

4

Q520.3
H11

现代生物技术译丛

DNA 及 RNA 基本实验技术

[英]A.J.哈伍德 主编

盛小禹等 译 盛祖嘉等 校

科学出版社

2002

内 容 简 介

本书包括基因工程中一些最基本的实验方法,例如 DNA 分析、RNA 分析、克隆与亚克隆方法、PCR 等,同时也介绍了诸如银染、非放射性标记、自动化 DNA 序列分析等新技术。本书对于专业科研人员来说可提供较新的技术参考材料,对于生物学、医学、药学等专业的本科生、研究生来说也是一本非常好的实验技术参考书,使读者在学习基因工程常规操作的同时能全面了解当前新技术的进展情况。

The original English language work has
been published by HUMANA PRESS
Totowa, New Jersey, U. S. A.
All rights reserved.

图字:01-1999-3196

图书在版编目(CIP)数据

DNA 及 RNA 基本实验技术/(英)哈伍德(Harwood, A. J.)主编;盛小禹等译. —北京:科学出版社,2002.6

(现代生物技术译丛)

书名原文:Basic DNA and RNA Protocols

ISBN 7-03-009186-8

I. D… II. ①哈… ②盛… III. ①脱氧核糖核酸-生物化学-技术②核糖核酸-生物化学-技术 IV. Q520.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 05033 号

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>

源海印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2002 年 6 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2002 年 6 月第一次印刷 印张:24

印数:1—4 000 字数:545 000

定价:47.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈北燕〉)

译者序

笔者自 1985 年加入基因工程实验教学的行列以来已有多年的, 在长期的实验教学过程中深感要找到一本合适的参考书之不易。对于基因工程的基础实验教学而言, 能找到一本既介绍如核酸抽提、酶切、电泳、连接、转化、杂交、PCR、定点突变与 DNA 测序等基本技术, 同时还介绍如非放射性标记、银染和自动化测序等最新进展的综合性书籍尤其困难。1997 年偶然看到 Humana 公司出版的《Basic DNA and RNA Protocols》一书, 阅读之后认为此书无论在内容、深度等方面都适合于作为实验教学的参考书, 并且书的篇幅也并不庞大。尤其值得推荐的是每章末尾的注释部分, 其中描述了实验中常出现的问题和解决这些问题的途径。由于本书的每一章都是由对本章内容富有实验经验或对于有关实验技术的早期发展曾做出贡献的作者所写, 所以这些内容都是有价值的经验之谈。

本书中译本的出版像一个难产的婴儿。英文原作 1996 年出版, 1997 年购得, 直到 1998 年才确定了出版社并组织人员开始翻译。以后的审校工作也遇到了不少困难, 更值得一提的是本书审校者之一盛祖嘉先生在身患癌症住院之日起已在为本书工作, 令人深感惋惜的是另一审校者王顺德先生未能看到本书, 离我们而去。所幸今天终于到了交稿的日子, 真可以说是如释重负了。

最后还要感谢科学出版社使本书得以问世, 其中特别要感谢责任编辑的细致工作。此外还要感谢所有译者和审校者, 感谢为本书文字的录入做了大量工作的同志, 正是众人的努力才使读者终于能看到这本书。

盛小禹

2001.4.13

前 言

分子遗传学有时被称为“遗传工程”，它对生物学研究有巨大影响。现在离《分子生物学方法TM》第二卷《核酸》的出版已经 12 年，该书中包括当时通用的分子生物学和分子遗传学技术。这些技术发展很快，任何一本涉及其中基本技术的书都需要经常更新。最近一次修订是在 1988 年（《核酸新技术》第四卷）。在这以后许多新的、却是很基本的技术被写进《分子生物学方法》系列的某些分册中。《DNA 及 RNA 基本实验技术》这部书旨在把所有这些基本技术包含在一本书中。

