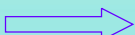
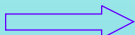


返回目录


第五章 分子生物学研究的主要方法

第一节 核酸的凝胶电泳 

第二节 核酸分子杂交 

第三节 **PCR**基因扩增 

第四节 基因定点诱变 

第五节 **DNA**核苷酸序列分析 

第六节 研究**DNA**与蛋白质相互作用的方法 

[返回目录](#)

[返回第二章](#)

分子生物学主要技术

密度梯度超速离心和电子显微镜技术

DNA分子的切割与连接

核酸分子杂交、凝胶电泳、**DNA**序列结构分析以及基因的人工合成、基因定点突变和**PCR**扩增等多种新技术、新方法。

DNA分子的切割与连接，是基因操作的核心部分

[返回目录](#)

[返回第二章](#)

第一节 核酸的凝胶电泳

- 1.基本原理
- 2.琼脂糖凝胶电泳
- 3.脉冲电场凝胶电泳

2.1.1 原理

➤电泳及迁移率

➤**核苷酸链多聚阴离子** 在生理条件下，核酸分子的糖—磷酸骨架中的磷酸基团，是呈离子化状态的。相同分子量的双链DNA几乎具有等量净电荷

➤**无反应活性的稳定的介质** 降低了对流运动，故电泳的迁移率又是同分子的摩擦系数成反比的。已知摩擦系数是分子的大小、极性、及介质粘度的函数，分子大小的不同、构型或形状的差异，所带的净电荷的多寡，便彼此分离开来。

