

FENZI SHENGWUXUE YIQI YU SHIYAN JISHU

分子生物学 仪器与实验技术



刘君星 闫冬梅 周奎臣 主编

黑龙江科学技术出版社

分子生物学仪器与实验技术

刘君星 闫冬梅 周奎臣 主 编

黑龙江科学技术出版社

中国·哈尔滨

图书在版编目 (CIP) 数据

分子生物学仪器与实验技术/刘君星, 闫冬梅, 周奎臣主编. —哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2009.6
ISBN 978-7-5388-6185-3

I. 分... II. ①刘... ②闫... ③周...
III. ①分子生物学—实验—仪器②分子生物学—实验
IV. TH79 Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 089809 号

责任编辑 侯文妍

封面设计 刘 洋

分子生物学仪器与实验技术

FENZI SHENGWUXUE YIQI YU SHIYAN JISHU

刘君星 闫冬梅 周奎臣 主编

出 版 黑龙江科学技术出版社

(150001 哈尔滨市南岗区湘江路 77 号)

电话 (0451) 53642106 电传 53642143 (发行部)

印 刷 哈尔滨市龙会科技彩印厂

发 行 黑龙江科学技术出版社

开 本 787×1092 1/16

印 张 18. 125

字 数 420 000

版 次 2009 年 6 月第 1 版·2009 年 6 月第 1 次印刷

印 数 1-1 000

书 号 ISBN 978-7-5388-6185-3/Q·20

定 价 45.00 元

《分子生物学仪器与实验技术》

编委会

- 主 编** 刘君星 (佳木斯大学基础医学院 副教授)
闫冬梅 (佳木斯大学基础医学院 副教授)
周奎臣 (佳木斯大学附属第一医院 副主任技师)
- 副主编** 张文陆 (佳木斯大学附属第一医院 副主任技师)
王 莉 (佳木斯大学附属第一医院 主管技师)
朱艳丽 (佳木斯大学附属第一医院 主治医师)
马雪梅 (佳木斯大学附属第一医院 主治医师)
- 编 委** 刘春婷 (佳木斯市中心医院 副主任技师)
李 丽 (佳木斯市中心医院 副主任技师)
王树清 (佳木斯市中心医院 副主任技师)
王 琳 (佳木斯大学附属第一医院 主管技师)
王 宇 (佳木斯大学免疫学 研究生)

目 录

第一章 质粒 DNA 的分离、纯化和鉴定	(1)
第一节 概述	(1)
第二节 材料、设备及试剂	(2)
第三节 操作步骤	(4)
第二章 RNA 的提取和 cDNA 合成	(9)
第一节 概述	(9)
第二节 动植物组织 mRNA 提取	(11)
第三节 植物病毒 RNA 提取	(13)
第四节 cDNA 合成技术	(14)
第三章 基因组 DNA 的提取	(20)
第一节 概述	(20)
第二节 从植物组织提取基因组 DNA	(20)
第三节 从动物组织提取基因组 DNA	(22)
第四节 细菌基因组 DNA 的制备	(23)
第五节 基因组 DNA 的检测	(24)
第四章 聚合酶链反应 (PCR) 技术	(25)
第一节 PCR 原理	(25)
第二节 PCR 实验方法	(33)
第三节 建立 PCR 实验室的基本条件	(40)
第四节 反转录 PCR (RT-PCR)	(44)
第五节 荧光定量 PCR (Real time PCR)	(58)
第五章 原子力显微镜	(66)
第一节 原子力显微镜原理	(66)
第二节 原子力显微镜操作	(69)
第三节 原子力显微镜在生物学研究中的应用	(78)
第六章 激光共聚焦扫描显微镜技术	(81)
第七章 生物芯片技术	(90)
第一节 生物芯片简介	(90)
第二节 生物芯片检测基本原理	(98)
第三节 生物芯片实验方法	(101)
第四节 生物芯片相关技术	(106)
第五节 生物芯片技术的应用	(113)

