

教育部生物医学工程专业教学指导委员会推荐教材

生物医学实验

王进科 编著



科学出版社

教育部生物医学工程专业教学指导委员会推荐教材

生物医学实验

Biomedicine Experiments

王进科 编著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书从系统训练学生从事生物科学与医学工程综合实验研究技能的角度,系统编排了50个实验,构成三个模块,即生物分子实验、细胞组织实验和纳米材料实验。生物分子实验以生物技术中的基因工程为主线,系统编排17个实验,教授学生熟悉和掌握三类生物大分子——DNA、RNA和蛋白质的基本制备和检测分析技术。细胞组织实验以细胞为实验核心,编排22个实验,教授学生熟悉和掌握细胞相关的基本实验技术,包括细胞培养、细胞器的分离和各种细胞组分的制备及检测分析技术,同时涵盖组织水平检测细胞组分的实验技术。纳米材料实验以常见的纳米材料为实验对象,编排11个实验,教授学生熟悉和掌握生物医学工程相关纳米材料学科中常见的纳米材料的制备、表征和生物检测应用技术。这些纳米材料包括铁、金、量子点等无机纳米粒子和脂质体、壳聚糖等有机纳米粒子。

本书编写的实验体系,有助于系统培养学生从事生命科学、纳米材料科学及生物医学工程的实验研究能力。每个实验都按实验目的、实验原理、实验材料、实验步骤、注意事项和示例图片等部分编写,目的是让学生明确每个实验的训练目的,熟悉实验的原理,了解实验所需的各项材料及其功用,掌握成熟细致的实验步骤及实验各环节应注意的事项,以保证实验的质量,同时提供典型实验结果,作为评判实验效果的依据。

本书内容系统丰富,适合作为生命科学及生物医学专业本科生和研究生的实验教材和参考资料;同时也可作为科研人员的实验参考手册。

图书在版编目(CIP)数据

生物医学实验/王进科编著. —北京:科学出版社,2013.6

教育部生物医学工程专业教学指导委员会推荐教材

ISBN 978-7-03-037939-9

I. ①生… II. ①王… III. ①生物工程-医学工程-实验-高等学校-教学参考资料 IV. ①R318-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2013)第134043号

责任编辑:刘 畅 王国栋/责任校对:桂伟利

责任印制:阎 磊/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>

铭浩彩色印装有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013年7月第 一 版 开本:1/16 (787×1092)

2013年7月第一次印刷 印张:27 1/2

字数:712 000

定价:59.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

生物医学工程学是一门交叉学科,是生命科学、医学和工程学等学科的相互交叉渗透。交叉学科的发展特别需要具备交叉学科相关知识的综合型研究人才,因此,生物医学工程领域的研究人员应具有扎实的生命科学、医学与工科的综合性的基础理论知识和实验操作技能。也正是因为是交叉学科,生物医学的研究领域非常宽泛,不同的研究机构所从事的生物医学研究内容可能大相径庭。因此,很难编写一本能涵盖生物医学各领域的通用性实验教材。

尽管如此,生物医学的实验研究仍然具有一定的共性。生物医学工程研究和开发的各类产品主要用于人类医疗、保健及生物检测,最终都要与人的活体接触,与人体中的器官、组织、细胞及分子接触。因此生物医学工程产品研发过程中不但要考察生物材料在活体、组织、细胞、分子水平的生物医学效应,还要考察生物材料在活体、组织、细胞、分子水平的生物相容性和安全性。因此,生物材料和生物体不同结构层次的组分间存在密切的关系。针对这一共性,仍然可以编写一本具有一定通用性的实验教材。

基于这一认识,笔者编写了《生物医学实验》一书。本书从综合训练学生从事生物医学实验研究的角度,系统编排了 50 个实验,构成三个模块,即生物分子实验、细胞组织实验和纳米材料实验。

生物分子实验部分实验内容的设计,以生物技术研究中,利用基因工程的手段制备具有生物医学应用价值的活性蛋白质的实验流程和逻辑,系统编排 17 个渐进式实验,目的是不仅让学生在实验教学期间经历该研究的完整过程,体会到完成一项生物医学研究所需要的实验内容的综合性特征,并且接触和掌握完成这一研究所必需的各种实验技术,特别是与生物医学工程研究关系最密切的三类生物大分子:DNA、RNA 和蛋白质的基本制备和检测分析技术。

细胞组织实验部分实验内容的设计,以细胞相关研究中所涉及的各种主要实验内容为核心,编排 22 个系统化的实验,目的是使学生在在学习期间清楚地了解到,与细胞相关的实验研究中会接触和需要的实验内容,这些实验内容间的关系,以及各种实验为细胞相关的研究能提供的信息;同时,使学生在在学习期间逐渐掌握细胞相关的各种实验技术,包括细胞培养、细胞凋亡及周期分析、细胞器(如线粒体)分离及检测、各种细胞分子组分(如 DNA、RNA、核蛋白、miRNA)的制备及检测分析技术,以及组织水平上细胞内生物分子的检测分析技术。

纳米材料实验部分实验内容的设计,以目前生物医学研究中常见的纳米材料为实验对象,系统编排 11 个实验,目的是让学生在实验教学期间系统掌握常见纳米材料,如铁、金、量子点、脂质体、壳聚糖等无机及有机纳米粒子的基本制备、表征和生物医学应用技术。生物材料种类繁多,纳米材料仅仅是该领域近年来快速发展的典型代表,因此,本书仅以该类生物材料为研究对象,教授学生生物材料的制备、表征和生物医学应用实验技术。

