现代食品检测技术第二部分

第12章 核酸探针检测技术

赵杰文 邹小波

江苏大学食品与生物工程学院

第十二章核酸探针检测技术

- 1 核酸探针的种类及其制备方法
- 2 探针标记物与标记方法
- 3 探针杂交与信号检测
- 4 核酸探针在食品微生物检测中的应用

1核酸探针的种类及其制备方法

- 一、基因组DNA探针
- 二、cDNA探针
- 三、RNA探针
- 四、寡核苷酸探针

一、基因组DNA探针

- 这类探针多采用分子克隆或PCR技术从基因文库筛选或扩增方法制备。

二、cDNA探针

- cDNA探针是以RNA为模板，在反转录酶的作用下合成的互补DNA，因此它不含有内含子及其他非编码序列，是一种较理想的核酸探针。

三、RNA探针

- mRNA作为核酸分子杂交的探针是较为理想

四、寡核苷酸探针

- 用人工合成的寡聚核苷酸片段作为分子杂交的探针，其优点是可根据需要随心所欲地 合成相应的序列，避免了天然核酸探针中存在的高度重复序列所带来的不利影响

2 探针标记物与标记方法

- 一、核酸探针标记物种类及其特点
- 二、探针标记方法
- 三、探针的纯化
- 四、探针标记效率的评估

一、核酸探针标记物种类及其特点

- 标记探针的目的是为了跟踪探针的去向，确定探针是否与相应的基因组DNA杂交

一、核酸探针标记物种类及其特点

- 一种理想的探针标记物，应具备以下几种特性：1、高度灵敏性；；2、标记物与核酸探针分子的结合 ；；3、应不影响探针分子的主要理化特性 ；4、当用酶促方法进行标记时，应对酶促活性(Km值)无较大的影响 ；5、检测方法除要求高度灵敏性外，还应具有高度特异性

