

核酸分子杂交技术简介

张 玉 砚

(中国科学院 上海细胞生物研究所)

核酸分子杂交现象是 Marmur 和 Lane (1960) 以及 Doty 等 (1960) 在研究热变性 DNA 慢速冷却后, 重新形成具种属专一性的双螺旋分子时发现的。在一定条件下, 碱基互补的两条多核苷酸链间, 通过氢键配对形成 DNA—DNA 或 DNA—RNA 双链杂交分子。检测核酸杂交分子形成的定性或定量技术, 即为核酸分子杂交技术。此技术已广泛应用于比较不同种属或细胞来源的核酸间碱基顺序的同源性; 比较在各演化发展阶段, 各生长发育以及病理变化过程中, 核酸碱基顺序的变化规律; 广泛应用于病毒基因在寄主细胞内检测和定位; 以及遗传工程学上用来检定核酸片段顺序的相关性等等。此外, 在一定范围内可用于定量检测基因组上某基因的数目, 和作为一种基因或基因片段分离的手段。

一、核酸分子杂交方法

核酸分子杂交有多种方法^[1-3]。近年来,

随着应用面的扩大, 也在不断的发展。但是, 总的可概括为两大类: 一类是液相杂交反应, 一类是固相杂交反应。

(一) 液相核酸分子杂交反应

将 DNA 加碱或加热变性后, 在适当盐浓度和温度条件下, 在溶液内与标记的 RNA 自由碰撞。反应一定时间后, 反应混合液内具有: 碱基能互补配对而形成的 DNA—RNA 杂交分子, 未杂交的 RNA 和单链 DNA, 以及自我“退火”复性的双链 DNA。用以下讨论的各种方法收集 DNA—RNA 杂交分子。用 RNase 消化去除 RNA 未互补配对区。测定杂交的标记 RNA 的脉冲数, 由此计算杂交百分数 (图 1)。

或者以标记 DNA 为探针, 杂交反应后, 用 S₁ 核酸酶处理, 消化未杂交的单链 DNA。然后用 TCA 沉淀法或上柱洗脱法分离双链杂交分子。

收集杂交分子常用的方法有如下几种:

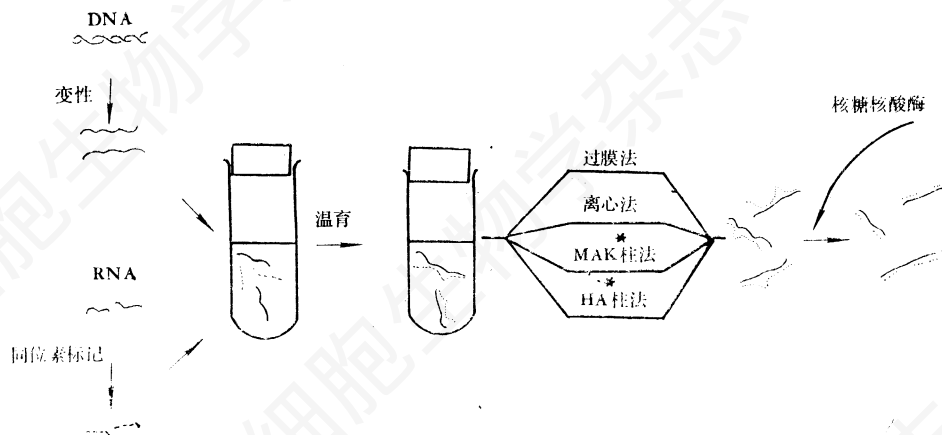


图 1 液相核酸分子杂交方法示意图

* MAK 甲基白蛋白硅藻土, HA 羟基磷灰石。

硝基纤维微孔滤膜能吸附单链DNA和DNA—RNA分子。Nygard和Hall用这种滤膜过滤杂交反应液，以收集DNA—RNA杂交分子。用RNase处理去除RNA未互补配对区后，测膜上脉冲数，计算杂交百分数。