三个部分的实验模块在生物医学工程的研究中其实是密切相关的。之所以花大量的时间系统学习生物分子实验和细胞组织实验,是因为生物学对于生物医学工程学科而言是极其重

要的,生物医学工程所有研究的目的是发展生物医学产品用于人类的保健及诊疗。因此,生物医学产品在生物检测中的应用、生物相容性检测评价及用生物分子进行材料的功能化处理等,都无法避免生物分子和细胞相关的实验;因此,生物分子实验和细胞组织实验是纳米材料实验的基础和支撑。例如,本书纳米材料实验模块中将壳聚糖作为基因转移载体的实验,涉及生物分子实验模块中的RNA及DNA制备及检测技术、细胞组织模块中的细胞培养及组分检测技术、纳米材料模块中的材料制备及表征技术等。

三个部分的实验设计充分反映生命科学及生物医学工程科学研究中的实验内容和实验技术的综合性特征;通过系统化实验项目的设计,让学生看到并学到从事实验研究所需要的具有严密逻辑性的、完整而系统的实验技术知识。通过该门实验课程的实践,目的使学生成为具有系统实验理论知识和实验操作技能,能够独立进行生物医学实验研究的研究性人才。

虽然本书命名为《生物医学实验》,但本书第一篇和第二篇编写的实验体系对培养生命科学专业学生的综合实验技能也是非常有用的。因此,可以独立用于生命科学专业学生的综合实验教学。

本书的最初编写是在2008年完成的,那时我受东南大学生物科学与医学工程学院的委托,筹建了本科实验教学专用实验室“生物技术与材料实验中心”,并为该实验室中生物医学工程专业生物技术方向的学生规划实验教学体系、拟定实验项目和编写实验讲义。本书初稿编写完成后,先后用于2009到2012连续四届学生的实验教学,并在此期间对讲义进行了不断修订和完善,直到现在的出版。因此,在本书即将出版之时,作者首先感谢东南大学生物科学与医学工程学院给予本书编写和教学实践的支持,以及本书最终出版的经费资助。感谢东南大学生物电子学国家重点实验室在本书出版上给予的经费支持。感谢科学出版社的刘畅编辑在本书出版期间给予的中肯建议,使得本书能够及时顺利出版。

最后,作者诚挚地感谢那些不能一一具名的同行,本书引用了他们的研究成果,特别是精美的图片和一些精辟的描述。知识的快速发展和大量累积,让后来的人常常无法精确地知悉和记录为这些知识的发现、发展和描述做出创造性贡献的前辈,期望这些知识的存在和传播能作为对他们智慧的最好的纪念。

王进科

2013年6月

目 录

前言

第一篇 生物分子实验

实验 1	动物组织/细胞总 RNA 的制备及检测	3
实验 2	cDNA 的反转录制备	11
实验 3	全长基因编码序列或片段的 PCR 扩增制备及其半定量 PCR	14
实验 4	GAPDH 基因 PCR 产物的 T 载体克隆	20
实验 5	细菌培养及 CaCl_2 法制备感受态细胞	25
实验 6	CaCl_2 转化法质粒转化	30
实验 7	阳性克隆筛选	33
实验 8	质粒 DNA 的碱裂解法分离纯化	43
实验 9	T 载体克隆的 DNA 序列分析	49
实验 10	质粒 DNA 的酶切及酶切片段的纯化	56
实验 11	GAPDH 基因表达载体构建	60
实验 12	蛋白表达的 SDS-PAGE 检测	67
实验 13	蛋白表达的 Western blot 检测	79
实验 14	蛋白表达的 ELISA 测定	91
实验 15	蛋白表达的 2-DE 检测	99
实验 16	蛋白原核表达产物的纯化	110
实验 17	蛋白原核表达产物的活性分析	115

第二篇 细胞组织实验

实验 18	动物细胞培养	121
实验 19	细胞凋亡及周期的检测	128
实验 20	细胞骨架的观察	138
实验 21	细胞染色体标本制备及吉姆萨染色观察	144
实验 22	细胞染色体荧光原位杂交	151
实验 23	细胞线粒体及线粒体 DNA 的制备及检测	159
实验 24	细胞基因组 DNA 的制备	166
实验 25	细胞基因组 DNA 小卫星多态性的 Southern blot 检测	173
实验 26	细胞基因组 DNA 微卫星多态性的 PCR 检测	181
实验 27	细胞基因组 DNA 中 SNP 的 DNA 微阵列芯片检测	187
实验 28	细胞基因组 DNA 超声剪切及高通量 DNA 测序文库的制备	197

实验 29	细胞中基因表达的定量 PCR 检测	218
实验 30	全基因组基因表达的双色基因芯片分析	233
实验 31	全基因组基因表达的单色基因芯片分析	241
实验 32	转录组 RNA 表达的 RNA-Seq 测定	255
实验 33	microRNA 表达的 miRNA-Seq 检测	269
实验 34	细胞核蛋白的制备及 EMSA 分析	283
实验 35	细胞中 DNA 结合蛋白的 ChIP-Seq 分析	292
实验 36	动物组织切片的制备及 HE 染色	309
实验 37	组织中蛋白表达的免疫组化检测	314
实验 38	组织中核酸分子的原位杂交检测	327
实验 39	组织中核酸分子的原位 PCR 检测	334

第三篇 纳米材料实验

实验 40	纳米金的制备与表征	345
实验 41	纳米金的 DNA 标记及检测	349
实验 42	量子点 (CdSe@SiO ₂) 的制备	357
实验 43	荧光量子点的 DNA 标记及检测	365
实验 44	壳聚糖纳米粒制备及荧光标记	370
实验 45	壳聚糖纳米粒基因转移实验	375
实验 46	脂质体的制备和表征	379
实验 47	载药脂质体的制备和表征	382
实验 48	磁性纳米材料的制备及表征	387
实验 49	磁性纳米材料的细胞氧化应激检测	394
实验 50	磁性纳米材料的近红外荧光标记及活体代谢检测	410
附录	告诫	419