第八章 色谱技术	(116)
第一节 概述	(116)
第二节 液相色谱法	(121)
第三节 气相色谱法	(139)
第四节 毛细管电泳	(142)
第九章 凝胶电泳技术	(154)
第一节 概述	(154)
第二节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(161)
第三节 琼脂糖凝胶电泳	(169)
第四节 Western Blot	(173)
第五节 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	(180)
第六节 RNA 凝胶电泳试验	(184)
第十章 显微操作技术	(185)
第十一章 显微系统仪器使用	(188)
第一节 光学显微镜的原理和构造	(188)
第二节 倒置显微镜	(199)
第三节 荧光显微镜	(201)
第四节 透射电镜	(207)
第五节 扫描电镜	(214)
第十二章 离心机	(218)
第一节 离心机概述	(218)
第十三章 光学分析方法	(223)
第一节 光学分析方法的发展	(223)
第二节 分光光度计	(228)
第三节 FRET 在生物学中的应用	(245)
第十四章 其他仪器使用	(255)
第一节 pH 计	(255)
第二节 真空冷冻干燥技术	(259)
第三节 MediMachine 组织匀浆器	(262)
第四节 Milli-Q Academic 型超纯水器标准操作规程	(263)
第五节 ECAN SUNRISE 酶标仪操作规程	(264)
第六节 制冰机操作规程	(266)
第七节 自动双重蒸馏水器操作说明	(266)
第八节 移液器使用	(267)
第十五章 玻璃仪器的清洗	(268)
第十六章 分子实验常用溶液	(273)

第一章 质粒 DNA 的分离、纯化和鉴定

第一节 概 述

把一个有用的目的 DNA 片段通过重组 DNA 技术，送进受体细胞中去进行繁殖和表达的工具叫载体 (Vector)。细菌质粒是重组 DNA 技术中常用的载体。

质粒 (Plasmid) 是一种染色体外的稳定遗传因子，大小从 1~200 kb 不等，为双链、闭环的 DNA 分子，并以超螺旋状态存在于宿主细胞中。质粒主要发现于细菌、放线菌和真菌细胞中，它具有自主复制和转录能力，能在子代细胞中保持恒定的拷贝数，并表达所携带的遗传信息。质粒的复制和转录要依赖于宿主细胞编码的某些酶和蛋白质，如离开宿主细胞则不能存活，而宿主即使没有它们也可以正常存活。质粒的存在使宿主具有一些额外的特性，如对抗生素的抗性等。F 质粒 (又称 F 因子或性质粒)、R 质粒 (抗药性因子) 和 Col 质粒 (产大肠杆菌素因子) 等都是常见的天然质粒。

质粒在细胞内的复制一般有两种类型：紧密控制型 (Stringent control) 和松弛控制型 (Relaxed control)。前者仅在细胞周期的一定阶段进行复制，当染色体不复制时，它也不能复制，通常每个细胞内只含有 1 个或几个质粒分子，例如 F 因子。后者的质粒在整个细胞周期中随时可以复制，在每个细胞中有许多拷贝，一般在 20 个以上，例如 Col E1 质粒。在使用蛋白质合成抑制剂—氯霉素时，细胞内蛋白质合成、染色体 DNA 复制和细胞分裂均受到抑制，紧密型质粒复制停止，而松弛型质粒继续复制，质粒拷贝数可由原来 20 多个扩增至 1 000~3 000 个，此时质粒 DNA 占总 DNA 的含量可由原来的 2.0% 增加至 40%~50%。

利用同一复制系统的不同质粒不能在同一宿主细胞中共同存在，当两种质粒同时导入同一细胞时，它们在复制及随后分配到子细胞的过程中彼此竞争，在一些细胞中，一种质粒占优势，而在另一些细胞中另一种质粒却占上风。当细胞生长几代后，占少数的质粒将会丢失，因而在细胞后代中只有两种质粒的一种，这种现象被称为质粒的不相容性 (Incompatibility)。但利用不同复制系统的质粒则可以稳定地共存于同一宿主细胞中。

质粒通常含有编码某些酶的基因，其表型包括对抗生素的抗性，产生某些抗生素，降解复杂有机物，产生大肠杆菌素和肠毒素及某些限制性内切酶与修饰酶等。

质粒载体是在天然质粒的基础上为适应实验室操作而进行人工构建的。与天然质粒相比，质粒载体通常带有一个或一个以上的选择性标记基因 (如抗生素抗性基因) 和一个人工合成的含有多个限制性内切酶识别位点的多克隆位点序列，并去掉了大部分非必

需序列，使相对分子质量尽可能减少，以便于基因工程操作。大多质粒载体带有一些多用途的辅助序列，这些用途包括通过组织化学方法肉眼鉴定重组克隆、产生用于序列测定的单链 DNA、体外转录外源 DNA 序列、鉴定片段的插入方向、外源基因的大量表达等。

一个理想的克隆载体大致应有下列一些特性。

- (1) 相对分子质量小、多拷贝、松弛控制型。
- (2) 具有多种常用的限制性内切酶的单切点。
- (3) 能插入较大的外源 DNA 片段。
- (4) 具有容易操作的检测表型。

