

国家 [] 配套教材

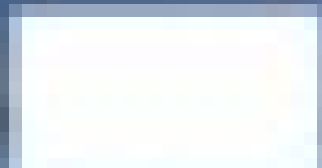
基因工程实验

Gene
Engineering
ExperimentS

陈雪岚 主编



科学出版社



第 2 版

基因工程实验

Gene
Engineering
Experiment

周 群 主编



国家级实验示范中心配套教材

基因工程实验

陈雪岚 主 编
秦红霞 肖 波 吴 杨 副主编

科 学 出 版 社
北 京

内 容 简 介

本书包括 18 个实验,分别是基因组 DNA 的提取、总 RNA 和 mRNA 的提取、质粒 DNA 的提取、目的基因的获得、限制性内切酶的酶切反应、凝胶电泳法进行 DNA 的分离和纯化、DNA 片段的体外连接、大肠杆菌感受态细胞的制备、重组子的转化、菌落 PCR 筛选阳性重组子、重组质粒的酶切鉴定、外源基因在大肠杆菌中的诱导表达、基因表达产物的检测分析、Western Blotting 实验、Southern 印迹实验、全长 cDNA 文库的构建、凝胶阻滞实验和染色质免疫共沉淀技术。

本书内容清晰准确、简明扼要,便于指导操作。可作为综合性大学、师范和农林院校生物工程、生物技术、生物制药等专业基因工程实验指导用书。

图书在版编目(CIP)数据

基因工程实验/陈雪岚主编. —北京:科学出版社,2012.3

国家级实验示范中心配套教材

ISBN 978-7-03-033374-2

I. ①基… II. ①陈… III. ①基因工程—实验—高等学校—教材 IV. ①Q78-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 007923 号

责任编辑:陈 露、叶成杰 责任校对:刘珊珊
责任印制:刘 学 封面设计:殷 靓

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

南京展望文化发展有限公司排版

江苏省句容市排印厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012 年 3 月第 一 版 开本: B5(720×1000)

2012 年 3 月第一次印刷 印张: 6 1/2

字数: 118 000

定价: 16.00 元

前 言

基因工程是现代生物工程的主体核心技术,其最大特点是可打破生物种属界限,进行生物种(属、科、目、纲、门、界)内外基因的重组、遗传信息的转移。因此,它是人工定向改变生物遗传特性的根本技术。随着生命科学的发展,基因工程技术已渗入到生物学的各个分支学科和医药农林的各个分支领域,具有重大的理论意义和广泛的实践意义。在生物学基础研究领域,基因工程技术从基因的结构与功能入手,在分子水平上为细胞、组织、器官及个体的生长、发育、分化、进化等理论研究开辟了新途径;在医药学领域它为采用基因疗法根治遗传性疾病及肿瘤等奠定了坚实的理论与技术基础,使传统技术难以或不能获得的许多珍贵药品得以大量生产,从而实现商品化;在动植物生产、食品工业等领域,它已经得到了广泛的应用并且还将发挥愈来愈大的作用。因此,对基因工程的基本操作技术的掌握是这些学科的共同需求。

本书围绕基因工程学的基本理论、基本技术及基因工程学在实践中的应用,围绕基因工程的基本程序:提-P(PCR)-切-连-转-筛-表-检,系统阐述了基因组DNA的提取、植物总RNA的提取和mRNA的纯化、质粒的提取、PCR扩增、限制性内切酶的酶切反应、凝胶电泳进行DNA的分离和纯化、DNA片段的体外连接、感受态细胞的制备、重组子的转化、菌落PCR筛选、重组质粒的酶切鉴定、外源基因的诱导表达、SDS-PAGE对诱导产物的检测、Western免疫印迹检测这些常用的基因工程学技术的原理及方法。在此基础上增加了Southern印迹实验和近几年应用较多的全长cDNA文库的构建方法、凝胶阻滞实验和染色质免疫共沉淀技术,供有条件的单位选用。本书的特点是内容详实、可操作性强。

全书共编写了18个实验,其中实验1~4由秦红霞编写,实验5~9由吴杨编写,实验10~14由肖波编写,实验15~18由陈雪岚编写。本书的编写参考了大量国内外的文献资料,得到了所有参与编写的人员和相关单位的大力支持,在此一并表示衷心的感谢。