实验 1 动物组织/细胞总 RNA 的制备及检测

【实验目的】

掌握采用 Trizol 抽提法从动物新鲜组织或细胞制备总 RNA 的实验技术、用紫外分光光度法检测 RNA 的纯度及定量方法，以及用琼脂糖电泳法检测 RNA 的完整性及质量。

【实验原理】

1. Trizol 提取 RNA

Trizol 是一种新型的总 RNA 即用型制备试剂，适用于从各种组织或细胞中快速分离总 RNA（表 1-1）。Trizol 试剂是由苯酚和异硫氰酸胍配制而成的单相的快速抽提总 RNA 的试剂，在匀浆和裂解过程中，能在破碎细胞、降解细胞其他成分的同时保持 RNA 的完整性。在氯仿抽提、离心分离后，RNA 处于水相中，将水相转管后用异丙醇沉淀 RNA。

表 1-1 真核细胞中 RNA 构成

种类		简写	含量	亚类（长度）
核糖体 RNA		rRNA	80%~85%	5S（约 120 个碱基）
				18S（1 898~1 976 个碱基）
				28S（3 898~6 333 个碱基）
转运 RNA		tRNA	10%~15%	—
信使 RNA		mRNA	1%~5%	平均长度：1 930 个碱基
mRNA 组成	丰度	基因数量	拷贝数	含量
	高丰度	<10 个基因	10~20 000 个拷贝/细胞	>1%
	中等丰度	~500 个基因	200~400 个拷贝/细胞	0.1%
	低丰度	>10 000 个基因	<20 个拷贝/细胞	0.004%

Trizol 的主要成分是酚，主要作用是裂解细胞，使细胞中的蛋白质、核酸物质解聚得到释放。但酚虽可有效地变性蛋白质，却不能完全抑制 RNA 酶（RNase）活性，因此 Trizol 中还加入了 8-羟基喹啉、异硫氰酸胍、β-巯基乙醇等来抑制内源和外源 RNase。0.1% 的 8-羟基喹啉与氯仿联合使用可增强对 RNase 的抑制；异硫氰酸胍属于解偶剂，是一类强力的蛋白质变性剂，可溶解蛋白质，并使蛋白质二级结构消失，细胞结构降解，核蛋白迅速与核酸分离。β-巯基乙醇主要破坏 RNase 蛋白质中的二硫键。

Trizol 试剂可用于小量样品（50~100 mg 组织、 5×10^6 个细胞），也可用于大量样品（ ≥ 1 g 组织或 $\geq 10^7$ 个细胞），对人、动物、植物和细菌、血液提取都适用，可同时处理大量不同样品。Trizol 可以抽提长达 15 kb 的 RNA，也可以抽提 microRNA 等小 RNA。抽提小 RNA 时宜-70℃沉淀过夜。1 h 内即可完成反应，提取的总 RNA 没有 DNA 和蛋白质污染，可用于 Northern blot、RT-PCR、Dot blot、分离 mRNA、RNase 保护分析、体外翻

译、cDNA 克隆、基因表达芯片分析、高通量测序等。

2. 紫外吸收法测定核酸的浓度及纯度

利用紫外可见分光光度计 (spectrophotometer) 以紫外吸收法可测定核酸的含量及纯度, 其原理是 DNA 和 RNA 都有吸收紫外光的性质, 它们的吸收高峰在 260 nm 波长处。吸收紫外光的性质是嘌呤环和嘧啶环的共轭双键系统所具有的, 所以嘌呤和嘧啶及一切含有它们的物质, 不论是核苷、核苷酸或核酸都有吸收紫外光的特性, 核酸和核苷酸的摩尔消光系数 (或称吸收系数) 用 $\epsilon(\rho)_{260}$ 来表示, $\epsilon(\rho)_{260}$ 为每升溶液中含有 1 mol 核酸磷的吸光度。RNA 的 $\epsilon(\rho)_{260}$ (pH7) 为 7700~7800。RNA 的含磷量约为 9.5%, 因此每毫升溶液含 1 μg RNA 的吸光度相当于 0.022~0.024。小牛胸腺 DNA 钠盐的 $\epsilon(\rho)_{260}$ (pH7) 为 6600, 含磷量为 9.2%, 因此每毫升溶液含 1 μg DNA 钠盐的吸光度为 0.020。

蛋白质由于含有芳香氨基酸, 因此也能吸收紫外光。通常蛋白质的吸收高峰在 280 nm 波长处, 在 260 nm 处的吸收值为核酸的 1/10 或更低, 故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。RNA 在 260 nm 与 280 nm 吸收的比值在 2.0 以上; DNA 的 260 nm 与 280 nm 吸收的比值则在 1.9 左右。当样品中蛋白质含量较高时比值即下降。

采用紫外分光光度法测定核酸含量时, 通常规定: 在 260nm 波长下, 浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 DNA 溶液其光密度为 0.020, 而浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 RNA 溶液其光密度为 0.024。因此, 测定未知浓度的 DNA (RNA) 溶液的光密度 OD_{260} , 即可计算测出其中核酸的含量。根据 260nm 的读数计算样品中的核酸浓度时, OD 值为 1 相当于大约 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 双链 DNA (dsDNA)、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 单链 DNA 或 RNA、大约 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的单链寡核苷酸。

$$\text{RNA 浓度 } (\mu\text{g}/\text{ml}) = \frac{A_{260}}{0.024 \times L} \times \text{稀释倍数}$$

$$\text{DNA 浓度 } (\mu\text{g}/\text{ml}) = \frac{A_{260}}{0.020 \times L} \times \text{稀释倍数}$$

式中, A_{260} 为 260 nm 波长处吸光度; L 为比色池的厚度, 一般为 1 cm 或 0.5 cm; 0.024 为每毫升溶液内含 1 μg RNA 的吸光度; 0.020 为每毫升溶液内含 1 μg DNA 钠盐时的吸光度。

