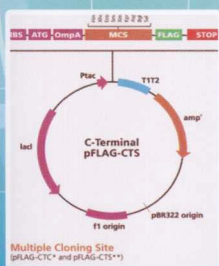
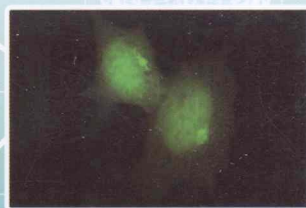
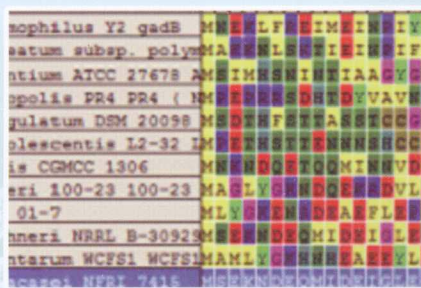


供生物学、生物技术、生物工程等专业使用

主 编 冯乐平 刘志国



科学出版社

全国高等院校医学实验教学规划教材

供生物科学、生物技术、生物工程等专业使用

基因工程实验教程

主 编 冯乐平 刘志国

副主编 闫达中 林 军 乔 伟 甘耀坤

编 委 (按姓氏笔画排序)

王小敏 玉林师范学院

甘耀坤 玉林师范学院

乔 伟 桂林医学院

刘志国 武汉工业大学

李冬娜 海南医学院

张 洁 湖北大学

林 军 桂林医学院

黄东爱 海南医学院

王文锋 新乡医学院

冯乐平 桂林医学院

刘红美 湖北大学

闫达中 武汉工业大学

李惠敏 广西师范大学

张海谋 贵阳医学院

林 谦 玉林师范学院

谭 涛 广西师范大学

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

《基因工程实验教程》是以基因工程实验为主要内容,编写的一本实验教材。全书共包括21个基因工程方面的基本实验,同时也涵盖了与基因工程密切相关的部分细胞培养技术、生物信息学计算机操作技术等内容,书后还附有基因工程常用试剂配制、实验室常用数据和实验室安全的一般常识。书中大部分实验是我们在教学中通过反复摸索后才搬进学生课堂的,也有一部分实验借鉴了已发表的科研论文和互联网的资料以及编写人员自己的相关科研成果。所编写的每个实验都配有基础知识链接和背景资料的介绍,对每个实验的原理和操作步骤以及所出现问题的分析,力求解释详尽,以便于读者能较快地掌握实验原理和操作技巧。

本书充分展示了编写人员在编写过程中各自的教学和科研优势,使本教程能够最大限度满足生物技术专业的本科教学需求。

图书在版编目(CIP)数据

基因工程实验教程 / 冯乐平,刘志国主编. —北京:科学出版社,2013

(全国高等院校医学实验教学规划教材)

ISBN 978-7-03-037306-9

I. ①基… II. ①冯… ②刘… III. ①基因工程-实验-高等学校-教材
IV. Q78-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 076123 号

责任编辑:朱 华 / 责任校对:鲁 素

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

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>

骏杰印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013年6月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2013年6月第一次印刷 印张:11 1/2

字数:270 000

定价:29.80 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

在历史的长河中,人类从来没有比现在更像是这个世界的主宰者,因为基因工程赋予了人类这种改造物种和创造物种的能力。自1973年美国斯坦福大学的Stanley Cohen和Herbert Boyer成功实现了基因重组和蛋白的异源表达,基因工程开始得到蓬勃发展。基因工程(genetic engineering),也称作基因重组,是一项将生物的某个基因通过基因载体运送到另一种生物的活性细胞中,并使之产生新的生物学性状或生产新的物质的遗传学技术。

基因工程的出现标志着任何不同种类生物学基因都能通过基因重组技术连接到一起,也就是说,人类可以根据自己的意愿定向地改造生物的遗传特性,甚至创造新的生命类型。

基因工程是一门实践性较强的科学,其要求从事基因工程操作的专业技术人员不但要有深厚的理论基础,而且具有较强的动手能力。《基因工程实验教程》就是在新形势下为适应高等院校生物技术专业教育改革的发展的需要,坚持以培养有创新精神和动手能力的实用型人才为指导思想,同时结合我们多年教学实践而编写的一本实验教材。

本教材紧密配合生物技术专业授课的理论教学,主要内容包括现代生物技术中所涉及的与基因工程密切相关的实验技术,其中也包含了有关细胞培养和生物信息学方面的主要技术和所涉及的相关问题,在教学过程中力求能够使学生真正掌握基本的生物技术方面的实验技能,提高学生的综合动手能力和实验素质。使学生在生物技术专业的学习过程中动手能力得到全面的加强。

全书主要介绍生物工程技术的相关实验方法与操作。在基因工程部分中,包括有21个基本实验:动物胸腺或脾脏有核细胞基因组DNA的提取、哺乳动物组织mRNA提取、植物组织基因组DNA提取、植物细胞RNA提取、细菌基因组DNA的制备、大肠杆菌质粒DNA的小量提取、核酸的琼脂糖凝胶电泳、DNA片段的回收与纯化、紫外分光光度法测定核酸含量、PCR反应及其产物检测、限制性内切酶切割DNA、DNA的重组和连接、大肠杆菌感受态细胞的制备和重组DNA分子的转化、重组转化子DNA的鉴定(蓝白斑筛选法)、转化克隆的筛选和鉴定、工程菌的诱导和酶活性检测、SDS-PAGE电泳、基因工程综合大实验、植物基因转化与转基因植株鉴定、限制性片段长度多态性(RFLP)分析和免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达。此外,也涵盖了细胞培养技术、生物信息学技术的相关内容。书后还介绍了基因工程常用试剂配制及实验室安全的一般常识。

