

Molecular Blotting

分子印迹技术

© 刘朝奇 王艳林 刘森 主编

- Southern印迹分析
- Northern印迹杂交
- 蛋白质印迹技术
- 菌落原位杂交
- 斑点杂交
- DNA芯片技术
- 蛋白质芯片技术
- 核酸和蛋白质序列分析软件



YZL10890139670



化学工业出版社

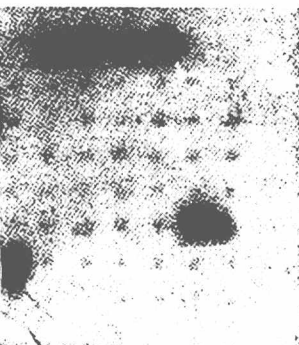
三峡大学学科建设项目资助

Supported by Service of Key Discipline in
China Three Gorges University

Molecular Blotting

分子印迹技术

◎ 刘朝奇 王艳林 刘 森 主编



化学工业出版社

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

分子印迹技术/刘朝奇, 王艳林, 刘森主编. —北京:
化学工业出版社, 2012. 1

ISBN 978-7-122-11645-1

I. 分… II. ①刘…②王…③刘… III. 高聚物-制备
IV. O63

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 124891 号

责任编辑: 杨燕玲

装帧设计: 韩 飞

责任校对: 宋 玮

出版发行: 化学工业出版社

(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市万龙印装有限公司

710mm×1000mm 1/16 印张 13 字数 281 千字 2012 年 2 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 39.00 元

版权所有 违者必究

编写人员名单

主 编	刘朝奇	王艳林	刘 森
编写人员	刘朝奇	王艳林	刘 森
	柳长柏	盛德乔	韩 钰
	杨建林	韩 莉	史继静
	钟春燕	覃晓琳	

目 录

第一篇 原理篇

第一章 分子印迹的发展史	2
参考文献	5
第二章 分子印迹原理及方法概论	6
第一节 分子印迹原理	6
第二节 分子印迹方法	9
第三节 分子探针	12
第四节 分子印迹信号检测	22
参考文献	24

第二篇 操作方法/技术篇

第三章 Southern 印迹分析	27
第一节 Southern 印迹分析的基本方法	27
第二节 影响杂交的主要因素	35
第三节 探针标记	36
参考文献	51
第四章 Northern 印迹杂交	52
第一节 基本原理	52
第二节 实验方法	52
参考文献	58
第五章 蛋白质印迹技术	59
第一节 原理	59
第二节 实验材料和试剂配制	61
第三节 操作步骤	63
第四节 相关技术及其应用	71
参考文献	90
第六章 菌落原位杂交	91
第一节 原理	91
第二节 实验材料和试剂配制	92
第三节 操作步骤	93
第四节 条件优化	100
第五节 蛋白质表达产物的测定	103
参考文献	106
第七章 斑点杂交	107
第一节 核酸斑点印迹分析	107
第二节 斑点免疫结合实验	111

第三节	斑点免疫层析实验	115
第四节	酶联免疫斑点技术	123
参考文献		126
第八章	DNA 芯片技术	128
第一节	DNA 芯片的概念和基本原理	128
第二节	DNA 芯片技术的历史及发展	129
第三节	DNA 芯片的分类	130
第四节	DNA 芯片的基本步骤	131
第五节	DNA 芯片的特点	137
第六节	DNA 芯片技术的应用	138
第七节	基因芯片技术的延伸	142
第八节	基因表达谱芯片数据分析方法	144
参考文献		147
第九章	蛋白质芯片技术	148
第一节	蛋白质芯片的基本概念	148
第二节	蛋白质芯片的分类	150
第三节	蛋白质芯片的制作	151
第四节	蛋白质芯片技术的主要影响因素	153
第五节	蛋白质芯片技术的应用	155
第六节	蛋白质芯片的现状和发展前景	158
参考文献		159
第十章	核酸和蛋白质序列分析软件	160
第一节	翻译和反向翻译	160
第二节	序列搜索	163
第三节	序列比对	168
第四节	DNA 序列分析	168
第五节	蛋白质序列分析	169
第六节	RNA 序列分析	174
第七节	序列分析资源列表与简介	174
参考文献		177
常见问题解答		179

