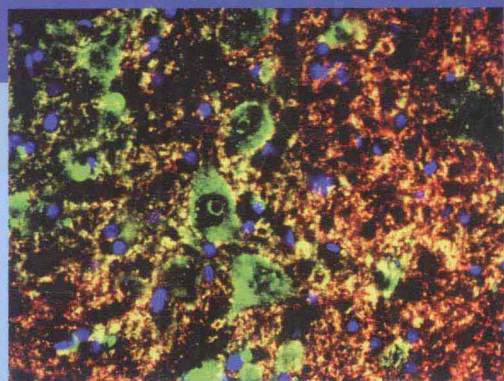


21世纪生物技术系列

分子杂交 理论与技术

Fenzi zaijiao
Lilun Yu Jishu

第3版



主编

王廷华

刘进

Jean Philippe Merlio



科学出版社

21 世纪生物技术系列

分子杂交理论与技术

第 3 版

主 编 王廷华 刘 进 Jean Philippe Merlio

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书是《21 世纪生物技术系列》的一个分册。全书系统地介绍了分子杂交的基本理论,对地高辛原位杂交技术、荧光原位杂交技术、抑制消减杂交、放射性杂交、反义核酸分子杂交、基因芯片理论与进展作了详细阐述;对 Southern 印迹杂交、Northern 印迹杂交、Western 印迹杂交、cRNA 探针原位杂交、寡核苷酸探针原位杂交、原位分子杂交双标技术,以及最近较为热门的蛋白芯片杂交技术进行了详细描述,并给出了具体的实例分析。

本书可供生物医学专业研究生、本科生及从事分子杂交的科研人员阅读和实验时参考。

图书在版编目(CIP)数据

分子杂交理论与技术/王廷华,刘进,(法)默利奥(Merlio JP)主编.—3 版.—北京:科学出版社,2013.6

(21 世纪生物技术系列)

ISBN 978-7-03-037968-9

I. 分… II. ①王… ②刘… ③默… III. 分子杂交 IV. Q781

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 135988 号

责任编辑:沈红芬/责任校对:桂伟利

责任印制:肖 兴/封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新科印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005 年 3 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2013 年 6 月第 三 版 印张:15 插页:1

2013 年 6 月第四次印刷 字数:355 000

定价:58.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《21 世纪生物技术系列》第 3 版编审委员会

主 审 李云庆

委 员 (按姓氏笔画排序)

王廷华

四川大学

特聘教授,博导

昆明医科大学,云南师范大学,成都医学院

教授,博导

白 洁

昆明理工大学医学院

教授,博导

刘 进

四川大学华西医院

教授,博导

李云庆

第四军医大学

教授,博导

李成云

云南农业大学

教授,博导

李兵仓

第三军医大学

教授,博导

李官成

中南大学湘雅医学院

教授,博导

李建国

上海交通大学医学院

教授,博导

张连峰

北京协和医学院

教授,博导

陈向东

华中科技大学同济医学院

教授,博导

陆 地

昆明医科大学

教授,博导

项 鹏

中山大学中山医学院

教授,博导

胡幞明

重庆医科大学

教授,博导

顾晓松

南通大学医学院

教授,博导

曾园山

中山大学中山医学院

教授,博导

游 潮

四川大学华西医院

教授,博导

Jean Philippe Merlio

法国波尔多第二大学

教授,博导

John W. McDonald

美国霍普金斯大学医学院

教授,博导

Leong Seng Kee

新加坡国立大学

教授,博导

Xin-Fu Zhou

澳大利亚南澳大学

教授,博导

Zhi-Cheng Xiao

澳大利亚莫纳什大学

教授,博导

《分子杂交理论与技术》第3版编写人员

主 编 王廷华 刘 进 Jean Philippe Merlio

副主编 张 晓 戴 萍 邹 宇

编 委 (按姓氏笔画排序)

习杨彦彬	王廷华	王昭君	王熙才
尹 昭	刘 进	孙伟伟	杨慧娟
李 华	吴碧华	邹 宇	张 晓
罗华友	胡长林	饶 莹	洪孙权
袁文丽	湛宏鸣	董 坚	曾 茜
戴 萍	Jean Philippe Merlio		

《21 世纪生物技术系列》前言

21 世纪是生命科学飞速发展的时代。如果说 20 世纪后半叶是信息时代,那么 21 世纪上半叶,生命科学将成为主宰。我国加入 WTO 后与世界科技日益接轨,技术的竞争已呈现出其核心地位和作用。正是在此背景下,为适应我国 21 世纪生物技术的发展和需求,科学出版社于 2005 年组织编写了一套融基础理论和实践技术为一体、独具特色、主要面向一线科技人员的学术著作——《21 世纪生物技术丛书》,包括《组织细胞化学理论与技术》、《神经细胞培养理论与技术》、《蛋白质理论与技术》、《分子杂交理论与技术》、《PCR 理论与技术》、《基因克隆理论与技术》、《抗体理论与技术》和《干细胞理论与技术》共 8 个分册。本丛书自 2005 年 3 月问世以来,即受到了广大生物技术科技工作者的喜爱,2006 年 1 月进行了重印;2009 年出版了第 2 版。本丛书对满足我国日益扩大的科研人员及研究生实践需求,以及推动我国 21 世纪生物技术的普及和发展起到了积极的作用。

