

核酸杂交技术及其在肿瘤研究中的某些应用

中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组

1957年 Warner 等首先发现 polyA 与 polyU 能形成稳定的双链结构,但当时未引起人们的重视。直到 1960 年 Doty 等发现肺炎双球菌的双链 DNA 可以通过物理的方法解离成二条单链,又可再聚成双链。这才使 Spiegelman 等按照氢键作用原理很快地创建了核酸杂交技术(图 1)。在此之前,人们对大分子核酸还只能进行浮力密度、稀有碱基、碱基组成、 T_m 值、感染力等特性测定。自从建立了既灵敏又具有特异性的核酸杂交技术以后,就在核酸的研究领域内,增添了一种有力的分析和制备工具。至今,不仅尚无一种化学测定方法可以取代核酸

杂交技术,而且已发展成为一项纯化特异核酸、比较核酸顺序、测定转录水平和研究基因表达的重要技术。在分子生物学领域中核酸杂交技术的应用很广,尤其是近年来它在肿瘤的病毒病因和基因表达等方面的研究工作中起了关键的作用。

一、核酸杂交技术的进展

1. 液相法的进展

液相法是 Spiegelman 等最先使用的一种核酸杂交方法。他们把 DNA 和互补的 RNA 混合在溶液中进行杂交反应,然后用氯化铯平衡密度梯度离心法分离出杂交链(图 2)。由于在反应中会形成一些非互补的双链称为“端”和“环”。因而测定结果不太准确。1962 年 Spiegelman 等用 RNase 处理杂交后的混合物,结果降解了“端”和“环”,增加了杂交反应的特异性(图 3)。1963 年 Hall 等发现硝酸纤维素滤膜对单链 DNA 和 DNA:RNA 杂交链有特异的吸附能力,从而用滤膜过滤法取代了费时的氯化铯超离心法。但是在进行液相法 DNA/RNA 杂交时, DNA 的再聚反应将使单链 DNA 的浓度下降,不利于 DNA:RNA 杂交链的形成。所以,以后发展的固相法,几乎要取代液相法。1971 年 Szybalski 等用不相互补的 DNA 单链来进行 DNA/RNA 杂交,克服了 DNA 再聚的缺点。同时又发挥了液相法中分子碰撞几率大,杂交反应时间短,产率高等优点,使液相法有了新的发展。最近 Spiegelman 和 Astrin 已分别成功地把预先经过再聚反应处理的单链 DNA 和单链

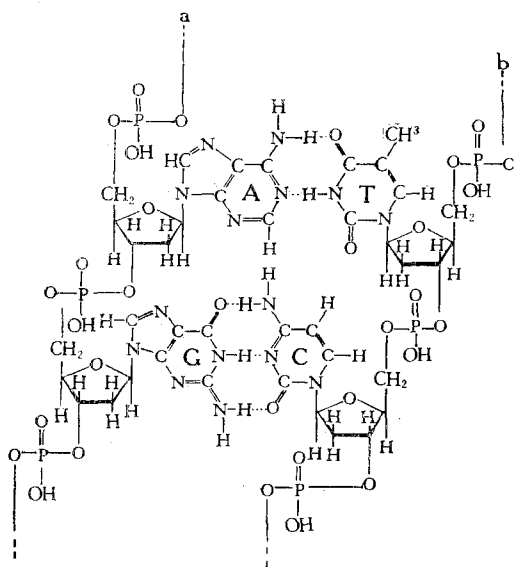


图 1 碱基配对氢键作用图

图中虚线表示氢键。a、b 二链借氢键形成双链, A、T、G、C 分别为腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶碱基

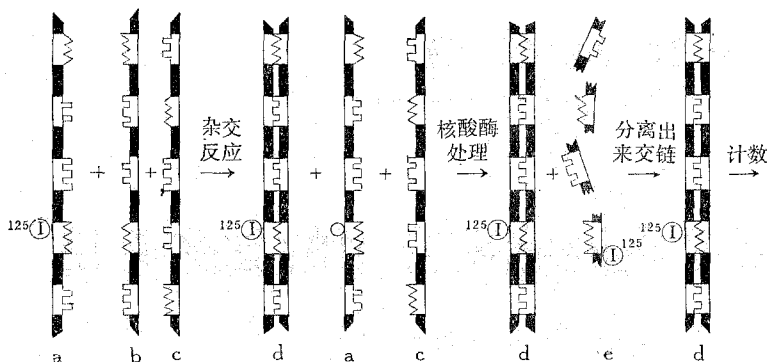


图2 液相法杂交示意图

图中 a 为同位素标记的单链核酸。b 为与同位素标记核酸顺序相互补的单链核酸。c 为与同位素标记核酸顺序不相互补的单链核酸。d 为杂交链。e 为被核酸酶消化的片断

