

高等医学院校教材

· Short Protocols in  
*Medical Molecular Biology*

精编 医学分子生物学  
实验指导

主编·傅俊江

中国医药科技出版社

高等医学院校教材

# 精编医学分子生物学实验指导

Short Protocols in Medical Molecular Biology

主 编 傅俊江

参编人员 (以姓氏笔画为序)

于海清 王 丽 甘 淋

刘晓燕 成竞梁 张天丹

张连美 张鹏飞 李 娟

杨曼曼 杨璐全 段承刚

陶忠群 梅志强 龚 舒

中国医药科技出版社

## 内 容 提 要

本书共分五章,详细介绍了40余个医学分子生物学的相关实验内容,包括基本分子生物学实验技术、基因操作、基因诊断、表观遗传学和蛋白质分析及细胞培养与分析,同时附有医学分子生物学实验课程简介和医学分子生物学教学大纲供参考。本书不仅可以作为高等院校医学各专业本科生、研究生的实验指导和教材,也可作为医学、生命科学领域从事教学、科研的教师及医务工作者的参考书。

### 图书在版编目(CIP)数据

精编医学分子生物学实验指导/傅俊江主编. —北京:中国医药科技出版社,2012.1

高等医学院校教材

ISBN 978-7-5067-5371-5

I. ①精… II. ①傅… III. ①医药学:分子生物学-实验-医学院校-教学参考资料 IV. ①Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第276925号

美术编辑 陈君杞

版式设计 郭小平

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲22号

邮编 100082

电话 发行:010-62227427 邮购:010-62236938

网址 [www.cmstp.com](http://www.cmstp.com)

规格 787×1092mm<sup>1</sup>/<sub>16</sub>

印张 10<sup>1</sup>/<sub>2</sub>

字数 210千字

版次 2012年2月第1版

印次 2012年2月第1次印刷

印刷 三河市腾飞印务有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978-7-5067-5371-5

定价 28.00元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

# 序

医学分子生物学是一门实验性非常强、生命科学发展中最重要的前沿学科。医学分子生物学实验技术正深刻地影响着医学的各个分支领域。因此，作为医学院校各专业的本科生、研究生、青年教师和临床各科医务工作者，掌握分子生物学技术的基础理论和实验基本方法十分重要，编写一本适合医学生使用的、实用性强的实验教材势在必行。

傅俊江博士在国内外从事医学分子生物学、细胞生物学和遗传学科研、教学和临床基因诊断等工作 20 余年，有扎实的理论功底及丰富的实践经验。参与编著的成员均为相关领域第一线的年轻科技人员，对于所撰写的每一个实验均是他们的亲身实验和实践经验的总结。

全书共分五章，含 40 余个具体的实验操作，按照实验目的、原理、仪器材料、步骤及注意事项等结构介绍每一项实验技术，包括基本分子生物学实验技术、基因操作、基因诊断、表观遗传学和蛋白质分析及细胞培养与分析；该实验指导既有原理又有实验结果，图文并茂、简洁精炼。同时附有医学分子生物学实验课程简介和医学分子生物学教学大纲供参考。

这本《精编医学分子生物学实验指导》适用于医学各专业本科生，并且其中一些新技术和综合性实验对研究生，特别是对从事临床分子诊断及分子生物学研究的临床科研人员适用。本书是一本关于医学分子生物学实验技术的非常实用的教学参考书。



教授、博士生导师  
中国医学遗传学国家重点实验室首届主任  
中信湘雅生殖与遗传专科医院遗传中心主任  
2012 年元月于长沙

# 前 言

1999年9月，我编写了一本《基因诊断实验室操作手册》，供分子生物实验室的人员内部使用。当时我在原湖南医科大学人类生殖工程研究室（现中南大学生殖与干细胞工程研究所和中信湘雅生殖与遗传专科医院）从事生殖遗传学和分子生物学工作。2010年9月，我从美国贝勒医学院应聘来到泸州医学院，深感缺少一本用以指导我们学习和科研的、实用的医学分子生物学实验指导。同时觉得，掌握医学分子生物学技术的基础理论和实验基本方法、提高大家的动手能力、培养应用型人才，对广大医科本科学士、研究生和青年教师而言显得越来越重要。培养应用型人才成为目前教育教学改革的趋势。因此，根据医学院校的特点和我的实践经验，计划编写一本面向医学各专业本科生、研究生和青年教师以及基层医院的临床和科研工作者，同时又有现代最新技术的体现；是实验指导性质，有原理、方法技术但也很具体、实用的医学分子生物学实验指导。现经过一年多的策划、讨论、组织和编写，这本《精编医学分子生物学实验指导》终于面世了！一路走来，非常感谢中南大学湘雅医学院的李麓芸教授、夏家辉院士、卢光琇教授、范立青教授、胡维新教授、曾卫民教授、戴和平主任技师，美国贝勒医学院的 Jianming Xu 教授、Sophia Hsai 教授、Rui Chen 副教授，华东师范大学的翁杰敏教授、李晓涛教授，泸州医学院马跃荣教授、廖斌教授、曾晓荣教授、鄢丽莎教授、何涛教授、刘克林教授、杜杰科长！同时感谢参与编写的全体成员和其他一切关注、关心和关怀过我的人们。本项目得到泸州医学院教改项目“医学分子生物学实验课教学改革探讨”立项资助（编号：2011010）。最后要特别感谢我的父母、爱人和女儿对我的工作的一贯理解和支持。本书编写力求完善准确，但由于作者的水平 and 能力有限，错误在所难免，殷切希望广大读者批评指正。我们将在教学和科研实践过程中不断修正和完善本教材，力争成为广大年轻读者成长道路上的良师益友。



