基本相同, 只是所采用的探针为单链 RNA 探针, 杂交后形成 RNA/RNA 双链。RNA 酶 A 和 T_1 专一性降解单链 RNA 而双链 RNA 则受到保护。此法的灵敏性较之核酸酶 S_1 保护分析法还要高数倍。

试剂及设备:

Sp6 (或 T_7 、 T_3) RNA 聚合酶

α - 32 P-UTP

杂交缓冲液:

80% 甲酰胺

0.4mol/L NaCl

40mmol/L PIPES (pH6.4)

1mmol/L EDTA (pH8.0)

RNA 酶酶解缓冲液:

10mmol/L Tris·Cl (pH7.4)

5mmol/L EDTA (pH8.0)

300mmol/L NaCl

RNase A 和 T_1 : 使用前用酶解缓冲液稀释, 使 RNase A 和 RNase T_1 的终浓度分别为 40 μ g/ml 和 20 μ g/ml。

10mg/ml 蛋白酶 K

聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂及装置

其它实验室常规设备及试剂

操作步骤:

(1) 按第 5 章介绍的方法制备标记的 RNA 探针。经无 RNase 的 DNase 消化, 酚/氯仿抽提及乙醇沉淀后, 探针 RNA 分子溶于少量杂交缓冲液中。

(2) 在一微量离心管中加入适量待测 RNA 样品, 真空下冷冻干燥。

(3) 加入约 10^5 cpm 标记的单链 RNA 探针。加入杂交缓冲液至 30 μ l, 混匀。盖严管盖, 浸入 85℃ 水浴中保温 15 分钟。

(4) 然后置 45 ~ 50℃ 水浴中保温过夜。

(5) 加入 300 μ l 40 μ g/ml RNase A 和 20 μ g/ml RNase T_1 溶液, 置室温下 30 分钟。

(6) 加入 20 μ l 10% SDS, 10 μ l 10mg/ml 蛋白酶 K, 37℃ 保温 15 分钟。

(7) 加入 10 μ l 2 μ g/ μ l 酵母 tRNA。酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀。在 8mol/L 脲-聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离, 放射自显影。

6.3 核酸原位杂交及其应用

6.3.1 核酸原位杂交的基本原理

特定标记的已知顺序核酸作为探针与细胞或组织切片中核酸进行杂交并对其实行检测的方法称为核酸原位杂交 (nucleic acid hybridization *in situ*)。该技术最早应用于 60 年代末期, 由于核酸分子杂交的特异性高, 并可精确定位, 因此该技术已广泛地应用于医学分子生物学的研究之中。例如用标记的探针与分裂中期染色体 DNA 杂交以研究染色质中特定核酸顺序在染色体中的精确定位; 与细胞内 RNA 进行杂交以观察该组织细胞中特定基因表达水平; 此外还可利用特异性的细菌、病毒的核酸作为探针对组织、细胞进行杂交, 以确定有无该病原体的感染等。原位杂交能在成分复杂的组织中进行单一细胞的研究而不受同一组织中其它成分的影响, 因此对于那些细胞数量少且散在于其他组织中的细胞内 DNA 或 RNA 研究更为方便; 同时由于原位杂交不需要从组织中提取核酸, 对于组织中含量极低的靶序列有极高的敏感性, 并可完整地保持组织与细胞的形态, 更能准确地反映出组织细胞的相互关系及功能状态。近年来核酸原位杂交的方法更为完善, 应用也更加广泛, 因而又称为原位杂交组织化学或杂交组织化学。

6.3.1.1 核酸原位杂交的基本要点

核酸原位杂交可根据其检测物而分为细胞内原位杂交和组织切片内原位杂交; 根据其所用探针及所要检测核酸的不同又可分为 DNA-DNA, RNA-DNA, RNA-RNA 杂交。但不论哪种杂交都必须经过组织细胞的固定、预杂交、杂交、冲洗等一系列步骤及放射自显影或免疫酶法显色以显示杂交结果。这些具体步骤中, 组织切片或细胞涂片要经过多种有机或无机化合物处理, 不同的温度变性杂交、复性等温度变化。现将几种应注意的事项叙述如下。

1. 细胞或组织载片的处理:

原位杂交都在载片上进行, 因此载片的清洗至关重要, 必须保持清洁并且不能有任何核酸酶的污染。所用载片可先经洗衣粉浸泡过夜, 第二天用流水冲洗、并泡酸 4~8 小时, 再用流水冲洗, 双蒸水涮 2~3 次, 干燥, 可在 160℃ 烤箱中烘烤 2~4 小时, 亦可经 15 磅高压灭菌 20 分钟处理, 可将载片上的核酸酶清除。为防止杂交及以后冲洗、放射自显影等步骤中组织或细胞从载片上脱落, 可应用 1mg/ml 多聚赖氨酸 (poly-L-lysine, 分子量 300 000 之上) 作为组织细胞的粘附剂。其具体方法是将 1mg 多聚赖氨酸溶于消毒之去离子水中或 1mmol/L Tris·Cl (pH7.0) 中, 并将其涂于载片上, 待载片干燥后再进行细胞涂片或组织切片, 石蜡切片可在 80~120℃ 烘烤 4~6 小时, 使组织片完全牢固地附于载片上。多聚赖氨酸可用于多种核酸杂交, 方法简便、结果可靠, 有许多其它方法无可比拟的优点。但应用时一定要用新鲜配制的多聚赖氨酸液, 时间过久, 多聚赖氨酸将解聚而失效, 组织或细胞脱落影响实验进行。其它细胞或组织粘附剂, 如明胶液 (1 000ml 溶液中含明胶和甲明矾各 2.4g) 浸 3 次后空气干燥, 效果也较稳定。

2. 组织与细胞的固定:

进行原位杂交的组织或细胞必须经过固定处理。许多化学物质对细胞或组织有固定作用, 但核酸原位杂交的理想固定液应具备下列特点: ①能很好地保持组织细胞的形态; ②对核酸无抽提、修饰与降解作用; ③不改变核酸在组织细胞内的定位; ④不能对核酸与探针的杂交过程有阻碍作用; ⑤固定液对杂交信号无遮蔽作用, 如本底过高等; ⑥理化性质稳定, 价格低廉。

常用于核酸原位杂交的固定液有 10% 甲醛、4% 多聚甲醛、乙醇:冰醋酸 (3:1)、戊二醛、Carnoy 固定液、Bouin 固定液等。这些固定液都有不同的优缺点, 因此要根据具体的实验对象, 选择最佳的固定液。一般而言, 10% 甲醛促进 DNA 双链分子的交联进而干扰 DNA 的变性, 因此不适于 DNA 杂交, 但在 10% 甲醛固定组织或细胞中行核酸原位杂交时, 可通过使用含 50% 甲酰胺杂交液使 DNA 变性解链而解

决。这种固定液在 DNA/RNA 杂交中常有较好的效果。4%多聚甲醛是应用最广的固定液之一，它能较好地保持组织或细胞内的 RNA，在 10~15 分钟的固定时间内 RNA 含量比较恒定。但过度延长固定时间则引起细胞浆内生物大分子的过度交联，影响探针的穿透力，从而降低了杂交率。4%戊二醛的固定效果比 4%多聚甲醛差，核酸损失较多，而且其穿透能力差、固定速度慢，细胞形态较模糊。就组织细胞中 RNA 含量而言，4%戊二醛固定的组织细胞中 RNA 的量只有正常的 60%~70%，但其本底则增高三倍或更高，因而严重影响实验结果的观察。乙醇:冰醋酸固定液虽然广泛地用于核酸原位杂交，但其固定后组织细胞内 RNA 明显减少，但其本底很低。Carnoy 固定液对不同的组织细胞固定结果不完全相同。同时固定的时间亦是一个影响原位杂交的重要因素，因此还须根据具体实验摸索出适于自己要求的固定液及固定时间。

3. 湿盒:

原位杂交中所应用的杂交液成分复杂，每张标本所用的杂交液亦较少，常为 20~100 μ l，而杂交的温度变化也很大，从 37~62℃。因此，为了防止杂交液中液体蒸发后造成杂交液浓缩，甚至完全干燥，使探针非特异性吸附增多，本底增高，必须使用密闭的湿盒。湿盒底部所加液体必须与杂交液中盐的浓度相同，并要防止湿盒盖顶部水滴流入玻片上，使杂交液中探针过度稀释而影响杂交结果。为防止杂交液蒸发，还可在杂交液上加盖一张硅化的盖片，其边缘用橡胶水泥 (rubber cement) 封闭，用石蜡封闭也可以很好地防止杂交液蒸发。

4. 组织细胞杂交前的预处理:

核酸原位杂交同样遵循核酸杂交的一般原则，但与核酸滤膜杂交及液相杂交不同的是，组织细胞中的核酸都与细胞内的蛋白质结合，以核酸蛋白复合体的形式存在于细胞浆或细胞核中，固定过程中固定液的交联作用使胞浆或胞核内的各种生物大分子形成网络，影响探针的穿透力，阻碍杂交体的形成。因此必须使用去垢剂 (detergent) 和/或蛋白酶对组织细胞进行部分地消化酶解以去除核酸表面的蛋白质，使探针在细胞基质中获得最大的穿透力而易于与靶核酸进行杂交。常用的去垢剂有 Triton X-100 和十二烷基硫酸钠 (SDS)，常用的蛋白酶有蛋白酶 K 等。值得注意的是，蛋白酶 K 的质量必须纯，不能含有任何核酸酶，否则对实验有极大的破坏性，甚至导致实验完全失败。蛋白酶 K 的浓度、消化时间在不同的组织细胞中相差极大，因此必须进行一系列的预试验找出适当的浓度及消化时间，防止过度消化导致细胞结构的破坏和核酸从载片上脱落而出现假阴性，影响实验结果的观察。

5. 探针的选择:

核酸原位杂交中所用的探针可以是双链的 DNA (dsDNA)，或单链的 DNA (ssDNA)，或为 RNA，近年来人工合成之寡核苷酸也得到了广泛的应用。各种探针选择必须以杂交取得最好效果为依据。一般而言，标记的 DNA 或 RNA 探针都可用于 DNA 或 RNA 的定位，其长度为 50~300bp 最好，这个长度范围的探针在组织细胞中的穿透能力好，杂交效率高。在特殊情况下，如染色体中基因定位，或为使探针交联成网络而增强杂交信号时，可应用长达 1.5kb 的探针。

(1) 双链 DNA 探针: 常用于杂交的探针之一。可通过切口平移标记或随机引物标记法标记。切口平移标记可以用来标记特定的插入片段，也可用于标记插有特定片段的完整质粒。标记探针的长度主要取决于体系中 DNA 酶 I (DNase I) 与 DNA 聚合酶 I (DNA polymerase I) 的比例，因此必须根据不同的体系进行调整。随机引物标记法与切口平移标记法相比，能产生高比活的探针，但其标记探针的产量较低，每次反应只有 50ng。因此在行大量切片的原位杂交时一般不用随机引物标记法，因原位杂交中每张切片所用的探针大约为 10ng，每次标记反应之探针只能用于 5~10 张切片。

(2) 人工合成脱氧寡核苷酸: 可由 DNA 合成仪人工合成。与克隆的 DNA 相比，人工合成之寡核苷酸探针有下述优点: ①特异性高; ②当 DNA 顺序未知时可根据氨基酸顺序进行合成; ③可用于相似基因顺序差异研究; ④可用合成之不同顺序探针对特定基因进行最佳杂交条件的筛选; ⑤由于寡核苷酸分子量小，因此与相同量的 dsDNA 探针相比，其摩尔浓度高，可达到几十倍甚至上百倍。寡核苷酸的标

记主要为末端标记法,可应用 T_4 多核苷酸激酶 (T_4 polynucleotide kinase) 进行 5' 末端标记,也可用脱氧核苷酸末端转移酶 (terminal deoxynucleotidyl transferase) 进行 3' 末端标记。

(3) 单链 cDNA 探针,常通过克隆载体 M13 获得。ssDNA 探针与 dsDNA 探针相比其最大优点在于,ssDNA 探针不会像 dsDNA 探针那样与自身互补的第二条链复性杂交,增加了探针的有效浓度。

(4) 单链反义 RNA 探针:可由构建的 RNA 表达载体而获得。在 RNA 聚合酶作用下,以 DNA 为模板合成反义 RNA 探针。这种探针与切口平移标记的 DNA 探针相比特异性高, RNA/RNA 形成的杂交分子热稳定性好,而且探针的大小也比较恒定,因而增加了杂交的敏感性及均一性。此反义 RNA 探针不含载体顺序减少了非特异杂交,还能防止 dsDNA 中第二条链的竞争性杂交。杂交后用 RNA 酶消化单链未杂交的探针可明显减少本底,因此, RNA 探针在核酸原位杂交中的应用也越来越广泛。

(5) 反义寡核苷酸探针:将合成之 20~70mer 寡核苷酸亚克隆到 RNA 表达载体上而获得。这种探针既有寡核苷酸探针的优点,又有 cDNA 探针的优点。

6. 探针的标记:

探针的标记方法详见有关章节。本章只讨论与原位杂交关系密切的有关事项。探针的标记主要可分为放射性标记与非放射性标记两种方法 (表 6-1)。

表 6-1 原位杂交探针的标记

放射性核素	非放射性核素
^3H	碱性磷酸酶
^{32}P	生物素、光敏生物素
^{35}S	荧光素
^{14}C	地高辛
^{125}I	乙酰汞
	抗 dsDNA、RNA-DNA、 RNA-RNA 杂交体

(1) 放射性标记:常用于标记探针的放射性核素有 ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^3H , ^{125}I 。放射性核素的敏感性高,方法简便,操作稳定,可应用核乳胶或 X 线片通过放射自显影的方法检测。 ^3H 标记探针的放射自显影分辨率高,但其曝光时间长至数周至数月。 ^{32}P 与 ^{35}S 是原位杂交应用多而广的放射性核素,由于其能量高,常可在几天内得到结果。但 ^{32}P 与 ^{35}S 相比分辨率低,本底高。 ^{14}C 与 ^{125}I 分辨率差,而很少用于原位杂交。

(2) 非放射性标记:与放射性核素标记之探针相比,非放射性标记具有安全、无放射性污染、稳定性好、显色快而易于观察等优点,因此非放射性标记近年来得到了广泛的应用。特别是生物素 (biotin) 标记是应用最多、最广的方法之一。生物素标记之 dUTP 可通过上述的标记方法 (如切口平移等) 直接掺入到双链 DNA 上。也可以用光敏生物素 (photobiotin) 的形式通过特定波长的光线激活而结合到 dsDNA、ssDNA、RNA 上。此外,尚可应用地高辛标记及直接用化学修饰法标记探针,如荧光素、汞化等。其它如碱性磷酸酶、溴脱氧嘧啶标记等也有报道。值得注意的是,不同厂家的产品质量相差极大,而且其各自显色系统也不完全相同,因此必须根据实际情况选择。

7. 探针的长度:

用于细胞染色体原位杂交常用较长的探针以增加杂交信号。相反,用于细胞的原位杂交则常用较短的探针,通常为 50~300bp。小分子的探针穿透力较大分子探针强。但大分子探针可在组织细胞中形成网络 (network) 而增加杂交信号,同时也使本底增高。dsDNA 探针的长度随着切口平移系统中 DNA 酶 I 的浓度增高而变短,低浓度的 DNA 酶 I 常产生 1500bp 左右的探针,而高浓度的 DNA 酶 I 产生 50~200bp 的探针,必要时可于标记后取最小量标记之探针行 1%~2% 琼脂糖凝胶电泳,以确定所标记探针

的分子大小。

8. 杂交条件:

有关核酸杂交的分子动力学完全适于核酸原位杂交, 有关内容详见 6.1.2 节, 但原位杂交与普通的滤膜杂交及液相杂交又有一定的差异。同时与免疫组织化学相比, 原位杂交的一个主要优点就是, 其杂交反应的特异性可通过调节反应条件而进行精确的控制。杂交的特异性依赖于探针的结构、杂交温度、pH 及杂交液中甲酰胺和盐离子的浓度。碱基的错配可经过控制严格的杂交条件而排除。在非严格条件下(如低温、高盐或低浓度的甲酰胺等), 探针可与只有 70%~90% 同源顺序的核酸杂交而产生非特异杂交信号。在严格条件下, 探针只能同高度同源的靶顺序杂交。用放射性核素标记的 dsDNA 或 RNA 探针在每张切片中用量大约为 2~10ng。杂交液的体积应尽量缩小, 每张切片 10~20 μ l。应用生物素标记的探针时, 则每张切片要用 10~20ng DNA 探针。常用的杂交液多为 50% 甲酰胺、2 \times SSC, 为提高探针的相对浓度还要应用 10% 硫酸葡聚糖 (dextran sulphate)。一般温度范围在 37~60 $^{\circ}$ C。冲洗时温度不能高于 50 $^{\circ}$ C, 否则将导致组织细胞结构的破坏及组织或细胞从切片上脱落, 使实验失败。但如为石蜡切片组织固定好, 粘附牢固, 也可耐受 100 $^{\circ}$ C 左右的高温。cDNA 与 RNA 探针在原位杂交中最佳温度大约为 50 $^{\circ}$ C, 即低于解链温度 20~25 $^{\circ}$ C。DNA 探针的杂交可在 2~4 小时内完成, 而 RNA 探针则应杂交过夜。与细胞内 mRNA 杂交不同, 细胞内 DNA 杂交应将组织切片加热至 95 $^{\circ}$ C 5~15 分钟, 以使靶 DNA 变性。杂交后为减低非特异杂交进行的冲洗, 其 SSC 的浓度可低至 0.1 \times SSC。应用放射性核素探针时冲洗可达几小时, 而用生物素及地高辛等标记之探针冲洗时间则可缩短为 15 分钟。用反义 RNA 探针时, 可于杂交后用 RNA 酶消化以去除本底, 这种方法比 DNA 探针杂交后用核酸酶 S_1 消化效果好。应用核乳胶放射自显影时, 切片应预先空气干燥。总之杂交时及杂交后的处理都对杂交结果有极大的影响, 因此必须准确应用各种方法使之能获得最佳效果。

6.3.1.2 结果的评定

1. 特异性与敏感性:

核酸原位杂交的特异性主要由杂交的严格性 (stringency) 所决定。DNA 探针长度超过 0.5kb 时非特异性杂交增多, 本底增高; 此外, 探针与无关基因中部分同源顺序的非特异结合亦是非特异杂交的原因之一。因 tRNA 的含量占细胞总 RNA 的 90%, 在对 mRNA 定位的原位杂交中, 非特异杂交的最常见原因之一就是探针与 tRNA 的非特异结合。因此在进行原位杂交之前, 必须先应用 Northern 杂交以检测探针的不同严格条件, 以此评定原位杂交的结果。除了探针的非特异性结合之外, 检测系统亦是导致非特异结果的原因之一。生物素标记的探针常用免疫组织化学方法检测, 在许多组织中都含有内源性生物素 (vitamin H) 而出现假阳性结果, 因此而限制了生物素标记探针的应用。地高辛则不存在这种问题。应用液体乳胶检测同位素标记探针时, 化学潜像 (chemography) 主要由于重金属离子的作用而产生, 因此必须防止固定液中混有重金属离子, 切片于 4 $^{\circ}$ C 曝光等可防止化学潜像产生。

高度敏感是原位杂交的优点之一, 用放射性标记的 RNA 探针可检测细胞到内 20 个拷贝的 mRNA, 而 dsDNA 经缺口平移标记的探针, 则需 200 个以上拷贝的 mRNA。同时, 固定与杂交的条件则随着杂交检测目的而异。不均一组织中 mRNA 的检测则更为复杂, 敏感性更难以评定, 因此每一次反应中必须有阳性对照和阴性对照。组织切除后若不及时固定, 可能会由于 mRNA 降解而出现假阴性结果。探针的长短、浓度、在组织中的穿透能力、杂交及杂交后的冲洗严格性、检测系统的灵敏性等都可产生假阳性或假阴性结果。DNA 探针在检测细胞或组织内 DNA 时比较稳定。由于染色体 DNA 空间位置伸展范围大, 可以应用较长的探针, 一般可用 2kb 以上, 其敏感性很高, 在染色体或组织切片中甚至可进行单拷贝基因的定位。

2. 对照的选择:

原位杂交有高度的敏感性和特异性, 但这种优点如无确切的阳性或阴性对照则很难加以评定, 因此除探针的选择应经过鉴定之外, 必须在每一次实验中选择阳性和阴性对照。阳性对照选择可用: ①

Northern 或 Southern 印迹杂交；②将原位杂交与免疫组织化学联合应用；③用不同互补探针与靶核酸杂交。阴性对照选择可应用；①用非标记 cDNA 预杂交；②用无关的非特异顺序（如载体）等作探针；③杂交前用 RNA 酶或 DNA 酶消化处理切片。此外核乳胶或其它显色检测系统应先进行本底检测，以排除假阳性或假阴性。

6.3.1.3 展望

核酸原位杂交是在组织和细胞内进行 DNA 或 RNA 精确定位和定量的特异性方法之一，它对于研究细胞的生物学功能，基因表达的规律，以至肿瘤发生机制及病原微生物的检测，有广泛的应用前景。随着方法学的不断发展与完善，检测的灵敏性、特异性及方法的简捷等快速、无害、稳定使其有更为广泛的应用前景，必将对医学及生物学研究有极大推动作用。

6.3.2 核酸原位杂交的基本操作方法

6.3.2.1 组织细胞内 mRNA 的原位杂交

操作步骤：

1. 冰冻切片的制备：

(1) 手术切块或新鲜活检取材标本 $0.4\text{cm} \times 0.4\text{cm}$ 大小，用 PBS 冲洗两次后置于冰冻切片机标本固定头上。

(2) 行 $8\mu\text{m}$ 切片，附于涂有 1mg/ml 多聚赖氨酸的载片上，室温空气干燥 3 分钟。

(3) 4% 多聚甲醛 (PBS 新鲜配制) 室温下固定 20 分钟，或于 4°C 下用乙醇:冰醋酸 (3:1) 固定 20 分钟。

(4) PBS 冲洗切片，室温下冲洗 2 次，每次 5 分钟。

(5) 30%，60%，80%，95%，100% 梯度乙醇脱水。

(6) 切片空气干燥或置 100% 乙醇中， -20°C 冰箱内保存。

2. 细胞涂片的制备：

(1) 贴壁培养细胞用 0.04% EDTA 消化后离心（注意不能用胰酶消化，以防止胰酶中 RNA 酶的降解作用）。悬浮培养细胞可直接离心后用 PBS 冲洗 2 次，细胞计数后用 PBS 重新悬浮细胞至其浓度为 10^6 个/ml。

(2) 于细胞涂片机上将细胞涂在有 1mg/ml 多聚赖氨酸载片上，或取 2~3 滴细胞悬液滴于载片上，室温下空气干燥 5 分钟。

(3) 余处理同上述步骤 (3) ~ (6)。

3. 杂交前的预处理：

(1) 将切片或涂片置 $1\mu\text{g/ml}$ 蛋白酶 K (溶于 50mmol/L EDTA, 0.1mol/L Tris·Cl, pH8.0 中) 溶液中 37°C 下消化 30 分钟。

(2) 去离子水冲洗切片 2 次，每次 5 分钟。

(3) 乙酰化切片：将切片置于 0.1mol/L 三乙醇胺 (pH8.0) 溶液中并彻底搅拌，同时在每 L 溶液中加入乙酸酐 (acetic anhydride) 5ml，待其完全溶化后静置 10 分钟。

(4) 用 $2 \times \text{SSC}$ 冲洗二次，每次 5 分钟，70%、95% 乙醇处理，空气干燥。

4. 杂交

(1) 杂交可在 40% 甲酰胺、 $4 \times \text{SSC}$ 、 0.1mol/L 磷酸钠溶液 (pH8.0) 中，于 50°C 杂交；或 50% 甲酰胺， 5mmol/L EDTA, 0.3mol/L NaCl, 20mmol/L Tris·Cl (pH8.0) 于 50°C 杂交。每张切片可用探针 1~10ng。应用 DNA 探针时可加入 $100\mu\text{g/ml}$ 变性的大肠杆菌 DNA 或鲑精 DNA 及 $100\mu\text{g/ml}$ 酵母 tRNA，并可在杂交液中加入 Denhardt 液 (0.02% 牛血清白蛋白, 0.02% 聚蔗糖, 0.02% 聚乙烷吡咯酮) 以减少本底，加入 10% 硫酸葡聚糖 (dextran sulphate) 以增加探针的相对浓度。

(2) 每张玻片加入杂交液 10~100 μ l 后, 加硅化盖玻片于杂交液上, 边缘用橡胶水泥 (rubber cement) 或石蜡封闭, 以防止杂交液蒸发。

(3) 将玻片置于密闭湿盒中, 50℃保温 12~14 小时。

5. 杂交后处理:

(1) 将玻片从湿盒取出, 去掉橡胶水泥或石蜡后, 于 2 \times SSC 中轻轻揭去盖片并洗去杂交液。

(2) 使用 RNA 探针的杂交后处理:

1) 将玻片于含 20 μ g/ml RNA 酶 (溶于 0.5mol/L NaCl, 10mmol/L Tris·Cl, pH8.0 中) 溶液中, 37℃消化 30 分钟。

2) 用不含 RNA 酶的上述溶液于 37℃冲洗 30 分钟。

3) 用 0.1 \times SSC 50℃冲洗 10 分钟。

4) 用 0.1 \times SSC 室温冲洗 10 分钟。

5) 70%、95%乙醇脱水, 每一浓度中 5 分钟, 然后空气干燥。

(3) 使用 DNA 探针的杂交后处理:

1) 用不含探针的杂交液在低于杂交温度 3~5℃条件下反复冲洗切片。

2) 用 0.1 \times SSC 室温下冲洗, 必要时可用放射线监测仪检测每一张切片, 以防止过度冲洗。

3) 70%、95%乙醇脱水, 每一浓度中 5 分钟, 空气干燥。

6. 放射自显影:

详见后。

注意事项:

(1) 选择冰冻切片或细胞涂片固定液时应时, 对不同组织应有区别。肝、脾、肾等组织以乙醇:冰醋酸 (3:1) 为好; 而多聚甲醛固定本底较高。

(2) 切片在进入固定液之前, 必须在空气中干燥至组织或细胞涂片表面没有水份, 否则组织细胞极易脱落。

(3) 探针的选择: 检测 mRNA 的原位杂交以 RNA 探针为佳, 其制备简单、敏感性高。其次为人工合成之寡核苷酸探针, 这种探针可以进行组织胚胎发育中基因表达调控、剪切等研究。

(4) 分辨率与标记探针所用的放射性核素种类有关,³H 标记之探针分辨率最好, 其次为³⁵S, 而³²P 分辨率最差。

(5) 所有操作过程必须戴手套, 应尽可能使用镊子等器械操作, 避免 RNA 酶的污染。

6.3.2.2 与间期细胞内染色质 DNA 的原位杂交

操作步骤:

与间期细胞内 DNA 的原位杂交可应用冰冻切片、细胞涂片、石蜡切片。玻片的准备同上述 mRNA 杂交法。石蜡切片应将组织片附于涂有 1mg/ml 多聚赖氨酸的玻片上之后于 80~120℃烘烤 4 小时, 以防止组织片脱落。经脱蜡后再行原位杂交。

1. 杂交前玻片的预处理:

(1) 70%、95%乙醇中处理各 5 分钟, 空气干燥。

(2) 将玻片置于底部有 2 \times SSC 湿盒中, 每张玻片加 200 μ l 1mg/ml RNA 酶 (溶于 20mmol/L NaAc, pH5.0, 沸水煮 5 分钟以去除 DNA 酶后, 于 -20℃保存, RNA 酶消化细胞内总 RNA 时, 其浓度可达 100 μ g/ml, 用 2 \times SSC 稀释), 上加盖 2.2cm \times 2.2cm 盖片。

(3) 用 2 \times SSC 洗玻片 3 次, 每次 5 分钟。70%、95%乙醇脱水, 空气干燥。

(4) 玻片置 70mmol/L NaOH 中 3 分钟, 70%、95%乙醇脱水, 空气干燥。

2. 杂交:

(1) 为防止杂交液蒸发, 应在含 50%甲酰胺的杂交液中 37℃进行杂交。

杂交液：50% 甲酰胺、4× SSC、5× Denhardt 氏液、100μg/ml 变性鲑精 DNA。如所用探针为 dsDNA，使用前必须于 90℃ 变性 10 分钟后于冰浴中快速冷却。

(2) 每张玻片加杂交液 20~50μl，加硅化之盖片后橡胶水泥或石蜡封闭周边。

(3) 于密闭湿盒中 37℃ 杂交 12~14 小时。

3. 杂交后处理：

(1) 杂交后将玻片从湿盒中取出，置于 2× SSC 中去掉盖玻片及杂交液，并于 2× SSC 冲洗切片 2 次，每次 1.5 分钟。

(2) 去掉非特异结合的探针：

1) RNA 探针的处理：

a. 将玻片置于 RNA 酶溶液中 (20μg/ml，溶于 2× SSC 中)，于 37℃ 消化 1 小时。

b. 于 2× SSC 中冲洗玻片 2 次，每次 10 分钟。

c. 70%、95% 乙醇脱水，空气干燥。

2) DNA 探针的处理：

a. 用 2× SSC 于低于杂交温度 5℃ 冲洗 3 次，每次 10 分钟。

b. 70%、95% 乙醇脱水，空气干燥。

c. 放射自显影。

注意事项：

(1) 细胞在杂交前后乙醇脱水能保持良好的形态结构，应于乙醇中放置足够的时间，每一梯度应不少于 3 分钟，最好能适当振动。

(2) 应用 RNA 酶于杂交前消化细胞内 RNA，能减少探针的非特异结合性，但消化后冲洗应充分，以防止组织细胞中残留 RNA 酶对 RNA 探针的降解作用。

(3) 组织细胞中的 DNA 于杂交前必须变性，DNA 变性方法很多，碱、热、有机溶剂及酸变性效果都可以，但以碱变性效果最好。

(4) 硫酸葡聚糖能增加杂交效率，因硫酸葡聚糖能使探针的相对浓度增高，但冲洗要充分，否则残留的硫酸葡聚糖使本底增高。

(5) 所用盖片应硅化，某些盖片能释放碱性成分，使杂交液的 pH 值明显升高，从而阻碍杂交的形成，因此，所用盖片应于 1mol/L HCl 中煮沸 10 分钟后用 10mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 冲洗。

6.3.2.3 与分裂中期细胞染色体 DNA 的原位杂交

应用探针与分裂中期细胞染色体 DNA 的原位杂交可用于基因定位、基因缺失、基因易位、特异基因整合部位检测等研究，现已广泛地应用于医学临床遗传病的诊断、肿瘤中特定基因的定位筛选等。

操作步骤：

1. 细胞染色体的制备：

细胞分裂处于中期时染色体形成，多条染色体密集于细胞中，因此必须把它们分散开以进行各种研究。通常培养细胞在指数生长期其分裂指数只有 3%~5%，用来显示染色体其数量很少，特别是原代培养的人外周血淋巴细胞、表皮细胞等分裂指数更低，因此，常用外源性刺激因子如植物血凝集素 (PHA)、刀豆素 A (Con A)、商陆凝集素、EB 病毒等刺激细胞分裂，同时加用秋水仙素 (colchicine) 或其衍生物秋水仙胺 (colcemid) 破坏纺锤丝，阻抑细胞于分裂中期，经低盐溶液低渗处理使细胞体积增大，染色体松散以供进一步研究。

(1) 传代培养细胞染色体的制备：培养细胞来源丰富，细胞分裂率高是制备染色体的极好材料，操作方法如下：

1) 取指数生长期单层培养细胞分裂相多者加入秋水仙素 (0.04~0.8μg/ml 培养液)，37℃ 培养 6~10 小时。

- 2) 将培养瓶左右反复摇动或用吸管轻轻吹打, 使 90% 的分裂细胞从瓶壁脱落。
- 3) 转入离心管中, 1 000r/min 离心 10 分钟。
- 4) 低张处理: 吸除上清液, 加入预热至 37℃ 的 0.075mol/L KCl 溶液 10ml, 温箱中静置 20 ~ 30 分钟。
- 5) 预固定: 向悬液中加入新鲜醋酸: 甲醇 (1:3) 固定液 1ml, 用吸管吹打均匀;
- 6) 1 000r/min 离心 10 分钟, 去上清, 再加醋酸: 甲醇固定液 5ml, 轻轻吹打均匀, 静置 15 分钟; 并重复一次。
- 7) 制片: 1 000r/min 离心 10 分钟, 去上清, 根据细胞数量余下固定液 0.5 ~ 1ml, 于涂有 1mg/ml 多聚赖氨酸玻片上滴 1 ~ 2 滴细胞悬液, 室温中干燥后备用。

(2) 白细胞染色体的制备:

- 1) 采血: 取肝素抗凝血 1 ~ 2ml, 在洁净台内向 RPMI 1640 培养液中滴入 0.4 ~ 0.5ml。
- 2) 加入秋水仙素: 37℃ 培养到第 62 ~ 72 小时之间加入秋水仙素使其终浓度为 0.04 ~ 0.8 μ g/ml 培养液, 继续培养 20 分钟 ~ 1 小时。
- 3) 1 000r/min 离心 10 分钟。
- 4) 低张处理: 吸除上清液, 加入预温过的 0.075mol/L KCl 10ml, 温箱中置 15 ~ 20 分钟。
- 5) 同传代细胞培养法中步骤 5) ~ 7)。

2. 与细胞中期染色体 DNA 的杂交

(1) 去除内源性 RNA

- 1) 玻片于 10 μ g/ml RNA 酶 (溶于 2 \times SSC 中) 中, 37℃ 消化 1 小时。
- 2) 2 \times SSC 冲洗 3 次, 5 分钟/次。
- 3) 70%、95% 乙醇脱水各 5 分钟, 空气干燥。

(2) 染色体 DNA 的变性

- 1) 将玻片置于 2 \times SSC 配制 70% 甲酰胺中, 于 70℃ 变性 2 分钟。
- 2) 70%、95% 乙醇脱水各 5 分钟, 空气干燥。

(3) 杂交:

杂交液: 50% 甲酰胺, 0.3mol/L NaCl, 30mmol/L 柠檬酸钠, 10% 硫酸葡聚糖, 40mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH6.0), 100 μ g/ml 变性鲑精 DNA。

- 1) 每张玻片加入杂交液 20 ~ 50 μ l。
- 2) 盖 18mm \times 18mm 盖片后用橡胶水泥封片, 37℃ 杂交 11 小时。

(4) 去除非特异结合探针:

- 1) 39℃, 50% 甲酰胺 (2 \times SSC 配制) 冲洗 10 分钟。
- 2) 2 \times SSC 于 39℃ 冲洗。
- 3) 70%、95% 乙醇脱水各 5 分钟, 空气干燥。

6.3.2.4 放射自显影

核酸原位杂交中放射性核素标记的探针, 经杂交后必须经过放射自显影, 以对被检测之靶核酸进行定位与定量, 这一技术就是放射自显影。常用的放射性核素为³²P 和³⁵S 及³H, 它们均放出 β 粒子并可通过核乳胶或 X 线片经曝光、显影、定影等过程而显示出来。现将核酸原位杂交后放射自显影的基本技术简介如下。

设备及试剂:

- (1) 暗室: 由于核乳胶有高度的感光能力, 因此暗室必须完全避光, 同时由于玻片涂乳胶后需 2 ~ 4 小时的空气干燥, 就要求暗室要设有双层的避光门或门帘。暗室中的安全灯要求也很高, 可用 Kodak、Wratten 系列 II 号或 OA 滤色片, 并要用 25W 的灯泡。国产暗室灯要用有开关保险的红灯, 要使光低到

以不妨碍暗室内操作为限,以防止乳胶非特异性曝光。为使乳胶于 43~45℃融化,暗室中应备有恒温水浴箱,但要防止水浴箱的指示灯漏光。乳胶可用浸片法或涂片法涂于玻片表面,浸片时可用玻片盒盛乳胶,浸入的玻片应慢入慢出,防止气泡形成。玻片涂完乳胶后置于玻片架上室温在暗室内干燥 2~4 小时。

(2) 放射性核乳胶:常用核乳胶有中国原子能研究院产的核-4 乳胶及 Kodak NTB-2 核乳胶。这两种核乳胶在室温下是固体的胶冻状,当加热到 45℃时融化为液体状。使用前应加入等体积的去离子水 1:1 稀释,如乳胶太稠,涂片后在玻片上形成一层厚的乳胶层,不能增加敏感性而只能增加本底。稀释后之乳胶以 10~20ml 为单位分装入密不透光的分装瓶内,外包锡箔或黑纸,于 4℃保存。取 2 张洁净玻片,浸于稀释后之乳胶中,慢慢取出后暗室内干燥 20 分钟,显影定影后阿拉伯树胶封片于 100×物镜、10×目镜下观察银颗粒数,如果每个视野中银颗粒数少于 100 个,则该乳胶可用于放射自显影。如少于 50 个则效果更佳。如颗粒多于 100 个则不能用于放射自显影。

操作步骤:

(1) 于暗室内,45℃水浴箱中将核 4 乳胶融化,并倒入能浸入玻片的小盒中。倾倒时速度要慢,并沿小盒壁倒入,以防止气泡形成。

(2) 将玻片轻轻地浸入融化的乳胶中,缓慢取出,垂直置于玻片架上。

(3) 室温下干燥玻片 2~4 小时。

(4) 将玻片装入密闭的暗盒中,暗盒中可放入小袋硅胶,以保持暗盒内干燥。

(5) 将暗盒置于 4℃曝光。使用³H 标记探针要曝光 15~30 天,³⁵S 标记探针要 3~5 天,³²P 要曝光 2~3 天。

(6) 曝光时间充分后,暗室内将玻片置于玻片架上,用 D-19 显影液显影,如无 D-19 则可将 D-76 显影液用双蒸水 1:1 稀释,并调节温度至 20℃,显影 3~5 分钟,蒸馏水冲洗 2 次,每次 1 分钟。

(7) 将玻片置于 20℃之 F-5 定影液或酸性定影液中定影 5 分钟,蒸馏水冲洗 5 次,每次 3 分钟。

(8) 染色:定影后之玻片直接行苏木素伊红染色,或 Ciemsa 染色。阿拉伯树胶封片,于光镜下观察结果。

6.3.2.5 非放射性核素标记在核酸原位杂交中的应用

近年来非放射性核素标记探针在原位杂交中得到了广泛的应用,其中应用最多的就是生物素。DNA 探针可用生物素化的 dUTP 或 dATP 进行标记,RNA 探针可用生物素化的 rUTP 标记。生物素标记之探针其 T_m 低于放射性标记之探针,并与标入的生物素量成反比。上述探针可通过切口平移或随机引物法标记。此外尚可应用光敏生物素 (photobiotin) 标记 DNA、RNA 或蛋白质,其标记的量,但光敏生物素标记探针的本底高,其产生原因可能是由于探针中混有其它物质如蛋白质及无关核酸等,另一方面可能由于光敏生物素易于与带阴电荷的分子结合而产生假阳性结果。生物素标记之探针可通过离心柱层析或 Sephadex G-50 柱层析而纯化,亦可在加入载体 DNA 后经乙醇反复沉淀而纯化。

生物素化探针检测主要有抗生物素抗体检测及 avidin/streptavidin 检测。抗体可以是单克隆抗生物素抗体,也可以是多克隆抗体。两种抗体敏感性无明显差异。卵白素 (avidin) 和链亲和素 (streptavidin) 是具有生物素结合特性的蛋白质,它们与生物素有极高的亲和能力。Avidin 是从卵清中提取的一种糖蛋白,分子量大约有 66 000, $pI=10.5$ 。Avidin 碳水化合物成分带有正电荷,能与 lectins (凝集素) 及其它带阴电荷的生物素大分子 (如核酸等) 结合,因此其特异性较差。而 streptavidin 为 *streptomyces avidinii* 分泌的一种分子量为 60 000 的蛋白质,不含有碳水化合物成分, pI 为中性,因此比 avidin 有更高的特异性。Biotin/streptavidin 检测系统共有三种不同的方法:①streptavidin 作为原始靶核酸与检测物 (生物素化酶如碱性磷酸酶) 之间的桥接物;②以 streptavidin 和生物素化酶复合物形式直接检测标记核酸上的生物素;③用荧光素标记之 streptavidin 直接检测生物素。这三种方法中以第二种方法最为敏感,但其特异性较差。第一种方法中作用的步骤较第二、第三种复杂。常用的酶为碱性磷酸酶。它能作用于底物 5-溴

-4-氯-3-吲哚磷酸 (5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate, BCIP) 与显色原硝基四氮唑蓝 (nitro blue tetrazolium NBT) 而产生棕蓝色色物。现已证实 streptavidin-碱性磷酸酶-BCIP/NBT 联合应用检测生物素化 DNA 时敏感性高。改变这一系统中的任何成分将导致其敏感性降低。

以下介绍两种生物素标记探针的检测方法。

方法一：抗生物素蛋白-碱性磷酸酶检测法

(1) 将玻片浸于 22℃ 之抗生物素蛋白-碱性磷酸酶稀释液中 (1:100 稀释, 稀释液 TBT) 30 分钟。

注: TBT: 0.01mol/L Tris·Cl, pH7.5, 0.15mol/L NaCl, 0.25% (W/V) BSA, 0.05% Triton X-100

(2) TBS (50mmol/L Tris·Cl, pH 7.2, 100mmol/L NaCl,) 冲洗 2 次。

(3) 在显色液中保温 5~20 分钟 (显色液制备见附 1)。

(4) 用蒸馏水冲洗 5 分钟, 终止反应。

(5) 42℃ 空气干燥, 甘油明胶封片 (见附 2)。

方法二：抗生物素抗体检测法

(1) 将玻片在 27℃ 在 TBT 1:50 稀释之抗生物素抗体溶液中孵育 30 分钟。

(2) TBS 冲洗 2 次, 每次 5 分钟。

(3) 将玻片于 22℃, 在 TBT 1:200 稀释的生物素标记之兔抗鼠 F(ab)₂ 片段溶液中孵育 30 分钟。

(4) TBS 冲洗二次, 每次 5 分钟。

(5) 将玻片浸于抗生物素-碱性磷酸酶液 (TBT 1:50 稀释, 含 5% 脱脂奶) 中 10~20 分钟。

(6) 余同上述方法中 (2)~(5) 步。

附 1. 显色液的制备

NBT/BCIP 液。

(1) 将 10mg NBT 溶于 200μl 二甲基甲酰胺中。

(2) 于 37℃ 加入 1ml 底物缓冲液 (50mmol/L Tris·Cl, pH9.5, 100mmol/L NaCl, 1mmol/L MgCl₂) 后, 以滴入法将液体滴于 37℃ 的 30ml 底物缓冲液中。

(3) 将 5mg BCIP 溶于 200μl 二甲基甲酰胺中, 然后慢慢加入上述溶液中。置 -20℃ 保存。

附 2. 甘油明胶的制备

(1) 将 10g 明胶于 37℃ 溶于 60ml 蒸馏水中。

(2) 加入 70ml 甘油和 0.25g 苯酚。室温保存时呈胶冻状, 42℃ 时为液体状。

6.3.2.6 原位聚合酶链反应 (PCR in situ)

聚合酶链反应具有快速、灵敏、特异性高等一系列优点, 然而由于其不能进行组织细胞的定位, 因此在组织学、病理学、胚胎学乃至肿瘤学的研究工作中的应用受到限制。核酸原位杂交的敏感性较 PCR 低, 其检测范围约为每个细胞中 20~300 个拷贝, 此差异主要由所应用的探针及其显示系统所决定。而将两者结合的原位聚合酶链反应 (PCR in situ) 则具备了两种方法的优点, 即高度的敏感性、特异性及精确的定位。既可检测细胞内的基因的有无, 又可检测病原微生物的存在。

操作步骤:

(1) 组织细胞玻片的制备: 组织石蜡切片或细胞涂片的制备见前述方法, 但将载玻片改为盖玻片, 玻片经 80℃ 烘烤 4 小时后, 用玻璃刀将玻片裁成 3mm×5mm 大小的小片, 经脱蜡后置于 0.5ml 小离心管中。细胞涂片则于 70% 乙醇处理再置于 0.5ml 小离心管中。

(2) 加入 PCR 缓冲液 100μl, 其各种成分的终浓度为: 引物各 50ng, dATP、dGTP、dTTP 各 200μmol/L, 100μmol/L dCTP, 50μCi ³⁵S-dCTP, 40μl/ml DMSO, 6.7mmol/L MgCl₂, 67mmol/L EDTA, 67mmol/L Tris·Cl (pH7.4), 170ng/ml BSA, 16.6mmol/L (NH₄)₂SO₄, 10mmol/L β-巯基乙醇。于 97℃ 变性 10 分钟。加入 Taq DNA 聚合酶 2 单位。混匀, 12 000r/min 离心 10 秒, 加入液体石蜡 50μl。于扩增仪中 94℃ 30 秒, 50℃ 45 秒, 70℃ 45 秒, 扩增 5~10 个循环。

(3) 取出玻片, 75%、95% 乙醇脱水各 5 分钟, 空气干燥。

(4) 放射自显影, 见前述方法。玻片浸乳胶后慢慢取出, 空气干燥 2~4 小时, 于暗室中 4℃ 曝光 3~5 天。经显影、定影、HE 染色后封于载片之上, 光镜观察结果。

注意事项:

(1) 引物的合成: 原位 PCR 中所用的引物可根据实验者的要求而定, 可以是细胞内特定基因也可以是某种病原体如细菌、病毒的特定片段引物。

(2) 示踪显色系统可以是放射性核素, 也可以是生物素标记的 dUTP, 应根据具体情况调节浓度。当应用 bio-dUTP 代替 dTTP 或用 ^{35}S -dCTP 代替 dCTP 时, 应适当减少 dTTP 或 dCTP 的浓度。

(3) 原位 PCR 的循环数: PCR 的产物其理论值应为 2^n (n 为热循环数), 因此其产物的量由循环的多少所决定, 循环次数少, 所需片段拷贝数亦少, 检测敏感性低, 达不到所需的要求。循环次数多, 产物过多, 导致产物向反应体系、细胞外及组织之间外泄, 反而使本底增高。通常以 5~10 次循环为佳, 必要时可增加至 20 个循环, 但过多地增加循环数除本底高之外, 细胞形态亦受到破坏, 影响结果的观察。

6.4 新技术简介

核酸分子杂交技术虽是分子生物学领域中一种较经典的技术, 但也在不断发展之中。总的发展趋势是固相化, 便于自动化操作和精确定量。本文仅简要介绍几种新技术的基本原理, 具体操作过程请参阅有关文献。

6.4.1 亲和捕捉法

6.4.1.1 羟基磷灰石亲和法

经典的亲和捕捉法 (affinity capture) 是羟基磷灰石亲和法。羟基磷灰石 (hydroxyapatite) 对单链和双链 DNA 具有不同的亲和力, 可利用不同的盐浓度将 dsDNA 和 ssDNA 分开。

标记的单链 DNA 探针与待测 DNA 在液相中杂交后, 加入悬浮于适当盐溶液中的羟基磷灰石, 经离心和洗脱, 杂交的双链 DNA 将与羟基磷灰石结合, 而单链 DNA 探针则被去除。测量羟基磷灰石的放射性强度, 即反映了待测样品中目的基因序列的量。

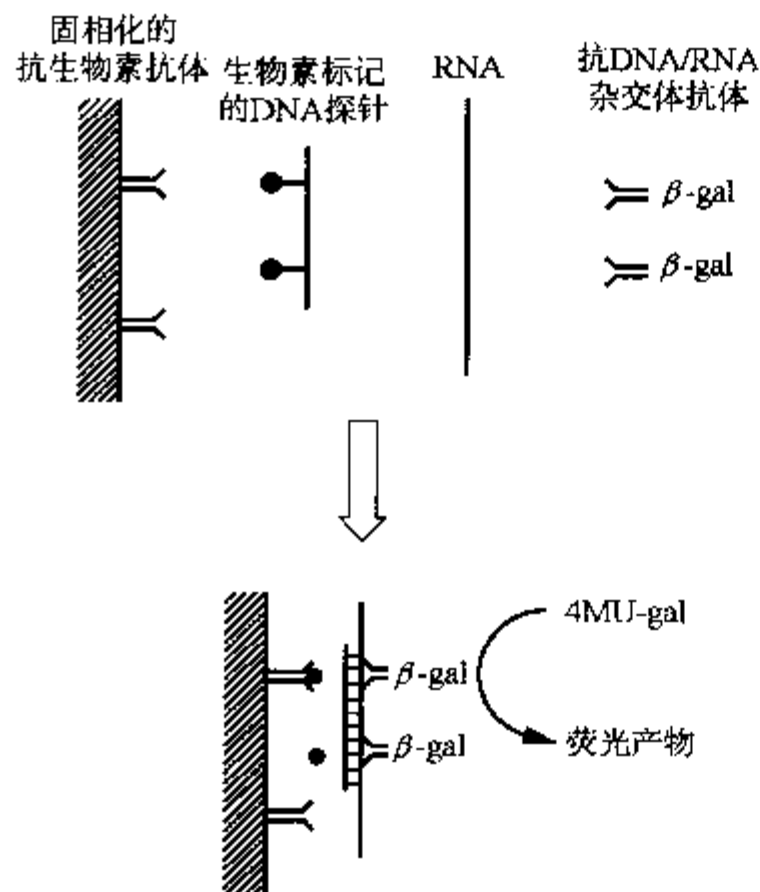


图 6-9 抗体亲和捕捉法原理示意图

羟基磷灰石层析法还广泛应用于差示文库 (扣除文库, 参见第 21 章) 的建立和吸收探针的制备。

另外, 羟基磷灰石还可连接在磁珠上, 可通过磁铁进行分离, 而毋需离心。

6.4.1.2 抗体亲和法

其原理如图 6-9, 生物素标记的 DNA 探针经与待测 RNA 样品杂交后, 被固相的抗生物素抗体捕捉。然后加入抗 DNA/RNA 杂交体抗体, 此抗体仅特异性地与 DNA:RNA 杂交体结合。连接在此抗体上的 β -半乳糖苷酶可催化其底物形成荧光物质, 从而可将其中的目的 DNA 序列定量。

6.4.2 夹心杂交法

两个相邻但又不重叠的探针 (其中一种被标记), 同时与目的基因序列杂交。目的基因序列被夹在两个探针之间, 因此被形象地称之为夹心杂交 (sandwich hybridization) 或三明治杂交。

6.4.2.1 固相夹心杂交法

其基本原理如图 6-10。基因组中两个相邻的 DNA 序列 (A 和 B) 分别克隆入 M13 和 pBR322 载体中, 将克隆了 B 序列的 M13DNA 吸附于微量多孔塑料培养板上, 与液相中的靶基因杂交。靶基因序列 A 中又可与克隆了 A 序列的 pBR322 DNA 杂交。pBR322 DNA 上标记的生物素可通过链亲和素-碱性磷酸酶体系进行检测。

夹心杂交法的优点是: ①对核酸样品纯度要求不高, 粗样品结果同样可信; ②特异性较高, 因为必须经两步杂交才能得到结果; ③在微量多孔塑料培养板中可同时进行多个样品的检测; ④定量较准确; ⑤有利于实现自动化操作。

6.4.2.2 液相夹心杂交法

检测探针 (detection probe) 用放射性核素标记, 而捕捉探针 (capture probe) 用生物素标记, 在液相中杂交后, 通过吸附在多孔板上的链亲和素捕捉靶基因序列 (图 6-11)。

另一种液相类夹心杂交法的探测探针与上法相同, 而捕捉探针则为带 poly (A) 尾的 RNA, 通过包裹在磁珠上的 poly (dT) 捕捉杂交体。

6.4.3 链取代法

链取代法 (strand displacement) 基本原理如图 6-12。首先将一个较短的 DNA 分子与单链 DNA 探针退火杂交, 然后再与待测样品杂交。由于样品中的靶基因序列与探针的同源性较长, 杂交体的稳定性更高, 因此可取代短的 RNA 链。脱落的单链 RNA 可被多核苷酸磷酸酯酶 (polynucleotide phosphorylase) 催化水解为 NDP, 其中的 ADP 在丙酮酸激酶 (pyruvate kinase) 的作用下转变为 ATP, ATP 作为荧光素酶 (luciferase) 的底物产生光子, 从而被检出。

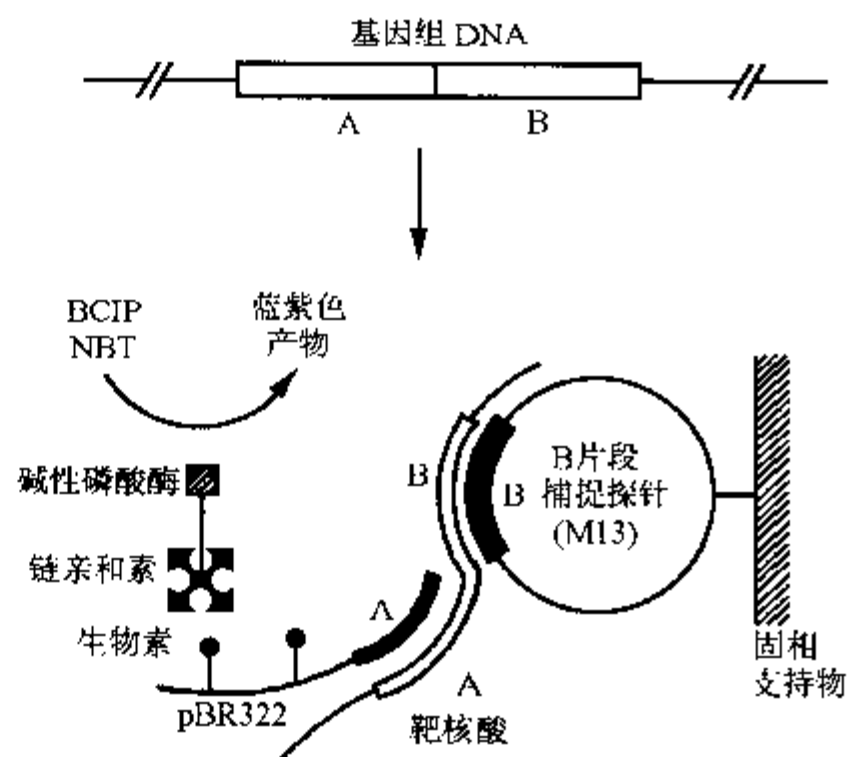


图 6-10 固相夹心杂交法原理示意图

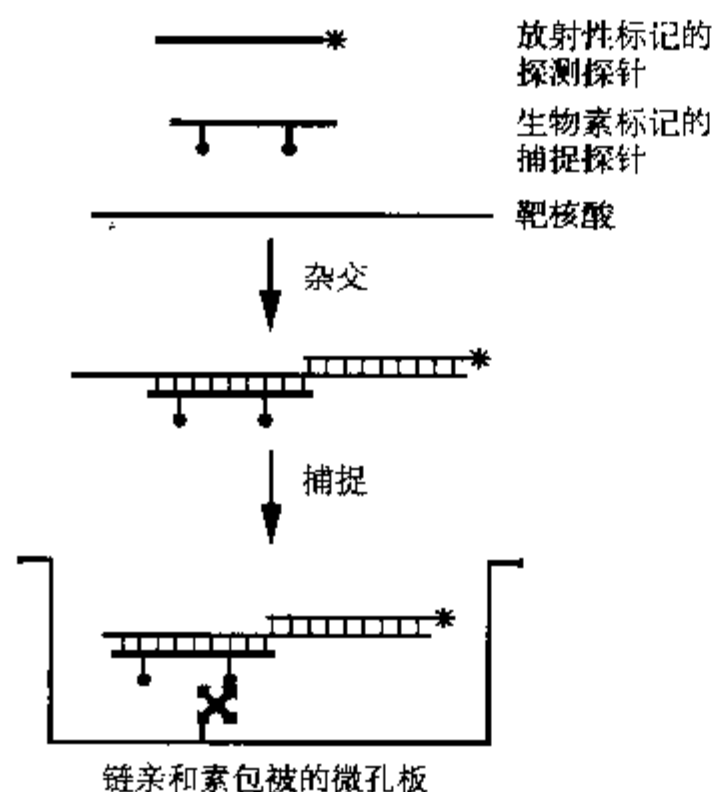


图 6-11 液相夹心法原理示意图

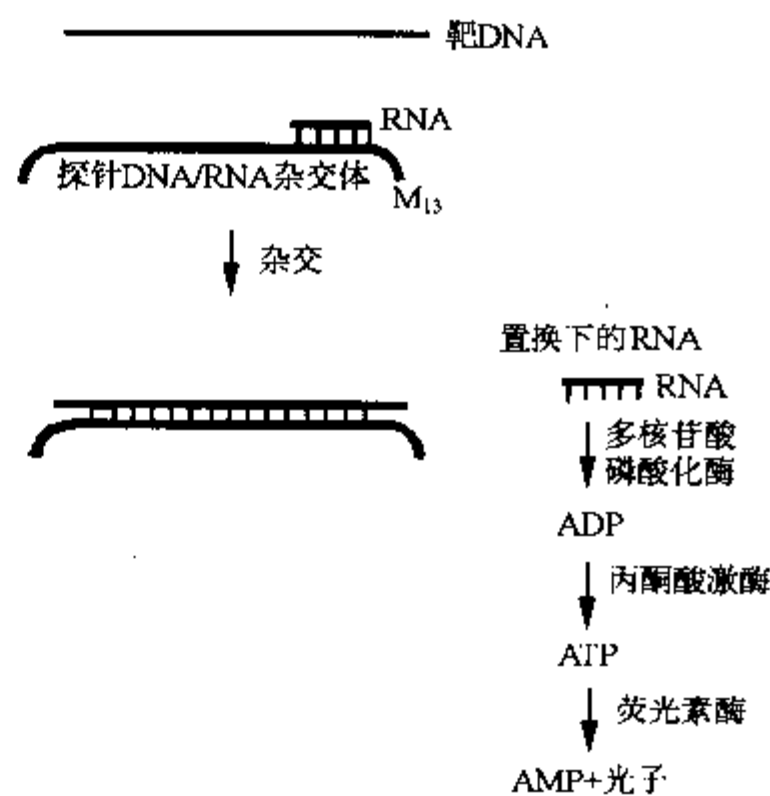


图 6-12 链取代法原理示意图

(胡晓年 李德春 文 方福德 审)

参 考 文 献

- [1] Symons RH. Nucleic Acid Probes. CRC Press, 1989
- [2] Keller GH, et al. DNA Probes. Stockton Press, 1989
- [3] Sambrook J, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [4] 曹凯鸣, 等. 核酸化学导论. 上海: 复旦大学出版社, 1991

7. 基因克隆技术

基因克隆技术是分子生物学的核心技术，这项技术的主要目的是获得某一基因或 DNA 片段的大量拷贝，有了这些与亲本分子完全相同的分子克隆，就可以深入分析基因的结构与功能，并可达到人为改造细胞以及物种个体的遗传性状的目的。

基因克隆又称 DNA 克隆，其中的一项关键技术是重组 DNA 技术，重组 DNA 是用酶学方法，将不同来源的 DNA 分子在体外进行特异切割、重新连接，组装成一个新的杂合 DNA 分子。在此基础上，这个杂合分子能够在一定的宿主细胞中进行扩增，形成大量的子代分子，此过程称基因克隆。有目的地通过基因克隆技术，人为操作改造基因，改变生物遗传性状的系列过程，总称为基因工程。

7.1 基因工程诞生的历史背景

1973 年是基因工程的元年。这座里程碑的树立，凝聚着几代科学家的心血与努力，他们在理论与技术上的卓越贡献，为基因工程的诞生奠定了坚实的基础。

1. 核酸是生物遗传物质：

1944 年，Avery, Macleod 和 McCarty 三人证明转化 II 型肺炎双球菌的物质是 DNA；1952 年，Hershey 和 Chase 证明噬菌体 T₂、T₃、T₄ 感染细菌时，只有其 DNA 进入细菌，外壳蛋白在细菌外，最后仍能增殖形成子代噬菌体。这两个著名的经典实验使人们纠正了蛋白质是遗传物质的错误观念，充分证明 DNA 是遗传信息的携带者。

2. DNA 的双螺旋模式：

1953 年 Watson 和 Crick 两人提出了 DNA 结构的双螺旋模型，揭示了遗传物质自我复制的机制。

3. 破译 DNA 遗传密码：

1961~1966 年以 Nirenberg 和 Crick 为首的一批科学家，证明了 DNA 携带遗传密码，每三个核苷酸组成一个密码子，编码一个氨基酸。到 1966 年破译生物界全部 64 个遗传密码，发表了划时代的遗传密码字典，提出了遗传信息由 DNA→RNA→蛋白质传递的中心法则。

4. 发现反转录酶：

1970 年，Baltimore 和 Temin 两人同时发现反转录酶，解释了 mRNA 转变成 DNA 的机制，丰富了中心法则，为以后 cDNA 的制备奠定了基础。

5. 染色体外遗传单位——质粒的深入研究：

自 1946 年 Lederberg 研究细菌因子（F 因子）起，20 年中人们相继发现了许多质粒，如抗药性因子（R 因子），大肠杆菌素因子（CoE）等，对于这些染色体外遗传单位的性质、功能及与宿主的关系进行了深入的研究，为第一批重组 DNA 载体提供了材料。

6. 发现 DNA 限制性内切酶：

1968~1970 年，Arber, Smith 和 Nathans 三个小组发现并纯化了能特异切割 DNA 序列的限制性内切酶，为 DNA 体外重组提供了有力的工具。

7. DNA 体外重组：

1972 年，Berg 等人首次用限制性内切酶 EcoR I 切割 λ 噬菌体和 SV₄₀ 病毒 DNA 分子，将这两种不同来源的 DNA 片段成功地在体外连接成杂合 DNA 分子。

至此，用重组 DNA 技术改变生物学性状的尝试在 1973 年由 Cohen 等人完成（图 7-1）。他们将抗四

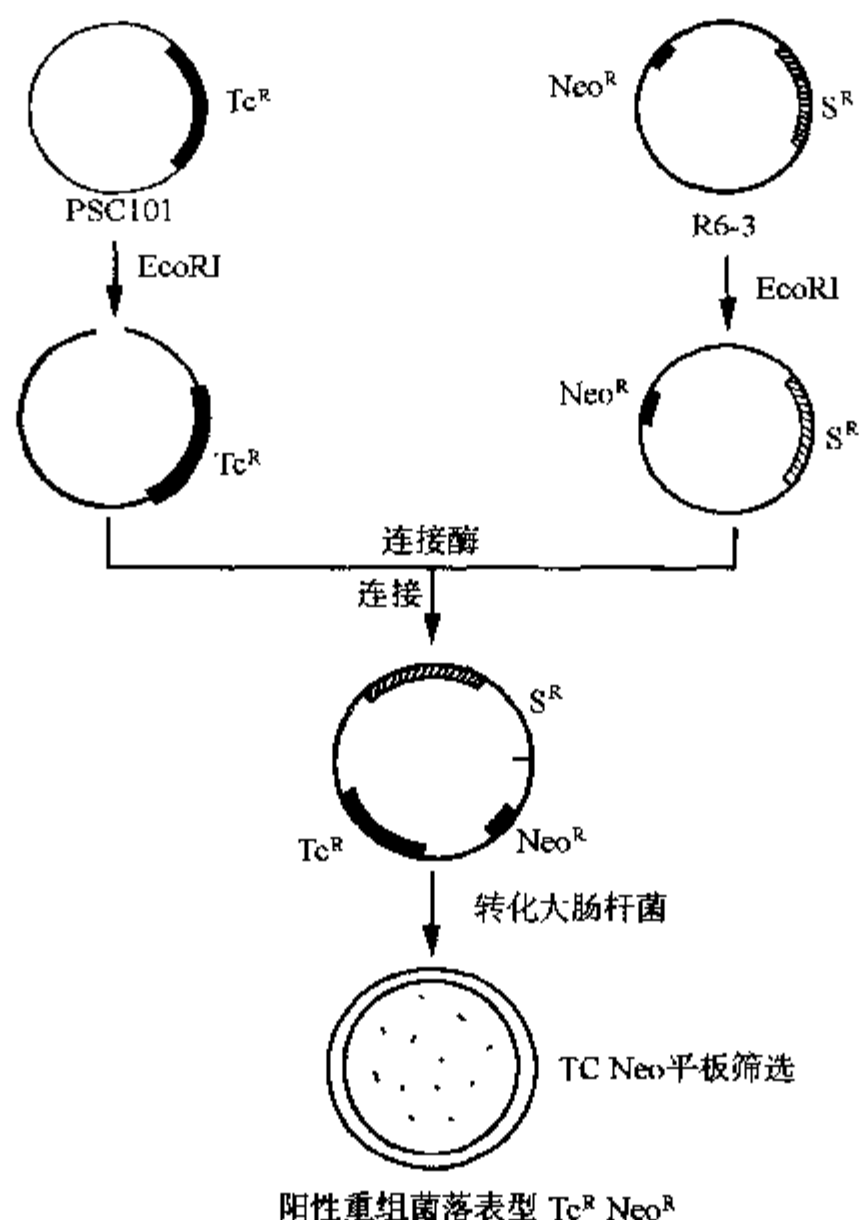


图 7-1 Cohen 绘制的基因工程实验示意图 (1973 年)

环素 (Tc^R) 质粒 pSC101 和抗新霉素 (Neo^R) 及抗磺胺 (S^R) 质粒 R6-3, 分别用 EcoR I 酶切后, 在体外将它们连接成一个新分子, 然后转化大肠杆菌; 成功地选择出抗新霉素并抗四环素的菌落, 该菌落含有重组的质粒分子, 表现型为 Tc^RNeo^R。从此, 这项技术为生物学带来了一场深刻的变革, 这类技术本身也迅猛地发展起来并广泛地渗透到各个学科的研究领域。

7.2 基因克隆的策略与技术路线

克隆原指一个亲本细胞产生成千上万个相同细胞组成的群体的过程。在分子水平, 为了达到获取同一基因或 DNA 片段克隆这一目的, 总策略上应该采取体外进行靶 DNA 分子与某一微生物载体杂合, 导入生物宿主细胞后, 通过自主复制而产生大量分子克隆。这是目前基因克隆的主要策略。聚合酶链反应技术产生后, 可以通过特定的 DNA 引物, 在体外完成对某一特定 DNA 顺序进行大量扩增, 可称为基因体外克隆, 但该技术的前提是对于靶基因的一级结构有一定的了解。

本节对各种不同基因克隆方案中具有共性的理论知识, 及各类载体特性做一介绍, 并以亚克隆 (subcloning) 技术为例讲解重组 DNA 技术涉及的主要过程与方法。

7.2.1 通过建立基因库分离靶基因

要对一个未知基因进行克隆, 最好的办法是从含有这个基因的细胞中分离出所有基因, 建立基因库, 然后再根据蛋白质的性状、结构, 设计出筛选该靶基因的技术路线。

基因文库主要有两类：基因组文库和 cDNA 文库，两者获取的核酸来源不同，前者是通过内切酶酶解细胞染色体 DNA 与载体连接、转化细菌而建库；后者是从细胞中分离出总 RNA 和 mRNA，然后以 mRNA 为模板通过反转录酶合成 cDNA，与载体相连，转化细菌而成。两种建库的技术路线不同，产生的基因结构不同，应用也不相同，但可以相互补充。

7.2.2 通过载体在适当宿主中扩增

载体是基因克隆中外源 DNA 片段的重要运载工具，它们都是通过改造天然质粒、噬菌体和病毒等构建的。载体的选择与改造应具备以下几个条件：

(1) 载体必须提供在适当宿主细胞中自主复制的信号，或者能整合到宿主染色体上与基因组一同复制，或能自主包装分泌出宿主细胞。

(2) 载体上有一些对于它们在宿主中增殖非必需的 DNA 区域，并包含单个内切酶位点，以便外源 DNA 能够通过共价连接插入或取代该区段，形成的重组子可在宿主细胞中复制和增殖。

(3) 载体分子量不宜过大，以便于 DNA 体外操作，同时载体 DNA 与宿主核酸应容易分开，便于提纯。

(4) 载体应具有筛选标记，以区别阳性重组分子和阴性重组分子。选择标记包括抗药性基因、酶基因、营养缺陷型及形成噬菌斑的能力等。

(5) 对于表达型载体还应配备与宿主细胞相适应的启动子、前导顺序、加尾信号、增强子等调控 DNA 元件。

大多数载体是能在染色体外进行无性繁殖的复制子，各类载体具有不同的生物学特征，适用于不同目的基因克隆。将在有关章节分别阐述。

宿主细胞是基因克隆载体的增殖场所，对于一个适当的宿主细胞，具有以下几个要求：①对载体的复制和扩增没有严格的限制；②不存在特异的内切酶体系降解载体 DNA；③在载体增殖过程中，不对载体 DNA 进行修饰；④不会产生载体 DNA 的体内重组；⑤容易导入重组 DNA 分子；⑥符合“重组 DNA 操作规则”的安全标准。现在常规使用的是大肠杆菌 K12 株。

基于以上基因克隆的总体策略，其技术路线大致包括以下几个程序：①分离制备待克隆的 DNA 片段；②将靶 DNA 片段与载体在体外进行连接；③重组 DNA 分子转入宿主细胞；④筛选、鉴定阳性重组子；⑤重组子的扩增。

7.3 目的基因的来源与产生

1. 基因组 DNA 的非特异性断裂：

将细胞的基因组 DNA 非特异性地随机断裂成大小基本一致的 DNA 片段的方法很多，用非专一性核酸酶降解或化学试剂处理均可完成，但是普遍使用的还是机械剪切的方法，如：超声波处理可得到 300bp 左右的随机片段，高速组织捣碎器，控制一定的条件也能得到不同大小的 DNA 片段，如将高分子量 DNA 1 500r/min 捣碎 30 分钟，可得到大约 8kb 的 DNA 片段。由机械处理产生的 DNA 片段末端不一，断点随机，条件难以掌握，所以目前较少使用这种方法。

2. 染色体 DNA 的限制性内切酶酶解：

Ⅱ型限制性内切酶，为基因克隆的操作提供了有力的工具。这种内切酶可专一识别并切割特定的 DNA 顺序，产生不同类型的 DNA 末端。已纯化的几百种限制性内切酶切割种类繁多的 DNA 顺序，为实际应用提供较大的选择范围。若载体 DNA 与插入片段用同一种内切酶消化，或靶 DNA 片段与载体 DNA 末端具有互补的粘性末端，可以直接进行连接。

内切酶识别的 DNA 顺序长短与降解后 DNA 产生的片段大小有直接关系。若识别顺序为 4 个碱性

对, 则该顺序在 DNA 链上出现的机率为 4^4 , 即在碱基随机排列的前提下, 每 256 个碱基对就有一个切点。基因组 DNA 完全酶解后, 产生的 DNA 片段太小, 往往一个基因被分成多个 DNA 片段, 所以在基因组文库建立时, 目的 DNA 常采用部分酶切, 尽可能地提供完整的基因片段。对于识别 6 个核苷酸的限制性内切酶, 其顺序出现的频率为 4^6 (4096), 可获得较大的 DNA 片段, 也可用于 DNA 文库的建立。

3. 通过 mRNA 合成 cDNA:

基因组 DNA 中结构基因仅占一部分, 重复顺序和假基因占有很大比重, 使目的基因克隆的挑选有一定困难, 而且长度很大的基因 (如大于 50kb) 很难得到完整的基因克隆。从 RNA 入手, 用 mRNA 反转录成 cDNA, 得到相应的双链 cDNA, 再进行克隆, 不但可以获得较完整的连续编码顺序, 容易在宿主细胞中表达, 而且能通过不同细胞或同一细胞的不同状况表达 mRNA 的差异, 筛选出有意义的关键基因, 可深入研究发育、分化、癌变等重大生物现象的分子调控机理, 这正是反向生物学的课题所在。

除 cDNA 文库建立以外, 对于一些高丰度表达、容易纯化的蛋白质, 可以直接通过该蛋白质的单克隆抗体纯化该基因的核糖体, 再洗脱下编码该蛋白质的特异 mRNA, 直接反转录成 cDNA, 进行基因克隆, 从而直接获得该特定基因的克隆, 这是用染色体 DNA 难以达到的克隆效果。

4. 人工体外合成 DNA 片段:

随着体外合成 DNA 的技术日渐完善, 合成 DNA 的长度不断加长。对于一些小分子生物活性多肽, 完全可以通过人工合成编码顺序插入载体后, 转化细菌进行该多肽的表达。对于分子较大的基因, 可以通过分段合成, 然后连接组装成完整的基因。目前已经合成了人胰岛素 A、B 链基因和干扰素基因, 并成功表达, 制备成商业产品。

5. 聚合酶链反应 (PCR) 扩增特定基因片段:

对于有部分了解或完全清楚的基因, 可以通过 PCR 反应, 直接从染色体 DNA 或 cDNA 上高效快速地扩增出目的基因片段, 然后进行克隆操作。唯一的要求是, 对基因片段两侧的序列了解清楚。通过针对这两个已知区域的 DNA 引物, 在 Taq 酶催化下, 进行 2^n 指数递增方式的扩增, 获得大量的 DNA 片段, 这种方法使不同细胞中相同基因的克隆, 变得快速、简单。还可以比较分析不同细胞或同一细胞在不同状态下, 同一基因的结构与功能变化。

7.4 基因克隆的载体

载体是携带靶 DNA 片段进入宿主细胞进行扩增和表达的工具。

7.4.1 质粒载体

质粒是细菌染色体外小型双链环状 DNA 复制子, 对细菌的某些代谢活动和抗药性表型具有一定的作用。质粒载体是在天然质粒的基础上人工改造拼接而成。质粒 DNA 不但能在细菌中复制, 并且在添加真核复制信号和启动子后, 可以构建出能在原核或真核细胞中均可复制的穿梭质粒, 并在真核细胞中表达, 因此这类载体在基因工程中应用广泛。

质粒 DNA 在细菌中的复制有两种类型: 严紧型质粒的复制需要蛋白质合成和 DNA 聚合酶 III 的存在, 它的复制与细菌的繁殖密切相关, 每个细胞内只有 1~5 个质粒, 这类复制子在基因克隆中应用前景不大; 松弛型质粒复制使用 DNA 聚合酶 I, 能在没有蛋白质合成的情况下继续复制, 每个细胞内存在 10~200 个以上质粒, 在细胞蛋白质合成及染色体复制停止的情况下, 可继续大量扩增至上千份。在质粒扩增时, 加入氯霉素抑制大肠杆菌蛋白质合成, 正是基于这个原理达到进一步扩增松弛型质粒的目的。

作为载体的质粒一般具备以下特点: ①分子相对较小, 3~10kb 左右; ②具有松弛型复制子, 如

ColEI; ③在复制子以外适当的位置, 存在几个单一内切酶位点, 便于外源 DNA 片段插入; ④具有插入失活的筛选标记, 以便从平板中直接筛选阳性重组子。

质粒一般只能接受小于 15kb 的外源 DNA 插入片段, 插入片段过大, 会导致重组子扩增速度的减慢, 甚至使插入片段丢失。

7.4.1.1 质粒载体举例

质粒载体的种类非常多, 我们以 Riboprobe^R 质粒系列为例进行介绍。

在众多的质粒载体中, Promega 公司的 Riboprobe^R 载体体系具有一定的特色。该系列中每个载体的设计严谨、组装方便, 因而在分子生物学中得到广泛的应用, 在此将这些载体的特性和应用作一扼要介绍。

pSP64 ~ pSP73 系列:

这些载体主要是为了插入片段进行体外转录而设计的。pSP64、pSP65 和 pSP64 (polyA) 载体通过 SP6 启动子转录 DNA 插入片段的一条链, 其中 pSP64 (polyA) 的多克隆位点一端含有 dA:dT 顺序, 可以使体外合成的 RNA 携有 30 个碱性的 polyA 尾。pSP70 ~ pSP73 及所有的 pGEM^R 载体利用多克隆位点两端的 SP6 和 T7 启动子, 可以在体外分别转录 DNA 插入片段的两条链。

pGEM - 3Z、pGEM - 4Z:

除 pSP 系统的多克隆位点和 SP6、T7 两个启动子以外, 还具有半乳糖苷酶蓝/白筛选系统。使得重组子的选择更为直接、方便。

pGEM - 3Zf (+/-) 系列的载体, 是在 pGEM - 3Z 载体基础上, 引入了丝状噬菌体 ϕ 的复制起始位点, 通过 ϕ 的复制起始位点的方向 (+/-) 选择质粒的哪一条链复制形成单链 DNA。

pGEM - 5Zf (+/-)、pGEM - 7Zf (+/-) 载体的多克隆位点含有产生 5' 和 3' 突出的内切酶位点, 这种结构有利于利用核酸外切酶 III 删切大分子的插入片段, 然后进行 DNA 顺序分析。

pGEM - 9Zf (+/-)、pGEM - 11Zf (+/-) 质粒的设计中, 多克隆位点中的 Sfi I、Eco R I 和 Not I 位点可用于 cDNA 文库合成时进行定向克隆, 并且能很方便地亚克隆到 λ gt11 Sfi I - Not I 载体中去。pGEM - 13Zf (+/-) 则可用于 cDNA 片段的亚克隆, 并以融合蛋白形式表达。

pGEMXTM 载体利用 T7 启动子高效表达与 T7 噬菌体基因 10 的融合蛋白, 也可用 SP6 和 T3 启动子在体外进行双向转录。

Riboprobe 载体系列的总体特征和应用:

1. 体外转录:

特点: (1) 转录特异性强, 使用特异的转录酶识别专一的启动子序列。

(2) 转录产物可不含有载体上的序列。

(3) 可以分别转录插入片段的两条链。

(4) 转录效率高。

应用: (1) 体外制备单链 RNA 探针, 核素掺入比活高, 产量大; 可应用于 Northern、Southern 斑点印迹及原位分子杂交进行基因检测, 重组子筛选和基因染色体定位。

(2) 制备体外翻译的 mRNA 模板。

(3) 进行核酸酶 S₁ 图谱分析, 确定转录起始位点和外显子分析。

(4) 合成反义 RNA, 用于转录和翻译的封闭。

2. 半乳糖苷酶的蓝/白筛选系统:

pGEM - Z 和 pGEM - Zf 系列中引入了编码 Lac 基因的 α -肽的顺序, 其中含有多克隆位点, 当无外源 DNA 片段插入时, 质粒表达 α -肽, 它与宿主菌中 F' 因子上的 lacZ Δ M15 基因的产物互补, 产生有活性的 β -半乳糖苷酶, 在含有指示剂 X-gal 和诱导剂 IPTG 的存在下, 菌落呈现蓝色; 外源基因的插入后, 当 Lac α -肽基因阅读框架被破坏, 细菌内将无 β -半乳糖苷酶活性存在, 菌落呈白色。

3. DNA 顺序分析:

(1) 载体中多克隆位点两侧的 SP6、T7 或 T3 启动子序列, 为插入 DNA 片段的序列分析提供了特异的引物位点。选用不同的引物可以快速地测定插入片段中两种 DNA 链中的任意一条链序列。

(2) pGEM-Zf 载体, 可以利用 ϕ 复制位点, 进入丝状噬菌体复制模式、产生出单链 DNA, ϕ 的方向 (+/-) 决定复制载体中哪一条单链 DNA, 即使用不同的辅助噬菌体 (M13 K07 或 R408) 及不同的宿主菌中 (JM109 或 NM522) 均能产生单链 DNA。

(3) 对于需要进行插入片段 500bp 以上的 DNA 顺序测定, 可以通过 Erase-a-Base 系统, 用核酸外切酶进行删切、产生不同长度的系列克隆进行测序。

(4) pGEM 载体中的多克隆位点适用于真核表达质粒的构建, 对于同时插入真核启动子和目的基因的克隆方案选择时有较多的位点, 更重要的是转染哺乳动物细胞后, 对于转染阳性细胞克隆株中外源基因稳定整合的鉴定, 可以很方便地利用 SP6、T3 或 T7 启动子的引物快速进行 PCR 筛选和鉴定, 不需要进行繁杂的 Southern 印迹杂交实验, 既省时又省力。

4. 单链 DNA 产生:

pGEM-Zf 载体可以通过适当的辅助噬菌体, 在适当的宿主中产生单链 DNA, 分泌到培养液的上清中, 经过简单的沉淀等步骤即可提纯, 不但对于插入片段的 DNA 序列分析极其方便, 而且还可以利用这一特性, 进行插入片段的人工体外定点突变, 可在蛋白质基因工程中充分发挥其优势。

7.4.1.2 质粒克隆的设计策略

外源 DNA 片段与质粒载体重组, 技术上比较简单, 即将两者经过适当内切酶酶切后, 回收所需片段, 在 T4 DNA 连接酶作用下连接成新的重组分子, 然后转化细菌。实际上这类工作大部分时间花费在重组子的筛选与鉴定上, 甚至最后一无所获。这种问题往往是由于克隆方案设计时没有选择最佳途径, 因此有必要阐述一下在设计以质粒为载体进行基因克隆方案时的总体策略。

1. 质粒载体的选择:

选择载体主要取决于实验的目的, 应考虑以下几个因素: ①载体上应具备完成实验目的的最基本元件: 如原核系统表达实验中, 载体上应具有适当的启动子, SD 顺序、终止信号、分泌信号 (信号肽) 等元件; 在真核系统表达的穿梭质粒, 除在适当的真核宿主细胞中能高效表达的启动子以外, 3' 端的加尾信号也比较重要; ②载体上最好存在可供选择的克隆位点: 现在常规使用的质粒载体, 大多数均有多克隆位点, 甚至同一载体设计出含不同多克隆位点的系列, 这为外源 DNA 片段的插入提供了方便省时的途径。如果一个选定的克隆载体上, 缺乏外源 DNA 片段插入的适当位点, 克服这一困难的一个方法, 就是先将该外源 DNA 片段插入到合适多克隆位点的质粒载体中, 然后再从该插入片段的外侧, 选择多克隆位点上合适的内切酶位点将插入片段切割下来, 从而改变两侧的酶切位点, 以满足方便插入到另一个选定载体的需要。这种通过一次亚克隆, 在插入片段两侧添加新的适当酶切位点的方法, 越来越多地被人们所采用, 尤其是没有 DNA 合成仪合成适当连接子的情况下, 此法不失为一种可行的替代办法。

2. DNA 的连接末端:

限制性内切酶处理 DNA 后, 一般产生粘性末端、平末端两种形式。DNA 片段两个不同末端可有以下几种出现方式: ①两个不同的粘性末端; ②两个相同的粘性末端; ③一个粘性末端一个平末端; ④两个平末端。

末端方式①、③的 DNA 片段与载体适当位点连接效率较高, 连接点保留原来的酶切位点 (两个相同粘末端相连) 或产生新的位点、或位点消失 (两平端相连); 插入片段的方向只有一种可能性, 所以是定向克隆, 不含插入片段自身环化质粒 (假阳性重组子) 的背景低。

方式②连接效率高, 插入片段存在两个方向插入的可能性; 插入片段间可相互连接, 导致载体中可能存在几个插入片段, 重组子的连接位点仍然为原酶切位点, 载体自身环化机率高, 故应在连接前, 将

酶解完成的质粒载体 DNA 用碱性磷酸酶处理, 使其 5' 端去磷酸化减少自身环化, 降低假阳性重组子背景。

方式④连接时需要较高的 DNA 浓度, 连接效率比以上方式稍低, 插入方向有两种可能性, 重组子中可存在多个插入片段的聚合体, 重组子中连接位点上原酶切位点可能消失, 转化细菌后, 不含插入片段的假阳性重组子背景高。

考虑到以上几种方式的不同效果, 在设计重组方案时, 最好通过电脑中相应软件程序进行辅助设计, 最佳方案是两个不同的粘性末端连接。如果载体与插入片段之间根本达不到以上任何一种酶切位点方式, 可以考虑以下三种方法来解决: ①通过适当的多克隆位点载体进行亚克隆, 倒换外源 DNA 片段两侧的酶切位点; ②合成连接子或适配子, 连接到外源性 DNA 片段上或线性载体 DNA 上, 添加适当酶切位点; ③将粘性末端变成平末端, 用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 大片段 (Klenow 片段) 填平 5' 突出的粘性末端或用核酸酶 S₁ 切平 3' 突出的粘性末端。

3. 减低载体自身环化的措施:

在连接反应体系中, 通过调节插入片段与载体之间的 DNA 浓度, 在一定限度上可以减少载体的自身环化, 而在克隆方案确定时, 有以下几种措施, 可提高重组子的筛选概率。

[磷酸酯酶处理线性载体 DNA]

T₄ DNA 连接酶催化 DNA 末端的一个 5' 端的磷酸与 3' 端的羟基形成磷酸二酯键, 如用磷酸酯酶去除线性载体 DNA 两端的 5' 磷酸, 去磷酸化的线性载体 DNA 将不能自身环化, 从而降低非重组子的假阳性背景。T₄ DNA 连接酶催化的共价连接, 只能发生在未去磷酸的外源 DNA 片段和去磷酸化的线性载体 DNA 之间, 产生的重组分子虽有两个缺口 (开环分子), 仍可转化细菌, 通过菌体内的修复系统使有缺口的开环分子形成闭环分子, 如图 7-2 所示。

[线性质粒 DNA 的去磷酸]

磷酸酯酶有细菌碱性磷酸酶 (BAP) 和牛小肠碱性磷酸酶 (CIP) 两种。CIP 是一个二聚体糖蛋白, 因为每个 CIP 单体带有两个对酶活性至关重要的锌原子, 故而在去磷酸化的缓冲液中含有 1mmol/L 的 ZnCl₂。DNA 去磷酸化以后, 在 EDTA 作用下, 用少量蛋白酶 K 来处理灭活 CIP, 再通过酚/氯仿抽提, 以纯化去磷酸化的 DNA。

试剂:

10 × CIP 去磷酸缓冲液:

10mmol/L ZnCl₂

10mmol/L MgCl₂

100mmol/L Tris·Cl (pH8.3)

灭活剂:

0.5mol/L EDTA (pH8.0)

10% SDS

10mg/ml 蛋白酶 K

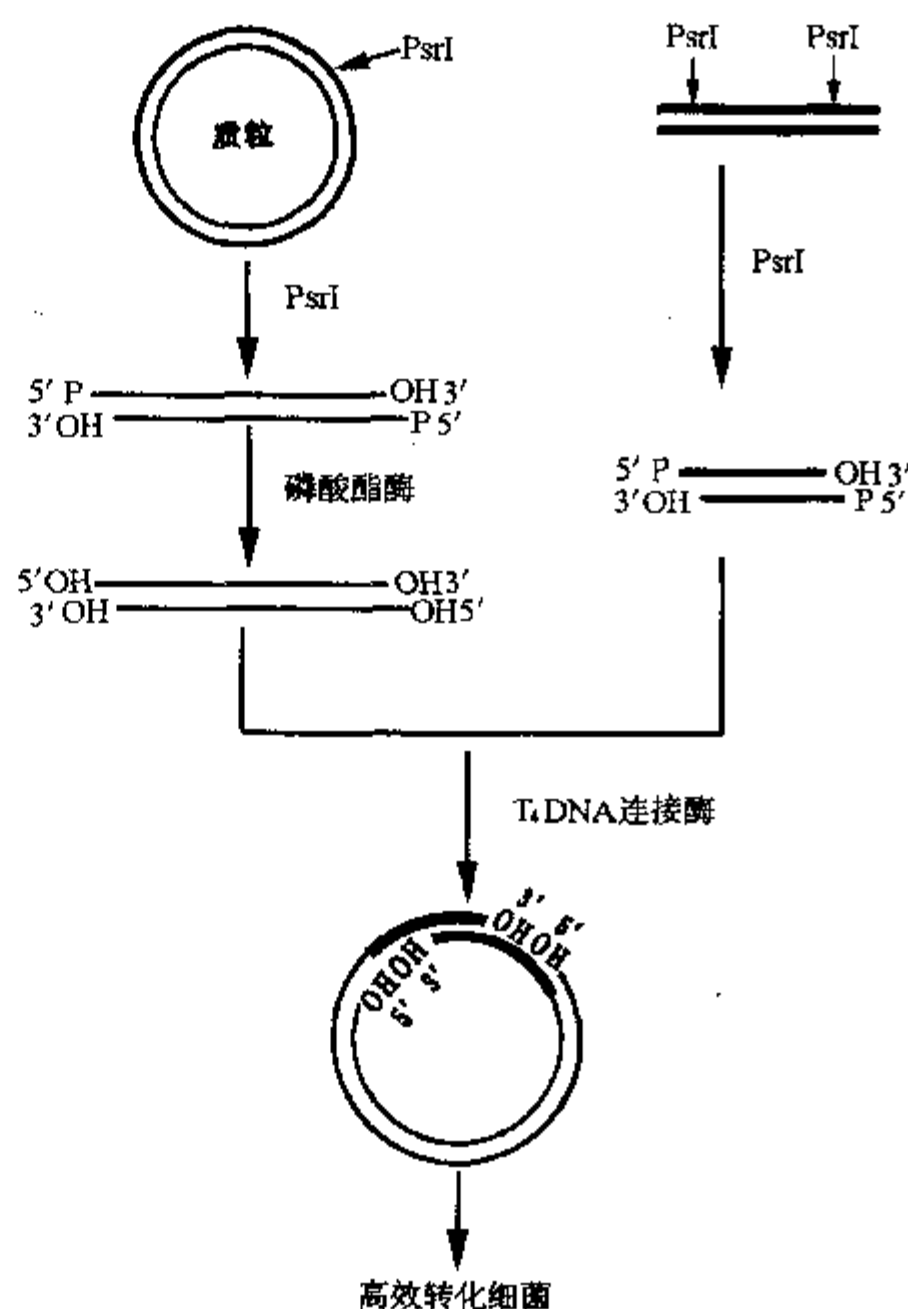


图 7-2 碱性磷酸处理降低载体的自身环化

3mol/L NaAc (pH7.0)

酚/氯仿

乙醇

TE (pH7.6)

操作步骤:

(1) 用适当量的限制性内切酶消化质粒 DNA (10 ~ 20 μ g), 微型凝胶电泳鉴定酶切结果, 待质粒 DNA 完全酶切成线性 DNA 后, 用等体积酚/氯仿抽提 DNA 一次。

(2) 上清液中加入两倍体积的乙醇, 0℃放置 15 分钟后, 12 000g, 4℃离心 10 分钟, 弃上清, 室温干燥蒸发乙醇后, 用 90 μ l 10mmol/L Tris·Cl (pH8.3) 溶解 DNA 沉淀。取出约 200ng DNA, -20℃保存, 作为以后 DNA 连接试验时的对照组之一。

(3) 剩余的 DNA 加入 10 \times 去磷酸化缓冲液和 CIP 进行反应, 5'端突出的 DNA, 每 100pmol 5'磷酸基团加入 1 个单位的 CIP, 37℃反应 30 分钟。平末端或 3'端突出的 DNA, 每 2pmol 5'磷酸基团加 1 个单位 CIP, 37℃保温 15 分钟后, 再加 CIP, 55℃反应 45 分钟 (2 μ g 5kb 的线性 DNA 约含 1.4pmol 左右的 5'磷酸基团)。

(4) 反应完毕后, 加入 SDS 和 EDTA (pH8.0) 分别至终浓度为 0.5% 和 5mmol/L, 混匀后再加蛋白酶 K 至终浓度 50 μ g/ml, 56℃反应 30 分钟。

注意: CIP 也可以通过加热失活, 加 EDTA (pH8.0) 至终浓度为 5mmol/L, 65℃保温 1 小时或 75℃, 10 分钟灭活 CIP。

(5) 冷却至室温后, 加入等体积酚、酚/氯仿、氯仿分别抽提一次。

(6) 取上清液移至另一清洁 Eppendorf 管中, 加入 0.1 容积 3mol/L NaAc (pH7.0), 混匀后再加 2 倍容积乙醇, 混匀, 0℃放置 15 分钟, 12 000g, 4℃离心 10 分钟, 弃上清, 用 70% 乙醇漂洗 DNA 沉淀, 12 000g, 4℃离心 3 分钟, 弃上清。室温干燥蒸发乙醇, 加入适量 TE (pH7.6) 溶解 DNA, 最好浓度为 100 μ g/ml 左右, -20℃贮存。

说明:

(1) 本实验中 3mol/L NaAc 的 pH 值为 7.0, (常规乙醇沉淀 DNA 使用的 NaAc 的 pH 则是 5.2), 因为 EDTA 浓度大于 5mmol/L 时, 在酸性条件下容易与 DNA 共沉淀。

(2) 蛋白酶 K 灭活 CIP 后, 为了保证以后 DNA 连接的效率, 必须用酚、氯仿抽提, 以彻底去除蛋白酶 K。

(3) 对于 RNA 的 5'端的去磷酸化, 一般每 1pmol 5'磷酸基团用 0.01 单位 CIP, 37℃反应 15 分钟, 然后 55℃保温 30 分钟。

(4) 线性质粒 DNA 去磷酸化的效果, 最好通过与外源 DNA 插入片段连接的转化细菌的效率判断, 故连接时应设立以下几个对照组: ①200ng 去磷酸化线性质粒 DNA; ②200ng 去磷酸化线性质粒 DNA 加 200ng 外源 DNA 插入片段; ③200ng 未去磷酸化线性质粒 DNA 加 200ng 外源 DNA 插入片段。

[定向克隆]

载体具备两个以上不同的内切酶位点, 产生非互补粘性末端是定向克隆的基本条件。线性 DNA 的两个不同非互补粘端自身环化的机率自然会减低。而且, 插入片段的两端位点不一 (两个不同粘性末端或一个平端一个粘性末端) 插入载体时, 只可能有一个方向连接于载体, 这种定向克隆, 有利于以后的实验 (如: 基因表达), 即不需要对重组子中插入片段进行插入方向的鉴定。

对载体多克隆位点和插入片段内切酶位点的选择, 应尽量考虑定向克隆方案。在某些情况下, 如启动子对编码基因的要求, 还应创造条件进行所需的定向克隆, 如图 7-3 所示。

对于靶 DNA 片段, 虽然 Bgl II 与 BamH I 也能将插入片段切下来, 但是载体通过 Bgl II 与 BamH I 切割产生线性 DNA, 由于两末端可以互补配对, 自身连接, 并且插入片段也不会定向克隆, 故应采用

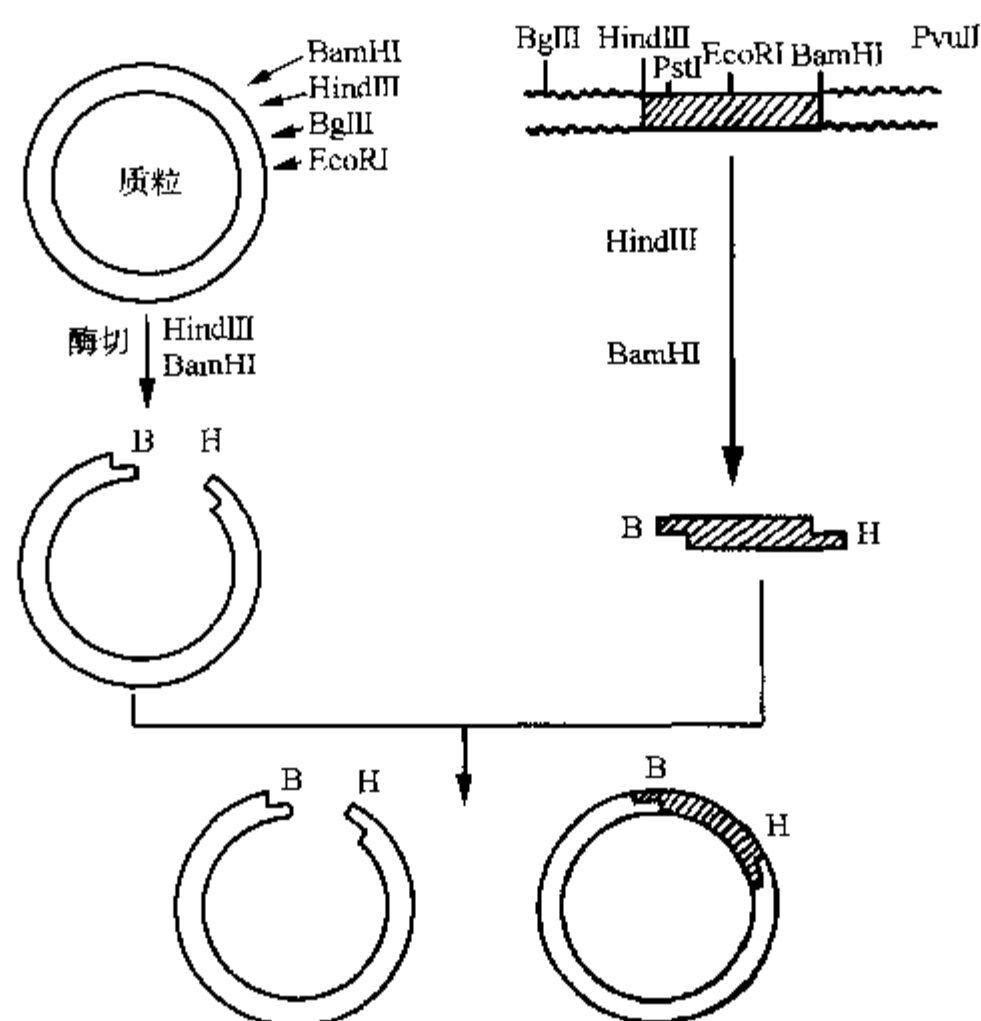


图 7-3 定向克隆

Hind III、BamH I 位点连接方案。

插入失活：

载体的设计上，往往具备两个筛选标志，其中的一个筛选标志基因中插入一段外源 DNA 可导致该基因的失活，对于重组子的筛选既方便又准确。如 pBR322 质粒中，插入失活四环素抗性基因，重组子的表型应为 Amp^r Tr^s（抗氨苄青霉素，对四环素敏感）很容易筛选出来。

pGEM 系列质粒，其 Amp^r 基因和 LacZ 编码基因其中含有多克隆位点，外源 DNA 片段插入 LacZ 基因后，重组子中 LacZ 基因失活，不能编码有功能的 β -半乳糖苷酶，在含 Amp 平板上生长的转化菌落，加入 X-gal 与 IPTG 后，重组子应为白色菌落，自身环化不含外源 DNA 插入片段的质粒菌落为蓝色，极易鉴别（图 7-4）。

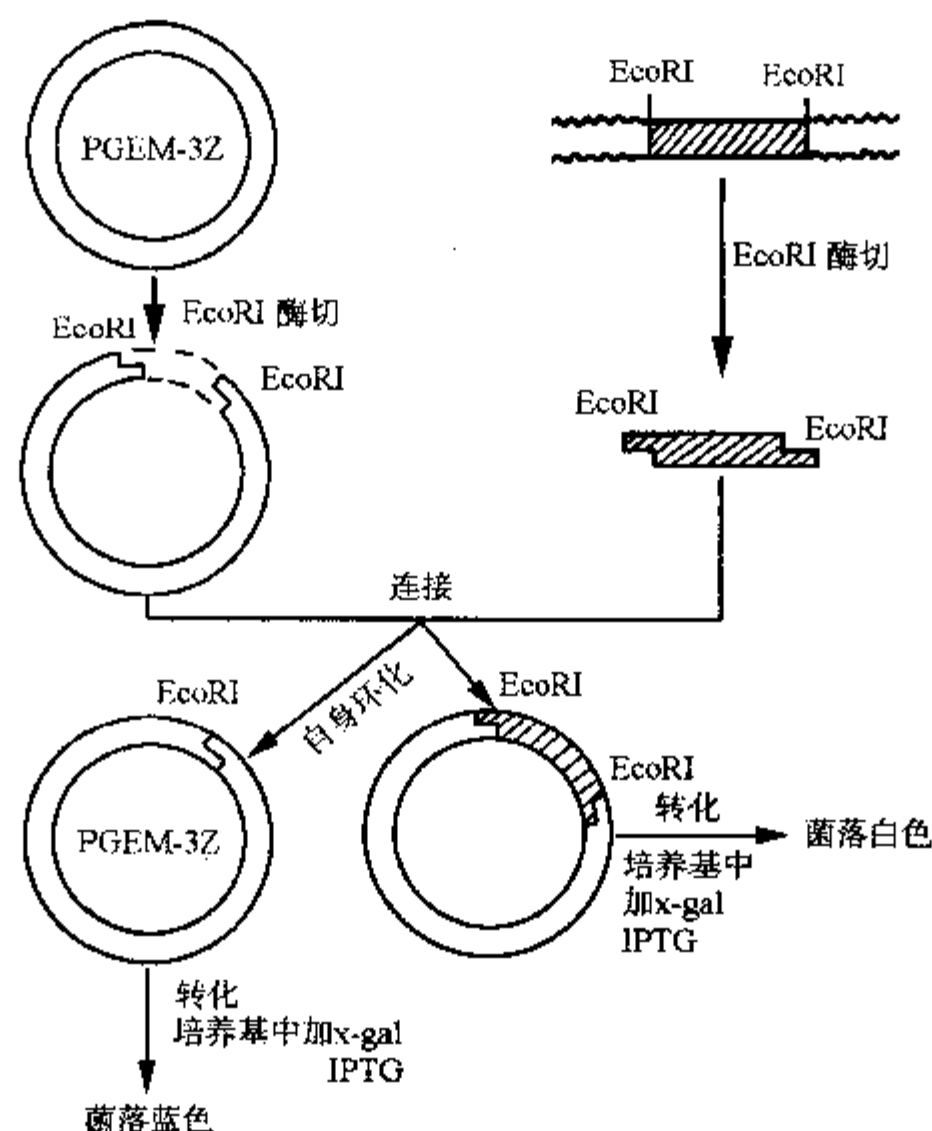
7.4.2 λ 噬菌体载体

λ 噬菌体是一种双链 DNA 噬菌体，基因组约为 50kb，在 λ 噬菌体颗粒中分离出来的 DNA 为线性双链分子，在分子两端各有 12 个碱基的互补单链顺序，是天然的粘性末端，称为 cos 位点。

λ 噬菌体基因组上的所有基因（除 b2 区以外）均已研究清楚，对其复制、转录、调控及生活史，也了解得比较透彻，已测出其全部核苷酸顺序，为 λ 噬菌体的人工改造、组建成克隆载体打下了坚实的基础。

7.4.2.1 λ 噬菌体的基因组构成及生活周期

λ 噬菌体感染细菌后，DNA 通过粘性末端而环化，在感染早期以环状分子进行转录，此后有两种不同的生活途径，其一是裂解生长，又叫溶菌循环，环状 DNA 在细胞中多次复制，合成大量噬菌体基因产物，装配成噬菌体颗粒，裂解宿主菌再进行下一轮感染；其二是溶源性生长，即感染细胞内 λ 噬菌体 DNA 整合到细胞宿主染色体基因组 DNA 中，与染色体 DNA 一起复制，并遗传给子代细胞，宿主细胞不被裂解。裂解途径和溶源途径的选择取决于宿主与噬菌体之间许多因素的相互作用，以及 λ 噬菌体基因

图 7-4 重组子的 α -互补筛选

的精确调控 (图 7-5)。

1. λ 噬菌体控制复制的基因:

(1) 头部基因: 由 A、W、B、C、D、E、F 等 7 个基因组成, 它们编码 λ 噬菌体头部蛋白质及具有包装功能的蛋白质。

(2) 尾部基因: 由 Z、U、V、G、T、H、M、L、K、I、J 等 11 个基因组成, 编码 λ 噬菌体尾部蛋白质。

(3) 重组基因: 包括 int, xis, exo, red, gam 基因及 att 识别位点。其中 int 蛋白能使 λ DNA 整合到细菌染色体上; xis 蛋白是一种能将原噬菌体从宿主细胞染色体上切割下来的酶; 这两种蛋白均能识别 att 位点; red 是促进重组的基因。总之, 重组基因行使整合、重组和切割功能。

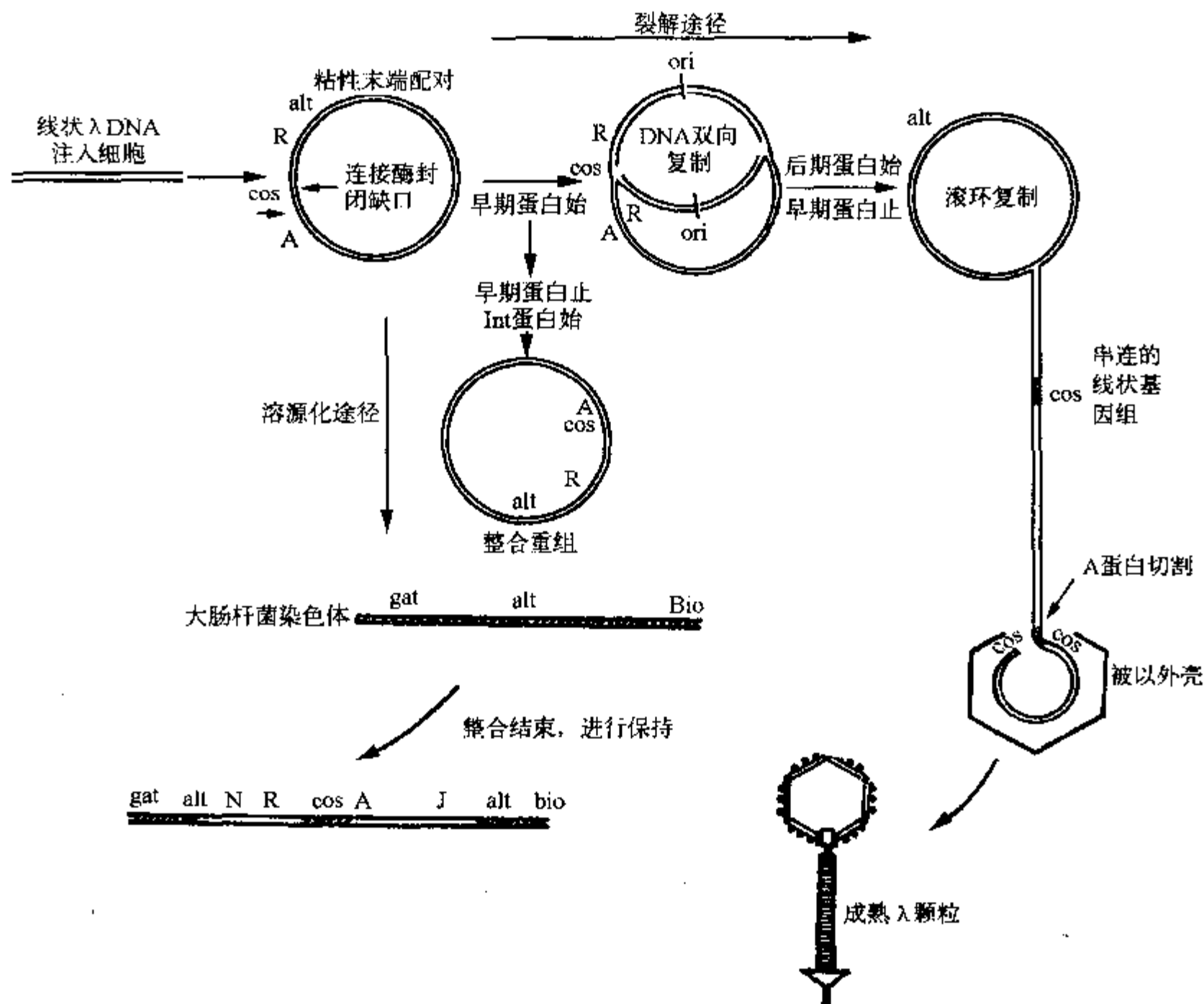
(4) 正调控基因: 包括 N、Q 两个基因, N 蛋白能拮抗宿主的转录终止因子 (ρ), 促进 O、P、Q、red、xis 和 int 基因的转录, 是早期正调控因子。晚期调控因子是 Q 蛋白, 它促进头部、尾部基因和溶菌基因的表达。

(5) 负调控基因: 由 C I、C II、C III、tof (cro) 等基因组成。其中 C I 蛋白与 O_1 、 O_2 结合, 终止噬菌体 λ 上所有的基因转录, 促进噬菌体进入溶源途径并维持该状态。C II、C III 维持免疫性, 阻止裂解基因 S、R 的转录, 并促进 C I 基因的转录。cro, red 部分抑制 C I、N、red 和 xis 的转录; tof 关闭 C I 基因, 使噬菌体由溶源状态进入溶菌循环。

(6) DNA 合成基因: 包括 O、P 基因。

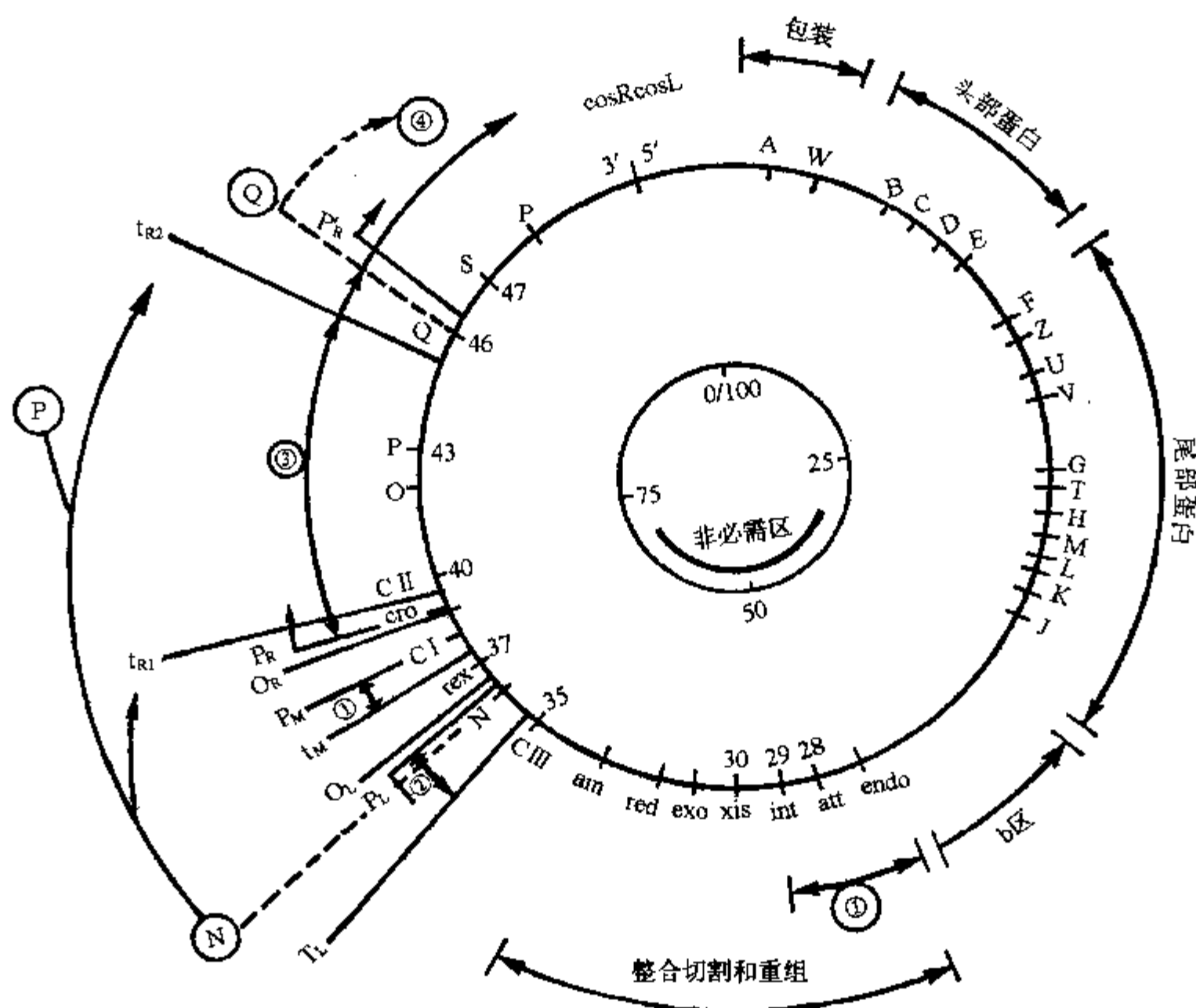
(7) 裂解基因: 包括 S、R 基因, 后者编码溶菌酶。

2. λ 噬菌体基因组上转录调控及识别位点:

图 7-5 λ 噬菌体生活周期示意图

- (1) O_R 、 O_L : 左向、右向操纵子。
- (2) P_L 、 P_R : 左向、右向启动子。
- (3) P_{RM} : 阻遏物维持启动子。
- (4) P_{RE} : 阻遏物建立启动子。
- (5) att : 整合与切割识别位点。
- (6) t_L : 左向终止子。
- (7) t_{R1} 、 t_{R2} : 右向终止子 1、2。
- (8) P'_R : 右向晚期启动子。
- (9) $cosL$ 、 $cosR$: 左端、右端粘性末端。

λ 噬菌体的转录过程分为早期、迟早期、晚期三个阶段。早期从 P_L 和 P_R 两个启动子起始，早期 RNA 转录分别终止于 N 基因和 *cro* 基因末端的 t_L 和 t_{R1} 位点。其产生的 N 蛋白可以中和宿主 ρ 转录中止因子，从而使转录越过 t_L 、 t_{R1} 和 t_{R2} ，进入迟早期转录。早期转录产物 *cro* 蛋白的积累，导致 P_L 和 P_R 启动子关闭，同时 Q 蛋白的合成可导致晚期转录的起始，启动子为 P'_R ，转录与噬菌体头、尾组装和裂解有关的基因（图 7-6）。

图 7-6 λ 噬菌体基因结构及其调控示意图

7.4.2.2 λ 噬菌体载体系列

λ 噬菌体具有两个重要特点，使之成为一类重要的、很有价值的基因克隆载体。①功能相关的基因成簇排列在基因组上，中间部分从 J 到 N 基因约占全基因组的 30%，非裂解生长所必需，它们的功能是重组和溶源性生长。根据这一特性，可用其它外源 DNA 片段取代该区域，或者将该区域缺失，对噬菌体的感染和生长都不会造成严重影响；②噬菌体颗粒成熟时，外壳蛋白包装 DNA，其长度下限不能小于野生型噬菌体基因组全长的 70%，上限不能大于 105%，才能组装成成熟的病毒颗粒，这一点决定了 λ 噬菌体载体允许外源 DNA 插入，总长的大小范围在 36.8 ~ 51.5kb 之间。即 λ 噬菌体裂解生长非必需区基因的缺失或替代是组建 λ 噬菌体载体的基础所在，其基因组上缺失的片段大小不能超过全基因组全长的 25%，否则将影响 λ 噬菌体的活性。

野生型 λ 噬菌体的基因组上限制内切酶的位点很多，必须对其进行适当改造后，方可作为载体使用。已经组建成功的 λ 噬菌体载体分为两类：只有一个限制性内切酶位点可供插入外源 DNA 片段的载体，称作插入型载体 (insertion vector)；有两个酶切位点或两组排列相反的多克隆位点，其间 DNA 可被外源 DNA 取代的载体称作置换型载体 (replacement vector)。不管是取代还是插入，构建的重组 λ 噬菌体分子，其总长不得超过野生型 λ 噬菌体 DNA 的 105%，不能短于野生型的 75%。

【载体举例】

1. λ gtWES- λ B:

该载体是由 Thomas 和 Heder 等人在 70 年代分别构建而成的，置换型载体，全长 40.4kb，对野生型

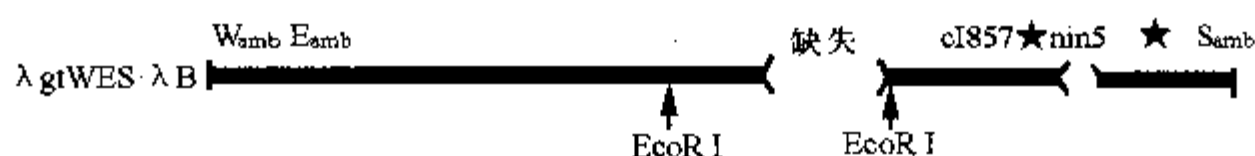


图 7-7 λgtWES-λB 载体示意图

λ噬菌体进行了以下改造 (图 7-7):

先将中间两个 EcoRI 位点中的 B 片段 (5.5kb, 11.3%) 和 C 片段 (5.9kb, 12%) 切除, 这两个片段与噬菌体的溶源性生长有关, 去除这个 23.3% 部分后, λ噬菌体仍可包装成噬菌体颗粒。

然后在右臂部分又将 nin5 缺失 (6.1%), 这样共计缺失 29.4%, 该噬菌体载体不再能包装。必须有 2.2~16.9kb 的外源 DNA 片段连接于该载体左、右两臂之间才能形成噬菌体颗粒, 从而提高了阳性重组子的筛选机率。

野生型 λ噬菌体上有五个 EcoRI 位点, 消除 att 和 int 部位的 EcoRI 位点和最右边的两个 EcoRI 位点, 引入 cI 857 标记。

在 W、E、S 基因中分别引入 3 个琥珀 (UAG) 突变, 重组噬菌体分子转染一个适当的大肠杆菌琥珀校正基因菌株, 就可以得到活的噬菌体。而自然界琥珀突变校正株很少, 这样降低了重组子污染外界的可能性。

2. Charon 系列:

Blattner 等人于 1977 年开始组建的一系列 λ噬菌体插入型载体, 由于 DNA 缺失更多, 可容纳外源 DNA 片段更大。如 Charon 4A 缺失 DNA 42%, 可插入 8.2~22.2kb 的外源 DNA 片段, 在 A、B 基因中分别引入了 2 个琥珀突变 (Aam32, BamI), 缺失 KH54 和 nin5。

插入位点为 EcoRI, 正好在引入的 LacZ 基因内, 外源基因插入导致 LacZ 基因编码的 β-半乳糖苷酶失活, 转染 Lac 缺陷菌株时, 用 X-gal 筛选, 阳性噬菌斑为白色, 阴性噬菌斑为蓝色。

3. EMBL 系列:

这是含多克隆位点的 λ噬菌体置换型载体、在可置换的中间片段两侧各有 Sall BamHI 和 EcoRI 三种内切酶位点相反排列。适用于克隆由 Sau3A 或 MboI 部分消化的 DNA 片段。这一段被置换的 DNA 顺序, 能抑制 λ噬菌体在相应的大肠杆菌菌株中进行溶源性生长, 该片段被外源 DNA 取代后, 重组子为 Spi 基因表型, 则在 P₂ 溶源化的大肠杆菌中生长并产生噬菌斑 (图 7-8)。

在一般条件下, 每微克噬菌体重组子 DNA 直接转染大肠杆菌仅能产生 10³~10⁴ 个噬菌斑。所以在转染前需要进行体外包装, 以提高转染率。

体外包装是指将重组的噬菌体分子与 λ噬菌体的头部、尾部蛋白混合, 通过自动包装, 体外组成完整的噬菌体颗粒, 此成熟颗粒对大肠杆菌具有很高的感染性。

Dam 琥珀突变的 λ噬菌体感染大肠杆菌后, 其溶菌物中存有大量的头部蛋白, 而且 Aam 琥珀突变的 λ噬菌体的溶菌物中则含有高浓度的尾部蛋白, 将重组 DNA 与这两种溶菌物混合, 在 A 蛋白作用下, 作为外壳蛋白主要成分的 E 蛋白将 DNA 包装起来, 加上 D 蛋白形成噬菌体头部, 然后通过 W 和 F 蛋白将头和尾连接起来, 形成完整的噬菌体颗粒。

包装的噬菌体颗粒转染受体菌, 每微克重组 DNA 形成噬菌斑数可高达 10⁶, 比未包装的重组噬菌体转染率高 100~1 000 倍。

7.4.3 粘粒 (cosmid)

粘粒由质粒和噬菌体的 cos 粘性末端构建而成。由于 λ噬菌体载体进行真核细胞基因组文库构建, 其容量仍然受到一定限制, 最大插入片段不能超过 23kb。1978 年 Collins 和 Hohn 发展了这类质粒与噬菌

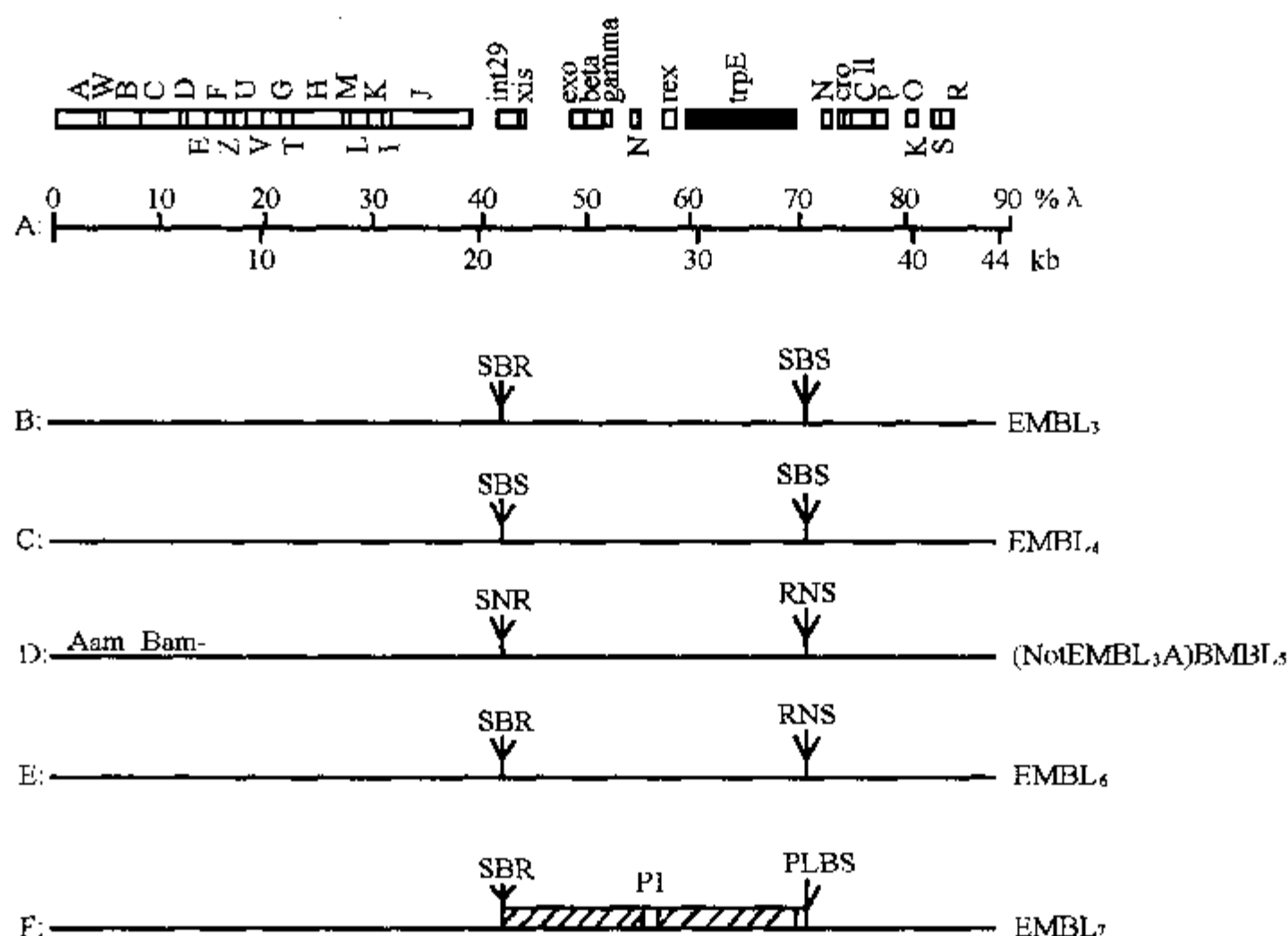


图 7-8 EMBL 系列载体图

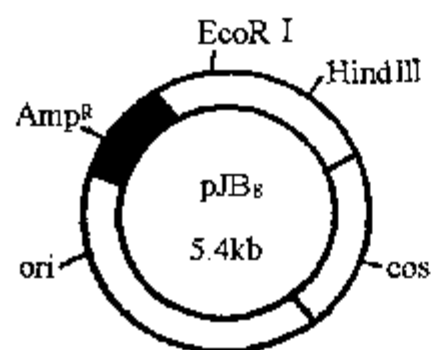


图 7-9 pJB8 粘粒图谱

体联合的新载体——粘粒，粘粒的基因组一般由以下几部分组成：质粒复制起始位点，1 个或多个限制性内切酶位点，抗药性标记和带有粘性末端的 DNA 片段。粘粒载体大小为 4~6kb，而插入片段则可大至 29~45kb（图 7-9）。

7.4.3.1 粘粒与外源 DNA 的重组

外源 DNA 与粘粒载体使用同一种限制性内切酶处理，然后用连接酶将两者连接，外源 DNA 片段插入到两个粘粒之间，将重组子与 λ 噬菌体体外包装系统混合，在 λ 的 A 蛋白 *ter* 功能作用下切割 *cos* 部位以外的部分，将具有单位长度的中间部分包装到外壳蛋白中，组成成熟的噬菌体颗粒。实际上，只要两个 *cos* 位点之间的距离为野生型 λ 噬菌体大小的 75%~105% 范围以内，均可以包装；*cos* 位点附近的小区域对于包装系统的识别是必须的。体外包装好的颗粒感染宿主细胞后，像 λ 噬菌体一样环化，而复制则完全与质粒一样，并不表现任何 λ 噬菌体的功能。最后根据载体携带的抗药性标记，筛选阳性克隆株细胞，作进一步的鉴定与分析（图 7-10）。

7.4.3.2 粘粒克隆的技术困难

粘粒克隆真核 DNA 片段的最大容量为 45kb，但与 λ 噬菌体载体比较，粘粒的克隆操作，在技术上还存在一些关键问题：

- (1) 粘粒载体之间相互连接，这种自我重组分子中没有外源 DNA 插入片段，导致阳性重组率降低。
- (2) 多个外源 DNA 片段同时插入同一个粘粒载体，使在真核染色体上并不相关的 DNA 片段在粘粒中连接在一起。
- (3) 粘粒中的插入片段不稳定，易丢失或重排。
- (4) 产生阳性重组子的变化范围很大。
- (5) 在粘粒文库扩增时，含不同重组子的克隆菌生长速率不一，导致基因组文库中不同 DNA 片段

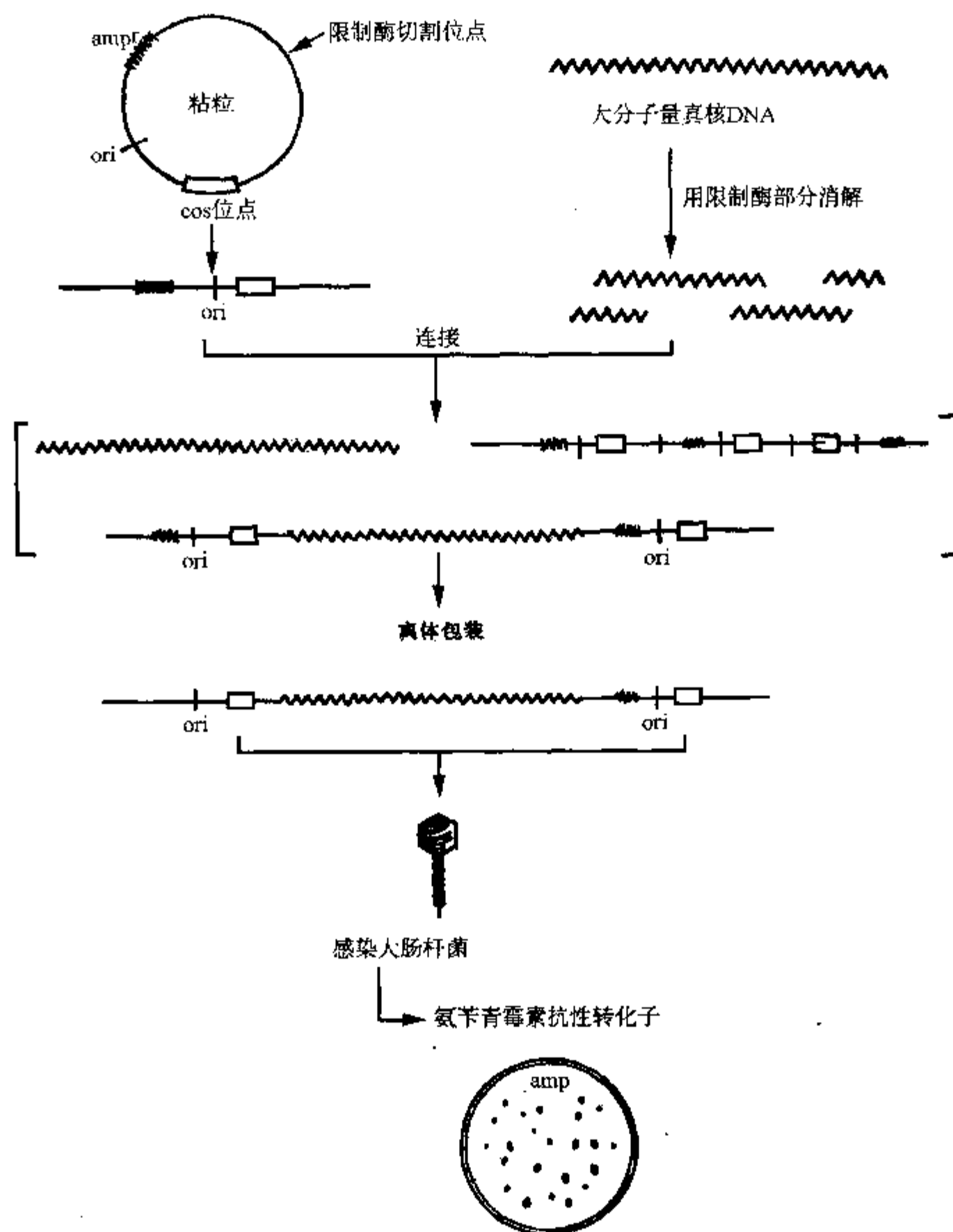


图 7-10 用粘粒克隆外源 DNA 片段的过程

克隆数目不一。

以上这些问题，在粘粒基因文库组建技术的发展中，一方面通过技术环节上的改进而克服，另一方面对粘粒载体本身进行新的修饰。

7.4.3.3 粘粒克隆中的技术改进

(1) 使用碱性磷酸酶处理线性粘粒载体，阻止载体与载体之间的自身连接。

具体方案如图 7-11。先用两种不同的限制性内切酶 (A、B) 分别把粘粒载体切割成线性 DNA，用碱性磷酸酶分别将两份 DNA 脱去 5'磷酸，再使用另一种内切酶 (C)，切割已去磷酸化的两份载体 DNA 样品；对于真核 DNA 的部分酶切样品，也需进行去磷酸化，最后将两份分别处理好的载体 DNA 和外源 DNA 片段混合在一起。由于粘性末端互补及末端去磷酸化两方面的限制，连接的可能性只有一种，由

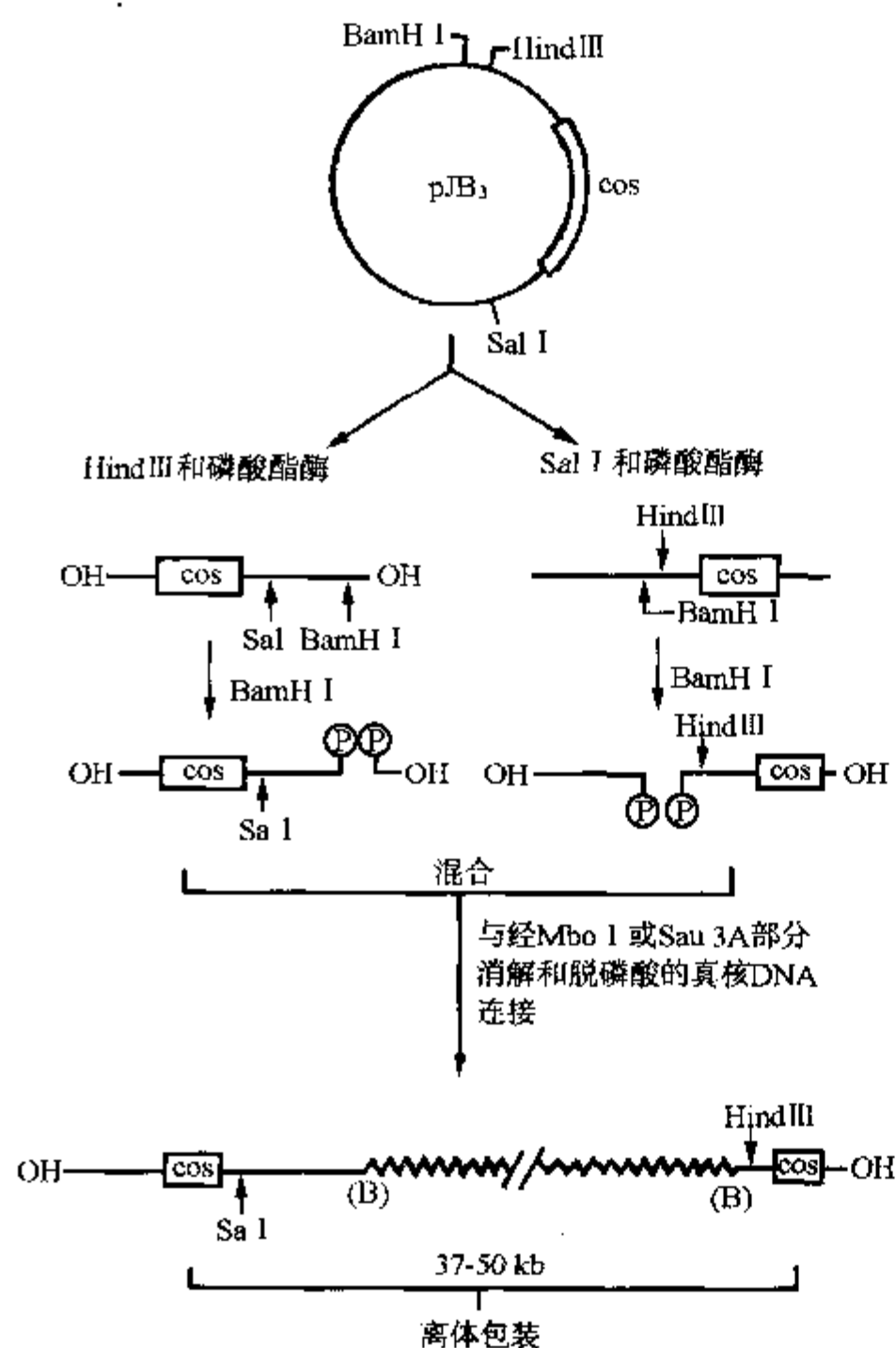


图 7-11 碱性磷酸酶确保粘粒的高效克隆方案

pMCS 粘粒含有 SV₄₀ 复制位点。

(6) 加入原核标志, 有利于在细菌中的复制。

(7) 使用噬菌体复制起始位点取代质粒复制起始信号, 减少携带不同重组子的细菌生长速率不一的困难。

并非每种粘粒载体都具有以上优点, 但这些改造为粘粒作为基因文库的载体在真核细胞中的表达, 展现了广泛的应用前景。

7.4.3.5 粘粒载体转染哺乳类动物细胞

穿梭粘粒能够携带真核 DNA 片段在细菌内扩增, 也能通过转染进入哺乳类动物细胞并进行转录表达, 表达蛋白质功能的体现往往是筛选目的基因的最佳途径, 从哺乳动物细胞阳性克隆株中, 提取的粘粒重组子, 在体外仍然可以包装成噬菌体颗粒, 再感染细菌进一步扩增, 即可大量获取所需基因的克隆。

1. 构建这类穿梭载体的实验条件并不十分复杂:

(1) 不需要特殊的真核筛选标志与原核筛选标志, 因为筛选标志就是目的基因与编码蛋白质本身的功能。

(2) 不需要在载体上添加真核启动子, 因为粘粒所携带的 DNA 是真核细胞基因组 DNA, 它是基因存在的自然状态, 本身的启动子和调控元件就可以调控基因的表达。

30~45kb 大小的插入片段与含 cos 位点的左、右臂相联。即可形成在 1 个载体分子中只插入 1 个外源 DNA 片段。

(2) 对于部分酶切后的真核 DNA 片段, 只选择 30~45kb 大小范围内的分子, 限制插入片段自身连接后, 插入粘粒的重组子形成。

因为粘粒自身分子为 5kb 左右, 可形成噬菌体颗粒所需的分子长度为 40~50kb。所以在外源 DNA 片段分子长度为 30~45kb 的情况下, 若两个分子相连, 再加上粘粒, 重组子的分子远远大于 50kb, 而不能包装成 λ 噬菌体颗粒, 感染不了细菌而被淘汰。

(3) 使用高密度菌落筛选技术, 通过菌落原位杂交大量筛选载有所需 DNA 片段的重组子。

7.4.3.4 粘粒载体的修饰

(1) 在同一个粘粒中使用两个 cos 位点, 如 c2RB 载体图 7-12, 有利于定向克隆。

(2) 缺失质粒载体中同源的片段, 有利于遗传标记筛选。

(3) 添加噬菌体特异启动子 (T₃、T₇、SP6), 有利于插入片段的双向转录形成 RNA 探针, 如 pWE15。

(4) 加入筛选标记, 有利于转染真核细胞后的筛选, 如 PTM 含有新霉素 (neo) 抗性。

(5) 含有真核细胞的复制起始位点, 如

(3) 穿梭粘粒除含有细菌复制起始信号外, 还要含有真核细胞复制起始信号, 这是最根本的要求。

(4) 穿梭粘粒除含有 *cos* 位点以外, 最好还携带噬菌体的体外包装信号。

2. 粘粒重组子对于哺乳动物细胞的转染, 可以进行以下两类研究:

(1) 用已经筛选鉴定的粘粒重组子转染动物细胞, 研究该基因表达调控的组织细胞特性以及该基因编码蛋白质的功能。例如, 将携带编码肿瘤坏死因子 (TNF) 的粘粒克隆转染纤维肉瘤细胞, 可以研究 TNF 对该细胞株的效应情况。

(2) 从粘粒基因组文库中筛选特殊功能基因。即将整个粘粒文库转染哺乳类动物细胞, 通过基因所表达的特殊蛋白质功能, 筛选出含感兴趣基因的细胞克隆株, 进一步纯化该基因的粘粒克隆。1987 年 Lau 和 Kan 用该法找出了编码胸腺嘧啶激酶的一个 43.8kb 的基因组 DNA 片段。他们先用含有抗新霉素基因的粘粒载体 pCA18 构建了基因组 DNA 文库, 用整个文库的 DNA 转染缺乏胸腺嘧啶激酶 (tk) 的小鼠 L 细胞系, 通过 HAT 培养基筛选, 然后用新霉素筛选, 找到了含有编码胸腺嘧啶激酶的基因组 DNA 片段。

该基因功能筛选途径, 为寻找新的癌基因与抗癌基因提供了一种很有发展的新方法。通过粘粒基因组文库转染细胞 (纤维母细胞或肿瘤细胞), 根据细胞的表型变化 (细胞恶变或逆转) 可分离癌基因或抗癌基因。

对于与细胞表面的蛋白质标志及其它可见的细胞表型变化相关的基因, 也可以使用这一方法进行粘粒文库的筛选。

7.4.4 丝状噬菌体载体

7.4.4.1 野生型 M13 噬菌体

M13、f1 和 fd 三种丝状噬菌体基因组, 颗粒大小和形状相近, 它们的 DNA 全长顺序已经清楚。现对 M13 进行扼要介绍, 操作和应用参阅有关章节。

M13 基因组大小为 6 407bp, 它是一种闭环正链 ssDNA 的大肠杆菌丝状噬菌体, 通过吸附细胞壁上性纤毛的方式感染雄性大肠杆菌。进入细胞后, 噬菌体 ssDNA 转变成双链 DNA (dsDNA), 并不杀死细胞, 只是抑制细胞的生长, 因此在平板上出现了混浊的噬菌斑。dsDNA 复制大量的 ssDNA, 包装成成熟的子代噬菌体释放出来, 每毫升培养液可提取 5 ~ 10 μ g 的 ssDNA。由于 M13 能以双链 DNA 形式存在于细胞中, 并且以单链 DNA 形式分泌到大肠杆菌以外, 故野生型 M13 具有改造成基因克隆载体的潜力。

7.4.4.2 M13 载体

1977 年以来, 以 Messing 为代表的一些研究小组对野生型 M13 进行了改造, 组建了一系列 M13 载体。

在丝状噬菌体基因组上, 基因 II 与基因 IV 之间, 有一段 50bp 大小的间隔区 (intergenic region), 又称为间隔顺序 (intergenic sequence, IS), 它不编码蛋白质, 但与 DNA 的复制转录和噬菌体的包装具有密

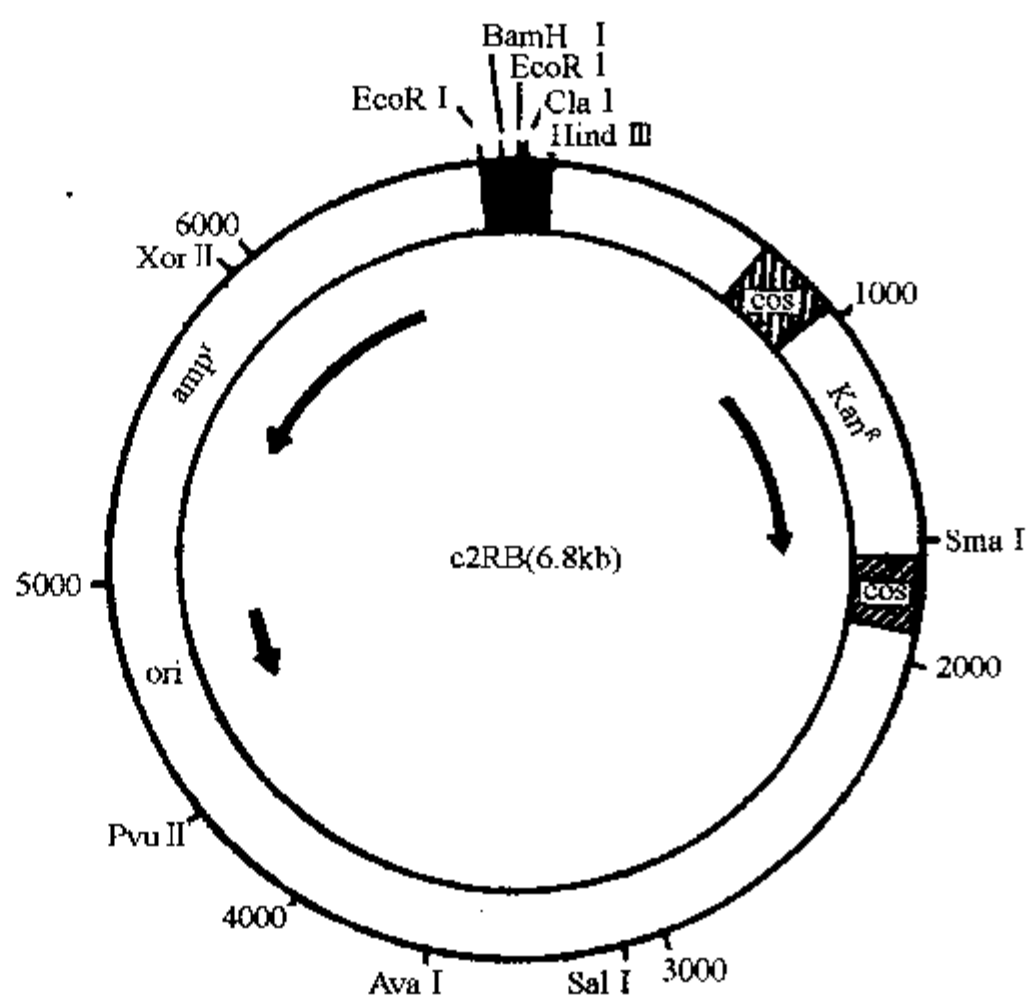


图 7-12 c2RB 粘粒图谱

切的关系。在 IS 区插入外源 DNA 片段会干扰丝状噬菌体的复制。幸运的是基因 II、IV 上的积累突变对这种干扰能够代偿, 所以外源 DNA 片段插入该区时并不影响噬菌体的活力。除 IS 区以外, M13 基因组上的其它基因均为病毒复制所必需, 这样对于野生型 M13 的改造就集中于 IS 区。

1. 在 IS 区插入筛选标志:

将大肠杆菌 lac 操纵子和编码 β -半乳糖苷酶基因的前一部分 (lacZ) 插入 M13 的 IS 区, 使改造的 M13 能表达 β -半乳糖苷酶的 α 肽 (为 β -半乳糖苷酶氨基末端的 146 个氨基酸), α 肽与大肠杆菌突变株中缺失 lacZ 基因的 F 因子附加体进行互补 (α 互补作用), 形成有活性的完整 β -半乳糖苷酶, 使该大肠杆菌突变株获得 lac 表型。在 IPTG 与 X-gal 的平板上, β -半乳糖苷酶降解 X-gal, 产生蓝色物质, 即不含插入片段的克隆菌斑为蓝色, 阳性重组子的菌斑为白色, 筛选非常方便。这个改造野生型 M13 的衍生物称为 M13mpl。

2. 引入适当的单一限制性内切酶位点:

Barner 等人用 N-甲基-亚硝基脲处理 M13mpl 的单链 DNA, 在 α -多肽编码区的第 13 位诱导出一个点突变: G→A, 使天门冬氨酸 (Asp) 的密码子 GAT 变成天门冬酰胺 (Asn) 的密码子 AAT, 产生了一个 EcoRI 的识别切割位点, 这一突变并不改变 α -多肽的生物活性, 得到野生型 M13 的第二个衍生物 M13mp2。

(1) M13mpl (+) 链 5'...ATG-ACC-ATG-ATT-ACG-GAT-TCA...

M13mpl (-) 链 3'...TAC-TGG-TAC-TAA-TGC-CTA-AGT...

(2) M13mp2 (+) 链 5'...ATG-ACC-ATG-ATT-ACG-AAT-TCA...

α -多肽: H_2N -Thr-Met-Ile-Thr-Asp-Ser

3. 聚合接头多克隆位点的插入:

M13mp2、3、4、5 等载体仅有 EcoRI 或 HindIII 单酶切位点, 在克隆中的应用受到极大的限制。在此基础上, 将多聚接头插入在 α -多肽 N 端编码部分, 形成多克隆位点, 得到了 M13mp7、M13mp8、M13mp9 等一系列载体, 这种插入仍然不影响 β -半乳糖苷酶突变体互补, 可降解 X-gal 形成蓝色菌斑, 而外源 DNA 片段插入该区后破坏了 α -互补作用, IPTG 与 X-gal 平板筛选为白色菌斑。各种 M13 克隆载体的主要区别就是多克隆位点中的限制性内切酶位点的不同。表 7-1 列出了各类 M13 载体的大小与改造。

表 7-1 各种 M13 载体的比较

载 体	基 因 组	lac	接 头	全 长
野生型 M13	6407	无	无	6407
M13mpl, 2	6407	789	无	7196
M13mp7	6407	789	42	7238
M13mp8, 9	6407	789	33	7229
M13mp10, 11	6407	789	48	7244
M13mp18, 19	6407	789	54	7250

7.4.4.3 M13 载体的应用

1. M13 载体主要用于测定 DNA 序列时制备单链 DNA 模板:

在使用 Sanger 末端终止法测定 DNA 顺序时, 同一外源 DNA 片段可按不同方向在 M13mp8, M13mp9 或 M13mp18, M13mp19 载体中克隆。由于在多聚接头的下游, 即 lacZ' 的第 6 位到第 14 位密码子为引物的结合部位, 所以, 在 M13mp8 或 M13mp9 载体中, DNA 插入片段的合成方向是 5'→3', 而测序阅读方

向即为 $3' \rightarrow 5'$ ；在 M13mp18, M13mp19 载体中, DNA 合成方向与阅读方向均为 $5' \rightarrow 3'$, 即从两个末端往中间阅读, 便于测出大片段 DNA 顺序。

2. 制备单链特异性 DNA 探针:

M13 的载体中, 使用不同的引物, 在合成 DNA 时, 掺入 $\alpha - ^{32}\text{P} - \text{dNTP}$, 可以制备单链 DNA 探针, 对分析真核细胞中特定基因的 mRNA 表达水平及反义 RNA 的存在状况具有较大的应用价值。

7.4.4.4 M13 载体克隆中常见问题

(1) M13 载体克隆外源 DNA 片段的最大困难是 DNA 插入片段不稳定。超过 1000bp 的外源 DNA 片段, 在 M13 噬菌体的增殖过程中会发生丢失, 但 300 ~ 400bp 的插入片段, 在 M13 载体中, 一般是十分稳定的。通过以下措施可得到一定缓解: M13 重组子应贮存于 -70°C , 感染适当的大肠杆菌菌株。不要进行一系列的放大培养, 培养物尽可能在小容积中进行, 培养时间尽量缩短 (一般为 4 ~ 8 小时) 等。

(2) 单向优势: 经常可以看到, 插入 M13 载体的 DNA 片段, 本可双向复制, 实际上是一个方向很容易, 另一个方向很困难。这是由于插入片段中, 两条链干扰载体中间隔区功能的程度不同造成的。避免这种现象出现的办法之一, 就是在外源 DNA 插入时, 选择多克隆位点上的两个内切酶位点进行定向克隆。对于某些顽固发生此类问题的外源 DNA 片段, 应考虑使用携带丝状噬菌体复制信号的质粒载体, 如 pGEM 系列中的适当载体。

7.4.5 真核细胞的克隆载体

作为载体, 无论是原核系统还是真核系统的基因克隆载体, 基本要求是一致的, 即具备在宿主中进行复制的信号、适当的单一酶切位点和筛选标志。

在原核载体的基础上, 进行一定的改造修饰, 得到携带真核复制信号的穿梭载体, 它们能够在真核系统中扩增, 若加上真核启动子等元件, 则能进一步在真核细胞中表达插入载体中的外源基因。当然, 还有一条途径, 就是使用理、化转染技术, 使载体直接随机整合到真核细胞的染色体 DNA 上, 与染色体一起复制, 那么载体上有无真核宿主细胞中自主复制信号变得无关紧要。关键在于是否有适当的真核转录元件控制目的基因的表达。为了获取阳性转染细胞株, 真核体系中必需具备筛选标志。除使用遗传缺陷型特殊细胞株与载体上基因产物互补以外 (如 TK 基因产物), 普遍使用的是抗新霉素基因。下面我们简要介绍几类真核体系中的基因克隆载体, 至于真核表达型载体则在有关章节介绍。

7.4.5.1 酵母穿梭质粒

除有细菌质粒复制子和抗药性标记以外, 还有酵母菌复制子和选择标记 (图 7-13)。酵母菌复制子取自染色体复制区或酵母菌质粒 2U 环。酵母菌中选择标志一般为色氨酸、亮氨酸、组氨酸或尿嘧啶的合成基因, 通过转化这些基因产物缺陷型的酵母菌而筛选。

在大肠杆菌中扩增含 DNA 插入片段的酵母穿梭质粒, 然后将混合质粒导入适当的酵母菌原生质球, 在选择条件下, 筛选出与受体细胞突变株互补的重组质粒, 重新导入大肠杆菌, 大量扩增该特定质粒。

7.4.5.2 Ti 质粒

1. Ti 质粒的生物特性:

肿瘤脓杆菌感染植物后, 能导致冠瘿瘤, 该植物肿瘤的形成与肿瘤脓杆菌中的质粒密切相关, 这种诱导肿瘤的质粒 (tumor inducing plasmid) 称为 Ti 质粒。

Ti 质粒是环状双链 DNA, 长 185kb, 分子量为 1.2×10^8 道尔顿。它合成氨基酸类物质——欧品 (opine), 作为肿瘤

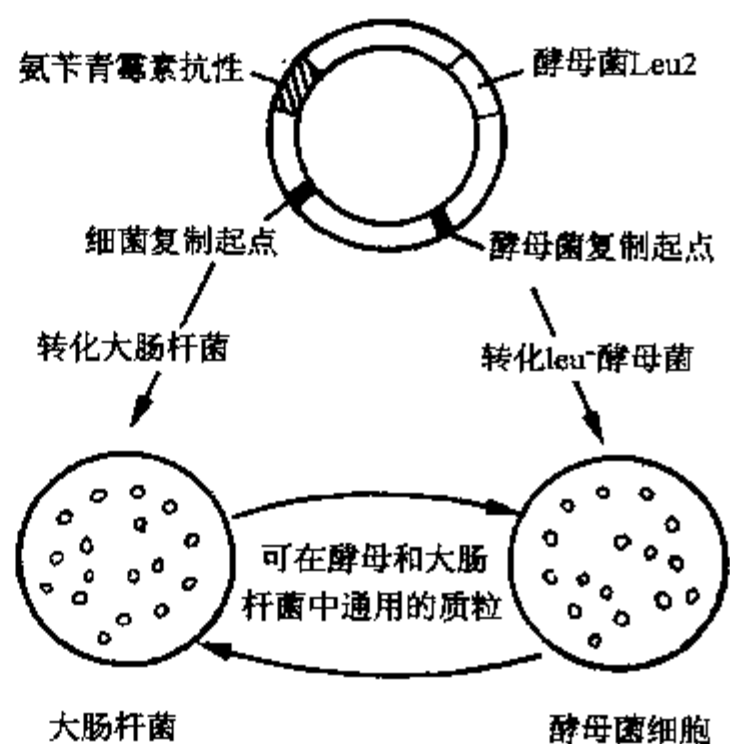


图 7-13 酵母穿梭质粒结构

脓杆菌生长所需的碳源和氮源,但欧品是精氨酸衍生物,对于植物细胞是异源性的。

Ti 质粒上有一段长 20kb 的 DNA 片段,含有癌基因,随机整合到植物染色体 DNA 上。活化癌基因后导致植物肿瘤,这段可转移至染色体上的 Ti 质粒 DNA 叫 T-DNA。T-DNA 具有三种功能:诱导肿瘤、合成欧品和抑制细胞分化。

2. Ti 质粒作为基因工程载体:

由于 Ti 质粒中的 T-DNA 能随机整合到植物细胞染色体 DNA 上,诱导植物形成肿瘤,Ti 质粒的宿主范围广泛,欧品合成酶基因的启动子效率极高,且能稳定整合于染色体中,故 Ti 质粒可以做为植物基因工程的天然载体。

但是 Ti 质粒基因组大,难以改造,故采用体外、体内重组结合法:

(1) 体外重组:从 Ti 质粒中切下 T-DNA,插入一个载体(如 pBR322),然后切开 T-DNA,将外源基因插入在欧品合成酶基因启动子的下游,组成重组子。

(2) 联合感染:用野生型 Ti 质粒先转化肿瘤脓杆菌细胞,然后将重组子转化含 Ti 质粒的脓杆菌细胞。

(3) 同源重组:由于重组子中的 T-DNA 与野生型 Ti 质粒中的 T-DNA 同源性高,发生体内同源重组,等位交换,这样天然 Ti 质粒将由 T-DNA 的交换,而携带外源基因。

(4) 感染植物细胞:含有外源 DNA 片段的 Ti 质粒感染植物细胞后,外源基因随着 T-DNA 整合到植物细胞的染色体 DNA 上,在欧品合成酶基因启动子作用下,在植物细胞中高效表达外源基因。

T-DNA 片段中的 Rooty 区突变,可以消除对 T-DNA 植物分化的影响,形成完整的植物株。这种 Rooty 区突变的 T-DNA 称弱化 T-DNA 载体。在 Rooty 区插入外源基因可以达到弱化 T-DNA 的作用,使植物分化成完整的植物株(图 7-14)。

Ti 质粒的 T-DNA 整合染色体 DNA 的特性还可以用于植物基因的功能研究,即形成基因表型缺陷性植物株,也可以进行基因的纯化及染色体定位工作。

7.4.5.3 DNA 病毒载体

动物细胞中的 DNA 病毒在细胞中形成较高的拷贝数并有强大的启动子,故 DNA 病毒是哺乳动物细胞中理想的基因工程载体。

1. SV₄₀(猴肾病毒)载体:

SV₄₀基因组全顺序已经完全清楚,对于该病毒的生活习性和各基因的调控也了解得比较深刻。所以,当今许多真核表达载体中的元件都取材于 SV₄₀的调控顺序或复制信号,而原始的天然 SV₄₀作为载体已很少使用。

SV₄₀基因组分为早期、晚期两大区域,早期区在溶原生长中均表达,晚期区仅在 DNA 复制开始后的一段时间内表达,产生病毒外壳结构蛋白。在早期区与晚期区之间为复制起始位点。

用 SV₄₀作为载体有两种方式:①用 SV₄₀ DNA 与外源

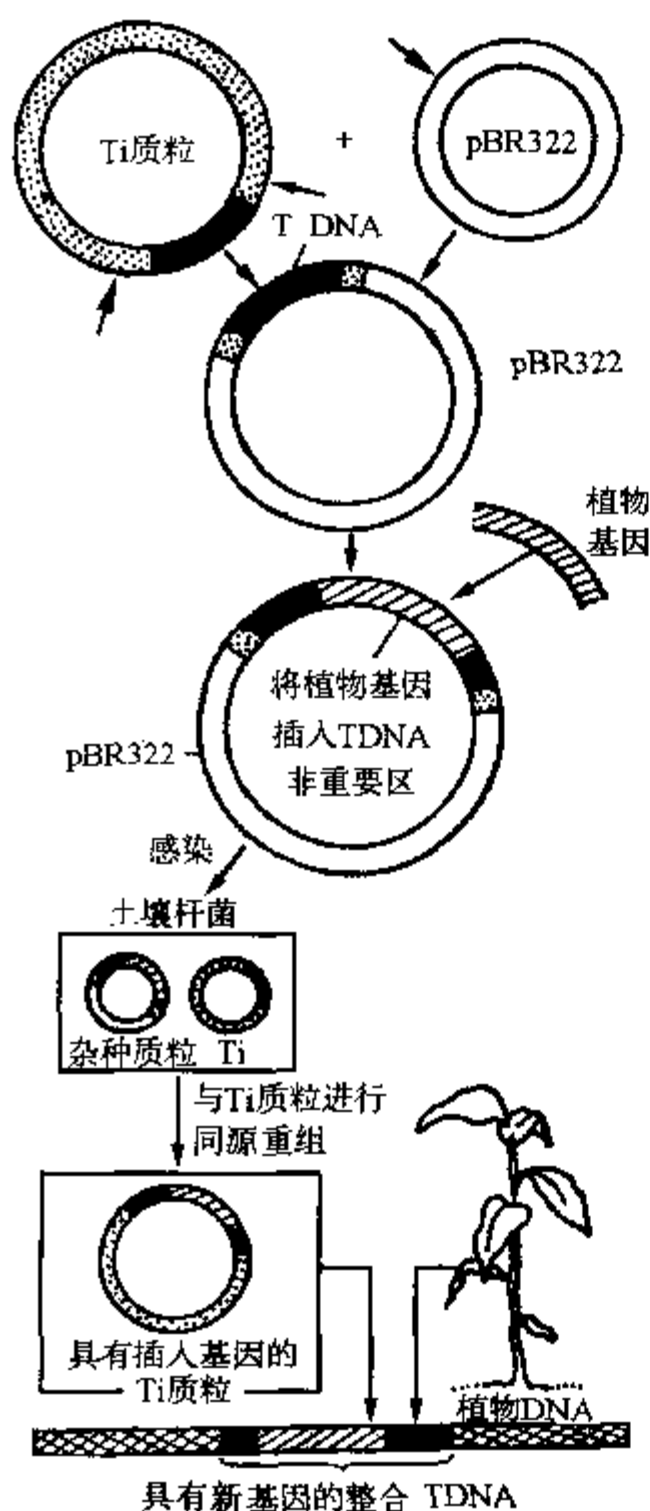


图 7-14 Ti 质粒克隆方案

DNA 构建重组子，转染允许细胞形成含外源 DNA 的病毒颗粒；②重组子不包装成病毒颗粒，而像质粒一样复制或整合到染色体 DNA 中。

一般以取代方式组建 SV₄₀ 重组子，天然 SV₄₀ 中能插入 2.5kb 大小的外源 DNA 片段。

(1) 野生型 SV₄₀ 完整病毒载体：

晚期区取代：

以外源 DNA 片段取代天然 SV₄₀ 晚期区域，重组子在宿主细胞中能复制，但不能形成病毒颗粒。只有在辅助病毒与之联合感染的情况下，重组病毒才能包装成子代病毒颗粒。其辅助病毒为早期区缺乏，只能表达晚期区的 SV₄₀ 突变种（图 7-15A）。

早期区取代：

用外源 DNA 片段取代 SV₄₀ 的早期区域，应用晚期缺乏，只表达早期区（主要是大 T 抗原）的辅助病毒，营救 SV₄₀ 重组子，使之复制并包装成完整病毒颗粒。另一种方法是感染 cos 细胞，（是用一个复制起始部位缺失的 SV₄₀ 突变种感染的猴肾细胞），整合于染色体 DNA 上的该突变 SV₄₀，可以表达功能性大 T 抗原，辅助 SV₄₀ 重组子的复制与包装（图 7-15B）。

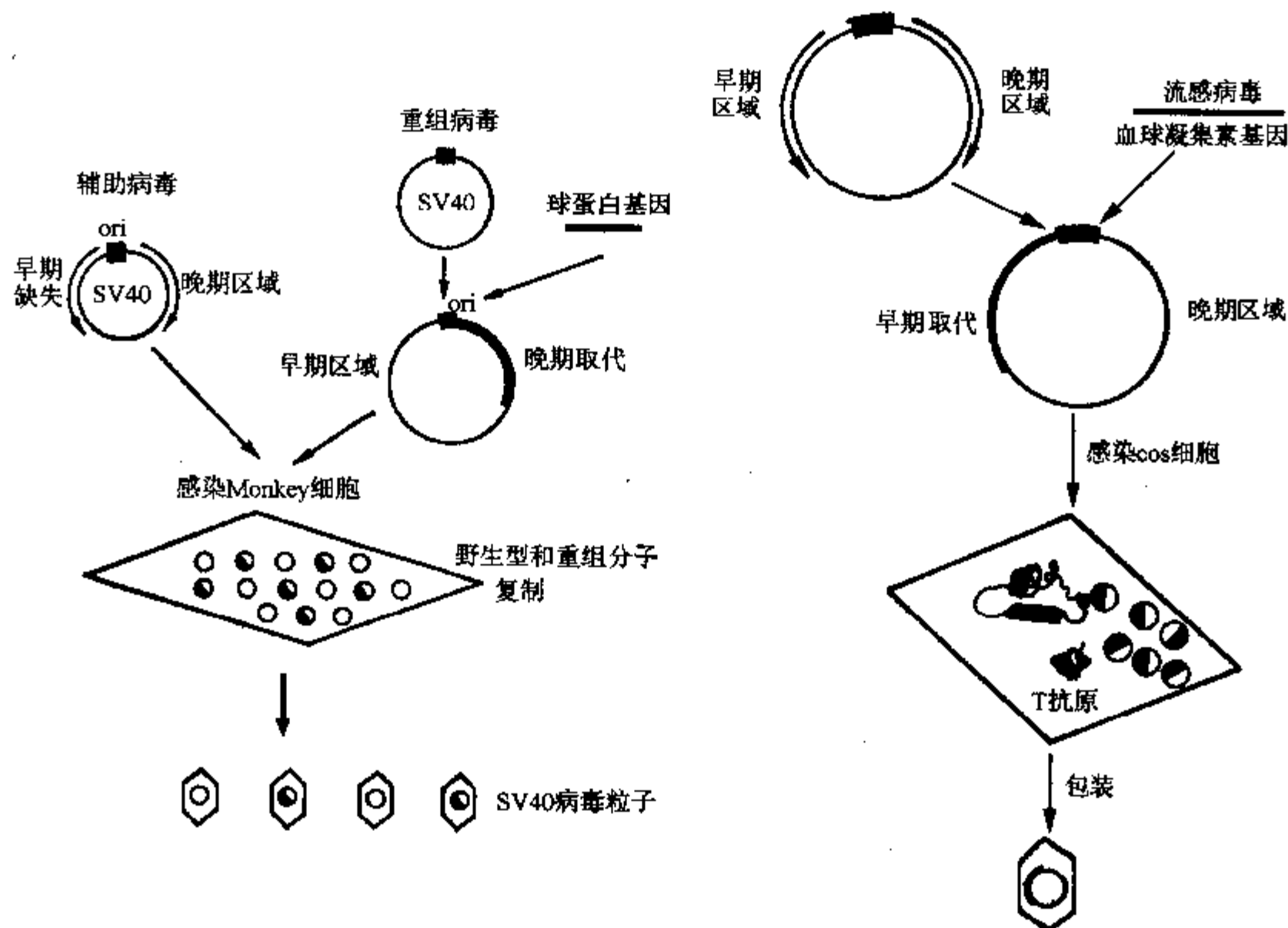


图 7-15 A: SV₄₀ 晚期区取代及标记营救

B: 早期区取代的 SV₄₀ 转染 cos 细胞

(2) SV₄₀ DNA 元件组建的穿梭质粒：以天然 SV₄₀ 完整病毒作为载体，存在以下几点缺陷：①载体容量小，最大只能插入 2.5kb 外源 DNA 片段；②宿主范围小，只能在猴细胞中复制；③使用辅助病毒进行营救 SV₄₀ 病毒重组子，存在重组成野生型 SV₄₀ 病毒的危险，使用 SV₄₀ 中转录元件构成穿梭质粒能够克服以上局限。

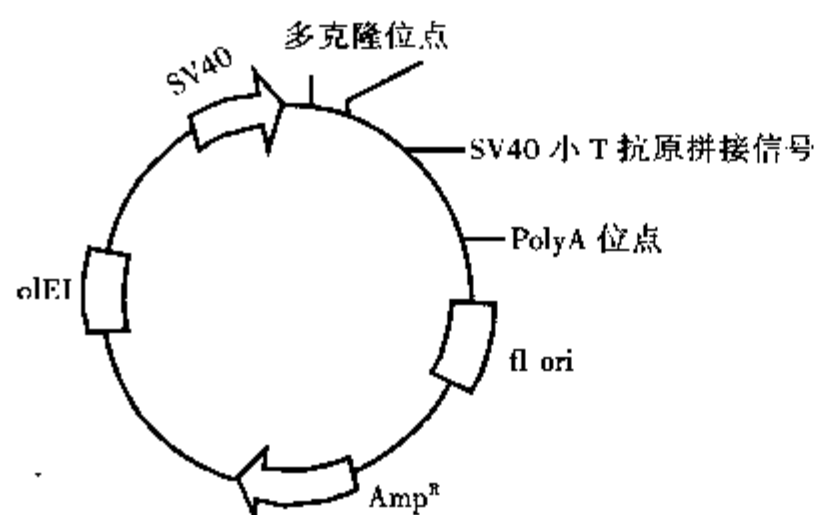


图 7-16 pSVK3

pSVK3 质粒: pSVK3 是一种广泛适用于的哺乳动物细胞系表达外源基因的穿梭质粒, 全长 3919bp, 由噬菌体、质粒及 SV₄₀ 病毒构建而成 (图 7-16), 其 DNA 元件分别来源于 pBluescrip HKS 和 pSV₂cat。

说明: fl 复制子, 在辅助噬菌体 M13 K07 的存在下, 穿梭质粒可以产生单链噬菌体。T7 启动子, 可以体外转录出插入片段的 RNA, 制备成 RNA 探针。

原核系统构件:

复制子: 质粒复制起始点 ColE1

丝状噬菌体复制起始点 fl

筛选标志: 抗氨苄青霉素基因 Amp^r

启动子: T7 启动子

真核系统构件:

复制起始信号: SV₄₀

启动子: SV₄₀ 早期启动子

RNA 修饰信号:

SV₄₀ 小 T 抗原的拼接信号

SV₄₀ 早期区 mRNA polyA 加尾信号

多克隆位点: 在 SV₄₀ 启动子下游存在 EcoR I、Kpn I、Sma I、Xba I、Sal I、pst I、Apa I 及 Xho I 共八个酶切位点。

2. 牛乳头瘤病毒 (BPV) 载体:

BPV 基因组为 8kb, 能引起家畜产生肿瘤, 可转化某些鼠的细胞系成恶性表型, 每个细胞中产生 20~150 个拷贝的病毒。在真核细胞中, BPV 象细菌中的质粒一样, 为染色体外独立复制单位 (附加体, episome)。由于 BPV 不整合到宿主染色体 DNA 中, 使它成为组装穿梭质粒的极好材料, 而且 BPV 能引起细胞恶性转化的特性, 本身就是一个显性筛选的标志。

pBPV 载体:

原核系统构件:

来源于 PBR322 的复制起始点, 抗氨苄青霉素基因

真核系统构件:

启动子: 小鼠摄金蛋白基因 I 启动子 MTI。

增强子: 鼠肉瘤病毒 (MSV) LTR 中的增强子。

RNA 转录修饰信号: 来源于 SV₄₀ 的 mRNA 拼接信号和 polyA 加尾信号。

多克隆位点: Xho I、Sac II、Not I。

pBPV (图 7-17) 全长 12516bp, 真核宿主为哺乳类动物细胞株 C127, 小鼠 3T3 细胞株和大鼠纤维细胞株 FR3T3, 原核宿主为缺乏 recA 的大肠杆菌, 如 HB101。

pBPV 载体具有以下三大优势: ①pBPV 不整合到宿主染色体基因组 DNA 中, 因此靶基因的表达不会由于整合而受到影响, 始终以环状双链 DNA 形式存在, 保持了基因的稳定; ②pBPV 携带 pBR322 和 BPV 的复制起始位点, 使其成为在细菌和哺乳动物细胞中均能复制的穿梭质粒; ③pBPV 能转化哺乳动物细胞, 使得细胞生长失控, 该特性是一个方便的显性筛选标志。

7.4.5.4 反转录病毒载体

反转录病毒为单链 RNA 病毒, 长约 8~10kb, 该 RNA 有 mRNA 的功能, 5'端是甲基化的帽状结构, 3'端为 polyA 尾。所有的反转录病毒一般由三个共同的基因组成:

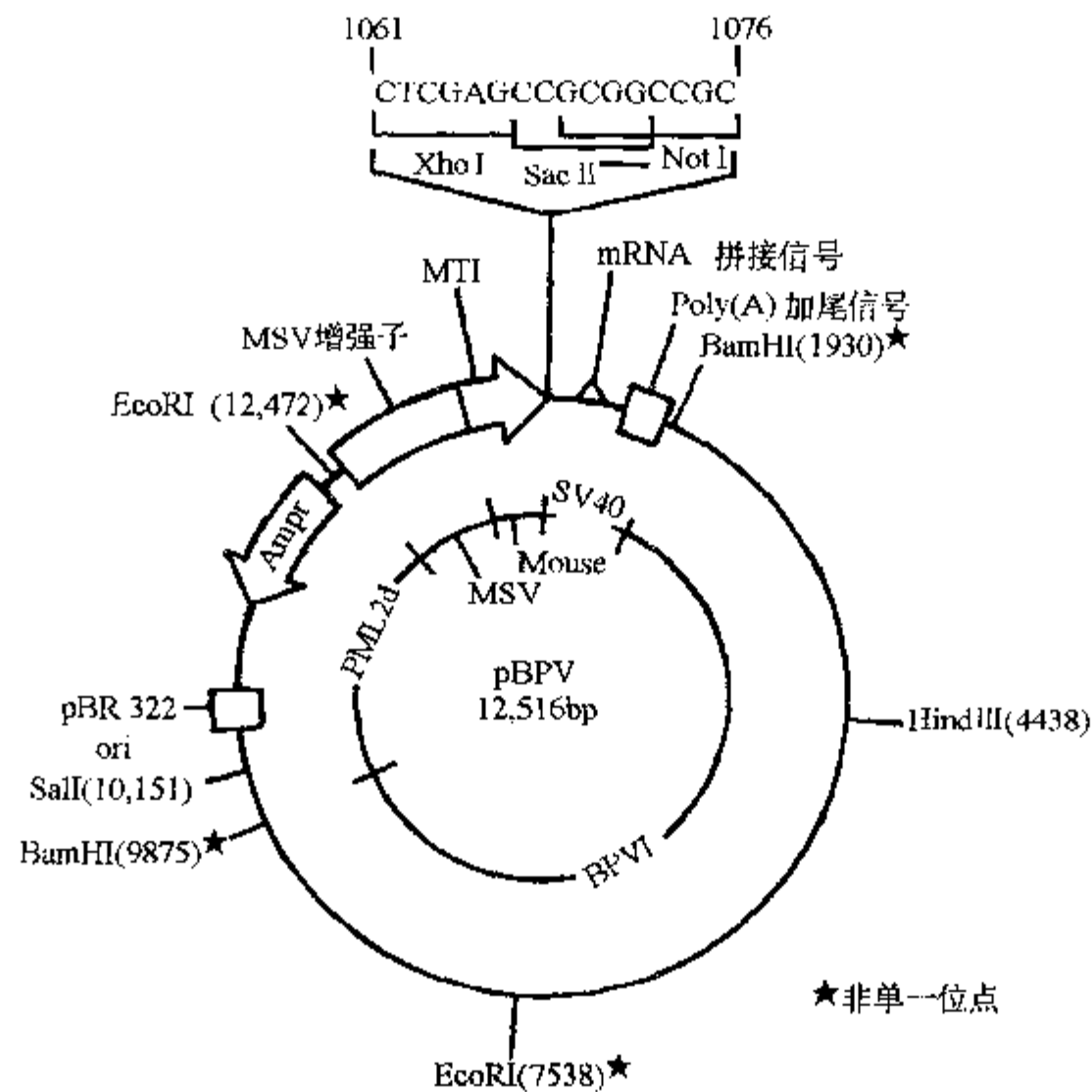


图 7-17 pBPV 载体图谱

gag: 核心蛋白基因, 其产物位于病毒颗粒中心, 与 RNA 相连。

pol: 反转录酶基因, 编码反转录酶, 催化 RNA 反转录成 cDNA。

env: 糖蛋白基因, 合成病毒的外壳蛋白。

以上三个基因组成的 RNA 反转录病毒, 并不能转化动物细胞, 许多反转录病毒还有另一个基因: **onc** (癌基因), 它编码转化蛋白, 转化细胞。

另外, 在 RNA 反转录病毒基因组的两端分别有一个长末端重复序列 (long terminal repeat, LTR), LTR 中含有一个强的启动子。

RNA 病毒感染动物细胞后, 以 RNA 为模板反转录成线性双链 DNA, 即原病毒 DNA, 这时 DNA 的双端已经形成 LTR, 有时也有环状双链 DNA 形式存在, 通过整合进入宿主染色体 DNA 中, 原病毒以自身的 LTR 中的启动子和加尾信号, 转录并表达基因, 原病毒与染色体一起复制, 并可以长期存在。

反转录病毒做为基因克隆载体, 具备以下几个特点: ①病毒具有广泛的哺乳类动物细胞宿主; ②病毒基因组有较大的容量, 能插入至少 7kb 大小的外源基因; ③原病毒基因组自身含有完整高效的转录调控元件; ④病毒通过主动感染方式进入宿主细胞, 并有效地整合在宿主染色体 DNA 中。

反转录病毒可以组建成两类基因工程载体: 卸甲载体 (disarmed vector) 和穿梭载体。

(1) 卸甲载体: 即用完整的天然原病毒双链 DNA 为基础, 用一个外源 DNA 片段取代反转录病毒中的致癌基因构建而成。有人用该方法成功地在体外培养细胞中表达了人绒毛膜促性腺激素 α -HCG。

(2) 穿梭载体: 通过反转录病毒的 LTR、包装信号等 DNA 元件与质粒等原核复制、筛选元件重组而成。这类载体发展非常迅速, 已成为动物体内表达外源基因的有力工具, 并且在临床基因治疗的探索中发挥了重要的作用。有关这类载体的组装原则、安全性等请参阅本书基因治疗部分。

7.4.5.5 昆虫杆状病毒、人痘病毒

昆虫杆状病毒 (baculovirus) 是另一类很有前途的真核系统基因工程载体。主要是利用茵蓓银纹夜蛾 (autograph californica) 核型多角体病毒 (ACNPV) 的 DNA 进行, 宿主是昆虫细胞, 利用该载体细胞已经成功地表达了干扰素等十几种蛋白质。

1. 昆虫杆状病毒载体:

有感染性好, 具显性筛选标志和应用广泛、安全等优点。

感染性好: 昆虫杆状病毒基因组中有一段病毒的复制与表达的非必需区, 提供了一个天然的重组操作区, 重组子的感染性与野生型病毒比较, 无明显区别。该病毒的包涵体蛋白可以延伸, 使其对外源 DNA 的容纳能力高达 100kb。包涵体蛋白基因 (ocu) 有一个强大的启动子, 表达效率高, 容量大, 可允许一个外源基因的多拷贝插入, 也提高了表达水平。表达的产物分泌至细胞外, 有利于分离、提取。

具显性筛选标志: 外源基因插入使包涵体蛋白基因失活, 不出现 O^- 空斑, 容易识别。

应用安全、广泛: O^- 重组病毒在自然界生存短暂, 使昆虫杆状病毒重组子的使用安全性提高。由于其外源 DNA 片段的容纳量大, 可联合克隆多个外源基因, 制备成多效价疫苗。

2. ACNPV:

为共价闭环双链 DNA, 全长 128kb, 超螺旋占 30% ~ 50%, 分子量为 82×10^6 道尔顿, 已定位了 25 个基因, 其中对包涵体蛋白基因了解的比较清楚。整个基因组的限制性内切酶图谱 (EcoR I、Hind III) 已经制成。

昆虫杆状病毒克隆的过程: 由于昆虫杆状病毒基因组大、难以改造, 故其克隆过程类似于 Ti 质粒, 是一个体外重组与体内同源重组的联合方式。

体外重组: 从 ACNPV 中切下 ocu 基因, 与质粒 DNA 重组后, 再将外源 DNA 片段插入 ocu 基因中, 在原核细胞中复制。

体内同源重组: 也称等位交换, 即将体外重组子与野生型 ACNPV 联合感染昆虫培养细胞, 由于 ocu 同源而产生同源重组, 使得野生型 ACNPV 获得外源基因并进行表达, 转染的昆虫细胞以 O^- 表型进行筛选。

Smith 等人曾将 ACNPV 的 EcoR I — I 片段 (ocu 基因) 与 pUC8 质粒连接, 构建成 PAC-380 质粒, 然后用 BamH I 切开 PAC-380 质粒中的 ocl 基因, 插入人的 β -干扰素基因, 形成新的重组子 PAC-380-IFN β 。将 PAC-380-IFN β 与野生型 ACNPV 共同感染昆虫细胞, 发生同源重组, 用 O^- 表型筛选阳性重组子细胞。最后, 每 10^6 个感染细胞可产生 5×10^6 单位活性 β -干扰素, 95% 以上的 β -干扰素分泌到细胞外培养基中。

3. 人痘病毒载体:

作为基因工程的载体的最大应用是制备多价活疫苗, 其基因组允许插入 25kb 的外源 DNA 片段, 在细胞中的表达效率也非常高。克隆过程与昆虫杆状病毒的操作极其相似, 它以割离的胸腺嘧啶激酶 (TK $^-$) 基因作为筛选标志, 也是通过体外重组、联合感染和体内同源重组三大步骤最后达到表达外源基因的目的。

7.5 DNA 分子的体外连接

DNA 重组技术中的核心步骤是 DNA 片段之间的体外连接。DNA 连接本质上是一个酶促生物化学过程。这个酶促反应中的各种成分及其组成的体系不同程度影响了反应的速率和产物的形成, 毋庸置疑, DNA 连接酶是其中的重要角色, 下面依次阐明酶学反应中的各种因素与不同的 DNA 连接的有关问题。

7.5.1 DNA 连接酶及连接机制

DNA 的连接就是在一定条件下, 由 DNA 连接酶催化两个双链 DNA 片段相邻的 5' 端磷酸与 3' 端羟基

之间形成磷酸二酯键的过程。

DNA 连接酶主要有两种： T_4 噬菌体 DNA 连接酶和大肠杆菌连接酶。DNA 连接酶能修复双链 DNA 中一条链上的缺口。而且还能将两个独立 DNA 片段形成磷酸二酯键共价连接。

7.5.1.1 T_4 噬菌体 DNA 连接酶

1. 酶的特性：

T_4 DNA 连接酶是 T_4 噬菌体基因 30 编码的产物，最早是从 T_4 噬菌体感染的大肠杆菌中提取的，分子量为 68kD，需要 ATP 做为辅助因子并由 ATP 提供能量。编码 T_4 DNA 连接酶的 T_4 噬菌体基因 30 已经克隆，并可在大肠杆菌中大量表达。

2. 酶促催化机制：

T_4 DNA 连接酶催化 DNA 连接的反应分为三步（图 7-18）：①ATP 与 T_4 DNA 连接酶形成复合物，通过 ATP 中的磷酸与 T_4 DNA 连接酶中亮氨酸的氨基，形成磷酸-氨基键而连接： T_4 DNA 连接酶 + ATP \rightarrow T_4 - DNA 连接酶 - 亮氨酸 - N - 核糖 - 腺嘌呤（酶 - ATP 复合物）；②酶 - ATP 复合物活化 DNA 链 5' 端的磷酸基团，形成磷酸-磷酸键；③DNA 链 3' 端的羟基活化并取代 ATP，与 5' 端磷酸根形成磷酸二酯键，并释放出 AMP，完成 DNA 链之间的连接。

3. T_4 DNA 连接酶的适当底物：

①一条链带有缺口的双链 DNA 分子；②两个不同片段的双链 DNA 之间存在互补粘性末端；③两个双链 DNA 分子之间的平末端；④RNA - DNA 杂合体中，RNA 链上的缺口，也可将 RNA 末端与 DNA 链连接。

对底物形式①、④的催化连接有重要的生理功能，前者承担细胞内 DNA 修复工作，后者在 DNA 复制过程中，RNA 引物与 DNA 配对后，RNA 对 DNA 的复制起着重要的作用。

对底物形式②③催化的是体外 DNA 重组应用最广的两个特性。对于平末端的连接，在 T_4 RNA 连接酶存在时，可使 T_4 DNA 连接酶的连接效率提高 20 倍，低浓度 PEG 也能增强 T_4 DNA 连接酶对平末端 DNA 的连接活性；ATP 是酶辅助因子，其浓度对酶的催化活性影响很大，在 ATP 浓度为 0.5 ~ 5mmol/L 范围内，随着 ATP 浓度的升高对 T_4 DNA 连接酶产生可逆性抑制，当 ATP 浓度升达 7.5mmol/L 时对 T_4 DNA 连接酶的粘末端及平末端连接活性均有抑制作用。

4. T_4 DNA 连接酶的活性单位：

T_4 DNA 酶的活性单位有多种定义，比较通用的是韦氏（Weiss）单位。一个韦氏单位，是指在 37℃ 下 20 分钟内催化 1nmol 32 P 从焦磷酸根置换到 γ - β - 32 P - ATP 所需要的酶量。

用不同的方法测定 T_4 DNA 连接酶的催化活性，可有酶单位不同的定义。如 M-L 单位使用 d(A-T)_n 做为底物；粘性末端连接单位以 λ DNA/Hind III 片段为底物。以下是韦氏单位与其它单位之间的换

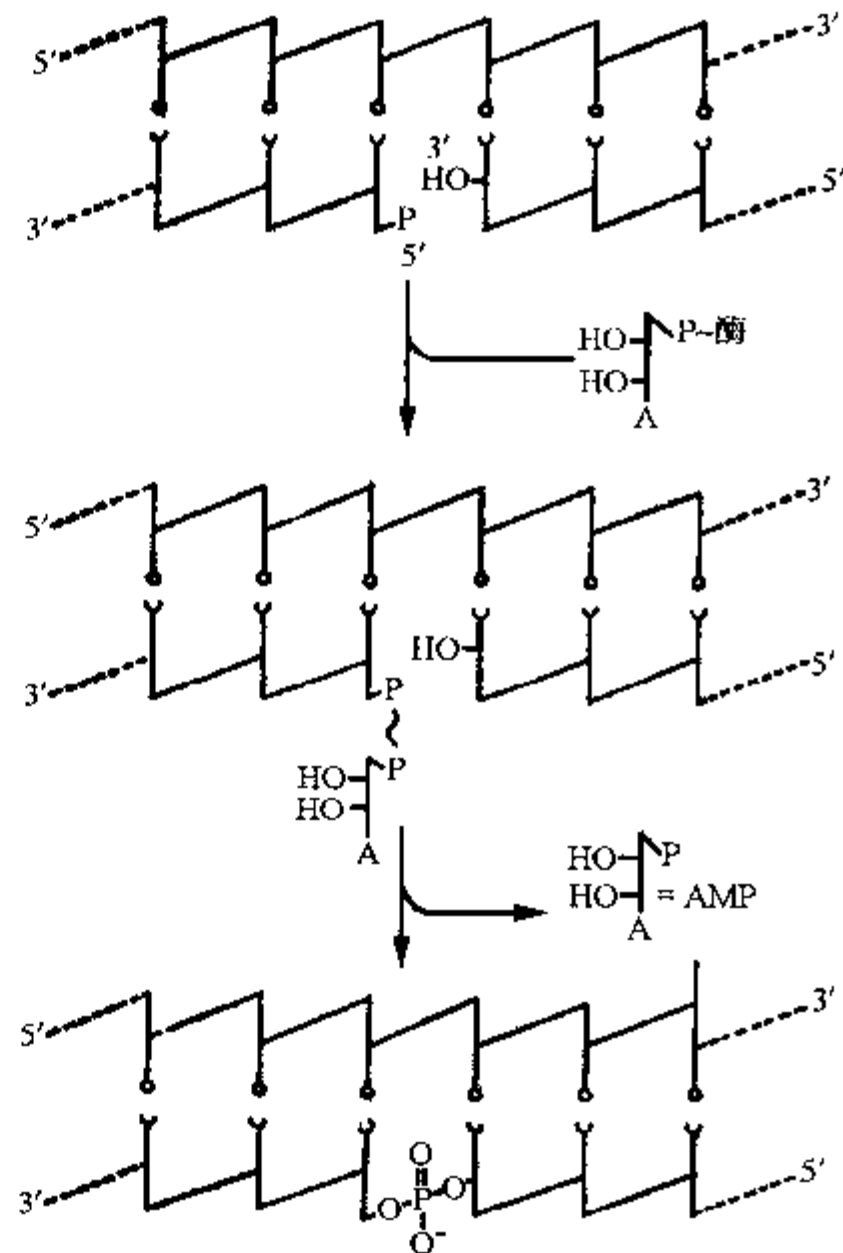


图 7-18 T_4 DNA 连接酶催化 DNA 间 5' 磷酸与 3' 羟基形成磷酸二酯键

算关系:

1 韦氏单位 = 66.6 粘末端连接单位

1 韦氏单位 = 0.2M - L 单位 (Modrich - Lehman)

0.01 韦氏单位能在 16℃、30 分钟内将 HindIII 完全酶切的 1μg λDNA 片段完全连接。

1 韦氏单位在 16℃、30 分钟内, 能将 1μg HaeIII 完全酶切的 λDNA 平末端 DNA 片段有效连接。

在使用 T₄DNA 连接酶时, 一定要了解清楚生产厂家所使用的定义单位, 因为不同厂家规定的单位, 其酶活性可相差几十倍, 甚至上百倍。

5. T₄DNA 连接酶的反应条件:

与酶活性单位定义存在差异一样, 不同厂家的 T₄DNA 连接酶其反应条件 (反应缓冲液和反应温度、时间等) 也有不同。

下面推荐一个较普遍的反应条件:

40mmol/L Tris·Cl (pH7.5)

10mmol/L MgCl₂

10mmol/L DTT

1.0μg DNA (0.1 ~ 1.0μmol/L 5'末端)

0.5 ~ 1.0mmol/L ATP

50μg/ml BSA

1 韦氏单位的 T₄DNA 连接酶

反应终体积为 50μl, 根据 DNA 片段的分子量及末端情况, 在 12 ~ 30℃之间反应 1 ~ 16 小时。终止反应的方法为加入 2μl 0.5mol/L 的 EDTA 溶液或者 75℃水浴 10 分钟。

对于粘性末端一般在 12 ~ 15℃之间进行反应, 以保证粘性末端退火及酶活性、反应速率之间的平衡, 所以连接温度介于同源粘性末端退火最适温度和酶的最佳反应温度之间, 粘性末端中 G + C 含量多, 其连接反应温度可以增高。在 DNA 浓度为 100μg/ml 时, EcoR I 酶解的线性 SV₄₀ DNA (末端为 pAATT), 连接最适温度为 12.5℃, 即使 AATT 四核苷酸的最适退火温度为 5 ~ 6℃, 当连接反应温度上升至 25℃时, 连接成环状的 SV₄₀ DNA 仍在 50% 以上。平末端反应可在室温进行, 因为不需考虑两个末端的退火问题。但是, 温度高于 30℃会导致 T₄DNA 连接酶的不稳定, 需用比粘末端连接大 10 ~ 100 倍的酶量。tRNA 及 dNTP 的存在不会抑制 T₄DNA 连接酶的活性, 但是较高的 NaCl 浓度 (> 150mmol/L) 将严重地阻碍 T₄DNA 连接酶的连接效率。

6. T₄DNA 连接酶的应用:

T₄DNA 连接酶是应用最广泛的 DNA 体外重组工具酶: ①连接具有同源互补粘性末端的 DNA 片段; ②连接双链 DNA 分子之间的平末端; ③在双链平末端的 DNA 分子上添加合成的人工接头。

7.5.1.2 大肠杆菌 DNA 连接酶 (*E. coli* DNA 连接酶)

E. coli DNA 连接酶是由大肠杆菌基因组中 lig 基因所编码, 分子量为 75kD, lig 基因已经克隆并能在相应的大肠杆菌株的细胞中大量表达。

E. coli DNA 连接酶催化 DNA 分子连接的机制及反应过程, 大致与 T₄DNA 连接酶相同, 只是辅助因子为 NAD⁺, 首先 NAD⁺ 与酶形成复合物, 进而与 DNA 链的 5'磷酸连接, 然后另一 DNA 链的 3'羟基取代它, 并释放酶复合物。两者另一个区别是: *E. coli* DNA 连接酶几乎不能催化平末端 DNA 分子之间的连接。故它的适当底物只是带缺口的双链 DNA 分子和具有同源互补粘性末端的不同 DNA 片段。

E. coli DNA 连接酶的反应条件:

40mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

10mmol/L MgCl₂

5mmol/L NaCl

5mmol/L DTT

1 μ g DNA

50 μ g/ml BSA

10 个 Modrich - Lehman 单位 *E. coli* DNA 连接酶

反应体积为 50 μ l, 反应温度为 10 ~ 25 $^{\circ}$ C, 时间为 2 ~ 16 小时, 用 2 μ l 0.5mmol/L EDTA 终止反应 (或 75 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟)。对于具体的连接体系, 其反应体积、时间、温度、DNA 浓度及酶的用量可以根据实际情况作相应调整。

E. coli DNA 连接酶可以不需要还原剂 DTT 的保护, PEG 可显著促进 DNA 粘性末端的连接效率, 在 PEG 的存在下, *E. coli* DNA 连接酶还能催化 DNA 平末端之间的连接反应。由于 *E. coli* DNA 连接酶对 DNA 末端结构要求比较严格 (同源粘末端), 所以它的连接产物转化细菌后, 假阳性背景非常低, 这是 *E. coli* DNA 连接酶较 T_4 DNA 连接酶的一个优点。由于 T_4 DNA 连接酶的底物范围广, 尤其是能有效地连接 DNA 的平末端, 故 T_4 DNA 连接酶的应用最为广泛。

7.5.1.3 T_4 噬菌体 RNA 连接酶

T_4 RNA 连接酶由 T_4 噬菌体基因 63 所编码, 在 ATP 的辅助下, 催化单链 DNA 或 RNA 的 5' 磷酸与相邻的 3' 羟基共价连接 (图 7-19), 其反应条件为:

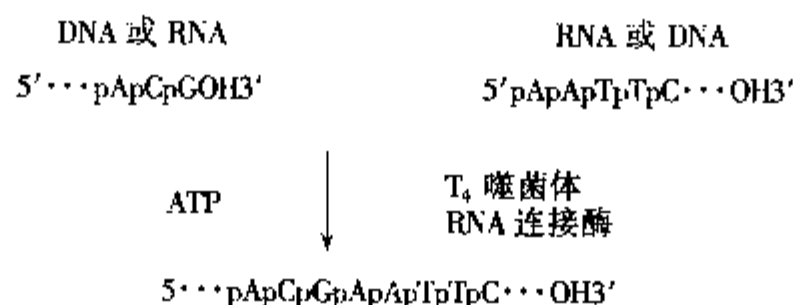


图 7-19 T_4 RNA 连接酶催化的连接反应

50mmol/L HEPES, pH8.3

10mmol/L MgCl_2

5mmol/L DTT

2 μ g 单链 DNA 或 RNA

2mmol/L ATP

50 μ g/ml BSA

1 单位 T_4 RNA 连接酶

反应终体积为 50 μ l, 17 $^{\circ}$ C 反应 10 小时, 加入 2 μ l 0.5mmol/L EDTA 终止反应。

此酶可应用于: ①将放射性 3'、5' 双磷酸核苷 (如 5' - 32 PCp) 连接到 RNA 的 3' 端, 用于 RNA 3' 端放射性标记; ②环化寡聚脱氧核糖核苷酸或寡聚核糖核苷酸; ③用于寡聚核糖核苷酸人工合成中, 寡聚物之间的连接; ④增强 T_4 DNA 连接酶对 DNA 平末端的连接。

7.5.2 DNA 浓度对连接产物构型的影响

在 DNA 连接反应体系中, DNA 的浓度高, 其末端之间的连接几率增高, 产物的产量就会随之上升。但是, 在连接反应中, 由于 DNA 末端之间的相互竞争, DNA 片段的末端浓度将直接影响连接物的分子构型, 一般产物的构型有两种: ①线性 DNA 连接物: 不同分子 DNA 的两个末端首尾相连形成线性分子, 但该线性分子两端并不连接环化; ②环状连接物: 同一分子的两个末端, 或多个 DNA 分子连成线

性分子的两端进一步连接形成环状分子。

体外 DNA 重组分子的构型直接影响到该连接物对细菌的导入效率。如以 λ 噬菌体作为载体的重组分子，线性构型有利于体外包装成病毒颗粒从而感染细菌，而对于质粒载体，其杂合分子，应为环状构型才能有利于转化细菌。所以 DNA 重组技术中，连接物的分子构型是一个比较重要的问题。

重组子的分子构型与 DNA 的浓度及 DNA 分子的长度存在密切的关系。在一定浓度下小分子 DNA 片段，同一分子的环化趋势大；而长度恒定的 DNA 分子，其浓度的降低反而有利于分子的环化。

对于两个以上的 DNA 分子的连接，如载体 DNA 与插入片段之间，往往它们的分子长度不同，原则上应该保证一个 DNA 分子的末端具备较高的机率与另一个 DNA 分子的连接，这样才能减少同一个分子两端之间的自身连接，从而达到重组的目的——DNA 分子间的连接。

7.5.2.1 同种线性 DNA 分子的连接

Dugaiczky 等人，1975 年以 EcoR I 酶切的 DNA 片段为对象，详细探讨了连接物形成线性构型和环状构型与 DNA 浓度之间的关系。一系列的结果表明，连接体系中，有两个主要参数非常重要：

i: 连接反应体系中，DNA 末端的总浓度；

j: 同一 DNA 分子两端接触的有效浓度；

假设 DNA 分子在溶液中随机卷曲，j 值对于一个分子长度确定的 DNA 片段是一个常数，它与该 DNA 分子的长度有关，而与溶液中该分子的浓度无关。DNA 分子越小其 j 值越高，即线性 DNA 分子两端的接触机会越多，可用以下公式计算：

$$j = \left(\frac{3}{2\pi Lb} \right)^{\frac{2}{3}}$$

其中：j 为同一个 DNA 分子一个末端的有效浓度；L 为该 DNA 分子的长度 (cm)；b 为 DNA 随机卷曲部分的长度，b 值决定于溶液中的离子强度，因为离子强度影响 DNA 分子的刚性程度。

例如： λ 噬菌体， $L = 13.2 \mu\text{m}$ ($13.2 \times 10^{-4} \text{cm}$)； $b = 7.7 \times 10^{-2} \mu\text{m}$ ($7.7 \times 10^{-6} \text{cm}$)，计算得出 $3.22 \times 10^{11} \text{end/ml}$ ，即为 λ DNA 分子的有效末端浓度。

i 值包括所有 DNA 末端的浓度，对于一个两端能自身粘性互补的 DNA 分子而言，每毫升自我互补（或平末端）的末端总浓度为：

$$i = 2NoM \times 10^{-3} \text{ (end/ml)}$$

No: Avogadro 常数 (6.02×10^{23})

M: DNA 的摩尔浓度 (mol/L)

当 $j = i$ 时 ($j/i = 1$)：对于同一种 DNA 线性分子的连接，每一个 DNA 分子自身的两个末端之间的连接机率与不同分子的末端之间的连接机率相等。因此，在这种条件下，反应初期形成线性聚合物与环状自身连接物两种构型的比率是相等的。

此时，DNA 的浓度可用以下公式计算：

$$\text{DNA 浓度} = 51.1 \times \text{Mr}^{-1/2} \text{ (mg/L)}$$

当 $j > i$ ($j/i > 1$) 时，同一分子的两个末端容易自身连接而环化，产物主要是环状分子；

当 $j < i$ ($j/i < 1$) 时，分子之间的末端发生首尾顺序相连，线性寡聚物是主要产物。

j/i 比值可用以下公式计算：

$$j/i = \frac{51.1}{[\text{DNA 浓度}] (\text{Mr})^{-1/2}}$$

选择 j/i 的一定值，DNA 的分子量 (Mr) 与 DNA 浓度之间呈函数关系，图 7-20 是四种不同 j/i 比值情况下，DNA 的分子大小 (kb) 与 DNA 浓度之间的关系。

7.5.2.2 不同 DNA 分子的连接

图 7-20 列出了不同 DNA 浓度，分子量及 j/i 值与连接物产物之间的关系。

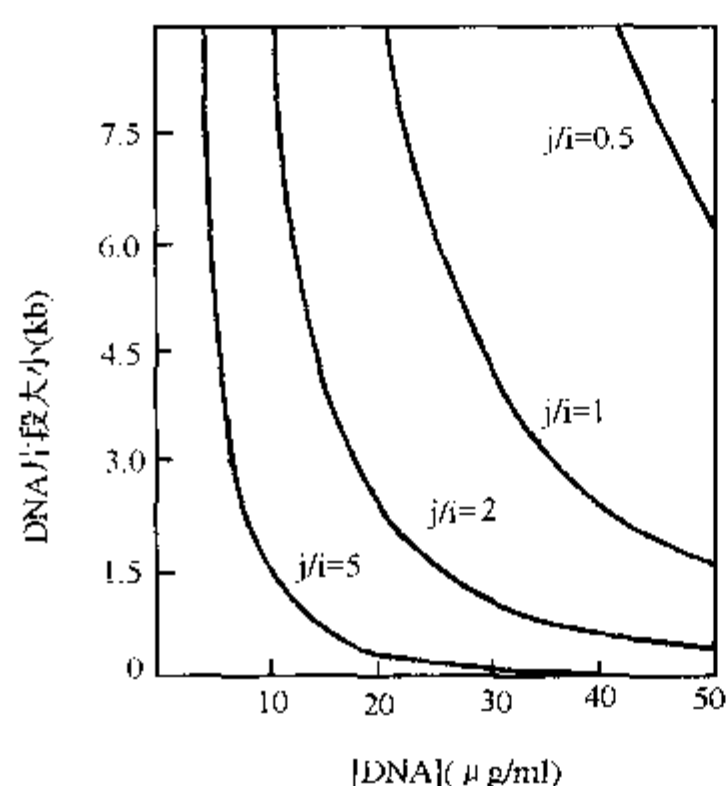


图 7-20 4 种不同 j/i 比值情况下, DNA 片段大小与浓度的关系

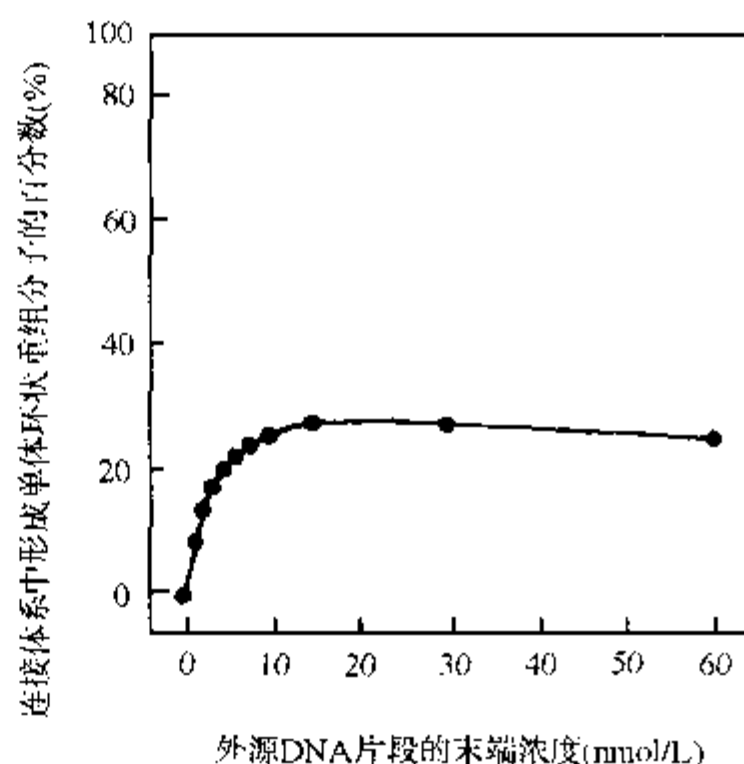


图 7-21 外源 DNA 片段浓度与形成单体环状杂合子效率之间的关系

表中资料表明, 有 $j/i \leq 1$ 时, DNA 连接物主要为线型寡聚物, $j/i \geq 2$ 时, 以环状连接物为主, 若 j/i 在 1~2 之间时, 分子长度越短, 形成环状产物的可能性越大。

以上的理论分析是针对一种线性 DNA 分子而言。而重组 DNA 往往是指线性载体分子和外源 DNA 插入片段形成的杂合子, 即两类不同 DNA 分子之间的连接。对于这种情况, 要产生一个载体与单个插入片段的重组子, 不但与反应体系中总末端浓度有关, 而且要着重考虑载体末端数与插入片段的末端数之间的比例。Brewer 对此进行了理论计算并作图如下:

图 7-21 表明, 在连接体系中线性载体 DNA 的 j/i 值为 2~3 时, 对于具有同源性粘末端的载体 DNA 与外源 DNA 插入片段, 形成单体环状杂合分子的比例随着外源 DNA 片段的浓度增高, 急剧上升, 达到最高峰后, 又缓慢下降。一般产生单体环状杂合分子的最大值为 40%。外源 DNA 的末端浓度应大于载体末端浓度 2 倍, 并且此时反应体系中 DNA 的总末端浓度适于 DNA 分子之间连接, 但又不宜形成多分子连接的寡聚物。

表 7-2 外源 DNA 克隆所需的载体 DNA 最低浓度

插入片段长度 (kb)	载体 DNA 浓度 Lambda - DNA	($\mu\text{g/ml}$) pBR322 - DNA
0.5	9750	813
1	3447	286
2	1218	102
3	663	55
4	430	36
5	308	26
10	109	9
15	59	5
20	38	3.2
30	21	1.8

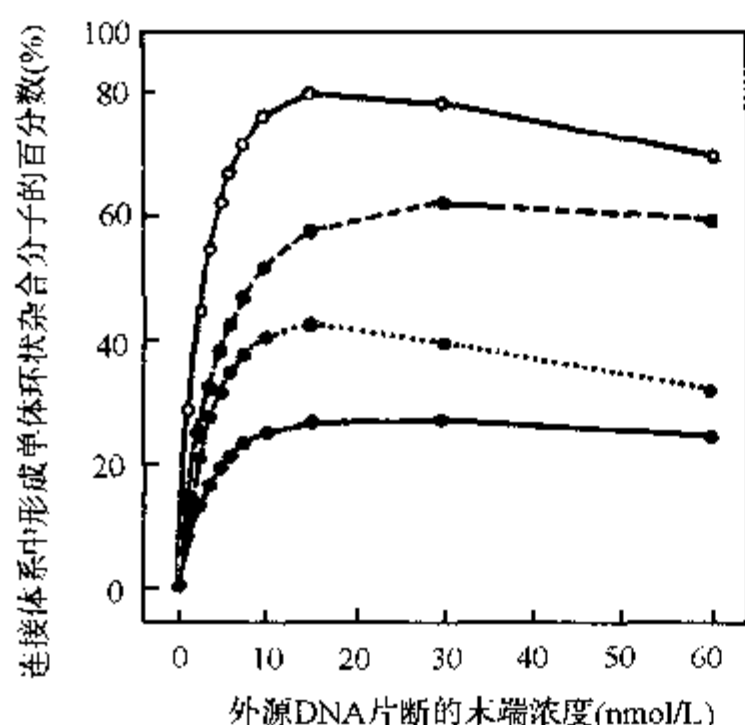


图 7-22 四种不同的载体处理方式与外源片段形成单体环状杂合子

图 7-22 分析的是以下四种情况：

(1) 载体 DNA 使用两种内切酶酶解，将所需要的 DNA 片段分离回收提纯。

(2) 载体 DNA 用两种内切酶酶解后，不分离提纯所需片段，直接与外源 DNA 插入片段连接。

(3) 用一个内切酶酶解载体 DNA 并进行 5' 端去磷酸化处理，再与外源 DNA 片段连接。

(4) 用一个内切酶酶解载体 DNA，不进行 5' 端去磷酸化，直接与外源 DNA 分子连接。

第一种情况，连接产物中单体环化重组子比例能达到 80% 左右的最高值；第二种情况，为 60% 左右；第三、四种情况，分别为 40% 与 25%。这些理论数据，为克隆方案的选择提供了有力的判断依据。

通常回收的 DNA 片段浓度往往是估计值，并且在回收过程中对 DNA 的末端也有损害，所以进行严格的数据计算决定连接反应 DNA 的浓度，对一般的克隆组建，并不十分必要，原则上对于单体环化重组质粒来

说，基本上应该满足以下两点：①线性载体 DNA 的 j/i 比值在 1~3 范围内，如质粒 pUC18，连接体系中其 DNA 浓度为 20~60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ；②外源 DNA 插入片段的末端浓度应等于或稍大于线性载体 DNA 的末端浓度，否则连接物转化的细菌中，携带阳性重组子的数量低，难以筛选，所以，最好是外源 DNA 末端浓度大于线性载体 DNA 末端浓度的两倍以上。若是插入片段的量很少，样品宝贵，则应将线性载体 DNA 进行 5' 端去磷酸化，或考虑其它的克隆方案。

在建立 cDNA 文库时，需要大机率地克隆所需 RNA 插入片段，除 DNA 的提取等环节以外，在连接时，外源 DNA 最适浓度的选择也很重要，应该先进行预实验，参照理论值，进行几种外源 DNA 浓度与载体 DNA 浓度的连接反应，以确定外源 DNA 与载体 DNA 的最适浓度比值。

以质粒为载体时，连接反应早期，非环状杂合单体是主要产物，而杂合单体的环化发生在连接反应的晚期。 $j/i < 0.8$ 时，主要产生线性连接物； j/i 在 1~1.7 之间时，反应 15 分钟后，线性分子迅速进行环化，而且杂合单体总是高于二聚体、三聚体和四聚体。

对于 λ 噬菌体载体的克隆，则与质粒相反，期望最终产物为线性单体杂合分子，根据 Dugaiczky 的计算应该满足以下两条件：①三类 DNA 分子（cos 左臂，右臂及外源 DNA 插入片段）的可连接末端浓度比例应接近 1:1:1；② j/i 的比值应比每一单独的 DNA 片段的 $j:i$ 比值低。

这样，最终产物多为线性寡聚分子，有利于体外包装成噬菌体颗粒。高效感染宿主菌，提高阳性重组子的数量和范围，增加基因文库的完整性。

7.5.3 DNA 分子连接的策略与方案

连接不同的 DNA 分子有很多方案可供选择，需要根据具体情况综合判断而决定。DNA 插入片段的详尽内切酶图谱资料或已知的全长顺序，对于计算机辅助克隆方案的设计是非常有益的，一个合理的设计方案和技术路线，往往能取得事半功倍的效果。

不管选择什么样的连接方案，原则上应该有利于所需重组子和载体自身环化分子的区分。基于这一策略，在基因克隆的每一个技术环节上应采取相应的措施，如适当的分子比率、插入失活、定向克隆、菌落原位筛选等。但是为了满足以上设计的要求，DNA 插入片段与载体分子的末端位点往往不能直接进行连接，必须对其中的一个或多个末端加以改造和修饰，以便它们之间的有效连接。概括起来，目前

有以下几种方案：

7.5.3.1 全同源粘性末端的连接

若 DNA 插入片段与适当的载体存在同源粘性末端，这将是最方便的克隆途径。同源粘性末端包括相同一种内切酶产生的粘性末端和不同的内切酶产生的互补粘性末端，后者连接成的 DNA 顺序不能再被原切割内切酶识别，而不利从重组子上完整地将插入片段重新切割下来。

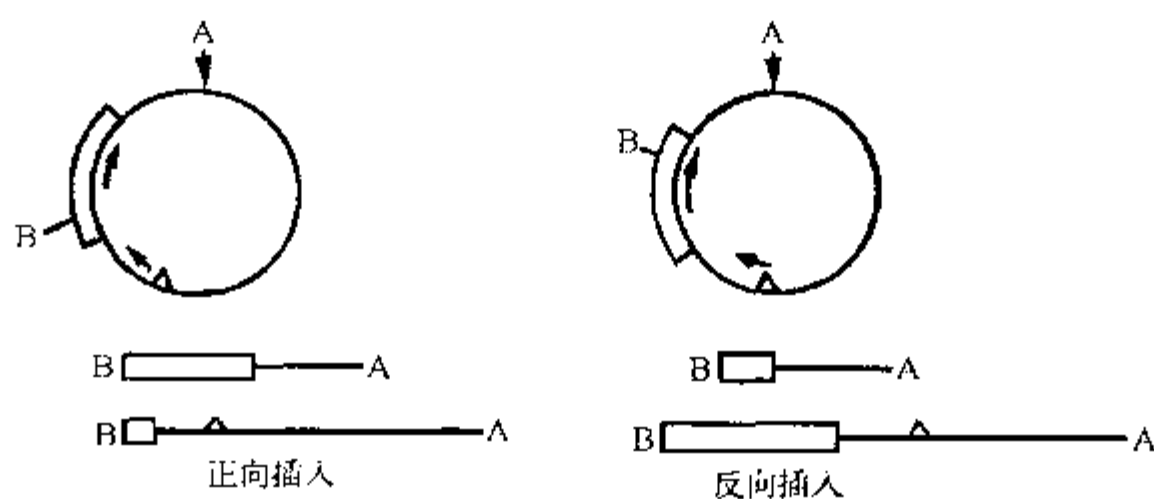


图 7-23 联合酶解鉴定同源末端连接重组子中 DNA 插入片段的方向

全同源粘性末端连接方案中，存在以下两个弊端：即高背景和两向插入。

高背景即连接物中，除重组子以外，还有一定数量的载体自身环化分子，这将产生转化菌中较高的假阳性克隆背景。针对这一问题，往往需要在连接前，将线性 DNA 分子进行 5' 端去磷酸化处理，可参照图 7-2。

两向插入由于载体与插入片段之间的 4 末端全为粘性互补顺序，所以插入片段插入载体中存在两个方向。对于原核或真核表达型重组子的构建，反向插入的重组子，由于插入片段的转录及翻译阅读方向与载体启动子转录方向相反，产物的表达困难，或表达出完全不同的产物，故必须筛选出正向连接的重组子。其解决办法是将重组子进行内切酶图谱分析，以鉴定重组子中插入片段的方向。如图 7-23 所示，在 DNA 插入片段的邻近末端部位选一个单酶切点 (B)，在载体分子上也只有一个该酶的位点。用这个内切酶消化重组子，正、反两个方向的插入，将产生不同大小的 DNA 片段，通过凝胶电泳可直接鉴定。

全同源粘性末端连接方案中，还有一个问题是片段的多拷贝插入，对于有些实验这一类重组子是合适的。如反义 RNA 转录体，多拷贝的插入片段将导致更高的反义 RNA 产生，对靶基因表达的封闭效果更好。但是在需要表达蛋白质产物时，多拷贝的插入，在没有拼连剪切信号的情况下，将会导致表达困难或紊乱。所以需要内切酶图谱对单拷贝插入片段进行鉴定和筛选。

适当的插入片段与载体分子比率能减少多拷贝插入片段的形成，一般比例为 2:1 (插入片段摩尔数:载体摩尔数)。

操作步骤：

(1) 取 200ng 线性载体 DNA (经碱性磷酸酶处理) 与 2 倍摩尔数的 DNA 插入片段混合，用乙醇沉淀混合物，并用 75% 乙醇漂洗一次，弃乙醇，干燥 DNA 沉淀。

(2) 将 DNA 沉淀溶于 17~18μl TE (pH8.0) 中，加入 2μl 10× 连接缓冲液，混匀，取出 2μl 样品保留，作为凝胶电泳鉴定连接效果的对照。

(3) 加入 10 单位的 T₄ DNA 连接酶，混匀，用 TE (pH8.0) 补足终体积至 20μl，12℃ 保温 8 小时 (EcoR I 粘性末端)，或 16~20 小时 (其它粘性末端)。

(4) 70℃, 10 分钟终止连接反应, 取 2 μ l 连接物与步骤 (2) 中取出的连接前样品, 凝胶电泳分析连接效果。成功的连接应为在载体与插入片段之后, 存在连续的多条带, 这是由于环状分子的不同空间构型造成的。

(5) 取 3~5 μ l 连接物转化细菌, 一般转化细菌所需环化质粒的量为 10~100pg, 可根据电泳估计的连接效率决定取多少连接物转化细菌。

7.5.3.2 平末端连接

1. 平末端连接的优点

理论上任何一对 DNA 平末端均能在 T₄ DNA 连接酶催化下进行连接, 这给不同 DNA 分子的连接带来了极大的方便。因为除内切酶酶切 DNA 直接产生的平末端分子以外, 3'突出或 5'突出的粘性末端通过一定的修饰也能产生平末端。

平末端连接的另一个特点是可以恢复一个原始的酶切位点, 甚至产生一个新的酶切位点。位点的创建和恢复是十分有用的, 它提供了一条简捷的重组子筛选鉴定途径, 并可方便地使插入片段从重组子中切割下来。

例如, EcoR I 识别 G/AATTC 序列, 切割后产生 3'-CTTAA-5'的 5'端突出粘性末端, 用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段填补后, 末端填平为 5'-GAATT-3', 若与一个 5'端为 C 的平末端 DNA 连接, 如 Hae III (GG/CC) 的酶解 DNA 片段, 连接后则恢复 EcoR I 的识别切割位点 (图 7-24)。

又如填平的 BamH I 与填平的 Taq I 酶切位点, 连接后可恢复 BamH I 的识别切割顺序 (图 7-25)。

即 EcoR I 或 BamH I 酶切产生的末端, 填平后, 只要另一个片段末端能供给一个 5'C, 如 Hae III 酶切或 Taq I 酶切并填平的末端, 那么连接后, EcoR I 位点或 BamH I 可以恢复。

为了设计时查找方便, 表 7-3 归纳了内切酶直接酶解双链 DNA 产生平末端的 5'碱基或粘性末端改造成平末端的 5'碱基。它们可以作为供体方, 为其它位点的恢复提供适当的 5'端碱基。表 7-4 列出了一个 5'突出粘性末端填平后, 需要接受哪一种碱基才能恢复该内切酶的识别切割顺序。

综合以上两表, 可方便地选择适当的内切酶位点, 使基因克隆的技术路线更加简明。例如, 一个 FnuD II 和 Rsa I 双酶切的 DNA 片段, 插入载体 DNA 中已填平的 EcoR I 和 Xba I 位点, 重组子仍然可用 EcoR I 和 Xba I 切割下来 (图 7-26)。

有些特殊情况下, 两个不同的内切酶位点产生的末端填平后, 其连接成的序列, 可产生出另一种内切酶的识别切割位点, 在克隆位点选择时, 也是一种可以考虑的方案。

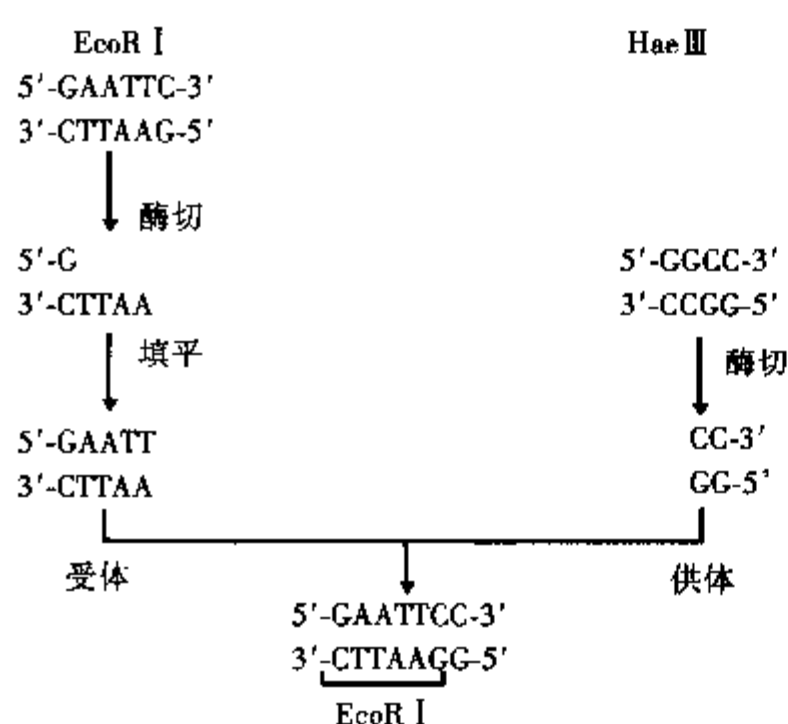


图 7-24 EcoR I 位点恢复

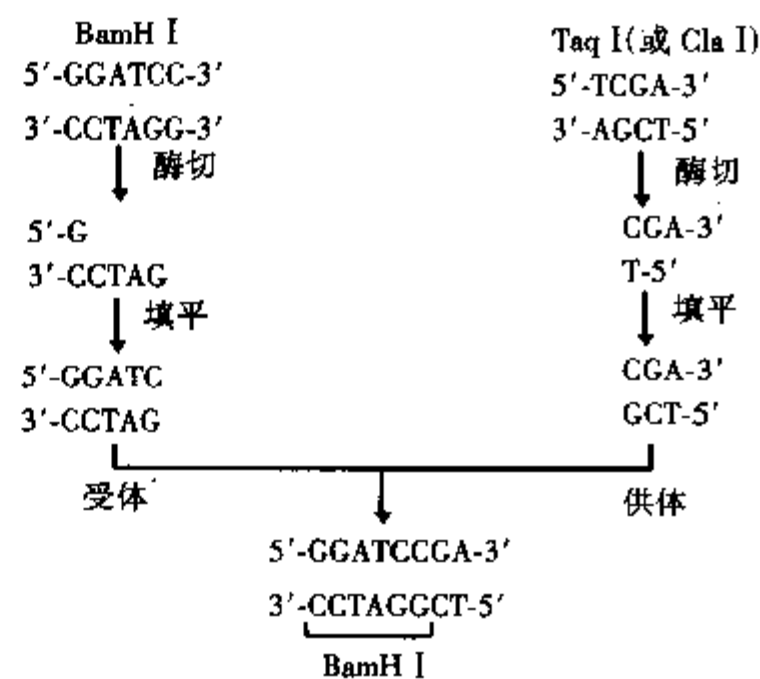


图 7-25 BamH I 位点的恢复

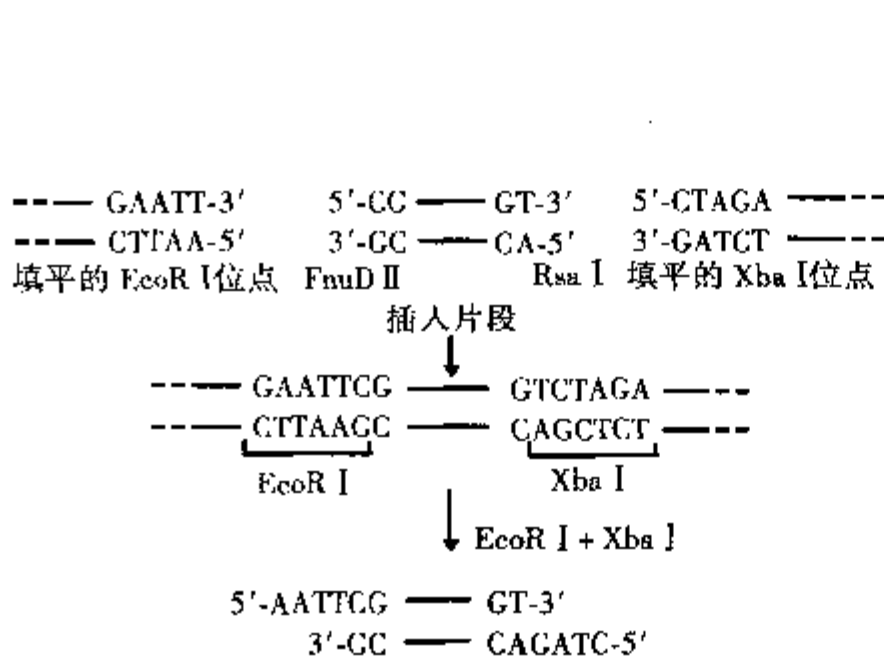


图 7-26 酶切位点的恢复与切割

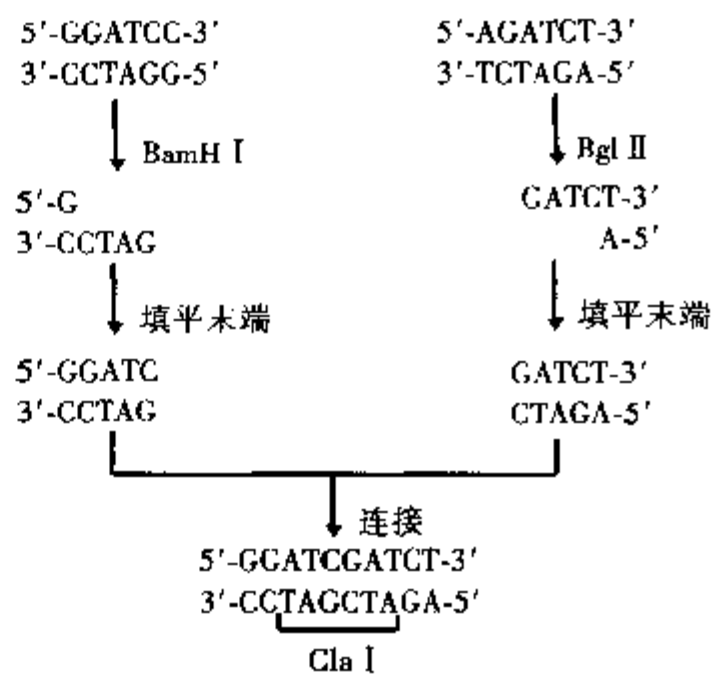


图 7-27 平末端连接构建一个新的内切酶位点

例如：BamH I 与 Bgl II 的末端填平连接后，可产生一个 Cla I 的切割位点（图 7-27）。

2. 平末端连接的注意问题

(1) 连接效率比粘性末端连接低：

表 7-3 修复后可作供体的 5'碱基

供体碱基	限制性内切酶
A	EcoR I, Hind III, Hinf I, Hpa I ¹ , Rsa I ¹
T	Dde I, Mst II, Sal I, Xho I
G	Ava II, BamH I, Bcl I, Bgl II, BstE II, Hae II ¹ , Mbo I, Mst I ¹ , Pst I ² , Sac II ² , Sau3A, Sau96 I, Sma I ¹ , Xma II
C	Alu ¹ , Bal I ¹ , Cla I, FnuD II ¹ , HgiA I ² , Hha I ² , Hpa II, Kpn I ² , Nar I, Pru I ¹ , Pvu II ¹ , Sac I ² , Sph I ² , Stu I ¹ , Taq I, Xba I, Sma I

注：①直接产生平末端的内切酶；
②产生 3'突出末端的内切酶，需用核酸酶 S1 删切。

表 7-4 内切酶位点恢复所需的 5'碱基

所需 5'碱基	内切酶位点
A	Bcl I, Tap I, Xba I
T	Bgl I, Hind II
G	Dde I, Hpa II, Xho I, Xma I, Xma III
C	BamH I, Pst I II, EcoR I, Hinf I, Sal I, Sau96 I

虽然平末端 DNA 片段之间在 T₄ DNA 连接酶的催化下，可以直接连接，但是连接效率较低，主要是由于 T₄ DNA 连接酶对于平末端的 K_m 值比粘末端的 K_m 值高约 1 000 倍。这样平末端连接需要更多的 T₄ DNA 连接酶催化，并要求较高的底物浓度，一般 DNA 平末端的浓度应大于 1 μmol，因此需要回收大量的 DNA 内切酶片段进行操作；连接反应体系中，ATP 的浓度不能太高。加入适量的 PEG 能促进平末端连接。连接效率低的另一个原因是线性载体 DNA 的自身环化，故连接前，线性载体 DNA 同样也需要 5'端脱磷酸处理。

(2) 双向插入及多拷贝插入:

平末端连接没有粘性末端的碱基互补限制, 只要是平末端均能连接, 所以平末端外源 DNA 片段在载体中插入方向有两种可能性, 在重组子筛选后, 应该利用内切酶图谱对阳性重组子中外源 DNA 片段的插入方向进行鉴定。

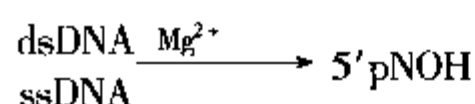
由于平末端连接要求较高的底物浓度, 故载体中多拷贝的外源 DNA 插入现象在所难免, 因此应该利用加大 T_4 DNA 连接酶的浓度、降低 ATP 浓度、载体去磷酸化、用 PEG 促进连接等其它措施提高连接效率, 不要过份加大外源 DNA 的浓度, 从而减少多拷贝插入的机率。当然, 重组子还需内切酶酶解鉴定, 筛选插入单拷贝外源 DNA 片段的重组子。

7.5.3.3 非互补粘末端的修饰

两个不能互补的粘性末端不能直接连接, 除上述修饰成平末端的策略外, 另一个方案是将粘性末端部分填平, 以便与适当的粘性末端互补, 并形成新的内切酶识别切割位点。

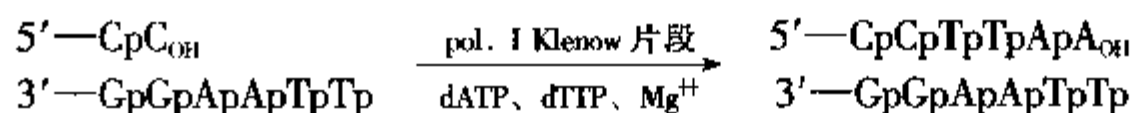
1. 5'突出末端的完全填平:

限制性内切酶降解后产生 5'端突出的粘性末端, 可用 5'突出部分作为模板, 在大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的大片段酶 (Klenow 片段) 催化下, 将另一条链的 3'凹缺填平。Klenow 大片段酶由大肠杆菌聚合酶 I 衍生而来, 它是枯草杆菌蛋白酶切割完整的 DNA 聚合酶 I 所产生的一条分子量为 76kD 的多肽链, 它缺乏 5'→3'的核酸外切酶活性, 但仍然具备完整的 DNA 聚合酶 5'→3'聚合酶活性和 3'→5'核酸外切酶活性。

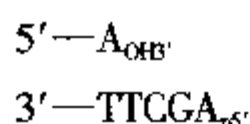


该 3'→5'核酸外切酶活性: 从游离 3'-OH 末端开始降解双链或单链 DNA。不对其对双链 DNA 的 3'→5'外切作用, 受到核酶本身的 5'→3'聚合酶活性的抵消。

5'→3'聚合酶活性: 用于填补由限制性内切酶消解 DNA 产生的 3'凹缺末端, 如 EcoR I 产生的粘性末端需要 dATP 和 dTTP 两种 dNTP 就可填平该末端:



对于 Hind III 产生的粘性末端, 则需要所有四种 dNTP 才能完全填平该 3'残缺末端:



5'突出末端的填平方法:

(1) 用适量的内切酶消化 0.2 ~ 5 μg DNA。

(2) 完全酶解后, 加热使内切酶失活然后直接在反应混合物中加入含各种所需 dNTP 的混合溶液 1 μl。

(3) 每 1 μg DNA 底物加入 1 单位的大肠杆菌聚合酶 I 大片段酶混匀后, 在室温反应 15 分钟。

(4) 选择以下两种方法之一失活 Klenow 片段的酶活性: ① 70℃ 加热 10 分钟; ② 或加入等容积 TE (pH 7.6) 溶液后, 再用酚、氯仿抽提, 最后两倍体积乙醇沉淀 DNA。

注意事项:

(1) Klenow 片段能够在所有的内切酶缓冲液中发挥活性, 所以不必在内切酶消化后, 重新纯化 DNA 再进行 5'突出末端的填平反应。

(2) 若 DNA 片段酶解后需重新回收提取, 则溶于 TE (pH 7.6) 缓冲液中, Klenow 片段加入前, 应该将缓冲液中的 MgCl_2 浓度添加到 5 mmol/L。这是 Klenow 片段发挥 5'→3'聚合酶活性所必须的。

(3) 填平后的 DNA 反应混合物可以直接用 T_4 DNA 连接酶进行连接反应, 一般无需进一步去除 dNTP 纯化 DNA, 因为 dNTP 并不抑制 T_4 DNA 连接酶的活性, T_4 DNA 连接酶在所有的内切酶缓冲液中均能发挥

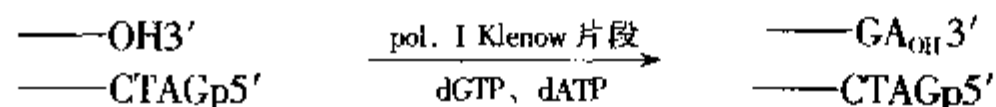
催化作用。

若需从填平的 DNA 反应物去除 dNTP, 可以用 Sephadex G-50 柱离心纯化或直接过柱。

(4) 加热 75℃, 10 分钟处理, 并不能使所有的内切酶失活 (请参阅本书有关内切酶的章节或厂家说明书)。若有痕量具有活性的内切酶存在, 可严重干扰 DNA 连接效果。

2. 5'突出末端的部分填平:

有些酶的 5'突出粘性末端, 部分填平后可以产生一个与另一个粘性末端互补的粘性末端, 如 *Sau3A* 的粘性末端, 只加入 dATP 和 dGTP 部分填平后的末端正好能与 *Xho I* 的粘性末端互补:



这也是在 DNA 重组位点设计时不宜忽视的一种方案。

其方法与完全填平的操作一样, 前提是 5'突出末端中碱基组成没有重复, 控制加入的 dNTP 成分即可。

3. 3'突出粘性末端的删切:

大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段和 T_4 DNA 聚合酶均有 3'→5'的核酸外切酶活性和 5'→3'的聚合酶活性, 并失去 5'→3'的外切酶活性, 虽然后者较贵, 但是它比前者的 3'→5'外切酶活性高 200~1000 倍, 所以一般选择 T_4 DNA 聚合酶进行 3'突出末端的切除, 使之变成平末端。

T_4 DNA 聚合酶的反应最适 pH 为 8~9, 在所有的内切酶反应缓冲液中, 均能发挥到最大活性的 50%。在内切酶消化 DNA 后, 可以直接加入较高浓度的 dNTP 和 T_4 DNA 聚合酶进行反应, 而不需要重新纯化 DNA。在 dNTP 存在下, T_4 DNA 聚合酶去除未配对的 3'尾序, 当切除至第一个配对的碱基对时, T_4 DNA 聚合酶的外切活性与聚合掺入 dNTP 的活性就会达到平衡, 从而使 3'突出的粘性末端变为平末端。

操作步骤:

- (1) 用适量、适当的内切酶在 20μl 体积中完全消化 0.2~5μgDNA。
- (2) 在内切酶反应体系中, 直接加入 1μl 含有四种 2mmol/L dNTP 的混合溶液。
- (3) 每 1μg DNA 加入 1~2 单位的 T_4 DNA 聚合酶, 混匀后 12℃反应 15 分钟。
- (4) 70℃加热 10 分钟或酚/氯仿抽提灭活 T_4 DNA 聚合酶和内切酶, 反应物不需进一步纯化, 可直接用于 T_4 DNA 连接酶催化的连接反应。

说明:

(1) 内切酶消化的 DNA 可直接进行 3'尾序切除。若 DNA 片段需要凝胶电泳回收, 则溶于 TE (pH8.0) 溶液中, 加入 dNTP, 并将 $MgCl_2$ 补足至终浓度为 5mmol/L, 再加 T_4 DNA 聚合酶反应。

(2) T_4 DNA 聚合酶的 10×缓冲液为:

0.33mol/L Tris·Ac (pH7.9)

0.66mol/L KAc

0.10mol/L $MgCl_2$

5.0mmol/L DTT

1mg/ml BSA (Pentax V 部分)

使用该缓冲液能达到 T_4 DNA 聚合酶的最大活性, 由于操作费时费力, 一般不需要。

(3) 若 DNA 片段在切除 3'突出粘性末端后, 还需进行内切酶消化, 应该纯化 DNA 后, 换成相应的 DNA 内切酶缓冲液。

(4) T_4 DNA 聚合酶删切 3'突出末端时, 若采用 37℃反应, 其 5'→3'的 DNA 聚合酶活性比 3'→5'外切活性大 3 倍; 在较低温度下, 其聚合活性明显下降, 其外切活性变化不大, 所以删切 3'尾序时, 采用

12℃为反应温度,使其3'→5'外切活性充分发挥。

(5) 反应物中的 dNTP 及盐类可用 Sephadex G-50 柱层析去除,对于一般连接反应并非必须。

7.5.3.4 定向克隆

使外源 DNA 片段定向插入到载体分子中的方案叫定向克隆。定向克隆是利用 DNA 分子两个末端的不同内切酶位点进行的,它能有效地限制载体 DNA 分子的自身环化,降低非重组子的背景,并且对于一些表达型重组子,外源 DNA 片段在载体启动了下游的正向插入,是成功表达的基本条件。

定向插入对于 DNA 末端的要求是载体 DNA 分子的两个末端不能互补,只能与外源 DNA 分子的相应末端连接,达到这一要求的 DNA 分子末端有两种形式:①DNA 两端为非同源互补的粘性末端(粘-粘);②DNA 分子一侧为粘性末端,一侧为平末端(粘-平)。

前一种形式通过两种不同的内切酶分别消解 DNA 而产生,但这两种酶不能是同裂酶或能产生互补粘性末端的内切酶。“粘-粘”定向克隆的连接效率非常高,是重组方案中最有效、简捷的途径。

“粘-平”形式的末端有两条途径,用一个产生平末端的内切酶与一个产生粘性末端的内切酶联合消解 DNA 即可产生;或用一个产生粘性末端的内切酶先消解 DNA,然后填平或删除粘性末端的突出部分,使之变成平末端,再用另一个产生粘性末端的内切酶消化 DNA 分子。在两个粘性末端中一个能互补,另一个不能互补的情况下,将不能互补的粘性末端修饰改造成平末端,再进行重组是一条很好的重组方案。

7.5.3.5 插入片段部分酶切

本方案适用于一个完整的靶 DNA 片段中,存在一个或多个与 DNA 片段两侧相同的内切酶位点。如图 7-28:

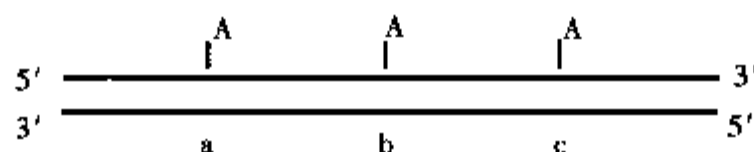


图 7-28 插入片段的部分酶切

靶 DNA 片段含有三个相同酶切位点(A),要克隆 ac 片段,若用内切酶 A 完全消化该 DNA 分子,将产生 ab、bc 两个片段,不能得到完整的 ac 片段。这种问题,在重组 DNA 设计中,往往会碰到,解决的办法有多种,如内切酶位点修饰、分段连接等等,但部分酶解该 DNA 片段不失为一个简捷的设计方案。

部分酶切的关键是酶切的火候,即得到较多所需 DNA 片段的酶切条件。一般没有理论计算可以遵循,必须通过预试验进行摸索。如系列稀释内切酶浓度,不同时间终止酶切反应,找到最适的反应条件,再进行大量 DNA 的内切酶部分酶切。

这种情况,需要有大量的靶 DNA 分子,对于一些来源有限、非常珍贵的 DNA 样品,本方案不太适宜,而应在适当的位点选择其它的内切酶进行酶解。

7.5.3.6 DNA 连接子技术

DNA 平末端连接虽然适用范围很广,但是它还存在连接效率低,非重组背景高,多拷贝插入片段及双向插入等缺陷。1976 年 Bahl 等人首先使用了 DNA 连接子技术,为平末端 DNA 片段的连接找到了一条较好的途径。

DNA 连接子是等摩尔数的两条完全互补的寡聚脱氧核糖核苷酸链,形成的平末端双链 DNA 序列中含有一个或多个限制性内切酶位点。

DNA 连接子的作用主要是在 DNA 平末端添加新的内切酶位点以产生粘性末端,便于 DNA 片段之间的连接,是亚克隆技术及基因文库构建中一项常用的技术。

图 7-29 表示使用 EcoR I 连接子, 在外源 DNA 片段的两个平末端导入一个 EcoR I 位点的过程:

连接子大小一般为 8~12bp, 接受连接子的 DNA 片段必须是平末端, 对于粘性末端则需预先修饰成平末端。

由于连接子的分子量小, 很容易达到 DNA 平末端连接所需的高末端浓度, 一般连接子的末端浓度必须高于靶 DNA 末端浓度 2~3 倍。另一个要考虑的因素是 4~20 $\mu\text{mol/l}$ 连接子末端浓度, 才能驱动 T_4 DNA 连接酶的连接反应, 这样靶 DNA 的浓度就可以较低。

靶 DNA 片段中, 若存在与连接子相同的内切酶位点, 在添加连接子前, 必须预先用相应的甲基化酶进行修饰, 防止内切酶切割连接子时降解靶 DNA 片段。

市售的连接子有两种形式, 即 5' 末端磷酸化的连接子和 5' 末端去磷酸化的连接子。只有前者才能在 T_4 DNA 连接酶催化下进行连接反应。后者需要用 T_4 多核苷酸激酶在其 5' 端磷酸化后, 才能成为连接酶合适底物。

使用连接子进行亚克隆操作包括三个步骤: ①将连接子连接于外源 DNA 片段两侧一平末端上; ②用相应的内切酶切割连接子; ③含新粘性末端的外源 DNA 片段与相应的线性载体 DNA 分子连接。

1. 非磷酸化连接子的磷酸化:

试剂:

10 \times 连接子-激酶反应缓冲液 (-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存):

0.66mol/L Tris \cdot Cl (pH7.6)

0.1mol/L MgCl_2

100mmol/L DTT

2mg/ml BSA (最好为 Pentax V 部分)

T_4 多核苷酸激酶

10mmol/L ATP

操作方法:

(1) 依次加入以下试剂建立连接子磷酸化体系:

10 \times 连接子-激酶反应缓冲液 1.0 μl

非磷酸化连接子 0.5~2.0 μg

10mmol/L ATP 1.0 μl

加 H_2O 至终体积 10 μl 混匀。

(2) 加入 2 单位 T_4 多核苷酸激酶, 混匀后短暂离心, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 小时。磷酸化反应后的 DNA 连接子不需进一步纯化, 可直接用于连接反应。

2. 磷酸化连接子与平末端 DNA 分子的连接

试剂:

10 \times 平末端连接缓冲液:

0.66mol/L Tris \cdot Cl (pH7.6)

50mmol/L MgCl_2

50mmol/L DTT

1mg/ml BSA

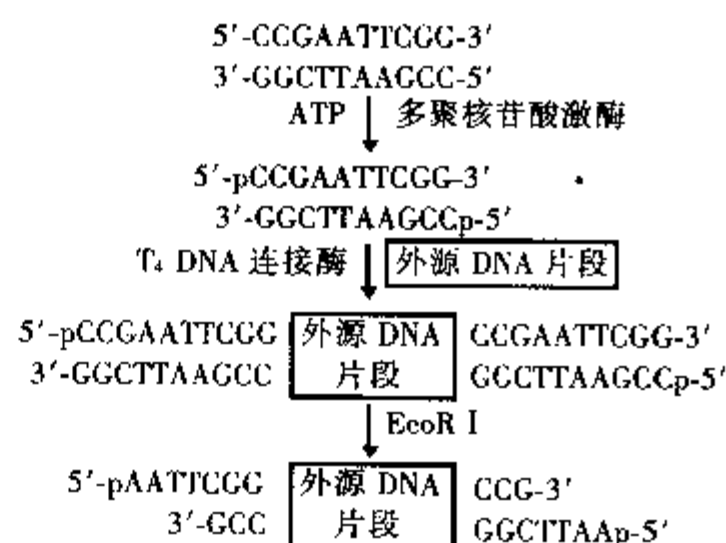


图 7-29 EcoR I 连接子在平末端 DNA 两侧导入 EcoR I 位点

10mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{CoCl}_3$

5mmol/L 盐酸亚精胺

该缓冲液需 -20°C 保存。

10× 内切酶反应缓冲液及相应的内切酶

0.5mol/L EDTA (pH8.0)

Sepharose CL-4B

操作步骤:

(1) 在 0.5ml 微量离心管中依次加入 0.1~0.5 μg (小于 7 μl 容积), 1~2 μg (小于 8 μl 容积) 平末端 DNA 片段, 2 μl 磷酸化的 DNA 连接子, 2 μl 5mmol/L ATP, 1 μl (1~2 韦氏单位) 10× 平末端连接缓冲液, 10 单位 T_4 DNA 连接酶。

用 H_2O 补足终体积为 20 μl , 混匀后在 16°C 反应 6~16 小时。

(2) 连接完毕后, 置反应物于 65°C , 15 分钟失活连接酶。

(3) 冰上冷却后, 加入 70 μl H_2O , 10 μl 相应的 10× 内切酶反应缓冲液和 20~50 韦氏单位的相应的内切酶。混匀后, 在该内切酶最适反应温度保温 4 小时。

(4) 补加 10 韦氏单位该内切酶, 继续保温 1 小时, 完全切割连接子, 并产生粘性末端。

(5) 加入 0.5mol/L EDTA 至终浓度为 10mmol/L。终止内切酶反应, 用等体积酚/氯仿抽提两次, 12000g 离心 30 秒钟, 取出上清液移至一清洁的微型离心管中。

(6) 用以下两种方法的一种去除连接子: ①制备 2ml Sepharose CL-4B 层析柱: 用 0.01mol/L Tris·Cl (pH7.6), 0.1mol/L NaCl, 1mmol/L EDTA (pH8.0) 平衡层析柱: 将连接混合物与 15 μl IV 型凝胶电泳上样缓冲液混匀后, 上样进行层析。每 125 μl 一份, 立即收集流出液, 大于 300bp 的 DNA 片段与溴酚蓝一同洗脱出来。每份收集物取出少许进行凝胶电泳, 鉴定 DNA 分布, 合并含所需 DNA 片段的洗脱液, 用乙醇沉淀回收 DNA。②用琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳分离连接子和添加连接子的 DNA 片段, 然后用适当方法从凝胶中回收 DNA 片段。

(7) 将制备好的 DNA 片段 (含连接子的粘性末端) 与另一含互补粘性末端的 DNA 片段进行连接。

说明:

(1) 联合应用亚精胺和 $(\text{NH}_4)_2\text{CoCl}_3$, 可使连接效率提高 5 倍。

(2) 通常连接效率较好, 若需要检查连接效果, 在连接过程中可取出少许 DNA 在 1.3% 琼脂糖凝胶中电泳, 根据单连接子、双连接子及多连接子添加在 DNA 末端引起的分子长度变化, 加以区分。另一种办法是用 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ 标记连接子, 与平末端 DNA 连接后, 进行 15% 聚丙烯酰胺电泳, 然后进行自显影鉴定。

(3) 完全酶切连接在平末端上的连接子, 对于下一步连接效率非常重要。可以在步骤 (3) 中取出 2 μl 样品, 再加入 0.5 μl 100ng 的另一种线性 DNA (该 DNA 片段中含有相应内切酶的位点), 通过该外加 DNA 的切割程度 (产生两个片段), 间接判断靶 DNA 上连接子是否切割完全。

7.5.3.7 DNA 适配子技术

DNA 连接子只适应于 DNA 平末端的连接和改造, 并且还需要用内切酶消化才能产生新的粘性末端。DNA 适配子可以克服这两个弊端, 使得克隆方案设计时具有更大的回旋余地, 即使靶 DNA 片段内部含有与两端添加位点相同的内切酶识别顺序, 也不需要预先进行甲基化修饰, 操作也更为简单。

DNA 适配子是一条人工合成的寡聚脱氧核糖核苷酸链, 它含有某种粘性末端的突出顺序, 不需内切酶切割而产生。通过与其它适配子或连接子互补配对, 形成双链 DNA, 再与靶 DNA 连接。在 DNA 重组中, 可适用于各种类型的 DNA 末端之间的连接。

当今, 由于适配子及连接子技术的发展, 就重组技术而言, 几乎不存在不能连接的 DNA 分子。下

面分别例举适配子在不同类型 DNA 末端连接中的应用。

1. 使平末端 DNA 分子产生新的粘性末端:

将 BamH I 的适配子与 Hap II 的连接子退火, 将产生一端平一端粘的双链 DNA 分子, 其平端与平末端 DNA 分子相连后, 靶 DNA 分子双侧形成 BamH I 的粘性末端, 而 BamH I 适配子 5'端脱磷酸防止了适配子之间聚合, 这样可以直接克隆到含 BamH I 位点的载体中去 (图 7-30)。

2. 直接使两个非互补的粘性末端连接:

方案一: 利用适配子技术可以直接将 X 内切酶切割的 DNA 片段插入到载体的 Y 内切酶位点中, 如 EcoR I 适配子与 BamH I 适配子联合, 能够使 EcoR I 切割的外源 DNA 片段直接与 BamH I 切割的载体 DNA 连接, 其中一个适配子 5'端去磷酸, 使得配合的两个适配子双链 DNA 片段不能自身连接, 通过适配子使插入片段与载体 DNA 连接后, 连接处除 BamH I 与 EcoR I 外, 还有一个新切点 Xho I (图 7-31)。

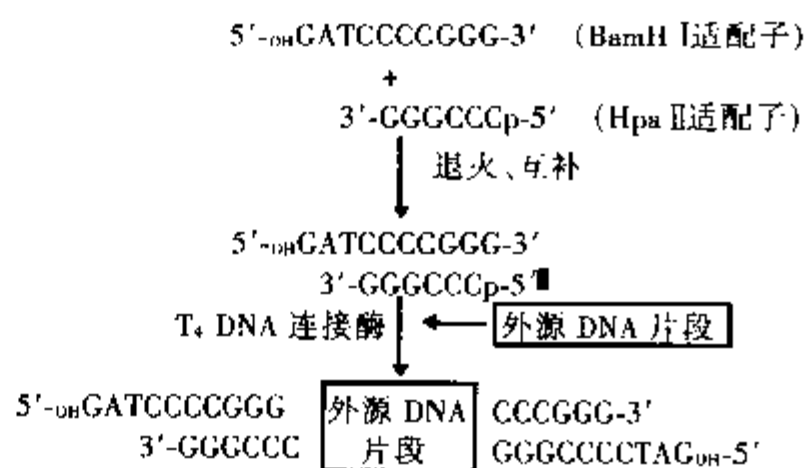


图 7-30 制备一个 BamH I 粘性末端

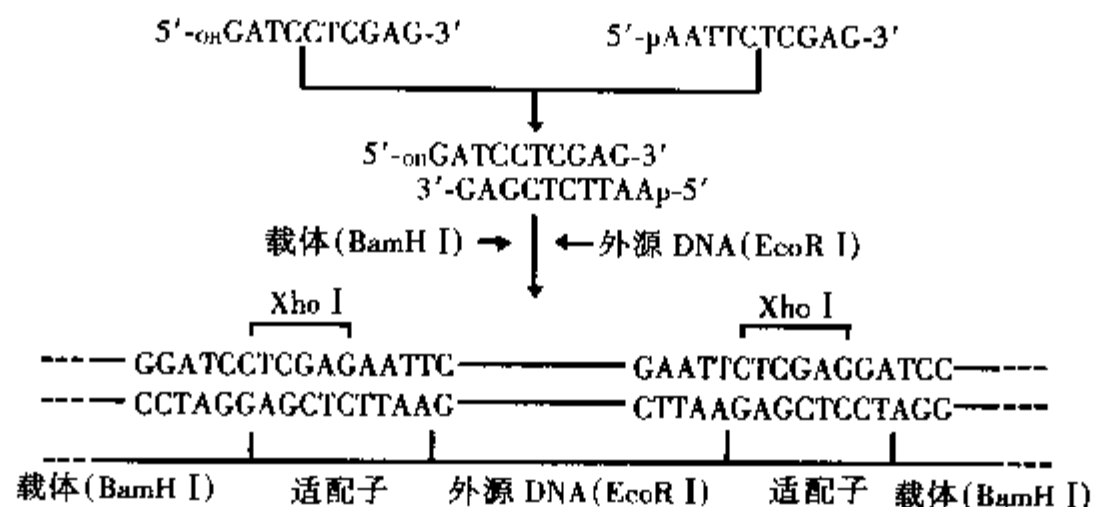


图 7-31 适配子连接非互补 DNA 粘性末端

方案二: 先将两个含 5'磷酸的适配子 X 与 Y 退火, 互补形成双链 DNA (XY), 然后用 T₄ DNA 连接酶催化退火的双链适配子之间聚合 (XY_n), 再用其中一个内切酶 (X) 消化聚合物, 产生一个中间含有 Y 位点, 两侧为 X 粘性末端的小分子双链 DNA, 与 X 内切酶切割的外源 DNA 片段连接后, 改用 Y 内切酶消化, 使含 X 粘性末端的外源 DNA 片段变为 Y 粘性末端, 最后很自然地插入到 Y 内切酶消化的线性载体 DNA 中。

下面, 以 BamH I 与 Hind III 的适配子为例, 解释 BamH I (X 内切酶) 切割的外源 DNA, 插入到载体 DNA Hind III (Y 内切酶) 位点的过程。

BamH I 与 Hind III 的适配子均由一条寡聚脱氧核糖核苷酸链组成, 除 5'端的 4 个碱基为各自的特异粘性末端以外, 其它 6 个碱基相互之间能够互补, 退火以后经 T₄ DNA 连接酶催化连接, 形成两端分别为 BamH I 和 Hind III 粘性末端的小分子双链 DNA。由于 5'端存在磷酸基团, 所以自身能够在 T₄ DNA 连接酶催化下连接, 形成聚合物, 用 BamH I 切割该聚合物, 产生两端为 BamH I 粘性末端中间含有 Hind III 酶切位点的双链 DNA, 将其连接于 BamH I 切割的外源 DNA 上, 再用 Hind III 酶切, 使外源 DNA 的 BamH I 位点外侧添加了一个 Hind III 粘性末端, 正好插入 Hind III 切割的载体 DNA 中。形成的重组子, 既能用 Hind III, 也能用 BamH I 将插入片段切割下来。这个克隆方案, 本质上就是通过适配子技术将非互补粘性末端改变成互补粘性末端再连接。它的缺陷是外源 DNA 存在双向插入载体的可能性, 重组子

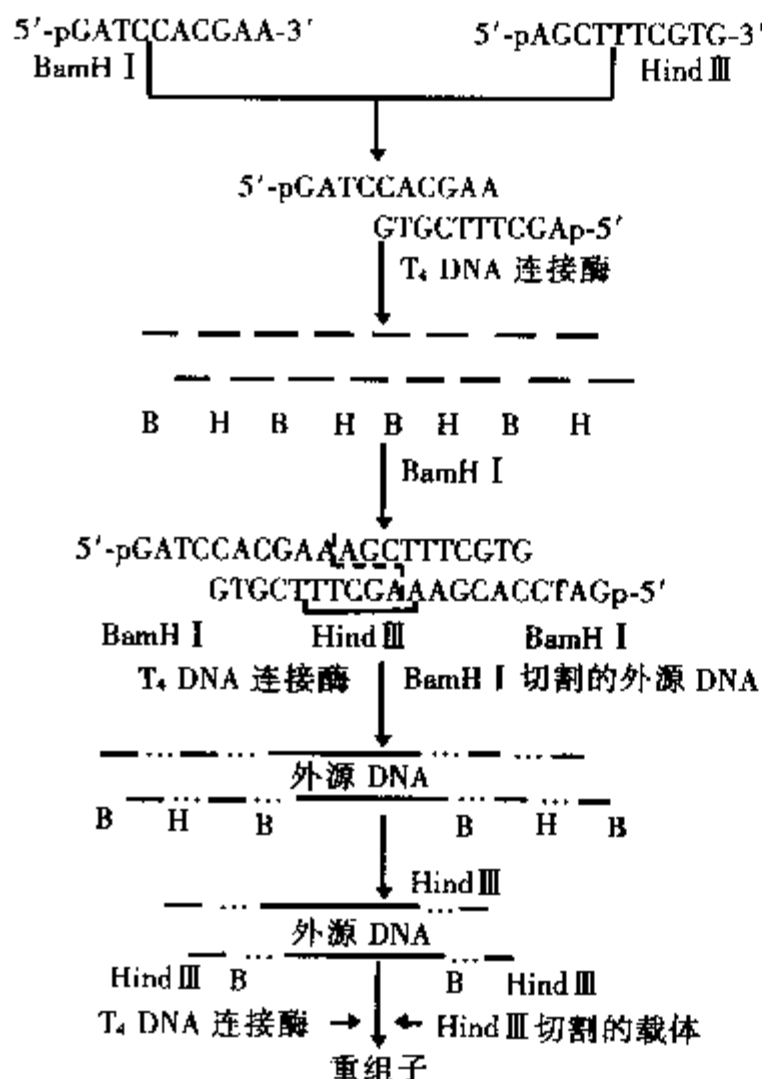


图 7-32 适配子使用方案二

应用还非常广泛，其中有两个方面值得介绍。

(1) 多插入片段定向连接: DNA 携带非同源粘性末端, 或一平末端一粘性末端可以进行定向克隆。使用识别切割位点并非是回文对称顺序的连接子, 如内切酶 *Ava* I 识别 C/PCGPaG 顺序, 合成 C/TC - GGG 连接子, *Ava* I 仍能识别切割, 如图 7-34 所示, 含该连接子的 DNA 片段, 用 *Ava* I 切割后, 只能头尾一个方向相连接, 头头相连或尾尾相连均会有两个碱基不能互补而被抑制, 所以这些 DNA 片段将按一个方向连接。这一特性可以用于在载体中插入多拷贝同一 DNA 分子以增加表达产物, 也可以用于载体组建时, 让某一功能的顺式调控元件多次同方向重复。

这个方案的关键是内切酶的切割顺序为非回文结构，所以同裂酶之间的粘性末端，如 BamH I / Bgl II，Sal I / Xho I 等，也只能产生头尾相连的定向连接，因为只有这种连接方式的聚合物能够拮抗同裂酶中任一种的切割。

(2) 插入突变：连接子能够对某一种 DNA 分子中进行插入突变，不但能够方便地进行内切酶物理图谱制作，而且通过插入失活，观察生物表型变化，分析每一基因的功能。Heffron 等人曾经成功地使用该方法鉴定了 RSE1050 质粒青霉素抗性基因，DNA 复制起始位点。其技术路线如图 7-35。用胰 DNase I 切割环状质粒 DNA 成线性，其切割位点是随机的，修平线性 DNA 末端后，将 EcoR I 位点甲基化，然后双端加入 EcoR I 连接子，用 EcoR I 切割后，重新将线性 DNA 连接成环状质粒，由于 DNase I 切口随机，故该质粒中添加的 EcoR I 位点也随机，据转化后菌株的表型变化，再分析该菌株中所含重组子 EcoR I 插入位点的位置，可以推断出该位点的功能。

需要用内切酶图谱鉴定外源 DNA 的插入方向 (图 7-32)。

方案三：适配子填平连接 5'突出与 3'突出粘性末端。

以上两个方案, 适应于外源 DNA 与线性载体 DNA 分子的粘性末端均为 5'突出或 3'突出, 若两者之间, 一个为 3'突出末端, 一个为 5'突出末端, 连接两个分子, 其接端存在一个较大的缺口, 而这个缺口正好由适当的适配子填补, 使得两个非同源性末端连接。如图 7-33 用适配子 5'p ACGTCCT-TAA_{OH} 3'连接 EcoR I (5'突出粘性末端) 和 Pst I (3'突出粘性末端) 产生的末端。虽然适配子中间多余两个碱基(CC), 使重组子在该位点留下小缺口, 但转化细菌后, 在细胞内能够得到修复。它的优点是使重组子中, 仍然保留 EcoR I 和 Pst I 切割位点(图 7-33)。

适配子添加到 DNA 片段末端上的操作与连接子几乎相同，一般也需要较高的摩尔浓度 ($10 \sim 20 \mu\text{mol/L}$)，在此不重复。唯一不同的是有些适配子需要退火处理，再与 DNA 连接。

毫无疑问，连接子与适配子的最大用途是在 DNA 末端上引入一个新的内切酶位点或末端，如在 cDNA 文库组建时，将非均一的 cDNA 分子末端，改造成适于插入载体的均一末端，就是一个极好例子。除此之外，连接子与适配子的

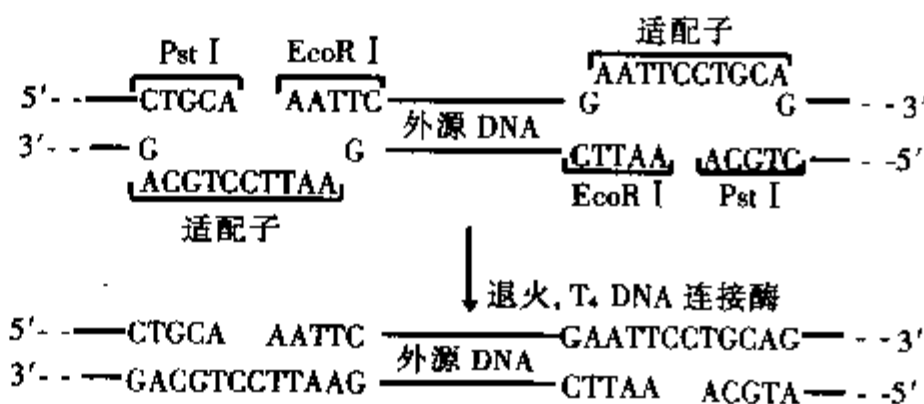


图 7-33 适配子填补连接 5'突出和 3'突出非同源粘性末端

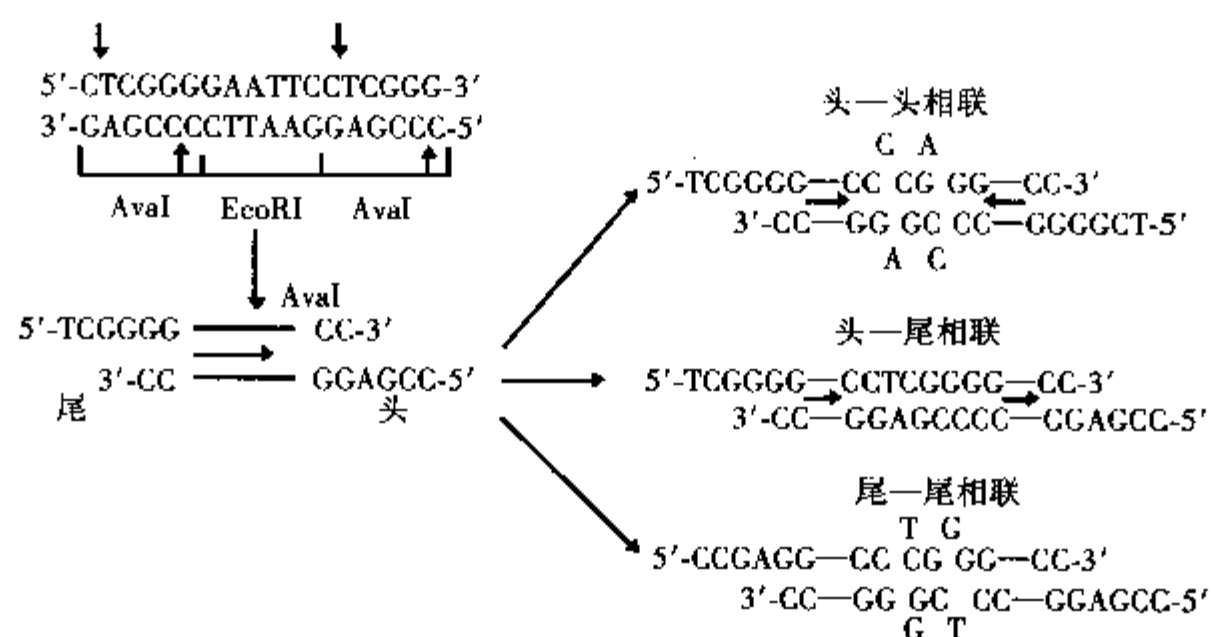
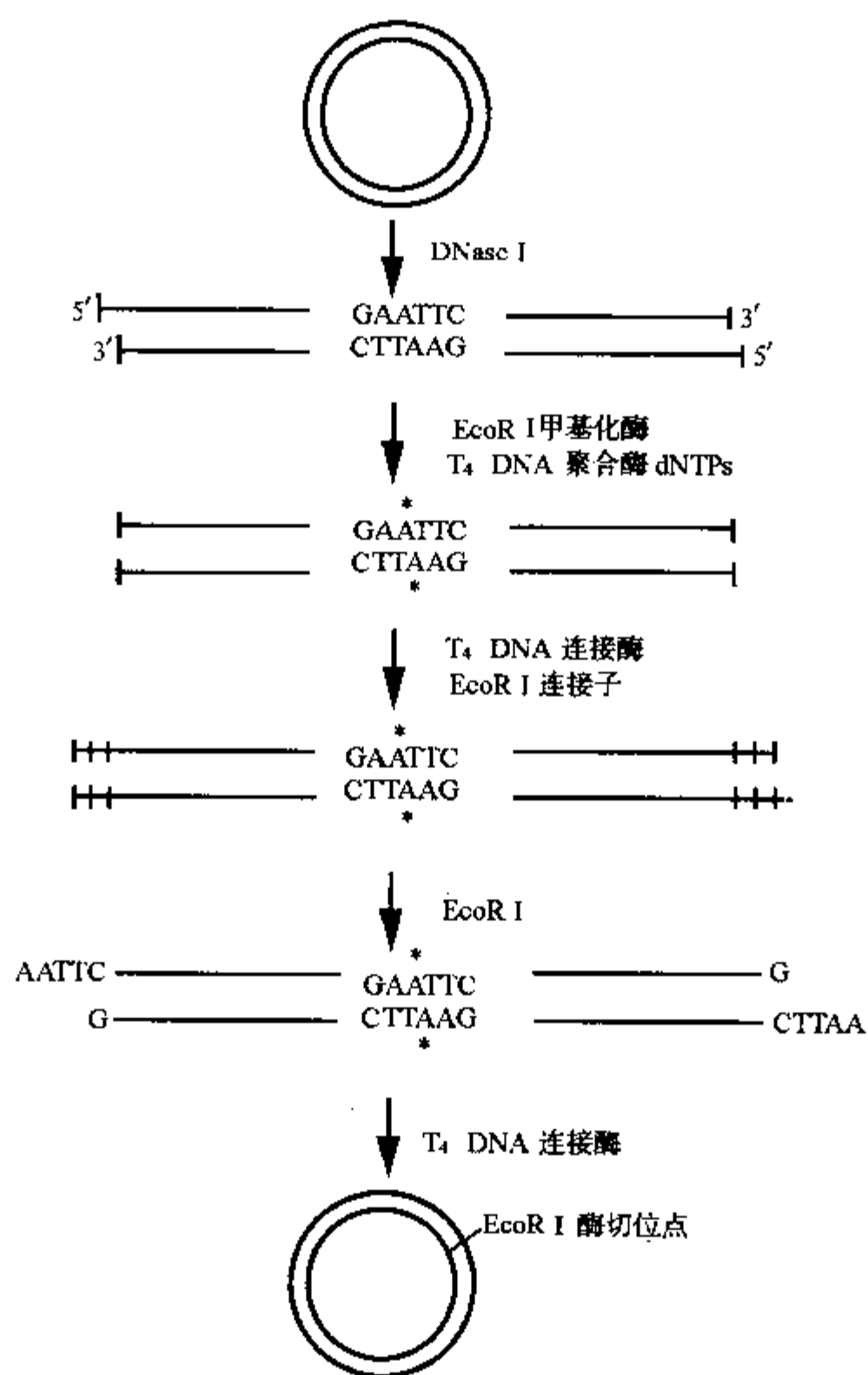
图 7-34 *Ava*I 连接子定向连接多拷贝 DNA 插入片段

图 7-35 连接子插入突变

7.5.3.8 同源多聚尾序 (homopolymeric tails) 连接

理论上讲,只要两个 DNA 分子之间,通过突出末端的碱基互补,形成较稳定的环状分子,那么体外连接是可以省略的。因为开环环状 DNA 分子也能转化细菌,并且其缺口可在细菌内,通过 DNA 聚合酶、连接酶修复。这种策略有人称之为体内连接 (*in vivo* ligation)。

体内连接的关键是两个 DNA 分子之间突出末端的碱基互补,在 37℃ 的环境下是否稳定。而 II 型限制性内切酶切割 DNA 产生的粘性末端,大多数只有 2~4 个突出的碱基,即使全为 G:C 形式的碱基,配对也非常不稳定,故内切酶的粘性末端不足以维持开环分子的稳定,必须进行体外连接后才能转化细菌。

在 DNA 分子末端添加同源多聚尾序,可以解决以上问题, Jackson 使用这一方法在 1972 年成功地将 λ 噬菌体的基因插入猴肾病毒 SV₄₀ 基因组中,可谓这项技术的鼻祖。

同源多聚尾序包括 dA:dT 和 dG:dC 两种类型。已有资料证明开环质粒 DNA 转化细菌的最佳效率,每分子 DNA 要具备 dA:dT 碱基数一般为 100 个,而对于 dG:dC 尾序,其碱基数只需 20 个,这是因为后者 G:C 配对存在三个氢键,较 A:T 配对更为稳定。

在 DNA 分子末端添加同源多聚尾序,一般由末端脱氧核苷酸转移酶催化,该酶是一个分子量为 80kD 的多肽分子,它能在单链、双链 DNA 的 3'-OH 上添加脱氧核糖核苷酸,其最适底物是具有 3'端突出的双链 DNA。对于平末端和 5'端突出的双链 DNA,催化活力不高,需要用核酸外切酶处理,删切 5'端部分碱基,形成 3'突出端,添加 dA 或 dT 尾序时,可用 Ca^{2+} 为辅助因子,而 Mg^{2+} 则适用于 dG 或 dC 尾序的添加 (图 7-36)。

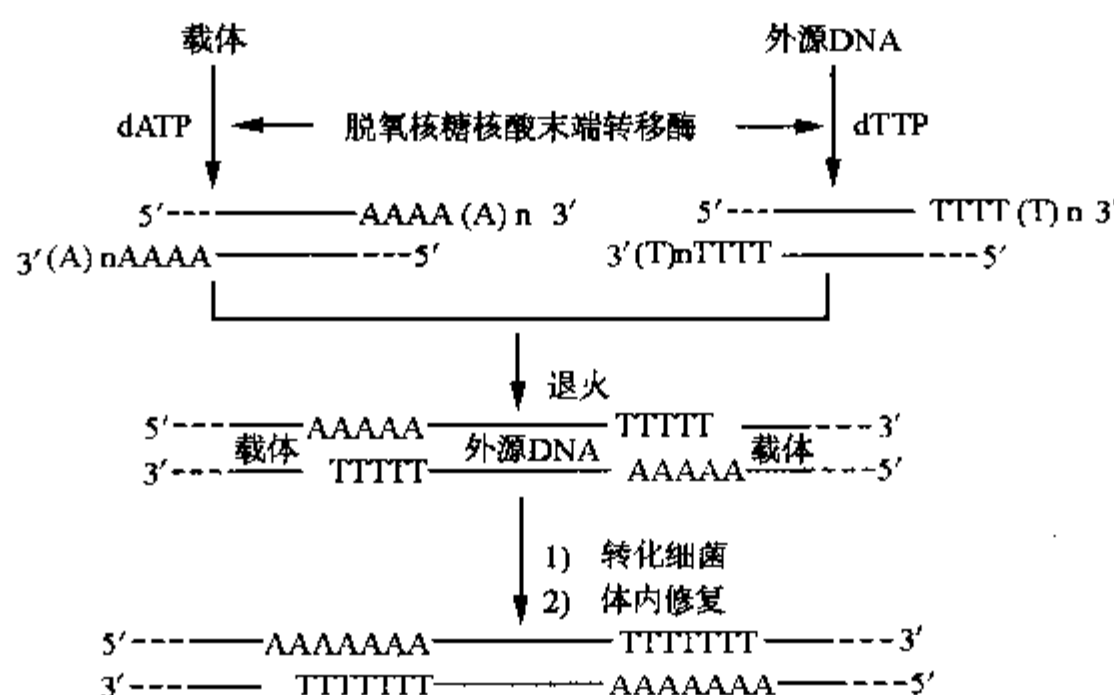


图 7-36 利用同源多聚尾序体内连接重组 DNA 分子

有关同源多聚尾序的操作方法请参阅 cDNA 文库组建的有关章节。

应该指出同源多聚尾序克隆方案存在两个缺陷:一是 DNA 分子内部必须完整,即在两个 DNA 链中间不存在裂口,否则游离的 3'-OH 会因添加多聚尾序而分支,破坏了载体的活性;另外 DNA 末端加尾破坏了该部位的内切酶位点,同时添加了许多核苷酸顺序,影响了外源 DNA 片段表达的真实性,并且在多数情况下,外源 DNA 片段不能从载体上完整地切割下来。

对于有些内切酶切割 DNA 产生的末端,添加适当的尾序可以保留原内切酶的识别位点。如 Pst I 的粘性末端为 3'突出,添加 (dG)_n 外源 DNA 形成的重组子,仍然保留 Pst I 位点 (图 7-37)。

表 7-5 列出了几个内切酶的识别位点以及添加尾序后,在重组子中仍可保留识别切割位点。

表 7-5 加尾序后仍保留识别位点的内切酶

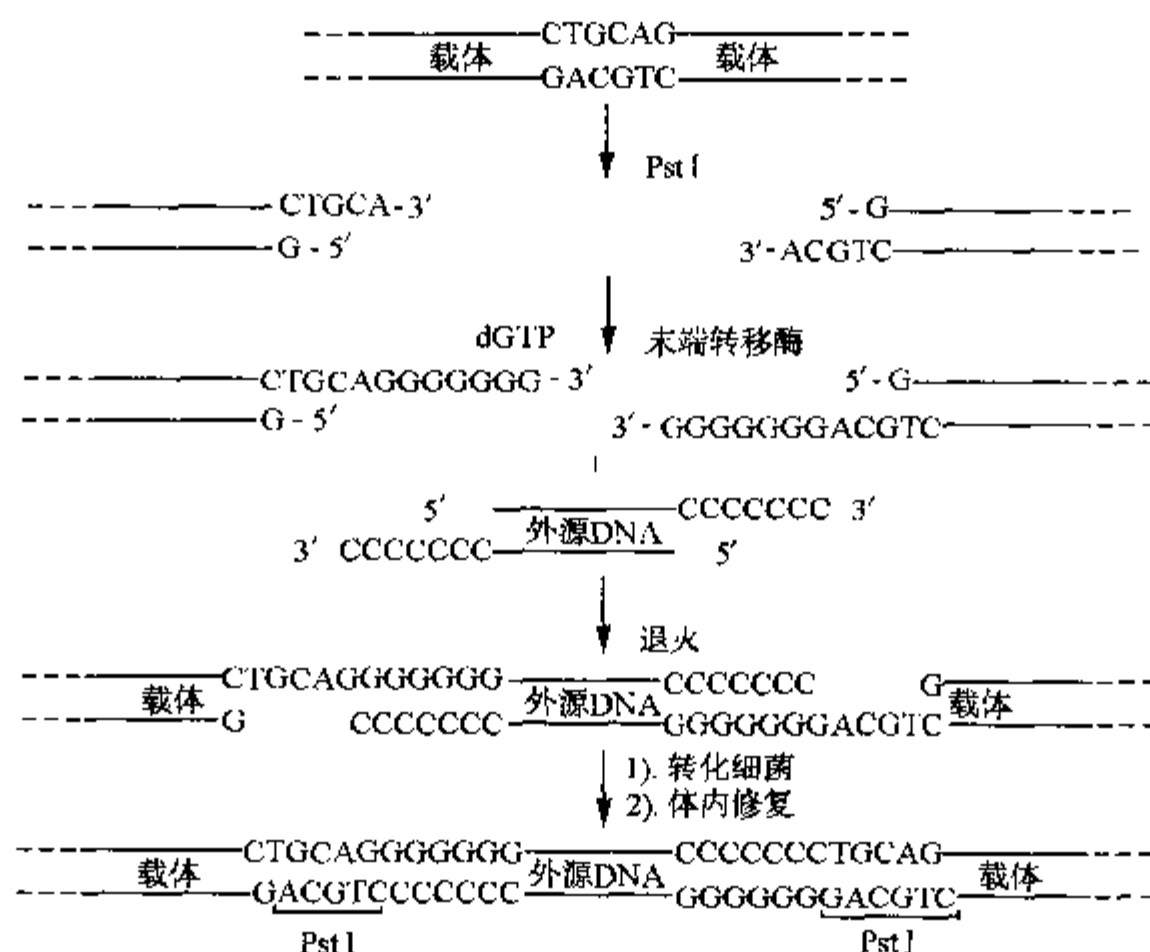


图 7-37 dG:dC 尾序保留 Pst I 位点

酶	切割位点	末端	添加与否	尾部特征
Pst I	5' - CTGCAG - 3'	5' - CTGCA	-	dG
	3' - GACGTC - 5'	3' - G		
Kpn I	5' - GGTACC - 3'	5' - CGTAC	-	dC
	3' - CCAATG - 5'	3' - G		
Sst I	5' - GAGCTC - 3'	5' - GAGCT	-	dC
	3' - CTCGAG - 5'	3' - G		
Hae III	5' - GGCC - 3'	5' - CG	-	dC
	3' - CCGG - 5'	3' - CC		
EcoR I	5' - CAATTC - 3'	5' - G	+	dC
	3' - CTTAAG - 5'	3' - CTTAA		
Bgl II	5' - ACATCT - 3'	5' - A	+	dT
	3' - TCTAGA - 5'	3' - TCTAG		

另外还有两种方法从同源多聚尾序的重组子中切割插入片段, dA:dT 尾序相对不稳定, 在 45% ~ 50% 的甲酰胺存在下, 用核酸酶 S_1 或绿豆核酸酶在 37 ~ 55℃ 切割变性解链 dA:dT 区, 从而回收外源 DNA, 本方法对 dG:dC 尾序则无效。

另一种方法是先用一个内切酶将重组子变成线性, 然后将线性 DNA 变性。短暂复性, 使得每一条 DNA 链插入片段两侧的 dA:dT 快速退火, 而载体 DNA 仍未复性呈单链状, 随后用大肠杆菌核酸外切酶 V II 从 5'→3'、3'→5' 两个方向切除单链载体 DNA, 插入片段再退火形成双链 DNA (图 7-38)。

同源多聚尾序的开环重组子, 宜选用含 $recA^+$ 基因型的细菌作为宿主, $recA$ 系统有利于开环杂合分子的修复。用 RRI 大肠杆菌株 ($recA^+$) 作为宿主, 可以获得比 HB101 ($recA^-$) 菌株多 10 倍的 dA:dT 尾序连接的重组子。

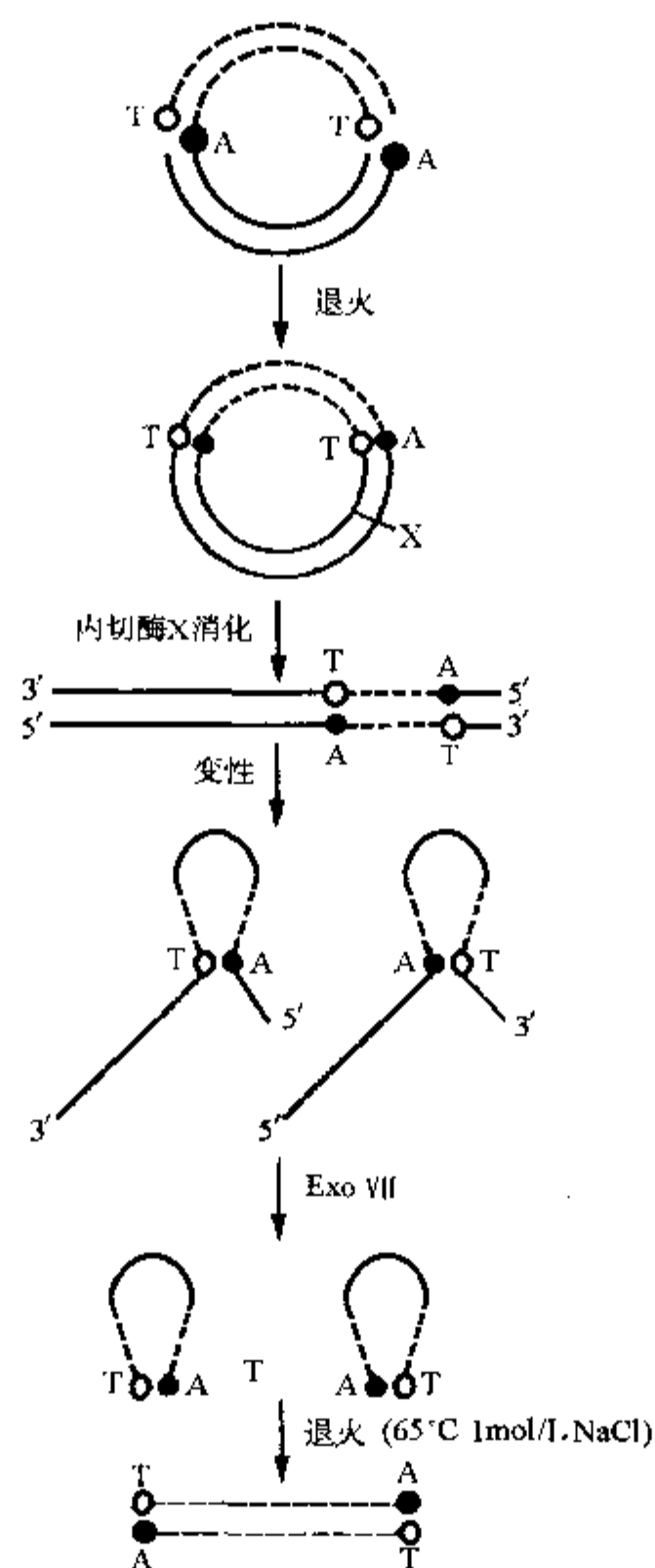


图 7-38 通过 dA:dT 尾回收重组子插入的片段

虚线: DNA 插入片段

实线: 载体 DNA

○: 多聚 dT

●: 多聚 dA

X: 只切割载体 DNA 的内切酶

7.5.4 一种快速 DNA 连接技术

常规的体外 DNA 连接, 需要首先纯化 DNA 片段, Struhl 与 Michaelis 等人于 1985 提出了一种省时省力的连接方法。他们从低熔点琼脂糖凝胶中直接切下所需的 DNA 片段, 不需纯化, 连同凝胶一起与载体 DNA 进行连接, 取得了成功。本方法虽然比常规方法的连接效率低得多, 需要较多的 DNA 连接酶, 但很有效, 并且对 DNA 粘性末端与平末端的连接均适用, 所以逐渐被人们采用。

主要试剂:**2 × T₄ DNA 连接酶反应混合液:**

1mol/L Tris·Cl (pH7.6)	1.0μl
100mmol/L MgCl ₂	1.0μl
200mmol/L DTT	1.0μl
10mmol/L ATP	1.0μl
H ₂ O	5.5μl
T ₄ DNA 连接酶	1 韦氏单位

使用前配制。

操作步骤:

- (1) 用适当的内切酶切割外源 DNA 产生 0.2μg 插入片段。
- (2) 用适当的内切酶切割 0.5μg 载体 DNA。若为互补粘性末端或平末端, 在切割完毕后, 加入 2.5μl 100mmol/L Tris·Cl (pH8.3), 10mmol/L ZnCl₂, 再加 0.25 单位小牛肠碱性磷酸酶, 37℃ 保温 30 分钟, 进行 5' 端去磷酸化处理。
- (3) 1 × TAE 配制的低熔点琼脂糖凝胶 (含 0.5μg/ml EB), 电泳分离所需的 DNA 片段。
- (4) 在长波紫外线下观察电泳分离效果并估计所需 DNA 片段的含量, 切下所需 DNA 片段, 尽可能多地切除不含所需 DNA 片段的凝胶, 一般体积为 40 ~ 50μl 将它移入一个清洁。微型离心管中。
- (5) 70℃ 加热 10 ~ 15 分钟, 以溶化低熔点琼脂糖凝胶。
- (6) 取出适量外源 DNA 与 37℃ 预热的载体 DNA 溶液混合, 外源 DNA 与载体 DNA 的分子比率为 2:1, 总体积不要超过 10μl。两个对照组分别含载体 DNA 或外源 DNA 片段。
- (7) 将三个微型离心管置 37℃ 保温 5 ~ 10 分钟后, 每管另再加入冰上预冷的 10μl 2 × T₄ DNA 连接酶混合溶液, 琼脂糖凝固前立即混匀, 在 16℃ 反应 12 ~ 16 小时。
- (8) 将连接完毕的连接混合物置 70℃, 10 ~ 15 分钟再融化。
- (9) 取 5μl 连接物按常规方法转化致敏感受态菌。

7.6 重组子导入受体细胞

7.6.1 概述

体外连接的 DNA 重组分子导入合适的受体细胞才能大量地进行复制、增殖和表达, 其首要目的是获取大量的克隆基因, 虽然 DNA 体外聚合酶链反应 (PCR)、体外转录及翻译能部分达到上目的, 但毕竟受到体外操作的许多限制。

受体细胞也称宿主, 是重组子扩增及表达的场所, 分为原核细胞和真核细胞两类。原核细胞主要是大肠杆菌株、链霉菌及枯草杆菌等。真核细胞包括酵母、哺乳动物细胞及昆虫细胞等。前者不但是重组子复制扩增的场所, 也可以作为外源基因的表达系统。后者主要用于外源基因的表达, 对于重组子的扩增, 其效率和操作均不如原核细胞, 这一缺陷可由穿梭载体弥补。外源基因在真核细胞的表达可以改变细胞遗传学性状, 获取适当的生物活性蛋白产物, 也可用于对真核基因的结构与功能和基因治疗的研究等。

在基因克隆技术中, 转化 (transformation) 特指以质粒 DNA 或以它为载体构建的重组子导入细菌的过程。转染 (transfection) 是指噬菌体、病毒或以它作为载体构建的重组子导入细胞的过程。对于以噬菌体为媒介, 将外源 DNA 导入细菌的过程, 有人又称之为转导 (transduction), 这些概念往往容易混淆。

有关 DNA 对哺乳动物细胞的转染方法请参阅本书真核表达系统的有关章节, 本节主要以质粒 DNA 转化大肠杆菌为例介绍转化技术。

转化这一概念来源于遗传学: 细菌细胞的生物学特性由于吸收外源 DNA 发生可遗传的改变叫转化。转化是一个自然存在的过程。细菌处于容易吸收外源 DNA 状态叫感受态, 用理化方法诱导细胞进入感受态的操作叫致敏过程。重组 DNA 转化细菌的技术操作关键就是通过化学方法, 人工诱导细菌细胞进入一个敏感的感受态, 以便外源 DNA 进入细菌内。这项技术始于 Mandel 和 Higa 1970 年的观察, 他们发现细菌经过冰冷的 CaCl_2 溶液处理及短暂热休克后, 容易被 λ 噬菌体 DNA 感染, 随后 Cohn 于 1972 年进一步证明质粒 DNA 用同样的方法也能进入细菌。其原理是细菌处于 0°C , CaCl_2 低渗溶液中, 菌细胞膨胀成球形, 转化混合物中的 DNA 形成抗 DNase 的羟基-钙磷酸复合物粘附于细胞表面, 经 42°C 短时间热冲击处理, 促进细胞吸收 DNA 复合物, 在丰富培养基上生长数小时后, 球状细胞复原并分裂增殖, 被转化的细菌中, 重组子中基因得到表达, 在选择性培养基平板上, 可选出所需的转化子。

Ca^{2+} 处理的感受态细胞, 一般每微克 DNA 能获得 $10^5 \sim 10^6$ 个转化子, 环化重组子分子愈小, 转化率愈高, 环状 DNA 分子比线性 DNA 分子的转化率高 1 000 倍。在 Ca^{2+} 的基础上, 联合其它二价金属离子 (如 Mn^{2+} 、 Co^{2+})、DMSO 或还原剂等物质处理细菌, 使可转化率提高 100 ~ 1 000 倍。

除化学法转化细菌外, 还有电击转化法, 电击法不需要预先诱导细菌的感受态, 依靠短暂的电击, 促使 DNA 进入细菌, 转化率最高能达到 $10^9 \sim 10^{10}$ 转化子/ μg 闭环 DNA。因操作简便, 愈来愈为人们所接受。

7.6.2 转化方法

7.6.2.1 氯化钙转化程序

对于化学法致敏感受态细胞, 以下几个因素是影响转化率的关键:

致敏缓冲液中试剂的纯度: 试剂纯度高是非常重要的, 尤其是 CaCl_2 , 有时同一厂家出品的不同批号产品, 其致敏的感受态细胞转化率也有一定区别, 所以应该进行预试验鉴定其致敏效果。致敏缓冲液最好避光贮存于 4°C 冰箱中。

细胞的生长状态: 贮存的菌株应该保存在 -70°C , 有经验表明, 直接从 -70°C 取出的菌株, 培养致敏后, 比连续使用或 4°C 短期保存的细菌的转化率要高。致敏前, 应收获对数期或对数生长前期的细菌感受态用于制备。

转化实验使用器皿的清洁度玻璃器皿、微量吸管及 Eppendorf 管等, 应彻底洗净并进行高压消毒, 表面去污剂及其它化学试剂的污染往往大幅度地降低转化率。

氯化钙转化程序由 Cohen 等人首创, 其转化率一般能达到 $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 转化子/ μg 质粒 DNA, 可以满足一般的基因克隆试验。本方法简单、快速、稳定、重复性好, 菌株适用范围广, 感受态细菌可以在 -70°C 保存, 但贮存时间过长将导致转化率的下降。

试剂:

LB 培养基或 SOC 培养基及含相应抗生素的琼脂平板

SOB 琼脂平板

0.1mol/L CaCl_2

CaCl_2 最好配制分装成为 1mol/L 的贮存液, 10ml , 于 -20°C 贮存, 使用前稀释到 100ml , 用 $0.45\mu\text{m}$ 的滤膜滤过灭菌。

1mol/L MgCl_2

10mg/ml 氨苄青霉素

操作步骤:

(1) 将宿主菌在琼脂培养基平板上划线, 37°C 培养 16 ~ 20 小时。

(2) 从平板中取出 1 个 2 ~ 3mm 大小的单菌落, 移至含 100ml LB 或 SOB 培养基的 500ml 或 1000ml

三角瓶中, 37℃ 300r/min 强烈振荡培养 3 小时, 使细胞的浓度达到 5×10^7 个细胞/ml, 此时, 细菌的 OD600 一般在 0.2 ~ 0.4 之间, 为对数生长期或对数生长期前期。

