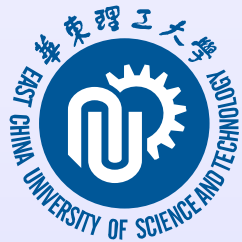


## 第五章 目标成分常用定性鉴别方法(三)

### 核酸定性鉴别技术

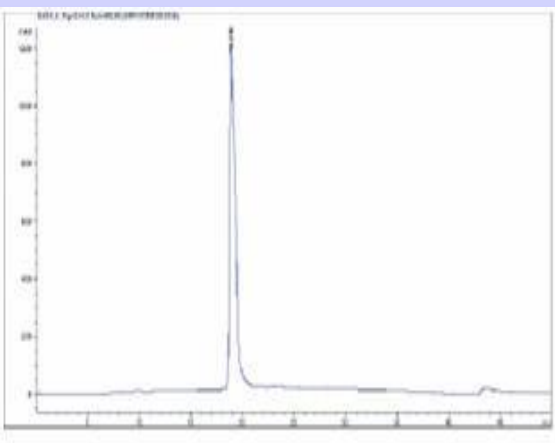


**思考：** 蛋白质( $\alpha$ -干扰素)定性  
检测方法？



显色法

色谱法HPLC



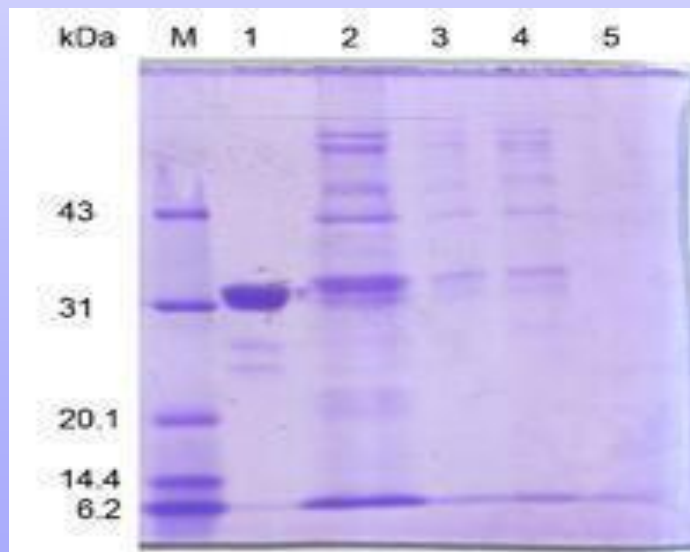
分子量较小的多肽

(正相HPLC)

大分子蛋白

凝胶过滤色谱 (GFC)

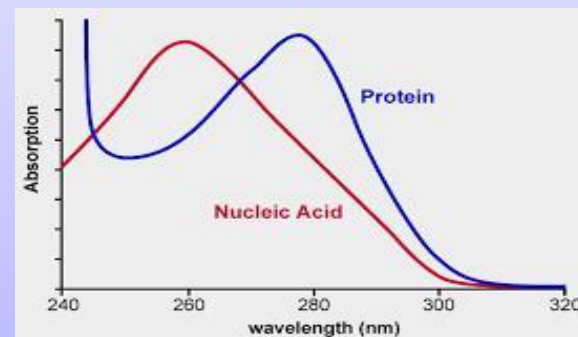
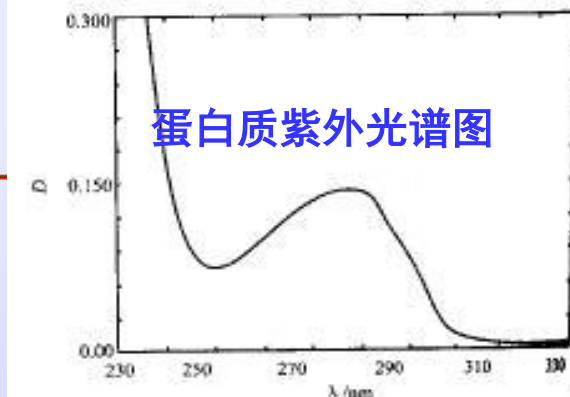
电泳法



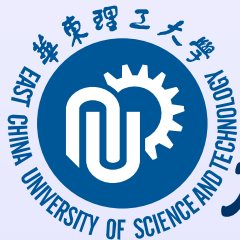
染色液: 考马斯亮蓝R250

紫外光谱法

蛋白质紫外光谱图



问题:  
特异性?



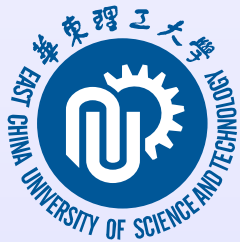
## 前节课内容回顾：蛋白质定性鉴别

### 免疫标记技术(Immunolabeling Technique)：

是将已知抗体或抗原标记上易显示的物质，通过检测标记物来反应抗原抗体反应的情况，从而间接地测出被检抗原或抗体的存在与否或量的多少。

常用的标记物有**荧光素、酶、放射性核素及胶体金**等。

1. **Western blot (immunoblotting test, IBT)**  
(免疫印迹法)
2. **Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay**  
(Elisa, 酶联免疫吸附剂测定法)



# 免疫印迹技术 (Western blot)

## 原理:

免疫印迹技术 (Western blot) 是通过聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 将蛋白质转移到膜 (硝酸纤维素, or **PVDF**) 上, 然后**利用抗体进行检测**目标蛋白质。是检测**特定蛋白质**存在与否的技术。

是在蛋白质电泳分离和抗原抗体检测的基础上发展起来一项检测蛋白质的技术。它将**SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳的高分辨力与抗原抗体反应的特异性相结合**, 因与Southern早先建立的检测核酸的印迹方法Southern blot相类似, 亦被称为Western blot。

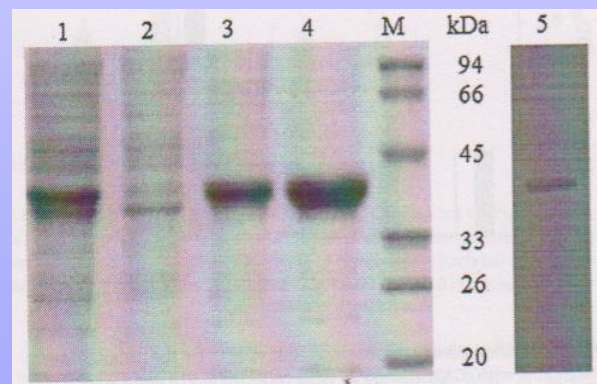
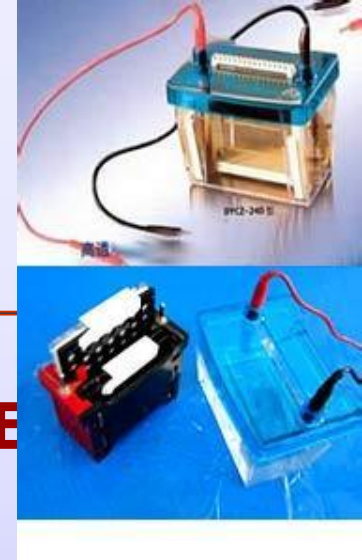
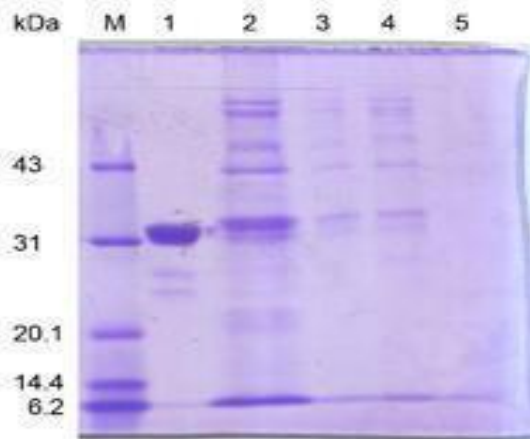


Fig. 1. SDS-PAGE and western blotting analysis of the rGAPDH expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Lanes: M, protein molecular weight marker; (1) supernatant of ultrasonicated cells lysate; (2) flow through; (3) elution; (4) elution; (5) Western blotting of purified rGAPDH with anti-GAPDH polyclonal antibody.



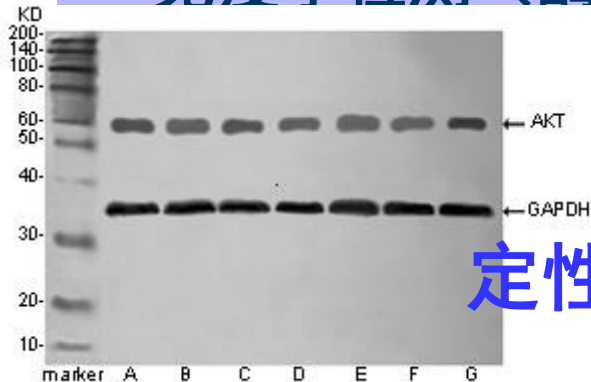
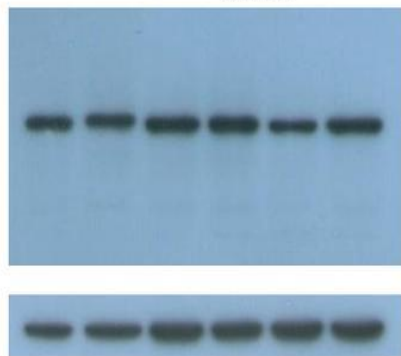
## Gel electrophoresis (SDS-PAGE) (蛋白质的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离)

Typical Western-  
blot Procedure

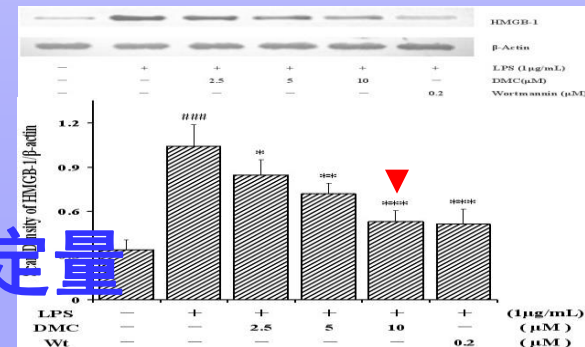
## Transfer and Blocking (转膜和封闭)

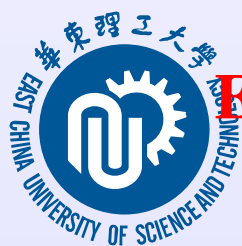
## Immunological Detection 免疫学检测 (酶免疫定位)

Western blotting服务实例



定性、半定量





# ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assays)

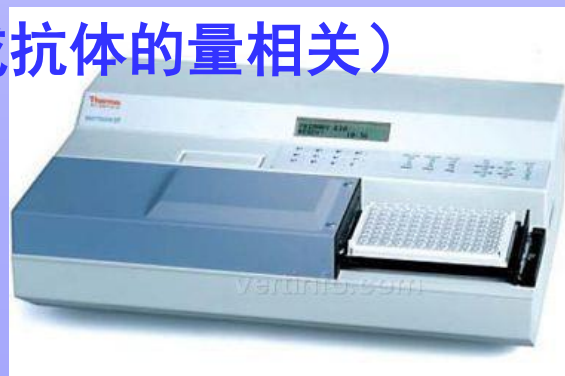
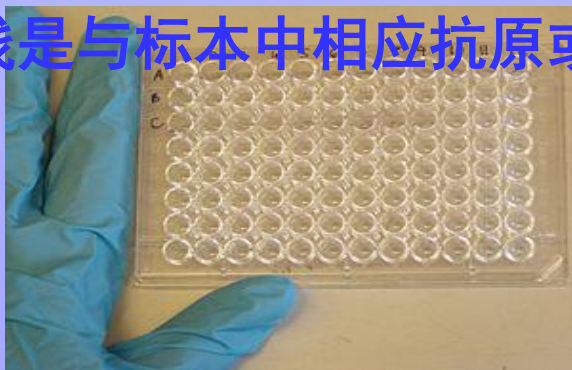
## 酶联免疫吸附技术

ELISA是一种**免疫酶标**技术。

ELISA是以免疫学反应为基础，将**抗原、抗体的特异性反应**与**酶对底物的高效催化作用**相结合起来的一种**敏感性**很高的试验技术。

三种必需试剂

- **免疫吸附剂(Immunosorbent)**: 固相的抗原或抗体（**物理性地**吸附，保持其免疫学活性）
- **酶联物(Conjugate)**: 酶标记的抗原或抗体（**共价键与酶连接**，保持其免疫学和酶学活性）
- **底物(Substrate)**: 酶反应的底物（**颜色反应判定**是否有免疫反应的存在，颜色深浅是与标本中相应抗原或抗体的量相关）

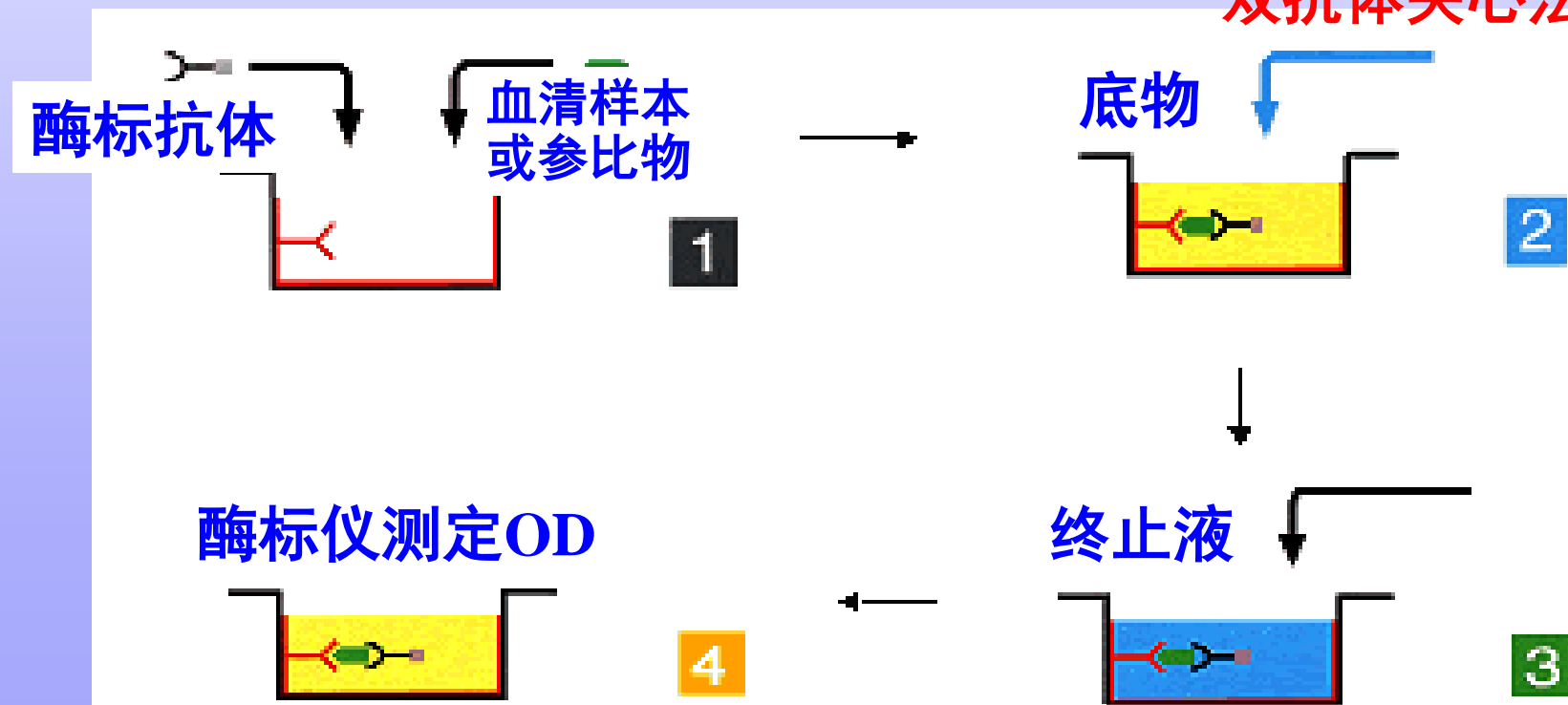




# ELISA 主要种类 (Types of ELISA)

- **Sandwich ELISA**(双抗体夹心法测抗原, 双抗原夹心法测抗体)
- **Indirect ELISA** (间接法测抗体)
- **Competitive ELISA** (竞争法测抗原/抗体)