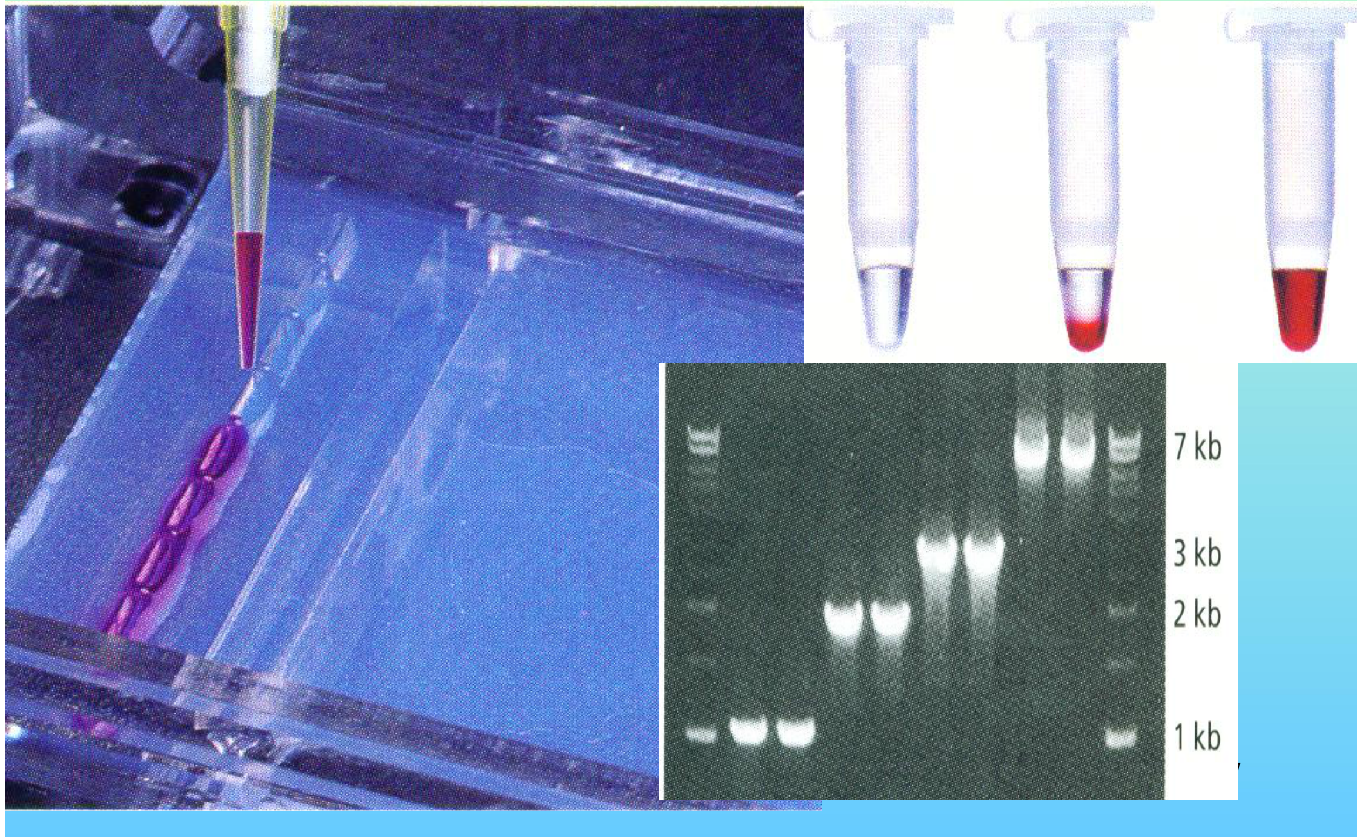
2.1.2 琼脂糖凝胶电泳

■琼脂糖为线性多糖聚合物，红色海藻产物琼脂中提取而来。琼脂糖溶液加热到沸点后冷却凝固，密度由浓度决定的。

■分辨能力同凝胶的类型和浓度有关:琼脂糖凝胶分辨范围为0.2~50kb之间.

不同浓度琼脂糖凝胶的分辨能力

凝胶类型及浓度	分离DNA片段的大小范围 (bp)
0.3%琼脂糖	50 000~1000
0.7%琼脂糖	20 000~1000
1.4%琼脂糖	6 000~300
4.0%琼脂糖	1000~100
10%琼脂糖	500~25
20%琼脂糖	50~1



凝胶电泳的优点

它不单是一种分析的手段，同时也可以用来制备和纯化特定的DNA片段。在这方面，低熔点（LMP）的琼脂糖凝胶较为方便。

LMP琼脂糖是一种熔点为62~65℃的琼脂衍生物，它一旦溶解，便可在37℃下持续保持液体状态达数小时之久，而在25℃下也可持续保持液体状态约10分钟。LMP琼脂糖可以不经电洗脱或破碎凝胶，即可用来回收DNA分子。

指示剂

常用的指示剂有溴酚兰和二甲苯青及银染色.溴酚兰在碱性液体中呈紫兰色,在0.6%、1%、1.4%和2%琼脂糖凝胶电泳中,溴酚兰的迁移率分别与1Kb、0.6Kb、0.2Kb和0.15Kb的双链线性DNA片段大致相同。二甲苯青的水溶液呈兰色,在1%和1.4%琼脂糖中迁移速率分别与2Kb和1.6Kb的双链线性DNA相似.

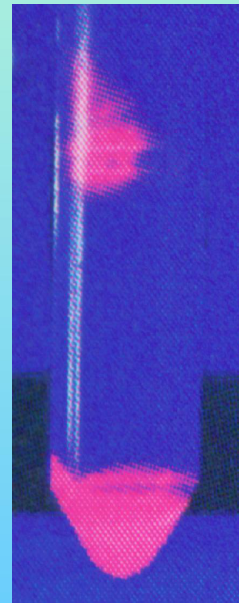
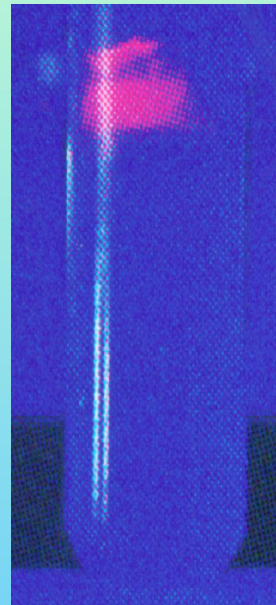
指示剂一般与蔗糖、甘油组成载样缓冲液.作用有①增加样品密度.②在电泳中形成肉眼可见的指示带,可预测核酸电泳的速度和位置.③使样品呈色,加样操作更方便

