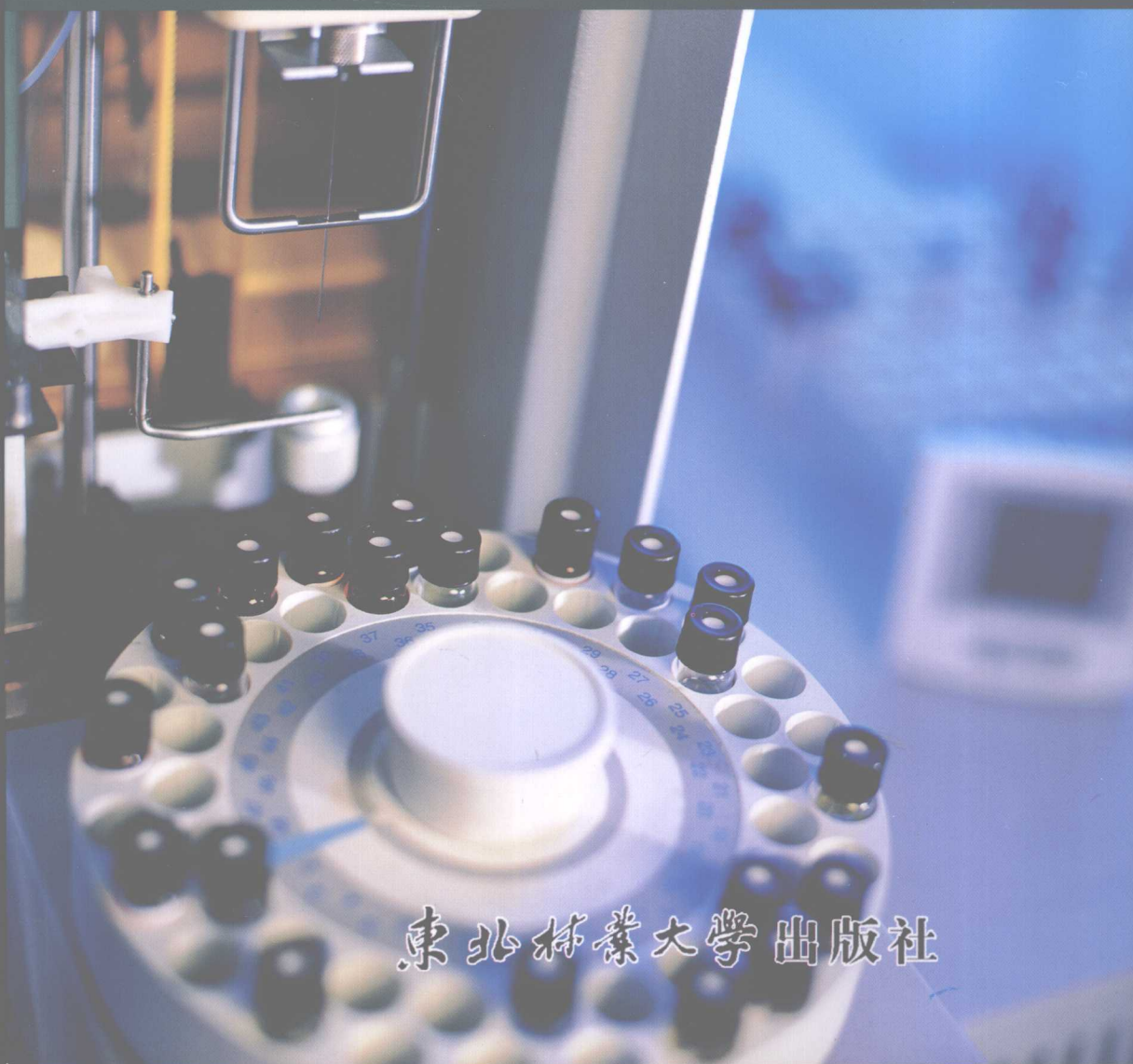


XIANDAI FENZI SHENGHUA SHIYAN JINENG JICHU ZHISHI

# 现代分子生化实验 技能基础知识

李和平 主 编  
夏彦玲 葛玉香 副主编



东北林业大学出版社

---

图书在版编目 (CIP) 数据

现代分子生化实验技能基础知识/李和平主编. —哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2007.12

ISBN 978 - 7 - 81131 - 156 - 3

I. 现… II. 李… III. 分子生物学—生物化学—实验 IV. Q7 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 190205 号

---

责任编辑: 郑国光

封面设计: 彭 宇



NEFUP

现代分子生化实验技能基础知识

Xiandai Fenzi Shenghua Shiyan Jineng Jichu Zhishi

李和平 主编

夏彦玲 葛玉香 副主编

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路 26 号)