第一篇 原理篇

第一章 分子印迹的发展史

20 世纪 50 年代 J. D. Watson 和 F. Crick 提出的 DNA 双螺旋结构模型是现代分子生物学诞生的里程碑。20 世纪 60 年代基因调控操纵子学说的出现以及 20 世纪 70 年代初期 DNA 限制性内切酶的发现和一整套 DNA 体外重组技术——基因工程技术的发展，推动了分子生物学空前高速的蓬勃发展。自此对于核酸和蛋白质生物大分子的研究进入了一个崭新的时代。进入 21 世纪后，随着人类基因组计划的完成以及蛋白质组学研究的启动，生命科学研究进入了另一个新纪元。各种生物的 DNA 分子中所包含的遗传学信息正在逐渐被揭示，对 DNA、RNA 及蛋白质的检测和分析在很多领域都有着举足轻重的地位。在基础研究领域，如何解读这些浩如烟海的核苷酸序列中所包含的遗传学意义并使之为全人类所用，是摆在生物学家们面前的一大难题。而分子印迹检测技术为这些工作提供了有力的工具。

所谓分子印迹技术是指将核酸、蛋白质等大分子物质通过凝胶电泳后印迹到固相支持物或直接将这大分子物质印迹到固相支持物，然后通过探针测定这些大分子的性质和数量的技术。不论是寻找新基因，还是开展基因突变、多态性分析、基因组学等方面的研究，印迹检测技术都是不可或缺的必要工具。应用分子印迹技术进行的核酸和蛋白质检测将帮助我们理解遗传疾病、癌症和传染病等疾病发生的分子生物学机理，促进人类疾病诊断模式和治疗策略的革新。

Hall 等于 1961 年开创了核酸印迹技术的研究工作，他们将探针与靶序列在溶液中进行杂交，然后通过平衡密度梯度离心分离杂交体。该方法操作复杂、费时且不精确，但它开拓了核酸杂交技术的先河。Bolton 等于 1962 年设计了第一个简单的固相杂交方法，命名为 DNA-琼脂技术。该技术将变性 DNA 固定在琼脂中，DNA 不能复性，但能与其他互补核酸序列杂交，基本过程是用放射性标记的短 DNA 或 RNA 分子与胶中 DNA 杂交过夜，然后将胶置于柱中进行冲洗以去除游离探针，再在高温、低盐条件下将结合的探针洗脱，洗脱液的放射性与结合的探针量呈正比。该法尤其适用于过量探针的饱和杂交实验。20 世纪 60 年代末，Britten 等设计了另一种分析细胞基因组的方法，该方法研究液相中 DNA 的复性速度以比较不同来源核酸的复杂度。具体操作是从不同生物体（细菌、酵母、鱼和哺乳动物等）内分离 DNA，用水压器剪切成长约 450 个核苷酸（nt）的片段。剪切的 DNA 液经煮沸使双链 DNA（dsDNA）热变性成单链 DNA（ss-

DNA)。然后冷至约 60℃，在此温度孵育过程中，测定溶液一定时间内的 UV260nm 的吸光度（减色效应）来监测互补链的复性程度。通常该实验可比较不同来源生物 DNA 的复性速率，并可建立序列复杂度与动力学复杂度间的关系。进入 20 世纪 70 年代，许多重要技术的发展促进了核酸杂交技术的进展，固相化的 Poly U-Sephrose 和寡（dT）-纤维素使人们能从总 RNA 中分离 Poly A+RNA，用 mRNA 的柱纯化技术可从网织红细胞总 RNA 中制备 α -珠蛋白和 β -珠蛋白 mRNA 混合物，这些珠蛋白 mRNA 首次被用于合成特异的探针以分析珠蛋白基因的表达。由于制备 cDNA 探针很繁琐，所获得 cDNA 的长度和纯度也不稳定，这些问题阻碍了分子杂交技术的进一步推广。20 世纪 70 年代末期到 20 世纪 80 年代早期，分子生物学技术有了突破性进展，限制性内切酶的发现和应用使分子克隆成为可能；各种载体系统的诞生，尤其是质粒和噬菌体 DNA 载体的构建，使特异性 DNA 探针的来源变得丰富且可控。人们可以从基因组 DNA 文库和 cDNA 文库中获得特定基因克隆，只需培养细菌，便可提取大量的可供合成探针的 DNA。1975 年，Edwin Mellor Southern 创造了将 DNA 区带原位转移到硝酸基纤维素膜（NC 膜）上再进行杂交的方法，被称为“Southern 印迹法”。恰巧“southern”一词具有地理学涵义，随后，Alwine 等将类似方法用于 RNA 印迹，被称为“Northern”印迹。