(3) 将培养物于冰上放置 10 分钟, 然后转移到两个 50ml 离心管中, 4 000r/min, 4℃ 离心 10 分钟 (Sovall GS30 转头)。

(4) 弃上清, 倒置离心管 1 分钟, 流尽剩余液体, 然后加入 10ml 用冰预冷的 0.1mol/L CaCl_2 致敏液悬浮细胞, 置于冰上 10 分钟。

(5) 4 000r/min, 4℃ 离心 10 分钟回收细胞, 弃上清, 每 50ml 的原培养物再加入 2ml 冰冷的 0.1mmol/L CaCl_2 溶液, 悬浮细胞。

(6) 按每份 200 μl 分装细胞, 若不马上进行转化, 该感受态细胞可以加入终浓度为 10% 的灭菌甘油, 置于 -70℃ 冻贮。

(7) 加 10 μl 含 40ng 的 DNA 溶液至 200 μl 感受态细胞中, 温和混匀, 置于冰上 30 分钟, 在此步骤操作时应设立两个对照组: ①取 10ng (10 μl) 已知的超螺旋闭环质粒 DNA 加至感受态细胞, 作阳性对照; ②不加任何 DNA 的感受态细菌作阴性对照。

(8) 42℃ 热休克 90 秒钟, 迅速放回冰中, 将细胞冷却 1 ~ 2 分钟后, 加入 800 μl SOC 培养基, 37℃, 225r/min, 振荡培养细菌 45 ~ 90 分钟, 让细菌中的质粒表达抗生素抗性蛋白。

(9) 取 200 μl 转化混合物铺于 90mm 的 SOB 琼脂平板上 (SOB 琼脂中含有 20mmol/L MgSO_4 和适当浓度的抗生素), 室温下放置 20 ~ 30 分钟, 待溶液被琼脂吸收后, 倒置平皿于 37℃ 培养 12 ~ 16 小时。

说明:

(1) 不同菌株的 OD600 值与细胞浓度的关系并不一致, 当 OD600 = 0.2 时, 对于 rec^+ 菌株 (如 $\chi 1776$, MM294), 相当于 5×10^7 个细胞/ml; 而对于 rec^- 菌株 (DH1, HB101), 当 OD600 = 0.5 时, 才相当于 5×10^7 个细胞/ml。对于未明菌株应该预先测定 OD600 值与细胞浓度的关系。

(2) 除 MC1061 菌株以外, 多数菌株用 TFB 致敏缓冲液 (见下文) 取代 CaCl_2 制备感受态细菌, 将获得更好的转化率。

(3) 步骤 (5) 中, 可将细胞在 4℃ 放置 12 ~ 24 小时, 感受态细菌的转化率可增高 4 ~ 6 倍, 24 小时后, 转化率又下降到原来的水平。

(4) 步骤 (9) 铺板时, 若一个平板需要铺 200 μl 以上的转化菌, 则应先离心沉淀细菌, 然后用适当体积的 SOC 培养基悬浮细胞再铺板。对于抗四环素的转化菌, 可将全部转化菌铺于 1 个琼脂板上, 而氨苄青霉素抗性的转化菌, 每个琼脂板只能铺一部分转化菌, 否则容易产生卫星菌落, 而且氨苄青霉素抗性的转化菌落多少并不与铺板时加入转化菌的量成线性关系。最好每个平板 (90mm) 不要超过 4 000 个菌落。

(5) 对于携带 LacZ 基因的重组子, 转化细菌中分泌出来的 β -内酰胺酶, 能使氨苄青霉素敏感的细菌形成卫星菌落, 妨碍阳性转化子的挑选。所以不应太长时间培养 (20 小时), 并将氨苄青霉素浓度加大到 60 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 或用羧苄青霉素 (carbenicillin) 代替氨苄青霉素。

(6) 注意无菌操作, 防止污染杂菌。

7.6.2.2 氯化钙/氯化铷转化程序

本方案最早由 Kushner 用于 SK1590 大肠杆菌菌株, 效果很好, 对于其它大肠杆菌菌株其转化率也高于标准的氯化钙转化方法。

试剂:

溶液 I:

10mmol/L MOPS (3-N-吗啉代丙磺酸, pH7.0)

10mmol/L RbCl

溶液 II:

0.1mol/L MOPS (pH6.5)

50mmol/L CaCl_2

10mmol/L RbCl

操作步骤:

(1) 从 5ml 单菌落过夜培养物中, 取出 0.5ml 加至含有 100ml LB 培养基的 500ml 三角瓶中, 37℃ 强烈振荡, 直至培养浓度为 5×10^7 个细胞/ml, 每次转化试验需 2ml 细胞悬浮液, 约 1×10^8 个细胞。

(2) 取 2ml (1×10^8 个细胞) 于 4℃, 4000g 离心 10 分钟, 弃上清收集细胞。

(3) 将细胞沉淀轻轻悬浮在 1ml 溶液 I 中, 再离心回收细胞。

(4) 弃上清, 细胞沉淀物再悬浮于 1ml 溶液 II 中, 冰上放置 15 分钟。

(5) 4℃, 4000g 离心 10 分钟, 尽可能地去尽上清液, 再将细胞沉淀物悬浮于 0.2ml 溶液 II 中即可马上用于转化试验。

(6) 加入 3μl 二甲基亚砜 (DMSO, 光谱纯), 1~200ng DNA (溶于 10μl TE), 冰上放置 30 分钟。

(7) 43~44℃ 热休克 30 秒, 加入 5ml LB 培养基 37℃ 振荡培养 1 小时 (也可以不振荡放至 37℃ 水浴中 1 小时)。

(8) 将培养物离心回收细胞后, 悬浮在 1ml LB 培养基中, 分别取 100μl, 200μl 细胞悬浮液, 铺于含适量相应的抗生素琼脂板上, 20 分钟后, 倒置琼脂板 37℃ 培养 12~24 小时。

注意事项:

步骤 (6) 中加入的 DMSO 若含其氧化物, 则可强烈抑制转化。故光谱纯 DMSO 开包装后, 应分装成若干小份, 保存于 -70℃, 每份使用一次后即弃去。

7.6.2.3 氯化钙/氯化锰转化方法

本方案是 Hanahan 于 1983 年发明的, 对于大肠杆菌菌株 DH1、DH5 和 MM294, 转化率可达到高于 5×10^8 , 除 MC1061 等少数几个菌株不适用该方法以外, 多数菌株也能达到 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 之高的转化率。

主要试剂:

TFB 缓冲液 (配制 1L 所需各试剂量):

成 分	所需量 (/L)	终浓度
1mol/L MES (pH6.3)	10ml	10mmol/L
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.91g	45mmol/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.47g	10mmol/L
KCl	7.46g	100mmol/L
$(\text{NH}_4)_6\text{CoCl}_3$	0.80g	3mmol/L

加双蒸去离子水至 1000ml, 溶液 pH 应为 6.0~6.1, 用 0.45μm 滤膜滤过灭菌后, 分成小包装贮存于 4℃。

FSB 缓冲液:

成 份	所需量 (/L)	终浓度
1mol/L KAc (pH7.5)	10ml	10mmol/L
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.91g	45mmol/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.47g	10mmol/L
KCl	7.46g	100mmol/L
$(\text{NH}_4)_6\text{CoCl}_3$	0.8g	3mmol/L
甘油	100ml	10%

加水至 1000ml, 滤过灭菌, 分装, 4℃ 贮存。

DnD 溶液 (10ml):

DTT	1.53g
DMSO	9ml
1mol/L KAc (pH7.5)	100 μ l

加水至 10ml, 用 0.45 μ m 滤膜滤过后, 分装成每份 300 μ l, -20℃ 贮存。

操作步骤:

(1) 取 1~2mm 的 DH1 (或 DH5, M294) 单菌落移入 1ml SOC 培养基 (含 20mmol/L MgSO₄) 中, 振荡分散菌落, 再移入含 30~100ml SOC 培养基 (含 20mmol/L MgSO₄) 的 500ml 三角瓶中, 培养至细胞浓度为 5×10^7 个细胞/ml, 大约需要 3 小时左右。

(2) 用两个 50ml 离心管分装培养物, 4℃ 下, 4 000r/min 离心 10 分钟 (Sorvall GS 转头), 弃尽上清液。

(3) 若细菌需马上用于转化试验, 则用 TFB 缓冲液悬浮, 若制备的感受态细菌需 -70℃ 冰贮, 则用 FSB 缓冲液悬浮。每 50ml 培养物的细菌用 20ml 缓冲液悬浮, 冰上放置 10 分钟。

(4) 4 000r/min, 4℃ 离心 10 分钟, 弃尽上清液。

(5) 每管再用 4ml 冰预冷的 TFB 或 FSB 悬浮细胞沉淀物。

(6) A、立即用于转化的感受态细胞制备: ①每管加入 140 μ l DnD 溶液, 立即温和混匀, 冰上放置 15 分钟; ②再加 140 μ l DnD 溶液, 重复步骤 (1) 一次; ③50 μ l 一份分装细胞悬浮液。大多数转化实验 50 μ l 感受态细胞已经足够。若需要产生更高的转化率, 如 cDNA 文库构建, 可用 100 μ l 该感受态细胞进行转化。

B、制备 -70℃ 冻贮的感受态细胞: ①每 4ml 悬浮细胞 [按步骤 (5)] 加入 140 μ l DMSO 温和混匀, 冰上放置 15 分钟; ②再加 140 μ l DMSO, 重复步骤 (1) 一次; ③快速分装成 50 μ l 一份, 迅速将管置于液氮表面, 降温 5 分钟, 然后移入 -70℃ 冰箱保存。

使用前, 从 -70℃ 取出贮存的感受态细胞, 速置于 25℃ 左右的水中 30 秒钟化冰, 然后将细胞悬浮液移入另一消毒的 Eppendorf 管中, 置于冰上。

(7) 加入 1ng 闭环质粒 DNA 至 50 μ l 感受态细胞中, 温和倒置 Eppendorf 管数次混匀, 冰上放置 30 分钟。

(8) 42℃, 准确热休克 90 秒钟, 不要振荡。

(9) 速置于冰上 1~2 分钟后, 加入 800 μ l SOC 培养基, 37℃ 水浴中预热至 37℃ 后, 37℃, 225r/min 振荡培养 45 分钟。

(10) 取 200 μ l 铺于 90mm 的琼脂平板中, 20 分钟后, 反置琼脂平皿于 37℃ 培养 12~16 小时。

注意事项:

(1) 制备感受态前的细胞应处于对数生长期。

(2) 转化试验时, 应有已知的环状质粒阳性对照组和不加任何 DNA 的空白感受态细菌阴性对照组。

(3) 加入 50 μ l 感受态细胞中的 DNA 体积不要大于 3 μ l, 以 1ng 以下闭环 DNA 为最适, 过量的闭环 DNA 反而会使转化率下降。所以最好将 DNA 稀释至 100pg、500pg、1ng 几个浓度分别进行转化。

7.6.2.4 氯化镁法

本方法在致敏缓冲液中没有 CaCl₂, 而由 Mg²⁺ 代替, 联合 PGE 和 DMSO 可达到 $10^7 \sim 10^8$ 的转化率, 适用于此法的菌株广泛, -70℃ 冻贮 18 周转化率无明显下降。更重要的是一步操作即可制备感受态菌, 简短, 转化过程中不需热休克。

试剂:

1× TSS 致敏缓冲液:

10% PEG (MW = 3 350 ~ 8 000)

5% DMSO

50mmol/L MgCl₂

用 LB 培养基制备, 调 pH 至 6.5

操作步骤:

1. 感受态细菌制备及长期冻贮:

(1) JM109 菌株于 LB 培养基中生长至对数前期 ($OD_{600} \approx 0.3 \sim 0.4$), $1\,000g$, $4^{\circ}C$ 离心 10 分钟弃上清, 收获细菌。

(2) 用 0.1 倍原培养物体积的 $1 \times$ TSS 致敏缓冲液 (冰预冷) 悬浮细胞, 然后分装成 0.1ml 一份速置干冰乙醇中冷冻, 然后 $-70^{\circ}C$ 贮存。使用前, 从 $-70^{\circ}C$ 取出贮存的感受态细菌, 冰上放置 5 分钟后即可使用。

2. 转化细菌:

(1) $-70^{\circ}C$ 取出制备好的感受态细菌, 冰上放置 5 分钟, 或直接用 $2 \times$ TSS 致敏缓冲液与细菌培养物 1:1 混合, 即可直接进行转化。

(2) 每 0.1ml 感受态细胞加入 $1\mu l$ DNA 溶液 (含 $100pg \sim 1ng$ 的闭环质粒 DNA), 混匀后冰上放置 30 分钟。

(3) 加入 0.9ml LB 培养基 (含 20mmol/L 葡萄糖), $37^{\circ}C$, 225r/min 摇荡 1 小时, 使抗生素基因表达。

(4) 取 $200\mu l$ 铺于 90mm 琼脂平板上, 20 分钟后, 放置于 $37^{\circ}C$ 温箱, 培养 17~20 小时。

说明:

(1) 本方法中, 热休克与否对转化率影响不大, 甚至 $42^{\circ}C$ 处理 45 秒钟, 转化率反而会下降。

(2) 用本方法转化 0.1ml 感受态细菌, 最适闭环 DNA 用量为 $1ng$ 。

7.6.2.5 高电压脉冲电击转化细菌

1988 年 Dower 等人用电击转化细菌取得成功, 随后该技术不断改进, 已有特殊的装置出售 (Bio-Rad 公司)。电击法转化细菌不但操作简单, 而且可以达到 $10^9 \sim 10^{10}$ 的高转化率, 任何菌株均适用, 电压高, 脉冲时间长, 转化率愈高, 但导致细胞死亡率增高, 一般使用的电击条件导致细胞死亡率为 50%~75% 时, 转化率为最高。

细菌可预先培养至对数生长中期, 然后离心收获细胞, 用 10% 甘油制成细胞悬浮液 (3×10^{10} 个细胞/ml), 分装成小份, 速置于冰中冰冻后, $-70^{\circ}C$ 保贮, 6 个月以内均可使用。电击转化时, 只需 20~40 μl 以上浓度的细胞悬浮液, 转化在 $0 \sim 4^{\circ}C$ 进行。

7.7 重组子的筛选与鉴定

基因克隆的最后一道工序就是从转化细菌菌落中筛选含有阳性重组子的菌落并鉴定重组子的正确性, 通过细菌培养以及重组子的扩增, 从而获得所需基因片段的大量拷贝, 进一步研究该基因的结构、功能或表达该基因的产物。

不同的克隆载体及相应的宿主系统, 其重组子的筛选、鉴定方法不尽相同, 概括起来有以下几类。

7.7.1 针对遗传表型改变筛选法

重组子转化宿主细胞后, 载体上的一些筛选标志基因的表达失活, 会导致细菌的某些表型改变, 通过琼脂平板中添加一些相应筛选物质, 可以直接筛选鉴别含重组子的菌落。操作非常简单, 常是筛选阳性重组子的第一步。

7.7.1.1 抗生素平板筛选

大多数克隆载体均带有抗生素抗性基因, 常见的有抗氨苄青霉素基因、抗四环素基因、抗卡那霉素

基因等。如果外源 DNA 片段插入载体的位点在抗药性基因之外,不导致抗药性基因的插入失活,仍能编码抗药性基因,这样含有重组子的转化细胞,能够在含有相应药物的琼脂平板上生长成菌落。但是除阳性重组子以外,自身环化的载体,未酶解完全的载体以及非目的基因插入载体形成的重组子均能转化细胞并形成菌落,只有未转化的宿主细胞不能生长,故本法仅是阳性重组子的初步筛选。

7.7.1.2 插入失活双抗生素对照筛选

在含有两个抗药性基因的载体中,通过插入失活其中一个基因,可用两个分别含不同药物的平板对照筛选阳性重组子。如 pBR322 质粒含有 Tc^r 、 Amp^r 双抗药性,插入失活 Tc^r 后, Tc^r 、 Amp^r 为含载体的阴性菌落, Tc^s 、 Amp^r 表型的菌落为阳性, Tc^s 、 Amp^s 的表型不能生长,对未转化的受体细胞,该方法筛选出阳性重组子的机率较高(Tc^r :四环素抗性; Amp^r :氨苄青霉素抗性; Tc^s :对四环素敏感; Amp^s :对氨苄青霉素敏感)。

7.7.1.3 环丝氨酸(cSer)筛选

这种方法只适应插入失活抗四环素基因的重组子筛选,如 pBR322 中 Tc^r 失活,将转化细胞先接种在含有 Tc 和 cSer 的培养液中培养,Tc 只抑制蛋白质合成,并不杀死细胞,所以 Tc^s Amp^r 的细菌生长受到抑制,cSer 不能掺入。而 Tc^r Amp^r 表型的细菌可以生长,同时掺入 cSer,导致细菌死亡,富集 Tc^s Amp^r 细菌后,再铺在含有 Amp 的 LB 琼脂平板上,只有 Tc^s Amp^r 的细菌生长成菌落。

7.7.1.4 插入表达筛选

有些载体设计时,在筛选标志基因前面连接一段负控制序列,当插入失活该负调控序列时,其下游的筛选标志基因才能表达。如 pTR262 质粒,其 Tc^r 基因上游存在 CI 基因的负调控序列,CI 基因可以抑制 Tc^r 基因的表达,当外源 DNA 片段插入 CI 基因的 Hind III 或 Bgl I 位点时, Tc^r 基因阻碍解除而表达,阳性重组子为 Tc^r 表型,而质粒本身为 Tc^s 表型,故转化细菌在 Tc 平板中,只有含外源 DNA 插入片段的阳性重组子的转化菌才能生长成菌落。

7.7.1.5 β -半乳糖苷酶系统筛选

通过插入失活 lacZ 基因,破坏重组子与宿主之间的 α -互补作用,是携带 lacZ 基因的许多载体的筛选优势。这些载体包括 M13 噬菌体,pUC 质粒系列,pEGM 质粒系列等。它们的共同点是载体上携带一段细菌的基因 lacZ,它编码 β -半乳糖苷酶的一段 146 个氨基酸的 α -肽,载体转化的宿主细胞为 lacZ⁻ DM15 基因型,重组子中基因插入使 α -肽基因失活不能形成 α -互补作用,在 X-gal 平板上,含阳性重组体的细菌为无色噬菌斑或菌落,反之载体自身环化后转化的细菌为蓝色噬菌斑或菌落。

试剂:

X-gal 20mg/ml (溶于二甲基甲酰胺,不需滤过灭菌,分装小包装,避光贮存于 -20°C)

IPTG 200mg/ml

取 2g IPTG 溶于 8ml 双蒸去离子水中,再用水补至 10ml,用 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌,每份 1ml 分装后,贮存于 -20°C 。

操作方法:

(1) 在预制好的 LB 琼脂平板(含相应适量抗生素)上,加 $40\mu\text{l}$ 20mg/ml X-gal 和 $4\mu\text{l}$ 200mg/ml IPTG 溶液。

(2) 用灭菌玻璃推子,将 X-gal 和 IPTG 溶液均匀涂布于琼脂凝胶表面, 37°C 放置 3 小时左右。

(3) 待溶液全部吸入琼脂表面,将细菌涂布于平板中。

7.7.1.6 噬菌斑形成能力

对于以 λ 噬菌体载体系统,外源 DNA 插入 λ 噬菌体载体后,重组 DNA 分子大小必须在野生型 λ DNA 长度的 78%~105% 范围内,才能在体外包装成具有感染活力的噬菌体颗粒,感染细菌后,形成清晰的噬菌斑。没有外源 DNA 片段插入的载体不能包装成噬菌体颗粒,不能感染细菌形成噬菌斑,达到初步筛选的作用。

7.7.2 分析重组子结构特征的筛选法

7.7.2.1 快速裂解菌落鉴定分子大小

从平板中直接挑取菌落裂解后,不需要内切酶消化,直接进行凝胶电泳,与载体 DNA 比较迁移率,初步判断是否有插入片段存在,本方法适用于插入片段较大的重组子初步筛选。

操作步骤:

(1) 用消毒牙签从菌落上挑取少许细菌移入另一个 LB 琼脂平板,再将该菌落中剩下的细菌全部取出移至 96 孔培养板中,在 25 μ l 裂解液中用牙签打散菌落,可一次分别挑选处理 30~50 个菌落。

(2) 盖上 96 孔板的盖,用胶布封严,68℃ 水浴保温 45 分钟。

(3) 每孔加入 2.5 μ l 25% 蔗糖,对照组为载体 DNA,上样于琼脂糖凝胶电泳。

(4) 电泳完毕后,凝胶于 0.5 μ g/ml EB 溶液中染色 45 分钟,紫外线灯下观察,如有比载体 DNA 迁移慢的样品,则根据编号,从贮存琼脂板上,挑取相应的菌落,小量培养提取 DNA,进行内切酶消化鉴定。

7.7.2.2 内切酶图谱鉴定

对于初步筛选鉴定具有重组子的菌落,应小量培养后,再分离出重组质粒或重组噬菌体 DNA,用相应的内切酶(1 种或 2 种)切割重组子释放出插入片段,对于可能存在双向插入的重组子还要用内切酶消化鉴定插入方向,然后凝胶电泳检测插入片段和载体的大小。有关小量质粒 DNA 提取、内切酶消化 DNA 及琼脂糖凝胶电泳的内容请参阅有关章节。

7.7.2.3 Southern 印迹杂交

为了进一步确定 DNA 插入片段的正确性,在内切酶消化重组子,凝胶电泳分离后,通过 Southern 印迹转移将 DNA 移至硝酸纤维素膜上,再用放射性核素或非放射性标记的相应外源 DNA 片段作为探针,进行分子杂交,鉴定重组子中的插入片段是否是所需的靶基因片段。有关方法请参阅分子杂交及探针标记章节。

7.7.2.4 PCR 筛选重组子

一些载体的外源 DNA 插入位点两侧,存在恒定的序列,如 pGEM 载体系列中多克隆位点双侧是 SP6 及 T7 启动子的序列,通过与插入片段两侧的 SP6 及 T7 启动子互补的引物,对小量抽提的质粒 DNA 进行 PCR 分析,不但可迅速扩增插入片段,而且可以直接进行 DNA 顺序分析。对于原核或真核系统表达型重组子,其插入片段的序列正确性是非常关键的,故有必要对重组子进行序列测定,有关 PCR 操作方法请参阅 PCR 及 DNA 序列分析的有关章节。

7.7.2.5 菌落(或噬菌斑)原位杂交

至今最为通用的筛选重组子技术仍为菌落或噬菌斑原位杂交技术,它是先将转化菌直接铺在硝酸纤维素薄膜或琼脂平板上,再转移至另一硝酸纤维素薄膜上,用核素标记的特异 DNA 或 RNA 探针进行分子杂交,然后挑选阳性克隆菌落。本方法能进行大规模操作,一次可筛选 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 个菌落或噬菌斑,对于从基因文库中挑选目的重组子,是一项首选的方法。

1. 小量的细菌菌落转移至硝酸纤维素薄膜上:

对于亚克隆技术,有时转化菌铺在几个琼脂板上,而总共只有 100~200 个菌落,这种情况可以先将菌落中部分细胞分别移种在一个琼脂贮存板上,编好顺序,同时将相应的菌落移至一张铺于琼脂平板上的硝酸纤维素膜上,经一段时间的生长后,用碱裂解硝酸纤维素薄膜上的菌落,中和后,将 DNA 烘干固定在滤膜上,再进行分子杂交,贮存板于 4℃ 保存直至获得筛选结果。

(1) 在含有选择标记的琼脂板上,铺一板相应大小的硝酸纤维素膜,避免产生气泡;使滤膜均匀湿润。操作时需戴手套,防止手指直接接触滤膜。

(2) 用牙签将欲筛选的单个细菌菌落转移(画线或涂点)至滤膜上,同时相应地转移到贮存琼脂平

板上。每个菌落在两个平板上的位置应该相同。最后在硝酸纤维素薄膜上特定位置，接种一个非重组质粒菌落作为阴性对照。

(3) 倒置平板 37℃ 培养使菌落长至 0.5mm ~ 1.0mm 宽，若为严紧型复制质粒，可再转移至含氯霉素 (10μg/ml) 平板，37℃ 扩增 12 小时。

(4) 用 18 号针头 (带防水绘图墨水) 在硝酸纤维素薄膜上戳三个不对称点，在贮存板的相应位置也戳三个点，以便杂交放射自显影后寻找阳性菌落。

(5) 取出滤膜，进行溶菌固定 DNA 操作，将平板倒置于贮存 4℃，直至获得杂交反应结果。

2. 硝酸纤维素大量菌落复印：

方法一：

此法将平板上的菌落直接印迹于硝酸纤维素膜上，0.1mm ~ 0.2mm 大小的菌落能足以产生清晰的杂交斑，菌落太大，菌落之间的杂交信号容易弥散，难以区分出菌落的位置。对于直径为 150mm 平板一次可筛选 10^4 个菌落。

(1) 当菌落直径长至 0.1 ~ 0.2mm 时，停止培养，将平板放入 4℃，1 ~ 2 小时。

(2) 用软铅笔或圆珠笔先在硝酸纤维素薄膜上作面标记，将标记朝下小心铺在平板的琼脂表面，使滤膜完全变湿，再用 18 号针头 (带有防水绘图墨水) 刺穿滤膜及其下的琼脂，在三个不对称位置上戳三个孔作为标记。

(3) 用平头镊子小心剥离滤膜，进行溶菌、固定 DNA 操作 (见下法)。转印后的琼脂平板 37℃ 继续培养 10 ~ 12 小时，直至长出新的菌落，然后用石蜡膜封住培养皿，倒置 4℃ 保存，待获得杂交结果后，挑选阳性菌落。

方法二：

(1) 将适当大小的无菌硝酸纤维素膜标号面朝下小心铺在适当抗生素的琼脂平板上，润湿后，将滤膜反转，标号朝上平放于琼脂平板上，小心不要留下气泡。

(2) 取少量细菌， 5×10^4 个细胞/0.2ml 铺于 137mm 直径的滤膜上；或 1.5×10^4 个细胞/0.1ml 铺于 82mm 直径的滤膜上，用无菌玻璃推子小心涂布，在滤膜边缘 2mm ~ 3mm 区留下无菌边界，室温下放置 20 分钟至所有液体被吸收。

(3) 倒置平板 37℃ 培养 8 ~ 10 小时左右，直至出现 0.1mm 直径的菌落，用灭菌平头镊将滤膜含菌面朝上移至一叠消毒的新华滤纸上。

(4) 将准备复印的硝酸纤维素膜编好号，编号面朝下平放于另一含相应抗生素的琼脂板上，使滤膜湿润后，取标号面与主滤膜含菌面相对，叠在一起，用 18 号针头在三个不对称位置刺孔标记，小心剥离滤膜，复印滤膜和主滤膜分别放回原琼脂平板中，可用相同方法制备第二张复印滤膜。

(5) 37℃ 将主平板和复印平板培养至 1 ~ 2mm 菌落出现，一般主平板需 6 ~ 8 小时，复印平板需稍长一些的时间。若重组质粒拷贝数低，可在 10μg/ml 氯霉素平板中再扩增 12 小时。

(6) 主平板用石蜡膜封严，置 4℃ 贮存，复印滤膜取出后，溶菌并将释放出来的 DNA 结合并固定在滤膜上。

3. 溶菌并将 DNA 变性结合在滤膜上：

方法一：

(1) 用 8 张适当大小和形状的新华 1 号滤纸分别紧贴于 4 只较大的玻璃平皿底部 (每个平皿 2 张滤纸)，4 只玻璃平皿分别用 A、10% SDS；B、0.5mol/L NaOH；1.5mol/L NaCl；C、1.5mol/L NaCl、0.5mol/L Tris·Cl (pH8.0)；D、2 × SSPE 四种溶液浸泡湿润，倒出多余液体。

(2) 将转移含有菌落的硝酸纤维素薄膜菌落面朝上放置于泡湿的新华滤纸上，A 溶液浸湿的滤纸上放置 3 分钟，用 B、C、D 溶液浸湿的滤纸上分别各放置 5 分钟。

(3) 最后将滤膜含菌落面朝上放置于一张干新华 1 号滤纸上，室温干燥 30 ~ 60 分钟，将滤膜夹于

两张新华滤纸中间，真空 80℃ 烤 2 小时固定滤膜上 DNA，即可用于分子杂交。

方法二：

(1) 用一张保鲜膜在其上另加入 0.75ml 0.5mol/L 的 NaOH，形成一个小洼，将含菌落的滤膜面朝上放置于小洼上，使滤膜均匀浸湿，放置 2~3 分钟，然后用干纸巾吸渍滤膜后，再用 0.75ml 0.5mol/L NaOH 重复操作一次。

(2) 吸渍滤膜后，将滤膜转移到含 0.75ml 1mol/L Tris·Cl (pH7.4) 的保鲜膜上，中和 5 分钟，并重复一次。

(3) 吸渍滤膜并转移至含 0.75ml 的 1.75mol/L NaCl, 0.5mol/L Tris·Cl (pH7.6) 溶液的保鲜膜上，5 分钟后，吸渍滤膜并转移至一张干的新华滤纸上室温干燥 30~60 分钟。

(4) 将滤膜夹在两张新华滤纸中间，真空 80℃ 烤 2 小时，即可用于分子杂交。

4. λ 噬菌体的转移：

方法一：本法适用于直径为 150mm 的培养皿中筛选 5×10^4 个噬菌斑。

(1) 提前 2 天预先制备琼脂平板，使用前继续 37℃ 条件下干燥数小时。

(2) 将数份包装混合物或含有 50 000 个噬菌体颗粒以内的 λ 噬菌体原液 50 μ l 与 0.3ml 制备好的铺板用细菌混合，37℃ 培养 20 分钟。

(3) 加入 6.5ml 融化 (50℃) 上层琼脂糖 (0.7%)，灌注在 150mm 直径的琼脂板上，37℃ 培养至噬菌斑达 1.5mm 大小且彼此恰好接触 (10~12 小时)，但不能出现融合裂解。

(4) 将平板移至 4℃ 冷却 1 小时，使上层琼脂糖更好地凝固。

(5) 小心将编好号的硝酸纤维素滤膜，铺于上层琼脂糖表面与噬菌斑接触，用带防水绘图墨水的 18 号针头扎穿滤膜及其下的琼脂，制备 3 个不对称的标记点，注意戴手套操作，穿孔作标记时勿移动滤膜。

(6) 30~60 秒钟后，用平头镊剥离第一张滤膜，依次浸入变性液 (1.5mol/L NaCl, 0.5mol/L NaOH) 30~60 秒钟，中和液 (1.5mol/L NaCl, 0.5mol/L Tris·Cl, pH8.0) 5 分钟，然后用 2 \times SSPE 溶液漂洗滤膜，并放在新华滤纸上干燥，所有操作中滤膜含 DNA 面朝上。

(7) 将第二张滤膜铺于同一平板上，并在第一张滤膜的相同位置用防水墨水标记，1~2 分钟后剥离滤膜，按步骤 (6) 方法变性、中和 DNA，一个平板可以复印 7 张滤膜，以后的复印依次延长 30 秒钟。

(8) 待滤膜干燥后，夹在两张新华滤纸之间，真空 80℃ 烤 2 小时，使 DNA 固定在滤膜上。

(9) 不立即进行杂交的滤膜可在室温真空保存。

方法二：

本法直接在硝酸纤维膜上扩增，使得杂交信号大大增强。

(1) 制备噬菌体平板 (同方法一中步骤 4)，同时准备新鲜过夜生长的宿主细菌和编好号的无菌硝酸纤维素滤膜。

(2) 将过夜培养菌用培养基稀释 10 倍，然后把无菌的滤膜浸于细胞悬浮液中，取出后置于新华 1 号滤膜上在超净台中完全干燥 1~2 小时。

(3) 将含细菌的滤膜小心放置于制备好的噬菌体琼脂平板上，用含防水墨水的 18 号针头标定滤膜与琼脂，然后将平板放置 4℃ 冰箱 5 分钟，使 λ 噬菌体转移。

(4) 小心从琼脂板中取出滤膜，含 λ 噬菌体面朝上，放置于一新的琼脂平板中，重复步骤 (3)、(4) 制备下一张滤膜，主平板用石蜡膜封严后，倒置于 4℃ 保存。

(5) 含复印滤膜菌面朝上铺于一个无细菌和噬菌体的琼脂平板中，置 37℃ 培养 6~12 小时，滤膜上将长出噬菌斑。

(6) 取出 λ 噬菌体扩增后的复印膜，放在饱浸变性液的新华 1 号滤纸上 5 分钟，移至饱浸中和液的

滤纸上 5 分钟, 最后移至 $2 \times \text{SSPE}$ 滤纸上 5 分钟, 也可用适当波长的紫外线照射, 快速固定 DNA。

(7) 空气中干燥滤膜, 然后 80°C 真空烤 2 小时, 固定 DNA。

5. 转移 λ 噬菌体或菌落的硝酸纤维素滤膜杂交:

λ 噬菌体或菌落原位杂交方法中, 探针的标记, 杂交方法与一般核酸杂交方法大致相同, 请参阅本书有关章节。但在杂交前, 转移有 λ 噬菌体或菌落的硝酸纤维素滤膜应该预先处理。

(1) 将烘烤固定 DNA 的滤膜用 $6 \times \text{SSC}$ 浸湿 5 分钟, 然后转移至一适当大小的平底塑料盒中。

(2) 加入 100 ~ 300ml 预洗液, 42°C 慢速回旋摇荡 1 ~ 2 小时。

50mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

1mol/L NaCl

1mmol/L EDTA

0.1% SDS

(3) 倒出预洗液, 换预杂交液 60 ~ 100ml 42°C 保温, 摇荡 4 ~ 6 小时, 以下步骤同常规核酸杂交操作方法。

7.8 亚克隆技术

以 pGEM 载体为例。

1. 载体和 DNA 插入片的准备:

根据载体的克隆位点和 DNA 插入片段具体情况, 选择适当的内切酶位点进行载体和 DNA 插入片的酶切制备, 回收足量的 DNA。如果载体仅用单酶切割, 不管产生的是平末端还是粘性末端, 均应使用碱性磷酸酶对酶切后的载体 DNA 进行 5' 端去磷酸化处理, 以减低载体在连接时自身环化的几率。

操作步骤:

(1) 载体和 DNA 插入片段的酶切:

载体或含插入片段的 DNA	5 μg
适当的内切酶 $10 \times$ 反应缓冲液	5 μl
1mg/ml 乙酰化 BSA (非必须)	5 μl
适当的限制性内切酶	5 ~ 25U
加去离子双蒸水至终体积	50 μl
保温 1 ~ 3 小时。	

(2) 取 0.3 μg DNA 在微型凝胶 (1% 浓度) 上电泳鉴定酶切情况, 然后回收 DNA 片段。

(3) 若载体是单酶切, 则进行 5' 端去磷酸化处理:

1) 小牛肠碱性磷酸酶 (CIAP 或 CIP) 反应缓冲液 ($10 \times$)	10 μl
CIAP	0.01U/pmol DNA 末端
经内切酶完全切割的 DNA 混合液	50 μl
加去离子双蒸水至终体积	100 μl

对于 5' 端突出的 DNA 片段去磷酸化处理, 37°C 保温 60 分钟; 对于 3' 末端突出的粘性末端或平端的 DNA 片段去磷酸化, 37°C 保温 30 分钟, 然后 56°C 再保温 30 分钟。

2) 加 2 μl 0.5mol/L EDTA (pH8.0), 终止去磷酸化反应。

注意: CIAP 能干扰 DNA 的连接和转化效率, 在进行 DNA 连接以前, 应该去除 CIAP。

3) 加等体积 TE 饱和的酚/氯仿混合液, 振荡混匀 1 分钟, $12\,000g$ 离心 2 分钟, 取上层水相再用酚/氯仿抽提 1 次, 然后用氯仿:异戊醇 (24:1) 抽提 1 次。

4) 吸上层水相至 Eppendorf 管中, 加入 0.5 倍体积 7.5mol/L NH_4Ac , 两倍体积乙醇。 -70°C 15 分钟,

然后 12 000g 离心 5 分钟。

(4) 弃上清, DNA 沉淀用 1ml 75% 乙醇漂洗, 离心后, 弃乙醇, 真空干燥 2 分钟后, 加 15 ~ 20 μ l 去离子水溶解 DNA 沉淀, 电泳估计 DNA 浓度。

2. DNA 连接:

根据插入片段和载体的分子量大小, 计算连接体系中需要加入的各 DNA 片段的含量, 一般采用插入片段与载体的比率为 3:1。计算公式如下:

$$\text{插入片段所需量 (ng)} = \frac{\text{载体含量 (ng)} \times \text{插入片段长度 (kb)}}{\text{载体长度}} \times \text{插入片段与载体分子数的比例}$$

在连接反应和以后转化细菌的试验中应该设立以下几个对照组: ①未切割的原始载体; ②切割、脱磷、无插入片段的载体; ③插入片段与载体含量不同比率 (如 1:1、1:3、1:5) 的连接体系。下面以 3.0kb 载体与 0.5 kb 的插入片段的连接为例。

操作步骤:

(1) 连接体系建立 (插入片段:载体 = 3:1)

载体 DNA	100ng
插入片段	500ng
T ₄ DNA 连接酶 (韦氏单位)	1 单位
10 \times T ₄ DNA 连接酶反应缓冲液	2 μ l
去离子双蒸水加至终体积	20 μ l

(2) 15 $^{\circ}$ C 连接 4 ~ 6 小时 (可以按需要延长时间)。在经验不足的情况下, 可以尝试不同温度和时间连接, 如:

4 $^{\circ}$ C	过夜
15 $^{\circ}$ C	4 ~ 6 小时
25 $^{\circ}$ C	1 小时

(3) 取 4 μ l 连接反应混合液 (1/5) 进行微型凝胶电泳分析, 应该在载体及插入片段的条带以后有若干条连续的微弱带型 (已连接并环化的重组分子形成的不同空间构型), 参照未连接的插入片段及载体带型的荧光强弱, 初步估计连接效率。

3. 重组 DNA 转化细菌:

转化所使用的菌株一定要与载体系统要求的一致, 对于 pGEM-3Z 类的载体应该选择含有 F' 因子和 Lac Z Δ M15 基因型的菌株, 如 JM101、JM103、JM109 或 NM522, 而这些使用蓝/白筛选重组子菌落的菌株, 在制备感受态细菌以前, 应该用 M9 琼脂平板进行筛选, 该平板上含 F' 因子的细菌才能正常生长。

(1) 感受态细菌制备:

1) 在 M9 琼脂平板上, 用 JM109 或其它适当菌株画线, 37 $^{\circ}$ C 温箱培养 3 ~ 5 天左右, 可见含 F' 因子的菌落长出。

2) 挑单个菌落接种到 25ml LB 培养基中, 强烈摇荡 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。

3) 0.5ml 过夜培养物, 接种到 100ml LB 培养基 (用 500ml 的三角瓶做容器) 中, 150 ~ 200r/min 振荡培养, 直至培养液中的细菌浓度达到 OD₆₀₀ 为 0.45 ~ 0.55 (细菌的对数期生长)。

4) 培养物冰上放置 2 小时, 使细菌代谢减缓, 然后 2 500g, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 ~ 20 分钟收集菌体。

5) 将细菌悬浮在预冷的 10 ~ 20ml 致敏缓冲液中, 然后用同样的缓冲液将体积加至 100ml, 冰上放置 45 分钟。

6) 1 800g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟, 弃上清, 然后重新将细菌悬浮在 25ml 致敏缓冲液中。

7) 缓慢滴入 80% 甘油 (灭菌) 至终浓度为 15%, 轻轻混匀, 将细菌分装成每份 0.2ml 干冰中放置 1 小时, 转入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱贮存。

(2) 感受态细菌转化:

1) 新鲜制备的感受态细菌转化:

- a. 将 0.2ml 感受态细菌 (如 JM109) 置于冰上。
- b. 加入 3 μ l DMSO 短暂混匀, 再加入 10~20ng 质粒 DNA。

注意: DMSO 应分装成小管贮于冰箱, 不应反复解冻使用。

- c. 冰上放置 30 分钟。
- d. 42℃ 热休克 1~2 分钟, 放置冰上 1 分钟, 对于有些菌株可提高转化效率, 有些人认为不必要, 可根据个人爱好选择。
- e. 加入 1ml LB 培养基, 轻轻摇荡, 37℃ 培养 1 小时, 使得细菌恢复正常并让氨苄青霉素抗性基因表达。

f. 取 50 μ l、100 μ l、200 μ l 细菌培养液, 分别涂布含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上。

g. 37℃ 培养 12~24 小时, 可见菌落长出。

2) 冻融的感受态细胞用于转化:

- a. 从 -80℃ 冰箱中取出感受态细菌, 置冰上 5 分钟至刚好解冻。
- b. 用手指轻弹管壁混匀细菌, 取出 100 μ l 感受态细菌至预冷管中。
- c. 加入 1~50ng DNA (容积不要大于 10 μ l), 用微量移液器吸头搅动两次, 以便 DNA 扩散均匀, 用手指弹动管壁数次。
- d. 马上放置冰上 30 分钟。

表 7-6 亚克隆技术障碍分析

问 题	可能的原因	可供参考的解决办法
极少或没有 转化菌落	感受态细胞失活	-80℃ 冰贮的感受态细胞在 5~6 周以后, 转化率很低。可用一已知标准闭环质粒鉴定感受态细胞的转化效率
	DNA 片段连接不成功加入感受态细胞中 DNA 体积过大	电泳检查连接效率连接后的混合物加至感受态菌中的体积不要超过感受态细菌体积的 10%。
DNA 片段之间没有连接	T4DNA 连接酶反应缓冲液失活	ATP 是 T4 连接酶反应所必需的, 故配制好的 10 \times T4 连接酶缓冲液, 应该分成小管多份贮存于 -20℃, 多次的冻融或贮存于 4℃ 会导致 ATP 的降解
	载体末端与插入片段末端之间难以连接	有经验表明, 理论上即使两个内切酶粘性末端可以互补对接, 却很难粘连。这种情况, 往往发生在载体多克隆位点邻近的两个不同内切酶完全切割载体后的线性 DNA
假阳性克隆 背景高	对于单一酶切割的线性载体 DNA 脱磷不够完全。	连接脱磷酸后的线性 DNA, 然后电泳分析连接效果, 以推测脱磷效果
	培养琼脂板中的抗生素浓度低	用无 DNA 转化的感受态细菌铺板, 若有菌落生长, 说明其中抗生素浓度不够
	载体 DNA 与插入片段的分子比率过高, 导致载体自身连接的机率增高	减低连接体系中载体 DNA 的含量

- e. 42℃水浴热休克 45~50 秒, 注意不要摇动离心管。
- f. 迅速置冰上 2 分钟。
- g. 加入 900 μ l 室温的 SOC 培养基, 37℃、225r/min 振荡, 振荡培养 60 分钟。
- h. 取 100~200 μ l 转化菌涂布平板。

4. 重组菌落筛选:

pGEM 载体系统除含氨苄青霉素抗性筛选标志以外, 还含有 lacZ 编码 α -肽基因, 为阳性菌落的筛选提供了准确、方便的筛选标志。

转化细菌可以直接涂布在含 100 μ g/ml Amp、0.5mmol/L IPTG 和 40 μ g/ml X-gal 琼脂板上, 这种琼脂板的制作方法是, 先铺琼脂, 待凝固后, 再在含氨苄青霉素的琼脂表面涂匀 20 μ l 50mg/ml X-gal 和 100 μ l 100mmol/L IPTG, 静置半小时, 这两种化合物渗入琼脂后, 再涂布转化菌。一般来说, 含有活性半乳糖苷酶的细菌比无此活性酶的细菌生长慢, 过夜培养后, 可见到毫米大小的白色菌落, 而蓝色菌落只有针尖大小。也可以待菌落长出后, 制备 0.35% 的顶层 LB 琼脂 (0.5mmol/L IPTG, 40 μ g/ml X-gal), 琼脂冷却到 42℃时, 再铺在菌落上, 3~4 小时后, 阴性菌落开始变蓝。

(李尹雄 文 袁建刚 审)

7.9 高效率感受态细胞的制备

在分子生物学日益普及的今天, 基因操作已经成为一项必须的常规技术。体外连接的 DNA 重组分子导入合适的受体细胞才能大量地进行复制, 增殖和表达, 从而得到大量的重组基因。尽管 DNA 体外聚合酶链式反应 (PCR) 体外转录及翻译也能部分达到上述目的, 但毕竟受到了体外操作的许多限制。使用最频繁的仍是将重组子导入受体细胞后扩增的方法。尤以转化为主。

在基因克隆技术中, 转化特指以质粒 DNA 或以质粒为载体构件的重组子导入细菌的过程。转化是一个遗传学的概念, 细菌细胞的生物学特性由于吸收外源 DNA 发生可遗传的改变叫转化。当细菌处于容易吸收外源 DNA 的状态称为感受态。重组 DNA 转化细菌的技术操作关键就是通过化学及其他方法, 人工诱导细菌细胞进入一个敏感的感受态, 以利于外源 DNA 进入细菌内。最早是由 Mandel 和 Higa 于 1970 年发现细菌经过冰冷的 CaCl_2 溶液处理及短暂热休克后, 容易被 λ 噬菌体感染。1972 年, Cohen 证明用同样的方法可将质粒 DNA 转进细菌。它的主要原理是, 当细菌处于 0℃的 CaCl_2 低渗溶液中时, 菌体细胞膨胀成球形, 同时转化混合物中的 DNA 形成的抗 DNase 的羟基-钙磷酸复合物粘附于细菌表面, 经过 42℃短时间热冲击处理, 促进细胞吸收 DNA 复合物, 在丰富培养基上生长 1 小时后, 球状细胞复原并分裂增殖, 重组子中的基因在被转化的细菌中得到表达, 在选择性培养基平板上即可筛选出所需的转化子。目前可以通过两种途径得到大肠杆菌感受态细胞的储存物: 第一种是通过商业途径购买冻存的感受态细菌, 其转化效率十分可靠, 一般可达到 10^8 转化子/ μ g 质粒 DNA (pBR322), 但是相当昂贵, 因此我们通常选择的是自制感受态细菌的储存物。一般实验室中所采用的感受态细胞的制备方法大多是以 Mandel 和 Higa 的 CaCl_2 低渗处理方法为基础的各种改进方法, 这些方法各有特点, 均比较稳定, 转化效率一般在 $10^5 \sim 10^7$ 转化子/ μ g 质粒 DNA (pBR322)。其转化程序一般为: 4℃冰浴 30 分钟, 42℃热激 90 秒, 冰浴 3~5 分钟, 在无抗生素的培养基中于 37℃震荡复苏约 1 小时, 取适量的菌液涂布于选择性培养基平板上培养, 即可得到相应的转化子。这些方法基本可以满足一般基因克隆的需要, 但对于那些对转化效率要求更高的场合, 如某些平端连接反应和 cDNA 文库的构建, 由于 DNA 样品量的限制, 通常途径制备的感受态细胞就略显不足了。近些年来兴起了电转化法, 可达到 10^9 转化子/ μ g 质粒 DNA。但是所需的电转化设备十分昂贵, 并且 DNA 样品需脱盐, 既费时又费力不能被一般的实验室所采用。

7.9.1 感受态细胞制备的影响因素

为了能够得到高效的感受态细胞,很多科学家进行了大量的探索性研究,并且得到了一些很有意义的结果:

7.9.1.1. 感受态细菌的基因型对于转化效率的影响

David 等人发现,大肠杆菌中 *recA* 基因缺失的菌株同未缺失的菌株相比其对于质粒、粘粒等的转化效率更高。Umemoto 则发现,对于基因型分别为 *crp*⁺ 和 *crp*⁻ 的大肠杆菌所制备的感受态,其转化效率有显著的不同,*crp*⁻ 基因型的转化效率要比 *crp*⁺ 的感受态高出很多。*crp* 基因是目前所发现的第一种能特异地影响转化效率的基因。

7.9.1.2 菌株的生长条件的影响

几乎所有的研究者都发现,从 -70℃ 冰箱中的冻存管中直接划平板,再转接至液体培养基中震荡培养所制备的感受态细胞转化效果最佳。同时,收获菌体时细菌的密度及生长情况也很重要。根据不同的培养条件,其得到最佳感受态效率时菌液的光吸收值不同,如 Tang X 等人发现,在 37℃ 培养时,从培养液中收集菌体所得到的感受态细胞转化效率同菌液的光吸收值之间存在两个峰值,即 $A_{600} = 0.3 \sim 0.4$ 和 $A_{600} = 0.94 \sim 0.95$ 时所制备的感受态细胞转化效率最高,尤其是后者,可达到近 10^9 转化子/ μg 质粒 DNA; 而 Hiroaki Inoue 等则发现在 18℃ 下剧烈震荡培养可使细菌达到一种均一的生长状态,有助于提高转化效率,此时收获菌体的最佳时机为 $A_{600} = 0.75$,再采用相应的处理方法可以得到转化效率最高达 $(1 \sim 3) \times 10^9$ 转化子/ μg pBR322 质粒 DNA; 当在室温 (25℃) 下生长时,制备的感受态细胞转化效率仍然相当不错,只比 18℃ 的条件略低。

7.9.1.3 转化缓冲液的影响

无可否认,缓冲体系对于转化效率的影响是最直接的。缓冲液中成分的改变往往会导致转化效率—两个数量级的波动。

1. 缓冲液的 pH 值十分关键:

Chung 等发现,当转化缓冲液的 pH 值 > 8 或者 < 4 时,基本上得不到任何转化子,可能是此时细胞的活力已大大受损了; 而当 pH 值在 4 ~ 8 之间时,转化效率呈一种钟形曲线,其峰值大约在 6.4 ~ 6.8 之间。Hiroaki 的方法中由于其转化缓冲液中存在锰离子,当 pH 值 > 7 会导致沉淀,因而其 pH 值选择为 6.7。Nishimura 及 Brian 等人所采用的缓冲体系也均在此范围中,为中性或偏弱酸性。

2. 缓冲液中的阳离子:

一致的意见是真正起作用的是缓冲液中的二价阳离子,常见的有 Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} 等。Chung 等经过比较发现, Zn^{2+} 在浓度较低时基本上无转化诱导功能,相反 Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} 却十分有效。同 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 相比, Mg^{2+} 在一个相对较大的浓度范围里均能保持一个较高的转化诱导效率因而其在转化缓冲液中采用 20 ~ 50mmol/L 的 Mg^{2+} 。Hiroaki 也发现,在由 Okayama 等人对 Hanahan 方法所改进后的 FTB 液中所含的如:氯化六氨合高钴, CoSO_4 , LiCl , RbCl 对于转化的抑制作用大于它们的诱导作用,为了得到更高的转化效率, Hiroaki 采用 MnCl_2 , CaCl_2 , KCl 为缓冲体系提供阳离子, 10mmol/L Pipes (pH6.7) 或 Hepes (pH6.7) 提供缓冲能力,最终可得到 $(1 \sim 3) \times 10^9$ 转化子/ μg pBR322。

3. PEG 的作用:

Nishimura 及 Chung 都发现,在转化缓冲液中适量的 PEG 能显著提高转化效率。当 PEG 的浓度超出 20% 或低于 5% 时无诱导作用, 10% 时效果最好。PEG 的聚合度也有一定的影响,在分子量为 200 ~ 15 000 的 PEG 中,以 3350 和 8000 的诱导效果最佳。

4. 冻存保护剂的影响:

在常规的 CaCl_2 制备方法中经常采用的是 10% 的甘油,这样可以使细胞在冻存过程中不至于形成冰

晶损伤细胞活性。但进一步的研究表明：转化缓冲液中甘油的引入，尽管是纯度很高的甘油，对于感受态细胞的转化效率也只有抑制作用，这恰恰同制备电转化感受态细胞的研究结论是相同的，即甘油会使转化效率降低约 30% (Michelsen BK)。而相反的，在 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 等存在时，适量添加另一种经常用作保护剂的化学试剂 DMSO 能显著提高转化效率。DMSO 的最佳浓度约在 5% 到 7% 之间。DMSO 的氧化产物对于转化效率没有什么不良的影响，且从一般途径购买的 DMSO 即可发挥良好的作用。加入 DMSO 后，制备的感受态细胞可在液氮中存放 30 天以上而无明显的活力损失。

7.9.1.4 转化步骤的影响

在大多数情况下，转化过程受到转化体系中 DNA 的量的影响。经过比较发现，当 DNA 的量在 10pg ~ 1ng 之间时，转化效率变化不大，但 DNA 的量超过 10ng 以上时，其效率则会大大下降。而 DNA 的体积与转化效率无关。加入 DNA 后，通常的步骤是冰浴约 30 分钟，热激 90 秒，在无抗生素的培养基中复苏约 1 小时后铺板。实验表明，冰浴时间已经能得到一个较高的转化率，更长的冰浴时间 (1 小时) 的影响也不明显。热激的作用也并不像我们通常想象的那么重要，条件并不严格。Hiroaki 等对热激的温度 (35℃ ~ 60℃) 及热激时间 (0 ~ 90 秒) 进行比较后发现：最佳的条件应为 42℃ 30 秒。而在 Chung 的方法中，热激是不必要的甚至有害的。更有甚者，Brian Pope 最新的发现表明，在不进行 42℃ 热激时，铺板前将平板预先温育到 37℃ 可明显提高转化效率；对于常规的 $CaCl_2$ 法制备的感受态细胞，标准的 1.5 小时的转化方案可在不到 5 分钟内完成，并不需要任何特殊的设备或试剂，具体为将感受态细胞同 DNA 冰浴 1 ~ 5 分钟，直接涂布于预热至 37℃ 的选择性培养基上，其结果不但是大大节省了时间，而且可使转化效率提高一倍。

7.9.1.5 质粒分子量大小的影响

当质粒在大约 4 ~ 7.3kb 时，所得到的转化效率基本一致；当质粒进一步增大时，如 10.3kb, 13.2kb, 17.6kb 时，其对应的转化率只有 pBR322 (4.4kb) 的 46%，26% 和 15%，因而随着质粒分子量的增大，其转化效率会相应地降低。但这一范围已经足可满足常规的基因克隆和文库构建的需要。对于较大分子量质粒的转化，Yao 等人发现，在进行转化之前将质粒先用 DNA 解旋酶 (DNA gyrase) 处理，分别可使大小为 6.8kb, 14.8kb, 19.7kb 的重组质粒转化效率提高 2 倍，3 倍和 9 倍。有趣的是质粒越大，解旋酶的作用越明显。对于化学转化法和电穿孔转化法，DNA 解旋酶对于提高大分子量重组质粒转化效率的作用都是一致的。

7.9.1.6 其他因素的影响

除了上面所讨论的几个方面外，还存在着其他一些意想不到的因素。如 Hiroaki 在研究中发现，在转化过程中一定不能使用玻璃管，否则转化效率会大幅度降低 (可降低 10 倍)。复苏期间，采用普通 LB 培养基或是加富培养基所得到的效果相差很大；此外，Michelsen 发现，在电穿孔转化前，仅是简单地将 T4 DNA 连接酶加热失活就可以使转化子的数目增加 260 倍。尽管对于化学转化法未见类似的报道，但估计可能同样有效。

综上所述，尽管已有很多人对于如何提高感受态细胞的转化效率进行了大量的探索性研究，并发展了许多各不相同的试剂。然而这些试剂的机制尚不清楚，转化的机制仍是扑朔迷离。转化率的提高仍是经验性的实验结果，但相对于目前的经典 $CaCl_2$ 来说，已经有了相当大的进步。而且各有自己的独到之处，有的转化效率极高，可与电穿孔法相媲美，有的简便易行，制备过程大大简化，却不降低转化的效率。下面介绍几种有代表性的方法：

7.9.2 高效率感受态细胞制备方法

7.9.2.1 Nishimura 法

主要过程为：0.5ml 过夜培养物转接于 50ml 培养基 A 中 (含 10mmol/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 及 0.2% 葡萄糖的 LB 培养基) 通气培养至指数中期，冰浴 10 分钟，4℃ 1500g 离心 10 分钟，重悬于 0.5ml 冰预冷的培

培养基 A 中, 再加入 2.5ml 储存液 [含 36% 甘油, 12% PEG (分子量 7 500), 12mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的 LB 培养基, pH7.0, 过滤除菌], 轻轻混匀即可。感受态细胞冻存时不需液氮快速冷冻, 但此前所有步骤均需冰上操作。转化时将冻存于 -80°C 的细胞置于冰上融化, 立即加入 $5\mu\text{l}$ pBR322 (约 100pg), 4°C 15 ~ 30 分钟, 42°C 热激 60 秒, 冰浴 1 ~ 2 分钟, 用 37°C 预热的 LB 培养基稀释 10 倍后 37°C 振荡温育 1 小时, 涂布于含 $20\mu\text{g}$ 氨苄青霉素/ml 的 LB 平板, 37°C 温育 20 小时后计数。结果对 HB101, JM103, DH1 这三种不同的菌株, 转化效率均在 10^8 转化子/ μg 质粒 DNA 左右。

7.9.2.2 一步制备法

此法的特点是只需加入一种试剂即可, 且不需另加保护剂就可以直接冻存, 转化时不需热激。

主要过程为: 新鲜的过夜培养物按 1% 的接种量转接于事先温育至 37°C 的 LB 培养基中, 37°C 振摇 (225r/min) 至 OD_{600} 值为 0.3 ~ 0.4。 4°C 1 000g 离心 10 分钟, 将菌体重悬于 1/10 原体积的冰预冷的 TSS 液中即可 [TSS 液为含 10% PEG (分子量 3 500 或 8 000), 5% DMSO, 20 ~ 50mmol/L Mg^{2+} 的 LB 培养基, 调 pH 至 6.5]。若长期保存, 应将细胞立即置于干冰/酒精浴中, 并保存于 -70°C 。转化时, 取 0.1ml 新鲜菌液置于冰预冷的聚丙烯酰胺管中, 加入质粒后轻轻混匀, (冻存细胞应置于冰上缓慢融化后立即使用。) 混合液于 4°C 保温 5 ~ 60 分钟均可。加入 0.9ml 含 20mmol/L 葡萄糖的 TSS 液, 37°C 振摇 1 小时使抗生素抗性基因表达, 涂布平板。此法快速简便, 且对上面的三种菌, 其转化效率也均达到 10^7 转化子/ μg 质粒 DNA 以上。

7.9.2.3 超高效法

此法可制备超级感受态细胞, 转化效率可达 $(1 \sim 3) \times 10^9$ 转化子/ μg 质粒 DNA, 并可在液氮中保存 40 天以上而不损失转化效率; 此外, 与电转化相比, 它几乎不受到 DNA 样品中的盐浓度的干扰。因此对于只有极少量的 RNA 样品, 却需要制备高分辨率的 cDNA 文库时是非常有用的。

主要应用的试剂是一种转化缓冲液, 其主要成分是 10mmol/L Pipes, 55mmol/L MnCl_2 , 15mmol/L CaCl_2 , 250mmol/L KCl。除 MnCl_2 外, 其它成分溶解后用 KOH 调 pH 至 6.7, 再加入 MnCl_2 。溶液用 0.45mm 的滤膜除菌, 4°C 储存。

制备感受态的过程为: 在新鲜培养的平板上挑取一个大的菌落, 接种于 250ml SOB 培养基中, 18°C 下剧烈振荡, 培养至 OD_{600} 值为 0.6, 冰浴 10 分钟, 4°C 下 2 500g 离心 10 分钟, 悬浮于 80ml 冰预冷的转化缓冲液中, 冰浴 10 分钟, 4°C 离心, 菌体重悬于 20ml 冰预冷的转化缓冲液中。加入 DMSO 并轻轻旋转管壁至终浓度为 7%; 冰浴 10 分钟后, 将菌液分装至细胞冻存管中; 转化时, 取出感受态细胞, 室温融化, 置于冰上。每管 ($200\mu\text{l}$) 中加入 1 ~ $5\mu\text{l}$ DNA 溶液, 冰浴 30 分钟, 42°C 热激 30 秒后仍置于冰上, 补充 0.8ml SOC 培养基, 37°C 剧烈振摇 1 小时, 取一定数量的菌液涂布或倾注平板, 37°C 培养过夜。此法对 HB101, JM109, 和 DH5 均获得了超过 1×10^9 转化子/ μg 质粒 DNA 的极为理想的转化效率。利用此法, Hiroaki 等人仅用 $1\mu\text{gmRNA}$ 就制备了超过 10^7 个不同克隆的 cDNA 文库。可见此法的效率之高。

7.9.2.4 高效电转法

由 Michelsen 对标准的电穿孔法改进而来。

主要步骤为: 在大肠杆菌生长至光吸收值为 $A_{600} = 0.55 \sim 0.65$ 时收集菌体分别用 1 倍体积, 1/2 倍, 和 1/40 倍体积的 1mmol/L Hepes (pH7.0) 清洗细胞, 并最终用 1/500 体积的 1mmol/L Hepes (pH7.0) 重悬细胞, 使菌体浓度约为 6×10^{10} 至 6×10^{11} 细胞/ml (冻存的感受态细胞可储存于 10% 的甘油中, 但会使转化效率降低 30%), 对纯质粒的转化效率可达 1.3×10^9 转化子/ μg 质粒 DNA。此外, 对于连接体系中的 DNA 的转化, 一定要预先将 T4 DNA 连接酶热变性, 这样可使转化子的数目增加 260 倍。

上面介绍的这几种方法, 都是比较具有代表性的。并同常见的 CaCl_2 法有明显不同, 当然还有其他很多种制备感受态细胞的方法, 有的甚至效果更佳, 但由于篇幅所限, 无法一一列举。但由此我们可看出, 尽管感受态细胞的制备作为一种方法被提出已经有相当一段长的时间, 但仍然在不断地完善和更新。

参 考 文 献

1. Wu R, et al. *Methods in Enzymology*, Vol. 100, Recombinant DNA, Part B. Academic Press Inc, 1983
2. Wu R, et al. *Methods in Enzymology*, Vol. 154, Recombinant DNA, Part D. Academic Press Inc, 1988
3. Sambrook J, et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
4. Colin RH, et al. *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley & Sons Ltd, 1990
5. Brian W, et al. *Genetics of Microbes*. 2nd ed. Blackie & Son Ltd, 1990
6. Michael M, et al. *Methods in Enzymology, Molecular Genetics of Mammalian Cells*. Academic Press Inc, 1987
7. Wu R, et al. *Methods in Enzymology*, Vol. 101, Recombinant DNA, Part C. Academic Press Inc, 1983
8. Novick P, et al. *Molecular Biology of the Streptococci*. VCH Publishers Inc, 1991
9. Watson JD, et al. *Recombinant DNA, A Short Course*. Scientific American Inc, 1983
10. Watson JD. *Molecular Biology of the Gene*. 5th ed., WA Benjamin Inc, 1988
11. Winnacker EL. *From Gene to Clones: Introduction to Gene Technology*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1987
12. Mertz JE, et al. Cleavage of DNA by RI restriction endonuclease generates cohesive ends. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1972, 69: 3370
13. Jackson D, et al. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular sr40 DNA molecules containing lambda phage genes and galactose operon of escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1990, 87:8095
14. Short JM, et al. λ ZAP: A bacteriophage λ expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16:7583
15. Mandel M, et al. Calcium - dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, 1970, 53 (1) :159 - 162
16. Cohen SN; Chang AC; Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R - factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, 69 (8) :2110 ~ 2114
17. Kunit DM. Escherichia coli recA deletion strains that are highly competent for transformation and for in vivo phage packaging. *Gene*, 1989, 82 (2) :313 ~ 315
18. Umemoto A, et al. The effect of the crp genotypes on the transformation efficiency in Escherichia coli. *DNA Res*, 1996, 3 (2) : 93 ~ 94
19. Tang X, et al. The optimization of preparations of competent cells for transformation of E. coli. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22 (14) :2857 ~ 2858
20. Inoue H, et al. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, 1990, 96 (1) :23 ~ 28
21. Chung CT, et al. One - step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86 (7) :2172 ~ 2175
22. Nishimura A, et al. A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18 (20) :6169.
23. Pope B, et al. High efficiency 5 min transformation of Escherichia coli *Nucleic Acids Res*, 1996, 24 (3) :536 ~ 537
24. Hanahan D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 1983, 166 (4) :557 ~ 580
25. Chen C, et al. High - efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*, 1987 7 (8) :2745 ~ 2752
26. Michelsen BK. Transformation of Escherichia coli increases 260 - fold upon inactivation of T4 DNA ligase. *Anal Biochem*, 1995, 225 (1) :172 ~ 174
27. Hengen PN. Methods and reagents. Better competent cells and DNA polymerase contaminants. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19 (10) :426 ~ 427
28. Yao Z, et al. DNA gyrase improves DNA transformation of E. coli cells with large recombinant plasmids. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23 (16) :3353 ~ 3354

8. 基因组文库

基因工程技术的迅速发展使人们对生物体基因的结构、功能、表达及其调控的研究深入到分子水平,而对特定基因片段的分离和获得是上述研究的基础。完整的基因组文库 (genomic library) 的构建使任何 DNA 片段的筛选和获得成为可能。基因组文库是含有某种生物体全部基因的随机片段的重组 DNA 克隆群体,构建基因组文库时,先将原核或真核细胞染色体 DNA 提纯,通过机械剪切或酶切使之成为一定大小的片段,将其与适当的载体(一般为 λ 噬菌体)相连接,经体外包装,转染细菌,得到一组含有不同 DNA 片段的重组噬菌体颗粒。这个文库中将含有基因组内全部基因片段,它像一个贮存有基因组全部序列的信息库,故称为基因组文库。含有感兴趣的基因片段的重组子,可以通过标记探针与基因组文库中的重组子杂交等方法而筛选出来,所得到的克隆经过纯化和扩增,可用于进一步的研究。

8.1 构建基因组文库的载体

常用的构建真核细胞基因组文库的载体是 λ 噬菌体和粘性质粒。自1974年,Murry等人提出 λ 噬菌体可以改建成克隆外源基因的载体后,不断有各种 λ 载体构建成功。一般来说, λ 噬菌体作为载体分为两类,即插入型载体和取代型载体。插入型载体在 λ 噬菌体的非必需基因内,有一种或多种限制性内切酶的单一位点供外源基因片段插入,产生的重组子并不丢失载体上的任何一段基因,所以它比原载体要长。由于超过野生型 λ DNA分子长度5%的重组噬菌体的包装效率要比正常长度的噬菌体DNA低得多,因而插入型载体的容量较小,最多为9kb左右。取代型载体在 λ 噬菌体DNA的中央非必需区,具有同种限制性内切酶的两个酶切位点,所以用同一种限制性内切酶处理载体,可以将载体切割成三段,左、右两臂和中央片段,用适当方法分离得到左、右两臂,去除中央片段,然后与外源DNA片段连接,产生中央区被外源基因取代的 λ DNA,由于少于 λ DNA长度78%或多于其长度105%的重组子,不能被有效地包装成噬菌体颗粒,所以重组 λ DNA的包装范围是38~51kb,两臂长度之和约为29kb,因此插入片段的长度范围为9~22kb。当插入片段的大小接近野生型48.50kb的长度时,重组DNA的包装效率较高,当重组DNA的大小接近极限值时,包装效率较低,因此插入片段的最适值为19~20kb。

粘性质粒是构建基因组文库的另一个常用载体,与 λ 噬菌体相比,它具有质粒和 λ 噬菌体两种载体的性质,它具有质粒的复制起始点及药物抗性筛选标记,因此能像质粒一样复制及转化入细菌中。同时,它又具有 λ 噬菌体的cos位点,能像 λ DNA一样在体外被包装成病毒颗粒,并感染适当的宿主菌。进入细胞后,其增殖过程与质粒复制相同,因而产生的重组子为菌落而不是噬菌斑。粘性质粒本身长度4~6kb,与 λ 载体相比其优点在于能容纳较大片段的外源基因,其最大长度可达46kb,因而可以缩小基因文库的规模。

由于有些真核基因较大(几百至几千kb),用 λ 噬菌体及粘性质粒做载体不能得到完整的基因序列,根据人类染色体全部碱基序列测定工作的需要,人们正在探索一种新的容量更大的载体系统——酵母人工染色体克隆系统(yeast artificial chromosome cloning system)简称YACS。它由Olson等人首次提出,近几年来对酵母染色体结构和功能的研究以及大片段DNA分离技术的应用,促进了这一克隆系统的发展。如:染色体稳定性所需要的顺式调控元件的确定;酵母高效转化系统的发展以及脉冲场凝胶电泳法(pulse field gel electrophoresis,简称PFGE)分离DNA大片段(100~1000kb)等。

酵母人工染色体的克隆步骤与 λ 噬菌体DNA做载体的步骤相似。DNA大片段与人工染色体两“臂”相连接,然后将连接混合物转化入酵母细胞中。人工染色体的每一个臂带有选择性标记,同时又是

DNA 序列的起始点, 在酵母中行使端粒的功能。两臂之一还带有一段 DNA 顺序, 做为染色体复制的起始点, 行使着丝粒的功能, 也称为 ARS (自主复制序列 autonomously replicating sequences)。利用酵母人工染色体的一臂或两臂上的营养标记进行筛选。含有稳定的人工染色体的酵母克隆能在缺乏某种营养的平板上生长。或利用颜色筛选, 含有插入片段的 DNA 克隆使 trRNA 基因的抑制子失活, 在带有琥珀 ade2 基因的酵母菌株中生长形成红色菌落而不是白色菌落。

克隆于人工染色体的基因组 DNA 片段, 其平均长度要求在几百万个碱基对左右, 因而提取 DNA 时应尽量避免打断染色体。这种 DNA 样品用限制性内切酶降解成 200 ~ 500kb 大小的片段, 与经处理的人工染色体的两臂相连接。酵母人工染色体转化入酵母原生质体, 其转化效率约为每微克连接的基因组 DNA 产生 500 个转化子。虽然与细菌转化相比效率较低, 但对于构建完整的哺乳动物基因组 DNA 文库已经足够了。部分酶解片段构建的重叠 DNA 文库, 与 λ DNA 及粘性质粒文库一样能用于染色体步移, 彻底酶解的 DNA 片段构建的文库可用于特定基因片段的分离。

由于酵母人工染色体系统应用历史不长, 有关报道较少, 有些问题尚不明析。例如, 酵母人工染色体的最适及最大长度还不清楚, 也没有资料表明哺乳动物 DNA 重复序列在酵母中增殖时是否会发生重排。虽然我们对这一体系知之甚少, 但对于分离和研究哺乳动物基因组的大片段区域, 酵母人工染色体将是一个很重要的新工具。

8.2 λ 噬菌体载体

8.2.1 应用 λ 噬菌体构建基因组文库的基本步骤

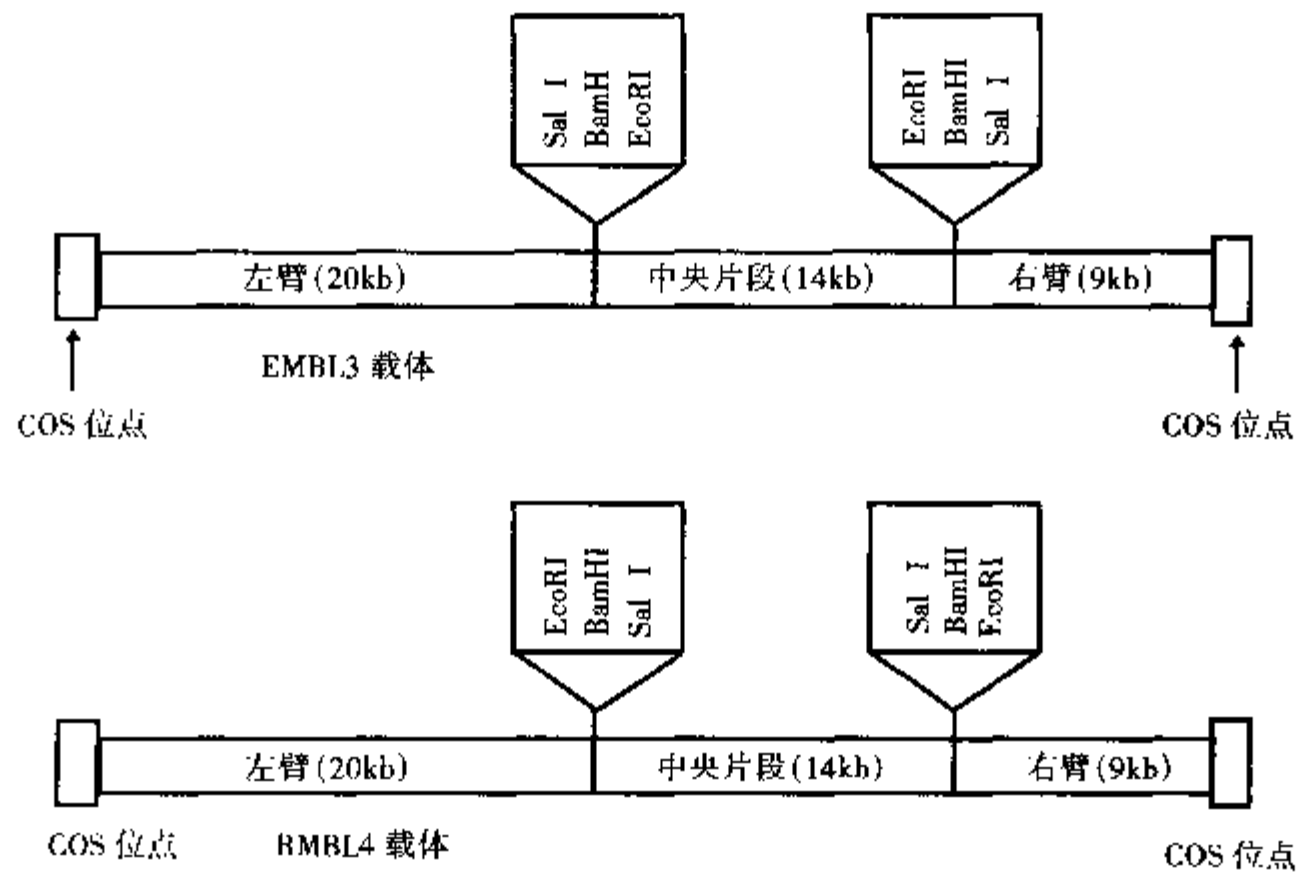
- (1) 准备载体 DNA: 容量为 20 ~ 24kb 的 λ 噬菌体取代型载体, 用适当的限制性内切酶 (如 BamH I) 消化, 分离得到 λ DNA 的左右两臂。
- (2) 提取高分子量真核细胞 DNA: 并选择合适的限制性内切酶 (如 Sau3A I 或 Mbo I) 进行部分降解。
- (3) 分离大小合适的真核 DNA 片段: 应用凝胶电泳法或密度梯度离心法分离长度在 20 ~ 24kb 之间的片段, 这一步可以显著地减少在每个 λ 噬菌体载体中克隆两个以上的基因组 DNA 片段。
- (4) 载体 DNA 与外源 DNA 连接。
- (5) 连接产物在体外进行包装。
- (6) 检测重组噬菌体的滴度, 分装保存。
- (7) 基因组文库的扩增或用于筛选所需要的基因。

8.2.2 几种 λ 噬菌体载体

克隆载体是能携带外源 DNA 进入细胞内并进行扩增的 DNA, 它必须具备以下几个条件: ①具有自我复制能力; ②含有多个限制性内切酶的单一位点; ③具有选择性标记以区别转化与非转化细胞 (如: 抗药性、营养缺陷型以及形成噬菌斑的能力等); ④分子量较小, 便于 DNA 体外操作。 λ 噬菌体 DNA 全长 48.5kb, 是构建基因组文库的常用载体。下面介绍几种取代型 λ DNA 载体。

8.2.2.1 λ EMBL3 和 λ EMBL4

关于 λ 噬菌体的生物学特性, 生活周期及其扩增转染和 DNA 提取在核酸分离和纯化一章中已有介绍, 本节着重介绍 λ 取代型载体的特点。野生型 λ 噬菌体是线性单链 DNA, 全长 48 ~ 502bp, 其中 30% ~ 40% 的基因是噬菌体生长非必需的, 因而这一部分可以被外源 DNA 片段所代替而不影响 λ 噬菌体的生存。图 8-1 所示为 λ EMBL3 和 λ EMBL4 载体。 λ EMBL3 与 λ EMBL4 的区别只在于酶切位点的顺序方向相反, 下面以 λ EMBL3 为例介绍 λ EMBL 载体的应用。

图 8-1 λ EMBL3 和 λ EMBL4 载体

λ EMBL 载体 DNA 包括三个组成部分：左臂约 20kb，右臂约 9kb，中间区约为 14kb。左臂有编码噬菌体头部和尾部蛋白的全部基因，右臂包括 DNA 链的复制起始点和其它必需基因，左右两臂的 5' 末端比 3' 末端多出 12 个核苷酸，而且两者的碱基之间可以互补形成环状 λ DNA 或 λ DNA 串联体，此序列称为 cos 位点，是包装内切酶的识别位点。中间区含有噬菌体整合、重组所需的基因，可被适当长度的外源基因代替而不影响噬菌体的生长、繁殖。

在 λ EMBL3 载体中间区的左右两侧各有 3 个酶切位点：（图 8-1）Sal I，BamH I 和 EcoR I。BamH I 是克隆外源基因的常用位点，因其粘性末端与识别 4 个核苷酸序列的限制性内切酶 Sau 3A I 和 Mbo I 切割所产生的粘性末端一致，所以用 Sau3A I 或 Mbo I 部分酶切处理的染色体 DNA 片段能够与 λ EMBL3 BamH I 酶切产生的片段相连接。用于克隆的 λ EMBL3 载体的处理及其应用过程如图 8-2 所示。

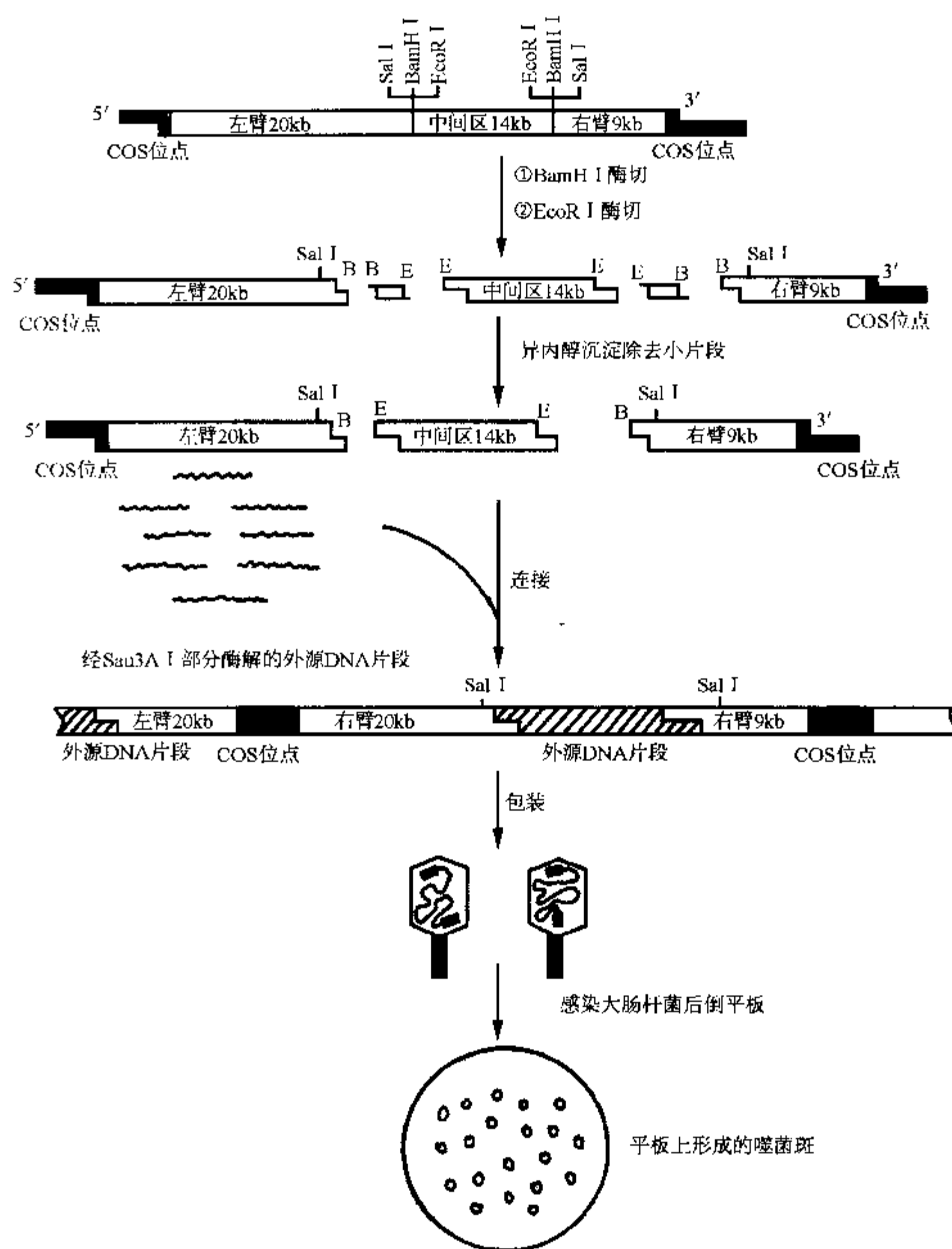
先用 BamH I 酶处理载体，产生 3 个片段，再用 EcoR I 酶切，则中间片段两端被切割，共产生 5 个片段，其中左、右两臂为 BamH I 粘性末端，而中间片段两端均为 EcoR I 粘性末端，同时还有两个序列相同的寡核苷酸片段，其一端为 EcoR I 粘性末端，另一端为 BamH I 粘性末端。这两个寡核苷酸片段用异丙醇沉淀法即可除去。中间区片段由于不具有与左右两臂相匹配的粘性末端，不能再与两臂相连接，所以噬菌体左右两臂与外源 DNA 片段进行重组连接时，无需除去中央片段即可与外源基因直接进行连接。连接产生的重组子可利用左右两侧的 Sal I 位点，切割产生完整的外源基因片段，而不含有载体的任何序列，可保持探针的特异性。

8.2.2.2 Lambda GEM11 和 Lambda GEM12

近几年来，又有许多改建的 λ 噬菌体 DNA 得到应用，如美国普洛麦格公司（promega）生产的 Lambda GEM11 和 Lambda GEM12。（图 8-3 及表 8-1）。

Lambda GEM11 来源于 λ EMBL3，与后者相比，它的中间可取代区两侧各有 6 个限制性内切酶的识别位点，它们是：Sac I，Xho I，BamH I，Avr II，EcoR I，Xba I，此外两侧还有识别顺序不对称的限制性内切酶 Sfi I 的识别位点以及两侧方向相对的 SP6，T7 RNA 聚合酶的启动子。

因 Lambda GEM11 由 λ EMBL3 改造而来，所以可以像 λ EMBL3 那样经 BamH I、EcoR I 酶切，异丙醇沉淀后与 Sau3A I 或 Mbo I 部分降解的基因组 DNA 片段（>14kb）相连接，克隆过程与 λ EMBL3 的应用相

图 8-2 λ EMBL3 载体的处理及应用

图中 B = BamHI, E = EcoRI 表示酶切产生的粘性末端

同。

λ EMBL3 载体还有另一种较优良的应用方法。载体经 XhoI 酶切后, 进行部分填充, 然后与 Sau3AI 或 MboI 部分酶切, 经过部分填充的基因组 DNA 片段进行连接, 其克隆过程如图 8-4 所示。

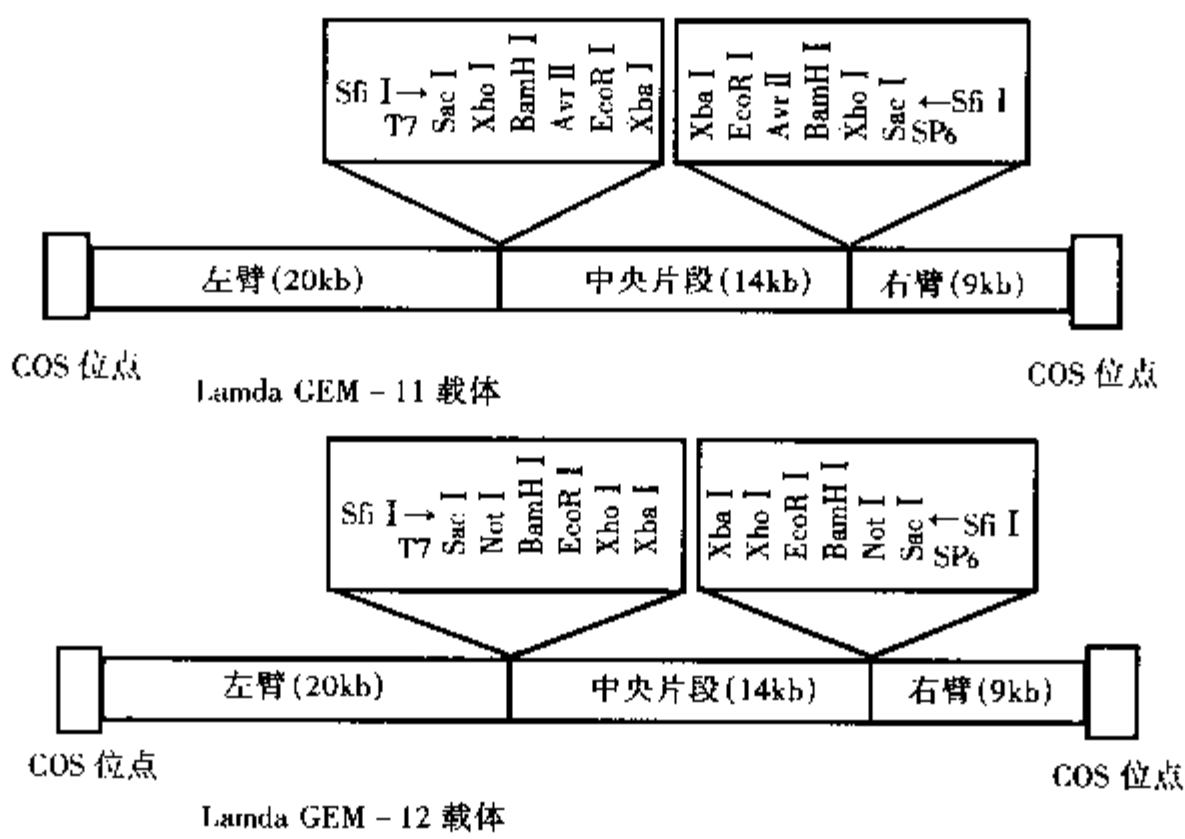


图 8-3 Lambda GEM11 和 Lambda GEM12 载体

表 8-1 Lambda 基因组克隆载体的性质及应用

λ 载体	克隆位点	非重组背景	SfiI 高分辨限制性 内切酶图谱分析	SP6/T7 启动子 染色体步移分析	基因组 DNA 是否需要分离
Lamda GEM-11 载体	Sac I, Xho I, BamH I, Avr II, EcoR I, Xba I	Spi 筛选	+	+	+
Lamda GEM-11 BamH I 载体臂	BamH I (亦能与 Bel I, Bgl II, Mbo I 和 Sau3A I 酶切的基因组 DNA 片段的末端相匹配)	极低 < 100pfu/μg 载体	+	+	+
Lamda GEM-11 Xho I 半位点臂	部分填充的 Xho I 位点 (亦能与 Bel I, Bgl II, Mbo I 和 Sau3A I 酶切部分填充的基因组 DNA 片 段的末端相匹配)	极低 < 100pfu/μg 载体	+	+	-
Lamda GEM-12 载体	Sac I, Not I, BamH I, EcoR I, Xho I, Xba I	Spi 筛选	+	+	+
Lamda GEM-12 Xho I 半位点臂	部分填充的 Xho I 位点 (亦能与 Bel I, Bgl II, Mbo I 和 Sau3A I 酶切部分填充的基因组 DNA 片 段的末端相匹配)	极低 < 100pfu/μg 载体	+	+	-
EMBL 3 载体	Sal I, BamH I, EcoR I	Spi 筛选	+	-	+
EMBL 3 BamH I 载体臂	BamH I 位点 (亦能与 Bel I, Bgl II, Mbo I, Sau3A I 酶切的 基因组 DNA 片段的末端相匹 配)	极低 < 100pfu/μg 载体	-	-	+
EMBL 4 载体	EcoR I, BamH I, Sal I	Spi 筛选	-	-	+

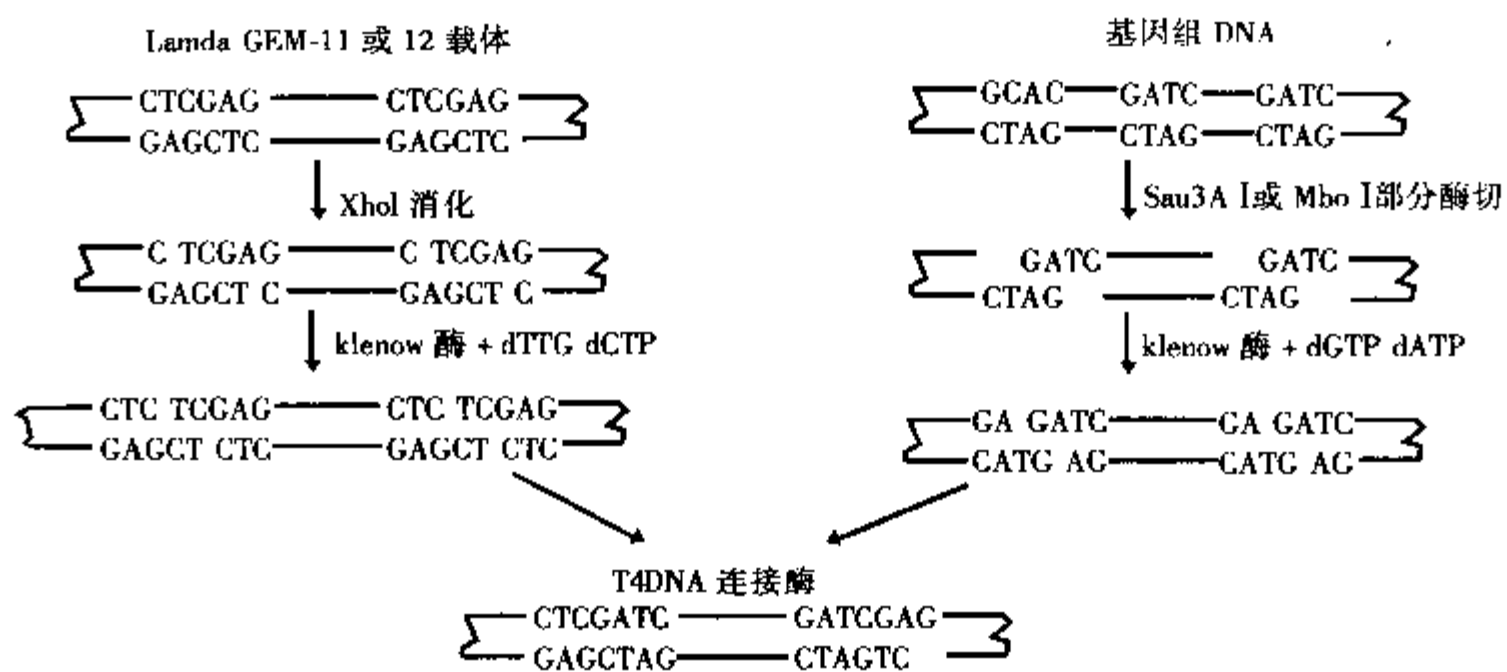


图 8-4 Xho I 半位点臂克隆过程

载体经 Xho I 酶切后, 产生 5' 突出 4 个核苷酸的粘性末端, $5' \text{---TC3'}$, $3' \text{---AGCT5'}$, 在 dTTP, dCTP 存在下进行补平反应, 产物具有 5' 突出 2 个核苷酸的粘性末端 $5' \text{---TC3'}$, $3' \text{---AGCT5'}$ 。此时, 中间区片段因粘性末端不匹配, 不能再与载体左右两臂相连接。基因组 DNA 经 Sau3A I 或 Mbo I 部分降解, 产生具有 5' 突出 4 个核苷酸的粘性末端, 在 dGTP 和 dATP 存在下进行补平反应后, 产生 5' 突出 2 个核苷酸的粘性末端 $5' \text{---GA3'}$, $3' \text{---CTAG5'}$, 这样各 DNA 片段之间不能再相互粘连。经过上述处理的载体和外源 DNA 片段均可不经分离纯化而直接进行连接, 如图 8-4 所示其连接反应产物只能是载体两臂与单个外源 DNA 片段的连接。由于任何 DNA 片段的分离纯化步骤都会导致产物量的明显减少, 因而当基因组 DNA 量较少时, Xho I 半位点臂克隆是很有用的一种方法。应用这种方法, 如果 BamH I 位点克隆需要 $100\mu\text{g}$ DNA, 那么 Xho I 半位点克隆只需 $10\mu\text{g}$ DNA 即可构建一个基因组文库。供体 DNA 只需在同一缓冲体系中进行部分酶切, 然后补平前两个核苷酸; 而载体 DNA 在酶切后补平前两个核苷酸后, 再用牛肠碱性磷酸酶进行脱磷处理, 即可与外源 DNA 片段进行连接, 实验步骤较少, 损失的 DNA 量不会太多。

Lambda GEM12 与 Lambda GEM11 具有相同的性质, 只是限制性内切酶有一个位点不同, 它具有 Not I 位点而缺少 Avr II 位点 (图 8-3)。其应用与 Lambda GEM11 相同。

虽然 lambdaEMBL 与 Lambda GEM 载体均可作为构建基因组文库的载体, 但 Lambda GEM 载体与前者相比有以下几个优点: ①具有 Xho I 和 BamH I 两个可应用的多克隆位点; ②具有两侧方向相对的 SP6 和 T7 启动子; ③多克隆位点和启动子之间有不称 Sfi I 限制性内切酶识别位点 ($5' \text{GGCCNNNN} \downarrow \text{NGCCC} 3'$)。两个噬菌体的启动子能在体外转录条件下产生与插入片段两条链相对应的 RNA 探针, 可以应用于染色体“作图” (mapping) 及“步移” (walking) 分析。Sfi I 酶切位点的识别序列多达 13 个核苷酸, 因而产生足够大的 DNA 片段应用于染色体作图, 较 lambdaDNA cos 位点作图法更为方便。通过 Sfi I 单一位点酶切, DNA 插入片段的每个末端可用适合于左臂或右臂 Sfi I 位点的特殊寡核苷酸加以标记, 标记的 DNA 片段被识别 4 个核苷酸的限制性内切酶切割后, 很容易地进行图谱分析。

Xho I 和 BamH I 克隆位点相互重叠而且从载体上的启动子到酶切位点分别只有 6 个和 11 个碱基, 因此应用从载体启动子上转录出的 RNA 产物作为探针对杂交反应没有干扰。Lambda GEM11 或 12 的中间区片段不含有 pBR322 的序列, 因此, 少量的非重组噬菌斑 (约 $1/10^5$) 不能与 pBR322 来源的探针杂交, 因而杂交背景影响较小。

利用 λ EMBL3/4 和 λ amda GEM11/12 能满足构建基因组文库的三个要求：①在最低的非重组子背景下产生最大数量的重组子；②所构建的基因组文库能够代表基因组 DNA 的序列；③被克隆的外源基因的限制性内切酶的酶切图谱的确定工作较易进行。应用 $BamH$ I 或 Xho I 半臂填充 λ 载体，不用除去中间区域，其与外源基因连接后的非重组子相当少（ $< 100\text{pfu}/\mu\text{g}$ 载体臂或 10^5 噬菌斑中有一个非重组子），在这样低的背景下，在限制性宿主（ rec^+ ）中利用 Spi 基因的筛选可以被取消。

如果噬菌体中含有 red 和 gam 基因，则不能在含有 P_2 噬菌体的溶源菌中生长繁殖，这种噬菌体的表型为 Spi^+ ，而 red 和 gam 基因存在于 λ 噬菌体的被取代区，因而重组的 λ 噬菌体为 Spi^- ，能在含有 P_2 的溶源菌中生长，而非重组子则不能，但这种宿主菌必须是 recBC^+ 。最近有实验证明 9% 的人类及果蝇的基因在 recBC^+ 的宿主细胞中不能被克隆，而新型载体的低背景优点使得基因文库不须应用 Spi 筛选，所以可以不用 recBC^+ 宿主菌，使得所构建的基因组文库更加完整。

8.2.2.3 Charon 系列载体

Charon 系列噬菌体用于克隆小片段，可做插入型载体用，用于构建基因文库克隆大片段可做取代型载体用。第一代载体 Charon4A，Charon21A 由于酶切位点较少及容量较小，已不太使用。经过改造的新一代 Charon 载体，Charon32 ~ 35 以及 Charon40 与第一代载体相比，具有较大的外源 DNA 容量和更多的限制性内切酶位点。特别是 Charon40，具有其它载体所没有的优点，其可取代部分中间片段具有多个 Nae I 酶切位点，因而可被降解成小的寡核酸片段，通过简单的异丙醇沉淀就可有效地与载体两臂分离，因而重组背景很低。

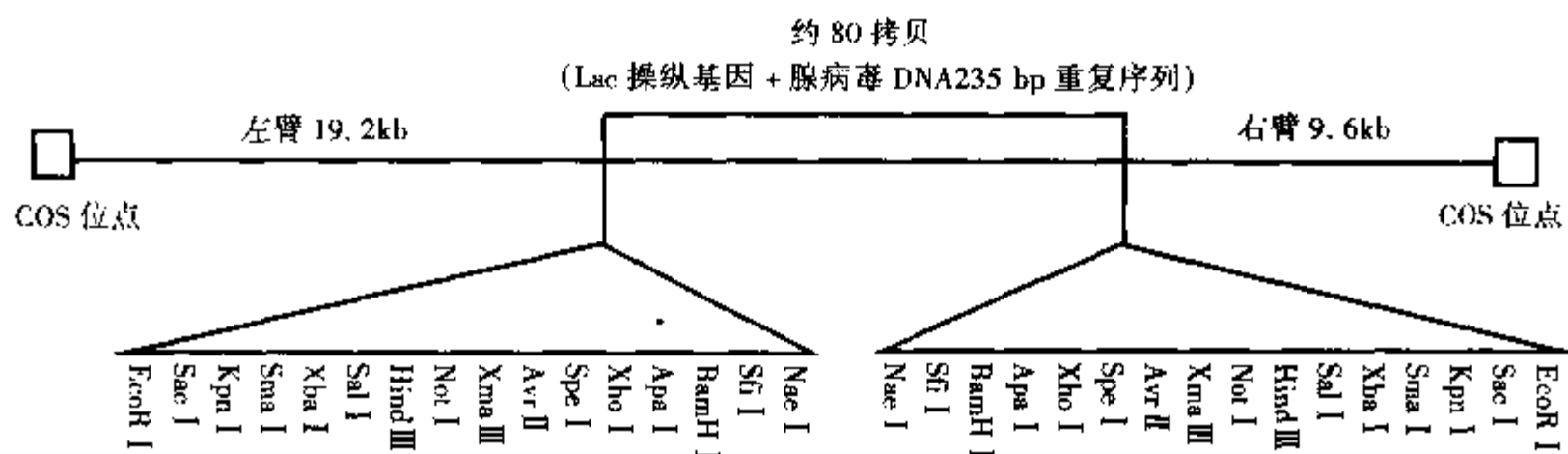


图 8-5 Charon 40 载体

Charon40 如图 8-5 所示，Charon 40 载体全长 41.9kb，左臂 19.2kb、右臂 9.6kb。在中央片段两侧各具有 16 个限制性内切酶的多克隆位点。选择余地大，可容纳 9.4 ~ 24.2kb 长的外源 DNA 片段，中央片段可用 Nae I 降解后通过异丙醇沉淀除去小片段，得到载体两臂。重组子为 gam^+ ，可以在 recA^- 的大肠杆菌中增殖，宿主为 LE392。

70 年代构建的第一代 λ 噬菌体载体如：Charon4A， $\lambda\text{gt}-\text{WES}$ ，由于插入外源 DNA 片段的容量小（15 ~ 20kb），克隆位点少及筛选工作量大，现在基本上已经不用了。目前用于构建基因组文库应用较多的载体如前面介绍的 λ EMBL3/4、 λ amda GEM11/12 以及 $\lambda 2001$ 、 λDASH 、Charon38 ~ 40，他们能够插入大约 24kb 长的外源 DNA 片段。由于容量的增大，基因组文库的规模显著减小，给构建和筛选工作带来了方便。

8.3 载体 DNA 的制备

8.3.1 载体 DNA 的酶解

真核细胞染色体 DNA 一般使用 *Sau* 3A I 或 *Mbo* I 进行部分降解, 因此载体 DNA 要用与之相匹配的酶 *Bam*HI I 进行酶切处理。根据具体情况, 也可选用其它限制性内切酶。

仪器设备:

琼脂糖凝胶电泳装置

超速离心机

恒温水浴

Eppendorf 离心机

试剂:

10× 限制性内切酶缓冲液

乙酰化的牛血清白蛋白 10mg/ml

牛肠碱性磷酸酶

10× 碱性磷酸酶缓冲液:

50mmol/L Tris·Cl (pH9.0)

10mmol/L MgCl₂

1mmol/L ZnCl₂

10mmol/L 亚精胺 (spermidine)

TE 或 0.1mol/L Tris·Cl (pH8.0) 饱和酚

酚/氯仿 (酚:氯仿:异戊醇 = 25:24:1)

氯仿 (氯仿:异戊醇 = 24:1)

醋酸钠 3mol/L

醋酸铵 7.5mol/L

T4 DNA 连接酶

10× 连接缓冲液:

0.5mol/L Tris·Cl (pH7.6)

100mmol/L MgCl₂

100mmol/L DTT

500μg/ml BSA

噬菌体缓冲液:

20mmol/L Tris·Cl (pH7.5)

100mmol/L NaCl

100mmol/L MgSO₄

LB 培养基

LB 固体平板

LB 上层琼脂

8.3.1.1 载体 DNA 的单酶切反应:

(1) 取 20~50μg λDNA, 加适当的 10× 限制性内切酶缓冲液 25μl, 10mg/ml 乙酰化的牛血清白蛋白 25μl, 加水至体积为 230μl, 取两份样品, 于 4℃ 保存备用, 每份 0.2~0.3μg。

(2) 加适当的限制性内切酶至 $3 \sim 5 \text{ U}/\mu\text{g}$ DNA, 加水至 $250 \mu\text{l}$, 在最适温度保温 1 小时。

(3) 冰浴冷却酶切反应管, 再取两份已酶切的样品, 每份 $0.2 \mu\text{g}$, 加上步骤 1 中所保留的未酶切的载体 DNA 为对照, 共 4 份样品, 于 68°C 加热 10 分钟, 以打断粘性末端之间的退火连接然后取其中两份于 0.4% 琼脂糖凝胶中电泳分离 DNA 样品, 如果酶切反应完全, 会看到酶切后的样品有三条 DNA 片段带, 其大小分别与载体的左臂、右臂及中间片段相一致, 仔细观察, 以确定有无部分酶切反应的产物, 未酶切的样品为一条分子量较大的条带。

(4) 如果酶切不完全, 则增加酶量 ($40 \sim 100 \text{ U}$) 继续酶切, 直至降解完全。

(5) 经过彻底酶切的 DNA 样品, 加 EDTA 至终浓度为 10 mmol/L , 加等体积酚/氯仿抽提一次, 氯仿抽提一次, $12\,000 \text{ r/min}$ 离心 3 分钟。

(6) 取上层水相, 加 $1/10$ 体积 3 mol/L 醋酸钠 ($\text{pH} 7.0$)、2 倍体积无水乙醇, 混匀后室温放置 30 分钟。

$5 \sim 10 \text{ mmol/L}$ EDTA 在 $\text{pH} 5.2$ 时会随 DNA 一起沉淀, 所以醋酸钠的 pH 为 7 时, 其 DNA 沉淀效果要比 $\text{pH} 5.2$ 为好, 如果不加 EDTA 终止反应, 可用酚/氯仿抽提两次, 氯仿抽提一次, 然后加 $1/2$ 体积的 7.5 mol/L 醋酸铵, 2 倍体积乙醇 -70°C 沉淀 DNA 30 分钟。

(7) $12\,000 \text{ r/min}$ 离心 10 分钟, 弃上清, 沉淀用 70% 乙醇洗涤一次, 真空干燥或自然干燥后, 加 TE 溶解至 DNA 浓度为 $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

8.3.1.2 载体 DNA 的双酶切

对于 $\lambda\text{EMBL}3/4$ 和 $\lambda\text{amda GEM}11/12$ 载体可以同时用 BamH I 和 EcoR I 双酶切, 以减低重组背景。由于 EcoR I 对反应体系盐浓度的要求较严格, 所以一般选用 EcoR I 的酶切反应体系, BamH I 在此体系中的酶活性也较好。对于含有较多限制性内切酶位点的载体, 如选用其中两个酶进行双酶切, 所用体系可灵活掌握, 可选用两者之中的一种酶反应体系同时加入两种酶, 也可先用一种酶消化后, 再换另一种酶切反应体系消化。

具体的酶切反应步骤与 8.3.1.1 中 1~5 相同。经酚/氯仿抽提的酶切反应物, 加 $1/10$ 体积 3 mol/L 醋酸钠 ($\text{pH} 7.0$), 加 0.6 倍体积异丙醇, 混匀后室温放置 15 分钟, $12\,000 \text{ r/min}$ 离心 5 分钟, 弃上清, 沉淀用 70% 乙醇洗涤一次, 干燥后溶于 TE 缓冲液中, 使 DNA 浓度为 $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 左右。

8.3.2 酶切后载体的再连接及包装后的滴度检测:

(1) 取酶切后的载体 DNA $1 \mu\text{g}$, 做下面的连接反应:

10 × 连接缓冲液	$2 \mu\text{l}$
10 mmol/L ATP	$1 \mu\text{l}$
DNA ($0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)	$2 \mu\text{l}$
H_2O	$15 \mu\text{l}$

总体积 $20 \mu\text{l}$

(2) 从上述溶液中取出 $5 \mu\text{l}$, 4°C 保存。

(3) 其余部分加 T4 DNA 连接酶 $0.2 \sim 0.5$ 韦氏单位, 15°C 反应 2 小时。

(4) 取 $2 \mu\text{l}$ 连接反应产物, 再取 8.3.1.1 步骤 1 中保留的一份未经酶切的 λ 载体 DNA $0.1 \mu\text{g}$, 进行体外包装 (包装步骤将在后面详述) 然后感染合适的大肠杆菌, 计算出斑率。

经单酶切后再连接的产物其包装效率大约是未经酶切的载体 DNA 的 10% , 经双酶切异丙醇沉淀的载体 DNA 样品, 其连接包装后的感染率更低, 大约是未经酶切载体的 $10^{-5} \sim 10^{-4}$ 。

8.3.3 载体臂的纯化

做为载体的 λDNA 经单酶切后, 需经过纯化处理除去中间片段, 以提高外源 DNA 的连接效率, 降

低非重组子的背景。纯化方法一般有两种：一种是通过 0.5% 琼脂糖凝胶电泳纯化，但是载体的回收率比较低。另一种方法较常用，是用蔗糖或氯化钠密度梯度超速离心方法分离载体臂。如果载体 DNA 用量较少，可以直接从生物制品公司购买。但是如果应用量较大或经常构建 DNA 文库，则自己纯化载体相对来讲要便宜得多。前面几节中介绍的 λ mda GEM11/12 Xho I 或 BamH I 半臂填充载体不需经过下面的纯化步骤即可进行连接反应。

8.3.3.1 蔗糖密度梯度离心

(1) 经过酶切处理的载体 DNA，大约 50 μ g，加 TE 调整 DNA 浓度至约 150 ~ 200 μ g/ml 左右，取 0.2 μ g 留作对照。加 1mol/L Tris·Cl (pH8.0) 及 1mol/L MgCl₂ 至终浓度为 100mmol/L Tris·Cl (pH8.0)，10mmol/L MgCl₂，置 42℃ 保温 1 小时，使载体两臂退火。取 2 份样品，每份 0.2 μ g，其中一份于 68℃ 保温 10 分钟，与 8.3.1.1 步骤 1 中保留的未酶切样品同时在 0.5% 琼脂糖凝胶中电泳，鉴定退火反应是否已经发生，也可加分子量标准做对照。

注意事项：电泳时不要用高压或高电阻缓冲液，温度过高会使已退火的粘性末端再次分离，另外温度过高还会导致凝胶融化。

对于双酶切处理的载体 DNA，也可使用连接酶使左右两臂的粘性末端连接。

(2) 用超速离心管 (Beckman SW28 或与其相当的离心管) 制备 2 个 38ml 10% ~ 40% W/V 蔗糖梯度，蔗糖溶液用下列缓冲液配制：

1mol/L	NaCl
20mmol/L	Tris·Cl (pH8.0)
5mmol/L	EDTA (pH8.0)

(3) 每一梯度加 500 μ l 或少于 500 μ l 的溶液，其中载体 DNA 含量不得多于 75 μ g。如果过载将影响载体两臂与中间片段的分离效果。将装好的样品平衡后于 15℃ 26 000r/min 离心 24 小时。

(4) 将粗针头插入离心管底部，以 500 μ l 为一份收集 DNA。

(5) 每隔 3 份样品取 15 μ l 加 35 μ l 水稀释，加 8 μ l 载样缓冲液，68℃ 加热 5 分钟，在 0.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳分析。以步骤 1 中取出的样品作对照，调节对照中的蔗糖及相应盐浓度与超离心样品相一致，否则，两者泳动率不一致将使他们之间失去可比性。

对电泳结果照相，由分析结果确定含有退火双臂的样品，合并这些样品。注意不要取有明显未切割的 λ DNA 或未退火的左、右两臂的分部。

(6) 将合并的部分对 1 000 倍 TE (pH8.0) 于 4℃ 透析 12 ~ 16 小时，更换透析液 2 ~ 3 次。使透析袋的体积大到是初始样品体积的 2 ~ 3 倍。

(7) 透析后的样品可用正丁醇或 2-丁醇抽提样品数次使体积减至 3 ~ 5ml，加 1/10 体积 3mol/L 醋酸钠，2 倍体积无水乙醇沉淀 DNA。

如果样品量较少，可以不经透析直接乙醇沉淀，此种处理方法可使蔗糖浓度减小到 10%。

(8) DNA 用 TE 溶解至浓度为 300 ~ 500 μ g/ml。

(9) 用紫外分光光度计测量 OD_{260nm} 吸收值，以确定 DNA 浓度，以 0.5% 琼脂糖凝胶电泳检测纯度，分装 1 ~ 5 μ g/管，-20℃ 保存。

8.3.3.2 氯化钠梯度离心

与蔗糖密度梯度法相比，氯化钠密度梯度离心所需时间较短，但由于氯化钠溶液的粘度较小，所以在准备时必须小心操作。

(1) 经酶切处理的 λ DNA 载体 1 约 50 ~ 60 μ g，用 TE (pH8.0) 调整浓度至 250 ~ 500ng/ μ l，42℃ 保温 1 小时，使双臂退火。

(2) 在 Beckman SW41 或相当于此的超速离心管中，制备 12.5ml 连续的氯化钠梯度 (5% ~ 25% W/V)，每一梯度可加入 50 ~ 100 μ g λ DNA 载体。

氯化钠溶液中含 10mmol/L Tris·Cl (pH8.0), 10mmol/L EDTA (pH8.0), 在制备梯度时, 用玻璃吸管小心地将液体加到液面上, 制备时, 要求室温比较低 ($< 10^{\circ}\text{C}$), 梯度仪的流速控制在 $1 \sim 2\text{ml/min}$ 。

(3) 每一梯度加少于 $200\mu\text{l}$ 的 DNA 溶液, 含 DNA 量 $50 \sim 100\mu\text{g}$, 将样品于 4°C , $37\,000\text{r/min}$ 离心 4.5 小时。

(4) 将粗针头插入离心管底部, 每 $250\mu\text{l}$ 一份收集 DNA 样品。注意, 梯度下降很快。

(5) 每隔 3 份取 $5\mu\text{l}$ DNA 样品, 加 $30\mu\text{l}$ 水, $4\mu\text{l}$ 载样缓冲液, 68°C 加热 5 分钟, 于 0.5% 琼脂糖凝胶电泳分析样品。注意, 调整对照样品的盐浓度与超离心纯化的样品一致。

(6) 分析电泳结果, 合并含有退火双臂的样品, 加等体积水至合并样品中, 混匀后加 2 倍体积无水乙醇沉淀 DNA, 离心弃上清, 沉淀用 70% 乙醇洗涤一次, 干燥后溶于 TE 中至 DNA 浓度为 $300 \sim 500\mu\text{g/ml}$ 。

(7) 用紫外分光光度计测量 OD 260nm 光吸收值以确定 DNA 浓度。0.5% 琼脂糖凝胶电泳测定纯度。分装 $1 \sim 5\mu\text{g/管}$, 于 -20°C 保存备用。

注意事项: 在蔗糖或氯化钠密度梯度离心时, 可加 EB 至 $2\mu\text{g/ml}$, 这样不同大小的 DNA 片段的位置可以用目测分辨, 有经验时, 可以不做琼脂糖凝胶电泳分析而合并含有退火双臂的部分。其中的 EB, 可通过水饱和的正丁醇或异戊醇抽提至无色而得以去除。

8.3.4 载体的脱磷处理

载体经过碱性磷酸酶处理, 减少载体间的自身连接, 目的在于进一步降低非重组背景。

(1) 经酶切纯化后的载体 DNA	$250\mu\text{l}$ ($10 \sim 20\mu\text{g}$)
10 × 碱性磷酸酶缓冲液	$40\mu\text{l}$
碱性磷酸酶	20U
加水至总体积	$400\mu\text{l}$

37°C 保温 1 小时。

(2) 加 SDS 及 EDTA 至终浓度分别为 0.5% 和 5mmol/L, 等体积 TE 饱和酚/氯仿抽提两次, 氯仿/异戊醇抽提一次。

(3) 上层水相加 1/2 体积 7.5mol/L 醋酸铵, 2 倍体积乙醇 -70°C 沉淀 DNA 30 分钟, $12\,000g$ 离心 15 分钟收集 DNA 沉淀。

(4) 用 70% 乙醇洗涤一次, 干燥后加 H_2O 至 DNA 浓度为 $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 分光光度法测定 DNA 浓度, 分装 $1 \sim 5\mu\text{g/管}$, -20°C 保存备用。

8.3.5 Lamda GEM11/Lamda GEM12 BamH I . Xho I 酶切后载体臂的部分填充

经 Xho I 酶切的载体 DNA	$10\mu\text{g}$
10 × 填充缓冲液	$5\mu\text{l}$
2mmol/L dTTP	$2\mu\text{l}$
2mmol/L dCTP	$2\mu\text{l}$
Klenow 聚合酶 $5\text{U}/\mu\text{l}$	$4\mu\text{l}$
加水至总体积	$50\mu\text{l}$

37°C 水浴放置 30 分钟:

加等体积酚/氯仿抽提一次, 氯仿抽提一次, 上清中加 1/10 体积 3mol/L 醋酸钠、2 倍体积无水乙醇, 于 4°C 沉淀 DNA 30 分钟 ~ 1 小时, $13\,000g$ 离心 10 分钟, 沉淀用 70% 乙醇洗一次, 室温干燥, TE 溶解至 DNA 浓度为 $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$, -20°C 分装保存。

8.4 真核细胞 DNA 的制备

构建基因组 DNA 文库中重要的一步就是获得高分子量的外源 DNA, 通过部分降解产生所需长度的 DNA 片段, 便于与载体相连。真核细胞的 DNA, 特别是哺乳动物细胞的 DNA, 在提取时必须注意尽可能得到高分子量的染色体 DNA。因此, 在操作时要把机械剪切力的作用控制在最小程度。常用的提取方法是在 EDTA 和 SDS 存在下, 用蛋白酶 K 消化细胞, 然后用酚抽提蛋白质, 透析除去低分子量杂质, 这样得到的 DNA 大约 100 ~ 150kb 能够用于 Southern 杂交分析, 及以 λ DNA 为载体构建基因组 DNA 文库。

从图 8-6 中可以看出, 所提取的基因组 DNA 的大小至少是被克隆的片段大小的 4 倍时, 部分酶切获得的片段有 80% 能被克隆。如果用粘性质粒做载体, 其插入片段长度为 30 ~ 45kb, 基因组 DNA 的最初大小必须大于 200kb, 由于有机溶剂抽提以及提取过程中的机械剪切, 获得这样大小的 DNA 片段是很困难的, 因此常用 λ 噬菌体 DNA 做载体, 其插入片段大小要求在 18 ~ 22kb 范围内, 其所需染色体 DNA 的大小 > 100kb 即可满足要求, 如果抽提的染色体 DNA 大小在 100kb 以下, 当用限制性内切酶进行部分酶解时, 产生的合适大小的片段中会有相当一部分片段的一端不具有相应的粘性末端, 这样的片段只能与处理过的 λ 载体的一端相连接, 形成的重组子不能被有效地包装, 因此, 这样的文库是不完整的文库。所以, 获得高分子量染色体 DNA 是构建完整的 DNA 文库的基础。

8.4.1 几种染色体 DNA 的提取方法

方法一:

仪器设备:

高速冷冻离心机
电动组织匀浆器
恒温水浴箱
紫外分光光度计

试剂:

TBS:

NaCl	8g
KCl	0.2g
Tris 碱	3g
酚红	0.015g

加 800ml 蒸馏水, 用浓盐酸调 pH = 7.4, 定容至 1L

抽提缓冲液 10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)
100mmol/L EDTA (pH8.0)
20 μ g/ml 胰 RNA 酶
0.5% SDS

蛋白酶 K 20mg/ml

操作步骤:

(1) 对不同种类的细胞及血液样品分别用下列方法处理:

1) 对于贴壁细胞: 用橡胶刮子刮下细胞, 4℃ 1500g 离心 10 分钟收集细胞用 TBS 多次洗涤细胞, 然后悬浮于 TE 溶液中, 使用细胞浓度为 5×10^7 个/ml。每毫升细胞悬浮液加 10ml 抽提缓冲液, 37℃ 消化 1 小时。

2) 对于悬浮细胞, 4℃ 1500g, 10 分钟离心收集细胞, TBS 洗涤细胞 2 ~ 3 次, 悬浮于 TE 溶液中使

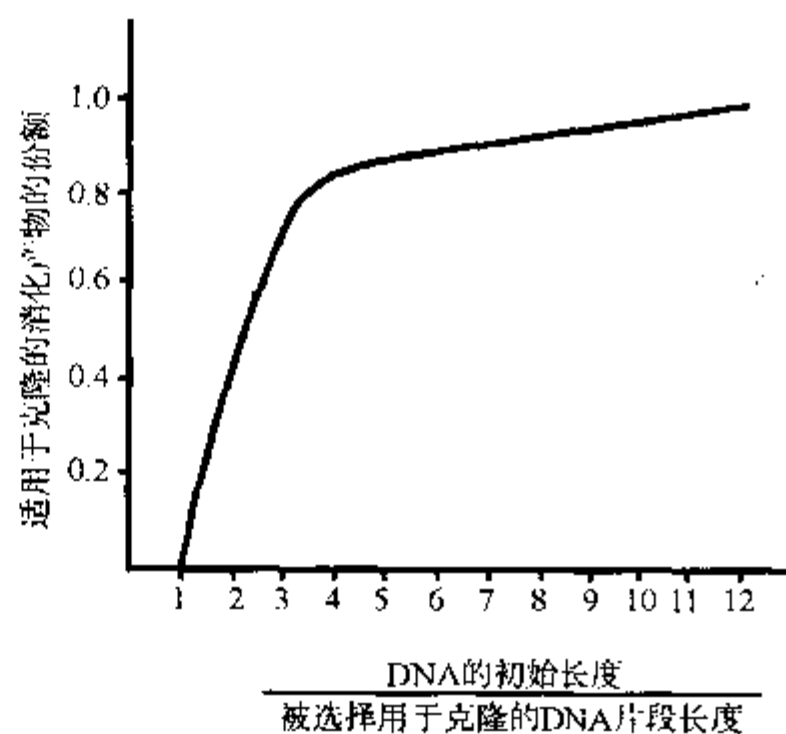


图 8-6 两端适于克隆的部分消化产物的份额与基因组原始长度的关系

细胞浓度为 5×10^7 个/ml, 同上加抽提缓冲液消化。

3) 对于组织样品: 新鲜的组织样品放在不锈钢容器中, 于液氮中冷冻, 用机械匀浆器快速将其研成细粉, 待液氮挥发后, 把组织粉末一点点地加入有 10 倍体积抽提缓冲液的瓶中, 使细粉在溶液表面扩散, 摇动容器使组织粉末浸入溶液中, 然后转移至 50ml 离心管中, 37℃ 保温 1 小时。

4) 对于血液样品: 在预先加有 3.5ml ACD (acid citrate dextrose solution) 溶液的试管中收集 20ml 新鲜血液。

ACD: 柠檬酸	0.48g
柠檬酸钠	1.32g
葡萄糖	1.47g
加水至	100ml

ACD 溶液作为抗凝剂使用时, 6ml 新鲜血液加 1ml ACD 溶液。作为抗凝剂, 在提取高分子量 DNA 时, 对于贮存的血液, 其效果比 EDTA 好。抗凝血可在 4℃ 存放数天或在 -70℃ 不定期存放。

新鲜血液 (20ml): 1300g 离心 15 分钟, 去掉上层血浆, 用吸管小心地吸取淡黄色的一层, 转移至一个新管中, 再次离心。第二次离心获得的淡黄色细胞层, 加 15μl 抽提缓冲液, 37℃ 保温 1 小时。

冷冻血液 (20ml): 室温水浴融化样品, 在离心管中加 1 倍体积磷酸缓冲液 (PBS), 稀释样品, 室温下 3500g 离心 15 分钟, 弃上清, 加 15ml 抽提缓冲液, 37℃ 保温 1 小时。

(2) 加蛋白酶 K 至终浓度为 100μg/ml, 用玻璃棒温和地搅拌粘稠的溶液使酶均匀分布。

(3) 50℃ 水浴中保温 3 小时并不断轻摇溶液。

(4) 室温冷却。加等体积 0.5mol/L Tris·Cl (pH8.0) 饱和的酚, 缓慢地上下颠倒离心管 10 分钟, 使两相温和地混匀。如果上述操作不能使之形成乳浊液, 把离心管放在旋转台上缓慢混合 1 小时, 室温下 5000g 离心 15 分钟。

(5) 用直径较粗的吸管 (直径 0.3cm) 转移粘稠的水相至一新管中, 重复酚抽提两次。

(6) 获得 200kb 左右的高分子量 DNA, 经酚抽提过的上层水相, 在 4℃ 对 4L 50mmol/L Tris·Cl (pH8.0)、10mmol/L EDTA (pH8.0) 溶液透析 4 次, 至透析液的 OD_{270nm} 小于 0.05。透析袋中留出空隙使样品能增加体积 1.5~2 倍。继续步骤 (7)。

获得 100~150kb 左右 DNA 样品: 经酚抽提的上层水相, 加 1/5 体积 10mol/L 醋酸铵, 室温下加 2 倍体积乙醇, 旋转离心管使溶液充分混匀。DNA 会马上沉淀出来, 用具有 U 形头的平滑玻璃棒挑出染色体丝状物, 大部分寡聚核苷酸留在溶液中, 如果 DNA 沉淀形成片段, 室温下 5000g 离心 5 分钟收集沉淀, 70% 乙醇洗涤一次, 再次离心、尽量去除 70% 乙醇, 室温下晾干, 至乙醇挥发完全, 不要使 DNA 彻底干燥, 这将会使溶解变得很困难。按每 5×10^6 个细胞加 1ml TE (pH8.0) 溶解 DNA 样品, 在旋转台上缓慢摇动 12~24 小时, 至 DNA 全部溶解。

(7) 测定 DNA 的 OD_{260nm} 及 OD_{280nm}, A₂₆₀/A₂₈₀ 应大于 1.75, 如小于此值, 说明样品中蛋白质含量过高。加 SDS 至 0.5%, 然后重复 (2)~(7) 步。

(8) 计算 DNA 样品的浓度 (1OD_{260nm} ≈ 50μg/ml DNA)。在 1% 琼脂糖支持物上倒 0.3% 琼脂糖凝胶, 在脉冲凝胶电场中电泳检验 DNA 片段的大小是否符合要求。大于 100kb 的 DNA 在电泳中比双聚体 λDNA 的迁移慢。样品于 4℃ 保存。

5×10^7 细胞用上述方法可以得到大的 200μg 高分子量 DNA, 20ml 正常血液大约可得 250μg DNA。高分子量 DNA 标准可用 λDNA 制备, 线性 λDNA 溶于 TE (pH7.6) 56℃ 加热 5 分钟, 使粘性末端相粘连, 在 1× 连接缓冲液中, 加 1mmol/L ATP、2 个韦氏单位/ml DNA 连接酶, 16℃、保温 30 分钟。

注意事项:

(1) 在加入抽提缓冲液前, 细胞必须均匀分散, 以减少 DNA 团块的形成。

(2) 抽提缓冲液中, 如使用 0.5mmol/L EDTA, 其水相的密度与酚的密度相似, 在第 4 步时分离较困

难,在上述方法中,使用 0.1mmol/L EDTA 其效果与 0.5mmol/L EDTA 相同,并且上层水相容易与酚相分离。

(3) 在提取组织及血液样品 DNA 时,注意样品中可能会有 HBV 或 HIV 等病毒存在,因此在接触这些样品时应小心操作,防止感染。如:戴一次性手套,使用机械吸液器,在安全的操作室中工作,防止气溶胶的产生,废物扔掉以前应进行灭菌处理。

方法二:

(1) 对培养的细胞、组织及血液样品处理步骤同方法一中的 (1) ~ (3)。

(2) 使溶液温度降至 15℃,加 10ml 变性缓冲液。

变性缓冲液: 80% 甲酰胺 (去离子)
0.8mol/L NaCl
20mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

如果甲酰胺颜色变黄,则需加 Dowex、XG8 混合床树脂,磁力搅拌 1 小时,Whatman 1 号滤纸过滤 2 次,分装, -70℃ 保存。

上述溶液用玻璃棒温和地混匀,15℃ 放置 12 小时。

(3) 把粘稠的溶液装入火棉胶袋中,对 4 升 0.1mol/L NaCl、20mmol/L Tris·Cl (pH8.0)、10mmol/L EDTA (pH8.0) 透析,换液 3 次,对 4L 10mmol/L NaCl、10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)、0.5mol/L EDTA (pH8.0) 透析,换液 6 次。

(4) 测量 DNA 样品的 260nm 及 280nm 吸光度值, A260/A280 应大于 1.75。如果达不到,重复 2 ~ 4 步。

(5) 计算 DNA 浓度。在 1% 琼脂糖支持的 0.3% 琼脂糖凝胶中,用脉冲场电泳法检验 DNA 纯度及大小。DNA 应大于 200kb,其迁移率比 λ DNA 四聚体要慢。

5×10^7 细胞 (如 Hela 细胞),应用上述方法能获得 20ml 溶液,大约含高分子量 DNA 5 ~ 10 μ g/ml。虽然 DNA 浓度较低,但由于 DNA 分子量较大,溶液很粘稠。

8.4.2 限制性内切酶部分酶解高分子量真核 DNA

应用不同的 DNA 提取方法,获得分子量在 100kb 以上的染色体 DNA 片段。在构建基因组文库时,需把它随机分割成段,克隆于载体 DNA 中。理论上认为机械剪切方法打断 DNA,其产生的片段随机性是最高的,但用这种方法处理的 DNA,其末端会带有单链尾巴,因此不能与载体直接相连,需经过一系列处理,先把末端补平,加上合适的连接子,再经酶切,产生能与载体相连接的粘性末端后,才能符合要求。由于此方法比较繁琐,现在人们一般用识别 4 个核苷酸的限制性内切酶对 DNA 进行部分酶切,产生的大小合适的 DNA 片段,其末端具有与载体相匹配的粘性末端,可直接与处理过的载体相连接。就其切割的随机性来讲,识别 4 个核苷酸的限制性内切酶如: Hae III、Mbo I、Sau 3A I 等,在切割 DNA 分子时,理论上每 256 (4^4) 个碱基上有一个切口。哺乳动物染色体有 3×10^9 bp 长,如要求切割产生 20kb 左右的 DNA 片段,这样的酶基本上满足了随机性的要求。

下面以 Sau 3A I 为例,介绍染色体 DNA 的部分降解

为最大限度地获得能克隆入 λ 噬菌体或粘性质粒中的 DNA 片段,在进行大量酶切之前,先进行小量酶切试验,以确定最适酶切反应条件。根据小量酶切实验结果,确定大量酶切反应,然后通过蔗糖密度梯度离心或 NaCl 密度梯度离心,分离纯化大小合适的 DNA 片段;也可通过琼脂糖凝胶电泳加电洗脱法,分离回收大小合适的片段。两种方法相比,前者分辨率高,但产量较低。

8.4.2.1 小量酶切确定部分降解的酶反应条件

(1) 取 20 μ g 染色体 DNA 配制 DNA 稀释液,称为溶液 D,加 40 μ l 10 \times Sau3A I 酶切缓冲液,加水至总体积为 400 μ l,冰浴放置。

表 8-2 基因组 DNA 的部分降解

管号		最终酶浓度 U/ μ g DNA
1	40 μ l D 溶液 + 2 单位 Sau3AI	1.0
2	20 μ l D 溶液 + 20 μ l 1 号溶液	0.500
3	20 μ l D 溶液 + 20 μ l 2 号溶液	0.250
4	20 μ l D 溶液 + 20 μ l 3 号溶液	0.125
5	20 μ l D 溶液 + 20 μ l 4 号溶液	0.063
6	20 μ l D 溶液 + 20 μ l 5 号溶液	0.031
7	20 μ l D 溶液 + 20 μ l 6 号溶液	0.015
8	20 μ l D 溶液 + 20 μ l 7 号溶液	0.007
9	20 μ l D 溶液 + 20 μ l 8 号溶液	0.003
10	20 μ l D 溶液 + 20 μ l 溶液 D	0

(2) 取 10 个 1.5ml 离心管, 编号 1~10。1 号管加 DNA 稀释液 40 μ l, 2~10 号管各加 20 μ l。

(3) 如表 8-2 中所示, 在 1 号管中加 2 单位 Sau 3AI (使酶浓度与 DNA 之间比值为 1U/ μ g DNA), 用平头毛细管温和地混匀, 注意勿使离心管的温度高于 4℃, 一切操作需在冰浴中进行。换新吸头吸取 20 μ l 1 号管中的溶液加入 2 号管中, 混匀, 然后依次转移 20 μ l 溶液至下一管中, 9 号管中弃去 20 μ l 溶液, 10 号管加 20 μ l D 溶液作为不加酶的空白对照。这样每管酶浓度依次倍比下降。

(4) 同时将 1~10 号管放入 37℃ 水浴中, 保温 1 小时, 立即放入冰浴中, 加 1 μ l 0.5mol/L EDTA, 至终浓度为 20mmol/L 终止反应。加 4 μ l 6 \times 载样缓冲液, 于 1% 琼脂糖凝胶支持的 0.4% 琼脂糖凝胶中电泳分离样品, 加样时用较粗口径的吸头, 2V/cm 电泳 16~20 小时, 至溴酚蓝走出凝胶, 同时加 DNA 分子量标准, 常用的分子量标准为 λ DNA/Hind III 酶解产物, 片段大小为: 23.1, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3, 2.0 和 0.56kb。 λ DNA/Sac II 酶切产物, 片段大小为 20.3, 18.8, 8.1, 1.1 及 0.2kb、 λ DNA/PvuI 酶切产物, 14.3, 12.7, 11.9, 9.5kb。也可用 λ DNA 多聚体做分子量标准。紫外灯下观察结果并照像。

(5) 根据分子量标准的大小分析照相结果, 观察 20~23kb 范围内片段产量最多的反应管号, 得到最适酶浓度, 选择此酶量的 1/2 做为大量酶切的反应浓度。如果所得基因组 DNA 量较多, 也可选用三种酶浓度进行大量酶切, 即产生 20~23kb 间 DNA 片段量最多的管及与其相邻的前后两管的酶切浓度。

注意事项:

(1) 操作时应用口径较粗的吸头, 如果没有, 可用一般的吸头剪掉前端使用。

(2) 电泳检验时, 电压应较低, 一般 < 2V/cm, 且应在低温下 (4℃) 进行。为防止凝胶融化及 DNA 条带扩散, 可在 4℃ 冰柜中进行电泳, 也可用能通冷凝水的电泳槽进行电泳。

(3) 加酶后, 一定要使溶液混匀, 且在酶切反应开始前, 勿使样品温度高于 4℃, 以保证酶切反应同时进行。

8.4.2.2 大量 DNA 的部分酶切

(1) 根据测试实验, 选择合适的酶浓度, 与所选择的测试实验的酶浓度、反应温度、反应时间及 DNA 量尽量一致。取 DNA 100 μ g, 进行消化。

(2) 反应结束后, 取 10 μ l 电泳检查片段大小、酚/氯仿抽提消化的 DNA 两次, 加 0.5 体积 7.5mol/L 醋酸铵, 2 倍体积乙醇混匀后 -20℃ 放置 30 分钟。

(3) 离心 12 000g、10 分钟, DNA 沉淀用 75% 乙醇洗一次, 干燥后加 200~500 μ l TE 溶解。

(4) 10%~40% 蔗糖密度梯度超速离心纯化片段, 使用 Beckman SW40 转头或与此相当的转头。蔗糖溶液用 10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)、10mmol/L NaCl、1mmol/L EDTA (pH8.0) 配制, DNA 样品 68℃ 加热

10 分钟,以打断粘性末端之间的连接,冷却至 20℃,加到蔗糖梯度中,20℃22 000 r/min 离心 22 小时。

(5) 用粗针头从管底穿刺,收集 DNA 溶液每 350 ~ 500 μ l 为一个部分。

(6) 每部分取 10 μ l、加 10 μ l 水稀释,4 μ l 载样缓冲液,0.4% 琼脂糖凝胶电泳分离、以分子量标准作对照,上样时使分子量标准中的蔗糖浓度及盐浓度与样品相一致。

(7) 根据电泳结果,合并含有所需片段大小范围(若以粘性质粒为载体,则要 35 ~ 45kb 大小的片段,若以 λ DNA 为载体,则取 20 ~ 25kb 之间的片段)的部分,4℃对 2L TE (pH8.0) 溶液透析 12 ~ 16 小时,每 4 ~ 6 小时换一次透析液。透析袋要留出能使样品增加 2 ~ 3 倍体积的量。

(8) 经过透析的 DNA 样品,如果体积较大,可用正丁醇或 2-丁醇抽提数次至体积为 1ml 左右,加 1/5 体积 10mol/L 醋酸铵,2 倍体积乙醇沉淀 DNA,室温放置 30 分钟。

(9) 离心,沉淀用 70% 乙醇洗涤一次,干燥后,TE 溶解使 DNA 浓度为 300 ~ 500 μ g/ml;取 1 ~ 2 μ l 在 0.4% 琼脂糖凝胶中走电泳,检验片段的大小。

上述经过部分酶解并纯化的 DNA 片段,可用于与处理过的载体相连接。

8.4.2.3 部分降解的 DNA 片段 3' 末端的部分填充

用于与 λ mda GEM 11/12 Xho I 或 BamH I 酶切半臂填充载体相连接的 DNA 片段经 Sau3A I 或 Mbo I 酶切后,必须经过部分填充,才能与相应载体相连接。处理步骤如下:

(1) 用限制性内切酶 Sau 3A I 部分降解 25 μ g 高分子量基因组 DNA 样品,加等体积酚/氯仿抽提一次,加 1/10 体积 3mol/L 醋酸钠,2 倍体积无水乙醇,0℃沉淀 DNA 30 分钟,12 000g 离心 10 分钟,弃上清,70% 乙醇洗涤沉淀一次,干燥后,TE 溶解使 DNA 浓度达 1 μ g/ μ l,并通过电泳检验片段大小。

(2) 在一个灭菌的 1.5ml 离心管中,混合下列溶液:

DNA	10 ~ 20 μ g	
10 \times 填充缓冲液	5 μ l	
2mmol/L dATP	2 μ l	
2mmol/L dGTP	2 μ l	
Klenow 酶 5U/ μ l	4 μ l	(约 1U/ μ g DNA)
加水至总体积为	50 μ l	
10 \times 填充缓冲液: 0.5mol/L Tris·Cl (pH7.2)		
0.1mol/L MgSO ₄		
1mmol/L DTT		
500 μ g/ml BSA		

(3) 37℃水浴中保温 30 分钟。

(4) 加等体积酚/氯仿,氯仿各抽提一次。

(5) 上层水相中加 1/10 体积 3mol/L 醋酸钠,2 倍体积无水乙醇,0℃沉淀 DNA 30 分钟。

(6) 12 000g 离心 10 分钟,70% 乙醇洗涤沉淀一次,真空干燥或室温下晾干,TE (pH7.6) 溶解 DNA 至终浓度为 0.5 ~ 1 μ g/ μ l,0.4% 琼脂糖凝胶电泳,检验 DNA 纯度。

经过上述处理的 DNA 样品可用于与 Xho I 或 BamH I 半臂填充载体 DNA 相连接。

8.5 连接和包装

8.5.1 连接浓度

前两节主要介绍 λ DNA 载体的制备和真核细胞染色体 DNA 片段的获得,下一步就是将两者进行连接重组,在体外包装后,感染适当的宿主细胞,获得完整的基因组文库。

DNA 插入片段与载体之间的连接主要受两种因素影响, 插入片段与载体两臂的摩尔数比和每种 DNA 分子的浓度。Dugaiczky 等在理论上讨论了 DNA 的浓度及片段大小对连接反应的影响。

离体包装的最佳底物是(左臂—插入片段—右臂)的多个串联体, 为了得到所需串联体, 连接反应应在含有等摩尔数的 3 种 DNA 分子的互补末端的体系中进行。由于每种 λ 噬菌体的臂只有 1 个能与片段互补的末端, 而每个插入片段有 2 个可与载体臂互补的末端, 各 DNA 片段之间的分子数比为左臂: 片段: 右臂 = 2:1:2, 因而载体两臂与插入片段之间的摩尔数比为 2:1。

Dugaiczky 的连接理论认为, 连接产物为环状或为串连体由 i 和 j 的比值决定。其中 i 是 DNA 分子的一个末端在同一分子的另一末端的周围环境中的浓度, j 的数值是根据 DNA 分子是随机卷曲的这一假设作出的, 因此 j 与 DNA 分子的长度成反比, 而与 DNA 浓度无关。

$$j = \left(\frac{3}{2\pi lb}\right)^{3/2} \text{末端/ml} \quad [1]$$

其中, l 是 DNA 分子的长度 (λ 噬菌体 λ DNA $l = 13.2 \times 10^4 \text{ cm}$), b 是随机卷曲的 DNA 片段长度, b 值随缓冲液离子强度的变化而变化, 它影响 DNA 的刚性 (在连接缓冲液中 λ DNA 的 $b = 7.7 \times 10^6 \text{ cm}$)。根据公式 [1] 计算: $j\lambda = 3.22 \times 10^{11} \text{ 末端/ml}$, λ DNA 分子量为 $MW_\lambda = 30.8 \times 10^6$, 公式 [1] 的另一种表示形式为

$$j = j\lambda \left(\frac{MW_\lambda}{MW}\right)^{3/2} \text{末端/ml} = \frac{5.5 \times 10^{22}}{MW^{3/2}} \text{末端/ml} \quad [2]$$

i 是溶液中所有互补末端浓度的测量值、对于具有自身互补的粘性末端的双链线性 DNA 分子

$$i = 2N_0 M \times 10^3 \text{ 末端/ml} \quad [3]$$

其中 $N_0 = 6.02 \times 10^{23}$ 为阿伏加德罗常数, M 是 DNA 的摩尔浓度。

如果 DNA 分子具有自身不相互补的两个末端, 则 $i = N_0 M \times 10^3 \text{ 末端/ml}$ [4]

从理论上说, $j = i$ 时, 一个 DNA 分子的末端能够机会相等地与同一分子的另一端或不同分子的末端接触。因此, 反应产物中环形与串连体产物以相同速度产生。当 $j > i$ 时, 有利于环形产物生成, 当 $i > j$ 时, 有利于串连体形成。

对于噬菌体 λ DNA 载体两臂与真核 DNA 插入片段之间的连接, 为了产生长的串连体, 我们选择一种 DNA 浓度, 使载体两臂与插入片段在这一连接条件下的 $i > j$, 同时使载体两臂与插入片段的摩尔浓度比值超过 2:1。假定退火后的载体两臂大小为 29kb ($MW = 1.79 \times 10^7$ 道尔顿), 插入片段平均大小为 22kb ($MW = 1.35 \times 10^7$ 道尔顿), 根据公式 [2] 计算出

$$j_{\text{双臂}} = 7.26 \times 10^{11} \text{ 末端/ml}$$

$$j_{\text{片段}} = 1.10 \times 10^{12} \text{ 末端/ml}$$

两个 j 值相差较大, 要保证 $j < i$, 在以后的计算中取两者值中较大的一个。

i 值是所有粘性末端的浓度测量值, 我们选择 $i = 10j_{\text{片段}}$, 使体系中形成串联体

$$i = 10j_{\text{片段}} = 1.10 \times 10^{13} \text{ 末端/ml} \quad [5]$$

$$i = i_{\text{片段}} + i_{\text{双臂}} = [2N_0 M_{\text{片段}} + 2N_0 M_{\text{双臂}}] \times 10^3 \text{ 末端/ml}$$

因为 $M_{\text{双臂}} = 2M_{\text{片段}}$, 所以

$$i = 6N_0 M_{\text{片段}} \times 10^3 \text{ 末端/ml} \quad [6]$$

根据等式 [5] [6] 得:

$$6N_0 M_{\text{片段}} \times 10^3 = 1.10 \times 10^{13}$$

$$M_{\text{片段}} = 3 \times 10^9 \text{ mol/L, 相当于 } 41 \mu\text{g/ml}$$

$$M_{\text{双臂}} = 2M_{\text{片段}} = 6 \times 10^9 \text{ mol/L, 相当于 } 107 \mu\text{g/ml}$$

由此得出, 反应体系中应含有 $41 \mu\text{g/ml}$ 的插入片段和 $107 \mu\text{g/ml}$ 的载体双臂, 这样样品经过连接后能够得

到适合于体外包装的 λ 重组噬菌体的串连体。

然而, 以上计算是假设所有 DNA 分子都是完好的, 但实际情况中, 不完全是这样的, 因此在进行连接反应以前, 根据理论计算值, 先进行一系列不同连接比例的连接和包装实验, 以确定产生最大量可包装分子的双臂与片段之间的连接比例。

8.5.2 连接条件的确定

1. 一般地说, 测试连接条件的实验含有固定量的 λ 噬菌体两臂 DNA $0.5 \sim 1.0 \mu\text{g}$, 而插入片段的 DNA 浓度是变化的。载体两臂与插入片段的摩尔数比在 $1:3 \sim 1:0.5$ 之间, 如果载体及 DNA 量较多, 也可扩大比例范围至 $1:4 \sim 1:0.25$ 。连接体积要尽量小, 一般 $5 \sim 10 \mu\text{l}$ 。测试的同时加只有载体没有插入片段, 以及没有载体只有插入片段的阴性对照, 以确定背景的水平。

表 8-3 连接条件的确定

	1	2	3	4	5	6	7
载体 DNA $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($1 \mu\text{g} \approx 0.035 \text{ pmol}$)	$2 \mu\text{l}$	$0 \mu\text{l}$	$2 \mu\text{l}$	$2 \mu\text{l}$	$2 \mu\text{l}$	$2 \mu\text{l}$	$2 \mu\text{l}$
插入片段 $300 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($100 \text{ ng} \approx 0.01 \text{ pmol}$)	$0 \mu\text{l}$	$3 \mu\text{l}$	$3 \mu\text{l}$	$2 \mu\text{l}$	$1 \mu\text{l}$	$0.5 \mu\text{l}$	$0.25 \mu\text{l}$
$10 \times$ 连接缓冲液	$1 \mu\text{l}$	$1 \mu\text{l}$	$1 \mu\text{l}$	$1 \mu\text{l}$	$1 \mu\text{l}$	$1 \mu\text{l}$	$1 \mu\text{l}$
H_2O	$6 \mu\text{l}$	$5 \mu\text{l}$	$3 \mu\text{l}$	$4 \mu\text{l}$	$5 \mu\text{l}$	$5.5 \mu\text{l}$	$5.75 \mu\text{l}$
T4 DNA 连接酶							
1~2 韦氏单位	$1 \mu\text{l}$	$1 \mu\text{l}$	$1 \mu\text{l}$	$1 \mu\text{l}$	$1 \mu\text{l}$	$1 \mu\text{l}$	$1 \mu\text{l}$
总体积	$10 \mu\text{l}$						

16°C 保温 4~6 小时。

2. 连接产物的体外包装:

如果使用量少, 可能购买商品包装蛋白。如普洛麦格公司生产的包装抽提物。如大量使用, 自己制备较便宜, 方法在后面介绍。

(1) 取连接反应物总体积的 $1/4$, $2.5 \mu\text{l}$, 加入到 $50 \mu\text{l}$ 包装抽提物中, 轻轻敲打离心管底部使之混匀, 如需测定包装效率, 则加 $0.5 \mu\text{g}$ $\lambda\text{CI 857 Sam7}$ DNA 串联体, 做阳性对照。

(2) 22°C 保温 2 小时。

(3) 加噬菌体缓冲液 $20 \text{ mmol/L Tris} \cdot \text{Cl}$ ($\text{pH} 7.4$)

100 mmol/L NaCl

10 mmol/L MgSO_4

至 $500 \mu\text{l}$, 加 $25 \mu\text{l}$ 氯仿。上下颠倒混匀, 静置使氯仿沉至管底。此包装好的噬菌体可以在 4°C 存放 3 星期。

3. 倒平板测定包装的噬菌体滴度:

(1) 把 2 中的包装好的噬菌体稀释 $1000 \sim 10000$ 倍。

(2) 取 $100 \mu\text{l}$ 稀释液加 $100 \mu\text{l}$ 培养好的受体菌 LE392 或 KW251, 37°C 放置 30 分钟使噬菌体吸附。

(3) 加 3 ml 融化的上层琼脂, (置 45°C 水浴中), 立即混匀例在 LB 平板上。待上层琼脂凝固后, 37°C 倒置培养过夜。

(4) 计算噬菌体的滴度, 如果平板上有 50 个噬菌斑, 其稀释倍数为 10000, 则滴度为 $50 \times 10000/$

$0.1\text{ml} = 5 \times 10^6 \text{ pfu/ml}$, 包装 DNA 浓度认为是 $0.5\mu\text{g}/0.5\text{ml} = 1\mu\text{g/ml}$, 则包装效率为 $5 \times 10^6 \text{ pfu}/\mu\text{g}$ 。

(5) 结果中阳性管 3~7 的噬菌体滴度应至少是阴性对照管 1 号的 100~1 000 倍, 如果用半臂填充载体, 则阴性对照为 $<100 \text{ pfu}/\mu\text{g}$ 。2 号对照管应该没有噬菌斑形成。挑取数个噬菌斑, 提取 DNA, 酶切检查插入片段的大小, 根据 3~7 号管的噬菌体滴度选择连接反应的最适比例。其噬菌斑形成率应 $>10^6 \text{ pfu}/\mu\text{g}$ 才能保证文库的完整性。如低于 $10^6 \text{ pfu}/\mu\text{g}$ 则不符合要求。

根据测试实验中的最适比例, 放大连接反应体系的体积, 可平行包装多个管, 或与测试实验相同平行做数个反应管。

注意事项:

(1) 更换不同批号的载体及插入片段, 连接反应条件需重新测试。因此, 最好制备足够数量的载体及插入片段, 以保证测得合适条件后, 有足够的同批量的样品来完成基因文库的构建。

(2) 测试实验的剩余产物不要丢弃, 它们经常能产生完整基因文库重组体数目的 1/2 或几乎全部。只要按测试条件再重复 1~2 次, 即可完成基因文库的构建。

(3) 如果噬菌体滴度较低, 可通过以下几种处理方法解决:

1) 如果使用的宿主菌为 LE392, 则更换为 KW251。因为有些真核重组子不能在 rec^+ 菌株中生长, 而 KW251 是 rec^- , 且能在 $15\mu\text{g/ml}$ 四环素环境中生长。

2) 在阳性对照连接实验中噬菌体两臂与噬菌体中央片段连接体系中, 加入基因组 DNA 插入片段, 连接后电泳检验看是否对连接反应有影响, 如果抑制连接反应, 则基因组 DNA 片段需经酚/氯仿抽提, 氯仿抽提, 乙醇沉淀再次纯化。

3) 多聚糖杂质, 存在于植物中或细菌基因组 DNA 中, 将影响大片段酶的补平作用及连接反应。除去多聚糖可在 1% 十六烷基三甲基溴化铵 (cetyltrimethyl ammonium bromide 简称 CTAB) 存在下用氯仿抽提。

4) 基因组 DNA 片段之间的连接效率很低, 说明样品中含有外切酶, 破坏了互补的粘性末端。需重新提取 DNA 片段, 或重新酶切。

8.5.3 包装抽提物的制备和体外包装

λ 噬菌体感染大肠杆菌一般形成 $1.8 \times 10^8 \text{ pfu}/\mu\text{g}$, 而 λDNA 直接感染大肠杆菌, 其效率只有 $10^4 \sim 10^6 \text{ pfu}/\mu\text{g}$, 两者相差 $10^4 \sim 10^6$, 因此重组 λDNA 如果能在体外有效地包装, 对于保证基因文库的完整性是极为重要的。1975 年, Becker 和 Gold 从感染 λ 噬菌体突变体的细菌制备抽提物, 成功地进行了 λDNA 的体外包装。Sfernerg 和 Faber 等建立了制备包装抽提物的方法, 这在《分子克隆》一书中有介绍。现在 λDNA 体外包装抽提物已有商品出售, 且包装效率很高, 如美国 Stratagene 公司、Promega 公司等, 这不仅减少了实验人员的工作量, 而且也节约了时间, 给工作带来很大方便。

利用具有 λ 噬菌体突变体的溶源菌, 制备包装抽提物, 其原理主要是噬菌体的包装过程需多种蛋白参与 (过程参见噬菌体一章), 如 E 蛋白, D 蛋白, A 蛋白等。D 蛋白突变, 导致大量前头部的积累, 且 λDNA 不能插入到前头部中。E 蛋白是构成噬菌体头部的主要成分, E 蛋白突变导致构成头部的其它蛋白呈可溶状态, 构成噬菌体外壳的所有蛋白均积累在细胞中。我们选用两种菌株 BHB2688, BHB2690, 前者具有 E 突变, 后者具有 D 突变, 两种溶源菌分别培养诱导后均不能产生噬菌体颗粒, 但把两种裂解液合并在一起, 由于两种突变的互补而使之具有产生成熟噬菌体颗粒的全部成分, 外源基因可被包装形成有感染能力的成熟噬菌体。

另一种方法是 Rosenberg 等 1985 年建立的, 利用 *E. coli* C 菌株制备一种细菌裂解液。较第一种方法要简单一些。*E. coli* C 有 2 个特点: ①溶源菌能产生噬菌体包装蛋白的全部组分; ②其所含原噬菌体缺失 *cos* 位点。*E. coli* C 菌株被诱导后, 能形成完整的前头部, 但由于 λDNA 缺乏 *cos* 位点, 因而不能插入前头部, 导致噬菌体外壳蛋白各组分的积累。当细菌裂解液中加入外源 DNA 时, *cos* 位点被识别并包

装入前头部, 随后形成有感染力的噬菌体。*E. coli* C 菌株由于缺乏 *E. coli* K 株的限制系统, 因对未修饰的外源 DNA 不产生降解, 其包装效率比 *E. coli* K 高 2~7 倍。

方法一: 含有两种裂解液的包装抽提物的制备

第一、从 BHB2690 细胞中制备超声抽提物 (提供前头部):

在制备包装抽提物之前要检验所用菌株的温度敏感基因 *Clts857* 及 *recA*⁻ 基因是否发生突变。从保种平板挑取单菌落接种于 2 块 LB 平板上, 一块置 32℃ 培养过夜, 另一块置 45℃ 培养过夜。挑选在 32℃ 生长而在 45℃ 不生长的菌落, 接种于 5ml 液体培养基中, 32℃ 振荡培养过夜。取少量过夜培养物涂平板, 置 45℃ 培养过夜, 如果平板上无菌落生长, 则此液体培养菌可用于大量制备包装抽提物。

recA⁻ 菌株经紫外线照射后, 因缺乏修复机制, 细菌不能生长, 以紫外线照射检验 *recA* 基因是否缺失, 挑选紫外线照射后不能生长的另一平板上相对应的菌落, 此种菌为 *recA*⁻。*recA*⁻ 菌株生长缓慢, 因而实验中挑取较小的菌落成功率较高。

(1) 使用 NZM 培养基 (N-Zamine, 水解酪蛋白 10g, NaCl 5g, MgSO₄·7H₂O 2g, 酪蛋白氨基酸 1g, pH7.5, 配制 1 升培养基), 制备 50ml 细菌培养物, 32℃ 过夜培养, 接种至 500ml 液体培养基中, 使初始菌液 OD_{600nm}≈0.1 左右, 32℃ 培养至对数生长期 OD_{600nm}≈0.3 左右。

(2) 45℃ 水浴中维持菌液温度与水浴温度相同 15~20 分钟, 38~39℃ 继续振荡培养 2~3 小时, 使热诱导后的菌液裂解, 取少量菌液加几滴氯仿振荡, 如果在几分钟内变清亮则说明裂解完全。

(3) 4℃, 4 000g 离心 10 分钟, 收集细胞。

(4) 尽量除去上清液, 用吸水纸擦干管壁。

(5) 加 3.6ml 超声缓冲液悬浮细胞沉淀。

超声缓冲液 20mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

1mmol/L EDTA

5mmol/L β-巯基乙醇

(6) 超声波打碎细胞, 10 秒/次, 共 20 次以上, 此步骤应在冰浴中进行, 因超声波产热较多, 每次间隔 20~30 秒, 不要使溶液温度超过 4℃。直至溶液清亮。粘度下降。

(7) 4℃, 12 000g 离心 10 分钟。

(8) 上清中加等体积超声缓冲液, 并加 1/10 体积新配制的包装缓冲液, 15μl/管分装, 液氮中冷冻后 -70℃ 保存。

包装缓冲液 6mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

50mmol/L 亚精胺

50mmol/L 腐胺

20mmol/L MgCl₂

30mmol/L ATP

30mmol/L β-巯基乙醇

第二、从 BHB2688 细胞中制备冻/融抽提物:

(1) 用与方法一中相同的方法检验 BHB2688 的温度敏感性及 *recA*⁻ 表型。大量制备生长至对数期的细菌 (OD_{600nm}≈0.3), 45℃ 诱导 15~20 分钟, 38~39℃ 培养 2~3 小时, 使之在细胞内积累包装蛋白。

(2) 4℃, 4 000g 离心 10 分钟, 收集菌体, 尽量除去上清, 用吸水纸吸干管壁。

(3) 加 3ml 冰冷的蔗糖溶液 [10% 蔗糖, 50mmol/L Tris·Cl (pH8.0)], 冰浴中 0.5ml/管分装 6 小管, 加 25μl/管冰冷的溶菌酶溶液 [2mg/ml 溶菌酶, 10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)], 温和地混匀, 快速液氮冷冻。

(4) 取出冷冻的小管, 冰上融化, 加 25μl/管新配制的包装缓冲液。

(5) 合并融化物, 4℃, 45 000g 离心 1 小时。

(6) 取上清液 10 μ l/管于 4℃ 分装, 置液氮中冷冻, -70℃ 长期保存。

第三、用上述两种抽提物包装 λ DNA:

(1) 取出上述两种包装抽提物, 置冰上融化。冻/融抽提物先融化, 把它转移至仍在冰冻状态的超声抽提物中。

(2) 混匀后在其全部融化之前加适量 λ DNA, [5 μ l 10mmol/L Tris·Cl (pH8.0), 10mmol/L MgCl₂ 溶液, 其中含有 DNA 至多 1 μ g]。用平滑的玻璃棒搅匀, 避免产生气泡, 室温放置 1 小时。

(3) 加 0.5~1ml SM 液和 1 滴氯仿, 温和地混匀, 室温下 12 000g 离心 30 秒以去除残渣。

SM 液: NaCl 5.8g

MgSO₄·7H₂O 2g

1mmol/L Tris·Cl (pH7.5) 50ml

2% 白明胶溶液 2ml

加水至 1L, 1.034 × 10⁵ Pa (15 磅/吋²) 灭菌 20 分钟, 室温分装保存。

(4) 用倒平板法测定包装后的噬菌体滴度。

上述包装抽提物也可用于粘性质粒的包装。它对被包装的重组 DNA 的长度有选择性, 相当于 λ DNA 长度的 90% 或 80% 的重组 DNA, 其包装效率要比正常长度的 DNA 低 1/50~1/20。

方法二: 从一种细菌裂解液中制备包装抽提物

选取 SMR10 菌株, 它具有 *CltS857* 温度敏感诱导基因, 但为 *recA*⁺ 菌株。

(1) 34℃ 过夜培养 50ml SMR10 菌液, 检测 OD_{600nm} 光吸收值, 在 100ml 预热至 34℃ 的 LB 培养基接种过夜培养物, 使 OD_{600nm} = 0.015, 54℃ 振荡培养至 OD_{600nm} = 0.8。(需 2~3 小时)。

(2) 在细菌生长期间, 冰浴配制下面溶液:

H₂O 255 μ l

DMSO 300 μ l

ATP 0.1mol/L (pH7.0) 45 μ l

DMSO 溶于水中产热, 在加 ATP 前, 溶液需在冰浴中冷却。

(3) 5 μ l/管分装, 冰浴中放置。

(4) 步骤 1 中生长至 OD_{600nm} = 0.8 的菌液, 分成两瓶, 45℃ 振荡培养 15 分钟。

(5) 37℃ 强烈振荡培养 90 分钟。

(6) 冰浴 5 分钟, 使菌液冷却, 以后的操作均在冰浴中进行。

(7) 250ml 离心管分两管于 4℃, 4 000g 离心 6 分钟。尽量除去上清液, 用吸水纸吸干管壁。

(8) 每管加 TSP 溶液 (预冷) 4.5ml, 温和地悬浮菌体并转移至一个管中。

TSP 溶液 0.04mol/L Tris·Cl (pH7.9)

0.01mol/L 亚精胺

0.01mol/L 腐胺

(9) 4℃, 4 000g 离心 6 分钟, 小心地尽可能地除去上清液。

(10) 沉淀中加 0.35ml TSP 溶液, 用玻棒小心地混匀。

(11) 加 50 μ l 上述悬浮液于步骤 3 中装有溶液的小管中, 振荡混匀, 0℃ 放置直至所有悬液分散均匀。

(12) 液氮冷冻保存。此抽提物在液氮中放置 4 个月仍能保持活性。如果在 -70℃ 贮存, 则在一星期内包装效率显著下降。

抽提物的包装过程:

(1) 从液氮中取出一管包装抽提物, 迅速加入 10 μ l DNA 溶液 (DNA 含量在 10pg~4 μ g 之间可被有效包装)

(2) 用玻棒温和地搅匀, 尽量避免产生气泡, 28℃加热 90 分钟。

(3) 包装反应完成后, 加 0.5ml 含有 50μg/ml DNase I 的 SMC 溶液, 混合均匀。加 3μl 氯仿, 再次混匀。振荡小管直至所有固体物质消失, 溶液均匀。

SMC: SMC - A 8ml
 SMC - B 2ml
 加水至 200ml

SMC - A 无水 Na_2HPO_4 52.5g
 KH_2PO_4 22.5g
 加水至 300ml

15 磅/吋² ($1.034 \times 10^5 \text{ Pa}$) 灭菌 15 分钟。

SMC - B NaCl 10g
 NH_4Cl 20g
 1mol/L MgCl_2 20ml
 1mol/L CaCl_2 20ml
 加水至 200ml

15 磅/吋² ($1.034 \times 10^5 \text{ Pa}$) 灭菌 15 分钟。

(4) 室温下, 12 000g 离心 2 分钟, 弃沉淀。

(5) 取上清液测定包装的噬菌体滴度。

包装实验完成后, 选择合适的宿主菌 (常用的有 LE392, NM538, NM539, KW251), 进行感染, 挑取 10~20 个噬菌斑, 小量提取 λDNA, 用适当的限制性内切酶切割后, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分离, 如果插入片段大小为 20kb 左右, 则说明连接和包装反应条件比较合适, 可以进行大量连接和包装, 建立完整的基因组文库。

8.6 基因组文库的保存和扩增

包装后的重组噬菌体在感染宿主菌时, 其滴度 (效价) 一般要在 10^6 pfu 以上, 才能保证基因组文库的完整性及代表性。Clark 和 Carbon 提出任一 DNA 顺序在文库中出现的机率

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-f)}$$

其中 p 为任何一段 DNA 顺序在文库中出现的机率; f 为插入片段长度与全体基因组总长度的比值, N 为重组克隆总数。例如建立人的基因组 DNA 文库, DNA 总长度为 $3 \times 10^9 \text{ bp}$, 假定插入片段为 17kb, 其在

文库中出现的机率为 99% 则, $N = \frac{\ln(1-0.99)}{\ln(1-\frac{1.7 \times 10^4}{3.0 \times 10^9})} = 8.1 \times 10^5$ 。N 的含义是对于长度为 $3.0 \times 10^9 \text{ bp}$ 的基

因组 DNA, 在重组子插入片段大小为 17bp 时, 所构建的基因文库数目必须在 8.1×10^5 以上时, 才能保证 99% 的基因组 DNA 存在于文库中。在实际实验中, 由于采用限制性内切酶部分降解法, 其随机性受一定限制, 因而所建文库的克隆数要比理论计算值高 3 倍, 甚至更高时, 才能保证文库的完整性。

基因文库的保存比较简单, 经过测试连接反应和包装反应条件, 选择合适的条件进行大量连接及包装, 离心除去沉淀, 上清中加少量 (几滴) 氯仿, 4℃可长期保存, 滴度保持在 10^{10} pfu 左右。一般构建好的基因文库可用于筛选特定基因。也可先行扩增, 再行筛选。扩增的好处在于增加每个重组噬菌体的拷贝数, 有利于筛选、重复使用及长期保存。但也有许多缺点, 由于真核基因片段插入至 λ 噬菌体中, 外源 DNA 对噬菌体的生长会造成不同的影响, 因而每个克隆的生长速度不尽相同, 有的生长的快, 有

的生长慢，生长慢的噬菌体在扩增过程中的比例越来越少，而生长快的越来越多，这样就会造成某些克隆的丢失，影响了基因文库的完整性；另一缺点在于如果噬菌体数目较多，则会出现两个不同重组噬菌体感染同一细菌的现象，如果重组子间具有同源顺序，则由于同源重组作用会导致重组子间的 DNA 重排和互换，破坏了基因文库顺序的真实性，一般构建好的基因文库不进行扩增，直接筛选所需基因，更有利于那些生长缓慢的克隆的检出。如果扩增基因文库，则需注意以下几点：①选用固体培养基平板培养法，以减少液体培养环境中的竞争生长现象；②每个平板上噬菌斑数目不要太大，培养时间控制在 8~10 小时，防止不同噬菌斑相互融合；③控制噬菌体与受体菌的比例，噬菌体密度不宜过大，防止 2 个以上噬菌体同时感染一个宿主菌；④采用新鲜宿主菌，防止噬菌体吸附于死细胞。

扩增方法：

(1) 制备新鲜受体菌。从过夜培养的划线平板上挑取单菌落；接种于含 0.2% 麦芽糖的 LB/NZCYM 培养基中，37℃ 培养过夜，取 1ml 接种于 100ml 培养基中，37℃ 培养至 OD_{600nm} = 0.5，离心，收集菌体，并悬浮于 10ml 10mmol/L MgSO₄ 溶液中。

(2) 根据包装混合物的滴度，取混合物使噬菌体的量达到 10 000~20 000 个，与 0.2ml 受体菌液混合，根据文库规模，计算所需试管数，37℃ 吸附 20 分钟。

(3) 加 65ml 融化的上层胶，混匀后倒于预先铺有底层琼脂的 150mm 平板上。

也可把 450 000 噬菌体与 14ml 菌液混合，加 75ml 上层琼脂，倒在 230mm × 330mm 的有底层琼脂的平盘中。

(4) 37℃ 培养 8~10 小时，勿使噬菌斑互相接触。

(5) 加 12ml SM 液 (150ml 大盘)，4℃ 浸泡过夜，将上清吸入离心管中。

(6) 平板中加 4ml SM 液，0.2ml 氯仿，室温放置 15 分钟，并不断摇动。

(7) 合并两次 SM 液，4℃，4 000g 离心 5 分钟。

(8) 上清液置玻璃管中，加 1~2 滴氯仿，4℃ 保存，其滴度可在几年内保持稳定。

(9) 若加 DMSO 至 7%，可贮存于 -70℃。

8.7 粘性质粒为载体的基因组文库

粘性质粒 (cosmid) 作为载体构建基因文库与 λ 噬菌体 DNA 载体相比有以下几个特点：①粘性质粒比较小，长度 5kb 左右，可能插入较大的外源基因片段 (40~45kb)，因而基因文库的规模比 λ 噬菌体为载体时要小；②粘性质粒具有 cos 位点，因而可被包装成噬菌体颗粒，其感染细菌的过程与 λ 噬菌体相同；③由于粘性质粒中不含 λDNA 的复制起始点，而含有质粒的复制起始点，因而其扩增过程与质粒相同，重组 DNA 感染细菌后，产生含有重组质粒的菌落。

对于粘性质粒的特征及其应用在本书有关章节中已有介绍，这里不再赘述。

使用粘性质粒作为载体，构建基因组文库时，主要有以下几个步骤。

(1) 用适当的限制性内切酶 (如 BamH I) 切开质粒，用碱性磷酸酶处理脱去 5' 末端磷酸，以减少质粒间的串连及自身环化。

(2) 提取分子量在 200kb 以上的真核染色体 DNA (方法见 8.4)。选择适当的内切酶如 Sau 3A I 进行部分降解，分离纯化 45kb 左右大片段。尽量避免打断 DNA 分子的操作。

(3) 外源基因与载体相连接时，质粒的摩尔数要比片段高 10 倍以上，以利形成串联体，连接反应中 DNA 的浓度也要高一些，达到 200μg/ml。

(4) 包装及感染步骤与噬菌体相同。

(5) 包装后的重组 DNA 吸附细菌以后，加 1ml LB 培养基，37℃ 培养 45 分钟，铺平板，在含有一定的抗生素的培养基中筛选含重组质粒的菌落。

(6) 小量抽提质粒, 并做酶切, 鉴定插入片段的大小。

基因组文库构建好以后, 要从中找到感兴趣的基因一般用原位杂交法筛选, 具体操作方法参见有关章节。

(于文文 琦祖和 审)

参 考 文 献

1. Murry NE, et al. Manipulation of restriction targets in phage λ to form receptor chromosomes for DNA fragments. *Nature*, 1974, 251:476
2. Rambach A, et al. Bacteriophage λ having EcoRI endonuclease sites only in the nonessential region of the genome. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1974, 71:3927
3. Rosenberg SM, et al. Improved in vitro packaging of coliphage lambda DNA: A one - strain system free from endogenous phage. *Gene*, 1985, 38:165
4. Rosenberg SM, et al. EcoK restriction during in vitro packaging of coliphage lambda DNA. *Gene*, 1985 39:313
5. Karn J, et al. Novel bacteriophage λ cloning vector. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1980, 77:5172
6. Karn J, et al. A new selective phage cloning vector, λ 2001, with sites for XbaI, BamHI, HindIII, EcoRI, SstI and XhoI. *Gene*, 1984, 32:217
7. Clarke L, et al. A colony bank containing synthetic col EI Hybrid plasmids representative of the entire E. Coli genome. *Cell*, 1976, 9:91
8. Dunn IS, et al. Charons 36 to 40: Multi enzyme, high capacity, Vecombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15:2677
9. Sambrook J, et al. *Molecular Cloning, A laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
10. Promega Corporation. *Promega protocols and applications guide*. 2nd ed, 1991

9. cDNA 文库

9.1 概述

cDNA 是指以 mRNA 为模板, 在反转录酶的作用下形成的互补 DNA (complementary DNA, 简称 cDNA)。与基因库一样, cDNA 库也是指一群含重组 DNA 的细菌或噬菌体克隆。其区别之处在于, 在体外重组 DNA 时, 选用的供体不是源于生物体的基因组, 而是由细胞的 mRNA 所提供。在反转录酶作用下, mRNA 可在体外被反向转录合成 DNA 拷贝, 拷贝 DNA 的核苷酸序列完全互补于模板 mRNA, 因此这种以 mRNA 为模板, 在体外由反转录酶促合成的单链 DNA, 称之为互补 DNA (cDNA)。若再以 cDNA 为模板, 由大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 可合成第二链, 得到双链 DNA。由于 mRNA 制剂含有某种细胞的各种 RNA 分子, 因而被合成的 cDNA 产物将是各样 mRNA 拷贝的群体, 将其和载体 DNA 重组, 并转化到宿主细菌里或包装成噬菌体颗粒, 得到一系列克隆群体。每个克隆只含一种 mRNA 的信息, 足够数目克隆的总和则包含细胞的全部 mRNA 的信息, 这样的克隆群体叫 cDNA 库。cDNA 便于克隆和大量扩增, 不像基因组 DNA 含有内含子很难表达, 可以从 cDNA 库中筛选到所需的目的基因, 并直接用于该目的基因的表达。所以在基因工程研究中, 真核细胞的 cDNA 库往往比基因库更为有用。

cDNA 库可分表达型和非表达型两类。表达型 cDNA 库采用表达型载体。插入的 cDNA 片段可表达产生融合蛋白, 具有抗原性或生物活性。这类 cDNA 库适用于那些蛋白质的氨基酸序列目前尚不完全清楚, 不能采用核苷酸探针筛选的目的基因, 可采用能与表达产物发生特异性结合的抗体或化合物进行标记筛选。这类 cDNA 库中最常用的是 λ gt11 cDNA 库。非表达型 cDNA 库适用于那些采用核苷酸探针进行杂交筛选的基因。核苷酸探针可以从部分蛋白质序列中推知的人工合成的寡核苷酸序列, 也可以是同种或同属的已知的同源序列。这类 cDNA 库中最常用的是 λ gt 10 cDNA 库。

还可根据载体的不同, 将 cDNA 库分为质粒 cDNA 库和噬菌体 cDNA 库。前者包含的 cDNA 克隆数目较少, 适于较高丰度的 mRNA; 后者包含的 cDNA 克隆数目非常多, 适用于那些低丰度和极低丰度的 mRNA。

在构建一个 cDNA 库时, 首先应考虑的问题是筛选方法。若采用核苷酸探针进行杂交筛选, 可构建表达型或非表达型 cDNA 库; 如利用蛋白质的生物活性或免疫原性进行筛选, 则只能构建表达型 cDNA 库。其次应考虑的问题是 mRNA 的丰度。对于高丰度的 mRNA 所需构建的 cDNA 库相对较小; 而极低丰度的 mRNA, 如仅占 mRNA 总量的 $1/10^6$ 的某些 mRNA, 所需构建的 cDNA 库则必须很大, 尽可能包括其对应的克隆。

构建 cDNA 库主要包括以下几个步骤: ①mRNA 的分离; ②cDNA 第一链的合成; ③cDNA 第二条链的合成; ④cDNA 与载体的连接; ⑤噬菌体的包装及转染或质粒的转化。现简述如下。

9.1.1 mRNA 的分离

成功的构建一个 cDNA 库, mRNA 的获得是一个至关重要的因素。

首先 mRNA 必须完整, mRNA 种类越多, 构建的 cDNA 库就越完整。mRNA 不能降解, 可用 Northern blot 检测。可采用已知的基因为探针进行检测, 杂交后的条带应清晰, 不出现拖尾现象。

其次应注意 mRNA 不被 DNA 污染, 即使是 1 ppm DNA 的污染, 也可严重影响其结果。提取 mRNA 的具体方法参见本书第四章 mRNA 提取部分。

9.1.2 cDNA 第一链的合成

由于反转录酶的发现和应用,使 mRNA 可在体外反转录成 DNA。cDNA 第一链的合成有两个关键因素,一是模板 mRNA,二是反转录酶。

模板 mRNA 制备后,可用变性凝胶电泳检测其完整性和有无 DNA 污染。提取的 mRNA 应该在 0.5 ~ 8.0kb 之间均匀着色,无明显区带,但在 1.5 ~ 2.0kb 间应着色较强。

反转录酶有两种:一种来源于鸟成髓细胞性白血病病毒 (avian myeloblastosis virus, AMV);另一种来源于莫洛尼鼠白血病病毒 (Moloney murine leukemia virus, M-MLV)。目前,已有市售的 M-MLV 反转录酶的制品。上述两种反转录酶均有两种酶活性:DNA 聚合酶活性和 RNase H 酶活性。后一种酶活性在反应中起副作用,它可使 cDNA-RNA 杂交分子中的 RNA 分子降解成小片段,继而做为引物或被反转录成小片段 DNA,以致干扰全长 cDNA 的合成;另外, RNase H 酶活性还可使 mRNA 分子末端的 poly A 序列降解,当使用 oligo-dT 做引物时,使分离出来的 mRNA 成为无效模板,降低 cDNA 的合成产率。因此应尽量去除它的活性。Gibco-BRL 公司出品一种 M-MLV 反转录酶,缺少 C-末端 180 个氨基酸,已完全去除其 RNase H 酶活性,并保持完整的 DNA 聚合酶的活性。

在反转录酶作用下,第一链的合成起始于与 mRNA 杂交的引物。常用的引物有两种,一种是 Oligo-dT,另一种是 6 聚体寡聚核苷酸随机引物。Oligo-dT 可与 mRNA 分子的 3'末端的 poly A 序列相结合,形成非常有效的引物。但使用 Oligo-dT 做引物也有缺点,即第一条链合成需起始于 mRNA 的 3'末端,越过可能较长的 3'非编码区才能达到 mRNA 的编码区。对于较长的 mRNA (>3kb) 分子,就很难得到全长的 cDNA。若采用随机引物,第一链的合成可能起始于 mRNA 上的许多部位,这样就保证能够得到 mRNA 的编码区及 5'末端的序列。在构建表达型 cDNA 库时,由于插入片段方向及阅读框架的影响,真正表达融合蛋白的 cDNA 克隆只占 1/6。若在 Oligo-dT 引物的末端加上一个 Not I 或 Xho I 的限制性内切酶识别位点,使得产生的 cDNA 片段可定向插入载体,便可将这一比率提高一倍。

在合成第一链时,一般掺入 α - ^{32}P -dCTP,以便计算合成的效率。计算的公式如下:

$$\text{第一链合成 pg} = \frac{\text{掺入第一链 cpm}}{\text{总 cpm}} \times \text{合成 DNA 的总量}$$

通常第一链的合成率不太高,产量最高可达模板 mRNA 的 50%。

9.1.3 cDNA 第二链的合成

第一链的合成反应完成后,得到 DNA/RNA 杂交分子,在 DNA 聚合酶的作用下,以第一链为模板,合成 cDNA 的第二链。

第二链的合成有两种方法:第一种方法是变性降解除去 DNA/RNA 杂交分子中的 RNA (图 9-1)。单核 cDNA 3'末端自身环化,形成发夹结构,在 DNA 聚合酶作用下,开始第二链的合成这种方法由于采用 S1 酶降解“发夹”结构,常常使这部分序列丢失。因此,目前采用第二种方法合成 cDNA 的第二链。

第二种方法用 RNaseH 酶使 DNA/RNA 杂交分子中的 RNA 分子水解为小片段,并以此为引物起始第二链的合成,类似“缺口翻译”。当加入大肠杆菌 DNA 连接酶时,使第二链成为完整的分子(图 9-2)。最后在 T4 DNA 聚合酶作用下,使双链 DNA 成为平头末端,这样才能与连接子相连。

9.1.4 cDNA 与载体的连接

构建 cDNA 库最常用的载体是 λ gt 10 和 λ gt 11 两种,其酶切图谱见图 9-3。

这两种载体都有供外源 cDNA 片段插入的 EcoR I 位点。上一步骤得到的双链 DNA 为平头末端,需要在其两边加上 EcoR I 连接子,然后经过 EcoR I 酶切消化,产生两个 EcoR I 粘性末端(图 9-4),然后与载体相连接。

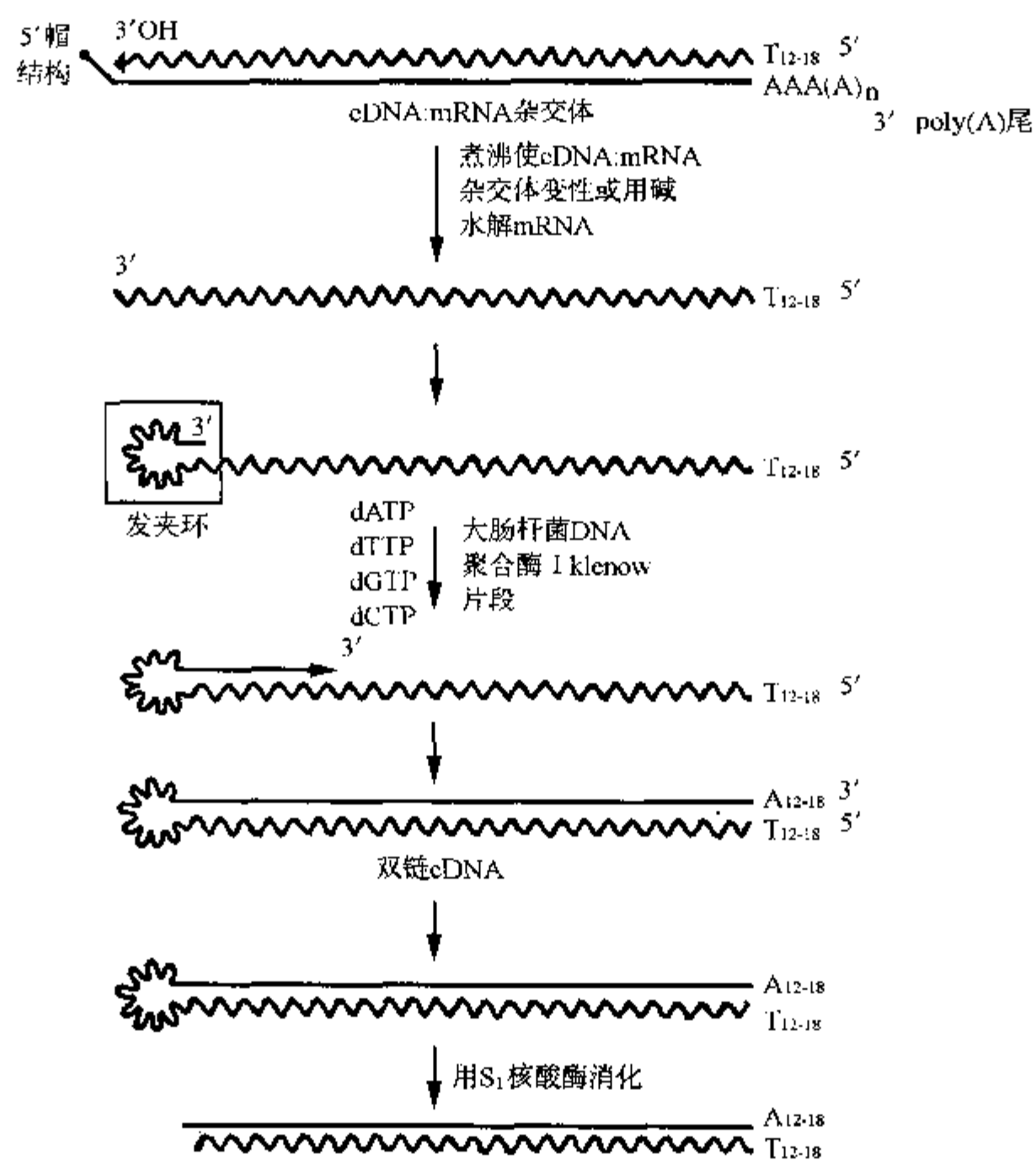


图 9-1 cDNA 第二链的合成方法一

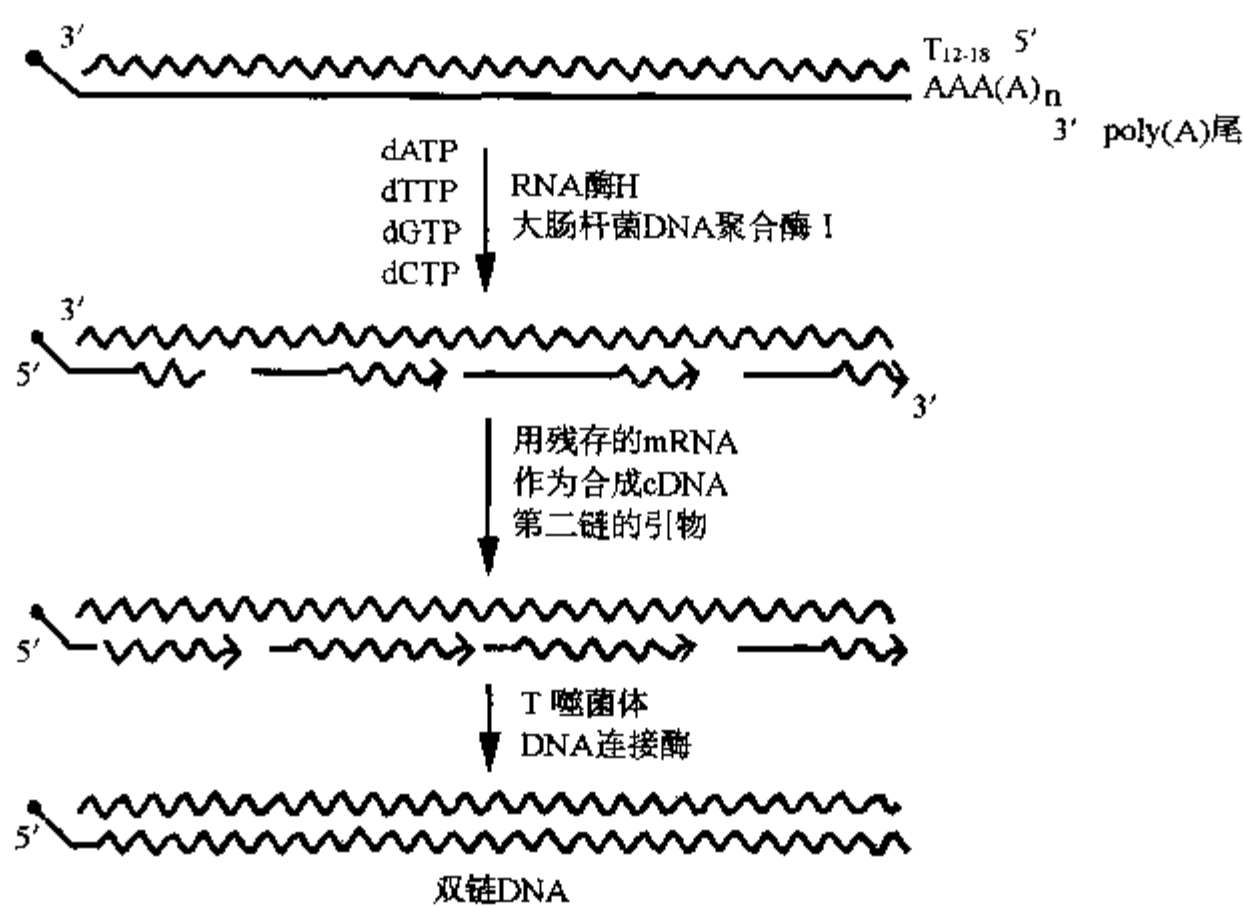


图 9-2 cDNA 第二链的合成方法二

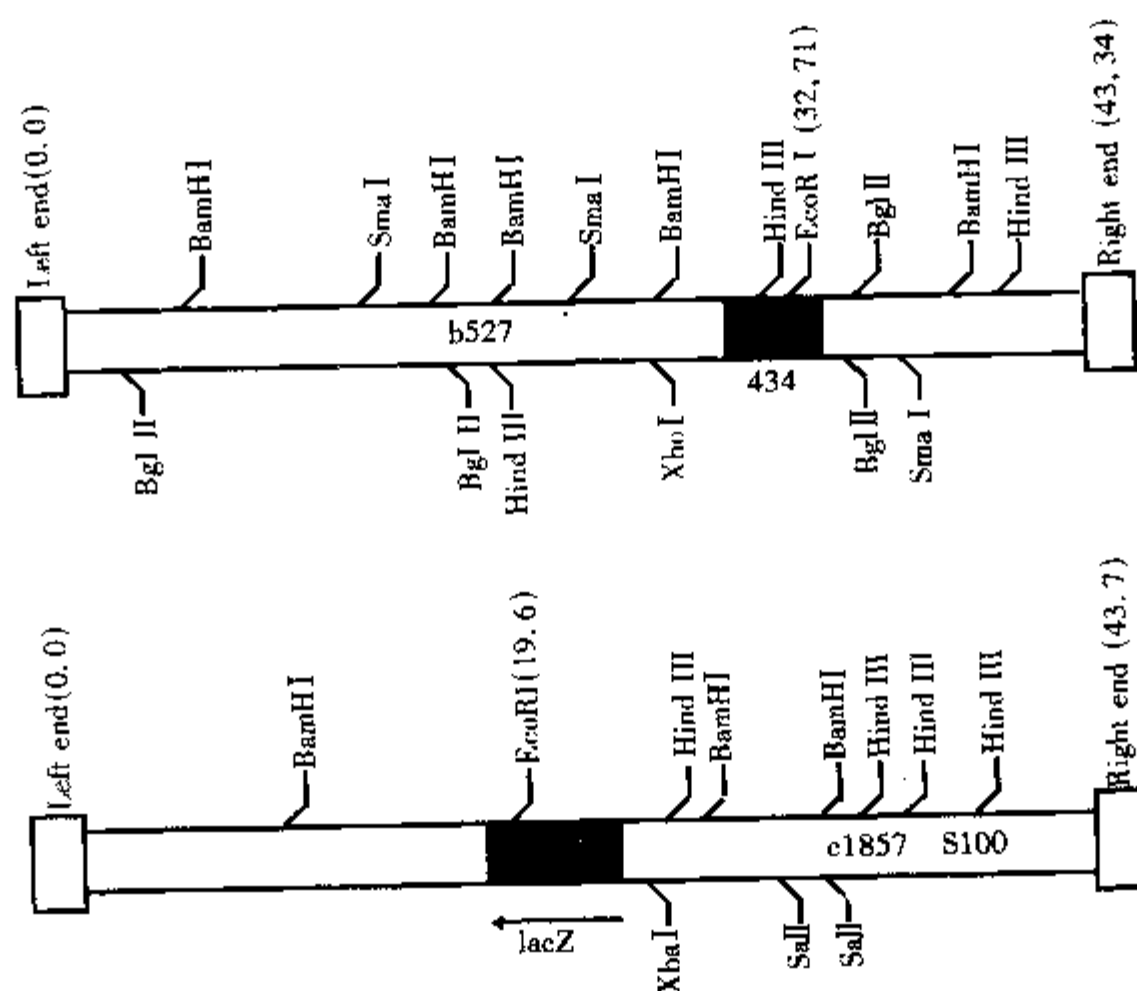
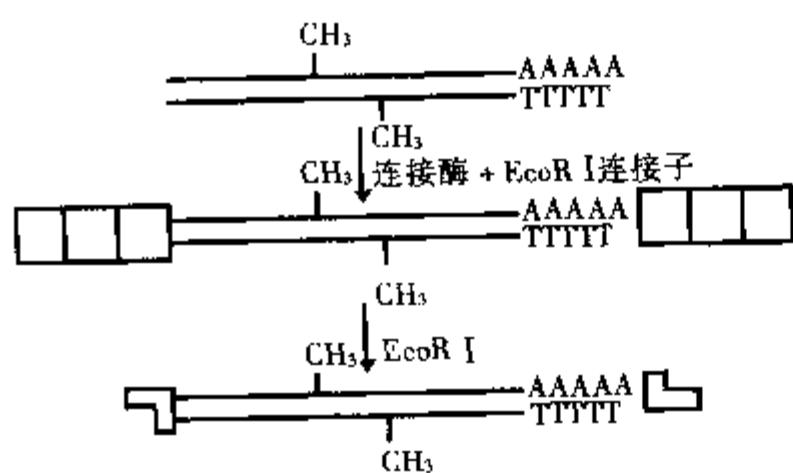
图 9-3 载体 λ gt10 (上) 和 λ gt11 (下)

图 9-4 cDNA 与 EcoRI 连接子的连接

在加上 EcoRI 连接子之前, cDNA 需要经过 EcoRI 甲基化酶甲基化, 以免在酶切产生粘性末端时 cDNA 内部的 EcoRI 位点被切开。

如果构建表达型 cDNA 库, 必须采用 3 种长度的连接子, 每种长度相差两个核苷酸, 以保证插入片段能有一种正常的阅读框架, 表达出融合蛋白。

cDNA 片段与连接子连接后, 经过凝胶电泳或柱层析分部分离, 可将过量的未被连接的连接子及一些小的 cDNA 片段除去。

cDNA 片段末端经过处理后, 可与载体进行连接。

由于 cDNA 大小不均一, 很难确定其克隆分子浓度,

因此, 在与载体连接时需要进行摸索试验, 以确定 cDNA 与载体的最佳摩尔数比, 保证有最佳的克隆效率。另外, 为防止自身连接, 使用脱磷酸的噬菌体左右臂效果更好。

9.1.5 噬菌体的包装、转染及质粒 DNA 的转化

如果采用质粒 DNA 做载体, cDNA 与载体连接后可直接转染宿主细胞, 建立 cDNA 库。

若采用噬菌体为载体, 必须经过体外包装, 形成噬菌体颗粒, 感染宿主菌。包装蛋白来自大肠杆菌 BHB 2690 和 BHB 2688 抽提液。对于 λ gt10 选用 *E. coli* BNN 102 宿主菌, 没有外源基因插入的载体在此菌中不能生长。对于 λ gt11 载体则选用 *E. coli* Y 1090 为宿主菌, 通过蓝白斑确定有无外源基因插入。

包装后必须测定噬菌体的效价, 只有达到一定的效价, 才能大规模地进行包装、转染, 一旦 cDNA 库建立, 应进行效价测定并扩增。扩增后的 cDNA 库可长期保存, 并多次筛选。

现将上述过程概括于图 9-5 中。

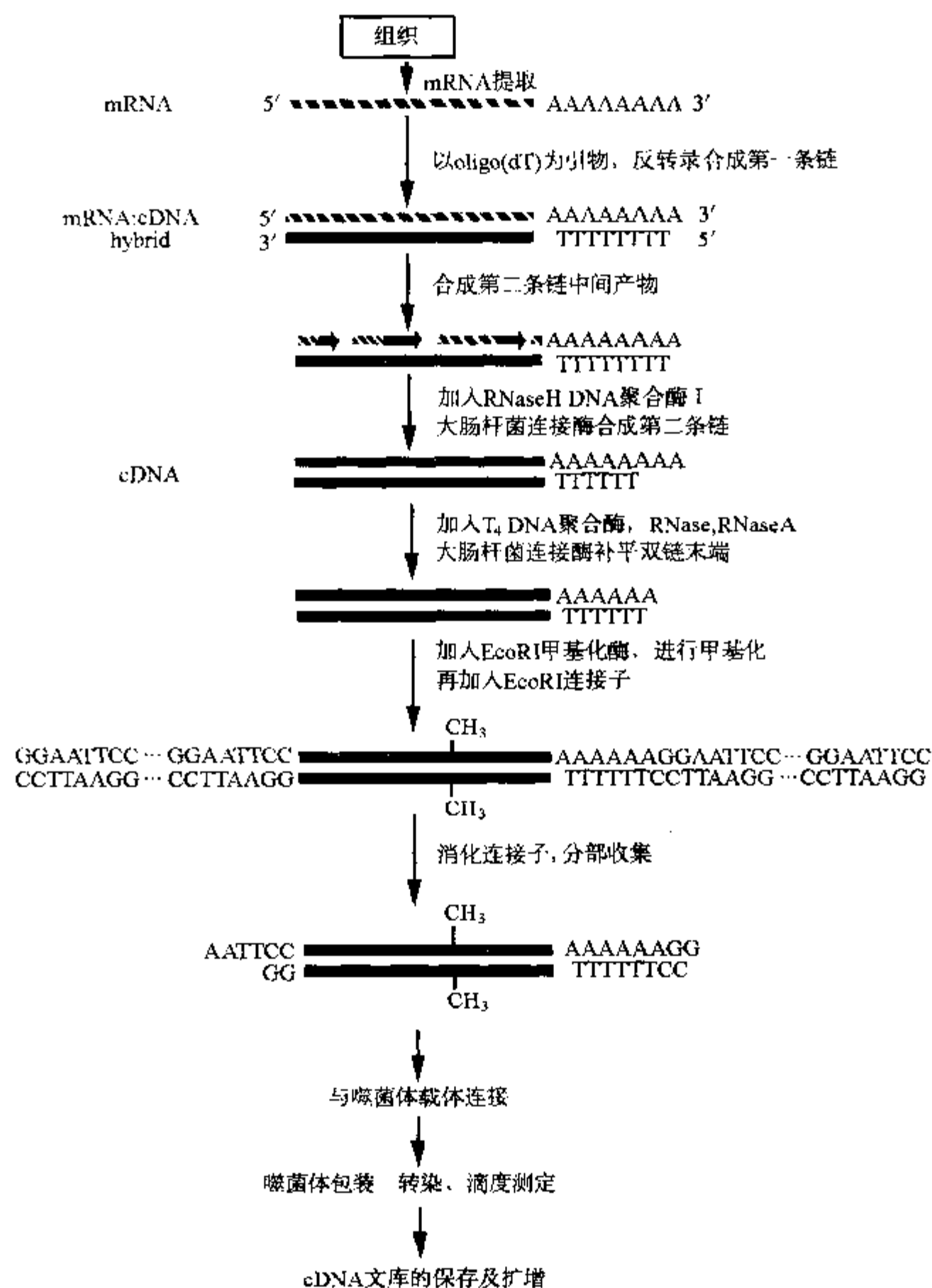


图 9-5 噬菌体的包装、转染及质粒 DNA 的转化过程

9.2 cDNA 库的构建

9.2.1 mRNA 分离

具体的操作方法, 参见本书第四章 mRNA 提取一节, 这里不再赘述。

对于某些只在特定细胞或组织内表达的基因, 要选择合适的细胞或组织提取 mRNA, 否则将不能得到所要求的 cDNA 克隆。特别需要注意的是要防止操作过程中 DNA 的污染。最好使用一次性的塑料器

皿, 提取 mRNA 的所用试剂也应专用。

9.2.2 第一链的合成

试剂:

1mg/ml poly A⁺ mRNA
1mg/ml Oligo - dT₁₂₋₁₈
1mol/L Tris·Cl (pH7.6)
1mol/L KCl
250mmol/L MgCl₂
dNTP 混合物 (均为 5mmol/L)
100mmol/L DTT
25U/ml RNase 抑制剂
200U/ml 鼠反转录酶
10pci/μl α - ³²P - dCTP

操作步骤:

(1) 取 1 个 Eppendorf 管, 向其中加入 10μl polyA⁺ mRNA (1mg/ml), 10μl Oligo - dT₁₂₋₁₈ (1mg/ml), 2.5μl 1mol/L Tris·Cl (pH7.6), 3.5μl 1mol/L KCl, 2μl 250mmol/L MgCl₂, 10μl dNTP 混合物, 2μl 100mmol/L DTT 和 25 单位的 RNA 酶抑制剂。

(2) 加水至 48μl, 然后加入 2μl 鼠反转录酶 (Pharmacia, 200U/ml), 轻轻混匀。

(3) 为计算第一链的合成率, 取出 2.5μl 混合液置于 1 个小管中, 然后加入 0.1μl α - ³²P - dCTP。将两管反应液于 37℃ 保温 1 小时, 再将大量反应管置于 4℃ 条件下。

(4) 从小量反应管取出 0.5μl 反应液, 分别计算其总放射性及 TCA 沉淀的放射性。由于在反应体系中已加入 200nmol/L 的 dNTP, 以平均分子量为 330 计算, 共能产生 66μg 的 DNA。第一链的实验产率为:

$$\frac{\text{掺入的 cpm 值}}{\text{总 cpm 值}} \times 66 (\mu\text{g})$$

注意事项:

- (1) 10μg mRNA 可建立 1 个较大的 cDNA 文库。
- (2) 第一链合成后其产物经 1% 琼脂糖电泳, cDNA 长度应为 0.7 ~ 8kb。
- (3) 若采用不同的反转录酶, 则应改变反应体系的 pH 值及离子强度。由于各公司生产的反转录酶的最佳反应条件不同, 操作应用时应参照各公司的推荐体系。
- (4) 相对多的反转录酶及引物可提高第一链的产率。

9.2.3 第二链的合成

第一链合成反应产物可直接进行第二链的合成, 无需进行特殊处理。

试剂:

10mmol/L MgCl₂
2mol/L Tris·Cl (pH7.4)
α - ³²P - dCTP (400Ci/mmol, 10μCi/μl)
1mol/L (NH₄)₂SO₄
1 000U/ml RNase H
10 000U/ml *E. coli* DNA 聚合酶 I
50mmol/L 辅酶 I

1 000 000U/ml *E. coli* DNA 连接酶
 3 000U/ml 噬菌体 T₄ 多聚核苷酸激酶
 0.5mol/L EDTA (pH8.0)
 10mmol/L NaCl
 TE 缓冲液, (pH7.6)

操作步骤:

(1) 向第一链合成产物中加入 70 μ l 10mmol/L MgCl₂, 5 μ l 2mol/L Tris·Cl, (pH7.4), 10 μ l α -³²P-dCTP (400Ci/mmol), 1.5 μ l, 1mol/L (NH₄)₂SO₄, 1 μ l RNase H (1 000U/ml), 0.5 μ l 10 000U/ml *E. coli* DNA 聚合酶 I, 在 16℃ 条件下放置 4 小时。

(2) 再加入 1 μ l 50mmol/L 辅酶 I, 1 μ l 1 000 000U/ml 的 *E. coli* DNA 连接酶, 1 μ l 3 000U/ml 噬菌体 T₄ 多聚核苷酸激酶在室温下放置 15 分钟。*E. coli* DNA 连接酶将修复 DNA 链中的缺口, T₄ 多聚核苷酸激酶将使 Oligo dT 的 5' 端磷酸化。

(3) 加入 5 μ l 0.5mol/L EDTA, (pH8.0) 终止反应。取 0.5 μ l 反应液测定总放射性和 TCA 沉淀的放射性。其余样品用等容积酚/氯仿抽提。

(4) 然后用 Sephadex - G50 柱层析除去未掺入的 dNTP, 平衡液为 TE (pH7.6) 10mmol/L NaCl。用两倍体积的无水乙醇进行沉淀, 回收的 cDNA, 溶解于 80 μ l TE 缓冲液中, pH7.6。

(5) 第二链合成产率为:

$$\frac{\text{掺入第二链的 cpm}}{\text{总 cpm}} \times \text{第一链产量 \%}$$

第二链合成产率一般可达第一链的 70% ~ 80%。

9.2.4 cDNA 的甲基化

(1) 向 cDNA 溶液中加入:

2mol/L Tris·Cl (pH8.0)	5 μ l
5mol/L NaCl	2 μ l
0.5mol/L EDTA (pH8.0)	2 μ l
20mmol/L S-腺苷甲硫氨酸	1 μ l

加水到终体积为 98 μ l, 加入 2 μ l EcoR I 甲基化酶 (80 000U/ml), 于 0℃ 条件下混合, 37℃ 保温 1 小时。68℃ 加热 15 分钟终止反应。

(2) 用等容积酚/氯仿抽提, 再用氯仿抽提, 乙醇沉淀, 将回收的 cDNA 溶于 29 μ l TE (pH7.6) 的缓冲液中。

9.2.5 cDNA 与连接子的连接

在 cDNA 与连接子进行连接之前, cDNA 需经过 T₄ 噬菌体 DNA 聚合酶补平末端。

操作步骤:

(1) 将 cDNA 溶液于 68℃ 加热 5 分钟, 以展开 DNA 末端单链结构, 冷却至 37℃。

(2) 加入 5 × T₄ 噬菌体 DNA 聚合酶缓冲液 10 μ l

[90mmol/L (NH₄)₂SO₄, 0.33mol/L Tris·Cl (pH8.3), 33mmol MgCl₂, 50mmol/L β -巯基乙醇]

4 种 dNTP 混合物 (各为 5mmol/L) 5 μ l

(3) 加水至 50 μ l, 再加入 1 ~ 2U T₄ 噬菌体 DNA 聚合酶 (500U/ml), 37℃ 保温 15 分钟。

(4) 然后加入 1 μ l 0.5mmol/L EDTA (pH8.0), 以终止反应。

(5) 用酚/氯仿抽提样品, 用 Sephadex G - 50 柱层析除去未掺入的 dNTP。

(6) 乙醇沉淀, 再将 cDNA 溶于 13 μ l 10mmol/L Tris·Cl (pH7.6) 缓冲液中。

(7) 向其中加入:

10 \times 连接缓冲液	2 μ l
磷酸化的 EcoR I 连接子 (800 ~ 1 000ng)	2 μ l
T ₄ 噬菌体 DNA 连接酶 (10 000U/ml)	1 μ l
10mmol/L ATP	2 μ l

混匀后, 16 $^{\circ}$ C 保温 8 ~ 12 小时

(8) 68 $^{\circ}$ C 加热 15 分钟, 以灭活连接酶, 冰浴 2 分钟。

(9) 然后加入

10 \times EcoR I 酶缓冲液	20 μ l
H ₂ O	150 μ l
EcoR I 酶	200U

混匀后 37 $^{\circ}$ C 保温 2 小时。

(10) 用酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀, 将 cDNA 溶于 20 μ l TE (pH7.6) 中, 60 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟, 终止反应。

注意事项:

(1) 连接子的浓度应该很大 (> 100 倍), 以保证每个 cDNA 分子的末端都有连接子相连, 而不是自身连接。

(2) 连接效率的检查: 取连接后样品进行 1.4% 琼脂糖凝胶电泳, 若在胶底部出现弥散性着色区, 表明连接效果良好。经 EcoR I 酶切后, 连接子形成的着色区消失。

9.2.6 cDNA 的分部分离

加上连接子之后, cDNA 需要经过 Sepharose CL-4B (27cm \times 0.3cm) 柱层析分离, 以除去未连接的 EcoR I 连接子和 500bp 以下的 cDNA 片段。

操作步骤:

(1) 向反应液中加入 2 μ l 10 \times 上样缓冲液。

(2) 用含 0.1mol/L NaCl 的 TE (pH7.6) 彻底洗涤 Sepharose CL-4B 柱层析。

(3) 分部收集流出液, 每管约 200 μ l, 至收集液无放射性为止。

(4) 从每管中取出 2 μ l 进行放射性测定, 绘制洗脱液曲线。收集洗脱液峰值中间部分, 进行乙醇沉淀, 再将样品溶于 20 μ l 10mmol/L Tris·Cl (pH8.0) 缓冲液中。测定 cpm 值, 可得出与载体连接的 cDNA 含量。

$$\text{用于连接的 cDNA 的产量 } (\mu\text{g}) = \frac{\text{回收 cpm}}{\text{插入第二链 cDNA 的 cpm}} \times \text{第二链合成量 } (\mu\text{g}) \times 2$$

如果实验顺利, 10 μ g mRNA 可获得 250 ~ 400ng cDNA, 其长度大于 500bp。

9.2.7 cDNA 的克隆

构建 cDNA 库的最后步骤是将 cDNA 克隆到载体上。通常选用 λ gt10 或 λ gt11 做为载体。cDNA 和载体的比例是这一步骤成功的关键。需要做两者不同浓度比例的预试验, 以确定最佳条件。作者的经验, 一般以 50 ~ 100ng 的 cDNA 与 1 μ g 的去磷酸化的 λ 噬菌体载体进行连接的效率最高。

操作步骤:

(1) cDNA 与载体连接, 在一个小管中加入:

cDNA	100ng
------	-------

λ gt10 或 λ gt11 1 μ g

10 \times T4 噬菌体 DNA 连接酶缓冲液 2 μ l

加水至 19 μ l 混匀, 42℃保温 15 分钟, 使 λ 噬菌体 DNA 退火, 然后冰浴 2 分钟, 加入 1 μ l 20 韦氏单位 T4 噬菌体 DNA 连接酶 (20 000U/ml), 于 14℃连接过夜。

(2) 体外包装:

从 -70℃取出包装蛋白, 放在冰浴中融化, 待包装蛋白混合物完全融化后, 立即加入 cDNA 进行包装。反应完成后加入 500 μ l SM 及 1 滴氯仿, 轻轻混匀, 冰浴保存。

(3) 转染大肠杆菌:

将上述包装好的噬菌体分别稀释 10² 倍和 10³ 倍, 各取 1 μ l 转染预先以 SM 处理的宿主菌, 测定效价, 对于 λ gt10 噬菌体, 选用 *E. coli* BNN102 为宿主菌。对于 λ gt11 噬菌体选用 *E. coli* Y1090 为宿主菌。

测定效价后, 将剩余噬菌体全部转染宿主菌。由于包装噬菌体不稳定, 所以最好第二天将剩余噬菌体涂板。

9.2.8 计算克隆效率

一般每微克 cDNA 应得到 1 \times 10⁷ ~ 5 \times 10⁷ 个克隆。对于 λ gt11, 蓝斑应少于 1/10。

一个完整的 cDNA 库应包含的克隆数为 N:

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-n/T)}$$

P 为筛选到某一 mRNA 的概率;

n 为细胞内最稀有 mRNA 的拷贝数;

T 为细胞中总 mRNA 拷贝数。

一个哺乳动物细胞约含有 560 000 个 mRNA 拷贝, 若 n 为 8, 筛选某个 mRNA 的概率为 99% 时,

$$N = \frac{\ln(1-0.99)}{\ln(1-\frac{8}{560000})} \approx 3.3 \times 10^5$$

实际上, 1 个完整的 cDNA 库至少含有 1 \times 10⁶ 个克隆, 这样才能保证其中含有每一个单拷贝的 mRNA。

9.2.9 cDNA 库的扩增

对上述构建的 cDNA 库, 可直接进行筛选; 但最好进行扩增, 以便于进行多次筛选, 并可进行长期保存。对于 λ gt10 cDNA 库, 用 *E. coli* BNN102 菌株进行扩增, 对于 λ gt11-cDNA 库, 应在 *E. coli* Y1090hsdR 菌株中扩增。

操作步骤:

(1) 取 10⁵ 个噬菌体转染宿主菌, 铺板, 保温后, 加 15ml SM, 室温振荡 2 小时。

(2) 回收 SM, 4℃7 000g 离心 30 分钟, 以除去细胞碎片。分装上清, 每管 1ml, 各加 20~30 μ l 氯仿; 紧塞管塞于 4℃保存, cDNA 文库可在数月内保持稳定。如长期保存, 应加入终浓度为 7% 的二甲基亚砜, 保存于 -70℃。

目前, cDNA 文库的应用比较广泛, 特别是对于基因序列未知的组织特异性蛋白质的研究, cDNA 文库的构建和应用成为必要。现在, 许多试剂公司已有 mRNA 提取试剂盒以及 cDNA 文库合成试剂盒出售。其中 Pharmacia 公司生产的 Time Saver cDNA 合成试剂盒具有方便快捷的特点, 能在一天内完成 cDNA 文库的构建。因为试剂盒中备有 Oligo (dT) 12-18pd (N)₆ 引物, 高效液相色谱纯的各种构建 cDNA 文库所需要的酶, 以及 Sephacryl S-400 柱, 节省了准备实验试剂所需要的时间, 给实验工作者带来方便。

(吴晓林 文 琦祖和 审)

参 考 文 献

- [1] Sambrook J, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [2] Berg SL & Kimmel AR. Methods in Enzymology vol 152. Academic Press, 1987
- [3] Okayma H & Berg P. High - Efficiency Cloning of Full - length cDNA. Molecular and Cellular Biology, 1982, 2:161
- [4] Brown TA. Essential Molecular Biology, A Practical Approach. vol. 2. Oxford University Press, 1991
- [5] Klickstern LB & Nevve RL. Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, 1988
- [6] 蔡良婉. 核酸研究技术. 北京: 科学出版社, 1989
- [7] Promega Corporation. Promega Protocols and Applications Guide. 2nd ed, 1991

起始 DNA 的合成, 需要事先与 DNA 模板结合的寡聚核苷酸引物, 根据碱基配对的原则, 将脱氧核糖核苷 (dNTP) 底物加到引物的 3' - OH 末端, 使引物延伸链的延长通过引物的 3' - OH 基, 与脱氧核糖核苷酸底物的 5' - 磷酸基团, 生成磷酸二酯键而实现, 其方向由 5' 到 3'。Sanger 发现在 DNA 聚合反应过程中, 掺入双脱氧核糖核苷酸底物时, 它的 5' - 磷酸基团是正常的, 能够加到正常核苷酸的 3' - OH 基末端。但其自身 3' - OH 基团由于脱氧而不存在, 下 1 个核苷酸不能通过 5' - 磷酸与之形成磷酸二酯键, 使 DNA 链的延伸被终止于这个异常的核苷酸处。因而在 4 种反应体系中分别加入 4 种不同的 2'3' - 双脱氧核苷酸底物, 就可以得到终止于特定碱基的一系列寡聚核苷酸产物。

Sanger 的双脱氧核苷酸末端终止法包括下列主要步骤 (图 10-2)。

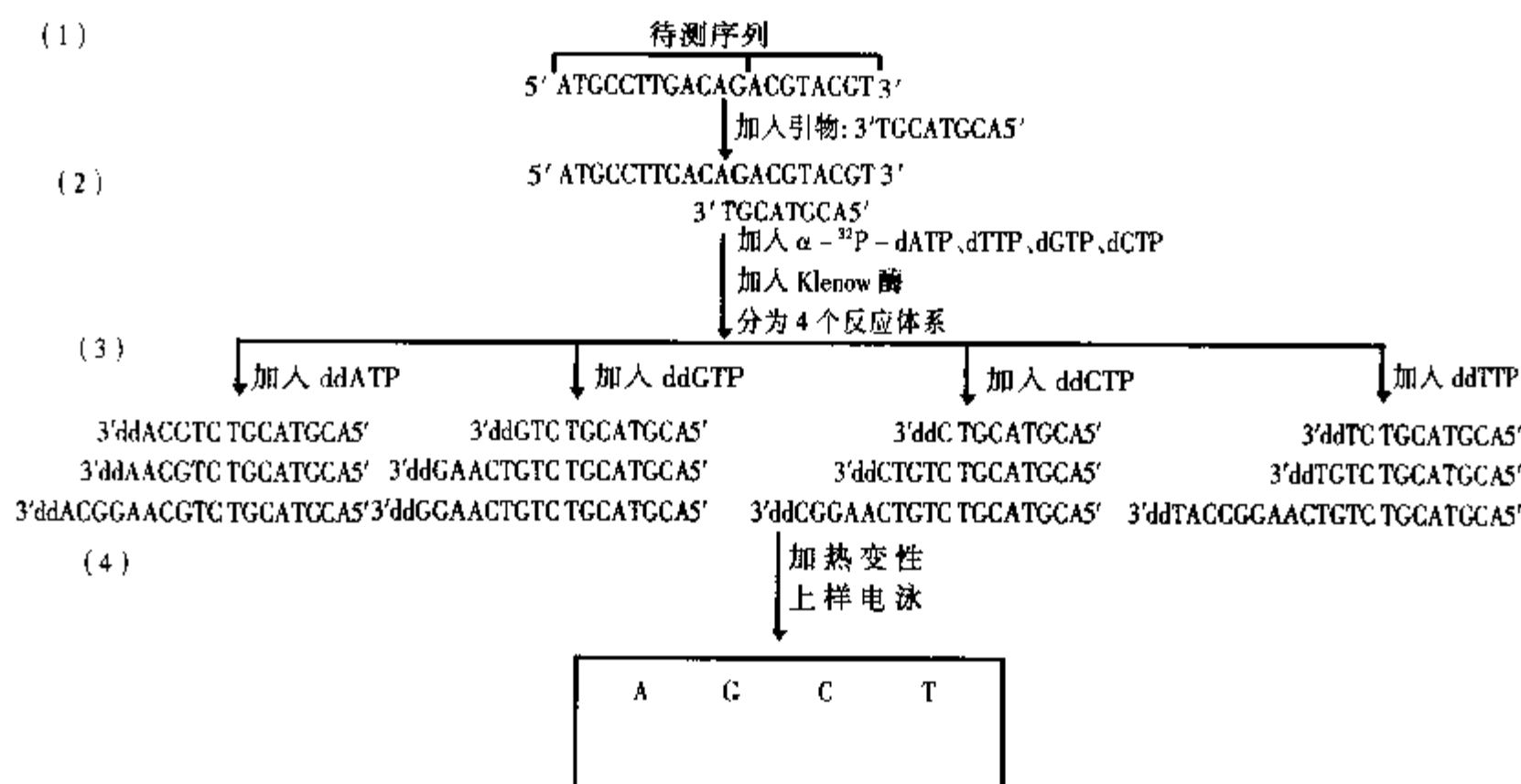


图 10-2 末端终止法测序流程

将待测 DNA 制备成单链分子, 以此为 DNA 聚合酶的模板。

通常将待测 DNA 片段克隆到噬菌体 M13 或质粒 DNA 中, 从 M13 克隆中可以制备出纯的单链 DNA 做模板。这是最常用的, 也是最好的方法。在适当的反应条件下, 可以一次读出数百个碱基序列。为方便起见, 也可以用克隆在质粒中的待测 DNA, 经变性后做为模板进行双链测序。这一方法通常对质粒 DNA 的纯度和聚合酶的质量有比较高的要求。一般说来, 对未知序列的测定, 采用单链模板; 对于已知序列 DNA 的亚克隆产物, 采用双链模板更为快速方便。

将人工合成的寡聚核苷酸与模板中待测区域的 3' 部位退火, 做为聚合酶反应的引物。

对克隆到噬菌体 M13 或质粒载体中的 DNA 进行序列测定, 可以利用与载体多克隆位点一侧的载体序列互补的寡聚核苷酸 (一般 15 ~ 30bp) 做为 “万能引物。” 许多种寡聚核苷酸引物都可从厂商直接购买。

退火后的模板——引物分置 4 个反应管中, 每个反应管包含所有 4 种脱氧核糖核苷酸, 其中一种 (通常为 ATP) 为放射性核素标记, 一种 2'3' - 双脱氧核糖核苷酸, 将 ddNTP 的浓度调整到适当的大小, 使得 DNA 聚合酶催化的引物延伸反应, 能够终止于所有可能发生的位置。这样得到的反应产物具有固定的 5' 末端 (即引物的 5' 端) 和终止于不同位置的特定碱基的 3' 末端, 并带有放射性核素标记。

引物延伸反应终止后得到的核素标记的单链 DNA 分子, 经加热变性和测序凝胶电泳分离, 再从放

射自显影得到的图谱直接读出 DNA 序列。

10.1.2 化学裂解法

化学裂解法（简称化学法）是 Maxam 和 Gilbert 等人创建的，用来测定 DNA 序列。近年由于末端终止法技术不断改进成熟，绝大多数以单纯测定 DNA 序列为目的实验都采用末端终止法进行。但化学法在研究 DNA 二级结构以及蛋白质—DNA 相互作用的诸多实验中，仍有重要的应用价值。

化学法的基本原理是，首先对待测 DNA 片段进行单侧末端的放射性核素标记。标记后的 DNA 片段分成 4~5 个反应体系，分别用不同的化学试剂处理，使 DNA 片段分别于某一种或某一类碱基处断裂，并且控制化学反应进行的程度，使得平均每个 DNA 分子只在 1 个位置被裂解，而断裂的位置随机发生在 DNA 片段某种碱基中的任何一个。例如在 G 反应体系中，DNA 在任意位置的鸟嘌呤处断裂，产生一组一端为放射性标记的固定末端，另一端为鸟嘌呤的不同大小的 DNA 片段混合物。他们的长度可以从数个核苷酸到接近待测 DNA 全长。连同其它反应体系 A + G、C + T、C 的产物在变性聚丙烯酰胺凝胶上相邻的加样孔中进行电泳分离，放射自显影后得到互相错落的梯形图谱，即可识读出 DNA 序列（图 10-3）。

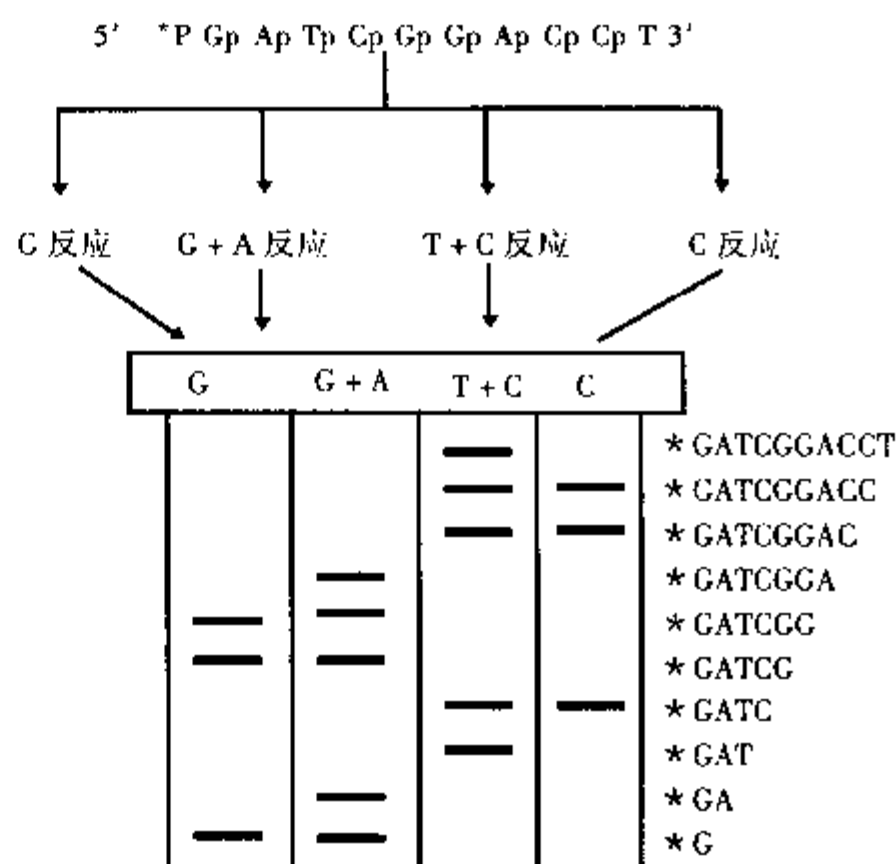


图 10-3 化学法测序原理

在 4 种反应体系中，化学试剂特异地断裂 DNA 机制分述如下：

G 反应：硫酸二甲脂（DMS）使鸟嘌呤 N₇ 甲基化。

A + G 反应：甲酸使嘌呤环上的氮质子化导致糖苷键被削弱，进而嘌呤环被吡啶取代。

C + T 反应：肼能够裂解嘧啶环，进而导致其脱落。

C 反应：在一定浓度的 NaCl 条件下，肼只对胞嘧啶起作用。

在以上修饰反应完成后，吡啶在加热条件下导致被修饰碱基处磷酸二酯键断裂。

10.2 末端终止法测定 DNA 核苷酸序列

10.2.1 末端终止法所需的关键试剂

10.2.1.1 模板与引物

两种类型的 DNA 可以用做序列测定模板，即纯化的单链 DNA 和经过碱变性的双链 DNA。单链模板 DNA 常用噬菌体 M13mp 系列，使用单链模板能够得到比双链模板更好的结果。有经验的工作人员通过一次末端终止反应，能够读出 500 个以上的核苷酸序列。利用双链质粒模板测序，若想得到比较好的结果，首先要制备高纯度的质粒 DNA，最好采用氯化铯—溴乙锭超速离心法制备。其次要选择高质量的酶。作者采用测序酶进行双链模板测序，从一次反应的样品中读出过 300 个核苷酸序列。双链模板测序的主要优势在于对已知序列 DNA 产品的亚克隆鉴定。由于不需要向 M13 载体克隆的过程，因而简便迅速。适合做双链模板的质粒，最好具有较高的拷贝数，有插入失活的选择性标志，有配套供应的通用引

物结合区。如 pGEM-3z/4z, pT7T3-18u/19u 等。以上两类质粒载体可分别从 Promega 公司及 Pharmacia 公司订购。

除特殊需要外, 测序所用引物不必自己合成。根据所用载体的特点可从多家厂商购买到合适的引物。

10.2.1.2 DNA 聚合酶

1. 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 大片段 (Klenow):

此酶是末端终止法最早采用的酶。用它进行序列测定常常产生较高的本底和假带, 催化链延伸反应的能力也比较差, 通常只能读出距引物 250 个核苷酸以内的序列。此酶价格便宜, 容易获得, 对于已知序列 DNA 次级克隆的鉴定仍有应用价值。

2. 测序酶 (sequenase):

测序酶是经过改造的 T7 噬菌体 DNA 聚合酶, 消除了 3'→5' 外切酶活性。活性非常稳定, 具有很高的链延伸能力和极快的聚合反应速度, 是测定较长 DNA 序列的首选酶。该酶及其名称是 USB 公司的专利。除可从该公司订购, 在国内可从 Pharmacia 公司订购 “T7 Sequencing™ Kit” 试剂盒。名称不同而效果很好。

3. Taq DNA 聚合酶:

该酶是聚合酶链反应 (PCR) 所需的关键酶, 可在 95℃ 的高温下保持稳定。Taq DNA 聚合酶用于序列测定, 除具有很好的链延伸性能外, 还有可在高温 (70~80℃) 中进行反应的优点。因而能够克服富含 GC 序列的模板形成自身二级结构对测序的影响。Promega 公司生产的 “fmol™ DNA Sequencing System” 试剂盒, 将 PCR 反应与末端终止法测序结合进行, 具有很多优点。例如只需很少量的模板, 对双链模板的测序不需要碱变性的步骤、高退火温度增强了引物与模板结合的特异性, 可以对多种模板, 如 PCR 产物、Lambda DNA, 富含 GC 的模板及带有回文结构的模板进行序列测定。值得在此向读者推荐。

10.2.1.3 放射性核素标记的 dNTP

传统的测序方法都采用 α - ^{32}P -dNTP, 由于 ^{32}P 衰变过程中产生高能的 β 射线, 导致放射自显影图谱条带扩散, 分辨率低, 限制了识读序列的数量。另外, 由于 ^{32}P 对 DNA 样品辐射分解作用很强, 通常都在测序反应后 24 小时内上样电泳, 否则无法得到满意的结果。

α - ^{35}S -dATP 近年来得到广泛使用, 它解决了 ^{32}P 的两大缺点, 具有很高的分辨率, 较低的本底。测序反应产物 -20℃ 保存一周并不明显影响结果。

10.2.2 末端终止法测定 DNA 序列方法的选择

在进行序列测定之前, 必须首先考虑待测 DNA 的大小, 所要了解的序列范围, 以及序列的精确程度, 还要结合实验室所能获得的试剂及仪器设备等来选择克隆及测序的具体方案。多数情况下, 测序是针对已知序列的次级克隆进行鉴定和证实。例如次级克隆 DNA 插入片段的方向、定点突变的检测、删切产物的鉴定, 待表达基因阅读框架的调整等。这类待测 DNA 片段通常比较小, 或者只需要了解两端的序列。所以只需直接克隆到 M13mp 或者质粒载体中, 进行单链或双链模板测序。

另一类测序是针对大片段未知序列 DNA 进行的, 对序列的了解要求全面而准确。因此必须对其各个局部分别次级克隆后进行测序, 最后拼出全序列。传统的方法是随机克隆法或称鸟枪法, 即利用 DNA 酶 I 或超声波, 将待测 DNA 随机切割成小片段分别克隆。目前多采用定向连续克隆法, 具有节省工作量, 便于拼读等优点。

10.2.3 大片段待测 DNA 片段的定向连续次级克隆

对于数千个碱基对的 DNA 进行序列测定, 可以建立一系列一端删切 200~300bp 的 DNA 片段次级克隆。对他们分别测序, 就可以连续读出该大片段 DNA 的全部序列。核酸酶 BAL 31 和核酸外切酶 III, 均

可以达到连续删切的目的。

核酸酶 BAL 31 具有外切酶活性，能够逐个降解双链线性 DNA 的 3' 末端。同时还具有较弱的单链特异的内切酶活性。因此，双链线性 DNA 经核酸酶 BAL 31 消化后，因酶量及作用时间的不同，将产生两端被删切掉不同长度的 DNA 片段，具有平头或较短的 5' 突出的末端。利用核酸酶 BAL 31 建立次级克隆过程（图 10-4），首先将含有待测大片段目的 DNA 的质粒或复制型噬菌体 M13，用限制性内切酶从目的 DNA 的一端切成线性，将线性 DNA 用 BAL 31 作用不同时间以产生不同程度降解产物。经 DNA 聚合酶补齐成平头末端后，再用另一种限制性内切酶，从目的 DNA 的另一端切开，回收不同长度的目的 DNA，重新克隆到载体中。

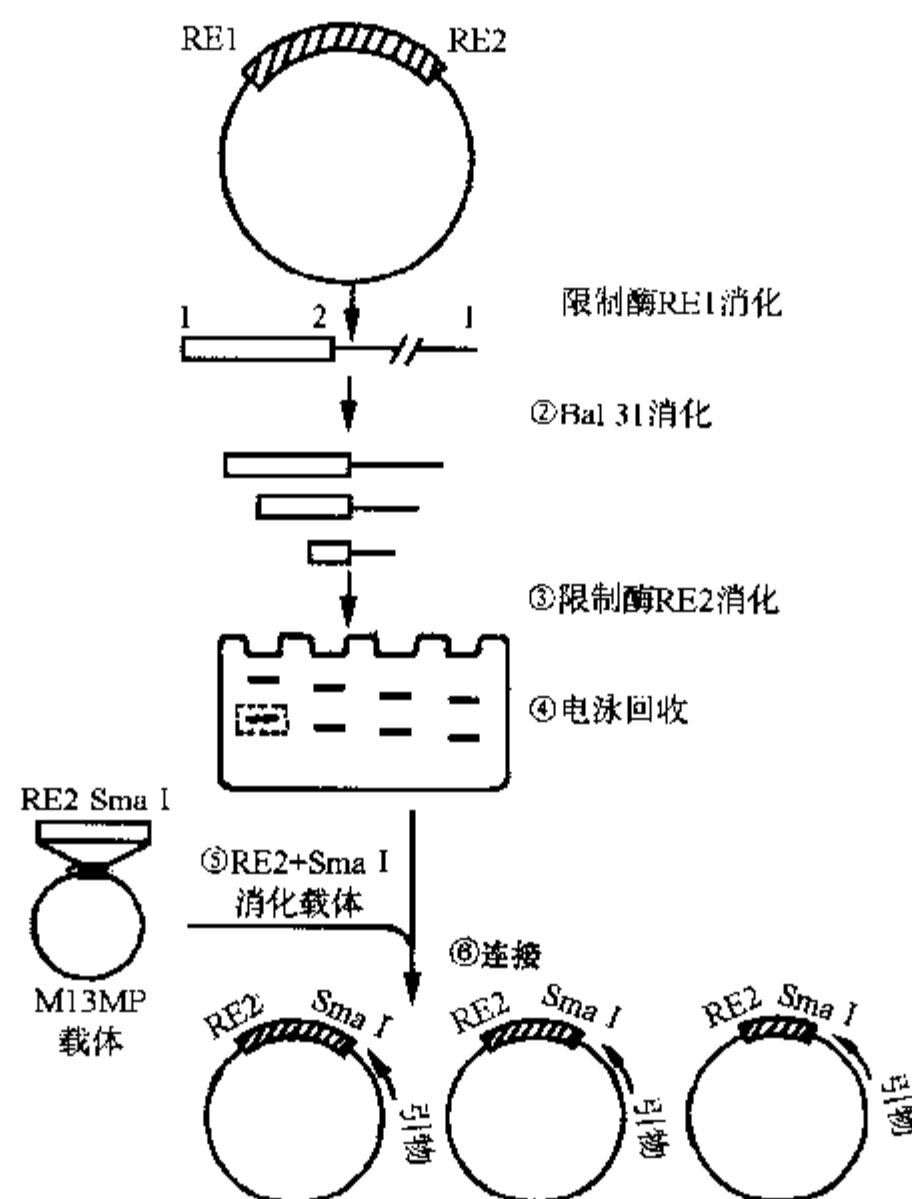


图 10-4 核酸酶 BAL31 建立定向连续次级克隆流程

核酸外切酶Ⅲ，能够逐个降解具有 3' 凹进及平头末端的双链 DNA 的 5' - 单核苷酸，而有 3' 凸出末端的双链 DNA 完全不被其降解。根据这一特性，设计出了单一方向删切线性双链 DNA 的方法。利用核酸外切酶Ⅲ建立连续次级克隆过程（图 10-5）。重组质粒或复制型 M13 DNA，在目的 DNA 与引物结合区之间，至少应有 2 个限制酶切位点，其中靠近引物结合区的酶切位点，能够产生 3' 凸出 3~4 个核苷酸的末端，另 1 位点能够产生 3' 凹进式或平头末端。重组 DNA 经两个限制酶消化后得到的线性 DNA，经外切酶Ⅲ作用不同时间，得到目的 DNA 被不同程度降解，而载体（包括引物结合区）一端完全保留的一系列产物。再经过核酸酶 S1 消化掉残余的单链，使两端均成为平末端。然后自身连接环化，就可直接转化或转染宿主菌得到次级克隆。

两种方法比较，首先外切酶Ⅲ的外切反应基本上是匀速进行的，因而可以比较准确地预计反应进行的程度，易于控制。而核酸酶 BAL 31 反应常常是不同步的，导致降解产物差异较大。因而反应时间的控制比较困难。其次，通过正确的设计可以使外切酶Ⅲ反应只从一端进行，保留了完整的载体结构。几

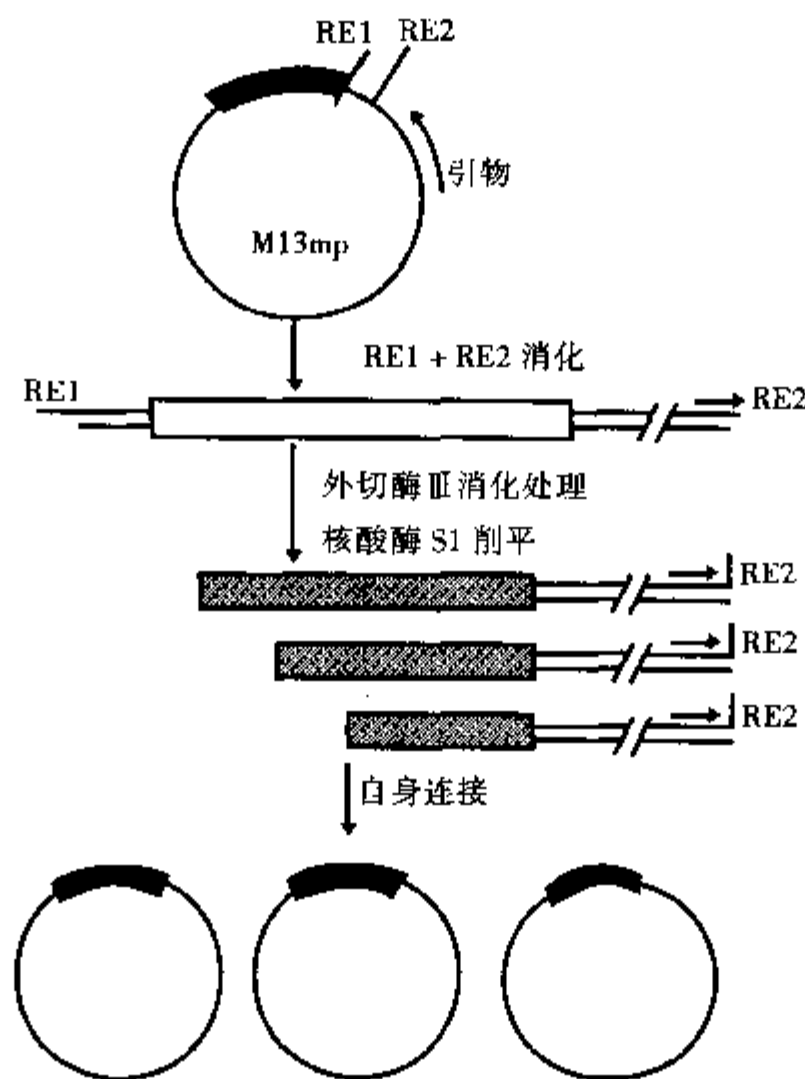


图 10-5 外切酶Ⅲ建立连续次级克隆流程

步反应（包括外切酶消化、核酸酶 S1 处理及连接反应）可以在同一反应管中进行，大大节省时间和实验材料；而核酸酶 BAL 31 反应是从两端同时进行，删切待测序列同时也破坏了原来载体的结构，所以必须增加电泳分离回收再与完整载体连接的步骤。这些步骤是比较费时的，而且电泳回收后 DNA 的质量都受影响。总的来说，核酸外切酶Ⅲ的方法明显优于核酸酶 BAL 31。该方法唯一的缺点是需要合适的酶切位点。然而目前广泛应用的克隆载体大都具有很多克隆位点，从中几乎都能找到相应的位点。因此也不再是太大的问题。目前国外一些公司生产了该方法的成套试剂盒，如 Promega 公司的“Erase-a-Base System”试剂盒，可提供高质量的成套试剂。

10.2.3.1 利用核酸酶 BAL 31 建立 DNA 的连续次级克隆

试剂：

限制性内切酶及其相应缓冲液

Tris 饱和酚及氯仿/异戊醇 (24:1)

3mol/L 醋酸钠, (pH7.0)

10× DNA 聚合酶缓冲液：

70mmol/L Tris·Cl (pH7.4)

500mmol/L NaCl

70mmol/L MgCl₂

DNA 聚合酶 I 大片段 (Klenow), 5U/μl

dNTP 混合液：各 0.5mmol/L dATP、dGTP、dCTP、dTTP (pH7.0)

核酸酶 BAL 31, 3U/μl

5× Bal 31 缓冲液：

3mol/L NaCl

60mmol/L CaCl_2
 60mmol/L MgCl_2
 100mmol/L Tris·Cl (pH8.0)
 5mmol/L EDTA

酵母 tRNA, 10mg/ml
 0.5mol/L EGTA (pH8.0)
 10mmol/L DTT

TE 缓冲液

操作步骤

(1) 100 μg 含待测 DNA 插入片段的质粒或复制型 M13 噬菌体, 在 250 μl 反应体积中用限制性内切酶消化。

(2) 取 2 μl 在微型琼脂糖电泳中鉴定酶切是否完全。

(3) 取 23 μl 酶切完全的 DNA 到另一管中, 剩余的大部分贮存于 -20°C 中待用。向 23 μl 的线性 DNA 中加入: 6 μl 5 \times BAL31 缓冲液和 1 μl 核酸酶 BAL31。

(4) 混匀后, 置 30°C 保温, 每隔 10 分钟取出 5 μl 放到 1 个新管中, 并立即加入 1 μl 0.5mol/L EGTA 终止反应, 暂存于 -70°C 。直至 1 小时后反应全部完成, 得到 6 组不同反应时间的产物。

(5) 向各管中加入 1 μl tRNA 和 20 μl H_2O 。用酚及氯仿抽提及乙醇沉淀纯化 DNA。

(6) 将 DNA 沉淀溶于 10 μl TE 缓冲液, 进行琼脂糖凝胶电泳判断各时间点的产物大小。

(7) 根据上步结果确定合适的反应时间, 使每一相邻时间得到的产物大小相差 400~500bp。

(8) 从步骤 3 的样品中取出 25 μl 。向其余 200 μl 样品中加入:

5 \times BAL 31 缓冲液	60 μl
核酸酶 BaL 31 (3U/ μl)	10 μl
H_2O	30 μl

(9) 置于 30°C 水浴保温, 每次 30 μl 共分 10 次取出样品加入 3 μl 0.5mol/L EGTA 终止反应, 暂存于 -70°C 。每次时间间隔由步骤 (7) 的预实验结果确定。

(10) 用酚、氯仿抽提及乙醇沉淀纯化各反应管 DNA。

(11) 用 TE 缓冲液 50 μl 溶解 DNA 沉淀。

(12) 用 DNA 聚合酶 I 大片段补齐可能存在的非平头末端。

DNA [步骤 (11)]	50 μl
10 \times DNA 聚合酶缓冲液	10 μl
dNTP 混合液 (各 0.5mmol/L)	10 μl
10mmol/L DTT	10 μl
H_2O	15 μl
DNA 聚合酶 I (大片段)	5 μl

(13) 置 37°C 保温 15 分钟。然后于 70°C 10 分钟灭活。

(14) 调整各管缓冲体系, 使之适合另一限制性内切酶, 并用限制性内切酶完全消化。经酚抽提及乙醇沉淀纯化后, 得到一端被不同程度删切后的平端, 另一端为固定的限制酶切粘性末端的一系列 DNA 片段。这步反应得到的产物中还混有载体 DNA 片段, 需经过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳, 用电洗脱或低熔点琼脂糖方法回收所需片段后, 才能进行与载体的连接反应。

10.2.3.2 利用核酸外切酶 III 建立待测 DNA 的连续次级克隆

试剂:

两种限制性内切酶及其相应缓冲液, 限制酶的选择见前述。

Tris 饱和酚及氯仿/异戊醇

10 × 核酸外切酶Ⅲ缓冲液:

0.66mol/L Tris·Cl (pH8.0)

66mmol/L MgCl₂

核酸外切酶Ⅲ

10 × 核酸酶 S₁ 缓冲液, 按下列方法配制:

5mol/L NaCl 5ml

3mol/L 醋酸钾 (pH4.5) 1.1ml

甘油 5ml

1mol/L 硫酸锌 20μl

S₁ 终止液:

0.3mol/L Tris 碱

50mmol/L EDTA (pH8.0)

DNA 聚合酶 I, 大片段

0.5mmol/L 的 4 种 dNTP

10 × 连接缓冲液:

500mmol/L Tris·Cl (pH7.6)

100mmol/L MgCl₂

100mmol/L DTT

500μg/ml BSA

5mmol/L ATP

30% (W/V) 聚乙二醇 (8 000)

T₄ DNA 连接酶

操作步骤:

(1) 用两种限制性内切酶完全消化 10μg 含待测大片段 DNA 的重组质粒或 M13 噬菌体复制型。2 个酶切位点, 均在插入片段一端与引物结合区之间。靠近插入片段的酶切位点, 应产生平头或 3'凹进末端; 靠引物结合区的位点应产生 3'具有 3~4 个核苷酸残基的凸出末端。两个都必需是单酶切位点。

由于核酸外切酶Ⅲ能够从双链 DNA 分子的缺口处开始降解, 所以必须制备高质量的质粒或复制型噬菌体 DNA。闭合环状 DNA 的比例应占 90% 以上。

(2) 以酚及氯仿抽提及乙醇沉淀纯化酶切完全的 DNA。将 DNA 沉淀溶于 60μl 1 × 外切酶Ⅲ缓冲液中。暂存于冰浴。

(3) 按下列方法配制 S₁ 反应混合液:

H₂O 172μl

10 × S₁ 缓冲液 27μl

核酸酶 S₁ 60U

各取 7.5μl 上述混合液到 25 个 0.5ml 离心管中。暂存于水浴。

(4) 将步骤 (2) 的 DNA 样品放置 37℃ 预保温 5 分钟, 取 2.5μl 加入到第一管含 S₁ 混合液的离心管中。向剩余的 DNA 溶液按每 pmol 150 单位的量加入核酸外切酶Ⅲ。快速混合后立即放回 37℃ 水浴保温。

(5) 每隔 30 秒钟取出 2.5μl, 依次转到冰浴中的含 S₁ 反应混合液的各个离心管中。在此反应条件下, 外切酶Ⅲ大约以每分钟 200 个碱基的速度, 降解平头或 3'凹进末端。

(6) 当所有样品分别加入到 S₁ 管中后, 将 25 个离心管转移到 30℃ 保温 30 分钟, 然后向每管中加

入 1 μ l S_1 终止液。置 70℃ 水浴 10 分钟以灭活核酸酶 S_1 ，暂存于冰浴中。

(7) 从各管中取少量样品进行琼脂糖电泳，以检查酶解反应是否满意。理想的结果应能够从中找出 10 余组各相差 200bp 左右的样品。挑选这些样品进行下列步骤。

(8) 按下列方法配制大片段酶混合液。

H_2O	20 μ l
1mol/L $MgCl_2$	6 μ l
0.1mol/L Tris·Cl (pH7.6)	3 μ l
DNA 聚合酶 (大片段)	3U

取 1 μ l 大片段酶混合液，加入到上一步的各管中，置 37℃ 保温 5 分钟。这步反应在没有 4 种 dNTP 存在的条件下，大片段酶可以发挥其 3'→5' 外切酶活性，消除残留的少量 3' 突出末端。

(9) 向各管分别加入 1 μ l 各 0.5mmol/L 的 4 种 dNTP，室温下继续保温 15 分钟，补齐为平末端。

(10) 按下列方法配制连接混合液：

H_2O	550 μ l
10× 连接缓冲液	100 μ l
5mmol/L ATP	100 μ l
30% (W/V) PEG 8 000	250 μ l
T_4 DNA 连接酶	5U

向各管分别加入 40 μ l 连接混合液，室温中反应 2 小时，使已成为平末端的不同程度删切的 DNA 自身环化。

(11) 得到的自身连接产物，可以直接转化或转染宿主菌。

10.2.4 用噬菌体 M13 克隆待测 DNA 片段

M13 是一类雄性特异的大肠杆菌噬菌体，含单链环状 DNA。它感染宿主菌后呈溶源状态生长，在细菌细胞内形成过渡阶段的双链环状复制型 DNA (RF)。在适当条件下可以扩增至百余个拷贝。成熟的噬菌体成为单链分泌到培养液中。因此双链 DNA (RF) 可以按质粒提取的方法从细菌细胞中制备，做为克隆所用的载体。从培养基的上清液中可以提取成熟的单链 DNA 做为测序的模板。

目前测序所用的 M13mp 系列，是通过野生型 M13 噬菌体进行不断改造获得的。它们中插入了一段包括乳糖操纵子在内的 β -半乳糖苷酶基因 (lacZ)。在 LacZ 基因中构建了多克隆位点。因此当 M13mp 感染某些 β -半乳糖苷酶基因缺陷型 (gal^-) 大肠杆菌，如 JM103、JM109 时，M13mp 的 lacZ 与 gal^- 发生 α -互补作用。在存在诱导物 IPTG 的条件下，能够产生有活性的 β -半乳糖苷酶。该酶能够水解 X-Gal 产生蓝色的溴氯吲哚，在培养皿中为蓝色菌落。克隆后的 M13mp 插入片段，进入 lacZ 基因中的多克隆位点，破坏了 lacZ 基因结构，转化大肠杆菌后将得到白色噬菌斑。这一特性是一非常有效的克隆筛选的选择性标志。

现在常用的 M13mp 载体一般是成对设计，如 MBmp18 与 MBmp19，它们都有相同的 13 个多克隆位点，但方向相反。同一待测 DNA 片段分别克隆到这两个载体中，用同一通用引物能够从两个方向，分别测定 DNA 的互补链。

10.2.4.1 M13mp 载体 DNA 的制备及插入片段的连接

试剂：

待克隆的 DNA 片段：

- 用载体多克隆位点中相应的限制酶切割下来的待测 DNA 片段。
- 平末端待测 DNA 片段。

以上两类 DNA 片段应小于 500bp, 否则难以测出全序列。

c. 核酸酶 BaL31 方法制备的一组连续删切的 DNA 片段。

噬菌体 M13 贮备液

LB 培养基

JM103 或 JM109 菌种。选用低营养培养基 M9 中生长的单菌落。

氯霉素 30mg/ml, 溶于乙醇

2×YT 培养基:

胰蛋白胨 16g

酵母提取物 10g

NaCl 10g

H₂O 加至 1L, pH 调至 7.4

氯化铯-溴乙锭密度梯度离心法提取质粒 DNA 所需试剂。

10×T4 连接酶缓冲液

T4 DNA 连接酶

0.1mol/L DTT

操作步骤:

(1) 取 10μl M13 贮备液 20μl 2×YT 溶液稀释, 取 5μl 与 200μl 新过夜培养的 JM109 菌液混合, 加入到 3ml 预先融化保存在 48℃ 的软琼脂中, 加入 IPTG (100mmol/L) 20μl, X-Gal (10% 溶于二甲基甲酰胺) 20μl 混匀后立即倒入 1.5% 琼脂培养基铺底的培养皿中, 凝固后于 37℃ 培养箱保温过夜。将得到蓝色菌斑。

(2) 挑取单个蓝色菌斑到 5ml 2×YT 培养基中, 37℃ 振荡培养过夜, 做为 M13 噬菌体供体。同时挑取单个宿主菌落, 到 5ml LB 培养基中振荡培养过夜。

(3) 将过夜培养的 5ml 宿主细胞, 加入到 1 000ml 2×YT 培养液中, 继续 37℃ 振荡培养到 OD₆₀₀ = 1.5 时, 加入 5ml 噬菌体供体感染细胞, 于 37℃ 振荡培养 15 分钟。

(4) 加入 100μl 氯霉素溶液到感染了噬菌体的细胞中, 继续培养 2 小时以扩增复制型 M13mp DNA。

(5) 离心收集菌体, 参照质粒 DNA 制备方法提取复制型双链 M13mp 载体。

(6) 取 2μg 双链 M13mp DNA, 用适当的限制性内切酶消化, 电泳检查酶切完全后, 以酚/氯仿抽提以及乙醇沉淀纯化样品, 溶于 TE 使浓度为 0.1μg/μl。

(7) 进行载体与待插入 DNA 片段的连接反应。在 20μl 反应体系中加入:

M13mp18 或 19 (0.1μg/μl) 1μl

待测 DNA (0.1μg/μl) 0.5~3μl

10×连接酶缓冲液 2μl

T₄ DNA 连接酶 0.5~1U

H₂O 加至总体积为 20μl

(8) 放置 14℃ 反应过夜。连接反应产物即可用于转化 JM109 细胞。如暂时不用可以存放在 -20℃。

10.2.4.2 重组 M13mp DNA 转化大肠杆菌 JM109

试剂:

LB 培养基

50mmol/L CaCl₂ 高压灭菌

LB 上层琼脂

X-Gal 10% 溶于二甲基甲酰胺

IPTG, 100mmol/L

LB 琼脂培养基

低营养培养基上生长的 JM109 菌株。

操作步骤:

- (1) 接种低营养培养基上的 JM109 菌落到 50ml LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养至 600nm 波长光吸收值为 0.3。取出 2ml 存放 4℃ 冰箱中备用。
- (2) 将剩余的菌液于 4℃, 3 000g 离心 5 分钟, 弃上清液。
- (3) 将细菌沉淀轻轻悬浮于 2ml 50mmol/L CaCl₂, 再加入 CaCl₂ 溶液至 20ml。在冰浴中放置 30 分钟。
- (4) 于 4℃, 3 000g 离心 5 分钟, 弃上清液, 将细菌悬浮于 2ml 冰冷的 50mmol/L CaCl₂ 中。存放于 4℃ 冰箱, 两天之内随时可用于转化。
- (5) 取 5μl 连接产物与 200μl CaCl₂ 处理的 JM109 细胞混和, 放置冰浴中 30 分钟。
- (6) 用微波炉或沸水浴加热融化 LB 上层软琼脂培养基。冷却至 48℃ 时, 每 30ml 中加入 100μl 10% X-Gal, 100μl 0.1mol/L IPTG。放置 48℃ 以避免凝固。
- (7) 将冰浴后的连接产物与受体细胞混合物, 置 42℃ 水浴热休克 1~2 分钟。加入 50μl 步骤 (1) 备用的 JM109 菌液和 3ml 步骤 (6) 配制的软琼脂培养基。混匀后立即铺在含有 LB 琼脂培养基的 90mm 平皿中, 室温放置 20 分钟使其凝固。
- (8) 将平皿倒置放入 37℃ 保温箱培养过夜, 产生的白色噬菌斑即可用来提取单链 M13mp DNA 进行电泳或杂交鉴定, 以及做为末端终止法序列测定的模板。

10.2.4.3 单链 M13 DNA 模板的制备

试剂:

2×YT 培养基

20% PEG (聚乙二醇) / 2.5mol/L NaCl 溶液:

PEG-8 000	20g
NaCl	14.5g
加 H ₂ O 至 100ml	

操作步骤:

- (1) 接种白色噬菌斑于 2ml 2×YT 培养基中, 于 37℃ 振荡培养过夜。
- (2) 取 1.3ml 培养物到 1.5ml 离心管中, 于室温 12 000g 离心 10 分钟, 回收 1ml 上清液到 1 个新的离心管中, 同上面条件离心 10 分钟。吸取 0.8ml 上清液。吸取上清液时应小心, 不要沾染管底的细菌沉淀。
- (3) 向 0.8ml 上清液中加入 200μl 20% PEG/2.5mol/L NaCl 溶液, 放置冰浴 20 分钟。然后于 12 000g 离心 10 分钟, 弃上清液, 并用吸水纸或毛细管仔细吸走粘附在管壁上的所有液体。
- (4) 将沉淀溶于 400μl TE 缓冲液中, 以酚/氯仿抽提 2~3 次, 直至水相与有机相界面不再有絮状物。用氯仿/异戊醇 (24:1) 抽提 1 次。加入 0.1 倍体积醋酸钠和 2 倍体积的无水乙醇, 置 -20℃ 20 分钟, 12 000g 离心回收沉淀, 用 70% 乙醇淋洗沉淀, 减压干燥后, 溶于 5~10μl 去离子水中。此方法通常可得到 0.1~1μg 单链 DNA 模板, 可直接用于测序反应。

10.2.5 双脱氧末端终止法

材料及仪器设备:

0.5mmol/L dATP、dCTP、dGTP、dTTP

10mmol/L ddATP、ddCTP、ddGTP ddTTP

Tris·Mg 缓冲液:

100mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

100mmol/L MgCl₂寡聚核苷酸引物 2ng/ μ l大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段 (5U/ μ l) 或测序酶 α -³⁵S-dATP (1 000Ci/mmol) 或 α -³²P-dATP, 10mCi/ml。

去离子水

100mmol/L 二巯基苏糖醇 (DTT)

上样缓冲液:

甲酰胺 10ml

二甲苯蓝 10mg

溴酚蓝 10mg

0.5mol/L EDTA (pH8.0) 200 μ l5 \times 测序酶缓冲液:1mol/L Tris·Cl (pH7.5) 200 μ l1mol/L MgCl₂ 100 μ l5mol/L NaCl 25 μ l

加水至 1ml

1mol/L NaOH

3mol/L 乙酸钠 (pH4.8)

TE 缓冲液: 10mmol/L Tris·Cl (pH8.0), 1mmol/L EDTA。

冰冷的 70% 乙醇及无水乙醇。

冰水浴、37℃ 水浴、55~65℃ 水浴、80℃ 水浴。

Eppendorf 离心机。

10.2.5.1 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段的 DNA 序列测定方法

准备工作:

(1) 制备含待测序列的重组噬菌体 M13 模板。

(2) 制备 dNTP 及 ddNTP 工作溶液。在本方法中需预先配制下列三种工作溶液:

1) 反应补充液——含四种脱氧核苷三磷酸 dATP、dGTP、dCTP 及 dTTP, 其浓度均为 0.5mmol/L, 用 Eppendorf 离心管分装保存于 -70℃。

2) 4 种 dNTP 工作液——在反应过程中 dATP 将以 α -³²P-dATP 或 α -³⁵S-dATP 的形式加入。配制方法如下:

dNTP 工作液	0.5mmol/L 4 种 dNTP 贮存液			
	dTTP	dCTP	dGTP	dATP
dTTP	10 μ l	200 μ l	200 μ l	10 μ l
dCTP	200 μ l	10 μ l	200 μ l	10 μ l
dGTP	200 μ l	200 μ l	10 μ l	10 μ l
dATP	200 μ l	200 μ l	200 μ l	10 μ l

将 4 种 dATP 工作液分别分装保存于 -70℃。

3) 4 种双脱氧核苷三磷酸 (ddNTP) 工作液将 4 种双脱氧核苷三磷酸的 10mmol/L 母液用 TE 缓冲液

和水按下表稀释:

ddNTP 工作液	10mmol/L ddNTP (μ l)	TE (pH8.0) (μ l)	H ₂ O (μ l)
ddITP	60	40	900
ddCTP	8	92	900
ddGTP	20	80	900
ddATP	9	91	900

4 种 ddNTP 工作液体积均为 1ml, 分别分装于 Eppendorf 离心管, 保存于 -70°C 。

(3) 制备变性聚丙烯酰胺凝胶。

操作过程:

(1) 向 Eppendorf 离心管中依次加入:

待测单链 DNA 模板	0.1 ~ 1 μ g
相应引物 (2ng/ μ l)	2 μ l
Tris·Mg 缓冲液	2 μ l
H ₂ O 补充到总体积为 20 μ l	

(2) 混均后加盖置于 55°C 水浴中保温 30 分钟, 然后缓慢降温使模板与引物退火。

(3) 当模板—引物保温时, 将 -70°C 中保存的 dNTP 和 ddNTP 工作液以及 $\alpha-^{35}\text{S}-\text{dATP}$ (1 000Ci/mmol) 取出融化, 存放在冰水浴中。

(4) 配制 4 种链延伸—终止混合液:

将 4 个 Eppendorf 管上分别标上 A $^{\circ}$ 、C $^{\circ}$ 、G $^{\circ}$ 、T $^{\circ}$ 符号。在标有 “A” 的管中加入:

ddATP 工作液	25 μ l
dATP 工作液	7.5 μ l
$\alpha-^{35}\text{S}-\text{dATP}$ 5 μ Ci	0.5 μ l

在其它 3 管中同样加入相应的 dNTP、ddNTP 工作液和 $^{35}\text{S}-\text{dATP}$ 。暂存于冰水浴中。

(5) 配制 Klenow 酶稀释液:

10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)	8 μ l
100mmol/L 二巯基苏糖醇 (DTT)	1 μ l

放置于室温中。

以上步骤 (1) ~ (5) 均在模板—引物退火时完成。

(6) 步骤 (2) 完成后, 短暂离心使蒸发液体甩回管底。

(7) 取 4 个 Eppendorf 离心管, 分别用记号笔标上 A、C、G、T。每管分别加入 4 μ l 退火后的模板引物混合物, 再向各管中相应地分别加入 A $^{\circ}$ 、C $^{\circ}$ 、G $^{\circ}$ 、T $^{\circ}$ 混合物各 2 μ l。

(8) 将大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段 (5U/ μ l) 1 μ l, 加入步骤 (5) 的酶稀释液中, 混匀后向 A、C、G、T 4 个反应管中各加入 2 μ l。将 4 个反应管混匀 (可用 20 μ l 微量移液器仔细吹吸数次, 尽量避免产生气泡), 放置室温反应 15 分钟。

(9) 在等待反应进行时, 取出含 0.5mmol/L 4 种 dNTP 的反应补充液融化。当反应进行到 12 分钟时, 将 2 μ l 反应补充液分别加入 4 个反应管的管壁上, 不与反应液体接触。待反应到 15 分钟时, 将 4 个反应管短暂离心使之混合, 继续于室温保温 15 分钟。

(10) 向各反应管中加入 4 μ l 上样缓冲液终止反应。反应产物可以进行测序电泳分离, 也可以存于 -20°C 一星期。如果使用 $\alpha-^{32}\text{P}-\text{dATP}$ 代替 $\alpha-^{35}\text{S}-\text{dATP}$, 应尽快上样电泳, 存放时间不要超过 24 小时。

10.2.5.2 测序酶的 DNA 序列测定方法

准备工作:

(1) 制备含待测序列的单链模板。

(2) 制备反应混合物

a. 标记反应混合物:

dGTP (0.5mmol/L)	1.5 μ l
dCTP (0.5mmol/L)	1.5 μ l
dTTP (0.5mmol/L)	1.5 μ l

加去离子水至总体积为 1ml, 于 -20℃ 保存。

b. 链延伸——链终止反应混合物:

ddG 混合物: 各 80 μ mol/L dGTP、dATP、dCTP、dTTP8 μ mol/L ddGTP, 50mmol/L NaCl

ddA 混合物: 各 80mmol/L dGTP、dATP、dCTP、dTTP

8 μ mol/L ddATP, 50mmol/L NaClddC 混合物: 各 80 μ mol/L dGTP、dATP、dCTP、dTTP8 μ mol/L ddCTP, 50mmol/L NaClddT 混合物: 各 80 μ mol/L dGTP、dATP、dCTP、dTTP8 μ mol/L ddTTP, 50mmol/L NaCl

(3) 配制 5× 测序酶缓冲液:

1mol/L Tris·Cl (pH7.5)	200 μ l
1mol/L MgCl ₂	100 μ l
5mol/L NaCl	25 μ l

加水至 1ml

(4) 制备聚丙烯酰胺凝胶。

操作过程:

(1) 向 Eppendorf 离心管中依次加入:

待测单链 DNA 模板	0.1 ~ 1 μ g
5× 测序酶缓冲液	2 μ l
引物	1 μ l
去离子水至总体积为 10 μ l	

(2) 加盖后置于 65℃ 水浴保温 5 分钟, 然后使之在 30 分钟以上的时间里缓慢降温至室温, 引物与模板的退火即告完成。可放置冰浴中备用。

(3) 将标记混合物用去离子水稀释 5 ~ 10 倍。

(4) 向退火后的模板—引物中加入:

100mmol/L DTT	1 μ l
稀释的标记混合物	2 μ l
α - ³⁵ S-dATP (5 μ Ci)	0.5 μ l
测序酶 0.5U	0.5 μ l

立即仔细用微量移液器吹吸混匀, 尽量避免出现气泡。在室温中反应 2 分钟。注意不要反应过长时间, 温度不要超过 25℃。否则在靠近引物 100bp 以内的序列中可能会出现人工带, 影响实验结果。 α -³⁵S-dATP 的用量还可以减少, 作者曾仅用 1 μ Ci 仍然获得相当满意的结果。(5) 将 4 个 Eppendorf 离心管, 分别标上 A、C、G、T。分别加入 2.5 μ l ddA、ddC、ddG、ddT 链延伸

——终止混合物，并放入 37℃ 水浴保温 1 分钟。此步骤应尽快在 2 分钟的标记反应中完成，也可提前到步骤 (4) 之前进行。

(6) 将步骤 (4) 完成的标记反应产物 3.5 μ l 分别加入 A、C、G、T 四个链伸——终止反应管，用移液器吹吸混匀后于 37℃ 保温 5~10 分钟。

(7) 向 4 个反应管中加入上样缓冲液 4 μ l 终止反应。

10.2.5.3 双链 DNA 模板序列测定

(1) 制备高纯度的超螺旋质粒 DNA。最好采用氯化铯-溴乙锭超速离心法提取质粒。作者采用聚乙二醇 (PEG) 沉淀法提取的质粒 DNA，作为模板也获得了比较满意的结果。

(2) 将 3~5 μ g 超螺旋质粒 DNA 溶于 16 μ l TE 缓冲液，加入 4 μ l 1mol/L 的 NaOH，室温变性 10 分钟。

(3) 加入 2 μ l 3mol/L 醋酸钠 (pH4.8)，立即混匀，迅速加入 60 μ l 冰冷的无水乙醇。混匀后于冰上放置 15 分钟。

(4) 12 000g 离心 15 分钟 (4℃)，弃上清液。加入 1ml 70% 乙醇 (4℃) 于管中，12 000g 离心 5 分钟，仔细将上清液完全吸干。室温中开盖放置数分钟，使管内乙醇全部挥发。然后将 DNA 沉淀溶于 5 μ l H₂O 中，暂存于冰浴中。变性的双链 DNA 模板，可按前面介绍的两种单链模板 DNA 序列测定方法进行反应。但是引物的用量应 3 倍于单链模板测序，³⁵S-dATP 的量也应增加到 1 μ l (10 μ Ci)。

10.2.6 变性聚丙烯酰胺凝胶制备

凝胶制备可以在测序反应前一天进行，凝胶灌制后 2~24 小时之间使用均可获得良好效果。

(1) 用热水加洗涤剂清洗灌胶用的两块玻璃板，最好用纱布或棉花擦洗，以免损伤玻璃表面。再用蒸馏水冲洗干净，凉干后玻璃灌胶一面肉眼不应看到任何痕迹。用 0.4mm 厚的边条装配好灌胶板。为防止灌胶时渗漏，可用 1% 琼脂糖从外部封堵边条之间的接缝处。

(2) 配制 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶：

丙烯酰胺	7.6g
甲叉双丙烯酰胺	0.4g
尿素	48g
10 \times TBE 缓冲液	10ml
去离子水	40ml

在 37℃ 水浴中搅拌溶解，加去离子水至总体积为 100ml。在灌胶前加入 10% 过硫酸胺 500 μ l TEMED 50 μ l，混匀后应立即灌注。

注意：丙烯酰胺及甲叉双丙烯酰胺具有神经毒性，能够经过皮肤吸收进入人体。因此操作时必须戴上橡胶或塑料手套，称取粉末时要小心，不要吸入呼吸道。聚丙烯酰胺没有毒性，但可能存在少量未聚合的丙烯酰胺，操作时仍应戴手套。

(3) 将板呈 40° 倾斜放置，用 50ml 注射器将配好的丙烯酰胺溶液连续灌入，避免出现气泡，气泡发生时轻敲玻璃板使之排出。灌满后将鲨鱼齿梳背面插入液面约 5~6mm。将板呈 20° 角放置聚合。在 20℃ 的室温中，凝胶应在 20 分钟内聚合，可通过观察凝胶周边出现折光线，即 Schlitten 线来确定其是否聚合。过长时间仍不聚合说明试剂质量较差，可能会影响电泳结果，最好更换试剂。凝胶应在聚合后 2~24 小时之间使用。

凝胶制备一般在测序反应之前进行。当反应完毕后，即可上样电泳。

测序胶可以配制成从 6%~20% 之间的不同浓度。方法是使丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺之比为 19:1，按二者总量的百分比浓度配制。如配制 100ml 10% 的测序凝胶可称取丙烯酰胺 9.5g，甲叉双丙烯酰胺 0.5g，其它试剂用量不变。

凝胶浓度的选择决定于电泳分离的 DNA 片段的大小。当需要测定距离引物 50 个碱基以内的序列，

或化学法测定 50bp 以下的 DNA 片段时,应采用高浓度凝胶 (12% ~ 20%)。作者采用 8% 的凝胶,测序酶方法,进行双链质粒 DNA 模板测序,分两次上样电泳,在一张 40cm 长的电泳图谱上,可以读出距离引物 15 ~ 350bp 的 DNA 序列。

若希望在一次电泳图谱上读出更多 DNA 序列,作者建议:①采用单链 DNA 模板;②采用测序酶进行测序反应;③在测序反应标记步骤中增加 dNTP 和 α - ^{35}S -dATP 的量 3 ~ 4 倍,延长 1 倍反应时间。但此项改动会影响靠近引物的数十个碱基的识读;④采用更长的测序胶,或采用缓冲液梯度聚丙烯酰胺凝胶。

10.2.7 测序产物的凝胶电泳

操作方法:

(1) 将电泳仪下槽中倒满 1×TBE 电泳缓冲液。去掉凝胶底部的 Spacer 和鲨鱼齿梳,将鲨鱼齿梳掉转过来用尖齿插入凝胶约 1mm。凝胶板安装到电泳仪上,用弯头吸管吹掉凝胶板没入下槽缓冲液中的气泡。在上槽中倒入 1×TBE 缓冲液,用带针头的注射器彻底冲洗梳齿形成的加样孔。接通稳压电源,40cm 长的凝胶以 1800V 进行预电泳 20 ~ 30 分钟,使凝胶加热到 60℃ 左右。

(2) 将测序反应样品在 90℃ 水浴中加热 2 分钟变性。关闭电源,用微量移液器上样 2.5μl 上样前应再次用注射器冲洗加样孔。上样完毕后打开电源开关进行电泳。

(3) 电泳时间可根据上样缓冲液中指示剂泳动的位置决定。在变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中,寡核苷酸链与指示剂泳动速度关系见下表:

聚丙烯酰胺	溴酚蓝	二甲苯蓝
6%	26b	106b
8%	19b	75b
10%	12b	55b
20%	8b	28b

为了在一块胶上读出更多序列,可在第一次上样电泳中,溴酚蓝带走到凝胶底部时第二次上样电泳,到二次上样的溴酚蓝走到凝胶底部时停止电泳。

(4) 将凝胶上层玻璃板掀开,凝胶连同下层玻璃板一同放入大瓷盘中,用 10% 甲醇和 10% 乙酸溶液浸泡 15 分钟以去除凝胶中的尿素。用玻璃板将凝胶托出,将一张 Whatman 3MM 滤纸或新华 3 号滤纸 (略大于凝胶) 铺在凝胶上面,连同玻璃板一同翻转过来,

使凝胶落在滤纸上,去掉玻璃板,将一张食品保鲜膜平铺在凝胶上,用手轻轻赶开保鲜膜与凝胶之间的气泡。由于凝胶很易破碎,操作时应格外仔细。

(5) 将夹在滤纸与保鲜膜之间的凝胶一同放到干胶器上,于 80℃ 抽真空烤干。干后的凝胶将贴附在滤纸上,去掉保鲜膜,使凝胶与 X 线胶片直接接触曝光 24 ~ 36 小时。

测序所用的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳设备差别很大。最简单的可以利用比较平整的玻璃板材、有机玻璃及金属材料自己加工制做,或从国内一些厂家购买。这类设备适合于一般实验室进行要求不很高的鉴定性测序或教学使用。对于需要进行大分子未知 DNA 序列的测定而又有足够资金的实验室,为获得更好的结果可以购买国外厂家的产品。例如 Pharmacia 公司的“Macro Gene 核酸定序工作站”,该套产品工艺精湛,操作简便,能够灌制 0.1mm 度的超薄胶,配合恒温装置减低了图谱的边缘效应,提高了分辨率,一次可获得 400 碱基对以上的序列,利用数码读序仪和序列分析软件,在计算机中进行序列分析并且与 Gen Bank 等核酸序列资料库的内容进行对比研究。这些特点确实能够大大提高工作效率。

10.2.8 Taq DNA 聚合酶催化的测序反应及凝胶的银染色法

银染色法是近年来建立的一种非放射性核素标记的核酸序列测定方法。其基本原理是通过高灵敏度的银盐显色步骤来检测末端终止法完成的测序凝胶条带。与放射性同位素标记法比较,放射自显影通常需要一天到数天的时间。该方法可以在电泳结束后一个半小时迅速地得出结果,同时也省去了放射性同

位素操作过程中的特殊防护措施。与荧光染料标记方法比较, 荧光及化学发光技术需要昂贵的试剂来标记引物。该方法使用普通的寡核苷酸引物, 无需在引物 5' - OH 末端做任何修饰, 也不需要复杂的仪器设备来检测结果, 可以在显色后的胶上直接读出序列。因此该方法更经济, 易于推广普及。

美国普罗麦格公司 (Promega) 新近推出了一种 "SILVER SEQUENCE" DNA 序列测定系统, 该系统除了上述银染法所具有的优点外, 由于采用了 Taq DNA 聚合酶, 在程控循环加热仪中进行反应, 因而比常规测序方法具有如下优点。

第一, 该反应过程能够使模板 DNA 量呈线性增长, 得到足够银染法检测出来的条带。根据模板种类的不同, 需要 0.02 ~ 1pmol 的 DNA 模板。

第二, 在反应的每个循环过程均有较高的变性温度, 对于双链 DNA 模板省去了碱变性的操作步骤。

第三, 比较高的复性温度提高了引物与模板结合的特异性。

第四, 很高的聚合反应温度能够有效地解除模板 DNA 的二级结构, 使得聚合反应顺利地通过复杂的二级结构区域。

下面根据普罗麦格公司的技术资料介绍 Taq DNA 聚合酶催化的末端终止测序方法及银染色检测法。

实验材料及试剂:

测序级 Taq DNA 聚合酶 5U/ μ l

5 × 测序反应缓冲液:

200mmol/L Tris - HCl (pH9.0)

10mmol/L MgCl₂

4 种 dNTP/ddNTP 混合物

测序反应终止液:

10mmol/L NaOH

95% 甲酰胺

0.05% 溴酚蓝

0.05% 二甲苯蓝

DNA 模板

(1) 待测 DNA:

PCR 产物 (200bp) 10ng (60fmol)

超螺旋质粒 DNA (3 000 ~ 5 000bp) 2 μ g (1pmol)

Lambda DNA (约 50kb) 750ng (23fmol)

(2) 对照反应模板——pGEM - 3Zf (+) DNA (1 μ g/ μ l)

引物:

(1) 与待测 DNA 特异结合引物

(2) 对照反应引物——pUC/M13 正向引物

粘合硅烷溶液 (Promega 公司)

硝酸银

甲醛 37%

硫代硫酸钠 10mg/ml 水溶液

95% 乙醇

冰乙酸

Sigmacote 硅烷 (美国 Sigma 公司产品)

Taq DNA 聚合酶测序反应操作步骤:

(1) 将 4 个 0.5ml 微量离心管分别标记上 A、C、G、T。加入 2 μ l 相应的 dNTP/ddNTP 混合液。加盖

后暂存于冰水浴。对于每一个待测序样品, 包括对照模板, 都需准备这样 4 个反应管。

(2) 向一个微量离心管中, 依次加入下列试剂:

DNA 模板 (用量参见材料与试剂)

5 × 测序反应缓冲液 5 μ l

引物 4.5 pmol

加去离子水至总体积为 16 μ l

(3) 向上步引物——模板混和物中加入 1.0 μ l 和 Taq DNA 聚合酶, 用微量加样器吹吸混匀。

(4) 各取 4 μ l 引物—模板—酶混合物分别加入到第一步骤的 A、C、G、T, 4 个反应管的管壁上, 再分别向 4 个管中加入 1 滴 (约 20 μ l) 石蜡油。在 Eppendorf 离心机上短暂离心使之混匀。

(5) 将 4 个反应管放置于已经预热到 95℃ 的程控循环加热器上。然后根据引物的序列及长度选择下列两种方法设定程序。

方法一: 适合小于 24 个碱基或 GC 含量小于 50% 的引物。

95℃, 2 分钟后进入下列温度循环:

95℃, 30 秒 (变性)

42℃, 30 秒 (复性)

70℃, 1 分钟 (延伸)

共进行 45 ~ 60 个循环, 反应结束后存放于 4℃。

方法二: 适合于大于或等于 24 个碱基或 GC 含量大于 50% 的引物。

95℃, 2 分钟后进入下列温度循环:

95℃, 30 秒 (变性)

70℃, 30 秒 (复性及延伸)

共进行 45 ~ 60 个循环。反应结束后存放于 4℃。

(6) 向各管中加入 3 μ l 测序反应终止液。短暂离心使之混匀。

(7) 上样电泳前于 70℃ 加热 2 分钟, 然后立即取 3.0 ~ 3.5 μ l 上样。取样时应避免吸入上层的石蜡油。

[银染色法测序凝胶制备]

使用银染法检测电泳条带必须采用特殊方法分别处理测序凝胶的长短两块玻璃板。使电泳结束后凝胶能够附着在短玻璃板上, 而与长玻璃板能够比较容易分离, 凝胶在短玻璃板的托载下, 能够方便地进行显色操作。

1. 短玻璃板的处理:

(1) 新鲜制备粘合溶液: 将 5 μ l 粘和硅烷加入到 1ml 含 95% 乙醇, 0.5% 冰乙酸的溶液中。

(2) 用吸水纸浸透 1ml 粘合溶液, 仔细均匀地涂满玻璃表面。

(3) 4 ~ 5 分钟后, 用干净的吸水纸浸透 95% 乙醇轻轻沿一个方向擦洗玻璃, 要将玻璃擦遍, 重复擦洗 3 次。以上操作必须戴上橡胶手套进行。

2. 长玻璃板的处理:

(1) 用浸透 Sigmacote 溶液的吸水纸仔细涂满玻璃板。

(2) 5 ~ 10 分钟后用干净吸水纸擦去多余的 Sigmacote 溶液。

测序凝胶的灌制及电泳过程与常规方法相同, 电泳结束后按下述方法进行显色反应。

[银染色法显色反应]

显色过程除显影外均在室温中进行。显影液需冷却至 10 ~ 12℃, 以降低染色后的背景。

(1) 每次新鲜配制下列溶液:

1) 凝胶固定液:

10%冰乙酸

2L

2) 显影液:

在 2L 去离子水中加入 60g Na_2CO_3 , 3ml 37% 甲醛和 400 μl 硫化硫酸钠 (10mg/ml)。放置水浴预冷至 10~12℃。

3) 染色液:

将 2g 硝酸银, 3ml 37% 甲醛溶于 2L 去离子水中。

(2) 电泳结束后, 小心地掀开玻璃板, 凝胶应牢固地附着在短玻璃板上。

(3) 将凝胶连同短玻璃板放到大平底塑料皿或搪瓷盘中, 加入凝胶固定液淹没凝胶, 固定 20 分钟以上, 可以缓慢地水平摇动。固定结束后回收固定液作为显色后的定影剂。

(4) 用双蒸馏水漂洗凝胶 3 次。

(5) 加入染色液缓慢摇动染色 30 分钟。

(6) 用双蒸水漂洗凝胶 20 秒钟。

注意: 漂洗时间过长会导致信号减弱。

(7) 加入预冷的显影液并缓慢摇动直至凝胶上显出条带。条带通常在 5~6 分钟出现。

(8) 向塑料皿中加入等体积的凝胶固定液以中止显色反应。缓慢摇动 2~3 分钟。

(9) 用双蒸水漂洗凝胶 2 次。

(10) 凝胶在空气中干燥后, 即可在灯箱上识读序列。

10.3 Maxam - Gilbert 化学法测定 DNA 序列

化学法测定 DNA 序列首先需要制备各单侧末端标记的待测 DNA 片段。DNA 片段末端核素标记有三种方法。一是用多核苷酸激酶和 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ 标记 DNA 5' 末端; 二是用末端转移酶和 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dATP}$ 标记 DNA 3' 末端; 三是对限制性内切酶产生的 3' 凹进末端, 利用 DNA 聚合酶 I 大片段和 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dATP}$ 标记。对于双链待测 DNA 片段, 前二种方法都会使 DNA 两侧末端均被标记, 不能直接用来测序, 需由限制性内切酶切成更小的片段, 经电泳分离两种不同大小的片段, 从凝胶当中回收。或者变性后经变性聚丙烯酰胺电泳分离两条单链, 但这种分离方法比较困难, 较少使用。第三种方法能够直接制备单侧末端标记的 DNA, 只要待测 DNA 满足下列条件之一: ① DNA 两端一侧为 3' 凹进末端, 另一侧为 3' 凸出末端或平末端; ② 两侧均为 3' 凹进末端, 但末端单链结构不同。在这种情况下可以选择不同的 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dNTP}$ 实现单末端标记 (图 10-6)。

末端标记探针及电泳回收 DNA 片段的具体操作过程参见本书有关章节。

化学法对标记的待测 DNA 的纯度有比较高的要求, 因为盐能够干扰胍对胸腺嘧啶的修饰, Tris 也会抑制 A+G 反应中的去嘌呤过程。

10.3.1 待测 DNA 的纯化

(1) 标记的 DNA 片段经酚/氯仿抽提后, 加入 3mol/L 醋酸钠 (pH5.2) 至终浓度为 0.3mol/L。加入 2 倍体积乙醇沉淀 DNA。

(2) 于 4℃, 12 000g 离心 10 分钟回收沉淀, 仔细吸净管壁上的乙醇。

(3) 用 70% 乙醇洗沉淀 3 次以除盐。每次弃掉上清液之前应用手提式盖革计数器分别检测沉淀与上清液, 避免探针丢失。

(4) 将沉淀于室温中干燥后, 溶于去离子水中, 不要使用 TE 缓冲液。经液闪仪测定后调整体积至 2 500~5 000cpm/ μl 。

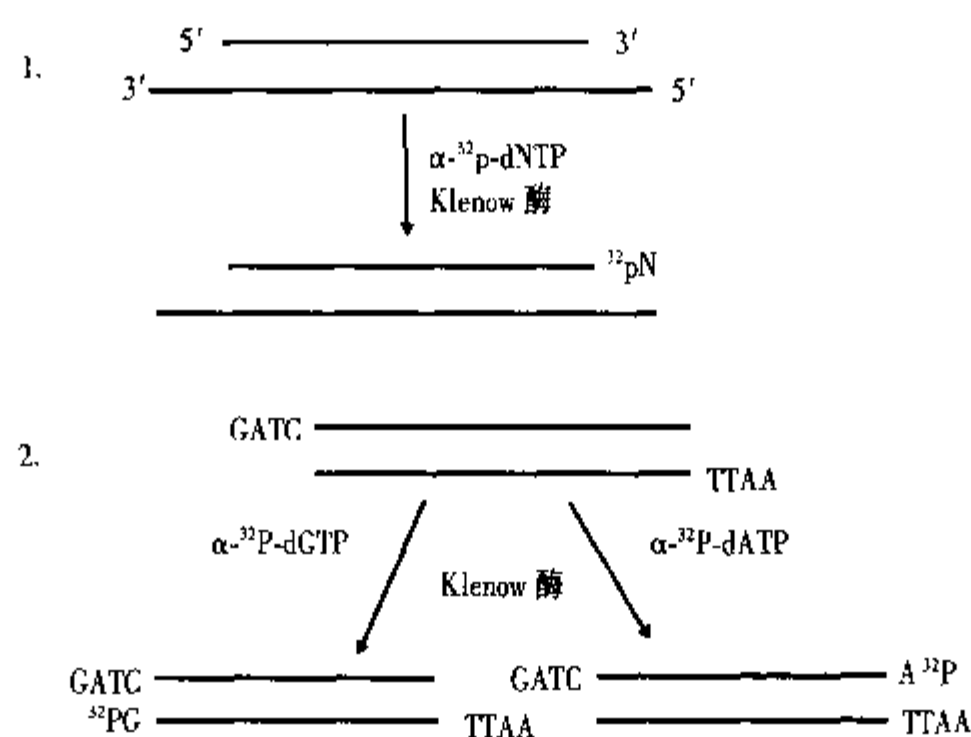


图 10-6 DNA 聚合酶 I 大片段及 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$
- dNTP 标记 DNA 单侧末端

10.3.2 碱基的特异性修饰及裂解

试剂与设备:

1mol/L 醋酸使用时由冰醋酸 (17.4mol/L) 新鲜配制硫酸二甲酯 (DMS)。

10% DMS 用无水乙醇配制

DMS 缓冲液: 50mmol/L 二甲砷酸钠 1mmol/L EDTA (pH8.0)

DMS 终止液: 1.5mol/L 乙酸钠 (pH7.0)

1mol/L β 巯基乙醇

250 $\mu\text{g/ml}$ 酵母 tRNA

无水乙醇 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏

胍 95%,

胍解终止液: 0.3mol/L 乙酸钠 (pH7.0)

0.1mmol/L EDTA (pH8.0)

100 $\mu\text{g/ml}$ 酵母 tRNA

5mol/L NaCl

NaOH/EDTA 溶液: 1.2mol/L NaOH

1mmol/L EDTA

0.3mol/L 醋酸钠

吡啶: 使用前用去离子水稀释至 1.0mol/L。

1mol/L 吡啶-甲酸 (pH2.0): 用吡啶调节 4% 的甲酸溶液至 pH2.0。

胍废物瓶

3mol/L 氯化铁溶液 150ml 装于 500ml 广口瓶中。

DMS 废物瓶:

5mol/L NaOH 溶液 150ml 装于 500ml 塑料广口瓶中。

鲑鱼精子 DNA 或牛胸腺 DNA: 将 DNA 溶于水中, 使其浓度为 1mg/ml。用超声破碎仪使之成为 500bp 左右的片段 (可在破碎过程中用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查破碎程度), 加入 5mol/L NaCl 至终浓度为 0.15mol/L。加入 2 倍体积无水乙醇, 室温放置 15 分钟后于 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000g 离心 10 分钟回收 DNA 沉淀。

用 70% 乙醇洗涤 2~3 次除盐。减压干燥后溶于去离子水中，使其浓度为 1mg/ml。

酵母 tRNA: 1mg/ml 溶于去离子水中。

3mol/L 醋酸钠 (pH5.2)

上样缓冲液: 98% 去离子甲酰胺

10mmol/L EDTA (pH8.0)

0.025% 二甲苯蓝

0.025% 溴酚蓝

真空冷冻干燥器,

测序凝胶电泳装置,

冰水浴、干冰/乙醇浴 (-70°C), 90°C 水浴。

10.3.2.1 特异性碱基化学修饰反应

1. 作用于 G 的修饰反应:

(1) 在 1.5ml Eppendorf 离心管中, 加入:

DMS 缓冲液	190 μl
鲑鱼精 DNA (1mg/ml)	4 μl
待测 DNA (2 500 ~ 5 000cpm/ μl)	5 μl

(2) 混匀后置冰浴中冷却至 0°C 。

(3) 加入 10% DMS 5 μl , 立即加盖混匀, 于 20°C 保温 10 分钟。

(4) 加入 50 μl DMS 终止液, 置于冰水浴中, 再加入 750 μl 预冷的乙醇, 混匀后放入干冰/乙醇浴中 (-70°C) 冷冻 5 分钟。

(5) 于 4°C , 12 000g 离心 5 分钟。将上清液弃至装有 5mol/L NaOH 的废液瓶中, 吸附在管壁上的上清液要尽量吸干净, 最后连同一一次性吸头一并弃入废液瓶。

(6) 向 DNA 沉淀中加入 300 μl 0.3mol/L 醋酸钠, 振荡溶解后加入 900 μl 冷乙醇。混匀, 干冰/乙醇浴中冷冻 5 分钟。

(7) 4°C , 12 000g 离心 5 分钟回收 DNA, 弃上清液, 加入 1ml 冷乙醇淋洗, 12 000g 离心 2 分钟, 弃上清液, 真空干燥 DNA 沉淀。

2. 作用于嘌呤 (A + G) 的修饰反应:

(1) 在 1.5ml 离心管中加入:

去离子水	10 μl
鲑鱼精子 DNA	4 μl
待测 DNA (2 500 ~ 5 000cpm/ μl)	10 μl

(2) 混匀后置冰浴冷却至 0°C 。

(3) 加入 4 μl 1mol/L 吡啶-甲酸 (pH2.0)、振荡混匀后至 37°C 保温 15 分钟。

(4) 加入 240 μl 胍解终止液。混匀后加入 750 μl 冷乙醇, 置干冰/乙醇浴 (-70°C) 冷冻 5 分钟。

(5) 于 4°C , 12 000g 离心 5 分钟, 弃上清液。

以下同 G 反应中步骤 (6)、(7)。

3. 作用于嘧啶碱基 (C + T) 的修饰反应:

(1) 在 1.5ml 离心管中, 加入:

去离子水	10 μl
鲑鱼精子 DNA (1mg/ml)	4 μl
待测 DNA (2 500 ~ 5 000cpm/ μl)	10 μl

(2) 混匀后置冰浴冷却至 0°C 。

(3) 加入 95% 胍 30 μ l, 加盖后用手指轻弹试管壁使之混匀, 放置 20 $^{\circ}$ C 反应 10 分钟。

(4) 加入 200 μ l 胍解终止液, 振荡混匀后加入冷乙醇 750 μ l, 于 -70 $^{\circ}$ C 冷冻 5 分钟。

(5) 4 $^{\circ}$ C, 12 000g 离心 5 分钟, 将上清液弃至装有 3mol/L 氯化铁的废物瓶中, 吸附在管壁上的液体也要仔细吸干净, 最后将吸头也弃入废物瓶中。

以下操作同 G 反应中步骤 (6)、(7)。

4. 作用于胞嘧啶 (C) 的修饰反应:

在 1.5ml 离心管中加入:

5mol/L NaCl	15 μ l
鲑鱼精 DNA (1mg/ml)	4 μ l
待测 DNA (2 500 ~ 5 000cpm/ μ l)	μ l

混匀后以下操作步骤同 C + T 反应步骤 (2) ~ (5)。

5. 作用于腺嘌呤和胞嘧啶的修饰反应 (A > C):

(1) 在 1.5ml 离心管中加入:

NaOH/EDTA 溶液	100 μ l
鲑鱼精子 DNA (mg/ml)	4 μ l
待测 DNA (2 500 ~ 5 000cpm/ μ l)	5 μ l

(2) 混匀后于 90 $^{\circ}$ C 保温 7 分钟。

(3) 置冰水浴中冷却至 0 $^{\circ}$ C, 加入 150 μ l 1mol/L 醋酸, 然后加入 5 μ l 酵母 tRNA (1mg/ml), 振荡混匀。

(4) 加入 750 μ l 冷乙醇, 混匀后置 -70 $^{\circ}$ C 冷冻 5 分钟。

(5) 4 $^{\circ}$ C, 12 000g 离心 5 分钟回收 DNA 沉淀。弃上清液后以下步骤同 G 反应步骤 (5)、(6)。

10.3.2.2 吡啶处理断裂被修饰的碱基

(1) 将上述 5 种修饰反应得到的干燥沉淀产物, 分别溶于 100 μ l 1mol/L 吡啶。生产厂家提供的吡啶一般为 10mol/L, 应在每次使用前用去离子水新鲜配制。

(2) 将试管盖关严。应选用质量较好的 Eppendorf 离心管, 必要时可用塑料胶带封严管口, 以防止加热时管盖崩开。

(3) 置于 90 $^{\circ}$ C 水浴加热 30 分钟。

(4) 当加热结束冷却至室温后, 打开管盖, 放到真空冷冻干燥器中彻底干燥样品。

(5) 从真空干燥器中取出样品管, 向各管中加入 20ml 去离子水, 在涡旋振荡器上混合 30 秒, 经短时离心使液体流到管底。用手提式盖革计数器检测管壁及管底, 以确保放射性标记的 DNA 都已溶于水中。

(6) 打开管盖, 放入真空冷冻干燥器中彻底干燥样品。

(7) 重复步骤 (5)、(6)。

(8) 向各管中加入 10ml 测序上样缓冲液。用盖革计数器检测放射性物质彻底溶于缓冲液中。

(9) 关严管盖, 在 90 $^{\circ}$ C 水浴中加热 1 分钟使 DNA 变性, 立即上样于已经过预电泳的测序胶上。测序胶的制备可以在前一天完成, 也可以在吡啶处理过程的步骤 (4)、(5) 时的空闲时间中进行。真空干燥时间一般需要 1 ~ 4 小时。

10.3.3 测序图谱的识读

化学法测序的电泳放射自显影图谱的识读, 比末端终止法复杂一些, 每组测序图谱为 4 或 5 条垂直的阶梯带, A > C 反应可以不做。读片时从胶底部一个个地向顶部读。G + A 和 C + T 两列中含有所有相差一个碱基的 DNA 片段, 如果在 G + A 中出现一条带, 就看 G 列中是否有同样大小的带, 如果有即为 G

碱基, 若没有则为 A 碱基; 同样, 在 C + T 中出现条带, 就检查 C 列中是否有同样大小条带, 有即为 C, 无则为 T。如果做了 A > C 反应, 在 A > C 列中出现比较深的带时, 可以帮助确定其为 A 碱基。

化学法测序通常都用³²P 标记的 DNA, 所以与用³⁵S 标记的末端终止法比较, 它显出的条带比较宽且有扩散, 这就限制了化学法对较大片段条带的分辨能力。一般在一块电泳胶上最多能读出 200 ~ 250 个核苷酸序列。

(杜 恺 文 卢圣栋 审)

参 考 文 献

1. Sambrook J. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
2. Davis LG, et al. Basic Methods in Molecular Biology. Elsevier Press, 1986
3. Henikoff S. Unidirectional digestion with exonuclease III Creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene, 1984, 28:351
4. Hong GF. A systematic DNA sequencing strategy. J Mol Biol, 1985, 158:539
5. Sanger F, et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, 74:5463
6. Maxam AM & Gilbert W. A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, 74:560