Hall和Spiegelman根据RNA和RNA—DNA杂交分子的密度不同，将杂交反应液冷至室温，与饱和的氯化铯(CsCl)混合，进行CsCl密度梯度离心。收集杂交分子部分，透析，用RNase处理，测脉冲数。但此法价钱昂贵，耗费时间。

Hayashi等根据RNA经RNase降解后，杂交的RNA比已消化的RNA能更加紧密地结合到甲基化白蛋白——硅藻土(MAK)柱上的性质，在杂交反应后，将杂交反应液冷至室温，用RNase处理后上MAK柱。用梯度盐浓度洗脱，低盐浓度洗脱峰为消化降解的RNA，高盐浓度洗脱峰为DNA—RNA杂交分子。

Britten和Kohne^[4]利用羟基磷灰石柱(HAP)能分离单链DNA和双链DNA的性质，用来洗脱分离复性DNA。随后，HAP又

用来分析DNA—RNA杂交分子。当以标记RNA为探针时，杂交反应后用RNase处理，当以标记DNA为探针时，则用S₁核酸酶处理反应液。然后上HAP柱，60℃水浴条件下，用0.12M磷酸缓冲液洗脱单链DNA或未杂交DNA部分，用0.4M磷酸缓冲液洗脱双链DNA或DNA—RNA杂交分子部分，或者提高水浴温度，用0.12M磷酸缓冲液洗脱双链部分。从HAP柱上洗脱单链DNA比洗脱RNA容易，所以洗脱RNA使用的盐浓度可达0.18M磷酸缓冲液，甚或0.28M磷酸缓冲液。

(二) 固相核酸分子杂交反应

将变性DNA固定于固体基质上，然后再与标记RNA或DNA进行碱基互补配对杂交反应。用RNase处理去除未杂交RNA，或用S₁核酸酶处理去除未杂交的单链DNA，测杂交分子的脉冲数，计算杂交百分数。固相法可避免变性DNA本身的自我“退火”反应。但是只适用于较低Cot值的反应。

Gillespie和Siegelman^[5]的固相膜法是目前常用的方法之一。其基本步骤如图2所示。

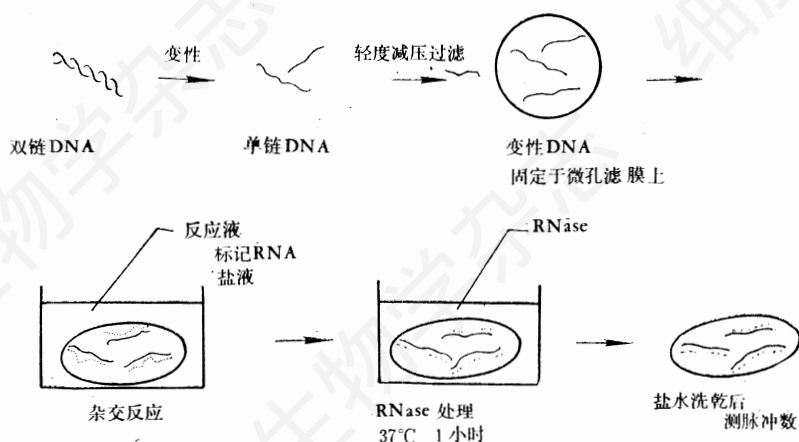


图2 固相膜杂交方法示意图

固相膜方法能同时测量大量样品。但其杂交率比液相法较低。而且常见的困难是空白膜污染，特别是用固相膜法进行DNA与DNA杂交时。有人在杂交反应前，将DNA—膜预先用0.02% Ficoll-0.02% Polyvinylpyrro-

lidone-0.02% bovine albumin-3 × SSC混合液温育处理，或浸入含有30%二甲基亚砜(DMSO)的2 × SSC中数分钟。然后再与标记样品进行杂交反应，则可减低空白膜污染。或者在杂交反应液内加入一定量不相关的核酸样

