

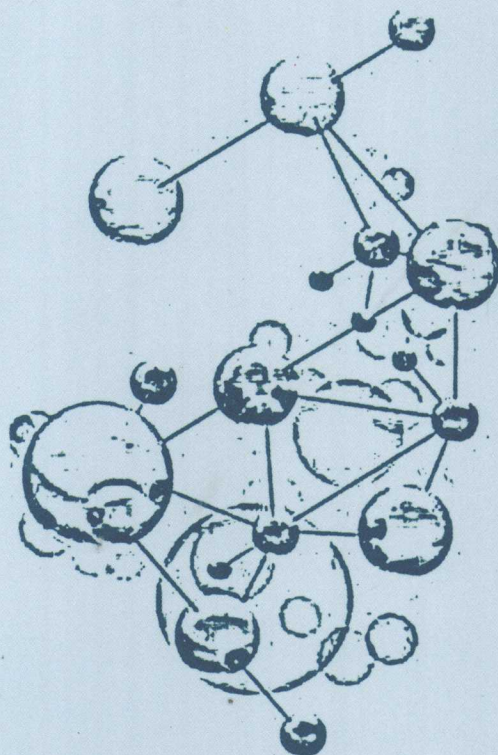


21世纪高等院校示范性实验系列教材

分子生物学实验教程

FENZI SHENGWUXUE SHIYAN JIAOCHENG

主编 任 峰 李学宝



教育部直属师范大学
华中师范大学出版社

分子生物学实验教程

主 编 任 峰 李学宝
副主编 王友如 余知和 李 伟 钟春英
编 委 (按姓氏拼音顺序排列)
常莉丽 魏华珊 黄耿青 李 兵
李登弟 李 伟 李学宝 李 扬
任 峰 王友如 许文亮 余知和
钟春英 赵彩芝 钟雪萍 张则婷



华中师范大学出版社
2013 年 · 武汉



北航

C1640390

Q7-33
42

内 容 提 要

本实验教程依据系统性研究型的分子生物学实验教学体系,以基因功能及其调控研究为主轴,致力于帮助学生系统地进行基因克隆和基因功能及其分子调控研究相关的蛋白质表达纯化、转基因技术、生物大分子杂交技术、蛋白质—蛋白质相互作用及蛋白质—DNA 相互作用等最新分子生物学实验技术原理的学习和技能训练,理解并领会分子生物学实验技术在实际科学研究中的具体应用。

本教程可作为综合性大学及理工和师范类院校生物学科各专业本科生与研究生的实验指导,还可作为从事相关领域教学、科研工作人员的参考书。

新出图证(鄂)字 10 号

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学实验教程/任峰,李学宝 主编. —武汉:华中师范大学出版社,2013.1

(21 世纪高等院校示范性实验系列教材)

ISBN 978-7-5622-5891-9

I. ①分… II. ①任… ②李… III. ①分子生物学—实验—高等学校—教材 IV. ①Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 002880 号

分子生物学实验教程

©任 峰 李学宝 主编

责任编辑:张晶晶

责任校对:刘 峥

封面设计:罗明波

编辑室:第二编辑室

电话:027—67867362

出版发行:华中师范大学出版社有限责任公司

社址:湖北省武汉市珞喻路 152 号

销售电话:027—67863426/67863280

邮购电话:027—67861321

传真:027—67863291

网址:<http://www.ccnpublish.com>

电子信箱:hscbs@public.wh.hb.cn

印刷:武汉理工大印刷厂

督印:章光琼

字数:316 千字

开本:889mm×1 194mm 1/16

印张:11.5

版次:2013 年 1 月第 1 版

印次:2013 年 1 月第 1 次印刷

印数:1—2 000

定价:23.00 元

欢迎上网查询、购书

前 言

分子生物学是研究核酸等生物大分子的功能、形态结构特征及其重要性和规律性的科学,是人类从分子水平上真正揭开生物世界的奥秘,由被动地适应自然界转向主动地改造和重组自然界的基础学科。分子生物学基本理论的建立以大量的实验为基础,是一门实验性非常强的学科。分子生物学教学如果不做实验,只学习理论,往往会事倍功半,理不出头绪。因此,分子生物学实验课程教学对高素质专业人才的培养尤显重要。

近年来,随着分子生物学突飞猛进的发展,其新理论、新技术层出不穷。但目前,国内分子生物学实验课程教材严重滞后于该学科的发展,实验教材中实验内容繁杂,缺乏分子生物学的系统性,可以称之为分子生物学技术大杂烩。多数实验教程中设计的不同实验项目之间缺乏应用的关联性,如质粒的提取、PCR 技术等独立的实验,不同的实验之间没有相关性。这种实验教学模式仅注重相关分子生物学实验技术原理的掌握,对分子生物学实验技术在实际科学研究中的应用的训练却严重不足。学生学习之后,仅仅能了解一些实验技术,对这些技术在分子生物学研究中的应用仍不知其所以然。