由于作者水平的限制,疏漏之处在所难免,敬请读者批评指正。

陈雪岚

2012年1月于南昌

目 录

前言

实验 1 基因组 DNA 的提取	1
实验 1.1 植物基因组 DNA 的提取	2
实验 1.2 动物基因组 DNA 的提取	3
实验 1.3 细菌基因组 DNA 的提取	4
实验 1.4 酵母菌基因组 DNA 的提取	5
实验 2 总 RNA 和 mRNA 的提取	8
实验 2.1 Trizol 法提取总 RNA	9
实验 2.2 异硫氰酸胍/酚一步法提取总 RNA	10
实验 2.3 总 RNA 提取试剂盒	11
实验 2.4 mRNA 的分离纯化	12
实验 3 质粒 DNA 的提取	15
实验 3.1 碱裂解法少量提取质粒 DNA	17
实验 3.2 少量质粒提取试剂盒	19
实验 4 目的基因的获得	21
实验 4.1 PCR 扩增	26
实验 4.2 反转录 PCR	27
实验 5 限制性内切酶的酶切反应	30
实验 5.1 pUC18/19 质粒 DNA 的 <i>Eco</i> RI 单酶解	32
实验 5.2 <i>Hind</i> III 和 <i>Sal</i> I 对 pUC18/19 质粒 DNA 的双酶切	33
实验 6 凝胶电泳法进行 DNA 的分离和纯化	35
实验 7 DNA 片段的体外连接	37
实验 8 大肠杆菌感受态细胞的制备	40
实验 9 重组子的转化	42

实验 10	菌落 PCR 筛选阳性重组子	45
实验 11	重组质粒的酶切鉴定	47
实验 12	外源基因在大肠杆菌中的诱导表达	49
实验 13	基因表达产物的检测分析: SDS - PAGE	53
实验 14	Western Blotting(蛋白免疫印记)实验	59
实验 15	Southern 印迹实验	63
实验 16	全长 cDNA 文库的构建	68
实验 17	凝胶阻滞实验	78
实验 18	染色质免疫共沉淀技术	82
参考文献		87
附录一	基因工程实验中的常用数据和换算关系	89
附录二	基因工程实验常用试剂、溶液和缓冲液	92
附录三	PCR 实验引物设计原则	95

实验 1 基因组 DNA 的提取

【实验目的】

掌握染色体 DNA(基因组 DNA)的提取方法。

【实验原理】

从各种生物材料中提取 DNA(包括质粒 DNA 的提取)是基因工程实验最常见的操作之一。高质量 DNA 的获得是基因组文库构建、基因克隆、序列测定、PCR 及 DNA 杂交等实验的基础。

生物的大部分或几乎全部 DNA 都集中在细胞核或核质体中。一般情况下,随着生物从低级到高级的进化,DNA 的分子长度也由小到大递增。如许多病毒的 DNA 分子长度超过 100 千碱基对(kilobase pair, kb),细菌 DNA 为几千 kb,而高等动植物的基因组 DNA 则长达上亿 kb。真核生物的 DNA 是以染色体的形式存在于细胞核内,与蛋白质结合构成大小不一的染色体。因此,制备 DNA 的原则是既要使 DNA 与蛋白质、脂类和糖类等分离,又要保持 DNA 分子的完整。

基因组 DNA 提取的方法依实验材料和实验目的而略有不同,但总的原则都是首先将细胞破碎,然后用有机溶剂及盐类将 DNA 与蛋白质、大分子 RNA 及其它细胞碎片分开,用 RNA 酶将剩余的 RNA 降解,最后用乙醇(或异丙醇)将 DNA 沉淀出来。因此可将基因组 DNA 提取分三步:① 温和裂解细胞及溶解 DNA;② 采用化学或酶学的方法,去除蛋白质、RNA 以及其它的大分子;③ 沉淀和溶解 DNA。

真核生物细胞的破碎通常采用机械研磨的方法,可在研磨材料时加入液氮,使材料冻结,易于破碎,并减少研磨过程中各种酶类的作用。大肠杆菌等原核生物细胞通常是通过冻融、溶菌酶或 EDTA 处理,并用去垢剂使细胞裂解,释放 DNA。

