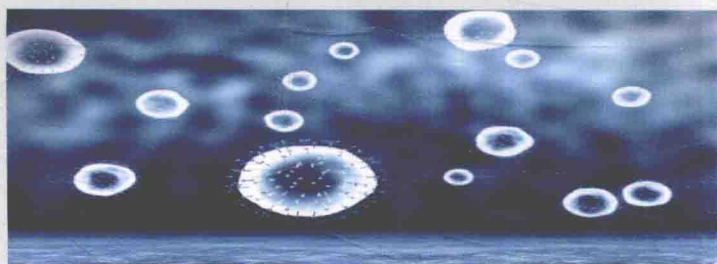




普通高等教育“十三五”规划教材

分子微生物学 实验指导

GUIDE TO EXPERIMENTS
OF MOLECULAR MICROBIOLOGY



柳志强 主 编
李晓宇 副主编



中国轻工业出版社 | 全国百佳图书出版单位

普通高等教育“十三五”规划教材

分子微生物学实验指导

柳志强 主 编

李晓宇 副主编



中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

分子微生物学实验指导/柳志强主编. —北京: 中国轻工业出版社, 2017. 7

普通高等教育“十三五”规划教材

ISBN 978-7-5184-1453-6

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

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 138958 号

责任编辑: 王 朗 车向前

策划编辑: 江 娟 责任终审: 劳国强 封面设计: 锋尚设计

版式设计: 姜 涛 责任校对: 晋 洁 责任监印: 张 可

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

印 刷: 三河市万龙印装有限公司

经 销: 各地新华书店

版 次: 2017 年 7 月第 1 版第 1 次印刷

开 本: 787×1092 1/16 印张: 7

字 数: 160 千字

书 号: ISBN 978-7-5184-1453-6 定价: 20.00 元

邮购电话: 010-65241695 传真: 65128352

发行电话: 010-85119835 85119793 传真: 85113293

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社邮购联系调换

170113J1X101ZBW

前 言

分子微生物学是从分子水平上研究微生物生命现象物质基础的学科，主要研究微生物细胞成分的物理、化学性质和变化，以及这些性质变化与生命现象的关系。随着生命科学的发展，分子微生物学技术已渗透到生命科学的各个领域，占有举足轻重的地位。分子微生物学实验技术是分子生物学研究中最基本也是最重要的手段，目前国内关于分子生物学实验的书籍较多，但多数书籍涉及的实验技术较多，内容较繁杂，不利于学生快速掌握其中基本的内容。为了适应分子微生物学技术的发展，并为培养研究型创新人才服务，编者在现有分子生物学实验相关书籍的基础上，整理了其中与分子微生物学相关的实验技术，编写《分子微生物学实验指导》，供生命科学各专业，特别是微生物学相关专业的本科生和研究生使用。

本书共十四章，内容包括微生物核酸提取、聚合酶链反应、载体连接转化、大肠杆菌表达、分子杂交、DNA 和蛋白质相互作用等目前分子微生物学领域常用的实验技术，章节顺序基本参照常规实验的流程。每个章节在开篇部分对实验原理进行了详细阐述；在实验步骤中，结合前人经验总结了部分注意事项；每章结尾均配有思考题，可用于实验的复习和加深理解；书末还附有本书所涉及的质粒图谱及微生物常用培养基配方。

由于编者水平有限以及经验不足，书中难免有不足之处，敬请广大读者指正。

编 者

2017 年 5 月于海南大学

目 录

第一章 琼脂糖凝胶电泳	1
一、实验材料	2
二、实验仪器	2
三、操作步骤	2
四、技术要点	2
第二章 基因组 DNA 的提取	4
一、从植物组织提取基因组 DNA	4
二、从动物组织提取基因组 DNA	5
三、细菌基因组 DNA 的制备	6
四、丝状真菌基因组 DNA 的制备	7
五、酵母基因组 DNA 的制备	7
六、基因组 DNA 的检测	8
第三章 RNA 的提取和 cDNA 的合成	9
一、动植物组织 mRNA 提取	11
二、植物病毒 RNA 提取	13
三、丝状真菌 RNA 提取	14
四、细菌 RNA 提取	16
五、酵母 RNA 提取	17
六、cDNA 的合成	18
第四章 聚合酶链反应 (PCR)	21
一、常规 PCR 技术	21
二、降落 PCR	25
三、RACE 技术	25
四、实时荧光定量 PCR	27
第五章 DNA 酶切	31
一、实验材料	32
二、实验仪器	32
三、操作步骤	32
四、技术要点	33

