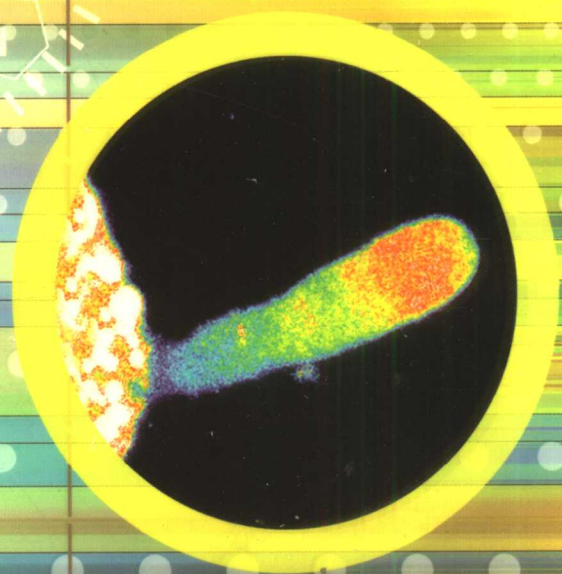
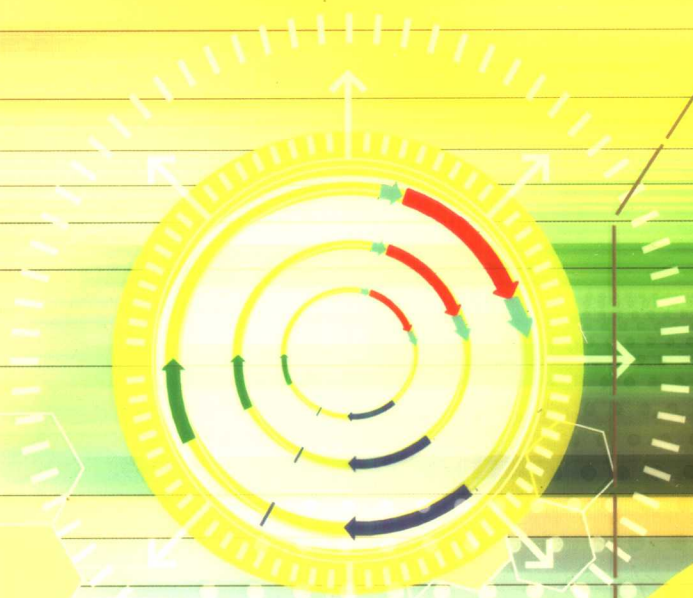


现代分子生物学 模块实验指南

◎主 编 李玉花

副主编 刘靖华 徐启江 许志茹



高等教育出版社
Higher Education Press

现代分子生物学 模块实验指南

◎主 编 李玉花

副主编 刘靖华 徐启江 许志茹

编写人员 (按姓氏笔画排序)

于晓梅

许志茹

李葵花

聂玉哲

周 波

蓝兴国

唐

解莉楠

流

花

靖

楠

刘靖华

李志杰

徐启江

滕春波



高等教育出版社
Higher Education Press

图书在版编目(CIP)数据

现代分子生物学模块实验指南/李玉花主编. —北京:高等教育出版社, 2007. 7

ISBN 978-7-04-021463-5

I. 现… II. 李… III. 分子生物学-实验-高等学校-教学参考资料 IV. Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 071206 号

策划编辑 王 莉 责任编辑 张晓晶 封面设计 张 楠 责任绘图 朱 静
版式设计 马静如 责任校对 俞声佳 责任印制 张泽业

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街 4 号
邮政编码 100011
总 机 010-58581000

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司
印 刷 北京市卫顺印刷厂

开 本 889×1194 1/16
印 张 17.75
字 数 550 000

购书热线 010-58581118
免费咨询 800-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

版 次 2007 年 7 月第 1 版
印 次 2007 年 7 月第 1 次印刷
定 价 24.70 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 21463-00

科学与技术从来都是相辅相成、互促共进的一对孪生兄弟,科学为技术的发明与提升提供理论依据,技术为科学的发现与研究提供方法手段。20世纪70年代建立的“遗传工程”是 Paul Berg 和他的合作者将许多独立的技术要素相互联系,形成网络后的一项重要的技术集成。这一技术创造性地实现了不同物种 DNA 分子的体外遗传重组,不仅引发了一场分子生物学革命,而且被科学界评价为与 Watson 和 Crick 发现 DNA 双螺旋结构模型具有同样的开拓性价值。Kary B. Mullis 发明了 DNA 扩增的 PCR 技术,尽管它本身并未开辟分子生物学新的研究领域,但它却使一些既无法实施,又无法深入的研究领域迅速获得成功与突破。毫无疑问,这项简单而又晚熟的技术发明对分子生物学研究的影响程度超过了其他任何技术,它的应用领域也几乎超过了其他任何技术。

