



普通高等教育“十二五”规划教材



分子生物学实验原理与技术

任林柱 张 英 主编



科学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

分子生物学实验原理与技术

任林柱 张 英 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

全书共列三十个分子生物学实验及其相关附录,内容不仅涵盖了基因克隆、基因表达、核酸及蛋白分子杂交等分子生物学常规实验,也包括基因检测、基因打靶、RNA 干扰、蛋白分析等新型的分子生物学技术。每个实验包括原理介绍、实验操作、常见问题及注意事项。在介绍原理和流程过程中,穿插一些实用的重点提示、试剂作用及可能出现的现象。本书所列的实验流程均是编者们正在使用的、在教学中进行过实践的、切实可行的方法;所列常见问题及注意事项均是多年科研工作及教学实践的总结积累。

本书可用于高等院校生物、医药学科各专业本科生和研究生的分子生物学实验指导教材,同时也可作为从事相关领域的教学、科研人员的一本有益的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学实验原理与技术/保林等. 张英主编. —北京:科学出版社, 2015.6

普通高等教育“十二五”规划教材

ISBN 978-7-122-24926-9

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

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 126923 号

责任编辑:吴美丽/责任校对:郑金红

责任印制:徐晓晨/封面设计:迷底书装

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>

北京教图印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015年5月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2015年5月第一次印刷 印张:13

字数:297 000

定价:39.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《分子生物学实验原理与技术》编写人员名单

主 编：任林柱 （吉林大学）

张 英 （吉林大学）

副主编：王 琳 （吉林大学）

马成有 （吉林大学）

编 者：（按姓氏笔画排序）

于 浩 （吉林大学）

王铁东 （吉林大学）

艾永兴 （吉林大学）

刘松财 （吉林大学）

李占军 （吉林大学）

杨艳玲 （中国农业科学院特产研究所）

张丽颖 （吉林大学）

张明军 （吉林大学）

欧阳红生 （吉林大学）

赵翊臣 （东北林业大学）

郝林琳 （吉林大学）

逢大欣 （吉林大学）

唐小春 （吉林大学）

焦虎平 （吉林大学）

前 言

分子生物学是集生物学、生物化学、细胞生物学、分子遗传学、蛋白质学等学科于一体的新型学科，也是当前生命科学中发展最快、并正与其他学科广泛交叉与渗透的重要前沿学科之一。

分子生物学实验技术已经成为生命科学的基石与主要技术，同时也是其他相关学科深入研究的必备技术。本书参编人员广泛收集资料，结合教学实践进行深入细致的研究，力图在教材的结构形式、内容选择和参考资料的收录等方面做到合理布局。本书内容不仅涵盖了基因克隆、基因表达、核酸及蛋白分子杂交等分子生物学常规实验，也包括基因检测、基因打靶、RNA 干扰、蛋白分析等新型分子生物学技术。目的在于既能加强学生的基本实验操作技能、提高学生分析问题和解决问题的实际工作能力，又能使学生掌握分子生物学实验技术的新动向、新技术。全书共列三十个分子生物学实验及其相关附录，每个实验包括原理介绍、实验操作、常见问题及注意事项。在介绍原理和流程过程中，穿插一些实用的重点提示、试剂作用及可能出现的现象。本书所列的实验流程均是编者们正在使用的、在教学中进行过实践的、切实可行的方法；所列常见问题及注意事项均是多年科研工作及教学实践的总结积累。

本书被列为吉林大学本科“十二五”规划教材和科学出版社普通高等教育“十二五”规划教材。可用于高等院校生物、医药学科各专业本科生和研究生的分子生物学实验指导教材，同时也可作为从事相关领域的教学、科研人员的一本有益的参考书。