第六章 重组质粒的连接 37

 一、实验材料 38

 二、实验仪器 38

 三、操作步骤 38

 四、技术要点 38

第七章 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化 39

 一、CaCl₂法制备感受态细胞及转化 40

 二、大肠杆菌超级感受态细胞的制备 41

 三、电转化感受态细胞的制备及转化 42

第八章 质粒 DNA 的提取 45

 一、实验材料 46

 二、操作步骤 46

 三、技术要点 47

第九章 聚丙烯酰胺凝胶电泳 48

 一、实验材料 49

 二、实验仪器 49

 三、操作步骤 49

 四、技术要点 50

第十章 融合蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化 53

 一、实验材料 54

 二、实验仪器 54

 三、操作步骤 54

 四、技术要点 55

第十一章 分子杂交技术 56

 一、核酸探针标记的方法 56

 二、Southern 杂交 63

 三、Northern 杂交 65

 四、Western 杂交 67

 五、菌落原位杂交 68

 六、斑点杂交 70

 七、杂交反应的条件及参数的优化 71

第十二章 RFLP 和 RAPD 技术	73
一、RFLP 技术	74
二、RAPD 技术	75
第十三章 EMSA 实验方案	77
一、实验试剂	78
二、操作步骤	80
第十四章 酵母双杂合系统筛选相互作用的蛋白	85
一、实验材料与方法	86
二、阳性克隆的进一步证实	94
三、注意事项	94
附录一 质粒图谱	96
附录二 常用微生物培养基配方	101
参考文献	102

第一章 琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳是分离鉴定和纯化 DNA 片段的标准方法。该技术操作简便快速，可以分辨用其他方法（如密度梯度离心法）所无法分离的 DNA 片段。当用低浓度的荧光嵌入染料溴化乙锭（ethidium bromide, EB）染色，在紫外光下至少可以检出 1~10ng 的 DNA 条带，从而可以确定 DNA 片段在凝胶中的位置。此外，还可以从电泳后的凝胶中回收特定的 DNA 条带，用于以后的克隆操作。

琼脂糖和聚丙烯酰胺可以制成各种形状、大小和孔隙度。琼脂糖凝胶分离 DNA 片段的范围较广，不同浓度的琼脂糖凝胶可分离长度从 200bp 至近 50kb 的 DNA 片段。琼脂糖通常用水平装置在强度和方向恒定的电场下电泳。聚丙烯酰胺分离小片段 DNA (5~500bp) 效果较好，其分辨力极高，甚至相差 1bp 的 DNA 片段就能分开。聚丙烯酰胺凝胶电泳很快，可容纳相对大量的 DNA，但制备和操作比琼脂糖凝胶困难。聚丙烯酰胺凝胶采用垂直装置进行电泳。目前，一般实验室多用琼脂糖水平平板凝胶电泳装置进行 DNA 电泳。

琼脂糖主要在 DNA 制备电泳中作为一种固体支持基质，其密度取决于琼脂糖的浓度。在电场中，在中性 pH 下带负电荷的 DNA 向阳极迁移，其迁移率由下列多种因素决定。

1. DNA 的分子大小

线状双链 DNA 分子在一定浓度的琼脂糖凝胶中的迁移率与 DNA 分子质量的对数成反比，分子越大则所受阻力越大，也越难于在凝胶孔隙中爬行，因而迁移得越慢。

2. 琼脂糖浓度

一个特定的线状 DNA 分子，其迁移率在不同浓度的琼脂糖凝胶中各不相同。DNA 电泳迁移率的对数与凝胶浓度成线性关系。凝胶浓度的选择取决于 DNA 分子的大小，分离小于 0.5kb 的 DNA 片段所需胶浓度是 1.2%~1.5%，分离大于 10kb 的 DNA 分子所需胶浓度为 0.3%~0.7%，DNA 片段介于两者之间则所需胶浓度为 0.8%~1.0%。

3. DNA 分子的构象

DNA 分子在电场中的移动速度不仅和分子量有关，还和它本身的构象有关。相同分子量的线状、开环和超螺旋 DNA 在琼脂糖凝胶中的移动速度是不一样的，超螺旋 DNA 移动最快，而开环 DNA 移动最慢。如在电泳鉴定质粒纯度时，发现凝胶上有数条 DNA 带，难以确定是质粒 DNA 不同构象引起，还是因为含有其他 DNA 引起时，可从琼脂糖凝胶上将 DNA 带逐个回收，用同一种限制性内切酶分别水解，然后电泳，如在凝胶上出现相同的 DNA 图谱，则为同一种 DNA。