常用的质粒载体大小一般在 1~10 kb 之间，例如 PBR322，PUC 系列，PGEM 系列和 pBluescript（简称 pBS）等。

从细菌中分离质粒 DNA 的方法都包括 3 个基本步骤：培养细菌使质粒扩增；收集和裂解细胞；分离和纯化质粒 DNA。采用溶菌酶可以破坏菌体细胞壁，十二烷基硫酸钠（SDS）和 Triton X-100 可使细胞膜裂解。经溶菌酶和 SDS 或 Triton X-100 处理后，细菌染色体 DNA 会缠绕附着在细胞碎片上，同时由于细菌染色体 DNA 比质粒大得多，易受机械力和核酸酶等的作用而被切断成不同大小的线性片段。当用强热或酸、碱处理时，细菌的线性染色体 DNA 变性，而共价闭合环状 DNA（Covalently closed circ μ Lar DNA，简称 cccDNA）的两条链不会相互分开，当外界条件恢复正常时，线状染色体 DNA 片段难以复性，而是与变性的蛋白质和细胞碎片缠绕在一起，而质粒 DNA 双链又恢复原状，重新形成天然的超螺旋分子，并以溶解状态存在于液相中。

在细菌细胞内，共价闭环质粒以超螺旋形式存在。在提取质粒过程中，除了超螺旋 DNA 外，还会产生其他形式的质粒 DNA。如果质粒 DNA 两条链中有一条链发生一处或多处断裂，分子就能旋转而消除链的张力，形成松弛型的环状分子，称开环 DNA（Open circ μ Lar DNA，简称 ocDNA）；如果质粒 DNA 的两条链在同一处断裂，则形成线状 DNA（Linear DNA）。当提取的质粒 DNA 电泳时，同一质粒 DNA 其超螺旋形式的泳动速度要比开环和线状分子的泳动速度快。

第二节 材料、设备及试剂

一、材料

含 pBS 的 *E. coli* DH5 α 或 JM 系列菌株，1.5 mL 塑料离心管（又称 eppendorf 管），离心管架。

二、设备

设备包括微量取液器（20 μ L，200 μ L，1 000 μ L），台式高速离心机，恒温振荡摇床，高压蒸汽消毒器（灭菌锅），涡旋振荡器，电泳仪，琼脂糖平板电泳装置和恒温水浴锅等。

三、试剂

1. LB 液体培养基 (Luria - Bertani)

称取蛋白胨 (Tryptone) 10 g, 酵母提取物 (Yeast extract) 5.0 g, NaCl 10 g, 溶于 800 mL 去离子水中, 用 NaOH 调 pH 至 7.5, 加去离子水至总体积 1.0 L, 高压下蒸汽灭菌 20 min。

2. LB 固体培养基

液体培养基中每升加 12.0 g 琼脂粉, 高压灭菌。

3. 氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp) 母液

配成 50 mg/mL 水溶液, -20°C 保存备用。

4. 溶菌酶溶液

用 10 mmol/L Tris·Cl (pH8.0) 溶液配制成 10 mg/mL, 并分装成小份 (如 1.5 mL) 保存于 -20°C , 每一小份一经使用后便予丢弃。

5. 3 mol/L NaAc (pH5.2)

50 mL 水中溶解 40.81 g NaAc·3H₂O, 用冰醋酸调 pH 至 5.2, 加水定容至 100 mL, 分装后高压灭菌, 储存于 4°C 冰箱。

6. 溶液 I

50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L Tris·Cl (pH8.0), 10 mmol/L EDTA (pH8.0)。溶液 I 可成批配制, 每瓶 100 mL, 高压灭菌 15 min, 储存于 4°C 冰箱。

7. 溶液 II

0.2 mol/L NaOH (临用前用 10 mol/L NaOH 母液稀释), 1.0% SDS。

8. 溶液 III

5.0 mol/L KAc 60 mL, 冰醋酸 11.5 mL, H₂O 28.5 mL, 定容至 100 mL, 并高压灭菌。溶液终浓度为: K⁺ 3 mol/L, Ac⁻ 5 mol/L。

9. RNA 酶 A 母液

将 RNA 酶 A 溶于 10 mmol/L Tris·Cl (pH7.5), 15 mmol/L NaCl 中, 配制成为 10 mg/mL 的溶液, 于 100°C 加热 15 min, 使混有的 DNA 酶失活。冷却后用 1.5 mL eppendorf 管分装成小份保存于 -20°C 。

10. 饱和酚

市售酚中含有醌等氧化物, 这些产物可引起磷酸二酯键的断裂及导致 RNA 和 DNA 的交联, 应在 160°C 用冷凝管进行重蒸。重蒸酚加入 0.1% 的 8-羟基喹啉 (作为抗氧化剂), 并用等体积的 0.5 mol/L Tris·Cl (pH8.0) 和 0.1 mol/L Tris·Cl (pH8.0) 缓冲液反复抽提使之饱和并使其 pH 值达到 7.6 以上, 因为酸性条件下 DNA 会分配于有机相。