因此,设计一种系统性研究型分子生物学实验课程教学体系,在生物学人才培养中显得十分迫切。基于此,本教程作者根据多年本科生实验教学和研究生培养经验,结合目前最新的分子生物学实验技术编写了本实验教程。我们力图使学生在理解分子生物学实验技术原理、熟悉实验操作的基础上领会分子生物学实验技术在科学研究中的应用,初步体验通过分子生物学实验技术来解决科学问题,揭示生命现象。

在体系设计上,以基因功能及其调控研究为主轴,将整个实验课程体系分为几个大的专题,如基因克隆鉴定、蛋白质表达与纯化、转基因技术、分子杂交技术、蛋白质—DNA 相互作用及蛋白质—蛋白质相互作用分析等。整个实验体系在宏观上为一个有机的整体,具有连续性,通过实验材料传递的方法,上一次实验的结果,作为下一次实验的材料。例如在基因克隆鉴定专题中,首先是基因组的提取和 RNA 的提取,通过 PCR 技术从基因组或者通过 RT-PCR 克隆目的基因,进行基因亚克隆构建和鉴定,至测序验证完成基因克隆。成功克隆的基因又可以进行蛋白质表达载体构建和转基因载体构建,进一步进行蛋白质表达纯化,获得转基因生物。对获得的转基因生物可以进行分子鉴定,等等。这样整个实验内容类似于一个整体的研究课题,学生不仅可以学习分子生物学实验技术,也可以充分理解这些技术在分子生物学研究中的应用,从而有助于培养高素质的生物学人才。

本教程由华中师范大学任峰、李学宝、许文亮、黄耿青、李登弟、钟雪萍、张则婷、李扬、常莉丽、赵彩芝、骞华珊、李兵,湖北师范学院王友如,长江大学余知和、李伟,湖北第二师范学院钟春英共同编写。本书的主要编者多年来一直承担分子生物学实验课程教学工作,主持了多项科学研究项目并发表了多篇研究论文。但由于知识面有限以及时间仓促,在本书的编写过程中难免存在疏漏和不足之处,恳请同行和读者提出宝贵的意见,给予批评和指正。

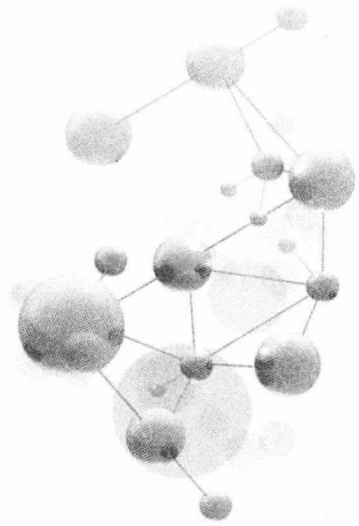
编 者

2012 年 12 月

目 录

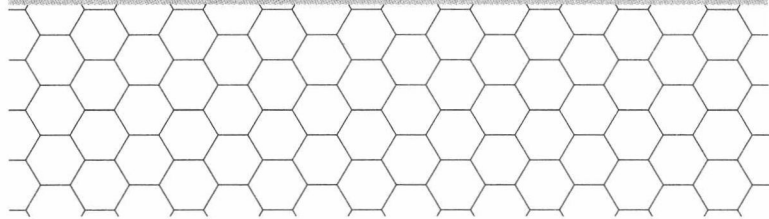
第一篇 基因克隆鉴定	1
实验 1 植物基因组 DNA 的分离与纯化	3
实验 2 拟南芥总 RNA 的提取与纯化	6
实验 3 逆转录 cDNA 的合成	9
实验 4 PCR 克隆目的基因	12
实验 5 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析	18
实验 6 目的 DNA 的回收与纯化	22
实验 7 目的基因与克隆载体的连接	25
实验 8 大肠杆菌感受态细胞的制备	29
实验 9 大肠杆菌的转化	31
实验 10 阳性克隆的筛选与鉴定	33
实验 11 重组质粒的提取	36
实验 12 重组质粒酶切分析	40
第二篇 蛋白质表达与纯化	45
实验 13 大肠杆菌原核表达载体的设计与构建	47
实验 14 重组蛋白诱导表达与 SDS-PAGE 检测	52
实验 15 重组蛋白的分离与纯化	57
第三篇 转基因技术	61
实验 16 烟草叶盘法遗传转化	63
实验 17 拟南芥浸花法遗传转化	69
实验 18 转基因斑马鱼的构建	73
第四篇 分子杂交技术	75
实验 19 Southern 杂交分析	77
实验 20 Northern 杂交分析	81
实验 21 Western Blot 印迹技术	84
第五篇 蛋白质—DNA 相互作用分析	87
实验 22 凝胶迁移实验(EMSA)	89
实验 23 酵母单杂交技术	93
实验 24 杂色质免疫共沉淀(ChIP)	97
第六篇 蛋白质—蛋白质相互作用分析	103
实验 25 酵母双杂交技术	105
实验 26 免疫共沉淀分析	112
实验 27 GST pull-down 技术	115
实验 28 双分子荧光互补技术	118

