

第二十一章 常用分子生物学技术

本章要求

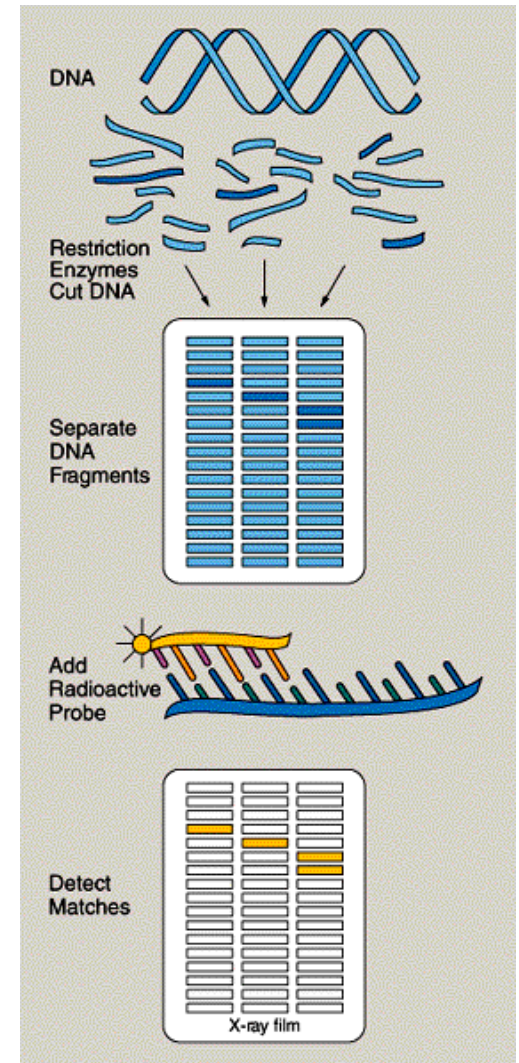
- 1.掌握核酸分子杂交的原理和方法。
- 2.掌握 PCR的原理和操作过程。
- 3.掌握Sanger法测定DNA序列的原理和过程。
4. 掌握下列概念：转基因动物、克隆动物、基因敲除、生物芯片、 RNA干扰、 siRNA

第一节 核酸分子杂交

- 核酸分子杂交以DNA的变性和复性为理论基础，是不同来源的DNA或RNA单链通过碱基互补形成杂合双链的过程。

一、核酸探针 (probe)

- 核酸探针是指能与特定核苷酸序列发生特异性互补杂交，杂交后又能被特殊方法检测的已知被标记的核苷酸序列。



探针的种类

- 基因组探针：某一基因的全部或部分序列，应注意内含子和非编码区。
- cDNA探针：是与mRNA互补的DNA分子，理想的探针，但一般不易获得。
- RNA探针：注意PolyA，本身易降解，多用于基因转录研究。
- 寡核苷酸探针：人工合成。
注意：长度；（G+C）%；发卡结构；碱基重复；特异性

标记物的要求

- 高灵敏度
- 不影响杂交
- 检测方法灵敏，特异，无污染，价格廉
- 易操作，稳定性好

探针的标记方法

- 放射性同位素标记
- 生物素标记
- 地高辛标记
- 分子信标

二、核酸分子杂交的方法

- 液相分子杂交
- 固相分子杂交

固相分子杂交是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。

支持物（载体）：硝酸纤维素膜；尼龙膜；化学激活膜；乳胶颗粒；磁珠；微孔板

各种核酸杂交法的适用范围

杂交方法	适用范围
Southern 印迹杂交	检测经凝胶电泳分开的DNA分子，需转印到膜上
Northern 印迹杂交	检测经凝胶电泳分开的RNA分子，需转印到膜上
斑点杂交	检测未经分离的，固定在膜上的DNA或RNA分子
原位杂交	检测细胞或组织中的DNA或RNA分子

Southern印迹杂交 (Southern blotting)

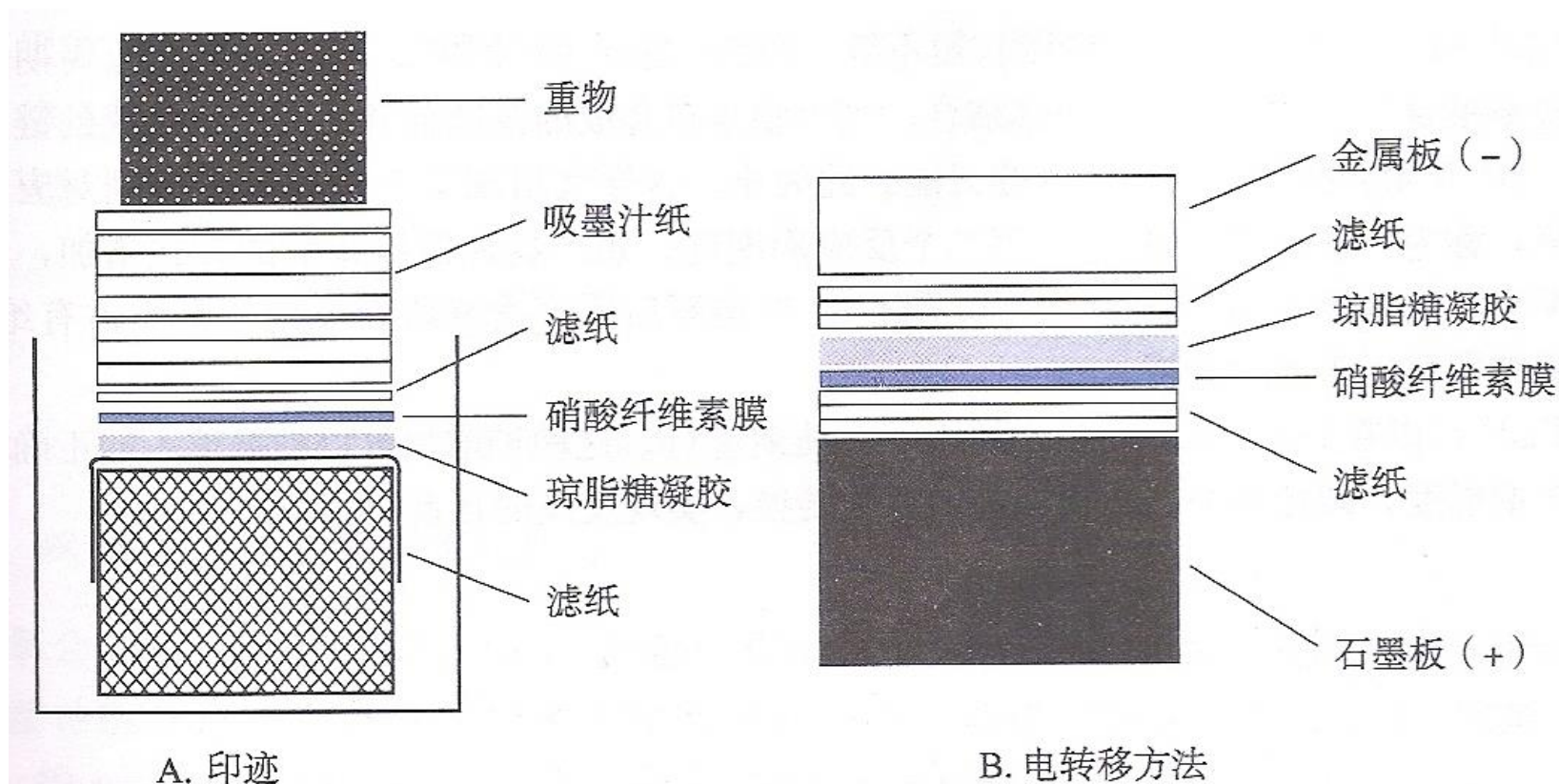
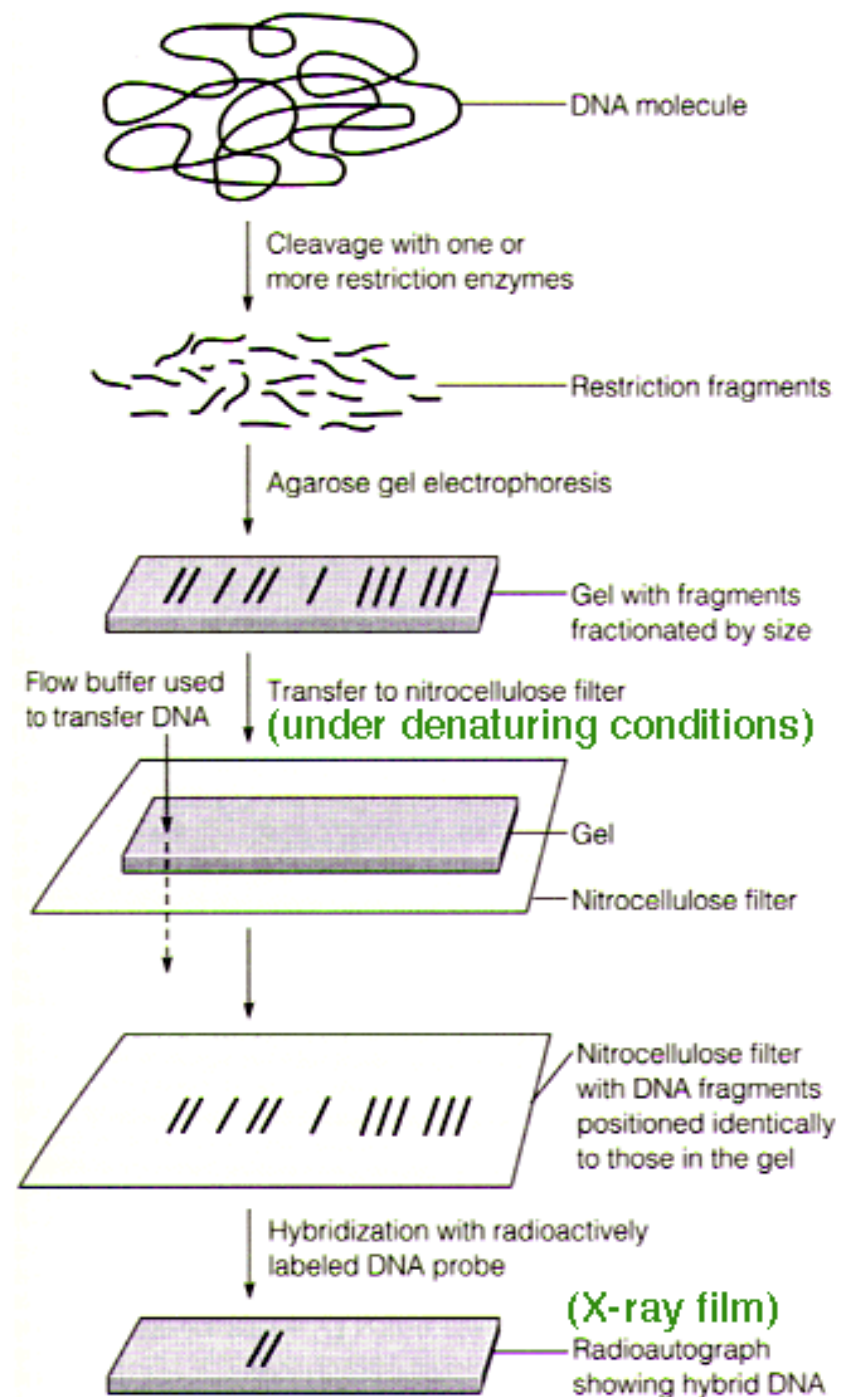


