



第八章 核酸分子杂交技术
Nucleic acid hybridization technology
倪培华

<http://www.shsmu.edu.cn/>



第一节 杂交的基本原理

一、核酸分子杂交的基本原理与分类

(一) 核酸分子杂交的基本原理

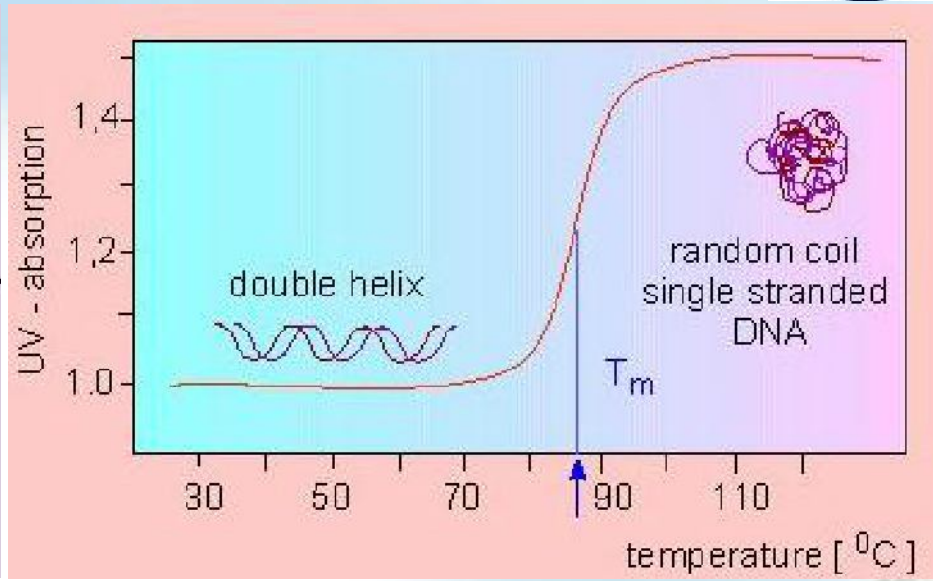
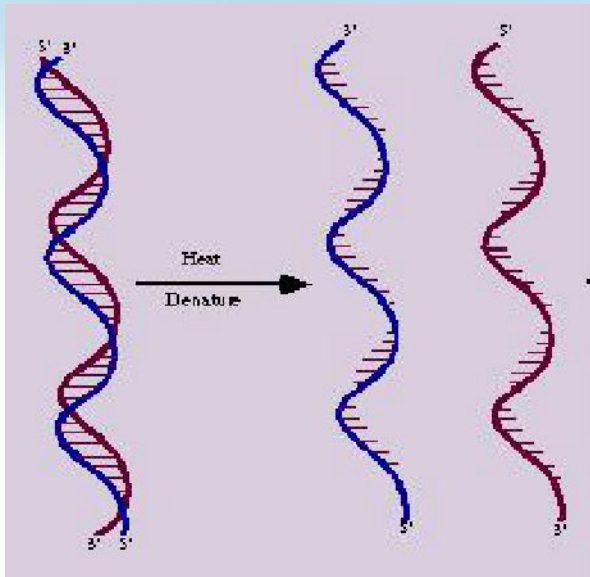
1. 变性 (denaturation)

(1) 定义:

在一定的条件下，双螺旋之间氢键断裂，双螺旋解开，形成无规则线团，双链解链成为单链。

2009年3月

上海交通大学医学院



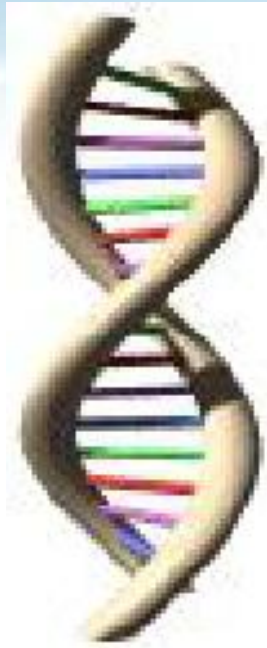
2009年3月

上海交通大学医学院



(2) 引起核酸变性的因素

变性剂
(尿素)



酸碱

有机溶剂
(乙醇)

热

2009年3月

上海交通大学医学院



(3) 变性核酸的特点:

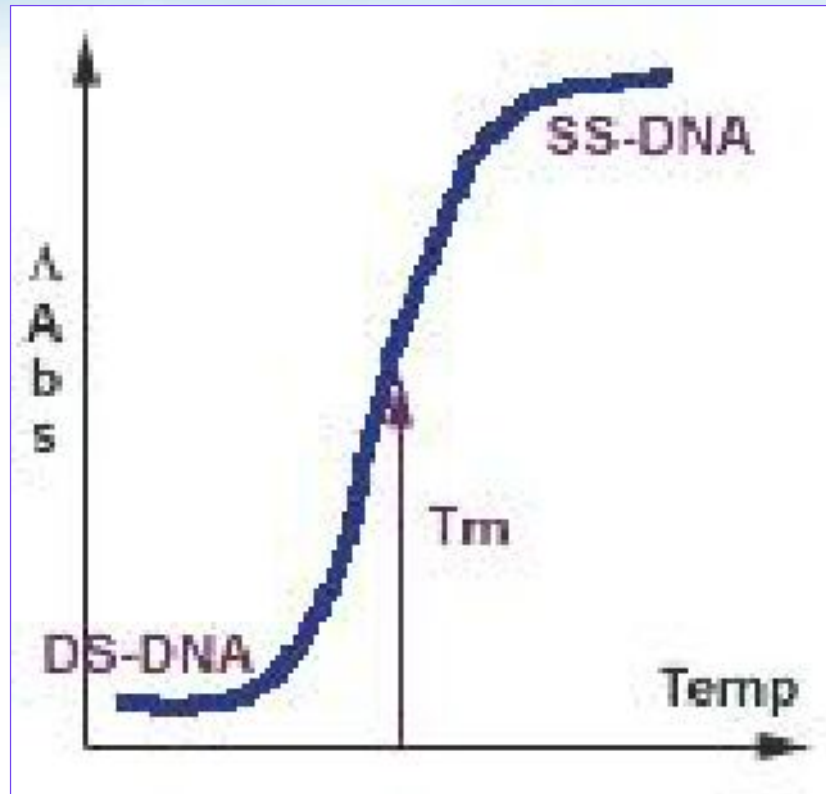
- ▶ 粘度下降
- ▶ 沉降速度增加
- ▶ 浮力上升
- ▶ 紫外吸收增加



2009年3月

上海交通大学医学院

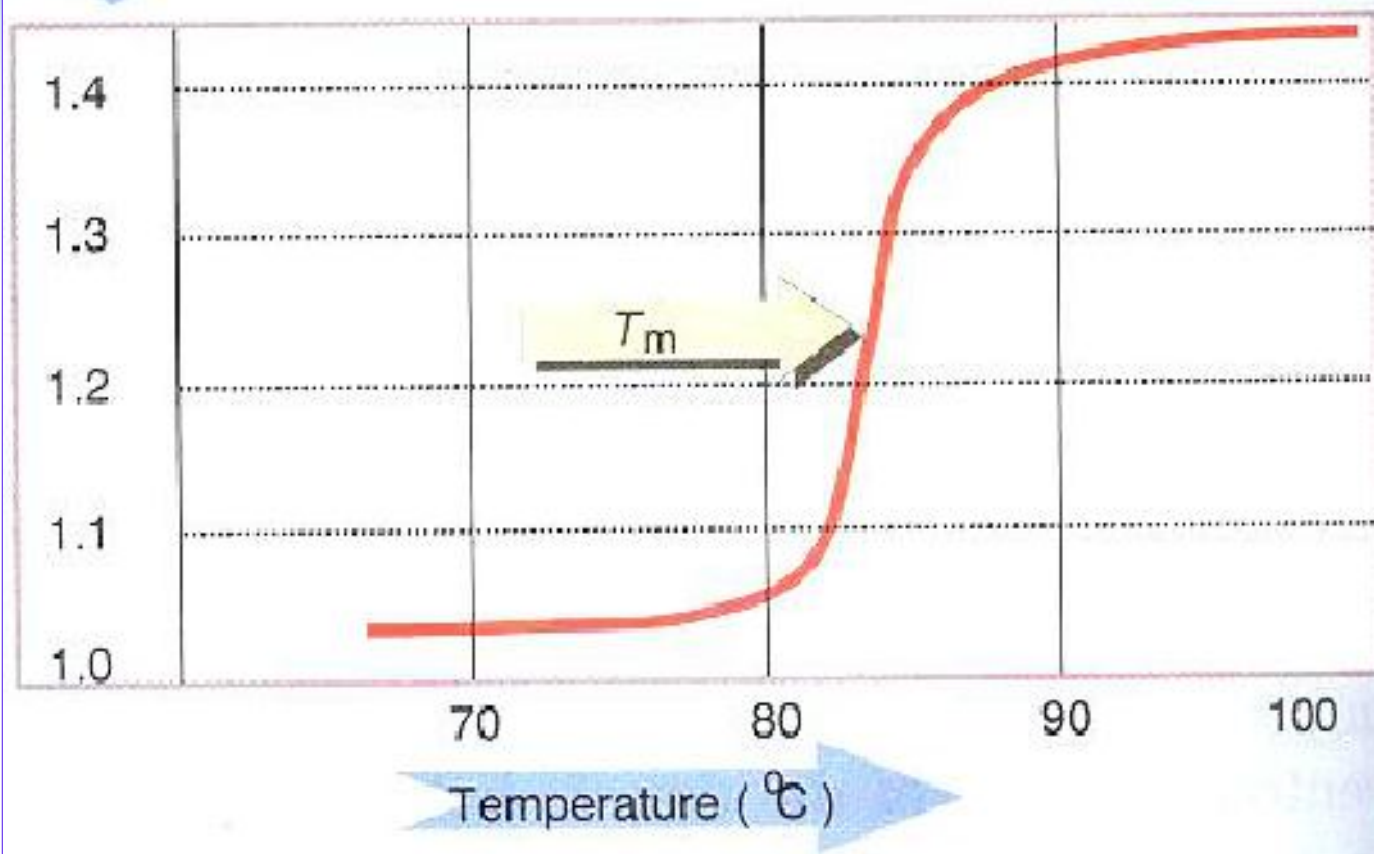
2、融解温度 (Melting temperature, T_m) :
在DNA热变性时, 其A260的升高达最大值一半时的温度。



2009年3月

上海交通大学医学院

Optical density



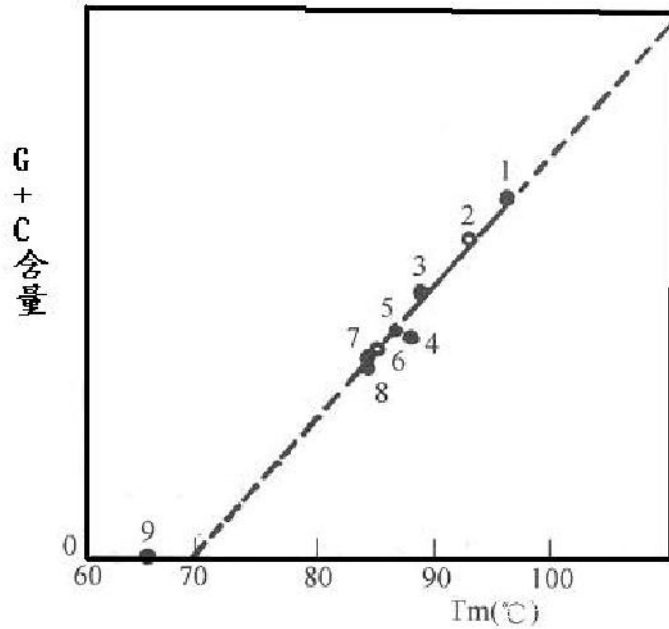


影响 T_m 的因素:

(1) DNA碱基的组成

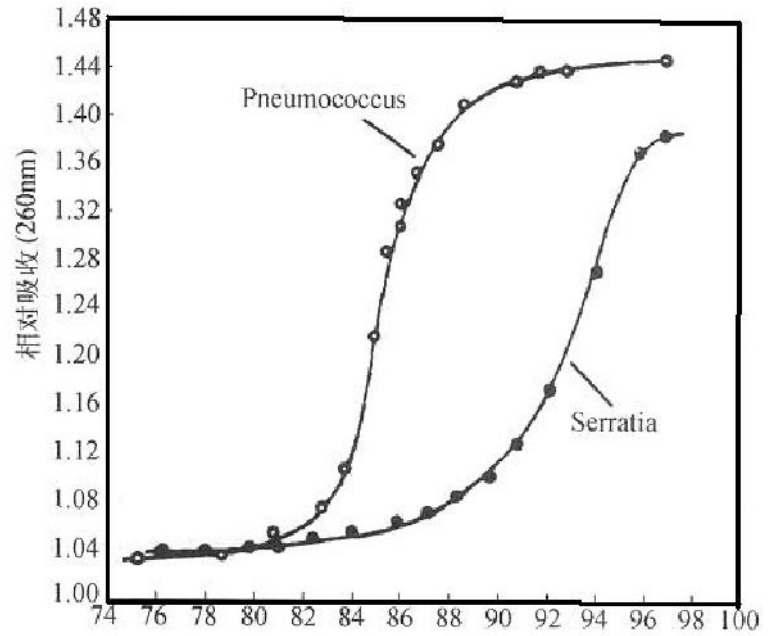
G-C含量越多 T_m 值越高

A-T含量越多 T_m 值越低



DNA的 T_m 值与GC百分含量之间的关系

2009年3月



不同DNA的 T_m 比较

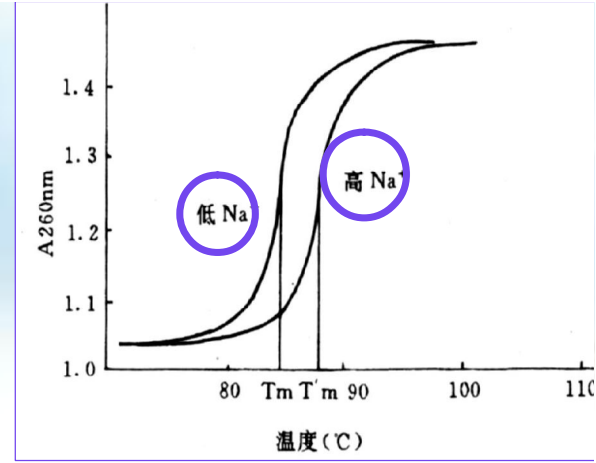
上海交通大学医学院

(2) 溶液的离子强度

(ionic strength)

低离子强度 T_m 值越低

高离子强度 T_m 值越高



(3) pH值

pH值5-9 T_m 值变化不明显

pH < 4 pH > 11 不利于氢键形成

(4) 变性剂 (denaturant)

干扰碱基堆积力和氢键的形成



2009年3月

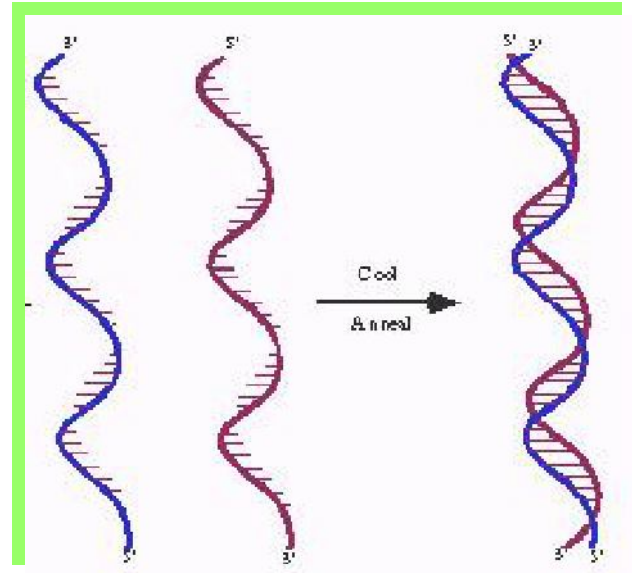
上海交通大学医学院

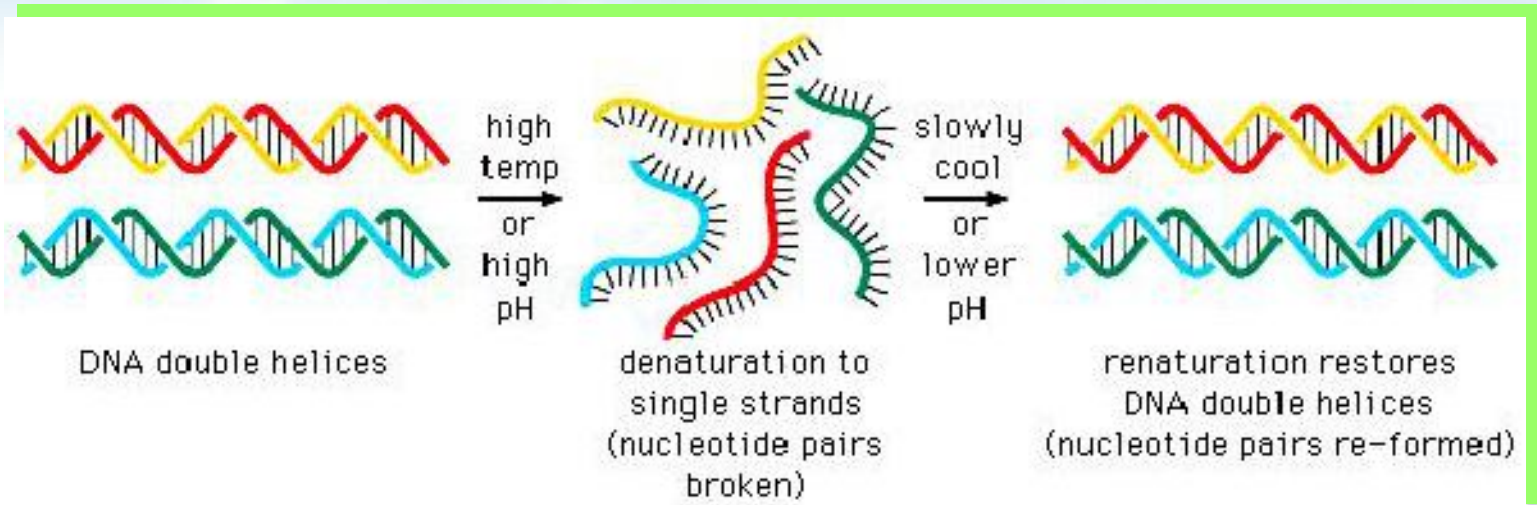
3. 复性(renaturation)

变性DNA经过一定处理重新形成双螺旋的过程。

影响复性速度的因素：

- ▶ DNA浓度
- ▶ DNA片段的大小
- ▶ DNA片段复杂性
- ▶ 合适的复性温度
- ▶ 适当的离子强度





2009年3月

上海交通大学医学院



4. 杂交Hybridization

定义

两条来源不同，但具有互补序列的核酸，按碱基配对原则复性形成一个杂交体，这个过程即杂交，或称分子杂交。

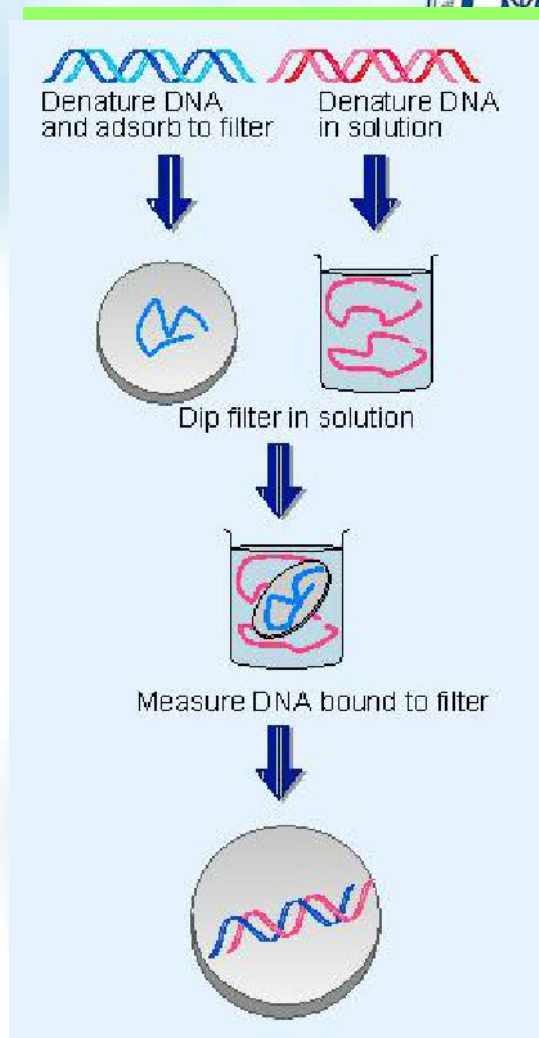
分类

DNA-DNA

DNA-RNA

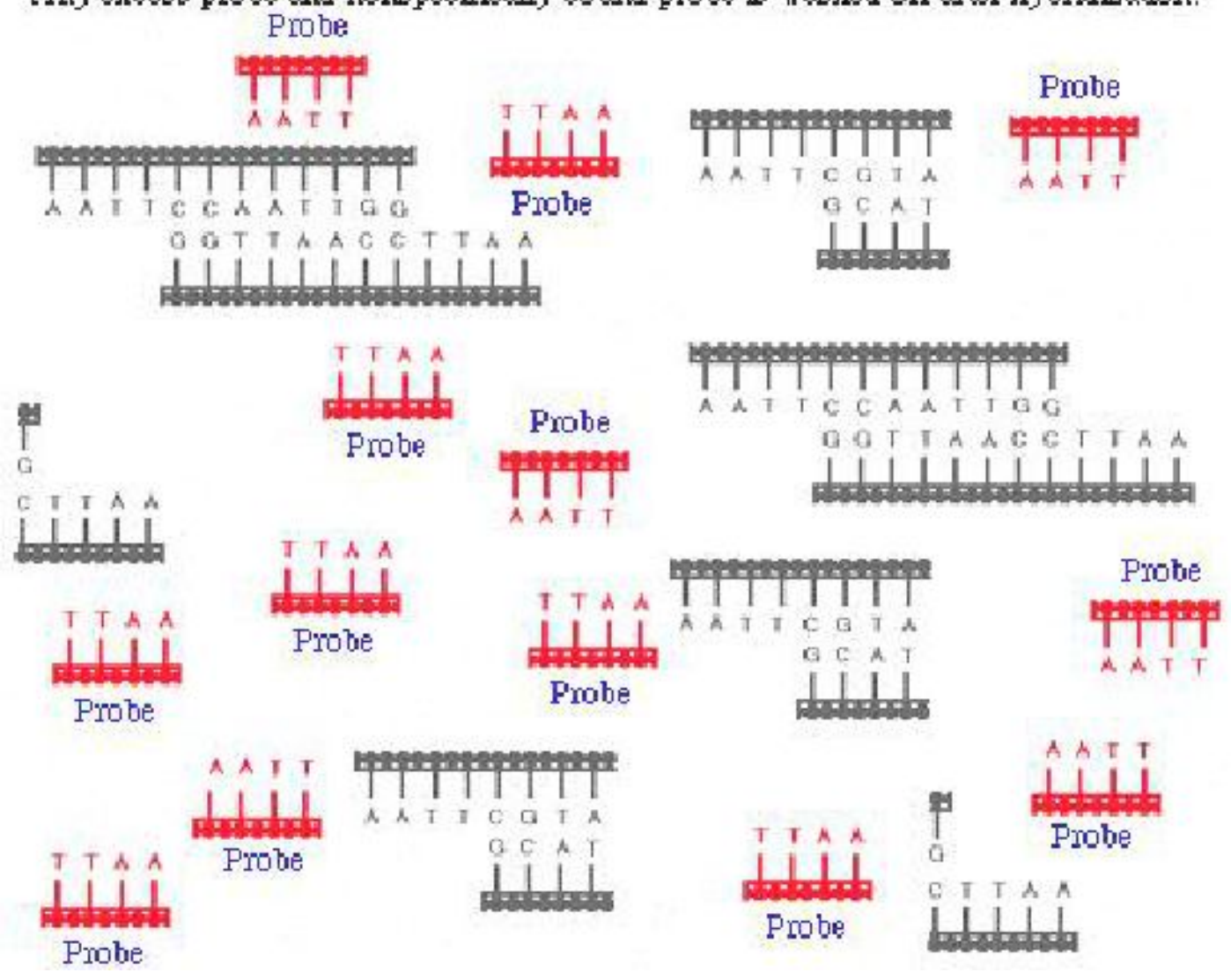
RNA-RNA

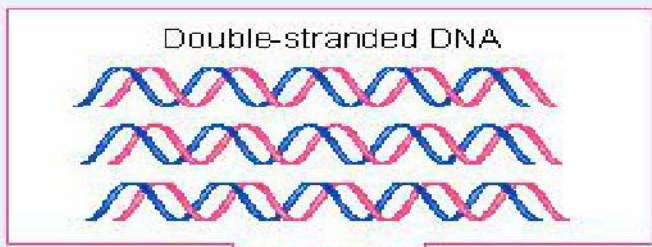
2009年3月



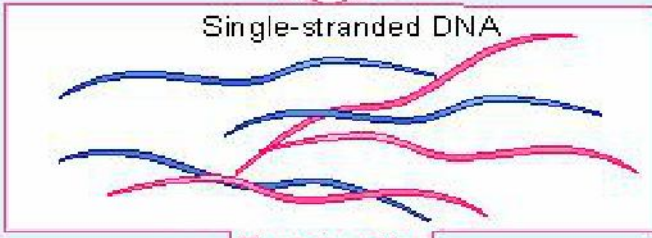
上海交通大学医学院

Probes can be radioactive or fluorescent. The probes find its blotted counterpart. Any excess probe and nonspecifically bound probe is washed off after hybridization.