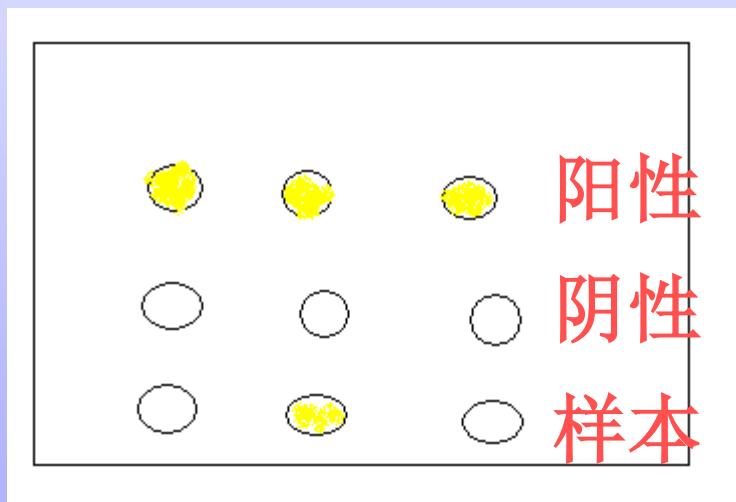
## 双抗体夹心法测抗原



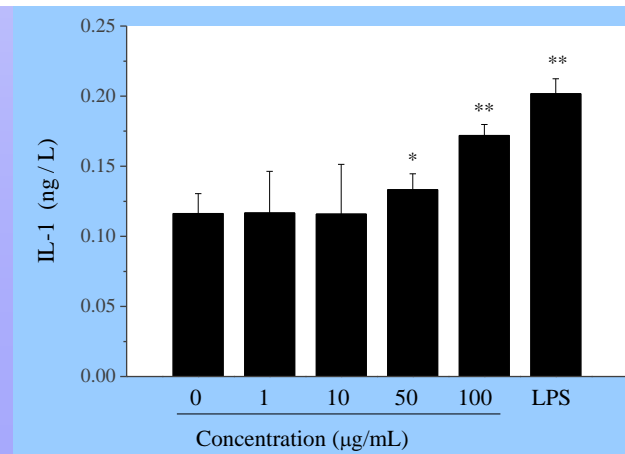
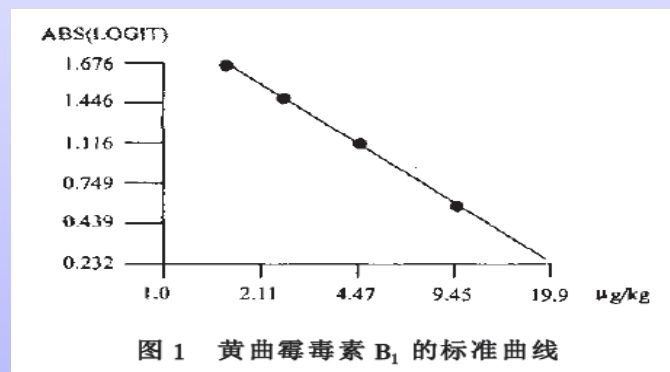
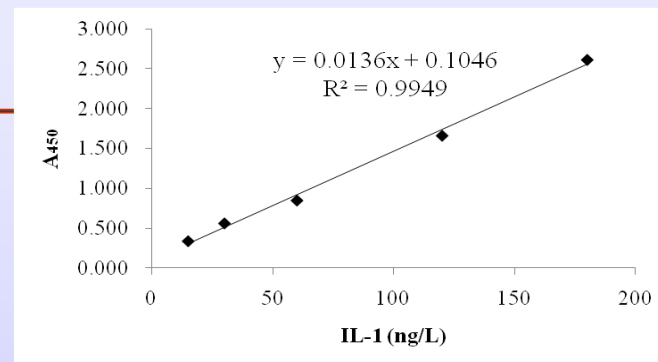


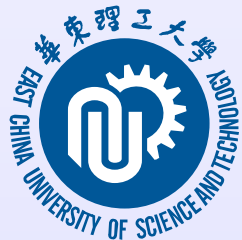
# Elisa 定性、定量:

## 定性鉴别



## 定量





# 问题

1. 如果让你鉴别一个核酸药物（成分），哪些方法？
2. 检测乙肝病毒，除了特异抗原检测外，其它方法？



## 显色法

甲基绿使DNA显绿  
吡罗红使RNA显红

## 紫外光谱法

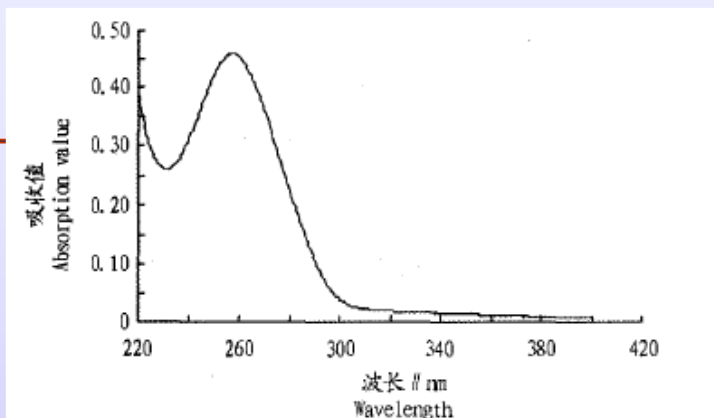
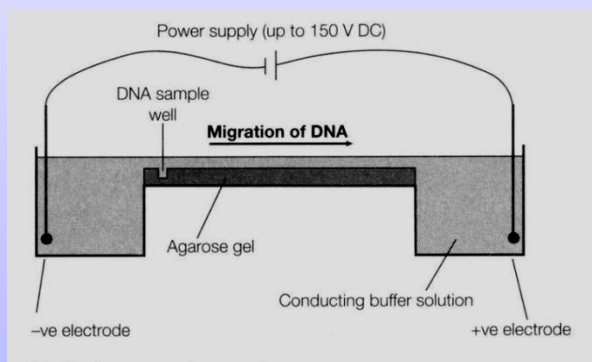
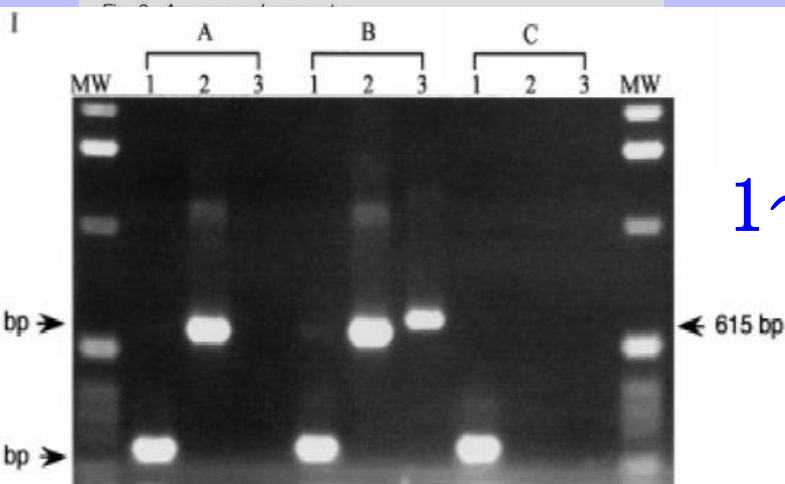
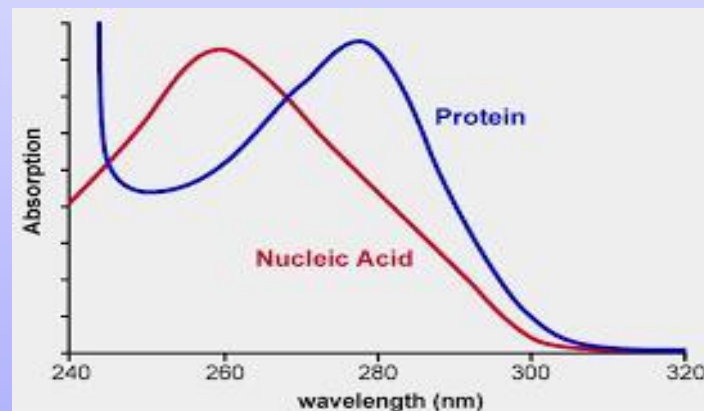


图1 大豆基因组 DNA 紫外光谱



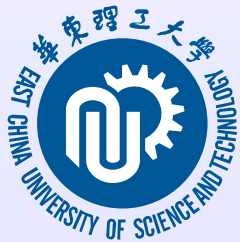
## 电泳法



1~2%的琼脂糖凝胶

EB溴乙锭染色

问题：  
特异性？



# 乙肝病毒的检测

Sandwich ELISA

## □ 乙型肝炎血清标志物-特异性抗原

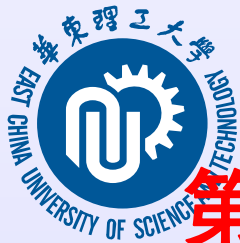
- Hepatitis B surface antigen (HBs-Ag) : 表面抗原
- Hepatitis B surface antibody (HBs-Ab): 表面抗体
- HBeAg : E-抗原
- HBe-Ab: E-抗体
- HBc-Ab- IgG:核心抗体IgG

大三阳: 1, 3, 5 (+) ; 小三阳: 1, 4, 5 (+)

## □ 遗传物质检测, 特异DNA片段检测

问题: 如何得到DNA样品?

俗称的乙肝“两对半”



## 第五章 目标成分常用定性鉴别方法(三)

### Nucleic Acid Detection Tech

### 核酸检测技术

- Polymerase Chain Reaction  
(PCR, 聚合酶链式反应)
  - Southern Blot ,Northern blot  
(核酸杂交技术)
- nucleic acid



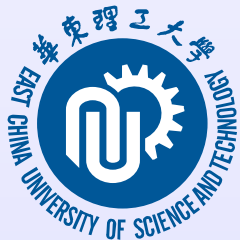
# 第一节 聚合酶链式反应 (PCR)

## PCR: Polymerase Chain Reaction

是一种选择性体外扩增DNA片段的方法。

PCR is a technique widely used in molecular biology. It derives its name from one of its key components, a DNA polymerase used to amplify a piece of DNA by in vitro enzymatic replication.

PCR is used to amplify specific regions of a DNA strand (the DNA target).



# Main content of PCR

**Principle of PCR**

**(PCR技术的构建原理)**

**Reaction system and procedure**

**(PCR反应的体系及反应过程)**

**Detection of the target products**

**(PCR产物的分析检测)**

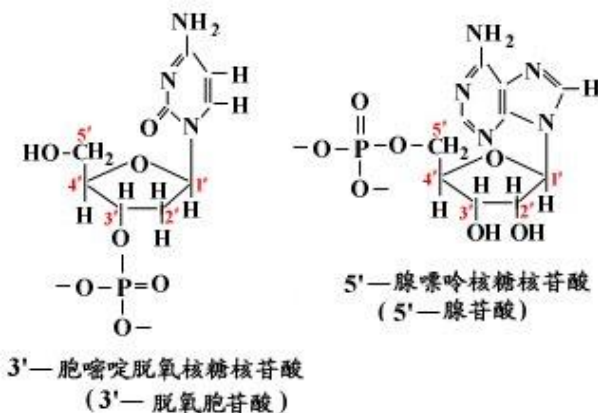
**Application of PCR**

**(PCR技术的应用)**

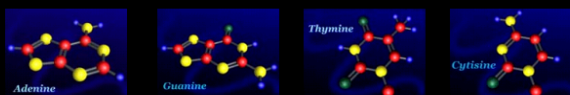


核酸是遗传信息的载体, 基因是遗传物质结构和功能的基本单位。  
不同物种性状的差异是它们基因差异的集中体现。

核酸 → 核苷酸 { 核糖 戊糖  
                  { 磷酸 碱基



DNA就是脱氧核糖核酸（长链）



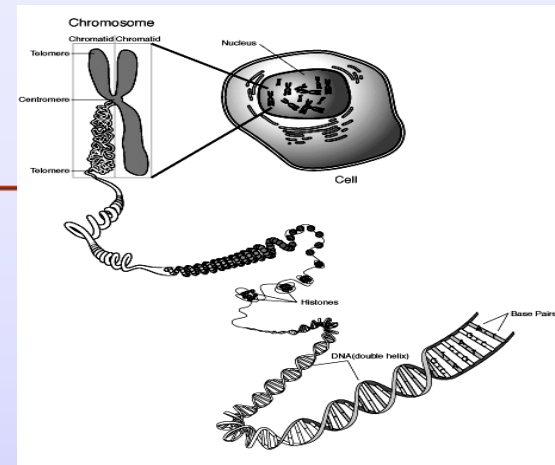
腺嘌呤 (A) 鸟嘌呤 (G) 胸腺嘧啶 (T) 胞嘧啶 (C)



基因测序就是读出 A-C-G-T-G-G-A-C-G.....