11. 氯仿

按氯仿: 异戊醇 = 24:1 体积比加入异戊醇。氯仿可使蛋白变性并有助于液相与有机相的分开, 异戊醇则可起消除抽提过程中出现的泡沫。按体积: 体积 = 1:1 混合上述饱和酚与氯仿即得酚: 氯仿 (1:1)。酚和氯仿均有很强的腐蚀性, 操作时应戴手套。

12. TE 缓冲液

10 mmol/L Tris·Cl (pH8.0), 1.0 mmol/L EDTA (pH8.0)。高压灭菌后储存于 4 ℃ 冰箱中。

13. STET

0.1 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris·Cl (pH8.0), 10 mmol/L EDTA (pH8.0), 5% Triton X-100。

14. STE

0.1 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris·Cl (pH8.0), 1.0 mmol/L EDTA (pH8.0)。

15. 电泳所用试剂

(1) TBE 缓冲液 (5×): 称取 Tris 54 g, 硼酸 27.5 g, 并加入 0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 20 mL, 定容至 1 000 mL。

(2) 上样缓冲液 (6×): 0.25% 溴酚蓝, 40% (w/v) 蔗糖水溶液。

第三节 操作步骤

一、细菌的培养和收集

将含有质粒 pBS 的 DH5 α 菌种接种在 LB 固体培养基 (含 50 μ g/mL Amp) 中, 37 ℃ 培养 12~24 h。用无菌牙签挑取单菌落接种到 5 mL LB 液体培养基 (含 50 μ g/mL Amp) 中, 37 ℃ 振荡培养约 12 h 至对数生长期。

二、质粒 DNA 少量快速提取

质粒 DNA 少量提取法对于从大量转化子中制备少量部分纯化的质粒 DNA 十分有用。这些方法共同特点是简便、快速, 能同时处理大量试样, 所得 DNA 有一定纯度, 可满足限制酶切割、电泳分析的需要。

(一) 煮沸法

1. 方法

- (1) 将 1.5 mL 培养液倒入 eppendorf 管中, 4 ℃ 下 12 000 g 离心 30 s。
- (2) 弃上清, 将管倒置于卫生纸上几分钟, 使液体流尽。
- (3) 将菌体沉淀悬浮于 120 mL STET 溶液中, 涡旋混匀。
- (4) 加入 10 mL 新配制的溶菌酶溶液 (10 mg/mL), 涡旋振荡 3 s。
- (5) 将 eppendorf 管放入沸水浴中, 50 s 后立即取出。
- (6) 用微量离心机 4 ℃ 下 12 000 g 离心 10 min。
- (7) 用无菌牙签从 eppendorf 管中去除细菌碎片。
- (8) 取 20 mL 进行电泳检查。

2. 注意事项

- (1) 对大肠杆菌可从固体培养基上挑取单个菌落直接进行煮沸法提取质粒 DNA。

(2) 煮沸法中添加溶菌酶有一定限度, 浓度高时, 细菌裂解效果反而不好。有时不同溶菌酶也能溶菌。

(3) 提取的质粒 DNA 中会含有 RNA, 但 RNA 并不干扰进一步实验, 如限制性内切酶消化, 亚克隆及连接反应等。

(二) 碱法

1. 方法

(1) 取 1.5 mL 培养液倒入 1.5 mL eppendorf 管中, 4 ℃ 下 12 000 g 离心 30 s。

(2) 弃上清, 将管倒置于卫生纸上数分钟, 使液体流尽。

(3) 菌体沉淀重悬浮于 100 μ L 溶液 I 中 (需剧烈振荡), 室温下放置 5~10 min。

(4) 加入新配制的溶液 II 200 μ L, 盖紧管口, 快速温和颠倒 eppendorf 管数次, 以混匀内容物 (千万不要振荡), 冰浴 5 min。

(5) 加入 150 μ L 预冷的溶液 III, 盖紧管口, 并倒置离心管, 温和振荡 10 s, 使沉淀混匀, 冰浴中 5~10 min, 4 ℃ 下 12 000 g 离心 5~10 min。

(6) 上清液移入干净 eppendorf 管中, 加入等体积的酚:氯仿 (1:1), 振荡充分混匀, 4 ℃ 下 12 000 g 离心 5 min。

(7) 将水相移入干净 eppendorf 管中, 加入 2 倍体积的无水乙醇, 振荡混匀后置于 -20 ℃ 冰箱中 20 min, 然后 4 ℃ 下 12 000 g 离心 10 min。