图 21 - 1 Southern 印迹杂交

- 步骤：
- DNA提取
 - 限制性内切酶消化
 - 琼脂糖电泳分离DNA片段
 - 变性
 - 转膜
 - 预杂交
 - 杂交
 - 放射自显影



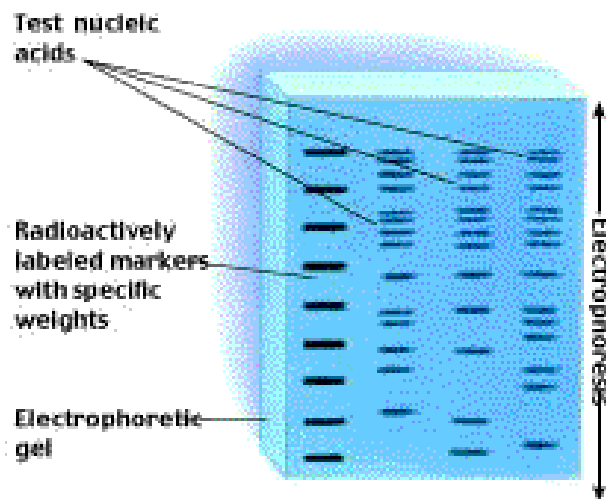
应用：

- 主要用于基因组中
- 特定基因的定性和定量检测
- 克隆基因的酶切图谱、基因突变分析
- 基因重排，丢失等分析

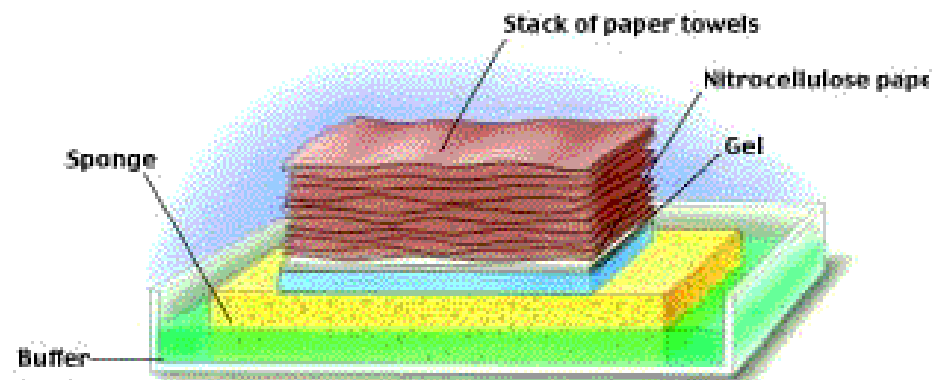
Northern印迹杂交(Northern blotting)

步骤:

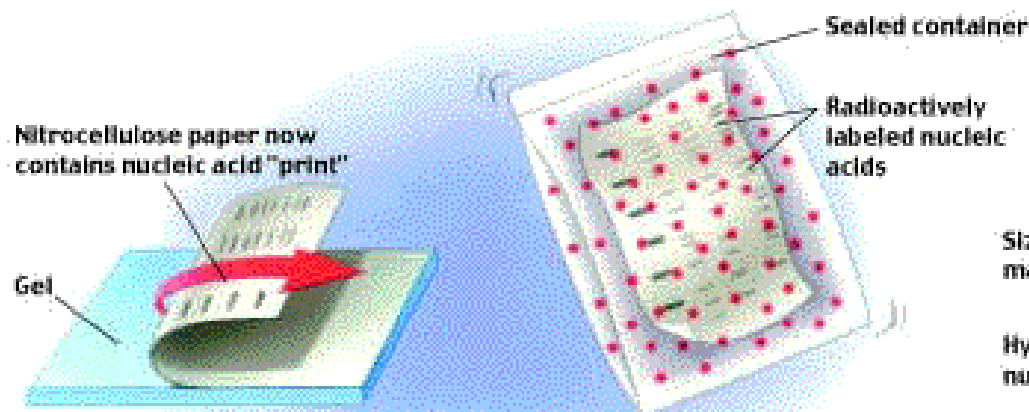
- RNA (mRNA) 提取
- 限制性内切酶消化
- 变性凝胶电泳分离RNA片段
- 转膜
- 预杂交
- 杂交
- 放射自显影



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

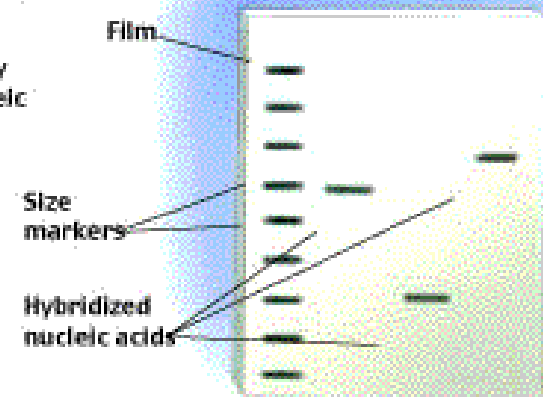


2. The gel is covered with a sheet of nitrocellulose and placed in a tray of buffer on top of a sponge. Alkaline chemicals in the buffer denature the DNA into single strands. The buffer wicks its way up through the gel and nitrocellulose into a stack of paper towels placed on top of the nitrocellulose.



3. Pattern on gel is copied faithfully, or "blotted", onto the nitrocellulose.

4. Blotted nitrocellulose is incubated with radioactively labeled nucleic acids, and then rinsed.



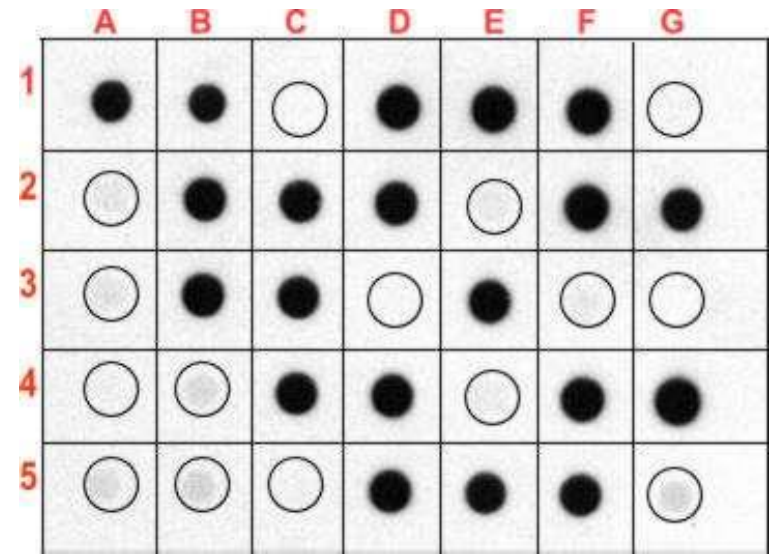
5. Photographic film is laid over the paper and is exposed only in areas that contain radioactivity (autoradiography). Nitrocellulose is examined for radioactive bands, indicating hybridization of the original nucleic acids to the radioactively labeled ones.