破碎细胞后,一般加入十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)或十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)等离子型表面活性剂。这些表面活性剂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。再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。最后是在上清液中加入异丙醇或无水乙醇使 DNA 沉淀,沉淀 DNA 溶于 TE 溶液或无菌双蒸水中,即得基因组 DNA 溶液。

提取染色体 DNA 的最根本要求是保持核酸的完整性,在提取 DNA 的过程中

有许多因素会导致 DNA 降解成小片段:

(1) 物理降解: 因为染色体 DNA 分子较长, 机械张力或高温很容易使 DNA 分子发生断裂。因此, 在实际操作时应尽可能轻缓。尽量避免过多的溶液转移, 剧烈的振荡等, 以减少机械张力对 DNA 的损伤, 同时也应避免过高的温度, 此外操作所用的枪头口不能太小, 应去除尖端部分, 使其孔径有 5 mm 左右。

(2) 细胞内源 DNA 酶的作用: 细胞内常存在活性很高的 DNA 酶, 细胞破碎后, DNA 酶便可与 DNA 接触并使之降解。为避免 DNA 酶的作用, 在溶液中常加入 EDTA, SDS 以及蛋白酶等。EDTA 具有螯合 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 等二价离子的作用, 而 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 是 DNA 酶的辅因子, SDS 和蛋白酶则分别具有使蛋白质变性和降解的作用。

(3) 化学因素也会降解 DNA: 如过酸的条件下, 由于脱嘌呤而导致 DNA 不稳定, 使其极易在碱基脱落的地方发生断裂。因此, 在 DNA 的提取过程中, 应避免使用过酸的条件。

【仪器、材料】

1. 仪器

培养箱、灭菌锅、超净工作台、小试管、Eppendorf(离心)管、Eppendorf 管架、吸头、吸头盒、微量移液器、涡旋混合器、低温高速离心机、台式高速离心机、37℃和 55℃恒温水浴锅、真空干燥器、陶瓷研钵、恒温摇床、50 ml 离心管(有盖)及 5 ml 离心管、冰箱、通风橱、电泳仪、电泳槽、紫外检测仪。

2. 材料

植物组织、动物组织、大肠杆菌、酿酒酵母、RNA 酶 A、蛋白酶 K、溶菌酶、溶壁酶、 β -巯基乙醇。其他生化试剂见试剂配方。

实验 1.1 植物基因组 DNA 的提取

【试剂】

1. 2%(W/V)CTAB 抽提缓冲溶液(200 ml): 4 g CTAB, 16.364 g NaCl, 20 ml 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 8 ml 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0), 先用 70 ml ddH₂O 溶解, 再定容至 200 ml, 高温高压灭菌, 冷却后加入 400 μ l β -巯基乙醇, 使其终浓度为 0.2%~1%(V/V)。

2. 氯仿/异戊醇(24:1): 96 ml 氯仿, 加入 4 ml 异戊醇, 摇匀即可。

3. TE 缓冲液(pH 8.0): 10 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0), 1 mmol/L EDTA, 高温高压灭菌, 室温保存。

4. 10 mg/ml RNase A: 用 10 mmol/L Tris-Cl(pH 7.5), 15 mmol/L NaCl 溶

液配制,并在 100℃保温 15 min,然后室温条件下缓慢冷却,分装后-20℃保存。

5. 其他试剂:异丙醇、无水乙醇、70%乙醇、灭菌双蒸水。

【实验步骤】

1. 取少量叶片(约 1 g)置于研钵中,加入液氮研磨至粉状,转移到 1.5 ml 离心管中加入 700 μ l 65℃预热的 2% CTAB 抽提缓冲液,颠倒混匀 5~6 次,65℃保温,每隔 10 min 轻轻摇动,40 min 后取出。

2. 待冷至室温后加入等体积氯仿/异戊醇(24:1)溶液,颠倒混匀 2~3 min,至溶液成乳浊状,4℃,12 000 r/min 离心 10 min,小心取上清转移到新的 1.5 ml 离心管中。