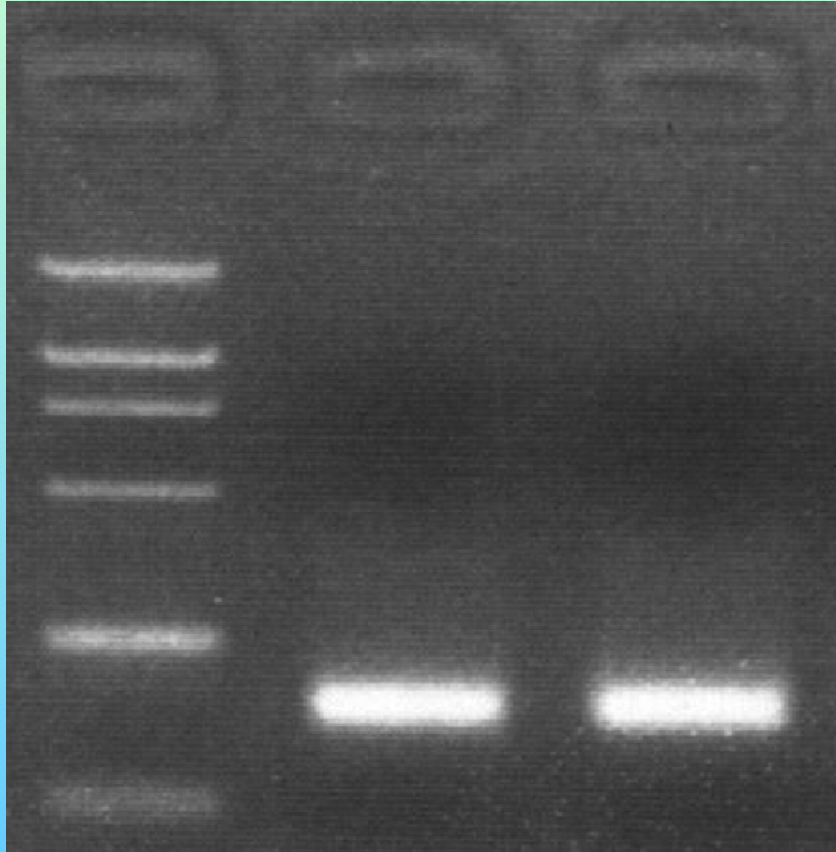
溴化乙锭染色

溴化乙锭 (ethidium bromide, 简称 EtBr), 是一种具扁平分子的核酸染料, 在一切可能的部位同DNA分子结合, 却不能同琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶结合并在300nm紫外光照射下放射出, 可显现凝胶中0.05ug的微量DNA

方法: 加入凝胶中, 凝胶浸泡

重要的特性: 荧光强度同DNA片段的大小或数量成正比。在包含有数种DNA片段的电泳谱带中, 每一条带的荧光强度是随着从最大的DNA片段到最小的DNA片段方向逐渐降低的。