(8) 弃上清, 将管口敞开倒置于卫生纸上使所有液体流出, 加入 1 mL 70% 乙醇洗沉淀一次, 4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 5~10 min。

(9) 吸除上清液, 将管倒置于卫生纸上使液体流尽, 真空干燥 10 min 或室温干燥。

(10) 将沉淀溶于 20 μ L TE 缓冲液 (pH8.0, 含 20 μ g /mL RNaseA) 中, 储存在 -20 ℃ 冰箱中。

2. 注意事项

(1) 提取过程应尽量保持低温。

提取质粒 DNA 过程中除去蛋白很重要, 采用酚和 (或) 氯仿去除蛋白效果较单独用酚或氯仿好, 要将蛋白尽量除干净需多次抽提。

(2) 沉淀 DNA 通常使用冰乙醇, 在低温条件下放置时间稍长可使 DNA 沉淀完全。沉淀 DNA 也可用异丙醇 (一般使用等体积), 且沉淀完全, 速度快, 但常把盐沉淀下来, 所以多数还是用乙醇。

(三) Wizard 少量 DNA 纯化系统

Promega 公司的 Wizard 少量 DNA 纯化系统可快速有效的抽提质粒 DNA, 整个过程只需 15 min。提取的质粒可直接用于 DNA 测序、酶切分析和体外转录等。

该系统中所含试剂和柱子可以用于 50 次 1~3 mL 质粒培养液的分离和纯化, 试剂包括 10 mL 细胞悬浮液, 10 mL 细胞裂解液; 10 mL 中和液, 50 mL Wizard 少量 DNA 纯化树脂, 50 mL 柱洗液 (使用前加 95% 乙醇至 120 mL) 和 50 支 Wizard 微型柱。

1. 方法

- (1) 1~3 mL 过夜培养细胞液 4 ℃ 下 12 000 g 离心 1~2 min。
- (2) 去除上清液，菌体细胞悬浮于 200 μ L 细胞悬浮液中，充分混合，并移入 eppendorf 管中。
- (3) 加 200 μ L 细胞裂解液，颠倒离心管数次，直到溶液变清亮。
- (4) 加 200 μ L 中和液，颠倒离心管数次。
- (5) 4 ℃ 下 12 000 g 离心 5 min，取上清液于新的 eppendorf 管中。
- (6) 加 1 mL Wizard 少量 DNA 纯化树脂，颠倒离心管数次以充分混匀。
- (7) 取一次性注射器，取出注塞，并使注射筒与 Wizard 微型柱连接，用移液枪将上述混合液加入注射筒中，并用注塞轻推，使混合物进入微型柱。
- (8) 将注射器与微型柱分开，取出注塞，再将注射筒与微型柱相连，加入 2 mL 柱洗液，并用注塞轻推，使柱洗液进入微型柱。
- (9) 取出微型柱置于 eppendorf 管中，离心 2 min 以除去微型柱中的柱洗液。
- (10) 将微型柱放在一个新 eppendorf 管中，加 50 μ L TE（或水）于微型柱中，静置 1 min 后，4 ℃ 下 12 000 g 离心 20 s。
- (11) 丢弃微型柱，将 eppendorf 管中的质粒 DNA 贮于 4 ℃ 或 -20 ℃ 冰箱。

2. 注意事项

树脂使用前应充分混匀，如有结晶，可将树脂用 25~37 ℃ 水浴处理 10 min。

三、质粒 DNA 的大量提取和纯化

在制作酶谱、测定序列、制备探针等实验中需要高纯度、高浓度的质粒 DNA，为此需要大量提取质粒 DNA。大量提取的质粒 DNA 一般需进一步纯化，常用柱层析法和氯化铯梯度离心法。

（一）碱法

1. 方法

- (1) 取培养至对数生长后期的含 pBS 质粒的细菌培养液 250 mL，4 ℃ 下 5 000 g 离心 15 min，弃上清，将离心管倒置使上清液全部流尽。
- (2) 将细菌沉淀重新悬浮于 50 mL 用冰预冷的 STE 中（此步可省略）。
- (3) 同步骤（1）方法离心以收集细菌细胞。
- (4) 将细菌沉淀物重新悬浮于 5 mL 溶液 I 中，充分悬浮菌体细胞。
- (5) 加入 12 mL 新配制的溶液 II，盖紧瓶盖，缓缓地颠倒离心管数次，以充分混匀内容物，冰浴 10 min。
- (6) 加 9 mL 用冰预冷的溶液 III，摇动离心管数次以混匀内容物，在冰上放置 15 min，此时应形成白色絮状沉淀。
- (7) 4 ℃ 下 5 000 g 离心 15 min。
- (8) 取上清液，加入 50 mL RNA 酶 A（10 mg/mL），37 ℃ 水浴 20 min。
- (9) 加入等体积的饱和酚/氯仿，振荡混匀，4 ℃ 下 12 000 g 离心 10 min。