品,也可改进空白膜的污染。

Southern^[6]将DNA用限制性内切酶酶切成片段后,用琼脂糖凝胶电泳分离。之后,琼脂糖凝胶纵切成薄片,与硝基纤维膜夹在一起,将胶上的DNA片段吸印固定于硝基纤维膜上。然后将吸印有DNA片段的硝基纤维膜与标记的RNA杂交,用放射自显术观察那一段DNA片段是与标记RNA互补配对杂交的。但有一个问题值得注意,凝胶上大的DNA片段向膜上扩散是较慢的,而凝胶上小的DNA片段虽然容易向膜上扩散,但固定不牢,杂交无效,所以对结果的解释需要小心。

随着遗传工程学的发展,发展了一个菌落杂交技术^[7]。将带有不同杂交质粒的E. Coli放在硝基纤维微孔滤膜上培养成菌落。在滤膜上将细菌原位融解,使其DNA原位变性,并固定于硝基纤维滤膜上,然后与标记RNA杂交,放射自显影观察杂交结果。对显示有杂交反应的菌落,从影印培养对照组检出进行扩增繁殖。这样就分离到含有一定基因顺序的杂交质粒的无性繁殖系。

除去以硝基纤维膜为固定DNA的基质外,Bauty和Hall将DNA与纤维素接连,用来分离专一的RNA。Bolton和McCarthy利用DNA葡萄糖的羟基和磷酸醋酸纤维素的磷酸基团间能形成共价键原理,将DNA固定于磷酸醋酸纤维素上。与此同时,他们又将变性DNA与琼脂混合,做成DNA琼脂胶粒。Britten(1963)则用UV处理DNA,然后将其固定于合成的Polymer上。固定的DNA与标记RNA杂交反应后,用洗脱法将互补杂交的核酸分子洗脱下来,测脉冲数。

二、核酸分子杂交反应条件

选择最适反应条件是使核酸杂交达到完好效果的先决条件。

(一) 盐浓度

各项工作使用的盐浓度范围很广,0.3M—1.5M Na⁺或K⁺。比较常用的是0.3M NaCl—

0.03M 柠檬酸钠,或者0.01 M Tris, pH7.0。

DNA复性动力学试验常采用的盐浓度为0.12M磷酸缓冲液(pH6.8)。如提高盐浓度,则需提高反应温度。其最后杂交百分数则依据Britten等^[8]提供的校正值表将其校正为盐浓度为0.12M磷酸缓冲液时应得的结果。

Mg⁺⁺对维持DNA双链结构比Na⁺强,Mg⁺⁺的存在会提高T_m值,影响DNA与RNA的杂交。所以,在杂交反应液中尽可能排除Mg⁺⁺的存在。

(二) 温度

对不同的核酸样品进行杂交反应时,则分别选择最适的温度条件;使杂交形成的速度和RNA加热降解速度的比值达到较高值为适。如具较高二级结构的RNA反应时,需较高的温度。反应液内复性DNA的量较大时,则温度适当低些,以尽可能减低DNA复性的竞争影响。当小的RNA片段,或核苷酸长度<50者,也需要低温反应,以稳定杂交结构,总之,反应温度(Tr)与熔点温度(T_m)间是密切相关的。一般Tr比T_m约低25℃左右。

为了避免由于高温引起核酸的降解,利用甲酰胺(formamide)能降低核酸T_m值的性质,Bonner et al在反应液内加一定量的甲酰胺,则杂交反应可在25℃,低离子强度条件下进行。大约每加1%的甲酰胺,T_m值约降低0.72℃,因而反应时间可延长。在液相杂交反应中,加一定量的甲酰胺可使变性DNA的自我“退火”下降到最低限度^[9]。

(三) 时间

与两条核酸链间碱基互补程度和核酸浓度有关。当两条核酸链间碱基顺序的同一性大,或者可互补配对的碱基对数目比较多,则反应时间就较短。反应液内核酸浓度比较高时,则反应时间也较短。但是,过分长的反应时间,反而由于使杂交分子产生降解,以至于使杂交百分数下降。

