



“十二五”江苏省高等学校重点教材



医学检验技术实验系列教程

丛书主编 邵启祥 许文荣

丛书主审 郑铁生 柴顺根 周天戟

Medical Laboratory Experiments Series of Tutorials

临床分子生物学检验技术 实验指导

主 编 钱 晖 陶国华



“十二五”江苏省高等学校重点教材（编号：2013-2-053）

医学检验技术实验系列教程

临床分子生物学检验技术 实验指导

丛书主编 邵启祥 许文荣

丛书副主编 鞠少卿 朱雪明 马 萍

丛书主审 郑铁生 柴顺根 周天戟

本书编委会

主 编 钱 晖 陶国华

副主编 王爱东 严永敏 周丽萍

编 者 （按姓氏笔画排序）

王爱东（苏州大学第二临床医学院）

孙梓暄（江苏大学医学院）

严永敏（江苏大学医学院）

张 徐（江苏大学医学院）

肖 莉（苏州大学第二临床医学院）

周丽萍（江苏大学医学院）

钱 晖（江苏大学医学院）

陶国华（南通大学第二附属医院）

谢 玮（南通大学第二附属医院）

 江苏大学出版社
JIANGSU UNIVERSITY PRESS

镇 江

图书在版编目(CIP)数据

临床分子生物学检验技术实验指导 / 钱晖, 陶国华
主编. — 镇江: 江苏大学出版社, 2016.5
ISBN 978-7-81130-891-4

I. ①临… II. ①钱… ②陶… III. ①分子生物学—
医学检验—医学院校—教学参考资料 IV. ①R446

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 308989 号

临床分子生物学检验技术实验指导

Linchuang Fenzi Shengwuxue Jianyan Jishu Shiyan Zhidao

主 编/钱 晖 陶国华

责任编辑/仲 蕙

出版发行/江苏大学出版社

地 址/江苏省镇江市梦溪园巷 30 号(邮编: 212003)

电 话/0511-84446464(传真)

网 址/http://press. ujs. edu. cn

排 版/镇江华翔票证印务有限公司

印 刷/虎彩印艺股份有限公司

经 销/江苏省新华书店

开 本/787 mm×1 092 mm 1/16

印 张/5.75

字 数/146 千字

版 次/2016 年 5 月第 1 版 2016 年 5 月第 1 次印刷

书 号/ISBN 978-7-81130-891-4

定 价/21.00 元

如有印装质量问题请与本社营销部联系(电话:0511-84440882)

序 言

医学检验技术专业的培养目标是培养牢固掌握基础医学和医学检验基本理论知识、基本技能和技术,熟悉临床医学知识,适应社会主义市场经济和社会发展要求的,具有一定创业意识和创新能力的医学检验及医学研究的复合人才。2012年教育部调整了普通高等学校本科专业的设置,将五年制授医学学位的医学检验专业更改成四年制授理学学位的医学检验技术专业,更加突出了对检验技术相关知识的要求。临床检验诊断学是临床医学的重要组成部分,近年来随着生命科学和相关科学的不断发展,临床检验诊断学和相关技术也得到了飞速发展,因此对医学检验教育也提出了更高的要求。实验教学是医学检验技术专业教学的重要组成部分。

江苏大学是国内最早开设医学检验本科专业的五所高校之一,在40余年的医学检验教学工作中,针对医学检验人才培养过程中存在的问题,学校一代代医学检验人倾注了毕生的精力,积累了丰富的教学经验,形成了以优质师资队伍、精品课程和特色教材为一体化的多维教学体系;构建了以新生研讨—本、硕、博联动—教学法改革—国际化培养为基础,推动全局、想象、求异和批判的多元思维模式体系;以实验教学示范中心、省重点实验室和优势学科一体化建设促进教学资源的共享,提升学生实践创新能力,先后荣获多项江苏省教学成果奖。在医学检验技术实验教学改革中,构建了通用技术、课程内验证性实验、课程内综合性实验和专业设计性与创新性实验四位一体的模块化体系。在此基础上,为了使我们的教学成果能更好地服务和辐射省内医学检验技术教学,我们申请并获批了“2013年度江苏省高等学校重点教材建设项目”,并联合了我省南通大学、苏州大学、徐州医学院和扬州大学等高校,编写了“医学检验技术实验系列教程”。本教程共分13个分册,覆盖了医学检验技术所有专业课程的实验教学内容。从体例方面充分体现了我们的实验教学改革成果,设置了医学检验通用技术分册和专业课分册。在各个专业课程的实验课程中包含了验证性实验和综合性、设计性实验,最后还设置了医学检验技术专业综合性实验分册和临床案例实验诊断分析分册。通过这个系列教程的教学,学生能在早期较为系统地掌握医学检验专业通用技术,并能将这些技术应用于课程内实验教学。在全面掌握了各个专业课程的技术以后,我们希望经过专业综合性实验训练和临床诊断案例分析,使学生对临床疾病的复杂性有较为全面的整体性认识,以提高临床适应能力,为随后开展临床实践奠定良好的基础。