本书所涉及的实验技术虽然相对宽泛,但具体实验内容却力求尽可能集中。书中大部分实验是我们通过反复摸索后才搬进学生课堂的,也有一部分实验借鉴了兄弟院校生物技术专业为生物技术本科学士生设立的基本实验内容。本书既可作为大专院校生物技术专业学生的教学参考书,也可作为从事生物技术的专业人员和生物专业教师的参考书。本教材的编写得到了武汉工业大学、湖北大学、新乡医学院、海南医学院、广西师范大学、广西师范大学、玉林师范学院和桂林医学院广大同仁们的大力协助。本书还参考了许多科研论文和互联网的资料以及编写人员的相关科研成果。在编写过程中,所有编写人员在编写过程中均表示出极大的热情,倾注了大量的心血,充分发挥各自教学和科研优势,使本教材能最大限度满足教学需求。在编写过程中也得到科学出版社的大力支持。在此,对所有参与本书编写的人员和单位表示衷心的感谢。由于我们的水平有限,书中存在不当之处,请批评指正。

冯乐平

2013年1月

目 录

第一部分 基因工程实验

第一章 组织细胞遗传物质的提取	(1)
实验一 动物胸腺或脾脏有核细胞基因组 DNA 提取	(1)
实验二 哺乳动物组织 mRNA 提取	(3)
实验三 植物组织的基因组 DNA 提取	(6)
实验四 植物细胞 RNA 提取	(8)
实验五 细菌基因组 DNA 的制备	(10)
实验六 大肠杆菌质粒 DNA 的小量提取	(12)
第二章 核酸凝胶电泳分离与纯化方法	(15)
实验七 核酸的琼脂糖凝胶电泳	(15)
实验八 DNA 片段的回收与纯化	(17)
实验九 紫外分光光度法测定核酸含量	(19)
实验十 PCR 反应及其产物检测	(21)
第三章 DNA 的重组连接和克隆的筛选鉴定	(27)
实验十一 限制性内切酶切割 DNA	(27)
实验十二 DNA 的重组和连接	(32)
实验十三 大肠杆菌感受态细胞的制备和重组 DNA 分子的转化	(35)
实验十四 重组转化子 DNA 的鉴定(蓝白斑筛选法)	(39)
实验十五 转化克隆的筛选和鉴定	(41)
实验十六 工程菌的诱导和酶活性检测	(44)
实验十七 SDS-PAGE 电泳	(48)
第四章 综合大实验	(54)
实验十八 基因工程综合大实验	(54)
实验十九 植物基因转化与转基因植株鉴定	(57)
第五章 基因工程相关的其他实验方法	(65)
实验二十 限制性片段长度多态性(RFLP)分析	(65)
实验二十一 免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达	(67)

第二部分 细胞培养技术

第六章 细胞培养的一般操作过程	(74)
实验二十二 实验器械、器皿的清洗、包装和消毒	(74)
实验二十三 应用微孔滤膜过滤除菌	(78)
实验二十四 细胞培养用液的配制	(80)
实验二十五 小鼠肾脏细胞原代培养	(82)
实验二十六 动物细胞的传代培养	(85)

实验二十七	烟草叶片愈伤组织诱导和器官发生	(86)
实验二十八	培养细胞的冻存与复苏	(89)
实验二十九	细胞计数	(91)
实验三十	细胞活力的测定方法	(93)
实验三十一	动物细胞融合	(94)
实验三十二	MTT 法检测细胞相对数和相对活力	(97)
实验三十三	细胞的基因转染实验——脂质体法	(99)

第三部分 生物信息学

第七章	生物信息学实验	(103)
实验三十四	生物信息学数据库	(103)
实验三十五	核酸序列检索	(106)
实验三十六	原核与真核生物核酸序列分析	(109)
实验三十七	核酸序列分析和引物设计	(120)
实验三十八	蛋白质序列分析	(130)

第四部分 附 录

第八章	基因工程常用试剂配制及常用数据	(141)
附录一	基因工程常用试剂配制	(141)
附录二	PCR 引物设计时常用 II 型限制性内切酶的酶切位点保护碱基	(154)
附录三	常用的基因工程型宿主菌的相关信息	(157)
附录四	基因工程常用数据	(159)
附录五	常用化学试剂的一般常识	(167)
附录六	分子生物学综合数据库工具箱	(176)

化乙锭(EB)染色液。

五、实验方法和步骤

1. 将用于抽提 DNA 的动物组织(胸腺或脾脏组织)约 50mg 放入 1.5ml 离心管中,用手术剪剪碎成匀浆。

2. 加入 500 μ l 的 DNA 提取液和 20 μ l 蛋白酶 K,充分混匀后,55~65℃ 水浴 2~3h。

3. 加入 375 μ l 的 6mol/L NaCl 溶液,在漩涡振荡器上振荡 30sec。

4. 12 000g 条件下离心 30min 后,量取上清液,加入等体积异丙醇,-20℃ 静置 40min。

5. 12 000g 离心 15min 后,弃去上清液,70% 乙醇洗涤沉淀 1 次,无水乙醇洗涤沉淀 1 次。

6. 空气中自然干燥沉淀后,加 20 μ l 无菌水溶解 DNA。

7. 取 5 μ l 进行电泳鉴定。

电泳操作步骤如下。

(1) 倒胶:取出有机玻璃内槽及隔板,洗净、晾干。将有机玻璃内槽置于水平位置且在其一端和中间插入隔板(即只制半块胶),为防止漏胶,可用滴管吸取少量的凝胶封好隔板边沿,然后放好样品梳子,并使梳齿高于底板约 1.0mm。