应用：

- RNA的研究
- mRNA表达高低
- 癌基因，抑癌基因活化

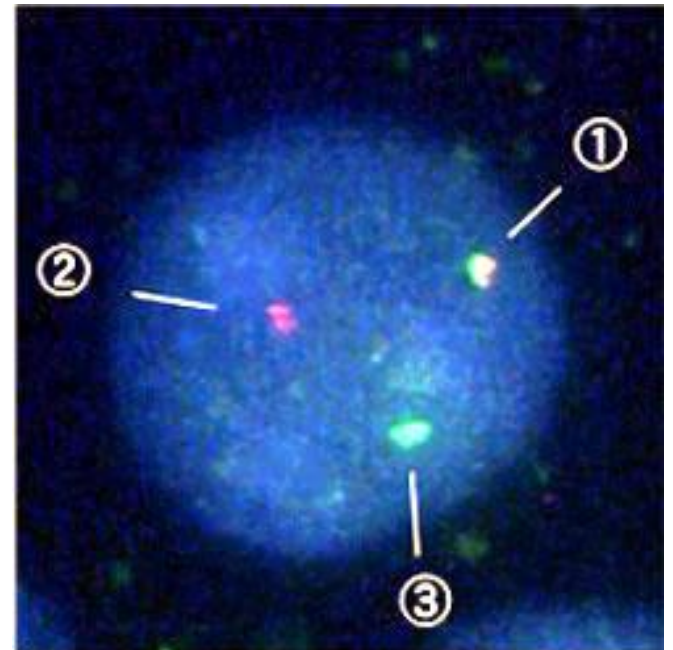
斑点杂交(dot blot hybridization)

- 是一种快速、简便检测微量DNA或RNA的方法，是将样品点到一张硝酸纤维素膜上，并将膜划分区域，点多个样品，烘烤固定，然后杂交显色。
- 优点：快速，高通量，半定量
- 缺点：灵敏度不理想



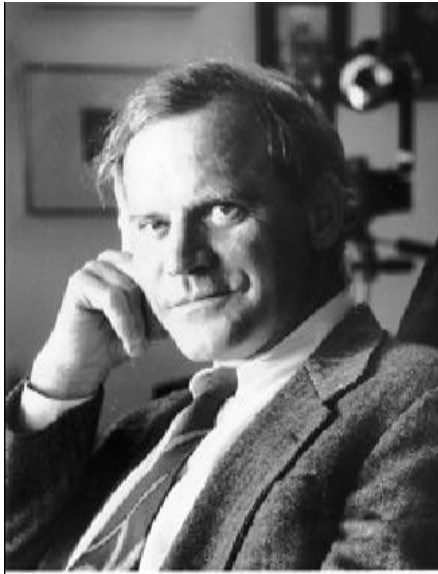
原位杂交(in situ hybridization)

- 核酸保持在细胞或组织切片中，经适当方法处理细胞或组织，将标记的核酸探针与细胞或组织切片中核酸，进行杂交称为原位杂交。
- 特点：
 - 不需要提取核酸
 - 可定性定量
 - 可定位



第二节 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)

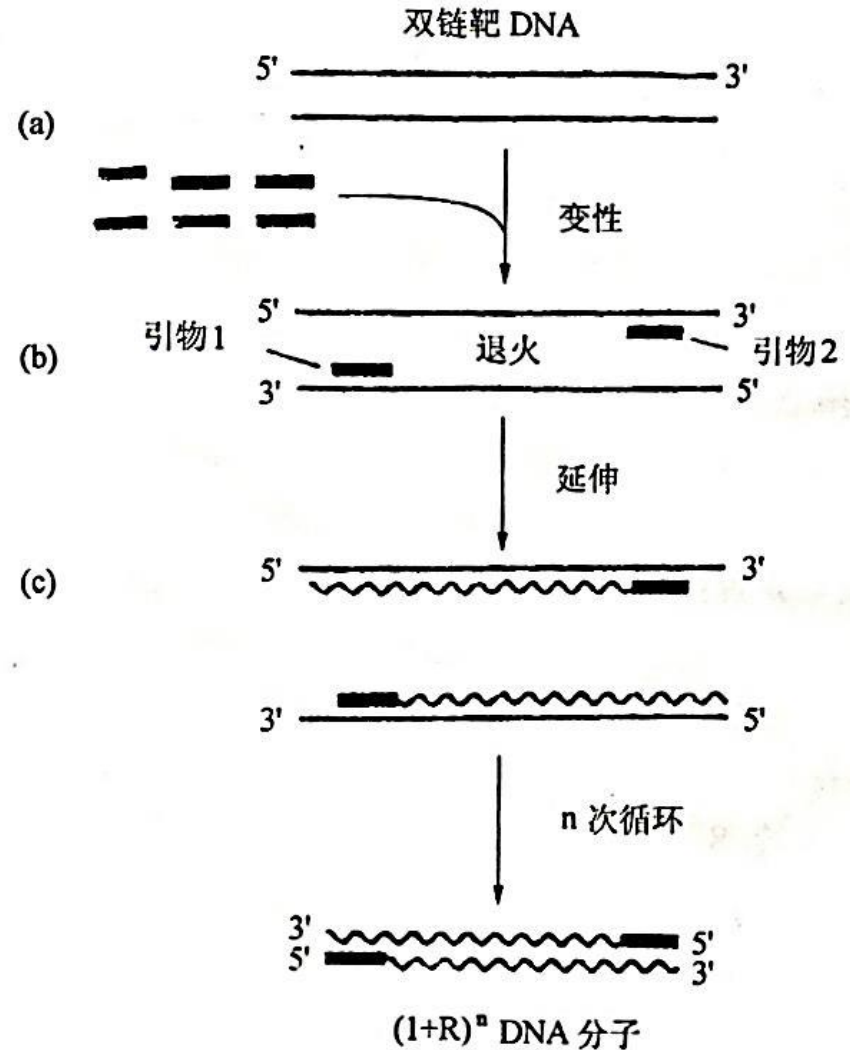
- 20世纪80年代K.Mullis等建立的一种体外酶促扩增特异DNA片段的技术，是在试管中进行的DNA 复制反应。

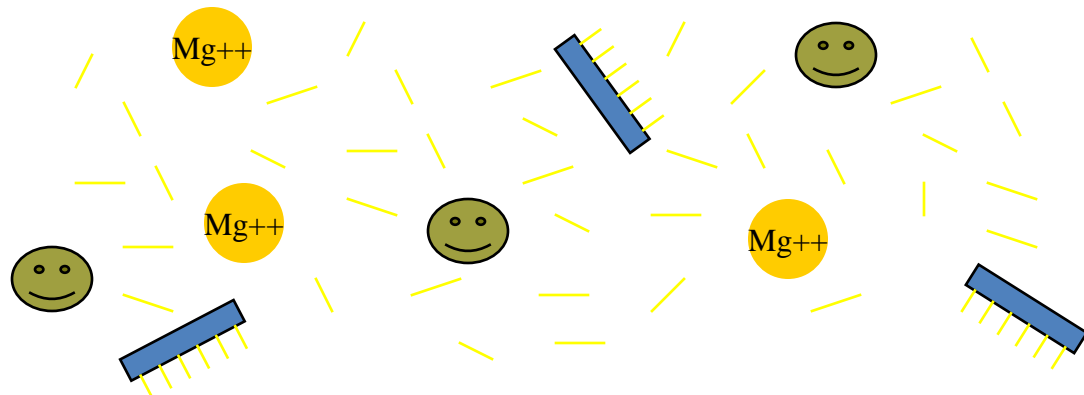
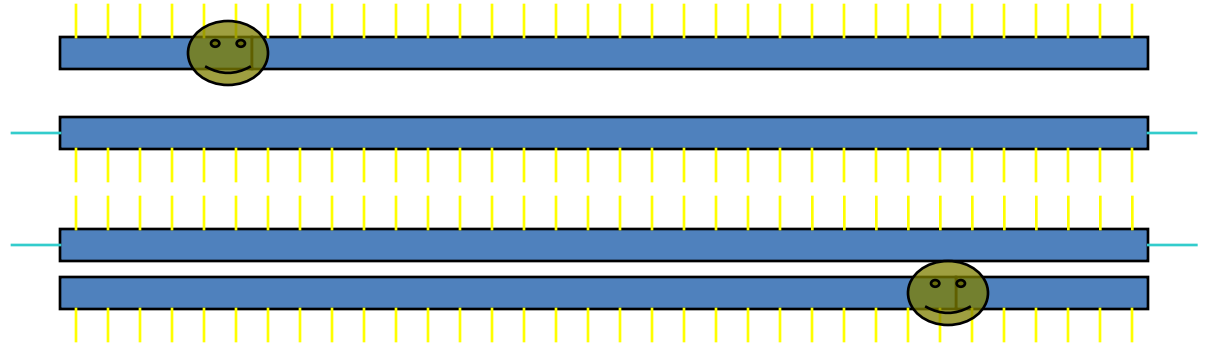