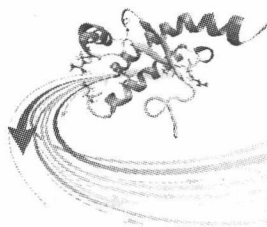
附录 实验报告	123
实验 1 植物基因组 DNA 的分离与纯化实验报告	123
实验 2 拟南芥总 RNA 的提取与纯化实验报告	125
实验 3 逆转录 cDNA 的合成实验报告	127
实验 4 PCR 克隆目的基因实验报告	129
实验 5 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析实验报告	131
实验 6 目的 DNA 的回收与纯化实验报告	133
实验 7 目的基因与克隆载体的连接实验报告	135
实验 8 大肠杆菌感受态细胞的制备实验报告	137
实验 9 大肠杆菌的转化实验报告	139
实验 10 阳性克隆的筛选与鉴定实验报告	141
实验 11 重组质粒的提取实验报告	143
实验 12 重组质粒酶切分析实验报告	145
实验 13 大肠杆菌原核表达载体设计与构建实验报告	147
实验 14 重组蛋白诱导表达与 SDS-PAGE 检测实验报告	149
实验 15 重组蛋白的分离与纯化实验报告	151
实验 16 烟草叶盘法遗传转化实验报告	153
实验 17 拟南芥浸花法遗传转化实验报告	155
实验 18 转基因斑马鱼的构建实验报告	157
实验 19 Southern 杂交分析实验报告	159
实验 20 Northern 杂交分析实验报告	161
实验 21 Western Blot 印迹技术实验报告	163
实验 22 凝胶迁移实验(EMSA)实验报告	165
实验 23 酵母单杂交技术实验报告	167
实验 24 染色质免疫共沉淀(ChIP)实验报告	169
实验 25 酵母双杂交技术实验报告	171
实验 26 免疫共沉淀分析实验报告	173
实验 27 GST pull-down 技术实验报告	175
实验 28 双分子荧光互补技术实验报告	177



第一篇 基因克隆鉴定

JYIN KELONG JIANDING





实验 1

植物基因组 DNA 的分离与纯化

1. 原理概述

基因组(genome)一般是指单倍体细胞中的全套染色体。基因组测序结果发现基因编码序列只占整个基因组序列的很小一部分。因此,基因组也指单倍体细胞中包括编码序列和非编码序列在内的全部 DNA 分子。基因组 DNA 提取通常用于构建基因组文库、克隆来源于基因组的基因或表达调控元件、Southern 杂交、分析群体遗传多样性(如 RFLP)等。

不同生物(植物、动物、微生物)基因组 DNA 提取方法有所不同;不同种类或同一种类的不同组织因其细胞结构及所含的成分不同,分离方法也有差异。在提取某种特殊组织的 DNA 时必须参照文献和经验建立相应的提取方法,以获得可用的 DNA 大分子。尤其是组织中的多糖和酶类物质对随后的酶切、PCR 反应等有较强的抑制作用。因此,用富含这类物质的材料提取基因组 DNA 时,应考虑除去多糖和酚类物质。

核酸是生物有机体中的重要成分。在生物体中核酸通常与蛋白质结合在一起,以核蛋白的形式存在。核酸分为 DNA 和 RNA。在真核生物中,前者主要存在于细胞核中,后者主要存在于细胞质和核仁里。

(1)植物基因组 DNA 的提取程序。

①破碎组织:常用的方法是将新鲜植物(如水稻)组织置于液氮中快速研磨成粉末,而拟南芥组织常温研磨成匀浆也完全可以获得较高质量的基因组 DNA。

②破坏细胞膜:通常采用去污剂破坏细胞膜。去污剂能与细胞膜上的蛋白质结合而裂解细胞。常用去污剂有十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)及十二烷基磺酸钠(SDS)。CTAB 和 SDS 能溶解细胞膜和核膜蛋白,使核蛋白解聚,从而使 DNA 得以游离出来。在适度盐离子存在下,去污剂与蛋白质复合物溶解度变小,有助于基因组 DNA 的释放。

SDS 是一种阴离子去污剂,能与细胞膜上的蛋白质结合,在 65 °C 高温下能有效裂解细胞膜,使基因组 DNA 释放出来。在用 SDS-苯酚法提取基因组时,酚能够使 SDS-蛋白质复合物中的蛋白质变性,从而使蛋白质和水溶性的 DNA 分离。虽然 SDS 法是提取植物基因组 DNA 的经典方法,操作简便, DNA 产率也较高,但是该方法并不适用于多糖含量较高的植物基因组 DNA 提取,因为 SDS 法提取的基因组 DNA 中多糖类物质难以去除。对于多酚含量较高的植物,可以在提取缓冲液中加入 2% 的聚乙烯吡咯烷酮(PVP),因为 PVP 能与多酚形成不溶性的复合物,从而可去除多酚,此外 PVP 也能与多糖结合并去除多糖。

而 CTAB 是一种阳离子去污剂,能与细胞膜上的蛋白质结合,从而裂解细胞膜。在 NaCl 高盐溶液中,CTAB 能与蛋白质和多糖形成复合物沉淀下来,而不能沉淀核酸。CTAB 法广泛应用于各种植物基因组 DNA 的提取,能有效地去除基因组 DNA 中的多糖,可用于多糖含量较高的植物基因组 DNA 的提取。

