

fenzi shengwuxue changyong shiyan caozuo

分子生物学 常用实验操作

fenzi shengwuxue changyong shiyan caozuo

胡维新 主编

湖南科学技术出版社



分子生物学 常用实验操作

fenzi shengwuxue changyong shiyan caozuo

主 编 胡维新

副主编 陈汉春

编 者 (以姓氏笔画为序)

石奕武 朱 敏 刘 静 汤立军

陈汉春 何莉芳 罗志勇 周 钢

罗赛群 胡维新 曾赵军 曾海涛



hunan science & technology press

湖南科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

分子生物学常用实验操作 / 胡维新主编. —长沙:
湖南科学技术出版社, 2012. 1

ISBN 978-7-5357-3707-6

I. ①分… II. ①胡… III. ①分子生物学—实验
IV. ①Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 004542 号

分子生物学常用实验操作

主 编: 胡维新

责任编辑: 陈一心

出版发行: 湖南科学技术出版社

社 址: 长沙市湘雅路 276 号

<http://www.hnstp.com>

邮购联系: 本社直销科 0731-84375808

印 刷: 衡阳博艺印务有限责任公司

(印装质量问题请直接与本厂联系)

厂 址: 湖南省衡阳市黄茶岭光明路 21 号

邮 编: 421008

出版日期: 2012 年 1 月第 1 版第 2 次

开 本: 787mm×1092mm 1/16

印 张: 11.5

字 数: 278000

书 号: ISBN 978-7-5357-3707-6

定 价: 25.00 元

(版权所有·翻印必究)

前 言

所有的科学理论和成果都来自实践观察和实验，生物学或生命科学尤其如此。它是一门从观察和实验获取知识的系统科学，生命科学工作者通过大量的观察和实验来解释各种复杂的生理和病理现象。生命科学研究的主要目的在于获得最新的基础信息，例如纯化和鉴定新发现的生物分子并对其结构与功能进行研究，熟悉和掌握其研究技术便特别重要。分子生物学是生命科学领域的一个重要分支，分子生物学实验技术飞速发展，特别是近 20 年来，分子生物学新技术、新方法不断涌现，为生命科学研究工作者提供了有用的工具。为适应生物学及现代医学高度综合发展的需要，为给生命科学研究人员提供更多的方便，我们在多年科研工作中积累的经典而成熟的分子生物学实验技术的基础上，依据我们的工作经验和体会，并参考大量近期文献而编写出这本实用性的分子生物学常用实验操作。

本书系统介绍了分子生物学的常用技术和方法，实用性、通用性和可行性强。总共编有 34 个实验，从常规的分子生物学实验操作到近期建立的实用性分子生物学操作技术均囊括其中。重点介绍了每个实验的基本原理、材料准备、操作步骤和注意事项等内容，深入浅出，图文并茂。本书不但适合从事生命科学领域学习和研究的本科生、研究生使用，对从事教学和科研的有关教师和科研人员也有参考价值。

由于我们的水平有限，疏漏和不当之处在所难免，衷心希望读者指出书中存在的问题及错误，以便我们再版时修正。

熊德慧、易伟峰同志参与了本书文稿的部分文字编排和图表绘制工作，我们深表谢意。

胡维新 陈汉春

2003 年 1 月

目 录

分子生物学实验室常规设备简介	(1)
实验一 细胞传代培养	(7)
实验二 外周血白细胞中高分子量 DNA 提取	(11)
实验三 微量质粒 DNA 提取与纯化 (碱裂解法)	(15)
实验四 植物 DNA 提取	(19)
实验五 哺乳动物细胞 RNA 分离	(25)
实验六 植物总 RNA 提取	(27)
实验七 核酸浓度测定	(29)
实验八 限制性核酸内切酶消化 DNA	(32)
实验九 琼脂糖凝胶电泳	(37)
实验十 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(41)
实验十一 DNA 片段分离纯化	(46)
实验十二 DNA 分子体外连接	(56)
实验十三 大肠杆菌转化 (CaCl_2 转化方法)	(60)
实验十四 大肠杆菌高效转化方法	(62)
实验十五 重组子筛选和鉴定	(66)
实验十六 Southern 印迹转移	(71)
实验十七 核酸分子杂交	(76)
实验十八 哺乳动物细胞转染	(87)
实验十九 Northern 印迹转移	(92)
实验二十 PCR 和 RT-PCR	(95)
实验二十一 M13 单链 DNA (ssDNA) 制备	(101)
实验二十二 DNA 序列分析	(104)
实验二十三 Western 免疫印迹	(109)
实验二十四 外源基因在大肠杆菌中表达和蛋白质纯化技术	(113)
实验二十五 DNA 定点诱变技术	(123)
实验二十六 非放射性核素 PCR-SSCP 分析	(129)
实验二十七 基因组文库构建	(133)
实验二十八 cDNA 文库构建	(140)
实验二十九 cDNA 文库和基因组文库筛选	(147)
实验三十 报告基因检测	(152)
实验三十一 细胞凋亡检测	(157)

