



全国高等学校医学规划教材（供医学检验等专业用）

# 分子诊断学 实验指导

主编 钱士匀



高等教育出版社  
Higher Education Press

全国高等学校医学规划教材

(供医学检验等专业用)

# 分子诊断学实验指导

主 编 钱士匀



高等教育出版社  
Higher Education Press

## 内容简介

本书是根据近几年分子生物学检验技术的发展现状和各医学院校医学检验专业所开设的分子诊断学实验内容组织编写的。全书共分5章,计35个实验,按核酸的分离与纯化、聚合酶链反应、核酸鉴定与分析、基因工程综合实验和其他相关分子诊断技术顺序编写,实验内容涵盖最基本的分子生物学操作技术、常用的分子生物学实验技术及分子生物学技术在临床医学检验中的应用实验技术,尚有部分较为实用的分子检验技术在附录中详细介绍。

每个实验编写包括:原理、试剂与器材、操作步骤、结果分析、临床应用、注意事项、评价及思考题。书末附有参考文献,核酸和蛋白质数据,常用仪器介绍,常用试剂、缓冲液的配制,常用词汇的中英文对照等。全书所选实验项目,内容新、技术全、操作性强,具有较好的可读性、实用性。

本教材可供高等医学院校医学检验专业本、专科学生及分子生物学专业研究生使用,也可供从事临床分子生物学检验工作的技术人员参考。

## 图书在版编目(CIP)数据

分子诊断学实验指导/钱士匀主编. —北京:高等教育出版社,2006.12

ISBN 7-04-020237-9

I. 分... II. 钱... III. 分子生物学-实验室诊断-医学院校-教材 IV. R446

中国版本图书馆CIP数据核字(2006)第131181号

策划编辑 刘晋秦 冯娟 责任编辑 薛玥 封面设计 张楠 责任绘图 朱静  
版式设计 张岚 责任校对 杨凤玲 责任印制 朱学忠

出版发行 高等教育出版社  
社 址 北京市西城区德外大街4号  
邮政编码 100011  
总 机 010-58581000

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司  
印 刷 北京新丰印刷厂

开 本 850×1168 1/16  
印 张 11.5  
字 数 330 000

购书热线 010-58581118  
免费咨询 800-810-0598  
网 址 <http://www.hep.edu.cn>  
<http://www.hep.com.cn>  
网上订购 <http://www.landaco.com>  
<http://www.landaco.com.cn>  
畅想教育 <http://www.widedu.com>

版 次 2006年12月第1版  
印 次 2006年12月第1次印刷  
定 价 21.20元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 20237-00

## 《分子诊断学实验指导》编写委员会

(以姓氏拼音为序)

|     |        |
|-----|--------|
| 黄 彬 | 中山大学   |
| 黄佩琚 | 南京医科大学 |
| 鞠少卿 | 南通大学   |
| 毛旭虎 | 第三军医大学 |
| 潘世扬 | 南京医科大学 |
| 钱士匀 | 海南医学院  |
| 张海涛 | 广东医学院  |
| 张 磊 | 四川大学   |
| 张 彦 | 重庆医科大学 |
| 赵春艳 | 大连医科大学 |

# 全国高等学校医学规划教材 (供医学检验等专业用)

## 编写指导小组名单

组长 涂植光

重庆医科大学

成员 (排名不分先后)

樊琦诗

上海交通大学医学院

刘新光

广东医学院

刘 辉

大连医科大学

邹 雄

山东大学医学院

徐克前

中南大学湘雅医学院

刘运德

天津医科大学

李 萍

四川大学华西临床医学院

毕胜利

北华大学医学院

许文荣

江苏大学医学技术学院

周 新

武汉大学医学院

张进顺

河北北方学院

刘成玉

青岛大学医学院

张学宁

昆明医学院

童明庆

南京医科大学

杨国珍

贵阳医学院

章 尧

蚌埠医学院

尹一兵

重庆医科大学

钱士匀

海南医学院

蒲晓允

第三军医大学

吕建新

温州医学院

胡建达

福建医科大学

陈芳梅

广西卫生干部管理学院

张纯洁

四川省卫生干部管理学院

宁 勇

湖北中医学院

秘书 尹一兵

## 编者的话

医学检验(laboratory medicine)又称检验医学,是细胞病理学、化学病理学、分子病理学与临床医学有机结合,以生物分析化学、分子生物学、免疫学、病原生物学、细胞学技术、生物信息学等为技术支撑的交叉学科。其任务是为疾病诊断、病情判断和治疗决策提供信息,为临床和科研提供实验室方法和数据。我国高等医学检验教育始于1983年,到2006年为止,已有70余所高等院校相继建立了医学检验本科专业。23年的探索发展历程中,其培养目标和要求已趋统一。教育部本科专业目录中对该专业的培养目标是:“具有基础医学、临床医学、医学检验等方面的基本理论知识和基本能力,能在各级医院、血站及防疫部门从事医学检验及医学类实验室工作的医学高级专门人才。”业务培养要求为:“本专业学生主要学习基础医学、临床医学、医学检验等方面的基本理论知识,受到医学检验操作技能系统训练,具有临床医学检验及卫生检验的基本能力。”

作为特殊的知识载体和教学基本要素的教材,必须体现服务于培养目标,遵循其培养人才的业务要求的基本属性。由国内18所有影响的院(校)医学检验系(学院)参与,进行的国家“十五”重点立项课题——“21世纪中国高等学校人才培养体系的创新与实践”子课题“21世纪中国高等学校医学检验专业课程体系与教学内容的创新与实践”中,将教材建设作为主要内容之一。在此教学改革研究的基础上,经过全国高等医学检验教育界同仁的努力,在高等教育出版社的大力支持下,编写出版了这套体现上述教学改革研究成果的高等医学检验专业教材。该套教材有以下特点:

1. 适应现代教育思想和观念,突出调动学生主动学习积极性,培育学生应用所学知识解决问题能力和创新精神。充分体现教学改革研究课题形成的办学模式、课程体系、教学内容和手段的改革成果。

2. 应用现代化教学手段,坚持教材的一体化建设,使教材成为教学全过程的资源库。该套教材除文字教材外,每本均附包括教学大纲、多媒体教案、模拟试题、案例分析、扩展知识和参考材料、典型实验规范化实验操作的视频材料等的教学光盘。既有利于教师组织教学,亦可为学生主动学习,进一步发展提供帮助,是一套真正的立体化教材。

3. 基于医学检验是以生物分析化学、分子生物学、免疫学、病原生物学、遗传学、细胞学技术、生物信息学等技术为支撑,而上述技术在各亚专业中均交叉应用。因此,本套教材单独编写了《基本检验技术及仪器学》一书,将医学检验涉及的通用性基本技术集中介绍。这既符合教育部对实验教学改革的要求,有利于学生在掌握基本技术后举一反三,也避免了各亚专业肤浅地重复介绍,更有利于学生能力和技能的培养。

4. 在借鉴国内外同类教材基础上,除坚持基本理论、基本知识、基本技能,思想性、科学性、先进性、启发性、适用性原则外,本套教材注重突出医学检验专业教材的特点。与现有同类教材相比,内容上除根据学科发展,进行了必要的增、减调整外,尤其注意避免片面追求理论系统性而大量、系统重复已学知识的弊病,根据专业特点,重点介绍检验项目的依据、怎样做和做好、项目的临床意义等。力求重点突出、深入浅出、图文并茂。每章前以Key Points根据了该章的知识要点,章末客观介绍了存在问题与发展趋势,并附有主要参考资料及网站,有利于学生主动学习,培养创新能力。这是本套教材的又一鲜明特点。

本文完成之际,欣悉本套教材有10本遴选入“普通高等教育‘十一五’国家级规划教材”,这是对本套教材的充分肯定和认可,也是对广大编写人员的鞭策和鼓励。

全国高等学校医学规划教材(供医学检验等专业用)编写指导小组

2006年9月

# 前言

《分子诊断学实验指导》系尹一兵教授主编的《分子诊断学》的配套实验教材,该套教材由全国高等学校教学研究中心、高等教育出版社共同组织编写。

本教材内容与理论教材衔接,共分5章,计35个实验,按核酸的分离与纯化、聚合酶链反应、核酸鉴定与分析、基因工程综合实验和其他相关分子诊断技术顺序编写,实验内容涵盖最基本的分子生物学操作技术、常用的分子生物学实验技术及分子生物学技术在临床医学检验中的应用实验技术。从DNA、RNA的分离纯化、基因突变的检测至DNA序列的自动化测定,多种常用的分子生物学检验技术均有较详细的操作介绍。对于个别不便于作为单独实验列出又比较实用的内容,作为附录安排在相关实验的后面,作为教学参考之用。

每个实验包括原理、试剂与器材、操作步骤、结果分析、临床应用、注意事项、评价及思考题。为方便学生深入了解各章内容和方便检索分子生物学实验相关术语,书末附有主要参考书目、核酸和蛋白质数据、常用仪器介绍、常用试剂缓冲液的配制、常用词汇的中英文对照等。全书采用国家规范化术语、名词和计量单位,所选实验项目,内容新、技术全、操作性强,具有较好的可读性、实用性。

本教材在编写过程中得到检验医学界许多老教授的指点和帮助,同时得到海南医学院检验医学系部分教师的大力支持,在此表示衷心的感谢。同时对所选用参考文献及有关资料的作者表示感谢。