将已配制好的 0.8% 琼脂糖凝胶溶液,连同锥形瓶放进微波炉加热,直至琼脂糖完全熔化,待琼脂糖凝胶液冷却至 60~70℃,小心地倒在有机玻璃板内槽,控制好倒胶速度,使胶液缓慢地展开,直至在整个有机玻璃板表面形成均匀的胶层(胶厚约 4mm),室温下静置 30min 左右,待凝胶完全凝固后(白色透明),取下有机玻璃板内槽两端的隔板,再将内槽放入电泳槽中,加入电极缓冲液,使液面高出胶面 1~2mm。轻轻拔出梳子,在胶板上即形成相互隔开的样品孔。

(2) 上样:取长约 10cm 的透明胶(或封口膜)贴在实验桌上,间隔 2cm,用微量移液器依次点上 1 μ l DNA 上样缓冲液,然后量取 3~5 μ l 样品与其在透明胶上混匀,再小心吸取样品并将其加入到样品孔内。加样时应避免枪头戳破样品孔,同时也要避免碰坏样品槽周围的凝胶面。操作时可用右手持移液器,左手握住右手腕,左肘支撑桌面,防止点样时右手晃动。同时,在样品孔的一端点上 DNA 分子量标准物(DNA Marker)以便于比较待测样品分子量大小。

(3) 电泳:加样完毕,盖上电泳槽盖,将靠近样品一端连接负极,另一端连接正极(注意电极方向,勿接反了),接通电源,调节电压 100V 开始电泳。当溴酚蓝指示剂移动到凝胶长度的 4/5 距离左右,可停止电泳。

(4) 染色:将电泳后的凝胶板小心推至 EB 染色液中,室温下浸泡 15min。

(5) 观察:戴三层一次性手套,用专用铲子从凝胶染液中小心取出凝胶置于托盘上,在凝胶成像仪上将凝胶板推至成像仪内部的黑色玻璃板上,在波长大于 254nm 的紫外透射光下进行观察。DNA 存在位置呈现亮带,电脑拍照,保存图谱。

六、结果分析与讨论

图 1-1 显示所提动物总 DNA 经琼脂糖凝胶电泳检测结果,所提取得到的 DNA 大片段大于 20kb(DNA Marker 为 λ DNA/Eco RI-Hind III 酶切片段,即最大片段为 21.2kb)。

七、注意事项

1. 在基因组 DNA 提取之前,需将动物组织处理成匀浆。

2. 在 DNA 提取过程中,染色体 DNA 会由于机械剪切力发生断裂,产生大小不同的片段,因此在细胞破裂后,应尽量在温和条件下操作。

3. 提取过程中应尽量避免使 DNA 断裂和降解的各种因素,混匀试剂、吸取上清等操作时均应避免动作剧烈,以保证 DNA 的完整性,为后续的实验打下基础。

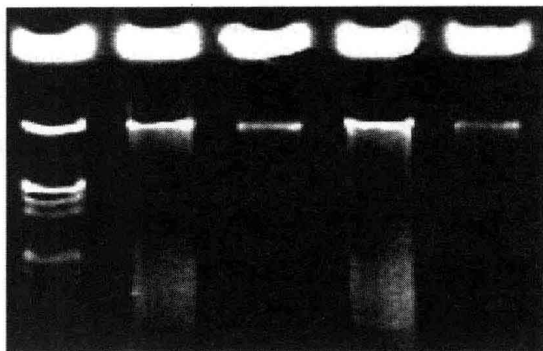


图 1-1 动物基因组 DNA 电泳图

(李惠敏 刘红美 谭 涛 张 洁 冯乐平)

参考文献

Green MR, Sambrook J. 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Protocol 5:247

Malferrari G, Monferini E, DeBlasio P, et al. 2002. High-quality genomic DNA from human whole blood and mononuclear cells J. Bio Techniques, 33:1228 ~ 1230

Rodriguez IR, Chader GJ. 1992. A novel method for the isolation of tissue-specific genes. Nucleic Acids Research, 20(13):3528

Rudbeck L, Dissing J. 1998. Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCRJ. Biotechniques, 25(4):588 ~ 592

参考网站:

www. bioon. com 生物谷

www. biooo. com 中国生物论坛

www. dnalc. org 冷泉港实验室

www. dxy. cn 丁香园

www. ncbi. nlm. nih. gov 美国国立生物信息中心

实验二 哺乳动物组织 mRNA 提取

一、相关知识链接

1961 年 Jacob 和 Jacques Monod 提出了信使 RNA 假说,认为细胞内肯定存在一种特殊的 RNA 是直接从 DNA 上合成的,它们的序列与 DNA 上的基因序列互补,然后被运输到细胞质中为蛋白质合成提供模板。mRNA 的假说很快得到了 Brenner、Jacob 和 Meselson 等科学家的同位素实验确认,从而解决了遗传信息传递的问题。

生物细胞中的 RNA 主要包括信使 RNA (mRNA), 转运 RNA (tRNA) 和核糖体 RNA (rRNA) 以及各种特殊功能的小分子 RNA 等。mRNA 是合成蛋白质的模板, tRNA 是转运氨基酸的运载工具, rRNA 则是蛋白质翻译场所核糖体的重要构成部件, mRNA 的碱基序列, 决定着蛋白质装配时氨基酸的序列, 因此, 研究 RNA 具有重要的生物学意义。

