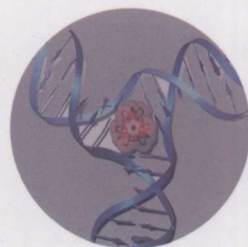


21

世纪高等院校生命科学实验系列教材



分子

FENZI

生物学实验指导

SHENGWUXUE SHIYAN ZHIDAO

主编 田生礼

编委 宋国丽 李 辉 张建华

Q7-33
49



华南理工大学出版社
SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PRESS

014040674

Q7-33

49

21

世纪高等院校生命科学类系列教材

分子生物学实验指导

FENZI

SHENGWUXUE SHIYAN ZHIDAO

主编 田生礼

编委 宋国丽 李 辉 张建华



华南理工大学出版社
SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PRESS



北航

C1727978

Q7-33

49

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学实验指导/田生礼主编. —广州:华南理工大学出版社, 2014. 4
21 世纪高等院校生命科学实验系列教材
ISBN 978-7-5623-4119-2

I. ①分… II. ①田… III. ①分子生物学-实验-高等学校-教学参考资料
IV. ①Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 318006 号

分子生物学实验指导

田生礼 主编

出 版 人: 韩中伟

出版发行: 华南理工大学出版社

(广州五山华南理工大学 17 号楼, 邮编 510640)

<http://www.scutpress.com.cn> E-mail: scutcl3@scut.edu.cn

营销部电话: 020-87113487 87111048 (传真)

责任编辑: 黄丽谊

印 刷 者: 广东省农垦总局印刷厂

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 6.25 字数: 160 千

版 次: 2014 年 4 月第 1 版 2014 年 4 月第 1 次印刷

印 数: 1~1 000 册

定 价: 16.00 元

版权所有 盗版必究 印装差错 负责调换

前 言

分子生物学实验技术已经渗透到生命科学的各个领域,如今在生物技术、生物科学、生物工程、医学、药学、检验检疫、林学和农学等诸多领域都涉及分子生物学实验技术,对分子生物学实验技术的掌握已成为这些学科发展的重要技术手段。

为了适应普通高等学校分子生物学实验教学的需要,本书主要针对生物技术、生物科学本科生实验教学编写,也可作为研究生基础实验和分子生物学实验的参考书。本书的特点是实验简明实用、各实验步骤叙述详细、清楚,学生可以根据实验指导独立完成实验操作。特别是在实验中应该注意的地方,我们根据多年的科研和实验教学经验在本书中都进行了较详细的叙述。

本书包含基础实验和综合(创新)实验两大部分。基础实验内容包括核酸的分离纯化技术,琼脂糖凝胶电泳技术,PCR 基因扩增技术,限制性内切酶酶切和 DNA 凝胶回收技术,基因的克隆技术包括感受态细胞的制备和转化、质粒的提取和酶切鉴定技术,外源基因在原核细胞中的表达和聚丙烯酰胺凝胶电泳技术。综合(创新)实验主要介绍分子生物学综合(创新)实验的基本程序和使用的技术方法。在核酸分离与纯化技术和分子杂交技术试验中,各个学校可以根据自己的实验条件选择性开设。

本书的出版得到了广东省生物科学实验教学示范中心建设专项经费的资助。本书是深圳大学生物科学实验中心的系列实验教材之一,全书由田生礼统筹组织,编写组成员通力合作而成。其中实验1~4、综合(创新)实验及附录由

前 言

田生礼编写，实验5~7由李辉编写，实验8~10由宋国丽编写，实验11~14由田生礼及张建华编写。

本书的编写人员均是教学科研的一线老师，虽然在研究方向上有各自的研究特长，但鉴于知识和能力所限，书中错漏之处在所难免，希望在使用过程中，得到广大读者批评指正，为促进分子生物学实验教学，提高教学质量作出贡献。