哈尔滨市工大节能印刷厂印装

开本 787 × 1092 1/16 印张 7.5 字数 175 千字

2007 年 12 月第 1 版 2007 年 12 月第 1 次印刷

印数 1—1 000 册

ISBN 978-7-81131-156-3

Q·142 定价: 15.00 元

# 前 言

随着微观生物学技术的不断发展和完善,使得分子生化实验技术更加迅速、广泛地渗透到生命科学的各个研究领域。分子生化实验技术在从事实验室的研究中尤其重要。

由于分子生化技术和方法不断出现,新的知识、概念和技术原理不断涌现,因此很需要一本各实验室都能通用的简明的基础知识参考用书。

分子生化技术是生命科学中具有极其重要地位的实验科学,对于刚刚从事或欲从事该类技术工作的科研人员、大中专学生、实验室人员及相关教学工作者来讲,如何在短时间内快速掌握该技术的实验室基本技能知识就是摆在他们面前的严峻问题了。本书以简明扼要、知识点突出、可快速查读、易掌握等特点,阐述了分子生化实验基础技能知识,能够满足初步涉足分子生化实验或科研工作的大中专学生、实验室技术人员和相关科研教学人员的实验室需要。本书也是生命科学类实验室日常必备的参考书之一。

《现代分子生化实验技能基础知识》一书,重点介绍了在分子生化实验过程中 DNA、RNA 以及蛋白质操作的基础技能知识和相关的知识点;同时介绍了相关溶液、培养基的配制及操作注意事项;还介绍了相关的计算、公式及变换的基础技能知识。全书包括 DNA 的实验室操作、RNA 的实验室操作、蛋白质的实验室操作、缓冲液与培养基的准备和常用变换的表格与公式 5 个部分。

参加此书编写的人员有李和平(103 千字)、夏彦玲(50 千字)、葛玉香(22 千字)。

本书虽几经修改,力求无误,但由于时间仓促,还是难免在理论、技术和文字上有疏漏错误之处,对此,除向广大读者致歉外,还诚恳希望提出宝贵意见,以便日后修改、完善。

编 者

2007 年 9 月于哈尔滨

# 目 录

|     |                      |     |
|-----|----------------------|-----|
| 1   | DNA 的实验室操作 .....     | 1   |
| 1.1 | DNA 操作预备知识 .....     | 3   |
| 1.2 | 常用计算 .....           | 4   |
| 1.3 | 分离与纯化 DNA .....      | 6   |
| 1.4 | DNA 分析 .....         | 8   |
| 1.5 | DNA 扩增 .....         | 19  |
| 1.6 | DNA 克隆 .....         | 30  |
| 1.7 | DNA 和寡核苷酸标记 .....    | 34  |
| 2   | RNA 的实验室操作 .....     | 41  |
| 2.1 | RNA 操作的注意事项 .....    | 43  |
| 2.2 | 常用公式 .....           | 44  |
| 2.3 | 分离和纯化 RNA .....      | 46  |
| 2.4 | RNA 的分析 .....        | 48  |
| 2.5 | RT-PCR .....         | 49  |
| 2.6 | RNA 标记 .....         | 55  |
| 3   | 蛋白质的实验室操作 .....      | 59  |
| 3.1 | 蛋白质处理的预备知识 .....     | 61  |
| 3.2 | 从核酸到蛋白质的转化 .....     | 64  |
| 3.3 | 蛋白质分析 .....          | 69  |
| 3.4 | 蛋白质定量 .....          | 75  |
| 3.5 | 蛋白质纯化 .....          | 78  |
| 4   | 缓冲液与培养基的准备 .....     | 85  |
| 4.1 | 缓冲液 .....            | 87  |
| 4.2 | 抗生素 .....            | 100 |
| 4.3 | 细菌培养基 .....          | 101 |
| 5   | 常用变换的表格与公式 .....     | 103 |
| 5.1 | 核苷的模糊密码 .....        | 105 |
| 5.2 | 融解温度 $T_m$ 的计算 ..... | 105 |
| 5.3 | 不同基因组的 GC 含量 .....   | 106 |

## 2 现代分子生化实验技能基础知识

---

|                        |     |
|------------------------|-----|
| 5.4 细菌细胞中核酸和蛋白含量 ..... | 106 |
| 5.5 哺乳动物细胞核酸含量 .....   | 107 |
| 5.6 人血液核酸和蛋白含量 .....   | 108 |
| 5.7 培养皿细胞生长范围及产量 ..... | 108 |
| 5.8 度量表示与符号 .....      | 109 |
| 5.9 希腊字母 .....         | 110 |
| 5.10 放射性同位素的特性 .....   | 111 |
| 5.11 温度与压力 .....       | 111 |
| 5.12 离心力 .....         | 112 |
| 5.13 元素周期表 .....       | 112 |
| 主要参考文献 .....           | 114 |

\*\*\*\*\*

# 1 DNA 的实验室操作

\*\*\*\*\*



## 1.1 DNA 操作预备知识

### 1.1.1 DNA 提取之前新鲜与储存样品的操作

(1) 为了从细胞或组织分离基因组或质粒 DNA，要用新鲜样品或液氮快速冷冻后保存在 $-70^{\circ}\text{C}$ 的样品，该过程通过抑制内源核酸酶活性而最低限度地降解 DNA。