4. 电源电压

在低电压时，线状 DNA 片段的迁移速率与所加电压成正比。但是随着电场强度的增加，不同分子量的 DNA 片段的迁移率将以不同的幅度增长，片段越大，因场强升高

引起的迁移率升高幅度也越大,因此电压增加,琼脂糖凝胶的有效分离范围将缩小。要使大于 2kb 的 DNA 片段的分辨率达到最大,所加电压不得超过 5V/cm。

5. 嵌入染料的存在

荧光染料溴化乙锭用于检测琼脂糖凝胶中的 DNA,染料会嵌入到堆积的碱基对之间并拉长线状和带缺口的环状 DNA,使其刚性更强,还会使线状 DNA 迁移率降低 15%。

6. 离子强度影响

电泳缓冲液的组成及其离子强度影响 DNA 的电泳迁移率。在没有离子存在时(如误用蒸馏水配制凝胶),电导率最小, DNA 几乎不移动;在高离子强度的缓冲液中(如误加 10 × 电泳缓冲液),则电导很高并明显产热,严重时会引起凝胶熔化或 DNA 变性。

对于天然的双链 DNA,常用的几种电泳缓冲液有 TAE [含 EDTA (pH 8.0) 和 Tris - 乙酸]、TBE (Tris - 硼酸和 EDTA)、TPE (Tris - 磷酸和 EDTA),一般配制成浓缩母液,储于室温。

一、实验材料

(1) TAE 电泳缓冲液 TAE (50 ×) 储存液: 242g Tris, 57.1mL 冰乙酸, 100mL 0.5mol/L EDTA (pH 8.0), 定容至 1000mL。使用液为 TAE (1 ×)。

(2) 6 × DNA 上样缓冲液 30mmol/L EDTA, 36% 甘油, 0.05% 二甲苯腈蓝 FF, 0.05% 溴酚蓝。

(3) 溴化乙锭 配成 10mg/mL 溶液, 双蒸水配制, 避光保存, 用时以 1:20000 稀释。溴化乙锭为致癌剂, 配制时防止皮肤接触。

二、实验仪器

DYY - III 型稳压稳流电泳仪、水平电泳槽、微波炉、离心机、凝胶成像系统。

三、操作步骤

(1) 0.8% 琼脂凝胶板的配制 取 0.8g 琼脂糖加 100mL TAE (1 ×), 微波炉加热融化, 将其冷却至 55 ~ 65℃, 倒入制胶槽中。

(2) 充分凝固后从制胶槽中卸下凝胶板, 放入电泳槽, 加入 TAE (1 ×), 使其液面略高于琼脂糖板。

(3) DNA 样品 5μL 加 1μL 6 × DNA 上样缓冲液, 混匀后全部加样于琼脂糖板的样品孔中。

(4) 稳压电泳 100V 约 30min, 使溴酚蓝指示剂泳动至适当位置。

(5) 取出凝胶板, 置溴化乙锭溶液中染色 20min。

(6) 在凝胶成像仪观察结果。

四、技术要点

(1) 选择琼脂糖凝胶浓度取决于所鉴定 DNA 的大小, 小片段 DNA 应用高浓度凝

胶，大片段则用低浓度凝胶。在1%的琼脂糖凝胶中溴酚蓝的泳动速度与50bp 的双链线状 DNA 一致。

不同浓度琼脂糖凝胶及其可分离的线性 DNA 大小范围见表 1-1。

表 1-1 不同浓度琼脂糖凝胶及其分离线性 DNA 分子的有效范围

凝胶浓度/%	分离 DNA 的有效范围/kb	凝胶浓度/%	分离 DNA 的有效范围/kb
0.3	5~60	1.2	0.4~6
0.6	1~20	1.5	0.2~3
0.8	0.8~10	2.0	0.1~2
1.0	0.5~7		

