

DNA 指纹图谱法及其应用

刘 德 立

(华中师范大学生物系, 武昌 430070)

提 要

DNA 指纹图谱法是利用卫星 DNA 作探针, 探测不同生物的卫星区, 产生相应的 DNA 指纹图谱的杂交方法。它是八十年代中期发展起来的最新技术。短暂几年, 该法得到迅速发展和完善, 并在法医学、人类遗传学以及鸟类和其它哺乳类的遗传研究中得到广泛应用。

关键词 DNA 指纹图谱, 指纹技术, 卫星 DNA 探针

随着分子生物学的飞速发展, 各种先进技术正在不断涌现和完善, 并在各个领域得到广泛应用。八十年代中期出现的 DNA 指纹技术 (DNA fingerprinting) 就是其中之一。

一、DNA 指纹图谱的发现

在人类染色体中, 含有许多分散的具有串联重复单位的微小卫星区 (minisatellite)。在这些区域中, 由于重复单位的数目不同和重复拷贝数的等位性不同, 所以, 许多卫星区表现出高度多态性 (high polymorphism)^[1-3]。1985 年, Jeffreys 等人发现, 这些区域可通过一种 10—15 个碱基对的核心序列来检测^[3,4]。根据这种核心序列合成的探针能同时检测到许多高度可变的位点 (即卫星区), 产生相应的 DNA 图谱。不同生物, 同一生物的不同品种, 甚至同一品种的不同个体, 其所含卫星区各异。因此, 杂交产生的 DNA 图谱各不相同, 就象人的指纹一样。所以, 把这种具有个体特征和种属特性

的 DNA 图谱称之为 DNA 指纹图谱。这种利用人体卫星区 DNA 作为探针, 探测不同生物的卫星区, 产生相应的 DNA 指纹图谱的杂交方法叫 DNA 指纹图谱法。

二、卫星 DNA 探针的制备

人类卫星 DNA 探针最初由 Jeffreys 小组合成^[3]。他们首先从人肌红蛋白基因的卫星区分离出单一重复单位。该重复单位由 33 对碱基组成。然后, 头尾相接, 再克隆到质粒 pUC13 中, 得到一重组体——PAV 33.7。用限制性内切酶 BamHI 和 EcoRI 同时切割, 产生一个 767 碱基对的插入片段。该片段几乎是 23 个完整的重复单位 (每个重复单位是 33 个碱基对), 如图 1 所示。将人体 DNA 用 Sau 3A 部分消化, 形成 10—20kb 片段, 克隆到噬菌体 λ L 47.1, 构成人的基因库。再用由重组体 PAV 33.7 制备的探针进行筛选。杂交结果表明: 在 3×10^5 个重组体中至少有 40 个从强到弱的杂

72: 2305

- 14 Sielecki A R *et al.* *J Mol Biol*, 1979; 134: 781
15 Harry M G. *J Mol Biol*, 1989; 205: 201
16 Almassy R J *et al.* *J Mol Biol*, 1983; 170: 497
17 Garavito R M *et al.* *J Crystal Growth*, 1986;

76: 701

- 18 Deisenhofer J *et al.* *Nature*, 1985; 318: 618
19 Huber R *et al.* *Hoppe-Seyler's, Z Physiol Chem Bd S*, 1980: 1389

[本文于 1989 年 10 月 24 日收到]