本书的编写自始至终得到了吉林大学和科学出版社的大力支持，尤其是吴美丽编辑为此做了大量的工作，使本书得以出版。

本书虽然几易其稿，但由于分子生物学技术日新月异，不妥与遗漏之处在所难免，期盼读者与专家们不吝指正，使其日臻完善，作者不胜感谢。

编 者

2015 年 6 月于长春

目 录

前言	
实验一 DNA 的提取	1
实验二 核酸的定量	8
实验三 真核细胞总 RNA 的提取	11
实验四 PCR 扩增目的基因	17
实验五 RT-PCR	25
实验六 DNA 琼脂糖凝胶电泳	31
实验七 从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段	36
实验八 目的基因片段与载体的连接	39
实验九 用氯化钙法制备新鲜的大肠杆菌感受态细胞	42
实验十 重组 DNA 的转化	44
实验十一 DNA 酶切	48
实验十二 转化克隆的筛选和鉴定	52
实验十三 质粒 DNA 的分离纯化	55
实验十四 含甘油培养物保藏法	65
实验十五 Southern blot 分析	67
实验十六 Northern blot 分析	74
实验十七 实时定量 PCR 技术	78
实验十八 环介导等温扩增技术	87
实验十九 mRNA 差异显示技术	93
实验二十 外源基因在大肠杆菌中的诱导表达	97
实验二十一 SDS-PAGE 检测蛋白质的表达	100
实验二十二 Western blot 检测蛋白质的表达	107
实验二十三 双向电泳技术	114
实验二十四 DNA 甲基化的检测	138
实验二十五 哺乳动物细胞中的 RNA 干扰技术	141
实验二十六 小鼠血浆 microRNA 提取技术	144
实验二十七 DNA 芯片技术检测病原	147
实验二十八 TALEN 载体的设计与构建	149
实验二十九 TALEN 定点制备及筛选突变体	155
实验三十 CRISPR/Cas9 介导的基因组定点编辑技术	157
主要参考文献	163
附录	166

实验一

DNA 的提取

【实验目的】

了解 DNA 提取的基本原理，掌握 DNA 的提取方法。

【实验原理】

遗传信息全部储存在 DNA 一级结构之中，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。

一、分离纯化 DNA 的原则

(1) 保持 DNA 分子一级结构的完整性。温度不要过高；控制一定的 pH 范围 (pH5~9)，保持一定的离子强度，减少物理因素对核酸降解的机械剪切力。

(2) 防止 DNA 的生物降解。细胞内或外来的各种核酸酶能消化核酸链中的磷酸二酯键，破坏核酸一级结构。因此，所用器械和一些试剂需要高温灭菌，提取缓冲液中也需要加核酸酶抑制剂。

二、分离提取核酸的主要步骤

(一) 细胞的破碎

细胞破碎的常用方法有以下几种。

- (1) 高速组织捣碎机捣碎；
- (2) 玻璃匀浆器匀浆；
- (3) 超声波处理法；
- (4) 液氮研磨法；
- (5) 化学处理法 (SDS、Tween-80 等)；
- (6) 生化法 (溶菌酶、纤维素酶等)。

(二) 核蛋白的解聚、变性蛋白的去除

核酸与蛋白质的结合力主要是正负静电吸力 (核酸与碱性蛋白的结合)、氢键和非极性的范德华力。分离核酸最困难的是将与核酸紧密结合的蛋白质分开，同时避免核酸降解。

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，再用酚和氯仿/异戊醇抽提分离蛋白质，得到的 DNA 溶液再经过乙醇沉淀，使 DNA 从溶液中析出。

蛋白酶 K 能在 SDS 和 EDTA-2Na 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-2Na 则抑制细胞中 DNA 酶 (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。

- 常见的 DNA 酶抑制剂如下:
- (1) 金属离子螯合剂。DNA 酶需要金属二价离子 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 的激活, 因此使用金属二价离子螯合剂, 可抑制 DNA 酶活性。如 EDTA-2Na 等。
 - (2) 阴离子型表面活性剂。如 SDS, 该试剂除对核酸酶有抑制作用外, 还能使蛋白质变性, 并与变性蛋白结合成带负电荷的复合物, 该复合物在高盐溶液中易于沉淀。

- 常用 DNA 提取原理如下。
- (1) 加入 10 倍体积的缓冲液: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 0.5% SDS。其中, NaCl 破坏核酸-蛋白质间的静电引力, 使氢键破坏, 核蛋白解聚; EDTA 破坏细胞膜、螯合 Ca^{2+} , 使 DNase 失活; SDS 可破坏细胞膜、抑制核酸酶, 还可使核酸从蛋白质上游离出来。
 - (2) 加入蛋白酶 K。蛋白酶 K 是一种非特异性蛋白酶, 它可将蛋白质消化成氨基酸。一般工作浓度是 50~100 $\mu\text{g/mL}$ 。反应时间大于 5 h, 反应温度 55℃。