除了用紫外分光光度计进行核酸测定外, 目前已经出现微量核酸分析仪, 如 Thermo Scientific 公司生产的 NanoDrop 8000 分光光度计, 该类仪器可用低至 1~2 μl 的小体积样品测定核酸样品的浓度及纯度, 可测量达 2~3700 ng/ μl 双链 DNA (dsDNA)。其原理与紫外分光光度计相似。

3. 核酸电泳

带电粒子或分子在电场作用下, 向着与其电性相反的电极移动, 称为电泳 (electrophoresis)。利用带电粒子在电场中移动速度不同而达到分离的技术称为电泳技术。在确定的条件下, 带电粒子在单位电场强度作用下, 单位时间内移动的距离为常数, 即迁移率 (mobility), 是该带电粒子的物化特征性常数。不同带电粒子因所带电荷不同, 或虽所带电荷相同但荷质比不同, 在同一电场中电泳, 经一定时间后, 由于移动距离不同而相互分离。分开的距离与外加电场的电压与电泳时间成正比。

完成电泳所需要的设备主要包括电泳槽和电源 (图 1-1)。电泳槽是电泳系统的核心部分, 根据电泳的原理, 电泳支持物都是放在两个缓冲液之间, 电场通过电泳支持物连接两个缓冲液, 不同电泳采用不同的电泳槽, 常用的电泳槽有水平电泳槽和垂直电泳槽。水平电泳槽一般用于核酸电泳, 垂直电泳槽一般用于蛋白电泳 (实验 12 中介绍)。水平电泳槽的形状各异, 但

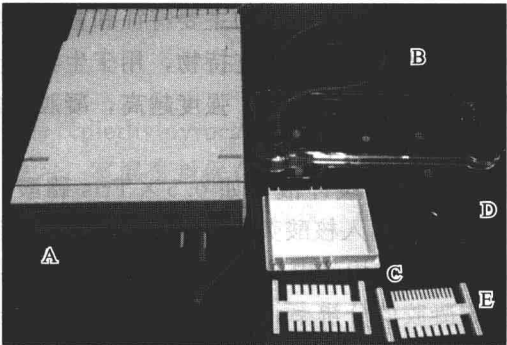


图 1-1 水平电泳设备

A. 电泳仪；B. 电泳槽；C. 夹具；D. 制胶板；E. 梳子

结构大致相同，即含有两个处于同一水平的电极池，一个为阳极池，含有阳极电极丝，一般以红色电极丝固定物为标志；另一个为阴极池，含有阴极电极丝，一般以黑色电极丝固定物为标志。阳极池和阴极池之间有一突起的平台，用于搁置带有电泳介质（一般是凝胶）的制胶槽。制胶模具是电泳槽必备的配套设备，包括各种规格的制胶板、梳子和夹具。制胶模具用于制备具有加样孔的各种规格的凝胶块，以便作为电泳介质。除了电泳槽，电泳设备还必须具备电源，也称为电泳仪，是负责向电泳槽提供电源的设备。电泳仪上有电压、电流及功率指示板、电压及电流调节旋钮或按钮、一对或多对电极插座，用于输出电流，此外还有电流输出按钮（即通电开关）。要使带电的生物大分子在电场中泳动，必须加电场，且电泳的分辨率和电泳速度与电泳时的电参数（电压，电流和功率）密切相关。根据电泳技术的需要选择合适的电源。商业化提供的电泳槽和电泳仪一般成套销售，在设备兼容性方面没有问题。

电泳技术除上述硬件设备外，还必须有电泳介质，即电泳物质在其中泳动的材料。常用的电泳介质有琼脂糖（agarose）和聚丙烯酰胺（polyacrylamide）。前者常用于水平电泳，用于电泳核酸；后者则常用于垂直电泳，用于电泳蛋白质（实验 12 中介绍）。琼脂（agar）是一类从石花菜及其他红藻类植物中提取出来的藻胶。市售的琼脂常呈片状或疏松绳索状，通常作食用胶质、药物包装剂或细菌培养基使用。琼脂糖是琼脂中不带电荷的中性组成成分，是线性的多聚物，基本结构是 1, 3 连接的 β -D-半乳呋喃糖和 1, 4 连接的 3, 6-脱水 α -L-半乳呋喃糖（图 1-2）。琼脂糖在水中加热到 90 $^{\circ}\text{C}$ 以上溶解，温度下降到 35~40 $^{\circ}\text{C}$ 时形成

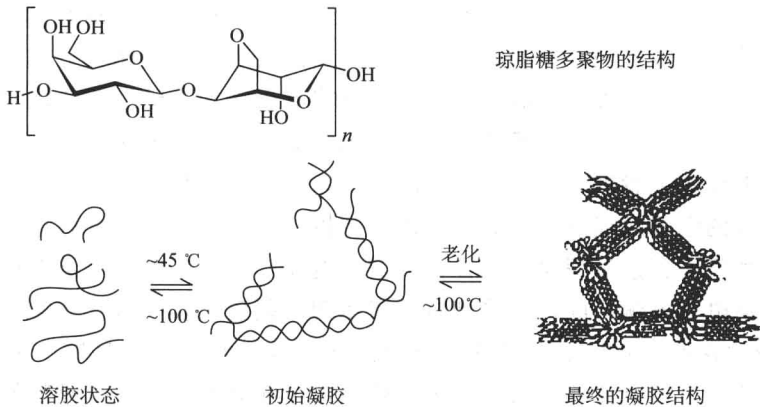


图 1-2 琼脂糖多聚物的结构及琼脂糖的凝胶结构

（图片改编自：<http://students.washington.edu>）

良好的半固体状的凝胶，这是它具有多种用途的主要特征和基础。纯制的琼脂糖常在生物化学实验室中作为电泳、层析等技术中的半固体支持物，用于生物大分子或小分子物质的分离和分析。琼脂糖凝胶性能通常用凝胶强度表示，强度越高，凝胶性能越好。质量较好的琼脂糖强度通常在 1200 g/cm^2 以上（1%胶浓度）。