图4-4 DNA分子模型和模式图

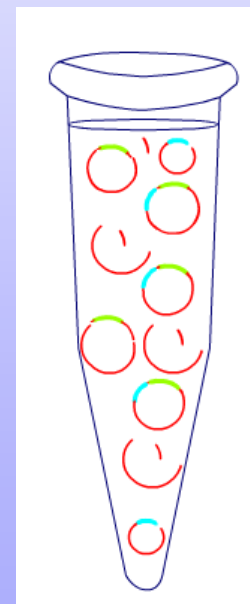


A gene is a set of segments of nucleic acid that contains heredity information

对基因结构和功能的研究，有助于解开生命的奥秘  
对特异性基因的鉴定，有助于身份确认（定性检测）

**How to get enough gene?**

**如何获得足够量的目的基因以供研究？**





# Methods to get target gene: 获取基因的基本方法

- **Extract from enough samples:** 直接从大量的样品中提取基因

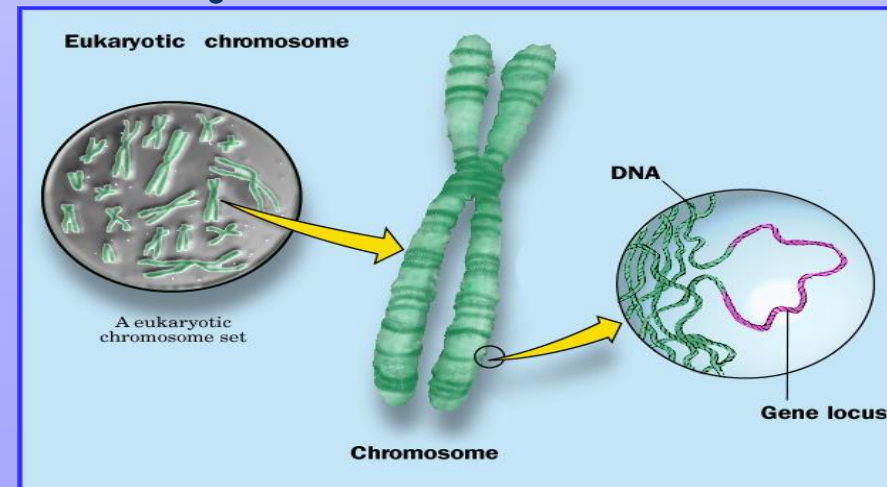
- **Synthesize according to known gene sequence**

根据基因序列, 用人工合成方法获得相应的基因

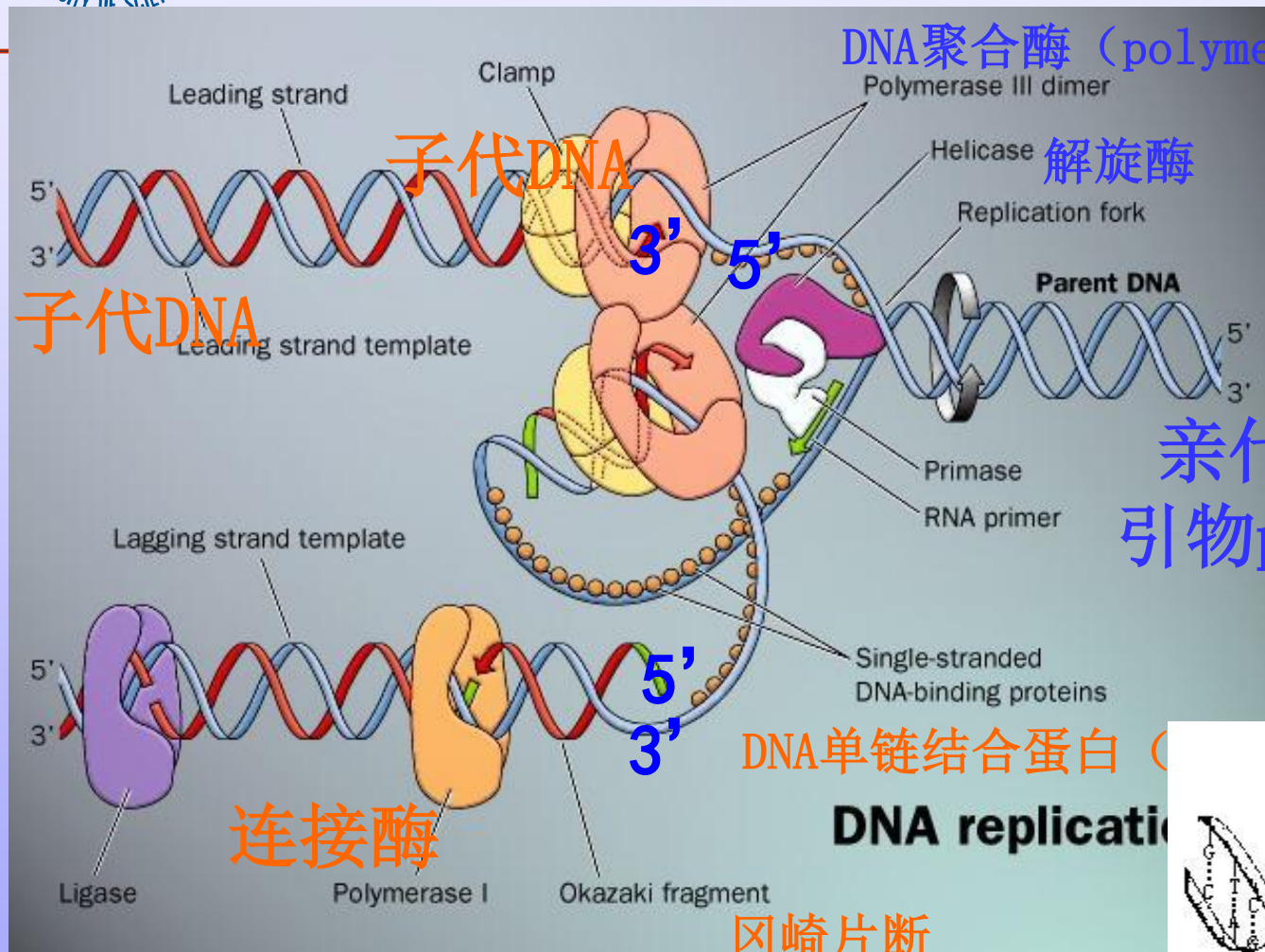
- **Gene replication *in vitro***

模拟细胞内基因复制过程, 获得足够量目的基因——基因体外扩增体系的构建

## 1. Principles of DNA amplification by *in vitro* ??



# 细胞体内DNA（基因）复制的机制：半保留复制



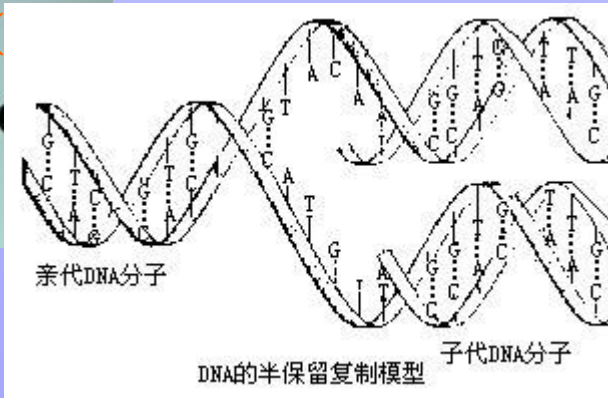
酶合适的离子环境

亲代DNA  
引物primer

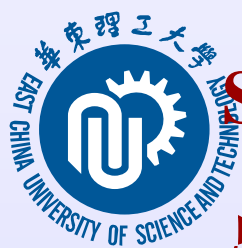
DNA单链结合蛋白

DNA replication

冈崎片断



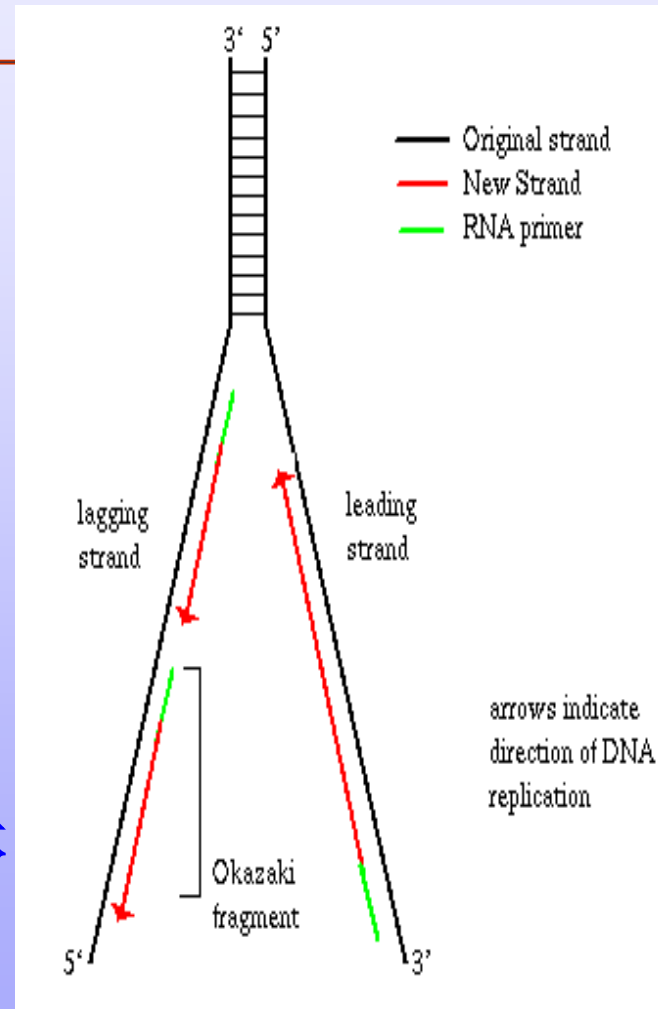
DNA合成所需的四种脱氧核苷酸

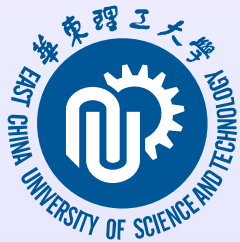


# Summarization: factors of gene replication *in vivo*

## 总结：DNA体内复制必备条件：

- (1). **DNA Template** (DNA模板) :  
需复制的DNA样品
- (2). **DNA Helicase** (DNA解旋酶) :  
解开DNA双螺旋。
- (3). **Primer** (引物) :  
DNA聚合酶在其上延伸合成子代DNA
- (4). **DNA polymerase** (DNA聚合酶) :  
DNA合成酶
- (5). **Reaction buffer** (DNA聚合酶反应体系) :  
提供酶反应所需的离子条件等。
- (6). **ATP、CTP、GTP、TTP** :  
DNA合成所需的四种脱氧核苷酸。





# 模拟基因的体内合成机制, 构建体外基因扩增反应体系: **PCR (Polymerase Chain Reaction)** 聚合酶链式反应

## 2. Standard PCR reaction system

### 标准的PCR反应体系:

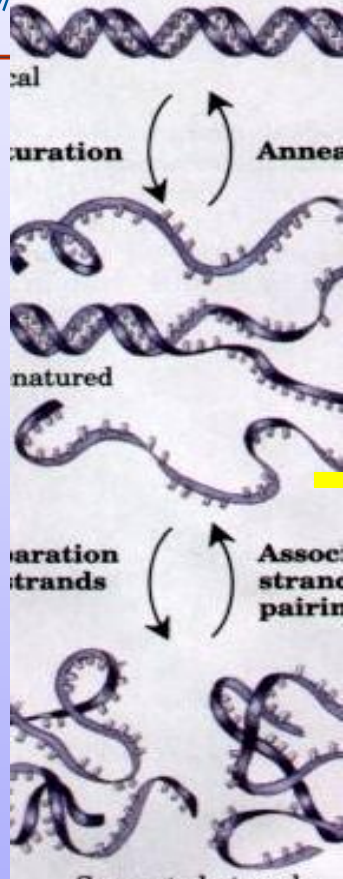
Reaction buffer (contain $Mg^{2+}$ )	10 $\mu$ l
4 species of dNTP mixture	200 $\mu$ mol/L each
Primer (Forward, Reverse)	10~100 pmol each
DNA Template	0.01~2 $\mu$ g
DNA polymerase (Taq)	2.5U
Add distilled water till	100 $\mu$ l



问题: 为何没有DNA解旋酶?



# 解旋酶的功能：使DNA双链解旋成两条单链DNA



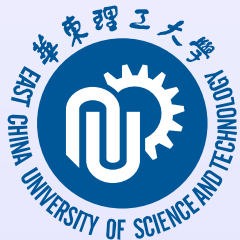
- 96个镀金反应孔
- 控温速度：4°C/Sec
- 自动防蒸发热盖设计
- 99个程序设计记忆
- 99h自动4°C保温
- 断电自动记忆保护