(三) 核酸的沉淀

沉淀是浓缩核酸最常用的方法。优点: 改变核酸的溶解缓冲液; 重新调整核酸的浓度; 去除溶液中某些盐离子与杂质。

1. 常见的用于 DNA 沉淀的盐类及浓度 (表 1-1)

表 1-1 DNA 沉淀的盐类及浓度

盐	储存液浓度/(mol/L)	使用浓度/(mol/L)
MgCl ₂	1	0.01
NaAc	3 (pH 5.2)	0.30
KAc	3 (pH 5.2)	0.30
NH ₄ Ac	10	2.50
NaCl	5	0.20
LiCl	8	0.80

注: Ac 代表乙酸根。

2. 有机沉淀剂
- (1) 乙醇。优点: 对盐类沉淀少, 沉淀中所含少量乙醇易挥发除去。缺点: 需要量大 (2~3 倍体积)。
 - (2) 异丙醇。优点: 需体积小, 速度快, 适于浓度低、体积大的 DNA 样品沉淀。一般不需低温长时间放置。缺点: 易使盐类、蔗糖与 DNA 共沉淀; 异丙醇难以挥发除去。
 - (3) 聚乙二醇 (PEG)。优点: 可用不同浓度的 PEG 选择沉淀不同相对分子质量的 DNA 片段。应用 PEG600 进行 DNA 沉淀时, 使用浓度与 DNA 片段的大小成反比。注意: PEG 沉淀一般需要加入 0.5 mol/L 的 NaCl 或 10 mmol/L 的 MgCl₂。
 - (4) 精胺 (spermine)。精胺不是有机溶剂, 但可快速有效沉淀 DNA。原理: 精胺与 DNA 结合后, 使 DNA 在溶液中结构凝缩而发生沉淀, 并可使单核苷酸和蛋白质杂质与

DNA 分开，达到纯化 DNA 的目的。

3. 核酸沉淀的温度和时间

核酸沉淀应该在低温下长时间进行。若溶液中核酸浓度很高，在盐离子存在的情况下，加入异丙醇等后即可看到 DNA 的絮状沉淀。若溶液中核酸浓度很低，则需在 -20℃ 条件下过夜。酵母 tRNA 可有助纳克 (ng) 级的核酸沉淀。大于 10 μg/mL 的核酸，冰浴 10 min 即可有效沉淀。

(四) 核酸的保存

1. DNA

DNA 样品溶于 pH 8.0 的 TE 缓冲液中，4℃ 或 -20℃ 保存，或者加 1 滴氯仿 -70℃ 可保存数年。

2. RNA

(1) RNA 样品溶于含 0.3 mol/L NaAc (pH 5.2) 的 2 倍体积的乙醇中，-70℃ 保存。

(2) 在 RNA 溶液中加入 1 滴氯仿或 0.2 mol/L VRC (氧钒核糖核苷复合物) 冻存于 -70℃，可保存数年。

(五) 常见基因组 DNA 提取方法

1. 基因组 DNA 提取——CTAB 法 (植物 DNA 提取经典方法)

十六烷基三甲基溴化铵 (hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB) 是一种阳离子去污剂，可溶解细胞膜，并与核酸形成复合物。该复合物在高盐溶液中 (>0.7 mol/L NaCl) 是可溶的，通过有机溶剂抽提，去除蛋白质、多糖、酚类等杂质后加入乙醇沉淀即可使核酸分离出来。CTAB 提取缓冲液经典配方及改进配方见表 1-2 和表 1-3。

表 1-2 CTAB 提取缓冲液的经典配方

组分	Tris-HCl (pH 8.0)	EDTA (pH 8.0)	NaCl	CTAB	β-巯基乙醇
终浓度	100 mmol/L	20 mmol/L	0.4 mol/L	2% (W/V)	0.1% (V/V) 用前加入

表 1-3 CTAB 提取缓冲液的改进配方

组分	Tris-HCl (pH 8.0)	EDTA (pH 8.0)	NaCl	CTAB	PVP 40	β-巯基乙醇
终浓度	100 mmol/L	20 mmol/L	0.4 mol/L	3% (W/V)	5% (W/V)	2% (V/V) 用前加入

