

第二章 核酸分子操作技术

第一节、核酸简介和性质

1.1 核酸简介

1.2 核酸的理化性质

第二节 核酸分子操作技术

2.1 核酸提取

2.2 凝胶电泳

2.3 PCR

2.4 核酸分子杂交

2.5 生物芯片

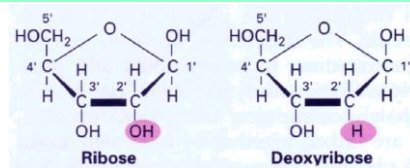
2.6 核酸测序

1.1 核酸简介

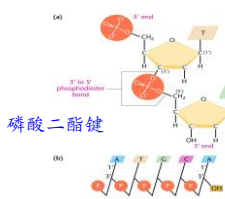
1. 核酸：

由核苷酸通过3'-5'磷酸二酯键连接而成的一类生物大分子。

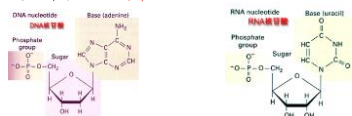
核苷酸 { 五碳糖：脱氧核糖、核糖
磷酸
环状的含氮碱基 { 鸟嘌呤(G)、腺嘌呤(A)
胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)



第一节 核酸简介和性质



核酸分为脱氧核糖核酸（DNA）和核糖核酸（RNA）两类，其中DNA主要集中在细胞核内，其余在叶绿体和线粒体中，而RNA则主要分布在细胞质中。



1.2 核酸的理化性质

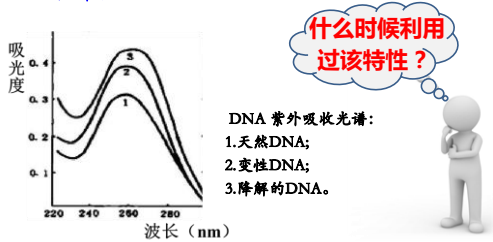
核酸分子的结构特征、理化性状决定了其操作技术上的特点。

核酸的一般性质：

- 1、通常表现为酸性。
- 2、溶解性：极性化合物，一般微溶于水，不溶于乙醇、氯仿等有机溶剂；DNA、RNA钠盐易溶于水。
- 3、粘度：DNA粘度很大，而RNA粘度较小。
- 4、稳定性：不耐酸碱。

核酸的紫外吸收性质：

碱基具有共轭双键，因此具有紫外吸收性质，其**最大吸收峰接近260nm**。



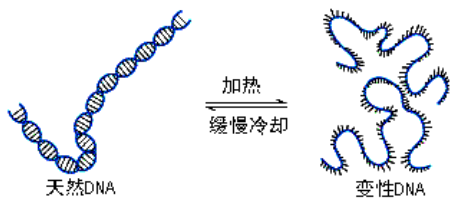
核酸的变性、复性：

核酸**变性**指核酸双螺旋区碱基对间的氢键断裂，空间结构破坏，形成单链无规则线团状态的过程。

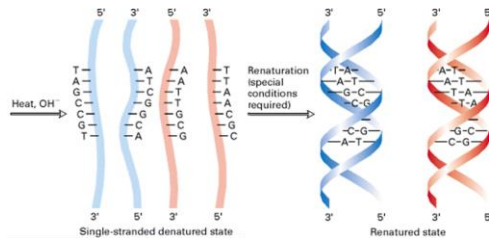
核酸变性后，260nm的紫外吸收值明显增加，称**增色效应**。

温度加热(80~100℃)后，核酸即发生**热变性**。热变性是核酸的重要性质。

DNA变性的本质：双链间氢键的断裂



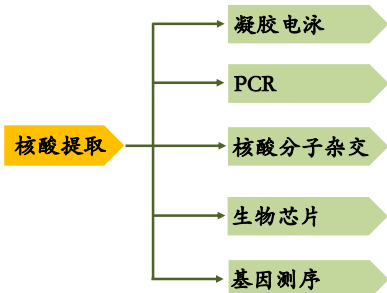
复性：变性DNA在适当的条件下，两条彼此分开的单链重新缔合成双链。



复性的程度、速率与复性条件有关：

- 热变性DNA骤然冷却（**淬火**）不可复性；
- 将变性DNA缓慢冷却（**退火**）可以复性；
- 分子量越大，复性越难；
- 浓度越高，复性越容易。

第二节 核酸分子操作技术



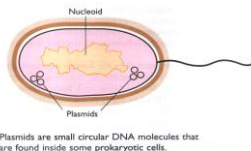
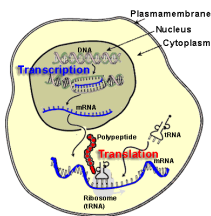
2.1 核酸的提取

核酸提取是分子生物学研究的基础，提取出来的核酸可被用于后续各种相关研究。

核酸提取质量好坏直接决定下游实验的成败。因此，**核酸提取**是分子生物学实验技术中**最重要、最基础**的操作。

(1) 核酸提取操作对象

1. 植物基因组DNA
2. 植物总RNA
3. 质粒DNA



质粒(Plasmid)是一种染色体外的稳定遗传因子，大小从1-200 kb不等，为**双链、闭环**的DNA分子，并以超螺旋状态存在于宿主细胞中，具自主复制和转录能力。

核酸的用途

1. 基因组DNA的用途：

Southern分析
基因文库
PCR
.....

2. 高纯度且完整的RNA用途：

Northern分析
mRNA纯化
cDNA合成
体外转录
.....