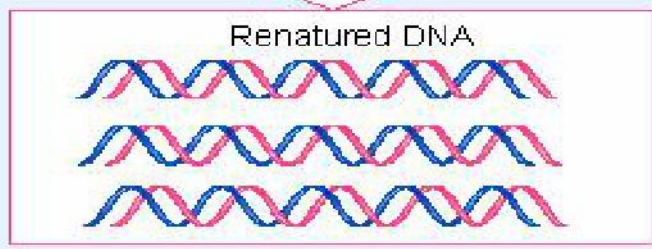
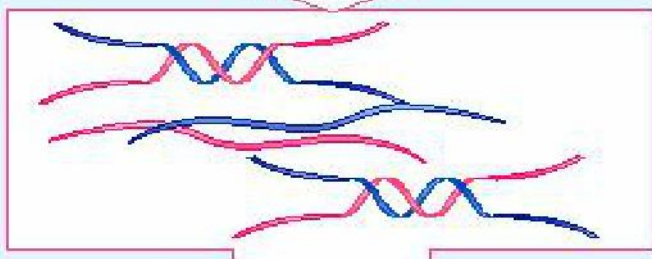




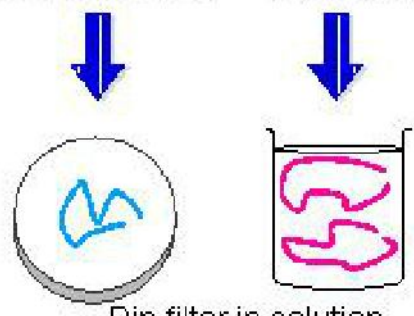
Denaturation



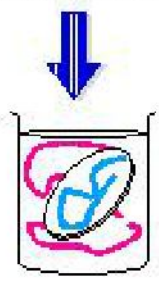
Renaturation



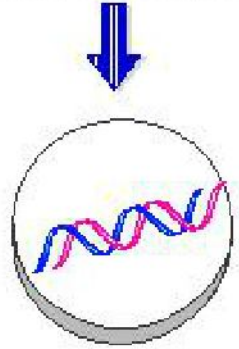
Denature DNA and adsorb to filter Denature DNA in solution



Dip filter in solution



Measure DNA bound to filter





二、核酸探针

(一) 探针的概念

探针 (probe)

指能与特定靶分子发生特异性相互作用，并能被特殊方法所检测的分子。

抗原-抗体、生物素-亲和素等均可看成是探针与靶分子的相互作用。

基因探针

指能与特定核苷酸序列发生特异互补杂交，杂交后又能被特殊方法检测的已知被标记（同位素或非同位素标记）的核苷酸链。

2009年3月

上海交通大学医学院



(二) 探针种类和选择

1. 探针种类

(1) 基因组DNA探针

为某一基因的全部或部分序列，或某一非编码序列。

(2) cDNA

以mRNA为模板经逆转录酶催化产生的互补于mRNA的DNA链。

(3) RNA探针

以DNA两条链中的任意一条为模板转录生成RNA。具有高杂交效率，但易于降解和标记方法复杂。

2009年3月

上海交通大学医学院



2. 探针的选择

高度特异性，一般探针越长，杂交作用越强，其专一性也越强。



2009年3月

上海交通大学医学院



三、探针标记原理与方法

理想的探针标记物应具备

- 高度的敏感性
- 标记物与探针结合后，不影响杂交时碱基配对及探针分子的主要理化性质；
- 检测方法除有高灵敏性、高特异性、假阳性率低外，尚需考虑环境污染少，价格低；
- 若用酶促方法标记，应对酶的 K_m 值影响不大，以保证标记反应的效率和标记产物的比活性。

2009年3月

上海交通大学医学院



(一)、标记物

放射性核素标记物

非放射核素标记物



2009年3月

上海交通大学医学院



1.放射性核素

特点:

放射自显影技术检测,信号的强弱通过计数银粒的多少易于进行定量分析。

主要缺点

射线对人体有伤害

放射性物质需特殊的处理

半衰期短不宜存放使用



2009年3月

上海交通大学医学院

2. 非放射性标记物

常用的有地高辛 (digoxigenin, Dig)、生物素 (biotin)、荧光素。

特点:

敏感性不如同位素标记

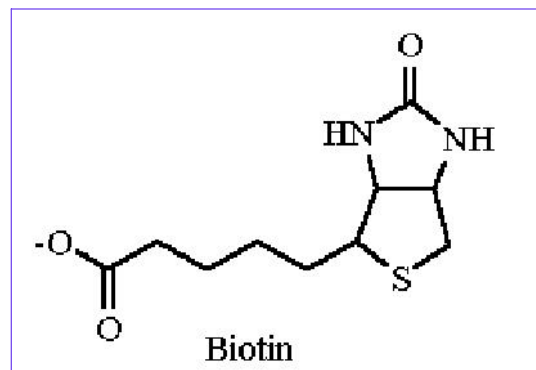
稳定性和分辨率高

检测时间短

操作简便

不需特殊的防护设备

不存在放射性污染





(二) 放射性核素标记法

探针标记法

酶反应法

化学反应法

常用标记探针的核素

^{32}P

^3H

^{35}S

^{131}I

^{125}I

^{14}C



2009年3月

上海交通大学医学院



全程标记

1. 随机引物法 (random priming)

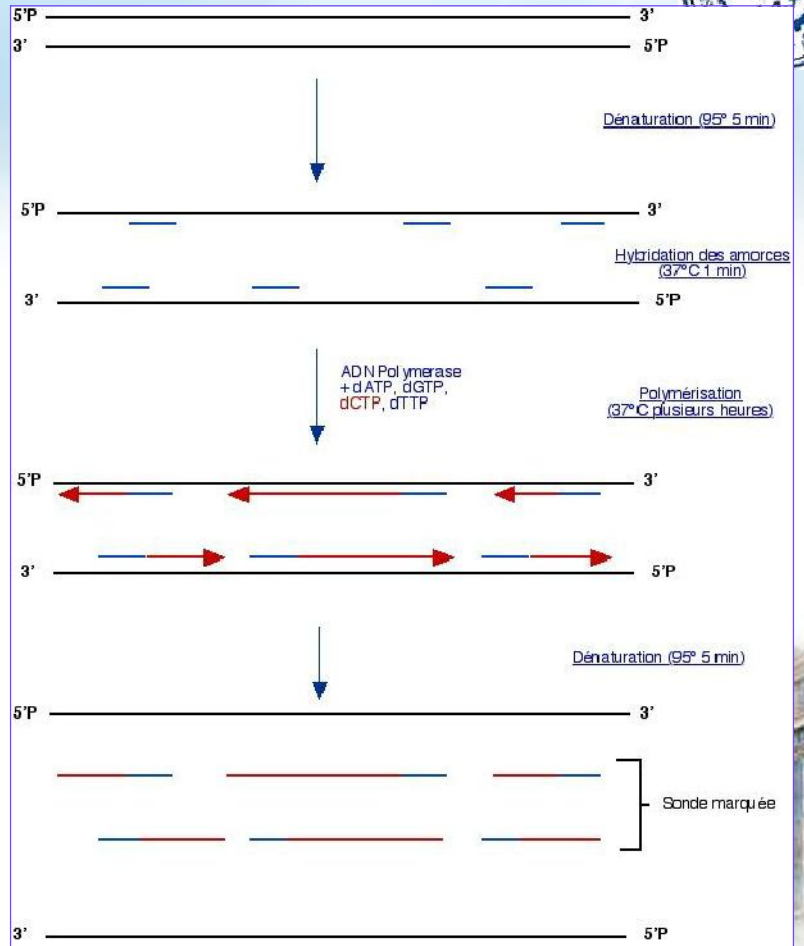
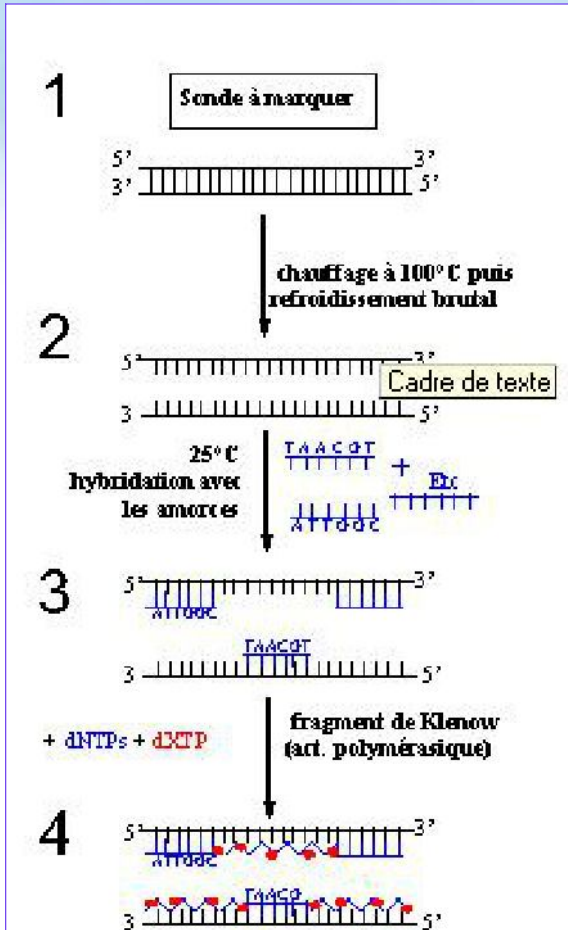
利用DNA聚合酶来合成与模板互补的新的DNA链。

将6-8寡核苷酸片段与已变性的DNA单链或RNA模板退火，使该片段随机互补结合在单链分子上，在大肠杆菌DNA聚合酶I Klenow片段作用下，以同位素标记的dNTP为原料，寡核苷酸为引物的3'-OH端开始沿5'至3'方向，合成一条与模板互补的新DNA链。



2009年3月

上海交通大学医学院



2009年3月

上海交通大学医学院



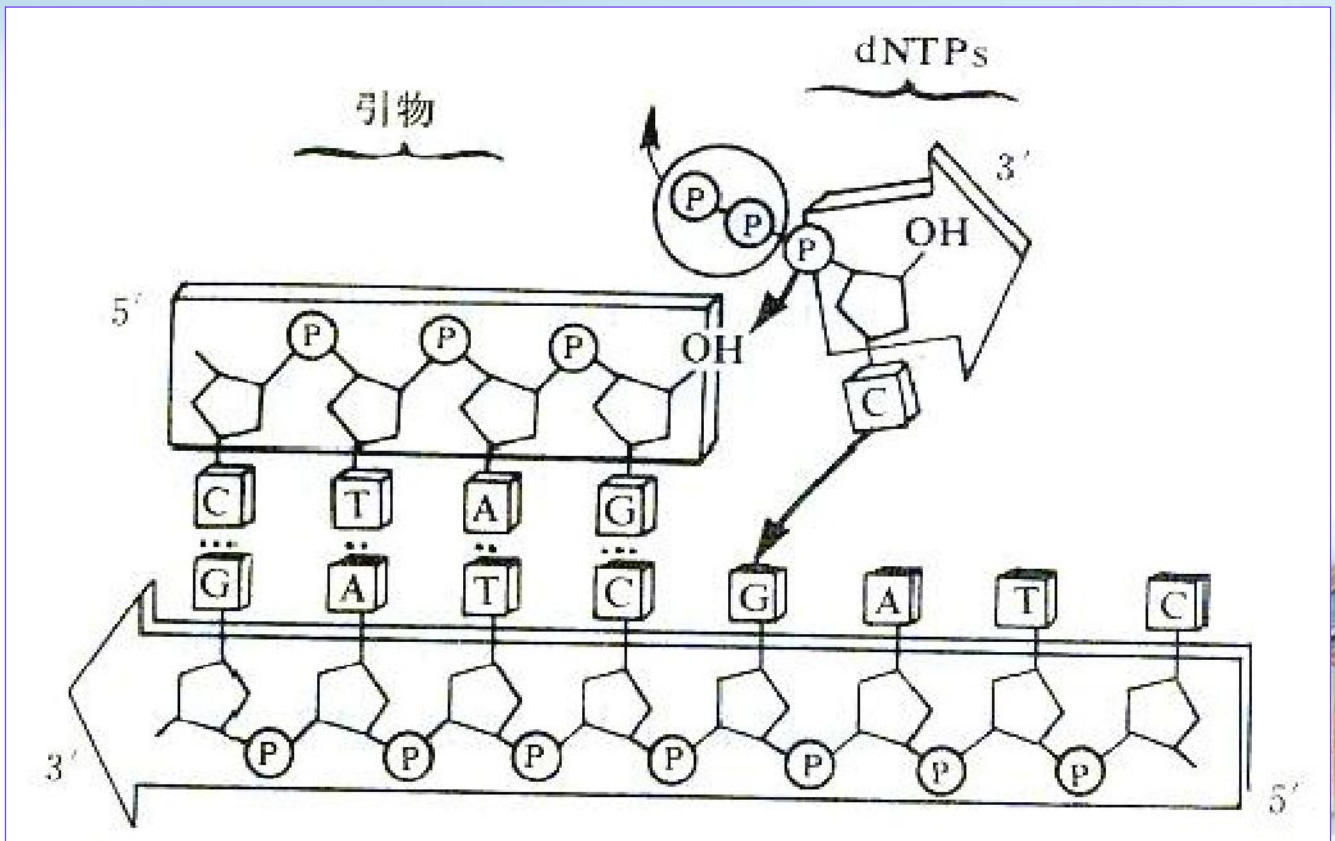
2. 切口平移法

- ◆ 胰DNA酶I在DNA双链上随机切开若干切口，切口处形成3'-OH末端。
- ◆ 大肠杆菌DNA聚合酶I以切口处开始作用，以另一条DNA链为模板。
- ◆ 4种三磷酸脱氧核苷酸为原料，沿切口水解5'端核苷酸和3'端修复加入标记核苷酸同时进行，切口平行推移。