二、实验原理

绝大多数哺乳动物细胞的 mRNA 在其 3' 端均有一个 poly(A) 尾端, 因此可以应用 oligo

(dT)-纤维素亲和层析法从细胞总 RNA 中分离出 mRNA。当总 RNA 流经 oligo(dT)纤维素柱时,在高盐缓冲液作用下,mRNA 被特异的吸附在 oligo(dT)纤维素上,然后逐渐降低盐浓度洗脱,在低盐溶液或蒸馏水中,mRNA 被洗脱下来。经过两次 oligo(dT)纤维素柱,可得到较纯的 mRNA。纯化的 mRNA 在 70% 乙醇中-70℃ 可保存一年以上。

三、实验目的

掌握从哺乳动物组织提取 mRNA 的原理和方法,提取的 mRNA 可以用于 RT-PCR 以及 Northern 杂交分析。

四、实验材料和配方

(一) 实验器材与设备

冷冻台式高速离心机,涡旋振荡机,低温冰箱,冷冻真空干燥器,紫外分光光度计,层析柱,研钵,微量移液器,离心管。

(二) 试剂与配方

1. 无 RNA 酶灭菌水 用将高温烘烤的玻璃瓶(180℃,2h)装蒸馏水,然后加入 0.01% (体积比)的 DEPC(ml/ml),处理过夜后高压灭菌。
2. 75% 乙醇 用 DEPC 处理水配制 75% 乙醇,(用高温灭菌器皿配制),然后装入高温烘烤过的玻璃瓶中,存放于低温冰箱。
3. 1×层析柱加样缓冲液 20mmol/L Tris-HCl(pH7.6),0.5mol/L NaCl,1mmol/L EDTA (pH8.0),0.1% SDS。
4. 洗脱缓冲液 10mmol/L Tris-HCl(pH7.6),1mmol/L EDTA(pH8.0),0.05% SDS。
5. 其他试剂 液氮,Trizol 试剂盒,氯仿,异丙醇,3mol/L NaAc 溶液(pH5.2)。

五、实验方法和步骤

(一) 总 RNA 的提取(Trizol 法)

1. 将组织在液氮中磨成粉末后,将 50~100mg 组织加入 1ml Trizol 液研磨。
(注意:样品总体积不能超过所用 Trizol 体积的 10%)。
2. 研磨液室温放置 5min,然后以每 1ml Trizol 液加入 0.2ml 氯仿的比例加入氯仿,盖紧离心管,用手剧烈摇荡离心管 15sec。
3. 取上层水相于另一离心管中,按每 ml Trizol 液加 0.5ml 异丙醇的比例加入异丙醇,室温放置 10min,12 000g 离心 10min。
4. 弃去上清液,按每 ml Trizol 液加入至少 1ml 75% 乙醇溶液的比例加入 75% 乙醇溶液,涡旋混匀,4℃ 下 7500g 离心 5min。
5. 小心弃去上清液,然后室温或真空干燥 5~10min,注意不要干燥过分,否则会降低 RNA 的溶解度。然后将 RNA 溶于水中,必要时可 55~60℃ 水溶 10min。RNA 可进行 mRNA 分离,或储存于 70% 乙醇溶液并保存于-70℃。

(二) mRNA 提取

1. 用 0.1mol/L NaOH 悬浮 0.5~1.0g oligo(dT)纤维素。
2. 将悬浮液装入灭菌的一次性层析柱中或装入填有经 DEPC 处理,并经高压灭菌的玻

璃棉巴斯德吸管中,柱床体积为 0.5 ~ 1.0ml,用 3 倍柱床体积的灭菌水冲洗柱床。

3. 用 1×柱层析加样缓冲液冲洗柱床,直到流出液的 pH<8.0。

4. 将提取的总 RNA 液于 65℃ 温育 5min 后,迅速冷却至室温,加入等体积 2×柱层析缓冲液后上样,立即用灭菌试管收集洗出液,当所有 RNA 溶液进入柱床后,加入 1 倍柱床体积的 1×层析柱加样溶液。

5. 测定每一管的 OD₂₆₀ 值,当洗脱液中 OD 为 0 时,加入 2 ~ 3 倍柱床体积的灭菌洗脱缓冲液,以 1/3 至 1/2 柱床体积分管收集洗脱液。

6. 于 260nm 测定 OD 值,合并含有 RNA 的洗脱组分。

7. 加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc 溶液(pH5.2),应用 2.5 倍体积的冰冷乙醇,混匀于 -20℃ 放置 30min。

8. 4℃ 下 12 000g 离心 15min,小心弃去上清液,用 70% 乙醇洗涤沉淀,4℃ 下 12 000g 离心 5min。

9. 小心弃去上清液,沉淀空气干燥 10min,或真空干燥 10min。

10. 用少量 DEPC 水溶解 RNA 液,即可用于 cDNA 合成(或保存在 70% 乙醇溶液中并贮存于 -70℃)。

mRNA 在 70% 乙醇中 -70℃ 可保存一年以上。Oligo(dT)纤维素柱用后可用 0.3mol/L NaOH 洗净,然后用层析柱加样缓冲液平衡,并加入 0.02% 叠氮钠(NaN₃)冰箱保存,可重复使用。每次用前用 NaOH 水层析柱加样缓冲液依次淋洗柱床。

六、结果分析与讨论

(略)

七、注意事项

1. 模板 mRNA 的质量直接影响到 cDNA 合成的效率,在构建 cDNA 文库时,必须经纯化步骤制备 mRNA 模板。由于 mRNA 分子的结构特点,容易受 RNA 酶的降解,加之 RNA 酶极为稳定且广泛存在,因此在提取过程中要严格防止 RNA 酶的污染,并设法抑制其活性,这是实验成败的关键。

2. 所有组织中均存在 RNA 酶,试剂和容器等也均可能被污染,因此实验过程中均需戴手套操作并经常更换(使用一次性手套)。所用的玻璃器皿需置于干燥烘箱中 200℃ 烘烤 2h 以上。