2012年壬辰新春  
于美国休斯顿

## 目 录

<b>第一章 基本分子生物学实验技术</b> .....	(1)
实验一 人外周血全血 DNA 的提取 .....	(1)
实验二 人羊水 DNA 的抽提 .....	(4)
实验三 全血基因组 DNA 的快速提取 .....	(4)
实验四 组织细胞基因组 DNA 的提取 .....	(5)
实验五 碱法提取质粒 DNA .....	(8)
实验六 基因组 DNA 的定量分析 .....	(10)
实验七 琼脂糖凝胶电泳 .....	(13)
实验八 大肠杆菌感受态细胞的制备 .....	(15)
<b>第二章 基因操作</b> .....	(18)
实验一 细胞/组织总 RNA 的提取 (Trizol 法) .....	(18)
实验二 聚合酶链式反应 (PCR) .....	(21)
实验三 逆转录反应 .....	(24)
实验四 荧光定量 PCR .....	(25)
实验五 PCR 产物扩增、连接、转化与阳性克隆鉴定 .....	(28)
实验六 GST 融合蛋白的克隆、表达与纯化 .....	(33)
实验七 凝胶迁移实验 .....	(35)
实验八 RNA 干扰技术 .....	(40)
<b>第三章 基因诊断</b> .....	(44)
实验一 进行性肌营养不良 (DMD) 的基因诊断 .....	(44)
实验二 性畸形的基因诊断 .....	(45)
实验三 特发性无精症和严重少精症患者 Y 染色体微缺失的分子检测 .....	(48)
实验四 $\beta$ -地中海贫血的基因诊断 .....	(50)
实验五 脊髓性肌萎缩症的基因诊断 .....	(52)
实验六 软骨发育不全患者的 PCR-限制性酶切法分析 .....	(56)
实验七 荧光原位杂交 (染色体涂染) 技术 .....	(57)
实验八 DNA 指纹分析 .....	(61)
实验九 RAPD 技术 .....	(63)
<b>第四章 表观遗传学和蛋白质分析</b> .....	(67)
实验一 蛋白质免疫印迹杂交 .....	(67)

实验二	免疫共沉淀与 Western Blot .....	(73)
实验三	Protein complex purification from Flp - In <sup>TM</sup> T - REx <sup>TM</sup> 293 stably expressed FLAG tagged protein cell line .....	(77)
实验四	Protocol for ChIP assay for endogenous gene .....	(79)
实验五	Protocol for ChIP - SEQ with inducible 293 cell lines .....	(82)
实验六	双向电泳技术 .....	(86)
实验七	蛋白质组研究中的蛋白质鉴定——质谱技术 .....	(92)
实验八	血清蛋白 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....	(106)
实验九	免疫组化技术 .....	(109)
<b>第五章 细胞培养与分析</b> .....		(113)
实验一	组织细胞的原代培养、传代与冻存 .....	(113)
实验二	肿瘤细胞的培养 .....	(117)
实验三	可诱导稳定表达细胞系的建立 .....	(118)
实验四	细胞增殖活性的测定 .....	(121)
实验五	肿瘤细胞侵袭和迁移运动实验 .....	(122)
实验六	实验动物的肿瘤模型实验 .....	(124)
实验七	流式细胞分析术 .....	(127)
<b>附录一：医学分子生物学实验课程简介</b> .....		(132)
<b>附录二：医学分子生物学教学大纲</b> .....		(133)

RNase 的活性。

(3) 氯仿的作用：克服酚的缺点，加速有机相与液相分层。酚易溶于氯仿，由此可去除核酸溶液中的微量酚。

(4) 异戊醇的作用：具有降低表面张力的作用，可以减少蛋白质变性操作过程中产生的气泡。异戊醇还有助于相分离，使离心后的上层含 DNA 的水相、中间的变性蛋白相及下层有机溶剂相维持稳定。

(5) 乙醇的作用：经  $\text{Na}^+$  中和 DNA 分子上的负电荷，减少 DNA 分子之间的同性电荷相斥力，在无水乙醇的吸水作用下 DNA 易于聚集沉淀，同时无水乙醇还可以将 DNA、RNA、蛋白和多糖都沉淀下来。沉淀用 70% 乙醇洗盐，晾干，溶解即可。