生成的两条链都被核素均匀标记。

大肠杆菌DNA聚合酶I

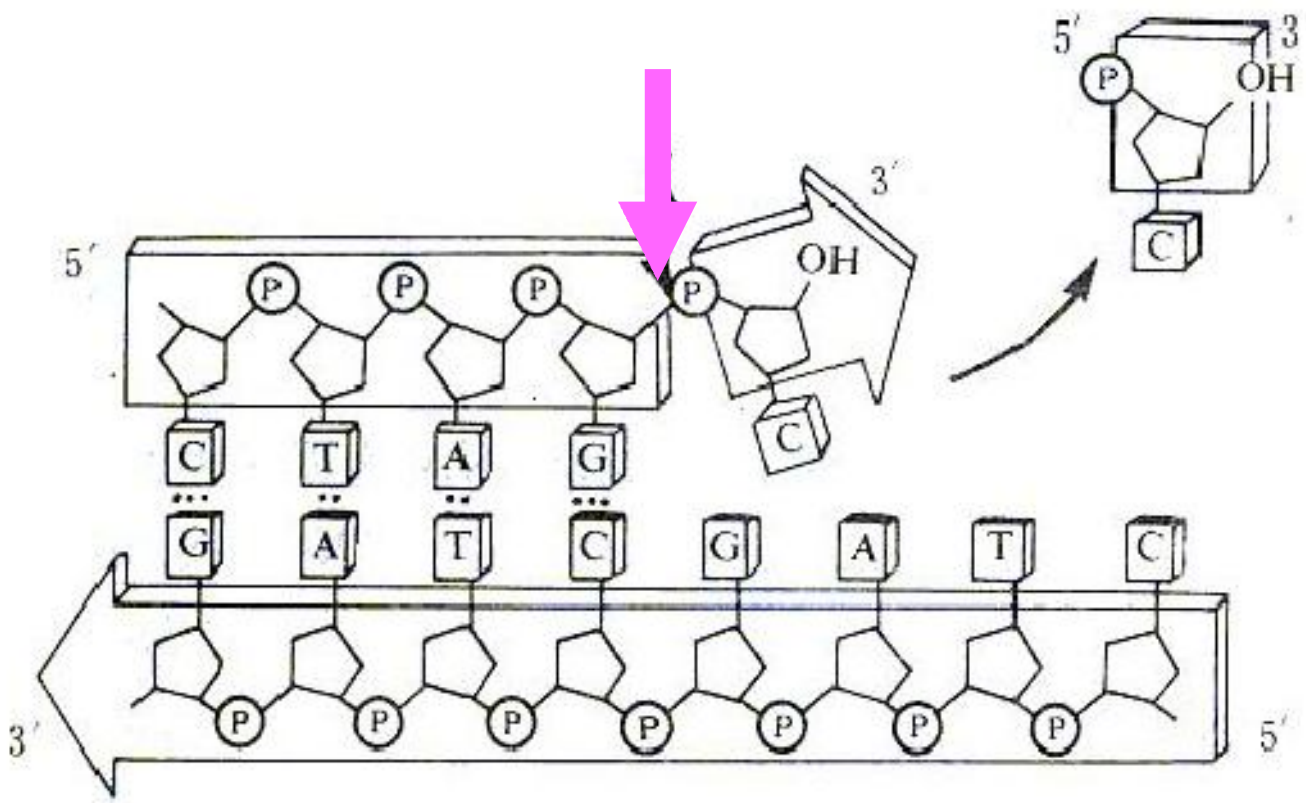
(1) 5'—3'聚合酶活性



2009年3月

上海交通大学医学院

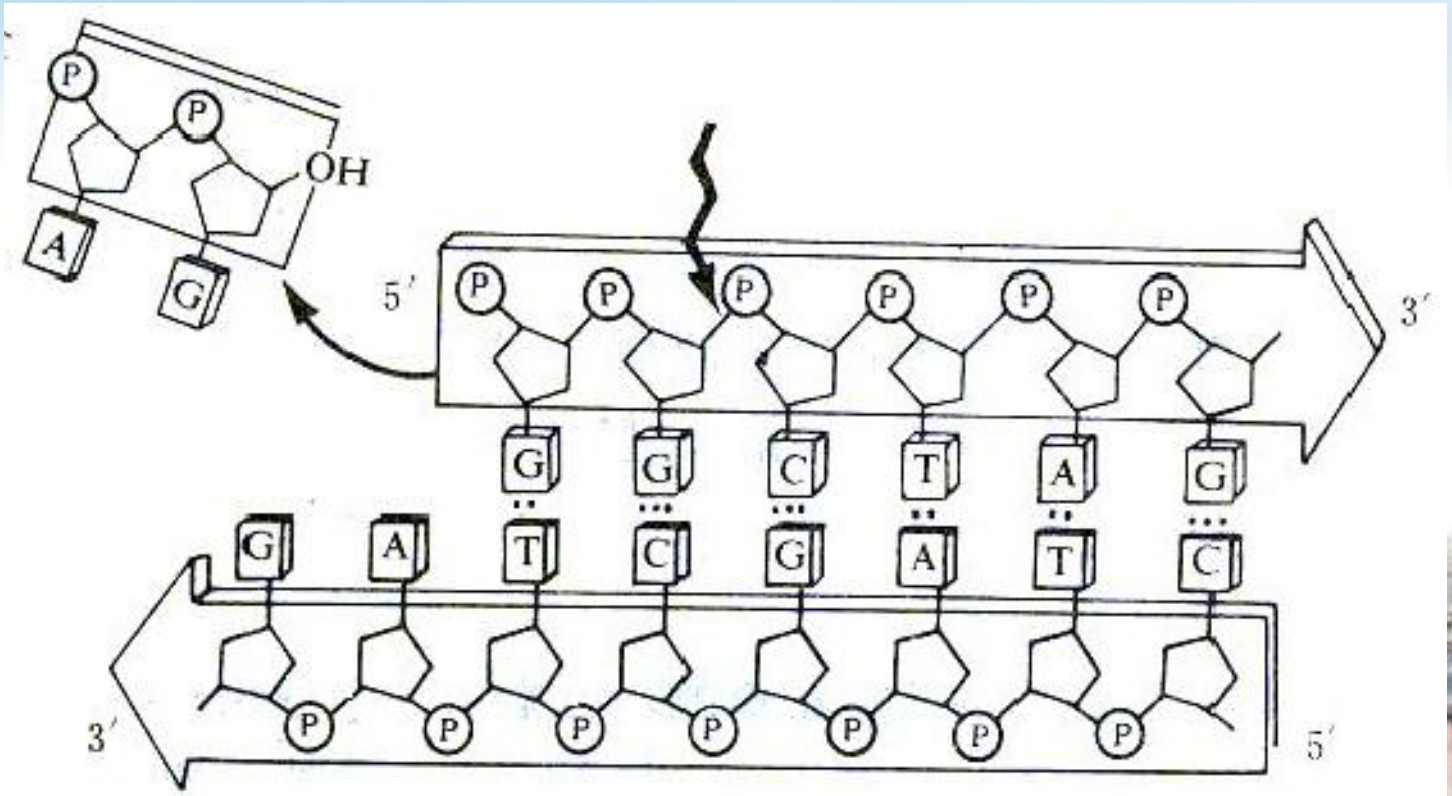
(2) 3'—5'外切酶活性



2009年3月

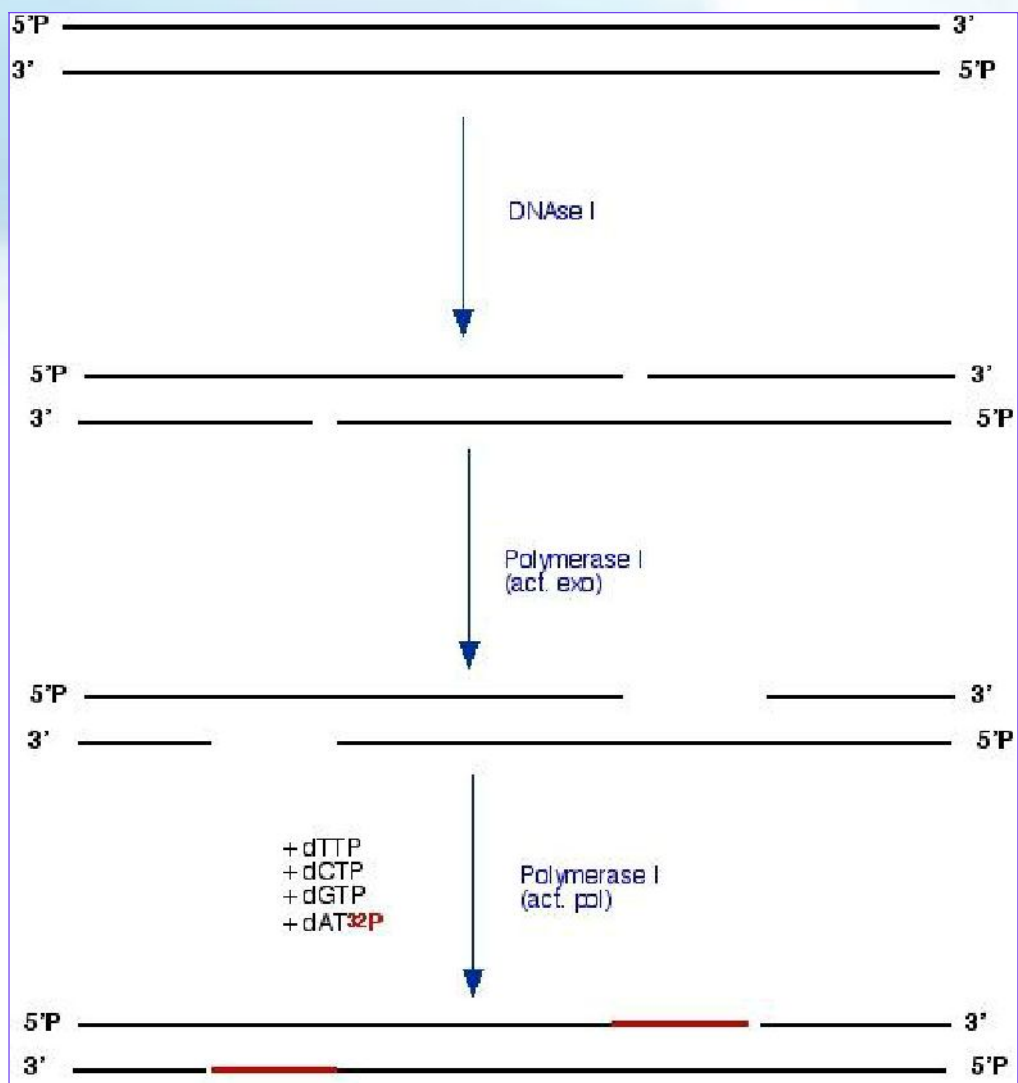
上海交通大学医学院

(3) 5' → 3' 外切酶活性



2009年3月

上海交通大学医学院



2009年3月

上海交通大学医学院



3、全程RNA探针标记

4、化学法全程标记



2009年3月

上海交通大学医学院



末端标记法

末端标记法是将标记物导入线型DNA或RNA的5'端或3'端的一类标记法。

5'端标记法

3'端标记法



2009年3月

上海交通大学医学院



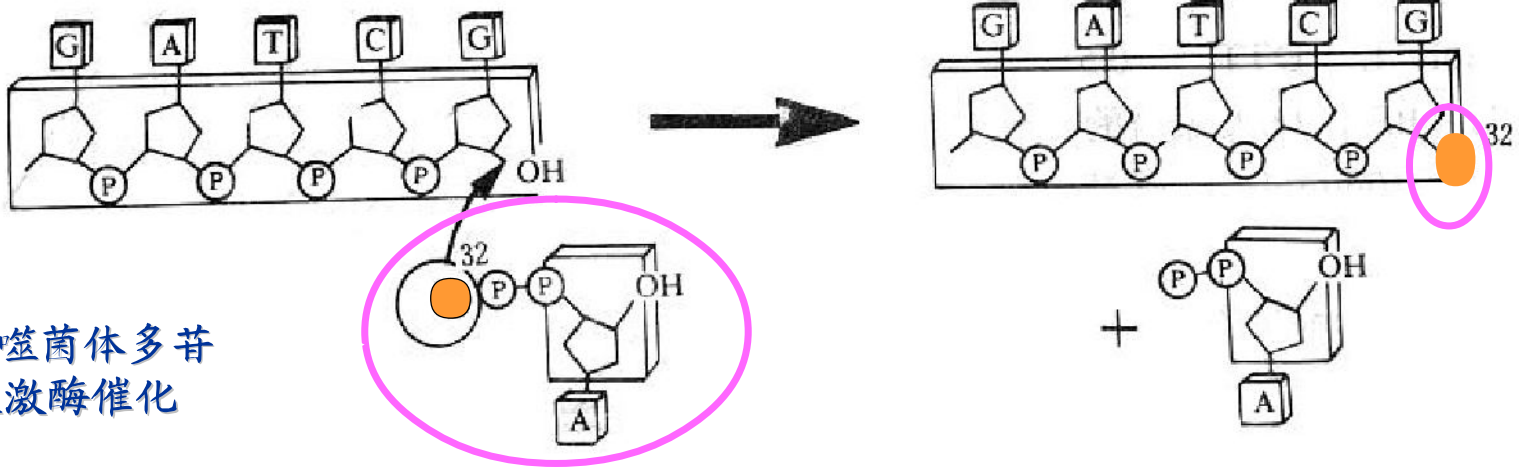
(1) 5'端标记法 (T_4 噬菌体多苷酸激酶)