注：Tris-HCl (pH 8.0) 提供一个缓冲环境，防止核酸被破坏；EDTA 螯合 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} ，抑制 DNase 活性；NaCl 提供一个高盐环境，使 DNA 充分溶解，存在于液相中；CTAB 溶解细胞膜，并结合核酸，使核酸便于分离；β-巯基乙醇是抗氧化剂，有效地防止酚氧化成醌，避免褐变，使酚容易去除。

PVP (聚乙烯吡咯烷酮) 是酚的络合物，能与多酚形成一种不溶的络合物，有效去除多酚，减少 DNA 中酚的污染；同时它也能和多糖结合，有效去除多糖。

CTAB 法实验流程见图 1-1。

2. 基因组 DNA 提取——SDS 法

SDS 是一种阴离子去垢剂，在高温 (55~65℃) 条件下能裂解细胞，使染色体离析，蛋白质变性，释放出核酸；然后，提高盐 (KAc 或 NH_4Ac) 浓度并降低温度 (冰浴)，使蛋白质及多糖杂质沉淀，离心后除去沉淀；上清液中的 DNA 用酚/氯仿抽提，反复抽提后用乙醇沉淀水相中的 DNA。

SDS 法适用于大部分实验材料的基因组 DNA 提取，如动物组织、细胞、全血、细菌、

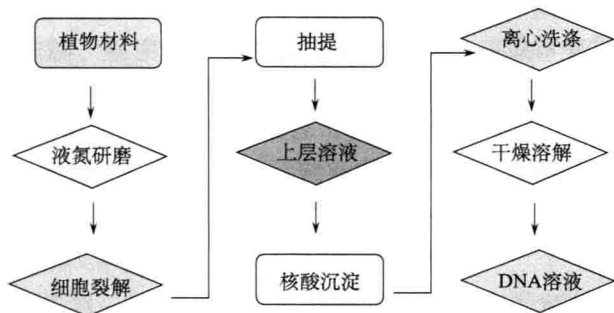


图 1-1 CTAB 法实验流程

酵母等。

SDS 提取缓冲液配方见表 1-4。

表 1-4 SDS 提取缓冲液的配方

组分	Tris-HCl (pH 8.0)	EDTA (pH 8.0)	NaCl	SDS
终浓度	50 mmol/L	20 mmol/L	0.4 mol/L	2%

注：Tris-HCl (pH 8.0) 提供一个缓冲环境，防止核酸被破坏；EDTA 整合 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} ，抑制 DNase 活性；NaCl 提供一个高盐环境，使 DNA 充分溶解，存在于液相中。

SDS 法实验流程见图 1-2（以动物组织为例）。

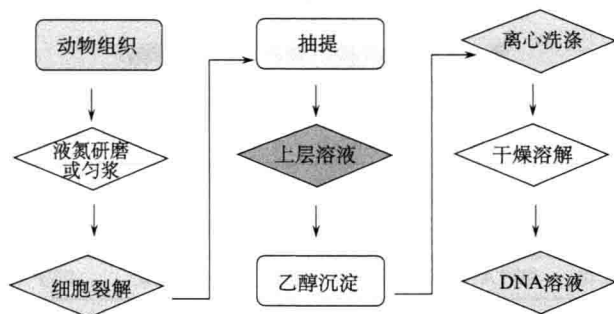


图 1-2 SDS 法实验流程

（六）几种常见细胞或组织 DNA 的提取

1. 细菌基因组 DNA 的制备过程

（1）细胞裂解。0.6 倍体积的异丙醇或 2 倍体积乙醇（可以加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸铵辅助沉淀）。

（2）DNA 纯化。CTAB 除去多糖，酚-氯仿-异戊醇除去蛋白质。

（3）沉淀 DNA。10% SDS 和蛋白酶 K。

2. 哺乳动物细胞基因组 DNA 的抽提过程

（1）组织粉碎。动物组织剪成小块，置液氮中冻结后研磨成细粉末；组织培养的细胞用胰酶消化松散后直接使用。

（2）细胞裂解。0.5% SDS 和 0.1 mg/mL 蛋白酶 K，50℃ 温育。

(3) 沉淀 DNA。用 2 倍体积的无水乙醇或 0.6 倍体积的异丙醇（加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸铵可以辅助沉淀）。