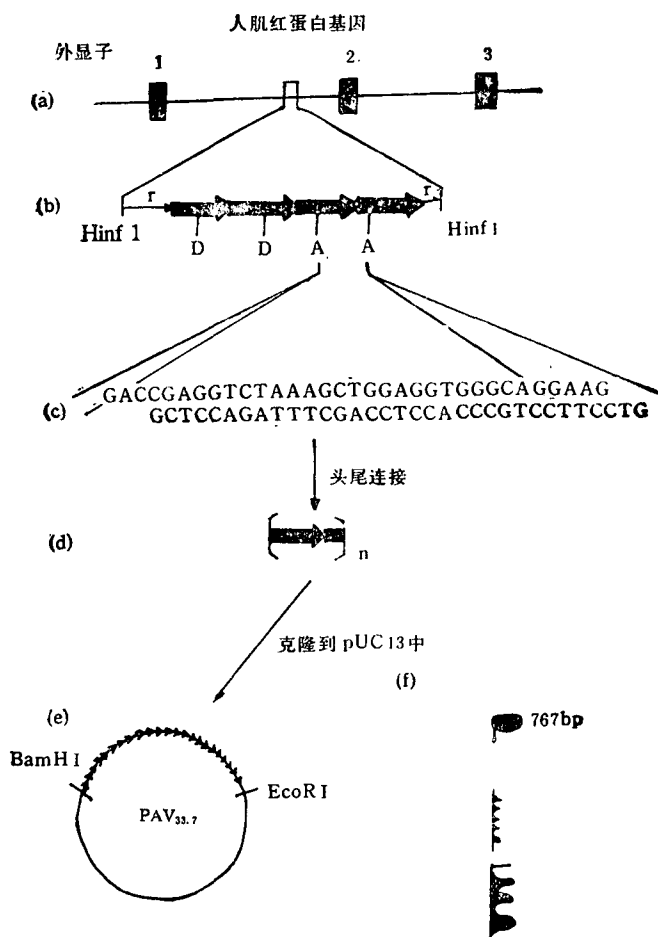


图 1 33 碱基对探针的制备

- (a) 人肌红蛋白基因。
 (b) 第一个内含子中有一个卫星区,含有 4 个重复单位 (每个重复单位由 33 对碱基组成),两侧各有 9 对碱基用 r 表示。
 (c) 分离纯化出单一重复单位。
 (d) 头尾相接。
 (e) 克隆到 pUC13 中。
 (f) 插入片段的电泳图谱

交斑。随机挑选 8 个斑进行纯化 (杂交斑代号分别为 λ 33.1, 33.3, 33.4, 33.5, 33.6, 33.10, 33.11 和 33.15)。并对重组噬菌体 DNA 进行杂交分析。结果表明: 在每个重组体中, 杂交 DNA 位于一个独特的小区 (0.2—2kb)。序列分析表明: 这 8 个重组体的独特区是一个微小卫星区。它由串联的重复单位组成。重复单位数从 3—29 个不等。每个重复单位的序列长度从 λ 33.15 中的 16 碱基对到 λ 33.4 中的 64 碱基

对。每种卫星区的重复单位, 分别是人肌红蛋白基因中卫星区的 33 碱基对探针的一半, 如 λ 33.5 和 33.15 分别为 17bp 和 16bp; 或者相同, 如 λ 33.3, λ 33.6, λ 33.10 和 λ 33.11; 或者加倍, 如 λ 33.1 和 λ 33.4 分别为 62bp 和 64bp。由此制备的这 8 种 DNA 片段又成为新的探针, 可用于人类 DNA 杂交和其它动物 DNA 的杂交。其中探针 33.6 和 33.15 在与哺乳类和鸟类 DNA 杂交中特别有效。其结构如图 2 所示。