(10) 取上层水相, 加入等体积氯仿, 振荡混匀, 4℃下 12 000 g 离心 10 min。

(11) 取上层水相, 加入 1/5 体积的 4 mol/L NaCl 和 10% PEG (相对分子质量 6 000), 冰上放置 60 min。

(12) 4℃下 12 000 g 离心 15 min, 沉淀用数 mL 70% 冰冷乙醇洗涤, 4℃下 12 000 g 离心 5 min。

(13) 真空抽干沉淀, 溶于 500 mL TE 或水中。

2. 注意事项

(1) 提取过程中应尽量保持低温。

(2) 加入溶液 II 和溶液 III 后操作应混合, 切忌剧烈振荡。

(3) 由于 RNA 酶 A 中常存在有 DNA 酶, 利用 RNA 酶耐热的特性, 使用时应先对该酶液进行热处理 (80℃, 1 h), 使 DNA 酶失活。

(二) Wizard 大量 DNA 纯化系统

碱法大量提取 DNA 往往需要很长的时间。Promega 公司的 Wizard 大量 DNA 纯化系统既简单又快速, 只需要离心和真空抽干, 这个系统可以从 500 mL 培养液中在 3 h 以内获得 1 mg 以上的高质量的质粒 DNA (200~20 000 bp)。该系统不需要酚和氯仿抽提, 纯化后的 DNA 溶于水或 TE 缓冲液中, 不含任何盐分, 可以直接用于 DNA 序列分析和酶切反应, 也可以用于在核酸酶抑制剂 (如 RNasin) 存在的条件下进行体外转录反应等。

该系统中含有的试剂和柱子可以用于 10 次 100~500 mL 质粒培养液的分离和纯化, 试剂包括: 150 mL 细胞悬浮液, 150 mL 细胞裂解液, 150 mL 中和液, 100 mL Wizard 大量 DNA 纯化树脂, 125 mL Wizard 柱子洗脱溶液和 10 支 Wizard 带有存储离心管的柱子。

1. 方法

(1) 100~500 mL 细胞培养液置离心管中, 22~25℃下 5 000 g 离心 10 min, 所得细胞沉淀充分悬浮于细胞悬浮液中。

(2) 加 15 mL 细胞裂解溶液并轻轻混合, 可以反复倒置混合, 但不能用涡旋振荡, 细胞裂解完全时, 溶液会变清, 这一步需要 20 min。

(3) 加 15 mL 中和溶液, 立即反复倒置离心管数次, 并使之混匀。

(4) 14 000 g, 22~25℃离心 15 min。

(5) 小心地将上清液吸出并移至一个新离心管中。

(6) 加 0.5 倍体积的异丙醇, 混合均匀, 14 000 g 22~25℃下离心 15 min。

(7) 弃上清, 悬浮 DNA 沉淀于 2 mL TE 缓冲液中。这一步中也许有的沉淀不能溶解。

(8) 加 10 mL Wizard 大量 DNA 纯化树脂溶液, 并涡旋混合。

(9) 每一个样品, 使用一支 Wizard 大量柱子, 柱子的头插在真空器上 (Promega 产品, 与此配套)。

(10) 将树脂和 (或) DNA 混合液转入柱子中, 真空抽取树脂和 (或) DNA 混合液。

(11) 将树脂和(或) DNA 混合液抽干后, 加 13 mL 柱子洗脱溶液至离心管中, 对管底部的树脂和(或) DNA 进行洗脱(柱子一边旋转一边加入洗脱液), 并加入柱子中。

(12) 真空抽干所加入的洗脱液。

(13) 再加 12 mL 柱子洗脱液进柱子并抽干。

(14) 加入 5 mL 80% 乙醇漂洗柱中的树脂, 柱子真空抽干后将柱子放入用户提供的离心管中, 2 500 r/min 离心 5 min。

(15) 取出柱子, 并且真空抽干 5 min, 然后再将柱子放入系统所提供的离心管中, 2 500 g (1 300 g) 离心 5 min。

(16) 在柱子中加入 1.5 mL 65~70 °C 预热过的灭菌重蒸水或 TE, 1 min 以后于 2 500 g (1 300 g) 离心柱子和(或) 离心管 5 min。