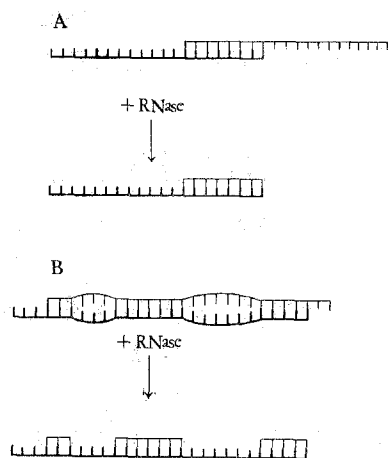


图3 液相法杂交后的非特异性反应及处理

图中(A)为“端”的降解,(B)为“环”的降解。上述二种降解后的双链 T_m 值较低,仍可与真正的杂交链相区别

RNA 作为探针,用于液相法杂交反应中。

2. 固相法的进展

1962 年 Hall 等首先建立了纤维素粉末柱固相杂交法。由于固相法克服了 DNA 再聚的问题,因而发展较快。同年 Bolton 等又建立了琼脂法,这一方法操作简便,适用范围较广。但由于在进行 DNA/RNA 杂交时, RNA 量较大,会引起非特异性吸附的干扰,当用于 DNA/DNA 杂交时,又须把液相待测的 DNA 降解成片断,因而目前较少采用。1963 年 Britten 所建立的紫外光照固化核酸的简便方法是利用胸腺嘧啶或尿嘧啶在紫外光照下形成二聚体的性

质。紫外光照法既能固化 DNA,又能固化 RNA,适用的载体范围也很广,但由于固化后使顺序上起了变化,因此常用于 polyA/polyU 等简单的杂交反应中。在固相杂交法中,比较好的是 1965 年 Spiegelman 等发展的 DNA 滤膜法。这一方法操作简便,适应性强,可以进行多种作用方式的杂交,由于使用了 RNase,它的特异性也很强,能适用于大批的定量分析。

1971 年 Poonion 和 Wagner 等又分别把核酸的多点氨基和 RNA 的 5' 末端磷酸基,以共价键联接到琼脂糖珠上(Sephrose 4B),1972 年 Kim 把真核细胞的染色质固定在滤膜上,结果也能特异地与互补 RNA 杂交。

3. 杂交作用方式的进展

(1) 饱和杂交和竞争杂交 二者都建立于 1962 年,前者是固定了 DNA 的用量,然后逐渐加大互补 RNA 的用量而进行的一系列杂交反应。当 RNA 用量加大到杂交链不再增加时,就达到饱和。后者是采用二种不同标记的 RNA 来竞争同一 DNA。先固定 DNA 和第一种标记 RNA 的用量,然后加入用量逐渐增大的第二种 RNA,从第二种 RNA 对第一种标记 RNA 的取代与否,可以判别二种 RNA 的顺序是否相同。

(2) 预饱和和竞争杂交 1967 年 Kasai 等用固定量的 DNA 滤膜,先和一系列用量渐增的未标记 RNA 作用,使达饱和。然后在各张滤膜上再加入足以饱和 DNA 的定量标记 RNA 来竞争。Soeire 等通过对 Hela 细胞 Hn RNA 和小鼠 L 细胞 Hn RNA 的分辨,认为此法的分辨力比竞争杂交强。

(3) 彻底杂交 按 1968 年 Spiegelman 所述用固定量的 RNA 和一系列不同量的 DNA 滤膜杂交,在某一 DNA 量下,杂交反应不再增加就达到了彻底杂交。然而 Gillespie 所述的彻

底杂交,在操作上却另有特色。

(4) 原位杂交 1967 年 French 等首先在细胞水平上建立了原位杂交技术。他们把细胞染色体固定在载玻片上,然后与氘标记的互补 DNA 杂交,最后用放射自显影测定。这样就不需要将待测核酸从组织细胞中抽提出来,又能确定特异核酸在染色体上的位置。这一方法目前已趋成熟。但原位杂交的效率较低,灵敏度较差,因此必须使用高比活性的标记物才能进行定位测定。

