

分子生物学第五章笔记：基因与基因活性的分子工具

第五章主要介绍了分子生物学中用于研究基因和基因活性的常用分子工具和技术。本章内容是理解基因操作和分析的基础，涵盖了生物大分子的分离、标记示踪、核酸杂交、测序、互作分析等多个重要方面，基础方法章节。

5.1 生物大分子的分离 (Molecular Separations)

在分子生物学实验中，经常需要对核酸或蛋白质等生物大分子混合物进行分离纯化。常用的分离方法包括凝胶电泳和层析。

5.1.1 凝胶电泳 (Gel Electrophoresis)

凝胶电泳是根据分子的大小和电荷特性在电场中迁移速度不同而进行分离的技术。

- **核酸凝胶电泳**：由于核酸（DNA、RNA）本身带负电荷，在电场中会向正极（阳极）移动。
 - **琼脂糖凝胶电泳 (Agarose Gel Electrophoresis)**：主要用于分离较大片段的 DNA。琼脂糖是一种线性多聚物，形成多孔的三维网状结构，DNA 片段在凝胶中的迁移速度与其 **大小的对数** 呈反比（在一定范围内）。不同构象的 DNA（如超螺旋、线性、开环）在琼脂糖凝胶中迁移速度不同，通常 **超螺旋 DNA 迁移最快，开环双链 DNA 迁移最慢**。DNA Marker（DNA 分子量标准）用于参照判断未知 DNA 片段的大小。RNA 电泳过程与 DNA 电泳类似，但需注意 RNA 易降解，需使用 DEPC（diethylpyrocarbonate，焦碳酸二乙酯）水等处理以抑制 RNase 活性。总 RNA 电泳常出现 28S、18S 和 5S rRNA 条带，其比例可指示 RNA 是否降解。
 - **脉冲场凝胶电泳 (Pulsed-field Gel Electrophoresis, PFGE)**：适用于分离超

大分子量的 DNA（兆碱基，Mb 级别）。通过周期性改变电场方向，使大分子 DNA 在凝胶中“转向”迁移，从而实现分离。

- **蛋白质凝胶电泳 (Protein Gel Electrophoresis):**

- **聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE):** 聚丙烯酰胺凝胶具有**分子筛效应**，根据蛋白质分子大小进行分离。
- **十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE):** 在 PAGE 中加入 SDS (Sodium dodecyl sulfate, 十二烷基磺酸钠) 这种去污剂，可以使蛋白质变性并带有均匀的负电荷，从而主要根据蛋白质亚基的分子量进行分离。
- **双向凝胶电泳 (Two-dimensional Gel Electrophoresis):** 结合了等电聚焦电泳 (Isoelectric Focusing Electrophoresis, IEF) 和 SDS-PAGE。第一维按蛋白质的等电点 (**pI**) 分离，第二维按**分子量**分离，可实现蛋白质的高分辨率分离。

5.1.2 层析 (Chromatography)

层析技术是利用物质在固定相和流动相中分配系数不同而实现分离的方法。

- **离子交换层析 (Ion-exchange Chromatography):** 利用固定相上的离子与蛋白质等带电分子之间的静电吸附差异进行分离。通过改变洗脱液的离子强度或 pH，将结合在树脂上的物质洗脱下来。DEAE（二乙氨乙基）纤维素是一种常用的离子交换树脂。
- **凝胶过滤层析 (Gel Filtration Chromatography):** 又称**分子筛层析**，利用多孔凝胶珠作为固定相。大分子物质无法进入凝胶珠孔隙，直接通过柱子，流速较快；小分子物质可以进入孔隙，在柱子中滞留时间长，流速较慢，从而实现分

离。

- **亲和层析 (Affinity Chromatography):** 利用生物分子之间特异性的亲和力进行分离。将具有特异结合能力的配体固定在载体上，目标分子与配体特异结合，其他杂质洗掉后，再用特异性洗脱剂将目标分子洗脱下来。

5.2 标记示踪物 (Labeled Tracers)

标记示踪物用于检测微量的生物分子。

- **放射性标记 (Radioactive Tracers):** 早期常用放射性同位素标记核酸或蛋白质，通过放射自显影 (Autoradiography) 检测。将标记的分子在凝胶中分离后，与 X 光片接触，放射性会使胶片曝光，形成暗带。
- **非放射性标记 (Non-radioactive Tracers):** 现在更常用生物素 (biotin) 等非放射性标记，结合酶促反应或荧光信号进行检测，避免了放射性带来的健康和处理问题。

5.3 核酸杂交技术的应用 (Using Nucleic Acid Hybridization)