用碱性磷酸酶切除DNA双链分子或RNA单链5'末端的磷酸基团,使其成为5'-OH,然后在(γ - ^{32}P) ATP存在下,经 T_4 噬菌体多苷酸激酶催化,将 γ 位上的 ^{32}P 转移到DNA或RNA分子的5'-OH末端,使DNA片段或RNA或寡核苷酸5'端均带 ^{32}P 标记。



2009年3月

上海交通大学医学院



T₄噬菌体多核苷酸激酶催化



2009年3月

上海交通大学医学院



(2) 3'端标记法 (大肠杆菌DNA聚合酶I Klenow片段)

大肠杆菌DNA聚合酶I Klenow片段有5'→3'DNA聚合酶

微弱的3'→5'外切酶活性

无5'→3'外切酶活性

对残缺3'末端可进行标记



2009年3月

上海交通大学医学院



35kD

76kD



5' → 3' 外切酶

5' → 3' 聚合酶

3' → 5' 外切酶

DNA 聚合酶 I 全酶



苦草杆菌蛋白酶裂解全酶



5' → 3' 聚合酶

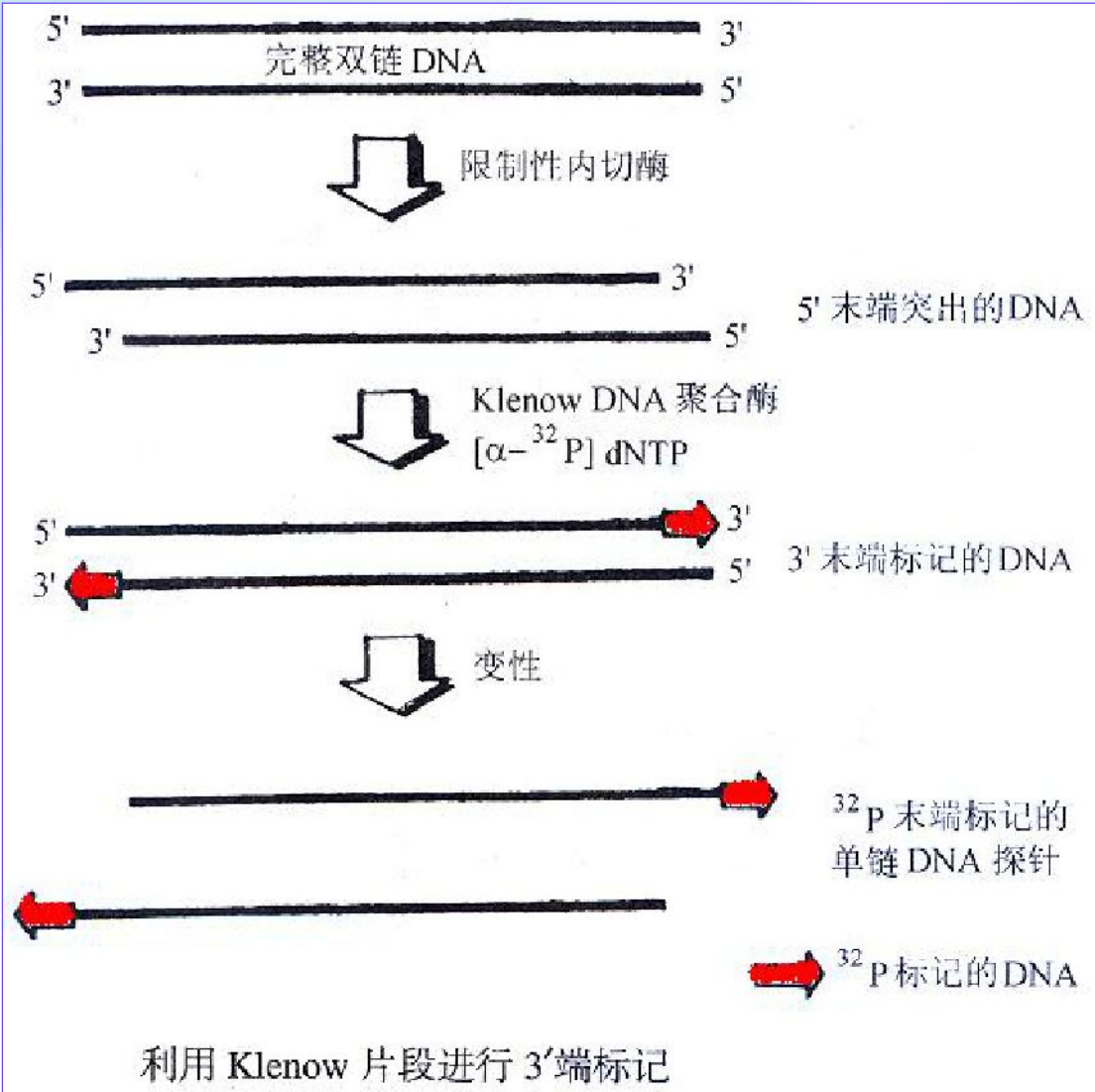
3' → 5' 外切酶

Klenow 片段



2009年3月

上海交通大学医学院



2009年5月

学医学院



四、杂交与杂交后检测

(一) 核酸分子与固相介质的结合

1. 支持介质的类型和性质

硝酸纤维薄膜:

本底低, 易检测杂交信号对小于500碱基的核酸结合力低, 脆性大易破裂。

尼龙膜和带电荷的尼龙膜:

耐用, 结合力强, 但其本底高。



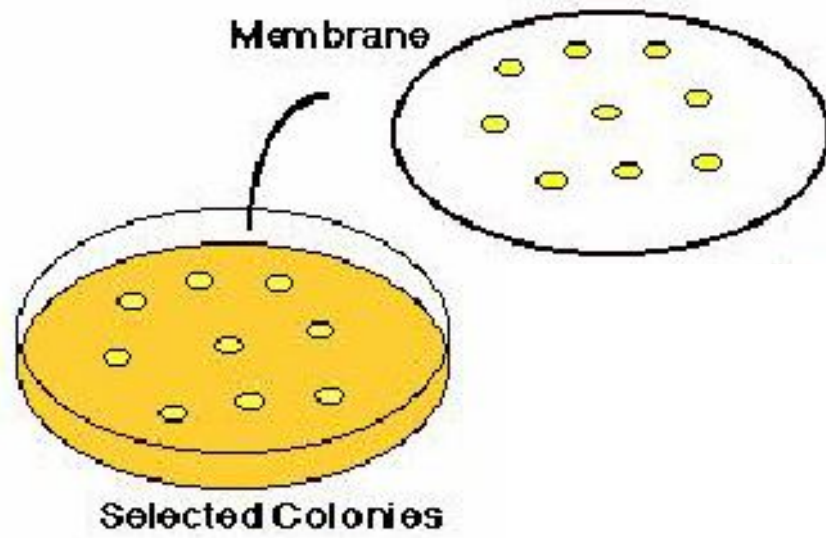
2009年3月

上海交通大学医学院



(二) 核酸分子的转移

1. 噬菌体/克隆的转移

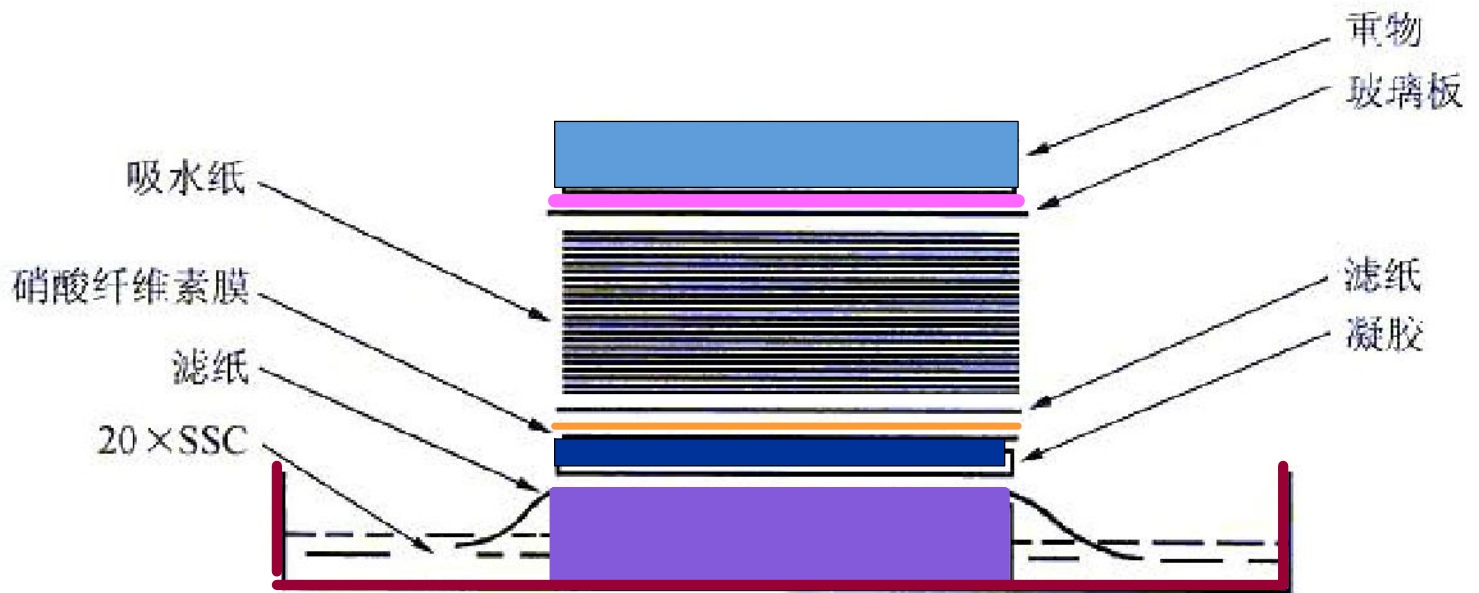


2009年3月

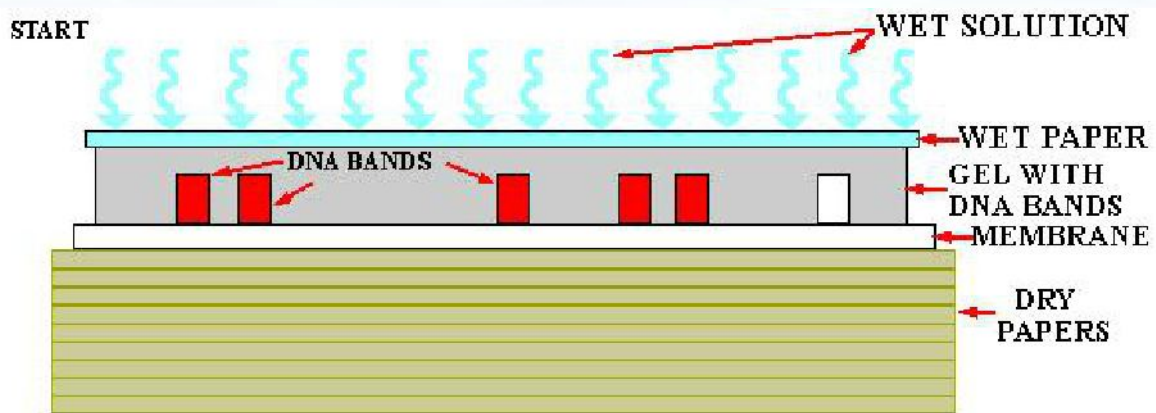
上海交通大学医学院

2、从凝胶上转移DNA

- ❖ (1) 毛细转移
- ❖ (2) 真空转移
- ❖ (3) 电转移

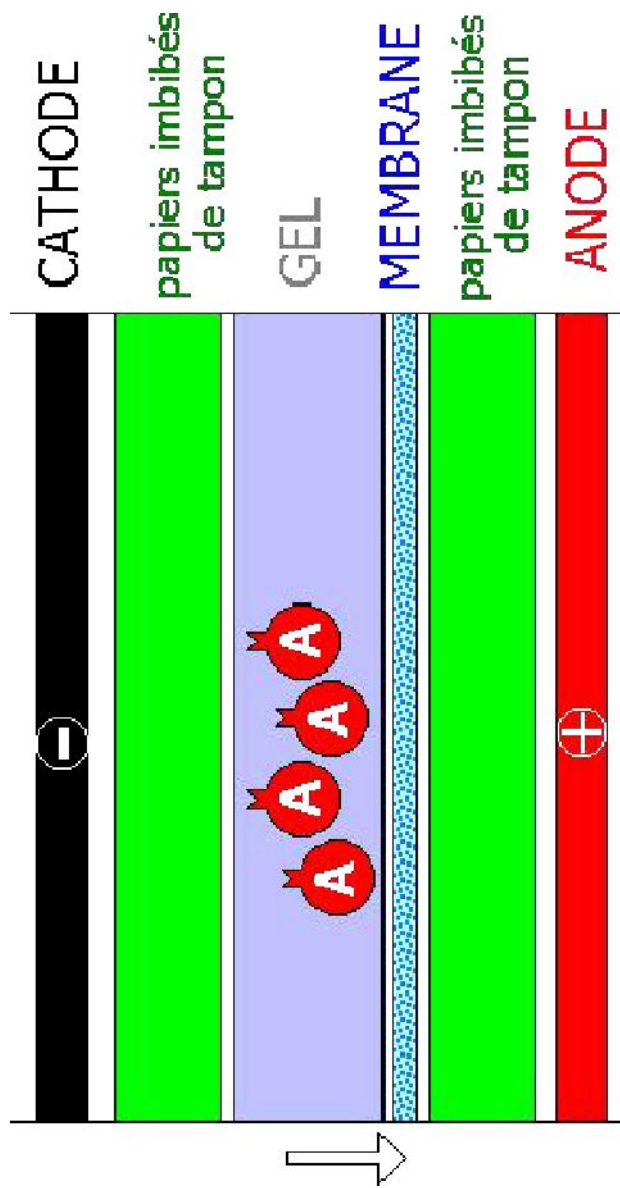


Southern 印迹示意图



2009年3月

上海交通大学医学院



上海交通大学医学院



(三) 核酸的固定

❖ 1、烘烤

80°C 2小时

❖ 2、紫外光固定

❖ 3、碱固定



2009年3月

上海交通大学医学院



(四) 杂交

❖ 1. 预杂交

(1) 目的：减少非特异性杂交

(2) 成分：

去污剂：1%SDS（可促进溶液对薄膜的覆盖，可抑制RNase酶活性）

封闭剂：Denhard氏溶液



2009年3月

上海交通大学医学院



2. 杂交

❖ 影响杂交的因素

(1) 影响长探针杂交的因素

1) 影响杂交速率和杂化分子稳定性的因素

- ◇ 核酸分子浓度与杂交速率
- ◇ 高浓度双链探针的杂交
- ◇ 碱基组成：探针的 T_m 高，杂交速率快
- ◇ 盐浓度：离子强度与杂交速率成正比；与杂交稳定性也成正比。
- ◇ 温度：与杂交速率成正比。
- ◇ 甲醛：可降低 T_m 值。
- ◇ 错配的核酸序列：错配降低杂交速率。
- ◇ 杂交的加速剂

2009年3月

上海交通大学医学院



影响长探针杂交的因素

- ❖ 2) 酶联探针
- ❖ 3) 杂交反应体积
- ❖ 4) 杂交时间



2009年3月

上海交通大学医学院



3. 洗脱

❖ 除去溶液

未反应的探针

与滤膜疏松结合的探针

非特异性结合的探针



2009年3月

上海交通大学医学院



(五) 杂交信号的检测

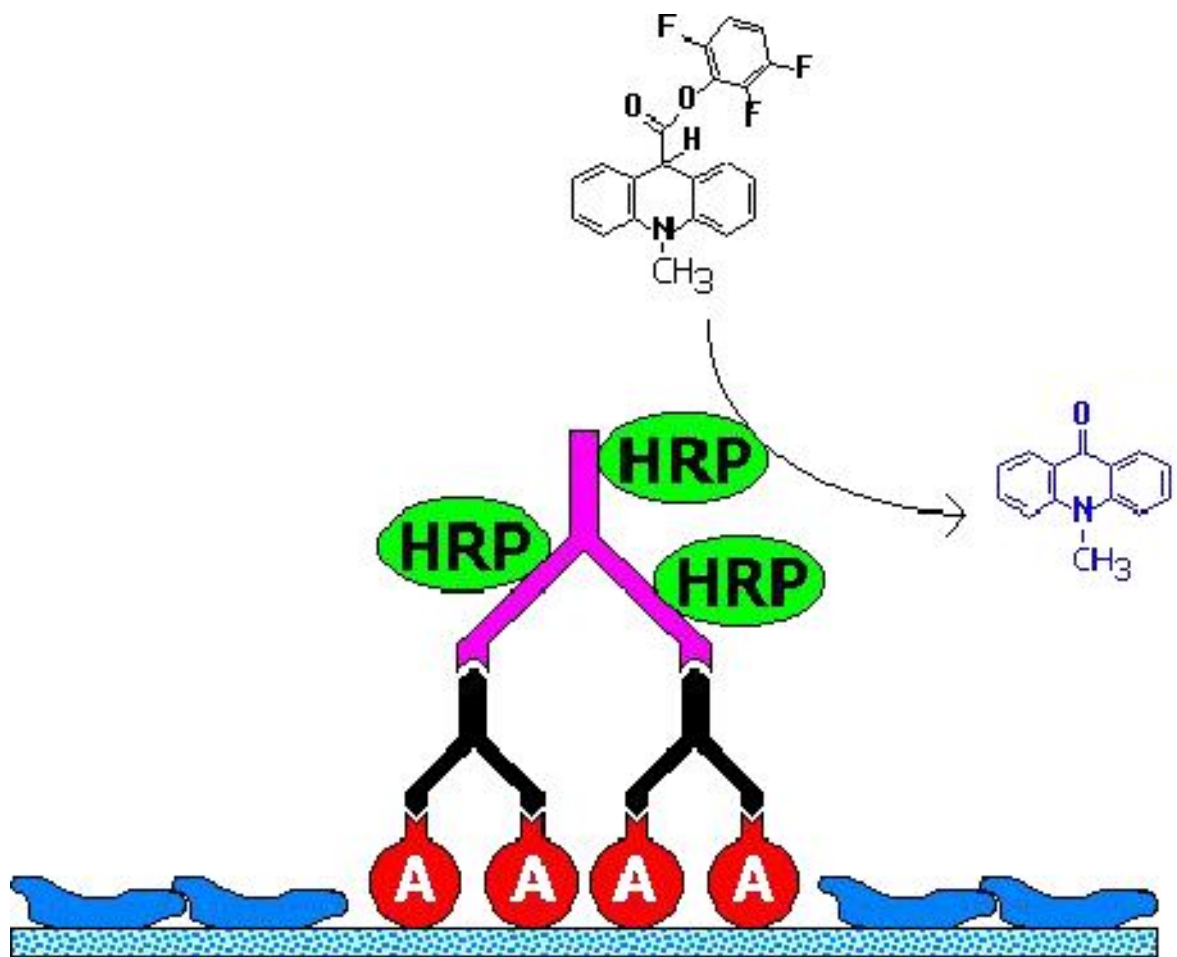
❖ 放射自显影

❖ 非放射性杂化分子的检测



2009年3月

上海交通大学医学院



2009年3月

上海交通大学医学院



五、分子杂交技术

液相杂交、固相杂交、原位杂交、基因芯片

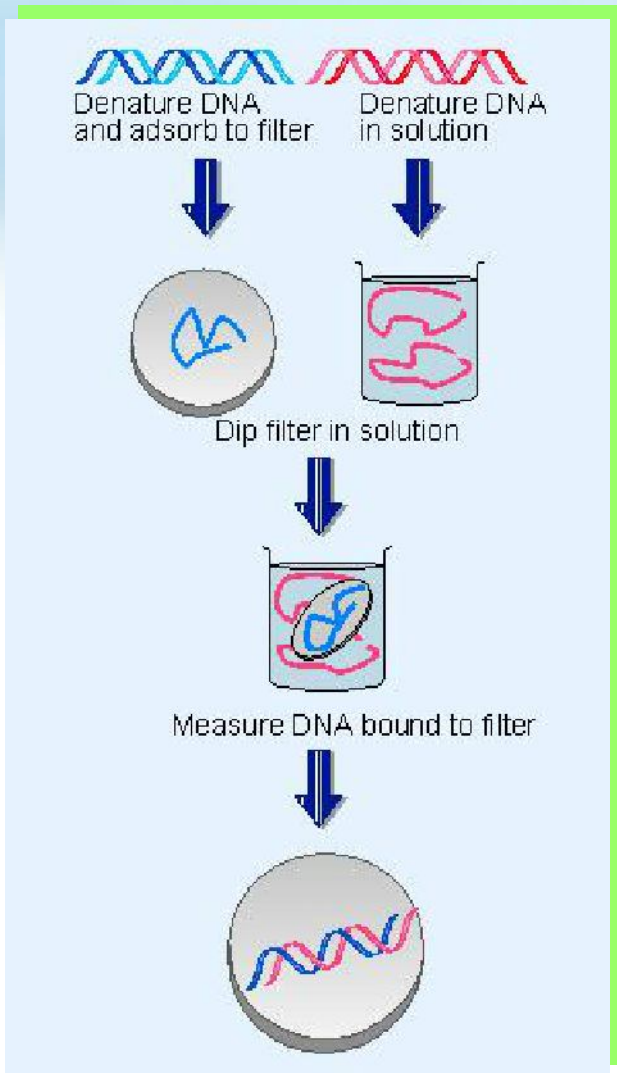
(一) 液相分子杂交

将参与液相杂交的两条核酸链都游离在溶液中，在一定条件下（溶液的离子强度、温度、时间等）进行杂交，然后再将未杂交的探针除去，即得到杂交后的核酸分子。

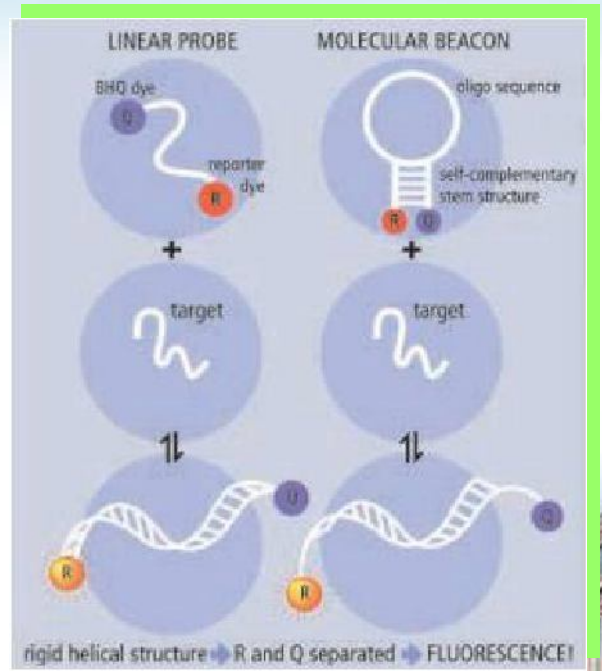


2009年3月

上海交通大学医学院



2009年3月



上海交通大学医学院



(二) 固相分子杂交

将待测的靶核苷酸链预先固定在固体支持物上，而标记的探针则游离在溶液中，进行杂交反应后，使杂交分子留在支持物上，故称固相杂交。其可通过漂洗能将未杂交的游离探针除去，留在膜上的杂交分子容易被检测，能防止靶DNA的自我复性，故被广泛应用。