生物技术发展迅速,为了满足广大科技工作者的需求,本丛书于 2013 年推出第 3 版。在第 2 版的基础上,第 3 版主要对实验技术中的经验体会部分进行了全面增补,同时补充了新的理论技术,包括免疫荧光染色、诱导型干细胞理论与培养、基于病毒载体的转基因及 RNA 干扰技术、免疫共沉淀与蛋白质相互作用、蛋白芯片等实用技术,并对各技术的相关实践经验进行了更全面的总结。重要的是,为了应对和满足前沿技术的发展需要,推出第 3 版的同时还增补了 4 个分册,即《基因沉默理论与技术》、《电生理理论与技术》、《生物信息学理论与技术》和《神经疾病动物模型制备理论与技术》,并将丛书名更改为《21 世纪生物技术系列》。至此,本丛书已达 12 个分册,从行为、形态、细胞、分子生物学、电生理和生物信息等多个层面介绍了目前常用生物技术的基本理论、进展及其相关技术与应用,是我国 21 世纪生物技术著作中覆盖面最广、影响最大的一套著作。本丛书从培养科学思维能力和科研工作能力的目标出发,以实用性和可操作性为目的,面向我国日益增多的研究生和广大一线科研人员。在编写方式和风格方面,力求强调对基本概念和理论进行简明扼要的阐述,注重基本技术实践,认真总结了编者的实验经验和体会,并提供了大量原版彩图,使丛书在兼顾理论的同时更具实用价值。

本丛书由王廷华教授牵头,邀请国内外一批知名专家教授参加编写和审阅。本丛书是全体参编人员实践经验的总结,对从事科研的研究生和一线研究人员有很好的参考价值。

由于编写时间有限,加之科学技术发展迅速,书中的错误和不足之处在所

难免,恳请各位读者批评指正。

值本丛书出版之际,感谢为我国生物技术及科学发展孜孜不倦、奉献一生的老一辈科学家,他们的杰出工作为我国中青年一代的发展奠定了基础;感谢国内外一批知名专家教授对丛书的指导和审阅;感谢编者们所付出的辛勤劳动;感谢中国解剖学会长期以来对本丛书组织工作的支持;感谢各位同道给予的鼓励 and 关心!

《21 世纪生物技术系列》编审委员会

2013 年 4 月 8 日

目 录

第一章 分子杂交概论	(1)
第一节 分子杂交技术及其意义	(1)
第二节 核酸分子杂交	(2)
第三节 核酸探针	(7)
第二章 原位杂交技术的基本理论	(25)
第一节 原位杂交技术的发展及研究历史	(25)
第二节 原位杂交技术的基本方法和主要内容	(26)
第三章 地高辛原位杂交技术	(33)
第一节 实验原理	(33)
第二节 地高辛原位杂交技术的研究历史与发展	(33)
第三节 实验所需设备、试剂及配制	(36)
第四节 实验操作步骤	(39)
第五节 cRNA 探针原位杂交实验中存在的问题和经验体会	(43)
第四章 荧光原位杂交技术	(47)
第一节 实验原理	(47)
第二节 荧光原位杂交技术的研究历史与发展	(47)
第三节 实验操作步骤	(51)
第四节 实验所需设备、试剂及配制	(57)
第五节 详细实验步骤、结果及分析	(60)
第六节 实验中存在的问题和经验体会	(64)
第五章 抑制消减杂交	(66)
第一节 抑制消减杂交的概念	(66)
第二节 抑制消减杂交产生的背景及内涵	(66)
第三节 抑制消减杂交的原理	(68)
第四节 抑制消减杂交实验操作步骤	(73)
第五节 结果与分析	(79)
第六节 实验中相关问题解答	(82)
第六章 放射性杂交	(87)
第一节 放射性杂交的基本原理与发展历程	(87)
第二节 构建放射性杂交图谱的方法	(90)
第三节 放射性杂交图谱的应用	(94)

