

21世纪生物技术丛书

# 分子杂交理论与技术

(第二版)

主编 王廷华 Jean Philippe Merlio



科学出版社

[www.sciencep.com](http://www.sciencep.com)

21 世纪生物技术丛书

# 分子杂交理论与技术

(第二版)

主 编 王廷华 Jean Philippe Merlio

科学出版社

北 京

## 内 容 简 介

《分子杂交理论与技术》是《21 世纪生物技术丛书》的一个分册。本书于 2005 年出版,2006 年进行二次印刷。随着当今生物技术的迅速发展和需求的日益扩大,现予以再版。

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以及原位分子杂交双标技术给出了具体的实例分析。

本书第二版在第一版的基础上增加了实验技术等内容,更具实用价值和可操作性,可供生物医学专业研究生、本科生以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/王廷华主编. —2 版. —北京:科学出版社,2009  
(21 世纪生物技术丛书)  
ISBN 978-7-03-024214-3

I. 分… II. 王… III. 分子杂交 IV. Q781

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 031230 号

策划编辑:沈红芬 吴茵杰 / 责任编辑:李 植 / 责任校对:陈玉凤  
责任印制:刘士平 / 封面设计:黄 超

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.sciencecp.com>

新 蕾 印 刷 厂 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

2009 年 3 月第 二 版 印张:15 1/4 插页:1

2009 年 3 月第三次印刷 字数:348 000

印数:5 001 ~ 8 000

定价:48.00 元

如有印装质量问题,我社负责调换

## 《21 世纪生物技术丛书》编审委员会

主 审 李云庆 蔡文琴  
委 员 (按姓氏笔画为序)

|                      |                   |      |
|----------------------|-------------------|------|
| 王廷华                  | 四川大学              | 特聘教授 |
| 方秀斌                  | 中国医科大学基础医学院       | 教授   |
| 冯 华                  | 第三军医大学西南医院        | 教授   |
| 冯忠堂                  | 昆明医学院神经科学研究所      | 教授   |
| 齐建国                  | 四川大学华西医学中心        | 教授   |
| 李云庆                  | 第四军医大学基础医学院       | 教授   |
| 李成云                  | 云南农业大学植物病理国家重点实验室 | 教授   |
| 李官成                  | 中南大学湘雅医学院         | 教授   |
| 李建国                  | 上海交通大学医学院         | 教授   |
| 吴良芳                  | 四川大学华西医学中心        | 教授   |
| 吴承远                  | 山东大学医学院           | 教授   |
| 应大君                  | 第三军医大学            | 教授   |
| 沈馨亚                  | 上海交通大学医学院         | 教授   |
| 周 东                  | 四川大学华西医院          | 教授   |
| 赵春华                  | 协和医科大学            | 教授   |
| 胡长林                  | 重庆医科大学            | 教授   |
| 施 静                  | 华中科技大学同济医学院       | 教授   |
| 姜保国                  | 北京大学医学部           | 教授   |
| 顾晓松                  | 南通大学医学院           | 教授   |
| 曾国山                  | 中山大学中山医学院         | 教授   |
| 游 潮                  | 四川大学华西医院          | 教授   |
| 蔡文琴                  | 第三军医大学            | 教授   |
| Jean Philippe Merlio | 法国波尔多第二大学         | 教授   |
| John W. McDonald     | 美国霍普金斯大学医学院       | 教授   |
| Leong Seng Kee       | 新加坡国立大学           | 教授   |
| Pierre Dubus         | 法国波尔多第二大学         | 教授   |
| Xin-Fu Zhou          | 澳大利亚阿德莱德大学        | 教授   |
| Xiong-Zhong Ruan     | 英国伦敦大学            | 教授   |

# 《分子杂交理论与技术》(第二版)编写人员

主 编 王廷华 Jean Philippe Merlio

副主编 李力燕 戴 萍 杨慧娟

编 委 (按姓氏笔画为序)

习杨彦彬 王廷华 王昭君 王熙才

尹 昭 孙伟伟 杨慧娟 李力燕

李 华 李咏梅 吴碧华 张 晓

罗华友 孟步亮 胡长林 洪孙权

袁文丽 谌宏鸣 董 坚 戴 萍

Jean Philippe Merlio

## 第二版总序

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。随着我国加入 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 世纪生物技术和需求,科学出版社组织编写了这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》。本套丛书共有八本,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》、《干细胞理论与技术》。自 2005 年 3 月本套丛书问世以来,即得到了广大生物技术科技工作者的喜爱,2006 年 1 月即进行了重印。本套丛书对满足日益扩大的研究生实践需求,以及我国 21 世纪生物技术的普及和发展起到了积极的促进作用。