本教程是教学改革的一次初步尝试,在体例、内容安排上不一定能完全适应现代医学检验教学改革和人才培养的需求,还需要不断完善。希望各位专家、教师、检验界同行和同学在使用本教程过程中多提宝贵意见,以便我们进一步提高教程的质量,为广大师生提供优质的实验教学用书,共享我们教学改革的成果。

在此特别感谢 BD 公司对本系列教程出版的大力支持。

邵启祥 许文荣

2014 年 6 月于江苏大学医学院

前 言

在新时期医学检验技术专业人才培养的需要、学制“五改四”的新要求下,启动“医学检验技术实验系列教程”的编撰工作,有利于医学检验不同学科实践技术的进一步融合,可使医学检验技术专业学生的实践能力获得进一步提升。

临床分子生物学检验是一门理论性和实践性强、发展迅猛的检验医学专业主干课程。它以分子生物学理论和技术为基础,利用分子生物学技术来研究人体内源性或外源性生物大分子和大分子体系的存在、结构或表达调控的变化,为疾病的预防、预测、诊断、治疗和预后提供信息和决策依据。分子生物学技术的渗入和新技术的不断涌现使实验室诊断水平逐年提升。

为使学生更好地理解临床分子生物学检验的内容,抓住课程重点、要点、难点,让理论知识和实践技术更好地结合,我们编写了《临床分子生物学检验技术实验指导》。本教材分为上、下篇,上篇为课程内验证性实验,主要介绍分子生物学的一些常用技术,如PCR技术、印迹技术和生物大分子的分离纯化技术等;下篇是综合性实验,需要学生综合运用所学理论和技术知识,采用多种分子生物学方法或从多个角度诊断一种或一类疾病,主要偏重方法的应用、比较和融合。

在编写过程中,江苏大学、南通大学和苏州大学的相关老师付出了大量的辛勤劳动。他们均活跃在临床分子生物学检验教学的第一线,有着较丰富的教学经验和较强的教学能力。

因编者水平有限,本书难免有疏漏之处,恳请读者提出宝贵意见,以便在下一轮修订中予以完善。

编 者

2015年8月

目 录

上篇 课程内验证性实验

一、生物大分子的分离与纯化

实验一 基因组 DNA 的分离与纯化	3
实验二 质粒 DNA 的分离与纯化	7
实验三 RNA 的分离与纯化	11
实验四 核酸浓度与纯度鉴定	15
实验五 琼脂糖凝胶电泳鉴定 DNA	18
实验六 蛋白质的分离与纯化	21

二、PCR 技术

实验七 PCR(SRY 基因检测)	26
实验八 RT-PCR(GAPDH 基因 mRNA 检测)	30
实验九 实时荧光定量 RT-PCR(ERCC1 基因 mRNA 检测)	37

三、印迹技术

实验十 Southern blot	47
实验十一 Northern blot	54
实验十二 Western blot	59

下篇 综合性实验

一、HBV-DNA 的分子生物学检测

实验十三 病毒载量测定(实时荧光定量 PCR)	67
-------------------------------	----



实验十四 HBV 基因型分析(限制性片段长度多态性 RFLP) 70
实验十五 HBV-DNA 的耐药株检测(线性探针反向杂交 INNO-LIPA) 73

二、基因点突变的分子生物学检测

实验十六 PCR-RFLP 检测 N-ras 基因点突变 76
实验十七 PCR-ASO 检测 N-ras 基因点突变 79
实验十八 荧光定量 PCR 高分辨率熔解曲线分析检测 JAK2 基因点突变 81