3. 凡不能用高温烘烤的材料,如塑料容器等皆可用 0.1% 的焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶液处理,然后剧烈振荡 10min,再煮沸 15min 或高压灭菌,以消除残存的 DEPC,否则 DEPC 也能和腺嘌呤作用而破坏 mRNA 活性。

4. DEPC 是 RNA 酶的化学修饰剂,它和 RNA 酶的活性基团的咪唑环反应而抑制酶活性。DEPC 与氨水溶液混合会产生致癌物,因而使用时需小心。

(刘红美 李惠敏 张洁 冯乐平)

参考文献

Hengerer B. 1993. A rapid procedure for mRNA extraction from a large number of samples. *Biotechniques*, 14(4):522 ~ 524

Karrer EE, Lincoln JE, Hogenhout S, et al. 1995. In situ isolation of mRNA from individual plant cells: Creation of cell-specific cDNA libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:3814 ~ 3818

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis J. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Vol 3. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor

参考网站:

www.bion.com 生物谷

www.biooo.com 中国生物论坛

www.dnalc.org 冷泉港实验室

www.dxy.cn 丁香园

www.ncbi.nlm.nih.gov 美国国立生物信息中心

实验三 植物组织的基因组 DNA 提取

一、相关知识链接

随着人类基因组计划(human genome project, HGP)的完成,科学家逐步进行了一系列经济作物及模式植物的基因组计划的研究,比如:拟南芥基因组计划和水稻、玉米基因组计划等。到目前为止,已经测序完成了拟南芥、黑杨、苜蓿、酿酒葡萄、大豆、玉米、水稻和高粱的全基因序列,西红柿、马铃薯等重要作物的基因组计划也正在进行中。重要经济作物基因组计划的完成,使基因功能的大规模研究成为可能,从而进入了后基因组时代,进一步阐明基因功能对于增加作物产量有着重要的意义。

二、实验原理

关于植物总 DNA 的提取方法,从提取原理上看主要有两种:CTAB 法和 SDS 法。本实验采用的是 CTAB 法。先将新鲜的植物叶片研磨,以机械力破碎细胞壁,然后加入十六烷基三甲基溴化铵(cetyl trimethyl ammonium bromide, CTAB),它是一种阳离子去污剂,可溶解细胞膜,在高盐溶液(0.7mol/L NaCl)中,它能与核酸形成可溶性复合物,当降低盐浓度到一定程度(0.3mol/L)时,可从溶液中沉淀析出。先进行提取,通过离心可将 CTAB 与核酸的复合物同蛋白质和多糖类物质分开,然后将 CTAB 与核酸的复合物沉淀溶解于高盐溶液,再加入乙醇使核酸沉淀,CTAB 能溶解于乙醇。再经酚/氯仿/异戊醇抽提去除蛋白质,得到的 DNA 可用于限制性酶切、PCR 等。CTAB 法提取 DNA 最初用于冷冻干燥的材料,用冷冻干燥材料提取时,使用 1×CTAB 缓冲液,用新鲜材料提取时使用 2×CTAB 缓冲液。

三、实验目的

掌握植物基因组 DNA 提取的原理,掌握 CTAB 法提取植物基因组 DNA 的方法。

四、实验材料和配方

(一) 实验器材与设备

恒温水浴锅,高速台式离心机,高压灭菌锅,珠磨器,普通冰箱,微量移液器(1000μl、100μl),加样枪头(1000μl、100μl)、1.5ml 离心管,1.8ml 离心管(螺旋口),灭菌吸水纸。

(二) 试剂与配方

1. 2×CTAB 提取缓冲液 2% CTAB, 1.4mol/L NaCl, 20mmol/L EDTA, 100mmol/L Tris-

Cl(pH8.0)。

2. TE 溶液 10mmol/L Tris-Cl, 1mmol/L EDTA(pH8.0)。

3. 其他 氯仿/异戊醇(24:1), 酚, 3mol/L NaAc 溶液(pH5.2), β -巯基乙醇。

五、实验方法和步骤

1. 取干净新鲜植物叶片 50mg 放入已灭菌 1.8ml 离心管, 加入适量石英砂和玻璃珠, 珠磨器研磨 1min 至叶片成均匀粉末。

2. 加入 0.8ml 2 $\times$ CTAB(65 $^{\circ}$ C 预热)和 20 μ l 巯基乙醇, 混合均匀后 65 $^{\circ}$ C 水浴 40min。

3. 10 000g, 离心 10min 后, 量取上清, 加入 1/2 体积的酚和 1/2 体积的氯仿/异戊醇, 颠倒混匀。

4. 12 000g, 离心 10min 后, 量取上清, 加入等体积的氯仿/异戊醇, 颠倒混匀。

5. 12 000g 离心 10min 后, 小心量取上清, 加入 1/10 体积的 NaAc, 轻轻转混匀。

6. 再加入等体积的异丙醇, 轻轻上下颠倒离心管 8~10 次使 DNA 沉淀下来(此时可看到白色絮状沉淀), 冰浴 20min, 使 DNA 沉淀充分。

7. 10 000g 离心 5~10min 后, 弃去上清, 用 70% 乙醇洗涤沉淀 1 次。

8. 再用 100% 乙醇洗涤沉淀 1 次, 倒置离心管至管内完全干燥, 加 20 μ l TE 溶液溶解 DNA。

9. 取 5 μ l DNA 溶液进行电泳检测, 其余于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

六、结果分析与讨论

1. 图 1-2 为 CTAB 法提取的植物基因组 DNA, 琼脂糖凝胶电泳检测结果显示所提取得到的总 DNA 大小在 20kb 左右, 由于没有使用 RNase 酶消化, DNA 条带出现拖尾现象。高质量的基因组 DNA 电泳条带应该是单一且无拖尾现象。