3. 加入等体积的氯仿,颠倒混匀 2~3 min,4℃,12 000 r/min 离心 10 min,小心取上清转移到新的 1.5 ml 离心管中。

4. 加入 700 μ l 异丙醇,将离心管慢慢上下颠倒 30 s,充分混匀至能见到 DNA 絮状物,-20℃静置 20 min,4℃,12 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液。

5. 加入 700 μ l 70%乙醇洗涤沉淀,轻轻转动悬浮沉淀,4℃,12 000 r/min 离心 5 min 后,倒掉液体,室温下干燥 DNA 5~10 min。

6. 加入 200 μ l 含 40 μ g/ml RNase A 的无菌双蒸水或 TE 缓冲液,使 DNA 溶解,置于 37℃恒温箱中 30 min,除去 RNA。

7. 加入等体积的氯仿,颠倒混匀 2~3 min,4℃,12 000 r/min 离心 10 min,小心取上清转移到新的 1.5 ml 离心管中。

8. 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc(pH 5.2),及 2 倍体积的无水乙醇,混匀后室温静置 10~20 min,12 000 r/min 离心 10 min,小心弃去上清液。

9. 用 1 ml 70%乙醇洗涤沉淀物 1 次,12 000 r/min 离心 5 min。

10. 小心弃去上清液,将离心管倒置于吸水纸上,将附于管壁的残余液滴除去,室温干燥 5~10 min。

11. 加入 50~100 μ l 无菌双蒸水或 TE 缓冲液,使 DNA 溶解。

12. 取 5 μ l 样品进行电泳检测(方法参见实验 6)或测定 260 nm 下的光密度(optical density, OD)值来确定 DNA 的含量。

13. 样品储存在-20℃或-80℃冰箱中备用。

实验 1.2 动物基因组 DNA 的提取

【试剂】

1. 细胞裂解缓冲液:100 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0),500 mmol/L EDTA (pH 8.0),20 mmol/L NaCl,10% (W/V) SDS,20 μ g/ml RNA 酶。

2. 10 mg/ml 蛋白酶 K: 称取 10 mg 蛋白酶 K 溶于 1 ml 灭菌的双蒸水中, -20°C 备用。

3. 酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)(V/V): 按 1:1 的比例混合 Tris 饱和酚与氯仿/异戊醇(24:1)。

4. 3 mol/L NaAc(pH 5.2): 用 80 ml 水溶解 40.81 g 的 $\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 用冰醋酸调至 pH 5.2, 加水定容至 100 ml。

【实验步骤】

1. 取新鲜或冰冻动物组织块 0.1 g (0.5 cm^3), 去除结缔组织, 吸水纸吸干血液, 剪碎(越细越好), 放入研钵, 倒入液氮研磨至粉末, 转移到 1.5 ml 离心管中, 加入 1 ml 的细胞裂解缓冲液。

2. 加入 20 μl 10 mg/ml 蛋白酶 K 混匀, 55°C 保温 2 h, 间歇振荡离心管数次。

3. 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清转移到新的 1.5 ml 离心管中, 加等量的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)缓慢颠倒混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上层溶液到新的 1.5 ml 离心管中。

4. 加入等体积的氯仿/异戊醇, 缓慢颠倒混匀, 12 000 r/min 离心 5 min。

5. 取上层溶液到新的 1.5 ml 离心管中, 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH 5.2), 及 2 倍体积的无水乙醇, 混匀后室温静置 10~20 min, 12 000 r/min 离心 10 min。

6. 小心弃去上清液, 将离心管倒置于吸水纸上, 将附于管壁的残余液滴去除。

7. 用 1 ml 70% 乙醇洗涤沉淀物 1 次, 12 000 r/min 离心 5 min。

8. 小心弃去上清液, 将离心管倒置于吸水纸上, 将附于管壁的残余液滴除去, 室温干燥 5~10 min。

9. 加入 200 μl 含 40 $\mu\text{g/ml}$ RNase A 的无菌双蒸水或 TE 缓冲液, 使 DNA 溶解, 置于 37°C 恒温箱中 20 min, 除去 RNA, 按步骤 4~8 去除 RNase A。