上 篇

课程内验证性实验

一、生物大分子的分离与纯化

实验一 基因组 DNA 的分离与纯化

【引言】

真核生物基因组 DNA 的主要分离方法有酚抽提法、甲酰胺解聚法、玻璃棒缠绕法及多种快速方法。本实验介绍的制备高分子量 DNA 样品的酚抽提法,源自对 1976 年 Stafford 及其同事提出的经典方案的改进。酚抽提法可用于多种来源标本的高分子量 DNA 样品的制备,包括单层培养细胞、悬浮生长细胞、新鲜的组织及血液标本等。DNA 样品的纯化方法包括透析、层析、电泳及选择性沉淀等。其中电泳法简单、快速、易于操作、分辨率高、灵敏度好、易于观察及便于回收,在 DNA 分子的纯化中占有重要的地位。

【目的】

掌握酚抽提法分离基因组 DNA 的实验原理和操作步骤。

【原理】

以含蛋白酶 K、EDTA、十二烷基硫酸钠(SDS)及无 DNA 酶的 RNA 酶的裂解缓冲液裂解细胞,使组织蛋白与 DNA 分子分离,再经 pH 8.0 的 Tris 饱和酚抽提,最后经无水乙醇沉淀获得基因组 DNA。

【材料】

1. 器材

标本(单层培养或悬浮生长的哺乳动物细胞、新鲜的组织或血液标本)、匀浆器或研磨器(组织标本选用)、透析袋(制备 150 ~ 200 kb 大小的 DNA 时选用)、低温冷冻高速离心机、恒温水浴箱、混匀器或旋转器、可调速恒温摇床、电泳装置和低温冰箱等。

2. 试剂

(1) 组织细胞裂解液:10 mmol/L Tris(pH 8.0),0.1 mol/L EDTA(pH 8.0),0.5% SDS,20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 无 DNA 酶的胰 RNA 酶(临用前加入)。



(2) 20 mg/mL 蛋白酶 K:以无菌 50 mmol/L 的 Tris-HCl(pH 8.0)溶液配制,小量分装, -20℃ 保存。

(3) Tris 饱和酚:含 0.5 mol/L Tris, pH 8.0 饱和平衡,0.1% 的 8-羟基喹啉。

(4) 氯仿/异戊醇(体积比为 24:1)。

(5) 3 mol/L pH 5.2 乙酸钠(NaAc)。

(6) 无水乙醇。

(7) 70% 乙醇。

(8) TE 缓冲液:10 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA, pH 8.0, 高压灭菌。

(9) 磷酸盐缓冲液(PBS):137 mmol/L NaCl,10 mmol/L Na_2HPO_4 ,2.7 mmol/L KCl, 2 mmol/L KH_2PO_4 , 高压灭菌。

【方 法】

1. 样品收集

(1) 培养细胞:生长细胞悬液直接转入离心管中,于 4℃ 1500 r/min 离心 10 min 后弃去上清液,收集管底细胞;贴壁生长细胞,先经胰酶消化,再加入预冷 PBS 吹打,细胞悬液移至离心管后,离心收集细胞。两种不同生长形式的细胞数都应为 10^7 个左右。将收集的细胞重新悬浮在 1~10 mL 预冷的 PBS 或生理盐水中,漂洗一次,离心收集沉淀。重复洗涤一次。

(2) 组织标本:最好是新鲜生物组织,先去除组织中的筋膜等结缔组织,吸干血液。如果是肝组织,必须除去胆囊,因其含有大量的各种消化酶。组织也可贮存于液氮或 -80℃ 冰箱,稍后再行 DNA 提取。取新鲜或冷冻组织 0.2~0.5 g,剪碎,TE 缓冲液匀浆后转入离心管中,加等体积 2×组织裂解液混匀;或将组织置于陶瓷研钵中,加少许液氮研磨(研钵和研杵需先用液氮预冷),反复添加液氮直至组织碾成粉末状,待液氮蒸发,将粉末转入离心管中。