实验三十二 凝胶阻滞分析法..... (163)

实验三十三 DNA 酶 I 足纹分析法 (168)

实验三十四 酵母双杂交系统筛选相互作用蛋白质..... (171)

附录 I 度量衡表..... (174)

附录 II 离心机转速与离心力换算表..... (175)

附录 III 核苷三磷酸物理常数表..... (175)

附录 IV 常用核酸序列长度和相对分子质量表..... (176)

附录 V 氨基酸缩写和相对分子质量表..... (176)

附录 VI 核酸和蛋白质常用换算关系..... (177)

附录 VII 常用放射性核素衰变表..... (177)

附录 VIII 原子序数和相对原子质量表..... (178)

分子生物学实验室常规设备简介

一个标准的分子生物学实验室大致可以分为：实验操作室、细胞培养室、细菌培养室、分析仪器室、离心机室、放射性核素操作室、暗室、消毒室及洗涤室等。以下将就其主要的设备分别给予简单的介绍。

实验室及分析仪器室

(一) 电泳装置

电泳装置是分子生物学实验中应用最频繁的装置之一。通常用于分离、检测或鉴定不同大小及不同性质的核酸片段。它主要由电泳仪和电泳槽两部分组成。电泳仪可分为普通电泳仪和高压电泳仪。普通电泳仪电压范围通常为 0~500 V，用于电压不高的普通电泳。高压电泳仪的电压则最高可达到 2 000 V 以上，在 DNA 序列分析、AFLP 等需要高电压电泳的实验中经常用到。电泳槽可以分为水平式电泳槽和垂直式电泳槽。水平电泳槽一般用于琼脂糖凝胶电泳、纸上电泳、醋酸纤维膜电泳等。用水平电泳槽进行琼脂糖凝胶电泳配合紫外观察仪检测核酸分子，是分子生物学中最常用的实验手段，故建议每个实验室至少配备一大一小的两种水平电泳槽，以方便实验操作。垂直电泳槽则更多地用于聚丙烯酰胺凝胶电泳中，如在 PCR-SSCP、蛋白质电泳、DNA 序列测定和聚丙烯酰胺凝胶回收等试验中常常用到。

(二) PCR 仪

PCR(polymerase chain reaction) 仪又称基因扩增仪、DNA 热循环仪(图 0-1)等。PCR 仪通过在体外模拟 DNA 的复制过程，设定变性、退火、延伸三种不同温度并反复循环，在酶促反应下实现在体外成百万倍地迅速扩增 DNA 片段的目的。PCR 仪的发展大致经历了两个阶段：最开始的 PCR 仪是一种机械式装置，以至于在没有 PCR 仪的条件下也可以做 PCR 实验，前提是拥有三个可以调节温度的加热块。将它们分别调节到所需要的温度后，所需做的就是频繁地按时将反应管在三种温度的加热块中来回移动。公司设计出的 PCR 仪是使用机械手来操作的，但这种产品现在已基本淘汰。目前的产品通常都是带有微电脑控制的全自动仪器，使用时只需配好反应体系和设置好反应条件就可以了。现在的 PCR 仪通常由温度控制模块和芯片控制模块两大部分组成。芯片控制模块的核心就是一个微电脑控制系统，是直接和用户打交道的。用于编辑、设定反应的条件，显示反应情况，调节系统参数等等。而温度控制模块通常根据加热和制冷的原理不同，可以分为以下几类：电阻加热/液体冷却；电



图 0-1 PCR 仪

阻加热/压缩机制冷；电阻加热/半导体制冷。现在的 PCR 仪都附带了一些功能，有一些并不实用，但推荐大家购买带有“热盖”功能的产品。它的原理是在加热块的样品槽上方再设计一个名为“热盖”的加热装置，并且“热盖”的温度始终高于加热块的温度，这样反应管中的反应体系就不会因为下方温度高而挥发，从而使反应体系上免去了加矿物油的麻烦。

（三）紫外可见分光光度计

通常利用核酸分子的紫外吸收特性，用 A_{260} 和 A_{280} 来测量核酸样品的浓度及纯度，以及测量细菌培养液的 A_{600} 吸光度，来检测细菌的生长状况。

（四）真空印迹系统和电转移系统

真空印迹系统是一种利用真空原理将 DNA 片段从凝胶中转移到膜上的仪器。较之传统的印迹方法，具有简单快捷、转移效率高的特点。真空转移装置有一些类似装置，如斑点杂交装置（图 0-2）和狭缝杂交装置，它们也同样利用真空原理来转移 DNA。电转移系统利用了核酸及蛋白质的电荷性，其实质就是一套特殊的电泳装置。它同样用于 DNA 的转移，而且几乎所有的蛋白质转移都是使用电转移装置，例如 Western Blot。