10. 加入 50~100 μl 无菌双蒸水或 TE 缓冲液, 使 DNA 溶解。

11. 取 5 μl 样品进行电泳检测(方法参见实验 6)或测定 260 nm 下 OD 值来确定 DNA 的含量。

12. 样品储存在 -20°C 或 -80°C 冰箱中备用。

实验 1.3 细菌基因组 DNA 的提取

【试剂】

1. LB(Luria-Bertani)培养基: 1%(W/V)胰蛋白胨(tryptone), 0.5%(W/V)

酵母提取物(yeast extract), 1%(W/V)氯化钠(NaCl), 加双蒸水至 1 000 ml, 用 5 mol/L NaOH 调至 pH 7.2, 121℃ 高压蒸气灭菌 30 min。

固体培养基另加琼脂粉 12~15 g。

2. 其他试剂: 100 mg/ml 溶菌酶、2 mol/L NaCl、10%(W/V)SDS、10 mg/ml 的蛋白酶 K、氯仿/异戊醇(24:1)、异丙醇、70%乙醇。

【实验步骤】

1. 从平板培养基上挑单菌落接种至 5 ml 的液体 LB 培养基中, 适当温度条件下, 振荡培养过夜。

2. 取 1.5 ml 培养物于 1.5 ml 离心管中, 12 000 r/min 离心 1 min, 尽可能弃去培养基, 菌体沉淀中加入 600 μ l 的 TE 缓冲液, 反复吹打使之重新悬浮。

3. 加入 6 μ l 100 mg/ml 溶菌酶至终浓度为 1 mg/ml, 混匀, 37℃ 温育 30 min。加入 30 μ l 的 2 mol/L NaCl, 66 μ l 10% SDS 和 6 μ l 10 mg/ml 的蛋白酶 K, 混匀, 于 55℃ 温育 1 h, 使溶液变透明。

4. 加入等体积(约 750 μ l)氯仿/异戊醇混匀, 室温放置 5~10 min; 12 000 r/min 离心 10 min, 将上清转移到新的 1.5 ml 离心管中。

5. 加入 0.6~0.8 倍体积(约 450 μ l)的异丙醇, 颠倒混匀, 室温放置 10 min 以上, 至 DNA 沉淀下来, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清。

6. 用 1 ml 的 70%乙醇洗涤沉淀 1~2 次, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 沉淀在室温下倒置干燥 10~15 min。

7. 加入 200 μ l 含 40 μ g/ml RNase A 的无菌双蒸水或 TE 缓冲液, 使 DNA 溶解, 置于 37℃ 恒温箱中 20 min, 除去 RNA。

8. 按“植物基因组 DNA 的提取”步骤 7~10 去除 RNase A。

9. 加入 50~100 μ l 无菌双蒸水或 TE 缓冲液, 使 DNA 溶解。

10. 取 5 μ l 样品进行电泳检测(方法参见实验 6)或测定 260 nm 下 OD 值来确定 DNA 的含量。

11. 样品储存在 -20℃ 或 -80℃ 冰箱中备用。

实验 1.4 酵母菌基因组 DNA 的提取

【试剂】

1. YPD 培养基: 10 g 酵母粉, 20 g 蛋白胨, 20 g 葡萄糖, 加水至 1 000 ml, 溶解, 自然 pH, 121℃ 灭菌 20 min。

配制固体培养基, 则加入 1.2%~1.5% 的琼脂粉灭菌。

2. 5 mg/ml 溶壁酶(Zymolyase)溶液: 称取 5 mg 溶壁酶溶于 1 ml 含 1 mol/L 甘露醇, 0.1 mol/L Na_2EDTA (pH 7.5) 溶液中。

3. 其他试剂: 1 mol/L 甘露醇、0.1 mol/L Tris-Cl (pH 7.4)、10% (W/V) SDS、0.1 mol/L Na_2EDTA (pH 7.5)、异丙醇、70% 乙醇。

【实验步骤】

1. 用接种环(或无菌牙签)从 YPD 平板上刮取新鲜的单菌落, 接种在含 5 ml YPD 的大试管中, 30℃ 振荡培养过夜。

2. 将培养液转至 10 ml 离心管中, 5 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。

3. 加入 5 ml 的 TE (pH 8.0) 悬浮细胞, 5 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。

4. 加入 0.5 ml 的 1 mol/L 甘露醇, 0.1 mol/L Na_2EDTA 以悬浮细胞, 然后用移液枪将悬浮液转至 1.5 ml 离心管中, 加 20 μl 5 mg/ml 溶壁酶, 37℃ 水浴 60 min。