第七章 反义核酸分子杂交技术及其应用	(101)
第一节 反义 RNA	(101)
第二节 反义 DNA	(104)
第三节 反义核酸的特性	(105)
第四节 人工合成反义寡核苷酸的类型	(106)
第五节 反义寡核苷酸的化学改造	(107)
第六节 制备反义寡核苷酸要考虑的因素	(108)
第七节 反义寡聚核苷酸导入细胞的方法	(112)
第八节 核酶	(112)
第九节 反义核酸分子杂交技术的应用	(116)
第八章 基因芯片固相分子杂交技术理论与进展	(121)
第一节 基因芯片的制备方法	(121)
第二节 基因芯片检测的样品制备	(125)
第三节 基因芯片杂交	(127)
第四节 基因芯片检测原理	(127)
第五节 基因芯片杂交的结果分析	(130)
第六节 基因芯片的应用	(130)
第七节 国内外基因芯片研究及开发情况	(138)
第九章 基因芯片分子杂交技术在脑出血周围带基因组分析中的应用	(141)
第一节 实验原理	(141)
第二节 材料和方法	(141)
第三节 实验结果	(146)
第四节 注意事项与经验体会	(146)
第十章 Southern 印迹杂交	(149)
第一节 实验原理	(149)
第二节 实验方法	(149)
第三节 实验结果及注意事项	(157)
第十一章 Northern 印迹杂交	(158)
第一节 实验原理	(158)
第二节 实验方法	(158)
第十二章 Western 印迹杂交	(163)
第一节 蛋白质样品的制备	(164)
第二节 蛋白质样品的分离——不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	(169)
第三节 转移电泳	(172)
第四节 免疫检测	(175)
第五节 Western 印迹应注意的问题和出现的异常情况及对策	(177)
第十三章 cRNA 探针原位分子杂交单、双标技术的应用	(181)
第一节 原位杂交技术检测猫脊髓和背根节中 NGF mRNA 的表达	(181)

第二节	用免疫组化及原位杂交双标技术检测猫脊髓内 NGF 及其 mRNA 的表达	(186)
第十四章	寡核苷酸探针原位杂交技术检测大鼠脊髓中 NGF 家族及其受体 mRNA 的表达	(189)
第一节	实验原理	(189)
第二节	实验所需设备、试剂及其配制	(189)
第三节	实验步骤	(190)
第四节	实验结果	(192)
第五节	结果分析	(194)
第六节	实验中存在的问题和经验体会	(194)
第十五章	Western 印迹技术在检测全横断脊髓损伤大鼠神经干细胞移植后 NGF 变化中的应用	(200)
第一节	实验原理	(200)
第二节	实验所需设备、试剂及其配制	(200)
第三节	实验步骤	(202)
第四节	实验结果	(204)
第五节	结果分析	(205)
第六节	实验体会	(206)
第十六章	Northern 印迹杂交检测小鼠乳房肿瘤组织的总 RNA	(207)
第一节	实验目的及原理	(207)
第二节	实验方法	(207)
第三节	实验结果	(212)
第四节	实验体会	(214)
附	生物素(地高辛)标记探针的 Northern 印迹检测方法	(214)
第十七章	基因芯片技术检测针刺促进脊髓损伤修复中的基因表达	(217)
第一节	实验原理	(217)
第二节	实验所需仪器、试剂及其配制	(217)
第三节	实验步骤	(220)
第四节	实验结果	(222)
第五节	结果分析	(224)
第六节	实验体会	(224)
第十八章	脑缺血肺损伤组织蛋白芯片杂交检测技术	(226)
第一节	试剂和材料	(226)
第二节	实验结果与分析	(229)
彩图		

将变性的 DNA 固定在琼脂中, DNA 不能复性但能与其他互补核酸进行杂交。20 世纪 60 年代中期, Nygaard 应用标记 DNA 或 RNA 探针检测固定在硝酸纤维素膜上的 DNA 序列。由于当时缺乏特异性的探针, 这种方法不能应用于研究其他特异基因的表达, 不过, 这一时期的过量探针-膜杂交实验, 实际上是现代膜杂交实验的基础。

20 世纪 70 年代早期, 许多重要领域的发展促进了分子杂交技术的进展。如固相化的 Poly U-Sepharose 和寡 (dT)-纤维素使人们能从总 RNA 中分离 Poly A⁺RNA。而 mRNA 的纯化技术使人们从网织红细胞总 RNA 中提取 α -和 β -珠蛋白 mRNA 成为可能。这些珠蛋白 mRNA 首次被用于合成特异性的探针以分析珠蛋白基因的表达。但此期的 cDNA 探针制备很繁琐, 所获得的 cDNA 的长度和纯度均不稳定。因此, 寻找新的探针来源已成为分子杂交技术进一步发展的前提和希望。

20 世纪 70 年代末期至 80 年代早期, 分子生物学技术方面有关限制性内切酶的发展与应用使分子克隆成为可能。各种载体系统的开发与应用, 特别是质粒和噬菌体 DNA 载体的成功构建, 极大地丰富了特异性 DNA 探针的来源。