核酸分子生物学的发展促进了对于蛋白质的分析和研究。聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）是分析蛋白质的有效工具，随着 O'Farrell 双向凝胶电泳技术的开展，PAGE 的分辨力大幅提高。利用 PAGE 双向电泳法可分辨出 1600 余种蛋白质。然而，由于方法学上的限制，不能对分布在凝胶基质中的蛋白质斑点或区带作进一步的研究。虽曾提出洗脱法、抗血清或其他蛋白质探针原位分析等方法，但这些方法灵敏度低、分辨力差、费时。在 DNA 印迹技术的启示下，仿效 DNA 转移的方法，1979 年 Towbin 等设计了将蛋白质从凝胶转移到硝酸纤维素膜的装置，将蛋白质转移到膜上，再与相应的抗体等配体反应，被称为“Western 印迹”。这种装置将膜和凝胶、滤纸等制成夹心饼干状，用低电压高电流电泳将凝胶中的蛋白质转移到支持膜上。1982 年 Reinhardt 等用电转移法将等电聚焦后的蛋白质区带从凝胶转移到特定膜上，称为“Eastern 印迹”。这些技术的建立和发展使分子印迹技术广泛应用于分子生物学研究的各个领域，加速了生物技术的快速发展。

Western 印迹法是将 PAGE 凝胶中的蛋白质转移到固相载体表面，从而使经 PAGE 分离的蛋白质可以用生物化学探针进行分析和鉴定。最普通的方法是将蛋白质直接转移到载体纸上，然后与探针温育。与探针发生特异结合的蛋白质区带可通过不同的方法显示，而非特异结合的探针则通过反复漂洗而去除。另一种方法是将探针预先结合到载体纸上，然后再将蛋白质结合上去，特定蛋白质被固定在纸上的探针所识别。这种方法称为易化主动转移（facilitated active transfer），由 Erlich 首先提出。上述两种方法的结果基本一致，选择哪种方法应以实验方便为原则。如果实验需要同时应用数种不同的探针，而蛋白质样品的量又很少，则采用第一种方法为宜。如果仅用一种探针来筛选大量的蛋白质样品，则用第二种方法更方便。

目前,蛋白质印迹法在免疫学领域中应用十分广泛。该法在筛选特异抗原和特异抗体方面充分显示了快速、灵敏的特点。应用传统方法,需先纯化和标记抗原或抗体,但用蛋白质印迹技术,复合的抗原或未经纯化的抗血清均可直接使用。只要将抗血清进行适当稀释,它即可与转移到载体纸上的相应蛋白质区带产生免疫复合物,然后再用 ^{125}I 标记的金黄色葡萄球菌蛋白 A、 ^{125}I -辣根过氧化物酶或荧光标记的第二抗体来显示特异的阳性区带。应用蛋白 A 可测出低于 0.1ng 的蛋白质。用单克隆抗体作探针进行抗原免疫印迹,较多克隆抗体更为清晰、特异。生物素 (biotin)-第二抗体交联物以及抗生物素 (avidin)-辣根过氧化物酶交联物的使用,极大地提高了蛋白质印迹法的灵敏度,值得推广。

蛋白质印迹法对探讨 DNA 和 RNA 结合蛋白也发挥了重要作用。将蛋白质转移到载体纸上,然后用同位素或荧光素标记的 DNA 或 RNA 与之结合,产生的核酸-蛋白复合物可用放射自显影及荧光法显示。应用此法,许多与 DNA 产生特异结合的蛋白质及多肽已被发现,包括组蛋白与非组蛋白。由于蛋白质与 DNA 和 RNA 的结合需要蛋白质具有天然的分子构象,因而印迹过程中的蛋白质变性将严重影响结果的真实性和准确性。这一问题目前已通过非变性凝胶系统或转移前和转移后的复性步骤得到了部分解决。

蛋白质印迹技术使聚丙烯酰胺凝胶电泳的用途大为扩展。近年来,它作为一种快速、灵敏的分析技术已经在分子生物学领域中成为一种重要的常规研究手段。尽管取得了上述重大进展,但分子印迹技术在实际应用中仍存在不少问题,包括进一步提高检测的敏感性、发展简单的高通量的杂交方式,使实验更加简便、快速、低廉和安全。