5. 加入 200 μl 0.1 mol/L Tris-Cl 和 0.1 mol/L 的 Na_2EDTA , 70 μl 10% SDS, 充分混匀, 65℃ 保温 30 min。

6. 加入等体积(约 750 μl) 氯仿和异戊醇混匀, 室温放置 5~10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 将上清转移到新的离心管中。

7. 加入 0.6~0.8 倍体积(约 450 μl) 的异丙醇, 颠倒混匀, 室温放置 10 min 以上, 至 DNA 沉淀下来, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。

8. 用 1 ml 的 70% 乙醇洗涤沉淀 1~2 次, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 沉淀在室温下倒置干燥 10~15 min。

9. 加入 200 μl 含 40 $\mu\text{g/ml}$ RNaseA 的无菌双蒸水或 TE 缓冲液, 使 DNA 溶解, 置于 37℃ 恒温箱中 20 min, 除去 RNA。

10. 按“植物基因组 DNA 的提取”步骤 7~10 去除 RNase。

11. 加入 50~100 μl 无菌双蒸水或 TE 缓冲液, 使 DNA 溶解。

12. 取 5 μl 样品进行电泳检测(方法参见实验 6)或测定 260 nm 下 OD 值来确定 DNA 的含量。

13. 样品储存在 -20℃ 或 -80℃ 冰箱中备用。

【注意事项】

1. DNA 提取过程中, 细胞必须均匀分散, 以减少 DNA 团块形成。

2. 因配制好的酚/氯仿/异戊醇溶液上面覆盖了一层 Tris-HCl 溶液, 以隔绝空气, 在使用时应注意取下面的有机层。提取过程中, 加入酚/氯仿/异戊醇溶液后应采用上下颠倒方法, 充分混匀。如发现苯酚已氧化变成红色, 应弃之不用, 因为苯酚的氧化产物可以破坏核酸链, 使其发生断裂。如果经过抽提后, 其上清液太黏

不易吸取,可能是因为 DNA 浓度过高,可加大抽提前缓冲液用量或减少所取组织的量。

3. 在提取过程中为了避免染色体 DNA 发生机械断裂,应尽量在温和的条件下操作,如尽量减少酚/氯仿抽提次数,混匀过程要轻缓,离心通常采用低速离心,以保证得到较长 DNA。

4. 如果提取的 DNA 不易溶解,可能是因为 DNA 不纯、沉淀物太干燥、含杂质较多或加溶解液太少使浓度过大。

5. 分光光度计分析 DNA 的浓度和纯度: OD_{260} 值为 1 相当于大约 $50 \mu\text{g/ml}$ 双链 DNA, $40 \mu\text{g/ml}$ 单链 DNA 或 RNA 及大约 $20 \mu\text{g/ml}$ 单链寡核苷酸。纯 DNA 样品的 $OD_{260}/OD_{280} \approx 1.8 (>1.9, \text{表明有 RNA 污染}; <1.6, \text{表明有蛋白质、酚等污染})$ 。

6. 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量时,用 $\lambda\text{DNA}/Hind \text{ III}$ 作为标准 DNA 相对分子质量,染色体 DNA 一条带应该在 $\lambda\text{DNA}/Hind \text{ III}$ 的第一条带 (23 kb) 上面。图 1-1 是基因组 DNA 与标准 DNA 相对分子质量的电泳图。

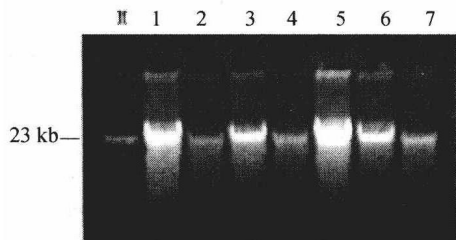


图 1-1 染色体 DNA 电泳图

【思考题】

1. 如何正确使用微量移液器?
2. 沉淀 DNA 时加 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠,为什么?
3. 如何准备基因操作中的吸头、Eppendorf 管等器具,在使用这些东西时应注意什么?
4. 提取染色体 DNA 的基本原理是什么? 在操作中应注意什么?
5. 在使用苯酚进行 DNA 抽提时应注意什么?
6. 进行 DNA 抽提,显红色的苯酚可否使用,如何保护苯酚不被空气氧化?
7. 在基因工程操作中苯酚、氯仿的作用是什么?
8. 如何检测和保证 DNA 的质量?