### 【实验步骤】

(1) 用 5ml 一次性注射器，吸取 0.2ml 肝素 (0.4mg/ml)，湿润注射器内壁，或一次性真空采血管 (含肝素) 无菌操作抽取静脉外周血 5ml，装入 50ml 灭菌干净离心管。

(2) 加入 3~5 倍体积的  $1 \times \text{Blood Lysis Buffer}$ 。

(3) 摇匀，置冰上 30min (或  $4^\circ\text{C}$  水浴中)。3000rpm  $\times$  10min 离心。

(4) 小心弃去上清液。如果沉淀中有未破的红色沉淀 (即红细胞)，则再重复上述 (2)、(3) 和 (4) 步骤。

(5) 加入 3ml 的  $\text{Nucleic Lysis Buffer}$ ，摇 (打) 匀。

(6) 加入  $150\mu\text{l}$  的 20% (W/V) 的 SDS，摇匀，直到沉淀出现黏稠透明状为止。

(7) 加入  $10\mu\text{l}$  (20 mg/ml) 的蛋白酶 K，摇匀。

(8)  $37^\circ\text{C}$  恒温水浴消化过夜。

(9) 加入等体积的饱和重蒸酚，充分摇匀，静置 15min 以上或过夜。

(10) 3000 rpm  $\times$  10min 离心。吸取上清液到另一干净离心管中。

(11) 加入等体积的酚/氯仿 (V/V)，充分摇匀。

(12) 3000 rpm  $\times$  10min 离心。吸取上清液到另一干净离心管中，注意不要带有下层的酚/氯仿等。

(13) 如果吸出的上清液清亮透明，看不到白色黏稠物，则可以不用继续进行氯仿或酚/氯仿抽提，直接进入下一步。

(14) 加入 2.5 倍体积的无水乙醇，盖上盖子，来回倒置摇匀，此时可见白色絮状物析出，此为所抽提的 DNA。

(15) 用火焰烧过的玻璃钩针将白色絮状物的 DNA 钩出。

(16) 用 70% 的酒精小心冲洗 DNA 两次，注意不要将 DNA 沉淀物冲走。室温干燥 2~5min，不宜太长。

(17) 将钩出的 DNA 溶解到  $500\mu\text{l}$   $1 \times \text{TE}$  的无菌干净的 Eppendorf 管中。

(18) 取出玻璃钩针，火焰灭菌后下次备用。

(19) 转鼓溶解 DNA 过夜；或置  $4^\circ\text{C}$  冰箱中，每天摇动 1~2 次，直到 DNA 完全溶解为止。

(20) 紫外仪测 DNA 的 OD 值 (注意 260nm、280nm 的吸收值及其比值)。



(21) 样本放 4℃ 冰箱中供使用或放 -70℃ 冰箱中长期保存。也可以将 DNA 长期保存在无水乙醇中。

### 【提取 DNA 的各种试剂及配方】

(1) 10 × Blood Lysis Buffer (4℃ 保存)、NH<sub>4</sub>Cl 82.9g、KHCO<sub>3</sub> 10g、EDTA 2ml (0.5M)、ddH<sub>2</sub>O 加至 1000ml, 高压灭菌备用。

(2) Nucleic Lysis Buffer (4℃ 保存)、2M Tris (pH 8.2) 0.5ml、4M NaCl 10ml、0.5M EDTA (pH 8.0) 0.4ml、ddH<sub>2</sub>O 加至 1000ml, 高压灭菌备用。

(3) 蛋白酶 K (20mg/ml, -20℃ 保存): 称取 20mg 的蛋白酶 K (购自 Sagon), 溶于 1ml 的无菌水中, 摇匀即可。

(4) 1 × TE (600ml)、2M Tris Cl (pH 8.0) 3ml、0.5M EDTA (pH 7.6) 1.2ml, 加水至 600ml, 高压灭菌备用。

(5) Tris 饱和酚 (pH 8.0)、氯仿/异戊醇 (24:1)、氯仿。

(6) 无水乙醇、70% 乙醇、灭菌双蒸水等。

### 【仪器】

恒温水浴锅、台式离心机、紫外分光光度计、移液器、灭菌 50ml 离心管、灭菌吸头、酒精灯、玻璃钩针等。

### 【注意事项及常见问题】

(1) 所有用品均需要高温高压, 以灭活残余的 DNA 酶。所有试剂均用高压灭菌双蒸水配制。

(2) 用大口滴管或吸头操作, 以尽量减少打断 DNA 的可能性。

(3) 加入细胞裂解缓冲液, 充分裂解, 如果不完全, 可见明显的红细胞, 可再做一次裂解 (重复一次)。

(4) 提取的 DNA 若不易溶解, 可能是含杂质较多纯度低、加溶解液太少使浓度过大、沉淀物太干燥溶解变得很困难所致。

(5) 酚和氯仿/异戊醇抽提后, DNA 浓度高会导致上清液太黏不易吸取, 可加大抽提前缓冲液的量或减少所取组织的量。

(6) 电泳检测时 DNA 集中在靠近点样孔位置, 证明 DNA 分子片段完整、质量好 (图 1-1), 而 DNA 成涂布状 (SMEAR), 表明操作不慎、DNA 断裂、存在污染 DNase 酶等。