编 者

2012年8月于深圳大学

目 录

分子生物学实验室规则	1
第一部分 基础实验	2
实验 1 细胞基因组 DNA 的提取	3
实验 2 酵母细胞总 RNA 的提取	8
实验 3 大肠杆菌质粒 DNA 的提取	14
实验 4 琼脂糖凝胶电泳分析及 DNA 片段的回收	17
实验 5 聚合酶链式反应扩增目的基因片段	23
实验 6 质粒 DNA 及 PCR 产物酶切后纯化、回收	33
实验 7 DNA 分子的体外重组	40
实验 8 大肠杆菌感受态细胞的制备及质粒 DNA 转化实验	43
实验 9 α -互补实验及重组质粒 DNA 的酶切鉴定分析	47
实验 10 重组工程菌的诱导表达实验	51
实验 11 SDS-PAGE 凝胶电泳分析蛋白产物	54
实验 12 Southern 杂交实验	59
实验 13 Northern 杂交实验	66
实验 14 Western 杂交实验	69
第二部分 综合(创新)实验	72
大豆 Glycinin G2 蛋白表达载体的构建及其在大肠杆菌中的表达研究	73
生物技术综合实验设计作业	84
实验报告写作要求	84
附录 常用数据、试剂配制、酶切位点等查询	85
1 常用核酸蛋白换算数据	85
2 常用琼脂糖凝胶电泳缓冲液的配制	85
3 Luria-Bertani 培养基配制	86
4 质粒提取所需试剂配制	86
5 TE 缓冲液的配制 (pH 8.0)	86
6 抗生素的使用浓度	86

目 录

7 IPTG 储存液的配制 (0.1 mol/L)	86
8 X-gal 储存液的配制 (50 mg/mL)	86
9 SDS-PAGE 凝胶电泳试剂	86
10 考马斯亮蓝染色液的配制 (100 mL)	87
11 SDS 凝胶脱色液的配制 (100 mL)	87
12 丙烯酰胺凝胶电泳胶的配制	87
附表 1 配制 SDS-PAGE 丙烯酰胺凝胶电泳分离胶所需溶液	87
附表 2 配制 SDS-PAGE 丙烯酰胺凝胶电泳 5% 浓缩胶所需溶液	88
附表 3 常用核酸的长度与相对分子质量	89
附表 4 常用 DNA 相对分子质量标准参照物	89
附表 5 常用蛋白质相对分子质量标准参照物	90
附表 6 氨基酸名称、缩写及其密码子	90
附表 7 常用压力单位换算表	91
附表 8 常用限制性内切酶酶切反应温度及识别位点一览表	92
参考文献	94