(2) 电泳中注意防止凝胶发热。

(3) 将电泳仪置稳压挡，电压设置小于 5V/cm（电极间的最小路径）。随着电压的增加，琼脂糖凝胶的有效分离范围缩小。

(4) 溴化乙锭有强烈的致癌作用，操作时注意防护。

思考题

- 1. DNA 样品点样前与 6×DNA 上样缓冲液混匀的作用是什么？
- 2. 琼脂糖凝胶电泳中 DNA 分子迁移率受哪些因素的影响？

第二章 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取通常用于构建基因组文库、Southern 杂交（包括 RFLP）及 PCR 分离基因等。利用基因组 DNA 较长的特性，可以将其与细胞器或质粒等小分子 DNA 分离。加入一定量的异丙醇或乙醇，基因组的大分子 DNA 即沉淀形成纤维状絮团飘浮其中，可用玻璃棒将其取出，而小分子 DNA 则只形成颗粒状沉淀附于壁上及底部，从而达到提取的目的。在提取过程中，染色体会发生机械断裂，产生大小不同的片段，因此分离基因组 DNA 时应尽量在温和的条件下操作，如尽量减少酚/氯仿抽提、混匀过程要轻缓，以保证得到较长的 DNA。一般来说，构建基因组文库，初始 DNA 长度必须在 100kb 以上，否则酶切后两边都带合适末端的有效片段很少。而进行 RFLP 和 PCR 分析，DNA 长度可短至 50kb，在该长度以上，可保证酶切后产生 RFLP 片段（20kb 以下），并可保证包含 PCR 所扩增的片段（一般 2kb 以下）。

不同生物（植物、动物、微生物）基因组 DNA 的提取方法有所不同；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酚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。

一、从植物组织提取基因组 DNA

1. 实验材料

水稻幼苗或其他禾本科植物，李（苹果）幼嫩叶子。

2. 实验设备

移液器，冷冻高速离心机，台式高速离心机，水浴锅，陶瓷研钵，50mL 离心管（有盖）及 5mL 和 1.5mL 离心管，弯成钩状的小玻璃棒。

3. 实验试剂

（1）提取缓冲液 I 100mmol/L Tris - HCl (pH 8.0)，20mmol/L EDTA，500mmol/L NaCl，1.5% SDS。

（2）提取缓冲液 II 18.6g 葡萄糖，6.9g 二乙基二硫代碳酸钠，6.0g PVP（聚乙烯吡咯烷酮），240 μ L 巯基乙醇，加水至 300mL。

（3）氯仿:戊醇:乙醇（80:4:16）。

（4）RNase A 母液 10 μ g/ μ L。

（5）其他试剂 液氮，异丙醇，TE 缓冲液，无水乙醇，70% 乙醇，3mol/L NaAc。

4. 操作步骤

（1）水稻幼苗或其他禾本科植物基因组 DNA 提取。

①在 50mL 离心管中加入 20mL 提取缓冲液 I，60℃ 水浴预热。

②水稻幼苗或叶子 5~10g, 剪碎, 在研钵中加液氮磨成粉状后立即倒入预热的离心管中, 剧烈摇动混匀, 60℃ 水浴保温 30~60min, 不时摇动。

③加入 20mL 氯仿:戊醇:乙醇溶液, 颠倒混匀 (需戴手套, 防止损伤皮肤), 室温下静置 5~10min, 使水相和有机相分层。

④室温下 5000r/min 离心 5min。

⑤仔细移取上清至另一 50mL 离心管, 加入 1 倍体积的异丙醇, 混匀, 室温下放置片刻即出现絮状 DNA 沉淀。

⑥在 1.5mL EP 管中加入 1mL TE。用钩状玻璃棒捞出 DNA 絮团, 在干净吸水纸上吸干, 转入含 TE 的离心管中, DNA 很快溶解于 TE。

⑦如 DNA 不形成絮状沉淀, 则可用 5000r/min 离心 5min, 再将沉淀移入 TE 管中。这样收集的沉淀, 往往难溶解于 TE, 可在 60℃ 水浴放置 15min 以上, 以帮助溶解。

⑧将 DNA 溶液 3000r/min 离心 5min, 上清倒入干净的 5mL 离心管。

⑨加入 5 μ L RNase A (10 μ g/ μ L), 37℃ 10min, 除去 RNA (若 RNA 对 DNA 的操作、分析无影响, 可省略该步骤)。

⑩加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc 及 2 倍体积的冰乙醇, 混匀, -20℃ 放置 20min 左右, DNA 形成絮状沉淀。

⑪用玻璃棒捞出 DNA 沉淀, 70% 乙醇漂洗, 再在干净吸水纸上吸干。

⑫将 DNA 重溶解于 1mL TE, -20℃ 贮存。

⑬取 2 μ L DNA 样品在 0.7% 琼脂糖胶上电泳, 检测 DNA 的分子大小。同时取 15 μ L 稀释 20 倍, 测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀, 检测 DNA 含量及质量。