11. DNA 序列的自动测定

11.1 概述

DNA 序列测定技术是在 70 年代中期提出并逐渐完善起来的, Sanger、Maxam 和 Gilbert 等人因此分享了 1979 年诺贝尔化学奖这一殊荣。80 年代以来, 随着计算机软硬件技术、仪器制造和分子生物学研究的迅速发展, 使得 DNA 自动测序技术取得了突破性进展。DNA 自动测序技术, 以它在操作上简单 (自动化)、安全 (非同位素)、精确 (计算机控制)、快速等特点得到广泛的应用。本文重点介绍 DNA 自动测序技术的基本原理和操作方法。

基本原理

由英国剑桥分子生物学实验室生物化学家 Sanger 等人 1977 年创建的利用 DNA 聚合酶和双脱氧核苷酸末端终止法测序已成为现今自动测序的最佳选择方案。其独特性在于: 在 DNA 聚合酶作用下进行引物延伸反应; 双脱氧核糖核苷三磷酸 (ddNTP) 作为链终止剂; 采用聚丙烯酰胺区分长度仅差 1 个碱基的单链 DNA。在操作程序上只是把 DNA 片段或 dNTP 以荧光标记而替代了手工测序的同位素标记。DNA 的复制需要大肠杆菌 DNA 聚合酶、DNA 模板、引物和 4 种 2'-脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP)。在这一反应过程中, 标记有荧光素 (fluorescein) 的引物在 DNA 聚合酶的作用下, 依照碱基配对的原则, 分别将 4

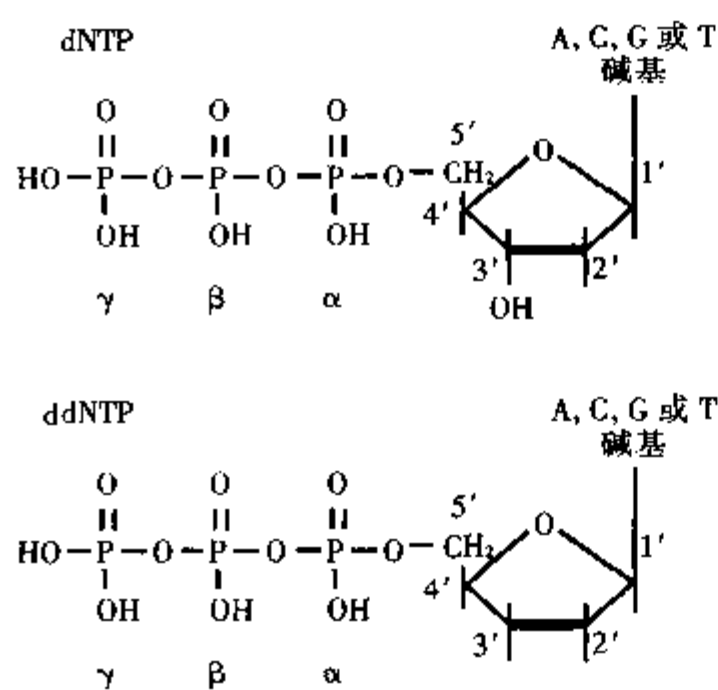


图 11-1 dNTP 和 ddNTP 的分子结构式

种 dNTP 底物加入到引物的 3'-羟基, 与 dNTP 的 5'-磷酸基团形成磷酸二酯键。如果在这一反应体系中掺入 2'3'-双脱氧核糖核苷酸底物 (2'3'-ddNTP) (图 11-1), 因这种 2'3'-ddNTP 在脱氧核糖的 3' 位置上缺少一个羟基, 虽然可以在 DNA 聚合酶的作用下通过其 5'-磷酸基团掺入到正在延伸的 DNA 链中, 但由于没有 3' 羟基, 它们不能同后续的 dNTP 形成磷酸二酯键, 使得正在增长的 DNA 链就此终止。由于产生这样一种 ddNTP 与 dNTP 的竞争, 所以反应产物是一系列长度不同的多核苷酸片段。例如: 如果 dATP 掺入则核苷酸链可以继续延伸, 如果 ddATP 掺入合成反应就不能进行了, 因为 ddATP 的 3' 位置没有羟基。由此可以得到一系列不等长度的以 ddA 为结尾的一组片段。同理, 也可以得到以 G、T 或 C 为结尾的片段, 电泳之后, 就可以直接“读出”碱基顺序。

11.2 自动测序仪及操作原理

11.2.1 ALF express™全自动激光荧光核酸测序仪

11.2.1.1 简介

ALF 全自动激光荧光 DNA 测序系统 (automated laser fluorescent DNA sequencer) 是由德国海德堡 (Heidelberg) 欧洲分子生物学实验室 (EMBL) Wilhelm Ansorge 和 Brian sproat 提出和设计的。与同位素测

序系统相比, ALF 不但在仪器硬件设计上, 而且在驱控仪器的软件功能上都作了很大的改进, 操作中能直接分析原始数据, 也可及时处理收集过程中获取的数据。最近推出的 ALF express™ 全自动激光荧光核酸测序仪, 则是利用电泳原理把荧光标记的 DNA 片段通过测序胶电泳分离。该仪器本身设计独特, 提供快速可靠的核酸测序、片段分析、HLA 序列定型及突变检测等。在人类基因组大规模序列测定中, 该设备起到了重要的初筛作用。

11.2.1.2 原理

ALF express™ 系统采用非放射性的单一 Gy5 荧光素标记引物或 dNTPs 进行核酸测序和片段分析, 沿用 Sanger 双脱氧核苷酸末端终止测序法, 使用 Gy5 荧光标记的引物与模板进行退火。测试时, 把 A、C、G、T 四种反应物分别加到凝胶板上的样品槽内, 上样程序与手工测序相同。另外, 在仪器电泳单元的下方是由激光枪 (laser source) 和探测器 (detector) 排列组成的探测系统: 每个样品道后面都有一个探测器, 激光能透过凝胶的每一条泳道, 当 DNA 条带迁移到探测区域并遇上激光时, DNA 上的荧光标记立刻被激活, 放出光信号; 此荧光信号由泳道前的光探测器接收, 并将信息输送给电脑进行分析和保存 (图 11-2)。电泳结束后, 电脑将收集到的信号 (原始数据) 进行处理, 从而获得最终序列。

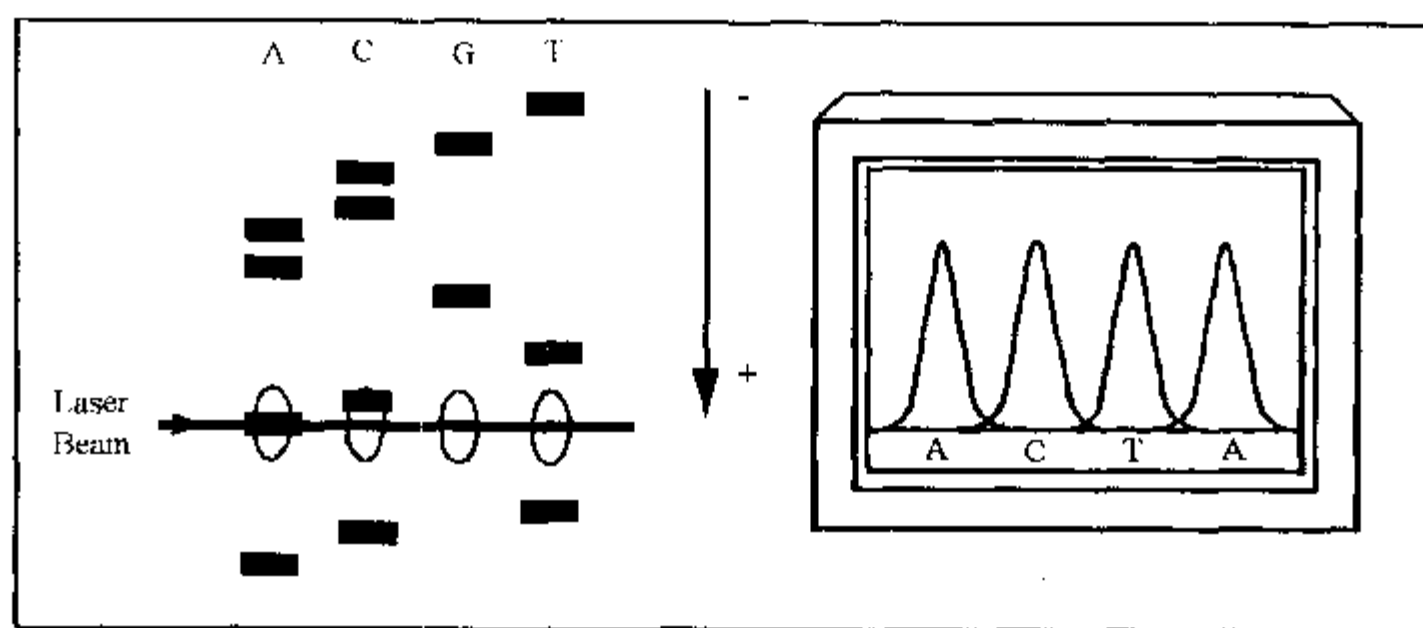


图 11-2 ALFexpress™ 全自动测序仪基本操作原理

11.2.1.3 组成

ALF 系统包括电源电泳仪、运行驱控软件的计算机及绘图仪。

1. 电泳单元:

包括凝胶模具区带检测系统, 缓冲液槽及恒温水浴。凝胶模具由 Pharmacia LKB 公司专利的恒温板, 玻璃板及间隔片组成。恒温板依恒温水浴提供凝胶的均匀高温, 既可把区带弯曲现象减至最低, 又可帮助打开片段中的二级结构。间隔片有标准的 0.5mm 及 0.35mm 厚度, 利用 0.35mm 厚的超薄凝胶电泳时间仅 1.5 小时。标准凝胶板规格为 27cm × 30cm, 短凝胶为板 15cm × 30cm (可供 SSCP 用)。检测系统由固定激光光源代替了扫描激光系统, 这是 ALF 系统能在短至 3.5 小时内完成电泳的关键。

2. 驱控软件:

IBM 兼容计算机中的 ALF Manager 软件控制着 ALF 系统的运行。由于使用了 OS/2 环境操作系统, 计算机拥有同步多功的能力, 即一部计算机, 可同时运行多个软件程序。例如计算机可一方面运行 ALF Manager 收集电泳仪传递过来的信号, 同时又可进行 DNASIS 序列分析, 处理上一次测序实验结果。

ALF Manager 的功能还包括原始数据显示、数据处理、数据编辑输出等。该软件分析处理数据的能力强, 对于 420 个左右碱基的序列, 其误差平均低于 1%; 遇有不能确定的情况, 软件会以含糊密码 (ambiguity code) 显示该位置的最有可能碱基供编辑时参考。ALF 系统采用传统的一种标记且分 4 个泳道

分别加样的方法,这样使得测序结果更可靠。

11.2.2 ABI 最新型全自动 DNA 测序仪

11.2.2.1 简介

早在 1987 年 Perkin Elmer (PE) Applied Biosystems 公司就推出 DNA 自动测序仪,其专利是分别采用 4 种荧光染料进行标记而在同一个泳道测序,具有极大的优越性。

377 型全自动 DNA 测序仪是 PE 公司近年推出的新型测序仪,它采用专利的四种荧光染料标记,并采用激光检测方法,具有测序精确度高、每个样品判读序列长 (700bp)、一次电泳可测定样品数量多 (64 个)、不需要同位素测序,方法灵活多样等特点,在人类基因组测序和 cDNA 文库测序研究中应用极其广泛。此外,该仪器在各种应用程序的辅助下还可以进行 DNA 片段大小分析和定量分析,应用于基因突变分析 SSCP、DNA 指纹图谱分析、基因连锁图谱分析以及基因表达水平的研究,有着极其广泛的应用前景。

11.2.2.2 原理

采用四种荧光染料标记终止物 ddNTP 或引物,经 Sanger 测序反应后,产物 3' 端 (标记终止物 ddNTP 法) 或 5' 端 (标记引物法) 带有不同荧光标记,一个样品的 4 个测序可以在一个泳道内电泳,从而降低了测序泳道间迁移率差异对精确性的影响。由于增加了一次电泳样品的数目,可一次测定 64 个或更多样品。经电泳后各个荧光谱带分开,同时激光检测器同步扫描,激发出的荧光经光栅分光后打到 CCD 摄像机上同步成像。也就是代表不同碱基信息的不同颜色荧光经光栅分光,经 CCD 摄像机成像,因而一次扫描可检测出多种荧光,传入电脑,其测序速度高达 200bp/h,比 373 型 DNA 测序仪速度大大提高,最后经过软件分析后输出最终结果。

11.2.2.3 组成

包括电泳系统、激光检测装置、power Macintosh 7200 型苹果电脑、HP1600CM 型彩色打印机、DNA 序列分析及 DNA 片段大小和定量分析软件 (Gene Scan™)。该系统采用电脑单点控制整个 DNA 测序仪,包括电泳参数设置、数据收集、分析及结果输出。电脑可在电泳过程中对仪器运行状态进行同步检测,电泳结果可以凝胶电泳图谱、荧光吸收峰图或碱基排列顺序等多种形式输出。

11.2.3 ABI PRISM 310 型全自动 DNA 测序仪 (遗传分析仪)

该仪器采用毛细管电泳技术取代了传统的聚丙烯酰胺凝胶平板电泳进行 DNA 测序,它不仅具有 DNA 测序、PCR 片段大小分子和定量分析功能,而且实现了全部操作自动化,包括自动灌胶、自动进样、自动数据收集分析等。把反应后的待测样品放在自动进样器的样品盘中,由计算机程序控制自动进样,只需输入样品信息,如:进样次序、电泳时间和电压、及数据分析模式 (如:SSCP、微卫星序列、DNA 序列分析等模式),其余的工作,如:灌胶、进样、电泳、检测、数据分析就全部由电脑控制进行了。

11.3 自动测序操作程序

11.3.1 载体系统

理想的测序结果,模板的质量是关键,但测序前,如何将待测 DNA 片段随机地克隆到一种合适的载体上,对于得到高质量模板尤为重要。

本段简要介绍几种目前常用的测序载体。

11.3.1.1 单链丝状噬菌体 - M13 载体 (M13mp18 和 M13mp19)

将待测 DNA 片段克隆到 M13 载体上, 使用通用引物 (universal primer) 来对所有的重组体克隆进行序列分析, 再通过计算机将派生的序列拼接起来。这种方法操作简单, 是目前最普遍采用的快速 DNA 序列测定方法。

M13 是雄性特异的大肠杆菌丝状噬菌体, 病毒形式呈线状, 只能感染具有性纤毛的细菌菌株 [由细胞中的 F 分子 (F⁺, 或 Hfr) 所编码]。当它穿过性纤毛时, 外层衣壳脱落, 病毒 DNA 进入细菌体内。在噬菌体复制的每一代, 每个细胞大约释放出 200 个噬菌体。M13 噬菌体基因组由一条单链环状 DNA 分子组成, 大约 6.4kb, 编码 10 个基因。其中基因Ⅶ编码病毒的外壳蛋白, 基因Ⅲ产物为次要衣壳蛋白, 位于丝杆的末端, 参与病毒颗粒对细菌性纤毛的吸附。在 M13 的特殊生活周期中, 既有复制型 (RF) 双链 DNA, 又有单链 DNA 形成, 前者可以做为克隆的载体, 后者可以用作序列测定的模板 (可以产生大量含有外源 DNA 某一条链的 DNA 分子)。目前常用的 M13 载体为 M13mp18 和 M13mp19。Messing (1977) 在野生型 M13 的基因Ⅲ与Ⅱ之间插入一段大肠杆菌染色体 DNA HindⅡ降解的产物 (789bp), 这一区带有 β -半乳糖苷酶基因 (LacZ) 的调控序列及其 N 端头 146 个氨基酸的编码信息。由此建立一种简单的颜色试验来鉴别有无外源 DNA 插入的载体。由于宿主菌 (例如, Jm109) 缺失 β -半乳糖苷酶基因, 它所编码的多肽缺失第 11~41 位的氨基酸, 因而没有酶活性。当将改造后的 M13 载体转染含 F' 的宿主细胞时, M13 载体上的部分乳糖操纵子在诱导物 IPTG (isopropyl - B - D - thiogalactoside, 异丙基 - B - D - 硫代半乳糖苷) 的诱导下, 表达 α -多肽 N 端 146 个氨基酸的多肽, 即宿主菌缺失的第 11~41 位氨基酸, 所以这两种产物可发生一种互补作用而恢复 β -半乳糖苷酶的活性。这种缺失 LacZ 操纵子近邻区段的突变体与 β -半乳糖苷酶阴性, 但操纵基因近邻区完整的突变体之间的互补称为 α -互补。经初步改造的 M13 感染宿主菌后, 实现 α -互补, 产生有活性的 β -半乳糖苷酶, 该酶可水解 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -半乳糖苷 (5' - bromo - 4 - Chloro - 3 - indolyl - β - D - galactoside, X - gal) 得到溴氯吲哚的蓝色产物, 因而在铺有 IPTG 和 X - gal 的培养基上形成蓝色噬菌斑, 这一改造的 M13 定名为 M13mpl。然而作为载体不但要有选择标记, 还要有多个克隆位点。Messing 等在 M13mpl LacZ 序列内导入了多克隆位点 (multiple cloning sites, MCS), 从而构建了 M13mp 载体系列。当有外源 DNA 插入多克隆位点时, 由于破坏了 α 互补作用, 所得重组体在 IPTG 与 X - gal 存在下可形成无色噬斑。目前常用的 M13mp18 和 M13mp19 (图 11-3) 都含有 13 个限制性位点。两种载体的插入方向互为相反, 因此可以把它们作为一对载体, 从外源 DNA 的两端开始, 测定其互补的两条链的序列。

使用该系统测序其优点在于, 待测定的 DNA 片段均被克隆在 M13mp 基因组的 MCS 区段内, 因此所有待测定的 DNA 片段都可共同使用一种引物, 这种引物能特异地同载体分子上与克隆位点相连的单链 DNA 区段杂交。由该引物引导的载体互补链 DNA 的合成, 是从引物的 3' - 端开始向克隆序列方向延伸, 这样的序列可直接用于序列测定。由于使用通用引物测序, 减少了合成和分离各种不同引物所需要的烦琐程序。

11.3.1.2 λ 噬菌体载体 - λ ZAP

分离到目的基因之后, 要把目的 DNA 片段亚克隆到质粒载体, 再提取质粒 DNA, 这是一个复杂过程。 λ ZAP 是将目的 DNA 片段直接从 λ 噬菌体载体转移到质粒载体的一种快速而简便的体内系统。 λ ZAP 载体实质上是一种插入型 λ 噬菌体载体 (图 11-4)。该基因组是一长度为 50kb 的双链 DNA 分子, 在其颗粒内, DNA 为一线状双链分子, 末端为长 12 个核苷酸的互补单链, 称为 Cos 位点。在基因组中, 含有一个可以在体内发生删除作用的 PBluescript 噬菌粒的 DNA 片段, 该片段两侧是由两个单链 DNA 噬菌体 F1 的复制信号, 即 F1 起始子和 F1 终止子。在 PBluescript DNA 序列的内部, 大肠杆菌 LacZ 启动子下游有一个 MCS 位点, 两侧有 T3 和 T7 噬菌体启动子, 可装入长达 10kb 的 cDNA 片段 (short 等, 1988)。外源 DNA 片段在 MCS 位点插入, 会导致 LacZ 基因失活, 这为重组体分子的筛选提供了组织化学手段。如果插入的方向及读码框正确, 就可以在大肠杆菌中表达出特异性抗原 (作者所在实验室所构建的 cD

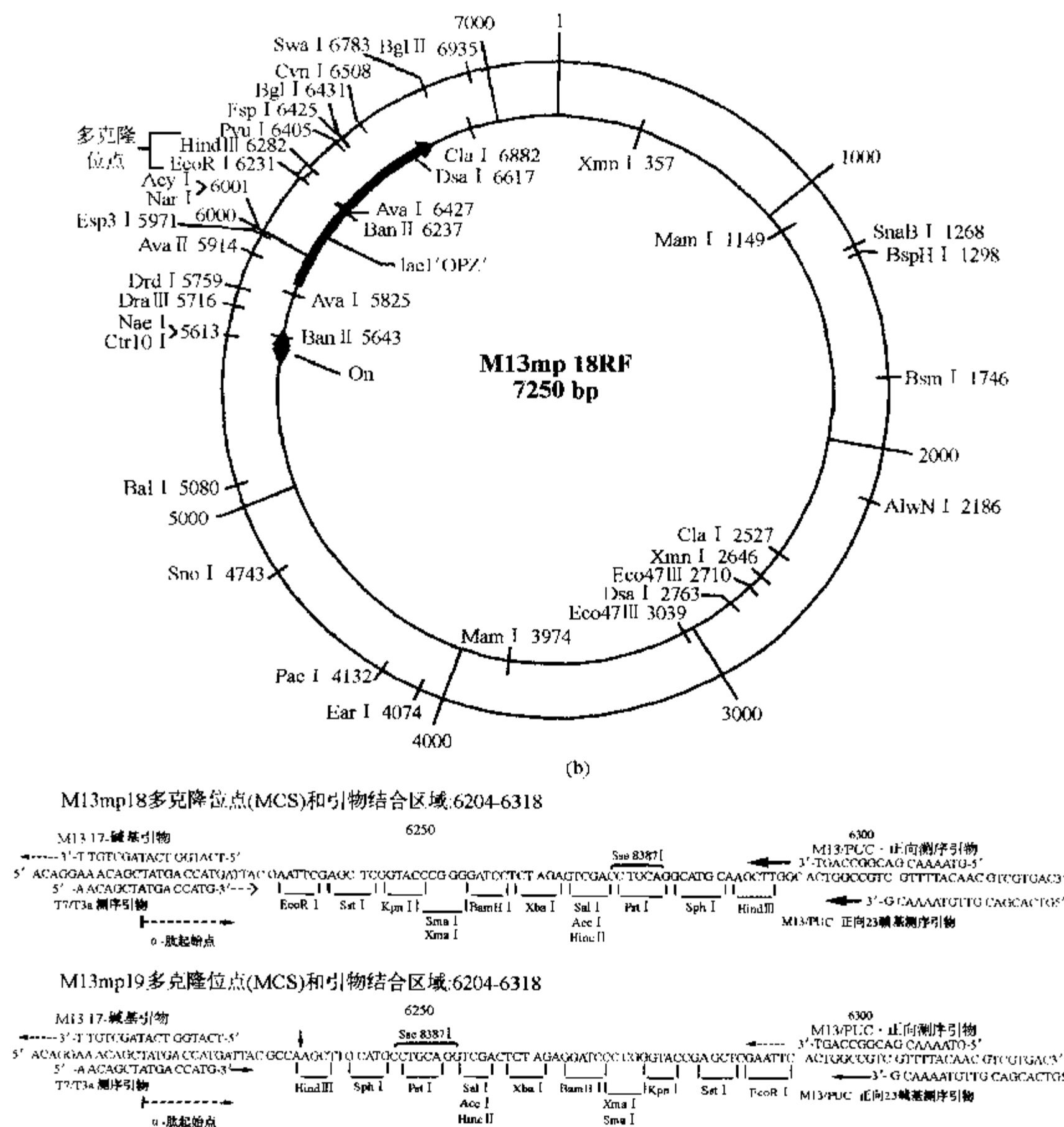
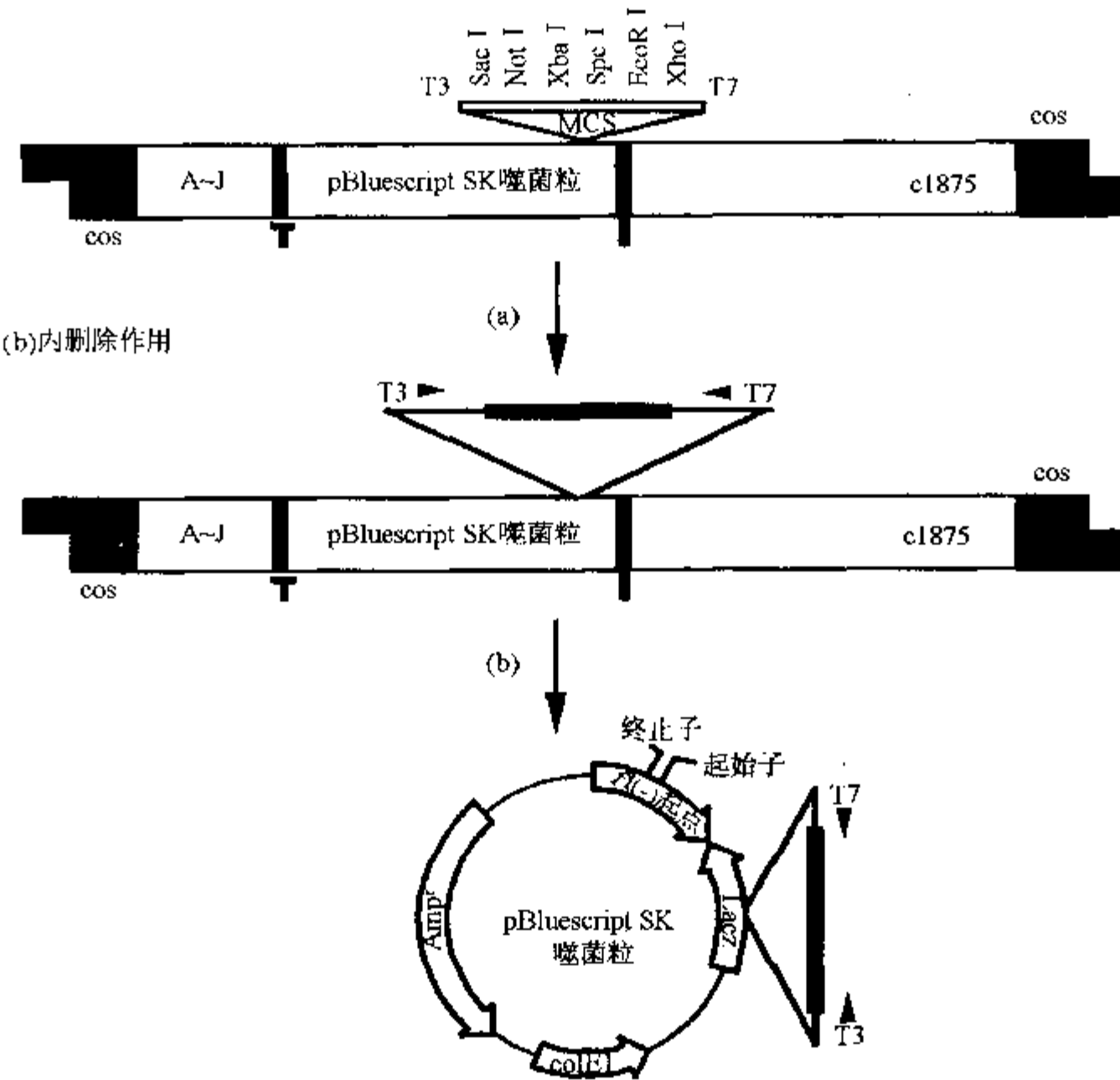


图 11-3 M13mp18-19 的物理图谱

NA 文库就是选用 λ ZAP 载体)。为了从 cDNA 文库中快速检测阳性克隆和序列测定, 可使用 T3 和 17 通用引物做 PCR, 这样的阳性 PCR 产物可直接测序, 进行初筛, 从而快速地获取大量的 ESTs。经 GenBank 比较后, 将所需要的 ESTs 进行 cDNA 全长测定时, λ ZAP 载体就显示出了体内删除的巨大作用, 只要把含有外源 DNA 插入序列的重组 λ ZAP 载体感染大肠杆菌 F' (或 F+) 菌株, 再用辅助噬菌体 M13 (或 ϕ) 超感染, 这样, 在细胞内由此辅助噬菌体基因 II 提供的反式作用蛋白, 会首先识别位于 λ ZAP 载体臂上的 F1 DNA 合成起始子, 并在其 (+) DNA 链上切成一缺口, 从此切口处开始, 沿着 PBluescript 序列按滚环模型进行单向性 (+) DNA 链合成, 终止在 F1 终止子。于是, 辅助噬菌体基因 II 蛋白将再次切割, 此种形式产生的 (+) DNA 链的两端便会连接形成一个环形的单链 PBluescript 噬菌粒基因。该噬菌粒最终被噬菌体 M13 的蛋白质包装成单链的 DNA 噬菌体颗粒, 并被挤出宿主细胞, 这便是体内亚克隆的全程。由于包装着噬菌体 PBluescript DNA 的 M13 颗粒是热抗性的, 所以经 70°C/15 ~ 20 分钟的加热

(a) λ ZAP 载体的结构图 11-4 λ ZAP 载体的结构及其体内删除作用

(此时大肠杆菌细胞和 λ 噬菌体被杀死), 得以存活。再用它感染 F' 大肠杆菌, 在含有四环素或氨苄青霉素的 LB 平皿上获得选择性克隆, 按常规质粒的提纯方法, 便可获得高质量的 DNA 测序模板。

11.3.1.3 pUC 系列

pUC 系列是 Vieira (1982) 构建的一套和 M13 噬菌体相对应的 pBR322 的衍生质粒系列。在 Sanger 双脱氧核苷酸末端终止 DNA 序列测定方法的基础上, 该方法不断得到改进和完善, 继 M13mp 载体系列的使用之后, 反转录酶或 T7DNA 聚合酶替代了大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段催化 DNA 链的聚合延长, 这种改良方法, 可以将待测定的 DNA 片段克隆到质粒载体上, 直接用闭合环形的双链质粒 DNA 模板按照 sanger 双脱氧链终止法测序。pUC 系列是目前最为常用的双链克隆载体。这一载体在多克隆位点的两侧具有与 M13 相同的正反两方向引物结合序列。因此, 可以利用商品化的 M13 DNA 测序引物 (通用引物) 进行序列分析, 并且同一模板可进行正反双向测序 (图 11-5)。

11.3.1.4 pGEM 系列

该系列从 pGEM3Zf (+) 开始均带有丝状噬菌体 ϕ 1 复制起始点序列, 为一种噬菌粒。在多克隆位点的两端分别设置了 T7 和 SP6 启动子, 它们不仅可以完成插入片段的转录, 同时也可应用已商品化的 T7 引物和 SP6 引物, 以及 M13/pUC 通用引物对插入序列进行序列分析。该系列为具有转录功能的克隆

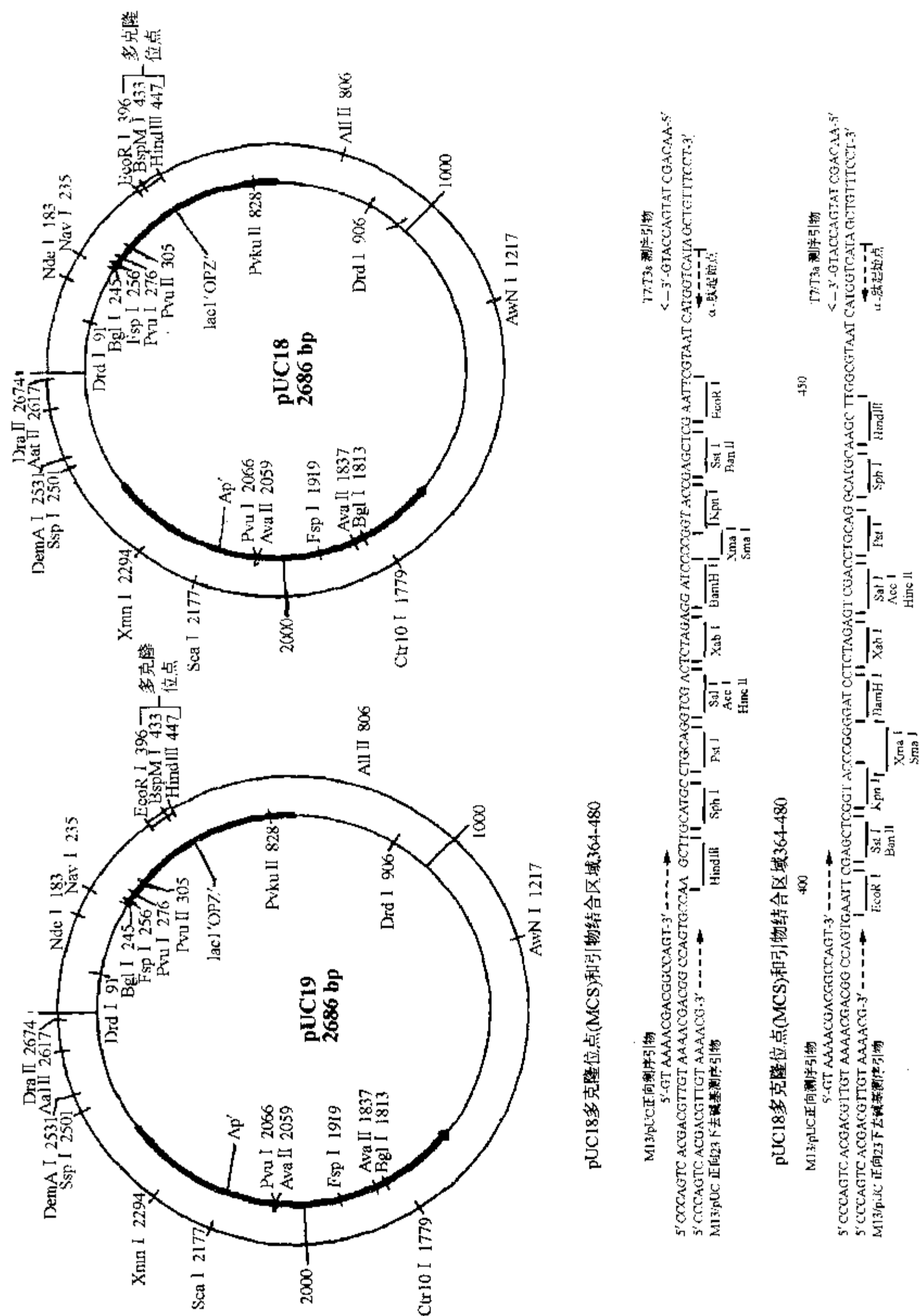


图 11-5 pUC 质粒系列图谱

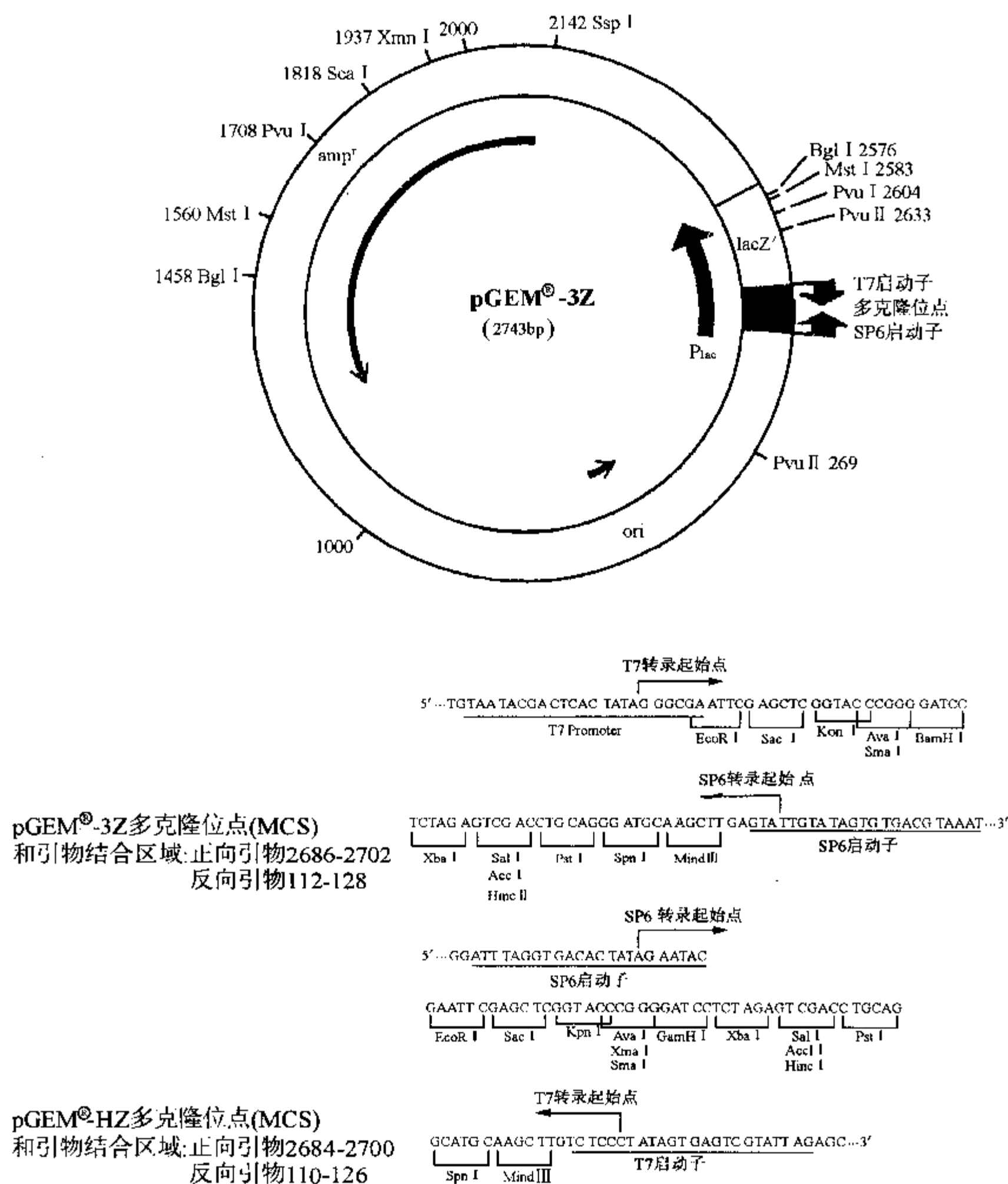


图 11-6 pGEM-3Z 质粒图谱

载体, 它的 M13 引物结合序列距离多克隆位点较远 (约在 50—130nt 左右), 在实际测序工作中应予以考虑, 这一特点有利于读准插入片段两端的序列 (图 11-6)。

11.3.2 模板 DNA 的制备

在自动测序中, 模板质量的好坏对信号读解的准确率和读出的序列长度有很大关系, 因此模板的制备, 要比手工测序模板的制备更严格。

本段主要介绍从以 λ ZAP 为载体构建的 cDNA 文库中筛选阳性克隆, 经 PCR 扩增制备模板的具体过程。其特点是不仅提高了分析结果的准确性, 简化了操作程序, 使 DNA 测序的自动化成为可能, 而且减少了模板用量, 避免了模板二级结构对测序的影响。

材料

(1) NZY 培养液 (per liter)

5g NaCl

2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

5g yeast extract

10g N-Z-amine A

用 5 ~ 10mol/L NaOH 调节 pH 至 7.5

15 lbf/in² (1 lbf/in² = 6.895kPa) 高压蒸汽灭菌 30 分钟

(2) NZY 琼脂培养基 (per liter)

5g NaCl

2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

5g yeast extract

10g N-Z-amine A

用 10mol/L NaOH 调节 pH 至 7.5 再加入

15g agar

15 lbf/in² 高压蒸汽灭菌 30 分钟, 待溶液尚未冷却时取出, 轻轻转动, 使已融解的琼脂均匀分布在培养基溶液中, 铺盘 (30 ~ 40ml/90mm、60 ~ 70ml/150mm 培养皿), 待凝固后倒置平皿, 置 4℃ 备用。

(3) NZY 上层琼脂糖培养基

与 NZY 培养液相同

Add 0.7% (W/V) agarose

15 lbf/in² 高压蒸汽灭菌 30 分钟, 稍冷却后, 混匀, 分装成 3ml 或 8ml, 置 4℃ 备用。

(4) SM 缓冲液 (per liter)

5.8g NaCl

2.0g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

50.0ml 1mol/L Tris·HCl (pH7.5)

5.0ml 2% (W/V) gelatin

(5) LB (Luria - Berfan) 培养液 (per liter)

10g NaCl

10g tryptone

5g yeast extract

用 10mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0, 15 lbf/in² 高压蒸汽灭菌 30 分钟

(6) 10mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

(7) 麦芽糖 (20% W/V), 使用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

(8) 大肠杆菌 XL1 - Blue MRF' 株

(9) 0.5mol/L IPTG (in water)

(10) X - gal (250mg/ml in DMF)

操作步骤

(1) 在 15ml 含有四环素 (终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 LB 培养液中, 接种一个大肠杆菌 XL1 - Blue MRF' 单

菌落, 37℃振荡培养过夜。

(2) 次日, 在消毒的 50ml 离心管内, 加入 0.5ml 过夜培养菌液, 及 20ml LB 培养液、0.2ml 20% 麦芽糖、0.2ml 10mmol/L $MgSO_4$, 37℃振荡培养 4~6 小时。麦芽糖是编码 λ 噬菌体受体基因 (LamB) 的诱导物, 镁离子的存在有利于吸附的发生, 在 37℃几分钟内即可完成。加麦芽糖后细菌更容易吸附 λ 噬菌体。

(3) 收集菌体细胞 700g/15 分钟、4℃、离心。

(4) 用 10ml 灭菌的 10mmol/L $MgSO_4$ 溶液悬浮细胞沉淀, 并将其浓度调至 $OD_{600} = 0.5$ 。

(5) 转染: 10 μ l cDNA 文库稀释液 (10 000 pfu/ml)

600 μ l 稀释的菌液 ($OD_{600} = 0.5$)

轻轻混匀, 37℃水浴 30 分钟。

(6) 铺板: 将上述转染液与 8ml 顶层琼脂糖 (已煮沸后放在 48℃水浴至少 10 分钟) 混匀后, 立即倒在已凝固的底层琼脂培养基 (NZY) 的 150mm 平皿内, 轻轻晃动平皿, 勿产生气泡, 以便细菌和顶层琼脂糖在平板上分布均匀。

(7) 盖上平皿, 室温作用 10 分钟, 待顶层琼脂糖凝固, 将平皿倒置, 放在 37℃恒温箱培养 12~16 小时。

(8) 将长有噬菌斑的培养皿置 4℃放置 2 小时后, 挑取噬菌斑。

(9) 在消毒的 0.5ml Eppendorf 管中加入 75 μ l SM Buffer 和 5 μ l 氯仿。

(10) 用一装有橡皮头的巴斯德吸管, 轻轻吸取单个噬菌斑放入步骤 (9) 的管中, 轻轻混匀后, 置 4℃保存, 待以 PCR 检测其纯度及定量。

(11) 振荡, 离心, 取上清液做 PCR 扩增, 组成如下:

5 μ l	上清液	
5 μ l	Mg^{2+}	15mmol/L *
5 μ l	dNTP	1mmol/L *
1 μ l	正向引物	0.3 μ g/ μ l *
1 μ l	反向引物	0.03 μ g/ μ l *
0.5 μ l	Tag DNA 聚合酶	5 μ l/ μ l *
32.5 μ l	ddH ₂ O	

反应体积

50 μ l

注: * 贮存液浓度

加一滴液体石蜡, 将反应管放入 PCR 仪, 热循环参数: (用于 λ ZAP cDNA 文库)

94℃	5 分钟	} 28 次循环
94℃	45 秒	
55℃	35 秒	
72℃	3 分钟	
72℃	5 分钟	
4℃	循环结束后, 待温度降至 4℃取出样品。	

(12) 取 5 μ l PCR 样品, 在 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 模板纯度, 并依据 PCR 电泳带挑选测序标本, 置 -20℃保存。将无带或有杂带的标本去除。

注意事项

(1) F' 附加体带有四环素抗性。镁离子是四环素的拮抗剂, 因此在四环素抗性菌的筛选过程中不能使用含镁盐的培养基。

(2) 不要用新制备的琼脂平皿作培养, 因 37℃ 时, 水蒸气会在顶层琼脂的表面形成水珠, 使生长中的噬菌体随水珠流动而互相污染, 为避免这一问题, 需在转染前 2~3 天铺盘, 临用前将培养皿放 37℃ 1 小时。

(3) 不同的 λ 噬菌体株或同一株 λ 噬菌体组连的不同重组体所形成的噬斑大小形状不同。但是同源的噬菌体所形成的噬斑很少有变化。菌苔的生长速度、顶层琼脂糖的浓度, 平皿的新鲜程度及温箱的湿度都可影响噬斑的形状。例如: 细菌生长过快, 顶层琼脂糖浓度过高, 琼脂板太干或温箱内温度较低都容易形成小噬斑, 所以可根据需要适当调整上述条件, 但菌苔长满而细胞进入静止期后, 噬菌斑将不再扩大。

(4) 应在噬斑形成早期挑取单个噬菌斑, 避免噬斑相互融合。最迟需在 2 周内将噬斑挑取完。

(5) PCR 扩增反应后, 除主要扩增产物外, 若还有其它杂带, 可使用低熔点琼脂糖回收, 再用酚/氯仿抽提。

(6) DMSO 对 DNA 聚合酶有一定抑制作用, 但它可减少模板二级结构, 提高 PCR 反应特异性。但勿反复冻化使用。

11.3.3 测序胶的制备 (以下步骤均以 ALF express™ DNA 自动测序仪为例)

自动测序的优点之一是荧光发色基因吸收了激光束提供的能量而发射光信号, 信号被探测器检测到并传送至计算机, 经整理显示出四种彩色图像。由此可见, 凝胶本身及胶板上的任何污染物所放射出的荧光均会被当作信号收集。所以, 在序列胶制备的过程中, 很关键的是消除一切可能产生荧光的物质。

11.3.3.1 胶板的清洗和组装

(1) 洗制胶玻璃板时可用塑料刷 (公司专门配备) 或松软的海绵沾少许洗涤剂擦洗, 但一定要用温水反复多次冲洗, 以除去残留的洗涤剂, 再用蒸馏水冲洗干净。

(2) 用 95% 的乙醇擦洗玻璃板内面, 2~3 次, 再用镜头纸擦干。

(3) 分别将擦洗干净的玻璃间隔片 (易碎, 应小心操作) 放在玻璃板和恒温板的边缘固定位置。

(4) 两边用强力夹对称扣紧, 调好制胶玻璃板的水平后, 即可灌胶。

11.3.3.2 6% 聚丙烯酰胺—尿素胶的配制

核苷酸序列的数量和质量都取决于聚丙烯酰胺的质量, 而丙烯酰胺浓度则取决于待分析 DNA 片段的长短。我们所选用的 6% 聚丙烯酰胺胶可读出距离引物 5' 端 25~400 碱基 (bp) 之间, 如果要读出距引物 5' 端更远的序列, 可选用 4%~5% 的聚丙烯酰胺来测定, 反之, 要选择高浓度的聚丙烯酰胺凝胶。另外, 如果适当降低 ddNTP/dNTP 浓度比例, 便可测到较长的可读序 DNA 片段。

材料

10× TBE

194.00g Tris (0.8mol/L & M. W 121.14)

99.00g Boric acid (0.8mol/L & M. W 61.83)

7.44g EDTA (0.01mol/L & M. W 372.24)

加去离子水至 200ml

40% 聚丙烯酰胺

丙烯酰胺 (测序级) 190g

N, N'-甲叉丙烯酰胺 10g

加去离子水 500ml, 搅拌 20 分钟, 加一汤匙 MB-树脂, 磁力搅拌 30 分钟 (过滤, 装入棕色瓶内, 置 4℃ 保存), 也可购买已商品化的 40% 聚丙烯酰胺 (19:1) 产品, 直接使用。

10% 过硫酸铵 (W/V)

1.0g 过硫酸铵

加去离子水 10ml 溶解后置 4℃, 使用期应 < 1 周。

6% 聚丙烯酰胺—尿素胶

960g 尿素

120ml 10 × TBE

先加水 1 000ml, 稍做加热, 持续搅拌, 完全溶解后, 用 0.45μm 孔径的过滤器去除杂质, 再加入 300ml 40% 聚丙烯酰胺, 补加去离子水, 至总体积 2 000ml, 置 4℃ 保存。

11.3.3.3 制胶

(1) 230μl 过硫酸铵加到 60ml 6% 聚丙烯酰胺—尿素胶内, 混匀后, 再加 75μl TEMED, 迅速转动烧杯, 混匀溶液。

(2) 用 50ml 注射器吸入胶溶液, 从胶板一侧线性平行, 连续缓慢灌注, 避免出现气泡。

(3) 在胶板的上方, 插入平端梳子。灌制后可在 2~24 小时之间使用。

注意:

(1) 在配制胶溶液和制胶的过程中, 要带手套, 因为丙烯酰胺有强烈神经毒素, 经皮肤吸收, 在称取粉末时, 注意呼吸道吸入。

(2) 用蒸馏水冲洗胶板或用镜头纸擦干胶板时, 动作要轻, 以防破坏玻璃板内的硅化层。

(3) 如果用乙醇擦洗时, 一定要等乙醇挥发尽, 才可制胶。

(4) 灌胶用的注射器, 每次用后, 用热水冲洗, 再用蒸馏水冲净, 以防堵住。

11.3.4 测序模板 DNA 聚合酶延伸反应

这一过程能提高信号强度, 减少操作复杂性及 DNA 聚合酶的用量。确保测序的可重复性和可靠性。使用 Perkin - Elmer Sequencing Kit, 使测序反应极为方便, 组成如下:

ddH ₂ O	18μl
Cy5 标记引物 *	2μl
PCR 产物	2~3μl
10 × 反应缓冲液	4μl
ddNTP	2μl
DMSO	2μl

注: * Cy5 标记引物目前有两种方法: ①以 5' 端标记的引物, 适用于以引物渐进法测序, 也可用于 PCR 产物的直接测序。在合成引物时, 引物的 5' 端被标记上荧光素; ②荧光素标记核苷酸 (fluore - dATP 或 Fluore - dCTP), 其优点是: 一个反应物上能有多个标记, 提高了检测的灵敏度。同时扩大了测序的范围, 多种模板均可用这种引物。

操作步骤:

(1) 用记号笔标记好 0.5ml 彩色 Eppendorf 管的序号, 例如:

10 个绿色管	1A ~ 10A
10 个蓝色管	1C ~ 10C
10 个黄色管	1G ~ 10G
10 个红色管	1T ~ 10T

如无 4 种颜色的彩管, 可分别标上 A, C, G, T, 再写好序号。

(2) 在一个 1.5ml 灭菌的 Eppendorf 管, 配制 N 个样品的混合液:

ddH ₂ O	18μl	18N + 18μl
Primer	2μl	2N + 2μl
10 × 缓冲液	4μl	4N + 4μl

DMSO 2 μ l 2N

混匀, 离心, 置于冰中

(3) 将 2~3 μ l DNA 模板 (根据 PCR 电泳带的亮度), 加在 1 个 0.5ml Eppendorf 管中, 如有 10 个测序模板, 就要在每个管上写好序号, 例如: 1, 2, 3, ..., 10。

(4) 从步骤 (2) 的管中, 吸出 26 μ l 混合液, 加到步骤 (3) 的 1 号管中, 其余的 2, 3, 4, 5, ..., 10 管依此类推, 均加入 26 μ l 的混合液, 用微量加样器轻轻上下混匀; 避免出现气泡, 短暂离心。

(5) 加 2 μ l ddNTP 到步骤 (1) 的各管中:

2 μ l ddATP 到 1A~10A

2 μ l ddCTP 到 1C~10C

2 μ l ddGTP 到 1G~10G

2 μ l ddTTP 到 1T~10T

(6) 从步骤 (4) 的 1 号管中依次吸出 6 μ l (每次量一定要均等) 加到步骤 (1) 中与 1 号管相对应的 1A, 1C, 1G 和 1T 管中, 2 号, ..., 10 号管照此步骤加到与各自序号相同的 A, C, G, T 管中。加样时注意微量加样器的滴头不要碰到各管下面的 ddNTP。

(7) 在各反应管中加一滴液体石蜡, 短暂离心。

(8) 将样品放入 PCR 仪内, 按下列条件启动热循环反应:

反应参数: (用于 λ ZAP 载体)

94 $^{\circ}$ C	2 分钟	
94 $^{\circ}$ C	30 秒	} 20 个循环:
50 $^{\circ}$ C	15 秒	
72 $^{\circ}$ C	1 分钟	
94 $^{\circ}$ C	30 秒	} 15 个循环
72 $^{\circ}$ C	1 分钟	

(9) 当热循环反应温度降到 4 $^{\circ}$ C 时, 在各管中加入 4 μ l Stop Solution 终止反应, 振荡或用手指弹匀使其终止作用完全, 短暂离心, 可立即上样或置 -20 $^{\circ}$ C。

11.3.5 样品上样和电泳

(1) 上样前, 将样品 90 $^{\circ}$ C 加热变性 5 分钟, 迅速插入冰中。

(2) 开机并将胶板固定在仪器上, 在上、下电泳槽倒入 2 000ml 0.6 \times TBE 电泳缓冲液。

(3) 输入各项电泳参数, 当激光值 > 500, 并已稳定时, 即可开始上样。

(4) 轻轻拨出梳子, 用注射器吸取槽内的电泳缓冲液并用 7 号注射针头冲洗胶口, 至少 3 次。

(5) 每孔上样 6~8 μ l。一份样品分别加入 A, C, G, T 四个泳道, 每板胶可测序 10 份样品。

(6) 接通电源, 在恒定功率下电泳。

注意: 自动测序仪为高压电泳, 电压范围在 0~5 000V, 一般设定在 1 500V 左右, 所以在电泳时, 切勿打开电泳箱, 如有情况需要停机时, 要按暂停键, 待高压指示灯熄灭后, 方可打开。

11.3.6 核苷酸顺序的阅读

自动测序仪连续采集的数据在计算机中储存并迅速加以处理, 结果清晰准确, 分辨率很高, 操作人员可以根据显示屏上的彩色显示图像准确地分辨出某一 DNA 样本的碱基排列顺序。读序时根据计算机软件中碱基的代表符号, 进行阅读和编辑。大多数软件采用国际生化联合会标准碱基符号 (IUB Standard nucleotide Codes) (表 11-1)。

表 11-1 国际生化联合会标准碱基符号

符 号	碱 基	含 义
A	A	腺嘌呤 (adenine)
C	C	胞嘧啶 (cytosine)
G	G	鸟嘌呤 (guanine)
T 或 U	T 或 U	胸腺嘧啶 (thymine) 或尿嘧啶 (uracil)
R	A 或 G	嘌呤 (purine)
Y	C 或 T	嘧啶 (pyrimidine)
S	G 或 C	强结合 (三对氢键) (strong)
W	A 或 T	弱结合 (两对氢键) (weak)
K	G 或 T	含酮基 (keto)
M	A 或 C	含氨基 (amino)
B	C 或 C 或 T	非 A
D	A 或 G 或 T	非 C
H	A 或 C 或 T	非 G
V	A 或 C 或 G	非 T、U
N (或 X)	任意碱基及空位	任意或未知 (any)

读序时一般读两次, 并将两次结果输入到计算机, 进行结果比较, 并增亮显示有差异的区域, 对于难确定的碱基, 可参照计算机同步记录下的电泳带图形进行对照 (可购买到此软件)。读序时要将 DNA 片段中碱基的错误率控制在 2% 以内, 一旦不确定的碱基累计已达 2%, 而且继续向下读不能降低这个比率时, 应终止读序。对于很重要的克隆测序, 可做亚克隆, 读双链序列, 确保结果正确。序列可通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/核酸/蛋白数据库做同源性分析及相关性信息检索>。

11.3.7 测序全程常见问题和解决办法

表 8-2 测序全程常见问题和解决办法

种 类	常见问题	可能原因	解决办法
模板	出现假带	1. 缺口 DNA 的形成或者是 RNA 碎片在序列中起到随机引物作用 2. 挑取两上以上克隆的混合斑 3. 收获的平板在 4℃ 保存时间长使噬菌体颗粒在上层琼脂糖中扩散 4. 单链模板反复冻融	控制 37℃ 培养时间及接菌数量 严格噬斑生长时间, 仔细挑取单噬斑 及时挑斑 重新提取
引物	序列弱 假带多	1. 引物浓度低或因反复冻融 2. 引物浓度过高	引物分小管置 -20℃, 选择合适浓度
序列反应	假带多	1. 在保证模板质量前提下, 聚合酶可也引起假带 2. 核苷酸混合液交叉污染	聚合酶避免多次冻融 应临用前加酶。 及时更换滴头
电泳	灌胶时形成气泡 带形失真	1. 玻璃板未洗净有油脂 2. 灌胶时不流畅 1. 配胶不当 2. 电泳缓冲液沉淀析出严重 3. 样品变性过度	玻璃板应反复多次冲洗。 灌胶时要连续加入无断流 要用测序级的尿素配制, 溶解时水温 < 50℃, 4℃ 保存 < 1 个月, 及时更换缓冲液 90~94℃ 5 分钟
序列本身问题	条带强度 假 带 压缩现象	由于存在 A C G 带 当 TGCC 或 GCA 时易出现假带 GC 丰富区, 可能有二级结构存在	

(刘玉清 盛 华 文 惠汝太 审)

参 考 文 献

1. Sanger F, et al. DNA sequencing with chain - terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74:5463
2. Sanger F, et al. Cloning in single - stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J Mol Biol*, 1980, 143 (2) :161 - 178
3. Boland EJ, et al. Automation of the Maxam - Gilbert Chemical sequencing reactions. *Biotechniques*, 1994, 16 (6) :1088 ~ 1092
4. Kraus JP, et al. Direct DNA sequencing of polymerase chain reaction - amplified genomic DNA by Maxam - Gilbert method. *Methods Enzymol*, 1993, 218:227 ~ 233
5. Ausube FM, et al. *DNA Sequencing Current Protocolsin Molecular Biology*. John wiley & sons, Inc Coyright, 1997
6. 叶寅, 王苏燕, 田波主编. 核酸序列测定. 北京: 科学出版社, 1995
7. 吴乃虎. 基因工程原理. 第二版. 北京: 科学出版社, 1998

12. 外源基因在原核细胞中的表达

基因工程的最终目的是在一个合适的系统中,使外源基因高效表达,从而生产有重要价值的蛋白质产品。这包括外源基因的克隆、转录、转译、加工、分离纯化等过程。基因工程的表达系统有原核表达系统和真核表达系统两大类。外源基因在原核细胞中的表达就是令克隆的外源基因在原核细胞中以发酵的方式快速、高效地合成基因产物。到目前为止,这是人类了解最深入,实际应用最为广泛的表达系统。

12.1 原核生物基因表达的特点

同所有的生命过程一样,外源基因在原核细胞中的表达包括两个主要过程:即 DNA 转录成 mRNA 和 mRNA 翻译成蛋白质。与真核细胞相比,原核生物的基因表达有以下特点:

(1) 原核生物只有 1 种 RNA 聚合酶(真核细胞有 3 种),识别原核细胞的启动子,催化所有 RNA 的合成。

(2) 原核生物的基因表达是以操纵子为单位的。操纵子是数个相关的结构基因及其调控区的结合,是 1 个基因表达的协同单位。调控区主要分为 3 个部分:操纵基因(operator)、启动基因(promoter)又称启动子及其它有调控功能的部位。

(3) 由于原核生物无核膜,所以转录与翻译是耦联的,二者也是连续进行的。原核生物染色体 DNA 是裸露的环形 DNA,转录成 mRNA 后,可直接在胞浆中与核糖体结合翻译形成蛋白质。在翻译过程中,mRNA 可与一定数目的核糖体结合形成多核糖体(polyribosome)。两个核糖体之间有一定长度的间隔,为裸露的 mRNA。每个核糖体可独立完成 1 条肽链的合成,即这种多核糖体可以同时在 1 条 mRNA 链上合成多条肽链,大大提高了翻译效率。

在双链 DNA 分子中,只有 1 条链转录成 mRNA,这条链称为有意义链(sense strand),该基因的另一条链则称反意义链(antisense strand)。在含有许多基因的 DNA 双链中,每个基因的意义链并不是在同 1 条 DNA 链上。就是说,1 条链上既具有某些基因的意义链,也含有另外一些基因的反意义链。由于 RNA 聚合酶是沿着 DNA 链的 3'→5'方向移动。DNA 链与合成的 RNA 链有反平行关系,所以 RNA 链的合成方向是 5'→3',mRNA 上信息的阅读是从多核苷酸链 5'末端向 3'末端进行。从转录和翻译的方向也可看出,在原核生物细胞内当 mRNA 的合成还没有完成时,蛋白质或多肽的翻译就已经开始了。

(4) 原核基因一般不含有内含子(intron),在原核细胞中缺乏真核细胞的转录后加工系统。因此当克隆的含有内含子的真核基因在原核细胞中转录成 mRNA 前体后,其中内含子部分不能被切除。

(5) 原核生物基因表达的控制主要是在转录水平,这种控制比对基因产物的直接控制要慢。对 RNA 合成的调控有两种方式:1 种是起始控制(启动子控制),1 种是终止控制(衰减子控制)。

(6) 在大肠杆菌 mRNA 的核糖体结合位点上,含有 1 个转译起始密码子及同 16S 核糖体 RNA 3'末端碱基互补的序列,即 S-D 序列。而真核基因则缺乏此序列。

从上述特点可以看到,欲将外源基因在原核细胞中表达必须考虑表达载体、外源基因的性质、原核细胞的启动子和 S-D 序列、阅读框架及宿主菌调控系统等基本条件,也就是:①通过表达载体将外源基因导入宿主菌,并指导宿主菌的酶系统合成外源蛋白;②外源基因不能带有间隔顺序(内含子),因而必须用 cDNA 或全化学合成基因,而不能用基因组 DNA(genomic DNA);③必须利用原核细胞的强启动子和 S-D 顺序等调控元件控制外源基因的表达;④外源基因与表达载体连接后,必须形成正确的开

放阅读框架 (open reading frame); ⑤利用宿主菌的调控系统, 调节外源基因的表达, 防止表达的外源基因产物对宿主菌的毒害。

12.2 外源基因在原核细胞中表达的重要调控元件

根据不同需要科学家们构建了多种原核表达载体, 即在适当的受体细胞中能表达外源基因的载体, 通常的原核表达载体要求: ①有 1 个强的原核启动子及其两侧的调控序列; ②应有 S-D 序列, 而 S-D 序列与起始密码子 ATG 之间要有合适的距离; ③在克隆基因与启动子之间有正确的阅读框架等; ④外源基因下游应加入不依赖 ρ 因子的转录终止区。下文将主要介绍一些常用的启动子和操纵子、S-D 序列、终止子等重要的原核细胞表达的调控元件。

12.2.1 启动子

启动子是 DNA 链上一段能与 RNA 聚合酶结合并能起始 mRNA 合成的序列, 它是基因表达不可缺少的重要调控序列。没有启动子, 基因就不能转录。

原核启动子是由两段彼此分开且又高度保守的核苷酸序列组成, 对 mRNA 的合成极为重要, 如图 12-1。

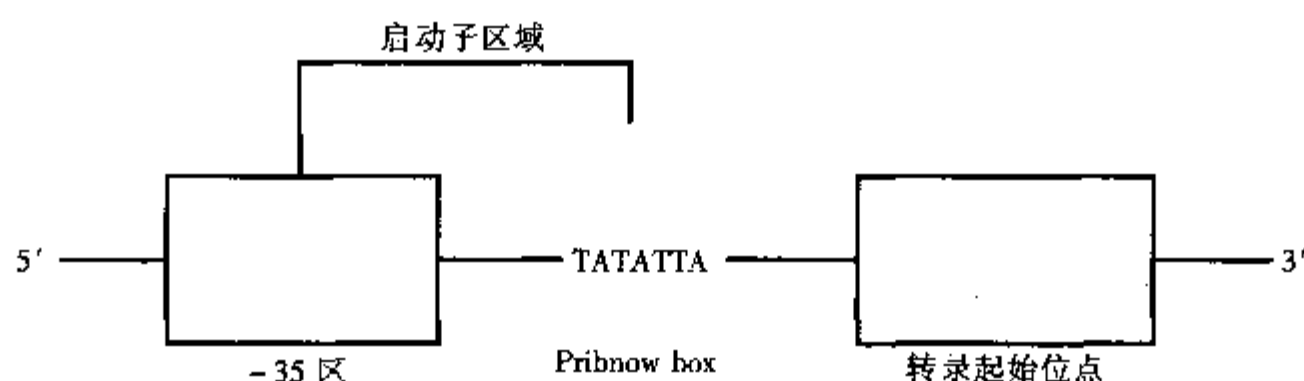


图 12-1 原核启动子示意图

Pribnow box, 位于转录起始点上游 5~10bp, 一般由 6~8 个碱基组成, 富含 A、T, 故又称为 TATA box 或 -10 区。启动子来源不同, Pribnow box 的碱基顺序稍有变化。

-35 区, 位于转录起始位点上游 35bp 处, 一般由 10bp 组成, 故称 -35 区。

一般认为, 大肠杆菌 RNA 聚合酶识别并结合启动子, -35 区和 RNA 聚合酶 σ 亚基结合, -10 区和 RNA 聚合酶的核心酶结合, 在转录起始位点附近, DNA 被解旋形成单链, RNA 聚合酶使第 1 和第 2 核苷酸形成磷酸二酯键, 以后 RNA 聚合酶向前推进, 形成新生的 RNA 链。

由于细菌 RNA 聚合酶不能识别真核基因的启动子, 因此原核表达载体所应用的启动子必须是原核启动子, 将外源基因克隆在其下游, 原核 RNA 聚合酶识别原核启动子, 并带动真核基因在原核细胞中转录。原核表达系统中通常使用可调控的强启动子有 lac (乳糖启动子), trp (色氨酸启动子), λP_L (λ 噬菌体的左向启动子), Tac (乳糖和色氨酸的杂合启动子) 等。

12.2.1.1 lac 启动子

lac 启动子是来自大肠杆菌的乳糖操纵子, lac 操纵子模型最早是由 Jacob 和 Monod 于 1961 年提出的, 它是 DNA 分子上 1 段有方向的核苷酸顺序, 即由阻遏蛋白基因 (lac I)、启动基因 (启动子 P)、操纵基因 (O) 和编码 3 个与乳糖利用有关的酶的结构基因所组成 (图 12-2)。

从图中可见, lac 操纵子的大部分核苷酸顺序属于结构基因, 用于调控的除 I 基因 (1080bp) 外, 其主要 P、O 基因部分仅占 122bp, 其中 P 与 O 有重叠部分。此操纵子含有 3 个编码酶蛋白基因 Z、Y、A,

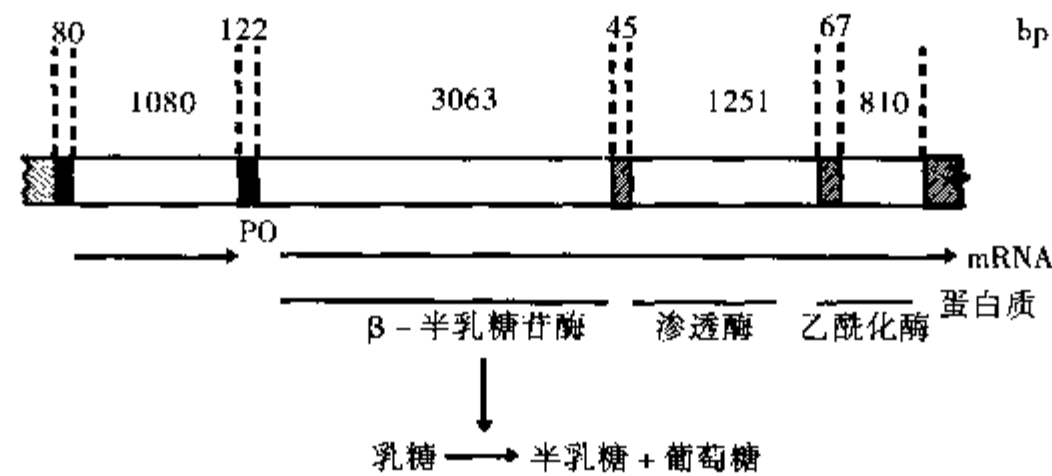


图 12-2 Lac 操纵子结构

它们在乳糖代谢中起不同作用。Z 基因的产物为 β -半乳糖苷酶，它可水解乳糖生成葡萄糖和半乳糖，以使细菌利用。Y 基因的产物是与乳糖有关的通透酶，此酶可使乳糖进入细胞内。A 基因的产物为半乳糖苷乙酰化酶，是个去毒作用的酶。LacI 基因为编码阻遏蛋白的基因，是经常表达的，操纵基因 (O) 是阻遏蛋白结合部位，启动子 (P) 是转录起始时 RNA 聚合酶结合部位。它们都位于结构基因之前，在此区域内还有一个能与 CAP-cAMP 复合物结合的部位，位于 I 基因和 P 基因之间。

lac 操纵子受分解代谢系统的正调控和阻遏物的负调控，如图 12-3 所示：

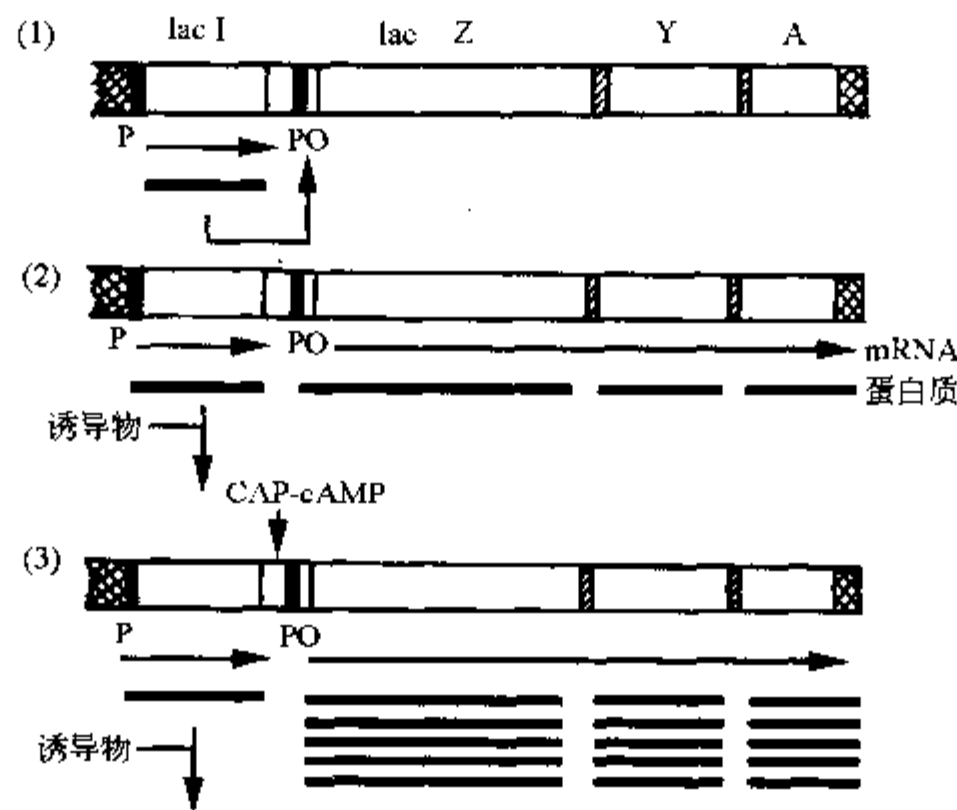


图 12-3 lac 操纵子的正负调控

P 为启动子 O 为操纵基因 (1) 为 lacI 产物与 O 结合，阻遏 lacZYA 转录，但仍有低水平转录 (2) 诱导物与阻遏物结合，lacZYA 转录提高 1000 倍 (3) 在去阻遏条件下，CAP-cAMP 的存在使 lacZYA 转录又提高 2.5 倍

操纵基因片段一是个反转重复顺序，可形成十字架结构，正好可以接受阻遏蛋白的结合（阻遏蛋白是四聚体）。当阻遏蛋白与 O 基因结合，O 基因顺序中的反转重复顺序在空间上能妨碍 RNA 聚合酶转录。因而处在阻遏状态下的操纵子就不能产生与乳糖代谢有关的酶。加入诱导物（如乳糖或某些类似物如 IPTG）后，可与阻遏物蛋白形成复合物，而使阻遏蛋白构象改变，阻遏蛋白就不能再与 O 基因结合，基因即可表达，转录出的 mRNA 链，继而翻译出相关的蛋白质。

在 RNA 聚合酶结合部位的上游（即 P 基因上游处），还有一个 CAP-cAMP 结合部位，又可进一步

诱导加强操纵子的表达。当细胞内乳糖分解出的葡萄糖被利用后, 会使 cAMP 的浓度上升, 因而可结合 CAP 共同作用于乳糖操纵子的 CAP - cAMP 结合部位。CAP - cAMP 是 1 个正诱导调节因子, 故又可使转录产物大量增加。但当有大量葡萄糖供应, cAMP 浓度会下降, 又会妨碍许多分解代谢基因包括乳糖操纵子基因的表达。

lacUV, 是 1 个突变的乳糖启动子, 对分解代谢抑制不敏感, 即使在没有 CAP - cAMP 的情况下, 转录也能照常进行。另外, IPTG 是 β -半乳糖苷酶底物的类似物, 有很强的诱导力, 它能与阻遏蛋白结合, 促进转录。有报导用 lac 启动子组建的载体在原核细胞中表达时, IPTG 可提高真核基因的表达水平 50 倍。在用 lacUV 启动子构建表达载体时, 因剪切关系通常取其 P、O 部分及部分的 I 基因。

12.2.1.2 trp 启动子

trp 启动子可以从大肠杆菌的色氨酸操纵子分离。色氨酸操纵子结构基因排列及其表达如图 12-4。

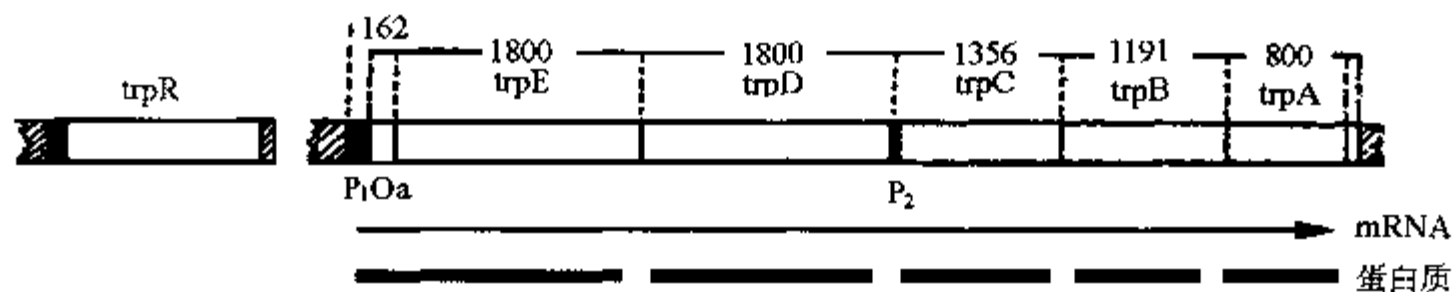


图 12-4 trp 操纵子结构基因排列及其表达产物

如图 12-4 所示, 色氨酸操纵子由阻遏物蛋白基因 (*trpR*)、启动子 (P_1 、 P_2)、操纵基因 (O)、衰减子 (α) 和结构基因组成。结构基因编码酶或亚基, 催化从分支酸经 5 步反应合成 L-色氨酸。另外在结构基因 A 之后有两个终止结构 t 和 t' , 其中 t' 为 ρ 因子所识别。 ρ 因子是蛋白质分子, 它是 1 个分子量为 20 万道尔顿的四聚体, 能与 RNA 聚合酶结合, 帮助其识别终止信号。

启动子 P_1 与操纵基因 O 大部分重叠。 P_1 是色氨酸操纵子的主要启动子, 它启动结构基因 *trpE*、*D*、*C*、*B*、*A* 的转录; 另有 1 个弱启动子 P_2 位于 *trpD* 基因下游, 它只控制 3% 的 *trpC*、*B*、*A* 基因的表达, 生理作用不大。此操纵子还有 1 个特点, 即调控区不与结构基因 *E* 直接相连, 中间有 1 段前导顺序 (L) 相隔。 L 基因约有 162bp, 能编码出 1 个 14 肽, 此肽中有两个色氨酸, 这两个色氨酸很重要, 因它能与这段转录产物 mRNA 作用形成独特结构, 类似转录终止信号, 故被命名为衰减子 (α)。

trp 启动子受两种调控。阻遏物蛋白基因 (*trp*) 平时不断合成阻遏蛋白, 只有阻遏蛋白与色氨酸结合, 才能作用于操纵基因, 阻止转录的进行。所以 *trp* 启动子的调控主要取决于色氨酸的存在与否。当色氨酸缺少时, 因上述作用不存在, 故操纵子基因启动转录。这种调控类似于 lac 启动子的负调控。*trp* 启动子的另 1 种调控是通过启动子与结构基因间的衰减子进行的。当细胞内色氨酸丰富时, 转录到弱化基因 (衰减子) 区域停止; 当细胞内色氨酸贫乏, 则转录可能通过弱化基因区域, 一直进行到结构基因。 β -吡啶丙烯酸是色氨酸的竞争控制剂, 它能与阻遏蛋白结合, 阻止了色氨酸与阻遏蛋白结合, 因而能使转录顺利进行。

用于原核表达载体的 *trp* 启动子常常包含启动基因, 操纵基因和部分色氨酸 *trpE* 基因, 而删除了弱化基因 (衰减子), 则可使转录水平提高 8~10 倍。

12.2.1.3 P_L 和 P_R 启动子

在原核细胞中表达外源基因, 常用的启动子还有 λ 噬菌体的 P_L 及 P_R 启动子, 它们都是强启动子, 比 lac 启动子的活性高 8~10 倍。 λ 噬菌体基因组的转录是分两期完成的。早期转录中 mRNA 翻译出的蛋白质有两种, 即向右生长 Cro 蛋白质和向左转录翻译 N 蛋白质。两种蛋白质都是作用于操纵基因 O 区

的调控蛋白，可加强 P_L 启动子和 P_R 启动子的作用。 P_L 和 P_R 启动子受 λ 噬菌体 CI 基因的负调控。CI 阻遏蛋白是温度敏感蛋白，其作用类似 lac 操纵子中基因表达产物——阻遏蛋白。在 28 ~ 32℃ 培养时，CI 产生抑制作用，在温度升至 42℃ 时，CI 被破坏（是 1 个可逆过程），这样就解除了对启动子的封闭，使 P_L 和 P_R 启动子开始转录。因此有人称 CI 是 1 个温度敏感抑制因子。

P_L 和 P_R 启动子的 Pribnow box 的顺序都是 GATAAT，-35 区的顺序都是 TGACTA，构建表达载体时，还要有 SD 序列，起始密码子 ATG 以及温度敏感抑制因子 CI 蛋白的结构基因。

12.2.1.4 tac 启动子

tac 启动子是 1 组由 lac 和 trp 启动子人工构建的杂合启动子，是非常强的启动子，它比 lacUV₅ 启动子强 7 倍。其中 tacI 是由 trp 启动子的 -35 区加上 1 个合成的 46bpDNA 片段（包括 Pribnow box 区）和 lac 操纵基因构成，tac 12 是由 trp -35 区和 lac 启动子的 -10 区，加上 lac 操纵子中的操纵基因部分、SD 序列融合而成。它受 lac 阻遏蛋白的负调节，并被 IPTG 诱导。

12.2.2 SD 序列

mRNA 在细菌中的转译效率严格依赖于是否有核糖核蛋白体结合位点的存在，即 SD 序列以及 SD 序列与起始密码子 AUG 之间的距离。在原核细胞中，当 mRNA 结合到核糖体上后，翻译或多或少会自动发生。细菌在翻译水平上的调控是不严格的，只有 mRNA 和核糖体的结合，才是蛋白质合成的关键。1974 年 Shine 和 Dalgarno 首先发现，在 mRNA 上有核糖体的结合位点，它们是起始密码子 AUG 和 1 段位于 AUG 上游 3 ~ 10bp 处的由 3 ~ 9bp 组成的序列。这段序列富含嘌呤核苷酸，刚好与 16SrRNA 3' 末端的富含嘧啶的序列互补，是核糖体 RNA 的识别与结合位点。根据发现者的名字，命名为 Shine - Dalgarno 序列，简称 SD 序列（图 12-5）。

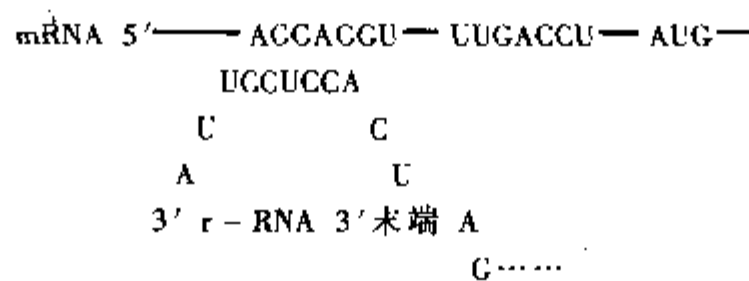


图 12-5 SD 识别序列

SD 序列与起始密码子之间的距离，是影响 mRNA 转译成蛋白的重要因素之一。Marq - iusv 等发现当 lac 启动子的 SD 序列距 AUG 为 7 个核苷酸时，IL-2 表达最高，为 2581 单位，而间隔 8 个核苷酸时，表达水平降到不足 5 个单位，这说明 SD 序列与 AUG 的距离将显著地影响基因的表达水平。另外，某些蛋白质与 SD 序列结合也会影响 mRNA 与核糖体的结合，从而影响蛋白质的翻译。

12.2.3 终止子

在 1 个基因的 3' 末端或是 1 个操纵子的 3' 末端往往还有一特定的核苷酸序列，它有终止转录的功能，这一 DNA 序列称为转录终止子，或简称终止子 (terminator)。转录终止过程包括：①RNA 聚合酶停在 DNA 模板上不再前进，RNA 的延伸也停止在终止信号上；②完成转录的 RNA 从 RNA 聚合酶上释放出来；③RNA 聚合酶从模板上释放出来。对 RNA 聚合酶起强终止作用的终止子在结构上有一些共同的特点，有 1 段富含 A/T 的区域和 1 段富含 G/C 的区域，G/C 富含区域又具有回文对称结构，这段终止子转录后形成的 RNA 具有茎环结构。并且有与 A/T 富含区对应的一串 U（图 12-6）。

转录终止的机制较为复杂，并且结论尚不统一，在此就不多述。但在构建表达载体时，为了稳定载体系统，防止克隆的外源基因表达干扰载体的稳定性，一般都在多克隆位点的下游插入 1 段很强的 rmb

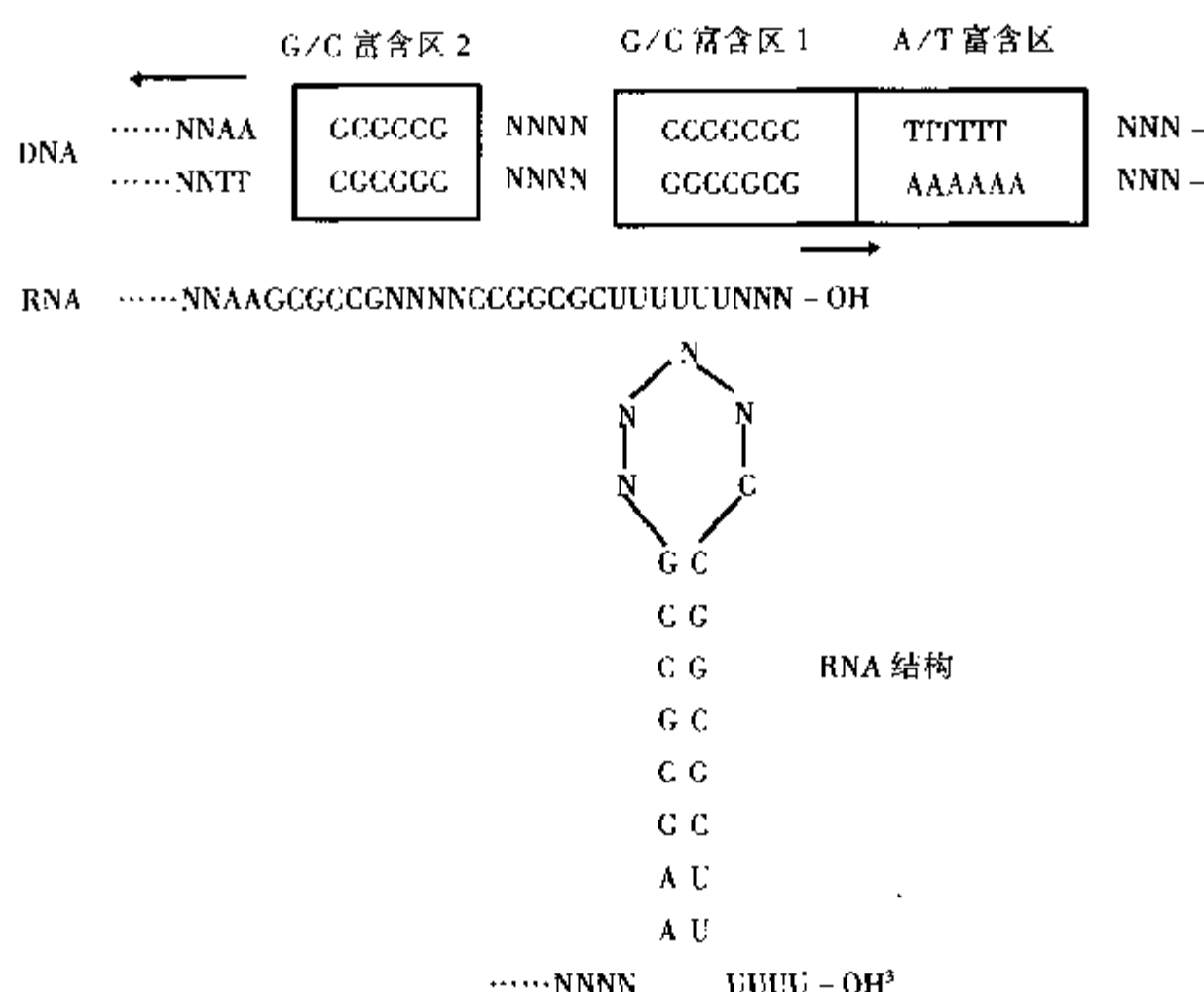


图 12-6 强终止子模式图

核糖体 RNA 的转录终止子。

12.3 几种类型的原核表达载体

在原核细胞中表达外源基因时，由于实验设计不同，总的来说可产生融合型和非融合型表达蛋白。不与细菌的任何蛋白或多肽融合在一起的表达蛋白称为非融合蛋白，非融合蛋白的优点在于它具有非常近似于真核生物体内蛋白质的结构，因此表达产物的生物学功能也就更接近于生物体内天然蛋白质。非融合蛋白的最大缺点是容易被细菌蛋白酶破坏。为了在原核细胞中表达出非融合蛋白，可将带有起始密码 ATG 的真核基因插到原核启动子和 SD 序列的下游，组成 1 个杂合的核糖体结合区，经转录翻译，得到非融合蛋白。融合蛋白是指蛋白质的 N 末端由原核 DNA 序列或其它 DNA 序列编码，C 端由真核 DNA 的完整序列编码。这样的蛋白质由 1 条短的原核多肽或具有其它功能的多肽和真核蛋白质结合在一起，故称为融合蛋白。含原核细胞多肽的融合蛋白是避免细菌蛋白酶破坏的最好措施。而含另外一些多肽的融合蛋白则为表达产物的分离纯化等提供了极大的方便。表达融合型蛋白时，为了得到正确的真核蛋白，在插入真核基因时，应非常注意其阅读框架，其阅读框架应与融合的 DNA 片段的阅读框架一致，翻译时，才不至于产生移码突变。

基因工程的载体有克隆载体和表达载体之分。克隆载体中都有 1 个松弛型复制子，能带动外源基因在受体细胞中复制扩增，这类载体在有关章节已有介绍。表达载体是适合在受体细胞中表达外源基因的载体。组建这类载体比较困难，但幸运的是表达载体已有数类被构建成功，并且市场上已有出售。下面介绍 3 种类型的用于原核表达的载体。

12.3.1 非融合型表达蛋白载体 pKK223-3

这个载体是由 Brosius 等在哈佛大学的 Gilbert 实验室组建的。在大肠杆菌细胞中，它能极有效地、

高水平地表达外源基因。它具有 1 个强的 *tac* (*trp-lac*) 启动子。这个启动子是由 *trp* 启动子的 -35 区域和 *lac UV-5* 启动子的 -10 区域, 操纵基因及 SD 序列组成。在 *lac I* 宿主, 例如 JM105, *tac* 启动子受阻遏, 但只要在适当的时候, 加上 IPTG, 就可去阻遏, 如图 11-7 所示, 紧接 *tac* 启动子的是 1 个取自 pUC8 的多克隆位点 (polylinker), 使之很容易把目的基因定位在启动子和 SD 序列后; 在多克隆位点下游的 1 段 DNA 顺序中, 还包含 1 个很强的 *rmB* 核糖体 RNA 的转录终止子, 目的是为了稳定载体系统的。因为上游强的 *tac* 启动子控制的转录, 必须由强终止子抑制, 才不至于干扰和载体本身稳定性有关的基因表达, 载体其余部分是由 pBR322 组成的。在使用 pKK223-3 质粒时, 应相应地使用 1 个 *Lac I* 宿主, 例如 JM105。1 个具有 pKK223-3 质粒类似结构 (图 12-7) 的载体被用于表达 *Lambda CI* 基因时, 经 IPTG 诱导产生的阻遏子蛋白, 占可溶性细胞抽提液中总蛋白的 18%~26%。由此可见, 在需要获得大量的基因产物时, pKK223-3 确实是 1 种非常有用的工具。前面所述的强启动子在构建表达载体时都可应用, 但由于质粒 pKK223-3 已包括了用上述启动子构建的载体的特点, 并且在某些方面更优越, 因此就不一一列举了。

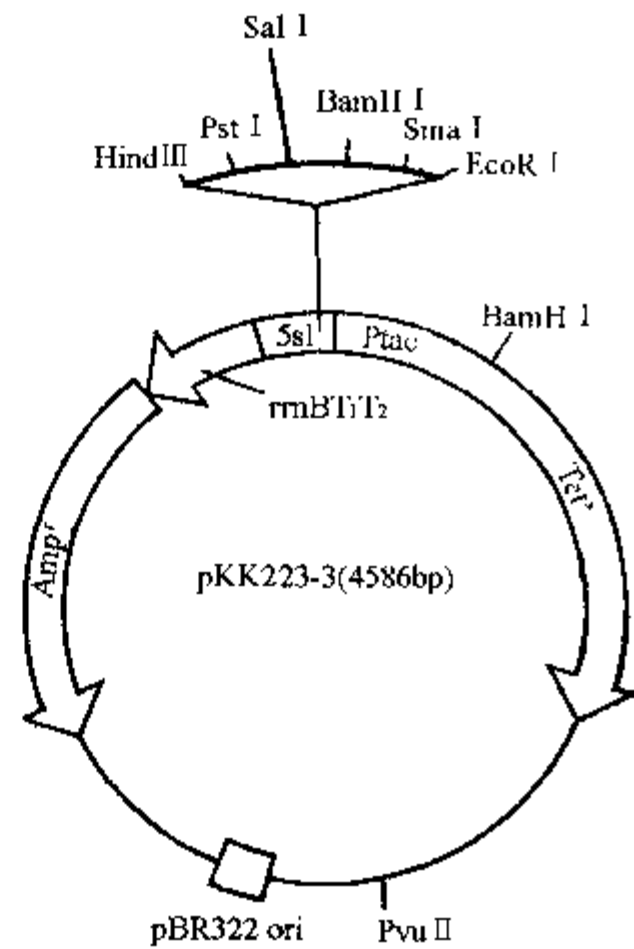


图 12-7 质粒 pKK223-3 结构图

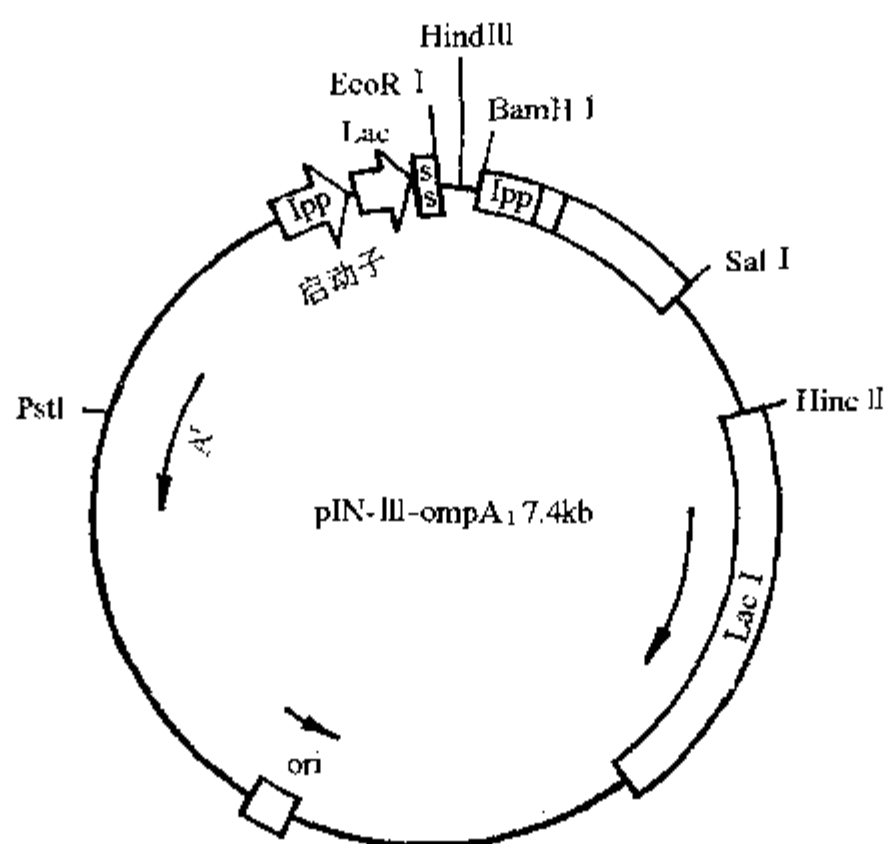
12.3.2 分泌型克隆表达载体 PIN Ⅲ 系统

这个载体系统是以 pBR322 为基础构建的, 它带有大肠杆菌中最强的启动子之一, 即 *Ipp* (脂蛋白基因) 启动子。在启动子的下游装有 *lac UV-5* 的启动子及其操纵基因, 并且把 *lac* 阻遏子的基因 (*lac I*) 也克隆在这个质粒上, 这样, 目的基因的表达就成为可调节的了。在转录控制顺序的下游再装上人工合成的高效翻译起始顺序 (SD 序列及 ATG)。作为分泌克隆表达载体中关键的编码信号肽的顺序, 是取自于大肠杆菌中分泌蛋白的基因: *ompA* (外膜蛋白基因)。在信号肽编码顺序下游紧接着的是 1 段人工合成的多克隆位点片段, 其中包含 3 个单酶切点: *EcoR I*、*Hind III* 和 *BamH I*。为了使不同密码子阅读框架的目的基因片段都能在克隆位点上和信号肽密码子阅读框架正确衔接, 分别合成适用于所有 3 种密码子阅读框架的多克隆位点片段。使用这 3 种多克隆位点片段的载体分别称之为: pIN-ompA1, pIN-ompA2 和 pIN-ompA3 (图 12-8)。

用这个分泌型载体来表达金黄色葡萄球菌的核糖核酸酶 A (staphylococcal nuclease A) 的基因, 不仅产物能分泌到细胞间质中, 而且产量达 300mg/L, 占细胞总蛋白量的 9%。为了进一步提高载体的表达效率, 对 *Ipp* 启动子作以下修饰: 把启动子的 -35 区的 DNA 顺序 A-ATACT 改为 TATACT。结果目的基因的表达产量提高到 1,500mg/L, 占细胞总蛋白量的 42%。但是, 大概由于细胞固有的信号肽酶的产量和这么高表达产物的产量不相适应, 因此, 只有 40% 的基因产物是经过信号肽酶加工而成为成熟蛋白的。

12.3.3 融合蛋白表达载体 pGEX 系统

融合表达载体在原核细胞中表达具有一定的优越性 (见后述)。这里仅介绍 Pharmacia 公司的融合蛋白表达载体系统。这个系统有 3 种载体 pGEX-1T, pGEX-2T 和 pGEX-3X 和 1 种用于纯化表达蛋白的亲合层析介质 Glutathione Sepharose 4B。载体的组成成分基本上与其它表达载体相似, 含有启动子 (*tac*)

图 12-8 分泌克隆载体 PIN_{III}-ompA₁ 物理图谱

及 lac 操纵基因、SD 序列、lac I 阻遏蛋白基因等。这类载体与其它表达载体不同之处是 SD 序列下游就是谷胱甘肽巯基转移酶基因，而克隆的外源基因则与谷胱甘肽巯基转移酶基因相连。当进行基因表达时，表达产物为谷胱甘肽巯基转移酶和目的基因产物的融合体。这个载体系统具有如下优点：①可诱导高效表达；②载体内含有 lac I 阻遏蛋白基因；③表达的融合蛋白质纯化方便；④使用凝血酶（thrombin）和 Xa 因子（factor Xa）就可从表达的融合蛋白中切下所需要的蛋白质和多肽；⑤用 EcoR I 从 λ gt11 载体中分离的基因可直接插入 pGEX-1XT 中（图 12-9）。

12.4 用于原核细胞表达的外源基因

与原核细胞的基因组相比，真核细胞的基因组具有如下特点：①真核生物的基因组存在于细胞核内，一般是线状 DNA；②在真核生物的基因组中存在大量的重复序列和很多不编码的序列；③基因中常含有内含子，并且功能上相关的基因集中程度总的来讲不如原核生物。利用真核细胞表达真核基因，一般来说，困难较少，相反，利用原核细胞表达真核基因是比较困难的。这主要是因为原核细胞缺乏真核细胞转录后的加工系统，mRNA 中的内含子不能切除，成熟的 mRNA 不能形成；同时原核细胞也缺乏真核细胞翻译后的加工系统。因此，用于原核细胞表达的目的基因应是删除 5' 非编码区和基因中内含子的结构基因；同时，目的基因最好只编码成熟蛋白质或多肽。

目前有 3 种办法可以得到符合要求的目的基因。

(1) 从真核细胞中分离 mRNA，在体外利用逆转录酶，反转录成 cDNA，cDNA 有完整的编码序列，但无内含子。分离并克隆需要 cDNA 片段到原核表达载体，进行表达（详见有关章节）。

(2) 体外合成法。如果欲表达的蛋白质或多肽的分子量较小且氨基酸或核苷酸序列是已知，根据遗传密码可以设计并利用 DNA 合成仪合成 1 段“全基因”，进行克隆和表达。

(3) 设计并合成两段引物，以 cDNA 为模板，采用 PCR 技术扩增得到目的基因。

第一种方法是最早使用的，它的不足之处在于不能除去编码蛋白质“前导肽”或“信号肽”的核苷酸序列。同时，向原核表达载体克隆目的基因时也常常遇到麻烦。后两种方法是最近几年兴起的，它克

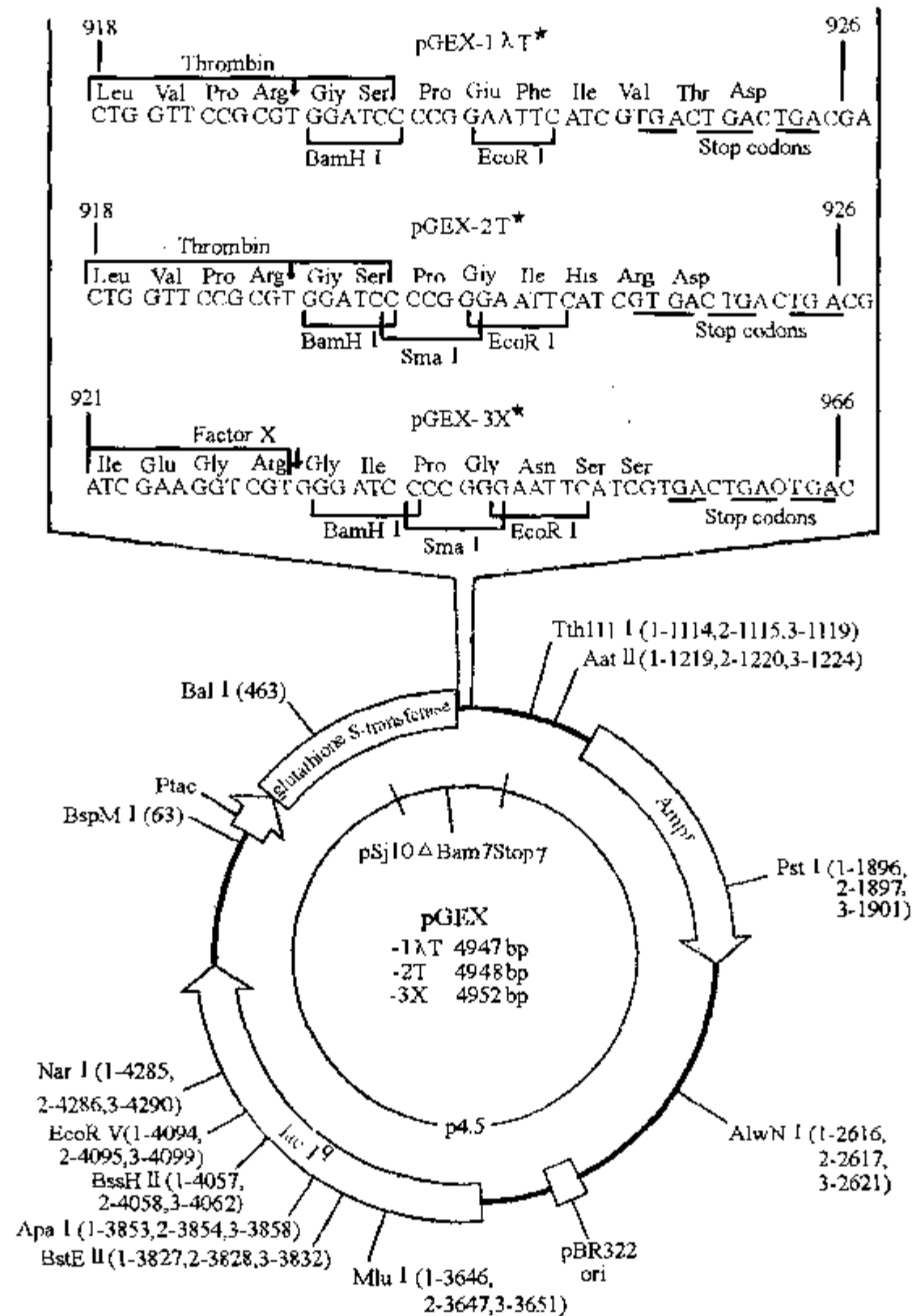


图 12-9 融合蛋白表达载体 pGEX 物理图谱

服了前 1 种方法的不足，在目的基因的克隆和表达方面具有明显的优势。

12.5 提高外源基因表达水平的措施

如前文所述，只要考虑到表达载体，外源基因的性质，原核细胞的启动子，读码框架及宿主调控系统等条件，一般都可使外源基因在原核细胞中有所表达。但如何使外源基因在原核细胞中获得高效表达，却是科学家们努力探索的目标之一。

从理论上讲，增加表达质粒的拷贝数量，提高外源基因的转录、翻译水平及防止表达的蛋白质或多肽降解就可获得外源基因的高效表达，但实际上 mRNA 翻译效率低、翻译的提前终止、表达蛋白在原核细胞内不稳定以及 RNA 不稳定等，均是导致外源基因在原核细胞中表达水平降低的主要因素。下面主要围绕以上问题介绍常用的提高外源基因在原核细胞表达的策略。

12.5.1 提高翻译水平

12.5.1.1 调整 SD 序列与 AUG 间的距离

提高外源基因在原核细胞中表达水平的关键之一是调整 SD 序列和起始密码 ATG 之间的距离。此距离过长、过短都影响真核基因的表达。Marquis 人工合成核糖体结合点 (ribosome binding site) 使 SD 顺序与起始密码 (ATG) 的距离由 5~9 个碱基不等, 并分别连入 7 个不同启动子的下游, 测试其表达 IL-2 的水平。结果发现, 在同 1 种启动子带动下, SD 顺序与 ATG 的距离不同, IL-2 表达水平可相差 2~2 000 倍。如在 lac 启动子带动下, 其距离为 7 个 bp 时, IL-2 的表达水平为 2 581 单位, 而距离为 8 个 bp 时, 表达水平降至不足 5 个单位。而在 P_L 启动子带动下, 其距离为 6 个碱基时, IL-2 表达水平达 9 707 单位, 距离为 8 个碱基时, 表达水平降至 5 363 单位, 这表明根据不同的启动子, 调整好 SD 序列与起始密码 (ATG) 的距离, 确实可提高外源基因的表达水平。

12.5.1.2 用点突变的方法改变某些碱基

翻译的起始是决定翻译水平高低的一个重要因素。有资料表明, 由于紧随起始密码下游的几组密码子不同, 可使基因的表达效率相差 15~20 倍。这主要是改善了翻译的起始和 mRNA 的二级结构。

另外, 有人对大肠杆菌各种基因顺序进行了大量分析, 根据不同密码子的使用频率, 将 64 组密码子分为强、中、弱密码子。如果在不改变编码的氨基酸顺序的条件下, 尽量用强密码子取代弱密码子, 确有可能提高表达水平。但是, 大量的研究表明, 含有弱密码子的真核基因是能够在大肠杆菌获得高效表达的。可见, 密码子的使用问题并非是影响外源基因在大肠杆菌表达水平的决定因素。

12.5.1.3 增加 mRNA 的稳定性

多数情况下, 细菌的 mRNA 的半衰期短, 一般仅为 1~2 分钟, 而外源基因 mRNA 的半衰期可能更短。若能增加 mRNA 的稳定性, 则有可能提高外源基因的表达水平。研究表明, 大肠杆菌的“重复性基因外回文 (repetitive extragenic palindromic, REP) 顺序”具有稳定 mRNA 的作用, 能防止 3'→5' 外切酶的攻击。因此, 外源基因下游插入 REP 顺序或其它具有反转重复顺序的 DNA 片段可起到稳定 mRNA, 提高表达水平的作用。

12.5.2 减轻细胞的代谢负荷, 提高外源基因的表达水平

外源基因在细菌中高效表达, 必然影响宿主的生长和代谢, 而细胞代谢的损伤, 又必然影响外源基因的表达。合理地调节好宿主细胞的代谢负荷与外源基因高效表达的关系, 是提高外源基因表达水平不可缺少的一个环节。目前常用的方法有:

12.5.2.1 诱导表达, 使细菌的生长与外源基因的表达分开

将宿主菌的生长和外源基因的表达分开成为两个阶段, 是减轻宿主细胞的代谢负荷最为常用的一个方法。一般采用温度诱导或药物诱导。如采用 λ P_L 启动子时, 则应用含 λ CI ts875 基因的溶源菌。在 32℃ 时, CI 基因有活性, 它产生的阻遏物抑制了 λ P_L 启动子下游基因产物的合成, 此时, 宿主菌大量生长。当温度升高到 42℃ 时, CI 基因失活, 阻遏蛋白不能产生, P_L 启动子解除阻遏。外源基因得以高水平表达; 而应用 tac 启动子, 则常用 F'^{lac} 的菌株或将 lac I 基因克隆在表达质粒中, 当宿主菌生长时, lac I 产生的阻遏蛋白与 lac 操纵基因结合, 阻碍了外源基因的转录及表达, 此时, 宿主菌大量生长, 当加入诱导物 (如 IPTG) 时, 阻遏蛋白不能与操纵基因结合, 则外源基因大量转录并高效表达。有人认为, 化学诱导比温度诱导更为方便和有效, 并且将相应的阻遏蛋白基因直接克隆到表达载体上, 比应用含阻遏蛋白基因的菌株更为有效。

12.5.2.2 表达载体的诱导复制

减轻宿主细胞代谢负荷的另一个措施, 是将宿主菌的生长和表达质粒的复制分开。当宿主菌迅速生长时, 抑制质粒的复制; 当宿主菌生物量积累到一定水平后, 再诱导细胞中质粒 DNA 的复制, 增加质

粒的拷贝数, 拷贝数的增加必将伴随外源基因表达水平的提高。质粒 pCII01 是温度控制诱导 DNA 复制的最好例子, 用此质粒转化宿主菌, 25℃ 时宿主中仅有 10 个拷贝, 宿主细胞大量生长; 但当温度升高到 37℃, 质粒大量复制, 每个细胞中拷贝数增加到加 1 000 个。

12.5.2.3 表达分泌蛋白 (详见后文)

12.5.3 提高表达蛋白的稳定性, 防止其降解

在大肠杆菌中表达的外源蛋白往往不够稳定, 常被细菌的蛋白酶降解, 因而会使外源基因的表达水平大大降低。因此, 提高表达蛋白的稳定性, 防止细菌蛋白酶的降解是提高外源基因表达水平的有力措施。

12.5.3.1 克隆 1 段原核序列, 表达融合蛋白

这里的融合蛋白是指表达的蛋白质或多肽的 N 末端由原核 DNA 编码, C 末端是由克隆的真核 DNA 的完整序列编码。这样表达的蛋白是由 1 条短的原核多肽和真核蛋白结合在一起, 故称为融合蛋白。融合蛋白是避免细菌蛋白酶破坏的最好措施。在表达融合蛋白时, 为得到正确编码的表达蛋白, 在插入外源基因时, 其阅读框架应与原核 DNA 片段的阅读框架一致。这样, 插入的外源基因翻译时才不致产生移码突变。因此表达融合蛋白的载体一般都是根据密码子阅读框架的不同而构建的 (有 3 种)。这样不论重组的外源基因编码框架如何, 总有 1 种载体的阅读框架与之匹配。

在融合蛋白被表达之后, 必须从融合蛋白中将原核多肽去掉。常用的有化学降解法及酶解法。一般而言, 化学降解法缺乏选择特异性, 且反应条件剧烈 (如溴化氰); 而酶解法特异性较高, 但切割效率不高 (如牛的血细胞凝集因子 Xa)。

12.5.3.2 采用某种突变菌株, 保护表达蛋白不被降解

大肠杆菌蛋白酶的合成主要依赖次黄嘌呤核苷 (lon), 因此采用 lon⁻ 缺陷型菌株作受体菌, 则使大肠杆菌蛋白酶合成受阻, 从而使表达蛋白得到了保护。Baker 发现大肠杆菌 htp R 基因的突变株也可减少蛋白酶的降解作用。Bull 利用 lon 和 htp R 双突变的菌株表达出稳定的生长调节素 C。另外, T₄ 噬菌体的 pin 基因产物是细菌蛋白酶的抑制剂, 将 pin 基因克隆到质粒中并转化大肠杆菌中, 细菌的蛋白酶便受到抑制, 外源基因的表达产物受到保护。有人应用此法, 成功地在大肠杆菌中表达了人 β -干扰素。

12.5.3.3 表达分泌蛋白

表达分泌蛋白是防止宿主菌对表达产物的降解, 减轻宿主细胞代谢负荷及恢复表达产物天然构象的最有力措施。在原核表达系统中, 人们研究比较多的主要是大肠杆菌。

大肠杆菌主要由四部分组成: 胞质、内膜、外膜及内外膜之间的周间质。一般情况下, 所谓“分泌”是指蛋白质从胞质跨过内膜进入周间质这一过程。而蛋白质从胞质跨过内、外膜进入培养液这种情况较为少见, 被称为“外排”以区别于“分泌”。

蛋白质能够在大肠杆菌中进行分泌, 至少要具备 3 个要素: ①有一段信号肽; ②在成熟蛋白质内有适当的与分泌相关的氨基酸序列; ③细胞内有相应的转运机制。

1. 信号肽:

信号肽序列对于分泌蛋白质是必需的。其长度一般为 15~30 个氨基酸残基。真核生物和原核生物的信号肽在结构上都有以下特征: ①在氨基末端有一段带正电荷的氨基酸序列, 往往是精氨酸或赖氨酸残基, 其数目为 1~3 个; ②有 1 个疏水的核心区, 含亮氨酸或异亮氨酸残基, 位置可以从带正电荷的氨基酸延伸到含切割位点的区域; ③含有能被信号肽酶水解的切割位点, 这个位点常常在丙氨酸之后, 有的是在甘氨酸或丝氨酸之后。

原核和真核的信号肽序列不仅在结构上相似, 而且在功能上也具有相似性。Talmage 等 (1980 年) 发现, 细菌的信号肽可以在真核细胞中发生作用。以后他们又发现真核的信号肽序列也能在原核细胞中起作用。这两种信号肽序列在切割位点上具有相似性, 细菌的信号肽酶可以切除真核的信号肽。

2. 成熟蛋白质内有与分泌相关的氨基酸序列:

对于很多蛋白质来说, 信号肽对其分泌是必须的, 但仅有信号肽是不能完成分泌过程的, 很多在大肠杆菌中分泌的蛋白质需要其成熟体中的氨基酸序列来引导其到达最终的目的地。缺少这部分相应的氨基酸序列, 分泌就不能正常进行, 这已被基因融合和基因删除两方面的实验所证实。

3. 细胞内的转运机制:

和真核细胞一样, 原核细胞内蛋白的分泌也需要数种细胞内蛋白质的参与。目前已发现了信号肽酶 I、信号肽酶 II 等近 20 种蛋白质参与了分泌过程。与真核细胞不同的是, 在大肠杆菌中, 蛋白质的合成和蛋白质的分泌过程有些是同步的, 有些则采取了先翻译出蛋白质, 然后再分泌出来的翻译后机制。而分泌的能量来源于高能磷脂键的水解或质子的推动力。

通过以上论述可以看出, 并非任何蛋白都可以在大肠杆菌得到分泌表达的。这主要是由于欲表达的成熟蛋白质的氨基酸序列和构象的限制。由于原核生物和真核生物蛋白质的分泌机制十分相似, 真核生物中的分泌蛋白大多能在大肠杆菌中得到很好的分泌表达。还有一些小分子量的多肽也往往能得到分泌表达。但对原属真核细胞的非分泌蛋白, 很难在大肠杆菌表达后, 再分泌到周间质, 而最多只能结合到细胞内膜上。因此, 欲在大肠杆菌中表达分泌型外源蛋白时, 必须首先考虑目的蛋白被分泌的可能性。其次, 要考虑到在应用分泌蛋白技术路线时, 可能遇到目的蛋白的某些序列被信号肽酶错误识别, 以致把目的蛋白切成碎片进而部分或完全失去生物活性。因此, 要慎用这一技术路线。

12.6 关于包涵体

在原核细胞表达外源基因, 尤其是以大肠杆菌为宿主菌高效表达外源基因时, 表达蛋白常常在细胞质内聚集, 形成包涵体 (inclusion body)。包涵体的形成有利于防止蛋白酶对表达蛋白的降解, 并且非常有利于分离表达产物。但包涵体形成后, 表达蛋白不具有物理活性, 因此必须溶解包涵体并对表达蛋白进行复性。包涵体形成后另一个不利方面是, 由于表达产物形成包涵体, 负责水解起始密码子编码的甲硫氨酸的水解酶, 不能对所有的表达蛋白质都起作用, 这样就可能产生 N-末端带有甲硫氨酸的目的蛋白质的衍生物, 而非生物体内的天然蛋白, 这可能会对某些蛋白质的性质产生影响。

包涵体是具有膜结构的非结晶性蛋白质聚集体。在偏振光显微镜或电子显微镜下可发现包涵体与细胞质的明显区别。不仅带有重组高效表达质粒的大肠杆菌可形成包涵体, 而且有变异蛋白产生或菌体本身蛋白质异常高表达的大肠杆菌也可形成包涵体。包涵体的形成原因和形成过程还不十分清楚。有人认为包涵体的形成不仅与表达蛋白的生成速率高、无足够时间使肽链折叠及表达蛋白的高浓度有关, 而且还与培养宿主菌的温度、pH、某种金属离子不足等造成细胞内环境变化的因素有关。另外, 对二硫键是否是包涵体形成的原因, 有截然相反的报告。

在大肠杆菌表达外源基因时所形成的包涵体大小可达 $0.5 \sim 1.0 \mu\text{m}$, 比重在 1.2 左右。包涵体与细胞质内的蛋白质的物理化学性质不同。主要成分为表达产物, 其次还有 RNA 聚合酶的 4 个亚基, 外膜蛋白 OmpC、OmpF 和 OmpA、16S 或 23S rRNA、环状和缺口质粒 DNA 以及脂质、肽聚糖、脂多糖等。常规方法使菌体破碎 (如超声波、匀浆等) 后, 离心就可得到包涵体。密度梯度离心后则可得高纯度的包涵体。包涵体通常不溶于水, 加入强蛋白质变性剂后方可溶解。根据包涵体中蛋白质种类的不同, 通常用 $6 \sim 8 \text{ mol/L}$ 盐酸胍或 $9 \sim 10 \text{ mol/L}$ 尿素溶解包涵体。有时不用蛋白质变性剂, 而采用 $\text{pH} 2.0 \sim 4.5$ 的酸性溶液也可使包涵体溶解。

表达蛋白的肽链中含有半胱氨酸时, 在包涵体内可形成二硫键 (S-S)。菌体破碎后, 由于空气的氧化作用, 表达蛋白分子间或与杂蛋白质也可形成二硫键。这种情况下, 用变性剂溶解包涵体时, 再加入二硫苏糖醇 (DTT)、巯基乙醇等还原剂可使表达蛋白质完全还原。使形成包涵体的表达蛋白恢复其活性的过程称为包涵体蛋白质复性, 其基本原理是随着变性剂浓度的降低, 表达蛋白质恢复其天然构

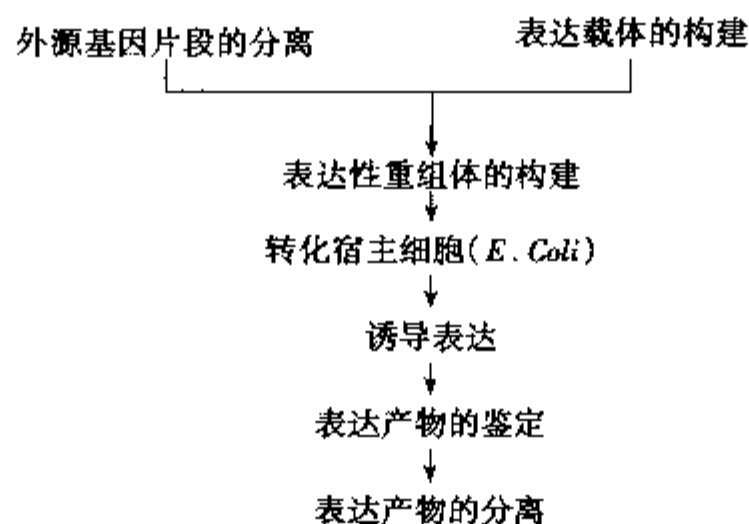
型。但表达蛋白质浓度、纯度，复性时的 pH、离子强度、温度，残留变性剂的浓度等因素都可影响表达蛋白的复性效率。降低变性剂浓度的方法有多种，常用的有稀释法、透析法、凝胶过滤及各种层析方法等。最简单而又常用的方法是稀释法或透析法。在蛋白质肽链内含有多个半胱氨酸时，为了形成正确的二硫键，常在包涵体蛋白质复性时加入还原型谷胱甘肽和氧化型谷胱甘肽等氧化还原缓冲液。并且，为了抑制蛋白质聚集，防止分子间错误的二硫键形成，常使变性剂保持在 1~2mol/L 之间。当分子内二硫键少时，可不用氧化还原缓冲液，而通过搅拌，依靠空气的氧化作用，恢复表达蛋白的正确构型。

总之，为了提高蛋白质复性效率，在溶解包涵体时应：①尽量提高包涵体的纯度；②尽量使包涵体充分溶解，并且使形成包涵体的蛋白质完全还原；③必要时加入还原剂。在具体复性实验过程中应：①分阶段减低变性剂浓度，并使变性剂保持在适当浓度；②使用氧化还原缓冲液；③应使复性的蛋白浓度、pH、温度及盐的种类、离子强度等最适。当然，如果能防止表达蛋白形成包涵体，是保存蛋白质功能最好的方法。目前，这方面的研究已正在进行中。基本的设想是与目的基因同时表达 Chaperonins 蛋白。据报道 Chaperonins 蛋白可防止包涵体的形成，并参与蛋白质折叠。

12.7 有关的实验

本节主要介绍外源基因在大肠杆菌中表达的一些实验方法。外源基因在大肠杆菌中表达的基本实验流程如下：

由于外源基因片段的分离，限制性内切酶酶解，DNA 片段的末端修饰，DNA 片段与表达载体的连接以及重组子的转化、筛选，限制性内切酶酶谱的分析，DNA 序列测定等基本方法及外源基因在原核细胞中（主要是 *E. coli*）表达的原理及原则已在有关章节有了详细的论述，故本章就不再详述。本节主要介绍：①外源基因的表达；②宿主菌的裂解；③包涵体的分离；④包涵体的溶解和复性；⑤SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳等实验方法。



12.7.1 外源基因的诱导表达

原理：提高外源基因表达水平的基本方法之一，就是将宿主菌的生长与外源基因的表达分成两个阶段，以减轻宿主菌的负荷。常用的有温度诱导和药物诱导。

材料与仪器：

LB 培养基
IPTG 贮备液
恒温振荡器

实验步骤：

- (1) 用合适的限制性内切酶消化载体 DNA 和目的基因。
- (2) 连接步骤 (1) 准备好的目的基因和载体，并转化到相应的宿主菌。

(3) 筛选出含重组子转化菌株, 提取质粒 DNA 作限制性内切酶图谱, DNA 序列测定, 确定无误后进行步骤 (4)。

(4) 如果表达载体的原核启动子为 P_L 启动子, 则在 $30 \sim 32^\circ\text{C}$ 培养数小时, 使培养液的 OD_{600} 达 $0.4 \sim 0.6$, 迅速使温度升至 42°C 继续培养 $3 \sim 5$ 小时。

如果表达载体的原核启动子为 tac 等, 则 37°C 培养细菌数小时达到对数生长期后加 IPTG 至终浓度为 1mmol/L , 继续培养 $3 \sim 5$ 小时。

(5) 取上述培养液 1ml , 离心 $1000g$, 1min , 沉淀加 $100\mu\text{l}$ $1 \times$ loading buffer, 100°C 加热 3 分钟, 上样行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

注意:

不同的表达质粒, 因启动子不同, 诱导表达方法并不完全相同, 可根据具体情况而定。

12.7.2 细菌的裂解

细胞破碎是提取胞内产物的关键性步骤。方法很多, 常用的有①高速温法珠磨; ②高压匀浆; ③超声破碎法; ④酶溶法; ⑤化学渗透等。前三种方法属机械破碎法, 并且方法①, ②已在工业生产中得到应用, 后三种方法在实验室研究中应用较为广泛。本文主要介绍酶溶法和超声破碎法的实验步骤。

12.7.2.1 酶溶法

酶溶法就是用生物酶将细胞壁和细胞膜消化溶解的方法。常用的溶解酶有溶菌酶 (lysozyme), β -1, 3 葡聚糖酶 (glucanase), β -1, 6 葡聚糖酶, 蛋白酶, 壳多糖酶 (chitinase), 糖苷酶 (glycosidase) 及几种酶的复合物等。溶菌酶主要对细菌类有作用, 而其它几种酶对酵母作用显著。

实验步骤:

(1) 4°C , 离心 $500g$, 15 分钟, 收集诱导表达的细菌 (1000ml)。

(2) 弃上清液, 每克菌加 3ml 裂解缓冲液, 悬浮沉淀。裂解缓冲液: 50mmol/L Tris·Cl, $\text{pH}8.0$, 1mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl。

(3) 每克菌加 $3\mu\text{l}$ 50mmol/L 的蛋白酶抑制剂 PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride), $80\mu\text{l}$ 溶菌酶 (10mg/ml), 搅拌 20 分钟。

(4) 在搅拌下, 每克菌加 4mg 脱氧胆酸。

(5) 溶液变得粘稠时加每克菌 $20\mu\text{l}$ DNase I (1mg/ml)。

(6) 室温放置至溶液不再粘稠。

(2) 至 (4) 在冷室中进行。

12.7.2.2 超声破碎法

声频高于 $15 \sim 20\text{kHz}$ 的超声波在高强度声能输入下可以进行细胞破碎, 其破碎机理尚不清楚, 可能与空化现象 (cavitation phenomena) 引起的冲击波和剪切力有关。在处理少量样品时操作简便, 液体量损失少, 同时还可对染色体 DNA 进行剪切, 大大地降低了液体的粘度, 有利于后续的目标产物的分离。

实验步骤:

(1) 收集诱导表达的细菌 (1000ml), 4°C , 离心 $500g$, 15 分钟。

(2) 弃上清液, 每克菌加 3ml TE Buffer。

(3) 根据厂家提供的超声波仪的数据进行破菌。

(4) 离心 $10000g$, 15 分钟, 分别收集上清液和沉淀。

(5) 分别取少量上清液和沉淀加入等体积的 $2 \times$ Loading buffer, 行 SDS-PAGE 电泳。

注意:

(1) 超声破碎与声频、声能、处理时间、细胞浓度、菌种类型等因素有关, 实验者应根据具体情况

掌握。

(2) 进行步骤(3)之前应留取少量步骤(2)的样品,作为对照用,以判断进行步骤(3)后细胞的破碎程度:可进行稀释后测 OD_{600} 。

(3) 超声波破菌前,细胞经数次冻溶后更容易破碎。

12.7.3 包涵体的分离

方法一:

(1) 离心细菌裂解液 12 000g, 15 分钟, 4℃, 台式离心机。

(2) 弃上清液,沉淀用 9 倍体积的含 0.5% Triton X-100, 10mmol/L EDTA, pH8.0 缓冲液悬浮。

(3) 室温放置 5 分钟。

(4) 12 000g, 15 分钟, 4℃, 离心。

(5) 吸出上清液,用 100 μ l H_2O 重新悬浮沉淀。

(6) 分别取 10 μ l 上清液和重新悬浮沉淀,加 10 μ l 2 \times 缓冲液,行 SDS-PAGE 电泳。

2 \times 加样缓冲液:

100mmol/L Tris·Cl (pH6.8)

200mmol/L DTT

0.2% 溴酚蓝

20% 甘油

4% SDS

方法二:

(1) 离心细胞裂解液 (12 000g 15 分钟 4℃)。

(2) 弃上清液,每克菌加 1ml H_2O 使悬浮,分别取 100 μ l 分装 4 个管,其余备用。

(3) 离心同(1)。

(4) 弃上清液,用 100 μ l 0.1mol/L Tris·Cl (pH8.5),并含不同浓度尿素 (0.5, 1, 2, 5mol/L) 重新悬浮沉淀。

(5) 离心。

(6) 分别吸出并保留上清液,用 100 μ l H_2O 重新悬浮沉淀。

(7) 分别取 10 μ l 上清液和重新悬浮的沉淀,加 10 μ l 2 \times loading buffer 行 SDS-PAGE 电泳。

12.7.4 包涵体的溶解和复性

实验步骤:

(1) 用 100 μ l 裂解缓冲液 (含 0.1mmol/L PMSF, 8mol/L 尿素, 10mmol/L DTT) 溶解包涵体。

(2) 室温放置 1 小时。

(3) 加 9 倍体积的

50mmol/L KH_2PO_4 (pH10.7)

1mmol/L EDTA (pH8.0)

50mmol/L NaCl

2mmol/L 还原型谷胱甘肽

1mmol/L 氧化型谷胱甘肽

室温放置 30 分钟。用 KOH 保持 pH 到 10.7。

(4) 用 HCl 调至 pH8.0,最少在室温放置 30 分钟。

- (5) 离心 10 000g, 15 分钟, 室温。
- (6) 吸出上清液并保留, 用 100 μ l 1 \times SDS - Loading buffer 重新溶解沉淀。
- (7) 取 10 μ l 上清液, 加 10 μ l 2 \times Loading buffer, 取 20 μ l 重新溶解的沉淀, 行 SDS - PAGE 电泳。

12.8 蛋白质的 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳

几乎所有的蛋白质分析都使用了聚丙烯酰胺凝胶电泳。在此电泳过程中有三种物理效应: ①样品的浓缩效应; ②凝胶的分子筛效应; ③一般电泳分离的电荷效应。因此, 样品分离效果好, 分辨率高。而在 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳中, 由于 SDS 和巯基乙醇作用, 使得蛋白质分子中二硫键还原, 氢键、疏水键打开, SDS 按 1.4g SDS/1g 蛋白质的比例结合到蛋白质多肽链分子上, 形成 SDS - 多肽复合物。

因十二烷基硫酸根带负电, 使各种 SDS - 多肽复合物都带有相同密度的负电荷, 它的量大大超过了蛋白质多肽分子原有的电荷量, 因而掩盖了不同种类蛋白质多肽分子间原有的电荷差别。同时, 在水溶液中, SDS - 多肽复合物具有近似的形状 (长椭圆棒状), 并且不同 SDS - 多肽复合物的短轴长度趋于一致, 而长轴与分子量成正比。这样, SDS - 多肽复合物, 在 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳的迁移率, 不再受蛋白质多肽原有电荷和形状的影响, 而只与其分子量有关, 并且在一定条件下与迁移率成线性关系。

聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺 (acrylamide, 简称 Acr) 和交联剂亚甲双丙烯酰胺 (N, N - methylene bisacrylamide, 简称 Bis) 在催化剂的作用下聚合而成。凝胶聚合时所形成的微孔影响了不同 SDS - 多肽复合物电泳时的迁移率, 即所谓的分子筛效应。微孔的大小由于 Bis 和 Acr 的比例和凝胶的浓度决定。表 12-1 列出了凝胶的浓度与有效分离范围:

多数情况下, SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳使用一种不连续的缓冲液系统。在这一系统中, 一般凝胶分为低浓度的成层胶和较高浓度的分离胶。配制凝胶的缓冲液也有不同的 pH 和离子强度。当电泳时, 凝胶中样品里的 SDS 多肽复合物沿移动的界面迁移。在分离胶表面形成了一个极薄的层, 极大地浓缩了样品的体积, 这就是所谓的浓缩效应。

表 12-1 蛋白质在聚丙烯酰胺胶的有效分离范围

凝胶浓度 %	分离范围 (kD)
15	12 ~ 43
10	16 ~ 68
7.5	39 ~ 94
5.0	57 ~ 212
Bis: Acr 的分子比为 1:29	

试剂:

30% 凝胶贮备液: 含 29% (W/V) 丙烯酰胺

1% (W/V) N, N - 亚甲双丙烯酰胺

用去离子水配制, 避光贮存于棕色瓶中。

10% SDS, 去离子水配制, 贮存于室温中

TEMED (N, N, N', N' - 四甲基乙烯二胺)

10% 过硫酸胺: 用无离子水配制少量, 最多 4 $^{\circ}$ C 贮存一周;

Tris - 甘氨酸电泳缓冲液:

25mmol/L Tris

250mmol/L 甘氨酸 (pH8.3)

0.1% SDS

1.5mol/L Tris·Cl (pH8.8)

1.0mol/L Tris·Cl (pH6.8)

方法:

(1) 准备玻璃板, 依次用水, 10% SDS, H₂O, 乙醇和水冲洗, 干燥。按厂家介绍装好。

(2) 确定凝胶浓度体积, 按表 12-2 配制分离胶溶液。

表 12-2 配制 Tris - 甘氨酸 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶所用溶液

溶液成分	不同体积凝胶中各成分所需体积							
	5ml	10ml	15ml	20ml	25ml	30ml	40ml	50ml
6%								
H ₂ O	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30% 丙烯酰胺溶液	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
1.5mmol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸胺溶液	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8%								
H ₂ O	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
30% 丙烯酰胺溶液	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
1.5mmol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸胺溶液	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10%								
H ₂ O	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30% 丙烯酰胺溶液	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
1.5mmol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸胺溶液	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12%								
H ₂ O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30% 丙烯酰胺溶液	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
1.5mmol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.0	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸胺溶液	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%								
H ₂ O	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30% 丙烯酰胺溶液	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
1.5mmol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸胺溶液	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

(3) 小心将分离胶注入准备好的玻璃板间隙中, 为成层胶留有足够空间。轻轻在顶层加入几毫升覆盖物, 以阻止空气氧对凝胶聚合的抑制作用。

覆盖物: 凝胶浓度 $\leq 8\%$ 时, 可用 0.1% SDS。

凝胶浓度 $\geq 10\%$ 时, 可用异丁醇。

有人用无离子水作为覆盖物。

(4) 凝胶聚合完成之后, 倒掉覆盖层, 用无离子水洗凝胶上部数次, 尽可能用吸水纸吸干凝胶顶端的残存的液体。

(5) 按表 12-3 配制成层胶, 并注入分离胶上端, 插入梳子应小心避免气泡。

表 12-3 配制 Tris-甘氨酸 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 5% 成层胶所用溶液

溶液成分	不同体积凝胶液中各成分所需体积							
	1ml	2ml	3ml	4ml	5ml	6ml	8ml	10ml
H ₂ O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30% 丙烯酰胺溶液	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
1.0mol/L Tris (pH6.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10% 过硫酸胺溶液	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

(6) 在成层胶聚合的同时, 将样品与样品缓冲液混合, 100°C 加热 3 分钟。

样品缓冲液 (终浓度):

50mmol/L Tris·Cl (pH6.8)

100mmol/L DTT

2% SDS

0.1% 溴酚蓝

10% 甘油

(7) 成层胶完成后, 用无离子水冲洗梳孔, 将凝胶放入电泳槽上。上下槽均加入 $1\times$ 电极缓冲液, 检查是否泄漏。驱除两玻璃板间凝胶底部的气泡。上样前用上槽缓冲液冲洗梳子孔。

(8) 按次序上样, 一定安排已知分子量的标准物。最好将 $1\times$ 样品缓冲液加入未使用的梳子孔中。

(9) 电泳。开始时电压为 $8\text{V}/\text{cm}$ 凝胶, 染料进入分离胶后, 将电压增加到 $15\text{V}/\text{cm}$ 凝胶, 继续电泳直到染料抵达分离胶底部, 断开电源。

(10) 取下凝胶, 固定、染色或进行 Western blot 等实验。

[考马斯亮蓝染色 SDS-聚丙烯酰胺凝胶]

(1) 0.25g 考马斯亮蓝 (Commassise blue R250) 溶解于 90ml 甲醇:水 (1:1) 和 10ml 冰醋酸溶液中过滤除去颗粒物质。

(2) 用至少 5 倍体积的染色液浸泡凝胶, 放摇床上室温缓慢旋转 3~4 小时。

(3) 换掉染色液并回收以备后用, 用无染料的甲醇/醋酸溶液浸泡凝胶, 缓慢摇动 4~8 小时脱色, 其间换 3~4 次溶液。

(4) 继续使凝胶脱色 24 小时, 直到满意为止。

(5) 将脱色后的凝胶照相或干燥, 也可无限期地用塑料袋封闭在含 20% 甘油的水中。

注意:

(1) 此种染色法可检测到 $0.1\mu\text{g}$ 以上的单一条带的蛋白质。

(2) 如欲更快脱色可用下述方法:

- 1) 用 30% 甲醇、10% 乙醇混合液脱色, 但脱色时间过长, 蛋白质带的着色深度将有一些丧失。
- 2) 用正常的脱色液在 45℃ 下脱色。
- 3) 正常的脱色液中加入数克阴离子或一块海绵。
- 4) 使用某些公司生产的仪器电泳脱色。

(3) 染色过的凝胶不应贮存在脱色液中, 因这将导致蛋白质带褪色。

[用银盐染色 SDS-聚丙烯酰胺凝胶]

蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离之后可用银盐染色, 其方法可分为两类, 一类是用氨盐, 一类是使用硝酸银。这两类染色法比考马斯亮蓝 R250 染色灵敏 100 ~ 1 000 倍, 在单一条带有可能染出 0.1 ~ 1.0ng 多肽, 硝酸银溶液比氨盐溶液易配制, 且不产生潜在的爆炸性副产品。下面主要介绍此法。

方法一:

- (1) 电泳结束后, 凝胶使用固定液固定 1 小时。

固定液: 25% 异丙醇, 10% 冰醋酸

(去离子水配制)

- (2) 去离子水洗凝胶 3 次, 每次 15 分钟。
- (3) 50% 甲醇浸泡凝胶至少 1 小时或过夜 (50% 甲醇用去离子水配制)。
- (4) 染色液的配制:

A 液: 4ml 20% 硝酸银

B 液: 21ml 0.36% NaOH

2.8ml 26% ~ 30% NH_4OH

C 液: 将 A 液逐滴加入 B 液中, 在滴加的过程中应不断搅拌 B 液至 A 液产生的棕色絮状沉淀完全溶解, 加去离子水至 100ml。

- (5) 染色: 弃甲醇溶液, 加入新鲜配制的 C 液, 持续摇动 15 分钟。
- (6) 弃染色液, 去离子水洗凝胶 2 次, 每次 5 分钟。
- (7) 显色:

显色液的配制: 2.5ml 1% 柠檬酸

0.25ml 3.8% 甲醛 (新鲜)

混合, 加去离子水至 500ml。

将凝胶浸泡在显色液中, 蛋白质条带通常在 10 分钟内出现, 很少超过 15 分钟。

- (8) 终止显色反应: 1% 冰醋酸洗数分钟, 然后去离子水洗涤数次。

方法二:

- (1) 固定蛋白质, 用至少 5 倍体积的乙醇:水:乙酸 (30:10:60) 溶液室温下温和摇动 4 ~ 12 小时。
- (2) 弃固定液, 加入至少 5 倍体积 30% 乙酸, 室温温和摇动 30 分钟。
- (3) 重复步骤 (2)。
- (4) 弃掉乙醇溶液, 加 10 倍体积去离子水, 室温温和摇动 10 分钟。
- (5) 重复步骤 (4)。
- (6) 弃掉水, 加入 5 倍体积 0.1% AgNO_3 溶液 (从 20% 原液中新鲜稀释, 原液贮存在密封的棕色瓶中), 室温下摇动 30 分钟。
- (7) 弃掉 AgNO_3 溶液, 用去离子水冲洗凝胶两面 (每面 20 秒)。
- (8) 显色加入 5 倍体积 2.5% 碳酸钠和 0.02% 甲醛。

振荡仪上温和搅动, 仔细观察凝胶, 标准蛋白质条带几分钟内出现, 继续搅动直到所要求的每条带出现。

(9) 终止反应：用 1% 乙酸冲洗凝胶数分钟，用去离子水冲洗凝胶数次（每次 10 分钟）。

(10) 脱色：

脱色溶液 A 的配制：

37g NaCl
37g CuSO₄ }——溶于 850ml 去离子水中，加浓 NH₄OH 直到深蓝色沉淀物形成，接着又溶解。用去

离子水调至体积 1L。

脱色溶液 B 的配制：

463g 硫代硫酸钠溶于 900ml 离子水中，用水调至 1L。

等体积混合溶液 A - B，用 3 倍体积的水稀释混合液，并立即用稀释的混合液冲洗凝胶（2 ~ 3 秒）。

(11) 用大量去离子水冲洗处理过的凝胶。

(12) 照像或保存凝胶。

注意：

(1) 实验中必须戴手套轻柔地移动凝胶。

(2) 实验中的玻璃器皿必须干净并用无离子水冲洗，否则，会大大降低银染的灵敏度。

附：SDS - 聚丙烯酰胺凝胶的干燥：

作放射自显影之前，常常要干燥 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶。放射自显影方法一般用于检测表达水平很低的蛋白质产物。其原理是在进行诱导表达时，把 ¹⁴C 标记的氨基酸或 ³⁵S 标记的甲硫氨酸加入到培养基中进行蛋白质产物的细胞内标记。电泳后干燥凝胶进行放射自显影。凝胶干燥时遇到的主要问题是凝胶的变形和破裂。将凝胶放在 Whatman 3MM 滤纸上，干燥凝胶变形的问题会得到解决，但凝胶是否破裂则取决于凝胶的厚度和干燥器的质量，因此应尽量使用薄的凝胶并使凝胶干燥器处于良好状态，使其真空压力波动极少。

材料及仪器：

Whatman 3MM 滤纸

保鲜膜或玻璃纸

凝胶干燥器

方法：

(1) 电泳后的凝胶用 5 ~ 10 体积的冰乙酸:甲醇:水 (10:20:70) 室温下固定。酸性固定液使凝胶中的溴酚蓝变黄。蓝色消失后，继续固定 5 分钟。

为防止凝胶碎裂，在进行步骤 (2) 之前可将凝胶浸泡于含 20% 甲醇、30% 甘油溶液中过夜。

(2) 将凝胶作好标记放在保鲜膜或玻璃纸上面，在凝胶上面放一张比凝胶四周长出 1 ~ 2cm 的 Whatman 3MM 滤纸。

(3) 另将一张 Whatman 3MM 滤纸放在凝胶干燥器上。

(4) 将步骤 (2) 准备好的 Whatman 3MM 滤纸/凝胶/保鲜膜或玻璃纸，放在凝胶干燥器上的 Whatman 3MM 滤纸上面、保鲜膜或玻璃纸在最上面。

(5) 放下凝胶干燥器的盖子，抽真空使凝胶四周封闭以干燥凝胶，干燥时间常由厂家提供一般 0.75mm 厚凝胶干燥 2 小时，如 50 ~ 65℃ 可加快干燥进程。

(6) 释放真空，如加热状态下干燥，则先停止加热并自然冷却 10 分钟。释放真空。

(7) 取出凝胶，除去保鲜膜，但此时 Whatman 3MM 滤纸与凝胶粘在一起。作放射自显影。

注意：

为保存凝胶步骤 (2)，可改为将染色后的凝胶放在玻璃纸上并在凝胶上面覆盖一层玻璃纸。这样干燥出来的直接用于照像、摄影或永久保存效果甚佳。

12.9 表达产物的免疫学及生物活性的检测

外源基因在原核细胞中的表达产物（蛋白质或多肽）是否具有免疫学和生物学活性，及其活性的高低，是决定其是否具有实用价值的关键。这需要通过一定的实验才能作出正确的判断。表达产物免疫学活性的检测在本书的第 12 章及其它有关章节已有了较为详细的论述，在此就不再赘述。表达产物的生物活性检测方法则因各个表达产物的特性及生物活性的不同而异，不可能有固定的模式和方法。如转化生长因子 - β (transforming growth factor - β) 一般是通过生长抑制实验 (growth inhibition assay) 和刺激锚

着不依赖生长 (stimulation of anchorage - indepeden growth) 实验检测其活性的, 而超氧化物歧化酶 (super-oxide dismutase) 则通过化学发光法 (chemiluminesence)、活性测定分光法等多种化学反应与比色相结合测定其活性的。因此, 读者可根据各自表达产物的具体情况采用各自所需的方法检测其生物活性。另外, 表达产物的“N”末端氨基酸顺序的测定在表达产物的鉴定中也占有重要地位。

(于英杰 文 卢圣栋 审)

参 考 文 献

1. 蔡良婉. 核酸研究技术. 北京: 科学出版社, 1989
2. 黄翠芬. 遗传工程理论和方法. 北京: 科学出版社, 1987
3. 齐义鹏, 等. 基因工程原理和方法. 成都: 四川出版社, 1988
4. Sambrook J, et al. Molecular Cloning, A laboratory manual. 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
5. Old RW, Primoise SB. Principles of gene manipulation. University of Californ press, 1980
6. Watson JD, et al. Recombinant DNA. Scientific American Books, 1983
7. Shine J, Dalgarno L. Determinant of cistron speccificity in bacterial ribosomes. Nature, 1975, 34:254
8. Brosius. Plasmid vectors for the selection of promoters. Gene, 1984, 27:151
9. Masui Y, et al. Novel high - level expression 10^4 - fold amplification of escherichia coli minor protein. Biotechnology, 1984, 2:151
10. Lnouye S, Lnouye Mup - promoter mutation in the lpp gene of escherichia coli. Nucleic Acid Res, 1985, 13:3101
11. Mitraki A, King J. Protein folding intermediates and inclusion body formation. Biotechnology, 1989, 7:690
12. Gray GL et al. Priiplasmic production of correctly processed human growth hormone in Escherichia: Natural and bacterial signal sequences are interchangeable. Gene, 1985, 39:247
13. Hsiung HM, et al. Hight - level expression, efficient secretion and folding of human growth hormone in Escherichia Coli. Biotechnology, 1986, 4:991
14. Chang CN, et al. High - level secretion of human growth hormone by Escherichia Coli. Gene, 1987, 55:189
15. Botstein KD. Secretion of Beta - lactamase requires the carboxy end of the protein. Cell, 1980, 20:749
16. Talmage K, et al. Eukaryotic signal sequence transports insulin antigen in Escherichia Coli. Proc Natl Acad Sci USA, 1980, 77:3369
17. Geus P, et al. The pro - and mature forms of the E. coliK - 12 outer membrane phospholipase A are identical. EMBO J, 1984, 3:1799
18. Bassford PJ, et al. Use of gene fusion to study secretion of multosebinding protein into escherichia periplasm. J Bacteriol, 1979, 139:19
19. Kate C, et al. Construction of an excretion vector and extracellular production of human growth hormone from Escherichia Coli, 1987, 64:197
20. Ferener T, et al. Sequence information required for protein thanslocation from the cytoplasm. J Bacteriol. 1987, 169:5339

13. 外源基因在真核细胞中的表达

基因的体外重组和表达体系起始于大肠杆菌,迄今,它仍然是常用的体系。随着真核基因表达和调控研究的深入,证明酵母也可成为有用的表达体系。经过几年试用表明,酵母型疫苗却暴露出以下几方面的弱点:即提纯工艺复杂、成本高、制品纯度达不到要求、制品免疫原性差和接种剂量大等。应用动物细胞,如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)等也可用于表达并产生基因工程疫苗、活性蛋白和多肽等产品。美国基因技术公司(Gene tech)用CHO表达的含糖基化多肽乙型肝炎表面抗原免疫黑猩猩,证明该产品有良好的免疫原性和保护效果。实验证明,用哺乳动物细胞作宿主表达体系具有以下主要优点:①哺乳动物细胞能识别和除去外源基因中的内含子,剪接加工成成熟的mRNA,这是原核细胞办不到的;②哺乳动物细胞表达的蛋白质在翻译后被加工的机会较多(如糖基化),可提高产品正确构型的几率,有可能被改造成类人体源型,加工后的蛋白质免疫原性好,约为酵母型的16~20倍;③哺乳动物细胞易被重组DNA质粒转染,具有遗传稳定性和可重复性;④经转化的哺乳动物细胞可将表达的产物分泌到培养基中,其提纯工艺简单,成本低。鉴于上述优点,世界卫生组织(WHO)生物制品研究小组于1986年在日内瓦召开会议,建议世界各国采用长期培养的哺乳动物细胞株,制备各种生物制品。

13.1 哺乳动物基因转移的遗传选择标记

在哺乳动物基因转移过程中,如何从成百万个细胞群体中,检测出为数极少的转化细胞,以及怎样鉴定已导入受体细胞中的外源DNA?就成为发展哺乳动物基因转移系统的一个关键。迄今,已知的绝大多数的哺乳动物细胞病毒载体,除了牛乳头状病毒载体外,都得附加上标记基因,才能进行筛选。常用的这些标记基因有:胸腺核苷激酶基因(tk)、二氢叶酸还原酶基因(dhfr)、氯霉素乙酰转移酶基因(cat)、新霉素磷酸转移酶基因(neo)以及次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸糖基转移酶基因(hgpt)等。

13.1.1 胸苷激酶基因(tk)选择系统

胸苷激酶(thymidine kinase)是核苷酸合成代谢途径中的一种酶,能将胸苷转换成胸苷-磷酸。几乎在所有的真核细胞中都能有效地表达胸苷激酶基因(tk)。在胸苷激酶基因选择系统中,必须用tk表型缺陷型(tk⁻)细胞株作为宿主细胞。由于选择tk⁺细胞的培养含有次黄嘌呤(hypoxanthine)、氨基蝶呤(aminopterin)和胸苷(thymidine),所以叫做HAT选择法。其选择原理为:如果用叶酸的类似物氨基蝶呤(A)处理细胞,二氢叶酸还原酶被抑制,不能使二氢叶酸还原成四氢叶酸,其结果是培养基中的四氢叶酸因得不到补充而逐渐耗尽,于是从dUMP合成TTP以及dATP和dCTP的合成过程均被阻断。次黄嘌呤是dATP和dCTP补救合成途径的一种底物,培养基中含有这种物质时,细胞就能越过氨基蝶呤的抑制作用,利用补救途径继续合成出这些核苷酸。同时由于在HAT培养基中含有外源的胸苷(T),所以tk⁺细胞通过胸苷激酶的作用合成TTP,继续存活下去;而tk⁻细胞因缺乏胸苷激酶而不发生这种合成,因而死亡。如将正常的tk基因导入tk⁻细胞,这些细胞能够存活下去,所以使用HAT培养基,能够选择出经tk基因转化的tk⁺细胞。

13.1.2 二氢叶酸还原酶基因(dhfr)选择系统

二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, dhfr)在真核细胞的核苷酸合成中起着重要的作用,它催化二氢叶酸还原成四氢叶酸,四氢叶酸在胸腺嘧啶的合成过程中提供甲基,无四氢叶酸则不能合成胸腺

嘧啶。由二氢叶酸还原成四氢叶酸的反应过程能被叶酸的类似物氨基蝶呤和氨甲蝶呤竞争性抑制。 dhf^{-} 表型的细胞由于不能合成四氢叶酸, 除非培养基中含有外源的胸腺嘧啶、甘氨酸和嘌呤, 否则细胞就会因胸腺嘧啶及嘌呤的饥饿而死亡。但将 $dhfr$ 基因转入缺陷型细胞后, 细胞则能合成四氢叶酸, 进而使细胞的核酸合成能够进行, 所以转入 $dhfr$ 基因的细胞就能在无胸腺嘧啶和次黄嘌呤的选择培养基中存活, 而未转入 $dhfr$ 基因的细胞则被选择淘汰。

$dhfr$ 基因选择系统需要 $dhfr^{-}$ 表型的受体细胞, 这就限制了它的使用范围。但这一选择系统有一个明显的优点, 就是它可以使外源基因得到扩增。当培养基中逐渐增加氨甲蝶呤 (methotrexate, MTX) 的浓度时, 随着细胞对 MTX 抗性的增加, $dhfr$ 基因与外源基因均明显扩增, 进而使外源基因的表达产物增加。

13.1.3 新霉素抗性选择系统

新霉素是细菌抗生素, 它可以干扰原核生物的核糖体, 使其蛋白质合成不能正常进行, 而真核细胞核糖体则不受新霉素的影响。新霉素的一种类似物 G418 (geneticin) 对真核细胞和原核细胞均有毒性。细菌的新霉素抗性基因 (neo) 能在真核细胞中表达, 当 neo 基因与能有效转录的真核 DNA 序列连锁时就能获得有效的表达。 neo 基因编码一种磷酸转移酶, 这种酶能使 G418 失活。所以, 当细胞表达了这种 neo 抗性基因后, 就会在含 G418 的选择培养基中存活, 这种选择系统适用于所有的细胞类型。

13.1.4 氯霉素乙酰转移酶基因检测系统

氯霉素乙酰转移酶 (chloramphenicol acetyltransferase, cat) 是由大肠杆菌转座子 Tn9 编码的, cat 可催化氯霉素发生乙酰化作用, 从而使其失去活性。虽然真核细胞不含有内源的 cat 酶活性, 但真核细胞的启动子却可引发外源 cat 基因的表达, 所以细菌的这个基因可以作为检测外源基因导入真核细胞的一种十分敏感的标记基因, 尤其是这一选择系统适用于瞬时表达的研究。带有 cat 基因的质粒载体转化到哺乳动物细胞后, 就会合成 cat 。哺乳动物细胞本身不能合成 cat , 所以只要在转化的细胞中检测到 cat 的活性, 即可肯定它是来自外源的 cat 质粒, 这也是 cat 基因选择系统的一大优点。为了测定转化细胞的 cat 的活性, 在转化后 48 ~ 72 小时, 离心收集细胞, 并制备细胞提取物, 然后加入乙酰辅酶 A 和 ^{14}C 标记的氯霉素进行孵育, 如果细胞中有 cat 存在, 氯霉素就被乙酰化, 作薄层层析分离, 便可将氯霉素和乙酰化的氯霉素分开。然后通过放射自显影技术测定乙酰化的产物。此法十分灵敏, 而且精确。

13.2 外源基因导入哺乳动物细胞的载体

高等真核细胞中并不携带相当于细菌质粒的附加体 DNA, 因此通常应用来自 DNA 病毒或 RNA 病毒基因作为载体。目前常用的动物病毒表达载体大体上可分为两大类: 一类是整合型 (integrated), 即外源基因通过这种病毒载体与宿主细胞的染色体整合, 外源基因随宿主细胞基因组的复制而扩增, 这类载体的代表是 pSV 系列。另一类为游离型 (transient) 或称病毒颗粒型, 这类载体携带外源基因后, 本质上仍然是一种完整或缺损的病毒, 能够以病毒颗粒的形式在宿主细胞内自行复制或借助病毒存在下进行复制。常见的这类载体系统为痘苗病毒、腺病毒、杆状病毒及逆转录病毒等。

13.2.1 SV40 载体

在上述这些动物病毒中, 以猴空泡病毒 40 (simian vacuolating virus 40, SV40) 载体的发展最迅速, 远远超过了其他动物病毒的载体, 其主要原因在于: ①该病毒基因组只有 5243bp, 全部核苷酸序列均已确定, 基因组为共价闭合环 DNA (cccDNA), 它的酶切图谱及各种功能的基因定位均已详细了解, ②病毒 DNA 较易制备, 在感染晚期每个细胞的病毒拷贝可达 10^5 ; ③病毒感染不同类细胞导致细胞裂解或细

胞转化；④病毒的早期功能及晚期功能都有温度敏感突变株；⑤关于病毒基因组的复制和表达已有了较多的了解。但是，以 SV40 病毒作为载体有以下几个缺点：①当 SV40 重组病毒转染细胞，如猴肾细胞时，随着病毒的繁殖，细胞便裂解，这对研究解决基因的表达，控制和基因工程的实用目的等问题是很不理想的；②SV40 DNA 分子量小，重组病毒的构建是去掉一段晚期区 DNA 后将外源 DNA 插入，插入的 DNA 不能大于 2 500bp；③如果将 SV40 DNA 改建为在早期功能区插入外源 DNA 载体，由于早期功能与病毒致癌性有关，而这正是 SV40 病毒作为载体的隐患。为此，人们对病毒载体进行了不同改造，pSV 质粒就是以 SV40 为基础派生出来的一群质粒的总称。同时将 tk, dhfr, neo, cat 等标记基因与 pSV 质粒重组，构成了适用于不同目的的表达载体。Magnusson 等将 dhfr 基因克隆到 pSV2 载体的 Hind III 及 Bgl II 位点，构成了 pSV dhfr 表达载体，如图 13-1 所示。

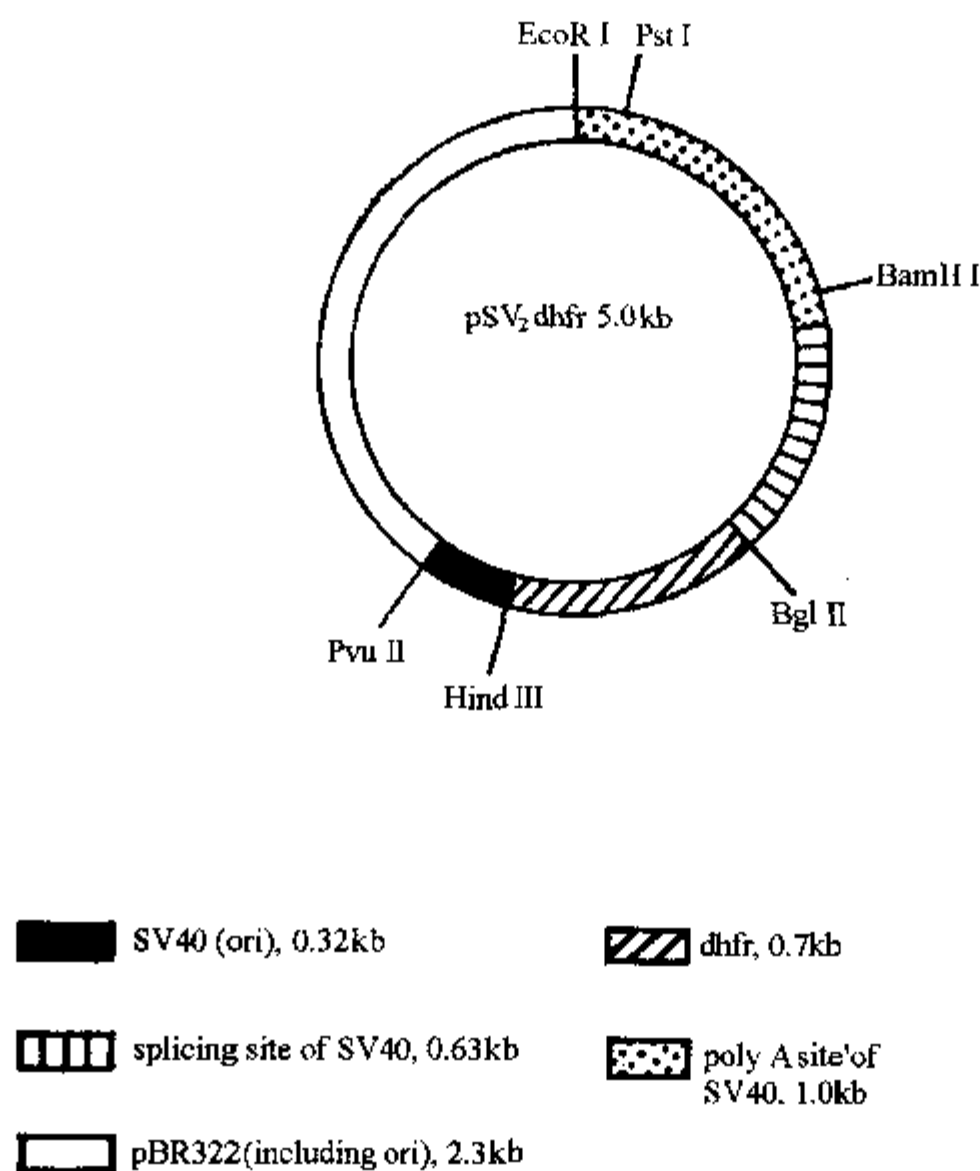


图 13-1 pSV2dhfr 酶切图谱

作者对 pSV2dhfr 质粒进行改造，切除 dhfr 基因，加入 1 个人工合成的寡聚核苷酸，构建成了哺乳动物细胞表达载体 pSV2-EP (图 13-2)。该载体具有以下结构特点：①含 SV40 早期启动子及 DNA 复制起点；②含有 SV40 多聚 A 位点及剪切位点；③启动子下游含起始密码子 ATG，当外源目的基因来自于表达型载体 λ gt11 cDNA 库时，插入该载体的 EcoR I 位点后，由 ATG 起始可形成开放阅读框架。作者将自表达型噬菌体载体 λ gt11 构建的大鼠睾丸 cDNA 库筛选出的编码兔精子膜蛋白 rSMP-B 的 cDNA 片段 (RSD-1) 和编码人精子膜蛋白 YWK-II 抗原的 cDNA 片段 (RSD-2) 分别插入表达载体 pSV2-EP 中，然后应用磷酸钙沉淀法分别与带标记基因的 pSV2dhfr 质粒或 pSV2neo 质粒共转化 CHO dhfr- 或 CHO 细胞。经选择培养基筛选，得到多个阳性细胞株。对这些细胞株分别以 DNA 斑点杂交、RNA 斑点杂交及间接免疫荧光抗体法检测，发现有外源基因存在，并有 mRNA 的高效转录及蛋白质的表达。表明外源基

因已稳定地整合到细胞基因组中并获得了有效的表达。此结果也证明,作者所构建的表达载体(pSV2-EP)可作为 λ gt11库中cDNA片段的通用表达载体(图13-2, 13-3)。

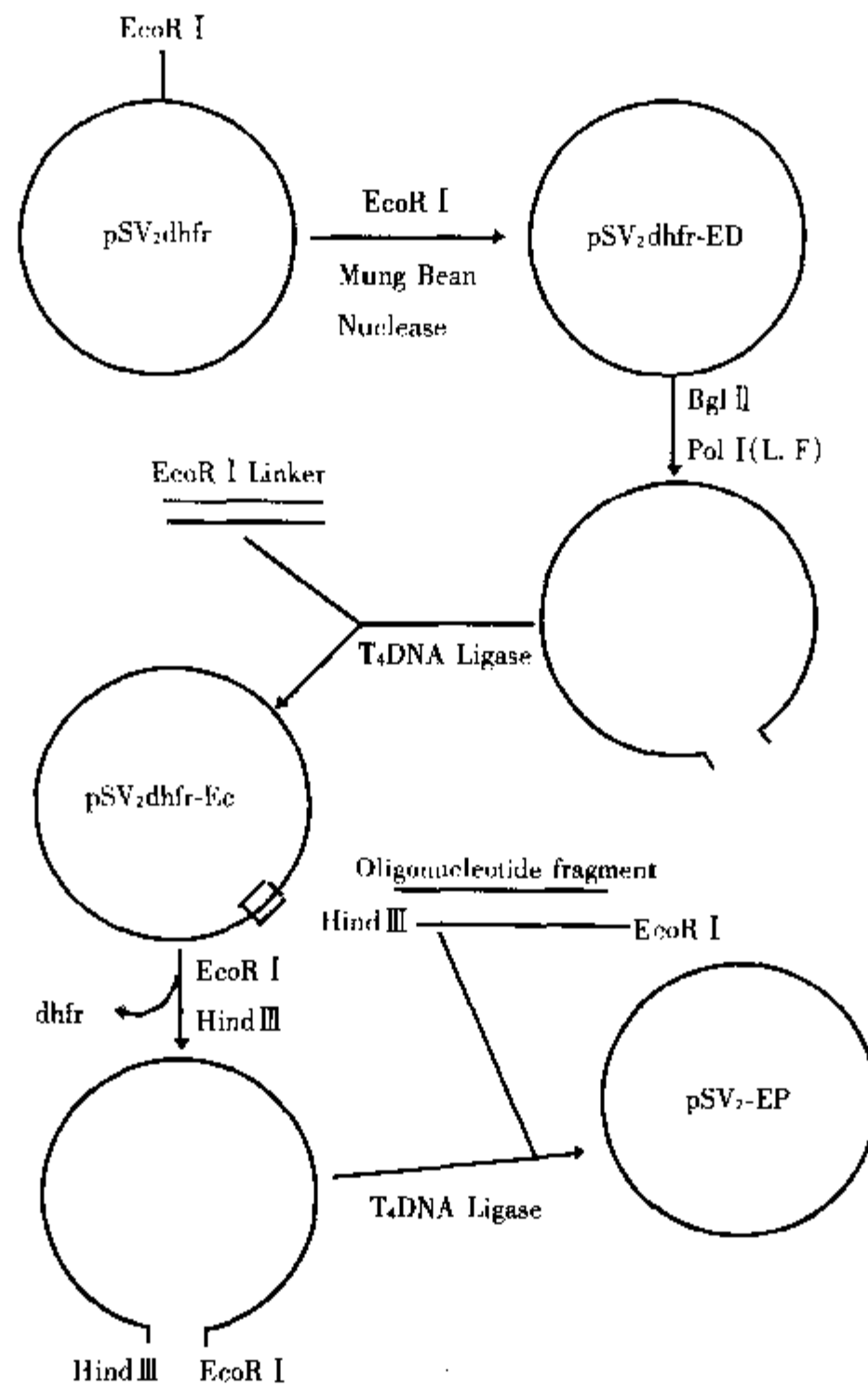


图 13-2 真核细胞表达载体 pSV2-EP 的构建过程

将 cat 基因克隆在 pSV 质粒上,就构建了一批能够表达氯霉素乙酰转移酶的所谓 cat 质粒载体。先从大肠杆菌转座子 Tn9 上分离出 cat 基因,这段长 773bp 的序列经过加工之后插入到 pSV2 质粒上,便产生了 pSV2 cat 质粒,其中 cat 基因是置于 SV40 启动子的控制下进行表达的。还有一种无启动子的派生质粒载体 pSV0-cat,它能够使用任何一种启动子片段,所以利用该质粒可以测定各种真核启动子的强度。

13.2.2 其它病毒载体

13.2.2.1 腺病毒载体

腺病毒有很大的潜力,可发展为真核基因的表达体系。首先是因为它的基因组 DNA 分子量大,可插入较大的外源 DNA 片段,而且还可以在宿主细胞中大量增殖。其次,在腺病毒感染周期中,宿主蛋白质合成被中止,可最大限度地合成病毒编码的蛋白质,这种特性为克隆基因蛋白质产物的检测与纯化提供较大的方便。

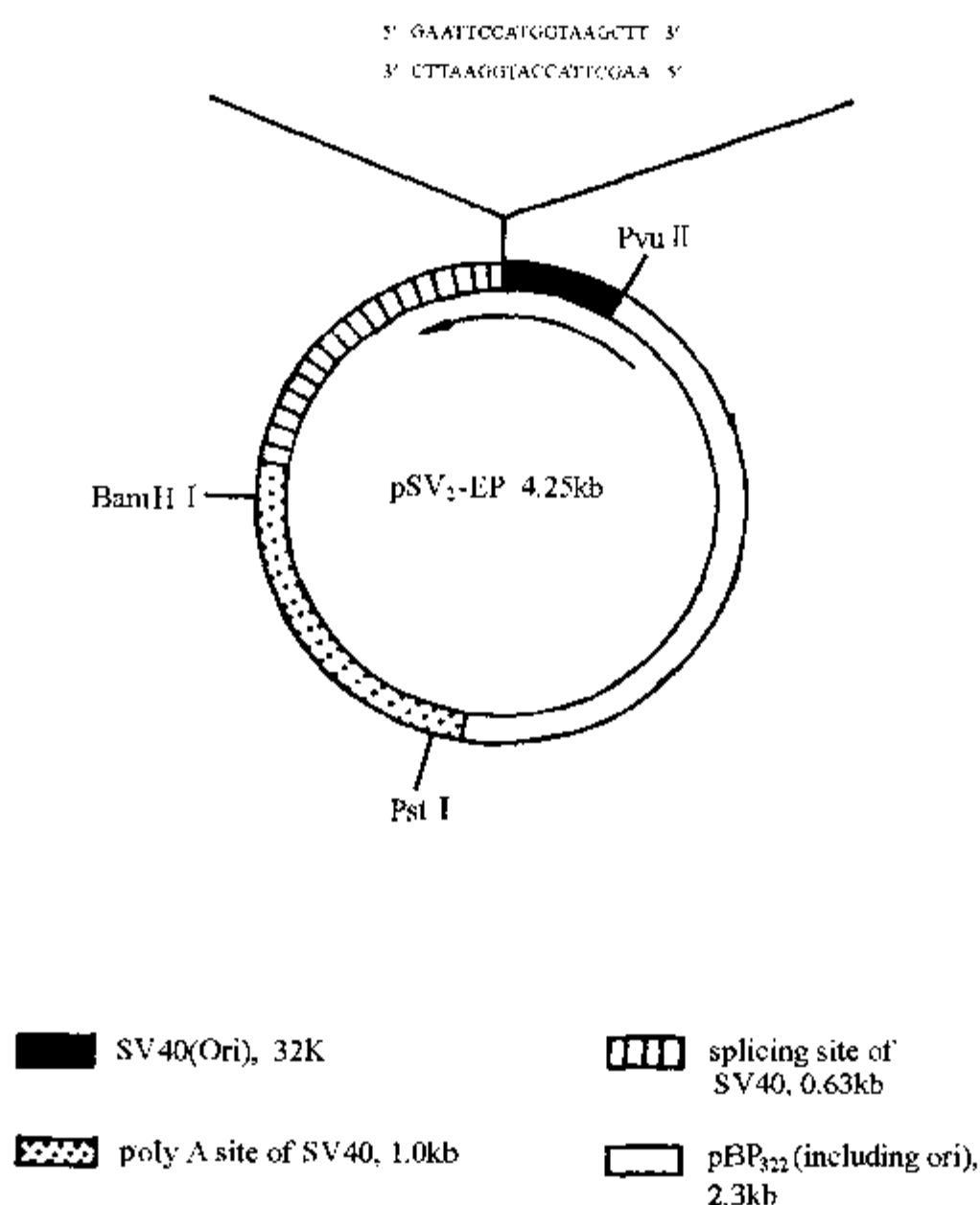


图 13-3 真核表达载体 pSV2-EP 图谱

13.2.2.2 痘苗病毒载体

痘苗病毒 (vaccinia virus) 与天花病毒 (variola virus) 的亲缘关系十分密切。当人们接种痘苗病毒后, 可获得对天花的高度免疫性。在 DNA 重组技术发展之后不久, 曾有人将外源 DNA 片段插入到痘苗病毒的基因组中, 得到了具有生物活性的重组病毒。根据这一发现, 人们就设想构建表达多种病原体抗原的重组痘苗病毒。作为预防这些病原体感染的活疫苗。痘苗病毒不依赖于寄生细胞的机理, 能独立地在细胞中进行复制和转录。与此相适应的是, 痘苗病毒的基因组 DNA 的分子量就相当大, 达 180kb, 操作不方便。由于它寄生范围广泛, 且可作为预防天花的疫苗, 对其基础生物学已有较详尽的了解, 这些优点, 使痘苗病毒具有用作克隆载体的良好条件。

13.3 外源 DNA 导入哺乳动物细胞的方法

当一个基因被克隆之后, 研究者们总是希望把其导入各种不同类型的细胞, 以便进行其它方面的研究, 如基因调控、基因表达、以及分离特定的蛋白质产物等。所有这些目的, 都必须具有将 DNA 有效地导入细胞的能力。

13.3.1 磷酸钙转染技术

原理:

通过形成一种 DNA - 磷酸钙沉淀物, 使之粘附到培养的哺乳动物单层细胞表面, 就会迅速地被细

胞所捕获。

操作过程:

(1) 溶液的配制:

1) $2 \times$ HEPES - buffered saline (HeBs)

50mmol/L HEPES

280mmol/L NaCl

0.75mmol/L Na_2HPO_4

0.75mmol/L NaH_2PO_4

取 HEPES 2.98g, NaCl 4.1g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.067g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.029g

溶于 245ml 水中, 用 1mol/L NaOH 调 pH 值至 6.7 用 $0.22\mu\text{m}$ 的滤膜过滤除菌, 分装, -20°C 保存。

2) 2mol/L CaCl_2

微滤膜过滤, 分装, -20°C 保存。

3) DNA 溶液:

DNA 溶于 $0.1 \times \text{TE}$ (1mmol/L Tris·Cl pH8.0, 0.1mmol/L EDTA) 浓度为 $0.5 \sim 1.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 。为了获得高转化效率, 质粒 DNA 应该用氯化铯密度梯度离心进行纯化。如果用于转化的 DNA 量比较小, 可加介导 DNA (carrier DNA)。一般用鲑鱼精子 (salmon sperm) DNA 作为介导 DNA。

(2) 细胞于转化前 24 小时传代: 吸去旧培养基, 加 $2 \sim 3\text{ml}$ $1 \times$ 胰酶消化液, 室温下 $3 \sim 5$ 分钟。随时在显微镜下观察, 当细胞皱缩变圆时, 吸去消化液, 加 3ml 完全培养基, 用吸管轻轻吹打细胞, 使其悬浮, 按所需量吸取细胞悬液 [$(1 \sim 2) \times 10^5$ cells/66mm 培养基], 放入一新的培养皿, 加培养基 5ml 37°C $5\% \text{CO}_2$ 培养, 待细胞密度达 $50\% \sim 75\%$ 满底时即可进行转化。

$1 \times$ 胰酶消化液:

NaCl 8g

KCl 0.2g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g

KH_2PO_4 0.2g

Trypsin (胰酶) 1.0g

加水至 1000ml , 用 $0.22\mu\text{m}$ 或 $0.4\mu\text{m}$ 的微量滤器过滤除菌, 4°C 保存备用。

(3) 向一透明玻璃管中加入: $417.5\mu\text{l}$ 水, $62.5\mu\text{l}$ 2mol/L CaCl_2 , $10\mu\text{l}$ 鲑鱼精液 DNA ($1 \sim 2\mu\text{g}/\mu\text{l}$), $10\mu\text{l}$ 重组质粒 DNA ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 充分混匀。在强烈振动下向上述 DNA 液中缓慢加入 $500\mu\text{l}$ $2 \times$ HeBs 液 (约需 30 秒加完)。

(4) 静止玻璃管, 约 5 分钟出现轻度混浊, 浊度越来越深, 大约在 $20 \sim 30$ 分钟时, 出现细小颗粒, 即可进行下一步。

磷酸钙颗粒状态的判定: 将试管对着光线观察, 见溶液呈混浊状态、略带白色, 但肉眼又看不到颗粒, 在高倍显微镜下则可见均匀的细小颗粒。此时的颗粒为比较理想的状态。如果用肉眼即能看到颗粒, 则说明所形成的颗粒太大; 如果 20 分钟以后溶液仍然透明, 则说明无颗粒形成或所形成的颗粒太小。

(5) 充分混匀上述 DNA 沉淀液, 取 0.5ml 加入待转化细胞的培养基中, 轻轻地摇动, 使其均匀, 此时培养其变为橘黄色; 另一种方法是除去培养皿内的培养基, 取 0.5ml DNA 沉淀液逐滴加到细胞表面, 室温下静置 $20 \sim 30$ 分钟, 然后再加入 5ml 培养基。 37°C $5\% \text{CO}_2$ 孵箱培养。

(6) 培养 24 ~ 60 小时, 可进行瞬时表达的检测, 或用适当的选择培养基进行稳定转化克隆的筛选。

(7) a. 瞬时表达: 转化后 48 ~ 60 小时, 提取细胞 RNA 或 DNA 进行杂交分析; 要检测新产生的蛋白质, 可用放射免疫测定法, Western blotting、免疫沉淀法等进行分析。

b. 稳定转化克隆的筛选: 转化后用非选择培养 18 ~ 24 小时, 使转化的外源基因得以表达。胰酶消化, 按 1:15 ~ 20 稀释传代, 换用适当的选择培养基继续培养, 以后每隔 2 ~ 4 天换一次选择培养基。10 ~ 14 天出现细胞克隆。

(8) 在显微镜下选出生长状态良好的细胞克隆。将旧培养基弃去, 加胰酶消化液消化 5 分钟, 吸去消化液。用一玻璃吸管首先吸少许培养基, 对准欲挑选的细胞克隆, 轻轻吹吸 3 ~ 5 次, 将其转入 24 孔板内, 如此反复 2 ~ 3 次, 尽量将细胞克隆的所有细胞都吸出。待孔底长满细胞后, 转入较大的培养瓶内扩大培养。当细胞长至足够量 ($10^7 \sim 10^8$) 时即可进行 DNA、RNA 的杂交分析和表达蛋白质的检测。

注意事项:

(1) HEPES 液 pH 值可明显地影响沉淀颗粒的形成。偏酸时不形成颗粒, 偏碱时则形成大块状颗粒, 这两种情况均导致转染失败。所以一定要预先调节 HEPES 液的 pH 值 (用 1.0mol/L NaOH 调节), 边调节, 边观察形成颗粒的状态, 直至形成的颗粒状态最佳 (20 分钟后形成细小颗粒) 时, 才可进行正式的转染实验。

(2) 一定要在强度振荡下缓慢加入 HEPES 液, 否则将形成大块状颗粒。

13.3.2 电穿孔转染技术

原理:

电穿孔 (electroporation) 是指在高压电脉冲的作用下使细胞膜上出现微小的孔洞, 导致不同细胞之间的原生质膜发生融合作用的过程。后来发现, 电穿孔也可以促使细胞吸收外界环境中的 DNA 分子。在微孔开启期间, 细胞外界环境中的 DNA 分子便会穿孔而入, 并最终进到细胞核内部。

操作过程:

(1) CHO 细胞在 10% DMEM 培养基生长至 50% ~ 75% 满底。

(2) 胰酶消化收集细胞, 用预冷的电穿孔缓冲液冲洗两次, 然后将细胞重新悬浮在该缓冲液中, 使细胞的终浓度为 $(0.5 \sim 1.0) \times 10^7$ 个细胞/ml。

有 3 种缓冲液供选用:

a. Dulbecco phosphate buffered saline (不含 Ca^{2+} 或 Mg^{2+})

b. Phosphate buffered sucrose (272mmol/L 蔗糖, 7mmol/L 磷酸钠 pH7.4, 1mmol/L MgCl_2)

c. Hamm's F12 培养基 (不含小牛血清或抗生素)

(3) 取 0.8ml 细胞悬液放入 0.4cm 的 gene pulser cuvette 中, 取 2.5 ~ 40 μg 线性化的 pSVneo 载体加入细胞悬液中, 充分混合, 冰浴中放置 10 分钟。

(4) 将 gene pulser cuvette 放在电脉冲仪的正负极之间, 电击一次。电击条件为:

1) electroporation in PBS:

电容: 25 μF

电压: 100 ~ 1 600V (250 ~ 4 000V/cm)

2) electroporation in phosphate buffered sucrose:

电容: 25 μF

电压: 100 ~ 1 000V (250 ~ 2 500V/cm)

3) electroporation in hamm's F12:

电容: 960 μF

电压: 250 ~ 450V (625 ~ 1 125V/cm)

(5) 电击后将电转杯放入冰浴中 10 分钟。

(6) 用适当的完全培养基稀释细胞, 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养。以下步骤同磷酸钙操作过程 (6)、(7)、(8)。

注意事项:

(1) 电击的最大电压和电击持续时间是影响转染效率的 2 个主要因素。电压太小和/或持续时间太短, 则转染效率太低; 如果电压太大和/或持续时间太长, 则电击后细胞不能存活。所以一定要反复试验找出最佳电压及持续时间。

(2) 细胞: 细胞类型、生长速率及生长期均影响电转效率。生长快的细胞比生长慢的细胞转化效率高。细胞处于有丝分裂期时更易感受外源 DNA。

(3) 电转缓冲液对细胞的影响:

1) 缓冲液的电阻影响电击时间。

2) 渗透压影响细胞的脆性。

3) 缓冲液的成分, 如二价阴离子, 影响细胞膜的稳定性。

4) 缓冲液中的某些成分能进入可透性细胞, 对细胞产生不良影响。

(4) DNA: DNA 的状态也影响电转效率, 要使外源 DNA 整合到细胞染色体中, 最好用线性化 DNA。因为线性化 DNA 有较高的重组机率; 瞬时表达时用环状 DNA 即可。

DNA 浓度在 2 ~ 40 μg/ml 范围内时, 当 DNA 的浓度增加, 转化效率也增加。作稳定表达时, DNA 浓度为 2 ~ 10 μg/ml 即可, 而某些瞬时表达系统则需 20 ~ 40 μg/ml。介导 DNA (如鲑鱼精液 DNA) 的使用, 也能增加转化效率。

(5) 温度: 一般来说, 在电击前及电击后将细胞置冰浴 10 分钟是必需的。但也有报道某些类型细胞在室温下也可获得较高的转化率。

13.3.3 基因显微注射技术

见本书“转基因动物”。

13.3.4 脂质体载体法

脂质体 (liposomes) 是一种人造膜, 制备包装 DNA 的脂质体, 一般是用逆相蒸发 (reverse phase evaporation) 技术, 因为此法可产生大型的、包装着高效 DNA 的单层膜脂质体载体。采用敏感的噬菌斑及荧光测定法, 检测脂质体载体将外源 DNA 导入哺乳动物细胞的能力。发现包装成脂质体的 SV40DNA 的感染性, 至少要比其裸露 DNA 的高出 100 倍, 但比 DEAE-葡聚糖法则低得多。虽然细胞在加入脂质体之后, 用高浓度的聚乙二醇 (PEG) 或甘油处理, 可使脂质体 DNA 感染性提高 10 ~ 20 倍, 而与 DEAE-葡聚糖法相比至少还要低 10 倍。尽管脂质体载体法的转染率相对低于其它方法, 但这并不妨碍它在哺乳动物基因转移中的实用价值。因为它有许多优点。例如制备程序比较简单, 可以通过多聚碳酸酯滤膜 (polycarbonate filter) 消毒灭菌, 用它包装的 DNA 在 4℃ 可长期保存不失活性, 以及毒性低, 包装容量大, 可保护 DNA 免受核酸酶的降解作用等等。以脂质体为载体的基因转移过程通常是先用 PEG 处理培养的动物细胞, 使之易于吸收周围培养基中的脂质体。正常情况下, 每个细胞平均可吸收 1 000 个左右, 若加甘油或 DMSO 等促进因子, 吸收量还要增多。

操作过程:

(1) 在 PBS 中将 DNA 稀释到 50 ~ 500 μg/ml。

(2) 在一个试管中按摩尔比 1:1 混合磷脂酰丝氨酸和胆固醇, 用减压旋转蒸发法蒸发溶剂。

(3) 将上述两种混合好的脂溶于乙醚, 浓度为 10 μmol/L, 将 1ml 这种脂溶液与 0.33ml DNA 溶液混合。

(4) 对混合后的两相混合物用超声波处理 10 秒钟 (500 毫秒脉冲频率), 从而形成 1 个单相的分散体系。

(5) 用减压旋转蒸发法除去乙醚, 试管中留下均一的脂质体悬浮液, 以 40 000r/min 离心 30 分钟收集脂质体。上清液中通常含有未被包埋的 DNA, 可以用乙醇沉淀回收。因此可以计算出脂质体的包埋效率 (一般为 10% ~ 20%)。

(6) 将脂质体重新悬浮于 1ml PBS 中, 加入 50 μ g DNase I, 室温下 1 小时。这一步可使脂质体与游离的 DNA 更好地分离。

(7) 用 PBS 平衡的 Sepharose 4B 层析柱分离脂质体与消化的 DNA。在 280nm 检测 DNase I 消化的 DNA 与脂质体的分离。4 $^{\circ}$ C 条件下, 包埋 DNA 的脂质体可保存一个月左右。

(8) 转化前 24 小时对细胞传代, 接种数以 5×10^5 细胞/10cm 细胞培养皿为宜。

(9) 转化前, 吸去培养基, 并用无血清培养基混合, 浓度为 10 ~ 500nmol/L 磷脂培养基将 1ml 含脂质体培养液直接加到培养皿的细胞上, 37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟。

(10) 吸去培养基, 加含 25% DMSO 的培养基作用 4 分钟。用无血清培养基洗 2 次, 在完全培养基中培养 24 小时后即可换用选择培养基。

13.3.5 DEAE - 葡聚糖转染技术

二乙胺乙基葡聚糖 (diethyl - aminoethyl - dextran, DEAE - dextran) 是一种高分子量的多聚阴离子试剂, 能促进哺乳动物细胞捕获外源 DNA。因此被用于基因转染技术。其促进细胞捕获 DNA 的机理还不清楚, 可能是因为葡聚糖与 DNA 形成复合物而抑制了核酸酶对 DNA 的作用, 也可能是葡聚糖与细胞结合而引发了细胞的内吞作用。DEAE - dextran 与磷酸钙共沉淀法比较有 3 点不同: ①它一般用于克隆基因的瞬时表达, 不易形成稳定转化细胞系; ②由于它对细胞有毒性作用, 所以, 某些细胞系 (如 BSC - 1, CV - 1, COS 等) 用该转染技术时转染效率很高, 而其它类型的细胞则效率不满意; ③DEAE - dextran 可用于转染小量 DNA。

DEAE - dextran 转染主要有 2 种不同的方法。一种是先使 DNA 直接同 DEAE - dextran 混合, 形成 DNA/DEAE - dextran 复合物后, 再用来处理细胞; 另一种是受体细胞先用 DEAE - dextran 溶液预处理, 然后再用来与转染的 DNA 接触。

影响 DEAE - dextran 转染效率的因素主要有 2 个: ①DEAE - dextran 的浓度; ②DEAE - dextran 处理细胞的时间。一般用高浓度 (1mg/ml) 短时间 (30 分钟到 1.5 小时); 或用低浓度 (250 μ g/ml) 长时间 (8 小时) 两种方法来进行转染。由于 DEAE - dextran 对细胞有毒性, 所以采用低浓度长时间的方法比较可靠。

操作过程:

(1) 溶液的配制:

50mg/ml DEAE - dextran:

取 100mg DEAE - dextran ($M_r = 500\ 000$; Pharmacia) 溶于 2ml 水中, 高压灭菌。

TBS - D 的配制:

先配 TBS 液, 取 8g NaCl, 0.2g KCl, 3g Tris 溶于 800ml 水中, 用 HCl 调 pH 值为 7.4, 加水至 1 000ml, 高压灭菌。

在临用前加 20% (W/V) 的右旋糖溶液至 TBS 液中, 使其终浓度为 0.1%。

(2) 转化前 24 小时细胞应传代 1 次, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养, 待细胞达 50% ~ 75% 满底时即可转化。

注意: 如果传代后细胞生长不足 12 小时即进行转化, 则细胞贴壁不好, 在 DEAE - dextran 作用时, 细胞容易丢失。

(3) DNA/DEAE - dextran/TBS - D 溶液的准备。

加质粒 DNA 和 50mg/ml DEAE - dextran 液至 TBS - D 溶液中, 使 DNA 的终浓度为 $0.1 \sim 4\mu\text{g}/\text{ml}$, DEAE - dextran 的终浓度为 $1.0\text{mg}/\text{ml}$ 。

(4) 吸去培养皿内的旧培养基, 用预热的 PBS 及 TBS - D 各洗 1 次。

(5) 向培养皿内加 DNA/DEAE - dextran/TBS - D 溶液 (60mm 培养皿加 $250\mu\text{l}$, 35mm 的加 $150\mu\text{l}$), 轻轻摇动使所有细胞都接触到溶液, 放回孵箱 30 ~ 90 分钟 (时间的长短取决于每种细胞对 DEAE - dextran 的敏感性)。每隔 15 分钟摇动 1 次培养皿, 并在显微镜下观察细胞的形态。如果细胞仍然贴壁则继续孵育, 当细胞皱缩变圆时进行下一步。

(6) 吸去 DNA/DEAE - dextran/TBS - D 溶液, 用预热的 TBS - D 和 PES 各洗 1 次, 一定注意不要将细胞吹起。

(7) 用无血清培养基洗 3 次, 最后加完全培养基, 于 37°C 5% CO_2 孵箱中培养 24 ~ 60 小时。以下操作过程同磷酸钙法的 (7) 和 (8)。

13.4 基因表达产物的检测

一种克隆的外源基因, 是否能够在新宿主细胞中有效地表达, 需要通过一定的实验才能作出正确的判断。如果我们事先已经知道克隆基因编码的蛋白质或 RNA 种类, 就能够据此设计出适当的实验, 检测基因在新宿主中的表达情况。例如, 化学合成的激素和胰岛素基因, 可用敏感的放射免疫测定法检测; 5SRNA 可用适当的探针进行杂交检测; 对于某些酶产物, 可以通过同适当的营养缺陷突变型宿主间的互补作用予以检测。

13.4.1 免疫荧光抗体法检测表达蛋白

此法方便易行, 无需特殊仪器, 无需进行蛋白质的提取, 适用于蛋白质的定性研究。

操作过程:

(1) 取干净盖玻片 ($22\text{mm} \times 30\text{mm}$), 放入 75% 乙醇浸泡 1 小时, 取出玻片于酒精灯上烤干, 用 DMEM 培养基漂洗数次, 放入 $35\text{mm} \times 10\text{mm}$ 的细胞培养皿内, 将待检细胞株传入该平皿。

(2) 待盖玻片上长满细胞后, 取出玻片, 用 PBS (每升含: NaCl 8g, KCl 0.2g, Na_2HPO_4 1.15g, KH_2PO_4 0.2g) 洗 3 次, 每次 3 分钟。

(3) 将盖玻片浸入丙酮内固定 3 ~ 5 分钟, PBS 洗 3 次。

(4) 细胞与第一抗体反应: 第一抗体用被检蛋白的单克隆抗体或多克隆抗体, 所用抗体的量由预实验来定。首先在 Parafilm 膜上加 $30 \sim 50\mu\text{l}$ 稀释的第一抗体溶液, 将盖玻片有细胞的一面向下盖在第一抗体上, 密封于一定湿度的小盒中, 于 37°C 孵箱中孵育 1 小时, PBS 洗三次, 每次 3 分钟。

(5) 与第二抗体反应: 第二抗体可选用葡萄球菌 protein A - EITC 或抗鼠 Ig 标记荧光素。稀释度以 1:100 ~ 1000 比较合适。操作与 (4) 相同, 37°C 孵育 1 小时, PBS 洗 3 次, 每次 5 分钟。

(6) 用 60% 的甘油将盖玻片封在载玻片上立刻用荧光显微镜观察, 照像。

注意事项:

(1) 固定细胞时可用丙酮或丙酮/甲醇 (1/1、V/V): 当用丙酮固定时, 细胞缩为圆形, 荧光染色在细胞浆内, 细胞核无荧光染色; 当用丙酮/甲醇固定时, 细胞维持原状, 但有时核仁也有染色, 这可能是非特异性吸附, 所以, 一般来说, 丙酮固定效果要好一些。

(2) 为保持结果的可靠性, 要作一些对照实验。阴性对照可将第一抗体换为其它的无关抗体, 去掉第一抗体, 以及将被检细胞换为未经转染的正常宿主细胞。

(3) 由于荧光素在自然光线下易于褪色, 所以, 实验结果要立刻进行观察, 照像。若要保存, 可将玻片包在黑纸内, 置 4°C 冰箱, 可保存 1 周左右。

13.4.2 免疫沉淀法检测表达蛋白

免疫沉淀法可用于检测并定量分析多种蛋白质混合物中的靶抗原。这种方法很敏感,可检测出 100pg 的放射性标记蛋白。当与 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳并用时,即可用于分析外源基因在原核和真核宿主细胞中的表达情况。

放射性标记靶蛋白的免疫沉淀以及其后的分析包括下列几个步骤:①靶蛋白的放射性标记;②裂解细胞;③特异性免疫复合物的形成;④免疫复合物的收集及纯化;⑤放射性标记蛋白质的免疫沉淀分析。

13.4.2.1 靶蛋白的放射性标记

用于标记蛋白质的放射性同位素通常是 ^{35}S ,其半衰期为 87.1 天,同位素是以 ^{35}S -标记蛋氨酸或 ^{35}S -蛋氨酸和半胱氨酸,这些氨基酸是哺乳动物细胞的必需氨基酸,必须由培养基中提供。因此,培养的哺乳类细胞的放射性标记就可以通过将细胞培养在含 ^{35}S -蛋氨酸或同时含 ^{35}S -蛋氨酸和 ^{35}S -半胱氨酸的培养基中进行。

培养基中含有高浓度的蛋氨酸和半胱氨酸,为了增加同位素标记氨基酸的掺入率,可去除培养基中的蛋氨酸或同时去除蛋氨酸和半胱氨酸。同位素标记的强度取决于被检蛋白的合成速度和其氨基酸的组成,以及该蛋白质的代谢速度。

操作过程:

(1) 吸去培养基,用不含蛋氨酸和血清的培养基 (Med-AA) 洗 2 次。

(2) 于 Med-AA 中 37℃ 培养 20 分钟以耗尽细胞内的含硫氨基酸。

(3) 吸去 (Med-AA), 立刻换含适当量 ^{35}S -标记氨基酸的 Med-AA, 按所需时间于 37℃ 中培养。

在短期标记 (小于 1 小时) 中,为了增加同位素标记氨基酸的浓度,应使培养基的体积尽可能的小,下列是一个参考值:

培养基体积	培养皿的大小 (mm)
1.0ml	90
150 μl	60
100 μl	35

每隔 15 分钟轻轻摇动一下培养皿,以免细胞干燥。当进行较长时间的标记 (大于 6 小时) 时,培养基中的所有同位素标记氨基酸都要耗尽,因此有必要补充相应的非同位素标记氨基酸以保持细胞的正常生长。通常情况下加 1/10 体积的完全培养基即可。

(4) 吸去含有同位素的培养基。如果只检测菌胞内的抗原,则弃去含同位素的培养基;如果被检抗原是分泌型蛋白质,则留下培养基进行免疫沉淀。

(5) 用冰冻的 PBS 洗 2 次细胞,尽量吸去残留的 PBS, 然后即可进行细胞裂解。

13.4.2.2 裂解细胞

用于提取哺乳类细胞蛋白质的裂解缓冲液有以下几种,在不清楚被检蛋白质性质的情况下,一般用第一种和第二种缓冲液。

50mmol/L Tris·Cl (pH8.0):

150mmol/L NaCl

0.02% 叠氮钠

0.1% SDS

100 $\mu\text{g/ml}$ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

1 μ g/ml aprotinin
 1% NP-40
 50mmol/L Tris·Cl (pH8.0):
 150mmol/L NaCl
 0.02%叠氮钠
 100 μ g/ml PMSF
 1 μ g/ml aprotinin
 1% Triton X-100 或 1% NP-40
 50mmol/L HEPES
 500mmol/L NaCl
 1% NP-40
 1 μ g/ml aprotinin
 100 μ g/ml PMSF
 50mmol/L HEPES (pH7.0):
 1% NP-40
 1 μ g/ml aprotinin
 100 μ g/ml PMSF

操作过程:

(1) 向培养皿中加入裂解缓冲液, 冰浴 20 分钟。下列数值可作参考:

裂解缓冲液的体积 (ml)	培养皿大小 (mm)
1.0	90
0.5	60
0.25	30

(2) 用橡皮刮子刮下培养皿中的细胞, 将裂解缓冲液及细胞碎片吸入一预冷的微量离心管中。

(3) 于 4℃ 下 10 000r/min, 离心 2 分钟。

(4) 将上清液吸入一新的微量离心管中, 保存于 4℃ 或 -70℃。

注意事项:

(1) PMSF (一种蛋白酶抑制剂) 对呼吸道粘膜、眼睛及皮肤等极具毒性, 如果被吸入或接触到皮肤, 应立刻用水冲洗。由于 PMSF 在水溶液中不稳定, 所以要在临用前再加入裂解缓冲液中。其贮备液为 17.4mg PMSF/ml 异丙醇, 保存于 -20℃。

(2) 上述步骤均应在冰冷的条件下进行, 以免蛋白酶抑制剂失活而导致蛋白质的降解。

13.4.2.3 抗原-抗体复合物的形成及收集

将被检蛋白的特异性抗体加入上述细胞裂解液中, 所形成的抗原-抗体复合物可通过下列几种方法收集:

(1) 用耦联葡萄球菌蛋白 A 和 Sepharose (蛋白质 A-Sepharose) 进行吸附: 这种方法的结果清晰, 因为蛋白质 A-Sepharose 与无关蛋白质几乎不发生非特异性吸附。但是这种方法成本高, 并且所需抗体有种系特异性的限制。

(2) 用经热致死并经甲醛固定的 *S. aureus* 细胞进行吸附: 这种方法背景高, 但较蛋白质 A-Sepharose 法经济。

(3) 用抗被检蛋白抗体的抗体进行吸附, 这种方法用于下列两种情况: ①第一抗体的 FC 不能被葡萄球菌蛋白质 A 识别; ②对被检蛋白进行定量分析时。

操作过程:

(1) 将上述细胞裂解液等分放入两支微量离心管中, 用 NET - gel buffer 调节体积使其为 0.5ml, 向一个管中加被检蛋白的特异抗体, 向另一个管中加入无关的单克隆抗体。在 0℃ 下轻轻地摇动 1 小时。

NET - gel buffer:

50mmol/L Tris·Cl (pH7.5)

150mmol/L NaCl

0.1% NP - 40

1mmol/L EDTA (pH8.0)

0.25% 白明胶

0.02% 叠氮钠

抗体的用量取决于抗原的浓度及抗体的滴度。一般来说对转染的哺乳类细胞提取液进行免疫沉淀时, 需要 0.5 ~ 5μl 多克隆抗血清或 5 ~ 100μl 杂交瘤组织培养液或 0.1 ~ 1.0μl 腹水。如果抗体的用量过多, 则增加非特异性的背景。

用 NET - gel buffer 稀释细胞抽提液可降低非特异的背景, 但表面活性剂浓度过高则导致蛋白质的部分变性或降解。

(2) 如果被检蛋白抗体不能有效地与蛋白质 A 结合, 可加适当量的抗免疫球蛋白抗体, 并继续在 0℃ 下轻轻地摇动 1 小时。

(3) 向抗原 - 抗体混合液中加入蛋白质 A - Sepharose 于 4℃ 下轻轻地摇动 1 小时。

所需蛋白质 A - Sepharose 的量应作预试验来确定, 一般来说, 1ml 包装的已膨胀的蛋白质 A - Sepharose 至少能结合 20mg 的 IgG; 1ml 标准的 10% 悬浮的 *S. aureus* 细胞能结合 1mg 免疫球蛋白。

(4) 于 4℃ 下离心 1 分钟, 10 000r/min, 吸去上清液, 加 1ml 洗涤 buffer 重悬 Separose, 共洗 3 次, 前两次用 NET - gel buffer 洗, 最后用 10mmol/L Tris·Cl (pH7.5) 0.1% NP - 40 洗 1 次。

(5) 于 4℃ 下振荡 20 分钟, 离心 10 000r/min, 弃上清液。

(6) 向沉淀中加 30μl IX SDS gel - Loading buffer

IX SDS gel - Loading buffer:

50mmol/L Tris·Cl (pH6.8)

100mmol/L dithiothreitol

2% SDS

0.1% 溴酚蓝

10% 甘油

(7) 100℃ 加热 3 分钟, 离心, 10 000r/min, 收集上清液至一新管中。

(8) 标记蛋白质的放射自显影分析

将上述收集的上清液进行 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 干胶; 压片; 放射自显影。详细操作过程见本书其它有关章节。

13.4.3 Western 印迹检测表达蛋白质

Western Blotting 是 70 年代末 80 年代初, 在蛋白质凝胶电泳和固相免疫测定的基础上发展起来的, 它结合了凝胶电泳分辨力高和固相免疫测定的特异敏感等多种优点, 与免疫沉淀法比较, 这种方法无需对靶蛋白进行同位素标记。Western blotting 具有从混杂抗原中检测出特定抗原, 或从多克隆抗体中检测出单克隆抗体的优越性, 还可以对转移到固相膜上的蛋白质进行连续分析, 具有蛋白质反应均一性, 固

相膜保存时间长等优点, 因此该技术被广泛地用于蛋白质研究, 基础医学和临床医学的研究。

13.4.3.1 哺乳细胞的裂解

(1) 用 PBS 洗 2 次细胞, 加 $1 \times$ SDS 加样缓冲液 (50mmol/L Tris·Cl pH6.8, 100mmol/L 二硫苏糖醇, 2% SDS, 0.1% 溴酚蓝, 10% 甘油) 至培养皿中, 用橡胶刮子刮下细胞, 由于染色体 DNA 的释放, 使溶液变得很粘稠, 将细胞裂解液吸入一微量离心管中。

(2) 沸水煮 5~10 分钟。

(3) 用超声波打碎染色体 DNA, 直至溶液不粘为止。

(4) 室温下离心 10 分钟, 10 000r/min, 取上清液至 1 个新的离心管中。

(5) 如果条件允许, 测定蛋白质的浓度。

Western blotting 检测蛋白的敏感性为 1~5ng, 0.75mm 厚的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶的一个孔大约能上 100 μ g 的总蛋白。所以, 只要被检蛋白占总蛋白量的 $1/10^5$, 即可被检测出来。如果所分析的样品为未知时, 应同时作阳性对照。

(6) 对上述细胞抽提液进行 SDS-PAGE 分析 (详细步骤见有关章节)。

13.4.3.2 蛋白质的电转移

很多膜可作为蛋白质电转移的固相支持物, 如重氮化纤维素膜 (DTP, DBMO), 离子交换纸 (DE-AE-纤维素), 阳离子化尼龙膜等, 但目前在 Western 印迹中, 最常用的还是硝酸纤维素膜 (NC 膜), 它与蛋白质以共价键结合, 其结合与疏水作用有关, 结合能力为 80 μ g/cm², 与其它膜相比, 不要预先活化, 对转移物质生物活性影响较小, 能应用多种阳离子染料染色, 非特异性的显色浅, 来源较方便、价格也较低。但转移的小分子蛋白洗涤过程中易于丢失, 应予以注意。

操作过程:

(1) 剪 6 块 3MM 滤纸和一块硝酸纤维素膜, 其大小应与 SDS-凝胶的大小相同。如果纸或膜比凝胶大, 在转移过程中会形成短路。这将影响蛋白质的转移。

注意: 当用手触摸胶, 3MM 滤纸及纤维素膜时均应戴手套, 因为皮肤上的油和分泌物会影响蛋白质从胶上转移到膜上。

(2) 将剪好的 3MM 滤纸及纤维素膜在转移缓冲液中浸泡 3~5 分钟。

转移缓冲液: 48mmol/L Tris·Cl

39mmol/L 甘氨酸

0.037% SDS

配制 1 000ml 转移缓冲液 (pH8.3): 取 2.9g 甘氨酸, 5.8g Tris, 0.37g SDS, 加水至 1 000ml。

(3) 按下列过程安装转移装置:

1) 将塑料支架平放在含有转移缓冲液的托盘中, 在塑料支架上放一块海绵。

2) 将 3 块 3MM 滤纸对齐放在海绵上, 依次放置纤维素膜、凝胶。另外 3 块 3MM 滤纸及海绵。在放置每一层时, 均要去除它们之间的气泡, 若有气泡残留, 则影响转移效果。

3) 最后用塑料支架夹紧上述各层, 放入电转移槽内, 注意纤维素膜一侧靠正极, 胶一侧靠负极;

(4) 接通电源, 电压 40V 电流 0.17~0.2A, 转移 1.5~6 小时, 转移时间可根据靶蛋白的大小来定, 蛋白质分子量小则需时短, 蛋白质分子量大需时长。

(5) 转移结束后, 取出塑料支架, 依次去掉各层, 用铅笔在膜的上缘作好标记, 切下其中一个孔所对应膜的 1/2, 用氨基黑染色 30 秒, 10% 乙酸脱色, 检查转移是否完全; 也可将转移后的凝胶作考马斯亮蓝染色来检查转移效果。

(6) 将其余的纤维素膜放在一张干净的 3MM 滤纸上, 室温下干燥 30~60 分钟。

干燥可使蛋白质更牢固地结合在膜上, 但是干燥也可能会导致蛋白质的更进一步变性从而影响其免疫反应性。

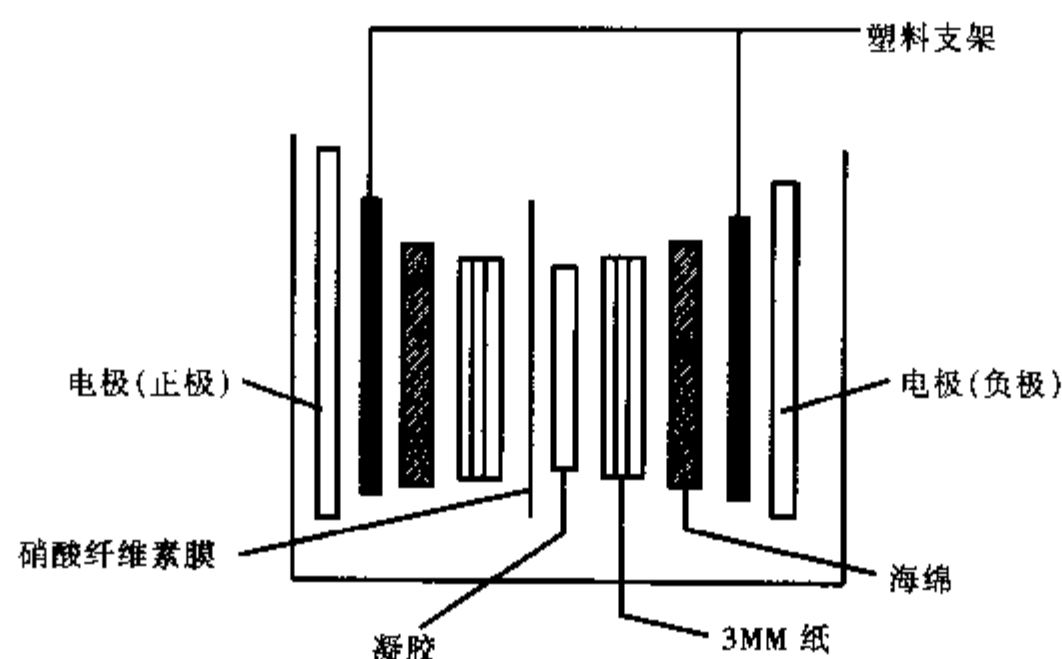


图 13-5 电转移装置示意图

13.4.3.3 封闭

免疫试剂中作为探针的蛋白质（抗体）如同电转移中蛋白质能结合到硝酸纤维素膜上一样，也能结合到纤维素膜上。Western blotting 的敏感性取决于对一些无关蛋白质的潜在结合位点的封闭。一般用去脂奶粉封闭最好，也可用血清白蛋白。

将硝酸纤维素膜放在一平皿中，加封闭液（其量以浸过膜即可）。室温下轻轻振荡 2~3 小时。

封闭液：1%（W/V）去脂奶粉，溶于 PBS 中

0.01% antifoam A

0.02% 叠氮钠

如果非特异背景仍然很高，可向封闭液中加入 Tween 20 使其终浓度为 0.02%，通常情况下 Tween 20 的存在并不影响抗体与靶抗原的结合。

13.4.3.4 靶蛋白与第一抗体反应

（1）第一抗体溶液的配制：用封闭液稀释第一抗体。抗体的稀释度要由预实验来定，下列数值可作为参考

多克隆抗体：1:100 到 1:5 000

培养的杂交瘤细胞上清液：可稀释到 1:100

小鼠腹水：1:1 000 到 1:10 000

（2）封闭结束后，将纤维素膜放入一塑料袋中，按每平方厘米膜加 0.1ml 第一抗体溶液，去除袋内的所有气泡，用封膜机封上开口，4℃下轻轻振荡 2 小时。

据报道，在室温下延长孵育时间可增加靶蛋白的检出率，但同时也增加了非特异性结合的背景。

（3）剪开塑料袋，弃去反应液，用 PBS 洗 3 次，每次 10 分钟。

13.4.3.5 与第二抗体反应

一般所用的第二抗体（抗免疫球蛋白或蛋白质 A）为酶标抗体，如辣根过氧化物酶标抗体或碱性磷酸酶标抗体。

（1）将膜从 PBS 中转入 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris·Cl (pH7.5) 的溶液中，室温下轻轻振荡 10 分钟。

该步骤目的是去除纤维素膜上的磷酸及叠氮钠。

（2）将膜放入一塑料袋中，加第二抗体溶液，每平方厘米膜加 0.1ml。

第二抗体溶液：

将酶标抗体用下述溶液稀释：

1% (W/V) 去脂奶粉

150 mmol/L NaCl

50 mmol/L Tris·Cl (pH7.5)

第二抗体的稀释度一般为: 1:200 到 1:2 000

(3) 封好塑料袋, 在室温下轻轻振荡 1 小时

(4) 取出纤维素膜于 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris·Cl (pH7.5) 溶液中冲洗 3~5 次, 每次 10 分钟。

13.4.3.6 显色

1. 碱性磷酸酶:

(1) 溶液的配制:

取 0.5g NBT (氮蓝四唑 nitroblue tetrazolium) 溶于 10 ml 70% 的二甲基甲酰胺中。

取 0.5g BCIP (5' - bromo - 4 - chloro - 3 - indoxyl phosphate) 溶于 10ml 100% 二甲基甲酰胺中。

碱性磷酸酶缓冲液

100 mmol/L NaCl

5 mmol/L MgCl₂

100 mmol/L Tris·Cl (pH9.5)

(2) 于 10ml 碱性磷酸酶缓冲液中加 66μl NBT 液, 充分混匀, 再加 33 μl BCIP 液, 混匀。这一混合液必须在 30 分钟以内使用。

(3) 将膜放入上述显色液中, 室温下轻轻摇动。

(4) 注意观察显色反应, 当条带达到所需深度 (~ 20 分钟) 时, 将膜转入 500μl 0.5mol/L EDTA (pH8.0) 和 50 ml PBS 的溶液中。

(5) 照像。

2. 辣根过氧化物酶:

(1) 取 6 mg diaminobenzidine tetrahydrochloride 溶于 9 ml 0.01 mol/L Tris·Cl (pH7.6) 中, 加 1ml 0.3% (W/V) 的 NiCl₂ 或 CoCl₂, 此液必须新鲜配制。

(2) 过滤除去沉淀。

(3) 加 10μl 30% H₂O₂ 充分混匀。

(4) 将膜放入上述显色液中, 室温下轻轻摇动。

(5) 观察显色反应, 当条带达所需深度时 (1~3 分钟) 立刻用水洗膜, 然后将膜转入 PBS 中。

(6) 照像。

注意:

辣根过氧化物酶显色的条带在阳光下几小时就会褪色。

(刘强远 文 缪时英 审)

参 考 文 献

1. Taniguchi T. Structure and Expression of a Cloned cDNA for Human Interleukin - 2. *Nature*, 1983, 302:305
2. Doodbourn S. The human β - interferon gene enhancer is under negative control. *Cell*, 1986, 45:601
3. 黄翠芬. 遗传工程理论方法. 北京. 科学出版社, 1987
4. 吴乃虎. 基因工程原理. 北京. 高等教育出版社, 1989
5. Takebe Y, et al. SR α promoter: An efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R - US Segment of human T - cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol Cell Biol*, 1988, 8:466
6. Sambrook J, et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

14. 基因工程菌的大规模培养

基因工程菌大规模培养又被称为工程菌发酵，是重组蛋白生产的重要步骤，其目的是提供大量含重组蛋白的菌体（胞内表达）或培养上清（分泌表达）。基因工程菌培养的主要流程为：

菌种库→单菌落培养→一级种子培养→二级种子培养→发酵罐培养→收菌。

14.1 菌种保藏

菌种的稳定是工程菌培养的基础，为了避免长期传代可能引起的菌种变异，应建立适合长期保藏的工程菌菌种库并进行保藏。菌种保藏的方法主要有固体斜面法、甘油冻存法、冷冻干燥法等。

14.1.1 固体斜面法

本方法适合于短期保藏工作中使用的菌种，保藏时间一般为1~3个月。

材料和仪器：

固体 LB 培养基	121℃，30 分钟高温灭菌
带试管塞的 30ml 试管	121℃，30 分钟高温灭菌
1 号橡皮塞	121℃，30 分钟高温灭菌
抗性 LB 平皿	
恒温培养箱	
恒温振荡器。	

操作步骤：

- (1) 固体 LB 培养基高温灭菌后冷却至 50℃左右，加入适量的抗生素，轻摇使混匀。
- (2) 5ml/支分装至 30ml 试管中，塞上试管塞。
- (3) 立刻将试管倾斜放置在一支持物（如一支 10ml 吸管）上，使培养基的前沿位于试管长度的 1/2 处。静置使培养基凝固。
- (4) 用火焰灭菌的接种环取菌种在抗性 LB 平皿上画线分离单菌落。
- (5) 平皿倒置于 30℃或 37℃恒温培养箱（带温敏启动子的菌种应 30℃培养，其他菌种可用 37℃培养。），培养 24~48 小时，至单菌落的大小为 3mm 左右。
- (6) 用火焰灭菌的接种环挑取一个单菌落，在固体 LB 斜面上画线接种。
- (7) 30℃（或 37℃）培养箱培养 24~48 小时。
- (8) 用无菌橡皮塞代替试管塞，4℃冰箱保存。

14.1.2 甘油冻存法

本方法适合于中、长期菌种保藏，保藏时间一般为 2~4 年左右。

材料和仪器：

抗性 LB 培养基	
抗性 LB 平皿	
30% 甘油	121℃，30 分钟高温灭菌
菌种保存管	121℃，30 分钟高温灭菌

恒温培养箱

恒温振荡器。

操作步骤:

- (1) 用火焰灭菌的接种环取斜面菌种在抗性 LB 平皿上画线分离单菌落。
- (2) 平皿倒置于 30℃ 或 37℃ 恒温培养箱, 培养 24~48 小时, 至单菌落的大小为 3mm 左右。
- (3) 挑取一个单菌落, 接种于一个含 50ml 抗性 LB 培养基的 300ml 三角瓶中, 30℃ 或 37℃ 振荡培养 10~15 小时, 至菌密度为 1.0~1.5 OD₆₀₀。
- (4) 用火焰灭菌的接种环取少量种子液, 涂片后, 作革兰染色, 在显微镜下观察菌体的形态, 及是否有杂菌。
- (5) 按 30% 甘油: 种子液 (V/V) 为 1:1 的量加入无菌甘油, 混合后分装至事先灭菌的菌种保存管 (1~2ml/管), -70℃ 或液氮保存。

14.1.3 冷冻干燥法

本方法适合于长期菌种保藏。

材料和仪器:

菌种斜面	按 14.1.1 方法制备
牛奶	
安瓿管	121℃, 30 分钟高温灭菌
冷冻干燥机	
真空泵	

操作步骤:

- (1) 将牛奶煮沸后, 3000r/min 离心 10 分钟, 去油脂制得脱脂牛奶。
- (2) 脱脂牛奶 110℃, 20 分钟高温灭菌。
- (3) 取一支菌种斜面, 加入 5ml 无菌脱脂牛奶, 用无菌吸管反复吹打, 制成菌种悬液。
- (4) 将菌种悬液分装安瓿管, 0.5~1.0ml/支。
- (5) 安瓿管置于冷冻干燥机中冷冻干燥。
- (6) 用真空泵抽真空, 在真空条件下用火焰熔封安瓿管管口, 置于 4~10℃ 冰箱保藏。
- (7) 一周后, 取出一支加入少量无菌 LB 培养基, 混匀后接种斜面, 观察菌种是否存活, 如果存活则该批菌种可长期保存。

14.2 工程菌培养

14.2.1 影响工程菌生长和产物合成的因素

14.2.1.1 培养基

培养基按用途可分为种子培养基和发酵培养基等, 种子培养基用于种子的逐级扩大培养, 常用的为 LB 培养基, LB 培养基中含有丰富的氨基酸、小肽、小分子糖类和各种营养元素, 有利于菌种的快速生长。同时, 为了保证菌种的稳定性, 可在种子培养基中加入适量的相应抗生素作为选择性压力, 发酵培养基则应针对不同的工程菌筛选和优化, 以维持菌体生长至较高密度和目的基因的高效表达, 它一般应包括碳源、氮源、无机盐等, 对有些工程菌, 还需要维生素等。

1. 碳源:

碳源是工程菌生长和产物合成的主要能源和前体来源之一, 它通过糖酵解途径、三羧酸循环和呼吸

链生成 ATP 及合成氨基酸、核苷酸等的前体。基因工程菌培养中常用的碳源为葡萄糖、甘油、乳糖、果糖、甘露糖等。其中葡萄糖是最易利用的碳源,而且葡萄糖价格低廉,因而是大多数工程菌培养首选的碳源。但是基因工程大肠杆菌在葡萄糖充足的培养基中生长时,往往会产生代谢副产物乙酸,乙酸积累到一定浓度就会抑制菌体的生长和产物的合成。另外在工程菌诱导表达阶段,对使用 lac、Arab 等糖类启动子及其杂合启动子如 lac 等的工程菌,一定浓度的葡萄糖的存在会引起葡萄糖效应,阻遏目的基因的转录。解决上述问题的方法有:①采用较难利用的碳源,如甘露糖,代替葡萄糖,但这些碳源往往比葡萄糖昂贵;②控制培养基中的葡萄糖浓度极低,并采用缓慢流加葡萄糖的措施使葡萄糖浓度维持在这种状态,使工程菌以较低的比生长速率(通常是 $0.1 \sim 0.2 \text{h}^{-1}$) 生长。

2. 氮源:

氮源的作用主要是提供氨基酸、蛋白质、核酸等合成所需的元素氮,氮源可分为有机氮源和无机氮源,有机氮源主要是一些含氮有机物的水解产物,含有丰富的氨基酸、小肽和其它营养物,其中的氨基酸和其它一些小分子有机物可被工程菌直接利用,而不需再从糖代谢的中间产物合成了,因而对工程菌的生长和外源蛋白的合成都有利,在工程菌培养中被广泛使用,但有机氮源一般价格较高,而且,工程菌对有机氮源中各成分的利用是不均衡的,因而过量使用会使某些成分积累,产生抑制作用或影响后续纯化工作。常用的有机氮源有:酵母抽提物、胰蛋白胨、酪蛋白水解物、玉米浆等。无机氮源主要是一些含氮的化合物,如氨水、铵盐等。无机氮源的优点是价格低廉且成分确定,易于按需补加。其中氨水在工程菌培养过程还可同时起到调节 pH 的作用。

3. 无机盐和维生素:

工程菌培养基中所需的无机盐主要为磷酸盐、Mg、Fe、Ca 和一些微量元素如 S、Zn、Co、Cu、Mn、Ni 等的盐类,其作用是提供菌体生长所需的各种元素,同时还有维持渗透压,和控制 pH 的作用。

大多数工程菌都能合成所需的各种维生素,可以在不含维生素的培养基中生长,但在培养基中含适量的维生素往往对菌体的生长是有利的,而有些工程菌的宿主菌为维生素营养缺陷型,这些菌的培养基中必需含相应的维生素。

酵母抽提物、玉米浆等有机氮源中含有丰富的无机盐和和维生素,因而当培养基中含有较高浓度的上述成分,且菌密度较低时,除加入 $20 \sim 100 \text{mmol/L}$ 的磷酸盐用于维持 pH 和渗透压外,不需另外补加无机盐和和维生素。但当培养基中不含有有机氮源或培养的菌密度较高时,则应考虑补加无机盐和和维生素。

对一个合适的发酵培养基,上述各成分的量应以满足或略多于菌体生长和产物合成所需为度,不宜过多加入,以免产生抑制效应和浪费原料,另外各成分的配比也很重要,以利于菌体均衡利用各成分。表 14-1 为在基本培养基中一些主要营养元素的得率系数,表 14-2 为一些营养成分产生抑制效应的浓度,可供参考。对每个工程菌,其发酵培养基最终应通过实验筛选。

表 14-1 一些主要营养元素的得率系数

元素	得率系数 (g 菌体/g 元素)*
C**	1.2
N	5
P	36
S	278
Mg	588
Ca	7.1×10^3
Fe	7.1×10^3

*: 得率系数: 在基本培养基中, 当某元素为限制性基质时, 每克该元素所能产出的菌体量。

** 碳源的得率系数, 随碳源的不同变化较大, 这里的碳源为葡萄糖。

表 14-2 一些营养成分产生抑制效应的浓度

成分	含量 (g/L)
葡萄糖	50
NH ₃	3
P	10
Mg	8.7
Fe	1.15
Mo	0.8
B	0.044
Cu	0.0042
Mn	0.068
Co	0.0005
Zn	0.038

14.2.1.2 温度

温度是影响工程菌生长和产物合成的重要因素之一,大肠杆菌的最佳生长温度为 37℃。但对于带有温敏启动子的重组大肠杆菌,由于在 37℃ 培养会使这些启动子部分启动,使重组大肠杆菌的生理负担加重,不利于质粒的稳定,因而这类菌的培养温度一般为 30℃,而诱导温度一般为 40~42℃。温度有时还会影响重组蛋白的活性和存在形式,有些工程菌在较低温度(如 28℃)培养时,其合成的重组蛋白主要以可溶形式存在,而在较高温度(如 37℃)培养时,主要以包涵体形式存在。工程菌的代谢速度与温度密切相关,随着温度的降低,工程菌的代谢速度明显下降,对氧和营养成分的消耗速度下降,因而在工程菌高密度培养时,有时可通过降低培养温度来解决供氧不足的矛盾。

14.2.1.3 溶氧

氧是影响大肠杆菌生长和代谢的重要因素,大肠杆菌只能利用溶解在培养基中的氧。当培养基中的溶氧不足时,大肠杆菌的呼吸链和三羧酸循环就会被抑制,并通过糖酵解途径来获得能量,同时积累大量乙酸,乙酸的积累会抑制菌体的生长和重组蛋白的合成。大肠杆菌的临界氧浓度一般为 10%~30% 饱和氧浓度。重组大肠杆菌培养时应将培养基中的溶氧浓度控制在临界氧浓度以上。

14.2.1.4 pH

pH 也是影响工程菌生长和产物合成的重要因素之一,适合大肠杆菌生长的 pH 范围为 6.0~8.0。最常用的 pH 为 7.0,但对不同工程菌,适合其重组蛋白的合成最佳 pH 常常是不同的,一般应通过实验来确定某种工程菌合成重组蛋白所需的最佳 pH。培养基的初始 pH 一般是通过其中的磷酸二氢盐和磷酸氢二盐的比例来调节的,培养过程中可通过补酸或碱来调节。常用的酸为盐酸、硫酸和磷酸,常用的碱为氢氧化钠和氨水,其中氨水和磷酸在用于调节培养基 pH 的同时还兼有补氮和补磷的作用。

14.2.1.5 代谢副产物

大肠杆菌不只在供氧不足时才产生代谢副产物乙酸,而是即使在供氧充足的情况下也会有乙酸产生,乙酸的产生与比生长速率有关,在含葡萄糖的基本培养基中比生长速率大于 0.35h^{-1} 或在含葡萄糖的复合培养基中的比生长速率大于 0.20h^{-1} 时,便有可测到的乙酸积累。高浓度的乙酸(如 10g/L)对菌体的生长和重组蛋白合成有明显的抑制作用。这种抑制作用对不同的菌株有较大的区别。乙酸的积累是重组大肠杆菌高密度培养时遇到的主要困难之一。

14.2.1.6 诱导起始时间

诱导起始时间对工程菌重组蛋白的合成有较大的影响,对带温敏启动子的工程菌,一般应在工程菌指数生长的中后期诱导,应使诱导后菌体能继续生长至诱导时菌密度的 2~3 倍。对带糖类启动子,如乳糖启动子的工程菌,一般应在培养基中葡萄糖耗尽或通过补料维持在低浓度时诱导,以避免或减少葡萄糖效应的抑制作用。不同工程菌在不同的培养基和培养工艺时,其最佳诱导起始时间都是不同的,应

通过实验确定。

14.2.2 工程菌培养方法

工程菌培养可分为分批培养、补料分批培养和连续培养。

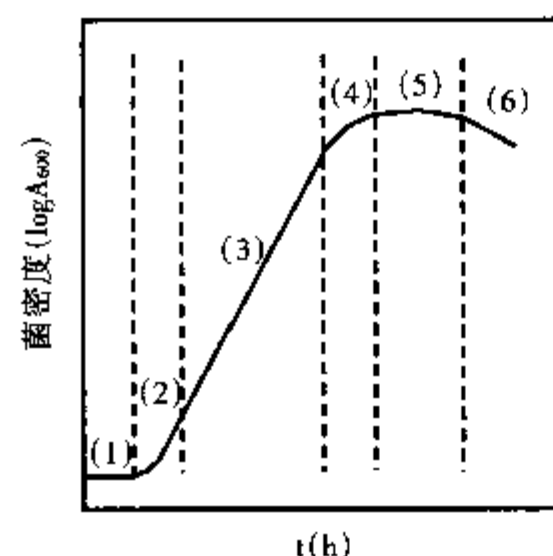


图 14-1 工程菌在分批培养过程中比生长速率的变化

分批培养系统属于封闭系统，在向培养基中接入种子液后，除了通入无菌空气外，一般不再向系统内补加任何营养成分（诱导物除外）或除去任何物质，工程菌完全依靠初始培养基中的营养成分生长和合成产物。这种培养方法工艺简单，适合于工程菌的低密度培养。分批培养只能在一段有限的时期内支持菌体的增殖。根据比生长速率 (μ) 的变化可将整个培养过程细分为六个期（如图 14-1）：①延滞期： $\mu = 0$ ；②加速生长期， μ 逐渐变大；③指数期， μ 达到最大；④减速生长期， μ 开始变小；⑤稳定期， $\mu = 0$ ；⑥死亡期， $\mu < 0$ 。在指数生长期， μ 不变，其数值大小与菌种特性、及培养条件有关。

补料分批培养是指在分批培养过程中，间隙地或连续地补加营养成分，以供给工程菌生长和产物合成所需的培养方法，是工程菌的高密度培养常用的方法。其优点在于使发酵

液中维持较低的基质浓度：①可以避免葡萄糖阻遏效应；②可维持适当的菌体比生长速率；③可避免有害代谢副产物的大量积累；④可减缓供氧矛盾。

间隙补料通常是当培养基中某种成分（如葡萄糖）浓度过低或被耗尽时，向培养基中分次补入一定量的营养成分；连续补料则是用蠕动泵或其它方式，以某一速度不间断地向培养基中补加营养成分，连续补料方式有恒速补料和指数补料等。恒速补料可通过手动控制蠕动泵泵速实现，指数补料难以手动控制，通常由计算机控制。指数补料方式符合菌体指数生长要求，在发酵培养工艺中的应用越来越普遍。这种培养方法可用于工程菌的高密度培养。

连续培养是指在培养过程中，连续向发酵罐内流加培养基，同时使发酵罐内的培养液以相同流速流出，所流入的培养基有一种成分为限制性基质，经过一段时间后，培养液中菌体和营养成分浓度就达到一种恒定状态，因而这种培养方法也被称为恒化培养。连续培养常用于研究某种基质成分或培养条件对菌体生长和产物合成的影响。

14.2.3 参数检测与控制

见表 14-3。

表 14-3 工程菌培养过程检测和控制的主要参数

参 数	检测和控制方法	作 用
温度	传感器，自控	满足生长和合成对温度的要求
pH	传感器，自控	满足生长和合成对 pH 的要求
溶氧浓度	传感器，自控	满足生长和合成对氧的需求
空气流量	流量计或传感器，手控或自控	控制溶氧
搅拌转速	传感器，自控	控制溶氧
罐压	压力表，手控	维持正压、增加溶氧
泡沫	传感器，自控	避免泡沫溢出
菌密度	取样分析	检测菌体生长情况
底物浓度	取样分析，手控或自控补加	检测营养成分供需情况
代谢副产物浓度	取样分析	检测代谢副产物浓度的积累

14.2.4 工程菌培养设备——发酵罐及其控制系统

发酵罐是工程菌培养的主要设备之一，发酵罐型号很多，但基本结构相似，它主要由罐体、供氧系统、温度、pH、消泡和补料控制系统等组成，有时还配有上位计算机，图 14-2 为德图贝朗公司生产的 B5 型实验室小试用发酵罐的示意图。

14.2.4.1 罐体

发酵罐的罐体为圆柱型，高径比一般为 1.0~2.5:1，它是工程菌培养的空间，实验室工程菌培养研究用发酵罐一般为玻璃罐体，体积为 0.3~10L；而中试和生产用发酵罐一般为不锈钢罐体，体积为

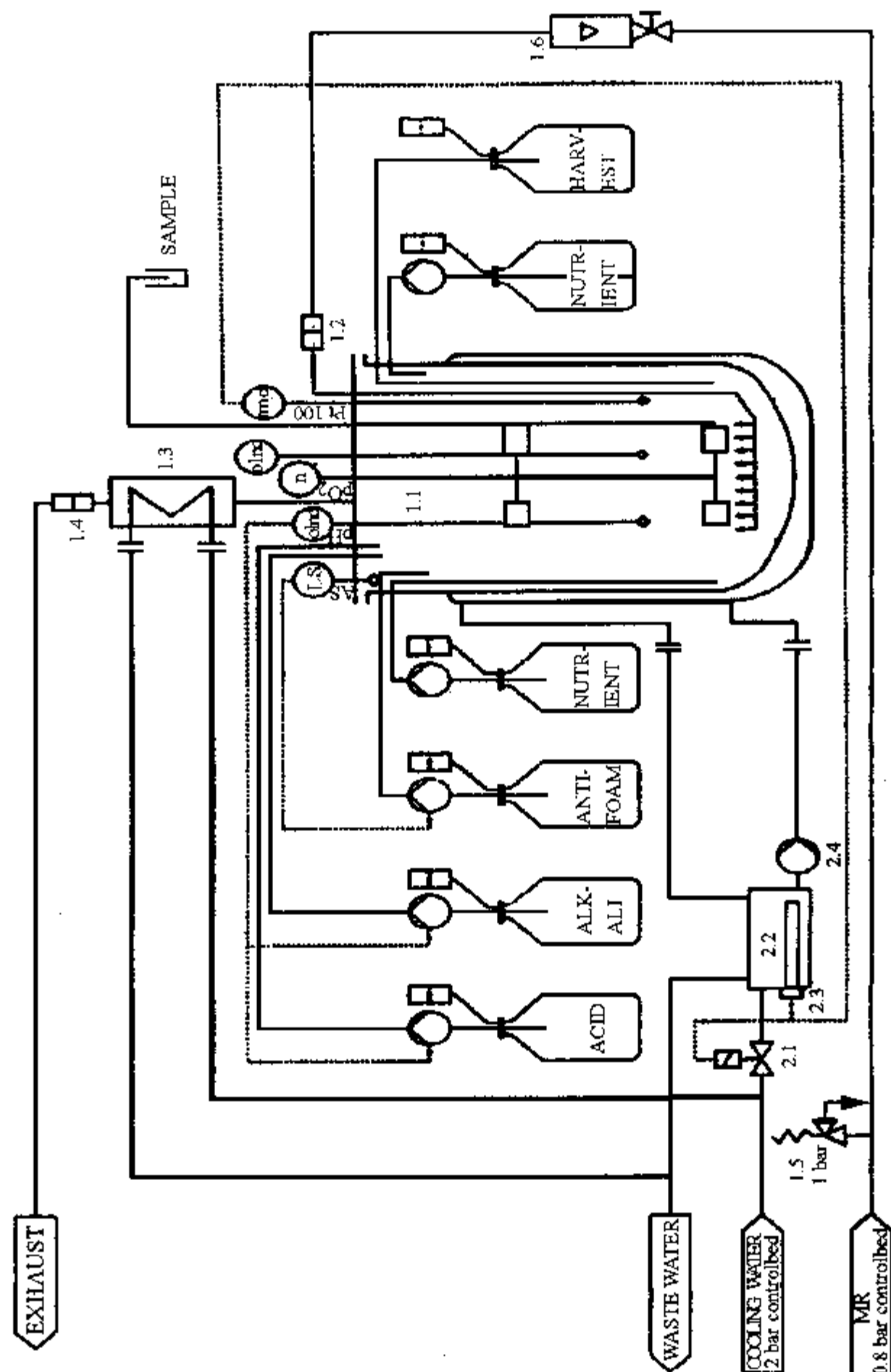


图 14-2 B5 型发酵罐示意图

0.01 ~ 100m³。

14.2.4.2 供氧系统

工程菌生长需要大量消耗培养基中的溶解氧，而培养基中的溶解氧即使在饱和状态下也是微量的，因而在工程菌培养过程中要不断地向培养基中供氧，发酵罐供氧是这样实现的（图 14-2）：压缩空气经转子流量计（1.6）定量和空气滤器（1.2）过滤除菌后通入发酵罐底部，气泡在上升时被搅拌桨（1.1）破碎，使之与培养基充分混合，空气中的氧部分溶于培养基中，以供工程菌生长所需，同时，工程菌生长产生的二氧化碳进入气泡，最后，多余的空气和产生的二氧化碳通过排气冷凝器（1.3）冷却和排气滤器（1.4）过滤除菌后排出。培养基中的溶解氧浓度由溶氧电极（pO₂）检测，溶解氧浓度一般用百分数表示，以接种前用空气饱和的培养基中的溶氧浓度为 100%，工程菌培养过程中溶解氧浓度一般应控制在 20% ~ 30% 以上，当溶解氧浓度过低时可通过加大搅拌转速、增加空气流量或通富氧空气（纯氧和空气的混合气）来加大供氧速度，提高溶解氧浓度。

14.2.4.3 温度控制系统

发酵罐温度控制是这样实现的：发酵罐内培养基的温度由温度电极（Pt100）检测，并与设定的温度比较，当温度过高时，启动冷却水电磁阀，冷却水在水泵的驱动下，流经发酵罐罐体的夹套，用以冷却培养基；当温度过低时，则同时启动电加热棒，使冷却水升温后流经发酵罐罐体的夹套，用以加热培养基。上述控温过程由发酵罐控制系统按 PID 控制规律自动进行，以控制稳定的培养温度。

14.2.4.4 pH 控制系统

pH 也是影响工程菌生长和产物合成的重要因素之一，培养基的 pH 由 pH 电极（pH）检测，并与设定的 pH 值比较，当过高或过低时，分别启动补酸泵或补碱泵，向发酵罐内补酸或碱。

14.2.4.5 消泡控制系统

在工程菌培养过程中，尤其是在培养的后期，经常会产生大量泡沫，当泡沫过多时会使培养基液面上升，甚至从排气口溢出。因此发酵罐一般设有消泡控制系统：当泡沫上升至与消泡电极接触后，控制系统就会启动消泡泵，向发酵罐内补加消泡剂。消泡剂的种类很多，常用的为聚氧乙烯氧丙烯甘油（俗称泡敌）。

14.2.4.6 补料控制系统

发酵罐一般配有一台或两台补料泵，可采用手动控制补料泵的开启时间控制补料量来实现间隙补料，也可设定补料泵的流速，控制补料泵进行连续流加。B5 型发酵罐补料泵的流速的改变是通过改变一定时间周期内（如 100 秒）泵的开启时间占整个时间周期的比来实现的。

14.2.5 工程菌培养过程

仪器和材料：

5L 发酵罐 Biostat B5 型（德国 B. Brun Biotech International CO.）
 恒温培养箱
 恒温振荡器
 抗性 LB 平皿
 抗性 LB 培养基
 发酵培养基

14.2.5.1 种子液的制备

无论多大规模的培养，其种子液应起源于同一单菌落，以保证培养物的均一性和减少种子染菌的可能。

- （1）取一支甘油保存菌种，用接种环取少量菌种在 LB 平皿上画线分离单菌落。
- （2）平皿倒置于 30℃ 恒温培养箱，培养 24 ~ 48 小时，至单菌落的大小为 3mm 左右。

(3) 挑取一个单菌落, 接种于一个含 50ml 抗性 LB 培养基的 300ml 三角瓶中, 30℃ 振荡培养 10~15 小时, 至菌密度为 $1.0 \sim 1.5 \text{ OD}_{600}$ 。

(4) 将上述种子液, 按 0.2% (V/V) 接种于 1 个含 100ml 抗性 LB 培养基的 500ml 三角瓶中。

(5) 30℃ 振荡培养 10~15 小时, 至菌密度为 $1.5 \sim 2.5 \text{ OD}_{600}$ 。

(6) 取样测种子液的菌密度、pH。用火焰灭菌的接种环取少量种子液, 涂片后, 作革兰染色, 在显微镜下观察菌体的形态, 及是否有杂菌。

若菌密度、pH 及镜检结果均正常, 该种子液就可作为发酵罐培养的种子液。

工程菌大规模培养的种子一般采用二级种子液, 其中一级种子一般用 LB 培养基, 二级种子可用 LB 培养基, 也可用经实验优化的发酵培养基, 以提高种子液的菌密度, 缩短发酵罐培养时, 种子的适应期。在不同的培养基中, 二级种子应控制的菌密度和 pH 是不同的, 在 LB 培养基中, 二级种子液菌密度一般应为 $1.5 \sim 2.5 \text{ OD}_{600}$, pH 为 7.0~8.0。

14.2.5.2 发酵罐检测与控制系统的标定

1. pH 电极的标定:

(1) 将 pH 电极和温度电极一起插入装有 pH7.0 标准缓冲液的烧杯中, 轻轻搅拌, 待 pH 显示稳定后, 标定 pH 电极的零点。

(2) 将 pH 电极和温度电极一起插入装有 pH4.0 或 9.0 标准缓冲液的烧杯中 (选用 pH4.0 还是 9.0 的标准缓冲液, 应由培养时控制的 pH 确定, 控制的 pH < 7.0 应选用 pH4.0 的标准缓冲液, 反之, 则选用 pH9.0 的标准缓冲液), 轻轻搅拌, 待 pH 显示稳定后, 标定 pH 电极的斜率。

注: 有些型号的发罐罐, 温度电极由于体积较大, 或其它原因, 不易与 pH 电极一起插入装有 pH 标准缓冲液的烧杯中, 此时可另用一支水银温度计测量标准缓冲液的温度, 然后手动设定温度。

2. 溶氧 (DO) 电极的标定:

(1) 将 DO 电极和温度电极一起插入装有饱和亚硫酸钠溶液的烧杯中, 轻轻搅动, 可以看到 DO 显示值逐渐下降, 待显示稳定后, 标定 DO 电极的零点。

(2) DO 电极的斜率待培养前标定。

3. 输液泵的标定:

(1) 用量筒测量一定时间内 (如 10 分钟), 补料泵 1 输送溶液的体积, 用以标定该泵的流速。

(2) 用同样方法标定补料泵 2、补酸泵和补碱泵。

14.2.5.3 培养基的配制和灭菌

培养基中大部分成分如: 酵母抽提物、蛋白胨、水解酪蛋白、磷酸盐、氯化钠、氯化钾、泡敌等, 可配成混合溶液与发酵罐一起高温灭菌; 而有些成分如: 葡萄糖、维生素、抗生素等, 高温时易与其它成分发生化学反应, 因而不能与其它成分一起高温灭菌, 其中葡萄糖灭菌温度不能太高, 一般采用 110℃, 20 分钟高温灭菌的方法; 而另一些成分如维生素、抗生素、氨基酸等, 高温时易破坏, 因而只能先配成浓缩液, 用 $0.22\mu\text{m}$ 的无菌滤器过滤除菌。

工程菌培养用发酵罐的高温灭菌方法一般为实罐灭菌, 即将主要培养基加入发酵罐中, 一起高温灭菌。10L 以下的实验室用发酵罐, 一般为玻璃罐体, 不耐压, 高温灭菌时, 将整个罐体放入蒸汽灭菌锅中, 121℃, 30 分钟高温灭菌; 而 10L 以上, 中试和生产用发酵罐, 一般为不锈钢罐体, 可耐受 0.2MPa 的压力, 高温灭菌时, 通过向夹套或蛇管中通高压蒸汽, 或直接向罐内通高压蒸汽, 使罐内培养基的温度升至 121℃, 保温 30 分钟, 完成对培养基和罐体的灭菌。

1. 发酵罐接种前的准备:

(1) 开启主电源, 及冷却水、压缩空气、蒸气 (10L 以下实验室用发酵罐培养时一般不需要蒸汽) 等共用设施的进出阀门。

(2) 设定工程菌培养温度 (如 30℃), 将发酵罐的温度控制设定为“自动”状态。(高温灭菌后,

将温度降至培养温度并稳定,所需的时间受发酵罐的规模、冷却方式、冷却水温等因素的影响,一般在1~2小时左右,因而应在培养开始前的1~2小时开始本步操作。)

- (3) 设定搅拌转速,将转速控制设定为“自动”状态。
- (4) 设定空气流量,将流量控制设定为“自动”状态。
- (5) 观察 DO 值,稳定后标定 DO 电极的斜率(100%)。
- (6) 接上补酸瓶和补碱瓶,设定培养基控制的 pH 值,将 pH 控制设定为“自动”状态。
- (7) 从取样口取样 10ml,作为比浊法测定菌密度的参比。

2. 接种:

- (1) 取种子液,及培养基中单独除菌的成分,如葡萄糖、抗生素等。

(2) 在接种口周围,放一个浸透酒精的棉花圈,拧松接种口螺丝,点燃棉花圈,用钳子拧去接种口螺丝,迅速从接种口倒入种子液和其它成分。拧上接种口螺丝,用止血钳夹走棉花圈,放入水中,熄灭火焰。火焰接种时,火焰不易过大,倒种子液要快,以免部分菌种被高温杀死。

接种也可用补料泵,将种子液和其它成分分别装入事先高温灭菌的补料瓶中,然后用补料泵泵入发酵罐内。但当种子液体积较大,而泵速又较小时,接种时间可能会较长。

3. 培养(以带温敏启动子的工程菌为例):

(1) 每隔1~2小时,观察并记录各显示参数,如:温度, pH, 溶氧, 搅拌。并取样分析菌密度、还原糖浓度、代谢副产物乙酸浓度,必要时还应涂片,进行镜检。观察菌型和检查是否染菌。

(2) 当溶氧低于30%时,可通过增加搅拌转速或空气流量来增加供氧量,使溶氧值回升。当还原糖浓度即将耗尽时,通过补料泵补加50%的葡萄糖溶液。

(3) 培养至适当菌密度后,用补料泵补入含葡萄糖和有机氮的复合补料液。将温度设定值改为42℃,开始升温诱导。在诱导培养过程中,当还原糖浓度低于1g/L时可通过补料泵重复补加复合补料液。

(4) 每隔1小时,取样除记录和测定步骤1所列参数外,还应留样作 SDS-PAGE,分析外源蛋白的表达量。

(5) 42℃诱导培养3~6小时,培养终止,终止时间由实验依据表达水平和菌密度最高时确定,然后将搅拌、通气、温度、pH等的控制状态从“自动”改为“关闭”。从发酵罐的放液口放出培养物,用低温离心机在4~10℃条件下离心分离,如果外源蛋白表达在胞内,则取菌体-20~-70℃冻存,用于纯化;如果外源蛋白表达在上清,则取上清冻存,或直接进行纯化。

(6) 关闭发酵罐系统总电源,及冷却水、压缩空气、蒸汽等共用设施的进出阀门。取出 pH 电极和溶氧电极,用蒸馏水冲洗后保存。

工程菌培养时,搅拌转速和空气流量的控制量因发酵罐规模、结构、菌密度等因素而变化,以 DO 值不低于20%~30%为控制目标,其中空气流量一般控制在0.5~1.0VVm(VVm,1体积的培养基,1分钟内通入1体积的空气,如发酵罐中有30L培养基,则1分钟内通入30L空气为1.0VVm)搅拌转速应控制在设备允许的范围内。在高密度培养时,补葡萄糖溶液可采用补料泵低速流加,并随菌密度的增加,不断增加补料速度,控制 $\mu=0.1\sim0.2\text{h}^{-1}$,以减少乙酸的积累和降低氧耗。开始诱导的时间,是影响重组蛋白产量的重要因素,一般在菌密度低时升温诱导,诱导后单位菌体外源蛋白的产量一般较高,但培养液中菌体较少;而在菌密度高时升温诱导,诱导后单位菌体外源蛋白的产量往往会有所下降,但培养液中菌体较多。因而需通过实验选择升温诱导时的菌密度,以提高每升培养物中,外源蛋白的总量。对许多工程菌,在诱导时补加复合补料液对重组蛋白的合成有利,复合补料液可由葡萄糖和有机氮源组成,其中的有机氮源可以是酵母抽提物、胰蛋白胨、水解酪蛋白等中的一种或几种,应通过实验确定各成分的含量。高密度培养时,补复合补料液也可采用补料泵低速流加,并随菌密度的增加,不断增加补料速度,控制 $\mu=0.1\sim0.2\text{h}^{-1}$,以减少乙酸的积累和降低氧耗。

14.3 工程菌培养中的主要分析方法

工程菌培养中一般需要检测的主要参数见 14.2.3, 其中温度、pH、DO、空气流量、搅拌转速、罐压等均由传感器直接检测, 而菌密度、底物 (主要是葡萄糖) 浓度和代谢副产物乙酸需要取样测定, 以下分别介绍其测定方法。

14.3.1 菌密度的测定

菌密度的测定方法主要有比浊法、菌干重法、活菌计数法等。

14.3.1.1 比浊法

比浊法是最常用的菌密度测定方法, 具有简便, 快速等优点, 该方法通过分光光度计测定菌液对光的吸收, 在一定浓度范围内, 菌密度与吸光度成正比。为了减少培养基的干扰, 选择测定波长为 600nm, 并用培养基作参比, 比色杯一般采用光程为 1cm 的玻璃比色杯。如果发酵液吸光度 > 0.6, 则应将发酵液和作为参比的培养基均用生理盐水作适当稀释, 使测定值大约在 0.2~0.6, 发酵液吸光度 = 稀释后的测定值 × 稀释倍数。

14.3.1.2 菌干重法

仪器和材料:

电热烘箱

分析天平 精度为 1%₀g

离心机

50ml 玻璃离心瓶

生理盐水

菌液

操作步骤:

- (1) 取 3 只 50ml 玻璃离心瓶编号, 置于 105℃ 电热烘箱, 干燥过夜。
- (2) 用分析天平称取各玻璃离心瓶的精确质量 (m_1)。
- (3) 在各离心瓶中分别加入 30ml 菌液, 4 000r/min, 离心 20 分钟。
- (4) 弃上清, 加入 30ml 生理盐水, 用吸管吹打, 使沉淀重悬, 4 000r/min, 离心 20 分钟。
- (5) 弃上清, 离心管倒置于滤纸上, 使残液尽可能流出。
- (6) 离心管置于 105℃ 电热烘箱, 干燥 24 小时。
- (7) 用分析天平称取各玻璃离心瓶的精确质量。
- (8) 将离心管置于 105℃ 电热烘箱, 再干燥 12 小时。
- (9) 用分析天平称取各玻璃离心瓶的精确质量 (m_2), 若两次称取质量差大于 3mg 则重复步骤 (8) (9)。
- (10) 菌干重 (g/L) = $1\,000 \times (m_2 - m_1) / 30$, 三个离心瓶测定结果的平均值即为该菌液的菌干重。

14.3.1.3 活菌计数

仪器和材料:

恒温培养箱

抗性 LB 平皿

无菌生理盐水

操作步骤:

- (1) 取 8 支 30ml 无菌试管分别编为 1~8 号, 各加入无菌生理盐水 4.5ml。

- (2) 取菌液 0.5ml, 加入 1 号试管中, 震荡混合, 制得 10^{-1} 倍的稀释菌液。
- (3) 从 1 号试管中取出 0.5ml, 加入 2 号试管中, 震荡混合, 制得 10^{-2} 倍的稀释菌液。
- (4) 如上重复, 分别制得 $10^{-3} \sim 10^{-8}$ 倍的稀释菌液。
- (5) 各取 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 倍的稀释菌液 100 μ l, 分别加在 3 块抗性 LB 平皿上。
- (6) 分别用无菌玻璃涂布将菌液在平皿表面涂匀。
- (7) 待菌液渗入琼脂后, 将平皿倒置于恒温培养箱, 在合适温度下培养 24 ~ 48 小时。
- (8) 取每个平皿上菌落数在 30 ~ 300 个之间的平皿计数。
- (9) 将菌落数除以该平皿对应的稀释倍数, 再除以 0.1ml, 即得原菌液的活菌数。为了减少误差, 步骤 (1) ~ (9) 一般应平行重复三组, 取三组测得的活菌数的平均值为计数结果。

14.3.2 发酵液中葡萄糖浓度的测定

葡萄糖浓度常用的测定方法有对硝基水杨酸法和酶法等, 酶法测定有市售的试剂盒, 并附有详细的测定方法介绍。对硝基水杨酸法是根据葡萄糖的还原性建立起来的, 该方法成本低、操作简便、快速、干扰少。

原理:

基于 3, 5-二硝基水杨酸 (DNS) 与还原糖共热后还原成棕红色的氨基化合物。在一定范围内还原糖的量和棕红色物质颜色的深浅程度 (在 520nm 处的吸光值) 成一定比例关系。

仪器和材料:

分光光度计
水浴锅
结晶酚
亚硫酸钠
酒石酸钾钠
二硝基水杨酸
葡萄糖
发酵液

操作步骤:

1. DNS 试剂配制:

- (1) 称取 35g NaOH, 用蒸馏水溶解定溶至 350ml。
- (2) 称取 8.8g 二硝基水杨酸, 用蒸馏水溶解定溶至 880ml。
- (3) 甲液: 称取 6.9g 结晶酚溶于 15.2ml 10% NaOH 溶液中, 并用水稀释到 69ml, 然后加 6.9g 亚硫酸钠, 搅拌溶解。
- (4) 乙液: 称取 225g 酒石酸钾钠, 加到 300ml 10% NaOH 溶液中, 再加入 880ml 1% 二硝基水杨酸溶液。
- (5) 将甲液: 乙液相混合即得 DNS 试剂 (黄色), 贮于棕色瓶中备用。在室温下放置 1 周以后使用。

2. 标准曲线:

- (1) 称取 1g 葡萄糖置于平皿中, 80 ~ 90 $^{\circ}$ C 烘干两小时。准确称取 100mg, 用少量蒸馏水溶解后, 定容至 100ml, 摇匀, 配成浓度为 1mg/ml 的标准葡萄糖溶液。
- (2) 取 9 支 30ml 试管, 标上号 (0 ~ 8), 按下表加入试剂:

管号	0	1	2	3	4	5	6	7	8
标准葡萄糖溶液 (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6
蒸馏水 (ml)	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6	0.4
葡萄糖浓度 (mg/ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
DNS 试剂 (ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

(3) 将各管溶液摇动混匀, 在沸水浴中加热 5 分钟。

(4) 取出试管, 立即用冷水冷却至室温, 再向每管加入 10ml 蒸馏水, 摇匀。以 0 号为对照, 于 520nm 处测定其吸光度 (OD_{520}), 以葡萄糖浓度为横座标, 吸光度为纵座标, 绘制标准曲线, 或用线性回归法, 求出回归方程。

3. 发酵液样品测定:

(1) 取 3ml 发酵液置于 5ml 离心管中, 以 10 000r/min 的转速离心 5 分钟。

(2) 取 2ml 上清置于 30ml 试管中, 取 2ml 蒸馏水置于另一 30ml 试管中 (0 号), 各加入 1.5ml DNS 试剂, 摇动混匀, 在沸水浴中加热 5 分钟。

(3) 取出试管, 立即用冷水冷却至室温, 再向每管加入 10ml 蒸馏水, 摇匀。以 0 号为对照, 于 520nm 处测定其吸光度 (OD_{520})。

(4) 将其吸光度 (OD_{520}) 值代入上述回归方程或标准曲线即可得到发酵液中葡萄糖的浓度。当发酵液中葡萄糖的浓度大于 0.8mg/ml 时可先用蒸馏水作适当稀释后再测。

发酵液中葡萄糖浓度 (mg/ml) = 稀释后测定的葡萄糖浓度 \times 稀释倍数

14.3.3 发酵液中乙酸浓度的测定

原理:

乙酸可在乙酰辅酶 A 合成酶 (ACS) 的作用下转化为乙酰辅酶 A, 乙酰辅酶 A 与草酰乙酸在柠檬酸合成酶 (CS) 的作用下生成柠檬酸。而草酰乙酸是由苹果酸和 NAD 在苹果酸脱氢酶 (MDH) 作用下生成的, 同时 NAD 转化为 NADH, NADH 在 430nm 处有一吸收峰, 可用分光光度计定量。

材料

乙酸酶法检测试剂盒: (Boehringer Mannheim 公司产品) 由五部分组成:

试剂 A: pH8.4 的三乙醇胺缓冲液、L-苹果酸、氯化镁。

试剂 B: ATP、乙酰辅酶 A、NAD

试剂 C: 苹果酸脱氢酶、柠檬酸合成酶。

试剂 D: 乙酰辅酶 A 合成酶

乙酸标准品

操作步骤:

(1) 取发酵液样品 1ml, 10 000r/min 离心 5 分钟, 上清用纯水适当稀释。该方法的测定范围为 1~30 μ g/0.1ml 样品。一般发酵液样品可作 50~100 被稀释。

(2) 取 3 支试管, 分别加入 0.1ml 纯水 (空白)、0.1ml 样品、0.1ml 乙酸标准品。

(3) 各试管分别加入试剂 A 1.0ml, 试剂 B 0.2ml, 纯水 1.9ml。

(4) 混合后, 在紫外-可见分光光度计上, 用光程为 1cm 的比色杯测定各管在 340nm 的吸光度, 计为 A_0 。

(5) 各试管分别加入试剂 C 0.01ml。

- (6) 混合 3 分钟后测定各管在 340nm 的吸光度, 计为 A_1 。
- (7) 各试管分别加入试剂 D 0.02ml。
- (8) 混合 15 分钟后测定各管在 340nm 的吸光度, 计为 A_2 。
- (9) 用乙酸标准品的浓度及其 A_2 、 A_1 、 A_0 值按下式计算校正系数 K

$$\text{乙酸含量 (g/L)} = K \cdot V \cdot MW \cdot \Delta A \cdot D / (\epsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000)$$

其中: V: 最终加入比色杯的体积 3.23ml

MW: 乙酸分子量 60.06

D: 样品稀释倍数

ϵ : NADH 在 340nm 的吸光系数 6.3

d: 光程 1 (CM)

v: 样品体积 0.1 (ml)。

$$\Delta A = [(A_2 - A_0)_{\text{样品}} - (A_1 - A_0)_{\text{样品}}^2 / (A_2 - A_0)_{\text{样品}}] - [(A_2 - A_0)_{\text{空白}} - (A_1 - A_0)_{\text{空白}}^2 / (A_2 - A_0)_{\text{空白}}]$$

- (10) 用样品的 A_2 、 A_1 、 A_0 值代入上式计算样品的乙酸浓度。

(吴 军 文 马清钧 审)

参 考 文 献

1. Millar GL, et al. Use of dinitrosalicylic acid for the determination of reducing sugar. Anal. Chem. 1959, 32:426 ~ 428.
2. Riesenber D, et al. High - cell - density culturation of *Escherichia coli*. Current Opinion in Biotechnology, 1991, 2:380 ~ 384.
3. Reiling HE, et al. Mass culture of *Escherichia coli*: Medium development for lowand density cultivation of *Escherichia coli* B/r in minimal and complex media. J Biotechnology, 1985, 2:191 ~ 206.

15. 工程菌生产的蛋白的复性与纯化

许多真核蛋白的基因在大肠杆菌中表达时,其产物以一种非活性的、不溶于水的包涵体形式存在,包涵体中除含有非活性形式的重组蛋白外,还含有一些质粒 DNA、RNA、RNA 聚合酶及其它菌体蛋白。通过破菌和回收包涵体,往往能去除大部分菌体蛋白,但包涵体中的重组蛋白是以非活性形式存在的,必需经过变性和复性及进一步的纯化才能得到高纯度的活性蛋白。

15.1 包涵体的制备和溶解

包涵体密度较大,经菌体破碎和离心分离即可与大部分菌体蛋白分离,破菌常用的方法为超声波破菌法,为了避免破菌过程中,菌液温度升高,一般应在冰浴中进行;破菌需要的时间随超声仪功率、菌液量、菌液浓度不同而不同,可通过取样镜检来确定破菌的程度。离心分离包涵体时的离心力不宜过大,时间不宜过长,以电泳检测上清中基本不含重组蛋白即可,以减少沉淀中菌体细胞膜碎片、核糖体等的量,提高粗制包涵体的纯度。粗制包涵体用低浓度的变性剂(如 1~4mol/L 的尿素,0.5~2mol/L 的盐酸胍)和去污剂(如 1% Triton X-100、Tween 20、80 等)洗涤,可去除一些附着在包涵体表面的脂类和杂蛋白。

包涵体溶解过程一般应包括包涵体蛋白的变性和错配二硫键的还原,包涵体蛋白变性常用的变性剂有 4~6mol/L 盐酸胍、6~8mol/L 的尿素,以及一些去污剂如 1%~2% 的 SDS、脱氧胆酸盐等。还原剂有 DTT、2-巯基乙醇等。

材料和仪器:

TE1 缓冲液: Tris·Cl 10mmol/L, pH7.0, EDTA 1mmol/L

TE2 溶液: 1% TritonX-100 (V/V), Tris·Cl 10mmol/L, pH7.0, EDTA 1mmol/L

TE3 溶液: 尿素 2mol/L, Tris·Cl 10mmol/L, pH7.0, EDTA 1mmol/L

变性液: 尿素 8mol/L, Tris·Cl 10mmol/L, pH8.0, DTT 10mmol/L

超声破菌仪

低温高速离心机

操作步骤:(以 30g 湿菌为例)

(1) 称取 30g 湿菌,置于 500ml 烧杯中,加 300ml TE1 缓冲液,加入搅拌子搅拌 20 分钟,使菌体分散均匀。

(2) 将上述烧杯置于冰浴,用超声破菌仪超声破菌 20~40 次(30 秒/次,间隔 30 秒),每隔 10 次取样涂片作革兰染色,显微镜油镜下检查,当每个视野内未破菌 ≤ 2 个时,超声破菌结束。

(3) 将破菌液转移至 500ml 离心管,在低温高速离心机上(如 Beckman JA-2 型离心机配 JA-10 离心头),以 7000r/min,4℃离心 20 分钟,弃上清。

(4) 在沉淀中加入 300ml TE2 溶液,加入搅拌子搅拌 30 分钟。取出搅拌子,将装有悬浊液的离心管在低温高速离心机上,以 7000r/min,4℃离心 20 分钟,弃上清。

(5) 在沉淀中加入 300ml TE3 溶液,加入搅拌子搅拌 30 分钟。取出搅拌子,将装有悬浊液的离心管在低温高速离心机上,以 7000r/min,4℃离心 20 分钟,弃上清。

(6) 在沉淀中加入 150ml 变性液,加入搅拌子搅拌溶解 2 小时。取出搅拌子,将装有悬浊液的离心管在低温高速离心机上,以 8000r/min,4℃离心 30 分钟,上清移至一个 500ml 烧杯中。

不同包涵体的大小和密度并不相同,因而离心分离时的转速和时间,应通过实验确定,以分离的上清经电泳分析基本不含目标蛋白即可,不宜使用过高的转速和过长的时间,以使一些细胞膜碎片留在上清中,从而提高包涵体的纯度。对包涵体的洗涤步骤4和5是可选的,且TritonX-100和尿素的浓度,应通过实验确定。蛋白变性用的变性剂可以是6~10mol/L尿素,也可是4~6mol/L的盐酸胍,应通过实验确定。

15.2 变性蛋白的纯化

从包涵体中制备的变性蛋白中,除重组蛋白外还有一些宿主蛋白、核酸等。这些成分有时会影响重组蛋白的复性,因而可在复性前先对变性液进行纯化。纯化的方法主要有凝胶过滤层析法、离子交换层析法等。凝胶过滤层析法是变性蛋白纯化最常用的方法,它适合于各种变性剂和去污剂变性蛋白的纯化,而且,由于从包涵体制备的变性液蛋白浓度较高,也适合于凝胶过滤层析。

仪器和材料:

中压液相色谱仪

凝胶色谱柱(Supdex200 Φ 5.0cm \times 120cm 或其它凝胶柱)

变性蛋白:(含目的蛋白5~10mg/ml, 8mol/L尿素, 10mmol/LDTT, 10mmol/L Tris·Cl pH8.0)

流动相:(8mol/L尿素, 1mmol/LDTT, 10mmol/L Tris·Cl pH8.0)

操作步骤:

- (1) 将层析仪的A通道进液口放入装有8L流动相的试剂瓶中。
- (2) 将进样阀转至“inject”状态。使进样环和通道一起冲洗和平衡。
- (3) 冲洗A通道。
- (4) 接入Supdex200 Φ 5.0cm \times 120cm柱。

(5) A100%, 流速9ml/min平衡Supdex200 Φ 5.0cm \times 120cm凝胶层析柱5小时以上,待检测器输出信号基线平稳(用于平衡柱的流动相一般与溶解包涵体的变性液基本相同,以免变性蛋白因变性剂的浓度或种类的改变而发生沉淀)。

(6) 进样阀转至“load”状态,用注射器将25ml变性蛋白注入进样环,将进样阀转至“inject”状态。

- (7) 用流动相以流速9ml/min洗脱。
- (8) 进样后1.5小时开始,用分步收集仪,20ml/管收集洗脱液。
- (9) 取各洗脱峰对应的收集管样品50 μ l/管,SDS-PAGE分析。
- (10) 将含重组蛋白纯度较高的收集管的收集液合并,用于复性。

凝胶过滤层析时,进样体积一般为柱床体积的0.5%~2%,最多不超过5%。如果流动相为含高浓度盐酸胍的变性液,由于盐酸胍会与SDS反应产生沉淀,那么,步骤(9)的样品在作SDS-PAGE分析前应先对缓冲液透析,有些样品在透析时会发生沉淀,应将沉淀重悬后,取悬浊液用SDS-PAGE样品缓冲液溶解后作SDS-PAGE分析。

15.3 蛋白复性

15.3.1 影响蛋白复性的因素

蛋白复性过程主要包括肽链折叠和分子内二硫键的氧化,这是两个相互影响的过程,适当折叠的肽链常常有利于正确二硫键的形成,同时,正确的二硫键有利于折叠产物的稳定。

15.3.1.1 肽链折叠的条件

变性蛋白在变性剂去除或浓度降低后,就会自发地从变性时的热力学不稳定状态向热力学稳定状态转变。这一过程是一复杂的过程,其主要过程包括:变性剂去除或降低后,变性蛋白从伸展态迅速卷曲形成第一中间态,也称为融球态(MG)的形式,在这种状态,蛋白的疏水基团处于蛋白的表面,然后融球态蛋白表面的疏水性残基向蛋白内部折叠形成疏水核心,即转变为第二中间态,并进一步折叠形成天然态,这一过程相对缓慢,MG由于其表面的疏水性,在分子间碰撞中易于发生分子间可逆的暂时性缔合,形成二聚体,二聚体进一步缔合就会形成多聚体,最终形成沉淀。因而这一步往往是影响一些蛋白复性回收率的关键。影响复性时MG缔合和沉淀形成的主要因素有:蛋白浓度、变性剂浓度、复性方法等。

分子间的缔合与MG向第二中间态转变不同,后者主要是一级反应,其速度与蛋白浓度关系不大,而前者是多级反应,其反应速度往往随蛋白浓度的增加而加快,因而在变性蛋白复性工作中降低蛋白浓度往往能提高复性效果。但实际上过低的蛋白浓度又会给后续纯化工作造成困难。因而应通过实验选择适当的蛋白浓度,这一浓度通常为0.01~0.2mg/ml。

复性一般都是在水溶液中进行的,用稀释、透析等方法降低变性剂和还原剂的浓度,并加入适当的巯基氧化剂(这部分内容在后面讨论),变性蛋白就会自然复性,为了减少沉淀和聚体,往往需要在复性体系中保留低浓度的变性剂(通常是2~3mol/L的尿素或0.5~1mol/L的盐酸胍),对有些蛋白用逐步降低变性剂浓度的方法,以稳定复性中间体,有利于减少沉淀的产生。在有些蛋白的复性体系中加入一些高分子聚合物(如PEG等)、低浓度的表面活性剂(如Tween、Triton、SDS等)能提高复性率。这些化合物可能是通过与融球态中间体的疏水基团结合,减少这些中间体的疏水性,从而减少了分子间的缔合和沉淀的形成。另外,变性蛋白在固相复性有时也能减少分子间的缔合和沉淀的形成,固相复性是这样进行的,先将变性蛋白通过共价键、离子键等固定在固相介质上,然后降低变性剂浓度和加入巯基氧化剂,促使变性蛋白复性,然后将复性蛋白从固相介质上洗脱。由于蛋白分子固定在介质上,从而减少了分子间的碰撞和缔合。

分子伴侣是包括在热休克蛋白中的一类蛋白质,由于它们在体内能促进其它蛋白质的“组装”,但不参与其终产物的形成而得名,它在体外能促进蛋白的复性,但其作用机制还不完全清楚。

15.3.1.2 巯基氧化的条件

多数蛋白中含有分子内二硫键,正确的分子内二硫键对稳定蛋白构型,维持其生物活性有着重要的作用。但由于大肠杆菌内相对还原的环境,以包涵体形式表达的产物主要是以还原形式存在的,未能形成正确的分子内二硫键。因而通过巯基氧化形成正确的分子内二硫键是这类蛋白复性的一个重要步骤。巯基氧化是一个复杂的过程,它包括一系列的巯基配对和断开的“寻找”,最后完成使蛋白处于稳定态的正确巯基配对的过程。因而巯基氧化条件应即有利于二硫键的形成又有利于巯基配对和断开的“寻找”过程。巯基氧化方法有空气氧化、氧化还原剂介导的二硫键氧化等。

空气氧化:直接将还原蛋白置于空气中或对蛋白溶液鼓空气,空气中的 O_2 直接作为电子受体,使半胱氨酸残基氧化形成二硫键。在体系中加入微量的(10^{-6} mol/L) Cu^{2+} 或其它金属离子可加速空气氧化的速度。这种氧化方法的优点是成本低,缺点是缺乏能控制反应速度的方法。

氧化还原剂介导的二硫键氧化:最常用的氧化还原剂是氧化型谷胱甘肽和还原型谷胱甘肽,两者的比例一般在1:10至5:5,浓度一般为1mmol/L。谷胱甘肽氧化法已被广泛用于还原蛋白的氧化复性,这种方法的优点在于其氧化条件比较温和,通过控制氧化型和还原型谷胱甘肽的比例能较好地控制氧化复性的速度。其缺点在于谷胱甘肽价格较高,用于大规模生产时会提高产品生产成本。

15.3.2 蛋白复性方法

15.3.2.1 稀释复性

稀释复性是通过用缓冲液或含低浓度变性剂的溶液稀释蛋白变性液,使蛋白变性液中变性剂的浓度

下降,以促进变性蛋白肽链的折叠。稀释的方法有一步稀释、分步稀释和连续稀释等。在稀释的同时,在稀释液中加入谷胱甘肽、 Cu^{2+} 等巯基氧化剂,以促进二硫键的形成。一步稀释是在复性开始时将变性液用缓冲液或含低浓度变性剂的溶液快速稀释,使变性剂浓度和蛋白浓度一步降至较低浓度,其特点是操作简单,且复性开始时蛋白浓度已降至较低,有利于降低复性中间体的浓度,但由于变性剂浓度迅速降低,不利于复性中间体的稳定,因而有时反而易产生沉淀;分步稀释和连续稀释则是将变性液用缓冲液或含低浓度变性剂的溶液逐步稀释,以使变性剂浓度和蛋白浓度逐步降低,随着变性剂浓度的逐步降低,蛋白逐步复性,复性中间体存在于较高浓度变性剂溶液中,有利于稳定中间体,但由于蛋白浓度也是逐步降低的,在复性开始时,蛋白的浓度还较高,易于产生中间体缔合。对不同蛋白的复性采用何种稀释方法应由实验确定。

15.3.2.2 透析复性

透析复性是用不含重组蛋白的变性液将重组蛋白变性液中的蛋白浓度稀释到较低浓度(如 $0.01 \sim 0.2\text{mg/ml}$),而变性剂浓度不变,然后将稀释后的蛋白变性液装入透析袋中,用含低浓度变性剂和巯基氧化剂的复性液透析,以逐步降低变性剂浓度,并在巯基氧化剂存在条件下逐步复性,这种方法避免了一步稀释复性时变性剂浓度变化过快及分步稀释和连续稀释时,初始蛋白浓度较高的问题。这种方法的缺点是规模放大较困难。

材料:

变性蛋白溶液 5ml: 含 6mol/L 盐酸胍, 10mmol/L DTT, 20mmol/L Tris·Cl, pH8.0, 蛋白浓度约 5mg/ml

稀释用变性液: 6mol/L 盐酸胍, 20mmol/L Tris·Cl, pH8.0

复性液: 0.6mol/L 盐酸胍, 0.1mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 0.9mmol/L 还原型谷胱甘肽, 20mmol/L Tris·Cl, pH8.0

透析袋: 截留分子量为 3 000 道尔顿

操作步骤:

- (1) 将 5ml 变性蛋白溶液加入到 245ml 稀释用变性液中, 搅拌混合。
- (2) 稀释后的变性蛋白溶液装入预先处理过的三只 $\phi 25\text{mm} \times 300\text{mm}$ 透析袋中, 两端用透析袋夹夹紧。
- (3) 将透析袋放入一只装有 5L 复性液的烧杯中, 4°C , 搅拌透析 5 小时。
- (4) 将透析袋取出, 放入另一装有 5L 复性液的烧杯中, 4°C , 搅拌透析 10~15 小时。
- (5) 将透析袋取出放入另一装有 5L TE 缓冲液的烧杯中, 4°C , 搅拌透析 10~15 小时
- (6) 将透析袋中溶液合并。
- (7) 用低温高速离心机, 以 $10\,000\text{r/min}$ 的转速, 4°C 离心 30 分钟。
- (8) 上清用 $0.45\mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤。滤液即可用于纯化重组蛋白了。

若变性蛋白浓度未知, 应先测定其蛋白浓度, 然后再作稀释。一般把变性蛋白溶液中的蛋白浓度稀释至 $0.01 \sim 0.2\text{mg/ml}$, 蛋白浓度越低, 复性回收率往往越高, 但蛋白浓度越低, 后续纯化工作就越困难, 因而, 需通过实验确定合适的蛋白浓度。步骤 3 透析时, 也可采用分步透析的方法, 即先用盐酸胍浓度较高的复性液透析, 再用盐酸胍浓度较低的复性液透析。

15.4 蛋白复性的检测方法

蛋白复性程度的检测是蛋白复性方法和复性条件优化的重要依据, 常用的蛋白复性检测方法有反相高压液相色谱法、凝胶高压液相色谱法和活性测定法等。蛋白的生物活性是蛋白复性的重要标志, 因而活性测定常用作最终复性效果的判据, 活性测定方法一般是针对特定蛋白建立的, 常用的有细胞测活法

(用于一些细胞因子类蛋白)、酶活测定(用于一些酶类)等。细胞测活法,由于需对蛋白进行多次倍比稀释,且测定时间一般较长,未复性蛋白在这一过程中可能进行进一步的复性,因而一般不用于蛋白复性过程的研究。反相高压液相色谱法和凝胶高压液相色谱法,分析速度快,常用于蛋白复性过程的分析,用于检测复性速度和判断复性终点。其中反相高压液相色谱法是利用不同构型蛋白的疏水性不同,在反相色谱柱上会有不同的保留时间,从而分析蛋白不同复性状态的含量,常用于二硫键氧化程度的分析。凝胶高压液相色谱法根据不同构型的蛋白的水化半径不同,在凝胶色谱柱上有不同的保留时间,从而分析蛋白不同复性状态的含量,常用于肽链折叠程度的分析。

15.4.1 反相高压液相色谱法

仪器和材料:

高效液相色谱仪(HP1050或其它分析用高效液相色谱仪)

配紫外检测器

C8 ϕ 4.0mm \times 250mm 反相色谱柱(也可用 C18 色谱柱)

流动相 A: 0.1% TFA + 超纯水

流动相 B: 0.1% TFA + 乙腈。

目标蛋白标准品: 0.01mg/ml、0.03mg/ml、0.06mg/ml、0.1mg/ml

操作步骤:

- (1) 在高效液相色谱仪的 A、B 通道,分别放流动相 A 和流动相 B。
- (2) 冲洗 A、B 通道。
- (3) 开紫外检测器,设定检测波长为 280nm。
- (4) 以 100% A, 0.5ml/min 的流速平衡柱,至基线平稳。
- (5) 设定洗脱程序: 0min, 100% A, 0% B, 5min, 100% A, 0% B, 65min, 10% A, 90% B。
- (6) 进 20 μ l 0.1mg/ml 目标蛋白标准品,启动洗脱程序。测定标准蛋白(天然态)的保留时间,和峰面积。
- (7) 同步骤(6),分别测定 0.06mg/ml、0.03mg/ml、0.01mg/ml 目标蛋白标准品的峰面积。
- (8) 以蛋白浓度对峰面积作标准曲线。
- (9) 不同复性时间的复性蛋白样品用 0.45 μ m 滤膜过滤后,取 20 μ l 进样,启动洗脱程序。测定其天然态的峰面积,代入标准曲线计算复性蛋白含量,并除以复性初期加入复性体系的目标蛋白含量,计算复性率。

如果目标蛋白标准品难以得到,那么标准曲线可用其它已知浓度的蛋白作,并通过收集步骤(9)的各洗脱峰样品冻干后进行 SDS-PAGE 分析和活性测定及在反相高压液相色谱中复性蛋白的保留时间一般早于变性蛋白的保留时间这一规律来初步判段哪个峰是复性的目标蛋白峰。从而估算复性率。

15.4.2 凝胶高压液相色谱法

仪器和材料:

高效液相色谱仪(HP1050或其它分析用高效液相色谱仪)

配紫外检测器

TSK2000 色谱柱(也可用其它相似的凝胶色谱柱)

流动相 A: 20mmol/LPB, pH7.0, 0.6mol/L 盐酸胍

目标蛋白标准品: 0.01mg/ml、0.03mg/ml、0.06mg/ml、0.1mg/ml

操作步骤:

- (1) 在高效液相色谱仪的 A 通道,放流动相 A。

(2) 冲洗 A 通道。

(3) 开紫外检测器, 设定检测波长为 280nm。

(4) 以 100% A, 0.5ml/min 的流速平衡柱, 至基线平稳。

(5) 设定洗脱程序: 100% A, 45 分钟。

(6) 进 20 μ l 0.1mg/ml 目标蛋白标准品, 启动洗脱程序。测定标准蛋白 (天然态) 的保留时间和峰面积。

(7) 同步骤 (6), 分别测定 0.06mg/ml、0.03mg/ml、0.01mg/ml 目标蛋白标准品的峰面积。

(8) 以蛋白浓度对峰面积作标准曲线。

(9) 不同复性时间的复性蛋白样品用 0.45 μ m 滤膜过滤后, 取 20 μ l 进样, 启动洗脱程序。测定其天然态的峰面积, 代入标准曲线计算复性蛋白含量, 并除以复性初期加入复性体系的目标蛋白含量, 计算复性率。

如果目标蛋白标准品难以得到, 那么标准曲线可用其它已知浓度的蛋白测定, 并通过收集步骤 (9) 的各洗脱峰样品冻干后进行 SDS-PAGE 分析和活性测定及根据在凝胶高压液相色谱中复性蛋白的保留时间一般晚于变性蛋白的保留时间这一规律来初步判段哪个峰是复性的目标蛋白峰; 从而估算复性率。

15.4.3 细胞测活法

一些细胞因子的活性常用细胞测活法测定, 即在该因子的敏感的细胞株 (如 IL-2 的 CTIL 细胞; GM-CSF 的 TF1 等) 的培养液中加入细胞因子后, 细胞会受到刺激而生长。测定细胞的生长即可测定因子的生物活性。测定细胞生长的方法有 MTT 法、³H 掺入法等。其中 MTT 法由于操作简单, 不使用同位素等优点, 而被大量使用。该方法是利用细胞线粒体中的脱氢酶 (比如琥珀酸脱氢酶、心肌黄酶) 可以将四甲基偶氮唑盐 MTT 的唑环打开, 生成蓝色的产物甲臆 (Formazan)。并且甲臆的形成量与活细胞数和功能状态是成比例的。

材料和仪器:

细胞

细胞培养液

96 孔细胞培养板

血球计数板

MTT 溶液: 100mg MTT [3 - (4, 5 - Dimethylthiazol - 2 - yl) - 2, 5 - diphenyltetrazolium bromide]
37℃ 温浴溶解于 20ml 0.01mol/L pH7.4 PBS, 过滤除菌置棕色小瓶中, 4℃ 冰箱保存。

甲臆溶解液: 20% SDS, 0.01mol/L HCl。

细胞培养箱

酶标仪

操作步骤:

(1) 取 1~2 瓶细胞 (5~10ml), 将细胞悬液置于一支预先灭菌的 50ml 离心管中。

(2) 1000r/min, 离心 5 分钟, 轻轻倒去上清。

(3) 加入 10ml 不含细胞因子的培养液, 重悬细胞。

(4) 重复步骤 (2)、(3) 四次。

(5) 加入 10ml 不含细胞因子的培养液, 重悬细胞, 取一滴在血球计数板上计数。

(6) 加入适当量的不含细胞因子的培养液, 使细胞浓度为 $(1 \sim 5) \times 10^4$ 细胞/ml。

(7) 在无菌 96 孔细胞培养板上, 每孔加入 100 μ l 不含细胞因子的培养液。

(8) 在 96 孔板第二行的第一孔加 100 μ l 经适当稀释的样品, 混合后, 取 100 μ l 加入第二孔。如此一直稀释到第 12 孔。

- (9) 用步骤(8)相同的方法在第三和第四行稀释不同的样品。
- (10) 用步骤(8)相同的方法在第五行稀释标准品。第六行作为阴性对照。
- (11) 在第一和第八行各孔加入 100 μ l 不含细胞因子的培养液作为空白。
- (12) 在第二至第六行各孔加入 100 μ l 细胞。
- (13) 将 96 孔板置于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱培养 24~72 小时。
- (14) 取出 96 孔板, 每孔加入 20 μ l MTT 溶液, 将 96 孔板再置于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱培养 4~6 小时。
- (15) 取出 96 孔板, 每孔加入 80 μ l 甲腈溶解液。37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱孵育过夜。
- (16) 以空白孔为吸光度零点, 用酶标仪, 以波长 570nm 测定各孔的吸光度。
- (17) 以标准品的活性和吸光度关系的曲线标定样品的活性。

不同细胞株, 其测活所用的细胞浓度并不相同, 应通过实验确定, 一般为 $(1 \sim 5) \times 10^4$ 细胞/ml。加入细胞因子后的培养时间对不同的因子和细胞也是不同的, 可通过倒置显微镜观察 96 孔板中的细胞, 当阴性对照孔内的细胞大部分已破碎, 而标准品的前几孔(阳性孔)内的细胞生长良好时既可。

15.5 蛋白纯化

15.5.1 蛋白纯化的方法

蛋白纯化的方法很多, 主要有超滤、盐析、等电点沉淀、双水相萃取、液相层析等, 其中前四种方法分辨率较低, 一般用于蛋白的初纯化; 而液相层析, 由于近年来, 针对蛋白纯化工工艺的需要, 开发了适应各种工艺需要的凝胶, 并保持了液相层析分辨率较高的特点, 已被广泛用于蛋白纯化的各个工艺步骤。

广泛用于蛋白纯化的液相层析有: 离子交换层析、凝胶过滤层析、疏水层析、反相层析、亲和层析等。

1. 离子交换层析:

离子交换层析法是根据在某一 pH 条件下, 蛋白分子带电状态的不同来实现蛋白分离的, 其所用的层析介质是一类在基架上固定有离子化基团的凝胶, 由于不同蛋白所带的电荷不同, 因而与这些基团的结合能力也不同, 因而在含不同浓度反离子的溶液中, 其被洗脱的速度也不同。影响离子交换层析分离能力的因素主要有: pH、交换基团类型、盐浓度、上样量、柱的塔板数、洗脱梯度和流速等。

蛋白在高于其等电点的溶液中带负电, 可被阴离子交换介质吸附, 反之, 则可被阳离子交换介质吸附, 即 pH 的选择和交换基团类型选择是相关的, 但 pH 的选择首先应考虑蛋白的稳定性, 蛋白一般只能在一定的 pH 范围内稳定, 当溶液 pH 超出该范围, 则往往会引起蛋白的活性下降, 因而蛋白分离一般只能在这个 pH 范围内。如果蛋白在 pH 高于和低于其等电点的溶液中均能稳定存在, 则应通过实验, 根据分离能力来选择 pH 和交换基团类型; 离子交换层析要求样品含盐浓度低, 以利于被介质吸附, 含高浓度盐的样品应先通过透析、稀释或凝胶层析脱盐等方法处理, 降低盐浓度后再进行离子交换层析分离; 离子交换层析的上样量主要由介质的载量决定, 以毫升(或毫克)介质能吸附多少毫克蛋白表示, 各公司出售的介质, 都有其对某种蛋白(如 BSA)的载量, 可供参考, 但对特定分离条件下柱的载量和分离效果还应通过实验确定(表 15-1); 柱的塔板数主要取决于介质的直径、柱长和装填的均匀度, 柱的塔板数越多, 其分离能力越强; 减缓洗脱梯度, 降低流速, 也往往能提高分离效果。

表 15-1 蛋白分离中常用的离子交换介质

类 型	离子交换基团	工作 pH	基架	介质举例	厂 家
强阴离子交换凝胶	季铵盐	2~12	交联琼脂糖	Q Sepharose Fast Flow	Pharmacia
弱阴离子交换凝胶	二乙胺基乙基	2~9	交联琼脂糖	DEAE Sepharose Fast Flow	Pharmacia
			纤维素	DE52	Whatman
强阳离子交换凝胶	磺酸基	3~13	交联琼脂糖	SP Sepharose Fast Flow	Pharmacia
弱阳离子交换凝胶	羧甲基	6~13	交联琼脂糖	CM Sepharose Fast Flow	Pharmacia
			纤维素	CM52	Whatman

2. 凝胶过滤层析:

凝胶过滤层析是根据蛋白分子的大小来实现不同蛋白的分离的,其所用的层析介质是一类具有多孔结构,孔径范围比较集中、粒径也比较均匀的凝胶。层析时,蛋白样品从柱的上部随流动相向下部运动,分子较大的蛋白不能进入凝胶的孔中,而从介质颗粒之间通过,首先被洗脱;而分子较小的蛋白能进入凝胶的孔中,其通过的路径比分子较大的蛋白长,因而后被洗脱。影响凝胶过滤层析分离能力的因素主要有:凝胶的孔径、柱的塔板数、上样量、流速等。凝胶过滤常用的介质有 Pharmacia 公司的 Superdex、Sephacryl 系列等,各种介质适用的分离范围见表 15-2;柱的塔板数主要由介质颗粒的大小和均匀度、柱长、柱装填的均匀度等因素决定,对于凝胶过滤层析,柱的塔板数是决定柱的分离能力的主要因素之一,因而凝胶过滤层析一般采用颗粒较小、均匀的介质,而且柱较长;凝胶过滤层析上样量主要受上样体积的限制,上样体积过大,分辨率往往会下降,一般上样体积为柱体积的 0.5%~2%,最多不超过 5% (不包括 Sephadex G25 脱盐和换溶剂时,它的上样体积最多可为 30%);流速过快也会影响分辨率,各种介质一般都有其建议流速,该流速一般是指以低盐浓度的缓冲液为流动相时的流速,当流动相中含高浓度的盐酸胍,尿素等变性剂时,由于流动相粘度较大,应适当降低流速。

表 15-2 蛋白分离中常用的凝胶过滤层析介质 (Pharmacia 公司产品)

介质	分离范围 (kD)	颗粒大小 μm	建议流速 (cm/h)
Sephadex G25fine	1~5*	20~80	150
Superdex30	<10	24~44	100
Superdex75	3~70	24~44	100
Superdex200	10~600	24~44	100
Sephacryl			
S-100HR	1~10	25~75	20~39
S-200HR	5~250	25~75	20~39
S-300HR	10~1500	25~75	20~39

* Sephadex25 常用于将蛋白与小分子物质分离,如脱盐、换缓冲液等。

3. 反相层析:

反相层析是根据蛋白分子表面疏水性的不同来实现不同蛋白的分离的,其所用的层析介质是一类在基架上固定有疏水配体的凝胶,其疏水配体常用的是 C_4 、 C_8 和 C_{18} 烷基,配体碳链越长疏水性也越强。水溶液中的蛋白可通过疏水结合被介质吸附,逐渐增加流动相中有机溶剂(如乙腈、甲醇、乙醇等)的含量,可降低流动相的极性,使疏水性弱的蛋白先被洗脱,疏水性强的蛋白后被洗脱。反相层析一般分离能力较强,可用于蛋白的精细纯化,但由于纯化过程使用有机溶剂,有时会影响蛋白的活性。反相层析介质常用的基架为硅胶,可耐几至几十兆帕的压力,因而广泛用于高压层析,但硅胶在碱性溶液中不稳定,因而分离过程应在酸性环境中进行,常用方法的是在流动相中加入 0.1% 的三氟乙酸。反相层析

介质生产厂家较多,但作为蛋白分离用的反相层析介质应选择孔径较大(30nm或以上)的介质。

4. 疏水层析:

疏水层析是近年来发展起来的一种层析方法,是根据蛋白分子表面疏水性的不同来实现不同蛋白的分离的,其所用的层析介质是一类在支持物上固定有疏水配体的凝胶,与反相层析介质不同的是疏水配体的疏水性较弱,且其配体的含量也较少,因而需要在蛋白溶液中加入一定浓度的盐(如1~2mol/L的硫酸铵、硫酸钠等)才能使蛋白被介质吸附(表15-3),当逐渐降低盐浓度后,疏水弱的蛋白先被洗脱,疏水强的蛋白后被洗脱。由于疏水层析洗脱时未使用有机溶剂,从而可避免有机溶剂对蛋白活性的影响,且其高盐浓度时吸附,低盐浓度时洗脱的特性非常适合与盐析、离子交换层析等纯化步骤衔接。影响疏水层析分离能力的因素主要有:疏水层析介质类型、pH、温度、上样量、柱的塔板数、洗脱梯度和流速等。但疏水介质类型、pH、温度等条件的选择还缺乏理论依据,主要是依靠实验确定。

表 15-3 蛋白分离中常用的疏水层析介质 (Pharmacia 公司产品)

介 质	配 体	配体含量 ($\mu\text{mol/ml}$)	颗粒大小 (μm)
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high Sub)	苯基	40	45 ~ 165
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low Sub)	苯基	20	45 ~ 165
Phenyl Sepharose High Performance	苯基	25	24 ~ 44
Octyl Sepharose 4 Fast Flow	正辛烷基	5	45 ~ 165
Butyl Sepharose 4 Fast Flow	正丁烷基	6 ~ 14	45 ~ 165

5. 亲和层析:

前四种层析都是利用蛋白的物理化学特性进行分离的,而亲和层析则是利用配基与配体之间的特异性吸附(如抗原-抗体、底物-酶等),即利用蛋白的特异生物活性来进行分离。因而具有很高选择性,但这类层析都是针对特定的蛋白建立起来的,一般没有通用的方法和介质。

15.5.2 蛋白纯化的操作方法

以下以一种重组蛋白(等电点约为5.9)为例,介绍蛋白纯化的操作方法。

材料和仪器:

中压层析仪: Waters650E 美国 Waters 公司

阴离子交换柱: DEAE Sepharose Fast Flow Φ 1.6cm \times 15cm

疏水层析柱: Phenyl Sepharose High Performance Φ 2.6cm \times 15cm

凝胶层析柱: Sephadex G25fine Φ 5.0cm \times 35cm

酸度计

抽滤装置: 配 0.45 μm 滤膜, 抽滤瓶体积为 5L

复性液: 含 20mmol/L Tris \cdot Cl, pH8.4, 蛋白浓度为 100~150 $\mu\text{g/ml}$, 1.5L

TE 缓冲液: Tris \cdot Cl 20mmol/L, pH7.0, 使用前抽滤脱气, 1L

B 溶液: NaCl 1mol/L, Tris \cdot Cl 20mmol/L, pH7.0 使用前抽滤脱气, 1L

C 溶液: Na₂SO₄, Tris \cdot Cl 20mmol/L, pH7.0 使用前抽滤脱气, 1L

操作步骤:

1. 复性液的初纯化:

(1) 1.5L 复性液中边搅拌边滴加 1mol/LHCl, 并用酸度计测定溶液 pH, 至 pH 为 7.0, 继续搅拌 30 分钟。

(2) 复性液用装有 0.45 μm 滤膜的抽滤装置抽滤。

(3) 将层析仪的 A 通道进液口放入装有 1L TE 缓冲液的试剂瓶中, 将层析仪的 B 通道进液口放入装有 1L B 溶液的试剂瓶中。

(4) 先冲洗 B 通道, 再冲洗 A 通道。

(5) 开紫外检测器, 设定检测波长为 280nm。

(6) 接入 DEAE Sepharose Fast Flow Φ 1.6cm \times 20cm 柱。

(7) A100%, 流速 6ml/min 平衡柱 50 分钟。

(8) 将 A 通道进液口的 TE 缓冲液换成抽滤后的复性液, 以 A100%, 流速 6ml/min 上样, 上样后再将 A 通道进液口的溶液换回成 TE 缓冲液。(也可用 C 通道上样, 但通道内易残留样品。)

(9) A100%, 流速 2ml/min 冲洗柱 30 分钟。

(10) 梯度洗脱: 流速 2 ml/min, 0 \rightarrow 60min; A100% \rightarrow 70%, B0% \rightarrow 30%

60 \rightarrow 70min; A70% \rightarrow 0%, B30% \rightarrow 100%

在整个过程中用试管, 4ml/管收集洗脱液。

(11) 每个收集管取 20 μ l 样, 作 SDS-PAGE 分析, 将含目的蛋白, 且纯度较高的收集管样品合并, 用于进一步纯化。

对一个未知蛋白, 可先采用 A 100% \rightarrow 0%, B 0% \rightarrow 100% 的线性梯度洗脱。初步确定目标蛋白洗脱的 NaCl 浓度后, 再采用阶段梯度洗脱, 以提高分辨率, 缩短洗脱时间。

2. 蛋白的精细纯化:

疏水层析:

(1) 在蛋白样品中加入硫酸钠至浓度为 1mol/L

(2) 溶液用装有 0.45 μ m 滤膜的抽滤装置抽滤。

(3) 将层析仪的 A 通道进液口放入装有 1L TE 缓冲液的试剂瓶中, 将层析仪的 B 通道进液口放入装有 1L C 溶液的试剂瓶中。

(4) 将进样阀转至 “inject” 状态。使进样环和通道一起冲洗和平衡。

(5) 先冲洗 A 通道, 再冲洗 B 通道。

(6) 接入 Phenyl Sepharose High Performance Φ 2.6cm \times 15cm 柱。

(7) B100%, 流速 4ml/min 平衡柱 60 分钟。

(8) 进样阀转至 “Load” 状态, 用注射器将加入硫酸钠的初纯化蛋白溶液注入进样环, 将进样阀转至 “inject” 状态。

(9) B100%, 流速 4ml/min 冲洗柱 30 分钟。

(10) 梯度洗脱: 流速 4ml/min, 0 \rightarrow 20min; B100% \rightarrow 50%, A0% \rightarrow 50%

20 \rightarrow 120min; B50% \rightarrow 0%, A50% \rightarrow 0%

在整个过程中用试管, 4ml/管收集洗脱液。

(11) 每个收集管取 20 μ l 样, 作 SDS-PAGE 分析, 将含目的蛋白, 且纯度 > 95% 样品收集管合并。

对一个未知蛋白, 可先采用 B 100% \rightarrow 0%, A 0% \rightarrow 100% 的线性梯度洗脱。初步确定目标蛋白洗脱的硫酸钠浓度后, 再采用阶段梯度洗脱, 以提高分辨率, 缩短洗脱时间。

3. 蛋白脱盐:

(1) 将层析仪的 A 通道进液口放入装有 2L 20mmol/L PB, pH7.0 溶液的试剂瓶中。

(2) 冲洗 A 通道后, 将 Sephadex G25fine Φ 5.0cm \times 35cm 柱接入。

(3) A100%, 流速 15ml/min 平衡柱 60 分钟。

(4) 将 A 通道进液口的 PB 换成纯化的蛋白溶液, 以 A100%, 流速 15ml/min 上样, 上样完成后, 再将 A 通道进液口的溶液换回成 PB, 用于洗脱。

(5) A100%, 流速 15ml/min 洗脱。

(6) 收集第一峰即为蛋白纯品。

15.5.3 层析柱的清洗

有时, 溶液中的一些物质, 如变性蛋白, 脂类等, 会吸附在层析柱上, 用通常的洗脱程序并不能将其洗脱, 经多次纯化过程后, 这些物质逐渐累积, 这不仅会影响柱的载量、分辨率, 而且会使柱的反压上升, 流速下降。这种现象在蛋白复性液初纯化时尤其显著。因而层析柱在使用一定次数后应进行清洗。不同的介质所能耐受的清洗的方法是不同的, 重组蛋白纯化中常用的以交链琼脂糖为基架的介质稳定性都较好, 一般能耐受 0.5 ~ 1.0mol/L NaOH、高浓度的胍盐、尿素、以及乙醇、异丙醇等的清洗(清洗前应查阅厂家提供的介质的稳定性说明)。清洗的方法应视沉积在柱上的污染物而定, 如果污染物以变性蛋白为主, 则可用 0.5 ~ 1.0mol/L NaOH 清洗, NaOH 清洗能去除绝大多数变性蛋白和一些脂类, 是常用的清洗方法; 当污染物主要为疏水性较强的蛋白, 脂蛋白或脂类时, 可用 70% 乙醇或 30% 异丙醇清洗, 或先用溶于 1mol/L 乙酸的 0.5% 的非离子型去污剂(如 Triton X-100)清洗, 再用 70% 乙醇清洗。

材料和设备:

中压层析仪: Waters 650E 美国 Waters 公司

阴离子交换柱: DEAE Sepharose Fast Flow Φ 1.6cm \times 20cm 柱, 用于蛋白复性液初纯化 5 ~ 10 个周期, 污染物主要为变性蛋白和一些脂类

抽滤装置: 配 0.45 μ m 滤膜

TE 缓冲液: Tris·Cl 20mmol/L, pH7.0, 使用前抽滤脱气, 1L

NaOH 溶液: 0.5mol/L, 1L, 使用前抽滤脱气

实验步骤:

(1) 将层析仪的 A 通道进液口放入装有 1L TE 缓冲液的试剂瓶中, 将层析仪的 B 通道进液口放入装有 1L 0.5mol/L NaOH 溶液的试剂瓶中。

(2) 先冲洗 A 通道, 再冲洗 B 通道。

(3) 将柱反接入层析仪, 即使溶液从柱的下部进, 上部出。

(4) B100%, 流速 2ml/min, 洗柱 2 小时。

(5) A100%, 流速 2ml/min, 洗柱 2 小时以上, 使流出液的酸碱度接近中性。

(6) 将柱改为正接入层析仪, 即使溶液从柱的上部进, 下部出。

(7) A100%, 流速 6ml/min, 平衡柱 1 小时。

若该柱需要长期保存, 则进行步骤 (8) ~ (12)。

(8) 将 A、B 通道进液口的 TE 缓冲液和 NaOH 换为 500ml 超纯水, 冲洗 A、B 通道。

(9) A100%, 流速 8ml/min, 平衡柱 30 分钟。

(10) 将 A 通道进液口的 TE 缓冲液换为 500ml 20% 乙醇, 冲洗 A 通道。

(11) A100%, 流速 4ml/min, 平衡柱 20 ~ 40 分钟。

(12) 将柱从层析仪上卸下, 封闭柱的进出口, 4℃ 保存。

无论是通道内, 还是柱内, 当从盐溶液或 NaOH 溶液换为乙醇溶液时, 应先用纯水冲洗, 以免两者混合时产生盐析出, 引起管路或柱堵塞。

15.6 蛋白含量测定

蛋白的含量和纯度是复性时确定复性浓度、纯化时确定上样量、计算回收率、选择纯化途径等的依据。蛋白纯度测定的方法主要有 SDS-PAGE (还原和非还原)、反相 HPLC、凝胶 HPLC 等, 其中 SDS-PAGE 的操作步骤在本书第三章已经介绍了, 蛋白纯度的反相 HPLC 法和凝胶 HPLC 法分析可参考本章第

四部分介绍的用于蛋白复性检测的反相 HPLC 法和凝胶 HPLC 法。

蛋白的含量的测定方法主要有紫外分光光度法、Lowry 法、BCA 法等。

15.6.1 紫外分光光度法

原理:

蛋白质中的酪氨酸和色氨酸残基的苯环在 275 ~ 280nm 有一紫外吸收峰。在一定浓度范围内, 其在 280nm 的吸光度与蛋白浓度成正比。

方法:

取适量蛋白溶液 (约 3.5ml), 置于光径为 1cm 的石英比色杯、用与溶解蛋白的缓冲液相同的缓冲液为对照, 在 280nm 波长处测定吸光度, 吸光度为 1.0 的蛋白溶液, 蛋白浓度约为 1.0mg/ml。当溶液中含少量核酸时, 应同时测定 260nm 波长处的吸光度, 以下式估算蛋白浓度: 蛋白浓度 (mg/ml) = $1.55A_{280} - 0.75A_{260}$ 。该测定方法误差较大, 有紫外光吸收的物质 (如核酸) 干扰大。

15.6.2 Lowry 法

Lowry 法是目前最常用的蛋白浓度测定方法。该方法灵敏度较高, 线性范围为 20 ~ 100 μ g/ml。该方法干扰因素主要有: 高浓度的胍盐、尿素等变性剂, Triton、Tween 等去垢剂, EDTA 等螯合剂, 以及 Tris、甘氨酸等等。

材料和仪器:

4% Na_2CO_3

0.2mol/L NaOH

1% CuSO_4

2% 酒石酸钠

试剂 A: 使用前, 将 1、2、3、4 试剂以 50:50:1:1 的比例混合均匀, 当天使用。

试剂 B: 酚试剂

分光光度计

操作步骤:

- (1) 准确称取 10mg 标准蛋白 (常用牛血清白蛋白或人血清白蛋白) 加蒸馏水溶解定容至 100ml。
- (2) 取 6 支试管分别编为 0 ~ 5 号, 分别加入步骤 (1) 制备的标准蛋白溶液 0、0.08、0.16、0.24、0.32、0.40ml, 并都用蒸馏水补足至 0.4ml。
- (3) 各试管加入试剂 A 2ml, 混匀, 室温放置 10 分钟。
- (4) 各试管加入试剂 B 0.2ml, 立即混匀, 室温或 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中, 保温 30 分钟。
- (5) 在分光光度计上, 以 0 号为参比, 测定各管样品在 750nm 的吸光度值。
- (6) 以蛋白浓度为横座标, 吸光度为纵座标绘制标准曲线, 或作直线回归。
- (7) 取样品溶液 0.4ml, 按步骤 (1) ~ (5) 测定, 将测得的吸光度值代入上述标准曲线, 计算蛋白浓度。

如果样品浓度过高, 可用蒸馏水作适当稀释。

15.6.3 BCA 法

BCA 法是近年来发展起来的蛋白浓度测定方法, 其优点是抗干扰能力强, 其原理是: 在碱性溶液中, 蛋白将二价铜还原成一价铜, 后者与试剂中的 BCA (二辛可酸, Bicinchoninic acid) 形成一个在 562nm 处具有最大吸光度的紫色复合物, 其吸光度与蛋白浓度成正比, 线性范围 20 ~ 100 μ g/ml。

材料和仪器:

试剂 A: 1% BCA 二钠盐, 2% 碳酸钠, 0.16% 酒石酸钠, 0.4% 氢氧化钠和 0.95% 碳酸氢钠。
用 50% NaOH 或碳酸氢钠调 pH11.25。

试剂 B: 4% 硫酸铜

工作液: 100 倍体积试剂 A 与 2 倍体积试剂 B 混合。

操作步骤:

- (1) 准确称取 10mg 标准蛋白 (常用牛血清白蛋白或人血清白蛋白) 加蒸馏水溶解定容至 100ml。
- (2) 取 6 支试管分别编为 0 ~ 5 号, 分别加入步骤 1 制备的标准蛋白溶液 0、20、40、60、80、100 μ l, 并都用蒸馏水补足至 100 μ l。
- (3) 各试管加入工作液 2ml, 混匀, 37℃ 水浴保温 30 分钟。
- (4) 在分光光度计上, 以 0 号为参比, 测定各管样品在 562nm 的吸光度值。
- (5) 以蛋白浓度为横座标, 吸光度为纵座标绘制标准曲线, 或作直线回归。
- (6) 取样品溶液 100 μ l, 按步骤 1 ~ 4 测定, 将测得的吸光度值代入上述标准曲线, 计算蛋白浓度。如果样品浓度过高, 可用蒸馏水作适当稀释。

(吴 军 文 马清钧 审)

参考文献

- [1] Cleland JL, et al. Transient association of the first intermediate during the refolding of bovine carbonic anhydrase B. *Biotechnol. Prog.*, 1992, 8 (2) :97 ~ 103.
- [2] Mach H, et al. Partially structured self-associating states of acidic fibroblast growth factor. *Biochemistry*, 1993, 32: (30) :7703 ~ 7711.
- [3] Lowry OH. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Bio Chem*, 1951, 193:265
- [4] Smith PK, et al: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem*, 1985, 150: (1) 76 ~ 85.