由于生物技术发展迅速和需求日益扩大,本套丛书于 2009 年再版。第二版在第一版的基础上,主要对实验技术进行了全面增补和修订,新增内容 20 余章。补充了神经形态示踪、肿瘤干细胞培养、神经干细胞移植、转基因干细胞构建、抗体封闭、细胞凋亡染色、免疫荧光染色、蛋白质组和基因组等实用技术,并对各技术的相关实践经验进行了更全面的总结。丛书从形态、细胞、分子生物学三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。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的一线科研人员。在编写方式和风格方面,力求强调基本概念和理论的阐述,注重基本技术的实践,并提供了大量原版彩图及实验经验体会,使丛书更具实用价值。

本套丛书由我国神经科学青年专家王廷华教授牵头,邀请国内外一批知名专家教授参加编写和审阅。本套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。由于时间有限,加之科学技术发展迅速,错误和不足之处在所难免,恳请各位读者批评指正。

值本套丛书出版之际,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,是他们的指导、培养和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组成的编审委员会对丛书的认真审阅,感谢编者所付出的辛勤劳动。感谢中国解剖学会对本套丛书的组织工作给予的支持。感谢各位同道给予的鼓励 and 关心。

《21 世纪生物技术丛书》编审委员会

2009 年 1 月

# 第一版总序

21 世纪是生命科学取得革命性进展和医学飞速发展的时代。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。随着我国加入 WTO 和与世界科技日益接轨,生命科学领域里生物技术的竞争已日益呈现出其核心地位和作用。正是在此背景之下,科学出版社组织编写了这套《21 世纪生物技术丛书》。该套丛书共八本,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》、《干细胞理论与技术》。

本套丛书从形态、细胞、分子生物学三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。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的一线科研人员。在技术章节提供了大量原版彩图及实验经验体会,使丛书更具实用价值。在编写方式和风格方面,力求强调科学史的沿革及基本概念、基本技术和理论的阐述,基本反映了现阶段常用生物技术和理论的现状与进展。

丛书由我国青年神经科学专家王廷华教授牵头,邀请国内外一批知名专家、教授参加编写和审阅。丛书是全体参编人员实践经验的总结,对一线从事科研的研究生和科研人员有较好的参考价值。由于时间有限,加之科学技术发展迅猛,错误、不足之处在所难免,恳请各位前辈、老师、同道及广大读者批评指正。

值本套丛书出版之际,感谢为我国生物技术与科学发展孜孜不倦、奉献一生的老一辈科学家,是他们的指导、培养和杰出工作为我国中青年一代的发展奠定了基础,并为本套丛书提供了参考。感谢国内外一批知名专家、教授组成的编审委员会对丛书的认真审阅和编者们的辛勤劳动。感谢科学出版社的同志们对丛书出版所付出的辛勤劳动和支持。感谢各位同道给予的鼓励 and 关心。