分子生物学实验室规则

一、遵守实验室纪律，上课不准迟到或早退。实验中途因故需要外出时应向任课老师请假，不得擅自离开。

二、实验前要预习实验教材，进入实验室之前要换好实验服。

三、不准穿拖鞋进入实验室，不准在实验室吃东西、喝水。

四、保持实验室安静，不许在实验室内大声喧哗及随意走动。

五、必须严肃认真地进行实验，实验期间不得进行任何与实验无关的活动。

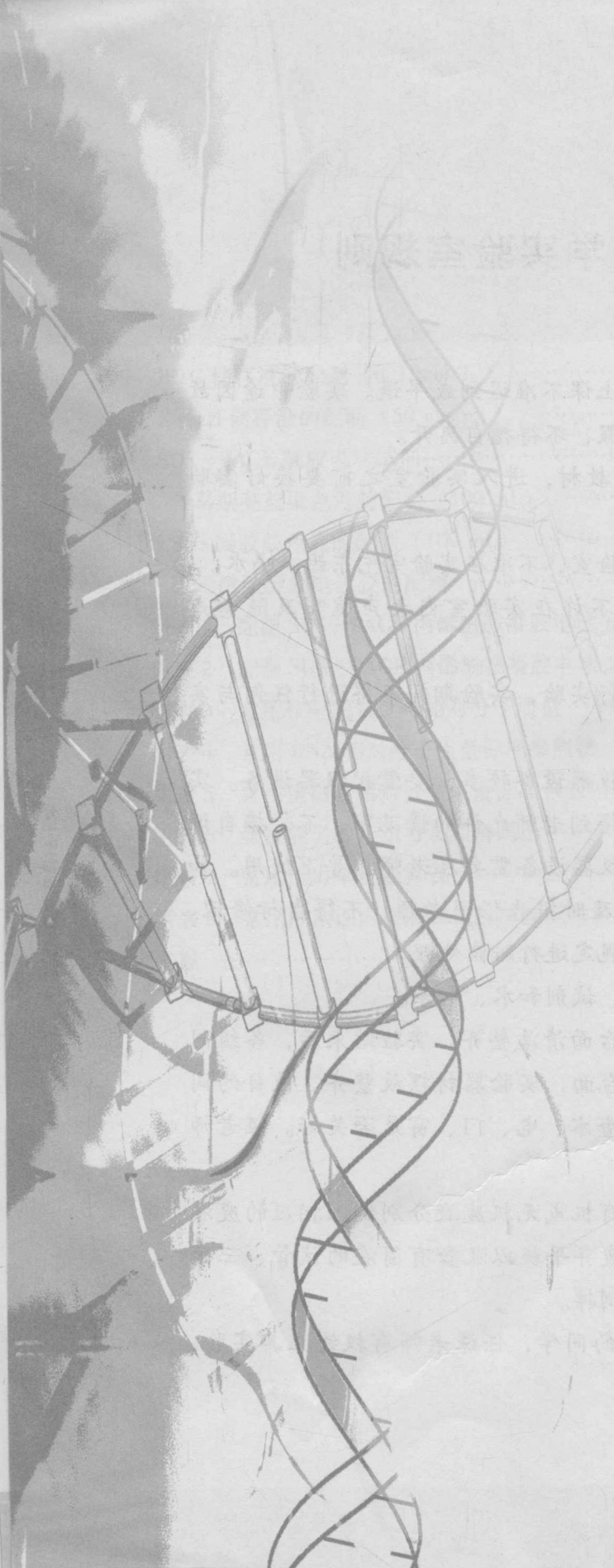
六、分子生物学实验室仪器设备较多，要爱护仪器设备。实验室内各种仪器设备在没有得到老师允许的情况下，不得擅自调节按钮或旋钮。没有用过的仪器设备需要在老师指导下使用。如发现仪器有问题或不灵，应及时报告任课老师，不得自行修理。有意损坏仪器设备者按有关规定进行赔偿处理。

七、注意节约实验材料、试剂和水、电等。

八、保持实验室和实验台面清洁整齐。实验结束后，各组同学必须认真清理各自的实验台面，实验器材摆放整齐。值日的同学负责清扫实验室卫生，检查水、电、门、窗是否关好。经老师允许后方可离开实验室。

九、实验室的废液应按有机或无机废液分别倒入相应的废液回收桶内。含有生物污染的废弃平板以及含有菌液的试管、三角烧瓶等均要高压灭菌后方可倒掉。

十、对不遵守上述规定的同学，任课老师有权终止其实验，并取消其当堂的实验成绩。



第一部分

基础实验

实验 1 细胞基因组 DNA 的提取

【概述】

核酸是存在于有核细胞中的生物大分子,它包括脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA),其中储存着遗传信息。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。RNA 的提取主要用于构建 cDNA 文库、Northern 杂交 Q-PCR 和 RT-PCR 分离目的基因。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,从而达到提取基因组 DNA 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/氯仿抽提次数,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 100 kb(千碱基对)(约为 34 μm)以上,否则酶切后两边都带合适末端的有效片段很少。进行 RFLP 和 PCR 分析, DNA 长度可短至 50 kb(约为 17 μm),在该长度以上,可保证酶切后产生 RFLP 片段(20 kb 以下,约为 6.8 μm),并可保证包含 PCR 所扩增的片段(一般 2 kb 以下,约为 0.68 μm)。

不同生物(植物、动物、微生物)的基因组 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。幼嫩组织的细胞处于旺盛的分裂阶段,核较大而胞质较少,核酸浓度高,且内含物少、次生代谢产物少,蛋白质及多糖类物质相对较少,在 SDS 或 CTAB 物质存在时,经机械研磨,可使细胞破裂并释放出内含物,从而使提取的 DNA 产量高,纯度好。