基于印迹技术的不断改进及对生物技术新的需求,产生了又一个新技术:生物芯片技术。作为一种新型的生物检测技术,生物芯片是继 20 世纪 50 年代半导体芯片后微芯片技术的又一重大发展,也是 20 世纪 90 年代中期以来影响最深远的重大科技进展之一,是 21 世纪一项革命性的技术。生物芯片技术目前主要包括基因芯片 (DNA 芯片)、蛋白芯片及芯片实验室 3 个领域。

DNA 芯片的概念起始于 20 世纪 80 年代中期,1996 年底,美国加利福尼亚旧金山 AFFYMATRIS 公司 Steven Fodor 等充分结合并灵活运用了照相干板印刷、计算机、半导体、激光共聚焦扫描、寡核苷酸 DNA 合成、荧光标记探针杂交及分子生物学的其他技术,创造了世界上第一块 DNA 芯片或 DNA 阵列 (DNA chip),即基因芯片。其原理是将特定序列的寡核苷酸片段以很高的密度有序地固定在一块玻璃或硅等固体基片上。它作为核酸信息的载体,通过与样品杂交反应来识别、提取信息。基因芯片从本质上讲与 Southern 印迹和 Northern 印迹相同,只是将大量探针 (可以是同种分子或不同种分子) 同时固定在同一芯片上,在相同的实验条件下,同时完成多种不同分子的检测。由于采用了微电子学的并行处理和高密度集成的概念,因此它与传统杂交法相比具有高效、高信息量的突出优点。目前已达到每个芯片上能集成 40 万种不同的 DNA 片段的水平。DNA 芯片是生物芯片中最基础、研究开发最早、最为成熟和目前应用最广泛的产品。与传统检测技术相比,它的突出优点是整个检测过程快速高效。由于探针阵列具有高度的序列多样性,它可以同时对大量基因、乃至整个基因组进行扫描分析,从而能够使人们

从一个更高的层次来全面研究基因的功能,分析不同基因之间的生物相关性。

随着人类基因组计划的进一步深入和人类后基因组计划的开始,人们希望在更加宏观的层面上了解人类基因组所包含的完整生物信息,其解决方法之一就是直接研究基因的表达产物(蛋白质),于是蛋白质芯片技术应运而生。蛋白质芯片是将已知蛋白质点印在不同种类支持介质上,制成由高密度的蛋白质或多肽分子组成的微阵列,其中每个分子的位置及序列为已知。用荧光标记的蛋白质样品与该芯片进行孵育反应,当荧光标记的靶分子与芯片上的分子结合后,可以通过激光扫描系统或电荷偶联照相系统(CCD)对荧光信号的强弱进行分析,以对杂交结果进行量化分析。该技术的出现对于生物学、临床检验医学、遗传学、肿瘤学、药理学和毒理学等多种学科的发展具有极大的推动作用。

芯片实验室是当前生物芯片技术发展的最高阶段。它是高度集成化的集样品制备、基因扩增、核酸标记及检测为一体的便携式生物分析系统,它所需的设备、化验、检测以及结果显示等都在一块芯片上完成,从而使现有繁琐的、不精确的生物分析过程自动化、连续化和微缩化,相对成本低廉,使用非常方便。

参 考 文 献

- [1] Watson JD, Crick FH. The structure of DNA. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1953; 18: 123-131.
- [2] Bonner J, Kung G, Bekhor I. A method for the hybridization of nucleic acid molecules at low temperature. Biochemistry. 1967; 6 (12): 3650-3653.
- [3] Greenberg LJ, Uhr JW. DNA-RNA hybridization studies of myeloma tumors in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1967; 58 (5): 1878-1882.
- [4] Lemieux B, Aharoni A and Schena M. Overview of DNA chip technology. Molecular Breeding. 1998; 4 (4): 277-289.
- [5] Dickson C. Protein techniques: immunoprecipitation, *in vitro* kinase assays, and Western blotting. Methods Mol Biol. 2008; 461: 735-744.
- [6] Chain PS, Grafham DV, Fulton RS, et al. Genomics. Genome project standards in a new era of sequencing. Science. 2009; 326 (5950): 236-237.