2. DNA 浓度及纯度的检测 $A_{260} = 1$ 时, DNA 浓度约为 50 μ g/ml, 较纯的双链 DNA, 其 A_{260}/A_{280} 约为 1.8。

3. 若提取的 DNA 样品纯度较低, 往往会影响后续的酶切消化或者 PCR 反应。

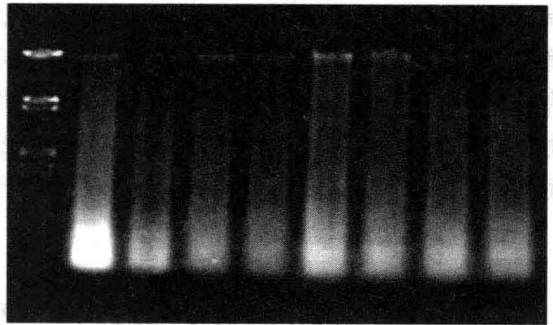


图 1-2 植物基因组 DNA 电泳图谱

七、注意事项

1. 在使用配制好的酚/氯仿/异戊醇时, 应注意吸取下层有机层, 而在用酚/氯仿/异戊醇抽提 DNA 后, 不要吸取中间层, 该层为变性的蛋白质。

2. 在提取过程中为保证植物 DNA 的完整性, 要注意防止和抑制 DNase 对 DNA 的降解以及尽量减少对溶液中 DNA 的机械剪切破坏作用。

3. 不同组织因其细胞结构和所含成分不同, 分离 DNA 的方法略有不同。通常选择幼嫩的植物叶片用于 DNA 提取材料, 而对于使用富含多糖和酚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, 以避免这些物质对后续的酶切、PCR 反应等的抑制作用。

4. CTAB 溶液在低于 15℃ 时会形成沉淀析出,因此使用前需预热且离心温度不要低于 15℃。

(李惠敏 谭 涛 王小敏 冯乐平)

参 考 文 献

Hengerer B. 1993. A rapid procedure for mRNA extraction from a large number of samples. *Biotechniques*, 14(4): 522 ~ 524

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis J. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Laboratory Press

参考网站:

www. bioon. com 生物谷

www. biooo. com 中国生物论坛

www. dnalc. org 冷泉港实验室

www. dxy. cn 丁香园

www. ncbi. nlm. nih. gov 美国国立生物信息中心

实验四 植物细胞 RNA 提取

一、相关知识链接

植物细胞内 RNA 根据其所存在部位,分为细胞质 RNA、细胞核 RNA 和细胞器 RNA。植物细胞 RNA 提取主要是防止 RNA 酶的降解作用。RNA 酶是一类水解核糖核酸的内切酶,它与一般作用于核酸的酶类有着显著的不同, RNA 酶生物活性十分稳定,耐热、耐酸、耐碱,作用时不需要任何辅助因子,而且存在非常广泛,除细胞内含有丰富的 RNA 酶外,在环境中,如各种器皿、试剂、人的皮肤、汗液、甚至灰尘中都有 RNA 酶的存在。因此, RNA 酶的降解作用是 RNA 提取中至关重要的问题。提取过程中有效抑制内源 RNA 酶活性的做法是将蛋白质变性剂,如使用酚、氯仿、SDS、十二烷基肌氨酸钠(dodecyl sarcosine sodium)、异硫氰酸胍(different guanidine thiocyanate)等联合使用,效果比较理想。

二、实验原理

植物总 DNA 的抽提方法有多种,不同的植物都有其最合适的抽提方法。但各种方法的原理都一样,那就是先用机械的方法使组织和细胞破碎,然后加入十二烷基肌氨酸钠、CTAB、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)等离子型表面活性剂,溶解细胞膜和核膜蛋白,使细胞膜和核膜破裂,让进入细胞核内的表面活性剂解聚核中的核蛋白(并与蛋白质形成混合物);再加入酚和氯仿等表面活性剂,使蛋白变性,经离心除去植物的组织和变性蛋白;上清液中加入无水乙醇使 DNA 沉淀;沉淀 DNA 溶于 TE 溶液中, RNA 用 RNase A 消化后,即得植物总 DNA 溶液。

本实验采用异硫氰酸胍法:异硫氰酸根及胍离子都是很强的蛋白质变性剂,异硫氰酸胍与十二烷基肌氨酸钠合用可使核蛋白体迅速解体;与还原剂 β -巯基乙醇合用使 RNase 活力十分低下,因而是一种常用试剂。做法是将异硫氰酸胍、 β -巯基乙醇、十二烷基肌氨酸钠三者合用,强有力抑制 RNA 降解,增加了核蛋白体的解离,最后将大量的 RNA 释放到溶液中,然后用酚进行抽提,既可保证 RNA 稳定又可抑制 DNA 解离,使 DNA 与蛋白质一起沉淀, RNA 被抽提进入水相,然后用异丙醇沉淀 RNA。

三、实验目的

掌握植物 RNA 的制备原理,学习异硫氰酸胍法制备植物总 RNA 的方法,提取的 RNA 可用于 RT-PCR。

四、实验材料和配方

(一) 实验器材与设备

普通冰箱,烘箱,高速冷冻离心机,制冰机,液氮罐,高压灭菌锅,紫外分析透射仪,电泳系统,凝胶成像系统,水浴锅,微量移液器,移液器,各种离心管架各一个,研钵一套,纱布,50ml 离心管,玻璃滴管,1.5ml 离心管,各种加样枪头。