(2) 从李 (苹果) 叶子提取基因组 DNA。

①取 3~5g 嫩叶, 液氮磨成粉状。

②加入提取缓冲液 II 10mL, 再研磨至溶浆状。10000r/min 离心 10min。

③去上清, 沉淀加提取缓冲液 I 20mL, 混匀。65℃ 水浴 30~60min, 常摇动。

④同本节 (1) 中步骤③~⑬操作。

5. 注意事项

5g 样品可保证获得 500 μ g DNA, 足供 RFLP、PCR 等分析之用。

二、从动物组织提取基因组 DNA

1. 实验材料

哺乳动物新鲜组织。

2. 实验设备

移液管, 高速冷冻离心机, 台式离心机, 水浴锅。

3. 实验试剂

(1) 分离缓冲液 10mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 10mmol/L NaCl, 25mmol/L EDTA。

(2) 其他试剂 液氮, 10% SDS, 蛋白酶 K (20mg/mL 或粉剂), 乙醚, 苯酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1), 无水乙醇及 70% 乙醇, 5mol/L NaCl, 3mol/L NaAc, TE, RNase A (10 μ g/ μ L)。

4. 操作步骤

(1) 切取组织 5g 左右, 剔除结缔组织, 吸水纸吸干血液, 剪碎放入研钵 (越细越好)。

(2) 倒入液氮, 磨成粉末, 加 10mL 分离缓冲液。

(3) 加 1mL 10% SDS, 混匀, 此时样品变得很黏稠。

(4) 加 50 μ L 或 1mg 蛋白酶 K, 37 $^{\circ}$ C 保温 1~2h, 直到组织完全解体。

(5) 加 1mL 5mol/L NaCl, 混匀, 5000r/min 离心数秒。

(6) 取上清于新离心管, 用等体积苯酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 抽提。待分层后, 3000r/min 离心 5min。

(7) 取上层水相至干净离心管, 加 2 倍体积乙醚抽提 (在通风情况下操作)。

(8) 移去上层乙醚, 保留下层水相。

(9) 加 1/10 体积 3mol/L NaAc, 及 2 倍体积无水乙醇, 颠倒混合沉淀 DNA。室温下静置 10~20min, DNA 沉淀形成白色絮状物。

(10) 用玻璃棒钩出 DNA 沉淀, 70% 乙醇中漂洗后, 在吸水纸上吸干, 溶解于 1mL TE 中, -20 $^{\circ}$ C 保存。

(11) 如果 DNA 溶液中有不溶解颗粒, 可在 5000r/min 短暂离心, 取上清; 如要除去其中的 RNA, 可加 5 μ L RNaseA (10 μ g/ μ L), 37 $^{\circ}$ C 保温 30min, 用苯酚抽提后, 按步骤 (9) ~ (10) 重沉淀 DNA。

三、细菌基因组 DNA 的制备

1. 实验材料

细菌培养物。

2. 实验设备

移液管, 高速冷冻离心机, 台式离心机, 水浴锅。

3. 实验试剂

(1) CTAB/NaCl 溶液 4.1g NaCl 溶解于 80mL H₂O, 缓慢加入 10g CTAB, 加水至 100mL。

(2) 其他试剂 氯仿:异戊醇 (24:1), 苯酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1), 异丙醇, 70% 乙醇, TE, 10% SDS, 蛋白酶 K (20mg/mL 或粉剂), 5mol/L NaCl。

4. 操作步骤

(1) 100mL 细菌过夜培养液, 5000r/min 离心 10min, 去上清。

(2) 加 9.5mL TE 悬浮沉淀, 并加 0.5mL 10% SDS, 50 μ L 20mg/mL (或 1mg 干粉) 蛋白酶 K, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 保温 1h。

(3) 加 1.5mL 5mol/L NaCl, 混匀。

(4) 加 1.5mL CTAB/NaCl 溶液, 混匀, 65 $^{\circ}$ C 保温 20min。

(5) 用等体积苯酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 抽提, 5000r/min 离心 10min, 将上清移至干净离心管。

(6) 用等体积氯仿:异戊醇 (24:1) 抽提, 取上清移至干净管中。

(7) 加 1 倍体积异丙醇, 颠倒混合, 室温下静置 10min, 沉淀 DNA。

(8) 用玻璃棒捞出 DNA 沉淀, 70% 乙醇漂洗后, 吸干, 溶解于 1mL TE, -20°C 保存。如 DNA 沉淀无法捞出, 可 5000r/min 离心, 使 DNA 沉淀。

(9) 如要除去其中的 RNA, 可以按本章“二、从动物组织提取基因组 DNA”中操作步骤处理。

四、丝状真菌基因组 DNA 的制备

1. 丝状真菌基因组的大量提取

(1) 以每克经过滤抽干的菌丝体加 4mL CTAB 抽提液 (2% CTAB; 100mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 20mmol/L EDTA, pH 8.0; 1.4mol/L NaCl), 加入 2-巯基乙醇 (2-ME) 至终浓度为 2% (体积分数)。