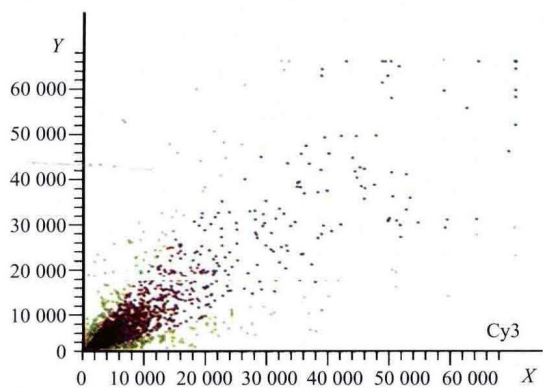
《21 世纪生物技术丛书》

编审委员会

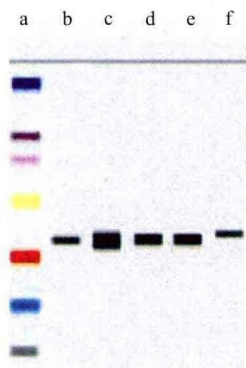
2004 年 12 月 8 日



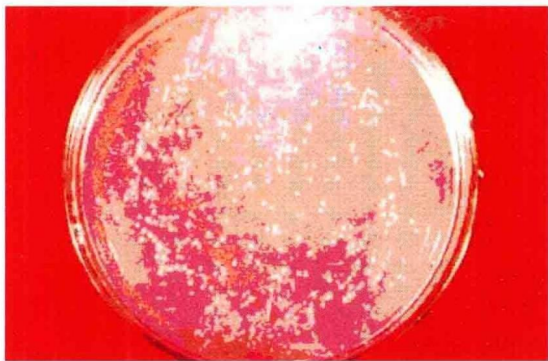
# 彩图



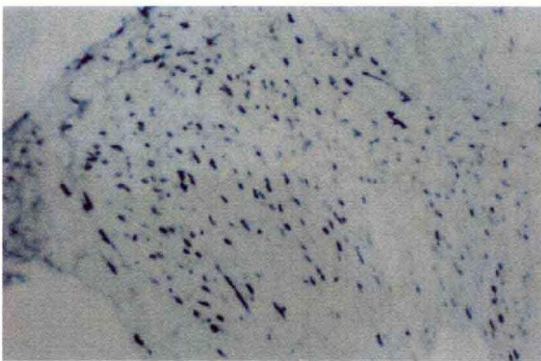
彩图 9-1 不同组织样本（对照组/实验组）  
杂交信号强度散点图



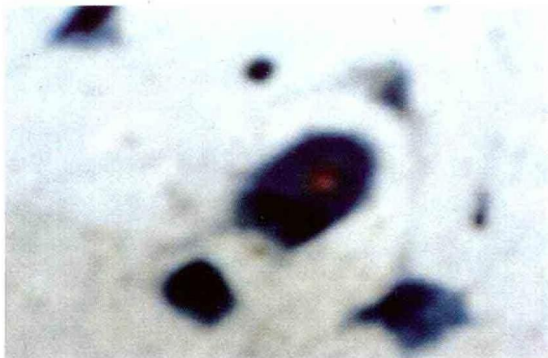
彩图 12-1 考马斯亮蓝染色结果模式图  
a为蛋白质分子质量标准凝胶电泳区带，b、c、d、e和f为  
不同浓度样品凝胶电泳区带（引自：[www.erin.utoronto.ca/w3bio315/virtua](http://www.erin.utoronto.ca/w3bio315/virtua)）



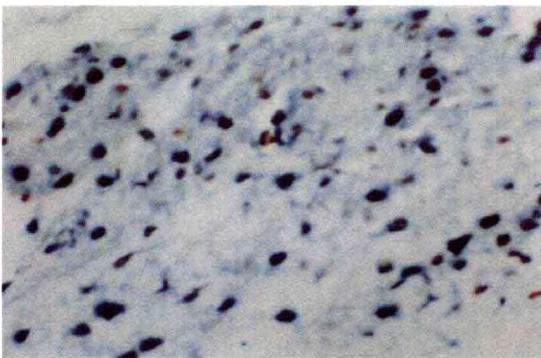
彩图 13-1 NGF 重组质粒转化 *E. coli* DH5 $\alpha$   
的菌落生长情况



彩图 13-2 猫脊髓背角 NGF 及其 mRNA 阳性细胞



彩图 13-3 猫脊髓腹角 NGF 及其  
mRNA 阳性双标细胞。



彩图 13-4 猫脊髓背角 NGF 及其  
mRNA 阳性双标细胞



# 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 详细实验步骤、结果及分析 .....             | (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 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 问题与解答 .....                    | (82) |
| 第六章 放射性杂交 .....                    | (88) |
| 第一节 放射性杂交的基本原理与发展历程 .....          | (88) |
| 第二节 构建放射性杂交图谱的方法 .....             | (91) |