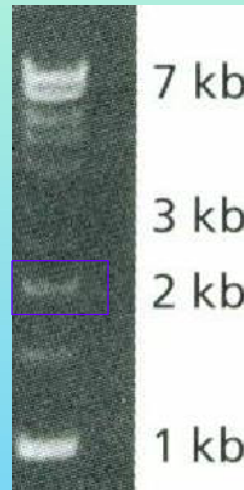


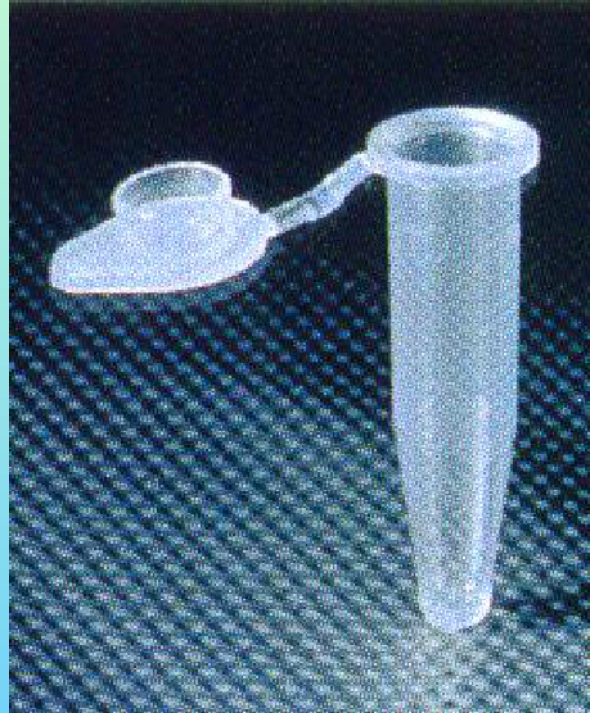
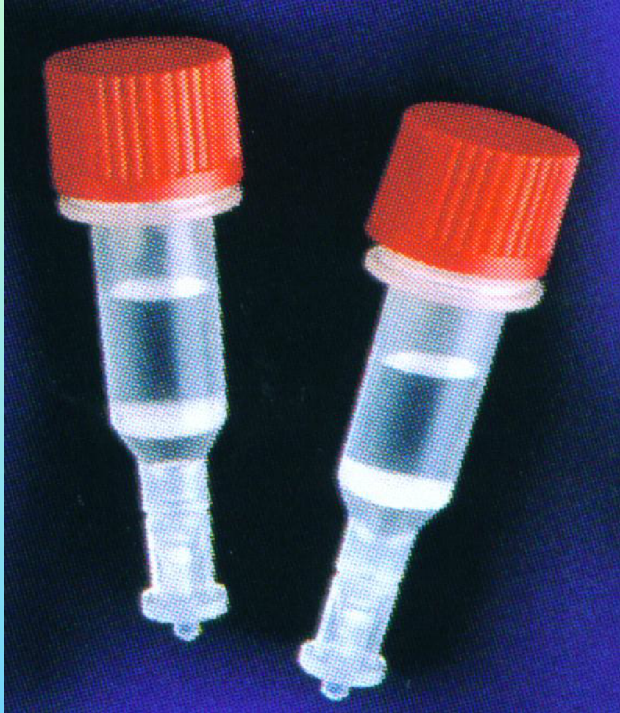
银染

银染色:银染色液中的银离子(Ag^+)可与核酸形成稳定的复合物,然后用还原剂如甲醛使 Ag^+ 还原成银颗粒,可把核酸电泳带染色黑褐色.主要用于聚丙烯酰胺凝胶电泳染色.也用于琼脂糖凝胶染色.其灵敏度比EB高200倍.但银染色后,DNA不宜回收

LMP琼脂糖回收DNA分子

将凝胶在65℃下加热数分钟，然后向液态琼脂糖溶液中加入过量的酚液抽提DNA，这样在离心所得的上清液中便含有除去了琼脂糖的DNA分子。另外，一旦LMP琼脂糖已经熔化，并保持在37℃下，那么就可以直接进行一定的酶催反应。据此，人们可以对业经电泳分离的DNA酶切片段进行第二种酶切消化反应。将这种混合物加到另一个凝胶槽上，待凝固之后，再进行第二次电泳

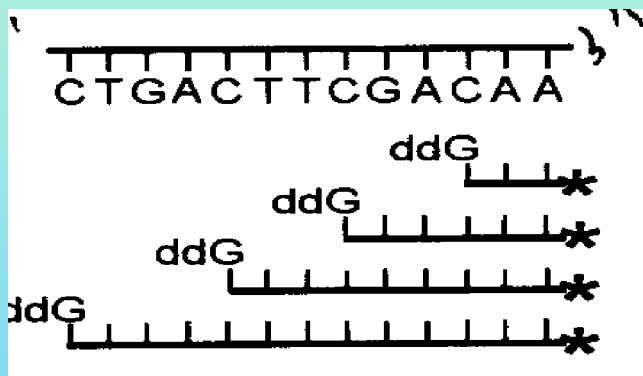




变性胶电泳

□方法

□用途



2.1.3 脉冲电场凝胶电泳

DNA大分子的分离：实验表明，即便是浓度为0.1%~0.2%的琼脂糖凝胶，亦不能分离分子量大于750kb的DNA大分子。原核生物，其染色体基因组DNA超过4000kb，哺乳动物DNA达数千kb。