PCR thermal cycler

热变性  
DNA denaturation

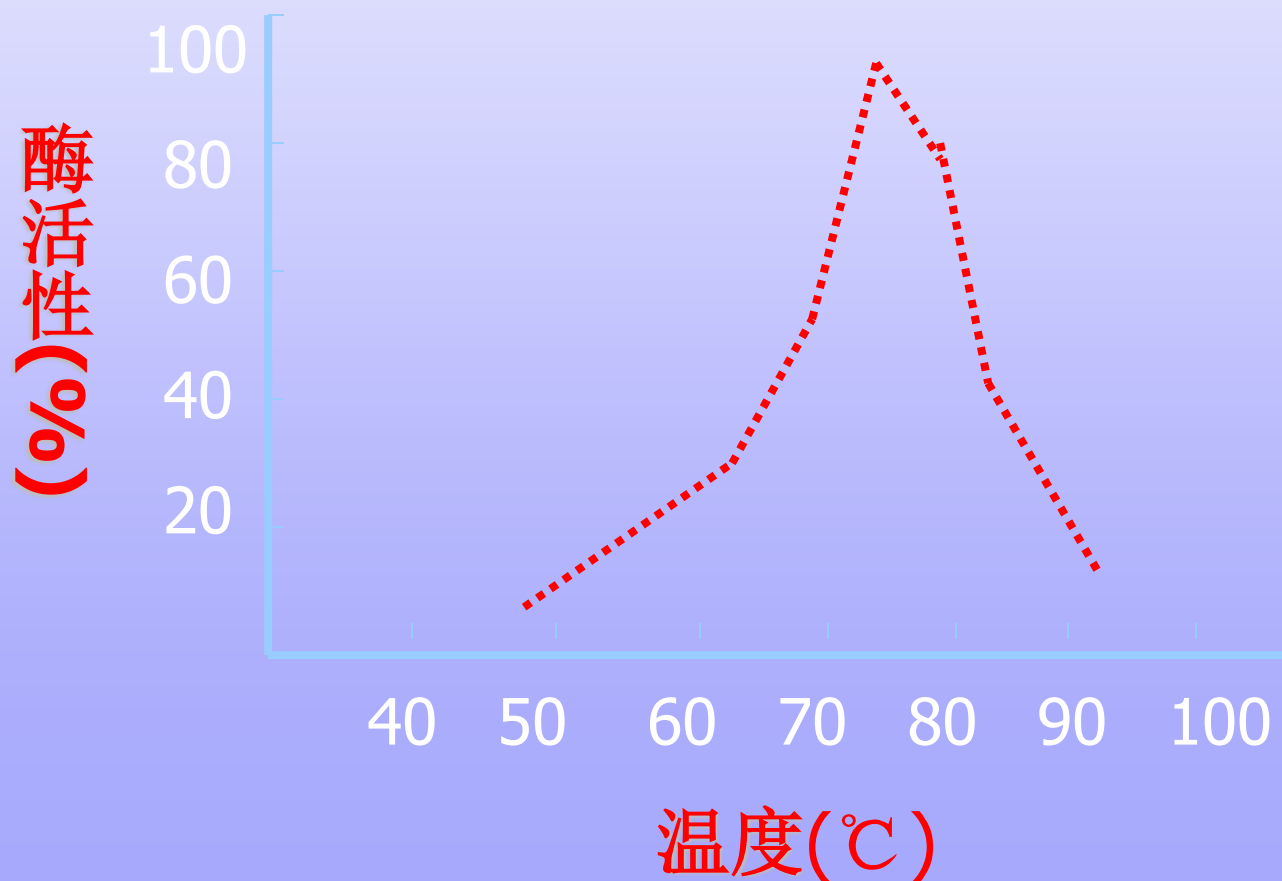
问题：热变性导致聚合酶失活？  
解决办法.....Taq酶？





1988年Saiki等将耐热DNA聚合酶 (Taq) 引入了PCR技术

## Taq\_DNA聚合酶 (thermus aquaticus)



### 3. PCR reaction procedure

**Denaturing(变性) – Annealing(退火) – Elongation(延伸)**  
三温度法。

(1). **Denaturing at 90~95°C (变性):**

双链DNA在90~95°C, **2min**。

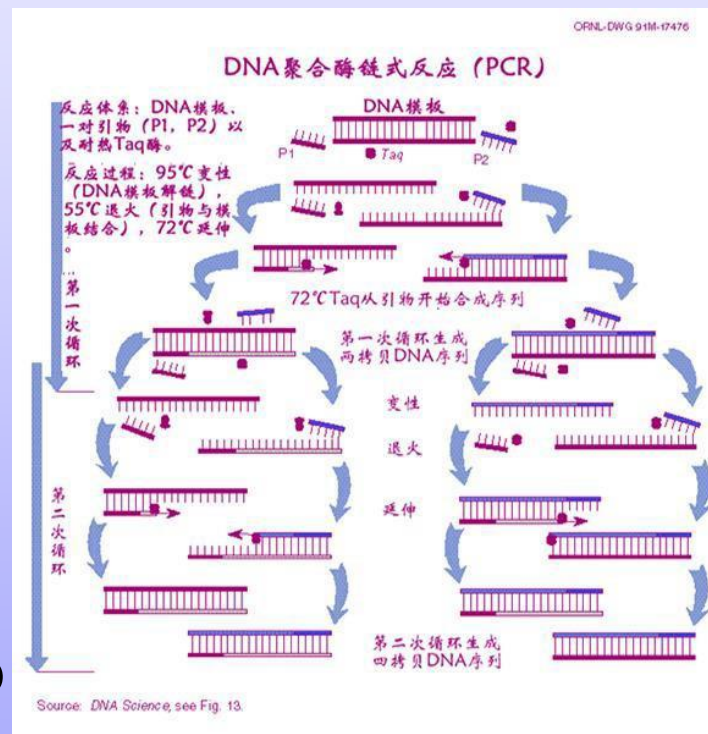
(2). **Annealing at 40~60°C (引物退火):**

迅速冷却至40~60°C, 引物退火并结合到靶序列上, **1min30s**。

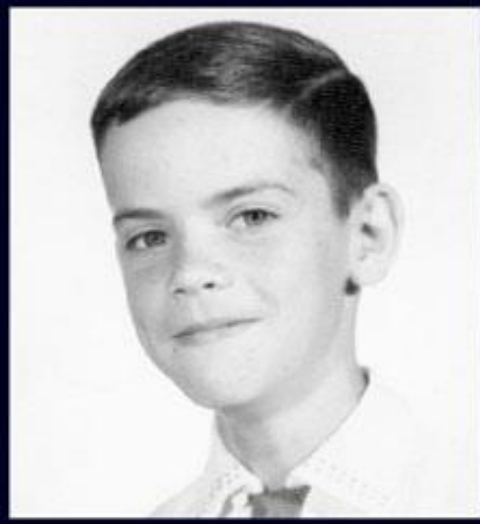
(3). **Elongation at 70~72°C (模板延伸):**

快速升温至70~72°C, 在DNA聚合酶(Taq酶)的作用下, 使引物链模板延伸复制DNA, **1min30s**。

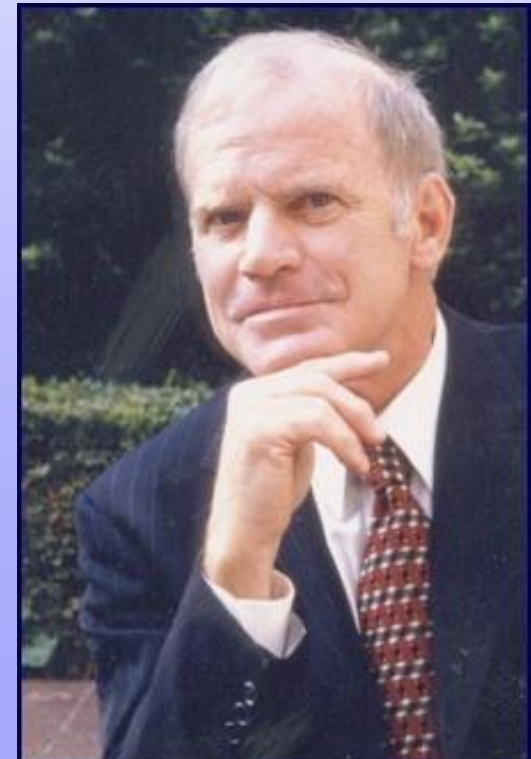
• 循环次数:**25-30 cycles**。



# Kary B. Mullis (1944—)



Developed in 1983 by Kary Mullis, won Nobel Prize in 1993



问题:

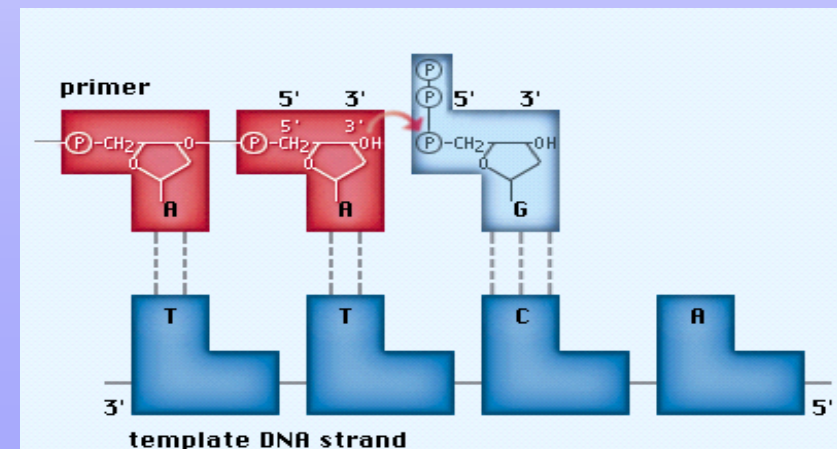
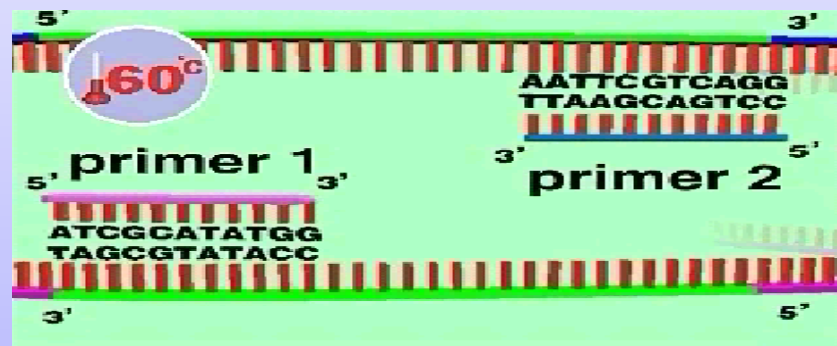
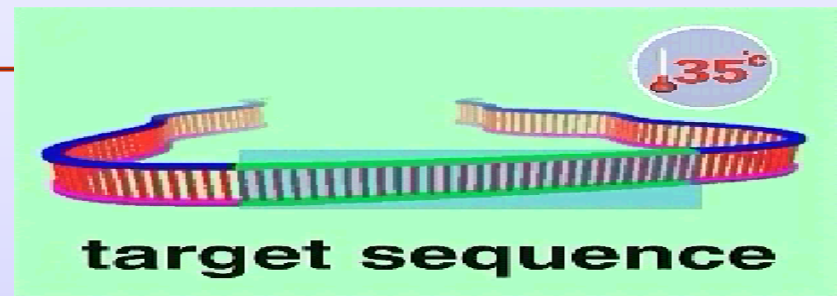
PCR能扩增出需要的特定目的基因吗?

## 4. PCR反应特点

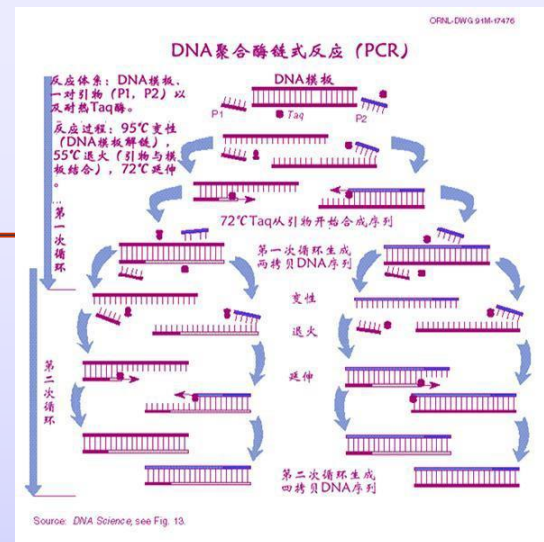
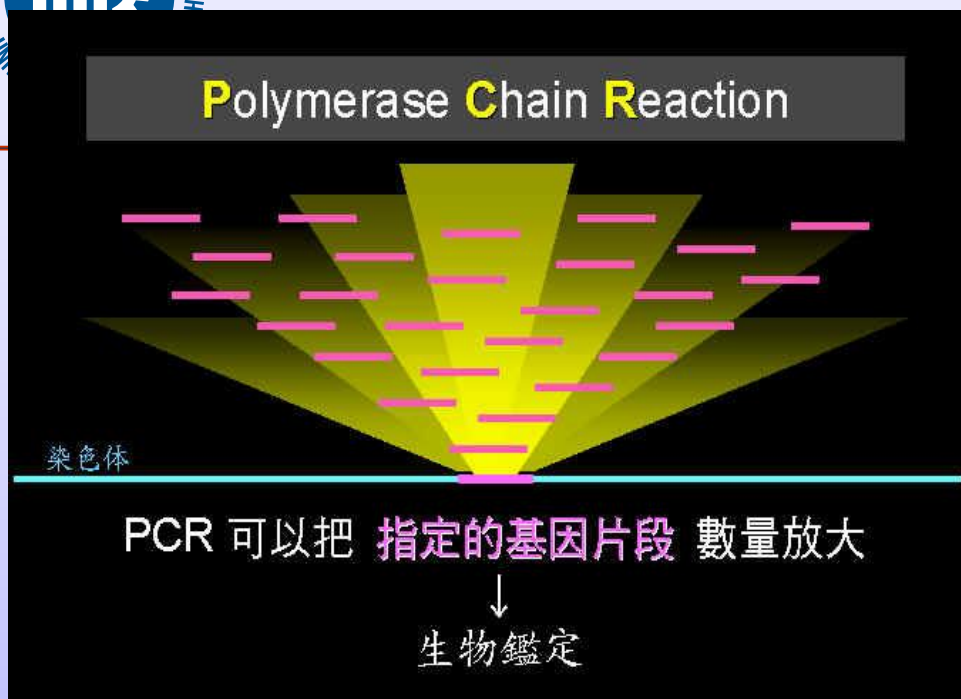
### (1). 特异性强

PCR反应的特异性决定因素为:

- ① 引物与模板DNA特异正确的结合
- ② 碱基配对原则
- ③ DNA聚合酶合成反应的忠实性
- ④ 靶基因的特异性与保守性。



## (2). 灵敏度高



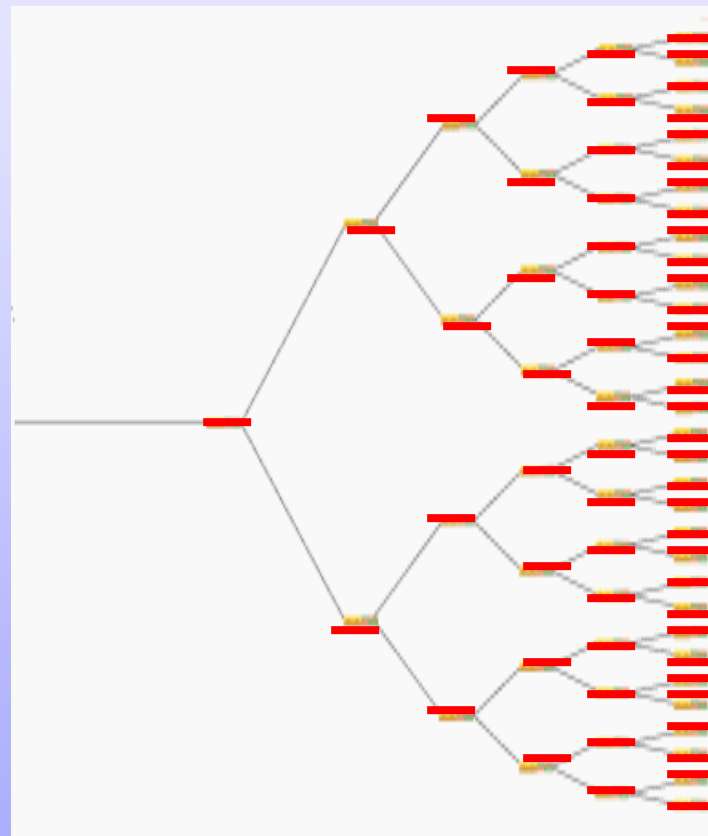
呈指数增长  
理论 模板扩增30轮 1ng-  
-----1g

- PCR产物的生成量是以指数方式增加的, 能将皮克量级的起始待测模板扩增到微克水平。
- 能从100万个细胞中检出一个靶细胞; 在病毒的检测中, PCR的灵敏度达3RFU (空斑形成单位); 在细菌学中最小检出率为3个细菌。