在过去的 8 年里，已有的技术经历了许多重大的创新和次要的改进。例如聚合酶链式反应(PCR)为基因克隆和重组 DNA 带来全新的方法。另一方面，一些较为次要的改进，例如测序酶TM使 DNA 测序变得更为平常。本书既包含这些正在修改中的新的技术，也包括老技术的及时更新。由于我们仍然处在一个快速更新的时代，本书中也包括一些虽已足够成熟，但仍有待于进一步改进的技术，特别是像非同位素检测以及日渐变得重要的非同位素 DNA 标记、银染和自动化测序等。

在新技术的开发方面，公司从来没有像现在这样起着重要的作用。有一些技术创新的公司为本书做出贡献，就此我们对他们表示感谢。商品化的试剂为我们的研究工作带来方便。可是也存在着一种危险，即令初学者忽略了这些技术中的原理。为了补偿这一倾向，我们把某些常由厂商提供的试剂的制备方法写入书中。

本书按照以往的《分子生物学方法》所采用的原则编写。每一章由一位或几位对于所写的一章富于实验室经验或者做出开创性贡献的学者撰写。每一章都以菜谱的格式表达，以便于在实验室中直接应用，非但包括基本方法的详细描述，而且在注释一节中讨论了可能遭遇的问题（以及解决问题的方法）和一些可提供尝试的变化。

本书分为 7 个部分：DNA 分析、RNA 分析、基因克隆技术、亚克隆方法、PCR 技术、DNA 序列测定、定点诱变与蛋白质合成。这是为了使用方便而这样设置的，不应该把它们看成是固定的单元。所有这些方法都是相互关联并相互促进的。在各章之间文献的交叉就足以显示它们的相互关系。

本书基本上是为初步接触这些技术的成熟的科学工作者所写。可是我也希望即使最有经验的科学家在书中也可以发现一些他（她）们所感兴趣的建议或提示。

我感谢《分子生物学方法》各分册的编辑先生，我借用了其中许多有用的章节。为了能对某一专门问题了解更多的方法，我向读者推荐叙述更为详尽的原书。我也对所有对本书做出贡献和提出修改意见者特别表示感谢。最后还向为本书的出版提供多方面帮助的 Janet 女士表示感谢。

Adrian J. Harwood

译 者

第一部分	盛小禹
第二部分	李 舰
第三部分	刘亚和
第四部分	盛小禹
第五部分	付为军
第六部分	杨秀疆
第七部分	王立新

审校者

盛祖嘉	沈仁权
沈仁权	盛祖嘉
沈仁权	盛祖嘉
沈仁权	盛祖嘉
盛祖嘉	王顺德
王顺德	沈仁权
盛祖嘉	王顺德

目 录

第一部分 DNA 分析	(1)
第一章 从组织或培养细胞同时分离 DNA 与 RNA	(3)
第二章 DNA 的限制性内切酶消化	(9)
第三章 琼脂糖凝胶电泳	(12)
第四章 琼脂糖凝胶电泳的印迹转移	(16)
第五章 应用随机引物的 ³² P 标记 DNA 探针的制备	(19)
第六章 Southern 印迹的杂交和竞争性杂交	(22)
第七章 Southern 杂交中地高辛修饰的核苷酸标记 DNA 探针的应用	(28)
第八章 荧光素标记核酸探针的制备及其碱性磷酸酯酶催化的二氧杂环 烷化学发光反应检测	(36)
第九章 监测核酸探针中荧光素标记水平的快速检测	(44)
第十章 辣根过氧化物酶标记的核酸探针制备及其强化的化学发光反应 检测	(46)
第十一章 寡核苷酸 3' 端的荧光素-11-dUTP 标记及其强化的化学发光 反应检测	(52)
第十二章 RNA 探针的制备	(57)
第十三章 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	(64)
第十四章 核酸的银染检测	(67)
第十五章 DNA 片段的末端标记	(72)
第二部分 RNA 分析	(77)
第十六章 Northern 印迹分析	(79)
第十七章 RNA 狭缝印迹分析	(91)
第十八章 RNase 保护测定法	(93)
第十九章 mRNA 的引物延伸分析	(98)
第二十章 应用单链 DNA 探针的 S1 定位法	(105)
第二十一章 细胞及组织的非放射性原位杂交	(111)
第三部分 基因克隆技术	(123)
第二十二章 DNA 的体外包装	(125)
第二十三章 应用 λ 置换型载体构建哺乳动物基因组文库	(129)
第二十四章 用于构建文库的双链 cDNA 制备	(140)
第二十五章 cDNA 文库的构建	(146)
第二十六章 λ 文库的筛选	(155)