在电泳制胶中，用终浓度的电泳缓冲液，如 $0.5 \times \text{Tris-硼酸}$ (TBE) 或 $1 \times \text{Tris-乙酸}$ (TAE)，加热融化琼脂糖，降温后加入核酸荧光染料（如溴化乙锭等），再倒入带有梳子的倒胶槽中，凝固后即成为多孔网状结构的电泳介质。凝胶的孔径取决于凝胶的浓度，浓度越大孔径越小。孔径的大小决定凝胶的分辨率，即孔径越大的凝胶分辨率越低，可区分分子质量差异大的核酸分子；而孔径越小则分辨率越高，可区分分子质量差异小的核酸分子。因此电泳大片段核酸分子时，使用低浓度凝胶，如电泳哺乳动物基因组 DNA（一般大于 20 kb ）时，使用 0.5% 左右的凝胶；而电泳小片段核酸分子时，使用较高浓度凝胶，如电泳 PCR 产物（一般数百个碱基对），使用 1.5% 左右的凝胶；电泳分子更小的寡核苷酸（低于 100 bp ）时，可使用大于 2% 的凝胶。

核酸物质，包括 RNA 和 DNA，由于其磷酸骨架带有大量的负电荷而带有负电，因此核酸物质不经处理，加入电场后可始终从负极向正极泳动。用琼脂糖进行核酸物质的水平电泳时，首先组合制胶模具，制备带加样孔的琼脂糖凝胶。然后将带有凝胶的制胶槽放置在电泳槽池间平台上（带有加样孔的一侧朝负极），再向两个电极池加注电泳缓冲液（一般是 TAE 或 TBE 缓冲液），使电泳缓冲液刚好没过凝胶。再将电泳槽的两极接通到电泳仪的正负极上（此时不要打开电泳仪开关，即让电泳槽处于不通电状态），这样即准备好了水平电泳装置。

核酸分子的密度接近电泳缓冲液的密度，因此电泳加样（或称上样、载样）时无法使核酸样品顺利进入加样孔，因此核酸样品上样前需混合一定体积的上样缓冲液（也称载样缓冲液）。上样缓冲液主要包括两种组分：一是甘油或蔗糖等高密度物质，以提高核酸样品的密度，以便上样期间使核酸物质顺利沉入上样孔；二是溴酚蓝或二甲苯青 FF 等电泳指示剂；电泳指示剂本身带负电荷且显示颜色，可在电场中向正极移动，移动的速率与特定大小的核酸片段相似，如以 $0.5 \times \text{TBE}$ 电泳时，溴酚蓝在 0.5%~1.4% 的琼脂糖凝胶中的泳动速率约与 300 bp 的双链线状 DNA 相同，而二甲苯青 FF 的泳动与长 4 kb 的双链线状 DNA 相同。此外，载样缓冲液的颜色有利于上样时观察电泳样品是否顺利沉入上样孔及是否均匀地分散在样品孔中。载样缓冲液一般配成 6 倍浓度，使用时用核酸样品稀释到 1 倍浓度，即 1 体积 6 倍浓度的载样缓冲液与 5 体积核酸样品混合，混匀后即可上样。

将核酸样品与载样缓冲液混匀后，可用移液器将混合液加入已经准备好的水平电泳装置中的凝胶上样孔中，之后盖好电泳槽的上盖，接通电流，即进入电泳状态。此时，可从电泳槽的阳极和阴极电极丝上看到大量细微的气泡出现，并且阴极释放的气泡量接近阳极气泡量的 2 倍。这是由水的电解形成氢气和氧气造成，阴极释放氢气，阳极释放氧气，氢气量是氧气量的 2 倍。若观察不到这种现象，则证明未发生电泳，需检查电极丝是否在导线接触部位断裂或设备是否通电。电泳期间，应看到电泳指示剂的蓝色（溴酚蓝）或深蓝色（二甲苯青 FF）条带向阳极的移动，并且根据其移动位置判断电泳时间是否已足够。电泳结束时，从电泳仪上切断电流，去掉电泳槽上盖，取出凝胶，即可在凝胶成像系统或紫外透射仪上观察核酸电泳的条带、拍照记录或切胶回收核酸分子。

【实验材料】

1. 试剂配制

[1] 0.1%焦碳酸二乙酯 (diethylpyrocarbonate, DEPC) 水: 1 ml DEPC 加入 900 ml 双蒸水, 定容至 1000 ml 混匀, 室温密封保存。

[2] 无 RNase 水: 0.1% DEPC 水, 37 °C 过夜, 高压 20 min, 去除 DEPC。

[3] Trizol 试剂。

[4] 氯仿: 用于提取 RNA 的氯仿为新包装。

[5] 异丙醇: 用于提取 RNA 的异丙醇为新包装。

[6] 75% 的乙醇由 25 ml 0.1% DEPC 水与 75 ml 无水乙醇混匀配制而成, 4 °C 保存。

[7] 5×TBE 缓冲液: 0.45 mol/L Tris-硼酸, 0.01 mol/L EDTA。配制: 54 g Tris, 27 g 硼酸, 20 ml 0.5 mol/L EDTA (pH8.0), 用无 RNase 水溶解并定容至 1000 ml, 室温保存, 临用时用无 RNase 水 10 倍稀释。

[8] 琼脂糖 (agarose)。

[9] 6×凝胶载样缓冲液: 0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青 FF, 40% (W/V) 蔗糖。

[10] PBS (0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液): 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 4.3 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.4 mmol/L KH_2PO_4 。配制 10× 储存液: 称取 80 g NaCl、2 g KCl、11.5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2 g KH_2PO_4 , 溶于 800 ml 蒸馏水中, 用 HCl 调节溶液的 pH 至 7.4, 最后加蒸馏水定容至 1 L 即可。需要注意的是, 通常所说的浓度 0.01 mol/L 指的是缓冲溶液中所有的磷酸根浓度, 而非钠离子或钾离子的浓度, 钠离子和钾离子只是用来调节渗透压的。