二、探针标记方法

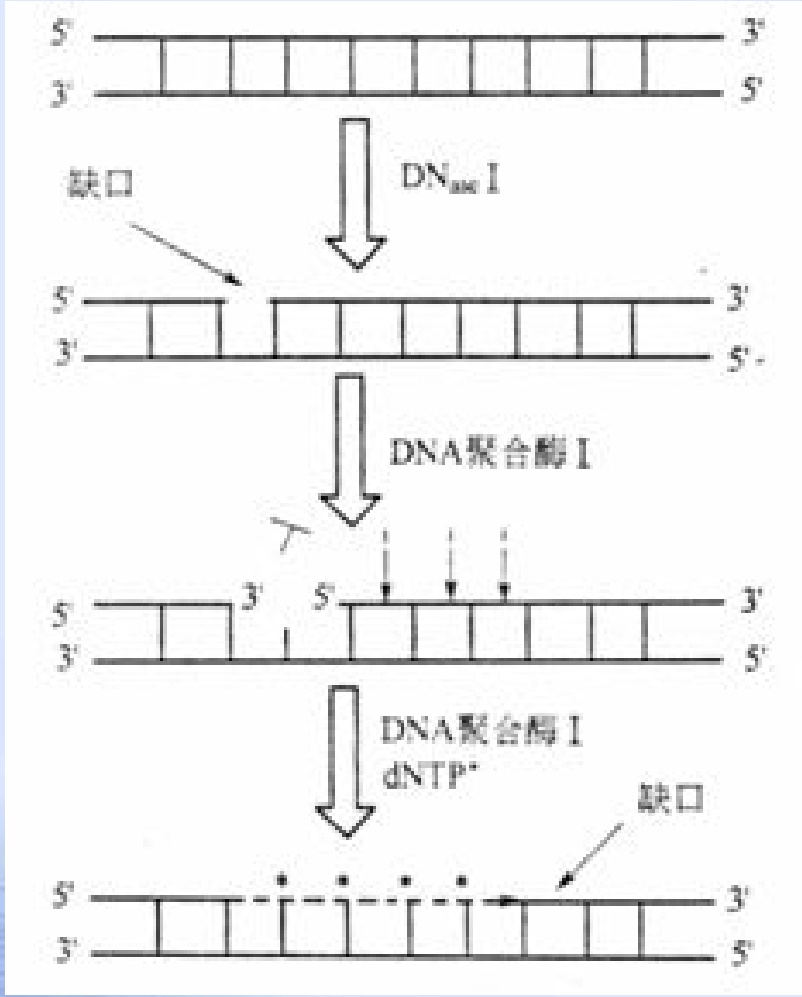
（一）探针的放射性核素标记法

（二）探针的非放射性标记法

（一）探针的放射性核素标记法

1. 缺口平移法
2. 随机引物法
3. 单链DNA探针的标记
4. cDNA探针的标记
5. 寡核苷酸探针的标记

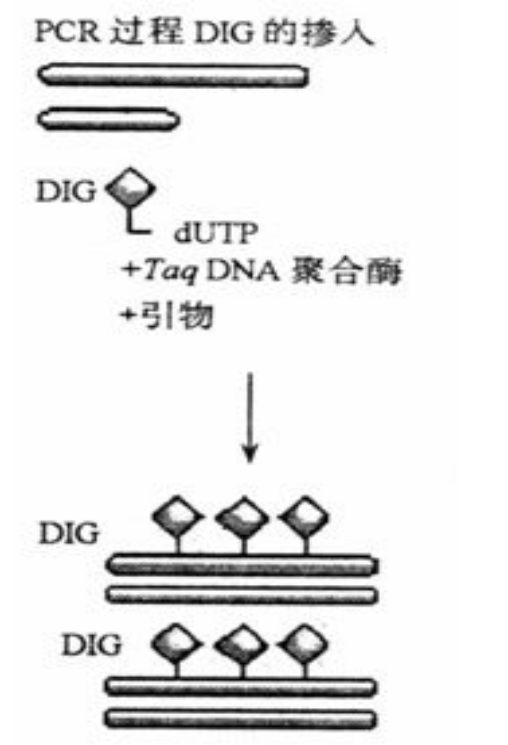
缺口平移法



（二）探针的非放射性标记法

- 1．PCR标记法
- 2．体外转录标记RNA探针

PCR标记法



体外转录标记RNA探针

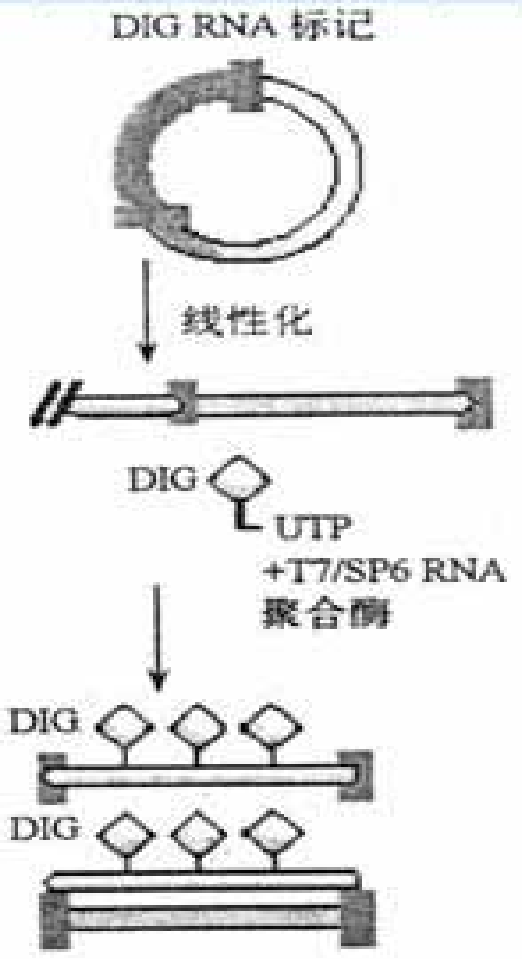


图 12-4　体外转录法
合成 RNA 探针

三、探针的纯化

- （一）凝胶过滤柱层析法
- （二）反相柱层析法
- （三）乙醇沉淀法

四、探针标记效率的评估

- 通过测定标记产物的量来估计每一次标记反应的效率，这可以准确了解杂交液中应加探针的量。
- 估计探针产量的推荐方法

估计探针产量的推荐方法

标记方法	估计方法	标记方法	估计方法
随机引物法	直接检测	RNA 探针	直接检测
PCR 标记法	琼脂糖凝胶电泳	3′末端标记（寡核苷酸）	直接检测
缺口平移法	直接检测	3′加尾标记（寡核苷酸）	直接检测