分子生物学的发展不仅得益于不同学科的相互渗透,而且在极大程度上取决于实验技术、研究手段的不断革新与发明。现代分子生物学已从一门“观察性”和“验证性”的科学发展成为一门“干涉性”和“创造性”的科学。学生只有在学习分子生物学基本理论的同时,不断强化分子生物学实验技能的训练,才能为全面提高从事科学研究、技术发明、产品开发的综合创新能力奠定基础。

《现代分子生物学模块实验指南》一书正是基于这一学科发展的规律和人才培养的理念,以形式新颖、内容先进、图解清晰、注重启迪为特色,为实验教学提供了一本图文并茂、系统完整的实验教材。作者将自己丰富的教学经验与丰厚的科研积累有机地结合起来,组合了一系列具有设计性、综合性的模块式教学实验内容。该书的突出特点主要体现在:

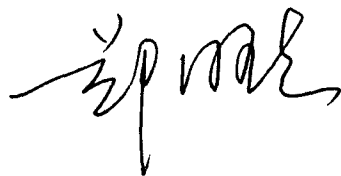
1. 将现代分子生物学的前沿研究技术与经典的实验技术进行有机整合,不仅使每一模块的实验内容形成一个独立的研究专题,而且强化了实验内容的相关性、完整性和先进性。

2. 每个实验模块都编写有“注意事项与建议”,不仅有助于学生对实验原理的理解,而且有助于提高学生分析问题、解决问题的能力。

3. 全书以流程图的方式对每一模块实验的基本过程进行图文并茂的讲述和逻辑严谨的指导,有操作过程直观、要点提示清晰的效果,不仅提高了课堂实验的成功概率,而且增强了学生参与实践教学的兴趣。

该书对生物类专业本科生和研究生以及相关领域研究人员均具有较高的参考价值,是实现研究型实验教学的一本不可多得的好教材。

华中农业大学



21 世纪是生命科学的世纪,各种组学研究使得生命科学由描述性的定性的科学走向精确定量的科学,对生命现象的认识从还原论到整体论,以分子生物学为先导的生命科学的发展正面临一个新的高峰。分子生物学是从分子水平上研究生命本质的一门新兴边缘学科,以核酸和蛋白质等生物大分子的结构及其在遗传信息和细胞信息传递中的作用为研究对象,是当前生命科学中发展最快并正在与其他学科广泛交叉与渗透的前沿研究领域。分子生物学基本理论的建立与发展都是以实验为基础的,只有通过实验室的实际操作训练,才能进一步理解实验背后的科学理论,达到掌握实验基本技能、培养理论与实践相结合能力、提高科学思维能力和创新能力的目的。

为加强分子生物学实验内容的完整性、先进性,我们结合自己的科研实践,编写了模块式实验教学讲义,对实验内容进行了精心选择,注意将前沿性技术从科研上汲取过来,力求实验体系内容新颖、方法先进、技术全面、注重创新。经过四轮的本科学、研究生必修课的教学实践,达到“基本技能训练、综合能力培养、创新能力开发”的渐进式、启发式教学效果。为适应今后一段时期教学科研的需要,我们对教学讲义进行了补充修订并编辑成书,内容兼顾了农、林、医学的基础实验与应用实验,可作为农、林、医学专业的通用教材。

本书由十个模块组成。第一模块为核酸提取与分子杂交,第二模块为目的基因的合成及检测,第三模块为大规模基因差异表达分析,第四模块为蛋白质的表达、纯化与检测,第五模块为蛋白质样品的制备、分离与鉴定,第六模块为蛋白质相互作用的研究,第七模块为分子标记技术的比较与应用,第八模块为目的基因的遗传转化,第九模块为激光扫描共聚焦显微镜的应用,第十模块为生物信息学与网络应用。为了模块的完整性及实现对模块研究内容的全面理解,模块内除了编写适合本科教学的实验内容之外,还编入了扩展性的实验内容(用*号标注),可为本科生创新实验及本科生作毕业论文提供参考。

本书具有以下主要特色:① 把现代分子生物学的经典及前沿研究技术分成若干个模块,模块内的实验相互有机联系形成一个小的研究专题,使学生通过实验理解研究内容,提高学生的研究能力和研究兴趣,达到研究型教学的目的。② 每章设有模块的实验目的和模块的实验流程图,使学生清楚了解实验之间的相关性,对实验的目的和流程有一个系统的了解和掌握。③ 实验方法与主要结果附图,具有一定的示范实验的作用,使学生能基本独立操作,并可以判断实验结果的正确性。④ 每个模块都设有注意事项和建议,增强了学生对实验的理解,并提高了学生的实验操作技巧与成功概率。⑤ 编入大量的前沿研究技术,对培养本科生的研究能力及研究生研究使用都很有帮助。