【实验目的】

- (1) 掌握提取基因组 DNA 的原理、方法和步骤。
- (2) 了解相对分子质量较大的 DNA 的琼脂糖凝胶电泳技术。

【实验原理】

真核生物的一切有核细胞(包括培养细胞)都能用来制备基因组 DNA。真核生物的 DNA 以染色体的形式存在于细胞核内,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。提取 DNA 的一般过程是将分散好的组织细胞在含 SDS(十二烷基硫酸钠)和蛋白酶 K 的溶液中消化分解蛋白质,再用酚/氯仿/异戊醇抽提分离蛋白质,得到的 DNA 溶液经乙醇沉淀使 DNA 从溶液中析出。蛋白酶 K 的重要特性是能在 SDS 和 EDTA(乙二胺四乙酸二钠)存在下保持很高的活性。在匀浆后提取 DNA 的反应体系中,SDS 可破坏细胞膜、核膜,并使组织蛋白与 DNA 分离,EDTA 则通过



整合二价金属离子,抑制细胞中 DNase 的活性;而蛋白酶 K 可将蛋白质降解成小肽或氨基酸,使 DNA 分子完整地分离出来。

植物的组织和细胞通常在液氮中研磨破碎,由于植物细胞匀浆含有多种酶类(如氧化酶类),为了降低这些酶类的活性,在抽提缓冲液中需加入抗氧化剂或强还原剂(如巯基乙醇)。十二烷基肌酸钠(sarkosyl)、十六烷基三甲基溴化铵(hexadyl trimethyl ammonium bromide,简称 CTAB)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate,简称 SDS)等离子型表面活性剂,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。上清液中加入无水乙醇使 DNA 沉淀,沉淀 DNA 溶于 TE 溶液中,即得植物基因组 DNA 溶液。

一、动物组织、细胞基因组 DNA 的提取

【实验材料】

哺乳动物新鲜组织(肝脏、肌肉等)、培养的贴壁细胞。

【实验仪器】

高压灭菌锅、高速冷冻离心机、台式高速冷冻离心机、恒温水浴锅、移液管、紫外分光光度计(GeneQuant)、玻璃匀浆器、10 mL 离心管(灭菌)、1.5 mL Eppendorf 管、50 mL 离心管(有盖)、各种规格吸头(灭菌)、一次性手套和口罩、各种规格可调式微量移液器、陶瓷研钵、弯成钩状的小玻棒、吸水纸、液氮罐、电子天平、pH 计、电泳仪、电泳槽等。

【实验试剂】

(1) 抽提缓冲液: 100 mmol/L Tris - HCl (pH 8.0), 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0), 20 mmol/L NaCl, 20 μ g/mL 胰 RNA 酶, 0.5 % SDS。

(2) 其他试剂: 10% SDS、蛋白酶 K (20 mg/mL 或粉剂)、乙醚、酚/氯仿/异戊醇(体积比为 25:24:1)、冰冷无水乙醇、70% 乙醇、5 mol/L NaCl、3 mol/L NaAc、TE 缓冲液(pH 8.0, 高压灭菌, 室温贮存)、异丙醇、灭菌去离子水。

【实验步骤】

(1) 取新鲜或冰冻动物组织块 0.1 g (或 0.5 cm³), 尽量剪碎。置于玻璃匀浆器中, 加入 1 mL 的细胞裂解缓冲液匀浆至不见组织块, 转入 1.5 mL 离心管中, 加入 20 μ L 蛋白酶 K (500 μ g/mL), 混匀。在 65 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中水浴 30 min, 也可转入 37 $^{\circ}$ C 中水浴 12 ~ 24 h, 间歇振荡离心管数次。于台式离心机以 12000 r/min 离心 5 min, 取上清液入另一离心管中。

(2) 加 2 倍体积异丙醇, 倒转混匀后, 可以看见丝状物, 用 100 μ L 吸头挑出, 晾干, 用 200 μ L TE 重新溶解。(可进行 PCR 反应等, 需要进一步纯化的按下列步骤进行)

- (3) 加等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 振荡混匀, 以 12000 r/min 离心 5 min。
- (4) 取上层溶液至另一管, 加入等体积的氯仿/异戊醇, 振荡混匀, 以 12000 r/min 离心 5 min。
- (5) 取上层溶液至另一管, 加入 1/2 体积的 7.5 mol/L 乙酸氨, 加入 2 倍体积的无水乙醇, 混匀后室温沉淀 2 min, 以 12000 r/min 离心 10 min。
- (6) 小心倒掉上清液, 将离心管倒置于吸水纸上, 将附于管壁的残余液滴除掉。
- (7) 用 1 mL 70 % 乙醇 (体积分数, 下同) 洗涤沉淀物 1 次, 以 12000 r/min 离心 5 min。
- (8) 小心倒掉上清液, 将离心管倒置于吸水纸上, 将附于管壁的残余液滴除掉, 室温干燥。
- (9) 加入 200 μ L TE 重新溶解沉淀物, 然后置于 4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。
- (10) 吸取适量样品于 GeneQuant 上检测浓度和纯度。