(2) 为了得到最佳结果，要用新鲜血液或室温保存不超过 2 天的血液样品。 $4^{\circ}\text{C}$ 保存 7 天或 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存不超过 1 个月的血液样品将使 DNA 提取的产量降低 10%~15%。

(3) 采集血液样品要用试管中含有 EDTA 成分的抗凝剂，而且最好不用肝素抗凝。肝素能导致 PCR 扩增抑制或效率降低。

(4) 但是，如果不可避免地要用肝素抗凝的话，那么可以利用高纯度的 PCR 模板制备试剂盒将肝素从样品中去除。

### 1.1.2 抽吸 DNA

(1) 避免强力抽吸。

(2) 抽吸基因组 DNA，用小口径吸头将导致 DNA 断裂或缺口，应该用大口径吸头或专门为基因组 DNA 设计的吸头。

(3) 常规的移液吸头对质粒 DNA 和其他小分子 DNA 是没有影响的。

### 1.1.3 DNA 保存

(1) 基因组 DNA 保存在 $4^{\circ}\text{C}$ ，保存在 $-20^{\circ}\text{C}$ 可导致 DNA 断裂。

(2) 质粒 DNA 和其他小分子 DNA 可在 $4^{\circ}\text{C}$ 短期保存，或分装后于 $-20^{\circ}\text{C}$ 长期保存。

(3) 以细胞转化为目的时，于 $4^{\circ}\text{C}$ 保存质粒可避免 DNA 断裂。

(4)  $4^{\circ}\text{C}$ 保存修饰 DNA。

### 1.1.4 DNA 的操作

在准备实验的过程中，DNA 样品通常应放置于冰上。

### 1.1.5 DNA 干燥

(1) 乙醇沉淀的基因组 DNA 不宜过分干燥，让其风干。

(2) 质粒或其他小分子 DNA 可风干或真空干燥。

### 1.1.6 溶解 DNA

- (1) 于 Tris 缓冲液中溶解 DNA (如, 10mmol/L Tris, pH 值 7.0~8.0)。
- (2) 在加入缓冲液后, 为了有助于 DNA 溶解, 可小心翻转试管几次和/或在边上轻弹试管。
- (3) 之后, 于 4℃ 在 DNA 缓冲液中溶解过夜。
- (4) 不允许涡旋震荡基因组 DNA。
- (5) 于 65℃ 温热 DNA 10 分钟以促进其溶解并使 DNA 酶失活。

## 1.2 常用计算

### 1.2.1 以道尔顿为单位计算相对分子质量

- (1) 脱氧核苷酸的平均相对分子质量 (MW) 是 330 道尔顿 (Da)。
- (2) DNA 碱基对的平均相对分子质量 (MW) 是 660 道尔顿 (Da)。
- (3) 双链 DNA 的相对分子质量 (MW, dsDNA) = 碱基对数目 × 660 Da

例如, pBR322 dsDNA (4 363 个碱基对) 的相对分子质量 (MW) =  $4\ 363 \times 660 \text{ Da} = 2.9 \times 10^6 \text{ Da} = 2.9 \times 10^3 \text{ kDa}$

- (4) 单链 DNA 的相对分子质量 (MW, ssDNA) = 碱基数目 × 330 Da

例如, M13mp18 (7 249 个碱基, ssDNA 形式) =  $7\ 249 \times 330 \text{ Da} = 2.4 \times 10^6 \text{ Da} = 2.4 \times 10^3 \text{ kDa}$

注: 1Da 是一个质量单位, 近乎等于一个氢原子的质量, 以物质原子理论奠基人 John Dalton (1766—1844) 的名字命名。

### 1.2.2 计算 5' 或 3' 末端 pmol 数

- (1) 双链 DNA 分子末端 pmol 的计算:

$$= [2 \times 10^6 \times \mu\text{g} (\text{双链 DNA})] \div [\text{平均相对分子质量 (道尔顿)}]$$

$$= [2 \times 10^6 \times \mu\text{g} (\text{双链 DNA})] \div (\text{碱基对数} \times 660 \text{ Da})$$

例如, 1μg 100 个碱基对的双链 DNA 片段的 5' 或 3' 末端 pmol

$$= (2 \times 10^6 \times 1) \div (100 \times 660 \text{ Da})$$

- (2) 单链 DNA 分子末端 pmol 的计算:

$$= [1 \times 10^6 \times \mu\text{g} (\text{单链 DNA})] \div [\text{平均相对分子质量 (道尔顿)}]$$

$$= [1 \times 10^6 \times \mu\text{g} (\text{单链 DNA})] \div (\text{碱基数} \times 330 \text{ Da})$$

例如, 1μg 250 个碱基的单链 DNA 片段的 5' 或 3' 末端 pmol

$$= (1 \times 10^6 \times 1) \div (250 \times 330 \text{ Da})$$

- (3) 分子末端 pmol 因核酸内切酶降解而改变:

环状 DNA:  $2 \times (\text{pmol DNA}) \times \text{位点数}$

线状 DNA:  $[2 \times (\text{pmol DNA}) \times \text{位点数}] + [2 \times (\text{pmol DNA})]$