|      |                                   |       |
|------|-----------------------------------|-------|
| 第三节  | 放射性杂交图谱的应用 .....                  | (95)  |
| 第七章  | 反义核酸分子杂交技术及其应用 .....              | (103) |
| 第一节  | 反义 RNA .....                      | (103) |
| 第二节  | 反义 DNA .....                      | (106) |
| 第三节  | 反义核酸的特性 .....                     | (107) |
| 第四节  | 人工合成反义寡核苷酸的类型 .....               | (108) |
| 第五节  | 反义寡核苷酸的化学改造 .....                 | (109) |
| 第六节  | 制备反义寡核苷酸要考虑的因素 .....              | (110) |
| 第七节  | 反义寡聚核苷酸导入细胞的方法 .....              | (114) |
| 第八节  | 核酶 .....                          | (114) |
| 第九节  | 反义核酸分子杂交技术的应用 .....               | (118) |
| 第八章  | 基因芯片固相分子杂交技术理论与进展 .....           | (123) |
| 第一节  | 基因芯片的制备方法 .....                   | (123) |
| 第二节  | 基因芯片检测的样品制备 .....                 | (127) |
| 第三节  | 基因芯片杂交 .....                      | (129) |
| 第四节  | 基因芯片检测原理 .....                    | (129) |
| 第五节  | 基因芯片杂交的结果分析 .....                 | (132) |
| 第六节  | 基因芯片的应用 .....                     | (132) |
| 第七节  | 国内外基因芯片研究及开发情况 .....              | (140) |
| 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 .....  | (144) |
| 第一节  | 实验原理 .....                        | (144) |
| 第二节  | 材料和方法 .....                       | (144) |
| 第三节  | 实验结果 .....                        | (149) |
| 第四节  | 注意事项与经验体会 .....                   | (149) |
| 第十章  | Southern 印迹杂交 .....               | (152) |
| 第一节  | 实验原理 .....                        | (152) |
| 第二节  | 实验方法 .....                        | (152) |
| 第三节  | 实验结果及注意事项 .....                   | (160) |
| 第十一章 | Northern 印迹杂交 .....               | (161) |
| 第一节  | 实验原理 .....                        | (161) |
| 第二节  | 实验方法 .....                        | (161) |
| 第十二章 | Western 杂交 .....                  | (167) |
| 第一节  | 蛋白质样品的制备 .....                    | (168) |
| 第二节  | 蛋白质样品的分离——不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 ..... | (173) |
| 第三节  | 转移电泳 .....                        | (177) |
| 第四节  | 免疫检测 .....                        | (179) |

|      |                                                      |       |
|------|------------------------------------------------------|-------|
| 第五节  | Western 印迹应注意的问题和出现的异常情况及对策 .....                    | (181) |
| 第十三章 | cRNA 探针原位分子杂交单、双标技术的应用 .....                         | (185) |
| 第一节  | 原位杂交技术检测猫脊髓和背根节中 NGF mRNA 的表达 .....                  | (185) |
| 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 .....           | (190) |
| 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 .....        | (193) |
| 第一节  | 实验原理 .....                                           | (193) |
| 第二节  | 实验所需设备、试剂及其配制 .....                                  | (193) |
| 第三节  | 实验步骤 .....                                           | (194) |
| 第四节  | 实验结果 .....                                           | (196) |
| 第五节  | 结果分析 .....                                           | (198) |
| 第六节  | 实验中存在的问题和经验体会 .....                                  | (198) |
| 第十五章 | Western blot 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 ..... | (204) |
| 第一节  | 实验原理 .....                                           | (204) |
| 第二节  | 实验所需设备、试剂及其配制 .....                                  | (204) |
| 第三节  | 实验步骤 .....                                           | (206) |
| 第四节  | 实验结果 .....                                           | (208) |
| 第五节  | 结果分析 .....                                           | (209) |
| 第六节  | 实验体会 .....                                           | (210) |
| 第十六章 | Northern 印迹杂交检测小鼠乳房肿瘤组织的总 RNA .....                  | (211) |
| 第一节  | 实验目的及原理 .....                                        | (211) |
| 第二节  | 实验方法 .....                                           | (211) |
| 第三节  | 实验结果 .....                                           | (216) |
| 第四节  | 实验体会 .....                                           | (218) |
| [附]  | 生物素(地高辛)标记探针的 Northern blot 检测方法 .....               | (218) |
| 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 .....                       | (221) |
| 第一节  | 实验原理 .....                                           | (221) |
| 第二节  | 实验所需仪器、试剂及其配制 .....                                  | (221) |
| 第三节  | 实验步骤 .....                                           | (224) |
| 第四节  | 实验结果 .....                                           | (226) |
| 第五节  | 结果分析 .....                                           | (228) |
| 第六节  | 实验体会 .....                                           | (228) |