(7) 分光光度分析 DNA 的  $A_{260}/A_{280}$  小于 1.8, 表明含有蛋白质和酚等杂质。 $A_{260}/A_{280}$  大于 2.0, 表明含有 RNA 杂质。

(8) 因采用人血, 应注意感染和污染的防护。

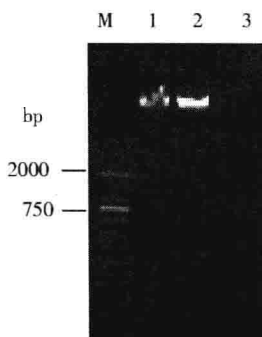


图1-1 人基因组DNA电泳图

M 为 DL2000DNA Marker, 1 和 2 分别为不同人的基因组 DNA,  
3 为空白对照

(张连美 张天丹 杨璐全 杨曼曼 傅俊江)

## 实验二 人羊水 DNA 的抽提

- (1) 在 B 超指导下抽取孕妇羊水 10 ~ 20 ml。
- (2) 3000rpm × 10min 离心, 弃上清液。
- (3) 加入 1 ~ 2ml 前述的 Nucleic Lysis Buffer, 并打匀。
- (4) 余下步骤均同全血 DNA 的提取。但可能抽提出来的 DNA 量少, 可用 3M 的 NaAC (pH 5.2), -70℃ 沉淀, 再离心以回收沉淀的 DNA, 用 70% 的酒精小心洗涤 DNA, 用适当体积的 1 × TE 溶解。

(傅俊江)

## 实验三 全血基因组 DNA 的快速提取

### 【实验目的】

掌握快速提取小量全血细胞 DNA 的原理和方法。

### 【实验原理】

硅胶膜离心柱法: 高效红细胞裂解液首先去除血液不含细胞核的红细胞, 通过离心回收白细胞, 经过细胞核裂解液裂解释放基因组 DNA, 硅胶膜特异性吸附 DNA, 通过漂洗去除蛋白质和其他杂质, 最后用低盐溶液洗脱得到高纯基因组 DNA。不需酚、氯仿等毒性有机溶剂抽提以及乙醇沉淀等步骤, 速度快、纯度高, 适用于 PCR、酶切等下游实验。

磁珠法：亦可应用磁珠法快速提取小量全血细胞 DNA。

### 【实验步骤】

(1) 血液标本处理。取 5ml 血液，加入 3 倍体积的红细胞裂解液 SR 上下颠倒混匀，室温放置 5 ~ 10min，其间上下颠倒 2 ~ 3 次，混匀。12000rpm 离心 30s，吸弃上清，重新加入同第一步等量红细胞裂解液 SR，12000rpm 离心 30s，吸弃上清（注意不要触及或吸出管底白色沉淀）。离心后在管底应该见到白色的白细胞团，也可能有一些红细胞残片和白细胞团在一起，不会影响后续试验结果。

(2) 加入 200 $\mu$ l 缓冲液 SL。加 20 $\mu$ l 蛋白酶 K 溶液，混匀，58 $^{\circ}$ C 放置 2h（也可消化过夜），其间上下颠倒 2 ~ 3 次。溶液应变清亮（如溶液未彻底变清亮，请延长裂解时间至溶液清亮为止）如果需要去除 RNA，可加入 4 $\mu$ l RNaseA 溶液，振荡 15s，室温放置 5min。

注意：以上步骤，每次充分混匀非常重要，否则易造成细胞裂解不彻底，导致堵塞或 DNA 产量降低。

(3) 加入 220 $\mu$ l 结合液 SB，上下颠倒离心管充分混匀，58 $^{\circ}$ C 放置 10min，其间上下颠倒 2 ~ 3 次。

(4) 加入 220 $\mu$ l 无水乙醇，快速颠倒离心管混匀，此时可能有白色絮状沉淀出现，应将沉淀和溶液一起转移到吸附柱中 12000rpm 离心 1min，弃掉废液。

(5) 向吸附柱中加入 700 $\mu$ l 漂洗液 PW（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），12000rpm 离心 30s，倒掉废液，将吸附柱放入收集管中。

注意：漂洗液 PW 在第一次使用前加入 4 倍体积的无水乙醇。

(6) 向吸附柱中加入 500 $\mu$ l 漂洗液 PW，12000rpm 离心 30s，倒掉废液。

(7) 将吸附柱放回清空的收集管中，12000rpm 空离心 2min 将吸附柱置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，漂洗液中乙醇的残留影响后续的实验（酶切、PCR 等）。

(8) 将吸附柱放入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位打入 50 ~ 100 $\mu$ l 洗脱液 EB（洗脱缓冲液预先在 70 $^{\circ}$ C 水浴中预热），室温放置 3 ~ 5min，12000rpm 离心 1min。

注意：洗脱体积越大，洗脱效率越高，如需要 DNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但最小体积不应少于 50 $\mu$ l，体积过小降低 DNA 洗脱效率，降低 DNA 产量。