感谢高等教育出版社生命科学分社的同志们对本书出版的大力协助与支持。

本书的编写人员虽然在相关研究领域具有自己的技术专长,并且都是处于教学科研第一线的教师、博士研究生。但限于学术水平和编写经验的不足,难免存在疏漏和差错,恳请各位读者给予批评指正,以便进一步修改完善。

编者
2006 年 8 月

目 录

模块一	核酸提取与分子杂交	1
1-1	DNA 的提取与 Southern 杂交	4
1-2	RNA 的提取与 Northern 杂交	21
* 1-3	原位杂交分析	36
模块二	目的基因的合成及检测	53
2-1	cDNA 末端快速扩增法合成目的基因	56
2-2	目的基因的克隆	64
2-3	目的基因的序列分析	75
模块三	大规模基因差异表达分析	79
* 3-1	抑制消减文库的建立	82
3-2	特异基因的序列测定	91
3-3	序列比对与基因注释	94
* 3-4	基因芯片分析	98
模块四	目的蛋白质表达、纯化与检测	103
4-1	目的基因原核表达质粒的构建	106
4-2	谷胱甘肽-S-转移酶融合蛋白的表达与纯化	111
4-3	组氨酸标签融合蛋白的表达与纯化	115
4-4	免疫印迹检测目的蛋白质的表达	118
模块五	蛋白质样品的制备、分离与鉴定	123
5-1	蛋白质样品的制备	126
5-2	蛋白质的定量	130
5-3	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质	133
5-4	双向电泳分离蛋白质	139
* 5-5	二维液相色谱分离蛋白质	148
* 5-6	蛋白质的质谱鉴定	155
模块六	蛋白质相互作用的研究	161
6-1	酵母双杂交	164
* 6-2	T7 噬菌体展示筛选技术	175
6-3	Pull-down 分析蛋白质相互作用	185
* 6-4	免疫共沉淀	194
模块七	分子标记技术的比较与应用	200
7-1	SSR 分子标记技术	203
7-2	改良 AFLP 分子标记技术	207
7-3	相关分子标记技术概述	213
模块八	目的基因的遗传转化	215
8-1	PCR 法克隆目的基因全长	218

II 目 录

* 8-2 Gateway 技术构建表达载体	221
8-3 农杆菌真空渗入法遗传转化	225
8-4 水稻愈伤组织的遗传转化	229
* 8-5 RNAi 发夹式载体的构建及转化	235
模块九 激光扫描共聚焦显微镜的应用	240
9-1 激光扫描共聚焦显微镜的基本使用	243
9-2 花粉管内钙离子梯度分布的观察	248
9-3 激光扫描共聚焦显微镜检测荧光蛋白	254
模块十 生物信息学与网络应用	259
10-1 基因序列分析	262
10-2 蛋白质结构以及相互作用预测	270
附录	274

模块一

核酸提取与分子杂交

- 1-1 DNA 的提取与 Southern 杂交
- 1-2 RNA 的提取与 Northern 杂交
- *1-3 原位杂交分析

模块实验目的与流程图



模块实验目的

核酸是重要的生物大分子之一。作为遗传信息载体的 DNA(某些情况下是 RNA)和传递遗传信息的 RNA,它们参与遗传信息在细胞内的贮存、编辑、传递和表达,因此,在进行科学研究时,获得遗传信息的最直接方法便是进行 DNA 和 RNA 的研究。

核酸提取与分子杂交模块介绍了 DNA 提取与 Southern 杂交, RNA 提取与 Northern 杂交以及原位杂交的常规实验方法。

DNA 提取与 Southern 杂交:通过基因组 DNA 的提取、酶切、电泳及探针与特定基因的杂交,确定目的基因在所研究试验材料基因组 DNA 中的拷贝数,从而为研究家族基因、同源基因及转基因材料中外源基因的拷贝提供检测手段。