此后, 由于固相化学技术和核酸自动合成仪的诞生, 亦使常规制备 18~100 个碱基的寡核苷酸探针成为易事。特异 DNA 或 RNA 序列的量和大小均可分别用 Southern 和 Northern 印迹杂交来测定, 这些技术的应用无疑为提高杂交水平及其可信度提供了质的保证。

综观分子杂交技术的发展史, 该技术在杂交方法、探针的来源与特异性程度的提高、探针的标记方法、杂交的效率和成功率方面均得到了快速的发展。但是就目前来看, 将分子杂交技术应用于临床研究中尚存在一定的问题, 具体表现在: ①对单拷贝基因检测的敏感性不高; ②非放射性标记探针的有效使用率也需提高; ③分子杂交的实验操作步骤较繁琐等。因此, 今后分子杂交技术的发展方向及其应用前景主要应从以下方面考虑: 其一, 进一步完善现有的非放射性标记探针技术以提高其利用率, 同时加大开发新的非放射性标记探针技术的力度, 以适应临床科研对分子杂交技术提出的新要求; 其二, 靶序列与探针杂交信号需进一步扩大, 从而提高分子杂交体的检测效率; 其三, 发展简单的杂交方式, 使 DNA 探针实验进一步向简便、快速、低廉及安全的方向发展, 进而实现实验室研究与临床实际应用的相互衔接。

第二节 核酸分子杂交

一、分子杂交

事实上, 分子杂交反应的实质是核酸探针与待测靶核酸的相互反应; 而抗原-抗体、外源性凝集素-糖类、亲合素-生物素、受体-核酸的杂交在广义上也属于探针-靶分子反应。与分子杂交反应所不同的是, 蛋白质探针 (如抗体) 与特异靶分子的结合是通过混合力 (疏水、离子键及氢键) 与少数特异结合位点相互作用得以实现的; 而核酸探针与待测靶核酸的反应则是根据杂交体的长短不同, 在几十、几百甚至上千个位点上互补碱基对通过氢键的结合而实现的。因为有机溶剂可降低杂交体的稳定性, 所以疏水反应对待测靶核酸的结合也有一定作用, 但对其特异性影响甚微。

核苷酸经某一原子、功能基团或长侧链修饰后仍可进行碱基配对,这取决于修饰的部位和修饰物的性质。这一特性有助于了解非放射性核酸探针标记物的设计和 ^{125}I 与 DNA 探针的化学结合。能与核酸结合的单一原子有银、溴和碘等,这些元素可与嘧啶(胸腺嘧啶除外)环的 C-5 位或嘌呤环的 C-8 位反应而不影响氢键的形成。溴亦可与胸腺嘧啶的 C-6 位结合,而胞嘧啶的 C-4 位和腺嘌呤的 N-6 位就不能被修饰,否则将影响碱基配对。这种明显差异可能是因为标记的探针每 1kb 掺入了 10~30 个修饰碱基,即仅 4%~12% 的单个碱基被修饰的类似物取代了。由于掺入位点处的碱基配对较弱或不存在,故对杂交分子的稳定性影响很小。防止氢键破坏的一种方法就是修饰探针——将探针克隆入 M13 载体中,只修饰载体区而不修饰插入片段。当用放射性核素 ^{32}P 和 ^{35}S 标记核酸时,由于核素是掺入核酸骨架的磷酸二酯键中,因此碱基未发生任何修饰。在 5' 端磷酸基团上可进行化学修饰,这是标记寡核苷酸探针的有效方法。因为这种方法是在一个探针分子上标记一个可检测的基团,所以对长的克隆探针并不适用。

另外,可利用修饰过的碱基来增加杂交的稳定性和特异性。2-氨基腺嘌呤可替代寡核苷酸探针中的腺嘌呤,并通过形成 3 个氢键以增加杂交体的稳定性。在 G-C 丰富的 RNA 探针中,可用次黄嘌呤代替鸟嘌呤来获得特异的杂交。因为次黄嘌呤-鸟嘌呤间只形成 2 个氢键,有效地降低了杂交体的 T_m 值。这样的结果是, T_m 值与杂交温度越接近,杂交的严格度亦随之增加,因此也就增加了杂交的特异性。

显而易见的是,由于结合位点的不同、可检测基团及检测系统的不同,可派生出很多核酸探针标记方法。

二、分子杂交的类型

核酸分子杂交按杂交反应进行的环境可分为固相杂交和液相杂交两种类型。固相杂交是将参加杂交反应的一条核酸先固定在固体支持物如硝酸纤维素滤膜、尼龙膜、乳胶颗粒、磁珠和微孔板上,而另一条反应核酸则游离在溶液中,即靶核酸和探针核酸分别位于固体支持物和溶液中。液相杂交所参加反应的两条核酸链都游离在溶液中。