1973 年 Wu 等用铁蛋白标记的噬菌体 tRNA 与 DNA 进行杂交反应。他们通过电镜观察已定出了 tRNA 结构基因在单链 DNA 上的位置。这是一种分子水平的杂交定位方法。

(5) 夹心式杂交 1968 年 Fujenaga 先用不标记的 RNA 饱和 DNA 滤膜,再加入同种标记的 DNA 进行再聚。从标记 DNA 与固定在滤膜上 DNA 的再聚量,即可知 RNA 的杂交量。本法对标记 RNA 有困难时较适用。

(6) 多步杂交 Bøvre 等自 1968 年进行多步杂交后,至 1971 年已推广应用。这一技术是成功地将放射性标记的 RNA,从各种杂交链的 DNA 上洗脱下来,然后再重新与 DNA 杂交。如此反复多步杂交即可增加核酸杂交的特异性,但操作较繁琐。

(7) Poly A 杂交 从 1963 年起不少工作者已测定了在哺乳动物 mRNA、Hn RNA 及致癌 RNA 病毒的 RNA 中都具有 Poly A 顺序。1969 年 Edmonds 等利用这一特征发展了 Poly A 杂交法,这一方法对纯化、测定 mRNA 和鉴定致癌 RNA 病毒具有独特的功效。

(8) 连续杂交 1973 年 Shih 等用固化 RNA 的纤维素柱来提取相应的 DNA。由于 DNA 是液相的,它的自身再聚反应降低了 DNA 与 RNA 的杂交效率。作者使用了一个封闭的装置(图 4),使从 RNA 纤维柱素上流出的再聚双链 DNA 在另一根变性柱中,再解聚成单链,然后重新被压回到 RNA 纤维素柱上进行反应。这种连续杂交既能使 40—45% 的相应 DNA 形成杂交链,又具有高度的特异性,是一种纯化基

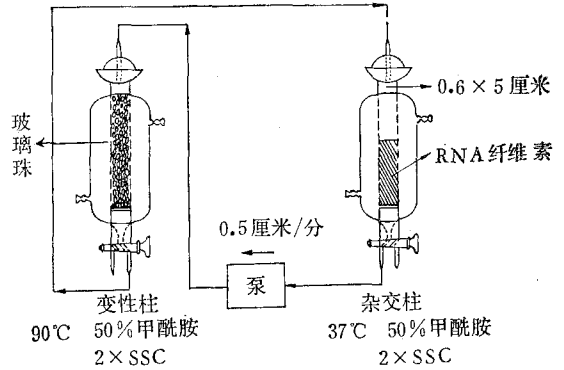


图 4 连续杂交装置

图中 SSC 为柱内反应缓冲液 (0.15M 氯化钠-0.015M 柠檬酸钠) 它的作用是使溶液有一定的离子强度,以克服带电磷酸基之间的静电排斥

因的方法。最近这一技术已应用于 SV₄₀ 基因的分

4. 标记核酸方面的进展

核酸杂交技术能成为一种简便、灵敏的技术是与应用同位素标记核酸分不开的。继 Warner 后,早在 1960 年 Rich 已对 polyA:polydT 和 polyA:polyU 双链采用了超离心、X 光衍射等分析法,确定了杂交链的双螺旋结构,但今天,人们常常把首创核酸杂交技术归功于 Spiegelman。可见,核酸的同位素标记是核酸杂交分析法的一个重要方面。同位素标记核酸的方法有三种:

(1) 细胞系统 将放射性底物(例 ³H TTP)加入到组织培养液中,由细胞摄取进行生物合成,最后再提取标记核酸。由于放射源太强会伤害细胞,因此在培养液的稀释下,所获得的这种标记核酸,一般比活性不太高,约在 10⁵cpm*/微克核酸左右。

(2) 无细胞系统 通常用大肠杆菌 RNA 聚合酶来合成 RNA 标记物,用逆向转录酶或大肠杆菌 DNA 聚合酶来合成 DNA 标记物。Ruprecht 等则在大量的放线菌素 D 存在下,使致癌 RNA 病毒内源合成了标记的单链 DNA。一般由无细胞系统所合成提取的标记核酸比活性在 10⁶—10⁷ cpm/微克核酸之间。