2009年3月

上海交通大学医学院





1、菌落杂交

用于重组细菌克隆筛选的固相杂交。

主要步骤：

菌落平板培养

滤膜灭菌后放到细菌平板上

菌落粘到滤膜上

滤膜放到杂交液中

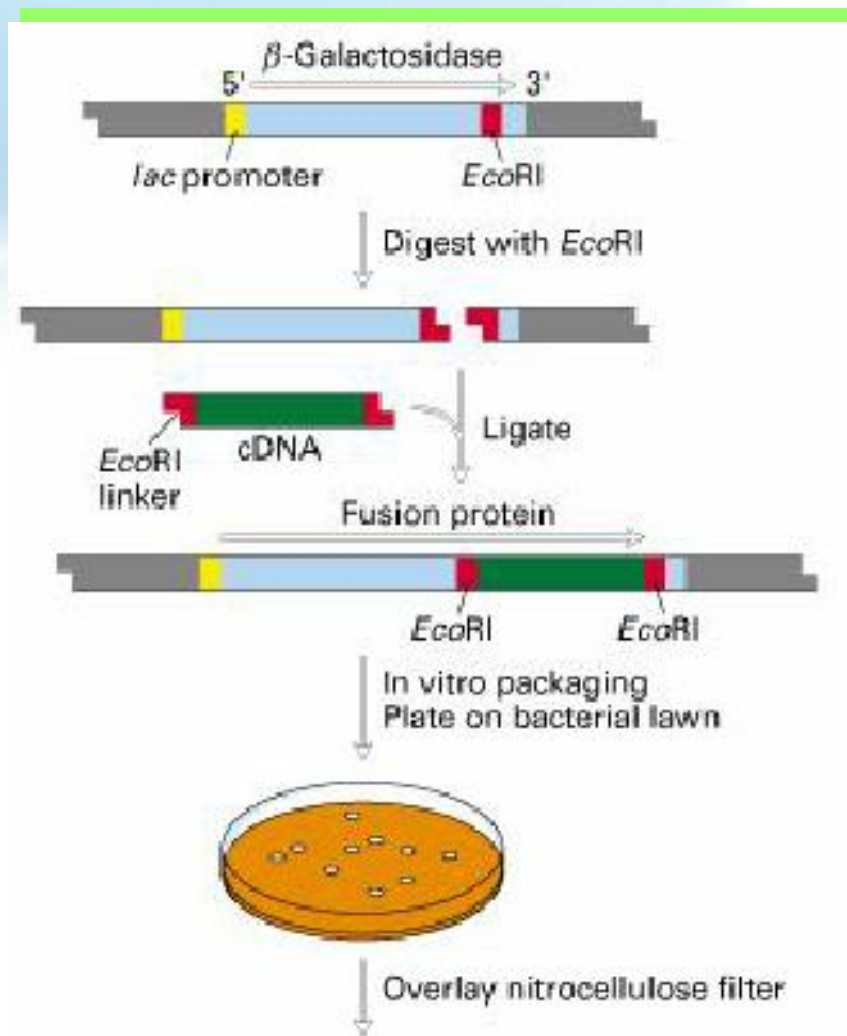
探针杂交

检测



2009年3月

上海交通大学医学院



2009年3月

上海交通大学医学院





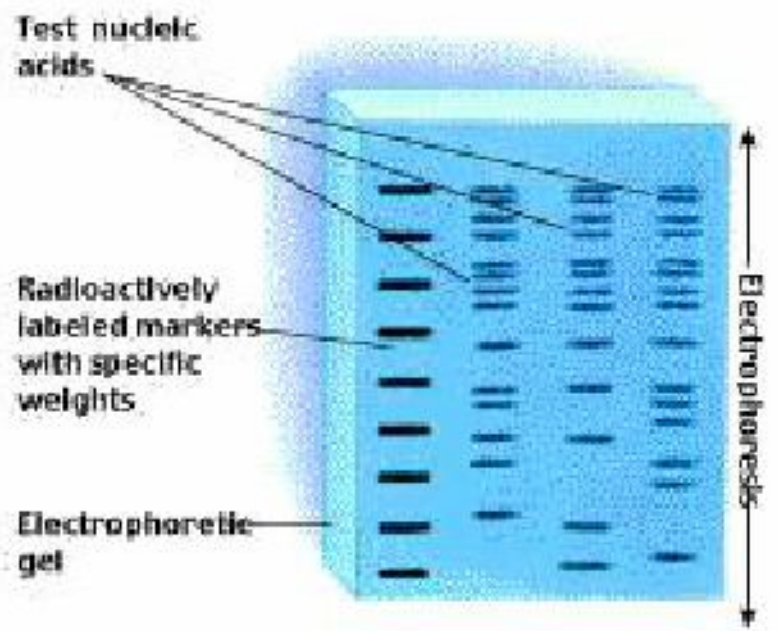
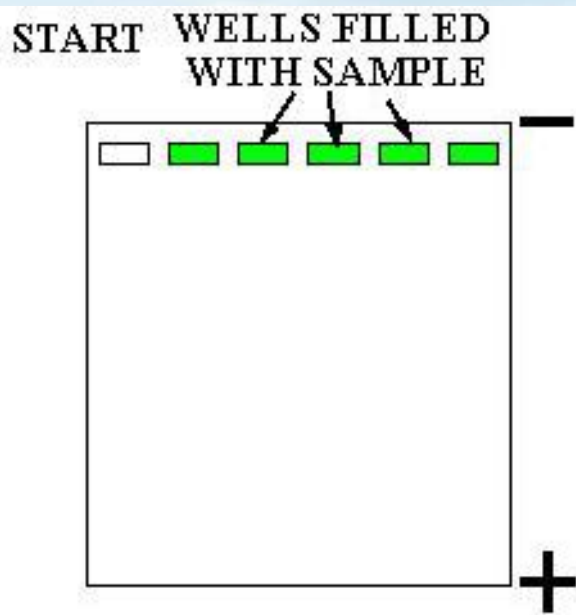
2. Southern印迹杂交

膜上检测DNA的杂交技术，1975年由Edwin Southern建立。利用这一技术可进行克隆基因DNA的酶切图谱分析，基因组中某一基因的定性分析与定量分析、基因点突变及限制性片段长度多态性分析等。



2009年3月

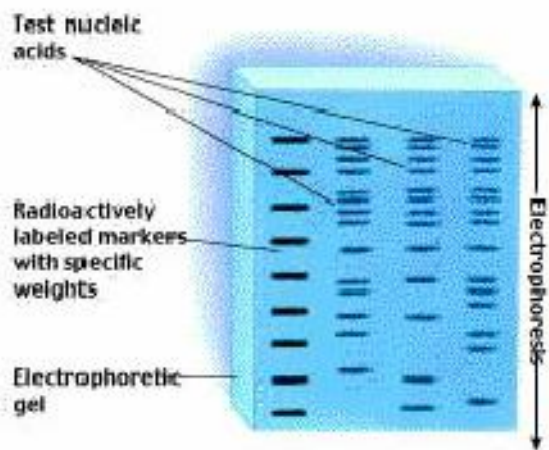
上海交通大学医学院



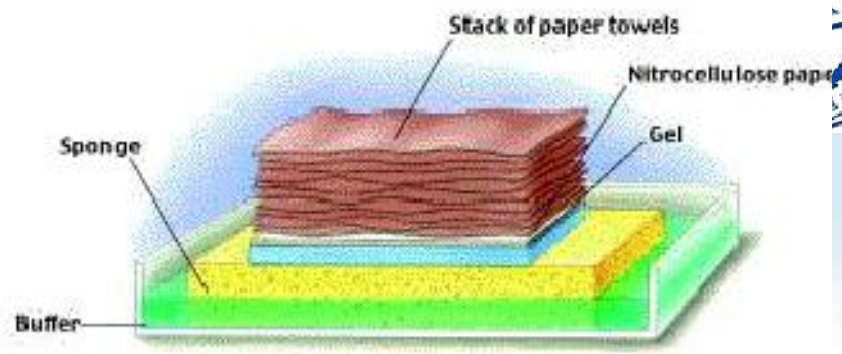
1. Electrophoresis is performed, using radioactively labeled markers as a size guide in the first lane.

2009年3月

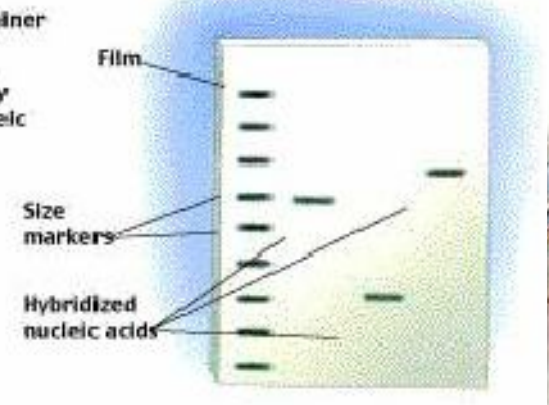
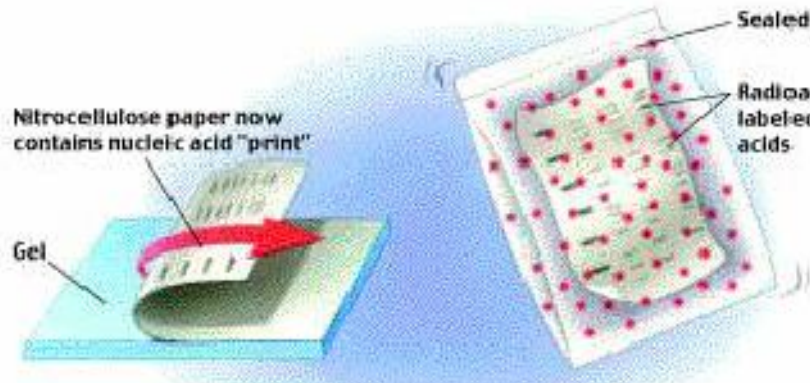
上海交通大学医学院



1. Electrophoresis is performed, using radioactively labeled markers as a size guide in the first lane.

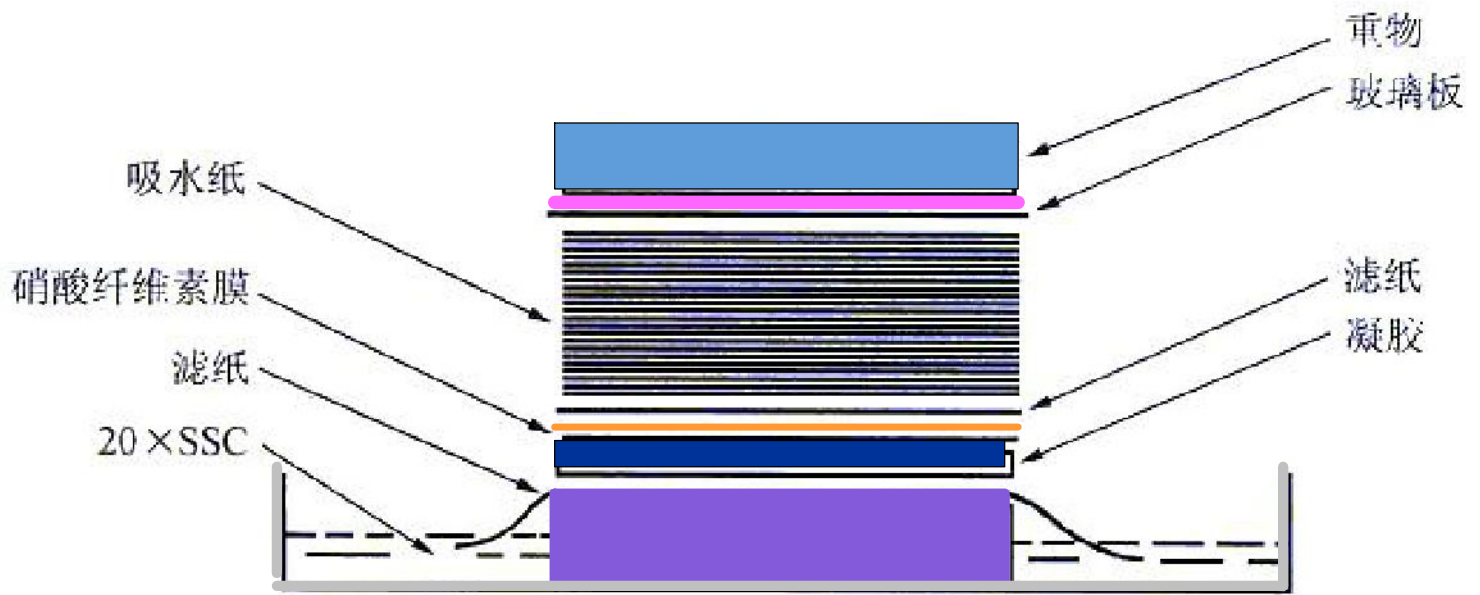


2. The gel is covered with a sheet of nitrocellulose and placed in a tray of buffer on top of a sponge. Alkaline chemicals in the buffer denature the DNA into single strands. The buffer wicks its way up through the gel and nitrocellulose into a stack of paper towels placed on top of the nitrocellulose.