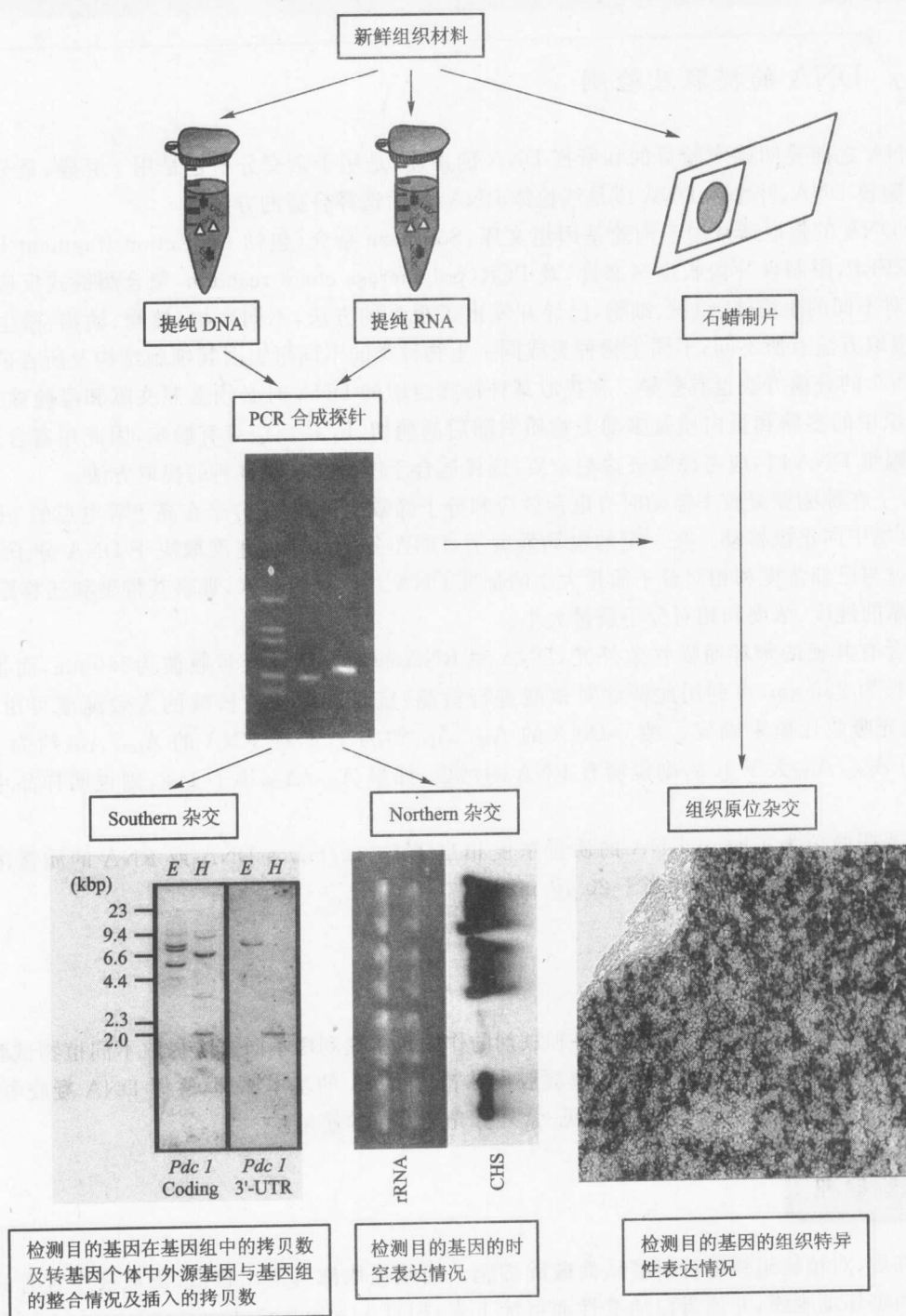
RNA 提取与 Northern 杂交:通过试验材料总 RNA 的提取,电泳及探针与特定基因的杂交,分析目的基因的表达丰度,确定目的基因在所研究试验材料中的时间和空间表达模式,从而为研究目的基因在不同发育时期、不同外界环境胁迫、不同的器官及正常与病变组织中的表达差异提供依据,为认识相关代谢调控路径及基因间的表达关系提供参考。

细胞组织原位杂交提供了特定基因在组织、细胞及细胞器中的表达模式,从而为研究目的基因在特定发育时期、特定处理条件和特定组织部位的表达提供方法手段,为发育调控及疾病诊断提供依据。

通过本模块的系列实验,掌握核酸提取及分子杂交的基本原理与操作程序,明确相关分子杂交的应用,为从事科学研究奠定实验操作基础和提供研究手段。



模块流程图



1-1 DNA 的提取与 Southern 杂交

1-1-1 DNA 的提取及检测

提取 DNA 之前要明确实验目的和所提 DNA 的用途,是用于杂交分析还是用于克隆;是分离总 DNA 还是分离细胞核 DNA、叶绿体 DNA 或是线粒体 DNA,然后选择合适的方法。