* cpm 为每分钟的计数

(3) 化学标记 自从1959年 Borenfreund 等用氘取代法标记人白血病 DNA 以来,已建立了好几种化学标记核酸的方法,但是这些方法有的需要把核酸转变成能溶于有机溶剂的盐,易造成降解;有的则比活性较小。近年来化学标记法有了新的进展。1971年 Commerford 用 ^{125}I 标记核酸,得到了比活性较高的标记物,经 Commerford 进一步试验和改进,使它有可能发展成为一种简单有效的核酸标记方法。

5. 羟基磷灰石 (HA) 层析柱的应用

杂交反应后杂交链的分离除了上述提到过的方法外,还可采用分子筛凝胶过滤, MAK 柱层析和 HA 柱层析等。其中尤其是 HA 柱层析的应用更为重要。它不仅能分离杂交链,而且能进行动力学定量测定,测定所形成的杂交链的稳定性,以鉴定杂交反应的特异程度。1968年 Britten 用 HA 柱分析了高等动物 DNA 再聚的动力学,得到了高等生物 DNA 中存在重复顺序的证据,所以 HA 柱层析法是真核细胞核酸杂交反应的一种重要分析工具。

6. 有机溶剂系统的应用

真核细胞的核酸杂交反应,常需要较长的反应时间。这样往往会引起固化 DNA 从滤膜上脱落、再聚;RNA 的降解及非特异性吸附的增加。1967年 Bonner 在适当盐浓度下,用30%的甲酰胺溶液在低温下进行滤膜法杂交反应,得到的结果良好。1971年 Gillespie 又进一步用实验证实,在滤膜法杂交中,甲酰胺溶剂系统的多种性能都比水溶液系统更为优越,从而进一步为核酸杂交技术在真核细胞系统中的应用创造了条件。

二、核酸杂交技术在肿瘤研究中的某些应用

1. 在人类肿瘤病毒病因研究中的应用

近年来由于肿瘤病毒病因研究的进展,已有不少科学家对肿瘤病毒必须符合 Koch 提出的经典病毒病因三原则*提出了疑议。目前许多人认为流行病学的统计结合实验室工作,将可提供较多的肿瘤病毒病因证据。

在实验室中核酸杂交技术是测定致癌病毒信息的整合作用,检查可疑 RNA 致癌病毒颗粒中逆向转录酶的活力和 polyA 顺序等的重要工具。为肿瘤病毒病因研究提供了很多有价值的资料。

(1) 测定致癌病毒信息的整合作用 近年来通过核酸杂交技术的测定已初步证明在白血病、Burkitt 瘤(一种非洲儿童淋巴瘤)、鼻咽癌、子宫颈癌、何杰金氏病和淋巴瘤细胞 DNA 中有可能的致癌病毒信息。已在 Burkitt 瘤细胞和鼻咽癌细胞核的 DNA 中发现了 EB 病毒(一种疱疹病毒)的基因组;单纯疱疹病毒 2 的基因则在子宫颈癌细胞 DNA 中出现;而白血病,何杰金氏病和淋巴瘤细胞核的 DNA 中却具有正常细胞 DNA 中所没有的大鼠白血病病毒(RLV)基因。这些结果都支持病毒 DNA 整合在宿主细胞 DNA 上的学说。

(2) 测定致癌病毒的 RNA 及其相应的逆向转录酶 据 Spiegelman 认为癌细胞中可疑 RNA 病毒颗粒,如能满足以下条件即可列为一种可能的病因剂:a. 该可疑颗粒中含有 60—70S 的高分子量 RNA;b. 具有以此 60—70S RNA 为模板的内源逆向转录酶活力;c. 其颗粒密度在 1.16—1.19 克/毫升之间;d. 内源逆向转录酶所合成的氘标记 DNA 探针,能与相应的动物致癌病毒 RNA (或与相应癌细胞中的 P-RNA) 杂交。

Spiegelman 利用 70S RNA 与新生氘标记 DNA 形成中间体杂交链的过程,建立了 70S RNA 和逆向转录酶的同时测定法。由此得到的氘标记 DNA 探针,又可进一步用于和上述相应的 RNA 杂交。可见核酸杂交技术在鉴定一种可疑颗粒是否属于致癌 RNA 病毒时起了很重要的作用。至今,Spiegelman 等已在人乳腺癌、白血病、何杰金氏病、淋巴瘤、肉瘤、Burkitt 瘤、脑癌、肺癌、结肠癌和胃癌中发现了这类可