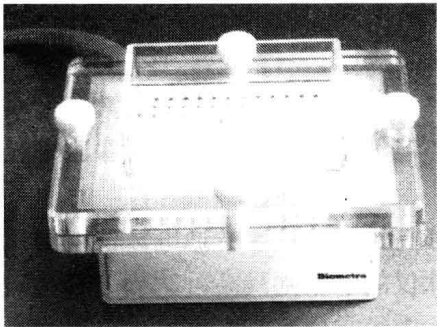


图 0-2 斑点杂交装置

（五）水浴箱

分子生物学实验中有许多实验需要恒定的温度环境，如酶切反应、连接反应、标记反应等。水浴箱就用来提供此反应条件。一般水浴箱有普通水浴箱和恒温水浴箱两种。普通水浴箱价格较低，但温控精度也不高，温差在 1.5°C 左右。适用于对温度精度要求不高的反应。恒温水浴箱温控相对精确，适用于对反应温度要求较高的实验，但价格也较贵。

（六）可调式微量移液器

用于吸取一定体积的液体试剂，通常规格有 $1\ \mu\text{L}$, $20\ \mu\text{L}$, $200\ \mu\text{L}$, $1\ 000\ \mu\text{L}$, $5\ 000\ \mu\text{L}$ 等。

（七）实验室的常规仪器

实验室的常规仪器当然也是必不可少的。如电子天平及托盘天平用于样品的称量、平衡等。pH 计用于液体 pH 值的测定。还有磁力搅拌器，快速振荡混匀仪，多功能脱色摇床等小型设备也经常用到。

离心机室

离心技术是分离不同物理性质的物质的常用手段之一。在分子生物学实验中离心技术运用也相当广泛，包括分离收集细胞、细菌、细胞器、核酸、蛋白质等。离心机常有台式及落地式之分，一般来说，台式离心机（图 0-3）体积较小，可置于工作台上，相对而言离心的量也较小，价格也较低。落地式离心机体积较大，离心的量也较大，对温度的控制也更为

精确，运行更稳定。但制作成本较高价格也较贵。

(一) 台式微量离心机

最大转速为 12 000~15 000 r/min，通常用于小规模富集可快速沉降的物质，如细胞、细胞核、酵母、细菌以及蛋白质等等。

(二) 高速冷冻离心机

最高转速为 20 000~25 000 r/min，用于大规模制备细胞、细菌、大分子细胞器以及免疫沉淀物等。

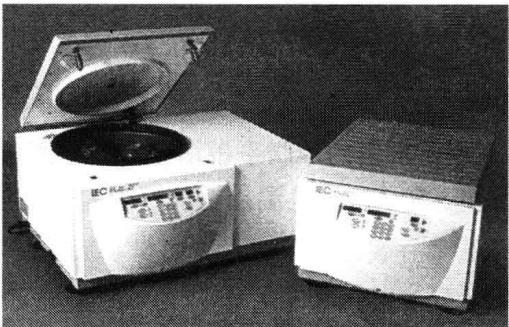


图 0-3 台式离心机

(三) 超速离心机

离心力为 500 000 g ($1g=9.8m/s^2$ ，下同) 以上或转速在 70 000 r/min 以上的离心机。用于分离提纯线粒体、微粒体、染色体、溶酶体、肿瘤病毒等物质。

细胞培养室

(一) 超净工作台

超净工作台是进行细胞培养和细菌培养时必备的无菌操作装置。它的工作原理是利用鼓风机驱动空气通过高效滤净器，去除空气中的尘埃及细菌后，再将无菌的空气送至工作台面，形成无菌的工作环境。

(二) CO₂ 培养箱

用于细胞的培养。大多数的细胞在培养的过程中需要一定浓度的 CO₂ (通常为 5% 左右)，用来维持培养液的酸碱度。所有的 CO₂ 培养箱均要求有高精度的温控装置、CO₂ 浓度控制装置，以及洁净的培养环境。

(三) 液氮罐

液氮罐 (图 0-4) 通常用于细胞、细胞株、菌株、组织的保存。将生长状态良好的细胞与一定比例的甘油混合，置于液氮中保存。在液氮的 -196 ℃ 的超低温下，许多样品可以保存数年甚至更久。但液氮极易挥发，要注意定期给予补充。