③去除杂质:通过去污剂的处理释放的基因组 DNA 仍然含有许多杂质,包括蛋白质、RNA、多糖、丹宁和色素等。加入苯酚和氯仿等有机溶剂能使蛋白质变性,并使抽提液分相,因核酸(DNA、

RNA)水溶性很强,经离心后即可从抽提液中除去细胞碎片和大部分蛋白质。污染的 RNA 则可以通过添加 RNase A 去除,但多糖类杂质一般很难去除。

④沉淀基因组:DNA 经去除大部分杂质后,可以用无水乙醇(或异丙醇)将基因组 DNA 从溶液中沉淀出来。在沉淀 DNA 时,还需要中性盐的高盐环境,如乙酸钠(NaAc)等,这种中性盐提供的 Na^+ 可以中和 DNA 所带的大量负电荷,消除 DNA 分子之间的静电排斥,有利于乙醇(或异丙醇)将 DNA 从溶液中沉淀出来。然后用 70%乙醇溶液漂洗沉淀,除去分离过程中残留的有机溶剂和盐离子,以免影响核酸降解和抑制后续步骤的酶促反应。沉淀 DNA 溶于 TE 溶液或水中,即得植物基因组 DNA 溶液。

(2)DNA 检测方法。

常用的有两种:一是紫外分光光度法,通过 A_{260} 可以定量,通过 A_{260}/A_{280} 的值可以分析其纯度。 $A_{260}=1$ 时相当于含 $50\text{ }\mu\text{g}$ 的双链 DNA, $A_{260}/A_{280}=1.8$ 时就是 DNA 纯度高的标志。 $A_{260}/A_{280}<1.7$ 时说明有蛋白质的污染, A_{260}/A_{280} 在 $1.7\sim1.9$ 说明纯度很好, $A_{260}/A_{280}>1.9$ 时说明有部分降解或有 RNA 污染。

A_{260}/A_{230} 的值也可以作为 DNA 纯度评价参考。 230 nm 是碳水化合物的最高吸收波长,纯度高的核酸其 A_{260}/A_{230} 的值在 $2.0\sim2.5$ 之间,若 $A_{260}/A_{230}<2.0$,表明样品被碳水化合物(糖类)、盐类或有机溶剂污染,需要纯化样品。

二是通过电泳检测 DNA 的质量。由于植物基因组 DNA 相对分子质量大,在 1.0%琼脂糖凝胶中电泳时会呈现一条迁移率较小的整齐条带。如果呈现清晰的 DNA 条带,但在溴酚蓝前出现弥散的荧光区,则表明样品中存在较多的 RNA 杂质;如果加样孔里有亮带,说明有蛋白质污染;如果加样量合适,泳道有弥散、拖尾现象,说明基因组 DNA 有降解。

2. 实验目的

以拟南芥为材料,学习 SDS 法提取基因组 DNA 的原理和方法,为从拟南芥基因组 DNA 克隆目的基因做准备。

3. 实验材料、仪器和试剂

(1)材料:拟南芥幼苗。

(2)仪器:陶瓷研钵,微量移液器及吸头,1.5 mL 离心管,普通冰箱,台式离心机,水浴锅,紫外分光光度计。

(3)试剂:DNA 提取缓冲液($0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaCl}$, $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ EDTA}$, $0.5\%\text{ SDS}$, $\text{pH } 7.5$), 70%乙醇,无水乙醇,酚,氯仿,异丙醇, RNase A($10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)等。

4. 实验方法与步骤

(1)取一定量(100 mg)拟南芥组织;

(2)加入 $600\text{ }\mu\text{L}$ 提取缓冲液,室温下快速研磨;

(3)把抽提液从研钵中移至 1.5 mL 离心管中,混匀;

(4) $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 10 min(室温),取上清,加等体积的酚/氯仿(1:1)混合液,上下颠倒混匀;

(5) $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 5 min(室温),取上清,加等体积的异丙醇,上下颠倒混匀;

(6) $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 10 min(室温),弃上清,倒置于吸水纸上待壁上液体流尽后加入 1 mL 的 70%乙醇洗沉淀;

- (7) $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 5 min(室温), 弃上清, 倒置于纸巾上待其干燥;
- (8) 加 $20\text{ }\mu\text{L}$ ddH₂O 溶解沉淀;
- (9) 在溶解的 DNA 中加入 $3\text{ }\mu\text{L} \sim 5\text{ }\mu\text{L}$ RNase A, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 消化 2 h~3 h;
- (10) 加入 1/10 体积的乙酸钠和 2 倍体积的无水乙醇, 混匀, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min;
- (11) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 10 min;
- (12) 弃上清, 用 70% 乙醇洗沉淀, $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 离心 5 min;
- (13) 弃上清, 待沉淀干燥后, 加入 ddH₂O 溶解 DNA;
- (14) 将 DNA 进行适当的稀释后进行浓度和纯度测定。