16. 动物细胞的大规模培养

细胞培养 (cell culture) 或组织培养 (tissue culture) 是指将组织或细胞从机体取出, 给予必要的生长条件, 模拟体内生长环境, 使其在体外继续生长和增殖。细胞培养和组织培养并无严格区别。一方面, 现代培养技术尚不能在体外长期维持组织的结构和机能长期不变, 随着培养时间的延长, 特别是反复传代, 很容易导致细胞发生变化和出现单化现象, 即趋向于变成单一类型细胞, 最终成为细胞培养; 另一方面, 细胞培养也并不意味细胞彼此是完全独立的, 细胞在培养中的生命活动和体内时基本相同, 仍然是相互依存、互相影响的, 呈现着一定的“组织”特性。

随着本世纪 70 年代细胞生物学和分子生物学的相互渗透, 分子克隆技术与细胞培养技术相结合, 以及 80 年代生物医药产业的崛起, 细胞培养技术成为纳入分子生物学技术体系的一种关键技术, 同时也是将生物工程的实验室研究成果向产业化生产开发的关键环节。

严格地说, 细胞培养应包括动物和植物的组织或细胞的培养。本节仅就动物细胞培养的基本知识和技术作扼要的介绍。

16.1 培养细胞的特性

16.1.1 培养细胞的生长方式及类型

体外培养的细胞, 按其生长方式可分为贴附生长型细胞和悬浮生长型细胞两大类。

16.1.1.1 贴附生长型细胞

为能附着于底物 (支持物) 表面生长的细胞。包括非淋巴组织的细胞和许多异倍体体系的细胞都属于这一类型。当这类细胞从活体体内转移到体外培养时, 必须贴附于底物才能生长。这些细胞在活体体内时, 各自具有其特殊的形态, 但是处于体外培养状态下的贴附生长型细胞则常在形态上表现为比较单一化而失去其在体内原有的某些特征, 并反映出其胚层起源的情况。一般可将贴附生长的体外培养的细胞从形态上大体分为上皮细胞型和成纤维细胞型, 还有一些难于确定其稳定形态的细胞。

16.1.1.2 悬浮生长型细胞

少数细胞类型在体外培养是不需要附着于底物而于悬浮状态下即可生长, 来源于血液、淋巴组织的细胞, 许多肿瘤细胞 (包括杂交瘤细胞) 和某些转化细胞均属于这一类型。这些细胞在悬浮培养中生长良好, 可以是单个细胞或细小的细胞团, 细胞呈圆形。由于细胞悬浮生长于培养基中, 因此细胞生长空间大, 具有能够提供增殖大量细胞、传代方便、易于收获细胞的优点。

16.1.2 培养细胞的生长特点

细胞在体外培养生长时具有一些特点, 其中特别是细胞贴附和接触抑制、密度依赖性。

16.1.2.1 贴附

附着于一定的底物并伸展, 是大多数体外培养细胞的基本生长特点。支持细胞生长的底物可以是其他细胞、胶原、玻璃或塑料等。培养细胞在未贴附于底物之前一般呈球体状, 当与底物贴附后, 细胞将逐渐伸展而形成一定的形态, 呈上皮细胞样或成纤维细胞样等。细胞附着于底物并非是一种需能的过程, 一般认为与电荷有关。一些特殊的促细胞附着的物质 (如基膜素、纤维连结素、Ⅲ型纤维、血清扩展因子等) 可能参与细胞的贴附过程。这些促细胞附着因子均为蛋白质, 存在于细胞膜表面或培养基中以

血清之中。在培养过程中,这些带阳电荷的促贴附因子先吸附于底物上,悬浮的球形细胞再以已吸附有促贴附物质的底物附着,进而细胞逐渐伸展成其原来的形态。另外,细胞的贴附和伸展,还受培养体系中的某些物理和化学因素的影响。如低钙离子浓度、高 pH、低温或培养基的流动过快等均可妨碍细胞的贴附。一般来说,除非是转化了的细胞或肿瘤细胞,从底物脱离下来的贴附生长型细胞,不能长期在培养基中悬浮生长而将逐渐退变。

16.1.2.2 接触抑制及密度依赖性

接触抑制是体外培养中某些贴附生长型细胞的生长特性之一。正常细胞在培养中存在不停顿的活动或移动,其外周的细胞膜呈现某些特征性的皱褶样活动。当两个细胞移动而互相靠近时,其中之一或二者将停止移动,继而向另一方向移动,这就保证了细胞不会发生重叠。当一个细胞被其他细胞围绕而发生接触时,细胞不再移动,接触区域的细胞膜皱褶样活动停止。此即细胞接触抑制。因此,正常细胞一般并不互相重叠于其上而生长。转化细胞或肿瘤细胞则因细胞间的接触抑制作用不明显,细胞之间可相互重叠生长。

当正常细胞生长、汇合形成单层时,细胞间变得比较拥挤,扁平形状的程度减小,与培养基接触的表面区域也因而减少,同时培养基中的一些营养物质被逐渐消耗掉、代谢产物不断积累,细胞停止分裂增殖。细胞可在静止状态维持存活一段时间,其终末细胞密度常与培养基中的血清浓度有关。细胞的这种特性即为密度抑制。转化细胞或肿瘤细胞则因细胞间的密度抑制程度较低,细胞可生长至较高的终末细胞密度。

16.1.3 培养细胞的生长过程

16.1.3.1 单个细胞的生长过程:细胞周期

细胞的增殖是通过细胞的有丝分裂来实现的。细胞从一次分裂结束后起始,到下一次分裂终止所经历的过程,称为增殖细胞的细胞周期。细胞周期包括细胞 DNA 合成前期(G_1)、DNA 合成期(S)、DNA 合成后期(G_2)和分裂期(M)。从细胞增殖的角度,细胞可分为三类:连续分裂的细胞、休眠细胞和不分裂的终端分化细胞。连续分裂的细胞即在细胞周期中连续运转的细胞,故又称为周期性细胞。休眠细胞为暂时脱离细胞周期,不进行增殖,但在适当刺激下可重新进入细胞周期的细胞,也称作 G_0 期细胞。终端分化细胞是指那些不可逆地脱离细胞周期,丧失分裂能力,保持生理机能活动的细胞。

(1) G_1 期:发生在上一次 M 期之后,故也称为细胞分裂后期。在 G_1 期主要发生与 DNA 合成前有关的生化变化,如 DNA 聚合酶和 RNA 的合成等。各种细胞 G_1 期持续的时间差别很大,短者 4~5 小时,长者可达数日。增殖旺盛的细胞 G_1 期持续时间短,衰退细胞持续时间长。

(2) S 期:主要进行 DNA 的合成,各种细胞 S 期持续时间的差别较小,一般为 6~8 小时。用 5-氟尿嘧啶等能抑制细胞 DNA 的合成。

(3) G_2 期:发生在细胞分裂之前,故也称为细胞分裂前期。细胞进入 G_2 期后, DNA 量加倍。在 G_2 期主要的变化是 RNA 的合成和染色体的螺旋化。在 G_2 期,蛋白质的合成与细胞的分裂有关,若此期内蛋白质的合成受阻,将影响细胞进行分裂。处于 G_2 期的细胞对周围环境较敏感,易因温度、pH 等的影响而停留在 G_2 期。 G_2 期持续时间较短,一般为 2~3 小时。

(4) M 期:是细胞分裂阶段。细胞处于分裂阶段时称为分裂相。细胞分裂相的多少可作为判断细胞生长和增殖的参考指标。M 期的持续时间很短,也较稳定,一般只有 1~2 小时。依照细胞分裂的进程, M 期又可分为前、中、后和末 4 期。

细胞周期是反映细胞增殖规律的主要参数。在一定条件下,细胞由 G_0 期进入细胞周期,细胞增殖生长;在某些条件下则由细胞周期进入 G_0 期。不同的动物细胞的细胞周期所需的时间(t_c)各异。一个细胞周期内各期的时间(t_{G_1} 、 t_S 、 t_{G_2} 、 t_M)随细胞的生长状态而变化。在细胞培养过程中,细胞周期

活动并非恒定,常随培养阶段不同而有所变化。如在细胞接种或传代后,细胞并不立即进入活跃的细胞周期,一般需要经过一个潜伏期。潜伏期是细胞适应或同化培养基的过程。不同培养细胞的潜伏期长短不一。传代细胞系的潜伏期较短,原代培养细胞的潜伏期较长。潜伏期的长短也与接种细胞的数量有关,一般细胞多比细胞少时潜伏期短。此外,有关细胞周期调控的研究,发现了许多具有调控细胞周期的因素,如DNA合成的诱导剂及其抑制剂、有丝分裂因子及其抑制剂、各种生长因子、激素、多胺、cAMP和多种抑素等,为培养细胞增殖的调控提供了理论和方法。其中特别引起注意的是各种生长因子,许多生长因子已被提纯,并已确定其功能和结构。许多生长因子的受体具有蛋白激酶活性,在生长调节中通过对靶蛋白磷酸化实现其对细胞的增殖调节作用。

16.1.3.2 细胞系的生长过程

取自动物并置于体外培养中的细胞在其传代之前称为原代培养或原代细胞。当细胞持续生长增殖一段时间,达到一定的细胞密度后,就应将细胞分成两部分或更多至新的培养器皿并补充新鲜的培养基,此即为细胞传代或再培养。细胞传代生长后,便成为细胞系。正常细胞的细胞系的寿命只能维持一定的时间期限,称为有限(生长)细胞系。细胞系在培养中能够存活时间的长短,主要取决于细胞来源的种类、组织及年龄。

体外培养细胞的生长过程一般可分为三个阶段(图16-1)。

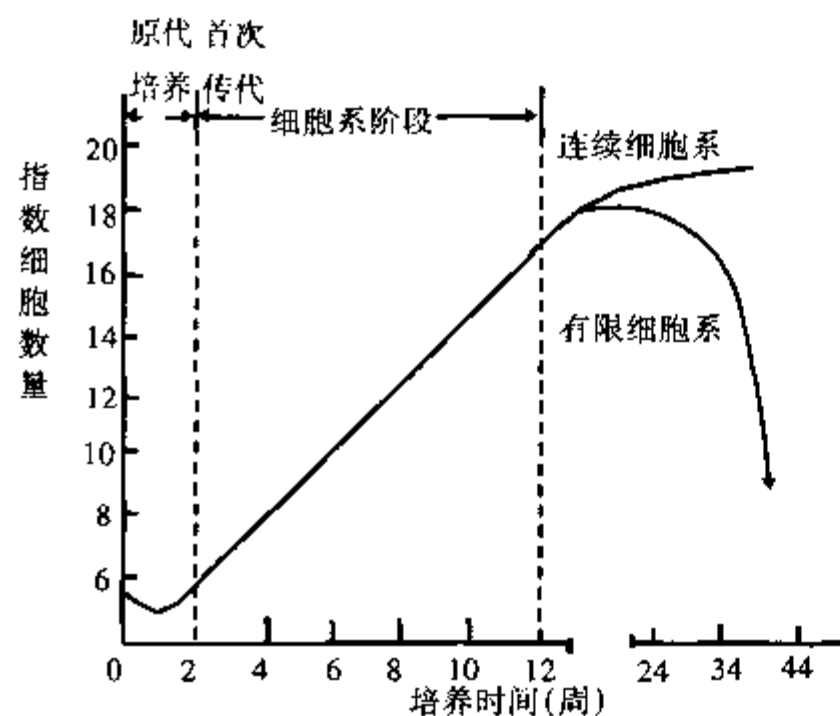


图 16-1 细胞系生长过程示意图

(1) 原代培养或初代培养期: 为新鲜组织细胞自体内取出并在体外培养生长至第一次传代的时期。原代培养通常为异质性, 含较少的生长组分, 为二倍体核型。此期中的细胞移动比较活跃, 细胞分裂不旺盛。原代培养的细胞与体内相应的细胞性状相似, 更能代表其来源组织的细胞类型和组织特异性。

(2) 传代期: 原代培养的细胞生长一定时间后, 如贴附型细胞即融合成片而逐渐铺满底物的表面, 此时便应将原代细胞分开接种至2个或更多的培养器皿中, 即传代。细胞传代大约数天至一周左右即可重复一次, 持续数月。传代期的细胞增殖旺盛, 一般仍是二倍体核型, 并保留原组织细胞的很多特征。细胞经长期反复传代, 将逐渐失去其二倍体性质, 至一定期限后(约在传代30~50次后)

细胞增殖变慢, 进入衰退期。

(3) 衰退期: 有限细胞系在此期的细胞开始时虽仍然存活, 但增殖已明显减慢并逐渐完全停止, 继而细胞衰退、死亡。体外培养的细胞有所谓的“危机期”(crisis)。有限细胞系生长过程中若不能通过“危机期”, 将进入衰退期而趋于死亡。但是, 并非所有原代培养的传代细胞最后全部都发生死亡。传代细胞中可有极少数的后代细胞能通过“危机期”, 获得不死性而具有持久或无限增殖的能力。这种细胞即称为无限细胞系或连续(生长)细胞系。培养细胞无限增殖生长的能力能否获得, 与其种族、来源及性质有关。

16.1.3.3 每代细胞的生长过程

细胞自接种至新培养器皿到其下一次再传代接种的时间为细胞的一代。对于群体细胞的生长, 一般可分为滞后期、对数生长期、稳定期和衰退期(图16-2)。

(1) 滞后期: 包括悬浮期(游离期)及潜伏期。当细胞接种入新的培养器皿时, 细胞的胞质收缩, 胞体呈圆球形, 悬浮于培养基中。经过一段时间后, 有活力的细胞开始附着于底物并逐渐伸展, 恢复其原

来的形态,但尚无细胞增殖分裂。此后出现细胞分裂并逐渐增多而进入指数生长期。正常细胞的滞后期约为24~96小时,肿瘤细胞及连续细胞系的滞后期较短,可少于24小时。

(2) 对数生长期:经过滞留期准备,细胞生长所需的各种营养条件具备后,细胞进入对数生长期。此期细胞增殖旺盛,某一时刻细胞数的增长速率与细胞数成正比。如果假设此时细胞生长所需的营养物质均能满足,代谢产物又不致影响细胞的正常分裂增殖,则可用如下微分方程表示细胞的生长速率:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \quad (16-1)$$

式中 N —时间 t 时细胞数; μ —细胞比生长率。

通过积分,就可以得出从时间 t_1 到时间 t_2 , 细胞数从 N_1 到 N_2 的变化。由(16-1)可得

$$\int_{N_1}^{N_2} \frac{1}{N} dN = \int_{t_1}^{t_2} \mu dt \quad (16-2)$$

$$N_2 = N_1 e^{\mu(t_2-t_1)} \quad (16-3)$$

可见细胞的生长是呈指数形式增加的,因此,对数生长期又称指数生长期。此期持续时间的长短因细胞本身的特性及培养条件而异,一般可持续3~5天。

(3) 稳定期:细胞在体积和营养含量固定的培养基中培养,一方面营养成分终究要耗尽,另一方面细胞代谢的产物也将达到对细胞生长不利的浓度,因而细胞是不能无限制地生长的。当细胞增殖到一定程度时,细胞数不再增加,而是保持一个相对恒定的值。此时细胞虽仍保持分裂增殖,但增殖的细胞数与死亡的细胞数相当,从而保持着一种动态平衡,因此,称为稳定期。

(4) 衰退期或死亡期:处于稳定期的细胞如不传代或不加入新鲜培养基,则会进入死亡期或衰退期。此时死亡细胞数超过细胞分裂数,细胞数迅速减少。

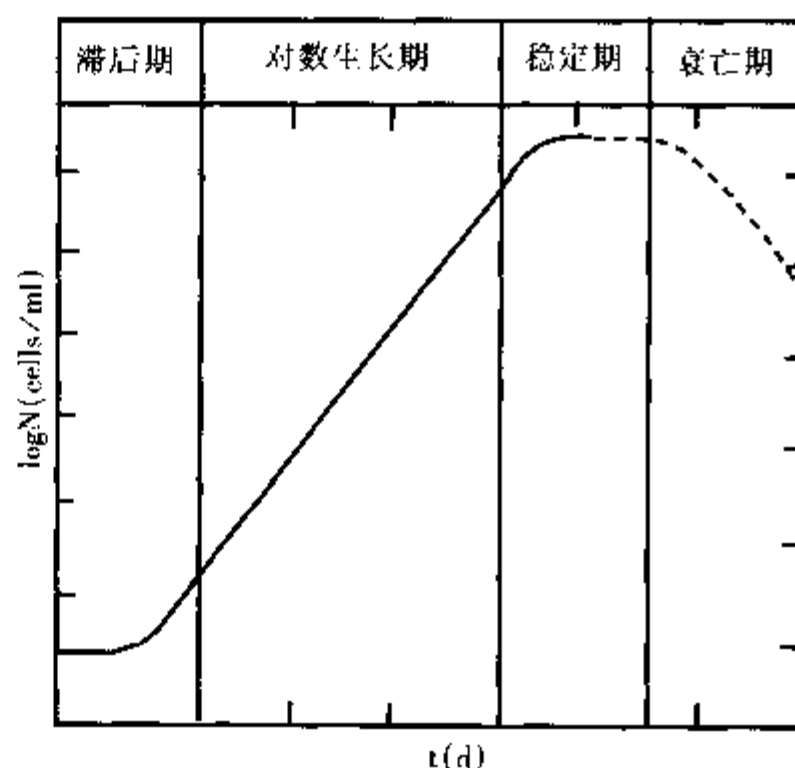


图 16-2 群体细胞生长曲线

16.2 培养细胞生长的条件

使动物细胞有可能在体外培养的基本条件,是提供尽可能与体内生活条件相接近的培养环境。这个环境至少包括以下6个因素:①所有与细胞接触的设备、器材和溶液等,都必须保持绝对无菌,避免细胞外微生物的污染;②必须有足够的营养供应,而绝对不可有有害的物质,包括极微量的有害离子的掺入;③保证有适量的氧气供应;④随时清除细胞代谢所产生的有害物质;⑤有良好的适于细胞生存的外界环境,包括pH、渗透压和离子浓度等;⑥及时分种,保持合适的细胞密度。

16.2.1 细胞的营养需要

16.2.1.1 基本营养物质

体外培养细胞的生长需要一些基本的营养物质,包括氨基酸、维生素、碳水化合物及一些无机离子。

氨基酸是组成蛋白质的基本单位,不同种类的细胞对氨基酸有不同的需求。细胞所能利用的氨基酸是L型同分异构体。体外培养细胞时有12种氨基酸细胞不能合成,必须由培养基供给,这12种氨基酸称为必需氨基酸,包括异亮氨酸、亮氨酸、胱氨酸、精氨酸、组氨酸、色氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、赖氨酸。

酸、缬氨酸、酪氨酸及苯丙氨酸等。几乎所有的动物细胞均对谷氨酰胺有较高的要求，细胞需要谷氨酸合成核酸和蛋白质，同时谷氨酰胺也作为能源被细胞利用。

维生素是维持细胞生长的生物活性物质，它们在细胞中大多形成酶的辅酶，对细胞的代谢有重大影响。其中烟酰胺、叶酸、核黄素、氰钴素、胆碱、生物素、吡哆醇和维生素 C 等，是细胞培养所必需的。

碳水化合物：细胞生命的能量来源，也是细胞合成蛋白质和核酸的碳源。主要有葡萄糖、核糖、脱氧核糖、丙酮酸钠和醋酸钠等。

无机盐：是细胞的重要组成成分之一，参与细胞的代谢活动和调节培养基渗透压。除钠、钾、镁、钙、磷、氮、氯等基本的无机离子外，还包括铁、铜、锌、钴、锰和硒等微量金属离子。

16.2.1.2 促生长因子等物质

许多多肽生长因子均具有促有丝分裂的作用，分别作用于细胞周期的不同时期。体外培养细胞除需要上述基本营养物质，还需要促细胞生长因子等物质才能正常生长、增殖。某些生长因子的作用只限于特定的细胞类型；某些生长因子的作用则具有较广的靶细胞范围。如表皮生长因子不仅对来自外胚层的表皮细胞有增殖促进作用，对中胚层来源的血管内皮细胞、软骨细胞和成纤维细胞以及内胚层来源的肝细胞和甲状腺细胞均有促增殖作用。同样，某些类型的细胞可为不同的生长因子所刺激。如成纤维细胞对成纤维细胞生长因子、表皮生长因子、血小板生成因子和生长调节素等均有反应。

16.2.1.3 激素

几乎所有的动物细胞的生长均对激素有一定的需求，如多肽类激素中的胰岛素、生长激素、甲状腺素等和甾体类激素中的氢化可的松、孕酮和雌二醇等。不同细胞对激素的种类和用量的要求有所不同。胰岛素可促进葡萄糖和氨基酸的吸收。生长激素与促生长因子结合后，有促进细胞分裂的效应。氢化可的松有利于细胞附着和细胞增殖，但在某些情况下，如细胞密度比较高时则具有细胞增殖抑制和诱导细胞分化的作用。

16.2.2 细胞的生存环境

除了满足细胞的营养需要外，培养环境还必须具备细胞生存和增殖的生理学所要求的物理化学特性，包括温度、渗透压、气相和 pH 等。

16.2.2.1 温度

体外培养的细胞需在保持一定恒温的环境中才能生长，其适宜的温度取决于所培养细胞的类型。在达到培养细胞所能耐受的上限之前，细胞增殖率随温度升高而加快，当温度超过上限后，细胞增殖受抑制。哺乳动物细胞体外培养的适宜温度为 35 ~ 37℃。一般说来，高温比低温对细胞的影响更为明显。当温度为 25 ~ 35℃，细胞的生长速度虽然很慢，但仍能保持存活，即使在 4℃ 条件下，细胞也能存活数天。温度只要不低于 0℃，细胞的代谢虽受抑制，但对细胞的损害作用并不严重，若加保护剂细胞可在 -196℃ 的液氮中保存。细胞置于高温时则不同，在 41 ~ 42℃ 中培养 1 小时，细胞严重受损，温度达 43℃ 以上时则大多数细胞将死亡。

16.2.2.2 渗透压

多数培养细胞对渗透压有一定的范围的耐受能力，适宜的渗透压因细胞类型的不同而异。用于哺乳动物细胞培养的培养基渗透压一般介于 260 ~ 320 mmol/L 之间。若以培养皿培养细胞，则培养基的渗透压应配制成为低渗，以代偿培养基在培养过程中的蒸发。

16.2.2.3 气相和 pH

体外培养细胞需要适宜的气体环境。多数细胞需要在有 O₂ 条件下才能生长，O₂ 分压通常维持在略低于大气状态，若 O₂ 分压超过大气中氧的含量则可能对细胞的生长不利。体外培养细胞的适宜气体环境一般为 95% 空气和 5% CO₂ 的混合气体。CO₂ 为细胞生长所需要，同时又是细胞代谢的产物，并影响

培养基的 pH。CO₂ 分压增高，培养基 pH 下降。

各种细胞对 pH 的要求不尽相同，大多数细胞系在 pH7.2~7.4 之间生长良好。一般来说，细胞对碱性不如对酸性的变化耐受，偏酸的条件比偏碱的环境对细胞生长有利。为使培养基的 pH 保存相对稳定，大多采用磷酸盐和 HEPES (N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) 作为培养基的缓冲剂。

16.2.3 无污染及无毒

无毒是培养细胞的必要条件。凡与细胞直接接触的材料（如培养器皿、底物、培养基等）和间接接触材料（如配制培养基的容器、瓶盖、瓶塞等），若具有细胞毒性，在培养过程中将导致细胞的死亡。

细胞培养中的污染问题包括细菌、支原体、霉菌、病毒等微生物的污染以及不同细胞类型间的交叉污染。体外培养的细胞由于缺乏机体的免疫系统机制而失去对微生物的防御能力，若发生细菌等微生物的污染，细胞必将最终死亡。微生物的污染虽然因为使用抗生素及超净工作台等措施已大为减少，但仍然是细胞培养中需特别重视的问题。不同细胞类型间的交叉污染，可使实验室的细胞系失去原有特性。为避免细胞间的交叉污染，对不同细胞系的操作应特别注意。

16.3 细胞培养的基本技术

16.3.1 细胞培养基和血清的选择

由于用于动物细胞培养的合成培养基的种类很多，不同批号间的血清存在着差异，因此，细胞培养能否达到实验目的，选择合适的培养基和血清是关键之一。一般可通过检查细胞克隆生长和测定专一功能的表达进行选择。检测培养基和血清有如下几个指标：

- (1) 纯系效应：取 10~100 细胞/ml，在 10~14 天内观察细胞群落形成情况。
- (2) 生长曲线：观察滞后期、倍增时间和细胞饱和密度。
- (3) 培养细胞特征的保持。
- (4) 无菌：将细胞培养在有血清的培养基中，观察是否有微生物污染。

表 16-1 所列资料可供培养基和血清选择时参考。

16.3.2 培养基的配制

现今国内外普遍使用的动物细胞培养基是商品化的干粉合成培养基。干粉型合成培养基是用球磨机或喷雾法将各种培养基成分混合后制成的，具有性质稳定，便于储存和运输，使用方便的优点。干粉型培养基颗粒极细，很容易完全溶解于水，只要参照说明书的要求，按比例配制，经消毒灭菌后即可使用。

试剂及仪器：

干粉合成培养基

NaHCO₃

1mol/L NaOH

1mol/L HCl

胎牛（小牛）血清

不锈钢正压除菌滤器

表 16-1 培养基和血清的选择

细胞	含血清培养基		无血清培养基
	培养基	血清	
鸡胚成纤维细胞	MEM、F12	CS	MCDB202
中国地鼠卵巢细胞	MEM、DMEM/F12	CS	MCDB301、CHO-S-SFM
成骨细胞	MEM	FB	
连续细胞系	MEM	CS	
内皮细胞	DMEM	FB	MCDB130、199
成纤维细胞	MEM	CS	MCDB110、202、402
胶质细胞	MEM、F12	FB	
Hela 细胞	MEM	CS	
造血细胞	RPMI1640、Fischer's	FB	
人白血病细胞	RPMI1640	FB	
人肿瘤细胞	F12、L15、DMEM	FB	
人淋巴母细胞	RPMI1640	FB	
黑色素细胞	MEM、F12	FB	
MCDK 狗肾细胞	DMEM、DMEM/F12		
非洲绿猴肾细胞	MEM、DMEM、199	CS	
BLIK 幼小仓鼠肾细胞	DMEM	CS	
3T3 细胞	MEM、DMEM	CS	MCDB402
小鼠神经母细胞瘤细胞	DMEM、DMEM/F12	FB	MCDB411
小鼠骨髓瘤细胞	DMEM、RPMI1640、	FB	
小鼠红白血病细胞	DMEM、F12、RPMI1640	CS	

注：CS：小牛血清； FB：胎牛血清

磁力搅拌器

气体压缩钢瓶

洁净工作台

操作步骤：

(1) 在 12L 平底玻璃容器内放一磁力搅拌棒，室温下加入所需的干粉培养基和 5L 去离子水，用磁力搅拌器轻轻搅拌。

(2) 将适量的分析纯级 NaHCO_3 溶于 2L 去离子水中，搅拌使之充分溶解。

(3) 将两种液体混合，加入所需量的已做过检测的血清，补加水至 10L，用磁力搅拌器混匀，必要时用 1mol/L NaOH 或 HCl 调 pH 值在 7.0~7.2 之间，瓶口用铝箔盖好。

(4) 连接好已消毒灭菌处理的玻璃器皿和不锈钢正压膜过滤系统，把培养基装入一个合适的不锈钢压力容器，拧紧所有接口。

(5) 用加强的 PVC 管供应压力气体 10~12 磅。

(6) 过滤的培养基经连接于滤器的分装罩注入灭菌容器中，过滤期间间歇地取 2 份培养基做无菌检测。

(7) 每瓶灌注后，用无菌硅橡胶塞塞好并用无菌铝箔将塞子连同瓶颈一并包好，瓶上标明培养基类型，瓶号和批次号，避光 4℃ 保存。

注意事项：

(1) 细胞培养对水质的要求很高，一般采用双重玻璃蒸馏或去离子和玻璃蒸馏或逆相渗透法进行制

备, 水的电阻值需大于 $18.2\text{M}\Omega$ 。配制培养基的用水应在配制当天或前一天制备, 以保证水的纯度和质量。

(2) 配制培养基时, 遇有极细的悬浮颗粒不能充分溶解, 可通入 CO_2 助溶。

(3) 不锈钢正压膜滤器系统中滤膜安装的排列顺序如下: $0.8\mu\text{m}$ 孔径滤膜; 垫片, $0.22\mu\text{m}$ 孔径滤膜; 垫片。必要时可同时使用两张 $0.22\mu\text{m}$ 孔径滤膜。

(4) 过滤培养基时提供的气体压力不能过高, 以免细小的微生物通过滤膜或使滤膜破裂, 造成污染。

(5) 培养基的过滤和分装过程应在洁净工作台中严格按照无菌操作进行。

(6) 培养基的配制以使用两周左右的量为宜, 以减少因存放过久而造成培养基中营养成分的损失。

16.3.3 其他常用液体的配制

在细胞培养中, 除细胞培养基外还有一些必不可少的用液。其中包括作为合成培养基的基础液及用于洗涤组织、细胞的平衡盐溶液 (BSS), 分离组织和分散细胞的消化液, 调整培养基 pH 的调整液, 防止发生污染的抗生素溶液, 检查细胞和观察研究细胞的各种染色液, 以及检查各种用液是否有污染的微生物培养基等。

16.3.3.1 平衡盐溶液

平衡盐溶液主要是以无机盐及葡萄糖配制而成。各种平衡盐溶液的主要不同点在于氯化钠的浓度、离子的浓度及缓冲系统不同 (表 16-2)。可根据需要选用适当的平衡盐溶液。现以 Hanks 液为例介绍具体配制方法。

试剂:

NaCl

KCl

CaCl_2

MgSO_4

Na_2HPO_4

KH_2PO_4

NaHCO_3

葡萄糖

酚红

操作步骤:

(1) 按表中 Hanks 液各成分的含量准确称量。试剂含水分子时可根据具体含水分子的量进行换算后再称量。

(2) 先将 CaCl_2 溶解于 100ml 水中。

(3) 依次将其他成分逐个溶解于 800ml 水中。

(4) 用 5.6% NaHCO_3 溶解酚红。

(5) 缓慢将 100ml CaCl_2 (2) 液倒入溶液 (3) 中, 搅拌以防止沉淀。

(6) 将酚红液 (4) 加入 (5) 中。

(7) 补加水至 1 000ml, 混匀。

(8) 将 Hanks 液分装盐水瓶内, 110°C 、8 磅高压蒸汽消毒灭菌 10~20 分钟, 4°C 冰箱内保存备用。

注意事项:

(1) 在配制 Hanks 液时, 钙盐、镁盐及磷酸盐易形成沉淀, 溶解时必须待一种试剂完全溶解之后, 再加入下一种试剂, 直至所有试剂完全溶解。

(2) Hanks 液的 pH 偏酸, 使用时可根据需要用无菌的 7.4% NaHCO_3 溶液调节 Hanks 液的 pH 至 7.2~7.4。

表 16-2 常用的平衡盐溶液 (g/L)

	Ringer	PBS	Earle	Hanks	Dulbecco	D-Hanks
NaCl	9.00	8.00	6.80	8.00	8.00	8.00
KCl	0.42	0.20	0.40	0.40	0.20	0.40
CaCl ₂	0.25		0.20	0.14	0.10	
MgCl ₂ ·6H ₂ O					0.10	
MgSO ₄ ·7H ₂ O			0.20	0.20		
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O		1.56		0.06		0.06
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O			1.14		1.42	
KH ₂ PO ₄		0.02		0.06	0.20	0.06
NaHCO ₃			2.20	0.35		0.35
葡萄糖			1.00	1.00		
酚红			0.02	0.02	0.02	0.02

16.3.3.2 胰蛋白酶溶液

胰蛋白酶的作用是使细胞间的蛋白质水解、分散细胞。常用的胰蛋白酶有 1:125 和 1:250 两种, 即 1 份胰蛋白酶能解离 125 份和 250 份酪蛋白。胰蛋白酶的常用浓度为 0.25%。

操作步骤:

(1) 称取胰蛋白酶 2.5g, 用少量无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 Hanks 液 (D-Hanks) 先将胰蛋白酶粉末调成糊状。

(2) 补足 Hanks 液至 1L, 搅拌混匀, 置室温 2~4 小时或 4℃ 冰箱内过夜。

(3) 用滤纸粗滤, 再用 G₆ 玻璃滤器或 0.22μm 微孔滤膜过滤除菌。

(4) 分装小瓶, 低温冰箱冰冻保存备用, 同时取样作无菌试验。

注意事项:

(1) Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和血清的存在会降低胰蛋白酶的活力, 配制时应用不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和血清的液体。

(2) 胰蛋白酶在 pH 偏碱的条件下的活力较高, 使用时可用 7.4% NaHCO₃ 调节 pH 至 8.0 左右。

16.3.3.3 EDTA (乙二胺四乙酸二钠) 溶液

EDTA 是一种化学整合剂, 它能螯合 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} , 从而使细胞分离。常用浓度为 0.02%。

操作步骤:

(1) 称取 EDTA 0.2g。

(2) 用 Hanks 液溶解 EDTA, 115℃、10 磅高压消毒灭菌 15~20 分钟。

(3) 分装小瓶, 4℃ 保存备用。

16.3.3.4 NaHCO₃ 液

常用浓度有 7.4%、5.6%、3.7% 三种, 配制时用三蒸水溶解后, 用 0.22μm 滤膜过滤, 分装小瓶, 4℃ 冰箱或室温下保存。

16.3.3.5 HEPES 液

HEPES 液具有较强的缓冲能力, 20℃ 时其缓冲效能 (pK_a) 为 7.55, 37℃ 时为 7.31。温度每改变 1℃, 其缓冲效能改变 0.014。HEPES 的使用浓度为 10~25mmol/L, 如浓度高于 50mmol/L, 则对某些细胞类型有毒性。HEPES 通常配制成 1mol/L 的浓度。

操作步骤:

(1) 用 100ml 双蒸馏水溶解 47.6g HEPES。

- (2) 用 1mol/L NaOH 调节 pH 至 7.5 ~ 8.0。
- (3) 补加水至 200ml。
- (4) 用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌，分装小瓶，室温或 4℃ 冰箱保存。

16.3.3.6 抗生素液

培养基中加入适量的抗生素，能抑制可能存在的微生物的生长，而又不影响细胞生长。需要加入哪一种抗生素，剂量多少，何时加入适宜等，与污染来源，抗生素专一性，抗生素的抗菌谱范围，抗生素的稳定性等密切相关。常用的抗生素有青霉素、链霉素、卡那霉素和庆大霉素等。通常将其配制成 100× 或 200× 的储备液，分装成小瓶，冰冻保存。使用前根据培养基的量加入到培养基中，其中最常用的为青霉素和链霉素，培养基中的用量为青霉素 100 单位/ml；链霉素 100 单位/ml。

表 16-3 常用的抗生素用量和效应（+ 号表示效应程度）

抗生素	浓度（量/毫升）		对象和效应	
	范围	实用	细菌	支原体
青霉素	10 ~ 1 000U	100U/ml	++	
链霉素	10 ~ 1 000 μ g	100 μ g/ml	++ [#]	
庆大霉素	10 ~ 200 μ g	50 μ g/ml	++ [#]	
卡那霉素	10 ~ 1 000 μ g	100 μ g/ml	++ [#]	+
多粘菌素	10 ~ 1 000 μ g	50 μ g/ml	++ [#]	
四环素	5 ~ 50 μ g	10 μ g/ml	++	++
二性霉素 B	1 ~ 50 μ g	3 μ g/ml	++	
红霉素	10 ~ 100 μ g	50 μ g/ml	++	
制菌霉素	1 ~ 500U	50U/ml	++	
4 氟、2 羟基喹啉（CIP）	10 μ g/ml		++	
截儿素衍生物（BM-1）	10 μ g/ml		++	
四环素衍生物（BM-2）	5 μ g/ml		++	

对革兰阴性菌有效

16.3.4 原代培养

原代培养也称初代培养，是从供体取得组织细胞后在体外进行的首次培养。原代培养是建立各种细胞系的第一步。原代培养细胞刚刚离体，生物学特性未发生很大变化，仍具有二倍体核型，最接近和反映体内生长特性，适合用作药物测试、细胞分化等实验研究。原代培养方法很多，最基本和常用的有两种，即组织块法和消化法。

16.3.4.1 组织块培养法

组织块培养是常用的、简便易行和成功率较高的原代培养方法。即将组织剪切成小块后，接种于培养瓶进行培养。组织小块贴壁培养 24 小时后，细胞即从组织块四周游出。但由于在反复剪切和接种过程中对组织块的损伤，并不是每一组织块都能长出细胞。组织块培养法特别适合组织量少的原代培养如成纤维细胞、神经胶质细胞和牙髓细胞等的培养。

操作步骤：

- (1) 将取自动物的组织用 Hanks 液或不含血清的培养基漂洗。
- (2) 用眼科剪将经漂洗的组织剪切成 1mm³ 左右的小块。在剪切过程中，向组织滴加 1 ~ 2 滴培养基，以保持组织湿润。
- (3) 将剪切好的组织小块用眼科镊送入培养瓶内。用牙科探针或弯头吸管将组织块在瓶壁上均匀摆

置, 每小块间距 0.5cm 左右。

(4) 组织块放置好后, 轻轻地将培养瓶翻转, 让瓶底朝上, 向瓶内加入适量培养基, 盖好瓶盖, 将培养瓶倾斜放置在 37℃ 温箱内。

(5) 放置 2~4 小时待组织块贴附后, 将培养瓶慢慢翻转平放, 让液体缓缓覆盖组织小块, 静置培养。3~5 天后更换培养基, 去除飘浮的组织块和细胞碎片。

注意事项:

(1) 组织块接种 1~3 天内, 由于游出的细胞数很少, 组织块的贴附不牢靠, 在观察和移动中要注意动作轻巧, 尽量不要引起液体的振荡而使组织块漂浮。

(2) 在原代培养的 1~2 天内要特别注意观察是否有微生物的污染, 一旦发现, 要及时清除, 以防污染其他细胞。

(3) 如组织块不易贴附, 可预先在瓶壁涂于薄层胶原、多聚赖氨酸或纤维连结素等, 为细胞贴附提供基质。

(4) 组织块培养也可不用翻转法, 即在摆放组织块后, 向培养瓶内加入少量培养基, 以能保持组织块湿润即可。

16.3.4.2 消化培养法

消化培养法是结合生化和化学手段把已剪切成较小体积的组织块进一步分散, 去除妨碍细胞生长的细胞间质, 使细胞分散, 形成悬液而进行培养的方法。本方法适用于培养大量组织, 原代细胞产量高; 但操作较繁琐、易污染。常使用胰蛋白酶作为消化组织的消化剂。

操作步骤:

(1) 将取自动物的组织用 Hanks 液或不含血清的培养基漂洗。

(2) 用眼科剪将经漂洗的组织剪切成 (1~2) mm³ 左右的小块。

(3) 置入放置有磁性搅拌棒的三角烧杯内, 注入 30~50 倍组织量预温至 37℃ 的胰蛋白酶。缓慢搅拌 20~60 分钟。

(4) 将消化液通过 100 目孔径的不锈钢网过滤, 去除未充分消化的组织块。

(5) 800~1 000r/min, 离心 3~5 分钟, 去除胰蛋白酶, 用 Hanks 液或培养基漂洗 1~2 次。

(6) 计数细胞, 用培养基将细胞配成 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 细胞/ml 的细胞悬液, 接种培养瓶, 置 37℃ 温箱培养。

注意事项:

(1) 胰蛋白酶对细胞间质较少的组织, 如胚胎、上皮、肝、肾等组织的消化效果较好, 但对纤维性组织和较硬的癌组织的消化效果较差, 可采用胶原酶消化此类组织。

(2) 消化时间要根据不同情况而定, 温度低、组织块大、胰蛋白酶浓度低时, 消化作用的时间长, 反之则相反。

(3) 某些组织和细胞对胰蛋白酶的耐受性差, 要采用分次消化并及时把已消化下来的细胞与组织分开, 放入含有血清的培养基中, 更换消化液, 继续消化。

(4) Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 及血清对胰蛋白酶活性有抑制作用, 消化过程中使用的液体, 应不含这些离子及血清。

16.3.5 传代培养和细胞系的维持

原代培养后期, 由于细胞游出数量增加和细胞的增殖, 单层培养细胞相互汇合, 整个瓶底逐渐被细胞覆盖。这时需要将细胞分离, 否则细胞将因生存空间不足或密度过大, 营养供应不足和代谢产物积累, 影响细胞生长。细胞由原培养瓶内分离稀释后转到新的培养瓶的过程称为传代。

16.3.5.1 细胞传代

培养细胞传代根据不同细胞采用不同的方法。贴壁生长细胞的传代需先采用消化法解离细胞再行传代；部分贴壁生长的细胞和悬浮生长的细胞传代则无需对细胞进行解离，可采用直接吹打或离心后，或用自然沉降法吸去上清后，用新鲜培养基稀释后传代。以下介绍贴壁生长细胞的传代方法。

试剂与仪器：

贴壁生长细胞

培养基

0.25%胰蛋白酶或其他消化液

Hanks 液

其他细胞培养常规仪器

操作步骤：

(1) 吸出或倒掉培养瓶内的旧培养基。

(2) 以 25ml 培养瓶为例，向瓶内加入 1ml 消化液（胰蛋白酶或与 EDTA 混合液），轻轻摇动培养瓶，使消化液流遍所有细胞表面，作用 1~2 分钟后，倒掉大部分消化液，仅留少量消化液。

(3) 在 37℃ 或室温下继续消化 2~5 分钟后，把培养瓶放置倒置显微镜下进行观察，如胞质回缩，细胞间隙增大后，即可终止消化。

(4) 倒掉剩余的消化液，如用 EDTA 消化，需加 Hanks 液数毫升，清洗残留的消化液后再加培养基。如仅用胰蛋白酶即可直接加含血清的培养基终止消化。

(5) 用弯头吸管吸取培养基，反复吹打瓶壁细胞，使细胞脱离瓶壁，充分分散，形成细胞悬液。

(6) 计数细胞，用新鲜培养基稀释，分种到新的培养瓶内。

注意事项：

(1) 胰蛋白酶的消化效果主要与 pH、温度、胰蛋白酶的浓度、培养基中的血清浓度及细胞类型等有关。当细胞难于消化时，可在倒掉消化液后再加 1~2ml 新的消化液，延长消化液的作用时间。

(2) 在用吸管吹打瓶壁的细胞时，动作要尽量轻柔，尽可能不要出现泡沫，以免对细胞造成损伤。

16.3.5.2 细胞系的维持

细胞系的维持是培养工作的重要内容。概括起来说细胞系的维持是通过换液、传代、再换液、再传代和细胞冻存实现的，但对每一个细胞系来说都有其各自的特点，要维持好细胞系，需注意以下几点：

(1) 细胞系档案要记录好，如组织来源、生物学特性、细胞遗传学标志、生长形态等。

(2) 细胞系的传代、换液一般都有自身的规律性，因而在维持传代时要注意保持其稳定的规律性，以减少由于传代时细胞密度的频繁增减或换液时间的不规律而导致细胞生长特性的改变。

(3) 多种细胞系维持传代，要严格操作程序，以防细胞之间的交叉污染。传代时所用的材料要编号或做标记，严禁交叉使用。

(4) 每一细胞系都应有充足的冻存储备，以防由于培养细胞污染等因素造成细胞系的绝种。另外，二倍体细胞等有限细胞系如暂时不用，最好冷冻保存，以免因传代过多，造成细胞衰老或发生改变。

16.3.6 细胞克隆

克隆是指由一个细胞经特定条件下培养增殖而产生的细胞群。细胞克隆技术又称单个细胞分离培养技术，即从细胞群体中分离出一个细胞并使其在体外增殖成新的细胞群体。这种纯化的细胞群体称为细胞株，它们当中的每一个细胞的遗传特征及生物学特性极为相似，有利于对不同亚群细胞的形态和功能进行比较和研究。常用的细胞克隆方法有软琼脂克隆分离法、有限稀释法、平皿克隆分离法和单细胞显微操作法等。以下介绍有限稀释法和软琼脂克隆分离法。

方法一：有限稀释法

有限稀释法采用梯度倍数稀释的原则,将细胞悬液连续倍数稀释至极低密度,然后接种于微量培养板,培养一定时间后,微孔中可出现单个细胞克隆。本法不需特殊设备、操作简单,适合大量克隆化培养,是目前最常用的一种方法,广泛用于异质性细胞系的克隆化培养。

试剂与仪器:

培养基
胎牛血清
0.25%胰蛋白酶
台盼蓝染色液
96孔或24孔培养板
其他细胞培养常规试剂及仪器

操作步骤:

(1) 取对数生长期的细胞,用0.25%胰蛋白酶消化,待细胞变圆,用吸管吸取培养基吹打细胞,制成单个细胞悬液。

(2) 取少量细胞悬液,用台盼蓝染色并计数活细胞。

(3) 将细胞悬液移至刻度离心管中连续倍数稀释,最后配成浓度分别为50、10、5细胞/ml的细胞悬液。

(4) 将3种稀释好的细胞悬液分别接种于96孔板中,每孔加0.1ml,置CO₂温箱37℃培养。

(5) 于细胞接种后次日,在倒置显微镜下观察培养板各孔细胞数,挑选只含一个细胞的孔,做好标记并补加0.1ml培养基,进行培养。

(6) 培养期间,视培养基pH的变化,决定是否更换培养基。待克隆长至孔底面积的1/3~1/2时,用消化法分离克隆细胞,转种至24孔培养板扩大培养。

注意事项:

(1) 在细胞克隆化之前,一般应先测定细胞克隆形成率,以了解细胞在极低的密度下的生长能力。如细胞克隆形成率偏低(<10%),应采取一些措施提高细胞克隆形成率。如添加某些刺激细胞生长的物质及制备底层饲养细胞等。

(2) 细胞悬液的单个细胞百分率应至少在90%以上,否则获得单克隆的几率低。

(3) 在显微镜下确认培养孔中的细胞数时,应特别注意观察培养孔的周边,此处细胞折光弱不易看清楚,谨防漏记。

(4) 克隆培养时间较长,应注意清洁温箱,防止细菌或真菌污染。

方法二:软琼脂克隆分离法

软琼脂克隆分离法常用于非贴壁依赖性生长细胞的克隆如肿瘤细胞系和转化细胞系等。

试剂及仪器:

5%琼脂
其他试剂及仪器同方法一

操作步骤:

(1) 取对数生长期细胞用0.25%胰蛋白酶消化使之分散成单个细胞,作活细胞计数,调整细胞密度至 1×10^3 细胞/ml。然后根据实验要求再作梯度倍数稀释。

(2) 5%琼脂置沸水浴中使琼脂完全溶化,取1份5%琼脂,移入小烧杯中,待琼脂冷至50℃迅速加入9份预温37℃的新鲜培养基,配成0.5%琼脂培养基,充分混匀后,按每块直径为60mm的培养皿加6ml 0.5%琼脂培养基铺板,置室温使琼脂凝固备用。

(3) 取37℃保温的不同密度的细胞悬液9.4ml移入小烧杯中,加入50℃的5%琼脂0.6ml,迅速混匀,配成含待克隆细胞的0.3%琼脂培养基,吸取6ml加入已铺有底层琼脂培养基的培养皿中,室温下使琼

脂凝固。

(4) 把培养皿移入 CO₂ 温箱, 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度环境下培养 2~3 周。

(5) 待克隆出现后, 在倒置显微镜观察下用毛细吸管吸取单个克隆, 移入小试管中吹打使细胞从琼脂中释出。

(6) 将克隆细胞转入不含琼脂的培基中, 移入适当的培养器皿中扩大培养。

注意事项:

(1) 进行软琼脂克隆细胞时, 务必使培基和琼脂充分混匀, 避免局部结块。

(2) 制好底层琼脂后, 应待其完全凝固后再浇上含细胞的琼脂培基, 防止细胞进入底层琼脂。

(3) 其他注意事项参见方法一。

16.3.7 细胞计数

细胞计数是细胞培养过程中用于观察细胞生长的重要手段。尽管目前已有自动细胞计数器, 但实验室中常用的方法仍主要采用血球计数板直接计数法、台盼蓝拒染法、噻唑蓝 (MTT) 比色法进行细胞计数。

方法一: 血细胞计数板直接计数法

操作步骤:

(1) 取血细胞计数板和盖玻片, 用 75% 酒精擦净, 用绸布轻轻擦干, 将盖玻片放在计数室上。

(2) 用消化液分散单层培养细胞或直接收集悬浮培养细胞, 用培基将细胞悬液作适当稀释, 然后用吸管吸取少许混合均匀的细胞悬液, 滴加于计数板上盖玻璃片一端, 让液体自动进入盖玻片下方的计数室内。

(3) 滴加细胞悬液后约静置 1 分钟, 在显微镜下观察并计算出四角大格内的细胞数。有些细胞可能处于大方格的边缘, 计数时只能计数接触其中两条边缘的细胞。

(4) 将计数结果代入下式, 得出细胞密度。

$$\text{细胞数/ml} = 4 \text{ 大格中细胞总数} / 4 \times 10\,000 \times \text{稀释倍数}$$

注意事项:

(1) 消化单层细胞时, 务求细胞充分分散, 制成单个细胞悬液。否则会影响细胞计数的结果。

(2) 吸取细胞悬液后应立即滴加, 避免由于细胞下沉而使计数不准。滴加的细胞悬液量要适当, 过多或过少均会影响计数结果的准确性。

(3) 镜下计数时, 2 个以上细胞组成的细胞团, 应按单个细胞计数。如细胞团占 10% 以上, 表明细胞消化分散不充分, 将影响细胞计数的准确性。

(4) 每个细胞悬液的细胞密度的确定至少要滴样两次求其平均值。

方法二: 台盼蓝拒染法

细胞损伤或死亡时, 某些染料可穿透变性的细胞膜, 与 DNA 结合, 使其着色。而活细胞能阻止这类染料进入细胞, 不被着色。借此可以鉴别死细胞和活细胞。台盼蓝拒染法操作简单, 是最常用的活细胞计数方法和细胞活力检测方法。

操作步骤:

(1) 按方法一准备血细胞计数板, 制备细胞悬液。

(2) 取 4 份 0.2% 台盼蓝水溶液与 1 份 5× 生理盐水混合。

(3) 将 1 份台盼蓝生理盐水溶液与待计数的细胞悬混合。

(4) 按方法一将含台盼蓝的细胞悬液滴加到细胞计数板的计数室中。

(5) 按方法一分别计数未染色的活细胞数以及染为淡蓝色的死细胞数。代入下式求得活细胞密度和细胞活力。

$$\text{活细胞数/ml} = 4 \text{ 大格中活细胞总数} / 2 \times 10\,000 \times \text{稀释倍数}$$

$$\text{细胞活力}(\%) = \text{活细胞数} / (\text{活细胞数} + \text{死细胞数}) \times 100\%$$
注意事项:

(1) 细胞经台盼蓝染色后, 必须在 3 分钟内计数细胞, 否则, 部分活细胞也会着色, 干扰计数。同时, 由于台盼蓝对蛋白质有很强的亲和力, 用不含血清的培养基稀释细胞可使细胞活力的检测更为准确。

(2) 检测细胞活力时, 为了检测精确起见, 着色的死细胞及不着色的活细胞总数应计 200 个以上。

(3) 其他注意事项参见方法一。

方法三: 噻唑蓝 (MTT) 比色法

MTT 是一种能接受氢原子的化学染料, 其化学名称为 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐。活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 还原为难于溶解的蓝紫色结晶并沉积在细胞中, 而死细胞无此功能。二甲基甲酰胺能溶解细胞中的蓝紫色结晶, 用酶联免疫检测仪在 570nm 波长处测定其光吸收值。在一定细胞数量范围内, 蓝紫色结晶的形成量与细胞数量成正比, 因而在 570nm 波长处测到的光吸收值可间接反映活细胞数量。该方法具有灵敏度高、重复性好、与其他检测活细胞数的方法有较好的相关性。

试剂及仪器:

MTT

二甲基甲酰胺

振荡混合仪

酶联免疫检测仪

其他细胞培养常规试剂及仪器

操作步骤:

(1) 用 0.25% 胰蛋白酶消化单层培养细胞, 用培养基将细胞作适当稀释。

(2) 用血细胞计数板直接计数法精确计数细胞, 用培养基将细胞配成系列浓度的细胞悬液。如自 5×10^4 细胞/ml 起, 至 50×10^4 细胞/ml 止, 每一浓度相差 5×10^4 细胞/ml, 共设 10 个不同浓度。

(3) 将不同浓度的细胞悬液接种 24 孔培养板, 每孔接种 1ml, 每一浓度接种 3~5 个培养孔。

(4) 于每孔加入浓度为 5mg/ml 的 MTT 溶液 0.1ml, 将培养板移入 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度的温箱内静置 4~6 小时。

(5) 按每孔 1ml 加入含二甲基甲酰胺的脱色液 (二甲基甲酰胺: Triton X-100: 水 = 3:1:2, 用柠檬酸调 pH 至 5~6)。混匀, 继续温育 2~4 小时, 期间间歇振荡 10 分钟, 使结晶充分溶解。

(6) 用移液器吸取各孔液体 0.2ml 于 96 孔酶联板, 选择 570nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔的光吸收值。

(7) 以细胞浓度为横坐标, 同一细胞浓度的光吸收值的平均值为纵坐标绘制标准曲线。

(8) 按上法测得同一细胞的待测样品的光吸收值, 即可从标准曲线求得待测样品的细胞密度。

注意事项:

(1) 待测细胞应配制成浓度适宜的细胞悬液, 其浓度应在标准曲线的细胞密度范围内。

(2) 测定待测样本的活细胞密度时, 加入 MTT 后的温育时间及加入脱色液后的脱色时间应以绘制标准曲线时的时间相同。

(3) 与实验孔平行设不加细胞只加培养基的空白对照孔并与实验孔作相同处理, 比色时以空白孔作本底调零。

16.3.8 细胞的冻存与复苏

培养细胞的传代及维持过程中, 要耗去大量的人力和物力。同时, 细胞一旦离开活体开始原代培

养,它的各种生物特性都将发生变化,并随着传代次数的增加和体外环境的变化而不断有新的变化。因此,及时进行细胞冻存十分必要。细胞的冻存大多采用将细胞储存在 -196°C 的液氮中,理论上细胞在这一温度下的储存时间是无限的。细胞在冷冻和复苏过程中,胞内所形成的冰晶以及渗透压的变化是细胞受损的主要原因。在细胞冻存液中加入保护剂如二甲基亚砜(DMSO)或甘油,选择合适的冻存及冻融速度,可减少对细胞的损伤。

16.3.8.1 细胞冻存

细胞冻存时尽可能均匀地减少细胞内水分,减少细胞内冰晶的形成是减少细胞损伤的关键。目前多采用二甲基亚砜或甘油作为保护剂。这两种物质对细胞无明显毒性,分子量小,溶解度大,易透过细胞膜,可使冰点下降,提高细胞膜对水的通透性。冻存时温度缓慢下降可使细胞内的水分渗出细胞外,在胞外形成冰晶,减少细胞内冰晶的形成,从而减少由于冰晶形成所造成的细胞损伤。

试剂及仪器:

细胞
培养基
0.25%胰蛋白酶
小牛血清或胎牛血清
DMSO 或甘油
亚甲蓝
细胞冻存管
喷灯
其他细胞培养常规仪器

操作步骤:

(1) 取在培养瓶内已生长2~3天形成单层的细胞,最好在冻存前一天换液,以保证细胞处于良好的营养状态。

(2) 按培养基70%、小牛血清20%、二甲基亚砜或甘油10%配制细胞冻存培养基。

(3) 用胰蛋白酶消化细胞(悬浮生长的细胞则不需作消化处理),计数细胞,1000r/min,离心10分钟。

(4) 倒掉上清,用冻存培养基重新悬浮细胞并配成浓度为 $10^6 \sim 10^7$ 细胞/ml的细胞悬液。

(5) 用吸管轻轻吹打使细胞均匀,按1ml的量分装入无菌安瓿或冻存管内。

(6) 用火焰将安瓿封熔或将冻存管密封。为检查封口是否完善,可在 4°C 条件下将其完全垂直浸于0.05%亚甲蓝溶液中,30~40分钟后取出,自来水冲洗。将含有蓝色染料的安瓿或冻存管丢弃。

(7) 贴上标签,写上细胞名称和冻存日期,外面贴上一层透明胶纸,放入已做好标记的小袋或支架。

(8) 按以下三种方法之一开始缓慢冷冻,当温度下降至 -70°C 或更低时将其迅速放入液氮罐中。

1) 将安瓿或冻存管放在壁厚为1.5cm的聚乙烯盒内,然后放在 -70°C 冰箱内2小时,再转入液氮。

2) 先将安瓿或冻存管置 4°C ,4~5小时或过夜,移至 -20°C 冰箱2小时,再悬于液氮罐颈口1小时,最后浸入液氮。

3) 将安瓿或冻存管放在冻存简易装置内,置于液氮罐颈口,离液氮面约5~10cm,2~3小时后浸入液氮。

注意事项:

(1) DMSO能溶解有机物质,它可透过橡皮手套,经皮肤进入血液循环。在使用DMSO时要特别小心,避免有害化学物质的污染,减少与皮肤的接触机会。

(2) 定期检查并及时补充液氮罐内的液氮量。

(3) 细胞在液氮中的储存时间理论上无限的, 但为妥善起见, 特别是未被冻存过的细胞在首次冻存后要在短期内复苏一次, 观察细胞对冻存的适应性。已建系的细胞最好也每年取一支复苏后, 再继续冻存。

(4) 玻璃安瓿不能用于保存取自于病毒感染患者的细胞系 (如 HIV-1 或其他病毒)。

(5) 检查和补充液氮以及放入或取出冻存细胞时, 操作者应戴手套和防护面罩, 以免皮肤冻伤或因安瓿爆裂而伤及面部。

16.3.8.2 细胞复苏

复苏细胞与冻存的要求相反, 应尽可能快速融化。以保证细胞外结晶在很短的时间内融化, 避免由于缓慢融化而使水分渗入细胞内形成胞内再结晶对细胞造成损伤。

操作步骤:

(1) 操作者戴防护面罩, 迅速取出所要的冻存管或安瓿, 立即投入盛有 37 ~ 40℃ 水浴中并迅速将盖子盖好。

(2) 振荡冻存管或安瓿, 直至内容物完全溶解 (20 ~ 60 秒钟)。

(3) 将冻存管或安瓿放入 70% 的乙醇中浸泡后, 打开安瓿或冻存管。

(4) 将细胞悬液移入离心管, 加入 10ml 完全培养基, 离心 (1 000r/min, 10 分钟)。

(5) 吸去上清, 用新鲜培养基适当稀释后接种培养瓶, 37℃ 静置培养, 次日更换一次培养基, 继续培养。

16.3.9 细胞培养的污染及检测

对细胞培养工作而言, 污染是可能发生的。一项与细胞培养有关的成功研究或生产开发, 除了要有良好的实验设计和技术方法外, 关键的因素是避免污染。

培养细胞的污染概念不仅仅指微生物, 而是指所有混入培养环境中对细胞生存不利的成份和造成细胞不纯的异物, 一般包括生物 (细菌、真菌、病毒和支原体)、化学物质 (影响细胞生长、非细胞所需的化学成分) 及细胞交叉污染。其中以微生物污染最多见。微生物的污染可通过空气、器材、培养用液、组织样本及不严格的无菌操作等多种途径发生。由于体外培养细胞自身没有抵抗污染的能力, 而且培养基中加入的抗生素的抗污染能力是很有限的, 因此培养细胞一旦发生污染多数将无法挽救。一般在污染的早期或污染程度较轻时, 如能及时处理并去除污染物, 部分细胞有可能恢复。如污染物持续地存在培养环境中, 轻者细胞生长缓慢, 分裂相减少, 细胞边缘粗糙, 胞浆出现较多的颗粒物质; 重者细胞停止生长, 分裂相消失, 细胞变圆或崩解, 从瓶壁脱离。此外, 不同的微生物污染对细胞的影响也有差别, 支原体和病毒对细胞的形态和机能的影响是长期的、缓慢的和潜在的; 而细菌和真菌由于繁殖迅速, 能在短时间内抑制细胞生长或产生有毒物质而使细胞死亡。以下介绍有关微生物污染的问题。

16.3.9.1 细菌和真菌的检测

细菌的污染较为多见的是大肠杆菌、白色葡萄球菌、假单胞菌等。一旦发生细菌污染, 多数情况下培养基在短期内变黄, 表明有大量酸性物质产生, 出现明显混浊现象。倒置显微镜下观察, 可见培养基中有大量圆球形颗粒飘浮, 有时细胞表面和周围有大量细菌存在, 细胞停止生长并有中毒表现。

污染培养细胞的真菌多为烟曲霉、黑曲霉、毛霉菌、孢子霉、白念珠菌和酵母菌等。真菌污染后多数在培养基中形成白色或浅黄色飘浮物, 较易被发现, 短期内培养基多不浑浊。倒置显微镜下可见细胞之间有纵横交错的丝状、管状及树枝状菌丝。

肉眼及显微镜观察只能检查出明显的污染, 对较轻的污染和污染的早期则难于检出。当培养基改变不明显而又凝有细菌或真菌污染时, 可采用培养法进行检测。

操作步骤:

(1) 按表 16-4 配制用于检测细菌和真菌的培养基。

(2) 在无菌条件下分装试管或铺成平板, 4℃或室温贮存备用。

(3) 取约 0.3ml 待测细胞悬液或培养基接种到表 16-4 所列的各种检测培养基中, 按表中所示的条件进行检测。

(4) 观察培养物 12~21 天。如果在固体培养基上出现菌落或是液体培养基变浑浊则表明有污染。

注意事项:

(1) 所用物品应保证绝对无菌, 操作过程中严格无菌操作。

(2) 检测时要设阳性对照和阴性对照。建议阳性对照应包括绿脓杆菌、败血性链球菌、大肠杆菌、类杆菌属、特异青霉、黑曲霉和白色念珠菌等。

16.3.9.2 支原体的检测

支原体是含有一个环状 DNA 分子和核糖体的简单原核微生物, 其大小和结构复杂程度介于细菌和病毒之间, 易通过细菌滤器。支原体的污染往往并不引起培养基和细胞形态的明显改变, 但它能抑制细胞代谢和生长, 影响核酸合成和改变细胞的表面受体, 引起细胞染色体改变。因此, 不可忽视支原体的污染, 要对培养细胞作常规性的或阶段性的检测。检测支原体的常用方法有 9 种之多。American Type Culture Collection (ATCC) 常用直接培养法及间接的 DNA 荧光染色法检测细胞中是否存在支原体的污染。以下介绍这两种支原体检测方法。

表 16-4 检测细菌和真菌的培养基和培养条件

检 测 培 基	温 度 (℃)	有 氧 状 况	观 察 时 间 (天)
含 5% 新鲜脱纤维蛋白兔血琼脂 ^a	37	有	14
	37	无	14
巯基乙酸盐肉汤 ^b	37 或 26	有	14
Trypticase 大豆肉汤 ^c	37 或 26	有	14
大脑、心脏浸液肉汤 ^d	37 或 26	有	14
Sabouraud 肉汤 ^e	37 或 26	有	21
YM 肉汤 ^f	37 或 26	有	21
含 2% 酵母浸液的营养肉汤 ^g	37 或 26	有	21

a. 40g blood agar base 加 950ml 蒸馏水, 加热溶解, 15 磅、15 分钟高压灭菌, 加入 50ml 新鲜的脱纤维蛋白的兔血搅拌均匀 (兔血需先经无菌检测)。无菌条件下铺平板, 4℃贮存。

b. 巯基乙酸盐肉汤粉末 29.8g, 加热溶解于 1 000ml 蒸馏水中, 分装试管内, 每管 10ml, 高压蒸汽灭菌, 室温贮存。

c. Trypticase 大豆肉汤粉末 30g, 溶解于 1 000ml 蒸馏水中, 分装试管内, 每管 10ml, 高压蒸汽灭菌, 室温贮存。

d. 大脑、心脏浸液肉汤粉末 37g, 溶解于 1 000ml 蒸馏水中, 分装试管内, 每管 10ml, 高压蒸汽灭菌, 4℃贮存。

e. Sabouraud 肉汤粉末 30g, 溶解于 1 000ml 蒸馏水中, 分装试管内, 每管 10ml, 高压蒸汽灭菌, 室温贮存。

f. YM 肉汤粉末 21g, 溶解于 1 000ml 蒸馏水中, 分装试管内, 每管 10ml, 高压蒸汽灭菌, 室温贮存。

g. 8g 营养肉汤粉末, 20g 酵母浸液, 溶解于 1 000ml 蒸馏水中, 分装试管内, 每管 10ml, 高压蒸汽灭菌, 室温贮存。

方法一: 培养法检测支原体污染

操作步骤:

(1) 配制营养补充液:

葡萄糖	50g
盐酸 L-精氨酸	10g
胸腺 DNA	0.020g
氯化胆碱	0.922g

D-戊硫代巴比妥钙	0.024g
盐酸吡哆醛	0.020g
叶酸	0.010g
维生素 B ₁₂	0.003g
i-肌醇	0.110g
尼克酰胺	0.024g
D-生物素	0.002g
盐酸硫胺	0.010g

溶解于 1 000ml 蒸馏水中, 过滤除菌, 分装 100ml, -70℃ 存放。

(2) 配制支原体肉汤培养基:

肉汤基质	14.7g 溶于 600ml 蒸馏水中, 高压灭菌
酚红	0.02g
选择性马血清	200ml 室温下与肉汤基质混合
25% 酵母浸液	100ml
营养补充液	100ml

调 pH 至 7.2~7.4, 按每管 10ml 分装, 4℃ 保存, 4 周内使用。

(3) 配制支原体琼脂培养基:

琼脂	23.7g 溶于 600ml 蒸馏水, 高压灭菌后于 50℃ 中水浴
选择性马血清	200ml 37℃ 温浴, 与琼脂混合
25% 酵母浸液	100ml
营养补充液	100ml

加入直径为 60mm 的平皿中, 每个 10ml, 4℃ 保存, 4 周内使用。

(4) 取培养 3 天尚未换培养基的细胞培养物, 弃去大部分培养基仅留 3ml, 用无菌橡皮刮板刮下部分单层细胞, 制成细胞悬液。

(5) 将 1ml 待测细胞悬液接种于支原体肉汤培养基内, 0.1ml 待测细胞悬液接种于支原体琼脂培养板中。

(6) 将肉汤培养基置于 37℃ 有氧条件培养, 琼脂盘放入含 95% N₂、5% CO₂ 气体的湿润条件下培养。肉汤培养基的 pH 值改变或变浑浊表明可能有支原体污染。

(7) 在培养的 14 天内, 每隔一周, 从肉汤培养基中取出 0.1ml, 接种于新鲜的支原体琼脂培养板中, 37℃ 无菌条件下培养。

(8) 每周用倒置显微镜观察琼脂培养板上有无支原体集落形成和生长, 至少连续观察 3 周。典型的支原体集落直径约为 200μm, 中央浓厚, 四周清淡, 形态类似“油煎荷包蛋”。

注意事项:

(1) 待测培养物应保证培养基中不含抗生素, 尤其是庆大霉素、泰乐菌素和其他支原体的抑制剂。

(2) 检测支原体时必须设阳性对照以验证所用的检测系统是否合适。但阳性对照实验必须注意安全, 最好在实验后期进行, 尽可能在隔离区内操作。

(3) 许多支原体, 尤其是 *M. hyorhinis* 很难用培养法直接检测, 应同时用间接法对待测培养物进行检测。

(4) 实验完毕, 应将所使用的器材收集起来并立即用高压蒸汽消毒灭菌。

方法二: DNA 荧光染色法检测支原体污染

支原体内含有一个环状 DNA 分子, 能与荧光染料 Hoechst33258 特异地结合, 然后根据细胞表面的

荧光来显示细胞是否有支原体污染。

试剂及仪器：

荧光染色母液 (1 000 ×)：

Hoechst33 258

乙汞硫代水杨酸钠

加入 100ml 无碳酸氢钠、酚红的 HBSS 中，室温下完全混匀，分装于小瓶中，用铝箔封瓶，4℃避光保存。

荧光染色工作液 (1 ~ 5 ×)：

0.1 ~ 0.5ml 荧光染色母液

100ml 无碳酸氢钠、酚红的 HBSS

封固剂：

柠檬酸 (0.1mol/L) 22.2ml

磷酸氢二钠 (0.2mol/L) 27.8ml

甘油 50ml

4℃保存，使用前调整 pH 至 5.5

固定液：

冰醋酸 1 份

无水甲醇 3 份

荧光显微镜

其他细胞培养常规仪器

操作步骤：

(1) 将 10^5 个指示细胞接种于直径为 60mm 的培养皿内的盖玻片上，加入 4ml 含 10% 胎牛血清的培养基。

(2) 将培养皿放入 95% 空气、5% CO_2 的温箱，37℃培养 16 ~ 24 小时，加入 0.5ml 按直接培养法配制的待测细胞悬液。

(3) 继续培养 6 天后，取出培养皿，吸出培养基，加固定剂，使样本完全浸润，5 分钟后吸出固定剂，换等量新鲜固定剂继续固定。

(4) 吸出固定剂，将样本在空气中自然干燥。

(5) 向培养皿内加入 5ml 荧光染色工作液，封盖，室温下静置 30 分钟。

(6) 吸出染色液，用 3 ~ 5ml 蒸馏水冲洗细胞 3 次后，用滤纸吸干。

(7) 取出盖玻片，在载玻片上滴加 1 滴封固液，将盖玻片放在封固剂上，细胞固着面向上。

(8) 在盖玻片及载玻片上再滴加 1 滴封固剂，用另一干净的盖玻片封片，避免出现气泡。

(9) 在荧光显微镜下用 BG12 激发光滤片 (330/380nm) 观察样本。细胞质和表面及细胞间隙显示黄绿色荧光者表明有支原体污染。

注意事项：

(1) 每次检测均应包括阴性、阳性对照，阴性对照是将 Vero 或 3T6 细胞接种于支原体检测培养基中。阳性对照可用 *M. hyorhinis*、*M. arginini*、*M. orale*、*A. Laidlawii*。

(2) 当细胞形成较致密的单层后，细胞不能充分伸展，细胞不易被 Hoechst 着色，因此，应在细胞形成致密单层之前间隙染色。

(3) 其他注意事项同方法一。

16.3.9.3 病毒的检测

细胞培养中的病毒污染也是一个重要的问题。一般培养细胞出现细胞病变效应 (CPE)，可用作早

期检测病毒污染的指征。然而不出现 CPE 并不能排除培养物中存在病毒污染。事实上,一些持久的、潜伏性病毒污染必须经过适当的免疫学、细胞学超微结构及生物化学的方法才能检出。ATCC 细胞系质量控制中除用相差显微镜进行常规 CPE 检测外,还采用血细胞吸附试验和鸡胚接种试验检测培养物有无病毒污染。

方法一:红细胞吸附试验

操作步骤:

(1) 取鸡或人 O 型血红细胞,用生理盐水连续漂洗 3 次,将漂洗后的红细胞悬于生理盐水中制成体积比为 0.5% 的红细胞悬液。

(2) 取培养 48 ~ 72 小时形成单层细胞的培养瓶,如果是冷冻的细胞可从每批待测的安瓿中取出 5%,混合后进行检测。

(3) 吸出培养基,用 5ml 无二价阳离子的 HBSS 漂洗细胞。

(4) 每个培养瓶中加入 0.5ml 新配制的红细胞悬液,4℃ 静置 20 分钟。

(5) 肉眼或低倍镜观察单层细胞上红细胞凝集和吸附。

(6) 对未出现红细胞吸附的培养物需重复上述试验,如仍无红细胞吸附现象,则为阴性。

方法二:鸡胚接种试验

操作步骤:

(1) 取孵育 8 ~ 9 天的鸡胚,用碘酒和酒精消毒气囊端蛋壳后,在其上用直径约 1.5mm 的钻头打一小孔。

(2) 将胚蛋放在照蛋灯源上,确定血管发育区,在中央小心地钻开蛋壳。

(3) 将 2 ~ 3 滴 HBSS 液滴于边孔内,用 26 号针头穿过壳膜,HBSS 便渗入绒毛尿囊膜 (CAM) 内,使 CAM 与壳膜分开。

(4) 吸出气囊端蛋壳内的气体,在 CAM 上形成人工气囊。

(5) 用胶布封闭蛋壳上的两个孔,将胚蛋置 37℃ 条件下孵育。

(6) 用培养基将待检测的细胞配成浓度为 $(0.5 \sim 1) \times 10^7$ 细胞/0.2ml 的细胞悬液。

(7) 去掉封闭蛋壳上小孔的胶布,将 0.2ml 细胞悬液注入 CAM,每个样本接种 5 ~ 10 个胚蛋,再用胶布封口,继续孵育。

(8) 次日用照蛋灯检查,丢掉死胚蛋,定期检查 8 ~ 9 天,待胚胎形成后,从人工气囊处开洞,检查 CAM 上是否有水肿、细胞集落,胚胎有无异常。

注意事项:

(1) 带有人工气囊的胚蛋可在 24 ~ 48 小时内接种待测细胞,接种前要仔细检查,弃去死亡的胚蛋。

(2) 检测时应设阳性和阴性对照。用接种流感病毒、新城疫病毒或劳氏肉瘤病毒的胚蛋作为阳性对照。阴性对照则为胚蛋仅接种标准的细胞培养基。

16.3.9.4 微生物污染的排除

培养细胞受微生物污染后,一般都较难排除或杀灭,其中以支原体更难排除,因此,如果污染的细胞不具有重要价值或易从其他实验室获得,一般发现污染后应尽快丢弃,以防污染扩大影响其他细胞。防止污染的关键在于严格无菌操作,把好每一关口,尽可能禁止其他污染的物品进入培养操作环节。为防止污染和抢救有价值的细胞,目前一般可采用以下措施:

(1) 抗生素:细胞培养中使用抗生素的目的主要是防止污染。培养物发生污染后再使用抗生素往往难于根除细胞污染。有的抗生素对细菌仅有抑制作用,而无杀菌效应。同时,反复使用抗生素会使微生物产生抗药性,对细胞生长也有一定影响。因此,抗生素一般不作常规使用添加到培养基中。当有价值的细胞遭受微生物污染时,可联合使用抗生素,并先用常规用量的 5 倍左右作冲击处理,24 ~ 48 小时后再换含常规剂量抗生素的培养基,有时在污染的早期此法可能奏效。

(2) 加温处理: 根据支原体对热耐受性差的特点, 将受支原体污染的细胞置 41℃ 作用 5 ~ 10 小时, 最长不超过 10 小时, 以杀灭支原体。但如此高温对细胞本身也有很大影响, 故在处理前应先进行预实验, 确定出最合适的处理时间和温度, 以尽可能保证既最大限度杀伤支原体又使细胞不致受到太大的损伤。

(3) 动物体内接种: 将受支原体污染的细胞接种到同种动物的皮下或腹腔, 借动物体内的免疫系统消灭支原体, 而细胞却能在动物体内继续生长, 待一定时间后, 从体内取出细胞再继续培养增殖。

(4) 巨噬细胞吞噬: 从动物腹腔采取巨噬细胞, 为排除其他细胞成分, 可先进行纯化, 然后再加入到被支原体污染的细胞中混合培养。在培养过程中巨噬细胞能吞噬支原体, 而对培养细胞无影响。

16.4 动物细胞大规模培养

16.4.1 细胞培养规模的放大

“放大”通常是指生产规模的增大和生产能力的增加。放大的目的是在更大的规模重现某个过程并实现预期的实验结果。

培养规模的大小取决于所要生产的细胞产品的需求量和生产效率, 往往可以相差几个数量级。如促红细胞生成素 (EPO) 可以在转瓶培养系统或在 5 ~ 10L 的台式生物反应器中生产, 而组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA) 则可能要在 10 000L 规模的生物反应器中生产。

动物细胞培养由实验室建立的细胞株到反应器的大规模培养一般经历 5 个阶段 (表 16-5)。第一阶段是筛选和开发能高效表达目的产物的细胞系。这一阶段通常涉及 DNA 重组和细胞融合技术以期获得一个具有较高生长速率、较强的抗诱变性能、较高的专一表达水平的细胞株。第二阶段是在方瓶或转瓶或搅拌瓶中确定该细胞系对营养物质和环境的要求。放大的过程从第三阶段开始。这一阶段, 细胞培养转入生物反应器中进行, 最理想的是采用由生产规模的反应器缩小的台式反应器, 其工作体积通常为 1 ~ 5L。对细胞的营养物质要求和环境条件参数进行验证和修正, 确定最佳的操作方式。第四阶段在中试规模进一步根据生产的实际条件和可能性, 确定过程的控制方案, 根据细胞株的实际情况寻求过程的优化方案, 对培养的环境作进一步的调整。这一阶段是把实验室的结果引向生产水平过程中所必需的, 其中包含许多在转入生产规模时所必须解决的工程问题。第五阶段是扩大到生产规模, 所用的反应器是生产规模的, 但还必须与中试工程密切结合, 在生产规模中尚需解决的问题可以和中试的试验相结合, 以最终实现由实验室研究转入规模化生产。

目前, 动物细胞培养规模的放大很大程度上仍然依赖于实践经验, 同时也取决于反应器设计的简单性以及设计与放大实用性相结合的程度。以下是动物细胞培养规模放大中有待进一步解决的 6 个主要问题: ①培养基的优化; ②细胞生长限制因素的确定及消除; ③产物表达的有效控制; ④污染的控制; ⑤硬件和过程设计参数的优化; ⑥产物的有效回收。

表 16-5 细胞培养规模放大的 5 个主要阶段

步 骤	装 备	培 养 规 模
筛选细胞系	细胞培养实验室	96 孔或 24 孔板、方瓶
确定培养条件	细胞培养实验室	方瓶、转瓶、搅拌瓶
产物表达的优化	生物工程实验室、细胞培养实验室	台式生物反应器
为放大修正条件	中试车间、生物工程实验室	台式和中试生物反应器
放大生产	生产车间、中试车间	生产和中试生物反应器

16.4.2 动物细胞培养生物反应器

动物细胞生物反应器是动物细胞产品生产过程中唯一的能把原料转化为产物的环节,是生化工艺过程的心脏。由于动物细胞与微生物细胞有很大的差异,对体外培养环境有严格的要求,如动物细胞没有细胞壁,非常脆弱,生长缓慢,对培养环境十分敏感。传统的微生物发酵用的反应器不能适用于动物细胞的大规模培养,因而对动物细胞培养用的反应器的设计和过程控制系统提出了特殊的要求。一般地说,一台生物反应器的设计必须满足如下的要求:

- (1) 生物因素:必须有很好的生物相容性,能很好地模拟细胞在体内的生长环节。
- (2) 化学因素:必须提供足够的停留时间,完成所需要的转化度,符合过程反应动力学的要求。
- (3) 传质因素:对非匀相反应,反应过程往往可能被反应底物的扩散速率制约,而不是被反应动力学所控制,因此,必须满足物质传递的要求。
- (4) 传热因素:有能力除去和加入反应过程的热量,无过热点。
- (5) 安全因素:能有效地隔离有毒害的反应物和产物,有优良的防污染性能。
- (6) 操作因素:便于操作和维修。

自 70 年代以来,动物细胞培养生物反应器有很大的发展,其种类越来越多,规模越来越大。种类上大致有气升式生物反应器、通气搅拌生物反应器、中空纤维管生物反应器、无泡搅拌生物反应器和流化床生物反应器等;规模上气升式生物反应器和通气搅拌生物反应器已分别达到 10 000L 和 8 000L 工作体积的规模。不同生物反应器的主要特性列于(表 16-6)。

表 16-6 不同生物反应器的主要特性

特 性	反 应 器 类 型				
	气升式	通气搅拌式	中空纤维管式	无泡搅拌式	流化床式
培养方式	悬浮	悬浮	贴壁、结团	悬浮	贴壁、结团
细胞的剪切保护	较差	较差	好	较好	好
细胞生长速率	较高	稍低	较低	较高	较低
对细胞的检测和控制	直接	直接	间接	直接	间接
过程控制	容易	容易	较难	容易	稍难
扩散限制	无	无	有	无	有
放大	容易	容易	难	较难	难
生产率	较低	较低	较高	稍高	较高
下游处理	较难	较难	容易	较难	稍易

16.4.3 动物细胞微载体培养

动物细胞微载体培养是动物细胞大规模高密度培养中目前公认的技术相对完善、最有实用价值的一种培养模式。采用微载体培养具有以下优点:①表面积/体积(S/V)大,单位体积培养基的细胞产率高;②细胞处于均一的生长环境,培养系统重现性好;③细胞的生长状况易于观察;④培养基利用率高;⑤产品收获过程不复杂,培养规模易于扩大;⑥培养系统占有空间小,生产效率高。

细胞能否在微载体表面附着生长取决于细胞的特性、微载体的理化性质、培养基成分及培养条件,而微载体性能的优良与否是关键的因素,它影响着培养细胞的形态、贴壁率、生长速率、细胞密度以及目的产物的表达。概括来说,一种优良微载体必须具备以下特性:①不含有对细胞有毒的成分;②与细胞有良好的相容性,使细胞易于贴壁生长;③密度在 1.03 ~ 1.05 之间;④溶胀后的粒径在 60 ~ 250 μm

范围, 粒度分布均匀, 粒径差不大于 $20 \sim 25 \mu\text{m}$, 表面光滑以利于细胞铺展; ⑤有良好的光学透明性, 便于显微镜观察细胞生长情况; ⑥能在 PBS 中耐受 $120 \sim 125^\circ\text{C}$ 、 $20 \sim 30$ 分钟高压蒸汽灭菌; ⑦基质为非刚性材料, 避免在培养过程中微载体间的相互碰撞而损伤细胞; ⑧不吸收培养基中的营养成分及目的产物; ⑨收获细胞或目的产物容易; ⑩价格低廉, 能重复使用。然而, 从国外商品化的微载体看, 尚未有能全面符合上述要求的微载体。以下以 Cytodex 1 微载体为例, 简要介绍动物细胞微载体固定化培养的一般方法。

试剂及仪器:

贴壁生长型细胞
Cytodex 1
培养基
0.25%胰蛋白酶
PBS
吐温 80
甲基硅油
细胞培养用搅拌瓶
细胞培养用磁力搅拌装置

操作步骤:

(1) 用 $2\% \sim 5\%$ (V/V) 溶于乙酸乙酯的甲基硅油硅化搅拌瓶, 室温下自然凉干后, 用去离子水反复冲洗, 121°C 、15 磅高压蒸汽处理 20 分钟。

(2) 称取适量的 Cytodex 1, 室温下用按每克微载体用 $50 \sim 100\text{ml}$ PBS 浸泡 4 小时以上, 必要时可加入适量的吐温 80, 使之充分膨胀, 再用 PBS 漂洗 2~3 遍, 115°C 、15 磅高压蒸汽处理 15 分钟。

(3) 吸去经高压蒸汽灭菌处理的微载体中的 PBS, 用培养基浸泡微载体 2~4 小时, 必要时加于适当搅拌。

(4) 吸出用于漂洗微载体的培养基, 加入适量含血清的培养基。

(5) 用胰蛋白酶消化处于对数生长期的细胞, 使细胞充分分散, 用培养基悬浮细胞。

(6) 将细胞按一定的接种密度移入搅拌瓶内, 将搅拌瓶移入 37°C 温箱, 置搅拌装置上, 细胞接种后最初 4~6 小时, 可采用缓慢搅拌或间歇搅拌, 尽可能使细胞均匀地贴附于微载体上。

(7) 调节搅拌速度至 $40 \sim 60\text{r/min}$, 使微载体充分悬浮并有利于溶质的传递而不造成细胞损伤。观察细胞生长、监测并控制细胞生长环境的变化。

注意事项:

(1) 不同类型细胞体外培养的生长特性及不同微载体表面的理化性质有所不同, 在实施微载体固定化培养动物细胞时, 应根据培养细胞的类型, 选择合适的微载体。

(2) 微载体的使用浓度决定着培养细胞所能达到的最大密度。微载体浓度低, 细胞产量相应低; 反之, 微载体浓度高, 则细胞产量相应高。但当微载体增加到一定浓度后, 过多的微载体会在空间上对细胞的生存和生长造成不利的影响。因此, 在实际应用中应根据培养细胞及微载体的特性选择合适的微载体浓度。

(3) 细胞接种浓度的高低影响着细胞在微载体上的生长增殖以及最终的细胞产量。接种浓度的高低取决于细胞的集落形成率, 即取决于所培养的细胞类型。不同的细胞株, 其合适的细胞接种浓度不同。

(4) 细胞能否在微载体表面贴附, 既取决于细胞与微载体的相容性, 又取决于细胞与微载体接触的机率和时间。细胞接种后先采用低速搅拌或间歇搅拌, 既能减少因搅拌而产生的剪切力又能延长细胞与微载体的接触时间, 从而有利于细胞在微载体表面贴附。

(5) 随着培养细胞密度的增加, 对培养基的营养条件及培养的环境条件的要求不断提高。因此, 在培

养过程中应及时监测和控制细胞生长环境,必要时给予适当通气、补充营养物质、调整培养基 pH 并通过更换培养基降低对细胞生长不利的代谢产物的浓度。

16.4.4 生物反应器的操作

如前所述,动物细胞生物反应器是动物细胞产品生产过程中唯一的能把原料转化为产物的环节,是生化工艺过程的“心脏”。由于动物细胞生物反应器的不同以及主要因细胞类型和产品特性所决定的操作模式的不同,反应器操作的具体方法各有不同。但总的来说,反应器的操作包括运转前准备、试运转、培养运转和运转结束三个阶段。以下以 BIOSTAT B5 通气搅拌式细胞培养罐 (B. Braun Biotech International) 为例介绍动物细胞生物反应器的操作。

操作步骤:

1. 运转前准备:

(1) 控制器的准备:

1) 准备工作间、电源 (电压: 200 ~ 240V)、冷却水供应系统 (最大水压: 29 磅; 最大流量: 5L/min)、气体供应系统 (最大气压: 11.6 磅; 最大气体流速: 10L/min)。

2) 连接恒温系统管路,将冷却水供应系统与控制器的冷却水进出口连接。

3) 根据需要将气体供应系统与控制器的气体混合器上的相应入口 (Air、CO₂、N₂ Aux.) 连接。

(2) 培养罐及附件的准备:

1) 检查所有部件是否完好。

2) 连接 pH 电极,接通电源 6 小时,使电极极化。用 pH7.0 的标准溶液调节零点,用 pH4.0 或 pH9.0 的标准溶液调节斜率,校正 pH 电极。

(3) 安装培养罐:

1) 拧开顶盖螺丝,卸下顶盖。

2) 从下面安装固定于顶盖的部件: 搅拌杆、叶轮、旋转滤器、膜式通气筒、进气管、出气管、采样管、接种管及相应的 O 型密封圈。

3) 顶盖固定到培养罐上。

4) 从上面安装 pH 电极、溶氧电极、液面水平控制电极和废气冷却塔。

5) 用蒸馏水灌注培养罐夹层。

6) 将适量的去离子水或 PBS 溶液注入培养罐。

7) 用足够长的硅胶管连接接种瓶、贮液瓶、补料瓶及采样装置。

8) 外露的电极接头用铝箔包裹,所有与管路的外端或用空气滤器封闭或用纱布和纸包裹。

9) 用止血钳封闭与培养罐内液体接触的管路,拧紧所有松动的部件。

(4) 将培养罐及附件 121℃、15 磅高压蒸汽灭菌,时间至少为 60 分钟。

2. 运转准备:

(1) 将搅拌马达安装在培养罐的搅拌杆绞合接头上。

(2) 将控制器的供气管连接到培养罐的进气口的滤器上。

(3) 将恒温系统的管路与培养罐夹层的进出口相接。

(4) 将废气冷却塔的管路连接到控制器冷却系统的相应接口上。

(5) 用电极连线将所有电极连接到控制器上的相应接口上。

(6) 接通电源,通电 6 小时以上使溶氧电极充分极化。向培养罐内通入 N₂, 调节零点; 向培养罐内通入 O₂, 调节斜率。校正溶氧电极。

(7) 将各种输液管路置入控制器的相应蠕动泵中,启动蠕动泵使溶液充盈相应的管路。

(8) 去除培养罐中的水或 PBS 溶液,加入培养基。

(9) 设定控制器的各种参数, 运转反应器至少 24 小时, 观察反应器的运转情况及检测培养罐灭菌彻底与否。

3. 培养运转:

- (1) 按前述方法准备待接种的细胞和微载体, 移入接种瓶中。
- (2) 利用重力或蠕动泵将接种瓶中的细胞和微载体通入培养罐内。
- (3) 启动搅拌马达, 在适宜的参数控制下开始培养运转。
- (4) 定期取样观察细胞生长及目的产物的生产情况, 检测培养基的主要营养成分及有害代谢产物。
- (5) 根据对细胞生长的观察及培养环境的检测结果调整有关控制参数, 优化过程控制。

4. 运转结束:

- (1) 关闭所有气体管阀。
- (2) 关闭控制器, 取下搅拌马达。
- (3) 切断控制器的电源, 取下各种电极、有关附件及其连线。
- (4) 卸下培养罐顶盖, 吸出培养罐中的内容物, 排出夹层中的水。
- (5) 用适当洗涤剂清洗培养罐及其附件, 再用去离子水浸泡后冲洗几次。

注意事项:

(1) 动物细胞生物反应器的操作环节多、周期长、材料消耗大, 一旦发生污染将造成人力、物力和时间的很大浪费, 因此, 在整个培养过程中应特别注意微生物污染的问题。对密封垫圈、空气滤器等涉及培养罐密闭的配件应经常检查, 定期更换。培养罐高压蒸汽灭菌应根据培养罐的结构、大小严格按照相应的操作手册的要求进行。

(2) 当培养细胞达到较高密度时, 为维持适宜的溶氧, 应适当提高气体供应的流量和压力, 但应把通气硅胶管的内压控制在 11.6 磅以下, 以免管壁破裂。

(3) 安装用于培养基 pH 控制的 pH 电极时, 操作要小心, 以免损坏电极探头。pH 电极和溶氧电极应按相应手册要求妥善保存, 定期检测电极的性能, 以保证不同批次培养的条件基本相同。

(4) 采用长期连续罐流培养模式时, 与蠕动泵接触的液体输送管路因长期磨损, 有破裂的可能, 应定期检查, 及时变换与蠕动泵接触的部位。

(陈昭烈 文 马清钧 审)

附录 1

常用的培养液成分及配方 (mg/L)

成分名称	MEM	DMEM	HAM F-10	HAM F-12	McCoys 5A	RPMI 1640	199	L-15	Fischers	Waymouth MB752/L
丙氨酸	8.9		9.00	9.00	13.36		50.00	225.00		
精氨酸	126.00	84.00	211.00	211.00	42.14	200.00	70.00		15.00	75.00
天冬氨酸	13.30		13.30	13.30	19.97	20.00	60.00			60.00
天冬酰胺	15.00		15.00	15.00	45.03	50.00		260.00		61.00
胱氨酸	31.30	62.60					26.00			15.00
半胱氨酸			35.00	35.00	24.24		0.11	120.00		61.00
谷氨酸	14.70		14.70	14.70	22.07	20.00	133.60			150.00
谷氨酰胺	292.00		146.00	146.00	219.15	300.00	100.00	300.00	200.00	350.00
甘氨酸	7.50	30.00	7.51	7.51	7.51	10.00	50.00	200.00		50.00
组氨酸	42.00	42.00	21.00	20.96	20.96	15.00	21.88	250.00		128.00
羟脯氨酸					19.67	20.00	10.00			

续上页

成分名称	MEM	DMEM	HAM	HAM	McCoy's	RPMI	199	L-15	Fischers	Waymouth
异亮氨酸	52.00	105.00	2.60	3.94	39.36	50.00	40.00	125.00	75.00	25.00
亮氨酸	52.00	105.00	13.10	13.10	39.36	50.00	120.00	125.00	30.00	50.00
赖氨酸	72.50	146.00	29.30	36.50	36.54	40.00	70.00	93.00	50.00	240.00
蛋氨酸	15.00	30.00	4.48	4.48	14.92	15.00	30.00	75.00	100.00	50.00
苯丙氨酸	32.00	66.00	4.96	4.96	16.52	15.00	50.00	125.00	67.00	50.00
脯氨酸	11.50		11.50	34.50	17.27	20.00	40.00			
丝氨酸	10.50	42.00	10.50	10.50	26.28	30.00	50.00	200.00	15.00	75.00
苏氨酸	48.00	95.00	3.57	11.90	17.87	20.00	60.00	300.00	40.00	40.00
色氨酸	10.00	16.00	0.60	2.04	3.06	5.00	20.00	20.00	10.00	40.00
酪氨酸二钠	51.90		2.61	7.78	26.10	28.83	57.66	373.00	74.60	
缬氨酸	46.00	94.00	3.50	11.70	17.57	20.00	50.00	100.00	70.00	65.00
氯化钙	185.00	265.00	44.10	44.10	132.43		265.00	186.00	91.00	120.00
硫酸镁	97.67	97.67	74.64		97.68	48.84	97.67	400.00	121.00	200.00
氯化钾	400.00	400.00	285.00	224.00	400.00	400.00	400.00	400.00	400.00	150.00
磷酸二氢钾	60.00		83.00					60.00		80.00
磷酸氢二钠	47.88		153.70	142.04		800.00				566.00
磷酸二氢钠		109.00			504.00		122.00		78.00	
氯化钠	8000	4400	6800	7100	6460	6000	6800	8000	8000	6000
生物素			0.024	0.0073	0.20	0.20	0.01		0.01	0.02
氯化胆碱	1.00		0.69	13.96	5.00	3.00	0.50	1.00	1.50	250.00
肌醇	2.00	7.20	0.54	18.00	36.00	35.00	0.05	2.00	1.50	1.00
尼克酰胺	1.00	4.00	0.62	0.04	0.50	1.00	0.03	1.00	0.50	1.00
D-泛酸(半钙)	1.00	4.00	0.72	0.48	0.20	0.25	0.01			
吡哆醛	1.00	4.00	0.21	0.06	0.50	1.00	0.03		0.50	
吡哆醇					0.50		0.03			1.00
			F-10	F-12	5A	1640				MB752/L
硫胺素	1.00	4.00	1.00	0.34	0.20	1.00	0.01	1.00	1.00	10.00
核黄素	0.10	0.40	0.38	0.04	0.02	0.20	0.01		0.05	1.00
抗坏血酸					0.56		0.05			17.5
维生素 B-12										0.20
对氨基苯甲酸							0.05			
叶酸	1.00	4.00	1.32	1.32	10.00	1.00	0.01	1.00	100.00	0.40
偏多酸钙								1.00	0.05	1.00
D-葡萄糖	1000	1000	1100	1802	3000	2000	1000		1000	5000
酚红	11.00	9.30	1.30	1.30	11.00	5.30	21.3	10.00	5.00	10.00
丙酮酸钠		110.00	110.00	110.00				550.00		
次黄嘌呤			4.08	4.08			0.30			25.00
胸苷			0.73	0.73			0.30			
谷胱甘肽 (还原型)					0.50	1.00	0.05			150.00
碳酸氢钠	350	3700	1200	1176	2200	2000	2200			
谷氨酰胺		72.00								

附录 2

动物细胞培养用的商品微载体

商品名	制造商	材料	比重	直径 (μm)	表面积 (cm^2/g)
Acrobead	Galil		1.04	150	5000
Biosilon	Nunc	聚苯乙烯	1.05	160 ~ 300	255
Bioglas	Solohill Eng	玻璃	1.03	150 ~ 210	350
Biosphere	Solohill Eng	胶原	1.02	150 ~ 210	350
Biocarrier	Bio - Rad	聚苯乙烯酰胺	1.04	120 ~ 180	5000
Cellfast	QDMLab	硅/聚氨基葡萄糖			10000
Cytodex 1	Pharmacia	DEAE 葡聚糖	1.03	160 ~ 230	6000
Cytodex 2	Pharmacia	DEAE 葡聚糖	1.04	115 ~ 200	5500
Cytodex 3	Pharmacia	胶原	1.04	130 ~ 210	4600
Cytosphere	LUX	聚苯乙烯	1.04	160 ~ 230	250
Dormacell	peifer & Langen	葡聚糖	1.05	140 ~ 240	7000
DE - 53	Whatman	纤维素	1.03	圆柱状	4000
Gelibead	Hazeltan	明胶	1.04	115 ~ 235	3800
Mica	Muller - Licheim	聚丙烯酰胺	1.04		350
Micareel G	Reactifs	胶原/葡聚糖	1.03		5000
Microdex	Dextran Prod	DEAE 葡聚糖	1.03	150	250
Superbeads	Flow Lab	DEAE 葡聚糖	1.03	150 ~ 200	6000
Ventreglas	Ventrex	玻璃	1.03	90 ~ 210	300
Ventreglas	Ventrex	明胶	1.03	150 ~ 250	4300

参 考 文 献

- [1] 陈瑞铭. 动物组织培养技术及其方法. 北京: 中国科学出版社, 1991
- [2] 鄂 征. 组织培养和分子细胞学技术. 北京出版社, 1995
- [3] 司徒镇强, 等. 细胞培养. 北京: 世界图书出版公司, 1996
- [4] 陈因良, 等. 细胞培养工程. 上海: 华东化工学院出版社, 1992
- [5] Butler M. Animal Cell Technology, Principle and Products. Milton Keynes, Open University Press, 1987
- [6] Freshney RJ. Culture of Animal Cells. New York, Alan R. Liss Inc., 1983
- [7] Ham HR, et al. Methods in Enzymology. 1979, 58:44
- [8] Freshney RJ. Animal Cells Culture, A Practical Approach. Oxford University Press, 1992
- [9] Hay RJ. ATCC Quality Control Methods for Cell Lines. American Type Culture Collection, 1985
- [10] Adams RLP. Cell Culture for Biochemists. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier. Amsterdam, 1980

17. 多聚酶链式反应 (PCR) 技术

多聚酶链式反应 (polymerase chain reaction) 简称 PCR 技术, 是近年发展起来的一种体外扩增特异 DNA 片段的技术。此法操作简便, 可在短时间内在试管中获得数百万个特异 DNA 序列的拷贝。PCR 技术虽然问世时间仅数年, 但它已迅速渗透到分子生物学的各个领域。在分子克隆、遗传病的基因诊断、法医学、考古学等方面得到了广泛的应用。

人们为了从生物材料中获得某一特定的 DNA 顺序或进行其序列分析、鉴定, 按传统的方法要经过 DNA 酶切、连接、转化等步骤构建含有目的基因的 DNA 克隆, 然后导入细胞进行扩增, 再经过同位素标记探针的筛选等过程。虽然技术上已无难点, 但操作复杂, 一般需要数周到数月的时间。而 PCR 技术可在数小时内对仅有几个拷贝的基因放大百万倍, 大大简化了传统的分子克隆技术, 从而比较容易地对目的基因进行分析、鉴定。

17.1 PCR 技术的原理

PCR 技术实际上是在模板 DNA、引物和 4 种脱氧核糖核苷酸存在的条件下依赖于 DNA 聚合酶的酶促合成反应。PCR 技术的特异性取决于引物和模板 DNA 结合的特异性。反应分三步: ①变性 (denaturation): 通过加热使 DNA 双螺旋的氢键断裂, 双链解离形成单链 DNA; ②退火 (annealing): 当温度突然降低时由于模板分子结构较引物要复杂的多, 而且反应体系中引物 DNA 量大大多于模板 DNA, 使引物和其互补的模板在局部形成杂交链, 而模板 DNA 双链之间互补的机会较少; ③延伸 (extension): 在 DNA 聚合酶和 4 种脱氧核糖核苷三磷酸底物及 Mg^{2+} 存在的条件下, $5' \rightarrow 3'$ 的聚合酶催化以引物为起始点的 DNA 链延伸反应。以上 3 步为一个循环, 每一循环的产物可以作为下一个循环的模板, 数小时之后, 介于两个引物之间的特异性 DNA 片段得到了大量复制, 数量可达 $2 \times 10^6 \sim 7$ 拷贝。

如图 17-1 所示, 经过高温变性, 低温退火和中温延伸 3 个温度的循环, 模板上介于两个引物之间的片段不断得到扩增。每循环一次, 目的 DNA 的拷贝数加倍, 随着循环次数的增加, 目的 DNA 以 2^n -

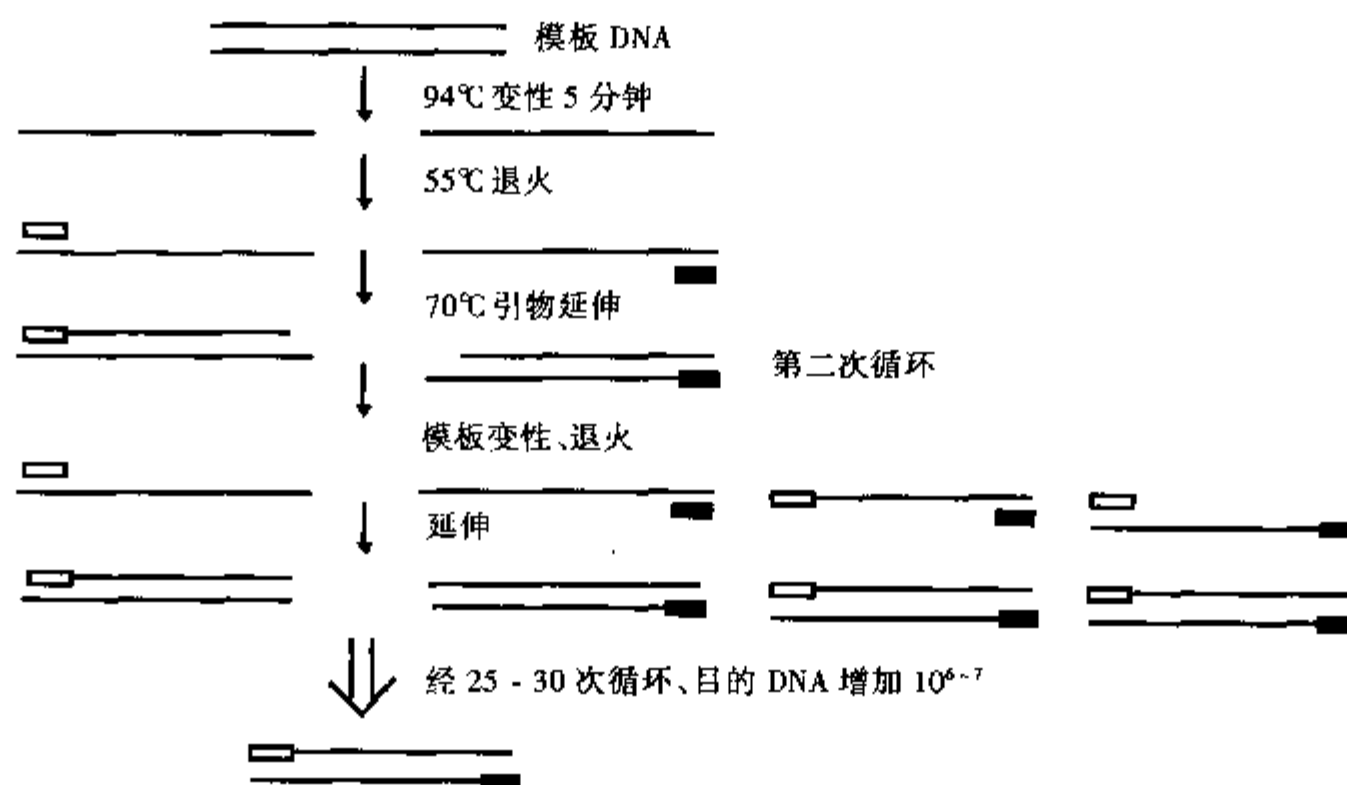


图 17-1 PCR 原理示意图

2n 的形式堆积。PCR 扩增的特异性是由人工合成的一对寡核苷酸引物所决定的。在反应的最初阶段, 原来的 DNA 担负着起始模板的作用, 随着循环次数的递增, 由引物介导延伸的片段急剧地增多而成为主要模板。因此, 绝大多数扩增产物将受到所加引物 5' 末端的限制, 最终扩增产物是介于两种引物 5' 之间的 DNA 片段。

17.2 PCR 反应的成分和作用

根据多年来的实践经验, 已提供了一个标准的 PCR 反应条件。反应体系一般选用 50 ~ 100 μ l 体积, 其中含有:

50mmol/L KCl
10mmol/L Tris·Cl (室温下 pH = 8.4)
1.5mmol/L MgCl₂
100 μ g/ml 明胶或牛血清白蛋白 (BSA)
2 个引物, 各 0.25 μ mol/L
4 种底物 (dATP + dCTP + dGTP + dTTP), 各 200 μ mol/L
模板 DNA (人基因组 DNA) 0.1 μ g
Taq DNA 聚合酶 2.5U

其中模板 DNA 的用量必须根据其分子量的多少加以调整, 一般需要含 $10^2 \sim 10^5$ 拷贝的 DNA, 封上矿物油防止高温反应时液体的挥发, 即可进行 PCR 反应。

反应条件一般为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 秒, 70 ~ 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 ~ 60 秒, 共进行 30 次左右的循环。

17.2.1 PCR 反应的缓冲液

PCR 反应中缓冲液是一个重要的影响因素, 特别是其中的 Mg²⁺ 能影响反应的特异性和扩增片段的产率。在一般的 PCR 反应中, 1.5 ~ 2.0mmol/L Mg²⁺ 是比较合适的 (对应 dNTP 浓度为 200 μ mol/L 左右)。Mg²⁺ 过量能增加非特异扩增并影响产率。

现在认为限制 KCl 和明胶的用量值得提倡, 尤其是 BSA, 虽其对酶有一定保护性, 如果质量不好将起相反的作用, 建议使用乙酰化的 BSA。KCl 在 50mmol/L 时能促进引物退火, 大于此浓度时将会抑制 Taq DNA 聚合酶的活性。

在 PCR 中使用 10 ~ 50mmol/L Tris·Cl, 主要靠其调节 pH 使 Taq DNA 聚合酶的作用环境维持偏碱性。Tris 缓冲液是一种双极化离子缓冲液, pKa 为 8.3 (20 $^{\circ}$ C), Δ pKa 为 -0.021/ $^{\circ}$ C。

在反应体系中加入适量 (10%) 的 DMSO (二甲基亚砜), 虽然 DMSO 对聚合酶活性有一定抑制作用, 但它可减少模板二级结构, 提高 PCR 反应特异性。有报道指出甲酰胺或氯化四甲基氮 (TMAC) 均可提高反应特异性, 而对酶活性没有明显影响。

17.2.2 底物 (脱氧核糖核苷三磷酸, dNTPs) 浓度

dNTP 溶液具有较强的酸性, 使用时应以 NaOH 将 pH 值调至 7.0 ~ 7.5, 分装小管, 于 -20 $^{\circ}$ C 存放, 过多的冻融会使 dNTP 产生降解。在 PCR 反应中, dNTPs 浓度应在 20 ~ 200 μ mol/L, dNTP 浓度过高可加快反应速度, 同时还可增加碱基的错误掺入率和实验成本。反之, 低浓度的 dNTP 会导致反应速度的下降, 但可提高实验的精确性。4 种 dNTP 在使用时必须以等当量浓度配制, 以减少错配误差和提高使用效率。此外, 由于 dNTP 可能与 Mg²⁺ 结合, 因此应注意 Mg²⁺ 浓度和 dNTP 浓度之间的关系。

17.2.3 PCR 反应的酶及其浓度

最早用于 PCR 反应的酶是 Klenow 酶。由于该酶对高温耐受性差, 每次变性时绝大部分酶失活, 所以每经过数个循环后则重新添加新酶, 致使实验操作复杂化且加高实验成本。以后又分别使用 T_4 DNA 聚合酶和 T_7 DNA 聚合酶。均因其耐热性较差使得这两种酶在 PCR 反应中的应用受到限制。后来发现的 Taq DNA 聚合酶有很高的耐热性 (经 95°C 持续高温仍不失活), 加酶一次可完成整个 PCR 反应。

在 $100\mu\text{l}$ 反应体系中, 一般所需 Taq DNA 聚合酶的用量为 $0.5 \sim 5\text{U}$ 。根据扩增片段的长短及其复杂程度 ($G+C$ 含量) 不同而有所区别。使用 Taq DNA 聚合酶浓度过高, 可引起非特异产物的扩增; 浓度过低则合成产物量减少。不同厂家酶的定义及生产条件不一, 可根据具体情况区别使用。

17.2.4 引物

PCR 反应中引物浓度一般为 $0.1 \sim 0.5\mu\text{mol/L}$, 引物浓度偏高会引起错配和非特异性产物扩增, 且可增加引物之间形成二聚体的机率, 这两者还由于竞争使用酶、dNTP 和引物, 这一切均会使 DNA 合成产率下降。

17.2.5 PCR 反应条件的选择

自 Taq DNA 聚合酶应用于 PCR 反应以后, PCR 整个反应只需要经过几个简单的温度变换即可在短时间内在试管内完成。这使得人们可以利用自动化的机械来完成整个反应过程。目前国内外已有多种用于 PCR 自动扩增仪, 即使没有自动的 PCR 仪, 只要应用 3 个不同温度的水浴也可很容易完成 PCR 反应。

一个 PCR 反应开始, 首先是使双链模板 DNA 解离为单链, 使之有利于与引物相结合。这个过程可以通过加热完成, 在 $90 \sim 95^{\circ}\text{C}$ 条件下, 即使再复杂的 DNA 分子, 如人基因组 DNA 也可变性成为单链, 根据模板 DNA 复杂程度, 我们可以调整变性温度和时间。一般情况下选择 94°C 30 秒可使各种复杂的 DNA 分子完全变性。过高温度或高温持续时间过长, 可对 Taq DNA 聚合酶活性和 dNTP 分子造成损害。

变性后的 DNA 很快冷却至 $40 \sim 60^{\circ}\text{C}$, 可使引物和模板 DNA 发生结合。这一方面是由于模板 DNA 结构比引物要复杂得多, 引物和模板之间碰撞的机会大大高于模板互补链之间的碰撞。复性温度的选择, 可以根据引物的长度和其 $G+C$ 含量确定。长度在 $15 \sim 25\text{bp}$ 之间时, 引物的退火温度可通过 $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ 计算得到。在 T_m 允许的范围内, 选择较高的退火温度可大大减少引物和模板之间的非特异结合, 提高 PCR 反应的特异性。退火时间设置为 30 秒钟, 足以使引物和模板之间完全结合。PCR 反应的延伸温度建议选择在 $70 \sim 75^{\circ}\text{C}$ 之间, 此时, Taq DNA 聚合酶具有最高活性。当引物在 16 个核苷酸以下时, 过高的延伸温度不利于引物和模板结合。此时, 可采用使反应温度缓慢升高到 $70 \sim 75^{\circ}\text{C}$ 的方法。因为最初较低温度下, DNA 聚合酶已催化延伸反应开始, 接下来的较高温度不会对这种“延长”过的引物和 DNA 模板的结合发生影响。PCR 延伸反应的时间, 可根据待扩增片段的长度而定, 一般 1kb 以内的片段, 延伸时间 1 分钟是够用的。扩增片段在 1kb 以上则需加长延伸时间。国外报道扩增 10kb 片段时其延伸时间可达 15 分钟。

其他参数选定后, PCR 循环次数主要取决于模板 DNA 的浓度。理论上说 $20 \sim 25$ 次循环后, PCR 产物的积累即可达最大值, 实际操作中由于每步反应的产率不可能达到 100% , 因此不管模板浓度是多少, $20 \sim 30$ 次是比较合理的循环次数。循环反应的次数越多非特异性产物的量亦会增加。

17.2.6 PCR 反应的产物积累规律

在 PCR 反应中, DNA 扩增过程遵循酶的催化动力学原理。在反应初期, 目的 DNA 片段的增加呈指数形式。随着目的 DNA 产物的逐渐积累, 在引物—模板与 DNA 聚合酶达到一定比例时, 酶的催化反应趋于饱和, 此时扩增 DNA 片段的增加减慢进入相对稳定状态, 即出现所谓“停滞效应”, 这种效应称

“平台期”。到达平台期所需 PCR 循环次数取决于样品中模板的拷贝数、PCR 扩增效率及 DNA 聚合酶的种类和活性, 以及非特异性产物的竞争等等因素。一般在达到“停滞”阶段之前, 用 Klenow 酶只能进行 20 次左右的循环, 积累大约 3×10^5 个目的基因拷贝。而用 Taq DNA 聚合酶则可进行 25 次以上 PCR 循环, 积累 4×10^8 目的基因拷贝。这是因为 Taq DNA 聚合酶的高效及高特异性, 减少来自非特异性延伸产物对聚合酶的竞争, 从而使在“停滞”期到达之前有更多的目的基因片段积累。

大多数情况下, 平台期在 PCR 反应中是不可避免的。但一般在此之前, 合成的目的基因片段的数量足可满足实验的需要。

17.3 PCR 反应的自动化

在 PCR 技术发明的早期, 由于使用的聚合酶 (Klenow, T_4 DNA 聚合酶) 耐热性差, 每一个或数个循环后都需要重新加酶, 反应只能在手工操作下进行。Taq DNA 聚合酶的发现使 PCR 的自动化成为可能。Cetus 公司率先推出 PCR 自动扩增仪, 产品不断革新, 已实现了由电脑控制整个反应过程。目前, 国内已有中科院遗传所、复旦大学、北京市应用新技术研究所等多家单位推出的国产 PCR 自动扩增仪。常用的 PCR 扩增仪主要有 3 种形式。①机械手: 用 3 个不同温度的水浴, 样品用 1 个机械手臂控制在不同温度间移动。此装置的优点在于, 温度转换快, 耗时少 (一般 1~3 小时), 设备比较简单, 容易控制和维修, 由于温度升降太快, 可能对聚合酶的活性有某些影响; ②空气加热/光加热循环装置: 用热空气枪借空气作为热传播媒介或用光照射加热, 由风扇提供外部冷空气, 加上精确的温度传感器构成不同的温度循环。这种装置的优点是不用金属精密加工, 成本低, 整个系统没有液体流动也不用制冷剂, 因而安全程度高; ③变温金属块作恒温装置: 通过半导体加热和冷却, 在 1 个铝合金金属块上来完成 PCR 过程。这种装置比较牢固耐用, 温度变换平稳, 有利于保持 DNA 聚合酶的活性, 但相对来说温度变换梯度较小, 整个实验耗时较长 (3~4 小时)。

17.4 PCR 反应引物设计

对整个 PCR 扩增体系, 引物的设计占有十分重要的地位。PCR 技术在实际应用中环境和条件是千差万别的。模板的组成、欲扩增片段的长度及其不同的使用目的, 对引物的要求是不一样的。PCR 作为一个体外酶促反应, 其效率和特异性取决于两个方面, 一是引物与模板的特异结合, 二是多聚酶对引物的有效延伸。基因组 DNA 作为模板时, 由于其数量的庞大及结构复杂, 除了特异扩增外, 往往很容易产生非特异性扩增产物。引物设计的总原则就是提高扩增的效率和特异性。引物设计一般遵循下列原则:

(1) 引物长度以 15~30bp 为宜。引物过短时会使特异性降低, 过长时则成本增加, 且也会降低特异性。

(2) 引物碱基尽可能随机分布, 避免出现嘌呤、嘧啶堆积现象, 引物 G+C 含量宜在 45~55% 左右。

(3) 引物内部不应形成二级结构, 两个引物之间尤其在 3' 末端不应有互补链存在。

(4) 引物的碱基顺序不应与非扩增区域有同源性。要求在引物设计时采用计算机进行辅助检索分析。

(5) 引物 3' 末端碱基: 原则上要求引物 3' 末端与模板 DNA 一定要配对。另外引物 3' 末端的末位碱基在很大程度上影响着 Taq DNA 聚合酶的延伸效率。国外资料表明, 引物 3' 末端碱基在错误配对时不同碱基的引发效率存在很大差异 (表 17-1)。当末位碱基为 A 时, 即使在错配的情况下, 也能引发链的合成, 而末位碱基为 T 时, 错配时引发效率大大降低。G、C 居于中间, 所以 3' 末端的末位碱基最好选 T、C、G, 而不选 A。

表 17-1 引物 3'端碱基与模板 3'端碱基配对

引物 3'端碱基 模板 3'端碱基	T	C	G	A
T	1.0	1.0	1.0	1.0
C	1.0	0.01	1.0	1.0
G	1.0	1.0	1.0	<0.01
A	1.0	1.0	<0.01	0.05

(6) 引物 5'末端碱基: PCR 反应物 5'末端碱基并没有严格的限制, 只要与模板 DNA 结合的引物长度足够, 其 5'末端碱基可以不与模板 DNA 匹配而呈游离状态。这样, 引物设计时可以在 5'末端加上限制性内切酶位点或其它短的序列。可以加 ATG 起始密码, 可以加错配碱基造成突变。文献报道, 在引物 5'末端最多可以游离数 10 个碱基并不影响 PCR 反应的进行。

17.5 耐热 DNA 聚合酶

在 PCR 反应中, DNA 聚合酶是最关键的因素之一。PCR 发明的初期使用的 DNA 聚合酶是大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段。由于: ①该酶对热的稳定性差, 每次 DNA 热变性后, 该酶绝大部分均被灭活, 每一至数个循环即需添加新酶; ②Klenow 酶反应温度偏低, 容易形成引物与 DNA 模板的非专一性配对, 产生非特异性扩增。由于温度低, 反应易受某些 DNA 二级结构的影响而得不到完整的扩增产物。Klenow 酶的缺点和不便限制了其在 PCR 反应中的应用。以后人们曾使用 T_4 DNA 聚合酶和 T_7 DNA 聚合酶, 两者虽使扩增特异性增加和 DNA 合成速度提高, 终因对热的稳定性差而未得到广泛应用。直到耐热 DNA 聚合酶 (Taq DNA polymerase) 应用于 PCR 反应, 才使这一技术得到迅速发展和广泛的应用。

Taq DNA 聚合酶是从一种嗜热水生菌 *Thermus aquaticus* YT-1 菌株中分离提纯的。是 1969 年从美国黄石国家森林公园火山温泉中分离得到的, 它生长在 70~75℃ 极富矿物质的环境中。在嗜热脂肪芽孢杆菌及其他一些嗜热菌中也得到类似的耐热 DNA 聚合酶。

Taq DNA 聚合酶基因全长 2496 个碱基, 编码 832 个氨基酸, 其酶蛋白分子量为 94kD。该酶在 70~75℃ 时具有最高的生物学活性。75~80℃ 条件下每一个酶蛋白分子每秒可延伸约 150 个核苷酸。70℃ 时, 酶分子延伸速率在 60 个核苷酸/秒以上。温度降低时, Taq DNA 聚合酶延伸速度明显下降。55℃ 时为 22 核苷酸/秒, 而 37℃ 和 22℃ 时分别为 1.5 核苷酸/秒和 0.25 核苷酸/秒。当温度超过 80℃ 时, 合成速度也明显下降, 此可能与引物或引物—模板的稳定性遭到破坏有关。

Taq DNA 聚合酶具有良好的热稳定性。测试结果为: 92.5℃、95℃、97.5℃ 下, Taq DNA 聚合酶的生物半衰期分别为 130 分钟、40 分钟和 5~6 分钟。对国产 Taq DNA 聚合酶 (协和医学技术开发公司) 的测试显示, 95℃ 保温 2 小时, Taq DNA 聚合酶活性未见明显损失。在 PCR 反应中, 变性温度一般为 94℃ 30 秒, 最长不超过 60 秒, 以循环 30 次计算, Taq DNA 聚合酶可保证 PCR 反应的需要 (图 17-2)。

与大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 相比, Taq DNA 聚合酶具有 5'→3' 聚合酶活性和 5'→3' 外切酶

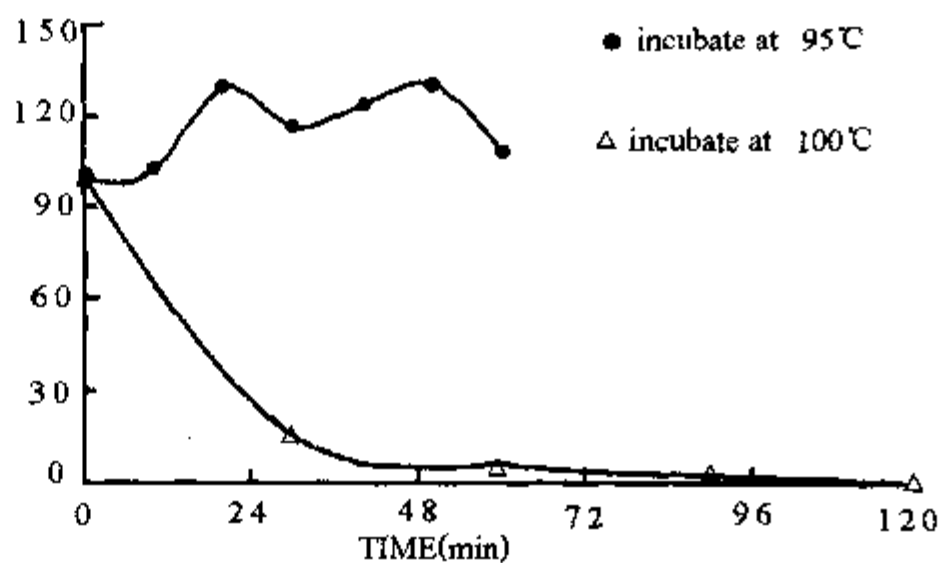


图 17-2 Taq DNA 聚合酶热稳定曲线

活性, 缺乏 3'→5' 外切酶活性。因此, 在 PCR 反应中如果发生某些单核苷酸的错配, 这种酶是没有校正功能的。使用 Taq DNA 聚合酶的 PCR 反应出现碱基错配的机率为 2.1×10^{-4} 左右。

和许多其它聚合酶一样, Taq DNA 聚合酶是 Mg^{2+} 依赖性酶, 因此, Taq DNA 聚合酶活性对 Mg^{2+} 浓度非常敏感。以鲑鱼精子 DNA 为模板, dNTP 的总浓度在 0.7 ~ 0.8 mmol/L, 使用不同浓度 $MgCl_2$ 进行 PCR 反应 10 分钟, 结果表明 $MgCl_2$ 浓度在 2.0 mmol/L 时酶活力最高。 Mg^{2+} 浓度偏高, 酶活性受抑制。10 mmol/L $MgCl_2$ 使酶活性下降 50%。由于 Mg^{2+} 能与负离子或负离子团 (如磷酸根等) 结合, 在 PCR 反应中模板 DNA、引物及 dNTP 均可与 Mg^{2+} 结合, 尤以 dNTP 的影响最大。所以 $MgCl_2$ 浓度在不同反应体系中应适当进行调整。一般反应中 Mg^{2+} 浓度至少应比 dNTP 总浓度高出 0.5 ~ 1.0 mmol/L。

KCl 最适浓度是 50 mmol/L, 高于 75 mmol/L 时 PCR 反应明显抑制。50 mmol/L 的 NH_4Cl 、 NH_4Ac 及 NaCl 对 Taq DNA 聚合酶活性影响分别为中等抑制、无影响及 20% ~ 30% 促进。均衡的 dNTP 有利于酶活性发挥, 并能减少错配和获得多量的特异性 DNA 扩增产物。

如表 17-2 所示, 不同变性剂对酶活性的影响不一样, 了解这些特性对 PCR 反应的设计是有益的。

世界各国许多实验室对耐热多聚酶进行研究, 发现了多种耐热的 DNA 聚合酶。值得注意的是, 美国 New England Biolabs 公司从海底火山口中能在近 100℃ 高温下生长的 *Thermococcus litoralis* 菌中提纯得到性能比 Taq DNA 聚合酶更优越的另一个耐热酶—Vent™ DNA 聚合酶。该酶在 100℃ 时半衰期达 95 分钟, 此外还具有 3'→5' 外切酶活性。在不断寻找新酶的基础上, 许多实验室还致力于原有酶的修饰和改造。Stoffel 等人在 Taq DNA 聚合酶上除去其 5'→3' 外切酶活性部分 (N 端 289 个氨基酸) 后, Taq DNA 聚合酶在 97℃ 时半衰期由原来 5 ~ 6 分钟增加到 20 分钟, 该酶对复合 PCR (多重 PCR) 反应更加有利。此外, 目前已有耐热的 Klenow 及具有 3'→5' 外切酶活性的 Taq DNA 聚合酶的报道。

我国 PCR 技术的发展和应 用十分迅速。复旦大学、医科院基础所、华美生物工程公司均能提供耐热 DNA 聚合酶, 前者是从国内分离的一株耐热菌中提取, 后二者均来源于 *Thermus aquaticus* YT-1 菌株。耐热酶的国产化无疑对推动我国 PCR 技术的发展和普及起到非常积极的作用。

表 17-2 变性剂对 Taq DNA 聚合酶活性的影响

抑制剂	浓度	活性 (%) [*]
乙醇	≤ 3%	100
	10%	110
尿素	≤ 0.5 mol/L	103
	1.0 mol/L	118
	1.5 mol/L	107
	2.0 mol/L	82
DMSO	≤ 1%	100
	10%	53
	20%	11
DMF	≤ 5%	100
	10%	82
	20%	17
甲酰胺	≤ 10%	100
	15%	86
	20%	39
SDS	0.001%	105
	0.01%	10
	0.1%	< 0.1

* 以鲑鱼精子为 DNA 模板 70℃ 反应 10 分钟。

17.6 PCR 反应模板的准备

大多数用途的 PCR 反应中,对 DNA 模板的要求并不严格。首先对纯度要求不严。大量的实验数据表明存在一定量的蛋白质,或 SDS 等对实验过程影响不大,所以只要没有交叉污染,模板 DNA 的制备可以不必像克隆、酶切、连接、标记等反应所用 DNA 制备那样严格。其次,模板用量很低,理论上 $10^2 \sim 10^4$ 拷贝的模板足可满足各种要求的 PCR 反应。由于种种原因,准备的模板量要求达一定水平。一方面可减少由于实验操作和实验精确度方面等原因而引起的扩增失败,同时用于扩增的模板 DNA 量越多,由于交叉污染引起的反应失败的可能性越小。

传统的 DNA 纯化方法通常采用去垢剂破坏细胞组份、蛋白水解酶消化除去蛋白质,特别是与 DNA 结合的组蛋白,最后用有机溶剂去掉蛋白质和细胞膜成分,用乙醇沉淀核酸。此种纯化 DNA 的方法完全可以满足 PCR 反应。通常情况下,可以采用更加快速简便的方法,如用高温低渗液体(如水煮沸)溶解细胞制备 PCR 反应模板均可满足实验的要求。另外,如果所用细胞是复杂的生物液态物或是难以分解的细胞(如毛发、精液等),还要增加一些辅助操作。下面介绍一些快速、微量的 DNA 和 RNA 提取方法。

1. 血液:

取 1~2 滴抗凝血液 ($100 \sim 200 \mu\text{l}$),离心后去上清液。细胞用 10~20 倍红细胞裂解液 ($100\text{mmol/L NH}_4\text{Cl}/10\text{mmol/L NH}_4\text{HCO}_3/5\text{mmol/L EDTA}$) 或直接用蒸馏水,放冰浴使红细胞溶解,低速离心 ($3\,000 \sim 4\,000\text{r/min}$) 后弃去含有红细胞碎片的上清液,用 5~10 倍蒸馏水悬浮沉淀,煮沸 5 分钟,高速离心 ($10\,000 \sim 15\,000\text{r/min}$) 5 分钟,去细胞碎片,上清液即可直接用于 PCR 扩增。对于陈旧的血迹,可以碱性 TE (pH10~12) 或 PBS 浸泡并加入终浓度为 0.5%~1% SDS 和 0.1mg/ml 蛋白酶 K, 50°C 保温 1~2 小时,经高温灭活 ($85 \sim 90^\circ\text{C}$) 蛋白酶 K 后,上清液即可直接进行 PCR 扩增。

2. 陈旧的精斑:

需剪碎后放入离心管中,以 PBS 或碱性 TE 浸泡 30 分钟,加入 SDS 和蛋白酶 K 使其终浓度达 1% 和 $100\mu\text{g/ml}$, 50°C 消化过夜,酚、氯仿抽提,乙醇沉淀 DNA。

3. 组织块或石蜡包埋组织:

取 1~2g 组织块,剪碎,放入研钵或玻璃匀浆器中,加入 1~2ml PBS,经充分研碎或匀浆处理后,取 0.2~0.5ml 放入离心管中加入 1% SDS, $100\mu\text{g/ml}$ 蛋白酶 K, 50°C , 消化 2 小时,或加入 1% TLS 消化 15 分钟左右,酚、氯仿抽提,乙醇沉淀 DNA。

石蜡包埋组织(如病理标本),首先将较大的石蜡包埋组织切成 $5 \sim 10\mu\text{m}$ 厚的切片,置带塞试管中,加入少量二甲苯浸泡,不时摇动,并在 12 小时或更长时间换液 3 次以上,然后用 100%~25% 不同梯度乙醇水化,以 PBS 浸洗 1 次 (30 分钟),弃上清液。组织块的处理同上。

对于微量石蜡包埋组织 DNA (病理切片),放入 Eppendorf 管中,加入 0.5~1ml STE,置 $70 \sim 80^\circ\text{C}$ 水浴 10 分钟,不时以吸水滤纸条将悬脂吸去,反复数次,除净石蜡,以后的处理同前。

亦有报道将病理组织切片直接放 Eppendorf 管,直接进行 PCR。变性时的高温足以溶去标本中的石蜡,并破坏细胞,释放出可作为模板的 DNA。

4. 绒毛:

将绒毛样品离心 1~2 分钟,弃上清液,以 PBS 缓冲液洗涤 2~3 次。采用液氮冻溶破坏细胞,加入 1% TLS 15 分钟,破坏细胞和降解蛋白分子,常规酚、氯仿抽提,去蛋白,乙醇沉淀 DNA。或者将绒毛悬浮于适量 0.1mol/L NaOH, 0.5% SDS, 1mol/L NaCl 中,强烈振荡后,煮沸 2~5 分钟,离心去沉淀,上清液可直接用于 PCR。

5. 毛发:

将数根新鲜毛发剪下毛囊部分, 置 70% 乙醇浸泡, 消毒室温干燥后, 加 50 ~ 100 μ g/ml 蛋白酶 K, 40mmol/L DTT, 50 $^{\circ}$ C 消化过夜, 不时以吸管搅动毛囊, 促其溶解。以酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀 DNA, 真空干燥后溶于双蒸水中。

6. 羊水脱落细胞:

取 1.5 ~ 5ml 羊水, 高速离心 5 分钟, 沉淀以 STE 洗涤 1 ~ 2 次, 细胞悬浮于 0.1mol/L NaOH 的蒸馏水中, 煮沸 2 分钟, 离心取上清液, 直接用于 PCR。

7. 尿样:

取尿液 1ml, 1500r/min 低速离心, 弃沉淀, 上清液加 SDS 至 0.1%, 室温 30 ~ 60 分钟, 酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀 DNA, 真空干燥后, 溶于 TE, 取适量可用于 PCR。

8. 大便中致病菌及病毒颗粒:

取适量有疾病特征的粪便, 悬浮于 TLS 中, 800 ~ 1000r/min 离心 5 分钟。取上清液加 SDS 至 0.5% 及 1/5 体积 1% STE, 室温置 15 ~ 20 分钟, 酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀 DNA 或 RNA。

9. RNA 模板的制备:

将适量细胞悬浮于 PBS 中, 采用高速匀浆器破碎细胞, 离心弃细胞碎片, 上清液以氯化铯梯度离心 16 ~ 20 小时。取管底沉淀, 溶于 0.3mol/L NaAc 中, 乙醇沉淀 RNA, 沉淀溶于 DEPC 处理过的水中。采用反转录酶进行反转录的 cDNA 亦可进行 PCR 反应。

如无超速离心条件, 可将细胞悬液按每 10^6 个细胞加 0.1ml 变性溶液 (4mol/L 异硫氰酸胍, 25mmol/L 柠檬酸钠, pH7.0; 0.5% 十二烷基 - N - 甲基甘氨酸钠, 0.1mol/L β - 巯基乙醇), 振荡混匀。然后依次加入 0.1ml 2mol/L 乙酸钠 (pH4.8), 1ml 饱和酚和 0.2ml 氯仿/异戊醇 (49:1) 混匀, 用力振荡 10 秒钟, 置冰浴 15 分钟, 于 4 $^{\circ}$ C 10000r/min 离心 20 分钟, 溶液分为两相, RNA 存于上层水相而 DNA 和变性蛋白存在于界面和下层酚/氯仿相。取上清液, 加入等容积异丙醇, -20 $^{\circ}$ C 放置 1 小时使 RNA 完全沉淀, 离心后将沉淀重新溶于 0.3ml 变性液, 再以等容积异丙醇沉淀, -20 $^{\circ}$ C 1 小时, 离心沉淀后以 80% 乙醇洗 1 次, 真空干燥, RNA 溶于 TE 缓冲液中, 置冰箱备用。

RNA 的反转录: 在无菌的 0.5ml 离心管中加入 5 ~ 10 μ g 细胞总 RNA, 10 单位 RNasin, 10pmol 3'端引物, 1mmol/L 各种 dNTP (pH7.0) 和 50U 左右 M - MuLV 反转录酶 (或 5 单位左右 Taq DNA 聚合酶), 反应缓冲液 (50mmol/L Tris · Cl pH8.3, 40mmol/L KCl, 6mmol/L MgCl₂, 1mol/L MDTT, 0.1% BSA) 加水至 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时。如不马上做 PCR 反应, 可 95 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟, 使反转录酶失活。

RNA 提取及反转录过程所用器皿及液体需经高温灭菌或 DEPC (diethylpyrocarbonate) 处理。

17.7 几种特殊的 PCR

17.7.1 锚定 PCR (anchored PCR)

通常采用的 PCR 反应必须知道欲扩增 DNA 或 RNA 片段两侧的序列, 而在大多数情况下对某些序列本身或其旁侧序列并不清楚, 这无疑限制了 PCR 技术的广泛应用, “锚定 PCR” 可以帮助克服序列未知或序列未全知带来的障碍 (图 17-3)。

分离细胞总 RNA 或 mRNA, 在反转录酶作用下合成 cDNA, 通过 DNA 末端转移酶在 cDNA 3' 末端加上 poly (dG) 尾。与此 poly (dG) 相对应的锚定引物 poly (dC) 为保证扩增特异性, 建议此段旁聚 (dC) 在十二聚以上, 5' 端可带上某些限制酶序

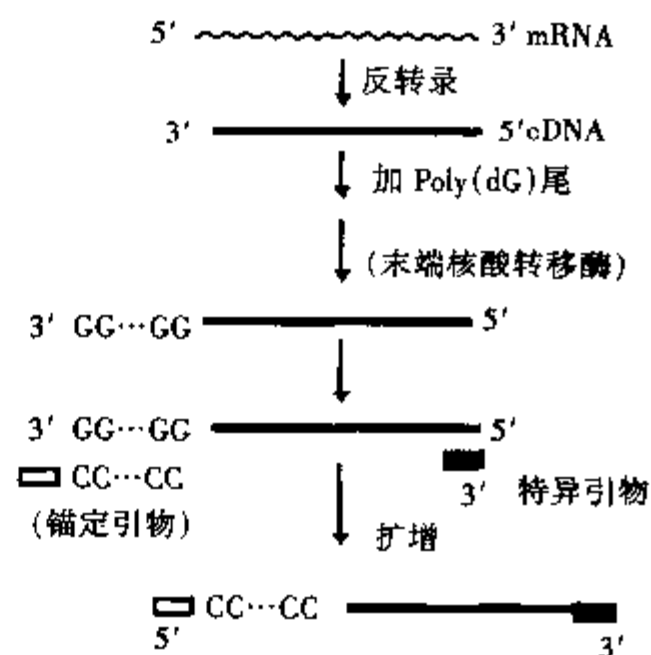


图 17-3 锚定 PCR 方法示意图

列或其他序列信息。在与基因特异配对的引物参与下,可以扩增此带同源多聚物尾巴的 cDNA 序列。

17.7.2 不对称 PCR (asymmetric PCR)

典型的 PCR 反应产生一个特定的双链 DNA 拷贝,但在基因分析中,常常需要知道目的基因的序列是什么。当然可以将扩增的双链 DNA 片段克隆到 M_{13} 噬菌体载体中,提取单链模板进行序列测定。这样做既费时、费力又很昂贵。Gyllensten 和 Erlich 改进了 PCR 方案。在扩增循环中引入不同引物浓度,而得到单链 DNA。一般采用 50~100:1 比例的引物浓度,在最初 10~15 个循环中主要产物还是双链 DNA,但当低浓度引物被消耗尽后,高浓度引物介导的 PCR 反应就会产生大量单链 DNA (图 17-4)。分离此扩增产物中的 ssDNA 可用原引物或第三条内部引物直接测序。

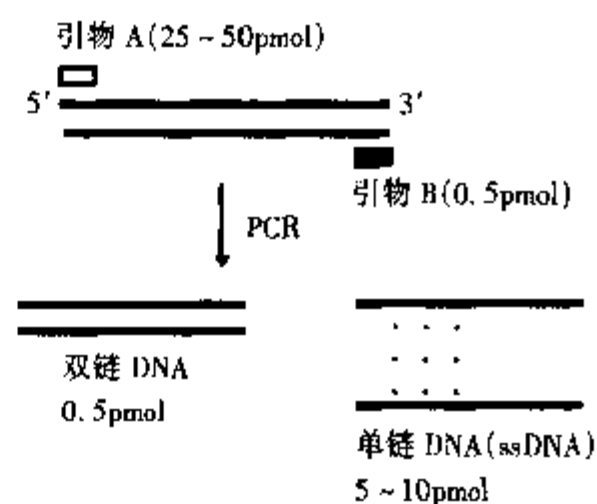


图 17-4 不对称 PCR 扩增示意图

17.7.3 反向 PCR (inverse PCR)

PCR 反应允许扩增 DNA 片段位于已知序列的两个引物之间。反向 PCR 的应用则可以对一个已知的 DNA 片段两侧的未知序列进行扩增和研究。选择已知序列内部没有切点的限制酶对此段 DNA 进行酶切,连接形成环状 DNA 分子,此时选择合适方向的与已知序列两末端互补的引物,经 PCR 后,可以得到未知序列的 DNA 片段 (图 17-5),用此方法建立基因组步移文库,在分子生物学研究上是非常有意义的。

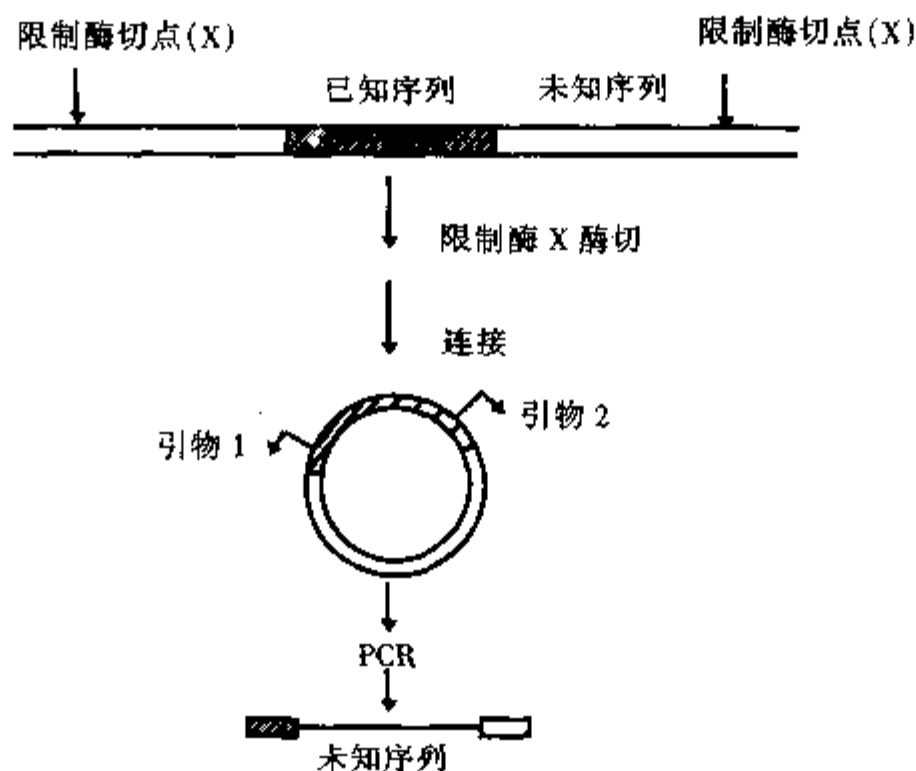


图 17-5 反向 PCR 示意图

17.7.4 多重 PCR (multiplex PCR)

PCR 技术的一个重要应用领域是检测特定序列的存在或缺失。如果待检测的基因片段存在,经 PCR 可以产生扩增区带,如果这一片段缺失,PCR 反应后没有扩增区带出现。这一方法已在缺失型地中海贫血的基因诊断中得到广泛应用。在许多情况下,与疾病相关的基因十分庞大,如 Rb (视网膜母细胞瘤) 基因有数百个 kb,而 DMD (进行性肌营养不良症) 则有 2000 多个 kb 长。这些基因上常有多处发生缺失或突变,而且这些改变发生在相邻数十至数百个 kb 的距离。这就超出了 PCR 技术所能扩增的有效长度。对此有些人采用了多重 PCR 技术,即在同一试管中加入多对引物,扩增同一模板的几个区域。如

果基因的某一区段缺失, 则相应的电泳图谱上这一区带就会消失。多重 PCR 反应和 southern blotting 一样可靠, 但显然要简便得多。目前报道的多重 PCR 反应, 最多可同时扩增 12 条区带 (图 17-6)。

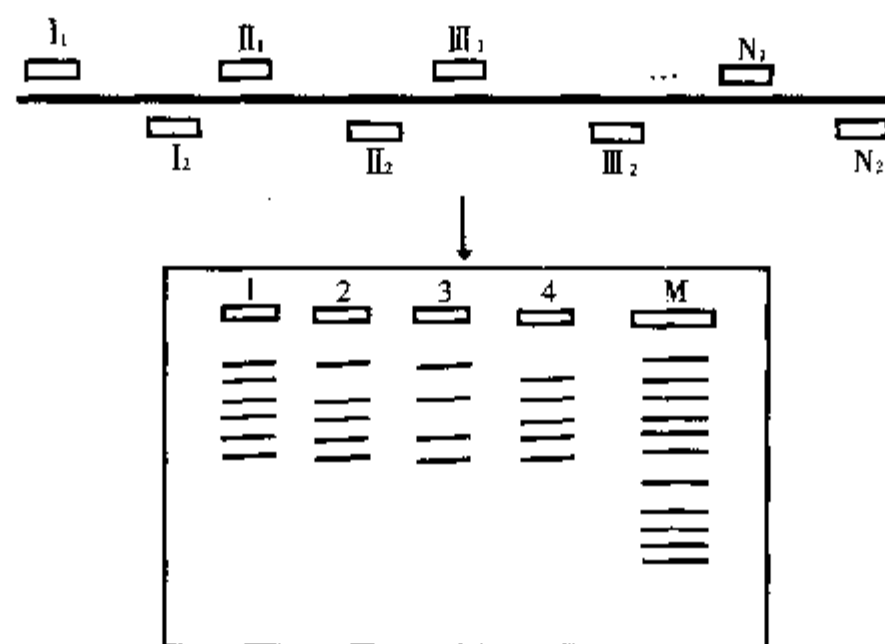


图 17-6 多重 PCR 示意

1. 正常人对照 2, 3, 4. 不同病人标本 M. 分子量标准

17.7.5 着色互补 PCR (color complementation assay)

应用 PCR 技术扩增感兴趣的 DNA 区带时, 通常需要对 PCR 扩增产物作进一步的分析、鉴定, 如电泳、序列分析和 DNA 分子杂交。在多重 PCR 试验中, 一次试验还不容易区分长短相近的多种基因成分。着色互补或称荧光 PCR (fluorescent PCR) 可用于解决这一问题。

荧光 PCR 的原理是用不同的荧光染料, 如红色的罗丹明 (6-carboxy-x-rhodamin, POX) 和绿色荧光素 (5'-carboxyfluorescein, FAM) 等分别标记于不同的寡核苷酸引物上, 同时扩增多个 DNA 区段, 反应完毕后, 利用分子筛除去延伸的引物。用紫外线照射扩增产物, 就能显示某一种或几种荧光染料颜色的组合, 如果某一 DNA 区带缺失, 则会缺乏相应的颜色, 据此可以很快诊断是否某种基因缺失, 或是发现某些感染的病毒等。荧光 PCR 可以进一步发展, 为 PCR 技术成为临床自动化诊断打下基础。

17.8 PCR 技术的应用

PCR 技术问世后, 立即引起广泛的兴趣与重视, 很快在全世界范围内得到广泛的应用和发展, 迅速进入遗传性疾病的基因诊断、传染病病原体的检测、法医学、考古学和分子生物学各个领域。

17.8.1 遗传性疾病的基因诊断

到目前为止已发现的遗传病有 4 000 多种, 以地中海贫血 (简称地贫) 为例, 地贫是由珠蛋白链合成不平衡所导致的一类遗传性疾病, 在我国南方许多省区发病率很高。其主要病因由基因缺失, 单个或少数核苷酸的缺失、插入或置换而造成基因的不表达或表达水平低下, 或导致 RNA 加工、成熟和翻译异常或无功能 mRNA, 或合成不稳定的珠蛋白。由于目前对地贫的治疗还缺乏有效手段, 所以, 结合产前诊断进行遗传咨询、婚姻指导, 达到优生目的, 不失为一条有效方法。

以往的地贫产前诊断多采用取胎儿脐带血、绒毛等为样品, 通过 DNA 分析进行诊断或采取胎儿血在体外培养后用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 测定各珠蛋白链的合成速率比进行判断, 此类方法由于标本用量较大, 部分样品只能在妊娠中期取样, 以及分析操作耗费较长时间和成本高昂而有很大局限性。

PCR 方法发明后给地贫产前诊断的普及带来了希望 (图 17-7)。PCR 技术的成本低、快速和对样品质量和数量要求不高等特点,使得可在怀孕早期取得少量样品(如羊水、绒毛)进行操作,发现异常的胎儿可早期终止妊娠,这不仅减轻了孕妇的经济和身心负担,易于为广大群体接受,也减轻了医护人员的劳动,为推广和普及遗传病的产前诊断提供了前提。

按前述方法提取 DNA, PCR 之后,主要有 3 种不同的方法,进行基因诊断。

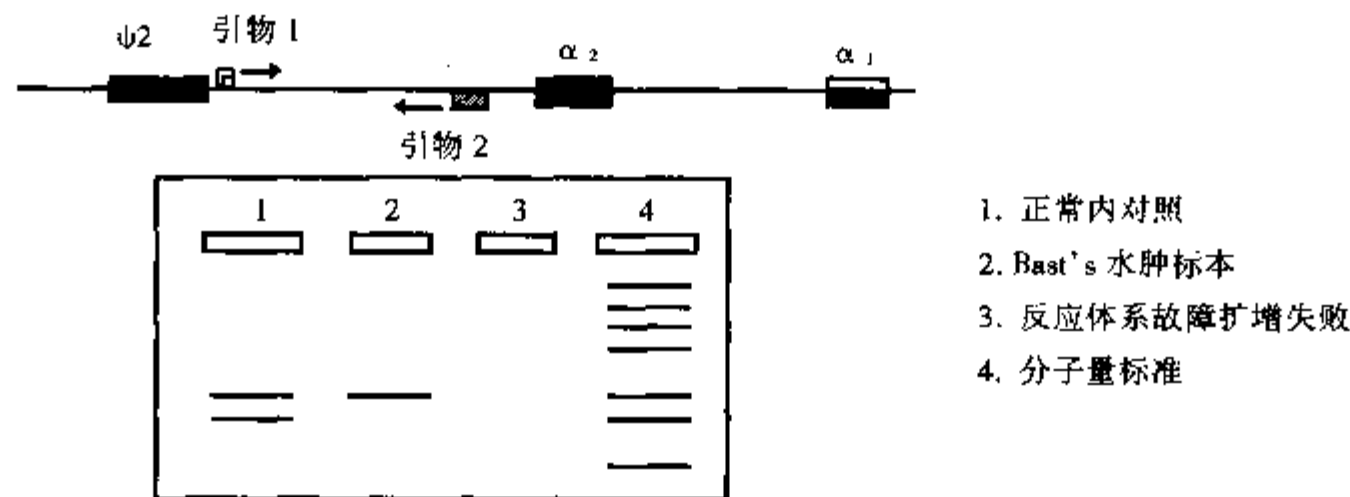


图 17-7 PCR 用于 α -地贫 Bart's 水肿产前诊断

17.8.1.1 根据特异性扩增带作出诊断

这对主要是由基因缺失引起的疾病有重要意义。如 α -地中海贫血的 Bart's 胎儿水肿综合征和缺失型 β -地中海贫血的产前诊断就可以利用该方法进行。选择引物位于 β 珠蛋白基因簇 $\Psi 2$ 与 α_2 之间。以 5'-TACTGTAGATACCCGTGTACAA-3' 和 5'-ATCATGGAAACATAGTAAT-3' 来扩增 α 珠蛋白基因。正常基因组可得 136bp 长片段。Bart's 水肿胎儿和 α -地贫-1 (缺失与一个引物互补的 α 珠蛋白基因序列) 没有扩增区带。为排除因 PCR 反应条件不适而造成的假阳性,应在同一反应体系中加入另一对引物扩增其他非缺失序列作为阳性对照,如选择 β 珠蛋白基因的一段合适长度的片段为内对照。只有当内对照出现区带而特异扩增带不出现时才能作出相应判断。

如对于检出结果有疑问时,可以通过分析其父母的基因组 DNA 结构来进一步阐明。直接用凝胶电泳分析 PCR 产物进行地贫诊断的方法简单易行,省时省力,在一定条件下不失为地贫产前诊断的较好方案。但应消除各种假象的影响。同时,该方法有其应用局限性。它只能检测由于基因缺失导致的疾病,而对于非基因缺失疾病(如点突变)或缺失少数核苷酸引起的疾病则无能为力,对此应结合其他方法加以判断。

17.8.1.2 根据(限制酶片段长度多态性)连锁分析作出诊断

在非缺失型疾病中,突变往往会产生新的或消除原有的内切酶位点。而某一(些)酶位点的改变往往与不同的遗传疾病有连锁关系,这一点已在基因组 DNA RFLP 分析中得到证明(图 17-8)。因此,分析基因组 DNA 上多态性位点及新酶切位点的产生或原有切点的消失引起的酶切片段长度变化是进行遗传病诊断的重要手段。这一方法的应用,需要有待诊断疾病大量 RFLP 资料为基础。

设计一对(数对)适当的引物,使扩增片段包含某一个或数个多态性的限制性内切酶识别序列。PCR 后,用该限制酶酶切 PCR 产物,根据电泳后酶切片段长度的变化,即可作出诊断。

如上图所示,PCR 产物酶切可以得到三种情况:一是酶切后,PCR 产物长度没有变化,说明扩增片段不含此酶切点(-/-)。二则属于(+/-)型,即一条染色体上有此酶切点,而其等位基因上没有。第三个样品 PCR 产物全部被切开,说明其两条染色体上均有此酶位点,为纯合状态(+/+)。结合家系分析,如果该家系某一遗传病基因与这一酶切位点的存在有连锁关系,即可对该待诊断者是否含有致病

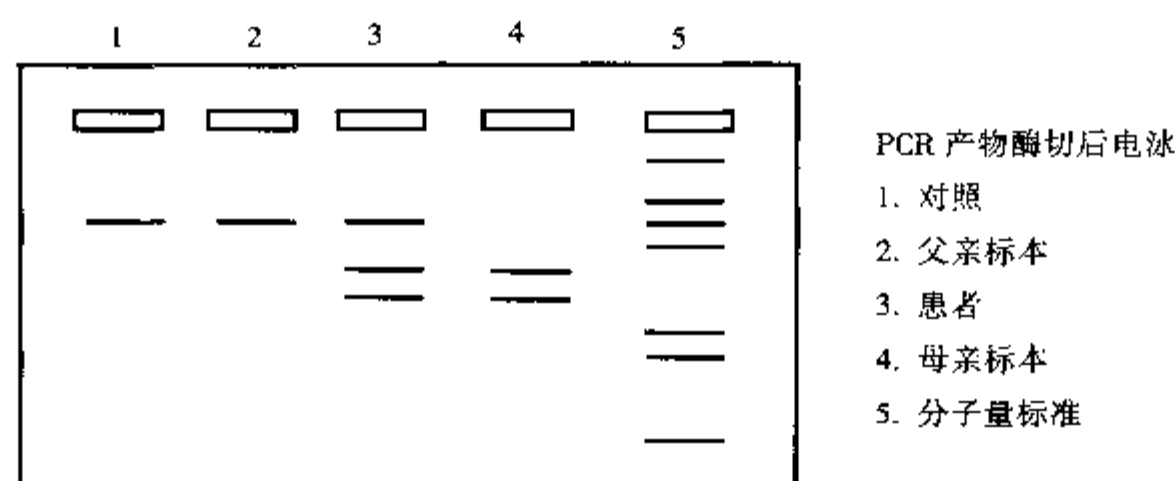


图 17-8 PCR 结合 RFLP 基因连锁分析

基因，其来自父方？母方？还是来自父母双方作出诊断。这一方法已在部分突变所致 β -地贫、甲型血友病等方面得到广泛应用。

PCR 结合 RFLP 进行遗传病基因诊断的方法较之原来的 RFLP 方法简便、快速、灵敏度提高，特别是 DNA 用量减少，使这一方法更有可能得到普及。

17.8.1.3 PCR 结合特异寡核苷酸探针 (ASO) 斑点杂交进行基因诊断

目前发现的遗传病中，许多疾病并没有基因缺失和与限制性内切酶切点变化有连锁的点突变。绝大部分只是一些单纯的碱基突变（替代、缺失、插入）引起的，而且每一种遗传疾病都有一些突变发生的热点，如我国的 β -地中海贫血患者中，突变常集中在 10 个碱基（图 17-9）。针对各种基因突变合成一系列具有正常顺序和突变顺序的寡核苷酸片段，经 5' 端核素标记后作为探针，严格控制杂交和洗膜条件，使探针与待测 DNA 序列间只要有 1 个碱基错配就不能杂交上（图 17-10）。

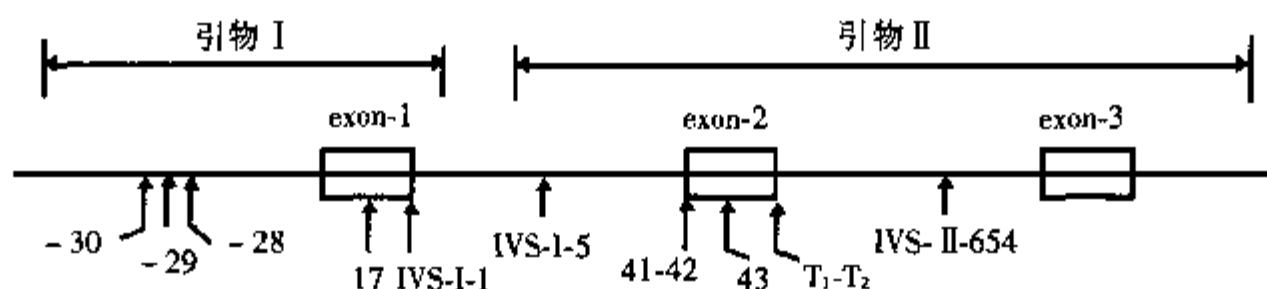
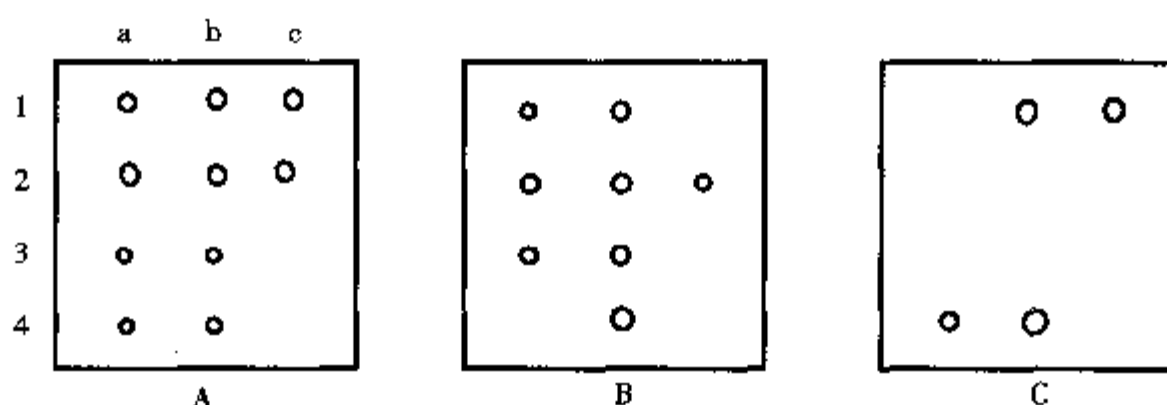
图 17-9 中国人中已发现的 10 种主要 β 地贫突变点

图 17-10 PCR 结合 ASO 斑点杂交示意图

- A. 样品在尼龙膜上的位置，2C 为正常人样品，1C 为 41-42 突变阳性对照；
B. 样品与 41-42 正常序列寡核苷酸探针杂交
C. 样品与含 41-42 点突变探针杂交，4a，为 41/42 突变纯合子，1b，4b，为 41/42 突变杂合子。

PCR 扩增产物经碱变性后用斑点点样器上样于硝酸纤维素膜（或尼龙膜）上，高温（70 ~ 80℃）固定 2 小时，使 DNA 固定在膜上。根据探针的长度和碱基组成确定预杂交和杂交条件及温度。

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (C + G)$$

严格洗膜，杂交膜经干燥后放射自显影，正常的基因片段只能与正常顺序的探针杂交，而突变基因片段将与含突变点的异常顺序探针杂交，据此可作出诊断。此种诊断方法必须以已知的可能导致异常的碱基突变资料作为基础。

实验步骤：

(1) 引物：合成两对引物在 β 珠蛋白基因上分别扩增出 700bp 和 600bp 片段，此两引物内分别包含了中国人中常见的突变位点。

引物	序列 (3' - 5')
I A	GCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATC
B	CCCTTCCTATGACATGAACCTTAACCAT
II C	TATCATGGCTCTTTGCACCATTC
D	AATGCACTGACCTCCCACATTCC

(2) PCR 反应：在 0.5ml Eppendorf 管中加入下列试剂，加水至 49 μ l

10 × PCR 缓冲液	5 μ l
dNTP (2mmol/L/每种)	5 μ l
引物：A&B 或 C&D	(50pmol/每种)
人基因组 DNA:	0.5 μ g
100 × BSA	0.5 μ l
DMSO	5 μ l

混匀后，97℃变性 5 分钟，冷却至 4℃，加 Taq DNA 聚合酶 1 ~ 2U，混匀离心后，加入石蜡油 40 μ l，按下列条件在 PCR 自动扩增仪上进行。

94℃ 30 秒
55℃ 30 秒
70 ~ 72℃ 60 秒

循环 25 ~ 30 次后；反应在 70℃停留 5 ~ 8 分钟，取 5 μ l PCR 产物，在 2% 琼脂糖凝胶电泳上检查扩增效果。

(3) 点膜：取 PCR 样品 10 μ l 加 DNA 变性液 (4mol/L NaOH, 0.25mol/L EDTA-Na₂) 40 μ l，将合适大小的尼龙膜 (zeta probe, Bio-Rad) 夹入点膜器，接上真空阀，一边抽气，一边上样，一般每孔点样 200 μ l 上述样品，点样后每孔以 20 × SSPE (或 SSC) 溶液冲洗一次 (约 100 μ l)。从点膜器上取下载有样品的膜，作好标记后夹在两张 3MM 干净滤纸中 80℃烘干两小时。通常一次制备两张完全相同的膜，也可根据需杂交探针的多少制备更多的膜。

探针标记：在 0.5ml Eppendorf 管中加入下述部分

10 × 激酶缓冲液 (NEB 公司)	2 μ l (500mmol/L Tris·Cl pH7.4, 50mmol/L DTT 100mmol/L MgCl ₂ , 50mmol/L 亚精胺)
寡核苷酸片段	50 ~ 100ng
γ - ³² P - ATP	2 ~ 3 μ l (10 μ Ci/ μ l, 比活 3000Ci/mmol)
T ₄ DNA 激酶	5 ~ 10 单位

加水至 20 μ l。37℃水浴温育 60 ~ 90 分钟，65℃6 分钟灭活多聚核苷酸激酶，过 Sephadex G₂₅ 或 G₅₀ 柱，除去游离同位素。

预杂交及杂交：按下列组成配制预杂交液

5 × SSC/20mmol/L NaH₂PO₄, pH7.0

10 × Denhardt's 液

7% SDS

100μg/ml SSD (鲑鱼精子 DNA, 超声破碎, 用前 100℃ 6 分钟)

根据膜的大小, 按 150μl/cm², 加预杂交液, 在塑料口袋中 50℃ 预杂交 2~4 小时 (预杂交 0.5~24 小时均可)。预杂交完毕, 倒出 1/3 预杂交液后加入标记好的寡核苷酸探针, 50℃ 杂交过夜 (4~24 小时均可)。

洗膜及放射自显影: 弃去杂交液, 膜置 2 × SSC/0.5% SDS 洗膜液中, 室温洗涤 2~3 次, 每次 10 分钟, 然后 0.1 × SSC/0.1% SDS 室温洗 1 次, 50℃ 5~10 分钟。膜洗至本底干净后, 台灯下干燥。根据计数检测强度, -70℃ 包片 1 小时至数天, 根据放射自显影结果可作出相应基因诊断。如果一张膜要使用数种探针杂交, 可在 100℃ 煮沸 4~5 分钟或变性液 (0.5mol/L NaOH, 1.5mol/L NaCl) 处理 4~6 分钟, 中和液 (0.5mol/L Tris·Cl pH7.5, 1.5mol/L NaCl) 5 分钟, 再次用于杂交。

注意事项:

(1) 设计寡核苷酸探针时, 主张将突变的碱基尽量置于引物之中, 应尽量避免在此处形成 T:C 错配的可能。探针长以 15~20mer 为宜。

(2) 寡核苷酸探针标记时, 可不必去除游离 γ-³²P-ATP, 为了避免因标记反应不好而影响实验, 还是以分离一次为好。杂交液可反复使用, 回收后应置 -20℃ 保存。

(3) 预杂交液和杂交液可使用 0.2% 脱脂奶粉/5 × SSC, 既可降低成本, 又能取得良好结果。

(4) PCR 反应中使用的试剂应以高纯度的产品为准以提高成功率。dNTP 溶液呈强酸性, 反应前应该用 NaOH 将溶液的 pH 值调整至 7.5 左右。配制完毕应小包装保存, 过多的冻融会影响 PCR 的效果。

(5) 扩增 1kb 以内 DNA 片段, Taq DNA 聚合酶用量应控制在 5μl, 不超过 3U, 否则不仅浪费, 还可产生非特异性扩增。

(6) 本篇所使用技术较过去常用的基因诊断方法具有简便、快速、样品量少、结果准确和成功率高等特点, 但仍需作 DNA 分子杂交, 使得该技术在条件较差地区受到部分限制。有人设计了 1 种 3' 碱基特异 PCR 方法, 选择在中国人中出现突变频率最高的几个位点 (如 41-42; 17; IVS-II-654) 设计引物, 使突变碱基出现在引物 3' 端 (3' 特异碱基), 在引物与模板退火的过程中, 如果与引物配对的模板上是正常碱基, 由于引物 3' 碱基不配对而使延伸不能, 没有扩增带出现, 只有当模板上出现与引物配对的突变碱基时, 延伸反应才能完成, 出现 PCR 扩增区带。

如此只要根据特异性扩增带出现与否即可知被测样品中是否包含某种突变 (图 17-11)。

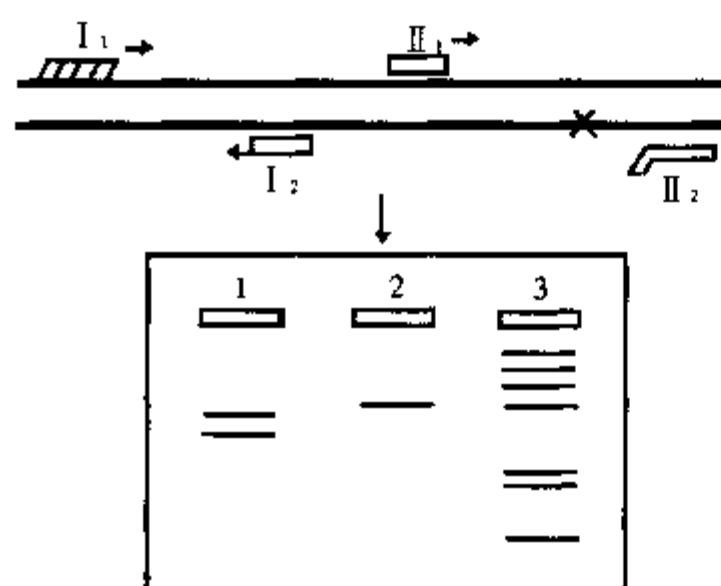


图 17-11 3'-碱基特异 PCR 原理图

1. 含特异点突变患者 2. 正常人对照
I 正常内对照 II 特异点突变引物
3. 分子量标准

17.8.2 PCR 反应在检测艾滋病中的应用

一种检测手段是否可行, 关键在于它的敏感性和特异性。现阶段虽然医药科学已得到极大发展, 但对于病毒性疾病仍缺乏有效的治疗手段。因此, 病毒性疾病的早期诊断对该疾病的防治显得尤为重要。感染的早期, 病毒仅侵入人体少量的细胞, 此时捕捉这些病毒的信息, 一般常规方法如细胞培养、血清学甚至原位杂交、Southern 印迹等方法就显得力不从心。PCR 方法能从具有大量宿主核酸存在的条件下, 特异扩增病毒 DNA 核酸序列而加以检测。目前 PCR 技术已在人反录病毒、人免疫缺陷病毒、人嗜 T 细胞病毒、乙肝病毒、巨细胞病毒、人乳

头状瘤病毒、肠道病毒、肺炎支原体等疾病中得到应用并初步显示了其威力。艾滋病 (AIDS) 是由人免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染所致的获得性免疫缺陷综合征, 其死亡率极高, 是目前对人类危害最严重的疾病之一。

对大多数 AIDS 患者, 通过血清学方法检测其血清中 HIV-1 抗体可特异敏感地加以筛查和诊断, 但在 HIV-1 感染的早期机体内尚无 HIV-1 抗体产生及母婴垂直传播的婴儿是否已感染 HIV-1 (母传抗体能在婴儿体内持续一年以上) 等情况下, 直接检测病毒则十分必要。

PCR 方法检测病原体时, 引物对病原体的专一性是特异的 PCR 扩增的关键, 设计出的引物既要病原体是特异的, 又要对宿主没有交叉作用。此时病毒的异质性往往是检测的敏感性和专一性的致命缺点。病毒基因组尤其是 RNA 病毒和以 RNA 病毒为中间复制的病毒 (如反录病毒) 存在许多碱基改变 (插入、重复和缺失), 这都给 PCR 扩增带来许多问题。HIV-1 病毒是一个多态性病毒, 它属于 RNA 反录病毒, 感染细胞后依靠自身的反转录酶, 反转录成相应 DNA 整合在宿主细胞染色体上, 并以此为基础进行复制。从不同 AIDS 患者体内分离出的病毒结构表现出一定的差异。因此只有选择病毒基因组中高度保守区域作为目的基因加以扩增, 才能有效地检测所有 HIV-1 的变异性。世界范围内 AIDS 的研究是一个热点, 目前已经查出许多个 HIV-1 序列, 在计算机的帮助下, 通过同源性比较, 设计出一些具有较大保守性的序列作为引物。表 17-3 为常见的检测 HIV-1 病毒基因组的引物及相对应的寡核苷酸探针序列, 对应用 PCR 检测 HIV-1 病毒有较大帮助。

表 17-3 常用检测 HIV-1 前病毒基因组的引物及其在 HIV-1 基因组的位置

SK ₃₀	Primer	GGTCTGAGGGATCTCTA	LTR 589 ~ 605
SK ₃₁	Probe	ACCAGAGTCACACAACAGAC	
		GGGCACACTACT	LTR 552 ~ 585
SK ₃₈	Primer	ATAATCCACCTATCCCAGTAGG	
		AGAAAT	gag 1551 ~ 1578
SK ₃₉	Primer	TTTGCTCCTTGCTTATGTCCA	
		GAATGC	gag 1638 ~ 1665
SK ₁₉	Probe	ATCCTGGGATTAAATAAAATAG	
		TAAGAATGTATGCCCTAC	gag 1595 ~ 1635
SK ₆₈	Primer	AGCACCAGGAAGCACTATCG	cnp 7801 ~ 7820
SK ₆₉	Primer	CCAGACTGTCAGTTCCAACAG	cnp 7922 ~ 7942
SK ₇₀	Probe	ACGGTACAGGCCAGACAATTA	
		TTGTCTGGTATAGT	cnp 7841 ~ 7875
CO ₁	Primer	ACAATTATTATTGCTCTGGTATAG	cnp 7855 ~ 7874
CO ₂	Primer	AGGTATCTTTCCACAGCAG	cnp 7970 ~ 7989
CO ₃	Probe	TGAGTTGCAACAGATGCTGTTG	
		CGCCTCAATAGCCCTCAG	cnp 7895 ~ 7934

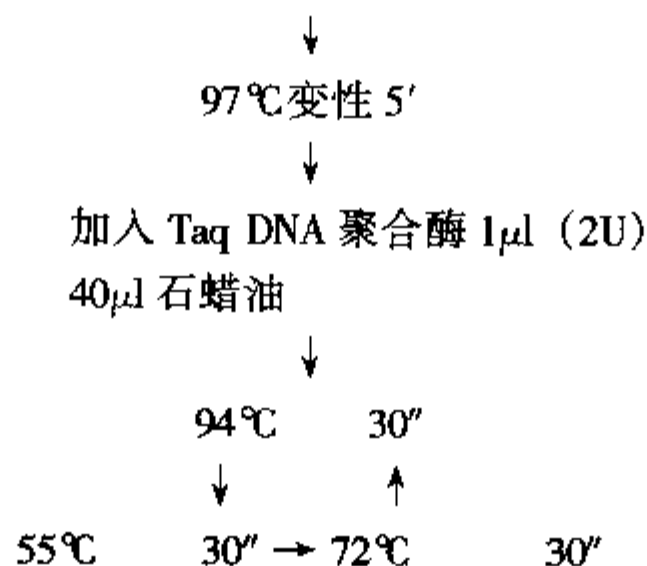
实验方法:

(1) 样品制备: 取静脉血 5ml, 加生理盐水稀释至 15ml。将等量淋巴细胞分层液缓慢加入血层下, 20℃, 1 500r/min 离心 30 分钟, 取中间含淋巴细胞层, 2 000r/min 离心细胞, 沉淀以生理盐水洗涤 2 次。

细胞计数：每 ml 血可得约 10^6 淋巴细胞。加蒸馏水 0.5ml 悬浮细胞，100℃煮沸 5 分钟，15 000r/min 离心 5 分钟，取上清液 20 ~ 50 μ l 即可直接用于 PCR。

(2) PCR 反应：在 Eppendorf 管中加入下述试剂：

10 × PCR 缓冲液	5 μ l	25mmol/L Tris·Cl (pH8.3)
		50mmol/L KCl 2.5mmol/L MgCl ₂
2mmol/L dNTP	5 μ l	
引物 I, II	50pmol/每种	
模板 DNA	20 μ l	加水至 49 μ l



循环 25 ~ 30 次，72℃延伸 5 分钟，取 5 μ l 电泳 (2% 琼脂糖或 6% ~ 8% PAGE) 检查扩增效果。

注意事项：

- (1) 每一步须仔细进行，防止交叉污染。
- (2) 每一次反应设阴性 (正常人血)、阳性 (确诊为艾滋病病人血) 对照。
- (3) 为增加实验结果的可靠性，PCR 产物最好进行斑点杂交或 Southern 杂交。

17.8.3 检测癌基因

目前已发现大量的癌基因，与人类肿瘤相关的有 10 余种，其中 ras 基因是与人类肿瘤发生相关的基因中研究得最彻底的一种。

ras 癌基因的命名来自大鼠肉瘤 (rat sarcoma) 的字首，它于 1964 年首次从大鼠肉瘤的反录病毒中分离出来，ras 基因家族由 3 个密切相关的基因组成，即 H-ras, K-ras 和 N-ras。ras 基因在密码子 12, 13 和 61 发生点突变都能使 ras 癌基因活化从而获得转化潜能，产生 ras 癌基因。具有转化潜能的 ras 基因广泛存在于多种肿瘤细胞系，有时亦存在于人的肿瘤细胞内，近年来还发现 ras 癌基因也存在于没有癌基因序列的反录病毒诱导的肿瘤中，这些病毒能结合在细胞的原癌基因附近，破坏原癌基因的正常调控元件。至今我们仍不完全了解 ras 癌基因在不同类型肿瘤发生过程中所起的作用，ras 癌基因的活化是肿瘤发生的起始事件，还是肿瘤发生的早期事件，或者 ras 癌基因点突变并不参与肿瘤的发生，仅是肿瘤发生的结果。这除了理论上的原因外也有技术上的因素。早期进行的 ras 癌基因点突变的检测是用高分子量的 DNA 转染 NIH₃T₃ 细胞，结合分子克隆和序列分析，由于敏感度低而且需要大量高纯度 DNA，这就限制了待分析的肿瘤的数量。尔后用转染的 NIH₃T₃ 细胞接种于裸鼠的致瘤实验进行检测，此法十分灵敏，但耗时费力，而且在检测过程中有可能会产生基因突变。寡核苷酸探针杂交实验直接检测高分子量 DNA 中 ras 癌基因点突变的方法，操作简便，但灵敏度较低，用于分离 DNA 的样品细胞中，肿瘤细胞不能少于 25%。PCR 方法可选择性地扩增 ras 基因百万倍，大大提高了实验灵敏度，简化了操作过程。PCR 结合寡核苷酸探针杂交，可同时检测大量的病例，灵敏度为 5% ~ 10%，即 100 个细胞中含 5 ~ 10 个具有 ras 基因点突变的细胞即可检测出来，使快速、灵敏地大规模检测各种类型肿瘤的 ras 癌基因点突变情况成为

可能。

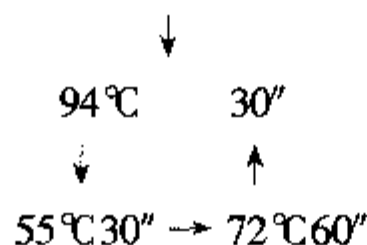
PCR 结合寡核苷酸探针检测 *ras* 基因点突变可分两步。首先进行 PCR 反应, 使包含 *ras* 基因 12, 13, 61 位密码子的基因片段放大上百万拷贝。最后用检测 *ras* 基因第 12, 13 和 61 碱基突变的寡核苷酸探针与扩增片段杂交, 经严格控制条件的洗膜后放射自显影, 检测点突变发生的类型及部位。

实验操作:

(1) PCR 反应: 用 50 μ l 反应体系

10 \times PCR 缓冲液	5 μ l
2mmol/L dNTP	5 μ l
引物 1&2	25pmol/每种
基因组 DNA	0.5 μ g
BSA (100 \times)	0.5 μ l (可不加)
DMSO	5 μ l (可不加)

加水至 49 μ l, 经 97 $^{\circ}$ C 5 分钟, 加入 Taq DNA 聚合酶 1 μ l (2U) 封上石蜡油 (40 μ l)



循环 30 次后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 分钟。取 5 μ l 在 2% 琼脂糖凝胶上检测扩增结果。

(2) 寡核苷酸探针杂交

1) 根据样品数量的多寡取合适大小的尼龙膜, 小心夹在点样器中。

2) 碱变性: 10 μ l PCR 产物, 加上变性液 (4mol/L NaOH/250mmol/L EDTA- Na_2) 10 μ l, 加水至 100 μ l。作用 5 分钟。

3) 开动真空泵, 取 50 μ l 变性 PCR 产物加入点样孔, 边抽气边点样, 样品上完后, 以 100 μ l 2 \times SSC 冲洗点样孔。

4) 取出尼龙膜, 80 $^{\circ}$ C 烘烤 2 小时, 使 DNA 固定在膜上。

5) 根据膜的大小配制预杂交液 (含 5 \times Denhardt's, 6 \times SSC, 7% SDS 和变性鲑鱼精子 DNA 100 μ g/ml)。将膜与预杂交液封入塑料口袋, 56 $^{\circ}$ C 预杂交 2 小时。

6) 寡核苷酸探针的标记: 取 50 ~ 100ng, 合成的寡核苷酸探针, 加 10 \times Kinase buffer 2 μ l (NEB 提供) γ - 32 P-ATP 2 ~ 5 μ l (10 μ Ci/ μ l, 比活 3 000Ci/mmol) T₄ polynucleotide kinase 5 ~ 10U 加 ddH₂O 至 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 保温 90 分钟, 70 $^{\circ}$ C 灭活 5 分钟, 可直接用于杂交。吸去 1/3 预杂交液, 加入标记好探针, 封口后 56 $^{\circ}$ C 杂交 4 ~ 20 小时。

7) 洗膜, 取出杂交膜用 2 \times SSC, 0.1% SDS, 58 $^{\circ}$ C 洗涤 20 分钟, 边洗边用探测器探测本底计数, 以防杂交信号全部丢失或出现假阳性。

8) 洗净之杂交膜灯下干燥后, 暗室包 X 线片, 根据膜上杂交信号的强弱, 放射自显影 12 ~ 48 小时。

注意事项:

(1) 为提高成功率, 应注意基因组 DNA 的质量, 如果因模板的原因未出现 PCR 扩增区带, 可取 10 μ g 基因组 DNA 经稀释后 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 ~ 10 分钟, 然后过 Sephadex G-50 或 G-75 柱纯化, 可获得满意扩增效果。

(2) 为减少使用不同探针杂交的次数, 可以选用混合探针。

(3) 本方法虽然具有快速、灵敏度高及检测量大等优点, 但本方法只能检测已知的突变信息而不能发现新的突变类型。新近发展的 PCR 直接测序方法弥补了上述缺点。

17.8.4 PCR 在法医学上的应用

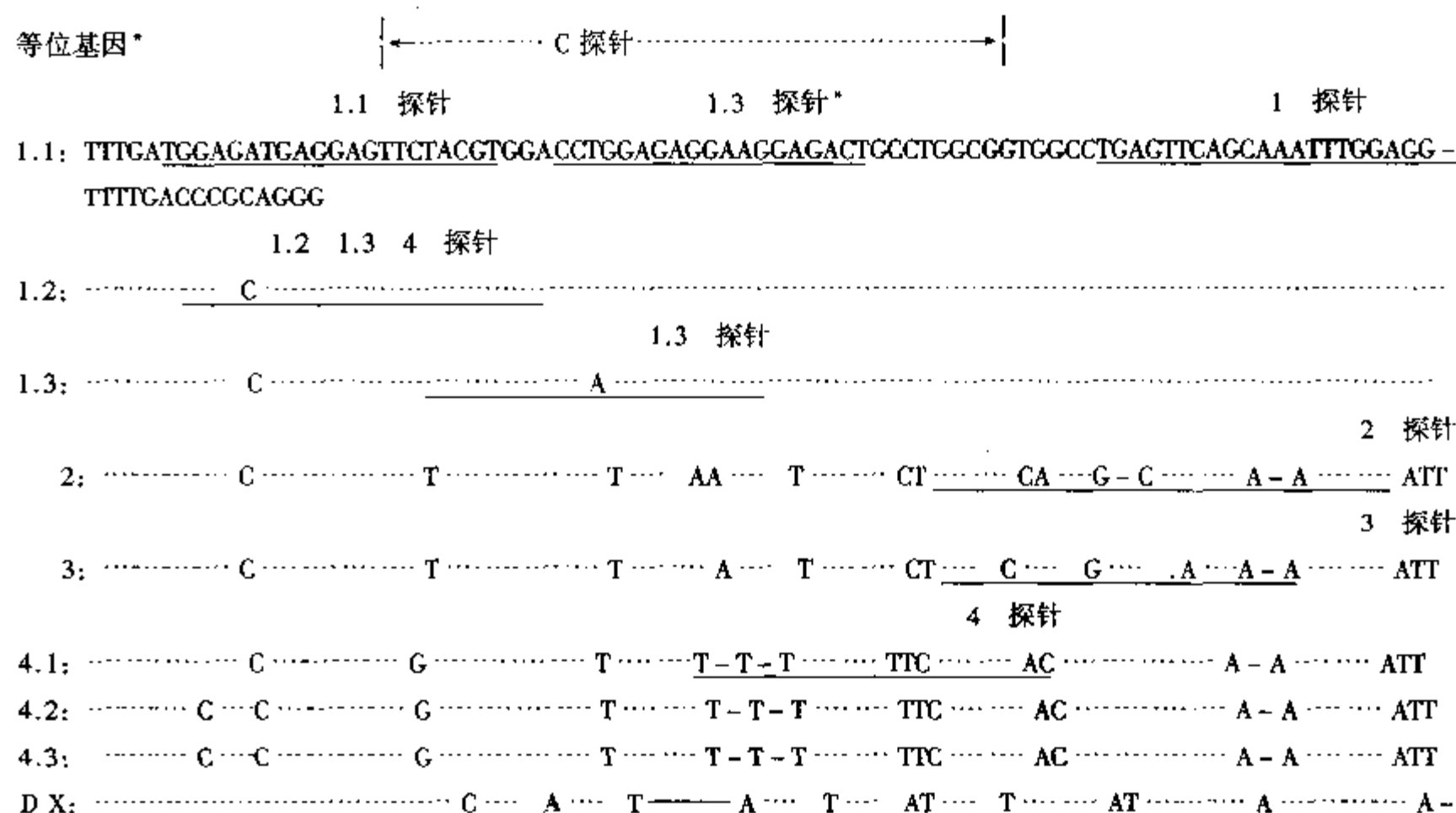
DNA 分析技术在法医学中的应用取得重大进展。法医生物学中应用 DNA 分析的目的有两个,即个人认识和亲子鉴定。

法医学应用 PCR 分析技术最早的报道是 1985 年,英国遗传学家 Jeffreys,用人肌红蛋白基因中的一段 33bp 的多聚体从人的基因文库中筛选出几种小的卫星 DNA 探针,制备出了具有个体特异性的限制性内切酶片段长度多态图谱 (RFLP) 称为 DNA 指纹图 (DNA fingerprint)。并成功地用于个人识别和亲子鉴定。目前这项技术已在 20 个国家的实验室得到推广和应用,并得到某些国家法律部门的认可。随着研究的不断深入,人们又发现了不少新的 DNA 多态性位点,制备出多种探针为 DNA 指纹技术的发展和运用开辟了道路。由于犯罪现场条件不可控制,法医取证在许多时候是非常困难的,常有取量不够和 DNA 降解等问题困扰。应用多位点探针杂交进行 RFLP 分析时, DNA 用量至少在 $0.1\mu\text{g}$ 以上,大于 $0.5\mu\text{g}$ 才有可能得出可靠的结论。PCR 技术的发展和运用,有效的解决了这些问题。对于犯罪现场留下的少量证据,如一根毛发、一滴血、少量精液、牙齿、口腔上皮细胞、骨块等都可进行 DNA 分析。从理论上讲,即使样品 DNA 已经降解,但只要有一条 DNA 链包含了欲扩增的靶序列,便可进行 PCR 反应。PCR 技术用于生物物证的分析与 RFLP 技术相比,操作简单、省时、而且大大地降低了成本。

DNA 多态性一般分为二类:一类是序列多态性 (sequence polymorphism),如发生在高度多态性 HLA 复合体基因类以及线粒体 DNA D-环区内的多态性;另一类为长度多态性 (length polymorphism),如发生在一些可变数目的串联区域 (variable number of tandem repeat, VNTR) 位点的多态性。这两类多态性区域的 DNA 片段都可用 PCR 技术进行扩增,并根据不同的检测手段区分其等位基因变异体。

检测序列多态性的方法有两种,一种是用标准的序列方法直接测定扩增产物的 DNA 序列。这是一种最直接序列多态性检测方法,尽管它费时费力,但在某些情况下,等位基因变异体可以只是单个碱基的差别,这些测定 PCR 扩增产物的序列其结果就会十分明确。另一种更为简单快速的序列多态性检测方法是利用 ASO 探针。在严格控制的条件下,ASO 探针只能与之完全配对的 DNA 序列进行杂交,借此区分各等位基因变异体十分简便。要使用此方法,首先必须清楚所有常见的等位基因变异体的 DNA 序列,藉此才能合理地进行 ASO 探针的设计。有两种方法对 PCR 扩增的片段进行检测:一种是将 PCR 扩增产物固定在硝酸纤维素膜上,然后与 ASO 探针进行杂交;另一种方法是将探针固定在膜上;然后与生物膜标记的 PCR 扩增产物进行杂交 (逆向杂交)。这两种方法都能通过固相酶标记技术在点样处产生颜色来显示。

检测长度多态性的方法比较简便。对一个特定的 VNTR 位点,PCR 扩增产物的长短和其等位基因内串联重复的数目是相关联的。这样只要用凝胶电泳分析 PCR 产物即可得出相应的结果。如果结合特异性探针的杂交分析,得出的结论更加可靠。目前在法医标本的 PCR 分析中,使用最早,发展最为完善的遗传标记系统是 HLA-DQ_α (human leucocyte antigen DQ_α) 系统。以往的 HLA 蛋白多态性分析是通过血清学方法进行研究的。从功能和结构特点上可以将 HLA 蛋白分为两类:Ⅰ类和Ⅱ类。HLA Ⅱ类蛋白相应的基因位于第 6 号染色体上,并且由三个家族构成:HLA-DP、HLA-DQ 和 HLA-DR。每个家族的表型蛋白又由 2 个亚单位构成:即 α 和 β 。HLA-DQ_α 基因的第二个外显子内包含 1 个等位基因变异区。利用这一变异区旁侧保守顺序互补的引物,可以得到 1 个 242bp 的扩增产物。已经发现 DQ_α 有 8 种等位基因,它们是:1.1、1.2、1.3、2、3、4.1、4.2 和 4.3。其中前 6 个是常见的,后两个 (4.2、4.3) 比较少见,一般不作分型。已设计了一套能确定 6 种常见等位基因的寡核苷酸探针 (图 17-12),其中 4 种探针与扩增物在同一顺序变异区杂交,能够区分等位基因型 A1、A2、A3 和 A4。对亚洲人、白人和黑人群中,对 HLA-DQ_α 等位基因及其基因型的分布频率已积累了一定的资料如 (表 17-4)。



* 探针序列为另一条链

探针	长度	序列 5'→3'
C	35 - mer	TTCTACGTGGACCTGGAGAGGAAGGAGACTGCCTG
1	20 - mer	TGAGTTCAGCAAATTGGAG
1.1	19 - mer	CGTAGAACTCCACATCTCC
All but 1.3	18 - mer	GTCTCCTTCCTCTCCAGG
1.2, 1.3, 4	19 - mer	GATGAGCAGTTCTACGTGG
1.3	18 - mer	CCTGGAGAAGAAGGAGAC
2	21 - mer	TTCCACAGACTTAGATTGAC
3	19 - mer	TTCCGCAGATTAGAAGAT
4	19 - mer	TGTTTCCCTGTTCTCAGAC

图 17-12 DQ_α 各种等位基因作用探针表 17-4 DQ_α 等位基因在不同种族中的分布频率

HLA DQ _α 等位基因	黑人 n = 448	黑人 (RBL) n = 344	高加索人 n = 826	高加索人 (RBL) n = 348	日本人 n = 184	Mestizo n = 200	Hipanic n = 338	Hispanic (RBL) n = 292	SE 亚洲人 n = 174
1.1	15	11.3	13.7	12.6	8.7	9	8	11.6	19
1.2	26.3	29.4	19.7	24.4	12	9	5.6	20.2	23.6
1.3	4.5	3.8	8.5	4.3	22.8	4	1.2	3.8	0
2	12.1	11.1	10.9	13.5	0.5	8	5	7.5	6.9
3	11.8	12.2	20.1	16.7	44.6	29.5	43.5	23.6	25.3
4	30.4	32.3	27.1	28.5	11.4	40.5	36.7	33.2	25.3

6 种常见的等位基因决定了 21 种基因型, 如 1.1/1.1; 1.1/1.2; 1.1/1.3; 1.2/2; 1.2/3; 1.2/4; 1.3/1.3; 1.3/2; 1.3/3; 1.3/4; 2/2; 2/3; 2/4; 3/3; 3/4; 4/4。这些基因型的频率变化范围从小于 0.005 到 0.15。DQ α 分型系统的分辨能力在 82.2% ~ 93.7% 之间。这明显优于传统的标记系统, 例如 ABO 血型的分辨能力只有 0.60。同工酶 PGM 的分辨能力也只有 0.76。DQ α 分型系统用于法庭案例调查已有两年多的历史。

实验操作:

法医标本的 DNA 提取及 PCR 扩增, 可见本章 DNA 模板制备; 下面介绍 PCR 扩增产物的斑点杂交。

(1) 取 5 ~ 10 μ l PCR 扩增产物, 加热或碱变性, 点样于硝酸膜条带上 (使用 n 个 ASO) 探针, 每个样品必须点 n 张膜, 80 $^{\circ}$ C 烘烤 60 ~ 120 分钟或紫外线照射 5 分钟固定 DNA。

(2) 使用 HRP 标记 ASO 探针, 加入杂交液中 (5 \times SSC: 5 \times Denhardt's: 0.5% Triton X-100, 探针 0.5 pmol/ml) 膜条放入杂交液, 55 $^{\circ}$ C 杂交 20 分钟。

(3) 洗膜 (2 \times SSC: 0.1% Triton X-100): 55 $^{\circ}$ C 洗膜 20 分钟。

(4) 膜条放缓冲液 A (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L KH $_2$ PO $_4$, 8.0 mmol/L Na $_2$ HPO $_3$, pH 7.4, 5% Triton X-100, 1 mol/L 尿素, 1% 硫酸葡聚糖)。室温下振荡 5 分钟。以 100 mmol/L 柠檬酸钠 (pH 5.0) 洗膜 5 分钟。

(5) 膜条放入底物缓冲液中 (100 mmol/L 柠檬酸钠, pH 5.0, 0.1 mg/ml 四甲基联苯胺), 避光下振荡 10 分钟。

(6) 加入 H $_2$ O $_2$, 使其达 0.0015%, 显色 5 分钟, 以水冲洗膜条 5 分钟, 终止反应。

注意事项:

(1) 为避免假阳性的干扰, 取材时应尽量减少污染的可能性。

(2) Saiki 等发明一种反向斑点杂交的方法, 即将探针本身固定在硝酸膜上, 与带上生物素的 PCR 产物进行杂交。此方法更为简便, 且可以购买试剂盒, 只要用扩增的产物直接与带有探针的膜片进行杂交即可。

17.8.5 PCR 技术在分子生物学中的其它应用

以上简述了 PCR 技术在疾病的基因诊断、病原体的检测、癌基因等方面的应用, 这些都属于分子生物学的范畴。除此之外, PCR 在分子生物学中还可应用在 DNA 序列测定, 基因的点突变、缺失或插入、基因克隆和表达等方面。

17.8.5.1 DNA 克隆

基因的克隆和分离是分子生物学和细胞生物学研究中必不可少的手段。运用 PCR 技术于基因克隆和亚克隆比传统的方法具有更大的优点。由于 1 次 PCR 可以对单拷贝的基因放大上百万倍, 产生微克 (μ g) 级的特异 DNA 片段, 从而可省略从基因组 DNA 中克隆某一特定基因片段所必须经过的像 DNA 的酶切、连接到载体 DNA 上、转化、建立 DNA 文库及基因的筛选、鉴定、亚克隆等繁琐的实验步骤。

只要知道目的基因的两侧序列, 通过一对和模板 DNA 互补的引物, 可以十分有效地从基因组 DNA 中或从 mRNA 序列中, 或从已克隆到某一载体上的基因片段中扩增出所需的 DNA 片段。为了克隆操作的方便或保证克隆后基因的方向正确性, 可以在设计引物时在其 5' 端作一些修改, 或加上一段不完全与模板互补的序列。这个添加的序列可以是带限制性内切酶切点的连接子, 或某种启动子序列或起始或终止密码。经过 PCR 扩增后, 添加的序列最终可整合到新合成的产物中, 便于下一步的重组克隆和基因的表达和调控研究。如果引入的序列是包含限制性内切酶位点的连接子, PCR 产物经相应的内切酶消化后, 即可进行定向克隆。

1986 年 Charf 等将 PCR 方法直接用于克隆 β 珠蛋白基因和 HLA-DQ α 位点基因, 并取得了成功。他

们首先利用带有限制性内切酶位点的引物扩增了 110bp 的 β 珠蛋白基因和 242bp 的 HLA-DQ α 位点的基因片段。经限制酶消化后,透析除去连接酶抑制剂,然后将酶切片段与 M₁₃ 载体连接并传染 JM₁₀₃ 宿主菌,挑选克隆提取单链 DNA 进行序列测定,结果表明有 1% 克隆为 β 珠蛋白基因,20% 的克隆含 HLA-DQ α 基因片段(图 17-13)。与传统的 DNA 克隆方法比较,采用 PCR 的 DNA 克隆方法省时、省力,但它需要目的基因两侧的序列信息。

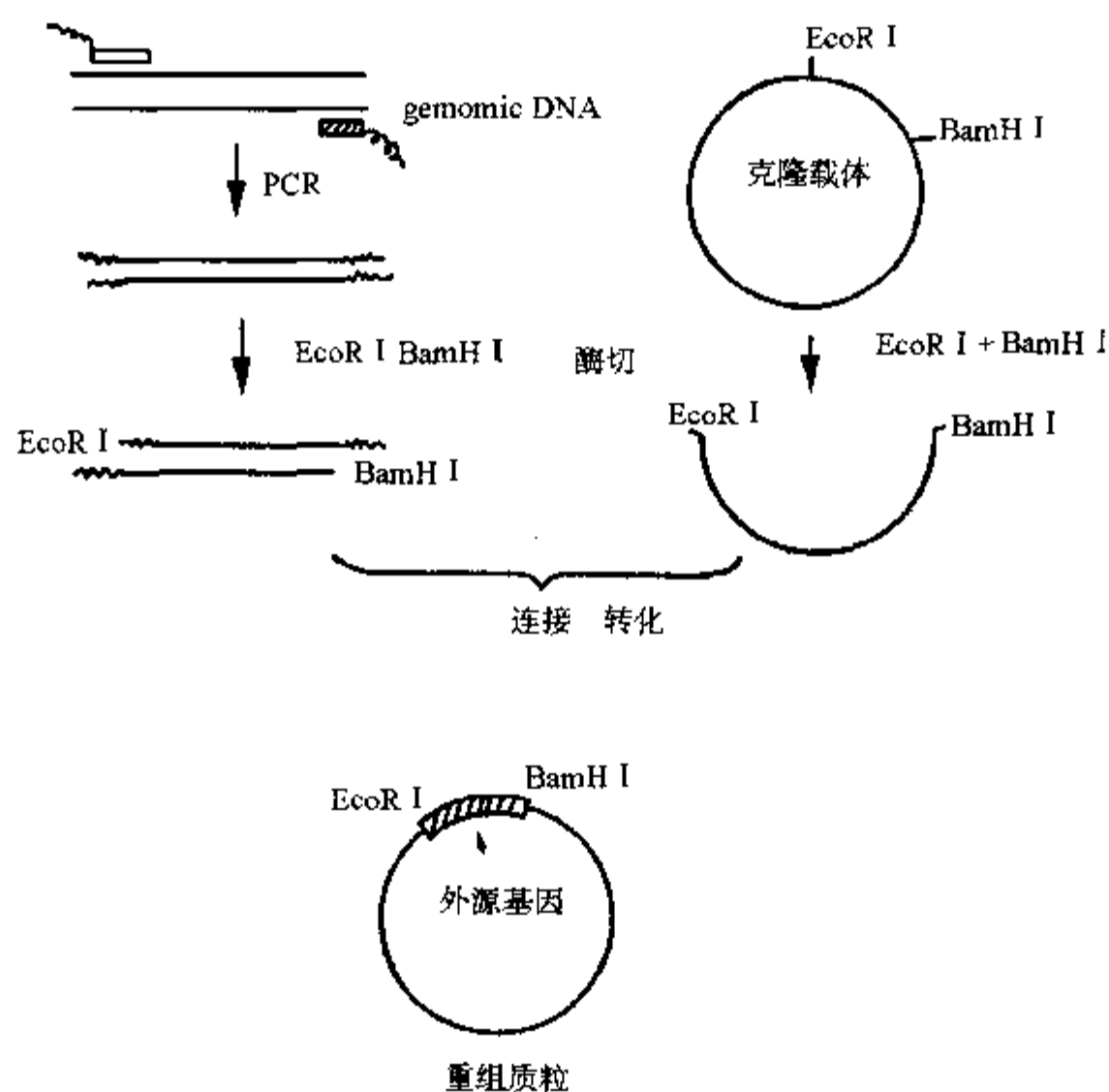


图 17-13 PCR 产物直接克隆示意图

17.8.5.2 引入点突变、缺失或插入

DNA 突变、缺失和插入是微生物学,特别是基因表达和调控的重要手段。传统的方法耗时长、成本高,且成功率低,采用 PCR 方法引入基因点突变、缺失和插入是比较容易操作的。

根据需要合成引物时,在靠近 5' 末端部分人为地造成引物与模板之间碱基的替代、小的缺失或插入,这不会影响 PCR 反应。为保证扩增的成功,引入的变化序列应尽量靠近引物 5' 末端(图 17-14)。

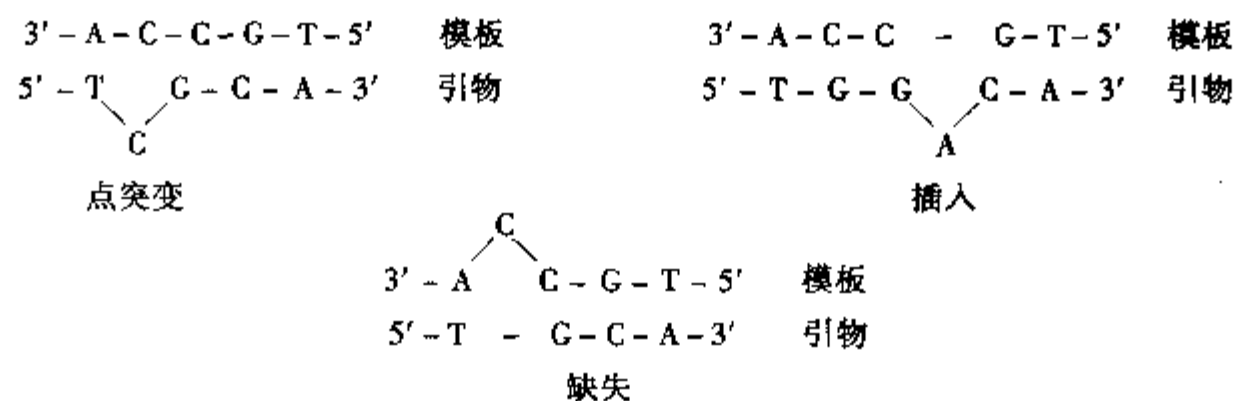


图 17-14 PCR 用于引入点突变、缺失和插入

17.8.5.3 重组 PCR

在分子生物学研究中常常需要将两个不同的基因融合在一起。通过 PCR 反应可以比较容易地实现这一目的。如图 17-15 所示, 在两个 PCR 扩增体系中, 两对引物分别由其中之一在其 5' 末端和 3' 末端引物带上一段互补的序列。混合两种 PCR 扩增产物, 经变性和复性, 两组 PCR 产物通过互补序列发生粘连, 其中 1 条重组杂合链能在 PCR 条件下发生延伸反应, 产生 1 个包含两个不同基因的杂合基因。

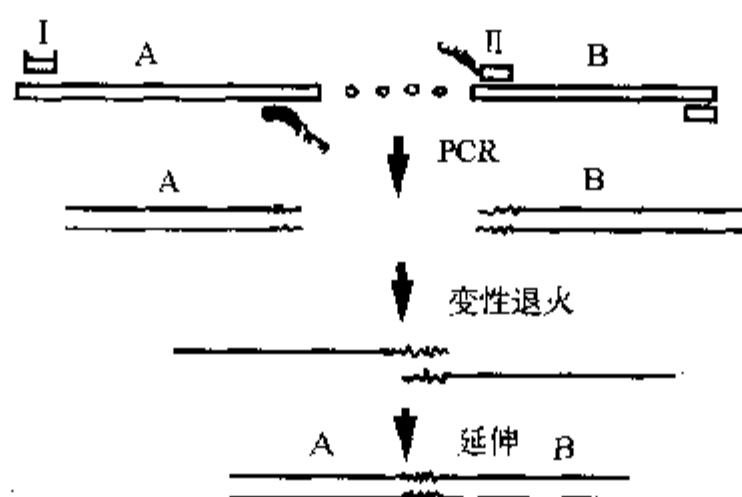


图 17-15 PCR 用于基因融合

17.8.5.4 DNA 序列的测定

目前广泛采用的 DNA 测序方法有化学法和双脱氧法两种, 它们对模板的需要量均较大。传统的模板制备方法是将含目的基因的 DNA 片段进行酶切, 建立基因库, 筛选克隆, 并亚克隆到 M_{13} 噬菌体载体上, 经噬菌体繁殖, 分泌单链 DNA。这是一项十分复杂的工作。利用 PCR 方法可以比较容易地测定位于两个引物之间的序列。利用 PCR 测序有下列几种方法:

1. 双链直接测序:

将 PCR 产物进行电泳回收或利用分子筛等方法除去小分子物质。采用热变性或碱变性的方法使双链 DNA 变为单链, 与某一个方向的引物退火, 用 Sanger 的双脱氧法即可测出一定长度的 DNA 序列。这种方法测序时, 1 次测定的距离较短, 同时容易出现假带。

2. 双链克隆后测序:

为避免双链测序的缺点, 可以将 PCR 扩增产物直接克隆到 M_{13} 中去, 通过提取单链后进行序列测定。

3. 基因扩增转录测序:

在 PCR 时, 使用 1 个 5' 端带有 T_7 启动子序列, 扩增后在 T_7 RNA 酶作用下合成 mRNA 作为模板, 用反转录酶测序。

4. 不对称 PCR 产生单链测序:

在 PCR 反应中加入不等量的一对引物, 经过若干循环后, 其中 1 种引物被消耗尽, 在随后的循环里, 只有 1 种引物参与反应, 结果合成了单链。这是一种简单又可靠的测序方法, 此反应不必在测序之前除去剩余的引物, 因为量少的引物在反应中已经消耗掉, 也不用担心测出由于 Taq DNA 聚合酶碱基识别能力限制所引起的随机突变。因为某个随机突变在所有单链中所占比例总是很少的。

17.8.5.5 用于基因定量

应用 PCR 技术可以定量检测标本中靶基因的拷贝数。这在研究基因的扩增等方面具有重要意义。这种方法称为差示 PCR (differential PCR)。它是将目的基因和一个单拷贝的参照基因置于同 1 个试管中进行 PCR 扩增。电泳分离后呈两条区带, 比较两条区带的丰度, 或在引物 5' 端标记上放射性核素后, 通过检测两条区带放射性强度即可测出目的基因的拷贝数。利用差示 PCR 还可以对模板 DNA (或 RNA)

的含量进行测定,在一系列 PCR 反应中,分别加入待测模板 DNA 和参照 DNA 片段。参照 DNA 片段基本上按待测 DNA 的方式进行构建,只是在其基础上增加了一小段内部连接顺序,这样使得两种 DNA 片段的 PCR 产物可在凝胶电泳上分开。由于这两种不同的 DNA 片段可以在同一种寡核苷酸引物作用下同步扩增,因此可以避免因使用不同的引物所引起的可能误差。这两种扩增产物的相对量就反应了在起始反应混合物中的目的 DNA 和参照 DNA 的相对浓度。

利用差别 PCR 同样可以作 mRNA 的定量,与 DNA 模板含量测定基本相似,所不同的是首先应提取总 RNA,加入 1 个与 mRNA 3' 区互补的引物,在反转录酶的作用下,合成 cDNA,余下的操作与 DNA 定量相同。利用 PCR 可以对像进行性肌萎缩蛋白 mRNA 之类丰度极低的 mRNA 作比较准确的定量。甚至连 Northern 杂交未能发现的 mRNA 都可以得到检测。

实验方法:

[PCR 克隆 DNA 片段]

(1) 按前章模板制备方法准备包含目的基因片段的模板 DNA。在 100 μ l 反应体中加入:

10 \times PCR 缓冲液	10 μ l (250mmol/L KCl, 20mmol/L MgCl ₂ , 100mmol/L Tris·Cl, pH8.3)
100 \times BSA	1 μ l
模板 DNA	0.5 μ g
上游引物、下游引物	各 30pmol
2mmol/L dNTP	10 μ l
DMSO	10 μ l

加双蒸水至 98 μ l 混合后 97 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟,迅速冷却至 4 $^{\circ}$ C,加入 Taq DNA 聚合酶 2 μ l (2U/ μ l),加 50 μ l 矿物油防止水分蒸发。

根据引物 T_m 值及欲扩增片段大小,在 PCR 自动扩增仪上设置循环参数,一般为 94 $^{\circ}$ C 30 秒,55 $^{\circ}$ C 30 秒,70~72 $^{\circ}$ C 60 秒,循环 25~30 次,最后使其停留在 72 $^{\circ}$ C 5 分钟。完毕后取 5 μ l 检测扩增效果。

(2) 插入片段粘性末端的准备:

取 5~10 μ l PCR 产物
10 μ l 酶切缓冲液 (10 \times)
2 μ l (10~30U) 限制性内切酶

加水至 100 μ l。在限制性内切酶最适温度 (一般为 37 $^{\circ}$ C) 保温 1~2 小时,65 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟灭活限制酶活性 (少数热稳定酶需要酚抽提)。如果两个引物分别带有不同的限制酶识别序列,需在第一个酶切后,调整缓冲液盐浓度,进行第二个酶切。使用异丙醇沉淀方法,除去酶切体系中 dNTP,引物及酶切下的小片段,以利连接反应顺利进行。

(3) 连接反应:

5 \times 连接酶缓冲液	2 μ l (NEB 提供)
消化的 M ₁₃ 载体	1 μ l (50ng)
目的 DNA 片段	2 μ l (100~200ng)
T ₄ DNA 连接酶	1 μ l (5U/ μ l)
H ₂ O	4 μ l

反应于 14~16 $^{\circ}$ C 连接过夜 (4~12 小时)。如果是平末端连接,应调节插入基因和载体 DNA 量至 5~10:1,反应在 18 $^{\circ}$ C 连接过夜。

(4) 转化筛选及克隆鉴定:见分子克隆有关章节。

[利用 PCR 产物测序]

1. 双链测序:

(1) PCR 扩增目的 DNA 片段:在 100 μ l 反应体系中分别加入 10 \times PCR 缓冲液 10 μ l,模板 DNA 10²~

10^5 拷贝, 引物各 30pmol, dNTP 50 μ mol/L, 100 \times BSA 1 μ l, Taq DNA 聚合酶 2 μ l, 加石蜡油防止蒸发。在 40 $^{\circ}$ C 30 秒, 55 $^{\circ}$ C 30 秒和 72 $^{\circ}$ C 60 秒条件下循环 30 次。以异丙醇沉淀 PCR 产物除去多余引物和其它小分子物质。

(2) 序列测定: 先进行 DNA 变性。向 10 μ l PCR 产物 (4 μ g) 22.5 μ l OH⁻ EDTA (2mmol/L NaOH, 2mmol/L EDTA) 中加 H₂O 至此 200 μ l。室温作用 6 分钟, 加 3mol/L NaAc (pH4.8) 34 μ l, 同时加入 580 μ l 预冷的无水乙醇, 置液氮 15 分钟, 以 80% 乙醇洗 2 次, 真空干燥。使用时以 14 μ l H₂O 溶解 DNA。随后进行杂交反应。取 7 μ l 变性 DNA 加 1 μ l 寡核苷酸引物 (10ng/ μ l), 1 μ l 10 \times 双链测序缓冲液 (75mmol/L Tris \cdot Cl, 50mmol/L MgCl₂, pH7.5) 37 $^{\circ}$ C 作用 30 分钟。因 10 μ l 杂交 DNA 加入 1 μ l 0.1mmol/L DTT, 2 μ l 稀释 dCTP 标记混合物 (1 μ l 标记混合物加 1 μ l 水) 0.5 μ l ³²P-dATP (或 ³²S-dATP), 0.5 μ l 测序酶, 2 μ l TE, 室温反应 6 分钟。取 4 支 0.5 μ l 离心管, 每管加入标记反应物 4 μ l (U S B Kit) 和 2 μ l ddNTP 试剂 (A, C, G, T), 37 $^{\circ}$ C 反应 7 分钟, 然后每管加入 4.3 μ l 终止反应液。各取 2~3 μ l 走 8% 变性丙烯酰胺凝胶。上样前 100 $^{\circ}$ C 变性 4 分钟, 如为 ³⁵S 标记反应, 可在 -20 $^{\circ}$ C 存放一周, 如为 ³²P 标记反应须在 24 小时内电泳。

2. 单链测序:

采用不对称 PCR 反应中, 两种引物用量分别为 50~100pmol 和 1pmol, 其它条件不变。反应完毕取 3 μ l 在琼脂糖凝胶上鉴定扩增结果。用终浓度分别为 2mol/L 的醋酸铵和 50% 异丙醇沉淀单链 DNA 模板, 同时除去 dNTP 和引物。单链 DNA 溶于 TE 后可直接用双脱氧方法测序 (方法同前)。

3. 定量 PCR (内参比法):

(1) RNA 制备: 以异硫氰酸胍 - CsCl 方法提取细胞 RNA。以 A₂₆₀ 比色测定含量。

(2) 反转录: 在 10 μ l 反应体系中加入

总 RNA	1 μ g
10 \times PCR 缓冲液	1 μ l
DTT	1mmol/L
dNTP	0.5mmol/L
RNasin	10U
Oligo (dT) 引物	0.1 μ g
反转录酶	100U

37 $^{\circ}$ C 保温 60 分钟, 95 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟, 使酶灭活, 迅速置冰浴保存。

(3) PCR: 取 5 μ l 逆转产物作 PCR 分析。同时扩增内参照 mRNA (cDNA)。所不同的是扩增引物其 5' 端应以 γ -³²P-ATP 标记。

(4) 结果比较: PCR 扩增反应产物经琼脂糖凝胶电泳分离目的区带 (待测) 和参照物扩增产物区带, 取下两者进行闪烁记数即可比较得出待测 mRNA 的含量。

注意事项:

(1) 以 PCR 定向克隆 DNA 片段时, 引物 5' 端所携带的限制酶“连接子”外侧应带上数个保护碱基以保证酶切形成粘性末端 (参见 NEB Catalogue)。

(2) 以平末端 PCR 产物直接克隆时, 建议对 PCR 产物用 Klenow 酶进行补齐。同时提高插入顺序与载体的摩尔比, 以提高连接效率。

(3) 单链 PCR 产物测序时, 所用引物的比例十分重要, 最佳比例范围在 0.5pmol:50pmol 和 0.5pmol:100pmol。因反应效率低 (单链 DNA 只是线性增加) 故需比平常更多的循环周期。

(4) 定量 PCR 的循环数一般为 20 次左右, 超出此范围扩增产物就不能保持稳定的指数级增长。

(敖朝晖 文 强伯勤 审)

参 考 文 献

1. 毛裕民, 等. 多聚酶链式反应. 科学通报, 1990, 2:81
2. 孙文东, 等. 从石蜡包埋和甲醛浸泡组织中提取 DNA 进行 PCR 扩增的研究. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18:65
3. 刘敬忠, 等. 3'碱基特异的 PCR 技术及 β 地中海贫血基因点突变的直接检测. 科学通报, 1990, 21:1668
4. 黄培堂, 等. PCR 技术原理及应用. 北京: 中国科学技术出版社, 1990
5. 朱平. PCR 基因扩展操作实验手册. 北京: 中国科学技术出版社, 1992
6. Brock TD, et al. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. J Bacteriol, 1969, 98:289
7. Chien A, et al. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *thermus aquaticus*. J Bacteriol, 1976, 127:1550
8. Clark JM. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. Nucl Acids Res, 1988, 16:9677

18. DNA 的化学合成

基因是由具有特定的核苷酸顺序的核酸组成的功能单位，它携有特定的遗传信息，在染色体上按一定的顺序排列。基因的基本单位为核苷酸，每个核苷酸包含三种成分：碱基、戊糖和磷酸。DNA 的单体单位为脱氧核苷酸，其中戊糖是 D-2-脱氧核糖。四种碱基分别为腺嘌呤 (A)、鸟嘌呤 (G)、胞嘧啶 (C) 和胸腺嘧啶 (T) (图 18-1)。

在核苷酸中两类杂环化合物嘧啶和嘌呤具有明显的芳香族特性。嘌呤本身可以认为是嘧啶的 1 种衍生物，它是 1 个嘧啶环和 1 个咪唑环耦合在一起组成的。在大多数细胞中，碱基只有少数呈游离或不结合形式存在，而且它们通常是酶水解核酸和核苷酸的产物。游离嘧啶和嘌呤碱基在水中是相对难溶解

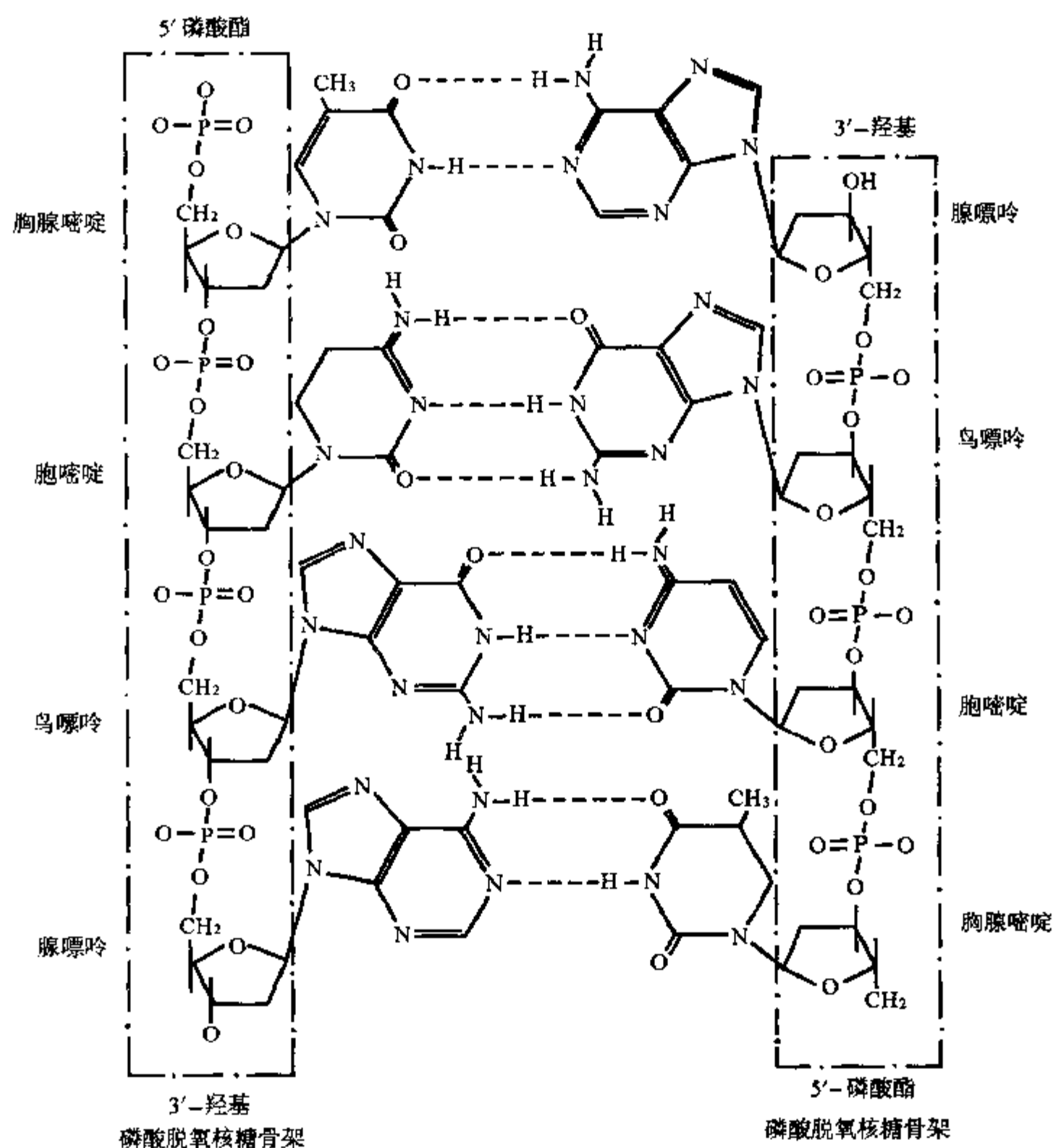


图 18-1 DNA 骨架示意图

的，是弱碱性化合物，随 pH 不同能以两种或多种互变异构的形式存在。嘌呤碱基的第九氮原子或嘧啶碱基的第一氮原子与戊糖的第一碳原子形成 β -N糖苷通称核苷。核苷按所含糖的不同分为：D-核糖核苷类和2-脱氧-D-核糖核苷类。在大多数细胞中只有微量的游离核苷存在。核苷比相应的碱基易溶于水，在不同 pH 条件下存在与碱基类似的互变异构，N-糖苷键对酸不稳定。核苷的磷酸酯称核苷酸。核糖有3个游离羟基，所以核糖核苷酸有2'、3'和5'核苷酸。脱氧核糖只有2个羟基可以酯化，故脱氧核糖核苷酸只有3'和5'核苷酸。核酸分子是由核苷酸通过3'→5'磷酸二酯键连接而成（图18-2）。

DNA 的化学合成研究始于 50 年代。1952 年阐明核酸大分子是由许多核苷酸通过 3'→5'磷酸二酯键连接起来的这个基本结构以后，化学家们便立即开始尝试核酸的人工合成。英国剑桥大学 Todd 实验室于 1958 年首先合成了具有 3'→5'磷酸二酯键结构的 TpT 和 pTpT。此后，Khorana 等人对基因的人工合成作出了划时代的贡献，不仅创建了基因合成的磷酸二酯法，而且发展了一系列有关核苷酸的糖上羟基、碱基的氨基和磷酸基的保护基及缩合剂和合成产物的分离、纯化方法。到目前为止，使用的 DNA 合成方法有磷酸三酯法、亚磷酸酯法及亚磷酸酰胺法。此后又发展了固相化技术，实现了 DNA 合成的自动化。

由于合成技术的迅速发展，具有特定顺序的核酸合成取得了丰硕的成果。1972 年 Khorana 等人合成了相当于酵母内丙氨酸 tRNA 结构基因的 DNA 双链，1979 年完成了包括启动和调节顺序在内的共有 207bp 的大肠杆菌酪氨酸校正 tRNA 基因。一系列蛋白和多肽基因，如胰岛素、生长激素、 α -和 β -干扰素、胸腺素和脑啡肽等相继合成并得到表达。我国科学工作者于 1981 年完成了酵母丙氨酸 tRNA 的全合成，这是世界上第一个人工合成的具有全部生物活性的 RNA 分子。DNA 的人工合成正在分子生物学和医学等许多领域中发挥越来越多的作用。

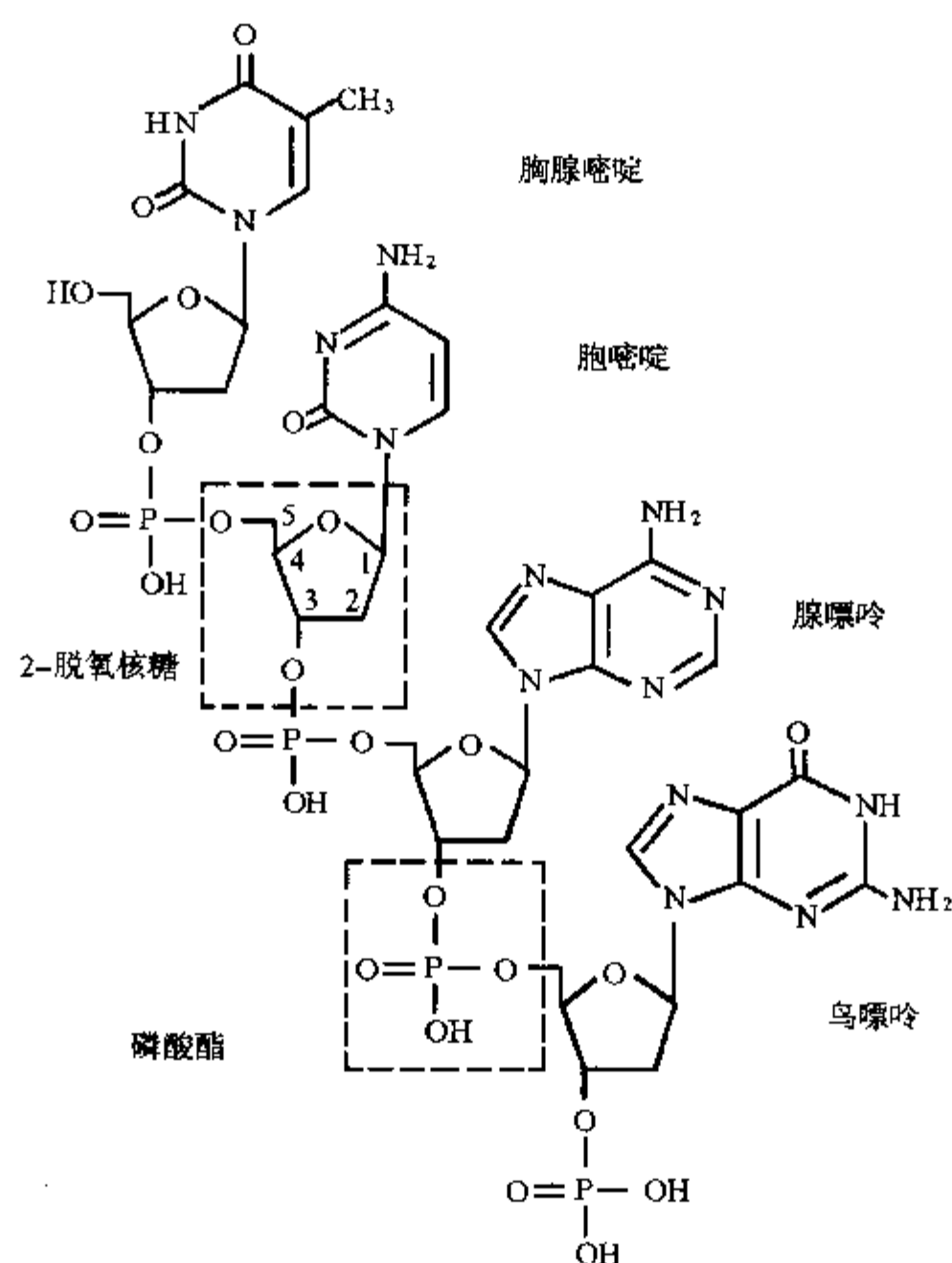


图 18-2 核酸结构示意图

18.1 DNA 化学合成原理

DNA 合成的含义是将核苷酸单体按 3', 5' 磷酸二酯键连接, 使其具有天然的 DNA 分子的全部生物学活性和特定的排列顺序。由于核苷酸是一个多官能团的化合物, 在连接反应中除了特定的基团会发生反应外, 其它如核糖和磷酸羟基、碱基上的氨基等基团也会参加反应产生错接等, 从而使得真正需要的产物的产率降低并且影响产物的分离纯化。因此, 在 DNA 的化学合成中总是将暂时不需要的基团保护起来, 并且在下一轮缩合反应之前将这些保护基有选择地除去, 这样不断迅速形成专一的 3'→5' 磷酸二酯键的特定核苷排列。

固相亚磷酸酰胺法是目前绝大部分 DNA 自动合成仪所使用的方法, 合成的原理及步骤见图 18-3。

首先将欲合成的寡核苷酸链 3' 末端核苷 (N_1) 以其 3'OH 通过 1 个长的烷基臂与固相载体 (不溶性的高分子物质, 常用的有硅胶 S、交联的聚苯乙烯、特殊孔径的多孔玻璃珠等) 耦联、 N_1 的 5'OH 以二甲氧基三苯甲基 (DMTr) 保护。然后从 N_1 开始逐步地接长寡核苷酸链。1 个合成循环包括 4 步。第一

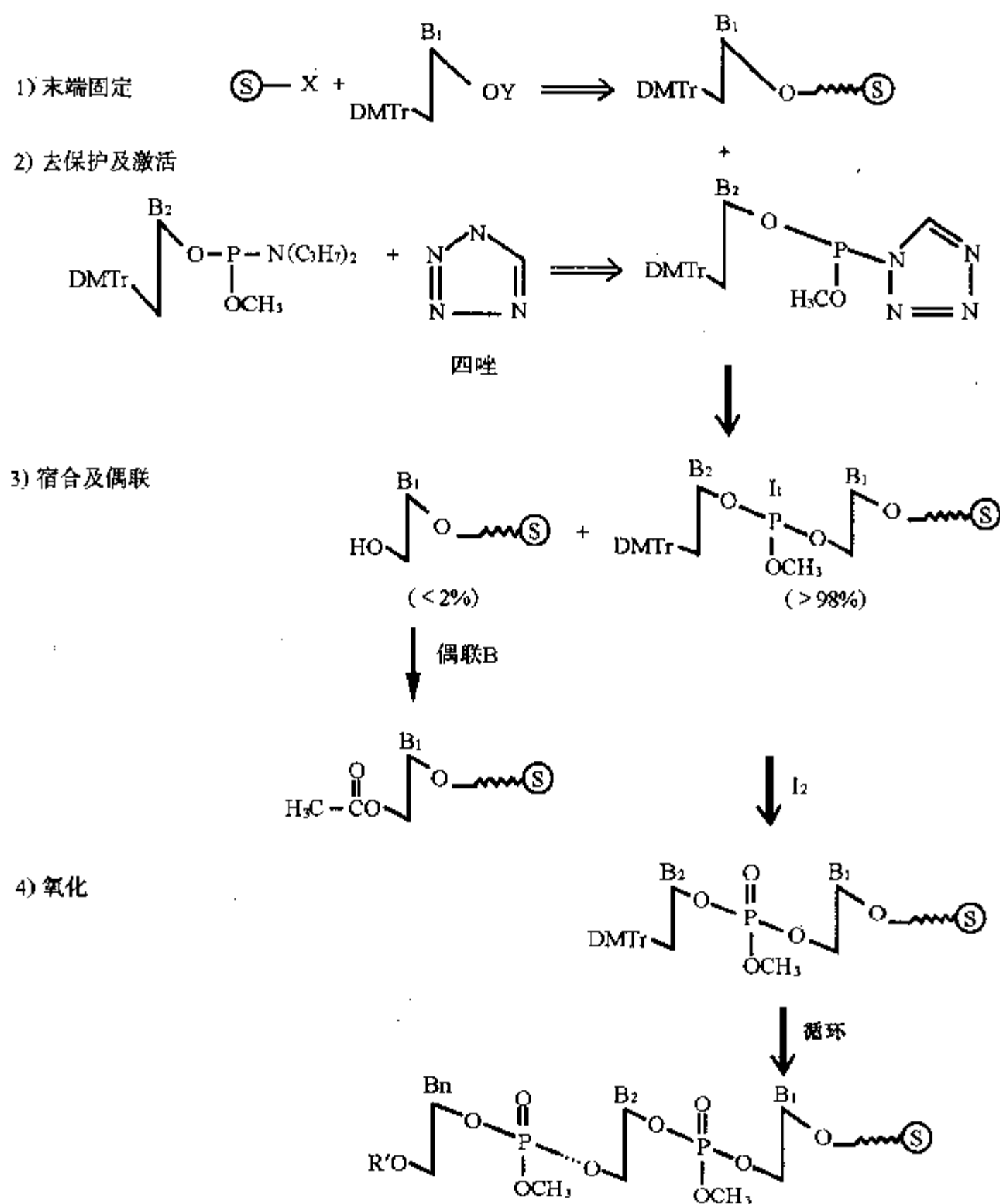


图 18-3 亚磷酸酰胺法合成寡核苷酸原理示意图

步为去保护 (deprotection); 以苯磺酸 (或三氯醋酸) 处理带有保护基的核苷, 去除 5' 末端的 DMT, 暴露出 5'OH, 经洗涤后进行下步反应。第二步为耦联反应 (coupling); 加入经四唑作用 (激活) 的核苷 N_2 , 使之与核苷 N_1 上的 5'OH 起耦联反应, 乙腈洗涤。第三步为加帽反应 (capping); 加入醋酐及二甲基氨基吡啶, 使未参加反应的寡核苷酸链 (2% 以下) 乙酰化, 乙酰化的链不参加下一步反应, 如此有利于纯化所需全长的 DNA 片段。第四步为氧化反应 (oxidation); 加入碘, 使三价的亚磷酸转变为更稳定的五价磷酸。上述循环完成之后进行第二个合成循环。每经历一轮循环, 接长 1 个核苷酸。接长的链始终被固定在不溶的固相载体上, 过量的未反应物或分解物则通过过滤或洗涤除去。当整个链达到预定的长度后, 从固相载体上切下, 脱去保护基 (氨解), 并经过分离纯化得到所需要的最后产物。

固相亚磷酸胺合成法耦联效率高、反应快, 每完成 1 个循环仅需 7~10 分钟。

18.2 DNA 的合成、纯化及鉴定

由于现代科学技术的发展, DNA 合成已广泛采用 DNA 自动合成仪, 仅有少数特殊情况下, 采用人工合成。目前, 主要有 ABI (Applied Biosystem Inc.)、Pharmacia、Backman 等几家公司生产 DNA/RNA 合成仪, 其中以 ABI 公司的仪器占我国及世界市场的 80%~90%。由于合成技术的现代化, 人们已从繁重的劳动中得到解脱。输入合成仪的 DNA 序列, 可以在数小时之内得到完成。我们所要做的工作只是将合成柱取下, 进行 DNA 切落和去保护基以及纯化, 并进行量鉴定和计算合成率。

18.2.1 DNA 合成仪的操作 (以 Pharmacia 合成仪为例)

18.2.1.1 合成前的准备

(1) 合成开始前 1~2 天, 开箱取乙腈 1 瓶, 按 1/10 体积加 E. Merck 公司产 0.3nm 分子筛, 干燥乙腈。

(2) 试剂的准备和底物的溶解

按包装和说明加入适量的乙腈溶解底物, 然后加入少量的分子筛以保证试剂的干燥。

β -膦乙基亚磷酸胺	含量 (g)	乙腈体积 (ml)	浓度 (mol)
PAC-dA	0.4	4.5	0.1
IPr-PAC-dG	0.	4.2	0.1
IBU-dC	0.	5.0	0.1
dT	0.4	5.3	0.1
四唑	0.7	20	0.1

注: 根据我们的经验, 乙腈用量可比理论值多加 1/2 体积。其它尚有 1, 2-二氯乙烷 detritylation solution, 氧化剂, capping A, B 其中氧化剂为 0.5% I_2 /乙腈, 及 2, 4, 6 三甲吡啶/乙腈/水, 二瓶分装。capping A 为乙腈; 4-2 甲基吡啶二瓶分装。capping B 为无水乙酸/吡啶, 2, 4, 6 三甲吡啶/乙腈二瓶分装, 使用前以等体积混匀。

(3) 检查氩气钢瓶气压, 高压应在 4 个 MPa 以上, 低于此数应更换气体, 1 瓶氩气可连续使用 3 个月以上。

4. 准备好废液收集瓶。

18.2.1.2 开始合成

(1) 接通氩气: 调整合成仪气体控制阀, 首先让 4 种脱氧核糖核苷三磷酸底物和乙腈充满氩气, 并使气压保持在 10~20MPa。

(2) 接通合成仪和计算机, 使合成仪 on/off 开关置于 on 位置, 选择主泵方向 (pump direction) 为逆

时针方向（虚线方向），泵速开关置于 X_{10} 位置。

(3) 连接合成仪和计算机，运行 GA (gene assembler) 文件。

(4) 试运行：在主菜单 (major menu) 下，选择 Purge/call ↓，再选择 purge ↓，根据不同目的回答屏幕提问并输入各试剂液体体积。

如为新开始合成或停机 1 周以上重新开始合成，则运行 user control ↓，重新检测和校正各泵和阀流速是否均衡和管线是否通畅。如为更换部分试剂或停机在 1 周以内重新开始合成则选择 purge/call。

注意：运行 Purge 文件时，应在合成柱 1 上装填试验柱（可用使用过的废柱）。

Purge 运行完毕即可开始合成过程。

(5) 合成：

1) 在主菜单下选择 Sequence Editor 程序。

输入拟合成序列，反复核对后，储存并给出该序列名称。

2) 根据拟合成序列 3' 末端碱基，选择相应的固相柱。

如 5' - ACGTACGTAAGGCCTT - 3' 序列，则应选择 T 柱。

3) 主菜单下，选择 Run Synthesis ↓ 开始合成。

键入或在屏幕上选择拟合成序列名称并再次核对待合成寡核苷酸序列。开始合成 (start synthesis ↓)。

(6) 合成过程中人可以离开，但应不时观察机器。合成完毕储存合成资料也可即刻打印。

注意合成完毕应松开泵上橡胶管，使其保持弹性延长寿命。

(7) 取下含有合成片段的柱子，置于 1.5ml Eppendorf 管中 10 000r/min 离心 30 ~ 60 秒，弃液体部分。

(8) 去保护及合成片段的收获：

合成柱置 1.5ml 带螺口的 Eppendorf 管中，加入 1ml 氢氧化氨（28% 优级纯），10 000r/min 离心 30 秒，拧紧管口，70℃ 2 小时或 55℃ 过夜。

取出固相柱置另 1 个 Eppendorf 管，10 000r/min 离心 30 秒，合并液体部分待纯化。

(9) 合成片段去盐及纯化 (NAP-10) 柱纯化。

1) 取下 NAP10 柱保护塞。

2) 以双蒸水 5ml 洗 3 次。

3) 将待纯化样品上柱 (1ml)。

4) 以 1ml 双蒸水洗柱，洗柱液即为所需片段。

5) 测 OD_{260} ，电泳或 FPLC 检测合成片段纯度。

(10) 合成完毕可继续合成新的片段或关机，关闭计算机合成仪电源，如在 3 天内继续合成不必取下各试剂，如停机时间长于 1 周，建议取下各试剂，密封。如较长时间停机（大于 10 天）应运行 shut-down 程序：①取下所有试剂瓶套上空瓶；②将干燥管置含干燥乙腈的烧杯中，将机器泵转动反方向倒转（顺时针，实线方向）。

18.2.2 DNA 的切落及去保护

取下 DNA 合成柱，置适量浓氨水（氢氧化铵，28%）中浸泡，一般为 1ml 氢氧化铵密封后 55℃ 保温：约 15 小时，或 70℃ 保温 2 小时，使合成的寡核苷酸片段从载体上切落并去除 β - 膦乙基磷酸保护基。

18.2.3 寡核苷酸片段的纯化

1. NAP 柱纯化：

由 Pharmacia 公司生产，主要成分为 Sephadex G-25，经特殊处理后装成的不同体积的小柱，常用的

有 NAP-10。含寡核苷酸片段的氨水溶液,调整体积为 1ml 加样于 NAP-10 柱上(使用前,以 15ml 双蒸水平衡柱子),以 1ml 双蒸水洗脱,收集洗脱下的液体,即为纯化的寡核苷酸, NAP-10 柱可以纯化长度在 10mer 以上的寡核苷酸,产率在 90% 以上。经 NAP-10 柱纯化后样品中盐的含量少于 3%,完全可以满足实验的需要。

2. 丙烯酰胺凝胶电泳纯化:

从合成柱上洗脱的寡核苷酸片段,冰冻、干燥、去氨水、溶于适量水中后,点样于 15%~20% 丙烯酰胺凝胶制备胶上,按 10V/cm 条件电泳,过夜。电泳完毕后,取下凝胶于 EB 染色后观察,或直接将含寡核苷酸片段的凝胶置于硅胶荧光板上(CMC 板)紫外线灯下,根据分子量的标准切下所需的区段(呈黑色),将胶块置少量缓冲液中(10mmol/L Tris·Cl, pH8.0, 1mmol/L EDTA, 300mmol/L NaCl),捣碎胶块,25~42℃ 浸泡过夜(4~24 小时)。或将胶块置于有少量缓冲液的透析袋中,通电下,寡核苷酸片段即进入透析袋中。洗脱的寡核苷酸片段以酒精沉淀、洗涤。真空抽干后即可应用。

浸泡法简单,成本低,易操作。电泳法较快,回收产率高,但需鉴定。此外还有 HPLC(高效液相层析),及寡核苷酸纯合柱(OPC, ABI 生产)等方法可以纯化寡核苷酸片段。可以根据手头的材料、仪器、及使用习惯而加以选择。

18.2.4 寡核苷酸片段的鉴定

可以采用 PAGE、HPLC、FPLC 等方法对合成的寡核苷酸进行鉴定。

对于 10~100mer 的寡核苷酸,可以用 20% 浓度的丙烯酰胺凝胶电泳,观察电泳区带即可判断合成片段的纯度及片段大小。如果结合 5' 或 3' 末端核素标记放射自显影技术则结果更加可靠。采用 FPLC 和 HPLC 鉴定合成片段的纯度,速度快,精确度高,但需昂贵的仪器设备。合成片段最精确的鉴定方法是采用 Maxam-Gilbert 化学法测定核苷酸序列。

18.2.5 合成产物中 DNA 含量的测定

4 种碱基的平均最大吸收波长为 260nm。一般选用该波长测定 DNA 含量。测定前,稀释样品,使光吸收在 0.2~1.2OD 范围内。在石英比色杯中测定样品溶液光密度(表 18-1)。

表 18-1 合成寡核苷酸片段粗产量

合成柱规格 (μmol)	粗产量 (OD_{260})
0.2	20~25
1.0	100~125
10.0	800~1 000

$$\text{产量} = \text{OD}_{260} \times 25$$

$$= \text{OD}_{260} \text{实测值} \times \text{稀释倍数} \times \text{体积} \times 25 (\mu\text{g/ml})$$

一般认为对单链寡核苷酸片段, $1\text{OD}_{260} = 25\mu\text{g/ml}$ 。不同规格合成柱产量均不一样。

18.3 DNA 化学合成的应用

随着 DNA 合成技术的发展,特别是自动化合成技术的引入,人们能简便、快速、高效地合成其感兴趣的 DNA 片段。目前, DNA 合成技术已成为分子生物学研究必不可少的手段,并且已在基因工程、

临床诊断和治疗、法医学等各个领域日益发挥重要的作用。

18.3.1 DNA合成在基因工程和分子生物学研究中的应用

18.3.1.1 合成基因

目前有许多基因和蛋白质的核苷酸和氨基酸序列已得到阐明,人们已经可以根据需要合成出具有实际应用和研究价值的多肽和蛋白质基因。已报道的合成基因有人生长激素,干扰素、胰岛素、表皮生长因子、白细胞介素Ⅱ、集落刺激因子等,这些基因均已被克隆,绝大多数已在原核和真核系统中获得表达。我国上海生物化学研究所等单位于1981年首次在世界上合成了具有生物学活性的酵母丙氨酸转移核糖核酸,为人类文明作出了应有的贡献。

目前,合成基因的方式有2种:①全基因合成:一般对于分子较小而又不易得到的基因采用该方式。可将双链基因分成若干寡核苷酸单链片段(尤其待合成基因在100个核苷酸以上时),每个片段长度控制在40~60个碱基,并使每对相邻互补的片段之间有4~6个碱基交叉重叠(图18-4)。在体外将除基因两端末端外的所有片段磷酸化。混合退火后加入DNA连接酶,即可得到较大的基因片段。如果需连接的DNA片段较多,可采用分步连接或分步接连亚克隆的方法,最后将亚克隆的较大片段重组为完整的基因。采用分步连接、亚克隆的方法时,为便于亚克隆中回收基因片段。应在片段两侧设计合适的酶切位点,由于每个亚克隆可以分别鉴定,从而可减少顺序错误的可能性;②酶促合成:此法又称基因的半合成。全基因,特别是较大的基因的全部化学合成成本昂贵,使用半合成的方法可以降低成本,从而利于普及使用。首先合成末端之间有10~14个互补碱基的寡核苷酸片段,退火后以重叠区作为引物,在4种dNTP存在的条件下,通过DNA聚合酶Ⅰ大片段(Klenow酶)或反转录酶的作用,获得两条完整的互补双链。在合成基因的结构中,应包括有克隆和表达所需要的全部信号及DNA顺序,基因密码的阅读框架也应该同表达体系相适应。此外,由于不同种类的生物体或密码子的使用都具有明显的选择性,在基因合成和克隆时必须考虑这个问题。选择合适的密码子,以获得高效表达。

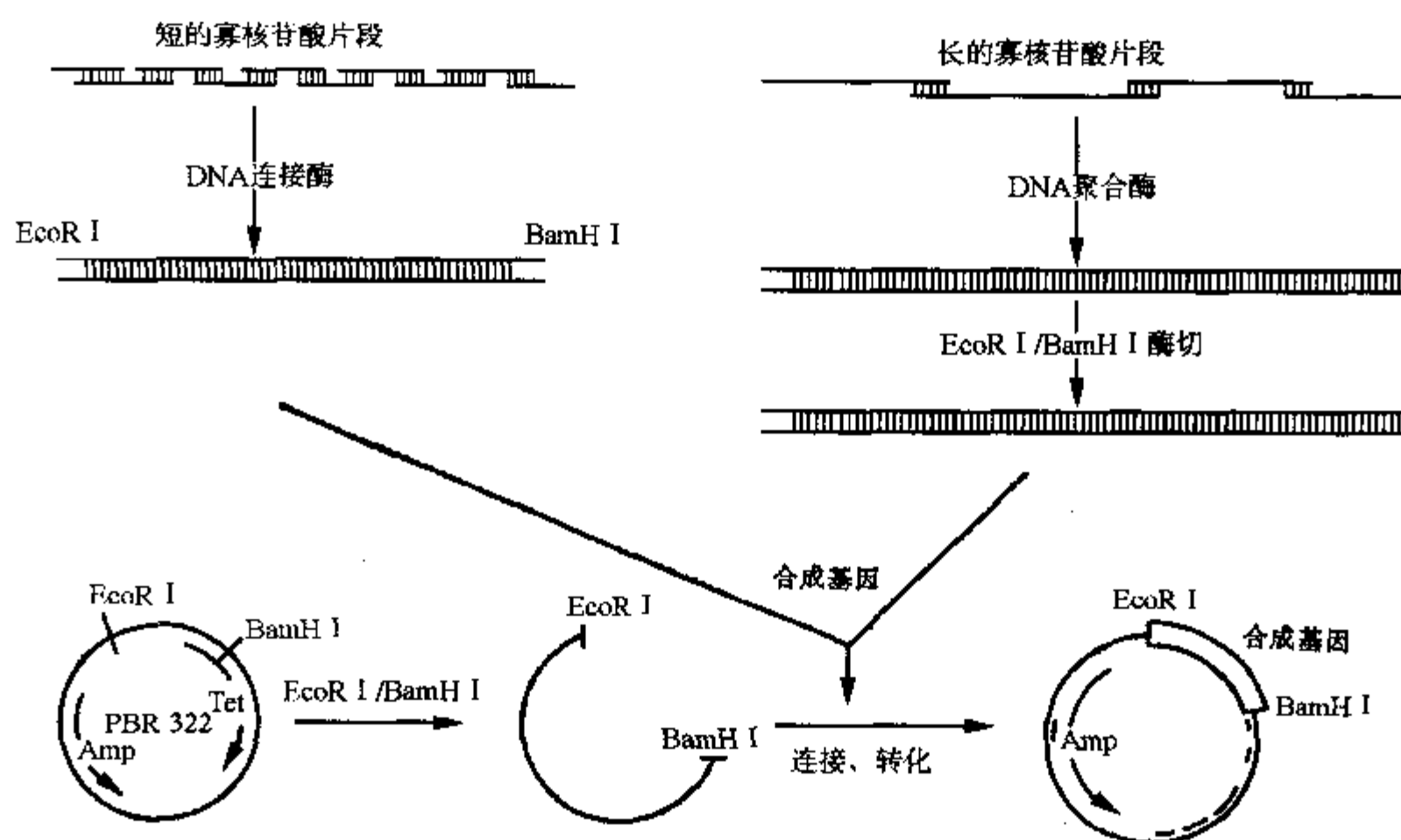


图 18-4 小片段的互补粘接和大片段酶促合成图

18.3.1.2 合成探针

基因的克隆和分离已成为现代分子生物学研究必不可少的手段。DNA 合成技术在其中起着越来越重要的作用。它不仅使得过去颇费周折的基因筛选与鉴定成为常规技术,而且使得克隆载体的构建及克隆基因和载体的连接变得更加容易和准确。蛋白质的结构可以通过 mRNA 的结构间接地得出。相反,如果已知某个肽段的氨基酸顺序,也可根据密码简并的原则推导出所有可能的 mRNA 序列密码。人工合成的具有特定顺序的寡聚 DNA 片段,已应用于筛选和鉴定重组质粒或 λ 噬菌体。实验证明用合成的寡核苷酸片段,即使只有 1 对碱基错配采用严谨条件杂交也能与完全互补的双链相区别。因此,使用作探针的寡核苷酸,应将密码的简并度调至最高限度时,可减少假阳性,增加筛选的准确率。

18.3.1.3 合成引物

1. 合成 PCR 引物进行基因扩增:

PCR 技术是 80 年代中期发展起来的一种体外扩增特异 DNA 片段的技术。该法操作简便,可在短时间内在试管中获得数百万特异 DNA 序列拷贝。PCR 技术的特异性取决于所用引物和模板 DNA 结合的特异性。合成引物在 PCR 反应中的使用,详见本书聚合酶链式反应技术的原理和应用一章。

2. 序列测定用引物:

DNA 序列测定是分子生物学中最重要和最精细的研究技术,其中最常使用的是末端终止法,即是一种依赖于特异 DNA 引物的序列测定方法,此外该法对模板的需要量较大,这就要求将待测 DNA 片段尤其是拷贝数少的片段首先克隆到适合的载体中经过扩增后进行序列测定。常用的克隆载体如 M13、pUC19、PBR322 等均可购到有商品出售的公用测序引物。

3. 合成导入突变用的引物:

利用寡核苷酸引导的突变,可在目的 DNA 序列的任何部分产生点突变、插入和缺失,从而使得基因编码的蛋白质在结构和功能上发生改变。具体方法见第 10 章。

18.3.1.4 合成连接子和接头

在 DNA 重组中常需要将外源 DNA 片段插入某些载体 DNA 中。如果载体或外源 DNA 上没有合适的限制性内切酶位点,为提高插入效率或实现定向克隆,可采用合成连接子(linker)和接头(adaptor)的方法。使用连接子和接头需要插入片段是平末端;否则,首先需要用 DNA 聚合酶 I 大片段补齐或者用核酸酶 S1 或 Bal31 处理得到平末端后才可同连接子或接头连接。

具有多酶切点的接头(polylinker)还广泛应用于构建某些运载体,使之带有多个新的酶切位点。这在质粒 pUC 系列及用于序列分析的 M13mp 噬菌体系统中都得到了广泛的应用。接头片段还用来调整表达载体的读码框架,用于基因表达及功能的研究。

18.3.2 DNA 合成在基因表达和调控方面的应用

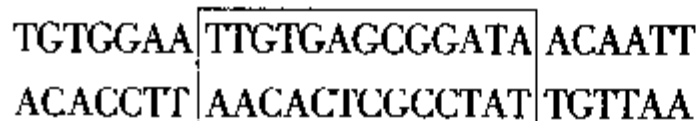
利用化学合成转录和翻译所需要的调控序列以研究基因结构与功能的关系是现代分子生物学的一个重要手段。目前已在有关转录启动子、操纵基因、核糖体结合位点等方面取得了许多有意义的结果。

18.3.2.1 转录启动子

一般来说,基因的表达调控区是一段短的 DNA 序列。例如原核基因其转录启动序列通常在 40 核苷酸以下,核糖体结合位点在 20 核苷酸以内,而转录终止序列小于 30 核苷酸。这些都在有效的 DNA 合成序列长度以内。通过对大肠杆菌多个启动子序列的研究发现,在转录起始位点上游有 2 个保守区域,即 -10 区的 TATAAT 和 -35 区的 TTGACA,它们分别是 RNA 聚合酶的结合位点和识别位点,它们和转录的效应密切相关。采用 DNA 合成的方法,人们将 lac 启动子的 -10 顺序和 Trp 启动子的 -35 顺序融合组成杂合的 tac 启动子,它的转录效率比 Trp 启动子提高 3~5 倍。还可用人合成的方法调整基因起始密码(ATG)和 SD 的序列之间序列的长度,可以获得高效的表达。

18.3.2.2 操纵基因

DNA 合成在研究蛋白质 - DNA 相互作用方面也显示了极大的优越性。在乳糖阻遏蛋白和乳糖操纵基因相互作用的研究中, 合成手段弥补了遗传分析和化学修饰技术的不足, 应用核苷类似物在某一位置取代原有核苷的方法进行体外阻遏蛋白 - 操纵基因结合试验, 帮助人们认识了 DNA 分子上功能基因的重要作用。在乳糖操纵基因的研究中, 用 DNA 合成手段证实了操作基因的活性顺序呈反转对称结构的 21kd 核苷酸, 并确定了其中 17 个核苷酸长的片段是其显示生物学活性的最短序列。



(乳糖操纵基因: 方框内为其最短活性顺序)

18.3.2.3 核糖体结合位点的研究

原核生物中翻译起始的核糖核蛋白体结合位点的顺序直接影响基因的有效表达。此调控区一般由含嘌呤的顺序组成, 其下游翻译起始密码, 二者间有 4 ~ 10 核苷酸的 SD 序列。以合成 DNA 片段取代的方法发现核糖体结合位点 GGTTAA 的存在, 具有普遍的提高表达效率的作用, 并且核糖体结合位点和起始密码之间的核苷酸数目和碱基组成都能影响翻译的效率。

18.3.3 合成基因在医学中的应用

随着科学技术的发展, 人们对疾病的认识已逐步从整体和器官的水平深入到细胞分子水平。医学家发现, 许多严重危害人类健康的疾病, 如遗传性疾病、肿瘤、心血管疾病等可在基因结构上找到某些变化, 如基因的缺失、突变、转位或致病基因的存在, 以此作为证据亦可对这些疾病作出相应的判断。例如镰刀状细胞贫血症即是由于 A → T 突变造成 β -珠蛋白第六位谷氨酸变为缬氨酸, 从而造成珠蛋白结构异常, 并引起红细胞形态及对氧的亲合力发生改变。通过人工合成的 19 个核苷酸作为探针即可明确区别正常人、杂合和纯合的病人。目前, 合成 DNA 探针已广泛应用于临床, 成为一种有效的诊断手段。

18.3.3.1 用于遗传病的诊断

过去仅有少数遗传性疾病可以凭借蛋白质和酶学方面的异常作出判断, 随着分子生物学的发展, 对遗传病的诊断有了巨大的进步, 出现了基因诊断法。医学上使用基因诊断法最早成功的报道是 1985 年 Saiki 等人对镰刀状红细胞贫血的诊断。另外, 对于以突变为主的 β -地中海贫血, 以合成 DNA 片段为探针, 亦可得出满意的结果。

18.3.3.2 用于传染病的诊断

临床上对传染性疾病的传统诊断程序常常是检测病原体及其抗体, 需时较长, 达不到早期诊断的目的。合成探针在传染病特别是由病毒感染性所致的传染病检测中, 已得到广泛应用, 尤其是结合 PCR 方法使诊断的灵敏度可进一步提高, 目前国内已制出检测乙肝病毒、艾滋病病毒 (HIV)、轮状病毒和疱疹病毒等多种基因探针诊断试剂盒。

人工合成核酸在医学上不仅可以作为一种手段, 而且在某些疾病的治疗上显露了端倪, 寡聚核苷酸及其衍生物对肿瘤的治疗已经取得可喜的进展。作为蛋白质翻译抑制剂的寡核苷酸现称为反义 RNA 或反义 DNA, 其作用原理可能有以下几种: ①反义 RNA 与体内靶 mRNA 结合形成双螺旋, 使 mRNA 不能成为翻译蛋白质的模板; ②反义 RNA (DNA) 与 DNA 结合, 影响 DNA 复制; ③反义 RNA 能阻止 mRNA 与核蛋白体结合, 降低蛋白质合成效率。

反义 RNA 或反义 DNA 是近年来国际上研究课题的热点, 人们寄希望它在抗病毒, 尤其是对艾滋病和肿瘤基因治疗上发挥重要作用, 为征服这两类严重威胁人类健康的疾病作出贡献。

(敖朝晖 文 强伯勤 审)

参 考 文 献

1. 王美岭, 韩金祥. 基因合成及其应用. 济南: 山东大学出版社, 1991
2. 黄培堂, 等. PCR 技术的原理和应用. 北京: 中国科学出版社, 1990
3. 中科院上海生物化学研究所三室核酸研究组. 生物化学与生物物理学报, 1987, 10:202
4. Applied Biosystem. Users. Bulletin: The Evaluation and Purification of Synthetic Oligonucleotides, 1987
5. Ittakura K, et al. Expression Escherichia coli of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin Science, 1977, 198:1056

19. 多肽的固相合成

19.1 多肽合成原理

自然界中有各种各样的蛋白质和活性多肽，它们具有自己特有的生物功能。这些种类繁多的蛋白质和多肽，从化学结构上看，又都是由氨基酸组成的。各个氨基酸之间通过一个氨基酸的羧基同另一个氨基酸的氨基以酰胺键（也叫肽键）结合连接成肽链，由二个氨基酸连成的叫二肽，三个氨基酸连成的叫三肽，并依次类推。

对蛋白质来说，氨基酸的排列顺序称为一级结构，由分子内或分子间的氢键、范德华力的相互作用而使蛋白质具有高级结构，即二级结构，三级结构和四级结构。一些活性多肽也在不同程度上存在着像蛋白质一样的高级结构，但由于活性多肽的肽链较短，次级键的作用力较弱，因而高级结构的表现是不完全的，而且构象的稳定性也较差。有的书上将蛋白质和多肽按照分子量来划分，即 100 个氨基酸以上的或分子量在一万以上的划为蛋白质，以下的划为多肽，但是这种划分并不是很严格，例如胰岛素由 51 个氨基酸组成，它也称为蛋白质。

化学合成蛋白质和多肽的任务就是如何把各种氨基酸按照天然产物的氨基酸排列顺序和连接方式连接起来。为了得到具有特定顺序的合成多肽，只能采用逐步缩合的定向合成方法，一般如图 19-1 所示，即先将不需要反应的氨基或羧基用适当的基团暂时保护起来，然后再进行连接反应，以保证合成的定向进行。

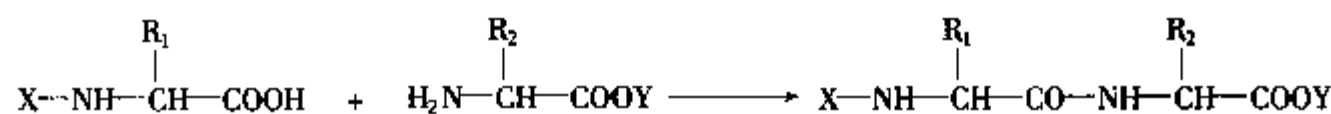


图 19-1 肽键的定向形成

多肽合成发展至今，主要有两种方法，即液相法和固相法，固相法由于其自身的许多优点，而得以广泛应用。

19.1.1 液相多肽合成的简介

在多肽合成的历史上有两位科学家 Theodore Curtius 和 Emil Fisher 是不能被忘记的，Theodore Curtius 在 1881 年第一次合成了保护的多肽，Emil Fisher 在 1901 年首次成功地合成了一个自由的二肽。Fisher 被视为多肽化学领域的创始人，在 20 世纪初人们对蛋白质的组成和结构都缺乏了解，而他已经预见到了蛋白质将被合成，并致力于这个领域的研究，为后来从事多肽化学研究的人们开辟了一块天地。从这以后的四十年多肽化学的进展非常缓慢，令人振奋的是 1932 年 Bergmann 和 Zervas 发现了苄氧羰酰基，直到这时人们才找到了一个易上易下的氨基酸的 α -氨基的保护基，但在随后的几年中，进展仍然很慢。

到了 50 年代，多肽合成取得了迅速的发展并成为一门成熟的技术。在缩合反应中除了早期 Curtius 的叠氮法和 Fisher 的酰氯法，又发展了混合酸酐法和活化酯法。活化酯是一种很好的缩合剂，它们包括硫代苯酯，氰甲酯和硝基苯酯，还有后来的各种卤代苯酯。而在这段时期中最主要的进展是 Sheehan's 小组将碳二亚胺应用于肽键的形成。

随后，在苄氧羰酰基的基础上，由 Carpino 发现了酸易脱除的叔丁氧羰酰基，接着 Zervas 实验室又

发现了酸更易脱除的邻硝基苯硫基以及 Sieber 和 Iselin 的联苯异丙氧羰基。与此同时,带有三个功能基的氨基酸的侧链保护方法和选择性地脱保护的方法都得到了显著地发展。合成中的消旋问题受到了极大的重视,并发展了一些解决消旋的方法。这时多肽化学家把注意力转到活性多肽的合成上。最具有划时代意义的是 1953 年 Vincent du Vigneaud 和他的小组成功地合成了肽类激素——催产素。很快血管加压素,短杆菌肽 S, α -促黑素 (MSH), β -促黑素,肾上腺皮质激素 (ACTH) 的片段也被成功地合成了。

这一时期的多肽合成都是采用液相法,并为今后多肽合成的发展打下了基础。

19.1.2 固相多肽合成的简介

随着生命科学的发展,新的多肽,如新的激素,释放因子,抑制剂,生长因子,生物毒素,离子载体和抗生素不断被发现,一些激素原和前激素原被分离。并直接或间接地通过 cDNA 测序,许多新的未知功能的多肽和蛋白的序列在核酸的研究中被推测出来。这些研究都迫切需要化学合成多肽和小的蛋白。合成母体化合物并确认其结构是非常重要的;有的多肽或蛋白从天然获取非常困难,通过合成便能获得比较大的量;合成的多肽的类似物对于构效关系和作用机理的研究很有价值;合成具有免疫原性的多肽对于疫苗的开发很有潜力,并对基因产物的确认和分离起着非常重要的作用。就是这些需求加速了多肽合成的发展。在液相肽合成中,每次接肽以后都需要对产物进行分离纯化或结晶,以除去未反应的原料和副产物,这个过程是一个高劳动强度的过程,往往需要花费几个月的时间而总收率却极低。为了减少这些繁琐的工作,并期望能够使接肽反应自动化, Merrifield 于 1963 年发展成功了固相多肽合成方法,并用这个方法获得了结晶的 LeuAlaGlyVal 四肽。以后又经过 Merrifield 本人以及其他实验室对这个方法进行不断的改进和完善,使之到今天已经成为多肽和蛋白质合成中最广泛应用的技术。固相多肽合成法的发明不仅大大推动了多肽和蛋白质的研究进展,同时为有机化学的固相合成,尤其是在多重合成和组合化学的发展和应用中开辟了广阔的前景。Bruce Merrifield 因为这一重大贡献而荣获 1984 年度的诺贝尔化学奖。

固相多肽合成的前提是由氨基酸组成的肽链的一端挂在一个不溶性的载体上,通常是肽链的羧基端与高分子载体连接,当设计的序列中所有的氨基酸都连在载体上后,再用一个试剂把肽链从载体上切下来并将合成完了的肽链释放到溶液中。在合成中所涉及的所有反应应当趋近于 100%,由此可得到单一的产物。将肽链连接在分子载体上的最大优点是合成中所有的纯化步骤都被省略了,而以简单的冲洗和过滤树脂代之。通过使用一个合适的反应管,所有的合成都在一个容器中完成而不需要任何从一个容器至另一个的转移。因此,液相合成中由于转移过程带来的损失和中间纯化步骤的损失消除了。简言之,固相法的优点在于简化了操作,减少了损失,所有反应及操作均在一个反应管中进行,克服了用液相法合成长肽分子时在溶液中难以溶解的问题。

固相多肽合成的基本的设计思想如图 19-2 所示。高分子载体上带有可反应的基团 (X)。要合成肽的碳端氨基酸的氨基被一易于脱除的保护基 (L) 保护。采用适当的化学方法将保护的碳端氨基酸与可反应的载体连接,从这以后固相多肽合成的循环就开始了。用一个试剂脱除连在载体上的碳端氨基酸氨基的保护基 (L),这个试剂不能破坏氨基酸与载体的连接。如果要反应的氨基酸有侧链,侧链也需要保护起来,而且侧链保护基 (S) 在整个合成中不被破坏。氨基

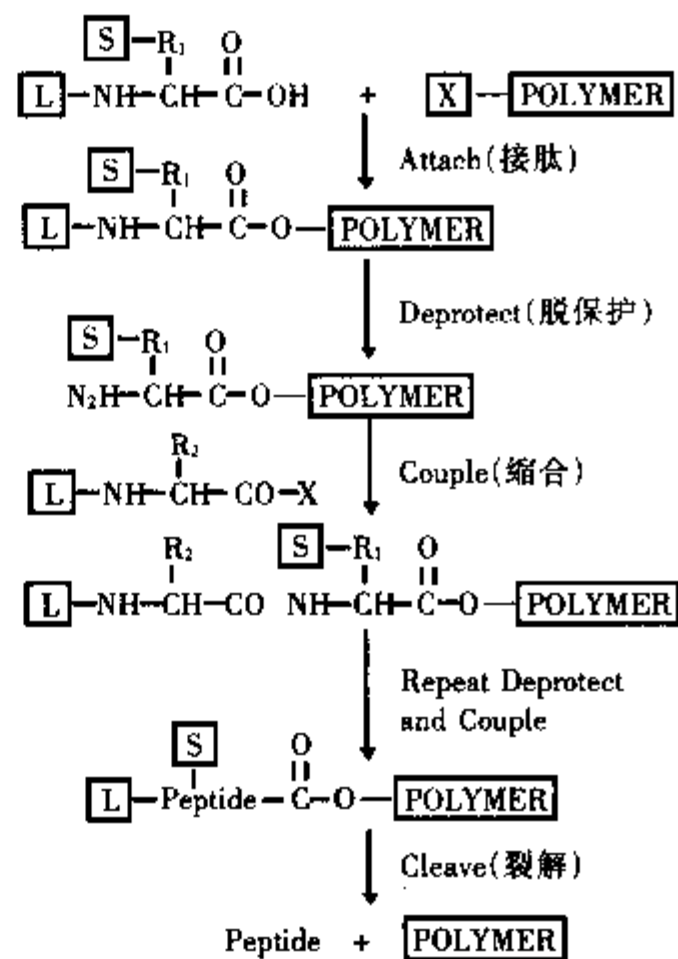


图 19-2 固相多肽合成原理

保护基脱除后,下一个氨基酸再以适当的缩合方法接到肽树脂上。脱保护和缩合的过程随着引入氨基酸而重复。最后,当保护的肽完全接在树脂上,用另一个试剂将肽从树脂上切下,侧链保护基也被同时切下。

为了保证固相多肽合成能得到单一的肽,要求每一步的脱保护和缩合反应都趋于完全,并且侧链保护基和肽与树脂的连接在整个接肽过程中保持稳定。实际上,脱保护的条件比保护基需要的条件要强得多,这是因为不仅要把最后少量的保护基脱除干净,而且对连在载体上的保护肽脱保护比在溶液中进行时要难得多。同样,每一步的缩合反应都需要过量的活化氨基酸与树脂肽反应。如果反应不完全就会导致残缺肽的出现。尽管各项反应条件要求很苛刻,但是在实际中,经验告诉我们大多数的反应基本是能够定量完成的。

19.2 固相多肽合成

固相多肽合成的基本原理如图 19-2 所示,具体的实验操作基本是一个重复的过程,但针对不同的合成要求已经发展了很多策略,不同的策略对应了不同的方法,下面就此做一概述。

19.2.1 固相多肽合成的策略

19.2.1.1 合成的策略

经典的固相合成方法即氯甲基树脂法,该方法的合成流程图如图 19-3 所示。这种方法对于大多数小肽的合成能取得满意的结果,但对于长肽来说就不太适合。这是因为用经典的固相合成法合成长肽时某些副反应就会显现出来,氨基保护基的脱除,侧链保护基的脱除以及肽树脂的裂解都是酸解反应,而成功的固相多肽合成要求这三个反应的反应性有极大的差别,把肽与树脂连接起来的酯键在脱除氨基保护基(Boc)时并不是绝对稳定的,每一次的脱保护都会导致少量的肽从树脂上切下,一般情况下这种丢失约为 1%,这对小肽的合成没有太大的影响,而对于长肽的合成就很严重。这不仅是因为肽的丢失所导致的最后产物的低产率,而且它会引起分子内的酰化反应,进一步地导致肽链的终止(见图 19-4)。这些问题可以通过两个方面来解决,一是选择更易脱除的 α 氨基保护基,或者是选择更稳定的树脂与肽的连接。这两方面的选择都已得到应用,更易脱除的保护基有 Bpoc, Ddz 和 Poc,更稳定的树脂与肽的连接有 Pam 树脂,最常用的方法是使用 Pam 树脂。决定酯键和酰胺键酸解难易的因素是羰基上的电子云密度,电子云密度越高越容易酸解,Pam 树脂由于乙酰胺基的吸电子作用,使它的稳定性比经典的氯甲基树脂强 100 倍。

并不是所有的肽在经典的固相合成中能保持稳定,如用于裂解的 HF 和 TFMSA 等强酸对有些肽是有害的。所以需要引入更温和的反应系统,这就是醚树脂(Wang 树脂),使用 Bpoc 和 Fmoc 作为氨基保护基,裂解试剂为三氟醋酸(TFA)。

在标准的固相多肽合成过程中,如果任何一步的脱保护和缩合反应不完全,都会导致丢失一个或多个氨基酸的残缺肽的出现。这不仅会导致收率的降低,而且在最后的分离中,这种残缺肽很难与产物分开。如果用小的保护肽代替单个的氨基酸进行反应,残缺肽与目的物的差别很大(不止一个氨基酸),这将有利于分离和纯化。先分别合成保护的肽段,再把这些肽段连接起来,这就是片段合成。片段合成方法用途广泛,并已经在许多合成中取得成功。片段合成还可以用于解决逐步合成中困难肽段的合成,例如,在某些情况下会出现谷氨酰胺和脯氨酸后肽链的终止,这时可以合成包括困难肽段的二肽,然后将二肽接在肽树脂上,从而避免肽链的终止。

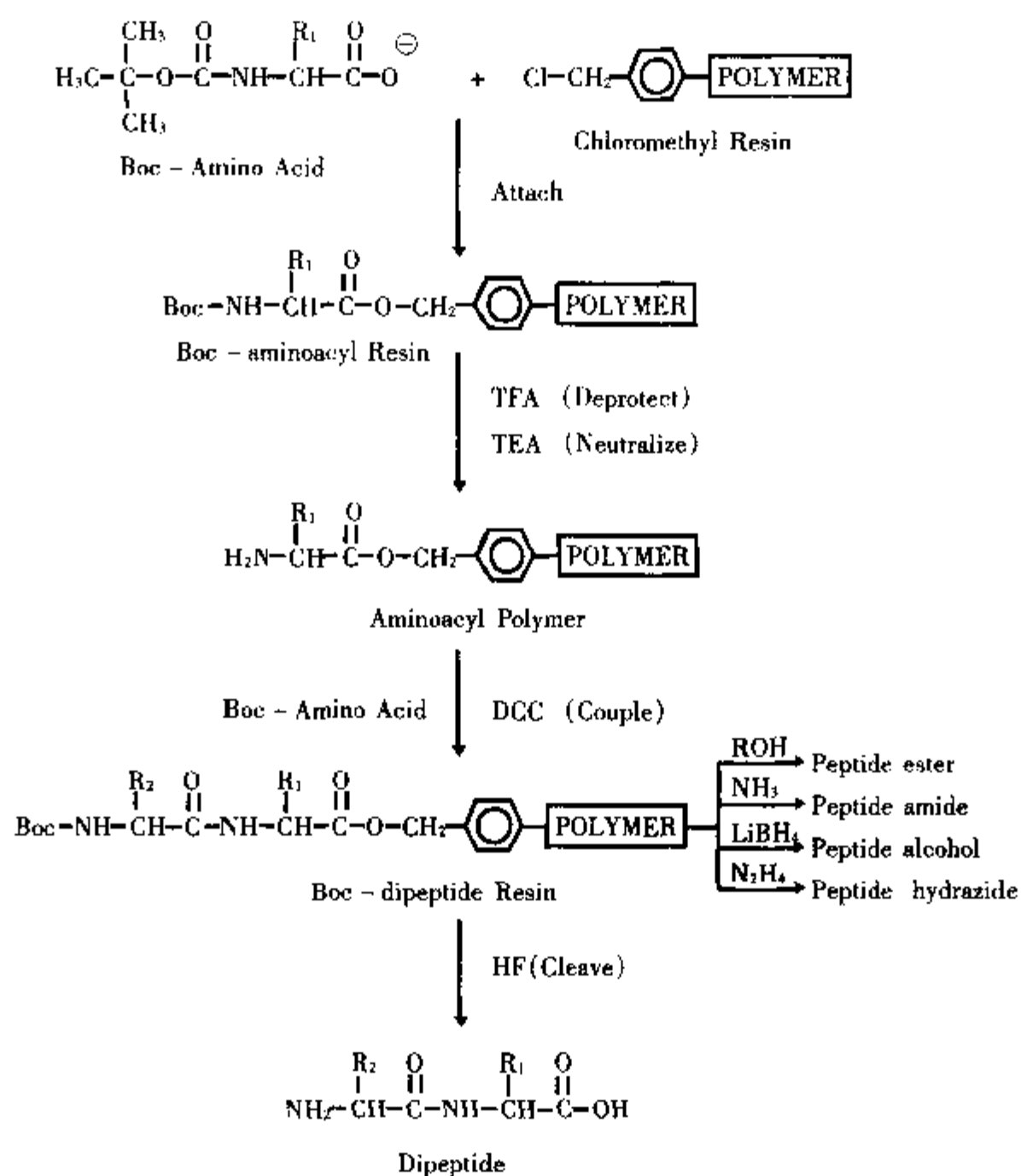


图 19-3 经典固相多肽合成流程图

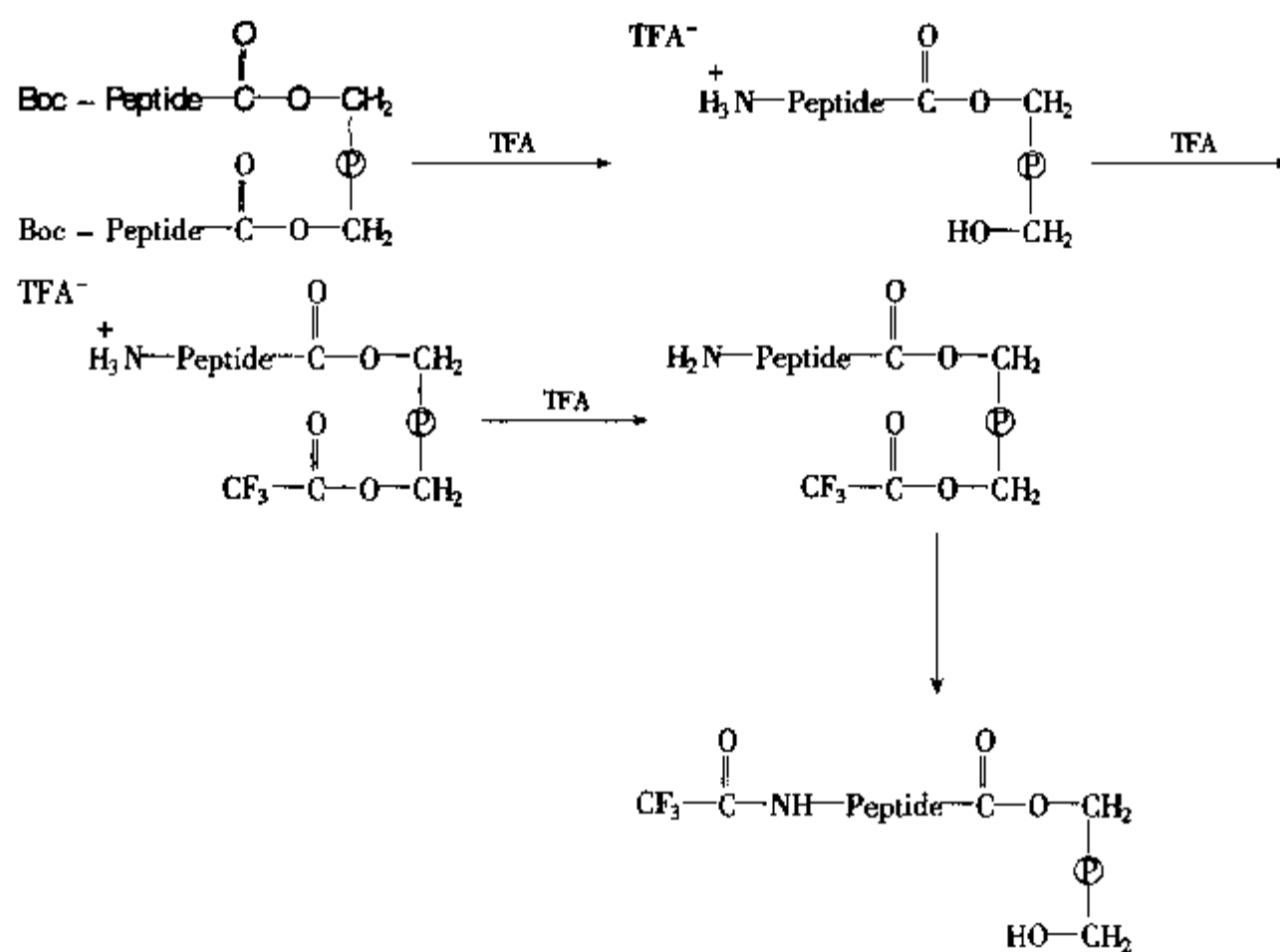


图 19-4 三氟乙酰化终止肽链的机理

另一个策略是多肽酰胺的合成。多肽酰胺非常重要, 因为很多自然的多肽激素的 C 端是以酰胺形式存在的。多肽酰胺可以用经典的固相多肽合成法通过氨解获得, 但当肽链中含有谷氨酸和天冬氨酸时, 氨解会把这两个氨基酸的另一个羧基也转变为酰胺。但是氨解反应总的来说反应很慢, 通常收率很低。这些缺点随着可以直接产生酰胺的氨基树脂的引入而被克服。这就是常用的氨基树脂 (BHA) 和氨基甲基树脂 (MBHA)。一些不同的组合, 包括合成目的, 树脂、氨基保护基, 脱保护和裂解试剂被列于表 19-1。

表 19-1 固相多肽合成的策略

SPPS System used	Peptide - resin link	Alpha protection	Deprotection reagent	Side - chain blocking	Cleavage reagent
Classical	Benzyl ester	Boc	TFA, HCl	Benzyl	HF, HBr, TFMSA
Stable (long chain)	Pam	Boc	TFA, HCl	Benzyl	HF, HBr, TFMSA
	Benzyl ester	Bpoc	Dilute TFA	Benzyl	HF
	Benzyl ester	Bpoc	Dilute TFA	t - Butyl	HF
Labile	Ether resin	Bpoc	Dilute TFA	t - Butyl	TFA
Orthogonal	Ether resin	Fmoc	Piperidine	t - Butyl	TFA
Segment synthesis	Ether resin	Fmoc	Piperidine	Benzyl	TFA
	t - Butyl resin	Fmoc	Piperidine	Benzyl	TFA
	Hydrazide resin	Fmoc	Piperidine	Benzyl	TFA
Segment assembly	Benzyl ester	Fmoc	Piperidine	Benzyl	TFA
Peptide amides	MBHA, BHA	Boc	TFA, HCl	Benzyl	HF
	Dimethoxy - alkoxybenzyl amine resin	Fmoc	Piperidine	t - Butyl	TFA
Peptide alcohols	Benzyl ester	Boc	TFA, HCl	Benzyl	LiBH ₄