### (3). 简便、快速

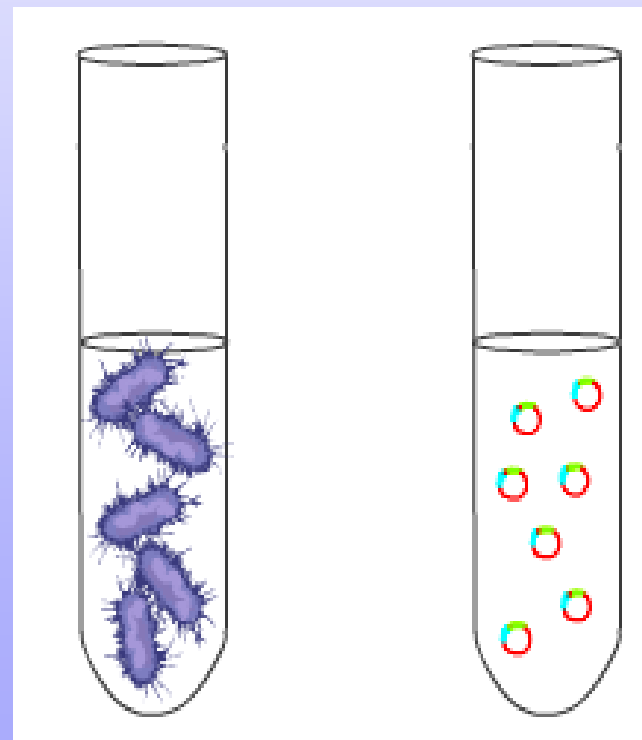
- PCR反应用耐高温的Taq DNA聚合酶，一次性地将反应液加好后，即在PCR仪内进行变性-退火-延伸反应，一般在2~4 小时完成扩增反应。
- 扩增产物一般用电泳分析，不一定要用同位素，无放射性污染、易推广。



反应结果：反应产物以指数级增加( $2^n$ )

## (4). 对标本的纯度要求低

- 不需要分离病毒或细菌及培养细胞，DNA、粗制品及总RNA均可作为扩增模板。
- 可直接用临床标本如血液、体腔液、洗嗽液、毛发、细胞、活组织等粗制的DNA扩增检测。



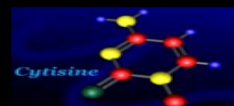
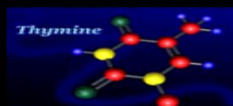
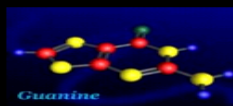
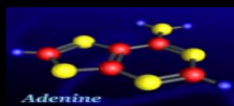


## 问题：

如何判断PCR反应是否扩增得到特定的目的基因？

不同的基因在片断大小和脱氧核苷酸排列顺序是不同的。

DNA就是脱氧核糖核酸（长链）



腺嘌呤（A） 鸟嘌呤（G）胸腺嘧啶（T） 胞嘧啶（C）



基因测序就是读出 A-C-G-T-G-G-A-C-G.....

# 5. Detection of PCR products

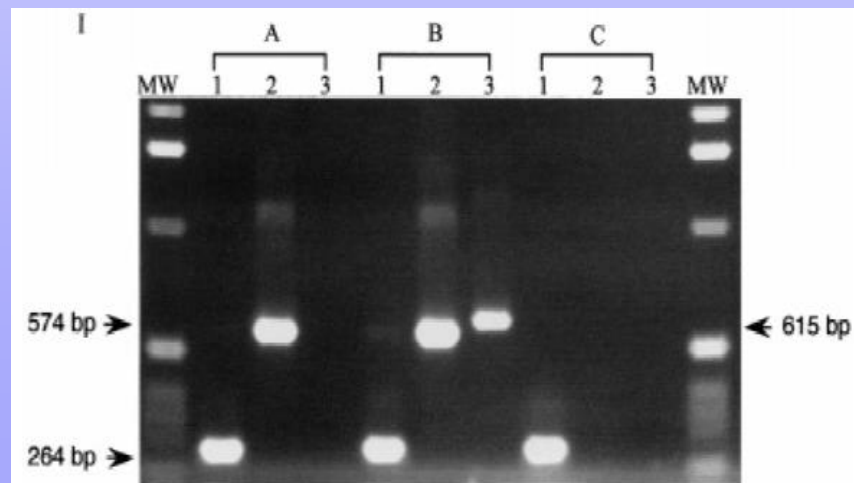
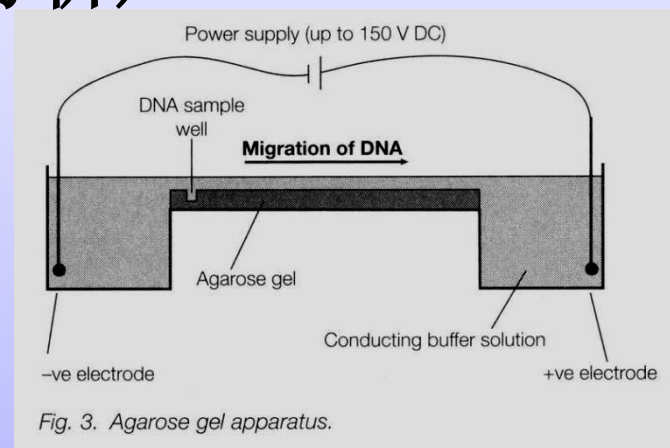
## PCR扩增产物检测方法

### 1) Gel Electrophoresis(凝胶电泳分析)

- 琼脂糖凝胶电泳:

PCR产物电泳, EB溴乙锭染色紫外仪下观察, 初步判断产物的特异性。通常应用1~2%的琼脂糖凝胶, 供检测用。

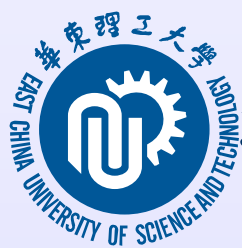
- 注意:** 溴化乙锭具有致癌性, 操作时要带手套





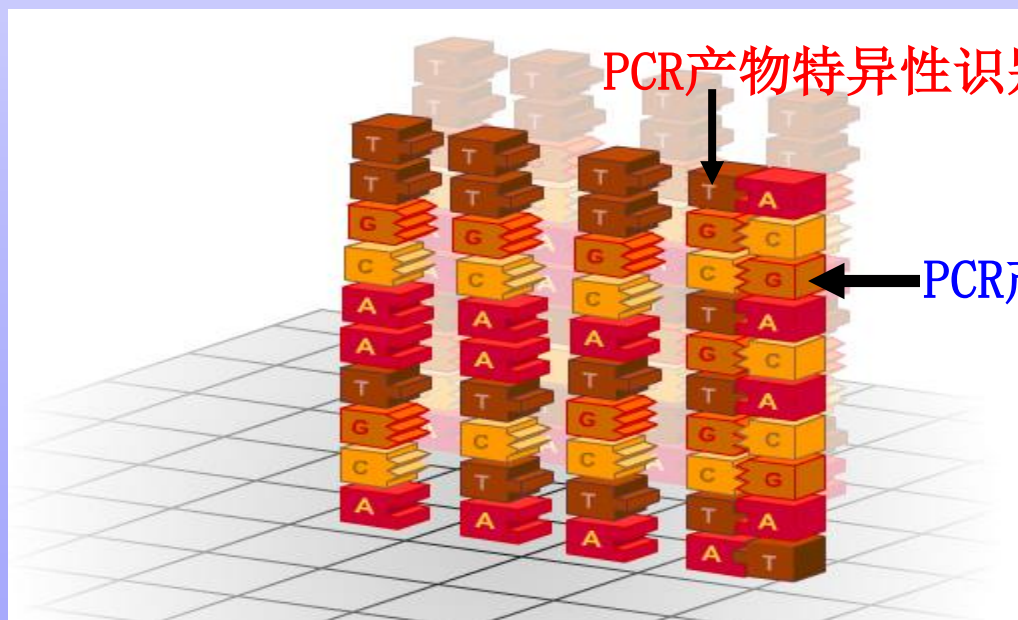
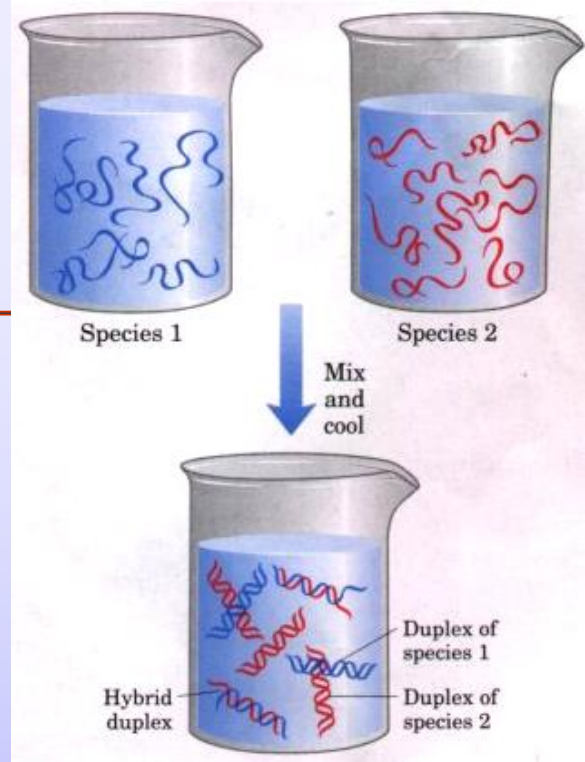
四种颜色代表四种不同的碱基

## 检测PCR产物特异性的最可靠方法



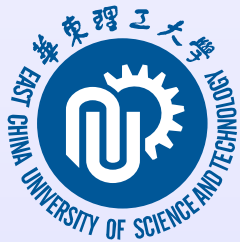
### 3) Molecular hybridization (分子杂交)

**分子杂交：**两条单链，通过碱基配对，形成稳定双链。是检测PCR产物特异性的有力证据。常用**Southern Blot**技术。



PCR产物特异性识别片段 (探针)

PCR产物片段



## 6. Application of PCR

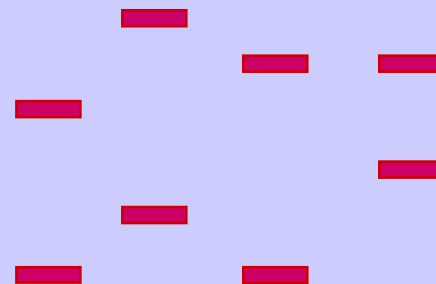
- Identity detection (身份确认)
- Diagnosis of diseases (疾病诊断)
- Harmful microbes detection in Foods  
食品中病原微生物的检测
- Detection of Transgenic Food  
转基因食品的检测

病原微生物基因

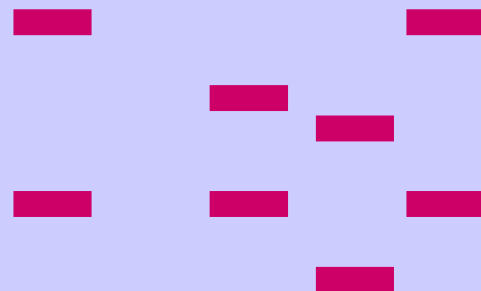
正常人 (-)

病人 (+)

父 父' 子 母



现 嫌1 嫌2 嫌3





# PCR技术在身份确认中的应用

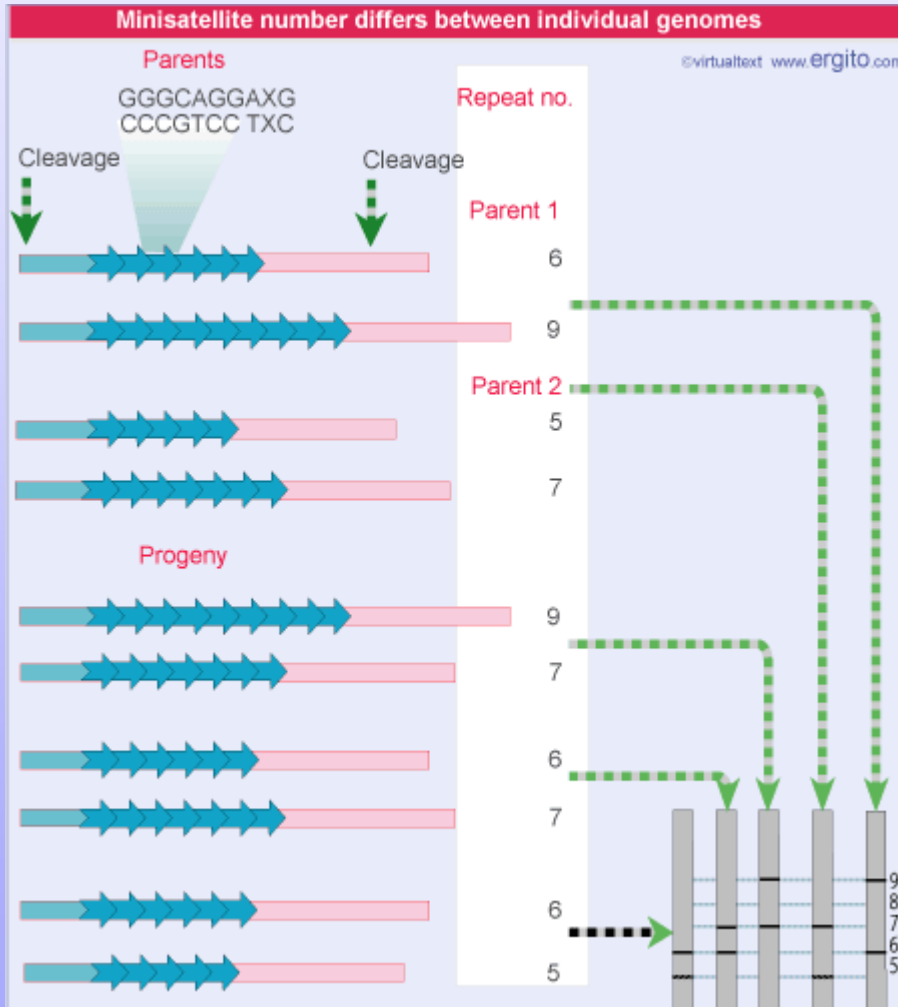
- 1998年克林顿拉链门事件
- 2006年伊拉克总统萨达姆绞刑
- 2011年基地组织拉登事件
- 亲子鉴定



拉链门主角



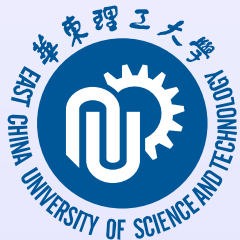
## PCR-STR



**短串联重复序列(short tandem repeat, STR)**, 也叫做微卫星DNA (microsatellite) 或简单重复序列 (Simple Sequence Repeat, SSR) 是一类广泛存在于真核生物基因组中的DNA串联重复序列。它由**2-6 bp**的核心序列组成, 呈串联重复排列, 重复次数通常在**15-30**次。由于STR较易通过PCR扩增、电泳分型, 因而成为一个日益重要的**遗传标记系统**, 现已广泛地应用于亲子鉴定、法医学个体识别等领域。理论上, 在目前**地球上近100亿**人口中, 没有任何**2**个无关个体在这**14**个STR位点基因型完全相同。

