

## 分子生物學技術（Ⅱ）

王志堅

三軍總醫院院內感染管制委員會

本次專欄將繼續介紹其他常用來做為細菌分型的技術包括利用DNA探針（probe）進行南方墨點雜交試驗（southern blotting hybridization）及聚合酶連鎖反應（polymerase chain reaction; PCR）等較準確的方法。

### 一、DNA探針及南方墨點雜交試驗

#### 1. 探針的選擇及製造

目前在細菌分型中所選用的探針大多是利用細菌染色體上不太容易發生突變的基因，也就是保留很好沒有發生突變的基因（conserved gene），常使用的為大腸桿菌中核糖體RNA基因（16S及25S rRNA）。這些基因先以加熱方式變成單股，然後以此單股DNA做為模板，合成互補的雙股DNA，在新合成的核酸鏈中可以標記上放射性或非放射性物質，這些物質在雜交試驗中可以做為被偵測到的標記物。

#### 2. 南方墨點雜交試驗

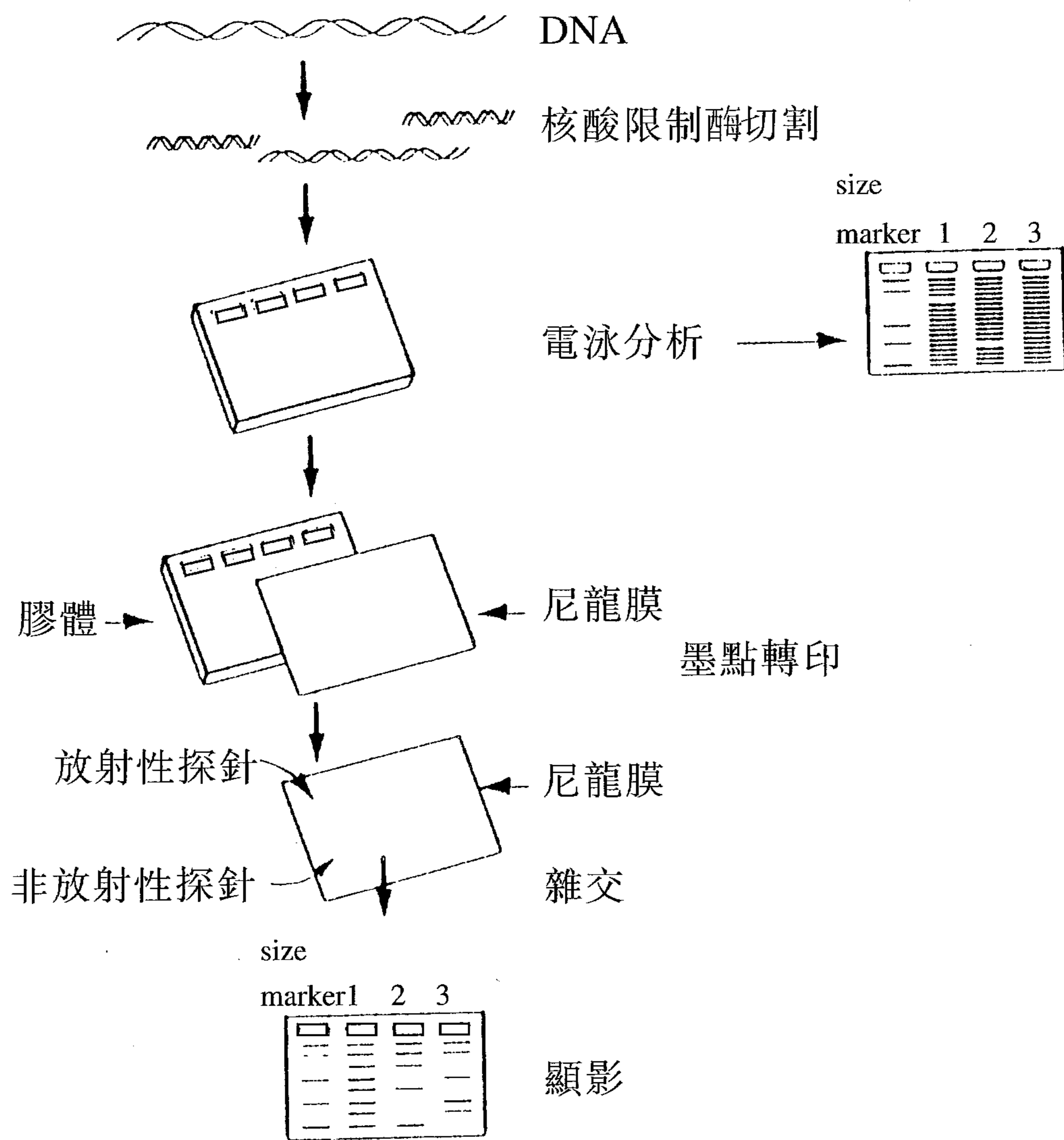
上次專欄所提到的染色體DNA經由核酸限制酶切割後，經電泳分析會出現數百個片段，在判讀時很難由肉眼加以區分；若利用南方墨點雜交法，結果只會出現少數在染色體中特殊部位的片段，通常只有10至15個片段，可以直接用肉眼加以區分不同的片段。