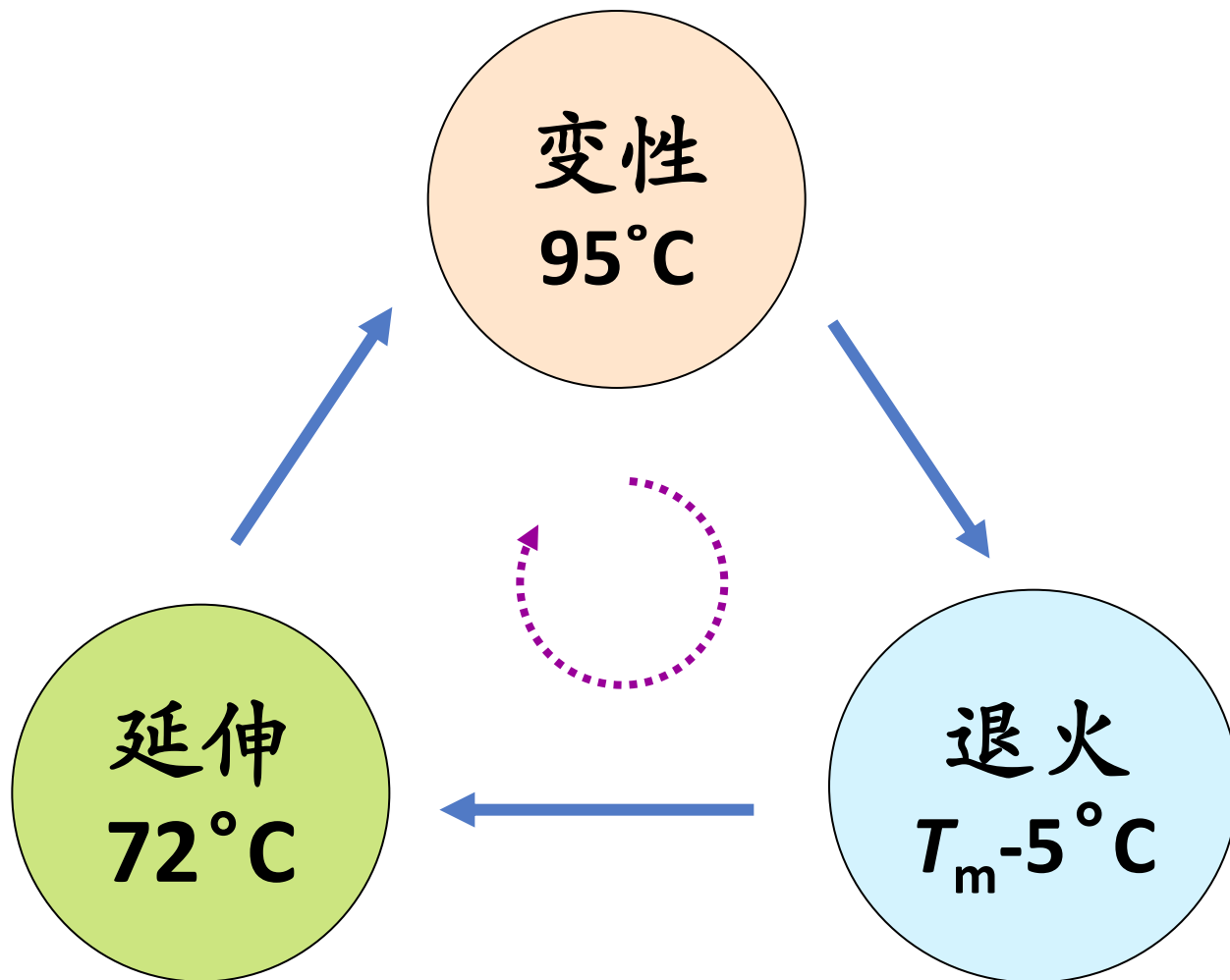
K.Mullis获得1993年诺贝尔化学奖

一、PCR的基本原理

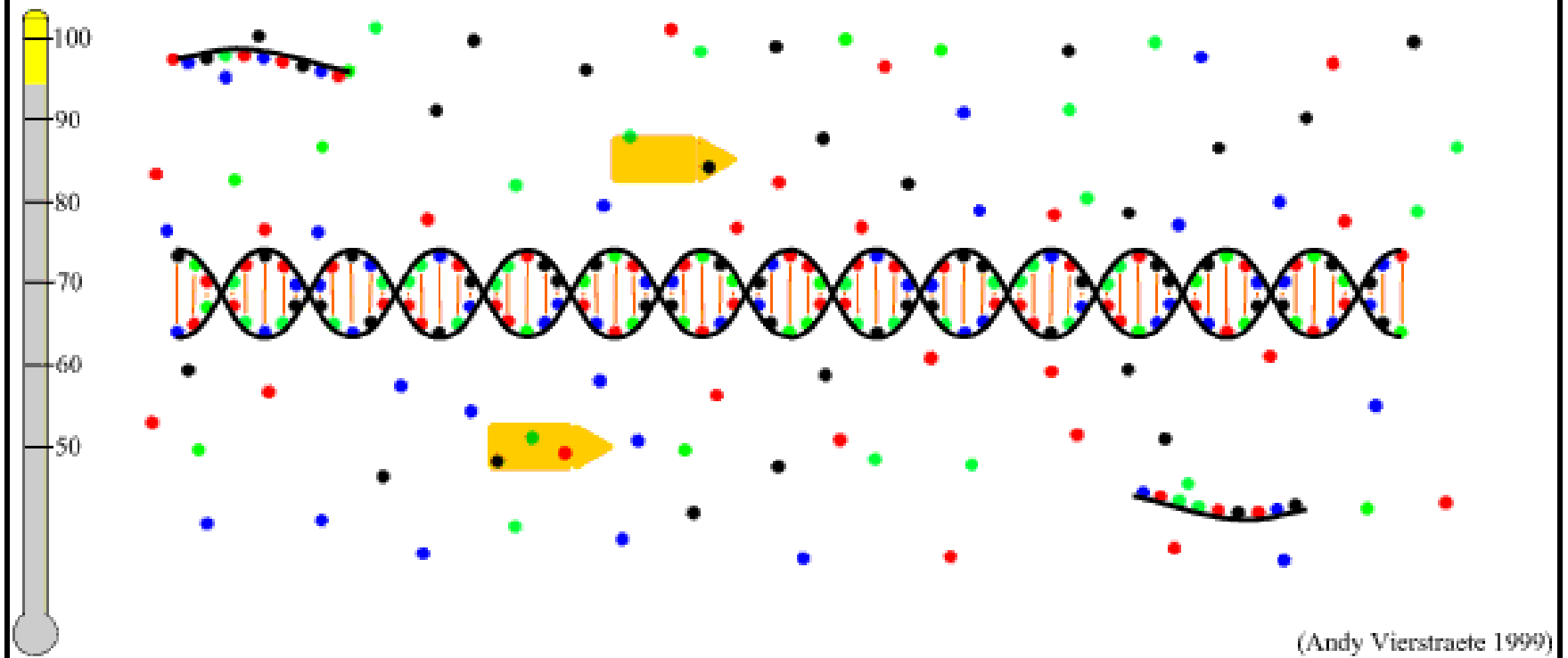
- 根据待扩增DNA片段两端的核苷酸序列，设计并人工合成两个分别与DNA片段两端互补的寡聚核苷酸引物，在有过量的引物、过量的底物（dNTP）、耐热的DNA聚合酶以及模板的反应体系中，经过高温变性、低温退火和适温延伸三个阶段的循环周期使模板DNA以几何级数扩增。