**亲子鉴定**常选择**15**个位点左右。





# 案例分析-血斑检验认定男孩生父

[ 鉴定事由 ]

认定张某和吴某俩人谁是男孩的生父

[ 检验及结果 ]

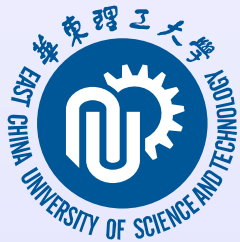
李某（女）、孩、吴某和张某的血斑检测

7/13不同

吴某与男孩之间存在着亲生血缘关系，亲子关系概率值经计算可达99.99%以上。

张某与男孩之间不存在着亲生血缘关系

检测系统	李某血样(母)	男孩血样	吴某血样	张某血样
D3S1358	16, 17	16, 17	16, 16	14, 15
vWA	16, 18	16, 16	16, 16	17, 19
FGA	22, 23	23, 24	24, 26	19, 19
D8S1179	10, 12	12, 13	13, 16	14, 14
D21S11	28, 29	28, 30	30, 31	30, 31
D18S51	14, 15	13, 14	13, 15	15, 15
D5S818	11, 12	10, 12	10, 13	11, 11
D13S317	8, 10	10, 11	11, 11	8, 11
D7S820	8, 12	8, 12	12, 12	12, 13
D16S539	9, 11	11, 11	9, 11	10, 11
TH01	7, 8	7, 8	7, 7	7, 9
TPOX	8, 8	8, 8	8, 8	8, 11
CS1PO	11, 13	12, 13	11, 12	10, 11



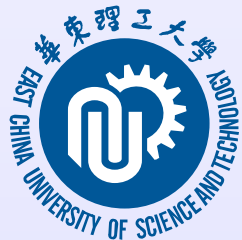
# PCR技术在食品检测中应用

## ■ 食品中病原微生物的检测

- 单核细胞增生李斯特菌
- 大肠杆菌
- 沙门氏菌
- 副溶血性弧菌
- 金黄色葡萄球菌

## ■ 食品中转基因成分的检测

- 转基因植物食品
- 转基因动物食品



# 食品中病原微生物的分析检测

## 食品中副溶血性弧菌PCR快速检测方法的研究

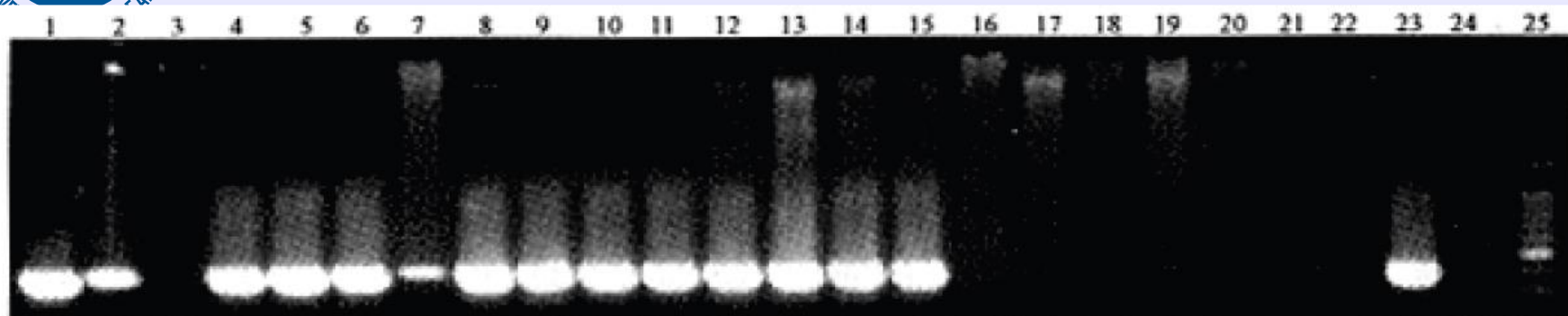
副溶血性弧菌特异性 $tl$ 基因

上游引物5'—AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG—3'

下游引物5'—GCTACTAGCACTAGCACTCTGC—3'

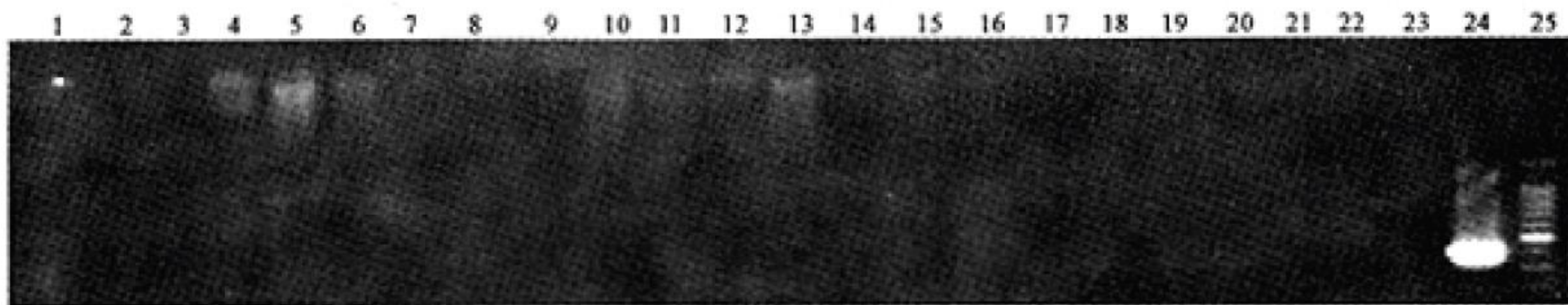
样品：冷冻虾仁、沙丁鱼罐头,均购于北京某超市。

## 方法特异性



1,2 副溶血性弧菌;3 明斯特沙门氏菌;4~15 副溶血性弧菌;16 痢疾1型志贺氏菌;17 奇异变形杆菌;18 小肠结肠炎耶尔森氏菌;19 阴沟肠杆菌;20 蜂房哈夫尼亚菌;21 臭鼻克雷伯氏菌;22 粘质沙雷氏菌;23 阳性对照;24 阴性对照;25 100 bp Marker。

图1 副溶血性弧菌 PCR 的引物特异性(1)

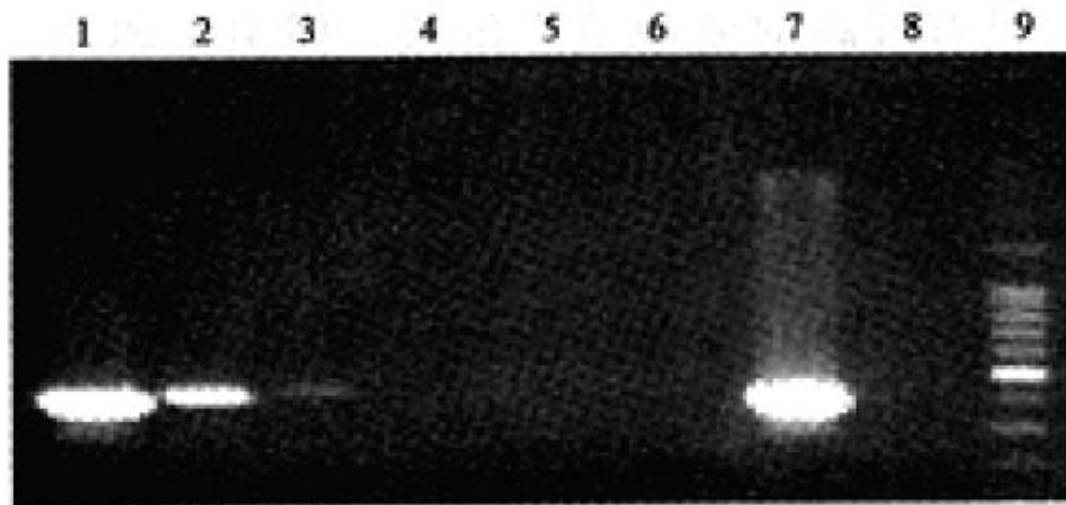


1 弗劳地枸橼酸杆菌;2 雷极氏变形杆菌;3 肠炎沙门氏菌;4 肿瘤克雷伯氏菌;5 乙型副伤寒沙门氏菌;6~12 大肠杆菌;13 宋内氏志贺氏菌;14 鲍氏IV型志贺氏菌;15 蜡样芽胞杆菌;16~18 单增李斯特氏菌;19~22 金黄色葡萄球菌;23 阴性对照;24 阳性对照;25 100 bp Marker。

图2 副溶血性弧菌 PCR 的引物特异性(2)

## 2.2 方法的灵敏性

图3 结果表明对于副溶血性弧菌的纯培养，PCR 的检出限为  $10^6$  CFU/mL。

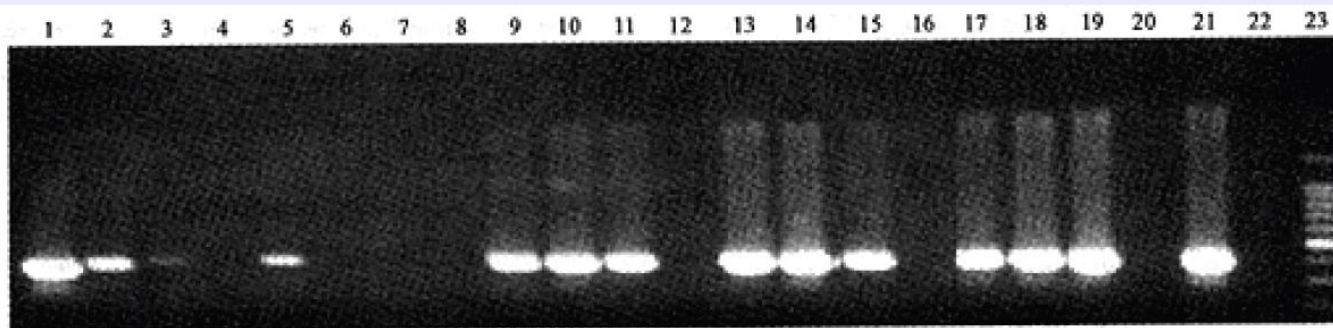


1  $10^8$  CFU/mL; 2  $10^7$  CFU/mL; 3  $10^6$  CFU/mL; 4  $10^5$  CFU/mL; 5  $10^4$  CFU/mL; 6  $10^3$  CFU/mL; 7 阳性对照; 8 阴性对照; 9 100 bp Marker。

图3 副溶血性弧菌 PCR 的灵敏性

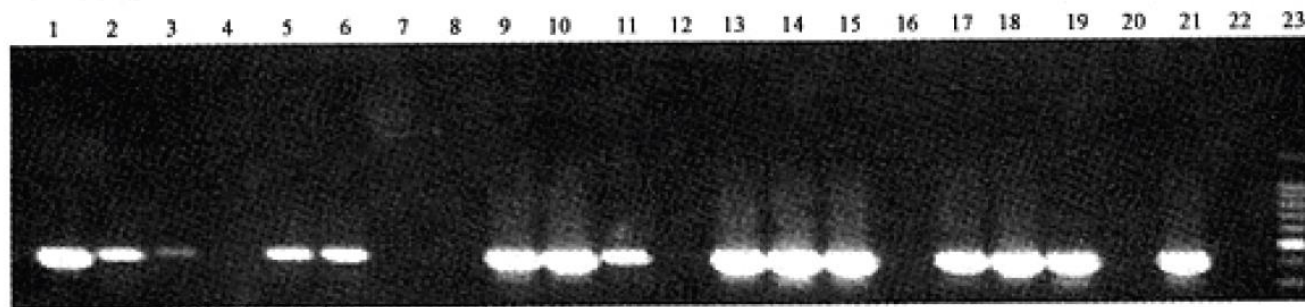


## 样品测定



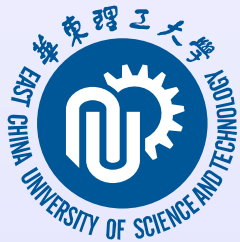
1 起始菌液;2 起始菌液 10 倍稀释;3 起始菌液 100 倍稀释;4 起始菌液 1 000 倍稀释;5  $10^2$  CFU/mL 增菌 4 h;6  $10$  CFU/mL 增菌 4 h;7 1 CFU/mL 增菌 4 h;8 增菌液空白对照;9  $10^2$  CFU/mL 增菌 6 h;10 10 CFU/mL 增菌 6 h;11 1 CFU/mL 增菌 6 h;12 增菌液空白对照;13  $10^2$  CFU/mL 增菌 8 h;14 10 CFU/mL 增菌 8 h;15 1 CFU/mL 增菌 8 h;16 增菌液空白对照;17  $10^2$  CFU/mL 增菌 10 h;18 10 CFU/mL 增菌 10 h;19 1 CFU/mL 增菌 10 h;20 增菌液空白对照;21 阳性对;22 阴性对照;23 100 bp Marker。

图 4 人工污染副溶血性弧菌的沙丁鱼罐头 PCR 检验结果



1 起始菌液;2 起始菌液 10 倍稀释;3 起始菌液 100 倍稀释;4 起始菌液 1 000 倍稀释;5  $10^2$  CFU/mL 增菌 4 h;6  $10$  CFU/mL 增菌 4 h;7 1 CFU/mL 增菌 4 h;8 增菌液空白对照;9  $10^2$  CFU/mL 增菌 6 h;10 10 CFU/mL 增菌 6 h;11 1 CFU/mL 增菌 6 h;12 增菌液空白对照;13  $10^2$  CFU/mL 增菌 8 h;14 10 CFU/mL 增菌 8 h;15 1 CFU/mL 增菌 8 h;16 增菌液空白对照;17  $10^2$  CFU/mL 增菌 10 h;18 10 CFU/mL 增菌 10 h;19 1 CFU/mL 增菌 10 h;20 增菌液空白对照;21 阳性对照;22 阴性对照;23 100 bp Marker。