基因组 DNA 的提取通常用于构建基因组文库、Southern 杂交(包括 restriction fragment length polymorphism, RFLP, 限制性片段长度多态性)及 PCR(polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应)分离基因等。目前针对不同的生物体、组织、细胞,已经开发出了很多的方法,不同生物(植物、动物、微生物)的基因组 DNA 的提取方法有所不同;不同生物种类或同一生物种类的不同组织因其细胞结构及所含的成分不同,其基因组 DNA 的分离方法也有差异。在提取某种特殊组织的 DNA 时必须参照文献和经验建立相应的提取方法。组织中的多糖和蛋白质及多酚类物质对随后的酶切、PCR 反应等有影响,因此用富含这类物质的材料提取基因组 DNA 时,应考虑除去这些杂质,选择适合于所研究试验材料的提取方法。

DNA 分子在琼脂糖凝胶中泳动时有电荷效应和分子筛效应。DNA 分子在高于等电点的 pH 溶液中带负电荷,在电场中向正极移动。在一定的电场强度下, DNA 分子的迁移速度取决于 DNA 分子本身的大小和构型。通过与已知浓度和相对分子质量大小的标准 DNA 片段对照电泳,观察其带型和迁移距离,即可鉴定出待测样品的纯度、浓度和相对分子质量大小。

核酸因含有共轭的苯环而吸收紫外光, DNA 和 RNA 的最大紫外光吸收波为 260 nm, 而蛋白质的最大光吸收波长为 280 nm, 可利用此特性对核酸进行检测、定量和纯化。核酸的大致纯度可由 260 nm 和 280 nm 处的光吸收比值来确定。纯 dsDNA 的 A_{260}/A_{280} 约为 1.8, 纯 RNA 的 A_{260}/A_{280} 约为 2.0。如果 DNA 样品的 A_{260}/A_{280} 大于 1.8, 则说明有 RNA 的污染, 如果 A_{260}/A_{280} 小于 1.8, 则说明样品中有蛋白质的污染。

260 nm 光吸收值为 1 时, dsDNA 的质量浓度相当于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ssDNA 或 RNA 的质量浓度相当于 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 寡核苷酸的质量浓度相当于 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。



实验目的

了解植物总 DNA 提取的基本原理及各种试剂的作用。掌握利用不同方法提取不同植物试验材料或同一试验材料不同组织部位的总 DNA。了解凝胶电泳检测 DNA 的基本原理, 掌握 DNA 凝胶电泳的方法。了解 DNA 浓度测定的原理与方法, 掌握可见-紫外分光光度仪的使用。



实验原理

液氮速冻后, 对植物组织进行研磨从而破碎细胞。细胞提取液可溶出核酸, 提取液中含有的变性剂能溶解膜蛋白而破坏细胞膜, 并使蛋白质变性而沉淀下来; EDTA(ethylene diaminetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸)与金属离子螯合可抑制 DNA 酶的活性。再用酚、氯仿抽提的方法去除蛋白质, 得到的溶液经乙醇沉淀离心获得 DNA; 或者利用基因组 DNA 较长的特性, 加入一定量的异丙醇或乙醇, 形成纤维状絮团漂浮其中, 用玻璃棒将其取出, 而细胞器或质粒等小分子 DNA 则只形成颗粒状沉淀附于管壁上及底部, 从而达到

提取基因组 DNA 的目的。

DNA 分子在琼脂糖凝胶电泳中泳动时有电荷效应和分子筛效应。DNA 分子在高于等电点的 pH 溶液中带负电荷,在电场中向正极移动。在一定的电场强度下,DNA 分子的迁移速度取决于 DNA 分子的大小和构型。

不同物质由于其分子结构不同,对不同波长光线的吸收能力也不同,因此,每种物质都具有其特异的吸收光谱。用分光光谱来鉴定物质性质及含量的技术,其理论依据是利用物质特有的 Lambert 和 Beer 定律。利用此原理可以通过紫外分光光度法测定溶液中 DNA 的含量。单一的核苷酸在 260 nm 的光吸收值最大,其次是单链 DNA 或 RNA,而双链 DNA 最小,这是由于碱基在疏水环境中的堆积所造成的。这种光吸收的变化称为减色性,即 dsDNA 相对于 ssDNA 是减色的;反之,ssDNA 相对于 dsDNA 是增色的。随着温度的升高,双链核酸部分的碱基堆积会逐渐地减少,其光吸收值也逐渐地增大。



实验准备

1. 仪器设备

微量移液器(20 μ L、200 μ L、1 000 μ L),低温离心机,台式离心机,琼脂糖凝胶电泳系统,凝胶成像系统,恒温摇床,通风橱,制冰机,振荡器,恒温金属浴,研钵。水平凝胶电泳槽,稳压电泳仪,紫外凝胶成像仪,微波炉,50 mL 三角瓶。可见-紫外分光光度仪,石英比色杯。