3. 质粒DNA用途：

基因工程操作

(2) 核酸提取的总原则与要求

- 1、**保证核酸一级结构完整性**：最基本要求；
- 2、**防止互相干扰**：如提取RNA时排除DNA干扰等；
- 3、**减少降解**：过酸、过碱等化学因素的影响；
机械剪切力、高温等物理因素影响；
核酸的生物降解（如各种核酸酶）；
- 4、**减少杂质污染**：如样品中其他生物大分子（如蛋白质、多糖和脂类分子），以及有机溶剂、高浓度金属离子等。

(3) 核酸提取的基本步骤

利用核酸的溶解性进行核酸提取：

- 1、**裂解细胞，释放核酸**：使用裂解液裂解细胞，使核酸游离在裂解体系中；
- 2、**核酸的分离与纯化**：除去和核酸结合的多糖、脂类、蛋白质等生物大分子物质以及其他杂质分子；
- 3、**核酸富集**：采用洗脱液处理，富集核酸。

1、细胞裂解

通过物理、化学或生物酶等方法使组织细胞裂解的过程。
该步骤在不同提取方法中大同小异，且经常合并使用。
核酸提取各个方法的主要差异在于：分离纯化、富集。

细胞裂解方法：

物理法：煮沸法、超声波法、研磨法、冻融法、匀浆法等。

化学法：一定的pH环境下，使细胞破裂、蛋白变性沉淀、解开与核酸相连的蛋白，使核酸游离到水相，如：表面活性剂(SDS、CTAB)、强离子剂(尿素、异硫氰酸胍)、碱裂解法。

酶解法：加入溶菌酶或蛋白酶，都可使细胞壁破碎。

2、核酸分离纯化

核酸分离纯化是指使核酸与裂解体系中的其他成分（蛋白、盐、其他杂质）分离的过程。



DNA structure determined & published

DNA结构被发现



Purification of DNA with ultracentrifuge

密度梯度离心法



Phenol Chloroform Extractions

酚/氯仿等溶液法

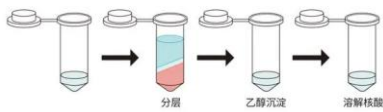


QIAGEN introduces the spin column

柱膜法
磁珠法

分离纯化方法的发展

① 酚/氯仿法



最经典方法，核酸主要溶解在水相，离心分层后取出水层。

- 该法最大优点：成本低，对实验条件要求较低。
- 缺点：操作较为繁琐、提取核酸损耗较大。

② 柱膜法



硅胶膜表面存在的硅醇基团呈弱酸性，水化后带负电。

如果溶液**高盐、低PH**时，会中和DNA、硅醇基团间的表面负电荷，**硅胶膜吸附DNA**。

如果溶液**低盐、高PH**时，DNA磷酸基团和硅胶膜之间会存在静电排斥，**硅胶膜释放DNA**。

核酸(水相)

吸附

再洗盐乙醇低PH

洗脱

无再洗盐低盐高PH

核酸(吸附于硅胶膜)

作为用于微量核酸分离纯化的较为简单的方法，在市场上应用较为广泛。

③ 磁珠法



磁珠法运用的是纳米技术，该磁珠能在微观界面上与核酸分子特异性地识别并高效结合。

核酸结合到磁珠上主要是依靠氢键、静电和疏水作用。

磁珠法无需离心和加入多种试剂，操作简单，符合核酸自动化提取要求，但成本较高。

分离纯化方法比较与选择

| 提取方法 | 提取质量(浓度、纯度) | 提取样本数量 | 提取时间 | 高通量自动化 | 价格 |
|------|-------------|--------|----------|--------|----|
| 溶液法 | 稍低 | 按需提取 | 根据样本量决定 | 否 | 便宜 |
| 柱膜法 | 高 | 按需提取 | 根据样本量决定 | 是 | 居中 |
| 磁珠法 | 高 | 可大批量提取 | 15-45min | 是 | 较高 |



3、核酸的沉淀（主要用于酚/氯仿等溶液抽提法）

核酸的沉淀是指将核酸从水相（溶液）中析出，从而实现核酸与溶液中盐和杂质的分离。

- ①有机溶剂沉淀法：异丙醇、乙醇等；
- ②盐沉淀法：KAc、NaAc等盐溶液；
- ③选择性沉淀：如选择聚乙二醇沉淀DNA，LiCl沉淀RNA；
- ④等电点沉淀：如脱氧核糖核酸核蛋白等电点pH4.2，核糖核酸核蛋白等电点pH2.0-2.5，该方法繁琐、应用较少。

(4) 核酸提取的常用方法

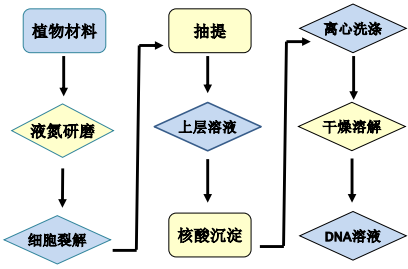
1、基因组DNA提取方法

CTAB法（植物DNA提取经典方法）

- CTAB（十六烷基三甲基溴化铵），是一种阳离子去污剂，可溶解细胞膜，并与核酸形成复合物。
- 该复合物在高盐溶液中（>0.7 mol/L NaCl）可溶，通过有机溶剂抽提，去除蛋白、多糖、酚类等杂质后加入乙醇沉淀即可分离出核酸。

注：与动物组织相比，植物组织含有较多的多糖和其他次生代谢产物(酚、酯、萜、色素等)，提取相对困难。CTAB法相对于SDS法去除多糖效果更好。

CTAB法实验流程

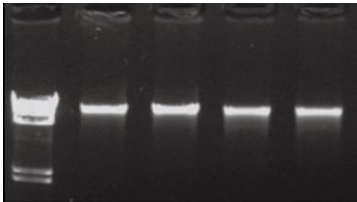


SDS法

- SDS是一种阴离子去垢剂，在高温（55~65℃）条件下能裂解细胞，使染色体离析，蛋白变性，释放出核酸；
- 提高盐浓度并降低温度（冰浴），使蛋白质及多糖杂质沉淀，离心后除去沉淀；
- 上清液中的DNA用酚/氯仿抽提，反复抽提后用乙醇沉淀水相中的DNA。