彩图

# 第一章 分子杂交概论

## 第一节 分子杂交技术及其意义

### 一、分子杂交技术

分子杂交技术(technique of molecular hybridization)又称核酸杂交技术,是利用现代分子生物学技术手段,从分子水平探讨组织细胞内特定基因的表达变化规律并阐明细胞功能调节机制的一种极为重要的方法,在一定程度上具有其他生物检测技术所不能替代的作用。因此,分子杂交技术的诞生及发展在生命科学的发展史上具有划时代的意义。

那么,什么是分子杂交技术?或者说,分子杂交技术的核心是什么?简而言之,分子杂交技术是在用特定标记物标记已知核酸碱基序列,即在所谓核酸探针简称探针(probe)的基础上,将该标记的探针以碱基互补配对的原则与组织细胞中的待测核酸进行特异性的杂交结合,形成标记探针与待测核酸的杂交体,最后利用各种标记物的显示技术,在光学显微镜、荧光显微镜或电子显微镜下探索待测目标核酸(mRNA 或 DNA)的存在及位置。可见,分子杂交技术的核心就是使带有标记物的核酸探针与待测核酸形成杂交体。理论上,探针与待测核酸形成杂交体的前提有二,缺一不可:一是上述两种来源的核酸应该都是以单链的形式存在;二是两种单链核酸之间必须有一定程度的互补的序列。前者要求如果待测目标核酸是 DNA 时,必须先进行待测 DNA 的变性,即将双螺旋结构的 DNA 解链形成单链 DNA;而后者碱基序列的互补性则保证了两种核酸分子杂交过程的顺利实现,同时,亦决定了探针与待测核酸杂交的特异性。

一旦形成探针与待测目标核酸的杂交体,即可进行对杂交体的观察分析。这有赖于两个方面的条件或准备:其一,探针的标记,这要求杂交前的探针必须进行有效标记;其二,具备对携带有标记物的杂交体进行检测的有效技术——显示技术(technique of visualization)。因此,分子杂交技术的产生与发展同时亦带动了相关生物技术的发展,主要包括:核酸探针的制备技术、核酸探针的标记技术和核酸探针的检测技术等。

### 二、分子杂交技术的发展历史及前景展望

分子杂交技术源于 Hall 在 1961 年的工作,他第一次将探针与靶序列在溶液中杂交,并通过平衡密度梯度离心技术分离杂交体,由此开拓了一种全新的分子生物学技术——分子杂交技术。1962 年, Bolton 开创了第一种简单的固相杂交方法,即 DNA-琼脂技术,其特点是

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<sup>+</sup> RNA。而 mRNA 的纯化技术使人们从网织红细胞总 RNA 中提取  $\alpha$ -和  $\beta$ -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取得了快速的发展。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即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, 通过氢键在几十、几百甚至上千个位点上互补碱基对的结合而实现的。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  $^{125}\text{I}$  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。尽管掺入位点处的碱基配对较弱或不存在,但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。当用放射性同位素  $^{32}\text{P}$  和  $^{35}\text{S}$  标记核酸时,由于同位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、磁珠和微孔板等上,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。因为: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除去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  $^{32}\text{P}$  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  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (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膜上。本法可以快速检测大量标本,而且仅需少量的细胞( $5 \times 10^4$ )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酸基复合物(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 $^{32}\text{P}$  标记的探针的杂交。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 blotting):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 缓冲液中和,高盐下通过毛吸作用将 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 $^{32}\text{P}$  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 blotting):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 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  $0.1\text{mol/L}$  醋酸铵中 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 探针或寡核苷酸探针。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,以供实验之需。通常探针的长度以  $100 \sim 400\text{nt}$  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同位素,也可以是非放射性生物素、半抗原地高辛及荧光素等。放射性同位素中, $^3\text{H}$  和  $^{35}\text{S}$  最常用。 $^3\text{H}$  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。 $^{35}\text{S}$  标记的探针活性较高,影像分辨率也较好,但由于  $^{35}\text{S}$  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  $0.2\text{mol/L}$  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 等又做了进一步改进。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。用微孔板杂交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<sup>32</sup>P 标记探针( $3 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g)作 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作多份样品,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,调节检测器使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,才能产生受激发光,故这种方法具有较好的特异性。

(2) 吖啶翁酯标记法:吖啶翁酯标记探针与靶核酸杂交后,未杂交的标记探针分子上吖