二、培养贴壁细胞基因组 DNA 的提取

【实验步骤】

- (1) 细胞用 0.25 % 的胰酶消化, 离心收集。
- (2) 细胞重悬于冰冷的 PBS 漂洗一次, 离心收集细胞。
- (3) 重复步骤 (2)。
- (4) 加入 5 mL DNA 提取缓冲液 (100 mmol/L Tris - HCl, 0.1 mol/L EDTA, 0.5 % SDS), 混匀。
- (5) 加入 25 μ L 蛋白酶 K, 使终质量分数达到 100 μ g/mL, 混匀, 50 $^{\circ}$ C 水浴 3 h。
- (6) 用等体积的酚缓慢颠倒离心管约 10 min, 室温下以 1000 r/min 离心 15 min。
- (7) 将上层水相转移上清至一新的离心管中, 用等体积的酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 混合液再抽提一次, 室温下以 12000 r/min 离心 15 min, 转移上清至一新的离心管中。
- (8) 加入等体积的氯仿/异戊醇 (体积比为 24:1) 再抽提一次, 室温下以 12000 r/min 离心 15 min, 转移上清至一新的离心管中。
- (9) 加入 1/10 倍体积 3 mol/L NaAc (pH 5.2) 和 2 倍体积 -20 $^{\circ}$ C 预冷无水乙醇, 颠倒混匀, 置于 -20 $^{\circ}$ C 中冷冻 20 min。
- (10) 取出, 在室温下以 12000 r/min 离心 5 min。弃上清, 加入预冷的 70 % 乙醇洗一次, 室温下再以 12000 r/min 离心 5 min。弃上清, 沉淀物空气干燥片刻, 将 DNA 溶于适量 TE 中。

三、植物组织基因组 DNA 的提取

【实验目的】

- (1) 了解植物基因组 DNA 提取的原理。



(2) 学习掌握植物基因组 DNA 提取方法和步骤。

【实验材料】

植物幼嫩组织 (如幼叶、花器、幼根)。

【实验仪器】

高压灭菌锅、高速冷冻离心机、台式高速冷冻离心机、恒温水浴锅、移液管、紫外分光光度计 (GeneQuant)、玻璃匀浆器、10 mL 离心管 (灭菌)、1.5 mL Eppendorf 管、50 mL 离心管 (有盖)、各种规格吸头 (灭菌)、一次性手套和口罩、各种规格可调式微量移液器、陶瓷研钵、弯成钩状的小玻棒、吸水纸、液氮罐、电子天平、pH 计、电泳仪、电泳槽等。

【实验试剂】

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

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

(3) 酚/氯仿/异戊醇 (体积比为 25:24:1) 混合液。

(4) RNaseA 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、3 mol/L NaAc。

【实验步骤】

(1) 在 50 mL 离心管中加入 20 mL 提取缓冲液 I, 60 $^{\circ}$ C 水浴预热。

(2) 水稻幼苗或叶子 5~6 g, 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 $^{\circ}$ C 水浴保温 30~60 min (时间长, 则 DNA 产量高), 并不时摇动。

(3) 加入 20 mL 酚/氯仿/异戊醇溶液, 颠倒混匀 (须戴手套, 以防止损伤皮肤), 室温下静置 5~10 min, 使水相和有机相分层 (必要时可重新混匀)。

(4) 室温下以 6000 r/min 离心 10 min。

(5) 仔细移取上清液至一个新的 50 mL 离心管, 加入 1 倍体积异丙醇, 混匀, 室温下放置片刻即出现絮状 DNA 沉淀。

(6) 在 1.5 mL Eppendorf 管中加入 1 mL 70% 乙醇 (体积分数)。用钩状玻璃棒捞出 DNA 絮团, 在 Eppendorf 中漂洗后用干净吸水纸吸干, 转入含 1 mL TE 的 Eppendorf 管中, DNA 很快溶解于 TE (如难溶解于 TE, 可在 60 $^{\circ}$ C 水浴放置 15 min 以上, 以帮助溶解)。