注：SDS法适用于大部分实验材料基因组DNA提取。如动物组织、细胞、全血、细菌、酵母等。

植物DNA琼脂糖凝胶电泳检测



从不同材料中提取DNA的方法和难易程度不同，植物DNA分子量较大，易被机械外力剪短。电泳检测时，一般分子量大小约几十kb，一条主带、无拖尾等降解现象。

2、质粒DNA提取方法

- ① 碱裂解法：0.2molNaOH+1%SDS
- ② 煮沸法：沸水煮沸40秒
- ③ SDS裂解法：10%SDS，一般用于质粒大量提取

碱裂解法

在强碱性条件下用SDS破坏和裂解细胞，使细胞蛋白质和DNA变性，释放出质粒DNA；

细胞碎片、蛋白质和线粒体DNA会形成复合物沉淀，而质粒DNA仍为可溶状态，离心分离去除杂质，DNA则保持在上清液中。

碱裂解法试剂配方

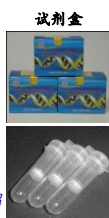
| | 組分1 | 組分2 |
|------------|--|--------|
| I 液 | 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM EDTA (pH 8.0) | |
| II 液 | 0.2 M NaOH | 1% SDS |
| III 液 | 3 M KAc (pH 4.2) 冰乙酸 | |
| RNase A | 10 µg/ml RNase A | |

悬浮细菌

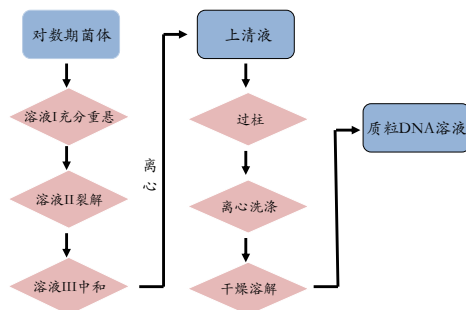
变性

中和复性

Let μ be a



碱裂解法实验流程



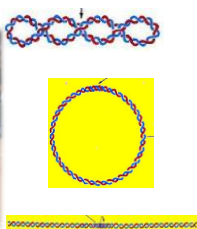
质粒DNA电泳检测

质粒DNA的三种带型:

1. 线性闭环环状DNA分子 (SC) :



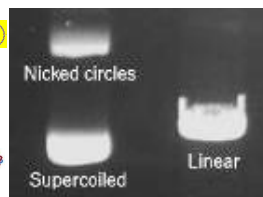
谁跑的最快？



质粒DNA电泳检测

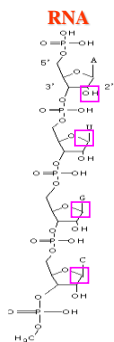
泳动速度**最慢**

泳动速度**最快**



泳动速度居中

3、植物总RNA提取方法



植物样本一旦从生物体中分离，细胞内的RNA就变的非常不稳定。

RNase是导致RNA降解的最主要原因。

RNase分布广泛且非常稳定, 用常规高温高压蒸气灭菌、蛋白抑制剂都不能使RNase完全失活。

RNA提取的关键环节:

1. 植物组织样本**保存**：新鲜取材或组织离体后液氮速冻，**存于液氮或-80℃**，避免反复冻融；
2. 样品细胞**有效破碎**；
3. 有效的**核蛋白复合体变性**：将RNA从DNA核蛋白混合物中分离；
4. 对外源和内源RNase的有效抑制；
5. 有效**去除多糖多酚**等杂质。

去除RNase污染

对于外源Rnase:

- 玻璃、金属器皿等处理: 须200℃ 烘烤2小时以上。
- 使用一次性无菌无Rnase的塑料制品
- 药品试剂: 氯仿、异丙醇、无水乙醇等应采用未开封的新瓶, 溶液需要用无Rnase的水配置。
- 专用的RNA操作室、专用器械。
- 操作过程中始终戴口罩、手套、帽子、穿实验服。

对于内源Rnase:

- 加入Rnase的专一抑制剂(Rnasin等)
- 对于RNA的分离制备可采用非特异的蛋白变性剂、蛋白酶等
- B-巯基乙醇、DTT等还原剂可破坏Rnase二硫键, 使其变性水解

总RNA提取通用方法: 异硫氰酸胍/苯酚法 (Trizol法)

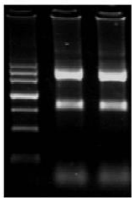
基本原理:

- 细胞内RNA均与蛋白质结合在一起, 制备RNA时, 必须使RNA与蛋白解离, 并除去蛋白质。
- Trizol试剂中的异硫氰酸胍可裂解细胞, 促使核蛋白体的解离, 使RNA与蛋白质分离, 并将RNA释放到溶液中。
- 核酸在酸性苯酚的处理下, DNA向疏水性的酚层移动, 而RNA由于有-OH的存在有亲水性, 因此向水相移动。
- 离心后, 水相层主要为RNA, 有机层主要为DNA和蛋白质。

Trizol法适用于普通的植物组织、动物组织以及真菌和细菌等

总RNA完整性检测

电泳检测法



28S
18S
5.8S

真核生物RNA包括?

rRNA、tRNA和mRNA, 其中80-85%为rRNA, 10-15%为tRNA, 1-5%为mRNA。

rRNA包括28S、18S、5.8S和5S四种。

核酸长度与结合EB的数量成正比。

高质量RNA: 28S和18S条带明亮、清晰、条带锐利, 且28S rRNA条带荧光强度约是18S 的2倍。

RNA有降解: 这两条rRNA带不清晰或比例小于上述范围 (因大的RNA被酶降解的可能性更大)。

总RNA产量与纯度检测

紫外吸收光度法: 提取的核酸溶液在260、280、320、230nm的吸收度OD分别代表了核酸、蛋白、溶液浑浊度、多酚和盐等有机物的浓度。

OD₂₆₀的应用:

1. DNA或RNA的定量

OD₂₆₀=1.0相当于 50μg/ml双链DNA
40μg/ml单链DNA (或RNA)
20μg/ml寡核苷酸

2.判断核酸样品的纯度

- DNA纯品: OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.8
- RNA纯品: OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 2.0

判断核酸样品的纯度:

纯RNA样品的OD₂₆₀/OD₂₈₀ 大约在1.8-2.0之间。

A₂₆₀/A₂₈₀<1.8时, 溶液中存在蛋白或其他有机物污染;

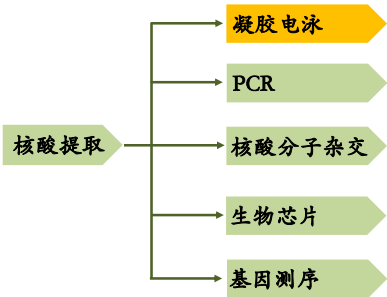
A₂₆₀/A₂₈₀>2.2时, 说明RNA已经降解。

A₂₃₀表示样品中存在一些污染物, 如碳水化合物、盐 (胍盐) 等, 较纯净的核酸A₂₆₀/A₂₃₀的比值大于2.0。

植物DNA和总RNA提取过程中, 如何消除对方的干扰?

DNA: DNA稳定, RNA不稳定, 提取后加入RNA 酶除去RNA。

RNA: 在酸性苯酚处理下, DNA在酚层, 而RNA在水相中, 最后也可加入DNA酶除去DNA。

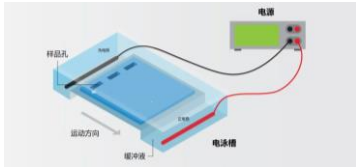


2.2 核酸凝胶电泳

电泳 (electrophoresis)：带电物质在电场中向相反电极移动的现象。

基本原理：

- > DNA分子在碱性缓冲液中带负电，在外加电场下向正极泳动。
- > 琼脂糖凝胶具有分子筛作用，不同分子量或分子构型的核酸，其移动速度有差异。



1、琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖凝胶电泳：用琼脂糖作支持介质的一种电泳方法。

琼脂糖是一种从海洋植物琼脂中提取出来的长链状多聚物，具亲水性，但不带电荷，是一种很好的电泳支持物。



琼脂糖凝胶电泳优点

- (1) 琼脂糖凝胶结构均匀，电泳图谱清晰，分辨率高，重复性好。
- (2) 琼脂糖呈透明状，无紫外吸收，电泳后的样品可直接用紫外检测；电泳后区带易染色，样品易洗脱，便于定量测定。
- (3) 操作简单，电泳速度快。



一、常用的核酸凝胶电泳

- 1、琼脂糖凝胶电泳：分辨率稍低，适于较大分子；检测灵敏度在0.2~50Kb之间。
- 2、聚丙烯酰胺凝胶电泳：分辨率高，适于较小分子；检测灵敏度在1~1000bp之间。

影响DNA迁移速率的主要因素

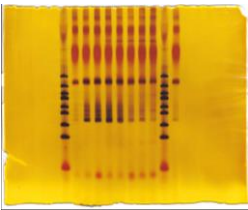
- ① DNA分子的大小：双链DNA分子迁移的速率与其碱基对数的常用对数近似成反比；
- ② DNA的构象：超螺旋环状>线状>切口环状；
- ③ 琼脂糖浓度：浓度越低，相同核酸分子迁移越快。

不同大小的DNA需要用不同浓度的琼脂糖凝胶进行电泳分离

| 凝胶浓度 (%) | 线性 DNA 长度 (bp) |
|----------|----------------|
| 0.5 | 1000~30000 |
| 0.7 | 800~12000 |
| 1.0 | 500~10000 |
| 1.2 | 400~7000 |
| 1.5 | 200~3000 |
| 2.0 | 50~2000 |

2、聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 由丙烯酰胺单体在催化剂四甲基乙二胺 (TEMED) 和过硫酸胺 (AP) 的作用下，发生聚合反应，生成具有三维网状结构的凝胶。



丙烯酰胺单体



聚丙烯酰胺



聚丙烯酰胺凝胶电泳优点

- (1) **分辨率高**：能分离长度仅相差0.2%的核苷酸分子，如即500bp中的1bp。
- (2) **载样样品量大**：是琼脂糖凝胶电泳的10倍以上。
- (3) **回收DNA纯度高**。
- (4) **机械强度高，韧性**好。
- (5) **宜分离鉴定低分子量蛋白质、小于1kb的DNA片段**。

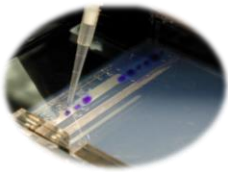
二、核酸电泳的指示剂和染料

指示剂：溴酚蓝、二甲苯蓝。

载样缓冲液：指示剂与甘油等组成。

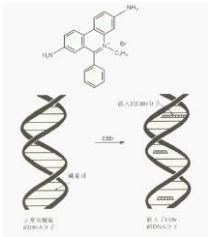
载样缓冲液的作用：

- 1. 甘油**增加核酸样品比重**，使其沉入加样孔。
- 2. **指示剂起到指示的作用**。



染色剂

(1) **溴化乙锭(Ethidium Bromide, EB)**：可嵌入核酸双链碱基对之间，在紫外线激发下发出红色荧光。



EB染料优点：
染色操作**简便、快速**，室温下15-20min；
不会使核酸断裂；
灵敏度高，10ng或更少的DNA即可检出；
操作方便，可以直接加到样品中或胶中；
价格低廉。
缺点：EB是诱变剂，使用时一定要戴手套。

(2) **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。

优点：灵敏度比EB还高200倍左右。

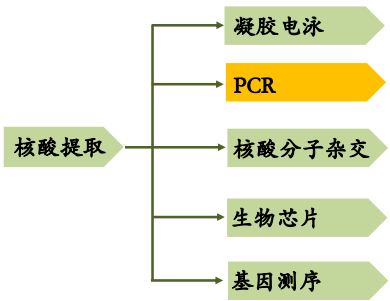
缺点：专一性不强，能与蛋白、去污剂反应产生褐色。

(3) **新型低毒染料**：如Gold View、SYBR Green I、SYBR Gold等。

优点：毒性较低，但价格较昂贵。

缺点：灵敏度较好，但不如EB。

三、琼脂糖凝胶电泳实例



2.3 聚合酶链式反应 (PCR)