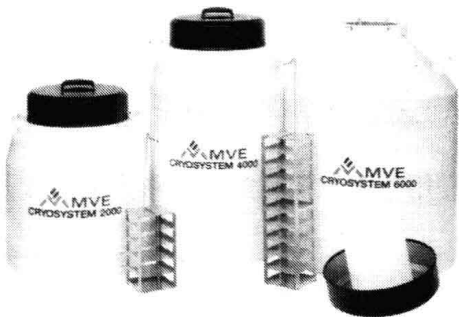


图 0-4 液氮罐

(四) 倒置显微镜

用于直接观察细胞培养瓶、细胞培养板中细胞的形态、数量、生长状况等。高档的倒置显微镜还带有摄像功能，可外接照相机，及时记录下细胞的生长状态。

细菌培养室

(一) 恒温培养箱

用于细菌的琼脂平板培养。由于细菌生长的最佳温度为 37°C ，故最好选择温控范围接近 ($0\sim 50^{\circ}\text{C}$)，且温控精确 (温差不超过 0.5°C) 的产品。

(二) 恒温振荡摇床

用于细菌的液体培养。细菌在分裂增殖的过程中对细菌在容器中的分布有较高的要求。只有将细菌团块均匀地分散到培养液中，才能保证细菌的良好生长。该装置所起的作用就是在提供细菌生长所需的温度同时，通过振荡的方法将细菌均匀地分散到培养液中，以确保细菌的良好生长。

(三) 电热恒温鼓风干燥箱

用于烘烤干燥消毒后的玻璃制品及塑料制品。通常的高压消毒锅消毒后，器物中会残留水分，均需要烤干后再使用。

放射性核素操作室

(一) 液体闪烁计数器

用于测量放射性物质的辐射强度。液体闪烁计数器利用辐射粒子能与某些化合物 (闪烁剂或荧光剂) 相互作用而产生闪烁现象的原理，将产生的光信号通过光电倍增管转换成电信号，并放大加以记录。然后计算电信号的大小来判断辐射的强度。

(二) 杂交炉

杂交炉 (图 0-5) 是专门用于核酸分子杂交实验的一类仪器。它拥有精密的温控系统和机械转动系统，有滚筒式和板式两种。可以使杂交样品在恒定的杂交温度下均匀转动，来提高杂交效率。

(三) 盖革计数器

用于跟踪探测放射性核素的强度及位置。

(四) X 线片曝光夹

用于 X 线的放射自显影。将 X 线片与含有放射性核素的膜或聚丙烯酰胺凝胶一同放入 X 线片曝光夹中曝光。膜或凝胶中的放射性物质发出高能粒子 X 线，轰击 X 线片使其卤化银分解，在 X 线片上相应的位置形成黑色的区带被记录下来。

(五) 有机玻璃防护屏及废物箱

厚度大于 7 mm 的有机玻璃可以有效地阻隔 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 等放射性核素的放射线。故用此

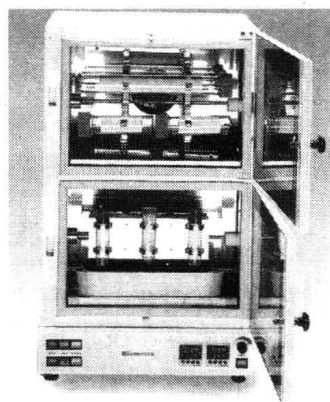


图 0-5 杂交炉

材料做成防护屏以保护操作者。接触过放射性核素的废物和废液，也不可随意丢弃，应放入同样厚度的有机废物箱中衰变 10 个半衰期以上，方可丢弃。

暗 室

(一) 紫外透射仪

用于观察用溴乙锭染色后的核酸分子的情况。溴乙锭可与核酸分子结合，并在紫外线能量的激发下，发出可见的橙色荧光。通常用于琼脂糖凝胶电泳中观测核酸分子的大小及量。

(二) 宝丽来 (Polaroid) 一次性成相系统

简单方便的快速成相系统，具有即拍即现的功能。由美国宝丽来 (Polaroid) 公司专利拥有。

(三) 凝胶成像分析系统

凝胶成像分析系统 (图 0-6) 是一种先进的图像分析系统。由软硬件两部分构成。硬件上拥有先进的 CCD 数码摄像头、视频捕捉卡和一套带有紫外透射仪的暗箱。最先进的是强大的图像分析软件，可以对电泳图像、放射自显影图像、印迹膜、SSCP 图像等进行定性、定量分析以及克隆计数等。