(9) 所得基因组 DNA 溶液测浓度，放置在 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 【实验器材】

#### 1. 实验设备

高速离心机、恒温水浴锅、加样枪、移液器吸头、微量离心管。

#### 2. 试剂盒组成

吸附柱及收集管、红细胞裂解液 SR、缓冲液 SL、结合液 SB、漂洗液 PW、蛋白酶 K、洗脱液 EB。

（张天丹）

## 实验四 组织细胞基因组 DNA 的提取

### 【实验目的】

熟练掌握用酚氯仿法快速提取动物组织细胞基因组 DNA 的原理和方法。

### 【实验原理】

制备基因组 DNA 是进行基因结构和功能研究的重要步骤，通常要求得到的片段的长度不小于 100~200kb。在 DNA 提取过程中应尽量避免使 DNA 断裂和降解的各种因素，以保证 DNA 的完整性，为后续的实验打下基础。一般真核细胞基因组 DNA 有  $10^7\sim 10^9$ bp，用酚氯仿法可以从新鲜组织、培养细胞或低温保存的组织细胞中提取。在 EDTA 和 SDS 等试剂作用下，经 65℃ 水浴变性 DNase 和大部分蛋白质，同时用蛋白酶 K 消化细胞，用 RNase 去除 RNA，用酚和氯仿/异戊醇抽提蛋白质，得到的 DNA 溶液经乙醇沉淀使 DNA 从溶液中析出，溶解于 TE 或灭菌双蒸水。

#### 1. 试剂的作用

同实验一。

#### 2. 样品处理

(1) 新鲜组织：新鲜离体动物组织适量（一般取组织块 25mg 约  $0.5\text{cm}^3$ ，小鼠尾约 1.2cm，大鼠尾约 0.6cm），用剪刀剪切成小块，移入预冷的匀浆器或研钵中，快速用力匀浆或研磨。

(2) 冻存组织：不能立刻提取 DNA 的组织样品，应置于液氮或 -70℃ 冰箱中保存并避免反复冻融。取出冻存样品，放入预冷的匀浆器或研钵中，加入少许液氮，快速用力研磨成粉末状。

(3) 特殊组织：某些组织样品因匀浆比较困难或匀浆过程中 DNA 容易降解，建议按照冻存组织样品的处理方式进行处理。

(4) 培养细胞：悬浮后用 PBS 洗涤，去除上清液后用裂解缓冲液处理。本实验以兔子新鲜肝组织进行 DNA 的制备。

### 【实验步骤】

(1) 取兔子新鲜肝组织 0.5g（约  $3\text{cm}^3$ ），剪碎后置于玻璃匀浆器中，加入 8ml 的细胞裂解缓冲液匀浆至不见组织块。

(2) 将匀浆液 2ml 转入 5ml 离心管中，加入蛋白酶 K（20mg/ml） $10\mu\text{l}$ ，混匀。在 65℃ 恒温水浴锅中水浴 30min。

(3) 加等体积的饱和酚，轻柔颠倒混匀 10min，4000 rpm 离心 10min。

(4) 取上清液至另一 5ml 离心管中，加入等体积的氯仿/异戊醇（24:1），轻柔颠倒混匀，4000 rpm 离心 10min。若水相仍不澄清，可重复此步骤数次。

(5) 取上清液 1ml 至另一个 5ml 离心管中, 加 1/10 体积的 3M 醋酸钠 (pH 5.2) 和 2.5 倍体积的无水乙醇, 轻轻倒置混匀, 出现絮状物 (若无絮状物, 4000 rpm 离心 5min)。

(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 3ml 70% 乙醇洗涤沉淀物 1 次。

(8) 小心倒掉上清液, 倒置离心管于吸水纸上, 去除管壁残余液滴, 室温干燥至近透明。

(9) 加 300 $\mu$ l TE 重新溶解沉淀物, 吸取适量样品检测浓度和纯度后, 4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C 保存。

## 【仪器及试剂】

### 1. 仪器

恒温水浴锅、台式离心机、紫外分光光度计、移液器、玻璃匀浆器、灭菌 5ml 离心管、灭菌吸头。

### 2. 试剂

(1) 细胞裂解缓冲液: 100mM Tris (pH 8.0) + 0.5M EDTA (pH 8.0) + 20mM NaCl + 10% SDS + 20 $\mu$ g/ml 胰 RNase A。