常规凝胶，超过一定大小范围的所有的双链DNA分子，都按相同速率迁移。因为它们在单向恒定电场的的作用下，仅以“一端向前”的方式游动穿过整个胶板。

1984，Schwartz 和 Cantor：脉冲电场凝胶电泳（pulsed-field gelelectrophoresis，简称PFGE）技术，可分离整条染色体。大分子量DNA需更多次数更换构型和方位，以便按新方向游动。迁移速率慢，可分离到 10^7 bpDNA大分子。

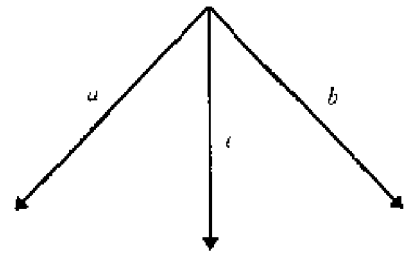


图 2-3 脉冲电场凝胶电泳

[返回目录](#)

[返回第二章](#)






“电泳”思考题

- ❖ 电泳的原理是什么
- ❖ 请说出以下电泳用胶的区别：普通DNA分离、测序胶、Southern 杂交
- ❖ 比较分子量相同的三种不同构型的DNA（直链线形、闭合环形、开链环形）在同一电场中的电泳迁移率
- ❖ 比较溴化乙锭染色和银染的区别
- ❖ 说明电泳技术在基因工程中的作用

[返回目录](#)

[返回第二章](#)