由于医学分子生物学发展迅速,内容涉及广泛,加之本人水平有限,难免存在不足之处或错误,敬请各位专家和读者批评。

钱士匀

2006年6月

# 目 录

|                                                    |    |                                        |     |
|----------------------------------------------------|----|----------------------------------------|-----|
| <b>第一章 核酸的分离与纯化</b> .....                          | 1  | 实验 17 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳                     | 44  |
| 第一节 真核基因组 DNA 的分离纯化                                | 1  | 实验 18 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳                      | 47  |
| 实验 1 蛋白酶 K - 苯酚抽提法                                 | 3  | <b>第三节 核酸杂交技术</b> .....                | 50  |
| 【附】甲酰胺解聚联合透析法                                      | 5  | 实验 19 Southern 印迹                      | 50  |
| 实验 2 外周血白细胞 DNA 的提取                                |    | 【附 1】核酸探针标记的方法                         | 56  |
| (NaI 法)                                            | 6  | 【附 2】杂交反应的条件及参数的优化                     | 62  |
| 实验 3 小样本中基因组 DNA 的分离                               | 7  | 实验 20 Northern 印迹                      | 63  |
| 第二节 质粒 DNA 的分离纯化                                   | 9  | 【附 3】RNA 变性电泳方法                        | 65  |
| 实验 4 裂解法提取质粒 DNA                                   | 10 | 实验 21 斑点及狭缝印迹法                         | 67  |
| 实验 5 聚乙二醇沉淀法纯化质粒 DNA                               | 13 | 实验 22 组织细胞内 mRNA 的原位杂交                 | 70  |
| 第三节 真核细胞 RNA 的制备                                   | 15 | <b>第四节 DNA 测序技术</b> .....              | 74  |
| 实验 6 异硫氰酸胍 - 酚 - 氯仿一步 (AGPC)                       |    | 实验 23 Sanger 双脱氧核苷酸末端终止法               | 74  |
| 法制备总 RNA                                           | 17 | 【附 1】Maxam - Gilbert 化学降解法测定 DNA       |     |
| 实验 7 氯化锂 - 尿素法制备总 RNA                              | 19 | 序列                                     | 79  |
| 实验 8 Trizol 专用试剂分离 RNA                             | 21 | 【附 2】DNA 序列的自动化测定                      | 82  |
| 实验 9 磁珠分离 mRNA                                     | 22 | <b>第四章 基因工程——综合性试验</b> .....           | 86  |
| <b>第二章 聚合酶链反应</b> .....                            | 25 | 实验 24 DNA 的限制性酶切反应                     | 87  |
| 第一节 PCR 原理                                         | 25 | 实验 25 DNA 片段的回收                        | 90  |
| 第二节 PCR 反应体系的组成                                    | 25 | 【附 1】SYBR® Green I 核酸荧光染料——快速而         |     |
| 实验 10 大肠杆菌的 PCR 检测                                 | 26 | 灵敏的核酸检测试剂                              | 92  |
| 实验 11 $\beta$ - 肌动蛋白 ( $\beta$ - Actin) 的 RT - PCR |    | 实验 26 DNA 的重组连接                        | 93  |
| 检测                                                 | 28 | 【附 2】可以提高连接效率的化学试剂                     | 95  |
| 实验 12 乙型肝炎病毒 (HBV) 实时荧光定量                          |    | 实验 27 感受态细胞的制备 (CaCl <sub>2</sub> 法) 与 |     |
| PCR                                                | 29 | 转化                                     | 96  |
| <b>第三章 核酸的鉴定与分析</b> .....                          | 33 | 实验 28 重组质粒的筛选与鉴定                       | 98  |
| 第一节 分光光度法测定核酸的浓度和                                  |    | 实验 29 外源基因的诱导表达与检测                     | 102 |
| 纯度                                                 | 33 | <b>第五章 其他相关的分子诊断技术</b> .....           | 109 |
| 实验 13 紫外分光光度法检测核酸的浓度                               |    | 实验 30 PCR - 限制性片段长度多态性                 |     |
| 及纯度                                                | 33 | (PCR - RFLP)                           | 110 |
| 实验 14 荧光分光光度法检测核酸浓度                                | 34 | 实验 31 PCR - 单链构象多态性分析                  |     |
| 第二节 核酸凝胶电泳法                                        | 36 | (PCR - SSCP)                           | 113 |
| 实验 15 DNA 的琼脂糖凝胶电泳                                 | 39 | 实验 32 蛋白质印迹技术                          | 116 |
| 实验 16 RNA 的甲醛变性凝胶电泳                                | 41 | 实验 33 等位基因特异的寡核苷酸                      |     |



|                        |     |                       |     |
|------------------------|-----|-----------------------|-----|
| (PCR - ASO) .....      | 120 | 附录一 核酸和蛋白质数据 .....    | 135 |
| 实验 34 甲基化特异性基因扩增 ..... | 122 | 附录二 常用仪器介绍 .....      | 140 |
| 实验 35 基因芯片 .....       | 126 | 附录三 常用试剂、缓冲液的配制 ..... | 147 |
| 【附】分子生物学实验设计与流程 .....  | 131 | 附录四 分子生物学中常用技术 .....  | 153 |
| 参考文献 .....             | 134 | 附录五 常用词汇的中英文对照 .....  | 157 |

# 第一章 核酸的分离与纯化

核酸是现代生物学和医学分子生物学研究涉及的主要对象,它的分离与纯化是分子生物学研究中的最重要的基本技术之一,制备纯的核酸分子是进行实验研究的第一步。

核酸是以核苷酸为基本组成单位的生物信息分子。细胞内的核酸具有复杂的结构和重要的功能,包括 DNA 和 RNA 两类分子,以与蛋白质结合成核蛋白的形式存在于细胞内。DNA 与蛋白质结合成脱氧核糖核蛋白,而 RNA 与蛋白质结合成核糖核蛋白。核酸在不同生物中具有不同的形态,真核生物的 DNA 分为染色体 DNA 与细胞器 DNA,前者位于细胞核内,约占 95%,为双链线性分子;后者存在于线粒体或叶绿体等细胞器中,约占 5%,为双链环状分子。原核生物“染色体”、质粒为双链环状 DNA。某些噬菌体 DNA 为单链环状分子。在非细胞型的病毒颗粒中,DNA 有多种存在形式,包括双链环状、单链环状、双链线状和单链线状。不同生物 DNA 分子的总长度存在很大差异,但一般随生物的进化程度而增长。RNA 分子与 DNA 相比较要小得多,而且与生物进化无明显关系,在大多数生物体内均是单链线性分子。不仅如此,RNA 功能的多样性,决定了 RNA 的种类、大小和结构都呈多样化。故 RNA 的最适分离与纯化的条件与 DNA 是不同的。

分离与纯化核酸的方法很多,这些方法各有特点,应根据具体生物材料的性质与起始量、待分离核酸的性质与用途具体选择。但无论采取何种方法,都应遵循总的原则:一是保证核酸一级结构的完整性,因为完整的一级结构是核酸结构和功能研究的最基本的要求,而且核酸的一级结构还决定其高级结构的形式以及和其他生物大分子结合的方法;二是尽量避免其他分子的污染,保证核酸样品的纯度。

在操作过程中,各种有害因素对核酸有破坏作用,为了保持核酸的完整性和纯度,应尽量简化操作步骤,缩短操作时间。影响核酸完整性的因素很多,包括物理、化学与生物学因素,因此在实验过程中需注意:① 过酸或过碱对核酸链中的磷酸二酯键有破坏作用,在核酸的提取过程中,一般把缓冲液的酸度控制在 pH 4~10。② 机械剪切力包括剧烈的溶液振荡、搅拌,使溶液快速通过狭长孔道,细胞突然置于低渗溶液中及 DNA 样品反复冻融等,都可引起 DNA 的降解,实验过程中要注意尽量减少这些操作带来的损害。机械剪切作用主要危害的是大分子线性 DNA,对小分子的环状 DNA 威胁相对较小。高温,如长时间煮沸,会破坏核酸分子中的化学键,因此核酸提取常常在 0~4℃ 的条件下进行,此温度还可以降低核酸酶的活性与反应速率,减少对核酸的生物降解。③ 细胞内或外来的各种核酸酶能破坏核酸链中的磷酸二酯键,破坏核酸的一级结构,其中 DNA 酶的激活需要  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  等二价金属离子,若使用二价金属离子螯合剂乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、枸橼酸盐并在低温条件下操作,基本可以抑制 DNA 酶的活性;而 RNA 酶,不但分布广泛、极易污染,而且耐高温、耐酸碱,不易灭活,所以生物降解是 RNA 提取的主要危害因素。