(2) 蛋白酶 K: 称取 20mg 蛋白酶 K 溶于 1ml 灭菌的双蒸水中, -20 $^{\circ}$ C 备用。

(3) TE 缓冲液: 10mM Tris - HCl + 1mM EDTA, 调节至 pH 8.0, 高压灭菌, 室温贮存。

(4) Tris 饱和酚 (pH 8.0)、氯仿/异戊醇 (24:1)。

(5) 3M 醋酸钠, pH 5.2。

(6) 无水乙醇、70% 乙醇、灭菌双蒸水。

## 【注意事项及常见问题】

(1) 所有用品均需要高温高压, 以灭活残余的 DNA 酶。

(2) 所有试剂均用高压灭菌双蒸水配制。

(3) 用大口滴管或吸头操作, 以尽量减少打断 DNA 的可能性。

(4) 选择的实验材料要新鲜, 处理时间不易过长。

(5) 加入细胞裂解缓冲液, 充分匀浆, 细胞必须均匀分散, 以减少 DNA 团块形成。

(6) 提取的 DNA 若不易溶解, 可能是含杂质较多纯度低、加溶解液太少使浓度过大、沉淀物太干燥溶解变得很困难所致。

(7) 酚和氯仿/异戊醇抽提后, DNA 浓度高会导致上清液太黏不易吸取, 可加大抽提前缓冲液的量或减少所取组织的量。

(8) 电泳检测时 DNA 成涂布状, 表明操作不慎、存在污染 Dnase 等。

(9) 分光光度分析 DNA 的  $A_{260}/A_{280}$  小于 1.8, 表明含有蛋白质和酚等杂质。  $A_{260}/A_{280}$  大于 2.0, 表明含有 RNA 杂质。

(10) 用上述方法提取的 DNA 纯度可以满足一般实验 (如 Southern 杂交、PCR 等)

目的。如要求更高，可参考有关资料进行 DNA 纯化。

## 实验五 碱法提取质粒 DNA

### 【实验目的】

掌握碱裂解法提取细菌质粒的操作过程；熟悉细菌质粒的特性和提取的基本原理；了解细菌质粒浓度的测定方法。

### 【实验原理】

细菌质粒是能自主复制并稳定遗传的一种环状双链 DNA 分子，大小介于 1 ~ 200kb 之间，独立存在于细菌染色体外，利用自身细胞的复制体系合成质粒 DNA。目前，细菌质粒是最常用的基因克隆载体分子，质粒 DNA 分子的提取、纯化与检测显得尤为重要。

碱裂解法是一种应用最为广泛的提取质粒 DNA 的方法，其基本原理为：当菌体在 NaOH 和 SDS 溶液中裂解时，蛋白质与 DNA 发生变性，当加入中和液后，质粒 DNA 分子能够迅速复性，呈溶解状态，离心时留在上清中；蛋白质与染色体 DNA 不复性而呈絮状，离心时可沉淀下来。

纯化质粒 DNA 的方法通常是利用了质粒 DNA 相对较小及共价闭环两个性质。对于小量提取的质粒 DNA，经过苯酚、氯仿抽提，RNA 酶消化和乙醇沉淀等简单步骤去除残余蛋白质和 RNA，所得质粒 DNA 已可满足细菌转化、DNA 片段的分离和酶切、常规亚克隆及探针标记等要求，故在分子生物学实验中广泛应用。

质粒 DNA 的检测包括浓度测定和琼脂糖凝胶电泳。浓度测定的方法有①紫外光吸收法，DNA 在 260nm 处具有强吸收峰，所以通过测定 260nm 处的吸收峰即可对 DNA 进行定量。一般在中性 pH 环境条件下进行测定，此方法常用于测定比较纯净的 DNA 样品。②溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 荧光强度法：EB 可嵌入 DNA 双链中，受紫外光照射时会激发产生荧光，荧光的强度与 DNA 含量成正比。紫外光吸收法利用紫外分光光度计进行，EB 荧光强度法要结合琼脂糖凝胶电泳来进行，琼脂糖凝胶电泳还可用于检测质粒 DNA 的大小和纯度等。

### 【实验步骤】

#### 1. 质粒 DNA 的提取

(1) 培养细菌：将带有质粒的大肠杆菌接种到液体培养基中，37℃ 振荡培养 12 ~ 16h，到细菌超过对数生长期 (OD 0.6 ~ 0.8) 后收获。

(2) 取 1.5ml 细菌培养液于 Eppendorf 管中，4℃，12000 rpm 离心 1min，完全弃上清液 (倒置于吸水纸上，吸干多余菌液)。重复此步骤可增加菌体收集量。

(3) 加入 100 $\mu$ l 冰预冷的溶液 I，涡旋仪上剧烈振荡使细胞完全重悬。

(4) 加入 200 $\mu$ l 新配制的溶液 II，轻柔快速颠倒 5 次（轻轻混合，切勿震荡），充分裂解菌体，使之变清亮，冰浴 3min。

(5) 加入 150 $\mu$ l 冰预冷的溶液 III，反复颠倒，温和振荡 10s 使溶液 III 均匀地分散在细菌裂解物中，冰浴 3 ~ 5min。

(6) 4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心 5min，将上清液移入另一离心管中。

(7) 通风橱内操作，加等量酚:氯仿:异戊醇（25:24:1）混合液约 400 $\mu$ l，振荡混匀（手摇约 20 次），4 $^{\circ}$ C，12000rpm 离心 2min。

(8) 上清液移入另一干净离心管（注意不要吸到交界处），加入约 400 $\mu$ l（2 倍体积）异丙醇，剧烈震荡混合，沉淀质粒，室温放置 2min，4 $^{\circ}$ C，12000rpm 离心 1min。