PCR : Denaturation 94°C



二、参与PCR反应体系的因素及其作用

- 模板DNA
- 特异性寡核苷酸引物
- 耐热的DNA聚合酶
- dNTP
- 含有必需离子的反应缓冲液
- 反应温度与时间
- 循环次数
- PCR仪

模板DNA

- 来源：培养细胞、细菌、病毒、组织、病理标本、考古标本等
- 模板量： $10^2 \sim 10^5$ 拷贝（ $1\mu\text{g}$ 基因组DNA相当于 3×10^5 拷贝的常染色体基因）
- 制备方法
 - 常规制备：酚抽提法；繁琐、费时、不经济
 - 改良方法：煮沸法、超声波处理、蛋白酶K消化等粗略制法；省时、经济，得到的模板足以满足PCR

引物

- 长度

16~30个碱基

良好的序列特异性

过长：扩增产物的量降低

过短：非特异性扩增

- 浓度

0.1~1.0 μ mol/L

过高：非特异性扩增

过低：PCR效率低

■ 引物设计原则

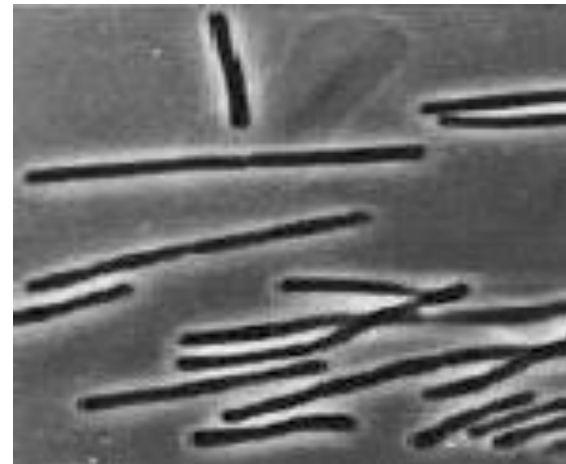
- 碱基尽量随机分布，避免堆积
- G+C含量45%~55%
- 内部不能形成二级结构
- 碱基顺序不应与非扩增区有同源性
- 3' 末端与模板DNA一定要配对

DNA聚合酶

- 1983年使用DNA聚合酶I的Klenow片段，局限性是酶不耐热，反应中需不断添加新酶，复杂、不经济、纯度不高
- 1988年发现耐热Taq DNA聚合酶，使反应自动化，PCR技术推广和应用

■ Taq DNA聚合酶

- 源于一种嗜热水生菌（*Thermus aquaticus* YT-1），该菌生长在70~75℃富含矿物质的环境中



- 用量：2~2.5U
- 反应温度：70~75℃
- 辅助条件：需要Mg²⁺离子的存在
- 生物半衰期：92.5℃, 130分钟；95℃, 40分钟

dNTP

- 包括dATP、dTTP、dCTP、dGTP
- 浓度各20~200 $\mu\text{mol/L}$

浓度过高：增加错配机率，实验成本高
浓度过低：反应速度降低。

缓冲液

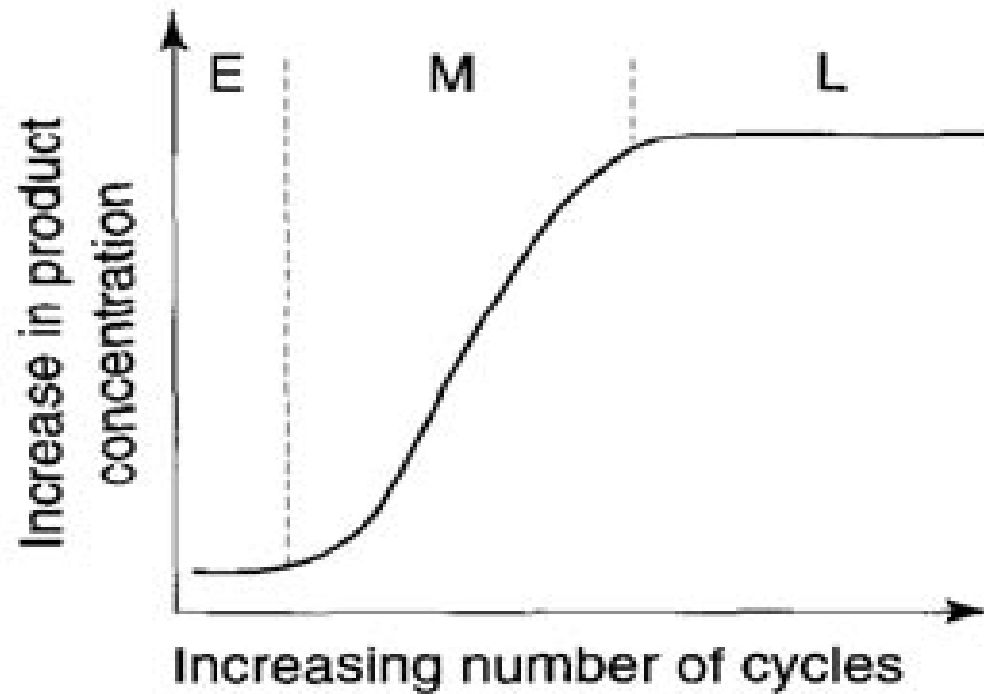
- Tris-HCl: 10~50mmol/L
- PH : 8.3~8.8
- KCl: 50mmol/L
- Mg^{2+} : 0.5~2mmol/L

不同的酶对Tris-HCl、 Mg^{2+} 有不同的浓度要求

PCR 循环参数

- 变性温度和时间
92~96℃, 常用95℃ 30秒
- 退火温度和时间
37~55 °C, 20~40s
退火温度 = T_m 值 - 5℃
- 延伸温度和时间
70~75℃
时间由DNA产物的长度决定, 1 kbp以内的片段延伸时间为 1 分钟

- 循环次数
30次左右



平台效应

PCR仪



三、PCR的应用

- DNA的微量分析
- 目的基因的克隆
- 测定基因的表达水平
- 基因的定点突变

第三节 DNA的序列分析

- 1977年 双脱氧合成末端终止法（Sanger法）
- 1978年 化学修饰法（Maxam-Gilbert法）

一、双脱氧合成末端终止法

- 在4组独立的DNA合成体系中分别采用4种不同的ddNTP，可产生4组寡核苷酸，每组将产生以一种特异性的ddNTP为末端的不同长度的核苷酸链。经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离和放射自显影，即可读出被测定的DNA的全部碱基序列。

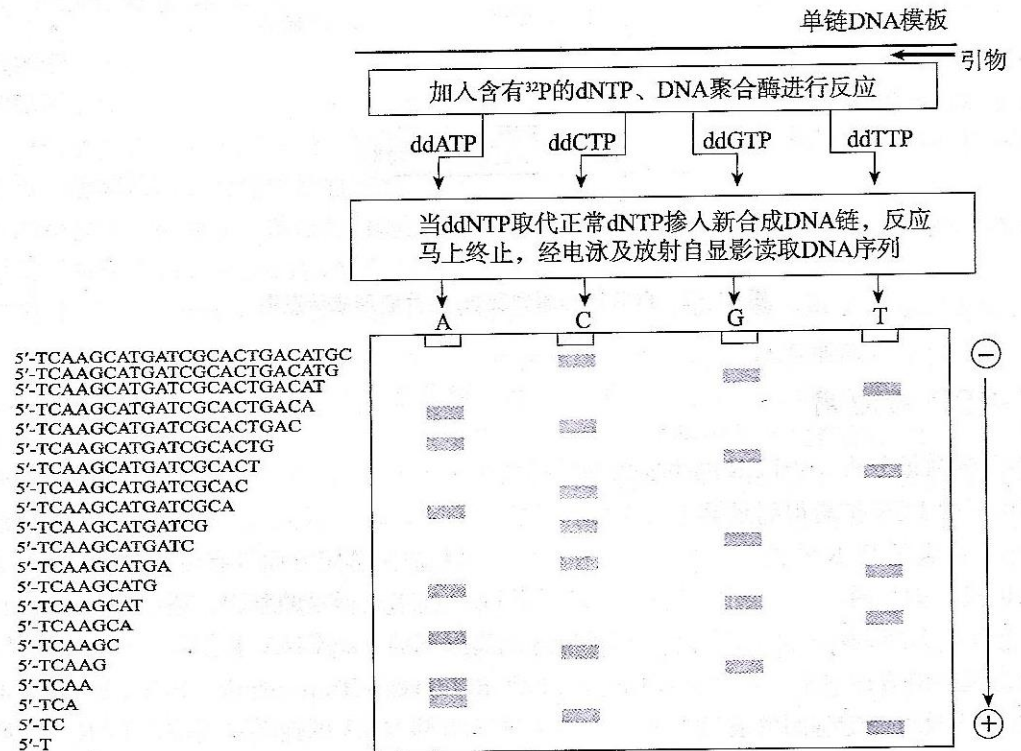


图 21-3 双脱氧末端终止法测序

二、化学修饰法

- 基于某些化学试剂可以使DNA链在1个或2个碱基处发生专一性断裂的特性，精确地控制反应强度，使一个断裂点仅存在于少数分子中，不同分子在不同位点断裂，从而获得一系列大小不同的DNA片段，将这些片段经电泳分离。