2. 器械处理

[1] 玻璃器皿常规洗净后, 在烤箱内 180 °C 干烤 10 h。

[2] 所有塑料器材 (如 Eppendorf 管、Tips 吸头、PCR 薄壁管) 均为新购产品, 使用前用 0.1% DEPC 浸泡 12 h, 高压消毒、烘干。

[3] 研钵处理: 0.4 mol/L NaOH 浸泡过夜, DEPC 水洗涤 3 遍。

【实验步骤】

1. 从动物组织制备总 RNA

[1] 小鼠颈椎脱臼处死。

[2] 迅速分离肝脏组织, 立即置于液氮中速冻, 然后移至 -70 °C 冰箱保存。样品必须经液氮速冻后再保存于 -70 °C 冰箱中。组织不能未经液氮条件下碾磨碎而直接加入裂解液中匀浆, 否则 RNA 很容易降解。

[3] 将 1 g 肝脏组织在液氮预冷的研钵中用研杵研磨, 期间不断加入液氮。直至研磨成粉末状 (无明显可见的颗粒, 如果没有研磨彻底, 会影响 RNA 的收率和质量)。使用液氮碾磨要特别注意在整个碾磨过程中, 样品不得融化, 以防内源 RNase 降解 RNA。

[4] 液氮刚刚挥发完时, 将组织粉末迅速撒入盛有 10 倍组织体积 Trizol 的匀浆器中, 立即匀浆。每 50~100 mg 组织加 1 ml 的 Trizol。

[5] 将匀浆器 (glass-Teflon) 置于冰浴中进行匀浆。直至匀浆液呈无颗粒透明状。

[6] 将匀浆液转移到离心管中, 室温静置 5 min, 使核酸蛋白质复合体完全解离。

[7] 4 °C 12 000 r/min 离心 5 min。

[8] 小心吸取上清液体, 转移到新的离心管中。切勿吸取沉淀, 沉淀中包含有细胞外膜、多糖, 以及高分子质量 DNA。在匀化后和加入氯仿之前, 样品可以在 -70°C 保存至少一个月。注意: RNA 在 Trizol 试剂中不会被 RNase 破坏, 但在氯仿分相后的上清中已经没有了 RNase 的抑制剂, 所以分相后的所有操作要特别小心, 保证使用的离心管和枪头都是无 RNase 的。

[9] 加入 0.2 ml 氯仿, 盖紧盖子, 用力振荡 15 s, 室温下静置 5 min。

[10] 4°C 12 000 r/min 离心 15 min, 将液体分 3 层, 其中上层为含 RNA 的水样层。上层呈无色, 下层呈紫红色, 便于吸取上层水相。

[11] 将上层水相 RNA 小心移入一新的 Eppendorf 管。转移水相时, 确保不要吸入中间层及有机相, 否则会造成蛋白质及苯酚污染。

[12] 水相中加入 0.5 ml 异丙醇, 充分混匀, 于 $15\sim 30^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min。

[13] 4°C 12 000 r/min 离心 15 min。隐约可见白色小丸状沉淀。

[14] 弃上清, 加 1 ml 75% 乙醇, 将 RNA 沉淀弹起, 漂洗, 8000 r/min 离心 5 min, 小心弃上清; 室温静置 $5\sim 15$ min, 使 RNA 沉淀恰好干燥。

[15] 加灭菌的无 RNase 的 0.1% DEPC 水 20 μl , 溶解 RNA 沉淀。若 RNA 沉淀难溶, 可以 $55\sim 60^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min 以完全溶解 RNA, 瞬时离心。取 5 μl 进行鉴定。RNA 样品 -70°C 冻存储备用。

2. 从培养的动物细胞提取总 RNA

[1] 细胞裂解: 取培养好的细胞 ($1\times 10^7\sim 5\times 10^7$), 倒掉培养液, 直接于培养瓶 (50 ml) 中加入 4°C 预冷 PBS 小心冲洗细胞 3 遍, 然后加入 1 ml Trizol 试剂, 用移液器反复抽吸 7~8 次, 至液体澄清且无细胞团块。将悬液移入经 DEPC 水处理过的无 RNase 的 Eppendorf 管内, 颠倒混匀 10 下, 于 $15\sim 30^{\circ}\text{C}$ 下孵育 5 min。

[2] 分相: 加入 0.2 ml 氯仿, 盖紧盖子, 用力振荡 15 s, $15\sim 30^{\circ}\text{C}$ 温育 15 min。 4°C 12 000 r/min 离心 15 min; 将液体分为 3 层, 其中上层为水样 RNA 层, 约占 60% 体积。

注意: RNA 在 Trizol 试剂中不会被 RNase 污染, 但在氯仿分相后的上清中已经没有了 RNase 的抑制剂, 所以分相后的所有操作要特别小心, 保证使用的离心管和枪头都是无 RNase 处理过的。

[3] 沉淀 RNA: 将上层水相 RNA 小心移入一新的 Eppendorf 管, 加入 0.5 ml 异丙醇, 充分混匀, 于 $15\sim 30^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min, 4°C 12 000 r/min 离心 10 min, 隐约可见白色小丸状沉淀。

[4] 洗涤 RNA: 弃上清, 注意防止沉淀丢失, 加 1 ml 无 RNase 的 75% 乙醇混匀, 轻弹管壁使沉淀分散。 4°C 8000 r/min 离心 5 min。小心弃上清, 室温干燥 5 min (勿全干, 否则 RNA 难溶)。

[5] 溶解 RNA: 加灭菌的无 RNase 的 0.1% DEPC 水 20 μl , 溶解 RNA 沉淀。若 RNA 沉淀难溶, 可以 $55\sim 60^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min 以完全溶解 RNA, 瞬时离心。取 5 μl 进行鉴定。RNA 样品 -70°C 冻存储备用。