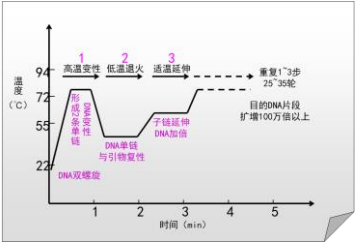
聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)：是一种体外酶促扩增特定DNA片段的技术，又称DNA体外扩增技术。



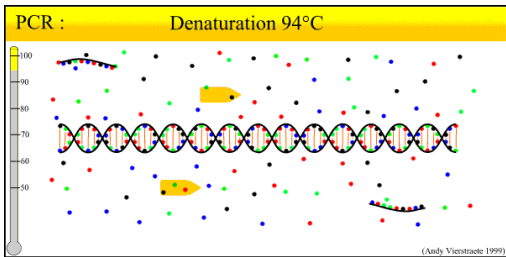
1985年由美国人Mullis发明，是现代生物学发展史上的一个里程碑，并荣获1993年度诺贝尔化学奖。

一、PCR的基本原理

- ① 建立在DNA半保留复制原理基础上的一种技术
- ② 体外DNA分子在不同温度下可变性和复性的性质。



二、PCR反应过程和条件



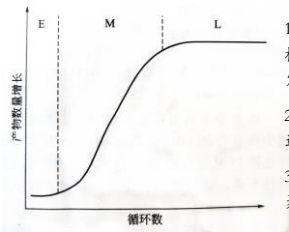
- 1. 变性：高温使双链DNA解离成单链 (95℃，30s)。
- 2. 退火(复性)：低温下引物与模板DNA互补区结合 (45～65℃，30s)。
- 3. 延伸：中温，DNA聚合酶催化以引物为起始点的DNA链延伸反应 (72℃，30～60s)。

➤ 理论：经n次循环后，反应混合物中所含目的DNA片段（双链）的拷贝数理论上最高值为 2^n 。 2^n 递增（n为循环次数），如果扩增30循环，目标DNA可增加 2^{30} 也就是 10^9 倍。

➤ 实际呢？

➤ 实际：由于引物和底物的消耗，酶活力的下降等因素，扩增产物的增加，逐渐由指数形式变为线性形式，所以实际上进行30个循环后，扩增倍数一般可达 $10^6 \sim 10^7$ 。

三、PCR扩增曲线



- 1. 早期 (E期)：引物在单链DNA模板上搜索互补序列，并与特定位点杂交。
- 2. 中期 (M期)：扩增反应顺利进行，产物呈指数型增长。
- 3. 晚期 (L期)：平台期，DNA聚合酶过度损耗或者产物的抑制。

四、PCR扩增反应体系

- 模板 (Template)：基因组DNA、质粒DNA、cDNA等。
- 引物 (Primer)：确定扩增目的序列特异性和产物长度。
- DNA聚合酶 (DNA Polymerase)：催化PCR反应进行。
- 反应缓冲液 (Buffer)：控制体系的pH和离子强度，为DNA聚合酶提供最佳工作环境。
- 脱氧核苷酸底物 (dNTPmix)：DNA的基本组成元件，包括dATP、dGTP、dCTP、dTTP。

耐热DNA聚合酶

Taq DNA聚合酶：从一种极度嗜热水生栖热菌中分离纯化而得，耐热特性使得PCR不用每个反应补充新的酶。

- ① 具有5'-3'聚合酶活性和5'-3'核酸外切酶活性：无3'-5'外切酶活性导致错配率较高，现已发现几种保真性高的酶。
- ② 具良好的热稳定性：在90℃下连续反应30分钟仍有约50%酶活。



例：

模板：基因组DNA；产物长度：506bp

| PCR扩展体系（10 μL） | PCR反应过程和条件 |
|---------------------------|------------|
| 模板：1 μL | 94℃ 5min |
| 上游引物：0.2 μL | 94℃ 30s |
| 下游引物：0.2 μL | 56.2℃ 30s |
| Easy Taq 酶：0.1 μL | 72℃ 30s |
| Easy Taq Buffer：1 μL | 72℃ 7min |
| dNTP：0.8 μL | 4℃ ∞ |
| ddH ₂ O：6.7 μL | |