(3) 血液标本:无菌条件下采集新鲜的血液标本,与枸橼酸钠抗凝剂(对于高分子 DNA 的分离,其保存血液的效果优于 EDTA)按 6:1 混匀,0℃ 下可保存数天,-80℃ 下可长期冻存、备用。如分离 DNA 后继进行 PCR,则应避免使用肝素抗凝,因其为 PCR 反应的抑制剂。新鲜抗凝血 0.5~1 mL,1500 r/min 离心 10 min,弃去上清液(血浆),取含有白细胞的淡黄色悬浮液于新的离心管中,重复离心一次,取下层细胞。如为冻贮血液,室温解冻后移入离心管中,用等体积的 PBS 混匀,3500 r/min 离心 10 min,弃去含裂解红细胞的上清液,保留含白细胞的沉淀。

2. 将上述各种来源的组织细胞悬浮于 400~500 μL 组织细胞裂解液中,加入蛋白酶 K 至终浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,混匀后 37℃ 保温 12~24 h,或 37℃ 保温 1 h 后 50℃ 保温 3 h。保温过程中应经常摇动以混匀。当液体逐渐变黏稠,表明 DNA 已部分释放出来。

3. 将反应液冷却至室温,加等体积的饱和酚,缓慢颠倒混匀,重复该动作 5~10 min,直至水相与酚相混匀成乳状液。

4. 室温 5000 r/min 离心 15 min,小心吸出上层水相,移至一新的离心管中。如果在水



相和有机相交界处有白色沉淀,可再次抽提有机相,合并水相。

5. 依次加等体积的酚/氯仿和氯仿/异戊醇抽提,5000 r/min 离心 10 min。

6. 取上层水相转移至新的离心管,加入 1/10 体积 NaAc 及 2.5 倍体积的无水乙醇,颠倒混匀。10000 r/min 离心 15 min,弃上清液。

7. 在沉淀中加入 1 mL 70% 预冷乙醇,反复颠倒离心管数次,5000 r/min 离心 5 min,弃上清液,重复操作一次。于室温挥发痕量乙醇,勿使 DNA 沉淀完全干燥,否则会因为分子量太大而极难溶解。

8. 加入适当体积的 TE 溶液溶解 DNA 沉淀。为充分溶解 DNA,可于摇床 4℃ 轻轻旋动溶液 12 ~ 24 h,直至 DNA 完全溶解。4℃ 分装保存,长期保存可置 -20℃ 或 -80℃。DNA 质量鉴定包括浓度分析、纯度鉴定及大小完整性的分析。可通过核酸蛋白检测仪测定 DNA 样品在 260 nm 和 280 nm 的吸光度值,计算 DNA 的纯度和浓度,琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 的大小与完整性。

【结果】

取基因组 DNA 样品 10 μL,经琼脂糖凝胶电泳分离,在 254 nm 的紫外线下可观察到与荧光染料 SYBR Green I 结合发光的 DNA 条带(见图 1-1)。



M: DNA Markers; 1 ~ 3: 基因组 DNA 样品

图 1-1 基因组 DNA 电泳结果示意图

【讨论】

1. 此方法可提取到少至数微克、多至数百微克的 DNA,组织标本因含大量的纤维结缔成分,产量一般不太高,且因不同的组织类型而有较大差异。由于实验过程中剪切力的产生,最终制备的 DNA 长度一般不超过 150 kb。这种大小的 DNA 足以作为 PCR 反应的模板,进行 Southern blot 分析,或用于克隆、限制性内切酶反应,以及构建以 λ 噬菌体为载体的基因组 DNA 文库。

2. A_{260}/A_{280} 的比值为 1.8,是高纯度 DNA 的标志,高于或低于此值均表示不纯。蛋白质与酚的污染会使比值下降,而 RNA 的污染则使比值升高。通常情况下, A_{260}/A_{280} 的比值在 1.75 ~ 1.80 是可以接受的。但 A_{260}/A_{280} 的比值若低于 1.75,则表明有较多的蛋白质污染,此时可加入终浓度为 0.5% 的 SDS,并重复抽提。