此方法是由一位名叫Southern的科學家在1975年所發明的，因此也就以他的姓做為方法的名字。此方法是將染色體DNA經由核酸限制酶切割後，經過洋菜膠體電泳分離DNA片段，然後將DNA片段轉印至帶有正電的尼龍（nylon）膜上，在轉印過程中所使用的鹼性緩衝液可將雙股DNA變成單股DNA，然後經由高溫及乾燥，同時可以使DNA片段永遠固定在尼龍膜上；接著將製造好的探針加熱使其變成單股DNA，在特別的溶液及適當的溫度下與尼龍膜作用，只要探針的單股DNA片段與染色體上單股DNA片段有互補關係時，就可發生雜交現象形成雙股DNA，再經過沖洗過程，將不發生雜交多餘的DNA片段由尼龍膜上洗掉，如果是放射性探針則可在X光底片上顯影，如果是非放射性探針則可使用酵素呈色法在尼龍膜上直接呈色，經由上述方法，就可看見與探針發生雜交後的DNA片段（圖一）。

### 二、聚合酶連鎖反應

#### 1. PCR的原理：

PCR方法是在1985年首先由Mullis等人所發明，這是一種使用DNA聚合酶在試管內將特定的DNA片段進行增



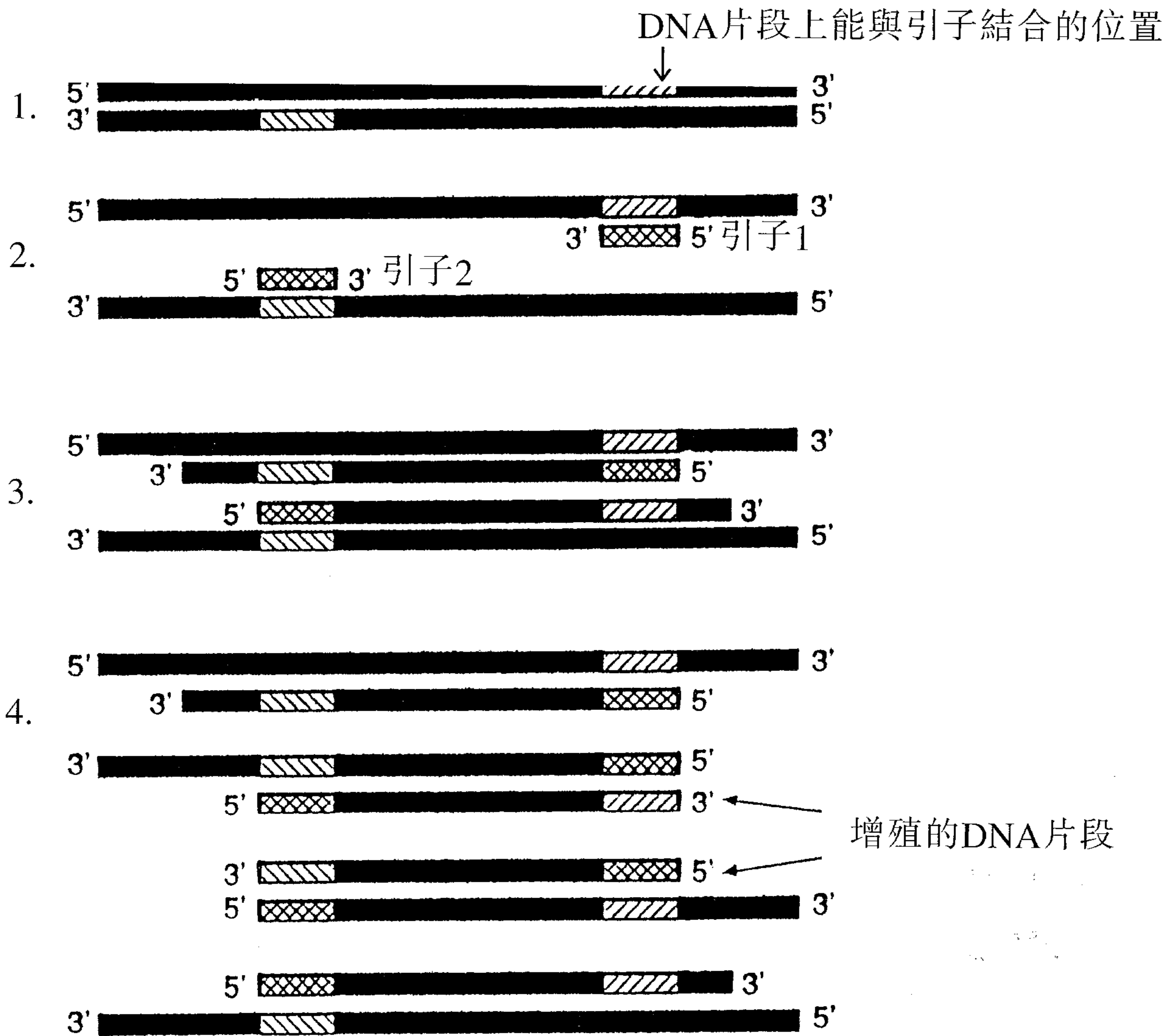
圖一 南方墨點雜交試驗的原理

殖的方法，因為廣泛應用在分子生物學的研究領域，佔有很重要的地位，對醫學研究也具有極大的貢獻，因此也使Mullis在短短數年內就獲得諾貝爾化學獎。

PCR方法中主要有3個重要步驟，第1就是將欲增殖的DNA片段變性(denature)變成單股DNA，通常需將溫度加熱至95°C左右；第2將設計好的引子(primer)與DNA片段上的互補處結合，這時的溫度大約是55°C左右；這裡所使用的引子為一種只有數十個鹽基的寡聚核苷酸(oligonucleotides)的單股DNA，其序列必需與欲增殖DNA片段外面的序列具有互補性，一般需

選一對引子，這樣才可以使每一股DNA從不同方向進行增殖；第3步驟則將溫度上升至72°C，加入嗜熱桿菌DNA聚合酶；這種聚合酶是由一種可以生存在溫泉內的細菌中所分離出來的，所以可以耐高溫不會影響酶的功能。然後利用加入的核苷酸以單股的特定DNA片段為模板進行DNA的增殖(圖二)。重覆上述的3個步驟約30次左右，DNA片段即可以等比級數的方式增加達到數百萬倍，目前已有自動的儀器，可以利用電腦設定所需要的步驟及條件，完全自動化的進行實驗，既快速又方便。