(四) 核酸纯度和浓度

DNA和RNA的纯度则视实验要求而定,

如在大量细胞 RNA 中检测是否有病毒专一的 RNA 存在时, 则病毒 DNA 要求不含有任何细胞 DNA 的存在。又如, 当检查的核酸样品与 DNA 互补配对的程度比较大时, 则样品中污染有少量的、与 DNA 互补程度比较差的 RNA 时, 可忽略不计。相反, 如检测的核酸样品与 DNA 互补配对的程度较差, 则样品中不能污染有任何微量的与 DNA 互补程度比较强的其他 RNA。

为了保证有足够的互补碰撞的分子, 因此要有足够的核酸浓度。但如果浓度过高, 以至于使核酸粘度增加, 则反而不利于分子的碰撞。

一种是 RNA 过量, 以一定量标记 DNA 为探针进行杂交; 另一种是 DNA 过量, 而以一定量标记 RNA 为探针进行杂交。前者说明 DNA 具转录活性部分, 在整个基因组中所占百分数; 后者反映 RNA 样品中含有多少与 DNA 互补的 RNA。

(五) DNA 与 RNA 的比例关系

如被检验的 RNA 顺序与 DNA 互补的程度较小时, 则 RNA 与 DNA 的比例要加大。在液相杂交反应中, 为了避免变性 DNA 的自我“退火”, 也常以加大 RNA 与 DNA 的比例关系来克服。

(六) DNA 变性

双链 DNA 变性为单链后才参与杂交反应。如 DNA 变性不完全, 或者自我“退火”速度较快, 则影响最终杂交百分数的下降。

(七) RNA 分子的大小

参与核酸杂交反应的核酸链的大小, 与杂交反应速度间有一定的关系。为了避免由于分子大小, 和两级结构的不同而引起杂交结果的改变, 在杂交反应前, 可以超声或加热处理 RNA 样品。一般将其切成为 4s 大小的片段后, 再进行杂交反应。

(八) 酶

在反应液中任何有关核酸酶的存在, 则随温育温度的提高及温育时间的延长, 对参与杂

交反应的 RNA 或 DNA, 甚或对形成的 RNA—DNA 杂交分子产生程度不等的降解反应, 直接影响到核酸分子杂交结果。所以, 有人将所有使用于杂交反应的玻璃器皿及试剂, 均经消毒手续处理, 或者将所有溶液及核酸样品过 Chelex 100 柱子, 尽可能去除重金属离子, 避免酶的激活。一般为大多数人采用的方法是, 在反应液内加微量的 EDTA 和十二烷基磺酸钠 (SDS), 尽可能抑制重金属离子及酶的作用。

杂交反应后, 用 RNase, 20 微克/毫升, 37°C 处理一小时 (RNase 溶于 $2 \times \text{SSC}$ 中, 沸水加热处理 10 分钟), 可将未杂交的 RNA 区段水解掉。但是, 如果用 RNase 在低盐浓度条件下, 37°C 温育 15 小时以上, 或者酶浓度过高, 则对已杂交上的 RNA 起降解作用。

三、核酸分子杂交实验

通常采用不同的核酸分子杂交技术和实验设计来说明不同的问题。主要有如下几种实验:

(一) 动力学实验:

在任何一个杂交反应系统正式进行之前, 先要做一系列的动力学实验, 以选择最适盐浓度、温度、时间, 以及 RNA 与 DNA 的比例关系等, 以便得到最大的反应速度。

(二) 饱和杂交实验:

DNA 量固定不变, 而与不同浓度的 RNA 进行杂交反应。在一定的反应时间内, 随着 RNA 浓度的增加, 则杂交百分数也增加, 一直到 DNA 能与 RNA 互补的位置被饱和为止。由此结果得的曲线包括两部分, 一部分是逐步增加杂交百分数至达到饱和, 一部分是水平区。由于杂交反应后非杂交区段仍存在, 所以水平区必须用 RNase 处理后才能达到 (图 3)。