3. 从植物组织中制备 DNA

(1) 组织粉碎。用液氮冷冻后研磨成细粉末。

(2) 细胞裂解。用 2% CTAB/ β -ME（十六烷基三甲基溴化铵/ β -巯基乙醇）或 1% SDS 和蛋白酶 K，65℃ 温育。

(3) 沉淀 DNA：用 0.6 倍体积的异丙醇（-20℃）（可以加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸铵辅助沉淀）。

【实验用品】

1. 材料

动物组织。

2. 器材和仪器

(1) 恒温水浴锅。

(2) 台式离心机。

(3) 紫外分光光度计。

(4) 移液器。

(5) 玻璃匀浆器。

(6) 离心管（灭菌）。

(7) 吸头（灭菌）等。

3. 试剂

(1) 细胞裂解缓冲液。

Tris (pH 8.0) 100 mmol/L

EDTA (pH 8.0) 500 mmol/L

NaCl 20 mmol/L

SDS 10%

胰 RNA 酶 20 μ g/mL

(2) 蛋白酶 K。称取 20 mg 蛋白酶 K 溶于 1 mL 灭菌的双蒸水中，-20℃ 备用。

(3) TE 缓冲液 (pH 8.0)。高压灭菌，室温保存。

(4) 酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）。

(5) 异丙醇。

(6) 预冷无水乙醇。

(7) 70% 乙醇。

(8) 灭菌水。

(9) TIANamp Genomic DNA kit (DP 304) 试剂盒。

【实验内容】

1. 方法一

(1) 取新鲜或冰冻动物组织块 0.1 g (0.5 cm³)，尽量剪碎。置于研钵研碎，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，加入蛋白酶 K (500 μ g/mL)

20 μL ，混匀。在 65 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中水浴 30 min（也可转入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 12~24 h），间歇振荡离心管数次。在台式离心机上，以 12 000 g 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 μL 吸头挑出，晾干，用 200 μL 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) 加等量的酚/氯仿/异戊醇振荡混匀，12 000 g 离心 5 min。

(4) 取上层溶液至另一管，加入等体积的酚/氯仿/异戊醇，振荡混匀，12 000 g 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 乙酸铵和 2 倍体积的无水乙醇，混匀后室温沉淀 2 min，12 000 g 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% 乙醇洗涤沉淀物 1 次，12000 g 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 200 μL TE 重新溶解沉淀物，然后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

(10) 吸取适量样品于紫外分光光度计上检测浓度和纯度。

2. 方法二

使用 TIANamp Genomic DNA kit (DP 304) 试剂盒提取 DNA。

(1) 动物组织（小于 10 mg）用液氮研磨后，加入 200 μL 缓冲液 GA，振荡至彻底悬浮。

(2) 加入 20 μL 蛋白酶 K 溶液（20 mg/mL），混匀，56 $^{\circ}\text{C}$ 放置，直到组织溶解。

(3) 加入 200 μL 缓冲液 GB，充分颠倒混合，70 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min，直到溶液变清亮。

(4) 加入 200 μL 无水乙醇，充分振荡混合 15 s。

(5) 将所有溶液及絮状沉淀加入到吸附柱 CB 3 中（吸附柱放入收集管中），12 000 g 离心 30 s，弃滤液，将吸附柱放回收集管中。

(6) 向吸附柱中加入 500 μL 缓冲液 GD，12 000 g 离心 30 s，弃滤液，将吸附柱放回收集管中。

(7) 向吸附柱中加入 700 μL 漂洗液 PW，12 000 g 离心 30 s，弃滤液，将吸附柱放回收集管中。

(8) 向吸附柱中加入 500 μL 漂洗液 PW，12 000 g 离心 30 s，弃滤液，将吸附柱放回收集管中。

(9) 将吸附柱放回收集管中，12 000 g 离心 2 min；

(10) 将吸附柱放到一个干净离心管中，加入 100 μL TE 缓冲液，室温放置 3 min，12 000 g 离心 2 min，收集到的溶液即为 DNA 溶液。

【注意事项】

(1) 选择的实验材料要新鲜，处理时间不要过长。

(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，可能的原因：DNA 不纯，含杂质较多；加溶解液太少使浓度过大；沉淀物太干燥，也会使溶解变得很困难。

(4) 电泳检测时 DNA 成涂布状，可能的原因：操作不慎；污染核酸酶等。

(5) 分光光度计分析 DNA 的 A_{280}/A_{260} 小于 1.8, 可能的原因: DNA 不纯, 含有蛋白质等杂质。在这种情况下, 应加入 SDS 至终浓度为 0.5%, 并重复步骤抽提 DNA。