第一部分

DNA 分析

第一章 从组织或培养细胞同时分离 DNA 与 RNA

Frank Merante, Sandeep Raha, Jutta K. Reed,
Gerald Proteau

1. 引言

分离纯化 DNA^[1~7]或 RNA^[8~23]的方法已有很多,但往往只能纯化一种核酸而浪费了另一种。当细胞材料有限时,人们经常希望从一种材料中同时分离出 DNA 和 RNA,例如从活检样品中、从原始细胞系中以及从经过处理的胚胎干细胞中分离核酸。

已发表的几种方法尽管可以同时从一种材料中抽提 DNA 与 RNA^[24~31],但仍不过是 Chirgwin 等^[8]原始方法的修改而已。这些方法利用硫代氰酸胍与三氟醋酸铯^[25,27]等强促溶性试剂破坏细胞膜并同时使细胞内 RNA 酶失活^[26,29,30]。这些方法的不利之处是须要用到超离心技术^[26~28,30]并且实验过程太长(16~44 h)。

不用超离心技术而用酚同时分离 DNA 与 RNA 的方法是利用酚是高效的蛋白质变性剂^[1,32],它可以很快地破坏细胞的完整性并且使蛋白质变性^[24~31]。这里所介绍的是在酚抽提过程中利用合适的抽提缓冲液以及选择性地从 RNA 中分离出高相对分子质量的 DNA 的方法^[31]。

这个方法用了一次酚抽提与两次酚/氯仿抽提,从核酸溶液中同时去除蛋白质与脂质类杂质。就像 Wallace^[33]讨论过的那样,水相抽提缓冲液的组成已调整到最适于回收核酸的状态,例如低 pH 值(pH 7.5),含有表面活性剂(0.2% SDS)和相对低盐的条件(100 mmol/L LiCl)都有利于蛋白质的分离并使核酸分配于水相中。此外 100 mmol/L 的 EDTA 能防止蛋白质集聚并且能螯合 Mg^{2+} ,这样就抑制了依赖于 Mg^{2+} 的核酸酶的作用^[34]。

这一方法与 Krieg 等人的方法^[24]不同,前者裂解与抽提的步骤十分温和,能在乙醇沉淀后用带钩玻璃棒将高相对分子质量的 DNA 选择性地缠绕出来^[2,34,35],这样就避免了将所有核酸沉淀出来之后再用 LiCl 沉淀的步骤。此外此法可放大或缩小到针对不同量的样品处理,并且可以同时处理多个样品。分离全部的细胞 DNA 与 RNA 约需 2 h。用这一方法曾顺利地分离了 PC12 细胞的核酸并用于 Southern 与 Northern 印迹分析中^[31]。