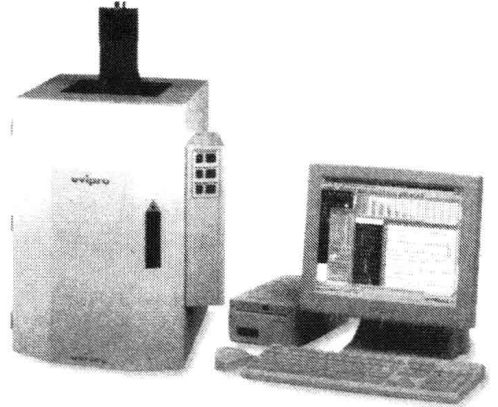


图 0-6 凝胶成像分析系统

其他设备

(一) DNA 合成仪和 DNA 测序仪

DNA 合成仪可以按试验者的要求合成特定的碱基序列，如特异性引物，寡核苷酸探针，适配子接头等；DNA 测序仪是一种半自动或全自动的 DNA 序列测定仪，相对手工测序，它可以一次性测定大批量的样品，大大提高工作效率，同时提高了测序的准确率，增加了片段测定的长度。这两种仪器的出现，都给分子生物学实验带来了突飞猛进的发展。但是价格昂贵是它们最大的弊端。小型的实验室没有必要购买它们。即使你有能力将其购入，你会发现维持其运转不但需要耗费人力而且维持的费用同样不菲。况且现在 DNA 的合成及测序早已商品化，不但费用上划算，而且可以节约人力。

(二) 制冰机

用于制备雪花冰。分子生物学实验中许多核酸与蛋白质的操作需要低温环境以减少核酸酶和蛋白酶的降解。

(三) 蒸馏器或纯水仪

分子生物学实验中对水的要求较高，单蒸水已不能满足使用的要求。于是双蒸水以及三蒸水被大量使用。由于双蒸水或者三蒸水中仍然存在许多无机物杂质，所以在某些实验中如分子克隆、DNA 测序、细胞培养等都需要更高质量的超纯水。但是市面上出售的制备超纯

水的纯水仪（图 0-7）通常是一些国外的大公司的产品，价格不菲，而且需要定期更换树脂柱。在一些经费不足的小型实验室中，可以考虑用国产的离子交换树脂装置对双蒸水进行去离子化处理的方法代替。

（四）高压消毒锅

用于试剂和器械的消毒，提供实验用的无菌的试剂及器械。

（五）超低温冰箱及普通冰箱

超低温冰箱用于存放要求较高的试剂、菌株、组织标本等。普通冰箱则通常用于存放普通生化试剂，酶类试剂等。

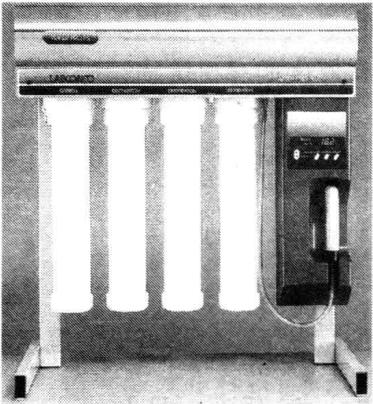


图 0-7 纯水仪

（周钢）

实验一 细胞传代培养

随着现代生命科学技术的发展，组织细胞培养技术已被广泛地用于细胞生物学、细胞遗传学、分子遗传学、分子生物学等领域的研究。细胞培养包括细胞原代培养和细胞传代培养两大类。本实验着重介绍贴壁细胞、悬浮细胞的传代培养。

基本原理

贴壁细胞经培养生长增殖形成单层细胞、悬浮细胞经培养充满培养液或形成细胞团后，需要进行分离培养，这一操作称为传代或再培养。如拖延传代，细胞会因增殖过度，培养基营养缺乏和代谢产物积累而发生中毒。

一、贴壁细胞的传代培养

主要试剂

1. 0.25% 胰蛋白酶
2. Hanks 液
3. 细胞培养液〔常用 RPMI1640, DMEM 等培养液，可加入青霉素至 100 U/mL 和（或）链霉素至 100 U/mL〕
4. 新生小牛血清
5. 75% 酒精

操作步骤

1. 吸除或倒掉瓶内旧培养液，用 2 mL Hanks 液洗 1 遍，吸除或倒入废液缸。
2. 以 25 mL 培养方瓶为例，向瓶内加入约 1 mL 0.25% 胰蛋白酶（以能覆盖瓶底为限）。
3. 37℃ 或室温 25℃ 以上消化 3 min 左右（若室温低于 25℃，消化时间适当延长），将正在消化的贴壁细胞置倒置显微镜下观察，发现胞质回缩，细胞间隙增大，呈针眼状，应立即终止消化（可直接加数滴培养液，终止消化）。
4. 吸除或倒掉消化液，加入含 10% 小牛血清的细胞培养液，依次从培养瓶底部一侧开始到另一侧结束，用吸管将细胞吹打成悬液，吹打时用力不要太猛烈，尽量保持吸管在液体内部吹打，以免形成气泡。
5. 计数板计数后（如非实验用，不计数亦可），把细胞悬液等份分装入数个培养瓶中，每瓶加入 5 mL 新的培养液，轻轻吹打均匀，盖好瓶盖，置二氧化碳培养箱继续培养（图 1-1）。
6. 结果观察：以 HeLa 细胞为例，细胞传代培养后，经过悬浮、贴壁伸长进入潜伏期、对数生长期，再经过繁殖、扩展，2~3 天可长满瓶底。我们可以从以下几点来观察细胞的生长情况。