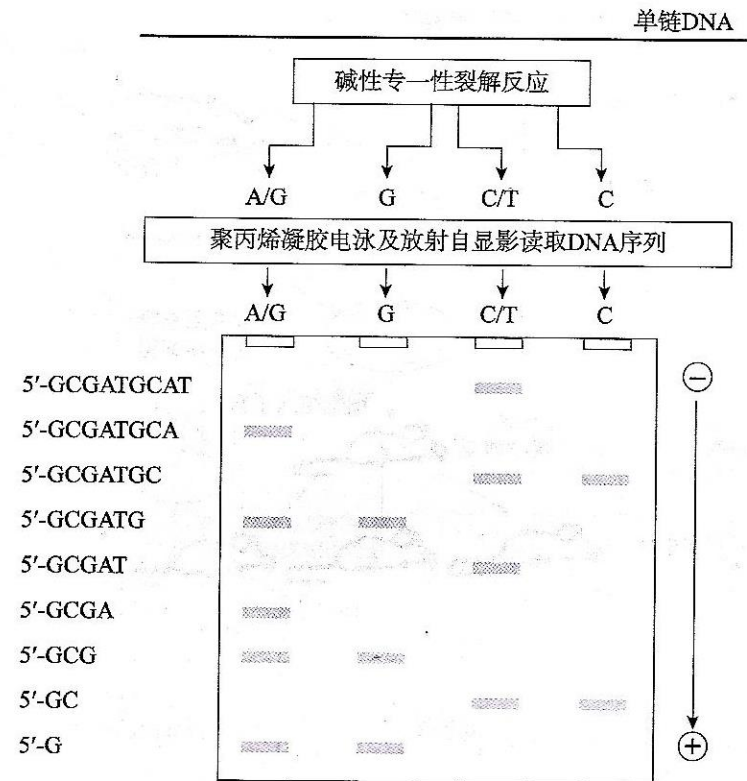


图 21-4 化学修饰裂解法测序原理

三、DNA自动测序

- 采用荧光替代放射性核素标记是实现DNA序列分析自动化的基础。用不同荧光分子标记四种双脱氧核苷酸，然后进行Sanger测序反应，反应产物经电泳（平板电泳或毛细管电泳）分离后，通过四种激光激发不同大小DNA片段上的荧光分子使之发射出四种不同波长荧光，检测器采集荧光信号，并依此确定DNA碱基的排列顺序。



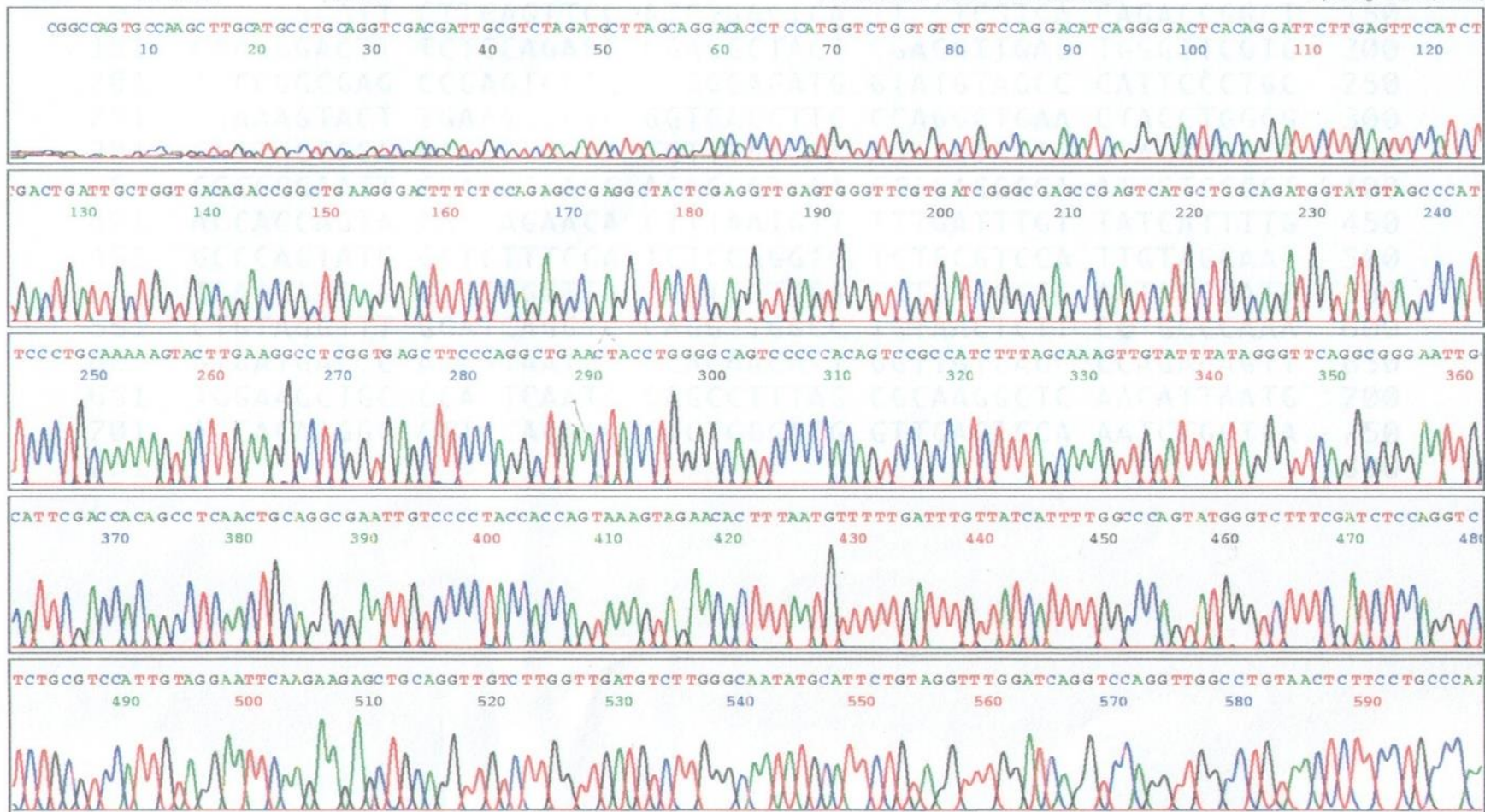
Model 3700
Version 3.3
Basecaller-POP5LR.bcp715015.ndr3-T-7.f(-47)
BC 1.1.0.0 Lane 57

715015.ndr3-T-7.f(-47)

Signal G:1164 A:1277 T:1252 C:872
DT3700POP5(BDv3)v1.mob

Points 3550 to 15939 Pk 1 Loc: 3550

Page 1 of 2
Wed, Jul 17, 2002 6:56 AM
Tue, Jul 16, 2002 5:24 PM
Spacing: 16.52(16.52)



第四节 转基因动物、克隆动物和基因敲除技术

一、转基因动物(transgenic animal)