探针 33.6 [(AGGGCTGGAGG)₃]₁₈;
探针 33.15 (AGAGGTGGGCAGGTGG)₁₁

图2 探针 33.6 和 33.15 的序列

三、DNA 指纹图谱的获取

用卫星 DNA 探针，可以较容易地获取

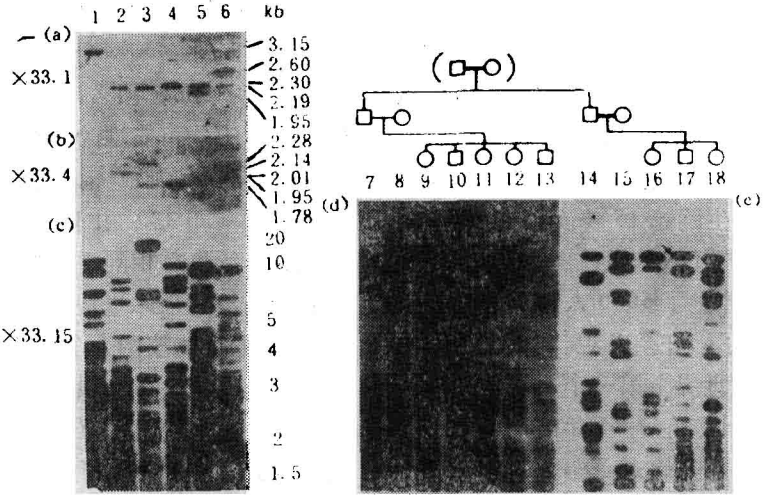


图3 不同人种的 DNA 指纹图谱

(a)(b)(c) 分别为探针 33.1,33.4,33.15 与英国人 DNA 酶解片段杂交的 DNA 指纹图谱
(d)(e) 为探针 33.15 与亚洲人 DNA 酶解片段杂交的 DNA 指纹图谱
□—○ 表示一个家族谱系

DNA 指纹图谱。其大致步骤包括：制备微量 DNA (约 10 μ g),并选用适当的限制性内切酶降解 DNA;再经琼脂糖电泳后,进行 Southern 印迹(肖式印迹)。然后,用 ³²P 标记的卫星 DNA 探针与转移到硝酸纤维薄膜上的 DNA 片段杂交,探针与膜上互补的 DNA 序列特异性结合。将不能和探针结合的 DNA 从膜上洗去,干燥滤膜,放射自显影得到 DNA 杂交图谱。由于不同生物或者同一物种的不同个体,其卫星 DNA 的多态性不同,因而得到的 DNA 杂交图谱各不相同,表现出“指纹”特征。图 3 表示不同人种的 DNA 与探针 33.1,33.14 和 33.15 杂交的指纹图谱^[3]。从图中可见,英国人与亚洲人的 DNA 指纹图谱明显不同,如图 3 中 c2 和 e15。同一人种的不同个体,其 DNA 指纹图谱也不相同,如图 3e14,15。但具有亲缘关系的生物, DNA 指纹图谱有一定相似性。一般来说,子代出现的谱带在父本和母本的谱带中都可找到,如图 3e。

四、DNA 指纹图谱法的应用

DNA 指纹图谱法的出现,为遗传研究、基因组分析以及亲缘关系的鉴定提供了十分有效的手段。短暂几年,该方法得到迅速发展和完善,并在法医学、人类遗传学、进化遗传学以及鸟类和其它哺乳类的遗传研究中得到广泛应用。

在法医学上,生物物证检验的准确性,直接影响破案率的高低。目前,法医检验生物物证,主要靠血型系统。血型系统分得越细,个人识别的准确性越高。但迄今为止,已经发现并用于常规血型检验的只有十多种血型系统。两个个体具有相同血型系统的机率为千分之几。更为重要的是,作为法律证据,血型鉴定只能起排除作用,不能起肯定作用。这就降低了物证应有的价值,直接影响破案率的提高^[4]。DNA 指纹技术则将个人的 DNA 作为特有的指纹图谱。这种 DNA 指纹图谱具有高度的个体特异性和遗传

传稳定性,而且在同一个体的各种细胞内部都一致。象多态性一样,除了同卵双生者外,每人均不相同。两个人具有完全相同的DNA 指纹图谱的机率为 $1:10^{14}$ 。因此,DNA 指纹图谱作为身份鉴定十分可靠,在法医学上,可以通过犯罪现场的血迹,强奸后留在衣服上的精液痕迹等进行DNA 指纹测定,从而作出肯定的判断。这已在破案过程中起了很大作用,用DNA 指纹图谱成功侦破的第一个案件是:英国警察破获的在同一地区连续发生两起15岁女孩被强奸后勒死的案件^[6]。根据DNA 指纹图谱,警察判定为同一人所为,在普查了5000人的DNA 指纹图谱后,终于查出了强奸杀人犯。美国加州警察署正在计划建立世界上第一个罪犯的计算机DNA 指纹图库,计划在3—5年内投入使用。1987年,我国公安部开始对DNA 多态性进行研究,并引进了卫星DNA 探针,成功地获得了清晰而又容易判读的DNA 指纹图谱^[7]。已对120份无关个体血样DNA 进行了测试,个体之间谱带各异,说明用于个体识别是完全可能的。