2. 材料

如果可能的话最好使用分子生物学级的试剂和一次性的灭菌聚丙烯管。如使用玻璃器皿则须预先在 280℃ 烘烤至少 3 h 方可。

2.1 非黏附型的组织培养细胞中核酸的抽提

- 1) PBS: 0.137 mol/L NaCl, 2.68 mmol/L KCl, 7.98 mmol/L Na_2HPO_4 , 1.47 mmol/L KH_2PO_4 , pH 7.2。
- 2) 二乙基焦碳酸盐 (diethylpyrocarbonate, DEPC) 处理的水: 1 ml DEPC 加入到 1 L 的重蒸水中 (0.1% DEPC v/v) 后搅拌过夜。20 psi ($1\text{ psi} = 6.89 \times 10^3 \text{ Pa}$) 高压灭菌 20 min 可使 DEPC 失活 (参见注释 1)。
- 3) STEL 缓冲液: 0.2% SDS, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10 mmol/L EDTA, 100 mmol/L LiCl。在 DEPC 处理过的水中加入 Tris-HCl, EDTA 和 LiCl, 高压灭菌后再加入适量的 10% SDS。10 g SDS 溶于 DEPC 处理过的水中配制成 10% SDS 贮存液, 使用前 65℃ 保温 2 h。
- 4) 酚: 酚的平衡如前所述^[34]。先用 pH 8.0 的 0.5 mol/L Tris-HCl 抽提含有 0.1% 8-羟基喹啉 (抗氧化剂) 的超纯重蒸酚一次, 然后用 pH 8.0 的 0.1 mol/L Tris-HCl 反复抽提直到液相的 pH 值至 8.0 为止。使用前再用 STEL 抽提缓冲液平衡二次。经平衡处理的酚至少可于 4℃ 贮藏两个月。
- 5) 酚/氯仿混合物: 将等体积的氯仿加入到 STEL 平衡过的酚中混匀, 混合物至少能在 4℃ 保存两个月。处理酚时必须戴上手套并在通风橱中进行。
- 6) 5 mol/L LiCl: 用 DEPC 处理过的水配制并进行高压灭菌。
- 7) TE: 10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0, 用 DEPC 处理过的水配制并进行高压灭菌。
- 8) RNA 保护剂: 例如 RNA 酶抑制剂 RNasin (Promega; Madison, WI)。

2.2 上述方法的变化, 用于黏附型的细胞培养物和组织

- 9) 胰蛋白酶: 以 0.125% 的浓度溶于 PBS, 短时间可保存于 4℃ 冰箱, 长时间则应保存于冰冻柜中。

3. 方 法

3.1 非黏附型的组织培养细胞中核酸的抽提

下面是从非黏附型的组织培养细胞中抽提核酸的具体步骤。3.2 节则是用此法抽提黏附型细胞培养与组织中核酸的方法。

为了防止皮肤上的 RNA 酶的污染, 应在抽提过程中戴上一次性手套。此外, 分离与分析 RNA 的器皿最好专用, 例如玻璃器皿、移液管与电泳槽等。

- 1) 细胞培养液 (1×10^7) 应置于冰水浴中 (参见注释 2)。倒入 15 ml 聚丙烯管中, 以 100 g 离心 5 min, 用 10 ml 冰冷却的 PBS 缓冲液洗涤沉淀后再次离心。处理其他样品时可将沉淀细胞置于冰水浴中。

- 2) 同时向管中加入 5 ml STEL 平衡过的酚与 5 ml 冰冷却的 STEL 缓冲液, 轻轻倒转 3~5 min 使沉淀细胞彻底悬浮 (参见注释 3 和 4)。
- 3) 20℃ 中以 100 000 g 离心 5 min 使两相分离, 用灭菌的聚丙烯移液管将水相 (上层) 移至一个新的管中, 再用等体积的酚/氯仿抽提两次 (参见注释 5)。
- 4) 将水相移至一个 50 ml 的 Falcon 管中, 加入 0.1 倍体积的 5 mol/L 冰冷却的 LiCl 与 2 倍体积冰冷却的无水乙醇使高相对分子质量的 DNA 从 RNA 中分步沉淀出来, 这时的 DNA 会立刻以线团状沉淀出来。
- 5) 轻轻用带钩玻璃棒缠绕 DNA 使其呈结构紧密状态。将玻璃棒靠在管子的壁上以除去残留的乙醇, 用 1 ml 70% 冰冷却的乙醇淋洗缠绕在玻璃棒上的 DNA 以除去其中的盐分。小心地用冰冷却的 TE (pH 8.0) 淋洗 DNA 以除去残留的乙醇 (参见注释 6)。
- 6) 玻璃棒上的 DNA 溶解于适当体积的 TE (pH 8.0) 中并于 4℃ 保存。
- 7) 将剩余溶液置于 -70℃ 冰箱或乙醇/干冰浴中 30 min 使 RNA 沉淀出来。
- 8) 10 000g 离心 15 min 沉淀 RNA 并小心地抽气除去残余的上清液。用冰冷却的 70% 的乙醇淋洗沉淀, 再次离心 5 min 并除去上清液。RNA 沉淀真空干燥后用 DEPC 处理过的水溶解。
- 9) 对于以水溶液保存的样品可按制造商所提供的资料加入 5~10 U 的 RNasin (RNA 酶抑制剂)。另外, RNA 也可以安全地保存在乙醇/ LiCl 溶液中 (参见注释 7 和 8)。