(二) 试剂与配方

1. 异硫氰酸胍溶液 含 4mol/L 异硫氰酸胍,25mmol/L 枸橼酸钠 (pH7.0),0.5% 十二烷基肌氨酸钠,0.1mol/L β -巯基乙醇。

2. 其他试剂 DEPC 水饱和酚 (pH8.0),2M NaAc,氯仿/异戊醇 (49:1),异丙醇,70% 乙醇溶液。

五、实验方法和步骤

1. 取 2g 左右新鲜植物组织置于研钵中,加入液氮,迅速研磨成均匀的粉末。
2. 将粉末移入预冷的离心管中,注意:动作要迅速,不要让粉末解冻。并向其中加入 5ml 异硫氰酸胍变性液,及 40 μ l 巯基乙醇,轻轻摇动离心管使混合均匀。
3. 按顺序分别加入 2mol/L NaAc 0.5ml、水饱和苯酚 5ml、氯仿/异戊醇 1ml,每加入一种试剂都轻轻摇动离心管混合均匀,最后将离心管盖紧,倒转几次混合均匀,冰浴 30min。
4. 4℃ 条件下 14 000g 离心 30min,将上层水相转移至另一离心管,并加入等体积的异丙醇,混合后置于-20℃ 冰箱冷冻 1h。
5. 4℃ 条件下 13 000g 离心 20min,沉淀用 70 %乙醇溶液洗一次,晾干后溶于适量体积 DEPC 处理水中 (50 ~ 200 μ l),检测后分装,置于-70℃ 低温条件下保存。
6. 取 5 μ l RNA 溶液进行电泳检测 (参见实验一中的电泳操作步骤)。

六、结果分析与讨论

1. RNA 纯度及浓度的检测 A_{260} 为 1 时, RNA 浓度约为 40 μ g/ml,较纯的 RNA,其 A_{260}/A_{280} 约为 1.9 ~ 2.1。

2. 总 RNA 电泳检测结果见图 1-3。

七、注意事项

1. 外源 RNA 酶的抑制方法主要使用 DEPC,因 DEPC 能与 RNase 分子中的必需基团氨基酸残基上的咪唑环结合而抑制酶活性,用于水、试剂、玻璃器皿的

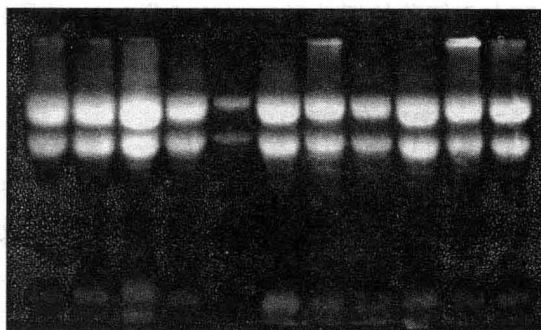


图 1-3 水稻总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱

RNase 的灭活。为防止皮肤 RNase 污染,在抽提过程中,应戴上一次性手套。应使用灭过菌的塑料制品和枪头,并不断更换,避免交叉污染;分离与分析 RNA 用的器皿也应该是专用的。

2. 水溶性的细胞代谢物如酚、多糖等易与 RNA 结合成胶冻状的不溶物或有色的复合物,能影响 RNA 的产量及质量。这时,可采用对组织提取液适当进行高速离心去除多糖;采用低 pH 的提取缓冲液抑制酚的解离及氧化或用巯基乙醇、PVP 来抑制酚类的干扰。

3. 尽量选用新鲜的植物材料和选取杂质少生长较快的幼嫩植物组织提取 RNA。

(李惠敏 刘红美 张 洁 冯乐平)

参 考 文 献

Jakobsen KS, Breivold E, Hornes E. 1990. Purification of mRNA directly from crude plant tissues in 15 minutes using oligo dT micro-spheres. *Nucleic Acids Research*, 18(12):3669

Rubin D. 1992. Magnetic Bead Isolation of mRNA from Plant Tissue. In: *The Red Book Bulletin, Current Protocols in Molecular Biology*, Subscriber's Notebook, Anonymous, Suppl(20):1

参考网站:

www.bion.com 生物谷

www.biooo.com 中国生物论坛

www.dnalc.org 冷泉港实验室

www.dxy.cn 丁香园

www.ncbi.nlm.nih.gov 美国国立生物信息中心

实验五 细菌基因组 DNA 的制备

一、相关知识链接

细菌基因组 DNA 通常仅由一条环形或线形双链 DNA 分子构成,只有一个复制起点,有操纵子串联在一起,受同一调控区调节,合成多顺反子 mRNA。编码蛋白质的结构基因为单拷贝的,但 rRNA 基因一般是多拷贝的,非编码 DNA 所占比例少,类似于病毒基因组。细菌基因组 DNA 具有多种调控区,如复制起始区、复制中止区,转录启动子等特殊序列。与真核生物基因组类似,细菌基因组 DNA 也具有可移动的 DNA 序列。细菌 DNA 以环状染色体形式存在于细菌的拟核区。制备细菌 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。

二、实验原理

提取 DNA 的一般过程是将分散好的组织细胞在含十二烷基磺酸钠(SDS)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 溶液经乙醇沉淀使 DNA 从溶液中析出。蛋白酶 K 能够在 SDS 和乙二胺四乙酸二钠(EDTA)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 分子完整地释放出来。

三、实验目的

了解基因组 DNA 的概念和意义,掌握细菌基因组 DNA 制备的原理和分离方法。

四、实验材料和配方

(一) 实验器材与设备

高速冷冻离心机,台式离心机,水浴锅,微量移液器,移液管。

(二) 试剂与配方

1. CTAB/NaCl 溶液 4.1g NaCl 溶解于 80ml H_2O ,缓慢加入 10g CTAB,加水至 100ml。
2. 其他试剂 氯仿:异戊醇(24:1);酚:氯仿:异戊醇(25:24:1);异丙醇;70% 乙醇;TE 溶液(10mmol/l Tris-HCl,1mmol/l EDTA,pH8.0);10% SDS;蛋白酶 K(20mg/ml),5mol/l NaCl。