分离纯化得到的核酸样品应不含有对酶有抑制作用的有机溶剂和高浓度的金属离子,同时把其他生物大分子,如蛋白质、多糖和脂质等的污染降到最低,并应排除其他核酸分子的污染。

核酸提取的方法很多,但主要步骤大致相同,包括破碎细胞,去除与核酸结合的蛋白质、多糖以及脂质等生物大分子,去除其他核酸分子,沉淀核酸,去除盐类、有机溶剂等杂质,纯化核酸等。根据不同的目的和要求宜采用不同的方法。下面分别介绍不同来源的 DNA、RNA 分子的分离提取方案和实验操作过程。

## 第一节 真核基因组 DNA 的分离纯化

细胞或生物体的全部基因序列称为基因组(genome)。基因组因来源、性质和用途不同,其分离纯化方法也不尽相同。



真核生物中的 DNA 在细胞中的包装是一种独特的、紧凑和高度凝聚的结构,经过多级螺旋盘绕压缩,与蛋白质结合形成染色体。整个基因组分布在细胞核内的多条染色体中,外面以核膜包裹,DNA 在真核细胞中的位置见图 1-1。因此,从组织细胞中提取 DNA 时首先要保证细胞呈分散状态,通过破碎细胞膜和核膜,使染色体释放出来,然后去除与 DNA 结合的蛋白质。

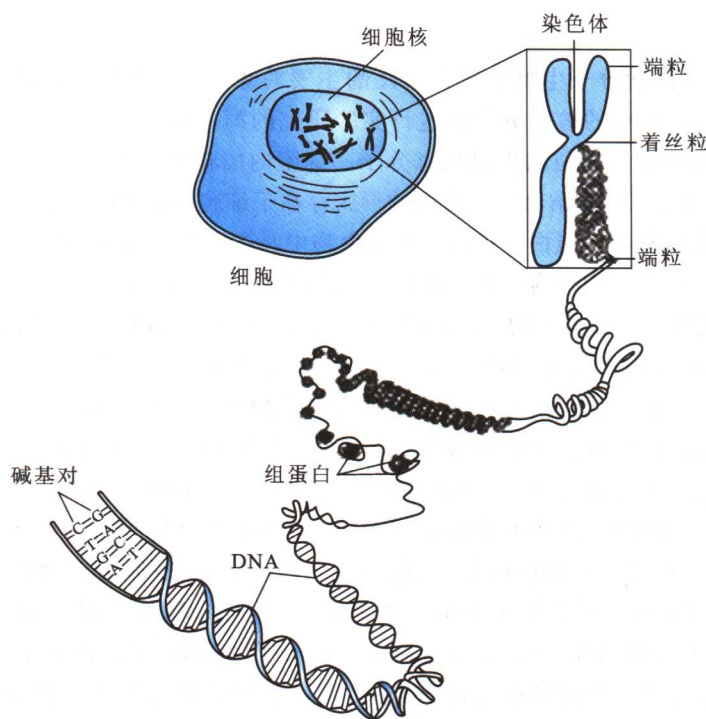


图 1-1 DNA 在真核细胞中的位置

真核生物染色体 DNA 因自身的结构特点,是一种惰性很强的化学分子。其双链由氢键紧密相连,潜在的反应基团隐藏在螺旋内部。碱基对外侧受磷酸和糖的保护,并由于其内部的碱基堆积力而相互作用进一步加强,使 DNA 在细胞内比其他成分更具化学耐久性。尽管如此,高相对分子质量 DNA 在物理上仍是易碎的,它在溶液中呈现长且弯曲的形态,容易发生随机卷曲,并因碱基堆积力和磷酸基团间的静电排斥力变得黏滞,容易受到吸液、振荡、搅拌等引起的剪切力作用而断裂,因此,基因组 DNA 容易以片段形式被获取。所需 DNA 分子的相对分子质量越大,获得的难度也相应增加,大于 150 kb 的 DNA 分子在常规分离方法中多被切断。

DNA 制备的经典方法是 Marmur 于 1961 年建立的,此法采用酚和氯仿提取 DNA,条件比较剧烈,只能得到几万个碱基的 DNA,且往往含有许多单链缺口,因此不能满足目前核酸研究的需要。自 20 世纪 60 年代后半期,尤其是蛋白酶 K 的发现,极大促进了真核生物细胞中高相对分子质量 DNA 的提取。

真核生物的一切有核细胞(包括培养细胞)都可以用来制备基因组 DNA。提取方法包括两步:先温和裂解细胞及溶解 DNA,使 DNA 与组蛋白分离,并完整地以可溶形式独立分离出来,接着采用酶学或化学方法去除蛋白质、RNA 及其他大分子。

真核细胞的破碎有多种方法,包括超声波破碎法、匀浆法、液氮破碎法、低渗法等物理方法及蛋白酶 K 和去污剂温和处理法,为获得大相对分子质量的 DNA,一般多采用后者温和裂解细胞。

去除蛋白质常用酚、氯仿抽提操作,但对 DNA 链机械剪切机会较多,因此有人使用 80% 甲酰胺解聚核蛋白联合透析的方法,可得大于 200 kb 的 DNA 片段,研究中可根据不同的实验要求选择不同的实验方法。