3.2 上述方法的变化, 用于黏附型的 细胞培养物或组织的核酸抽提

3.2.1 黏附型细胞的核酸抽提

- 1) 用抽气法去除相当于 1×10^7 细胞的培养液, 用 10 ml 37℃ 的 PBS 将细胞洗涤一次。
- 2) 加入 1 ml 胰蛋白酶溶液后于 37℃ 保温直至细胞脱落。这步操作约需 10 min。加入冰冷却的 PBS 溶液稀释胰蛋白酶。
- 3) 按照 3.1 节步骤 2~9 继续操作。

3.2.2 组织的核酸抽提

- 1) 用冰冷却的 PBS 缓冲液淋洗约 500 mg 的无血组织, 冷却后用灭菌刀片切成约 3~5 cm³ 的小块。
- 2) 将块状组织逐渐加到装有液氮的研钵中研碎至细粉末状。
- 3) 缓慢地将粉碎的组织加到已混匀的 5 ml 酚和 5 ml STEL 溶液中。操作时最好用经烘烤的玻璃棒逐渐将粉碎的组织搅入酚/STEL 的乳浊液中, 直至组分彻底混匀。继续轻轻上下倒转离心管 5 min。
- 4) 按照 3.1 节步骤 3~9 继续操作。

4. 注 释

- (1) DEPC 是可疑的致癌剂, 取用时应戴手套并在通风橱中操作。由于 DEPC 可作为酰

化剂作用于蛋白质中的组氨酸与酪氨酸,所以像 Tris 溶液等敏感材料不能直接用它进行处理,但可以用 DEPC 处理过的水来配制敏感的试剂。

- (2) 使收集到的细胞与组织处于低温状态下有利于保持核酸的完整性。
- (3) 此法成功的关键取决于是否能在温和条件下破碎细胞的同时使 DNA 保持高分子质量的完整状态。用 STEL/酚处理时应缓慢地将管上下倒转,这样可以减少 DNA 分子所受到剪切力的作用。
- (4) 首次酚抽提时(第 3.1 节步骤 3)分配于水相(上层)与酚相界面上的含蛋白质水溶液可用酚/氯仿再次抽提以提高 DNA 的回收效率。
- (5) 氯仿中通常以 24:1 (v/v) 的比例加入异戊醇,后者是一种消泡剂。我们发现当用温和的手法倒转或在转轮上转动管子时不存在产生泡沫问题,所以在常规的操作中就可以省略异戊醇了。
- (6) DNA 可以空气干燥,但再溶解时就要花费较长的时间。
- (7) 当用上述方法选择性地去高相对分子质量 DNA 后,剩余 RNA 中的 DNA 已不能被 EB 染色检出^[31]。如果抽提纯化的 RNA 是被用在 PCR 反应中,则必须用 RNase 处理过的样品作为对照,保证其中没有 DNA 的污染。实际上这一处理对任何 RNA 纯化步骤都适用,特别是对于那些在操作步骤开始时就将 DNA 剪切的实验更为必要。
- (8) 所用细胞数为 $1.5 \times 10^7 \sim 20 \times 10^7$, A_{260}/A_{280} 约 1.86 时 RNA 的典型产量为 60 ~ 170 μg ^[31]。这些数据完全与使用硫代氰酸胍与 CsCl 法抽提的结果相接近^[8]。