19.2.1.2 树脂的选择

随着多肽化学的发展, 开发出了适应各种需求的树脂, 这些树脂可以根据不同的用途从两个方面来分类。一方面, 有些树脂可以用强酸, 中等强度的酸, 或弱酸来裂解, 有些可以用碱和其他的亲核试剂来裂解, 有些可以用光解, 氨解或其他催化剂来裂解。另一方面, 有些树脂裂解后产生游离的羧基, 有些产生酯基, 有些产生酰胺, 有些产生酰肼。对树脂的研究从固相多肽合成的早期就开始了, 但近几年发展最快。下面简要介绍一下常用的树脂。

用强酸 (HBr, HF, TFMSA) 裂解的树脂, 最早的就是氯甲基树脂, 与之相匹配的是以 Boc 为 α -氨基保护基和以 Benzyl 为基础的侧链保护基。4 - Hydroxymethylphenyl acetamidomethyl resin (Pam 树脂) 的引入极大地改善了肽与树脂连接的稳定性, 与之相匹配的保护策略是 Boc/Benzyl 保护基, 最后用 HF 裂解。Wang 和 Merrifield 在 1971 年开发出了避免使用强酸而用中等强度的酸 (如 TFA) 裂解的树脂: t - alkoxycarbonylhydrazide resin 和 t - alkylalcohol resin, 它们与对酸很敏感的 Bpoc 保护基联用, 合成保护的肽片段, 再进行进一步的合成。紧接着, 1973 年 SS Wang 发明了 Wang 树脂, 这种树脂常与用碱脱除的 Fmoc 保护基联用。随后又开发出许多用稀的 TFA 裂解的树脂, 如 Sheppard and Williams (1982) 的 HM-PA/PAB 树脂, Albericio and Barany (1985) 的 PAB 树脂, Mergler, et al. (1988) 的 SASRIN 树脂, Albericio and Barany (1991) 的 HAL 树脂等。这些用弱酸裂解的树脂不能使用酸易脱除的 α -氨基保护基, 可以使用别的保护基如 Fmoc。上述的树脂裂解后产生的肽末端为游离的羧酸。

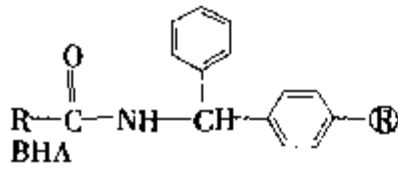
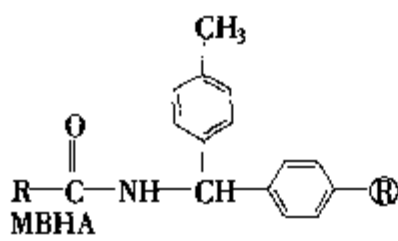
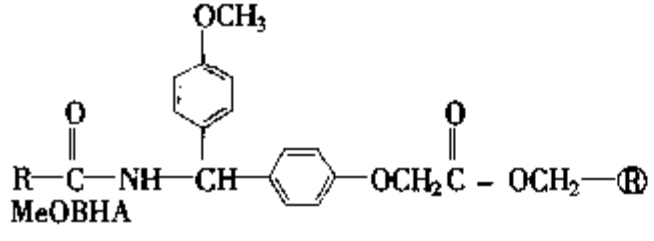
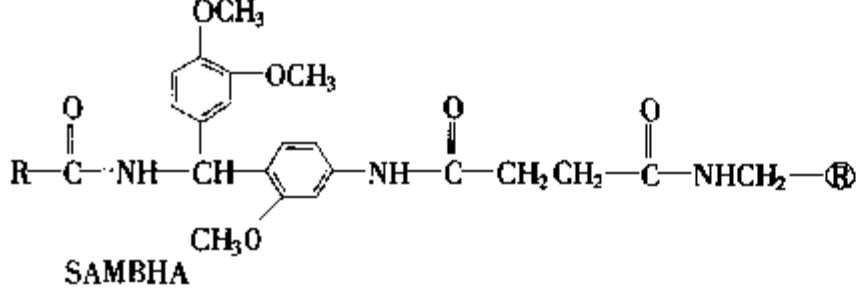
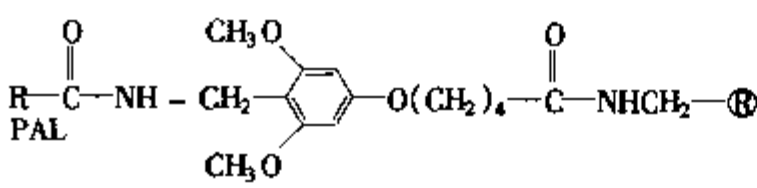
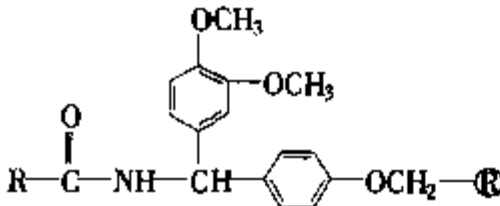
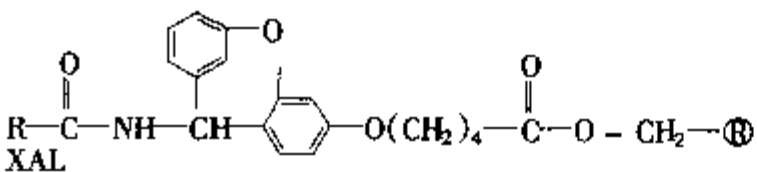
表 19-2 产生羧酸末端肽的酸裂解的树脂

Entry	Structure	Ester	Cleavage reagent	Ref.
1	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{OCH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{R}^{\oplus}$	Benzyl	HBr, HF, TFMSA	Merrifield (1963)
2	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{OCH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{NHCH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{R}^{\oplus}$ PAM	Hydroxymethyl - phenyl acetamidomethyl	HF	Mitchell et al. (1978)
3	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{OCH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OCH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{R}^{\oplus}$	Alkoxybenzyl	TFA	Wang (1973)
4	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{OCH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OCH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{NH}-\text{Poly Amide}$ HMPA/PAB	Acetoxybenzyl	TFA	Sheppard and Williams (1982)
5	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{OCH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{NHCH}_2-\text{R}^{\oplus}$ PAB	Hydroxymethyl - phenoxypropionyl	TFA	Albericio and Barany (1985)
6	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{OCH}_2-\text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3\text{O})_2-\text{OCH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{NH}-\text{Poly Amide}$	Methoxyacetoxy - benzyl	Dilute TFA	Sheppard and Williams (1982)
7	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{OCH}_2-\text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3\text{O})_2-\text{OCH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{R}^{\oplus}$ SASRIN	Methoxyalkoxybenzyl	Dilute TFA	Mergler et al. (1988)
8	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{OCH}_2-\text{C}_6\text{H}_2(\text{CH}_3\text{O})_3-\text{O}(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{NHCH}_2-\text{R}^{\oplus}$ HAL	Hydroxymethyl - dimethoxy - phenoxyvaleryl	Dilute TFA	Albericio and Barany (1991)
9	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{OCH}(\text{C}_6\text{H}_3(\text{OCH}_3)_3)-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OCH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{R}^{\oplus}$	Alkoxy - dimethoxybenzhydryl	Dilute TFA	Rink (1987)
10	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{O}-\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{R}^{\oplus}$ Cl	Chlorotrityl	Dilute TFA Barlos et al. (1989)	

R^{\oplus} = Copoly (styrene - 1% divinylbenzene) resin

注: 均从 R-COO- 处裂解得到含羧酸末端的肽

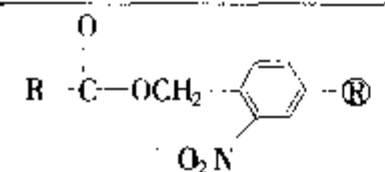
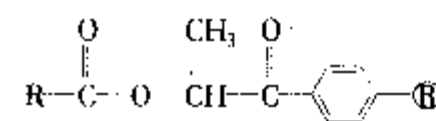
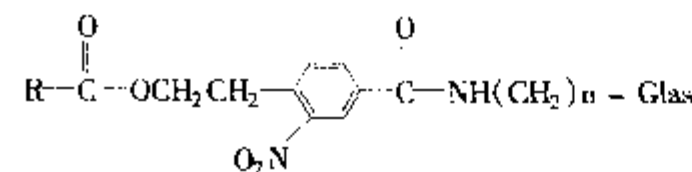
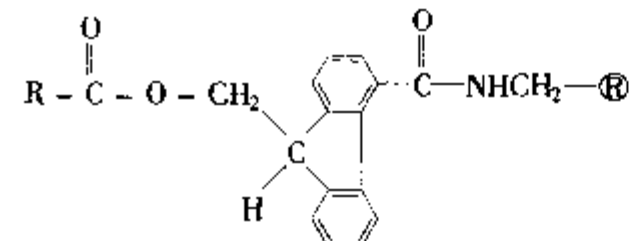
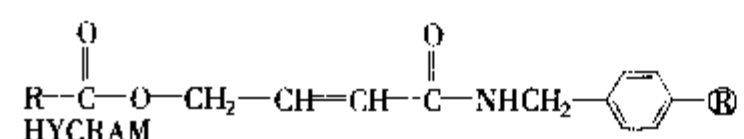
表 19-3 产生酰胺末端肽的酸裂解的树脂

Entry	Structure	Type	Cleavage reagent	Ref.
1	 BHA	Benzhydrylamine	HF	Pietta and Marshall (1970)
2	 MBHA	Methyl - benzhydrylamine	HF	Matsueda and Stewart (1981)
3	 MeOBHA	Methoxy - benzhydrylamine	TFA	Stüber et al. (1989)
4	 SAMBHA	Trimethoxy - benzhydrylamine	TFA	Penke and Nyerges (1989)
5	 PAL	Aminomethyl - dimethoxyphenoxy - valeryl	TFA	Albericio and Barany (1987)
6		Dimethoxybenzhydryl	Dilute TFA	Rink (1987)
7	 XAL	Aminoxanthyl - oxyvaleryl	Dilute TFA	Sieber (1987)

酸裂解产生酰胺的树脂与酸裂解产生羧酸的树脂情况相似，也可以分为强，中，弱酸裂解三种类型。用强酸裂解的树脂有 BHA 树脂和 MBHA 树脂，以 Boc/Benzyl 为保护策略，HF 裂解。在苄胺的苯环上适当地引入甲氧基能够增强树脂对酸的敏感度。Stüber, et al. (1989) 的 MeOBHA 树脂和 Penke and Hyerges (1989) 的 SAMBHA 树脂可以用 90% 的 TFA 裂解。Albericio and Barany (1987) 的 PAL 树脂可以用 50% 的 TFA 裂解。而 Rink (1987) 的 Dimethoxybenzhydryl resin 和 Sieber (1987) 的 XAL 树脂用稀的 TFA 就可以裂解。

非酸裂解的树脂有光解型的树脂，如 Rich and Gurwara (1975) 的 Nitrobenzyl resin 和 Wang (1976) 的 Phenacyl resin。碱解型的树脂有 Eritja, et al. (1991) 的 Nitrophenylethyl resin 和 Mutter and Bellof (1984) 的 Fluorenylmethyl resin。Birrr, et al. (1991) 开发的 HYCRAM resin 在金属钯 (Pd) 的催化下，在中性条件下释放出完整的保护肽。

表 19-4 非酸裂解的树脂

Entry	Structure	Type	Cleavage reagent	Ref.
1		Nitrobenzyl	<i>hν</i>	Rich and Gurwara (1975)
2		Phenacyl	<i>hν</i>	Wang (1976)
3		Nitrophenylethyl	Piperidine	Eritja et al. (1991)
4		Fluorenylmethyl	Piperidine	Mutter and Bellof (1984)
5		Allyl ester	Pd (O)	Kunz and Dombo (1988)

19.2.1.3 保护的策略

一个成功的多肽合成需要有完整的保护策略。固相多肽合成至少需要两个水平的保护。肽链必须通过可以裂解的但又对反复的脱保护过程稳定的化学键与树脂连接，侧链保护基也必须对脱保护过程稳定，而且对于某些合成目的它们还必须对裂解试剂稳定。传统的选择策略是通过反应的动力学差别来实现的。例如，Boc 保护基能够被 4N HCl/dioxane 或 50% TFA/DCM 脱除，与此同时以 Benzyl 为基础的侧链保护基和肽与树脂的连接却保持稳定，它们需要用比 TFA 更强的酸 HBr, HF, 或 TFMSA 切下。后来发展起来的 Fmoc 保护基用于正交策略，氨基的保护基 Fmoc 用碱脱除而对酸稳定，侧链保护基和肽与树脂的连接对碱稳定，它们需要用 TFA 脱除。正交策略的优越性在于脱保护和切树脂的条件都比较温和，对肽的损害小。但由于用 Fmoc 保护的氨基酸价格昂贵，不能完全取代 Boc 系统，所以目前这两个系统都比较常用。在多肽化学的发展过程中也还有其它类型的保护基，如 Bpoc, Nps, Ddz, Azoc, Adpoc, Msz, Bnpeoc, Noc, Dts 等等，由于用途不广就不再细述了。

对于侧链保护基来说，Benzyl 的衍生物与 Boc 保护基联用，这些保护基都能被 HF, HBr 和 TFMSA 脱除，只有 Arg (Tos) 不能被 HBr 和 TFMSA 脱除。对于 Fmoc 保护基来说主要是与 t-Butyl 的衍生物联用。

对于精氨酸来说，胍基的保护基有经典的 -NO₂ 和 -Tos，但 -NO₂ 需要氢解脱除，-Tos 必须用 HF 脱除，对于以 Fmoc 为氨基保护基的系统来说，需要对酸更敏感的侧链保护基。于是开发出了更易被酸裂解的 Mts 保护基，可以用 TFMSA 脱除；以及可以用 TFA 脱除的 Mtr 保护基，Mtr 用 TFA/thioanisole 脱除需要 1 小时，对于某些困难肽段需要 6 小时。后来开发出了 Pmc 保护基，更易脱除，50% TFA/CH₂Cl₂ 1 小时能脱除，但有多数 Arg (Pmc) 时，TFA 不能完全脱除 Pmc，Shroff et al. (1994) 引入了 Pmc 的类似物，更易脱除的 Pbf 保护基。

组氨酸在活化和缩合过程中非常容易发生消旋，这是因为咪唑基 π-氮原子合适的位置和足够的碱性导致它能在羧基活化时分子间地夺取 α 碳上的质子，从而引起消旋。解决问题的方法可以从两个方面入手：①在 N^ω 上引入吸电子基 Dnp 可以有效地减少咪唑环上的碱性，从而只引起 0.3% 到 0.7% 的消

旋；②在 π -氮原子上引入特殊的保护基，对于 α 氨基以Boc保护的氨基酸， π -氮原子以Bom保护，对于 α 氨基以Fmoc保护的氨基酸， π -氮原子以Boc或Trt保护，可以避免消旋。Dnp保护基必须在裂解前采用硫酚除去，操作起来稍显麻烦。

天冬氨酸和谷氨酸的侧链羧基通常用苄基保护为 β -苄酯和 γ -苄酯，它们在酸或碱的催化下很容易发生环化副反应，改用位阻较大的环戊醇酯或环己醇酯能减少此副反应。

天冬酰胺和谷氨酰胺通常不用保护侧链酰胺基，但在活化和缩合时会发生脱水副反应，在强酸催化下也会发生环合反应，目前已开发的保护基有Xan, Dmob, Trt, Mtt等。

色氨酸在缩合反应中往往不需要保护吲哚环上的氮。有些人选择甲酰基保护，其目的在于可以避免环被正碳离子进攻。甲酰基在HF裂解前要用哌啶除去，或采用低浓度-HF裂解将其除去。现在又有了别的保护基如Ppt保护基，0.25mol/L甲磺酸-硫代苯甲醚-TFA或四正丁基氟化铵脱除；Alloc保护基，用 $\text{Pd}^0(\text{PPh}_3)_4$ 或50%的哌啶水溶液脱除。

人们对半胱氨酸的保护，脱保护，二硫键的形成进行了广泛的研究，用于Boc化学的保护基有：4-MeBzl, HF脱除；Acm, I_2 脱除；S-t-Bu, 硫酚或磷脱除；Npys 硫酚或碱；Fm, 硫酚或碱。用于Fmoc化学的保护基有：Acm, I_2 脱除；S-t-Bu, 硫酚或磷脱除；Trt和Tmob, TFA脱除。

19.2.2 缩合反应

在固相多肽合成中，肽键的形成即使是有位阻的组分也必须是快速和完全的，而且还不能有消旋和其它的副反应。只有这样才能得到没有残缺，插入，或修饰的肽。缩合反应要求先将氨基酸活化，然后再进行缩合，实际中通常是羧基组分被活化，然后与肽树脂反应。羧基组分的活化是通过缩合剂来实现的。下面介绍几种常用的缩合剂及缩合方法。

19.2.2.1 DCC

固相多肽合成中第一个非常成功的活化试剂是二环己基碳二亚胺(DCC)，至今它仍然是一个很常用的缩合剂。DCC与保护的氨基酸反应，首先生成活化中间体O-酰基脲，它再以不同的途径反应(图19-5)：①直接与氨基组分反应；②与另一摩尔的羧基组分反应形成对称酸酐中间体；③这时加入酸性的醇，如1-羟基苯并三氮唑(HOBt)，就可以产生活泼酯；④重排为没有活性的N-酰基脲。这些都

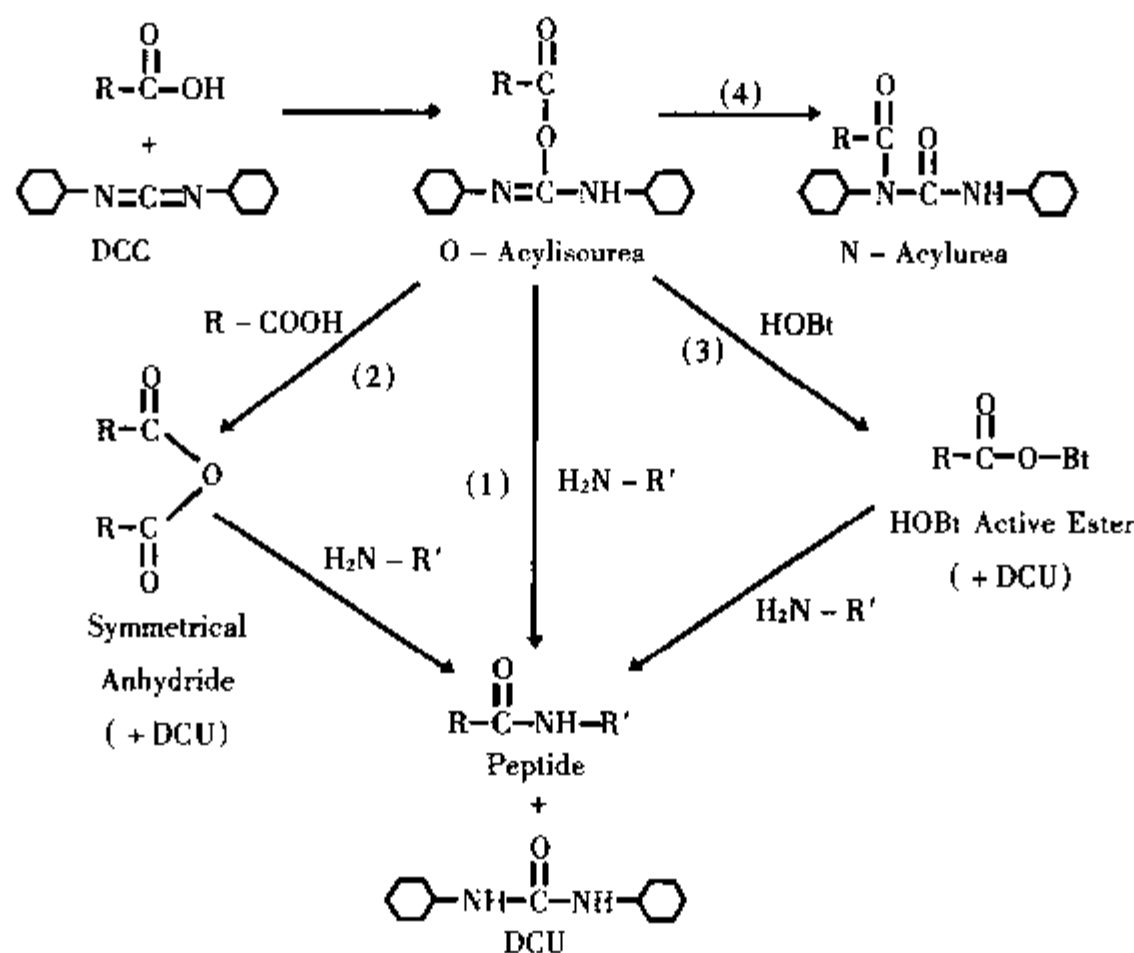


图 19-5 DCC 接肽的反应机制

是根据不同条件的竞争性反应。用 DCC 活化羧基时, 通常加入等摩尔的碱来催化, 过去使用三乙胺会导致消旋, 后来改用位阻较大的 DIEA 和 N-甲基吗啡啉来减少消旋的发生。另一个有效的措施是采用 DCC-HOBt 复合缩合剂。

19.2.2.2 活泼酯

Bodanszky 和 Sheehan (1964) 将对硝基苯酯引入固相合成中, 这个试剂被用来活化 Asn 和 Gln, 从而防止脱水副反应的发生。它很快被其它的反应性更好的活泼酯所取代, 它们是: N-羟基琥珀酰亚胺 (HOSu), 1-羟基苯并三氮唑 (HOBt), 3-羟基-4-氧-3,4-二氢苯并三氮唑 (Dhbt), 5-chloro-8-hydroxyquinoline, Pentafluorophenol 等等。Pentafluorophenol 和 Dhbt 活泼酯都能被 HOBt 所催化, HOBt 在 DCC 法中不仅可以防止 N-酰基脲的形成和抑制消旋, 而且还可以减少 Asn 和 Gln 酰胺基的脱水副反应。

19.2.2.3 对称酸酐法

继 DCC 和活泼酯法以后, 氨基酸的酸酐法开始引入固相多肽合成中。混合酸酐法是非常有效的方法, 但是不可避免的错位反应使它不能广泛的应用。当对称酸酐法引入后, 大家认为这是非常好的方法, 对称酸酐可以合成, 并以结晶的形式存在, 有利于保存。

19.2.2.4 新的缩合剂

在多肽合成中有时会遇到难以合成的肽段, 用普通的缩合剂难以反应完全, 很多多肽化学家致力于寻找更有效的缩合剂以解决这个难题。BOP 就是这样一个非常重要的试剂, 它能使缩合反应快速而高效。BOP 是磷盐的衍生物, 继 BOP 后又开发出一系列磷盐的衍生物: PyBOP, BroP, PyBroP, PyCloP。继磷盐以后, 发现脲盐也是很有效的缩合剂, 常用的有 HBTU 和 TBTU。除此之外还有 TSTU, TBPipU, TP-TU, TBPYU, TDBTU, HATU, TATU 等等。HBTU 和 TBTU 对固相合成非常有效, TPTU 对片段缩合是最好的试剂, TDBTU 对减少消旋是最好的。这些缩合剂的结构式见图 19-6。

19.2.3 反应的监测

在液相合成中, 每一次的缩合产物都可以通过结晶或层析来纯化。但在固相合成中, 这个步骤被简化了, 只是用溶剂反复洗去过量的未反应的羧基组分, 未反应的氨基组分则和缩合产物一道留在树脂上而不能分离除去。这种未反应的残留氨基组分越多对合成越不利, 因此, 在合成过程中掌握每一次缩合的完全程度对固相合成来说是很重要的。

目前测定树脂上氨基组分的残余氨基量是监测缩合反应完全与否的最常用的方法。其方法有:

(1) 茚三酮法 (Kaiser test): 此法简便快速, 是最常用的检测缩合反应是否完全的方法。将茚三酮试剂与树脂上氨基反应, 每克树脂 $5\mu\text{mol}$ 氨基就能给出轻微的蓝色。阴性反应为浅黄色。Asp (OBzl) 和 Pro 的氨基给出棕色或红棕色, 很难与背景区别, 因而不能用此法鉴定。茚三酮法用于定性时非常方便, 可以用肉眼观察, 用于定量时在 570nm 处测定吸收 (详见实验部分)。

(2) 苦味酸法: 苦味酸与树脂上氨基成盐, 然后用二异丙基乙胺将苦味酸置换下来。在 358nm 测定苦味酸的二异丙基乙胺盐的吸收, 该方法的灵敏度为 $0.2 \sim 1.0\mu\text{mol}$ 。

(3) 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS) 法: TNBS 与树脂上的氨基反应, 产生橙红色, 阴性反应为铁灰色。灵敏度为 $3\mu\text{mol}$ /克树脂。脯氨酸不能被检测。

(4) 荧光胺法: 荧光胺与氨基反应后, 在 360nm 处测定吸收, 这个方法非常灵敏, 灵敏度达 $0.6\mu\text{mol}$ /克树脂。脯氨酸不能检测。

(5) 四苯氯醌法: 四苯氯醌与树脂上氨基反应产生绿色或蓝色, 灵敏度为 $5\mu\text{mol}$ /克树脂。

(6) 氨基酸分析: 将肽树脂水解后测定氨基酸比例, 这种方法的准确性低。

载体之间连接的键的断裂以及侧链保护基的脱除等,还可采用碱性与 α -氨基相近的N-甲基吗啡啉来进行中和。

Fmoc 保护基对酸很稳定,需用碱性脱保护试剂如哌啶的二甲基甲酰胺(DMF)溶液脱除。除哌啶外,它也能被三级胺缓慢分解。Fmoc 保护基被碱脱除后,不需要进行中和反应。

19.2.5 合成中应注意的问题

在固相多肽合成中,也有一些不希望的副反应发生:

(1) 肽从树脂上的丢失:通常肽从树脂上的丢失是由于肽与树脂的连接对于反应条件缺乏足够的稳定性。在经典的 Merrifield 固相合成中,在每一个脱保护的循环中,都会有1%的肽从树脂上丢失,而 Pam 树脂与肽的连接要稳定100倍,所以 Pam 树脂的引入就可以解决这个问题。另外,也可以通过选择更易脱除的保护基来解决。引起肽从树脂上的丢失的另一个原因是二肽环合为二酮哌嗪衍生物(图19-7)。由于这个副反应是由弱酸来催化的,在实验中可以通过颠倒缩合反应中 Boc 保护的氨基酸和 DCC 的加料顺序来解决。

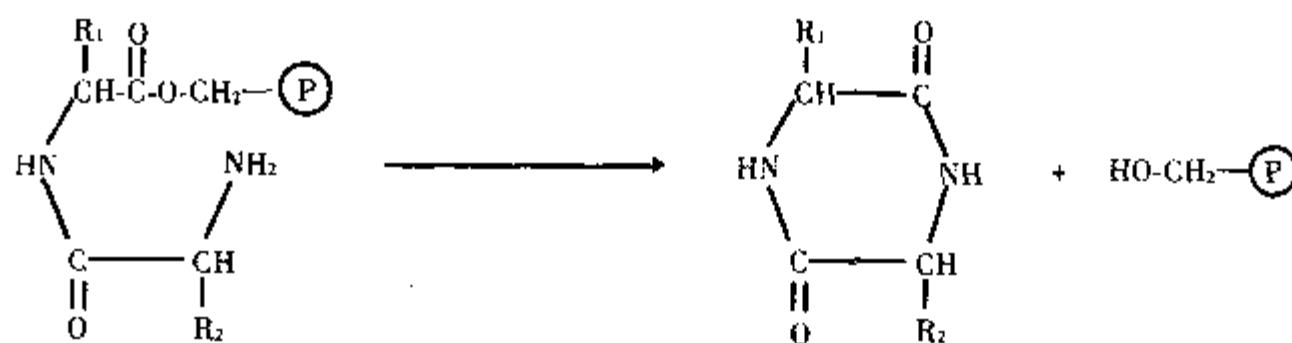


图 19-7 二肽通过二酮哌嗪裂解

(2) 肽链的终止:在经典的固相多肽合成中,肽链的丢失伴随着三氟乙酰化就可能导致肽链的终止。为避免此副反应可以通过增强肽与树脂的连接和不使用非羧基的酸脱保护来实现。如果在缩合反应时还残留有三氟乙酸,它会被 DCC 活化而导致肽链的终止。这可以通过使用对称酸酐法或活泼酯法来避免。在某些情况下,肽链可能会停止增长。在某些序列中,Boc 保护基可能会对脱保护试剂不敏感。在另一些情况下,肽链的氨基组分可能被包埋在树脂中,从而无法与活化了的氨基酸反应。这种困难通常用改变溶剂来克服。例如,如果反应监测显示反应没有完全,原来的缩合反应使用的是二氯甲烷。可以用 DMF 作溶剂再缩合一次。有趣的是,如果氨基不容易进行缩合反应,它也不容易与检测试剂反应,从而导致假阴性结果。

(3) 残缺肽:在固相合成中,如果任何一个缩合反应不能进行完全,在下一个缩合反应中就会有二个氨基组分出现,其中的一个比另一个少一个氨基酸。在紧接着的缩合反应中,这两个氨基组分都可能被酰化,从而产生两条肽链,一条比另一条少一个氨基酸。一个有立体位阻的氨基酸不能反应完全,而下一个氨基酸没有立体位阻,它很容易与残留的氨基组分反应,在这种情况下,容易发生残缺肽。由于很多比较大比较复杂的肽已被合成,因此发现了更多的困难肽段,说明反应的监测非常重要。当发现有缩合反应不完全时,可以反复地再进行缩合,同时改变溶剂和缩合试剂,如果反应仍然不能完全,就只能将未反应的氨基用酰化封闭。这种方法对小肽和中等大小的肽非常有效。酰化的副产物很容易与产物分离。对于长肽来说,如果这种酰化反复发生,就会导致最后产物收率很低,而且副产物与产物的分离也比较困难,所以在长肽的合成中,每一步缩合都应该尽量完全,另一个解决的方法是使用片段肽缩合来避开困难肽段。在具体的实验中还可能遇到很多问题,这就需要查阅文献灵活处理。

19.2.6 肽从树脂上的裂解

根据肽与树脂的连接不同,可以采取不同的裂解方法,下面就常用的几种方法作一介绍。

19.2.6.1 HF 裂解

Sakakibara 和 Shimonoshi (1965) 发明的 HF 裂解法被 Lenard 和 Robinson (1967) 用于固相合成中。这是一个非常普遍的方法,但在使用中也有些问题。像 HF 这样很强的酸,除将肽从树脂上裂解下来外,还可能催化各种副反应。常用的 HF 裂解试剂为 90% HF + 10% 苯甲醚,其中苯甲醚是清除剂。切除侧链保护基的反应是 S_N1 反应,由此产生的苄基正碳离子或酰基阳离子成为强的烷基化和酰基化试剂,它们可以被清除剂捕获,也可以与肽链中的亲核的氨基酸反应产生副产物(图 19-8)。

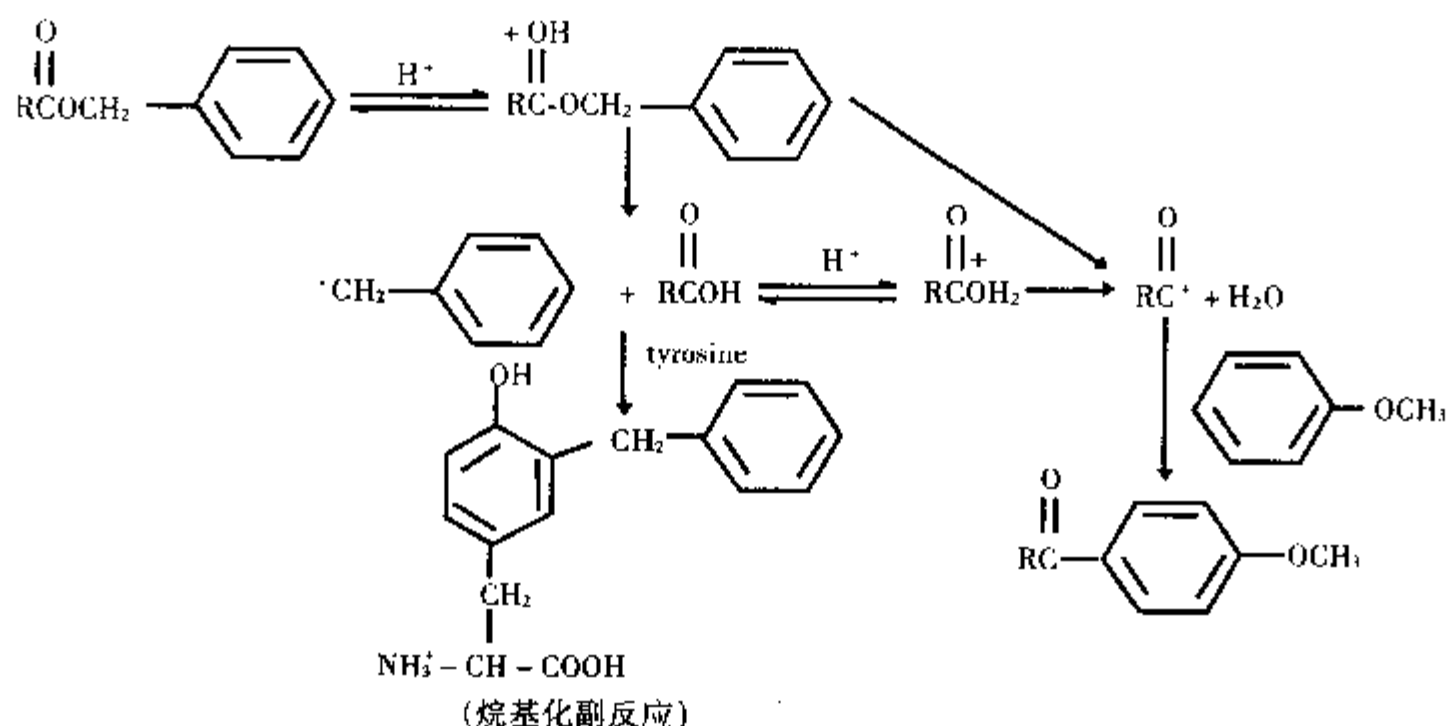


图 19-8 强酸通过 S_N1 裂解机理产生的副反应

Tam (1983) 引入了低/高浓度 - HF 裂解法来解决这个问题,由此 Tam 设想: HF 与一个合适的弱碱混合来降低 HF 的酸性,同时未质子化的弱碱作为一个有效的亲核剂去捕获苄基正碳离子或酰基阳离子。这个亲核剂可以辅助切除侧链保护基的反应以 S_N2 反应进行。在这种机理中,苄基或酰基被转移给碱,不能形成游离的苄基正碳离子或酰基阳离子。被捕获的阳离子是非常弱的烷基化试剂,避免了有害的副反应。这种理想的弱碱和强的亲核剂就是二甲硫醚 (DMS), DMS/HF 以 3:1 的比例混合,再加上 10% 的对甲基苯酚,这个混合物的酸度被降低了,这种酸度足以裂解酯,酰胺,醚和脲,而大部分未被质子化的 DMS 作为有效的亲核试剂去捕获裂解下来的阳离子。这种低浓度 - HF 试剂切除大部分的保护基并避免了强酸裂解所带来的副反应(见图 19-9)。这个试剂也可以将蛋氨酸 (Met) 亚砷还原为硫醚;在低浓度 - HF 中加入 5% 硫代对甲基苯酚,可以干净地脱掉色氨酸的侧链保护基甲酰基。肽与树脂的连接,以及肽链中含有 Arg (Tos), Cys (MeBzl) 时,需要用高浓度 - HF 试剂 (90% HF, 5% 对甲基苯酚, 5% 硫代对甲基苯酚) 进行第二步反应。由于大部分有害的正碳离子已经在第一步被除去,第二步只有极少的副反应发生。这种低/高浓度 - HF 裂解法现已被广泛应用。

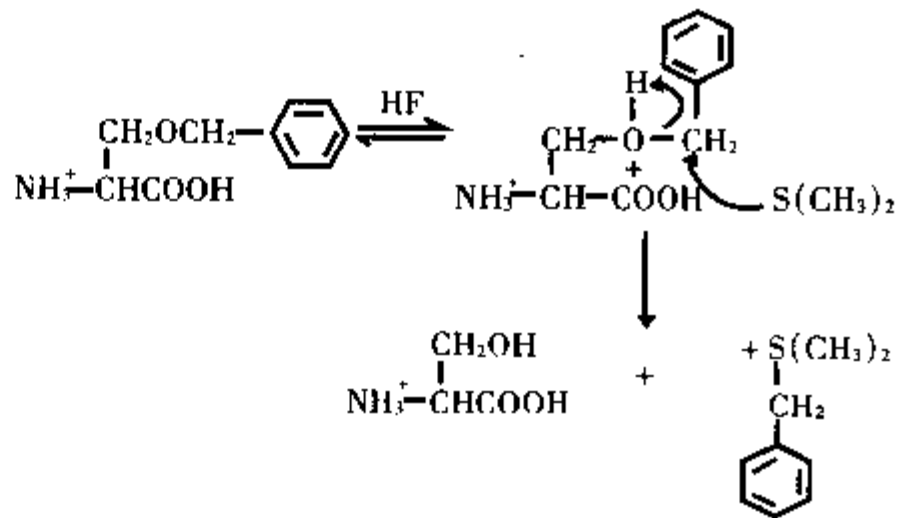


图 19-9 低浓度 - HF 在二甲硫醚中以 S_N2 机理裂解 Ser (Bzl) 的侧链保护基

19.2.6.2 TFMSA 裂解

Yajima 等 (1974) 将三氟甲磺酸 (TFMSA) 作为脱保护试剂引入多肽合成中。作为 HF 裂解法的补充, Tam 等 (1986) 指出 TFMSA, TFA 和 DMS 的混合物可以在 S_N2 机理下用于固相合成的脱保护和裂解树脂。由于 HF 裂解反应需要特殊的实验装置, 当没有 HF 裂解装置时, TFMSA 也是一个选择。TFMSA 裂解与 HF 裂解相似, 也有低/高浓度裂解法, 原理与 HF 裂解相似, 但却可能出现较多的副反应和裂解不完全的问题。

19.2.6.3 TFA 裂解

人们也研究了用强度弱一些的酸进行裂解, 肽与树脂的连接已经设计为可以被 100% 至 1% 的 TFA 裂解, 有的甚至可以用醋酸裂解。这些树脂只能用于脱氨基保护基不是用酸而是用别的试剂, 如 Fmoc 是用碱脱除, 与之相匹配的 Wang 树脂用 TFA 裂解。

19.2.7 粗肽的纯化

凝胶层析对于小肽的纯化非常有用, 对于大一些的肽有很多方法可以选择, 经过第一步的凝胶层析可以得到分子量相近的部分。但是必须注意的是肽与肽和肽与凝胶的相互作用会导致多肽不按照分子量的顺序流出, 这种失常的情况可以通过使用强的醋酸溶液或流动相中加入吡啶来克服。进一步的纯化需要使用不同的纯化方法, 相同的方法反复使用不能得到好的结果。半制备型和制备型的 HPLC 在纯化合成的多肽中起着相当重要的作用。对于合成的大肽要选择适当的方法纯化, 如透析, HPLC 或亲和层析都是有用的方法。

在实验中不能通过一个方法来决定合成多肽的单一性。HPLC 具有很强的解决这个问题能力, 它在确定多肽的单一性方面非常有用。需要强调的是用等比例的流动相 (恒流) 得到的单峰不能证明产物的单一性。样品中可能含有其它的组分在别的条件有很强的吸收而在现在的条件下观察不出来。因此恒流和梯度洗脱都要使用。大幅度的梯度洗脱可以覆盖的范围很宽, 大多数不同性质的化合物都能检测到。恒流洗脱可以将谱图上与主产物的峰邻近的峰分开。要选择一个恒流比例使多肽有一个合适的保留时间, 如果流出太快, 多肽不能与流出快的组分分开。对于正常分离量和超载分离要选择不同的恒流比例, 超载分离要求更高的分离度。

总之, 鉴于固相多肽合成是逐步接肽, 最后肽从树脂上裂解下来后方能进行纯化, 因此, 为使合成成功, 必须非常仔细地进行每一步缩合和有关的各项实验操作。

19.3 环肽的简介

人们对环肽的兴趣可以追溯到半个世纪以前, 当时发现了一个具有抗菌活性的短杆菌肽 S, 它是一个环十二肽, 从那时到今天, 又发现了大量的天然环肽的抗生素和毒素。这些环肽大多数是同键环肽, 也就是说环肽是以酰胺键成环的; 其余的是异键环肽, 环肽是以其它键成环的, 如二硫键、酯键、醚键或硫醚键。由于天然或非天然的环肽的合成比直链肽的合成更复杂更困难, 因此吸引了很多化学家为此努力工作。同时, 大量的生物学研究表明肽的环状结构可以增加代谢的稳定性, 具有更好的受体选择性和更易控制生物利用度。环肽固定的空间构象有利于进行构象分析, 也有利于模拟或锁定蛋白质折叠中与二级结构相关的关键因素。早期的环肽合成只能合成小的环肽如环六肽, 随着合成方法的发展, 更大的环肽和更复杂的环肽都能合成了。

环肽通常可以用液相法合成, 或者先用固相法合成直链肽, 然后将直链肽从载体上释放到溶液中, 并在溶液中环合。尽管人们为使操作简便易行已经作了很多工作, 但是液相法仍然具有局限性。即使是在高度稀释的条件下, 单体和二聚体的环合也会同时发生。

在过去的二十年中, 大量的实例说明环化可以在肽链还在树脂上时进行。以固相的方式进行环化也

许是有利的,因为在树脂上肽以“假稀释”状态存在,也就是说肽在树脂上分子之间相距足够远。因此对分子内的反应有利,而对分子间的反应不利。在合成中具体采取哪一种方法可以根据环肽的结构以及参考相关的文献来决定。

19.4 固相多肽合成

固相多肽合成发展至今对于不同的实验设计已有很多不同的方法,下面将按照固相多肽合成的流程就几个常用的方法作一介绍。

19.4.1 实验材料

仪器:

(1) 反应管:用于固相多肽合成的反应管是一种特制的玻璃仪器,根据制备量的不同有大小各种型号,这种反应管在国内可向中科院有机化学研究所订购,也可以向 Peninsula Laboratories Inc., Sequemat, Ace Glass Inc. 等公司订购。

(2) 多肽合成的振荡器:特殊仪器,可以向 Sequemat 和 Rocky Mountain Scientific Glassblowing Co. 订购,或者以摇床代替。

(3) 多孔加热块 (heating block): 可以向 Peninsula Laboratories. Inc., Sequemat, Ace Glass Inc 等公司订购。

(4) HF 裂解器: 可以向日本 Peptide Institute Inc. (Japan) 订购。

试剂:

(1) 树脂和保护氨基酸:都已商品化,可以从下述的公司购得: Peptide Institute Inc. (Japan), Nova (America), Peninsula Laboratories. Inc (America), Sigma, Aldrich 等。也可购买氨基酸自己接 Boc, Fmoc 等保护基。

(2) 普通试剂: HOBt, DCC, TFA, DIEA, N-甲基吗啡啉,以及其它的缩合试剂可以从国外订购。

(3) 实验中使用的溶剂需要处理后使用,下面介绍几种溶剂的处理方法:

二氯甲烷 (DCM): 在分液漏斗中用 10% 碳酸钾水溶液洗涤 DCM, 用炒过的无水碳酸钾干燥过夜,重蒸,收集 40~41℃ 的馏分,贮于棕色瓶中,加入烤过的 4A 分子筛及少量碳酸钾备用。

二甲基甲酰胺 (DMF): 要完全除去 DMF 中的水和二甲基胺是非常困难的。很多市售的 DMF,即使是色谱纯的试剂中都含有大量的二甲基胺。新买来的 DMF 要用 FDNB 试剂检测二级胺的含量。如果检测含有二级胺,在瓶中加入新烤的 4A 分子筛放置一星期,经常摇晃一下,然后再检测,通常一次就可以了,如果还不合格,换掉瓶中的分子筛用新烤的 4A 分子筛再泡一星期。4A 分子筛可以除去 DMF 中的二级胺和甲酸。如果 DMF 仍然不合格,将 2L 的 DMF 和干燥的氢氧化钾混合,然后倒入 5L 的圆底瓶中,加入等体积的干燥的苯。如果氢氧化钾变得很湿,换上新的干燥的氢氧化钾。在常压下将苯蒸出,减压蒸出 DMF (bp153~155℃/760mmHg)。贮于棕色瓶中,加入分子筛保存。

二异丙基乙胺 (DIEA) 和 N-甲基吗啡啉: 这两个试剂的处理方法相同。首先用茚三酮浸泡过夜,再回流一小时,减压蒸馏,氢氧化钾干燥保存。

(4) 1mol/L DCC/DCM 溶液的配制: 称取适量的 DCC, 加入部分二氯甲烷,有白色固体悬浮于溶液表面,取一张滤纸称重,过滤,滤饼烤干后称重,重新计算 DCC 的量,再补加 DCM 使浓度为 1mol/L。

19.4.2 第一个氨基酸与树脂的连接

19.4.2.1 Boc 保护的氨基酸与氯甲基树脂的连接

(1) 叔胺法: 1g 氯甲基树脂 (0.3~1.0mmol/g) 放入 15ml 圆底烧瓶中,加入 5ml 乙酸乙酯或乙醇,再

加入 1.0mmol Boc 保护的氨基酸和 0.9mmol 三乙胺 (TEA), 搅拌, 回流 24 ~ 65 小时。大多数的氨基酸都能顺利反应, 产率约为 35% ~ 50%, 无显著的消旋, 但甲硫氨酸会发生 S-烷基化副反应, 天冬酰胺则可能发生醇解或脱酰胺反应。将甲硫氨酸用甲亚砷氨酸 [Met (O)] 代替可避免 S-烷基化, 而在 DMF 中 25℃ 反应 24 小时可减少天冬酰胺的副反应。

这个方法的严重缺点是反应过程中三乙胺将同苯环上的氯甲基反应形成季铵, 这不仅会使未反应的氨基酸以盐的形式结合在树脂上而影响对已连接上的氨基酸含量的测定, 而且产生的季铵阳离子还会影响肽链在树脂上的稳定性。为了避免这个缺点, 可以改用 Boc-氨基酸的四甲铵盐 (1 当量) 同氯甲基树脂 (1 当量 Cl) 在二氧六环中 80℃ 反应, 而在 DMF 中 25℃ 反应可能得到更好的产率。

(2) 铯盐法: 由于铯盐具有较高的反应活性, 用稍过量的保护氨基酸铯盐同氯甲基树脂在 DMF 中 50℃ 反应 16 小时即可将氯甲基基本上完全反应掉。如果用二甲基乙酰胺或 N-甲基吡咯酮代替 DMF, 有时还可得到更好的结果。铯盐的制备方法是将被保护的氨基酸或肽溶于乙醇中, 用 CsHCO_3 或 Cs_2CO_3 水溶液滴定到中性, 然后减压浓缩至干而得到相应的保护氨基酸或肽的铯盐。

具体的实验操作如下: 1g 氯甲基树脂 (1mmol/g) 与 1.1mmol 的 Boc 氨基酸铯盐在 8ml DMF 中搅拌, 于 50℃ 水浴中过夜。过滤树脂, 分别用 DMF, DMF:H₂O (1:1), DMF, MeOH 和 DCM 各洗涤 2 次, 干燥待用。

19.4.2.2 Boc 保护的氨基酸与 Pam 树脂的连接

5g Pam (0.7mmol OH/g) 树脂悬浮于 50ml 处理过的 DCM 中, 加入 5mmol 的 Boc 保护氨基酸和 5mmol (0.61g) 的 p-二甲氨基吡啶 (DMAP), 加入 5mmol 的 DCC, 室温隔绝潮气搅拌过夜。过滤, 分别用 DMF, EtOH, DCM 洗涤树脂。树脂经减压干燥, 取 5 ~ 10mg 树脂作氨基酸分析, 计算取代当量, 如果取代当量太低, 再进行一次反应。在这个反应中需要注意的是: 虽然成功的酯化反应需要加入 DMAP, 但有报道认为它会引起 Boc 保护氨基酸的消旋。可以减少 DMAP 的用量 (0.1 当量) 来减少消旋的发生。另外, 未反应的羟基必须用酰化反应来封闭以免副反应的发生。

酰化反应: 大约估计一下未反应的羟基的量, 用 DMF 为溶剂, 加入 10 mmol/mol OH 的苯甲酰氯, 振荡 3 分钟后加入与苯甲酰氯等量的 TEA, 室温振荡 2 小时。分别用 DMF, EtOH, DCM 洗涤树脂 6 次, 减压干燥。乙酰化也可以用来作封闭反应, 但是乙酰基在长肽中可能不完全稳定。乙酰化的方法和上述的苯甲酰化相同, 只是将苯甲酰氯换为醋酐。

19.4.2.3 Boc 保护的氨基酸与 BHA 和 MBHA 树脂的连接

BHA 树脂或 MBHA 树脂适量 (如为 1.0 当量), 加入 Boc 保护的氨基酸 (3.0 当量) 和 DCC (3.0 当量) 室温反应 2 小时, 分别用 DMF, EtOH, DCM 洗涤树脂 6 次, 减压干燥。取 5 ~ 10mg 树脂作氨基酸分析, 计算取代当量, 并用 Kaiser 茚三酮实验检测, 如果是阳性反应, 可以再反应一次, 如果再检测仍然是阳性反应, 就必须用酰化进行封闭, 方法如上所述。

19.4.2.4 Fmoc 保护的氨基酸与 Wang 树脂的连接

反应管中加入 Wang 树脂 (1.0 当量) 和适量的 DMF, 再加入 Fmoc 氨基酸 (3.0 当量) 与 DCC (3.0 当量)。N, N-二甲氨基吡啶 (DMAP) (0.1 当量) 溶于 DMF 中 (~50mmol/L), 最后加入反应管中, 室温反应 1 小时, 过滤, 用 DMF 洗涤树脂 6 次 (~10ml/g 树脂), 按照上述方法再缩合一次。

缩合完成后用 DMF 洗涤树脂 5 次, 酰化封闭未反应的羟基。加入适量的 DMF 溶胀树脂, 加入醋酐 (6.0 当量) 和 DMAP (0.1 当量) 的 DMF 溶液, 振荡 1 小时后过滤, 用 DMF 洗涤树脂 10 次, 然后可以进行下一步的反应。

19.4.2.5 氨基和肽树脂的酰化反应

当缩合反应不能完全时酰化反应对于终止肽链是非常有用的, 同时它对于氨基树脂接上第一个氨基酸后未反应氨基的封闭也很重要。酰化反应一般使用 5 ~ 10 倍 (对于未缩合的氨基而言) 的酰化试剂。

(1) 醋酐酰化: 树脂悬浮在 DMF 中, 将 5mmol (0.47ml) 的醋酐和 5mmol (0.70ml) 的三乙胺加入

19.4.3.1 Boc 保护氨基酸的合成程序

1. 合成程序 1 (TFA 脱保护 - DCC 法缩合) (表 19-6):

步骤 1: DCM 洗涤 (3 次)

如果要放置过夜, 肽树脂可以在这一步悬浮于 DCM 中。

步骤 2 和 3: 50% TFA/DCM 脱保护

Boc 保护基常规是由 50% TFA/DCM 脱除。如果色氨酸在肽链中出现, 脱保护试剂中应该加入 1mg/ml 的吡啶, 以免色氨酸被破坏。

由于脱保护试剂会被树脂中的溶剂显著地稀释, 所以用脱保护试剂先洗一遍是必要的。这对于自动合成仪尤其重要, 管路中的溶剂也会稀释脱保护试剂。在某些情况下可以使用浓度稍高的 TFA/DCM 溶液, 因为在有些肽树脂上 Boc 保护基很难脱除。

在脱保护过程中会释放一些二氧化碳, 对于大量树脂的反应需要拧开瓶盖放气。

表 19-6 合成程序 1 (TFA 脱保护 - DCC 法缩合)

步 骤	试 剂	体 积 (ml)	时 间 (min)
1	DCM 洗涤 (3 次)	15	3 × 2
2	50% TFA/DCM (脱保护)	15	5
3	50% TFA/DCM (脱保护)	15	20
4	DCM 洗涤 (6 次)	15	6 × 2
5	5% DIEA/DCM 中和	15	2
6	5% DIEA/DCM 中和	15	2
7	DCM 洗涤 (6 次)	15	6 × 2
8	缩合: Boc-AA (2.5eq) + DCC (2.5eq)	10	120 或直到茚三酮检测阴性
9	DCM 洗涤 (6 次)	15	6 × 2
10	茚三酮实验		10
11	重复 4-8 步再缩合		

注: 各步所用溶剂的体积视反应管大小而定。表中的剂量为每 g 树脂 15ml。

步骤 4: DCM 洗涤 (6 次)

脱保护试剂中含有吡啶会把树脂染为紫色, 所以在洗涤时要多洗几次直到树脂上的颜色被洗净。

肽树脂可以在这一步后被转移用作其它用途或进行氨基酸分析。由于二氯甲烷洗涤后树脂溶胀不易操作。因此有时在树脂转移之前用乙醇洗涤树脂。肽树脂可以在这一步后干燥保存。

步骤 5 和 6: 5% DIEA/DCM 脱保护

过去最早使用的三乙胺, 由于它的多种弊端, 现多使用二异丙基乙胺 (DIEA)。加入两次中和试剂以保证中和反应的完全。在中和反应中不能用二甲基甲酰胺 (DMF) 作溶剂。

步骤 7: DCM 洗涤 (6 次)

要保证从步骤 6 至步骤 8 没有间断。尤其是使用氯甲基树脂时, 因为树脂上残留的氯甲基会与肽链中自由的氨基反应, 从而终止肽链。

步骤 8: 缩合

Boc 氨基酸的用量通常是第一个接在树脂上的氨基酸的摩尔数的 2.5 倍, DCC 的用量与 Boc 氨基酸的用量相等。在缩合反应中有立体位阻而影响反应的收率时可以加大反应配比。在缩合一步要保持用最

少量的溶剂以提高缩合反应浓度,并减少重排为酰基脲副产物的反应发生。DCC 通常溶于 DCM 中配成 1M 的溶液,这样在操作时非常方便,如果 DCC/DCM 溶液中含有 DCU 可以稍稍加大用量。

如果保护氨基酸在二氯甲烷中不溶或溶解度很小,可以用 DMF 和 DCM 的混合溶剂来代替 DCM。这些保护氨基酸有: Boc-Arg(NO₂), Boc-Arg(Tos), Boc-His(Tos), Boc-Asn(Xan) 和 Boc-Trp。先将保护氨基酸溶于少量的 DMF 中,再补足 DCM。DMF 只有在必要时才使用,因为要除去 DMF 中的二甲胺非常困难并且在 DMF 中有活性的 O-酰基异脲重排为无活性的酰基脲要比在 DCM 中快。如果在缩合反应中使用了 DMF,在缩合反应后的洗涤过程中也要加入 DMF。如果在缩合反应中的溶剂只有 DMF,在缩合反应前和缩合反应后都应该用 DMF 洗涤。

在反应中常常是保护氨基酸先溶于 DCM 中,再加入等量的 DCC/DCM 溶液,放置,待 DCU 析出后,滤出 DCU,将溶液加入反应管中。

在缩合反应中每摩尔的保护氨基酸加入一摩尔的 1-羟基苯并三氮唑(HOBT)可以加速反应的进行。当使用 Boc-His(Tos)或 Bpoc 氨基酸时不能用 HOBT。

缩合反应进行 30 分钟以后,可以取少量树脂用茚三酮反应(或其它的检测反应)检查反应是否完全,如果检测结果是阳性或难以判断,继续反应至 2 小时,再做检测。很多缩合反应 10 分钟就反应完全了。如果仍为阳性,再缩合一次。当第三个氨基酸准备接上肽链时(就是说氨基酸要与二肽树脂发生缩合反应)或者当肽链的 N-末端为谷氨酰胺时(就是说保护氨基酸要与肽链上的谷氨酰胺的氨基发生缩合反应),可以在缩合时于反应管中先加入 DCC/DCM 溶液,然后加入保护氨基酸的溶液。因为二肽酯环合为二酮哌嗪衍生物和 N-末端谷氨酰胺环合为焦谷氨酰胺的副反应是由像 Boc 保护氨基酸这样的弱酸催化的,因此改变加料的顺序可以减少这样的副反应。

将反应时间延长至 2 小时以上可能不太有利,因为在这段时间里所有的活化中间体都已重排为酰基脲,DCC 活化的氨基酸在这时也可能随着时间的延长而发生消旋。对于位阻大的氨基酸过夜反应是需要的。如果反应不完全,最好是用新鲜的 DCC 和保护氨基酸再缩合一次。

需要注意的是,DCC 可能会引起严重的过敏反应,应尽量避免与皮肤或与粘膜接触。如果接触了,最好立即用丙酮清洗。

步骤 9: DCM 洗涤(6 次)

缩合反应结束后需要进行 6 次洗涤。

步骤 10: 茚三酮检测

取少量树脂进行检测,如果是阴性,就返回步骤 1 进行下一轮的缩合;如果是阳性,就返回步骤 5,再缩合一次。取树脂时,树脂的量要合适,太少,对于弱阳性反应不易观察;太多,对于长肽的合成来说,就会浪费很多树脂,影响最后收率。取约 3mg 树脂为宜。

步骤 11: 再缩合步骤 4~8

再缩合之前,用 HOAc 洗涤肽树脂 3 次,然后分别用 EtOH, DCM 洗涤,再返回步骤 4。用 HOAc 可以洗掉不溶的酰基脲。对于有些困难肽段,再缩合时通常可以选择不同的缩合方法,或以 DMF 作溶剂,这样会更有效。如第一次缩合用活化酯法,第二次可以用 DCC 法,第三次可以用对称酸酐法。对于比较难反应的氨基酸还可以采用新型的缩合剂以提高反应效率,如 BOP, HBTU, TBTU 等等。如果三次缩合仍不能完全,可以对未反应的氨基进行封闭,如果酰化产物与最后产物的分离比较困难,可以用邻磺基苯甲酸酐进行封闭。

一个接肽的全合成通常是在最后一个脱保护后完成(也就是在步骤 4 结束),然后再进行裂解。这不仅可以防止在 HF 裂解时对于敏感残基可能发生的叔丁基化,而且还可以除去残留的保护氨基酸,DCU 以及 N-酰基脲。

最后一次脱保护结束后,应该用 3~5 次 DCM 洗涤,再用 EtOH 洗 3 次,然后将肽树脂转移到玻砂漏斗中。最后用 DCM 洗 3 次,这样树脂以溶胀的状态存在。树脂必须干燥后才能进行裂解,湿气对 HF

裂解是有害的。记录肽树脂的重量, 根据树脂的增重可以粗略地估计肽的含量, 另取约 5mg 左右的肽树脂进行水解, 作氨基酸分析并判断各氨基酸的比例是否与理论值相符。

2. 合成程序 2 (Dioxane-HCl 脱保护-DCC 法缩合) (表 19-7):

表 19-7 合成程序 2 (Dioxane-HCl 脱保护-DCC 法缩合)

步 骤	试 剂	体 积 (ml)	时 间 (min)
1	Dioxane 洗涤 (3 次)	15	3 × 2
2	4N HCl-dioxane (脱保护)	15	1.5
3	4N HCl-dioxane (脱保护)	15	30
4	Dioxane 洗涤 (3 次)	15	3 × 2
5	CHL 洗涤 (3 次)	15	3 × 2
6	5% DIEA/CHL 中和	15	2
7	5% DIEA/CHL 中和	15	2
8	CHL 洗涤 (3 次)	15	3 × 2
9	DCM 洗涤 (3 次)	15	3 × 2
10	缩合: Boc-AA (2.5eq) + DCC (2.5eq)	10	120 或直到茚三酮检测阴性
11	DCM 洗涤 (6 次)	15	6 × 2
12	茚三酮实验		10
13	重复 5~10 步再缩合		

各步骤的说明与合成程序 1 基本相同, 需要另外说明的是: 二氧六环 (Dioxane) 必须不含过氧化物; 由于胺盐在 DCM 中不溶, 在中和与相关的洗涤步骤中要使用三氯甲烷 (CHL), 不要使用 DMF。

3. 合成程序 3 (对称酸酐法) (表 19-8):

表 19-8 合成程序 3 (对称酸酐法)

步 骤	试 剂	体 积 (ml)	时 间 (min)
1	DCM 洗涤 (3 次)	15	3 × 2
2	50% TFA/DCM (脱保护)	15	5
3	50% TFA/DCM (脱保护)	15	20
4	DCM 洗涤 (6 次)	15	6 × 2
5	5% DIEA/DCM 中和	15	2
6	5% DIEA/DCM 中和	15	2
7	DCM 洗涤 (6 次)	15	6 × 2
8	缩合: Boc-AA (6.0eq) + DCC (3.0eq)	10	120 或直到茚三酮检测阴性
9	DCM 洗涤 (6 次)	15	6 × 2
10	茚三酮实验		10
11	重复 4~8 步再缩合		

合成程序 3 的特殊说明:

步骤 8: 缩合

Boc 氨基酸的用量通常是第一个接在树脂上的氨基酸的摩尔数的 6 倍, DCC 的用量是 Boc 氨基酸的用量的一半。在反应管外预制 Boc 氨基酸的对称酸酐, Boc 氨基酸溶于 DCM 中, 冷却至 0℃, 加入 DCC/DCM 溶液, 0℃放置 1 小时, 经常摇动混合物, 过滤除去 DCU, 滤液加入树脂中。

对称酸酐对水非常敏感, 在潮湿的空气中冷的对称酸酐溶液很容易吸潮, 在过滤和转移过程中预制液要隔绝潮气, 例如, 尽量在干燥季节或有空调的条件下进行反应。而且操作要快, 另外也可以使用氮气。

缩合反应可以通过加入 1 当量的三级胺来加速。常用的三级胺是 DIEA, 通常在缩合反应开始 15 分钟后加入。如果以三氟乙醇 (TFE) 为溶剂, 反应将更快, 更完全。

注意: 对于 Boc-Arg (Tos), Boc-Asn 和 Boc-Gln 不能使用对称酸酐法, 因为有报道说对称酸酐法会将两个精氨酸引入肽链中; 此法会使天冬酰胺和谷氨酰胺发生脱水副反应。

4. 合成程序 4 (活化酯法) (表 19-9):

表 19-9 合成程序 4 (活化酯法)

步 骤	试 剂	体 积 (ml)	时 间 (min)
1	DCM 洗涤 (3 次)	15	3 × 2
2	50% TFA/DCM (脱保护)	15	5
3	50% TFA/DCM (脱保护)	15	20
4	DCM 洗涤 (6 次)	15	6 × 2
5	5% DIEA/DCM 中和	15	2
6	5% DIEA/DCM 中和	15	2
7	DCM 洗涤 (6 次)	15	6 × 2
8	DMF 洗涤 (3 次)	15	3 × 2
9	缩合: Boc-AA 的活化酯	10	4hr 或直到茚三酮检测阴性
10	DMF 洗涤 (6 次)	15	6 × 2
11	DCM 洗涤 (3 次)	15	3 × 2
12	茚三酮实验		10
13	重复 4~9 步再缩合		

合成程序 4 的特殊说明:

步骤 8: DMF 洗涤 (3 次)

在缩合前最后一次的洗涤和缩合反应中要使用纯度最高的 DMF, 以保证二甲胺等杂质不进入缩合反应。纯度稍低的 DMF 可以用在其它洗涤步骤中。

步骤 9: 缩合

活化酯在 DCM 中不能很好地缩合, 所以缩合的溶剂为 DMF。用少量的 DMF 悬浮树脂, Boc 氨基酸的活化酯用量通常是第一个接在树脂上的氨基酸的摩尔数的 4 倍。反应配比和反应时间都比合成程序 1 多, 如果为了节约想回收未反应的活化酯, 可将缩合反应结束后的滤液用水稀释, 然后用氯仿或乙酸乙酯提取活化酯, 再用适当的方法进行纯化。加入 1 当量的 HOBt 或缩合反应在甲苯中进行都能加速缩合反应的进行。

1-羟基苯并三氮唑 (HOBt) 活化酯:

有很多学者在 DCC 参与的缩合反应中加入等当量的 HOBt 能起到加速反应的效果。一般采用预制的 HOBt 活化酯。

预制 HOBt 活化酯: 用 5 当量的 Boc 保护氨基酸, DCC 和 HOBt。先将 Boc 保护氨基酸和 HOBt 溶于高质量的 DMF 中, 冷却至 0℃, 加入 DCC/DCM 溶液, 再恢复至室温, 放置 30 分钟, 过滤, 在步骤 9 中将滤液加入肽树脂的反应管内, 振荡反应 30 分钟后再补加适量的 DMF, 使树脂能自如地流动。

氨基酸的活化酯在 DMF 的溶液中会缓慢地发生消旋。当缩合反应进行得很快时没有太大影响, 但是无论是酰化组分或是氨基组分的立体位阻导致的缩合反应进行很慢时, 而且在几个小时以后茚三酮检测仍为阳性, 这时应该洗净树脂再缩合一次。

步骤 11: DCM 洗涤

如果要放置过夜, 肽树脂应该用 DCM 洗涤并保持在 DCM 中。

注意: 当接肽过程中因故需要暂停实验放置时, 肽树脂的末端氨基酸不应脱保护。

19.4.3.2 Fmoc 保护氨基酸的合成程序

合成程序 5 (表 19-10) 只能适用于酸易裂解的醚树脂 (Wang 树脂), 最后的裂解使用 TFA。肽与树脂的连接是酸易裂解的, 但它对于脱除 Fmoc 保护基的哌啶是稳定的。C-末端的 Fmoc 氨基酸可以通过前面讲过的方法与 Wang 树脂连接。

表 19-10 合成程序 5 (用于 Fmoc 保护氨基酸)

步 骤	试 剂	体 积 (ml)	时 间 (min)
1	DCM 洗涤 (2 次)	15	2 × 2
2	DMF 洗涤 (2 次)	15	2 × 2
3	20% 哌啶/DMF (脱保护)	15	5
4	20% 哌啶/DMF (脱保护)	15	10
5	DMF 洗涤 (2 次)	15	2 × 2
6	Dioxane:H ₂ O (2:1) (2 次)	15	2 × 2
7	DMF 洗涤 (3 次)	15	3 × 2
8	DCM 洗涤 (3 次) (或 DMF)	15	3 × 2
9	缩合: Fmoc 氨基酸的对称酸酐	15	15
10	加入 1 当量的 DIEA		15
			或直到茚三酮检测阴性
11	DMF 洗涤 (5 次)	15	5 × 2
12	i-PrOH 洗涤 (5 次)	15	5 × 2
13	DCM 洗涤 (5 次)	15	5 × 2
14	茚三酮实验		10
15	重复 8~10 步再综合		

侧链保护基应该是叔丁基的衍生物, 它们可以在裂解时被同时脱除。另外, 这个系统也可以用苄基衍生物为侧链保护基进行肽段的合成。

步骤 2: DMF 洗涤

Fmoc 保护基在像 DMF 这样的极性非质子溶剂中并不是很稳定。由于这个原因, 不要把 Fmoc 保护的肽树脂长时间置于 DMF 中, 肽树脂要放置之前应用 DCM 洗涤。Fmoc 保护基在二甲基乙酰胺中更稳

定,但是二甲基乙酰胺要昂贵得多。在这个程序中使用的所有的 DMF 都必须去除二甲胺。

步骤 3: 用哌啶/DMF 脱保护

用哌啶脱除保护氨基酸上的 Fmoc 只需要几秒钟,在肽树脂上反应速率可能会慢一些。在通常情况下可以使用 20% 的哌啶,在特殊的情况下要使用 50% 的哌啶来缩短脱保护的时间。用 50% 哌啶脱保护的时间是第一次 1 分钟,第二次 4 分钟。在下述情况下使用 50% 哌啶脱保护:在第二个氨基酸脱保护到接第三个氨基酸的过程要短,游离的氨基可能进攻肽与树脂连接的酯键结构,使二肽以二酮哌嗪的形式从树脂上失落,因而在第二个氨基酸脱保护时采用 50% 的哌啶以缩短脱保护的时间;天冬酰胺和谷氨酰胺在碱催化下易发生分子内环化,所以要用 50% 的哌啶脱保护以缩短碱处理的时间,同时洗涤过程要快,尽快进行下一个氨基酸的缩合,以减少肽链分子内两个氨基游离存在的时间。

步骤 5~8: 脱保护后洗涤

当准备接第三个氨基酸时,应特别注意洗涤过程要快。因为有报道说二肽可以二酮哌嗪的形式脱落。

步骤 9: 缩合

具体的实验方法与步骤 3 (对称酸酐法) 相同。Fmoc 的对称酸酐比 Boc 的对称酸酐要稳定得多,它可以预先制备并以结晶的固体形式在 0℃ 保存至少 1 个月。对于隔绝潮气的要求也没有 Boc 对称酸酐严格。

缩合时也可以使用预制的 HOBt 活化酯,方法与合成程序 4 中的 HOBt 活化酯法相同。与对称酸酐法相比,HOBt 活化酯法反应速率要慢一些。

步骤 10: 加入 DIEA

用对称酸酐法进行缩合加入一个当量的三级胺可以加速反应的进行,三级胺可以中和作为副产物产生的游离的 Fmoc 氨基酸,以免使肽上的氨基质子化。

反应是否完全可以通过茚三酮或 TNBS 试剂检测。不要任意地延长反应时间,因为 Fmoc 保护基在缩合条件下并不是绝对稳定,任何的 Fmoc 的脱除都会导致多接一个氨基酸。

步骤 13: DCM 洗涤

如前所述,如果 Fmoc 保护的肽树脂要放置一段时间,必须用 DCM 洗涤树脂。

步骤 14: 茚三酮检测

检测方法将在后面分析技术中谈到。由于 Fmoc 保护基对碱不稳定,检测时间要从通常的 100℃ 10 分钟缩短为 100℃ 5 分钟。也有报道在检测时加入一滴冰醋酸以防止 Fmoc 的脱除。检测也可以使用 TNBS 法。

19.4.4 肽从树脂上的裂解

19.4.4.1 Boc 化学

1. 脱除 His (Dnp) 的侧链保护基 Dnp:

Dnp 保护基在裂解条件下不能脱除,所以要在裂解前先脱除该保护基。用最少量的 DMF 悬浮肽树脂 (约 5ml/g 树脂),对于 1mmol 的 Dnp 保护基加入 20mmol 的硫代苯酚 (0.102ml/mmol),室温反应 1 小时,硫解的速度快大概 15 分钟反应就完全了。用 DMF,水,EtOH 和 DCM 洗涤树脂并干燥树脂。随后就可以进行通常的裂解了。有少量的黄色的 Dnp-硫代苯酚被树脂吸附,会在裂解后与肽混在一起,用一般的纯化方法很容易将它除去。

2. HF 裂解:

HF 气体剧毒,强腐蚀性,易挥发 (bp 19℃)。HF 能迅速地溶解玻璃并放热。HF 只能在 Teflon-Kel-F 为材料的真空反应管中使用。不能用于普通的聚乙烯或聚丙烯制成的真空管,这些塑料在低温时变得很脆,并且可能突然碎裂而导致严重的后果。HF 与水发生剧烈的放热反应。

有专供固相多肽合成使用的 HF 裂解器 (图 19-10), 可以从日本的 Peptide Institute, Inc. 订购。不能一人操作 HF 裂解器。在操作中一定要避免任何的接触 HF 液体或气体, 实验应在通风很好的通风橱中进行。吸入 HF 会导致死亡。实验操作中要一直戴上保护眼镜和手套。尽管在用 HF 装置进行裂解反应时应高度注意安全, 但是只要严格按照仪器使用规定进行操作, 裂解反应还是易于控制的。

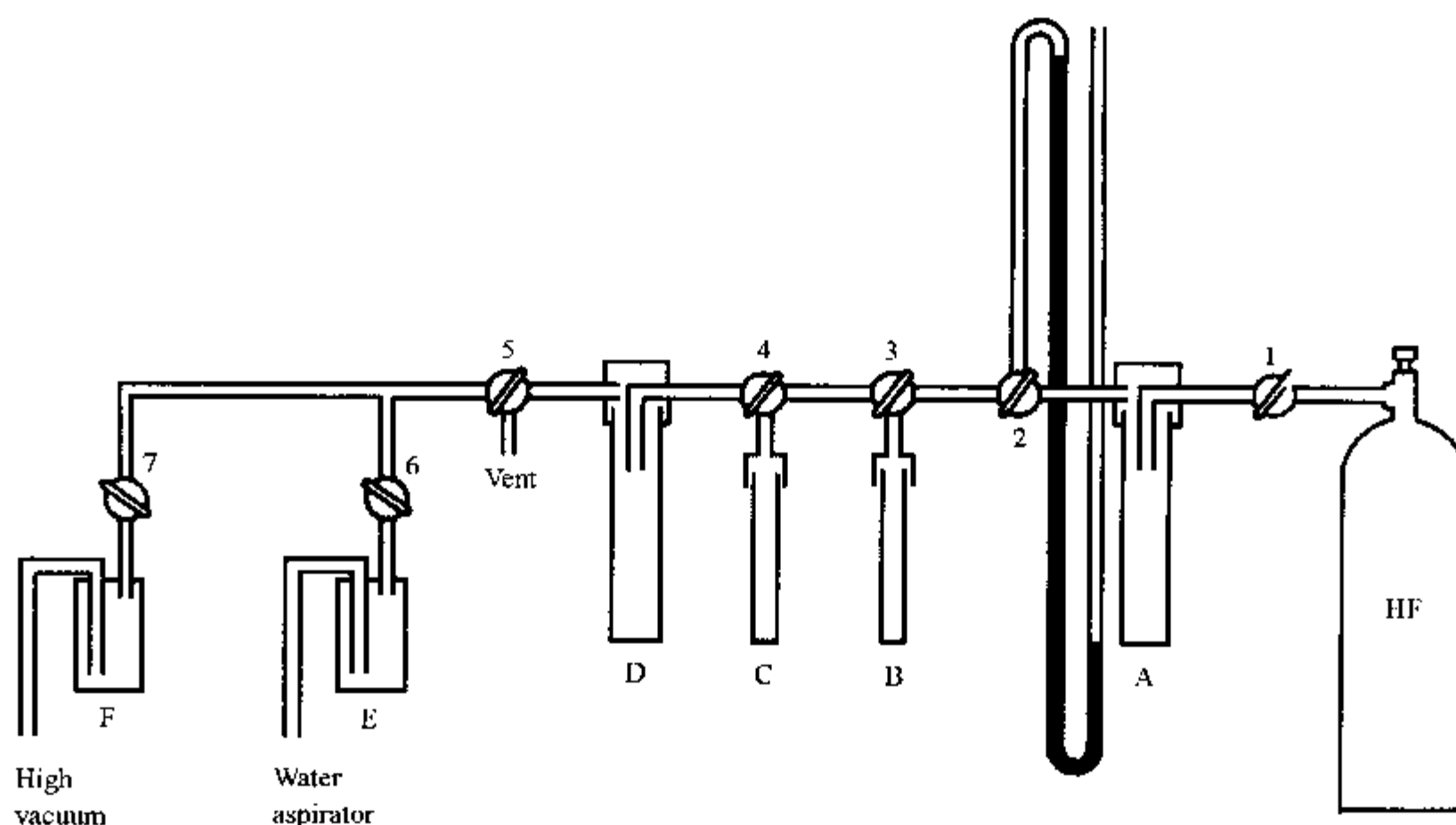


图 19-10 HF 裂解器示意图

(1) 裂解: 在裂解前一定要确保肽树脂已经脱除最后一个 Boc 保护基。如果苯甲醚被谷氨酸残基的 γ -羟基酰化的副反应是一个问题时, 可以让裂解反应在 -20°C 下进行, 或者加入足够的吡啶来进行, 即裂解试剂为吡啶:苯甲醚:HF = 1:1:10。如果肽链中不含敏感的残基 (酪氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸), 苯甲醚或其它的清除剂可以从裂解试剂中去除以免同谷氨酸残基发生问题。目前人们通常都使用低-高浓度 HF 裂解法来避免副反应的发生。

低-高浓度 HF 裂解法: Merrifield 研究组发现用低浓度的 HF 与高浓度的清除剂联合使用可以避免在 HF 裂解中可能发生的许多副反应。而且, Trp (CHO) 和 Met (O) 的保护基也能在裂解中被切除。这种温和的反应条件不能脱除所有的侧链保护基, 也不能完全将肽从树脂上切下。因此, 低浓度的 HF 裂解后还需要进行高浓度的 HF 裂解, 具体操作如下:

1) 将 0.2mmol 的肽树脂和一个搅拌棒放入裂解管中, 加入 1.0ml 的对甲基苯酚和 6.5ml 的二甲硫醚。如果肽树脂上带有 Trp (CHO), 加入的清除剂应为 0.75ml 的对甲基苯酚, 0.25ml 的硫代对甲基苯酚和 6.5ml 的二甲硫醚。

2) 将裂解管装在 HF 裂解器上, 放入 2.5ml HF。

3) 0°C 搅拌, 裂解反应 2 小时。

4) 用水泵抽走 HF 和二甲硫醚。对甲基苯酚 (和硫代对甲基苯酚) 留在反应管中可作为下面的高 HF 裂解的清除剂。

5) 放入 10ml HF 到裂解管中。

6) 在 0°C 搅拌, 裂解反应 45 分钟。

7) 先用水泵在裂解管冷却下抽去 HF, 再在室温下抽干, 最后用油泵将残留的 HF 全部抽尽, 再进

行下面的处理。注意：油泵必须配有钠石灰，石蜡，氯化钾，氯化钙等吸收塔，以保护油泵不被腐蚀。

(2) HF 裂解后将粗肽从树脂上提取出来：将裂解管从裂解器上取下来，加入干燥的乙酸乙酯 (10ml/g 树脂)，将树脂全部转移到玻璃漏斗中，滤掉乙酸乙酯，用乙酸乙酯再洗三遍，合并乙酸乙酯液并保存直到确定乙酸乙酯液中不含合成的肽。如果肽在乙酸乙酯中溶解，可以用乙醚代替乙酸乙酯。用 1mol/L HOAc 提取与树脂混合存在的肽 (大约每 0.2mmol 肽 15ml)，在裂解管中也加入几毫升 1mol/L HOAc，洗涤管壁，再倒入树脂中，浸泡几分钟，过滤，用滤液反复洗树脂几遍，冷冻干燥滤液，剩余的树脂先保存起来，需要时还可以再提取。由于含肽的水溶液在旋转蒸发时容易起泡，因此减压浓缩时要注意防止爆沸。凝胶层析应在冷干浓缩后进行。冷干后称重。如果多肽不溶于 1mol/L HOAc，可以用醋酸提取多肽。冰醋酸冻干得很好，但是浓度在 1mol/L 到冰醋酸之间时会在冷干机上融化。在实际中，树脂可以先用 1mol/L HOAc 提取，然后用冰醋酸提取，这两个提取液分别冷干。有些大肽只在脲素和盐酸胍的溶液中溶解。

3. 三氟甲磺酸 (TFMSA) 裂解：

TFMSA 是最强的酸之一，在使用时一定要小心，操作时应戴上防护眼镜和手套，并在有良好通风的通风橱中进行。

(1) 标准的 TFMSA 裂解：标准的 TFMSA 裂解程序是以小量反应 (100mg 树脂) 设计的，可以根据实际反应量的大小来放大或缩小。对于 Pam 树脂反应时间为 25 分钟，对于 mBHA 树脂反应时间为 1.5 ~ 2 小时。收率和 HPLC 的数据表明 TFMSA 裂解的粗肽与 HF 裂解的粗肽相比混有更多的盐和清除剂。要完全除去 TFMSA 的盐，粗肽溶液必须中和然后通过凝胶层析脱盐。

具体的实验操作如下：

- 1) 将 100mg 肽树脂放入 50ml 反应瓶中，加入 150 μ l 硫代苯甲醚/乙二硫醇 (2:1)，室温搅拌 10 分钟。
- 2) 冰浴冷却下，加入 1ml TFA，搅拌 5 ~ 10 分钟。
- 3) 缓慢加入 100 μ l TFMSA，撤去冰浴，对于 Pam 树脂在室温反应 25 分钟；对于 mBHA 树脂反应 1.5 ~ 2 小时。
- 4) 当反应结束后，加入冷乙醚沉淀裂解下来的肽，混合物搅拌约 1 分钟。
- 5) 过滤，用冷乙醚洗涤沉淀数次。
- 6) 用少量 TFA 洗涤树脂和沉淀，过滤，TFA 滤液滤入 200ml 冷乙醚中，肽在 TFA 中溶解，在乙醚中再沉淀。
- 7) 用少量 TFA 再洗树脂 2 次，乙醚液用冰浴冷却 10 分钟。
- 8) 过滤，用冷乙醚洗涤数次，尽量洗净清除剂和过量的 TFMSA。
- 9) 将沉淀溶于水中，如果不溶，可以加入少量的冰醋酸，冷却下加入适量的碳酸钠中和 TFMSA。
- 10) 用凝胶层析脱盐。方法见后文 19.4.5。
- 11) 冷冻干燥

(2) 低 - 高浓度 TFMSA 裂解：

低 - 高浓度 TFMSA 裂解程序可以还原 Met (O)，脱除 Trp (CHO) 的侧链保护基，并且可以将反应机理由 S_N1 转化为 S_N2 ，从而减少侧链保护基的副反应。

下述的低 - 高浓度 TFMSA 裂解程序是为 1g 树脂设计的，但可以根据反应量的大小进行调节，无论是 Pam 树脂或 mBHA 树脂，在低 TFMSA 裂解中需要 3 小时。

具体实验操作：

低浓度 TFMSA 裂解：

- 1) 将 1g 肽树脂放入 50ml 反应瓶中，冷却至 -5 $^{\circ}$ C 到 0 $^{\circ}$ C。

2) 依次加入下述裂解试剂:

1ml	间甲基苯酚
3ml	二甲硫醚
5ml	TFA
1ml	TFMSA

对于含有 Trp (CHO) 的肽树脂加入以下试剂:

200 μ l	乙二硫醇
800 μ l	间甲基苯酚
3ml	二甲硫醚
5ml	TFA
1ml	TFMSA

让反应混合物在 -5°C 到 0°C 反应 3 小时。

3) 过滤, 用冷乙醚洗涤树脂数次。

4) 将装肽树脂的漏斗置于干燥器中真空干燥, 抽去残留的乙醚。

5) 将干燥的肽树脂放入 100ml 反应瓶中。

高浓度 TFMSA 裂解:

- 1) 加入 1.5ml 硫代苯甲醚/乙二硫醇 (2:1), 搅拌 10 分钟。
- 2) 冰浴冷却, 加入 10ml TFA 搅拌 5 ~ 10 分钟。
- 3) 缓慢加入 1ml TFMSA, 撤去冰浴, 室温反应 Pam 树脂 25 分钟, mBHA 树脂 1.5 ~ 2 小时。
- 4) 按照标准的 TFMSA 裂解程序 (4) ~ (11) 步进行。

TFMSA 裂解不能完全切除 Arg (Tos) 的侧链保护基, His (Dnp) 的侧链保护基要预先脱除, Cys (Acm) 的侧链保护基要用碘脱除。

TFMSA 是一个强酸, 当温度升至 0°C 以上或肽暴露在 TFMSA 中时间太长时, 可能会导致产物的降解。当减压蒸去 TFMSA 时外温不能升至 0°C 以上。

19.4.4.2 Fmoc 化学

1. TFA 裂解:

TFA 是一个危险的腐蚀性液体。在进行操作时要在通风良好的通风橱中进行, 戴上防护眼镜和手套。

在进行裂解前要先脱除最后一个 Fmoc 保护基。在裂解步骤的前 3 步中, 肽从树脂上裂解下来并与树脂分开。后面的三步可以选择方法一 (醚过滤), 方法二 (离心) 或方法三 (乙醚提取) 进行。

下面的操作程序是为 0.1 ~ 1.5g 肽树脂设计的, 并根据肽链结构的不同列出了三种裂解试剂, 可以先用 20 ~ 50mg 的肽树脂选择一个程序进行小试, 然后根据小试的结果优化裂解条件, 再裂解余下的肽树脂。

试剂:

- (1) 用于肽链中不含 Arg, Met, Trp 和 Trt 侧链保护基。

0.5ml	蒸馏水
9.5ml	TFA

- (2) 用于肽链中含有 Arg, Met。

0.75g	苯酚
0.25ml	乙二硫醇
0.5ml	硫代苯甲醚
0.5ml	蒸馏水

- | | |
|---|------|
| 10ml | TFA |
| (3) 用于肽链中含有 Trp 和 Trt 侧链保护基, 不含 Arg, Met。 | |
| 0.25ml | 乙二硫醇 |
| 0.25ml | 蒸馏水 |
| 9.5ml | TFA |

操作步骤:

(1) 根据肽树脂的具体情况选择 (1) ~ (3) 裂解试剂。

注意: 裂解试剂 (2) 能成功地用于 4 个 Arg (Pmc), 当有 5 个或更多的 Arg (Pmc) 时, 需要更长的裂解时间, 但是不要超过 3 小时。

(2) 肽树脂放入 50ml 反应瓶中, 冰浴冷却。

(3) 冷却裂解试剂, 并将裂解试剂加入肽树脂中, 每 0.1 ~ 1.5g 肽树脂需要 10ml 裂解混合试剂。加完裂解试剂后撤去冰浴, 室温反应 1.5 小时。要将肽从 TFA 溶液中分离出来, 可选方法一, 方法二或方法三继续进行。

方法一:

(4) 反应结束后, 过滤, 使肽的 TFA 溶液与树脂分开。

(5) 用 1ml TFA 洗涤树脂, 洗涤的 TFA 液与 (4) 的滤液合并。

(6) 用 5 ~ 10ml DCM 洗涤树脂, 洗涤的 DCM 液与 TFA 液合并。

(7) 减压浓缩滤液至约 1 ~ 2ml, 浓缩的温度不能超过 40℃, 以免温度过高使肽受损害。

(8) 在浓缩液里加入 50ml (或更多) 的冷乙醚沉淀多肽。

(9) 过滤, 收集粗肽, 减压干燥。

(10) 干燥后, 粗肽溶于水溶液中进行冷干。

方法二:

(4) 反应结束后, TFA 溶液直接滤入 30ml 或更多的冷 MTBE (甲基叔丁基醚) 中。

(5) 用约 1ml TFA 洗涤树脂, TFA 滤入 (4) 的 MTBE 液中。

(6) 将 MTBE 液转移至离心管中, 离心管用 Teflon 盖拧紧, 室温下 2000g 离心 10 分钟。

(7) 吸去离心管的上清液, 加入 30ml MTBE 再离心一次。

(8) 重复 (7) 至少 2 次。

(9) 粗肽溶于水溶液中, 进行冷冻干燥。

方法三:

(4) 反应结束后, 过滤, 使肽的 TFA 溶液与树脂分开。

(5) 用 1ml TFA 洗涤树脂, 洗涤的 TFA 液与 (4) 的滤液合并。

(6) 用 5 ~ 10ml DCM 洗涤树脂, 洗涤的 DCM 液与 TFA 液合并。

(7) 减压浓缩滤液至 1 ~ 2ml, 浓缩的温度不能超过 40℃, 以免温度过高使肽受损害。

(8) 用 10 倍以上的蒸馏水稀释浓缩液, 用等量的冷乙醚提取清除剂, 用分液漏斗除去乙醚层, 用乙醚再提取至少 2 次。

注意: 对于小量反应, 乙醚可以直接加入反应瓶中, 用吸管转移乙醚。

(9) 粗肽溶于水溶液中, 进行冷冻干燥。

19.4.4.3 醋酸汞脱除 Cys (Acm) 的 Acm 基

下面的操作程序可以脱除 Cys (Acm) 和 Cys (tBu) 的侧链保护基。这个操作程序对上述两个侧链保护基是一样的。但是当脱除 tBu 基时, 反应时间要延长到 5 小时。有些肽需要更长的反应时间。

操作步骤:

(1) 用最少量的 30% HOAc 溶解粗肽 (20mg/ml)。

(2) 每当量的 Cys 加入 2 当量的醋酸汞 (MW = 318)。反应 1 小时。

(3) 在反应混合物中加入 2 当量的 2-巯基乙醇 (MW = 78.13, $d = 1.114$)。再反应 1 小时, 灰色的硫化汞沉淀下来。

(4) 过滤除去生成的盐, 用 Sephadex G-10 或 G-25 或分子膜透析脱盐。

19.4.5 脱盐

可以用凝胶层析或分子膜透析脱盐, 除去盐和残余的清除剂。脱盐对于用 TFA 和 HF 进行的裂解是不必要的。HPLC 的数据及产率表明 TFMSA 裂解后产生的盐和清除剂相关的副产物比 HF 裂解的粗产物多。要去除清除剂和过量的 TFMSA, 应在脱盐前用碳酸钠中和肽溶液调节 pH 至 8.5, 需要注意的是, 如果粗肽中含有半胱氨酸, 则应用冷的 5% 的碳酸钠中和。

用凝胶层析脱盐的操作:

(1) 用最少量的水溶解粗肽, 上 Sephadex G-10 或 G-25 柱。在这种凝胶柱上肽比盐和清除剂先从柱上流出。如果粗肽不溶于水, 加大醋酸的强度使之溶解, 可以用浓度从 10% 的醋酸水溶液到冰醋酸。

(2) 将收集到的肽溶液部分进行冷冻干燥, 以便进一步地纯化。冷干完成后一定要用水清洗冷干机, 以免残留的醋酸腐蚀机器。

19.4.6 纯化

1. 凝胶层析:

凝胶层析是基于分子量对化合物进行分离的技术, 它对多肽合成的分离纯化非常有用, 首先它可以将肽与盐和小分子的化合物分离, 其次, 可以基于分子量对肽进行分离。关于凝胶层析的详细资料可以参考 Determann 的 Gel Chromatography。肽的紫外检测波长 210nm, 含有酪氨酸或色氨酸的肽可以在 254 或 280nm 处检测。

凝胶的选择要根据具体情况来决定。对于简单的脱盐, 肽的分子量应该完全在凝胶可分离的分子量范围以外, 而盐保留在凝胶上, 例如 Sephadex G-10 或 Bio-Gel P-2; 凝胶柱的大小应该能完全保留样品中的盐并能将盐与肽分离。对于组分分离, 例如由多肽与载体蛋白偶联制备的抗原的分离, 抗原的分子量应该完全在凝胶可分离的分子量范围以内。对于更细的分离, 应该先将小分子的杂质分离除去, 再进行分离, 肽的分子量应该正好在凝胶的可分离的分子量范围以内, 也就是肽的分子量既不完全在分子量范围以外, 也不完全在分子量范围以内。

在凝胶层析过程中, 有时会发生很明显的吸附。芳香和疏水性的肽可能会在柱上保留下来, 表现出类似于分子量很小的化合物的性质。例如, 在 Sephadex G-15 上分离含有盐的脑啡肽 (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu), 洗脱液为 0.1mol/L HOAc, 脑啡肽由于被吸附而在盐之后流出。如果洗脱液换为 30% HOAc 或 0.1mol/L 吡啶-HOAc 缓冲溶液, 脑啡肽则在所希望的盐出现之前流出。

对于比较困难的分离, 有时可以利用吸附现象来达到分离的目的。如果一个肽在凝胶层析中用稀的 HOAc 溶液不能分纯, 再进行一次凝胶层析, 改用 30% HOAc 或稀的吡啶溶液为洗脱液, 会显著地改变肽的流出时间从而达到分离的目的。

分子间的相互作用有时也会导致不正常的结果。过量的脑啡肽与牛血清白蛋白偶联制备的抗原在 Sephadex G-25 上分离, 洗脱液为 0.1mol/L HOAc, 流出物以一个高分子量的单峰出现; 当用 30% HOAc 再进行一次层析, 则可将肽从吸附的蛋白上解离下来, 从而得到分子量相符的肽峰。

2. HPLC:

HPLC 法可以参考相关书籍, 本文不作细述。多肽的分离纯化多采用反相柱, 如 C18 柱, 也可用 C8 柱, 用大孔径 (如 30nm) 的填料分离效果好。对于合成的多肽多数不用使用梯度洗脱, 恒流洗脱就能达到分离目的。如果要分离多种性质的肽的混合物, 就需要用梯度洗脱。分析鉴定产物的单一性时不能

仅仅使用梯度洗脱, 因为有时梯度洗脱会压缩峰的位置, 引起另一个峰遮盖肽的峰而导致产物不纯。因此, 在鉴定产物的单一性时要综合应用恒流洗脱和梯度洗脱。

磷酸盐缓冲溶液由于它的透明性好而常被用于分析鉴定, 紫外检测通常为 210nm (以乙腈为溶剂), 如果以甲醇为流动相, 可选 254nm 的紫外检测波长。磷酸盐可以加快肽从反相柱中流出的速度, 洗脱液一般是磷酸盐缓冲溶液和乙腈的混合溶液, 磷酸盐缓冲溶液是由 0.1mol/L 的磷酸用三乙胺调节 pH 至 2.25 配制而成。由于有机酸在 190nm 处有最强的吸收而限制了其应用。在 210nm 处 HOAc 或 TFA 可以使用的最高浓度是 0.01mol/L, 如果需要提高酸的浓度来提高分离的效果, 就要在更长的波长处检测 (215 ~ 230nm)。但是对于吸收较弱的肽来说, 在长波长处可能会因检测不到而丢失产品。分离得到的纯化产物应经冷干后保存。

19.4.7 分析技术

19.4.7.1 茚三酮实验

试剂:

(1) 33mg 氰化钾溶于 50ml 水中, 取出 2ml, 用吡啶稀释到 100ml, 加入 Amberlite MB-3 树脂 4g, 搅拌 45 分钟, 过滤, 得滤液。

(2) 称取 40g 结晶的苯酚, 溶于 10ml 无水乙醇, 加入 4g Amberlite MB-3 树脂, 搅拌 45 分钟, 过滤, 得滤液。

(3) 试剂 (1) 与试剂 (2) 合并得试剂 A。

(4) 500mg 茚三酮溶于 10ml 无水乙醇, 为试剂 B。

(5) 8.28g Et₄NCl 溶于 DCM 中配成 0.5mol/L 的 DCM 溶液, 为试剂 C。

操作步骤:

(1) 定性实验: 从缩合反应中取少量肽树脂 (约 3mg) 于小试管中, 用 EtOH:HOAc (1:1) 洗涤 3 次, 再用 EtOH 洗涤 3 次 (用吸管吸去上清液), 加入试剂 A 3 滴, 加入试剂 B 1 滴, 100℃加热 10 分钟, 蓝色-绿色为阳性, 黄色为阴性。

(2) 定量实验: 取少量肽树脂, 用 5% TEA/DCM 洗两次, DCM 洗 3 次, 减压干燥树脂, 准确称取 2 ~ 5mg 肽树脂于小试管中, 加入 100μl 试剂 A 和 25μl 试剂 B, 同时做一空白对照。在 100℃加热 10 分钟, 将试管放入冷水中终止反应。加入 1ml 60% 的乙醇水溶液, 在滴管内塞入少量玻璃棉用以进行过滤, 用 0.2ml 试剂 C 洗树脂两次, 过滤, 合并滤液, 用 60% 的乙醇定容为 2ml。在 570nm 处测紫外吸收, $\epsilon = 1.5 \times 10^4 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。这个方法可以用于测定氨基的含量:

$$\mu\text{mol/g} = (A_{570} \cdot V_{\text{ml}} / \epsilon_{570} \cdot W_{\text{mg}}) \times 10^6$$

A_{570} : 570nm 处测紫外吸收值; V_{ml} : 溶液的体积; ϵ_{570} : $1.5 \times 10^4 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; W_{mg} : 肽树脂的毫克数

19.4.7.2 TNBS (2, 4, 6-三硝基苯磺酸) 实验

试剂:

EtOH: HOAc (1:1), EtOH

1% (W/V) TNBS/DMF

操作步骤:

取少量肽树脂, 用 EtOH: HOAc (1:1) 洗涤 3 次, 再用 EtOH 洗涤 3 次 (用吸管吸去上清液), 用 1ml EtOH 将肽树脂转移至一个小离心管中, 加入 1 滴 TNBS 试剂, 混合, 在室温放置 10 分钟, 离心, 富集树脂, 如果有游离的氨基残余在树脂上, 树脂将是橙红色, 完全阴性的树脂应为铁灰色。

19.4.7.3 苦味酸实验

试剂:

(1) 苦味酸 (三硝基苯酚) 0.1mol/L 的 DCM 溶液 (229.1g/l)。

(2) 5% (V/V) DIEA/DCM

操作步骤:

- (1) 在玻砂漏斗中用 DCM 溶胀树脂。
- (2) 用试剂 (2) 中和, 2×1 分钟。
- (3) 用 DCM 洗涤, 5×1 分钟。
- (4) 用试剂 (1) 处理, 2×1 分钟。
- (5) 用 DCM 洗涤, 5×1 分钟。
- (6) 用试剂 (2) 洗涤 2 次, 2×1 分钟, 保留洗涤液。
- (7) 用 95% 乙醇稀释洗涤液, 最后溶液的浓度不超过 20% 的 DCM。
- (8) 在 358nm 读取紫外吸收, DIEA 的苦味酸盐 $\epsilon = 14,500$ 。
(10^{-5} mol/L 溶液 $A_{358} = 0.145$)

19.4.7.4 荧光胺实验

荧光胺与一级胺立刻反应产生一个强荧光的化合物, 荧光胺不显荧光。荧光胺不与二级胺脯氨酸反应。

试剂:

- (1) EtOH:HOAc (1:1), EtOH, DCM 和 CHL 用于洗涤。
- (2) 10% TEA/CHL
- (3) 荧光胺的 CHL 溶液, 10 mg/ml。

操作步骤:

- (1) 在缩合反应中取出少量树脂, 用下述溶剂分别洗 3 次: EtOH:HOAc (1:1), EtOH, DCM 和 CHL。
- (2) 用试剂 (2) 洗 4 次。
- (3) 用 EtOH 和 CHL 洗 4 次。
- (4) 加入 3 滴试剂 (2)。
- (5) 加入 1.0ml 试剂 (3)。
- (6) 在 360nm 处测紫外吸收, 阳性为黄绿色荧光, 当肽链中含有 Asn (Xan), Gln (Xan), Trp, His (Dnp) 等有荧光的残基时, 不能用此法。

19.4.7.5 四氯苯醌法

试剂:

四氯苯醌溶于甲苯成饱和溶液
乙醛
丙酮

操作步骤:

在缩合反应中取出少量肽树脂, 用 EtOH:HOAc (1:1) 洗涤 3 次, 再用 EtOH 洗涤 3 次 (用吸管吸去上清液), 让树脂尽量干燥。如果 N-末端要检测的氨基酸是脯氨酸 (或其它的二级氨基酸), 加入 0.2ml 丙酮。对于所有其它的氨基酸加入 0.2ml 乙醛。加入 0.5ml 试剂 1, 室温反应 5 分钟。蓝色或绿色的树脂是阳性。

综上所述, 实际应用最广, 不仅能定性且能定量的残留氨基检测方法仍首推茚三酮法。

19.4.7.6 氨基酸分析

无论是测定第一个氨基酸的缩合量, 或是在长肽合成中分段取样了解接肽反应是否完全, 以及完成接肽合成后对最后产物的定性定量测定, 均需要进行氨基酸分析。

通过氨基酸分析仪的测定, 可以自动给出各种氨基酸的含量, 取其中一个稳定的氨基酸的含量定为

1, 与其它各氨基酸的含量比值可以得知该合成肽的氨基酸数目正确与否和合成的好坏程度。例如, 下面是一个 5 肽 (Phe - Arg - Leu - Ile - Gly) 的氨基酸分析数据:

	含量	氨基酸的比例
Phe	4.692nmol	1.00 (以 Phe 的含量为标准)
Arg	4.596nmol	0.98
Leu	5.073nmol	1.08
Ile	4.650nmol	0.99
Gly	4.964nmol	1.06

1. 肽树脂的水解:

准确称量 5 ~ 10mg 肽树脂, 放入水解管中 (带螺旋盖的特制小试管), 加入 1.0ml 丙酸, 盖上盖子, 在水浴中加热, 拧开盖子再盖上, 反复这样的操作两次, 以便赶走空气, 再加入 1ml 12mol/L HCl, 用氮气赶走管中的空气 (氮气不能插入液面下), 拧紧盖子, 在预先加热的加热块中水解, 130℃ 反应 7 小时 (注意: 要保证水解管不漏气)。反应完后, 冷却水解管, 将水解液转移至烧瓶中, 减压蒸去酸 (反复几次), 浓缩至干, 加入 1ml 或 2ml 蒸馏水溶解浓缩物, 用 0.45 μ m 的滤膜过滤, 滤液送氨基酸分析。

2. 游离多肽的水解:

(1) 6mol/L HCl 水解多肽: 准确称量 2 ~ 5mg 的肽加入水解管中, 加入 2ml 6mol/L HCl 水溶液, 用氮气赶走水解管中的空气, 拧紧盖子, 在预先加热的加热块中水解, 110℃ 反应 22 小时, 如果肽链中含有立体位阻的序列 (如, Ile - Ile) 水解时间要延长至 48 ~ 72 小时。反应结束后的处理同 1。

(2) 4N 甲磺酸 [含 0.2% 3 - (2 - 氨基乙基) 吡啶] 水解: 该法水解可得到含 Trp 的全氨基酸比例 (Cys, Met 除外)。准确称取约 2mg 肽加入水解管中, 加入 1ml 4N 甲磺酸 [含 0.2% 3 - (2 - 氨基乙基) 吡啶], 于 115℃ 水解 22 小时, 水解结束后需用 1.0ml 3.5mol/L NaOH 水溶液中和, 过滤, 送氨基酸分析。

(3) MetSO 的水解: 如果肽链中含有 MetSO, 可以用 3N 甲磺酸水溶液水解, 110℃ 22 小时, 水解完后用等体积的 3mol/L NaOH 水溶液中和, 过滤, 送氨基酸分析。

(4) 将半胱氨酸氧化为半胱磺酸

试剂:

I 液: 88% 甲酸

II 液: 30% 过氧化氢

III 液: 甲酸: 过氧化氢 = 9:1, 将 0.9ml 甲酸与 0.1ml 过氧化氢混合后在室温放置 1 小时, 然后用冰浴冷却混合物。

操作:

50nmol 的肽加入 250 μ l 的 I 液, 冰浴冷却下加入 250 μ l 的冷的 III 液。在冰浴中放置 1 小时, 加入 5ml 蒸馏水并做冷干, 样品干燥后, 按照常规方法水解。如果操作小心, 这个方法通常不会破坏色氨酸和酪氨酸。

注意对于有立体位阻序列的肽来说需要进行两次水解, 这样可以对照两次的数据。例如 Ile - Ile, Val - Ile, Val - Leu, 需要 96 小时才能水解完全, 而对长时间加热不稳定的 Thr, Ser, Tyr 来说 22 小时就足够了。

3. 氨基含量的计算:

氨基含量 (实测) = (水解后氨基酸分析中作为标准的氨基酸的 nmol 数 / 肽片段中该氨基酸的个数) \times (水解液的 ml 数 / 进样量) $\times 10^6 \div$ 肽树脂的克数

$$\text{氨基含量 (理论值)} = \frac{\text{初始取代当量 (mmol/g)} \times 1000}{[\text{1000} - \text{初始取代当量 (mmol/g)} \times \text{保护肽分子量}]}$$

19.5 结束语

固相多肽合成法从发明至今, 已积累了 30 多年的经验, 得到了不断的改进与完善, 现已发展成为相当成熟的科学。它的易操作性使许多生物化学家也能自己动手合成简单的多肽而不用求助于多肽化学家。由于其方法能够为众多的非专业人员所掌握, 因此固相多肽合成法的应用范围非常广泛, 尤其是合成少量供科研使用的肽。对初次使用该方法者, 不妨先合成一个简单的四肽——LeuAlaGlyVal, 以验证本实验室的条件及操作者的技术是否合格。

(孙颖 文 鲁桂琛 审)

参 考 文 献

1. Stewart JM, Young JD. Solid phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Company, Rockford. (1984)
2. 黄惟德, 陈常庆. 多肽合成. 北京: 科学出版社, 1985
3. Gutte B. Peptides: synthesis, structures, and applications, San Diego Academic Press, 1995
4. Fields GB. Methods in Enzymology, vol. 289, Solid - phase Peptide Synthesis, New York: Academic Press, 1997
5. Tam JP, Heath WF, Merrifield RB. S_N2 Deprotection of Synthetic Peptides with a Low Concentration of HF in Dimethyl Sulfide: Evidence and Application in Peptide Synthesis, J Am Chem Soc, 1983, 105:6442 ~ 6455.
6. Determann H. Gel Chromatography, Springer. New York (1968)
7. Bodanszky M. Principles of Peptide Synthesis. Berlin: Springer - Verlag, 1984
8. Tonelli A E. Cyclic Polymers. London: Elsevier, 1986
9. Basava C, Anantharamaiah GM. Peptides: Design, Synthesis, and Biological Activity. Boston. Birkhäuser, 1994

20. 蛋白质氨基酸组成及序列测定

蛋白质在几乎所有的生命过程中都起着极其重要的作用,研究蛋白质的结构、功能以及结构与功能的关系是当前分子生物学的重要课题之一。蛋白质是由各种氨基酸按一定顺序以肽键相联而成的肽链结构。所谓蛋白质(或肽链)顺序就是指肽链中氨基酸的排列顺序,即一级结构。通常从左至右表示与肽链从氨基端(N末端)到羧基端(C末端)。一级结构所包括的内容有:①多肽链的数目;②每一条肽链中末端氨基酸的种类;③每一条多肽链的氨基酸种类、数目和排列顺序;④链内二硫键的位置和数目;⑤链间二硫键的位置和数目。

研究蛋白质的氨基酸顺序的重要性在于:①可以根据某些蛋白质分子,如不同物种的细胞色素C的氨基酸顺序在进化中的变异,绘制物种发生树,揭示这些物种之间的进化关系;②蛋白质一级结构的研究是在蛋白质分子水平上阐述某些疾病发生的机理及诊断分子病的基础,如镰刀状贫血是由于遗传基因突变,导致血红蛋白一级结构突变,结果原 β 链第六位的谷氨酸变成了缬氨酸,导致其功能缺陷;③蛋白质一级结构的研究可为多肽类新药的设计与合成提供依据;④蛋白质一级结构的研究是开展蛋白质工程工作的前提,根据蛋白质结构与功能关系的研究,对蛋白质分子中某些氨基酸残基进行修饰或置换,以了解某个或某些氨基酸残基对其功能的作用,并采用基因工程手段对蛋白质分子进行定向改造以获得具有新的蛋白质,即为蛋白质工程;⑤蛋白质一级结构的研究及其与已知蛋白质同源性的比较,可为该蛋白的功能研究提供线索。

总之,蛋白质一级结构的研究是揭示生命本质、了解蛋白质结构与功能的关系、研究酶的活性中心和蛋白质多级结构、探索分子进化及遗传变异等的基础,也是基因工程中研究基因克隆、表达及DNA顺序分析的重要内容。

本章所述氨基酸组成测定及蛋白质序列测定,可以提供每一条多肽链的氨基酸种类、数目、排列顺序及末端氨基酸的种类的资料。

20.1 蛋白质及肽的氨基酸组成分析

蛋白质及肽的氨基酸组成分析,不仅可以为天然蛋白质及肽提供一级结构的信息,而且可为基因工程药物的检测和质量控制、重组蛋白质产品的纯度提供一个重要的指标。

除使用氨基酸自动分析仪外,用HPLC法测定氨基酸的研究日渐活跃,用HPLC测定氨基酸的方法可分为柱前衍生法和柱后反应法两大类,柱前法是蛋白质水解后的游离氨基酸先同衍生试剂作用生成衍生物,然后经色谱柱分离、通过相应的检测器检测的方法。柱后法是将蛋白质水解成氨基酸,经色谱柱分离成单一氨基酸后,再与反应试剂(如茚三酮)反应。然后进行检测的方法。目前有多种衍生技术可被利用,衍生剂的不断更新进一步展示了新一代氨基酸分析技术的活力。我们现在介绍其中两种常用的氨基酸组成分析的方法,其测定灵敏度可达到纳克(ng)的水平。这两种方法均采用柱前衍生,反相柱分离的技术,现并有试剂盒提供全部反应所需试剂,使用起来更加方便、快捷。除用于蛋白质、肽类的水解氨基酸测定外,还广泛用于各种游离氨基酸的分析,在最短的时间内得到最精确的结果。

20.1.1 实验前的准备:蛋白质水解

方法一:盐酸水解法

无论用哪一种方法测定氨基酸(AA),首先都要进行蛋白质的水解,最常用的是盐酸水解法,即采

用 5.7mol/L 的 HCl, 在 110℃ 下水解 24 小时, 这样的水解条件对大多数氨基酸适合。但是, 丝氨酸的最佳水解时间为 8 小时; 苏氨酸为 16 小时; 异亮氨酸、缬氨酸为 72 小时。也有用 150℃ 快速水解 4 小时, 结果与 110℃ 水解 24 小时基本相同。

除 HCl 直接加入样品中进行水解外, 还可用 HCl 蒸汽进行水解, 它非常适合于微量的蛋白质及肽类样品。

方法二: 盐酸蒸汽水解法

以贝克曼公司提供的试剂盒和装置为例, 叙述蛋白质的 HCl 蒸汽水解之主要具体实验步骤。

(1) 将溶解好的样品 (每个样品含蛋白 0.5 ~ 2.0 μ g), 真空干燥。

(2) 把待测样品、空白、和标准品的试管分别放在水解架上。

(3) 为防止酪氨酸在水解中降解, 在水解瓶中加入大约 1mg 固体苯酚。

(4) 将水解管架放入水解瓶中。

(5) 向水解瓶中通氮气 1 分钟, 赶走氧气。

(6) 放入水解试剂 (6mol/L HCl) 1ml, 倒入瓶中, 旋转以便溶解苯酚。

(7) 充分通氮气, 1 ~ 2 分钟。

(8) 抽真空, 调节抽气速度, 直至水解瓶中的盐酸轻轻起泡; 抽真空的时间不要超过 2 分钟, 否则盐酸损失过量。

(9) 将水解瓶放入 110℃, 24 小时水解。

(10) 24 小时后取出, 打开阀门听到有放气声说明水解成功。

20.1.2 氨基酸的测定

样品水解好后, 即可进行氨基酸的分析测定, 下面介绍两种试剂已经商品化的氨基酸测定方法。

方法一: DABS 方法

原理:

DABS 法所用的衍生剂是 4-二甲基氨基偶氮苯-4-磺酰氯 (DABS)。衍生后生成 DABS-AA。

DABS-氨基酸的分析衍生技术, 其特点为快速、可靠、操作过程简便, 对所有氨基酸 (包括一级和二级氨基酸) 均可衍生, 衍生物在常温下可保持稳定数周, 低温下 6 个月内分析结果不变。所需的反应条件对反应产物影响很小, 因此重复性好, 采用可见光检测, 可以避免样品、溶剂或污染物因紫外光或荧光吸收所带来的干扰, 灵敏度也得到了很大提高。

仪器:

高效液相色谱仪

冷冻干燥机

高纯氮气

恒温水浴或油浴

溶剂过滤装置;

试剂:

氢氧化钠溶液 (3mol/L)

二甲基甲酰胺 (DMF)

A 液: 110ml 100mmol/L 的柠檬酸溶液, 加 40ml DMF 溶液, 用纯水定容至 1000ml。

B 液: 30% 的 A 液, 70% 的乙腈 (含 40% DMF)

DABS 试剂盒: 3 # 样品稀释液

4 # 衍生试剂

5 # 稀释缓冲液

实验步骤:**(1) DABS—氨基酸的衍生制备:**

- 1) 将水解的标准品或蛋白样品 (或游离氨基酸) 冷冻干燥。
- 2) 取 20 μ l 3 # 溶液放入标有样品的小管中。
- 3) 向小管中加入 40 μ l 4 # 衍生试剂, 盖上塞后, 混合振荡。
- 4) 放入 70℃ 恒温水浴, 12 分钟衍生完成。
- 5) 放置片刻, 打开管塞, 加入 440 μ l 5 # 溶液。
- 6) 取 20 μ l 样品进行 HPLC 分析。

(2) HPLC 分离分析:

色谱柱: Beckman DABS C18 250mm \times 4.6

梯度洗脱:

按下表所设梯度进行洗脱

梯度: time	init	0.00	17.2	23.20	27end
B %	25	56	86	100	
Dur:		17.2	3.47	1.00	

流速: 1.4ml/min

检测波长: 436nm

方法二: AccQ. Tag 方法

原理:

AccQFluor 法的衍生剂为 6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚氨基氨基甲酸酯。此反应剂能与伯氨基酸和仲氨基酸迅速反应, 生成在 395nm 发射强荧光的高稳定性的脲。生成的衍生物在室温下可稳定一周。过量的试剂可在一步慢反应中完全水解, 生成不干扰测定的副产物: AMQ、NHS 和 CO₂。

仪器:

色谱仪
柱温箱
超声波清洗器
旋涡混合器
水浴及油浴
溶剂过滤器

试剂:

A 液: 19.0g 三水醋酸钠, 1.72g 三乙胺溶于 1000ml 水, 用磷酸调 pH 至 4.95, 加适量的 EDTA, 用 0.45 μ m 滤膜过滤, 超声波脱气备用。

B 液: 乙腈 600ml, 加二次重蒸水 400ml, 加适量丙酮, 超声波脱气备用。

实验步骤:**(1) AQC 氨基酸的制备:**

- 1) 取标准液稀释 5 倍, 备用。
- 2) 精确吸取标准样品 10 μ l 于衍生用小管中,
- 3) 加入 70 μ l 缓冲液, 涡旋混合。
- 4) 边涡旋边加入 20 μ l 衍生试剂。
- 5) 接着将小管中液体移至自动进样微量小瓶中, 密封, 放置于 55℃ 烘箱 10 分钟取出 (或常温放置 45 分钟), 衍生完成。
- 6) 样品液的衍生操作同上。

(2) HPLC 分离分析:

色谱柱: AccQ. Tag 柱 ($3.98 \times 150\text{mm}$)

梯度洗脱: 按仪器或试剂盒提供的条件设置

流速: 1.0ml/min 荧光检测器: 激发光 250nm , 发射光 395nm 柱温: 37°C

根据标准 DABS-AA 或 AQC-AA 的保留时间及样品的保留时间定性, 仪器根据标准曲线自动计算出样品的绝对含量。

20.2 蛋白质 N 末端氨基酸序列测定

蛋白质氨基酸序列测定主要包括蛋白质(肽链)选择性裂解成多个肽段、多个肽段分离为单个肽段及各个肽段的氨基酸序列测定等步骤。本节主要对肽段的氨基酸序列测定方法作较详细的叙述。

20.2.1 蛋白质(肽链)的选择性裂解

一条多肽链往往过长, 给直接测定多肽链的氨基酸顺序带来困难, 因此一般需要将肽链降解成较小的片段, 再进行分析。蛋白质顺序测定实际是肽段的氨基酸顺序测定。因此, 多肽链的选择性裂解, 长度合适的肽段的获得, 是一级结构研究工作中的重要问题。常用的裂解方法有化学降解与酶降解两类。

方法一: 化学法

此系多肽链降解的常用手段。一般此方法所得肽段较大, 适合于对其进行氨基酸自动分析。具体方法有溴化氰法、部分酸水解法及羟胺法等, 其中最理想的方法是溴化氰法。

溴化氰(CNBr)裂解法是由 Gross 和 Witkop 于 1962 年建立的。CNBr 能专一裂解甲硫氨酸(Met)残基的羧基端。由于蛋白质中的 Met 一般都比较少, 因此裂解后的肽段较少, 新生成的肽段往往是大肽段, 适合于自动顺序仪测定, 更适合于固相法测定。CNBr 裂解甲硫氨酸残基的反应机理见下图

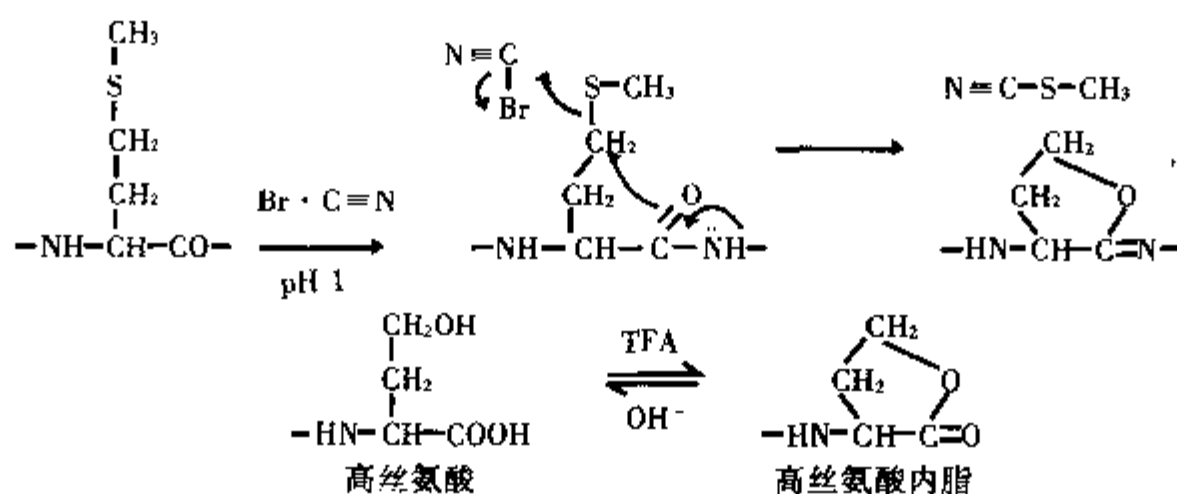


图 20-1 CNBr 裂解肽链的甲硫氨酸羧基所形成肽键的反应

反应是在酸性介质中进行。在酸性条件下氨基质子化, 可以避免一些副反应。如用 70% 甲酸可以破坏肽链的卷曲, 使甲硫氨酸侧链暴露, 有利于 CNBr 的裂解。整个反应应在氮气流或充氮容器中进行。

试剂与设备:

70% 甲酸

溴化氰(如有黄色需纯化处理)

冷冻干燥装置

操作步骤:

- (1) 称一定量蛋白质, 溶于一定体积的 70% 甲酸中 (5 ~ 50mg 蛋白/ml 70% 甲酸)。
- (2) 加 30 ~ 100 倍过量 CNBr。
- (3) 通 N₂ 充分混合后, 于室温 (20℃) 黑暗处放置 24 小时。
- (4) 加 10 倍量双蒸水稀释。
- (5) 冷冻干燥。

注意事项:

- (1) 如样品溶解度差, 可加大甲酸的浓度 (如 85% ~ 98%)。
- (2) 溴化氢是剧毒而挥发性的固体, 操作时必须戴手套在通风橱中进行, 用过的器皿须用次氯酸盐溶液洗涤。溴化氢不太稳定, 有颜色的溴化氢在裂解时使酪氨酸和色氨酸破坏, 只有用无色的溴化氢, 在 70% 过甲酸溶液中, 反应才能接近定量。
- (3) 溴化氢还可能产生某些特殊裂解, 如在半胱氨酸残基的 N 端或在酪氨酸残基羧基端形成的肽键处裂解。
- (4) 甲硫氨酸在 N 末端时, 则产生游离的高丝氨酸酯, 反应常不完全, 约有 10% Met 键保留下来, 不被裂解。

方法二: 酶解法

酶解法具有专一性高、水解产率高的优点。常用的酶有胰蛋白酶、糜蛋白酶、胃蛋白酶等 (表 20-1)。

表 20-1 几种常用肽链裂解酶的特性

酶	酶解部位	最适 pH
胰蛋白酶	N - Lys/Arg	8 ~ 9
胰凝乳蛋白酶	N - Met/Leu/His	8 ~ 9
嗜热菌蛋白酶	C - Phe/Leu/Ile/Val 等	8
胃蛋白酶	由疏水氨基酸 (除 Pro 外) 组成的肽键	2

20.2.2 肽段的分离、纯化

蛋白质裂解后所得到的肽段的分离无统一的方法可言, 可根据其片段长短的不同, 即分子量大小的不同或所带电荷的性质和数量的不同或疏水性的差异, 分别采用凝胶过滤层析、离子交换层析或反相柱层析等将其分离, 并收集单一片段的洗脱峰, 供氨基酸顺序测定。

20.2.3 肽段氨基酸顺序测定

蛋白质 (肽段) 氨基酸顺序测定既可从 N 末端开始进行, 也可从 C 末端开始进行。但是, 因为从 C 末端测序的方法尚不成熟, 通常都是从 N 末端进行的。从 N 末端测序的方法很多, 其中最主要的是化学方法。常见的有 Edman 降解法、DNS - Edman 降解法、DABITC/PITC 双偶合法。早年还使用 FDNB 法, 由于灵敏度低、操作复杂和不能连续降解等弊端, 一般已不再采用, 而 Edman 化学降解法迄今仍然是诸多蛋白质或多肽序列测定技术中最有效和最基本的方法。

20.2.3.1 Edman 化学降解法原理

Edman 化学降解法是 1950 年由 Edman 首先提出并以他的名字命名的一种化学降解法。其优点是可连续降解蛋白质的肽链, 这就为蛋白质序列测定全自动化提供了条件。现有的蛋白质序列分析仪实际上是执行一个全自动化的 Edman 化学降解反应和游离氨基酸的分离与鉴定过程。Edman 化学降解法所用的

试剂是异硫氰酸苯酯 (phenylisothiocyanate, PITC), 其原理如图所示: 肽与异硫氰酸苯酯 (PITC) 在 pH8 ~ 9 条件下反应, 肽的 NH_2 末端接到 PITC 的 C 原子上, 生成苯异硫甲氨酰肽, 简称 PTC - 肽。在强酸作用下, 可使靠近 PTC 基的氨基酸环化, 肽键断裂形成噻唑啉酮苯胺 (Thiazolinone ATZ) 衍生物和一个失去末端氨基酸的新生肽链。新生肽有一个新的 N - 末端, 可以重复上述反应。如此不断循环, 可依次使构成肽链的氨基酸, 逐一降解, 形成的 ATZ - 衍生物 (ATZ - 氨基酸极易被有机溶剂抽提, 并在水溶液中转化成稳定的乙酰苯硫脲氨基酸 Phenylthiohydantoin - AA, PTH - 氨基酸)。

20.2.3.2 蛋白质自动测序

根据上述 Edman 降解原理进行肽链顺序分析的方法可分为手工测定与自动化测定。

现以 Beckman 公司生产的 LF3000 测序仪为例, 介绍蛋白质自动测序全过程。

LF3000 蛋白测序仪是一种气相蛋白质顺序仪, 由以下几个部分组成:

(1) 反应系统 (主机)

(2) 分析系统:

高效液相色谱仪: 包括溶剂高压输液泵, 二极管矩阵检测器。

PTH - 氨基酸微型柱

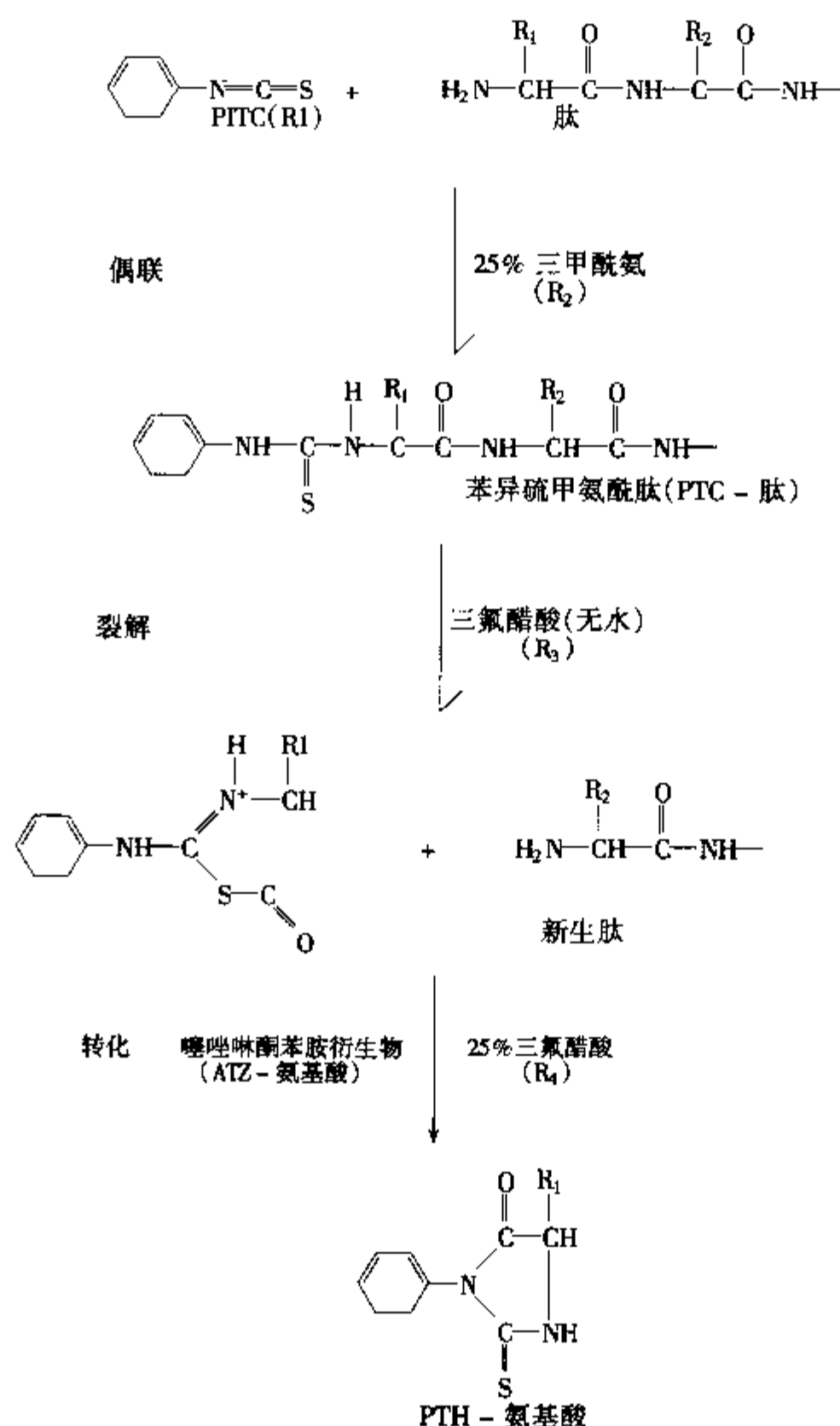


图 20-2 Edman 降解法反应示意图

全自动进样器

柱恒温加热器

(3) 数据系统: 计算机处理数据及打印

LF-3000 的特点是将被分析的样品加在样品支持盘上, 再由超纯氮将各种超纯试剂输送到支持盘上进行反应, 该样品支持盘的表面是一种带电荷的功能性配体, 通过表面离子化功能基团结合到样品上, 而不需要载体, 样品支持盘分蛋白质支持盘与肽支持盘两种。前者主要用于分子量大于 8kD 的样品的分析, 分子小于 15 个氨基酸残基组成的肽在洗涤过程中, 将被从支持盘上洗去; 肽支持盘则主要用于分子量小于 8kD 的样品分析, 这样可以避免载体中含有的不纯物对测序的干扰。

实验方法:

全部测序过程在电子计算机程序控制下完成。

1、Edman 降解:

试剂:

溶剂 1: 100% 乙酸乙酯/0.0016% DTT

溶剂 2: 10% 乙腈

PTTC 溶液: 0.5 异硫氰酸苯酯 (PTTC) /庚烷

二异丙基乙胺 (DIPEA)

100% 三氟乙酸

25% 三氟乙酸

反应步骤:

- (1) 将适量的肽溶液加在样品支持物上。
- (2) 在反应室中以 DIPEA 为偶联剂, 使肽与 PTTC 偶联生成 PIC-肽。
- (3) 经溶剂 1 提取洗涤干燥, 反复数次, 以除去剩余的反应试剂。
- (4) 输入 R_3 , 行切割反应, 形成 AT_2 -氨基酸。
- (5) 干燥除去 R_3 。
- (6) S_1 洗涤, 提取并将 AT_2 -氨基酸转运到收集瓶中。
- (7) 输入 R_4 至收集瓶中, 使 AT_2 -氨基酸转化成 PTH-氨基酸。
- (8) 将 PTH-氨基酸逐一输送至 PTH-微型柱于 HPLC 仪进行检测。

2. HPLC 检测 PTH-氨基酸

试剂与仪器

仪器:

HPLC

PHT 微型柱: Spherogel ODS Micro PTH Column 3μ 2.0×150

试剂:

溶剂 A: 828ml 3.5% 四氢呋喃 (THF)

17.5ml 3mol/L 醋酸钠

150 μ l 三乙胺 (TEA)

550 μ l 2.5% 三氟醋酸 (TFA)

混合备用

溶剂 B: 100% 乙腈

实验步骤:

- (1) 样品 (即转化好的 PTH-氨基酸) 经自动加样器, 上到 PTH 微型柱。
- (2) PTH 微型柱分离条件:

温度: 51 ~ 52℃

起始缓冲液: 5% B

梯度洗脱: 按仪器或试剂盒提供的条件设置。

一个循环为期 33 分钟。

洗脱过程中, 用二极管矩阵紫外检测器于 268nm 检测。

(3) 根据标准 PTH - 氨基酸的洗涤滞留时间, 确定逐一所得的氨基酸。

注意事项:

(1) 蛋白质测序样品应是经过纯化的单一组分, 或经聚丙烯酰胺变性凝胶电泳鉴定是一条带, 或经毛细管电泳鉴定是一个吸收峰, 样品纯度应达到 95% 以上。

(2) 样品应溶解在低盐缓冲液里 (100nmol/L 以下), 不含有 Tris、甘氨酸等影响测序结果的物质。

(3) 本方法属蛋白质 N 末端测序法, 待测样品应是 N 末端不封闭的。

(4) 测序需要的样品蛋白量与测定氨基酸数目、样品分子量及样品纯度有关系。一般测定 15 个氨基酸序列, 蛋白质纯度是 95%, 应提供 0.5 ~ 1nmol 的总蛋白量, 总体积约 10 ~ 20 μ l。

(崔莲仙、徐雁英、徐晓石 文)

参 考 文 献

1. 刘培楠、吴国利主编. 基础分子生物学. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1989
2. 徐秀璋. 蛋白质顺序分析技术. 北京: 科学出版社, 1988
3. Frederick M. Ausubel, et al. Short Protocols in Molecular Biology. 3rd ed. Published by John Wiley & Sons, Inc, 1995

21. 真核基因表达调控

机体的生长、发育及细胞的分裂、分化等一切生命现象，无一不是基因表达的有条不紊的调控的结果。因此，深入研究基因表达的调控机制，可以揭示生命的奥秘，诊断、控制肿瘤及其它遗传性疾病，改造生命，创造新物种，为人类的经济建设服务。基因表达的调控研究已成为当代分子生物学研究中的一个最活跃的领域。

所谓基因表达，是指按基因组中特定的结构基因上所携带的遗传信息，经转录，翻译等一系列过程，指导合成特定氨基酸序列的蛋白质分子而发挥特定生物功能的过程。但并非基因组上所有的结构基因都在所有细胞中同时表达，而必须根据机体的不同发育阶段，不同的组织细胞及不同的功能状态，选择性、程序性地在特定细胞中表达特定数量的特定基因，这就是基因表达的调控。基因表达的调控是一个多水平（基因组、转录、转录后、翻译及翻译后）的复杂过程，真核基因的表达调控尤其复杂，至今我们对之还知之甚少。基因表达调控研究仍将是今后相当长一段时间内的一项艰巨而又意义深远的工作。

本章将简要介绍真核基因表达调控的基本理论及主要研究方法。

21.1 真核基因表达调控基本理论

21.1.1 真核基因结构功能特点

原核生物与真核生物在基因结构上有相当大的差异，从而决定了其表达调控方式也有很大差别。

(1) 真核生物的 DNA 含量大得多，约为大肠杆菌 DNA 含量的数百至数千倍，与裸露状态的原核生物 DNA 不同，真核生物 DNA 大多与蛋白质结合，形成复杂而又有序的高级结构即染色质或染色体，并由核膜包裹起来，形成细胞核（线粒体与叶绿体 DNA 除外）。这就决定了真核生物基因表达必然受到其高级结构的影响，并且转录与翻译过程不能同步进行，从而可以在更多的水平上进行调节控制。

(2) 真核细胞编码基因大多是不连续的：绝大多数真核生物（特别是高等脊椎动物）的基因是由外显子与内含子镶嵌排列而成的。所谓外显子（exon）是指为蛋白质氨基酸序列编码的那部分 DNA 序列；而内含子（intron）则是指那些插入到编码序列之中的非编码序列。基因转录产生的初级转录产物必须经过一定的加工过程，将插入的内含子序列切除，才能形成成熟的 mRNA 分子。这些内含子的功能现仍不清楚，据推测可能有如下几种作用：①某些内含子中含有基因表达的调控序列，参与表达的调控；②不同的剪切方式可产生不同的基因表达产物；③提供遗传变异机会，与生物进化有关。

(3) 真核生物 DNA 中含有大量重复序列：所谓重复序列是指在基因组中多次反复出现的 DNA 序列。这些重复序列按其出现的频率可分为低度、中度和高度重复序列。各种重复序列的长度、序列及重复次数不同，其功能亦有极大差别。有些重复序列是为蛋白质编码的，有些则不是编码序列。其功能可能大致有以下几种：

1) 某些基因产物的生物学功能极为重要，且需要量极大，如组蛋白、rRNA、tRNA，及某些糖代谢酶类等，因此，为这些分子编码的基因以多拷贝形式存在，可充分满足细胞的需要量。这也是表达调控的一种有效方式。

2) 某些重复序列与染色质构象、着丝点的形成有关。

3) 参与基因复制及表达的调控：某些高度重复序列中 AT 含量丰富，易解链，有利于与调控基因

复制和表达的蛋白质因子结合；另外，许多重复序列结构中含有末端反向重复序列，可形成茎环状结构，这种高级结构参与基因表达调控，也可能与基因的转位有关。

(4) 某些有一定同源性而又不完全相同的基因簇，组成一个基因家族，如珠蛋白基因、ras 基因家族等。它们有些分工行使不同的生物学功能，还有一些则根本不具有功能，称为假基因 (pseudogene)，它们可能只是进化的痕迹，也可能为今后的进化提供物质基础。例如，多种蛋白水解酶都具有相似的活性中心，可以推断，它们都是由同一种原始蛋白水解酶进化而来的。这种原始酶基因通过扩增形成多拷贝基因，然后通过突变、自然选择而进化为各种不同功能的蛋白水解酶。

(5) 真核基因组中不存在“超基因”式的操纵子结构，功能相关的基因大多分散在不同的染色体上，即使空间位置相近，也是分别进行转录的，而不产生多顺反子 mRNA。

(6) 原核生物生存的唯一目的就是无限生长繁殖，因此其基因表达调控系统的作用就是在一个特定环境中为细胞提供最大的生长速度，即将酶活性控制在最大速度所要求的点上，并使细胞尽快地适应变化着的环境。而真核生物，特别是多细胞高等生物，则除了生长繁殖外，更重要的是要进行分化。由于高等动物的血液循环系统为细胞提供了一个较稳定的环境，因此生长的调控相对较为简单，而分化的调控则复杂得多。高度分化的组织细胞中，只有大约 10% 的基因程度不同地表达，大多数基因被关闭，如何调节各种基因的表达活性，其复杂程度是可想而知的。而原核生物中一般有 40% ~ 50% 的基因处于活性状态。

21.1.2 真核基因表达调控的策略

如上所述，真核基因的表达是一个多阶段过程，因此，真核基因表达的调控也是在多阶段水平来实现的，即转录前、转录、转录后、翻译和翻译后等五个水平。

转录前（基因组水平）调控：包括基因丢失、基因扩增、基因重排、甲基化修饰及染色质结构改变等。

初级转录产物合成的调控：主要包括顺式作用元件和反式作用因子对 RNA 聚合酶活性的调节，它们介导了激素、生长因子、应激等刺激和分化对基因活性的调节。

转录后调控：包括 mRNA 加“帽”、加“尾”及剪切等。

翻译水平调控：包括翻译的起始、mRNA 寿命等的调节。

翻译后调控：包括糖基化、磷酸化及水解等。

以下将分别进行介绍，并以转录水平的调控作为重点。

21.1.3 转录前的表达调控

转录前的调控是指发生在基因组水平上的基因结构的改变。这种调控方式较稳定持久，甚至有些是不可逆的，主要见于机体发育过程中的体细胞分化的决定。显然，这种调控方式未免缺乏灵活性，不适用于对生长因子应激等刺激的应答反应。

21.1.3.1 基因丢失

体细胞分化过程中，必须将某些基因永久性关闭。显然达到此目的的最简单而有效的方式就是将这些基因丢失掉。在一些低等真核生物（如线虫、原生动物和昆虫等）的体细胞发育过程中确实发现了染色体丢失现象。如原生动物尖毛虫细胞中有大、小两个细胞核。小核中 DNA 是完整的，但不具有转录活性，起维持种系的作用；而大核中只保留了部分 DNA，具有转录活性。马蛔虫体细胞中也丢失了大部分基因，只留下极少数维持细胞分化功能的基因。但这种基因丢失现象并非普遍存在。

21.1.3.2 基因扩增

当发育分化或环境条件的改变，使对某种基因产物的需要量剧增，而单纯靠调节其表达活性不足以满足需要时，增加这种基因的拷贝数（即基因扩增或基因放大，gene amplification）也是基因表达活性

调节的一种有效方式。

非洲爪蟾卵母细胞中 rRNA 基因 (rDNA) 扩增了约 2000 倍。这是因为卵母细胞的分裂需要大量合成蛋白质而对 rRNA 的需要量剧增的结果。基因扩增的结果使细胞内迅速积蓄起 10^{12} 个核糖体, 如果没有这种扩增作用, 则需要 500 年时间才能积蓄起如此多的核糖体。

一些药物如氨甲喋呤、镉汞等重金属、铜离子等也可分别诱导体细胞中的二氢叶酸还原酶基因、金属硫蛋白 I 基因、铜结合蛋白及其他抗药性基因的扩增。

基因扩增的机制仍不清楚, 目前多数人倾向于认为是基因反复复制的结果。也有人认为是姐妹染色单体不均等交换, 从而使一些细胞中某种基因增多, 而另一些细胞减少; 甚至有人认为是从其他死细胞中摄取 DNA 而据为己用的结果。另外, 不可忽视选择压力的作用, 无基因扩增的细胞将被生存竞争压力杀死。

扩增的基因可游离存在, 也可整合入染色体, 有些生物中可形成多线染色体。

值得注意的是, 不适当的基因扩增可导致某些疾病的发生。如某些癌基因 (c-myc、c-k-ras 等) 的扩增可能与某些肿瘤的发生有关。

21.1.3.3 基因重排

基因重排是指某些基因片段改变原来存在的顺序而重新排列组合。重排可以仅仅是空间位置或方向的不同, 也可同时伴有某些基因片段的扩增或丢失。基因重排方式是基因表达的转录前调控的较重要方式之一。

广义的基因重排有多种方式: ①类似于 mRNA 加工的“剪切”方式; ②转座子方式; ③染色体转位方式; ④外源基因序列 (如逆转录病毒长末端重复序列, LTR) 的插入激活方式等。

1. “剪切”方式:

哺乳动物淋巴细胞分化过程中免疫球蛋白 (Ig) 的产生是此种方式的代表。机体可产生上百万种不同的 Ig。而事实上基因组中不可能分别为如此众多的 Ig 编码, Ig 的多样性是通过基因重排实现的 (图 21-1)。

Ig 是由两条相同的轻链 (λ 或 κ) 和两条相同的重链 (H 链) 组成的, 在人体中它们分别由位于第 22、第 2 和第 14 号染色体上的 λ 、 κ 和 H 基因编码。 κ 轻链基因由可变区 (V)、连接区 (J) 和不变区 (C) 三部分组成。H 重链基因由高变区 (V)、可变区 (D)、连接区 (J) 和不变区 (C) 组成。抗体的多样性主要取决于 V 区, 与 D 区和 J 区也有一定关系。 κ 基因的 V 区约有 200 种不同的基因顺序, J 区有 4 种, 它们与 C_{κ} 一起串联排列。H 基因的 V 区也有约 200 种不同基因, D 区有 10 种, J 区 4 种, C 区约 10 种, 也串联排列。它们没有表达活性。

当细胞分化时, 每个细胞中的 κ 基因发生重排, 各随机取 1 个 V、J、C 基因连接形成 VJC, 即完整的一个轻链基因, 而将其它的 V 和 J 基因切除。同样, H 基因各取 1 个 V、D 和 J 基因形成 VDJ 连接, 其 mRNA 通过与不同的 C 基因拼接形成 IgG、IgM、IgA、IgE 和 IgD (图 21-1)。

因此, 虽然为 Ig 基因编码的基因数量不多 (不足 500 个), 却可通过不同的重排方式产生多种多样的抗体。 κ 基因通过重排产生 $4 \times 200 = 800$ 种不同的轻链, 而 H 基因可产生 $200 \times 10 \times 4 = 8000$ 种不同的 VDJ 连接可能性。这样, 不考虑不变区的不同, 总共有 $800 \times 8000 = 6400000$ 种不同抗体。这种重排方式是极为经济的, 节省了大量的基因组空间。

2. 转座子方式:

40 年代初, Barbara McClintock 即提出, 在玉米基因组上有一种可移动的遗传因子, 当它插入到染色体上的某些地方时, 就可控制此基因的表达。此卓越的发现已远远超过了当时科学水平, 因而未引起足够的注意。直到 70 年代后期, 人们发现了细菌抗生素抗性基因的移动现象, 她的这项成果才得到人们的承认。

目前所发现的移动基因大多是在原核生物中发现的, 如插入顺序 (insertion sequence, IS)、转座子

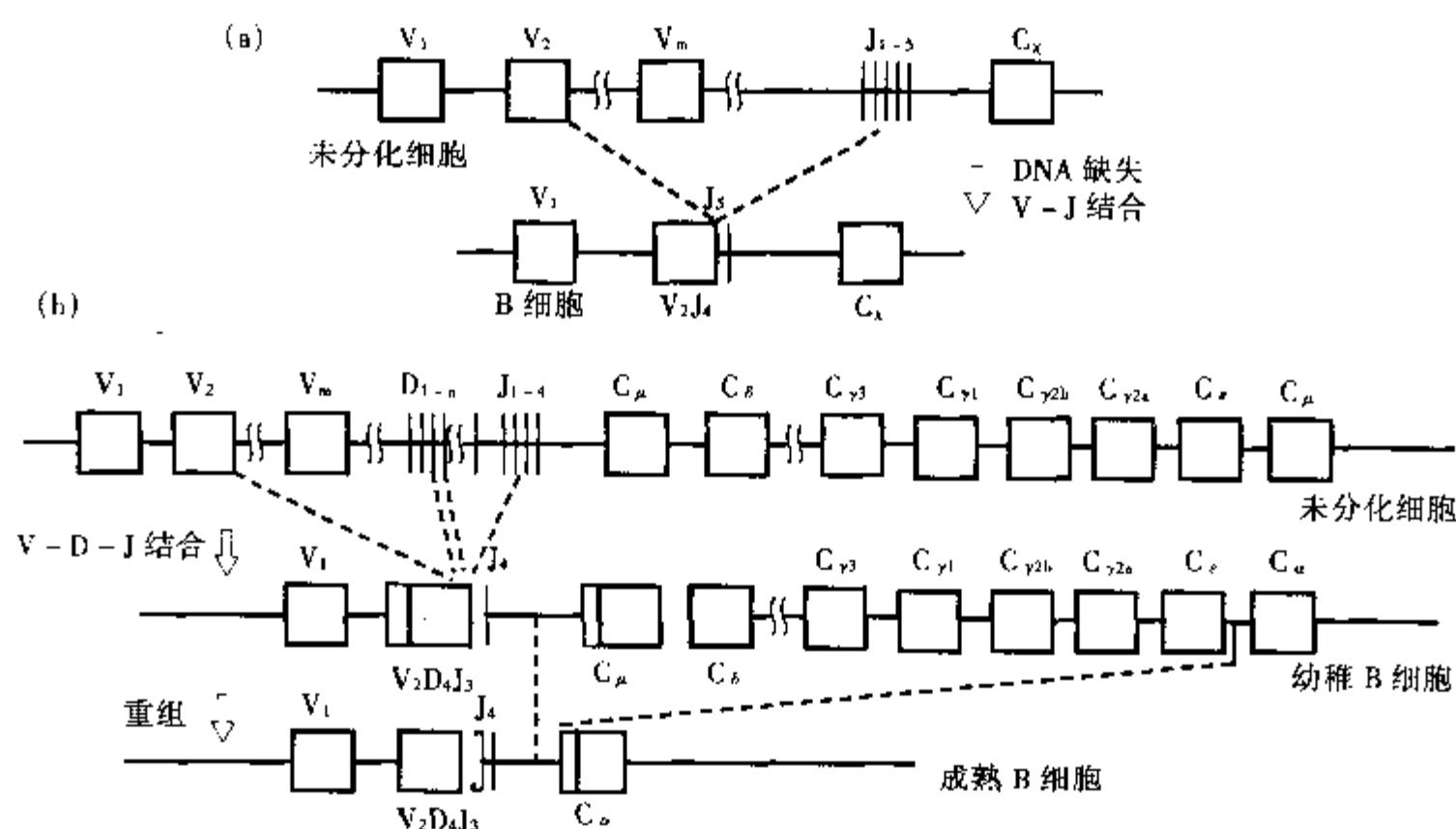


图 21-1 Ig 基因的重排

(transeron, Tn) 和 Mu 噬菌体 (mutator bacteriophage) 等。其中转座子 (Tn) 是比较典型的完整的移动基因 (图 21-2)。Tn 由 5 个部分组成：①反末端重复序列，这是转座酶识别位点，通过酶切、复制后再插入到其它位置；②转座酶基因，为转座酶编码，转座酶可识别插入顺序，并在 DNA 上切割；③阻遏蛋白基因，编码阻遏蛋白，对转座起负调控作用；④调控区，为调控蛋白的结合位点；⑤附加基因，与转座无关，如 Tn3 带有青霉素抗性基因—— β -内酰胺酶基因。

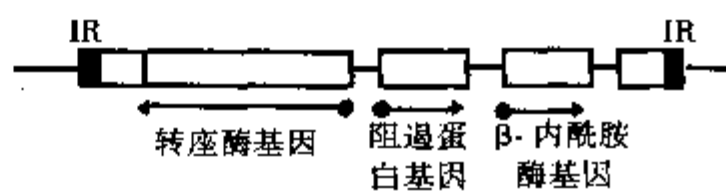


图 21-2 转座子 Tn3 结构示意图

IS 除带有与转座有关的基因外，不带有其它附加基因，有些即是 Tn 中的反向重复顺序，如 IS1 即是 Tn9 的反向重复顺序，IS10 是 Tn10 的反向重复顺序。因此可以认为 IS 是 Tn 的一个特殊类型。

真核生物中也发现了与 Tn 相似的基因，如酵母 TY1 因子和果蝇 Copia 因子等，结构功能都与 Tn 类似。

转座子对于真核基因表达的调控作用，仍有待进一步研究。但其在进化中的重要作用则是无疑的。转座子将一些原来在染色体上相距甚远的基因连接到一起，从而产生一些新的蛋白质分子或新的表达调控方式。

3. 染色体转位方式 (chromosome translocation):

严格来说，染色体转位方式并不是基因表达的正常调控方式，而是一种病理现象。但确实可以导致某些基因的表达改变。此方式常见于一些癌基因的活化过程。如人 Burkitt's 淋巴瘤中常可见 t(8; 14) 染色体易位，导致原来不具转录活性的 c-myc 癌基因转位到 Ig 重链基因的强大增强子作用之下，从而被激活转录。c-abl、c-myb 癌基因也常见转位激活机制。急性原粒细胞白血病细胞中 t(15; 17) 染色体转位可导致视黄酸受体 α (retinoic acid receptor α , RAR α) 基因的重排。

4. 外源基因插入激活方式:

类似于转座子方式，但可能并无转座子的参与。主要见于反转录病毒的长末端重复序列 (long terminal repeat, LTR) 的插入引起的细胞癌基因的激活。LTR 可能具有增强子作用。也有人认为有一些 (也可能是全部) RNA 肿瘤病毒本身就是转座子。其它病毒，如 SV40、腺病毒等基因的插入，也可导致

基因表达活性的改变。

21.1.3.4 甲基化修饰

某些高等生物,尤其是脊椎动物中,DNA上特定的 CpG 序列处的胞嘧啶可发生甲基化修饰(5mC),这种甲基化修饰可以阻止某些基因的转录,并且能遗传到子细胞中去。研究表明,转录活跃的基因是低甲基化或不甲基化的,而不表达基因则高度甲基化。如珠蛋白基因在红系细胞中是低甲基化的,而在不表达珠蛋白的细胞中则高度甲基化。胎儿型血红蛋白基因在成体中不表达也可能是其甲基化的结果。5-氮杂胞嘧啶可使细胞 DNA 脱甲基化,从而启动成体中胎儿型血红蛋白(HbF)基因的表达,可用于镰刀型红细胞贫血和 β 地中海贫血的治疗。持续表达的看家基因(house-keeping gene)的转录起始区极少发生甲基化(所谓看家基因是那些维持一般细胞正常功能所必须的而且持续表达的基因)。有人认为 X 染色体的失活也是 DNA 甲基化的结果。

在脊椎动物中,DNA 甲基化是普遍现象,但在无脊椎动物中则较少,而在昆虫中则根本没有。有人认为,DNA 甲基化调控作用是在进化发展到较高级阶段才出现的,因此它只对那些近期进化的基因才有调控作用。

总之,DNA 的甲基化修饰对真核基因的表达具有一定的调控作用。但它是否具有普遍性及其调控机制还有待于进一步研究。

21.1.3.5 染色质结构对基因表达的调控作用

真核生物基因组的最重要特征之一就是,DNA 与组蛋白、非组蛋白等多种蛋白质和少量 RNA 及其他物质结合,形成染色质(chromatin)或染色体(chromosome)结构。有关核小体(nucleosome)及染色质高级结构在有关文献及教科书中已有大量介绍,不再赘述。

含大量碱性氨基酸(约 25%)的组蛋白与 DNA 紧密结合,可保护 DNA 免受损伤,维持基因组的稳定性,并抑制基因的表达。去除组蛋白则基因转录活性增高。这种组蛋白的结合与解离是真核基因表达调控的重要机制之一。机体可通过以下几种机制将碱性组蛋白修饰,从而减少正电荷,减弱与 DNA 的结合能力:①磷酸化:组蛋白 N 末端的丝氨酸磷酸化,使其带负电荷,与 DNA 骨架上的磷酸基团排斥,从而减弱二者的结合能力。多种细胞生长、分化信息是通过磷酸化-去磷酸化作用向核内传递的,因此不难想象,组蛋白的磷酸化作用是介导对生长、分化等信息反应的重要机制之一;②乙酰化:组蛋白中的丝氨酸和精氨酸均可被乙酰化修饰,同样可削弱正电荷及与 DNA 的结合能力,从而有利于转录;③甲基化:主要是赖氨酸的甲基化,结果与上面相同。

非组蛋白蛋白质(非组蛋白,NHP)是染色质中含有的一类蛋白质,种类较多,氨基酸组成也比较复杂,多为中性或酸性蛋白质。非组蛋白的特点是具有种属与组织特异性,与细胞的发育、分化有重要关系。它在染色质中的含量极少,然而对基因的表达起着重要的调控作用。据认为,此调控作用,主要与其中一组被称为高迁移率非组蛋白(high mobility group, HMG)的组分有关。据推测,HMG 可以与组蛋白 H₁ 或 H₂ 竞争性地与 DNA 结合,从而取代 H₁ 或 H₂,解除组蛋白对基因表达的抑制作用。现在认为,非组蛋白中有相当部分是调节基因表达的反式作用因子(见 21.1.4)。

染色质有结构紧密的超卷曲状态和结构松散的伸展状态及多种中间状态。这两种状态的转换主要与组蛋白 H₁ 有关,H₁ 与伸展状态的核小体结合形成螺旋管结构。结构紧密的染色质形成异染色质,结构松散的染色质为常染色质。转录活性较高的基因都位于结构较松散的常染色质中,而位于结构紧密的异染色质中的基因则大多不具转录活性。

转录活跃的活性染色质区域,由于结构松散,去除了组蛋白的保护作用,因此对于核酸内切酶 I(DNase I)的水解作用较敏感,称为 DNase I 敏感区。而结构紧密的非活性染色质则对 DNase I 不敏感。因此常将 DNase I 敏感性作为该基因的转录活性的标志。研究表明,DNase I 敏感性有组织特异性。另外,在活性染色质中还存在一些对 DNase I 特别敏感的区域,称为 DNase I 超敏感区(DNase I hypersensitive site)。DNase I 超敏感区一般位于活性基因的 5'端,可能反映了基因转录的起始位点。

21.1.4 转录水平的调控

转录水平的调控,是真核基因表达调控中最重要的一步,主要涉及以下三种因素的相互作用:①RNA聚合酶(RNA polymerase, RNA pol):基因转录是由RNA聚合酶催化完成的,转录水平的调控实质上就是对RNA聚合酶活性的调节;②顺式调控元件(cis-acting element):为与结构基因串联的特定的DNA序列,它们对基因转录的精确起始和活性调节起着举足轻重的作用,③反式作用因子(trans-acting factor):是由位于不同或相同染色体上基因所编码的蛋白质因子,通过与顺式调控元件和RNA聚合酶的相互作用而调节基因转录的活性。图21-3所示为转录信息诱发的真核基因表达的调控的一种可能模式。

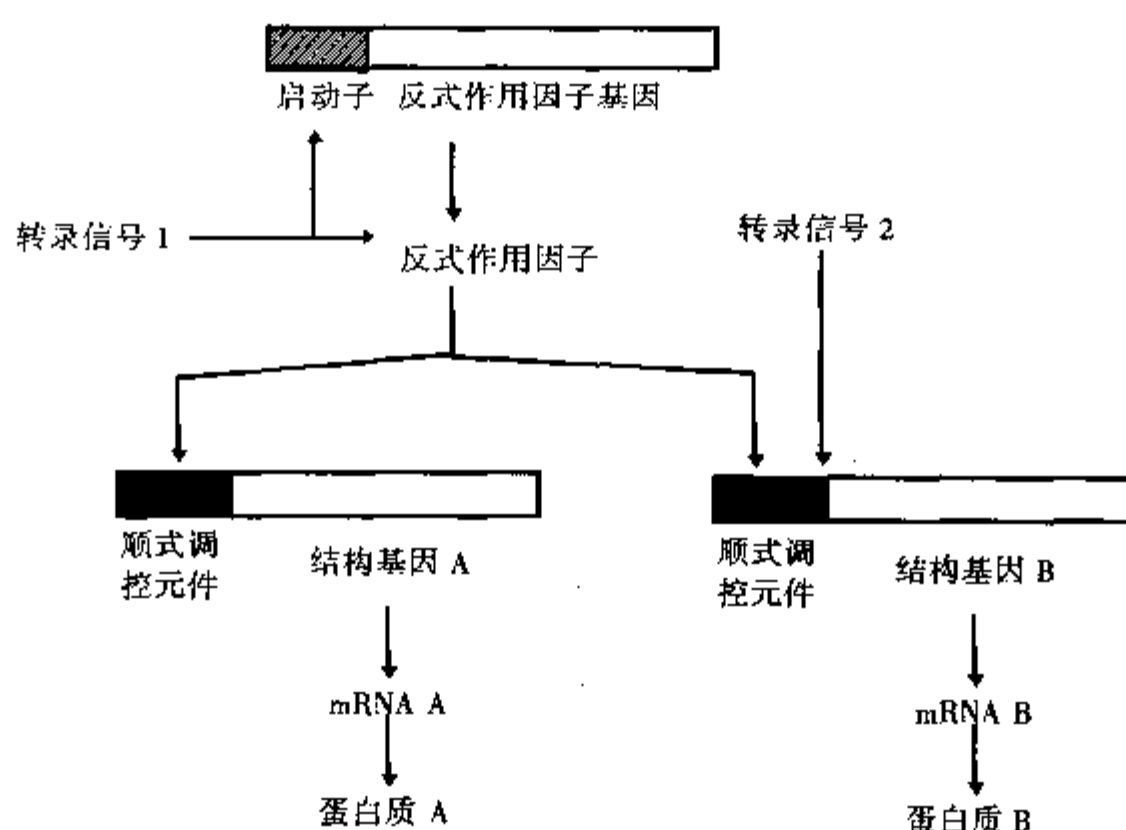


图 21-3 真核基因转录调控模式图

如图21-3所示,同一转录信息(如信息1)可调控一类基因(基因A、B)的表达,而同一基因(基因B)可受到多种信息的诱导。

21.1.4.1 RNA聚合酶

与原核生物单一的RNA聚合酶不同,真核生物的RNA聚合酶有三种:RNA聚合酶I、II、III。RNA聚合酶I(RNA pol I)存在于核仁中;其转录产物为rRNA(5.8S、18S和28S rRNA);对 α -鹅膏蕈碱有一定的抗性。RNA pol II存在于核质中;其转录产物为mRNA及其他一些功能不明的小分子量RNA,如U₁₋₆ RNA;对 α -鹅膏蕈碱十分敏感。RNA pol III存在于核质中;其转录产物为5S rRNA和tRNA;对 α -鹅膏蕈碱的敏感性介于上述两者之间。

由RNA pol II转录的基因称为II类基因,此类基因品种多,与细胞生长、分化直接相关,其表达调控也最为复杂。以下重点介绍II类基因的转录调控。

21.1.4.2 顺式调控元件(cis-acting element)

真核细胞中,不同的顺式调控元件按不同的数量、类别及空间位置串联排列,组成了各基因表达的调控区域,它们的协同作用决定了基因转录的精确起始与转录效率。

1. 启动子(promoter):

启动子是与基因转录启动有关的核酸序列,位于基因转录起始位点5'端,只能在近距离起作用(一般在100bp之内),有方向性,空间位置较恒定。它是转录的最基本信号结构。II类基因的启动子有以

下几种:

(1) Goldberg - Hogness 盒 (Hogness 盒, TATA 盒): 其核心序列为 TATA \uparrow A \uparrow , 与原核生物启动子 *Prinbnow* 盒相似。位于转录起始位点上游 -30bp 附近区域。TATA 盒决定了基因转录的精确起始。TATA 盒在离体条件下为转录所必需。活体下, 缺失 TATA 盒也可转录, 但没有固定的转录起始位点。

(2) 上游启动子元件 (upstream promoter elements, UPS): 主要包括 CAAT 盒和 GC 盒。CAAT 盒位于转录起始位点上游 -70 ~ -80bp 区域, 其核心序列为 GG \uparrow CAATCT。GC 盒核心序列为 CCGCCC, 位置不定。CAAT 盒和 GC 盒与 TATA 盒一样, 都是普通启动子元件, 它们的协同作用决定了基因的基础转录效率。

(3) 组织特异性启动子: 如肝细胞特异性启动子元件 HPI, 它们位于白蛋白、抗胰蛋白酶和 AFP 等肝细胞特异性基因的调控区, 与这些基因在肝细胞中的特异性表达有关。

(4) 诱导性启动子: 如 cAMP 反应元件 (cAMP responsive element, CRE) 等, 介导对 cAMP、生长因子等信号的反应。

RNA pol III 启动子位于结构基因内部。tRNA 基因启动子 (如图 21-4) 由 A 盒和 B 盒两部分组成, 分别位于 +9 ~ +18 和 +53 ~ +61bp 区域。5S RNA 启动子 C 盒位于 +50 ~ +83bp 区域, 其中 +50 ~ +60bp 区域序列与 tRNA 启动子 A 盒相似。

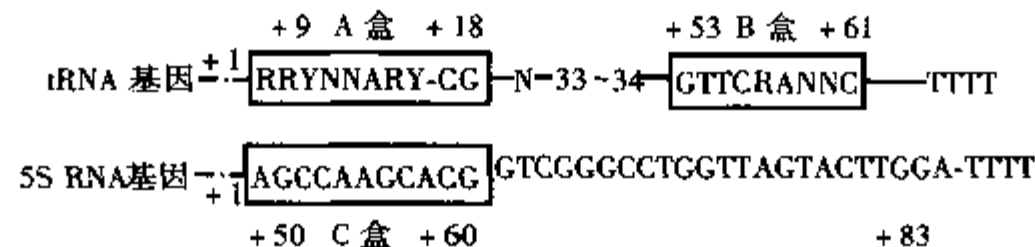


图 21-4 tRNA 和 5S RNA 基因的启动子

rRNA 基因的启动子仍不太清楚, 大约位于转录起始位点的上下游 -150 ~ +100bp 之间。

2. 增强子 (enhancer):

增强子是一类能促进基因转录活性的顺式调控元件, 但它本身不具备启动子的活性。其特点是: ①无方向性; ②远距离作用, 距靶基因可近可远, 甚至远至几十 kb 也同样能发挥作用, 可位于基因的上游、下游或内部; ③无基因特异性, 对各种基因启动子均有作用; ④具有组织特异性; ⑤有相位性, 它的作用虽然与距离无关, 但只有当它位于 DNA 双螺旋的某一相位时, 才具有较强活性。

典型的增强子是 SV40 早期基因中的 72bp 重复序列, 其中有由特定核苷酸组成的核心序列 (core sequence, module, motif) (如图 21-5)。多种真核基因中也有增强子存在, 如 Ig 基因增强子位于 J 区与 C 区之间的内含子中。

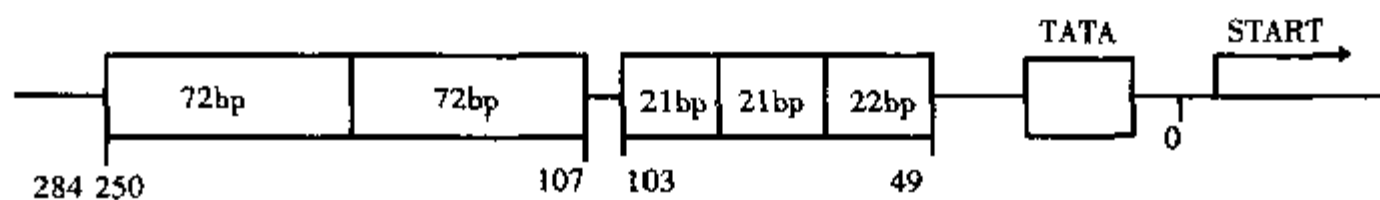


图 21-5 SV40 增强子示意图

有些增强子并不具备上述所有典型特征, 有时不易与启动子区别开来。

还有一些顺式作用元件的作用方式与增强子相似, 但是抑制基因的转录, 称为沉寂子 (silencer) 或衰减子 (dehancer)。也可将之归于广义的增强子之类中。如酵母的 HML 和 HMR 区, 在人抗胰蛋白酶,

小鼠细胞色素 P450 基因中可见到。

增强子调控基因转录活性的机制可能有以下几种：①与的反式作用因子相互作用；②Z-DNA 结构：如 SV40 72bp 重复序列中的 5'-GCATGCAT-3' 顺序，具有嘌呤与嘧啶交替出现的特征，可形成左旋 DNA 结构，此结构有利于与特定蛋白质结合，有利于转录；③增强子形成特异的二级结构，如茎环结构等；④与核基质结合。

3. 加尾信号及转录终止信号：

在加 polyA 尾位点的上游 10~20bp 处，常见一保守的 AATAA 序列，如去除此序列，基因会连续转录下去而不终止。它被认为是加尾信号，但与转录终止的关系仍不能肯定。有人认为，组蛋白等没有 PolyA 尾的基因转录终止信号，是一种能形成发夹结构的反向重复序列；而具有 PolyA 尾的基因的终止信号是 G/T 簇，其通式为 YGTGTTY，如 SV40 中为 AGCTTTTTT。

21.2.4.3 反式作用因子的概念

由于特定基因的顺式调控元件在同一机体的不同细胞中是完全相同的，这就不能解释基因表达的组织特异性及细胞周期特异性等现象。因此仅有顺式调控序列本身并不能决定基因的表达。而这是由顺式作用元件和反式作用因子两者的相互作用所决定的。顺式作用元件是反式作用因子的结合位点，其调控基因转录的作用正是通过反式作用因子的作用来实现的。反式作用因子（又称为反式作用转录因子）是由位于不同染色体或同一染色体上相距较远的基因编码的蛋白质因子。在其结构上含有一个与 DNA 结合的 DNA 结合结构域，能与特定的 DNA 序列结合，因此也在习惯上被俗称为 DNA 结合蛋白（DNA-binding protein）。以下除特别说明外，所有 DNA 结合蛋白即是指反式作用因子。但需指出的是，并非所有的 DNA 结合蛋白都是指反式作用因子。

目前已经发现了近百种 DNA 结合蛋白，其中有的具有组织或细胞特异性，有些具有基因或序列特异性，也有一些是非特异性的。目前所发现的 DNA 结合蛋白大多是序列特异性的，可与多种细胞中不同基因调控序列中相同的启动子或增强子顺序结合。如 TATA 盒结合蛋白 TFIIID、CAAT Box 结合蛋白 CTF/NF-1、CRE (cAMP-responsive element) 结合蛋白 CREB 等。它们有些是细胞固有的转录因子，与细胞周期、发育等密切相关，也有些是介导激素、生长因子、致癌物等外来刺激所诱导的转录起始作用。

根据其作用方式，反式作用因子可分为以下三大类：

(1) 普通转录因子（通用转录因子）：这是在多数细胞中普遍存在的一类转录因子。如 TATA 盒结合因子 TFIIID、GC 盒结合因子 SPI 等。

(2) 组织特异性转录因子：基因表达的组织特异性在很大程度上取决于组织特异性转录因子的存在。Ig 基因的淋巴细胞特异性表达是由一种淋巴细胞特异性的转录因子 OCT-2 所决定的。它仅在淋巴细胞中特异性表达，并识别 Ig 基因启动子与增强子中的 ATTTGCAT 八聚体序列。Frain 等最近分离出了一种肝细胞特异性启动子元件 HP₁ 的结合蛋白 LF-B₁，与哺乳动物细胞白蛋白、AFP、人抗胰蛋白酶等基因在肝细胞中的特异性表达有关。

(3) 诱导性反式作用因子：这些反式作用因子的活性可被特异的诱导因子所诱导。这种活性的诱导可以是新蛋白质的合成，也可是已存在的蛋白质的翻译后修饰。如 cAMP 结合转录因子 CREB、热休克转录因子 HSTF、类固醇激素受体等。

反式作用因子对基因转录的专一性调控作用体现在：

(1) 基因的基础表达 (constitutive expression)：多种普通转录因子如 TFIIID 等参与了 RNA pol II 的转录起始作用。研究表明，TFIIID 与 DNA 的结合是转录复合物形成的第一步，然后 RNA 聚合酶 II 才能结合到启动子上，并促进其它三种普通转录因子 TFIIIB、TFIIE、TFIIF 的结合 (图 21-6)。一些不具有 TATA 盒的基因的转录起始也需要 TFIIID 的参与。

(2) 组织专一性表达：已于上述。Ptashne 等认为，组织特异性转录因子有别于普通转录因子，它

在结构上常常只具有 DNA 结合结构域或转录活化结构域这两者之一，因此它仅仅在那些提供了其缺失部分功能的细胞中发挥作用。

(3) 介导诱导因子诱导的基因表达。

(4) 调节细胞发育与分化：某些 DNA 结合蛋白的表达具有发育阶段特异性，因此可能与机体的发育有关。研究表明，同源盒基因 (homeobox gene) 家族与脊椎动物的发育有着重要的关系。所谓同源盒是指其产物蛋白中具有一非常相似的结构域，即下文所述的同源结构域，通过它与特异的 DNA 序列综合。有人认为，同源盒基因家族决定了机体的形态，它是规划身体各主要区域——头部、腹背部、尾部等——的蓝图，它将胚胎沿头-尾轴将细胞划分为不同的区域，然后分化为肢体等不同器官结构。图 21-7 所示为果

蝇及小鼠机体不同部位分别受到同源盒基因家族中不同基因的控制。如果其中某一基因发生突变将会导致相应区域器官的畸形。例如，一种称为 bithorax 突变的果蝇有两对翅膀，而正常只有一对，这是由于同源盒基因家族中 bithorax 基因群 (包括 ultrabithorax, abdominal-A 和 abdominal-B) 突变的结果。而一种叫做 antenapedia 突变的果蝇较正常多了一只后肢，这是由于 antenapedia 基因群 (包括 labial, proboscipedia, deformed 和 antenapedia 基因) 突变的结果。

21.1.4.4 反式作用因子的结构

研究表明，一个完整的反式作用因子含有两个必不可少的结构域，即 DNA 结合结构域和转录活化结构域。DNA 结合蛋白通过前者与 DNA 特定顺序综合，并通过后者发挥转录活化功能。有些反式作用因子可能只含有两者之一，只有当互补的两个蛋白质存在于同一细胞时才具有功能，这可能与基因表达的组织特异性有关。

1. DNA 结合结构域 (DNA-binding domain):

DNA 结合蛋白发挥其转录调控功能的首要条件是必须有一与 DNA 特异结合的结构。目前已发现了以下几种不同类型的 DNA 结合结构域模型。

(1) 锌指结构域 (zinc finger motif): 第一种类型的锌指结构以 TFIIIA 及 SP1 为代表。这种锌指结构由大约 30 个氨基酸残基组成，其中含有两个半胱氨酸和两个组氨酸残基，在这两个半胱氨酸和组氨酸对之间含有一个大约 12 个氨基酸残基区域，这四个半胱氨酸和组氨酸通过与锌离子结合而形成一个稳定的指状结构，指状突出区分散地分布着几个碱性氨基酸和保守的疏水性氨基酸残基 (图 21-8)。目前已用核磁共振法搞清了这种锌指结构的三维结构，其多肽链自发性成螺旋结构，在螺旋的表面暴露出高密度的碱性及极性氨基酸，可能与 DNA 结合有关。

类固醇激素受体的 DNA 结合区为第二种类型的锌指结构。它区别于 SP1 的半胱氨酸、组氨酸对，而代之以两对半胱氨酸。

至今所鉴定的锌指蛋白表现出不同的 DNA 结合序列特异性。因此，虽然锌指结构中这些高度保守的氨基酸可能构成一个 DNA 结合区域的结构框架，但决定其结合特异性的区域可能位于其它地方。例如，孕激素和雌激素受体的 DNA 结合特异性仅稍有差异，其结合特异性被认为是由位于指状结构基部的非保守氨基酸所决定的。将酵母转录因子 GAL₄ 的锌指结构区全部 28 个氨基酸用另一种酵母转录因子 PPR1 的锌指结构区的氨基酸取代，除其中一个氨基酸外，其它氨基酸的取代并不影响 GAL₄ 的 DNA 结合特异性。而与锌指结构邻近的 14 个氨基酸区域是决定其结合特异性所必需的。

(2) 同源结构域 (homeodomain, HD): 同源盒基因家族各基因间都有一相同的保守的序列，称为同

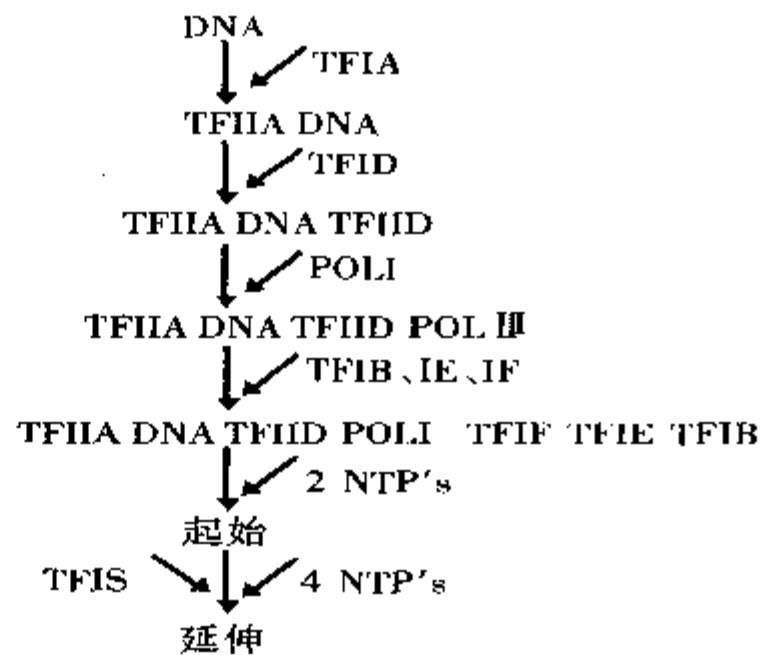


图 21-6 转录起始复合物装配示意图

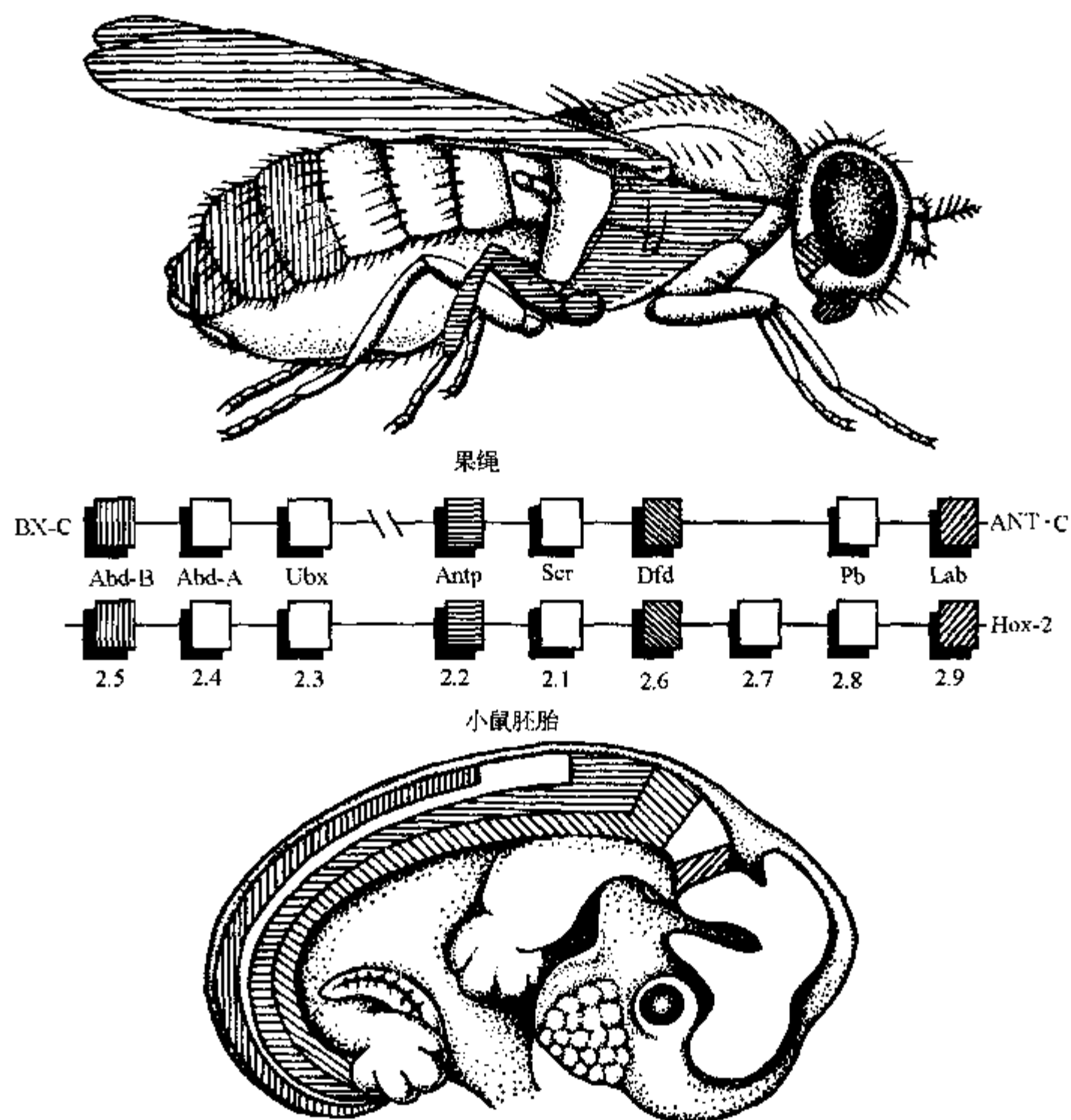


图 21-7 果蝇及小鼠机体分化受到同源盒基因家族的控制

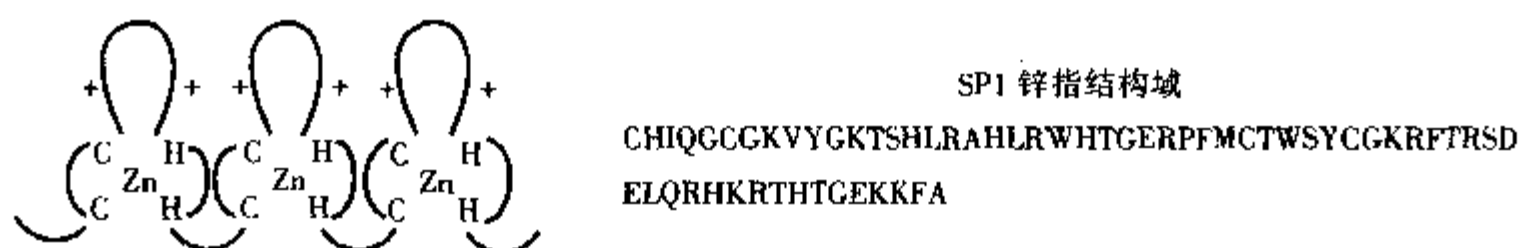


图 21-8 锌指结构域示意图

源结构域。这种结构域由大约 60 个氨基酸组成，其一级结构与原核生物抑制子 (repressor) 的螺旋-回转-螺旋 (helix-turn-helix) 结构有些类似。其中的碱性和疏水性氨基酸是较保守的 (图 21-9)。HD 结构可见于多种果蝇胚胎发生的调控蛋白、哺乳动物八聚体结合因子 OCT-1 (又称 OTF-1、NFA1 和 NF III)、OCT-2 (又称 OTF-2 和 NF-A2)、脑垂体特异结合因子 Pit-1 (GHF-1)。含有此 HD 结构的蛋白组成一同源盒基因家族，其最主要的功能是参与机体的发育分化过程。

(3) 亮氨酸拉链 (leucine zipper): 其一级结构由大约 30 个氨基酸组成，它们是高度保守的。可分为两个部分，第一个部分含有非常多的碱性氨基酸，随后的区域含有 4 个亮氨酸残基，按每间隔 6 个氨

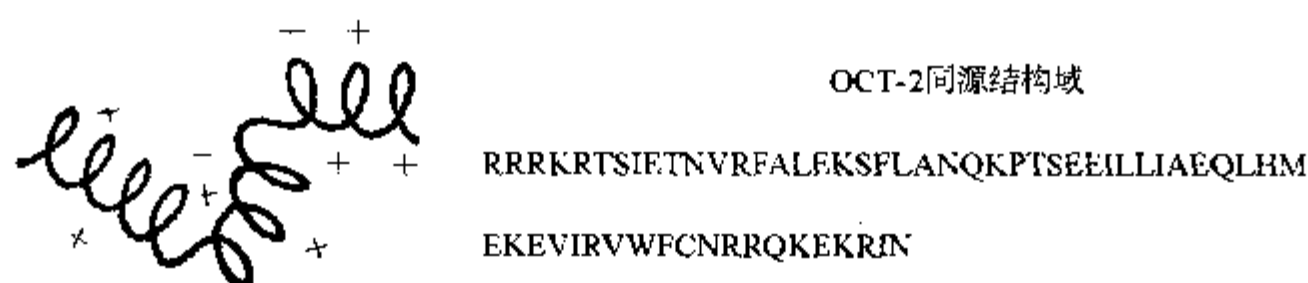


图 21-9 同源结构域结构图



图 21-10 亮氨酸拉链结构示意图

氨基酸残基一个亮氨酸的规律排列 (图 21-10)。含亮氨酸拉链的转录因子包括 AP-1, fos, jun, C/EBP 和 CREB 等。这些蛋白都通过其亮氨酸拉链结构形成同源或异源二聚体, 产生具有不同功能特性的转录因子而在转录调控中起着重要作用。如 Jun 的两个亚基可形成同源二聚体, 也可与 Fos 一个亚基组成异源二聚体。二聚体的形成是两个亚基中紧靠近的 α -螺旋中的亮氨酸重复区域疏水性相互作用的结果。亮氨酸拉链结构邻近的碱性区域可能是其结合 DNA 功能所必需的。但非其形成二聚体所必需。另有一些蛋白质如 myc, OCT-2 等也含有亮氨酸重复结构, 但缺少 C/EBP 类因子的保守的碱性氨基酸区域。

需注意的是, 亮氨酸拉链结构并非是 DNA 结合蛋白所特有的, 它也存在于一些其它蛋白中, 如葡萄糖转运蛋白, K^+ 通道蛋白等。甚至有人认为它仅仅是蛋白质二聚体化所需的, 而与 DNA 结合无关。

(4) 碱性 α -螺旋: 转录-复制因子 CTF/NF-1 的 DNA 结合区域具有形成 α -螺旋的结构并含有高密度的碱性氨基酸, 但缺少锌指结构、HD 以及亮氨酸拉链那样的特征结构。

(5) 螺旋-环-螺旋 (helix-loop-helix, HLH): 此种结构可见于 Myc、myoD 以及 Igc 基因增强子结合蛋白 E12/E47 等转录因子的结构中。

一些最近克隆的哺乳动物转录因子的一级结构的分析提示 DNA 结合区域的类型并不限于上述几种。例如 AP-2 及 SRF (血清反应因子) 等。

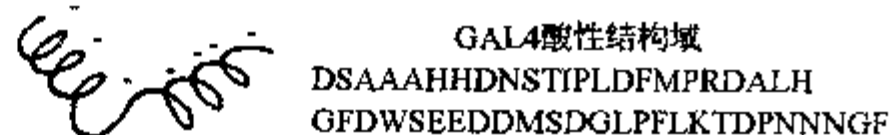
2. 转录活化结构域 (transcriptional activation domain):

转录因子的 DNA 结合结构域本身并不具有调控转录活性的功能, 其转录活化功能是由另一种结构域, 即转录活化结构域所决定的。

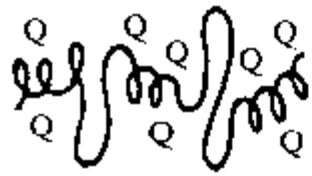
现已鉴定出以下三种不同类型的转录活化结构域模型。

(1) 酸性 α -螺旋结构域 (acidic α -helix domain): 这种结构首先是在酵母转录因子 GAL4 和 GCN4 中发现的。其特点是含有较多的负电荷并能形成亲脂性 α -螺旋 (图 21-11)。另外在糖皮质激素受体和 AP-1/jun 转录因子中也含有此种结构。各自的酸性 α -螺旋结构之间除上述两种特征之外, 无明显的序列同源性, 但其功能是相同的; 它们之间甚至可以互换而功能不变, 激活基因转录的特异性决定于 DNA 结合结构域的特异性。据推测, 酸性活化区可能是相对非特异性地与那些起始复合物的一般成份 (如 TATA 盒结合因子或 pol II 本身) 相互作用而发挥其转录活化功能的。

(2) 富含谷氨酰胺结构域 (glutamine-rich domain): 此结构首先是在转录因子 SPI 中发现的。它的

图 21-11 酸性 α -螺旋结构示意图

结构特点是含有大约 25% 谷氨酰胺，而含电荷氨基酸很少。其它如酵母 HAP1、HAP2 和 GAL II 及哺乳动物的 OCT-1、OCT-2、Jun、AP-2 和 SRF 也含有此结构。与酸性结构域一样，此结构之间也无明显的序列同源性，也可能是可以相互替代的（图 21-12）。

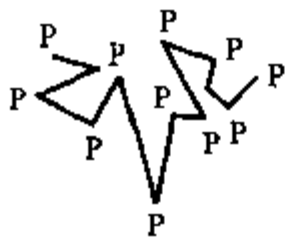


SP1 谷氨酰胺结构域

QGQTPQVRVSGLSQSDALNIQQNQTSGLQAGQQKEGEQNQQTQQQQILIQPQIVQ
GGQALQALQAAPLSGQTFTTQAISQETLQNIQAVPNSGPIIIRTPVGPNGQVSW
QTLQLQNLQVQNPQAQTITLAPMQGVSLGQ

图 21-12 富含谷氨酰胺结构域示意图

(3) 富含脯氨酸结构域 (proline-rich domain): CTF/NF-1 的羧基末端与其转录活化功能有关。此区域含 20% ~ 30% 脯氨酸 (图 21-13)。脯氨酸是一种亚氨基酸，可妨碍 α -螺旋的形成。AP-2、jun、OCT-2 和 SRF 中也存在此结构。



CTF 脯氨酸结构域

PPHLNPQDPLKDLVSLACDFASQQPGRLNGSGQLKMPHCLSAQMLPPPPGLPR
LPPATKPAITTEGGATSPSYSPDTS

图 21-13 富含脯氨酸结构域示意图

21.1.4.5 反式作用因子作用机制

1. DNA 结合蛋白结合位点通常与其所调控的基因相距较远，它何以能影响到远距离的 RNA 聚合酶的活性，目前有几种假说：

(1) 成环假说 (looping): 反式作用因子结合位点和 RNA 聚合酶结合位点之间的 DNA 成环，从而使两者直接接触。

(2) 扭曲假说 (twisting): DNA 结合蛋白与变形的 DNA (如左旋 DNA) 结合，或者结合蛋白具有某种酶活性，使 DNA 构型改变，如解旋等。

(3) 滑动假说 (sliding): 蛋白结合于特异位点，然后沿 DNA 滑动到另一特异的序列。

(4) Oozing: 调控蛋白与调控序列的结合促进了另一种蛋白与邻近序列的结合。而这种蛋白的结合反过来促进另一蛋白与其后的序列结合，直到基因的转录起始点。

2. 调控转录机制:

(1) 与其它转录因子的相互作用: 目前所发现的三种转录活化结构可能是通过与其它蛋白相互作用而发挥其功能的。至少有五种普通的转录因子 (TF II A、B、D、E、F) 是 pol II 转录起始所必需的。因此不难想象，序列特异性转录因子具有不同类型的活化结构域，与不同的普通转录因子或 pol II 的不同亚基相互作用。Pol II 最大亚基的羧基末端富含丝氨酸和苏氨酸。由于富含羧基基团，多种转录因子可通过氢键与之结合。这些羟基的磷酸化可能是阻止聚合酶与转录因子结合的机制之一。Stringer 等用单纯疱疹病毒核蛋白 VP16 作为配体进行亲和层析，结果证明 VP16 与人及酵母 TATA 盒结合蛋白特异性地结合，提示酸性活化结构域的靶位点是 TF II D。他们甚至认为，所有的调控因子都是直接或间接通过 TF II D 发挥作用的。酸性结构域是直接作用，而其它因子是通过另一种或几种中介体间接与 TF II D 作用。腺病毒 Ela 蛋白的靶位点可能是一个拼接子 (adaptor)，此拼接子可能具有一酸性结构域，从而通过与普通转录因子相互作用而影响转录 (图 21-14)。

(2) 竞争性排除组蛋白: 试验表明，序列特异性转录因子与转录起始复合物稳定结合，可以竞争性地排除组蛋白，并阻断核小体的组装对转录的抑制作用。

(3) 与核骨架蛋白作用：已证明了某些活性基因的调控区与核骨架蛋白的特异性相互作用。可能某些转录因子的活化区域与核基质结合，将基因拴到核中那些具有高浓度的其它转录因子及随后过程所必需因子的区域，从而促进基因的转录。

(4) DNA 解旋作用：转录起始因子 RAP30/74 具有 ATP 依赖性的 DNA 解旋酶作用。其功能可能是在转录起始点使 DNA 双螺旋解链。

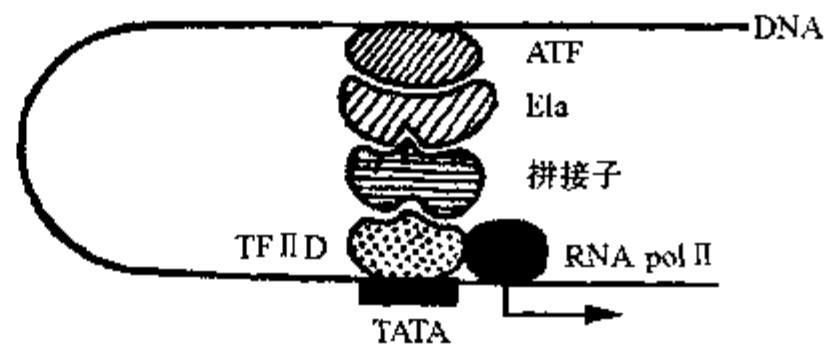


图 21-14 E1a 调控转录的可能机制

15.1.4.6 反式作用因子活性的调节

1. 磷酸化 - 去磷酸化：

细胞表面受体介导的第二信使分子（如 cAMP 和 Ca^{2+} ）的产生及随后蛋白激酶与磷酸二酯酶的激活，是哺乳动物细胞中最广泛应用的信息传导机制。许多转录因子是磷蛋白，因此可以想象其功能受到磷酸化 - 去磷酸化作用的调节。

据报道，酵母热休克蛋白转录的增加与已经结合在热休克基因启动子上的转录因子 HSF 的磷酸化的增加相对应。可能磷酸基团的负电荷通过类似于 GAL_4 等转录因子的酸性活化区的机制促进基因的转录。CREB 具有有转录活性的二聚体及无活性的单体两种形式，并处于动态平衡，磷酸化则有利于二聚体的形成。

2. 糖基化：

糖基化也是 pol II 转录因子的一个常见特征。如从 HeLa 细胞中纯化的 SP1 是高度糖基化的。体外用麦胚凝集素处理 SP1 并不影响其 DNA 结合活性，但可特异性地抑制其转录激活活性。由于糖基化与磷酸化的位点都是在丝氨酸和苏氨酸残基上，这两种修饰可能是相互排斥的。

3. 蛋白质 - 蛋白质相互作用：

蛋白质 - 蛋白质复合物的形成及解离，是多种细胞活动调节的一个重要组成部分。信使依赖性蛋白质复合物的解离对 DNA 结合转录因子的活性的调节可见于下述两例中：即甾体激素与其受体的结合引起的转化和佛波脂（如 TPA）引起的 Ig κ 轻链基因增强子结合蛋白 NF- κ B 的激活。在无诱导信息时，无活性的转录因子存在于细胞浆中，并与另一种蛋白结合，无活性的甾体激素受体与胞浆中的热休克蛋白 hsp90 结合。甾体激素与受体的结合则导致其与 hsp90 的解离，并进入细胞核，与相应的反应元件结合而调节基因的转录。转录因子 NF- κ B 则能与一种位于胞浆中的抑制因子 I κ B 结合。TPA 的诱导导致 I κ B 结构发生变化，从而使其解离，并在另一些成分的参与下调节相应位点基因的转录。

许多病毒的早期产物是特异的转录调控因子，但它们并不直接与靶基因的启动子元件结合。研究表明，病毒的反式激活作用是通过与 DNA 结合转录因子发生蛋白质 - 蛋白质相互作用的结果。II 型腺病毒的 E1A 蛋白通过与 ATF 的结合而与 DNA 结合，然后通过另一拼接子的结合而与 TFIIID 相互作用，从而激活病毒与细胞基因的转录（图 21-14），单纯疱疹病毒反式作用蛋白 VP16 缺乏 DNA 结合结构，但其羧基末端酸性结构区域可与 DNA 结合蛋白结合，具有激活转录的潜能。

SV40 的大 T 抗原具有激活和抑制转录的两种功能。T 抗原通过下述两种机制负性调控病毒早期基因的转录：①T 抗原在 DNA 上的结合位点与病毒早期基因的起始位点相互重叠，T 抗原通过直接与其结合位点结合从而形成空间障碍，进而阻止早期基因的转录；②T 抗原可与细胞转录因子 AP-2 形成复合物，从而抑制 AP-2 与 SV40 增强子元件的特异性结合，并抑制早期基因的转录。

最近报道，E1A 可与抗癌基因 RB 产物形成稳定复合物。虽然至今仍无直接证据表明 RB 是一种 DNA 结合转录因子，但从其结构上含有一亮氨酸拉链结构及其功能特征推断，RB 可能是一种调节细胞增殖与分化的转录因子。癌基因产物如 E1A、P53 等与 RB 结合则使其失活，可能是癌变的重要机制之一。

21.1.4.7 癌基因产物与基因表达调控

现已证明了多种癌基因产物参与细胞生长的调控过程。如 *c-sis* 癌基因产物与血小板来源的生长因子 (PDGF) 的 B 链具有高度同源性, 因而不依赖外源生长因子而持续刺激自身的生长繁殖。第二种类型的癌基因是为生长因子受体编码的, 如 *c-erbB* 基因产物与 EGF 受体高度同源, 但缺失了正常 EGF 受体的胞外配体结合部位, 因而不依赖外源 EGF 的刺激而长期处于活性状态。还有多种癌基因产物如 *ras* 等参与了生长信息的传递过程。

第四种类型的癌基因产物是核内蛋白, 这类癌基因包括 *myc*、*fos*、*myb* 和 *ski* 等。以前仅仅根据其细胞内的定位而推测其在基因表达调控中起着重要作用。近年来的研究结果初步证实了这一推测。研究表明, 这类癌基因产物有的是 DNA 结合蛋白, 直接参与基因表达的调控; 有的虽不具有 DNA 结合功能, 但能与反式作用因子发生蛋白质-蛋白质相互作用, 从而间接参与基因表达的调控。下面简要介绍这一方面的研究进展。

研究表明, 多种癌基因产物是 DNA 结合蛋白, 它们可能直接参与细胞内基因表达的调控。目前已发现的此类癌基因已有近二十种, 以 *jun*、*fos* 和 *myc* 为代表。其中含亮氨酸拉链结构的有 *fos*、*myc* 和 *maf*; 含螺旋-环-螺旋的有 *myc*、*n-myc*、*l-myc*、*lxl-1*、*tai* 和 *scl* 等; 含锌指结构的有 *myl/RAR α* 、*erbA*、*evi-1*、*vav* 和 *gli-1* 等; 含同源结构域的有 *pbx*、*hox-2.4* 等; 其它癌基因有 *myb*、*rel*、*ets-1*、*2*、*spi-1* 和 *ski* 等。

1. *fos/jun*

v-jun 癌基因是鸟肉瘤病毒 (avian sarcoma virus) 的致癌基因, 它是最早被发现其产物具有 DNA 结合功能的癌基因。人们首先在细胞提取液中发现了一种与 *fos* 稳定结合的蛋白质 p39, 研究表明它是 *c-jun* 基因的产物。后来发现, *fos* 癌基因产物 Fos 同 *jun* 基因产物 jun 一样也具有 DNA 结合功能, 并且两者的 DNA 结合特性完全相同。其所识别的 DNA 序列为 TGACTCA, 可以此为配基用 DNA 亲和层析法将之从核提取物中纯化。因此将它们同归于 AP-1 家族。AP-1 家族成员包括 *c-jun*、*junB*、*junD*、*fos* 和 *fra-1* 等。AP-1 家族蛋白的 DNA 结合特异性反映在其结构上, 是其具有共同的 DNA 结合结构域-亮氨酸拉链。Ap-1 蛋白可通过此结构形成同种或异种二聚体, 产生具有不同功能的转录因而在转录调控中起重要的作用。*jun* 单体既可与另一 *jun* 单体, 也可与 *fos* 单体形成二聚体; 但 *fos* 只能与 *jun* 形成异种二聚体, 不能形成 *fos* 同种二聚体。

fos 和 *jun* 基因产物在生长信息向基因的传导中起着重要的作用。*fos* 是一种核内磷蛋白, 在多种细胞中低水平表达, 但可被血清及多种生长因子、TPA 等迅速诱导。一般认为, *fos* 可能是一种核内“第三信使”分子, 起着将细胞膜上传来的短效的细胞生长信息转化为细胞表型上的长效改变的作用。多种基因的调控区具有 AP-1 的结合位点, 因此 *fos* 的作用可能是广泛性的。如 *fos* 可与 3T3-F442A 脂肪细胞的分化敏感基因 *aP2* 的调控区结合, 并促进其表达。*fos* 调控的另一特点是, 血清等对其表达的诱导作用受到负反馈的自身调节。*fos* 基因上游调控也具有 *fos* 本身的结合位点。Schonthal 等认为: *fos* 至少可结合在 *fos* 基因上游 -296 和 -60bp 两个位点上。Konig 等研究表明此结合位点主要是 -320 到 -299 区域。

2. *myb*

myb 癌基因与多种人类肿瘤, 特别是人成红细胞白血病密切相关。

myb 基因在进化中高度保守, 存在于从低等生物 (如果蝇) 到人的所有生物细胞中, 甚至在玉米基因组中也存在。*v-myb* 和 *c-myb* 基因产物分别为 p45^{*v-myb*} 和 p75^{*c-myb*}。

研究表明, 在脊椎动物中, *c-myb* 在未成熟的淋巴细胞、红细胞、粒细胞及多种其它细胞中表达。当细胞分化到更成熟的阶段时, 其表达水平迅速下降。在某些细胞中, 其表达水平随细胞分裂状态不同而异。大量研究证明, *c-myb* 基因表达水平是调节血细胞分裂与分化的重要因素。外源性 *myb* 基因的过量表达可阻断鼠成红细胞系的分化。采用反义 (antisense) 抑制 *c-myb* 基因的表达也可抑制人成红细

胞的生长。将 *v-myb* 基因转染细胞则使细胞固定于未成熟分裂状态；将温度敏感 E26 病毒（含 *myb* 和 *ets* 基因）转化到成熟的巨噬细胞中，可导致其逆分化到更不成熟的髓细胞状态。所有这些都提示 *myb* 基因产物对血细胞系的发育分化起着重要的调控作用。

myb 基因产物的生化特性提示其可能是一种转录因子。其产物是核蛋白，半寿期短（约 30 分钟）。研究表明，其产物具有 DNA 结合特性。 $p45^{v-myb}$ 的 DNA 结合位点被定位于其氨基末端，并且此区域在进化中高度保守。其 DNA 结合特异性为 $pyAACG/TC$ 。Westmo 等将 *v-myb* 基因的不同片段与转录因子 GAL_4 的 DNA 结合区连接，形成不同的融合蛋白，它们可激活与 GAL_4 结合位点顺式相连的标志基因的转录，证明 *v-myb* 基因产物具有转录调控功能。其转录活化结构域被定位于 204 到 254 位氨基酸之间。Nishina 等采用 *c-myb* cDNA 表达质粒与含有标志基因的质粒共转化的方法，也证明了 *c-myb* 基因产物的基因表达调控作用。这至少提示我们，*myb* 基因对血细胞的发育分化调控作用是通过其基因表达调控作用来发挥的。

3. *myc*

c-myc 癌基因产物在正常细胞中参与了细胞分裂、分化及细胞周期的调控，一般认为它是细胞从 G_0/G_1 期进入 S 期的驱动因子。它通过基因扩增、染色体转位等方式被激活后，即与多种肿瘤的发生密切相关。

最近研究表明，*myc* 蛋白是一种调控基因转录的反式作用因子。在其结构上具有两个 DNA 结合结构域——碱性氨基酸/亮氨酸拉链（BR/LZ）结构域和螺旋-环-螺旋结构域（HLH）。体外方法鉴定其识别序列为 CACGTG，此回文序列存在于多种增强子中，如 Ig 基因增强子 E 盒、腺病毒晚期启动子元件、胰岛素基因增强子及肌酸激酶基因增强子等。

与其他亮氨酸拉链蛋白不同，*myc* 蛋白不能形成同源二聚体，但可形成四聚体，因此推测到在细胞中还有一类 LZ 蛋白能与 *myc* 形成异源二聚体，从而协同作用调控基因的表达。现确已找到两种蛋白——*max* 和 *myn*。*myc/myn* 异源二聚体的识别序列为 GACCACGTGGTC，如其中的 CG 序列甲基化，则会显著抑制结合能力。这可能是 DNA 甲基化修饰调控基因表达的重要机制之一。

myc 作用的靶基因仍不清楚。另外，*myc* 除与 DNA 结合外，还可与 RNA 结合，提示其对于 mRNA 的转录后加工也可能有一定的调控作用。

4. 抗癌基因：

近年来，抗癌基因（anti-oncogene，或肿瘤抑制基因 tumor suppressor gene）在癌变中的作用越来越受到人们的重视，已有近十种抗癌基因或潜在的抗癌基因被分离鉴定，有的已被克隆并进行了序列分析。但对于其抗癌作用机制还远远没有搞清楚。不过，从最近发表的资料来看，有些抗癌基因产物可能是序列特异性 DNA 结合蛋白，通过对细胞基因表达的调控作用从而发挥其抗癌以及对细胞发育分化的调控作用。

RB 抗癌基因产物是一种分子量为 110kD 的核内磷蛋白（ $p110^{RB}$ ）。目前认为，RB 的主要功能是参与细胞分裂周期的调控，当细胞处于 S 期和 G_2 期时，RB 则进一步磷酸化，分子量稍稍增大（ $pp112^{RB}$ 至 $pp114^{RB}$ ）。

RB 基因产物是如何调控细胞分裂周期的还不清楚。序列分析表明，其结构基因中含有两个金属结合位点（锌指结构），并有一个典型的亮氨酸拉链结构，提示其可能是一种 DNA 结合蛋白，通过与特异 DNA 序列的结合而起到对基因表达的调控作用。当然，仅从其序列结构来推测是不够的。它是不是一种基因表达调控因子，还有待于进一步证实。另外，RB 基因还可与多种病毒基因产物（如腺病毒 E1A 蛋白、SV40 T 抗原、人乳头状瘤病毒 E7 蛋白）结合，虽然这种结合反应的意义还有待于深入研究，但所有这些蛋白都是基因表达的调控因子，因此 RB 基因通过蛋白质-蛋白质相互作用从而间接调控基因表达的可能性也是不能排除的。

21.1.5 转录后水平的调控

真核基因转录后，必须经过一系列的加工过程才能成为成熟的 mRNA。对此过程的调节，也是表达

调控的一个重要内容。

以下简要介绍 mRNA 的加工及其调控, 至于 rRNA 和 tRNA 也必须进行转录后加工 (如切割、甲基化修饰等), 这里不做介绍。

21.1.5.1 戴“帽”(capping)

mRNA 转录不久即在其 5' 末端加上 m^7GpppN 的“帽子”。其作用是: ①防止降解, 延长寿命; ②与核糖体小亚基结合; ③为翻译起始因子所识别。

21.1.5.2 加“尾”(tailling)

除组蛋白 mRNA 外, 真核生物的 mRNA 均有一 PolyA 序列。加尾信号是 AAUAAA, 由核酸内切酶切开 RNA 3' 末端 (常在 GC 序列之后), 然后加上 PolyA。

PolyA 的功能是: ①为 mRNA 进入细胞质所必需; ②保持 mRNA 稳定性, 延长寿命。

21.1.5.3 甲基化修饰

主要是形成 6-甲基腺嘌呤 (6mA)。其意义不明。

21.1.5.4 拼接 (splicing)

将 hnRNA (核不均一 RNA) 中的内含子序列切除, 外显子部分连接起来, 称为 RNA 拼接。在拼接位点上常有一些保守的序列, 在其 3' 端多为 AG, 5' 端多为 GU, 它们是指导正确拼接的信号。

拼接过程有核酸内切酶的参与, 有些 RNA 则可自身催化自发拼接, 一些小分子 RNA, 如 SnRNA, 也参与 mRNA 的拼接过程 (图 21-15)。

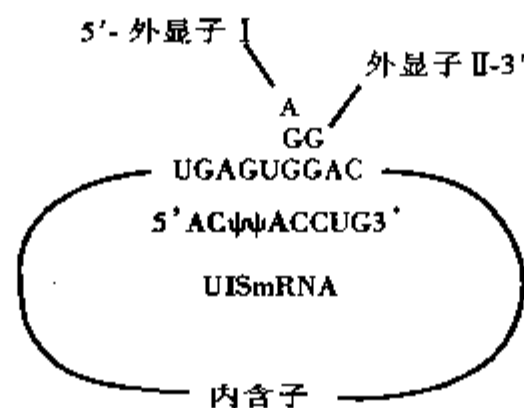


图 21-15 U1 snRNA 与 mRNA 的拼接

大多数基因的 mRNA 加工较简单, 只产生一种成熟的 mRNA, 指导合成一种蛋白质分子。但有些基因的 mRNA 可有不同的加工方式, 产生不同的蛋白质。这对于细胞的功能分化有一定的作用。

(1) 某些基因有多个加 Poly A 位点, 通过不同拼接产生不同的蛋白质, 如 IgM、D、E、G 重链基因, 大鼠降钙素基因、人血纤维蛋白原基因等。

Ig μ 链基因有两个 Poly A 位点, 通过不同的拼接方式产生两种不同的蛋白质, 较短的蛋白质 μ_s 蛋白是分泌型可溶性蛋白, 而较大的 μ_m 型蛋白则结合于细胞膜上 (图 21-16)。

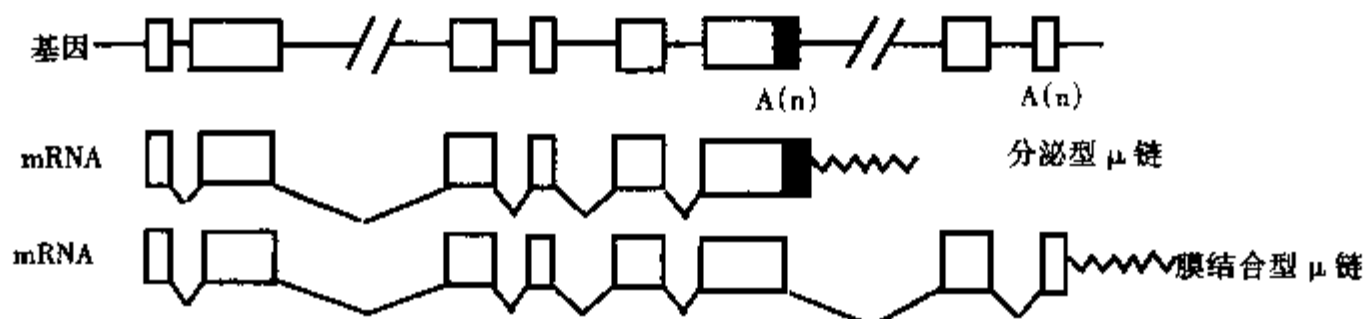


图 21-16 Ig μ 链基因 mRNA 的不同表达

(2) 有些基因有多种转录起始位点, 通过不同的拼接产生不同的蛋白质。如小鼠 α 淀粉酶基因, 在

不同的组织中使用不同的启动子，经拼接形成组织特异性的淀粉酶（图 21-17）。

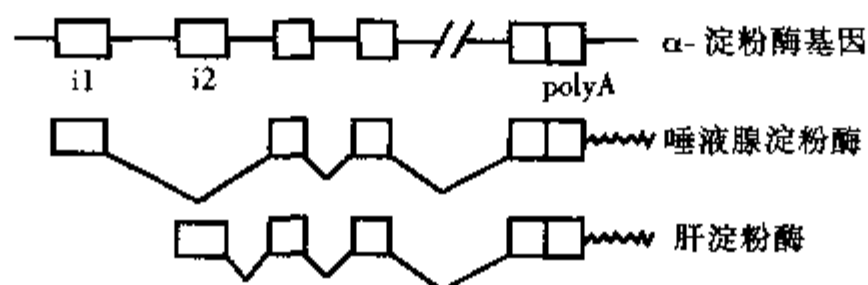


图 21-17 小鼠 α 淀粉酶基因的不同拼接

(3) 外显子的不同拼接。如大鼠 γ A 血纤维蛋白原基因的外显子不同剪切方式，分别产生 γ A 和 γ B 两种纤维蛋白原（图 21-18）。

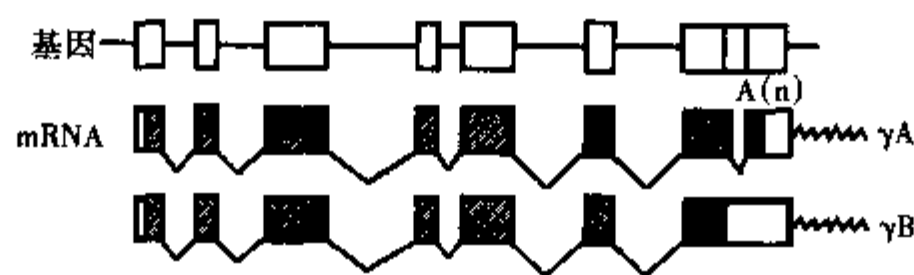


图 21-18 大鼠血纤维蛋白原基因的拼接

由此可见，对 mRNA 加工过程的调节，可以改变 mRNA 的寿命，从而实现量的调控；而通过不同的拼接，则可改变蛋白质种类，实现质的调控，这对于细胞分化可能具有一定的意义。mRNA 转录后加工的机制及其调控方式与意义有待进一步的研究。

21.1.6 翻译水平的调控

翻译过程主要涉及 mRNA、tRNA、核糖体和可溶性蛋白质因子四大类装置。其中可溶性蛋白质因子种类繁多，按其功能可分为肽链起始因子（如 eIF-1, 2, 2B, 3, 4A~4F, 5, 6 等）、肽链延长因子（EF-1 α , 1 β α , 2 等）和肽链终止因子（RF-1, 2, 3）。

真核生物 mRNA 中的“帽子”结构除增加 mRNA 的稳定性外，还可促进蛋白质合成起始复合物的生成。真核细胞中存在一类能识别“帽子”结构并与之结合的蛋白质因子，称为帽子结合蛋白（cap binding protein, CAP）。

对于翻译水平调控的机制目前了解不多，可能有以下几个方面：

1. 对可溶性蛋白质因子的修饰：

肽链起始因子 eIF-2 在激酶的作用下磷酸化后，可抑制蛋白质的合成。这可能是因为磷酸化的 eIF-2 与 eIF-2B 结合后不能解离，从而影响 eIF-2 的再循环利用的结果。

在脊髓灰质炎病毒感染的 HeLa 细胞中，宿主细胞蛋白质合成迅速停止，这是由于 CBP II 失活的结果，因此有帽子结构的宿主 mRNA 的翻译受抑制，而无帽子结构的病毒 mRNA 的翻译则不受影响。

2. 对 mRNA 稳定性的调节：

虽然机制还不清楚，但细胞确实可以调节各种不同 mRNA 的寿命。起重要作用的蛋白质的 mRNA 的寿命比其他 mRNA 的寿命长。如蚕蛹羽化成蛾后，需要合成大量的蛋白水解酶溶解蚕丝蛋白，此时蚕丝蛋白水解酶 mRNA 的半衰期长达 100 小时而其他的 mRNA 半衰期只有 2.5 小时。催乳激素可使乳腺组织中的酪蛋白 mRNA 的半衰期提高 20 倍。

冬眠的种子中，各种 mRNA 早已存在，但并不翻译，只有在萌发时才翻译。蛤卵中存在各种 mRNA-

NA, 但有些只在孵化前翻译, 有些只在孵化后翻译。其机制不明, 但显然对于机体的发育分化有重要意义。

在红细胞分化过程中, 细胞可专一性降解其他 mRNA, 而保留珠蛋白 mRNA。

3. 反义 RNA 对翻译的调控作用:

所谓反义 RNA (anti-sense RNA) 是一段含有与被调控基因所产生的 mRNA 互补的碱基序列的小分子 RNA。因此, 反义 RNA 可通过碱基配对与 mRNA 结合, 形成的双链 RNA 会影响 mRNA 的模板效率, 抑制其翻译。此外, 反义 RNA 也可能会抑制基因的转录, 有些反义 RNA 可能参与 mRNA 的拼接过程。

天然反义 RNA 首先在原核生物中发现, 如 Tn10 编码的转座酶基因就受到反义 RNA 的调控, 使得转座速度不会受到转座酶基因拷贝数的影响。

近年来, 在真核生物中也发现了一些可能的天然反义 RNA。如禽类 c-myc 基因可反向不连续转录出 3 个反义 RNA, 分别位于第 1 外显子上游、第 1 内含子及第 2 内含子和第 3 外显子。推测它与 mRNA 拼接、翻译及转录调控有关。

另外, mRNA 分子内部的碱基配对也影响翻译效率。如 c-myc 癌基因在正常细胞中翻译效率不高。这是因为, c-myc 的起始密码子 ATG 存在于第 2 个外显子中, 第 1 个外显子不编码, 同时, 第 1 外显子与第 2 外显子有段序列是反向互补的, 通过配对形成茎环状二级结构, 而 ATG 则刚好位于此二级结构中, 从而妨碍了蛋白质的翻译。当 c-myc 通过染色体转位丢失第 1 外显子, 则解除了此种抑制作用, c-myc 基因得以表达, 导致癌变。

总之, 在翻译过程中, 确实存在一系列的调控机制, 有些是非特异性的, 也有部分是特异性针对某特定基因的。这方面仍有很多的课题有待进一步研究。

21.1.7. 翻译后水平的调控

蛋白质合成后, 还须经一系列的加工过程才能成为有活性的功能蛋白质。

21.1.7.1 切割

分泌型蛋白质必须切除疏水性信号肽。

多种酶是以酶原形式存在的, 如胰蛋白酶原, 必须经酶解才能成为活性蛋白。

21.1.7.2 化学修饰

1. 磷酸化:

磷酸化-去磷酸化作用是机体调节酶活性的最常见方式。磷酸化位点多为丝氨酸, 也可见于苏氨酸和酪氨酸。

2. 糖基化:

糖基化位点多为门冬氨酸、丝氨酸和苏氨酸。

3. 乙酰化:

主要是 N 末端及赖氨酸。

21.1.7.3 连接

有些蛋白质经切割成小肽后, 还必须以一定的方式连接起来。如红细胞凝集素、植物凝集素及伴刀豆球蛋白等。因此, 推测细胞中可能存在一类多肽连接酶。

21.2 基因表达调控研究方法

基因表达调控研究已成为当代分子生物学的一个重要课题。技术的进步促进了调控研究的加深, 而研究的深入又产生了对新技术的需求, 因而新方法新技术层出不穷, 种类繁多。本书仅择其要者进行介绍。

21.2.1 DNase I 超敏感性分析 (DNase I hypersensitivity assay)

活跃转录的基因存在于结构松散的常染色质上, 较少受到蛋白质的保护, 因而易受核酸内切酶 DNase I 的攻击, 特别是基因转录调控位点。这种对 DNase I 的敏感性即称 DNase I 超敏感性。

此方法基本步骤是, 分离细胞核, 与一定量的 DNase I 反应, 再提取 DNA, 经限制性内切酶酶切、电泳分离后, 进行 Southern 杂交分析, 根据片段的大小, 鉴定超敏感位点。

试剂与仪器:

^{32}P 标记的探针

缓冲液 A:

10mmol/L Tris·Cl (pH7.4)

10mmol/L NaCl

3mmol/L MgCl_2

Nonidet P-40

1.7mol/L 蔗糖 (用缓冲液 A 配制)

1mg/ml DNase I

终止缓冲液:

20mmol/L Tris·Cl (pH7.4)

1% SDS

0.6mol/L NaCl

20mmol/L EDTA

20mg/ml 蛋白酶 K

限制性内切酶

琼脂糖凝胶电泳设备与试剂

其它实验室常规仪器与试剂

操作步骤:

- (1) 细胞用冷的 PBS 洗涤, 重悬于缓冲液 A 中, 加入终浓度 0.5% Nonidet P-40 使细胞膜破裂。
- (2) 750g 离心 5 分钟。收集细胞核沉淀。
- (3) 沉淀重悬于缓冲液 A 中, 铺于用缓冲液 A 配制的 1.7mol/L 蔗糖层上。15 000 离心 15 分钟。细胞核将沉淀于管底。
- (4) 细胞核沉淀重悬于缓冲液 A 中。浓度为 1mg DNA/ml。
- (5) 静置 3 分钟, 上清液以每管 200 μl 分装备用。
- (6) 对照管中加入 200 μl 终止缓冲液。
- (7) 实验管中分别加入不同浓度 DNase I (终浓度 0.3 ~ 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 分钟, 然后加入 200 μl 终止缓冲液。
- (8) 每管中加入 200 μg 蛋白酶 K, 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 4 小时。酚/氯仿抽提, 提取 DNA, 乙醇沉淀。
- (9) 用适当的限制性内切酶酶切。凝胶电泳分离。
- (10) Southern 印迹, 杂交, 放射自显影。
- (11) 根据不同 DNase I 浓度组的 DNA 判断 DNase I 超敏感位点。

适用范围:

用于初步了解某个基因的表达状态, 初步鉴定基因转录的调控区域。

21.2.2 DNA 甲基化分析

在哺乳动物细胞 DNA 中, CpG 二核苷酸序列出现的频率较低, 只有预计频率的 1/5 左右, 尽管只有

一部分 CpG 二核苷酸被甲基化,但这种甲基化具有高度的细胞特异性。DNA 上特定的 CpG 序列处的胞嘧啶甲基化修饰对基因的表达有抑制作用。检测 DNA 的甲基化状态有助于了解该基因的转录活性。甲基化分析的方法有多种。在此介绍一种最简单有效的方法,即利用限制性内切酶同裂酶对甲基化的敏感性不同。

表 21-1 列出了几种对 5mCG 序列具有不同的敏感性的限制性内切酶,这对于 DNA 甲基化分析极为有用。

表 21-1 对 CpG 序列甲基化作用敏感性不同的限制性内切酶

限制性内切酶	可切割序列	不可切割序列
Hpa II	CCGG	CmCGG
Msp I	CCGG CmCGG	mCCGG
Cfo I, Hha I	GCGC	GmCGC, GmCGmc
Sma I	CCCGGG	CCmCGGG
Xma I	CCCGGG CCmCGGG	mCCCGGG
Acc II, BsuE I	CGCG	mCGCG
BstI I	CGCG	mCGmCG
FnuD II	CGCG	mCGCG, CGmCG
Tha I	CGCG	mCGCG, mCGmCG
Xho I	CTCGAG	CTmCGAG
Ava I	CPyCGPuG	CPymCGPuG
Sal I	GTCGAC	GTmCGAC
Taq I	TCCA, TmCGA	TCCmA
Aos II, Aha II	GPuCGPyC	GPumCGPyC
Cla I	ATCGAT	ATmCGAT
Hae II, Ngo I	PuGCGCPy	PuGmCGCpy
Nar I	GGCGCC GGCGCmC	GGmCGCC
Mlu I	ACGCGT	AmCGCGT
Mae II	ACGT	AmCGT

试剂及仪器:

限制性内切酶
适当的限制酶缓冲液
琼脂糖凝胶电泳装置及试剂
 ^{32}P 标记的 DNA 探针
Southern 印迹及杂交装置与试剂
其它实验室常规仪器与试剂

操作步骤:

- (1) 将待测 DNA 样品溶于适量水中,加入适量适当的 $10\times$ 酶切缓冲液,终浓度为 $1\times$ 。
- (2) 加入适当限制性内切酶,混匀。
- (3) 适当温度保温 1~2 小时。

(4) 加入终浓度为 10mmol/L EDTA 终止反应。

(5) 琼脂糖凝胶电泳分离。

(6) Southern 印迹, 杂交, 放射自显影。

(7) 根据酶切片段长度, 判断是否甲基化。

注意事项:

(1) 为保证酶切完全, 防止酶切不完全对实验结果判断的干扰, 酶量必须过量 5~10 倍以上, 并在最适条件下反应。

(2) 根据不同的基因序列选用不同的限制性内切酶。一般需成对使用 (即对 5mC 敏感和不敏感的酶成对作用) 如 Msp I 与 Hpa II, Sma I 与 Xma I 等。

(3) 大肠杆菌中增殖可使 5mC 去甲基化, 因此不可用克隆化的 DNA 片段进行甲基化分析, 而必须用基因组 DNA。

(4) 其他甲基化分析方法: 如使用甲基化酶人为将 DNA 甲基化, 5-氮杂胞嘧啶将 DNA 脱甲基化等, 然后观察其功能的改变。

21.2.3 转录起始位点的测定 (引物延伸法)

精确测定基因的转录起始位点, 对于进一步研究其基因表达调控机制具有极重要的作用。

常用的转录起始位点测定方法有三种: 核酸酶 S_1 作图法 (S_1 -mapping), RNase 作图法 (RNase mapping; 或 RNase 抗性分析法, RNase-resistance assay) 和引物延伸法等。

S_1 及 RNase 作图法测定转录起始位点的基本原理如图 21-19 所示, 5'标记的单链 DNA 或 RNA 探针可与相应的 mRNA 互补链杂交, 用核酸酶 S_1 或 RNase 消化未杂交的单部分, 测序胶电泳分离, 放射自显影, 测定 DNA 片段长度, 估计 5'标记末端与 mRNA 5'末端的距离, 即可判断出转录起始位点。

同样, S_1 (RNase) 作图法还可用于内含子与外显子剪切位点及 mRNA 3'末端的分析。

S_1 (RNase) 作图操作方法已于第 5 章中介绍, 不再重复。本章主要介绍引物延伸法。其基本原理是: 待测基因 mRNA 与过量的 5'末端标记的单链 DNA 引物杂交, 利用反转录酶进行延伸反应合成 cDNA, 然后测定合成的 cDNA 产物的长度, 即可判断出引物 5'末端与 mRNA 5'末端 (即转录起始位点) 的距离。如果在反应体系中加双脱氧核苷三磷酸, 也可直接测定 cDNA 序列。

试剂与仪器:

5'末端标记的单链 DNA 引物

杂交缓冲液:

40mmol/L PIPES (pH6.4)

1mmol/L EDTA (pH8.0)

0.4mol/L NaCl

80% 甲酰胺

反转录酶缓冲液:

50mmol/L Tris·Cl (pH7.6)

60mmol/L KCl

10mmol/L MgCl₂

1mmol/L dNTP

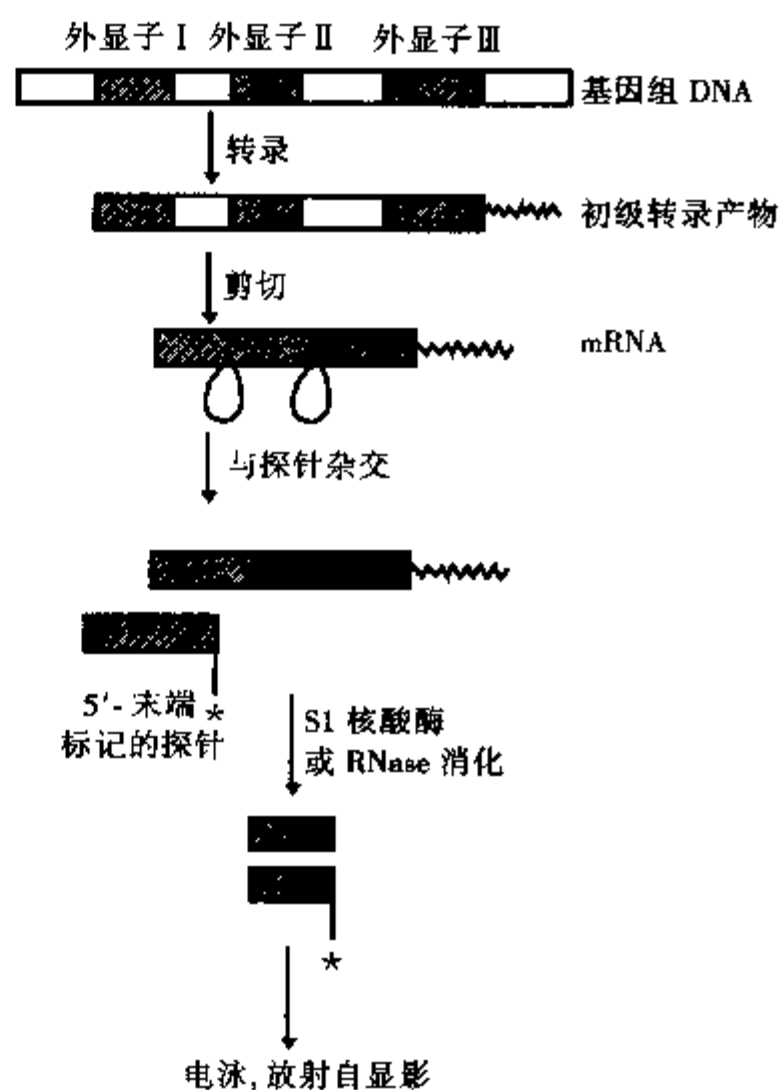


图 21-19 S_1 (RNase) 作图法原理示意图

1mmol/L DTT

1 单位/ μ l RNasin

50 μ g/ml 放线菌素 D

反转录酶

5 μ g/ml 无 DNase 的 RNase

DNA 测序胶凝胶电泳试剂与装置

其它实验室常规试剂与设备

操作步骤:

- (1) 按第 5 章方法制备 5'末端标记的单链 DNA 探针, 作为引物。
- (2) 取 $10^4 \sim 10^5$ cpm 引物与适量细胞总 RNA 或 mRNA 混合。乙醇沉淀。于 4℃ 下 12 000g 离心 10 分钟, 收集 RNA 沉淀。70%乙醇洗涤, 离心。RNA 沉淀置室温干燥。
- (3) RNA 沉淀重新溶解于 30ml 杂交缓冲液中。
- (4) 置 85℃ 水浴保温 10 分钟后, 迅速转移至适当的退火温度中, 保温 8~12 小时。
退火温度多为 40~50℃ 左右, 应根据引物大小, G+C 含量等进行估算, 最好应进行预试验。
- (5) 加 170 μ l 无核酸酶污染的水和 400 μ l 乙醇, 沉淀核酸, 离心收集沉淀, 70%乙醇洗涤, 离心。室温下干燥。

(6) 沉淀重溶于 20 μ l 反转录酶缓冲液中。

(7) 加入 50U 反转录酶, 混匀。置 37℃ 保温 1 小时。

(8) 加入:

0.5mol/L EDTA (pH8.0) 1 μ l

5 μ g/ml 无 DNase 的 RNase 1 μ l

置 37℃ 保温 30 分钟。

(9) 酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀。7mol/L 尿素/聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 放射自显影。根据片段长度判断转录起始位点。

注意事项:

- (1) 引物距 mRNA 5'末端应不大于 100bp, 否则会导致不均一的延伸产物。
- (2) 变性的双链 DNA 也可作为引物, 但应提高杂交温度, 抑制 DNA/DNA 杂交体的形成。
- (3) 杂交温度的估算参见第 6 章。

21.2.4 体外转录

建立一个无细胞体系进行体外转录 (*in vitro run off transcription*), 可对反应条件进行控制。便于研究顺式调控元件和反式作用因子的功能。

体外转录体系建立的关键是细胞核抽提物的制备。以下介绍一种较成熟大鼠肝细胞核提物体外转录体系, 研究者可根据需要进行适当改进, 将粗提物适当纯化 (如 DEAE-Sephrose CL-6B 和肝素-Sephrose CL-6B 柱层析等)。

试剂与仪器:

手术器械

缓冲液 A:

10mmol/L HEPES (pH7.9)

10mmol/L KCl

1.5mmol/L $MgCl_2$

0.1mmol/L EDTA

0.5mmol/L DTT (使用前加入)
 0.5mmol/L PMSF (使用前加入)
 14 μ g/ml aprotinin (抑蛋白酶肽, 使用前加入)
 0.15mmol/L 精胺
 0.5mmol/L 亚精胺
 0.35mol/L 蔗糖

玻璃匀浆器

Teflon (聚四氟乙烯) - 玻璃匀浆器

缓冲液 B: 含 0.5mol/L 蔗糖的缓冲液 A

缓冲液 C: 不含蔗糖的缓冲液 A

缓冲液 D:

20mmol/L HEPES (pH7.9)
 420mmol/L NaCl
 1.5mmol/L MgCl₂
 0.1mmol/L EDTA
 0.5mmol/L DTT (使用前加入)
 0.5mmol/L PMSF (使用前加入)
 14 μ g/ml aprotinin (使用前加入)
 10% 甘油

Nonidet P40

透析袋

缓冲液 E:

20mmol/L HEPES (pH7.9)
 0.2mmol/L EDTA
 0.5mmol/L DTT (使用前加入)
 10% 甘油
 0.1% Nonidet P40
 300mmol/L KCl

DNA 模板

2 \times 转录缓冲液

25mmol/L HEPES (pH7.9)
 7.5mmol/L MgCl₂
 120mmol/L KCl
 2mmol/L DTT (使用前加入)
 0.2mmol/L EDTA
 1mmol/L NTP
 80U RNasin (使用前加入)
 0.55U m⁷GpppG
 10% 甘油
 400Ci/mmol α -³²P-UTP 或 GTP

终止缓冲液:

50mmol/L Tris·Cl (pH7.5)

10mmol/L EDTA

0.5% SDS

200 μ g 蛋白酶 K

10 μ g 酵母 tRNA

RNA 提取及测序电泳所需试剂和设备

其它常规仪器与试剂

操作步骤:

细胞核蛋白提取过程所有操作均在冰浴中进行, 离心在 4℃ 冷柜中进行。

- (1) 取 150 ~ 200g 大鼠肝剪碎, 用冰冷的缓冲液 A 冲洗掉红细胞, 加入 800ml 缓冲液 A。
- (2) 用电动 Teflon - 玻璃匀浆器 1400r/min 匀浆 10 ~ 15 次, 至显微镜检见 90% 细胞破碎。
- (3) 匀浆液用数层纱布过滤。Beckman J - 6B 转头离心, 4 000r/min, 20 分钟。
- (4) 细胞核沉淀重悬于 600ml 缓冲液 A 中。再用 Teflon - 玻璃匀浆器 800r/min 匀浆 1 次。
- (5) 匀浆液铺在两个 250ml 缓冲液 B 层上。按上述同样条件离心, 洗净细胞核。
- (6) 细胞核沉淀重悬于 200ml 缓冲液 C 中, SS₃₄ 转头 12 000r/min 离心 15 分钟。
- (7) 细胞核沉淀重悬于 2.5 ~ 5 倍体积的缓冲液 D 中。
- (8) 用玻璃匀浆器匀浆 10 次。
- (9) 磁力搅拌 45 分钟。GSA 转头 10 000r/min 离心 15 分钟。
- (10) 取上清, 加入 Nonidet P40 至终浓度为 0.1%。
- (11) 上清液装入透析袋中, 对 50 倍体积的缓冲液 D 透析 2 次, 每次 2 小时。
- (12) 透析后, GSA 转头 10 000r/min 离心 15 分钟, 上清液分装, 置 -70℃ 保存备用。其蛋白含量可用 Kalb 定氮法测定。

(13) 体外转录:

模板 DNA 1 ~ 2 μ g

2 × 转录缓冲液 50 μ l

α - ³²P - UTP 10 μ Ci

加水至 100 μ l

置 30℃ 水浴保温 40 分钟。

(14) 加入 400 μ l 终止缓冲液, 37℃ 保温 30 分钟。

(15) 按 CsCl 超离心法提取 RNA, 乙醇沉淀。

(16) 尿素/聚丙烯酰胺凝胶电泳放射自显影。

注意事项:

(1) 防止核蛋白的失活是实验成败的关键, 组织细胞应新鲜, 操作应在冰浴上进行, 手法应轻柔, 并加入蛋白酶抑制剂。

(2) 此种核蛋白粗提物对于体外转录是满意的, 也可适用于后述的凝胶滞留实验。必要时 (如用于足纹法时), 应采用 DEAE - Sepharose CL - 6B 和肝素 - Sepharose CL - 6B 柱层析等进一步纯化。

(3) 进行 RNA 产物定量分析时, 加入已知 DNA 模板作为内标准参照物是必要的, 以排除人为因素造成的系统误差。

(4) DNA 模板不必要全长, 但必须包括转录起始点及上游调控序列。包括 3' 末端的全长序列反而会因转录终止位点不均一和不完全造成结果分析上的困难。非全长序列中, RNA 聚合酶转录至模板末端后可脱离模板, 因此称为 run - off 转录。

(5) 转录的 mRNA 经纯化后加入网织红细胞裂解物, 可进行体外翻译, 则在转录体系中必须加入 7mGpppG 或 3' - O - 甲基鸟嘌呤核苷三磷酸, 以形成“帽子”。DNA 模板则最好用全长序列。

(6) 在反应体系中加入适量鹅膏蕈碱可鉴别是否为 RNA 聚合酶 II 转录。pol II 对 α 鹅膏蕈碱最敏感, 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 即可抑制酶活力 50%; 而 pol I 最不敏感, 在其浓度达 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时仍保持完全的活力; pol III 则介于两者之间。

21.2.5 进行中的核转录分析

进行中的核转录分析 (nuclear run on transcription assay) 即在细胞核提取物中加入放射性核素标记的核苷三磷酸, 使其掺入到正在转录的 mRNA 分子中。通过核酸分子杂交方法, 即可同时鉴定出多种不同基因是否转录及其转录的量。这是测定基因转录活性的较可靠方法, 排除了 Northern 杂交等方法中 mRNA 半衰期对实验结果的影响。可同时分析多种基因的转录活性, 也是此法的一大优点。

试剂及设备:

非标记的核酸片段探针

硝酸纤维素膜

斑点或狭缝点样器

缓冲液 A:

10mmol/L Tris·Cl (pH7.4)

10mmol/L NaCl

3mmol/L MgCl_2

Nonidet P40

1.7mol 蔗糖 (用缓冲液 A 配制)

细胞核保存液:

50mmol/L Tris·Cl (pH8.3)

40% 甘油

5mmol/L MgCl_2

0.1mmol/L EDTA

转录缓冲液:

10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

5mmol/L MgCl_2

300mmol/L KCl

0.5mmol/L ATP, CTP, GTP

α - ^{32}P -UTP (400 ~ 800Ci/mmol)

核酸杂交所需试剂与装备

RNase A

其它实验室常规仪器与试剂

操作步骤:

(1) 非标记 DNA 探针 10 μg , 经变性后用斑点或狭缝点样器点样于硝酸纤维素膜上。80℃真空烘烤 2 小时。室温保存备用。

(2) 细胞用冰冷的 PBS 洗涤, 重悬于适量缓冲液 A 中。加入终浓度 0.5%, NP-40, 使细胞膜破裂。

(3) 750g 离心 5 分钟, 收集细胞核沉淀。

(4) 沉淀重悬于适量缓冲液 A 中, 铺于离心管中用缓冲液 A 配制的 1.7mol/L 蔗糖层上。15 000g 离心 15 分钟。细胞核穿过蔗糖层, 沉淀于管底。

(5) 细胞核沉淀重悬于细胞核保存液中, 小量分装, 置液氮中保存备用。

- (6) 取细胞核悬液 100 μ l, 加入 100 μ l 转录缓冲液, 100 μ Ci α - 32 P-UTP。置 37℃ 保温 30 分钟。
- (7) 提取细胞总 RNA, 乙醇沉淀。RNA 溶于适量 TE 中。
- (8) 标记的 RNA 与上述 DNA 探针杂交。
- (9) 2 \times SSC 65℃ 洗膜 3 次, 每次 2 小时。
- (10) 加入 10 μ g/ml RNase A, 37℃ 保温 30 分钟。
- (11) 2 \times SSC 37℃ 洗膜 1 小时。
- (12) 放射自显影。

21.2.6 差示文库

差示文库 (differential library) 又称扣除文库 (subtracted library), 是反映不同组织细胞或同一种细胞处于不同功能状态下的基因表达差别的 cDNA 文库。它对于研究细胞发育分化、细胞分裂周期、细胞对药物和生长因子的诱导反应及肿瘤等疾病的分子基础都有极大的帮助。

建立差示文库的基本流程是: 分别提取不同细胞的 mRNA, 将其中一种 mRNA 反转录成 cDNA, 然后与过量的另一种细胞 mRNA 进行杂交, 羟基磷灰石柱层析分离纯化未形成杂交体的单链 cDNA, 它反映此细胞中特异性表达的基因。以所得到的单链 cDNA 为模板, 合成第二链, 以此双链 cDNA 建立 cDNA 文库, 即为差示文库。

试剂与仪器:

mRNA 提取与纯化所需仪器与试剂

反转录酶 (AMV)

反转录酶缓冲液:

50mmol/L Tris·Cl (pH8.3)

6mmol/L MgCl₂

70mmol/L KCl

1mmol/L dNTP

10 μ g/ml oligo (dT)

20mmol/L DTT

100 μ g/ml 放线菌素 D

Sephadex G-50

Sephadex 洗脱缓冲液:

100mmol/L NaCl

50mmol/L Tris·Cl (pH7.5)

1mmol/L EDTA

0.02% SDS

酵母 tRNA

毛细玻璃管 (20 μ l)

2 \times 杂交缓冲液:

1mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.4)

10mmol/L EDTA

0.2% SDS

羟基磷灰石 (HAP, hydroxyapatite)

单链洗脱液:

0.12mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH6.8)

0.1% SDS
2-丁醇
Klenow DNA 聚合酶
S₁ 核酸酶
cDNA 克隆所需仪器及设备
其它常规仪器与设备

操作步骤:

- (1) 按第4章方法分别提取两种不同细胞的总 RNA, oligo (dT) 纤维素分离 poly (A) RNA。
- (2) 取其中一种细胞 mRNA 作为模板合成 cDNA: 取 mRNA 1 ~ 5 μ g, 溶于 100 μ l 反转酶缓冲液中, 每 μ g RNA 中加入 10U AMV 反转录酶。置 42℃ 保温 2 小时。
- (3) 加入等体积 0.2mol/L NaOH, 置 70℃ 保温 20 分钟, 以水解 RNA。
置冰浴中冷冻, 加入适量 1mol/L HCl 中和。加入乙酸钠 (pH6.5) 和 SDS, 使终浓度分别为 0.2mol/L 和 0.1%。
- (4) 保温至室温后, Sephadex G-50 柱层析, 用 Sephadex 洗脱液洗脱。
- (5) 加入 50 μ g tRNA, 乙醇沉淀。DNA 沉淀用 70% 乙醇洗涤, 干燥后溶于水中。
- (6) 在 cDNA 溶液中加入 20 倍过量的另一种细胞 mRNA (终浓度约 1 ~ 1.5mg/ml), 再加入 20 μ g 超声打断的非特异性 DNA, 10 μ l 2 \times 杂交缓冲液, 加水至体积为 20 μ l。非特异性 DNA 的作用为吸附高度重复序列对杂交的干扰。
- (7) 将上述杂交反应吸入一硅化的毛细玻璃管中, 封口。置沸水浴 1 分钟。
- (8) 置 68℃ 保温 16 ~ 20 小时。此时针对 mRNA 的 Cot 约为 1000mol \cdot s/L, DNA 的 Cot 为 10mol \cdot s/L。
- (9) 制备羟基磷灰石 (Bio-Gel HTP) 层析柱:
将羟基磷灰石粉悬浮于 0.01mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH6.8) 中。
在层析柱底部用硅化的玻璃纤维或 Whatman GF/C 滤膜覆盖。
将羟基磷灰石悬液装填于层析柱中, 填充体积约 0.5 ~ 1ml。
用数倍床体积的 0.01mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH6.8) 洗柱。
- (10) 将杂交后的核酸溶液稀释 10 倍, 使磷酸盐浓度小于 0.08mol/L。然后上样于羟基磷灰石层析柱上。
- (11) 用 3ml 0.01mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH6.8) 洗柱。
- (12) 层析柱底部密封后加入与床体积相等的预热至 60℃ 的单链洗脱液。60℃ 保温 5 分钟。然后收集洗脱液, 重复此步骤 2 次。
- (13) 合并洗脱液, 加入等体积 2-丁醇抽提, 重复数次, 至水相体积为 100 ~ 125 μ l。
- (14) Sephadex G-50 离心柱层析, 去除 DNA 中的盐。
- (15) 加入 50 μ g tRNA, 乙醇沉淀。
- (16) 单链 cDNA 沉淀重溶于水中。用 Klenow DNA 聚合酶合成 cDNA 第二链。
- (17) 用 S₁ 核酸酶切除发夹环。
- (18) 按第9章方法构建 cDNA 文库。

注意事项:

- (1) mRNA 含量极微, 经杂交和羟基磷灰石层析后, 回收的 cDNA 量更少, 因此此方法很难得到满意的结果。操作更需谨慎, 特别要防止 mRNA 降解。
- (2) 应进行预试验摸索合适的杂交条件。调整浓度与时间, 一般 Cot 值在 1 000 ~ 4 000 摩尔 \cdot 秒/升 (mol \cdot s/L) 之间。如一轮杂交吸收不完全, 可进行第二轮杂交。
- (3) 单链 cDNA 从羟基磷灰石层析柱上洗脱的条件应预先进行试验。一般 0.12 ~ 0.16mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH6.8) 可洗脱单链 DNA, 而双链 DNA 则需 0.36mol/L 以上。

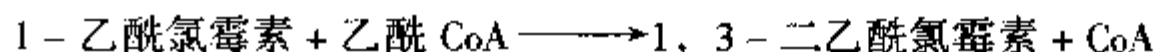
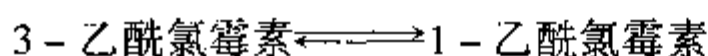
21.2.7 氯霉素乙酰转移酶分析

21.2.7.1 氯霉素乙酰转移酶分析 (CAT assay, chloramphenicol acetyltransferase assay) 基本原理

对假定顺式调控序列的启动子活性的测定,常采用“报道”基因 (reporter gene) 方法。即通过基因重组方法将待测 DNA 序列与一特异的“报道”基因相连,然后导入细胞中进行表达。通过测定表达出的“报道”基因产物的量,即可推断出此 DNA 序列是否具有启动子活性。

做为“报道”基因必须满足下列条件:①此基因所编码的酶活性必须易于同受体细胞内相似的酶活性相区别;②不会受细胞内其他酶活性的干扰;③测定方法简单、快速、灵敏度高、特异性高。目前有两种基因较为理想:氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 和 β -半乳糖苷酶。

氯霉素乙酰转移酶 (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) 基因最初来自细菌转座子 Tn9, 其产物 CAT 可产生氯霉素抗性。其催化的反应如下:



因此可以用 ^{14}C 标记的氯霉素或 ^{14}C 标记的乙酰辅酶 A 方便地进行 CAT 活性的检测。

β -半乳糖苷酶可作用于底物 ONPG (邻硝基苯- β -D-半乳糖苷) 或 X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷) 产生淡黄色或蓝色反应产物。 β -半乳糖苷酶基因常作为 CAT 活性测定的内对照基因,以排除转染及蛋白质提取等过程中的误差对实验结果的干扰。

图 21-20 所示为常用的 CAT 基因载体 pSV₀CAT 结构示意图:

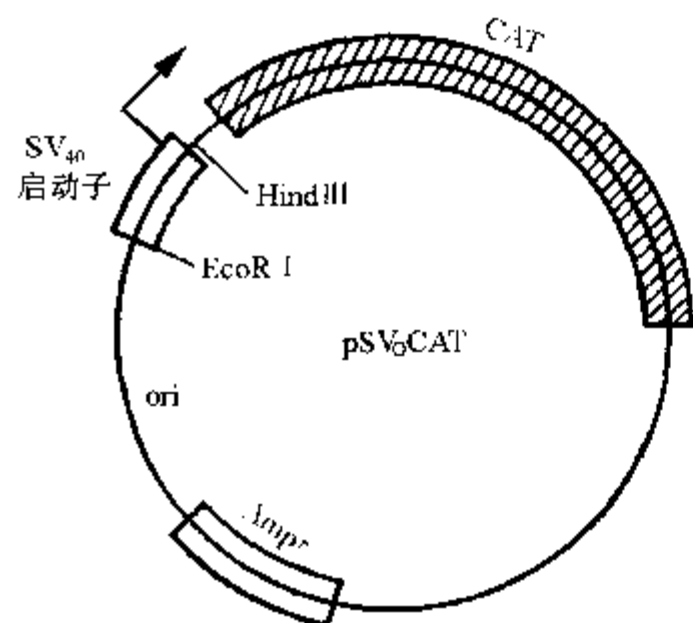


图 21-20 pSV₀CAT

实验基本流程是:将 SV₄₀ 启动子切除,将外源 DNA 片段插入,在大肠杆菌中扩增。然后与阳性对照 (含 SV₄₀ 启动子)、阴性对照 (不含启动子) 分别导入哺乳动物细胞中进行瞬时表达 (参见真核细胞表达章)。可同时将 β -半乳糖苷酶基因共转染入细胞中,作为 CAT assay 的内标。提取全细胞蛋白提取物,与氯霉素和乙酰 CoA 一起保温,用薄层层析等方法测定乙酰化的氯霉素的量,即可判断待测 DNA 序列的启动子活性。

21.2.7.2 CAT 基因的瞬时表达

(1) 将待测 DNA 克隆于 pSV₀CAT 载体中 CAT 基因的 5'端。

(2) CAT 将重组克隆 DNA 及阳性、阴性对照 DNA 转染入哺乳动物细胞中 (参见第 13 章)。可与 β -半乳糖苷酶表达质粒一起共转染。

(3) 48~60 小时后,用不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS 洗细胞 3 次。

(4) 收集细胞于 1ml PBS 中。12 000g 离心 10 秒钟,细胞沉淀重悬于 1ml PBS 中,再离心,去除 PBS。细胞沉淀置 -20℃ 保存备用。

21.2.7.3 CAT 活性测定——薄层层析法

试剂与仪器:

^{14}C 标记的氯霉素,用水稀释至 0.1mCi/ml

3.5mg/ml 乙酰 CoA (新鲜配制)

乙酸乙酯

薄层层析 (TLC) 硅胶板

真空干燥离心机

层析缸

其他实验室常规仪器与试剂

操作步骤:

- (1) 细胞重悬于 100 μ l 250 mmol/L Tris·Cl (pH7.8) 溶液中, 剧烈振荡。
- (2) 干冰乙醇浴和 37℃ 水浴中反复冻融 3 次, 或用超声波破碎仪破碎细胞。
- (3) 4℃ 下 1200g 离心 5 分钟。取上清保存于 -20℃ 备用。
- (4) 取 50 μ l 全细胞提取物置 65℃ 保温 10 分钟, 以灭活脱乙酰酶。如混浊, 可离心去除沉淀。
- (5) 加入下列试剂并混匀:

1mol/L Tris·Cl (pH7.8)	50 μ l
¹⁴ C-氯霉素 (0.1mCi/ml)	10 μ l
3.5mg/ml 乙酰 CoA	20 μ l

置 37℃ 保温 30 分钟至 2 小时。如保温时间长, 则应追加 10 μ l 乙酰 CoA。

(6) 加入 1ml 乙酸乙酯, 振荡, 使充分混匀。12 000g 离心 5 分钟。此时乙酰化氯霉素将进入上层有机相, 而未乙酰化的氯霉素则多数保留在水相。

(7) 吸取 900 μ l 上层有机相, 不要吸中间相及水相。

(8) 置真空干燥离心机中离心, 将乙酸乙酯蒸发。

(9) 重新溶解于 25 μ l 乙酸乙酯中。

(10) 取 10~15 μ l 样品点样于薄层层析硅胶板上, 少量多次, 用电风吹干。

(11) 层析缸中加入 200ml 氯仿: 甲醇 (95:5)。

(12) 将 TLC 层析板置层析缸中, 盖严缸盖。

(13) 当溶剂到达层析板 3/4 处, 取出层析板, 室温下晾干。

(14) 直接对 X 线片曝光, 不要用保鲜膜包裹。

(15) 结果判断: 离起点较近的斑点是非乙酰化的氯霉素。迁移较快的是单乙酰化的氯霉素修饰产物。有时可见到迁移更快的第 3 个斑点, 这是双乙酰化的氯霉素产物。

用黑度扫描仪对 X 线片进行扫描, 可比较不同样品的乙酰化程度, 它反应基因启动子活性的强弱。

(16) 将放射性斑点刮下, 液闪计数, 可对 CAT 活性进行定量。

21.2.7.4 CAT 活性测定——有机溶剂抽提法

采用 ¹⁴C 标记的乙酰 CoA 进行反应, 产物用乙酸乙酯抽提, 乙酰化的氯霉素极易与未反应的乙酰 CoA 分离, 分别进入有机相和水相。

试剂与仪器:

8mmol/L 氯霉素 (乙醇配制)

¹⁴C 标记的乙酰 CoA (58Ci/mmol)

乙酰 CoA

乙酸乙酯

闪烁液

液体闪烁计数器

其它实验室常温仪器与试剂

操作步骤:

(1) 按 21.2.7.3 同样方法制备全细胞提取物。

(2) 配制乙酰 CoA 溶液: 将 ¹⁴C 标记的乙酰 CoA 配成 50 μ Ci/ml 溶液, 小量分装贮存于 -70℃。反应前, 用 0.5mmol/L 非标记乙酰 CoA 溶液将之稀释 10 倍。

(3) 取 30 μ l 全细胞提取物, 加入:

8mmol/L 氯霉素	20 μ l
-------------	------------

0.25mol/L Tris·Cl (pH7.8)	30 μ l
乙酰 CoA 溶液	20 μ l

混匀, 置 37℃ 保温 1 小时。然后置 65℃ 加热 10 分钟灭活脱乙酰酶。

(4) 在冰浴上, 加入 100 μ l 冰冷的乙酸乙酯, 剧烈振荡, 室温下 12 000g 离心 3 分钟。

(5) 吸取 80 μ l 上层有机相。在原管中再加入 100 μ l 乙酸乙酯, 剧烈振荡, 离心。吸取 100 μ l 上层有机相, 与第 1 次有机相合并。

(6) 加入 1mol 闪烁液, 用液体闪烁计数器测定放射性强度, 它反映 CAT 活性。

21.2.7.5 CAT 活性测定——闪烁液扩散法

用与水不相混溶的闪烁液覆盖反应液。乙酰化氯霉素可迅速从水相扩散至闪烁液中并被捕捉, 而乙酰 CoA 和非乙酰化氯霉素则留在水相中。只有闪烁液中的放射活性可被液闪计数器测出, 并可进行动态测定。

试剂与仪器:

5mmol/L 氯霉素 (用乙醇配制)
50 μ Ci/ml 3 H 标记的乙酰 CoA (1.4Ci/mmol)
水不溶闪烁液
液体闪烁计数器
其它实验室常规仪器与试剂

操作步骤:

- (1) 按 21.2.7.3 同样方法制备全细胞提取物。
- (2) 取 30 μ l 全细胞提取物, 加入 20 μ l 100mol/L Tris·Cl (pH7.8), 移入 7ml 玻璃闪烁瓶中。
- (3) 65℃ 加热 15 分钟以灭活其中的脱乙酰酶。然后置 47℃ 水浴中。
- (4) 加入 200 μ l 新鲜配制的反应液:

1mol/L Tris·Cl (pH7.8)	25 μ l
5mmol/L 氯霉素	50 μ l
50 μ Ci/ml 3 H - 乙酰 CoA	0.1 μ Ci

加水至 200 μ l。

(5) 吸取 5ml 水不溶闪烁液, 覆盖于反应液面上。37℃ 保温。不必混合两相。

(6) 可随时或定时测定其放射性强度。

21.2.7.6 β -半乳糖苷酶的测定

试剂与仪器:

100 \times Mg 溶液:
0.1mol/L MgCl₂
4.5mol/L β -巯基乙醇
1 \times ONPG 溶液:
4ml/ml ONPG (邻硝基- β -D-半乳糖苷)
0.1mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH7.5)
1mol/L Na₂CO₃
分光光度计
其它常规仪器与试剂

操作步骤:

- (1) 按 21.2.7.3 同样方法制备全细胞提取物。
- (2) 取 30 μ l 全细胞提取物, 加入下列试剂并混匀:

100 × Mg 溶液	3 μ l
1 × ONPG	66 μ l
0.1mol/L 磷酸钠缓冲液	201 μ l

(3) 置 37℃ 保温 30 分钟, 或至出现淡黄色。

(4) 加入 500 μ l 1mol Na₂CO₃ 终止反应。测定 420nm 波长光密度值。

注意事项:

(1) 不可加热, 半乳糖苷酶对热敏感。

(2) 应设阳性 (纯品 β -半乳糖苷酶) 及阴性对照。

21.2.8 凝胶滞留法

凝胶滞留法 (gel retardation assay) 又称迁移率改变法 (mobility shift assay), 是检测 DNA 结合蛋白的一种简单迅速而又灵敏可靠的实验方法。

凝胶滞留法的基本原理是: 当 DNA 结合蛋白与相应的 DNA 片段或寡核苷酸结合而形成 DNA-蛋白质复合物后, 使 DNA 片段的分子量及电荷发生改变, 因而在聚丙烯酰胺凝胶电泳体系中其电泳迁移率发生改变, 通常较游离的 DNA 片段的泳动速率慢得多, 在放射自显影 X 光胶片上形成一较游离 DNA 片段滞后的带型。此方法与其它实验方法相比, 不但简单迅速, 而且灵敏度高, 可以检测出 fmol (10^{-15} 摩尔) 量的 DNA 结合蛋白。不同种类的 DNA 结合蛋白导致不同的迁移率, 因此可以将与同一 DNA 片段结合的不同的蛋白分离开来。采用此方法可以鉴定特定基因调控序列中是否存在特定 DNA 结合蛋白的结合位点, 也可以用来鉴定特定细胞核蛋白中是否存在某种基因的 DNA 结合蛋白, 常用作基因转录调控因子的初步筛选, 是研究序列特异性 DNA 结合蛋白的最常用方法。

试剂与仪器:

³²P-末端标记的 DNA 片段 (1~10ng)

10 × 结合缓冲液

100mmol/L Tris·Cl (pH7.4)

0.5mol/L NaCl

10mmol/L DTT

10mmol/L EDTA

50% 甘油

鲑精 DNA, 或小牛胸腺 DNA, 或大肠杆菌 DNA, 或 poly dI:dC

核蛋白提取液 (10 μ g/ μ l)

非标记的特异 DNA 片段

10 × TBE

丙烯酰胺

N, N' - 亚甲双丙烯酰胺 (N, N' - methylene - bis - acrylamide)

10% 过硫酸胺, 使用前新鲜配制

TEMED (N, N, N', N' - tetramethyl - ethylenediamine, 四甲基乙二胺)

载样缓冲液:

40% 蔗糖

0.25% 二甲苯青 (xylene cyanol)

0.25% 溴酚蓝 bromophenol blue

蠕动泵

垂直电泳槽及电泳装置

X 线胶片

其它实验室常规仪器与试剂

操作步骤:

(1) 按第 5 章介绍的方法将待测样品 DNA 片段进行 ^{32}P - 末端标记。一般要求其比活达到 $1 \times 10^7 \text{ cpm}/\mu\text{g}$ DNA 以上。

(2) 根据 DNA 片段的长度, 用 $0.25 \times \text{TBE}$ 或 $1 \times \text{TAE}$ 制备相应浓度的聚丙烯酰胺凝胶 (Acr: Bis = 20:1)。待凝胶完全凝固后, 在 $0.25 \times \text{TBE}$ 或 $1 \times \text{TAE}$ 缓冲液中预电泳, 100 ~ 200 伏, 1 小时。用蠕动泵将上下电泳槽中的电泳液不断循环。

(3) 在微量离心管中, 加入下列试剂, 并混匀:

末端标记的 DNA 片段	1ng
$10 \times$ 结合缓冲液	$2\mu\text{l}$
10mg/ml 鲑精 DNA	$1\mu\text{l}$
DNA 结合蛋白或核蛋白提取液	适量
加水至 $20\mu\text{l}$	

轻轻混合, 注意决不可剧烈振荡。置室温下 30 分钟。

(4) 在上述反应体系中加入 $4\mu\text{l}$ 载样缓冲液。混匀后, 上样于聚丙烯酰胺凝胶样品孔中。恒压 100 ~ 200V 电泳。电泳缓冲液为 $0.25 \times \text{TBE}$ 或 $1 \times \text{TAE}$ 。用蠕动泵将上下电泳槽中的电泳液不断循环。

(5) 根据 DNA 片段的大小, 待溴酚蓝或二甲苯青迁移到一定的位置后, 中止电泳, 取下凝胶夹板并打开。用一张滤纸覆盖在凝胶上, 揭下凝胶, 用一张保鲜膜覆盖在凝胶上。用干胶机将凝胶抽干。如凝胶不太厚, 也可不需抽干。用盖革计数器检测放射性的强度, 估计曝光时间。

(6) 将凝胶置暗盒中, 其上压磷钨酸钙中速感屏前屏, 光面向上。在暗室中, 压一至两张 X 线片, 再压上增感屏后屏。合上暗盒。置 -70°C 曝光适当的时间。

(7) 根据放射性的强度曝光一定的时间后, 在暗室中取出 X 线片, 显影, 定影。如曝光不足或过度, 可在压片重新曝光。

(8) 结果分析: 如待测细胞核蛋白提取物中含有相应基因的 DNA 结合蛋白, 或待测基因片段中含有特定 DNA 结合蛋白的结合位点, 则会在相应的加样孔中形成一较之游离探针 DNA 片段条带滞后的条带, 同时相应的游离探针 DNA 条带的带型强度减弱, 甚至消失。

注意事项:

(1) 本文提供的结合反应条件适合于大多数 DNA 结合蛋白。但可根据不同的蛋白和不同的实验需要进行适当的调整。影响 DNA - 蛋白结合的因素主要有以下几点:

1) 一价金属离子, 如 Na^+ 、 K^+ 等: 一般要求终反应浓度为 50 ~ 150mmol/L。低盐浓度有利于结合反应, 而高盐则有利于解离。当进行初筛分析时一般采用低盐浓度 (如本文采用 50mmol/L NaCl)。但低盐时非特异性结合增加。当需鉴定结合特异性时, 则应采用高盐浓度。盐浓度过高则所有 DNA - 蛋白复合物均解离。

2) 二价阳离子 (如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等): 各种 DNA 结合蛋白对二价阳离子的要求不同, 二价阳离子对某些蛋白结合有促进作用, 而对另一些则使结合能力下降。某些蛋白还需一些特殊金属离子, 如锌离子等。

3) pH: 一定范围内, 低 pH 有利于结合, 而高 pH 有利于解离。一般以采用生理范围 (7.2 ~ 7.5) 为宜。

4) 温度: 温度对此反应的影响不大, 多数可在 25 ~ 36 $^\circ\text{C}$ 下进行。有人在冰浴中进行, 似乎并无必要。

5) 为防止蛋白破坏, 可在临使用前加入终浓度 0.1mmol/L DTT 和/或 PMSF (phenyl - methylsulfonyl

fluoride, 溶于异丙醇中)。当蛋白浓度较低时, 可加入 10mg/ml BSA。

6) 时间: 10 ~ 60 分钟, 一般 20 分钟已足以使结合反应达到平衡。

(2) 在进行细胞核蛋白提取物分析时, 探针最好用 Klenow 或 T₄ DNA 聚合酶填平反应法进行末端标记, 而尽量不要用多核苷酸激酶法标记。有报道认为核蛋白提取物中有可能含有一定量的磷酸酶, 可将 5' 末端标记磷酸切除。

(3) 理想结果的获得取决于多种因素。例如核蛋白提取物的纯度, 应尽量减少非特异性 DNA 结合蛋白 (如组蛋白) 的含量, 一般要求采用 0.3 ~ 0.4mol/L KCl 可溶性部分, 同时不要有核酸酶及磷酸酶的污染, 否则它们会导致 DNA 探针的降解, 结合条件也是关键因素之一, 如盐浓度、温度、pH、特殊金属离子 (如锌离子、钙离子等), 另外, 电泳条件 (如 pH、丙烯酰胺的浓度及离子强度等) 都会影响 DNA-蛋白结合物的稳定性。因此一定要严格掌握合适的操作条件。

(4) DNA 片段的长度一般要求在 300bp 以下。DNA 片段过大, 在聚丙烯酰胺凝胶中不易分离, DNA 片段泳动速度的轻微改变不易监测到。但通过精心实验设计与操作 (如改变凝胶的浓度、电泳电压等), 也可用于较大的 DNA 片段。作者曾采用此方法对长达 3.6kb 的 DNA 片段进行了迁移率改变分析, 也获得了较为满意的结果。对于较大的 DNA 片段, 作者曾尝试了在琼脂糖凝胶中进行迁移率改变分析的体系, 结果也较理想。

(5) DNA 片段的量一般要求为 0.1 ~ 1ng, 但可视情况适当增减, 以能形成清晰的滞后带而游离 DNA 带又不过浓为宜。如量过大, 游离 DNA 带过浓, 而仅有小部分与 DNA 结合蛋白结合, 则会影响结果的分析。我们的经验以 1 000 ~ 10 000cpm 为宜。

(6) 加入过量鲑精 DNA 的目的是吸附核蛋白中存在的大量非特异性 DNA 结合蛋白 (如组蛋白等)。也可以用小牛胸腺 DNA、大肠杆菌 DNA 及 poly dI:dC 等代替。一般以 1000 ~ 10 000 倍过量为宜 (即当待测样品 DNA 量为 1ng 时, 加入 1 ~ 10 μ g 鲑精 DNA)。

(7) 核蛋白的量对实验结果有极大影响。蛋白量过大则非特异性结合增加, 过小则有可能出现假阴性结果。核蛋白的加入量没有一定之规, 文献中有关核蛋白的量多至 10 μ g, 少至 0.1 μ g, 可能与各 DNA 结合蛋白与 DNA 的亲合性、核蛋白提取液中特定 DNA 结合蛋白的丰度以及反应条件等诸多因素有关。正式实验前, 应进行预试验摸索出适宜的核蛋白加入量。以能形成清晰的滞后带, 而又有适量的游离 DNA 带残存为宜。

(8) 保持 DNA-蛋白复合物在凝胶中稳定的因素主要有两个: 低离子强度和凝胶的囚禁作用 (caging effect), 低离子强度凝胶电泳液使其结合力增强, 解离减少。而凝胶基质的囚禁作用则使解离的蛋白不会扩散而重新结合。电泳缓冲液一般采用 0.25 \times TBE 或 1 \times TAE。但是, 低离子强度的缓冲液缓冲能力不强, 长时间的电泳会导致阴阳极缓冲液的 pH 值发生改变, 因此要将阴阳极电泳液进行不间断循环。根据蛋白性质不同, 有时也可以采用高离子强度的电泳体系。

(9) 为验证这种 DNA 与蛋白质的结合是否有特异性, 一般都要进行竞争性抑制试验。其方法是反应体系中加入过量的非标记的特异 DNA 片段。如果这种结合是序列特异性的, 则这些非标记的 DNA 片段可与标记的 DNA 片段竞争性地与核蛋白结合, 其结果是导致放射自显影 X 线片上滞后带的消失。采用此方法, 用多个人工合成的寡核苷酸或较小的 DNA 限制性酶切片段分别进行竞争性抑制试验, 可以将 DNA 结合蛋白在 DNA 上的结合位点进行初步定位, 因为只有结合位点序列的寡核苷酸片段才能抑制它们的结合。

(10) Promega 公司生产的 Gel Shift Assay System 试剂盒 (Cat.No.E3300) 除含有本试验所需的各种试剂外, 还含有 AP1、AP2、OCT、CTF/NF1、GRE、CREB、NF/ κ B 和 TFIIID 等几种常见的 DNA 结合蛋白的结合序列寡核苷酸片段, 可方便地用于上述几种 DNA 结合蛋白的检测。

(11) 作者曾试验了 DNA 限制性片段混合物的迁移率改变分析, 结果证明是可行的。较大的 DNA 片段经限制性 DNA 内切酶酶切后, 形成的各 DNA 片段可以不经分离, 直接进行末端标记而用于本实

验。与未加核蛋白的阴性对照相比,新形成的 DNA 带是蛋白结合形成的滞后带,同时含有此蛋白结合位点的 DNA 带强度减弱,甚至消失;而不存在此蛋白结合位点的 DNA 带的强度不变,据此可将此蛋白的 DNA 结合位点初步定位。此方法特别适用于 DNA 结合蛋白的初筛研究工作。不但大大减轻了工作量,而且大大减少了因纯化回收 DNA 单一片段而导致的人力与财力的浪费。

适用范围:

适用于特定基因的 DNA 结合蛋白的初筛及蛋白提取过程中的鉴定,也可用于 DNA-蛋白结合反应动力学研究。此方法的优点是操作简单迅速,灵敏度高,结果稳定可靠。但其缺点是不能确定所鉴定的 DNA 结合蛋白的分子量,也不能确定其精确的结合位点。

21.2.9 滤膜结合法

滤膜结合法(filter binding assay)是利用硝酸纤维素滤膜不能结合双链 DNA 但可与蛋白质结合的特性,可将与蛋白结合的 DNA 片段与游离的 DNA 片段分离,从而从以下三个方面研究 DNA-蛋白相互作用。

- (1) 从多种片段的混合液中筛选出含特异结合位点的 DNA 片段。
- (2) 分离蛋白结合及游离的 DNA 片段,用于甲基化干扰足纹试验,但目前一般都用凝胶滞留法进行分离。
- (3) 本法最适于进行蛋白-DNA 结合作用动力学研究,因为结合及游离的 DNA 片段可迅速被分离开。

本法优点是简单、迅速。缺点是灵敏度与精确度均不高,目前多已被其它方法所替代。

试剂及仪器:

2×结合缓冲液(参见凝胶滞留法)

^{32}P -标记的双链 DNA

DNA 结合蛋白(或核提取液)

牛血清白蛋白(BSA)

0.45 μm 硝酸纤维素滤膜

DNA 洗脱液:

20mmol/L Tris·Cl (pH7.8)

0.3mol/L 乙酸钠

0.2% SDS

抽滤装置及真空泵

其它实验室常规仪器与试剂

操作步骤:

- (1) 按凝胶滞留法进行蛋白-DNA 结合反应,反应体积 50 μl 。
 - (2) 将一张硝酸纤维素滤膜浸泡于约 30ml 1×结合缓冲液中 30 分钟以上。过滤前将此硝酸纤维素滤膜置于负压抽滤装置的不锈钢丝网上(图 21-21)。勿使其干燥。
 - (3) 接通真空泵,将反应液迅速加样于滤膜上,调节负压至其流速约为 1ml/min。
 - (4) 液体抽干后,加入 0.5ml 1×结合缓冲液,抽干。再加入 0.5ml 1×结合缓冲液,抽干。加大真压使液体全部流出,可收集于一试管内。关闭真空。
- 取出滤膜,可直接进行液闪计数,推断蛋白结合率。也可按下列步骤将 DNA 洗脱下来进行进一步分析。
- (5) 将滤膜浸泡于盛有 450 μl 洗脱缓冲液的液闪计数瓶中,结合有 DNA 的一面向下。置 30℃ 水浴中保温 2 小时,用一重物将瓶压下。不间断地轻轻摇晃。

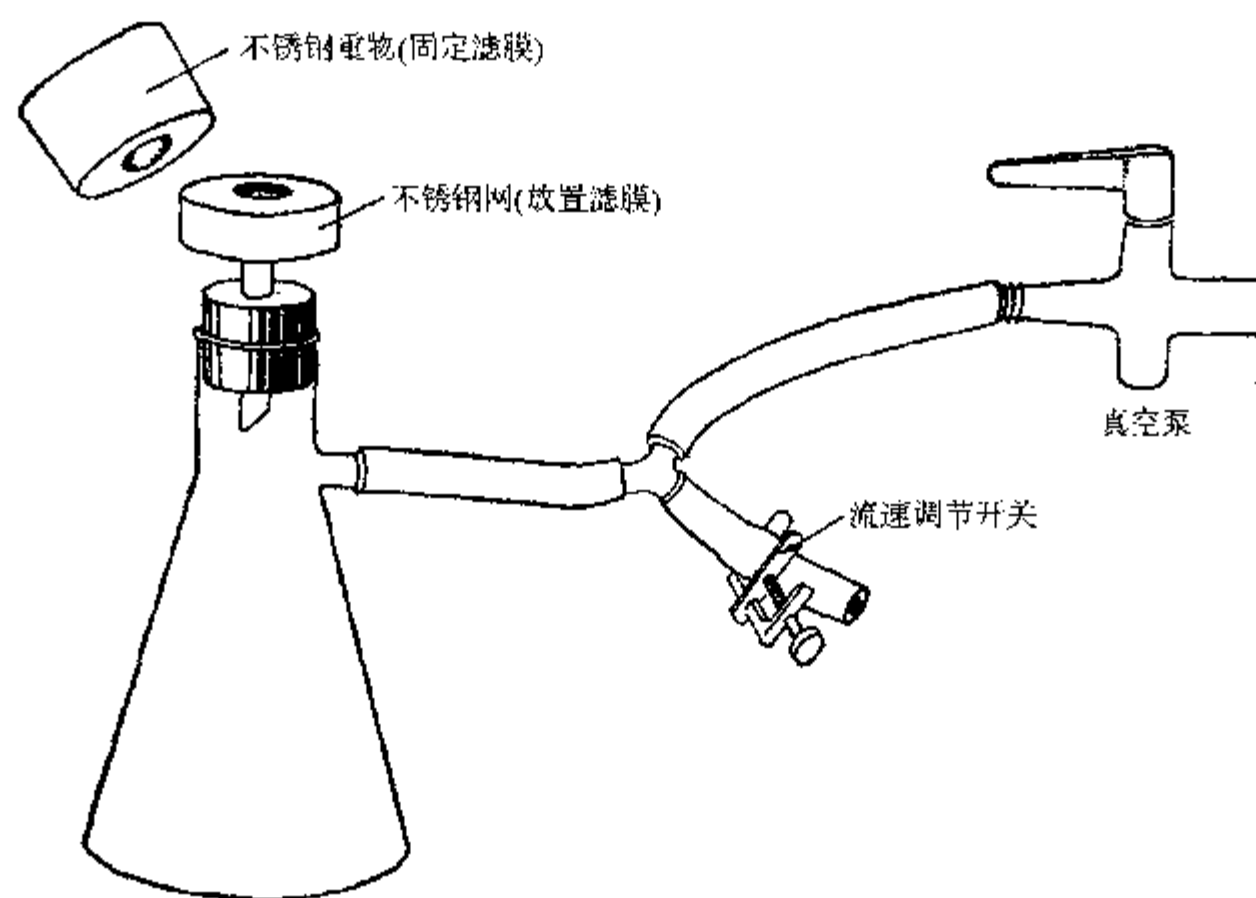


图 21-21 负压抽滤装置示意图

(6) 洗脱液移至一微量离心管中，加入适量载体 DNA，乙醇沉淀，电泳，放射自显影，即可鉴定出哪一段 DNA 片段含有此蛋白的结合位点。

注意事项：

(1) 抽滤的负压不可过高，速度不可过快，否则将导致 DNA-蛋白复合物没有充足的时间与滤膜结合，或导致滤膜干燥。每次过滤时，俟液体全部通过即应立即加入下一步液体，勿使其完全干燥。

(2) 可在结合反应液中加入非标记的特异 DNA 片段，鉴定其结合特异性。

(3) 部分游离的 DNA 亦可结合在硝酸纤维素滤膜上，形成高本底（可高达 15%）。按下述方法预先将滤膜进行处理，可使本底降低 0.1% ~ 1.5%：将滤膜湿润浸泡于 0.4mol/L KOH 中 40 分钟，然后用水彻底清洗，然后浸泡于 1× 结合缓冲液中 30 分钟以上。但需注意，滤膜经此处理后会发黄并变脆，须小心操作。

21.2.10 Southwestern 印迹

Southwestern 印迹是结合了 Western 印迹及 Southern 印迹两种试验方法特点而设计的一种检测序列特异性 DNA 结合蛋白的试验方法。其基本原理是，细胞核蛋白提取物经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后，采用 Western 印迹方法将核蛋白条带转移到硝酸纤维膜上，然后与 ^{32}P -末端标记的 DNA 片段杂交。如果此核蛋白提取物中含有此种 DNA 片段特异结合的序列特异性 DNA 结合蛋白，则会在相应的蛋白质条带区域形成 DNA-蛋白质复合物，并可被放射自显影检测到。此方法的优点是可以测定到 DNA 结合蛋白的分子量，因而为随后的蛋白提取与纯化创造了条件。

21.2.10.1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

试剂及仪器：

核蛋白提取液 ($10\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

30% 丙烯酰胺：亚甲基双丙烯酰胺 (29:1)

10% 过硫酸胺，使用前新鲜配制

TEMED (N, N, N' - tetramethyl - ethylenediamine, 四甲基乙二胺)

1.5mol/L Tris (pH8.8)

1mol/L Tris (pH6.8)

10% SDS

Tris - 甘氨酸电泳缓冲液:

25mmol/L Tris

250mmol/L 甘氨酸 (pH6.3)

0.1% SDS

1 × SDS 载样缓冲液:

50mmol/L Tris·Cl (pH6.8)

100mmol/L DTT (使用前加入)

2% SDS

0.1% 溴酚蓝

10% 甘油

蛋白质分子量标准参照物

垂直电泳槽及电泳装置

操作步骤:

(1) 制备适当体积的 8% 聚丙烯酰胺分离胶, 以 50ml 体积为例:

水	23.2ml
30% Acr: Bis (29:1)	13.3ml
1.5mol/L Tris (pH8.8)	12.5ml
10% SDS	0.5ml
10% 过硫酸胺	0.5ml
TEMED	30μl

混匀后立即灌注到制胶槽中。注意保留充足的空间用于下一步浓缩胶的制备 (约为样品梳齿长加 1cm)。用 0.1% SDS 或正丁醇覆盖其表面。室温下静置 30 分钟至 1 小时。

(2) 待其完全聚合后, 去除表面的覆盖液及未聚合的丙烯酰胺。用水冲洗数次, 然后用滤纸吸干。

(3) 制备适当体积的聚丙烯酰胺浓缩胶, 以 10ml 体积为例:

水	6.8ml
30% Acr Bis (29:1)	1.7ml
1mol/L Tris (pH6.8)	1.25ml
10% SDS	100μl
10% 过硫酸胺	100μl
TEMED	10μl

混匀后立即灌注到上述分离胶表面, 并立即插入样品梳。注意尽量不要形成气泡。室温下静置 30 分钟以上。

(4) 取约 100μg 核蛋白提取液, 在 1 × SDS 载样缓冲液中加热煮沸 3 分钟。蛋白质分子量标准参照物按同样的方法变性。

(5) 将上述变性的蛋白质样品上样于制备好的 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶上。

(6) 在 Tris - 甘氨酸电泳缓冲液中电泳, 电压 8V/cm, 待染料前沿进入分离胶, 增加电压至 15V/cm。待溴酚蓝达凝胶底部, 中止电泳。取出凝胶。

此凝胶可用于下一步 Western 印迹。如是新制备的蛋白质, 需进行考马斯亮蓝 (Coomassie Brilliant

Blue R250) 或银盐染色。

附: 考马斯亮蓝染色法:

- (1) 0.25 克考马斯亮蓝 R250 溶于 90ml 甲醇:水 (1:1 V/V) 及 10ml 冰醋酸溶液中, 滤纸过滤。
- (2) 将聚丙烯酰胺凝胶浸泡于 5 倍体积上述染色液中, 置室温下 4 小时, 并不时轻轻摇晃。
- (3) 将凝胶浸泡于甲醇/冰醋酸溶液 (甲醇:水:冰醋酸 = 4.5:4.5:1) 中脱色 4 小时或更长, 并不时轻轻摇晃, 中间换液数次。加大甲醇的浓度至 30%、升高温度至 45℃或加入几克阳离子交换树脂等措施均可使脱色过程加快。
- (4) 用干胶机抽干凝胶保存。

附: 银盐染色法:

银染法的灵敏度较考马斯亮蓝色法高得多, 可检测到少至 0.1~1ng 的多肽片段带。

下列所有操作步骤必须戴手套进行。

- (1) 室温下, 将凝胶浸泡于 5 倍体积的乙醇:冰乙酸:水 (30:10:60) 溶液中固定 4~12 小时, 并轻轻摇晃。
- (2) 然后将凝胶浸泡于 5 倍体积的 30%乙醇中 30 分钟, 轻轻摇晃。
- (3) 重复步骤 (2)。
- (4) 将凝胶浸泡于 10 倍体积的去离子水中 10 分钟, 并轻轻摇晃。
- (5) 重复步骤 (4)。
- (6) 将凝胶浸泡于 5 倍体积的 0.1% AgNO_3 溶液中 30 分钟, 并轻轻摇晃。
- (7) 弃去 AgNO_3 溶液, 用去离子水冲洗凝胶。
- (8) 凝胶浸泡于 5 倍体积的新鲜配制的 2.5%碳酸钠和 0.02%甲醛溶液中, 不断轻轻摇晃, 直至获得最佳对比度的蛋白带型。
- (9) 在 1%乙醇中漂洗数分钟中止反应。
- (10) 用干胶机抽干凝胶保存。

21.2.10.2 Western 印迹

Western 印迹是将聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后的蛋白质样品转移到固相支持物上的过程。用于 Western 印迹的固相支持物有多种, 如化学活化膜 (如 DPT 膜、DBM 膜、溴化氰活化膜), 活化的尼龙膜及硝酸纤维素等。前两者虽然具有共价结合牢固的优点, 但操作复杂, 因而目前使用更多的还是硝酸纤维素膜。

正如第 6 章所介绍的 Southern 印迹一样, Western 印迹现已极少有人用传统方法进行, 大多使用电转法进行转膜。Western 印迹的电转装置与 Southern 印迹完全相同, 有铂丝电极及石墨电极两种。后者具有电转液用量少、转移速度快的优点。下面主要介绍石墨电极电转法。

试剂及仪器:

硝酸纤维素膜

石墨电极电转缓冲液:

39mmol/L 甘氨酸 (氨基乙酸)

48mmol/L Tris 碱

0.037% SDS

20% 甲醇

铂丝电极电转缓冲液:

25mmol/L Tris

250mmol/L 甘氨酸 (pH8.3)

石墨电极电转仪

操作步骤:

- (1) 裁剪与凝胶大小完全相同的 6 张 Whatman 3MM 滤纸和一张硝酸纤维素膜。注意切不可用手接触滤纸和硝酸纤维素膜, 必须戴手套操作。在硝酸纤维素膜的一角用软铅笔进行标记。
- (2) 将硝酸纤维素膜漂浮于去离子水上, 使其从底部慢慢湿润, 并浸没入水中 5 分钟以上。
- (3) 将 6 张 Whatman 3MM 滤纸浸泡于石墨电极电转缓冲液中, 使其充分湿润。
- (4) 在电转仪的底层石墨电极 (阳极) 上覆盖 3 张用电转液湿润的 Whatman 3MM 滤纸。用玻璃棒

排除所有的气泡。

(5) 将湿润的硝酸纤维素膜覆盖在滤纸上, 注意排除所有的气泡。

(6) 将方法 21.2.10.1 中制备好的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶用离子水稍稍漂洗后, 覆盖在硝酸纤维素膜之上。注意准确定位。硝酸纤维素膜上的标记与凝胶的左下角相对应, 排除所有的气泡。

(7) 将另三张 Whatman 3MM 滤纸放置在凝胶之上, 排除气泡。

(8) 安装好电转仪的上层电极(阴极)。接通电源, 恒电流 $0.65\text{mA}/\text{cm}^2$ 胶面积电泳 2 小时。

(9) 电转结束后, 取出硝酸纤维素膜, 置一张 3MM 滤纸上干燥。

(10) 此硝酸纤维素膜即可用于下一步的 Southwestern 印迹。如果是第一次进行电转试验, 可将此硝酸纤维素用 Ponceau S 或氨基黑或印度墨水染色, 以检查转移的效率。一般情况下, 只须将蛋白质分子量标准参照物条带剪下, 进行染色以利于随后的蛋白质分子量鉴定。

附: Ponceau S 染色法:

(1) 将硝酸纤维素膜用水充分湿润后, 浸泡于 $1\times$ Ponceau S 染色液中 5~10 分钟, 轻轻晃动。

$10\times$ Ponceau S 贮备液:

Ponceau S	2g
三氯乙酸	30g
磺基水杨酸	30g
加水至 100ml	

(2) 用水反复漂洗多次。

附: 氨基黑染色法:

(1) 将硝酸纤维素膜浸泡于氨基黑染色液中染色 30 分钟至 1 小时。

氨基黑染色液: 0.5% 氨基黑 10B, 30% 甲醇, 10% 乙酸 (水: 甲醇: 乙酸 = 6:3:1)

(2) 用脱色液反复漂洗多次, 至背景清晰。

附: India ink 染色法:

(1) 硝酸纤维素膜用水充分湿润后, 转移到含 0.4% Tween-20 (吐温 20) 的 PBS (磷酸盐缓冲液) 中, 5 分钟后换新鲜溶液, 继续浸泡 5 分钟。

(2) 将此硝酸纤维素膜转移到印度墨水染色液中 ($100\mu\text{l}$ 墨水加入到 100ml 含 0.4% Tween-20 的 PBS 溶液中)。染色时间可由 15 分钟至数小时, 视情况而定。

(3) 滤膜在 PBS 中漂洗数次, 每次数小时。

21.2.10.3 Southwestern 印迹

在适当的条件下, 标记的 DNA 探针可与硝酸纤维素膜上结合的相应的序列特异性 DNA 结合蛋白结合, 从而可以被放射自显影探测到。

试剂及仪器:

^{32}P -末端标记的 DNA 探针或寡核苷酸片段

$50\times$ Denhardt 溶液:

1% Ficoll 400

1% PVP (聚乙烯吡咯烷酮)

1% BSA Pentex Fraction V

杂交缓冲液:

10mmol/L Tris·Cl (pH7.4)

50mmol/L NaCl

1mmol/L EDTA

$5\times$ Denhardt 溶液

$30\mu\text{g}$ 非特异性 DNA (如鲑精 DNA, 小牛胸腺 DNA, Poly dI:dC 等)

洗膜缓冲液:

10mmol/L Tris·Cl (pH7.4)

200mmol/L NaCl
10mmol/L EDTA
1 × Denhardt 溶液

塑料封口机

操作步骤:

(1) 制作一比硝酸纤维素膜稍大的塑料袋, 将硝酸纤维素膜装入塑料袋中, 加入适量杂交缓冲液。小心排除气泡, 用封口机将口封牢。置室温下保温数小时, 不时轻轻摇动。

(2) 将塑料袋剪去一角, 去除杂交液, 换新鲜杂交液, 并加入 $0.1\mu\text{g}$ 标记的 DNA 探针。置室温下保温数小时, 不时轻轻摇动。

在杂交液中加入数十倍至数百倍过量的非标记的特异 DNA 片段或寡核苷酸片段, 则可与标记的 DNA 探针竞争性地与 DNA 结合蛋白结合, 从而使杂交带强度减弱, 甚至消失。常用此方法鉴定此 DNA 结合蛋白的结合特异性; 也可用多个人工合成的寡核苷酸进行竞争性抑制试验, 从而将其在 DNA 上的结合位点初步定位。

(3) 杂交完毕, 弃去杂交液。硝酸纤维素滤膜用洗膜缓冲液漂洗 10~30 分钟。

(4) 滤膜用干燥的滤纸干燥后放射自显影。具体操作步骤参阅第 6 章。

(5) 结果分析: 如果核蛋白提取物中含有相应 DNA 探针的序列特异性 DNA 结合蛋白, 则可在相应的部位形成杂交带。与蛋白质分子量标准参照物对比, 即可判断其分子量。

21.2.10.4 凝胶中蛋白质的洗脱

SDS-聚丙烯酰胺凝胶中相应的 DNA 结合蛋白可以用适当的方法洗脱下来, 经适当的处理, 其活性可部分恢复。目前此方法还不太成熟, 根据各种不同的蛋白质, 洗脱的方法也互不相同。下面简要介绍其中一种, 仅供参考。

试剂及仪器:

洗脱缓冲液:

50mmol/L Tris·Cl (pH7.9)
0.1mmol/L EDTA (pH8.0)
0.1% SDS
5mmol/L DTT
150mmol/L NaCl

丙酮

TM 缓冲液:

50mmol/L Tris·Cl (pH7.9)
12.5mmol/L MgCl_2
1mmol/L EDTA
1mmol/L DTT
20% 甘油
0.1mol/L KCl
0.1% NP40

盐酸胍 (guanidine chloride)

Teflon 组织匀浆器

其它实验室常规仪器及试剂

操作步骤:

(1) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳完毕后, 按其分子量从凝胶上切下相应的蛋白质条带, 用手术刀片

将之切成碎块。

(2) 将凝胶碎块置于一硅化的 Teflon-组织匀浆器中, 加入 1ml 洗脱缓冲液, 温和地匀碎凝胶。将匀浆液置 -4°C 下洗脱过夜。

(3) 3000r/min 离心 10 分钟, 弃去凝胶碎块沉淀, 收集上清。

(4) -20°C 下, 用 5 倍体积的丙酮沉淀洗脱液中的蛋白质。 4°C 下, 12 000r/min 离心 30 分钟, 收集蛋白质沉淀。

(5) 蛋白质沉淀重新悬浮于适量的含 6mol/L 盐酸胍的 TM 缓冲液中。室温下静置 30 分钟。

(6) 将蛋白质悬浮液装入透析袋中, 用不含盐酸胍的 TM 缓冲液透析过夜, 其间换液数次。小量分装, 置 -80°C 保存备用。

注意事项:

与凝胶滞留法相比, Southwestern 印迹的优点是可以测定 DNA 结合蛋白的分子量。但本法的缺点也是显而易见的: 由于蛋白质需经 SDS 及煮沸等剧烈条件变性处理, 一些蛋白质将会失去其原本具有的 DNA 结合功能。特别是那些多亚基蛋白 (如 Jun/Fos 等), SDS 变性处理将使其亚基解离, 而在本法实验中呈现阴性结果。因此, 本实验结果为阴性时, 不能否认 DNA 结合蛋白存在的可能性, 必须结合凝胶滞留法等实验结果进行结果分析。另外, 与凝胶滞留法相比, 本法的放射性核素用量也大得多。

适用范围:

主要适用于 DNA 结合蛋白的初筛及其分子量的初步鉴定。由于其假阴性比例较高, 一般需与其它实验方法 (如凝胶滞留法) 结合进行。

21.2.11 足纹法 (foot-printing)

足纹法是近年来发展起来的一种测定 DNA 结合蛋白在 DNA 上的精确结合位点的实验方法。

事实上, 足纹法的起源可以追溯到 60 年代末到 70 年代初。当人们用小球菌核酸酶轻微作用染色质后得到了片段长均为约 200bp 或其倍数的 DNA 片段, 这是由于 DNA 受到非特异性 DNA 结合蛋白-组蛋白的保护的结果。据此提出了核小体模型。这是 DNA 酶解足纹法的最早雏形。随后这一方法也应用到了序列特异性 DNA 结合蛋白的结合位点鉴定上, Gilbert 等发现 lac 抑制子的结合可保护 lac 启动子免受甲基化试剂 (DMS) 的攻击, 这是化学足纹法的雏形。早期的足纹法大多是将蛋白-DNA 复合物完全酶

解, 回收受到保护的 DNA 小片段, 进而测定其序列, 这种方法耗时又费力, 直到 1978 年 Galas 等才以全新的方法发展了足纹技术, 并正式提出了“足纹法”概念, 他们发明的 DNase I 足纹法直至今日仍然是最常用的足纹法。

DNase I 足纹法的基本原理与 DNA 的化学测序法有些相似, 如图 21-22 所示。首先将待测双链 DNA 片段中的一条单链的一端选择性地末端标记, 然后加入适当浓度的 DNase I, 使在 DNA 链上随机形成缺口, 经变性后电泳分离, 放射自显影, 即可形成以相差一个核苷酸为梯度的 DNA 条带。与 DNA 序列测定的 DNA 梯带相似, 但没有碱基特异性。但当 DNA 片段与相应的序列特异性 DNA 结合蛋白结合后, DNA 结合蛋白可