**实验 1 蛋白酶 K - 苯酚抽提法****【原理】**

真核组织细胞经适当处理成为单个分散细胞后,用蛋白酶 K 和含 EDTA、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)及含 RNA 酶的组织细胞裂解液溶解细胞膜、核膜,并使组蛋白与 DNA 分子分离,再用酚、氯仿/异戊醇抽提去除蛋白质,最后经乙醇沉淀 DNA 溶液,可得到基因组 DNA 片段。

EDTA 为二价金属离子螯合剂,可抑制 DNA 酶的活性,同时还能降低细胞膜的稳定性;SDS 为阴离子去污剂,能引起细胞膜降解,乳化脂质和蛋白质,沉淀蛋白质,同时还有降解 DNA 酶的作用;无 DNA 酶的 RNA 酶,可有效水解 RNA 以获得高纯度的 DNA;蛋白酶 K 起水解蛋白质的作用,可消化 DNA 酶、DNA 上的蛋白质,同时也有裂解细胞的作用。在 EDTA 和 SDS 存在时,蛋白酶 K 的活性仍很高,故可在抑制 DNA 酶活力的同时用蛋白酶 K 消化去除蛋白质。另外,酚是很强的蛋白质变性剂,氯仿能加速有机相和水相的分离,异戊醇则可减少在抽提过程中由于蛋白质变性产生的大量气泡。

**【试剂与器材】**

1. 组织细胞裂解液:10 mmol/L Tris · Cl(pH 8.0)  
0.1 mol/L EDTA(pH 8.0)  
20 μg/mL 胰 RNA 酶  
0.5% SDS
2. 20 mg/mL 蛋白酶 K
3. 平衡酚(用 0.5 mol/L Tris · Cl, pH 8.0 饱和)
4. 氯仿/异戊醇(24:1, 体积分数)
5. 3 mol/L 乙酸钠(NaAc)(pH 5.2)
6. 无水乙醇
7. 70% 乙醇
8. TE 缓冲液(10 mmol/L Tris · Cl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0), 配后高压蒸汽灭菌。
9. 磷酸盐缓冲液 PBS(需高压蒸汽灭菌):137 mmol/L NaCl  
2.7 mmol/L KCl  
10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
10. 液氮(组织标本时选用)
11. 高压蒸汽灭菌装置
12. 匀浆器或研磨器(组织标本时选用)
13. 冷冻低温高速离心机
14. 双重纯水蒸馏器
15. 微量移液器
16. Eppendorf(Ep)管

**【操作步骤】****1. 样品制备**

(1) 生物组织 最好是新鲜生物组织,先用剪刀清除组织中的筋膜等结缔组织,吸干血液,如果是肝组织,要除去胆囊,因其含有较多的各种消化酶。若不能马上进行 DNA 提取,可将组织贮存于液氮或 -70 ℃ 冰箱。取新鲜或冷冻组织 0.2 ~ 0.5 g,剪碎,加 TE 缓冲液进行匀浆,转入 Ep 管中,加等体积 2 × 组织裂解液混匀;或将组织置于陶瓷研钵中,加少许液氮用研杵碾磨(研钵和研杵需先用液氮预冷),反复添加液氮直至将组织碾成粉末状,待液氮蒸发,将粉末转入 Ep 管中。

操作中需注意:①液氮操作,应戴保暖手套和防护目镜,以防溅出的液氮冻伤皮肤。②预冷研钵时应缓慢加入少量液氮,如突然将液氮倒入研钵或将研棒浸入液氮会发生碎裂。将研钵置于冰上并加入干冰可作为加入液氮前的预冷。③组织样品中可能带有致病菌、病毒等,应视为有毒生物材料,应按安全操作规程操作。接触这些样品的器械应高压蒸汽灭菌,废弃物应经灭菌措施处理。

(2) 培养细胞 悬浮生长细胞悬液直接转入离心管中,于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  离心,  $1\,500\text{ g} \times 10\text{ min}$ , 后弃去上清液,收集管底细胞;贴壁生长细胞,需先用胰酶消化,后加入冰浴冷 PBS,吹散自瓶壁脱落的细胞,细胞悬液移至离心管,后离心收集细胞。两种不同生长形式的细胞的细胞数都应为  $10^7$  个左右。将收集的细胞重新悬浮在  $1 \sim 10\text{ mL}$  冰浴冷的 PBS 液(磷酸盐缓冲液)或生理盐水中,漂洗一次,后离心,弃上清收集细胞。重复漂洗一次。

(3) 血液样品 新鲜和冻贮血液均可用于制备高相对分子质量 DNA。血液标本收集后与 ACD 抗凝剂(对于高相对分子质量 DNA 的分离,其保贮血液的效果优于 EDTA)按 6:1 混匀, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  下可保存数天或  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  可长期冻贮、备用。

|                   |       |
|-------------------|-------|
| ACD 抗凝剂具体配方如下:枸橼酸 | 0.48% |
| 枸橼酸钠              | 1.32% |
| 右旋葡萄糖             | 1.47% |

将新鲜抗凝血剂  $0.5 \sim 1\text{ mL}$  装入 Ep 管中,离心  $1\,500\text{ g} \times 10\text{ min}$ ,弃去上清(血浆),取含有白细胞的淡黄色悬浮液于新的 Ep 管中,再离心一次,弃上层血浆相,取下层细胞。如为冻贮血液,室温解冻后移入离心管中,用等体积的 PBS 液混匀,后离心  $3\,500\text{ g} \times 10\text{ min}$ ,弃去含裂解红细胞的上清,保留含白细胞的沉淀。