与液相杂交相比,固相杂交的优点主要体现在杂交反应后,表现为:①固相反应后,未进行杂交的游离片段可容易地漂洗去除;②固体支持物上留下的杂交物容易检测;③能有效防止靶核酸(主要是 DNA)的自我复性。因此,在实际应用中,固相杂交法远较液相杂交应用广泛。液相杂交是研究最早且操作简便的一种杂交类型,在过去的数十年里虽时有应用,但远不如固相杂交应用普遍,这主要是因为杂交后过量的未杂交探针在溶液中去去除较为困难和误差较高。近来,由于杂交检测技术的不断更新和改进,以及商业性基因探针的大量开发和实际应用,亦推动了液相杂交技术的迅速发展。

(一) 固相杂交类型

1. 菌落原位杂交(colony in situ hybridization) 是将细菌从培养平板转移到硝酸纤维素滤膜上,然后将滤膜上的菌落裂解以释出 DNA。将 DNA 烘干固定于膜上与 ^{32}P 标记的探针进行杂交,最后经放射自显影后检测菌落杂交信号,并与平板上的菌落对位。具体实验步

骤可参考如下:

(1) 将硝酸纤维素滤膜置于含抗生素的平皿琼脂培养基上,用无菌牙签挑取单菌落接种于滤膜和琼脂平板上,并使其排列成方格状,膜和琼脂板上菌落位置相同。

(2) 培养细菌至产生 1~2mm 大小的菌落。

(3) 在一块培养平皿中置 4 张滤纸,用 10% SDS 浸透,倒掉多余液体。将带有菌落的滤膜取下,轻轻置于滤纸上,菌落面在上,注意防止在滤膜底面存有气泡。

(4) 5min 后,将滤膜转至用变性溶液(0.5mol/L NaCl,1.5mol/L Tris-NaCl)浸湿的滤纸上,放置 10min。

(5) 将滤膜转至用中和溶液(1.5mol/L NaCl,0.5mol/L Tris-HCl,pH8.0)浸湿的滤纸上,放置 10min,并重复中和一次。

(6) 将滤膜转至用 2×SSPE 溶液浸过的滤纸上,放置 10min。SSPE 配成 20×储备液:3.6mol/L NaCl、0.2mol/L NaH_2PO_4 (pH 7.4)、20mmol/L EDTA(pH 7.4)。

(7) 将滤膜用滤纸吸干,80℃ 真空烘干 2h。

(8) 然后按固相膜的核酸杂交方法进行菌落 DNA 与探针的杂交。

2. 斑点杂交(dot blot) 是将被检测的标本点样在膜上,烘烤固定。这种方法耗时短,主要用于半定量分析,一张膜上可同时检测多个样品。为使点样准确方便,市售有多种多管吸印仪,如 Minifold I、II 和 Bio-Dot 等,它们有许多孔,样品加到孔中,在负压下就会流到膜上呈斑点状或狭缝状,反复冲洗进样孔,取出膜烤干或在紫外线照射下固定标本,然后就可以进行杂交。

(1) DNA 斑点杂交

1) 将膜在水中浸湿,再放到 15×SSC 中(膜准备)。

2) 将 DNA 样品溶于水或 TE 液,煮沸 5min,冰上速冷。

3) 用铅笔在膜上标好位置,将 DNA 点样于膜上。每个样品一般点 50μl (2~10μg DNA)。

4) 将膜烘干,密封保存备用。

(2) RNA 斑点杂交:与上法相似,每个样品最多加 10μl 总 RNA,经酚/氯仿或异硫氰酸胍提取纯化。方法是 RNA 溶于 5μl DEPC 水中,加 15μl 甲醛/SSC 缓冲液(10×SSC 中含 0.15mol/L 甲醛)使 RNA 变性。然后取 5~8μl 点样于处理好的膜上,烘干。

对培养细胞标本,处理技术相对简化,不用提取和纯化 RNA。方法是用含 0.5% Nonidet P40 的低渗缓冲液对多种动物细胞做简单处理,离心去掉细胞核和细胞碎片,就得到基本不带 DNA 而富含 RNA 的细胞质提取物。这一粗 RNA 在高温下用甲醛变性,不需加工,直接点样于硝酸纤维素膜上。本法可以快速检测大量标本,而且仅需少量的细胞(5×10^4 个)或组织。整个 RNA 实验中,要防止激活内源性 RNase,因此可以在样品中加入核糖核苷氧砷基复合物(RVC)。

(3) 完整细胞斑点杂交:应用类似检测细菌菌落的方法,可以对细胞培养物的特异序列进行快速检测。将整个细胞点到膜上,经 NaOH 处理,使 DNA 暴露、变性和固定,再按常规方法进行杂交和检测。完整细胞斑点杂交可用于筛选大量标本,因为它是使细胞直接在膜上溶解,所以 DNA 含量甚至比常用的抽提法还要高,又不影响与 ^{32}P 标记的探针杂交。但它