1) 培养液的观察：肉眼观察新鲜培养液为橘红色，测 pH 值为 7.2 左右，如发现培养液变浅变黄，应考虑培养液中代谢产物（呈酸性）所致，需立即换液。如传代 4 h 左右，肉

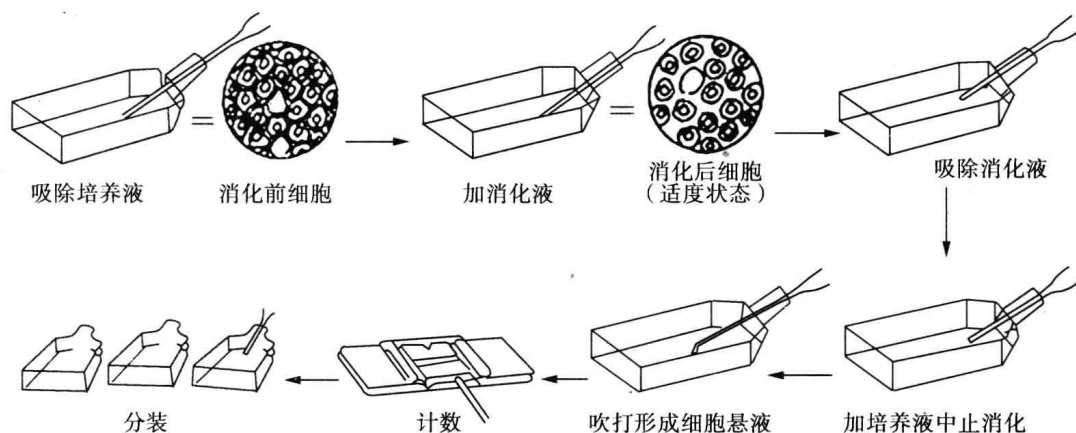


图 1-1 贴壁细胞的消化法传代步骤

眼观察培养液浑浊、暗淡，则应考虑细胞已被污染，应立即终止培养。

2) 倒置显微镜下观察：以 Hela 细胞为例，生长良好的 Hela 细胞，透明度大，折光性强，细胞呈扁平的多角形，胞质近中央处有圆形的细胞核，细胞间紧密联接，呈片状。生长不良的 Hela 细胞，细胞折光性变弱，胞质中出现空泡，细胞间隙加大，失去原有的透明状。如果细胞崩解，漂浮，则应尽快查清细胞死亡的原因。

二、悬浮细胞的传代培养

主要试剂

1. 细胞培养液
2. 新生小牛血清

操作步骤

1. 直接传代

传代前将培养瓶竖直静置约 30 min，让悬浮细胞慢慢沉淀在瓶底后，将上清液吸掉 1/2~2/3，然后用吸管吹打制成细胞悬液，计数板计数（如非实验用，不计数亦可），把细胞悬液等份分装入数个培养瓶中，每瓶加入一定量的含 10% 小牛血清的细胞培养液，轻轻混匀，盖好瓶盖，置二氧化碳培养箱继续培养。

2. 离心后传代

将细胞悬液移入带塞离心管内，800~1 000 r/min，离心 5~8 min，去上清液，加入一定量的含 10% 小牛血清的细胞培养液到离心管中，用吸管吹打成细胞悬液，计数板计数后（如非实验用，不计数亦可），然后分瓶培养。

注意事项

1. 根据实验要求，备齐实验用品，将培养用品放在超净工作台内合适的位置，减少因物品不全、东西摆放零乱、拿取频繁造成的污染机会。实验前要用 75% 的乙醇棉球擦洗超净工作台，然后用紫外线消毒超净工作台 30 min（培养的细胞及培养用液不能用紫外线照射）。

2. 实验操作中物品或细胞被污染，应立即更换，避免交叉污染。多人做实验时，应使用各人的用品，不能共用。加液时，要更换吸管，避免不良反应发生。

3. 把握好传代时机。在细胞汇合 80%~90% 阶段最好，过早传代，细胞产量少；过晚

则会影响细胞状态。

4. 胰酶消化时间要适度。消化过短，细胞不易从瓶壁脱落；而消化过长，细胞会脱落流失。

5. 胰酶消化液浓度要适宜。过浓时消化作用强烈，细胞反应快，所需消化时间短，掌握不好，细胞易流失。另外不同细胞对消化反应的敏感性不一样，因此应根据实验所用细胞特点制定适宜消化措施。

附 1：培养用品（玻璃器皿）的清洗和消毒灭菌

1. 浸泡：因一般新的普通玻璃器皿比较偏碱性，同时有一些灰尘沾在其表面，可以先用自来水初步刷洗后，于 5% 盐酸溶液浸泡过夜，浸泡时要将器皿完全浸泡在水中，如使用过的玻璃器皿应立即浸入清水中，避免因蛋白质或其他物质凝固后沾附于玻璃上，增加工作量。