(2) 菌丝体加入液氮冷冻, 研磨至细小粉末状。把粉末加入到预热的 2-ME/CTAB 抽提液中, 涡旋混匀, 65°C 保温 45~60min, 不时颠倒混匀。

(3) 加入等体积苯酚:氯仿:异戊醇溶液, 颠倒混匀, 12000r/min 离心 20min。

(4) 取上层水相至另一离心管中, 加入 0.5~0.6 倍体积冰冷的异丙醇, 颠倒混匀, 4°C 放置 20min, 12000r/min 离心 10min。

(5) 去上清, 以 70% 乙醇洗涤沉淀两次, 真空干燥后用适量 TE 缓冲液完全溶解。

(6) 加入等体积冰预冷的 5mol/L LiCl, 混匀, 12000r/min 离心 10min。

(7) 转上清至另一新离心管中, 加 0.5~0.6 倍体积冰冷的异丙醇, 混匀, -20°C 放置 20min, 12000r/min 离心 10min。

(8) 70% 乙醇洗涤沉淀, 真空干燥。

(9) 以含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase 的超纯水完全溶解沉淀, 37°C 温育 1h, -20°C 保存备用。

2. 丝状真菌基因组的小量提取

(1) 约 0.1g 的菌丝体置于 1.5mL 的离心管中, 加入 300 μL 的提取缓冲液 (100mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 100mmol/L EDTA; 250mmol/L NaCl; 1% SDS), 用带塑料钻头的手持式电钻进行研磨约 30s。

(2) 加入等体积氯仿:异戊醇 (24:1) 抽提, 12000r/min 离心 15min。

(3) 取上清, 加入 0.6 倍体积异丙醇, 混匀, -20°C 放置 20min, 12000r/min 离心 10min。

(4) 70% 乙醇洗涤沉淀, 真空干燥。

(5) 以含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase 的超纯水完全溶解沉淀, 37°C 温育 1h, -20°C 保存备用。

五、酵母基因组 DNA 的制备

操作步骤如下。

(1) 划线法在 YPD 平板上活化酵母菌, 28°C 培养, 2 天后长出单菌落。

(2) 挑取活化的单菌落接种于 5mL YPD 培养基中, 28°C , 180r/min 振荡培养 8~10h。

(3) 移取 1.5mL 菌液至无菌 EP 管中, 5000r/min 离心 5min, 弃上清。

(4) 将菌体悬浮于 0.5mL 1mol/L 山梨醇, 0.1mol/L Na_2EDTA , pH 7.5 的缓冲

液中。

(5) 加入 0.02mL 10mg/mL 消解酶溶液, 37℃ 保温 60 ~ 120min。

(6) 10000r/min 离心 1min, 弃上清, 菌体重悬于 0.5mL 50mmol/L Tris - HCl, 20mmol/L EDTA (pH 7.4) 的缓冲液中。

(7) 加入 0.05mL 10% SDS, 混匀, 65℃ 保温 30 ~ 60min。

(8) 加入 0.2mL 5mol/L 乙酸钾溶液, 冰浴 60min, 12000r/min 离心 10min。

(9) 移取上清至新的 EP 管中, 加入 1/10 体积的 3mol/L 乙酸钠 (pH 5.2) 和 2 倍体积的无水乙醇, 混匀, -20℃ 过夜沉淀, 12000r/min 离心 10min, 将沉淀用 70% 乙醇洗一次, 室温干燥。

(10) 将沉淀悬浮于 100μL TE (pH 7.4) 缓冲液中, 加入 2μL 无 DNase 的 10mg/mL RNase, 37℃, 保温 30min。

(11) 提取的基因 DNA 用双蒸水稀释适当倍数后, 在紫外分光光度计上测定 OD_{260} 和 OD_{280} , 计算 DNA 纯度和浓度。 OD_{260}/OD_{280} 值介于 1.8 ~ 2 时, DNA 纯度较高。DNA 浓度 ($\mu\text{g/mL}$) = OD_{260} 值 $\times 50\mu\text{g/mL} \times$ 稀释倍数。DNA 样品贮存于 -20℃。

六、基因组 DNA 的检测

上述方法得到的 DNA 一般可以用作 Southern、RFLP、PCR 等分析。由于所用的材料不同, 得到的 DNA 产量及质量均不同。有时 DNA 中含有酚类和多糖类物质, 会影响酶切和 PCR 的效果。所以获得基因组 DNA 后, 均需检测 DNA 的产量和质量。