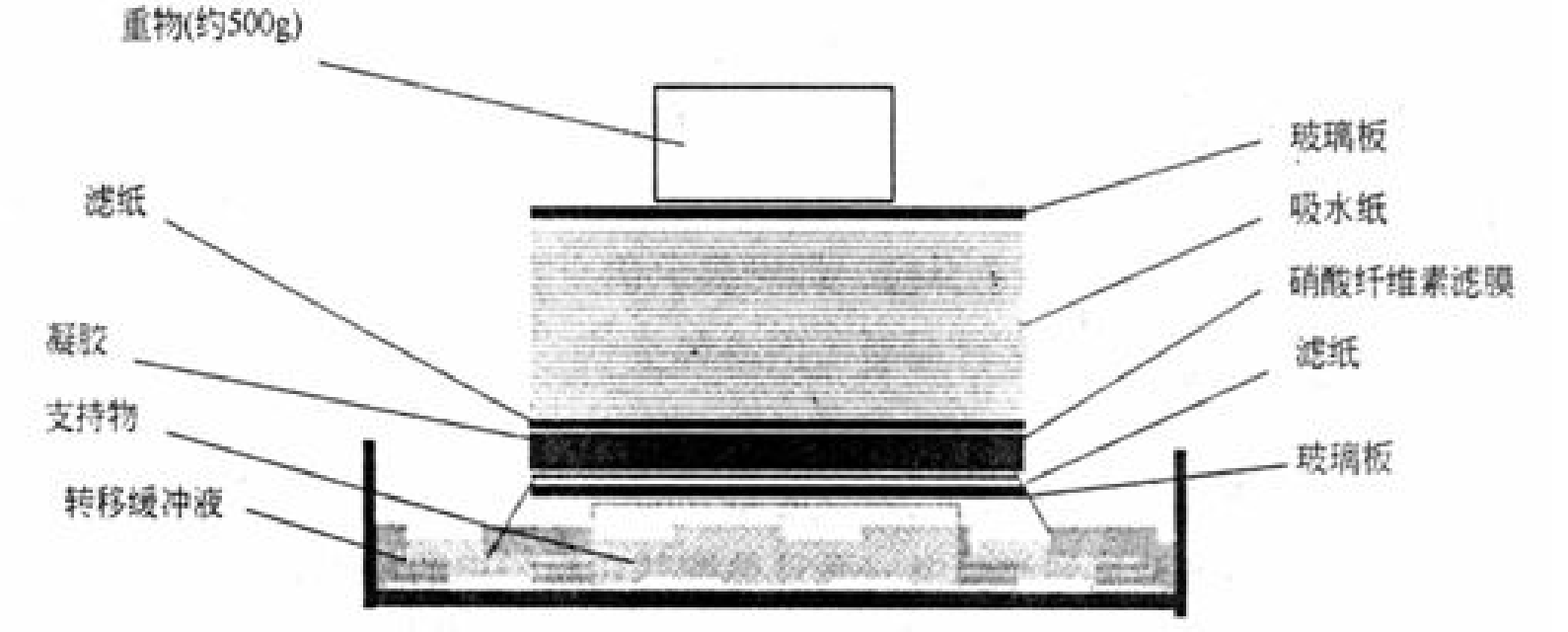
3 探针杂交与信号检测

- 一、核酸杂交
- 二、杂交信号检测

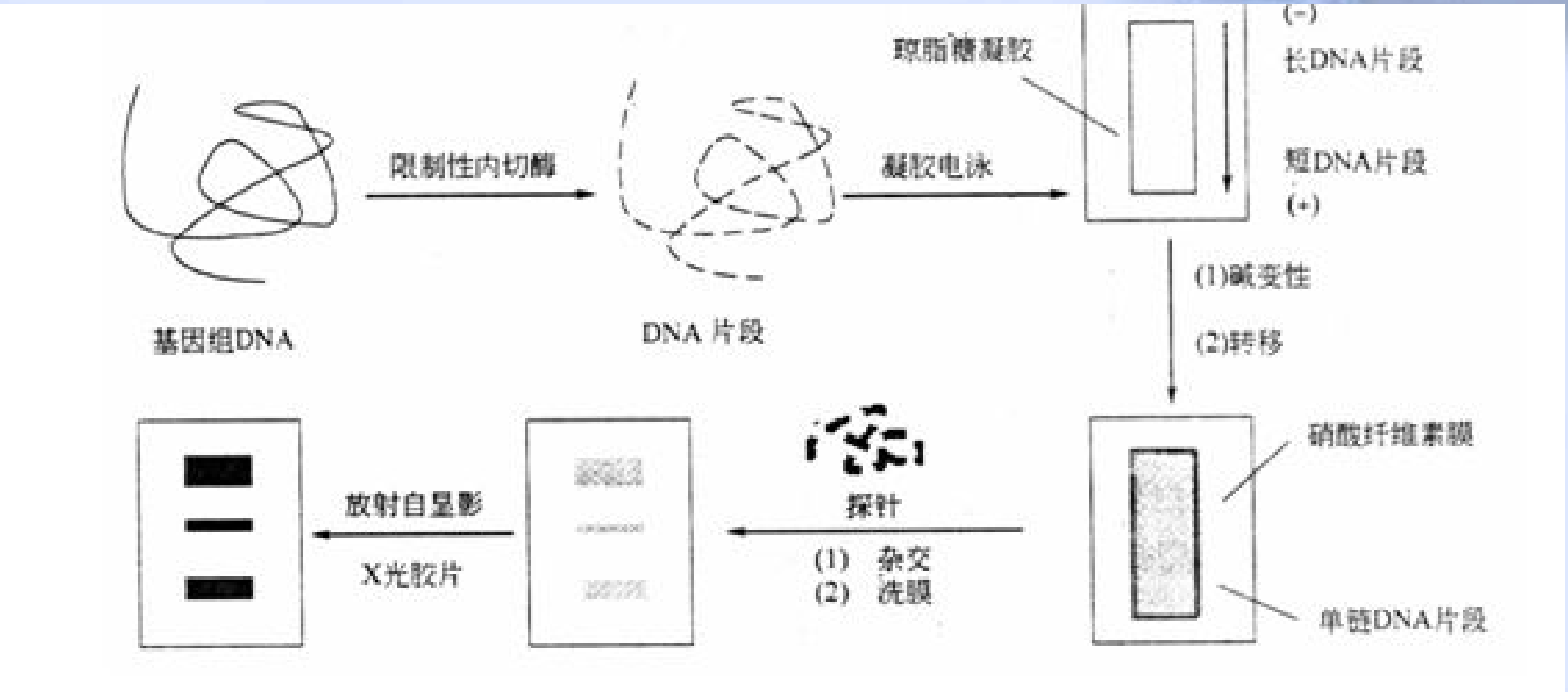
一、核酸杂交

- （一） **Southern**印迹杂交
- （二） **Northern**印迹杂交
- （三） 斑点印迹杂交和狭线印迹杂交
- （四） 原位杂交

Southern印迹杂交



Northern印迹杂交



斑点印迹杂交和狭线印迹杂交

- （三）斑点印迹杂交和狭线印迹杂交
- 斑点印迹杂交（dot blotting）和狭线印迹杂交（slot blotting），是在Southern印迹杂交的基础上发展的两种类似的快速检测特异核酸（DNA或RNA）分子的核酸杂交技术。

原位杂交

- 1975年，M.Grunstein和D.Hogness根据检测重组体DNA分子的核酸杂交技术原理，对Southern印迹技术作了一些修改，发展出了一种菌落杂交技术。

二、杂交信号检测

- （一）放射性核素探针的检测－放射自显影
- （二）非放射性核素探针的检测

（一）放射性核素探针的检测－放射自显影

- 利用放射线在×线片上的成影作用来检测杂交信号，称为放射自显影。