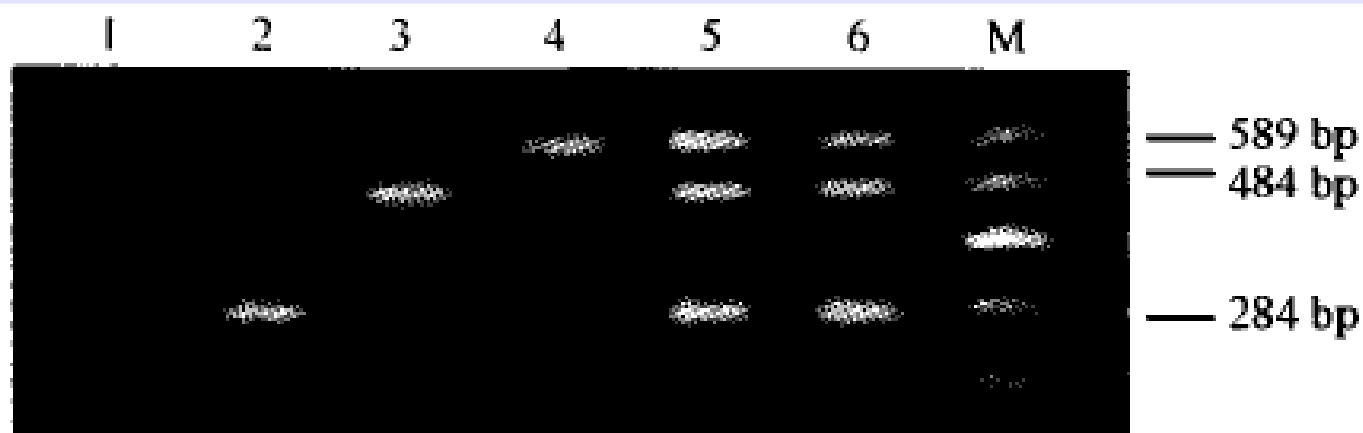
图 5 人工污染副溶血性弧菌的冻虾仁 PCR 检验结果



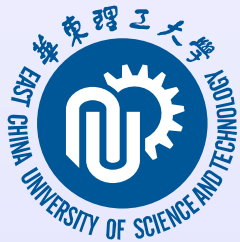
## 污染病原菌牛奶样品的多重PCR检测

- 将金黄色葡萄球菌、志贺菌和沙门菌，以及其他微生物分别或同时污染无菌的牛奶样品，然后采用7.5% NaCl肉汤和GN增菌培养基分别进行增菌，然后提取DNA，进行多重PCR检测。
- 根据金黄色葡萄球菌的*nuc*基因、志贺菌的*ipaH*基因、沙门菌的*invA*基因设计引物，通过多重聚合酶链反应(PCR)反应对食品样品中上述三种病原菌的目标基因进行扩增





- 1: 灭菌牛奶(阴性对照); 2: 人为污染沙门菌的灭菌牛奶;  
 3: 人为污染金黄色葡萄球菌的灭菌牛奶; 4: 人为污染志贺菌的  
 灭菌牛奶; 5: 人为污染三种病原菌的灭菌牛奶;  
 6: 人为污染三种病原菌和其他杂菌的灭菌牛奶;  
 M: 100 ~ 600bp Marker



# 食品中转基因成分的分析检测

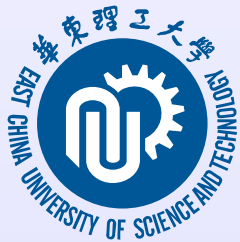
■ **转基因食品**(*Genetically Modified Foods, GMF*)是利用现代分子生物技术，将某些生物基因转移到其他物种中，改造生物遗传物质，使其在形状、营养品质等方面向人们所需要的目标转变。

■ 分为**植物性转基因食品**、**动物性转基因食品**、**转基因微生物食品**和**转基因特殊食品**。

■ **转基因食品带来的隐患：**

毒性问题；过敏反应问题；营养问题；对抗生素的抵抗作用；对环境的威胁

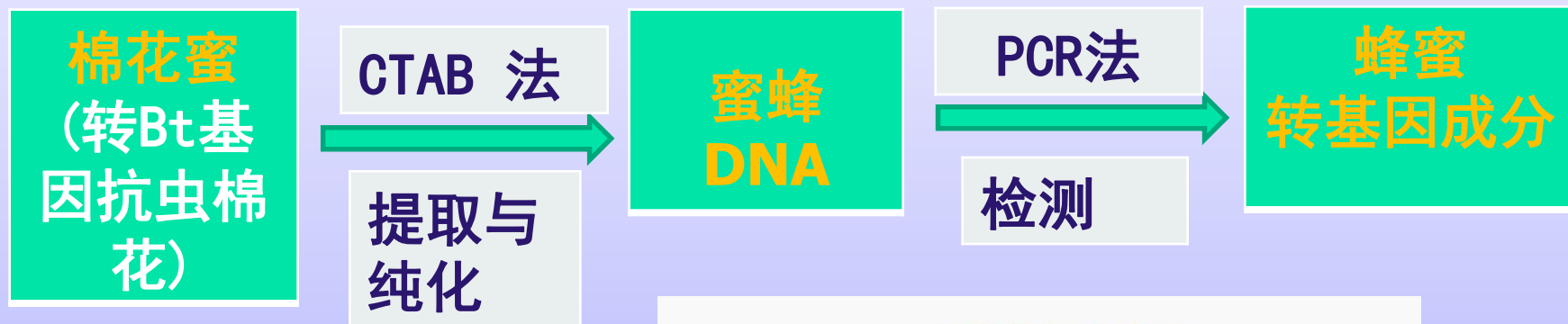




## ■ PCR技术检测食品中转基因成分原理

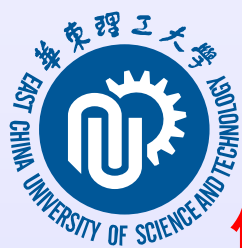
以主要食用菌为例，利用PCR检测方法对其中转基因成分定性检测。将样品经过提取DNA后，针对转基因食用菌所导入的常见**外源基因的基因序列设计引物**，通过PCR技术，对外源基因的DNA片段进行特异性扩增，根据实验结果，判定该食用菌样品是否含有外源基因成分。

## 例子：棉花和蜂蜜中转基因成分的PCR检测



抗虫棉花（棉铃虫）



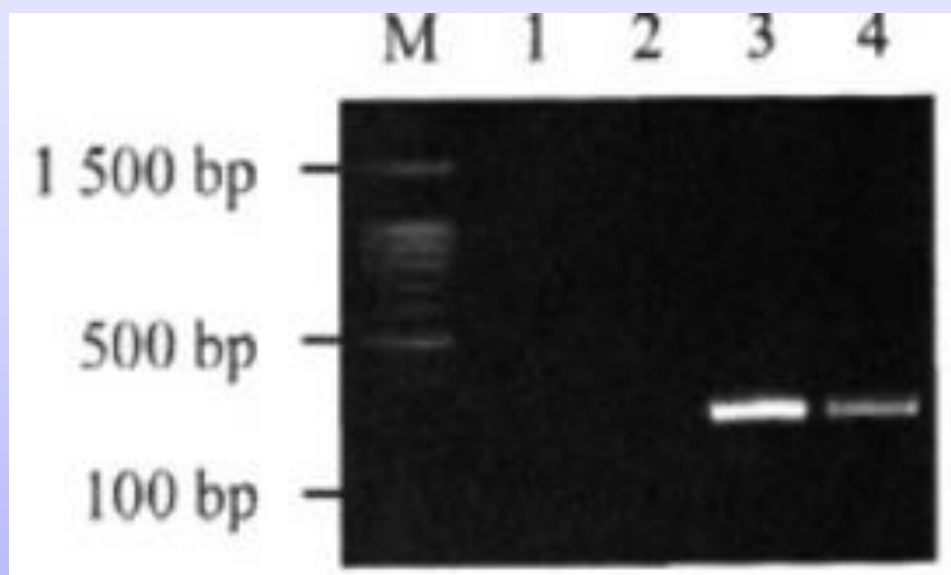


## 供试材料

- 棉花蜜 （转基因抗虫棉 33B 棉花）。
- 转基因抗虫棉 33B 棉花种子 。
- 非转基因棉花K312 种子 。

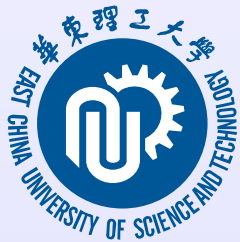
Table 2 Sequences of primers used for PCR detection

基因	引物序列(5'→ 3')	产物片段大小 (bp)
Gene	Primer sequence (5'→ 3')	Product sizes (bp)
<i>Sad1</i>	CCAAAGGAGGTGCCTGTTCA	108
	TTGAGGTGAGTCAGAATGTTGTTC	
<i>CaMV35S</i>	GCTCCTACAAATGCCATCATTGC	195
	GATAGTGGGATTGTGCGTCATCCC	
<i>Nos</i>	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	180
	TTATCCTAGTTTGCGCGCTA	
<i>Bt</i>	GAAGGTTTGAGCAATCTCTAC	340
	CGATCAGCCTAGTAAGGTCGT	



Bt基因

1: 空白对照; 2: 非转基因棉花; 3: 转基因棉花; 4: 蜂蜜



## 第二节 Nucleic Acid Hybridization 核酸杂交技术

**Probe (探针) : A labelled DNA (or RNA) fragment that contains sequence that is complementary to the specific DNA fragment.**

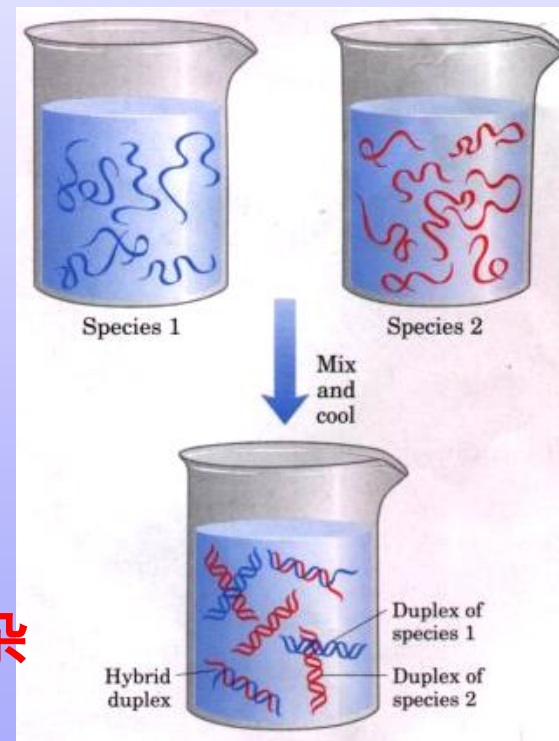
放射性或生物素等非放射性标记的**DNA 或RNA**片段。

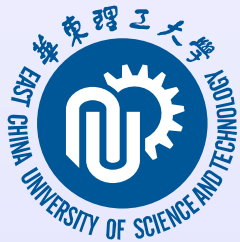


# Nucleic Acid Hybridization

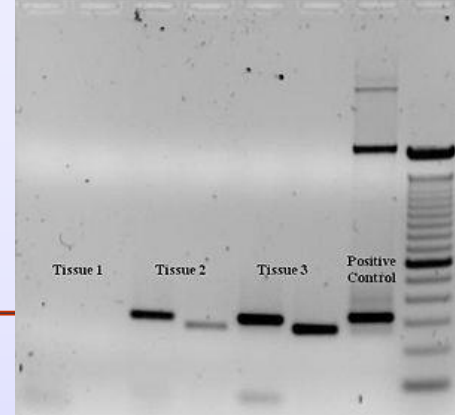
Nucleic acid hybridization is a fundamental tool in molecular genetics which takes advantage of the ability of individual single-stranded nucleic acid molecules to form double-stranded molecules (that is, to hybridize to each other).

互补的核苷酸序列通过Watson-Crick碱基配对形成稳定的杂合双链分子DNA分子的过程称为杂交。杂交过程是高度特异性的，可以根据所使用的探针已知序列进行特异性的靶序列检测。





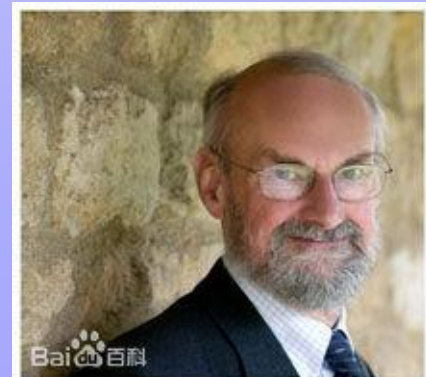
# 1. Southern Blot

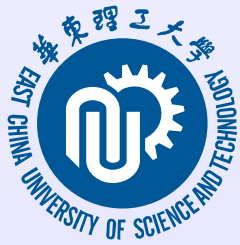


- **原理：**将待检测的DNA分子不用/用限制性内切酶消化后，通过琼脂糖凝胶电泳进行分离，继而将其碱变性并按其在凝胶中的位置转移到硝酸纤维素薄膜或尼龙膜上，固定后再与同位素或其它标记物标记的DNA或RNA探针进行反应。如果待检物中含有与探针互补的序列，则二者通过碱基互补的原理进行结合，游离探针洗涤后用自显影或其它合适的技术进行检测，从而显示出待检的片段及其相对大小。