第二章 分子印迹原理及方法概论

第一节 分子印迹原理

分子印迹主要包括核酸分子杂交和蛋白质免疫印迹及进一步扩展的现代芯片技术。

一、核酸分子杂交 (molecular hybridization) 技术

核酸分子杂交是指具有一定同源序列的两条核酸单链 (DNA 或 RNA), 在一定条件下按碱基互补配对原则经过退火处理, 形成异质双链的过程。利用这一原理, 可以使用已知序列的单链核酸片段作为探针, 去查找各种不同来源的 DNA 或 RNA 分子中的同源基因或同源序列。应用该技术可对特定 DNA 和 RNA 分子进行定性或定量检测 (图 2-1)。

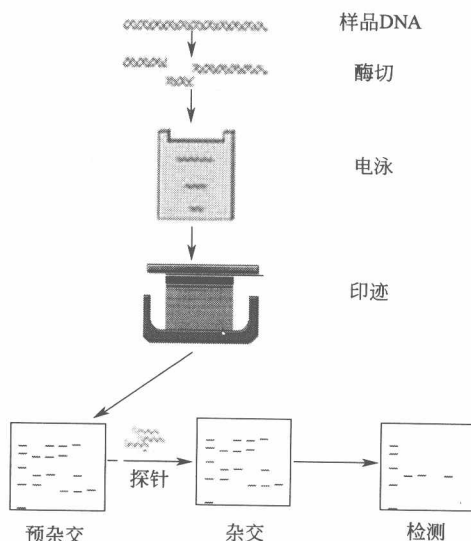


图 2-1 核酸分子杂交原理模式图

核酸分子杂交基本概念

1. DNA 变性

DNA 变性是指双螺旋之间氢键断裂, 双螺旋解开, 形成单链无规则线团, 因而发生性质改变 (如黏度下降, 紫外吸收增加等)。

(1) DNA 变性的方法 ①加热; ②改变 DNA 溶液的 pH; ③有机溶剂 (如乙醇、尿素、甲酰胺及丙酰胺等) 等理化因素。

(2) 增色效应 DNA 在 260nm 处有最大吸收值, 这一特征是由于 DNA 含有碱基的缘故。在 DNA 双螺旋结构模型中碱基藏于内侧, 变性时由于双螺旋解开, 碱基外露, 260nm 紫外吸收值因而增加, 这一现象称为增色效应 (hyperchromic effect)。利用 DNA 变性后波长 260nm 处紫外吸收的变化可追踪变性过程。

(3) 熔解曲线 升高温度使 DNA 变性, 以温度对 A_{260} 紫外吸收作图, 可得到一条曲线, 称为熔解曲线。

(4) 熔解温度 通常人们把 50% DNA 分子发生变性的温度称为变性温度 (即熔解曲线中点对应的温度), 由于这一现象和结晶的熔解相类似, 故又称熔点或熔解温度 (melting temperature, T_m)。因此 T_m 是指消光值上升到最大消光值的 50% 时的温度。

(5) 影响 T_m 值的因素 T_m 不是一个固定的数值, 它与很多因素有关。外部影响因素包括溶液 pH 和离子强度。随着溶剂内离子强度上升, T_m 值也随之增大。内部影响因素包括 DNA 的碱基比例和 DNA 的均一性。在相同条件下, DNA 内 G-C 配对含量高, 其 T_m 值也高。DNA 分子的 T_m 值可用如下经验公式进行估计: $T_m = 69.3 + 0.41 \times (G+C)\%$; 对于小片段的寡核苷酸, $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ 。

2. 复性

变性 DNA 只要消除变性条件, 二条互补链还可以重新结合, 恢复原来的双螺旋结构, 这一过程称为复性 (renaturation)。通常 DNA 热变性后, 将温度缓慢冷却, 并维持在比 T_m 低 25~30℃ 左右时, 变性后的单链 DNA 即可恢复双螺旋结构, 这一过程又叫做退火。复性后的 DNA 的理化性质都能得到恢复。但倘若 DNA 热变性后快速冷却, 则不能复性。

影响复性速度的因素包括:

① DNA 浓度。浓度愈高, 复性速度也愈快。

② DNA 片段的大小。DNA 片段愈大, 复性速度愈慢, 这是由于 DNA 分子越长, 扩散速度愈低, 使 DNA 线状单链互相发现互补的机会减少。因此, 在复性实验中, 有时需要将 DNA 切成小片段再进行复性。

③ 温度。过高不利于复性。

④ 溶液的离子强度。通常盐浓度较高时, 复性速度较快。

⑤ DNA 顺序的复杂性。简单的分子复性很快, 如 poly(dT) 和 poly(dA) 由于彼此互补识别很快, 故能迅速复性。但顺序较复杂的 DNA 分子复性则较慢。