3. 经脉冲场凝胶电泳或常规的 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分析, DNA 样品的大小一般在

100 ~ 150 kb,电泳结果还可判定样品中是否有 RNA 的污染。

4. 在制备分子量为 150 ~ 200 kb 的基因组 DNA 时,还可将含有 DNA 的上层水相移入透析袋中(透析袋应留出大于样品体积 1.5 ~ 2.0 倍的空间),4℃ 透析 4 次,每次使用透析液 1 L,间隔 6 h 以上透析一次。

5. 要制备分子量大于 200 kb 的 DNA,可选用甲酰胺解聚法,这些 DNA 样品可以高容量的黏粒为载体,构建基因组 DNA 文库。另外,为避免在分离提取中 DNA 分子受到剪切力的影响,可将细胞悬浮在溶化的低熔点琼脂糖中进行细胞的原位裂解与蛋白水解,再通过漂洗去除细胞碎片,从而获得完整的 DNA 分子。DNA 分子经切点稀少的限制性内切酶原位消化后,所得 DNA 片段可以用于构建以酵母人工染色体(YAC)为载体的基因组文库。

【注意事项】

1. 对于贴壁生长或悬浮生长的细胞,在加入组织细胞裂解液后,应确保细胞呈分散状态,避免细胞成块、成团。对于冷藏的标本应分成小块保存,避免反复冻融而造成高分子量 DNA 的产率降低。

2. 制备高分子量 DNA 时,为减少机械剪切力的破坏,每一步都应特别小心,避免剧烈振荡、搅拌、混匀和吸取等操作。

3. 在分子量 DNA 的制备过程中,经酚抽提、离心分层后,取上层 DNA 溶液时往往会牵动两相界面的蛋白质而引入污染。此时可缓慢抽吸掉下层的有机酚相,直至位于界面的蛋白质层处于管底。经 7500 r/min 室温离心 10 min,蛋白质可沉积吸附于管底,此时将含 DNA 的上层水相轻缓吸入另一洁净的离心管。

4. 所配试剂 pH 值要准确,否则会影响实验结果。饱和酚的 pH 值应接近 8.0,在此条件下可减少离心后水酚两相交界面上 DNA 滞留,利于吸出水相时不带动界面中的蛋白质。

5. 酚的制备要特别小心。一方面,酚的腐蚀性很强,并可引起严重的灼伤,应在化学通风橱中进行操作,操作时须穿防护衣、戴手套及防护镜。如皮肤不慎与酚接触,应使用大量的水清洗,并用肥皂洗涤,忌用乙醇。另一方面,用于 DNA 制备的酚应重蒸馏后,加入 0.1% 8-羟基喹啉抗氧化,并用 0.5 mol/L 的 Tris-HCl(pH 8.0)多次充分的平衡,直至有机酚相的 pH 值为 7.8 ~ 8.0。用于制备 DNA 的酚,其 pH 值必须接近 8.0,否则在酚的抽提过程中,DNA 会因为变性而进入两相界面的蛋白质层,低于 7.0 时则进入有机酚相。制备好的酚溶液可转入不透光的玻璃瓶中,在其上覆盖一层 0.01 mol/L 的 Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液,于 4℃ 保存;如黄色消失或呈粉红色(说明酚已经被氧化),则不能使用。

6. 操作中需注意:① 液氮操作,应戴保暖手套和防护目镜,以防溅出的液氮冻伤皮肤② 将研钵置于冰上并加入干冰可作为加入液氮前的预冷。预冷研钵时应缓慢加入少量液氮,如突然将液氮倒入研钵或将研杵浸入液氮会发生碎裂。③ 组织样品中可能带有致病菌、病毒等,应视为有危害的生物材料,按生物安全操作规程操作。接触这些样品的器械应高压消毒,废弃物应经灭菌措施处理。

(钱 晖)