1.2.3 由 μg 到 pmol 的转换

(1) pmol (双链 DNA) = μg (双链 DNA) × (10<sup>6</sup>pg/μg) × (1pmol/660pg) × (1/Nbp)  
=[μg (双链 DNA) ×1 515] /Nbp  
例如: 1μg100 个碱基对的双链 DNA 片段= (1×1 515) ÷100=15.2pmol  
(2) pmol (单链 DNA) =μg (单链 DNA) × (10<sup>6</sup>pg/μg) × (pmol/330pg) × (1/Nb)  
=[μg (单链 DNA) ×3 030] /Nb  
例如: 1μg1 000 个碱基的单链 DNA 片段= (1×3 030) ÷1 000=3.03pmol  
Nbp=碱基对 (双链 DNA), Nb=碱基数 (单链 DNA)

1.2.4 由 pmol 到 μg 的转换

(1) μg (双链 DNA) = pmol (双链 DNA) × (660pg /pmol) × (1μg/10<sup>6</sup>pg) ×Nbp  
= pmol (单链 DNA) ×Nb×6.6×10<sup>-4</sup>  
例如: 1 pmol 100 个碱基对的双链 DNA 片段=1×100×6.6×10<sup>-4</sup>=0.066μg  
(2) μg (单链 DNA) = pmol (单链 DNA) × (330pg /pmol) × (1μg/10<sup>6</sup>pg) ×Nb=pmol  
(单链 DNA) ×Nb×3.3×10<sup>-4</sup>  
例如: 1 pmol 250 个碱基的单链 DNA 片段=1×250×3.3×10<sup>-4</sup>=0.0 825μg  
Nbp=碱基对 (双链 DNA) Nb=碱基数 (单链 DNA)

1.2.5 不同大小 DNA 片段的相关计算

不同类型、大小 DNA 片段的计算实例见表 1-1。

表 1-1 计算实例

| 类型              | 大小      | 形状           | MW(kDa)             | pmol/ μ g | μ g/pmol | pmol/ μ g (5' 或 3' 末端) |
|-----------------|---------|--------------|---------------------|-----------|----------|------------------------|
| 双链 DNA 片段       | 100bp   | 线性           | 66                  | 15.2      | 0.066    | 30.3                   |
| 双链 DNA 片段       | 500bp   | 线性           | 330                 | 3.03      | 0.33     | 6.06                   |
| 双链 DNA 片段       | 1 000bp | 线性           | 660                 | 1.52      | 0.66     | 3.03                   |
|                 |         | 限制性酶酶切, 位点 1 |                     | 1.52      | 0.66     | 6.06                   |
|                 |         | 限制性酶酶切, 位点 2 |                     | 1.52      | 0.66     | 9.12                   |
| pUC18/19 双链 DNA | 2,686   | 环状           | 1.8×10 <sup>3</sup> | 0.57      | 1.77     | —                      |
|                 |         | 限制性酶酶切, 位点 1 |                     | 0.57      | 1.77     | 1.14                   |
|                 |         | 限制性酶酶切, 位点 2 |                     | 0.57      | 1.77     | 2.28                   |
|                 |         | 限制性酶酶切, 位点 3 |                     | 0.57      | 1.77     | 3.42                   |
| pBR322 双链 DNA   | 4,363   | 环状           | 2.9×10 <sup>3</sup> | 0.35      | 2.88     | —                      |
|                 |         | 限制性酶酶切, 位点 1 |                     | 0.35      | 2.88     | 0.7                    |
|                 |         | 限制性酶酶切, 位点 2 |                     | 0.35      | 2.88     | 1.4                    |
|                 |         | 限制性酶酶切, 位点 3 |                     | 0.35      | 2.88     | 2.1                    |

1.3 分离与纯化 DNA

1.3.1 据 DNA 的类型与来源选择试剂

为提高 DNA 分离的质量，应根据 DNA 的类型、来源选择不同的试剂，见表 1-2。

表 1-2 不同来源、类型 DNA 分离试剂

| 类型     | 来源                                | 建议 *                                               |
|--------|-----------------------------------|----------------------------------------------------|
| 基因组    | 组织，培养的细胞，细菌，酵母                    | 高纯度 PCR 模板制备试剂盒                                    |
|        | 组织，培养的细胞，细菌，酵母，小鼠尾巴               | 细胞和组织 DNA 分离试剂盒                                    |
|        | 人类血液                              | 高纯度 PCR 模板制备试剂盒                                    |
|        | 哺乳动物/人类血液                         | 哺乳动物血液 DNA 分离试剂盒                                   |
|        | 血液，骨髓，组织，培养的细胞                    | 血液/骨髓/组织 DNA 分离试剂盒                                 |
| 质粒     | 大肠杆菌中增殖的质粒                        | 高纯度质粒分离试剂盒                                         |
| 病毒     | 血清，血浆，血液，其他体液，细胞培养上清液             | 高纯度病毒核酸试剂盒                                         |
|        | 血清，血浆，细胞培养上清液                     | 高纯度 16 体系病毒核酸试剂盒                                   |
| DNA 片段 | PCR 混合物，限制性酶切混合物，标记与修饰反应，地高辛标记的探针 | 高纯度 PCR 产物纯化试剂盒                                    |
|        | 从标记的 DNA 分子琼脂糖凝胶片中除去未连接的核苷酸       | 微量快速旋转 DNA 柱<br>琼脂糖凝胶 DNA 抽提试剂盒<br>高纯度 PCR 产物纯化试剂盒 |