五、引物设计的基本原则

引物是PCR特异性反应的关键，同时也与PCR扩增效率密切相关。

引物设计的最重要原则：最大限度提高扩增效率和特异性。

1、引物应具有足够的特异性

非特异序列的同源性不超过70%或有不超过8个连续互补碱基。

2、避开易形成二级结构的模板序列区域

例如分子内互补、发夹结构、分子间互补。
二级结构会增加引物与模板杂交以及PCR的困难。

6、引物中四种碱基最好随机分布

避免4个以上连续排列的嘌呤或者嘧啶。

7、引物自身及引物之间不应存在互补序列

引物自身互补——发夹结构
引物之间互补——二聚体
引物自身连续互补碱基不超过3个，引物间连续互补不超过4个。

3、引物长度一般为18-30个碱基之间

引物长度与反应的特异性和解链温度成正比相关。

过短：扩增特异性下降

过长：引物自身形成二级结构，以及引物二聚体。

4、G+C含量一般为40%-60%

G+C含量过低：引物解链温度低，引物易于从模板上解离。

G+C含量过高：引物解链温度高，易与非特异性序列杂交。

5、T_m值之差应小于1℃，最适退火温度在55-60℃

一对引物的T_m值差过大可直接导致PCR扩增效率下降或失败。

对于20bp左右的引物：T_m（℃）=2（A+T）+4（G+C）

一般情况下，PCR的实际退火温度比引物T_m值低5℃左右。

8、引物的5'端可以修饰，3'端不可以修饰

引物的5'端可被修饰而不影响扩增特异性，如加酶切位点、标记生物素、引入点突变等。而延伸从3'端开始，所以不能进行任何修饰。

9、引物的3'端不可以A结尾

当引物3'端末位为A时，即使错配也能有引发链的合成；而当末位为T时，错配引发效率大大降低，G、C错配引发效率介于A、T之间。

10、引物3'端要避开密码子的第3位

如扩增序列位于基因编码区域，引物3'端不要终止于密码子的第3位，因密码子的第3位易发生简并，会影响扩增特异性与效率。

六、PCR反应常见问题

- 1、**假阴性**是指PCR产物检测不到应有的扩增带。
可能原因：模板、酶、引物等
- 2、**假阳性**是指PCR产物出现了不应有的扩增带。
可能原因：样品污染、试剂污染等
- 3、**非特异性扩增**指PCR产物出现的条带与预期大小不一致。
可能原因：引物、退火温度、Mg+浓度、PCR循环数等
- 4、**片状拖尾或涂抹带**
可能原因：dNTPs浓度、Mg+浓度、退火温度、PCR循环数等

七、反转录PCR技术

反转录PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR)：将RNA逆转录与PCR过程结合的一种PCR技术。

在反转录酶（依赖RNA的DNA聚合酶）作用下，以一条RNA单链（mRNA）为模板逆转录生成互补DNA（cDNA），再以cDNA为模板进行PCR扩增。

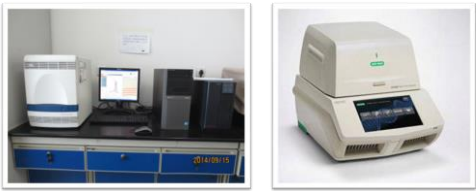


八、定量PCR (quantitative PCR, qPCR)

是应用一种标准作对照，估计出一种特异性靶DNA或RNA分子相对含量的技术。

- 1、半定量RT-PCR (semi-quantitative RT-PCR)
- 2、实时荧光定量PCR (Real time Quantitative PCR, RT-qPCR)

实时荧光定量PCR技术(RT-qPCR)



RT-qPCR是指在PCR反应体系中加入**荧光基团**，利用荧光信号累积**实时监测**整个PCR进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析。

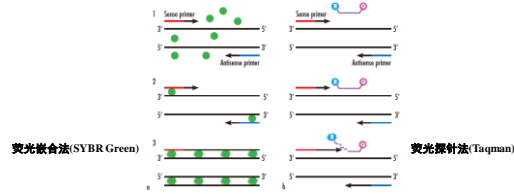
原理

常规 PCR 技术：

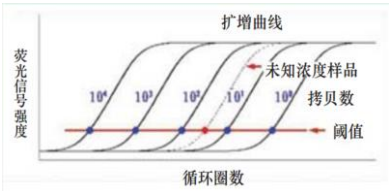
对PCR扩增反应的**终点产物**进行定量和定性分析；
无法对起始模板准确定量，无法对PCR反应过程实时检测。

实时定量PCR技术：

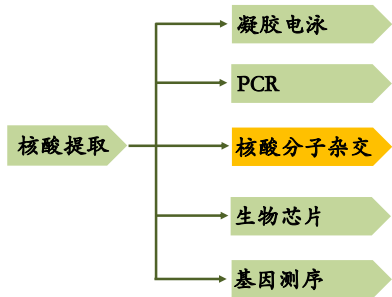
利用**荧光信号实时检测**PCR扩增反应中每个循环扩增产物量的变化；
通过Ct值和标准曲线的分析对起始模板进行定量。



定量原理



- 模板DNA量越多，荧光达到域值的循环数越少，即Ct值越小
- 标准曲线：起始模板的log浓度与Ct呈线性关系。
- 根据样品的Ct值就可计算出样品中所含的模板量。



2.4 核酸分子杂交技术

核酸分子杂交：基于核酸分子变性和复性、碱基互补配对原理，用特异性的核酸探针与待测样品的DNA/RNA形成杂交分子的技术。

核酸分子杂交因具有**高灵敏度**和**高特异性**的优点，在分子生物学领域应用广泛。

一、探 针(probe)

探针：一小段用**放射性同位素**或**生物素**等标记物标记的已知序列的**核酸片段**。长度一般以50~300bp为宜。

核酸探针的种类：

- ① DNA探针
- ② cDNA探针
- ③ RNA探针
- ④ 人工合成的寡核苷酸探针

核酸探针的标记 - 标记物

标记物应具有**高灵敏度**、**不影响碱基配对和探针性质**等特点

(1) 放射性标记物

放射性同位素曾是最普遍的探针标记物，但由于其安全性，近年已大量被非放射性标记物取代。常用的有³²P、³H、³⁵S。

(2) 非放射性标记物

半抗原：生物素、地高辛

配体：生物素既可作为半抗原，也是亲和素的配体

荧光素：异硫氰酸荧光素、罗丹明等

酶：辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶可催化底物发光。

光密度或电子密度标记物：如金、银等，适用于细胞原位杂交。

二、常用的核酸分子杂交技术

(一) DNA印迹技术(Southern blotting)

用于基因组DNA的定性定量分析、酶切图谱分析、基因突变分析、限制性片段长度多态性分析(RFLP)。

(二) RNA印迹技术(Northern blotting)

用于RNA的定性定量分析。

(三) 斑点印迹(dot blotting)

(四) 原位杂交(in situ hybridization)