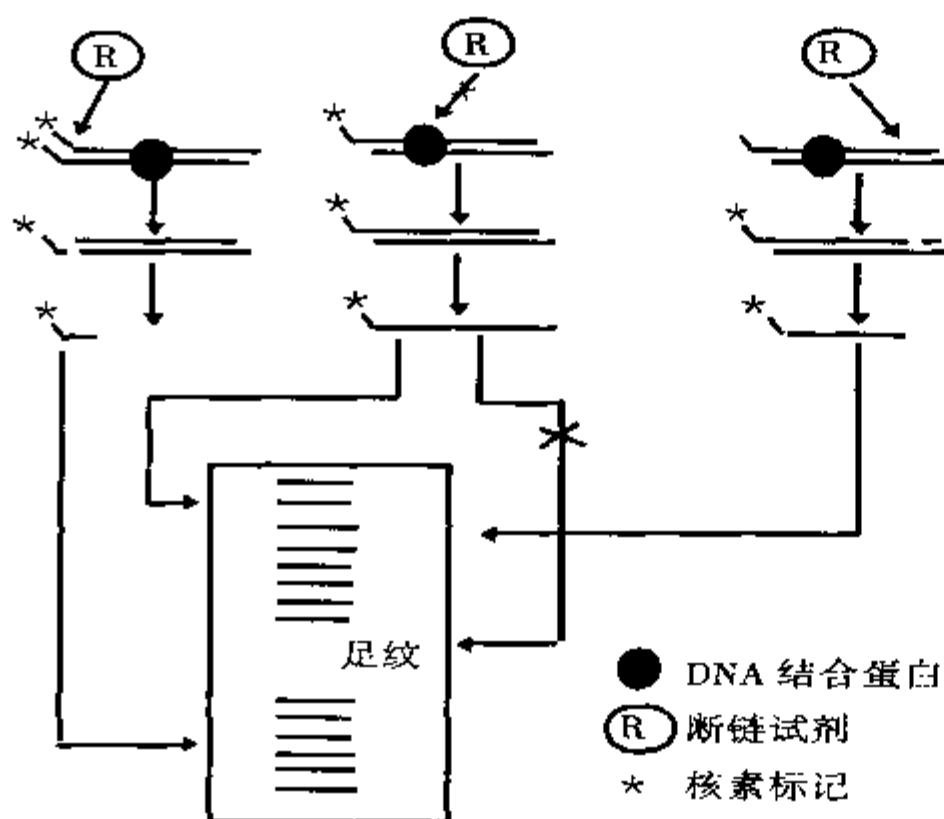


图 21-22 DNase I 足纹法原理示意图

保护相应的 DNA 顺序不受 DNase I 的攻击,因而在放射自显影图谱上, DNA 梯度条带在相应于 DNA 结合蛋白的结合区域中断,从而形成一空白区域,恰似蛋白在 DNA 上留下的足迹,因而被形象地称作足纹法。事实上,足纹是一个统计学结果,因为 DNase I 切断形成的每一个 DNA 片段自身本不能反映 DNA 结合蛋白的结合位点,而是反映此位点不是结合位点,只是将所有 DNA 片段综合在一起之后才反映出精细的结合位点。如果同时进行 DNA 化学测序 (Gilbert - Maxam 法),即可判断出结合区的精确顺序。

继 DNase I 足纹法之后,又有多种足纹法相继问世。按其作用机制的不同,可分为两大类——保护法和干扰法。

(1) 保护法 (protection): 以上述 DNase I 为代表。其机理是: DNA 结合蛋白与相应特异 DNA 序列相结合,可以保护相应的 DNA 位点免受某些 DNA 断裂试剂的攻击。如外切酶 III 足纹法、羟甲基化足纹法及紫外线足纹法等。

(2) 干扰法 (interference): 干扰法原理与保护法完全相反,类似于镜像关系。干扰法是将 DNA 片段用某些试剂进行修饰 (如甲基化、乙基化等),此修饰作用并不使 DNA 断裂,但对随后的处理方法敏感,可在修饰处断裂。然后此修饰后的 DNA 再与 DNA 结合蛋白进行结合反应。特异结合位点上的修饰将干扰蛋白的结合。因此只有那些在结合位点上未被修饰的 DNA 片段才能与蛋白结合,而此特异结合位点受到修饰的片段则不能结合。分别分离和回收结合与未结合蛋白的 DNA,用特殊方法将 DNA 从被修饰的碱基处进行切割、电泳分离。由于未结合蛋白的 DNA 可在随机修饰的位点上被切割,而有结合蛋白的 DNA 在结合位点上未被修饰而不能被切割,结合位点以外的区域则随机切割,因而形成与保护法相同的空白区域——“足纹”。如甲基化干扰法,乙基化干扰法等。

目前常用的 DNA 修饰和断链试剂有以下几种:

(1) DNase I: 正如以上所述, DNase I 是目前最常用的足纹试剂。其优点是操作简单;“足纹”边界清晰; DNase I 的切割没有碱基序列特异性。其缺点是分子大,从而影响“足纹”的分辨率,通常“足纹”区长度较之 DNA 结合蛋白的实际结合区域要大。

(2) 外切酶 III (exonuclease III): 外切酶 III 专一作用于双链 DNA,从 3' - 末端逐步水解。外切酶 III 足纹法与 DNase I 足纹法不同,此法是将 DNA 从 3' - 末端开始彻底水解,直到 DNA 结合蛋白结合位点,从而形成一较短的 DNA 片段,其 3' 末端是蛋白结合位点。此法的优点是: 其结果为新片段的形成,为阳性结果,而区别于其它方法的阴性结果 (空白区),因此此法更为灵敏。缺点是不能显示结合区域内部的接触情况。

(3) 硫酸二甲酯 (dimethyl sulfate, DMS): DMS 是一种甲基化试剂,可使鸟嘌呤的 N-7 位和腺嘌呤的 N-3 位甲基化。这些甲基化的 DNA 经碱和高温处理,可导致 DNA 在相应骨架部位断裂。DMS 既可用于保护法,也可用于干扰法,分别称为甲基化保护法 (methylation protection) 和甲基化干扰法 (methylation interference)。

(4) 乙基亚硝基脲 (ethylnitrosourea, ENU): ENU 是一种乙基化试剂,与 DNA 骨架上的磷酸基团反应。与 DMS 不同,它的乙基化作用没有碱基特异性。磷酸基团的乙基化使之在碱及高温处理后断裂。

(5) Methidiumpropyl EDTA·Fe (II) (MPE): MPE 是一种 DNA 双螺旋嵌入剂,而 EDTA·Fe (II) 可与 O₂ 反应形成羟自由基 (·OH),并攻击 DNA 骨架导致其断裂。DNA 结合蛋白与 DNA 的结合则不仅保护相应部位不被 MPE 插入,而且保护其免受·OH 攻击。

(6) 羟自由基 (hydroxyl radical): 过氧化氢 (H₂O₂) 与 EDTA 和 Fe (II) 复合物 [(Fe (EDTA))²⁻] 反应可产生·OH。此法与 MPE 法虽都涉及·OH 的作用,但原理不同,因为 Fe (II) EDTA 并不与 DNA 结合。·OH 是最小的断链试剂,因而其分辨率极高,甚至可以分辨出 DNA 结合蛋白与 DNA 双螺旋的哪一面结合。

(7) Copper phenanthroline: 其作用机制类似于 MPE,它也可能是一种 DNA 双螺旋嵌入剂,并产生氧自由基。

(8) 紫外线: 紫外线光子处理 DNA 可形成光产物 (如 T = T 等)。而蛋白可保护相应部位而防止光产物的形成。这种保护的机制不明, 可能是蛋白使 DNA 结构变形, 对紫外线不敏感所致, 而并不是蛋白的阴影蔽护作用, 另外, 组蛋白不能保护核小体结构内的 DNA, 从而使紫外线基因组足纹法成为可能。

以下将重点介绍最常用的 DNase I 足纹法和甲基化干扰法。羟自由基足纹法虽不特别常用, 但由于其具有极高的分辨率, 也将重点介绍, 相信此法会被愈来愈多的研究者所喜爱。另外, 基因组足纹法 (体内足纹法) 由于具有其独特的优点, 也将重点介绍。其它几种足纹法仅简要进行介绍。

21.2.11.1 DNase I 足纹法

试剂及仪器:

^{32}P - 末端标记的 DNA 探针

RQ1 无 RNase 污染的 DNase I ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

纯化的 DNA 结合蛋白

2× 结合缓冲液

50mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

0.1mol/L KCl

12.5mmol/L MgCl_2

1mmol/L EDTA

20% 甘油

1mmol/L DTT

终止缓冲液:

0.2mol/L NaCl

0.03mol/L EDTA

1% SDS

100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 酵母 tRNA

载样缓冲液:

0.1mol/L NaOH: 甲酰胺 (1:2 V/V)

0.1% 二甲青苯

0.1% 溴酚蓝

$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 溶液:

5mmol/L CaCl_2

10mmol/L MgCl_2

Acryl - a - MixTM 6 (6% 聚丙烯酰胺测序胶, Promega 配方):

800mmol/L 丙烯酰胺

10mmol/L 亚甲基双丙烯酰胺

8mol/L 脲

90mmol/L Tris

90mmol/L 硼酸

2mmol/L EDTA

0.05% TEMED

使用前加入 10% 过硫酸铵溶液

酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 溶液: 苯酚预先经含有 0.5mol/L NaCl 的 TEB 缓冲液饱和。

TEB 缓冲液:

50mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

1mmol/L EDTA

15mmol/L β -巯基乙醇

DNA 测序电泳装置

其它实验室常规仪器及试剂

操作步骤:

(1) 采用适当的方法 (参见第 5 章), 将 DNA 探针进行末端标记, 然后用适当的限制性内切酶消化后再分离相应的 DNA 探针, 以保证 DNA 双链中只有一条链被标记。

(2) 在一微量离心管中加入下列试剂:

25 μ l 2 \times 结合缓冲液

20ng 纯化的 DNA 结合蛋白

5~40ng 末端标记的 DNA 探针

加水至 50 μ l

在另一微量离心管中 (对照组) 加入除 DNA 结合蛋白外的其它试剂, 并补足容量至 50 μ l。

混匀。置冰浴中保温 10 分钟。

(3) 加入 50 μ l 5mmol/L CaCl_2 和 10mmol/L MgCl_2 溶液, 置室温下保温 1 分钟。

(4) 加入 3 μ l 稀释的 DNase I (5 μ l 1U/ μ l RO₁ 无 RNase 的 DNase I 稀释至 100 μ l 冰冷的 10mmol/L Tris·Cl, pH8.0 溶液中)。轻轻混匀。置室温下 1 分钟。然后加入 90 μ l 终止缓冲液。

(5) 加入 200 μ l 酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 抽提。无水乙醇沉淀, 置冰浴中 20 分钟。14 000g 离心 5 分钟。真空干燥 DNA 沉淀。

(6) DNA 沉淀重悬于 4 μ l 载样缓冲液中。加热至 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 分钟, 然后迅速置冰浴中。上样于 6% 聚丙烯酰胺测序胶 (参见 DNA 序列测定章)。1500V 电泳至溴酚蓝至凝胶底部, 放射自显影。

注意事项:

(1) 以上反应体系是 Promega 公司 Footprinting System 试剂盒方案, 此试剂盒提供了一系列 DNase I 足纹法所需试剂及多种纯化的 DNA 结合蛋白, 如 AP₁、SP₁、TFIID 等, 使用甚为方便。Pharmacia 产品 Sure Track foot-printing 试剂盒亦可选用。另外, 当采用细胞核蛋白粗提物进行反应时, 也可采用下列反应体系: 25mmol/L Hepes, pH 7.9, 0.5mmol/L EDTA, 50mmol/L KCl, 10% 甘油, 0.5mmol/L PMSF, 0.5mol/L DTT (或 20mmol/L Hepes, pH 7.9, 25mmol/L KCl, 4mmol/L 亚精胺, 0.5mmol/L EDTA)。并加入 1~10 μ g 非特异性 DNA (如鲑精 DNA 或 poly dI:dC 等)。25 $^{\circ}\text{C}$ 保温 20 分钟后, 补充 MgCl_2 至终浓度为 5mmol/L, 然后加入适量的 DNaseI (使用核蛋白粗提物时, DNaseI 的用量一般较之纯蛋白反应体系的 DNaseI 用量大)。

(2) DNaseI 的质与量及作用时间是本实验成败的最关键因素。一般情况下, DNaseI 的终反应浓度为 0.1~1.0 μ g/ml 左右, 反应时间在 30 秒至 2 分钟之间。由于 DNaseI 的活性不同、反应体系不同, 其加入量及作用时间也不一样。因此, 正式实验前, 均应进行预试验, 摸索出最适宜的加入量及作用时间。最理想的作用结果是平均使每个 DNA 分子链上形成一个断裂点。

(3) 由于电泳分辨率的关系, DNA 探针的长度一般要求在 200bp 以下, 也可以长至 700bp, 但是蛋白结合位点与标记端的距离应在 50~150bp 之间。

(4) 当采用双链 DNA 探针时, 应确保只有其中一条链的 5' 或 3' 末端被标记。通常可以利用 DNA 片段两端不同的粘性末端选择适当的标记的核苷酸进行填平标记而达到选择性标记的目的。也可以通过选择适当的限制性 DNA 内切酶在两端均被标记的 DNA 片段中间切断, 然后用电泳分离的方法得到选择性标记的 DNA 片段。请参阅第 5 章 DNA 末端标记及 DNA 序列测定章。

另外, 由于 DNA 结合蛋白与 DNA 双螺旋的结合具有特定的三维特异性, 因此可能会在 DNA 双链的

两条不同单链上产生不同的保护区,当采用另一条链标记的 DNA 探针时,其保护位点有可能不同。因此,最好分别用不同链标记的 DNA 探针进行足纹法分析。

(5) 应确保绝大多数 DNA 片段具有完整的长度和相同的末端,特别是标记的 DNA 末端。由于末端转移酶标记法在 3'末端加入的核苷酸的数目不定,因此不宜使用。当采用 Klenow DNA 聚合酶进行 3'末端填平标记时,应在标记结束后,加入过量的非标记的核苷酸继续聚合一段时间,以确保末端平齐。

(6) 核蛋白提取物最好预先采用适当的方法进行一定程度的纯化,如 0.3mol/L KCl 沉淀、硫酸铵分步沉淀 (0.35g/ml)、DE-52 离子交换柱层析,肝素-琼脂糖亲和柱层析及小牛胸腺 DNA-纤维素亲和层析等。

(7) 如果 DNA 探针的序列未知,可同时进行 DNA 化学测序 (Maxam-Gilbert 法)。根据化学测序结果即可直接读出 DNA 结合区的序列。如果其序列已知,一般也要同时进行化学测序以帮助定位,但毋须测定所有的序列,一般只须进行 G 或 G+A 测定即可。

(8) Promega 公司总结了 DNase I 足纹法反应的最优条件,照录如下以供参考:

DNA 探针	比放射活性	10 000 ~ 20 000cpm/1 ~ 10pmol DNA
	纯度	琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后洗脱并纯化 (酚抽提或离子交换柱层析或 Magic PCR Preps DNA 纯化体系)
	DNA 长度及结合位点位置	长度 100 ~ 700bp, 蛋白结合位点与标记末端的距离不小于 25bp。当此位点与标记末端的距离长至 400bp 时,也可以使用,但需要较长的电泳时间,且带不清晰
	标记	只能标记于单末端。末端填平,激酶及末端转移酶标记和酶切反应必须完全
蛋白	纯度	粗提物中能检测到相应的结合亲和性
	浓度	必须完全饱和 DNA 探针。对于 HeLa 提取物,建议的滴度为 10、20、40、80, 及 160 μ g 蛋白
DNA/蛋白结合条件	温度	4 $^{\circ}$ C ~ 37 $^{\circ}$ C
	时间	10 ~ 60 分钟
	pH	5 ~ 9, 多为 7 ~ 8
	K $^{+}$	50 ~ 200mmol/L, 对于大多数结合蛋白而言,随着 K $^{+}$ 浓度的提高,特异结合活性下降而结合特异性升高
	Mg $^{2+}$	0 ~ 10mmol/L, DNase I 需要某些二价金属离子 Mg $^{2+}$ 或 Ca $^{2+}$
	Ca $^{2+}$	0 ~ 10mmol/L, 同上
	PEG	0 ~ 5%, 应采用高质量 PEG (8 000MW), PEG 可能改变 DNase I 切割的速度
DNase I	非离子去污剂	0.01% Triton X-100
	浓度	使每个 DNA 探针分子上产生 1 个缺口
非特异性竞争性 DNA	作用时间	30 ~ 120 秒
	类型	核苷酸多聚物如 Poly dI:dC 或 dAHT, 较之其它竞争性 DNA 如鲑精 DNA 及 <i>E. coli</i> DNA 等提供了大量的非特异性位点,而序列特异性位点较少
	加入顺序	在加入探针 DNA 的同时或预先加入
	浓度	1 ~ 100 倍摩尔数过量
特异性竞争 DNA	浓度	1 ~ 100 倍摩尔数过量,以鉴定其结合的特异性

(9) Promega 公司总结了 DNase I 足纹法可能出现的问题及解决办法, 现照录如下以供参考。

问 题	可能原因	解决方法
DNase I 梯带不均一, 凝胶上部强, 而下部较弱	DNase I 酶解不完全	用一系列不同浓度的 DNase I 进行反应确定合适的 DNase I 浓度
	DNase I 未充分混匀	用加样器吹打数次或在最低档涡旋 3 秒钟, 使 DNase I 充分混匀, 但不要剧烈操作
	结合反应的条件不适合于 DNase I 活性	AP ₁ 贮存缓冲液中含有的盐酸胍会抑制 DNase I 的活性。无蛋白的对照中也要加入 AP ₁ 贮存缓冲液
DNase I 梯带不均一, 凝胶上部弱, 下部强	DNase I 消化过头	用一系列不同浓度的 DNase I 进行反应, 确定合适的酶浓度
	DNA 探针的放射活性过低	DNA 探针的浓度相对于蛋白浓度要低, 而其标记效率须达 40% ~ 50%
	DNase I 未被终止缓冲液抑制	反应终止液必须加热并混匀。使用前必须保持在 37℃, 加入样品后必须涡旋混匀
某些加样孔中的带型弱, 而同一探针在同一条件下在其它加样孔中却很好	样品未完全溶于上样缓冲液中	在加热及上样前, 样品必须涡旋混合并离心。必须使用硅化的微量离心管
	乙醇沉淀过程中沉淀丢失	离心时记住沉淀的部位, 吸去乙醇时须小心不要干扰沉淀
同样 DNase I 浓度上, 某些样品酶解过头, 而另一些不完全	操作误差	采用相同的 DNase I 反应时间, 用同样的方法进行操。将样品分成 1 或 2 组进行操作
无蛋白的对照样品酶解过头, 而含蛋白的样品反应良好	由于蛋白的加入使 DNase I 消化条件改变	无蛋白对照组样品采用不同浓度的 DNase I (通常较之含 DNA 结合蛋白的样品组所需 DNase I 浓度低) 进行反应, 以确定合适的 DNase I 浓度
未消化及消化的 DNA 探针都出现双带	末端填充反应不完全, 使 DNA 探针中出现 1 ~ 2bp 长度差的两种片段	加入未标记的核苷酸及 Klenow 片段酶使探针末端填平反应进行完全
	探针放置时间过长, 开始降解	标记探针的只能存放 1 ~ 2 周
无 DNase I 梯带, 但探针信号强	DNase I 失活或活性低	检测 DNase I 活性。避免反复冻融 DNase I。小量分装保存
	DNase I 量不足	加入不同量 DNase I, 确定合适的 DNase I 浓度
	探针中混有琼脂糖或丙烯酰胺凝胶中的杂质	用反相或离子交换 (TEAE-Cellulose) 层析或 Magic PCR Preps DNA 纯化体系进行探针的纯化
	操作过程 DNase I 失活	涡旋混合时须在最低速档, 混合 3 秒钟或用摇晃或加样器吹打方式混合
	蛋白量不足	蛋白浓度须足以使 DNA 探针饱和。调节蛋白量
	用纯化的蛋白时, 竞争 DNA 量过大	调整竞争 DNA 量

续表

问题	可能原因	解决方法
	在蛋白粗提物中竞争 DNA 量过小	调整竞争 DNA 量
	蛋白中含高浓度的硫酸铵或 NaCl 抑制了 DNase I 活性	蛋白对贮存缓冲液透析 (4℃下)
DNase I 梯带在凝胶底部变窄	样品中盐或 EDTA 的浓度过高	样品用 70% 乙醇洗两次, 降低反应终止液中 EDTA 的浓度
DNA 带模糊	增感屏与胶片与凝胶未直接接触	重新曝光, 使用较紧的暗盒或加入几层纸或胶片使其接触更紧密
	丙烯酰胺或凝胶缓冲液不纯	试剂必须高纯
	电泳液缓冲能力不足	检查 TBE 的浓度, 不要在太高的电压下电泳, 以免破坏缓冲体系
	样品中核酸过多	降低载体 rRNA 的量
信号弱	CIAP 处理后, DNA 不能被激酶磷酸化	铵离子是激酶的强抑制剂, 激酶反应前, DNA 不能溶于铵盐或从铵盐缓冲液中沉淀
	TCA 沉淀测定到较高的掺入, 而实际电泳时标记的 DNA 探针量较少	样品可能被低分子量 RNA 或细菌染色体 DNA 污染, 它们可以竞争性被激酶标记。用于激酶的 DNA 应用 CsCl 密度梯度离心进行纯化

(10) 由于蛋白与 DNA 的结合不可能是完全的, 因此“足纹区”并非完全是一片空白, 大多是强度减弱。如果蛋白与 DNA 的比例不适当、反应条件不适当以及 DNase I 浓度过大, “足纹”将会更加模糊。因此, 有人设计了将凝胶滞留法和足纹法结合起来的实验方法。其基本原理及操作过程是: 单末端标记的双链 DNA 片段首先在适当的反应条件下与蛋白质进行结合, 加入适量的 DNase I 消化, DNA 单链上虽然形成了缺口, 但仍以双链形式存在, 不会断裂。按凝胶滞留法进行非变性凝胶电泳。从凝胶上分别回收游离 DNA 探针及滞后带 (蛋白-DNA 结合带) 的 DNA 片段。经变性后, 进行测序胶电泳, 即可得到清晰的足纹结果。其最大的优点是, 排除了非结合 DNA 片段对实验结果的干扰, 使“足纹”更加清晰。此法对于较粗的核蛋白提取物也能适用, 而传统的足纹法方法则对蛋白纯度要求较高。另外, 由于蛋白结合和非结合 DNA 片段来自同一反应体系中, 结果也更具有可比性。可以预计, 此法将可能逐步取代上述传统方法而成为足纹法的常规方法。

21.2.11.2 甲基化干扰法 (methylation interference)

甲基化干扰法是一种利用硫酸二甲酯 (DMS) 的甲基化作用的足纹法, 由于特异 DNA 结合位点上 G⁷ 及 A³ 位的甲基化, 干扰了 DNA 结合蛋白的结合反应从而形成“足纹”。

与 DNase I 足纹法相比, 甲基化干扰法的优点是: ① DNase I 足纹法需要较高的蛋白浓度以使所有结合位点饱和, 而本法则不受非完全结合的影响。因为结合反应后要经凝胶滞留法或滤膜结合法将蛋白结合的 DNA 探针分离; ② 结合蛋白与 DNA 的结合是一可逆反应, 蛋白可与另一 DNA 上的结合位点进行交换, 此时 DNase I 可导致结合位点上的消化, 而本法则不会, 因为凡能结合蛋白的 DNA 在结合位点上均不会有甲基化修饰; ③ 本法的分辨率较 DNase I 法高, 因为 DNase I 是大分子。

本法的缺点是 DMS 的甲基化修饰作用有碱基特异性, 主要修饰 G⁷ 位, 少量修饰 A³ 位, 而不修饰 T 和 C, 因而当结合位点的一条单链上不存在 G 和 A 时, 则需测定另一条互补单链, 综合两条链的结果才

能得出精确的结合位点。

试剂及仪器：

单末端标记的 DNA 片段

硫酸二甲酯 (DMS)

DMS 缓冲液：

50mmol/L 二甲基砷酸钠 (sodium cacodylate) (pH8.0)

1mmol/L EDTA

DMS 终止液：

1.5mol/L 乙酸钠 (pH7.0)

1.0mol/L 2-巯基乙醇

100μg/ml tRNA

1mol/L 胍 (piperidine), 以 10mol/L 贮存液新鲜配制

10× 结合缓冲液：

100mmol/L Tris·Cl (pH7.4)

0.5mol/L NaCl

10mmol/L EDTA

10mmol/L DTT

0.5mg/ml BSA

50% 甘油

载样缓冲液：

80% 去离子或重结晶的甲酰胺

50mmol/L Tris - 硼酸 (pH8.3)

1mmol/L EDTA

0.1% 溴酚蓝

0.1% 二甲苯青

DEAE 洗脱液：

0.4ml 1mol/L Tris (pH7.9)

80μl 0.5mol/L EDTA (pH8.0)

8ml 5mol/L NaCl

加水至 40ml, 0.2μm 滤膜过滤

DEAE 滤膜 (Schleicher & Schull NA45)

旋转真空蒸发器 (speedvac evaporator)

琼脂糖及聚丙烯酰胺凝胶电泳装置

其它实验室常规仪器和试剂

操作步骤：

1. DNA 甲基化：

(1) 制备末端标记的 DNA 探针。

(2) 取约 10^6 cpm 标记的 DNA 探针, 溶于 5~10μl TE 中, 加入 200μl DMS 反应缓冲液, 混匀。加入 1μl DMS, 涡旋, 充分混匀。置室温下 6 分钟。

(3) 加入

DMS 终止液	40μl
无水乙醇	600μl

混匀, 置于冰-乙醇浴中 10 分钟。

(4) 离心 10 分钟, DNA 沉淀溶于 250 μ l 0.3mol/L 乙酸钠和 1mmol/L EDTA 溶液中, 加入 750 μ l 无水乙醇, 置于冰-乙醇浴 10 分钟。重复此步骤一次。沉淀用 70% 乙醇洗一次, 空气干燥。

(5) DNA 溶解于 TE 中, 浓度约 20 000cpm/ μ l。

2. 蛋白结合反应:

取上述甲基化的 DNA 溶液 5 μ l ($\sim 10^5$ cpm), 加入下列试剂并混匀:

10 \times 结合缓冲液	5 μ l
Poly (dl:dC)	10 μ g
DNA 结合蛋白	适量
加水至 50 μ l。	

30 $^{\circ}$ C 水浴中保温 15 分钟。

3. DNA-蛋白复合物与游离 DNA 探针的分离

有两种方法可将结合了蛋白的 DNA 与游离 DNA 分离, 即滤膜结合法 (参见 21.2.9) 和凝胶滞留法 (参见 21.2.8)。下面简要介绍凝胶滞留分离回收法。

(1) 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将游离 DNA 与结合了蛋白的 DNA 分开。

(2) 电泳结束后, 去除一块玻璃板, 用一层保鲜膜覆盖在凝胶上。于暗室中放射自显影, 1~2 小时。

(3) 按 X 线片上指示的位置, 用手术刀分别切下蛋白结合带 (滞留带) 和游离 DNA 带。其中的 DNA 可按常规方法 (压碎-浸泡法, crush-and-soak) 回收, 也可按下述 DEAE 滤膜法回收。

(4) 将切下的凝胶条块置于琼脂糖凝胶制胶槽中, 制备 1% 琼脂糖凝胶, 使琼脂糖完全包埋聚丙烯酰胺凝胶条块。

(5) 琼脂糖凝胶凝固后, 在聚丙烯酰胺条块前 4~5mm 处切开一缝, 将一张预先用电泳缓冲液湿润的 DEAE 滤膜插入此缝中。60mA 电泳, 10~15 分钟。

(6) 当 DNA 全部结合到 DEAE 滤膜上后 (可用盖革计数器随时监测), 取下滤膜, 用电泳缓冲液漂洗, 置微量离心管中, 加入 200 μ l DEAE 洗脱液, 65 $^{\circ}$ C 加热 30 分钟。

(7) 上清转移至另一离心管中, 用等量 200 μ l TE 洗涤滤膜后与前述上清液合并。

(8) 离心 5 分钟, 上清转移至另一离心管中, 等量酚/氯仿抽提。

(9) 取上层水相。加入 1 μ l 10mg/ml tRNA, 乙醇沉淀置于冰乙醇浴中 10 分钟, 离心 10 分钟沉淀用 70% 乙醇洗涤, 空气干燥。

4. DNA 的胍解:

(1) 上述 DNA 沉淀溶解于 100 μ l 1mol/L 胍中, 置 90~95 $^{\circ}$ C 水浴中保温 30 分钟。用一块玻璃板压住管盖, 使不被冲开。

(2) 取出离心管置冰浴中。用针在管盖上刺数个孔, 然后置旋转真空蒸发器中抽干 (约需 1 小时)。

(3) 加入 100 μ l 水, 冷冻干燥, 并重复一次。

5. 测序胶电泳:

(1) 分别测定蛋白结合 DNA 和游离 DNA 样品的放射活性。每次电泳约需 3 000cpm。

(2) 加入 1~2 μ l 甲酰胺载样缓冲液, 加热至 95 $^{\circ}$ C, 5 分钟, 然后迅速置冰浴中。

(3) 样品 DNA 上样于 6% 或 8% 聚丙烯酰胺/尿素测序胶, 电泳分离, 放射自显影 (参见 DNA 序列测定章)。

注意事项:

(1) 探针制备注意事项参见 DNase I 足纹法。

(2) DMS 为剧毒挥发性化合物, 需在通风柜中进行操作。

(3) 甲基化反应后 DNA 沉淀时, 如发现 DNA 沉淀非常多, 则需要重新配制 DNA 终止液, 或减少 2-巯基乙醇量。此 DNA 沉淀必须完全溶解于 TE 中, 可以加热至 65℃、涡旋及用加样品反复吹打以助其溶解。

(4) 从 DEAE 滤膜上回收 DNA, 如不溶性沉淀较多, 则大多是聚丙烯酰胺残渣。可在琼脂糖中加入 1% SDS。但需注意, SDS 会一定程度地与 DNA 竞争性与 DEAE 滤膜结合。

(5) DMS 作用程度是试验成败的极为关键的因素之一。影响 DMS 作用程度的最重要两个条件是温度和时间, 温度高、时间长则甲基化程度高。理想的结果是使每个 DNA 分子上只有一个碱基甲基化, 此时尚有约一半量的 DNA 分子上没有甲基化。因此建议在正式试验前要进行预试验, 摸索出适当的作用条件。在电泳图谱上形成均一强度的 DNA 条带。在凝胶上部保留适量的未被切割的完整 DNA 条带。

(6) 由于 DMS 只修饰 G 和 A, 如一条链未显示“足纹”, 则应试验互补的另一条链。

(7) 由于 DMS 对 G 的修饰程度大于 A, 因此通常 A 带较 G 带弱, 是正常情况, 如游离与结合 DNA 样品量不均, 有可能忽视极弱的 A 带存在而误认作“足纹”。所以应加样均匀, 曝光时间要充足。

21.2.11.3 甲基化保护法 (methylation protection)

甲基化保护法与甲基化干扰法相同处在于都是利用 DMS 的甲基化作用在 DNA 探针上 G 和 A 位点上随机形成甲基化, 然后在胍作用裂解。不同处是“足纹”形成的机制不同, 已知上述; 操作步骤先后次序不同。

首先进行 DNA-蛋白结合反应, 同时应设置加与不加蛋白的对照管。然后进行甲基化处理; 此法不需将游离 DNA 与蛋白结合 DNA 进行分离与回收。其它反应步骤与反应条件 (如胍解、电泳等) 与甲基化干扰法相同。

21.2.11.4 乙基化干扰法 (ethylation interference)

乙基化干扰法原理与操作都与甲基干扰法相似, 只是 DNA 修饰试剂及其修饰部位不同。乙基化修饰试剂是乙基亚硝基脲 (ENU, ethylnitrourea), ENU 可与 DNA 链骨架上的磷酸基团反应, 因而它没有碱基特异性, 是其较甲基化干扰法优越之处。

试剂及仪器:

ENU 饱和溶解于 95% 乙醇中

ENU 反应缓冲液:

50mmol/L 二甲基砷酸钠 (sodium cacodylate) (pH8.0)

10mmol/L $MgCl_2$

0.1mmol/L EDTA

10mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH7.0)

1mol/L NaOH

余同甲基化干扰法

操作步骤:

(1) 取 10^6 cpm 单末端标记的 DNA 探针, 溶于 100 μ l ENU 反应缓冲液中。

(2) 加入 100 μ l ENU 饱和的 95% 乙醇, 混匀。置 50℃ 水浴保温 30~60 分钟。

(3) 加入 10 μ l 5mol/L 乙酸铵和 200 μ l 无水乙醇, 沉淀 DNA。DNA 沉淀重溶于 100 μ l 0.5mol/L 乙酸铵溶液中, 加入 250 μ l 乙醇。DNA 沉淀用乙醇洗涤, 干燥。溶于适量 TE 中。

(4) 按甲基化干扰法同样方法进行蛋白结合反应, 电泳分离, 分别回收蛋白结合及游离 DNA。

(5) 回收的 DNA 溶于 43 μ l 10mmol/L 磷酸缓冲液和 1mmol/L EDTA 溶液中, 然后加入 7.5 μ l 1mol/L NaOH, 加热至 90℃, 30 分钟, 使 DNA 在被乙基化修饰位点断裂。

(6) 加入 7.5 μ l mol/L HCl 中和, 乙醇沉淀。DNA 溶于小量甲酰胺载样缓冲液中, 测序胶电泳分离, 放射自显影 (参见 DNA 序列测定章)。

注意事项:

- (1) 参见甲基化干扰法, DNase I 足纹法和凝胶滞留法相应部分。
- (2) ENU 是强致癌物, 须谨慎操作。

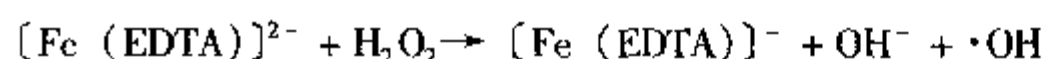
21.2.11.5. 外切酶 III 保护法 (exonuclease III protection)

外切酶 III 保护法, 又称外切酶 III 抗性法 (exonuclease III resistance), 也是保护性足纹法的一种, 但又区别于所有其它的足纹法, 其“足纹”是新片段的形成, 为正结果, 而区别于其它方法的原有片段的缺失 (负结果), 因而此法更为灵敏。但此法一次只能显示结合位点一端的边界, 只有将另一端标记后再进行试验才能得出另一边界; 另一缺点是不能精细地了解结合区内部蛋白与 DNA 的结合位点; 由于不能同时进行序列测定进行比较, 因此只有已知序列的 DNA 片段才能进行此法检测, 否则无法知道结合位点的碱基序列。

操作方法略, 不常用。

21.2.11.6. 羟自由基足纹法 (hydroxyl radical footprinting)

亚铁离子 $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$ 可以与过氧化氢 (H_2O_2) 反应产生羟自由基:



羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 可以攻击脱氧核糖的糖基而使 DNA 断裂, DNA 结合蛋白可保护相的 DNA 序列免受 $\cdot\text{OH}$ 攻击。

本法被认为是目前最好的一种足纹法, 与其它方法相比, 它具有以下几个优点:

(1) 分辨率极高: 羟自由基只有水分子大小, 因此几乎可以无孔不入, 使蛋白结合位点可以得到精确的定位, 不但结合区域边界准确, 而且可以反映结合区域内部的结合状况, 如图 21-23 所示比较了各种足纹法分析 λ 抑制子与 O_{H_1} 启动子序列结合位点结果, 可以看出本法分辨率更高。它反映了 λ 抑制子只与 DNA 双螺旋的一面相结合, 而不与其背面结合。

(2) $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$ 带负电荷, 不与 DNA 结合而干扰其构象, 因此不会影响 DNA-蛋白结合。

(3) $\cdot\text{OH}$ 的攻击作用没有碱基特异性, 因此得到结合位点的信息更多; 而甲基化干扰法由于只攻击 C 和 A, 如此位点不存在 G 或 T 则无法得到结果。

(4) $\cdot\text{OH}$ 的攻击作用无序列或构象特异性, 因此得到的 DNA 梯度带均匀一致, 而 DNase I 虽对每种

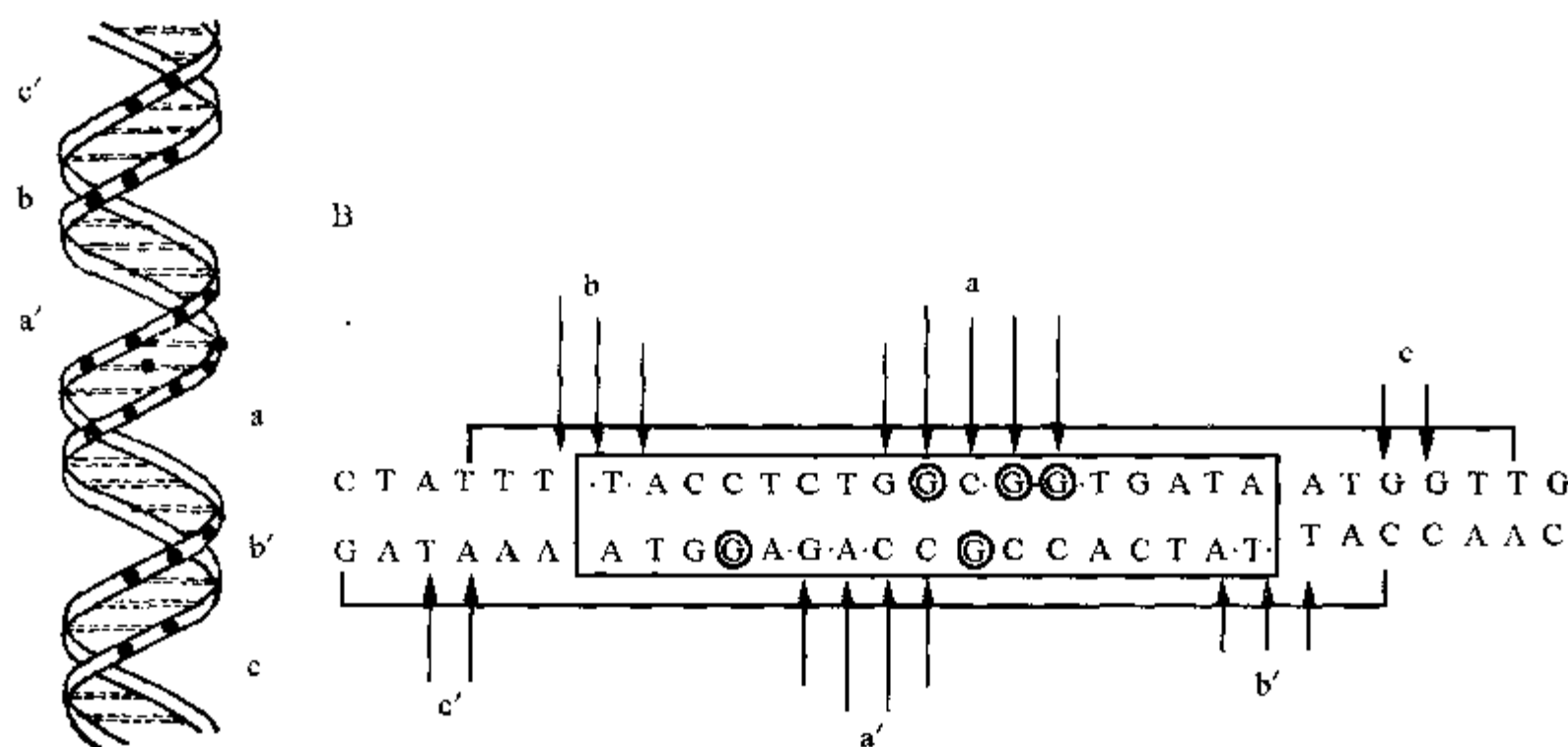


图 21-23 各种足纹法分辨率比较

A 显示 λ 抑制子只与 DNA 双螺旋一面结合; B 为各种足纹得到的足纹位点; \square 为 O_{H_1} 核心序列;

\uparrow 为本法足纹位点。 \square 为 DNase I 足纹位点。 \circ 为甲基化保护法位点; \cdot 为乙基化干扰法足纹位点。

碱基都可切割，但在一定程度上受到其序列或构象的影响。某些序列或构象的切割效率较低，在放射自显影图谱上，某些带较深，而某些带极浅，甚至缺失，如蛋白结合位点恰好位于此浅带处则极难辨认。

试剂及仪器：

单末端标记的 DNA 探针

1 × 结合缓冲液：

10mmol/L Tris·Cl (pH7.0)

0.1mmol/L EDTA (pH8.0)

50mmol/L KCl

1mmol/L CaCl₂

100μg/ml BSA

DNA 结合蛋白或核提取物

(NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O

0.8mmol/L EDTA

0.6% H₂O₂

20mmol/L 抗坏血酸钠 (sodium ascorbate)

0.1mmol/L 硫脲 (thiourea)

测序电泳装置及试剂

其它实验室常规仪器及试剂

操作步骤：

(1) 在 1.5ml 微量离心管中，加入：

单末端标记 DNA 探针	2μl
1 × 结合缓冲液	150μl
非特异性 DNA	0.5μg
DNA 结合蛋白	20μl

混匀，置 37℃ 水浴保温 30 分钟，设对照组不加 DNA 结合蛋白。

(2) 配制 Fe(EDTA)²⁻ 溶液 [Fe(II) EDTA]：等量混合 0.8mmol/L EDTA 和 0.4mmol/L Fe(II) (使用前用 (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O 新鲜配制)。

(3) 取上述 [Fe(EDTA)]²⁻ 溶液 10μl，0.6% H₂O₂ 10μl，20mmol/L 抗坏血酸钠溶液 10μl 分别置上述离心管内壁上，混合后加入至反应液中，反应 2 分钟。

(4) 加入下列试剂中止反应：

0.1mmol/L 硫脲	20μl
3mol/L 乙酸钠	25μl
tRNA	15μg
无水乙醇	750μl

置干冰-乙醇浴 15 分钟。离心。DNA 沉淀溶于 10mmol/L Tris·Cl/ 0.1mmol/L EDTA 溶液中，酚/氯仿抽提，乙醚抽提乙醇沉淀，离心，沉淀用 70% 乙醇洗一遍，干燥。

(5) DNA 溶于小量甲酰胺载样缓冲液中，变性，测序胶电泳分离，放射自显影 (参见 DNase I 足纹法)。

注意事项：

(1) 蛋白-DNA 结合反应条件应根据各种蛋白不同而不同，参见凝胶滞留法。羟自由基反应条件不严格，可在多种 pH、盐浓度及缓冲液中进行反应。但需特别注意的是，甘油是羟自由基的清除剂，

>0.5%的甘油将会严重干扰 $\cdot\text{OH}$ 的切割作用,因此反应体系中不要含甘油。多数DNA结合蛋白是溶于含甘油的贮存液中的,使用前应对不含甘油的 $1\times$ 结合缓冲液透析。

(2) 抗坏血酸钠是还原剂,其作用是防止 $\text{Fe}(\text{II})$ 氧化为 $\text{Fe}(\text{III})$,并将 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原为 $\text{Fe}(\text{II})$ 。

(3) 此法灵敏度极高,因此对DNA探针和蛋白的纯度要求较高。电泳回收的DNA须酚抽提两次,乙醚抽提两次。本法对于纯化的DNA结合蛋白效果极佳,但对细胞核粗提物反应效果则较差,因此最好将其部分纯化。另外,在结合反应及 $\cdot\text{OH}$ 作用后,用凝胶滞留法将结合及游离DNA分离回收再进行测序电泳,则效果将会有所改善。

适用范围:

特别适合于纯化的DNA结合蛋白的特异DNA结合位点的鉴定。对于细胞核粗提物则最好预先部分纯化,并与凝胶滞留法结合进行。

21.2.11.7. 羟自由基干扰法 (hydroxyl radical interference)

Chalepakis等报道了羟基化干扰法,即先利用 $\text{Fe}(\text{II})$ EDTA与 H_2O_2 反应产生的 $\cdot\text{OH}$ 在DNA上形成单链切口,然后与DNA结合蛋白进行结合反应,经凝胶滞留法分离回收,测序胶电泳分离,放射自显影。

此法与羟自由基足纹法(保护法)相比对蛋白的纯度要求不高,可用于部分纯化的细胞核提取物。

与其它干扰法不同, OH 并非对DNA进行修饰,而是攻击糖基使其破坏,最终导致DNA骨架断裂,形成单链切口。此法说明单链切口也会干扰DNA结合蛋白与DNA的结合反应。 DNase I 切割形成的DNA单链切口是否也有干扰作用?有待回答。

目前作者仅见一例此法报导,不推荐使用。

21.2.11.8 MPE $\cdot\text{Fe}(\text{II})$ 足纹法

与羟自由基足纹法相似,MPE $\cdot\text{Fe}(\text{II})$ 足纹法也是利用 $\text{Fe}(\text{II})$ 与 H_2O_2 或 O_2 反应产生羟自由基,从而实现对DNA的切割。但与前法不同,MPE(methidiumpropyl-EDTA)是能嵌入DNA双螺旋大沟中的小分子化合物。

操作方法:

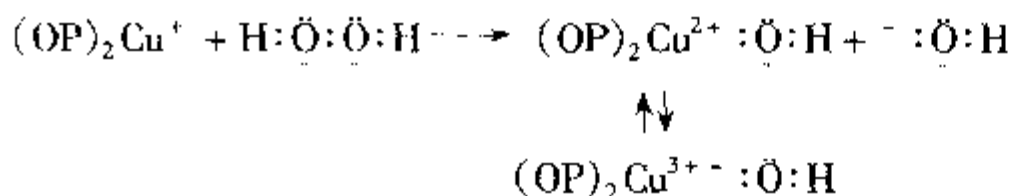
(1) $20\mu\text{l}$ 反应体系(参见羟自由基足纹法,含 15mmol/L DDT)中加入 $1\sim 2\text{ng}$ ($10\,000\sim 20\,000\text{cpm}$)单末端标记的DNA探针和适量蛋白, 30°C 保温2分钟。

(2) 加入 $2\mu\text{l}$ 新鲜配制的 $100\mu\text{mol/L}$ MPE和 $200\mu\text{mol}$ $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 溶液, 30°C 保温2分钟。

(3) 加入EDTA和乙酸铵使终浓度分别为 50mmol/L 和 0.6mol/L ,酚/氯仿抽提,乙醇沉淀,测序胶电泳,放射自显影(参见 DNase I 足纹法)。

21.2.11.9. OP-Cu足纹法

OP-Cu是1,10-phenanthroline-copper的缩写。其作用机制类似于MEP $\cdot\text{Fe}(\text{II})$, $(\text{OP})_2\text{Cu}^+$ 亦可嵌入DNA双螺旋中,并与 H_2O_2 反应生成羟自由基:



下面介绍一种在凝胶中原位切割的足纹法。

试剂仪器:

同羟自由基足纹法,但需下列几种特殊试剂:

OP (1, 10-phenanthroline)

2,9-二甲基 OP (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline)

MPA (3-mercaptopropionic acid)

硫酸铜 (CuSO_4)

操作步骤:

(1) 临使用前配制下列溶液: 取等量的 40mmol/L OP (溶于无水乙醇) 和 9mmol/L CuSO_4 混合, 用水稀释 10 倍即为溶液 A (2mmol/L OP, 0.45mmol/L CuSO_4)。将 MPA 稀用水稀释 200 倍, 即为溶液 B (58mmol/L MPA)。

(2) 按凝胶滞留法进行 DNA-蛋白结合反应, 反应液中不要含有 mmol/L 量 DTT 或 EDTA。聚丙烯酰胺凝胶电泳, 放射自显影, 切下蛋白结合及游离 DNA 凝胶块。

(3) 凝胶块浸于 100 μl 50mmol/L Tris·Cl (pH8.0) 溶液中, 加入 10 μl 溶液 A, 然后加入 10 μl 溶液 B。置室温保温 10 分钟。

(4) 加入 10 μl 28mmol/L 二甲基-OP (溶于无水乙醇中) 和 270 μl 0.5mol/L 乙酸铵/1mmol/L EDTA 溶液置 37℃保温洗脱过夜。

(5) 洗脱 DNA 用乙醇沉淀, 测序胶电泳; 放射自显影。

21.2.11.10 光照足纹法 (photofootprinting)

短波紫外线照射可导致 DNA 结构改变形成多种光照产物 (UV photoproduct)。蛋白与 DNA 的结合可防止此类光照产物的产生, 可能是因为此种 DNA 构型对 UV 不敏感所致, 而并不是结合蛋白的蔽护作用。组蛋白并不能防止光照产物的形成, 这也是后面所述基因组足纹法的基础。

光照产物中最多见的是 5, 6-双键胸腺嘧啶二聚体 (环丁基双胸腺嘧啶, T=T), 在过量 NaBH_4 的作用下, 可将其嘧啶环打开, 并导致其糖苷键不稳定而可在酸作用下断裂, 并最终导致其磷酸骨架在碱作用下的断裂。此两作用可由酸性苯胺的作用一步完成。另外, 胞嘧啶光照产物的 4 位虽不能被 NaBH_4 还原, 但 5, 6-二键的形成也可促使其自发脱氨并在 NaBH_4 作用下开环, 最终导致其骨架断裂。

操作步骤:

(1) 按凝胶滞留法进行 DNA-蛋白结合反应。

(2) 用 150W 短波紫外灯照 20 秒至 1 分钟。

(3) 加入 10 μg tRNA, 酚抽提, 乙醇沉淀。

(4) DNA 用两种不同的适当限制性内切酶消化, 产生不同的粘性末端。按 5.2.6.5 方法进行选择性单末端标记。分别对 2mol/L NaCl, 1mmol/L Tris·Cl (pH7.0) 溶液和 1mmol/L Tris·Cl (pH7.0) 溶液透析, 除去未掺入的核苷酸。

(5) DNA 溶于 1mmol/L Tris·Cl (pH7.0) 和 5mmol/L NaCl 溶液中, 加热至 50℃, 5 小时, 加速胞嘧啶光照产物的脱氨。

(6) 乙醇沉淀。DNA 重溶于 50 μl 溶液 A (5mmol/L 磷酸钾缓冲液, pH8.3, 5mmol/L NaCl, 50mmol/L 胸腺嘧啶核苷), 冷却至 0℃。

(7) 在 50 μl 溶液中加入 1mg NaBH_4 , 使溶解, 然后加入到上述 DNA 溶液中。轻轻混匀, 打开管盖, 置暗处, 2℃保温 15 小时。

(8) 加入 250 μl 0.7mmol/L 乙酸钠-乙酸 (pH5.0), 置室温下 1 小时。乙醇沉淀。沉淀重溶于 170 μl 0.5mol/L NaAc-HAc (pH5.0), 置室温 1 小时, 加入 100 μl 水, 750 μl 乙醇沉淀 DNA。

(9) DNA 重溶于 2 μl 水, 加入 25 μl 1.0mol/L 苯胺 (aniline) - 乙酸 (pH4.5), 暗处加热至 60℃, 20 分钟。

(10) -70℃冷冻干燥。溶于 20 μl 水重新冷冻干燥 3 次。乙醇沉淀两次。

(11) 测序胶电泳分离, 放射自显影。

21.2.11.11 体内光照足纹法 (photofootprinting in vivo)

体内足纹法又称基因组足纹法 (genomic footprinting), 是近年来发展起来的检测完整细胞内蛋白-

DNA 相互作用的--种新技术。

研究 DNA 结合蛋白的目的当然是为了阐明特定基因在不同组织细胞中、在不同发育阶段、不同功能状态下的表达调控状况及其机制。上述各种体外足纹法,虽也能在一定程度上对于了解体内情况有所帮助,但毕竟人为因素太多,受到各种反应条件的限制,因此直接在完整细胞内进行体内足纹分析便成为当务之急。利用体内足纹法还可同时对多种基因的表达调控或同一基因受多种蛋白调控进行分析。

以下介绍一种利用紫外线照射并结合引物延伸技术 (primer extention) 进行的体内足纹方法。紫外线作用机制参见紫外线足纹法。完整细胞经紫外照射后,提取基因组 DNA,与高放射活性标记的单链 DNA 探针杂交,以此探针为引物进行链延伸反应。链延伸反应将在光照形成的光产物 (photoproduct, 如环丁基胸腺嘧啶二聚体等) 或单链缺口处终止,而与蛋白结合的 DNA 部位则由于受到蛋白的保护,无光产物及缺口,链延伸反应不受阻碍。此链延伸产物经测序胶电泳分离和放射自显影即可得到足纹图谱。

试剂及仪器:

DNA 探针

缓冲液 A:

50mmol/L Tricine (pH7.6)

10mmol/L MgCl₂

0.1mg/ml 明胶 (gelatin)

10 μ g 大肠杆菌单链 DNA 结合蛋白

寡核苷酸引物

Klenow DNA 聚合酶

全部四种 α -³²P-dNTP (3 000Ci/mmol)

适当的限制性内切酶

TBS 缓冲液:

140mmol/L NaCl

5mmol/L KCl

25mmol/L Tris·Cl (pH7.4)

10 \times Taq 杂交液:

100mmol/L MgCl₂

100mmol/L Tricine (pH8.3)

600mmol/L KCl

1mg/ml 明胶

Taq 延伸缓冲液:

6.8mmol/L dNTP (全部四种)

100 μ g/ml 明胶

Taq DNA 聚合酶

绿豆核酸酶消化液:

200mmol/L 乙酸钠 (pH5.2)

30mmol/L 乙酸钠 (pH4.5)

2mmol/L ZnSO₄

20% 甘油

0.02% Triton X-100

50 μ g/ml 明胶

绿豆核酸酶 (mung bean nuclease)

倒置透射紫外灯

DNA 测序电泳装置及试剂

其它实验室常规仪器与试剂

操作步骤:

1. 高放射活性单链 DNA 探针的制备:

(1) 1 μ g 质粒 DNA 用适当的内切酶线性化, 溶于 30 μ l 溶液 A 中, 加入 15ng 非标记的延伸引物。加热至 90 $^{\circ}$ C 变性 4 分钟, 迅速置 37 $^{\circ}$ C 水浴中 3 分钟。

(2) 加入:

4mmol/L 2-巯基乙醇	3 μ l
200mmol/L MgCl ₂	3.5 μ l
1mol/L Tris·Cl (pH8.0)	3.5 μ l
四种 α - ³² P-dNTP	各 15 μ l
Klenow DNA 聚合酶	1 ~ 1.5U

置 37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟。

(3) 加入下列试剂中止反应:

0.2mol/L EDTA	5 μ l
酚/氯仿/异戊醇	110 μ l
EcoRI 消化的鲑精 DNA	10 μ g

再加入 100 μ l TE 和 100 μ l 酚/氯仿/异戊醇抽提, 乙醇沉淀。沉淀用 95% 乙醇洗两遍, 真空抽干。

(4) 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 放射自显影定位, 回收相应的单链 DNA 探针 (参见相应章节)。DNA 溶于 20mmol/L DTT, 10mmol/L Tricine (pH8.3) 和 1mmol/L EDTA 溶液中。

2. 基因组 DNA 紫外照射与抽提:

(1) 细胞培养于塑料平皿中至单层融合状态。弃培养基, 室温下用 5ml TBS 洗两遍。弃去 TBS。

(2) 倒置透射紫外灯 (254nm) 预热数分钟后, 将上述细胞培养皿去盖, 置紫外灯下照射, 平皿离灯管 4cm, 强度 12mW/cm², 照射 10 ~ 40 秒。对照组 DNA 用 TE 溶解按同样方法照射。

(3) 用常规方法提取细胞基因组 DNA。

(4) 用适当限制性内切酶消化过夜, RNase 消化, 酚/氯仿/异戊醇抽提, 乙醇沉淀, 透析。

3. 基因组 DNA 引物延伸:

(1) 取 50 μ l 上述基因组 DNA 溶于 10 μ l TE 和 45 μ l 水中, 离心 10 分钟, 取上清 50 μ l 置一螺口微量离心管中。

(2) 加入:

10 \times Taq 杂交液	10 μ l
1mg/ml 明胶	10 μ l
放射标记 DNA 探针	5 μ l (500dpm)
加水至 100 μ l	

混匀, 煮沸 8 分钟, 迅速置 74 $^{\circ}$ C 水浴 2 分钟。

(3) 加入 3.8 μ l Taq 延伸缓冲液及 4U Taq DNA 聚合酶。75 $^{\circ}$ C 水浴保温 5 小时。管盖需旋紧, 完全浸没于水浴中。

(4) 加入 100 μ l 冰冷的绿豆核酸酶消化液和 40U 绿豆核酸酶。混匀, 置 40 $^{\circ}$ C 水浴保温 30 分钟, 使未杂交单链 DNA 降解。

(5) 加入下列试剂终止反应:

酚/氯仿/异戊醇	300 μ l
TE	45 μ l
0.5mol/L EDTA	5 μ l

抽提 10 分钟, 上层水相重新抽提一次, 乙醇沉淀, 用 95% 乙醇洗两遍, 真空抽干。

(6) DNA 测序胶电泳分离, 放射自显影。

注意事项:

(1) 此法要求单链 DNA 引物的标记活性极高, 约 100nt DNA 中含 85 个放射性磷酸 (3 000Ci/mmol), 而且要求完整长度的 DNA 片段。用通常方法达不到此要求。因此需要加入高浓度的全部四种标记的 dNTP。如浓度过低则产物长度不完整。

(2) 加入 *E. coli* 单链 DNA 结合蛋白可使探针产量至少提高 2~3 倍, 可能是因此蛋白可与单链质粒 DNA 结合, 从而防止其复性。

(3) 为防止高放射活性对 DNA 的破坏, 标记的探针应立即使用。另外, 在探针制备及使用过程各步骤中, 用 Tricine 代替 Tris 可以使探针的稳定性大大提高。

(4) 在 74℃ 进行引物延伸反有两个好处: ①杂交特异性提高; ②防止自身回折形成发夹状结构。

(5) 由于制备高放射性 DNA 引物操作复杂, 条件不易控制、费用昂贵, 可用以下几种方法进行替代, 也可取得较佳效果:

1) 采用 21.2.11.10 节介绍的体外紫外线足纹法同样方法进行酶解、末端标记和化学裂解 (NaBH_4 -苯胺法)。

2) 按 Church 和 Gilbert 的基因组 DNA 序列测定法, 用非标记的探针作为引物进行链延伸反应, 电泳分离, 印迹到尼龙膜上, 然后与标记的 DNA 探针进行杂交。

3) 按 Pfeiler 等方法, 将 UV 照射的 DNA 用限制性内切酶酶解, 用 T_4 内切酶 V 将 DNA 从光照产物胸腺嘧啶二聚体处切断。用 photolyase (光产物裂解酶) 将 T=T 二聚体切除, PCR 扩增, 电泳分离, Southern 印迹至尼龙膜上, 最后与标记的 DNA 探针杂交。

4) 按 Nick 和 Gilbert 的体内甲基化保护法进行体内足纹分析。

21.2.12 蛋白-核酸紫外交联法

蛋白-核酸紫外交联法 (UV-Crosslinking) 是检测 DNA 结合蛋白与特异 DNA 结合顺序相互作用并测定蛋白分子量的一种较好方法。

蛋白-DNA 复合物经紫外线照射后, 可导致其相互交联。交联部位主要是 DNA 上的嘧啶碱基和蛋白上的多种氨基酸侧链基因, 如半胱氨酸、丝氨酸、蛋氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、色氨酸、苯丙氨酸及酪氨酸等。用溴脱氧尿嘧啶 (bromodeoxyuridine, BrdU) 替代正常的胸腺嘧啶, 可导致其对紫外线的敏感性提高数倍, 同时, 掺入了 BrdU 的 DNA 在进行紫外交联时可使用较长的波长, 减少了对 DNA 和蛋白的损伤。BrdU 的取代有时还可增强蛋白-DNA 的亲合性。

进行紫外交联的目的是使 DNA 上的标记转移到蛋白上, 进而可进行 SDS-PAGE 测定其分子量。

准确测定 DNA 结合蛋白的分子量, 对于随后分离纯化该蛋白并进而测定其氨基酸序列有极大的帮助作用。虽然 Southwestern 印迹法也可测定其分子量, 但操作繁琐, 而且先将 DNA 结合蛋白变性显然会改变其结合能力与特异性; 而紫外线交联法不但操作简单快速, 而且灵敏度与精确度均明显提高。

试剂及仪器:

含插入序列的单链 M_{13} 载体

M_{13} 通用引物 (universal primer)

α - ^{32}P -dCTP (3 000Ci/mmol)

50 \times dNTP/BrdU 溶液:

- 2.5mmol/L dATP
- 2.5mmol/L dCTP
- 250 μ mol/L dCTP
- 2.5mmol/L BrdU (5-溴-2'-脱氧尿嘧啶核苷三磷酸)

Klenow DNA 聚合酶

DNA 结合蛋白

非特异性 DNA [如 poly (dI·dC) ·poly (dI·dC)]

DNase I

微球菌核酸酶 (micrococcal nuclease)

¹⁴C-标记的蛋白分子量标准参照物

紫外透射仪

适当的限制性内切酶及缓冲液

SDS-PAGE 装置及仪器

其它实验室常规仪器及试剂

操作步骤:

1. 制备 BrdU 探针:

(1) 在微量离心管中加入:

单链 M ₁₃ DNA (含插入序列)	10 μ g
M ₁₃ 通用引物	等摩尔数
10 × 内切酶缓冲液 (0.5mol/L NaCl)	10 μ l
加水至 100 μ l	

混匀, 加热至 90℃, 5 分钟。置室温下缓慢冷却过夜。

(2) 加入下列试剂并混匀:

α - ³² P-dCTP (3 000Ci/mmol)	50 μ l
50 × dNTP/BrdU 溶液	3.5 μ l
0.1mol/L DTT	1.75 μ l
10 × 内切酶缓冲液 (0.5mol/L NaCl)	7.5 μ l
水	7 μ l
Klenow DNA 聚合酶	5 μ l (25U)

16℃保温 90 分钟。

(3) 加热至 68℃ 10 分钟, 灭活 Klenow DNA 聚合酶。

(4) 合适条件下加入 40 单位限制性内切酶消化, 使形成的 DNA 片段长度为 20 ~ 600bp。

(5) 加入乙酸铵使终浓度为 0.3mol/L, 乙醇沉淀, 重溶于 TE。

(6) 琼脂糖凝胶电泳分离, 回收相应的 DNA 片段。

(7) 液闪计数, 测定 DNA 量。

8. DNA-蛋白结合反应:

按凝胶滞留法进行 DNA-蛋白结合反应 (21.2.8)。反应体积 50 μ l。用保鲜膜封住管口。

9. 紫外交联及酶切:

(1) 离心管置倒置紫外透射仪下照射适当时间 (5 ~ 60 分钟), 管口离灯管 5cm, 紫外线波长 305nm, 强度 7000 μ W/cm²;

(2) 加入下列试剂:

0.5mol/L CaCl ₂	1 μ l
----------------------------	-----------

DNase I

4 μ g

微球菌核酸酶

1U

置 37℃ 保温 30 分钟。

4. SDS-PAGE 及放射自显影。

(1) 加入等量 2 \times SDS 样品缓冲液, 100℃ 煮沸 5 分钟。(2) SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 其中一孔加入 14 C-标记的蛋白质分子量标准参照物。

(3) 切除染料前的凝胶, 放射自显影。

注意事项:

(1) DNA 探针必须全长均匀标记, 如仅一端标记则在蛋白结合位点有可能不含标记; 要注意选择适当的标记的 dNTP, 在蛋白结合位点上必须含有此种碱基。应选用在蛋白结合部位最常见的那种碱基 (除 T 外), 否则也有可能得不到放射自显影图谱。

(2) 要注意选择适当的单链, 注意结合位点上是否含有胸腺嘧啶。如只含 A 而不含 T, 则应选用其互补链进行 BrdU 掺入。

(3) 如 DNA 探针长度小于 50bp, 也可以不进行核酸酶消化, 因小片段 DNA 对蛋白质迁移速度影响不大。

(4) 可在结合反应液中加入过量非标记 DNA 片段, 以鉴定结合蛋白特异性。

(5) 紫外交联的效率一般为 0.1% ~ 1% 之间, 在一个 DNA-蛋白复合物中一般只能形成一个交联键。如果一种 DNA 结合蛋白是以二聚体形式与 DNA 结合, 则一般只能与其中之一单体形成交联, 因此测定的蛋白分子量是其单体 (亚基) 的分子量。

(6) 不含 BrdU 的探针也可进行紫外交联, 但紫外波长应为 254nm, 照射时间延长至 5 分钟到 3 小时。

(7) 紫外交联也可在凝胶滞留法后在凝胶中原位进行 (UV crosslinking in situ): DNA-蛋白结合反应后, 1% 低融点琼脂糖凝胶电泳, 用保鲜膜覆盖, 紫外照射 5 ~ 30 分钟, 切下相应 DNA-蛋白复合物, 每 50 μ l 胶中加入 10ml SDS 载样缓冲液, 煮沸 2 分钟, 温热上样, SDS-PAGE。

21.2.13 DNA 结合蛋白的分离纯化

序列特异性 DNA 结合蛋白在细胞内行使着基因表达调控的重要功能, 将它们分离纯化进行深入研究有极重要的意义。然而 DNA 结合蛋白在细胞内含量极微, 常规方法很难将之纯化。目前虽有多种方法, 但都不甚理想, 如在 Southwestern 杂交后从 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上洗脱法 (参见 21.2.10), 得到的 DNA 结合蛋白量极微, 纯度低, 并且不能完全复性。DNA-蛋白质亲和层析法是目前较为理想的纯化方法。其基本原理是, 根据序列特异性 DNA 结合蛋白与其特异的 DNA 结合序列的可逆性结合作用, 以特异 DNA 序列作为配体, 用层析方法将蛋白质分离纯化。

下面介绍两种改进的亲和层析方法, 它们利用生物素和链亲和素 (streptavidin) 的特异亲和作用, 使分离方法更为简单、快速、高效。另有 GRAB 法仅介绍其原理。

21.2.13.1 生物素纤维素/链亲和素亲和法 (biotin-cellulose/streptavidin affinity)

如图 21-24 所示, 首先将生物素标记的核苷酸掺入到特异 DNA 片段的末端, 与蛋白质进行结合反应。加入链亲和素, 它可与生物素特异性结合。由于每个链亲和素上具有四个与生物素结合位点, 因此, 当加入生物素纤维素树脂后, 可将含生物素的探针与生物素纤维素交联在一起, 将游离蛋白质洗脱后, 再用高盐洗脱液将 DNA 结合蛋白洗脱下来。

试剂及仪器:

含蛋白结合位点的 DNA 片段

生物素-11-dUTP

Klenow DNA 聚合酶

生物素纤维素 (biotin-cellulose)

生物素纤维素结合缓冲液:

12% 甘油

12mmol/L HEPES-NaOH (pH7.9)

4mmol/L Tris·Cl (pH7.9)

60mmol/L KCl

1mmol/L EDTA

1mmol/L DTT

牛血清白蛋白 (BSA)

载体 DNA (鲑精 DNA)

生物素纤维素洗脱缓冲液:

12% 甘油

20mmol/L Tris·Cl (pH6.8)

1mol/L KCl

5mmol/L $MgCl_2$

1mmol/L EDTA

1mmol/L DTT

200 μ g/ml BSA

链亲和素

其它实验室常规仪器与试剂

操作步骤:

(1) 按第 5 章方法, 将生物素-dUTP 标记到 DNA 片段末端。乙醇沉淀。琼脂糖凝胶电泳, 回收 DNA 片段, 备用。

(2) 取 200 μ l 生物素纤维素, 离心 30 秒, 去除上清。在沉淀中加入:

生物素纤维素结合缓冲液	1ml
BSA	终浓度 500 μ g/ml
鲑精 DNA	200 μ g

缓缓颠倒混匀 5 分钟。

(3) 离心, 去上清, 重悬于 1ml 生物素纤维素结合缓冲液, 混匀 5 分钟。重复此步骤数次。备用。

(4) 按 21.2.8 方法进行 DNA-蛋白结合反应。生物素 DNA 探针需 10 倍 (摩尔数) 过量于所要分离的蛋白质。可先用凝胶滞留法摸索出合适的结合条件。

(5) 加入 5 倍 (摩尔数) 过量于 DNA 片段的链亲和素。30 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟。

(6) 取适量预处理过的生物素纤维素树脂置另一离心管中, 每 picomole DNA 片段需 2 μ l 生物素纤维素树脂, 即 12 μ l 上述预处理过的树脂悬液。离心, 去上清。

(7) 将结合反应液转移至生物素纤维素树脂管中, 轻轻混合 30 分钟。

(8) 离心, 去上清。

(9) 加入 500 μ l 生物素纤维素结合缓冲液, 轻轻颠倒离心管混匀 1~2 分钟。离心, 去上清。重复洗一次, 将非特异性结合的蛋白质去除。

(10) 将沉淀移至另一新管中。沉淀重悬于至少等量的生物素纤维素洗脱缓冲液。轻轻混合 20 分钟。高盐缓冲液可使 DNA-蛋白结合解离。

(11) 离心。取上清, 检测 DNA 结合活性。如量少, 可进行透析浓缩。

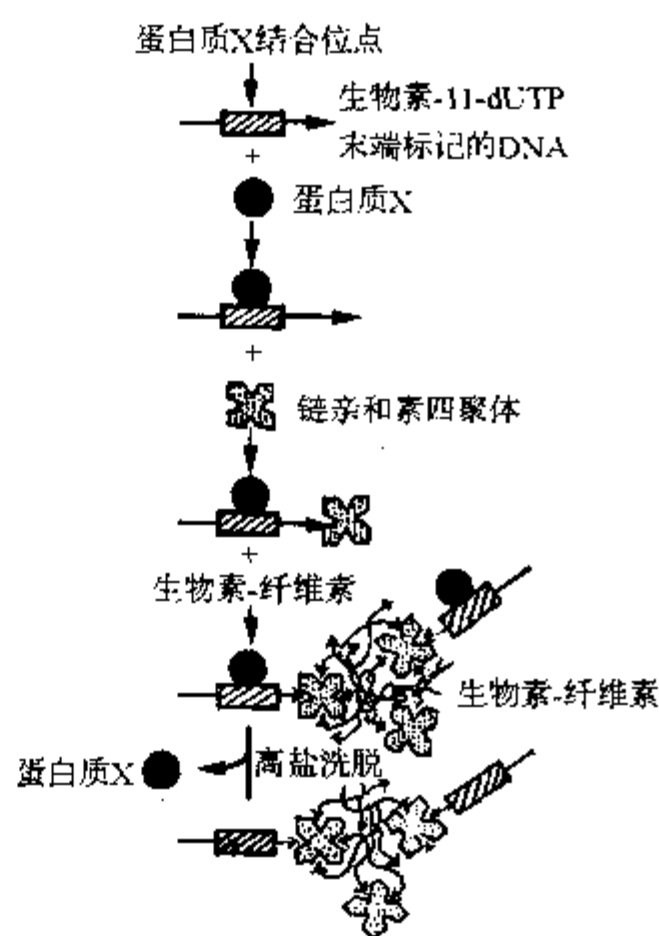


图 21-24 生物素纤维素/链亲和素亲和层析法原理示意图

注意事项:

- (1) 探针用生物素标记后,一定要乙醇沉淀,凝胶电泳回收,以去除游离生物素对实验的干扰。
- (2) 大量分离纯化时,可在—微型层析柱(1ml注射器)中进行。
- (3) DNA探针只能是单末端用生物素标记。如果两端均标记,则与链亲和素结合后形成不利于与蛋白质结合的构象。单末端标记的方法参见第5章。
- (4) 同时掺入一些低放射活性的同位素,将有利于对蛋白-DNA及生物素/链亲和素结合进行检测。但掺入量不可过多,一般同位素与非同位素dNTP的比例以1%~2%为宜。
- (5) 链亲和素较卵白素(avidin)好,链亲和素不是糖蛋白、偏酸性,因此较少与糖蛋白和酸性DNA形成非特异性结合。
- (6) 链亲和素放置时间过长后会解离为单体,不能在DNA与树脂间形成桥。可通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(非变性)进行鉴定。
- (7) 注意在洗脱时,由于结合缓冲液的稀释,KCl的实际浓度小于1mol/L。必要时可调整KCl浓度和pH及洗脱温度和时间。

21.2.13.2 链亲和素琼脂糖亲和法(streptavidin-agarose system)

基本与上法相同,但用链亲和素-琼脂糖取代了游离链亲和素和生物素纤维素。如图21-25。

试剂与仪器:

链亲和素琼脂糖(streptavidin-agarose)

余同上法

操作步骤:

- (1) 按21.2.13.2同样方法用生物素标记DNA片段、预处理树脂和进行DNA-蛋白结合反应。
- (2) 取适量预处理过的链亲和素琼脂糖树脂,每picomole DNA需50 μ l树脂,即300 μ l上述预处理过的树脂悬液。离心,去上清。
- (3) 将结合反应液与树脂混合30分钟至2小时。
- (4) 按上述同样方法洗涤和洗脱蛋白。

注意事项:

参见上节。

21.2.13.3 GRAB法

GRAB法是Promega公司介绍的一种分离DNA结合蛋白的新方法。其基本原理是: lac抑制子(lac repressor)与 β -半乳糖苷酶融合蛋白既保留了与lac操纵子的结合能力,又保留了 β -半乳糖苷酶的抗原性,可与其单克隆抗体结合,而 β -半乳糖苷酶则可共价结合在固相支持物(如Bio-Rad Immuno-beads等)上。这样,如果将所要分离的DNA结合蛋白的识别序列与lac操纵子串联起来,则可形成DNA结合蛋白-识别序列-lac操纵子-融合蛋白-抗体-支持物的复合物,从而可经洗涤和洗脱过程将感兴趣的DNA结合蛋白纯化,如图21-26所示。

21.2.14 编码DNA结合蛋白的cDNA克隆的筛选

如上所述,序列特异性DNA结合蛋白(反式作用因子)在细胞内含量极微,分离纯化极为困难,蛋白质序列测定复杂繁琐。因而,利用其识别序列DNA作为探针,在cDNA表达文库(λ gt11载体)中进行筛选,进而推测其蛋白质序列和获得其基因组序列,不失为序列特异性DNA结合蛋白分析的一种简单、快速的方法。

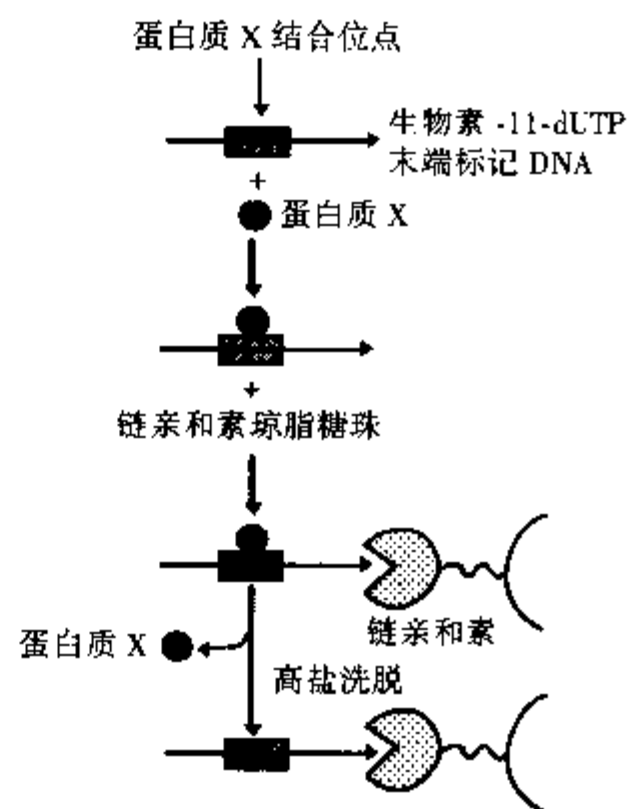


图21-25 链亲和素琼脂糖亲和法原理示意图

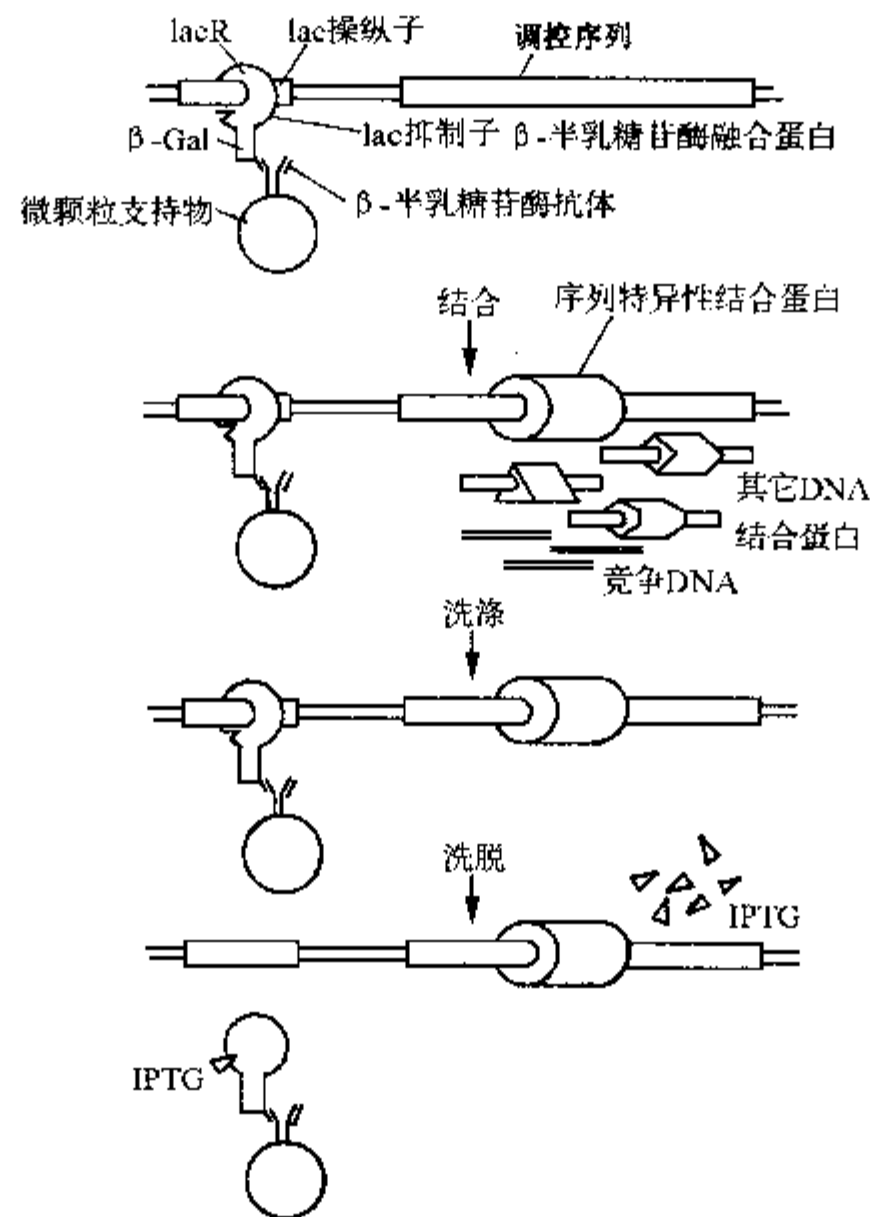


图 21-26 GRAB 法原理示意图

21.2.14.1 λ gt11 表达文库的筛选

含 λ gt11 表达载体的噬菌体在裂解状态下生长。噬菌斑出现后，将浸泡了 IPTG 的硝酸纤维素滤膜覆盖在平皿上，诱导 β -半乳糖苷酶融合蛋白的表达，并结合于膜上。此硝酸纤维素滤膜在过量非特异竞争 DNA 的存在下，与同位素标记的含特异蛋白结合序列的 DNA 探针反应。经洗膜、放射自显影，挑选出阳性克隆，再进行第二轮筛选。

试剂与仪器：

^{32}P 末端标记的特异 DNA 探针 ($> 10^8$ cpm)

λ gt11 cDNA 文库

大肠杆菌菌株 Y1090

含 0.2% 麦芽糖 (maltose) 和 $50\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基

含氨苄的 LB 平板

0.7% 琼脂

10mmol/L IPTG

BLOTTO:

5% 脱脂奶粉

50mmol/L Tris·Cl (pH7.5)

50mmol/L NaCl

1mmol/L EDTA

1mmol/L DTT

结合缓冲液 (Binding buffer):

10mmol/L Tris·Cl (pH7.5)

50mmol/L NaCl

1mmol/L EDTA

1mmol/L DTT

1mg/ml 超声打断的鲑精 DNA (或小牛胸腺 DNA, Poly dI:dC 等)

硝酸纤维素膜滤膜

其它实验室常规仪器与试剂

操作步骤:

(1) 按第 5 章方法制备末端标记的含蛋白结合序列的 DNA 探针, 比放射活性大于 10^8 cpm。酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、回收、纯化。

(2) Y1090 菌株于含 0.2% 麦芽糖和 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

(3) 对于每个培养皿, 混合 0.5ml Y1090 细菌过夜培养液和 λ gt11 文库稀释液 (含 $\times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ pfu 噬菌体)。37 $^{\circ}$ C 保温 15 分钟。

(4) 每管中加入 9ml 预热在 47 $^{\circ}$ C 的 0.7% 琼脂, 颠倒混匀数次。铺于预热至 37 $^{\circ}$ C 的 350mm 含氨苄青霉素的 LB 平板上。

(5) 42 $^{\circ}$ C 培养约 3 小时, 直至可见细小菌落。

(6) 迅速转移至 37 $^{\circ}$ C 孵箱中。

(7) 将干燥的浸泡了 IPTG 的硝酸纤维素滤膜铺在平板上, 37 $^{\circ}$ C 继续培养 6 小时。

IPTG 滤膜制备法: 将硝酸纤维素滤膜浸泡于 10mmol/L IPTG 溶液中 30 分钟, 空气干燥 60 分钟。

(8) 平板置 4 $^{\circ}$ C 冷却 10 分钟。用针扎孔进行定位。

(9) 小心取出滤膜, 迅速浸没于盛有 50ml BLOTTO 液的平皿中, 蛋白面朝上。室温下不间断轻轻摇晃 60 分钟。菌落平皿置 4 $^{\circ}$ C 保存。

(10) 滤膜转移至盛有 50ml 结合缓冲液的平皿中洗涤 1~5 分钟, 如必要, 可置另一盛结合缓冲液的平皿中于 4 $^{\circ}$ C 浸泡保存过夜。

(11) 在 25ml 结合缓冲液中加入终浓度为 $(1 \sim 2) \times 10^6$ cpm/ml 32 P 标记的 DNA 探针和终浓度为 5 μ g/ml 的变性鲑精 DNA (或小牛胸腺 DNA 等非特异性竞争 DNA, 预先用超声打断)。

(12) 将滤膜浸没于上述溶液中, 置室温下 60 分钟。

(13) 用结合缓冲液于室温下洗膜 4 次, 总共 30 分钟。

(14) 滤膜干燥后, 用保鲜膜包裹, 加增感屏于 -70 $^{\circ}$ C 放射自显影。一般需 12~24 小时。显影, 定影。

(15) 按放射自显影图谱挑选阳性噬菌斑, 进行第二轮筛选, 同时用非特异性 DNA 探针排除非特异性 DNA 结合蛋白。

注意事项:

(1) DNA 探针长度不宜过长, 以小于 200bp 为宜。过长的探针会导致非特异性结合。

(2) 采用人工合成的含有多拷贝结合序列的寡核苷酸作为探针, 可提高筛选效率。多拷贝序列可与多个蛋白结合, 防止洗涤过程中的解离。但此种探针应预先进行凝胶滞留法检测。

(3) 探针标记后应电泳分离回收, 以去除小分子核苷酸及单链 DNA 对实验的干扰。

(4) 洗膜时间不要过长, 因为蛋白与 DNA 的结合是可逆过程, 有一定的解离常数, 洗膜时间过长导致解离数量增多。采用多拷贝串联的探针可使解离数量减少。

(5) 有些 DNA 结合蛋白不能用此法筛选出来, 如有些 DNA 结合蛋白需多个亚基才能结合 DNA, 表达的单亚基不具备 DNA 结合活性。另外, 由于此种克隆表达的是融合蛋白有时不能表达出完整的蛋白

质。由于多数蛋白质只需其中的一小段即可表现出 DNA 结合活性, 因此用随机引物法克隆的 cDNA 文库更适用于此筛选法, 而用 oligo (dT) 引物延伸的 cDNA 有时得不到全长序列。

21.2.14.2 λ gt11 溶原菌融合蛋白粗提物的制备

上法得到的重组子需进行进一步验证。将得到的 λ 噬菌体感染 Y1089 菌株, 挑取溶原性生长的细菌经扩增表达融合蛋白, 破碎细菌, 提取蛋白抽提物, 用于融合蛋白的 DNA 结合活性的检测。

试剂及仪器:

E. coli Y1089 hflA150 菌株

含与不含 10mmol/L $MgCl_2$ 的 LB 培养基

10^{10} pfu/ml λ gt11 重组噬菌体贮备液

抽提缓冲液:

50mmol/L Tris·Cl (pH7.5)

1mmol/L EDTA

1mmol/L DTT

1mmol/L PMSF

5mg/ml 溶菌酶 (用抽提缓冲液配制)

消毒牙签

含 0.2% 麦芽糖和 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基

0.025 μ m Millipore 滤膜

其余同上法

操作方法:

- (1) *E. coli* Y1089 菌株在含 0.2% 麦芽糖和 50 μ g/ml 氨苄青霉素的培养基中于 37℃ 培养至饱和。
- (2) 用含 10mmol/L $MgCl_2$ 的 LB 培养基将上述细胞悬液稀释 100 倍。
- (3) 取 100 μ l 细胞悬液, 加入 5 μ l 重组噬菌体贮液 (10^{10} pfu/ml), 置 32℃ 保温 20 分钟。
- (4) 感染细胞用 LB 培养基稀释 1000 倍。每个平板取 100 μ l 铺在含氨苄青霉素的 LB 平板上。置 32℃ 培养过夜。在 32℃ 下噬菌体将处于溶原性生长状态。
- (5) 挑选单个克隆, 接种于两个氨苄青霉素/LB 平板上, 分别在 32℃ 和 42℃ 培养, 以试验其温度敏感性生长特性。
- (6) 挑选单个溶原菌克隆, 接种于氨苄青霉素/LB 培养基中, 32℃ 培养过夜。
- (7) 取 20 μ l 过夜培养菌液接种于 2ml 氨苄青霉素/LB 培养基中, 置摇床中于 32℃ 振荡培养。
- (8) 当菌液 OD₆₀₀ = 0.5 (约需 3 小时) 时, 迅速转至 44℃, 继续培养 20 分钟。使重组子扩增。
- (9) 加入终浓度 10mmol/L IPTG, 以诱导 β -半乳糖苷酶融合蛋白的表达, 将温度降低至 37℃, 继续培养 1 小时。
- (10) 取 1ml 菌液, 室温下离心 45 秒。
- (11) 沉淀重悬于 100 μ l 抽提缓冲液中。置干冰/乙醇浴快速冷冻。
- (12) 迅速解冻, 加入 0.5 μ g/ml 溶菌酶。置冰浴中保温 15 分钟。
- (13) 加入 NaCl 至终浓度为 1mol/L, 充分混匀, 置 4℃ 混摇 15 分钟。
- (14) 4℃ 下离心 30 分钟。
- (15) 小心吸出上清。
- (16) 在 100ml 抽提缓冲液上, 漂浮一张 0.025 μ m 滤膜, 小心将上述上清液加在滤膜上。置 4℃ 透析 60 分钟。
- (17) 将抽提物迅速冷冻, 置 -70℃ 保存。可用于凝胶滞留法等检测其融合蛋白的 DNA 结合活性。

(胡晓年 文 方福德 审)

参 考 文 献

1. 郑仲承、李敏棠·基因表达的调节控制·上海远东出版社, 1992
2. 胡晓年、王智·真核基因的反式调控蛋白及其结构与功能·国外医学遗传分册, 1990, 13 (6) :281
3. Ptashne M·How eukaryotic transcriptional activators work·Nature, 1988, 335:683
4. Ausubel FM, et al·Current protocols in Molecular Biology·Wiley Interscience, 1988
5. Robertis EM, et al·Homeobox Genes and the Vertebrate Body Plan·Scientific American, 1990, 7:26
6. Hendrickson W, Schleif R·A dimer of Arac protein contacts three adjacent major groove regions of the aral DNA site·Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82:3129
7. Tullius TD, Dombrosk PA·Hydroxyl radical "footprinting": High resolution information about DNA-protein contacts and application to λ repressor and cro protein·Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83:5469
8. Tullius·DNA footprinting with hydroxyl radical·Nature, 1988, 332:663
9. Wu C·An exonuclease protection assay reveals heat-shock element and TATA box DNA-binding proteins in crude nuclear extracts·Nature, 1985, 317:84
10. Sawadogo M & Roeder RC·Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region·Cell, 1985, 43:165
11. Kuwabara MK, Sigman DS·Footprinting DNA-protein complexes *in situ* following gel retardation assays using 1, 10-phenanthroline-copper ion: *escherichia coli* RNA polymerase-Lac promoter complexes·Biochemistry, 1987, 26:7234
12. Spassky A, Sigman DS·Nuclease activity of 1, 10-phenanthroline-copper Ion. conformational analysis and footprinting of the lac operon·Biochemistry, 1985, 24:8050
13. Chalepakis G, Beato M·Hydroxyl radical interference: a new method for the study of protein-DNA interactions·Nucleic Acid Res, 1989, 17:1783
14. Selleck S, Majors J· *In vivo* DNA-binding properties of a yeast transcription activator protein·Mol Cell Biol, 1987, 7:3260
15. Becker MM, Wang JC·Use of light for footprinting DNA *in vivo*·Nature, 1984, 309:682
16. Becker MM, et al·Genomic footprinting in mammalian cells with ultraviolet light·Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86:5315
17. Selleck SB, Majors J·Photofootprinting *in vivo* detects transcription-dependent changes in yeast TATA boxes·Nature, 1987, 325:173
18. Pfeifer GP, et al·Binding of transcription factors creates hot spots for uv photoproducts *in vivo*·Mol cell biol, 1992, 12:1798
19. Church GM, Gilbert W·Genomic sequencing·Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81:1991

22. 转基因动物

转基因动物是指以实验方法导入的外源基因在其染色体基因组内稳定整合并能遗传给后代的一类动物。用这种方法可建立转基因动物模型以研究外源基因在整体动物中的表达调控规律；可改变动物基因型使其表现型更符合人类需要；亦可用转基因动物产生人类所需的生物活性物质。

22.1 转基因方法

按基因导入方式划分，建立转基因动物主要有显微注射法、反转录病毒感染法与胚胎干细胞法。Lavitrano 等曾报道与 DNA 共培养的精子产生的受精卵，可将外源基因导入卵内，其后多家实验室的大量工作未能验证。后来 Muller 等用电转移法将 DNA 导入精子，由此产生的受精卵有 1% ~ 3% 携带外源基因。3 种方法将 DNA 导入受精卵及其不同发育阶段的时相如图 22-1 所示：

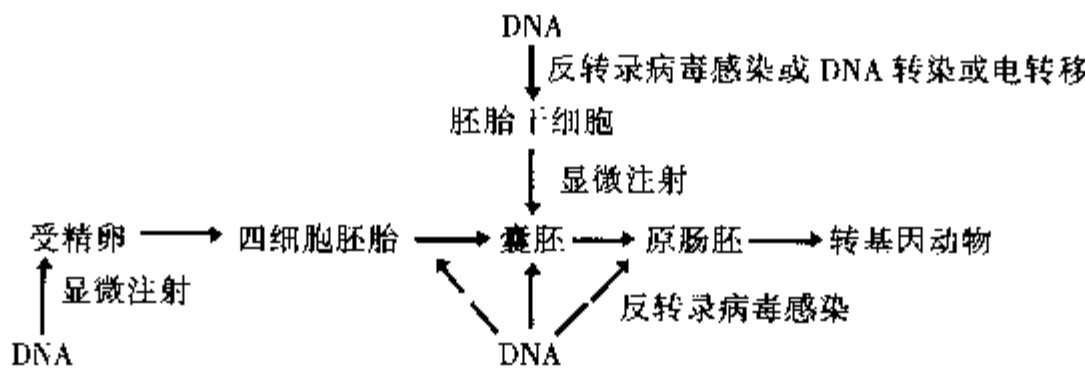


图 22-1 3 种转基因方法及其与受精卵不同发育阶段的关系

上述 3 种转基因方法中，显微注射法与反转录病毒感染法都是把 DNA 直接导入鼠受精卵，或其后的不同发育阶段，两种方法比较如表 22-1 所示：

表 22-1 显微注射与反转录病毒转染两种转基因方法比较

转基因方式	显微注射	反转录病毒转染
DNA 长度与导入时相	< 50kb，单细胞受精卵	< 10 ~ 15kb，4 ~ 16 细胞卵
培养液	M16	高营养液
移 卵	输卵管	子 宫
整 合	多为普遍细胞随机整合，首尾相连的多拷贝为主	嵌合体，随机整合，单拷贝
表 达	受整合部位宿主旁侧 DNA 影响，在一定范围内表达水平与拷贝数正相关	表达受病毒 LTR 影响，易缺如
转基因传代	可传代	转基因整合至生殖细胞的可传代

转基因的表达水平显然很重要。反转录病毒的长末端重复（LTR）的甲基化状态常使转基因的表达缺如，因此这种方法较少使用。应用较多的是显微注射法，其一般实验程序如图 22-2 所示：

用显微注射法建立转基因动物有较固定的实验时相，当对卵供体母鼠注射了第一种激素孕马血清（PMS）后，可看成启动了整个程序，其后的实验时相则基本固定如图 22-3 所示：

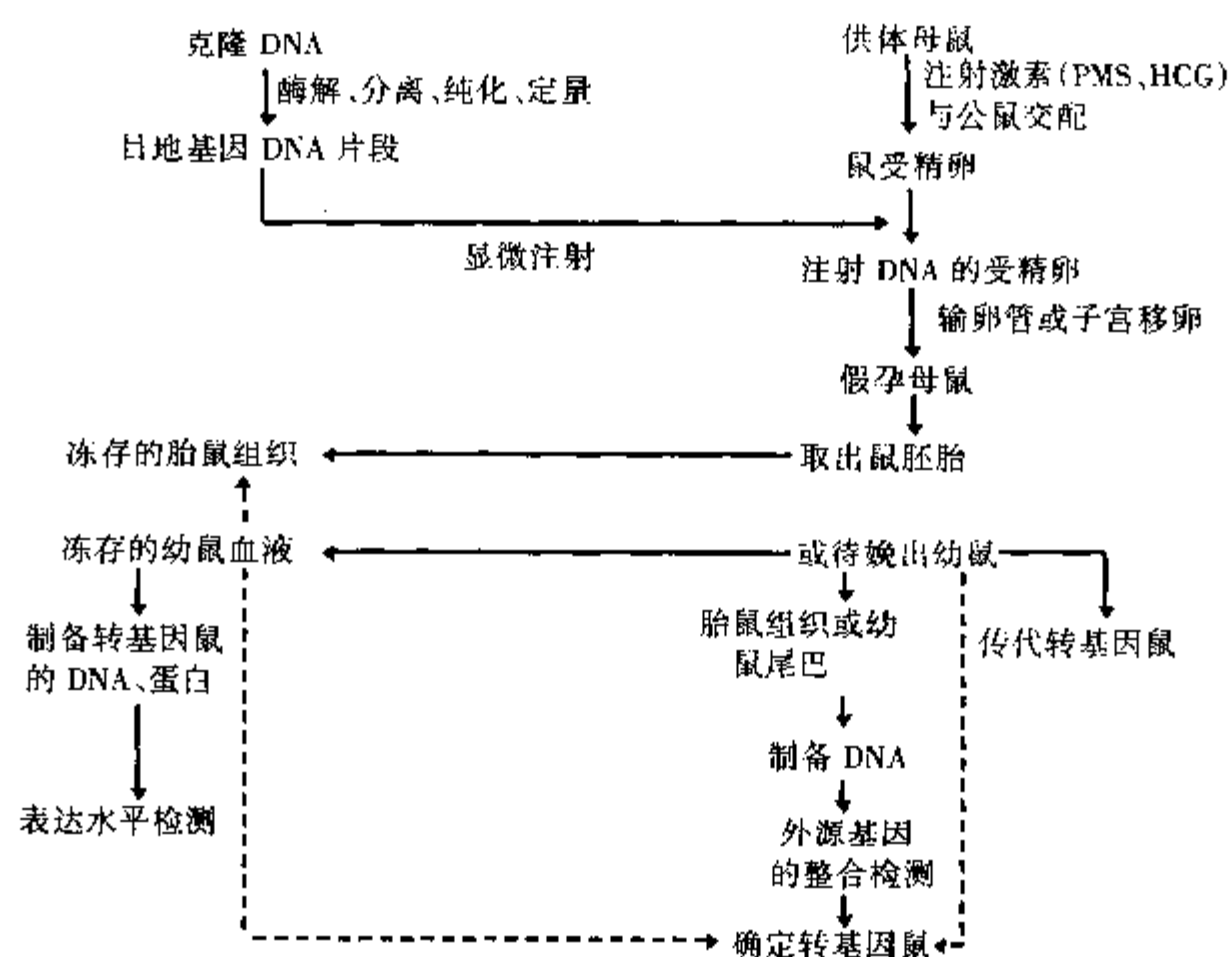


图 22-2 显微注射法建立转基因鼠的一般实验程序

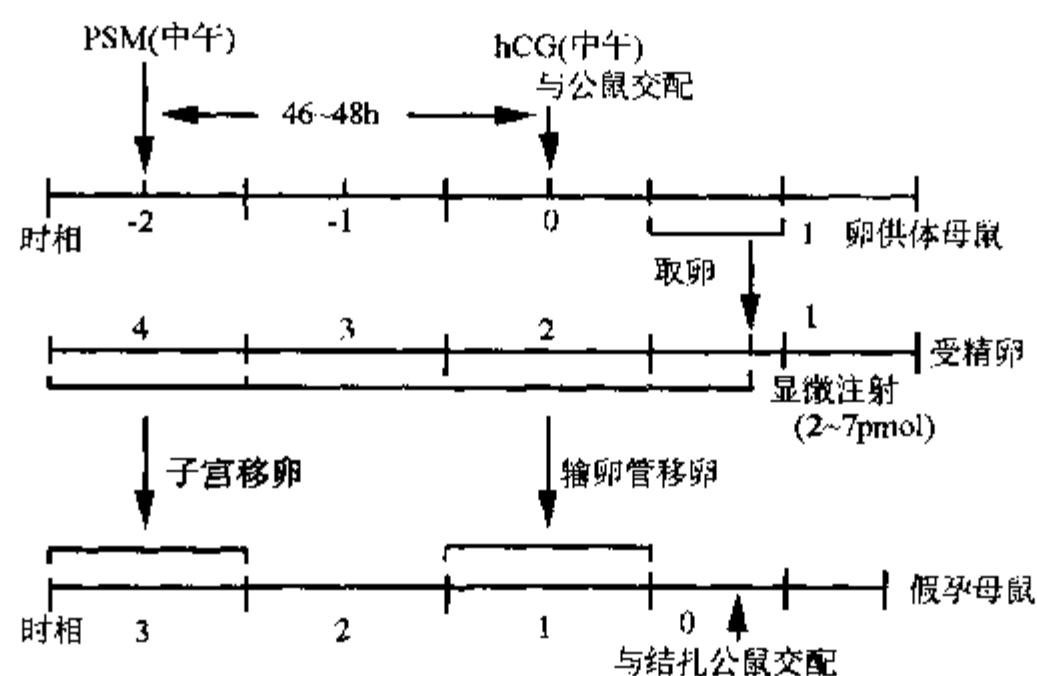


图 22-3 用显微注射法建立转基因鼠的实验时相

本文主要叙述以显微注射法制备转基因鼠的实验程序，实验步骤主要按实验的时间顺序分述。

22.2 显微注射 DNA 的制备与纯化

22.2.1 DNA 影响基因转移的因素

22.2.1.1 DNA 构型、末端与载体

线状与环状 DNA 均可用于微注射。对照实验显示，线状 DNA 整合效率 5 倍于超螺旋 DNA。线状 DNA 的末端结构差异（平末端、粘性末端）对整合效率与整合分子的结构影响不大。转移的 DNA 在染色体上的整合大多呈首尾相连的多拷贝，不同构型与末端间无明显差异。

原核克隆载体(如质粒)序列不影响携带基因的整合效率,但载体序列抑制转移的真核基因在转基因动物中的表达。注射前去除载体的基因,其表达水平显著高于保留载体的基因,且前者具有较好的重复性。对某些基因(如珠蛋白基因),只有注射前去除载体才能得到组织特异性表达。

22.2.1.2 DNA 长度与浓度

用显微注射法注入受精卵原核的 DNA 溶液的体积难以控制,一般认为每次注射 1~2nl,但保留在核内的 DNA 溶液体积不明。较易掌握的是注射 DNA 的浓度:DNA 浓度低于 1 μ g/ml 时,转移基因在染色体上的整合效率(转基因鼠频率)低;DNA 浓度高于 3 μ g/ml 时,受精卵注射 DNA 后两细胞分裂率显著降低;当 DNA 浓度为 1~3 μ g/ml,对 5kb 的 DNA 而言相当于 $1.8 \sim 6 \times 10^5$ 分子/nl,其整合效率可达 20%~40%。注射较低浓度的 DNA 溶液仅降低整合频率,一般不改变整合形式,仍主要产生首尾相连的多拷贝。

22.2.1.3 溶解 DNA 的缓冲液

用于显微注射的缓冲液一般含 5~10mmol/L Tris (pH7.4) 与 0.1~0.25mmol/L EDTA,增加 1mmol/L EDTA 或 1mmol/L MgCl₂ 使受精卵注射后两细胞分裂率降低 30%~50%。但如不用 EDTA 则降低两细胞分裂率与整合效率。

22.2.1.4 DNA 纯度

DNA 样品纯度对于微注射至关重要。应完全除去(实验中使用的)酚、酒精、其它有机溶剂和酶类,也不能含有影响微注射的颗粒。需采用分析纯以上等级的试剂和高纯度水。尽可能采用一次性容器,玻璃仪器需专用。

22.2.2 显微注射 DNA 样品的制备

22.2.2.1 氯化铯离心法

1. 酶解、分离与抽提:

含有目的基因的克隆 DNA,以合适的限制性内切酶消化,用低熔点琼脂糖凝胶电泳分离,以获得相当于目的基因 DNA 片段的凝胶块。将所得凝胶块移入 Eppendorf 管,置 65℃ 水浴 5~10 分钟使其熔化成液体。加入 37℃ 预温的等体积酚,震荡后于 4℃,16000r/min 离心 10~15 分钟,管内则分为上清、纤维素、酚三层。取上清,依次用等体积的水饱和正丁醇、氯仿异戊醇(24:1)、水饱和乙醚抽提,然后置 37℃ 水浴 5 分钟以去除痕量乙醚。用酒精沉淀 DNA 并真空干燥。DNA 用凝胶电泳分离后,也可用 Gene Clean 纯化。

2. 氯化铯离心:

将上述抽提纯化的 DNA (2~10 μ g) 溶于 2.4ml TE 缓冲液 [10mmol/L Tris·Cl, (pH8.0), 1mmol/L EDTA],加 3.0g 氯化铯 (EM Reagent, Catalog No. 2039) 缓慢溶解,其密度为 1.70 ± 0.01 g/ml,将溶液转入 1.3cm \times 5cm 异质同晶聚合物 (polyallomer) 超速离心管,溶液上部以 1ml 矿物油覆盖,用 Beckman 的 SW50.1 转头离心,于 20℃,40000r/min 离心 48 小时。

3. 收集 DNA 溶液:

离心完毕,去除部分矿物油,将离心管固定在铁架上,用内插注射针头的软木塞塞紧管口,接 2ml 注射器以封闭针头。从离心管底部用 8~9 号针头刺一孔,用 Eppendorf 管分步收集流出液,每管 5~6 滴。从中间 8 管内每管取 1~2 μ l,用琼脂糖凝胶电泳确定 DNA 溶液所在的管(因溶液中含高浓度氯化铯,电泳速度很慢)。集中 DNA 溶液。

4. 透析与定量:

于 4℃ (冷室或冰箱) 将 DNA 溶液对大体积 (4L) 显微注射缓冲液透析 48 小时,换液 4 次。用少量透析后的 DNA 作凝胶电泳,以片段长度相近的已知浓度 DNA 作标准对样品定量。用微注射缓冲液稀释样品至 1~3 μ g/ml,每管分装 20 μ l 并置 -20℃ 待注射,未稀释的置 -40℃ 以下。

22.3 鼠的种类与饲养

为使转基因实验顺利进行,需要定期提供相当数量母鼠作为卵供体和假孕母鼠,以及一批相对稳定的正常公鼠与结扎公鼠。所用各类鼠及有关要求如表 22-2 所示。这些鼠可由动物中心提供,在实验前做好这些鼠与转基因相关的安置与饲养。

表 22-2 转基因鼠实验所用各类鼠

鼠 类	供体母鼠	公 鼠	受体母鼠	结扎公鼠
鼠龄	4~6 周	>6 周	>6 周	>6 周
体重			>20g	
作用	受精卵供体	与供体母鼠交配	注射卵受体	与受体母鼠交配
更换频率	每次	6~8 个月	每次	6~8 个月
饲养	每笼 5~6 只	每笼 1 只	2~3 只放 1 个结扎公鼠笼	每笼 1 只
备注			产过仔的更好	结扎后两周用

22.3.1 鼠的种类

22.3.1.1 卵供体母鼠

卵供体母鼠需选择种系。如转移一种鼠的等位基因至另一种不同等位基因的种系,这种卵供体母鼠必须有特定的遗传背景,因此需用纯系鼠。如转移基因不需要卵供体母鼠有特定的遗传背景,则可用杂交子 1 代鼠。一般说来,杂交子 1 代鼠较纯系鼠产卵多,受精卵显微注射后两细胞分裂率较高,产仔较好。作卵供体母鼠的种系,自然产卵数与超排卵数均应较高。一般用 4~6 周母鼠作为超排卵供体;3~4 周母鼠产卵更多但卵细胞膜脆性较大,在处理过程中易破裂;而 6 周以后母鼠产卵逐渐减少。超排卵较好的母鼠每只每次产 20~30 个卵。如每周作 2~3 次显微注射,每次用卵供体母鼠 10 只,可每周 1 次从动物中心领取 20~30 只,表 22-3 表示 C₅₇BL/6J (F1) 超排卵及其后的转基因实验数据供参考。

表 22-3 超排卵与转基因实验

交配母鼠数	10 只
有精栓的母鼠数	6~10 只
取得的受精卵数	120~300 个
含可注射的雄性原核卵数	90~240 个
微注射后分裂为两细胞的卵数	60~160 个
输卵管移卵数	2~5 个

22.3.1.2 与卵供体母鼠交配的正常公鼠

公鼠性成熟约在 6~8 周,不同种系公鼠正常性维持时间不一,一般 1~2 年,但纯系公鼠只可使用 8~10 个月,此后公鼠生殖机能下降。每个公鼠需单笼饲养以免咬伤,饲养 1~2 周后方可与作超排卵母鼠交配,因公鼠中强壮者可抑制同窝公鼠的睾丸酮合成以致影响精子产量。每个作超排卵的母鼠与 1 个公鼠交配,次日上午检查有否精栓并作记录。如两次以上都不能使母鼠有精栓,或总的精栓产生率低于 60%~80%,则需更换公鼠。为保证有足够的受精卵,公鼠最好每周只交配 1 次。如前所述每周作 2~3 次显微注射,每次 10 只卵供体母鼠,则需养 20~30 只正常公鼠。

22.3.1.3 为产生假孕母鼠的结扎公鼠

结扎公鼠与母鼠交配以产生假孕母鼠。受结扎公鼠需8周以上,对种系无特殊要求。在作正式实验以前,每只结扎公鼠至少需要先后使3只母鼠产生精栓且所有产生精栓的母鼠均不怀孕,然后结扎公鼠方可用于正式实验。结扎公鼠可每晚与母鼠交配,但最好是隔日1次。结扎公鼠使母鼠产生精栓的能力可维持两年。每只结扎公鼠最好有使母鼠产生精栓的记录,如经4~6次都不能使母鼠产生精栓,则结扎公鼠必须更换。如每周作2~3次显微注射,每次需3~4只假孕母鼠,则需养结扎公鼠10~15只。

22.3.1.4 作为卵受体与养母的假孕母鼠

母鼠在正常发情期与结扎公鼠交配即产生假孕母鼠,假孕母鼠作为显微注射后受精卵的受体及其后的养母。这种母鼠在6周至5个月较适宜,体重最好大于20g,对种系无特殊要求,同系远交或杂交子1代均可。除以上条件外,已产过仔并成功抚育过幼鼠的假孕母鼠最理想。母鼠一般4~5天进入1次发情期,因此在1个较大的母鼠群体中约有20%~25%进入该期。如进入发情期的母鼠数与结扎公鼠数相近,可将每个公鼠笼内放1只母鼠;如母鼠数显著多于公鼠,可于每个公鼠笼内放2~3只母鼠。也可不考虑母鼠发情期,随机将每个公鼠笼内放2~4只母鼠。如每周作2~3次输卵管移卵,每次需3~4只假孕母鼠,则需20~30只母鼠以产生假孕母鼠。一般准备较多的假孕母鼠以防移卵失败。未使用的假孕母鼠可在精栓产生两周后再与结扎公鼠交配。

22.3.2 鼠的安置与饲养

从动物供应单位取鼠之前,需先了解鼠的种系、适应性、抗病能力、公鼠的交配能力及母鼠产卵数等。选择后给出所需鼠的种类、月龄及个数。公鼠取1次可用较长时间,母鼠一般每周取1次。鼠的饲料无特殊要求,动物房需保持明暗循环(light-dark cycle)。即早6时至晚6时保持照明,晚6时至次晨6时保持黑暗。每个公鼠单笼饲养,母鼠每笼可放5~6只。

22.4 超排卵与取卵

22.4.1 超排卵

4~6周母鼠在明暗循环的动物房内饲养3~5天,即可作超排卵。用孕马血清(PMS)模拟卵泡刺激素(FSH)的作用,用人绒毛膜促性腺激素(hCG)模拟黄体生成素(LH)的作用。影响鼠超排卵的因素有:母鼠的种系、周龄与体重,激素应用剂量与注射时间。卵能否受精则取决于公鼠的生殖能力。

母鼠的性成熟程度是影响其超排卵的主要因素,超排卵的最佳时间也随鼠种系不同而异,一般在3~5周。鼠发育至这一阶段,卵泡成熟周期已开始,使对FSH有反应的卵泡数达峰值,PMS中的有效成分即是FSH。除周龄外,鼠的营养与健康状况也影响鼠的超排卵,直观反映营养与健康状况的是体重。如C₅₇BL/6J种系,超排卵的最佳结果见于25日母鼠,此时体重在12.5~14.0g。母鼠的不同种系(同系远交或杂交子1代)其超排卵数也不同,这取决于其对FSH和LH的敏感程度,高敏种系每只鼠超排卵可达40~60个,低敏种系不足15个,介于二者之间的为中敏种系。

PMS与hCG均有商品供应(PMS Sigma G4877; hCG Sigma CG-2),一般为冰冻干燥的粉剂。均用生理盐水溶解,终浓度为50IU/ml,分装贮存于-20℃,至少可存放一个月。PMS与hCG的注射剂量均为每次5IU(0.1ml),一般用腹腔注射,PMS作皮下注射效果与腹腔注射相同。

PMS与hCG注射的间隔时间,二者与动物房明暗循环的时间关系均影响超排卵数。一般PMS与hCG注射间隔42~48小时,排卵发生于注射hCG后10~13小时。为精确地控制产卵时间,hCG的注射必须在内源LH释放之前。PMS刺激内源LH的释放受动物房明暗循环的调节。内源LH的释放随种系而异,对大多数种系其释放在PMS注射第2个暗循环的中点之后15~20小时。如暗循环是晚6点至早6

点, PMS 在下午 1~2 点注射, 46~48 小时后注射 hCG, 这一注射时间约在内源 LH 释放之前 2~3 小时。

对鼠施行腹腔注射时, 可抓住颈部贴耳根处, 以小指固定尾巴; 也可抓住尾巴让其自然抓住鼠笼上的金属框。用 $5\frac{1}{2}$ 号针头注射, 注意避开膈肌与膀胱。注射完毕略停一下再拔出针头以免药液外渗。注射 PMS 后鼠仍置原笼内, 待两日后注射 hCG, 注射 hCG 后每只母鼠置于 1 个单笼饲养的正常公鼠笼内, 次晨检查精栓。

22.4.2 取卵

将鼠置于饲养笼上, 鼠爪自然抓紧笼上铁支架, 此时一只手拉紧鼠尾, 另一只手食指与拇指压紧鼠颈部, 或用镊子压紧颈部即可致死, 此为引颈法 (图 22-4)。以 70% 酒精喷湿鼠全身以消毒并防止毛发飞扬。将鼠面向上平放于吸水纸上, 在下腹部中间剪开 1 个小口。一只手抓住鼠尾, 另一只手抓住切开的皮肤向头部牵拉直至充分暴露腹部。切开腹膜, 将内脏翻向上, 即暴露两侧卵巢与输卵管 (图 22-5, 22-6)。用细镊子夹住子宫与输卵管连接处, 先剪断卵巢与输卵管连接处, 再剪断子宫与输卵管连接处, 即得到输卵管 (图 22-7)。将输卵管转移到盛有 M_2 的培养皿内, 置室温。

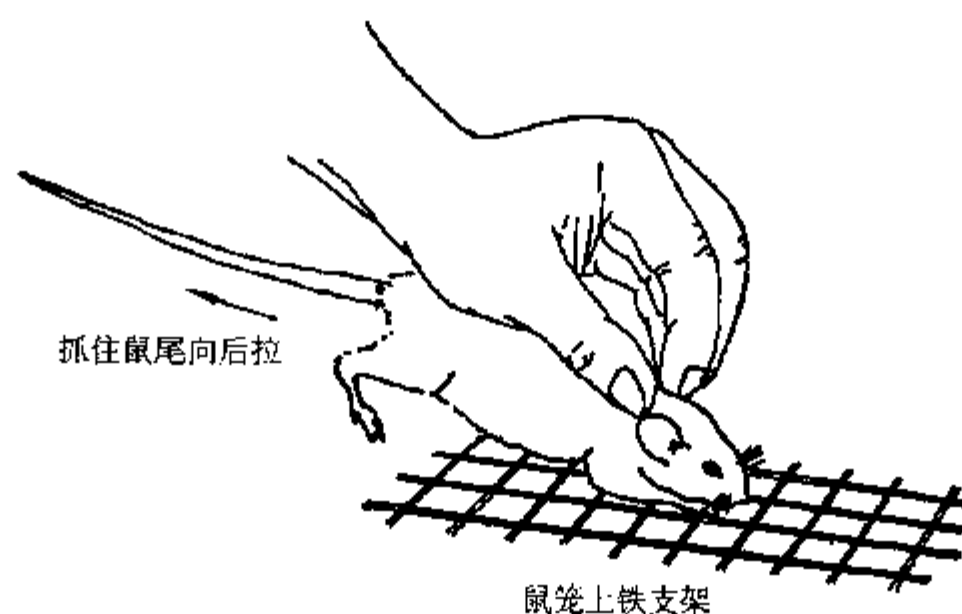


图 22-4 在鼠笼上用引颈法处死鼠

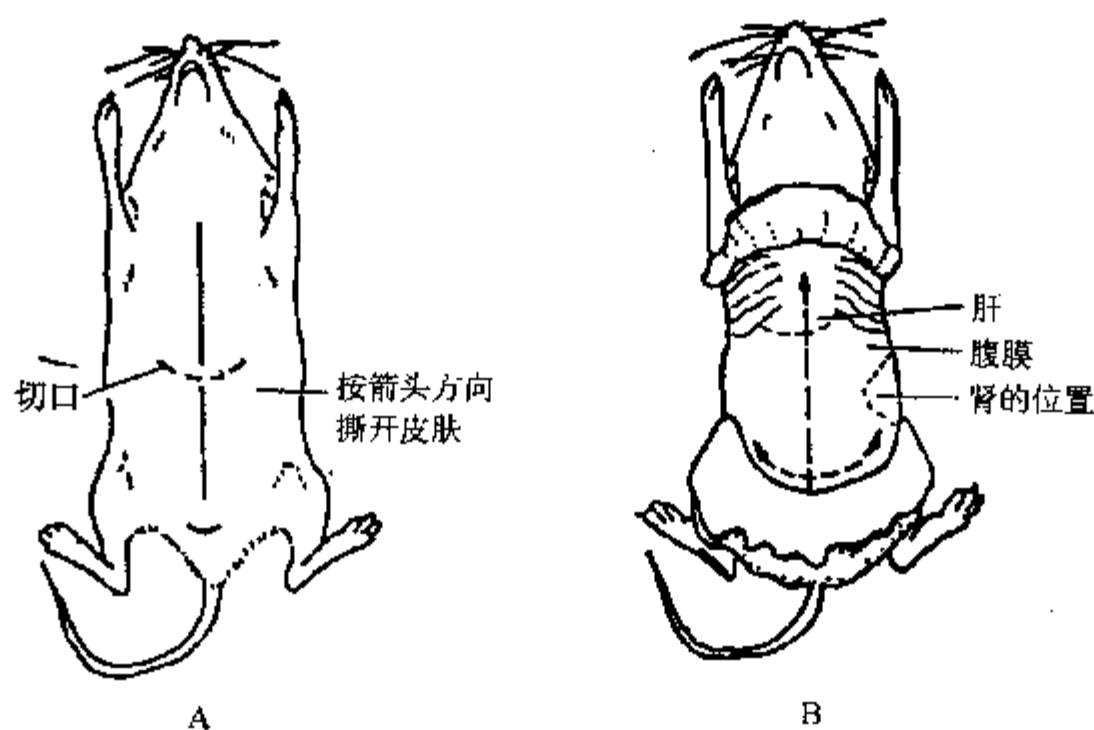


图 22-5 打开母鼠腹腔

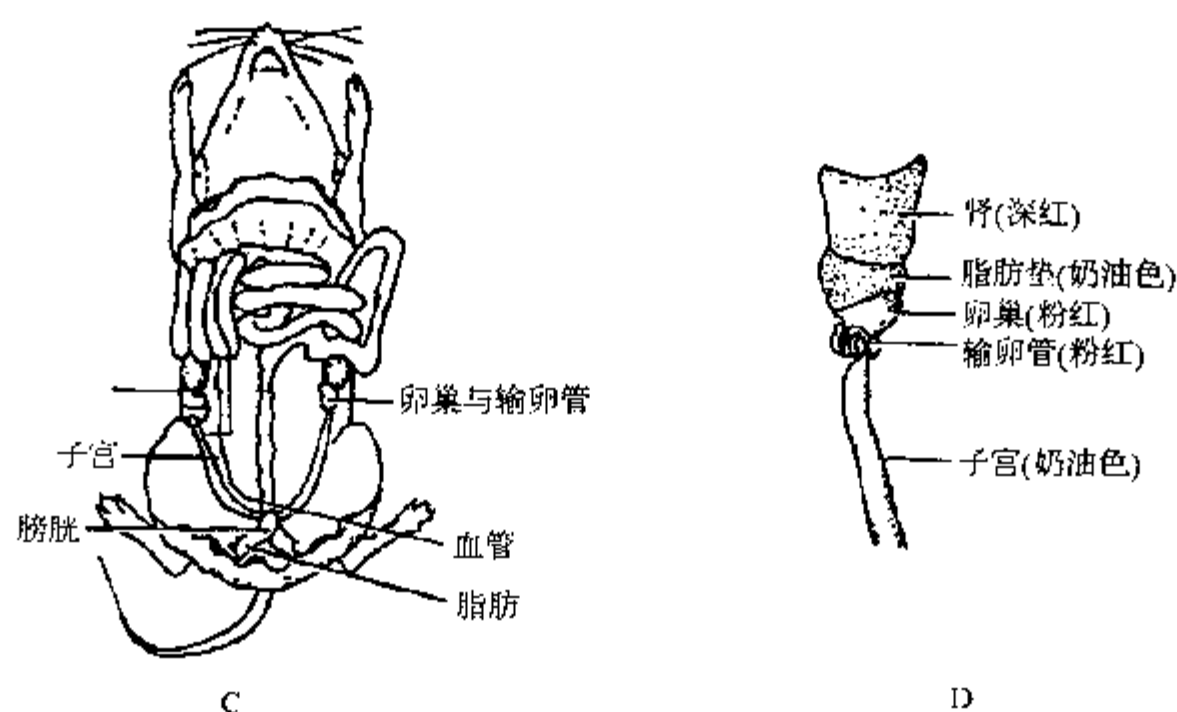


图 22-6 暴露并取出生殖器官

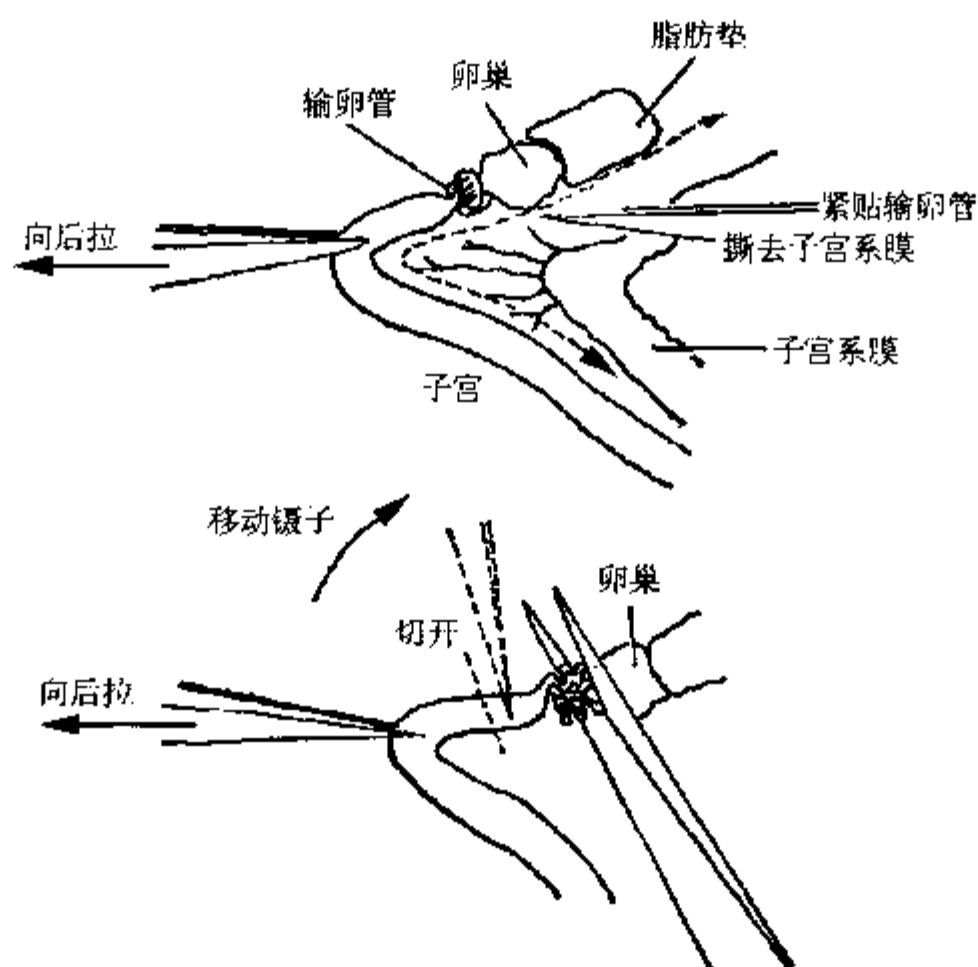
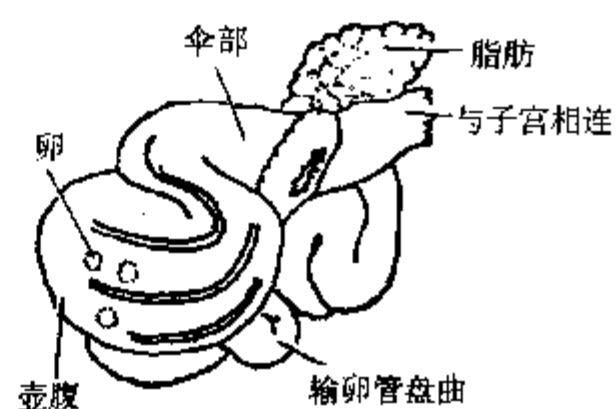


图 22-7 取输卵管

将 M_2 培养液与透明质酸酶 (Sigma H3884) 溶液 (0.3mg/ml) 分别以多个液滴滴于 35mm 直径的平皿上, 每个输卵管置于 1 滴 M_2 培养液内, 平皿置于解剖显微镜台上, 在 20 或 40 倍镜下找到输卵管膨大部 (壶腹部) (图 22-8)。用钟表镊尖撕开壶腹部, 待卵逸出或用钟表镊轻轻拨出, 此时多个卵聚集被积云状细胞包裹。用烧尖 (口径 0.2mm) 巴士德吸管或类似吸管将卵吸入透明质酸酶溶液, 轻轻吹吸以助消化, 待卵由聚集状态分散成单个细胞后, 随即将其转入大滴 M_2 内, 用 M_2 洗 3~5 次后, 将卵转入二氧化碳孵箱中含 M_{16} 培养液的培养皿内。取卵一般在上午进行, 全过程应尽快

图 22-8 输卵管伞部与壶腹部
(产卵 12 小时后)

完成(1小时内)以减少暴露状态给卵带来的不利因素。

22.5 显微注射

22.5.1 制备持卵管与注射针

持卵管的作用是连接负压装置可吸住卵以利注射,注射针是吸入DNA溶液后连接注射器或压力泵将DNA注入受精卵内,二者均可由1毫米口径的微玻璃管制制而成。

22.5.1.1 制备持卵管

在火焰喷灯上将微管拉成中间较细的约5~10cm长的一段,其口径约80~120 μm ,用玻璃刀将微管于离颈部2cm处切断。用烧针器(尼康MF-9)将微管开口处烧成如图形状,其口径约15 μm (图22-9A)。将持卵管尖部移近火焰喷灯略加热,用镊子轻触尖部适宜位置使弯成如图所示角度(图22-9)。

22.5.1.2 制备注射针

用薄壁微管制制注射针,全过程在拉针器(尼康PB-7)上进行。拉针器说明书上附有参数调试细节,需反复调试灯丝温度、拉力强度等参数,以拉制较适用的注射针。向受精卵注射DNA的针其口径不足1 μm ,在显微镜下如可看到开口说明口径已太大,但如针头呈封闭状态则无法注射,只有试注射才可确定所拉的针是否适用。DNA注射针拉制后一般直接使用,不需再处理。在机械拉针器上再处理或对飞轮再磨,产生较大的口径。较大口径的针头不易控制注射量,而且每次注射后压力降低,大口径针头可产生回流使DNA稀释。注射针接近针尖处的锥度可以测量,在距针尖50 μm 处的直径应在10~15 μm 或更小。开口距体颈交界处的距离至少应有3~4mm,如太短会影响注射针在注射槽上的位置固定,注射针总长应在5~8cm以便操作。一般拉针器每次拉出两根相似的针。如显微注射的卵当日或次日作输卵管移卵,注射针拉制后即可使用,无需清洗与消毒。如卵需培养数日后作子宫移卵或其它用途,可在注射针拉制前消毒,拉制后在消毒环境存放。一般将注射针钝端插入DNA

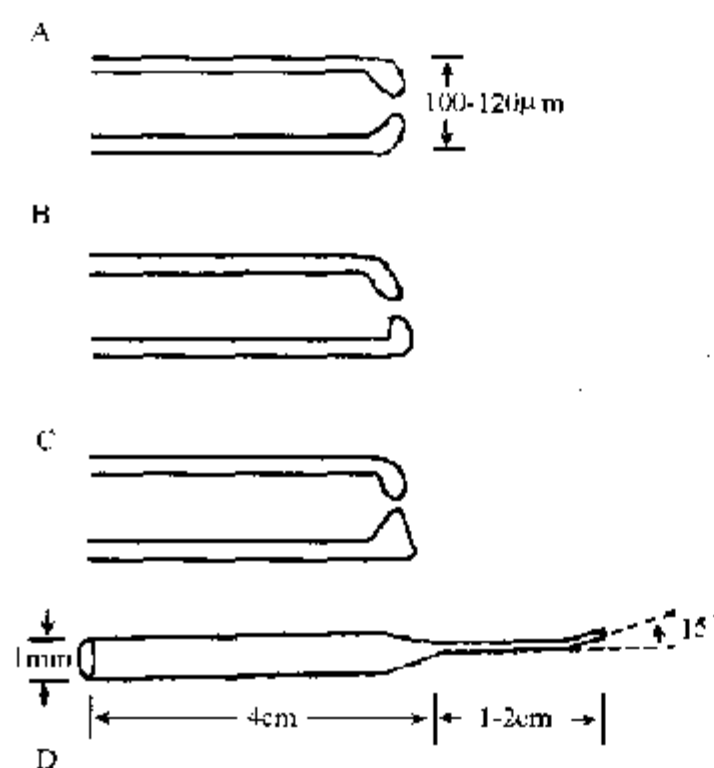


图22-9 制备持卵管

A、B、C表示尖端开口部

A合格, B、C不合格

D表示尖端弯成的角度

溶液靠虹吸作用将样品“灌入”注射针,因此手指不应直接碰钝端,同时不应使用带滑石粉的手套,因粉末可堵塞针头。注射针最好于使用当日拉制,久放的针易于堵塞。将拉制的注射针置于洁净的塑料泡沫的缺刻上,后者可放在平皿中。

[显微注射装置]

因目前已有多个厂家生产显微注射仪,同一厂家也不断更新产品,本实验室采用尼康倒置显微镜DIAPHOT TMD、显微操作系统NT88与显微注射装置PLI88等,操作显微注射仪之前需认真阅读仪器说明书。

图22-10为经典的显微注射装置。用于微注射的显微镜是倒置镜带固定的镜台与直立像的镜片。向受精卵原核作显微注射一般需放大400至600倍,通常采用40倍物镜与10~15倍目镜。低倍物镜用于在注射槽上移动卵或将卵移入及移出注射槽。显微镜两侧各置一台显微操作仪,一般左侧接持卵管,右侧接显微注射针。显微操作仪可调节持卵管或注射针的三维空间位置。操作仪的高度及与显微镜的距离必须适宜,固定在同一基座上以利于操作。底座不宜垫橡皮。

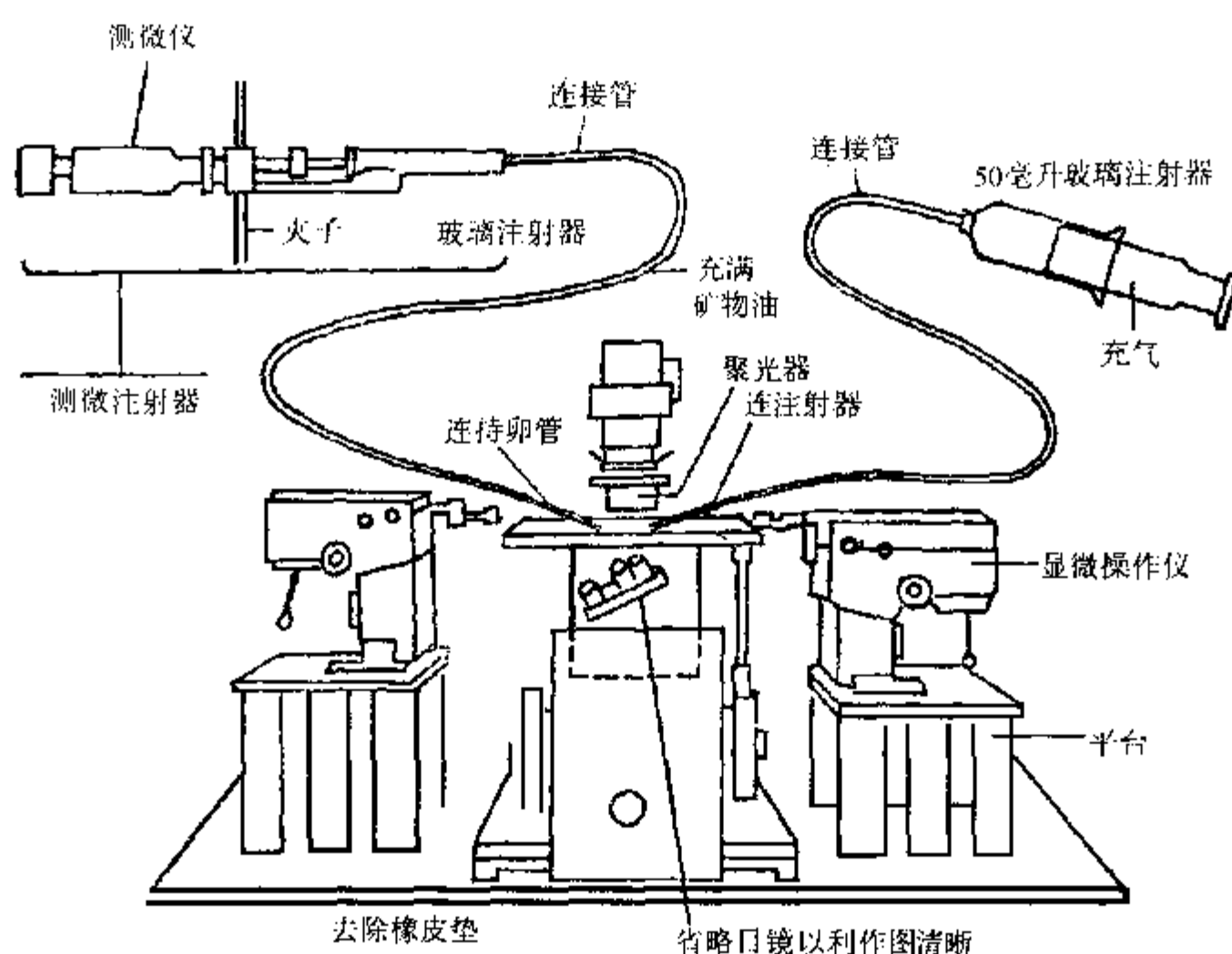


图 22-10 显微注射仪示意图

持卵管通过塑料管连接 1 个装满矿物油的带微调的注射器，通过调节压力可吹动或吸住卵。显微注射针一侧通过塑料管连接 1 支装矿物油的玻璃注射器，通过推注射器活塞加压作显微注射。近年来这一装置多改为连接有压力泵的注射仪。将注射时间与压力的参数固定后，每踩 1 次踏板即注射 1 次，重复性较好且省去手工操作。注射后仍维持一定压力以免培养液回流入注射针而稀释 DNA。如实验室无明显震动，整套设备可安放于普通桌上；如有震动则难于作精细操作，设备需置于防震桌上。整套设备最好购自在国内有分公司或代理商的同一厂家，以便配备与维修。

22.5.2 显微注射操作

倒置显微镜可配用培养皿 (Petri dish) 作注射槽，滴 1 大滴 M_2 培养液在培养皿中心，上面覆盖矿物油。液滴尽可能平滑以免增加曲面折射从而干扰操作。

(1) 将注射槽置于显微镜台上，用低倍目镜 ($4 \sim 10\times$) 聚焦在液滴底部。将持卵管从左侧插入液滴并调节使其与水平面成 $10 \sim 15^\circ$ 的角 (图 22-11)。

(2) 转移数个卵至注射槽，一般置于中线上部，用高倍镜检查以确定其原核可见。如未见原核，鼠卵可能未受精 (此时无第二极体)，或鼠卵刚刚受精原核尚未形成，或受精卵原核已裂解，卵将分裂成两细胞。如看到原核，将镜头转向低倍。

(3) 将注射针钝端插入 DNA 溶液，溶液将靠虹吸作用充满注射针头部。一般充盈部位距尖端数 mm 大致与颈平齐，此时溶液约 $0.5\mu\text{l}$ 。将注射针与注射器或注射压力泵接通，并连在右侧操作臂上。将注射针插入槽上的液滴内，注射针与平面约成 $5 \sim 10^\circ$ 的角 (图 22-11)。

(4) 检查注射针是否堵塞。在高倍镜下将注射针在同一水平上靠近 1 个卵，用力推注射器或启动压力泵，这样 DNA 液流将能使卵移动。如不能则需换一根针并重复以上操作，直至找到一根合适的。

(5) 移动持卵管使其靠近 1 个卵，增加负压使吸住卵。聚焦以显示原核。如原核位于注射针一侧，并靠近持卵管的中心轴，则较容易注射。如核远离中心轴注射时卵将旋转。必要时调节卵与持卵管的相

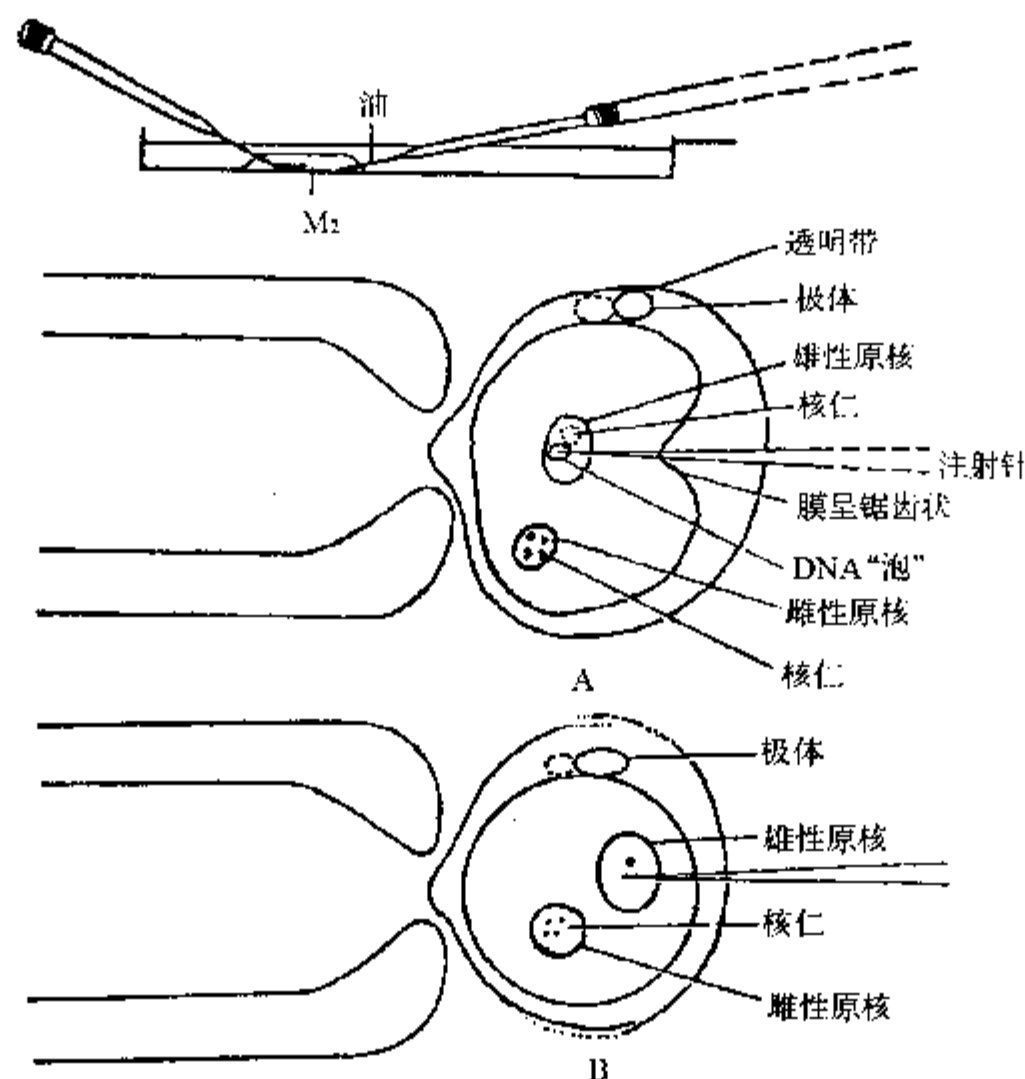


图 22-11 培替氏培养皿注射槽与向受精卵原核作微注射

A. 注射针使受精卵胞膜内陷但未能穿透

B. 成功的注射

对位置, 可将卵吹离, 略施压力使其轻微旋转, 在旋转至合适位置时再吸住。当相对位置合适后, 适当旋转注射器使负压略增以吸住卵。此时可见透明带被轻度吸向持卵管的开口部, 但卵本身形状不变。雌雄原核均可注射, 雄性原核通常较大且靠近细胞表面而较易注射。

(6) 重新对原核聚焦, 将注射针靠近卵, 用右侧显微操作仪上垂直控制旋钮调节注射针使其与卵在同一水平面上。如注射针连注射器, 注射前需先推活塞以吹出回流的培养液, 用压力泵则不需这一过程。将注射针通过透明带指向原核, 此时持卵管、注射针与卵均聚焦清晰。如卵移动或原核聚焦不清, 则不宜注射。继续向前推注射针使其进入原核, 注意因核仁特别粘, 注射针勿触及核仁以免粘着。当注射针进入原核后, 推注射器活塞或踩压力泵, 如原核明显胀大 (图 22-11B) 说明注射成功。如原核未膨胀, 可能是注射针堵塞或未刺破胞膜 (图 22-11A), 当加压时如看到 1 个小泡围绕注射针尖部, 即是注射针未刺破胞浆膜。膜的可塑性较大, 可在不被刺破的情况下推入卵内甚或核内。另一个征象是如注射针确实刺破胞膜, 在刺入部位注射针与膜大致垂直, 如膜未被刺破则呈锯齿状。当看到核明显膨胀说明 DNA 已注入, 这时迅速拔出注射针, 如拔针太慢, 常触及核内有形成分 (核膜或染色体), 可将核内容物一同拔出。

(7) 拔针后如看到细胞质颗粒一同流出, 这个卵可能要溶解。如卵保持完整, 将镜头转至低倍。将已注射的卵移至液滴中线下部, 再吸 1 个卵注射。同一注射针可连续反复使用。有下列情况之一者需更换注射针。①尽管原核清晰可见但注射针不能刺入原核; ②连续两个卵在注射后立即溶解; ③注射针尖部明显不干净或核内容物粘着在注射针上; ④注射针尖已断可看到开口 (直径大于 $1\mu\text{m}$); ⑤注射针已堵塞。平均每根注射针可注射 5~10 个卵。当注射槽的卵完全注射后, 将它们转入另一只含 M_{16} 的培养皿中, 置 37°C 二氧化碳孵箱。再转移一些未注射的卵到注射槽上。每次移到注射槽上的卵可供半小时

至1小时注射。如卵于室温置 M_2 溶液中时间太长则对其有害。

(8) 待所有的卵注射完毕, 将看起来健康的卵与溶解的卵分开。健康的卵在解剖镜下可见清晰轮廓, 且在透明带与卵之间有卵周隙。溶解的卵将充满全部透明带。一般 50% ~ 80% 的卵在注射后仍保持健康。这些卵可以对当天的假孕母鼠作输卵管移卵, 或体外培养过夜用发育成两细胞的卵对当日的假孕母鼠作输卵管移卵; 也可体外培养至胚泡期然后对第三日的假孕母鼠作子宫移卵。前两种方法产仔较多, 因这样避免了过长的体外培养。

22.6 卵的转移

从单细胞到囊胚的卵 (受精后 0.5 到 3.5 天), 可转移至假孕母鼠的生殖管道以完成发育。单细胞至桑椹胚的卵转移至受孕后 0.5 天的假孕母鼠的输卵管, 这种输卵管移卵仅适用于被透明带包裹的卵; 3.5 天的囊胚转移至受孕后 2.5 天的假孕母鼠子宫, 用于子宫移卵的卵不需有透明带 (图 22-3)。将卵转移至假孕母鼠的较早阶段是为了给卵以充足的时间使其赶上发育阶段。用上述两种方法转移未注射的卵, 其中 50% ~ 75% 可发育成胎鼠, 而转移注射过的卵可发育成胎鼠的约占 10% ~ 30%。一般转移足够的卵使每胎产 5 ~ 7 仔。如仅一、两个卵发育成胎鼠则胚胎过大易导致难产, 而产仔太少母鼠不予照料。如产仔过多其中一些可能长得太小, 最好对每只假孕母鼠转移 20 ~ 30 个已注射的卵。如所转移的卵注射了相同的 DNA, 两只卵受体假孕母鼠可置于同一笼内, 它们将所产的仔视为同一窝而一起照料。

22.6.1 输卵管移卵

(1) 初学者可以用死鼠练习, 也可转移染料或气泡以明确是否找到输卵管开口部。输卵管伞部的位置鼠间变异一般不大, 经过练习即可掌握。

(2) 将卵吸入移卵管。卵先移出二氧化碳孵箱, 并从 M_{16} 转入 M_2 。移卵管一般由 BDH 硬玻璃拉制而成, 前段较细部分长约 2 ~ 3cm, 其直径在 120 ~ 180 μm , 大于 1 个卵而小于两个卵。移卵管开口部需加热处理使平滑以尽量减少对输卵管的损伤。可先吸入矿物油充满前端较细部分再吸卵, 这样吸卵及转移时较易控制。吸卵前先吸 1 个气泡, 吸一段 M_2 , 再吸第二个气泡, 然后吸卵。吸卵时尽可能少吸 M_2 。吸卵毕再吸第三个气泡和少量 M_2 (图 22-12)。将移卵管平放于一个合适的架上, 待处理鼠以后使用, 其间不碰移卵管。

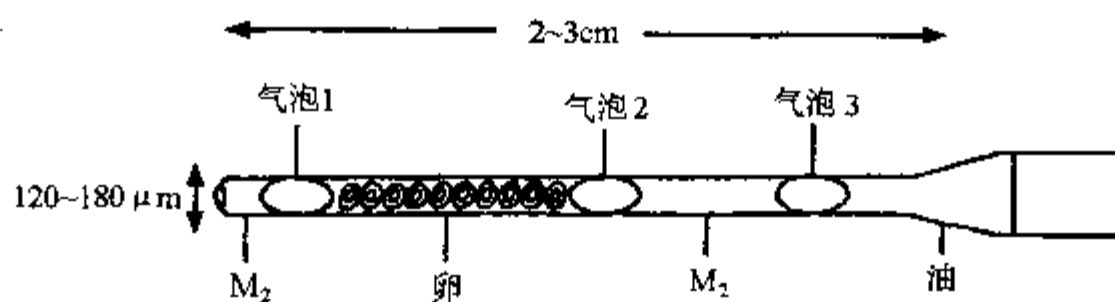


图 22-12 准备移卵管作输卵管移卵

(3) 移卵:

1) 金属器械用酒精烧灼消毒。剪去鼠体后部毛发, 用 70% 酒精消毒。用解剖剪剪开 1 个小口, 开口处位于脊柱左侧 1cm, 约与最后 1 根肋骨平齐。

2) 用镊子沿切口撕开皮肤肌肉, 透过腹膜可见卵巢 (桔黄色) 和/或脂肪垫 (白色)。然后用钟表镊在相当于卵巢上部的腹膜开 1 个小口。这时应尽可能避开血管以防出血。用外科缝合针在腹膜上穿一缝合线以便于其后腹膜固定。用无齿镊夹住脂肪垫并带出左侧的卵巢、输卵管与子宫。用脂肪夹 (或动

脉夹)夹住脂肪垫并将其放在鼠背后,这样卵巢与输卵管保留在腹膜外。

3) 鼠可于手术前即置于解剖镜(尼康 DIAPHOT DIC II)下,如打开腹膜后再移动,事先最好将鼠放在一只塑料盘上,一般头在左侧,脂肪垫翻向后,输卵管在显微视野中心(图 22-13)。

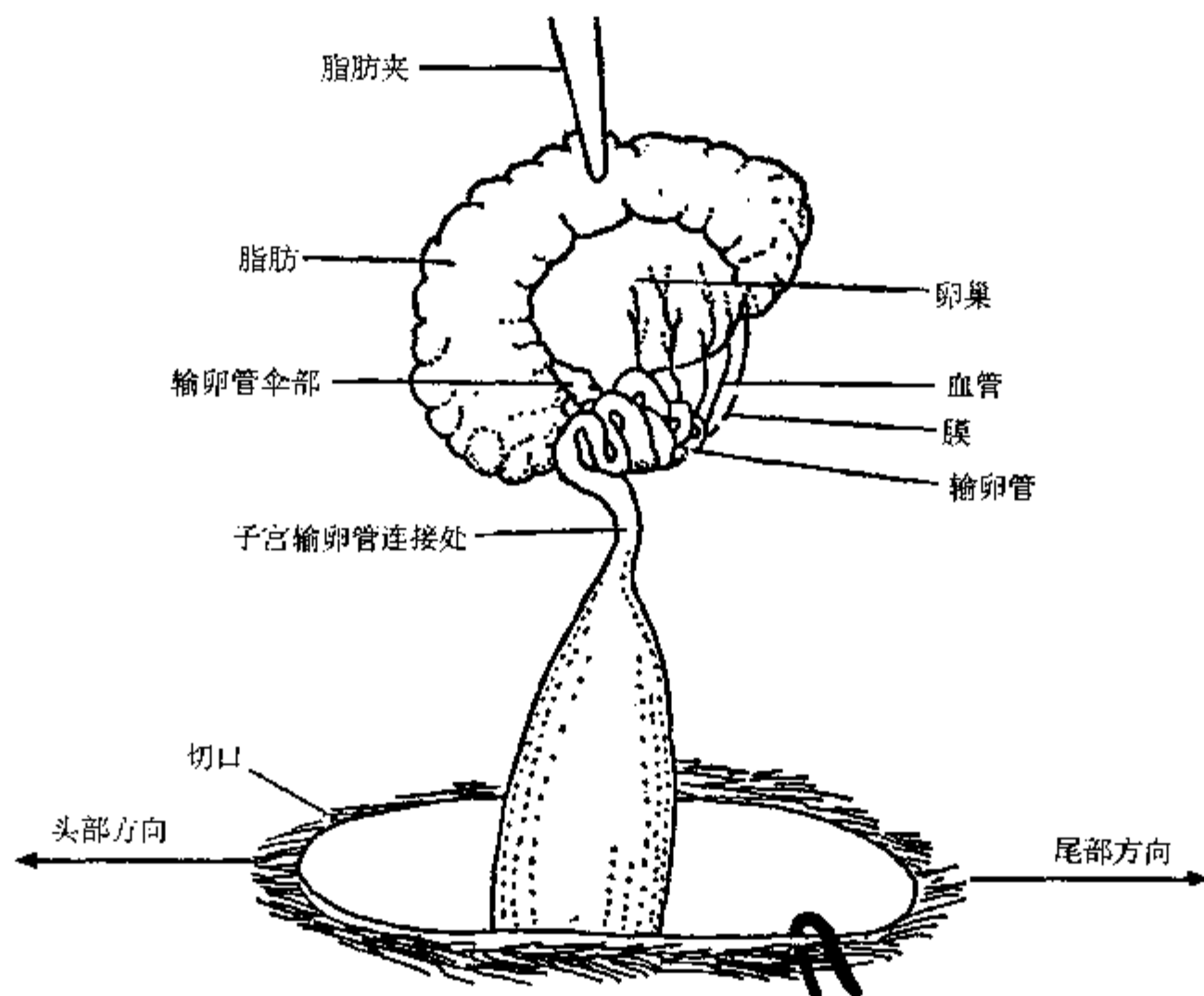


图 22-13 输卵管移卵中鼠的方位、手术切口及暴露组织

4) 在解剖镜下可见一透明膜覆盖输卵管,用两只钟表镊在相当于输卵管开口上部将透明膜打开一小口,尽可能避开血管以防出血。

5) 用钟表镊轻轻拨输卵管开口部并看清其走向,将移卵管从开口部插入输卵管,吹移卵管直至第二、第三个气泡进入壶腹部。将移卵管略停一下再拔出,以防气泡以至卵逸出。

6) 去除脂肪夹,用钝镊子夹住脂肪垫。带动卵巢、输卵管与子宫一并送回腹腔。可将腹膜缝一、两针,用损伤夹关腹腔。

可按上述方法将卵转移至右侧输卵管。

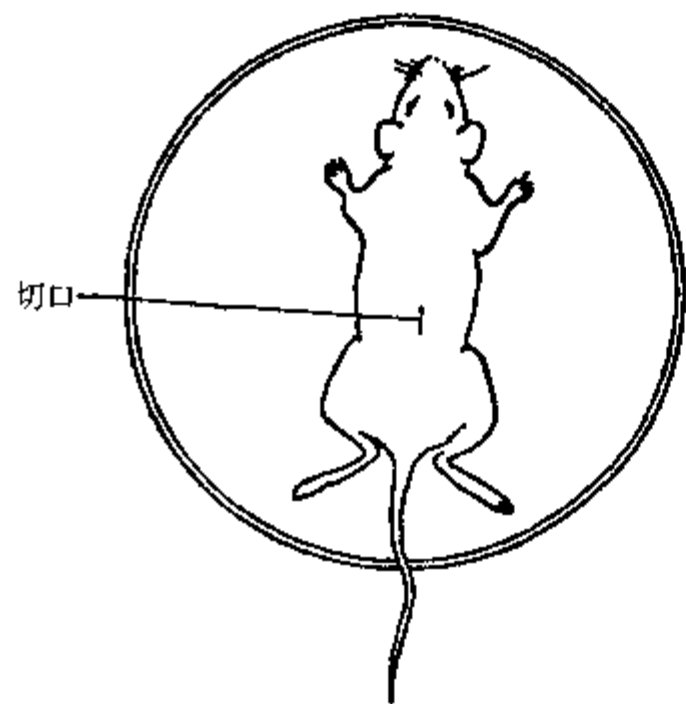


图 22-14 子宫移卵的切口位置

22.6.2 子宫移卵

(1) 手术器械准备、鼠麻醉同输卵管移卵。

(2) 用 70% 酒精将鼠后部消毒后,在背部相当于最下 1 根肋骨水平沿中线开 1 个纵行切口(图 22-14)。用酒精棉拭子擦去毛发。沿切口将肌肉撕开,通过腹膜可见卵巢与脂肪垫。用钟表镊夹起腹膜在相当于卵巢上部开 1 个小口,注意避开较大血管,将腹膜穿 1 根线以便于操作。

(3) 用脂肪夹夹住脂肪垫,连同卵巢、输卵管、子宫一

起拖出腹膜外。将鼠置于解剖镜下。

(4) 用巴士德吸管或 BDH 硬玻璃毛细管拉制移卵管，其直径约 $200\mu\text{m}$ ，火焰烧平开口边缘。在距开口端 1cm 处打弯，这样将便于掌握插入子宫的深度（图 22-15）。

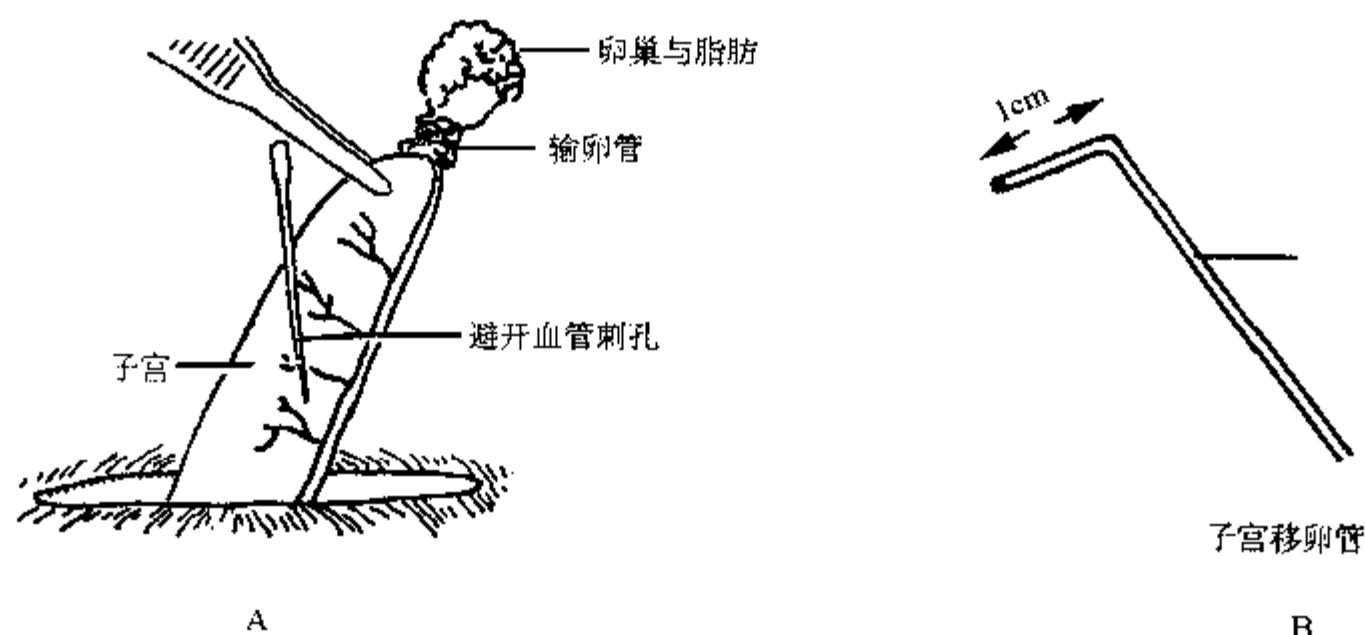


图 22-15 A. 子宫移卵暴露的组织及刺孔部位
B. 由巴士德吸管拉制的子宫移卵管

(5) 先用矿物油充盈子宫移卵管至肩部，依次吸 1 个气泡、少量 DMEM、第二个气泡、7~8 个胚泡（约 3/4 的胚泡可发育成鼠胚胎）。吸胚泡时尽可能少吸培养液。吸第三个气泡。将子宫移卵管水平放置，在作转移前不碰移卵管。

(6) 移卵：

1) 用细无齿镊轻轻夹住子宫上端，用 $5\frac{1}{2}$ 号针头或缝合针在距子宫上端数毫米处扎一个口，注意避开血管。要检查针头是否刺入管腔，可轻轻拔出再扎下，如来回轻松则说明已刺入。但不宜重复多次以防损伤子宫（图 22-15）。

2) 注意针刺的位置，拔出针，使子宫移卵管沿原针刺孔隙插入约 5mm，轻轻吹移卵管直至将第二个气泡吹入子宫。

3) 去除脂肪夹，用钝镊子夹住脂肪垫，连同子宫、输卵管及卵巢一起还回腹腔。腹膜缝一、两针，用损伤夹关腹腔。

可用上述方法将胚泡移入右侧子宫。

子宫移卵或输卵管移卵术后，将鼠放回笼内，置于温暖安静处，一般半小时可苏醒。

22.7 转基因鼠系的建立

假孕母鼠产出幼仔后，可用幼鼠尾巴提取 DNA。对于一些基因调控研究，需要尽快获得信息而暂不需保留转基因鼠，亦可取鼠胚胎提取 DNA。如取鼠胚胎只需简单编号即可，一般在转移基因后标阿拉伯数字；而对于取过尾巴的幼鼠，除编号外，尚需对幼鼠作印记，一般是在耳朵上打眼或做缺口。

22.7.1 取鼠胚胎

(1) 用引颈法将怀孕母鼠处死，以 70% 酒精喷洗全身。

(2) 打开腹腔，可见子宫内胎鼠。从子宫两端剪断，将胎鼠放在置于冰上的平皿内。

(3) 剪下 1 个胎鼠置小平皿内, 小心剥去胎衣。可剪开胎鼠, 按需要取不同组织。

(4) 一般用臀部肌肉提 DNA。供作 RNA 的组织需立即冻存, 可先置干冰上, 然后放入 -70°C 冰箱或液氮内。待转基因鼠确定后, 再取相对应的胎鼠组织制备 RNA。

22.7.2 从胎鼠肌肉或幼鼠尾巴提取大分子量 DNA

取 2 周胎鼠 1 侧臀部肌肉或 2~3 周幼鼠的 1.5~2cm 尾巴, 用下述方法可提取 50~200 μg DNA。

(1) 将胎鼠肌肉或幼鼠尾巴置 5ml 试管内, 用剪刀剪碎组织。

(2) 加入 1ml 裂解液 (50mmol/L Tris, pH8.0, 100mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl, 1% SDS), 100 μl 蛋白酶 K (100mg/ml)。

(3) 将试管置 55°C 水浴过夜 (8~18 小时), 最好带摇床, 亦可间歇震荡。

(4) 待消化完毕, 加 40 μl RNase (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 于 37°C 放 1~2 小时。

(5) 以下依次用酚、氯仿异戊醇 (24:1) 抽提, 酒精沉淀, 溶解于 10:1 TE 缓冲液, 紫外比色检测。所得大分子量 DNA 供作 Southern blot 用。

22.7.3 转基因鼠中外源 DNA 的分析

从胎鼠组织或幼鼠尾巴提取的 DNA, 可用 PCR (聚合酶链反应)、Dot blot (斑点杂交)、Southern blot (Southern 转移) 等多种方法分析以确定是否转基因鼠。PCR 与 Dot blot 可较快地提供信息, 但 PCR 易有假阳性, Dot blot 在基因拷贝数低或嵌合体时易有假阴性。Southern blot 可给出一定长度的区带, 不仅提供了外源 DNA 结构与整合的信息, 同时可克服上述方法所造成的假阳性或假阴性。一般用 Southern blot 的结果作结论。所用探针需高度特异。

因转基因鼠中外源 DNA 整合部位是随机的, 且常常是首尾相连的多拷贝, 一般选择在注射的 DNA 中仅有单切点的内切酶, 这样 Southern blot 产生的区带长度与注射 DNA 长度相同。同时应注意如外源 DNA 整合为单拷贝, 则产生两个新的区带; 如整合为多拷贝, 可有两个较淡的新区带, 是由整合的外源 DNA 两端产生。上述两种情况产生的新区带长度, 取决于外源 DNA 整合部位两侧的鼠染色体 DNA 上该内切酶切点的位置。是否有两个新的区带, 还需看探针覆盖外源 DNA 的区间。当外源 DNA 单拷贝整合时, 如需确定整合基因是否完整, 可选择靠近该基因两端且仅有单切点的两种内切酶或靠近两端每端有单切点的同一内切酶。这样所得区带的长度与注射的 DNA 接近。

要确定外源基因整合的拷贝数, 需用外源 DNA 本来所在的染色体 DNA 作对照。对照 DNA 与样品 DNA 需完全去除 RNA 再作紫外比色。选用的内切酶需使两种 DNA 的 Southern 区带长度接近, 如样品 DNA 选择单切点, 对照 DNA 则选择两端点的切点。如遇高拷贝或嵌合体需重复 Southern blot。高拷贝时可稀释样品 DNA, 嵌合体时可增加样品 DNA 量或稀释对照 DNA, 使得结果具可比性。增加 DNA 量不宜过大, 否则区带扭曲。可对区带扫描, 也可在冲片后切下区带相应位置的膜或凝胶, 洗脱后作液闪计数。

由显微注射的卵发育成的转基因鼠称为首建 (founder) 转基因鼠。有时首建转基因鼠会在两个部位整合外源 DNA, 可用中间染色体涂片的原位杂交法直接检出, 也可用传代转基因鼠的分析检出, 因两个位点将分离。因不同的整合位点含有不同拷贝数的外源 DNA, 传代转基因鼠不同拷贝数的遗传常提供首建转基因鼠不同整合位点的第一证据。另外每个整合部位将产生其连接片段, 传代转基因鼠这种不同的连接片段的现象也可分离。

22.7.4 转基因鼠系

首建转基因鼠确定后, 即用之交配以建立转基因鼠系。对于雌性首建者可待其交配后产仔; 对于雄性首建者可使之先后与多只母鼠交配。一般分析幼仔确系转基因鼠后, 再将首建者用作分析。大部分首

建者的下一代 50% 含外源基因, 约 20% 的首建者为嵌合体, 其将外源基因传给下一代的频率仅为 5% ~ 10%。同时一部分有精栓的母鼠不怀孕。

如首建者由纯系产生, 可用相同种系交配以维持其遗传背景; 如首建者是 F2 杂交体, 或无需维持纯系, 可用 F1 杂交体与首建者交配。

纯合子转基因鼠可用两个相同杂合子交配而获得, 在群体中可得到 1/4 纯合子, 1/2 杂合子与 1/4 非转基因鼠, 5% ~ 15% 转基因鼠其 DNA 整合产生隐性致死突变, 因此这类转基因鼠系难以用纯合子维持。

22.8 卵培养液的配制与保存

22.8.1 配制 M_2 与 M_{16} 培养液的贮存液

表 22-4 配制 M_2 与 M_{16} 培养液的贮存液

贮存液与浓度	成 分	体 积 (ml)	克 数
A 10 ×		100	
	NaCl		5.534
	KCl		0.356
	KH_2PO_4		0.162
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$		0.293
	乳酸钠		2.610
			或 4.349g60% 的浆
	葡萄糖		1.000
	青霉素		0.060
	链霉素		0.050
B 10 ×		100	
	$NaHCO_3$		2.101
C 100 ×	酚红	10	0.010
	丙酮酸钠		0.036
D 100 ×		10	
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$		0.252
E 10 ×		100	
	HEPES		5.958
	酚红		0.010

配制方法:

(1) 贮存液 A: 用 50ml 的一次性塑料刻度管称量乳酸钠或其 60% 的浆, 将称量的其余试剂均倾入其中。

(2) 贮存液 B: 试剂称量后倾入 50ml 一次性塑料刻度管。

(3) 贮存液 C、D: 试剂称量后分别倾入 15ml 一次性塑料刻度管。

(4) 贮存液 E: 试剂称量后倾入 50ml 一次性塑料刻度管。加 10ml 双蒸水使溶。用 0.2mol/L NaOH 调 pH 至 7.4。

对上述 15ml 塑料管加双蒸水至 10ml, 分别用 0.2 μ m 的滤器过滤; 对 50ml 塑料管, 加水至 50ml, 分别过滤, 用 50ml 双蒸水洗塑料管再过滤。

上述贮存液, 分装后置 -20℃, 可贮存半年以上。每种贮存液的分装体积, 最好与每次使用的体积相同, 以避免反复冻融并省去每次配制时的吸量。

22.8.2 由贮存液配制 M_2

贮存液	M_2 工作液 (单位 ml)		
	10	50	100
A (10×)	1.0	5.0	10.0
B (10×)	0.16	0.8	1.6
C (100×)	0.10	0.5	1.0
D (100×)	0.10	0.5	1.0
E (10×)	0.84	4.2	8.4
BSA	40mg	200mg	400mg
双蒸水	7.80	39.0	78.0

取出冻存的所需体积的每种溶液, 室温下待融。将融化液体倾入 50ml 一次性塑料刻度管。量所需体积双蒸水, 洗贮存液管并倾入塑料管, 使体积至约 40ml。加入 BSA 待其缓缓溶解。此溶液过滤后, 再将剩余的水洗塑料管过滤, 混匀过滤液。

M_2 于 4℃ 贮存可使用 2 周。

22.8.3 由贮存液配制 M_{16}

贮存液	M_{16} 工作液 (单位 ml)		
	10	50	100
A (10×)	1.0	5.0	10
B (10×)	1.0	5.0	10
C (100×)	0.1	0.5	1
D (100×)	0.1	0.5	1
BSA	40mg	200mg	400mg
双蒸水	7.8	39.0	78.0

配制方法与 M_2 基本相同。在加 BSA 之前可将溶液置 CO_2 孵箱内约 15 分钟以使 pH 达 7.4。过滤后置 CO_2 孵箱半分钟然后盖紧瓶盖使 pH 维持在 7.2~7.4。

M_{16} 于 4℃ 保存可使用 2 周。

22.9 转基因动物的应用

22.9.1 基因表达调控

基因表达调控, 是一个动态的开放系统, 它具有系统的基本特征, 尤其是系统的整体性与独立性。正常基因的诸要素总是按适时适量表达终产物的目的构成独立的整体并发挥作用。已有多种基因转移与表达的方法研究基因调控, 只有转基因动物实验既能从分子水平上设计, 又能包括影响调控的诸因素, 以调控系统的各基本特征为线索, 从四维时空观察基因调控的整体效应, 因此用转基因动物研究基因表达调控具有广阔的前景。

用转基因动物研究基因表达调控, 采用的方法有单基因调节系统 (single - gene regul - atory system, SGRS)、多基因调节系统 (multiplex - gene regulatory system, MGRS)、与基因删除系统 (gene knock out sys-

tem, GKOS)。

22.9.1.1 单基因调节系统

用单基因调节系统研究基因调控,即采用单基因作为转移基因,观察转基因的表达水平与基因表达产物所产生的生理效应,以探讨转移基因的调控机制。转移基因可采用自然基因(natural genes)与融合基因(fusion genes)。自然基因即转移基因的基本结构处于未加修饰的自然状态,对自然基因表达特点的了解,可作为融合基因研究的对照。在自然基因研究的基础上,将目的基因的一些结构与其它来源基因的一些结构重组成具有表达功能的融合基因。探讨融合基因转基因鼠的表达调控规律。根据实验需要融合基因可采用多种形式重组:①替换目的基因的启动子或增强子,用已知功能特征的启动子启动目的基因的编码顺序,或用增强子增加目的基因的表达,可以确定与目的基因的特异性表达有关的顺式调节序列的存在部位;②替换目的基因的编码顺序,采用表达不具有组织特异性与发育阶段特异性且易于检测的基因编码顺序取代目的基因编码顺序,可以探讨目的基因启动子、增强子等调节顺序的功能。一般将所采用的编码基因称为报告基因(report gene)。单基因调节系统简单有效,已广泛应用于基因调控研究中,已揭示基因表达的组织特异性、发育阶段特异性及一些特殊表达的调控规律。

1. 组织特异性表达与发育阶段特异性表达:

将兔骨骼肌肌凝蛋白轻链(MLC₂)基因与鼠重排的免疫球蛋白κ轻链基因重组使结构上紧密相连且方向相同,两种基因在重组基因的转基因鼠中仍保持各自自然状态的表达,免疫球蛋白基因在淋巴组织特异表达,而兔MLC₂基因只在骨骼肌表达。另一些转基因鼠携带兔MLC₂基因和兔骨骼肌肌动蛋白与珠蛋白的嵌合基因,MLC₂基因仅在骨骼肌表达,肌动蛋白与珠蛋白嵌合基因在骨骼肌与心脏均表达。同时嵌合基因的表达也受发育调控,在新生鼠的心肌表达较高而在成年鼠的骨骼肌表达较高。两种转基因在结构上紧密相连并整合在染色体的同一部位,仍保持其表达的组织特异性与发育阶段的特异性。这些结果也说明克隆基因片段中含有必要而充分的自主调节成分,单一的染色体位点允许两种具有不同的组织特异性基因的适宜表达。

转基因动物不仅能体现一些基因表达的绝对组织特异性,也能体现一些基因表达的相对特异性或组织分布。人生长激素释放因子(hGRF)基因与金属硫蛋白启动子的转基因鼠,在循环血液中显示高水平的hGRF与生长激素(GH)的表达且超速生长。从不同组织中hGRF的免疫反应性看,高表达的组织是垂体与胰腺,中水平表达的是下丘脑与肝脏,低水平表达在内脏器官、心脏与性腺。垂体和下丘脑含有两种成熟的激素类型[hGRF(1-44)-NH₂与hGRF(1-40)-OH]及一种大分子量的前体;胰腺与其它内脏与此类似但hGRF(1-40)-OH含量很少;在肝脏与血浆中均不存在成熟的激素类型与hGRF的主要代谢产物hGRF(3-44)-NH₂。激素前体、成熟类型与主要代谢产物的组织分布与分子异质性,说明了hGRF前体不同加工过程的组织特异性。

转基因动物亦用于寻找目的基因组织特异性增强子及探讨其作用机制的研究中。完整的β-珠蛋白基因在转移细胞和转基因动物中均低水平表达,说明结构基因与近距离旁侧序列不足以使珠蛋白基因产生适宜水平的表达。Grosveld以β-基因簇5'端有数个DNaseI高敏位点(HS)为线索,用含HS的21kb的DNA片段与β-珠蛋白基因重组,在重组体的转基因鼠中,β-珠蛋白基因呈现红系特异性高表达,表达水平与拷贝数相关而与整合部位无关。单一HS与β-基因重组体的转基因动物实验说明,单一的HSⅡ即有红系特异增强子作用。HSⅡ含有两个NFE-2/AP₁蛋白结合位点,将HSⅡ的不同部分与β-基因重组,凡含NFE-2/AP₁位点的片段均有红系特异增强子作用,将含NFE-2/AP₁位点的区域缺失67bp,增强子活性丧失这些结果说明HSⅡ是最重要的红系特异增强子,NFE-2/AP₁位点是其关键作用部位。

珠蛋白基因的表达还具有发育阶段的特异性,其作用机制的探讨主要也是采用转基因动物实验,β-基因簇的ε-基因、Aγ-基因与α-基因簇的ζ-基因分别与红系特异增强子的位点控制区域(LCR)

的重组体在转基因鼠中呈现正常的发育调控, 这些基因在胚胎期开启表达而在成年期终止表达, 同时在成年期 γ -基因自发终止表达, 这提示它受控于一个不被 LCR 所拮抗的负调机制, 已鉴定出位于 ϵ -基因 5'端的沉默子, 由这一实验结果提出珠蛋白基因发育调控的自发性 (autonomous) 模型。另一些实验结果显示, 单纯 γ -或 β -基因在转基因鼠中低水平表达但保持合适的发育调控, LCR- γ 或 LCR- β 重组体以较高水平表达但丧失发育阶段的特异性, 而 LCR- γ - β 重组体在转基因鼠中保持正确的发育调控, 这些结果提示 γ -、 β -基因与 LCR 竞争性结合。在这一实验基础上提出珠蛋白基因发育调控的竞争性 (competition) 模型。在另一类转珠蛋白基因鼠实验中, 将重组体中珠蛋白基因的顺序重新排列。结果表明, LCR- γ - β 重组体中 β 基因的表达保持正常的发育阶段的特异性, 而 LCR- β - γ 重组体, β -基因在胚胎卵黄囊细胞即被活化, 这提示珠蛋白基因在染色体上的排列顺序决定基因与 LCR 相互作用的频率, 基因与 LCR 距离越近相互作用频率越高即在发育阶段早期表达, 这同时也抑制远距离基因在较后阶段的激活, 由沉默子在适当的时候使近距离基因失活。由上述结果提出珠蛋白基因发育调控的非往复性竞争性 (nonreciprocal competition) 模型。上述 3 种模型的提出都建立在转珠蛋白基因动物实验结果的基础上, 其中非往复性竞争性模型较全面、系统地总结有关实验结果。

对珠蛋白基因组织特异性表达的研究, 体现出系统结构的层次性与结构功能的专一性; 对不同发育阶段特异性表达的研究, 体现出系统演化的目的性与系统要素的相干性。所有这些都建立在从分子水平上设计实验, 从四维时空观察转珠蛋白基因动物整体效应的实验结果的基础上。转珠蛋白基因动物实验将用于研究 α -与 β -两个基因簇表达的协调机制, 这将从更高的层次反映系统的基本特征。

2. 可诱导表达与特殊表达:

环境中的某些因子可诱导一些转基因的表达显著升高, 如小鼠金属硫蛋白基因-1 启动子/胸苷激酶结构基因 (mMT-1/TK) 在肝中受钙离子或脂多糖的诱导; mMT-1/人生长激素基因 (mMT-1/hGH) 在肝中受锌或糖皮质激素的诱导; 转铁蛋白基因在肝中受雌激素的诱导; 胰岛素基因在胰岛 β 细胞中受葡萄糖或氨基酸的诱导。基因表达的组织特异性和诱导物的关系同生理状态下情形一致。环境诱导物可能以直接或间接的方式激活细胞内某种 DNA 结合蛋白, 使得转录活动明显提高。

特殊表达指转基因的表达不是自身的特征, 而是由实验因素对它的影响产生, 常见的有以下几种情况:

(1) 在非特异性组织内表达: Lacy 曾观察到具有红系组织特异性的 β 珠蛋白基因在一只转基因鼠的肌肉和另一只转基因鼠的睾丸内表达。Swift 等也曾发现小鼠弹性蛋白酶 I 基因在一些不适当的组织内表达。转基因在非特异性组织内低水平表达可能是由于转移基因整合到一些内源性增强子附近, 使其受到部分激活所致。

(2) 在正常组织内不表达或低水平表达: 首先必须考虑供注射的 DNA 是否已去除原核载体顺序 (见 DNA 影响基因转移因素一节)。如已去除, 则需考虑转基因是否含有必要而充分的调控序列, 包括启动子与增强子。对于相同的转移基因, 一部分转基因鼠在正常组织内适宜表达, 而另一些低水平表达甚至不表达, 则有可能是染色体位置效应或甲基化。外源基因在转基因鼠细胞染色体 DNA 上的整合是随机的, 如转基因整合部位紧靠一个负调序列, 则可使其低水平表达或不表达。Raya 等对主要尿蛋白基因启动子与 HSV-tk 基因编码顺序的融合基因的转基因鼠 DNA 构建文库并筛选出转移的融合基因, 再用这种基因作成转基因鼠。结果发现, 同样的基因, 一些在初级转基因鼠中不能表达, 在次级转基因鼠中却能正常表达, 说明转基因的表达与染色体位置效应密切相关。基因的甲基化状态影响其表达, 如转基因在受体细胞中被甲基化, 其表达功能降低甚至丧失。对这种由于甲基化作用使表达受抑制的基因, 可用去甲基化试剂 (5-氮胞苷等) 处理活体转基因动物, 2~3 周后, 动物 DNA (包括转基因) 甲基化程度降低, 可检测到转基因表达升高。药物作用是一过性的, 作用消失后, DNA 甲基化程度与表达受抑制状态仍如处理前。

22.9.1.2 多基因调节系统

多基因调节系统是指在转基因鼠内, 目的基因的表达需要另外一种或多种转基因的表达产物的激活后才能表达, 由综合效应探讨目的基因表达调控机制的实验体系。Byrne 等注意到单纯疱疹病毒 (HSV) 在感染过程中, 它的最早期基因 (immediate-early genes, IEgenes) 启动子的活动需要一个叫做 VP16 病毒颗粒多肽 (viron peptide) 反式激活, 他们将 HSV 的 IE 基因的启动子与报告基因 CAT 的编码顺序组成融合基因 IE-CAT, 同时将小鼠神经丝 (neurofilament, NFT) 基因的启动子与 VP16 基因的编码顺序重组组成融合基因 NFT-VP16, 分别制备这两个融合基因的转基因鼠, 让两种品系杂交得到带有两种转基因的 (IE-CAT ~ NFT-VP16) 子代个体。IE-CAT 与杂交子代转基因鼠中 CAT 表达检测结果表明, 在 IE-CAT 转基因鼠的各种组织中 CAT 基因不表达, 杂交子 1 代转基因鼠中脑和脊髓组织有较高水平的 CAT 表达, 这一结果证明了 VP16 多肽的反式激活作用。其连锁作用机制如图 22-16 所示。

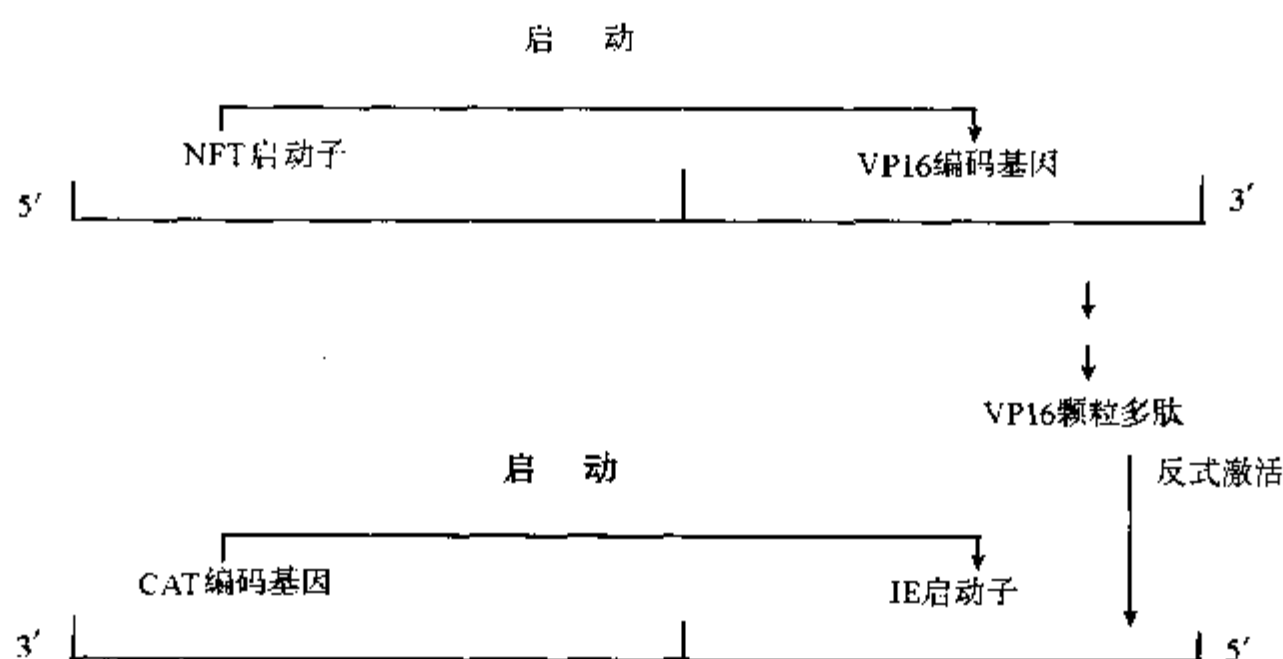


图 22-16 VP16 多肽反式激活 IE-CAT 的作用示意图

22.9.1.3 基因删除系统

基因删除系统是采用同源重组的方法, 用突变的基因删除 (取代) 相应的正常基因, 或用正常基因删除相应的突变基因, 由表达水平或转基因动物的表现型研究正常基因的功能和突变部位的作用。

基因转移的同源重组自然发生率极低, 约为 10^{-6} (百万分之一), 已有多种方法可提高同源重组率, 其中 Mansaur 等设计的正负选择系统适用范围宽且效率较高, 其基本方法如图 22-17 所示, 构建含有一段与靶基因同源顺序 (10~15kb) 的载体, 该同源顺序的 1 个外显子内插有新霉素抗性基因 (NEO) 作为正选择的标志, 在同源顺序的 3'端插有不带启动子的疱疹病毒胸苷激酶 (HSV-tk) 基因的顺序作为负选择, HSV-tk 基因由邻近的 NEO 基因启动子调节。用电转移 (Electroporation) 法将重组体导入胚胎干细胞, 继续作体外培养, 并以 G418 和 GANC 作双重筛选。因随机插入的 DNA 通常以从头至尾整合入受体细胞 DNA 中, HSV-tk⁺ 基因产物可使 GANC 转变成一种有毒物质使细胞死亡。如果发生同源重组, 由于 tk 基因在同源区之外不能整合, neo^r 基因在同源区之内得以保留, 这样受体细胞抗 G418 有正选择作用, 对 GANC 无转变功能而没有负选择作用, 因此认为存活的细胞是与导入基因发生同源重组的。

采用同源重组技术已对多种基因的表达调控机制进行探讨, 研究较多的是同源基因、癌基因与抗癌基因。Donebower 等用同源重组建立的转基因动物模型研究 p53 基因在哺乳动物发育与肿瘤形成中的作用。对鼠胚胎干细胞同源重组以产生无意义的等位基因。嵌合体鼠生殖细胞含有突变的 p53 等位基因。含突变基因的纯合子鼠能成活且外观完全正常, 在 6 个月之前易于自发产生不同类型的肿瘤, 尤其是淋巴瘤与肉瘤, 携带单个野生型 p53 等位基因的杂合子在 9 个月以前极少自发形成肿瘤。结果表明, 鼠的发育并不需要正常的 p53 基因, 缺失正常的 p53 基因使鼠有产生多种肿瘤的倾向, 在肿瘤形成中不需要

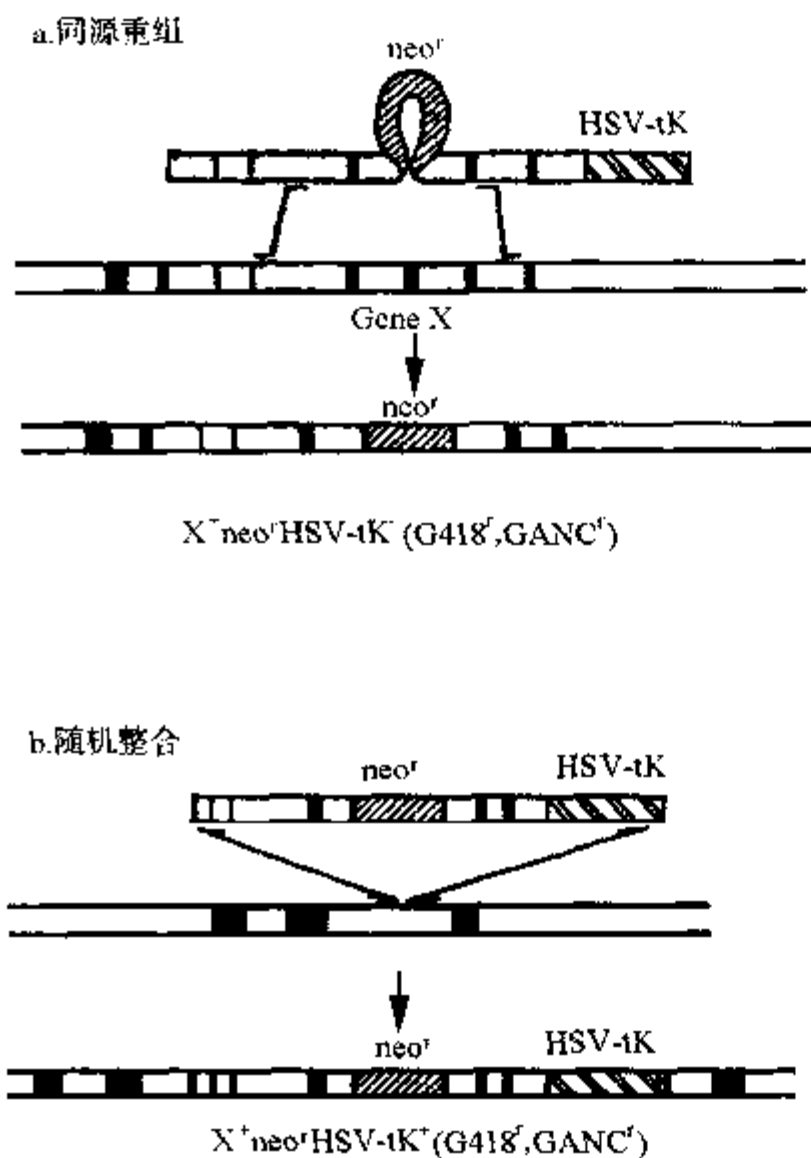


图 22-17 正负选择系统, 用以筛选含定位导入基因的胚胎干细胞

neo^r, 新霉素抗性基因; *HSV-tk*, 疱疹病毒胸苷激酶基因; *GeneX*, 干细胞内源基因 (与导入基因同源); *G418^r*, 新霉素; *GANC^r*, 抗致死的核苷类似物 *GANC*; *GANC^r*, 核苷类似物参与合成, 细胞致死。

丢失的热敏感性与皮肤溃疡恢复正常, 支配足掌皮肤外周神经肽免疫程度增加。*P75 NGFR* 基因的突变不改变交感神经节的长度, 不降低虹膜与唾液腺交感神经支配的强度。结果表明 *P75 NGFR* 在发育与外周神经系统功能上起重要作用。在癌基因研究中, *N-myc* 编码的转录因子被认为在哺乳动物胚胎形成不同阶段的分化调控中起作用。用基因打靶的方法在胚胎干细胞产生渗漏突变 (leaky mutation)。将 *NEO* 基因插入 *N-myc* 基因的第二个内含子, 这样插入使转录的 RNA 的不同剪接可产生正常的 *N-myc* 转录本和突变的转录体。突变的纯合子鼠因组织不能氧合于出生后即死亡。组织学检查显示肺泡上皮发育障碍呼吸道表面积降低。野生型的 *N-myc* 基因与突变型纯合子基因在胚胎肺的表达分析提示, 肺明显缺陷, 导致上皮增生需要 *N-myc* 基因以应答从肺间质发出的局部诱导信号。纯合子胚胎较正常胚胎略小仅脾脏明显减小, 其它正常表达 *N-myc* 的组织似乎未受突变的影响。在纯合子突变鼠的一些组织中检测到正常 *N-myc* 的转录体。与野生型胚胎相比, 突变体不同组织中表达的正常 *N-myc* 转录体水平不同, 在肺的表达水平最低。这一研究表明基因打靶能在给定的位点产生等位基因系列和部分功能丧失的突变, 由此可阐述基因在发育过程中的不同功能。

与家畜遗传育种相关的转基因动物, 第一个当推人类生长激素的转基因巨鼠。其主要目的是使转基因动物的性状 (表型) 更适合人类的需要。除转基因鼠外, 目前已得到兔、羊、猪、鱼的转基因动物。其中转基因鱼是国内首创的。

特异的“致癌突变”。

22.9.2 转基因动物模型

转基因动物模型大致可分为两类, 一类是人类疾病相关基因的转基因动物模型, 另一类是与家畜遗传育种相关的转基因动物模型。

功能性重排的小鼠免疫球蛋白 (*Ig*) κ 基因的转基因鼠实验结果表明, 不管转移基因的整合位点如何, 在连续传代中都能得到稳定的表达, 这提示重排的 *Ig* 基因包含了组织特异性表达所需的所有信息。导入的轻链或重链基因的表达可能通过反馈途径干扰 *Ig* 基因的进一步重排。同一转基因鼠整合了鸡和兔 *Ig* 基因, 结果表达了杂交的 *Ig* 分子, 提示产生种间单克隆抗体的可能性。

用多瘤病毒中的 T 抗原基因与早期调节顺序的重组体的转基因鼠, 其血管内皮产生多发性肿瘤, 可能是多瘤病毒中的 T 抗原破坏 T 细胞对血管生长的正常控制机制。DNA 肿瘤病毒 PBV 的转基因动物产生了皮肤癌, T 细胞白血病病毒转基因鼠产生了神经纤维瘤。

近年来用同源重组的方法使体外培养的胚胎干细胞定点突变, 已建立多种基因突变型的转基因动物模型。采用定点突变的方法制备编码低亲和力神经生长因子受体 (*NGFR*) 基因 *P75* 定点突变的转基因鼠。纯合子突变鼠可存活并有生殖能力。突变鼠的外周神经支配能力显著降低, 伴随热敏感丧失与进行性远端肢体溃疡, 并发细菌感染与毛发脱落。这种定点突变鼠与人 *P75 NGFR* 转基因鼠的杂交子 1 代转基因鼠, 丧

22.9.3 用转基因动物生产生物活性物质与药物

用转基因动物生产生物活性物质与药物,已展示出很好的应用前景。本书“绪论”已有较多介绍,不再赘述。

(刘德培 文 梁植权 审)

参 考 文 献

1. Hogan BF·Manipulating the mouse embryo, a lab manual·Cold Spring Harbor Lab·1986
2. Palmiter RD·Transgenic mice·Cell, 1985, 41:343
3. Putten HVD·Efficient insertion of genes into the mouse germ line via retroviral vectors·Proc Natl Acad Sci USA·1985, 82:6148
4. Botteri FM·Recombinant retroviruses in transgenic mice·Ann NY Acad Sci, 1986, 478:255
5. Lavitrano M·Sperm cell as vectors for introducing foreign DNA into eggs: Genetic transformation of mice·Cell, 1989, 57:717
6. Barinaga M·Making transgenic mice: Is it really that easy?·Science, 1989, 245:590
7. Brinter RL·Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs·Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82:4438
8. Frohman LA·Tissue distribution and molecular heterogeneity of human growth hormone - Releasing factor in the transgenic mouse·Endocrinology, 1990, 127:2149
9. Grosfeld F·Position - independent, high - level expression of the human β - globin gene in transgenic mice·Cell, 1987, 51:975
10. Curtin PT·Human β - globin gene expression in transgenic mice is enhanced by a distant DNase I hypersensitive site·Proc Natl Acad Sci, USA, 1989, 86:7082
11. Ryan TM·High - level erythroid expression of human α - globin genes in transgenic mice·Proc Natl Acad Sci, USA, 1989, 86:37
12. Raich N·Autonomous developmental control of human embryonic globin gene switching in transgenic mice·Science, 1990, 250:1147
13. Cao SX·Identification of a transcriptional silencer in the 5' - flanking region of the human ϵ - globin gene·Proc Natl Acad Sci, USA, 1989, 86:5306
14. Enver T·Developmental regulation of human fetal - to - adult globin gene switching in transgenic mice·Nature, 1990, 344:309
15. Behringer RR·Human γ - to β - globin gene switching in transgenic mice·Genes & Dev, 1990, 4:380
16. Hanscombe O·Importance of globin gene order for correct developmental expression·Genes & Dev, 1991, 5:1387
17. Araki K·Demethylation by 5 - azacytidine results in the expression of hepatitis B virus surface antigen in transgenic mice·Jpn J Cancer Res, 1989, 80:295
18. Byrne GM·Multiplex gene regulation in transgenic mice·Proc Natl Acad Sci, USA, 1989, 86:5473
19. Mansour SL·Disruption of the proto - oncogene int - 2 in mouse embryo - derived stem cells: A general strategy for targeting mutations to non - selectable gene·Nature, 1988, 336:348
20. Bucchini D·Rearrangement of a chicken immunoglobulin gene occurs in the lymphoid lineage of transgenic mice·Nature, 1987, 326:409
21. Baugh VL·Endothelial cell tumors develop in transgenic mice carrying polyoma virus middle T oncogene·Cell, 1987, 51:529
22. Mahon KA·Prenatal lethality in a transgenic mouse line is the result of a chromosomal translocation·Proc Natl Acad Sci, USA, 1988, 85:1165
23. Jaenisch R·Transgenic animals·Science, 1989, 240:1468
24. Lee KF·Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor P75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system·Cell, 1992, 69:737
25. Moens CB·A targeted mutation reveals a role for N - myc in branching morphogenesis in the embryonic mouse lung·Genes & Dev, 1992, 6:691
26. Palmiter RD·Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein - growth hormone fusion genes·Nature, 1982
27. 朱作言·转基因鱼模型的建立·中国科学 B 辑, 1989, 2:147

23. 转基因植物

植物遗传转化是将外源基因导入植物细胞, 经过组织培养将细胞培养成植株, 并且导入的基因在植物体内能够稳定表达和遗传; 这样的植物称为转基因植物。建立在植物组织和细胞培养基础上的各种基因转移技术不断革新, 绝大多数植物转化已获得成功。转基因植物在基因表达调控、作物改良和生物反应器等方面都有重要应用, 近年来, 转基因植物应用于表达各种抗体、疫苗和蛋白质药物等生物活性物质的研究突飞猛进, 在外源基因的表达、表达产物修饰和生物活性等方面取得了重要进展。例如葡糖脑苷脂酶在可诱导启动子控制下, 在烟草叶片中可达每克鲜重叶片大于一毫克的产量。转基因植物易于遗传操作, 没有人类病原体的潜在污染, 并保持了真核细胞的蛋白修饰机能, 它作为廉价的生物反应器展示了诱人的前景。本文就转基因技术与方法作以简单介绍, 并以几个较为常用的植物转化实例具体说明转基因方法。

23.1 转基因植物的基本技术与方法

23.1.1 植物转基因基本技术

建立在组织培养上的植物转基因主要包括组织培养、基因克隆、转基因方法等方面的基本技术, 这些技术有机结合在一起, 贯穿于整个转化过程。在植物转化过程中, 由组织培养获得受体细胞, 选择适当的转基因方法将外源基因导入受体细胞, 转化的受体细胞在选择压力作用下, 经过细胞增殖、植株再生等的培养形成完整转基因植株, 其主要实验步骤如图 23-1 所示:

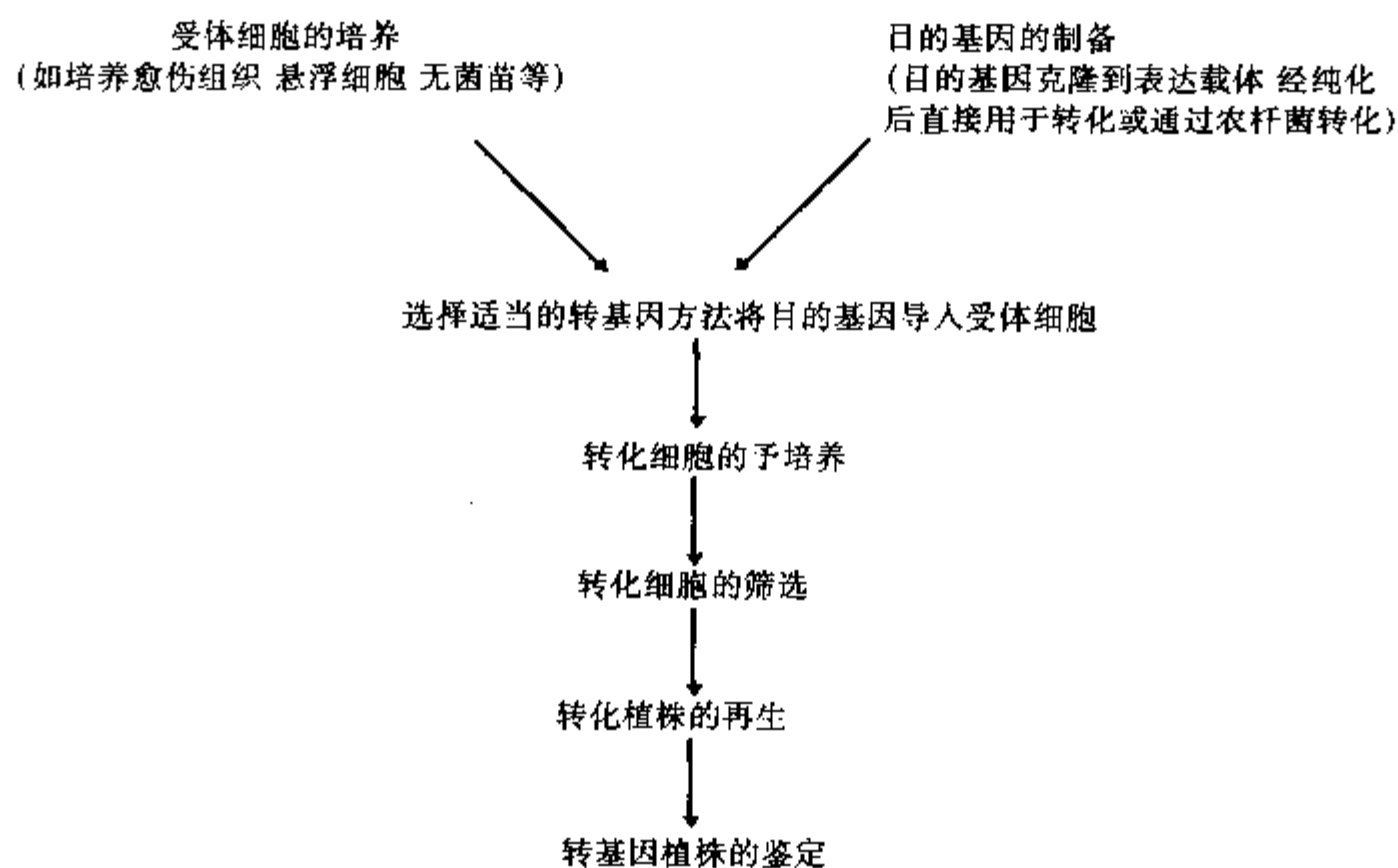


图 23-1 转基因技术路线简图

23.1.2 植物转基因方法

把特定的基因导入受体细胞的转化方法多种多样,按基因导入的方式分为两类:即载体介导的基因转移和直接基因转移。载体介导的基因转移是指带有目的基因的质粒借助于其它生物载体的介导,将目的基因导入受体细胞,如农杆菌介导的转化和病毒载体表达系统。直接基因转移是通过化学或物理的方法将目的基因导入受体细胞。常见的有PEG法、电击法、脂质体法、显微注射法和基因枪法。在转化过程中,不同的转化方法可选用不同的受体细胞,原生质体、培养细胞、组织、器官等都可用于受体细胞,不同的受体细胞也可选择不同的方法,不同的物种在长期的实验中形成了较为成熟的配合,现将转基因方法与受体细胞之间的配合列于表23-1。

表 23-1 受体细胞与转基因方法

受体细胞类型	转化方法
原生质体	PEG法、电击法、脂质体、微注射、病毒载体
愈伤组织和悬浮细胞	农杆菌介导、基因枪
外植体 (子叶 茎段 叶片 下胚轴等)	农杆菌介导、基因枪
植株	病毒载体

23.1.3 根癌农杆菌 Ti 质粒表达载体

在植物转化中,大多数表达载体是由根癌农杆菌 Ti (Tumor-induced) 质粒改造来的,根癌农杆菌感染植物时,它的 Ti 质粒转移到植物细胞并将其一部分 (Transfer DNA 即 T-DNA) 整合到细胞基因组, Ti 质粒上的 Vir 基因 (virulence gene) 以反式作用方式激活 T-DNA 的转移,基于这一原理,将 T-DNA 区域和 Vir 基因置于不同的复制子上,从而构建了双元载体系统。双元载体的一部分为 T-DNA 缺失的突变型 Ti 质粒,这类 Ti 质粒完全丧失了致瘤能力,其主要功能是激活处于反式位置上的 T-DNA 转移,这个质粒又称为辅助质粒,另一部分是构建微型 Ti 质粒,保留 Ti 质粒上 T-DNA 的左右边界序列,使插入到边界序列之间的外源基因能够转移并整合到植物细胞染色体上。现已发展的多种形式的微型 Ti 质粒有着共同的特性。它们包含一个广寄主范围的 DNA 复制起始点,可使质粒在大肠杆菌和根癌农杆菌中都能复制,含有两个 25bp 的边界序列,在边界序列内,胭脂碱合成酶 (NOS) 启动子启动的 NPT-II 基因产物用作转基因植物的筛选标记,在 NPT-II 基因下游含有一个多克隆位点,以利于外源基因和调控元件的插入,这个载体广泛应用于含有 Vir 基因的一些根癌农杆菌株系 (如 LBA4404, C58), 如 Bin19 (图 23-2)。基于 Bin19 改建的一些载体已商品化,在多克隆位点含有转录启动子和筛选报告基因,如编码 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) (pBI101, pBI121, Clontech) 和萤火虫荧光素酶 (pGL 系列) 基因。

另一类根癌农杆菌 Ti 转化载体称为共整合载体,如 pGV3850, Ti 质粒共整合载体的 T-DNA 和 Vir 区在同一个工程质粒上,首先将外源基因克隆在小质粒 (中间载体) 上,通过结合转移的方式将携带外源基因的中间载体引入到根癌农杆菌中,中间载体和 Ti 质粒的 T-DNA 区域有部分的同源序列。通过体内同源重组外源基因整合到 Ti 质粒 T-DNA 的同源区域。

23.1.4 植物组织培养和培养基

在植物转化中,选用的受体细胞应具有脱分化和再生的潜能,并能够形成新的植物体,组织培养中培养基营养成分和生长调节因子是两个主要因素,营养培养基通常由无机盐、碳源、维生素和生长调节

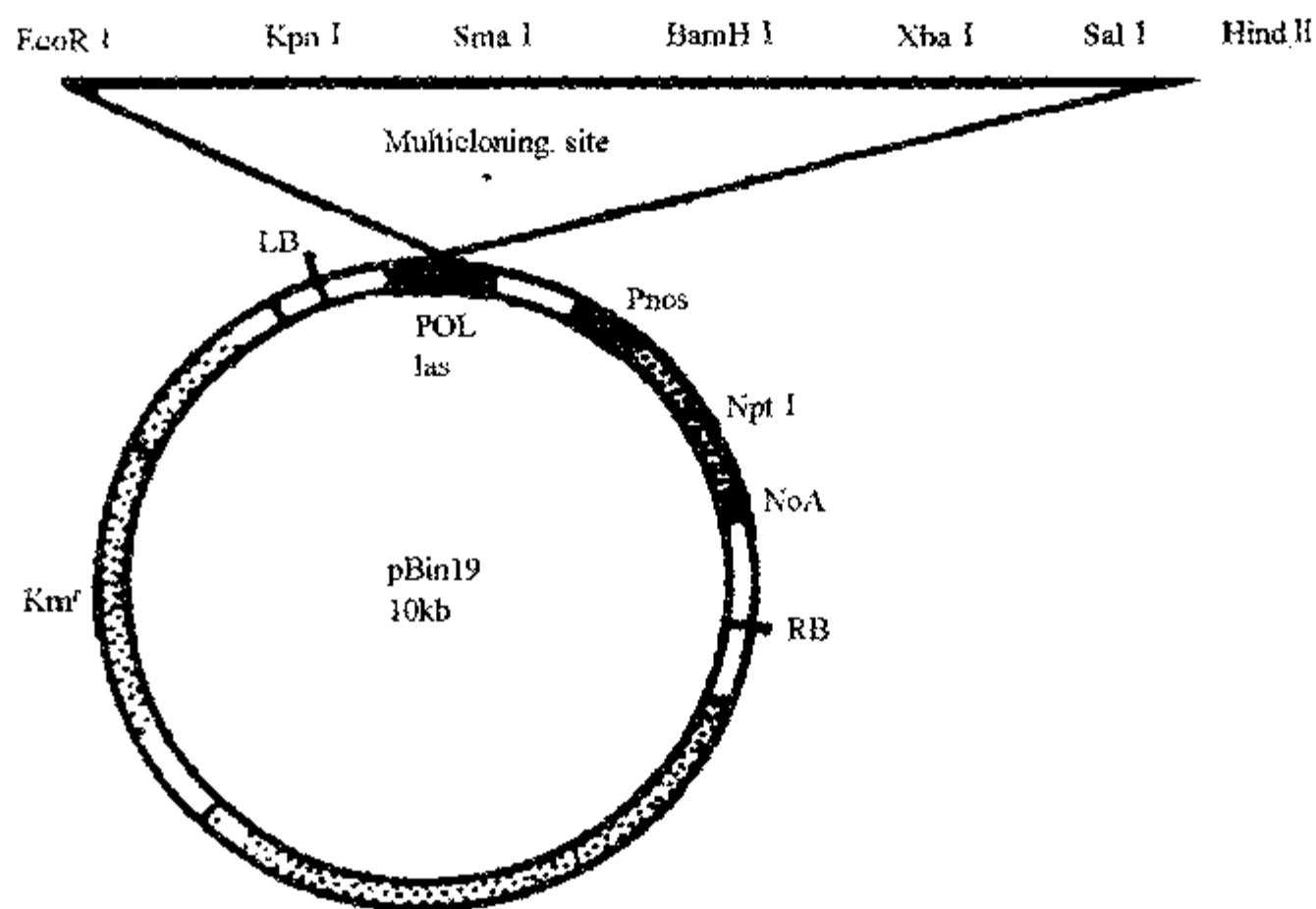


图 23-2 Bin19 质粒简图。LB 和 RB: 左右边界序列, Multicloning site: 多克隆位点, Pnos: 胭脂碱合成酶 (NOS) 启动子, Npt- II: 卡那霉素抗性基因, NoA: NOS 终止子, Km': 卡那霉素抗性基因。

剂等组分, 用于特殊目的时需加入其它组分, 如有机氮复合物和植物浸出液等。Murashige - Skoog (MS) 或 Linsmaier - Skoog (LS) 无机盐广泛用于植物再生过程, B5、N6 和 NN 及它们的衍生培养基广泛用于不同植物种类和不同培养物, 常用培养基组分列于表 23-2。生长调节剂对植物生长具有重要的调节作用, 不同的植物种类和不同的组织所用的量有较大差异, 组织培养中常用的生长调节剂列于表 23-3。配制培养基时, 先将大量盐、微量盐、维生素类、EDTA 钠铁盐等组分配制成 10 或 100 倍贮存液, 根据所用培养基的量加入各类贮存液, 用 1mol/L HCl 或 NaOH 调节 pH 值并定容至终体积, 121℃灭菌 20~30 分钟。在组织培养过程中, 不同的培养细胞所用的培养基成分有所差别, 主要是激素的变化, 通过调节激素的水平来调节培养细胞根、茎、叶等器官的分化形成, 受体细胞的培养方法在转化方法中加以介绍。

表 23-2 植物组织培养基

组 分	培养基浓度 (mg/L)				
	MS	B5	N6	NN	AA
大量盐					
KNO ₃	1900	2500	2830	950	
NH ₄ NO ₃	1650			720	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	250	185	185	250
KH ₂ PO ₄	170		400	68	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O		150			150
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	150	166	166	150
(NH ₄) ₂ ·SO ₄		134	463		

续表

组 分	培养基浓度 (mg/L)				
	MS	B5	N6	NN	AA
KCl					2950
微量盐					
H ₂ BO ₃	6.2	3	1.6	10	3.0
MnSO ₄ ·4H ₂ O	15.6	10	3.3	19.0	10.0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	2	1.5	10.0	2
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.025		0.025	0.025
KI	0.83	0.75	0.8		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8		27.8		
Na ₂ EDTA	37.3		37.3		
EDTA 钠铁盐		40		100	40
甘氨酸			40	5	
蔗糖	30 × 10 ³	20 × 10 ³	50 × 10 ³	20 × 10 ³	20 × 10 ³
维生素					
维生素 B ₁	0.5	10	1	0.5	10
盐酸吡哆醇	0.5	1	0.5	0.5	1
尼克酸	0.5	1	0.5	5.0	1
肌醇	100	100		100	100
pH	5.8	5.5	5.8	5.5	5.5

表 23-3 常用生长激素及其贮存液的配制

组 分	英文缩写	分 子 量	质量 (50ml 1mmol/L 溶液所需的 mg 数)	
苄基腺嘌呤	BA	225.2	11.25	溶于 2~5ml 0.5mol/L HCl
异戊烯腺嘌呤	2-IP	203.2	10.15	微热, 加水至终体积
激动素	K	215	10.25	调 pH 至 5。
玉米素	Z	219	10.95	
2, 4-二氯苯氧乙酸	2, 4-D	221		溶于 2~5ml 乙醇,
2, 4, 5-三氯苯氧乙酸	2, 4, 5-T	255.5		缓慢加水, 微热,
萘乙酸	NAA	186.2		加水至终体积,
吲哚丁酸	IBA	203.2		调 pH 至 5。
吲哚乙酸	IAA	175.2		
赤霉素	GA	364.4	17.3	溶于 2~5ml 0.5mol/L
脱落酸	ABA	264	13.2	KOH, 调 pH 至 5。

23.2 PEG 介导的原生质体转染

为了快速评价各种载体结构表达能力,通常采用原生质体瞬时表达这一分析方法。原生质体瞬时表达具有以下特点:转化细胞每次可多于 10^6 原生质体,每个细胞中的表达水平较为一致,这可避免转基因植物中克隆变异,所以原生质体转化常用于表达载体中调控元件的初步分析。转化原生质体时,悬浮细胞经过酶解获得原生质体,原生质体与外源基因混合后,在 PEG 作用下经短暂的共培养,洗涤除去 PEG 和外源基因,将转化的原生质体静置培养后,检测外源基因的表达,其操作步骤如下:

23.2.1 烟草悬浮细胞的培养

取继代后 15~20 天的烟草愈伤组织细胞 0.5g,接种于含有 25ml 悬浮细胞培养基 (MS 无机盐 + 0.2g/L KH_2PO_4 + 1mg/L 维生素 B_1 + 100 mg/L 甘露醇 + 1 mg/L 2, 4-D + 30g/L 蔗糖) 50ml 三角瓶中, 140r/min 避光培养。每隔 7 天以 5% 的培养物接于新鲜培养基继代一次。

23.2.2 原生质体的制备

100g、3 分钟离心收集继代后 3~5 天的悬浮细胞,用 0.4mol/L 甘露醇洗一次。细胞重悬于含 1% 纤维素酶 RS 和 0.1% 果胶酶 Y-23 的 0.4mol/L 甘露醇中, 30℃ 水浴酶解 2~3 小时,每隔 15 分钟轻轻摇晃一次并用显微镜观察细胞酶解情况,直到大多数细胞呈光亮的圆球状。将酶解液过滤 100 μm 的筛网,滤液 100g 离心 3 分钟收集原生质体。用 W_5 溶液 (NaCl 154mmol/L; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 125mmol/L; KCl 5mmol/L; Sucrose 5mmol/L pH5.9) 洗 3 次后原生质体重悬于 2~5ml W_5 溶液中,置于 4℃。

23.2.3 原生质体的转染

4℃ 保存 2~6 小时后离心收集原生质体,重悬于 MaMg 溶液 (Mannitol 0.4mol/L; MaCl 15mmol/L; pH 5.6) 至 2×10^6 个/ml。5~10 分钟后加 0.3ml 的原生质体悬液于预先加有 10 μg 经 CsCl 超离心制备的质粒 (如 pBI221) 的管中,轻轻转动管子混匀原生质体和质粒。5 分钟后加 0.3ml PEG CMS₄ 溶液 [PEG 4000 40% (W/V); Mannitol 0.4mmol/L; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.1mol/L; pH7.9],轻轻转动管子混匀,转化 15 分钟。然后以约 1ml/min 的速度逐滴加 W_5 溶液 3ml,5 分钟后 100g 离心 3 分钟,轻轻移去上清,加 5ml 液体培养基 28℃ 培养 24 小时。

23.2.4 报告基因产物的分析

瞬时表达评价载体时,人们常选用易于检测的报告基因,如 β -葡萄糖苷酸酶、萤火虫荧光素酶等,本文以 GUS 为例介绍其分析方法。

(1) 转化后 24 小时每个样取 1×10^6 个细胞,70g 离心 3 分钟收集原生质体,将细胞重悬于 100 μl 的 GUS 提取缓冲液 (Na_2HPO_4 0.03mol/L, NaH_2PO_4 0.02mol/L, Na_2EDTA 0.001mol/L pH8.0, Triton X-100 0.1%, Sarkosyl 0.1%, 二硫苏糖醇 0.01mol/L) 中。

(2) 原生质体在液氮中速冻 2 次以破碎细胞,Vertex 振荡 1 分钟,12 000g 离心 5 分钟,收集上清用于 GUS 分析。

(3) 用 Bradford 蛋白质分析仪 (Bio-Rad) 按说明书上的方法定量粗制浸出液中蛋白质的浓度。

(4) 在 0.5ml 37℃ 预热 GUS 反应缓冲液 [1mmol/L 4-甲基-7-羟基香豆素葡萄糖苷酸 (MUG, Sigma) 溶于浸出缓冲液。4℃ 可保存 2 周] 中,每个样品加入 25 μg 的蛋白质,37℃ 保温 1 小时 (GUS 反应缓冲液要 37℃ 预热)。

(5) 取 100 μ l 反应混合液加入 1ml 终止缓冲液 (0.2mol/L Na_2CO_3) 中。

(6) 以 50nmol/L 新配制的 4-甲基-7-羟基香豆素 (4-Mu 溶于裂解缓冲液中) 为标准, 在 Hoefer DyNAQuant™ 荧光仪 (Fluorometer Instructions, Hoefer Pharmacia) 上测定 GUS 活性, 测得数值的单位以 pmol/min 或每 mg 表示。

23.3 根癌农杆菌介导的叶盘转化法

双子叶植物的转化主要是通过根癌农杆菌进行的, 烟草叶盘转化法是根癌农杆菌介导的双子叶植物转化的典范, 许多实验室应用多种基因和结构已进行了烟草转化, 并且获得了多种转化子。烟草叶盘转化法是根据 Horsch 等的方法发展来的, 在这个系统中, 用打孔器 (叶盘) 或手术刀 (叶条) 将无菌叶片损伤, 根癌农杆菌将外源基因转移到切口表面的植物细胞, 在限定的培养基中激素刺激芽的形成, 进而再生植株, 与此同时加入抑制剂选择转化细胞并且抑制根癌农杆菌的生长, 实验步骤如下:

23.3.1 烟草无菌苗的培养

烟草无菌苗大多是种子表面消毒后培养得到的, 当种子来源的无菌苗不充足时, 靠近烟草无菌苗顶端 1/3 处剪下, 插到同前的培养基上可继续繁殖。用 2~3cm² 的 Miracloth (可用纱布代替, 若种子较小, 可使用双层纱布) 将种子包上, 再用回型针夹好, 这样可以防止小种子的丢失并易于操作。种子包裹后在 70% 的酒精中浸泡 1 分钟后, 转入 0.1% 的升汞中浸泡 5~10 分钟, 再用灭菌蒸馏水洗涤 4~5 次, 每次 3 分钟, 洗涤过程中不断搅动种子包裹, 使种子表面的升汞充分洗涤下来, 每次洗涤后, 最好将种子包裹放在灭菌滤纸上吸干。种子洗涤后放在无激素 MS 培养基 (MS 盐 + 15g/l 蔗糖 + 8g/l 琼脂) 上培养, 25~28℃, 80 μ E/ (m²·s) 光照 16 小时, 随着小苗的生长, 应逐渐增加光照强度以防止小苗白化。将生长强壮的单个无菌苗移入含有无激素 MS 培养基的较大容器中, 在小苗转移过程中尽量减少对根和叶的损伤。无菌苗的培养可每周或每月重复一次, 以保证不同年龄无菌苗的供应。

如果无菌苗不易得到, 田间或温室生长的植株叶片经表面消毒可用于转化的受体材料。取生长良好的叶片, 用解剖刀去除中脉, 将叶片浸入 70% 的酒精中 30 秒, 然后转入 0.525% 的次氯酸钠溶液 (从含 5.25% 次氯酸钠的商用漂白粉稀释得到, 另加 0.1% Tween 20) 中 15 分钟。叶片至少用灭菌水洗两遍, 即可用于转化的受体细胞。当然使用无菌苗更为理想, 因为它们没有潜在污染并且生长条件易于控制。

23.3.2 根癌农杆菌感受态的制备及其转化

23.3.2.1 氯化钙法转化根癌农杆菌

1. 根癌农杆菌感受态细胞的制备:

从 YEP (Yeast extract 5g, Peptone 10g, NaCl 10g, pH7.2) 平板 (含 50 μ g/ml 利福平) 上挑取根癌农杆菌单菌落, 接种于 5ml 含 50 μ g/ml 利福平的 YEP 液体培养基中, 200r/min、28℃ 培养过夜。取 2ml 过夜培养液接种于 50ml 含相同抗生素的 YEP 液体培养基中, 在相同条件下培养至 OD₆₀₀ 达 0.5, 菌液冰浴 30 分钟, 4℃、5 000r/min 离心 10 分钟收集菌体, 将菌体悬浮于 10ml 0.15mol/L 的 NaCl 中, 离心收集菌体, 再悬浮于 1ml 20mmol/L CaCl_2 溶液, 以 0.2ml 一份将菌悬浮液分装在 1.5ml EP 管中, 置液氮速冻 1 分钟, -70℃ 冰箱保存备用。

2. 根癌农杆菌的转化:

在室温下融化根癌农杆菌感受态细胞, 加入 1 μ g 载体质粒 DNA, 混匀后冰浴 30 分钟, 然后置液氮速冻 1 分钟, 经 37℃ 保温 3 分钟后加 1ml YEP 摇匀, 置 28℃ 保温 3 小时, 再以 5 000r/min 离心 3 分钟收集菌体, 涂于含 50 μ g/ml 利福平、50 μ g/ml 卡那霉素的 YEP 平板上, 28℃ 暗培养 2~3 天, 待转化子菌落长出后, 挑取单菌落进行鉴定。

23.3.2.2 电激法感受态的制备及其转化

挑取新鲜单菌落接种到 5ml YEP 培养基（含 50 μ g/ml 利福平）的试管里，28℃、200r/min 培养过夜。稀释 1ml 培养过夜的农杆菌到含 200ml YEP 培养基的 1 000ml 三角瓶里，28℃、200r/min 培养到 OD₆₀₀ 达 0.8。4℃、5 000r/min (2600g) 离心 10 分钟收集细胞。用 100ml 10% 的甘油（用去离子水配制）洗沉淀三次，洗涤时一定要把细胞悬均匀，每次 4℃、5 000r/min (2600g) 离心 15 分钟收集细胞，小心将上清倒掉，将细胞重悬于 1ml 10% 的甘油里（约 1×10^{11} 细胞/ml），细胞可以立即使用，也可分装成每管 30 μ l，经液氮速冻后，-70℃ 冰箱保存备用。取一管感受态细胞放在冰上融化，加入 100ng DNA 样品混匀，将样品放入冰上的电击杯中，按照电击仪厂商说明进行电击转化（0.1cm 宽电击杯，电压 1.8kV，电容 25 μ FD，电阻 200 Ω ，电击时间约为 3.5~5 毫秒，Gene Pulser, Bio-Rad）。

23.3.3 烟草叶盘共培养

含重组质粒的根癌农杆菌接种于 5ml 含卡那霉素和利福平的 YEP 培养基中，28℃ 200r/min 培养过夜，农杆菌培养液用 1/2MS 稀释 30 倍用于共培养。将无菌苗叶片边缘和中脉用手术刀切去，沿与中脉垂直方向将叶片切成 5~8mm 宽的叶条，叶片切割后立即放入农杆菌液中浸泡 30~40 分钟。用镊子取出共培养的叶片，放到灭菌的滤纸上吸去过量的菌液，叶条移入含有共培养培养基（MS 无机盐 + 0.6mg/L 2,4-D + 30g/L 蔗糖 + 8g/L 琼脂）的平皿中，用 Parafilm 将平皿封口两层，以减少培养基水分蒸发和污染，28℃ 暗培养 48 小时。

23.3.4 转化植株的筛选

将共培养叶片转移到愈伤组织诱导培养基（MS 无机盐 + 0.6mg/L 2,4-D + 300mg/L 卡那霉素 + 500mg/L 羧苄青霉素 + 30g/L 蔗糖 + 8g/L 琼脂）上，使转化叶片充分接触培养基有利于营养和激素的吸收，以及卡那霉素损伤未转化的细胞。在愈伤组织诱导培养基上培养两周后，将叶片转移到芽诱导培养基（MS 无机盐 + 0.1mg/L IAA + 1mg/L 6-BA + 300mg/L 卡那霉素 + 500mg/L 羧苄青霉素 + 30g/L 蔗糖 + 8g/L 琼脂）上培养。每隔 2~3 天观察一次，用解剖刀切下小芽转移到生根培养基（MS 无机盐 + 0.4mg/L IBA + 100mg/L 卡那霉素 + 500mg/L 羧苄青霉素 + 30g/L 蔗糖 + 8g/L 琼脂）上，转移小芽时，要完全去除根部的愈伤组织以利于营养吸收和根的生长。每隔 3~7 天观察一次，将生根的植株转移到含相同培养基的较大容器里。在筛选培养过程中，有时植物组织表面有白色的粘质物出现，这是由于农杆菌分解羧苄青霉素所致，除去植物绿色组织表面的细菌并将其转移到相同的新鲜培养基上，即可消除这种现象。

23.3.5 转化植株的田间移栽

小心移去植株根部的琼脂，将植株转移到含 10ml 1/10 MS 无机盐溶液的较大容器里，将容器的盖子稍微打开放在温室里，使气体扩散几个小时，同时加入一些灭菌水以补充蒸发的液体，之后把植株移栽到湿润的土壤里。植株栽入土壤后，用玻璃器皿或塑料袋将小苗盖上以减少水分的蒸发，新的根系形成后，再移去玻璃器皿或塑料袋。

23.4 基因枪法转化愈伤组织

大多数单子叶植物不能被根癌农杆菌感染，迄今为止大部分单子叶植物的遗传转化使用直接转移技术。在直接转移技术中，由于基因枪法（microprojectile bombardment）较为简单，而且转化受体细胞范围广，可以是悬浮细胞、愈伤组织、未成熟胚，甚至未成熟花序，因此该方法广泛应用于单子叶植物的转化。本文以水稻为例介绍基因枪法转化愈伤组织的操作过程。

23.4.1. 水稻愈伤组织的诱导与培养

在授粉 10~15 天后剥取水稻种子, 经 70% 酒精浸泡 1 分钟, 转入 10%~15% NaClO 溶液灭菌 20~30 分钟, 无菌水冲洗 3 次, 然后分离幼胚接种于诱导培养基 (基本培养基 NB (N₆ 大量盐 + B₅ 微量盐 + B₅ 有机 + MS 铁盐) + 500mg/L 氨基酸 + 300mg/L 水解酪蛋白 + 2mg/L 2,4-D + 30g/L 蔗糖 + 8g/L 琼脂) 上, 在暗中进行愈伤组织诱导培养, 诱导形成的愈伤组织接种于新配制的诱导培养基上培养, 愈伤组织每隔 20 天继代一次。

23.4.2 金粉制备

取 60mg 0.1 μ m 的金粉, 加 1ml 无水乙醇, 振荡 2 分钟混匀。1000r/min 离心 1 分钟, 弃上清, 重悬于无菌水中。10000r/min 离心 1 分钟, 弃上清, 重悬于 1ml 50% 的灭菌甘油中 (也可将金粉直接重悬于无菌水中), 混匀, 分装 Eppendorf 管中, 每管 50 μ l。分装过程中要不断混匀金粉, 以保持金粉处于均匀状态。也可用钨粉作 DNA 载体, 且价格便宜, 但钨粉对细胞的毒害作用较大, 并且能使 DNA 降解, 尽管金粉较贵, 但颗粒大小比较均匀, 对细胞的毒害作用小。

23.4.3 微弹 (microcarrier) 制备

- (1) 取 1 μ l 1 μ g/ μ l 的载体 DNA 加入装有 50 μ l 金粉-甘油的悬浮液中, 充分振荡混匀。
- (2) 加入 50 μ l 2.5mol/L CaCl₂ (过滤灭菌, 分装后于 4℃ 或 -20℃ 保存), 充分振荡混匀。
- (3) 加入 20 μ l 0.1mol/L 鱼精蛋白, 振荡约 3 分钟混匀。
- (4) 1000r/min 离心数秒, 迅速沉淀金粉, 离心时间不宜过长, 以免金粉成团, 影响下面操作。

23.4.4 轰击

- (1) 将置于超静工作台内的基因枪 (Bio-Rad PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System 如图 23-3, 4) 内壁用 70% 酒精仔细擦净。
- (2) 将微弹载片、可裂圆片和阻挡网于 70% 酒精中浸泡 15 分钟, 挥干酒精。阻挡网也可用灼烧方式灭菌, 冷却后即可使用。
- (3) 吸取微弹悬液 10 μ l 于微弹载片上, 使溶液分布均匀, 挥干酒精。
- (4) 按基因枪操作说明书安装可裂圆片、微弹载体、阻挡网。可裂圆片有不同的规格, 以调节轰击时破压力, 根据不同的材料选择不同的轰击参数。
- (5) 抽真空后轰击, 一个培养皿中的材料轰击 2 次, 第二次轰击时可将培养皿转换一下方位, 取出被轰击过的培养皿。用未包被 DNA 的金粉在相同条件下轰击愈伤组织作为对照。

23.4.5 水稻转化细胞的筛选

将轰击后的愈伤组织按其分散的颗粒继代于诱导培养基上, 在暗中过渡培养 1~2 周, 使转化细胞恢复正常状态, 或直接继代于筛选培养基 (诱导培养基 + 50mg/L 潮霉素) 上, 根据不同的受体细胞及被轰击后受体细胞的状况确定是否需要过渡培养。筛选过程中对照愈伤组织经相同的培养。

23.4.6 植株再生

愈伤组织在筛选培养基上培养 3 周后, 转移至再生培养基 (NB + 3mg/L 6-BA + 0.5mg/L NAA + 0.5mg/L TDZ + 30g/L 蔗糖 + 8g/L 琼脂) 上, 光照条件下进行培养, 每隔 20 天继代一出现和芽分化。将芽移至壮苗培养基 (1/2MS 无机盐 + B₅ 有机成分 + 0.5mg/L NAA + 20g/L 蔗糖 + 8g/L 琼脂) 上培养, 20 天继代一次, 直至生根。生根后高达 10~15cm 的苗即可移栽到土里。

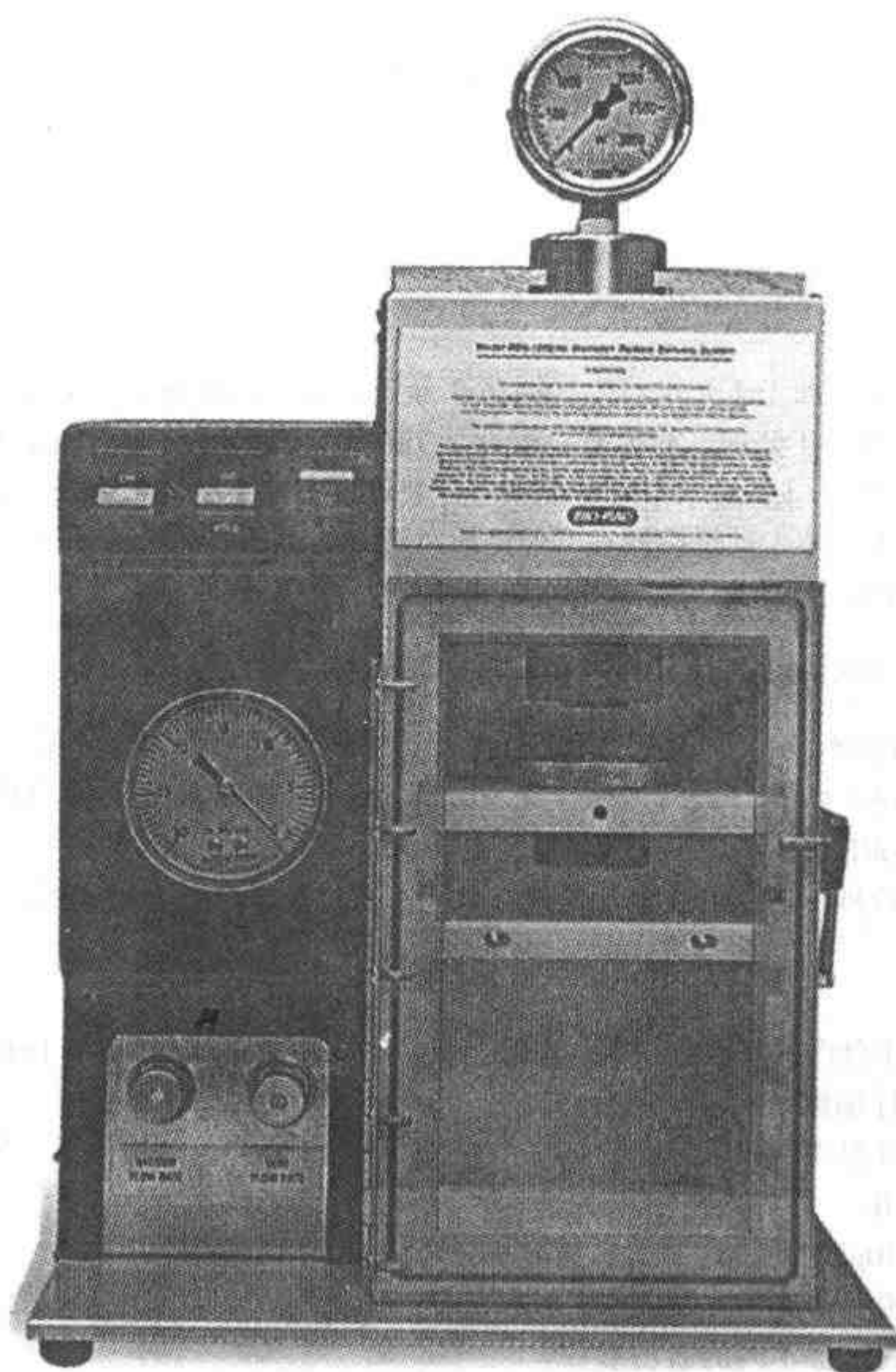


图 23-3 基因枪外形图

23.5 病毒载体表达系统

除 Ti 质粒的稳定表达外,植物病毒也可用于大量表达外源蛋白的表达载体。植物病毒载体具有广寄主性,能够感染多种植物,并且能够高效表达外源基因产物,因此植物病毒载体已广泛应用于表达外源蛋白。使用较多的植物病毒载体是正链 RNA 病毒,它编码外壳蛋白(CP)、复制蛋白和病毒粒子在植物中系统移动的蛋白质。将外源基因插入到与病毒复制和转染无关的基因中,或用外源基因置换病毒编码外壳蛋白的基因,而不影响病毒的复制和感染,用这些携带外源基因的病毒感染植物,通过收获病毒获得高表达的外源基因产物。烟草花叶病毒(TMV)广泛应用构建病毒载体表达系统, TMV 是烟草花叶病毒组中的一个代表株,它的基因组由一个约 6.5kb 的正链 RNA 组成,其基因组结构、亚基因组和翻

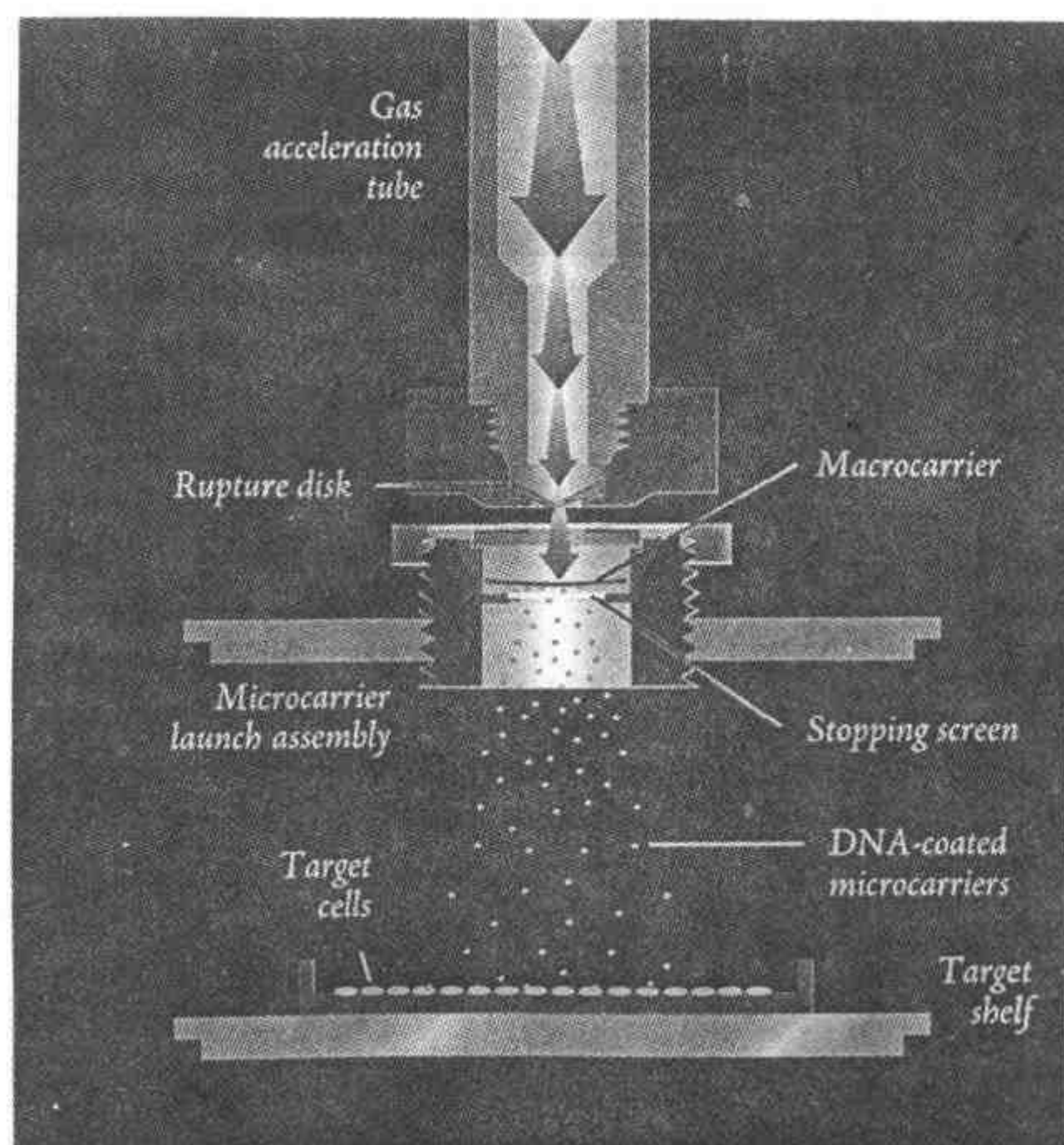


图 23-4 基因枪工作原理示意图

次，直至有绿点译产物见图 23-5。

用 TMV 表达外源蛋白的载体系统主要有两种形式，一是将外源基因插入到 30K 和 CP 基因之间，或将外源基因同框融合到 CP 基因的表面环区域，这种重组病毒复制效率都很高，在系统感染植物时，能够检测到外源蛋白的活性，并且有病毒颗粒的积累（图 23-6）。另一种形式是杂交病毒表达载体，它包含 TMV-U1 和 ORSV (*Odontoglossum ringspot virus*) 两个烟草花叶病毒株的外壳蛋白启动子序列，这两个序列具有很低的同源性，避免了两个外壳蛋白的亚基因组启动子的同源重组，增加了病毒的稳定性，这两个启动子分别指导外源基因和 ORSV 外壳蛋白的亚基因组 RNA 的合成（图 23-6-B）。本文以 TMV 插入表达载体表达疟疾孢子虫抗原决定簇基因为例，介绍病毒载体的一般操作方法。

用 TMV 插入型载体表达疟疾孢子虫抗原决定簇基因时，首先克隆 TMV 基因组的 cDNA，选择合适位点将疟疾孢子虫抗原决定簇基因同框插入到外壳蛋白的 63 位和 66 位氨基酸之间。由体外转录产生病毒基因组，将体外转录产物摩擦接种于烟草，获得含有疟疾孢子虫抗原决定簇基因的重组病毒，再将病毒批量接种于烟草，从感病烟草叶片中大量提纯病毒，从而获得外源基因的表达产物，其实验方法及操作步骤如下：

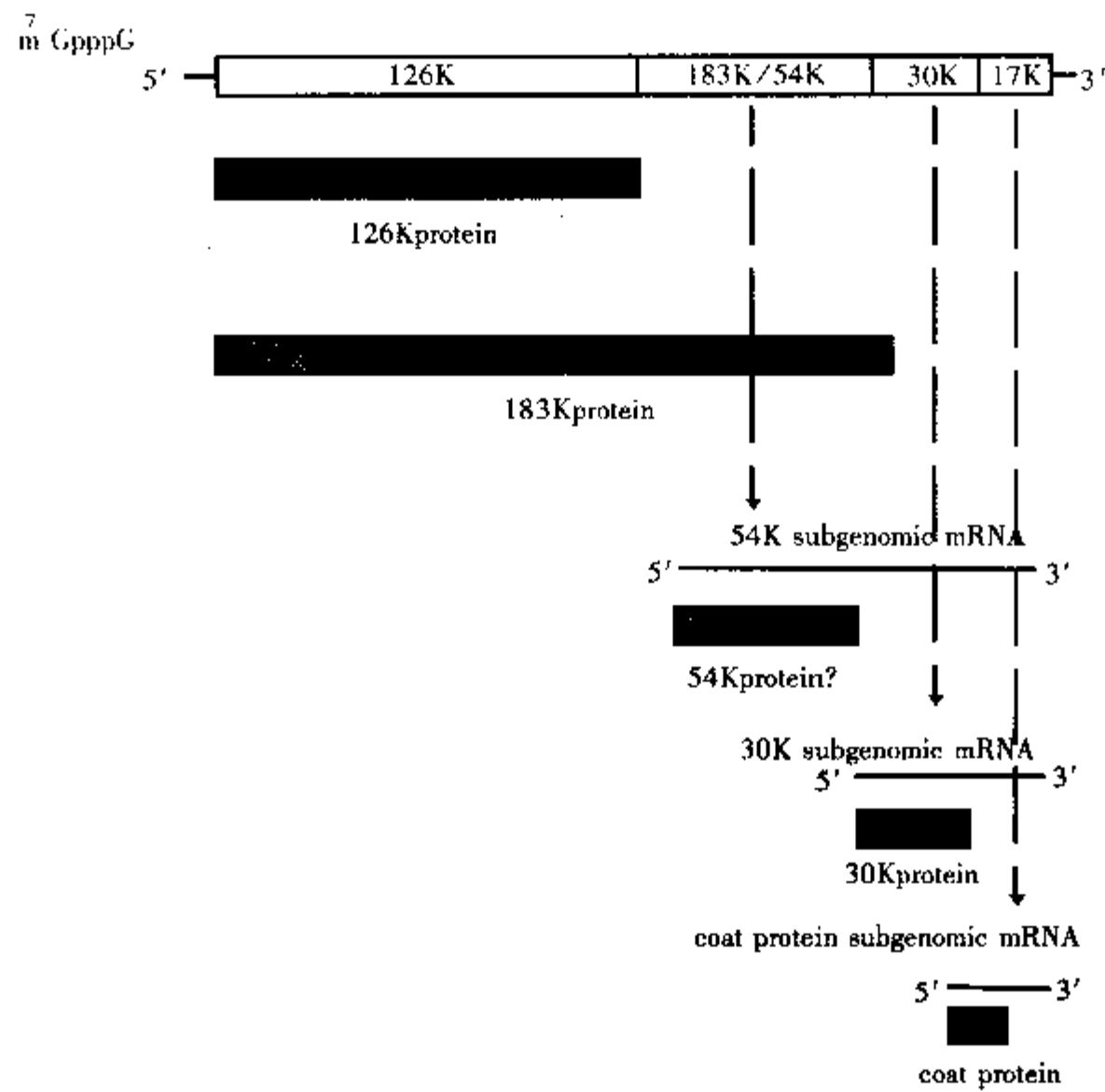


图 23-5 TMV 基因组结构和它的翻译模式简图

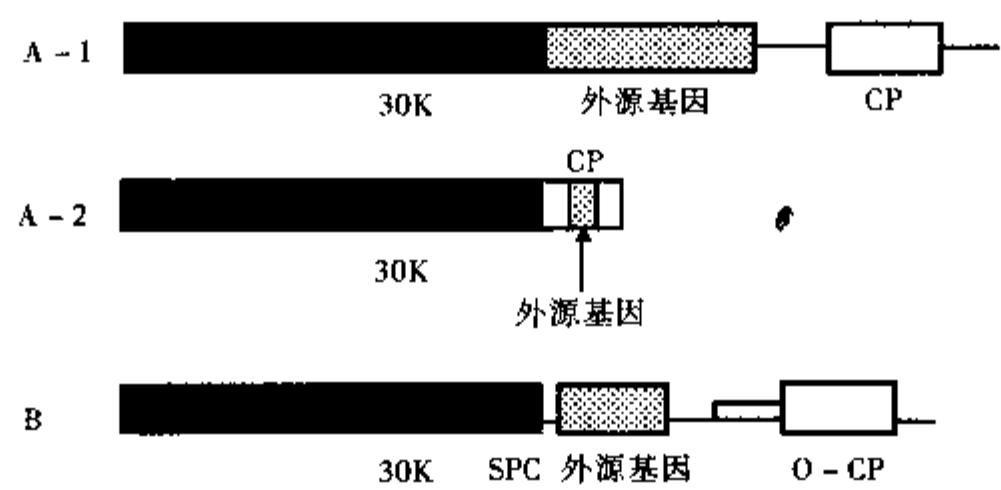


图 23-5 TMV 表达载体简图。

(A-1) TMV 突变体，外源基因加入完整的 TMV-U1 基因组中，外源基因融合在外壳蛋白亚基因组启动子的后面。(A-2) 外源基因插入外壳蛋白的表面环区域。(B) 杂交 TMV 表达载体，除外壳蛋白序列及其启动子来自 ORSV 外，所有的阅读框为 TMV-U1 序列。外源基因使用位于 30K 阅读框的 TMV-U1 启动子。SPC: TMV-U1 外壳蛋白的启动子。

23.5.1 病毒 cDNA 的克隆和外源基因的插入

病毒 cDNA 克隆和外源基因的定点插入等基本分子生物学操作方法本书其它章节已有详细介绍，这

里不再重述。主要步骤如下:

- (1) 将 TMV 基因组 RNA 反转录合成 cDNA。
- (2) 将 cDNA 克隆到带有噬菌体 SP₆ 启动子的载体上 (如 pGEM)。
- (3) 用 PCR 定点突变的方法将疟疾孢子虫抗原决定簇基因 (AGDR) 插入到外壳蛋白的 63 和 66 位氨基酸之间。

23.5.2 体外转录

- (1) 用噬菌体 SP₆ 启动子启动病毒 cDNA 的体外转录, 在病毒 cDNA 的另一端紧靠 cDNA 处, 选择一个合适的酶切位点, 将载体酶切成线性, 再用蛋白酶 K 65℃ 消化 30 分钟, 以使限制性内切酶失活。
- (2) 用等体积的苯酚-氯仿抽提一次, 加入二倍体积的乙醇和 1/10 体积 3mol/L 的 NaAc 沉淀载体 DNA。
- (3) SP6 转录反应体系的组成: 40mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 50mmol/L NaCl, 8mmol/L MgCl₂, 2mmol/L 亚精胺, 10mmol/L DTT, 40ng/μl BSA, ATP、UTP、CTP 各 0.5mmol/L, 0.2mmol/L GTP, 0.5mmol/L G (5') ppp (5') G, 2U/μl RNA 酶抑制剂, 0.02μg/μl 的线性 DNA, 0.3U/μl SP6 RNA 聚合酶, 反应总体积 100μl。
- (4) 37℃ 保温 60 分钟。

23.5.3 重组病毒的小量制备

- (1) 体外转录产物的接种: 选取温室里生长至 5~7 片叶片的烟草小苗, 用喷雾器喷洒金刚沙后, 选取新长出的叶片 1~2 片, 以摩擦接种的方式, 用体外转录反应体系进行接种, 每棵植株接种 25μl 的体外转录反应体系。
- (2) 种子病毒的制备: 接种 8~11 天后, 选取新长出的叶片, 称重, 用研钵将叶片研碎, 每克叶片加入 80ml 的水, 所得溶液中病毒的含量为 20μg/ml。

23.5.4 病毒的大量繁殖和提纯

- (1) 用小量制备的重组病毒大批接种烟草 (方法同上), 每株烟草接种 40μl (20μg/ml) 的病毒溶液。
- (2) 采集接种 21~25 天症状明显的病叶, 称重后加入等量的 0.02mol/L 的磷酸缓冲液 (pH7.0), 在搅碎机中搅碎。
- (3) 用双层纱布将搅碎的叶片过滤。
- (4) 1000r/min 将滤液离心 10 分钟, 上清转移到新的离心管中。
- (5) 上清在 60℃ 水浴中加热 10 分钟。
- (6) 4000r/min 离心 20 分钟, 将上清转移到新的离心管中。
- (7) 室温下, 按上清液量加入 4% 的 PEG6000 (W/V) 和 5.8% 的 NaCl (W/V), 随加随搅动, 使之充分溶解后, 于 4℃ 下静置过夜。
- (8) 4000r/min 离心 30 分钟, 弃上清。
- (9) 在沉淀中加入 5ml 0.02mol/L 的磷酸缓冲液 (pH7.0), 混匀。
- (10) 4000r/min 离心 20 分钟, 将上清转移到新的离心管中。

23.6 转基因植株的分析

转基因植株的检测可从 DNA、RNA 和蛋白质等三个方面进行, Southern blot、Dot blot 和 PCR 等方法

主要检测基因的整合, PCR 和 Dot blot 这两种方法可以快速检测植株, 但易出现假阳性, 常用于转基因植株的初筛, 而 Southern blot 可提供外源基因的结构和整合状态, 是可靠的检测方法。通过 Northern blot 检测基因的转录情况, 翻译产物的检测常用酶活性分析、酶联免疫吸附分析和 Western blot 等方法, 根据产物不同可选择一种或多种方法。这些检测方法本书其他章节已有详细介绍, 这里不再赘述。

(王新国 文 马清钧 审)

参 考 文 献

1. 田波, 等. 植物基因工程. 山东科学技术出版社, 1996
2. 王新国, 等. 生物工程进展. 用转基因植物生产口服疫苗, 1998, 18:51 ~ 54
3. Lindsey K. Plant Tissue Culture, Kluwer Academic Publishers, 1991
4. Jones H. Plant Gene Transfer and Expression Protocols. Humana Press, 1995
5. Meran RLO, et al. Transgenic Plant: A Production System for Industrial and Pharmaceutical Proteins. John Wiley & Sons, 1996
6. Draper J, et al. Plant Genetic Transformation and Gene Expression. Blackwell Scientific publications, 1988
7. Barcelo P, et al. Transgenic Cereal (tritordeum) plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of inflorescence tissue. Plant J, 1994, 5:583 ~ 592
8. Porta C, et al. Use of viral replicons for the expression of genes in plants. Molecular Biotechnology, 1996, 5:209 ~ 221
9. Conrad U, et al. Expression of engineered antibodies in plant cells. Plant Molecular Biology, 1994, 26:1023 ~ 1030
10. Dalsgaard K. Plant - derived vaccine protects target animals against a viral disease. Nature Biotechnology, 1997, 15:248 ~ 252
11. Vasil IK, et al. Transformation of wheat via particle bombardment. Methods Mol Biol, 1999, 111:349 ~ 358

24. 人类基因治疗

24.1 基因治疗概述

基因治疗就是将外源基因导入目的细胞并有效表达,从而达到治疗疾病的目的。重组 DNA 技术的问世激发了人类基因治疗的设想。1980 年 Cline 等采用磷酸钙介导的基因转移治疗 β -地中海贫血未能成功,其后发展的反转录病毒载体介导的基因转移,成为目前临床基因治疗的主要方法。同时这一领域进展迅速,基础研究与临床应用均解决了一些问题,并酝酿着新的突破。

基因治疗的基础研究,主要是基因转移与表达调控,探讨目的基因在受体细胞或整体动物中的整合特点与表达水平。基因治疗的临床研究,视疾病不同而异。对于以功能缺陷为特点的患病细胞(如遗传病),导入的外源基因主要是纠正或补偿其功能缺陷;对于以调节失控而导致异常增生为特点的患病细胞(如肿瘤),导入的外源基因主要是遏制其异常增生、逆转或摧毁其恶性增生的结果(癌细胞)。治疗的某些环节可能是增强细胞的正常功能。临床应用还涉及安全性、伦理学与所产生的社会效应,其中安全性在基础研究尤其是动物模型中就应充分注意到。因为基因治疗是一个全新的医学领域且有其突出的特点,其临床应用需要得到专门机构的批准。

基因治疗依转移基因的受体细胞不同,可分为生殖细胞基因治疗与体细胞基因治疗两个途径。生殖细胞基因治疗的可能对象主要是遗传病,设想将正常基因导入遗传病患者的生殖细胞,如能成功可使遗传病患者的后代不再患这种遗传病。如能在受精卵细胞分化之前对其进行遗传修饰,其改变将存在于包括生殖细胞内的所有细胞并能传代。用显微注射的方法将正常基因转移至受精卵,其效率尚不适用于排卵周期较长且每次仅排一个卵的人类。同时因转移基因在受体细胞随机整合且可传代涉及伦理学问题,因此目前尚不考虑生殖细胞基因治疗的途径。

体细胞基因治疗的可能对象范围较广,是将正常基因导入患者体内治疗患者本人的疾病。目前临床上已采用的均属于体细胞基因治疗。对于体细胞基因治疗,就基因转移程序而言,可分为间接体内(*ex vivo*)基因治疗与直接体内(*in vivo*)基因治疗。直接体内基因治疗是将 DNA 略加修饰或包裹后直接注射入患者体内,体内组织细胞以骨骼肌对这种基因转移方法反应较好,而其它种类组织细胞多表现转移基因不稳定,表达持续时间短或不表达。间接体内基因治疗采用载体携带目的基因感染受体细胞的基因转移系统。

如以转移基因在受体细胞染色体上整合特点的差异,体细胞基因治疗又可分为两类:同源重组与随机整合。同源重组法是将正常基因定位导入受体细胞染色体上的基因缺陷部位以替换缺陷基因。基因转移中同源重组的自然发生率极低约百万分之一,采用胚胎干细胞作为受体细胞加正负筛选的方法,同源重组的检出率可望达到十分之一。正常体细胞的生命周期及克隆筛选等实验给细胞生长带来的一系列技术问题尚未解决,利用胚胎干细胞同源重组的方法还不能用于人类出生之后的体细胞基因治疗,因此同源重组基因治疗只能作为远期目标。随机整合指的是导入的正常基因在染色体基因组上的整合是不定位的,转移基因不修复异常基因而只补偿异常基因的功能缺陷。在载体介导的基因转移中,除腺病毒伴随病毒载体外,其它种类的载体携带的转移基因的整合都是随机的。目前临床基因治疗的转移基因的整合都是随机的。其中主要是反转录病毒载体介导的基因转移,用携带目的基因的反转录病毒载体通过包装细胞系转染离体的患病组织细胞,对转染细胞作短期培养、筛选后再输回患者体内,如转移基因在受体细胞内稳定整合并适宜表达,则可达到治疗目的。这种体细胞基因治疗的方法与自体组织移植相似,其

突出特点是离体细胞受到携带外源基因的反转录病毒载体的转染。系统分析这种方法,它是间接体内随机整合的体细胞基因转移。

人类基因治疗最早着眼于遗传病。腺苷脱氨酶(ADA)缺陷所致的先天性免疫缺陷综合征(SCID)于1990年接受体细胞基因治疗并初见成效,这是迄今最成功的临床基因治疗。现在基因治疗已用于多种遗传病,如血友病B、家族性高胆固醇血症;也用于治疗恶性肿瘤,如恶性黑色素瘤、成神经细胞瘤、白血病、肾癌、卵巢癌等;也用于治疗其它疾病如肝功能衰竭、艾滋病等。随着基因治疗基础研究的不断突破,今后临床基因治疗的疾病范围可望进一步扩大。

24.2 基因转移系统

目前已有多种基因转移方法可将目的基因导入受体细胞。对基因治疗较有意义的载体有反转录病毒(RV)、腺病毒(Ad)、腺病毒伴随病毒(AAV)、单纯疱疹病毒(HSV)、脂质体与受体介导的蛋白(RMP)。在迄今进行的临床基因治疗中,几乎均采用反转录病毒载体介导的基因转移。

24.2.1 反转录病毒

RV是单链RNA病毒,可在宿主细胞内扩增并出芽释放。病毒进入宿主细胞后,脱壳释放出病毒RNA,由病毒反转录酶反向转录成双链病毒DNA,并在细胞质里加工处理成为35S病毒DNA亚基,称为前病毒DNA。前病毒DNA随机整合到宿主细胞染色体DNA上,并转录出病毒RNA链,这些RNA大部分是合成病毒专一性蛋白质的模板,它们分别指导合成类核体蛋白与内壳蛋白,还有一部分RNA指导合成糖蛋白,糖蛋白在宿主细胞膜上形成外壳部分。内壳蛋白、类核体蛋白与35S RNA基因在细胞质里组成一个病毒核心后,细胞膜上的病毒糖蛋白包围这一核心即形成完整的病毒粒子并从宿主细胞上释出,称为出芽,这样就完成一次RNA病毒的生活周期。出芽的病毒粒子能够再感染细胞,受感染的细胞可正常生长并不断分泌病毒颗粒。RV被选作体细胞基因治疗的载体,因为RV可进入细胞并整合到染色体上,病毒基因在宿主细胞内可适宜表达但不影响宿主细胞自身的生长。外源基因可插入前病毒DNA并在宿主细胞内表达而不显著影响病毒生活周期,从受体细胞出芽的病毒粒子给基因治疗带来安全性问题,不具包装功能的病毒载体与包装细胞系的应用,使病毒出芽的可能性极大地降低。

RV前病毒DNA如图24-1所示,基因组DNA可分成两部分:顺式作用序列与反式作用序列。顺式作用序列包括两端LTR、包装信号 ψ 位点等,为病毒复制的必需调控区;反式作用序列编码包装蛋白gag、pol与env。构建载体时去除反式作用序列,插入外源基因,再与质粒重组以利扩增。重组的病毒基因组是复制缺陷型的,只能产生病毒RNA,不编码病毒的结构蛋白。重组的RV载体大致可分为四类:第一类是双表达型载体(DE),含两种外源基因,分别取代gag/pol片段与env基因,DE载体的特点是病毒基因的调控区与外源基因的表达密切相关;第二类是内部含启动子的病毒载体(VIP),选择基因紧接LTR后面,其表达受5'LTR启动子控制,目的基因前附有一个外加启动子,其选用由目的基因与靶细胞而定,与DE载体相比有较大的自由度,不足之处是内部启动子的存在可能会影响病毒的效价;第三类是自身灭活载体(SI),3'LTR缺失一段序列,由于3'LTR是两端LTR的模板,病毒复制时其缺失便转移到下一代5'LTR中,因此重组病毒两端LTR都有缺失,这样病毒顺式结构不会干扰外源基因的表达,减小了LTR激活相邻癌基因的可能性。其缺点是病毒滴度特别低。第四类是双拷贝载体(DC),其主要特点是外源基因插入3'LTR的U3区,在转染细胞内基因被复制并转到5'LTR。外源基因的新位置处于反转录病毒的转录单位之外,减少了该转录单位对外源基因表达的负影响,使插入基因的调控序列较正常地发挥作用。体细胞基因治疗多采用内部含启动子的病毒载体。

上述4种缺失编码包装蛋白序列的病毒载体,必须提供包装蛋白以完成病毒包装。将缺失包装信号 ψ 序列的反转录病毒DNA导入细胞系即构建成包装细胞系,这种细胞产生包装蛋白,因自身缺乏包装

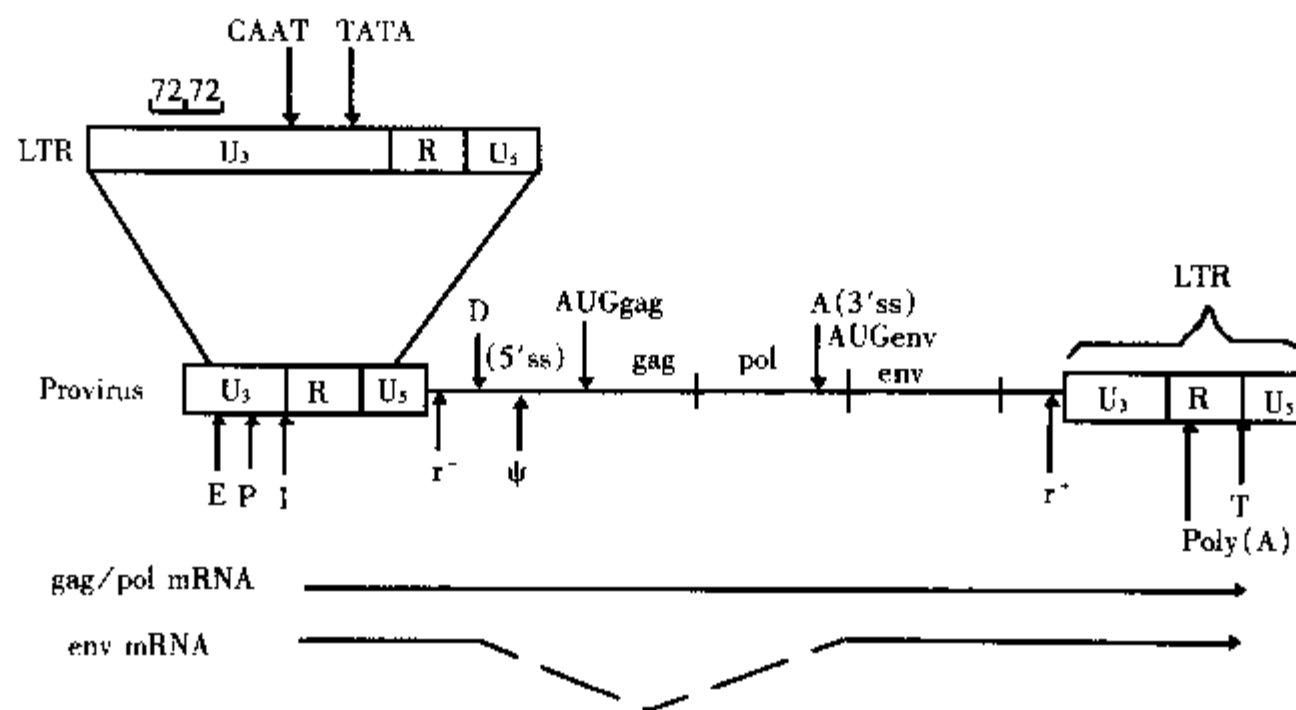


图 24-1 鼠莫洛尼白血病反转录病毒前病毒 DNA 结构

E, 增强子; P, 启动子; I, 病毒 RNA 合成起始部位; D, 给位裂解部位; γ^- , 副链 DNA 复制起始部位; ψ , 包装信号; A, 主要受位裂解部位; γ^+ , 正链 DNA 复制起始部位; T, 病毒 RNA 合成中 3'多聚腺苷酸加成部位; LTR, 长末端重复; U₃、U₅、R, 长末端重复的部分; gag, 病毒核心特异抗原; pol, 依赖 RNA 的 DNA 聚合酶 (反转录酶); env, 外壳蛋白。72.72, 72bp 重复; CAAT、TATA, 启动子区保守盒。

信号不能包装。病毒载体导入细胞后, 载体与包装细胞作用互补共同完成病毒包装, 出芽的病毒粒子转染目的细胞后, 因目的细胞不含编码包装蛋白的序列, 病毒 DNA 不能包装出芽从而避免了扩散。第一代包装细胞系 ψ_2 即是基于这种设想而构建的。 ψ_2 是单向性包装细胞系, 由此出芽的病毒粒子只能感染啮齿类动物, 这一种属特异性是由病毒粒子表面的糖蛋白类型所决定。因为反转录与整合的信号是完整的, 当导入的反转录病毒载体与缺失的 3'末端有交联时可产生辅助病毒即野生型病毒, 受感染细胞的内源序列亦可修复病毒的基因组缺陷。如辅助病毒的基因组同时被包装, 病毒粒子进入受体细胞后可进一步感染其它细胞, 即包装信号的去除仅能降低但不能排除辅助病毒的产生。第二代包装细胞系以 PA317 为代表, PA317 细胞株是双向性包装细胞系, 由 PA317 出芽的病毒粒子, 不仅可感染啮齿类细胞, 也可感染包括人类在内的灵长类细胞。它不仅缺失包装信号 ψ 序列, 还缺失 5'LTR 的 5'末端, 同时 3'LTR 与负链的起始位点被 SV40 的聚腺苷位点取代。经过如此处理, 即使这一结构的 RNA 也被包装, 仍不能反转录。同时病毒整合所需的位点缺失, 载体与包装细胞系之间必须发生两个同源重组才有可能产生辅助病毒。比起单纯缺失 ψ 序列的包装细胞系, PA317 产生辅助病毒的几率要低得多。对构建包装细胞系的进一步改进是将 gag/pol DNA 片段与 env DNA 片段分离并引入突变与缺失, 于 gag 或 env 两个区域的转录位点分别插入连接子 (linker) 以产生突变, 大部分分离的转录单位的 LTR 被 SV40 的聚腺苷信号取代, 由此构建单向性包装细胞系 ψ CRE 与双向性包装细胞系 ψ CRIP, 这两个细胞株可看成第三代包装细胞系。在包装细胞的两个转录单位与载体或内源成分共 3 个 DNA 重组才能产生辅助病毒, 但因突变位于转录单位, 可能仅需两种重组事件发生即可产生辅助病毒。重组发生于包装细胞内的病毒序列与反转录病毒载体或内源成分的反转录样结构, 另外分离的编码区顺序交叉可能增加重组的几率, 如重组则有可能修复两个突变产生辅助病毒。实验证明当采用特定的载体时, ψ CRE 与 ψ CRIP 细胞系产生辅助病毒的倾向小于 PA317 细胞。

24.2.2 腺病毒

Ad 的病毒粒子无包膜, 二十面体对称, 基因组为线状双链 DNA。Ad 病毒粒子通过其纤维蛋白与敏

感细胞膜上特异性受体结合进入细胞浆内,立即脱衣,暴露的病毒核心体通过核膜上的空隙进入核内,或释放出 DNA 进入核内,入核后先进行立即早期和早期 mRNA 转录,然后是 DNA 的半保留复制,再开始晚期转录。mRNA 的翻译产物回到核内进行包装,先形成一个原衣壳,复制的 DNA 进入原衣壳内,再释放到细胞外。

腺病毒易于培养和纯化,基因组的复制与转录依赖于细胞的聚合酶,因此病毒基因的表达调控可以模拟宿主细胞的基因表达机制,允许插入载体的外源基因长度可达 36kb,病毒滴度较高 (10^{11} pfu/ml)。能感染非分化细胞,可原位感染组织,尤其是肺。其主要缺点是目前所用的载体含较多的腺病毒序列,可能刺激免疫反应或有其它副作用。因病毒载体未整合在染色体 DNA 上,基因表达可能不稳定。

在鼠体内采用腺病毒介导的基因转移,一过性地提高低密度脂蛋白受体。携带人 LDL 受体 cDNA 的重组腺病毒在受体缺陷的培养细胞内具有 LDL 受体功能。对正常鼠静脉注射重组病毒使血浆胆固醇水平降低,而循环血液中¹²⁵I 标记的 LDL 廓清率升高。病毒注射后 4 天,血浆 LDL 的 t_{1/2} 降低 10 倍。采用 LDL 受体的免疫荧光或 β -半乳糖苷酶染色说明约 90% 的肝实质细胞表达腺病毒转移的基因。结果显示腺病毒介导的 LDL 受体基因转移提供一个在肝脏短期内大幅度提高 LDL 受体基因功能的途径。

用腺病毒载体携带人囊性纤维变性跨膜传导调节子 (CFTR) 基因,以气管滴注方法转移至棉鼠呼吸道上皮。转移后 6 周内可检测到人 CFTR 基因转录水平的表达。11 天至 14 天用抗人 CFTR 抗体检测到 CFTR 蛋白。这些结果提示不久将作人囊性纤维瘤临床基因治疗。

24.2.3 腺病毒伴随病毒

腺病毒伴随病毒亦称依赖性病毒 (dependovirus), 它的繁殖依赖于辅助病毒, 后者包括腺病毒和疱疹病毒。AAV 成熟病毒粒子内或含有正链 DNA, 或含有负链 DNA, 来自不同病毒粒子的正负链 DNA 在试管内可形成双链 DNA 结构。AAV 的复制在细胞核内进行, 完全依赖宿主细胞 DNA 的复制机制。AAV 转录产物较小。病毒粒子有三种结构蛋白。所有 AAV 大分子的合成均受辅助病毒的影响, AAV 与 Ad 的混合感染可以明显地抑制 Ad 的复制。在这种溶菌性感染中, 复制需要 Ad 或 HSV 的共同感染。当缺乏辅助病毒时, AAV 感染导致其基因组整合到宿主细胞染色体基因组上, 形成潜伏感染状态, 然后当有辅助病毒感染同一细胞时, AAV 基因组 DNA 将复制。取自潜伏感染细胞的染色体与 AAV DNA 的原位杂交证实, AAV 基因组整合的位点在 19 号染色体 q13.4。数个独立的整合位点的顺序分析显示, 断裂点均位于宿主细胞 DNA 上 100bp 内, 将基因组 DNA 特异地整合到宿主细胞染色体上单一一位点以形成病毒潜伏感染。在迄今所见的病毒 DNA 整合中, AAV 的这种位点特异性整合是仅有的。

24.2.4 单纯疱疹病毒

HSV 病毒粒子外膜由类脂双层膜组成, 外膜包被一层无定形的球状物质壳皮, 壳皮覆盖由 162 个壳粒排列成十二面体的衣壳, 衣壳下侧固定有 DNA 纤维卷轴末端, 纤维卷轴缠绕核心。HSV 的 DNA 为双链线状, DNA 链中有末端重复序列和内部重复序列, 链中有缺口。

HSV 进入细胞并呈潜伏状态不需要细胞的分裂, 病毒基因组未整合到细胞染色体上但可在神经细胞核内持续存在, 这一特点排除了由插入失活或激活原癌基因而扰动细胞内过程的可能性。可以通过立体接种将 HSV 导入脑内特定区域, 设想可用神经细胞类型特异的启动子实现基因的特异表达。HSV 基因组中有许多基因在细胞培养中对病毒生长是非必需的, 去除这些非必需成分不影响病毒体外复制而极大地降低体内复制和由此产生的神经毒性。HSV 载体可导入大片段基因以至多个基因, 构建 HSV 载体期望得到有组织特异性的、稳定、适宜的表达。从三点考虑建立这样的 HSV 载体: ①设计合适的突变载体骨架以产生非致病性突变, 可采用在非功能区缺陷的病毒载体或在功能基因中采用非复制型突变缺陷; ②设计合适的启动子/调节子以产生合适的基因突变, 可采用强的病毒启动子, 在病毒溶细胞基因不表达的情况下表达外源基因, 但当采用非 HSV 的病毒启动子时外源基因的表达是一过性的, 而由在

中枢神经细胞中潜伏感染的启动子驱动的外源基因的表达是低水平的, 尚未在脑内建立合适的神经细胞特异的基因表达方式; ③转移基因在载体上的位置对于在神经细胞内产生潜伏感染要求严格, 这一位置对外源基因表达的影响尚未找到规律。

HSV 的基因几乎全部转录。在溶菌感染状态, 依次表达立即早期 (α)、早期 (β) 与晚期 (γ) 基因; 在潜伏感染状态, α 、 β 、 γ 基因均不表达, 而转录一系列的无多聚 A 的与潜伏感染相关的转录本, 其确切分子机制不明。在细胞培养中, HSV 产生的病毒滴度可高达 10^{10} pfu/ml, 这一特点提供了用小体积立体定位接种至神经细胞的可能性。

24.2.5 脂质体

用一定比例的磷脂酰胆碱与磷脂酰丝氨酸共溶于氯仿, 制备有双层磷脂膜的脂质体。超声波处理将待转移的 DNA 分子包入脂质体中, 受体细胞可吞噬这种含外源基因的脂质体, 以此达到基因转移。脂质体已用于直接体内基因转移。将对特异靶细胞的单克隆抗体包埋于脂质体的脂质双层, 用超声处理将目的基因 DNA 包入这种“免疫脂质体”中。DNA-免疫脂质体的腹腔注射使基因转移至胞膜对单克隆抗体产生免疫反应的细胞。

24.2.6 受体介导的蛋白

受体介导的蛋白研究较多的是唾液酸糖蛋白与转铁蛋白。转铁蛋白受体介导的基因转移已成功地将 DNA 转移至多种离体细胞, 唾液酸糖蛋白受体介导的基因转移对肝细胞高度特异, 体外与体内实验均已将 DNA 转移至肝细胞。蛋白质与多聚赖氨酸或其它阳离子化合物偶联, 所带正电荷有利于形成 DNA/蛋白复合物, 复合物经静脉注射后, 受体所在的部位将决定其细胞特异性。影响核内体/溶酶体旁路的药物如氯喹增加基因转移的效率。蛋白受体介导的基因转移属直接体内的方法, 这一方法已显示出对肝细胞的突出优点, 不仅是唾液酸糖蛋白介导的基因转移对肝细胞高度特异, 而且不象反转录病毒载体那样需要作肝部分切除才能实现高效转移。受体介导的蛋白携带反义 DNA, 可显著抑制肝炎病毒基因的复制与表达。

24.3 受体细胞与转移基因的表达

考虑基因转移的受体细胞时, 不管是直接体内还是间接体内基因转移, 选择目的基因表达的组织细胞, 最好是组织特异性细胞, 在一种组织细胞中表达后可分泌或以其它方式进入靶细胞的也可应用。对于间接法基因转移, 还应考虑: ①细胞较易从体内取出且有增殖优势, 最好生命周期较长; ②离体细胞较易受外源遗传物质转化; ③细胞经转化和一定时间培养后再输回体内仍能成活。

24.3.1 造血细胞

造血细胞种类多样且在体内多处分布, 有多种疾病累及造血细胞, 已建立骨髓移植方法, 造血细胞较符合间接体内基因治疗应考虑的因素, 因此造血细胞作为基因转移的受体细胞研究较多, 其中骨髓最受重视。因骨髓含多种造血细胞且处于不同发育阶段, 如基因转移至分化细胞, 则转移基因只能在这种特定细胞的生命周期内表达。只有将基因转移至骨髓多能干细胞, 才能使转移基因终生存在于所有造血细胞内。目前主要采用反转录病毒载体介导的基因转移, 通过包装细胞系转染造血细胞。一般先用磷酸钙沉淀的方法将携带目的基因的反转录病毒载体导入单向性包装细胞系, 用出芽的病毒粒子转染双向性包装细胞系。在双向性包装细胞系中筛选出转移基因整合完整且病毒滴度较高的细胞克隆, 用筛选出的细胞克隆出芽的病毒粒子转染动物离体细胞, 作短期培养再输回动物体内。这种方法类似自体组织移植, 其主要区别是移植细胞受到反转录病毒的转染。主要关心的是转移系统的安全性与有效性, 转移基

因在受体细胞表达的适宜性。在转染目的细胞之前,对导入外源基因的双向性包装细胞系克隆作系统筛选,是为了最大限度地克服由反转录病毒载体的不稳定性所造成的基因缺失、重排和病毒滴度低等特点。检测受转染动物外源基因的整合与表达,并用非常敏感的方法检测有否辅助病毒的产生,是从整体水平上考虑安全性与有效性。反转录病毒载体介导的基因转移,只有在细胞处于分裂状态时进行转染,才能将外源基因导入受体细胞。因此这种方法适合于分裂较快的造血细胞,也可用于皮肤成纤维细胞、肝细胞等。不适合于增殖较慢甚至不分裂的细胞,尤其是肌肉细胞与脑细胞。对于反转录病毒载体转染造血细胞,目前只有少数实验室可分离鼠骨髓干细胞,人类与其它高等动物的骨髓干细胞尚未被分离,因此目前主要是将基因转移到未分离的骨髓细胞。取自整体动物的骨髓细胞先用 5-FU 处理使细胞分裂增强,然后用含目的基因的出芽病毒粒子转染,作短期培养后,再将骨髓静脉注射入受过放射处理的动物。如转移后 4 个月仍能在受体动物的骨髓和/或淋巴组织内检测到转移基因的表达,即认为转移基因已整合于造血干细胞。应用这种方法,已在鼠体内得到腺苷脱氨酶基因的长期表达,二氢叶酸还原酶突变体基因已在鼠体内表达并显示对转染细胞的选择优势。反转录病毒 DNA 在转移细胞染色体基因组上随机高效整合,但重建的动物造血组织细胞的基因组 DNA 中反转录病毒的不同整合位点数较少,说明只有少数受感染细胞在骨髓细胞内成活。转染及筛选过程使骨髓增殖能力降低,可能是丢失干细胞或对干细胞转染不足的原因。对人类基因治疗需要高效基因转移。骨髓细胞培养、造血干细胞的纯化,在细胞培养中使用多种生血因子联合应用,可望增加基因转移效率。

于出生前 7 周用反转录病毒载体介导的 NEO 基因通过子宫转移至胎羊造血细胞,出生后 1 周在骨髓、外周血、脾脏及胸腺均检测到 NEO 基因,出生后 6 周在骨髓检测到新霉素磷酸转移酶基因, G418 抗性在出生后 2 年内均检测到。但对成年羊骨髓细胞转染同一基因未能成功。向猴、犬及猫等成年动物骨髓细胞转染 ADA 与 NEO 基因,其结果不尽相同。猴子于骨髓移植后 4 个月内可检测到 ADA 的低水平表达,约 1% 外周血细胞在移植后 3 个月内持续存在反转录病毒载体顺序。在基因转移后 2 年内于数只犬体内淋巴细胞与骨髓细胞内检测到载体顺序,但仅有 NEO 基因低水平表达而未测到 ADA 基因的表达。对猫基因转移结果与犬类似,转移后 2 年内在造血细胞内存在载体顺序与 NEO 基因表达,但 ADA 基因不表达。在对猴与猫的试验中,因载体制备中污染辅助病毒从而在实验动物中检测到辅助病毒,有几只猴子产生淋巴瘤,4 只猫中有 2 只在接受转染骨髓后 90 天产生糖尿病,这可能与辅助病毒的存在有关。可见反转录病毒载体介导的基因转移中载体制备需严格标准化,对成年大动物基因转移与表达的效率需进一步提高。亦有人提出标记干细胞或用细胞表面标记 CD34 筛选富集干细胞的细胞群,但有关技术问题尚未能解决。

24.3.2 肌肉细胞

反转录病毒载体介导的基因转移对骨骼肌细胞几乎无效。骨骼肌细胞的突出特点是可采用直接体内基因转移,即将 DNA 直接注射入骨骼肌细胞。用含 β -半乳糖苷酶基因的质粒直接注射入小鼠骨骼肌细胞,在注射区域的肌细胞检测到该基因的表达。用同样的方法注射含荧光酶基因的质粒,在 2 个月的检测中荧光酶基因以较稳定的水平表达,提示其表达持续时间会更长。用金粒子携带 β -半乳糖苷酶基因轰击鼠体内肌肉细胞,在轰击后 2 个月内鼠肌肉内有该基因的存在与表达。直接注射与轰击后外源 DNA 似乎以未整合的染色体外状态存在。直接注射法仅对骨骼肌细胞有效而轰击适用于多种细胞。

血管平滑肌细胞可以培养,经遗传操作后再送回血管。反转录病毒载体携带人 ADA 基因与细菌 NEO 基因转染培养的兔平滑肌细胞,用特制的球形导管剥去内皮细胞后,将受转染的兔平滑肌细胞送回动脉壁。人 ADA 基因在兔血管壁上以和内源 ADA 相近的水平持续表达半年以上。

24.3.3 成纤维细胞

用携带目的基因的反转录病毒载体转染成纤维细胞,已表达具有生物活性的 ADA、葡萄糖脑苷酯

酶、嘌呤核苷磷酸化酶、低密度脂蛋白受体与凝血因子Ⅸ等。经过遗传操作的成纤维细胞的胶原基质可分泌因子Ⅸ，将这种基质移植到动物皮下检测到因子Ⅸ的表达。这一方法已用于临床治疗血友病 B。

经遗传操作的成纤维细胞可注射入动物骨骼肌并能持续表达转移的外源生长激素基因达 85 天。用于这一实验的 C_2C_{12} 细胞是恶性的鼠成纤维细胞株，能在受体细胞形成肿瘤。生长激素表达随时间推移而增加说明移植细胞持续增殖。正常成纤维细胞行为完全不同，移植后能阻遏转移基因的表达。值得探讨的是正常成纤维细胞能否在移植后持续表达一定水平的外源基因及对大动物是否有效。

24.3.4 肝细胞

肝脏是重要的代谢器官，有多种遗传病由肝脏特异的基因产物缺陷引起，且肝脏是肿瘤的高发部位，因此肝细胞成为基因治疗研究的重要目的细胞。已采用多种方法支持移植的正常肝细胞。与葡聚糖基质连接的肝细胞可在腹腔内持续 2 个月并在 1 个月内有功能。包有肝素结合生长因子的聚四氟乙烯纤维支持物可在腹腔形成器官样结构，这种结构能迅速血管化支持移植的肝细胞，用这种方法使正常肝细胞在患有高胆红素血症鼠体内持续存在，并降低血胆红素水平至少 4 个月。

由反转录病毒载体介导，将外源基因转移至离体细胞，然后作自体组织移植，是肝细胞基因转移中采用较多的方法。这种间接体内基因转移的方法，供体与受体肝细胞不易区别，从而难以估计其可行性，为回答这一问题，建立两种转基因鼠，分别携带大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因与人 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶基因 (hAAT)，用脾内注射方法将转基因鼠肝细胞注入非转基因鼠，移植后 2 个月用 X-gal 显色证明在肝脏实质细胞而不是在脾内有大量的这种移植细胞存在，hAAT 基因在受体鼠内稳定高水平表达持续 6 个月以上。这说明转基因鼠的肝细胞经同种异体移植可以成活并继续发挥肝细胞的功能。在肝细胞自体移植实验中，反转录病毒载体携带由细胞肥大病毒启动子驱动的 hAAT cDNA，以此转染 2 只犬离体肝细胞并由门静脉作自体移植，在 2 只犬血浆内检测到高水平 hAAT 达 1 个月，hAAT 的表达由于启动子失活而下降，但 PCR 分析表明转染的肝细胞移行至肝脏并成活。这种间接体内基因转移方法较繁杂。直接将外源基因转移至体内肝脏，方法之一也是采用反转录病毒载体介导的基因转移，对鼠肝脏行部分切除术以诱导肝细胞再生，术后 24~48 小时一过性阻断肝血液循环，然后通过门静脉输入由反转录病毒载体介导的 β -半乳糖苷酶基因。转移 3 个月后，至少 5% 的肝脏表达转移的 β -半乳糖苷酶。采用这种方法转移 hAAT 基因，受转染的鼠肝细胞持续表达这一蛋白在 30~140ng/ml 水平至少 6 个月。实验动物外观及肝脏组织学检查未见异常。另一种方法是将唾液酸糖蛋白与多聚赖氨酸偶联通过与肝的唾液酸糖蛋白受体相结合转移大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因至鼠肝细胞，约有 0.1% 肝细胞被转染并检测到低水平的 β -半乳糖苷酶。这种受体介导的基因转移系统与腺病毒的核内溶胞能力相结合可促进 DNA 转移至肝细胞并产生高水平基因表达。DNA 蛋白复合物与缺陷腺病毒相结合， β -半乳糖苷酶表达提高 1000 倍，所有肝细胞均被 X-gal 染为蓝色。采用这种方法将人苯丙氨酸羟化酶基因转移至缺乏该酶的鼠体内，结果酶活性全部重建。

24.3.5 其它细胞

用反转录病毒载体介导的基因转移至离体的猪与犬内皮细胞，自体内皮细胞移植后，外源基因表达可持续 1~2 个月。内皮细胞分泌抗凝血因子以抑制所在部位血栓形成，血管内皮细胞只有一层，广泛分布、数目有限及局部作用的特点限制了这一实验的实用性。

肿瘤浸润的淋巴细胞 (TIL) 以专门攻击肿瘤为其突出的特点。在体外用反转录病毒载体转染 TIL 细胞，扩增后再输回患者体内，受转染的 TIL 细胞在患者体内尤其是肿瘤部位持续存在未见明显副作用。TIL 细胞携带肿瘤坏死因子 (TNF) 基因，分泌的肿瘤坏死因子可杀伤肿瘤细胞。

24.4 人类基因治疗的审批程序

基因治疗是一个全新的医学领域,它采用多种方法,治疗多种疾病,而其治疗结果基本上未知的。因此其临床应用需要专门机构的审批是必须的。美国是最早开展基因治疗的国家。在美国每个用于人类基因治疗的方案需经过几个机构的审查,它们的权限实际是有交叉的,但对于基因治疗这一全新的领域,这种多余被认为是合理的。研究者将基因治疗方案呈送国立卫生研究院(NIH)重组DNA顾问委员会(Recombinant DNA Advisory Committee, RAC)下属的人类基因治疗小组委员会(Human Gene Therapy Subcommittee, HGTS),HGTS审查后呈送RAC,RAC审查后再送交食品药品监督管理局(FDA),经过HGTS,RAC与FDA三个机构均审查通过的方案才能用于临床。1992年2月撤销了HGTS,现在研究者提交的人类基因治疗方案需经过RAC与FDA两个机构的审批。

RAC的审查要点是治疗方案对受治患者与大众的安全性,对患者的预期疗效与潜在危险相比较。从接受基因标记实验的患者主要希望得到有用的信息,而对接受基因治疗的患者必需提出预期临床疗效。对于具体的基因治疗方案,RAC考虑以下问题:临床治疗程序相关的质量是否保证,治疗的最终目的与具体检测指标,对副作用与潜在危险的检测指标,治疗开始后长期随访的措施,开始与终止治疗的指征,所治疾病是否非致命性及有否其它替代疗法。FDA审查内容部分与RAC重复,其主要考虑治疗程序的特点,用于基因转移的生物制品的产品质量控制与鉴定。

24.5 基因标记与基因治疗

基因标记实验是基因治疗的前奏。标记假定对患者有治疗作用的细胞,由标记实验回答两个基本问题:①外源基因能否安全地转移到患者体内;②从患者体内取出的细胞能否检测到转移基因的存在。接受标记实验的患者不一定直接从治疗受益,其主要目的是得到对于进一步临床基因治疗有用的信息。标记实验与临床基因治疗的审批手续相同。

第一例基因标记始于1989年5月,采用NEO/TIL方案,接受基因标记实验的是恶性黑色素瘤患者。肿瘤浸润的淋巴细胞(TIL)直接从肿瘤组织分离,培养后取出一部分,由反转录病毒载体介导向TIL细胞转移NEO基因。标记与非标记的细胞分别培养,两种培养细胞均输回患者体内,定期细胞采样可反映TIL细胞在循环血液中的存在时间,定期肿瘤组织活检将指出肿瘤组织是否存在TIL细胞及标记的TIL细胞的大致的量。如研究足够多的病人,可看出标记TIL的存在及其与临床反应之间的关系亦有人提出培养标记的TIL以确定能否鉴定对肿瘤有效的TIL亚细胞群。第一批接受基因标记实验的患者结果显示,基因标记的TIL在输注后3周内可在循环血液中检测到,于输注9周后在肿瘤组织中可见少量的基因标记的TIL。用Southern分析T细胞受体 β -链异质性以比较输注的TIL与肿瘤活检得到的TIL之间的关系,从肿瘤组织增殖的TIL与输注的TIL有许多条共同区带,而用G418筛选的TIL与输注的TIL仅有少数几条共同区带,这一结果表明肿瘤活检中发现的特异的TIL细胞与输注的TIL非随机相关,或者在筛选的过程中来自活检组织的TIL产生不同的亚群。综上所述,第一阶段的基因标记实验已回答了两个基本问题,即外源基因能安全地转移到患者体内,从患者体内取出的细胞能检测到转移基因的存在。但研究中不能得到临床效果与分离到的不同肿瘤活检组织中标记的TIL细胞亚群之间的关系。

接受这种大量的经体外培养的自身TIL细胞的肿瘤患者多数有效,对其它治疗措施(包括IL-2)均无反应的患者,35%~40%对这一治疗有反应,但有反应者在6~12个月 after 治疗无反应。大部分受治病例肿瘤再复发。似乎输入的TIL细胞中只有一部分在体内对杀伤肿瘤细胞有效,进一步探讨TIL细胞克隆化方法以获得有效的TIL细胞群,用半定量PCR比较肿瘤组织中标记TIL的量和相邻的正常皮肤与肌肉组织中的量以确定TIL细胞是否进入肿瘤沉积物中,亦采用可供不同的PCR探针鉴定的反转录病

毒载体携带 CD₄ TIL 以鉴定 TIL 细胞的亚群。

基因标记实验除用于 TIL 细胞外,亦用 NEO 基因标记用自体骨髓移植治疗白血病回输骨髓中可能存在的白血病细胞,用 NEO 标记用于治疗急性肝功能衰竭中的肝细胞供体,用 hph-tk 基因标记艾滋病治疗中的 HIV 抗原特异的 T 细胞。

24.6 遗传病基因治疗

遗传病基因治疗是最先考虑和最早实施的人类基因治疗。 β -地中海贫血是常见的遗传病,且其患病组织骨髓可以移植,曾认为地贫将是较早接受临床基因治疗的遗传病。但由于珠蛋白基因表达异常复杂,对其调控原理的认识尚需时日。作为基因治疗的首选对象,更合适的是选择影响 DNA 代谢与细胞分裂的突变,对突变的校正或功能补偿将产生正常的细胞分裂与代谢,结果与非校正细胞差别显著。有三种遗传病符合这一要求:ADA 缺陷、嘌呤核苷磷酸化酶 (PNP) 缺陷与次黄嘌呤-鸟苷磷酸核糖转移酶 (HGPRT) 缺陷。这三种缺陷的酶在嘌呤代谢中催化连续的步骤。在 70 年代初即用相配骨髓移植治疗 ADA 缺陷,治疗有效的患者在受治一年后,常常恢复自身血细胞,只有 T 细胞例外,完全来自供体。由此可见,单一的 DNA 正常的 T 细胞可用于治疗,且其对患者自身的 DNA 异常的 T 细胞有生长优势。因此,ADA 缺陷作为基因治疗的首选疾病。