固相法和液相法均可用来做饱和杂交实验。但是, 有时由于实验条件的限制, 不能达到完全的饱和, 固相法比液相法尤甚, 也就是

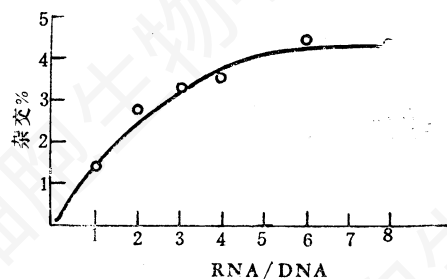


图3 饱和杂交曲线

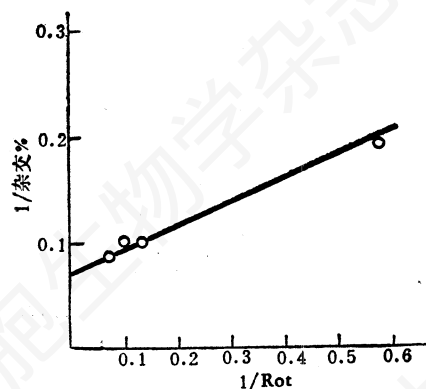
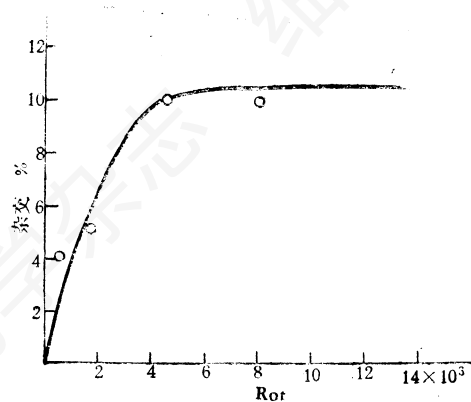


图4 双倒数坐标线求饱和值

左图为饱和曲线, 右图为其双倒数坐标线

(三) 竞争抑制实验:

在反应液内加入一定量标记 RNA 的同时, 加入不同剂量未标记的、与标记 RNA 相对比的竞争 RNA, 然后检测标记 RNA 与 DNA 杂交的百分数。以未加竞争 RNA 的实验对照组测得的标记 RNA 与 DNA 杂交的百分数为 100, 计算加竞争 RNA 组的相对杂交百分数。即,

$$\frac{\text{竞争抑制组杂交百分数}}{\text{实验对照组杂交百分数}} \times 100$$

竞争抑制实验可用来比较不同核酸链间碱基顺序的同一性和差异性。碱基顺序同一性大, 则竞争抑制力强。所以可用来比较不同种属间, 或者不同演化发展阶段, 细胞核酸碱基顺序的相关性问题见图 5。

(四) 预饱和和杂交竞争抑制实验:

固相膜法, 将变性 DNA-膜先与未标记

说, 在尽可能高的核酸浓度条件下, 反应曲线仍达不到水平区。这种情况下, 有人采用 Lineweaver-Burk 的双倒数坐标线求饱和值 (图 4)。由双倒数坐标线求得的饱和值为 14%。当然最好提高标记 DNA 的比强, 加大 RNA 与 DNA 的比例关系, 或者改进反应条件以达饱和。

不同生理、病理情况下, 不同细胞 RNA 杂交饱和值的比较, 反应基因组转录活性的多样化或变化。

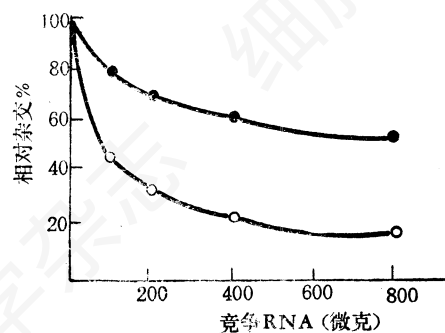


图5 核酸分子杂交竞争抑制曲线

的竞争 RNA 饱和杂交, 然后再与标记的 RNA 杂交, 测定膜上脉冲数, 计算相对杂交百分数。本实验的优点, 是将不同 RNA 样品间有同一性的碱基顺序先饱和杂交, 然后测得的脉冲数, 即表示 RNA 样品间有差异的部分。