（二）非放射性核素探针的检测

- 1．偶联反应
- 2．显色反应

1. 偶联反应

- 大多数非放射性标记物是半抗原，因此可以通过抗原—抗体免疫反应系统与显色体系偶联。另一类非放射性标记物如生物素，作为抗生物素蛋白(avidin)的配体，则可通过亲合法进行检测 。

2．显色反应

- 通过连接在抗体或抗生物素蛋白上的显色物质(如酶、荧光素等)进行杂交信号的检测。

4 核酸探针在食品微生物检测中的应用

- 一、大肠杆菌
- 二、金黄色葡萄球菌
- 三、李斯特氏菌
- 四、存在的问题及展望

一、大肠杆菌

- 放射性同位素标记的核酸探针正越来越多地用于ETEC的快速检测

二、金黄色葡萄球菌

- 法国生物梅里埃公司的GEN—PROBE系统，采用杂交保护分析法(HPA)研制成金黄色葡萄球菌检验和鉴定试剂盒，已成功应用于检测食品中的金黄色葡萄球菌 。

三、李斯特氏菌

- 生物梅里埃公司的“Accuprobe Listeria monocytogenes”和GENE-TRAK的“GENE-TRAK Listeria”。

四、存在的问题及展望

- 核酸探针技术虽为一种快速、敏感、特异的检测新技术，但其在实际应用中仍存在不少问题。放射性同位素标记的核酸探针具有半衰期短、对人体有危害等缺点，作为常规诊断，特别是在食品检验实验室很不适用。