因此通过变性速率的研究, 可以了解 DNA 顺序的复杂性。

二、蛋白质印迹技术

蛋白质印迹是继 DNA 印迹和 RNA 印迹之后发展起来的集电泳、转印和免

疫检测为一体的一项蛋白质分离检测技术。该技术利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白质样品并将其转移到固相载体 (例如硝酸纤维素薄膜) 上, 固相载体以非共价键形式吸附蛋白质, 且能保持多肽类型及其生物学活性不变。以吸附在固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原, 与对应的抗体进行免疫反应, 再与酶或同位素等标记的第二抗体反应, 经过底物显色或放射自显影以检测特异性目的蛋白的成分 (图 2-2)。该技术也广泛应用于检测基因在蛋白质水平的表达, 是应用最广泛的蛋白质免疫分析技术。

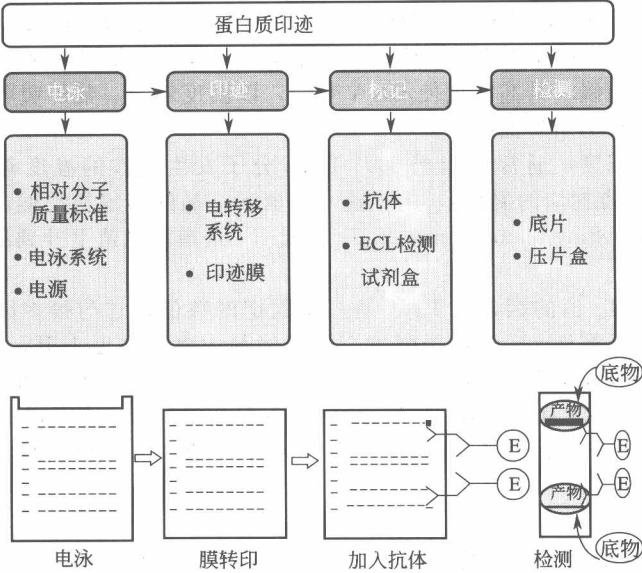


图 2-2 蛋白质印迹原理模式图

三、生物芯片技术

生物芯片 (biochip) 是指采用光导原位合成或微量点样等方法, 将大量生物大分子如核酸片段、多肽分子甚至组织切片、细胞等生物样品有序地固化于支持物 (如玻片、硅片、聚丙烯酰胺凝胶、尼龙膜等载体) 的表面, 组成密集二维分子排列, 然后与已标记的待测生物样品中的靶分子杂交, 通过特定的仪器如激光共聚焦扫描或电荷偶联摄影机 (CCD) 对杂交信号的强度进行快速、并行、高效的检测分析, 从而判断样品中靶分子的数量。由于常用玻片或硅片作为固相支持物, 且制备过程模拟计算机芯片的制备技术, 所以称之为生物芯片技术。根据芯片上固定的材料不同, 生物芯片包括基因芯片、蛋白质芯片、细胞芯片、组织芯片。另外根据原理还有元件型微阵列芯片、通道型微阵列芯片、生物传感芯片等新型生物芯片。

1. 基因芯片 (gene chip)

利用核酸的反向杂交原理, 将许多已知的寡聚核苷酸或 DNA 片段 (称为探针) 固定在芯片的每个预先设置的区域内; 将待测样本进行同位素或荧光标记

后,利用碱基互补配对原理与芯片上的探针分子进行杂交;检测芯片上的杂交信号并进行计算机分析,检测对应片段是否存在及存在量的多少。该技术可用于基因的功能研究和基因组研究、疾病的临床诊断和检测等众多方面。运用缩微技术,基因芯片能同时分析成千上万个生物样本,将许多不连续的分析过程集成于玻璃介质上,使这些分析过程连续化、微型化、集成化和自动化。其中最成功的基因芯片是在介质表面有序地点阵排列 DNA,因此又叫 DNA 微阵列 (DNA microarray)。

2. 蛋白质芯片或蛋白质微阵列 (Protein microchip)