不适用于非放射性标记探针,因为 DNA 纯度不高,会产生高本底。

3. Southern 印迹杂交(Southern blot) 是研究 DNA 图谱的基本技术,在遗传病诊断、DNA 图谱分析及 PCR 产物分析等方面具有重要价值。Southern 印迹杂交的基本方法是将 DNA 标本用限制性内切酶消化后,经琼脂糖凝胶电泳分离各酶解片段,然后经碱变性,Tris 缓冲液中中和,高盐下通过毛细作用将 DNA 从凝胶中转印至硝酸纤维素滤膜上,烘干固定后即可用于杂交。凝胶中 DNA 片段的相对位置在 DNA 片段转移至滤膜的过程中继续保持着。附着在滤膜上的 DNA 与 ^{32}P 标记的探针杂交,利用放射自显影术确定探针互补的每一条 DNA 带的位置,从而可以确定在众多酶解产物中含某一特定序列的 DNA 片段的位置和大小。Southern 印迹杂交具体实验步骤请参见相关章节。

4. Northern 印迹杂交(Northern blot) 是一种将 RNA 从琼脂糖凝胶中转印到硝酸纤维素滤膜上并进行杂交的方法。DNA 印迹技术由 Southern 于 1975 年创建而被称为 Southern 印迹技术。RNA 印迹技术因其正好与 DNA 印迹技术相对应,故被趣称为 Northern 印迹杂交。Northern 印迹杂交的 RNA 与 Southern 印迹技术的 DNA 转膜方法类似,只是在加样前用甲基氢氧化汞、乙二醛或甲醛使 RNA 变性,而不用 NaOH,因为它会水解 RNA 的 2'-羟基基团。RNA 变性后有利于在转印过程中与硝酸纤维素滤膜结合,它同样可在高盐中进行转印,但在烘烤前与膜结合得并不牢靠,所以在转印后不能用低盐缓冲液洗膜,否则 RNA 会被洗脱。此外,在胶中不能加溴乙锭(EB),因为它会影响 RNA 与硝酸纤维素滤膜的结合,为测定 RNA 片段大小,可在同一块胶上加标记物一起进行电泳,之后将标记物胶切下,上色、照相。将样品胶进行 Northern 印迹,标记物胶上色的方法是在暗室中将其浸在含 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ EB 的 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 乙酸铵中 10min,在水中就可脱色。在紫外灯下用一次成像相机拍照时,上色的 RNA 胶要尽可能少接触紫外线,若接触太多或在白炽灯下暴露过久,会使 RNA 信号降低。从琼脂糖凝胶中分离功能完整的 mRNA 时,所有操作均应避免 RNase 的污染。

5. 组织原位杂交(tissue *in situ* hybridization) 简称原位杂交(*in situ* hybridization),指组织或细胞的原位杂交,它与菌落原位杂交不同。它是在经适当处理后,使组织细胞的通透性增加,让探针进入细胞并与细胞内的固有核酸 DNA 或 RNA 杂交。因此,原位杂交可以准确反映组织细胞内待测靶核酸的空间位置,这一点具有重要的生物学和病理学意义。正是由于原位杂交的这一优势,使得该项技术的发展极为迅猛,同时,与之相关的其他生物技术亦得以发展。总之,近年来新的原位杂交技术不断涌现,各种原位杂交技术被极为广泛地应用于基础理论研究和临床实践中,并将继续发挥其重要作用。

原位杂交技术中使用的探针可以是单链或双链 DNA,也可以是 RNA 或寡核苷酸。目前,国内外很多生物试剂公司都能够大批量制备寡核苷酸探针。通常探针的长度以 100~400nt 为宜,过长会使杂交效率减低即降低杂交敏感性,过短则会增加杂交反应的非特异性。探针的标记物可以是放射性核素,也可以是非放射性生物素、半抗原、地高辛及荧光素等。放射性核素中, ^3H 和 ^{35}S 最常用。 ^3H 标记的探针半衰期长,成像分辨率高,便于定位,缺点是能量低。 ^{35}S 标记的探针活性较高,影像分辨率也较好,但由于 ^{35}S 能量过高,致使产生的影像模糊,不利于确定杂交位点。

原位杂交技术中,标本的固定是影响杂交效率的重要因素,组织标本蛋白质的消化程度

对探针进入组织细胞的影响极为重要。一般情况下,去除蛋白的方法是,用 0.2mol/L HCl 处理载玻片,并用蛋白酶 K 加以消化,最后用不同浓度的乙醇脱水。

原位杂交技术的具体方法请参见相关章节。

6. 固相夹心杂交 Dunn 等最早介绍了夹心杂交,而后 Ranki 等又做了改进。与直接滤膜杂交法相比,夹心杂交有两个主要的优点:其一,样品不需要固定,对粗制样品也能做出可靠的检测;其二,用夹心杂交法比直接滤膜杂交法特异性强,因为只有两个杂交物都杂交才能产生可检测的信号。