参 考 文 献

1. Graham, D. E. (1978) The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms of large tissue masses. *Anal. Biochem.* **85**, 609-613.
2. Bowtell, D. D. (1987) Rapid isolation of eukaryotic DNA. *Anal. Biochem.* **162**, 463-465.
3. Longmire, J. L., Albright, K. L., Meincke, L. J., and Hildebrand, C. E. (1987) A rapid and simple method for the isolation of high molecular weight cellular and chromosome-specific DNA in solution without the use of organic solvents. *Nucleic Acids Res.* **15**, 859.
4. Owen, R. J. and Borman, P. (1987) A rapid biochemical method for purifying high molecular weight bacterial chromosomal DNA for restriction enzyme analysis. *Nucleic Acids Res.* **15**, 3631.
5. Raymond, C. D. (1987) A rapid method for the preparation of multiple samples of eukaryotic DNA. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8118.
6. Miller, S. A. and Polesky, H. F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1215.
7. Grimberg, J., Nawoschik, S., Belluscio, L., McKee, R., Turck, A., and Eisenberg, A. (1989) A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Res.* **17**, 8390.
8. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., and Rutter, W. J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294-5299.

9. Auffray, C. and Rougeon, F. (1980) Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumour RNA. *Eur. J. Biochem.* **107**, 303–314.
10. Elion, E. A. and Warner, J. R. (1984) The major promoter element of rRNA transcription in yeast lies 2 Kb upstream. *Cell* **39**, 663–673.
11. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA extraction by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159.
12. Hatch, C. L. and Bonner, W. M. (1987) Direct analysis of RNA in whole cell and cytoplasmic extracts by gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **162**, 283–290.
13. Emmett, M. and Petrack, B. (1988) Rapid isolation of total RNA from mammalian tissues. *Anal. Biochem.* **174**, 658–661.
14. Gough, N. M. (1988) Rapid and quantitative preparation of cytoplasmic RNA from small numbers of cells. *Anal. Biochem.* **173**, 93–95.
15. Meier, R. (1988) A universal and efficient protocol for the isolation of RNA from tissues and cultured cells. *Nucleic Acids Res.* **16**, 2340.
16. Wilkinson, M. (1988) RNA isolation: a mini-prep method. *Nucleic Acids Res.* **16**, 10,933.
17. Wilkinson, M. (1988) A rapid and convenient method for isolation of nuclear, cytoplasmic and total cellular RNA. *Nucleic Acids Res.* **16**, 10,934.
18. Ferre, F. and Garduno, F. (1989) Preparation of crude cell extract suitable for amplification of RNA by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **17**, 2141.
19. McEntee, C. M. and Hudson, A. P. (1989) Preparation of RNA from unsphero-plasted yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*). *Anal. Biochem.* **176**, 303–306.
20. Nemeth, G. G., Heydemann, A., and Bolander, M. E. (1989) Isolation and analysis of ribonucleic acids from skeletal tissues. *Anal. Biochem.* **183**, 301–304.
21. Verwoerd, T. C., Dekker, B. M. M., and Hoekema, A. (1989) A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* **17**, 2362.
22. Schmitt, M. E., Brown, T. A., and Trumpower, B. L. (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3091.
23. Tavangar, K., Hoffman, A. R., and Kraemer, F. B. (1990) A micromethod for the isolation of total RNA from adipose tissue. *Anal. Biochem.* **186**, 60–63.
24. Krieg, P., Amtmann, E., and Sauer, G. (1983) The simultaneous extraction of high-molecular-weight DNA and of RNA from solid tumours. *Anal. Biochem.* **134**, 288–294.
25. Mirkes, P. E. (1985) Simultaneous banding of rat embryo DNA, RNA and protein in cesium trifluoroacetate gradients. *Anal. Biochem.* **148**, 376–383.
26. Meese, E. and Blin, N. (1987) Simultaneous isolation of high molecular weight RNA and DNA from limited amounts of tissues and cells. *Gene Anal. Tech.* **4**, 45–49.
27. Zarlenga, D. S. and Gamble, H. R. (1987) Simultaneous isolation of preparative amounts of RNA and DNA from *Trichinella spiralis* by cesium trifluoroacetate isopycnic centrifugation. *Anal. Biochem.* **162**, 569–574.
28. Chan, V. T.-W., Fleming, K. A., and McGee, J. O. D. (1988) Simultaneous extraction from clinical biopsies of high-molecular-weight DNA and RNA: comparative characterization by biotinylated and ³²P-labeled probes on Southern and Northern blots. *Anal. Biochem.* **168**, 16–24.
29. Karlinsey, J., Stamatoyannopoulos, G., and Enver, T. (1989) Simultaneous purification of DNA and RNA from small numbers of eukaryotic cells. *Anal. Biochem.* **180**, 303–306.