3. RNA 浓度及纯度检测

[1] 预热紫外分光光度计并调节好各项参数。

[2] 用 1 ml 10 mmol/L Tris (pH7.5) 调零。

[3] 取 RNA 样品 1 μl 加入 1 ml 10 mmol/L Tris (pH7.5) 中, 混匀。

[4] 读取 OD_{260} 、 OD_{280} 值;

[5] 以 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的值判断 RNA 纯度。 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值应在 1.7 以上, 才表明提取

的 RNA 较纯, 没有蛋白质混入。

[6] 根据稀释情况得出实际的 RNA 浓度, 反复操作取平均值。RNA 浓度计算公式为

$$\text{RNA 浓度} = \text{OD}_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{稀释倍数}$$

4. RNA 的完整性检测

[1] 小型水平电泳槽、制胶模具等洗净后依次经 3% 过氧化氢和 0.1% DEPC 水浸泡。

[2] 用无 RNase 水配制及稀释的 0.5×TBE 配制 1.2% 的琼脂糖凝胶: 称取 0.16 g 琼脂糖溶于 20 ml 0.5×TBE 溶液中, 加热完全溶解, 待冷却至 60 ℃ 左右加入 10 mg/ml 溴化乙锭 (EB) 使其终浓度为 0.5 μg/ml, 摇匀, 倒入插好样品梳的水平电泳槽制胶板中, 胶凝固 30 min 后拔出梳子, 将胶板置于电泳槽中, 加入 0.5×TBE 溶液, 使液面高于胶面 1 mm 备用。

[3] 混合 5 μl RNA 与 1 μl 上样缓冲液, 混匀, 点样。

[4] 电泳: 100 V, 电泳 30 min, 用凝胶照相系统观察凝胶。在电泳后能观察到 28S (约 4.5 kb)、18S (约 2.1 kb)、5.8S (5S), 特别是 28S 清晰的带型, 可认为所提取的 RNA 未被降解。用分析软件对 RNA 条带进行密度扫描分析, 完整的 RNA 样品, 28S 与 18S 荧光强度比为 2.7 : 1。

【注意事项】

1. 组织样品的处理

[1] 样品离开活体或者原来的生长环境后, 样品中的内源酶即会开始降解 RNA, 降解速度与内源酶含量及温度有关。一般有两个办法可以彻底抑制内源酶活性: 立即加入裂解液并且彻底而迅速地匀浆; 切成小块后立即投入液氮冷冻。这两个办法都要求操作快速。后者适合所有的样品, 而前者只适合细胞及内源酶含量较低并且较容易匀浆的组织。具体地讲, 植物组织、肝脏、胸腺、胰腺、脾脏、脑、脂肪、肌肉组织等最好都先用液氮冷冻起来, 再往下做。

[2] 确保 RNA 不降解的传统做法是: 在取组织前将含液氮的容器放在手边, 一旦取出所需组织, 立即切割成小块后投入液氮中。抽提前先在研钵中加入适量的液氮, 再将组织从液氮中取出, 迅速放入已加入液氮的研钵中研磨。研磨过程中要及时补充液氮以防止组织融化。待组织彻底磨碎后, 等待剩余液氮恰好挥发完时, 立即将磨碎的组织移入裂解液中快速匀浆。匀浆最好使用电动匀浆器。

2. 防止 RNA 酶污染的措施

[1] DEPC (焦碳酸二乙酯) 为活性很强的剧毒物, 须在通风橱中小心使用。

[2] 煮沸 15 min 或高压灭菌可以消除残存的 DEPC, 否则 DEPC 也能和腺嘌呤作用而破坏 mRNA 活性。

[3] DEPC 能与胺和巯基反应, 因而含 Tris 和 DTT 的试剂不能用 DEPC 处理。

[4] 所有的玻璃器皿均应在使用前于 180 ℃ 的高温下干烤 6 h 或更长时间。

[5] 塑料器皿可用 0.1% DEPC 水浸泡或用氯仿冲洗。注意: 有机玻璃器具因可被氯仿腐蚀, 故不能使用。

[6] 有机玻璃的电泳槽等, 可先用去污剂洗涤, 双蒸水冲洗, 乙醇干燥, 再在 3% H₂O₂ 中室温浸泡 10 min, 然后用 0.1% DEPC 水冲洗, 晾干。

[7] 配制溶液应尽可能用 0.1% DEPC 水, 在 37 ℃ 处理 12 h 以上, 然后用高压灭菌除去残留的 DEPC。不能高压灭菌的试剂, 应当用 DEPC 处理过的无菌双蒸水配制, 然后经 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

[8] 操作人员戴一次性口罩、帽子、手套，实验过程中手套要勤换。

[9] 设置 RNA 操作专用区，所有器械等应为专用。

[10] 用 Trizol 抽提 RNA 时要戴手套和护眼罩。避免接触皮肤和衣服。在化学通风橱完成操作。避免呼吸吸入。如无例外，所有操作应该在 15~30 °C 的条件下完成，试剂也在 15~30 °C 的条件下放置。

3. 常用的 RNA 酶抑制剂

[1] DEPC：是一种强烈但不彻底的 RNA 酶抑制剂。它通过和 RNA 酶的活性基团组氨酸的咪唑环结合使蛋白质变性，从而抑制酶的活性。

[2] 异硫氰酸胍：目前被认为是最有效的 RNA 酶抑制剂，它在裂解组织的同时也使 RNA 酶失活。它既可破坏细胞结构使核酸从核蛋白中解离出来，又对 RNA 酶有强烈的变性作用。