2. 刷洗：经浸泡过的器皿用中性洗衣粉水刷洗，刷洗时用力要均匀，从器皿的一侧刷向另一侧，注意瓶角及瓶口，然后用流水反复冲洗，直至除尽泡沫为止，晾干。

3. 清洁液浸泡：入清洁液浸泡，浸泡器皿时动作要缓慢，从浸泡缸边缘轻轻放入，一定要让器皿内气泡排出，整个器皿泡在清洁液中，至少 7 h 以上。配制清洁液时要戴好防护镜，耐酸手套，系好耐酸围裙，以防皮肤受伤。配制过程中，要先加热溶解重铬酸钾，待重铬酸钾完全冷却后，然后缓缓加入浓硫酸。由于加入硫酸时产生大量热量，所以加入硫酸时动作要缓慢、均匀。配制容器用耐高温、耐酸碱的优质塑料桶，下面垫有塑料盆。待清洁液完全冷却后可改用泡酸缸或瓷缸存储。

清洁液可根据需要，配制成以下三种不同浓度，一般常用次强液。

	弱液	次强液	强液
重铬酸钾 (g)	100	120	63
浓硫酸 (mL)	100	200	1000
蒸馏水 (mL)	1000	1000	200

4. 冲洗：所浸泡的器皿必须用流水冲洗，如用手工操作，每瓶都得用水灌满，倒掉，一般重复 8~10 次，然后用单蒸馏水冲洗 1~2 遍，再用双蒸水冲洗 1 次，倒立，晾干或烘干备用。

5. 包装：一般用牛皮纸，棉布，铝饭盒，储槽等。对培养瓶，培养皿，吸管，瓶塞等，都应先做局部包装后，再打包（消毒前写好消毒日期，名称）。

6. 器皿消毒灭菌：根据实验要求和器皿类型，采用不同的消毒灭菌方法。可选择物理方法如高压蒸汽，干热，紫外线照射等；化学方法如消毒剂，抗生素等。玻璃器皿、金属器械通常采用高压蒸汽灭菌 [6.8 kg (15 磅), 30 min]，橡胶类 [4.5kg (10 磅), 15 min]；不能耐高温的用品，可用消毒剂浸泡或紫外线照射。

7. 试剂消毒灭菌：平衡盐溶液及一些不会因高温破坏其成分的溶液可采用高压蒸汽灭菌。培养液，胰酶及含有蛋白质，具有生物活性的试剂可采用过滤除菌。

附 2：细胞计数方法和细胞活力鉴定方法

基本原理

细胞计数：通过吸取一定体积的细胞悬液于血细胞计数板上，然后计数血细胞计数板四

角大方格中的细胞数，再通过相应公式换算，计算出培养细胞的密度。

细胞活力鉴定：因只有生长状态好的细胞才有较强的传代的能力，所以在接种前应先检查一下细胞的活力。细胞损伤或死亡时，某些染料可穿透变性的细胞膜，与解体的 DNA 结合，使其着色。而活细胞能阻止这类染料进入细胞内。借此，可以鉴别死细胞与活细胞，并可计算出细胞存活率。

实验用品

- 1. 材料：组织细胞或培养细胞
- 2. 器材：血细胞计数板、盖玻片、巴氏吸管、显微镜
- 3. 试剂：0.25%胰蛋白酶溶液、细胞培养液、新生小牛血清、0.4%的台盼蓝溶液

操作步骤

- 1. 准备计数板：准备好洁净的计数板和盖玻片。
- 2. 制备细胞悬液并染色：用消化法收集贴壁培养细胞或直接收集悬浮培养细胞，轻轻反复吹打使细胞悬浮均匀后，立即吸细胞悬液少许，向另一离心管中滴入细胞悬液 9 滴，再滴入台盼蓝染液一滴，混匀，放置 2~3 min。
- 3. 加悬液：在计数板上盖玻片的一侧加微量细胞悬液，以不溢出盖玻片为度。
- 4. 计数：在低倍显微镜下观察计数板四角大方格中的细胞数，生长状态好的细胞胞体完整，透明不着色，凡着色细胞均为死细胞。细胞压中线时，只计左侧和上方者，不计右侧和下方者。一般细胞密度不低于 10^4 个/mL，若细胞数量不够，可通过将细胞悬液离心后，浓缩悬液，使其充分打匀后再滴片观察（图 1-2）。