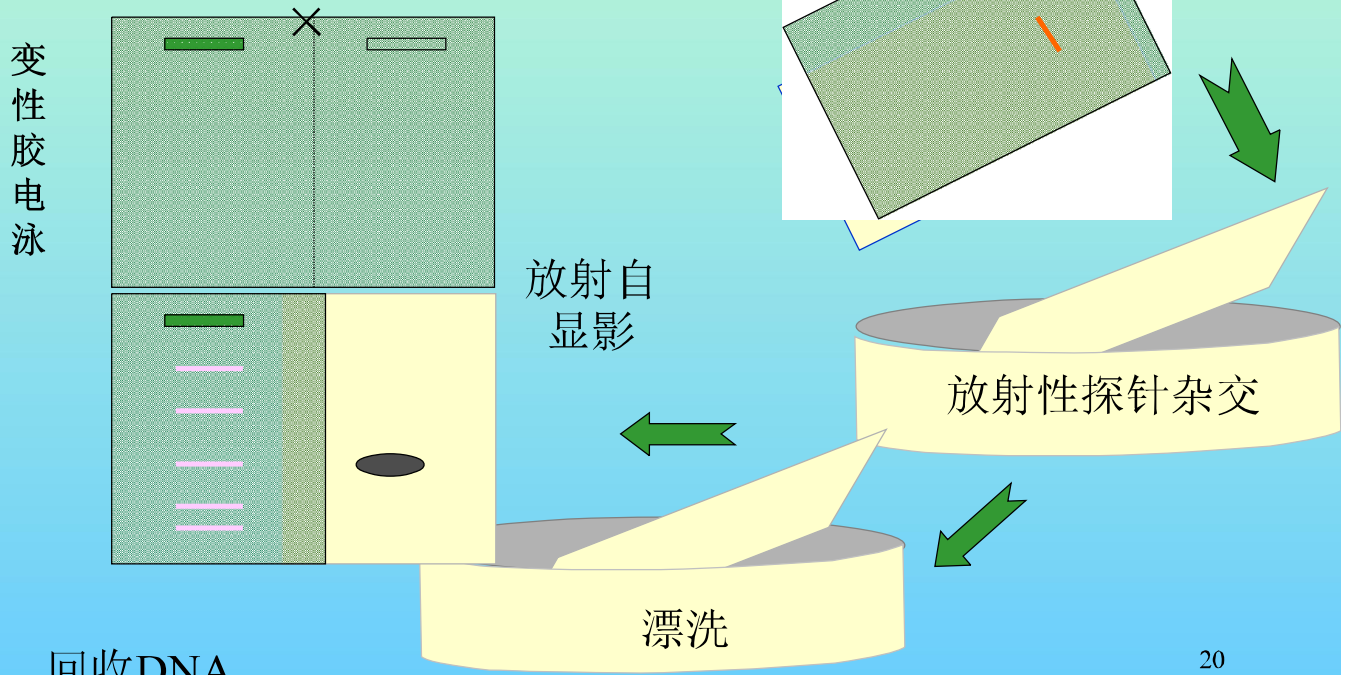
第二节 核酸分子杂交

1. Southern DNA印迹杂交 
2. Northern RNA印迹杂交 
3. Western印迹杂交 
4. 菌落(或噬菌斑)杂交 
5. 斑点印迹杂交和狭线印迹杂交 

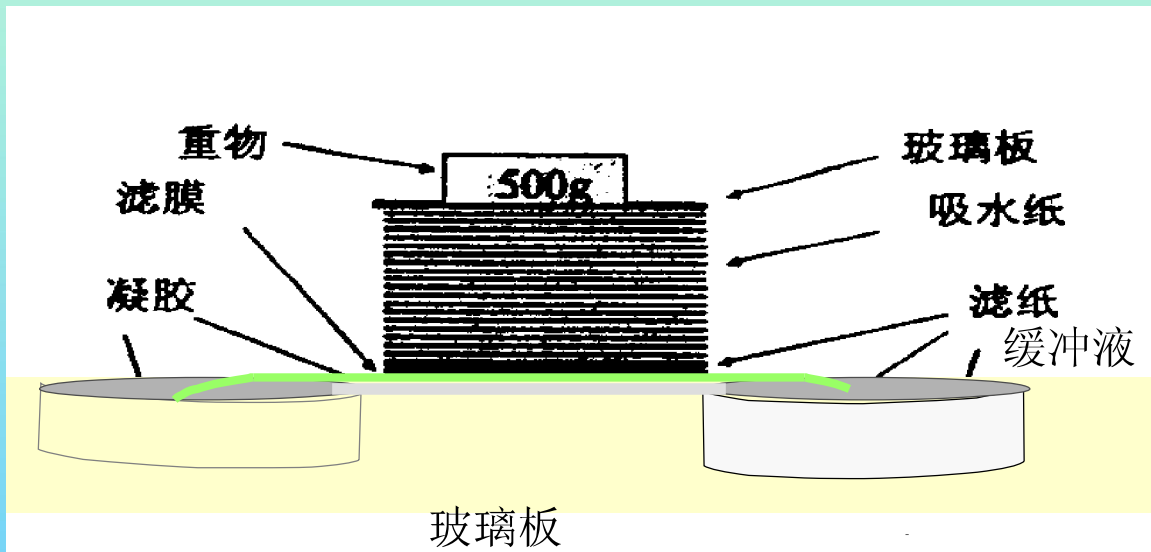
2.2.1 Southern blot

根据毛细管作用的原理，使在电泳凝胶中分离的**DNA**片段转移并结合在适当的滤膜上，然后通过同标记的单链**DNA**或**RNA**探针的杂交作用检测这些被转移的**DNA**片段，这种实验方法叫做**DNA**印迹杂交技术。由于它是由E. Southern于1975年首先设计出来的，故又叫做**Southern DNA**印迹转移技术。