## 2. 引子的選擇



圖二 PCR的原理

1. 先將DNA片段加熱使其變成單股DNA。
2. 加入引子使其能與DNA片段上的特定位置結合。
3. 利用DNA聚合酶合成新的DNA片段。
4. 經重覆增殖後的DNA片段。

目前使用在細菌分型的PCR方法中所選用的引子，可分為二種，其中一種是使用染色體中某些基因外圍所存在會重覆出現的序列作為引子稱為重覆性PCR (repetitive PCR; Rep-PCR)；另外一種則是選用隨意的序列做為引子稱為任意引子PCR (arbitrary primed PCR)，這兩種方法各有其優缺點。

本專欄已利用二期的篇幅將常用的分子生物學技術介紹給讀者，下期將陸續開始介紹目前所使用的細菌分型法，包括傳統及分子生物學的方法。

### 參考文獻

1. Arbeit RD: Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al, eds. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington D.C.: ASM Press 1995: 190-208.
2. Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975;98:503-17.
3. Welsh J, McClelland M: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res 1990;18:7213-8.
4. Woods CR, Versalovic J Jr., Koeuth T, et al: Analysis of relationship among isolates of *Citrobacter diversus* by using DNA fingerprints generated by repetitive sequence-based primers in the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992;30:2921-9.