(7) 加入 5 μ L RNaseA (10 μ g/ μ L), 37 $^{\circ}$ C 反应 10 min, 除去 RNA (RNA 对 DNA 的操作、分析一般无影响, 也可省略该步骤)。

(8) 将其分为两管, 各 0.5 mL, 加入等体积氯仿/异戊醇 (体积比为 24:1) 抽提一次。

(9) 上清液转移至一新的 Eppendorf 管中, 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 及 2 体积冰冷的无水乙醇, 颠倒混匀, -20 $^{\circ}$ C 放置 20 min 左右, 以 10000 r/min 离心 10 min。

- (10) 弃上清, DNA 沉淀用 70% 乙醇漂洗一次, 以 10000 r/min 离心 10 min。
- (11) 空气中干燥稍许, 加入 200 μL TE 溶解。一般要放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜溶解。
- (12) 溶解后置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。
- (13) 取 2 μL DNA 样品在 0.7% Agarose 胶上电泳, 检测 DNA 的分子大小。同时取 15 μL 稀释 20 倍, 测定 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的比值, 检测 DNA 的含量及质量。

【常见问题及分析】

- (1) 选择的实验材料要新鲜, 处理时间不宜过长。
- (2) 在加入细胞裂解缓冲液前, 细胞必须均匀分散, 以减少 DNA 团块形成。
- (3) 提取的 DNA 不易溶解: DNA 量过大、加入的溶解液太少或者是沉淀物干燥过度, 都将使溶解变得困难, 可以通过加热促进溶解, 或放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中溶解 48 h。
- (4) 电泳检测时 DNA 成涂布状: 这种情况说明提取的 DNA 有降解, 往往是由操作不慎、污染核酸酶造成的。
- (5) 分光光度分析 DNA 的 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值小于 1.8 时, 提示 DNA 含量不纯, 含有蛋白质等杂质。在这种情况下, 应加入 SDS 至终质量分数为 0.5%, 并重复步骤 (3)~(8)。
- (6) 酚/氯仿/异戊醇抽提后, 其上清液太黏不易吸取: 说明含高浓度的 DNA, 可加大抽提前缓冲液的量或减少所取组织的量, 或者可以用剪刀将 1 mL 的吸头尖端部分剪掉, 这样在吸取 DNA 上清时就不会出现明显的“拉丝”现象。
- (7) 通过琼脂糖凝胶电泳可见明显的基因组 DNA 条带。若条带不明显可能是漂洗过程中导致 DNA 丢失, 或者是干燥过度, DNA 没有完全溶解。



实验 2 酵母细胞总 RNA 的提取

【概述】

真核细胞内的 RNA 主要是 rRNA (占 80%~85%)、tRNA 及小分子 RNA (占 10%~15%) 和 mRNA (占 1%~5%)。rRNA 含量最丰富,由 25S、18S 和 5S 几类组成。mRNA 种类繁多,相对分子质量从数百至数千碱基不等,但绝大多数 mRNA 在 3' 端都有一个 polyA 尾巴,因此,可根据此特性用寡聚脱氧胸苷 (Oligo dT) 层析柱从总 RNA 中将 mRNA 分离出来。一般情况下,提取的总 RNA 也可用于 Northern blot 试验。已有多种较为成熟的分离总 RNA 的方法:盐酸胍法是通过用异硫氰酸胍或盐酸胍和 β -巯基乙醇变性蛋白,并抑制 RNase 的活性,经酚/氯仿抽提后,再通过沉淀将 RNA 提取;苯酚法是利用 SDS 变性蛋白并抑制 RNase 活性,经多次酚/氯仿抽提除去蛋白、多糖、色素等后,用 NaAc 和乙醇沉淀 RNA;氯化锂沉淀法是因为锂在一定 pH 下能使 RNA 相对特异地沉淀,但容易使小分子 RNA 损失,而且残留的锂离子对 mRNA 有抑制作用。目前最常用 Trizol 试剂盒提取总 RNA,其原理是依据盐酸胍法。Trizol 法适用于人类、植物和微生物组织,样品量从几十毫克至几克。用 Trizol 法提取的总 RNA 绝无蛋白和 DNA 污染。RNA 可直接用于 Northern 分析、Poly (A) 分离、体外翻译和分子克隆等。植物幼嫩组织的细胞处于旺盛的分裂阶段,核较大而胞质较少,核酸浓度高,且内含物少、次生代谢产物少,蛋白质及多糖类物质相对较少,在 SDS 或 CTAB 物质存在时,经机械研磨,可使细胞破裂并释放出内含物,从而提取的 RNA 的产量高,纯度好。