- 5. 计算：计算结果代入下式，得出细胞密度。

细胞数/毫升原液 = (4 个大方格细胞数之和/4) $\times 10^4 \times$ 稀释倍数

细胞存活率(%) = 活细胞总数 / (活细胞总数 + 死细胞总数) $\times 100\%$

注意事项

- 1. 消化单层细胞时，一定要制成单个细胞悬液后，再滴片计数。
- 2. 如果连续取样计数，应在取样前，再次混匀细胞悬液避免计数结果上的误差。
- 3. 如在计数时，发现 2 个以上的细胞组成的细胞团，应按单个细胞计数，如细胞团超过 10%，则应延长消化时间，若细胞数少于 200 个/ 10mm^2 或多于 500 个/ 10mm^2 时，说明稀释不均匀，需打匀细胞悬液后再计数。

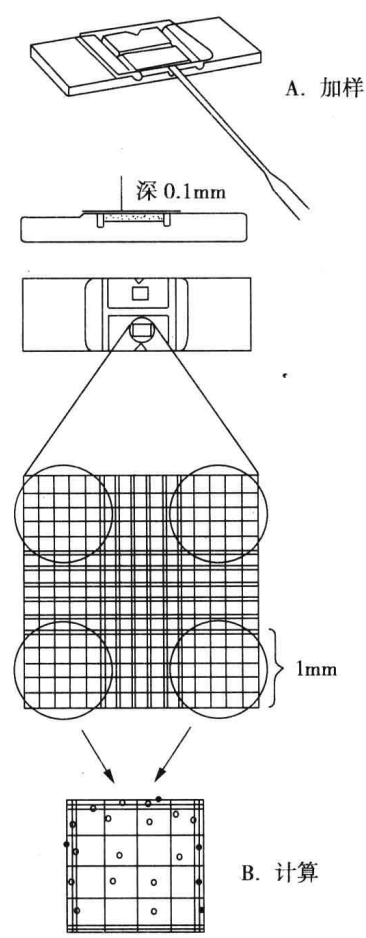


图 1-2 细胞计数方法

(何莉芳 刘静)

实验二 外周血白细胞中高分子量 DNA 提取

基本原理

DNA 及 RNA 的提取是分子生物学中最常用的一类实验。其中 DNA 的提取又以真核细胞基因组 DNA 和细菌质粒 DNA 的提取最具代表性。我们通常根据某种核酸分子的理化特性、分布部位等特点,来制定该种核酸分子的最佳分离方案。所有的方案都应遵循两个总原则,其一:保持核酸一级结构的完整性。其二:去除其他杂质保证核酸足够纯。一般说来提取的过程可分三大步:①破膜,释放出目的核酸分子。②分离,通过酶、有机溶剂、调节 pH 值、离心等手段得到粗制样品。③纯化,进一步去除杂质的污染,纯化目的核酸。

在本节实验中,由于外周血中高分子质量 DNA 主要位于白细胞的细胞核中,并与核蛋白结合而稳定存在,故而可以先通过不完全溶血剂 STMT 破碎红细胞及白细胞的细胞膜,将释放出的白细胞核离心收集。再以等渗的生理盐水洗涤细胞核后,将其重悬于蛋白酶 K 的反应缓冲液 NE 中。然后加入 SDS 使核膜破裂释放出高分子质量的基因组 DNA,并用蛋白酶 K 将核蛋白降解成小片段从核酸上分离下来。这样便初步得到了基因组 DNA。然后通过苯酚、氯仿抽提进一步去除蛋白质,再用乙醇洗涤、沉淀,得到的 DNA 分子便可满足一般的实验要求了。

主要试剂

1. EDTA Na₂、SDS、蛋白酶 K、RNase A、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、MgCl₂、NaAc、8-羟喹啉、Triton X-100、苯酚、氯仿、异戊醇、无水乙醇、蔗糖等
2. STMT: 8% 蔗糖, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 5 mmol/L MgCl₂, 1% Triton X-100
3. NE: 50 mmol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA Na₂ (pH 8.0)
4. TE: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA Na₂ (pH 8.0)

操作步骤

1. 取 0.3 mL 以 EDTA Na₂ (pH 8.0) 抗凝的全血,置于 1.5 mL Eppendorf 离心管中。
全血: 0.5% EDTA Na₂ = 5:1 (V/V)。
2. 加入 1 mL STMT, 充分混匀使其溶血。
3. 12 000 g 离心 1~2 min, 弃上清液。
4. 沉淀部分加 1 mL 0.9% NaCl 洗涤 1 次,以去除胞核外的可溶性杂质,同上离心,弃上清液。如仍有红细胞未溶血,重复步骤 2, 3。
5. 沉淀部分加 460 μ L NE 溶液,用吸管将沉淀充分吹散。
6. 加 30 μ L 10% SDS, 迅速混匀,再加入蛋白酶 K 至终浓度 100 μ g/mL。轻轻混匀后置于 50 $^{\circ}$ C 水浴 1~2 h。
7. 加入 500 μ L 平衡酚,颠倒混匀 1 min, 12 000 g 离心 1 min, 溶液将分为上层水相及下层酚相。小心吸转上层水相至另一个 Eppendorf 离心管内。