(6) 酚/氯仿/异戊醇抽提后, 其上清液太黏不易吸取, 可能的原因: 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。

(7) 抽提细胞 DNA 时酚的作用: 酚使蛋白质变性, 同时抑制了 DNase 的降解作用。用苯酚处理匀浆液时, 由于蛋白质与 DNA 连接键已断, 蛋白质分子表面又含有很多极性基团与苯酚相似相溶。蛋白质分子溶于酚相, 而 DNA 溶于水相。使用酚的优点: ①有效变性蛋白质; ②抑制了 DNase 的降解作用。缺点: ①能溶解 10%~15% 的水, 从而溶解一部分 poly (A) RNA; ②不能完全抑制 RNase 的活性。

(8) 氯仿的作用: 克服酚的缺点; 加速有机相与水相的分层。最后用氯仿抽提去除核酸溶液中的痕量酚 (酚易溶于氯仿中)。

(9) 用酚/氯仿抽提细胞基因组 DNA 时, 通常要在酚-氯仿中加少许异戊醇 (酚: 氯仿: 异戊醇=25: 24: 1)。异戊醇可以降低表面张力, 从而减少蛋白质变性操作过程中产生的气泡, 另外, 异戊醇有助于分相, 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。

(10) 用乙醇沉淀 DNA 时, 通常要在溶液中加入单价的阳离子, 如 NaCl 或 NaAc, 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, 而使之易于聚集沉淀。

(11) 酚通常是透明无色的结晶, 如果酚结晶呈现粉红色或黄色, 表明其中含有酚的氧化产物, 如醌、二酸等。变色的酚不能用于核酸抽提实验, 因为氧化物可破坏核酸的磷酸二酯键。

(12) 酚具有很强的结合水的能力, 因此在使用前需要用 pH 8.0 的 10 mmol/L Tris-HCl 饱和后, 加入抗氧化剂 β -巯基乙醇和 8-羟基喹啉。

(13) 酚腐蚀性很强, 并可引起严重的灼伤, 操作时应戴手套。

(14) 基因组 DNA 提取常见问题分析。①DNA 样品不纯, 抑制后续酶解和 PCR 反应, 可能的原因: DNA 中含有蛋白质、多糖、多酚类物质 (抽提纯化、高盐洗涤); DNA 在溶解前, 有乙醇残留, 乙醇抑制后续酶解反应 (重新沉淀); DNA 中残留有金属离子 (重新 70%乙醇漂洗)。②DNA 降解, 可能的原因: 材料不新鲜或反复冻融; 未很好抑制内源核酸酶的活性; 提取过程操作过于剧烈, DNA 被机械打断; 外源核酸酶污染。③DNA 提取量少, 可能的原因: 实验材料不佳或量少 [选取新鲜 (幼嫩) 材料]; 破壁或裂解不充分 (充分研磨、加入破壁酶、延长裂解时间); 沉淀不完全 (低温、延长沉淀时间)。

实验二

核酸的定量

【实验目的】

了解核酸（DNA 和 RNA）的定量原理，掌握 DNA 定量的不同方法。

【实验原理】

在 DNA 分子操作过程中，DNA 定量是一个非常关键的因素，如要对 DNA 进行酶切、PCR、测序等操作都需要对 DNA 进行定量。常用的 DNA 定量方法有两个：紫外光谱分析法和 EB 荧光分析法。

1. 紫外光谱分析法

核酸、核苷酸及其衍生物都具有共轭双键，具有紫外吸收。DNA（或 RNA）分子在 260 nm 处有特异的紫外吸收峰，且吸收强度与系统中 DNA 或 RNA 的浓度成正比。分子形状双链、单链之间的转换，也会导致吸收水平的改变，但是这种偏差可以用特定的公式来校正。一般在 260 nm 波长下，在 pH 7.0 时每毫升含 1 μg DNA 溶液的光吸收值约为 0.020，每毫升含 1 μg RNA 溶液的光吸收值为 0.022~0.024。在波长 260 nm 紫外光下，1 OD 的光光度相当于双链 DNA 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；单链 DNA 和 RNA 为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；寡核苷酸为 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。需要注意的是 OD 范围应该在 0.10~0.99，否则不符合上述线性关系。