(9) 小心弃上清液，倒置管，吸干，加 1ml 70% 乙醇混匀，室温静置 5min，4 $^{\circ}$ C，12000rpm 离心 30s。

(10) 小心倒弃上清液，将离心管倒置于滤纸上将剩余液体滴尽，室温干燥 10min。

(11) 用 40 $\mu$ l 的 1 $\times$ TE 或去离子水，37 $^{\circ}$ C 溶解质粒 DNA 30min，期间每隔 5 min 混匀一次，完全溶解后，-20 $^{\circ}$ C 冰箱贮存备用。

## 2. 质粒 DNA 含量测定

(1) 取 2 $\mu$ l 提取的质粒 DNA，加入 98 $\mu$ l 蒸馏水稀释待测样品。

(2) 蒸馏水作为空白，在波长  $\lambda$ 260nm、280nm 处调节紫外分光光度计读数至零。

(3) 加入 DNA 稀释液，测定 260nm 及 280nm 的吸收值。260nm 读数用于计算样品中核酸的浓度，OD<sub>260</sub> 值为 1 相当于约 50 $\mu$ g/ml 双链 DNA，33 $\mu$ g/ml 单链。根据在 260nm 以及在 280nm 的读数的比值（OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>）估计核酸的纯度。一般 DNA 的纯品，其比值为 1.8 ~ 2.0，比值偏低说明有蛋白质或酚类等杂质的污染，比值偏高说明有 RNA 污染。

(4) 记录 OD 值，通过计算确定 DNA 浓度或纯度，公式如下： $ds\ DNA = 50 \times (OD_{260}) \times \text{稀释倍数}$ （注：浓度单位为  $\mu$ g/ml）。

## 【仪器及试剂】

### 1. 仪器

核酸电泳仪、台式离心机、超净工作台和摇床、震荡混匀器、Eppendorf 管、微量移液器和移液器吸头、恒温水浴锅、高压灭菌锅、酒精灯。

### 2. 试剂

(1) 溶液 I：50mmol/L 葡萄糖，10mmol/L EDTA，25mmol/L Tris - HCl，pH 8.0，100mg/ml RNase A（质粒提取时现加）。

溶液 I 可成批配制，每瓶约 100ml，121 $^{\circ}$ C 湿热灭菌 20min，4 $^{\circ}$ C 冰箱贮存（注意：不能将 RNase A 加入溶液 I 中一起灭菌，RNase A 用时现加）。

(2) 溶液 II：0.2mol/L NaOH（5mol/L NaOH 贮存液现用现稀解），1% SDS（10mol/L SDS 贮存液现用现稀解）。

(3) 溶液 III：60ml 5mol/L 醋酸钠，5ml 冰醋酸，28.5ml H<sub>2</sub>O。

(4) TE 缓冲液：10mmol/L Tris - HCl，1mmol/L EDTA（pH 8.0）。

(5) 溶菌酶，苯酚饱和溶液，氯仿，异戊醇，异丙醇，NaCl，100% 乙醇，70%

乙醇, 苯酚饱和溶液: 氯仿: 异戊醇 = 25: 24: 1。

(6) 上样缓冲液 (6 ×): 0.25% (W/V) 溴酚蓝, 40% (W/V) 蔗糖水溶液或 30% 的甘油。

(7) 5 × Tris - 硼酸 (5 × TBE) 缓冲液 (工作浓度: 0.5 ×): 445mmol/L Tris 碱, 445mmol/L 硼酸盐, 10mmol/L EDTA。

称取 54g Tris 碱和 27.5g 硼酸溶于 500ml 蒸馏水中, 加入 20ml 的 0.5mol/L EDTA (pH 8.0) 混匀, 补加蒸馏水至 1000ml, 4℃ 冰箱贮存。

(8) 50 × Tris - 乙酸 (50 × TAE) 缓冲液 (工作浓度: 1 ×): 2mol/L Tris 碱, 17.4mol/L 乙酸, 50mmol/L EDTA。

称取 242g Tris 碱溶于 500ml 蒸馏水中, 加入 57.1ml 冰乙酸 (17.4mol/L) 及 100ml 0.5mol/L EDTA (pH 8.0) 混匀, 补加蒸馏水至 1000ml, 4℃ 冰箱贮存。

(9) 常用的限制性内切酶 EcoR I 和 Hind III 及酶切缓冲液。

(10) 无菌双蒸水, 质粒 DNA 样品。

(11) LB 培养基 (1L): Tryptone 10g、Yeast Extract 5g、NaCl 10g。

(12) 普通琼脂糖和西班牙琼脂糖。

### 【注意事项及常见问题】

(1) 为提高质粒产量, 收获细菌应在其对数生长期以后, 此时细菌内质粒拷贝数高。

(2) 质粒提取过程中, 溶液 II 应现用现配, 不宜贮存。

(3) 在质粒提取的整个过程中都应特别注意 DNase 污染, 防止质粒 DNA 被 DNase 水解。

(4) 质粒提取过程复杂, 在抽质粒前一定要作好充分准备, 将器具、离心管、枪头等消毒。

(5) 质粒 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳时, 要特别注意 EB 的使用, 因为 EB 是一种诱变剂, 有致癌作用, 操作时戴塑料或乳胶手套。