* 指:(1)必须能从大多数的此种疾病中分离出病毒。(2)此病毒可在体外培养液中生长。(3)培养后的病毒再接种到健康动物身上,可再产生此种疾病。见 Medical Virology p. 130, 1970

疑的颗粒。这些结果提出了病毒 RNA 先逆向转录成病毒 DNA,再整合入宿主细胞 DNA 中的可能性。

(3) 测定可疑颗粒 RNA 中的 polyA 顺序 上文提到致癌病毒的 RNA 中含有 polyA 顺序。因而运用 polyA 杂交法可作为鉴定该可疑颗粒是否属 RNA 致癌病毒的一项指标。这一测定方法,对于鉴定人类可疑的 RNA 致癌病毒颗粒具有突出的优点,它不需要对还不能进行培养传代的病毒 RNA 预先进行标记。由于测定的灵敏度高,只需要少量的样品。运用此法,Spiegelman 已测出人乳汁的可疑颗粒 70S RNA 中具有 polyA 顺序。Gillespie 则证实 Visna 病毒(一种羊神经系统病毒)的 RNA 也含有 polyA。运用这一技术,在人乙型肝炎病毒颗粒中寻找含 polyA 的 RNA,进而测定肝癌细胞核 DNA 中是否存在乙型肝炎病毒的基因,就将进一步明确乙型肝炎病毒致肝癌的可能性。

(4) 在三种病毒致癌模型中的作用 “前病毒说”、“致癌基因说”及“原病毒说”是近年来肿瘤病毒病因研究中的三种主要学派,核酸杂交的结果在这三种模型中都是最有说服力的实验证据之一。“前病毒说”除上述“整合作用”的证据外,最近 Spiegelman 又通过对以双生子互为对照的白血病细胞和正常细胞 DNA 的杂交测定取得了进一步的证据。用核酸杂交方法找到了正常鸟类细胞中的致癌病毒基因组是“致癌基因说”的重要实验证据之一。“原病毒说”所设想的基因放大作用,在对爪蟾卵发育时 rRNA 的研究中,也取得了核酸杂交的证据。因此进一步在哺乳动物细胞系统中发展多种既灵敏又有特异性,精细而可靠的核酸杂交方法,再结合其它证据将有可能衡量这些模型的可信程度。

2. 核酸杂交技术在某些癌变原理研究中的应用

(1) 在研究高等生物细胞遗传信息中的应用 按照经典的概念,一个合子在有丝分裂时,等量地分配其染色体,因此使其子代的全部细胞都具有同样的遗传信息。1970 年 Gurdon 的

核移植试验已证明将不同组织的细胞核移入蛙卵都可发育成正常蝌蚪。1971 年 Takebe 也把烟草叶单个细胞再生成整棵植物。这就更使人相信在高等生物细胞中的遗传物质——整套的 DNA 样板,可能也是相同的。目前在肿瘤细胞和正常细胞的 DNA 之间,有否差异的问题上,仍有着不同的看法。核酸杂交技术,为这些看法提供了一些依据。

Spiegelman 用不相互补的氘标记单链 DNA 作探针,发现白血病细胞 DNA 与正常白血球细胞的 DNA 不同,存在着一个特异的病毒基因。上文所述爪蟾卵发育中的基因放大作用也指出,细胞发育时会造成 rDNA 的含量变化,Tobler 等则发现在蛔虫染色体削减现象中失去了 27% 的 DNA。Scarano 则认为细胞分化是 DNA 修饰酶改变了 DNA 顺序的结果。因而遗传物质也是不同的。

Hubner 则认为癌细胞和正常细胞间有着先天就相同的病毒遗传信息。自 1964 年以来有不少工作者用琼脂法及滤膜法杂交对高等生物的各种组织细胞的 DNA 进行了比较研究,结果表明这些细胞的 DNA 无显著差异。目前,根据已有的杂交技术和实验结果,要对十分庞大而复杂的高等生物细胞间的遗传信息作出全面而准确的判断尚为时过早。因此进一步发展测定技术,通过大量的工作,搞清高等生物细胞间全套 DNA 样板的异同问题,是分子生物学的重要课题之一,也是解决癌变原理的重大理论基础。