实验2 总 RNA 和 mRNA 的提取

【实验目的】

学习利用异硫氰酸胍变性液从各种不同生物细胞中提取 RNA 的基本原理与方法。

【实验原理】

分离纯化完整的 RNA 是进行分子克隆、基因表达分析的基础。真核细胞的 RNA 分子的合成发生在细胞核,合成的 RNA 前体分子在核内加工成熟,并穿过核膜运至细胞质中用于指导蛋白质的合成。细胞内主要有 3 种 RNA, mRNA 只占 RNA 总量的 1%~5% 左右,其相对分子质量大小不一,由几百至几千个核苷酸组成。大部分 mRNA,均与蛋白质结合在一起形成核蛋白体。

要成功地提取真核生物 RNA,即确保 RNA 的数量和质量,关键在于尽可能完全抑制或去除 RNA 酶(RNase)的活性,因为 RNA 酶是导致 RNA 降解最主要的物质。RNA 酶由一条多肽链组成,变性后容易复性,因此非常耐高温,即使高温灭菌也不可能完全清除其活性。RNA 酶无需任何辅助因子,在较宽的 pH 范围内都有活性。加上 RNA 酶广泛存在,例如在所有的组织中均存在 RNA 酶,操作者的手、唾液、灰尘都含有较丰富的 RNA 酶。因此在实验中,一方面要严格控制外源性 RNA 酶的污染;另一方面要最大限度地抑制各种组织和细胞中内源性的 RNA 酶。在所有 RNA 的操作中,操作者均需戴一次性手套和口罩。所用耐热的物品,如玻璃制品,需置于干燥烘箱中 180℃ 烘烤 4~6 h。不能用高温烘烤的材料,如塑料制品等皆可用 0.1% 的焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水溶液处理,再经高压蒸汽灭菌。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其活性。RNA 提取中所用的溶液和水一般都先用 0.1% DEPC 水溶液处理,再经高温灭菌,并尽可能使用未曾开封的试剂。

在实验室中常用的抽提 RNA 方法有两种,一种是酸性酚-异硫氰酸胍抽提法和 Qiagen 硅胶膜纯化法。对任何生物材料的 RNA 提取,首先研磨组织或细胞,使之裂解;加入变性剂异硫氰酸胍,除能进一步破碎细胞并溶解细胞成分外,还可以保持 RNA 的完整;释放出来的 DNA 和 RNA 由于在特定 pH 下的溶解性不同,经氯仿抽提及离心后,分别位于整个体系的中间相和水相(RNA 存在于水相);收集含 RNA 的水相,通过乙醇或异丙醇沉淀,可获得 RNA 样品。Trizol 试剂是使

用最广泛的抽提总 RNA 的专用试剂,由 Gibco 公司根据酸性酚-异硫氰酸胍抽提法设计,主要由苯酚和异硫氰酸胍组成,适用于绝大多数生物材料。

从生物细胞中分离 mRNA 比分离 DNA 困难得多, mRNA 在细胞内尤其在原核细胞内的半衰期极短,只有几分钟,而且由于基因表达具有严格的时序性,目的基因的表达程序对相应 mRNA 的成功分离至关重要。此外 mRNA 在体外也不甚稳定,这对分离纯化过程和方法都提出更高的要求。提取 mRNA 一般有两条途径:其一是先提取多聚核糖体,再将蛋白质与 mRNA 分开。即利用抗原抗体的反应,可以将含量极微、特异的 mRNA 提取出来。因为没有合成完的蛋白质还停留在多聚核糖体上,这些新生肽链能与完整蛋白质的抗体发生抗原抗体的反应,因此,可以选择性地沉淀特异的 mRNA。其二是提取细胞总 RNA(大部分 rRNA、tRNA 和微量 mRNA),再根据大多数真核 mRNA 的 3'末端都具有长度为 20~250 个腺苷酸组成的 poly(A)尾巴,利用寡聚(dT)-纤维素柱层析法获得所有 mRNA。