(17) 取出柱子, 离心管中溶液即为提取的质粒 DNA, 可以直接放在离心管中, 盖上盖子, 储存在 4 °C 或 -20 °C 备用。

2. 注意事项

(1) 在使用之前, 系统所提供的柱子洗脱液按 1:1 加入 125 mL 95% 乙醇。

(2) 纯化树脂必须混匀后再用。

(三) Sephrose 2B 柱纯化质粒 DNA

碱法提取的质粒 DNA 即使用 RNA 酶处理, 仍会含有少量 RNA。当有些试验需无 RNA 污染的 DNA 制品时, 则需进行进一步纯化。一般常用 Sepharose 2B 或 Sepharose 4B 进行纯化, 该方法具有快速, 条件温和, 重复性好, 载体物质可以再利用等优点, 因而已广泛用于质粒 DNA 纯化。

1. 方法

(1) 将 Sepharose 2B 经含 0.1% SDS 的 TE (pH8.0) 平衡后上柱。

(2) 将至多 1.0 mL 的 DNA 溶液铺在 Sepharose 2B 柱上。

(3) 待 DNA 溶液完全进入柱内后立即在柱的上部连接含有 0.1% SDS 的 TE (pH8.0) 贮液瓶。

(4) 以 1.0 mL 流出液为 1 份进行收集。

(5) 对每一管测定其 OD₂₆₀ 值, 以确定哪些管中含有质粒 DNA。通常质粒 DNA 在柱上流出的第一个峰中。

(6) 合并所有含质粒的洗脱液, 用等体积的酚和(或) 氯仿 (1:1) 抽提, 4 °C 下 12 000 r/min 离心 2 min, 将上层水相转入新管。

(7) 加入 2 倍体积的冰冷无水乙醇, -20 °C 下沉淀 10 min, 然后 4 °C 下 12 000 g 离心 10 min, 弃去上清液。

(8) 沉淀加 70% 乙醇洗涤, 4 °C 下 12 000 g 离心 10 min, 弃去上清液。

(9) 沉淀真空抽干, 重新溶于 TE 或无菌水中。

2. 注意事项

在装柱过程中, 要防止柱床中出现断裂或气泡现象, 要使界面保持平整。对新装成的柱, 应用含 0.1% SDS 的 TE 平衡, 以使柱内的凝胶均匀。

第二章 RNA 的提取和 cDNA 合成

第一节 概 述

从真核生物的组织或细胞中提取 mRNA，通过酶促反应逆转录合成 cDNA 的第一链和第二链，将双链 cDNA 和载体连接，然后转化扩增，即可获得 cDNA 文库，构建的 cDNA 文库可用于真核生物基因的结构、表达和调控的分析；比较 cDNA 和相应基因组 DNA 序列差异可确定内含子存在和了解转录后加工等一系列问题。总之 cDNA 的合成和克隆已成为当今真核分子生物学的基本手段。自 20 世纪 70 年代中期首例 cDNA 克隆问世以来，已发展了许多种提高 cDNA 合成效率的方法，并大大改进了载体系统，目前 cDNA 合成试剂已商品化。cDNA 合成及克隆的基本步骤包括用反转录酶合成 cDNA 第一链，聚合酶合成 cDNA 第二链，加入合成接头以及将双链 DNA 克隆到适当载体（噬菌体或质粒）。

一、RNA 制备

模板 mRNA 的质量直接影响 cDNA 合成的效率。由于 mRNA 分子的结构特点，容易受 RNA 酶的攻击反应而降解，加上 RNA 酶极为稳定且广泛存在，因而在提取过程中要严格防止 RNA 酶的污染，并设法抑制其活性，这是本实验成败的关键。所有的组织中均存在 RNA 酶，人的皮肤、手指、试剂、容器等，均可能被污染，因此全部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 2 h 以上。凡是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，再用蒸馏水冲净。DEPC 是 RNA 酶的化学修饰剂，它和 RNA 酶的活性基团组氨酸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。试验所用试剂也可用 DEPC 处理，加入 DEPC 至 0.1% 浓度，然后剧烈振荡 10 min，再煮沸 15 min 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。但 DEPC 能与胺和巯基反应，因而含 Tris 和 DTT 的试剂不能用 DEPC 处理。Tris 溶液可用 DEPC 处理的水配制然后高压灭菌。配制的溶液如不能高压灭菌，可用 DEPC 处理水配制，并尽可能用未曾开封的试剂。除 DEPC 外，也可用异硫氰酸胍、钒氧核苷酸复合物、RNA 酶抑制蛋白等。此外，为了避免 mRNA 或 cDNA 吸附在玻璃或塑料器血管壁上，所有器皿一律需经硅烷化处理。