[3] 氧钒核糖核苷复合物：由氧化钒离子和核苷形成的复合物，它和 RNA 酶结合形成过渡态类物质，几乎能完全抑制 RNA 酶的活性。

[4] RNA 酶的蛋白抑制剂 (RNasin)：从大鼠肝或人胎盘中提取得来的酸性糖蛋白。RNasin 是 RNA 酶的一种非竞争性抑制剂，可以和多种 RNA 酶结合，使其失活。

[5] 其他：SDS、尿素、硅藻土等对 RNA 酶也有一定抑制作用。因为 DEPC 不加选择地修饰蛋白质和 RNA，因此在分离和纯化 RNA 过程中不能使用，而且它与一些缓冲液（如 Tris）不能相容。

[6] 在所有 RNA 实验中，最关键的因素是分离得到全长的 RNA。而实验失败的主要原因是 RNase 的污染。

4. 确认 RNA 溶液中有没有残留的 RNA 酶的方法

[1] 按照样品浓度，从 RNA 溶液中吸取两份 1000 ng 的 RNA 加入至 0.5 ml 的离心管中，并且用 pH7.0 的 Tris 缓冲液补充到 10 μ l 的总体积，然后密闭管盖。

[2] 把其中一份放入 70 °C 恒温水浴中，保温 1 h。另一份放置在 -20 °C 冰箱保存 1 h。

[3] 取出两份样本进行电泳。

[4] 电泳完成后，比较两者的电泳条带。

[5] 如果两者的条带一致或者无明显差别，则说明 RNA 溶液中没有残留的 RNase 污染，RNA 的质量很好。相反，如果 70 °C 保温的样本有明显的降解，则说明 RNA 溶液中有 RNase 污染。

5. 紫外吸收法测定核酸含量

[1] 测定 A_{260} 及 A_{280} 数值时，应使 A_{260} 读数为 0.10~0.50。此范围 A_{260} 值与 RNA 浓度间线性关系最好。

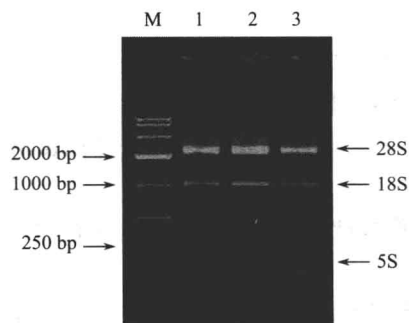


图 1-3 哺乳动物细胞总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

[2] 测 OD 值时，对照及样品稀释液使用 10 mmol/L Tris (pH7.5)。用水作为稀释液将导致比值的降低 ($A_{260}/A_{280} < 1.65$)。

6. RNA 样品的储存

[1] 充分裂解在 Trizol 中的 RNA 样品，加入氯仿之前，可在 -70 °C 保存至少一个月。

[2] RNA 沉淀在 75% 的乙醇中 4 °C 至少可保存一周，-20 °C 可保存一年。

[3] 水溶解的 RNA 沉淀要保存在 -70 °C。

【示例图片】见图 1-3。

实验2 cDNA的反转录制备

【实验目的】

掌握以总 RNA（包含 mRNA）为模板，利用反转录酶制备 cDNA（complementary DNA）的实验操作技术。

【实验原理】

cDNA 第一链的合成依赖于以 RNA 为模板的 DNA 聚合酶，即反转录酶，来催化反应。常用的反转录酶有从禽类成髓细胞瘤病毒纯化到的禽类成髓细胞病毒（AMV）反转录酶和从表达克隆化的 Moloney 鼠白血病病毒反转录酶基因的大肠杆菌中分离到的鼠白血病病毒（MLV）反转录酶。AMV 反转录酶有两个多肽亚基，具有依赖 RNA 或 DNA 的 DNA 合成功能，以及 RNA 酶 H 活性（内切降解 DNA:RNA 杂交体中的 RNA）。MLV 反转录酶只有一个多肽亚基，同时具有依赖 RNA 或 DNA 的 DNA 合成功能，以及弱的 RNA 酶 H 活性。

反转录酶利用 RNA 模板合成 cDNA 时都必须有引物来起始 DNA 的合成（图 2-1）。cDNA 合成最常用的引物是与真核细胞 mRNA 分子 3' 端 poly (A) 结合的 12~18 个核苷酸长的 oligo (dT)。

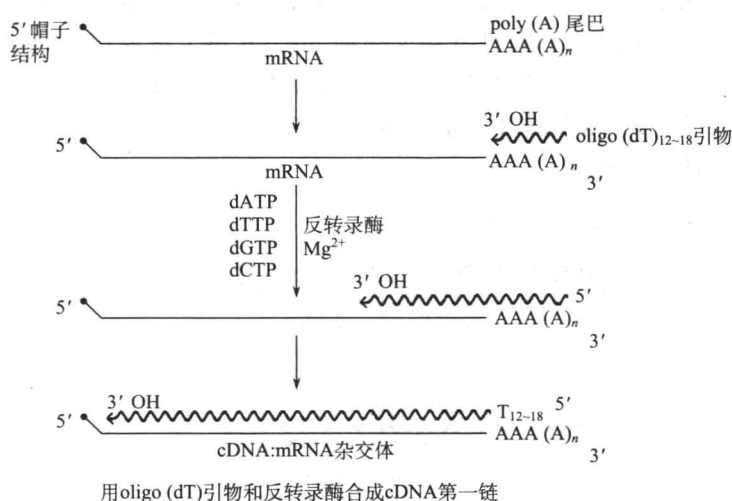


图 2-1 反转录酶利用 RNA 模板合成 cDNA

cDNA 第二链的合成方法主要有自身引导法和置换合成法两种。

cDNA 第一链 3' 端能够形成一短的发夹结构，提供了第二链合成的引物，当第一链合成反应产物的 cDNA-mRNA 杂交体变性后利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段或反转录酶合成 cDNA 第二链，最后用单链特异性的 S1 核酸酶消化单链环，即可形成双链 cDNA，