2. 实验材料

新鲜幼嫩植物组织,如叶片、花瓣、果实、种子、根和表皮等。

3. 试剂

(1) DNA 抽提缓冲液

SDS 抽提液

100 mmol/L	Tris - HCl(pH 8.0)
50 mmol/L	EDTA(pH 8.0)
500 mmol/L	NaCl
3%	SDS(m/V)*1

2% CTAB 抽提液

2%	CTAB(m/V)*2
100 mmol/L	Tris - HCl(pH 8.0)
20 mmol/L	EDTA
1.4 mol/L	NaCl

(2) β -巯基乙醇*3,PVP,Tris 饱和酚*4,氯仿/异戊醇(V/V=24:1),异丙醇,3 mol/L NaAc,5 mol/L NaCl,70%乙醇,灭菌去离子水,RNaseA,琼脂糖,EB(Ethidiumbromide,溴化乙啶)。

(3) DNA 电泳缓冲液。

缓冲液	工作液(1 $\times$)	贮存液(50 $\times$)/L
TAE	40 mmol/L(Tris-乙酸)	242 g Tris
		57.1 mL 冰醋酸
	1 mmol/L EDTA	100 mL 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)

*1 SDS,十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate)是一种阴离子去污剂,能溶解膜蛋白、脂肪,使细胞膜破坏,溶解核糖体,对 DNA 酶、RNA 酶有抑制作用。SDS 的微晶粒易于扩散,称量时要戴面具,称量后要清除残留在称量工作区和天平上的 SDS,3%SDS 无需灭菌。

*2 CTAB(cetyltrimethylammonium bromide),十六烷基三乙基溴化铵是一种去污剂,可溶解细胞膜,能与核酸形成复合物。该复合物在高盐浓度中(0.7 mol/L NaCl)是可溶的,当降低盐浓度到一定程度时(0.3 mol/L NaCl)便从溶液中沉淀,通过离心分离 CTAB 与核酸形成的复合物,之后将其溶于高盐,用乙醇沉淀核酸。

*3 β -巯基乙醇用于防止材料中多酚类物质的氧化。

*4 酚通常情况下是无色透明的,若呈现粉红色或黄色,则表明其中含有酚的氧化产物(醌、二酸等),这些氧化产物可断裂核酸的磷酸二酯键,并引起 DNA 链的交联。

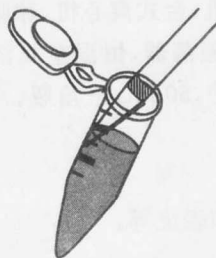
(4) 凝胶载样缓冲液^{*5}

试剂	用量(m/V)
溴酚蓝	0.25%
二甲苯氰	0.25%
甘油	30%

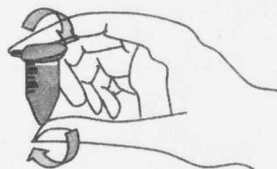
实验方法

方案一 适用于多数材料的常规提取 DNA 方法——SDS 法

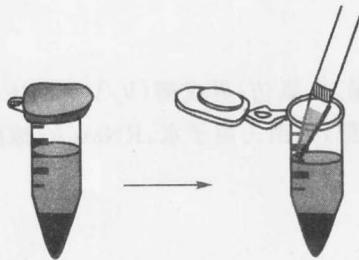
(1) 于 1.5 mL Eppendorf 管中加入 700 μL , 经 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 SDS 抽提液, 并加入 β -巯基乙醇 20 μL 及少许 PVP[poly(vinyl pyrrolidone), 聚乙烯基吡咯烷酮]。



(2) 取 0.5~2 g 植物材料放入预冷的研钵内, 倒入液氮, 使之快速成速冻结状态, 然后快速有力地将其研磨至粉末状。将粉末加入到 Eppendorf 管中, 混匀。



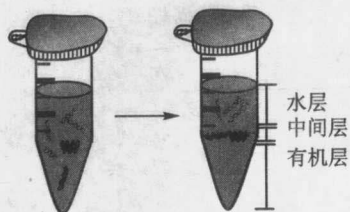
(3) 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 30 min, 其间要轻摇, 之后转速 10 000g 离心 5 min。



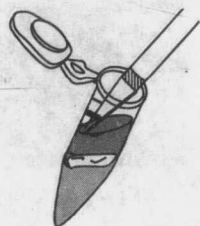
(4) 取上清液转入另一 Eppendorf 管中, 加入等体积的 Tris 饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 上下颠倒数次, 摇匀, 转速 10 000g 离心 5 min。离心结束后, 小心取出 Eppendorf 管^{*6}。