Southern blot原理模式

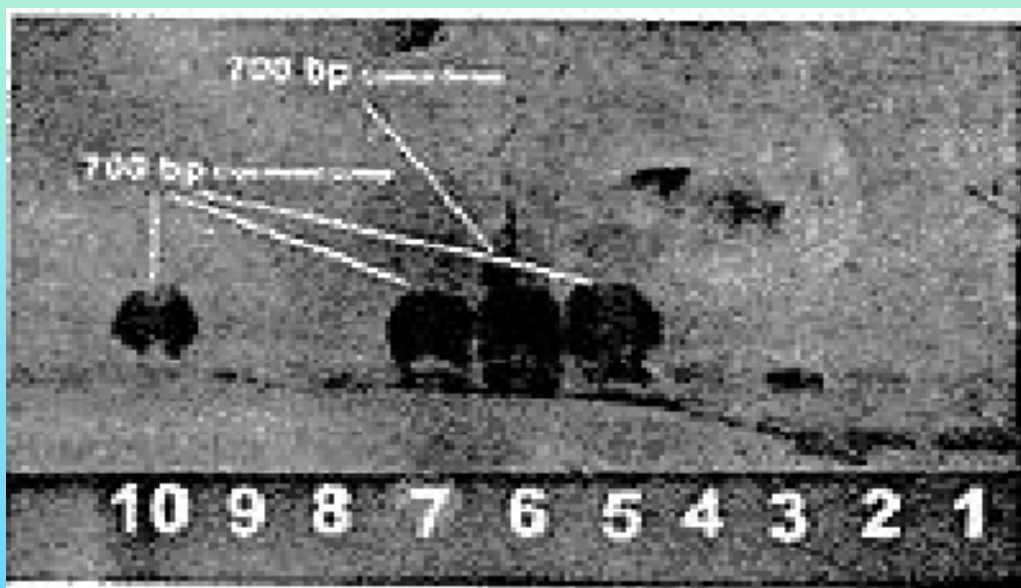


Southern blot转移装置图



转移时间: < 1kb 则 < 1hr, >15kb >18hr

Southern blot 自显影图样



探针标记

探针 -单链探针:

末端标记

DNA片段, Oligo, 随机DNA
ssDNA模板, 通用引物, 合成ssDNA探针
RNA探针, RNA polymerase

- Klenow: 标记3'端, 补平和置换反应
- T_4 polymerase: 标记3'端
3' -5' 外切活性强, 特别适用于3' 突出末端
- Kinase: 标记5'端
正反应 $^{32}P \rightarrow 5' -OH \text{ NNNN} \rightarrow 5' \text{ p NNNN}$
交换反应 过量ATP 使 $5' -p \rightarrow ADP$ then $^{32}P \rightarrow 5'$
- 末端转移酶标记3'

✓ 寡核苷酸

5' Kinase, 3' 末端转移酶

✓ 标记物

放射性: ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S

非放射性: Digoxigenin, Biotin
用于标记dUTP

DIG标记/检测举例

□ 探针标记

6Nt 随机寡核苷酸序列引物, Klenow 标记

□ 检测

漂洗

blocking

免疫反应 labeled Anti-DiG-Ab-Ap

洗涤

显色反应 化学发光检测

NBT-BCIP 形成棕黄色沉淀

2.2.2 Northern blot

类似于Southern blot,但用于检测RNA的分子杂交技术,用于分析总RNA或mRNA

❖ 电泳缓冲液

✓ 甲醛buf (5×)

0.1mM MOPS (Ph 2.0) (3-(N-玛琳代)丙磺酸)

40 mM NaAc

5mM EDTA (pH 8.0)

DEPC H₂O

✓ 制胶

甲醇 (MW 30.03) 通常为37%水溶液, 12.3M (pH>4.0)

终浓度, 1×buf + 2.2M甲醇

❖ 上 样

预处理 RNA (up to 30 μ g) 4.5 μ l + 5 \times buf 2.0 μ l

甲醛 3.5 μ l 甲酰胺 10 μ l

65 $^{\circ}$ C 15min

loading buf

50%甘油, 1mM EDTA (pH 8.0)

0.25% BPB 0.255 二甲苯 TFF

❖ 电 泳

loading之前, 预电泳5min 5V/cm

电泳1-2hr之后, 混合正负极电泳液

❖ 转膜

□ 预处理

- DEPC H₂O洗涤去除甲醛
- 如果胶浓度>10% 或 厚度>0.5cm 或 底物>2.5kb, 需用0.05M NaOH处理20min, 部分水解RNA
- 无RNase H₂O洗涤, 20×SSC浸泡45min