因此通过测定待测浓度 RNA 或 DNA 溶液 260 nm 的光吸收值即可计算出其中核酸的含量。此法操作简便，迅速。若样品内混杂有大量的核苷酸或蛋白质等能吸收紫外光的物质，则测定误差较大，故应设法事先除去。

蛋白质含有芳香氨基酸，因此也能吸收紫外光。通常蛋白质的吸收高峰在 280 nm 处，在 260 nm 处的吸收值仅为核酸的 1/10 或更低，因此核酸样品中蛋白质含量较低时对核酸的紫外测定影响不大。

纯净的 RNA 溶液，其 $A_{260}/A_{280} \geq 2$ ；纯净的 DNA 溶液，其 $A_{260}/A_{280} \geq 1.9$ 。

当样品中蛋白质含量较高时，比值即下降。

若高于 1.8 则可能有 RNA 污染，低于 1.9 则可能有蛋白质污染。

2. EB 荧光分析法

溴化乙锭（ethidium bromide, EB）是一种核酸染料，常在琼脂糖凝胶电泳中用于核酸染色，它能插入 DNA 或 RNA 的碱基对平面之间。在紫外光的照射下，未与核酸结合的溴化乙锭可被激发出橙红色荧光，在与 DNA 或双股 RNA 结合时，荧光强度会增强 20 倍，使得核酸电泳后的胶片可以辨识核酸的相对位置。溴化乙锭是一种强的诱变剂，可能也是一种致癌物或致畸剂。这种方法的优点是简单、经济，结合凝胶电泳还可同时分析出 DNA 的

纯度, 缺点是准确性较低。

【实验用品】

1. 仪器

- (1) 紫外分光光度计。
- (2) 电泳仪。
- (3) 微型水平电泳仪及电泳槽。
- (4) 透射式紫外分析仪等。

2. 试剂

- (1) 已知浓度的标准 DNA 样品。
- (2) EB 储存液 (10 mg/mL)。
- (3) 5×SDS 加样液或电泳加样缓冲液。甘油 50%, SDS 0.5%, EDTA 0.1 mol/L, 溴酚蓝 0.1%。二甲苯青 0.1%。
- (4) 琼脂糖。
- (5) 1×TAE 缓冲液。50×浓缩储存液: Tris 121 g, 冰醋酸 29.6 mL, 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 50 mL, 加 600 mL 蒸馏水, 剧烈搅拌至固体全部溶解, 加蒸馏水到 500 mL。
- (6) dd H₂O。
- (7) 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)。Na₂ EDTA · 2H₂O 18.61 g, ddH₂O 80 mL, 用 NaOH 调 pH 至 8.0 (约需要 NaOH 2 g), 然后定容到 100 mL。

【实验内容】

1. 应用紫外分光光度法定量分析 DNA

- (1) 用 TE 或蒸馏水对待测 DNA 样品进行稀释。
- (2) 用 TE 或蒸馏水作为空白, 在紫外分光光度计上测定 DNA 稀释液的 260 nm、280 nm、310 nm 光密度值 (OD 值)。
- (3) 通过计算确定 DNA 浓度或纯度。

DNA 浓度计算公式

$$\text{单链 DNA(ssDNA) 浓度} = 33 \times (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{280}) \times \text{稀释倍数}$$

$$\text{双链 DNA(dsDNA) 浓度} = 50 \times (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{280}) \times \text{稀释倍数}$$

$$\text{单链 RNA(ssRNA) 浓度} = 40 \times (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{280}) \times \text{稀释倍数}$$

2. 应用溴化乙锭琼脂糖凝胶电泳法进行 DNA 定量分析

- (1) 制备 1% TAE (或 TBE) 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/mL EB)。
- (2) 凝胶凝固后, 对待测样品及标准 DNA 进行梯度稀释。
- (3) 把稀释的 DNA 样品液及标准 DNA (0.1~0.5 μg) 分别与上样缓冲液混匀, 然后点样。
- (4) 以 30 mA 稳流方式或 100 V 稳压方法电泳, 直到溴酚蓝达到胶的 3/4 处。
- (5) 紫外灯下观察, 肉眼可见样品的最高稀释度, 含 DNA 80 ng 左右, 相片上最后可见稀释度含 DNA 20 ng 左右。同时与标准 DNA 对照, 就可确定出待测样品的浓度。