^{*5} 载样缓冲液的作用: 增加样品密度, 保证样品沉入加样孔内; 使样品带有颜色, 便于简化上样过程; 能明确显现样品在电泳胶上泳动的位置。溴酚蓝在琼脂糖凝胶中的迁移速率是二甲苯氰迁移速率的 2.2 倍, 与琼脂糖浓度无关。

^{*6} 从离心机中取出 Eppendorf 管时要十分小心, 不能破坏分层。一般情况, 上层为水层, 下层为酚-氯仿层, 中间为蛋白质及大量的细胞碎片层。

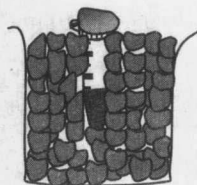


(5) 用微量移液器小心吸取上清液于一新的 Eppendorf 管中^{*7,*8}。

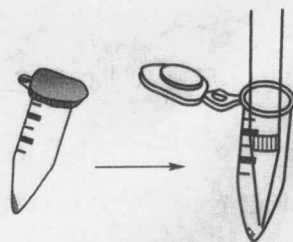


(6) 加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1),重复步骤(4)、(5)。

(7) 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 和等体积的异丙醇,缓慢摇匀,冰上静置 5 min^{*9}。



(8) 转速 10 000g 离心 5 min,吸弃上清液^{*10}。



(9) 加入 70%乙醇 800 μ L 悬浮沉淀,转速 10 000g 离心 5 min,吸弃上清液,干燥。

(10) 将粗提物溶于 500 μ L 灭菌去离子水中,加入 5 μ L 10 mg/mL 的 RNase A,适当离心混匀,37 $^{\circ}$ C 保温 1 h^{*11}。

(11) 重复步骤(6)~(9)。

(12) 沉淀于室温干燥约 5~10 min,至无乙醇味^{*12}。

*7 尽量吸取上清液,不要搅动及吸入中间层。

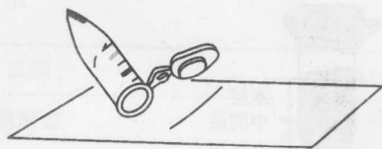
*8 一定不要吸入下层的有机层,否则将影响核酸的沉淀。为了避免吸入有机层,可以留少许上清液于 Eppendorf 管中。

*9 冰上静置有助于沉淀形成。

*10 弃上清液时小心操作,可用微量移液器将上清液从沉淀所在的相反方向吸出,防止吸入核酸沉淀。

*11 粗提物可直接用作 PCR 的模板,如果需要高浓度及纯度较高的 DNA 则需要重新进行沉淀。

*12 可反复离心 2 次,以吸净上清液,DNA 干燥不要过度。



(13) 用 50 μL 灭菌去离子水溶解沉淀, 取 1~2 μL 电泳检测(图 1-1-1), 剩余的样品于 -20°C 保存备用。

方案二 适用于大部分材料的 DNA 快速提取方法——CTAB 法

(1) 向 Eppendorf 管中加入 700 μL 2%CTAB 抽提液, 10 μL β -巯基乙醇。

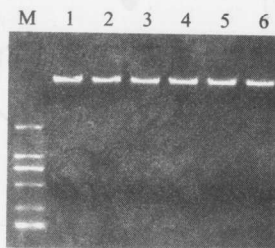


图 1-1-1 SDS 法提取的大蒜基因组 DNA

(2) 称取 0.5~1 g 幼嫩的组织(幼叶), 液氮研磨呈粉末后立即转入 1.5 mL 加有抽提液的 Eppendorf 管中, 轻轻摇动混匀, 加入等体积的苯酚/氯仿抽提, 混匀, 将 Eppendorf 管放入冷冻离心机, 调温至 4°C , 转速 10 000g 离心 5 min。

(3) 取上清液于新的 Eppendorf 管中, 加入 5 μL RNase A(10 mg/mL)消化 1 h。

(4) 加入等体积的氯仿, 混匀, 将 Eppendorf 管放入冷冻离心机, 调温至 4°C , 转速 10 000g 离心 5 min。

(5) 小心取上清液, 加入 100 μL 5 mol/L NaCl, 混匀后加入等体积的异丙醇, 混匀, 冰上静置 5 min。

(6) 将离心管放入冷冻离心机, 调温至 4°C , 转速 10 000g 离心 10 min, 弃上清液, 加 800 μL 75%乙醇清洗沉淀。

(7) 将 Eppendorf 管放入冷冻离心机, 调温至 4°C , 转速 10 000g 离心 5 min, 弃上清液, 室温干燥沉淀 5~10 min。

(8) 加入 30 μL 灭菌去离子水溶解沉淀, 取 1~2 μL 电泳检测(图 1-1-2), 剩余样品于 -20°C 保存备用。

方案三 富含多糖、多酚类材料总 DNA 提取方法

◇ 试剂

(1) 分离缓冲液(isolation buffer, IB)