蛋白质芯片是一种快捷、高效、并行、高通量的蛋白质分析技术。与基因芯片的基本原理相同,蛋白质芯片技术是指把制备好的已知蛋白质样品(如酶、抗原、抗体、受体、配体、细胞因子等)固定于经化学修饰的玻璃片、硅片等载体上,蛋白质与载体表面结合,同时仍保留蛋白质的物理和化学性质。由于蛋白质之间的相互作用,可利用蛋白质芯片对样本中存在的特定蛋白质进行检测。通过蛋白质芯片技术可以高效大规模俘获能与芯片上蛋白质特异性结合的待测蛋白质,经洗涤、纯化后,再进行确认和生化分析,从而判断样本中靶分子的性质和数量,以达到一次试验同时检测多种蛋白质的目的。蛋白质芯片可分为无活性和有活性两种形式。无活性芯片是将已合成好的蛋白质点在芯片上,有活性芯片则是在芯片上点生物体(如细菌),在芯片上原位表达蛋白质。活性芯片可以提供模拟的机体内环境,对于蛋白质功能分析更有利。

生物蛋白质芯片按支持物不同可分为两种类型:①在固相支持物表面高密度排列的探针蛋白质点阵;②微型化凝胶电泳板,即样品的待测蛋白质在电场作用下通过芯片上的微孔道进行分离,然后经喷射进入质谱仪中以检测待测蛋白质的相对分子质量及种类。蛋白质芯片还可按其密度分为高、中、低密度芯片。低密度芯片一般是指一块芯片上放置 400 个以下的生物信息。密度的高低将决定芯片的技术难易、价格高低、应用范围及商业化普及的程度等。

3. 糖芯片

将微生物多糖以非化学结合方式固定在表面修饰的玻璃片上,一张玻片上可固定大量的微生物含糖抗原(20000 个点)。含不同糖结构的糖结合物可以用于微阵列的制造,经空气干燥的微阵列可以稳定地长期保存。以微生物多糖为靶点的糖芯片可用于研究糖基介导的分子识别及抗感染反应,在生物医学研究领域具有重要意义。

随着芯片技术的不断发展及生物研究的需要,新的芯片及技术也不断出现,如细胞芯片、微流控芯片、芯片实验室、悬浮式生物芯片等技术和方法,这些技术将促使生命科学研究以更快的速度向前发展。

第二节 分子印迹方法

一、核酸印迹方法

将凝胶中的核酸片段印迹到滤膜的方法有:虹吸印迹法、电转移印迹法和真

空印迹法。

1. 虹吸印迹法

利用毛细管的虹吸作用使转移缓冲液带动核酸分子转移至滤膜上。操作时将一叠吸水纸压住转移膜，上面附一重物。缓冲液靠毛细现象穿过凝胶吸至膜上，在此过程中带动凝胶中的核酸移出凝胶并吸附到固体支持膜上。

2. 电转移印迹法

利用电泳作用将凝胶中的 DNA 转移至滤膜上，是一种快速、简单、高效的转移法，只需几小时，特别适用虹吸法转移不理想的大片段 DNA 的转移。电转移法对使用的滤膜有一定限制，只能用尼龙膜或化学活化膜，不能用硝酸纤维素膜。因为硝酸纤维素膜结合 DNA 依赖于高浓度盐溶液，高盐溶液的导电性极强，可产生强大的电流，使转移体系的温度急剧升高，破坏 DNA 的结构。

3. 真空印迹法

利用真空泵将转移缓冲液从上层容器中通过凝胶抽到下层真空室中，同时带动核酸分子转移到凝胶下面的滤膜上，整个过程只需 1h 左右。

二、蛋白质印迹方法

1. 电泳印迹 (Electrophoretic Blotting)

该法是蛋白质转移中最常见、应用最广泛的方法，速度快、效率高、分辨率好。1979 年 Towbin 等首次介绍了此方法，发展异常迅猛，普及应用面非常广。目前，主要有两种电泳系统应用于此方法：导线电极的缓冲缸系统和平板电极系统——“半干”系统，“半干”意指所用滤纸含很少量的缓冲液。两种系统各有优缺点，似乎半干系统更普及。缓冲缸系统常常由多孔塑料板夹持凝胶和膜组成，实验时把它们垂直放入电泳槽中，电极附在电极槽壁两侧，不与胶膜接触。可同时将数个膜转移系统平行放入电极槽中进行转移而互不干扰。半干系统是由两叠用少量缓冲液浸湿的滤纸将胶膜夹在中间形成“三明治”结构，滤纸紧贴住固相板电极。

2. 集落印斑 (plaque colony immunoblotting)