(2) 在细胞分化研究中的应用 目前很多人都认为胚胎细胞的分化是细胞基因活动与关闭的一系列复杂程序所导致的。因此不同组织的分化细胞或同种组织不同分化阶段的细胞,它们的基因表现也将是不同时。利用核酸杂交技术,以深入研究细胞分化和基因表现的关系是肿瘤基础研究中的重要问题。

Chuch 等用液相法竞争杂交测出了小鼠各种组织细胞的重复基因的表现有所不同。杂交动力学的结果又说明了结构基因的表现有相似之处。在鼠胚发育的杂交测定中则表明结构基

因的转录水平随鼠胚的发育而逐渐增高。近年来由于免疫方法和 polyA 杂交法在纯化特异 mRNA 上的应用,将使核酸杂交技术能揭示某一特异结构基因表现与细胞分化之间的关系。最近 Gillespie 等认为用 polyA 杂交法测定细胞发育中 mRNA 总量的变化,既可得到细胞分化和结构基因转录的关系,又使测定方法得到了简化,建立一个体外转录系统,以各种因子影响结构基因的转录,用 polyA 法测定 mRNA 总量,有可能找出促进分化的重要因子。

(3) 在肿瘤调节控制原理研究中的应用
癌胚特性比较的研究,为肿瘤调控原理的研究提供了一些线索。在高等生物中基因的调节控制比原核细胞中要复杂得多,各种高等动物细胞的调控模型将有助于更深入地研究肿瘤调控原理。目前据核酸杂交技术和其它实验的结果 Darnell 等认为在真核细胞中存在着转录调节,转录后调节及翻译调节等复杂过程。其中转录调节是指在 RNA 聚合酶作用期间,对产生含有 mRNA 的 HnRNA 的控制;转录后调节则是指在转录完成后,对 HnRNA 释放出 mRNA 分子数目的控制;而翻译调节是指一定量 mRNA,对合成蛋白输出量的控制。所以在真核细胞中,仅测定蛋白质的变化并不能说明调控发生在什么水平上。因此不建立核酸杂交技术,以测定转录水平上 mRNA 的量,就很难较准确地说明真核细胞的调控作用。

过去,核酸杂交技术无论在证实重复 DNA 所转录的染色体 RNA 可能具有调控作用的方面;还是在测定组蛋白脱落和 DNA 转录之间的调控关系上,都曾发挥过重要的作用。近来, Kim 用染色质滤膜法测定了甲状腺素对蝌蚪肝染色质转录的关系,表明核酸杂交技术可作为测定某些因子调控作用的工具,这对于肿瘤调

控原理的深入研究是很重要的。1973 年 Axel 等通过核酸杂交技术,对体外染色质转录特异蛋白 mRNA 作了测定,明确了染色质中含有限制基因表达的必要因素。因此使用某些因子,在体内或体外对癌细胞进行作用后,再用分离得到的染色质和大肠杆菌 RNA 聚合酶进行转录,就可测定出这些因子在转录水平上的调控作用了。如果我们利用癌胚特异性抗原的 mRNA 作为测定指标,用抑制该抗原表达的胚胎发生期的一些生物因子作为调控物质,进行上述染色质体外转录测定。经过耐心的工作就有可能寻找出促进癌细胞分化的重要因子。用核酸杂交技术来测定癌变细胞中 RNA 变化的工作很复杂,较难取得明确的结论。但这项工作对癌变调控原理的研究具有重要作用。例如 Garrett 等用滤膜法竞争杂交测得,在用二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌时, mRNA 的变化先发生在细胞浆中。这表明对细胞转录后的调控和癌变之间的关系,也应给予足够的重视。

结 束 语

核酸杂交是六十年代开始创建起来的一项新技术。近年来随着核酸研究、应用等方面的工作日益增多,及对生命本质现象了解的逐渐加深,核酸杂交技术不断得到改进。它的应用对象已由原核细胞扩大到真核细胞。在方法学上不仅建立了液相和固相等多种方式,而且还从定性测定进展到定量测定,从稳定态测定扩展到动力学研究。目前该项技术已成为核酸研究领域内一种重要的分析方法和制备工具。在肿瘤的防治研究中建立核酸杂交技术将有可能促进病因、治疗和发病原理等多方面研究工作的