10% 聚乙二醇(polyethylene glycol)

0.35 mol/L 山梨(糖)醇(sorbitol)

0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)

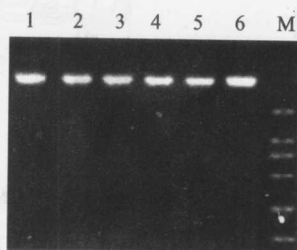


图 1-1-2 CTAB 法提取的菜豆基因组 DNA

- 0.5% 精胺(spermidine)
 0.5% 精胺酸(spermine)
 0.5% β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol)

(2) 溶解缓冲液(LYB)

- 0.35 mol/L 山梨(糖)醇(sorbitol)
 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)
 0.5% 精胺(spermidine)
 0.5% 精胺酸(spermine)
 0.5% β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol)

(3) 10% L-甲基甘氨酸(L-sarcosine)。

(4) 2×CTAB 溶液:

- 2% CTAB(cetyltrimethylammonium bromide)
 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 9.5)
 20 mmol/L EDTA
 1.4 mol/L NaCl
 0.5% β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol)

(5) TE 缓冲液

- 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)
 1 mmol/L EDTA

(6) 氯仿溶液(氯仿:异戊醇=24:1)。

◇ 实验流程:

- (1) 将材料在液氮中粉碎,悬浮于 IB 中^{*13}。



- (2) 离心分离^{*14}。



- (3) 弃去上清液,再用 LYB 冲洗沉淀。



- (4) 加入甲基甘氨酸,把细胞核溶解,释放 DNA。



- (5) 加入 CTAB,以 CTAB-DNA 复合物形式回收 DNA。

◇ 方案步骤:

- (1) Eppendorf 管中加入 700 μ L IB,冰上放置,在液氮中将材料研磨成粉末后取约 50 mg 加入管中。



- (2) 混匀后于 4℃,转速 10 000g 离心 5 min,弃去上清液^{*16}。

*13 IB 中含有山梨糖醇,细胞核不会被分解。

*14 细胞核及核以外的细胞残片沉淀下来,多糖和多酚溶解在上清液中。

*15 由于山梨糖醇的存在,细胞核不会被分解。

*16 上清液中含有大量可溶的多糖和多酚类物质,而细胞核及核以外的细胞残片沉淀下来。

(3) 往沉淀中加入实验材料 5 倍量(W/V)^{*17}的 LYB(250 μ L)。充分悬浮混匀后,再加入溶液量 1/10 体积的 10%甲基甘氨酸。室温放置 10 min。

(4) 加入等量的 2 $\times$ CTAB 溶液,65 $^{\circ}$ C 保温 10 min^{*18}。



(5) 加入等量的氯仿,轻轻搅拌,转速 10 000g 室温离心 10 min。

(6) 取上清液,加入等量的异丙醇(isopropanol),沉淀核酸。

(7) 转速 5 000g 室温离心 5 min,回收沉淀,沉淀轻微风吹干后,用适量的 TE 缓冲液溶解。

(8) 加入等量的 Tris 饱和酚混匀,室温下转速 10 000g 离心 10 min。

(9) 吸取上清液加入等体积的苯酚/氯仿,搅拌后室温下转速 10 000g 离心 10 min。

(10) 吸取上清液加入等体积的异丙醇,沉淀核酸。

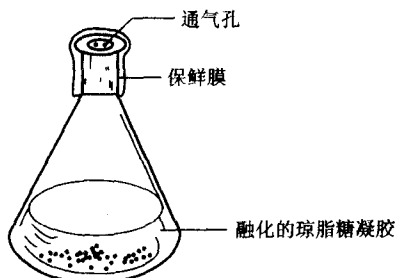
(11) 加入 70%乙醇清洗沉淀,室温下转速 10 000g 离心 5 min。

(12) 将沉淀室温干燥后,用 TE 缓冲液溶解。取 1~2 μ L 电泳检测,剩余样品于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

DNA 琼脂糖凝胶电泳

(1) 用透明胶带将胶板的两端封好。

(2) 称取 0.16 g 琼脂糖于 50 mL 三角瓶中,加入 1 $\times$ TAE 缓冲液 20 mL,配制 0.8%的琼脂糖凝胶,将其在微波炉中加热至琼脂糖完全溶解。



^{*17} 对于富含多糖和多酚物质的实验材料,增加溶解缓冲液(LYB)量到 10 倍量(m/V),因为未完全去除的多酚类和多糖类会使沉淀变得难溶。

^{*18} 溶液中难免会残留极少量的多糖和多酚类,但一般不影响后续的 PCR 及克隆等实验。