30. Coombs, L. M., Pigott, D., Proctor, A., Eydmann, M., Denner, J., and Knowles, M. A. (1990) Simultaneous isolation of DNA, RNA and antigenic protein exhibiting kinase activity from small tumour samples using guanidine isothiocyanate. *Anal. Biochem.* **188**, 338–343.
31. Raha, S., Merante, F., Proteau, G., and Reed, J. K. (1990) Simultaneous isolation of total cellular RNA and DNA from tissue culture cells using phenol and lithium chloride. *Gene Anal. Tech.* **7**, 173–177.
32. Kirby, K. S. (1957) A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. *Biochem. J.* **66**, 495–504.
33. Wallace, D. M. (1987) Large and small scale phenol extractions, in *Methods in Enzymology*, vol. 152: *Guide to Molecular Cloning Techniques* (Berger, S. L. and Kimmel, A. R., eds.), Academic, Orlando, FL, pp. 33–41.
34. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
35. Davis, L. G., Dibner, M. D., and Battey, J. F. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier, New York.

第二章 DNA 的限制性内切酶消化

Duncan R. Smith

1. 引言

在特定位点切割 DNA 的方式为今天的基因工程奠定了基础。限制性内切酶来自细菌，能对双链 DNA 的特定目标序列进行切割从而产生特定的片段，这些酶可以从大多数生物工程制品公司购得。酶的命名是按照 Smith 与 Nathans 的建议^[1]。从酶的名称上（例如 *Bam*HI、*Eco*RI 等）可以知道酶的来源，但不能知道任何有关于酶的切割特性（参见注释 1），而切割特性恰恰是因酶而异的。大部分常用酶的切割位点具有短的回文对称序列，通常是 4、5 或 6 个碱基的长度，例如 AGCT (*Alu*I)、GAATTC (*Eco*RI) 等。每一种酶在特定的回文对称位点上切割，但也有两种不同的酶识别同一种序列，却切割识别序列内的不同位置。酶的切点可以分为三类：一类是切割位点位于中间而产生平末端，另外两类则在 5' 或 3' 突出末端产生不配对的碱基。有关限制性内切酶的全面综述可参考 Fuchs 与 Blakesley^[2]的资料。

2. 材料

- 1) 适当的限制酶缓冲液：10×贮存液（参见注释 2）。
- 2) 待切的 DNA 溶于水或 TE（10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.3，1 mmol/L EDTA）中（参见注释 3 和 4）。
- 3) 浓度为 1 mg/ml 的牛血清白蛋白（BSA）（参见注释 5）。
- 4) 灭菌蒸馏水（参见注释 6）。
- 5) 正确选择的酶（参见注释 7）。
- 6) 5×点样液：50%（v/v）甘油，100 mmol/L Na₂EDTA、pH 8.0，0.125%（w/v）溴酚蓝（6pb），0.125%（w/v）二甲苯青。
- 7) 100 mmol/L 亚精胺（参见注释 8）。