表 24-1 目前遗传病基因治疗研究的主要对象

疾 病	缺陷基因
免疫缺陷	腺苷脱氨酶
	嘌呤核苷磷酸化酶
高脂血症	低密度脂蛋白受体
血友病	IX 因子
	X 因子
高歇病	葡萄糖脑苷脂酶
粘多糖累积症	葡萄糖苷酸酶
肺气肿	α_1 -抗胰蛋白酶
囊性纤维变性	囊性纤维变性跨膜调节子
苯丙酮尿症	苯丙氨酸羟化酶
高氨血症	鸟氨酸转氨基甲酰酶
瓜氨酸血症	精氨酸琥珀酸合成酶
肌肉萎缩症	营养因子
地中海贫血	β -珠蛋白基因
镰状细胞贫血	β -珠蛋白基因
白细胞粘着缺陷	CD-18

24.6.1 腺苷脱氨酶缺陷

ADA 缺陷的基因治疗于 1990 年七八月间先后得到美国 RAC 与 FDA 的审批。临床基因治疗于 1990 年 9 月 14 日开始。第一个接受基因治疗的是一个 4 岁女孩,她曾用 PEG 偶联的 ADA 置换治疗达两年,只在这种治疗开始时有效,在基因治疗开始时完全无免疫反应。开始基因治疗后患儿每月作一次白细胞透入 (Leukopheresis),用 Ficoll 梯度分离患儿离体血细胞得到单核细胞,在 OKT₃ 抗体与 IL-2 存在下培养这些细胞以刺激 T 淋巴细胞,当 T 细胞分化时,与携带正常 ADA 基因与 NEO 基因的载体共培养数

日,然后将 T 细胞输回患儿体内。所以采用这种治疗方案,是因为在正常 T 细胞池内, T 细胞不同部分应答不同的抗原,而 T 细胞的这种组成持续改变,取决于每个 T 细胞所接触的抗原种类。因此,如用单一样品经过长时间培养大量的 T 细胞,可能产生少数克隆占绝对优势,从而导致患者 T 细胞免疫漏洞。因此采用少量多次采取血样短期培养后输注的办法。

该受治患儿从 1990 年 9 月起 10 个半月,共接受 7 次自体细胞输注,同时每周注射 PEG-ADA,患儿免疫功能增强,临床症状改善,根据单核细胞群中 ADA 含量与 PCR 分析,在循环血液中有相当于正常人的 20%~25% 的 ADA 基因校正的 T 细胞。其后 6 个半月未接受基因治疗,然后每 3~5 个月接受一次治疗。1991 年 1 月起第二例患儿(9 岁女孩)接受同样基因治疗并取得类似疗效。两例患儿于基因治疗奏效后较少感染,均已入学。未见由细胞输注和转移的 ADA 基因自身带来的副作用。同时发现 ADA 缺陷的 T 细胞群半衰期约 30~35 天,ADA 校正的 T 细胞群半衰期长得多,约 3~5 个月。在开始基因治疗后的 10 个半月内 ADA 水平稳定升高,从不到正常人 1% 增至 25%,其后未接受基因治疗的 6 个半月内维持这一水平。转移的 ADA 基因在体内长时间持续表达,可能代表整个 T 细胞生命周期。

ADA 缺陷的临床基因治疗所潜在的问题是,因仅转染成熟的 T 细胞,免疫系统可能有漏洞。皮肤试验并非对所有的抗原都有反应,提示免疫功能未能完全恢复到正常。为回答这一问题,用 CD34 作特异抗体免疫筛选富集的造血祖细胞与干细胞,在保护干细胞功能同时促进反转录病毒载体介导的基因转移的培养条件下,用 ADA 基因转染两种细胞:成熟的 T 细胞与富集的干细胞,携带 ADA 基因的反转录病毒载体结构上有差异可用 PCR 检测,这样有可能比较富含 CD34 的细胞与成熟 T 细胞的作用差异。对这一治疗方案进一步提出的问题是:ADA 基因校正的富含 CD34 的前体细胞产生的临床效果是否较经过相同处理的成熟 T 细胞持续时间长,富含 CD34 的 T 细胞前体经基因校正后是否产生新的免疫功能。这方面的临床试验已经开始,疗效有待进一步观察。

对这一治疗方案进一步探讨的问题是:①能否测定来自外周血富含 CD34 细胞群中经基因标记的淋巴样的与髓样的血液细胞?如有可能,这将提示该细胞群存在上述两种细胞前体,且均被反转录病毒载体转染;②能否用克隆细胞的 Southern 杂交来确定淋巴样与髓样细胞来自同一种受转化的前体细胞?如是,这将是基因转移至干细胞的证据;③循环血液中基因标记的前体细胞在多长时间可检测到?如果干细胞被转染,则患者终生均可检测到。

荷兰的研究者对灵长类(恒河猴)的实验结果证明,在一定的实验条件下,用反转录病毒载体介导的基因转移,有可能转染取自骨髓的全能干细胞。根据对恒河猴的动物实验结果,该研究组已被批准并开始采用骨髓基因转移方案治疗 ADA 缺陷。

24.6.2 血友病

血友病是 X-染色体连锁的遗传性出血性疾病。A、B 型血友病分别由凝血因子Ⅷ与Ⅸ的缺陷引起。我国复旦大学遗传所兔子作为血友病 B 基因治疗研究的动物模型。用反转录病毒载体携带Ⅸ因子 cDNA,以重组体转染培养的正常兔子皮肤成纤维细胞,筛选能合成并分泌高水平的有生物活性的Ⅸ因子蛋白的成纤维细胞并包埋至胶原基质,将包埋物手术植入自体或同种异体兔体内。在植入兔血浆内均检测到Ⅸ因子蛋白且持续 1 年以上。将受转染的细胞胶原混合物对兔作皮下注射,在兔血浆内Ⅸ因子水平达 480ng/ml。

在上述动物实验的基础上,作了严格的安全性检测后,复旦大学遗传所与第二军医大学长海医院提出临床基因治疗血友病 B 的方案,经过基因治疗审查筹备组审批后,于 1991 年 12 月 3 日起对两例血友病 B 患者进行基因治疗。用携带Ⅸ因子基因的反转录病毒载体转染患者离体皮肤成纤维细胞,筛选能分泌Ⅸ因子蛋白的成纤维细胞,用胶原包埋再注入患者本人皮下。有两侧患者接受这种治疗,患者 1 受转染的离体成纤维细胞的Ⅸ因子蛋白分泌率为 300ng/10⁶ 细胞/24 小时,患者 2 为 400ng/10⁶ 细胞/24 小时;治疗后患者 1 血浆Ⅸ因子浓度由 130ng/ml 升至 250ng/ml,凝血活性未见明显改变,患者 2 血浆Ⅸ因

子浓度由 70ng/ml 升至 240ng/ml, 凝血活性由 2.9% 升至 6.3%, 临床出血症状明显改善。说明血友病 B 临床基因治疗已初见成效。

24.7 肿瘤基因治疗

真核细胞的生长分化与衰亡是细胞内特定基因群程序化表达的结果。原癌基因与抗癌基因参与这种正常表达的调控过程。两类基因的命名是因为最初发现时只认识到它们与肿瘤的关系, 现在也称它们为公共关系基因。肿瘤起源于细胞内基因表达调控失常及与其周围组织关系的紊乱。一个正常细胞变成恶性细胞大体上都要涉及抗癌基因的丢失或失活以及原癌基因被激活成癌基因。从理论上推测, 有多少个原癌基因就可能有多少个抗癌基因, 某一种原癌基因与抗癌基因对细胞分裂的正负调控, 只在某种特定的细胞范围才起作用。因此用抗癌基因治疗肿瘤, 使肿瘤细胞回复正常的基因表达与增殖分化, 是有特异性的理想途径。现在已报道的癌基因已有上百个, 而分离到的抗癌基因却很少, 其表达调控机制仍在研究中, 尚难直接用于肿瘤基因治疗。

目前采用的肿瘤基因治疗的方法是非特异性的, 主要采用肿瘤浸润的淋巴细胞 (TIL)、肿瘤坏死因子 (TNF) 与白细胞介素-2 (IL-2) 及其它细胞生长因子。1989 年采用 NEO/TIL 进行临床基因标记试验, 当证明外源基因可以安全地转移到患者体内, 且从患者体内取出的细胞能检测到转移基因的存在以后, 即产生出新的治疗方案: 在 IL-2 存在下大量培养取自肿瘤患者并分离的 TIL 细胞, 由反转录病毒载体介导的 TNF 基因转移至培养的 TIL 细胞, 使 TIL 细胞对恶性黑色素瘤及其它肿瘤的治疗更有效。在动物实验中 TNF 对于鼠是强力抗肿瘤剂, 鼠可耐受 400 μ g/kg 体重: TNF 用于临床, 当剂量达到 8 μ g/kg 体重时即产生明显的副作用。采用未修饰的 TIL 细胞治疗肿瘤, TIL 细胞有专门攻击肿瘤的特性, 导入 TNF 基因的 TIL 细胞可望在肿瘤组织中“安家”, 在局部产生高浓度 TNF 以杀死肿瘤而不带来严重的副作用。可能是 TNF 基因导入 TIL 细胞产生一种未知因素, 影响了 TIL 细胞进入肿瘤组织的能力, 结果肝、脾和肺组织内也滞留一定量的 TIL 细胞。如 TNF 基因在这些细胞内表达, 这些异位 TNF 就会对机体产生明显的毒性。还需要进行系统的毒性试验以确定在 TIL 细胞可能滞留的器官内是否产生毒性浓度的 TNF。TIL 细胞携带的 TNF 基因表达水平不象预期的那样高, 新的载体可望增加 TNF 基因的表达。从 1991 年 1 月起在美国 NIH 采用 TNF/TIL 方案治疗晚期恶性黑色素瘤患者, 受治病例对包括未修饰的 TIL 细胞等其它治疗肿瘤的方法均已无效。至 1992 年底, 已治疗 9 例这样的病人, 仅有 1 例仍存活。对晚期肿瘤患者治疗效果的评价是一个复杂的问题, 对 TNF/TIL 治疗方案下结论为时尚早。有关携带 TNF 基因的 TIL 细胞攻击肿瘤的专一性, TNF 基因的表达水平, 异位 TNF 的浓度及毒性作用, 这些问题均需要作进一步系统深入的研究。

24.8 伦理学安全性与社会效应

当基因治疗考虑生殖细胞途径时, 因转移基因在受体细胞基因组上随机整合后可传给下一代, 对相关个体及人类基因库有长期持续影响, 这就涉及伦理学问题。近几年对采用生殖细胞途径进行基因治疗较少提及, 最近又成为一个话题, 但迄今尚未能提出一个切实可行的方法。伦理学所产生的社会惯性是不可低估的, 但科学技术上的重大突破常产生知识的不连续性, 强有力的先进技术不仅改变人类的行为, 有时也能改变人们的思想, 包括哲学与伦理学。设想有朝一日产生一种新技术, 可安全有效地定位修复人类生殖细胞; 从而根治遗传病, 到那时人类可能会重新考虑对遗传病进行基因治疗的问题。

目前已经进行和即将开始的基因治疗, 都是体细胞基因治疗。且目前主要采用反转录病毒载体介导的基因转移, 较突出的是安全性问题, 一般从三个方面考虑反转录病毒载体用于基因治疗所产生的安全性问题: 第一, 对治疗病人, 可能产生的问题是肿瘤发生的危险性增加, 诱导产生其它有害突变, 产生

感染性病毒即辅助病毒及一些难以预料的并发症；第二，医务工作者及患者家属是否受病毒感染，如何应付患者医学及心理学并发症；第三，对一般大众，有否面对产生新的感染性病毒的可能性。随着包装细胞系的逐步改进，感染性病毒产生的可能性越来越小。反转录病毒插入突变可导致基因调控异常，病毒随机插入宿主细胞染色体基因组，因大部分基因是双拷贝的，反转录病毒的单拷贝插入一般不导致细胞死亡，因此不导致严重的临床并发症。担心的是载体的插入产生细胞生长的异常调节而导致恶性增生。

用作基因治疗的载体多来自鼠莫洛尼白血病病毒 (MO-MLV)，它对人类的恶性倾向尚不清楚。MO-MLV 是一个慢转化反转录病毒，潜伏数月出现肿瘤。当注入敏感的新生鼠，MO-MLV 使大多数动物产生克隆肿瘤。新生鼠的易感性可能和存在于成熟胸腺中的因子有关，这一因子促使 MO-MLV 与内源的反转录顺序重组，如 Mink 细胞病灶形成病毒 (MCF) 具有很强的致白血病性。据信是结合病毒 MO-MLV-MCF 导致鼠 T 细胞淋巴瘤。因人类细胞不含相同的遗传背景，似乎不存在致白血病的结合病毒的可能性。结合病毒的恶性转化作用可能是由于反转录病毒的插入激活了原癌基因。在所有 MO-MLV 转基因动物中，前病毒的插入激活了 c-myc 或 n-myc，MO-MLV 可能在肿瘤形成的多个步骤中起作用。综上所述，反转录病毒介导的基因治疗对人类致癌危险性较低，但真正回答这一问题仍需长期的灵长类动物实验及临床经验，因此对用反转录病毒介导的基因治疗患者进行密切随访是非常重要的。

基因治疗需要医学生物学工作者作坚持不懈的努力，还需要患者、亲属以至全社会的配合，在医学、伦理学与社会学诸方面的探索前进中求得共识。既要增强战胜疾病的信心，又要对治疗方案的利弊有一个正确的认识并不断改进。在实施治疗方案时更需要有各方面的共同努力。只有这样，人类征服遗传病、肿瘤等疑难病的理想才能逐步变为现实。

本章所述人类基因治疗，指的都是人类疾病的基因治疗，不包括其它目的。将来会不会将人类基因治疗的目的扩大，研究提高人的智商，增强某一方面功能的基因治疗，这涉及更大范围、更高层次的伦理学与社会学问题，不属于本文讨论的范畴。

今后，除了反转录病毒载体介导的基因转移外，还将有其它基因转移系统用于人类基因治疗。较有应用前景的有腺病毒、单纯疱疹病毒作载体的基因转移，直接注射 DNA 对不分化的组织如肌肉也有一定潜力。当考虑新的载体系统用于人类基因治疗时，需对该基因转移系统可能产生的安全性问题作全面评估。若认为是可行的，实施临床基因治疗后对受治患者的密切随访自然是必须的和重要的。

24.9 问题与展望

目前用于临床基因治疗的，是间接体内随机整合的体细胞基因转移方法。这种方法需从患者体内取出异常细胞，体外培养并导入相应的正常基因，再将整合外源正常基因的细胞输回患者体内。这种基因转移程序方法繁杂，所用技术专业性强，要求条件高且花费昂贵，在一般医疗机构难以实施。目前所用的基因转移载体，是反转录病毒前病毒基因组的顺式序列，未来可望用于这种转移方法的基因载体，仍主要是病毒载体。除腺病毒伴随病毒外，其它病毒载体介导的基因转移在受体细胞染色体基因组上的整合都是随机的，因此必须考虑由病毒载体本身与随机整合所带来的安全性问题。基因转移的受体细胞是已分化的细胞，因其生命周期有限，患者需反复接受基因治疗，对其应用产生更大的局限性。同时，反转录病毒载体只能转染可以离体的细胞，且只有分裂较旺盛的受体细胞才对这种转移方法敏感。

直接注射是最简易的基因转移方法，较适宜的受体细胞是肌肉细胞，转移基因似乎以未整合的染色体状态存在，外源基因表达持续时间数月不等。直接注射法有待进一步深入探讨。

原位基因转移，即由受体介导的基因转移所存在的主要问题是转移基因在非分裂的细胞中不稳定，通过唾液酸糖蛋白复合物能将 DNA 定位导入肝，但只有事先将肝大部分切除以刺激细胞分裂的情况下，转移基因才能较长时间地表达。从采用转铁蛋白-多聚赖氨酸偶联产生的受体介导的基因转移中发现，

腺病毒可明显增强这种基因转移过程，可能是在核内影响载体从复合物上释放，结果使转移基因的表达水平大幅度提高。这种方法有其发展前景。

造血干细胞一直是基因治疗研究中最受关注的受体细胞。对人类造血干细胞的识别、分离培养及相关理论研究酝酿着新的突破。如能完全分离造血干细胞，在体外培养扩增且保持分化潜能，可对单一的干细胞克隆，进行遗传操作，如同源重组使转移基因在受体细胞染色体基因组上定位导入，再将这种基因校正的造血干细胞输入患者体内。患者接受一次基因治疗可终生受益。因为转移的正常基因取代了患者造血干细胞内原有的异常基因，从而排除了由随机整合所产生的安全性问题。

目前临床进行的间接体内基因治疗，采用与自体组织移植类似的方法，避免了移植物抗宿主(GVHD)的发生。但当患者体内引入外源正常基因，表达出原来缺乏的蛋白后(如在肝内表达出低密度脂蛋白受体(LDLR)，这种新产生的蛋白是否会作为抗原产生免疫反应，甚至导致有害的自身免疫。这一点是值得引起重视的。

在进行基因治疗研究的同时，必须深入研究基因表达调控。目前已经实施临床治疗的遗传病，都是表达调控机理较简单的单基因遗传病，对其调控机理认识比较明确以后才设计基因治疗实验。对于一些基因表达调控较复杂的遗传病，只有深入探讨表达调控机理，揭示其内在规律以后，才能考虑临床基因治疗。即使是已经实施临床基因治疗的遗传病，因为治疗方法不是简单的基因校正，不仅由基因转移载体和随机整合所带来的问题需要重视，转移的外源正常基因在患者体内的表达水平与持续时间是基因治疗的基本指标，也是基因表达调控研究的重要内容。目前临床应用的以TNF/TIL为代表的肿瘤基因治疗，是非特异性的，从某种意义上说是肿瘤免疫治疗。肿瘤起源于细胞内基因表达调控失常及与其周围组织关系的紊乱、肿瘤发生相关的原癌基因与抗癌基因参与细胞内正常表达的调控过程。只有深刻揭示这些正常表达过程与表达调控失常的机理，才能考虑针对原癌基因与抗癌基因的设计，从根本上对肿瘤进行基因治疗。对于其它一些可能进行基因治疗的疾病，对其发病分子机理的探讨与基因治疗的关系，更是不言而喻的了。

人类基因组计划已经实施并取得可喜的进展。在不久的将来，人类可望在基因的分子结构上认识自我。到那时，有可能对人们作分子水平的体格检查，从而发现一些潜在的疾病并推测预后，对其中一些潜在疾病可作预防性基因治疗。这里需考虑对受检者的分子变异要否保密，如公开会不会影响诸如婚姻、就业等问题。

近年来，与疾病相关的基因表达调控机理的研究正逐步深入，基因转移技术迅速发展，这给基因治疗研究奠定了雄厚的基础，形成与日俱增的发展势头。一方面，已实施临床基因治疗并获成功的疾病，受治例数将逐步增加；另一方面，临床基因治疗的疾病范围将逐步扩大，这里包括更多种的遗传病、肿瘤和基因治疗尚未触及的疾病种类。ADA缺陷作为人类基因治疗的首选疾病，临床应用获得成功，虽然世界上患这种疾病的人数非常少，但已充分说明临床基因治疗的可行性，这种设计是非常明智的。在这一开创性工作之后，人类似更应下功夫攻克那些发病率高且危害严重的疾病，如常见的遗传病与肿瘤。只有这样，基因治疗研究才能真正增强人类健康素质，产生较大的社会效益。这就要求用于临床基因治疗的基因转移程序的适用性。今后一方面发展、完善现有的间接体内基因转移方法，造血干细胞的基因定点修复如能成功将极大地促进间接体内基因治疗的发展。另一方面开拓、发展新的基因转移系统，尤其是探讨象直接注射这样较简便的基因转移技术，如果这类技术发展、完善成有效的基因治疗方法，则基因治疗可在一定程度上普及从而发挥较大的作用。同时必须指出的是，象临床上目前普遍采用的药物治疗、手术治疗、放射治疗等方法一样，即使将来基因治疗进入成熟阶段，每一种基因治疗方法有其适应范围，基因治疗在总体上能解决的问题仍然是有限的。

(刘德培 文 梁植权 审)

参 考 文 献

1. Anderson WF. Prospects for human gene therapy. *Science*, 1984, 226:401
2. Miller AD. Progress Toward human gene therapy. *Blood*, 1990, 76:271
3. Karlsson S. Treatment of genetic defects in hematopoietic cell function by gene transfer. *Blood*, 1991, 78:2481
4. Anderson WF. Human gene therapy. *Science*, 1992, 256:808
5. Miller AD. Human gene therapy comes of age. *Nature*, 1992, 357:455
6. Mansour SL. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*, 1988, 336:348
7. Varmus H. Retroviruses. *Science*, 1988, 240:1427
8. Salmons B. Targeting of retroviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther*, 1993, 4:129
9. Herz J. Adenovirus-mediated transfer of low density lipoprotein receptor gene acutely accelerates cholesterol clearance in normal mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90:2812
10. Rosenfeld MA. In vivo transfer of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell*, 1992, 68:143
11. Kotin RM. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:2211
12. Samulski RJ. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J*, 1991, 10:3941
13. Clinical Protocol. Ex Vivo Gene Therapy of Familial Hypercholesterolemia. *Hum Gene Ther*, 1992, 3:179
14. Schuening FG. Retrovirus-mediated gene transduction into longterm repopulating marrow cells of dogs. *Blood*, 1991, 78:2568
15. Boding DM. Combination of interleukin 3 and 6 preserves stem cell function in culture and enhances into hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86:8897
16. Wolff JA. Direct gene transfer into mouse muscle. *Science*, 1990, 247:1509
17. Yang NS. In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:9568
18. Felly N. Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:8377
19. Kay MA. Expression of human α_1 -antitrypsin in dogs after autologous transplantation of retroviral transduced hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:89
20. Cristiano RJ. Hepatic gene therapy: Adenovirus enhancement of receptor mediated gene delivery and expression in primary hepatocyte. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90:2122
21. Rosenberg S. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 1988, 319:1676
22. Culver KW. Lymphocyte gene therapy. *Hum Gene Ther*, 1991, 2:167
23. Berenson RJ. Engraftment after infusion of CD34⁺ Marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood*, 1991, 78:107
24. Anderson C. Gene therapy researcher under fire over controversial cancer trials. *Nature* 1992, 360:399
25. Cornetta K. Safety issues related to retroviral-mediated gene transfer in human. *Hum Gene Ther*, 1991, 2:5
26. Carmen IH. human gene therapy, a biopolitical overview and analysis. *Hum Gene Ther*, 1993, 4:187

25. 体内外基因转移方法

25.1 体内外基因转移方法概述

基因治疗研究中最常用的实验方法是体内外转移基因方法 (*Ex vivo*)。它包括靶细胞培养, 已经克隆好的带有目的基因的表达式重组体对包装细胞的转染, 阳性细胞筛选, 收集带有目的基因的表达式重组体的假病毒 (因为其基因组——逆转录病毒表达式重组体——中缺少其复制所必需的基因, 此病毒在感染靶细胞、其基因组整合进靶细胞细胞的基因组后, 无法再形成逆转录病毒颗粒, 所以, 被称为复制缺陷型病毒或假病毒), 用假病毒感染靶细胞, 筛选阳性的遗传工程细胞, 之后将阳性的遗传工程细胞定量导入靶动物 (要进行基因治疗的实验动物)。导入的方法主要有二: ①如应用靶动物的骨髓细胞, 则需进行骨髓细胞的原代培养, 之后用假病毒感染该细胞, 筛选阳性的遗传工程骨髓细胞, 加以扩大培养, 并将之回注靶动物; ②如应用靶动物自身的或同种异体动物的皮肤成纤维细胞, 则要进行动物皮肤成纤维细胞的原代培养, 并用假病毒感染该细胞。如为同种异体动物细胞, 则要用胶原加以包裹, 以避免移植后因免疫原性而出现移植排斥反应。之后按具体的研究目标的要求, 设置必要的观察指标以观察疗效和可能出现的毒副作用。

本章介绍的是该实验方法的具体实例。首先将目的基因克隆进一种临床上可以使用的逆转录病毒载体, 经检测, 证明该重组体所携带的目的基因已整合进了靶细胞的基因组、可在细胞内获得高效表达并且其表达产物可分泌于细胞外。靶动物是有病的大鼠。目的基因表达式重组体导入动物的方法是将之包装成假病毒之后, 感染大鼠的同种异体皮肤成纤维细胞, 经检测获得整合了目的基因、可高效表达和分泌目的蛋白的遗传工程细胞, 该细胞经胶原包裹之后以同种异体的方式移植回靶动物的皮下。继之进行疗效观察。

25.2 体内外基因转移方法实例

材料、试剂与仪器:

基因:

带有目的基因的逆转录病毒表达式重组体。事先自行设计与构建后备用。

质粒 pBluescript II SK + / -。用于 DNA 序列测定 (Stratagene 公司产品)。

细胞:

PA317 细胞株, 用以将逆转录病毒表达式重组体包装成假病毒。

NIH3T3 细胞株, 用以检测病毒滴度。

动物:

新生乳鼠 (出生后 24 小时内)

靶动物——有病大鼠

试剂:

(1) 进口试剂:

D - MEM

Geneticin (G418Sulfate)

Lipofectamine

Trypsin (1:250)

OPTI - MEM I Reduced Serum Medium

以上试剂是 GIBCO - BRL 公司产品

Polybrene

Giemsa Stain

二者是 SIGMA 公司产品

(2) 国产试剂:

氨苄青霉素 (500mg)

硫酸链霉素 (100 万 U)

小牛血清

无水乙醇

戊巴比妥钠

EDTA

二甲基亚砷 (DMSO)

生理盐水 (0.85% NaCl)

细胞消化液:

0.025% EDTA

0.25% Trypsin

二者 1:1 混匀、pH 调 7.0 即可。

细胞冻存液:

20% 小牛血清

10% 二甲基亚砷 (DMSO)

70% D - MEM 培养液

细胞裂解液:

0.5% SDS

0.1mmol/L EDTA (pH8.0)

10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

20μg/ml RNase

TE:

1mmol/L EDTA (pH8.0)

10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

仪器:

CO₂ 培养箱: 美国 PrecisionScientific 公司产品。

PCR 扩增仪: PE 公司产品。

超速离心机: Beckman 公司产品。

超纯水制备仪: 美国 Milipore 公司产品。

倒置显微镜: 重庆光学仪器厂产品。

实验步骤:

1. 常规细胞培养:

本文所述为细胞培养的一般性要求。所有与细胞培养有关的实验均需严格无菌。靶细胞、NIH3T3 细胞和 PA317 细胞等均用 D - MEM 培养液进行培养。NIH3T3 和 PA317 的培养液中含 10% 小牛血清, 其它细胞的培养基中则含血清 15%。所有细胞在第一次传代前其培养液中均按常规加青霉素 100U/ml、链霉素 100μg/ml, 一经传代并且证实未被细菌或真菌污染, 则撤去抗生素, 以免对细胞的生长产生不利影响。包括细胞的原代培养、转染、病毒滴度测定、G418 抗性细胞克隆的筛选等过程均采用 37℃、5% CO₂ 和半封闭式方法进行。筛选 G418 阳性克隆时, 经携带有目的基因的逆转录病毒表达重组体转染的 PA317、或假病毒感染的 NIH3T3 和靶细胞均用 200μg/ml 的 G418。但不同实验的 G418 最佳浓度各异, 需进行预实验来确定。

2. 靶细胞的原代培养:

将新生的与实验大鼠同种系的乳鼠(出生后 24 小时内)整体浸泡于 70%乙醇中, 5 分钟后移入另一杯 70%乙醇中, 再 5 分钟, 剪取背部皮肤, 之后置 70%乙醇中浸泡 10 分钟, 将皮片剪成 0.5cm^2 左右大小, 用含青霉素、链霉素 400U/ml 和 $400\mu\text{g/ml}$ 的生理盐水漂洗 2 次, 5 分钟/次。取出皮片并尽可能去除液滴, 置青霉素小瓶中, 加两滴小牛血清, 用剪刀尽可能将其剪碎, 用弯头吸管将“泥状”组织点种于培养瓶壁, 倒置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下 30 分钟, 从培养瓶的一端缓缓加入 D-MEM 完全培养液(小牛血清 15%、青霉素、链霉素各 100U 、 $100\mu\text{g/ml}$), 使组织块有培养液与其接触为准, 轻轻放置于 37°C 培养。一般三天后组织块周围即可见梭形细胞长出。第三天换液一次, 但由于第一次所加培养液极少, 故第一次换液时不用弃旧液, 即仅为加液。少量旧培养液继续留于培养瓶中, 可避免加新培养液后细胞的生长环境变化太大而影响细胞的生长。待不同组织块周围的细胞连接成片时即可传代: 弃旧培养液, 生理盐水清洗长有细胞的瓶壁一次, 加 0.025% EDTA 0.5ml , 转动培养瓶以便与细胞均匀接触, 再加数滴 0.25% 胰酶, 混匀后再转动以消化细胞, 待 $1/2$ 左右的细胞变圆后加适量 D-MEM 完全培养液终止消化, 轻轻吹散细胞, 视细胞多少而转移于一至几个新培养瓶中继续培养。

3. 细胞的冻存和复苏:

待多瓶细胞生长至对数生长期(约铺满瓶壁的 85%以上)后, 按上述方法消化下细胞并吸集于离心管中, 室温 2500r/min 离心 10 分钟, 弃上清, 用少量(少于 1ml)新培养液重悬细胞, 加入冻存液(含 20%小牛血清和 10%二甲基亚砷的 D-MEM 培养液)使细胞的终浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 轻轻混匀, 分装于冻存管中: $1 \times 10^6/\text{ml}/\text{支}$ 。置 4°C 、 0°C 和 -20°C 各 30 分钟, 最后直接放入液氮中保存。复苏时先准备好 37°C 左右水浴, 将从液氮中取出的冻存细胞直接放入水浴, 并不断搅动以尽快融化。融化后直接移入新的培养瓶中, 加适量培养液置 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 孵箱即可。

4. 脂质体介导的基因转移:

(1) 逆转录病毒表达重组体在 PA317 细胞中的包装: 采用脂质体介导的基因转移方法来转染 PA317 包装细胞。消化、收集并计数细胞, 以能铺满 $\phi 60\text{mm}$ 培养皿皿底 30%~35%的密度接种 PA317 细胞(约 $5 \times 10^4/60\text{mm}$), 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下培养 18 小时左右, 具体时间以细胞密度不超过 60%~65%为宜。制备溶液 A: 将 $2\mu\text{g}$ 逆转录病毒表达重组体超螺旋 DNA 加入 $100\mu\text{l}$ 最适培养液(OPTI-MEM I Reduced Serum Medium)中, 轻轻吹吸 7~8 次以充分混匀, 溶液 B: 将 $10\mu\text{l}$ Lipofectamine 试剂于 $100\mu\text{l}$ 最适培养液中充分混匀, 室温下静置 15 分钟, 将溶液 A 和 B 轻轻混匀, 室温下静置 45 分钟以形成 DNA-脂质体复合物, 再加 $800\mu\text{l}$ 最适培养液并混匀。在 45 分钟的期限到来之前(即 DNA-脂质体复合物形成之前)用 2ml 生理盐水洗涤培养皿中的细胞 1 次, 弃尽洗涤液, 立即加入溶液 A、B 的混合物($1\text{ml}/\text{皿}$), 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下培养 5 小时后, 加 1ml 含 2 倍浓度的 D-MEM 培养液后继续培养。转染进行 24 小时后换正常浓度培养液继续培养。在转染 48~72 小时后(具体视细胞密度而定, 但以细胞密度不超过 95%为宜, 尤其是培养皿中部的密度太高将对细胞的生长不利), 以能铺满培养瓶壁 30%~40%的密度传代, 在正常培养液中于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下培养。24 小时内加 G418 $200\mu\text{g/ml}$ 进行筛选培养, 3 天左右换 1 次液, 8~10 天即可形成 G418 抗性细胞克隆。

(2) PA317 抗性克隆的筛选和扩增: 待(1)的克隆生长至一定大小时(以较大克隆间不重叠为限), 吸弃培养液, 生理盐水洗 1 次, 在倒置显微镜下(对于肉眼可见的克隆则不必, 以减少污染机会)用吸有 $50\mu\text{l}$ 消化液(0.025% EDTA 和 0.25% 胰酶以 1:1 混合)的微量加样枪对准单个克隆静置几秒钟后轻轻吹吸几次, 分别将每个克隆的细胞尽快转入不同的新培养皿中进行扩增培养, 每个表达重组体挑选 10~15 个不等的克隆。G418 用量仍为 $200\mu\text{g/ml}$, 每个克隆冻存 2 支($1 \times 10^6/\text{支}$)细胞备用。

(3) 假病毒的收集: 在(2)所获得的克隆中随机挑选 4 个进行扩增培养, 然后以 $1 \times 10^6/\text{瓶}$ 接种于 250ml 玻璃培养瓶中, 各用 8ml 培养液于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下培养。24 小时后换新培养液, 继续培养

24 小时后用 $0.22\mu\text{m}$ 微孔滤器除去细胞及杂质, 该培养液中就含有复制缺陷型逆转录病毒颗粒和被分泌于培养液中的目的基因的蛋白质产物。可用适当的方法 (如放射免疫测定法等) 来检测培养液中目的基因蛋白质产物的含量, 同时以下述方法检测培养液中假病毒的滴度。

(4) 病毒滴度的测定: 将 NIH3T3 细胞以 2×10^5 接种于 50ml 塑料培养瓶中, 置 37°C 、5% CO_2 条件下培养, 24 小时后换新培养液, 加 Polybrene (聚季铵盐) 至终浓度 $6\mu\text{g}/\text{ml}$, 混匀后分别加 $20\mu\text{l}$ 或更多的、经筛选表明目的基因表达水平较高克隆的病毒悬液, 继续培养 24 小时, 消化、收集细胞并计数, 将细胞分别以一定比例接种于数个 250ml 培养瓶中, 各加 8ml 培养液 37°C 、5% CO_2 条件下培养, 24 小时后加含 G418 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 的培养液进行筛选培养, 3 天换液 1 次, 8~10 天即可形成克隆, 用甲醇: 冰醋酸 (3:1) 固定细胞, Giemsa 染色, 计数细胞克隆数。最后据病毒悬液用量和细胞稀释的比例计算出病毒滴度, 用克隆形成单位 (colony forming unit, CFU) /ml 表示。病毒滴度 = 每瓶的平均克隆数 \times 传代比例/所用病毒上清体积。

5. 目的基因的离体表达:

(1) 靶细胞的感染: 靶细胞以 5×10^5 接种于 250ml 培养瓶中, 于 37°C 、5% CO_2 条件下培养, 待铺满瓶底 70% 左右时加入病毒悬液, 同时加入 polybrene 至终浓度 $6\mu\text{g}/\text{ml}$, 继续培养 24 小时后以 1:5 传代于 250ml 培养瓶中, 视细胞的生长情况于 24 至 48 小时后加入 G418 ($200\mu\text{g}/\text{ml}$) 进行筛选培养。如欲获高表达细胞系, 则应对不同的抗性细胞克隆分别进行扩增。

(2) 目的基因表达水平的测定: 首先对 (1) 的 G418 抗性细胞克隆分别进行扩大培养, 然后用适当的方法 (如放射免疫测定法等) 对目的基因的表达产物在培养液中的含量进行定量分析。

6. 目的基因整合情况分析:

(1) G418 抗性克隆基因组 DNA 的提取: 分别消化、收集目的基因高表达的 G418 抗性克隆细胞, 生理盐水洗 2 次, 将细胞重悬于 0.5ml TE 缓冲液中 (10^6 细胞/ml), 加 4.5ml 细胞裂解液 [0.5% SDS、0.1mmol/L EDTA (pH8.0)、10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase], 轻轻混匀, 37°C 缓慢摇动过夜, 等体积酚、酚/氯仿、氯仿/异戊醇各抽提一次 (上下颠倒离心管以轻轻混匀), 室温 $12000\text{r}/\text{min}$ 离心 5 分钟, 无水乙醇沉淀 (加入乙醇后稍加转动沉淀即出现), 挑出 DNA 沉淀, 晾干后溶于 1ml TE (pH8.0) 中, 4°C 备用。

(2) 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测目的基因在靶细胞基因组内的整合情况: PCR 引物根据目的基因完整编码区两端的序列进行设计。按常规 PCR 方法扩增出目的基因的 DNA 片段。继之, 对 PCR 产物进行 DNA 序列分析, 以证实用感染了假病毒的靶细胞的基因组 DNA 作为模板而获得的 PCR 产物是否就是目的基因的 DNA。所以, 首先将其 PCR 产物克隆进测序用质粒中的适当位点, 然后对整个 PCR 产物进行测序鉴定, 或直接对 PCR 产物进行测序。

结合 “5” 和 “6” 的结果, 选出目的基因在其基因组中既完整整合又具有高表达能力的靶细胞 (即所谓的遗传工程细胞) 备用。

7. 大鼠尾胶原的制备:

待移植的遗传工程细胞如为同种异体细胞, 则须用胶原包裹以避免移植后的排斥反应。在这种情况下, 胶原的制备是必要的。

取出于 -20°C 冻存的大鼠 (300~500g) 尾 3 根, 在 70% 乙醇中浸泡 30 分钟, 抽取尾腱 (如不易抽出, 可先剪成长 3cm 左右的小段), 尽可能剪碎, 用 0.02mol/L 冰醋酸 400ml 于 4°C 浸泡 48 小时, 4°C 、 $5000\text{r}/\text{min}$ 离心 1.5 小时, 移上清于另一管中, 4°C 、 $15000\text{r}/\text{min}$ 离心 2 小时, 吸集上清, 加 0.1mol/L NaOH 中和冰醋酸 (6:1, V/V) 后胶原蛋白即沉淀。室温 $2000\text{r}/\text{min}$ 离心 10 分钟, 弃上清, 用等体积新配制的 0.02mol/L 冰醋酸再溶解胶原蛋白的沉淀物, 4°C 保存备用。

8. 胶原细胞移植物的制备:

胶原细胞移植物, 即其基因组中既携带有目的基因表达重组体又能高表达和分泌目的蛋白的遗传工

程细胞与胶原的混合物。首先用少量 D-MEM 培养液（用量以能分散细胞为准）将遗传工程细胞分散成单细胞悬液，然后按胶原（2mg/ml）：5×D-MEM 培养液：小牛血清：单细胞悬液 = 3:1:0.5:0.5 的比例混匀即成胶原细胞移植物。移植物制备好后，即可立即用于移植，暂不移植者可放 37℃、5% CO₂ 培养箱中，但最好不要超过 1 小时，以免影响细胞的活力。移植物用量为 5ml/只靶动物。

9. 靶动物移植试验：

靶动物备妥后，先让其适应新环境 1~2 周。然后进行编号、称体重、随机分组、检测相关指标等前期工作，以便在试验后进行试验前后的比较研究。将动物分成 3 个组，即不给予任何处理的正常组，移植物为胶原与携带目的基因表达用空载体的遗传修饰细胞混合物的阴性对照组和移植物为胶原与遗传工程细胞混合物的试验组。移植手术前用腹腔注射戊巴比妥钠（45mg/kg 体重）的方法麻醉动物，用酒精棉球擦洗动物背部及两侧皮毛。用注射器将移植物按 5ml/只靶动物的量分四点注入靶动物背部两侧的皮下。按设定的指标进行疗效观察及可能的毒副作用观察。

（李 涛 文 卢圣栋 审）

参 考 文 献

1. Grossmann M, et al. Successful ex vivo gene therapy, directed to liver in a patient with familial hypercholesterolemia. *Nature Genet.* 1994, 6:335
2. Neel JV. Germ-line gene therapy: Another view. (Editorial). *Hum. Gene Ther.* 1993, 4:127
3. Shinnick TM, et al. Nucleotide sequence of moloney murine leukaemia virus. *Nature*, 1981, 293:543
4. Cepko CL, et al. Construction and application of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. *Cell*, 1984, 37:1053
5. Rosenfeld MA, et al. In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell*, 1992, 68:143
6. Moss B, Flexner C. Vaccinia virus expression vectors. *Annu. Rev. Immunol.* 1997, 5:305
7. Flotte T, et al. A phase I study of an adeno-associated virus - CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum Gene Ther*, 1996, 7:1145
8. Ponnazhagan S, et al. Lack of site-specific integration of the recombinant adeno-associated virus 2 genomes in human cells. *Hum. Gene Ther*, 1997, 8:275
9. Hsueh JL, et al. Treatment of hemophilia B with autologous skin fibroblasts transduced with a human clotting factor IX cDNA. *Hum Gene Ther*, 1992, 3:543
10. Krueger GG, et al. Use of cloned genetically modified human fibroblasts to assess long-term survival in vivo. *Hum Gene Ther*, 1997, 8:523
11. Wilson JM, et al. Ex vivo gene therapy of familial hypercholesterolemia. *Hum. Gene Ther*, 1992, 3:179

26. 非病毒载体基因治疗

基因转移的非病毒技术近来取得了迅速的进步。尽管现在多用病毒来转染哺乳动物细胞,但存在一些目前的技术所无法超越的局限,例如较低的滴度,逆转录病毒的整合产生致瘤的可能性,并要求活跃的细胞分裂,腺病毒造成宿主的免疫排斥,导致转导的细胞的毁灭。这些局限推动了非病毒技术的积极探索。总的设计策略就是,模仿病毒系统的有利部分,同时避免它的内在局限性。

基因治疗的目的就是获得一种简便、安全、无毒的基因转移方法,定向送至特异的靶组织,然后基因被细胞磷脂双分子层迅速有效地内吞,定位于宿主细胞的核仁,外源 DNA 编码的顺序与宿主的调控因子互相作用得以长期表达。当前处于实验室研究阶段的非病毒技术同样应该尽力满足这些要求。

非病毒载体基因治疗大体可分为两种:完全非病毒方法和病毒增强的转移方式。

26.1 完全非病毒的基因转移方式

26.1.1 粒子轰击(基因枪) - RNA 疫苗

粒子轰击是一种体内体外都有效的基因转移方法。最早应用于植物分子生物学领域,促使外源 DNA 进入单子叶植物。一般采用化学性质稳定、不会对细胞造成明显副作用的金微粒或钨微粒(直径 1 ~ 3 μm)包裹质粒 DNA,用一种电子发射装置或高压气流驱动,打入组织。由于金、钨微粒非常小,且速度极快,可以超越细胞膜的屏障。但是基因表达水平变化很大,而且维持时间较短,原因之一是进入细胞的外源 DNA 不整合进宿主细胞基因组,以不稳定的附加体形式存在。这就限制了其在基因治疗方面的应用,但可用于组织特异的 DNA 表达构建物的迅速筛选。

一般基因治疗主要研究 DNA 的转移系统,利用 mRNA 体内体外转移遗传信息进入哺乳动物体细胞的试验为数不多。然而对于某些基因治疗方案,例如核酸疫苗, RNA 介导的基因转移临床上比 DNA 介导的方法更为适宜。因为在正常生理条件下, RNA 分子是短暂的,明显不能直接整合进染色体 DNA,所以大大消除或减小了在基因接纳细胞中引起插入突变的可能性。Qiu P 等人将完整的、未降解的 RNA 样品加到含有金微粒的 0.25mmol/L CaCl_2 和 12.5% PEG 中,最后制备成 RNA - 金微粒的 100% 乙醇悬浮液。三种报告基因(reporter gene)的 RNA 转录本的表达已在体外单层和悬浮培养的细胞以及体内大鼠的肝组织、小鼠的肝和表皮组织中检测到。用人 α -1 抗胰蛋白酶信使 RNA 的再次加强剂量的轰击可以产生连续的强烈的抗体反应。

容易制备和纯化的核酸疫苗能产生长期的细胞和体液免疫反应,新技术的发展使得疫苗研究领域出现新局面。

26.1.2 穿刺方法

皮肤易接近,表面积大,成为基因治疗的主要靶器官。在皮肤中表达的外源基因可以在动物模型里产生全身的效应。Ciernik IF 等人用装有裸露质粒 DNA 的纹身用金属针,高频振动穿刺皮肤,两天后检测到明显的报告基因虫萤光素酶的活性。转移深度为表皮和皮下组织。可以重复应用穿刺方法弥补随时间而发生的基因表达的丢失。相比肌肉,皮肤含有更多的负责免疫诱导的细胞类型,如郎格汉斯细胞(Langerhans cells)。Ciernik 等人将一个编码单个 T 细胞抗原决定簇的表达载体穿刺滴注,成功诱导了特异的细胞免疫反应。穿刺方法是研究皮肤的基因治疗和遗传免疫的一个可行的新方法,有待进一步发

展。

26.1.3 超声介导的转染方法

Kim HJ 等人发现用超声介导悬浮和贴壁细胞的转染时, 超声波可直接透过细胞培养瓶或平皿壁而起作用, 此法简单, 方便, 并且可以保持无菌。转染成纤维细胞信号基因 (marker gene) 的稳定转染效率为成活细胞的 0.34%, 软骨细胞的瞬时转染效率为 2.4%。增加质粒浓度可以提高转染效率。而用磷酸钙沉淀, 脂质体和电击方法, 大鼠皮肤原代成纤维细胞的稳定转染效率都低于 0.1%。超声频率是介导转染的一个关键因素。他们假定超声穿透细胞膜, 产生两种孔——惯性的和稳定的, 使得质粒通过被动扩散进入细胞, 其中稳定的孔发挥重要作用。

Kim 等人还进行了体内超声转染的初步实验。将大鼠的膝关节暴露于超声信号, 并注射 β -gal 质粒, 四个实验的膝盖中三个的滑液组织中有 β -gal 的表达。超声能定位于身体的许多部位的优点使得这种方法应用于体内转染大有作为。

26.1.4 脂质体介导的大脑内连续转移基因

用一微型泵结合定向技术, Zhu J 等人将一脂质体复合物连续输入大鼠脑内的神经胶质瘤细胞, 然后使用药物 GCV, 神经胶质瘤细胞对 GCV 的敏感性提高 1000 倍, 导致实验动物中 34.6% 的肿瘤生长完全抑制, 没有发现任何器官病变。这种微型泵是可渗透的, 通过一个聚氯乙烯导管与一个 28 口径的不锈钢套管相连, 钢套管定向插入脑瘤, 固定在颅骨上。为了避免此装置不能正好定位于肿瘤中心, 一些肿瘤细胞可能躲开治疗, 他们利用磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 调整套管的位置。

以前认为 DNA-脂质体复合物不能在 37℃ 长期储存条件下维持活性, Zhu J 等人否定了这种看法。他们的 DNA-脂质体复合物 37℃ 72 小时后仍维持 90%~98% 的转移活性, 在微型泵中可稳定存在 1~3 天。

临床上已经开始利用微型泵来连续输入药物。Zhu 等人的实验是第一次用基因-阳性脂质体复合物通过微型泵连续导入脑瘤, 证明安全的抗肿瘤效应确实有希望。相信经过适当的修饰, 微型泵系统也可以转移基因到别的器官、腔或实心组织。

26.1.5 DNA-合成蛋白(肽)复合物

DNA 与高分子量的多聚 L 赖氨酸组成复合物, 其中的多聚 L 赖氨酸将 DNA 浓缩成为紧密结构, 自身作为蛋白质配基结合的模板, 使得 DNA 复合物与细胞特异性结合并被吸收。DNA 复合物中含有 50 到 200 个赖氨酸残基。

Gottschalk 等人尝试用一种膜活性细菌蛋白 (Perfringolysin O, PFO) 转移 DNA, 这种蛋白曾经用来转运小分子和蛋白进入细胞。PFO 是一种环状结构, 存在于含有胆固醇的膜上, 它通过生物素-streptavidin 桥与 DNA 结合。高水平的 β -gal 基因的表达在鼠的 sol8 成肌细胞中获得, 转染效率可达 15%~20%。基因表达水平与复合物中 PFO 的含量相关。PFO 可能有两个功能, 首先它通过胆固醇与细胞表面结合, 然后在膜上形成一个孔, 膜遭到破坏。DNA-PFO 复合物中加入一种受体配基转铁蛋白 (transferrin) 表达水平没有明显变化, 提示 DNA-PFO 复合物可以应用于破坏或杀死靶细胞的治疗范围, 例如将自杀基因运送到实心中瘤。PFO 的最适 pH 是中性, 其他的细菌膜活性蛋白, 如 Listeriolysin O (LLO), 在 pH5 和 6 之间, 即只在核内体 (endo-some) 或溶酶体中有活性, 显著降低细胞毒性。LLO 的大量制备与纯化工作有待进一步完善。

因为 PFO 等细菌膜活性蛋白的致免疫能力高于肽类, 考虑合成并试验这些蛋白的膜活性亚基 (Domain) 的肽类似物, 也许能降低甚至排除加强的免疫反应。最近 Gottschalk 等人又报道了他们用合成的短肽来竭力模仿病毒的功能。短肽 YKAK₆WK 是 DNA 浓缩物质, GLFEAL-LELLESLWELLLEA (JTS-1)

是两歧性的 pH 依赖性的核内体释放物。对比多聚 L 赖氨酸, 浓度大于 $0.1\mu\text{m}$, 即造成细胞完全死亡, YKAK₈WK 分子浓度高达 $100\mu\text{m}$, 也没有观察到细胞毒性。基于对酶、受体和抗体的有功能的活性区不超过 10~20 个氨基酸的认识, 以及前人研究发现 DNA-蛋白质复合物的体外高效基因转移必须依靠一种核内体溶解物, 他们合成了这两种肽。通过正负电荷的静电作用, DNA (CMV-luc) 与两种肽分步自我组装成为复合物。转染复合物在一系列细胞系中产生了高水平的表达。复合物与细胞膜的结合不通过受体介导, 很可能通过胞饮作用 (pinocytosis) 实现内在化 (internalization)。DNA 以核内体形式存在, 与溶酶体结合。JTS-1 破坏核内体, 使 DNA-肽复合物释放进入细胞质, 这样可以避免 DNA 在一级溶酶体中被降解, 导致转移效率下降。

受体介导的基因转移, 其效率与特异性的受体的表达水平有关。据报道, DNA 载体内插入一段核定位顺序 (nuclear localization sequence), 可使表达水平提高 5 到 10 倍。未来的合成肽将包括细胞特异性配基和核定位顺序。

26.1.6 哺乳动物人工染色体

基因表达的组织特异性由四部分决定: 基因 5' 端的启动子, 增强子, 内含子和基因的 3' 端。转基因构建物中原核 DNA 的存在明显降低了基因表达水平, 缺少内含子降低了基因整合入转基因鼠后的转录水平。将人 α -珠蛋白基因簇上远离基因的一段长范围顺序 (对应 DNAase 高敏位点) 也包括在构建物中, 可以提高在组织培养和转基因鼠中表达水平。为了获得长期的完全水平的哺乳动物基因的表达, 要求转移的基因必须是完整的, 片段长度可达几百 kb。至今一个成功的例子是用酵母人工染色体, 但只能在转基因鼠中可以调控基因生理水平的完全表达, 并且是异源的 DNA。如果一段内源性的 DNA 带有复制起始位点、着丝粒和端粒, 就可以在哺乳动物细胞中复制和进行等位基因的分离, 输入的 DNA 就能够长期表达。这样的构建物称为哺乳动物人工染色体 (mammalian artificial chromosomes, MAC), 它与宿主细胞内的染色体一样稳定, 但并不整合入宿主基因组。虽然对哺乳动物细胞中染色体 DNA 的复制和分离所必需的 DNA 序列的研究还有待深化, MAC 的构建方案还不成熟, 但是 MAC 必将成为基因治疗的一个强有力的新工具。

26.1.7 厌氧细菌-梭状芽胞杆菌在癌症基因治疗中的应用

某些种类的厌氧细菌能够定位于肿瘤的低氧区并且出芽繁殖, 导致肿瘤分解。Fox ME 等人据此提出了一种新颖的肿瘤特异性基因治疗方案。他们将编码胞嘧啶脱氨酶的大肠杆菌基因克隆到一个梭状芽胞杆菌表达载体, 转化梭状芽胞杆菌。同未被转化的梭状芽胞杆菌相比, 上清中该酶活性提高约 20 倍。胞嘧啶脱氨酶能够将对细胞无毒的原药 (prodrug) 5-氟胞嘧啶 (5-fluorocytosine, 5-FC) 转化成为抗肿瘤的化疗药物 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU), 此酶不存在于哺乳动物细胞。将上清加入培养的鼠 EM6 癌细胞, 细胞对 5-FC 的敏感性提高 500 倍。

早期实验仅用厌氧细菌分解肿瘤, 发现肿瘤的外周细胞不能被完全分解, 最后导致肿瘤重新生长。一个直接原因就是肿瘤中存在有代谢活性的有氧组织, 厌氧细菌无法发挥作用。经遗传修饰过的厌氧细菌可以采用酶/原药治疗方法, 定位肿瘤, 激活原药, 特异性地发挥作用, 有望完全消除肿瘤。

26.1.8 抗体作为酶或基因的载体

许多年来, 抗体被用来携带细胞毒性的蛋白杀死靶细胞。研究人员利用这个途径, 把抗体与某种酶相连, 再与肿瘤细胞表面上的特异性抗原结合, 此酶可以是自杀酶 (suicide enzyme), 诱发肿瘤细胞死亡, 或者是原药激活酶, 使某种无毒的药物转化成为毒性大大增加的化疗药物。这个系统叫做抗体介导的酶原药疗法 (antibody-directed enzyme prodrug therapy, ADEPT)。例如单纯疱疹病毒的胸苷激酶 (HSVtk), 将链终止药物 GCV 磷酸化成为破坏 DNA 合成的中间物, 这样正在增殖的细胞就遭到杀伤,

鼠细胞系 BALB/c 对 CCV 的敏感性提高 1000 倍。

与之相对应的病毒介导的酶原药治疗法 (virus-directed enzyme prodrug therapy, VDEPT), 用逆转录病毒携带一个肿瘤特异性启动子调控的酶基因, 转染肿瘤细胞。要求原药能够渗透进入细胞膜。两种治疗方案各有利弊, 都需要对肿瘤细胞和正常细胞之间的不同深入了解。

Poncet P 等人用拮抗 CD3, CD34 或表面免疫球蛋白的抗体与包含信号基因 (Neo^R, β -gal) 的载体共价结合, 体内外转染脾的 B 淋巴细胞或淋巴相关细胞系, 非常容易检测到信号基因编码的蛋白。这种方法可以利用许多单抗或多抗, 通过受体介导的摄粒作用, 定位于特定细胞类型。

26.2 病毒增强的基因转移方式

26.2.1 腺病毒的核内体溶解

人类腺病毒侵染细胞通过受体介导的摄粒作用, 最后进入核内体。在与一级溶酶体结合之前, 在体温 37℃, pH5.6~6.0 时, 病毒破坏核内体膜, 进入细胞质, 易位到宿主细胞核仁。除去 DNA 的腺病毒 (也就是空外壳) 也可以溶解核内体, 但效率相对降低。腺病毒外壳主要有 3 种蛋白: hexon, fiber 和 penton base 蛋白。penton base 蛋白可能在溶解核内体中起作用。

许多研究小组利用腺病毒的这个特性, 将腺病毒与 DNA-多聚赖氨酸复合物结合, 效率可提高 1000 倍。为避免使用完整的病毒, 正在研究利用腺病毒的某一外壳蛋白或有核内体溶解性的合成肽, 如 HA-2。

26.2.2 多瘤病毒假衣壳作为载体

多瘤病毒假衣壳 (polyoma virus pseudocapsid), 产生于重组的杆状病毒, 已经成功转移外源 DNA 稳定进入 rat-2 细胞。多瘤病毒有广泛的宿主。VP1 是多瘤病毒的主要外壳蛋白, 能够自我包装。VP1 与 DNA 混合后, 能保护 DNA 不被外源核酸酶消化, 基因被有效转运至核仁, 整合进宿主染色体。但外源 DNA 有大小限制, 理论上不能超过野生型病毒基因组大小 (5.2kb), 实际上接近 3kb。超螺旋或环状 DNA 的包装效率大于线性 DNA。Forstova J 等人用 VP1 假衣壳法在人肝细胞系转移表达外源 CAT 基因, 在人胚胎肺成纤维细胞转移瞬时表达内源性的 p43 基因, 均获成功, 表达效率很高。VP1 蛋白容易制备和纯化, 对细胞无毒, 应用前景极具吸引力。

26.2.3 噬菌体显示肽定向转移基因

细胞表面的整合蛋白 (integrin) 是一些异二聚体细胞粘连分子 (heterodimeric cell adhesion molecules), 包括几个不同的 α 和 β 亚基。整合蛋白是病原性细菌, 真核细胞病毒 (如腺病毒) 的细胞进入的受体, 可能也介导精卵结合。许多整合蛋白结合的蛋白包含一个保守的氨基酸顺序 Arg-Gly-Asp (RGD), RGD motif 两侧的氨基酸顺序及蛋白质在该区的二级结构决定结合的特异性和亲和力。环肽的亲和力要高于线性肽。Hart S L 等人证明包含 RGD motif 的小环肽可以高亲和力地结合整合蛋白分子, 实现内在化。他们合成一段寡聚核苷酸, 编码环肽序列 GGCRCGDMFGC 与 fd 噬菌体的主要外壳蛋白 pVIII 的基因融合, 以多拷贝的形式与 pVIII 形成融合蛋白, 在噬菌体的外壳表面显示。增强细胞结合和进入。一年后, Hart S L 等人合成了一个双功能肽, 由包含 RGD 的环肽和一段 16 个 Lys 的序列 (结合 DNA) 组成。肽-DNA 复合物转染 Caco-2 细胞, 48 小时后检测到虫荧光素酶活性。RGD-多聚赖氨酸肽可以破坏溶酶体, 多聚赖氨酸可能作为核定位信号, 这两点可以增强基因表达, 但是表达水平仍然低于病毒转染和脂质体。未来工作应以此为主。另外整合蛋白介导的内在化的颗粒大小要大于受体介导的形式, 应该能提高至人工染色体大小。

在噬菌体随机肽显示文库 (random peptide - presenting phage libraries) 里, Barry M A 等人筛选到几个 12 肽和 20 肽, 可以选择性地结合某些类型细胞。例如肽 12.1 只结合成纤维细胞和肝细胞, 不与成肌细胞、肥大细胞瘤和巨噬细胞结合。而 20 肽结合几种不同的细胞, 表明不同的肽识别不同的细胞表面分子。但是 Barry 他们还不能分离到只结合某一种细胞的肽。当不知道靶细胞的生物特性和受体情况时, 适合采取这种方法筛选合适的肽。癌细胞可能携带一系列近似随机的细胞表面受体, 也可用此法筛选靶向肽。

肽显示的噬菌体本身也可作为基因载体。用 DEAE 葡聚糖方法, 带有报告基因质粒的噬菌体能够转染哺乳细胞。然而这方面的工作刚刚开始, 需要一个很长的发展成熟过程。

非病毒基因转移方式与病毒方式相比, 有以下几个潜在优势:

- (1) 对 DNA 大小的限制较少, 长达 48kb 的片段已被成功转移至细胞。
- (2) 没有对包装和复制所必需的病毒序列的要求的限制, DNA 容易操纵。
- (3) 比起有感染性的病毒构建物, DNA 复合物不大可能有感染能力, 比较安全。
- (4) 关于免疫原性, 存在问题较少。
- (5) 在细胞质里, DNA 迅速降解, 半衰期缩短。

然而非病毒基因转移方式要想在临床上广泛应用, 还面临着许多挑战。这就要求我们去研究基因表达的基础问题, 揭示疾病机理, 发展可靠的疾病模型和改善技术。正如 Anderson WF 1992 年的评论: “只有当载体能发展到像药物胰岛素那样安全有效地注射进病人的时候, 基因治疗才会对我们群体的健康保障产生主要影响。” 人类基因治疗方法虽然还处于萌芽初生阶段, 但没有理由怀疑它最终会成功。

(梁红雁 文 卢圣栋 审)

参 考 文 献

1. Schofield JP, et al. Non-viral approaches to gene therapy. *Br Med Bull*, 1995, 51 (1): 56 ~ 71.
2. Spooner RA, et al. DNA vaccination for cancer treatment. *Gene Ther*, 1995, 2 (3): 173 ~ 180.
3. Qiu P, et al. Gene gun delivery of mRNA in situ results in efficient transgene expression and genetic immunization. *Gene Ther*, 1996, 3 (3): 262 ~ 268.
4. Knmar V, et al. Genetic vaccination: the advantages of going naked. *Nat Med*, 1996, 2 (8): 857 ~ 859.
5. Ciernik IF, et al. Puncture-mediated gene transfer to the skin. *Hum Gene Ther*, 1996, 20; 7 (8): 893 ~ 899.
6. Kim HJ, et al. Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Hum Gene Ther*, 1996, 7 (11): 1339 ~ 1346.
7. Zhu J, et al. A continuous intracerebral gene delivery system for in vivo liposome-mediated gene therapy. *Gene Ther*, 1996, 3 (6): 472 ~ 476.
8. Wagner E, et al. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87 (9): 3410 ~ 4.
9. Gottschalk S, et al. Efficient gene delivery and expression in mammalian cells using DNA coupled with perfringolysin O. *Gene Ther*, 1995, 2 (7): 498 ~ 503.
10. Gottschalk S, et al. A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells. *Gene Ther*, 1996, 3 (5): 48 ~ 57.
11. Huxley C. Mammalian artificial chromosomes: a new tool for gene therapy. *Gene Ther*, 1994, 1 (1): 7 ~ 12.
12. Fox ME, et al. Anaerobic bacteria as a delivery system for cancer gene therapy: in vitro activation of 5-fluorocytosine by genetically engineered clostridia. *Gene Ther*, 1996, 3 (2): 173 ~ 178.
13. Deonarain MP, et al. Genetic delivery of enzymes for cancer therapy. *Gene Ther*, 1995, 2 (4): 235 ~ 244.
14. Poncet P, et al. Antifection: an antibody-mediated method to introduce genes into lymphoid cells in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 1996 Aug; 3 (8): 731 ~ 738.
15. Cristiano RJ, et al. Hepatic gene therapy: adenovirus enhancement of receptor-mediated gene delivery and expression in primary

- hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90 (6) :2122 ~ 2126
16. Forstova J, et al. Polyoma virus pseudocapsids as efficient carriers of heterologous DNA into mammalian cells. *Hum Gene Ther*. 1995, 6 (3) :297 ~ 306
 17. Hart SL, et al. Cell binding and internalization by filamentous phage displaying a cyclic Arg - Gly - Asp - containing peptide. *J Biol Chem*, 1994, 269 (17) :12468 ~ 12474
 18. Hart SL, et al. Gene delivery and expression mediated by an integrin - binding peptide. *Gene Ther*, 1995, 2 (8) :552 ~ 554
 19. Barry MA, et al. Toward cell - targeting gene therapy vectors: selection of cell - binding peptides from random peptide - presenting phage libraries. *Nat Med*, 1996, 2 (3) :299 ~ 305
 20. Smith KT, et al. Gene delivery systems for use in gene therapy: an overview of quality assurance and safety issues. *Gene Ther*, 1996, 3 (3) :190 ~ 200.
 21. Anderson WF. Human gene therapy. *Science*. 1992 May 8; 256 (5058) :808 ~ 813
 22. Friedmann T. Human gene therapy - an immature genie, but certainly out of the bottle. *Nat Med*, 1996, 2 (2) :144 ~ 147

27. 细胞凋亡的研究方法

细胞凋亡与坏死是两种完全不同的细胞死亡形式,根据死亡细胞在形态学、生物化学和分子生物学上的差别,可以将二者区别开来。细胞凋亡的检测方法可分为四类,即:①细胞凋亡的形态学检测方法;②根据细胞膜通透性改变的检测方法(如测定标记蛋白、标记核酸和标记酶的释放,以及染料进入细胞等);③根据细胞膜成分外露的检测方法(如测定磷脂酰丝氨酸等);④根据细胞核 DNA 变化的检测方法(如测定高、低分子量 DNA 的变化和 DNA 梯形图谱等)。按照方法学的学科分类又可将这些细胞凋亡的测定方法分为形态学、生物化学、免疫化学、组织化学和分子生物学的测定方法。

27.1 细胞凋亡的形态学检测方法

根据凋亡细胞固有的形态特征,人们已经设计了许多不同的细胞凋亡形态学检测方法。使用普通光学显微镜可以直接观察细胞的大小和凋亡小体,也可用带电荷的染料台盼蓝(Trypan blue)使死细胞着色、活细胞不着色,或用染核的染料姬姆萨(Giemsa's)染色后再在光学显微镜下进行观察;使用透射电镜或扫描电镜则可以直接观察到凋亡细胞发泡、染色质浓缩、核着边现象和凋亡小体等;非荧光的酯酶底物(如二乙基荧光素, fluorescein diacetate)和双苯并咪唑染料(Hoechst 33342)等可被活细胞或凋亡细胞吸收,前者水解后能产生很强的绿色荧光,后者在紫外光的激发下可以产生蓝色荧光,而碘化丙啶(propidium iodide, PI)只染死细胞,并在紫外光下呈红色荧光。把 PI 和 Ho 染色结合起来,通过流式细胞仪分析,就可以把凋亡细胞和坏死细胞区别开来,等等。

27.1.1 凋亡细胞的显微镜观察

材料与仪器:

倒置显微镜、普通光学显微镜、载玻片、细胞培养板等。

操作步骤:

将含有细胞的 24 孔培养板直接置于倒置显微镜下观察。或将从外周血、组织中分离的细胞悬液滴在载玻片上,直接置于普通光学显微镜下观察。观察比较经过诱导的和未诱导的细胞形态、大小和细胞凋亡小体的出现。得到满意结果后,照像并记录实验结果。

结果评价

凋亡细胞体积变小、变形,细胞膜完整但出现发泡现象,细胞凋亡晚期可见凋亡小体。而坏死细胞的体积胀大,细胞膜损坏或裂解成碎片,有时可见呈网状的染色质结构。

27.1.2 凋亡细胞的姬姆萨染色

材料与仪器:

(1) 普通光学显微镜、载玻片、姬姆萨(Giemsa's)染料等。

(2) 姬姆萨染色液:称取姬姆萨染料 0.8g,加入 50ml 甲醇,加温至 58℃,搅拌约 2 小时待染料彻底溶解后,缓慢加入 50ml 甘油,充分摇匀,置 37℃ 温箱中保温 8~12 小时。然后置棕色瓶中密封保存,即为姬姆萨原液,一般在 12~24 小时后即可使用。临用时,取 1ml 姬姆萨原液与 10ml PBS 混合,即为姬姆萨工作液。

(3) 磷酸缓冲液(PBS), pH7.4:先将 1.392g K_2HPO_4 , 0.276g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 和 8.770g NaCl 溶于

900ml 蒸馏水, 然后用 0.01mol/L KOH 调 pH 至 7.4, 并用蒸馏水补足到 1 000ml, 高压灭菌备用。

操作步骤:

- (1) 细胞悬液于 4℃, 500r/min 离心, 去除上清后, 将细胞重悬于 PBS 中, 使细胞浓度为 10^6 个/ml。
- (2) 取 100 μ l 细胞悬液均匀涂布于载玻片上, 晾干后用甲醇固定 1 分钟, 晾干。
- (3) 在细胞上滴加两滴姬姆萨染色工作液, 室温染色 5 分钟。
- (4) 用水轻轻洗去染液, 室温晾干 24 小时。
- (5) 用二甲苯浸泡 3 分钟, 去除杂质, 使载玻片透明后, 以树脂封片。
- (6) 在普通光学显微镜下观察细胞核形态。

结果评价

在普通光学显微镜下可观察到凋亡细胞的染色质浓缩、并靠近核膜和核着边现象、核膜裂解、染色质分割成块状和凋亡小体等典型的凋亡形态。

27.1.3 凋亡细胞的电子显微镜观察

材料与仪器:

透射电子显微镜、组织切片机、包埋剂、PBS、戊二醛、锇酸、丙酮等。

操作步骤:

- (1) 于 4℃ 离心收集 5×10^6 个细胞, 用 PBS 洗两次。
- (2) 将细胞悬浮于 25% 的戊二醛中, 至少固定 30 分钟后, 用 PBS 洗两次。
- (3) 将细胞悬浮于 1% 锇酸中, 固定 1 小时。
- (4) 以丙酮梯度脱水。
- (5) 将细胞置于丙酮: 包埋剂 (1:1) 中置换 30 分钟。
- (6) 用包埋剂纯浸 2 小时。
- (7) 按常规将细胞包埋、切片。
- (8) 在透射电子显微镜上观察细胞形态、细胞质及细胞核的变化, 照像并记录实验结果。

结果评价

凋亡细胞体积变小, 细胞质浓缩, 细胞核变小, 染色质浓缩并凝结成块, 出现染色质沿核膜内侧排列的核着边现象。细胞凋亡的晚期, 细胞核裂解为碎块, 产生凋亡小体。

27.1.4 凋亡细胞的碘化丙啶 (PI) 排斥分析法

细胞凋亡过程中, 由于胞浆和核染色质浓缩, 核裂解, 产生凋亡小体, 使细胞的光散射性质发生相应的变化, 因此, 测定光散射的变化是非常简单的细胞凋亡分析法。在细胞凋亡的早期, 细胞对前向角光散射的能力显著降低, 而对 90°角光散射的能力增加或没有变化。前向角散射与细胞大小有关, 90°角散射与由于细胞内部结构, 特别是染色质的浓缩而引起的折射率变化有关。在细胞凋亡的晚期, 前向角和右向角光散射的信号均降低。因此, 可通过流式细胞仪测定细胞光散射的变化测定凋亡细胞。这个方法的显著特点是可与免疫荧光技术相结合, 测定凋亡细胞的表型。也可与细胞的功能分析相结合, 测定线粒体的电势、溶酶体质子泵、PI 排斥或细胞浆膜对某些染料 (如 Hoechst 33342) 的渗透能力等。

但是, 前角光散射降低不是凋亡细胞十分特异的标志。细胞的机械损伤、分离的细胞核以及坏死细胞的前角光散射能力也都会有所降低, 而且细胞凋亡时, 特别是在凋亡细胞的晚期, 一些细胞表面抗原可能丢失, 从而使光散射与免疫荧光技术相结合测定凋亡细胞表型复杂化。因此必须同时使用至少两种以上的细胞凋亡分析法, 才能准确地鉴定凋亡细胞。

带有电荷的染料 PI 不能使活细胞着色, 只能使坏死细胞着色。而 Ho 可渗透过细胞浆膜, 使活细胞和凋亡细胞的 DNA 染色, 经适当波长的紫外光激发, PI 和 Ho 可分别产生红色和蓝色荧光。下述方法先

用 PI 染色,再用 Ho 染色。这样,坏死细胞呈 PI 强阳性染色,而凋亡细胞或活细胞呈 Ho 阳性染色。通过流式细胞仪的分析,根据各种细胞光散射的性质不同,即可把坏死细胞、凋亡细胞和活细胞定量地区分开来。

仪器:

流式细胞分析仪,使用 351nm 光线氩离子激光光源或带有 UG1 滤光片的高压汞灯。

试剂:

PI 储存液: 1mg/ml, 蒸馏水溶解。

PI 染色液: 使用 PBS 将 PI 储存液稀释至 20 μ g/ml。

Ho 储存液: 1mmol/L, 蒸馏水溶解。

Ho 染色液: 使用无钙镁的 PBS, 按 1:4 稀释 Ho 储存液。

细胞固定液: 以 PBS 配制 25% 的乙醇。

操作步骤:

- (1) 细胞离心,去上清后,将细胞悬浮于 50 μ l PBS 中。
- (2) 加入 100 μ l PI 染色液,混匀,置冰中染色 30 分钟。
- (3) 加入 1.85ml 细胞固定液,混匀。
- (4) 加入 50 μ l Ho 染色液,混匀,置冰中染色至少 30 分钟(细胞可在此溶液中和 4℃保存一周)。
- (5) 进行流式细胞仪分析。

PI 和 Ho 均可使用 340nm 紫外光激发,其荧光分别为红色 ($> 620\text{nm}$) 和蓝色 ($480 \pm 20\text{nm}$)。因此,可使用适当的滤光片和二色镜测定 Ho 的蓝色荧光,使用长程滤光片测定 PI 的红色荧光。

结果评价:

对照活细胞的 Ho 蓝色荧光最强,而早期凋亡细胞由于其 DNA 降解和丢失,其 Ho 蓝色荧光较弱,也有很弱的 PI 红色荧光。晚期凋亡细胞 PI 红色荧光加强。坏死细胞 PI 红色荧光最强,而 Ho 蓝色荧光较弱。

注意事项:

(1) 可使用不加染料的正常培养细胞作为阴性对照,地塞米松处理 (1 μ mole, 3~4 小时) 的小鼠胸腺细胞做为阳性对照。

(2) 如果先固定细胞,再进行 PI 染色,然后根据凋亡细胞、坏死细胞和活细胞光散射性质的不同来鉴定凋亡细胞,不能将凋亡细胞与坏死细胞和受机械损伤的细胞严格地区别开来。

27.1.5 双苯并咪唑染料 (Hoechst 33342) 活细胞吸收分析法

上述 PI/Ho 染色法是先 PI 染色后,再用 25% 乙醇使细胞固定,改变其膜通透性,再用 Ho 进行染色。但 Dive 等研究发现,凋亡细胞在等渗条件下进行活细胞染色,其吸收 Ho 的能力增强,在活细胞中加入 Ho 染料,凋亡细胞很快即产生较强的蓝色荧光,其强度要比坏死的和活的细胞大得多。因此先进行 Ho 活细胞染色,再进行 PI 染色,并和细胞光散射性质测定结合起来,是目前细胞凋亡最令人满意的形态学分析方法。同时,也适用于不发生 DNA 断裂的凋亡细胞的测定。

仪器:

流式细胞分析仪,使用 351nm 光线氩离子激光光源或带有 UG1 滤光片的高压汞灯。

试剂:

Hoechst 33342 储存液: 0.1mg/ml, 蒸馏水溶解。

PI 储存液: 1mg/ml, 蒸馏水溶解。

PBS

操作步骤:

- (1) 细胞悬浮于 1ml 培养基 (含 10% 牛血清) 中, 加入 10 μ l Ho 储存液, 混匀。
- (2) 置于 37℃ 温育 5~15 分钟。
- (3) 将细胞置于冰上冷却后, 于 4℃ 离心, 去除上清。
- (4) 将细胞重新悬浮于 1ml PBS 中, 加入 5 μ l PI 储存液, 混匀, 立即用流式细胞仪进行分析。

结果评价:

如上所述, PI 和 Ho 均可使用紫外光激发, 然后分别测定其红色和蓝色荧光。凋亡细胞的蓝色荧光比活细胞和非凋亡细胞都要强, 其光散射能力则降低, 将二者结合起来, 可以很好地鉴定凋亡细胞。坏死细胞则由于 PI 复染, 呈红色荧光。

注意事项:

- (1) 要使用适当的阴性和阳性凋亡细胞作对照。
- (2) 细胞对 Ho 的吸收随着温育时间而变化, 因此最佳温育时间应通过预实验确定。

27.1.6 凋亡细胞对胰蛋白酶和脱氧核糖核酸酶敏感性分析法

活细胞与一定浓度的胰蛋白酶 (trypsin) 和脱氧核糖核酸酶 (DNase) 一起温育, 在短时间内, 对细胞的形态、功能和活力几乎没有什么影响, 但坏死的细胞以及细胞浆膜受到损伤的晚期凋亡细胞则可被这两种酶降解, 在使用流式细胞仪进行分析时, 通过提高光散射、核酸或蛋白质荧光信号的阈值, 则可排除晚期凋亡细胞和坏死细胞, 测定早期凋亡细胞。下述方法即是根据这一原理设计的。

仪器:

流式细胞分析仪, 使用 351nm 光线氩离子激光光源或带有 UG1 滤光片的高压汞灯。

试剂:

- (1) 含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 Hanks 平衡盐水 (HBSS)

A 液: 160g NaCl, 8g KCl, 2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.8g CaCl_2 溶于双蒸水, 定容至 1 000ml;

B 液: 3.04g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1.2g KH_2PO_4 , 20g 葡萄糖, 溶于双蒸水, 定容至 1 000ml。

取 1 份 A 液和 1 份 B 液, 与 18 份双蒸水混合, 调节 pH 至 7.2 至 7.4, 高压灭菌后, 于 4℃ 保存备用。

- (2) 0.5% 胰蛋白酶, HBSS 溶解后分装, 于 -20℃ 保存。

- (3) 200 μ g/ml DNase, HBSS 溶解后分装, 于 -20℃ 保存。

操作步骤:

- (1) 于 4℃ 离心收集细胞并重新悬浮于 0.2ml HBSS 中, 使其浓度为 10^6 个/ml。
- (2) 加入 100 μ l DNase, 混匀, 于 37℃ 保温 15 分钟。
- (3) 加入 100 μ l 胰蛋白酶, 混匀, 于 37℃ 保温 30 分钟。
- (4) 加入含 10% 小牛血清的 HBSS, 混匀, 使胰蛋白酶灭活, 4℃ 离心, 去上清。
- (5) 以 HBSS 洗细胞一次, 收集细胞并重新悬浮于 HBSS 中。
- (6) 按本章介绍的合适方法, 进行凋亡细胞的染色和流式细胞仪分析。

结果评价:

胰蛋白酶和 DNase 的消化作用, 去除了坏死的、机械损伤的以及凋亡晚期的细胞, 剩余的细胞大部分是 PI 排斥的细胞, 包括活细胞和凋亡早期的细胞。因此, 这方法适用于测定凋亡早期细胞以及不产生 DNA 断裂的凋亡细胞。

注意事项:

胰蛋白酶可能会使活细胞表面抗原决定簇丢失, 因此当欲研究活细胞的表型时, 要注意选择酶消化

的最适时间。但经过胰蛋白酶处理的细胞，在培养基中培养几个小时后，可使大部分表面抗原得以恢复。

27.2 细胞凋亡的生物化学研究方法

细胞凋亡时主要生物化学特征是其染色质发生浓缩，染色质 DNA 在核小体单位之间的连接处断裂，形成 50~300kb 长的 DNA 片段，或 180~200bp 整数倍的寡核苷酸片段，在凝胶电泳上表现为梯形电泳图谱（称为 DNA ladder）。细胞经处理后，采用常规方法分离提纯 DNA 后，进行琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色，在凋亡细胞群中则可观察到典型的 DNA ladder。如果细胞量很少，还可在分离提纯 DNA 后，用 ^{32}P -ATP 和脱氧核糖核苷酸末端转移酶（TdT）使 DNA 标记，然后进行电泳和放射自显影，观察凋亡细胞中 DNA ladder 的形成。

此外，在正常细胞中，其核是完整的，胞浆中不会产生低分子量的 DNA，而在凋亡细胞中，其核发生裂解，细胞浆中可产生低分子量的 DNA。因此，通过测定比较细胞内的 DNA 变化也是鉴别群体凋亡细胞的重要生物化学方法。欲测定细胞内的 DNA 的变化，可采用下述不同的方法进行：①用 ^3H -TdR 或 ^{125}I -UdR 预先标记 DNA，细胞经不同处理后，用离心法使高、低分子量的 DNA 分开，分别测定其放射活性，通过计算高、低分子量 DNA 的放射活性计算凋亡细胞的百分率；②用 ^3H -TdR 预先标记 DNA，细胞经不同处理后，用玻璃纤维膜将高、低分子量 DNA 分开，或用碱性溶液法将高、低分子量 DNA 分开，然后分别测定其放射活性，通过计算高、低分子量 DNA 的放射活性计算凋亡细胞的百分率；③用非同位素 BrdU 预先标记 DNA，细胞经不同处理后，用离心法将高、低分子量 DNA 分开，用酶联免疫吸附法测定上清液中的低分子量 DNA，以此代表凋亡细胞的多少。

上述方法都是用来测定细胞群中凋亡细胞的，下面介绍四种不同的生物化学研究方法，同时介绍了细胞凋亡时钙离子浓度变化的测定方法。

27.2.1 细胞群染色体 DNA 断裂的测定 I

仪器：

台式高速离心机、恒温水浴、全套琼脂糖凝胶电泳装置、凝胶电泳照相设备。

试剂：

(1) 磷酸缓冲液 (PBS), pH7.4: K_2HPO_4 , 1.392g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.276g, NaCl, 8.770g, 先溶于 900ml 蒸馏水，然后用 0.01mol/L KOH 调 pH 至 7.4，并用蒸馏水补足到 1000ml。

(2) 细胞裂解液: 10mmol/L Tris·Cl, pH8.0, 10mmol/L NaCl, 10mmol/L EDTA, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 蛋白酶 K, 1% SDS。

(3) 水饱和的酚/氯仿/异丙醇，冷无水乙醇。

(4) 3mol/L 醋酸钠: 408.1g $\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 溶于 800ml 蒸馏水，用冰醋酸调节 pH 至 5.2，然后用蒸馏水定容到 1000ml。

(5) 10mg/ml RNA 酶（无 DNA 酶活性）。

(6) TE 缓冲液: 0.1mol/L Tris, Cl, pH8.0 10mmol/L EDTA。

(7) 50 \times TAE 电泳缓冲液: Tris 碱 242g, 冰醋酸 57.1ml, 0.5mol/L EDTA pH8.0 100ml, 加水至 1L。

(8) 100bp DNA ladder 分子量标准品 (GIBCO/BRL)。

(9) 6 \times 样品缓冲液: 0.25% 溴酚蓝, 40% 蔗糖, 加水溶解, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

操作步骤：

(1) 将待测细胞用 PBS 洗一遍。

(2) 在 1.5ml 微量离心管中，离心沉淀 5×10^5 或 2×10^6 个细胞，去除上清。

- (3) 加入 50 μ l 细胞裂解液, 混匀, 于 37℃ 水浴保温至混合物变得清亮。
- (4) 在台式高速离心机中, 以室温 12 000r/min 离心 5 分钟, 将上清转移至另一洁净的微量离心管中。
- (5) 以等体积的苯酚/氯仿 (1:1)、苯酚/氯仿/异丙醇 (25:24:1) 和氯仿各抽提一次。
- (6) 在上清中加入 1/10 体积 3mol/L 醋酸钠和 2 倍体积冷乙醇, 于 -20℃ 沉淀过夜。
- (7) 于 -10℃、12, 000 转/分钟离心 10 分钟, 收集沉淀。
- (8) 将沉淀溶于 20ml TE 缓冲液, 加入 1 μ l RNA 酶, 37℃ 保温 1 小时。
- (9) 加入 4ml 样品缓冲液, 混匀, 立即加到含有 0.4 μ g/ml 溴化乙啶的 1%~2% 的琼脂糖凝胶的样品孔中, 室温、恒流 75mA, 于 1 \times TAE 缓冲液中电泳 1~2 小时, 紫外灯下照像和记录实验结果。

注意事项:

实验过程中, 关键要防止 DNA 酶的作用和剧烈震荡造成 DNA 断裂。本实验在细胞裂解后, 进行离心, 因而一些大分子核蛋白被除去了。若需要保留全部细胞 DNA, 则可采用下述方法进行。

27.2.2 染色体 DNA 断裂的测定 II

仪器:

台式高速离心机、恒温水浴、全套凝胶电泳装置和照相设备。

试剂:

- (1) 含 0.03mol/L Tris·Cl 的磷酸缓冲液, pH7.4: K₂HPO₄, 1.392g, NaH₂PO₄·H₂O, 0.276g, NaCl, 8.770g, Tris 碱 3.633g。先溶于 900ml 蒸馏水, 然后用 0.01mol/L KOH 调 pH 至 7.4, 并用蒸馏水补足到 1 000ml。
- (2) 细胞裂解液: 50mmol/L Tris·Cl, pH8.0, 0.5% 十二烷基肌氨酸钠 (sodium lauryl sarkosinate), 0.5mol/L EDTA。
- (3) 0.5mg/ml RNA 酶, 无 DNA 酶活性。
- (4) 样品缓冲液: 10mmol EDTA, pH8.0, 0.25g 溴酚蓝, 40% 蔗糖, 1% 琼脂糖。
- (5) 1% 琼脂糖凝胶。
- (6) 50 \times TAE 电泳缓冲液。Tris 碱 242g, 醋酸 57.1ml, 加 0.5mol/L EDTA (pH8.0) 100ml, 再加水至 1L。
- (7) 0.5 μ g/ml 溴化乙啶。
- (8) 内切酶 MspI 水解的 pBR322 DNA 分子量标准品。

操作步骤:

- (1) 用含 0.03mol/L Tris·Cl 的磷酸缓冲液 (pH7.4) 将待测细胞洗三次。
- (2) 在 1.5ml 微量离心管中离心沉淀 5×10^5 或 2×10^6 个细胞, 去除上清。
- (3) 加入 20 μ l 细胞裂解液, 混匀, 于 50℃ 水浴再水解 1 小时。
- (4) 加入 10 μ l RNA 酶, 混匀, 于 50℃ 水浴再水解 1 小时。
- (5) 将 DNA 提取物加热到 70℃, 加入 10 μ l 已融化的样品缓冲液, 混匀, 立即加入已制备好的 1% 琼脂糖凝胶样品孔中。
- (6) 待凝胶凝固后, 置 1 \times TAE 电泳缓冲液中, 室温、恒流 75mA, 电泳 1~2 小时, 以 MspI 水解的 pBR322 DNA 为分子量标准。
- (7) 电泳结束后, 将凝胶浸入溴化乙啶溶液染色 5 分钟, 以蒸馏水脱色两次, 每次 5 分钟, 然后于紫外灯下照像并记录实验结果。

27.2.3 同时分析凋亡细胞染色体 DNA 断裂及其细胞形态法

Darzynkiewicz 等发现, 如果细胞用乙醇固定时, 细胞内已经降解的低分子量 DNA 可在洗涤和染色等

步骤中漏出细胞外而丢失, 而用 DNA 荧光染料进行染色时, 凋亡细胞着色能力差, 其 DNA 含量低于其 G_1 期。Hotz 等观察到, 在洗涤细胞时, 加入 pH7.8 的磷酸盐/柠檬酸缓冲液, 可以促进已降解的 DNA 从凋亡细胞中被抽提出来, 并且通过加入磷酸盐/柠檬酸缓冲液的量可有效地控制抽提 DNA 的多少, 从而通过测定细胞中 DNA 的含量可以把凋亡细胞与活细胞更加明确地区分开来。被抽提到缓冲液中的 DNA 可通过琼脂糖凝胶电泳分析 DNA ladder, 而剩余的细胞可继续进行 PI 等 DNA 荧光染料染色, 通过流式荧光细胞分析仪测定凋亡细胞的表型。同一份标本, 既分析了 DNA ladder, 又测定了其表型, 一举两得。

仪器:

流式细胞分析仪, 使用 351nm 光线氩离子激光光源或带用 UG1 滤光片的高压汞灯。

试剂:

- (1) 磷酸盐/柠檬酸缓冲液, pH7.8: 分别配制 0.2mol/L Na_2HPO_4 (A) 和 0.1mol/L 柠檬酸 (B), 取 192ml A 液与 8ml B 液混合, 调节 pH 至 7.8。
- (2) 0.25% (V/V) NP40: 将 0.25ml NP40 溶于 100ml 蒸馏水中。
- (3) 1mg/ml RNase A: 将 1mg 无 DNase 活性的 RNase A 溶于 1ml 蒸馏水。
- (4) 1mg/ml 蛋白酶 K: 将 1mg 蛋白酶 K 溶于 1ml 蒸馏水。
- (5) DNA 加样缓冲液: 将 0.25g 溴酚蓝溶于 70ml 蒸馏水, 加入 30ml 甘油, 混匀。
- (6) DNA 分子量标准品: 100bp DNA ladder 分子量标准品 (BRL)。
- (7) 10×TBE 电泳缓冲液: 将 54g Tris 碱、27.5g 硼酸溶于 980ml 蒸馏水, 加 20ml 0.5mol/L EDTA (pH8.0)。
- (8) 溴化乙啶 (EB, 1mg/ml), 溶于蒸馏水。

操作步骤:

- (1) 于 4℃ 离心收集细胞 ($10^6 \sim 10^7$), 重悬于 10ml 70% 乙醇, 于 -20℃ 固定 4 小时后, 按下述步骤抽提 DNA, 或保存于 -20℃, 数周后使用。
- (2) 于 1000g 离心 5 分钟, 彻底去除乙醇。将细胞重悬于 40μl 磷酸盐/柠檬酸缓冲液, 并转移到 0.5ml Eppendorf 管中, 置室温至少 30 分钟, 间歇摇动。
- (3) 于 1500g 离心 5 分钟, 将上清转移到新的 Eppendorf 管中, 真空离心浓缩 15 分钟。将细胞沉淀置冰上备用。
- (4) 在上清中加入 3μl 0.25% NP40 和 3μl RNase 溶液, 混匀, 37℃ 保温 30 分钟。
- (5) 加入 3μl 蛋白酶 K 溶液, 37℃ 保温 30 分钟。
- (6) 再加入 12μl 加样缓冲液, 混匀, 转移至已配制好的 0.8% 琼脂糖凝胶样品槽中, 将适量 DNA 分子量标准品加到标准品槽中, 0.5×TBE 缓冲液、2V/cm 恒压电泳 16~20 小时后, 于紫外灯下观察结果, 照像。
- (7) 将第 (3) 步中保留的细胞重新悬浮于 50~100μl PBS 中, 按本章第一节所述方法, 经 PI 染色后, 使用流式细胞仪进行分析。

结果评价:

本方法使用完全相同的一份样品, 先进行 DNA ladder 测定, 再进行染色和流式荧光细胞仪分析, 同时得到生物化学和形态学的实验数据, 一举两得。因此, 本方法具有如下优点:

- (1) 细胞用乙醇固定, 可长期保存。特别适用于临床检验, 即在不同时间取样, 用乙醇固定后, 便于保存或运输, 待积累一定数量后再进行分析。
- (2) 乙醇固定细胞, 同时可使各种内源性的酶灭活, 防止采样后, 细胞自溶。
- (3) 乙醇也可使各种病毒、细菌等失活, 使得操作更加安全、方便。
- (4) 抽提 DNA 的方法简便, 避免使用苯酚、氯仿等有毒物质。
- (5) 此法选择性的抽提凋亡细胞中低分子量 DNA, 不含高分子量的 DNA, 当每个样品槽中加入等

量 DNA 时, 容易得到密度相同的区带。

(6) 高、低分子量 DNA 的比值可作为细胞群体中细胞凋亡的参数。

(7) 抽提低分子量 DNA 后的细胞, 经染色后, 仍可使用流式细胞仪进行分析, 因此, 用于 DNA 电泳的同一细胞样品中凋亡细胞的百分数可通过流式细胞仪测定。

27.2.4 大分子染色体 DNA 断裂的测定

细胞凋亡的早期, 染色质 DNA 断裂成为 50 ~ 300kb 以上的 DNA 片段。所有超过一定分子量大小的双链 DNA 分子在琼脂糖凝胶中的迁移速度相同。线性 DNA 的双螺旋半径超过凝胶半径时, 即达到分辨力的极限。此时凝胶不能再按分子量大小来筛分 DNA, DNA 像通过弯管一样, 以其一端指向电场一极而通过凝胶。这种迁移模式称之为“爬行”。因此, 细胞凋亡早期产生的 50 ~ 300kb 以上的 DNA 片段不能用普通琼脂糖凝胶电泳来分离。采用脉冲电场凝胶电泳技术可圆满地解决这一问题。这个方法在凝胶上外加正交的交变脉冲电场。每当电场方向改变后, 大的 DNA 分子便滞留在爬行管中, 直至新的电场轴向重新定向后, 才能继续向前移动。DNA 分子越大, 这种重排所需要的时间就越长。当 DNA 分子变换方向的时间小于电脉冲周期时, DNA 就可以按其分子量大小分开。脉冲电场凝胶电泳分辨力的极限取决于以下几个因素: ①两个电场的均一程度; ②电脉冲的绝对长度; ③用于产生两个电场的电脉冲长度的比例; ④两个电场与凝胶所成的角度; ⑤两个电场的相对长度。

据报道, 利用这一方法现在可以分辨大于 5 000kb 的 DNA 分子。

仪器:

台式高速离心机、恒温水浴、全套脉冲电场凝胶电泳装置、电泳照像设备。

试剂:

(1) 磷酸缓冲液, pH7.4: K_2HPO_4 1.392g, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0.276g, NaCl 8.770g, 先溶于 900ml 蒸馏水, 然后用 0.01 mol/L KOH 调 pH 至 7.4, 并用蒸馏水补足到 1 000ml。

(2) 细胞裂解液: 0.1mol/L EDTA, pH8.0, 0.01mol/L Tris·Cl, pH7.6, 0.02mol/L NaCl。

(3) 10mg/ml 蛋白酶 K。

(4) 10% SDS (十二烷基磺酸钠)。

(5) 4mg/ml PMSF (苯甲基磺酰氟): 4mg PMSF 溶于 1ml 异丙醇, 分装成小份贮存于 $-20^{\circ}C$ 。

(6) TE 缓冲液: 10mmol/L Tris·HCl, pH7.6, 1mmol/L EDTA。

(7) 10mg/ml 溴化乙啶水溶液。

操作步骤

(1) 以用冰预冷的 PBS 将 5×10^7 个培养的细胞洗 3 次, 重新悬浮于细胞裂解液中。

(2) 用细胞裂解液配制等体积的 1% 琼脂糖凝胶, 将熔化的琼脂糖凝胶冷却至 $42^{\circ}C$ 。

(3) 将细胞悬液温热到同样温度, 立即与熔化的琼脂糖凝胶混合, 用玻璃棒搅拌均匀。

(4) 将熔化的混合物吸到准备好的有机玻璃模 (50 ~ 100 μ l) 中, 置 $4^{\circ}C$ 让琼脂糖凝胶凝固。

(5) 将已凝固的琼脂糖块从模块中取出, 置于平皿上, 用刀片切成 1cm 大小的小块 (约 45 μ l, 含 1.5×10^6 个细胞, 可获得 5 ~ 10 μ g 的 DNA)。

(6) 将凝胶转移至 50 倍体积含 1mg/ml 蛋白酶 K 和 1% SDS 的细胞裂解液中, 于 $50^{\circ}C$ 温育 24 小时。用等体积新鲜消化混合物代替原来的消化混合物, 于 $50^{\circ}C$ 继续温育 4 小时。

(7) 将凝胶块置于 50 倍体积含 40mg/ml PMSF (苯甲基磺酰氟) 的 TE (pH7.6) 中, 于 $50^{\circ}C$ 温育 1 小时后, 用等体积的漂洗缓冲液替换原来的漂洗缓冲液, 于 $50^{\circ}C$ 继续温育 1 小时。

(8) 用一次性使用的吸头直接将凝胶块塞入脉冲电场凝胶的加样孔中 (如所使用的脉冲电场凝胶装置, 难以将凝胶块塞入加样孔中, 可将凝胶块加热至 $65^{\circ}C$ 熔化, 再将熔化后的琼脂糖沿着一次性使用的吸头外壁倒进凝胶加样孔中)。

(9) 按所使用的脉冲电场凝胶电泳装置及其操作指南进行电泳。电泳后, 凝胶以溴化乙啶染色, 水脱色。在紫外灯下照像并记录实验结果。

27.2.5 细胞凋亡时钙离子浓度的测定

细胞凋亡时常常引起钙离子浓度 $[Ca^{2+}]$ 的变化, 在细胞的各种生理过程中, 主要是细胞内 $[Ca^{2+}]$ 变化, 起着调节细胞生长、分化、成熟和凋亡的作用。因此, 检测细胞内 $[Ca^{2+}]$ 是细胞凋亡信号传递研究的常用方法。

常用 $[Ca^{2+}]$ 测定的方法, 有以下几种:

方法一: 选择性 $[Ca^{2+}]$ 微电极测定方法

选择性微电极是一种特殊的电化学敏感器, 可在其它离子存在下, 用电位法测定组织和细胞内的钙离子浓度。

原理:

将用特殊处理的 Ca^{2+} 敏感膜灌入经处理的微电极尖端, 然后接内充液。当微电极尖端插入细胞内, 细胞内 Ca^{2+} 选择性地向膜相迁移时, 就在内充液和细胞内产生电位差。该电位差即可反应出细胞内的 Ca^{2+} 浓度。

该方法能直接、敏感地测定组织或细胞内 $[Ca^{2+}]$, 连续提供活组织、活细胞内、外 $[Ca^{2+}]$ 动态的变化。但缺点是此方法不能测定 $[Ca^{2+}]$ 的快速变化。

方法二: 电子显微镜测定 $[Ca^{2+}]$ 技术

用特殊染色、涂片、固定标本技术, 在电子显微镜下观察细胞内 $[Ca^{2+}]$ 的分布情况。能观察到细胞内 Ca^{2+} 在亚细胞器内的分布。但不能区分游离钙和结合钙是其缺点。

方法三: 放射性同位素示踪法

利用放射性同位素示踪技术, 可测量单位碱性金属离子的单向流量, 分析其通过细胞膜转运速度及浓度变化, 可定性、定量分析细胞内、外 $[Ca^{2+}]$ 的变化。可用于测定跨膜 Ca^{2+} 流动及代谢动力学, 但对静息状态的 Ca^{2+} 浓度测定不够理想。

方法四: 荧光指示剂测定法

原理: 荧光指示剂测定法是根据某些荧光剂, 如 quin-2、Fura-2 和 Fura-3 等, 可与 Ca^{2+} 特异性结合, 并产生荧光值变化的原理而发展起来的一种新型检测 $[Ca^{2+}]$ 的方法。例如: 荧光指示剂 Fura-2/AM, 通常以非游离酸乙酸基甲基酯 (acetoxymethylester, AM) 和游离酸 (Fura-2) 两种形式存在, AM 能透过细胞膜但不能与 Ca^{2+} 结合, 而 Fura-2 不能透过细胞膜, 但能与 Ca^{2+} 结合, 并产生荧光。进入细胞内的 AM 可被细胞质脂酶水解呈游离酸形式 (Fura-2), 并与 Ca^{2+} 特异性结合形成螯合物, 而使 Fura-2 激发的荧光光谱发生变化。用荧光分光光度计即可测定一定波长范围内 Fura-2 产生的荧光峰值变化, 并根据公式 $[Ca^{2+}] = kDa (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$, 计算出 Ca^{2+} 的浓度。

[Fura-2/AM 检测 $[Ca^{2+}]$ 的方法]

材料与试剂:

- (1) Fura-2/AM 用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解配成 1mmol/L 浓度的贮备液, -20°C 避光保存备用。
- (2) 牛血清清蛋白 (BSA)
- (3) Hanks 液
- (4) Triton X-100
- (5) 台盼蓝染液

操作步骤:

(1) 细胞制备: 将培养细胞或组织制成细胞悬液 ($2 \times 10^6/\text{ml}$)。用台盼蓝排除法计数, 应保证活细胞数大于 95%。

(2) 加载 Fura-2/AM。

(3) 将细胞悬液于 37℃ 预热 5 分钟, 然后加入 Fura-2/AM (终浓度为 5mmol/L), 37℃ 恒温震荡 45 分钟。

(4) 为消除细胞外 Fura-2 的干扰, 将加载 Fura-2/AM 后的细胞用含 0.2% BSA 的 Hanks 液洗 2 次 (调节细胞悬液为 $2 \times 10^6/\text{ml}$)。

(5) 测细胞内荧光之前, 将细胞悬液于 37℃ 预热 2~3 分钟。

(6) 在荧光分光光度计上进行荧光检测。

根据所用荧光分光光度计及试验条件, 选用合适的激发光波长、发射光波长和滤光波长。一般激发光波长为 340~380nm, 因为 Fura-2 游离时的激发波长为 340nm, 结合状态的激发波长为 380~420nm。分别测定这两个波长的荧光强度, 求出其比率 (R)。滤光波长通常为 500nm。

(7) 结果计算: 根据公式 $[\text{Ca}^{2+}] = k_{\text{Da}} (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$ 计算钙离子浓度。公式中 k_{Da} 是 Fura-2 与 Ca^{2+} 的解离常数, 为 224 nmol/L; R 为不同条件下的荧光信号比值; R_{\min} 为最小荧光比值 (由加入高于 Ca^{2+} 浓度 2~3 倍的 EDTA pH8.5 测得); R_{\max} 为最大荧光比值 (由加入终浓度为 0.1% 的 Trion-X100 后测得)。

在计算 R 之前要减去自发荧光比值, 即式中的 R、 R_{\max} 和 R_{\min} 均要减去未加载 Fura-2 细胞所测得的 R、 R_{\min} 和 R_{\max} 后再按公式计算。

注意事项:

(1) 荧光检测要在短时间内完成, 否则随时间延长, Fura-2 漏出细胞外, 影响检测结果。

(2) 制备高质量的细胞悬液是测定准确与否的关键。

方法五: 定向测定细胞器内 Ca^{2+} 浓度技术

上述方法只能测定细胞内总游离钙的浓度, 但不能测定 Ca^{2+} 在各细胞器内的分布及浓度。Rizzuto 等和 Brini 等利用基因重组技术, 将发光蛋白的基因与细胞器特异性蛋白的基因重组在一起, 构建了一种既有细胞器特异性, 又有发光蛋白特性的融合蛋白, 进而建立了原位测定细胞器的 Ca^{2+} 浓度的新技术。

原理:

acquerin 是一种对 Ca^{2+} 敏感的发光蛋白, 它与 Ca^{2+} 特异性结合后能够产生荧光。将编码细胞器特异蛋白的 cDNA (如胞核分布的或 DNA 结合蛋白的 cDNA) 与编码 acquerin 的 cDNA 构建成为重组的融合分子, 转染合适的宿主细胞并获得表达后, 通过与计算机连接的光电倍增管接受细胞内发光蛋白所产生的荧光, 即可在活细胞内原位测定细胞器中 Ca^{2+} 浓度的变化。

方法:

利用构建重组的 acquerin 测定细胞核中的钙离子浓度: 为使发光蛋白定向分布在细胞核内, 首先将鼠糖皮质激素受体 (GR) 的基因序列中的编码细胞核定位信号 (nuclear localization signal) 和 DNA 结合功能区 (DNA binding domain) 的 cDNA 与 acquerin (Ca^{2+} 敏感发光蛋白) cDNA 构建在 pEMSV 表达载体内, 然后将此表达载体与 pSV2neo 表达质粒共同转染 HeLa 细胞, 用 G418 筛选出能稳定表达重组融合分子的细胞株。由于这些细胞能表达重组的 acquerin, 重组的 acquerin 能通过细胞核定向分布信号和 DNA 结合区定向分布在细胞核内。在与胞核内 Ca^{2+} 结合后, acquerin 即可发出荧光, 由光电倍增管接收。此荧光信号反应了胞核内 Ca^{2+} 浓度的变化。

实验表明, 这种定位分布的重组 acquerin 可检测胞核内 Ca^{2+} 的浓度变化, 与 Fura-2 测定 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的方法比较, 能明确区分胞核与胞质中的 Ca^{2+} 浓度梯度。可用于研究胞核中 Ca^{2+} 在基因表达和细胞凋亡等方面的生物学功能。

这种基于基因重组技术发展起来的新技术, 可根据重组融合分子带有的细胞器特异性分布信号的不

同,定位、定量检测细胞器内 Ca^{2+} 的浓度变化。为研究 Ca^{2+} 在细胞内的生物学功能提供了新的手段。

27.3 细胞凋亡的免疫化学分析方法

细胞凋亡时,细胞染色体双链 DNA 裂解而产生的核小体 DNA 可与核心组蛋白 $\text{H}_{2\text{A}}$ 、 $\text{H}_{2\text{B}}$ 、 H_3 和 H_4 紧密结合,形成复合物,保护其 DNA 不被核酸内切酶降解。在细胞凋亡的早期,只有少数细胞的 DNA 发生断裂,用生物化学方法很难测出 DNA ladder。最近,Leist 等使用抗组蛋白和抗 DNA 的单克隆抗体酶联免疫分析法 (ELISA),测定凋亡细胞,不仅大大提高了测定凋亡细胞的灵敏度,而且可以测定早期的细胞凋亡。

采用 ELISA 测定细胞凋亡具有下列优点:①可定量地测定凋亡细胞;②不需要预先标记细胞,因而也可测定在体外不增殖的细胞,如从组织中分离的细胞等;③如测定的是与组蛋白结合的断裂 DNA,则可以显示在细胞凋亡过程中基因组 DNA 的降解;④所使用的抗体没有种属特异性,因而可以测定各种不同种属的细胞凋亡;⑤可同时进行大量样品的检测;⑥灵敏度高,需要的细胞数少。

[凋亡细胞核小体 DNA 断裂的酶联免疫吸附法测定]

原理:

采用抗组蛋白抗体和抗 DNA 抗体夹心法 (sandwich ELISA) 进行测定,其原理与常规 ELISA 一致。测定时,首先用抗组蛋白抗体包被酶标测定板,接着用封闭试剂封闭,然后加入含有核小体和寡聚核小体的凋亡细胞裂解物,核小体则可与抗组蛋白抗体结合。最后,加入过氧化物酶 (POD) 标记的抗 DNA 抗体,此抗体可与已固定在酶标板上的核小体或寡聚核小体中的 DNA 结合,在 POD 底物 (二氨基联苯, DAB) 存在下,产生颜色反应,通过酶标测定仪分析,即可定量测定凋亡细胞。

抗组蛋白抗体可与人、小鼠、大鼠、仓鼠、牛、猪和果蝇的组蛋白结合,POD 标记的抗 DNA 抗体可与单链的和双链的 DNA 结合,据此设计的抗体夹心酶联免疫吸附分析法 (ELISA) 可以测定核小体单体和各种不同大小的核小体聚合物,因而可以测定许多不同的培养细胞株或从动物组织中分离的细胞的细胞凋亡。目前,Boehringer Mannheim 公司已经有试剂盒供应,下面以此试剂盒为例,介绍这一测定方法。

材料:

96 孔或 24 孔酶标测定板,酶标分析仪,平台振荡器。

试剂:

- (1) 抗组蛋白抗体:在冻干粉中,加 1ml 重蒸水彻底溶解。
- (2) POD-抗 DNA 抗体:在冻干粉中,加 1ml 重蒸水彻底溶解。
- (3) 0.1mol 碳酸盐缓冲液, pH9.2: 1.36g 碳酸钠, 7.35g 碳酸氢钠,溶于 950ml H_2O ,用 1mol/L HCl 或 1mol/L NaOH 调节 pH 至 9.2,加水至 1000ml。
- (4) 包被缓冲液 (临用前配制): 1ml 抗组蛋白抗体, 9ml 0.1mol/L 碳酸钠缓冲液, pH9.2。
- (5) 磷酸盐缓冲液 (PBS), pH7.3
 10×贮存液: 80g NaCl, 2g KCl, 11.5g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2g KH_2PO_4 溶于 1000 ml 重蒸水。
 1×工作液: 以双蒸水将 10×贮存液按 1:10 稀释,即: 137mmol NaCl, 2.7mmol KCl, 4.3mmol $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.4mmol KH_2PO_4
- (6) 洗涤缓冲液 (含 0.05% NaN_3 的 PBS): 0.5g NaN_3 溶于 1000ml PBS。
- (7) 封闭缓冲液: 0.05% Tween-20, 1mmol EDTA, 0.25% BSA 或 5% 脱脂奶粉, 0.05% NaN_3 。
- (8) 酶联抗体复合物工作液 (临用前制备): 1ml POD-抗 DNA 抗体, 9ml 封闭缓冲液。
- (9) 底物缓冲液: 50~75mg DAB 溶于 100ml 0.05 mol/L Tris·Cl (pH7.4) 中,在室温暗处振荡溶解,

用滤纸过滤后,于4℃暗处保存。临用前加0.01~0.003% H_2O_2 。

(10) 喜树碱溶液(1、2、4 μ g/ml):称量400 μ g喜树碱(camptothecin, CAM, Sigma)溶于100ml培养基(4 μ g/ml),再用培养基分别稀释2倍(2 μ g/ml)和4倍(1 μ g/ml)。

(11) 细胞裂解液:10mmol/L Tris·Cl, pH8.0, 10mmol/L NaCl, 10mmol/L EDTA, 100mg/ml 蛋白酶K, 1% SDS。

待测样品制备:

(1) 以HL60细胞(ATCC:CCL240,髓性白血病细胞株)为例。将对数生长期的HL-60细胞用培养基稀释至 10^5 个/ml。在Eppendorf管中,每管加入0.5ml细胞(5×10^4 个);

(2) 每管中分别加入500 μ l含有0、1、2和4 μ g/ml的喜树碱(CAM)溶液,其中含0 μ g CAM的为阴性对照(活细胞、未处理的细胞),置37℃ CO₂ 孵箱中培养4小时。

(3) 于1500r/min(200g)离心5分钟,收集细胞,去除上清。将细胞重悬于1ml培养基中,同法离心后,将细胞重新悬浮于细胞裂解液中,于4℃裂解30分钟。

(4) 于15000r/min(20000g)离心10分钟,小心吸出400 μ l上清(避免吸出细胞核,其中含有未降解的DNA),与3.6ml细胞裂解液混合(1:10稀释,1ml相当于 10^4 个细胞),立即用于核小体的酶标测定,或分装贮存于-20℃备用。

操作步骤:

抗体夹心ELISA的实验步骤:

(1) 在酶标板中,每孔加入100 μ l包被缓冲液,室温包被1小时,或于4℃包被过夜。

(2) 除去包被缓冲液,每孔加入200 μ l细胞裂解缓冲液,室温封闭30分钟。

(3) 除去裂解缓冲液,每孔加入200 μ l封闭缓冲液,再于室温封闭30分钟。

(4) 每孔加入250 μ l洗涤缓冲液,反复洗涤3次。

(5) 每孔加入100 μ l待测样品溶液,另设两孔只加细胞裂解缓冲液,作为测定本底的空白对照,室温孵育90分钟。

(6) 如4洗涤。

(7) 每孔加入100 μ l酶标抗DNA抗体溶液(空白对照孔不加),室温孵育90分钟。

(8) 如4洗涤。

(9) 每孔加入100 μ l底物缓冲液,置室温暗处反应10~20分钟后,以底物缓冲液为对照,使用酶标分析仪,于波长405nm处测定各孔光密度值。如果样品孔光密度值超过了仪器测量范围,则要将其稀释后再测。相当于活细胞的阴性对照孔也必须稀释相同的倍数。减少底物反应时间,也可使光密度值降低。

结果分析与计算:

待测样品光密度值等于从三个待测样品平行孔的光密度值中减去本底光密度值,代表正在死亡和已经死亡的细胞数目。凋亡细胞以富集系数(enrichment factor, EF)表示,EF值的高低代表释放到胞浆中的核小体单体或寡聚物的多少,等于待测样品光密度值除以阴性对照孔的光密度值。计算公式如下:

$$EF = \frac{\text{待测样品光密度值} - \text{本底光密度值(死细胞)}}{\text{阴性对照管光密度值(活细胞)}}$$

注意事项:

(1) 在使用不同的细胞和不同的细胞凋亡诱导剂时,ELISA所需要的细胞数目不同,因此,细胞数目应当通过预实验确定。

(2) 实验本底光密度值因实验条件不同会有所变化,在一般条件下,加入底物反应15分钟后,本底光密度值应小于样品光密度值的1/10。

(3) 阴性对照细胞(不加凋亡诱导剂的细胞)因不同的细胞培养条件会有所不同,通常在达到对数

生长期的培养细胞中, 约含 3% ~ 8% 的死细胞。在 ELISA 中, 这些死细胞会使光密度值增加, 因此要严格控制培养细胞中死细胞的数目。

(4) 由于阴性对照细胞会引起光密度值增加, 因此, 一般不需要另设阳性对照细胞。但如一定要求另设阳性对照细胞, 可按下述方法制备: 在 Eppendorf 管中加入 500 μ l 未经处理的细胞悬液 (5×10^6 细胞), 于 1 500r/min 离心 5 分钟, 去上清。将细胞重新悬浮于 500 μ l 高渗缓冲液 (10mmol/L Tris·Cl, pH7.4, 400mmol/L NaCl, 5mmol/L CaCl₂, 10mmol/L MgCl₂) 中, 37℃ 保温至少 2 小时以上。于 15 000r/min 离心 10 分钟, 小心吸出 400 μ l 上清, 以细胞裂解液按 1:5 稀释后作为阳性对照。

本实验的影响因素主要包括细胞凋亡的动力学、凋亡诱导剂和所试验的全部细胞中凋亡细胞的数量。在 HL-60/CAM 标准系统中, 抗体夹心 ELISA 最低可测定 5×10^2 个细胞/ml (相当于每孔 50 个细胞) 中的凋亡细胞。

27.4 细胞凋亡的分子生物学研究方法

细胞凋亡中染色体 DNA 的断裂是个渐进的分阶段的过程, 染色体 DNA 首先在内源性的核酸水解酶的作用下降解为 50 ~ 300kb 的大片段。然后大约 30% 的染色质 DNA 在 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 依赖的核酸内切酶作用下, 在核小体单位之间被随机切断, 形成 180 ~ 200bp 核小体 DNA 多聚体。DNA 双链断裂或只要一条链上出现缺口而产生的一系列 DNA 的 3'-OH 末端可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT) 的作用下, 将脱氧核糖核苷酸和荧光素、过氧化物酶、碱性磷酸化酶或生物素形成的衍生物标记到 DNA 的 3' 末端, 从而可进行凋亡细胞的检测, 这类方法一般称为脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法 (terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)。由于正常的或正在增殖的细胞几乎没有 DNA 的断裂, 因而没有 3'-OH 形成, 很少能够被染色。低分子量的 DNA 分离后, 也可使用 DNA 聚合酶进行缺口平移 (nick translation), 使低分子量的 DNA 标记或染色, 然后分析凋亡细胞。TUNEL 或缺口平移法实际上是分子生物学与形态学相结合的研究方法, 对完整的单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色, 能准确的反应细胞凋亡最典型的生物化学和形态特征, 可用于石蜡包埋组织切片、冰冻组织切片、培养的细胞和从组织中分离的细胞凋亡测定, 并可检测出极少量的凋亡细胞, 灵敏度远比一般的组织化学和生物化学测定法要高, 因而在细胞凋亡的研究中已被广泛采用。

27.4.1 过氧化物酶标记测定法

原理:

脱氧核糖核苷酸衍生物地高辛 (digoxigenin) - 11 - dUTP 在 TdT 酶的作用下, 可以掺入到凋亡细胞双链或单链 DNA 的 3'-OH 末端, 与 dATP 形成异多聚体, 并可与连接了报告酶 (过氧化物酶或碱性磷酸酶) 的抗地高辛抗体结合, 在适合底物存在下, 过氧化物酶可产生很强的颜色反应, 特异准确的定位出正在凋亡的细胞, 因而可在普通光学显微镜下进行观察。

毛地黄植物是地高辛的唯一来源。在所有动物组织中几乎不存在能与抗地高辛抗体结合的配体, 因而非特异性反应很低。抗地高辛的特异性抗体与脊椎动物垂体激素的交叉反应不到 1%, 若此抗体的 Fc 部分通过蛋白酶水解的方法除去后, 则可完全排除细胞 Fc 受体非特异性的吸附作用。

本方法可以用于福尔马林固定的石蜡包埋的组织切片、冰冻切片和培养的或从组织中分离的细胞凋亡测定。

仪器:

染色缸, 湿盒, 恒温水浴, 恒温箱, 光学显微镜。

试剂:

(1) 磷酸缓冲液 (PBS), pH7.4: 50mmol/L 磷酸钠盐 pH7.4, 200mmol/L NaCl。

- (2) 蛋白酶 K (200 μ g/ml): 0.02g 蛋白酶 K, 100ml PBS, pH7.4。
- (3) 含 2% 过氧化氢的磷酸缓冲液: 2.0ml 过氧化氢 (30%), 98.0ml 磷酸缓冲液, pH7.4。
- (4) TdT 酶缓冲液, pH7.2 (新鲜配制): 3.63g Trizma 碱, 990ml 蒸馏水, 用 0.1mol/L HCl 调节 pH 至 7.2, 加蒸馏水至 1 000ml, 再加入: 29.96g 二甲砷酸钠 $[(CH_3)_2AsO_2Na \cdot 3H_2O]$ 和 0.238g 氯化钴 ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)。
- (5) TdT 酶反应液 (新鲜配制): 76 μ l TdT 酶缓冲液, 32 μ l TdT 酶 (Promega), 混匀, 置于冰上备用。
- (6) 洗涤与终止反应缓冲液: 17.4g 氯化钠, 8.82g 柠檬酸钠, 溶于 1 000ml 蒸馏水。
- (7) 0.05% (W:V) 二氨基联苯 (DAB) 溶液 (新鲜配制): 5mg DAB 溶于 10ml PBS, pH7.4, 临用前过滤后, 加过氧化氢至 0.02% (V:V)。
- (8) 0.5% (W:V) 甲基绿: 0.5g 甲基绿溶于 100 ml 0.1 mol/L 乙酸钠, pH4.0。
- (9) 100% 丁醇, 100%、95%、90%、80% 和 70 乙醇, 二甲苯, 10% 中性甲醛溶液, 乙酸, 松香水等。
- (10) 过氧化物酶标记的抗地高辛抗体 (ONCOR)。

操作步骤

步骤一: 标本的预处理

1. 石蜡包埋的组织切片预处理:

- (1) 将组织切片置于染色缸中, 用二甲苯洗两次, 每次 5 分钟。
- (2) 用无水乙醇洗两次, 每次 3 分钟。
- (3) 用 75% 乙醇各洗一次, 每次 3 分钟。
- (4) 用 PBS 洗 5 分钟。
- (5) 加入蛋白酶 K 溶液 (20 mg/ml), 于室温水解 15 分钟, 去除组织蛋白。
- (6) 用蒸馏水洗 4 次, 每次 2 分钟, 然后按下述步骤二进行操作。

2. 冰冻组织切片预处理:

- (1) 将冰冻组织切片置 10% 中性甲醛中, 于室温固定 10 分钟。
- (2) 用 PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。
- (3) 置乙醇: 乙酸 (2:1) 的溶液中, 于 -20℃ 处理 5 分钟, 去除多余液体。
- (4) 用 PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟, 然后按下述步骤二进行操作。

3. 培养的或从组织分离的细胞的预处理:

- (1) 将约 5×10^7 个/ml 细胞于 4% 中性甲醛室温中固定 10 分钟。
- (2) 在载玻片上滴加 50 ~ 100 μ l 细胞悬液并使之干燥。
- (3) 用 PBS 洗两次, 每次 5 分钟, 然后按下述步骤二进行操作。

步骤二: 在染色缸中加入含 2% 过氧化氢的 PBS, 于室温反应 5 分钟。用 PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟。

步骤三: 用滤纸小心吸去载玻片上组织周围的多余液体, 立即在切片上加 2 滴 TdT 酶缓冲液, 置室温 1 ~ 5 分钟。

步骤四: 用滤纸小心吸去切片周围的多余液体, 立即在切片上滴加 54 ml TdT 酶反应液, 置湿盒中于 37℃ 反应 1 小时 (注意: 阴性染色对照, 加不含 TdT 酶的反应液)。

步骤五: 将切片置于染色缸中, 加入已预热到 37℃ 的洗涤与终止反应缓冲液, 于 37℃ 保温 30 分钟, 每 10 分钟将载玻片轻轻提起和放下一, 使液体轻微搅动。

步骤六: 组织切片用 PBS 洗 3 次, 每次 5 分钟后, 直接在切片上滴加两滴过氧化物酶标记的抗地高辛抗体, 于湿盒中室温反应 30 分钟。

步骤七: 用 PBS 洗 4 次, 每次 5 分钟。

步骤八: 在组织切片上直接滴加新鲜配制的 0.05% DAB 溶液, 室温显色 3 ~ 6 分钟。

步骤九：用蒸馏水洗4次，前3次每次1分钟，最后1次5分钟。

步骤十：于室温用甲基绿进行复染10分钟。用蒸馏水洗3次，前两次将载玻片提起放下10次，最后一次静置30秒钟。依同样方法再用100%正丁醇洗3次。

步骤十一：用二甲苯脱水3次，每次2分钟，封片、干燥后，在光学显微镜下观察并记录实验结果。

注意事项：

一定要设立阳性和阴性细胞对照。阳性对照的切片可使用DNase I部分降解的标本，阳性细胞对照可使用地塞米松（1 μ mol）处理3-4小时的大、小鼠胸腺细胞或人外周血淋巴细胞。阴性对照不加TdT酶，其余步骤与实验组相同。

27.4.2 荧光素标记测定法

原理：

脱氧核糖核苷酸衍生物地高辛（digoxigenin）-11-dUTP在TdT酶的作用下，可以掺入到凋亡细胞双链或单链DNA的3'-OH末端，与dATP形成异多聚体，与荧光素连接的抗地高辛抗体可与反应部位结合，当遇到波长为494nm的激发光时，荧光素产生波长为523nm的发射光，从而可在荧光显微镜下观察计数，或使用流式细胞仪进行定量测定。

本方法与前面描述的使用细胞化学染色和流式细胞仪进行细胞凋亡的测定方法比较，具有可以测定早期的凋亡细胞的特点，并且可测定在细胞周期中DNA发生断裂的具体时相。本实验采用的DNA末端标记法要比DNA缺口平移标记法灵敏10倍以上，使用dUTP-地高辛/抗地高辛标记系统具有很低的非特异染色，凋亡细胞产生的信号强度至少比非凋亡细胞高38倍以上，测定凋亡细胞的灵敏度要比测定坏死细胞高10倍以上。

本方法可用于福尔马林固定的石蜡包埋组织切片、冰冻组织切片、培养的细胞和从组织中分离的细胞的细胞凋亡测定。

仪器：

离心机、染色缸、湿盒、恒温水浴、恒温箱、荧光显微镜或流式荧光细胞分析仪等。

试剂：

- (1) 磷酸缓冲液（PBS，pH7.4）：50 mmol 磷酸钠盐 pH7.4，200 mmol NaCl。
- (2) 蛋白酶 K（200 μ g/ml）：0.02g 蛋白酶 K，溶于 100ml PBS，pH7.4。
- (3) 含 1% 副甲醛的 PBS，pH7.4。
- (4) 100%、95%、90%、80% 和 70% 乙醇，二甲苯，10% 中性甲醛，乙酸，RNA 酶。
- (5) TdT 酶缓冲液，pH7.2（新鲜配制）：3.63g Trizma 碱，990ml 蒸馏水；用 0.1mol/L HCl 调节 pH 至 7.2，加蒸馏水至 1 000ml，再加入：29.96g 二甲砷酸钠 [（CH₃）AsO₂Na·3H₂O]，0.238g 氯化钴 [CoCl₂·6H₂O]。
- (6) TdT 酶反应液（新鲜配制）：76 μ l 酶缓冲液，32 μ l TdT 酶（Promega），混匀，置于冰上备用。
- (7) 洗涤与终止反应缓冲液：17.4g NaCl，8.82g 柠檬酸钠，1 000ml 蒸馏水。
- (8) 荧光素（FITC）标记的抗地高辛抗体工作溶液：56 μ l 含 1% BSA 的 PBS，49 μ l 荧光素标记的抗地高辛抗体（ONCOR）混匀，置于冰上备用。
- (9) 含 0.1% Triton X-100 的 PBS：1.3 ml Triton X-100，128.7 ml PBS，pH7.4，混匀，4℃ 保存，可用一个月。
- (10) PI 染色液（新鲜配制，冰上保存）：50 μ g 碘化丙啶（PI），0.5 mg RNA 酶（50, 000U），10ml PBS，pH7.4。

操作步骤**方法一：使用流式细胞仪测定的实验步骤****步骤一：1. 细胞预处理：**

(1) 将 $(1 \sim 2) \times 10^6$ 细胞悬浮于 0.5ml PBS 中，用吸管将此细胞悬液加到含 1% 副甲醛的 PBS 中，混匀，置冰上固定 15 分钟。

(2) 在 4℃ 和 1 000r/min 离心 5 分钟后，重新悬浮于 10ml PBS 中，再以同样速度离心 5 分钟，去上清。

(3) 将细胞悬浮于 70% 冷乙醇中，置 -20℃ 保存备用。细胞可在此条件下保存 5 天。

步骤二：细胞悬液于 4℃ 和 1 000r/min 离心 5 分钟，去上清，加 1ml PBS 使细胞悬浮，将此细胞悬液转移到 1.5ml 的微量离心管中，以同样速度离心，去上清，如此再重复一遍，彻底洗涤已固定的细胞。

步骤三：将细胞悬浮于 2 滴 TdT 酶缓冲液中，离心细胞，除去上清，将细胞悬浮于 50 μ l TdT 酶反应液中，于 37℃ 水浴保温 30 分钟，在反应达 15 分钟时，将已沉到管底的细胞悬浮起来一次。

步骤四：细胞悬液中加入 1.0ml 洗涤与终止反应缓冲液，离心沉淀细胞，除去上清，再将细胞悬浮于 1.0ml 洗涤与终止反应缓冲液。

步骤五：离心细胞，除去上清，将细胞悬浮于 100 μ l 荧光素标记的抗地高辛抗体工作液，于室温反应 30 分钟。在反应到 15 分钟时，将已沉到管底的细胞悬浮起来一次。

步骤六：在细胞悬液中，直接加含 1% Triton X-100 的 PBS，离心，除去上清。再重复此过程一次。

步骤七：加 1.0ml 碘化丙啶染色液，于室温暗处染色 15 分钟。

步骤八：使用流式荧光细胞分析仪进行测定。在波长为 510 ~ 550nm 处测定荧光素标记的抗地高辛抗体-FITC 产生的绿色荧光，代表凋亡细胞数目。在波长大于 620nm 处测定 PI 产生的红色荧光，代表其余全部细胞数目。

方法二：使用荧光显微镜测定的实验步骤**步骤一：标本预处理：****1. 石蜡包埋的组织切片预处理：**

(1) 将组织切片置于染色缸中，用二甲苯洗两次，每次 5 分钟。

(2) 用无水乙醇洗 2 次，每次 3 分钟。

(3) 有 95% 和 75% 乙醇各洗一次，每次 3 分钟。

(4) 用 PBS 洗 5 分钟。

(5) 加入蛋白酶 K 溶液 (20 μ g/ml)，于室温水解 15 分钟，去除组织蛋白。

(6) 用蒸馏水洗 4 次，每次 2 分钟，然后按下述步骤二进行操作。

2. 冰冻组织切片预处理：

(1) 将冰冻组织切片置 10% 中性甲醛中，于室温固定 10 分钟后，去除多余液体。

(2) 用 PBS 洗 2 次，每次 5 分钟。

(3) 置乙醇:乙酸 (2:1) 的溶液中，于 -20℃ 处理 5 分钟，去除多余液体。

(4) 用 PBS 洗两次，每次 5 分钟后，然后按下述步骤 2 进行操作。

3. 培养的或从组织分离的细胞的预处理：

(1) 将约 5×10^7 个/毫升细胞于 4% 中性甲醛室温中固定 10 分钟。

(2) 在载玻片上滴加 50 ~ 100 μ l 细胞悬液并使之干燥。

(3) 用 PBS 洗两次，每次 5 分钟后，然后按下述步骤二进行操作。

步骤二：用滤纸小心吸去载玻片上组织周围的多余液体，立即在切片上加 2 滴 TdT 酶缓冲液，置室温 1 ~ 5 分钟。

步骤三：用滤纸小心吸去切片周围的多余液体，立即在切片上滴加 54 μ l TdT 酶反应液，置湿盒中于

37℃反应 10 小时（注意：阴性染色对照，加不含 TdT 酶的反应液）。

步骤四：将切片置于染色缸中，加入已预热到 37℃ 的洗涤与终止反应缓冲液，于 37℃ 保温 30 分钟，每 10 分钟将载玻片轻轻提起和放下一片，使液体轻微搅动。

步骤五：用滤纸小心吸去周围多余液体，用 PBS 洗 3 次，每次 3 分钟。直接在切片上滴加 52μl 荧光素标记的抗地高辛抗体工作液，于湿盒和室温反应 30 分钟。

步骤六：在染色缸中用 PBS 洗 3 次，每次 5 分钟。

步骤七：加 PI 复染，封片干燥后，于 -20℃ 避光保存。

步骤八：在荧光显微镜下观察或计数凋亡细胞。

注意事项：

一定要设立阳性和阴性的细胞对照。阳性对照的切片可使用 DNase I 部分降解的标本。阳性对照的细胞可使用地塞米松（1μmol，3~4 小时）处理的大、小鼠胸腺细胞或人外周血淋巴细胞。阴性对照标本不加 TdT 酶，其余与实验组染色步骤相同。在冰冻切片的染色中应删去 PI 染色步骤。

27.4.3 生物素 - dUTP/酶标亲和素测定法

原理：

生物素（biotin）标记的 dUTP 在 TdT 酶的作用下，可以掺入到凋亡细胞的双链或单链 DNA 的 3'-OH 末端，并可与连接了过氧化物酶（POD）的亲和素（streptavidin）特异结合，在 POD 底物（DAB）存在下，可产生很强的颜色反应，特异准确地定位正在凋亡的细胞，因而在普通光学显微镜下，即可观察和计数凋亡的细胞。

与前述方法类似，此方法可用于石蜡包埋的组织切片、冰冻组织切片和培养的细胞的凋亡研究。

仪器：

染色缸、湿盒、恒温水浴、恒温箱、光学显微镜。

试剂

(1) 蛋白酶 K (200μg/ml)：0.02g 蛋白酶 K，100ml 蒸馏水。

(2) 2% 过氧化氢 (H₂O₂)：2.0ml 过氧化氢 (30%)，98.0ml 蒸馏水。

(3) TdT 缓冲液，pH7.2（新鲜配制）：3.63g Trizma 碱，990ml 蒸馏水，用 0.1mol/L HCl 调节 pH 至 7.2，加蒸馏水至 1000ml，再加入 29.96g 二甲砷酸钠 [(CH₃)₂AsO₂Na·3H₂O]，0.238g 氯化钴 (CoCl₂·6H₂O)。

(4) TB 缓冲液：17.4g 氯化钠，8.82g 柠檬酸钠，1,000ml 蒸馏水。

(5) 2% 人血清清蛋白 (HSA) 或牛血清清蛋白 (BSA)：2.0gHSA 或 BSA，100ml 蒸馏水。

(6) TdT 酶/生物素 - dUTP 混合液：168 μl TdT 缓冲液，1 μl TdT 酶 (Promega, 51U/ml)，1μl 生物素 - dUTP。

(7) 亲和素 - 过氧化物酶工作溶液：用含 1% BSA 或 HSA 的 PBS 将亲和素 - 过氧化物酶 (StrepAvidin, Biogenex) 稀释 80~100 倍。

(8) 磷酸缓冲液 (PBS)，pH7.4：K₂HPO₄ 1.392g，NaH₂PO₄·H₂O 0.276g，NaCl 8.770g，先溶于 900ml 蒸馏水，然后用 0.01mol/L KOH 调 pH 至 7.4，并用蒸馏水补足到 1000ml。

(9) 二氨基联苯胺 (DAB) 工作溶液（新鲜配制，避光保存）：5mg DAB，10ml PBS，pH7.4，临用前过滤，加 0.02% (V:V) 过氧化氢。

(10) HE 染液：按常规配制。

操作步骤

步骤一：标本的预处理

1. 石蜡包埋的组织切片预处理：

(1) 组织切片用二甲苯洗两次, 每次 5 分钟。

(2) 100% 乙醇洗 2 次, 每次 3 分钟。

(3) 95% 和 90% 乙醇各洗一次, 每次 3 分钟。

(4) 蒸馏水洗两次后, 按下述步骤二操作。

2. 冰冻组织切片预处理:

(1) 冰冻切片置空气中干燥 1 小时。

(2) 丙酮固定 7 分钟。

(3) 空气干燥 20 分钟, 按下述步骤二操作。

3. 培养的细胞的预处理

(1) 将约 5×10^7 个/ml 细胞于 4% 中性甲醛室温中固定 10 分钟。

(2) 在载玻片上滴加 50 ~ 100 μ l 细胞悬液并使之干燥。

(3) 用 PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟后, 然后按下述步骤二进行操作。

步骤二: 将组织切片置蛋白酶 K 溶液中, 于 37℃ 保温 15 分钟。蒸馏水洗 3 次。

步骤三: 置 2% 过氧化氢中 5 分钟, 以淬灭内源性 H_2O_2 。

步骤四: 蒸馏水洗 3 次。

步骤五: TdT 缓冲液洗 1 次。

步骤六: 置 TdT 酶/生物素 - dUTP 混合液中, 于 37℃ 保温过夜。

步骤七: 将切片转移至 TB 缓冲液中, 于室温 15 分钟终止反应。

步骤八: 蒸馏水洗 3 次。

步骤九: 置 2% BSA 或 HSA 中, 室温封闭 10 分钟。

步骤十: 蒸馏水洗涤 1 次。PBS 洗涤 1 次, 5 分钟。

步骤十一: 置 1:80 稀释的亲合素 - 过氧化物酶溶液中, 37℃, 30 分钟。

步骤十二: 蒸馏水洗涤 1 次。再用 PBS 洗涤 1 次, 5 分钟。

步骤十三: 置 1:80 稀释的亲合素 - 过氧化物酶中, 37℃, 30 分钟。

步骤十四: 蒸馏水洗涤 1 次。再用 PBS 洗涤 1 次, 5 分钟。

步骤十五: 置 DAB 工作溶液中, 室温反应 5 分钟。

步骤十六: 蒸馏水洗 2 次。

步骤十七: 用 HE 染液染 5 分钟。

步骤十八: 蒸馏水洗 3 次。

步骤十九: 依次分别用 70%, 95%, 100% 乙醇脱水 2 次, 每次将切片提起放下 10 次。

步骤二十: 二甲苯洗 4 次, 每次 1 分钟。

步骤二十一: 封片干燥后, 于光学显微镜下观察实验结果。

注意事项:

与前述 TUNEL 方法一样, 设置必要的阳性和阴性对照。

27.4.4 Cy5 - dCTP 直接荧光标记法

原理:

研究发现, 荧光染料 Cy5 标记的 dCTP, 在 TdT 酶的作用下, 可直接掺入到凋亡细胞的双链或单链 DNA 的 3' - OH 末端, 从而可以利用流式荧光细胞分析仪准确地分析测定凋亡细胞。根据这一原理, 笔者与 Perkins 等合作建立了 Cy5 - dCTP 直接荧光标记测定细胞凋亡的方法。此法避免了抗体或生物素可能产生的非特异性反应, 特异性、重复性以及凋亡细胞的分离效果都优于前述方法, 并且简化了分析测定步骤。可用于培养的或从组织中分离的细胞凋亡分析, 也可在染色后, 利用流式荧光细胞分析仪分离

纯化凋亡细胞, 进一步进行凋亡细胞的生物化学分析等, 或对同一细胞标本进行多种荧光染色, 测定凋亡细胞的表型。

下面介绍在用 Cy5 - dCTP 直接荧光标记测定法的同时分析凋亡细胞的 CD4、CD8 和 CD44 的表达以及核 DNA 断裂的实验步骤。

材料:

离心机, 恒温水浴, 流式荧光细胞分析仪, 冰盒。

试剂:

(1) 磷酸缓冲液 (BPS), pH7.4: K_2HPO_4 1.392g, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0.276g, NaCl 8.770g。先溶于 900ml 蒸馏水, 然后用 0.01 mol/L KOH 调 pH7.4, 并用蒸馏水补足到 1000ml。

(2) 含 1% 甲醛的 PBS, pH7.4。

(3) 含 0.5% 吐温 - 20 (Tween - 20) 的 PBS, pH7.4。

(4) 荧光标记复合物: 亲和素 - PE、亲和素 - FITC 和亲和素 - Red613 (PharMingen)、Cy5 - dCTP (BDS Incorp)。

(5) 标记抗体复合物 (PharMingen): 鼠抗人 CD4 - PE、鼠抗人 CD44 - FITC、鼠抗人 CD8 - 生物素。

(6) TdT 酶缓冲液: 0.1mole 二甲基砷酸钠 [$Na(CH_3)_2AsO_2Na \cdot 3H_2O$], pH6.85, 1mmole 氯化钴 ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$), 0.1mmole 二硫苏糖醇 (DTT), 0.1mg/ml 牛血清清蛋白 (BSA)。

(7) TdT 酶 (Promega, 20U/ μ l)。

(8) 70% 冷乙醇 ($-20^\circ C$)。

操作步骤

(1) 实验前先将小鼠或大鼠的胸腺细胞, 加入地塞米松 ($3 \sim 10 \mu mole$) 于 $37^\circ C$ 、 CO_2 孵箱中培养 1 ~ 3 小时, 或加入抗鼠 CD3 ϵ 抗体 (2C11, $1 \sim 5 \mu g/ml$), 于 $37^\circ C$ 培养 8 ~ 12 小时, 以此细胞作为阳性对照。

(2) 于 1000r/min、 $4^\circ C$ 分别离心收集阳性对照细胞和待测细胞 (培养的或从组织中分离的细胞), 用 PBS 洗两次。

(3) 取 10ml 塑料管 1 支, 加入 50 μ l 待测细胞悬液 (含 1×10^6 个细胞) 作为阴性对照, 依次加入 1 μ l PE - 亲和素, 0.5 μ l FITC - 亲和素, 1 μ l Red613 - 亲和素和 1 μ l Cy5 - dCTP, 混匀。

(4) 取 10ml 塑料管 4 支, 各加入 50 μ l 阳性对照细胞悬液 (含 1×10^6 个细胞) 作为阳性对照。在其中 3 支试管中分别加入 PE - 抗 CD4 抗体、生物素 - 抗 CD8 抗体和 FITC - 抗 CD44 抗体 (注意: 每管只加入一种标记抗体复合物), 混匀。另置 1 支试管于冰上, 备作凋亡细胞的 Cy5 - dCTP 染色。

(5) 另取若干 10ml 塑料管, 各加入 50 μ l 待测细胞悬液 (1×10^6 个细胞), 依次加入 PE - 抗 CD4 抗体、生物素 - 抗 CD8 抗体和 FITC - 抗 CD44 抗体各 1 μ l, 混匀;

(6) 将上述各管, 置 $4^\circ C$ 温育 25 分钟。

(7) 用 PBS 洗 2 次 (洗细胞时, 离心条件为 $4^\circ C$ 和 1000r/min, 5 分钟, 下同)。

(8) 在加有生物素 - 抗 CD8 抗体的反应管中, 加入 1 μ l Red613 - 亲和素, 于 $4^\circ C$ 温育 15 分钟后, 用 PBS 洗 2 次。

(9) 在各管中加入 0.5ml 含 1% 甲醛的 PBS, 悬起细胞, 置冰上 15 分钟, 固定细胞。

(10) PBS 洗 2 次后, 分别加入 0.5ml 70% 冷乙醇 ($-20^\circ C$), 置 $-20^\circ C$ 1 ~ 3 小时 (最长可放置 3 天)。

(11) 在各管中加入 0.5ml PBS, 于 $4^\circ C$ 和 2000r/min 离心 15 分钟。

(12) PBS 洗两次后, 尽量去除上清。

(13) 在各待测细胞管和第 4 步中留作凋亡细胞 Cy5 - dCTP 染色的阳性对照管中, 依次加入: 10 μ l TdT 缓冲液, 0.25 μ l (5U) TdT 酶, 0.5 μ l Cy5 - dCTP (0.3nmol), 39.25 μ l 蒸馏水, 混匀, 置 $37^\circ C$ 水浴反

应 30 分钟。

(14) 细胞用含 0.5% Tween-20 的 PBS 洗 3 次, 重悬于 250~400 μ l PBS 中, 于 4℃ 避光保存 (最长可保存 3 天)。

(15) 以流式细胞仪分析各细胞亚群的凋亡细胞百分数。Cy5 最大激发光波长为 650nm, 最大发射光波长为 667nm。

(郑德先 刘彦信 文)

参 考 文 献

1. Kerr JFR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer*, 1972, 24: 239~257
2. Singh RP, et al. Cell Death in Bioreactors: A Role for Apoptosis. *Biotechnol. Bioeng*, 1994, 44:720~726
3. Ellis RE, et al. Mechanisms and Functions of Cell Death. *Annu. Rev. Cell Biol*, 1991, 7:663~698
4. Wyllie AH. Glucocorticoid-Induced Thymocyte Apoptosis Is Associated with Endogenous Endonuclease Activation. *Nature*, 1980, 284:555~556
5. Bowen ID & Bowen SM. Programmed Cell Death in Tumors and Tissues. Ed. Chapman and Hall, 1990, pp. 179~190
6. Hiremine C, et al. Establishment of a Murine Thymic Epithelial Cell Line Capable of Inducing both Thymic Nurse Cell Formation and Thymocyte Apoptosis. *Lab Invest*, 1990, 62:41~54
7. Duke RC, et al. IL-2 Addiction: Withdrawal of Growth Factor Activates a Suicide Program in Dependent T Cells. *Lymphokine Res*, 1986, 5:289~299
8. Nagata S, Golstein P. The Fas Death Factor. *Sciences*, 1995, 267:1449~1456
9. Brunner T, et al. Cell Autonomous Fas (CD95) /Fas-ligand Interaction Mediated Activation-induced Apoptosis in T-cell Hybridoma. *Nature*, 1995, 373:441~444
10. Nemazee DA, et al. Clonal Deletion of B Lymphocytes in Transgenic Mouse Bearing Anti-MHC Class I Antibody Genes. *Nature*, 1989, 337:562~566
11. Benhamou LE, et al. Anti-Immunoglobulins Induce Death by Apoptosis in WEHI-231 B Lymphoma Cells. *Eur J Immunol*, 1990, 20:1405~1407
12. Cohen JJ, Duke R. Apoptosis and Programmed Cell Death in Immunity. *Annu Rev Immunol*, 1992, 10:267~293
13. Tian Q, et al. A Polyadenylate Binding Protein Localized to the Granular of Cytolytic Lymphocytes Induces DNA Fragmentation Target Cells. *Cell*, 1991, 67:629~639
14. Ellis RE, et al. Mechanisms and Functions of Cell Death. *Annu. Rev. Cell Biol*, 1991, 7:663~698
15. Martin SJ & Green DR. Protease Activation during Apoptosis: Death by a Thousand Cuts? *Cell*, 1995, 82:349~352
16. Cleveland JL, Ihle JN. Contenders in FasL/TNF Death Signaling. *Cell*, 1995, 81:479~482
17. Evan GI, et al. Induction of Apoptosis in Fibroblasts by c-Myc Protein. *Cell*, 1992, 69:119~128
18. King KL, et al. Cell Death Comes to Life in Purgatory: a Keystone Meeting on Apoptosis. *Trends Cell Biol*, 1995, 5:287~289
19. Strasser A, et al. DNA Damage Can Induce Apoptosis in Proliferating Lymphoid Cells via p53-Independent Mechanisms Inhabitable by Bcl-2. *Cell*, 1994, 79:329~339
20. Bowen ID, Bowen SM. Programmed Cell Death in Tumors and Tissues. Great Britain at the University Press. Cambridge, 1st Ed, 1990
21. Darzynkiewicz Z, et al. Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry. *Cytometry*, 1992, 13:795~808
22. Dive C, et al. Analysis and discrimination of Necrosis and Apoptosis (Programmed Cell Death) by Multiparameter Flow Cytometry. *Biochem. Biophys. Acta*, 1992, 1133:275~285
23. Hotz MA, et al. Flow Cytometric Detection of Apoptosis: Comparison of the Assays of In Situ DNA Degradation and Chromatin Changes. *Cytometry*, 1994, 15:237~244
24. Sambrook J, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989,

25. Leist M, et al. Application of the Cell Death Detection ELISA for the Detection of Tumor Necrosis Factor - Induced DNA Fragmentation in Murine Models of Inflammatory Organ Failure. *Biocemica*, 1995, 11 (4): 20 ~ 23
26. Gavrieli Y, et al. Identification of Programmed Cell Death In Situ v. s. Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation, *J. Cell Biol*, 1992, 119 (3) :493 ~ 500
27. 郑德先, 等. CD8 α 和 CD3 ϵ 的融合分子介导 T 淋巴细胞凋亡. *科学通报*, 1997, 42 (1) :84 ~ 88
28. 王宪涛、郑德先, 等. 8-氯腺苷诱导的 MOLT-4 细胞凋亡. *科学通报*, 1997, 42 (2) :189 ~ 193

28. 微卫星技术

28.1 微卫星技术概述

28.1.1 概念

微卫星 DNA (microsatellite DNA) 或称简单重复序列 (simple repeat sequence, SRS 或 SSR) 与小卫星 (minisatellite) DNA 或称数目可变的串联重复序列 (variable number of tandem repeat, VNTR) 是人类基因组的一类序列, 它是近年来飞速发展起来的一种新型的 DNA 高度多态性遗传标记系统, 具有种类多、分布广泛、高度多态性、杂合性高、重组率低的特点, 在群体中变异范围大, 构成了丰富的长度多态性, 有高度的个体特异性, 并遵循孟德尔共显性遗传规律, 提供了众多有高度遗传信息的新的多态性标记。运用微卫星技术, 可为高分辨率的遗传连锁图谱构建、基因组全序列测定及基因分离奠定基础。随着它的广泛发现和应用, 人们对疾病相关基因的定位、分离、克隆和筛选的研究有了更深的认识。

28.1.2 微卫星技术基本特征

微卫星 DNA 广泛分布于原核、真核生物基因组中, 约占真核生物基因组的 5%, 呈串联重复状散在分布于基因组中, 约有 50 000 ~ 1000 000 个, 近几年发现的串联重复短序列便是其中一种。其特征为基本构成单元 (核心序列) 2 ~ 70bp 呈串联重复几次, 几十次排列而成, 中无间隔, 总长度一般小于 1kb。核心序列 6bp ~ 70bp 的串联重复称为小卫星 DNA (minisatellite DNA), 又称为 VNTR (variable number of tandem repeat)。这类重复可能源于减数分裂期间的同源染色体或染色体内部的不对等交换。核心序列为 1 ~ 6bp 串联重复称为微卫星 DNA, 其中最常见的是双核苷酸重复, 即 (CA)_n 和 (TG)_n。人类总共有 $5 \times 10^4 \sim 10^5$ 个 (CA)_n 型微卫星, 占 10%, 即平均每 6 ~ 60kb DNA 就存在一个。每个微卫星 DNA 的核心序列结构相同, 重复单位数目约 10 ~ 60 个。多位于基因非编码区, 基因内含子或非翻译区, 可存在于 Alu 序列或卫星序列之中, 但在编码序列及外显子中也可找到。其高度多态性主要来源于串联数目的不同。与其它 DNA 多态标记一样, 微卫星 DNA 呈孟德尔共显性方式遗传。

28.1.3 微卫星产生机制

普遍认为, 微卫星的产生主要是 DNA 复制过程中滑动, 或 DNA 复制和修复时滑动链与互补链碱基错配, 导致一个或几个重复单位的缺失或插入。而小卫星顺序多样的产生则主要通过重组机制, 即有丝分裂、减数分裂期姐妹染色单体不对等交换或染色体内部不对等交换的结果。

28.1.4 微卫星标记的筛选

微卫星 DNA 的发现需要基因组文库构建, 用重复数目为 10 ~ 20 的 (CA)_n 或其它 STRs 寡核苷酸探针筛库, DNA 序列分析等过程。现代分子生物技术很容易从人类基因组文库中筛选到微卫星 DNA, 并可了解微卫星 DNA 侧翼顺序, 选择微卫星序列两端互补序列设计 PCR 引物, 由于核心序列串联重复数目不同, 因而能够用 PCR 的方法扩增出不同长度的 PCR 产物。本节主要介绍以 PCR 的技术研究以微卫星为标记的基因分型。

28.2 微卫星多态标记检测技术

28.2.1 扩增片段长度多态性 (the amplified fragment length polymorphism, AMP - FLP)

应用 PCR 技术扩增微卫星片断, 将扩增产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 根据分离片段的大小决定基因型并计算等位基因频率。微卫星呈共显性遗传, 故微卫星 PCR 扩增产物如在 PAGE 胶上为一条片段, 则为纯合子; 两条片段, 则为杂合子。PCR 扩增的不同长度产物用高分辨的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 来区分。如产物在扩增时已经末端放射性标记, 电泳后的凝胶经干燥后放射自显影。如产物未经末端放射性标记, 则凝胶可经硝酸银染色分析。

28.2.1.1 试剂及配制

(1) 15mmol/L TES: 15mmol/L Tris·Cl (pH8.0)、15mmol/L EDTA (pH8.0) 15mmol/L NaCl。

(2) 10% SDS: 称 10g SDS 溶于 90ml 水中, 调 pH 至 7.2, 加水定容至 100ml。

(3) 15mmol/L TES 饱和酚: 重蒸酚加热熔化后加入 1/3 体积的 15mmol/L TES 溶液, 充分混匀, 置冰箱中过夜, 次日收掉上层多余的 TES 溶液, 于冰箱中保存。

(4) 氯仿/异戊醇 (24:1): 量取 24 体积氯仿及 1 体积异戊醇, 混匀, 于冰箱中保存。

(5) TE: 10mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA, pH7.5。

(6) 40% 丙烯酰胺

丙烯酰胺 (Acrylamide)	76g
-------------------	-----

N, N' - 亚甲双丙烯酰胺 (Bisacrylamide)	4.0g
---------------------------------	------

加双蒸去离子水至 150ml, 将溶液加热至 37℃ 使试剂溶解, 然后再用双蒸去离子水定容至终体积 200ml。用滤纸过滤于后, 4℃ 保存于棕色瓶中。

(7) 10 × TBE

Tris·Cl	108g
---------	------

硼酸	55g
----	-----

0.5mmol/ EDTA (pH8.0)	40ml
-----------------------	------

加双蒸去离子水至 1L, 室温下保存。

(8) 10% 过硫酸胺 (Aps) 溶液

过硫酸胺	1.0g
------	------

加双蒸去离子水溶解后再定容至 10ml, 4℃ 避光保存, 每周新鲜配制。

(9) 7% 变性聚丙烯酰胺凝胶 (8mol 尿素)

40% 丙烯酰胺	17.5ml
----------	--------

尿素 (超级纯)	50.45g
----------	--------

10 × TBE	10ml
----------	------

10% APS	1.33ml
---------	--------

TEMED	25μl
-------	------

加双蒸去离子水定容至 100ml, 磁力棒搅拌使其溶解, 过滤, 于棕色瓶中保存。

(10) 测序凝胶载样缓冲液 (终止液)

含 98% 去离子甲酰胺

1mmol/L EDTA (pH8.0)

0.025% 二甲苯青 FF

0.025%溴酚蓝

28.2.1.2 DNA 提取

从外周血分离白细胞，经蛋白酶 K 消化和酚/氯仿抽提获得。

1. 白细胞的分离：

有两种方法：

方法一：淋巴细胞分离液分离白细胞：

- (1) 取人外周静脉血 5ml，2% EDTA 抗凝。
- (2) 沿管壁缓慢加入盛有 2~3ml 的淋巴细胞分离液的试管中，保持血液与分离液界面清晰。
- (3) 置水平离心机，2000r/min，离心 20 分钟。
- (4) 吸取呈白膜状分布的白细胞层于另一无菌螺口试管中。
- (5) 用 PBS 洗两次，每次 1500r/min，10 分钟。
- (6) 吸掉上清，得到白细胞沉淀。
- (7) 得到的白细胞直接用酚抽提或冻存于 -70℃ 冰箱中备用。

方法二：低渗溶血法：

- (1) 取静脉血 1ml，加 0.2ml 2% EDTA 溶液混匀抗凝。
- (2) 加 5 倍体积的消毒蒸馏水，室温放置 10 分钟，注意这期间要经常振摇以达到红细胞完全溶血。
- (3) 5000r/min 离心 10 分钟。
- (4) 弃上清，沉淀加适量生理盐水悬浮。
- (5) 5000r/min 离心 10 分钟，倒掉上清，得到沉淀即为白细胞和细胞膜的碎片混合物，液氮贮存或立即提取 DNA。

2. DNA 的提取：

采用酚抽提法：

- (1) 在 5ml 15mmol/L TES 中悬浮白细胞，加蛋白酶 K 250 μ g (50 μ g/ml)，10% SDS 至终浓度 0.5%。
- (2) 充分混匀，放 50℃ 水中保温 3~5 小时，其间振荡 2~3 次。
- (3) 冷却至 4℃，加等体积 15mmol/L TES 饱和酚，振荡，使水相和酚层充分混匀。
- (4) 4℃，5000r/min 离心 15 分钟，此时 DNA 溶液在上层，酚位于下层，中间为变性蛋白质。
- (5) 用吸管小心吸取上层粘稠溶液，移至另一离心管中。
- (6) 重复步骤 (3)、(4)、(5) 两次。
- (7) 加入等体积氯仿/异戊醇，按步骤 (4)、(5) 抽提 3 次。
- (8) 用吸管将上层溶液移至小烧杯中，放入冰水中冷却至 0℃。
- (9) 加 2.5 倍体积无水乙醇，此时可见白色沉淀析出，轻轻摇动烧杯，待所有 DNA 均沉淀出来，并绕成一小团。
- (10) 用吸管捞出 DNA 沉淀，在 70% 冰乙醇中洗 3 次。
- (11) 将 DNA 沉淀放入 1.5ml Eppendorf 管中，打开管盖，让残存的乙醇在室温挥发，或放入冷冻干燥机中冷冻干燥。
- (12) 加适量 TE 溶解 DNA。

28.2.1.3 微卫星 DNA 引物选择

美国人类连锁合作中心 (Cooperative Human Linkage Center, CHLC)，基因组数据库 (genome data base, GDB) 和基因库 (genBank) 等收集了上千种微卫星 DNA，并有统一的登记号 (Accession No.)、克隆位点名称、染色体定位、扩增此微卫星 DNA 的引物、扩增片段长度、等位基因数目、杂合率和多态信息量 (PIC) 等。可经 Internet 来获得。目前一些大公司提供了覆盖 23 条染色体的全套引物，已完全商品化，亦可利用。

28.2.1.4 同位素标记微卫星引物

以 γ - ^{32}P -ATP 末端标记 5'端引物为例:

5'端引物	30 μl (30ng/ μl)
γ - ^{32}P -ATP	8 μl (3000Ci/mmol)
T_4 DNA 连接酶	2 μl (5U/ μl)
10 \times T_4 DNA 连接酶缓冲液	5 μl

加双蒸去离子水 5 μl 定容至总反应体积 50 μl 。充分混匀, 离心, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴孵育 20~30 分钟, 然后 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 分钟灭活, 置于冰水中。

28.2.1.5 PCR 反应

PCR 反应体系为 25 μl 。含 2mmol/L dNTP, Taq 聚合酶 1U 和 1 \times Taq 聚合酶缓冲液, 7.5pmol 上述标记的 5'引物和 7.5pmol 未标记的 3'引物, 基因组 DNA 50ng。经 PCR 变性、退火和延伸反应, 循环周期结束后加入 5 μl 终止液。

28.2.1.6 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)

PCR 产物和终止液混合经 95 $^{\circ}\text{C}$ 热变性后, 使用 7% 变性聚丙烯酰胺凝胶, 以 1 \times TBE 缓冲液, 45W 恒定功率, 在垂直测序凝胶电泳装置电泳 3~5 小时。

28.2.1.7 放射自显影

电泳结束后, 将胶取下, 真空抽干, 于 X 线片暗盒中放置 -70 $^{\circ}\text{C}$ 自显影数小时至过夜, 然后洗片, 观察阅读结果。

28.2.1.8 分析其基因型

依据微卫星 DNA 对照或分子量标准 (marker) 来确定分离片段的大小。微卫星呈共显性遗传, 因此微卫星 PCR 扩增如在 PAGE 胶上为一条带, 则为纯合子, 两条带, 则为杂合子。

28.2.2 荧光标记 PCR 法——采用 373A DNA 序列荧光标记自动分析仪

采用四色荧光染料标记终止物 ddNTP 或引物 5'端, 经 Sanger 测序反应后其产物 3'端或 5'端带有不同的荧光标记, 一个样本只占一个泳道上样, 经电泳后各个荧光谱分开, 同时激光监测器同步扫描, 激发出的荧光经光栅分光后打到 CCD 摄影机上同步成像, 再传入电脑, 经各种应用软件分析后输出最终结果。

28.2.2.1 试剂与设备

377 或 373 型 DNA 测序仪

荧光标记染料

荧光标记分子量大小内标

应用软件 (GeneScanTM、Genotype、AutoAssemble 和 Sequence Navigator 等)

28.2.2.2 引物的荧光标记

在微卫星引物 5'或 3'末端标记荧光染料如 6-FAM、HEX 或 TET, 通过荧光扫描, 三者分别显示蓝、黄和绿色。

28.2.2.3 PCR 反应

在 96 孔微量板中进行, 基因组模板 DNA 50ng, Taq 聚合酶 0.5U, 总反应体积 20 μl , 经变性、退火和延伸 PCR 循环, 可根据改变氯化镁浓度和退火温度等来选择最佳反应条件。

28.2.2.4 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物的质和量

如果大批量操作, 也可对每一种微卫星标记的阳性对照和未加模板的阴性对照 PCR 产物进行鉴定。

28.2.2.5 PAGE 电泳

采用 GenScanTM 软件进行电泳图像扫描和收集分析定量 DNA 片段大小。将稀释后的 PCR 产物与含甲

酰胺的 Genscan 2500 - ROX (激光扫描呈红色) 片段分子量内标混合, 在 373a 或 377 顺序测序仪以 7% 的 PAGE 电泳 4 ~ 6 小时。一般不同荧光标记的 PCR 产物, 或同一种荧光标记, 但扩增片段相差 50 ~ 100bp 的 PCR 产物混合在同一加样孔中进行电泳。这样, 在同一泳道上可同时泳动 2 ~ 24 个 PCR 产物。

28.2.2.6 基因型分析

应用 Genotype™ 软件可分析收集的数据自动得出基因型分析结果。一般二核苷酸的图像为 stutter - stutter - peak; 四核苷酸的图像为 stutter - peak。stutter 相当于放射自显影中的阴影带, 即非特异性扩增带, 而主峰相当于特异性扩增带。

28.3 统计分析

通常采用以下方法:

28.3.1 不同人群之间等位基因频率计算

根据 Hardy - Weinberg 原理, 由于每一个体任何常染色体位点的等位基因均呈二相分布, 假定该个体某一位点基因型为 M、N, 等位基因频率为 p 和 q, 并且 $(p + q) = 1$, 其基因型分布可按 $(p + q)^2$ 来计算, 即 $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$ 。假定人群中某一位点有 3 种类型的等位基因, 其频率为 p、q、和 r, 则该位点基因型分布为 $(p + q + r)^2$ 。以此类推, 可计算出任何已知基因型和等位基因数目的基因频率。

28.3.2 人群中 Hardy - Weinberg 平衡推算

Hardy - Weinberg 平衡定律是指人群中的基因型和等位基因频率按一定比例分布, 并且在向子代传递中保持稳定。符合该平衡定律的实际人群应满足以下要求: 随机婚配; 人群中的基因突变率保持恒定; 无针对某一表型的基因型选择; 人群数足够大, 不因某一偶发事件导致的等位基因频率波动在人群间扩散; 无大规模迁徙现象导致的人群结构改变。检测人群中 Hardy - Weinberg 平衡主要采用 3 种方法: ①通过人群中实际观察和理论推算的杂合子频率来分析; ②通过实际观察和理论推算的人群纯合子和杂合子基因型数目来分析; ③通过经验可能性计算公式算出的人群中实际观察和理论推算的经验型频率来分析。

28.3.3 推算突变率

参照相应的 SMM 或 IAM 突变模型, 采用 Chakraborty 和 Neel 的最大似然法间接计算。

另外, 就寻找新基因或疾病相关基因而言, 利用微卫星 DNA 多态性标记的策略, 是一个逐步缩小包围圈的策略。首先进行第一轮微卫星检测而确定一个 10cm M (即 10cm Morgan = 1Mb = 10^6 bp) 的位点。经连锁分析确定相关性之后, 再回头进行微卫星 PCR 扩增。再选取范围小、密度高的 Marker 为引物, 重复上述试验。不断重复这样的 PCR 扩增, 逐步缩小范围, 增加密度, 直至找到一个 0.1 ~ 1cmM 的位点 (至少缩小 10 倍)。之后, 或进行 DNA 测序, 或进行候选片段的定位克隆, 直至找出目标基因。最后一步是验证: 首先将目标基因转入动物, 观察其功能表型; 继之, 回到群体, 采集总 DNA 样品, 扩增出相关基因, 分析其与性状的相关性。

(周宪梁 胡爱华 文 惠汝太 审)

参 考 文 献

1. Jeffreys AJ, Neumann R, Wilson V. Repeat unit sequence variation in minisatellite: A novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecular analysis. *Cell*, 1990, 60:473

2. Wooster R, Cleton - Jansen AM, Collins N, et al. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancer. *Nat Genet*, 1994, 6:152
3. Schular GD, Boguski MS, Stewart EA, et al. A gene map of the human genome. *Science*, 1996, 274:540
4. 惠汝太, 等. 心血管分子生物学实验技术. 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998

29. cDNA 末端快速扩增技术

cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE), 是一种从低丰度转录本中快速扩增 cDNA 5' 和 3' 末端简单而有效的方法。

29.1 RACE 的原理

RACE 是基于 PCR 技术由已知的部分 cDNA 顺序来获得完整 cDNA 5' 和 3' 端的方法。该方法也被称为锚定 PCR (anchored PCR) 和单边 PCR (one-sided PCR)。为要获得 cDNA 3' 末端 (图 29-1A), 以 Oligo dT₁₇ 和一个 35bp 的接头 [(dT)₁₇ - adaptor] 为引物反转录总 RNA 得到 (-) cDNA。引物的接头有一个在

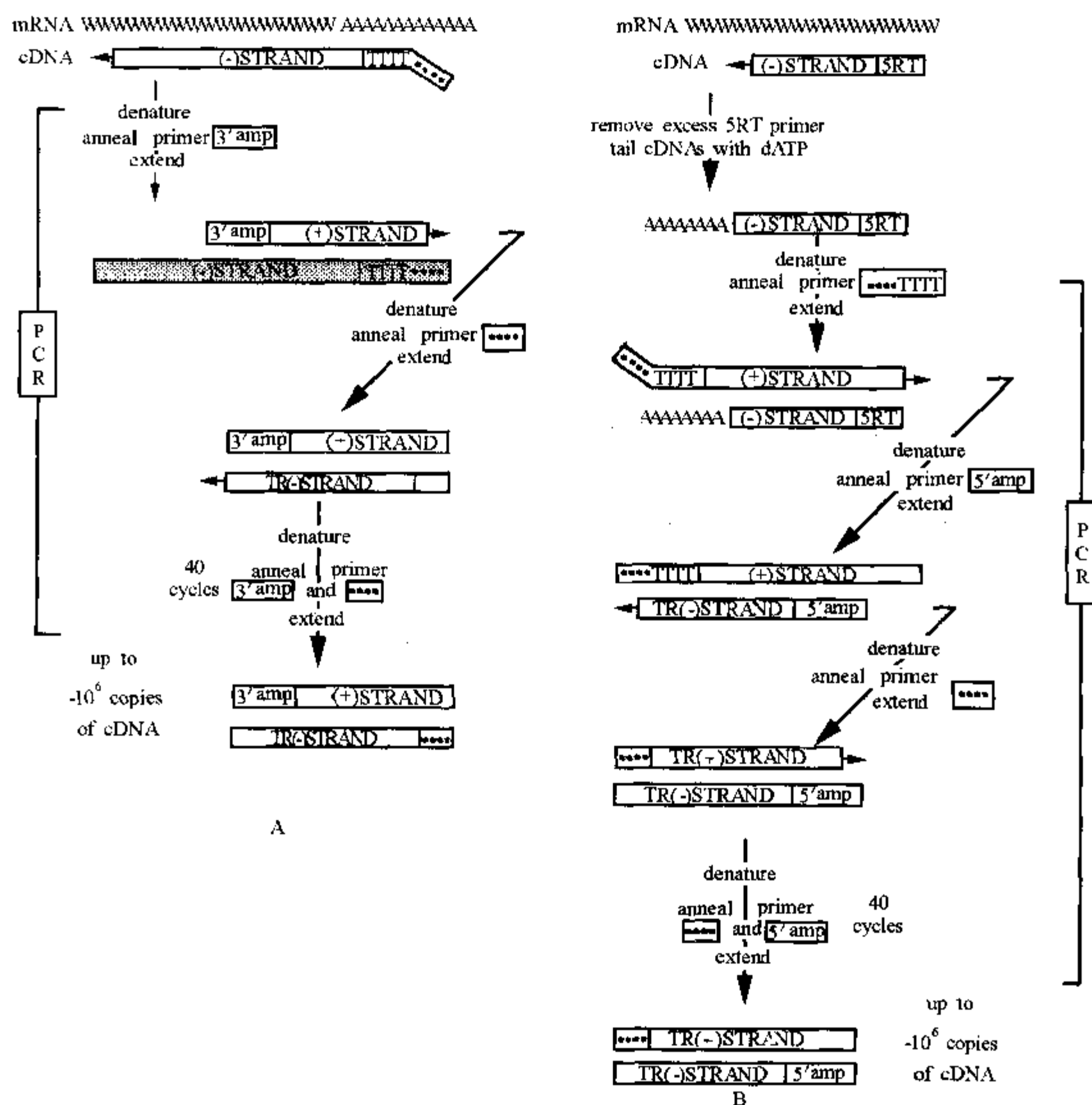


图 29-1 RACE 原理和方法 A. RACE 3' 末端; B. RACE 5' 末端

基因组 DNA 中罕见的限制性内切酶的酶切位点, 这样就在未知的 cDNA 末端接上了一段特殊的接头序列。接着, 用一个基因特异性引物 (3'amp) 与少量第一条 (-) cDNA 链退火 (一般 < 1ng) 并延伸, 产生互补的第二条 (+) cDNA 链。然后用 3'amp 和接头引物进行 PCR 循环即可扩增得到 cDNA 双链。扩增的特异性取决于 3'amp 的碱基只与目的 cDNA 分子互补。用接头引物来取代 (dT)₁₇ - 接头引物则阻止了长 dT 碱基引起的错配。

同样的原理可用来获得 cDNA 5' 末端 (图 29-1B), 利用基因特异性引物 (5RT) 反转录总 RNA, 分离反转录产物, 用脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT) 加上 poly (A) 尾。第二条 (+) 链以 (dT)₁₇ - adaptor 为引物合成。然后用接头引物和位于延伸引物序列上游的基因特异性扩增引物 (5'amp) (这个“中间”引物提高了扩增反应的特异性和效率) 进行 PCR 扩增。

扩增得到的双链 cDNA 用限制性内切酶酶切和 Southern blot 分析并克隆。最佳克隆的方法是同时使用一个切点在接头序列上的限制性内切酶和一个切点在扩增区域内的内切酶。由于大部分非特异性扩增的 cDNA 产物不能被后一个内切酶酶切, 因而也就不会被克隆, 从而大大增加了克隆过程的选择性。另外还可以用在基因特异性引物 5' 末端掺入一个限制性酶切位点的方法来克隆 RACE 产物。最后, 从两个有相互重叠序列的 3' 和 5' RACE 产物来获得全长 cDNA, 或者通过分析 RACE 产物的 3' 和 5' 末端顺序, 合成相应引物, PCR 扩增 mRNA 反转录产物来获得。

29.2 RACE 的方法

试剂

可选用 GIBCOBRL 公司的 5'RACE 试剂盒, 产品名: 5'RACE System for Rapid Amplification of Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0; CAT. NO. 18374 ~ 058。该试剂盒包括:

- 10 × PCR 缓冲液
- 2.5mmol/L MgCl₂
- 10mmol/L dNTP
- 0.1mol/L DTT
- 200U/μl supercriptase
- RNase
- 5 × tailing buffer
- 2mmol/L dCTP
- 5 × 脱氧核苷酸末端转移酶缓冲液 (TdT 缓冲液)
- 末端转移酶
- 2.5μmol/L GSP1 (5' - RACE)
- 10μmol/L oligo (dT)₂₀ 引物 (3' - RACE)
- 10μmol/L AAP (abridged anchor primer)
- 10μmol/L AUAP (abridged universal amplification primer)
- 10μmol/L UAP (universal amplification primer)
- DNA purification system

此外, 尚需如下试剂:

- GSP1 (gene specific primer1)
- GSP2 (gene specific primer2)
- GSP (nested gene specific primer)

以上三种引物需根据所要扩增的 cDNA 已知序列, 自行设计。

2.5U/ μ l Taq DNA 聚合酶

TE 缓冲液

操作步骤:

以 5' - RACE 为例叙述其操作步骤, 操作过程如图 29-2 所示。

[首链 cDNA 链的合成]

(1) 在 0.5ml 离心管中加入

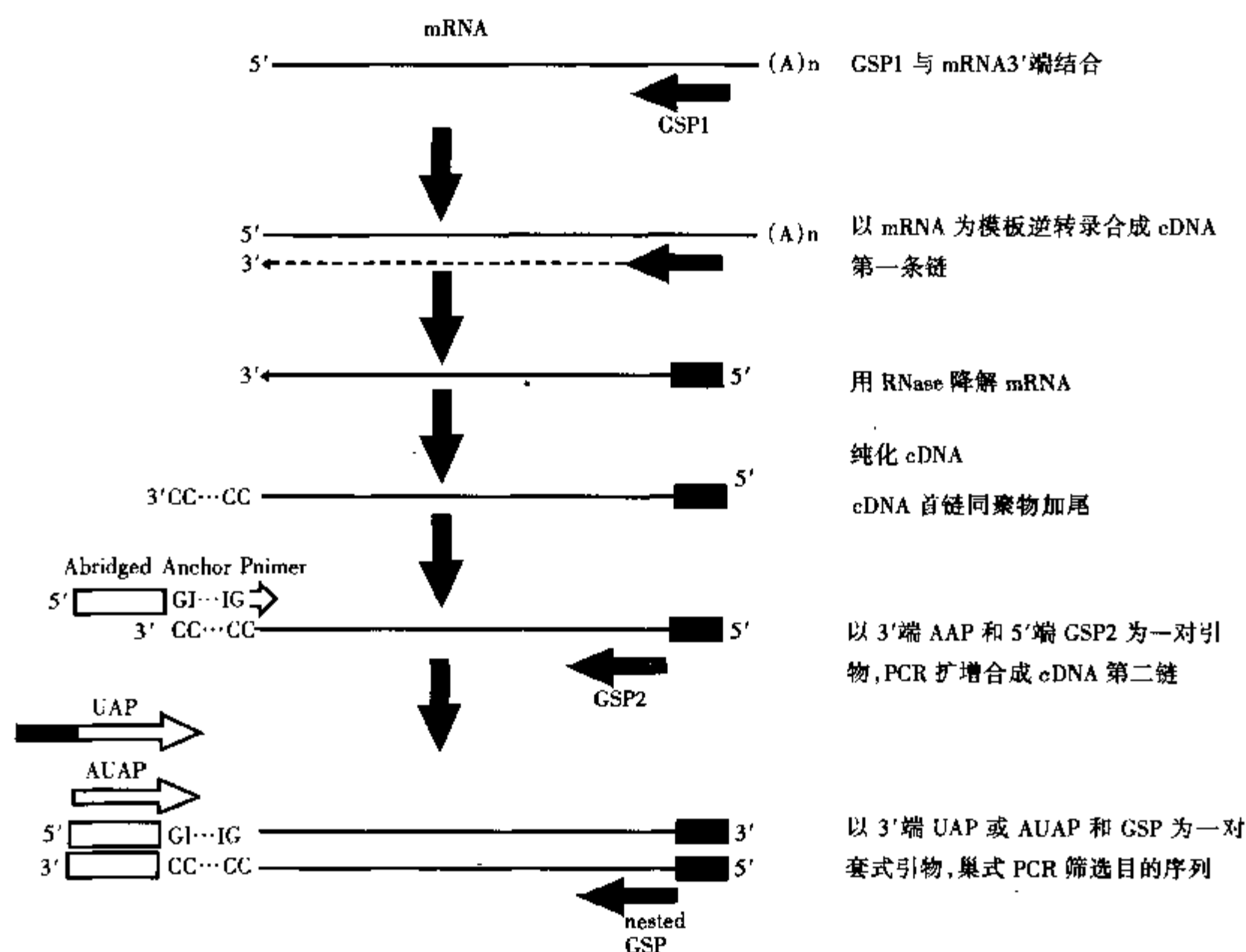
GSP1 2.5 μ mol (10 ~ 25ng)总 RNA < 或 = 1 μ g0.1% DEPC 水 加至 15.5 μ l(2) 70 $^{\circ}$ C 变性总 RNA 10 分钟, 插入冰内 1 分钟, 离心后, 按顺序加入下列样品10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ l25mmol/L MgCl 2.5 μ l10mmol/L dNTP 1 μ l0.1mol/L DTT 2.5 μ l总计 8.5 μ l(1) + (2) 24 μ l(3) 轻轻混匀, 离心, 42 $^{\circ}$ C 孵育 1 分钟。(4) 加入 1 μ l supercriptase, 轻轻混匀, 42 $^{\circ}$ C 孵育 50 分钟。(5) 70 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟终止反应。

图 29-2 5' RACE 操作步骤

- (6) 离心 10~20 秒, 把反应物放入 37℃。
- (7) 加入 1 μ l RNase, 轻轻混匀, 30℃孵育 30 分钟。
- (8) 离心后置于冰浴中。

[cDNA 的纯化]

cDNA 纯化的质量直接影响以下的反应和获取片段的长度, 纯化的方式有多种, 最经典的方法是酚-氯仿抽提法, 此法的主要缺点是 cDNA 的丢失较多。柱层析纯化的方式不仅快速, 纯化的质量高, 同时 cDNA 丢失较少。下面以柱层析纯化的方式介绍 cDNA 的纯化步骤:

- (1) 将结合液 (binding solution, 6mol/L NaI) 置于实验台平衡到室温。
- (2) 将 100 μ l 高压消毒的水在 65℃平衡。
- (3) 将 120 μ l 结合液加入到上述首链 cDNA 反应液。
- (4) 将步骤 (3) 中的反应液转移到层析柱 (GlassMax 柱) 中, 13 000g 离心 20 秒。
- (5) 把 GlassMax 柱从离心管中取出, 把滤过液移至一新管内, 保留此液直至获得 cDNA。
- (6) 加入 0.4ml 预冷 (4℃) 1 \times 洗液到 GlassMax 柱中, 13 000g 离心 20 秒, 丢掉滤过液, 重复此步骤 3 次。
- (7) 用 0.4ml 70% 预冷乙醇洗 GlassMax 柱 3 次, 每次 13 000g 离心 20 秒。
- (8) 最后一次用 70% 乙醇洗 GlassMax, 并以 13 000g 离心 1 分钟, 使 GlassMax 柱干燥。
- (9) 把 GlassMax 柱移至一新的离心管, 加入 50 μ l 65℃预热的高压消毒的水到 GlassMax 柱中洗脱 cDNA, 然后 13 000g 离心 20 秒, 回收 cDNA 首链。

[cDNA 首链同聚物加尾 (加 TdT)]

- (1) 取 0.5ml 离心管, 然后依次加入下列样品并轻轻混匀

0.1% DEPC 水	6.5 μ l
5 \times TdT 缓冲液	5.0 μ l
2mmol/L dCTP	2.5 μ l
纯化的 cDNA	10.0 μ l
总计	24.0 μ l

- (2) 94℃孵育 (变性) 2~3 分钟, 置于冰浴中 1 分钟, 离心后再放入冰浴。
- (3) 加入 1 μ l 末端脱氧核苷酸转移酶 (TdT), 轻轻混匀, 37℃孵育 10 分钟。
- (4) 65℃孵育 10 分钟, 使 TdT 加热失活, 离心后, 置于冰浴上备用。

[首轮 PCR 扩增]

- (1) 把 PCR 仪升温至 94℃ (热启动可保证得到特异的 PCR 扩增产物)。
- (2) 0.5 μ l 离心管中冰上加入下列样品

高压消毒水	31.5 μ l
10 \times PCR 缓冲液	5.0 μ l
25mmol/L MgCl ₂	3.0 μ l
10mmol/L dNTP	1.0 μ l
10 μ mol/L GSP2	2.0 μ l
10 μ mol/L AAP	2.0 μ l
加尾的 cDNA	5.0 μ l
总计	49.5

- (3) 加入 0.5 μ l Tag 酶 (5U/ μ l), 轻轻混匀, 加入 50~100 μ l 石蜡油。

(4) 从冰上将上述混合液移至 PCR 仪, 94℃变性 2 分钟; 然后, 94℃ 40 秒, 55℃ 1 分钟, 72℃ 1 分钟, 共 30 个循环; 72℃延伸 7 分钟, 最后放置 4℃。

(5) 将 10 μ l 反应产物加在 1% 的普通琼脂糖凝胶板上, 电泳观察结果, 以 pBR322/HinI 作为分子量标志。

[巢式 PCR 扩增]

(1) 将首轮 PCR 产物用 TE 缓冲液稀释 100 倍。

(2) 将 PCR 仪调至 94 $^{\circ}$ C。

(3) 在冰浴上将下列样品加入 0.5ml 离心管中

高压消毒水	33.5 μ l
10 \times PCR 缓冲液	5.0 μ l
25mmol/L MgCl ₂	3.0 μ l
10mmol/L dNTP	1.0 μ l
10 μ mol/L GSP	1.0 μ l
10 μ mol/L AUAP	1.0 μ l
稀释的首轮 PCR 产物	5.0 μ l
总计	49.5 μ l

(4) 加入 0.5 μ l Tag 酶 (5U/ μ l), 轻轻混匀, 加入 50~100 μ l 石蜡油。

(5) 将上述反应管移入 PCR 仪 94 $^{\circ}$ C 变性 2 分钟; 然后 94 $^{\circ}$ C 40 秒, 55 $^{\circ}$ C 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 1 分钟, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 分钟, 最后放置 4 $^{\circ}$ C。

(6) 取 15 μ l 反应产物加在 1% 的普通琼脂糖凝胶板上, 电泳观察结果。

如果巢式 PCR 得到几个不同大小片段, 通过低熔点琼脂糖凝胶电泳分离最大片段, 经纯化、克隆、测序, 即可得到延伸片段的序列。

注意事项

(1) 总 RNA 或 mRNA 提取的质量非常重要, 它直接影响着是否能够获取片段、获取片段的长度和获取片段的序列的准确性。对于高丰度的 mRNA 基因来说, 使用两者没有明显区别。对于低丰度的 mRNA 基因来说, 应该使用 mRNA, 保证得到足够量的逆转录 cDNA。

(2) 逆转录引物: 逆转录引物的设计部位非常重要, 应将其设计得离未知序列近些, 以保证得到较长的 cDNA。

(3) cDNA 的纯化: 逆转录出的 cDNA 的第一条链的纯化非常关键, cDNA 纯化质量的好坏直接影响着是否能够获取片段、获取片段的长度和获取片段序列的准确性。

(4) PCR 引物: 除尽量减少引物二级结构及引物二聚体外, 首轮和巢式引物设计时, 只要已知片段允许, 应尽量保证两者之间的距离, 同时增加 G+C 的含量, 以便保证较高的退火温度, 从而保证获取 cDNA 序列的准确性。

(5) Taq 聚合酶的选择: Taq 聚合酶的选择非常重要, 即要保证能够扩增出足够长的扩增产物, 同时又要保证得到的扩增产物的准确性。为此我们推荐能够扩增长片段的复合酶, 它即含有聚合酶活性, 又含有 5'、3' 外切酶活性能够自动校正碱基的突变, 这样即可保证扩增产物的长度又可保证扩增片段序列的准确性。扩增条件设置应相应地作出调整。

29.3 RACE 的改良和优化

尽管利用 PCR 扩增并克隆 cDNA 序列 3' 和 5' 末端的各种方法很有价值, 但许多研究小组观察到, 要成功地应用这项技术是很困难的。一般来讲, 失败的原因有两个。第一, 有三个连续的酶反应步骤 (反转录, TdT 加尾和 PCR), 每一个步骤都可能是失败的原因; 第二, 即使是酶反应步骤能顺利进行, 也常常会产生大量的非特异性或截短的产物背景。因此, 自 RACE 技术出现以来, 许多实验小组对 RACE

的各个步骤都进行了改良。

29.3.1 反转录

影响 RACE 实验结果最关键的步骤是 mRNA 反转录合成第一条 cDNA 链, 对想获得全长 5' - 端尤为重要。因为截短的 cDNA 在后续 PCR 循环中会优先扩增, 所以反转录反应尽量避免产生不完整的 cDNA。这首先就需要有高质量的 mRNA。也可用总 RNA 为反转录模板, 但本底太高, 而且获得的 cDNA 可能会含有内含子。若有足量的 mRNA, 在做 RACE 前应先电泳, 做 Northern 杂交以确定目的 mRNA 确实存在并且没有被降解。

由于高 GC/AU 比的转录本可能形成二级结构导致在反转录时产生截短的 cDNA, 有人采用 RNaseH⁻ 莫洛尼鼠白血病病毒 (MMLV) 反转录酶或嗜热 DNA 多聚酶如 rTth (Perkin - Elmer) 和 TetZ (Amersham) 解决了这个难题。这些嗜热 DNA 多聚酶在特定条件下能在高温 (一般 60 到 70℃) 中有效地反转录 mRNA。

用特异性引物合成第一条 cDNA 链时, 由于 mRNA 的二级结构致使一些特异性引物不能有效地与模板结合。同时, 由于采用的是特异性引物, 因而用同一 RNA 样品分离不同的 5' cDNA 末端 (如编码多基因家族不同成员的 5' - cDNA 末端) 显得很麻烦。Harvey 和 Darlison 采用六核苷酸随机引物进行第一条 cDNA 链的合成, 多聚腺苷酸化后再进行 RACE 消除了这些影响。

Borson 等采用锁定寡聚脱氧胸腺嘧啶核苷酸 (lock - docking oligo dT) 引物 [即 Oligo (dT)₁₆ MN, M 可为 A、G、C; N 可为 A、G、C、T 中任一种] “锁住” 基因特异性序列的 3' 末端与其 poly (A) 尾的连接处进行第一条链 cDNA 链的合成, M、N 这两个核苷酸使得引物定位在 poly (A) 尾的起始点, 消除了合成第一条 cDNA 链时寡聚 (dT) - 接头引物与 mRNA 模板 poly (A) 尾任何部位结合而带来的影响。同时, 采用 lock - docking 引物寻找多基因家族成员时, 单从 3' - UTR 的长度变化就可区分不同的 PCR 产物。

29.3.2 加尾反应

应用脱氧核糖核酸末端转移酶 (TdT) 加同聚 dG 或 dA 尾的方法有很大的局限性。首先, 脱氧核苷酸掺入的速率明显受碱基种类和 DNA 引物 3' - 末端核苷酸的影响; 其次, TdT 反应难以控制, 并且加尾效率低, 常不能有效地克隆目的片段或产生非特异性扩增; 第三, 若目的 cDNA 中含有与锚 (N)₁₅ 同聚尾互补的几个核苷酸同聚区, 则在合成第二条 cDNA 链时引物的延伸会从内部序列开始, 产生截短的第二条 cDNA 链。为了解决这些问题, 许多学者对 cDNA 的加尾方法进行了改良。

Edwards 和 Troutt 小组利用 T₄ RNA 连接酶把寡核苷酸锚连接到单链 cDNA 的 5' 末端, 然后用一个 3' 末端特异引物和一个锚引物就可直接对锚连接的 cDNA 进行体外 PCR 扩增和克隆 (图 29 - 3)。他们分别称

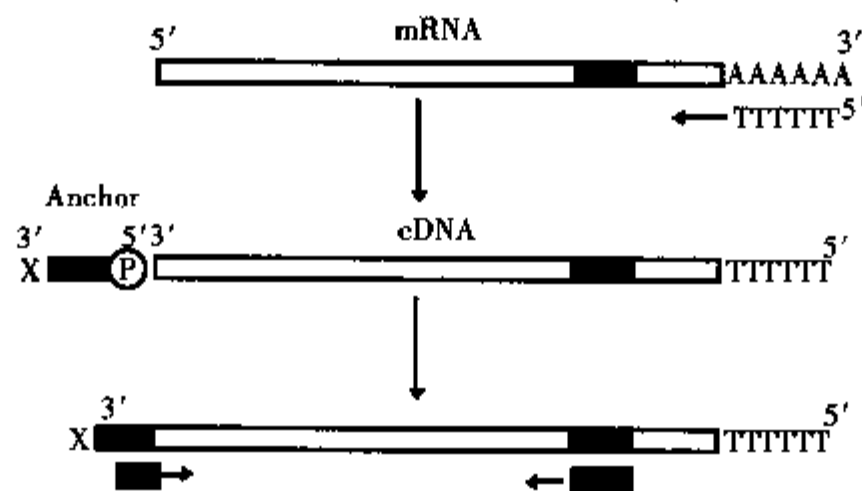


图 29 - 3 SLIC - PCR 和 LA - PCR 的原理

之为 SLIC-PCR (single strand ligation to ss-cDNA PCR) 和 LA-PCR (ligation anchor-PCR)。为了防止自身连接和/或环化, ss-cDNA 合成引物的 5'末端必须为羟基, 使其不能成为 RNA 连接酶的底物, 此引物在连接反应前须去除, 以阻止它竞争连接反应。另外, 寡聚核苷酸锚的 5'端必须为磷酸基, 而其 3'-末端则要用一个双脱氧核苷酸或氨基核苷酸类似物封闭, 防止寡同线体的形成。

Bertling 等认为 RNA 连接酶会优先连接短片段, 并且在头对尾连接中效率很低, 寡核苷酸引物不仅会与 cDNA 相连, 同时也会与 RNA 和短片段相连。而改用 DNA 连接酶则不会产生这些问题。但 T_4 DNA 连接酶不能连接单链底物, 因此, 他们采用有 4 个突出可变碱基的一套引物, 突出端将与 cDNA 3'末端相连。这种引物为连接反应提供了双链区。连接产物能稳定地进行后续的 RACE 程序 (图 29-4)。他们称此方法为依赖于 DNA 连接酶的扩增 (DNA ligase-dependent amplification, DLDA)。Schmidt 和 Mueller 在此原理基础上稍加改良, 提出了 CRTIC 法 (controlled ribonucleotide tailing of cDNA ends) (图 29-5)。他们利用 TdT 转移核糖核苷酸反应的可控制性、自限性 (掺入 2 到 4 个 rNMP) 和高效性 (>98%), 用核糖核苷酸代替脱氧核糖核苷酸作为 TdT 的底物进行加尾反应。加尾后的 cDNA 再与一 3'末端突出的特异双链 DNA 接头在 T_4 DNA 连接酶催化下连接, 以两个序列特异性引物 (接头和 cDNA 特异性引物) 进行 PCR 扩增, 获得目的 cDNA。

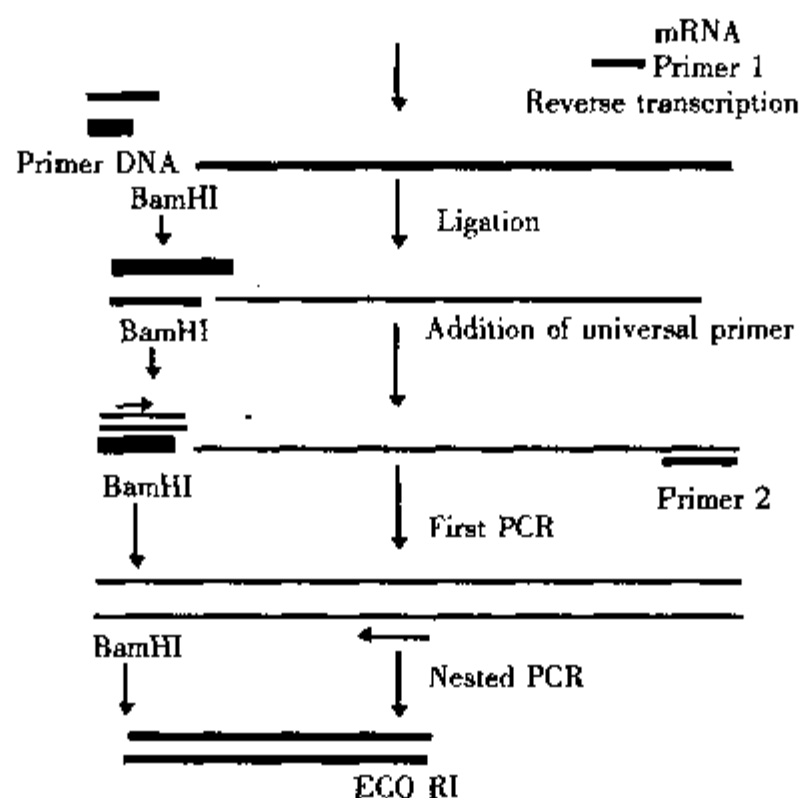


图29-4 依赖于 DNA 连接酶的扩增法(DLDA)原理

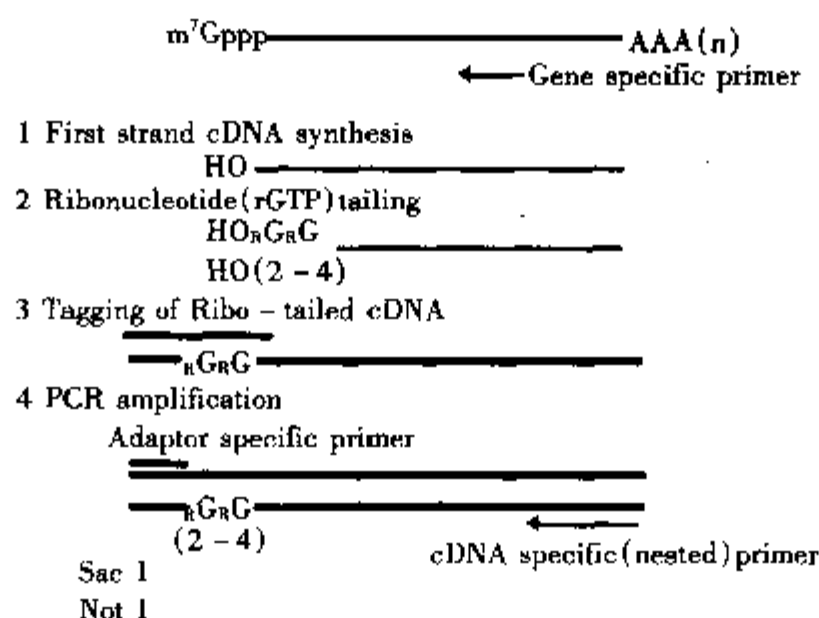


图 29-5 CRTIC 法原理

以上这些方法虽然都避免了在第二条 cDNA 链合成时由于锚 (N)₁₅ 与第一条 cDNA 链内同聚序列区互补而导致截短 cDNA 的产生,但仍不能完全避免截短 cDNA 的产生。因为反转录有可能会产生不完整的第一条 cDNA 链,它在后续的酶连接反应中也可做为底物与锚相连而产生截短的 cDNA。相比之下, RNA 连接酶介导的 RACE (RNA ligasemediated RACE, RLM-RACE) 和反向连接介导 PCR (Reverse ligation-mediated PCR, RLPCR) 能消除所有产生截短 5' 末端的机制。方法的原理是用烟草酸焦磷酸酶 (tobacco acid pyrophosphatase, TAP) 或 β 去除反应 (β -elimination) 去除 mRNA 的 5' 端帽子,然后在 RNA 连接酶催化下接上一段序列已知的接头,用接头引物和 3' 基因特异性引物进行 PCR 扩增,克隆定位基因 5' 端。定位基因的 3' 端则用连接酶直接把序列已知的接头连到总 RNA 或 mRNA 尾上,用 5' 基因特性引物和接头引物进行 PCR 扩增 (图 29-6)。这还可以测定 mRNA 3' poly (A) 的长度。

把修饰的寡聚核苷酸锚与 mRNA 相连需要多步的化学或酶反应以去除 mRNA 5' 端的帽子结构。为简化处理 cDNA 和 mRNA 的过程, Maruyama 等提出 cRACE 法 (circular or concatemeric first-strand cDNA-mediated RACE)。其原理是反转录后先用基因特异性引物 PCR 扩增目的 cDNA,接着在 T₄ RNA 连接酶催化下使第一条 cDNA 链环化和/或连接成连环形式,得到的单链 DNA 做为模板,用基因特异性引物进行 PCR 扩增 5' 端 (图 29-7)。因为 cRACE 的引物都是基因特异性的,所以非特异 PCR 产物基本上不会产生。

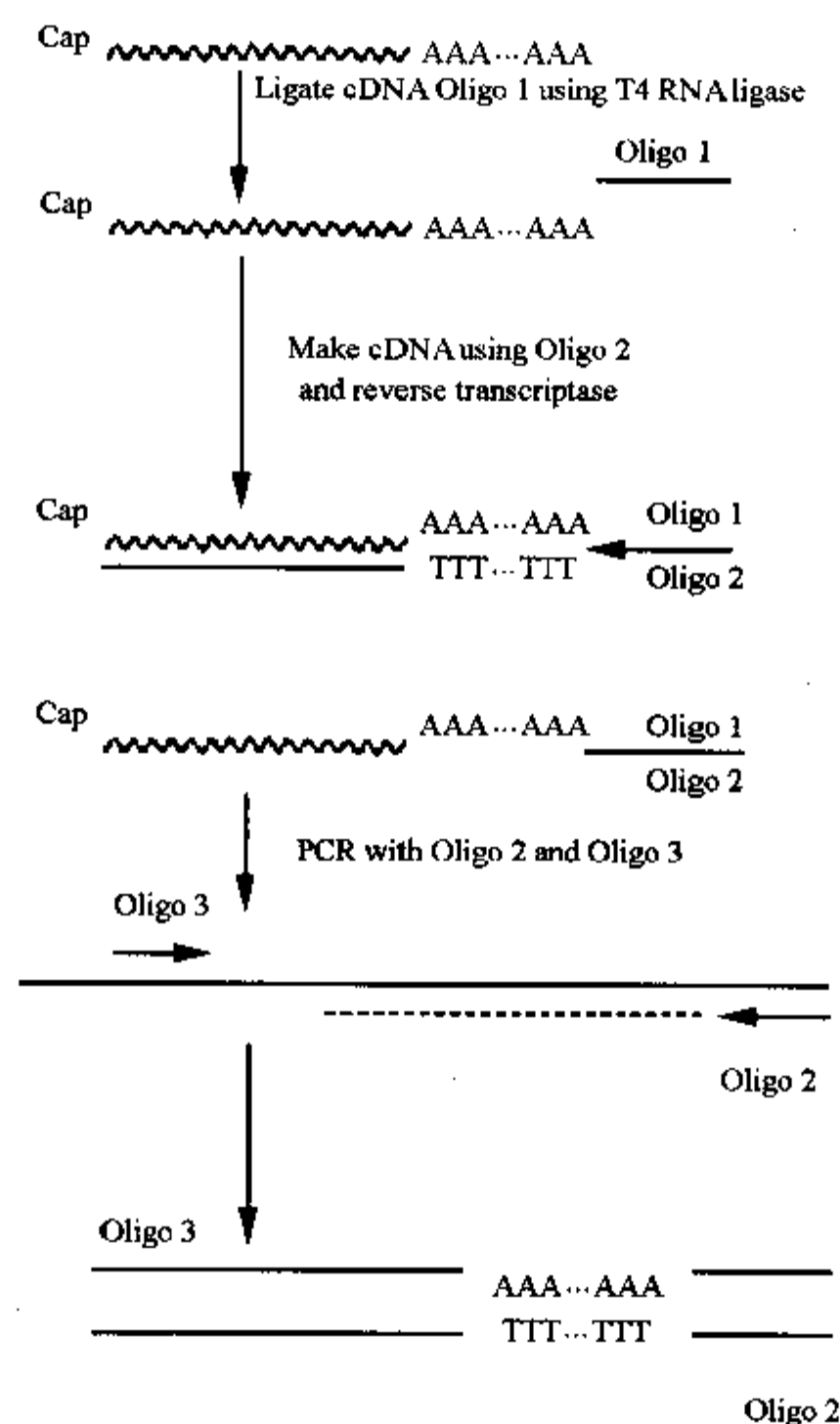


图 29-6 RLM-PCR 和 RL-PCR 的原理 A

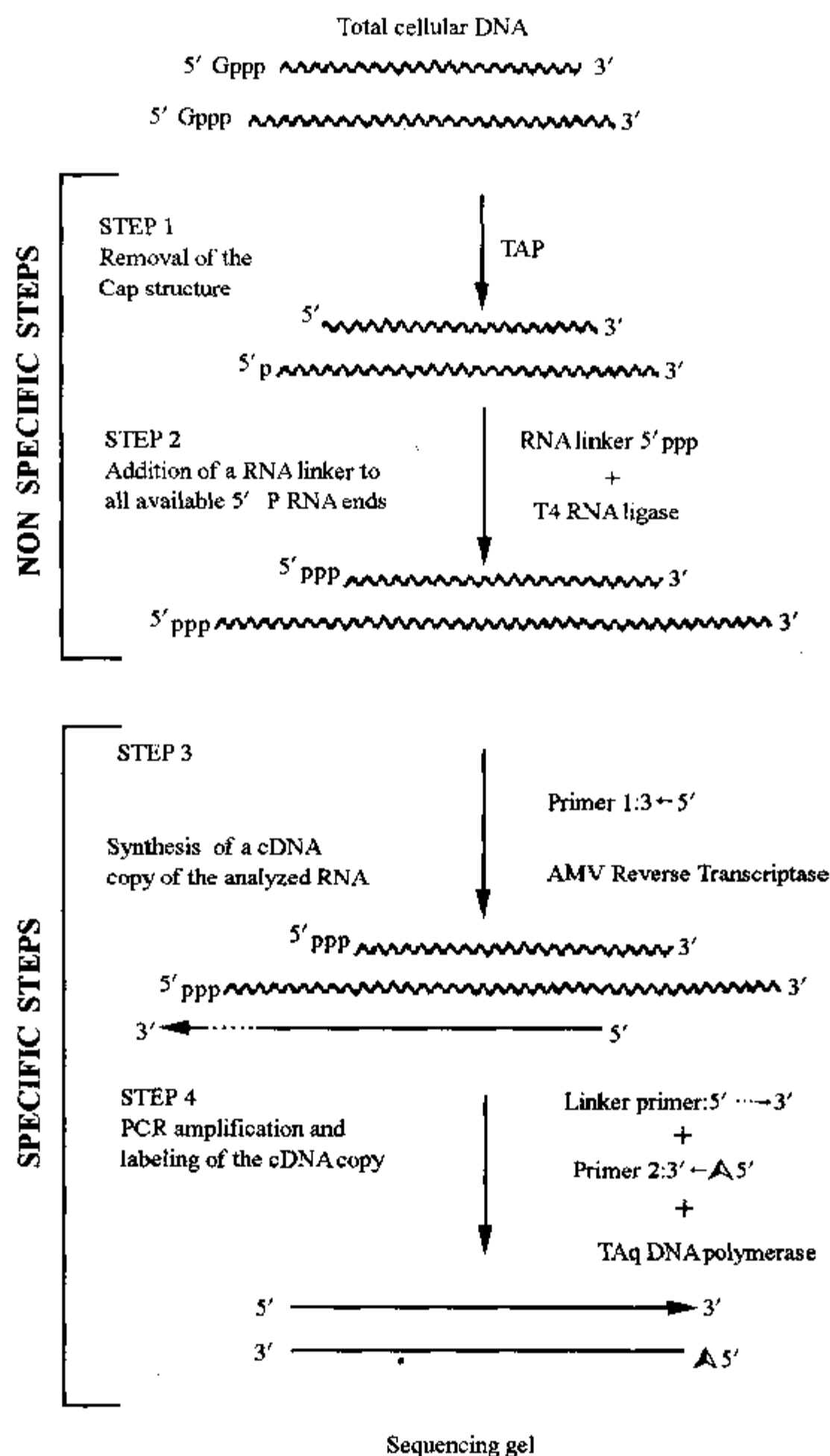


图 29-6 RLM-PCR 和 RL-PCR 的原理 B

29.3.3 PCR 扩增和 PCR 产物的克隆

PCR 扩增和 PCR 产物的克隆技术日渐完善。优化的 PCR 扩增条件使 PCR 在产物的长度和特异性以及扩增效率和忠实性方面都有了极大的提高。值得注意的是长距离扩增 PCR (long distance PCR, LD-PCR) 和热启动 PCR (hot start PCR) 的应用。Barres 和 Cheng 等用耐热 DNA 聚合酶分别扩增出 35kb 和 20kb 的目的 DNA。热启动 PCR 是在第一个循环中, 使一种 PCR 关键成分 (如 Taq 聚合酶或 dNTP) 在温度高于 T_m 值时再与反应体系混合进行 PCR。鉴于热启动在消除空间位阻效应, 酶抑制剂和引物与模板

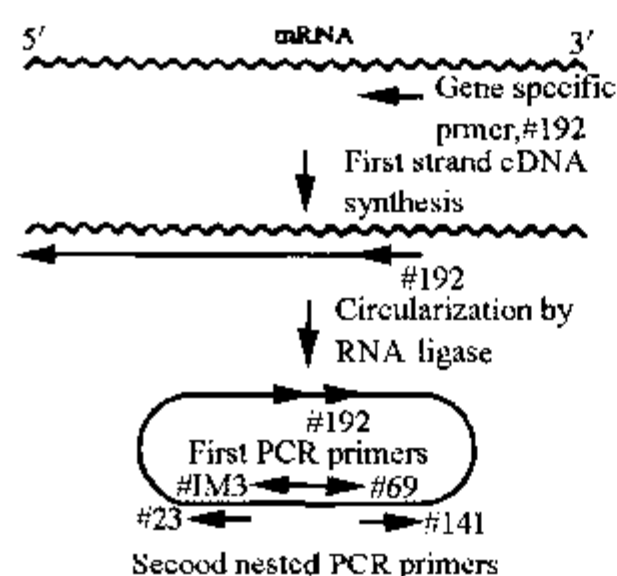


图 29-7 cRACE

错配等方面具有重要的作用, 不论扩增大片段或小片段 DNA, 采用热启动方式有利无弊。这些优化的 PCR 技术使 RACE 更加完善。

影响 PCR 产物克隆效率的因素主要有: ①PCR 产物的纯度; ②非特异性扩增; ③PCR 产物 3'末端残基的影响; ④平末端连接的困难。近来已有许多改进 PCR 产物克隆效率的有效方法, 在这里就不再详细讨论。

29.4 RACE 的其它应用及其前景

虽然 RACE 的目的主要是要获得全长 cDNA, 但稍加修改以后, 在其它方面也有很高的应用价值。RACE 首先是被用于构建 cDNA 文库。Belyavavsky 等用 10 个骨髓瘤细胞分离的总 RNA 通过 TdT 加同聚尾的方法建立了一个 10^6 克隆的 cDNA 文库。Domec 等也用同样的方法得到了相似的结果。SLIC/LA-PCR 也成功地被用来构建 cDNA 文库。所有这些构建 cDNA 文库的方法都只需要很少量的材料 (细胞或组织)。

Fritz 以及 Struck 等应用 RACE 克隆已知片段的旁侧序列。Zhang 和 Chiang 用 LA-PCR 寻找特异基因的 5'非编码和编码序列, 省去了构建和筛选基因组文库的麻烦。Carney 等用基于 RACE 的 RRACE 方法分离部分序列已知或有重复顺序的 cDNA 片段并成功地分离了 100 多个含 (CAG) $_n$ 重复的基因; 分析了其中 10 个克隆, 得到 4 个新基因。

除此之外, Whitcomb 等设计的随机引物/锚定 PCR (RPA-PCR: Random-primed/anchored PCR) 能对克隆在质粒载体上的靶序列进行定点删除, 缺失的片段可长达 2kb。Balavoine 应用连接介导 PCR (Ligation mediated PCR, LM-PCR) 从一种扁虫 *Planarian Polycelis nigra* 中克隆得到 8 个分别属于 Hox, msh, NK-1 和 NK-2 的含同源盒的片段, 说明 RACE 可用于克隆同源基因的同源片段, 为寻找同源基因提供了一种手段。

近年来, RACE 的成功应用充分显示了它是一种快速、有效地克隆全长 cDNA, 特别是从微量 mRNA 克隆全长 cDNA 的手段, 同时也开拓了 RACE 在其它方面应用的新天地。对 RACE 技术的改良和发展, 伴随着优化条件下 PCR 扩增效率和忠实性的提高以及 PCR 产物克隆技术的进步, 相信 RACE 在基因克隆以及 RNA 剪接、基因家族和基因表达变化的研究中将会有很大的发展前景。

(刘海玲 明 洪 王越英 文 黄秉仁 陆士新 审)

参 考 文 献

1. Schaefer BC. Revolution in Rapid Amplification of cDNA end: New strategies for PCR cloning for full-length cDNA ends. *Anal Biochem*, 1995, 227:255 ~ 273
2. Ausubel FM, et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. NY: Wiley Interscience, 1988
3. Frohman MA, et al. Rapid production of full-length cDNA from rase transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85:8998 ~ 9002
4. Loh EY, et al. Polymerase chain reaction with single-sided specificity: Analysis of T cell receptor delta chain. *Science*, 1989, 243:217 ~ 220
5. Ohara O, et al. One-sided polymerase chain reaction: The amplification of cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86:5673 ~ 5677
6. Cheng S, et al. Fockler C, Barnes WM, Higuchi R. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:5695 ~ 5699

7. Myers TW, et al. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase *Biochemistry*, 1991, 30: 7661 ~ 7666
8. Borson ND, et al. A lock-docking oligo (dT) primer for 5' and 3' RACE PCR. *PCR Method Appl*, 1992, 2: 144 ~ 148
9. Edwards TB, et al. Oligodeoxyribonucleotide ligation to single-stranded cDNAs: a new tool for cloning 5' end of mRNAs and for constructing cDNA libraries by in vitro amplification. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19: 5227 ~ 5232
10. Trout AB, et al. Ligation-anchored PCR: a simple Amplification technique with single-sided specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 9823 ~ 9825
11. Bertling WM, et al. Determination of 5' ends of specific mRNAs by DNA ligase-dependent Amplification. *PCR Method Appl*, 1993, 3: 95 ~ 99
12. Schmidt WM, et al. Controlled ribonucleotide tailing of cDNA ends (CRTC) by terminal deoxynucleotidyl transferase: a new Approach in PCR-mediated Analysis of mRNA Sequences. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24: 1789 ~ 1791
13. Liu X, et al. Mapping the 5' and 3' ends of *Tetrahymena thermophila* mRNAs using RNA ligase mediated Amplification of cDNA ends. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21: 4954 ~ 4960
14. Barnes WM. Per Amplification of up to 35kb DNA with high fidelity and yield from Lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 2216 ~ 2220
15. Cheng S, et al. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 5695 ~ 5699
16. Erlich HA, et al. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, 1991, 252: 1643 ~ 1651
17. Belyavsky A, et al. PCR-based cDNA library construction: general cDNA libraries at the level of a few cells. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17 (14): 5883
18. Domec C, et al. cDNA library construction from small amounts of unfractionated RNA: association of cDNA synthesis with polymerase chain amplification. *Anal Biochem*, 1990, 188: 422 ~ 426
19. James P. Random rapid amplification of cDNA ends (RRACE) allows for cloning of multiple novel human cDNA fragments containing (CAG)_n repeats. *Gene* 1995; 155 (2): 289 ~ 292
20. Frohman MA, et al. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988, 85 (23): 8998 ~ 9002
21. Loh EY, et al. Polymerase chain reaction with single-sided specificity: Analysis of T cell receptor δ chain *Science* 1989, 243 (4887): 217 ~ 220

30. mRNA 差异显示法

克隆基因的方法有多种,以研究对象的不同,其策略可概括为三大类:第一类为从 DNA 水平入手;第二类为从 mRNA 水平入手;第三类为从蛋白质水平入手。mRNA 差异显示法 (mRNA differential display, DD) 作为从 mRNA 入手的一种研究基因功能及克隆新基因的快速、简便、敏感的方法。1992 年 Liang 和 Pardee 在 Walsh 等建立的 RNA AP-PCR (arbitrarily primed PCR) 方法基础上,建立了 DD 法,并成功地克隆基因,DD 法已成为研究真核细胞基因的不同类型,不同分化、发育时期的基因表达,不同调控因子对组织细胞作用的比较分析和基因突变对细胞功能及周期影响的研究工具。除了应用于胚胎发育、分化与去分化、肿瘤、代谢等领域的研究外,还可对 cDNA 文库的质量进行检验和从进化意义上对 RNA 的来源进行分类和鉴定。

30.1 mRNA 差异显示法原理

近几年来,分析基因表达差异的指纹分析技术相继发展成熟,其中包括 RNA 指纹分析和 mRNA 差异显示。mRNA 差异显示从 mRNA 或总 RNA 入手,以与 mRNA 的 poly (A)⁺ 尾相对应的四套简并锚定 oligo (dT) 引物 (T₁₂MN) 中的任何一个作为逆转录引物,其中 M 可以为 G, A 或 C; N 为 G, A, T 或 C。每套引物由 3' 端碱基 (N) 决定,而倒数第二个位置 (M) 具有简并性,将 mRNA 逆转录为 cDNA。利用 PCR 技术 (以一种锚定引物为例),以一种锚定引物和随机引物 (Arbitrary Primer) 配对,对与其相对应的 cDNA 模板在合适的退火温度下进行 PCR 扩增,扩增同时标记同位素,其扩增产物包括不同大小的片段。再将相对应不同组织的扩增产物进行凝胶电泳,通过放射自显影,分离出差异带。将差异片段在相同条件下在进行 PCR 扩增、分离、纯化、克隆和测序,即可得到差异片段的序列。见图 30-1。

30.2 mRNA 差异显示技术

试剂:

细胞或组织总 RNA 或 poly (A)⁺ RNA
 1U/ μ l RNA 酶抑制剂
 50mmol/L Tris · Cl (pH8.3)
 5× 逆转录缓冲液
 25mmol/L MgCl₂
 10mmol/L dNTPs
 10mmol/L 二硫苏糖醇
 200U transcriptase
 10× PCR 缓冲液
 10 μ mol 简并 oligo (dT) 锚定引物套
 10 μ Ci/ μ l α -³²S-dATP
 矿物油
 甲酰胺加样缓冲液
 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳

1. 在 polyA 尾前分别具有 C, G 或 T 的碱基的组织 mRNA。

2. 以锚定引物 oligo-dT-G, oligo-dT-C 和 oligo-dT-A 分别逆转录不同 cDNA 的第一链。

3. 随机引物分别与三种锚定引物 (oligo-dT-G, oligo-dT-C 和 oligo-dT-A) PCR 扩增相对应的 cDNA 第二链。

4. 以锚定引物 A 即 oligo-dT-A 为例, 其与各种随机引物的 PCR 产物, 经放射自显影展示大小不同的表达带。

5. 以相同的一对引物扩增组织 1 和组织 2, 产生差异条带, 即组织 1 存在而组织 2 不存在的条带。

6. 回收及扩增该条带, 以其为探针用 northern blot 进一步对组织 1 和组织 2 进行鉴定。

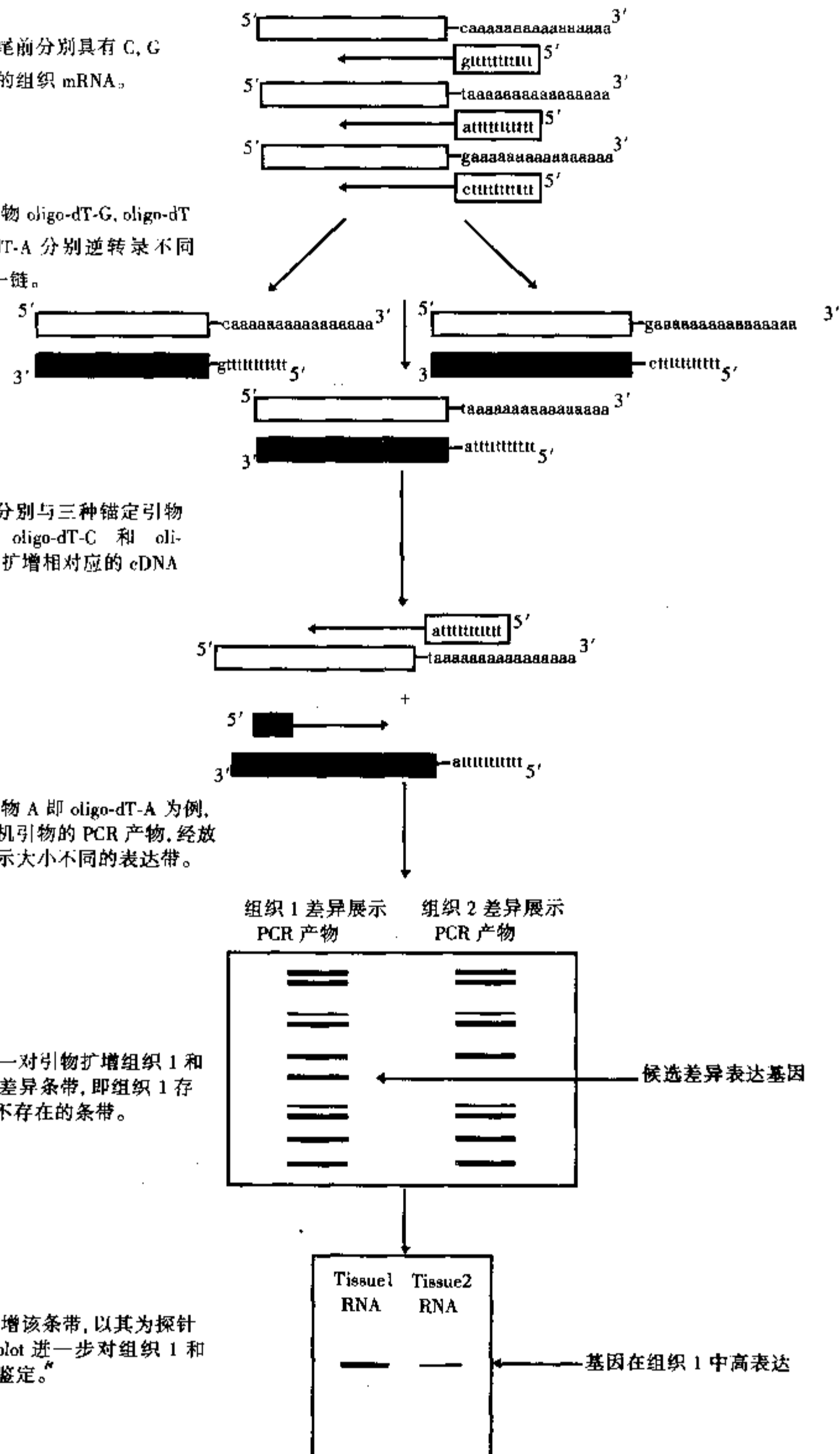


图 30-1 mRNA 差异显示法简要示意图

操作步骤:

(1) mRNA 逆转录: 20 μ l 的反应体系 (50mM Tris·Cl, pH8.3; 75mmol/L KCl; 3mmol/L MgCl₂) 中分别加入差示标本的总 RNA 2 μ g, 逆转录引物 (3'引物) 1 μ mol/L 和 20 μ mol/L dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), RNasin 20U, 二硫苏糖醇 10mmol/L。反应条件: 65℃ 10 分钟; 然后迅速插入冰水中 2 分钟; 加入逆转录酶 200U, 37℃ 孵育 1 小时; 95℃ 5 分钟终止反应。

(2) 取 2 μ l 差示标本逆转录反应混合液, 加入 20 μ l 体系的 PCR 反应体系中, 其中包括 1 \times PCR 反应液 (50mmol/L KCl, 10mmol/L Tris·Cl pH8.3, 1.875 μ mol/L MgCl), 2 μ mol/L dNTP, 0.5 μ mol/L 3' 引物, 0.5 μ mol/L 5' 引物, 12.5 μ Ci ³⁵S - dATP (放射比活性大于 1.000Ci/mmol), 和 1UTaq 酶。反应条件: 94℃ 3 分钟; 94℃ 30 秒, 40℃ 2 分钟, 72℃ 30 秒, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 分钟。

(3) 取 5 μ l PCR 反应产物上样, 于 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶 (含 6mol 尿素) 中, 60W 电泳 3 小时。电泳后, 凝胶不需固定, 转移至厚的滤纸上, 干胶, 与 X 线片于曝光盒内放射自显影 12~36 个小时。

(4) 暗室内, 将 X 线片与胶的相对应的位置标记好, 取出 X 线片冲洗后, 分析差示标本之间的差异带。

(5) 将与差异带相对应的凝胶切下, 加入高压消毒的去离子水 100 μ l 浸泡 15 分钟, 煮沸 15 分钟, 将 cDNA 溶于水中。然后 15 000g 离心 5 分钟去除碎屑, 将上清转移至另一离心管中, 加入 10 μ g 糖原和 2 倍体积的无水乙醇, 混匀后, 12 000g 离心 15 分钟, 沉淀 cDNA。将沉淀用 75% 的乙醇洗涤 2 次。去除上清液, 真空干燥后, 加入 20 μ l 高压消毒的去离子水溶解 cDNA。

(6) 取溶解后的 cDNA 2 μ l, 再进行 PCR 扩增, 扩增引物 (3' 和 5' 引物) 均加入 1 μ mol/L, 反应体系与反应条件与第一次相同。

(7) 将 PCR 反应产物于 1.2% 的低熔点琼脂糖凝胶电泳后, 将目的带切下后纯化 (纯化步骤见 DNA 纯化章节)。

(8) 将纯化后的目的 DNA 克隆到 pGEM-T (Promega) 克隆载体上, (见 DNA 片段连接章节), 转化细菌 (见质粒转化章节), 提取质粒 (见质粒提取章节) 后利用通用引物测序 (见测序章节)。

(9) 将得到的序列输入计算机, 通过 internet 网与美国国立图书馆的 GenBank 和 dbEST 数据库进行同源比较, 确定是否是新的基因片段。

注意事项:

(1) 模板: 为了比较表达基因的不同, 必须将 mRNA 逆转录成 cDNA。因此, 以纯 mRNA 为模板可减少非特异性背景, 对以后的操作最为有利, 尤其是克隆低丰度 mRNA 的基因。用总 RNA 代替 mRNA 为模板, rRNA 并不影响实验结果, 还有保护 mRNA 免受降解的可能。因此人们通常用总 RNA 代替 mRNA 以避免提纯 mRNA 步骤的烦琐和回收率不高的缺点。无论提取总 RNA 还是 mRNA, 尽量获得无 DNA 污染的全长 RNA 是十分重要的, 因为 RNA 的质量将直接影响实验的可靠性。如果 RNA 中混有 DNA, 不但会出现较高的背景, 有时会造成逆转录产物的假阳性。因此, 提取的 RNA 应用无 RNA 酶的 DNA 酶消化。逆转录时, 20 μ l 体系中的总 RNA 量应不少于 2 μ g, 或纯 mRNA 量不少于 0.1 μ g, 以免丢失稀有 mRNA 而导致错误的结果。

(2) 引物设计: Liang 和 Pardee 在 Welsh 等人的 AP-PCR 基础上 1992 年建立 mRNA DD-PCR 技术时设计的 3' 端引物为 T₁₂MN (M 为 A、C 或 G, N 为 A、G 或 T), 即 3' 端有 12 条引物, 而 5' 端有 20 条引物, 每条引物由 10 个碱基组成。通过计算机分析表明, 这种组合从统计学上几乎能完全覆盖所有的 mRNA 序列, 从理论上讲差异表达的基因会 100% 地被筛选出来。实践证明, 这种方法虽然有效, 但繁琐、出现的差异条带太多, 假阳性率大于 70%, 重复性比较差, 而且后续处理也比较复杂。Haag, Boris 和 Ito 等分别采用不同的随机引物进行逆转录和 PCR 以及使用一对较长的 (20~25 个碱基) 引物对此技术进行改进。其主要思路为 mRNA 逆转录后, 在首轮 PCR 循环中合成 cDNA 第二条链时, 采用较低的复性温度 (如 37℃) 和较长的复性时间 (如 5 分钟) 以便使长引物也能随机地与模板结合并启动 cDNA 第

二条链的合成。在以后的 PCR 循环中则采用较高的复性温度（如 55℃）以保证特异扩增。该方法与其他方法相比，可以减少在 PCR 扩增中出现的非特异条带。

引物的设计至关重要，是 mRNA DD 成败的关键。引物的设计应遵循以下一些基本原则：①在任一方向的任意阅读框架中均无终止密码子；②无发卡结构形成倾向；③序列中应包含哺乳动物中最常见的密码子；④引物之间无交联倾向；⑤GC 含量应为 60% ~ 70%；⑥应尽量少用甘氨酸密码子。

(3) 差异显示：mRNA DD 方法一直面临的主要问题是假阳性较多，但可以从下列几个方面加以改善：①逆转录反应结束以后用 RNaseH 完全消化 RNA；②进行热启动 PCR；③dNTP 浓度可选择为 2μmol/L，这样不但可以提高 DNA 扩增特异性，还有利于同位素（如³⁵S）的高掺入；④最重要的是做重复实验，可以分次进行，也可以一次完成，同一样品的重复固然重要，但如能分别取两次提取的 RNA 作为一组进行 RT-PCR 反应及测序胶电泳，在两组内部一致的条件下找出并分离差异条带，则更能提高获得真实差异的机率。回收的差异条带可以经乙醇沉淀或直接再扩增。

(刘海玲 王越英 文 陆士新 审)

参 考 文 献

1. Liang P, et al. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction Science 1992, 257 (5072) :967 ~ 971
2. Liang P, et al. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. Cancer Res 1992, 52 (24) :6966 ~ 6968
3. Liang P, et al. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. Nucleic Acids Res 1993, 21 (14) :3269 ~ 3275
4. Welsh J, et al. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. Nucleic Acids Res 1992, 20 (19) :4965 ~ 4970
5. Ralph D, et al. RNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR identifies differentially regulated RNAs in mink lung (MyILu) cells growth arrested by transforming growth factor β1. Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90 (22) :10710 ~ 10714
6. Sokolov BP, et al. A rapid and simple PCR - based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. Nucleic Acids Res 1994, 22 (19) :4009 ~ 4015

31. DNA 芯片技术

DNA 芯片 (DNA chip) 又被称为生物集成模片, DNA 阵列或寡核苷酸微芯片 (Bio-Chip, DNA arrays, oligonucleotide microchip) 等。这项技术是由位于美国旧金山以南的 Santa Clara 的一个新兴生物技术公司 Affymetrix 首先发展起来的。它是受到在固相支持物上合成多肽的启发而发明的。其中一个重要的发明者 Fodor 现为 Affymetrix 总裁。在 5 年前他曾预言: 利用这项光导合成与寡核苷酸合成相结合的技术, 将会在基因作图、DNA 指纹、DNA 诊断及核酸测序技术中得到有价值的应用。现在看来这个预言是正确的。DNA 芯片在产生的短短几年时间内技术不断完善, 已经显现出在基因诊断、基因表达研究、基因组研究、发现新基因及各种病原体的诊断等生物医学领域中的应用价值。据纽约时报 1997 年 4 月 8 日专题文章报道, 美国 Affymetrix 公司用于筛查 HIV-1 耐药株蛋白酶及逆转录酶突变的 DNA 芯片已经上市。第二个产品用于筛查 p53 基因突变的 DNA 芯片也即将上市。可见这项技术的应用前景是很广阔的。

31.1 DNA 芯片的制作原理

DNA 芯片是利用核酸杂交原理检测未知分子的。它是由核酸片段以预先设计的排列方式固定在载玻片或尼龙膜上而组成的密集分子排列。据现有文献报道可将其分为两类: 一类是在固定面上化学合成一系列寡核苷酸探针与游离的靶分子 (DNA 或 RNA) 杂交; 另一类是在固定面上按设计方式固定不同的靶分子与游离的探针杂交。杂交信号的检测是根据杂交分子或未杂交分子所发出的不同波长的光实现的。荧光信号是由激光激发探针或靶分子上的荧光素放出的荧光信号被检测器及处理器处理从而得知分子杂交情况。检测器及处理器由激光共聚焦显微镜及电脑组成。

第一类 DNA 芯片即在固相支持物玻片上直接合成探针比较复杂。其探针合成反应的循环次数为 $4N$, N 为寡核苷酸探针的长度。如需合成 20mer 的寡核苷酸探针则需 80 次反应。合成反应是在光导下完成的。具体方法是在经过处理的玻片表面铺上一层连接分子 (linker), 其羟基上加有光敏保护基团, 可因光照而除去。用特制的光刻掩膜 (photolithographic mask) 保护不需合成的部位, 而暴露合成部位, 在光作用下去除羟基上的保护基团, 游离羟基, 利用化学反应加上第一个核苷酸, 所加何种核苷酸及部位经事先设定, 可一次多个部位引入同样核苷酸。所引入核苷酸带有光敏保护基团。然后按上述方法加上另外三种核苷酸则完成探针上第一位核苷酸的合成。探针上每一个核苷酸的延伸则需四步反应。每一步反应均需新的特制的光刻掩膜, 以利暴露合成部位, 保护不合成部位。所以 N 个核苷酸长度的探针所需合成步骤为 $4N$ 。利用这种光导的合成反应, 几乎可得到全部可能序列组成的探针, 按预先设计好的顺序排列在玻片上。例如一个 10mer 的探针按此方法合成种类可达一百万种。每一种独特序列的寡核苷酸所占据的空间称为 "feature", 其中包含了百万个以上的同种寡核苷酸探针。一个 1.6cm^2 的芯片可有几十万至上百万 "feature", 间隔为 $20\mu\text{m}$ 。随着技术的进步, 可有更大容量的芯片出现。在本方法中每轮反应需要设计不同的保护光栅是主要的经费消耗。

第二类 DNA 芯片所用支持物为载玻片或尼龙膜。载玻片用多聚赖氨酸等包被。经过分区然后用电控制的机械手点上靶 DNA 分子。点样量很小约为 $0.005\mu\text{l}$ 。靶分子的排列按设计顺序, 不同靶分子点在不同区域内。每块芯片约为 $1\sim 2\text{cm}^2$, 上样可达数千至一万个。自动化程度的提高可使芯片上靶 DNA 密度更高, 即芯片密度更大。有的研究者将玻片上覆盖薄层聚丙烯酰胺凝胶作为支持将化学方法合成的探针点于各个区域内制成 DNA 芯片, 然后与荧光标记的靶 DNA 杂交, 区域大小为 $40\times 40\mu\text{m}$ 或 $100\times$

100 μm , 间隔分别为 80 μm 和 100 μm 。

制备好的芯片经过几步化学处理便可与目标分子或探针杂交。完全杂交则发出强的荧光信号或特殊波长的信号。不完全杂交信号较弱。若不能杂交则检测不到荧光信号或只测到芯片上原有的荧光信号。这取决于探针和目标分子的荧光标记情况。这些不同区域的荧光信号在芯片上组成荧光分布的谱型(pattern)可被激光共聚焦显微镜激发和检测,经电脑应用特制的软件处理可得出 DNA 的序列及其变化情况。

31.2 DNA 芯片的应用

现有文献报道的 DNA 芯片的应用目前主要集中于以下几个领域。其中有些是探索性的实验。

31.2.1 基因诊断

DNA 芯片可用于大规模筛查由基因突变所引起的疾病。在文献中报道了 DNA 芯片用于检测遗传性乳腺和卵巢癌基因 BRCA1 第 11 外显子全长 3.45kb 的突变。检测了 15 例病人样品,发现其中 14 例有基因突变。包括点突变、插入及缺失等突变。在 20 个对照样品中没有假阳性结果出现。研究者所用的高密度 DNA 芯片包含 96 600 种 20mer 寡核苷酸探针。探针设计中包含了热点区可能的四种点突变及 1 至 5 个核苷酸的缺失和单个核苷酸的插入等突变。探针以绿色荧光标记。目的基因转录产物即靶分子标记红色荧光。完全杂交的分子产生黄色荧光信号。结果显示携带 BRCA1 突变基因的杂合子来源的靶分子能与两种探针杂交,说明杂合子中包含了野生型及突变型两种基因。各种突变可通过分析两种荧光强度的对比区分出来。

利用这种技术筛查囊性纤维变性基因 CFTR 中的突变及 β -珠蛋白基因的突变都取得了成功。前面已提及检测 HIV-1 的 DNA 芯片已上市, p53 基因突变检测芯片也在被商品化。预计包括许多临床常见病病原体诊断在内的 DNA 芯片诊断技术不久便会在疾病的分子诊断方面得到广泛应用,成为一项常规检验和诊断技术。这项技术的高度准确性和高度自动化对于筛查大量样品具有很大优势。

31.2.2 应用 DNA 芯片技术分析基因组及发现新基因

DNA 芯片技术用于基因组研究可创造第三代遗传图。以单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)为标记可帮助区分两个个体遗传物质的差异。在人类基因组中大约 1000 个碱基 SNPs 出现一次。因此可作为基因特异性的标记。若能将所有 SNPs 全部信息装入 DNA 芯片则可检测到与之关联的基因间的差异。美国麻省 Whitehead 研究所已确定 450 个 SNPs。该机构的负责人 Lander 认为,如果他们得到 2000 个这种 SNPs 标志,就可以制造“基因组扫描仪”(genomic scanner)。即将所有 SNPs 收入单个 DNA 芯片,用来扫描各个个体基因组成上的差异。他们用一个下午的时间分析了 16 个家庭成员多于 100 个 SNPs 的变化。这项工作对研究亲代与子代间遗传中的重组及创造更精确的遗传图是有价值的。

在发现新基因的研究中,斯坦福大学的 Davis 等从外周血淋巴细胞 cDNA 文库中用 PCR 方法扩增插入基因,得到了 1046 种未知序列的扩增产物。将其连同作为研究对照的来自模式植物 *Arabidopsis* 的 10 种 cDNA,总共 1056 种靶 DNA 高速自动点样到经包被的玻片上,制成 DNA 芯片,面积为 1cm²。经过 SDS, NaBH₄ 等处理,95℃ 热变性后分别与热击(43℃)T 细胞及未处理 T 细胞的 cDNA 杂交,经激光共聚焦扫描系统分析共发现 17 个差异表达的基因,其中 11 个是被热诱导的,其余 6 个是被热击抑制的。经序列分析证明其中三个为未报道的新基因。用佛波酯处理的 T 细胞差示基因中也发现一个新基因。从以上实验中看出, DNA 芯片技术在发现新基因及分析各个基因在不同时空表达方面是一项十分有用的技术。DNA 芯片技术与传统的差异显示技术相比具有许多优点,例如被检目标 DNA 密度高,样品用量

极少, 自动化程度高便于大量筛选新基因, 使发现新基因的速度大大提高。

31.2.3 DNA 芯片用于基因表达的研究

由于 DNA 芯片技术可直接检测 mRNA 的种类及丰富度, 所以它是研究基因表达的有力工具。用于检测基因表达水平的 DNA 芯片已被 Affymetrix 公司的研制人员完成。DNA 芯片中包含了几万种人工合成的寡核苷酸探针。可检测转录产物从几个数量级到每个细胞几个拷贝, 均能被定量研究。可以用于外界因素诱导的基因表达研究, 被检测目的基因可多达 10 000 个。

肿瘤细胞的发生、发展中基因的表达调控是一个复杂变化的表达模式 (patterns of gene expression)。DNA 芯片为研究肿瘤发生发展中的基因开关及表达程度提供了强有力的工具。利用它可随时获取肿瘤细胞生长各期与肿瘤生长相关基因的表达模式。黑色素瘤细胞系 UACC-903 的裸鼠致瘤性及生长特性能被引入人类正常 6 号染色体而趋于正常。用含有 1161 个基因片段的芯片与来源于 UACC-903 的 cDNA 探针 (标记绿色荧光素) 及来源于 UACC-903 (+6) 的 cDNA 探针 (标记红色荧光素) 杂交, 杂交谱中绿色荧光斑点显示是 UACC-903 优势表达基因。红色荧光斑是 UACC-903 (+6) 优势表达基因。黄色或棕色则代表两细胞系共表达的基因。这样两种细胞系的基因表达性情况可被杂交谱直接表现出来, 并且 DNA 芯片的结果与 Northern 杂交结果是一致的, 说明了这种方法的可靠性。杂交结果与研究人类 6 号染色体引入癌细胞促使特异基因的表达变化提供了明确的依据。

31.2.4 利用 DNA 芯片进行 DNA 序列分析

DNA 芯片用于序列分析提出较早。原理是依靠短的标记寡核苷酸探针与靶 DNA 杂交, 利用杂交谱重建靶 DNA 序列, 现在证明是一种可行的方法。它可一次测定较长片段的 DNA 序列。Merk Chee 等利用这种方法确证性地对人类线粒体基因组测序, 准确率达 99%。另外还从十个非洲人线粒体基因组中检测到 505 个多态位点。

31.2.5 利用 DNA 芯片技术进行后基因组研究

基因组测序完成后未知基因的功能研究是一个十分诱人的后基因组研究课题。斯坦福大学的 Davis 研究小组利用 DNA 芯片对酵母缺失突变株进行定量分析以确定酵母全序列完成后新发现的开放读框 (open reading frame) 的生物学功能。应用基因打靶技术产生多个 ORF 缺失突变株酵母, 并在缺失 ORF 旁侧引入 20 个核苷酸的标志序列作为缺失 ORF 的身份标志谓之“分子条形码” (molecular bar codes), 分子条形码可与 DNA 芯片上探针杂交, 以便于筛选。这样 ORF 功能测试可通过一次杂交及用同一生长选择培养条件完成, 大大提高了效率和准确性, 提示 DNA 芯片技术将来可能应用于人类基因组测序完成后未明 ORF 生物功能的研究, 可能会对深刻认识生命现象及药物设计带来重大影响。

DNA 芯片技术的应用前景是乐观的, 但目前在技术上还存在一些问题。如 DNA 芯片上原位合成探针难免有错误核苷酸掺入及混入杂质, 这样可使整个杂交背景增高, 降低特异性。另一个问题是复杂的寡核苷酸存在的高级结构和自身配对会影响与靶 DNA 杂交, 或形成不稳定杂交二聚体都会影响结果分析。另一个显而易见的缺点是该技术需要昂贵的设备。例如激光共聚焦显微镜, DNA 合成仪以及制造光刻掩膜所付出费用较高。这些问题会得到逐步解决。可以认为 DNA 芯片一定也会像计算机芯片那样不断扩大容量, 升级换代在医药及生物科学研究中得到广泛应用。

(安海谦 文 卢圣栋 审)

参 考 文 献

1. Fodor SP, et al. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. Science, 1991, 251 (4995): 767~773

2. Goffeau A. DNA technology: Molecular fish on chips [news]. *Nature*, 1997, 385 (6613) :202 ~ 203
3. Pease AC, et al. Light - generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91 (11) :5022 ~ 5026
4. Khrapko KR, et al. An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing. *FEBS Lett*, 1989, 256 (1 - 2) :118 ~ 122
5. Yershov G, et al. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93 (10) :4913 ~ 4918
6. DeRisi J, et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet*, 1996, 14 (4) :457 ~ 460
7. Shoemaker DD, et al. Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar - coding strategy. *Nat Genet*. 1996 Dec; 14 (4) :450 ~ 456
8. Kozal MJ, et al. Extensive polymorphisms observed in HIV - 1 clade B protease gene using high density oligonucleotide arrays. *Nat Med*, 1996, 2 (7) :753 ~ 759
9. Hacia JG, et al. Detection of heterozygous mutations in BRCA₁ using high density oligonucleotide arrays and two - colour fluorescence analysis. *Nat Genet*, 1996, 14 (4) :441 ~ 447
10. Conin MT, et al. Cystic fibrosis mutation detection by hybridization to light - generated DNA probe arrays. *Hum Mutat*. 1996; 7 (3) :244 ~ 255.
11. Schena M, et al. Parallel human genome analysis: microarray - based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93 (20) :10614 ~ 10619
12. Ferguson JA, et al. A fiber - optic DNA biosensor microarray for the analysis of gene expression. *Nat Biotechnol*, 1996, 14 (13) :1681 ~ 1684
13. Bains W, et al. A novel method for nucleic acid sequence determination. *J Theor Biol*, 1988, 135 (3) :303 ~ 307
14. Chee M, et al. Accessing genetic information with high - density DNA arrays. *Science*, 1996, 274 (5287) :610 ~ 614
15. Schena M, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, 270 (5235) :467 ~ 470

32. 常用遗传统计分析方法

32.1 Hardy - Weinberg 定律

32.1.1 常染色体基因的 Hardy - Weinberg 定律

Hardy - Weinberg 定律是群体遗传学的基本定律, 在随机婚配的大群体中, 若没有选择、突变或迁移等因素的影响, 基因频率或基因型频率在世代间保持恒定不变。基因频率与基因型频率之间存在着下列关系: 两个等位基因 A_1 和 A_2 , 基因频率分别为 $A_1 = p$ 、 $A_2 = q$, $p + q = 1$, 3 种表型的频率为: A_1A_1 为 p^2 、 A_1A_2 为 $2pq$ 、 A_2A_2 为 q^2 。这个规则可以推广如下: 位点 A 若有 n 个等位基因: A_1 、 A_2 、 \dots 、 A_n , 其基因频率是 p_1 、 p_2 、 \dots 、 p_n , $\sum p_i = 1$; 并且就基因位点 A 而言, 该群体是随机婚配的, 则根据这些等位基因成对随机组合, 可产生下列各种表型及其相应的表型频率:

$$(p_1 + p_2 + \dots + p_n)^2 = \sum_{i=1}^n p_i^2 + \sum_{i < j} 2p_i p_j$$

对常染色体基因而言, 在随机婚配的第一代, 就已达到 H - W 平衡。然而对 X - 连锁基因, 并非如此计算, 情况更复杂。

32.1.2 X - 连锁基因的 H - W 定律

设两等位基因 A_1 和 A_2 , 在男性人群, 其两个等位基因的频率分别为 p_M 和 q_M , $p_M + q_M = 1$; 表型 A_1 和 A_2 的频率也分别为 p_M 和 q_M 。另外, 在女性人群, 基因型 A_1A_1 、 A_1A_2 , 和 A_2A_2 出现的频率分别为 r 、 $2s$ 和 t , $r + 2s + t = 1$; 则女性等位基因频率 A_1 和 A_2 分别是 $p_F = r + s$ 和 $q_F = s + t$, 而且, 女性产生 A_1 和 A_2 两种类型的卵细胞, 其频率也分别为 p_F 和 q_F 。因此, 将以相同比例产生男性子代, 而女性子代则以 $p_F(A_1) + q_F(A_2)$ 的卵细胞和 $p_M(A_1) + q_M(A_2)$ 男性的 X 精细胞这种组合形式产生。下一代的组成如下:

男性: $p_F(A_1) + q_F(A_2)$

女性: $p_M p_F(A_1A_1) + (p_M q_F + p_F q_M)(A_1A_2) + q_M q_F(A_2A_2)$

结果, 在下一代中, 男性 A_2 的频率和女性 A_2 的频率是:

$$q'_M = q_F, \quad q'_F = 1/2 (p_M q_F + p_F q_M) + q_M q_F = 1/2 (q_M + q_F)$$

这表明:

- (1) 每一代男性 A_2 的基因频率等于上一代女性 A_2 的基因频率。
- (2) 每一代女性中 A_2 的基因频率等于上一代男性及女性 A_2 的基因频率的平均数。
- (3) 方程: $q'_M - q'_F = -1/2 (q_M - q_F)$ 成立。

这意味着, 如果在一代人中男女性的基因频率不相等, 则在下一代中, 男女性基因频率的这种差异是上一代基因频率差异的一半, 而且, 这种差异的符号也改变了: 当 q_F 大于 q_M , q'_M 将大于 q'_F 。经过若干代后, 基因频率 q_M 和 q_F 二者逐渐会聚于一共同值 q , 此时, 两性的基因型分布即趋于平衡态:

男性: $(1 - q)(A_1) + q(A_2)$

女性: $(1 - q)^2(A_1A_1) + 2q(1 - q)(A_1A_2) + q^2(A_2A_2)$

由此可见, 经一代随机婚配后, H-W 平衡是否成立决非不言而喻, 而须证明。

大量的群体遗传学内容可认为是这个基本规则的进一步发挥。

32.1.3 近亲婚配和 Hardy - Weinberg 定律

32.1.3.1 近婚系数和 Hardy - Weinberg 定律

让我们考虑一对常染色体基因 A 和 a (基因频率为 p 和 q), 在一个随机婚配的群体中, 三种基因型以 p^2 、 $2pq$ 和 q^2 的比例发生。如果基因型包括基因频率为 p_i 和 q_i ($i = 1, 2, \dots, n$) 的 n 对这样的基因, 那么, 在随机婚配的情况下, 杂合度为:

$$2 \sum_{i=1}^n \frac{p_i q_i}{n}$$

纯合度为:

$$\sum_{i=1}^n \frac{p_i^2 + q_i^2}{n}$$

两者之和为 1。杂合度表示拥有两个等位基因的常染色体基因的比例, 也就是一个个体是杂合子的平均比例。对这些基因来说是杂合子的平均比例。对单个基因来说, 它表示一个个体的基因呈杂合性的概率。

在近亲婚配的情况下, 我们考虑一对交替轮换出现的等位基因 A 和 a, 一个卵子可能含有基因 A, 一个精子可能含有基因 a。如果婚配是随机的, 这个含有基因 a 的卵子和含有基因 a 的精子受精的概率是 p, 和含有基因 A 的精子受精的概率是 q。如果父母间存在亲缘关系, 他们就拥有一定比例的经遗传而相同的基因。从而, p 就增至 $(p + Fq)$, 而 q 就减至 $(q - Fq)$; 对于含有等位基因 A 的卵子来说, 情况相应地与此相同。在这里, 与前述的 F 相应, 该数值被称作 F' 。如果遗传方式是常染色体的, 父母双方就显示相同的基因 A 和 a 的分布。因此, $pq(1 - F) = qp(1 - F')$ 的关系就一定成立, 从而, 也就有 $F = F'$ 。

由此可见, F 等于前面定义的近婚系数。这就意味着具有近婚系数 F 的儿童基因型不以 Hardy - Weinberg 比例发生, 而是以下述比例发生:

$$\begin{array}{ccc} AA & : & Aa & : & aa \\ (p^2 + Fpq) & : & 2(1 - F)pq & : & (q^2 + Fpq) \end{array}$$

该儿童自身的杂合度一般降低一个 F 值。用不同的方式来表达, F 就是在一个随机选择的基因位点上, 两条同源染色体携带两个来自共同祖先的基因的概率。

32.1.3.2. 近婚系数 F 的计算

在人类遗传学上, 多数情况下, 不必计算 Φ 或 F。因为表明发生在人类群体中近婚程度的系数都为已知。对于少见的家系, 可能需要进行单独的计算。这与动物繁殖的情形明显不同。在动物中, 可能遇到非常复杂的配偶间关系。对于它们的评价, Wright 提出了通径系数法。该方法需绘出配偶双方的家系, 而且还要标出它们的全部共同祖先。然后, 选择一个最近共同祖先。通过该祖先, 画出两个配偶间所有可能的路径。这些路径有下列几种情形。即:

- (1) 均通向该共同祖先。
- (2) 路径由“步”构成。一步被定义为一个个体与其双亲之一的连接。
- (3) 通向一个人的路径只许一次。

其他的共同祖先也以同样的方式处理。每个途径的步数均需计算。对于一个祖先, 可能存在 X 个途径, 每个途径有 $m_1 \dots m_x$ 步。假定对于 t 个共同祖先, 有

$$\sum_{i=1}^t X_i = r \text{ 个通径}$$

$$\text{那么, } F = \frac{1}{2} (2^{-m_1} + 2^{-m_2} + \cdots + 2^{-m_r}) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^r 2^{-m_i} \quad (\text{式 1})$$

(如果某些共同祖先是来自近亲婚配的, 上式内的一些项必须按他们的近婚系数加以修正。)

以下简单的考虑可能有助于理解这个公式。一个孩子与其父亲或母亲共享 $1/2$ 的基因, 与其祖父或祖母共享 $1/4$ 的基因, 与其曾祖父或曾祖母共享 $1/8$ 的基因, 等等。依此类推, 在从母亲到一个祖先的 a 个步骤中, 她与该祖先共享 2^{-a} 的基因; 在从父亲到这个祖先的 b 个步骤中, 他与该祖先共享 2^{-b} 的基因。这就意味着父亲和母亲有 $2^{-a} \times 2^{-b} = 2^{-m}$ ($m = a + b$) 的基因是共享的。这个数字除以 2 就得出了母亲的任意一个基因与父亲的任意一个基因遗传等同的概率。(更精确的推导和其它计算方法见 Li (1955), Jacquard (1974) 和 Kempthorne (1957) 的论述。Kempthorne 给出了一个有用的矩阵方法。)

举例: 一级表亲结婚的例子, 这对夫妇和他们的共同祖父之间共有 4 步, 和他们的共同祖母之间也有 4 步。代入公式 (式 1) 得:

$$F = \frac{1}{2} (2^{-4} + 2^{-4}) = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{16} + \frac{1}{16} \right) = \frac{1}{16}$$

对于一个父女乱伦的例子, 它仅有一个途径, 而且只有一步:

$$F = \frac{1}{2} \times 2^{-1} = \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{4}$$

第 3 个例子是关于兄 (弟) 姐 (妹) 乱伦的:

$$F = \frac{1}{2} (2^{-2} + 2^{-2}) = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{4} + \frac{1}{4} \right) = \frac{1}{4}$$

如上所述, 对于人类来说, 一个有用的惯例限制了将这些计算扩展到三代以前。这种惯例在定量上是合理的。例如, 如果有一个五代以前的共同祖先, 那么, 相应的途径就有 10 条, 因此, 它对 F 的贡献仅为 $1/2 \times 2^{-10} = 1/2048$ 。

32.1.3.3. 群体的近婚系数

我们常常对衡量一个群体的平均近婚程度的指标感兴趣, 这个指标综合考虑了一个群体中各种类型的近亲婚配。如果将计算限制在最近三代, 则“三代内近婚”的系数 K 可由下式求得:

$$K = \sum F_i M_i$$

该算法包括了各种类型的近亲婚配, F_i 和 M_i 分别是第 i 种近亲婚配的近婚系数和相对频率。常将 K 简称为 F 的均值或群体的 F 值。在不同群体间比较这个参数时, 应当牢记, 只包括三代的惯例常被违背。另外, 几乎所有的群体研究都是按照前述定义计算全部夫妇的亲缘系数, 而不是计算全部个体的近婚系数。只有在近婚不影响生殖的情况下, 这种亲缘系数才是全部个体的平均近婚系数的无偏估计。

32.2 多态性

32.2.1 遗传多态性

32.2.1.1 历史与定义

多态性是指至少以两种表型 (或至少两种基因型) 存在于某一人群中的一种孟德尔性状或单基因性状。这两种表型 (或基因型) 很常见, 即它们在人群中出现的频率不低于 $1\% \sim 2\%$ 。这一简捷结论有点任意性, 不具备严谨的科学依据。对某种罕见的常染色体隐性疾病, 当其具有较高的杂合性时, 一般不使用多态这一术语。但是, 一旦这种杂合性状态可以在实验室进行检测时 (这种情况日益多见), 则把这类性状 (杂合性) 称为具有多态性频率是比较合适的。在一个位点上, 往往有两个以上等位基因和两种以上表型。多态性与罕见的遗传变异体形成对照, 通常这种变异体的频率是非常低的。一般把某种罕见的遗传变异体定义为人群中出现的单基因性状, 其基因频率低于 $1\% \sim 2\%$, ABO 血型组是由 Land-

steiner (1900) 发现的第一个人类多态性。1955 年以前, 人们还认为多态性仅仅是红细胞上的表面抗原, 如血型组。到 1955 年, Smithies 使用淀粉凝胶电泳方法, 检测了血清蛋白的多态性。这种方法证明是非常有用的, 首先它可用于检测血清蛋白多态性, 以后与其他特异地鉴定酶活性的方法一道, 可用于检测酶多态性。

另外, 还检测了许多其它血清蛋白的多态性以及血浆酶多态性、红细胞和白细胞酶的多态性。许多多态性在遗传学上是明确的, 由两个等位基因决定着两个产生相同蛋白质的变异体。而还有一些多态性十分复杂, 如人类第 6 号染色体上的复合系统 MHC, 具有多个相关位点, 其多态性就很复杂。

目前使用得最多的多态性是 DNA 多态性, 指 DNA 区域中等位基因 (或片段) 存在两种或两种以上形式, 对基因功能没有影响。DNA 序列中大约有 1/100 ~ 200 的碱基存在多态现象。

32.2.1.2 DNA 多态性

1. 序列多态性:

序列多态性是指在两条同源染色体上, 同源 DNA 序列长度相等但个别核苷酸存在差别, 由单个核苷酸取代造成, 这种多态性被称为单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP), 又称第三代多态性标记。检测这类多态性的途径有数种方法。

(1) 限制性内切酶酶切片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP, 常简读为限制片段长度多态性): 这是第一代 DNA 多态性。等位 DNA 节段的 DNA 序列差别可能改变限制酶的识别序列 (增加或消除), 这样用某一种限制酶切割 DNA 时, 不同的染色体就会产生不同的长度的 DNA 片段, 在 Southern 印迹图上显示同源片段的差别, 切点增加时表现为杂交片段变小, 或出现两个较小的片段; 切点减少时杂交片段增长, 或两个小杂交片段消失的同时出现一个大片段, 并且大片段的长度是小片段的和, 这就是限制片段长度多态性。基因组 DNA 中串联重复序列所含的重复单元数目不同时, 也表现为等位片段长度的差别。由限制酶识别位点差别所致的 RFLP 有两个等位基因 (有或无切点), 记为 “+”、“-”; 由重复序列所致的 RFLP, 可有多数等位基因, 之间相差一个重复单元。对于后者, 可以据长度的范围分组, 粗分为几个等位基因, 此时每个基因实际上是一组等位片段。

RFLP 是非常有用的遗传标记, 按孟德尔共显性方式遗传, 特别是由单个碱基改变导致的 RFLP 在世代传递中非常稳定。可用于连锁分析、基因定位和亲子鉴定。

RFLP 除可用 Southern 印迹方法检测外, 还可用限制酶酶解 PCR 扩增产物的方法。

(2) PCR 产物 SSCP 或 ddF: DNA 单链构象多态性 (single strand conformation polymorphisms, SSCP) 是指等长的单链 DNA 因核苷酸序列的差别而产生构象差异, 在非变性聚丙烯酰胺凝胶中表现为电泳迁移率的差别。单链 DNA 的构象分析对 DNA 序列的改变非常敏感, 常常一个碱基的差别都能显示出来。据此 Hayashi 等人发明了 SSCP 分析方法。将突变所在区域的 DNA 片段经 PCR 扩增后进行电泳, 根据单链条带位置的改变判断某个体是否存在特异的突变。单链 DNA 的构象还受凝胶的配方 (浓度、是否添加甘油)、电泳的温度的影响。因此要选择最佳电泳条件。依 SSCP 为线索还可通过扩增片段的直接测序确定突变位点。有些 SSCP 并不是致病突变的结果而纯粹是一种多态性, 也可用来进行连锁分析。不过, 不是所有的核苷酸序列改变都引起单链构象的改变, 因此 SSCP 方法还不能鉴别所有的突变。

SSCP 的结果判定是通过与正常样品对比, 观察条带位置的改变。分析多个样品时可不设正常对照。正常样品除未变性彻底的双链外, 一般出现两条带, 为正链和负链, 电泳条件不好时, 正负链分不开。有时会出现 3 条链, 机理不清。出现额外区带时即可判断有多态性, 多态性带有时为 2 条有时只有 1 条。双链的位置随电泳条件不同改变很大, 设置双链对照是为了判别额外的带是多态性还是双链。当变性不彻底时会出现双链带, 有多态性的样品, 带型更多, 除同源双链外还有异源杂合双链的带。

双脱氧指纹法 (dideoxy fingerprinting, ddF) 是将双脱氧末端终止法测序与 SSCP 结合起来的分析技术, 对由双脱氧末端终止法产生的长短不一的单链 DNA 进行 SSCP 分析。ddF 方法克服了 SSCP 分析时因 DNA 长度影响 SSCP 显示的困难, 通过一种双脱氧核苷酸产生异质性的单链 DNA, 使其中长度合适的

DNA 片段显示 SSCP 改变。

(3) PCR 产物 DGGE: 变性梯度凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE), 通常采用尿素甲酰胺浓度梯度, 强度范围根据计算机程序 (MELT87 或 SQHTX) 或通过垂直梯度电泳直接测定, 100% 变性强度为 7M 尿素、40% (V/V) 甲酰胺, 聚丙烯酰胺浓度为 6.5% (37.5:1), 电泳在恒温水浴 ($>30^{\circ}\text{C}$) 中进行。检测突变所用的 DGGE 是平行梯度, 即变性强度在水平方向是一致的, 变性梯度 (即尿素甲酰胺的浓度) 从阴极向阳极逐渐增强。电泳进程中 DNA 逐渐由低强度进入高强度, 解离温度较低的 DNA 片段先达到其解离强度 (变性梯度) 而解离, 电泳速度减慢; 解离温度高的 DNA 片段保持原来的泳速继续前进, 直至到达其解离强度时才解离减慢速度, 通过溴化乙啶染色或银染观测区带的变化。

在具体应用中, 为了达到更理想的分离, 设计 PCR 引物时要借助计算机程序, 使扩增片段只含有一个变性梯度区; 为了使要检测的 DNA 区充分解离而又保持部分解离的状态, 常在引物的 5' 端增加 40bp 左右的 CG 重复片段 (即 “CG” 夹); 有时单个碱基的替换不能引起解离温度的改变, 可在 PCR 后将待测个体的扩增产物与正常个体的扩增产物混合, 加热变性然后缓慢复性形成杂交双链, 杂交双链在突变部位形成碱基错配, 结果杂交双链的变性温度与纯合双链有明显的差别, 这样即使在突变的纯合双链与正常纯合双链不能区分的情况下, 它们的杂交双链也能显示突变的存在。

检测 SNPs 最有效的途径是 PCR 产物的序列测定, 若能解决交叉杂交这一难题, DNA 芯片分析将是最简便有效的途径。当然还有其他方法, 此处不再赘述。

2. 序列长度多态性:

序列长度多态性由重复序列造成, 表现为重复单元的拷贝数不同。重复序列以各自的核心序列 (重复单元) 首尾相连多次重复, 称为串联重复序列 (tandem repeats); 或散在地分布于染色体上, 以插入/缺失方式形成多态性。

重复序列有多种类型, 一些比较短, 常串联重复出现, 称为短串联重复序列 (short tandem repeats, STR); 一些比较长, 散在分布在基因组的许多地方。包括: 简单重复序列 (simple - sequence DNA), 重复单位长 5 ~ 10bp, 以长的串联串出现; 中度重复序列 (intermediate - repeat DNA, 又称移动 DNA 元件 (mobile DNA elements), 占基因组 25% ~ 40%。根据重复单元的长度, 中度重复序列可分为短散在分布元件 (short interspersed elements, SINE) 和长散在分布元件 (long interspersed elements, LINE)。

应用 PCR 技术扩增 STR 序列, 通过琼脂凝胶电泳 EB 染色、聚丙烯酰胺凝胶电泳结合银染色, 检测扩增产物的长度多态性 (扩增片段长度多态性), 较大重复单元的多态性需通过 Southern 分析检测。

(1) 简单重复序列: 简单重复序列的复性速度最快, 在基因组的氯化铯密度梯度离心时以次带出现, 伴随主带, 故而称为卫星 DNA (satellite DNA)。但不是所有的简单重复序列都在卫星带中。大部分简单重复序列存在于着丝粒和端粒及人类 16 号染色体长臂中部。这些简单重复序列由于重复单元的拷贝数不同而长短各异, 表现为一种长度多态性, 用简单重复序列为探针, 显示个体特异的 Southern 印迹图谱, 称为指纹图, 可进行个体鉴定和亲子识别。

短重复序列 (STR) 具有很高的多态信息量, 是非常有应用价值的连锁分析的遗传标志。

(2) Alu 重复序列 (Alu repeat sequence): Alu 重复序列是人类基因组中含量最丰富的中度重复序列家族, 占人类基因组的 3% ~ 6%。Alu 片段长 300bp 左右, 在基因组中重复约 500 000 次, 在染色体中分布不均匀, 平均每 4kb 左右插入一个, 除了人和猿外, 其它哺乳动物这类重复序列与人 Alu 序列均无同源性。Alu 序列中含有一个限制性内切酶 Alu I 识别的特异顺序 AGCT, 因此 Alu 序列可被 Alu I 酶解为两段, 分别含 170bp 和 130bp。推测 Alu 序列的功能与转录调节、hnRNA 加工以及 DNA 复制的启动有关。Alu 序列转录产物可能在蛋白质分泌方面具有重要作用。

Alu 序列是发生重组导致基因缺失的热点, 如 LDLR、NF1 基因的突变。

通过 Alu 序列在人类基因组中的特异性, 通过设计特异的 PCR 引物, 可扩增 Alu 序列间的人类基因

组序列,可以直接应用杂种细胞和 YAC DNA 标记探针进行 FISH 定位这些人类 DNA 的位置。应用这些探针显示类似于 R 带的染色体带型。

(3) 微卫星 DNA (microsatellite DNA): 在人类基因组 DNA 中存在着重复单位为 2~8bp 的重复序列,称为微卫星 DNA,具有高度的多态性,可用于多态性连锁分析,如基因诊断、基因定位。目前已确定这类微卫星位点 5000 多个,最常见的是二核苷酸重复序列,四核苷酸序列标记分析时分辨率较好。三核苷酸重复序列中已发现一些会导致动态突变、引起遗传性疾病,如脆 X 综合征、Huntington 病、强直性肌萎缩、脊髓小脑共济失调等神经系统疾病。

在基因组 DNA 序列中存在 5 到 10 万个 STR,为第二代多态性标记,在基因连锁分析中的应用越来越广泛。短重复单元(如二核苷酸、三核苷酸重复序列)的扩增产物电泳图上,等位基因不是以单一的条带出现,而是一组带,以其中 1 条或 2 条深染(即所谓的影子带),彼此相差一个重复单元。产生影子带的原因很复杂,有不同的解释,归纳起来有:合成过程中聚合酶滑动(slipage)、一个合成周期中未完成链的再延伸,正负链泳动速率的差别也可能是原因之一。为了便于结果判断,通常用变性 PAGE(同序列分析的 PAGE)进行分析,采用不对称 PCR 产生单链可能减少影子带。

32.2.2 基因频率

经典意义上的基因频率是指群体中某一基因座上突变基因的频率,是通过随机样本分析获得的突变基因的百分数来表示的。复等位基因的基因座,基因频率常指每个等位基因的频率,推广到多态性位点,则为每个等位片段(等位基因)的频率。

确定多态性等位基因频率时,根据多态性的定义(每个等位基因的频率达到 0.02),因此所分析的样本起码要 25 人(50 个等位基因),方能检出频率不低于 0.02 的多态性位点,对于罕见等位基因来说,样本越大检出的可能性越高。取得足够样本后进行基因型(或多态性)分析,分别计数每个等位基因的数目,然后计算出每个等位基因的百分比,通过 χ^2 检验确定了样本的代表性之后,这些百分数就可以作为该样本代表的群体每个等位基因的频率。不同的群体等位基因的数目可能不同,等位基因的频率也可能不同,在进行遗传分析时一定要注意样本的代表性。

32.2.3 样本取样随机性的验证

在分析一个样本的数据时,常需对所采集的样本的代表性进行检验,即检验样本的采集是否是随机的。根据 H-W 定律的二项式公式,对每个等位基因的纯合子、各个等位基因组合的杂合子的百分比进行计算,将获得的基因型理论值与实际个体的基因型观察值进行 χ^2 检验,确定这两组数据是否有显著性差别。如果存在显著性差别,则说明样本的随机性不够或者数目采集不足。由于存在不同的人类亚群,在不同的亚群中各等位基因的频率可能有差别,在白种人中表现多态性的标记位点在中国人中可能没有多态性。对于中国这样一个幅员广大、民族众多的国家,由于地域和历史的原因,形成许多群体和亚群,因此一般采集的群体很难具有广泛的代表性。在进行基因定位的研究中要特别注意这一点,需要获取区域性的或民族特定的多态性数据。

32.2.4 多态性信息量计算

一个位点的基因型为杂合时,才能提供信息。群体中杂合子的频率称为杂合度(heterozygosity, Het),随机样本中杂合子的百分数是其观察值。理论值可通过公式计算:

$$\text{Het} = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)$$

上式可见,等位基因数越多 p_i 越小, p_i 越接近平均数 $(1/n)$,杂合度就越大。

在家系分析中,双亲基因型为任何一个等位基因的纯合子时,不能提供信息,这表现在杂合度的计

算公式中；若父母是杂合子，但基因型相同，而子代也是同样基因型的杂合子时，不能用来确定目的基因与标记的连锁相 (linkage phase)，只能提供一半的信息。因此评价一个多态性位点的使用价值时需用一个量化的概念，这就是多态性信息量 (polymorphism information contents, PIC)。PIC 是指在某一家系中可以利用位点多态性作为遗传标志进行基因连锁分析的概率。也可以理解为利用此多态性在群体中进行基因诊断的诊断率。PIC 是由该位点的等位基因数、等位基因的基因频率分布两个因素决定。与杂合度一样，标记位点的等位基因数越多、各等位片段的频率越均匀，PIC 越大。对于常染色体上的多态性标记的 PIC 的计算公式如下：

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

其中 n = 该位点的等位基因数； p_i = 第 i 个等位基因在群体中的频率， $j = i + 1$ 。

对常染色体上的标记而言，PIC 小于该位点的杂合度，X 染色体上的多态性标记 PIC 等于杂合度。

32.3 多态性连锁分析

32.3.1 连锁分析

连锁分析的依据是孟德尔—摩尔根定律。即子代的等位基因（无论是基因本身还是多态性标记）分别来自父母（线粒体上的基因座和男性 X 染色体只来自母亲），在减数分裂形成配子的过程中，父源或母源的两条染色体上的基因座之间发生互换，形成新的单体型（连锁相）传递给子代，这种互换的机率取决于两个基因座之间的距离或连锁的紧密程度。紧密连锁的基因座，其等位基因在世代传递过程中倾向于形成一种固定的单体型（连锁相），作为一个整体一起传递，而不连锁的基因的基因座的等位基因独立传递。这种连锁的紧密程度可以通过家系连锁分析，检出在所分析的减数分裂中发生互换（重组）的比例来确定，用重组率来衡量。

常用的多态性标记有 2 种：① RFLP，第一代多态性标记；② 重复序列多态性，特别是那些可通过 PCR 方法检测的短重复序列 (STR)，被称第二代多态性标记，成为目前最有价值的遗传标志。单碱基多态性 (SNPs) 虽然最丰富，包含了第一代多态性，但由于过于细致，家系之间的共同性较差，就像使用不同的标记位点进行分析一样，这种异质性反而掩盖了本来的连锁关系；并且需要测序才能检测，不如第一和第二代标记方便。

多态性位点在基因连锁分析中的应用价值，除了它与致病突变之间连锁的紧密程度以外，还与它的杂合度有关。连锁越紧密所得结果越可靠；杂合度越高应用价值越大，衡量的标准是多态性信息量。

连锁分析通常用来进行基因诊断和基因定位。前者是用于已知的基因，后者是用于未知的基因，可以是未克隆基因的已报道的基因座的排除性分析，也可以是完全未知基因的全基因组扫描。典型的连锁分析包括如下步骤：① 选择将要分析的位点；② 确定将应用的分析方法；③ 采集适用于分析的家系；④ 对家系中各成员进行表型分析；⑤ 应用计算机程序分析实验数据，判断并解释所得到的结果。

如前所述，连锁分析即确定两点之间的重组率。显而易见，若各个体间无亲缘关系，便无法对他们进行连锁分析，如果家系成员中混有非亲生子，就会干扰连锁分析。为了确定每个位点的两个等位基因中哪一个被传递到子代中，要求被测对象为双杂合子，即两个位点都由不同的等位基因所组成。只有当双亲中至少有一个是双杂合子，才能提供连锁分析所需要的信息。

为了便于叙述，在连锁分析时，我们将一对位点分别称之为目标位点 (index locus) 与标记位点 (marker locus)。目标位点含有一个很少见到的等位基因，并在家系分析中能将其与相应的等位基因相区分。它可以是某一遗传病（或某一罕见性状）的相关基因。在一家系中 疾病状态的个体通常是已知的。连锁分析则要求目标位点的遗传方式也是已知的，单基因遗传或者是多基因遗传，因为两者的连锁

分析方式是不同的。有效的连锁分析还要求目标位点的被测性状为显性或共显性，以便能有效地检测杂合子。但是若某一遗传病的生化缺陷是已知的（如一些遗传性代谢性疾病），并且可以通过对酶活性的分析来确定是否为杂合子，这样即使临床上为隐性性状，也可对其进行有效的连锁分析。

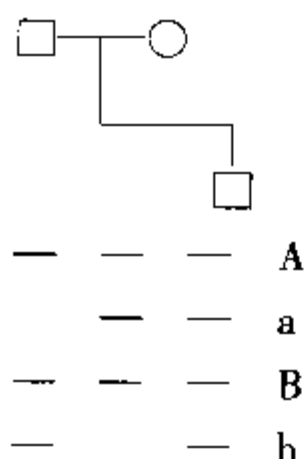
标记位点则通常为多态位点，在家系分析中将确定它与目标位点是否存在连锁关系以及连锁紧密程度。一个好的标记位点应具有下列特性：①对其所控制的性状的分析必须方法简单可行，取材方便；②各等位基因应为共显性，它们的存在与否可立即得到确定；③各等位基因在群体中的频率尽可能较高，即有较高的 PIC，使被测个体在该位点有可能为杂合子。

32.3.2 连锁相—单体型与重组

进行连锁分析时，检测的是两个或多个位点的等位基因组合一起传递的情况，特别是检测致病基因与标记等位基因共分离，即确定这些位点的连锁相（linkage phase）和这种连锁相在世代传递中被打断（发生重组）的情况。

染色体单体型（haplotype，其词根是 haploid，中文译为单倍体，描述配子细胞的染色体组成，而 haplotype 是讲一条染色体上等位基因的同线状态或称为连锁相，而不是指 23 条染色体——单倍体的状态，因此中文应该译为“单体型”而不是“单倍型”；当然，基因组扫描时，检测的是 22 条常染色体（常染色体遗传病）上的所有标记位点，在这种情况下倒是可以勉强称为单倍型，因为还没有包括性染色体上的标记。）这一概念是在应用 RFLP 进行基因诊断时提出来的，是指一条染色体上两个或两个以上的多态性位点状态的组合。有时单单分析一个多态性位点，还不能将某一家系中的致病基因所在染色体与正常染色体区分开来，必须分析多个位点的状态，综合起来才能获足够的信息。由于各位点紧密连锁，所以在遗传时，单体型可作为一个单位传给后代。如果在一个 DNA 区域有 n 个多态性位点，每个位点分别有 a, b, c, d, e, f, \dots 个等位基因（等位片段），每个位点的每个等位基因都可以与其它位点的任何一个等位基因同线，组成不同的单体型。如果这些位点的等位基因之间不存在连锁不平衡（linkage disequilibrium），从理论上讲，可组成 $a \times b \times c \times d \times e \times f \times \dots$ 个单体型。这表明，在单体型中分析使用的多态性位点越多组成的单体型越多、每个位点的等位基因数目越多所组成的单体型也越多，两条染色体之间的分辨率就越高。在多态性位点中，每个 RFLP 位点只有 2 个等位基因，而短串联重复序列（STR）位点的等位基因数目较多，并且可以应用 PCR 方法监测，因此较 RFLP 位点更有应用价值。

通过核心家系（父、母和孩子）分析可以确定多态性位点的连锁相（单体型），下图是两个位点（A、B）的分析结果：



进行单体型确定时可先设下面的惯例：每个个体划一条线，对于父、母，传给子女的等位基因标在线下；对于子女，父源染色体标在线上，母源的标在线下。记下每个个体在每个位点上的基因型，纯合状态的位点好标不用判断，杂合状态的位点先用括弧括上（或用铅笔标上），然后根据子代个等位标记的来源分别标在线上（父源）、线下（母源）。每个位点单独进行标识，这样便获得单体型。请看下列步骤：

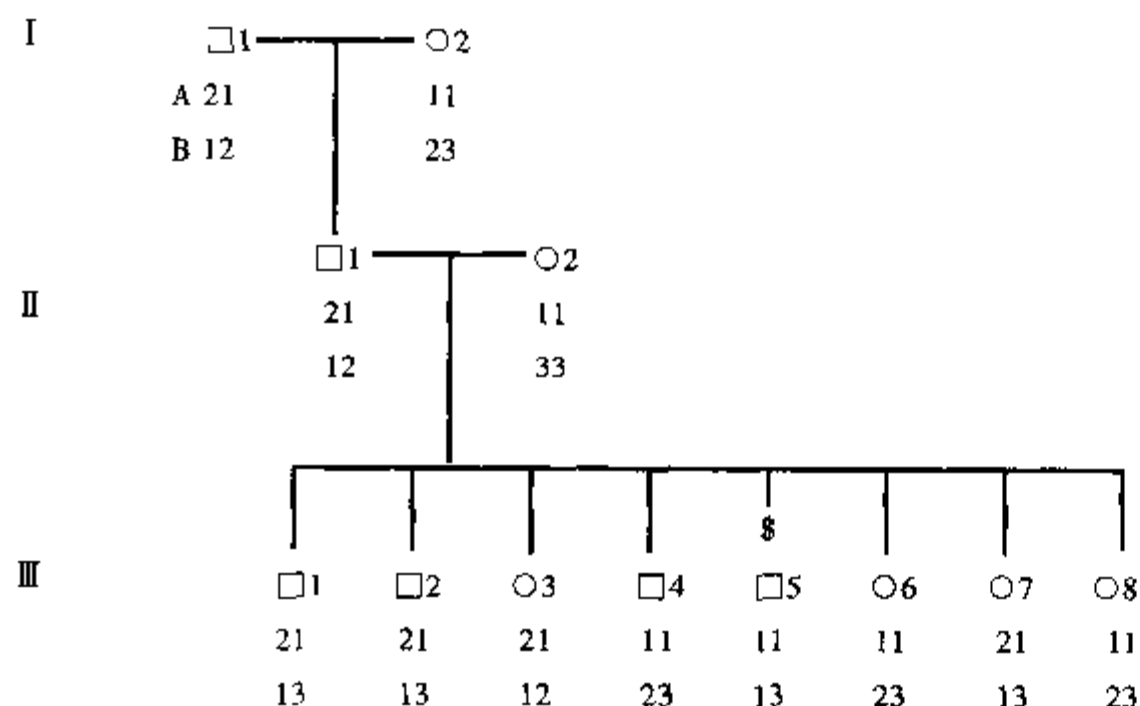
父亲	$\frac{A(B)}{A(b)}$	$\frac{AB}{Ab}$
----	---------------------	-----------------

母亲	$\frac{(A) \ B}{(a) \ B}$	$\frac{AB}{aB}$
子代	$\frac{(A) \ (B)}{(a) \ (b)}$	$\frac{Ab \text{ (父源)}}{aB \text{ (母源)}}$

从以上分析结果可见,在此家系中有3种单体型 AB、Ab 和 aB。

如果分析所用的标记位点只有两个等位基因,两个这样的多态性位点可组成4种单体型,理论上的最大杂合度为0.75(假设每种单体型的频率为 $1/4 = 0.25$, $Het = 1 - (0.25^2 + 0.25^2 + 0.25^2 + 0.25^2) = 1 - 0.25 = 0.75$);三个多态性位点联合组成8种单体型,理论上的最大杂合度为0.875;四个多态性位点联合组成16种单体型,理论上的最大杂合度为0.9375。

如果多态性位点之间有相当的距离时,减数分裂过程中可能发生染色体互换,通过大家系的传递分析,可计算出两个位点之间的大致遗传距离[1%的重组率为1个遗传单位,1厘摩(cM)]。利用父、母、子三人(核心家系)间的传递关系,分别独立确定家系各成员的单体型。下图示在一个三代人家系中进行多态性连锁分析的结果,在这一家系中II-1的单体型的基因型为A2B1/A1B2,在第三代中能确定所有个体的单体型,在这8个孩子中有一人(III-5)的父源单体型(A1B1)与众不同,是一个重组体,重组率为1/8。但是假如这一家系中只是两代(即图中的第II、III代),则II-1的单体型不确定,可能是A2B1/A1B2,也可能是A1B1/A2B2。若根据III-1确定其单体型,为A2B1/A1B3,则III-5是重组体;若根据III-5来确定则II-1的单体型(A1B1/A2B2),则是其他7个子女发生了互换,是重组体。不过后一种情况(重组率为7/8, > 0.5),一般是不可能的。



如果位点A是目标基因,是一种常染色体显性遗传的疾病,等位基因1为正常表型,等位基因2为疾病状态,那么这个家系的分析结果表明,疾病相关基因可能与位点B紧密连锁,遗传距离为12.5cM(重组率为 $1/8 = 0.125$)。这是一种直观的判断,在实际的基因定位中,情况要复杂得多,需要借助计算机连锁分析程序。

在进行基因定位时,采集多少家系或多少个体是大家关心的问题。由于存在遗传异质性问题,大家系的应用价值比小家系大。在家系分析中获得的重组率是一个近似值,分析的减数分裂数越多,这个值越精确。在基因定位克隆时,当范围缩小到1~2cM时即可进行结构基因的寻找,如通过cDNA筛选(cDNA selection)或外显子捕获(exon trapping)。1cM相当于1%的重组率,若以2%重组率计,要准确到这个数值,起码要分析50个表型明确的减数分裂。在50次减数分裂中没有检测到重组,重组率要 $< 2\%$ ($1/50 = 0.02$)。

32.3.3 连锁不平衡

所谓连锁不平衡是指两个连锁的基因座的某两个等位基因间的关系。若这两个等位基因的频率分别为 p_1 、 p_2 ，这两个等位基因组成的单体的频率为 h ，如果 h 为预期值 ($p_1 \times p_2$)，则称这两个基因座是连锁平衡的，如果 h 高于 $p_1 p_2$ ，就存在连锁不平衡，差别 $\Delta = h - p_1 p_2$ ，通过 χ^2 检验确定这种差别的显著性。连锁不平衡可有两种原因造成：①两个群体各为不同单体型纯合，而它们混合成一个群体时间不长，尚未通过随机婚配和重组达到等位基因的随机分布；②紧密连锁的基因座的两种等位基因组成的单体型具有某种选择优势，因而保存下来。在遗传病的基因定位中，致病基因与标记基因的等位基因之间是否存在连锁不平衡，是通过比较在正常群体中与突变基因中标记基因各等位基因的频率分布。这种连锁不平衡可能表明：①具有创建者效应，即来源于单一的突变，并且基因的突变率较低；②这种染色体背景的基因易发生致病突变；③该标记等位基因与致病基因紧密连锁，或者该标记基因就是疾病相关基因，其突变可能就是致病突变。

32.4 优势对数计分法与计算机程序

通过检测重组的连锁分析，可以计算出目标位点与标记位点之间或两个标记位点之间大致的重组律（或遗传距离），但不能确定这种连锁关系的可靠程度。在基因定位中使用优势对数计分法（lod scores）进行判断。

优势对数的定义是：

$$Z(\theta) = \log \frac{\text{当 } \theta = \theta_a \text{ 时获得这一家系性状组合的概率}}{\text{当 } \theta = 0.50 \text{ 时获得这一家系性状组合的概率}}$$

设重组率为 θ ，则非重组频率为 $1 - \theta$ ， $\theta = 0.5$ 是两个位点之间不连锁。若在上述家系中 A2 与 B1 相偶（同线），则获得这一家系性状组合的概率为 $\theta (1 - \theta)^7$ ，或 A2 与 B1 相斥（A1 与 B1 同线），获得这一家系的性状组合的概率为 $\theta^7 (1 - \theta)$ 。由于 A2 既可能与 B1 相偶也可能与 B1 相斥，其可能性各为 $\frac{1}{2}$ ，当重组率为 θ 时，出现该家系性状组合的概率为：

$$\frac{1}{2} \theta (1 - \theta)^7 + \frac{1}{2} 2 \theta^7 (1 - \theta)$$

按差额对数公式即可计算出

$$\begin{array}{cccccc} \text{当 } \theta = & .05 & .10 & .20 & .30 & .40 \text{ 时,} \\ Z(\theta) = & .650 & .787 & .730 & .503 & .193 \end{array}$$

以 r 代表子代中重组型的个体数， n 代表非重组型的个体数，当双杂合子亲体的连锁相位不能确定时，优势对数的计算方式为：

$$Z(\theta) = \log \{ 2^{r+n-1} [\theta^r (1 - \theta)^n + \theta^n (1 - \theta)^r] \}$$

当双亲的单体型明确时，上述公式可简化为

$$Z(\theta) = r \log (2\theta) + n \log [2(1 - \theta)]$$

由于受到家系大小的限制，同时也因为家系中双杂合子父亲或母亲两位点的等位基因之间的连锁相（相偶或相斥）通常是未知的，所以不可能用一简单的数学公式来计算家系中这两位点之间的重组率。人们经常只能收集到两代人的家系资料，即使能收集到三代或几代人的家系资料，两位点之间的相位关系仍有可能无法确定。为了对两代人或几代人的家系资料都能进行连锁分析，人们设计了许多数学计算方法，其中之一即 Morton 的优势对数（Log odds 或 Lods）的方法，它是目前连锁分析时的主要计算方法。优势对数法检测一种假设成立的可能性的对数。在连锁分析时，它并不给于是与否的回答。相反，而是

人们假定一对位点相互连锁, 并且假定它们之间的重组率为 θ , 优势对数法检测在上述假设的前提下, 获得如在某个家系中所观察到的性状组合的可能性。其中优势 (Odds) 为可能性的比值, 即当重组率为 θ 时获得这样一个家系的性状组合的可能性与当重组率为 0.50 (两位点互不连锁) 时获得这样一个家系性状组合的可能性的比例。以 10 为底取这一比值的对数所得到的数值即优势对数。

按 Morton 的建议, 当优势对数值 $Z(\theta) \geq +3$, 也就是说当 θ 当某一特定值, 获得所观测到的家系性状组合的可能性为当 $\theta = 0.50$ 时获得所观测到的家系性状组合的可能性的 1000 倍 (10^3) 时, 强烈提示两位点连锁, 并且其重组率就是该 θ 值。相反, 当 $Z(\theta) \leq -2$ 时, 强烈提示两位点并不连锁。

其优点是可将不同家系所得到的数值进行简单的数学相加, 这样, 不仅可利用大量只有二代人的小家系, 而且无世代、人群、时间先后的限制, 可将不同时间调查的资料累加起来, 一旦到了能够作出判断的程度, 即可停止调查。应用本方法, 所需的家系数目一般可减少 30% ~ 50% 左右。连锁分析过程中通常要计算当重组率 $\theta = 0.00$ 、0.001、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4 时的优势对数值 $Z(\theta)$, 并取 $Z(\theta)$ 最大值时的重组率 θ 为最有可能的实际重组率。用优势对数法所得到的重组率是通过计算最大概率的计算而得到的, 它与实际重组率之间有可能存在偏差。特别是当所分析的样本较小时, 这种偏差将更加明显。随着样本数目的增加, 这一偏差也将减少, 当样本数趋于无穷大时, 这种偏差也将消失。

当双杂合子父母的连锁相明确时, 即可根据子女中的非重组个体数 n 与重组个体数 r 从表中查出优势对数值。当双杂合子父母的连锁相不明确时, 则需先确定一参数值 $z1$ 。即将子女按其是否具有目标位点和/或标记位点的某一性状进行分组, 并计数各组的成员数目。如上图所示的家系若缺少有关第 I 代的资料, 则可将第 III 代个体分为四组。该家系的 $z1$ 值即为 7:1 (大的数值常写在前面), 查表时应查 “ $z17:1$ ” 位置的数值。当家系中父母标记位点的基因型只能从用于计算 $z1$ 值的子女的基因型推断时, 则需另加一矫正参数 el 。el 值等于子女中具有或不具有目标位点主特征的个体数的比例 ($G:g$), 上述家系的 el 值为 4:4 (通常也是大数值写在前面), 查表时就应查 “ $z17:1 el4:4$ ” 位置的 $Z(\theta)$ 值。

表 32-1 家系目标位点主特征与标记位点被测特征伴随分组

分 组	特 征		个 体 数	G+T/非 G+T 数
	目标位点 (A) 主特征	标记位点 (B) 被测特征		
	(A2, G)	(B1, T)		
GT	G	T	4	7
gt	g	t	3	
Gt	G	t	0	1
gt	g	T	1	

查表法没有考虑群体中多态性等位片段的频率分布, 也没有考虑外显率, 结果自然有偏差。目前已有不少计算机程序可用来计算优势对数值, 其中最常用的是 LIPED 与 LINKAGE 这两个程序。

对于某一对位点 (遗传病与多态性位点), 从某些家系分析所得到的重组率可能与从另一些家系分析所得到的重组率不尽相同。有两种原因可以引起这方面的差异。①实际重组率相同, 两者的差异是由取样误差或样本太小而引起, 此时所得到的优势对数可以相互相加, 以求得更接近实际的重组率; ②两者的实际重组率并不相同, 即存在着遗传异质性。遗传异质性是指不同位点的突变可以引起相同的临床症状。在连锁分析时疾病的遗传异质性表现为目标 (疾病) 位点 (实际是不同的基因座) 与标记位点的

重组率在不同的家系中各不相同。引起同一临床综合征的不同位点,有些可以与标记位点相连锁,有些则不然,或即使连锁,也会因其远离或接近标记位点而使重组率不同。若设因为遗传异质性使得群体中存在着两种类型的家系,一类其目标位点与标记位点相连锁,另一类则不然,此时的概率计算就需要考虑两个参数:①连锁的家系在总的家系数中所占的比例 α ;与②在这些家系中的重组率 θ 。对于某一特定的家系,究竟是否属于连锁型则取决于 α 与 θ 两个参数。应用数理统计学方法计算连锁家系的 θ 值的可信限范围,并对所测家系的 θ 值进行显著性检验,将有助于判断该家系究竟属于哪一类型。

在前面所讨论的连锁分析方法中,我们假设对个体的表现型的分析能完全确定其基因型,即个体的表现型能完全反映其基因型,而不考虑外显率的差异。但在许多情况下,这种假设并不符合实际。由于外显率的差异,人们会误将正常个体当作受累个体或将受累个体当作正常个体。重组率的计算也可因此而发生偏差。特别是对于那些与年龄相关的性状,这一现象更为突出。某些遗传病在出生时并不出现症状,而是到一定年龄时才发病。如遗传性舞蹈病通常在 40~50 岁时才出现症状,此时每一年龄组就有它自己的外显率。

对于大多数位点来说,在女性中的重组率要大于在男性中的重组率。虽然两位点的物理学距离相同,但在家系分析中,女性的遗传学距离大于男性。这一现象也在小鼠中被证实,而在果蝇中更为突出,雄性果蝇中没有重组现象。当两位点连锁不太紧密时,分析母亲为双杂合子的家系或分析所收集到的所有家系,可能会得出两位点不连锁的结论;而单独分析父亲为双杂合子的家系则可以证实两位点之间的连锁。

对显示单基因遗传的性状与已定位了的遗传标记之间的连锁分析包括 3 个步骤:

(1) 必须确立连锁。如在前面所讨论的,这已经成为常规,如果联合的 lod 值超过 +3 (1000 的对数值),计数倾向于连锁的可能性是 1000:1,便可认为连锁确立。这是 Morton 提出的严格标准,已被大家接受。因为随机选择的两个常染色体基因座之间连锁的前概率是非常低的,错误风险高,特别是用多重标记进行检测时。如果 lod 值低于 -2,则应排除连锁。

(2) 当连锁确立时,最大的重组间隔 θ 也必须确定。 θ 有性别的差异:对大多数人类基因组区域,女性减数分裂的 θ 高于男性;因此,对于两种性别必须分开来计算。

(3) 经常同时用几个家系进行连锁研究。有趣的是,同样的表型常常由不同的基因座的突变造成,即存在遗传异质性。因此,一些家系显示连锁而另一些家系却不。另一方面,我们常常发现一些家系之间,在一些减数分裂中存在某种程度的机会差别,在这些减数分裂中即使根本不存在连锁,也会出现有时重组有时不重组的情况。急于发现连锁的观察者决不能受到某种引诱,而只选择性地选用那些显示正 lod 值的家系,依据这种 lod 值可能会产生虚假的连锁证据。已经有特别的统计学方法,可以区分一些家系显示连锁的真异质性与虚假的连锁证据。

已有一些连锁分析的计算机程序,包括异质性检测(见表 32-2)。

在需要定位疾病基因时,这类 2 点连锁计算常常是分析的第一步。一个更有力的方法,是利用几个标记的固定图,在已知图的不同位置上来计算疾病假设位点位置的或然率(=多点连锁分析)。基因座排序和同时估计几个重组率的问题需要复杂的多变量连锁分析。用分步策略构建了目前 1266 个间隔的广泛遗传图,平均相隔 2.9cM。在多位点连锁分析中出现了许多问题,例如:使用什么样的干扰模型、存在什么样的技术限制、是否应该建立性别特异的图距。

表 32-2 连锁分析的计算机程序

名 称	程序的特征	联系地址
LINKAGE (包括 LIPED)	2-点和多点连锁, CEPH 家系数据的特别版本, 风险计算	J. Ott, Rockefeller Univ. New York NY, USA
HOMOG SLINK	检测连锁数据的异质性 模拟程序 (与 LINKAGE 合用)	Ott
FASTMAP	从 2 点分析构建多位点图的快速技术	D Curtis, Academic Dept. of Psychiatry, St Mary's Hospital, Praed St., London W2 7NY, UK
MAP	基因座排序的多重配对连锁; 可能的干扰; 错配的质量控制	V Andrews, CRC Research Group in Genetics Epidemiology, Dpt. of Community Medicine, Univ. of Southampton South Academic Block, Southampton General Hospital, Southampton S 09 4X, UK
FASTLINK	由于改进了 algorithms, LINKAGE 的较快版本	A. Schaffer, Dept. of Computer Science, Rice University, Houston TX 7725, USA
MENDEL	功能与 LINKAGE 范围相同	K Lange, Dept. of Biostatistics Univ of Michigan, Ann Arbor, Mich
LINKSYS	容易使用的数据库和产生 LINKAGE 与 LIPED 使用的数据库	J. Atwood, Genetics and Biometry Dept. UCL Wolfson House 4, Stephenson Way, London NW1 2HE, UK
Mapmaker	在 CEPH 型家系构建多位点图	Mapmaker Distribution, Lander lab, Whitehead Institute, for Biomedical Research, Nine Cambridge Center Cambridge MA 02142, USA
CRI - MAP	构建多位点图	Dr. Phil Green, Dept. Molecular Biotechnology, Univ. of Washington, Seattle WA 98195, USA

还可在表中找到检测连锁和作图程序, 例如 SAGE。SAGE 程序还可用同胞对 (或密切亲属) 方法进行连锁分析。其他进行同胞对分析的程序包括 KIN 和 PEDSCORE。

32.5 关联分析

关联 (association) 分析是比较来自同一群体中无亲缘关系的患病个体与非患病个体 (对照组) 在等位基因的频率分布上是否存在显著差别, 属于病例-对照研究。若存在显著差别, 则认为该等位基因与所研究的性状关联, 可能提示该座位含有一个易患基因或与易患基因紧密连锁。例如在强直性脊柱炎患者中, 有 90% 的个体具有 HLA-B27 等位基因, 而在正常人群中该等位基因的频率只有 9%。

通常采用 χ^2 检验 (列表关联分析)。设一个标记位点有 2 种等位基因 M1、M2, 患病组和对照组分析结果见下四格表:

观察值	患病组	对照组	合 计
M1	a (T1)	b (T2)	a + b
M2	c (T3)	d (T4)	c + d
合计	a + c	b + d	a + b + c + d = N

理论值为 $T1 = (a + c)(a + b) / N$; $T2 = (b + d)(a + b) / N$; $T3 = (a + c)(c + d) / N$; $T4 = (b + d)(c + d) / N$;

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{观察值} - \text{理论值})^2}{\text{理论值}} = \sum \frac{(O - E)^2}{E} = \frac{(ad - bc)^2 N}{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)}$$

χ^2 检验中, 每项的数目不得 < 5 , 总数不得 < 40 , 如果发生这种情况, 则需进行校正, 使用下列公式:

$$\chi^2 = \sum \frac{(|O - E| - 0.5)^2}{E} = \sum \frac{(|ad - bc| - N/2)^2 N}{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)}$$