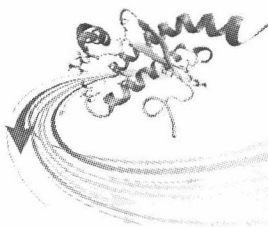
5. 注意事项

在基因组 DNA 提取过程中必须始终注意以下几个关键问题:

- (1) 选用幼嫩植物组织, 可减少淀粉类的含量。
- (2) 植物组织要充分匀浆。
- (3) DNA 的二级结构和双链易受多种因素(如强酸、强碱、加热、低盐浓度、有机溶剂、酰胺类、尿素等)的影响而引起双链解开, 即“变性”, 因此抽提时应避免使用导致变性的条件。
- (4) 抑制内外源 DNase 的活力。可以通过多种途径来达到这一目的: ①低温操作; ②调节 pH, 使偏碱(pH 8.0); ③抽提液中加表面活性剂; ④加螯合剂(EDTA)除去酶的辅助因子(Mg^{2+}), 使酶活性丧失。
- (5) 防止化学降解。比如过酸或过碱以及其他化学因素会使 DNA 降解, 一般综合考虑, 取 pH 8.0 左右为宜。
- (6) 防止物理因素降解。比如温度太高或机械张力剪切等会使 DNA 断裂。DNA 分子特别大, 其相对分子质量可达 10^9 kD , 极易被机械张力拉断, 甚至在细管中稍急一些的流动也会使 DNA 断裂, 所以在抽提过程中要特别注意这一点, 操作过程要尽量简便、温和, 减少搅拌次数, 也不要剧烈摇动。
- (7) 植物的次生代谢物(主要是胞质内的多酚类或色素类化合物)对核酸提取有干扰作用。因此, 一般尽可能选取幼嫩的、代谢旺盛的新生组织作为提取 DNA 的材料, 这是因为幼嫩的新生组织次生代谢物较少, DNA 含量高, 且易于破碎, 并且植物材料最好是新鲜的。

6. 参考文献

- [1] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂等, 译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [2] 奥斯伯, 布伦特, 金斯顿, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [3] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004.
- [4] 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天, 等. 植物基因与分子操作[M]. 北京: 北京大学出版社, 1995.



实验 2

拟南芥总 RNA 的提取与纯化

1. 原理概述

RNA 是基因表达的中间产物,对 RNA 进行操作在分子生物学中具有重要地位。高纯度和完整的 RNA 是很多分子生物学实验所必需的,如 Northern 杂交、cDNA 合成及体外翻译等实验的成败,在很大程度上取决于 RNA 的质量。RNA 分子在大多数生物体内均是单链线性分子。真核细胞中含多种 RNA,如 rRNA、mRNA、tRNA 及一些小分子 RNA。RNA 分子主要存在于细胞质中,约占 75%,另有 10%存在于细胞核内,15%在细胞器中。RNA 以 rRNA 的数量最多,占 80%~85%,tRNA 及核内小分子 RNA 占 10%~15%,而 mRNA 分子占 1%~5%。

不同生物(植物、动物、微生物)的总 RNA 的提取方法有所不同;不同种类或同一种类的不同组织其分离方法也有差异。提取细胞总 RNA 的方法有很多,常用的有异硫氰胍法、盐酸胍法、CTAB 法、SDS 法和热酚法,这些强变性剂可导致细胞结构及核蛋白二级结构破坏,有利于提取总 RNA (CTAB 和 SDS 的工作原理参见实验 1)。提取的总 RNA 可用于进一步分离 mRNA,用于建立 cDNA 文库,以及对 mRNA 的调控和进行反义 RNA 研究。

一般来说,分离纯化核酸总的原则一是应保证核酸一级结构的完整性,二是应排除其他分子的污染(保证纯度)。提取 RNA 的主要步骤有:①破碎细胞,一般用机械研磨的方法;②去除与核酸结合的蛋白质以及多糖、脂类等生物大分子,由于细胞内的大部分 RNA 是以核蛋白复合体的形式存在,所以要加入蛋白质变性剂,使核蛋白与 RNA 分离,释放出 RNA;③抑制内源和外源 RNase 活性;④去除基因组 DNA 分子,沉淀 RNA 等。核酸的纯化应达到以下要求:核酸样品中不应存在对酶有抑制作用的有机溶剂和过高浓度的金属离子;其他生物大分子如蛋白质、多糖和脂类分子的污染应降到最低程度;应排除其他核酸分子的污染,提取 RNA 过程中应去除 DNA 分子。

通常采用酚/氯仿抽提法来去除核酸溶液中的蛋白质。提取 RNA 过程中应避免 RNase 污染,并树立 RNase-free 的思想。由于 RNase 非常稳定,因此 RNA 提取过程必须在无 RNase 的环境中进行。提取 RNA 使用的各种玻璃器皿、研钵、金属及耐 250 °C 物品需在 180 °C~200 °C 烤箱中烘烤 8 h 以上以失活 RNase。提取 RNA 使用的所有玻璃器皿及吸头、离心管,均用 1%的焦炭酸二乙酯水溶液(DEPC-H₂O)室温浸泡过夜,高压灭菌。DEPC 是 RNA 酶的化学修饰剂,它和 RNA 酶的活性基团组氨酸的咪唑环反应而抑制酶活性。所用试剂除 Tris-HCl 外,均用 DEPC-H₂O 配制,室温过夜,高压灭菌。Tris-HCl 则用 DEPC-H₂O 处理过的高压灭菌的无菌水配制,然后再次高压灭菌备用。另外,RNA 在 pH 6.0 微酸性环境下相对稳定,在碱性条件下易分解。