□ 转移, 同Southern

2.2.3 Western blot

基本原理同其它blot方式，用于检测蛋白质，与Southern的关键区别在于探针性质：抗体

抗体的要求：

❖ 单克隆抗体
但并非都合适，由于靶蛋白已变性

❖ 多克隆抗体

抗体为混合物，对其特异性，亲和力及浓度都一无所知，对由SDS/还原剂变性处理的目标蛋白是否还能识别应做预备实验

简要步骤

- 制备样品 SDS-PAGE样品
- 蛋白质转移
 硝酸纤维素滤膜，电转移：三夹板/隔离电极板；干燥
- 染色
 丽春红S or 印度墨水（射启性检测适用）
 但现少采用，由于有prestain MW marker

- 封闭背景 脱脂奶粉 5%
- 第一抗体与靶蛋白结合
- 二级免疫反应

抗免疫球蛋白抗体或A 蛋白

标记: ^{125}I 碱性磷酸酶 辣根过氧化物酶 偶联

A蛋白可与IgG的Fc片段binding

木瓜蛋白酶切割IgG

Fragment antigen binding , Fragment
crystalline

2.2.4 原位杂交：菌落杂交和空斑杂交

❖ 菌落生长

点种：阳性重组子→二个平板上（有/无膜）； 加CK

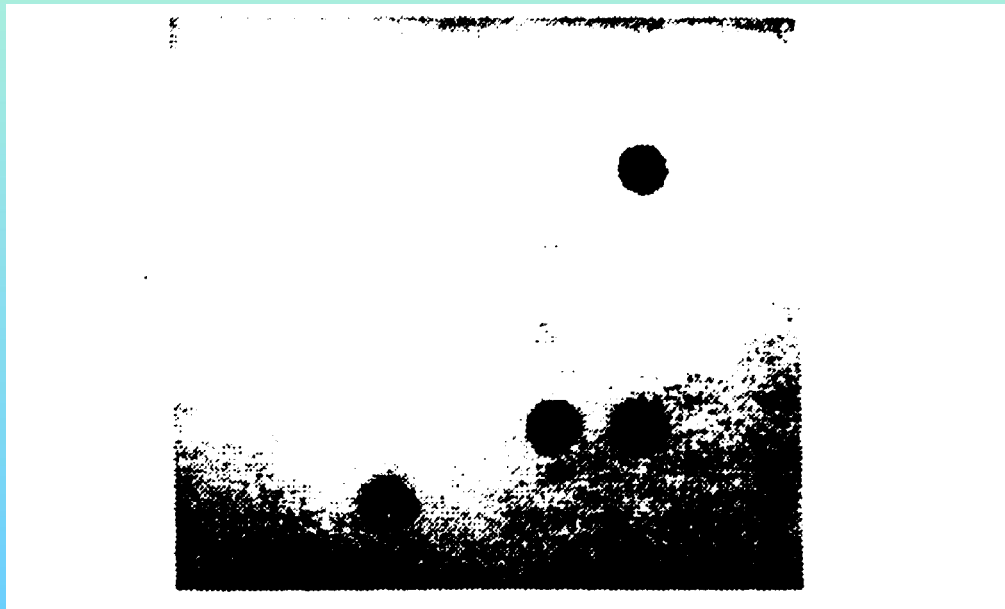
影印：菌落和空斑，绝大多数应为重组子（白色菌落）

❖ DNA的释放与固定：有多种方法

- 10%SDS
- 0.5N NaOH/1.5N NaCl
- 0.5M Tris 1.5N NaCl
- SSC
- 干燥
- 固定 80℃ 2hr

2.2.5 斑点杂交

直接将DNA样品点在杂交膜上



回答问题

1. 什么是 **Southern blotting**, **Northern blotting** 和 **Western blotting**. 各有什么用途?
2. 用于核酸杂交的电泳与比较核酸分子大小的电泳有什么异同?