当观察样本数 < 40 , 或某一格的理论数 < 1 时, 可通过 Fisher 确切概率法家系双侧检验。对于 χ^2 与概率 P 的关系, 可查阅 χ^2 表, 其自由度的计算是把行数和列数分别减 1 的乘积 (上表的自由度为 $(2 - 1)(2 - 1) = 1 \times 1 = 1$), 显著性水平以 0.05 为界; χ^2 值超过一定范围 ($P < 0.05$) 就认为有显著意义, 即确认关联, 两个样本之间的差别不是由于抽样误差所致。

引起疾病与遗传标记关联的因素很多, 如①标记基因就是致病基因; ②疾病易患基因与标记连锁不平衡; ③遗传背景不一致, 即群体混合 (近代的混杂), 可产生假阳性结果。许多已发现关联的标记性状, 通过 lod 和患病同胞对等分析却无法进一步得出连锁的结论。产生关联分析阴性结果可能有下列原因: 标记与疾病无关、标记的检出力不够 (如杂合度过低或样本不足)、遗传异质性。因此对于关联分析的结果的解释要相当谨慎。为了避免假性结果的出现, 可采取以下措施: ①尽可能选择遗传背景相当均一的群体样本; ②患病家系对照分析 (affected family - based controls, AFBAC), 例如双亲是 A1/A2、A3/A4, 患者是 A1/A3, 在可将另外两个未传递给患者的等位基因作为对照组一个虚拟的个体的基因型, 或选择 A2/A4 的其他家庭成员作对照, 获得的相对风险称为基于基因型的单体型相对风险 (genotype - based haplotype relative risk, GHRR), 若将传递与非传递的等位基因分别作为成员看待, 也可获得同样的结果, 获得的相对风险称为基于单体型单体型相对风险 (haplotype - based haplotype relative risk, HHRR), 此时的计数为基因数, 是人数的 2 倍。这种方法又称传递/不平衡检验 (transmission/disequilibrium test, TDT)。

32.6 传递不平衡检验

传递/不平衡检测是由 Spielman 等人首先提出, 它是以家系为基础的连锁不平衡检测, 观察双亲 (至少 1 人为杂合子) 将标记位点等位基因传递给受累后代是否表现连锁不平衡, 即是否存在某种等位基因传递给患者的频率显著增加。TDT 分析的群体是: ①已知标记位点等位基因与性状相关; ②患者双亲中至少有 1 人是标记位点的杂合子; ③至少有 1 个受累子代。其优点是: ①比单体型共享灵敏得多; ②可以使用一个或多个受累同胞的家庭; ③受累同胞数目不同的家庭数据可合并分析。缺点是: 这种方法是以连锁不平衡为前提, 如果没有连锁不平衡 ($\delta=0$), 即使标记位点与致病基因紧密连锁也不能检测出连锁。通常是在确定关联的情况下, 使用 TDT 确定连锁。

32.6.1 只有一个孩子受累的家庭

简便起见, 以只有一个孩子受累的 n 个核心家系为例。假设标记位点有 2 个等位基因 M1、M2、 n 个家系共有 $4n$ 个标记等位基因, $2n$ 个传递给患者, $2n$ 个没有传递。这些数据可列成下列四格表:

	M1	M2	总 数
传递的等位基因数	w	$2n - w$	$2n$
非传递的等位基因数	y	$2n - y$	$2n$
总 数	$w + y$	$4n - w - y$	$4n$

$$\chi^2 = 4n(w - y)^2 / [(w + y)(4n - w - y)], df = 1$$

使用上式应该考虑 3 个假设: ①标记位点与疾病没有关联 (即 $\delta=0$); ②标记位点与疾病之间不连锁 ($\theta=1/2$; 即 $1-2\theta=0$); ③假设①或假设②或二者皆是 [即 $\delta(1-2\theta)=0$]。

我们将标记位点分析结果根据父母的标记位点的基因型及传递列成四格表:

非传递的等位基因			
	M1	M2	总数
传递的等位基因 M1	a	b	$a + b$
M2	c	d	$c + d$
总 数	$a + c$	$b + d$	$a + b + c + d = 2n$

n 为患者 (家系) 数, a 、 d 为标记位点纯合的双亲数, b 、 c 为标记位点杂合的双亲数, 双亲总数为 $2n$, 标记等位基因总数为 $4n$, 传递的 M1 数 (w) 为 $a + b$, 未传递的 M1 数 (y) 为 $a + c$; 传递的 M2 数为 $c + d$, 未传递的 M2 数为 $b + d$ 。

这里我们只注意是双亲的数目 ($2n$) 而不是双亲的等位基因 ($4n$), 并且描述每位双亲时只讲他 (或她) 传递给孩子的标记等位基因和他 (或她) 没有传递给孩子的标记等位基因, 那么只有在假设①时上述的计算公式才是有效的。显然来自纯合子的双亲的数据是不能使用的。

假设群体中等位基因 M1 的频率为 m 、疾病基因 D1 的频率为 p 、连锁不平衡相关因子 (M1D1 的频率 $-mp$) 为 δ 、标记位点与致病基因之间的重组率为 θ 。Ott 认为对于隐性遗传病, 传递和非传递的标记等位基因的组的可能性应列成下表:

传递的等位基因	非传递的等位基因		总 数
	M1	M2	
M1	$m^2 + (m\delta/p)$	$m(1-m) + [(1-\theta-m)\delta/p]$	$m + [(1-\theta)\delta/p]$
M2	$m(1-m) + [(\theta-m)\delta/p]$	$(1-m)^2 - [(1-m)\delta/p]$	$1-m - [(1-\theta)\delta/p]$
总 数	$m + (\theta\delta/p)$	$1-m - (\theta\delta/p)$	1

前面的公式只比较了传递的等位基因 M1 数值 $w (= a + b)$ 和非传递的数值 $y (= a + c)$, Ott 认为不是在所有的情况下上面的公式能够进行有效的 χ^2 检测, 它需要假设对于所有的双亲来说, 传递和非传递的等位基因类型是独立的。这只有产生如上表所列的数据时才可能是独立的, 这需要 $\theta\delta = 0$ ($\theta = 0$ 或 $\delta = 0$)。

在我们的分析中需要假设 $\theta = 1/2$, 因此上述公式不能提供有效的检测。这需要增加适当的共变量, 经过一些代数运算之后, 形成下式:

$$\chi_{td}^2 = (b - c)^2 / (b + c)$$

上式表明只有来自杂合子的数据才能用于检测, 这就是“传递/不平衡 χ^2 检测”, 记为 χ_{td}^2 。由于舍去了纯合子的数据, 前式获得的 χ^2 为现式的 2 倍。

32.6.2 有两个孩子患病的家庭

在这种情况下不仅能直接地将 χ_{td}^2 公式扩展, 并且可以对 χ_{td}^2 和受累同胞“单体型共享”的 χ^2 (我们记为 χ_{hs}^2) 的结果进行比较。同样只有杂合子的双亲的数据才能使用, 假设在这样的家庭中有 h 个这样的双亲。当双亲都是杂合子时我们可以分别计数他们, 因为他们的贡献是独立的。(如果孩子也是杂合子, 则不适宜用作 TDT 分析, 除非有其他的措施能够区分它们。)

在这样的家庭中获得的数据有下面 3 类:

i = 传递 M1 给两个孩子的双亲数;

$h - i - j$ = 传递 M1 给一个孩子而传递 M2 给另一个孩子的双亲数;

j = 传递 M2 给两个孩子的双亲数。

因此, $b = 2i + (h - i - j) = h + i - j$;

$c = 2j + (h - i - j) = h - i + j$ 。

$b - c = 2i - 2j$, $b + c = 2h$, 这时 χ_{td}^2 计算公式变成:

$$\chi_{td}^2 = 2(i - j)^2 / h$$

对于有 2 个或 2 个以上的受累同胞时, IBD 的分析可用以下公式:

$$\begin{aligned}\chi_{hs}^2 &= [i + j - (h - i - j)]^2 / h \\ &= (2i + 2j - h)^2 / h\end{aligned}$$

我们可用分别或综合使用这些数据的 χ^2 结果:

$$\chi_{Total}^2 = \frac{[i - h/4]^2}{h/4} + \frac{[h - i - j - h/2]^2}{h/2} + \frac{[j - h/4]^2}{h/4}, \quad df = 2$$

32.6.3 有两个以上受累同胞的家庭

上面所述的原则同样适用于有 2 个以上受累同胞的家庭。以有 3 个受累同胞为例, 在这样的家庭中, 杂合子的双亲可分成以下 4 类:

s = 传递 M1 给所有 3 个受累同胞的双亲数 (几率 = $1/8$)

t = 传递 M1 给 2 个受累同胞而将 M2 传递给 1 个受累同胞的双亲数 (几率 = $3/8$)

u = 传递 M1 给 1 个受累同胞而将 M2 传递给 2 个受累同胞的双亲数 (几率 = 3/8)

v = 传递 M2 给所有 3 个受累同胞的双亲数 (几率 = 1/8)

$$\chi_{td}^2 = (3s + t - u - 3v)^2 / 3w$$

$$\chi_{hs}^2 = (3s - t - u + 3v)^2 / 3w$$

$$\chi_{Total}^2 = 8/w [(s - w/8)^2 + 1/3 (t - 3w/8)^2 + 1/3 (u - 3w/8)^2 + (v - w/8)^2]$$

其中 $w = s + t + u + v$ 。还有残余 χ^2 (χ_r^2), 尚无适当的解释。

χ_{td}^2 和 χ_{hs}^2 可分别或综合起来用以进行连锁分析。

对于任何数目受累同胞的家庭可合在一起分析, 使用公式:

$$\chi_{td}^2 = (B - C)^2 / (B + C)$$

B 为将 M1 传递给受累同胞的总数, C 为传递 M2 的总数。

对于标记位点具有 2 个以上等位基因, 根据群体分析数据显示多个等位基因与疾病关联, 以一个等位基因为传递等位基因, 逐个确定与每个没有关联的有关等位基因的杂合子进行分析。如只有一个等位基因与疾病关联, 可将其他的等位基因合并列为 MX, 然后检测另一个等位基因。

举例: 在一项 IDDM 研究中, 57 个杂合子双亲传递了 124 个等位基因给受累同胞 (78 个 M1, 46 个 MX), 应用预期值 $M1 = MX = 62$, 和等式 $b = 2i + (h - i - j) = h + i + j$, $c = 2j + (h - i - j) = h - i + j$, 获得显著的差别: $\chi_{td}^2 = (78 - 46)^2 / 124 = 8.26$, $P = 0.004$ 。

32.7 等位基因共享分析

近年来, 定位克隆技术分发展, 使得在定位和确定孟德尔遗传病的疾病相关基因变得前所未有的快捷。如果遗传方式确定, 连锁分析的 lod 值方法是比较理想的途径。但是如果突变基因的外显不完全或者表型不能确定, 即使是单基因的孟德尔遗传病的定位也变得困难了。引进一些参数则可能会导致假的连锁结果。对于非孟德尔遗传病或复杂疾病来说情况更是如此。在这些疾病中缺乏基因型与表现型之间的简单对应性, 它涉及到多个基因座的作用及遗传与环境因素的相互作用。等位基因共享分析 (allele-sharing methods) 可能对这种问题的解决有所帮助。这是非参数分析, 用这种方法确定连锁不依靠遗传方式的确定, 只是取决于基因对表型特征的影响。

同胞对法还可以应付更复杂的情况, 例如只有受累同胞的标记能够分析, 而不能分析父母的材料。如果受累父或母的标记是纯合的, 或者未受累的父母传递给患者的等位基因与患病父或母传递的等位基因相同, 可以通过下列两种途径克服这一困难: ①在同一家庭中使用未受累同胞对, 不过在这种情况下所患疾病的外显率应是 100%, 这样才能确定未受累同胞确实是未受累的; ②应用单体型分析代替单个标记位点的分析, 通常父母可能具有不同的单体型, 而某一个孩子只获得父母各一个单体型标记。

在复杂疾病表中, 疾病特征现为连续性状, 疾病的表型是以超过某一连续变量的阈值为标准, 例如体重与肥胖、血压与高血压病。进行这种数量特征基因座 (quantitative trait loci, QTLs) 的定位途径也可以使用同胞对法。有三种类型的同胞对: ①高值一致的 (concordant for high values); ②低值一致的 (concordant for low values); ③高值与低值不一致的 (极端不一致同胞对, extreme discordant sib pairs, EDSPs), 这些同胞对对 QTL 的连锁分析有用。

有两种类型的 EDSPs, 一种是同胞之一的数量指标位于分布的上限 10% 而另一同胞位于低限 10%, 定义为 T1B1; 一种是同胞之一位于上限 10% 而另一同胞位于低限 30%, 定义为 T1B3。T1B1 是对称的, 而 T1B3 不是。位于上限 10% 的同胞是患病的, 可以从临床病例收集, 然后根据先证者从家系中收集位于低限 10% (或 30%) 的同胞组成同胞对。如果临床上对某种疾病的阈值已有定义, 则患病同胞的选择标准便不限于上限 10%。

在常规分析中,同胞对特征数值的平方差别 (squared difference) 依赖于传递一致性 (identity by descent, IBD)。对于随机选择的同胞对来说,这种途径的效力很低,除非由某一个基因座引起的变异所占的比例足够大 (50%)。

32.7.1 受累同胞对分析

受累同胞对法 (affected-sib pair analysis) 是最简单的一种等位基因共享分析,受累同胞对数据的分析是非参数的,不需要假设遗传病的遗传方式,不需要考虑致病基因与标记位点间的重组事件,它是建立在检测受累同胞对是否具有比期望值更高的传递一致性的基础上。在同胞对研究中,受累同胞对的疾病表型与多态性标记进行分析,父母共有 4 个等位基因 (A1、A2、A3、A4), 如果不存在连锁,标记等位基因随机分配到子代中,同胞对共享 0、1、2 个等位基因的几率是 1/4、1/2、1/4,即在所研究的同胞对中将会有 25% 的同胞对共享分别来自父母的等位基因、50% 的同胞对共享一个等位基因、25% 的同胞对不共享父母的等位基因。如果标记与致病基因连锁,患病同胞对共享一个或两个等位基因的比例就会高于预期的 25% 或 50%。是通过比较患病的同胞对之间是否非随机地共享了某一位点的相同等位基因,从而推测该位点是否与易感基因连锁。如果双亲的标记等位基因的状况是已知的,就能确定共有的等位基因是否来自该家系的同一祖先,即同一染色体的同一区域,称为传递一致性,若不知其是否来自同一条染色体,称为状态一致性 (identical-by-state, IBS)。

32.7.1.1 IBD 法

这里介绍常用的 Suarez 法:

H_0 假设为: 标记基因与致病基因独立分离。一个家庭有 s 个受累同胞 (1, 2, 3, ..., s), 若第 i 个同胞与第 j 个同胞有 k 个 ($k=0, 1, 2$) 标记等位基因 IBD, 计为 Z_{ij} , 则这个家庭有 $Z = \sum \sum Z_{ij}$ 个受累同胞对, 对该家庭的全部受累同胞对的 Z_{ij} 值求和, 则 Suarez 加权统计量 t 为:

$$t = (\sum Z_w - \sum E(Z_w)) / (\sum \delta_w^2)^{1/2}$$

其中 $Z_w = 2Z/s(s-1)$, $E(Z_w) = s-1$, $\delta_w^2 = (s-1)/s$, 这里 \sum 为对全部家庭求和。

在上述 H_0 , t 近似地符合渐进标准正态分布。即使在有可传递的多因子成份存在时, 以 t 做统计检验一般也能得出可靠的结论。严格地说, Suarez 方法较适用于处理每个家庭只有两个受累同胞的分析。

Green 法提出另外一种计算方法, 对于每个家庭的受累同胞的标记等位基因, 若出现次数最多的前两个等位基因的频数分别为 N_1 和 N_2 , 记 $N = N_1 + N_2$, 计算公式为:

$$t = [\sum N - \sum E(N)] / [\sum V(N)]^{1/2},$$

其中, \sum 为对全部家庭求和, 期望值 $E(N)$ 和估计方差 $V(N)$ 分别可计算或查表获得。

例: 收集某病 13 家系进行分析, 有 2 个同胞患病的家系 7 个, 有 3 个同胞患病的家系 6 个, 每个患者在标记位点的基因型如下: 2/1, 2/1; 2/1, 2/3; 1/7, 7/2; 2/3, 2/5; 2/1, 2/8; 2/8, 2/3; 2/1, 2/1, 2/1; 3/2, 3/2, 3/2; 6/5, 6/2, 6/5; 5/6, 5/2, 5/2; 2/5, 2/3, 2/3; 5/3, 2/3, 2/3。

计算结果: $t = 3.3941$ (Suarez 法) ($t = 2.9192$, Green 法), $t > 1.6$ 时, 用单侧正态检验 ($P < 0.05$), 可拒绝标记等位基因与致病基因独立分离的 H_0 假设, 结论为两基因座连锁。

受累同胞对法检验遗传病易患基因的能力依赖于该基因座对遗传改变的作用大小, 此作用大小可根据受累先证者的一个同胞的发病率对群体发病率的比 (λ_s) 来估计, λ_s 值越高, 遗传效应越大。

在一组受累同胞对中, 一个标记位点的连锁可用最大 lod 值 T 来估计, 当 $T > 3.0$ 时, 支持连锁的概率为 1000:1。可用逐步升级筛查, 先以低密度标记位点进行筛查, 然后在高于低阈值 ($T > 1$) 的区域使用更密集的标记进行筛查, 在 T 值增高的区域两侧最好使用至少 2 个标记位点。使用同胞对进行筛查时, 第一次筛查 20cM 的间隔要比 10cM 或 40cM 更有效。若要求 $T = 3.0$, 使用 100 个同胞对的样本, 在 λ 超过 3.5 时能检测到一个易感基因的概率为 90%。

检测连锁能力的估计是假设标记位点与易感基因座位完全连锁, 而且标记位点具有完整的信息 (即能够确定同胞等位基因传递一致性)。在多因素遗传病中, 参与的基因数较多, 这种检测能力随参与效应的基因座数量 (n) 而下降, 如果这些基因以相乘方式相互作用而不是以相加效应, 则每个基因座的 λ_1 为 $\lambda_1^{1/n}$ 。

32.7.1.2 IBS 法

即使在具有高度多态性的标记位点, 也并不是对所有的家庭能够确定受累同胞对相同等位基因是否来自同一亲源 (IBD), 特别是不能获得双亲标本的情况下。受累同胞对的状态一致性 (IBS) 能够解决这一问题。

Green 法的计算公式为:

$$t = [\sum N - \sum E(N)] / V(N)^{1/2}$$

除了受累同胞的标记表型资料外, 受累同胞对分析 IBS 法还需要标记位点的等位基因的频率数据。

32.7.2 不一致同胞对

当多受累同胞对数据难以获得时, 可以利用只有一个受累同胞的同胞对进行分析。这是一种新的同胞对分析法, 其原理是不一致的同胞对 (例如患者 - 正常对) 共享某一标记等位基因的可能性较随机预期值低, 从而检出连锁。当散发病例较多或存在遗传异质性时, 单受累同胞对分析方法检测连锁的能力较弱。

对有 s 个患病、 r 个正常同胞的同胞组, 按 Green 法分别对 s 个患者、 r 个正常个体和 $s+r$ 个同胞计算随机变量 N 值, 所得结果 N_1 、 N_2 、 N_s , 记 $T = N_1 + N_2 + N_s$, 则:

$$Z = [\sum T - \sum E(T)] / [\sum V(T)]^{1/2}$$

$E(T)$ 和 $V(T)$ 可查表获得。

不一致同胞对 (discordant sib pairs, DSP) 对于可能的遗传模式提供了最有效的手段。当使用此法获得显示连锁时, 结论的可靠程度更高。

32.7.3 受累亲属对分析

这种方法是作为受累同胞对分析的一个推广, 受累亲属对分析 (affected pedigree - member method, APM) 方法可利用一般有血缘关系的受累亲属标记表型的检测信息, 分析致病基因与标记位点的是否连锁。这类方法一般只需要检测家系中感兴趣的受累亲属标记表型, 数据较易获得。Weeks 和 Lange 研制了 APM 计算机程序。APM 分析方法也血缘提供各标记位点的等位基因的群体基因频率数据, 基因频率的准确性对于检测效能有很强影响。此外, 标记位点的多态性程度对 APM 法的检出能力也有较强的影响。

同标准的 lod 连锁分析方法比较, 受累同胞 (亲属) 对法一般具有数据来源广泛、标记表型的检测工作量小, 且数据处理较为简捷可行等诸多优点。更主要的是, 它不需要对疾病的遗传方式作出准确的假设。在遗传方式已知的情况下, 受累亲属对方法也可作为一种在大量的标记座位中快速检测可能的与致病基因连锁的座位的初步分析方法, 为进一步细致地用 lod 分析等方法进行基因定位提供方向。但受累亲属对的最大缺点是不能提供致病基因与连锁标记之间的距离 (重组率)

(黄尚志 文)

参 考 文 献

1. Vogel F. and Motulsky AG (eds). Human Genetics. Problems and approaches (3rd ed). Springer, Berlin, Heidelberg, 1997.
2. Thompson and Thompson (eds). Genetics in Medicine (4th ed). WB Saunders Company. Harcourt Brace Jovanovich Inc. Philadelo-

- hia, 1991.
3. Lodish H, Baltimore D, Berk A, et al (eds). *Molecular Cell Biology*. (3rd ed). New York, Scientific American Books, 1995
 4. 黄尚志. 遗传病的分子基础. 见: 程在玉, 伦玉兰主编. 医学遗传学基础与临床. 青岛出版社, 1993, 165 ~ 179
 5. Ott J. *Analysis of Human Genetic Linkage*. Baltimore. Johns Hopkins University Press, 1985
 6. Emery AEH. *Methodology in Medical Genetics, an introduction to statistical methods*. 2nd ed. Churchill Livingstone, 1986
 7. Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C et al. Strategies for multilocus linkage analysis in human. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1984, 81: 3443
 8. 沈福民. 遗传医学. 上海医科大学讲义
 9. 郭政, 李霞, 何颖. 医学遗传学与遗传流行病学数据分析. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1996
 10. Green JR. The distribution of N and F: measures of HLA haplotype concordance. *Biometrics*, 1984, 40:341
 11. Shah S and Green JR. Testing for haplotype concordance with incomplete parent data – modified Q and correction for modified N. *Ann Hum Genet*, 1993, 57:239
 12. Weeks DE and Lange K. The affected pedigree – member methods of linkage analysis. *Am J Hum Genet*, 1988, 42:315
 13. Spielman RS, McGinnis RE and Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin – dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet*, 1993, 52:506 ~ 516

附录 1: 常见限制性内切酶酶切位点

酶	常见同裂酶	盐浓度 (1)	温度	识别顺序	匹配粘性末端
Aat II		中	37℃	GACGT↓C	
Acc I		中	37℃	GT↓(AC)AC	Acy I, Asu II, Cla I, Hpa II, Taq I
Acc III		高	65℃	T↓CCGGA	
Acy I			37℃	G(AC)↓CG(AC)C	Acc I, Asu II, Cla I, Hpa II, Taq I
Alu I		中	37℃	AG↓CT	blunt
Alw26 I		中	37℃	GTCTCN↓ CAGAGNNNN↑	
Alw44 I		中	37℃	G↓TGCAC	
Aos I			37℃	TGC↓GCA	blunt
Apa I		低	37℃	GGGCC↓C	
Apy I	Atu I, EcoR II		37℃	CC↓(A)GG	
Asu I			37℃	G↓GNCC	
Asu II			37℃	TT↓CGAA	Acc I, Acy I, Cla I, Hpa II, Taq I
Atu II			37℃	CC↓(A)GG	
Ava I		中	37℃	G↓PyCGPzG	Sal I, Xho I, Xma I
Ava II		中	37℃	G↓G(A)CC	Sau96 I
Avr II		低	37℃	C↓CTAGG	
Bal I			37℃	TGG↓CCA	blunt
BamH I		中	37℃	G↓GATCC	Bcl I, Bgl II, Mbo I, Sau3A, Xho II
Bcl I		中	60℃	T↓GATCA	BamH I, Bgl II, Mbo I, Sau3A, Xho II
Bgl I		中	37℃	GOCNNNN↓NGGC	
Bgl II		低	37℃	A↓GATCT	BamH I, Bcl I, Mbo I, Sau3A, Xho II
Bpa I			37℃	GT↓(A)(A)AC	
BstE II		中	60℃	G↓GTNACC	
BstN I		低	60℃	CC↓(A)GG	
BstX I		高	50℃	CCANNNNN↓NTGG	
BstZ I		高	50℃	C↓GGCOG	
Bsu36 I		高	37℃	CC↓TNAGG	
Cfo I		低	37℃	GCG↓C	
Cla I			37℃	AT↓CGAT	Acc I, Acy I, Asy II, Hpa II, Taq I

续表

酶	常见同裂酶	盐浓度 (1)	温度	识别顺序	匹配粘性末端
Csp45 I		低	37°C	TT↓CGAA	
Dde I		中	37°C	C↓TNAG	
Dpn I	Sau3A	中	37°C	G ^M A↓TC	blunt
Dra I		中	37°C	TIT↓AAA	
EcoR I		高	37°C	G↓AATTC	
EcoRV		高	37°C	GAT↓ATC	
EcoB			37°C	TGANNNNNNNTGCT	I 类酶
EcoK			37°C	AACNNNNNNGTGC	I 类酶
EcoP I			37°C	AGACC	III 类酶
EcoR I ¹			37°C	($\frac{A}{G}$) ($\frac{A}{G}$) A↓T ($\frac{T}{C}$) ($\frac{T}{C}$)	blunt
EcoR I *			37°C	↓AATT	EcoR I
EcoR II	Atu I, Apy I	高	37°C	↓CC ($\frac{A}{T}$) GG	
Fnu4H I		低	37°C	GC↓NGC	
FnuD II	Tha I	低	37°C	CG↑CG	blunt
Hae I		低	37°C	($\frac{A}{T}$) GG↓CC ($\frac{T}{A}$)	blunt
Hae II		低	37°C	PuGCGC↓Py	
Hae III		中	37°C	GG↓CC	blunt
Hga I		中	37°C	GACGCNNNNN↓ CTGCGNNNNNNNNNN↑	
HgiA I		高	37°C	G ($\frac{T}{A}$) GC ($\frac{T}{A}$) ↓C	
Hha I	Cfo I	中	37°C	GCG↓C	
Hinc II		中	37°C	GTPy↓PuAC	blunt
Hind II		中	37°C	GTPy↓PuAC	blunt
Hind III		中	37-55°C	A↓AGCTT	
Hinf I		中	37°C	G↓ANTC	
Hpa I		低	37°C	GTT↓AAC	blunt
Hpa II		低	37°C	C↓CGG	Acc I, Acl I, Ase II, Cla I, Taq I
Hph I		低	37°C	GGTGANNNNNNN↓ CCACTNNNNNNN↑	
Kpn I		低	37°C	GGTAC↓C	
Mbo I	Sau3A	高	37°C	↓GATC	BamH I, Bcl I, Bgl II, Xho II
Mbo II		低	37°C	GAAGANNNNNNN↓ CTTCTNNNNNNN↑	
Mnl I		高	37°C	CCTCNNNNNNN↓	
Msp I		低	37°C	C↓CGG C↓C ^M GG	
Mst I			37°C	TGC↓GCA	blunt
Nco I		高	37°C	C↓CATGG	
Pst I		中	21-37°C	CTGCA↓G	

续表

酶	常见同裂酶	盐浓度 (1)	温度	识别顺序	匹配粘性末端
Pvu I	Xor II	高	37℃	CGAT ↓ CG	
Pvu II		中	37℃	CAG ↓ CTG	blunt
Rsa I		中	37℃	GT ↓ AC	blunt
Sac I	Sst I	低	37℃	GAGCT ↓ C	
Sac II		低	37℃	CCGC ↓ GG	
Sac III		高	37℃	ACGT	
Sal I		高	37℃	G ↓ TCGAC	Ava I, Xho I
Sau3A		中	37℃	↓ GATC G ^M ATC	BamH I, Bcl I, Bgl II, Mbo I, Xho II
Sau96 I		中	37℃	G ↓ GNCC	
Sca I		中	37℃	AGT ↓ ACT	blunt
Sin I		低	37℃	G ↓ G ($\frac{AT}{TA}$) CC	
Sma I	Xma I	(2)	37℃	CCC ↓ GGG	blunt
SnaB I		低	37℃	TAC ↑ GTA	
Sph I			37℃	GCATG ↓ C	
Sst I	Sac I	低	37℃	GAGCT ↓ C	
Sst II		低	37℃	CCGC ↓ GG	
Sst III		高	37℃	ACGT	
Taq I		低	65℃	T ↓ CGA	Acc I, Acl I, Asu II, Cla I, Hpa II
Tha I	FnuD II	低	60℃	CG ↓ CG	blunt
Tth111 I		中	67℃	GACN ↓ NNGTC	
Xba I		高	37℃	T ↓ CTAGA	
Xho I		高	37℃	C ↓ TCGAG	Ava I, Sal I
Xho II			37℃	($\frac{A}{G}$) ↓ GATC ($\frac{T}{C}$)	BamH I, Bcl I, Bgl II, Mbo I, Sau3A
Xma I	Sma I	低	37℃	C ↓ CCGGG	Ava I
Xma III			37℃	C ↓ GGCCG	
Xor II	Pvu I, Rsa I	低	37℃	CGATC ↓ G	

注:

(1) 各种限制性内切酶缓冲液常配制成 10 倍浓缩液。
根据各酶所需的盐浓度, 常配制高盐、中盐和低盐贮存液:

10 × 低盐缓冲液:

100mmol/L Tris·Cl (pH7.5)
100mmol/L MgCl₂
10mmol/L DTT

10 × 中盐缓冲液:

0.5mol/L NaCl
100mmol/L Tris·Cl (pH7.5)
100mmol/L MgCl₂
10mmol/L DTT

10 × 高盐缓冲液:

1mol/L NaCl
500mmol/L Tris·Cl (pH7.5)
100mmol/L MgCl₂
10mmol/L DTT

(2) Sma I 需要一种特别的酶切缓冲液。

10 × Sma I 缓冲液:

200mmol/L KCl
100mmol/L Tris·Cl (pH8.0)
100mmol/L MgCl₂
10mmol/L DTT

附录 2: 放射性核素数据

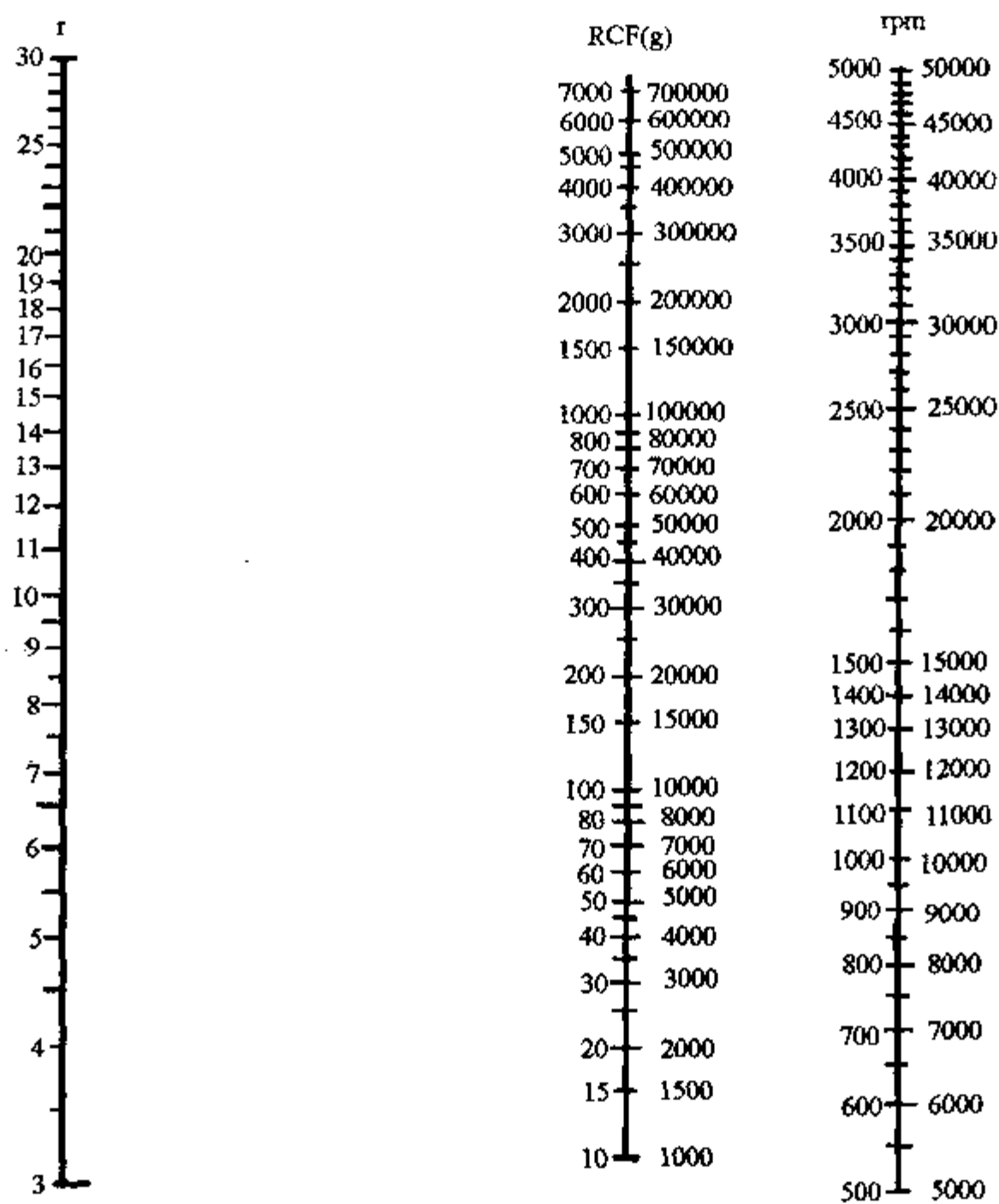
附表 2-1 放射性核素衰变表

^3H		^{35}S		^{32}P		^{125}I		^{131}I	
时间 (年)	剩余活性 (%)	时间 (天)	剩余活性 (%)	时间 (天)	剩余活性 (%)	时间 (天)	剩余活性 (%)	时间 (天)	剩余活性 (%)
1	94.5	2	98.4	1	95.3	4	95.5	0.2	98.3
2	89.3	5	96.1	2	90.8	8	91.2	0.4	96.6
3	84.4	10	92.3	3	86.5	12	87.1	0.6	95.0
4	79.8	15	88.7	4	82.5	16	83.1	1.0	91.8
5	75.4	20	85.3	5	78.5	20	79.4	1.6	87.2
6	71.3	25	82.0	6	74.8	24	75.8	2.3	81.2
7	67.4	31	78.1	7	71.2	28	72.4	3.1	76.7
8	63.7	37	74.5	8	67.8	32	69.1	4.0	71.0
9	60.2	43	71.0	9	64.7	36	66.0	5.0	65.2
10	56.9	50	67.0	10	61.2	40	63.0	6.1	59.3
11	53.8	57	63.6	11	58.7	44	60.2	7.3	53.4
12	50.9	65	59.6	12	55.9	48	57.4	8.1	50.0
12.3	50.0	73	56.0	13	53.2	52	54.8		
		81	52.5	14	50.7	56	52.4		
		87.1	50.0	14.3	50.0	60	50.0		

附表 2-2 放射性测定单位

单 位	定 义	换算
吸收放射线剂量 (拉得 rad)	100 尔格/克 (电离辐射传给单位质量物质的能量)	$0.87\text{rad} = 1\text{r}$
伦琴 (r)	使 1 克空气产生 1.6×10^{12} 离子对的 X 或 γ -射线的照射剂量	$\frac{\text{r}}{0.87} = 1\text{rad}$
居里 (Ci)	每秒放射性核衰变 3.7×10^{10} 个原子的量	$1\text{Ci} = 10^3\text{mCi}$ $= 10^6\mu\text{Ci}$
毫居 (mCi)	千分之一居里	$1\text{mCi} = 10^{-3}\text{Ci}$ $= 10^3\mu\text{Ci}$
微居 (μCi)	百万分之一居里 (每分钟衰变 2.2×10^6 次)	$1\mu\text{Ci} = 10^{-6}\text{Ci}$ $= 10^{-3}\text{mCi}$
伯克莱尔 (Bq)	每秒衰变 1 个原子的量	$1\text{Bq} = 3.7 \times 10^{-10}\text{Ci}$
千伯克莱尔 (kBq)		$1\text{kBq} = 10^3$
百万伯克莱尔 (MBq)		$1\text{MBq} = 10^6\text{Bq}$
兆伯克莱尔 (GBq)		$1\text{GBq} = 10^9\text{Bq}$
每分钟衰变数 (dpm)	每分钟衰变的原子数	$2.2 \times 10^6\text{dpm} = 1\mu\text{Ci}$
每分钟计数 (cpm)	测量仪测出每分钟 β 粒子数	$\text{cpm} = \text{dpm}$ $\times \text{计数器效率}$

附录 3: 离心机转速与离心力的换算



附图 3-1 离心机转速与离心力列线图

相对离心力 (RCF) 与离心机转速的换算公式为:

$$\text{RCF} = 1.119 \times 10^{-5} \times r \times (\text{r/min})^2$$

其中 RCF 为相对离心力, 以重力加速度的倍数 (g 或 $\times g$) 表示。r 为离心机转头半径, 或离心管中轴底部内壁到离心机转轴中心的距离 (单位 cm), r/min 为离心机每分钟转数。

附录 4: 核酸及蛋白质数据

附表 4-1 核苷三磷酸的物理常数

化合物	分子量	λ_{\max} (pH7.0)	1 摩尔溶液 (pH7.0) 中 λ_{\max} 时的最 大吸收值	OD280/OD260
ATP	507.2	259	15 400	0.15
CTP	483.2	271	9 000	0.97
GTP	523.2	253	13 700	0.66
UTP	484.2	262	10 000	0.38
dATP	491.2	259	15 200	0.15
dCTP	467.2	271	9 300	0.98
dGTP	507.2	253	13 700	0.66
dTTP	482.2	267	9 600	0.71

附表 4-2 常用核酸的长度与分子量

核 酸	核苷酸数	分子量
λ DNA	48 502 (双链环状)	3.0×10^7
pBR322	4 363 (双链)	2.8×10^6
28SrRNA	4 800	1.6×10^6
23SrRNA	3 700	1.2×10^6
18SrRNA	1 900	6.1×10^5
19SrRNA	1 700	5.5×10^5
5 SrRNA	120	3.6×10^4
tRNA (大肠杆菌)	75	2.5×10^4

附表 4-3 常用核酸蛋白换算数据

1. 重量换算:

$$1\mu\text{g} = 10^{-6}\text{g}$$

$$1\text{ng} = 10^{-9}\text{g}$$

$$1\text{pg} = 10^{-12}\text{g}$$

$$1\text{fg} = 10^{-15}\text{g}$$

2. 分光光度换算:

$$1\text{A}_{260} \text{ 双链 DNA} = 50\mu\text{g/ml}$$

$$1\text{A}_{260} \text{ 单链 DNA} = 33\mu\text{g/ml}$$

1A260 单链 RNA = 40 μ g/ml

3. DNA 摩尔换算:

1 μ g 1000bp DNA = 1.52pmol = 3.03pmol 末端

1 μ g pBR322 DNA = 0.36pmol

1pmol 1000bp DNA = 0.66 μ g

1pmol pBR322 = 2.8 μ g

1kb 双链 DNA (钠盐) = 6.6×10^5 道尔顿

1kb 单链 DNA (钠盐) = 3.3×10^5 道尔顿

1kb 单链 RNA (钠盐) = 3.4×10^5 道尔顿

脱氧核糖核苷的平均分子量 = 324.5 道尔顿

4. 蛋白摩尔换算:

100 μ mol 分子量 100 000 蛋白质 = 10 μ g

100 μ mol 分子量 50 000 蛋白质 = 5 μ g

100 μ mol 分子量 10 000 蛋白质 = 1 μ g

氨基酸的平均分子量 = 126.7 道尔顿

5. 蛋白质/DNA 换算

1kbDNA = 333 个氨基酸编码容量 = 3.7×10^4 MW 蛋白质

10 000MW 蛋白质 = 270bp DNA

30 000MW 蛋白质 = 810bp DNA

50 000MW 蛋白质 = 1.35kb DNA

100 000MW 蛋白质 = 2.7kb DNA

附表 4-4 常用 DNA 分子量标准参照物

λ DNA/Hind III	λ DNA/EcoR I	λ /Hind III + EcoR I	pBR322/Hae III	
23 130	21 226	21 227	587	123
9 416	7 421	5 148	405	104
6 557	5 804	4 973	504	89
4 361	5 643	4 268	458	80
2 322	4 843	3 530	434	64
2 027	3 530	2 027	267	57
564		1 904	234	51
125		1 584	213	21
		1 375	192	18
		974	184	11
		831	124	7
		564		
		125		

pBR322/Hinf I	$\phi\chi 174$ /Hinf I		$\phi\chi 174$ /Hae III	$\phi\chi 174$ /Taq I
1631	726	140	1353	2914
517	713	118	1078	1175
506	553	100	872	404
396	500	82	603	327
344	417	66	310	231
298	413	48	281	141
221	311	42	271	87
220	249	40	234	54
154	200	24	194	33
75	151		118	20
			72	

附表 4-5 遗传密码

密码子的第二位

		U	C	A	G		
密码子的第一位 (5'端)	U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U	密码子的第三位 (3'端)
		UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UCC Cys	C	
		UUA Leu	UCA Ser	UAA 终止 (赭石)	UGA 终止 (乳白)	A	
		UUG Leu	UCG Ser	UAG 终止 (琥珀)	UGG Trp	G	
	C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U	
		CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C	
		CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A	
		CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGC Arg	G	
	A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U	
		AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C	
		AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A	
		AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G	
	G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U	
		GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C	
		GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A	
		GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G	

附表 4-6 氨基酸的特性

氨基酸 名 称	三字母 记 号	单字母 记 号	质量	侧链电离 的 pH ₂ 值	结构
丙氨酸 (alanine)	Ala	A	89.09		$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 - \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
精氨酸 (arginine)	Arg	R	174.2	12.48	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} - \text{C}(\text{NH}_2) - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{H})(\text{NH}_3^+) - \text{COO}^- \end{array}$
天冬酰胺 (asparagine)	Asn	N	132.1		$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{H})(\text{NH}_3^+) - \text{COO}^- \\ \\ \text{O} \end{array}$
天冬氨酸 (aspartic acid)	Asp	D	133.1	3.86	$\begin{array}{c} -\text{O} \\ \\ \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{H})(\text{NH}_3^+) - \text{COO}^- \\ \\ \text{O} \end{array}$
半胱氨酸 (cysteine)	Cys	C	121.12		$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HS} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
谷氨酰胺 (glutamine)	Gln	Q	146.15		$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{H})(\text{NH}_3^+) - \text{COO}^- \\ \\ \text{O} \end{array}$
谷氨酸 (glutamic acid)	Glu	E	147.13	4.25	$\begin{array}{c} -\text{O} \\ \\ \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{H})(\text{NH}_3^+) - \text{COO}^- \\ \\ \text{O} \end{array}$
甘氨酸 (glycine)	Gly	G	75.07		$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
组氨酸 (histidine)	His	H	155.16	6.0	$\begin{array}{c} \text{HC} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{H})(\text{NH}_3^+) - \text{COO}^- \\ \quad \\ \text{HN}^+ \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \\ \\ \text{H} \end{array}$

续表

氨基酸 名称	三字母 记号	单字母 记号	质量	侧链电离 的 pH_0 值	结构
异亮氨酸 (isoleucine)	Ile	I	131.17		$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C}-\text{COO}^- \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$
亮氨酸 (leucine)	Leu	L	131.17		$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \diagup \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$
赖氨酸 (lysine)	Lys	K	146.19		$^+ \text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^-$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{NH}_3^+$
甲硫氨酸 (methionine)	Met	M	149.21		$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
苯丙氨酸 (phenylalanine)	Phe	F	165.19		$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
脯氨酸 (proline)	Pro	P	115.13		$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
丝氨酸 (serine)	Ser	S	105.06		$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
苏氨酸 (threonine)	Thr	T	119.12		$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{C}-\text{COO}^- \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$
色氨酸 (tryptophan)	Trp	W	204.22		$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}_8\text{H}_6\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \quad \\ \text{CH} \quad \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{H} \end{array}$

续表

氨基酸 名称	三字母 记号	单字母 记号	质量	侧链电离 的 pH_a 值	结构
酪氨酸 (tyrosine)	Tyr	Y	181.19	10.07	$ \begin{array}{c} \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} $
缬氨酸 (valine)	Val	V	117.15		$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \\ \text{CH}-\text{C}-\text{COO}^- \\ \diagup \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_3^+ \end{array} $

附表 4-7 常用蛋白质分子量标准参照物

高分子量标准参照:

蛋白质	分子量
肌球蛋白	212 000
β -半乳糖苷酶	116 000
磷酸化酶 B	97 400
牛血清白蛋白	66 200
过氧化氢酶	57 000
醛缩酶	40 000

中分子量标准参照:

蛋白质	分子量
磷酸化酶 B	97 400
牛血清白蛋白	66 200
谷氨酸脱氢酶	55 000
卵白蛋白	42 700
醛缩酶	40 000
碳酸酐酶	31 000
大豆胰蛋白酶抑制剂	21 500
溶菌酶	14 400

低分子量标准参照:

蛋白质	分子量
碳酸酐酶	31 000
大豆胰蛋白酶抑制剂	21 500
马心肌球蛋白	16 900
溶菌酶	14 400
肌球蛋白 (F_1)	8 100
肌球蛋白 (F_2)	6 200
肌球蛋白 (F_3)	2 500

附录5 分子克隆中使用的试剂与常用缓冲液的配制

(一) 常用缓冲液的 pKa 值

附表 5-1 常用缓冲液的 pKa 值

缓冲液	分子量	pKa 值	缓冲范围
Tris ^a	121.1	8.08	7.1~7.9
HEPES ^b	283.3	7.47	7.2~8.2
MOPS ^c	209.3	7.15	6.6~7.8
PIPES ^d	304.3	6.76	6.2~7.3
MES ^e	195.2	6.09	5.4~6.8

a. 三羟甲基氨基甲烷

b. N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸

c. 3-(N-吗啉代)丙磺酸

d. N, N'-双(2-乙磺酸)哌嗪

e. 2-(N-吗啉代)乙磺酸

附表 5-2 温度对常用缓冲液 pH 的影响

缓冲体系	pKa (20℃)	$\Delta pKa/10^\circ C$
Mes	6.15	-0.110
Ada	6.60	-0.110
Pipes	6.80	-0.085
Aces	6.90	-0.200
Bes	7.15	-0.160
Mops	7.20	-0.013
Tes	7.50	-0.200
Hepes	7.55	-0.014
Tricine	8.15	-0.210
Tris	8.30	-0.310
Bicine	8.35	-0.180
Glycylglycine	8.40	-0.280

(二) 各种 pH 值的 Tris 缓冲液的配制

附表 5-3 各种 pH 值的 Tris 缓冲液的配制

所需 pH 值 (25℃)	0.1mol/L HCl 的体积
7.10	45.7
7.20	44.7
7.30	43.4
7.40	42.0
7.50	40.3
7.60	38.5
7.70	36.6
7.80	34.5
7.90	32.0
8.00	29.2
8.10	26.2
8.20	22.9
8.30	19.9
8.40	17.2
8.50	14.7
8.60	12.4
8.70	10.3
8.80	8.5
8.90	7.0

某一特定 pH 的 0.05mol/L Tris 缓冲液的配制：将 50ml 0.1mol/L Tris 碱溶液与上表所示相应体积（单位：ml）的 0.1mol/L HCl 混合，加水将体积调至 100ml

附表 5-4 温度对 50mmol/L Tris·Cl 液 pH 值的影响

4℃	25℃	37℃
8.1	7.5	7.2
8.2	7.6	7.3
8.3	7.7	7.4
8.4	7.8	7.5
8.5	7.9	7.6
8.6	8.0	7.7
8.7	8.1	7.8
8.8	8.2	7.9
8.9	8.3	8.0
9.0	8.4	8.1
9.1	8.5	8.2
9.2	8.6	8.3
9.3	8.7	8.4
9.4	8.8	8.5

(三) 常见的市售酸碱的浓度

附表 5-5 常见的市售酸碱的浓度

溶质	分子式	分子量	mol/L	g/L	重量百分比	比重	配制 1mol/L 溶液的加入量 (ml/L)
冰乙酸	CH ₃ COOH	60.05	17.4	1045	99.5	1.05	57.5
乙酸		60.05	6.27	376	36	1.045	159.5
甲酸	HCOOH	46.02	23.4	1080	90	1.20	42.7
盐酸	HCl	36.5	11.6	424	36	1.18	86.2
			2.9	105	10	1.05	344.8
硝酸	HNO ₃	63.02	15.99	1008	71	1.42	62.5
			14.9	938	67	1.40	67.1
			13.3	837	61	1.37	75.2
高氯酸	HClO ₄	100.5	11.65	1172	70	1.67	85.8
			9.2	923	60	1.54	108.7
磷酸	H ₃ PO ₄	80.0	18.1	1445	85	1.70	55.2
硫酸	H ₂ SO ₄	98.1	18.0	1776	96	1.84	55.6
氢氧化铵	NH ₄ OH	35.0	14.8	251	28	0.898	67.6
氢氧化钾	KOH	56.1	13.5	757	50	1.52	74.1
			1.94	109	10	1.09	515.5
氢氧化钠	NaOH	40.0	19.1	763	50	1.53	52.4
			2.75	111	10	1.11	363.4

(四) 各种浓度的酸碱贮存液的近似 pH 值

附表 5-6 各种浓度的酸碱贮存液的近似 pH 值

溶 质	1N ^a	0.1N ^a	0.01N ^a	0.001N ^a
乙 酸	2.4	2.9	3.4	3.9
盐 酸	0.10	1.07	2.02	3.01
硫 酸	0.3	1.2	2.1	
柠 檬 酸		2.1	2.6	
氢氧化铵	11.8	11.3	10.8	10.3
氢氧化钠	14.05	13.07	12.12	11.13
碳酸氢钠		8.4		
碳酸钠		11.5	11.0	

a. N 为当量浓度 [1N = (1mol/L) × 离子价数]

(五) 分子克隆常用缓冲液

TE

pH7.4

10mmol/L Tris·Cl (pH7.4)

1mmol/L EDTA (pH8.0)

pH7.6

10mmol/L Tris·Cl (pH7.6)

1mmol/L EDTA (pH8.0)

pH8.0

10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

1mmol/L EDTA (pH8.0)

STE (亦称 TEN)

0.1mol/L NaCl

10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

1mmol/L EDTA (pH8.0)

STET

0.1mol/L NaCl

10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

1mmol/L EDTA (pH8.0)

5% Triton X-100

TNT

10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

150mmol/L NaCl

0.05% Tween 20

(六) 磷酸缓冲液

附表 5-7 25℃下 0.1mol/L 磷酸钾缓冲液的配制

pH	1mol/L K_2HPO_4 (ml)	1mol/L KH_2PO_4 (ml)
5.8	8.5	91.5
6.0	13.2	86.8
6.2	19.2	80.8
6.4	27.8	72.2
6.6	38.1	61.9
6.8	49.7	50.3
7.0	61.5	38.5
7.2	71.7	28.3
7.4	80.2	19.8
7.6	86.6	13.4
7.8	90.8	9.2
8.0	94.0	6.0

附表 5-8 25℃下 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液的配制

pH	1mol/L Na ₂ HPO ₄ (ml)	1mol/L NaH ₂ PO ₄ (ml)
5.8	7.9	92.1
6.0	12.0	88.0
6.2	17.8	82.2
6.4	25.5	74.5
6.6	35.2	64.8
6.8	46.3	53.7
7.0	57.7	42.3
7.2	68.4	31.6
7.4	77.4	22.6
7.6	84.5	15.5
7.8	89.6	10.4
8.0	93.2	6.8

用蒸馏水将混合的两种 1mol/L 贮存液稀释至 1000ml, 根据 Henderson-Hasselbalch 方程计算其 pH 值:

$$\text{pH} = \text{pK}' + \lg \left(\frac{[\text{质子受体}]}{[\text{质子供体}]} \right)$$

在此, $\text{pK}' = 6.86$ (25℃)。

(七) 电泳缓冲液

测序凝胶加样缓冲液

98% 去离子甲酰胺

10mmol/L EDTA (pH8.0)

0.025% 二甲苯青 FF

0.025% 溴酚蓝

甲酰胺: 许多批号的试剂级甲酰胺, 其纯度符合使用要求, 无须再进行处理。不过, 一旦略呈黄色, 则应在磁力搅拌器上将甲酰胺与 Dowex XG8 混合床树脂共同搅拌 1 小时进行去离子处理; 并用 Whatman 1 号滤纸过滤 2 次。去离子甲酰胺分装成小份, 充氮存于 -70℃。

附表 5-9 常用的电泳缓冲液

缓冲液	使用液	浓贮存液 (每升)
Tris-乙酸 (TAE)	1 × : 0.04mol/L Tris-乙酸	50 × : 242g Tris 碱
	0.001mol/L EDTA	57.1ml 冰乙酸
		100ml 0.5mol/L EDTA (pH8.0)
Tris-磷酸 (TPE)	1 × : 0.09mol/L Tris-磷酸	10 × : 108g Tris 碱
	0.002mol/L EDTA	15.5ml 85% 磷酸 (1.679g/ml)
		40ml 0.5mol/L EDTA (pH8.0)
Tris-硼酸 (TBE) ^a	0.5 × : 0.045mol/L Tris-硼酸	5 × : 54g Tris 碱

续表

缓冲液	使用液	浓贮存液 (每升)
	0.001mol/L EDTA	27.5g 硼酸
		20ml 0.5mol/L EDTA (pH8.0)
碱性缓冲液 ^b	1×: 50mmol/L NaOH	1×: 5ml 10mol NaOH
	1mmol/L EDTA	2ml 0.5mol/L EDTA (pH8.0)
Tris-甘氨酸 ^c	1×: 25mmol Tris	5×: 15.1g Tris 碱
	250ml/L 甘氨酸	94g 甘氨酸 (电泳级) (pH8.3)
	0.1% SDS	50ml 10% SDS (电泳级)

a. TBE 浓溶液长时间存放后会形成沉淀物, 为避免这一问题, 可在室温下用玻璃瓶保存 5× 溶液, 出现沉淀后则予以废弃。

以往都以 1×TBE 作为使用液 (即 1:5 稀释浓贮存液) 进行琼脂糖凝胶电泳。但 0.5× 的使用液已具备足够的缓冲容量。目前几乎所有的琼脂糖凝胶电泳都以 1:10 稀释的贮存液作为使用液。

进行聚丙烯酰胺凝胶电泳使用的 1×TBE, 是琼脂糖凝胶电泳时使用液浓度的 2 倍。聚丙烯酰胺凝胶垂直槽的缓冲液槽较小, 故通过缓冲液的电流通常较大, 需要使用 1×TBE 以提供足够的缓冲容量。

b. 碱性电泳缓冲液应现用现配。

c. Tris-甘氨酸缓冲液用于 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

2×SDS 凝胶加样缓冲液:

100mmol/L Tris·HCl (6.8)

200mmol 二硫苏糖醇 (DTT)

4% SDS (电泳级)

0.2% 溴酚蓝

20% 甘油

不含二硫苏糖醇 (DTT) 的 2×SDS 凝胶加样缓冲液可保存于室温, 应在临用前取 1mol/L 二硫苏糖醇贮存液现加于上述缓冲液中。

附表 5-10 凝胶加样缓冲液

缓冲液类型	6× 缓冲液	贮存温度
I	0.25% 溴酚蓝	4℃
	0.25% 二甲苯青 FF	
	40% (W/V) 蔗糖水溶液	
II	0.25% 溴酚蓝	室温
	0.25% 二甲苯青 FF	
	15% 聚蔗糖 (Ficoll400)	
III	0.25% 溴酚蓝	4℃
	0.25% 二甲苯青 FF	
	30% 甘油水溶液	
IV	0.25% 溴酚蓝	4℃
	40% (W/V) 蔗糖水溶液	
碱性加样缓冲液:		

续表

缓冲液类型	6 × 缓冲液	贮存温度
V	300mmol/L NaOH	4℃
	6mmol/L EDTA	
	18% 聚蔗糖 (Ficoll400)	
	0.15% 溴甲酚绿	
	0.25% 二甲苯青 FF	

使用以上凝胶加样缓冲液的目的有三：增大样品密度，以确保 DNA 均匀进入样品孔内，使样品呈现颜色，从而使加样操作更为便利，含有在电场中能以可预知速率向阳极泳动的染料。溴酚蓝在琼脂糖凝胶中移动的速率约为二甲苯青 FF 的 2.2 倍，而与琼脂糖浓度无关。以 0.5 × TBE 作电泳液时，溴酚蓝在琼脂糖中的泳动速率约与长 300bp 的双链线状 DNA 相同，而二甲苯青 FF 的泳动则与长 4kb 的双链线状 DNA 相同。在琼脂糖浓度为 0.5% ~ 1.4% 的范围内，这些对应关系受凝胶浓度变化的影响并不显著。

选用哪一种加样染料纯属个人喜恶。但是，对于碱性凝胶应当使用溴甲酚绿作为示踪染料，因为在碱性 pH 条件下其显色较溴酚蓝更为鲜明。

附表 5-11 染料在非变性聚丙烯酰胺凝胶中的迁移速度

凝胶浓度 (%)	溴酚蓝	二甲苯青 FF
3.5	100bp	460bp
5.0	65bp	260bp
8.0	45bp	160bp
12.0	20bp	70bp
15.0	15bp	60bp
20.0	12bp	45bp

附表 5-12 染料在变性聚丙烯酰胺凝胶中的迁移速度

凝胶浓度 (%)	溴酚蓝	二甲苯青 FF
5.0	35bp	140bp
6.0	26bp	106bp
8.0	19bp	75bp
10.0	12bp	55bp
20.0	8bp	28bp

附表 5-13 琼脂糖凝胶浓度与线性 DNA 分辨范围

凝胶浓度 (%)	线性 DNA 长度 (bp)
0.5	1 000 ~ 30 000
0.7	800 ~ 12 000
1.0	500 ~ 10 000
1.2	400 ~ 7 000
1.5	200 ~ 3 000
2.0	50 ~ 2 000

附录 6: 常用贮存液的配制

附表 6-1 常用贮存液的配制

溶 液	配 制 方 法	说 明
30%丙烯酰胺	将 29g 丙烯酰胺和 1g N, N'-亚甲双丙烯酰胺溶于总体积为 60ml 的水中。加热至 37℃ 溶解之, 补加水至终体积为 100ml。用 Nalgene 滤器 (0.45μm 孔径) 过滤除菌, 查证该溶液的 pH 值应不大于 7.0, 置棕色瓶中保存于室温	<p>注意: 丙烯酰胺具有很强的神经毒性并可通过皮肤吸收, 其作用具累积性。称量丙烯酰胺和亚甲双丙烯酰胺时应戴手套和面具。可认为聚丙烯酰胺无毒, 但也应谨慎操作, 因为它还可能会含有少量未聚合材料。</p> <p>一些价格较低的丙烯酰胺和双丙烯酰胺通常含有一些金属离子, 在丙烯酰胺贮存液中加入大约 0.2 体积的单床混合树脂 (MB-1 Mallinckrodt), 搅拌过夜, 然后用 Whatman 1 号滤纸过滤以纯化之。</p> <p>在贮存期间, 丙烯酰胺和双丙烯酰胺会缓慢转化成丙烯酸和双丙烯酸。</p>
40%丙烯酰胺	把 380g 丙烯酰胺 (DNA 测序级) 和 20g N, N'-亚甲双丙烯酰胺溶于总体积为 600ml 的蒸馏水中。继续按上述配制 30% 丙烯酰胺溶液的方法处理, 但加热溶解后应以蒸馏水补足至终体积为 1L	见上述配制 30% 丙烯酰胺的说明, 40% 丙烯酰胺溶液用于 DNA 序列测定
放线菌素 D	把 20mg 放线菌素 D 溶解于 4ml 100% 乙醇中, 1:10 稀释贮存液, 用 100% 乙醇作空白对照读取 OD ₄₄₀ 值。放线菌素 D (分子量为 1255) 纯品在水溶液中的摩尔消光系数为 21 900, 故而 1mg/ml 的放线菌素 D 溶液在 440nm 处的吸光值为 0.182, 放线菌素 D 的贮存液应放在包有锡片的试管中, 保存于 -20℃	<p>注意: 放线菌素 D 是致畸剂和致癌剂, 配制该溶液时必须戴手套并在化学通风橱内操作, 而不能在开放的实验桌面上进行, 谨防吸入药粉或让其接触到眼睛或皮肤。</p> <p>药厂提供的作治疗用途的放线菌素 D 制品常含有糖或盐等添加剂。只要通过测量贮存液在 440nm 波长处的光吸收确定放线菌素 D 的浓度, 这类制品便可用于抑制自身引导作用。</p>
0.1mol/L 腺苷三磷酸 (ATP)	在 0.8ml 水中溶解 60mg ATP, 用 0.1mol/L NaOH 调 pH 值至 7.0, 用蒸馏水定容至 1ml, 分装成小份保存于 -70℃	
10mol/L 乙酸铵	把 770g 乙酸铵溶解于 800ml 水中。加水定容至 1L 后过滤除菌	
10% 过硫酸铵	把 1g 过硫酸铵溶解于终容量为 10ml 的水溶液中, 该溶液可在 4℃ 保存数周	

续表

溶 液	配 制 方 法	说 明															
BCIP	把 0.5g 的 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸二钠盐 (BCIP) 溶解于 10ml 100% 的二甲基甲酰胺中, 保存于 4℃																
2 × BES 缓冲 盐溶液	用总体积 90ml 的蒸馏水溶解 1.07g BES [N, N-双 (2-羟乙基) -2-氨基乙磺酸]、1.6g NaCl 和 0.027g Na ₂ HPO ₄ , 室温下用 HCl 调节该溶液的 pH 值至 6.96, 然后加入蒸馏水定容至 100ml, 用 0.22μm 滤器过滤除菌, 分装成小份, 保存于 -20℃																
1mol/L CaCl ₂	在 200ml 纯水中溶解 54g CaCl ₂ · 6H ₂ O, 用 0.22μm 滤器过滤除菌, 分装成 10ml 小份贮存于 -20℃。	制备感受态细胞时, 取出一小份解冻并用纯水稀释至 100ml, 用 Nalgene 滤器 (0.45μm 孔径) 过滤除菌, 然后骤冷至 0℃															
2.5mol/L CaCl ₂	在 20ml 蒸馏水中溶解 13.5g CaCl ₂ · 6H ₂ O, 用 0.22μm 滤器过滤除菌, 分装成 1ml 小份贮存于 -20℃																
1mol/L 二硫 苏糖醇 (DTT)	用 20ml 0.01mol/L 乙酸钠溶液 (pH5.2) 溶解 3.09g DTT, 过滤除菌后分装成 1ml 小份贮存于 -20℃	DTT 或含有 DTT 的溶液不能进行高压处理															
脱氧核苷三磷酸 (dNTP)	<p>把每一种 dNTP 溶解于水至浓度各为 100mmol/L 左右, 用微量移液器吸取 0.05mol/L Tris 碱分别调节每一 dNTP 溶液的 pH 值至 7.0 (用 pH 试纸检测), 把中和后的每种 dNTP 溶液各取一份作适当稀释, 在下表中给出的波长下读取光密度计算出每种 dNTP 的实际浓度, 然后用水稀释成终浓度为 50mmol/L 的 dNTP, 分装成小份贮存于 -70℃</p> <table> <tr> <th>碱基</th><th>波长 (nm)</th><th>消光系数 (ε) [L/ (mol·cm)]</th></tr> <tr> <td>A</td><td>259</td><td>1.54 × 10⁴</td></tr> <tr> <td>G</td><td>253</td><td>1.37 × 10⁴</td></tr> <tr> <td>C</td><td>271</td><td>9.10 × 10³</td></tr> <tr> <td>T</td><td>260</td><td>7.40 × 10³</td></tr> </table> <p>比色杯光径为 1cm 时, 吸光度 = εM</p>	碱基	波长 (nm)	消光系数 (ε) [L/ (mol·cm)]	A	259	1.54 × 10 ⁴	G	253	1.37 × 10 ⁴	C	271	9.10 × 10 ³	T	260	7.40 × 10 ³	
碱基	波长 (nm)	消光系数 (ε) [L/ (mol·cm)]															
A	259	1.54 × 10 ⁴															
G	253	1.37 × 10 ⁴															
C	271	9.10 × 10 ³															
T	260	7.40 × 10 ³															
0.5mol/L EDTA (pH8.0)	在 800ml 水中加入 186.1g 二水乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-Na·2H ₂ O), 在磁力搅拌器上剧烈搅拌, 用 NaOH 调节溶液的 pH 值至 8.0 (约需 20g NaOH 颗粒) 然后定容至 1L, 分装后高压灭菌备用	EDTA 二钠盐需加入 NaOH 将溶液的 pH 值调至接近 8.0 时, 才能完全溶解															

续表

溶 液	配 制 方 法	说 明
溴化乙锭 (10mg/ml)	在 100ml 水中加入 1g 溴化乙锭, 磁力搅拌数小时以确保其完全溶解, 然后用铝箔包裹容器或转移至棕色瓶中, 保存于室温	注意: 溴化乙锭是强诱变剂并有中度毒性, 使用含有这种染料的溶液时务必戴上手套, 称量染料时要戴面罩
2 × HEPES 缓冲盐溶液	用总量为 90ml 的蒸馏水溶解 1.6g NaCl、0.074g KCl、0.027g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.2g 葡聚糖和 1g HEPES, 用 0.5mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.05, 再用蒸馏水定容至 100ml。用 0.22 μm 滤器过滤除菌, 分装成 5ml 小份, 贮存于 -20℃	
IPTG	IPTG 为异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (分子量为 238.3), 在 8ml 蒸馏水中溶解 2g IPTG 后, 用蒸馏水定容至 10ml, 用 0.22 μm 滤器过滤除菌, 分装成 1ml 小份贮存于 -20℃	
1mol/L 乙酸镁	在 800ml 水中溶解 214.46g 四水乙酸镁, 用水定容至 1L 过滤除菌	
1mol/L MgCl_2	在 800ml 水中溶解 203.3g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 用水定容至 1L, 分装成小份并高压灭菌备用	MgCl_2 极易潮解, 应选购小瓶 (如 100g) 试剂, 启用新瓶后勿长期存放
β -巯基乙醇 (BME)	一般得到的是 14.4mol/L 溶液, 应装在棕色瓶中保存于 4℃	BME 或含有 BME 的溶液不能高压处理
NBT	把 0.5g 氯化氮蓝四唑溶解于 10ml 70% 的二甲基甲酰胺中, 保存于 4℃	
酚/氯仿	把酚和氯仿等体积混合后用 0.1mol/L Tris·Cl (pH7.6) 抽提几次以平衡这一混合物, 置棕色玻璃瓶中, 上面覆盖等体积的 0.01mol/L Tris·Cl (pH7.6) 液层, 保存于 4℃	注意: 酚腐蚀性很强, 并可引起严重灼伤, 操作时应戴手套及防护镜, 穿防护服。所有操作均应在化学通风橱中进行。与酚接触过的部位皮肤应用大量的水清洗, 并用肥皂和水洗涤, 忌用乙醇
10mmol/L 苯 甲基磺酰氟 (PMSF)	用异丙醇溶解 PMSF 成 1.74mg/ml (10mmol/L), 分装成小份贮存于 -20℃。如有必要可配成浓度高达 17.4mg/ml 的贮存液 (100mmol/L)	注意: PMSF 严重损害呼吸道粘膜、眼睛及皮肤, 吸入、吞进或通过皮肤吸收后有致命危险。一旦眼睛或皮肤接触了 PMSF, 应立即用大量水冲洗之。凡被 PMSF 污染的衣服应予丢弃 PMSF 在水溶液中不稳定。应在使用前从贮存液中现用现加于裂解缓冲液中。PMSF 在水溶液中的活性丧失速率随 pH 值的升高而加快, 且 25℃ 的失活速率高于 4℃。pH 值为 8.0 时, 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 PMSF 水溶液的半衰期大约为 85 分钟。这表明将 PMSF 溶液调节为碱性 (pH > 8.6) 并在室温放置数小时后, 可安全地予以丢弃

续表

溶 液	配 制 方 法	说 明								
磷酸盐缓冲溶液 (PBS)	在 800ml 蒸馏水中溶解 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na ₂ HPO ₄ 和 0.24g KH ₂ PO ₄ ，用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4，加水定容至 1L，在 15 lb/in ² (1.034 × 10 ⁵ Pa) 高压下蒸气灭菌 20 分钟。保存于室温									
1mol/L 乙酸钾 (pH7.5)	将 9.82g 乙酸钾溶解于 90ml 纯水中，用 2mol/L 乙酸调节 pH 值至 7.5 后加入纯水定容到 1L，保存于 -20℃									
乙酸钾溶液 (用于碱裂解)	在 60ml 5mol/L 乙酸钾溶液中加入 11.5ml 冰乙酸和 28.5ml 水，即成钾浓度为 3mol/L 而乙酸根浓度为 5mol/L 的溶液									
3mol/L 乙酸钠 (pH5.2 和 pH7.0)	在 800ml 水中溶解 408.1g 三水乙酸钠，用冰乙酸调节 pH 值至 5.2 或用稀乙酸调节 pH 值至 7.0，加水定容到 1L，分装后高压灭菌									
5mol/L NaCl	在 800ml 水中溶解 292.2g NaCl 加水定容至 1L，分装后高压灭菌									
10% 十二烷基硫酸钠 (SDS)	在 900ml 水中溶解 100g 电泳级 SDS，加热至 68℃助溶，加入几滴浓盐酸调节溶液的 pH 值至 7.2，加水定容至 1L，分装备用	SDS 的微细晶粒易于扩散，因此称量时要戴面罩，称量完毕后要清除残留在称量工作区和天平上的 SDS，10% SDS 溶液无须灭菌								
20 × SSC	在 800ml 水中溶解 175.3g NaCl 和 88.2g 柠檬酸钠，加入数滴 10mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0，加水定容至 1L，分装后高压灭菌									
20 × SSPE	在 800ml 水中溶解 175.3g NaCl，27.6g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O 和 7.4g EDTA，用 NaOH 溶液调节 pH 值至 7.4 (约需 6.5ml 10mol/L NaOH)，加水定容至 1L，分装后高压灭菌									
100% 三氯乙酸	在装有 500g TCA 的瓶中加入 227ml 水，形成的溶液含有 100% (W/V) TCA									
1mol/L Tris	在 800ml 水中溶解 121.91g Tris 碱，加入浓 HCl 调节 pH 值至所需值 <table><tr><td>pH</td><td>HCl</td></tr><tr><td>7.4</td><td>70ml</td></tr><tr><td>7.6</td><td>60ml</td></tr><tr><td>8.0</td><td>42ml</td></tr></table> 应使溶液冷至室温后方可最后测定 pH 值，加水定容至 1L，分装后高压灭菌	pH	HCl	7.4	70ml	7.6	60ml	8.0	42ml	如 1mol/L 溶液呈现黄色，应予丢弃并置备质量更好的 Tris 尽管多种类型的电极均不能准确测量 Tris 溶液的 pH 值，但仍可向大多数厂商购得合适的电极 Tris 溶液的 pH 值因温度而异，温度每升高 1℃，pH 值大约降低 0.03 个单位。例如：0.05mol/L 的溶液在 5℃、25℃和 37℃时的 pH 值分别为 9.5、8.9 和 8.6
pH	HCl									
7.4	70ml									
7.6	60ml									
8.0	42ml									

续表

溶 液	配 制 方 法	说 明
Tris 缓冲盐溶液 (TBS) (25mmol/L Tris)	在 800ml 蒸馏水中溶解 8g NaCl、0.2g KCl 和 3g Tris 碱、加入 0.015g 酚红并用 HCl 调 pH 值至 7.4, 用蒸馏水定容至 1L, 分装后在 15 lb/in ² (1.034×10^5 Pa) 高压下蒸气灭菌 20 分钟, 于室温保存	
X-gal	X-gal 为 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷。用二甲基甲酰胺溶解 X-gal 配制成 20mg/ml 的贮存液。保存于一玻璃管或聚丙烯管中, 装有 X-gal 溶液的试管须用铝箔封裹以防因受光照而被破坏, 并应贮存于 -20℃。X-gal 溶液无须过滤除菌	

附表 6-2 杂交试验中用于降低背景的封闭剂

试剂	用途
Denhardt 试剂	Northern 杂交 使用 RNA 探针的杂交 单拷贝序列的 Southern 杂交 将 DNA 固定于尼龙膜上的杂交
<p>Denhardt 试剂通常配制 50×贮存液, 过滤后保存于 -20℃。可将该贮存液 10 倍稀释于预杂交液 (常为含有 0.5% SDS 和 100μg/ml 经变性被打断的鲑精 DNA 的 6×SSC 或 6×SSPE) 中。50×Denhardt 液中含 5g 聚蔗糖 (Ficoll, 400 型, Pharmacia)、5g 聚乙烯吡咯烷酮和 5g 牛血清白蛋白 (组分 V, Sigma), 加水至终体积为 500ml</p>	
BLOTTO	Grunstein-Hogness 杂交 Benton-Davis 杂交 除单拷贝序列 Southern 杂交以外的所有 Southern 杂交 斑点印迹
<p>1×BLOTTO (牛乳转移技术优化液, Bovine Lacto Transfer Technique Optimizer, 是含 5% 脱脂奶粉和 0.02% 叠氮钠的水溶液, 应保存于 4℃。使用前可用预杂交液稀释 25 倍。BLOTTO 不应与高浓度的 SDS 并用, 因为后者会导致牛奶中的蛋白质析出。如果杂交背景不合要求, 可在杂交液中加入 NP-40 至终浓度为 1%。BLOTTO 不能用作 Northern 杂交的封闭剂, 因为这一封闭剂中可能含有 RNA 酶, 其活性之高使人无法接受</p> <p>注意: 叠氮钠有毒性, 取用时需戴手套小心操作。含叠氮钠的溶液应予明确标记</p>	
肝素	Southern 杂交 原位杂交
<p>肝素 (Sigma H-7005, 从猪中提取的二级产品或相当等级的产品) 用 4×SSPE 或 4×SSC 溶解配制成 50mg/ml 的浓度, 保存于 4℃。肝素在含有葡聚糖硫酸脂的杂交液中用作封闭剂的浓度为 500μg/ml, 在不含葡聚糖硫酸脂的杂交液中的浓度为 50μg/ml</p>	
经变性并被打断的鲑精 DNA	Southern 和 Northern 杂交
<p>把鲑精 DNA (Sigma, III, 钠盐) 溶解于水配制成 10mg/ml 的浓度, 必要时于室温磁力搅拌 2~4 小时助溶。把溶液中 NaCl 的浓度调至 0.1mol/L, 并用酚和酚/氯仿各抽提一次, 回收水相。使 DNA 溶液快速通过 17 号皮下注射针头 12 次, 以剪切 DNA。加入 2 倍体积用冰预冷的乙醇沉淀 DNA。离心回收 DNA 并重溶于水, 配制成 10mg/ml 的浓度, 测定溶液的 OD₂₆₀ 值并计算出精确的 DNA 浓度, 然后煮沸 10 分钟, 分装成小份保存于 -20℃。使用前置沸水浴中加热 5 分钟, 然后迅速在冰浴中骤冷。预杂交液中应含有 100μg/ml 经变性并被打断的鲑精 DNA</p>	

附录 7: 常用酶的配制

(一) 溶菌酶

用水配制成 50mg/ml 的溶菌酶溶液, 分装成小份并保存于 -20°C 。每一小份一经使用后便予丢弃。

(二) 蛋白水解酶

附表 7-1 蛋白水解酶类

贮存液	贮存温度	反应浓度	反应缓冲液	温度	预处理
链霉菌蛋白酶 ^a			0.01mol/L Tris (pH7.8)		
20mg/ml	-20°C	1mg/ml	0.01mol/L EDTA	37°C	自消化 ^b
(溶于水)		0.5% SDS			
蛋白酶 K ^c			0.01mol/L Tris (pH7.8)		
20mg/ml	-20°C	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.005mol/L EDTA	$37 \sim 56^{\circ}\text{C}$	无须预处理
(溶于水)		0.5% SDS			

a. 链霉菌蛋白酶是从链球菌 (*Streptomyces griseus*) 中分离到的一种丝氨酸蛋白酶和酸性蛋白酶的混合物。

b. 自消化可消除 DNA 酶和 RNA 酶的污染, 经自消化的链霉菌蛋白酶的配制方法如下: 把该酶的粉末溶解于 10mmol/L Tris·Cl (pH7.5)、10mmol/L NaCl 中, 配成 20mg/ml 浓度, 于 37°C 温育 1 小时。经自消化的链霉菌蛋白酶分装成小份放在密封试管中, 保存于 -20°C 。

c. 蛋白酶 K 是一种枯草蛋白酶类的高活性蛋白酶, 从林伯白色念珠菌 (*Tritirachium album Limber*) 中纯化得到。该酶有两个 Ca^{2+} 结合位点, 它们离酶的活性中心有一定距离, 与催化机理并无直接关系。然而, 如果从该酶中除去 Ca^{2+} , 由于出现远程的结构变化, 催化活性将丧失 80% 左右, 但其剩余活性通常已足以降解在一般情况下污染核酸制品的蛋白质。所以, 蛋白酶 K 消化过程中通常加入 EDTA (以抑制依赖于 Mg^{2+} 的核酸酶的作用)。但是, 如果要消化对蛋白酶 K 具有较强耐受性的蛋白, 如角蛋白一类, 则可能需要使用含有 1mmol/L Ca^{2+} 而不含 EDTA 的缓冲液。在消化完毕后、纯化核酸前要加入 EGTA (pH8.0) 至终浓度为 2mmol/L, 以螯合 Ca^{2+} 。

(三) 无 DNA 酶的 RNA 酶

将胰 RNA 酶 (RNA 酶 A) 溶于 10mmol/L Tris·Cl (pH7.5)、15mmol/L NaCl 中, 配成 10mg/ml 的浓度, 于 100°C 加热 15 分钟, 缓慢冷却至室温, 分装成小份保存于 -20°C 。

(四) 无 RNA 酶的 DNA 酶

自未受到感染的哺乳动物细胞中制备的 mRNA 只含有少量 DNA, 并不妨碍 Northern 杂交或其他类型的 RNA 分析。然而从转染的哺乳动物细胞或 DNA 病毒感染的细胞中制备的 mRNA 则污染有大量 DNA, 必须用 DNA 酶 I 消化。但遗憾的是许多市售的胰 DNA 酶 I 制剂, 甚至作为无 RNA 酶试剂出售的制剂, 都被其量可观的 RNA 酶所污染。另外, 如要制备许多样品, 使用市售无 RNA 酶的 DNA 酶 I 也不经济。下面介绍能去除 DNA 酶 I 中污染的 RNA 酶的 3 种方法。经这些方法纯化的 DNA 酶 I 总应与 RNA 酶的某种蛋白质抑制剂同时使用。

1. 在琼脂糖-5'-(4-氨基苯磷酸)尿苷-2'(3')-磷酸上进行亲和层析

- 1) 把 10ml 琼脂糖-5'-(4-氨基苯磷酸)尿苷-2'(3')-磷酸悬浮于 100ml 0.02mol/L 的乙酸钠 (pH5.2) 中, 静置让琼脂糖下沉, 然后倾去清液并重复上述操作。用灭菌的硅烷化玻璃棉封堵一次性使用的 25ml 注射器的底部, 填装层析柱。
- 2) 在 1ml 0.02mol/L 乙酸钠 (pH5.2) 中溶解 20mg 胰 DNA 酶 I。
- 3) 把 DNA 酶 I 溶液加样于柱上, 并于室温下 0.02mol/L 乙酸量 (Hp5.2) 洗脱。用无 RNA 酶的试管收集样品, 每管 1ml, 直至所有在 280nm 波长处有吸收的物质均被洗脱。
- 4) 收集在 280nm 处有吸收的组分, 读取 OD_{280} 。假定 OD_{280} 为 1 的溶液含有 1mg/ml 的蛋白质, 计算出样品的蛋白质含量。加入 1mol/L $CaCl_2$ 至终浓度为 5mmol/L, 将样品分装成小份保存于 $-20^{\circ}C$ 。

2. Macaloid 吸附法

Macaloid 是一种粘土, 可吸附 RNA 酶。

(1) 制备

- 1) 把 0.5g Macaloid 粉末悬浮于 50ml 经灭菌的 50mmol/L Tris·Cl (pH7.6) 中。于 $100^{\circ}C$ 加热并持续搅拌 5 分钟。
- 2) 于室温以 2500g 离心 5 分钟。
- 3) 弃上清, 把带粘性的沉淀彻底重悬于 40ml 无菌的 50mmol/L Tris·Cl (pH7.6) 中。
- 4) 重复步骤 2)、3) 两次。
- 5) 于室温下以 3500g 将悬浮液离心 15 分钟。
- 6) 将沉淀物重悬于 30ml 无菌的 50mmol/L Tris·Cl (pH7.6) 中, Macaloid 的最终浓度大约为 17mg/ml, 悬液可在 $4^{\circ}C$ 长期保存。

(2) 使用

按下述步骤应用 Macaloid 悬液去除 DNA 酶 I 中污染的 RNA 酶活性。

- 1) 把 100mg 胰 DNA 酶 I 溶解于 5ml 下述溶液中:

20mmol/L Tris·Cl (pH7.6)

50mmol/L NaCl

1mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT)

100 μ g/ml 牛血清白蛋白 (组分 V) (可加不可加)

50% 甘油

- 2) 加入 15ml 用冰预冷的 50mmol/L Tris·Cl (pH7.6), 轻轻混匀。
- 3) 加入 7ml 用冰预冷的、分散均匀的 Macaloid 悬液, 于 $4^{\circ}C$ 混合 30 分钟。
- 4) 于 $4^{\circ}C$ 以 8000g 离心 10 分钟, 把上清液倒入另一离心管中。
- 5) 再取 7ml Macaloid 悬液, 混匀。
- 6) 于 $4^{\circ}C$ 以 12000g 离心 15 分钟。
- 7) 小心地移出上清液, 与等体积的用冰预冷的无菌甘油轻轻混匀。
- 8) 分装成小份, 保存于 $-20^{\circ}C$ 。

[注]

- 1) 在最终溶液中 DNA 酶 I 的浓度大约为 1.5mg/ml。
- 2) 在微量离心管中用 Macaloid 可处理更小体积的 DNA 酶 I 溶液。

3. 在碘乙酸盐存在下加热处理

下述方法可使 DNA 酶制剂中的 RNA 酶活性降低约 98%。所得 DNA 酶制剂除了要求特别严格的用途外都可采用。然而, 举例而言, 从要建立 cDNA 文库的 RNA 中去除 DNA 时不应采用本法。

- 1) 将 10mg 胰 DNA 酶 I 溶解于 10ml 0.1mol/L 碘乙酸、0.15mol/L 乙酸钠 (pH5.2) 中。
- 2) 于 $55^{\circ}C$ 加热 45 分钟, 待溶液冷却至 $0^{\circ}C$, 加 1mol/L $CaCl_2$ 至终浓度为 5mmol/L。
- 3) 把 DNA 酶 I 溶液分成小份, 保存于 $-20^{\circ}C$ 。

附录 8: 常用层析数据

附表 8-1 常用离子交换纤维素

性 质	离子交换剂	游离基团	结 构
阴 离 子 交 换 剂	中等碱性	AE	氨基乙基 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
	强碱性	DEAE	二乙基氨基乙基 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
		TEAE	三乙基氨基乙基 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$
		GE	胍基乙基 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$
	弱碱性	PAB	对氨基苯甲基 $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2$
	中等碱性	ECTEOA DBD BND PEL	三乙醇胺经甘油和多聚甘油偶联于纤维素的混合基团 (混合胺类) 苯甲基化的 DEAE 纤维素 苯甲基化萘酚化的 DEAE 纤维素 聚乙烯亚胺吸附于纤维素或较弱磷酸化的纤维素
阳 离 子 交 换 剂	弱酸性	CW	羧甲基 $-\text{CH}_2\text{COOH}$
	中等酸性	P	磷酸 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{P}-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$
	强酸性	SE	磺酸乙基 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$
		SP	磺酸丙基 $-\text{C}_3\text{H}_6\text{SO}_3\text{H}$
	强碱性	QAE	二乙基(2-羟丙基)季胺 $\begin{array}{c} -\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2 \\ \\ \text{CH}_2\text{CHCH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$

附表 8-2 葡聚糖凝胶的某些技术数据

种 类	干颗粒直径 (μm)	分子量分级范围		床体积 毫升/克 干分子筛	得水值	溶胀最少 平衡时间 (h)		柱头压力 (cmH_2O)
		肽及球形 蛋白质	葡聚糖 (线性分子)			室温	沸水浴	
Sephadex G-10	40~120	~700	~700	2~3	1.0 ± 0.1	3	1	
Sephadex G-15	40~120	~1 500	~1 500	2.5~3.5	1.5 ± 3.5	3	1	
Sephadex G-25								
粗级	100~300 ($\approx 5 \sim 100$ 目)							
中级	50~150 ($\approx 100 \sim 200$ 目)	1 000~ 5 000	100~ 5 000	4~6	1.5 ± 0.2	6	2	
细级	20~800 ($\approx 200 \sim 400$ 目)							
超细	10~40							
Sephadex G-50								
粗级	100~200							
中级	50~150	1 500~	500~	9~11	5.0 ± 0.3	6	2	
细级	20~80	30 000	10 000					
超细	10~40							
Sephadex G-75								
	40~120	3 000~	1 000~	12~15	7.5 ± 0.5	24	3	40~160
超细	10~40	70 000	50 000					
Sephadex G-100								
	40~120	4 000~	1 000~	15~20	10.0 ± 1.0	48	5	24~96
超细	10~40	1 500 000	150 000					
Sephadex G-150								
	40~120	5 000~	1 000~	20~30	15.0 ± 1.5	72	5	9~36
超细	10~40	400 000	150 000	18~22				
Sephadex G-200								
	40~120	5 000~	1 000~	30~40	30.0 ± 2.0	72	5	4~16
	10~40	800 000	200 000	20~25				

附表 8-3 聚丙烯酰胺凝胶的技术数据

型 号	排阻的下限	分级分离范围	膨胀后的床体积 (ml/g 干凝胶)	膨胀所需最少时间 (室温, 小时)
Bio-gel-P-2	1 600	200~ 2 000	3.8	2~4
Bio-gel-P-4	3 600	500~ 4 000	5.8	2~4
Bio-gel-P-6	4 600	1 000~ 5 000	8.8	2~4
Bio-gel-P-10	10 000	5 000~ 17 000	12.4	2~4
Bio-gel-P-30	30 000	20 000~ 50 000	14.9	10~12
Bio-gel-P-60	60 000	30 000~ 100 000	19.0	10~12
Bio-gel-P-100	100 000	40 000~ 100 000	19.0	24
Bio-gel-P-150	150 000	50 000~ 150 000	24.0	24
Bio-gel-P-200	200 000	80 000~ 200 000	34.0	48
Bio-gel-P-300	300 000	100 000~ 400 000	40.0	48

附表 8-4 琼脂糖凝胶的技术数据

型 号	琼脂糖含量 % (W/W)	排阻的下限 (分子量)	分级分离的范围 (分子量)	生产厂家
Sephacrose 4B	4		$0.3 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$	Pharmacia
Sephacrose 2B	2		$2 \times 10^6 \sim 25 \times 10^6$	
Sagavac 10	10	2.5×10^6	$1 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^5$	Seravac
Sagavac 8	8	7×10^5	$2.5 \times 10^4 \sim 7 \times 10^5$	
Sagavac 6	6	2×10^6	$5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$	
Sagavac 4	4	15×10^6	$2 \times 10^4 \sim 15 \times 10^6$	
Sagavac 2	2	150×10^6	$5 \times 10^5 \sim 15 \times 10^7$	
Bio-gel A-0.5M	10	0.5×10^6	$< 1 \times 10^4 \sim 0.5 \times 10^6$	Bio-Rad
Bio-gel A-1.5M	8	1.5×10^6	$< 1 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^6$	
Bio-gel A-5M	6	5×10^6	$1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$	
Bio-gel A-15M	4	15×10^6	$4 \times 10^4 \sim 15 \times 10^6$	
Bio-gel A-50M	2	50×10^6	$1 \times 10^5 \sim 50 \times 10^6$	
Bio-gel A-150M	1	150×10^6	$1 \times 10^6 \sim 150 \times 10^6$	

附表 8-5 各种凝胶所允许的最大操作压

凝 胶	最大静水压 (cmH ₂ O)
Sephadex	
G-10	100
G-15	100
G-25	100
G-50	100
G-75	50
G-100	35
G-150	15
G-200	10
Bio-gel	
P-2	100
P-4	100
P-6	100
P-10	100
P-30	100
P-60	100
P-100	60
P-150	30
P-200	20
P-300	15
Sephacrose	
2B	1 (每厘米凝胶浓度)
4B	1 (同上)
Bio-Gel	
A-0.5M	100
A-1.5M	100
A-5M	100
A-15M	90
A-50M	50
A-150M	30

附录 9: 细菌培养基、抗生素和菌株

(一) 液体培养基

(一) LB 培养基 (Luria - Bertani 培养基)

细菌培养用胰化蛋白胨 (bacto - tryptone)	10g
细菌培养用酵母提取物 (bacto - yeast extract)	5g
NaCl	10g
加去离子水至 800ml	

搅拌, 使溶质完全溶解, 用 5mol/L NaOH (约 0.2ml) 调节 pH 值至 7.4, 加入去离子水至总体积为 1L, 15 lb/in² (1.034 × 10⁵ Pa) 高压蒸气灭菌 20 分钟。

(二) NZCYM 培养基

NZ 胺 (酪蛋白酶促水解物)	10g
NaCl	5g
细菌培养用酵母提取物 (bacto - yeast extract)	5g
酪蛋白氨基酸 (casamino acid)	1g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2g
加去离子水至 800ml	

搅拌, 使溶质完全溶解, 用 5mol/L NaOH (约 0.2ml) 调节 pH 值至 7.4, 加入去离子水至总体积为 1L, 15 lb/in² (1.034 × 10⁵ Pa) 高压蒸气灭菌 20 分钟。

(三) NZYM 培养基

除不含酪蛋白氨基酸外, 其他成分与 NZCYM 培养基相同。

(四) NZM 培养基

除不含酵母提取物外, 其他成分与 NZYM 培养基相同。

(五) 高浓度肉汤

细菌培养用胰化蛋白胨 (bacto - tryptone)	12g
细菌培养用酵母提取物 (bacto - yeast extract)	24g
甘油	4ml
加去离子水至 800ml	

搅拌, 使溶质完全溶解, 15 lb/in² (1.034 × 10⁵ Pa) 高压蒸气灭菌 20 分钟, 冷却至 60℃ 或 60℃ 以下, 再加入 100ml 经灭菌的 0.17mol/L KH₂PO₄、0.72mol/L K₂HPO₄ 溶液 [该磷酸盐缓冲液的配制方法如下: 在 90ml 的去离子水中溶解 2.31g KH₂PO₄ 和 12.54g K₂HPO₄, 然后加入去离子水至总体积为 100ml, 15 lb/in² (1.034 × 10⁵ Pa) 高压蒸气灭菌 20 分钟]。

(六) SOB 培养基

细菌培养用胰化蛋白胨 (bacto - tryptone)	20g
-------------------------------	-----

细菌培养用酵母提取物 (bacto - yeast extract)	5g
NaCl	0.5g

加去离子水至 800ml

搅拌, 使溶质完全溶解, 然后加入 10ml 250mmol/L KCl 溶液, 用 5mol/L NaOH, (约 0.2ml) 调节溶液的 pH 值至 7.4, 然后加入去离子水至总体积为 1L, 15 lbf/in² (1.034×10^5 Pa) 高压蒸气灭菌 20 分钟。

该溶液在使用前加入 5ml 经灭菌的 2mol/L MgCl₂ 溶液 [2mol/L MgCl₂ 溶液的配制方法如下, 在 90ml 去离子水中溶解 19g MgCl₂, 然后加入去离子水至总体积为 100ml, 15 lbf/in² (1.034×10^5 Pa) 高压蒸气灭菌 20 分钟]。

(七) SOC 培养基

SOC 培养基除含有 20mmol/L 葡萄糖外, 其余成分与 SOB 培养基相同。SOB 培养基经高压灭菌后, 冷却至 60℃ 或 60℃ 以下, 然后加入 20ml 经除菌的 1mol/L 葡萄糖溶液。(1mol/L 葡萄糖溶液的配制方法如下, 在 90ml 的去离子水中溶解 18g 葡萄糖, 待糖完全溶解后, 加入去离子水至总体积为 100ml, 然后用 0.22μm 滤膜过滤除菌。)

(八) 2×YT 培养基

细菌培养用胰化蛋白胨 (bacto - tryptone)	16g
细菌培养用酵母提取物 (bacto - yeast extract)	10g
NaCl	5g

加水至 800ml

搅拌, 使溶质完全溶解, 用 5mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.4, 加入去离子水至总体积为 1L, 15 lbf/in² (1.034×10^5 Pa) 高压蒸气灭菌 20 分钟。

(九) M₆ 培养基

Na ₂ HPO ₄	6g
KH ₂ PO ₄	3g
NaCl	0.5g
NH ₄ Cl	1g

加水至 800ml

搅拌, 使溶质充分溶解, 调节 pH 值至 7.4, 加去离子水至总体积的 1L, 15 lbf/in² (1.034×10^5 Pa) 高压蒸气灭菌 20 分钟。待冷却后, 分别加入经除菌的下列溶液:

1mol/L MgCl ₂	2ml
20% 葡萄糖	10ml
1mol/L CaCl ₂	0.1ml

以上溶液需分别配制。葡萄糖溶液不可高压蒸气灭菌, 需用 0.22μm 滤膜过滤除菌。

(十) M₆CA 培养基

除含 2.0g/L 酪蛋白氨基酸 (casamino acid) 外, 其余成分与 M₆ 培养基相同。

(十一) X1776 培养基

细菌培养用胰化蛋白胨 (bacto - tryptone)	25g
细菌培养用酵母提取物 (bacto - yeast extract)	7.5g
1mol/L Tris·Cl (pH7.5)	20ml

加去离子水至 800ml

搅拌, 使溶质充分溶解, 加去离子水至总体积为 1L, 15 lb/in² (1.034×10^5 Pa) 高压蒸气灭菌 20 分钟。然后分别加入灭菌的下列溶液:

1mol/L MgCl ₂	5ml
1% diaminopimelic acid	10ml
0.4% 胸腺嘧啶核苷	10ml
20% 葡萄糖	25ml

除 MgCl₂ 溶液外, 其它溶液不可高压灭菌, 需用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌。

(二) 含有琼脂或琼脂糖的培养基

在液体培养基中加入下列试剂中的一种:

细菌培养用琼脂 (bacto - agar)	15g/L (铺制平板用)
细菌培养用琼脂 (bacto - agar)	7g/L (配制顶层琼脂用)
琼脂糖	15g/L (铺制平板用)
琼脂糖	7g/L (配制顶层琼脂糖用)

15 lb/in² (1.034×10^5 Pa) 高压灭菌 20 分钟。溶液尚未冷却时, 即应取出培养基, 并轻轻转动以使融解的琼脂或琼脂糖能均匀分布于整个培养基溶液中。必需小心, 此时培养基溶液可能过热, 旋动液体会发生爆沸。冷却至 50℃ 后, 方可加入不耐热的物质 (如抗生素)。为避免产生气泡, 混匀培养基时应采取旋动的方式, 然后可直接从烧瓶中倾出培养基铺制平板。90mm 直径的培养皿约需 30~50ml 培养基。

培养基完全凝固后, 应倒置平皿并贮存于 4℃ 备用。使用前 1~2 小时应取出贮存的平皿。如果平板是新鲜制备的, 在 37℃ 温育时会“发汗”, 便会导致细菌克隆或噬菌体噬斑在平板表面交互扩散而增加交叉污染的机会。为了避免这一问题, 可以拭去平皿内部的冷凝水并把平皿倒置于 37℃ 温育数小时方予使用, 也可快速甩一下平皿盖以除去冷凝水。为尽可能减少污染的机会, 除去盖上的水滴时应把开盖的平皿倒置握在手上。

(三) 保存培养基

细菌在穿刺培养物中可保存 2 年之久, 在含甘油的培养物中可无限期保存。

(一) 穿刺培养物

在 2~3ml 带有螺口旋盖和橡皮垫圈的玻璃试管中, 加入约 2/3 容量的融化 LB 琼脂, 旋上盖子, 但并不拧紧, 15 lb/in² (1.034×10^5 Pa) 高压蒸气灭菌 20 分钟。冷却至室温后拧紧盖子。置室温保存备用。

保存细菌时, 用一灭菌的接种针挑取分散良好的单菌落, 把针穿过琼脂直达瓶底数次, 盖上瓶盖并拧紧, 在瓶身和瓶盖上均作好标记, 室温下存放于暗处。或将瓶盖拧松, 37℃ 培养过夜, 然后拧紧瓶盖, 于室温或 4℃ 避光保存。

(二) 含甘油的培养物

1. 在液体培养基中生长的细菌培养物

在细菌培养物中加入终浓度为 15% 的灭菌甘油, 振荡培养物使甘油分布均匀, 然后小量分装于带有螺口和空气密封圈的保存管内, 在乙醇-干冰或液氮中冻结后转至 -70℃ 长期保存。

复苏菌种时, 用灭菌的接种针刮拭冻结的培养物表面, 然后立即把粘附在接种针上的细菌划于含适当抗生素的 LB 琼脂平板表面。菌种管重新置于 -70℃ 保存, 琼脂平板于 37℃ 培养过夜。

2. 在琼脂平板上生长的细菌培养物

在琼脂平板表面刮下细菌放入装有 2ml LB 的无菌试管内, 再加入等量的含有 30% 灭菌甘油的 LB 培养基。振荡混合物使甘油完全分布均匀后, 分装于带有螺口盖和空气密封圈的无菌试管中, 按上述方法冰冻保存。

(四) 抗生素

附表 9-1 抗生素溶液

抗 生 素	贮 存 液 ^a		工作浓度	
	浓度	保存条件	严紧型质粒	松弛型质粒
氨苄青霉素	50mg/ml (溶于水)	-20℃	20μg/ml	60μg/ml
羧苄青霉素	50mg/ml (溶于水)	-20℃	20μg/ml	60μg/ml
氯霉素	34mg/ml (溶于乙醇)	-20℃	25μg/ml	170μg/ml
卡那霉素	10mg/ml (溶于水)	-20℃	10μg/ml	50μg/ml
链霉素	10mg/ml (溶于水)	-20℃	10μg/ml	50μg/ml
四环素 ^b	5mg/ml (溶于乙醇)	-20℃	10μg/ml	50μg/ml

a. 以水为溶剂的抗生素贮存液应通过 0.22μm 滤器过滤除菌。以乙醇为溶剂的抗生素溶液无须除菌处理。所有抗生素溶液均应放于不透光的容器中保存。

b. 镁离子是四环素的拮抗剂，四环素抗性菌的筛选应使用不含镁盐的培养基（如 LB 培养基）。

(五) 用于 λ 噬菌体操作的溶液

(一) 麦芽糖

20% 的麦芽糖无菌贮存液的制备方法如下：

麦芽糖 20g

加水至 100ml

使用 0.22μm 滤器过滤除菌，将无菌溶液保存于室温。

麦芽糖是编码 λ 噬菌体受体的基因 (lamB) 的诱导物，培养用于铺制 λ 噬菌体平板的细菌时，通常在每 100ml 培养基中加入 1ml 20% 的无菌麦芽糖溶液。

(二) SM

NaCl 5.8g

MgSO₄·7H₂O 2g

1mol/L Tris·Cl (pH7.5) 50ml

2% 明胶溶液 5ml

加水至 1L

15 lb/in² (1.034 × 10⁵ Pa) 高压蒸气灭菌 20 分钟，冷却后分成 50ml 小份，贮存于无菌容器中，置室温保存。此溶液用于 λ 噬菌体原种的保存和稀释。

2% 明胶溶液的配制：把 2g 明胶溶于终体积为 100ml 的水中，在 15 lb/in² (1.034 × 10⁵ Pa) 高压蒸气灭菌 20 分钟。

(三) TM

1mol/L Tris·Cl (pH7.5) 50ml

MgSO₄·7H₂O 2g

加水至 1L

15 lbf/in² (1.034 × 10⁵ Pa) 高压蒸气灭菌 20 分钟, 冷却后分成 50ml 小份, 贮存于无菌容器中。置室温下保存。

(四) λ 噬菌体稀释液

1mol/L Tris·Cl (pH7.5) 10ml
MgSO₄·7H₂O 2g
加水至 1L

15 lbf/in² (1.034 × 10⁵ Pa) 高压蒸气灭菌 20 分钟, 冷却后分成 50ml 小份, 贮存于无菌容器中。室温下保存。

对于长期保存的 λ 噬菌体原种, 尤其是经过 CsCl 纯化的噬菌体, 可稀释液中加入 50mmol/L NaCl 和 0.01% 明胶。

(六) 细菌菌株一览表

附表 9-2 细菌菌株

菌 株	基 因 型	说 明
71/18	supE _{thi} Δ (lac - proAB) F' [proAB ⁺ lac I ^q lacZΔM15]	用于培养噬菌体的一种菌株。可高水平地产生 lac 阻抑物, 并对 lac 启动子调控下的基因进行可诱导的表达。该菌株可用于检测表达 β-半乳糖苷酶融合蛋白的重组体
BB4	supF58supE44hsdR514 galK2galT22trpR55 metB1tonAΔlacU169 F' [proAB ⁺ lac I ^q lacZΔM15Tn10 (tet ^r)]	用于培养 λZAP 和其他一些 λ 噬菌体的 recA ⁺ 菌株, 该株的 F' 因子有 lacZΔM15, 后者能与 λZAP 编码的 β-半乳糖苷酶氨基端实现 α 互补。由于具备该 F' 因子, 因此可用 M13 辅助噬菌体进行超感染, 而超感染是把重组 λZAP 转变为 pBluescript 质粒的必要步骤
BHB2688	[N205recA (λimm434cIts2 red Eam Sam/λ)]	是一种 λ 噬菌体溶源菌, 用于制备包装提取物
BHB2690	[N205recA (λimm434cIts2 red Dam Sam/λ)]	是一种 λ 噬菌体溶源菌, 用于制备包装提取物
BL21 (DE3)	hsdSgal (λc I ts857indl Sam7 nin5 lacUV5 - T7 基因 1)	该菌株用于高效表达克隆于含有 T7 噬菌体启动子的表达载体的基因。T7 噬菌体 RNA 聚合酶位于 λ 噬菌体 DE3 区, 该区整合于 BL21 的染色体上
BMH71 - 18 mutS	thi supE Δ (lac - proAB) [mutS::Tn10] [F' proAB lacI ^q ZM15]	大肠杆菌的错配修复突变株, 使新合成的 DNA 链获得高突变率, 亦可用于蓝/白斑筛选
BNN102 (C600hflA)	supE44hsdR thi - 1 thr - 1 leuB6 lacY1 tonA21 hflA150 [chr::Tn10 (tet ^r)]	是用于挑选 λgt10 重组体的一种 hflA 菌株。其高频溶源化突变可抑制 cI ⁺ 噬菌体的噬斑形成, 但允许 cI ⁻ 的重组噬菌体形成噬斑
C - la	一种野生型菌株	是在基本培养基上留存多年的野生型大肠杆菌 C 株的一个克隆, 而大肠杆菌 C 株是 F ⁻ 株, 作为宿主它缺失限制和修饰活性。本菌株是用于 λ 噬体琥珀突变体互补试验的一种非抑制型宿主菌
C600 (BNN93)	supE44 hsdR thi - 1 thr - 1 leuB6 lacY1 tpnA21	常用于制备裂解物及增殖 λgt10 的抑制型菌株
CES200	sbcB15 recB21 recC22 hsdR	一种用于培养 Spi ⁻ 噬菌体的菌株
CES201	recA sbcB15 recB21 recC22 hsdR	一种用于培养 Spi ⁻ 噬菌体的重组缺陷型菌株

续表

菌 株	基 因 型	说 明
CJ236	dut ⁻ ung ⁻ thi - 1 relA1 /pCJ105 (cam ^r F')	定点诱变实验中用于制备含尿嘧啶的 DNA 的 dut ⁻ ung ⁻ 菌株。pCJ105 有 F' 和 cam ^r , 培养 CJ236 时, 可加氯霉素作为保留 F' 的选择压力
CSH18	supE thi Δ (lac - pro) F' (proAB ⁺ lacZ ⁻)	一种用于筛选在 λ 噬菌体载体中所构建的重组体的抑制型菌株, 而所用载体在填充片段中带有 lacZ 基因。这类载体在含有生色底物 X-gal 的培养基上能产生蓝色噬斑, 而当噬菌体中的填充片段为外源 DNA 所取代后, 则产生白色噬斑
DH1	supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyr A96 thi - 1 relA1	用于铺制平板及培养质粒和粘粒的重组缺陷的抑制型菌株
DH5	supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi - 1 relA1	用于铺制平板及培养质粒和粘粒的重组缺陷的抑制型菌株。该菌株的转化效率高于 DH1
DH5α	supE44ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi - 1 relA1	一种用于铺制与培养质粒平板和粘粒平板的抑制型菌株。其 φ80lacZΔM15 基因的产物可与 pUC 载体编码的 β-半乳糖苷酶氨基端实现 α 互补
Dp50supF	supE44supF58 hsdS3 (r _B ⁻ m _B ⁻) dapD8 lac Y1 glnV44Δ (gal - uvrB) 47 tyrT58 gyrA29 tonA53Δ (thyA57)	一种用于分离和增殖 λ 噬菌体重组体的菌株
ED8654	supEsupFhsdRmetB lac Y gal trpR	一种通常用于增殖 λ 噬菌体载体及其重组体的抑制型菌株
ED8767	supE44 supF58 hsdS3 (r _B ⁻ m _B ⁻) recA56 galK2 gal T 22 metB1	一种用于增殖 λ 噬菌体载体的重组缺陷的抑制型菌株
HB101	supE44 hsdS20 (r _B ⁻ m _B ⁻) recA13 ara - 14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl - 5 mtl - 1	一种通常用于大规模制备质粒的抑制型菌株, 它是一种转化率很高的大肠杆菌 K12 × 大肠杆菌 B 的杂交菌株
HMS174	recA1 hsdR rif ^r	一种重组缺陷的非抑制型菌株, 用于高效表达克隆在带有 T7 噬菌体启动子的表达载体上的基因, 可通过带有 T7 噬菌体基因 1 的 λ 噬菌体感染该菌来提供 T7 噬菌体 RNA 聚合酶
JM101	supE thi Δ (lac - proAB) F' [traD36 proAB ⁺ lac I ^q lacZΔM15]	一种可支持带有琥珀突变的载体生长的宿主菌
JM103	endA1 hsdR supE sbcB15 thi - 1 strA Δ (lac - proAB) [F' traD36 proAB lacI ^q ZΔM15]	JM101 的无限制活性突变株, 用于增殖 M13 噬菌体重组体。但某些菌种已发生了突变, 现已不主张使用。可用 KK2186 代替
JM105	supE endAsbcB15hsdR4 rpsL thi Δ (lac - proAB) F' [traD36 proAB ⁺ lac I ^q lacZΔM15]	一种支持带有琥珀突变的载体生长的宿主菌, 对转染的 DNA 有修饰作用而无限制作用

续表

菌 株	基 因 型	说 明
JM106	supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ (lac - proAB)	除不带 F'附加体外, 与 JM107 相同, 用于增殖质粒, 不支持 M13 噬菌体的生长
JM107	supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ (lac - proAB) F' [traD36 proAB lac I ^q lacZ Δ M15]	一种支持带有琥珀突变的载体生长的宿主菌, 对转染的 DNA 有修饰作用而无限制作用
JM108	F ⁻ endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 (r _k ⁻ , m _k ⁺) relA1 supE44 Δ (lac - proAB)	除不带 F'附加体外, 与 JM109 相同, 可用于质粒增殖, 不支持 M13 噬菌体的生长
JM109	recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyr A96 relA1 thi Δ (lac - proAB) F' [traD36 proAB ⁺ lac I ^q lacZ Δ M15]	一种支持带有琥珀突变的载体生长的重组缺陷的抑制型菌株, 对转染的 DNA 有修饰作用而无限制作用
JM109 (DE3)	endA1 recA1gyrA96 thi hsdR17 (r _k ⁻ , m _k ⁺) relA1 supE44 Δ (lac - proAB) [F' traD36 proAB lag1 ^q Z Δ M15] γ (DE3)	JM109 的衍生株, 含 T7RNA 聚合酶基因。用于克隆入 pGEMEX TM -1 或 pGEMEX-2 等含 T7 启动子的质粒中的基因的高效表达
JM110	dam dcm supE44 hsdR17 thi leu rpsL lacY galK galT ara tonA thr tsx Δ (lac - proAB) F' [traD36 proAB ⁺ lac I ^q lacZ Δ M15]	一种不修饰 Bcl I 位点的菌株, 能支持带有琥珀突变的载体生长
K802	supE hsdR gal metB	一种用于增殖 λ 噬菌体载体及其重组体的抑制型菌株
KK2186	supEabcB15 hsdR4 rpsL thi Δ (lac - proAB) F' [traD36proAB ⁺ lac I ^q lacZ Δ M15]	一种支持带有琥珀突变的载体生长的宿主菌, 对转染的 DNA 有修饰作用而无限制作用
KW251	F ⁻ supE44 galK2 galT22 metB1 hsdR2 mcrB1 mcrA [argA81:Tn10] recD1014	用于基因文库克隆。某些真核基因克隆在 LE392 等菌株中不生长, 可试用此菌株。含甲基化胞嘧啶的基因组 DNA 克隆亦可在此菌株中扩增
LE392	supE44 supF58 hsdR514 galK2 galT22 metB1 trpR55 lacY1	一种通常用于增殖 λ 噬菌体载体及其重组体的抑制型菌株。LE392 是 ED8654 的衍生株
LG90	Δ (lac - proAB)	一种 lacZ 缺失的菌株, 用于检测表达 β -半乳糖苷酶融合蛋白的重组体的菌株

续表

菌株	基因型	说明
M5219	<i>lacZ</i> r _p A rpsL (λ bio252 cI ts857 Δ H1)	一种对克隆在 λ 噬菌体 P _L 启动子下游的基因进行可调型表达的菌株, 它含有编码 λ 噬菌体 cI ts857 阻抑物和 N 蛋白的缺陷型 λ 原噬菌体, N 蛋白是一个转录终止的拮抗物
MB408	<i>recF recB21 recC22</i> <i>sbcB15 hflA hflB</i> <i>hsdR (tet^r)</i>	重组缺陷菌株。可用于含迴文序列的稳定增殖。可用于 λ gt10 等 cI 插入载体的筛选。无限制活性, 修饰阳性, 四环素抗性
MBM7014.5	<i>hsdR2 mcrB1 zjj202::Tn10 (tet^r)</i> <i>araD139 araCU25arnΔlacU169</i>	一种用于在 λ ORF8 中建立一级文库的 <i>mcrB</i> 菌株。用于构建文库的 DNA 先用甲基化酶处理以保护 Hind III 和 BamHI 位点。用 M. Alu I 甲基化酶保护 Hind III 位点是由于没有 M. Hind III 甲基化酶的商品供应, 该菌株中识别 Alu I 甲基化位点的限制系统缺损
MC1061	<i>hsdRmcrBaraD139</i> Δ (<i>ara ABC-leu</i>) 7679 Δ <i>lacX74galU galK rpsL thi</i>	一种用于在 λ ORF8 中建立一级文库的 <i>mcrB</i> 菌株。参见 MBM7014.5 菌株的说明
MM294	<i>supF44 hsdR endA1 pro thi</i>	一种用于大规模制备质粒的抑制型菌株, 转化效率高
MV1184	<i>araΔ (lac-proAB) rpsL</i> <i>thi (ϕ80 lacZΔM15)</i> Δ (<i>srl-recA</i>) 306::Tn10 (<i>tet^r</i>) F' [<i>traD36 proAB⁺</i> <i>lac I^q lacZΔM15</i>]	一种重组缺陷的菌株, 用于增殖 pUC118/pUC119 噬菌粒并取得单链噬菌粒的菌株
MV1193	Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>rpsL thi</i> <i>endA spcB15 hsdR4</i> Δ (<i>srl-recA</i>) 306::Tn10 (<i>tet^r</i>) F' [<i>traD36 proAB⁺</i> <i>lac I^q lacZΔM15</i>]	一种重组缺陷的菌株, 用于增殖 pUC118/pUC119 噬菌粒并取得单链噬菌粒的菌株
MZ-1	<i>galK Δ8attL ΔBamN₇N₅₃</i> <i>cI ts857ΔH1 his</i> <i>ilv bio N⁺</i>	一种温度敏感的溶源性菌株, 用作含有 λ 噬菌体 P _L 启动子的质粒的宿主菌
NM522	<i>supE thi Δ (lac-proAB)</i> Δ <i>hsd5 (r⁻:m⁻) F'</i> [<i>proAB lac I^q ZΔM15</i>]	用于 pGEM 等单链 DNA 体系的扩增
NM531	<i>supE supF hsdR trpR</i> <i>lac Y recA13 metB gal</i>	一种重组缺陷的抑制型菌株, 用于增殖 λ 噬菌体载体
NM538	<i>supF hsdR trpR lacY</i>	一种用于分析和增殖 λ 噬菌体的菌株
NM539	<i>supF hsdR lacY (P2cox)</i>	一种用于选择 Spi ⁻ 噬菌体的菌株, 为 NM538 的衍生菌株
Q358	<i>sup E hsd R ϕ80^r</i>	一种 <i>supE</i> 宿主菌, 用于 λ 噬菌体载体的培养
Q359	<i>sup E hsd R ϕ80^r P2</i>	一种 <i>supE</i> 宿主菌, 用于选择 Spi ⁻ 重组体
R594	<i>galK2 galT22 rpsL179 lac⁻</i>	一种非抑制型菌株, 用作含有琥珀突变或赭石突变的载体的非许可性宿主菌
RB791	W3110 <i>lac I^q L8</i>	一种高水平地产生 <i>lac</i> 阻抑物的菌株, 用于 <i>lac</i> 和 <i>tac</i> 启动子控制下基因的可诱导型表达
RR1	<i>sup E44 hsdS20 (r_B⁻ m_B⁻)</i> <i>ara-14 proA2 lacY1 galK2</i> <i>rpsL20 xyl-5 trnI-1</i>	是 HB101 的 <i>recA⁺</i> 衍生株, 转化率高

续表

菌 株	基 因 型	说 明
SMR10	大肠杆菌 C (λ cos2 Δ B xis1 red3 gamarn210 c I ts857 nin5 Sam7/ λ)	一种 λ 噬菌体溶源菌, 用于制备包装提取物
TAP90	supE44 supF58 hsdR pro leuB thi - 1 rps L lacY1 tonA1 recD1903::mini - tet	一种用于制备高滴度 λ 噬菌体裂解物的菌株, 这种限制系统缺陷的 supE supF 菌株在 recD 区插入了一个 mini - tet 片段以促进 $\text{Spi}^- \lambda$ 噬菌体的生长
TG1	supE hsd Δ 5 thi Δ (lac - proAB) F' [traD36 proAB ⁺ lac I ^q lac Z Δ M15]	JM101 的 EcoK ⁻ 衍生株, 对转染的 DNA 既无修饰作用也无限制作用, 它能支持带有琥珀突变的载体生长
TG2	supE hsd Δ 5 thi Δ (lac - proAB) Δ (arl - recA) 306::Tn10 (tet ^r) F' [traD36 proAB ⁺ lac I ^q lacZ Δ M15]	TG1 的一种重组缺陷的衍生株
X1776	tonA 53 dapD8 minA1 glnV44 (supE44) Δ (gal - uvrB) 40 min 82 rib - 2 gyrA25 thyA142 oms - 2 meto65 oms - 1 (tte - 1) Δ (bioH - asd) 29 cyc 82 cycA1 hsdR2	主要用于某些质粒的宿主菌, 转化效率较高。但现已不被推荐使用
XL1 - Blue	supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac ⁻ F' [proAB ⁺ lac I ^q lacZ Δ M15 Tn10 (tet ^r)]	一种重组缺陷的菌株, 可支持带有琥珀突变的载体生长但不支持带有 Sam100 突变的载体 (如 λ ZAP) 的生长, 对转染的 DNA 有修饰作用但无限制作用, 该菌株可用于增殖在 BB4 菌株中不稳定的 λ ZAR II 重组体, 该菌株的 F' 容许利用 X - gal 进行蓝 - 白斑筛选并容许 M13 噬菌体超感染
XS101	recA1 hsdR rpoB331 F' [kan]	一种对转染的 DNA 有修饰作用但无限制作用的重组缺陷的菌株, 它带有一个附加体, 后者可产生卡那霉素抗性, 该菌株可用于噬菌粒的生长
XS127	gyrA thi rpoB331 Δ (lac - proAB) argE F' [traD36 proAB ⁺ lac I ^q lacZ Δ M15]	一种用于培养噬菌粒的菌株
Y1089	araD139 Δ lac U169 proA ⁺ Δ lon rpsL hflA150 [chr::Tn10 (tet ^r)] pMC9	一种用于通过 λ gt11 和 λ gt18-23 的重组体来生产蛋白质的菌株, 由来自带有 lac I ^q 的 pMC9 所产生的高水平的 lac 阻抑物控制外源蛋白的表达。Y1089 是 lon 蛋白酶缺陷型, 故可增加外源蛋白的稳定性。在该菌株中形成溶源菌的频率很高
Y1090hsdR	supF hsdR araD139 Δ lon Δ lacU169 rpsL trpC22::Tn10 (tet ^r) pMC9	一种用于表达文库的免疫学筛选和 λ gt11 和 λ gt18-23 的增殖的菌株。由带有 lac I ^q 的 pMC9 高水平地产生 lac 阻抑物控制外源蛋白质的表达, 在开始形成噬斑数小时后加入 IPTG 可检出对大肠杆菌有毒性作用的蛋白质。某些蛋白质在大肠杆菌中不稳定, 本菌株由于 lon 蛋白酶缺陷, 可提高待用抗体筛选的抗原的稳定性。其 supF 标记可抑制 Sam100 而使细胞能发生裂解
YK537	supE44 hsdR hsdM recA1 phoA8 leuB6 thi lacY rpsL20 galK2 ara - 14 xyl - 5 mtl - 1	一种重组缺陷的抑制型菌株, 用于对克隆于 phoA 启动子下游的基因进行可调型表达

(七) 常见大肠杆菌菌株遗传标记

附表 9-3 大肠杆菌遗传标记

符 号	说 明	作 用
ara-14	阿拉伯糖代谢突变	阻断阿拉伯糖分解代谢
dam	腺嘌呤甲基化酶突变	阻断 5'-G ^m ATC3' 序列中腺嘌呤碱基的甲基化
dcm	胞嘧啶甲基化酶突变	阻断 5'-C ^m CAGG3' 或 5'-C ^m CTGG3' 序列中胞嘧啶碱基的甲基化
deoR	调控基因的突变, 允许脱氧核糖基因持续表达	允许大量质粒的摄取
endA1	核酸内切酶突变	改善质粒 DNA 提取的质量
gal K	半乳糖激酶突变	阻断半乳糖分解代谢
gyrA96	DNA 旋转酶 (gyrase) 突变	赋予对 nalidixic acid 的抗性
hflA150	导致高度溶源性的突变	使含有正常抑制基因(cI)的 λ 噬菌体的溶源性频率大大提高
hsdR(r_K^- , m_K^+)	限制性阴性, 修饰性阳性	允许 DNA 的克隆而不被限制性内切酶切割。从这种菌株中提取的 DNA 可用于转化 r_K^+ 大肠杆菌菌株
hsdS20(r_B^- , m_B^-)	限制性阴性, 修饰性阴性	允许 DNA 克隆而不被限制性内切酶切割。从此菌株中提取的 DNA 未被 hsdS20 甲基化酶甲基化
lac I ^q	lac 抑制蛋白过量产生	导致大量 lac 抑制蛋白产生, 抑制从 lac 启动子的转录
lac Y	半乳糖苷透过酶 (permease) 突变	阻断半乳糖的利用
lac Y1	β -D-半乳糖苷酶突变	阻断半乳糖的利用
lacZ Δ M15	β -D-半乳糖苷酶的部分缺失	允许 pGEM-Z 等载体中 α 互补序列的 β -半乳糖苷酶活性互补。可用于含 X-gal 平板中重组体克隆的蓝/白筛选
leuB	β -异内基 malate 脱氢酶突变	基础培养基中需要亮氨酸以维持生长
Δ (lon)	lon 蛋白酶缺失	减少表达的融合蛋白的降解
mcrA	限制性体系的突变	阻断在 5'-G ^m CGC3' 序列中甲基化的 DNA 的限制性切割
mcrB	限制性体系的突变	阻断在 5'-AC ^m CT3' 序列中甲基化的 DNA 的限制性切割
metB	cystathione γ -synthase 突变	基础培养基中需要甲硫氨酸以维持生长
mlt-1	甘露糖醇代谢突变	阻断甘露糖醇分解代谢
P2	存在于宿主中的 P2 噬菌体溶原体	含 red 和 gam 基因的 λ 噬菌体的生长受到 P2 溶原菌的抑制
proAB	脯氨酸代谢突变	基础培养基中需要脯氨酸以维持生长
recA1, recA13	重组突变	防止导入的 DNA 与宿主 DNA 间重组, 保持插入片段的稳定性。插入片段在 recA1 宿主中较 recA13 宿主更稳定
relA	轻弛型表型; 去除紧缩因子的突变	允许无蛋白质合成下的 RNA 合成
recB, recC	内切酶 V 突变	降低重组, 影响放射损伤的修复
rpsL	30S 核糖体亚基 S12 的突变	赋予对链霉素的抗性

续表

符 号	说 明	作 用
shc B	内切酶 I 突变	允许在 <i>recBC</i> 突变株中的重组
supB, supC, supG, supL, supM, supN, supO	抑制子突变	抑制赭石 (UAA) 和琥珀 (UAG) 突变
supD, supE, supF	抑制子突变	抑制琥珀 (UAG) 突变
thi-1	硫胺代谢突变	基础培养基中需要硫胺 (维生素 B1) 以维持生长
Tn5	转座子	编码卡那霉素抗性基因
Tn10	转座子	编码四环素抗性基因
tonA	外膜蛋白突变	赋予对噬菌体 T1 的抗性
traD36	转移因子的突变	阻止 F' 附加体的转移
xyl-5	木糖代谢突变	阻断木糖分解代谢

(胡晓年 汇编)

参 考 文 献

- [1] 金冬雁等译. 分子克隆实验指南. 第二版. 科学出版社, 1992
 - [2] 吴鹤龄, 林锦湖. 遗传学实验方法和技术. 高等教育出版社, 1989
 - [3] Promega Corporation. Promega Protocols and Applications Guide. 2nd, 1991
- (本书附录主要参照以上著作汇编, 略有增删修改, 特此致谢。)

英汉分子生物学词汇

A

- absorbance 吸收, 吸光度
 absorption cell 吸收池
 abundance 丰度
 abundant mRNAs 高丰度 mRNA
 acaryotic 无核的
 acceptor 接纳体, 受体
 acceptor site 受体位点, 受位
 accuracy 准确度
 accessory chromosome ①副染色体 ②性染色体 ③额外染色体
 accidental evolution 机遇性进化
 accidental sport 不定芽变, 偶然芽变
 accidental variation 偶然变异
 accommodation 调节, 适应
 acetate 乙酸盐
 acetic acid 乙酸, 醋酸
 acetone 丙酮
 acetonitrile 乙腈
 acetylase 乙酰化酶, 乙酰基转移酶
 acetyl coenzyme A 乙酰辅酶 A
 achromatin 非染色质
 acid phosphatase 酸性磷酸〔酯〕酶
 acquired character 获得性状
 acquired immunity 获得性免疫, 后天性免疫
 acquisition 获得
 acrylamide 丙烯酰胺
 actidione 放线酮, 放线菌酮, 环己酰亚胺
 actin 肌动蛋白
 actinomycetes 放线菌
 actinomycin D 放线菌素 D
 activating enzyme (aminoacyl-tRNA synthetase) 活化酶 (氨酰基-tRNA 合成酶)
 activation 激活, 活化
 activation energy 活化能
 activator 激活物, 激活剂
 active carbon 活性炭
 active immunity 主动免疫
 active site 活性部位, 活性中心
 active transport 主动运输
 activity 活性, 活度
 actomyosin 肌动球蛋白
 acyltransferase 酰基转移酶
 adapter 衍接头
 adaptability 适应性
 adaptive enzyme 适应酶
 adaptive evolution 适应进化
 adaptive regression 适应退化
 adaptive selection 适应选择
 additive action of genes 基因加性作用, 基因累加作用
 additive effect 累加效应, 附加效应
 adenine 腺嘌呤
 adenosine 腺嘌呤核苷, 腺苷
 adenosine deaminase, ADA 腺苷脱氨酶
 adenosine diphosphate, ADP 腺苷二磷酸
 adenosine monophosphate, AMP 腺苷(一磷)酸
 adenosine triphosphatase ATP 酶
 adenosine triphosphate, ATP 腺苷三磷酸
 adenovirus 腺病毒
 S-adenosylmethionine, SAM S-腺苷甲硫氨酸
 adenylyl cyclase 腺苷酸环化酶
 adherent cell 贴壁细胞, 粘附性细胞
 adhesion 吸附, 结合, 粘合
 adjuvant 佐剂
 adrenaline 肾上腺素
 adrenoreceptor 肾上腺素受体
 adsorbent 吸附剂
 adsorption 吸附
 adsorption chromatography 吸附层析
 adverse selection 逆选择, 相反选择
 aerobe 需氧微生物
 affinity 亲和, 亲和性
 affinity chromatography 亲和层析
 affinity labeling 亲和标记
 affinity purification 亲和纯化(法)
 A-form DNA A 型 DNA
 agamobium 无性世代
 agamous ①无性的 ②隐花的
 agar 琼脂

- agarose 琼脂糖
 agarose gel 琼脂糖凝胶
 agar slant 琼脂斜面
 ag(e)ing 老化
 agenesis ①发育不全 ②无生殖力
 agglutination 凝集(作用)
 agglutinin 凝集素
 aggregate 聚集体, 凝聚体
 aggregate dominance 总显性, 聚合显性
 aggregation 聚集(作用)
 agropine 冰草氨酸
 AIDS, acquired immunodeficiency syndrome 获得性免疫缺损综合征
 akaryotic 无核的
 alanine, Ala, A 丙氨酸
 albinism 白化
 albumin 白蛋白, 清蛋白
 algeny 遗传手术
 algorithm 算法, 公式
 aliquot 小份
 alkali 碱, 强碱
 alkaline denaturation 碱变性(法)
 alkaline gel electrophoresis 碱性凝胶电泳
 alkaline hydrolysis 碱水解(作用)
 alkaline lysis 碱裂解(法)
 alkaline phosphatase 碱性磷酸酶
 allele 等位基因
 allele center 基因中心
 allele-shift 基因频率改变
 allele-specific oligonucleotide, ASO 等位基因特异的寡核苷酸
 allelic potency 基因潜能
 allelotype 等位基因型
 alloantigen 同种异体抗原
 allochromacy 异染色性
 allogene 异基因(隐性基因)
 allogeneic 异源的, 同种异体的, 异生的
 allograft 异源移植
 alloplasmcy 异质性
 allosteric effect 别构效应, 变构效应
 α -helix α 螺旋
 α -particle α 粒子
 α -peptide of β -galactosidase β -半乳糖苷酶的 α 肽
 α -complementation α -互补
 allotype 异型
 alternative inheritance 交替遗传
 alternative variation 交替变异
 aluminium foil 铝箔
 Alu repetitive sequence Alu 重复序列
 amber codon 琥珀密码子
 amber mutation 琥珀突变
 amber suppressor 琥珀(突变)抑制基因, 琥珀(突变)抑制因子
 ambiguity ①双关性 ②错读
 ambiguous codon 多义密码子
 amino acid 氨基酸
 amino acid sequence 氨基酸顺序
 amino acid composition analyzer 氨基酸组成分析仪
 aminoacyl tRNA 氨酰 tRNA
 aminoacyl-tRNA synthetase 氨酰基-tRNA 合成酶
 aminoglycoside antibiotics 氨基糖苷(类)抗生素
 aminoglycoside phosphotransferase, APT 氨基糖苷磷酸转移酶
 aminopterin 氨基蝶呤
 amino terminal 氨基端
 ammonium hydroxide 氢氧化铵, 氨水
 ammonium persulfate 过硫酸铵
 amniocentesis 羊膜穿刺(术)
 amorph 无效等位基因
 amphigony 两性生殖
 amphilepsis 双亲遗传
 amphimict 有性生殖体
 amphimixis 两性融合
 amphiont 接合体
 amphipathicity = amphiphilicity
 amphiphilicity 两亲性
 amphitropic 双向性的
 amphitropic virus 兼宿病毒
 ampholyte 两性物, 两性电解质
 amphophile 双嗜性的
 amphoteric character 兼性性质
 ampicillin 氨苄青霉素
 amplification 扩增
 amylase 淀粉酶
 anabolism 组成代谢, 合成代谢, 同化作用
 analog 类似物
 analytical balance 分析天平
 analytical reagent, A. R. 分析纯试剂
 anaplerotic reaction 回补反应
 ancestry ①祖先, 列祖 ②家系, 世系
 androcyte 雄细胞
 androgen 雄激素

- androgynism 两性现象
aneuploidy 非整倍性
anchored PCR 锚式 PCR
angiotensin 血管紧张肽
angle rotor 角转头
anion 阴离子
anisoploid 杂倍体
annealing 退火, 复性, 对合
anode 阳极
antagonism 拮抗作用
antenatal diagnosis 产前诊断
antibiotic resistance 抗生素抗性
antibiotic (s) 抗生素
antibody 抗体
anticancer 抗癌剂
anticoding strand 反编码链
anticodon 反密码子
antifoam agent 消泡剂, 除沫剂
antifoamer = antifoam agent
antifoaming agent = antifoam agent
antifoams = antifoam agent
antigen 抗原
antigen-antibody complex 抗原抗体复合物
antigenicity 抗原性
antigen determinant 抗原决定簇
antimetabolites 抗代谢物
antimutator 抗突变基因
antioncogene 抗癌基因
antipain 木瓜蛋白酶抑制剂
antirepressor 抗阻抑物
antisense RNA 反义 RNA
antisense strand 反义链
antiserum 抗血清
anti-terminator 抗终止子
anucleate 无核的
anucleolate 无核仁的
aperiodical coil = random coil
apoenzyme 脱辅基酶蛋白
apolipoprotein 载脂蛋白
apoptosis 细胞凋亡
aporepressor 阻遏(物)蛋白
apparatus 装置, 器(官)
aprotinin 抑蛋白酶肽
AP site 脱嘌呤嘧啶位点, 无嘌呤嘧啶位点
aptitude 诱发适合性
apurinic acid 脱嘌呤核酸
apyrimidinic acid 脱嘧啶核酸
aqueous phase 水相
aqueous solution 水溶液
arabinose 阿拉伯糖
archaeocyte 原始细胞
architectural gene 构筑基因
arginine, Arg, R 精氨酸
arrhenokaryon 雄核
arrhenoplasm 雄质
artificial mutation 人为突变
ASO allele-specific 等位基因专一的
oligonucleotide 寡核苷酸片段
aseptic technique 无菌操作
asparagine synthetase 天冬酰胺合成酶
asparaginate, asparagine, Asn, N 天冬酰胺
aspartate, aspartic acid, Asp, D 天冬氨酸
aspartate transcarbamylase 天冬氨酸转氨甲酰酶
aspartyl hydroxamate 天冬氨酸酰羟肟酸
Aspergillus 曲霉[属名]
aspiration 吸(出), 抽吸
assay 分析, 测定
assembly 装配
assignment of genes 基因定位, 基因配位
assimilation 同化作用
A-site A 部位(受体部位)
association 缔合
assortment of genes ①基因分配 ②基因组合
asymmetric labeling 不对称标记
asymmetric PCR 不对称 PCR
ATCC, American Type Culture Collection 美国模式培养物保藏所
ateliosis ①发育不全②幼稚型
atomic energy 原子能
atomic weight 原子量
ATP-dependent protease 依赖于 ATP 的蛋白酶
atrial natriuretic factor, ANF 心钠素
AT tailing AT 加尾
attachment site 附着位点
attenuation 弱化作用, 减毒作用
attenuator 弱化子, 衰减子
auto-allopolyploid 同源异源体
autoantibody 自身抗体
autocatalysis 自身催化
autoclave 高压灭菌器, 高压处理器
autoclaving 高压(处理), 高压(灭菌)
autophagosome 自噬小体

autosome 常染色体
 autodifferentiation 自动分化
 autoduplication 自体复制
 autogenesis (生物) 自然发生
 autogeny 自然发生
 autograft 同体移植, 自体嫁接
 autoimmunity 自身免疫性
 autologous 自体的
 autolysis 自溶 (作用)
 automatic control 自动控制
 automatic regulation 自动调节
 automatic pipetting device 自动移液器
 automutagenicity 自发突变性
 autonomously replicating sequence, ARS 自主复制序列
 autonomy 自主性
 autoplasmic transplantation 同体移植
 autoradiography 放射自显影 (术)
 autoreplication 自体复制
 autoregulation 自身调节
 autosegregation 自体分离
 autosome 常染色体
 autosynapsis 同源联会
 autotroph 自养生物
 autotrophy 自氧
 autozygote 同合子
 auxanography 生长谱法, 生长谱测定 (法)
 auxotroph 营养缺陷体, 营养缺陷型
 avian (myeloblastosis virus) reverse transcriptase, AMV-RT 禽
 源反转录酶, 禽成髓细胞瘤病毒反转录酶
 avidin 抗生物素蛋白, 亲和素
 avidity 亲合力, 抗体亲抗原性
 axoneme 轴丝, 鞭毛
 azaguanine 氮鸟嘌呤
 azaserine 重氮丝氨酸
 azathymidine 氮胸苷
 azathymine 氮胸腺嘧啶
 azauracil 氮尿嘧啶
 azygote 单性合子

B

Bacillus 杆菌
 backbone 主链, 骨架
 backcross 回交
 background 背景, 本底
 back mutation 回复突变

bacterial alkaline phosphatase, BAP 细菌碱性磷酸酶
 bacteriocin 细菌素
 bacteriophage 噬菌体
 bacteriophage arm 噬菌体臂
 bacteriophage-encoded DNA-dependent RNA polymerase 噬菌
 体编码的依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶
 bacteriophage M13 M13 噬菌体
 bacterium 细菌
 Bacto-agar 细菌培养用琼脂 [商品名]
 baculovirus 杆状病毒
 balance 天平, 平衡
 BAL 31 nuclease BAL 31 核酸酶
 band [电泳] 条带, 带
 Barr body 巴氏小体
 base 碱基
 base analog (ue) 碱基类似物, 类碱基
 baseline 基线
 base pair, bp 碱基对
 base pairing mistakes 碱基配对错误
 base-pairing rules 碱基配对规律
 base stacking 碱基堆积
 base substitution 碱基置换
 base transition 碱基转换
 base transversion 碱基颠换
 basic amino acid 碱性氨基酸
 basic medium 基础培养基
 basophil (e) 嗜碱的
 batch 分批, 批, 一批
 batch cultivation 分批培养
 β -bend = β -turn
 biocatalyzes 生物催化剂
 β -mercaptoethanol, BME 2-巯基乙醇, β -巯基乙醇
 β -particle β 粒子
 β -pleated sheet, β -sheet β -折叠
 β -turn β -转角
 B-form DNA B 型 DNA
 bicarbonate 碳酸氢盐
 bidirectional deletion 双向缺失
 bidirectional replication 双向复制
 bifunctional agent 双功能试剂
 bifunctional vector 双功能载体
 binding site 结合位点, 结合部位
 bioactive molecule (生物) 活性分子
 bioactive peptide (生物) 活性肽
 bioassay 生物测定
 biochemical mutant 生化突变体, 生化突变型

bio-chip 生物芯片, 生物集成模片
 biocybernetics 生物控制论
 bioenergetics 生物能学
 biogenesis 生物发生
 bioethics 生物伦理学
 biological containment 生物学抑制
 biological products 生物制品
 biological cabinet 生物学工作橱
 bioluminescence 生物发光
 biomacromolecule 生物大分子
 biomass 生物量 生物质
 biomembrane 生物膜
 bioplasm 原生质
 bipolarity 两极性
 biopolymer 生物聚合体, 生物高分子
 biosensor 生物传感器
 biosynthesis 生物合成
 biotechnology 生物工程(学)
 biotherapy 生物治疗
 biotin 生物素
 biotin-avidin conjugate 生物素-抗生物素蛋白缀合物, 生物素-亲和素偶联物
 bisacrylamide 双丙烯酰胺
 bisulfate 硫酸氢盐
 bisulfite 亚硫酸氢盐
 blank 空白(对照)
 blast burner 喷灯
 blocking agent 封闭剂, 封阻剂
 blood coagulation factor 凝血因子
 blood group system 血型系统
 blotting 印迹
 blunt end 平端, 钝端, 平头
 blunt end ligation 平端连接
 blunt-ended forceps 平头镊子
 blunt terminus = blunt end
 boiling lysis 煮沸裂解(法)
 Bolton-Hunter reagent Bolton-Hunter 试剂[一种缀合剂]
 bond energy 键能
 booster immunization 加强免疫
 bovine 牛
 Bovine Lacto Transfer Technique Optimizer, BLOTTO 牛乳转移技术优化液
 bovine papillomavirus, BPV 牛乳头瘤病毒
 bovine serum albumin, BSA 牛血清白蛋白
 bp (base pair) 碱基对
 broad host range 广宿主范围

bromocresol green 溴甲酚绿
 5-bromodeoxyuridine 5-溴脱氧尿苷
 bromophenol blue 溴酚蓝
 bromouracil 溴尿嘧啶
 buck 雄的, 公的
 buffer 缓冲液
 buffer capacity 缓冲容量
 buffer counterion 缓冲配对离子
 buffer-gradient polyacrylamide gel 缓冲液梯度聚丙烯酰胺凝胶
 buffering range 缓冲范围
 bungarotoxin 银环蛇毒素
 buoyant density 浮力密度, 浮密度
 butanol 丁醇

C

CACA box CACA 盒(框)
 C ①居里(辐射单位)②单倍体③DNA 总量
 calcium chloride 氯化钙
 calcium phosphate 磷酸钙
 calcium phosphate-DNA coprecipitate 磷酸钙-DNA 共沉淀物
 calf intestinal alkaline phosphatase, CIP (小)牛小肠碱性磷酸酶
 calf serum 小牛血清
 calf thymus 小牛胸腺
 calibration 校准, 标准
 calibration protein 校准蛋白
 calmodulin 钙调蛋白, 钙调素
 cAMP receptor protein, CRP cAMP 受体蛋白
 cancer 癌
 cancer cell 癌细胞
 cancer-inducing virus 致癌病毒
 CAP binding site 分解代谢基因活化蛋白结合部位
 canonical sequence 规范序列
 capacity 容量
 capillary 毛细管, 毛细血管
 capillary column 毛细管柱
 capillary electrophoresis 毛细管电泳
 capillary transfer 毛细管转移
 capping 加帽, 加帽反应; 封闭反应
 CAPS, 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid 3-(环己氨基)-1-丙磺酸
 capsid 衣壳
 cap site (加)帽位点
 capsomere 衣粒

- carbenicillin 羧苄青霉素
 carbonate 碳酸盐, 碳酸酯
 carboxylase 羧酶
 carboxyl peptidase 羧肽酶
 carboxyl terminal 羧基端
 carboxymethyl cellulose, CM-cellulose 羧甲基纤维素
 carcino-embryonic antigen, CEA 癌胚(性)抗原
 carcinogen 致癌剂
 carcinogenesis 癌形成
 carcinogenic substance 致癌物质
 carcinoma 癌, 肿瘤
 carcinostatic substance 制癌物质
 carotenoid 类胡萝卜素
 carrier 载体
 carrier coprecipitation 载体共沉淀
 carrier DNA 载体 DNA
 caryogenetics 核遗传学
 caryogram 核型
 casamino acid (水解) 酪蛋白氨基酸, 酪蛋白水解物
 cascade chromatography 级联层析
 casein 酪蛋白, 酪素
 cassette mutagenesis 盒式诱变
 catabolism 分解代谢
 catabolite repression 分解代谢产物阻抑, 分解代谢物阻遏
 catalysis 催化, 催化作用
 catalyst 催化剂
 catalytic constant 催化常数 [符号 K_{cat}]
 catalytic site 催化部位
 CAT box CAT 盒(框)
 cathode 阴极
 cation 阳离子
 cauliflower mosaic virus, CaMV 花椰菜花叶病毒
 C-banding C 分带
 cDNA cloning cDNA 克隆化
 cDNA (complementary DNA) 互补 DNA (cDNA)
 cDNA library cDNA 文库
 cell 细胞
 cell antigen 细胞抗原
 cell biology 细胞生物学
 cell coat 细胞外被
 cell culture 细胞培养
 cell cycle 细胞周期
 cell differentiation 细胞分化
 cell division 细胞分裂
 cell engineering 细胞工程(学)
 cell factory 细胞工厂
 cell-free translation 无细胞翻译
 cell fusion 细胞融合
 cell genetics 细胞遗传学
 cell hybridization 细胞杂交
 cell line 细胞系
 cell membrane (细) 胞膜
 cell-recognition 细胞识别
 cell sorter 细胞分类器
 cell strain 细胞株
 cell surface 细胞表面
 cell surface receptor 细胞表面受体
 cell wall 细胞壁
 cellular oncogene, c-oncogene 细胞癌基因
 cellule 细胞
 cellulose acetate 乙酸纤维素
 cellulose nitrate, CN 硝酸纤维素
 centimorgan cM 厘摩, 基因交换单位
 central dogma 中心法则
 central granule 中心粒
 centrifugal drier 离心干燥机
 centrifugal evaporator 离心蒸发器
 centrifugation 离心
 centrifuge 离心机
 centrifuge rotor 离心机转头, 离心机转子
 centrifuge shield 离心管套
 centrifuge tube 离心管
 centromere 着丝粒
 centriole 中心粒
 centromeric sequence 着丝粒序列
 cephalin 脑磷脂
 ceruloplasmin 血浆铜蓝蛋白, 蓝蛋白
 cesium chloride, CsCl 氯化铯
 cesium sulfate 硫酸铯
 cetylpyridinium bromide precipitation, CPB precipitation 十六
 烷基溴化吡啶沉淀法, CPB 沉淀法
 chain 链
 chain extension 链延伸
 chain reaction 链式反应, 链反应
 chain termination 链终止
 chain terminator 链终止剂
 character 性状, 特性
 charcoal 炭, 活性炭
 Charomid vectors 卡隆粒载体系列
 Charon vectors 卡隆载体系列
 CHEF, contour-clamped homogenous field electrophoresis 钳位
 均匀电场电泳, 钳压均匀电场电泳

- chelate 螯合剂, 螯合物
 chelation 螯合(作用)
 chemical degradation (of DNA) method of DNA sequencing = Maxam-Gilbert method (of DNA sequencing) DNA 化学降解测定法, Maxam-Gilbert DNA 测序法
 chemical hood 化学通风橱
 chemical mutagen 化学诱变剂
 chemically pure reagent 化学纯试剂
 chemiluminescence 化学发光
 chemoluminescence = chemiluminescence
 chemostat 恒化器
 chemosynthesis 化学合成
 chemotactic factor 趋化因子
 chemotaxis 趋化性
 chemotherapy 化学治疗
 chiasma 交叉
 chimera 嵌合体
 chimeric antibody 嵌合抗体
 chimeric gene 嵌合基因
 chimeric plasmid 嵌合质粒
 chimeric protein 嵌合蛋白
 Chinese hamster ovary cell, CHO cell 中国仓鼠卵巢细胞, CHO 细胞
chi sequence [大肠杆菌] *chi* 序列
 chloramine T 氯胺 T
 chloramphenicol 氯霉素
 chloramphenicol acetyltransferase, CAT 氯霉素乙酰转移酶
 chloroform 三氯甲烷, 氯仿
 chloro mycetin = chloramphenicol
 4-chloro-1-naphthol 4-氯-1-萘酚
 chlorophyll 叶绿素
 chloroplast DNA, ctDNA 叶绿体 DNA
 chloroplast genome 叶绿体基因组
 chloroquine 氯喹
 cholecystokinin, CCK 缩胆囊肽
 cholera toxin 霍乱毒素
 cholesterol 胆固醇
 choline 胆碱
 cholinergic 胆碱受体
 chondriogene 线粒体基因
 chondriosome 线粒体
 chromatid 染色单体
 chromatin 染色质
 chromatogram 层析谱, 色谱图
 chromatographic column 层析柱
 chromatographic peak 层析峰, 色谱峰
 chromatography 层析, 色谱(法)
 chromatosome 染色质小体
 chromatospherite 核仁
 chromogen 色素原
 chromogene 染色体基因
 chromomere 染色粒
 chromogenic substrate 生色底物, 显色底物
 chromosomal DNA 染色体 DNA
 Chromosome jumping library 染色体跳步文库
 chromosomal mutation 染色体突变
 chromosomal rearrangement 染色体重排
 chromosome 染色体
 chromosome crawling 染色体缓移
 chromosome duplication 染色体重复
 chromosome engineering 染色体工程学
 chromosome jumping 染色体跳步
 chromosome map 染色体图
 chromosome-mediated gene transfer 染色体中介基因转移
 chromosome walking 染色体步移
 chymotrypsin 胰凝乳蛋白酶, 糜蛋白酶
 circular chromosome 环状染色体
 circular DNA 环状 DNA
 circularization 环化
 circular permutation 循环交替变换, 环状变换
 cis acting 顺式作用
 cis-acting element 顺式作用元件
 cis-trans 顺反式
 cistron 顺反子
 citrate synthase 柠檬酸合酶
 citric acid 柠檬酸
 cladogram 进化树
 classification 分类
 class switching 类别转换
 clathrin 笼形蛋白
 cleared lysate 澄清裂解液
 cleavage 切割, 裂解, 断裂, 卵裂
 clip (弹簧) 钢夹
 clonal selection 无性(繁殖)系选择, 克隆选择
 clone 克隆
 cloned gene 克隆化基因
 cloning 克隆, 克隆化
 cloning by expression = expression cloning
 cloning vector 克隆载体
 close breeding 近亲繁殖
 closed crossing 近亲杂交
 coagulation 凝聚, 聚沉, 凝固

- coamplification 共扩增
coat protein 外壳蛋白
code 密码
coding capacity 编码容量
code degeneracy 密码简并
coding for = encoding 编码
coding region 编码区
coding sequence 编码序列
coding triplet 编码三联体
codominance 等显性
codon 密码子
codon bias 密码子偏倚
codon usage 密码子使用, 密码子选择
coenoblast 胚层
coenzyme 辅酶
coenzyme A, CoA 辅酶 A
coenzyme Q 辅酶 Q
cofactor 辅助因素, 辅因子
coformycin 助间型霉素
cog region 识别区 (核酸内切酶)
cohesive end 粘端, 粘性末端
cohesive terminus = cohesive end
coinducer 去阻遏诱导物
coiled coil 卷曲螺旋
cointegrant 共合体
colchicine 秋水仙素, 秋水仙碱
cold sensitive mutant 冷敏 (感) 突变体, 冷敏 (感) 突变型
colicin (e) 大肠 (杆) 菌素
colicinogenic factor 大肠 (杆) 菌素生成因子, COL 因子
colinearity 共线性, 同线性
coliphage 大肠杆菌噬菌体
collagen 胶原 (蛋白)
collagenase 胶原酶
collateral inheritance 旁亲遗传
collection 收集
collochore 配对区
collodion 火棉胶
colloid 胶体
colony 集落, 菌落
colony forming unit, cfu 菌落形成单位, 集落形成单位
colony hybridization 集落杂交, 菌落杂交
colony stimulating factor 集落刺激因子
column (层析) 柱
column chromatography 柱层析
comb 梳 [电泳胶模]
combining site 结合点, 结合部位
committed step 关键步骤
compartmentalization = compartmentation
compartmentation 区域化, 分室作用
compatibility 亲和性, 适合性 (指血液型)
compatible termini 匹配末端
compensator gene 补偿基因
competence 感受态
competent cell 感受态细胞
complement 补体, (染色体) 组分
complementary base pairing 互补碱基配对
complementary factor 互补因子
complementary gene 互补基因
competition 竞争
complementary DNA, cDNA 互补 DNA
complementation 互补 (作用)
complete digestion 完全酶切
complete dominance 完全显性
complete linkage 完全连锁
complete medium 完全培养基
complexant 络合剂
complexation 络合
concanavalin, ConA 伴刀豆球蛋白
concatemer 多联体, 串连体, 连环体
concatenate 多联体, 连环
concatenated probes 多联探针, 串联探针
concentration 浓度
condensing agent 凝聚剂, 缩合剂
conditional lethal mutant 条件致死突变体, 条件致死突变型
conditional mutant 条件突变体, 条件突变型
configuration 构型
confirmatory sequencing 确证性测序
conformation 构象
congenital 先天的
conjugate 缀合物, 偶联物
conjugated antigen 接合抗原
conjugated protein 缀合蛋白质
conjugation (细胞) 接合 (作用); 缀合, 偶联
connexon 连接单元
consensus sequence 共有序列
conservation of heredity 遗传的保守性
conserved sequence 保守序列
conspecific 同种的
constant gene, C gene C 基因 [为 C 区编码的基因]
constant region, C region (免疫球蛋白等分子的) C 区,

- 恒定区
- constitutive enzyme 组成酶
- constitutive expression 组成型表达
- constitutive gene 组成型基因
- construction 构建, 组建
- contact inhibition 接触抑制
- contaminant 污染物, 杂质
- contamination 污染
- continuous cultivation 连续培养
- continuous flow rotor 连续流转头
- continuous gradient 连续梯度
- control 控制, [实验的] 对照
- convergence 趋同
- conversion (基因) 转变
- Coomassie brilliant blue 考马斯亮蓝
- cooperativity 协同性
- coordination 配位 (作用)
- coordination bond 配位键
- coprecipitation 共沉淀
- copolymer (二元) 共聚物, 共聚体
- copy number 拷贝数
- cordycepin 3'-脱氧腺苷, 蛹虫草菌素
- core enzyme 核心酶
- corepressor 协阻抑制, 辅阻遏物
- correlation 相关
- core sequence 核心序列
- COS cell COS 细胞
- cos site cos 位点, 粘性位点
- cosmid 粘粒, 柯斯质粒
- cosmid library 粘粒文库
- cosmid vector 粘粒载体
- cotransduction 共转导
- cotransfection 共转染
- cotransformation 共转化
- cotranslational secretion 共翻译分泌
- countercurrent chromatography 反流层析, 逆流层析
- countercurrent electrophoresis 对流电泳
- countercurrent distribution 反流分步 (法), 逆流分步 (法)
- counterselection 反选择
- coupling 偶联, 偶合
- covalent bond 共价键
- covalent link = covalent bond
- covalent linkage = covalent bond
- covalently closed circular DNA, ccc DNA 共价闭 (合) 环 (状) DNA
- critical state 临界状态
- cross 杂交, 交叉
- cross over 交换
- crossed contamination 交叉污染
- crossing over 交换
- crosslinking 交联
- cross-reacting antibody 交叉反应抗体
- cross reaction 交叉反应
- cruciform loop 十字形环
- curing 消除
- coupling factor 偶联因子
- cryptic plasmid 隐蔽性质粒
- cryptic splice site 隐蔽剪接位点
- crystal 结晶, 晶体
- crystallizing dish 结晶皿
- crystallography 晶体学
- CsCl-ethidium bromide gradient 氯化铯-溴化乙锭梯度
- C-terminal = carboxyl terminal C 端, 羧基端
- cultivation 培养
- culture 培养物, 培养
- culture flask 培养瓶
- culture medium 培养基
- culture tube 培养 (试) 管
- culture transfer (r) ing 多种
- cumulative genes 累积基因
- cushion 垫层
- cuvette 小槽, 小池, 样品池, 吸收池
- cyanogen bromide 溴化氰
- cyanogen-bromide-activated agarose 溴化氰活化的琼脂糖
- cyanogen-bromide-activated paper, CBA paper 溴化氰活化纸, CBA 纸
- cyanuric chloride paper 氰尿酸氯纸
- cyclase 环化酶
- cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 环腺苷酸
- cyclic adenine (cAMP) 环形腺苷磷酸 (cAMP)
- cyclic DNA 环状 DNA
- cycloheximide = actidione 环己酰亚胺, 放线酮
- cycloserine 环丝氨酸
- cysteine, Cys, C 半胱氨酸
- cystine 胱氨酸
- cytidine 胞嘧啶核苷, 胞苷
- cytidine diphosphate, CDP 胞苷二磷酸
- cytidine monophosphate, CMP 胞苷 (一磷) 酸
- cytidine triphosphate, CTP 胞苷三磷酸
- cytobios 细胞生物学
- cytochalasin B 细胞松弛素 B
- cytochemistry 细胞化学

cytochimera 细胞嵌合体
 cytochrome 细胞色素
 cytochrome oxidase 细胞色素氧化酶
 cytodifferentiation 细胞分化
 cytogene 细胞质基因
 cytogenetics 细胞遗传学
 cytokine 细胞因子
 cytokinesis 细胞质分裂
 cytology 细胞学
 cytomegalovirus, CMV 巨细胞病毒
 cytomicrosome 微粒体
 cytopathic effect, CPE (致)细胞病变(效应)
 cytoplasm 细胞质
 cytoplasm 胞质体
 cytosine 胞嘧啶
 cytosine arabinoside 阿糖胞苷
 cytoskeleton 细胞骨架
 cytostatic agent 细胞生长抑制剂
 cytotoxin 细胞毒素

D

dalton 道尔顿
 dark reaction 暗反应
 dark repair 暗修复
 daughter cell 子细胞
 daughter colony 子菌落
 DDBJ, DNA Data Bank of Japan, 日本 DNA 序列资料库
 dd NTP dideoxy nucleoside triphosphate 双脱氧三磷酸核苷酸
 dead volume 死体积
 DEAE, diethylamino ethyl 二乙氨基乙基
 DEAE-cellulose membrane DEAE 纤维素膜, 二乙氨基乙基纤维素膜
 DEAE-dextran DEAE-葡聚糖, 二乙氨基乙基葡聚糖
 decarboxylation 脱羧[基]作用
 decline phase [细胞生长曲线的]衰亡期
 decoding 译码, 解码
 decontamination 净化, 去污
 defective interfering particle 缺损干扰颗粒, 干扰缺损颗粒
 defective phage 缺损噬菌体, 缺陷噬菌体
 defective virus 缺损病毒, 缺陷病毒
 DE-81 filter DE-81 滤膜, DE-81 滤纸[商品名]
 defined medium 确定成分培养基
 deformase 去甲酰酶
 degeneracy 简并, 简并性, 简并度
 degenerate codon 简并密码子

degradation 降解
 deionized water 去离子水
 deionizing 去离子(处理)
 delayed early transcription (延)迟早期转录
 deletion 缺失
 deletion mapping 缺失定位, 缺失作图
 deletion mutagenesis 缺失诱变
 deletion mutation 缺失突变
 deliquescence 潮解
 denaturant 变性剂
 denaturation 变性(作用)
 denaturing gradient polyacrylamide gel 变性梯度聚丙烯酰胺凝胶
 Denhardt's solution Denhardt's 溶液
 de novo sequencing 从头测序
 de novo synthesis 从头合成
 density gradient centrifugation 密度梯度离心
 2'-deoxyadenosine triphosphate, dATP 2'-脱氧腺苷三磷酸
 deoxycholate 脱氧胆酸盐
 2'-deoxycytidine triphosphate, dCTP 2'-脱氧胞苷三磷酸
 2'-deoxyformycin 2'-脱氧间型霉素
 2'-deoxyguanosine triphosphate, dGTP 2'-脱氧鸟苷三磷酸
 2'-deoxyinosine triphosphate, dITP 2'-脱氧次黄苷三磷酸, 2'-脱氧肌苷三磷酸
 deoxyribonuclease, DNAase, DNase 脱氧核糖核酸酶, DNA 酶
 deoxyribonucleic acid, DNA 脱氧核糖核酸
 deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP 脱氧核糖核苷三磷酸
 deoxyribonucleotide 脱氧核糖核苷酸
 deoxyribose 脱氧核糖
 2'-deoxythymidine 2'-脱氧胸腺嘧啶核苷, 2'-脱氧胸苷
 2'-deoxythymidine monophosphate, dTMP 2'-脱氧胸苷一磷酸
 2'-deoxythymidine triphosphate, dTTP 2'-脱氧胸苷三磷酸
 dephosphorylation 去磷酸化(作用)
 depurination 脱嘌呤(作用)
 derepression 去阻遏作用, 消阻遏作用
 derivative 衍生物
 desiccator 干燥器
 desorption 解吸, 脱附
 detection 检测, 检出, 观察
 detergent 去污剂, 除垢剂
 determinant ①决定子, 定子 ②因子
 determination 测定
 detrimental gene 有害基因
 developing solvent 展开剂

- development 发育, 发展, 展开
developmental genetics 发育遗传学
dextran 葡聚糖
dextran sulfate 葡聚糖硫酸酯
dG·dT tailing dG·dT 加尾
DHFR, dihydrofolate reductase 二氢叶酸还原酶
dialysate 透析物, 透析液
dialysis 透析
dialysis bag 透析袋
dialysis membrane 透析膜
dialysis tube = dialysis tubing
dialysis tubing 透析袋, 透析管
diaminobenzidine, DAB 二氨基联苯胺
diazobenzyloxymethyl paper, DBM paper 重氮苄氧甲基纸, DBM 纸
diazophenylthio paper, DPT paper 重氮苯硫醚纸, DPT 纸
dichlorodimethylsilane 二氯二甲硅烷
dideoxy-mediated chain-termination method (of DNA sequencing) 双脱氧链终止 (DNA 测序) 法
2', 3'-dideoxyribonucleoside triphosphate, ddNTP 2', 3'-双脱氧核苷三磷酸
diethyl pyrocarbonate, DEPC 焦碳酸二乙酯
difference spectrum 差光谱
differential centrifugation 差速离心
differential hybridization 差示杂交 (法)
differential screening 差示筛选
differential staining 鉴别染色 (法)
differentiation 分化
diffraction 衍射
diffusion 扩散
digestion (酶切) 消化
digoxigenin 洋地黄毒苷, 地高辛配体
digoxin 异羟基洋地黄毒苷原, 地高辛
dihedral angle 二面角、双面角
dihydrofolate reductase, DHFR 二氢叶酸还原酶
diluent 稀释剂, 稀释液
dilution-plate method 稀释平板分离法
dimer 二聚体, 双体
dimethyl sulfate 硫酸二甲酯
dimethyl sulfoxide, DMSO 二甲基亚砷
diphtheria toxin 白喉毒素
diploid 二倍体
directed mutation 定向突变
directed sequencing 定向测序
directed mutagenesis 定向诱变
directional cloning 定向克隆
direct repeat 同向重复 (序列)
direct selection 正选择
disc electrophoresis 圆盘电泳
disc gel 圆盘凝胶
discontinuous gradient 不连续梯度
dish 平皿, 皿
disinfectant 消毒剂
disinfection 消毒
disintegration 蜕变, 衰变
displaced loop = displacement loop
displacement loop, D-loop 替代环, 替位环, D 环
disposable tip 一次性 (使用的) 吸头
disposable microcentrifuge tube 一次性 (使用的) 微量离心管
disruption 破裂, 破坏
dissociation 解离, 离解
distillate 馏出物, 馏出液
distillation 蒸馏
distilled water 蒸馏水
disulfide bond 二硫键
disulfide bridge = disulfide bond
disulfide link = disulfide bond
dithiothreitol, DTT 二硫苏糖醇
divergence 趋异
diversity gene, D gene D 基因
D-loop = displaced loop = displacement loop
D-loop synthesis D 环式合成, 线粒体 DNA 的复制方式
DNA arrays DNA 阵列, DNA 芯片
DNAase, deoxyribonuclease DNA 酶, 脱氧核糖核酸酶
DNAase I, deoxyribonuclease I DNA 酶 I
DNA-binding protein DNA 结合蛋白
DNA chip DNA 芯片
DNA-dependent DNA polymerase 依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶
DNA-dependent RNA polymerase 依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶
DNA duplex DNA 双链体, DNA 双 (股) 螺旋
DNA fingerprint DNA 指纹
DNA homology DNA 同源性
DNA hybridization DNA 杂交
DNA ligase DNA 连接酶
DNase = DNAase
DNA sequence analysis DNA 序列分析
DNA sequence family DNA 顺序家族
DNA sequencer DNA 序列测定仪, DNA 测序仪
DNA sequencing DNA 序列测定, DNA 测序
DNA synthesizer DNA 合成仪
DNA virus DNA 病毒

docking protein [内质网的] 船坞蛋白(质)
 domain 结构域, 功能区, 域
 dominant character 显性性状
 dominant gene 显性基因
 dominant mutation 显性突变
 dominant selectable marker 显性选择标记, 优势选择标记
 donor 供体
 donor site 供体部位
 dosage 剂量
 dot blotting 斑点印迹(法)
 dot hybridization 斑点杂交
 dot-matrix plot 点阵图
 double helix 双螺旋
 double helix model 双螺旋模型
 double minute chromosome 双微染色体
 double-strand 双链
 doubling time 倍增时间
 downstream processing [生物工程产品的] 下游处理
 downstream sequence 下游序列
 drift (遗传) 漂变
Drosophila 果蝇[属名]
 drug-resistance 抗药性, 耐药性
 drug-resistance gene 抗药性基因
 drug-resistance marker 抗药性标志
 dryer = drier
 dry-heat sterilization 干热灭菌
 drier 干燥器, 干燥剂
 drying-down 干燥(处理)
 drying oven 烘箱, 干烤箱
 duplex 双链体, 双螺旋, 双链分子
 duplicase 复制酶
 duplicate gene 重复基因
 duplication 重复
 dyad symmetry 二重对称
 dynamic selection 动态选择
 dynein 动力蛋白

E

early gene (病毒) 早期基因
 early protein (病毒) 早期蛋白
 early transcription (病毒的) 早期转录
 eclipse period [细胞生长的] 隐蔽期
 ecology 生态学
E. coli, *Escherichia coli* 大肠杆菌
E. coli DNA polymerase I 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I

ecotropic virus 专宿病毒, 单向性病毒
 ectoenzyme = extracellular enzyme
 ectoderm 外胚层
 ecotype 生态型
 EDTA, ethylene diaminetetraacetic acid 乙二胺四乙酸
 effector 效应物
 efficiency 效率
 efflorescence 风化
 effluent 流出物, 流出液
 EGTA, ethyleneglycol bis(2-aminoethylether) tetraacetic acid
 乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸
 elastin 弹性蛋白
 electroblotting 电泳转移印迹
 electroelution 电洗脱
 electrode 电极
 electrofusion 电融合
 electroimmunodiffusion 电泳免疫扩散
 electron carrier 电子载体
 electron diffraction 电子衍射
 electronic balance 电子天平
 electron transport chain 电子传递链
 electron microscopy 电(子显微)镜(技)术
 electrophoresis 电泳
 electrophoresis apparatus 电泳仪, 电泳装置
 electrophoresis buffer 电泳缓冲液
 electrophoresis tank 电泳槽
 electrophoretic transfer 电泳转移(法)
 electrophoretogram 电泳图(谱)
 electroporation 电穿孔(法)
 electroporation apparatus 电穿孔仪
 electrotransformation 电转化(法)
 element 元素
 elementary membrane, unit membrane 单位膜
 elongation factor 延伸因子, 延长因子
 eluate 洗脱物, 洗出液
 eluent 洗脱液, 洗脱剂
 elution 洗脱
 embedding media 包埋剂
 EMBL, European Molecular Biology Laboratory 欧洲分子生物学实验室
 EMBL nucleotide sequence database EMBL 核苷酸序列资料库
 embryo 胚胎
 embryogenesis 胚胎发生
 embryology 胚胎学
 emission spectrum 发射光谱

emulsion 乳胶
 end cell 终末细胞
 endergonic reaction 吸能反应
 encoding 编码
 end-labeling 末端标记
 endoenzyme = intracellular enzyme
 endoderm, entoderm 内胚层
 endoenzyme 胞内酶
 endogenous 内源的, 内生的
 endomembrane system 内膜系统
 endonuclease 内切核酸酶
 endopeptidase 肽链内切酶
 endophenotype 内在表型
 endoplasmic reticulum (ER) 内质网
 endopolyploidy 核内多倍体
 endoreduplication 核的复制
 endosymbiosis 内共生现象
 endothermic reaction 吸热反应
 endotoxin 内毒素
 endproduct repression (inhibition) 最终产物阻遏
 energy 能量
 enhancer 增强子
 enhancer element 增强子元件
 enhancer 增强子单元
 enriched medium 滋养培养基
 enrichment 富集
 enrichment medium 富集培养基, 增菌培养基
 enterotoxin 肠毒素
 enthalpy 热函, 焓
 entoderm 内胚层
 entrapment 包载
 entropy 熵
 entry site 进入位点 (核糖体)
 enucleation 去核
 enzymatic reaction 酶促反应
 enzymatic synthesis 酶促合成
 enzyme 酶
 enzyme induction 酶诱导
 enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA 酶联免疫吸附测定
 enzyme repression 酶阻遏
 epidermal growth factor, EGF 上皮生长因子, 表皮生长因子
 epigenetic 外遗传的, 后生的, 渐成的
 epinephrine 肾上腺素
 episome 附加体, 游离体

epitope (抗原) 表位
 Eppendorf tube Eppendorf 离心管, 微量离心管
 epoxide 环氧化合物
 Epstein-Barr virus, EB virus EB 病毒
 equilibration 平衡 (化)
 equilibrium 平衡
 equilibrium centrifugation 平衡离心
 equilibrium density gradient centrifugation 平衡密度梯度离心
 equivalent concentration 当量浓度
 equivalent weight 当量
 ergosome 动体, 多核糖体
 erythropoietin = erythropoietin
 erythropoietin, EPO 红细胞生成素
 estrogen 雌激素
 ethanol precipitation 乙醇沉淀 (法)
 ether 乙醚
 ethidium bromide 溴化乙锭
 ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) 乙二胺四乙酸
 euchromatic zone 常染色质区
 euchromosome 常染色体
 euchromatin 常染色质
 eugenics 优生学
 eukaryote 真核生物, 真核体
 eukaryotic expression 真核 (生物的) 表达
 euploid 整倍体
 evaporating dish 蒸发皿
 evaporation 蒸发
 evaporation to dryness 蒸 (发至) 干
 evaporator 蒸发器
 eviction 回收
 evolution 进化
 evolutionary divergence 进化趋异, 进化分歧
 evolutionary genetics 进化遗传学
 evolutionary rate 进化速率
 evolutionism, evolution theory 进化论
 evolution pressure 进化压力, 演化压力
 exchange reaction 交换反应
 excision enzyme 切除酶
 excision repair 切除修复, 切补修复
 excretion vector 分泌型载体
 exergonic reaction 放能反应
 exocytosis 胞吐作用 (外排)
 exogenous 外源的
 exogenous gene 外源基因
 exon 外显子
 exonuclease 核酸外切酶

exonuclease III 核酸外切酶III
 exophenotype 外观表型
 exoskeletal factor 细胞外骨架因子
 explantation ①外植, 移植②外植体
 exponential amplification 指数式扩增
 exponential growth 指数生长
 export 输出
 exposure 曝光量, 照射
 expression cloning 表达克隆
 expression library 表达文库
 expression plasmid 表达质粒
 expression vector 表达载体
 expressor [基因] 表达子
 extension 延伸(反应), 突出
 external guide sequence 外在引导顺序
 extracellular enzyme 胞外酶
 extrachromosomal inheritance
 extrachromosomal replication 染色体外复制
 extrachromosome 额外染色体
 extraction 抽提, 提取, 萃取
 extragenetic 非遗传的
 extragenic mutation 基因外突
 extranuclear heredity 核外遗传
 exon, exon 外显子
 ex vivo 间接体内

F

factor 因子, 因素
 family selection 家系选择
 family tree 系统树
 fast protein liquid chromatography, FPLC 快速蛋白质液相层析
 fed batch cultivation 补料分批培养
 feedback 反馈
 feedback loop 反馈环
 feedback inhibition 反馈抑制
 female carrier 女性携带者
 fermentation 酵解, 发酵
 fermenter = fermentor
 fermentor 发酵罐
 fertility ①能育性, 稔性②生殖力
 fertility factor = F factor 致育因子
 fertilized egg 受精卵
 fetal calf serum 胎牛血清
 fetal hemoglobin (HbF) 胎儿血红蛋白

α -fetoglobulin, α -fetoprotein (AFP) 甲种胎儿球蛋白, 甲胎蛋白
 fetus 胚胎
 F factor F 因子
 FDA, Food and Drug Administration (USA) (美国) 食品与药物管理局
 fibrin 血纤蛋白
 fibrinogen 血纤蛋白原
 fibroblast 成纤维细胞
 fibronectin 纤连蛋白, 纤维结合素
 fibrous DNA 纤维状 DNA
 fibrous protein 纤维状蛋白
 Ficoll 水溶性聚蔗糖, 非可
 fidelity 忠实性, 保真性
 field-inversion gel electrophoresis, FIGE 倒转电场凝胶电泳
 filamentous bacteriophage 丝状噬菌体
 filling 填补(反应)
 filling-in 补平(反应)
 filter 滤膜, 滤纸
 filter hybridization 滤膜杂交
 filter paper 滤纸
 filtrate 滤液, 滤过物
 filtration 过滤
 filtration sterilization 过滤除菌
 finger pattern 指纹型
 finger printing 指纹法
 first-strand of cDNA cDNA 第一链
 five prime 5' (端)
 fixation 固定
 fixed-angle rotor 固定角转头
 flagellin 鞭毛蛋白
 flanking region 侧翼区, 旁侧区
 flanking sequence 侧翼序列, 旁侧序列
 flexibility 柔性[生物大分子]
 flavin adenine dinucleotide, FAD 黄素腺嘌呤二核苷酸
 flavoprotein 黄素蛋白
 flow chart 流程图, 程序框图
 flow cytometer 流式细胞仪
 flow cytometry 流式细胞术
 fluid mosaic model 流动镶嵌模型
 fluor 氟, 荧光剂
 fluorescein 荧光素
 fluorescence 荧光
 fluorescence analysis 荧光分析
 fluorescence excitation 荧光激发
 fluorescence labeling 荧光标记

fluorescence microscopy 荧光显微(术)
 fluorescence spectrum 荧光光谱
 fluorescent antibody technique 荧光抗体技术
 fluorescent dye 荧光染料
 fluorescent-dye primer = fluorescently-labeled primer
 fluorescent-dye terminator = fluorescently-labeled terminator
 fluorescently-labeled primer 荧光标记引物
 fluorescently-labeled terminator 荧光标记的(链)终止剂
 fluorescent quantitation 荧光定量(法)
 fluorography 荧光自显影(术)
 flush end = blunt end
 flying library = jumping library
 fold-back element, FB element 折回因子
 folding 折叠
 folic acid 叶酸
 follicle 滤泡, 卵泡
 foot-printing 足迹法
 forced cloning 强迫克隆化
 foreign DNA 外源 DNA
 foreign protein 外源蛋白(质)
 forensic medicine 法医学
 fork movement 叉点移动(DNA复制)
 formaldehyde 甲醛
 formal genetics 形式遗传学
 formamide 甲酰胺
 form- I DNA I 型 DNA
 form- II DNA II 型 DNA
 form- III DNA III 型 DNA
 formycin 间型霉素
 formylmethionyl-tRNA (fmet-tRNA) 甲酰甲硫氨酰 tRNA
 forward mutation 正向突变
 forward reaction 正向反应, 前向反应
 founder 首建者
 "founder" principle "建立者"原则, "创始者"原则
 foster mother 代孕母亲
 fraction 组分, 级分
 fractional cultivation 分部培养(法)
 fractional mutant 部分突变体, 部分突变型
 fractional precipitation 分级沉淀
 fractionation 分级分离, 分部(处理)
 fraction collector 分部收集器
 fragment 片段
 fragmentation 断裂, 裂解
 frame shift 移码
 frameshift mutagen 移码诱变剂
 frameshift mutation 移码突变

frameshift suppression 移码抑制
 fraternal twin 异卵双生
 free diffusion 自由扩散
 free energy 自由能
 free radical 自由基, 游离基
 freeze-drier = lyophilizer
 freeze-drying = lyophilization
 freeze-squeezing 冷冻挤压
 French (cell) press 弗氏(细胞)压碎器
 Freund's complete adjuvant 弗氏完全佐剂
 Freund's incomplete adjuvant 弗氏不完全佐剂
 frozen-thaw lysate (冰)冻-融(化)裂解物
 fruit fly 果蝇
 full-length cDNA 全长 cDNA
 full-sib 全同胞
 fume hood 通风橱, 烟橱
 funnel 漏斗
 fusant 融合子, 融合体
 fusion protein 融合蛋白
 fusogen 促融剂

G

G418-Geneticin
 galactosidase 半乳糖苷酶
 γ (-ray) counter γ (射线) 计数器
 gamete 配子
 gamogenesis 有性生殖
 gap 缺口, 空隙
 gap repair 缺口修复
 gas-phase protein sequencer 气相蛋白质测序仪
 gastrula 原肠胚
 GC box GC 盒(框)
 GC tailing GC 加尾
 GC value GC 值, GC 百分比
 gelatin 明胶
 gel chromatography 凝胶层析
 gel dryer 凝胶干燥机, 干胶机
 gel electrophoresis 凝胶电泳
 gel-filtration chromatography 凝胶过滤层析
 gel-loading buffer 凝胶加样缓冲液
 gel mold (凝)胶模
 gel mould = gel mold
 Gen Bank nucleotide sequence database Gen Bank 核苷酸序列
 资料库
 gene 基因

gene activation 基因活化, 基因激活
 genealogical tree 系统树
 genealogy ①家系②系统学③血统
 gene amplification 基因扩增
 gene analysis 基因分析
 gene arrangement 基因排列
 gene bank 基因文库
 gene center theory 基因中心学说
 gene cloning 基因克隆
 gene cluster 基因簇
 gene ecology 遗传生态学, 物种生态学
 gene complex 基因复合体
 gene conversion 基因转变, 基因转换
 gene diagnosis 基因诊断
 gene difference 基因差异
 gene diversity 基因多样性
 gene dosage 基因剂量
 gene duplication 基因重复
 gene engineering = genetic engineering
 gene eviction 基因回收
 gene exchange 基因交换
 gene expression 基因表达
 gene family 基因家族
 gene flow 基因流动
 gene frequency 基因频率
 gene fusion 基因融合
 gene interaction 基因相互作用
 gene library 基因文库
 gene localization 基因定位
 gene magnification 基因扩增
 gene mapping 基因定位, 基因图谱
 gene marking 基因标记
 gene mutation 基因突变
 gene mutation rate 基因突变率
 gene order 基因序列
 gene organization 基因组织
 gene pool 基因库
 generalized transduction 普遍性传导
 generate 发生, 产生
 gene-ratio 基因比例
 generation 产生, 生成; 世代
 generative cell 生殖细胞
 gene redundancy 基因冗余, 基因重复
 genesiology 生殖学
 genesis ①起源, 发生②生殖
 gene splicing 基因剪接

gene string 基因线, 基因替代
 gene substitution 基因置换
 gene switching 基因开关
 gene theory 基因学说
 gene therapy 基因治疗
 genetical system 遗传体系
 genetic analysis 遗传分析
 genetic apparatus 遗传器
 genetic assimilation 遗传同化
 genetic background 遗传背景
 genetic block 遗传性障碍
 genetic carrier 遗传携带者, 遗传载体
 genetic code 遗传密码
 genetic coefficient 发生系数
 genetic compensation 遗传补偿
 genetic complement 遗传互补
 genetic constitution 遗传成分, 遗传组成
 genetic continuity 遗传连续性
 genetic control 遗传防治
 genetic counseling 遗传咨询
 genetic disease 遗传疾病
 genetic distance 遗传图距
 genetic drift 遗传〔的〕漂移
 genetic engineering 基因工程, 遗传工程
 genetic equilibrium 遗传平衡
 genetic erosion 遗传侵害
 genetic factor 遗传因子
 genetic fingerprint 基因指纹, 遗传指纹
 genetic flexibility 遗传可塑性
 genetic formula 遗传公式
 genetic gain 遗传获得量
 genetic heterogeneity 遗传异质性
 genetic homeostasis ①遗传稳态 ②遗传的自动调节
 genetic inertia 遗传惰性
 Geneticin 一种氨基糖苷类抗生素 (G418)
 genetic information 遗传信息
 genetic interference 遗传干扰
 genetic isolation 遗传隔离
 geneticist 遗传学家
 genetic load 遗传负荷
 genetic linkage 遗传连锁
 genetic manipulation 基因操作
 genetic map 遗传图
 genetic marker 遗传标记
 genetic material 遗传物质
 genetic mosaic 遗传镶嵌

genetic polarity 遗传极性
 genetic polymorphism 遗传多态现象
 genetic process 遗传过程
 genetic progress 遗传进展
 genetic recombination 遗传重组
 genetic regulation 遗传调节
 genetics 遗传学
 genetic screening 遗传筛选, 遗传普查
 genetic shift 遗传漂移
 genetic stability 遗传稳定性
 genetic sterility 遗传性不育
 genetic surgery 遗传手术
 genetic transformation 遗传转化
 genetic typing 遗传分型
 genetic variance 遗传方差
 genetic variation 遗传变异
 gene transfer 基因转移
 gene transplacement 基因转位, 基因替换
 gene transposition 基因转位
 genic balance 基因平衡
 genocopy 拟遗传型, 拟基因型
 genohormone 基因激素
 genoid 细胞质基因, 类基因
 genome 基因组
 genomic exclusion 基因组排斥
 genomic library 基因组文库
 genomic mapping 基因组作图
 genophore 基因带
 genospecies 基因型群
 genotype 基因型
 genotypic control 基因型控制, 遗传型制约
 genovariation 基因变异
 genus 属
 germ cell 生殖细胞
 germ line 种系
 ghost 血影
 ghost peak 假峰, 鬼峰
 Giemsa stain Giemsa 染液, 吉姆萨染液
 glacial acetic acid 冰乙酸, 冰醋酸
 glassware 玻璃制品
 glass wool 玻璃棉, 玻璃毛
 global regulon 全局调节子
 globin 珠蛋白
 globular DNA 球状 DNA
 globular proteins 球状蛋白
 globulin 球蛋白

glucan 葡聚糖
 glucose 葡萄糖
 glucose effect 葡萄糖效应
 glutamic acid, Glu, E 谷氨酸
 glutamine, Gln, Q 谷氨酰胺
 glutaraldehyde 戊二醛
 glutathion 谷胱甘肽
 glycerol 甘油
 glycerol shock 甘油休克
 glycine, Gly, G 甘氨酸
 glycogen 糖原
 glycopeptide 糖肽
 glycoprotein 糖蛋白
 glycophorin 血型蛋白
 glycosaminoglycan 糖胺聚糖
 glyoxal 乙二醛
 goggles 护目(眼)镜
 Goldberg-Hogness box = TATA box
 Golgi body 高尔基体
 Golgi apparatus 高尔基器
 gonad 生殖腺
 gonocyte 性原细胞, 生殖母细胞
 Goldbrick box TATA 盒(框)
 gradient centrifugation 梯度离心
 gradient elution 梯度洗脱
 gradient gel electrophoresis 梯度凝胶电泳
 graft ①嫁接 ②接穗 ③嫁接物 ④移植 ⑤移植体
 graft rejection 移植体排斥
 gramicidin 短杆菌肽
 Gram staining 革兰氏染色
 granule [颗]粒
 germ plasm 生殖质
 graphite electrode 石墨电极
 growth curve 生长曲线, 增长曲线
 growth hormone, GH 生长激素
 growth medium 生长培养基
 GTP binding protein, G-protein GTP 结合蛋白, G 蛋白
 guanidine hydrochloride, Gu·HCl 盐酸胍
 guanidinium isothiocyanate 异硫氰酸胍
 guanidinium thiocyanate 硫氰酸胍
 guanine 鸟嘌呤
 guanine nucleotide binding protein = GTP binding protein 鸟嘌呤核苷酸结合蛋白
 guanosine monophosphate, GMP 鸟苷(一磷)酸
 guanosine diphosphate, GDP 鸟苷二磷酸
 guanosine triphosphate, GTP 鸟苷三磷酸

guaranteed reagent 保证试剂, 优级纯试剂
 guard column 保护柱
 guessmer 猜测体
 guide sequence 导引顺序
 gynanders 雌雄嵌合
 gyrase 促旋酶, 促超螺旋酶

H

h (a) emohlast 成血细胞, 血原细胞
 h (a) emocyte 血细胞
 h (a) emoglobin, Hb 血红蛋白
 h (a) emoglutinin 凝血素
 h (a) emolysin 溶血素
 h (a) emolysis 溶血作用
 h (a) emophilia 血友病
 hairpin loop 发夹环
 hairpin structure 发夹结构
 halflife 半寿期, 半衰期
 halide 卤化物
 hand-held (radioisotope) minimonitor 手提式小型 (放射性同位素) 探测器
 haploid 单倍体
 haplotype 单倍型
 hapten 辅抗原, 半抗原, 部分抗原
 haptoglobin (α -globulin) 触珠蛋白, 结合珠蛋白
 hardiness 抗性, 耐性
 harvesting 收获 (细胞等)
 HAT medium HAT 培养基
 HCRM, host controlled restriction and modification 宿主控制的限制和修饰作用
 heating belok 加热器
 heat shock 热休克
 heat shock gene 热休克基因
 heat shock protein 热休克蛋白 (质)
 heavy chain (H-chain, H-strand) 重链
 heavy metal resistance 重金属抗性
 HeLa cell HeLa 细胞, 海拉细胞
 helical structure 螺旋结构
 helicase 解旋酶
 helics 螺旋构形 (指染色体或 DNA)
 helicity 螺旋度
 helix 螺旋
 helix-coil transition 螺旋卷曲转变
 helix loop helix 螺旋—环—螺旋
 helix turn helix 螺旋—转折—螺旋

helper bacteriophage 辅助噬菌体
 helper phage = helper bacteriophage
 helper virus 辅助病毒
 hemagglutinin 血凝素, 红血球凝集素
 hematopoietic 造血的
 heme 血红素
 hemin 氯高铁血红素, 氯高铁原卟啉
 hemogenesis 生血, 血产生
 hemoglobinopathy 血红蛋白病
 heparin 肝素
 hepatitis A virus, HAV 甲型肝炎病毒
 hepatitis B virus, HBV 乙型肝炎病毒
 hepatitis B (virus) core antigen, HBcAg 乙肝 (病毒) 核心抗原
 hepatitis B (virus) e antigen, HBeAg 乙肝 (病毒) e 抗原
 hepatitis B (virus) surface antigen, HBsAg 乙肝 (病毒) 表面抗原
 hepatitis C virus, HCV 丙型肝炎病毒
 HEPES, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid
N-2-羟乙基哌嗪 *N'*-2-乙磺酸
 hereditary conservation 遗传保守性
 hereditary disease 遗传性疾病
 hereditary factor 遗传因素
 hereditary feature 遗传性状, 遗传特征
 hereditary substance 遗传物质
 hereditary variability 遗传变异性
 heredity 遗传
 herpesvirus 疱疹病毒
 herpex simplex virus, HSV 单纯疱疹病毒
 heteroallele 异点等位基因
 heteroantigen 异抗原
 heterochromatic zone 异染色质区
 heterochromatin 异染色质
 heterochromosome 异染色体
 heteroduplex 异源双链
 heterogeneity 异质性
 heterogeneous nuclear RNA 核内不均一 RNA, 不均一核 RNA, 核内异质 RNA
 heterogenic 异基因的
 heterograft 异种移植
 heteroimmune 异抑制免疫
 heterokaryosis 异核性, 异核现象
 heterologous 异源的, 不同的
 heteroploid 异倍体
 heterosome 性染色体
 heterotrophy 异养

heterozygote ①杂合体, 杂合子 ②异型接合体, 异型接合子

heterozygous 杂合的

hexamminecobalt chloride 氯化六氨合高钴

hexicology 生态学

high frequency of lysogenization 高频溶源化

high frequency of recombination, HFR 高频重组

highly repetitive DNA 高度重复 DNA

highly repetitive sequence 高度重复序列

high-molecular-weight DNA 高分子量 DNA

high-performance liquid chromatography, HPLC 高效液相层析

high-pressure liquid chromatography, HPLC 高压液相层析

high speed centrifugation 高速离心

histidine, His, H 组氨酸

histochemical identification 组织化学鉴定

histochemistry 组织化学

histocompatibility 组织相容性, 组织亲和性

histogenesis 组织发生

histology 组织学

histone 组蛋白

HLA = human leucocyte antigen 人体白细胞抗原

hollow fiber 中空纤维

holoenzyme 全酶

hologeny 个体系统发生

homeo box 同源盒 (框)

homeologous 部分同源的

homeokinesis 均等分裂

homeologue 部分同源染色体

homeostatic control 稳态控制

homeosis 同源异形

homeostasis 自动调节, 体内平衡, 顺境调节作用, 稳态

homeotic mutant 同源异形突变型

homeotransplant 同种移植

homocopolymer 同型共聚物

homoduplex 同源双链

homogeneity 同质性

homoallelic genes 同质等位基因

homogenization 匀浆 (作用), 均质化 (作用)

homogenizer 匀浆器

homogenom 同源染色体组

homograft 同种移植

homogenotization 同型基因化

homimmune phage 同源免疫噬菌体

homologous 对应的, 同源的, 同等的

homologous chromosome 同源染色体

homologous genes 相同基因, 同功基因

homologous helper plasmid 同源辅助质粒

homologous recombination 同源重组

homology 同源性

homoploid 同倍体

homopolymer 同聚物, 均聚物

homopolymeric tailing 同聚物加尾 (反应)

homoserine 高丝氨酸

homotype 同型

homozygote ①纯合体 ②纯合子 ③同型接合体 ④同型接合子

homozygous ①纯合的 ②同型的 ③纯合子的

hormone 激素 (内分泌)

hopping library = jumping library

horizontal rotor 水平转头

horizontal slab gel electrophoresis 水平板凝胶电泳

horseradish peroxidase, HRP 辣根过氧化物酶

host 宿主

host cell 宿主细胞

host range 宿主范围

hot plate 电热板

hot spot 热点

housekeeping gene 持家基因, 管家基因

human chorionic gonadotropin, HCG 人绒毛膜促性腺素

human growth hormone 人生长激素, 人促生长素

human immunodeficiency virus, HIV 人免疫缺陷病毒, 人免疫缺陷病毒

human leucocyte antigen, HLA 人类白细胞抗原

human papillomavirus, HPV 人乳头瘤病毒

human somatotropin = human growth hormone

humoral immunity 体液免疫

hybrid 杂交体, 杂合体, 杂种

hybrid arrested translation 杂交 (体) 扣留翻译

hybrid depletion method 杂交体耗竭法

hybridization 杂交

hybridization *in situ* = *in situ* hybridization

hybrid molecule 杂交分子

hybrid promoter 杂合启动子

hybridoma 杂交瘤

hybrid released translation 杂交 (体) 释放翻译

hybrid selection 杂交体选择 (法)

hydration 水合

hydrazine 肼

hydrochloric acid, HCl 盐酸

hydrogen bond 氢键

hydrolysis 水解 (作用), 水解 (反应)

hydrophilicity 亲水性
 hydrophobic interaction 疏水作用
 hydrophobicity 疏水性
 hydroxyapatite chromatography 羟(基)磷灰石层析
 hydroxyproline, Hyp 羟脯氨酸
 8-hydroxyquinoline 8-羟基喹啉
 hygromycin 潮霉素
 hygromycin B phosphotransferase 潮霉素 B 磷酸转移酶
 hyperchromicity 增色性
 hyperchromism = hyperchromicity
 hyperimmune serum 超免疫血清
 hypermutability 超突变性
 hypervariable region, HVR 高变区
 hypochromicity 减色性
 hypochromic shift 减色转变
 hypochromism = hypochromicity
 hypodermic needle 皮下注射针头
 hypoplasia ①发育不全 ②细胞减生现象
 hypoxanthine 次黄嘌呤
 hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, HGPRT 次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶

icebath 冰浴
 identification 鉴定
 idiochromatin 性染色质, 异染色质
 idiochromosome 性染色体
 idiogram 染色体组型模式图
 idiotypic 独特型 [抗原决定簇]
 illegitimate recombination 非常规重组
 imidazole 咪唑
 immediate early transcription (病毒的) 立即早期转录
 immobilized cell 固定化细胞
 immobilized enzyme 固定化酶
 immobilized protein 固定化蛋白质
 immune biology 免疫生物学
 immune complex 免疫复合物
 immune response 免疫应答, 免疫反应
 immune response gene, Ir gene 免疫应答基因
 immunity 免疫性
 immunizing 免疫
 immunization schedule 免疫程序
 immunoadsorption 免疫吸附
 immunoassay 免疫测定
 immunoblotting 免疫印迹(法)

immunochemistry 免疫化学
 immunocyte 免疫细胞
 immunodetection 免疫检测
 immunodiffusion 免疫扩散
 immunoelectrophoresis 免疫电泳
 immunogenetics 免疫遗传学
 immunofluorescence 免疫荧光
 immunogen 免疫原
 immunogenicity 免疫原性
 immunoglobulin, Ig 免疫球蛋白
 immunological disease 免疫性疾病
 immunological memory 免疫记忆
 immunological rejection 免疫排斥
 immunological screening 免疫学筛选
 immunology 免疫学
 immunoprecipitate 免疫沉淀物
 immunoprecipitation 免疫沉淀(法)
 implantation 植入
 inactivation 灭活, 失活
 inborn errors of metabolism 先天性代谢缺损, 先天性代谢缺陷
 inbred line 近交系, 自交系
 inbred strain 纯系
 incidence 发生率, 发病率
 incineration 烧灼灭菌
 inclusion body 包涵体, 包含体
 incross ①品种内异系交配 ②纯合体交配
 incompatibility 不相容性
 incompatible termini 不匹配末端
 incorporation 掺入, 参入
 incubation 温育, 培养
 incubator 培养箱, 温箱
 individual development 个体发育
 induced enzyme = inducible enzyme
 induced mutation 诱导突变
 inducer 诱导物
 inducible enzyme 诱导酶
 inducible phage (可) 诱导噬菌体
 induction 诱导
 inert gene 惰性基因
 infection 感染; 侵染; 传染
 information 信息
 informational macromolecules 信息大分子
 information theory 信息论
 inheritable character 遗传性状
 inheritance 遗传

- inhibiting 抑制
 inhibiting gene = suppressor
 inhibitor 抑制因子, 抑制剂
 initiation 起始
 initiation codon 起始密码子
 initiation factor 起始因子
 initiator = initiation codon
 injection 注射
 inner volume 内水体积
 inoculating 接种
 inoculating loop 接种环
 inoculating needle 接种针
 inoculation hood 接种箱
 inoculum 接种物, 种菌, 种子培养物
 inosine 次黄嘌呤核苷, 次黄苷, 肌苷
 insert 插入, 插入片段
 insertron 插入子, 嵌入子
 insertion 插入, 嵌入
 insertion site 插入位点
 insertional inactivation 插入失活
 insertional mutagenesis 插入诱变
 insertional mutation 插入突变
 insertional translocation 插入易位
 insertion element 插入元件, 插入成分
 insertion sequence, IS 插入序列
 insertion vector 插入型载体
 in situ 原位
 in situ amplification 原位扩增
 in situ hybridization 原位杂交
 instability 不稳定性
 insulin 胰岛素
 integral protein 整合蛋白
 integrase 整合酶
 integration 整合
 integrative suppression 整合抑制
 integrator gene 整合基因
 intensifying screen 增感屏
 intercalation 嵌入, 螯合
 interchelating agent 螯合剂
 intercross 互交, 杂交
 interface 界面
 interference 干扰, 干涉
 interference-resistant mutant 抗干扰突变体, 抗干涉突变体
 interferon 干扰素
 intergenic region, IG region 基因间隔区, 基因间区
 intergenic recombination 基因间重组
 intergenic suppression 基因间抑制
 interleukin, IL 白细胞介素, 白介素
 internal guide sequence 内在导引顺序
 intermicosis 有丝分裂间期
 internal spiral 内螺旋
 interphase 间期
 interspecific 种间的
 interstitial deletion 中间缺失
 intervening sequence 间插序列
 intra-allelic complementation 等位基因内互补
 intrallelic interaction 等位基因相互作用
 intracellular enzyme 胞内酶
 intrachromosomal 染色体内的
 intragenic complementation 基因内互补
 intragenic mutation 基因内突变
 intragenic suppression 基因内抑制
 intramolecular ligation 分子内连接
 intranuclear 核内的
 intraspecific 种内的
 intrinsic (al) ①先天性的, 天然的 ②固有的, 特具的
 ③内在的
 introgression ①基因渗入 ②种质渗入 ③渐渗现象
 intron 内含子
 inverse PCR 反向 PCR
 inversion 倒位
 inverted repeat, IR 反向重复(序列)
 in vitro (在) 体外
 in vitro mutagenesis 体外诱变
 in vitro packaging 体外包装
 in vitro transcription 体外转录
 in vitro translation 体外翻译
 in vivo (在) 体内, 直接体内
 in vivo foot printing 体内足迹法
 iodination 碘化(作用)
 ion-exchange chromatography 离子交换层析
 ion-exchange resin 离子交换树脂
 ionic strength 离子强度
 ion pump 离子泵
 irreversible dissociation 不可逆解离
 isoacceptor tRNA 同工 tRNA
 isoantibody ①自体抗体 ②同种抗体, 同族抗体
 isoantigen ①自体抗原 ②同种抗原, 同族抗原
 isoamyl alcohol 异戊醇
 isochromosome 等臂染色体
 isocoding 同类编码
 isoenzyme 同工酶, 同功酶

isogenetic 同源的, 同基因的
 isogenome 同基因组, 同质基因组
 isoelectric point 等电点
 isoelectrofocusing, IEF 等电聚焦
 isolate 分离物
 isolation 分离
 isoleucine, Ile, I 异亮氨酸
 isometric DNA sequence 同组异序 DNA 序列
 isopentanol 异戊醇
 isopropanol 异丙醇
 isopropylthio- β -D-galactoside, IPTG 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷
 isoprotein 同工蛋白质
 isopycnic centrifugation 等密度离心
 isoschizomer 同裂酶, 同切点酶, 同切口酶
 isotachophoresis 等速电泳
 isotonic solution 等渗溶液
 isotope 同位素
 isotopic tracing 同位素示踪
 isozyme = isoenzyme

J

jigsaw puzzle 拼板假说
 joining gene, J gene J 基因
 junction 连接
 jumping gene 跳跃基因, 移动基因
 jumping library 跳步文库
 juvenile stage 幼年期

K

kanamycin 卡那霉素
 karyogene 核基因
 karyogenetics 核遗传学
 karyokinesis ①有丝分裂 ②核分裂
 karyology 胞核学, 核学
 karyotype 核型
 katabolism 分解代谢
 katabolite 分解代谢产物
 keratin 角蛋白
 killer 放毒者, 杀伤者
 kilobase, kb 千碱基
 kinase 激酶
 klenow fragment (大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的) Klenow 片段, 大片段(酶)

kunkel method of site-directed mutagenesis Kunkel 定位诱变法

L

labelled compound 标记化合物
 labile gene 不稳定基因, 易变基因
 laboratory clamp 实验室用弹簧夹
 lac operon 乳糖操纵子
 lactam 内酰胺
 lactamase 内酰胺酶
 ladder (序列) 梯
 lagging strand 后随链
 lag phase [细胞生长曲线的] 延滞期
 λ phage = bacteriophage λ
 lane [电泳] 泳道
 lamellar body 片层体
 large-scale preparation 大量制备
 lariat RNA 套索 RNA
 laser 激光
 late gene (病毒) 晚期基因
 latent heredity 潜伏遗传
 late protein (病毒) 晚期蛋白
 late replicating 延迟复制
 late transcription (病毒的) 晚期转录
 lawn 菌苔
 leader region 前导区
 leader sequence 前导序列
 leading ion 先导离子
 leading peptide 前导肽
 leading strand 前导链
 leakage 渗漏
 leaky gene 渗漏基因
 leaky mutant 渗漏突变体, 渗漏突变型
 leaky mutation 渗漏突变
 leaky protein 渗漏蛋白质
 lectin 凝集素
 lethal 致死的, 致死因子
 lethal gene 致死基因
 lethal mutation 致死突变
 lethal zygosis 致死接合
 leucine 亮氨酸
 leucine zipper 亮氨酸拉链
 leupopun 亮抑蛋白酶肽, 亮抑制素, 亮抑酶肽
 library 文库
 life cycle 生活周期, 生活史

ligand 配体, 配基
 ligase 连接酶
 ligation 连接 (反应)
 light chain 轻链
 light reaction 光反应
 light repair 光修复
 lineage 谱系
 linear DNA 线状 DNA, 线型 DNA
 linkage 连锁, 连环
 linearize 线性化
 linker 接头, 衔接物
 linker - scanning mutagenesis 接头分区诱变
 linking library 连接文库, 连锁文库
 lipid 脂质, 类脂
 lipoprotein 脂蛋白
 liposome 脂质体
 liposome entrapment 脂质体包载
 liquid chromatography 液相层析, 液相色谱
 liquid culture 液体培养 (物)
 liquid culture method 液体培养法
 liquid medium 液体培养 (基)
 liquid scintillation counter 液体闪烁计数器
 lithium chloride 氯化锂
 loading 加样
 loading buffer 加样缓冲液
 localized random mutagenesis 局部随机诱变
 localization 定位
 locus 基因座, 位点
 log phase [细胞生长曲线的] 对数期
 long terminal repeat, LTR 长末端重复序列
 loop - in mutagenesis 插环诱变, 环圈插入诱变 (法), 环入诱变
 loop - out mutagenesis 去环诱变, 环圈删除诱变 (法), 环出诱变
 loss mutation 丧失突变
 luminescence 发光
 low - abundant mRNAs 低丰度 mRNA
 low - gelling temperature agarose = low melting - temperature agarose
 low melting - point agarose = low melting - temperature agarose
 low melting - temperature agarose 低熔点琼脂糖
 lyoenzyme = extracellular enzyme
 lyophilization (冷) 冻干 (燥)
 lyophilizer (冷) 冻干 (燥) 机
 luciferase 荧光素酶
 lymphokine 淋巴因子

lysate 裂解物, 裂解液
 lysine, Lys, L 赖氨酸
 lysogen 溶源体, 溶源菌
 lysogenesis 溶源现象
 lysogenic bacteria 溶源性细菌
 lysogenic phage 溶源性噬菌体
 lysogenization 溶源化
 lysogeny 溶源性, 溶源状态
 lysosomal enzyme 溶酶体酶
 lysosome 溶酶体
 lysozyme 溶菌酶
 lyticase 溶细胞酶
 lytic cycle 裂解周期
 lytic infection 裂解性感染
 lytic response 裂解反应
 lytic virus 裂解病毒

M

macroglobulin 巨球蛋白
 macromolecule 大分子
 magnesium 镁
 magnet 磁体
 magnetic stirrer 磁 (力) 搅拌器, (电) 磁搅拌器
 magnetic stirring bar 磁 (力) 搅拌棒, (电) 磁搅拌棒
 major groove [DNA 双螺旋的] 大沟
 major histocompatibility complex, MHC 主要组织相容性复合体
 malaria vaccine 疟疾疫苗
 male gonocyte 精母细胞
 male pronucleus 雄原核
 malignancy, malignant growth 恶性生长
 maltose 麦芽糖
 mammalian cell 哺乳动物细胞
 map 图, 图谱
 marker 标记, 标志, 标准参照物
 marker dye 标准参照染料
 marker enzyme 标志酶
 marker gene 标记基因
 marker rescue 标记获救
 marrow ①髓 ②骨髓
 mask (防护) 面具
 mass spectrometry 质谱
 master gene 主导基因, 主宰基因
 maternal effect 母体效应
 mating 交配, 杂交

- matrix 基质
- matricyte 母细胞
- maturation division (meiosis) 成熟分裂 (减数分裂)
- Maxam - Gilbert method (of DNA sequencing) Maxam - Gilbert DNA 测序法; 化学测序法
- MCS, multiple cloning site 多克隆位点
- measurement 测量
- medical genetics 医学遗传学
- medical molecular biology 医学分子生物学
- medium 培养基
- medulla 髓质
- meiosis 减数分裂
- melanin 黑色素
- melanosome 黑色素小体
- melting 熔解
- membrane 膜
- membrane filter 薄膜滤器
- membrane protein 膜蛋白
- Mendelian inheritance 孟德尔式遗传
- mercaptoethanol 巯基乙醇
- meromyosin 酶解肌球蛋白
- MES, 2 - (N - morpholino) ethanesulfonic acid 2 - (N - 吗啉代) 乙磺酸
- mesh 筛目
- mesoderm 中胚层
- mesosome 中体 (间体)
- messenger ribonucleoprotein mRNP 信使核糖核蛋白 (体)
- messenger RNA, mRNA 信使 RNA
- metabiosis 共生
- metabisulfite 偏亚硫酸氢盐
- metabolism 代谢
- metachromatin 异染色质
- metalloenzyme 金属酶
- metallothionein 金属硫蛋白
- metaphase 中期
- methanol 甲醇
- methionine, Met, M 甲硫氨酸, 蛋氨酸
- methionine - specific aminopeptidase 甲硫氨酸特异性氨肽酶
- methionine tRNA (tRNA^{met}) 甲硫氨酸转移 RNA
- methotrexate 氨甲喋呤
- methylase 甲基化酶
- methylation 甲基化 (作用)
- N, N' - methylenebisacrylamide N, N' - 亚甲双丙烯酰胺
- methylene blue 亚甲蓝, 美蓝
- methylmercuric hydroxide 氢氧化甲基汞
- micell 微团
- Michealis constant [Km] 米氏常数
- Michealis - Menton constant = Michealis constant 米 - 曼常数
- microbody 微体
- microbore column chromatography 微内径柱层析
- microcentrifuge 微量离心机
- microcentrifuge tube 微量离心管
- microconcentrator 微量浓缩器
- microenvironment 微环境
- microfilament 微丝
- microglobulin 微球蛋白
- microheterogeneity 微不均一性
- microinjection 显微注射
- micromanipulation 显微操作
- micrometer 微米
- micromutation 小突变 (基因突变), 微突变
- microorganism 微生物
- micropipette 微量移液器
- micropipette tip 微量移液器吸头
- microscope 显微镜
- microsome 微粒体
- microsatellite DNA 微卫星 DNA
- microtiter plate 微量滴定板
- microtubule 微管
- microvillus (pl., microvilli) 微绒毛
- midbody 中间体
- mid - log phase [细胞生长曲线的] 对数中期
- migration 迁移
- migration rate 迁移率
- millicurie (mc) 毫居里
- milli - micron (复, milli - micra) 毫微米
- millipore filter 微孔滤膜
- millipore filtration 微孔过滤
- minicell 小细胞
- minigel 微型凝胶
- minimal medium 基本培养基, 极限培养基
- miniprep 微量制备, 小制备
- minisatellite DNA 小卫星 DNA
- minisatellite region 小卫星区
- minor base 稀有碱基
- minor groove [DNA 双螺旋的] 小沟
- minus strand = negative strand
- mischarging 错载
- miscoding (密码) 错编
- misincorporation 错掺, 错误掺入, 错参
- misinsertion 错插
- mismatching 错配

mismatch repair 错配修复
 mispairing = mismatching
 misreading = mistranslation
 misrepair 错修复
 missense codon 错义密码子
 missense mutation 错义突变
 missense suppression 错义抑制
 missense suppressor 错义(突变)抑制基因, 错义(突变)抑制因子
 mistranslation 错译
 mitochondrial DNA, mt DNA 线粒体 DNA
 mitochondrial genome 线粒体基因组
 mitogen 促细胞分裂剂, 丝裂原
 mitomycin 丝裂霉素
 mitosis (复, mitoses) 有丝分裂
 mixed-bed resin 混合床树脂
 mixed-oligonucleotide-primed amplification of cDNA, MOPAC 混合寡核苷酸引导的 cDNA 扩增
 mixed-sequence oligonucleotide, MSO 混合序列的寡核苷酸
 mobile genetic element 可移动的遗传因子
 mobile phase 流动相
 mobility 迁移率
 mobilization 转移, 带动转移
 moderately repetitive sequence 中等重复序列
 moderator 调节子
 modification 修饰
 modification system 修饰系统
 modulator 调整基因
 molar absorption coefficient = molar absorptivity
 molar absorptivity 摩尔吸光系数
 molar concentration 摩尔浓度
 molar extinction coefficient = molar absorptivity 摩尔消光系数
 molar ratio 摩尔比
 molar weight 摩尔量
 mold 霉菌; 模, (胶) 模
 mole 摩尔
 molecular cloning 分子克隆
 molecular biology 分子生物学
 molecular bionics 分子仿生学
 molecular disease 分子病
 molecular evolution 分子进化
 molecular genetics 分子遗传学
 molecular hybridization 分子杂交
 molecular-weight marker 分子量标准参照物
 molecular sieve 分子筛

molecular spiral 分子螺旋
 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, M-MuL-
 VRT = murine reverse transcriptase 莫洛尼鼠白血病病毒反
 转录酶
 monitor 探测器, 监测器
 monoallelic 单等位基因的
 monobed resin 单床树脂
 monochromator 单色光源
 monoclonal antibody 单克隆抗体
 monocyte 单核细胞
 monogenic character 单基因性状
 monolayer 单分子层
 monomer 单体
 monoploid 单倍体, 一倍体
 monster 畸形, 畸胎
 MOPS, 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid 3-(N-
 吗啉代)丙磺酸
 morgan 摩(基因交换单位)
 morphocytology 细胞形态学
 morphogenesis 形态发生, 形态建成
 morphology 形态学
 mosaic ①花斑病 ②镶嵌体, 嵌合体
 motif 基元序列, 基序
 mtDNA 线粒体 DNA
 mould = mold
 mouse (小) 鼠
 M₁₃ phage = bacteriophage M₁₃
 mucinogen 粘蛋白原
 mucoid protein 类粘蛋白
 mucopolysaccharide 粘多糖
 mucoprotein 粘蛋白
 multicopy 多拷贝
 multicistron 多顺反子, 多作用子
 multigene family 多基因家族
 multigenic 多基因的
 multimer 多聚体, 多体
 multimutation 复突变, 多突变
 multiple allele, multiple allomorph 复等位基因
 multiple cloning sites 多克隆位点
 multiple-factor inheritance 多因子遗传
 multiplication 增殖, 繁殖
 multiplicity 感染复数
 multiploid 多倍体
 mung-bean nuclease 绿豆核酸酶
 murine reverse transcriptase 鼠源反转录酶
 muscarine 毒蝇碱, 毒蕈碱

mutability 突变可能性, 可突变性
 mutagen 诱变剂
 mutagenesis 诱变
 mutagenic oligonucleotide 诱变寡核苷酸
 mutant 突变体, 突变株, 突变型
 mutase 变位酶
 mutation 突变
 mutational site 突变位点
 mutator gene 增变基因
 mycophenolic acid 霉酚酸
 myoglobin 肌红蛋白
 myosin 肌球蛋白

N

nanometer (10^{-9} m) 毫微米, 纳米
 nascent DNA 新生 DNA
 National Institute of Health (U. S. A.), NIH 美国国立卫生研究院
 native immunity 先天免疫性
 native protein 天然蛋白质
 natural mutation 自然突变
 natural selection 自然选择
 nearest neighbor sequence analysis 毗邻序列分析
 negative control 负控制; 阴性对照
 negative correlation 负相关
 negative feedback 负反馈
 negative strand 负链
 negative supercoiling 负超螺旋
 neomorph 新效[等位]基因
 neomycin 新霉素
 nested deletion 嵌套缺失
 nested PCR 嵌套(式)PCR
 nested primers 嵌套引物
 neuron 神经元
 neutral base 中性碱基
 neutralization 中和作用
 neutralizing antibody 中和抗体
 neutral polymorphism 等位基因作用多形性
 nick 切口, 缺口
 nickase 切口酶, 缺口酶
 nicked circular DNA 带切口的环状 DNA
 nick translation 切(缺)口平移, 切(缺)口复制, 切(缺)口转译
 NIH Guideline NIH 的(重组 DNA)准则
 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(辅酶 I)
 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(辅酶 II)
 nitric acid 硝酸
 nitro-blue tetrazolium, NBT 氮蓝四唑
 nitrocellulose, NC 硝酸纤维素, 硝化纤维(素)
 nitrocellulose filter, NC filter 硝酸纤维素(滤)膜, 硝化纤维素膜
 nitrogen fixation 固氮
 o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, ONPG 邻硝基苯- β -D-半乳糖苷
 NMR, nuclear magnetic resonance 核磁共振
 non-allele 非等位基因
 non-allelic genes 非等位基因
 non-coding region 非编码区
 non-coding sequence 非编码序列
 nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳
 nonfat dried milk 脱脂奶粉
 nonhistone protein 非组蛋白(质)
 non-overlapping triplet 非重叠三联
 nonpermissive cell 非允许细胞
 nonpermissive condition 非允许条件
 nonphosphorylated linker 非磷酸化接头, 未磷酸化接头
 non-polar bond 非极性键
 nuclear membrane 核膜
 nonradioactive labeling 非放射性标记(法)
 nonsense codon 无义密码子
 nonsense mutation 无义突变
 nonsense suppression 无义抑制
 nonsense suppressor 无义(突变)抑制基因, 无义(突变)抑制因子
 non-translational region 非翻译区
 nopaline 胭脂碱
 normal saline 生理盐水
 Northern blotting Northern 印迹(法), RNA 印迹(法)
 Northern hybridization Northern 杂交
 Northwestern blotting Northwestern 印迹法, RNA-蛋白质印迹(法)
 N-terminal = amino terminal N 端
 nuclear 核; 细胞核
 nuclear envelope 核膜
 nuclear lamina 核层
 nuclear matrix 核基质
 nuclear polyhedrosis virus, NPV 核型多角体病毒
 nuclease 核酸酶

nuclease BAL₃₁ = BAL nuclease
 nucleaseSI = SI nuclease
 nucleic acid 核酸
 nucleoid 拟核
 nucleolar 核仁的
 nucleolar - organizing region 核仁组织区
 nucleolus 核仁
 nucleoplasm 核质
 nucleoprotein 核蛋白(体)
 nucleosidase 核苷酶
 nucleoside 核苷
 nucleosome 核小体
 nucleotide 核苷酸
 nucleotide analog (ue) 核苷酸类似物
 nucleus 核
 null mutation 无效突变
 nylon membrane 尼龙膜

O

ochre codon 赭石密码子 UAA 三联体密码子
 ochre mutation 赭石(突变)抑制基因, 赭石(突变)抑制因子
 octopine 章鱼碱
 Okazaki fragment 冈崎片段
 oligo (dG) 寡脱氧鸟苷酸
 oligo (dT) 寡脱氧胸苷酸
 oligo (dT) - cellulose 寡脱氧胸苷酸纤维素
 oligomer 寡聚体, 低聚体
 oligonucleotide 寡核苷酸, 低聚核苷酸
 oligonucleotide - directed mutagenesis = oligonucleotide - mediated mutagenesis 寡核苷酸指导的诱变
 oligonucleotide - mediated mutagenesis 寡核苷酸介导的诱变
 oligonucleotide microchip 寡核苷酸微芯片
 oligopeptide 寡肽
 oncogene 癌基因
 oncogenesis 瘤形成
 ontogenesis, ontogeny 个体发生, 个体发育
 oocyte 卵母细胞
 oogenesis 卵子发生
 open circular DNA, oc DNA 开环 DNA
 open reading frame, ORF 开放读框, 可读框, 可译框架
 operator 操纵基因
 operon 操纵子
 optical density, OD = absorbance 光密度
 organic phase 有机相

organic solvent 有机溶剂
 origin of replication 复制起点
 origin of species 物种起源
 orphon 孤独基因
 orthogonal field alternation gel electrophoresis, OFAGE 正交交变电场凝胶电泳
 orthomutation 定向突变
 oven 烘箱
 overdominance 超显性
 overlapping clones 重叠克隆
 overlapping code 重叠密码
 overlapping genes 重叠基因
 overexpression 超(量)表达
 overproduction 超量产生, 超量生产
 oviduct 输卵管
 ovum 卵
 oxidative phosphorylation 氧化磷酸化
 oxine = 8 - hydroxyquinoline
 oxyhemoglobin 氧合血红蛋白

P

packaging 包装
 packaging extract 包装提取物
 packaging signal 包装信号
 packed column 填充柱
 pairing 配对
 PALA, L - phosphonacetyl - L - aspartate L - 膦羧乙酰 - L - 天冬氨酸
 palindrome 回文, 旋转对称(顺序)
 papain 木瓜蛋白酶
 papillomavirus 乳头瘤病毒
 papovavirus 乳多空病毒
 parachromatin 副染色质
 paracodon 副密码子
 parallel determination 平行测定
 parallel mutation 平行突变
 paramagnetic resonance 顺磁共振
 paratop (抗原)旁位, (抗原)互补位
 partial digestion 部分(酶切)消化
 partial dominance 不完全显性
 particle 颗粒
 partition chromatography 分配层析
 passage (细胞)传代
 passive immunity 被动免疫
 passive transport 被动运输

Pasteur pipette 巴斯德吸管, 巴氏吸管
 paternal inheritance 父性遗传
 pathogenetics 病理遗传学
 pattern 型, 带型; 图; [特征序列] 模式
 pattern gene 成型基因
 pedigree 谱系
 pedigree diagram 谱系图
 pellet 丸(粒)片、(粒状)沉淀
 penetrance of gene 基因外显率
 penicillin 青霉素
 penicillinase 青霉素酶
 pepsin 胃蛋白酶
 pepstatin 胃蛋白酶抑制剂, 抑胃肽
 peptide 肽
 peptide bond 肽键
 peptone 蛋白胨
 peptide synthesizer 多肽合成仪
 peptidoglycan 肽聚糖
 perchloric acid 高氯酸
 peripheral blood 外周血
 peripheral protein 边周蛋白
 periplasm 外周质
 periplasmic space 壁膜间隙, 外周质间隙
 peristaltic pump 蠕动泵
 permease 透性酶
 permissive cell 允许细胞
 permissive condition 允许条件
 peroxidase 过氧化物酶
 peroxisome 过氧化物酶体
 pesticide 杀虫剂
 Petri dish 培养皿
 PHA (Phytohemagglutinin) 植物凝血素
 phaenogenetics, phenogenetics 表型遗传学
 phage = bacteriophage 噬菌体
 phagemid 噬菌粒, 噬粒
 phagocyte 吞噬细胞
 phase ①相 ②期, 阶段
 phase contrast microscope 相差显微镜
 phasnid = phagemid
 phenol 酚, 苯酚
 phenolsulfonphthalein, PSP 酚磺酞, 酚红
 phenotype 表型
 phenylalanine Phe, F 苯丙氨酸
 o-phenylenediamine, OPD 邻苯二胺
 phenylmethylsulfonyl fluoride 苯甲基磺酰氟
 phosphatase 磷酸酶

phosphate 磷酸盐
 phosphodiesterase 磷酸二酯酶
 phosphodiester bond 磷酸二酯键
 phospholipid 磷脂
 phosphoramidite 亚磷酰胺
 phosphoric acid 磷酸
 phosphorylated linker 磷酸化接头
 phosphorylation 磷酸化(作用)
 photoaffinity labeling 光亲和标记
 photobioun 光(敏)生物素
 photodigoxigenin 光(敏)地高辛配体, 光(敏)洋地黄毒苷
 photon 光子
 photopolymerization 光聚合
 photophosphorylation 光合磷酸化作用
 photoreactivation 光复活[作用]
 photoreactivation repair 光复活修复
 photorespiration 光呼吸
 photosensitivity 光敏性
 photosynthesis 光合作用
 pH value pH 值
 phyletic evolution 线系进化, 系统进化
 phylogeny 系统发育, 种系发生
 physical map 物理图谱
 physical selection 物理选择
 phytochrome (植物)光敏色素
 phylogenetics 植物遗传学
 phyto (a) emagglutinin, PHA 植物凝集素
 phytohormone 植物激素
 phyto kinase 植物激酶
 picking 挑取(菌落、噬斑、蚀斑等)
 pinocytosis 胞饮作用, 胞饮现象
 piperidine 哌啶
 pironavirus 细小 RNA 病毒
 PIPES, piperazine - N, N' - bis (2 - ethanesulfonic acid)
 哌嗪 - N, N' - 双(2 - 乙磺酸)
 placenta 胎盘
 placenta RN ase protein inhibitor 胎盘 RNA 酶蛋白质抑制剂
 plaque 噬斑, 噬菌斑, 蚀斑
 plaque forming unit pfu 噬斑形成单位, 蚀斑形成单位
 plaque hybridization 噬斑杂交, 蚀斑杂交
 plaque screening 噬斑筛选, 蚀斑筛选
 plaque purification 噬斑纯化, 蚀斑纯化
 plasmagene 细胞质基因
 plasma membrane 质膜
 plasmalemma = plasma membrane

- plasma protein 血浆蛋白
 plasma transferrins 血浆转铁蛋白
 plasmid 质粒
 plasmid rescue 质粒获救(回收)
 plasmid incompatibility 质粒不相容性
 plasticware 塑料制品
 plastid 质体
 plate 平板, 板
 plate electrophoresis 平板电泳
 platelet 血小板
 β -pleated sheet β -折叠片, β -片层
 platelet-derived growth factor, PDGF 血小板源性生长因子
 plate lysate method 平板裂解(物)法
 plate streaking 平板划线
 plating 铺平板, 平板接种
 plating bacteria 铺平板细菌, 用于平板接种的细菌
 platinum electrode 铂电极
 pluripotent 多能性
 plus-minus method [DNA 测序的] 加减法; [筛选 cDNA 文库的] 加减法
 plus strand = positive strand
 point mutation 点突变
 polar body 极体
 polarity mutant 极性突变体, 极性突变型
 polio myelitis virus 脊髓灰质炎病毒
 polishing = filling-in 补齐
 polyacrylamide 聚丙烯酰胺
 polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳
 polyadenylation signal 加 poly(A) 信号, 聚腺苷酸化信号, 加 A 信号
 polyadenylic acid, poly(A) 聚腺苷酸
 poly(A) tail 多聚(A)尾
 Polybrene 一种聚卤化季铵盐[商品名]
 polycation 聚阳离子
 polycistron 多顺反子
 polycistronic mRNA 多顺反子 mRNA
 polyclonal antibody 多克隆抗体
 polycloning sites 多克隆位点
 polyethylene glycol, PEG, 聚乙二醇
 polyethylene glycol precipitation 聚乙二醇沉淀(法)
 polygenes 多基因, 众基因, 微效多基因
 polygenesis ①多元发生说 ②有性生殖
 polygenom 多染色体组
 polylinker 多接头
 polymer 聚合物, 高聚物, 多聚体
 polymerase 聚合酶
 polymerase chain reaction, PCR 聚合酶链式反应, 聚合酶链反应
 polymerization 聚合, 聚合反应
 polymorphism 多态性
 polynucleotide 多核苷酸
 polynucleotide kinase 多聚核苷酸激酶
 polypeptide 多肽
 polyphasy 多相性
 polyphyly 多源性
 polyploid 多倍体
 polyribosome = polysome
 polysome 多聚核糖体, 多核糖体
 polysomy 多体性
 polytypism 多型性, 多型现象
 polyvalent antibody 多价抗体
 polyvalent vaccine 多价疫苗
 polyvinyl chloride, PVC 聚氯乙烯
 polyvinylidene difluoride, PVDF 聚偏二氟乙烯
 pool 库, 集合体
 pooling 集中, 合并
 positive control 正控制; 阳性对照
 positive correlation 正相关
 positive feedback 正反馈
 positive selection 正选择
 positive strand 正链
 post-hybridization washing 杂交后漂洗, 杂交后洗涤
 post-replication repair 复制后修复
 post-transcriptional control 转录后调控, 转录后控制
 post-transcriptional processing 转录后加工
 post-translational modification 翻译后修饰
 potassium 钾
 potassium glutamate buffer, KGB 谷氨酸钾缓冲液
 potency 势能, 潜力
 poured plate method 倾注培养法
 PPO, 2, 5-diphenyloxazole 2, 5-二苯基唑
 precarcinogen 前致癌剂
 precision 精密度
 precipitation 沉淀
 precursor 前体
 precursor mRNA, pre-mRNA 前信使 RNA
 pregnancy 受孕, 妊娠, 怀孕期
 prehybridization solution 预杂交液, 预杂交溶液
 preimmune serum 免疫前血清
 premunition 传染免疫
 prenatal diagnosis = antenatal diagnosis

preparation 制备
 preparative electrophoresis 制备电泳
 preprophase 早前期
 pribnow box Pribnow 框(盒)
 primary structure 一级结构
 primase 引发酶
 primate 灵长类
 primer 引物
 primer dimer 引物二聚体
 primer extension 引物延伸
 primer repair 引物修补
 primitive 原始的
 primosome 引物体
 prion 朊病毒
 probability 概率, 几率
 proband 先证者(病员家系中疾病最先确诊者)
 probe 探针, 探头
 probing 探查, 探测
 processing 加工
 processivity 持续合成能力
 production 生产, 产生
 proembryo 原胚
 progeny 子代, 后代
 prokaryote 原核生物
 prokaryotic expression 原核(生物的)表达
 proline, Pro, P 脯氨酸
 proline selection 脯氨酸筛选
 prometaphase 前中期
 promiscuous 广宿的
 promoter 启动子
 pronase 链霉蛋白酶
 pronucleus 原核
 proof-reading activity 校对活性
 propagation 增殖
 property 性质, 特性
 prophage 原噬菌体, 前噬菌体
 prophase 前期
 propositus 先证者(病员家系中疾病最先确诊者)
 protamine 鱼精蛋白
 protease 蛋白(水解)酶
 protease inhibitor 蛋白酶抑制剂
 protective goggles 防护眼镜, 护目(眼)镜
 protein 蛋白质
 protein blot = western blot 蛋白质印迹
 proteinase = protease
 protein kinase 蛋白激酶

proteoglycan 蛋白聚糖, 粘蛋白
 proteolysis 蛋白酶解
 proteolytic enzyme = protease
 prosthetic group 辅基
 prothrombin 凝血酶原
 protist 原生生物
 protocol 方案, 流程
 proto-oncogene 原癌基因
 protoplasm 原生质
 protoplast 原生质体
 protoplast fusion 原生质体融合
 prototroph 原养型
 protruding terminus 突出端, 突出的末端
 pseudoallele 拟等位基因
 pseudogene 假基因, 拟基因
 pseudopregnancy 假孕
 pseudoscreening 假筛选(法)
 pseudouridine 假尿(嘧啶核)苷
 pseudovirus 假病毒
 pulse-chase 脉冲追踪(术)
 pulsed-field gel electrophoresis, PFGE 脉冲(电场)凝胶电泳
 pulsed-liquid (phase) protein sequencer 脉冲液相蛋白质测序仪
 pure bred 纯种
 pure culture 纯培养物
 pure line 纯系
 purification 纯化
 purine 嘌呤
 puromycin 嘌呤霉素
 putrescine 腐胺, 1, 4-丁二胺
 PVDF membrane PVDF膜, 聚偏二氟乙烯膜
 pyrimidine 嘧啶
 pyrimidine dimer 嘧啶二聚体
 pyrogen (致)热原
 pyrophosphatase 焦磷酸酶
 pyrophosphate 焦磷酸(盐)
 pyrrole 吡咯

Q

Q β replicase Q β 复制酶
 quadruplets 四联体(遗传密码), 四胞胎
 qualitative determination 定性测定
 quantasome 光能转化体, 量子体
 quantitation 定量

quantitative determination 定量测定

quantum 量子

quantitative genetics 数量遗传学

quantum biology 量子生物学

quaternary alkylammonium salt 烷基季铵盐

quaternary structure 四级结构

quenching 熄灭、猝灭

quick blotting 快速印迹 (法)

R

rabbit reticulocyte system 兔网织细胞系统

RAC, Recombinant DNA Advisory Committee (美国 NIH)
重组 DNA 顾问委员会

rat 大鼠

rabbit 兔, 家兔

radial chromatography 径向层析

radiation contamination 放射性污染

radiation cytogenetics 辐射细胞遗传学

radiation damage 辐射损伤

radiation decontamination 放射性去污

radiation genetics 辐射遗传学

radiation protection 辐射防护

radiation sterilization 辐射灭菌

radiation waste 放射性废物

radiator 辐射体

radioactivation 放射性活化

radioactive decay 放射性衰变

radioactive ink 放射性墨水

radioactive isotope = radioisotope

radioactive labeling = radiolabeling

radioactivity 放射性, 放射性活度

radiobiology 放射生物学

radioimmunoassay, RIA 放射免疫测定, 放射免疫分析

radio immuno - electrophoresis 放射免疫电泳

radioiodination 放射性碘化

radioisotope 放射性同位素

radioisotope counter 放射性同位素计数器

radiolabeled probe 放射性标记 (的) 探针

radiolabeling 放射性标记

radiolysis 辐 (射分) 解 (作用)

radiotherapy 射线疗法

radwaste = radiation waste

random coil 无规线团

random genetic drift 随机遗传漂变

random oligonucleotide primer 寡核苷酸随机引物

random sequencing 随机测序

rare base 稀有碱基

rate - limiting step 限速步骤

rate - zonal centrifugation 速率区带离心

rDNA, ribosomal DNA 核糖体 DNA

reaction 反应

reaction mixture 反应混合液, 反应混合物

reading - frame shift 移码, 读框移位

reading - through 通读, 连读

reannealing 重退火

rearrangement 重排

receptor gene 接受基因

recessed 3' terminus 3'凹端

recessive character 隐性性状

recessive mutation 隐性突变

recipient 受体, 接受者, 容器

recipe 配方, 处方

reciprocal genes 互补基因

recircularization 重新环化

recognition sequence 识别序列

recognition site 识别部位

recombinant 重组体, 重组子

recombinant clone 重组克隆

recombinant DNA 重组 DNA

recombinant RNA 重组 RNA

recombination 重组

recombination frequency 重组频率

recombination repair 重组修复

recon 重组子

recovery of DNA DNA 回收

redox couple 氧化还原偶联

reductase 还原酶

reduction division reductional division 减数分裂

redundant DNA 冗余 DNA

refolding 重折叠

refractive index 折射率

regulation 调节, 调控

regulatory codon 调节密码子

regulatory gene 调节基因

regulatory site 调节位点

regulon 调节子

reiterated genes 重复基因

relative mobility 相对迁移率

relaxed circular DNA 松环 DNA

relaxed DNA 松弛 DNA

relaxed plasmid 松弛型质粒

- relaxed rephcation 松弛型复制
- release factor 释放因子
- renaturation 复性
- repair 修复, 修补
- repair - deficiency 修复缺陷
- repeatability 重复性
- repeat sequence length polymorphism 重复序列长度多态性
- repetitive DNA 重复 DNA
- replacement synthesis 置换合成 (反应)
- replacement vector 置换型载体
- replica plating 影印铺板, 复制铺板, 影印培养
- replica plating tool 影印铺平器
- replica filter 影印滤膜, 复制滤膜
- replica screening 影印筛选
- replicase 复制酶
- replication 复制
- replication fork 复制叉
- replicative cycle 复制周期
- replicative form DNA, RF DNA 复制型 DNA
- replicator 复制因子, 复制基因
- replicon 复制子
- reporter gene 报道基因, 报告基因
- repressible enzyme 可阻遏酶
- repression 阻抑, 阻遏
- repressor 阻抑物, 阻遏物
- reproducibility 再现性
- reproduction 繁殖, 生殖 (作用), 再生产
- reservoir 液槽, 贮液槽
- residue 残基, 基
- resistance gene 抗性基因
- resistivity 抗性
- resolution 分辨 (率)
- resolving gel = separation gel
- resolving power 分辨率
- restricted transduction 局限转导
- restriction allele 限制性等位片段
- restriction analysis 限制 (性) 内切酶 (酶切) 分析
- restriction endonuclease 限制 (性) 内切核酸 (酶) 酶
- restriction enzyme = restriction endonuclease 限制酶
- restriction fragment 限制 (性) 内切酶 (酶切) 片段
- restriction fragment length polymorphism, RFLP 限制性片段长度多态性, 限制片长多态性
- restriction map 限制 (性) 酶切图 (谱)
- restriction mapping 限制酶切作图
- restriction modification system 限制修饰系统
- restriction point = restriction site
- restriction site 限制 (酶切) 位点
- restriction system 限制系统
- restrictive host 限制性宿主
- retardation 阻滞, 延滞发育
- retention time 保留时间
- reticulocyte lysate 网织红细胞裂解物
- retinene 视黄醛
- retinol 视黄醇
- retriever vector 补偿载体
- retrogression 退化
- retroposon 反转录子
- retrotransposon 反转录转座子
- retrovirus 反转录病毒
- reverse biology 反向生物学
- reverse genetics 反向遗传学
- reversed - phase chromatography 反相层析
- reverse transcriptase 反转录酶, 逆转录酶
- reverse transcription 反转录, 逆转录
- reversible mutant 回复突变型
- reversion = back mutation 回复突变
- revertant 回复体
- Rh antigen Rh 抗原
- p - factor p 因子
- p - independent terminator 不依赖于 p 的终止子
- ribonuclease, RNAase, RNase 核糖核酸酶, RNA 酶
- ribonucleic acid (RNA) 核糖核酸
- ribophorin 核糖体亲和蛋白
- ribose 核糖
- ribosomal DNA (rDNA) 核糖体 DNA
- ribosomal protein 核糖体蛋白质
- ribosomal RNA, rRNA 核糖体 RNA
- ribosome 核糖体
- ribosome binding sequence 核糖体结合序列
- ribosome binding site, RBS 核糖体结合位点, 核糖体结合部位
- ribosome cycle 核糖体循环, 核蛋白体循环
- ribosome recognition sequence 核糖体识别序列
- ribosome template 核糖体模板, 核蛋白体模板
- ribozyme 核酶, 核糖核酸酶
- rich medium, 丰富培养基
- ricin 蓖麻毒蛋白
- rifamycin 利福霉素
- rifampicin 利福平
- Ri - plasmid, root - inducing plasmid Ri 质粒, 毛根诱导质粒
- R loop R 环

R-loop mapping R 环作图
 RNAase, ribonuclease RNA 酶, 核糖核酸酶
 RNAase A RNA 酶 A
 RNAase H RNA 酶 H
 RNAase T RNA 酶 T
 RNAase inhibitor RNA 酶抑制剂
 RNA-dependent DNA polymerase = reverse transcriptase 依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶
 RNA-dependent RNA polymerase 依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶
 RNA editing RNA 编辑
 RNA ligase RNA 连接酶
 RNase = RNAase
 RNA phage RNA 噬菌体
 RNA replicase RNA 复制酶
 RNA synthetase RNA 合成酶
 RNA virus RNA 病毒
 rocket immunoelectrophoresis 火箭免疫电泳
 rolling-circle replication 滚环复制
 room temperature 室温
 rotor (离心机) 转头, (离心机) 转子
 rotary evaporator 旋转蒸发器
 rotary vacuum desiccator 旋转真空干燥器
 rotary vacuum drier = rotary vacuum desiccator
 rough endoplasmic reticulum RER 糙面内质网, 粗糙型内质网
 Rous sarcoma virus, RSV Rous 肉瘤病毒, 劳斯肉瘤病毒
 rpm revolutions per minute 每分钟转数
 runaway replication 失控复制
 running buffer 电泳缓冲液
 run out 走电泳

S

safety mask 安全面具
 salicylate 水杨酸盐
 saline 盐水
 salmon sperm DNA 鲑精 DNA
 sampling 取样, 抽样
 salting-in 盐溶
 salting-out 盐析
 salvage pathway (of biosynthesis) (生物合成的) 补救途径
 samesense mutation 同义突变
 Sanger method (of DNA sequencing) = dideoxy-mediated chain-termination

method (of DNA sequencing) Sanger (DNA 测序) 法
 sarcosyl = sodium lauryl sarcosinate
 satellite 随体
 satellite DNA 卫星 DNA
 saturation 饱和
 saturation mutagenesis 饱和诱变
 scaffolded prehead 支架状前头
 scaffolding protein 支架状蛋白
 scalpel blade 解剖刀片
 scan 扫描
 scanning densitometer 光密度扫描仪, 扫描光密度仪
 scanning tunnel (ing) electromicroscopy, STEM 扫描隧道电子显微术
 schlieren pattern 因折射率不同而形成的纹线
 scintillant 闪烁体
 scintillation 闪烁
 scissors 剪刀
 screening 筛选, 筛查
 screening by hybridization 杂交筛选
 scripton 转录子
 SD sequence, Shine-Dalgarno sequence SD 序列
 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳
 secondary activity = star activity (限制酶的) 次级活性
 secondary ionization 次级电离
 secondary structure 二级结构
 second filial generation (F_2) 子二代
 second law of thermodynamics 热力学第二定律
 second-messenger molecule 第二信使分子
 second-strand of cDNA cDNA 第二链
 secretion 分泌
 secretory piece 分泌片 (段)
 sedimentation 沉降
 sedimentation coefficient (S) 沉降系数
 segment 区段
 segregation 分离
 selectable marker 选择 (性) 标记
 selection 选择
 selection pressure 选择压力
 selective marker = selectable marker
 selective medium 选择 (性) 培养基
 selectivity 选择性
 self-assembly 自我装配
 selfish DNA 自在 DNA
 self-ligation 自身连接 (作用)
 self-priming 自身引导 (作用)

semiconservative replication 半保留复制
 semi-lethal gene 半致死基因
 semisolid medium 半固体培养基
 Sendai virus 仙台病毒
 sense codon 有意义密码子
 sense strand 有意义链
 sensitivity 灵敏性, 敏感性
 separating gel = separation gel
 separation 分离, 离析
 separation gel 分离(凝)胶
 Sephadex 葡聚糖凝胶 [商品名]
 Sepharose 琼脂糖 [商品名]
 Sequenase 测序酶 [商品名]
 sequence alignment 序列对比, 序列对仗
 sequence gap 序列缺口, 序列空隙
 sequence ladder 序列梯
 sequence similarity 序列相似性
 sequencing 序列测定, 测序
 sequencing gel (DNA) 测序凝胶
 serine, Ser, S 丝氨酸
 serpin, serine protease inhibitor 丝氨酸蛋白酶抑制剂
 serum albumin 血清白蛋白
 serum globulin 血清球蛋白
 serum medium 血清培养基
 sex chromatin 性染色质
 sex chromosome 性染色体
 sex determination gene 性决定基因
 sexduction 性导
 sex influenced inheritance 从性遗传, 性影响遗传
 sex-linkage inheritance 伴性遗传
 sex-linked gene 性连锁基因
 sex pili 性纤毛, 性菌毛, 性丝
 shake cultivation 振荡培养, 摇床培养
 shark's tooth comb 鲨鱼齿梳 [测序凝胶的一种胶模]
 shearing 剪切
 shift (遗传) 转变
 shotgun method 鸟枪法
 shotgun sequencing 鸟枪法测序
 shuttle vector 穿梭载体
 sib-analysis 同胞分析
 sib selection 同胞选择
 sickle cell 镰形细胞 (红血球)
 side chain 侧链
 sigma factor σ 因子
 simple diffusion 简单扩散
 simple inheritance 简单遗传

simple repeat sequence 简单重复序列
 signal-noise ratio 信噪比
 signal peptidase 信号肽酶
 signal peptide 信号肽
 signal recognition particle, SRP 信号识别颗粒
 signal sequence 信号序列
 signal hypothesis 信号假说
 significance 显著度, 显著性
 silent allele 沉默等位基因
 silica gel 硅胶
 siliconizing 硅烷化
 silver staining 银染 (色法)
 simian virus 40, SV40 猴病毒 40
 single cell protein 单细胞蛋白
 single copy 单拷贝
 single-strand, ss 单链
 single-stranded DNA binding protein, SSB 单链 DNA 结合蛋白
 sister chromatid 姊妹染色单体
 sister chromosomes 姊妹染色体
 site 位点, 部位
 site-directed mutagenesis 定点诱变, 定位诱变
 site-specific mutagenesis 位点专一诱变, 位点特异性诱变
 site-specific recombination 位点专一重组, 位点特异性重组
 size-exclusion chromatography 尺寸排阻层析, 大小排阻层析
 size fractionation 按大小进行分级分离
 slab electrophoresis = plate electrophoresis
 slant culture 斜面培养物
 slot 狭线, 狭槽
 slot blotting 狭线印迹, 线渍法
 slot hybridization 狭线杂交
 slurry 浆液, 悬浮液, 匀浆
 small nuclear RNA, snRNA 核内小 RNA, 核小 RNA
 small nuclear ribonucleoprotein, snRNP 小核核糖核蛋白体
 small-scale preparation 小量制备
 smear 涂片, (不清晰的) 成片 (电泳) 条带
 smeary band (不清晰的) 成片 (电泳) 条带
 smooth endoplasmic reticulum (SER) 滑面内质网
 S1 nuclease S1 核酸酶
 S1 nuclease mapping S1 核酸酶作图
 sodium azide 叠氮钠
 sodium dodecyl sulfate, SDS 十二烷基硫酸钠
 sodium lauryl sarcosinate 十二烷基肌氨酸钠
 sodium lauryl sulfate = sodium dodecyl sulfate

sodium pump 钠泵
 sodium salicylate fluorography 水杨酸钠荧光自显影 (术)
 soft agar 软琼脂
 solenoid structure 螺线管结构
 solid medium 固体培养基
 solid-phase peptide synthesis, SPPS 固相多肽合成
 solid-phase radioimmunoassay 固相放射免疫测定
 solid support 固相支持体
 solubilization 溶解, 加溶 (作用), 增溶 (作用)
 solution 溶液
 solution hybridization 溶液杂交
 somatic cell genetics 体细胞遗传学
 somatic mutation 体细胞突变
 sonication 超声处理
 SOS pathway SOS 途径 [DNA 应急修复途径]
 Southern blotting Southern 印迹 (法), DNA 印迹 (法)
 Southern hybridization Southern 杂交
 southern transfer southern 转移
 spacer 间隔区, 间隔物
 spacer DNA 间隔 DNA
 spacer gel = stacking gel
 spacer region 间隔区
 species 种, 物种
 species specificity 种专一性, 种特异性
 specific activity 比活, 比活性, 比活度
 specific growth rate 比生长速率
 specificity 特异性, 专一性
 spectinomycin 壮观霉素
 spectrin 血影蛋白
 spectrophotometer 分光光度计
 spectrophotometry 分光光度法
 S period S 期, DNA 合成期
 spermidine 亚精胺
 spermine 精胺
 spheroplast 原生质球, 球形体
 spin dialysis 离心透析, 旋转透析
 spindle 纺锤体
 spindle fiber 纺锤丝
 splice junction 剪接点
 splicing 剪接
 splicing signal 剪接信号
 split gene 断裂基因
 spontaneous mutation 自发突变
 spreader 涂布器
 spread plate method 涂布培养法
 spun-column chromatography 离心柱层析, 旋转柱层析

stab cultivation 穿刺培养
 stab culture 穿刺培养物
 stability 稳定性
 stabilizing selection 稳定化选择
 stable integration 稳定整合
 stable nuclear RNA 稳定核 RNA
 stable transformation 稳定转化
 stacking gel 积层 (凝) 胶, 堆积 (凝) 胶, 浓缩 (凝) 胶, 成层胶
 stage development 阶段发育
 staggered cut 交错切口
 staggered nick = staggered cut
 staining 染色 (法)
 standard free-energy change 标准自由能变化 (ΔG)
 staphylococcal protein A, SPA 葡萄球菌 A 蛋白
 star activity 星号活性, 次级活性
 start codon 起始密码子
 stationary phase 稳定期; 固定相
 statistical genetics 统计遗传学
 stem-loop structure 茎-环结构
 sterilization 灭菌, 绝育
 sterilizer 灭菌器
 steroid 甾类化合物, 类固醇
 sticky end = cohesive end
 stock 原种, 贮存物
 stock culture 贮存培养物, 储用培养物
 stock solution 贮存液, 储备溶液, 母液
 stop 终止
 stop codon 终止密码子
 storage 贮存, 保存
 storage medium 贮存培养基
 strain ①株, 菌株②张力, 应变
 strand separating gel electrophoresis 链分离凝胶电泳
 strategy 策略
 streak culture 划线培养物
 streaking 划线 (培养), 划线 (分离)
 streak plate 划线平板
 streptavidin 链霉抗生物素蛋白, 链 (霉) 亲和素
 streptomycin 链霉素
 stringent condition 严紧条件
 stringent control 严紧控制, 应急控制
 stringent factor 应急因子
 stringent plasmid 严紧型质粒
 stringent state 应激状态
 stroma 基质
 structural gene 结构基因

stuffer = stuffer fragment
 stuffer fragment 填充片段
 subcellular 亚细胞的
 sub - chromatid 亚染色单体
 subcloning 亚克隆
 subculture 传代培养物
 subculturing 传代培养
 sublibrary 子文库
 submicroscopic 亚显微的
 substrate 底物
 subtilisin 枯草蛋白酶
 subtracted library 扣除文库
 subtracted probe 扣除探针
 subunit 亚基, 亚单位
 sucrose 蔗糖
 suicide method 自杀法
 suicide substrate 自杀底物
 sulfonic acid 磺酸
 sulfuric acid 硫酸
 super clean bench 超净台
 super - coiled DNA 超螺旋 DNA
 superfamily 超家族
 superhelix 超螺旋
 supergene family 超基因家族
 superinfection 超感染
 supernatant 上清 (液)
 superoxide dismutase 超氧 (化) 物歧化酶
 superprecipitation 超沉淀作用
 super - secondary structure 超二级结构
 superhelical DNA 超螺旋 DNA
 supplemented medium 补加培养基
 support 支持体, 载体
 suppression 抑制
 suppressor 阻遏物, 阻遏基因
 suppressor tRNA 抑制型 tRNA
 surface tension 表面张力
 surfactant 表面活性剂
 surrogate genetics 替代遗传学
 survival rate 成活率, 生存率
 suspension 悬浮, 悬浮液, 悬液
 swinging - bucket rotor 吊桶式转头
 swing - out rotor 甩平式转头
 switch gene 开关基因
 swivelase 解扭转酶, 转环酶
 symbiosis 共生现象
 symbiotic hypothesis (endosymbiotic hypothesis) 共生假说 (内

共生假说)

synapsis 联会
 symmetry 对称
 synchronous growth 同步生长
 synchronization 同步化
 syndrome 综合征, 症候群
 synergist 增效剂
 synergistic effect 协同作用
 syngenetics 群落遗传学
 syngraft 同种同基因移植
 synonymous mutation 同义突变
 synonymous codon 同义密码子
 synthesis 合成
 synthetase 合成酶
 synthetic antigen 合成抗原
 synthetic linker 合成接头
 synthetic peptide 合成肽
 syringe 注射器
 syringe needle 注射针
 systematic mutation 系统突变, 体系突变

T

tagged atom 标记原子, 示踪原子
 tailer sequence 尾随序列
 tailing 加尾
 tandem array 串联排列 首尾衔接
 tandem duplication 串联重复
 tandem inversion 串联倒位
 tandem repeat 串联重复
 tandem translocation 衔接易位, 连续易位
 T antigen T 抗原
 TAPS, 3 - [tris (hydroxymethyl) methyl] amino - 1 -
 propanesulfonic acid 3 - [三 (羟甲基) 甲基] 氨基 - 1 -
 - 丙磺酸
 TaqDNA polymerase TaqDNA 聚合酶
 target 靶, 目的, 目标
 target gene 靶基因
 target cell 靶细胞
 target sequence 靶顺序
 target site 靶位点
 TATA box = Goldberg - Hogness box TATA 盒 (框)
 T cell receptor, TCR T (淋巴) 细胞受体
 teleosis 目的进化论
 telomere 端粒
 telophase 末期

TEMED, N, N, N'N' - tetra methyl ethy - lene diamine N, N,

N'N' - 四甲基乙二胺

temperate phage 温和噬菌体

template 模板

template RNA = messenger RNA 模板核糖核酸 (信使 RNA)

tempo of evolution ①进化速率②进化节律

temporal gene 时序基因

teratogen 致畸剂

terminal deletion 末端缺失

terminal redundancy 末端冗余

terminal repetition 末端重复

terminal (deoxynucleotidyl) transferase 末端 (脱氧核苷酸) 转移酶

termination 终止

termination codon 终止密码子

termination factor 终止因子

termination signal 终止信号

terminator 终止子

terminator sequence 终止序列

tertiary structure 三级结构

testosterone 睾 [甾] 酮

tetracycline 四环素

tetraethylammonium chloride, TEACl 氯化四乙铵

tetramer 四聚体

tetramethylammonium chloride, TMACl 氯化四甲铵

tetraploid 四倍体

θ - form replication θ 型复制

thalassaemia 地中海贫血, 库利氏贫血

thelykaryon 雌核

thermodynamics 热力学

thiamine = vitamin B1 硫胺素

thin - layer chromatography, TLC 薄层层析

6 - thioguanine, 6TG 6 - 硫代鸟嘌呤

thiophosphate 硫代磷酸

three - dimensional structure 三维结构, 立结构体

three prime 3' (端)

threonine, Thr, T 苏氨酸

threshold 阈, 阈值

thrombin 凝血酶

thymidine 胸腺嘧啶脱氧核苷, 胸苷

thymidine kinase 胸苷激酶

thymine 胸腺嘧啶

thymine dimer 胸腺嘧啶二聚体

thymosin 胸腺素

thyroglobulin 甲状腺球蛋白

thyrotropin 促甲状腺激素

thyroxin 甲状腺素

Ti - plasmid Ti 质粒, 根瘤诱导质粒

tissue culture 组织培养

tissue plasminogen activator 组织纤溶酶原激活物

T_m , melting temperature 解链温度, 熔解温度

tolerance ①耐性 ②耐药量

toluenesulfonyl fluoride 对甲苯磺酰氟

top agar 顶层琼脂

top agarose 顶层琼脂糖

topoisomerase 拓扑异构酶

topology 拓扑学, 拓扑结构

totipotent cell 全能细胞

toxin 毒素

toxohormone 毒性激素

toxoid 类毒素

TPCK, tosylphenylalanine chloromethyl ketone 甲苯磺酰苯丙氨酰氯甲酮

trace 痕量

track = lane [电泳] 泳道

tracking dye [电泳] 示踪染料

trailing ion 尾随离子

trans - acting 反式作用

trans - acting factor 反式作用因子

trans - activation 反式激活

trans - configuration 反式构型, 反式排列

transconformation 转型

transcript 转录物, 转录本

transcriptase 转录酶

transcription 转录

transcription terminator 转录终止子

transdetermination 转决

transducing phage 转导噬菌体

transductant 转导子

transduction 转导

transfectant 转染子

transfection 转染

transferase 转移酶

transferred gene (DNA) 转移基因 (DNA)

transfer RNA, tRNA 转移 RNA

transferrin 铁传递蛋白, 转铁蛋白

transformant 转化体

transformation 转化

transforming gene 转化基因

transgene 转基因

transgenic animal 转基因动物

transgenic plant 转基因植物

transgenome 转移基因组
 transient expression 瞬时表达
 transition (碱基) 转换, 过渡
 transition state 过渡态
 translation 翻译
 translocase 移位酶
 translocation 易位
 transmission ①传递, 传换②发射, 透射
 transposable element 转座因子
 transposase 转座酶
 transposition 转座(作用)
 transposon, Tn 转座子
 transversion (碱基) 颠换
 trial-and-error method 尝试法, “尝试与错误”法
 trichloroacetic acid, TCA 三氯乙酸, 三氯醋酸
 trichosanthin 天花粉蛋白
 Tricine, N-[tris(hydroxymethyl)methyl] glycine N-[三(羟甲基)甲基]甘氨酸
 trimer 三联体, 三聚物, 三[聚]体
 trimethoprim 三甲氧苄二氮嘧啶
 triploid, tripont 三倍体
 triplet code 三联体密码
 Tris, tris(hydroxymethyl) aminomethane 三(羟甲基)氨基甲烷
 tritium (^3H) 氚
 trophoblast 滋养层
 tropomyosin 原肌球蛋白
 troponin 肌钙蛋白
 trypan blue 台盼蓝, 锥虫蓝
 trypsin 胰蛋白酶
 trypsinization 胰蛋白酶消化
 tryptone 胰(蛋白酶)化(酪)蛋白胨
 tryptophan (e), Trp, W 色氨酸
 ts mutant, temperature-sensitive mutant 温(度)敏(感)突变体, 温(度)敏(感)突变型
 tubulin 微管蛋白
 tumor genic virus 致癌病毒
 tumor necrosis factor, TNF 肿瘤坏死因子
 tumor viruses 肿瘤病毒
 turnover number = catalytic constant 转换数
 type culture 模式培养物
 type II DNA methylase II类DNA甲基化酶
 type II restriction enzyme II类限制酶
 tyrosinase 酪氨酸酶
 tyrosine, Tyr, Y 酪氨酸

U

ubiquinone 泛醌, 辅酶 Q
 ubiquitin 泛素
 ubiquitin 遍在蛋白质
 ultracentrifugation 超离心, 超速离心
 ultrafiltration 超滤
 ultrafiltration membrane 超滤膜
 ultramicrospectrophotometer 超微量分光光度计
 ultrapure water 超纯水
 ultrastructure 超微结构, 亚显微结构
 ultra-thin sectioning 超薄切片法
 ultraviolet light 紫外光, 紫外线
 ultraviolet radiation 紫外辐射
 ultravirus 超病毒
 unfolding 解折叠, 伸展
 uncoupler 解偶联剂
 uncoiling 解螺旋
 unequal crossing over 不等交换
 unequal division 不等分裂
 unequal translocation 不等易位
 unichromosomal gene library 单条染色体基因文库
 unidirectional deletion 单向缺失
 unidirectional replication 单向复制
 uniformly labeled DNA (probe) 均匀标记的 DNA (探针)
 unique-sequence DNA 单一序列 DNA
 unit membrane 单位膜
 universal code 通用密码
 universal primer (for DNA sequencing) (DNA 测序的) 通用引物
 unselected marker 非选择性标记
 unusual base = minor base
 unwindase 解旋酶, 解链酶
 unwinding protein 解链蛋白, 解旋蛋白
 up-promotor mutant 增强启动子突变型
 upstream activating sequence, UAS 上游激活序列
 upstream expressing sequence, UES 上游表达序列
 upstream repressing sequence, URS 上游阻抑序列
 upstream sequence 上游序列
 uracil 尿嘧啶
 urea 尿素
 URF, unidentified reading frame 未确定读框
 uridine 尿嘧啶核苷, 尿苷
 uridine diphosphate, UDP 尿苷二磷酸
 uridine monophosphate, UMP 尿苷(-磷)酸

uridine triphosphate, UTP 尿苷三磷酸

V

vaccine 疫苗

vaccinia virus 痘苗病毒

vacuole 液泡

vacuum 真空

vacuum desiccator 真空干燥器

vacuum oven 真空烤箱, 真空烘箱

vacuum pump 真空泵

vacuum transfer 真空转移

valence 价, 效价

valine, Val, V 缬氨酸

vanadyl-ribonucleoside complex 氧钒核糖核苷复合物

variable gene, V gene V 基因

variable region, V region V 区, 可变区

variation 变异

variety ①品种②变种

VDJC joining VDJC 连接

vector 载体

vehicle = vector (运)载体

vertical rotor 垂直转头

vertical slab gel electrophoresis 垂直板凝胶电泳

Vertical transmission 垂直传递

vinblastine 长春花碱

vincristine 长春新碱

viral oncogene, v-oncogene, 病毒癌基因

virion 病毒颗粒, 病毒粒子 病毒体

virogene 病毒基因

viroid 拟病毒, 类病毒, 无壳病毒, 拟核

virulent phage 烈性噬菌体

virus 病毒

vitamin B1 维生素 B1

vitellogenin 卵黄蛋白原

VJC joining VJC 连接

void volume 外水体积

voltage clamp 电压钳

W

washing 洗涤, 漂洗

watch glass 表面皿

water aspiration 水泵

waterbath 水浴

watertight seal 不透水密封

Watson-Crick model = double helix model

Watson-Crick 模型, 沃森-克里克模型

wedge-shaped gel 楔形凝胶

well 孔

Western blotting 蛋白(质)印迹(法)

Western 印迹法

wheat-germ system 麦胚(体外翻译)系统

wild species 野生种

wild-type 野生型

wobble hypothesis 变偶假说(摇摆假说)

wobble pairing 摆动配对

working buffer 工作缓冲液

working solution 使用液, 工作(溶)液

X

xanthine 黄嘌呤

xanthine-guanine phosphoribosyl transferase, XGPRT 黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶

X-chromosome X 染色体, 性染色体

Y-chromosome Y 染色体

Xenopus 非洲爪蟾(属)

xenotropic virus 广宿病毒, 多向性病毒

X-gal, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷

X-ray diffraction X 射线衍射

Xyl-A, 9- β -D-xylofuranosyl adenine 腺嘌呤-9- β -D-呋喃木糖苷

xylene cyanol FF 二甲苯青 FF, 二甲苯靛 FF, 二甲苯腈蓝 FF

Y

yeast 酵母

YAC, yeast artificial chromosome 酵母人工染色体

yeast centromeric plasmid, YCp 酵母中心粒质粒

yeast episomal plasmid, YpE 酵母附加体质粒

yeast extract 酵母提取物

yeast integrative plasmid, Ylp 酵母整合型质粒

yeast replication plasmid, YRp 酵母复制型质粒

yield 得率, 收率; 产额

Y-linkage Y 染色体连锁, Y 染色体环连

yolk sac 卵黄囊

Z

Z-chromosome Z 染色体

Z-form DNA Z型DNA [左手螺旋DNA]

zinc 锌

zincing fer 锌指(结构)

zonal centrifugation 区带离心

zonal electrophoresis = zone electrophoresis

zone electrophoresis 区带电泳

zoogamy 有性生殖

zwitterion 兼性离子

zygophase 合子期

zygote 合子, 接合子(受精卵)

zygotene stage 偶线期, 合线期

zymogram 酶谱

zymogen 酶原

Zymolase 消解酶

(刘德培 编)

索引

编排说明:

1. 本索引各条目按词首汉字的汉语拼音字母顺序排列;词首为英文字母者,则直接按英文字母次序排(如“charon”排在“超 chao”与“沉 chen”之间);词首为希腊字母者,按希腊字母的英文读音排列(如“ β -半乳糖苷酶”按“beita”读音排在“BAP”和“比放射活性”之间);词首为阿拉伯数字者,由数字后第一个汉字的拼音或字母决定其次序(如“2-氨基腺嘌呤”按“氨”字决定次序,“ 32 P”按“P”处理)。

2. 为方便检索,同一字条可排在不同的关键词下,如“cDNA 探针的标记”分别按“cDNA”、“探针”和“标记”三个关键词处理。

3. 为方便不熟悉汉语拼音的读者使用,正文前附有一级条目的笔画检字表。同笔画字按横、竖、撇、点、折为序。

笔画检字表:

一画:乙 yǐ

二画:二 èr 刀 dāo

三画:三 sān 工 gōng 上 shàng 大 dà 卫 wèi 小 xiǎo

四画:开 kāi 比 bǐ 切 qiē 长 cháng 中 zhōng 内 nèi 化 huà 反 fǎn 分 fēn 引 yǐn 双 shuāng

五画:示 shì 末 mò 艾 ài 丙 bǐng 平 píng 电 diàn 甲 jiǎ 白 bái 包 bāo 代 dài 生 shēng 外 wài 印 yìn 发 fā
加 jiā 尼 ní 丝 sī

六画:亚 yà 地 dì 夹 jiā 考 kǎo 扣 kòu 有 yǒu 光 guāng 回 huí 叮 dīng 多 duō 迁 qiān 同 tóng 向 xiàng 血 xuè
自 zì 传 chuán 次 cì 交 jiāo 关 guān 异 yì 杂 zá

七画:进 jìn 远 yuǎn 克 kè 苏 sū 报 bào 抗 kàng 连 lián 足 zú 毗 pī 体 tǐ 低 dī 卵 luǎn 免 miǎn
序 xù 沉 chén 启 qǐ 层 céng

八画:非 fēi 表 biǎo 环 huán 汞 gǒng 松 sōng 转 zhuǎn 固 gù 质 zhì 受 shòu 胼 píng 肿 zhǒng 限 xiàn
组 zǔ 终 zhōng 变 biàn 放 fàng 定 dìng 单 dān 细 xì

九画:草 cǎo 荧 yíng 持 chí 标 biāo 拼 pīn 耐 nài 显 xiǎn 冠 guān 星 xīng 虹 hōng 卸 xiè 氨 ān 看 kàn
选 xuǎn 重 chóng 适 shì 秋 qiū 狭 xiá 亮 liàng 疫 yì 亲 qīn 差 chà 测 cè 浮 fú 染 rǎn 退 tuì 统 tǒng

十画:载 zǎi 缸 jiāng 配 pèi 原 yuán 真 zhēn 核 hé 哺 bǔ 复 fù 脂 zhī 胰 yí 胸 xiōng 高 gāo 离 lí 病 bìng
烟 yān 穿 chuān 调 tiáo 通 tōng

十一画:基 jī 菌 jūn 培 péi 酚 fēn 植 zhí 填 tián 排 pái 探 tàn 掺 chān 插 chā 银 yín 移 yí 烯 xī 偶 ǒu
假 jiǎ 商 shāng 羟 qiǎng 盖 gài 液 yè 粘 nián 粒 lì 宿 sù 密 mì 蛋 dàn 随 suí

十二画:琼 qióng 斑 bān 替 tì 超 chāo 联 lián 葡 pú 硝 xiāo 硫 liú 裂 liè 紫 zǐ 遗 yí 置 zhì 链 liàn
锌 xīn 等 děng 筛 sāi 富 fù

十三画:感 gǎn 酵 jiào 碘 diǎn 微 wēi 愈 yù 筒 jiǎn 新 xīn 滤 lǜ 溴 xiù 溶 róng

十四画:聚 jù 酸 suān 碱 jiǎn 模 mó 增 zēng 腺 xiàn 熔 róng 辣 là 寡 guǎ

十五画以上:噬 shì 酶 méi 磺 huáng 磷 lín 操 cāo 螺 luó 癌 ái 凝 níng

A

ADA 缺陷基因治疗 639
 癌基因 473
 癌基因产物与表达调控 546
 艾滋病 28
 防治 29
 检测 471
 Allyl dextran 98
 α -互补作用 250, 283
 Amp^r 283
 Amp^s 283
 氨基黑染色法 570
 2-氨基腺嘌呤 210
 ARS 296
 avidin 213, 228

B

白细胞介素-2 641
 斑点印迹 205
 报道基因 560
 包装 313
 包装抽提物的制备 313
 包涵体 378
 包涵体分离 381
 包涵体制备和溶解 417
 BAP 239
 β -半乳糖苷酶 215, 283, 560
 β -半乳糖苷酶活性测定 562
 β -半乳糖苷酶基因 250
 比放射活性 193
 变性 207
 变性蛋白的纯化 418
 表达 533
 表达产物检测 386, 397
 表达水平 375
 表达载体 372
 基因表达的调控 533
 在原核细胞中的表达 367
 在真核细胞中的表达 388
 标记 155
 胞嘧啶生物素标记法 189
 cDNA 探针的标记 171
 单链 DNA 探针的标记 169

单末端选择性标记 178, 184, 347
 碘放射性核素标记法 186
 DNA 探针的末端标记 176
 非放射性标记法 186
 汞化标记法 189
 寡核苷酸探针的标记 185
 化学标记法 162, 187
 磺化标记法 189
 交叉相连法 189
 交换反应标记法 183
 Klenow DNA 聚合酶末端标记法 177, 185
 酶的直接交联 189
 酶促标记法 163, 187
 3'末端的填充标记 177, 178
 末端转移酶标记法 184, 185
 Oligo (dT) 引物法 173
 切口平移法 163
 RNA 探针的标记 173
 生物素的化学标记法 187
 生物素胍标记法 189
 随机引物法 166, 171
 T₄ DNA 聚合酶标记法 178
 T₄ 多核苷酸激酶标记法 181, 185
 探针的标记 155
 替代合成标记法 179
 体内标记法 162
 体外标记法 162
 5'突出末端模板的向前反应标记法 181

病毒

单纯疱疹病毒 634
 DNA 病毒载体 252, 389
 反转录病毒载体 254, 632
 非病毒载体 650
 辅助病毒 633
 HIV 病毒 29, 472
 黄瓜花叶病毒 9
 抗病毒作物 8
 昆虫杆状病毒 256
 苜蓿花叶病毒 9
 人痘苗病毒 256, 392
 乳头状瘤病毒载体 254
 SV₄₀ 病毒载体 252, 389
 腺病毒伴随病毒 634
 腺病毒载体 391, 633
 烟草花叶病毒 8
 烟草环斑病毒 9

依赖性病毒 634
 丙烯酰胺 85
 Biogel 98
 Biotin 186
 Blotto 210
 Brdu 588
 哺乳动物人工染色体 652

C

CAAT 盒 539
 草甘磷 7
 操纵子 4, 367
 操纵子学说 4, 368
 乳糖操纵子 4
 CAT 389, 560
 CAT 活性测定 560
 薄层层析法 560
 闪烁液扩散法 562
 有机溶剂抽提法 561
 cDNA 319
 cDNA 的甲基化 325
 cDNA 第二链合成 320, 324
 cDNA 第一链合成 320, 324
 cDNA 库的扩增 327
 cDNA 末端快速扩增 683
 cDNA 探针 155
 cDNA 探针的标记 171
 cDNA 文库 319
 测序酶 332, 342
 层析 97
 反相柱层析法 100, 192, 424
 离心柱层析法 192
 离子交换层析 99
 凝胶过滤柱层析法 191
 排阻层析 98
 羟基磷灰石柱层析 99
 亲和层析 99, 425
 疏水层析 425
 插入表达 283
 插入激活 536
 插入片段的部分酶切 268
 插入失活 241, 283
 插入顺序 535
 插入型载体 244, 295
 差示文库 558

掺入率 194
 长末端重复序列 255
 超排卵 601
 超速离心分离技术 94
 沉降平衡超速离心 96
 沉降速度超速离心 95
 Charon 245, 301
 沉降速度 95
 沉降系数 95
 沉寂子 539
 持卵管 604
 重复序列 533
 简单重复序列 677
 数目可变的串联重复序列 677
 重组 6
 重组 DNA 7
 重组子 7
 重组子导入受体细胞 277
 重组子的筛选 282
 体内重组 256
 体外重组 6, 252, 256
 同源重组 252, 256
 穿梭粘粒 248
 穿梭质粒 251
 传代培养 440
 传递不平衡检验 716
 次黄嘌呤 210
 CIP 239
 Col E1 237
 cos 位点 241
 cos 细胞 253
 Cot1/2 208

D

大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 163
 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段 166, 177, 332
 大肠杆菌 DNA 连接酶 258
 代谢工程 26
 蛋白纯化 423
 蛋白复性 418
 蛋白复性的检测 420
 蛋白含量测定 427
 蛋白质氨基酸组成分析 525
 蛋白质 N 末端氨基酸序列测定 528
 蛋白-紫外交联法 588

单链 DNA 探针的标记 169
 单链 M_{13} DNA 模板的制备 339
 单末端选择性标记 178, 184, 347
 单向优势 251
 刀豆素 A 226
 DEAE-纤维素 100
 等位基因共享分析 718
 等位交换 256
 Denhardt 溶液 211
 dhfr 基因 388
 地高辛 187
 低熔点琼脂糖 132
 碘放射性核素标记法 186
 电穿孔转染技术 394
 电泳 80
 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 343
 电泳的染色剂 83
 电泳的指示剂 83
 甲基氢氧化汞变性电泳 203
 甲醛胶变性电泳 202
 碱性琼脂糖凝胶电泳 91
 聚丙烯酰胺凝胶电泳 85
 聚乙二醛和二甲基亚砷变性电泳 201
 脉冲场凝胶电泳 92
 琼脂糖凝胶电泳 88
 RNA 变性电泳 201
 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 382, 567
 双相电泳 93
 电转印迹 199
 定向克隆 240
 DMS 331, 573, 578
 DNA
 变性 207
 半保留复制 1
 重组 6
 重组 DNA 技术 7
 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 163
 DNA 甲基化酶 79
 DNA 减色效应 207
 DNA 连接酶 256
 复性 208
 化学合成 483
 克隆 233
 模板学说 1
 限制性内切酶 5, 71
 小卫星 DNA 677

微卫星 DNA 677
 DNA 多态性 704
 DNA 合成仪 54
 DNA 甲基化分析 551
 DNA 甲基化修饰 537, 551
 DNA 结合蛋白 540
 DNA 结合蛋白 cDNA 克隆的筛选 592
 λ gtII 表达文库的筛选 593
 DNA 结合蛋白的分离纯化 590
 GRAB 法 592
 链亲和素琼脂糖亲和法 592
 生物素/链亲和素亲和法 590
 DNA 结合结构域 541
 DNA 片段的分离 126
 低熔点琼脂糖回收法 132
 电泳洗脱法 128
 DEAE 纤维素插片电泳法 127
 玻璃粉末洗脱法 133
 DNase I 163, 551, 572
 DNase I 超敏感区 1537
 DNase I 超敏感性分析 551
 DNase I 足纹法 572, 574
 DNA 提取 101
 染色体 DNA 提取 102, 306
 噬菌体 DNA 的提取 121
 质粒 DNA 的提取 109
 DNA 芯片 698
 DNA 序列测定 329
 化学裂解法 331, 347
 Maxam-Gilbert 法 331, 347
 末端终止法 329, 331
 双脱氧末端终止法 331, 329
 自动测定 352
 Dot 印迹 205
 多瘤病毒假衣壳 653
 多聚酶链式反应 (参见 PCR) 458
 多态性连锁分析 708
 多肽的固相合成 493

E

EMBL 载体 245, 296
 env 255
 二甲苯青 83
 二氢叶酸还原酶基因 388
 二乙基氨基乙基 (DEAE) 纤维素 100

F

发酵罐 409
 发育 541
 反式作用因子 540
 活性调节 545
 结构 541
 作用机制 544
 反相柱层析法 100, 192, 424
 反义 RNA 550
 对翻译的调控 550
 反意义链 367
 反转录病毒载体 254, 632
 反转录酶 171, 320, 553, 558
 放射性核乳胶 228
 放射性核素 159
 放射性核素探针杂交 210
 ^3H 160
 ^{125}I 160
 ^{131}I 160
 ^{32}P 160
 ^{35}S 160
 探测 161
 卫生防护 162
 物理性质 159
 放射自显影 213, 227
 非病毒载体基因治疗 650
 非放射性标记物 161
 非放射性核素探针的检测 213
 化学发光法 216
 酶法检测 213
 荧光检测 215
 非组蛋白 537
 高迁移率非组蛋白 537
 酚的重蒸与水饱和 62
 分光光度 69
 分化 541
 分泌蛋白 377
 分子克隆 233
 分子筛 98
 复性 208
 富含谷氨酰胺结构域 543
 富含脯氨酸结构域 544
 浮力密度 95

G

G418 389
 gag 255
 盖革-弥勒计数器(盖革管) 161
 感受态 278
 根瘤农杆菌感受态 623
 感受态细胞制备 278
 高迁移率非组蛋白 537
 GC 盒 539
 根瘤农杆菌感受态 623
 根瘤农杆菌 Ti 质粒 619
 Goldberg-Hogness 盒 539
 工程菌的大规模培养 404
 汞化标记法 189
 固体闪烁计数器 161
 固相多肽合成 493
 固相亚磷酸酰胺法 485
 固相支持物 195
 固相杂交 195
 固-液相杂交技术 207
 寡核苷酸探针 156
 标记 185
 设计 156
 杂交 210
 寡聚(dT)纤维素 149
 关联分析 715
 冠纓瘤 251
 光照足纹法 585

H

^3H 161
 Hardy-Weinberg 定律 702
 核酸分子探针 155
 核酸分子杂交 195
 核酸的沉淀 64
 精胺沉淀法 68
 PEG 沉淀法 67
 乙醇沉淀法 66
 核酸的纯化 61
 核酸的定量 69
 分光光度法 69
 荧光分光光度法 69
 核酸的分离 101

核酸的浓缩 63

丁醇抽提浓缩法 63

固体聚乙二醇吸水浓缩法 63

核酸的贮存 70

核酸酶 Bal31 333, 334

核酸酶 S_1 217, 553

核酸酶 S_1 保护分析法 217

核酸外切酶 III 333, 335, 573, 582

核酸外切酶 III 保护足纹法 582

核酸原位杂交 220

HIV 29, 472

Hogness 盒 539

虹吸印迹 197

化学发光 216

化学活化膜 196

化学裂解测序法 331, 347

化学潜像 223

环丝氨酸 283

磺化标记法 189

回收 DNA 片段的纯化 134

I

^{125}I 160

^{131}I 160

IL-2 641

india ink 染色法 570

J

基因表达 533

翻译后水平的调控 550

翻译水平的调控 549

基因表达的调控 533

基因表达调控研究方法 550

在原核细胞中的表达 367

在真核细胞中的表达 388

真核基因表达调控 533

转录后水平的调控 547

转录前的表达调控 534

转录水平的调控 538

基因标记 638

基因重排 535

基因打靶 12

基因丢失 534

基因工程

动物基因工程 11

基因工程多肽药物 12

基因工程菌的大规模培养 404

基因工程疫苗 12

历史背景 233

植物基因工程 7

基因枪 624, 650

基因家族 534

基因克隆 233

基因库 234

基因扩增 534

基因诊断 18

基因治疗 18, 631

安全性 641

非病毒载体基因治疗 650

间接体内基因治疗 631

伦理学 641

审批程序 638

腺苷脱氨酶缺陷基因治疗 639

血友病基因治疗 640

遗传病基因治疗 639

直接体内基因治疗 631

肿瘤基因治疗 641

基因转移 645

病毒增强的基因转移 653

非病毒基因转移 650

基因组文库 295

基因组足纹法 585

甲基化保护足纹法 581

甲基化干扰足纹法 578

甲基化修饰 537

甲基氢氧化汞变性电泳 203

甲醛胶变性电泳 202

假基因 534

假衣壳 653

加尾信号 540

夹心杂交法 230

固相夹心杂交法 231

链取代法 231

液相夹心杂交法 231

碱基增色效应 207

碱性 α 螺旋 543

碱性磷酸酶 182, 247

碱性琼脂糖凝胶电泳 91

简单重复序列 677

豇豆胰蛋白酶抑制因子 8

交叉相连法 189
 交换反应 181
 交换反应标记法 183
 酵母穿梭质粒 251
 酵母人工染色体克隆系统 295
 进行中的核转录分析 557
 胍 331
 聚丙烯酰胺凝胶 98
 聚丙烯酰胺凝胶电泳 85
 聚乙二醇和二甲基亚砷变性电泳 201
 菌密度的测定 413
 菌种保藏 404

K

开放阅读框架 367
 看家基因 537
 抗病毒作物 8
 抗除草剂作物 7
 抗昆虫作物 8
 抗生素 282
 抗生物素蛋白 213
 抗体
 重构抗体 17
 单克隆抗体 12
 单链抗体 17
 单区抗体 17
 嵌合抗体 17
 抗体工程 17
 全套抗体 17
 抗真菌作物 8
 抗重金属镉作物 8
 考马斯亮蓝染色法 384, 569
 克隆
 cDNA 克隆 326
 单克隆抗体 12
 定向克隆 240
 DNA 定向连续次级克隆 332
 DNA 克隆 233
 基因克隆 233
 克隆效率 327
 细胞克隆 441
 亚克隆 287
 Klenow DNA 聚合酶 I 166, 177, 332
 扣除文库 558

L

辣根过氧化物酶 214
 Lambda GEM 297
 λ gtWES- λ B 244
 λ 噬菌体载体 241
 离心力 94
 离心柱层析法 192
 粒子轰击 650
 联合感染 252
 连接 256, 310
 大肠杆菌 DNA 连接酶 258
 定向连接 272
 DNA 体外连接 256, 288
 平末端连接 264
 全同源粘性末端的连接 263
 T₄RNA 连接酶 176, 259
 T₄噬菌体 DNA 连接酶 257
 体内连接 274
 同源多聚尾序连接 274
 连接子 268
 链亲和素 213, 228
 链取代杂交法 231
 亮氨酸拉链 542
 裂解生长 241
 磷酸二酯键 484
 磷酸钙转染技术 392
 磷酸酯酶 239
 硫酸二甲酯 331, 573, 578
 硫酸葡聚糖 210
 LTR 255
 氯化钙/氯化锰转化方法 280
 氯化钙/氯化铷转化程序 279
 氯化钙转化程序 278
 氯化铯-溴乙锭梯度平衡超速离心 118
 氯化四甲胺 210
 氯霉素乙酰转移酶 389, 560
 活性测定 560
 氯霉素乙酰转移酶分析 560
 滤膜的重复使用 217
 滤膜结合法 566
 卵白素 213, 228
 卵的转移 607
 卵培养液 611
 螺旋-环-螺旋 543

M

- MAC 652
 M_{13} DNA 单链模板制备 339
 M_{13} 噬菌体载体 249, 337
 脉冲场凝胶电泳 92
 Maxam - Gilbert 测序法 331, 347
 酶工程 24
 密码子 2
 密码子的选择 156, 158
 密码子使用频率 157
 免疫沉淀法检测表达蛋白 398
 免疫荧光抗体法检测表达蛋白 397
 MPE 573, 584
 MPE·Fe(II) 足纹法 584
 mRNA 差异显示法 694
 mRNA 的分离与纯化 136
 M_{13} 噬菌体 536
 模板 331
 末端标记 176
 末端脱氧核苷酸转移酶 184
 末端终止测序法 329, 331

N

- N, N' - 亚甲双丙烯酰胺 85
 耐热 DNA 多聚酶 462
 内含子 533
 neo 389
 尼龙膜 196
 粘粒载体 245
 穿梭粘粒 248
 粘性末端
 非互补粘性末端的修饰 266
 全同源粘性末端的连接 263
 3'突出粘性末端的删切 267
 凝胶过滤柱层析法 191
 凝胶滞留法 563
 Northern 印迹 201, 204

O

- oligo (dT) 纤维素 149
 OP - Cu 584
 OP - Cu 足纹法 584

偶联反应 213

P

- 32 P 160
 PA317 647
 排阻层析 98
 pBPV 载体 254
 PCR 458
 不对称 PCR 466
 重组 PCR 479
 多重 PCR 466
 反向 PCR 466
 锚定 PCR 465
 PCR 引物设计 461
 PCR 应用 467
 PCR 原理 458
 PCR 自动化 461
 原位 PCR 229
 着色互补 PCR 467
 培养 404, 430
 传代培养 440
 工程菌培养 404
 动物细胞培养 430
 细胞培养基 435
 原代培养 439, 646
 植物组织培养 619
 配体 99
 PFGE 92
 pfu 121
 pGEM 237
 pGEMX 237
 吡啶 331
 拼接 548
 平衡盐溶液 437
 平末端 71
 平末端的连接 264
 pol 255
 Ponceau 染色法 570
 Pribnow 盒 368
 pSV₀ CAT 560
 pSVK₃ 质粒 254
 pSP 237
 葡聚糖凝胶 98

Q

启动子 368, 538
 CAAT 盒 539
 GC 盒 539
 Goldberg - Hogness 盒 539
 lac 启动子 368
 P_L 启动子 370
 P_H 启动子 370
 Pribnow 盒 368
 上游启动子元件 539
 tac 启动子 371
 TATA 盒 539
 trp 启动子 370
 诱导性启动子 539
 原核启动子 368
 组织特异性启动子 539
 迁移率 80
 迁移率改变法 563
 羟基磷灰石 230, 558
 羟基磷灰石亲和法 230
 羟自由基 573, 582, 584
 羟自由基干扰足纹法 584
 羟自由基足纹法 582
 切口平移法 163
 琼脂糖 88
 琼脂糖凝胶 89
 琼脂糖凝胶电泳 88
 亲和捕捉法 230
 秋水仙胺 226
 秋水仙素 226

R

RACE 683
 染色体 DNA 制备 306
 染色体 DNA 的原位杂交 226
 染色体转位 536
 染色质结构 537
 RFLP 468
 RNA
 RNA 变性电泳 201
 RNA 聚合酶 538
 RNA 酶 137, 219
 RNA 酶保护分析法 219

RNA 探针 155
 RNA 探针的标记 173
 SP₆ RNA 聚合酶 173
 T₄ RNA 连接酶 176, 259
 T₇ RNA 聚合酶 175

RNA 的分离 136
 RNA 的提取方法 139
 溶解温度 (T_m) 207
 溶菌生长 241
 溶源性生长 241

S

³⁵S 160
 三明治杂交 230
 Sephacryl 98
 Sephadex 98
 Sepharose 98
 S-D 序列 371
 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 382, 567
 筛选 282
 β - 半乳糖苷酶系统筛选 283
 插入表达筛选 283
 插入失活双抗生素对照筛选 283
 重组子的筛选 282
 分析重组子结构特征的筛选法 284
 环丝氨酸筛选 283
 抗生素平板筛选 282
 筛选标记 235
 针对遗传表型改变筛选法 282
 商陆凝集素 226
 上游启动子元件 539
 生物传感器 41
 生物电子学 41
 生物反应器 452
 生物素 186
 胞嘧啶生物素标记法 189
 光敏生物素 188
 抗生物素蛋白 213, 228
 生物素的化学标记法 187
 生物素胍 189
 生物素胍标记法 189
 生物素 Psoralen 衍生物 188
 抗生物素探针的检测 213, 228
 生物芯片 41
 噬菌斑形成单位 121

噬菌体 DNA 的纯化 123
 噬菌体 DNA 的提取 122
 噬菌体显示肽 653
 噬菌体效价 121
 适配子 270
 示踪物 155
 受体介导的蛋白 635
 受体细胞 277
 双脱氧核糖核苷酸 330
 双脱氧末端终止法 331, 329
 顺式调控元件 538
 丝状噬菌体载体 249
 Slot 印迹 205
 松弛型复制子 236
 Southern 印迹 197
 Southwestern 印迹 567
 SP₆ RNA 聚合酶 173
 苏云金杆菌毒蛋白 8
 宿主 277
 酸性 α 螺旋 543
 酸性磷酸酶 214
 随机引物 166
 随机引物法 166, 171
 随机整合 631
 SV₄₀ 载体 252, 392

T

T-DNA 252
 T₄ DNA 聚合酶 178
 T₄ DNA 聚合酶标记法 178
 T₄ 多核苷酸激酶 181
 T₄ 多核苷酸激酶标记法 181
 T₄ RNA 连接酶 176, 259
 T₄ 噬菌体 DNA 连接酶 257
 T₇ RNA 聚合酶 175
 Taq DNA 聚合酶 332, 462
 探针 155
 cDNA 探针 155
 寡核苷酸探针 156
 核酸分子探针 155
 基因组 DNA 探针 155
 检测探针 231
 捕捉探针 231
 RNA 探针 155
 探针比放射活性的测定 193

探针的标记 (参见标记) 155
 探针的纯化 191
 吸收探针 230
 TATA 盒 539
 Te⁺ 283
 Te⁰ 283
 Ti 质粒 251
 替代合成标记法 179
 体内光照足纹法 585
 体外转录 554
 填平 (填充) 266
 5' 突出末端的部分填平 267
 5' 突出末端的完全填平 266
 调控 533
 癌基因产物与表达调控 546
 翻译后水平的调控 550
 翻译水平的调控 549
 基因表达调控研究方法 550
 真核基因表达的调控 533
 转录后水平的调控 547
 转录前的表达调控 534
 转录水平的调控 538
 TIL 641
 tk 基因 388
 Tm 207
 TNF 641
 通用引物 169
 同工酶 71
 同裂酶 71
 同源重组 252, 256
 同源盒基因 541
 同源结构域 541
 统计 702
 退火 458
 退火温度 460

W

外显子 533
 微生物工程 25
 微卫星 DNA 677
 卫星菌落 279
 Western 印迹 400, 569

X

X-gal 250

烯丙基葡聚糖 98
 细胞凋亡 656
 细胞冻存与复苏 444, 647
 细胞计数 443
 细胞克隆 441
 细胞培养 430, 646
 细胞培养基 435
 细胞污染 446
 细胞系 432
 细胞周期 431
 狭缝印迹 205
 显色反应 213
 显微注射 604
 腺病毒伴随病毒 634
 腺病毒载体 391, 633
 腺苷脱氨酶缺陷基因治疗 639
 限制性内切酶 71
 I 型限制性内切酶 71
 II 型限制性内切酶 71
 对单链 DNA 的切割 79
 可变酶 72
 内切酶位点上的甲基化 79
 Subset 酶 72
 同裂酶 71
 限制性内切酶的底物位点优势效应 77
 限制性内切酶的命名 71
 限制性内切酶的星号活力 77
 限制性内切酶片段长度多态性 468
 异源同功酶 71
 远距离裂解酶 72
 向前反应 181
 向前反应标记法 181
 硝酸纤维素滤膜 196
 小卫星 DNA 677
 卸甲载体 255
 新霉素 389
 新霉素抗性 389
 锌指结构域 541
 星号活力 77
 胸腺核苷酸激酶基因 388
 溴酚蓝 670
 溴脱氧尿嘧啶 588
 溴乙锭 83
 溴乙锭的毒性猝灭 90
 序列
 长末端重复序列 255

重复序列 533
 DNA 序列测定 329
 多态性 705
 化学裂解法序列测定 331, 347
 简单重复序列 677
 Maxam - Gilbert 序列测定法 331, 347
 末端终止法序列测定 329, 331
 S - D 序列 371
 数目可变的串联重复序列 677
 双脱氧末端终止序列测定法 331, 329
 选择标记 388
 血友病基因治疗 640

Y

吡啶橙 84
 亚甲蓝 85
 亚克隆 287
 YACS 295
 烟草无菌苗 623
 烟草叶盘转化法 624
 液体闪烁计数器 (液闪) 161
 液相杂交技术 217
 遗传病基因治疗 639
 遗传多态性 704
 遗传密码 3
 遗传统计分析 702
 移动基因 535
 移卵 607
 输卵管移卵 607
 子宫移卵 608
 胰蛋白酶溶液 438
 乙基亚硝基脲 573
 乙基化干扰足纹法 581
 异硫氰酸胍 139
 疫苗
 多价 BCG 疫苗 12
 基因工程疫苗 12
 引物 331
 引物延伸 553
 印迹 195
 斑点印迹 205
 电转印迹 199
 虹吸印迹 197
 膜上印迹杂交 195
 Northern 印迹 201, 204

Southern 印迹 197
 Southwestern 印迹 567
 Western 印迹 400, 569
 狭缝印迹 205
 印迹技术 195
 真空印迹 (转移) 200
 银试剂 84
 银盐染色法 385, 569
 荧光分光光度 69
 有意义链 367
 愈伤组织 625
 原代培养 439, 646
 原核细胞 367
 原核细胞基因表达 367
 原位聚合酶链反应 (原位 PCR) 229
 原位杂交 220
 分裂中期细胞染色体 DNA 的原位杂交 226
 间期细胞内染色质 DNA 的原位杂交 225
 组织细胞内 mRNA 的原位杂交 224
 原生质体转染 622
 原生质体的制备 622
 远距离裂解酶 72

Z

杂交 195, 209
 放射性核素探针杂交 210
 非放射性标记探针杂交 212
 分裂中期细胞染色体 DNA 的原位杂交 226
 固-液相杂交技术 207
 固相夹心杂交法 231
 固相杂交 195
 核酸分子杂交 195
 夹心杂交法 230
 间期细胞内染色质 DNA 的原位杂交 225
 膜上印迹杂交 195
 三明治杂交 230
 液相夹心杂交法 231
 液相杂交技术 217
 预杂交 211
 原位杂交 220
 杂交基本原理 207
 杂交体系 209
 杂交信号的检测 213
 组织细胞内 mRNA 的原位杂交 224
 载体 235

插入型载体 244, 295
 Charon 245, 301
 穿梭粘粒载体 248
 DNA 病毒载体 252, 389
 EMBL 载体 245, 296
 反转录病毒载体 254, 632
 非病毒载体 650
 非融合型表达载体 372
 分泌型克隆表达载体 373
 酵母穿梭质粒载体 251
 昆虫杆状病毒载体 256
 Lambda GEM 载体 297
 λ 噬菌体载体 241
 λ gtWES- λ B 244
 M_{13} 噬菌体载体 249, 337
 粘粒载体 245
 pSVK₃ 质粒载体 254
 人痘苗病毒载体 256, 389
 融合蛋白表达载体 373
 乳头状瘤病毒载体 254
 丝状噬菌体载体 249
 SV₄₀ 载体 252, 392
 Ti 质粒载体 251
 腺病毒载体 391, 633
 卸甲载体 255
 游离型病毒载体 389
 原核表达载体 372
 整合型病毒载体 389
 置换型载体 244, 295
 质粒载体 236
 增强子 539
 SV₄₀ 增强子 539
 真核基因表达的调控 553
 真核细胞基因表达 388, 553
 真空印迹 (转移) 200
 置换型载体 244, 295
 质粒 236
 酵母穿梭质粒 251
 pSVK₃ 质粒 254
 Ti 质粒 251
 质粒 DNA 的纯化 117
 质粒 DNA 的大量制备 115
 质粒 DNA 的提取 109
 质粒 DNA 的小量制备 111
 植物基因工程 7
 植物血凝素 226

- 植物组织培养 619
 脂质体 395, 635, 647
 肿瘤坏死因子 641
 肿瘤基因治疗 641
 肿瘤浸润淋巴细胞 641
 中心法则 1
 终止子 371
 转导 277
 转化 277
 高电压脉冲电击转化法 282
 氯化钙/氯化锰转化方法 280
 氯化钙/氯化铷转化程序 279
 氯化钙转化程序 278
 氯化镁法 281
 烟草叶盘转化法 624
 转基因动物 597
 转基因动物的应用 612
 转基因方法 597
 反转录病毒感染法 597
 胚胎干细胞法 597
 显微注射法 597, 604
 原位基因转移 642
 转基因鼠系的建立 609
 转基因鼠系 610
 转基因植物 618
 转录活化结构域 543
 转录起始位点的测定 553
 核酸酶 S_1 作图法 217, 553
 RNase 抗性分析法 219, 553
 RNase 作图法 553
 引物延伸法 553
 转录因子 540
 普通转录因子 540
 通用转录因子 540
 诱导性转录因子 540
 组织特异性转录因子 540
 转录终止信号 540
 转染 277, 392
 超声介导的转染法 651
 电穿孔转染技术 394
 DEAE-葡聚糖转染技术 396
 磷酸钙转染技术 392
 PEG介导的原生质体转染 622
 脂质体载体法 395
 转位 536
 转座酶 536
 转座子 535
 紫外线 574, 585
 自主复制序列 (ARS) 296
 组蛋白 537
 组织培养 430, 619
 动物组织培养 430
 植物组织培养 619
 足纹法 572
 保护法 573
 DNase I 足纹法 572, 574
 干扰法 573
 光照足纹法 585
 基因组足纹法 585
 甲基化保护法 581
 甲基化干扰法 578
 MPE·Fe (II) 足纹法 584
 OP-Cu 足纹法 584
 羟自由基干扰足纹法 584
 羟自由基足纹法 582
 体内光照足纹法 585
 外切酶 III 保护法 585
 乙基化干扰法 581

(胡晓年 编)

[G e n e r a l I n f o r m a t i o n]

书名 = 现代分子生物学实验技术（第二版）

作者 = 卢圣栋主编

页数 = 8 1 3

S S 号 = 1 0 3 1 2 9 1 8

出版日期 = 1 9 9 9 年 1 2 月第 1 版

封面
书名
版权
前言
目录
正文