总 RNA 的鉴定及含量计算常用的有以下两种方法:

(1)紫外分光光度法测定 RNA 纯度及含量。

取少量提取的 RNA,经紫外线扫描,吸收峰位于波长 260 nm 处, $A_{260}/A_{280}=1.8\sim 2.0$ 表明 RNA 纯度较高。 $A_{260}=1$ 时,溶液中 RNA 浓度约为 $40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,故 RNA 浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)= $A_{260}\times 40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

(2)琼脂糖凝胶电泳法鉴定 RNA 纯度、质量和相对分子质量大小。

完整的总 RNA 样品在凝胶上会呈现多条清晰的条带,其中有 3 条最为清晰,分别为 28S rRNA、18S rRNA、5S rRNA (如图 2-1 所示),其中 28S rRNA 条带的亮度应约为 18S rRNA 条带亮度的 2 倍,这表明 RNA 样品比较完整,基本无降解。如果此两条带的亮度反过来,则说明 RNA 样品已发生降解。如果在凝胶点样孔或其附近有荧光区带,则表明 RNA 样品中有 DNA 污染。植物总 RNA 中 28S rRNA 及 18S rRNA 在变性胶上的迁移率相当于相对分子质量为 5.1 kb 及 2.0 kb RNA 的迁移率,以此可作为相对分子质量的参考。

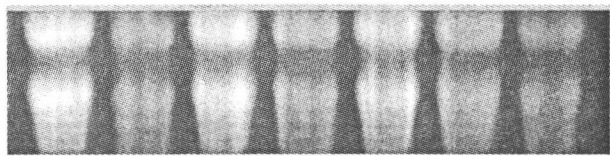


图 2-1 RNA 电泳图

2. 实验目的

- (1)以拟南芥为材料,学习 TRIzol 法提取拟南芥总 RNA;
- (2)了解 RNA 纯度、完整性和浓度测定的方法。

3. 实验材料、仪器和试剂

- (1)材料:拟南芥幼苗。
- (2)仪器:陶瓷研钵,离心机,DEPC-H₂O 处理的微量移液器及吸头,低温冰箱。
- (3)试剂:液氮,氯仿,75%乙醇(DEPC-H₂O 配制),0.1% DEPC-H₂O,异丙醇,RNAiso Plus 或者 TRIzol。

4. 实验方法与步骤

- (1)取 10 mg~30 mg 拟南芥叶片于研钵中,加入液氮,用研杵将叶片磨成粉末,转入 EP 管中,在 EP 管中加入 1 mL 的 RNAiso Plus 或者 TRIzol 试剂,室温下静置 5 min;
- (2)12 000 g, 4 ℃, 离心 5 min;
- (3)小心吸取上清液,移入新的 EP 管中(切勿吸出沉淀);
- (4)向新 EP 管中加入 RNAiso Plus 或者 TRIzol 试剂 1/5 体积量的氯仿,盖紧管盖,用手剧烈振荡 15 s~30 s(氯仿沸点低、易挥发,振荡时应小心管盖突然弹开),待溶液充分乳化(无分相现象)后,再室温静置 5 min;
- (5)12 000 g, 4 ℃, 离心 15 min;
- (6)从离心机中小心取出 EP 管,此时匀浆液分为三层,即无色的上清液、中间的白色蛋白层及带有颜色的下层有机相,吸取上清液转移至另一新的 EP 管中(切忌吸出白色中间层);
- (7)向上清液中加入等体积的异丙醇,上下颠倒 EP 管充分混匀后,在 15 ℃~30 ℃下静置 10 min;
- (8)12 000 g, 4 ℃, 离心 10 min;
- (9)小心弃去上清,缓慢地沿 EP 管管壁加入 75%的乙醇 1 mL(切勿触及沉淀),轻轻上下颠倒洗涤 EP 管管壁,12 000 g, 4 ℃, 离心 5 min 后小心弃去乙醇(为了更好地控制 RNA 中的盐离子含量,应尽量除净乙醇);
- (10)室温下干燥沉淀 2 min~5 min(不可以离心或加热干燥,否则 RNA 将会很难溶解),加入 20 μL DEPC-H₂O 溶解沉淀;
- (11)取部分 RNA 样品用紫外分光光度法测定其浓度和纯度,其余样品于一 80 ℃下保存。

5. 注意事项

(1)尽量简化操作步骤,以减少各种有害因素对 RNA 的破坏。

(2)减少化学因素对 RNA 的降解,为避免过酸、过碱对核酸链中磷酸二酯键的破坏,通常在 pH 6 条件下进行 RNA 提取。

(3)减少物理因素对 RNA 的降解,物理降解因素主要是机械剪切力,其次是高温。机械剪切作用的主要危害对象是相对分子质量大的线性 DNA 分子。在核酸提取过程中,常规操作温度是 0℃~4℃,此温度环境可降低核酸酶的活性与反应速率,减少对核酸的生物降解。

(4)防止 RNA 的生物降解。

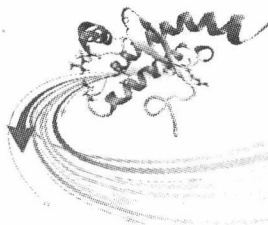
6. 参考文献

[1] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂等, 译. 北京: 科学出版社, 2002.