mRNA 的 3'末端的 poly(A)结构为真核生物 mRNA 的提取提供了极为方便的选择性标志,实验中常用寡聚(dT)-纤维素柱层析法获得高纯度 mRNA。该方法利用 mRNA 3'末端含有 Poly(A)的特点,总 RNA 流经寡聚(dT)-纤维素柱时,在高盐缓冲液的作用下, mRNA 通过其 3'端 poly A 尾与寡聚(dT)互补杂交,被特异地固定在固相介质上,而与总 RNA 的其他成分分离,再用低盐溶液或蒸馏水洗脱 mRNA。经过两次寡聚(dT)-纤维柱后,即可得到较高纯度的 mRNA。

【仪器、材料】

1. 仪器

培养箱、灭菌锅、超净工作台、小试管、Eppendorf(离心)管、Eppendorf 管架、吸头、吸头盒、涡旋混合器、低温高速离心机、微量移液器、真空干燥器、恒温水浴锅、陶瓷研钵、冰箱、通风橱、电泳仪、电泳槽、紫外检测仪。

2. 材料

Trizol 试剂、焦碳酸二乙酯(DEPC)、上海生工 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒。其他生化试剂见试剂配方。

实验 2.1 Trizol 法提取总 RNA

【试剂】

1. DEPC 水(DEPC-H₂O): 0.1% DEPC 水溶液经高压蒸汽灭菌至少 30 min。

2. 70%乙醇: DEPC-H₂O 配制。
3. 其他试剂: 氯仿、异丙醇、0.1% DEPC 水溶液(V/V)。

【实验步骤】

1. 材料的预处理

(1) 从组织中提取总 RNA: 取适量组织于液氮中充分研磨至粉末状, 在液氮挥发完之前将样品(50~100 mg)转移到 1.5 ml RNase-free 的离心管中, 加入 1 ml Trizol 试剂。

(2) 从细胞中提取总 RNA: ① 培养贴壁细胞离心除去培养基后, 可直接用 Trizol 试剂进行消化、裂解, Trizol 试剂按 10 cm²/ml 比例加入; ② 悬浮细胞可直接收集、裂解, 每 1 ml Trizol 试剂可裂解 5×10⁶ 个动物、植物或酵母细胞, 或 10⁷ 个细菌细胞。

2. 震荡混匀, 室温放置 5 min。

3. 按每毫升 Trizol 试剂加入 200 μl 氯仿, 颠倒混匀 2 min, 室温放置 3 min, 4℃, 12 000 r/min; 离心 10 min。

4. 取上清水相转移到 1.5 ml RNase-free 的离心管中, 加入等体积的异丙醇, 室温放置 20 min, 4℃, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。

5. 加入 1 ml 70%乙醇洗涤沉淀, 4℃, 12 000 r/min 离心 3 min, 弃去上清液, 室温干燥 5~10 min。

6. 用 30~50 μl RNase-free ddH₂O, 充分溶解 RNA。

7. RNA 的分析和定量: ① 取 5 μl 样品进行普通琼脂糖凝胶电泳或甲醛变性琼脂糖凝胶电泳, 确定 RNA 的完整性和污染情况(如图 2-1); ② 测定样品在 260 nm 下吸光度值, 按 1 OD = 40 μg/ml RNA 计算 RNA 的浓度。

8. 将所得到的 RNA 溶液置于 -70℃ 保存或用于后续试验。

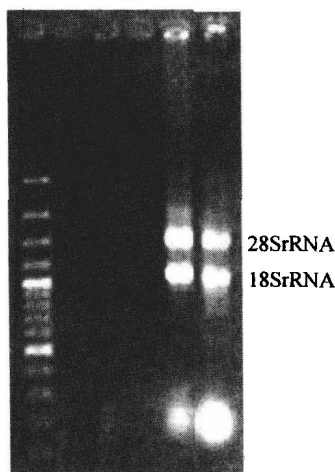


图 2-1 豇豆总 RNA 电泳

实验 2.2 异硫氰酸胍/酚一步法提取总 RNA

【试剂】

1. 异硫氰酸胍溶液: 4 mol/L 异硫氰酸胍, 25 mmol/L 柠檬酸钠(pH 7.0),