固相夹心杂交需要两个靠近而又不互相重叠的探针,一个作为固相吸附探针,另一个作为标记检测探针。样品基因组内核酸只有使这两个探针紧密相连才能形成夹心结构。需注意的是,两个探针必须分别亚克隆进入两个分离的非同源性载体内,以避免产生高的本底信号。

夹心杂交法可以用滤膜和小珠固定吸附探针,使用小珠可更好地进行标准化试验,也更容易对小量样品进行操作。Dahlen 等利用微孔板进行夹心杂交,可同时进行大量样品检测。用微孔板进行夹心杂交还可直接用于 PCR 技术。应用光敏生物素标记探针检测 PCR 产物的敏感性与用³²P 标记探针(3×10^8 cpm/ μ g)做 16h 放射自显影的 Southern 印迹杂交的敏感性一样。用微孔板的好处还包括可同时做多份样品,加样、漂洗和读结果等步骤可以自动化。

(二) 液相杂交类型

1. 吸附杂交

(1) HAP 吸附杂交:羟基磷石灰(HAP)层析或吸附是液相杂交中最早使用的方法,在液相杂交后,DNA:DNA 杂交双链在低盐条件下可特异地吸附在 HAP 上。通过离心使吸附有核酸杂交双链的 HAP 沉淀,再用缓冲液离心漂洗 HAP 几次,最后将 HAP 置于计数器上进行放射性计数。

(2) 亲和吸附杂交:生物素标记 DNA 探针与溶液中过量的靶 RNA 杂交,杂交物吸附到酰化亲合素包被的固相支持物(如小球)上,用特异性抗 DNA:RNA 杂交物的酶标单克隆抗体与固相支持物上的杂交物反应,加入酶显色底物,这个系统可快速(2h)检测 RNA。

(3) 磁珠吸附杂交:Gen-Probe 公司应用吖啶翁酯(acridinium ester)标记 DNA 探针,这种试剂可用更敏感的化学发光法加以检测。探针和靶核酸杂交后,杂交物可特异地吸附在磁化的有孔小珠上(阳离子磁化微球体)。溶液中的磁性小珠可用磁铁吸出,经过漂洗步骤后,吸附杂交物的小珠可用化学发光测定。

2. 发光液相杂交

(1) 能量传递法:Heller 首先设计了两个紧接的探针——一个探针的一端用化学发光基团标记,另一个探针的一端用荧光物质标记,并且这两个探针靠得很近。两个靠得很近的探针用不同的物质标记(标记光发射),当探针与特异的靶核酸杂交后,这些标记物靠得很近。一种标记物发射的光能被另一种标记物所吸收,并重新发出不同波长的光,调节检测器自动记录第二次发射光的波长。因为只有在两个探针靠得很近时,才能产生激发光,故这种方法具有较好的特异性。

(2) 吖啶酮酯标记法:吖啶酮酯标记探针与靶核酸杂交后,未杂交的标记探针分子上吖啶酮酯可以用专门的方法选择性地除去,所以杂交探针的化学发光是与靶核酸的量成正比的。该法的缺点是检测的敏感性低(约 1ng 的靶核酸),仅适用于检测扩增的靶序列。

3. 液相夹心杂交

(1) 亲和杂交法:在靶核酸存在下,两个探针与靶核酸杂交,形成夹心结构,杂交完成后,杂交物可移到新的管或凹孔中,在其中杂交物上的吸附探针可结合到固相支持物上,而杂交物上的检测探针则产生检测信号。一般用生物素标记吸附探针,用¹²⁵I 标记检测探针。这个系统的敏感性高,可检测出 4×10^6 个靶分子。该实验保证了固相夹心杂交的高度特异性。

(2) 多组合成探针和化学发光检测法:第一种探针是未标记的检测探针和液相吸附探针,它们有 50 个碱基长,其中含有 30 个细菌特异序列碱基和 20 个碱基的单链长尾;第二种探针是固相吸附探针,它可吸附在小珠或微孔板上。未标记的检测探针的单链长尾用于结合扩增多个标记探针,液相吸附探针和靶杂交物从溶液中分离并固定在小珠或微孔板上,典型的试验可用 25 个不同的检测探针和 10 个不同的吸附探针。第一个标记检测探针上附着很多酶(碱性磷酸酶或过氧化物酶),可实现未标记探针的扩增。同时,使用化学发光酶的底物比用显色反应酶的底物更敏感,敏感性能达到 5×10^4 个双链 DNA 分子。

4. 复性速率液相杂交 这种方法的原理是细菌等原核生物的基因组 DNA 通常不包含重复顺序。它们在液相中复性杂交时,同源 DNA 比异源 DNA 的复性速率快。同源程度越高,复性速率和杂交率越快。利用这个特点,可以通过分光光度计直接测定变性 DNA 在一定条件下的复性速率,进而用理论推导的数学公式来计算 DNA : DNA 的杂交结合度。