【实验目的】

- (1) 掌握细胞总 RNA 提取的原理、方法和步骤。
- (2) 掌握 RNA 提取过程的无 RNase 的观念,了解 RNA 琼脂糖凝胶电泳技术。

【实验原理】

细胞内大部分 RNA 均与蛋白质结合在一起,以核蛋白的形式存在。因此,提取 RNA 时要把 RNA 与蛋白质分离并除去。将细胞置于含有十二烷基磺酸钠 (Sodium dodecyl sulfate, 简称 SDS) 的缓冲液中,加入等体积水饱和酚,通过剧烈振荡,再通过离心形成上层水相和下层酚相。核酸溶于水相,被苯酚变性的蛋白质或溶于酚相,或在两相界面处形成凝胶层。本实验采用 SDS-缓冲液系统可使大部分 RNA-蛋白复合物解离,而 DNA-蛋白复合物只有极少部分解离。用酚处理时 DNA-蛋白复合物变性,在低温条件下从水相中除去,这样得到的 RNA 制品中混杂的 DNA 量极少。用氯仿/异戊醇继续处理 RNA 制品,可进一步除去其中少量的蛋白质。最后用乙醇使 RNA 从水溶液中沉淀出来。本法得到的 RNA 不仅纯度高,而且多呈自然状态,可供继续研究之用。

【实验材料】

活性干酵母或培养的酵母细胞。

【实验仪器】

高压灭菌锅、冷冻高速离心机 (13000 r/min)、台式高速离心机、水浴锅、振荡器、陶瓷研钵、50 mL 离心管、10 mL 离心管和 1.5 mL Eppendorf 离心管、微量移液器、吸头、吸水纸、液氮罐、电子天平、pH 计、紫外可见分光光度计、一次性手套和口罩、电泳仪、电泳槽、普通冰箱及 -80°C 低温冰箱。

注: DEPC + ddH₂O、离心管、吸头均要用 0.1% DEPC 浸泡过夜, 再经高压灭菌处理。RNase Free Water 也可以从生物公司购买。

【实验试剂】

(1) SDS - 缓冲液: 0.3% SDS, 0.1 mol/L NaCl, 0.05 mol/L 乙酸钠, 用乙酸调到 pH 5.0。

(2) 饱和酚液: 重蒸苯酚用 SDS - 缓冲溶液饱和。

(3) 氯仿/异戊醇液 (体积比为 24:1)。

(4) 含 2% 乙酸钾的 95% 乙醇溶液。

(5) 无水乙醇。

(6) 乙醚。

(1) 溶菌酶 (B. R.) (1 mg/mL)。

注: 配制以上药品均用 DEPC + ddH₂O 经灭菌后的 RNase Free Water。

【实验步骤】

(1) 取 1 g 活性干酵母在研钵中研碎, 加 10 mL SDS - 缓冲液使成匀浆。

(2) 洗入各 Eppendorf 管 (略少于管容积的一半), 加溶菌酶 0.1 mL, 混匀, 室温静置 10 min。

(3) 再加等体积饱和酚液, 剧烈振荡 5 min。

(4) 放置冰浴中分层, 在 4°C 低温环境下, 以 10000 r/min 离心 10 min。

(5) 吸出上清液, 转入新的 Eppendorf 管中, 加等体积氯仿/异戊醇, 剧烈振荡 2.5 min, 然后以 10000 r/min 离心 5 min。

(6) 吸出上清液, 转入另一新的 Eppendorf 管中, 加 2 倍体积 95% 乙醇 (含 2% 乙酸钾), 在冰浴中放置 30 min, 使 RNA 沉淀。