实验二 质粒 DNA 的分离与纯化

【引言】

质粒 DNA 的分离是最常用、最基本的分子生物学实验技术。根据实验目的不同,质粒 DNA 的提取方法各异。质粒 DNA 的分离方法主要有三步:细菌培养(细菌中质粒 DNA 的扩增)、细菌裂解和质粒 DNA 的提取。菌体裂解方法的不同,决定了质粒 DNA 提取方法的差异;目前菌体裂解法主要有碱裂解法、SDS 裂解法、煮沸裂解法、Triton-溶菌酶法等,以下介绍最常用的碱裂解法。质粒 DNA 的纯化方法主要有聚乙二醇沉淀法和氯化铯-溴化乙锭超速离心法等。

【目的】

掌握碱裂解法提取质粒的基本原理及操作步骤。

【原理】

碱裂解法抽提质粒 DNA 是基于染色体 DNA 和质粒 DNA 的变性和复性的差异而达到分离的目的。在碱性条件下,SDS 破坏细胞壁并使菌体蛋白质和染色体 DNA 变性,双链解开;超螺旋闭合环状结构的质粒 DNA 虽变性,但两条互补链不完全分离。当用酸性的高盐缓冲液调 pH 至中性,质粒 DNA 恢复原先构型,在溶液中为可溶状态;而染色体 DNA 不能复性,形成缠连的网状结构。通过离心可去除细菌碎片、染色体 DNA 与不稳定的大分子 RNA、蛋白质-SDS 复合物,从而达到提取质粒 DNA 的目的。质粒 DNA 进一步通过酚/氯仿/异戊醇抽提,酚可有效使蛋白质变性,氯仿使蛋白质变性并加速有机相和水相分层,异戊醇有利于消除抽提过程中出现的气泡。目前所用质粒 DNA 的复制量较大,少量制备质粒 DNA 已可满足细菌转化、限制酶图谱绘制、特定 DNA 片段分离、常规亚克隆及探针标记等需要。

【材料】

1. 器材

超净工作台、培养箱、恒温气浴摇床、微量离心机和紫外分光光度计等。

2. 试剂

(1) LB 培养基(Luria-Bertani 培养基):胰化蛋白胨(bacto-tryptone) 10 g、酵母提取液

(bacto-yeast extract) 5 g、NaCl 10 g, 加入 950 mL 双蒸水(ddH₂O) 完全溶解, 用 5 mol/L NaOH (约 0.2 mL) 调 pH 值至 7.0, 再加入 ddH₂O 定容至 1 L, 高压蒸气灭菌 20 min。

(2) 抗菌素

① 50 mg/mL 氨苄青霉素(Amp): 无菌 ddH₂O 配制于无菌管中, 少量分装, 贮存于 -20℃。

② 34 mg/mL 氯霉素(Cm): 先用少量无水乙醇助溶于无菌管中, 再加无菌 ddH₂O 至所需浓度。

(3) STE 液: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA。

(4) 溶液 I: 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 50 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L EDTA (pH 8.0), 高压蒸汽灭菌 15 min, 4℃ 贮存。

(5) 溶液 II (用时新鲜配制): 0.2 mol/L NaOH (用 10 mol/L 贮存液配制), 1% SDS。

(6) 溶液 III (5 mol/L): 乙酸钾 60 mL, 冰乙酸 11.5 mL, ddH₂O 28.5 mL。

(7) 酚/氯仿(1:1): Tris 饱和酚 100 mL, 氯仿 100 mL。

(8) 酚/氯仿/异戊醇(25:24:1): Tris 饱和酚 100 mL, 氯仿 96 mL, 异戊醇 4 mL。

(9) RNA 酶 A: 将 RNA 酶 A 溶于 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、15 mmol/L NaCl 中, 配成 10 mg/mL, 于 100℃ 加热 15 min, 缓慢冷却至室温, 分装成小份贮于 -20℃。

(10) TE 缓冲液(pH 8.0): 1 mmol/L EDTA (pH 8.0), 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)。

(11) 3 mol/L NaAc (pH 4.8)。

【方 法】

1. 增殖细菌、扩增质粒

(1) 活化菌种: 从冷冻保存的菌种(如携带氨苄抗性基因的 pUC19 质粒的大肠杆菌)挑取一环, 接种于含相应抗菌素(Amp)的 LB 固体培养基平板上, 37℃ 倒置培养过夜。