第三节 核酸探针

核酸探针在分子杂交技术中扮演着不可缺少的重要角色,可以说,离开了探针,分子杂交亦就不存在了。分子杂交过程能否顺利进行,完成的分子杂交特异性如何,以及分子杂交的成功检测等都与杂交所选用的核酸探针有着极为密切的关系。本节从核酸探针的实验优化、核酸探针的种类、核酸探针的标记、核酸探针的检测及核酸探针的应用等几个方面对核酸探针在分子杂交技术中的作用及地位进行全面阐述。

一、核酸探针的实验优化

(一) 核酸探针的选择

杂交实验所需的核酸探针分为两种:克隆的或合成的。应根据不同的杂交实验选择相应的核酸探针。一般来说,可以选择克隆的 DNA 或 cDNA 双链探针。特别是当存在特异的克隆,或当 DNA 序列未知而又必须首先进行克隆以便绘制酶谱和测序时,常常选用克隆探针。克隆探针一般较寡核苷酸探针的特异性强,复杂度也高。从统计学的角度而言,较长的序列随机碰撞互补序列的机会较短序列少。此外,克隆探针的另一优点是,可获得较强的杂

交信号,因为克隆探针较寡核苷酸探针掺入的可检测标记的基团更多。

长的双链 DNA 探针特异性强,适合检测复杂的靶核苷酸序列和病原体,但不适合组织原位杂交,系因其不易透过细胞膜进入胞内或核内。

在某些情况下,必须选用其他类型的探针如寡核苷酸探针或 RNA 探针。特别是在检测靶序列上的单个碱基改变时,应选择寡核苷酸探针。合成的寡核苷酸探针具有一些独特的优点:①由于链短,其序列复杂度低,相对分子质量小,所以与等量靶位点完全杂交的时间较克隆探针短;②寡核苷酸探针可识别靶序列内 1 个碱基的变化,因为短探针中碱基的错配能大幅降低杂交体的 T_m 值;③可大量合成,价格低廉。与克隆探针一样,寡核苷酸探针能够用酶学或化学法修饰以进行非放射性标记物的标记。尽管克隆探针较特异,但通过筛选序列和(或)选择相对长的序列(>30nt)亦可设计出非常特异的寡核苷酸探针。最常用的寡核苷酸探针有 18~30 个碱基,目前的合成仪可有效地合成至少 100 个碱基的探针。筛选寡核苷酸探针的原则包括:①长 18~50nt。较长的探针杂交时间长,合成量低;较短探针特异性较差。②碱基成分,G+C 含量为 40%~60%,超出此范围则会增加非特异性杂交。③探针分子内不应存在互补区,否则会出现抑制探针与靶核酸之间进行杂交的“发夹”状结构。④尽量避免单一碱基的重复出现(不能多于 4 个),如-CCCCC-。⑤一旦选定某一序列符合上述标准,最好将该序列与核酸库中核酸序列比较。核酸探针应与待测靶核酸杂交,而非靶区域的同源性不能超过 70%,不能有连续 8 个或更多碱基同源,否则该探针不可用。

另外,在选用探针时会受到可利用探针种类的限制。如在建立 DNA 文库时,若没有筛选特定基因的克隆探针,这时可用寡核苷酸探针进行替代。对于基因核苷酸序列背景清楚而无法获得克隆探针时,可采用 PCR 方法扩增某段基因序列,并克隆入合适的质粒载体中,即可得到所需的探针。

(二) 核酸探针的标记方法

核酸探针的标记方法在杂交实验中也很重要。目前,有多种方法可标记核酸探针(详见下文)。但选择什么标记方法主要根据实验者的习惯及可利用的条件而定。此外,还应考虑具体实验的要求,如灵敏度和显示方法等。一般地,放射性探针的灵敏度要高于非放射性探针,这是因为放射性探针的实际灵敏度不依赖于所采用的标记方法,如随机引物延伸法常常得到比缺口平移法更高的比活性。在检测单拷贝基因序列时,应选用标记效率高、显示灵敏的探针标记方法。在对灵敏度要求不高时,可采用生物素探针技术和比较稳定的碱性磷酸酶显示系统。

(三) 核酸探针的浓度

总的来说,核酸探针浓度越高,杂交率也越高。另外,在较窄的范围内,随着探针浓度增加,敏感性亦增加。我国多数科研工作者的经验是:要获得较满意的敏感性,在膜杂交中, ^{32}P 标记探针与非放射性标记探针的用量分别是 5~100ng/ml 和 25~1000ng/ml,而在原位杂交中无论应用何种标记探针,其用量均为 0.5~5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。探针的任何内在物理特性均不影响其使用浓度,但受不同类型标记物和固相支持物的非特异性结合特性的影响。