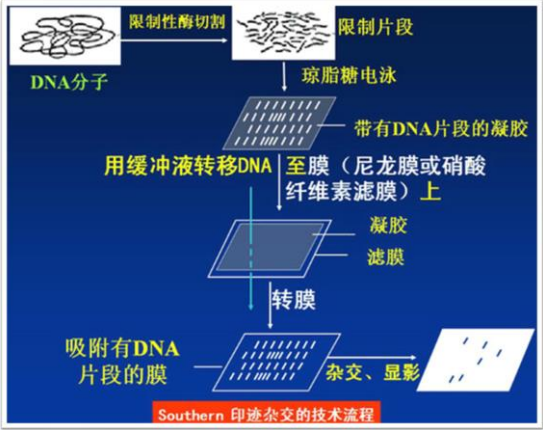
(一) Southern 印迹杂交

用于确定**DNA分子大小和丰度**的一种技术。

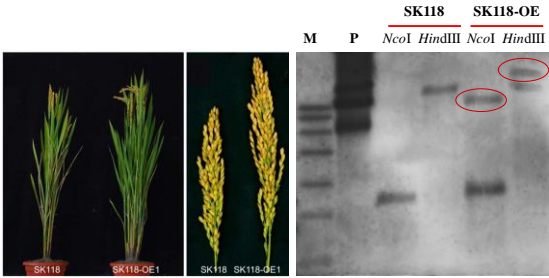
由于它是由英国人Edwin Mellor Southern于1975年首先设计出来的，故又称之为Southern blot。



Edwin Mellor Southern



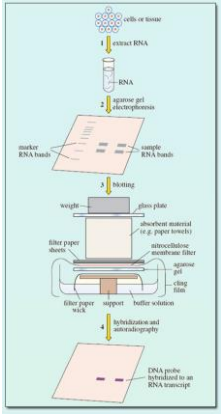
Southern 印迹杂交结果展示



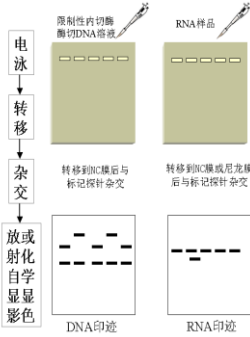
(二) Northern杂交

1977年，Alwine等人发展而来，用于分析细胞RNA分子大小和丰度的分子杂交技术。

因这种方法与Southern blot杂交技术十分类似，与Southern 杂交（DNA杂交）相对应，被趣称为Northern杂交。



两种印迹技术的比较



Northern与Southern 印迹的不同点:

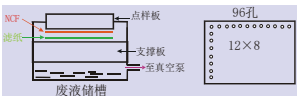
- 1、变性：采用变性的凝胶电泳系统，保持RNA处于变性状态，防止RNA分子局部形成双链
- 2、转膜：RNA转膜前不需碱变性、中和处理；而Southern印迹DNA转膜前需进行碱变性、中和处理
- 3、无需进行限制性内切酶切割

(三) 斑点印迹杂交 (dot blotting)

将待测DNA变性后直接点在膜上，用已标记探针进行杂交，判断是否有杂交及杂交强度，主要用于基因缺失或拷贝数改变的检测。

原理、优缺点：

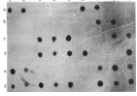
- 1、原理、操作步骤与Southern杂交相同；
- 2、将RNA或DNA变性后直接点样于NC或尼龙膜上，不需酶切和电泳。
- 3、简单、快速，同一张膜可检测多个样品；
- 4、特异性不高、不能鉴别核酸分子量。



斑点杂交示意图



斑点杂交仪



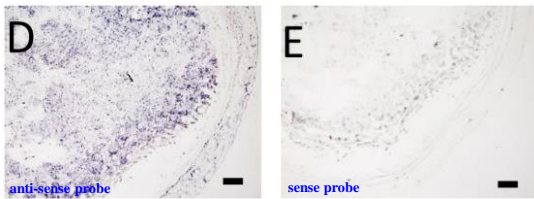
斑点杂交放射性显影图

(四) 原位杂交(in situ hybridization)

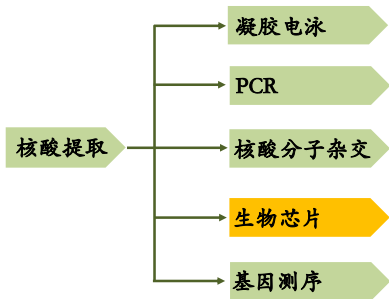
将标记的核酸探针与固定在细胞或组织中的核酸（原位）进行杂交，称原位杂交。

特点：

- (1) 能在成分复杂的组织中进行单一细胞的研究
- (2) 不需从组织或细胞中提取核酸，对含量极低的靶序列灵敏度
- (3) 能准确反映组织细胞的相互关系及功能状态



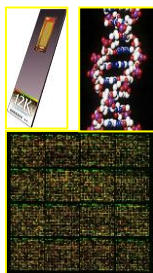
植物组织原位杂交



2.5 基因芯片技术



集成电子线路
电子芯片

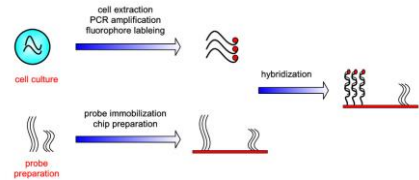


集成分子线路
基因芯片

一、DNA芯片的概念和基本原理

概念：即基因芯片，又称DNA微阵列，是一种生物芯片。

原理：基于核酸分子杂交的基本原理，以大量已知序列的寡核苷酸等作为探针，有序地固化在支持物表面，再与待测样品核酸分子杂交，通过对杂交信号进行定性定量分析，获得待测样品中的基因表达信息。

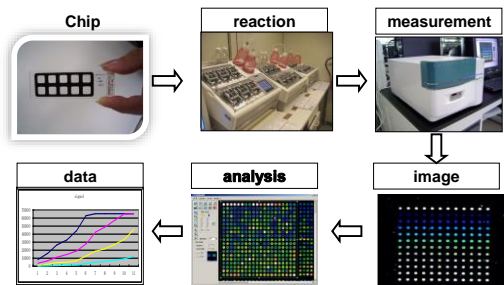


商业化芯片



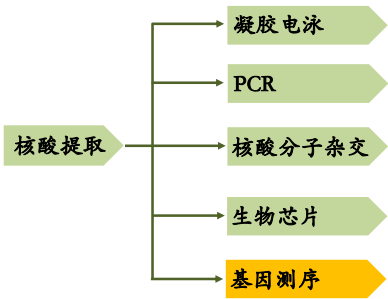
- Human
- Mouse
- *E. coli*
- Yeast
- Zebrafish
- Rice
-