[2] 奥斯伯, 布伦特, 金斯顿, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998.

[3] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004.

[4] 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天, 等. 植物基因与分子操作[M]. 北京: 北京大学出版社, 1995.



实验3

逆转录 cDNA 的合成

1. 原理概述

以 mRNA 为模板合成 cDNA 的过程,称为逆转录或者反转录,所有合成 cDNA 第一链的方法都要依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶即逆转录酶(reverse transcriptase)来催化反应。目前最常用的逆转录酶有 Superscript II、莫洛尼鼠白血病病毒(Moloney murine leukemia virus)反转录酶(简称 M-MLV RTase)和 AMV 等。它们具有依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶活性和 RNase H 酶活性,能以 RNA 分子为模板,合成出一条 DNA 链,形成的 DNA 是与 RNA 模板互补的,因而逆转录产生的 DNA 分子我们称为互补 DNA(complementary DNA, cDNA)。

逆转录合成 cDNA 依赖于高质量的 RNA,高质量的 RNA 至少应保证全长并且不含逆转录酶的抑制剂,如 EDTA 或 SDS 等。在提取 RNA 的过程中,要特别防止 RNase 的污染,同时在逆转录反应中经常加入 RNase 抑制剂以增加 cDNA 合成的长度和产量。RNase 抑制剂要在第一链 cDNA 合成反应中,在缓冲液和还原剂(如 DTT)存在的条件下加入,因为 cDNA 合成前的过程会使抑制剂变性,从而释放结合的可以降解 RNA 的 RNase。RNase 抑制剂并不能防止皮肤上的 RNase,因此尽管使用了抑制剂,也要小心避免从手指上引入 RNase,实验过程中要佩戴手套,并经常更换手套。

如果逆转录获得的 cDNA 用于基因表达的半定量或者定量 PCR 分析,其 RNA 样品中不能有 DNA 的污染。因此,在逆转录之前要去除样品中的 DNA 残留。通常采用 RNase-Free DNase 对 RNA 样品进行消化。RNase-Free DNase 是一种 DNase I,可以降解双链或单链 DNA。

逆转录所采用的引物有三种:Oligo dT、特异性引物和随机引物。三种引物各有其特点。选择 Oligo dT 时,要求 RNA 必须有 Poly(A),所以真核生物的 mRNA 都适用,尤其适合长链甚至全长 mRNA 的逆转录。其原理如图 3-1 所示。选择 Oligo dT 时,对 RNA 样品的质量要求较高,最好不要有明显的 DNA 污染、RNA 降解和 RNA 断裂。使用 Oligo dT 引物要比使用随机引物和特异性引物的稳定性好。

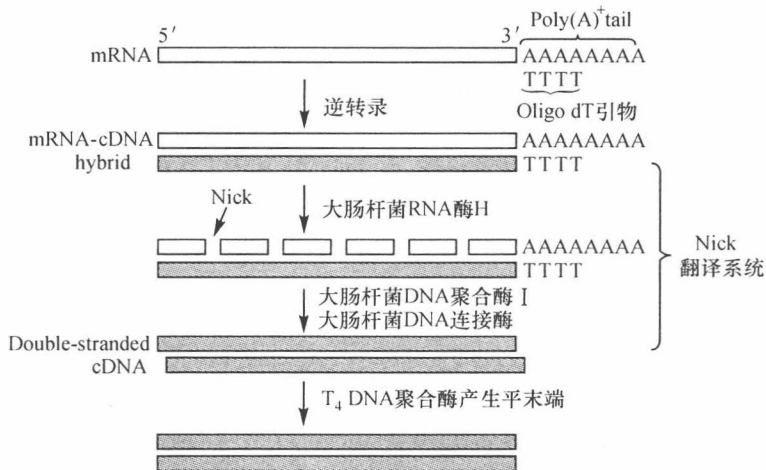


图 3-1 使用 Oligo dT 引物时的 cDNA 合成原理

随机引物法逆转录适合各种 RNA 的逆转录 RT, 尤其适合模板丰度很低的情况(比如某个基因表达量很低)。其原理如图 3-2 所示。选择随机引物时, 第一链 cDNA 合成反应中就是以所有的 RNA 为模板, 然后进行 PCR 反应时设计引物进行特异性扩增。同时要注意随机引物的量和总 RNA 量之间的关系, 一般建议每 5 μg 总 RNA 的随机引物的用量为 50 ng, 如果每 5 μg 总 RNA 的随机引物的用量超过 250 ng, 可能会导致小片段产物(<500 bp)的增加和长片段、全长产物的降低。