(7) 再以 10000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 沉淀用少许无水乙醇和乙醚各洗一次, 即加乙醇或乙醚, 迅速离心各 1 min, 保留沉淀。倾去乙醚后, 空气干燥或减压真空干燥, 用适量的 DEPC - H₂O 溶解 RNA。

一、CTAB 法提取植物组织总 RNA

【实验原理】

CTAB (hexadecyl trimethyl ammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵), 是一种阳离



子去污剂, 具有从低离子强度溶液中沉淀核酸与酸性多聚糖的特性。在高离子强度的溶液中 ($>0.7\text{ mol/L NaCl}$), CTAB 与蛋白质和多聚糖形成复合物, 只是不能沉淀核酸。通过有机溶剂抽提, 去除蛋白、多糖、酚类等杂质后加入乙醇沉淀即可使核酸分离出来。

【实验材料】

植物叶片、植物幼嫩组织 (如幼叶、幼根)。

【实验试剂】

(1) CTAB 提取液配制: 2% CTAB (10 g), 2% PVP-40 (10 g), $100\text{ mmol/L Tris-HCl}$ ($\text{pH } 8.0$) ($50\text{ mL } 1\text{ mol/L Tris-HCl}$), 25 mmol/L EDTA ($25\text{ mL } 0.5\text{ mol/L EDTA}$), 2 mol/L NaCl (58.44 g), 0.5 g/L 亚精胺 (0.25 g), $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 溶解 10 min 加入 0.1% DEPC 水定容至 500 mL 。

(2) SSTE 配制: 0.5% SDS ($5\text{ mL } 10\%$ SDS), 1 mol/L NaCl (5.84 g), $10\text{ mmol/L Tris-HCl}$ ($\text{pH } 8.0$) ($1\text{ mL } 1\text{ mol/L Tris-HCl}$), 1 mmol/L EDTA ($\text{pH } 8.0$) ($200\text{ }\mu\text{L } 0.5\text{ mol/L EDTA}$) 加入 0.01% DEPC 水定容至 100 mL 。

(3) 10 mol/L LiCl 配制: 称取 42.39 g LiCl , 溶解至 $80\text{ mL } 0.1\%$ DEPC 水, 定容至 100 mL 。

【实验步骤】

(1) 分别称取叶片 0.5 g 于研钵中, 加入适量液氮, 迅速研磨成粉末状, 并将所有粉末全部转入含有 5 mL CTAB 提取液的 10 mL DEPC 处理的离心管中, 振荡混匀。

(2) 放置到 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min , 期间振荡 $2\sim3$ 次。

(3) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 12000 r/min 离心 10 min , 取上清液至一新的 10 mL 离心管中, 用氯仿/异戊醇 ($24:1$) 抽提, 充分振荡。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 12000 r/min 离心 10 min 。

(4) 取上清液至一新的 10 mL 离心管中, 再加氯仿/异戊醇 (体积比为 $24:1$) 抽提。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 12000 r/min 离心 10 min 。

(5) 取上清液分装至 5 只 1.5 mL 离心管中, 每管 $900\text{ }\mu\text{L}$, 加入 $1/3$ 体积的 10 mol/L LiCl 。

(6) 轻轻混匀, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内放置 $6\sim8\text{ h}$, 沉降 RNA。

(7) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 12000 r/min 离心 20 min , 弃去上清, 加入 $500\text{ }\mu\text{L } 70\%$ 体积冰冷乙醇洗涤沉淀 2 次, 倒扣在吸水纸上数分钟。

(8) 每管加入 $100\text{ }\mu\text{L SSTE}$ 溶解沉淀, 将 5 管合为 1 管。

(9) 用等体积的苯酚/氯仿/异戊醇 (体积比为 $25:24:1$) 及氯仿/异戊醇 (体积比为 $24:1$) 各抽提 1 次, 每次振荡放置 10 min 。

(10) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 12000 r/min 离心 10 min , 取上清液至一新的离心管中, 加入 2 倍体积无水乙醇在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沉降 2 h 。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 12000 r/min 离心 20 min , 弃去上清, 室温下干燥 $5\sim10\text{ min}$ 。

(11) 用适量的 RNase Free Water 重悬 RNA。

(12) 1% 琼脂糖测定其完整性, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。