3. 方法

- 1) 除酶以外的所有溶液解冻后置于冰水浴中。
- 2) 确定酶切反应的最终体积，通常是 10~50 μ l（参见注释 9）。在灭菌的 Eppendorf 管中加入 1/10 终体积的酶切缓冲液、1/10 终体积的 BSA，0.5~1 μ g 的待切割 DNA（参见注释 3），最后再加灭菌蒸馏水至反应终体积。
- 3) 直接从 -20℃ 冰箱中取出酶。用干净的灭菌吸管吸取所需要的单位数（参见注释 7

和 10) 后立即放入反应混合液中并混匀 (参见注释 11)。

4) 将管子放在合适的温度中 (参见注释 12) 保温约 1 h, 基因组 DNA 可以酶切过夜。

5) 取出部分酶切样品 (通常 1~2 μ l) 与 5 $\times$ 点样液混合后进行电泳分析 (参见第三章)。

4. 注 释

(1) 酶的命名是按照 Smith 与 Nathans^[1]所建议的, 即根据首次分离到该酶的细菌而得名。限制酶名称的第一个字母是属名, 后两个是种名, 从而构成酶名的三字母缩写形式。例如从 *Providencia stuartii* 中分离的酶定名为 *Pst*, 从这一种细菌分离得到的第一种酶定名为 *Pst* I, 第二种酶为 *Pst* II, 余类推。但要注意的是酶的命名中并未给出任何关于酶切位点的信息, 而这些必须从酶的切割特性表中方能查到。大多数提供酶的公司的产品目录中载有详细的酶切特性资料, 这些特性包括酶的切割特性、酶的最适反应条件以及在常用 DNA 模板上的切割位点数等。这些产品目录都应该认为是有价值的信息来源。

(2) 每一种酶都有最适反应缓冲液, 这些推荐的反应条件通常都包括在制造商提供的测试表格中。实际上很多酶反应都可以使用一种共同的条件, 这就可以配制一种适用于大多数酶反应的通用缓冲液。绝大多数酶能在三种缓冲液的任何一种中进行切割反应。它们分别是高盐、中盐与低盐缓冲液, 配方列在下面。这些缓冲液通常是配成 10 $\times$ 的浓度, 使用时在待消化样品中加入终体积的 1/10 即可。必须注意的是使用的缓冲液必须与酶匹配, 用错缓冲液会导致酶活力剧降, 酶切特异性改变甚至出现酶活力完全丧失的现象。有些制造商还会额外提供合适的缓冲液以示优惠, 建议使用这些酶时应同时使用该厂商所提供的酶切缓冲液。

a. 高盐缓冲液 (1 $\times$): 100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5,

10 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT

b. 中盐缓冲液 (1 $\times$): 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5,

10 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT

c. 低盐缓冲液 (1 $\times$): 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10 mmol/L MgCl₂,

1 mmol/L DTT

除此之外还有两种有时采用的“通用缓冲液”, 在通用缓冲液中所有的限制酶都有活力, 但在有些情况下酶活力会下降到最大活力的 20%。这种通用缓冲液是谷氨酸钾盐^[3]和醋酸钾盐^[4]缓冲液。这两种缓冲系统特别适用于须用两种完全不同的缓冲系统进行 DNA 切割的实验中。

(3) 待切割 DNA 的量取决于以后的实验步骤。如果是为了鉴定质粒 DNA 中有否插入片段, 那么合适的酶切 DNA 量约为 500 ng 至 1 μ g, 当然酶切的 DNA 量还与插入片段的大小有关。插入片段愈小酶切的 DNA 量应愈大, 只有这样才能在以后的电泳中观察到插入的片段。

(4) 所切割的 DNA 应该有一定的纯度, DNA 样品中不能存在如酚、氯仿、乙醇、盐、去污剂以及螯合剂等杂质, 即使是痕量的这类化学物质也会抑制酶的反应或是使酶失活。

(5) 为了稳定低蛋白浓度的酶制剂以及防止变性, 酶的反应体系中通常须加入 BSA。