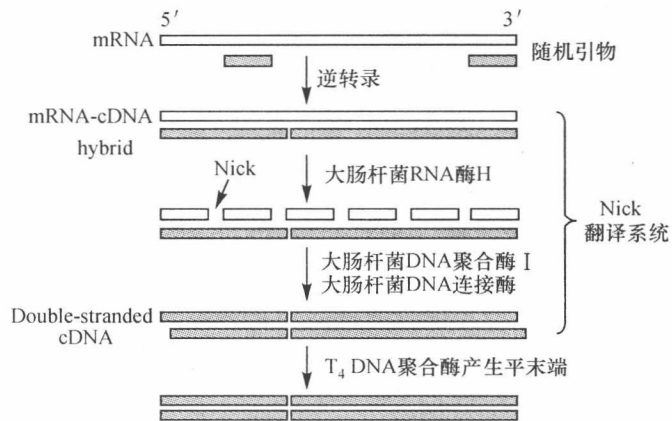


图 3-2 使用随机引物时的 cDNA 合成原理

特异性引物法只能用之前设计引物时的下游引物做逆转录, 引物设计质量影响逆转录的结果, 而且不同引物退火温度本来就不相同, 所以依照说明书按一个温度进行逆转录不是最佳选择, 一般不推荐。

2. 实验目的

- (1) 掌握 RNase-Free DNase 消化 RNA 的原理和方法;
- (2) 掌握植物 cDNA 合成的原理和方法;
- (3) 以提取的拟南芥总 RNA 为模板通过逆转录合成第一链 cDNA。

3. 实验材料、仪器和试剂

- (1) 材料: 实验 2 中获得的植物总 RNA 溶液。
- (2) 仪器: 离心机, 冰盒, 口罩, PE 手套, EP 管架, 移液器, DEPC- H_2O 处理过的枪头, EP 管。
- (3) 试剂。

① RNA 消化试剂: RQ1 RNase-Free DNase(Promega)、RQ1 DNase 10 $\times$ 反应缓冲液(Promega)、RQ1 DNase 失活液(Promega)、无菌 DEPC- H_2O 。

② 逆转录试剂: M-MLV 逆转录酶(Promega)、M-MLV RT 5 $\times$ 反应缓冲液(Promega)、RNase 抑制剂(20 U $\cdot$ μL^{-1})、Oligo(dT)18 引物(1 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、dNTP mix(10 mmol $\cdot$ L^{-1} each)、无菌 DEPC- H_2O 。

4. 操作方法与步骤

(1) 实验前期准备。

市售的一次性无菌塑料器材通常被认为是无 RNase 的, 可以直接使用。可以干热灭菌的器材(如玻璃器具等)必须在 160 $^{\circ}\text{C}$ 干热灭菌 2 h 以上; 微量离心管以及移液器吸头等需要经过高温高压灭菌后方能使用。不能干热灭菌的器材(如塑料制品等)须用 0.1% 的 DEPC 溶液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 12 h 以上

再经高温高压灭菌后使用。做 RNA 实验的器材必须和一般实验器材严格分开。用于 cDNA 合成反应的溶液试剂尽可能用 0.1% DEPC-H₂O 进行配制。

(2) 总 RNA 的 DNA 酶消化。

① 在一支无核酸酶污染的离心管中建立如下 DNA 酶消化反应体系：

总 RNA 1 μL ~ 8 μL

RQ1 DNase 10 $\times$ 反应缓冲液 1 μL

RQ1 RNase-Free DNase 1 U $\cdot$ μL^{-1}

补充 DEPC-H₂O 至 10 μL ；

② 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min；

③ 加入 1 μL RQ1 DNase 失活液终止反应。

(3) 逆转录合成 cDNA。

① 在一支无核酸酶污染的离心管中加入：

总 RNA 2 μg

Oligo(dT)18 1 μg

补充 DEPC-H₂O 至 15 μL ；

② 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育 5 min (这样可以打开模板的二级结构)；

③ 然后立即在冰上冷却，以避免重新形成二级结构，短暂离心，使溶液归于管底；

④ 按以下顺序在复性的引物/模板管 (即以上小离心管) 中加入下列组分：

M-MLV 5 $\times$ 反应缓冲液 5 μL

dNTP mix (10 mmol $\cdot$ L⁻¹ each) 1.25 μL

RNase 抑制剂 1 μL

M-MLV 反转录酶 1 μL (200 U $\cdot$ μL^{-1})

补充 DEPC-H₂O 至 25 μL ；

⑤ 轻弹离心管混合溶液，42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min。

5. 注意事项

(1) RNA 在 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴孵育后要迅速放置于冰上，否则会再次形成二级结构。

(2) M-MLV 反转录酶缓冲液与许多下游应用相容。在进行第二链合成或 PCR 之前，一般无需使用酚抽提及乙醇沉淀纯化合成的第一链 cDNA。

6. 参考文献

[1] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂等, 译. 北京: 科学出版社, 2002.

[2] 奥斯伯, 布伦特, 金斯顿, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998.

[3] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004.