(1) DNA 溶液稀释 20 ~ 30 倍后, 测定 OD_{260}/OD_{280} 比值, 明确 DNA 的含量和质量。

(2) 取 2 ~ 5μL 在 0.7% 琼脂糖胶上电泳, 检测 DNA 的分子大小。

(3) 取 2μg DNA, 用 10 单位 (U) *Hind* III 酶切过夜, 0.7% 琼脂糖胶上电泳, 检测能否完全酶解 (做 RFLP, DNA 必须完全酶解)。

如果 DNA 中所含杂质多, 不能完全酶切, 或小分子 DNA 多, 影响后续的分析 and 操作, 可以用下列方法处理。

(1) 选用幼嫩植物组织, 可减少淀粉类的含量。

(2) 苯酚:氯仿抽提, 去除蛋白质和多糖。

(3) 琼脂糖凝胶柱过滤, 去除酚类、多糖和小分子 DNA。

(4) CsCl 梯度离心, 去除杂质, 分离大片段 DNA (可用作文库构建)。

思考题

1. 为什么构建 DNA 文库时, 一定要用大分子 DNA?

2. 如何检测和保证 DNA 的质量?

第三章 RNA 的提取和 cDNA 的合成

从真核生物的组织或细胞中提取 mRNA，通过酶促反应逆转录合成 cDNA 的第一链和第二链，将双链 cDNA 和载体连接，然后转化扩增，即可获得 cDNA 文库。构建的 cDNA 文库可用于真核生物基因的结构、表达和调控的分析，比较 cDNA 和相应基因组 DNA 序列差异可确定内含子存在和了解转录后加工等一系列问题。总之，cDNA 的合成和克隆已成为当今真核分子生物学的基本手段。自 20 世纪 70 年代首例 cDNA 克隆问世以来，已发展出了许多种提高 cDNA 合成效率的方法，并大大改进了载体系统，目前 cDNA 合成试剂已商品化。cDNA 合成及克隆的基本步骤包括用反转录酶合成 cDNA 第一链，聚合酶合成 cDNA 第二链，加入合成接头以及将双链 DNA 克隆到适当载体（噬菌体或质粒）。

1. RNA 制备

模板 mRNA 的质量直接影响到 cDNA 合成的效率。由于 mRNA 分子的结构特点，容易受 RNA 酶的攻击反应而降解，加上 RNA 酶极为稳定且广泛存在，因而在提取过程中要严格防止 RNA 酶的污染，并设法抑制其活性，这是本实验成败的关键。所有的组织中均存在 RNA 酶，人的皮肤、手指、试剂、容器等均可能被污染，因此全部实验过程中均需戴手套操作并经常更换（使用一次性手套）。所用的玻璃器皿需置于干燥烘箱中 200℃ 烘烤 2h 以上。凡是不能用高温烘烤的材料，如塑料容器等，皆可用 0.1% 的焦碳酸二乙酯（DEPC）水溶液处理，再用蒸馏水冲净。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以抑制 RNA 酶活性。DEPC 与氨水溶液混合会产生致癌物，因而使用时需小心。实验所用试剂也可用 DEPC 处理，加入 DEPC 至 0.1% 浓度，然后剧烈振荡 10min，之后需要再煮沸 15min 或高压灭菌以消除残存的 DEPC，否则 DEPC 也能和腺嘌呤作用而破坏 mRNA 活性。除 DEPC 外，也可用异硫氰酸胍、钒氧核苷酸复合物、RNA 酶抑制蛋白等。此外，为了避免 mRNA 或 cDNA 吸附在玻璃或塑料器血管壁上，所有器皿一律需经硅烷化处理。

细胞内总 RNA 制备方法很多，如异硫氰酸胍热苯酚法等。许多公司有现成的总 RNA 提取试剂盒，可快速有效地提取到高质量的总 RNA。分离的总 RNA 可利用 mRNA 3' 末端含有 poly (A) 的特点，当 RNA 流经 oligo (dT) 纤维素柱时，在高盐缓冲液作用下，mRNA 被特异地吸附在 oligo (dT) 纤维素上，然后逐渐降低盐浓度洗脱，在低盐溶液或蒸馏水中，mRNA 被洗下。经过两次 oligo (dT) 纤维素柱，可得到较纯的 mRNA。纯化的 mRNA 在 70% 乙醇中 -70℃ 可保存一年以上。