DNA 指纹图谱法为确定家族的亲缘关系如亲子鉴定提供了一个有效的新方法,通过比较母亲及其孩子的DNA 指纹图谱,可鉴别出不在母亲中出现的DNA 片段,必然是从其生物学父亲遗传下来的。所以,DNA 指纹图谱可以肯定谁是孩子的父亲。这在鉴定私生子的亲缘关系、解决遗产争端等过程中起很大作用。而且DNA 指纹图谱作为亲子鉴定的证据已为英国内政部所接受,为解决移民案件提供了满意的证据。此外,DNA 指纹图谱将成为其它基因组分析中的新工具,特别是在有关人类基因组以及遗传缺陷诊断问题上的研究。DNA 指纹图谱法已同时应用于人口遗传学及进化遗传学的研究上。

最近的研究表明:人体卫星DNA 探针在与老鼠、狗和猫的DNA 杂交时,表现出相似的超变性^[7,8,9]。Wetton 小组和Burke 小组报道,用同样的方法可获得鸟类的DNA 指纹图谱,并能用于鉴定人工饲养的麻雀的亲缘关系^[10,11]。Wetton 等人应用探针33.6与麻雀DNA 杂交,

在同父异母的12只子鸟(1只雄鸟与4只雌鸟交配产生)中鉴别出约60条不同的带。每一条带代表能与核心序列杂交的不同长度的DNA 片段。这是由4只非亲缘关系的雌鸟引起的。所以,每只雌鸟平均产生14.25条不同的带。而一条带同时存在于两个非亲缘关系的个体中的可能性是0.086,那么,14.25条带同时存在于两个个体中的可能性为 $0.086^{14.25}(<10^{-14})$ 。由此可见,DNA 指纹图谱具有典型的个体特征。两种探针(即33.6和33.15)分别杂交后,两个不同的个体具有相同谱型的可能性很小。即使对完全同族的个体也是一样。如表1所示。另一方面,通过比较两个个体的DNA 指纹图谱,可确定其亲缘关系。根据统计学公式

$$D = 2N_{AB} / (N_A + N_B),$$

这里D为相似系数, N_A 为个体A具有的谱带数, N_B 为个体B具有的谱带数, N_{AB} 为二者共有的谱带数。当 $D = 0$ 时,两个体完全不一样,无亲缘关系。当 $D = 1$ 时,两个体完全一样,为同种同属的双胞胎。D值越大,亲缘关系越近。 $D \approx 0.5$ 时,A与B亲缘关系最近,如父子、母子关系。 $D \approx 0.25$ 时,A与B可能是祖孙关系。D值越小,亲缘关系越远。所以,DNA 指纹图谱又可用于亲缘关系的确定。在一组麻雀家谱研究中,有两只成鸟和十一只子鸟养在四个巢里,Burke 和 Bruford 发现有一只鸟有六条带在它父母的DNA 指纹图谱中都不存在。一般来说, F_1 代的每一条谱带都能在其父本或者母本体内找到。如果出现新带,则有两种可能。一是由于突变引起,其机率很低。二是由于非配偶交配引起。很明显,这只鸟是由于非配偶交

表1 用卫星DNA 探针33.6和33.15进行遗传分析

动物名称	每个个体杂交带的平均数		非亲缘关系的个体具有相同谱带的可能性	具有相同谱型的可能性	
	探针33.6	探针33.15		两种探针与两个不同种属的个体杂交	两种探针与两个同种同属的个体杂交
麻雀	6	15	0.22	6×10^{-34}	4×10^{-13}
狗	16	19	0.46	2×10^{-21}	5×10^{-10}
猫	8	13	0.47	3×10^{-14}	7×10^{-7}

(下转第436页)

使得人们在一些无法避免上述因素的实验中通过调整实验条件以达到理想的发光值。另外,值得提出的是,近年来实验方法学得到了改进,广泛采用鲁米诺作为冷光剂。鲁米诺的应用大大提高了测定化学发光的敏感度,它仅需以往实验所需细胞数的 1/100 即可测定,而且实验中也降低了红细胞的影响作用,因此有人提出,对于测定 LPS 诱导产生的化学发光鲁米诺是必须的^[11]。