- **用途：**检测样品中特定DNA序列的存在。

1975年,Southern印迹杂交 (Southern blot) 由英国人埃德温·迈勒·萨瑟恩 (Edwin Mellor Southern) 创建





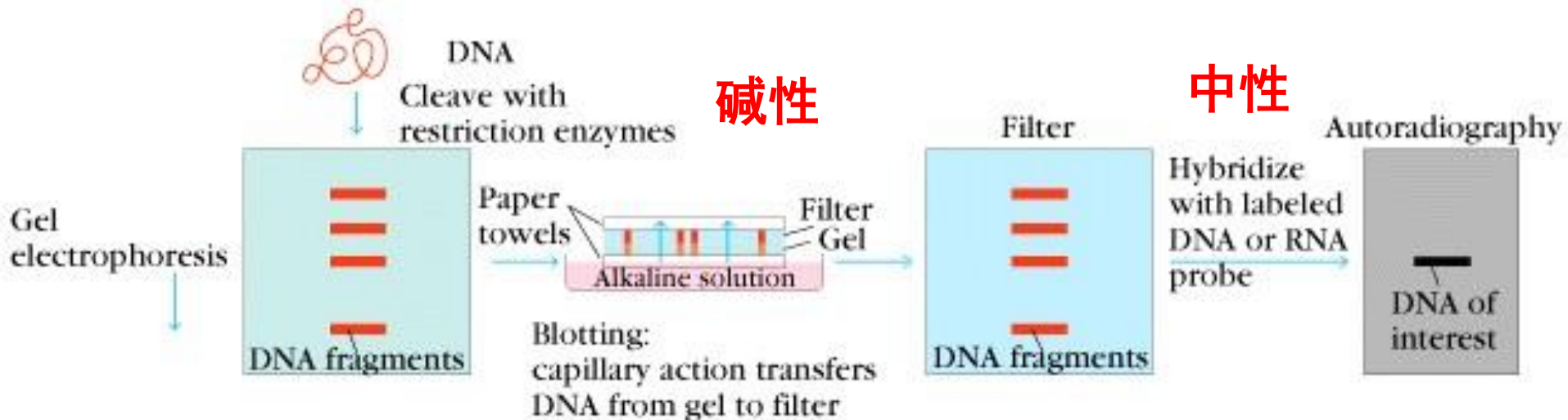
# Southern Blot procedure

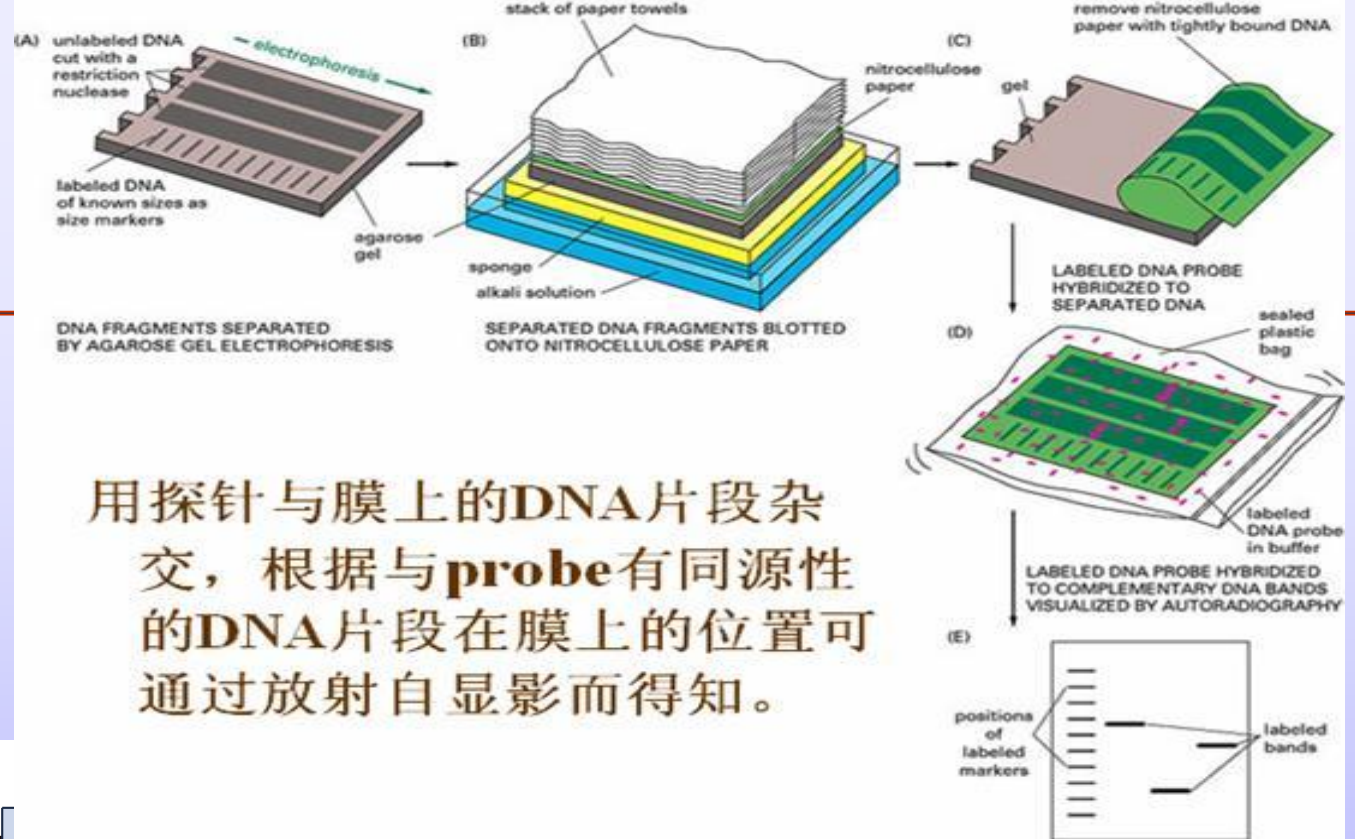
## 操作步骤:

DNA Restriction Digest → Electrophoresis → Southern Blot →

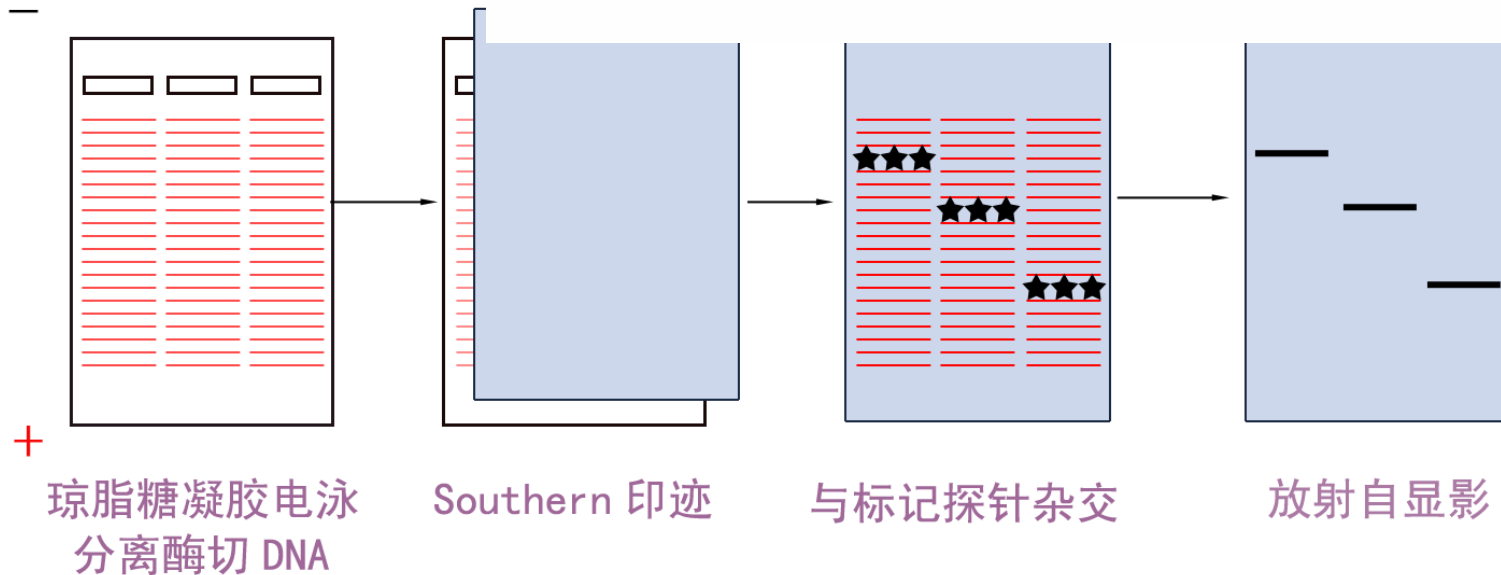
Prehybridization → Hybridization → Washing → Autoradiography (or Color)

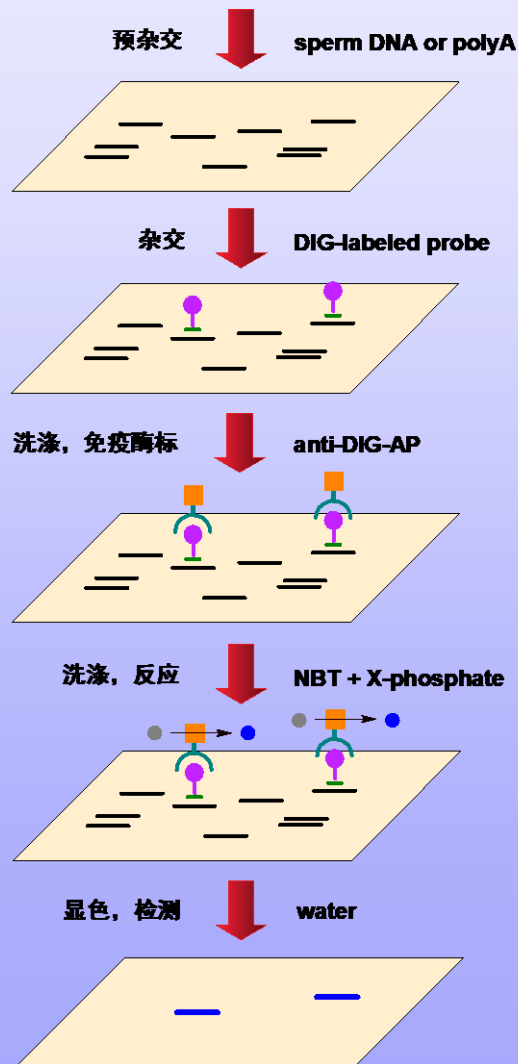
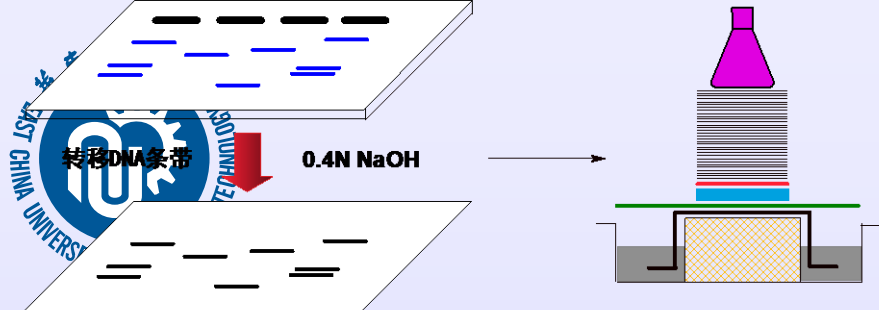
DNA → 琼脂糖电泳 → 印迹转移 → 预杂交 → (杂交, 变性探针) →  
洗膜 → 放射自显影或显色





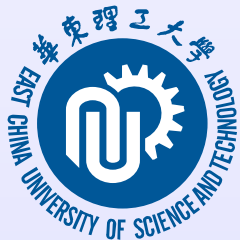
用探针与膜上的DNA片段杂交，根据与probe有同源性的DNA片段在膜上的位置可通过放射自显影而得知。





地高辛杂交检测程序

用地高辛（DIG）类固醇半抗原标记特异DNA片段做探针，与待检标本中DNA杂交，然后加入碱性磷酸酶标记的抗-DIG抗体（抗DIG-AP），再加入碱性磷酸酶的作用底物（NBT/BCIP），若待检标本中有与探针同源的DNA序列，则探针与其杂交并与抗DIG-AP结合，碱性磷酸酶催化底物呈色，则在杂交膜上出现蓝色斑点或条带。该探针可用于斑点杂交，菌落原位杂交及Southern blot杂交。



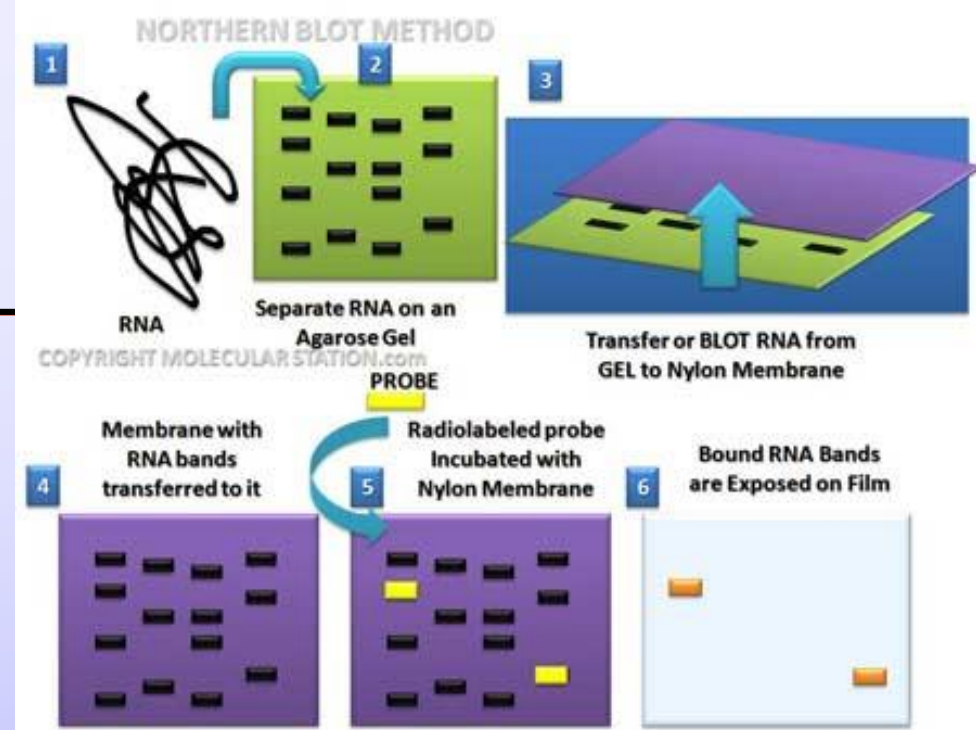
## 2. Northern Blot

- **原理：**在变性条件下（甲醛或乙二醛的变性凝胶中）将待检的RNA样品进行琼脂糖凝胶电泳，继而按照同Southern Blot相同的原理进行转膜和用探针进行杂交检测。
- **用途：**检测样品中是否含有**基因的转录产物（mRNA）**及其含量。

如，检测癌基因或其他肿瘤相关基因的过度表达，也可检测抑癌基因的低表达或不表达。



# Northern Blot procedure 操作过程

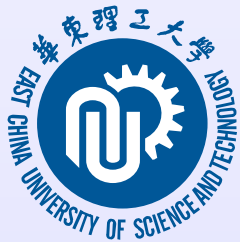


mRNA → Electrophoresis → Northern Blot → Prehybridization

→ Hybridization → Washing → Autoradiography (or Color)

mRNA提取 → 甲醛变性电泳 → 印迹转移 → 预杂交 →  
 杂交（变性探针） → 洗膜 → 放射自显影或化学发光





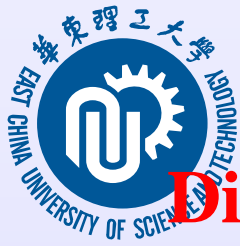
# Difference between Southern and Northern Blot

Southern 和Northern原理基本相同，但过程上也有区别：

- Southern blot 是分析DNA的杂交技术

Northern blot 是分析RNA的杂交技术

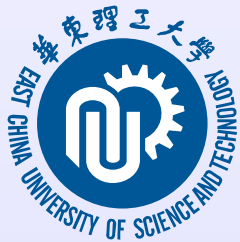
- Southern是先电泳后变性，而Northern是先变性后电泳。
- Southern是碱变性，而Northern采用甲醛、乙二醛、二甲基亚砜等变性，因为采用碱变性会导致RNA水解。



# Difference Among Southern, Northern, Western blot

---

- Southern blot is for DNA detection (分析DNA的杂交技术)
- Northern blot is for RNA detection (分析RNA的杂交技术)
- Western blot is for Protein detection (分析蛋白质的杂交技术)



# 问题讨论

- 为什么要进行预杂交，预杂交的目的是什么？
- 在进行杂交前，为什么一定保证膜是中性的？  
如何分辨膜的正反面？
- 基因组上基因的定位即Southern-blot，为什么要做酶切？