2. cDNA 第一链的合成

所有合成 cDNA 第一链的方法都要用依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶（反转录酶）来催化反应。目前商品化的反转录酶有从禽类成髓细胞瘤病毒纯化到的禽类成髓细胞病毒（AMV）反转录酶和从表达克隆化的 Moloney 鼠白血病病毒反转录酶基因的大肠杆菌中分离到的鼠白血病病毒（MLV）反转录酶。AMV 反转录酶包括两个具有若干种酶活性的多肽亚基，这些活性包括依赖于 RNA 的 DNA 合成，依赖于 DNA 的 DNA 合成以及对

DNA:RNA 杂交体的 RNA 部分进行内切降解 (RNA 酶 H 活性)。MLV 反转录酶只有单个多肽亚基,兼备依赖于 RNA 和依赖于 DNA 的 DNA 合成活性,但降解 RNA:DNA 杂交体中的 RNA 的能力较弱,且对热的稳定性较 AMV 反转录酶差。MLV 反转录酶能合成较长的 cDNA (如大于 3kb)。

AMV 反转录酶和 MLV 反转录酶利用 RNA 模板合成 cDNA 时的最适 pH、最适盐浓度和最适温度各不相同,所以合成第一链时相应调整条件是非常重要的。AMV 反转录酶和 MLV 反转录酶都必须有引物来起始 DNA 的合成。cDNA 合成最常用的引物是与真核细胞 mRNA 分子 3' 端 poly (A) 结合的 12~18 核苷酸长的 oligo (dT) 以及随机引物。

3. cDNA 第二链的合成

cDNA 第二链的合成方法有以下两种。

(1) 自身引导法 该法合成的单链 cDNA 3' 端能够形成一短的发夹结构,这就为第二链的合成提供了现成的引物,当第一链合成反应产物的 DNA:RNA 杂交链变性后,利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段或反转录酶合成 cDNA 第二链,最后用对单链特异性的 S1 核酸酶消化该环,即可进一步克隆。但自身引导合成法较难控制反应,而且用 S1 核酸酶切割发夹结构时无一例外地将导致对应于 mRNA 的 5' 端序列出现缺失和重排,因而该方法目前很少使用。

(2) 置换合成法 该方法中,第一链在反转录酶作用下产生的 cDNA:mRNA 杂交链不用碱变性,而是在 dNTP 存在下,利用 RNA 酶 H 在杂交链的 mRNA 链上造成切口和缺口,从而产生一系列 RNA 引物,使之成为合成第二链的引物,在大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的作用下合成第二链。该反应有 3 个主要优点:① 非常有效;② 直接利用第一链反应产物,无需进一步处理和纯化;③ 不必使用 S1 核酸酶来切割双链 cDNA 中的单链发夹环。目前合成 cDNA 常采用该方法。

cDNA 合成原理见图 3-1、图 3-2。

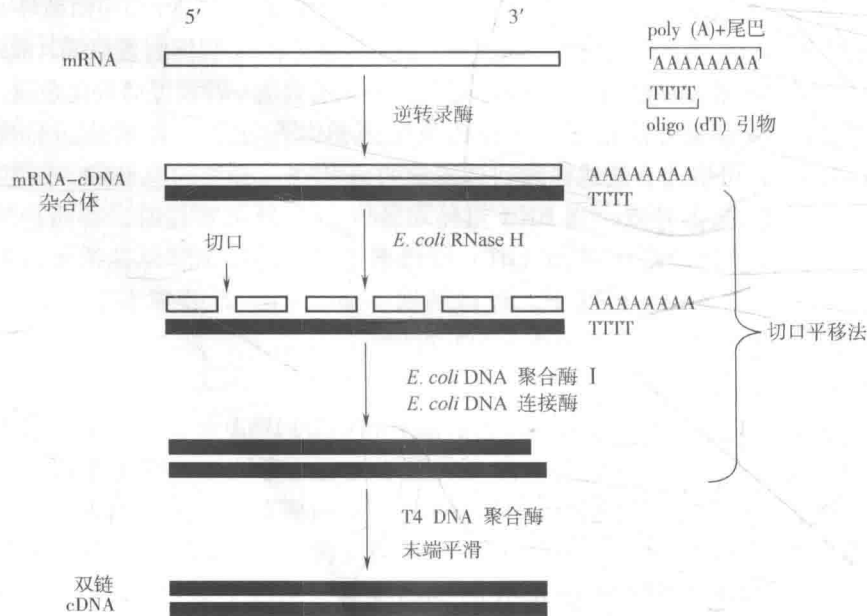


图 3-1 使用 oligo (dT)₁₈ 引物时的 cDNA 合成原理