利用固相膜法进行预饱和和杂交实验是比较简便的, 但在实际工作时, 由于反复温育处

理,膜上变性 DNA 和预饱和杂交上的 RNA 有脱落现象,以至于达不到预饱和的目的。因此,在进行预饱和杂交实验前,选择最适反应条件是很重要的。

液相法,将变性 DNA 与竞争的 RNA 饱和杂交,然后分离得变性 DNA 未杂交的部分,再与标记的、与竞争 RNA 相对比的 RNA 饱和杂交,由此分离得的杂交分子表示后一 RNA 比前一 RNA 具有较多的、能与 DNA 互补的核苷酸顺序。

(五) 多步杂交实验:

将标记 RNA 与变性 DNA 杂交后,用 RNase 处理反应液,再用碘代醋酸盐 (iodoacetate) 处理去除残余的 RNase。将杂交上的标记 RNA 洗脱下来,用 DNase 处理,去除污染的 DNA。用此分离得的标记 RNA,再与变性 DNA 或分离的 DNA 单链或 DNA 片段进行再杂交,为两步杂交反应,也可进行三步杂交反应。

多步杂交方法不仅能提高差别性,而且能用来了解基因组各片段转录的速度,以及那一段 DNA 和那一条链是转录的。

(六) 耗尽实验:

也可属于多步杂交。将变性 DNA 与 RNA 杂交,然后将未杂交上的 RNA 再与新加入的 DNA 杂交。如此反复杂交,最先被选择性的与 DNA 互补配对的是,与 DNA 互补程度最强的 RNA,其次是与 DNA 互补程度较差的 RNA,最后剩余的是一些与 DNA 不杂交的 RNA。耗尽实验可用来纯化某种 RNA,或用来滴定 RNA。

(七) 复性动力学实验:

DNA 变性后,在 0.12M 磷酸缓冲液系统,60°C,复性为双链。复性速度和程度则与碱基顺序相关性程度和 Cot 值有关。当以 Cot 值的 log 值为横坐标,以与 Cot 值相应的复性双链分子百分数为纵坐标,绘得的曲线为复性动力学曲线。以 50% 的变性 DNA 复性为双链时的 Cot 值,代表一个 DNA 的基本特性,

以 $Cot_{1/2}$ 表示之。以某一 DNA 的 $Cot_{1/2}$ 与 E. Coli DNA 的 $Cot_{1/2}$ 相比,可推算该 DNA 的复杂性。复性动力学实验,用于比较不同 DNA 基因组顺序组成的相关性。

四、小 结

本文仅只概括的介绍了几种常用的核酸分子杂交技术和反应条件。然而,尽管具体方法各有其特点,但都是依据核苷酸碱基顺序互补配对的基本原理。所以,使用核酸分子杂交技术来解决一些问题时,完全有可能根据这个基本原理而加以发展,使技术更加符合实验要求。

参 考 文 献

- [1] Gillespie, D., 1968. in "Methods in Enzymology". Vol. 12 (B): 641—668. ed. by L. Grossman and K. Moldave, Academic Press New York, London.
- [2] Church, R. B., 1973. in "Molecular Techniques and Approaches in developmental Biology", pp. 223—301. ed. by M. J. Chrispeels, A. Wiley-Interscience Publication New York.
- [3] Raskas, H. J. and Green, M., 1971. in "Methods in Virology", Vol. 5: 247—269, ed. by K. Maramorosch and H. Koprowski, Academic Press New York.
- [4] Britten, R. J. and D. E. Kohne, 1968. *Science*, 161: 529—540.
- [5] Gillespie, D. and S. Spiegelman, 1965. *J. Mol. Biol.* 12: 829—842.
- [6] Southern, E. M., 1975. *J. Mol. Biol.* 98: 503—517.
- [7] Grunstein, M. G. and D. S. Hogness, 1975. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 3961—3965.
- [8] Britten, R. J., D. E. Graham, and B. R. Neufeld, 1974. in "Methods in Enzymology" Vol. 29: 363—406. ed. by L. Grossman and K. Moldave, Academic Press New York, London.
- [9] Vogelstein, Bert, and D. Gillespie, 1977. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 75: 1127—1132.