2009年3月

上海交通大学医学院



Southern 印迹示意图



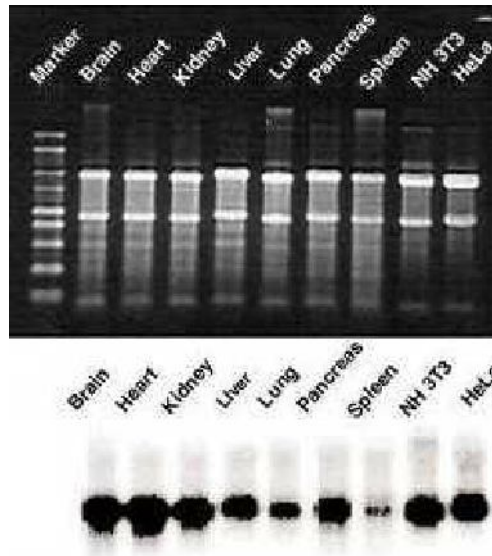
2009年3月

上海交通大学医学院



3. Northern印迹杂交

应用DNA探针检测特异mRNA的一种杂交技术，主要用于分析mRNA的转录或mRNA分子大小，其方法类似于Southern印迹杂交。

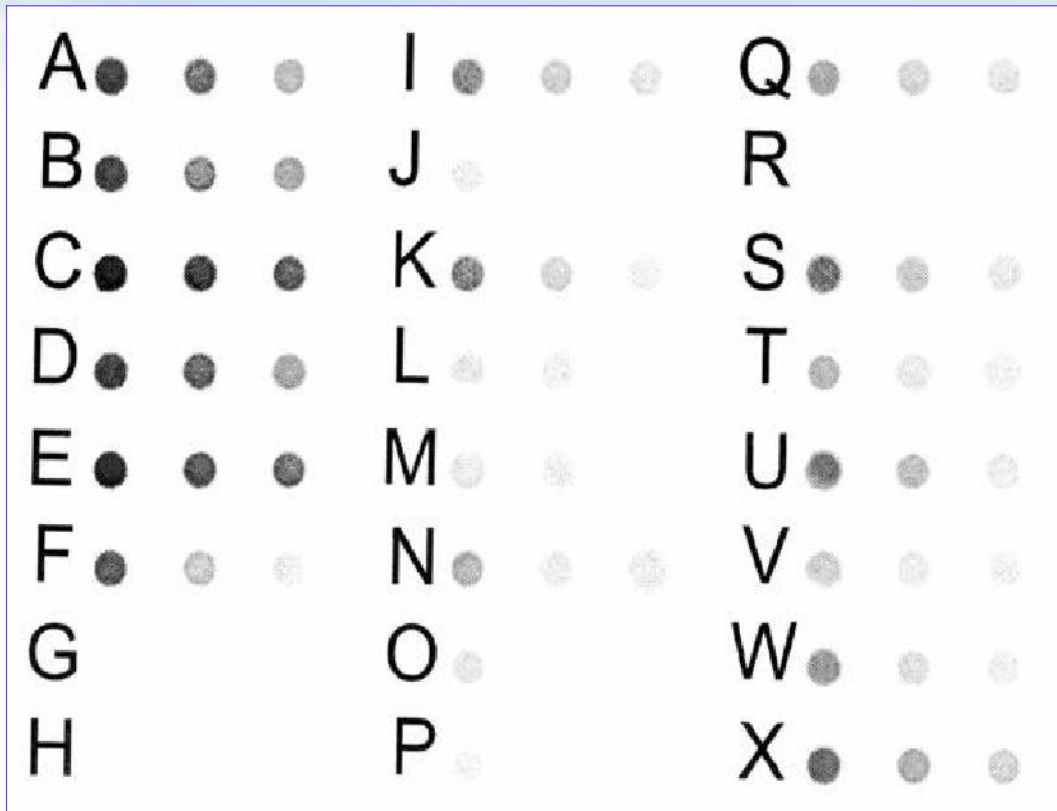


2009年3月

上海交通大学医学院



4. 点杂交和狭缝杂交



2009年3月

上海交通大学医学院



(三) 原位杂交

1. 定义:

将标记探针与细胞或组织中的核酸按碱基配对原则进行特异性杂交, 并应用组织化学或免疫组织化学方法在显微镜下进行细胞内定位或基因表达的检测技术称为原位杂交 (hybridization in situ)。

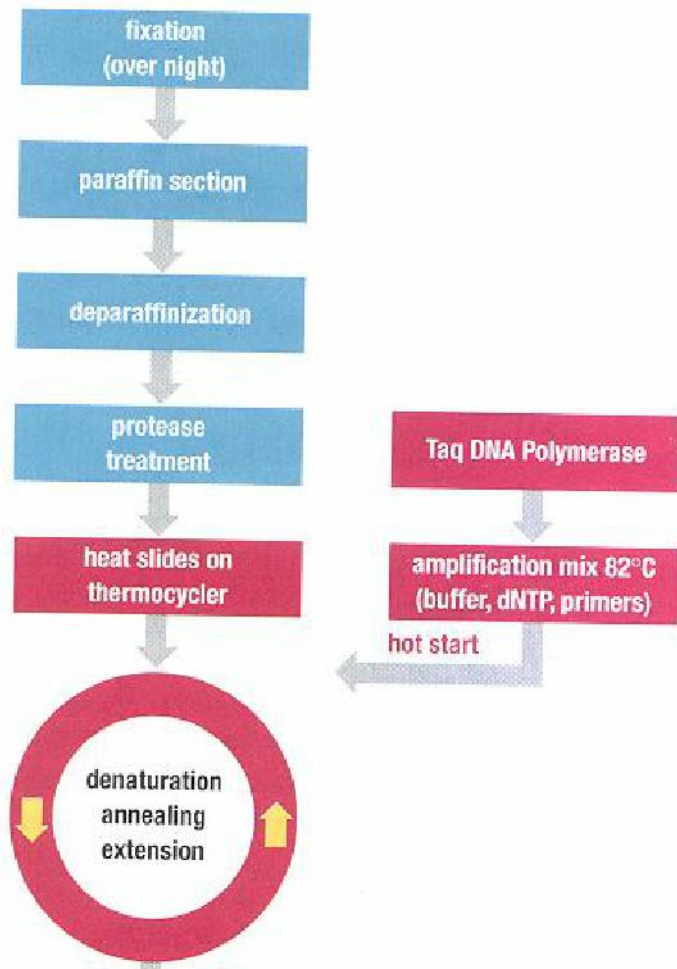
2. 操作步骤:

载片的清洁与处理
组织与细胞的固定
探针
湿盒

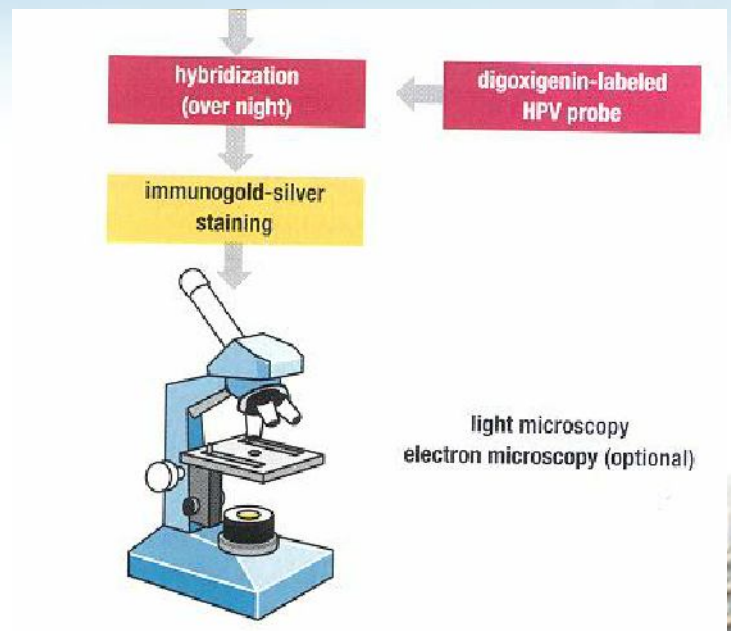


2009年3月

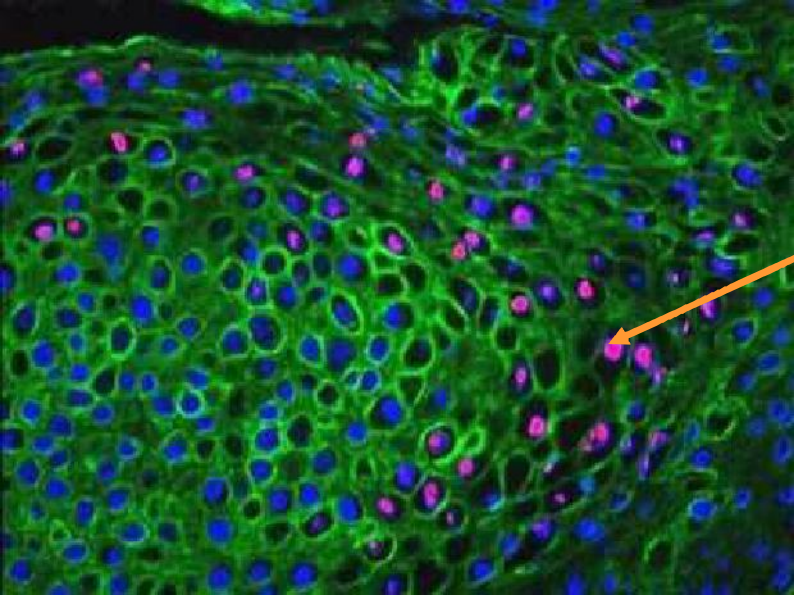
上海交通大学医学院



2009年3月

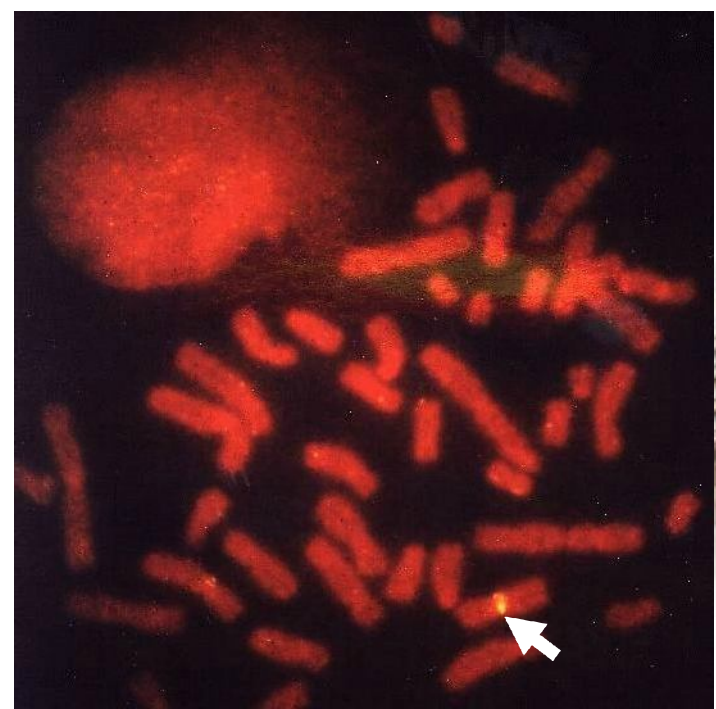


上海交通大学医学院



HPV

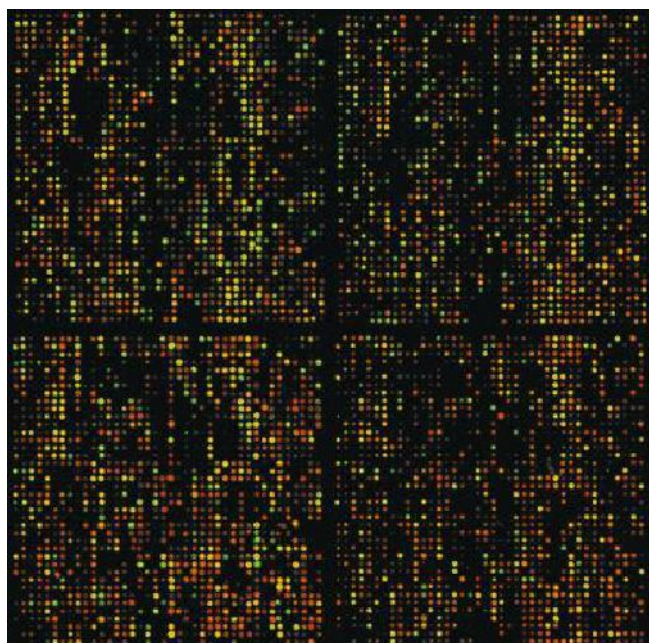
FISH



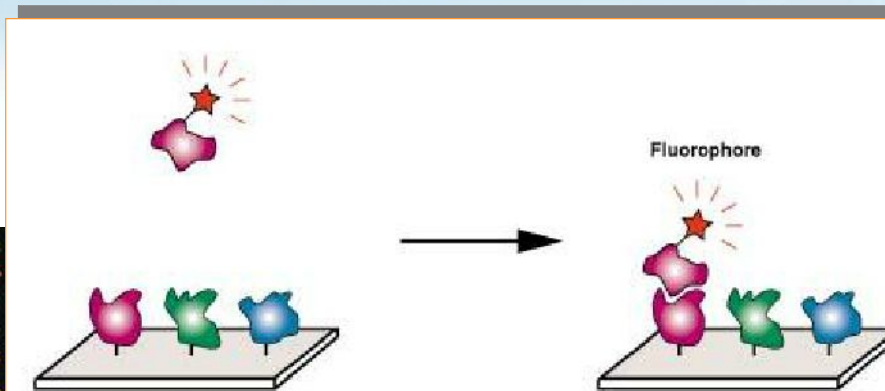
2009年3月



(四) 基因芯片技术 是集成的核酸分子杂交技术。



2009年3月



上海交通大学医学院

复习思考题



名词解释

Tm

杂交

基因探针

随机引物法标记

切口平移法标记

末端标记法

原位杂交

简述题

变性核酸的特点。

影响Tm值的因素。

影响复性速度的因素。

理想的探针标记物应具备的条件。



2009年3月

上海交通大学医学院