3. 用溴化乙锭斑点定量法对 DNA 浓度进行快速估测

(1) 用 TE 缓冲液配制 DNA 标准液: $0\ \mu\text{g/mL}$ 、 $1\ \mu\text{g/mL}$ 、 $2.5\ \mu\text{g/mL}$ 、 $5\ \mu\text{g/mL}$ 、 $7.5\ \mu\text{g/mL}$ 、 $10\ \mu\text{g/mL}$ 和 $20\ \mu\text{g/mL}$ 。

(2) 吸取标准 DNA 及样品 $4\ \mu\text{L}$, 分别点在塑料膜上, 每个样品一个点, 然后分别向每个样品中加入 $4\ \mu\text{L}\ 1\ \mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭, 混匀。

(3) 将塑料膜置于紫外分析仪上照相, 通过与标准溶液的荧光进行比较, 估测未知 DNA 的浓度。

【注意事项】

(1) 紫外分光光度法测定浓度时, OD_{310} 是背景, 若盐浓度较高, OD_{310} 也高。此外, $230\ \text{nm}$ 光吸收反映了样品被酚或尿素污染的程度。而 $325\ \text{nm}$ 的光吸收则提示有特殊物质污染或比色杯太脏。

(2) $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 对 DNA 而言, 其值为 $1.8\sim 1.9$, 高于 1.9 则可能有 RNA 污染, 低于 1.8 则可能有蛋白质污染。

(3) $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 对 RNA 而言, 其值为 $1.9\sim 2.0$ 。

实验三

真核细胞总 RNA 的提取

【实验目的】

学习并掌握从组织样本、细胞样本或全血样本中提取细胞总 RNA 的方法。

【实验原理】

细胞内大部分 RNA 均与蛋白质结合在一起，并且多以核蛋白的形式存在。因此，分离制备 RNA 时，首先必须使 RNA 与蛋白质解离，并除去蛋白质。由于 RNA 的种类来源和存在形式不同，所用的制备方法各异，一般常用的方法：盐酸胍法、去污剂法和苯酚法。其中，以苯酚法使用较为广泛，产品纯度高，适合小规模生产。经组织匀浆，用苯酚处理并离心后，RNA 溶于上层被酚饱和的水相中，DNA 和蛋白质则留在酚层中，向水层中加入乙醇后，RNA 即以白色絮状沉淀析出。此法能较好地除去 DNA 和蛋白质。

异硫氰酸胍/苯酚法（TRIzol 法）原理

TRIzol 是一种新型总 RNA 抽提试剂，可以直接从细胞或组织中提取总 RNA。试剂中的主要成分为异硫氰酸胍和苯酚，其中异硫氰酸胍可裂解细胞，促使核蛋白体的解离，使 RNA 与蛋白质分离，并将 RNA 释放到溶液中。核酸在中性条件下，因磷酸基解离而带负电荷，这一部分由于水化而溶于水；而在酸性条件下，磷酸基的负电荷消失，水溶性下降。因此，在酸性酚的处理下，DNA 向疏水性的酚层移动，而 RNA 由于有—OH 的存在有亲水性，因此向水层移动。当加入氯仿时，它可抽提酸性的苯酚，而酸性苯酚可促使 RNA 进入水相，离心后可形成水相层和有机层，这样 RNA 与仍留在有机相中的蛋白质和 DNA 便分离开。水相层主要为 RNA，有机层主要为 DNA 和蛋白质。TRIzol 在破碎和溶解细胞时能保持 RNA 的完整性，因此对纯化 DNA 及标准化 RNA 的生产十分有用。

RNase 分布广泛，极易污染样品，而且耐高温、耐酸、耐碱，不宜失活，它在一些极端的条件可以暂时失活，但限制因素去除后又迅速复性。用常规的高温高压蒸气灭菌方法和蛋白质抑制剂都不能使 RNase 完全失活。因此，提取 RNA 时常需要加入 RNA 酶 (RNase) 抑制剂。常用的 RNase 抑制剂如下。

1. 皂土 (bentonite)

作用机制：皂土带负电荷，能吸附 RNase，使其失活。

2. DEPC (二乙基焦碳酸盐)

黏性液体，很强的核酸酶抑制剂。作用机制：与蛋白质中 His 结合使蛋白质变性。

使用注意如下。