2. 将以上各种来源的组织细胞经适当处理后,悬浮于组织细胞裂解液  $400 \sim 500\text{ }\mu\text{L}$  中,并加入蛋白酶 K 至终浓度  $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ,混匀后  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  保温  $12 \sim 24\text{ h}$ ,或  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  保温  $1\text{ h}$  后转为  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  保温  $3\text{ h}$ 。保温过程中应不时摇动,混匀反应液。液体逐渐变黏稠,表明 DNA 已部分释放出来,操作应轻柔。

3. 将反应液冷却至室温,加等体积的饱和酚溶液,缓慢颠倒 Ep 管混匀两相,重复该动作  $10\text{ min}$ ,直至水相与酚相混匀成乳状液。

4. 室温离心  $5\,000\text{ g} \times 15\text{ min}$ ,小心吸出上层水相,移至一新的 Ep 管中。如果在水相和有机相交界处有白色沉淀,需重新抽提有机相,合并水相。

5. 加等体积氯仿/异戊醇,混匀后离心  $5\,000\text{ g} \times 10\text{ min}$ 。

6. 取上层水相转至新的 Ep 管中,加  $1/10$  体积  $3\text{ mol/L NaAc}$  和  $2.5$  倍体积的无水乙醇,反复颠倒混匀。

7. 离心  $10\,000\text{ g} \times 15\text{ min}$ ,弃上清。

8. 加入  $1\text{ mL}$   $70\%$  冷乙醇,反复颠倒离心管数次, $5\,000\text{ g} \times 5\text{ min}$  离心,弃上清。重复操作一次。于室温挥发痕量乙醇,勿使 DNA 沉淀完全干燥,否则会因相对分子质量太大而极难溶解。

9. 适当体积的水或 TE 溶液溶解 DNA 沉淀,置  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。测定 DNA 样品在  $260\text{ nm}$  和  $280\text{ nm}$  的吸光度值,计算 DNA 的纯度和浓度,并可用琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 的大小与完整性。

### 【注意事项】

1. 高相对分子质量 DNA 的制备时,为减轻机械剪切力的破坏,每一步都应特别小心,避免剧烈振荡、搅拌、混匀和吸取等操作。

2. 贴壁生长或悬浮生长细胞,在加入组织细胞裂解液后,应确保细胞呈分散状态,避免细胞成块、成团而难于处理。

3. 对于冷藏的标本应分成小块保存,避免以后反复冻融,造成高相对分子质量 DNA 的产率降低。

4. 所配试剂 pH 要准确,否则影响实验结果。饱和酚的 pH 应接近  $8.0$ ,在此条件下可减少离心后水酚两相交界面(主要是蛋白质)上有 DNA 滞留,有利于下一步吸出水相时不带动界面中的蛋白质。蛋白酶 K 在正式使用前应做预试验,明确其活性大小。

5. 测定 DNA 样品在 260 nm 和 280 nm 的吸光度值, 鉴定提取的 DNA 纯度,  $A_{260}/A_{280}$  应大于 1.75, 低于此值说明存在蛋白质的污染。需要注意的是, 用  $A_{260}/A_{280}$  估计核酸的纯度并不可靠, 而且如果样品中含有苯酚, 也会影响浓度估计的准确性。没有酚的核酸样品的  $A_{260}/A_{280}$  应为 1.2 左右。 $A_{260}$  很难准确测定高相对分子质量 DNA 的浓度, 主要因为高相对分子质量 DNA 溶液常不均一且十分黏滞, 此时可取 10 ~ 20  $\mu\text{L}$  样品于 0.5 mL TE 中激烈振荡 1 ~ 2 min 后再测吸光度 ( $1 A_{260} \approx 50 \mu\text{g/mL DNA}$ )。

6. 组织细胞裂解液中的 EDTA 浓度为 0.1 mol/L, 可有效抑制 DNA 酶且易与酚分层。另外, 该裂解液中加入 RNA 酶, 可省去传统方法中在 DNA 抽提后再加 RNA 酶处理的步骤, 且因为裂解液中有 0.5% SDS 存在, 使 RNA 酶不处于最高活性状态, 所以加入的 RNA 酶浓度较高。

### 【评价】

此方法可用于产生少至 10  $\mu\text{g}$ 、多至数百微克的 DNA, 但是由于实验过程中产生的剪切力, 使最终制备的 DNA 长度一般不超过 100 ~ 150 kb。此种长度的 DNA 适用于 Southern 分析、用作聚合酶链反应 (PCR) 的模板, 以及用于构建基因组 DNA 的噬菌体文库。

### 【思考题】

1. 根据核酸在细胞内的分布、存在形式及其特性, 提取过程中采用了哪些相应措施?
2. 在用酚抽提的过程中, 有机相和水相交界面有白色沉淀, 说明什么? 为什么要重新抽提有机相?

### 【附】 甲酰胺解聚联合透析法

采用高容量的载体构建文库和通过脉冲凝胶电泳分析基因组 DNA 要求 DNA 长度大于 200 kb, 用甲酰胺可从哺乳动物细胞中分离得到相对分子质量达 200 kb 的 DNA。为避免机械剪切对 DNA 链造成过多的破坏, 本法利用蛋白酶 K 消化细胞和组织, 高浓度变性剂甲酰胺解聚 DNA-蛋白质复合物, 并使蛋白质变性释放, 然后用火棉胶袋充分透析去除蛋白酶和有机溶剂。本法比其他方法需要更多时间, 所制备 DNA 最低浓度约 10  $\mu\text{g/mL}$ 。经适当处理, 可用于黏粒作为载体的基因组文库的构建以及基因组 DNA 脉冲凝胶电泳的分析。

### 【试剂与器材】

1. 透析缓冲液 1: 20 mmol/L Tris · Cl (pH 8.0)  
0.1 mol/L NaCl  
10 mmol/L EDTA (pH 8.0)

制备 6 L 透析液 1, 贮存于 4  $^{\circ}\text{C}$ 。

2. 透析缓冲液 2: 10 mmol/L Tris · Cl (pH 8.0)  
10 mmol/L NaCl  
0.5 mmol/L EDTA (pH 8.0)