(龚舒 于海清)

## 实验六 基因组 DNA 的定量分析

### 【实验目的】

熟练掌握用分光光度法和溴化乙锭法检测 DNA 纯度和浓度。

### 【实验原理】

#### 1. 分光光度法

组成 DNA 分子的碱基含有共轭双键, 具有吸收紫外线的特性, 最大吸收值在波长



为 250 ~ 270nm 之间。这些碱基与戊糖，磷酸形成核苷酸后，使 DNA 的最大吸收波长是 260nm。核酸浓度与其吸光度成正比，DNA 和 RNA 的最大紫外吸收峰均在 260nm，蛋白质在 280nm 处有最大的吸收峰，盐和小分子则集中在 230nm 处。RNA 在 260nm 与 280nm 处的吸收比值在 2.0 以上，而 DNA 的比值则在 1.9 左右。因此，可以用 260nm 波长进行分光测定 DNA 浓度，OD 值为 1 相当于大约 50 $\mu$ g/ml 双链 DNA。如用 1cm 光径，用 H<sub>2</sub>O 稀释 DNA 样品 N 倍并以 H<sub>2</sub>O 为空白对照，根据此时读出的 OD<sub>260</sub> 值即可计算出样品稀释前的浓度：DNA ( $\mu$ g/ml) = 50 × OD<sub>260</sub> 读数 × N。

DNA 纯品的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 为 1.8 ~ 2.0，故根据 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的值可以估计 DNA 的纯度。若比值较高说明含有 RNA，比值较低说明有残余蛋白质存在。OD<sub>230</sub>/OD<sub>260</sub> 的比值应在 0.4 ~ 0.5 之间，若比值较高说明有残余的盐存在。

## 2. 溴化乙锭法

溴化乙锭 (EB) 是一种嵌入型染料，其上的一个扁平的基团可插入到 DNA 或 RNA 链的堆积碱基之间。溴化乙锭的嵌入基团与碱基的接近使二者紧密结合。DNA 吸收 254nm 的紫外辐射并传递能量给 EB，而 EB 本身在 302nm 和 366nm 处有光吸收。吸收的能量在 590nm 处释放，并表现为橙红色荧光。结合的 EB 的荧光产率远大于游离 EB 的荧光产率。EB 结合量的多少与 DNA 的大小和构型有关，而荧光强度正比于嵌入溴化乙锭的量。对于单一构型的同种 DNA 样品来说，溴化乙锭的嵌入量与样品溶液的 DNA 含量成正比。通过比较样品与系列标准品的荧光强度，可对样品中的 DNA 进行定量。琼脂糖凝胶电泳过程中，蛋白质会滞留在胶孔，而 RNA 泳动速度较 DNA 快位于指示剂溴酚蓝的前方，由此判断 DNA 的纯度。

琼脂糖凝胶电泳是以琼脂糖为支持介质，利用分子筛效应，分离、鉴定和纯化 DNA 片段的技术，常用来分离 100bp ~ 60kb 的核酸分子。DNA 在一定的 pH 条件下带负电荷，因而在电场的作用下可向正极移动。由于所带电荷数、空间结构和分子量不同，在电场中的泳动速度和迁移率不同而被分离开来。经溴化乙锭染色，可确定 DNA 在凝胶中的位置，少至 1 ~ 10ng 的条带即可直接在紫外灯下检出。如有必要，还可以在凝胶中回收 DNA 条带，用于各种克隆操作。DNA 在琼脂糖凝胶中的迁移率受以下因素影响：①DNA 的分子量：线性和超螺旋 DNA 分子电泳迁移率与其分子量的对数值成反比；②琼脂糖凝胶浓度：不同浓度凝胶的孔径大小不一，故一定大小的 DNA 片段在不同浓度的琼脂糖凝胶中的迁移率不同。凝胶浓度大，有利于分子量较小的 DNA 片段的分离，凝胶浓度小，有利于分子量较大的 DNA 片段的分离。为较准确的测出 DNA 分子量并比较，应选择合适浓度的凝胶；③DNA 的形态：分子量相同时，闭环超螺旋 DNA 的迁移率 > 线性 DNA > 开环 DNA；④电场强度：低电压情况下，线性 DNA 分子迁移率与电压成正比，但电压过高会使分辨率下降，故电压一般不超过 5V/cm。

## 【实验步骤】

### 1. 分光光度法 (Nanodrop 法)

(1) 打开电脑，点开桌面图标 ND - 1000V3.1.2，以测量核酸为例，点击 Nucleic Acid。

(2) 提起测量板，拿下保护泡沫板，点上 2 ~ 5 $\mu$ l 纯水 (冲洗润滑作用)，放下测