\* 用这些试剂盒分离到的 DNA 的量取决于很多因素，如样本的量、样本中 DNA 的浓度、缓冲体系等。

1.3.2 根据 DNA 的主要应用选择试剂

分离 DNA 的用途不同，也应选择不同的 DNA 分离试剂，现举例如表 1-3。

表 1-3 各种 DNA 分离试剂的应用范围

| 产品                 | PCR/长 PCR | 限制性酶切分析 | Southern 斑点 | 标记/修饰反应 | 克隆 | 测序 | 体外转录 |
|--------------------|-----------|---------|-------------|---------|----|----|------|
| 细胞和组织 DNA 分离试剂盒    | ●         | ●       | ●           |         | ●  |    |      |
| 哺乳动物血液 DNA 分离试剂盒   | ●         | ●       | ●           |         | ●  |    |      |
| 血液/骨髓/组织 DNA 分离试剂盒 | ●         | ●       | ●           |         |    |    |      |
| 高纯度质粒分离试剂盒         | ●         | ●       | ●           | ●       | ●  | ●  | ●    |
| 高纯度病毒核酸试剂盒         | ●         |         |             |         |    |    |      |
| 高纯度 16 体系病毒核酸试剂盒   | ●         |         |             |         |    |    |      |
| 高纯度 PCR 模板制备试剂盒    | ●         | ●       | ●           |         | ●  |    |      |
| 高纯度 PCR 产物纯化试剂盒    |           | ●       | ●           | ●       | ●  | ●  | ●    |
| 微量快速旋转 DNA 柱       |           |         | ●           |         |    | ●  |      |
| 琼脂糖凝胶 DNA 抽提试剂盒    | ●         | ●       | ●           | ●       | ●  | ●  |      |

### 1.3.3 根据 DNA 的特性选择产品

根据 DNA 的特性，利用表 1-4 选择试剂。

表 1-4 根据分离 DNA 的特性建议选择的试剂

| 产品                 | 原始材料用量                                     | 常规产量                                                          |
|--------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 细胞和组织 DNA 分离试剂盒    | 组织: $\leq 1\text{g}$                       | 取决于组织类型                                                       |
|                    | 培养的细胞: $\leq 5 \times 10^7$ 个              | 700~3 000 $\mu\text{g}$                                       |
|                    | 小鼠尾巴: $\leq 400\text{mg}$                  | $\leq 800\mu\text{g}$                                         |
|                    | 酵母: $\leq 3 \times 10^{10}$ 个              | $\leq 300\mu\text{g}$                                         |
|                    | 革兰氏阴性菌: $\leq 10^{11}$ 个                   | 1 500~2 700 $\mu\text{g}$                                     |
| 哺乳动物血液 DNA 分离试剂盒   | 人: 全血 10ml                                 | 350 $\mu\text{g}$                                             |
|                    | 大鼠或家鼠全血: 10ml                              | 570 $\mu\text{g}$                                             |
| 血液/骨髓/组织 DNA 分离试剂盒 | 血或骨髓: 200 $\mu\text{l}$ ~2ml               | 4~11 $\mu\text{g}$ /200 $\mu\text{l}$ 血                       |
|                    | 组织: 10~100mg                               | 15~45 $\mu\text{g}$ /10mg 组织                                  |
|                    | 培养的细胞: $\leq 10^7$ 个                       | 90~110 $\mu\text{g}$ /10 <sup>7</sup> 个细胞                     |
| 高纯度质粒分离试剂盒         | 大肠杆菌: XLI Blue, pUC19: 2ml                 | 12 $\mu\text{g}$                                              |
|                    | 大肠杆菌: DH5 $\alpha$ , pUC19: 2ml            | 3.5 $\mu\text{g}$                                             |
| 高纯度病毒核酸试剂盒         | 血清, 血浆, 血液, 细胞培养上清液: 200~600 $\mu\text{l}$ | 通过 PCR 可检测                                                    |
| 高纯度 16 体系病毒核酸试剂盒   | 血清, 血浆, 血液, 细胞培养上清液: 200~600 $\mu\text{l}$ | 通过 PCR 可检测                                                    |
| 高纯度 PCR 模板制备试剂盒    | 血: $\leq 300\mu\text{l}$                   | 3~9 $\mu\text{g}$                                             |
|                    | 培养的细胞: $\leq 10^8$ 个                       | 15~20 $\mu\text{g}$                                           |
|                    | 小鼠尾巴: 15~50mg                              | 5~10 $\mu\text{g}$                                            |
|                    | 酵母: $10^8$ 个                               | 10~13 $\mu\text{g}$                                           |
|                    | 细菌: $10^9$ 个                               | 1~3 $\mu\text{g}$                                             |
| 高纯度 PCR 产物纯化试剂盒    | 修饰, 标记或限制性酶酶切反应物: 100 $\mu\text{l}$        | 回收率:<br>> 80% (5~25 $\mu\text{g}$ DNA, 片段 > 100bp)            |
| 微量快速旋转 DNA 柱       | 标记混合物: 20~75 $\mu\text{l}$                 | 回收率: > 90%<br>排阻限:<br>◎G-25: 10~12 bp<br>◎G-50: 72bp          |
| 琼脂糖凝胶 DNA 抽提试剂盒    | 琼脂糖薄片: 100~200mg                           | 回收率:<br>◎0.1~10kb: 80%<br>◎10kb~100kb: 60%<br>◎寡糖 > 20bp: 60% |