- 转基因动物是指将外源基因导入动物的受精卵，再将受精卵植入到代孕动物的输卵管或子宫中培育出的动物

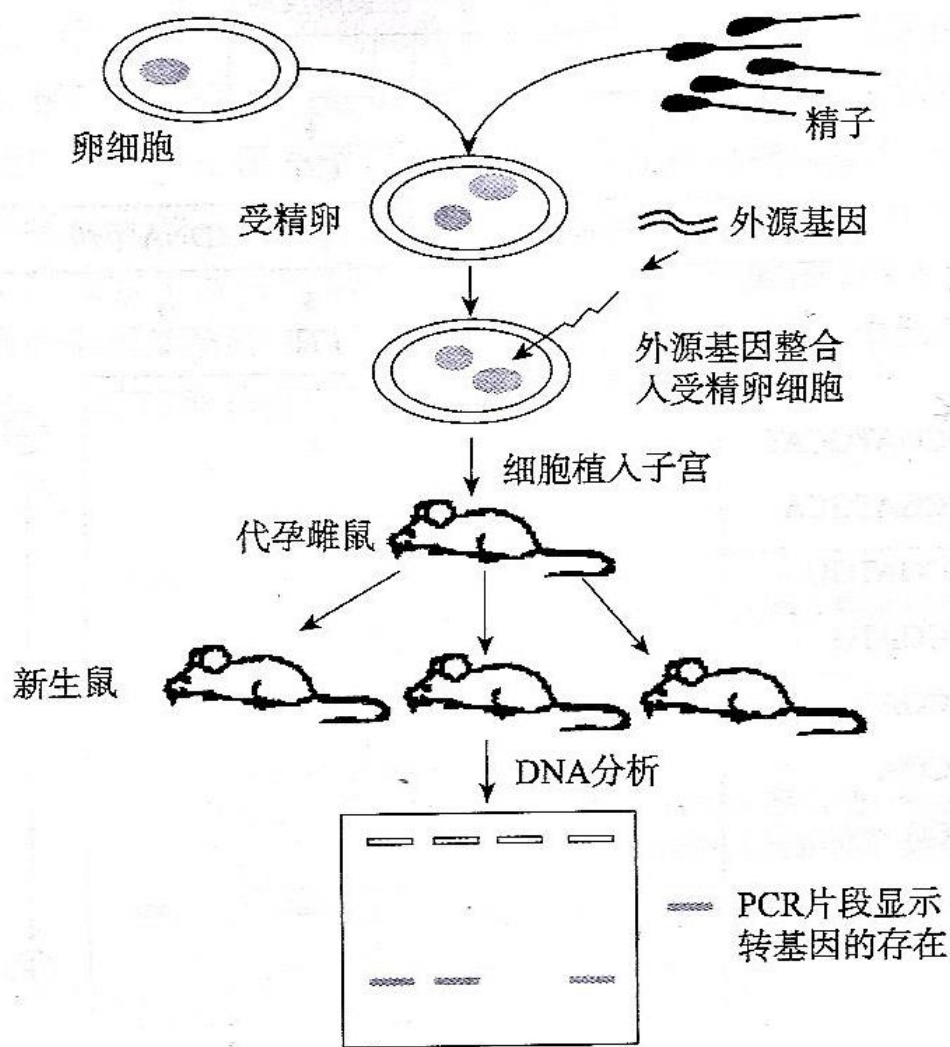


图 21-5 转基因动物原理

二、克隆动物（cloning animal）

- 克隆动物是生物体通过体细胞进行的无性繁殖以及由无性繁殖形成的基因型完全相同的后代个体组成的种群。

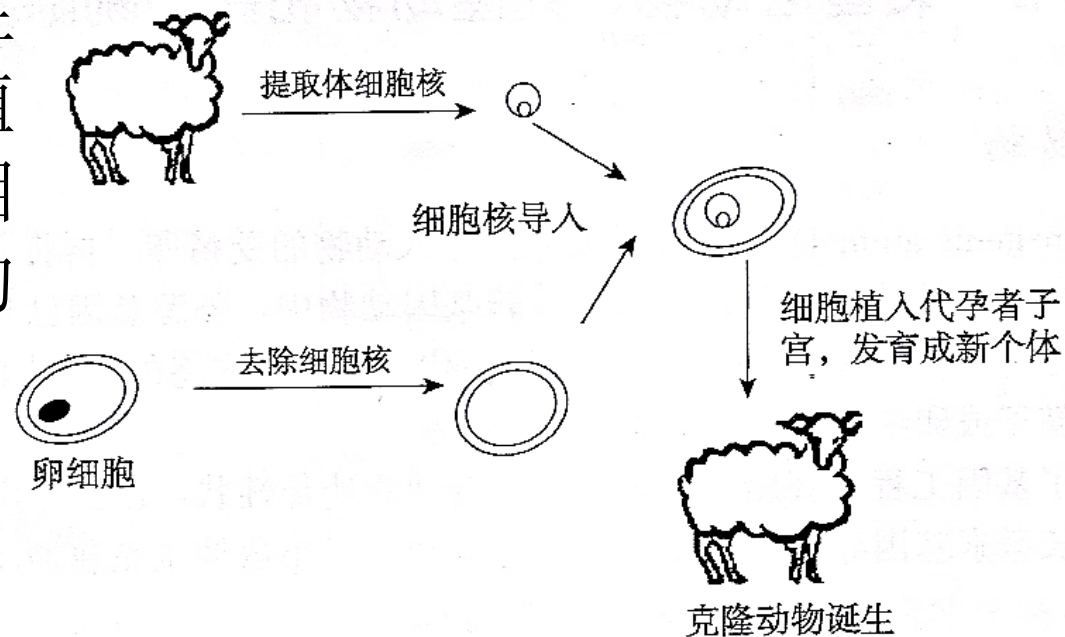


图 21-6 克隆动物

三、基因敲除技术

- 通过DNA定点同源重组，定向地去除基因组中的某一基因，称为基因敲除（gene knockout）或基因剔除，也称为基因靶向灭活。

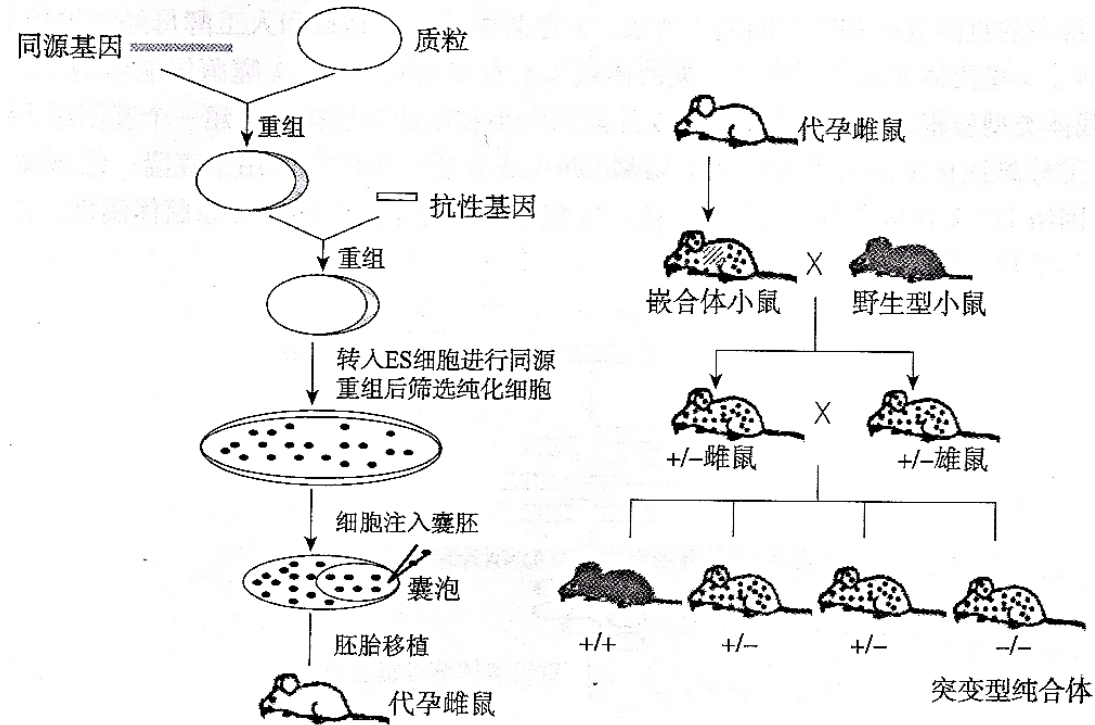


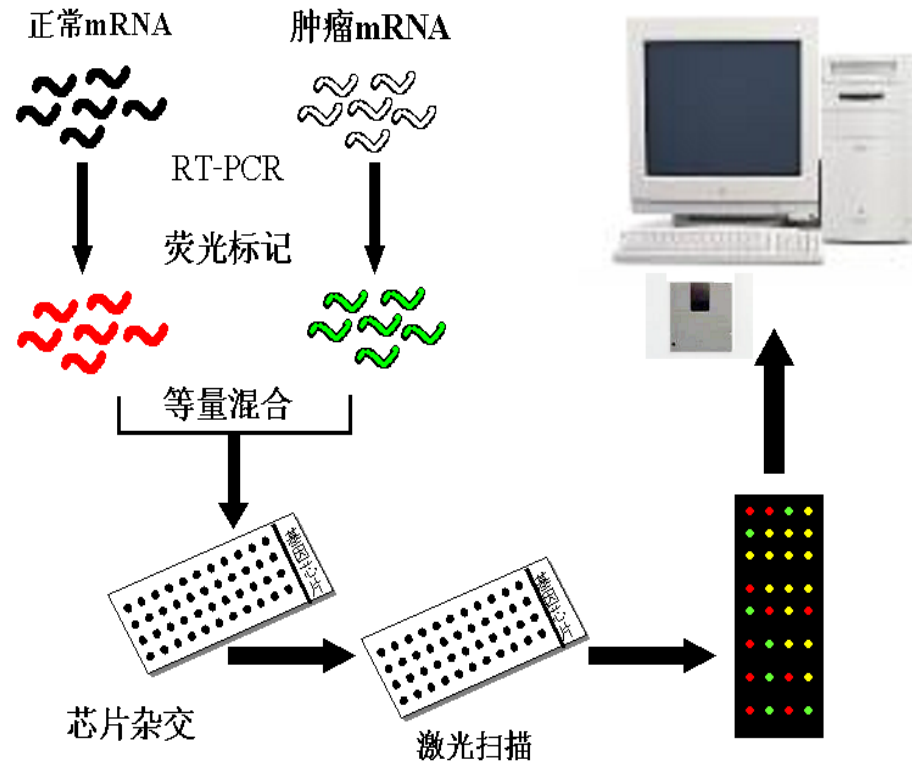
图 21-7 基因剔除原理

第五节 生物芯片技术

- 生物芯片（**biochip**）是指通过微电子、微加工技术在芯片表面构建的微型生物化学分析系统，以实现了对细胞、**DNA**、蛋白质及其他生物组分的快速、敏感、高效的处理。