核酸杂交是分子生物学的核心技术之一，利用单链核酸分子之间互补碱基序列配对形成双螺旋的原理。

- **Southern Blot:** 用于检测 DNA 样品中特定 DNA 片段的存在、大小和拷贝数。步骤包括：提取基因组 DNA，用限制性内切酶消化，琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片段，将 DNA 片段转移到固相膜上（转膜），与标记的 DNA 探针进行杂交，洗膜后通过显影检测杂交信号。Southern blot 常用于检测转基因植物中外源基因的整合以及法医鉴定中的个体识别。
- **DNA 指纹技术 (DNA Fingerprinting) 和 DNA 分型 (DNA Typing):** 利用个体间基因组中重复序列（如微卫星 DNA/小卫星 DNA, minisatellite DNA）数量或

类型的差异，通过限制性酶切和 Southern blot 等技术产生的特异性条带模式，实现个体识别。DNA 指纹图谱因其高度变异性和遗传稳定性，在亲子鉴定和法医破案中应用广泛。

- **Northern Blot:** 用于检测 RNA 样品中特定 RNA 分子的存在、大小和丰度，常用于研究基因在不同组织或条件下的表达水平。步骤类似于 Southern Blot，但分离的是 RNA，探针通常为 cDNA 或 RNA 探针。
- **报告基因转录 (Reporter Gene Transcription):** 将报告基因（如 LacZ、荧光素酶 Luciferase、绿色荧光蛋白 GFP）置于特定启动子的控制下，通过检测报告基因产物的表达水平来反映目的基因的转录活性。
- **原位杂交 (In situ Hybridization):** 将标记的核酸探针与组织或细胞中的核酸进行杂交，以确定特定核酸序列在组织或染色体上的位置。荧光原位杂交 (Fluorescence In situ Hybridization, FISH) 使用荧光标记的探针，常用于染色体定位和核型分析。

5.4 DNA 测序 (DNA Sequencing)

DNA 测序是确定 DNA 分子中碱基排列顺序的技术。

- **Sanger 测序法 (Sanger Method):** 基于双脱氧链终止原理 (dideoxy nucleotides)。在 DNA 合成反应中加入一定比例的双脱氧核苷酸，由于其 3'端缺少 -OH 基团，链延伸会终止。通过分别使用四种不同的双脱氧核苷酸进行反应，并对产生的不同长度的 DNA 片段进行电泳分离，根据片段长度即可读出 DNA 序列。弗雷德里克·桑格 (Frederick Sanger) 因此项贡献两次获得诺贝尔奖。

5.5 限制性图谱 (Restriction Mapping)

限制性图谱是通过限制性内切酶识别和切割 DNA 的位点，确定这些位点在 DNA 分子上的相对位置，构建 DNA 的物理图谱。通过不同酶单酶切和双酶切，结合凝胶电泳分析酶切片段的大小，可以绘制限制性图谱。结合 Southern blot 技术可以辅助鉴定限制酶切片段。