用于监测噬菌体或细菌表达的蛋白质，其转移膜的方法简便易行。将膜贴在细菌培养皿上，细菌产生的蛋白质结合到膜上，也就达到了转移的目的。由于细菌能产生大量蛋白质，可反复在培养皿上贴膜，这样可得到数个相同的蛋白质转移膜，从而可对蛋白质做多项分析。此方法亦用于噬菌体或细菌核酸的检测。

3. 扩散印迹 (Diffusion Blotting)

扩散印迹操作较简单，首先将蛋白质电泳后的凝胶夹在转移膜中间，然后浸泡在缓冲液中 2~3d，使其充分扩散，蛋白质均匀扩散出凝胶后结合到两侧的膜上。这种方法的蛋白质转移率约为 50%~70%，缺点是费时、分辨率不够高。

三、生物芯片的制备

1. 直接点样

点样的方式分两种，其一为接触式点样，即点样针直接与固相支持物表面接触，将合成好的探针、cDNA、基因组 DNA 或蛋白质点到固相支持物上。此种点样的优点是探针密度高，通常可点 2500 点/cm²，缺点是定量准确性及重现性

不好,点样针易堵塞且使用寿命有限;其二为非接触式点样,即喷点,是以压电原理将 DNA 样品通过毛细管直接喷至固相支持物表面。喷印法的优点是定量准确,重现性好,使用寿命长,缺点是喷印的斑点大,因此探针密度低,通常只有 400 点/cm²。

2. 原位光刻合成

其主要过程是,在固相支持物上偶联带有可感光保护基因 X 的羟基,汞光有选择地照射到固相支持物,去掉可感光保护基因 X,使羟基成为有功能的自由羟基,自由羟基与随后加入的带 X 基团的核苷酸偶联,第一个核苷酸就被嫁接到目标位置上。随着此反应的不断重复,核酸链不断地延伸,当所需的寡核苷酸链合成完后,对反应基板进行无遮板的汞光普照,去除所有的 X,即可得到所需的寡核苷酸阵列。这样,光照模式和反应物的加入顺序决定了合成产物的序列以及在基板上的位置。Affymerix 公司为此技术申请了专利保护。

3. 压电打印法

其原理类似于喷墨打印机,四种不同的碱基分装到打印机头上的墨盒中,打印机头在方阵上移动,并将带有某种碱基的试剂滴到基板表面。支持物经过包被后,根据芯片上不同位点探针的序列需要,将特定的碱基喷印在芯片上的特定位置。冲洗、去保护、偶联等则与一般的固相合成技术相同。该技术采用的化学原理与传统的 DNA 固相合成一致,因此不需要特殊制备的化学试剂。每步产率可达到 99% 以上,可以合成出长度为 40~50 个碱基的探针。

四、固相支持物

在分子印迹中,将核酸或蛋白质转印至载体上进行分析和检测,根据样品的不同及检测方法的差异将选用不同的固相支持物。

(一) 硝酸纤维素膜

1. 纯硝酸纤维素膜 (Protran)

在所有膜中,Protran 膜的封闭最简单容易,从而可有效阻断非特异结合,降低背景,无需严谨清洗即可得到良好的信噪比;广泛适用于同位素、化学发光法、显色法和荧光法等不同标记显色方法的 Southern blotting、Northern blotting 和 Western Blotting 等多种实验,对于 HRP 的化学发光法印迹反应效果尤佳。但纯硝酸纤维素膜比较脆,操作上要特别注意。Protran 孔径分为 0.45μm、0.2μm、0.1μm 3 种。0.45μm 膜通常适用于分子质量大于 20kDa 的蛋白质分子和 300bp 以上的核酸分子;而 0.2μm 膜则由于密度大、孔径小能有效减少“渗漏”,更适用于分子质量小于 20kDa 的蛋白质分子和 300bp 以下的短链 DNA 或寡核苷酸。而 0.1μm 膜则是用来对付 7kDa 以下的蛋白质。硝酸纤维素膜不需要甲醇预先浸润,用前直接铺在水面渗透润湿后就可以使用。Protran 的另外一个优点是非常稳定,可稳定保持蛋白质性质。

Protran 硝酸纤维素膜适用于常规电转、半干转、真空转、毛细转移,但不适合用碱法印迹。固定方法:如果样本是核酸,可以用紫外交联或 80℃ 烘干固定,蛋白质则只需干燥固定即可。

2. 夹心硝酸纤维素膜 (Optitran)

Optitran 中间为聚酯基质,两面均匀覆盖硝酸纤维素,使得该种膜具有硝酸纤