一、基因芯片

- 是指将许多特定的DNA片段或cDNA片段作为探针，有规律地紧密排列固定于单位面积的支持物上。
- 原位合成芯片
- DNA微集阵列（微点阵）



二、蛋白芯片

- 是将高度密集排列的蛋白分子作为探针点阵固定在固相支持物上，当与待测蛋白样品反应时，可捕获样品中的靶蛋白，再经检测系统对靶蛋白进行定性和定量分析的一种技术。

三、缩微芯片

■ 缩微芯片的特点

自动化，成本低，防污染；反应体系小，样品少，灵敏度高；快速，效益好。

■ 缩微芯片的类型

- 生物样品的制备芯片
- 核酸扩增芯片、毛细管电泳芯片及PCR毛细管电泳芯片

第六节 RNA干扰技术

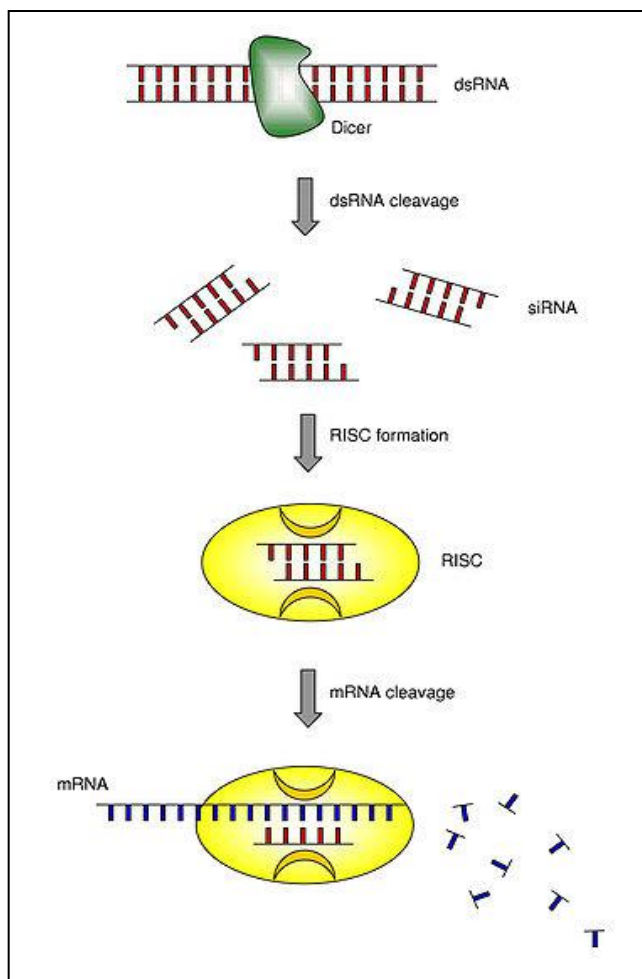
RNA干扰（RNA interference, RNAi）

- ❖ 也被称作转录后基因沉默（post transcriptional gene silencing, PTGS）
- ❖ 是指由RNA分子抑制基因表达，特别是降异性降解靶 mRNA分子的一种生物学过程。
- ❖ 一般包括2种干扰RNA分子： siRNA、 miRNA

一、RNA干扰的分子机制

1. 小干扰RNA, siRNA

长度为21~23个核苷酸（nt）的小分子RNA分子



dsRNA在Dicer的作用下裂解siRNA

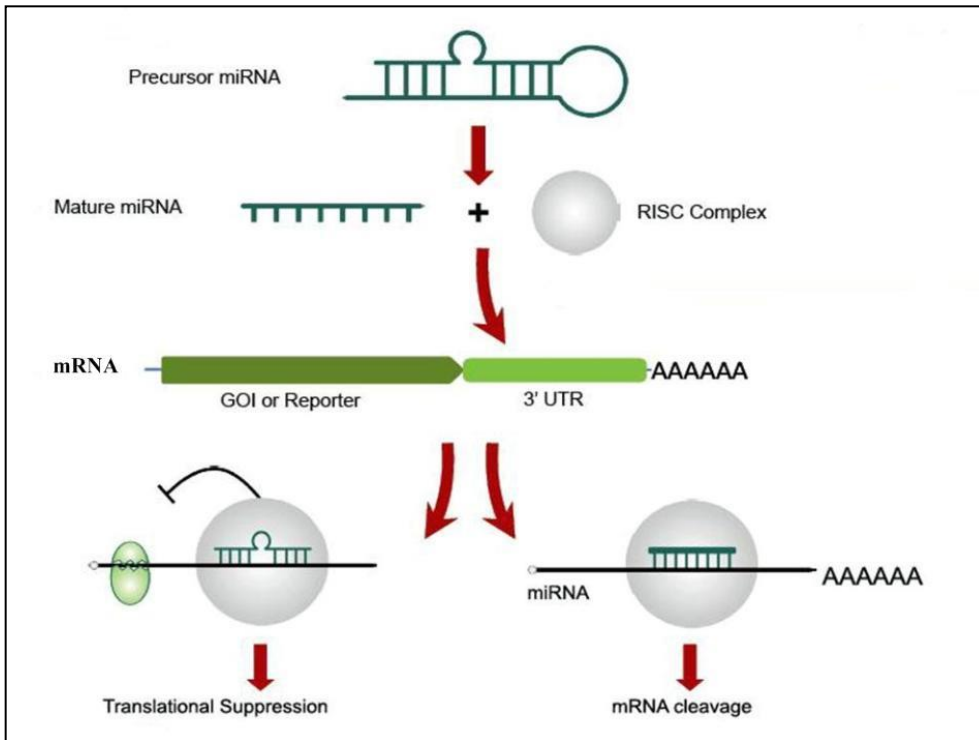
siRNA分子形成RNA诱导沉默复合物
(RNA-induced silencing complex, RISC)

siRNA解离成单链，形成活化的RISC

在单链siRNA的引导下结合至靶基因mRNA分子的特定部位，对mRNA分子进行切割

2. microRNA, miRNA

由前体pre-miRNA或小发夹RNA（small hairpin RNA, shRNA）转变而来



pre-miRNA经过Dicer酶切割成为成熟的单链miRNA。

miRNA可与目的mRNA分子中碱基序列互补的区域结合。

完全匹配——引起mRNA分子的降解；
不完全配对——抑制mRNA分子的翻译

二、RNA干扰技术在医学与研究中的应用

1.功能基因组学研究

2.药物开发

3.诊断与治疗

三、RNA干扰技术的基本流程

（一）siRNA的设计

1. siRNA序列的设计途径：

1) 现有数据库或网页查询，如

<http://www.dharmacon.com>

2) 专业网站设计：如[http://design.dharmacon.com/](http://design.dharmacon.com/rnadesign/default.aspx?SID=45358710)

[rnadesign/default.aspx?SID=45358710](http://design.dharmacon.com/rnadesign/default.aspx?SID=45358710)

2. RNAi 目标序列的选取原则

- (1) 从靶mRNA分子的起始密码开始，寻找AA序列，其3'末端的19个核苷酸序列作为潜在的siRNA靶位点。
- (2) GC 含量在45%~55%
- (3) 设计siRNA 时不要针对靶mRNA分子的非编码区
- (4) 通常一个基因需要设计多个靶序列的siRNA，以找到最有效的siRNA序列。

（二） siRNA的制备

- 1) 化学合成法
- 2) 体外转录法
- 3) 长片段dsRNA消化法
- 4) 表达载体法
- 5) 表达框架法

(三) siRNA的导入

- 1) 磷酸钙共沉淀法
- 2) 电穿孔法
- 3) 阳离子脂质体法
- 4) DEAE-葡聚糖
- 5) polybrene多具体复合物法
- 6) 显微注射法

（四）siRNA作用的检测

1) mRNA水平检测:

通过RT-PCR的方法检测细胞内靶mRNA分子的相对含量观察siRNA的基因沉默效应。

2) 蛋白质水平检测:

通过western blotting的方法检测细胞内特异性蛋白质的含量以判断siRNA的基因敲低效果。

思考题

- 1.试述核酸分子杂交的原理、方法和应用。
- 2.试述 PCR的操作过程和主要用途。
- 3.试述PCR的引物设计原则。
- 4.简述利用双脱氧合成末端终止法测定DNA序列的原理和过程。
- 5.试比较转基因动物、克隆动物和基因敲除技术。
- 6.试述生物芯片的概念和种类。
7. siRNA与miRNA的作用有何异同？
- 8.siRNA序列的选取原则有哪些？