5.6 DNA-蛋白质相互作用分析 (Assaying DNA-Protein Interactions)

研究蛋白质与 DNA 之间的相互作用对于理解基因调控等生命活动至关重要。

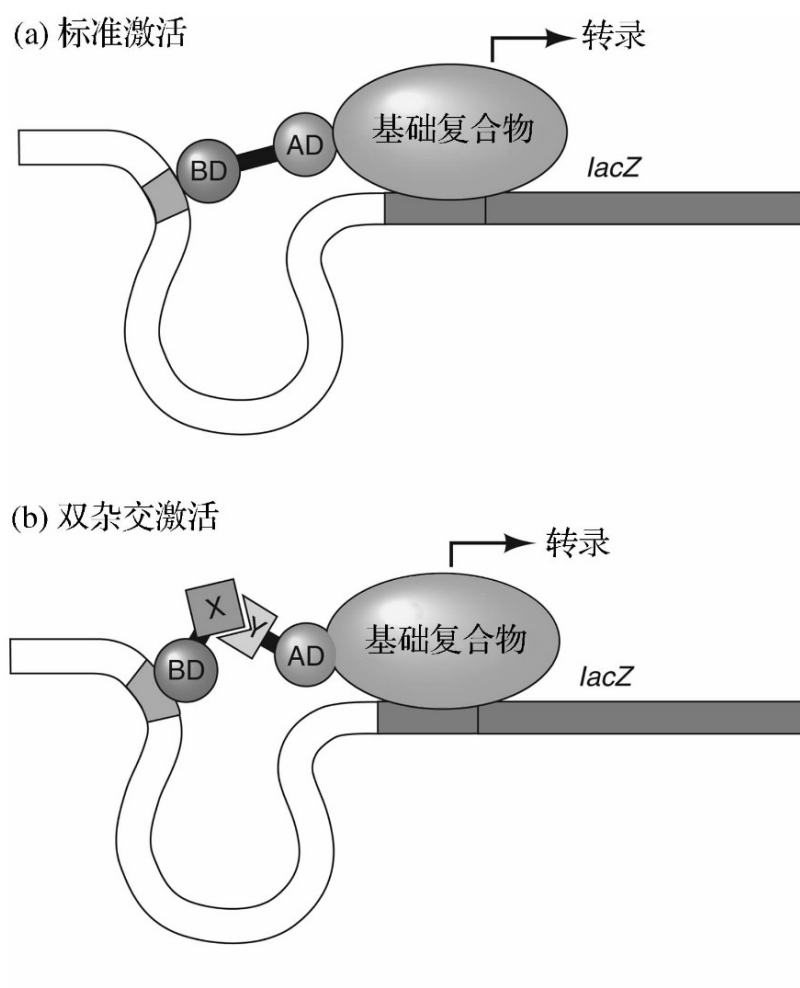
- **滤膜结合实验 (Filter Binding):** 利用硝酸纤维素膜可以结合蛋白质和单链 DNA，但不结合双链 DNA 的特性，检测蛋白质与双链 DNA 的结合。
- **电泳迁移率转换测定 (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA):** 也称凝胶阻滞实验。当蛋白质与 DNA 片段结合后，其在凝胶电泳中的迁移速度会减慢（发生阻滞），通过检测 DNA 片段迁移率的变化来判断蛋白质是否与 DNA 结合。
- **DNase 足迹法 (DNase Footprinting):** 利用 DNase I 随机切割 DNA 的特性。当蛋白质与 DNA 结合时，会保护其结合区域不被 DNase I 酶切，在电泳图谱上会显示为“足迹”（bands 缺失区域），从而确定蛋白质在 DNA 上的精确结合位点。

5.7 蛋白质-蛋白质相互作用分析 (Assaying Protein-Protein Interactions)

研究蛋白质之间的相互作用有助于揭示细胞内信号传导、复合物形成等机制。

- **免疫沉淀 (Immunoprecipitation):** 利用特异性抗体捕获目标蛋白质，通过离心将抗体-蛋白质复合物沉淀下来，与其相互作用的其他蛋白质也会被“拉下”，从而实现相互作用蛋白的鉴定。
- **酵母双杂交系统 (Yeast-two-hybrid assay):** 一种在酵母体内研究蛋白质相互作

用的强大工具。将一个蛋白质（Bait）与转录激活因子的 DNA 结合结构域 (BD) 融合，另一个蛋白质（Prey，可以是已知或未知蛋白）与转录激活结构域 (AD) 融合。如果两个蛋白质发生相互作用，会将 BD 和 AD 拉近，形成完整的转录激活因子，启动报告基因的表达，通过检测报告基因的表达来判断蛋白质之间是否存在相互作用。



本章介绍的分子工具和技术是现代分子生物学的基石，广泛应用于基因功能研究、疾病诊断、药物开发等领域。熟练掌握这些技术原理和应用对于深入学习分子生物学至关重要。

荧光原位杂交（FISH）

荧光原位杂交（Fluorescence In Situ Hybridization，简称 FISH）是一种分子细胞遗传

学技术，它利用荧光标记的核酸探针与细胞或组织样本中特定的核酸序列（DNA 或 RNA）进行杂交，从而在显微镜下直接观察和定位这些序列。

原理：

FISH 的基本原理是基于核酸分子之间碱基互补配对的特异性。

探针制备： 合成或制备与目标核酸序列互补的短核酸片段作为探针。这些探针会被直接或间接标记上荧光染料。不同的探针可以使用不同颜色的荧光标记，以便同时检测多个目标序列。

样本处理： 将细胞或组织样本固定在载玻片上，并进行透化处理，使探针能够进入细胞。对于 DNA FISH，通常还需要对样本进行变性处理，将双链 DNA 分离成单链，以便探针结合。

杂交： 将标记好的探针加入到样本中。探针会寻找并与其互补的目标核酸序列进行特异性结合（杂交）。

洗涤： 洗去未结合的探针，以减少背景信号。

检测： 在荧光显微镜下观察样本。与目标序列结合的探针会发出荧光，通过观察荧光信号的位置、数量和颜色，可以确定目标核酸序列在细胞或组织中的位置、拷贝数或是否存在结构异常。