1.3.4 不同生物的 DNA 大小和相对分子质量

现将不同生物的 DNA 大小和相对分子质量列于表 1-5。

表 1-5 不同生物的 DNA 与相对分子质量

| 生物             | 大小 (bp)         | 相对分子质量 (kDa)     | 染色体数        |
|----------------|-----------------|------------------|-------------|
| pBR322, 大肠杆菌质粒 | 4,363           | $2.9\times10^3$  |             |
| SV40, 猿猴空泡病毒   | 5,243           | $3.5\times10^3$  |             |
| ΦX174, 大肠杆菌噬菌体 | 5,386           | $3.5\times10^3$  |             |
| 腺病毒 2, 人类病毒    | 35,937          | $23.7\times10^3$ |             |
| λ 噬菌体, 大肠杆菌噬菌体 | 48502           | $32.0\times10^3$ |             |
| 大肠杆菌, 细菌       | $4.7\times10^6$ | $3.1\times10^6$  |             |
| 啤酒酵母, 酵母       | $1.5\times10^7$ | $9.9\times10^6$  | 32 (二倍体)    |
| 盘基网柄菌, 霉菌      | $5.4\times10^7$ | $3.6\times10^7$  | 7 (单倍体)     |
| 线虫, 蠕虫         | $8.0\times10^7$ | $5.3\times10^7$  | 11/12 (二倍体) |
| 黑腹果蝇, 果蝇       | $1.4\times10^8$ | $9.2\times10^7$  | 8 (二倍体)     |
| 家鼠, 鼠          | $2.7\times10^9$ | $1.8\times10^9$  | 40 (二倍体)    |
| 非洲爪蟾, 蛙        | $3.1\times10^9$ | $2.0\times10^9$  | 36 (二倍体)    |
| 人              | $3.3\times10^9$ | $2.2\times10^9$  | 46 (二倍体)    |
| 玉米             | $3.9\times10^9$ | $2.6\times10^9$  | 20 (二倍体)    |
| 烟草             | $4.8\times10^9$ | $3.2\times10^9$  | 48 (二倍体)    |

1.4 DNA 分析

1.4.1 通过 OD 值的测量分析 DNA 的浓度和纯度

DNA 浓度的计算:

- (1)  $1A_{260}$  单位的双链 DNA=50μg/mlH<sub>2</sub>O
- (2)  $1A_{260}$  单位的单链 DNA=33μg/mlH<sub>2</sub>O

注释:

(1) 最佳的 OD 值应该在 0.1~1.0 之间。

(2) 上面提到值的是基于核酸在水中的消光系数，该值在其他的缓冲液或溶液中是不同的。

计算实例：

(1) 双链 DNA 样品的体积：100μl

(2) 稀释：25μl 上述样品+475μlH<sub>2</sub>O（1/20 稀释）

(3) 这种稀释液的 A<sub>260</sub>：0.44

(4) 样品中双链 DNA 的浓度：0.44×50μg/ml×20（稀释系数）=440μg/ml

(5) 样品中双链 DNA 的量：440μg/ml×0.1ml（样品体积）=44μg

DNA 纯度的分析：

纯 DNA：A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>≥1.8

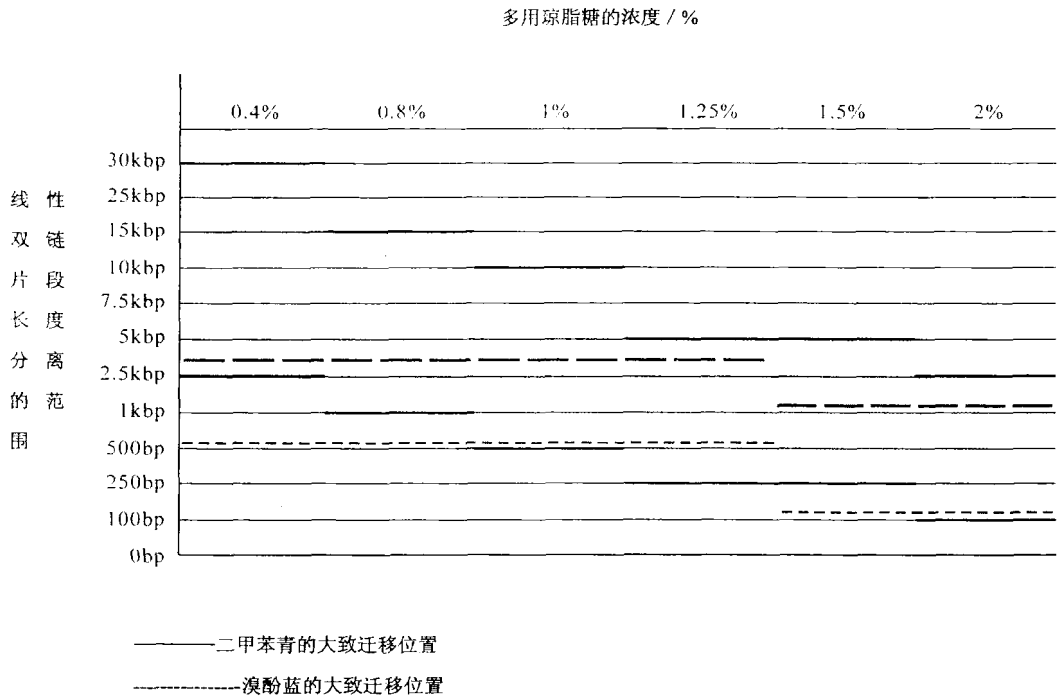
注释：

(1) A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub><1.8 表明样品中含有蛋白质和芳香族物质（如酚）。

(2) A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>>2 表明有一种可能即被 RNA 污染。

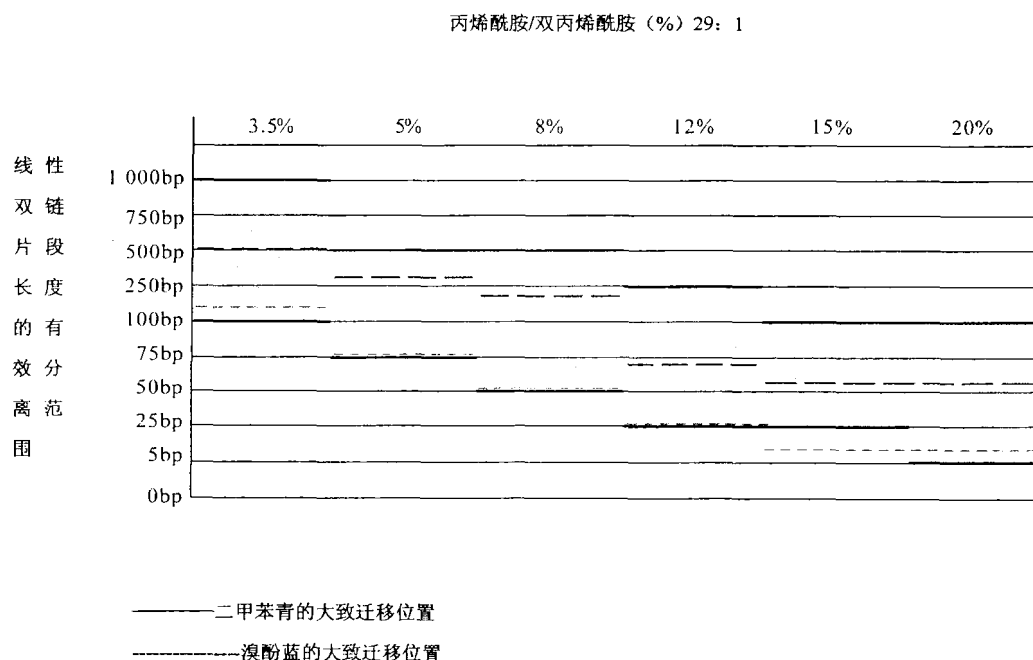
(3) OD 值不能反应 DNA 的大小。

1.4.2 多用琼脂糖凝胶中 DNA 片段大小的估计



多用琼脂糖：分子生化试剂——一种高强度琼脂糖凝胶（>1800g/cm，1%）该种琼脂糖可以使用非常高或非常低的浓度，所以在这种胶中可以分离大范围的 DNA 分子。请参考“缓冲液和培养基的配制”中所必须缓冲液的配制方法。

### 1.4.3 丙烯酰胺凝胶中 DNA 片段大小的估计



请参考“缓冲液和培养基的配制”中所必须缓冲液的配制方法。

### 1.4.4 限制性酶：常规知识

单位的定义：

(1) 一个单位的限制性内切酶是指该酶在最适的反应条件下 1 小时完全消化  $1\mu\text{g}$  DNA 所需酶的量；

(2) DNA 的类型，正确的反应温度和酶的特定活力在每个产品的说明书上都有陈述。

稳定性：

生物公司的分子生化试剂提供限制性内切酶标签上都有最后的使用期限，这个日期前使用可以保证酶有 100% 的活性。

保存：

(1) 像所有的蛋白质一样，限制性内切酶在高温条件下易于变性而失去特有的活性；

(2) 因此限制性内切酶应溶解在甘油中， $-20^{\circ}\text{C}$  下贮存。使用时，应把限制性内切酶置于冰上或特定的制冷冰盒中。

## 1.4.5 限制性内切酶：缓冲体系

SuRE/Cut 缓冲体系见表 1-6。

表 1-6 SuRE/Cut 缓冲体系 (10×)