三、结 语

化学发光作为一种生物物理化学的现象现在逐渐被应用到微生物学、免疫学的研究中,并已经引起人们的广泛兴趣。LPS 诱导的化学发光,为研究 LPS 的结构和功能的关系以及 LPS 激活 PMN 分子机制方面,提供了令人满意的模型。由于该实验敏感度高,微量测定,反应迅速,已逐步为 LPS 研究者所采用。但是,在这个研究领域还存在不少问题有待解决,对一些

现象也没有令人满意的解释,加上实验中影响因素十分复杂,实验的标准化问题等等,因此,这个领域的工作还有待于进一步深入开展。

参 考 文 献

- 1 Allen RC *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1972;47:679
- 2 Babior BM. *J Clin Invest*, 1984;73:599
- 3 Dechatelet LR *et al.* *J Immunol*, 1982;129:1589
- 4 Dahlgren C *et al.* *Infect Immun*, 1983;39:736
- 5 康建等. 生物化学与生物物理进展, 1984;5: 52
- 6 Cockcroft S. *Phosphoinositides and receptor mechanisms*, Alan R Liss Inc 1986:287—310
- 7 焦炳华等. 国外医学. 分子生物学分册, 1987;4: 168
- 8 Henricks PAJ *et al.* *Infect Immun*, 1983;41:294
- 9 Kapp A *et al.* *Infect Immun*, 1987;55:758
- 10 Parnham MJ *et al.* *Int J Immunopharmacol*, 1986;8:951
- 11 Goetz MB *et al.* *Cellular Chemiluminescence*, CRC Press, 1987; 11:101
- 12 Larry A *et al.* *J Cell Biol*, 1985;101:1161
- 13 胡天喜. 发光分析与医学, 上海生物物理学会, 华东师范大学生物系编, 1987
- 14 李明等. 上海免疫学杂志, 1986;6: 304
- 15 Easman CSF *et al.* *Immunol*, 1980;41:67

[本文于 1989 年 10 月 12 日收到]

(上接第 424 页)

配产生。它不是父本的后代,很可能是异父同母。进一步地研究发现邻近巢里一只雄鸟很可能是它的“亲生父亲”。

五、展 望

卫星 DNA 探针如 33.6 和 33.15 通常是定出多个位点,但它们仍能用于寻找只杂交单一基因的探针。White 小组正在人体进行这种研究。用于哺乳类和鸟类的特定基因的探针可能很快发展起来。如果成功,将对确定基因连锁十分有用,特别是对那些控制重要性状如生长率、牛奶产量等的基因。在饲养方面也很有用,还可能有助于某些基因定位,并可能阐明其作用机制。总之, DNA 指纹技术诞生以来,已显示出非凡的生命力。它在法医学和遗传学上的重要作用,受到人们的高度重视^[12],并在各相关领域广泛应用。为此, Jeffreys 教授获 1988 年

西德生化分析大奖。可以预计: DNA 探针的应用将越来越广泛。DNA 指纹技术将会进一步完善和发展,其应用前景将十分诱人。

参 考 文 献

- 1 Botstein D *et al.* *Am J Hum Genet*, 1980;32:314
- 2 Drayna D *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984; 81:2836
- 3 Jeffreys A J *et al.* *Nature*, 1985;314:67
- 4 Jeffreys A J *et al.* *Nature*, 1985;316: 76
- 5 李伯龄等. 遗传, 1988;10(3): 10
- 6 徐绍颖, 许幼禹. 生物工程进展, 1989;9(3): 38
- 7 Hill W G. *Nature*, 1987; 327:98
- 8 Jeffreys A J *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1987; 15: 2823
- 9 Jeffreys A J, Morton DB. *Anim Genet*, 1987;18:1
- 10 Wetten J H *et al.* *Nature*, 1987; 327:147
- 11 Burke T, Bruford M W. *Nature*, 1987; 327:149
- 12 徐俊杰. 生命的化学, 1989; 9(2): 13

[本文于 1989 年 10 月 4 日收到]