工作流程



二、DNA芯片的优点

| 技术优势 | 成本优势 |
|------------|-----------|
| (1) 高度自动化 | (1) 快速准确 |
| (2) 高度的平行性 | (2) 检测效率高 |
| (3) 微型化 | (3) 成本降低 |
| (4) 微量化 | |
| (5) 高密度化 | |



2.6 核酸测序

基因测序是用人工的方法测定并分析核酸的碱基组成及排列顺序，即核酸一级结构。

基因测序是直接获得核酸序列信息的唯一技术手段。

对基于特定基因序列检测的分子诊断，**核酸测序**仍是技术上的金标准。

优缺点：

Sanger测序是一种传统的测序方法，优点是**准确性高**，但**速度较慢**，只能测定较短的DNA序列。

高通量测序则是一种新兴的测序技术，优点是**速度快**，可以测定大量的DNA序列，但**准确性相对较低**。

一、基因测序的发展

第1代测序

1975年Sanger与Coulson发表了使用加减法进行DNA序列测定的方法，随后Maxam在1977年提出了化学修饰降解法的模型。经典的**Sanger测序技术**，被称作是测序界的**金标准**。

第2代测序

高通量测序技术，又称“下一代”测序技术（NGS），就是对几百万到数十亿的DNA分子一次性实现并行测序。NGS可在全基因组水平对序列进行深入细致的分析，提供了更快、更便捷和更经济的测序手段。

第3代测序

与第1代相比，**第2代测序**摆脱了电泳限制，但仍然需要生化反应延伸核苷酸，**读长相对较短**，是其致命弱点。

第三代测序技术指**单分子测序技术**。测序时，无需PCR扩增，实现了对每一条DNA分子的单独测序。第三代测序技术也叫**从头测序技术**。

二、DNA测序技术

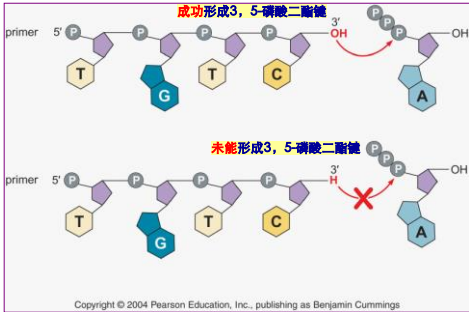
DNA 测序有两种基本方法，**Sanger双脱氧链终止法**（Sanger氏酶学法）和**化学测序法**（Maxam-Gilbert化学降解法）。现在全自动测序仍然沿用 Sanger双脱氧链终止法，但在**标记**上作了改进。



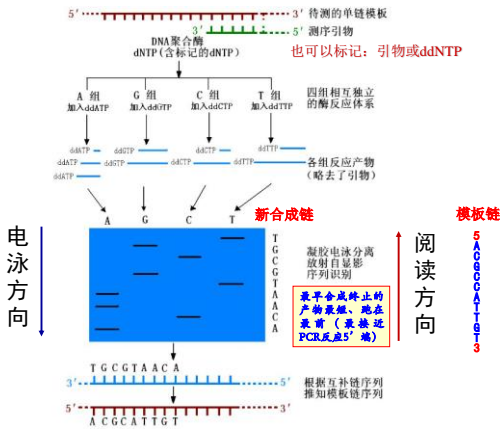
Sanger 双脱氧链终止法

核心：引入双脱氧核苷三磷酸（ddNTP）作为链终止剂。

dNTP和ddNTP的分子结构式



The absence of 3'-hydroxyl lead to the inefficiency of the nucleophilic attack on the next incoming substrate molecule.



三、DNA测序自动化

双脱氧法和化学修饰法的缺点：

- 放射性
- 操作步骤烦琐
- 效率低
- 读片过程慢



310型全自动遗传分析仪



3700型全自动遗传分析仪

DNA全自动分析仪

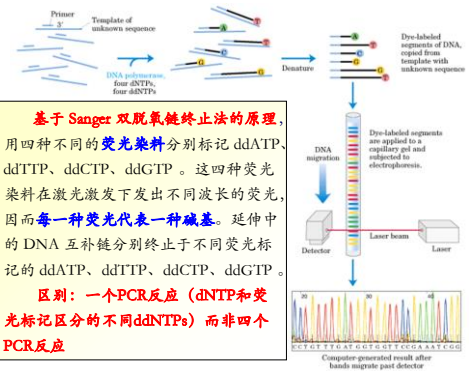


ABI Prism® 3100遗传分析仪

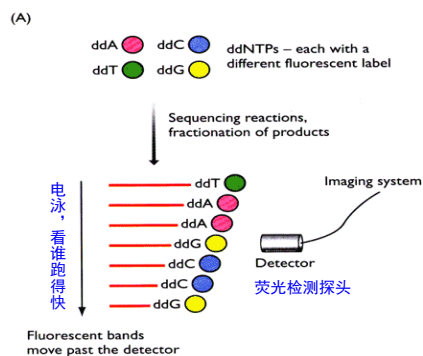


安玛西亚DNA序列分析系统型号：MegaBACE 500/1000/4000

DNA自动化测序原理



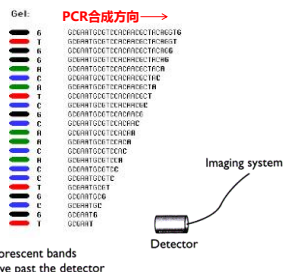
Target
Template-Primer 3' 5'
TGCA
5' ddA ddC
ddT ddG
Extend
Terminators
ddNTP : labeled ddNTP
100 : 1
Ladder
n, n+1...



Gel Electrophoresis

DNA Fragment Size Determination

一个而非四个电泳泳道!



CACCGCATCGAAATTAAC TTCCAAAGTTAAGCTTGG

跑得快的先检测到

跑得慢的后检测到

跑得快慢表示长短不同

同一个起点开始复制，短的表示在前头，长的表示在后

根据荧光定序。