| 缓冲液成分            | 终浓度 (mmol/L) |     |     |     |     |
|------------------|--------------|-----|-----|-----|-----|
|                  | A            | B   | L   | M   | H   |
| Tris-乙酸          | 33           |     |     |     |     |
| Tris-盐酸          |              | 10  | 10  | 10  | 50  |
| 乙酸镁              | 10           |     |     |     |     |
| 氯化镁              |              | 5   | 10  | 10  | 10  |
| 乙酸钾              | 66           |     |     |     |     |
| 氯化钠              |              | 100 |     | 50  | 100 |
| 1,4 二硫赤藓糖醇 (DTE) |              |     | 1   | 1   | 1   |
| 1,4 二硫苏糖醇 (DTT)  | 0.5          |     |     |     |     |
| 2-巯基乙醇           |              | 1   |     |     |     |
| 37℃下 pH 值        | 7.9          | 8.0 | 7.5 | 7.5 | 7.5 |

特定的孵化缓冲液见表 1-7。

表 1-7 特定的孵化缓冲液 (2×浓度的缓冲液)

| 缓冲液成分           | 终浓度 (mmol/L) |              |              |              |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                 | Mae I        | Mae II       | Mae III      | Nde II       |
| Tris-盐酸         | 20           | 50           | 20           | 50           |
| 氯化钠             | 250          | 220          | 275          | 75           |
| 氯化镁             | 6            | 6            | 6            | 5            |
| 2-巯基乙醇          | 7            | 7            | 7            |              |
| 牛血清白蛋白 (BSA)    |              | 100μg/ml     |              |              |
| 1,4 二硫苏糖醇 (DTT) |              |              |              | 0.5          |
| pH 值            | 8.0<br>(45℃) | 8.8<br>(50℃) | 8.2<br>(55℃) | 7.6<br>(37℃) |

## 1.4.6 限制性内切酶：星活性

定义：

在非最适的反应条件下，限制性内切酶切具有相似但非特异限制性酶切位点 DNA 序列的能力。

限制性内切酶受到的影响：

(1) 在一定的非最适反应条件下下列酶具有星活性：

BamH I, BssH II, Dde I, EcoR I, EcoR V, Hind III, Hinf I, Kpn I, Mam I, Pvu II,

Sal I, Sau 3AI, Sgr AI, Taq I。

(2) 但是有报道指出星活性可能是所有限制性内切酶的普遍特性。

引起星活性的因素:

- (1) 高的甘油浓度 (>5%V/V);
- (2) 过量的酶;
- (3) 缓冲体系非最适的离子强度、pH 值、二价阳离子;
- (4) 有机溶剂的存在。

星活性的避免:

- (1) 按产品说明上的建议, 使用每种酶的最适缓冲液;
- (2) 按产品说明上的建议, 使用最适量的酶;
- (3) 确保制备的 DNA 中不含 DNA 分离或纯化中使用的有机溶剂。

#### 1.4.7 限制性酶: 灭活和去除

下面的程序用于限制性酶的灭活与去除。

灭活:

- (1) 通过加热处理: 某些酶可以通过加热灭活, 请参照下文的限制性内切酶特性表。
- (2) 通过 EDTA 处理: 限制性内切酶还可通过加 0.5M EDTA(pH 值 8.0)至终浓度 10mmol/L 来灭活。

去除:

- (1) 通过酚/氯仿抽提: 用酚/氯仿抽提样品, 氯仿再抽提一次, 用乙醇或异丙醇沉淀 DNA;
- (2) 通过二氧化硅吸收: 酚/氯仿抽提程序比较麻烦, 可以用高纯度 PCR 产物纯化试剂盒(分子生化试剂)代替。

#### 1.4.8 限制性内切酶: 特性

限制性内切酶特性见表 1-8, 表 1-8 中的缩写和标示符号:

- A 在 SuRe/Cut 缓冲液 A 中内切酶的活性百分率;
- B 在 SuRe/Cut 缓冲液 B 中内切酶的活性百分率;
- L 在 SuRe/Cut 缓冲液 L 中内切酶的活性百分率;
- M 在 SuRe/Cut 缓冲液 M 中内切酶的活性百分率;。
- H 在 SuRe/Cut 缓冲液 H 中内切酶的活性百分率;
- T 内切酶的孵化温度, 黑体的温度不同于典型的 37℃。
- HI 内切酶的热灭活:
  - Y: 表明内切酶可以通过加热灭活 (65℃ 15 分钟);
  - N: 表明内切酶不可以通过加热灭活。
- MS 表明内切酶对甲基化作用的敏感性:
  - dcm<sup>+</sup>: 表明内切酶被 dcm 甲基化阻断;
  - dam<sup>+</sup>: 表明内切酶被 dam 甲基化阻断;