

核酸标记技术简介

技术简介

核酸其 5'端、3'端或整个分子都可被标记,取决于这一特性,现已发展多种 DNA 或 RNA 标记检测方法,可通过用可检测部分化学或生物化学标记 mRNA 然后与基因的核酸探针杂交来完成对核酸的监控;在探针位置检测标记的核酸表明靶基因已经表达。

核酸标记主要有两种类型的核酸标记技术:放射性同位素标记和非放射性标记。标记分子与核酸结合不会改变核酸的结构,对下游杂交应用也无影响,标记好的核酸分子可根据研究需要应用于:FISH、微阵列、体内外核酸成像等实验。

常用方法

1 放射性同位素标记

作为一种传统的核酸标记方法,利用 ATP- γ - ^{32}P or ^{35}P 合成放射性标记的核苷酸,容易被并入核酸序列,通过传统的酶法或者生物体。在 DNA 和 RNA 的标记应用中,放射性标记在早期起重要作用,该技术相对于非放射性标记成本低、应用广,但放射性原料安全性低且单分子水平精度低。

常应用同位素标记的 cDNA 探针,检测经 Northern blot 后细胞因子 mRNA 水平或采用打点杂交法。

2 非放射性标记

现阶段随着非放射性标记技术的开发,常用的标记为合成荧光标签并与寡核苷酸序列结合,也可以加入其他分子或蛋白质到化学反应基团上如生物素、链霉亲和素或荧光团等。非放射性核苷酸标记由于其相对速度快、灵敏度高、安全性好、多功能性等优点,可研究在单个分子水平上与核苷酸相互作用的蛋白质,得到了实验室较多应用。

常应用应用 cDNA 探针与细胞或组织切片进行原位杂交,然后进行放射自显影;或 Southern blot 后用标记探针检测特异细胞因子 DNA 水平。

模板	方法		试剂	标记	标记探针	标记位点
DNA	酶标法	5'端标记	T4 多聚核苷酸 激酶	γ - ³² PATP	ssDNA	5'-OH
		3'端标记	TdT	dNTP	ssDNA	3'-OH
	化学法	共轭	EDC	胺类/羧酸盐/磷 酸盐	DNA	5'-OH
		光反应	非特异性交联剂	碱基	DNA	随机
RNA	酶标法	5'端标记	T4 多聚核苷酸 激酶	γ - ³² PATP	RNA	5'-OH
		3'端标记	T4 RNA 连接酶	[5' - ³² P]pCp	RNA	3'-OH
	化学法	氧化	过碘酸盐	胺/酰肼	RNA	3'-OH
		共轭	EDC	胺类/羧酸盐/磷 酸盐	RNA	5'-OH
		光反应	非特异性交联剂	碱基	RNA	随机

标记选择

在选择标记系统时，要考虑所用核酸的大小和类型。大的 DNA，质粒 DNA 和 RNA 做印迹和原位杂交可以通过随机加入共价键耦合的标签来标记；共价探针具有良好的敏感性；酶法在实验室中更经济方便，可以标记样品的副本（PCR 标记）。

此外，也要综合考虑核酸标记研究实验目的。在蛋白质相互作用的研究中，由于空间位阻和化学性质，大的荧光团标签可能会中断相互作用，可以通过使用较小的标签或标记远离相互作用位点的方法来避免这种干扰；如果应用于信号放大实验，抗体偶联物如亲和素/链霉素亲和素是一个不错的选择。

参考文献

- [1]沈国平. 核酸分子的标记技术[J]. 中华实用中西医杂志, 2006, 019(015):1895-1896.
- [2]刘涛, 汤华. microRNA 微阵列研究中的核酸标记技术[J]. 医学分子生物学杂志, 2007, 4(5):4.
- [3]张少红, 刘斌. 非放射性 ECL 直接核酸标记及检测技术在水稻 RFLP 分析中的应用[J]. 中国水稻科学, 1998, 12(1):3.
- [4]吕全建, 王魁. 一步法合成一例用于活细胞核酸标记的荧光染料[J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 2014, 34(2):28-30.