FISH 的应用：

FISH 技术广泛应用于临床诊断和基础研究领域，包括：

染色体异常检测： 检测染色体的数量异常（如三体、单体）和结构异常（如缺失、重复、易位）。这在产前诊断、遗传病诊断和肿瘤诊断中非常重要。

基因定位： 确定特定基因或 DNA 序列在染色体上的精确位置。

肿瘤细胞检测和分型： 检测肿瘤细胞中与癌症发生、发展和预后相关的基因改变，例如基因扩增、缺失或易位。这有助于癌症的精确诊断、预后评估和治疗方案的选择（如 HER2 基因扩增在乳腺癌中的检测）。

感染性疾病诊断： 检测组织切片或细胞中的病原体（细菌、病毒）核酸序列。

基因表达研究： 通过检测细胞中特定 RNA 分子的数量和位置，研究基因的表达水平和亚细胞定位（称为 RNA FISH）。

Southern 印迹

Southern 印迹（Southern blot）是一种用于检测 DNA 样本中特定 DNA 序列的技术。

原理：

Southern 印迹的基本原理也基于核酸杂交，但其过程与 FISH 不同：

DNA 提取和酶切： 从样本中提取 DNA，并使用限制性内切酶将 DNA 切割成大小不等的片段。

凝胶电泳： 将酶切后的 DNA 片段在琼脂糖凝胶中进行电泳分离。DNA 片段根据其大小在电场中迁移不同的距离，形成肉眼不可见的条带。

转膜： 将电泳分离后的 DNA 片段从凝胶转移到固相支持物（如尼龙膜）上。

变性： 在转膜过程中或之后，对 DNA 进行变性处理，使其变成单链。

杂交： 将标记好的核酸探针与膜上的单链 DNA 进行杂交。探针会与其互补的特定 DNA 片段结合。

洗涤： 洗去未结合的探针。

检测： 通过放射自显影或化学发光等方法检测膜上探针结合的位置，从而确定目标 DNA 片段的大小和含量。

什么时候使用 FISH 而不用 Southern 印迹？

尽管 FISH 和 Southern 印迹都利用核酸杂交来检测特定序列，但它们在应用和提供的结果类型上存在显著差异，这决定了在特定情况下会优先选择 FISH 而非 Southern 印迹：

保留细胞或组织结构： FISH 是一种原位技术，意味着它在细胞或组织中直接进行杂交。这使得 FISH 可以在保留细胞形态和组织结构的情况下，观察目标核酸序列在细胞核或细胞质中的具体位置和分布。Southern 印迹则需要提取 DNA，破坏了原有的细胞结构，无法提供空间信息。

检测单细胞水平的变化： FISH 可以直接在单个细胞中检测目标序列的拷贝数或结构异常。这对于研究细胞异质性、检测微小比例的异常细胞（如肿瘤细胞浸润）非常重要。Southern 印迹分析的是大量细胞的 DNA 总和，难以检测到单个细胞或少数异常细胞的变化。

可视化染色体异常： FISH 可以直接在染色体上可视化特定基因或区域的位置，从而清晰地显示染色体的结构异常，如易位、缺失、重复。使用全染色体涂染探针

（chromosome paint probes）甚至可以显示整条染色体的来源或结构变化。Southern 印迹主要通过检测限制性片段长度的变化来推断染色体结构异常，不如 FISH 直观。

无需大量 DNA： FISH 只需要少量的细胞或组织样本即可进行检测，甚至可以在间期细胞（非分裂期细胞）中进行。Southern 印迹通常需要较高量的完整基因组 DNA，且更适用于分裂期的染色体分析（虽然也可以用于间期核）。

多重检测能力： 使用不同荧光颜色的探针，FISH 可以同时检测细胞中的多种核酸序列，提供更全面的信息。Southern 印迹通常一次只能检测一个或有限的几个目标序列，需要多次杂交或使用混合探针。

检测 RNA： FISH 也可以用于检测细胞中的 RNA 分子（RNA FISH），从而研究基因

的表达情况和 RNA 的亚细胞定位。Southern 印迹则主要用于 DNA 检测。

总结来说，当需要回答以下问题时，FISH 通常是比 Southern 印迹更好的选择：

目标核酸序列在细胞或组织中的具体位置在哪里？

特定基因在单个细胞中的拷贝数是多少？

是否存在染色体结构异常，并且需要直接在染色体上观察这些异常？

样本量很少，或者需要检测间期细胞？

需要同时检测多种不同的核酸序列？

需要研究特定 RNA 分子的表达和定位？

而 Southern 印迹则更适合于检测特定 DNA 片段的存在与否、大小和相对含量，常用于 RFLP 分析、基因组 DNA 的酶切图谱分析等需要分析 DNA 片段大小信息的应用。