制备 6 L 透析液 2, 贮存于 4  $^{\circ}\text{C}$ 。

3. 甲酰胺变性缓冲液: 20 mmol/L Tris · Cl (pH 8.0)  
0.8 mol/L NaCl  
80% (体积分数) 甲酰胺

4. TE 缓冲液 (pH 8.0)

5. 带有不锈钢杯的搅拌器

6. 火棉胶袋 (孔径为 8 mm, 能使中等大小的变性蛋白质在透析的过程中扩散出袋子。购得的火棉胶袋浸于 20% 乙醇中, 使用前, 需用透析液 2 冲洗, 并在透析液 2 中浸泡 30 min)

7. 透析管夹

8. 恒温水浴箱

### 【操作步骤】

1. 采用实验 1 的方法制备细胞悬液 (或冰冻细胞粉末) 的裂解液。



2. 将含有裂解细胞和裂解缓冲液的溶液冷却至 15 ℃。每 1 mL 细胞裂解液加入 1.25 mL 甲酰胺变性缓冲液,后用玻棒将溶液混匀,15 ℃放置 12 h。

3. 将黏滞的溶液转移至一个或多个火棉胶袋中。透析袋口用透析管夹夹住,放入 2 L 透析液 1 中,4 ℃透析 45 min。换新鲜透析液 1 继续透析至少 4 h,再次更换 2 L 新鲜透析液 1 透析 4 h。后用透析液 2 透析 3 次,每次 2 L、至少 4 h。要彻底从 DNA 中去除蛋白质,总透析时间至少 24 h。

4. 紫外分光光度法或荧光计测定核酸的浓度和纯度,琼脂糖凝胶电泳鉴定核酸的大小和完整性。

## 实验 2 外周血白细胞 DNA 的提取(NaI 法)

### 【原理】

从全血制备白细胞 DNA,用双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)低渗溶胀红细胞及白细胞膜,释放出血红蛋白及细胞核,NaI 破核膜并有效解离 DNA-蛋白质复合物,使核酸处于易提取状态,再以氯仿-异戊醇抽提使蛋白质变性沉淀并溶解脂质(异戊醇可减少抽提过程中的泡沫产生),离心后 DNA 存在于上层水相中,以 37% 异丙醇沉淀 DNA,弃去异丙醇,重复操作一次,即可获得白细胞 DNA。

### 【试剂与器材】

1. 6 mol/L NaI 将 0.75 g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>溶于 40 mL ddH<sub>2</sub>O,后加入 45 g NaI,并搅拌至完全溶解,用 Whatman 滤纸过滤,避光保存可达 3~4 个月。

2. 氯仿/异戊醇(24:1,体积分数)混合液,应在棕色密封瓶中保存。

3. 异丙醇(isopropanol)(分析纯)

4. 37% 异丙醇或 70% 乙醇

5. 双蒸水(高压蒸汽灭菌)

6. TE 缓冲液(pH 8.0, 10 mmol/L Tris·Cl, 1 mol/L EDTA),高压蒸汽灭菌。

7. 高压蒸汽灭菌装置

8. 冷冻低温高速离心机

9. 双重纯水蒸馏器

10. 微量移液器

11. Eppendorf 管

### 【操作步骤】

1. 取新鲜抗凝血剂 100 μL 置 Eppendorf(Ep)管中,离心 10 000 rpm × 1 min。

2. 弃去上清液,加 ddH<sub>2</sub>O 200 μL,摇匀 20 s。

3. 加 6 mol/L NaI 200 μL,缓慢倒置摇匀 20 s。

4. 于管内加氯仿-异戊醇(24/1)400 μL,缓慢颠倒摇匀两相,离心 10 000 rpm × 10 min。

5. 取上层水相 300~360 μL 置一新 Ep 管中,加纯异丙醇 200 μL,混匀。

6. 室温放置 15 min,离心 14 000 rpm × 12 min。

7. 小心弃去上清液,再加 37% 异丙醇(或 70% 乙醇)1 mL(勿摇动),离心 14 000 rpm × 12 min。

8. 小心弃去异丙醇(或乙醇),于室温敞口放置直至可见的痕量液体挥发殆尽。

9. 加 50 μL TE 缓冲液溶解 DNA, -20 ℃ 保存。测定 DNA 样品在 260 nm 和 280 nm 的吸光度,判断其纯度和浓度,并可通过琼脂糖凝胶电泳鉴定 DNA 的质量。

### 【注意事项】

1. 标本必须新鲜,提取前细胞应保持完整。所用 Ep 管、枪头等用品及 ddH<sub>2</sub>O、试剂等应高压蒸汽灭菌,操作尽量在 4 ℃ 以下进行。

2. 混匀试剂、吸取上清液等操作时应避免动作剧烈。

3. 弃去异丙醇时动作应轻,切忌甩干,以免 DNA 丢失。

4. 0.54~1 倍的异丙醇可选择性的沉淀 DNA 和大分子的 rRNA 和 mRNA,但对 5S RNA,tRNA 及多糖不产生沉淀。一般不需在低温条件下长时间放置。其缺点是易使盐类与 DNA 共沉淀;另外在 DNA 沉淀中异丙醇难以挥发除去,所以常规需要 70% 乙醇漂洗 DNA 沉淀物。

5. 室温下放置 16 h 或 65 °C 放置 1 h,可加快基因组 DNA 沉淀的溶解。

### 【思考题】

1. 采用 NaI 法提取外周血白细胞 DNA 的注意事项有哪些?
2. 如何判断所提取 DNA 的质量?