细胞内总 RNA 制备方法很多，如异硫氰酸胍热苯酚法等。许多公司有现成的总

RNA 提取试剂盒,可快速有效地提取到高质量的总 RNA。分离的总 RNA 可以利用 mRNA 3'末端含有多聚 (A) + 的特点,当 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并且洗脱,在低盐溶液或蒸馏水中, mRNA 被洗下。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。

二、cDNA 第一链的合成

所有合成 cDNA 第一链的方法都要用依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶 (反转录酶) 来催化反应。目前商品化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) 逆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 反转录酶包括两个具有若干种酶活性的多肽亚基,这些活性包括依赖于 RNA 的 DNA 合成,依赖于 DNA 的 DNA 合成以及对 DNA:RNA 杂交体的 RNA 部分进行内切降解 (RNA 酶 H 活性)。MLV 反转录酶只有单个多肽亚基,兼备依赖于 RNA 和依赖于 DNA 的 DNA 合成活性,但是降解 RNA:DNA 杂交体中的 RNA 的能力较弱,且对热的稳定性较 AMV 反转录酶差。MLV 反转录酶能合成较长的 cDNA (大于 2~3 kb)。AMV 反转录酶和 MLV 反转录酶利用 RNA 模板合成 cDNA 时的最适 pH 值,最适盐浓度和最适温度各不相同,所以合成第一链时相应调整条件是非常重要的。

AMV 反转录酶和 MLV 反转录酶都必须有引物来起始 DNA 的合成。cDNA 合成于最常用的引物是与真核细胞 mRNA 分子 3'端 poly (A) 结合于的 12~18 核苷酸长的 oligo (dT)。

三、cDNA 第二链的合成

cDNA 第二链的合成方法有以下几种。

1. 自身引导法

合成的单链 cDNA 3'端能够形成一短的发夹结构,这就为第二链的合成提供了现成的引物,当第一链合成反应产物的 DNA:RNA 杂交链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,最后用对单链特异性的 S1 核酸酶消化该环,即可进一步克隆。但自身引导合成法较难控制反应,而且用 S1 核酸酶切割发夹结构时无一例外地会导致对应于 mRNA 5'端序列出现缺失和重排,因而该方法目前很少使用。

2. 置换合成法

置换合成法利用第一链在反转录酶作用下产生的 cDNA: mRNA 杂交链不用碱变性,而是在 dNTP 存在下,利用 RNA 酶 H 在杂交链的 mRNA 链上造成切口和缺口。从而产生一系列 RNA 引物,使之成为合成第二链的引物,在大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的作用下合成第二链。该法是目前合成 cDNA 常采用该方法。

该反应有 3 个主要优点。

(1) 非常有效。

- (2) 直接利用第一链反应产物，无须进一步处理和纯化。
- (3) 不必使用 S1 核酸酶来切割双链 cDNA 中的单链发夹环。

四、cDNA 的分子克隆

已经制备好的双链 cDNA 和一般 DNA 一样，可以插入到质粒或噬菌体中，首先必须连接上接头 (Linker)，接头可以是限制性内切酶识别位点片段，也可以利用末端转移酶在载体和双链 cDNA 的末端接上一段寡聚 dG 和 dC 或 dT 和 dA 尾巴，退火后形成重组质粒，并转化到宿主菌中进行扩增。合成的 cDNA 也可以经 PCR 扩增后再克隆入适当载体。

第二节 动植物组织 mRNA 提取

一、材料

材料包括水稻叶片或小鼠肝组织。

二、设备

研钵，冷冻台式高速离心机，低温冰箱，冷冻真空干燥器，紫外检测仪，电泳仪，电泳槽。

三、试剂

1. 无 RNA 酶灭菌水

用将高温烘烤的玻璃瓶 (180 ℃, 2 h) 装蒸馏水，然后在其中加入 0.01% 的 DEPC (体积:体积)，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)，然后装入高温烘烤的玻璃瓶中，存放于低温冰箱。

3. 1× 层析柱加样缓冲液

20.0 mmol/L Tris·Cl (pH7.6)，0.5 mol/L NaCl，1.0 mmol/L EDTA (pH8.0)，0.1% SDS。

4. 洗脱缓冲液

10.0 mmol/L Tris·Cl (pH7.6)，1.0 mmol/L EDTA (pH8.0)，0.05% SDS。

四、操作步骤

(一) 动植物总 RNA 提取 - Trizol 法

Trizol 法适用于人类、动物、植物、微生物的组织或培养细菌，样品量从几十毫克至几克。用 Trizol 法提取的总 RNA 绝无蛋白和 DNA 污染。RNA 可直接用于 Northern