五、实验方法和步骤

1. 100ml 细菌过夜培养液,5000g 离心 10min,去上清液。
2. 加 9.5ml TE 溶液悬浮沉淀,并加 0.5ml 10% SDS、50 μ l 20mg/ml 蛋白酶 K,混匀,37℃保温 1h。
3. 加 1.5ml 5mol/l NaCl 溶液,混匀。
4. 加 1.5ml CTAB/NaCl 溶液,混匀,65℃保温 20min。
5. 用等体积酚:氯仿:异戊醇抽提,5000g 离心 10min,将上清液移至干净离心管。
6. 用等体积氯仿:异戊醇抽提,取上清液移至干净管中。
7. 加 1 倍体积异丙醇,颠倒混合,室温下静置 10min,沉淀 DNA。
8. 用玻棒捞出 DNA 沉淀,70% 乙醇溶液漂洗后,吸干,溶解于 1ml TE 溶液,-20℃保存。如果 DNA 沉淀无法捞出,可 5000g 离心 10min,弃上清取 DNA 沉淀。
9. 如要除去其中的 RNA,可加入 RNA 酶处理。

六、结果分析与讨论

细菌基因组 DNA 电泳结果见图 1-4,分析与讨论略。

七、注意事项

1. 加入异丙醇,基因组的大分子 DNA 即沉淀形成纤维絮状沉淀漂浮其中,可用灭菌的玻璃棒或加样枪头将其挑出,并在 70% 乙醇溶液中漂洗一下即可。

2. 为避免 DNase 的作用,对所使用的器皿等用具要进行灭菌处理,同时要在溶液中加入 EDTA、SDS、蛋白酶 K 等。

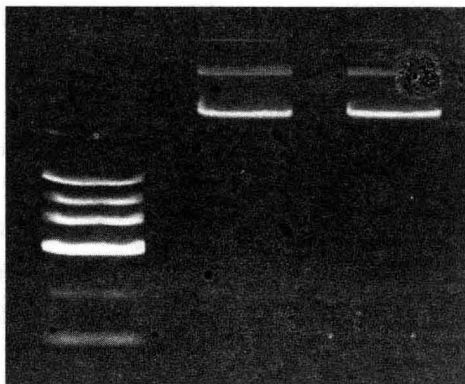


图 1-4 细菌基因组 DNA 电泳图

(李惠敏 刘红美 张洁 冯乐平)

参考文献

Liu XX, Lin JP, Qin G, et al. 2005. Expression of a new hem A Gene from *Agrobacterium radiobacter* in *Escherichia coli* for 5-aminolevulinate production. *Chinese J Chem Eng*, 13(4): 522 ~ 528

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis J. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Laboratory Press

参考网站:

www.bion.com 生物谷

www.biooo.com 中国生物论坛

www.dnalc.org 冷泉港实验室

www.dxy.cn 丁香园

实验六 大肠杆菌质粒 DNA 的小量提取

一、相关知识链接

质粒(plasmid)是独立于染色体 DNA 之外的能够独立复制的 DNA 分子。大部分质粒呈环状结构,目前亦发现少部分线状质粒。天然质粒 DNA 的长度从数千碱基对至数十万碱基对都有。质粒主要存在于细菌、酵母和一些植物细胞中,有时一个细胞里面可以同时存在一种乃至数种的质粒。质粒的拷贝数在细胞里从一个到几千个不等,可分为拷贝数少的严紧型质粒和拷贝数多的松弛型质粒。有些质粒含有某种抗药基因(如大肠杆菌中就有含有抗四环素基因的质粒)。质粒携带的基因可以赋予细胞新的生理代谢能力,例如使一些细菌中产生抗药性。经过修饰后的质粒是基因工程最常用的载体工具,科学家常将基因克隆的载体做成各种质粒形式,以承载目的基因。

二、实验原理

质粒 DNA 分离纯化方法有很多种,但其原理和步骤大同小异,本实验采用碱裂解法分离质粒 DNA。

碱裂解法是根据共价闭合环状质粒 DNA 与线性染色体 DNA 片段之间存在拓扑学上的差异进行分离的。在 pH 介于 12.0 ~ 12.5 之间时,线性 DNA 的两条链会完全将变性,而闭合环状 DNA 在这样的条件下连接 DNA 互补链之间的氢键虽然也会断开,但由于闭合环状质粒 DNA 的双螺旋主链骨架的彼此盘绕作用,互补的两条链紧密地结合在一起。当遇制冷且在恢复中性 pH 的方法处理 DNA 混合物时,共价闭合环状的质粒 DNA 能迅速而准确地复性,但随机断裂产生的线性染色体 DNA 分子,彼此已经分离的互补链之间的复性作用就不会那么迅速而准确,往往聚集成网状结构,与变性的蛋白质及 RNA 一起被离心沉淀下来。之后可以用无水乙醇沉淀法收集仍然留在上清液中的质粒 DNA。另行通过 NaOH 与 SDS 裂解细胞,然后用高浓度的醋酸钾中和,结果使细菌的染色体 DNA 与其他相对分子质量高的细胞结构选择性地沉淀下来,留在上清液中的质粒 DNA 用异丙醇或无水乙醇沉淀。

三、实验目的

了解质粒的特性及其在分子生物学研究中的作用,学习掌握质粒 DNA 的分离、纯化的原理,掌握碱裂解法小量制备质粒 DNA 的方法。