## 实验 3 小样本中基因组 DNA 的分离

### 【原理】

利用蛋白酶 K,sarkosyl 消化细胞蛋白质、溶解细胞膜,然后核酸以钠盐的形式在乙醇中形成沉淀,经 70% 乙醇洗涤后溶解得到 DNA 溶液。

### 【试剂与器材】

1. 细胞裂解液:10 mmol/L Tris · Cl(pH 8.0)  
10 mmol/L NaCl  
5 g/L sarkosyl (SLS)

使用前加蛋白酶 K 至终浓度为 1 mg/mL。

2. NaCl/乙醇溶液 每 10 mL 无水乙醇加 150 μL 5mol/L NaCl, -20 °C 保存。

3. 70% 乙醇

4. 磷酸盐缓冲液 PBS(pH 7.4):137 mmol/L NaCl  
(需高压蒸汽灭菌) 2.7 mmol/L KCl  
10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

5. TE 缓冲液(10 mmol/L Tris · Cl,1 mmol/L EDTA, pH 8.0)

6. 蔗糖凝胶上样缓冲液

7. 微量移液器

8. 96 孔培养板

9. 湿盒

10. 恒温水浴箱

11. 恒温振荡器

### 【操作步骤】

1. 用微量移液器吸去 96 孔培养板每孔中的培养液。小心不要接触细胞层,通常不需每个培养孔更换新的吸头。

2. 孔内细胞用 100 μL PBS 缓冲液冲洗 2 次。

3. 每孔加 50 μL 细胞裂解液,盖上培养板盖后置湿盒内,60 °C 温育 12~16 h。

4. 取出培养板冷却数分钟,每孔加 100 μL NaCl/乙醇溶液,不用混匀。室温温育 30 min,可见有纤维状的核酸沉淀。

5. 缓慢倒转培养板将乙醇倒入水池。后将培养板倒置于干燥的吸水纸上,使残余乙醇从孔内流出。核酸沉淀吸附在培养孔的底部。

6. 每孔用 100 μL 70% 乙醇洗涤核酸沉淀 2~3 次(小心不要移动核酸沉淀)。按步骤 5 去除 70% 乙醇。

7. 室温干燥培养板,使乙醇挥发殆尽。



8. 每孔加 30 ~ 50  $\mu\text{L}$  TE 溶液,室温缓和振荡 12 ~ 16 h 使 DNA 充分溶解。
9. 如提取的 DNA 用作 Southern 杂交,则需要制备限制性核酸内切酶混合液,每孔 40  $\mu\text{L}$ 。

|                         |                            |
|-------------------------|----------------------------|
| $\text{H}_2\text{O}$    | 0.8 倍体积                    |
| 10 $\times$ 限制性核酸内切酶缓冲液 | 0.1 倍体积                    |
| 无 DNA 酶的 RNA 酶          | 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |

使用前加限制性核酸内切酶,每 40  $\mu\text{L}$  混合液加 10 单位。

10. 在 96 孔培养板每孔中加入 40  $\mu\text{L}$  限制性核酸内切酶混合液。反复抽吸数次,混匀孔内物质,小心避免产生气泡。将培养板放入湿盒内,使反应在适宜的温度温育 12 ~ 16 h。

11. 加入 5 ~ 10  $\mu\text{L}$  蔗糖凝胶上样缓冲液终止反应,进行 Southern 杂交,分析消化的 DNA。

### 【注意事项】

1. SLS 是一种阴离子去污剂,与 SDS 相比,去污效率较低,但其不易从高离子强度溶液中沉淀下来。
2. 对于某些有特殊需要的 PCR(如长片段 PCR),最好使用丙酮和  $N,N$ -二甲基甲酰胺在 96 孔板中沉淀 DNA。
3. 该法适用于 PCR 的优化基因组 DNA 分离。如分离的 DNA 仅做 PCR 模板而不是 Southern 分析,可用一种适用于 PCR 的裂解液 A 或 B(对 DNA 酶活性无明显影响),使 PCR 反应直接在裂解后的溶液中进行。

### 方案 1:【试剂】

|                              |                   |
|------------------------------|-------------------|
| PCR 裂解液 A:67 mmol/L          | Tris · Cl(pH 8.8) |
| 16.6 mmol/L                  | 硫酸铵               |
| 5 mmol/L                     | $\beta$ -巯基乙醇     |
| 6.7 mmol/L                   | $\text{MgCl}_2$   |
| 6.7 $\mu\text{mol}/\text{L}$ | EDTA(pH 8.0)      |
| 1.7 $\mu\text{mol}/\text{L}$ | SDS               |
| 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$   | 蛋白酶 K             |

### 【操作步骤】

1. 去除 96 孔培养板中的培养基。
2. 每孔加 100  $\mu\text{L}$  PCR 裂解液 A,37  $^{\circ}\text{C}$  放置 1 h,后于 80  $^{\circ}\text{C}$  放置 10 min 以灭活蛋白酶 K。
3. 使用 5 ~ 25  $\mu\text{L}$  DNA 作为 PCR 反应模板。

### 方案 2:【试剂】

|                            |                   |
|----------------------------|-------------------|
| 1. PCR 裂解液 B:10 mmol/L     | Tris · Cl(pH 8.3) |
| 50 mmol/L                  | KCl               |
| 2 mmol/L                   | $\text{MgCl}_2$   |
| 0.45%                      | NP-40             |
| 0.45%                      | Tween-20          |
| 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 蛋白酶 K             |
| 2. 裂解缓冲液:670 nmol/L        | Tris · Cl(pH 8.8) |
| 166 mmol/L                 | 硫酸铵               |
| 1 mg/mL                    | 小牛血清清蛋白(BSA)      |

### 【操作步骤】

1. 去除 96 孔培养板中的培养基。
2. 每孔加 50  $\mu\text{L}$  PCR 裂解液 B,37  $^{\circ}\text{C}$  放置过夜,后于 95  $^{\circ}\text{C}$  放置 30 min 以灭活蛋白酶 K。
3. 每孔加等体积的裂解缓冲液