(2) 细菌培养: 无菌牙签挑取单个菌落, 加入含氨苄的 LB 培养液 3~5 mL 中(氨苄青霉素的终浓度为 50 μg/mL), 封好管口, 37℃ 振荡培养过夜(100~200 r/min), 直至 A₆₀₀ 为 0.4~0.6。若提取 pBR322 质粒, 扩增时需再加氯霉素至终浓度 170 μg/mL, 继续 37℃ 振荡培养过夜, 以便进行选择性的扩增。

2. 裂解细菌、释放质粒

(1) 细菌收集: 取 1.5~3 mL 培养菌液于离心管中, 4℃ 5000 r/min 离心 10 min, 弃上清液。加入 1 mL STE 液悬浮菌体, 再次离心弃上清液, 回收菌体。可重复该步骤一次。

(2) 细菌裂解: 加入 100 μL 预冷的溶液 I 混悬菌体, 剧烈振荡混匀; 再加入 200 μL 新配的溶液 II, 盖紧管口, 温和混匀 5 次, 冰浴 5 min, 至溶液变黏稠; 加入 150 μL 冰预冷的溶液 III, 盖紧管口, 温和颠倒混匀 10 s, 冰浴 5 min, 管中出现白色沉淀。

(3) 收集质粒: 4℃ 12000 r/min 离心 5 min, 转移上清液至另一离心管中。

3. 质粒抽提、纯化

(1) 酚/氯仿抽提: 加入等体积酚和氯仿(1:1), 温和颠倒混匀数次, 4℃ 12000 r/min 离心 5 min, 转上层水相至另一无菌离心管中, 加入酚/氯仿/异戊醇、氯仿/异戊醇重复抽提



各一次。

(2) 无水乙醇沉淀:上清液中加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 及 2 倍体积无水乙醇,温和颠倒混匀,室温放置 10 min,4℃ 12000 r/min 离心 10 min,弃上清液。

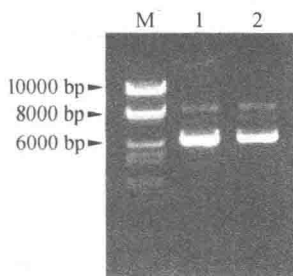
(3) 70% 乙醇洗涤:加入 1 mL 70% 的冷乙醇漂洗沉淀,4℃ 12000 r/min 离心 10 min,弃上清液。室温下蒸发乙醇 15 ~ 20 min 或真空抽干乙醇 2 min。

(4) 质粒溶解:加入 50 μL 含 RNA 酶 A (20 μg/mL) 的 TE 溶液溶解质粒 DNA,振荡混匀,-20℃ 贮存备用。

(5) 浓度、纯度鉴定:紫外分光光度计测质粒 DNA 在 230,260,280 nm 的吸光度,计算质粒浓度及纯度。具体内容详见实验四。

【结果】

取质粒 DNA 样品 5 μL,经琼脂糖凝胶电泳分离,在 254 nm 的紫外线下可观察到与 SYBR Green I 染料结合发光的质粒 DNA 条带(见图 2-1)。



M:DNA Markers;1,2:质粒 DNA 样品

图 2-1 质粒 DNA 电泳结果示意图

质粒电泳后呈三条带,超螺旋质粒 DNA 泳动最快,其次为线状质粒 DNA 和半开环质粒 DNA。

【讨论】

1. 本实验使用琼脂糖凝胶电泳法鉴定质粒 DNA 的纯度和浓度,此外,也可用紫外分光光度法、荧光光度法进行鉴定。在琼脂糖凝胶电泳后,可观察到质粒的三种构象,分别为超螺旋质粒 DNA、线状质粒 DNA 和半开环质粒 DNA。

2. 一般应该将质粒保存于 pH 8.0 的 TE 缓冲液中,可减少 DNA 的脱氨反应和抑制 DNA 酶活性,也可使用 ddH₂O 溶解质粒 DNA。长期保存应置于 -80℃;如需反复使用,应置于 4℃。

【注意事项】

1. 提取质粒 DNA,关键是去除染色体 DNA、蛋白质和 RNA,以获得高质量的质粒 DNA。尤其染色体 DNA 的去除最为重要也较困难,要求在加溶液 II、III 时,既要使染色体 DNA 与