分子生物学基本技术实验指导

陈庄　邓存良　吴刚　主编

科学出版社

分子生物学基本技术实验指导

陈　庄　邓存良　吴　刚　主编

科 学 出 版 社
北　京

内 容 简 介

本书共24个实验，分别介绍了组织或细胞总RNA制备和反转录、聚合酶链反应、实时荧光定量PCR、质粒重组与鉴定、淋巴细胞的分离等基因克隆技术，以及将所克隆基因进行转染后的蛋白质表达和转染细胞功能的检测等目前在生物医学研究中比较常用的实验方法。

本书主要供本科高年级及研究生学习使用，以强调分子生物学技术的应用性，同时也可作为青年科技工作者进行科研工作的参考书。

图书在版编目（CIP）数据

分子生物学基本技术实验指导/陈庄，邓存良，吴刚主编. —北京：科学出版社，2015.9

ISBN 978-7-03-045715-8

Ⅰ. ①分… Ⅱ. ①陈… ②邓… ③吴… Ⅲ. ①分子生物学–实验–高等学校–教学参考资料 Ⅳ. ①Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字（2015）第222473号

责任编辑：刘 畅 / 责任校对：郑君红
责任印制：徐晓晨 / 封面设计：迷底书装

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

北京科印技术咨询服务公司 印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销
*
2015年10月第 一 版 开本：720 × 1000 1/16
2015年10月第一次印刷 印张：7 5/8
字数：145 000 千字

定价：29.00 元

（如有印装质量问题，我社负责调换）

《分子生物学基本技术实验指导》编辑委员会

主　　编　陈　庄　邓存良　吴　刚

其他编者（以姓氏笔画为序）

王晓燕　卞铁荣　龙　洋　史小玲　李　燕
杨向东　杨颖丞　吴　剑　何雪梅　宋雪琴
陈　枫　唐　利　唐小平　曹　勇

前　言

分子生物学（molecular biology）是研究核酸、蛋白质等生物大分子的结构和功能特征及其规律性，进而从分子水平阐述生命本质的一门学科；是人类从分子水平上真正揭开生物世界的奥秘，由被动地适应自然界转向主动地改造自然界的基础学科。时至今日，分子生物学已经成为生命科学中最活跃的前沿学科之一。因为只有用分子手段才能研究和解答生命科学每个分支中的根本问题，使人类掌握主动改造自然界的利剑，迎来生物医学研究的新时代。所以，无论是正处于医科学习阶段的学生，还是已翱翔在医学领域的广大医学工作者，对这一技术的领略或融会贯通已是势在必行。

分子生物学是一门理论性很强的学科，也是一门实践性很强的学科。为了突出其应用性，我们根据多年研究生教学经验，本书选用了包括组织或细胞总 RNA 制备和反转录、聚合酶链反应、实时荧光定量 PCR、质粒重组与鉴定、淋巴细胞的分离等基因克隆技术，以及将所克隆基因进行转染后的蛋白质表达和转染细胞功能检测等目前在生物医学研究中比较常用的实验方法，为广大科研工作者了解生物医学基本技术的常用实验方法提供参考。

由于编者水平有限，时间仓促，内容覆盖不够全面，且难免有不足之处，真诚希望大家提出宝贵的意见和建议。

编　者

2015 年 7 月

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

目　录

前言
实验一　组织或细胞总 RNA 制备和反转录 ……1
实验二　核酸分子的定量 ……10
实验三　聚合酶链反应 ……12
实验四　实时荧光定量 PCR ……18
实验五　琼脂糖凝胶电泳 ……21
实验六　胶回收法纯化 DNA ……25
实验七　氯化钙法制备大肠杆菌感受态细胞 ……29
实验八　质粒重组、转化、筛选和鉴定 ……32
实验九　碱裂解法小量提取质粒 DNA ……37
实验十　质粒 DNA 限制性内切酶实验 ……42
实验十一　原核细胞中外源基因的表达和初步纯化 ……46
实验十二　十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE） ……52
实验十三　真核细胞中外源基因的表达 ……55
实验十四　免疫印迹（Western blot） ……58
实验十五　细胞增殖检测 ……61
实验十六　肿瘤细胞侵袭转移实验 ……65
实验十七　免疫共沉淀实验 ……68
实验十八　酶联免疫吸附实验 ……72
实验十九　激光扫描共聚焦显微技术 ……75
实验二十　焦磷酸测序技术 ……87
实验二十一　淋巴细胞的分离 ……91
实验二十二　流式细胞实验技术（FCM） ……95
实验二十三　免疫组织化学技术 ……107
实验二十四　TUNEL 法检测细胞凋亡 ……111
主要参考文献 ……114

实验一　组织或细胞总 RNA 制备和反转录

一、实验目的

1. 掌握制备细胞或组织总 RNA 的原理和方法。
2. 掌握 RNA 反转录为 cDNA 的原理和方法。

二、实验原理

总 RNA 提取试剂盒可从各种细胞或组织中快速提取总 RNA，可同时处理大量不同样品。裂解液中的主要成分为异硫氰酸胍和苯酚，其中异硫氰酸胍可裂解细胞，促使核蛋白体解离，使 RNA 与蛋白质分离，并将 RNA 释放到溶液中。当加入氯仿时，它可抽提酸性的苯酚，而酸性苯酚可促使 RNA 进入水相，离心后可形成水相层、中间层和有机层（下层），这样 RNA 与仍留在有机相中的蛋白质和 DNA 分离开。水相层（无色）主要为 RNA，有机层（黄色）主要为 DNA 和蛋白质。整个操作可在 1h 内完成，提取的总 RNA 没有 DNA 和蛋白质的污染，可用于 Northern blot、Dot blot、polyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆。

三、材料、试剂与仪器

1. 材料

新鲜全血。

2. 试剂

总 RNA 提取试剂盒（表 1-1）、氯仿、RNA-free ddH_2O、反转录试剂盒（表 1-2）。

表 1-1　总 RNA 提取试剂盒内容

制品内容（50 次量）	体积（数量）
裂解液 RZ	60ml
去蛋白液 RD	12ml
漂洗液 RW	15ml

续表

制品内容（50 次量）	体积（数量）
RNase-free ddH_2O	15ml
RNase-free 吸附柱 CR3	50 个
RNase-free 离心管（1.5ml）	50 个
RNase-free 收集管（2ml）	50 个

表 1-2　反转录试剂盒内容

制品内容（100 次量）	体积（数量）
AWV Reverse Transcriptase×L（5U/μl）	50μl
（Avian Myeloblasrosis Virus 来源）	
RNase Inhibior（40U/μl）	25μl
Random 9 mers（50μmol/L）	50μl
Oligo dT-Adaptor Primer（2.5μmol/L）	50μl
RNase-free dH_2O	1ml
TaKaRa Ex *Taq* HS（5U/μl）	40μl
M13 Primer M4（20μmol/L）	50μl
10×RT Buffer	1ml
5×Buffer	1ml
dNTP Mixture（各 10mmol/L）	150μl
$MgCl_2$（25mmol/L）	1ml
Control R-1 Primer（20μmol/L）	25μl
（Positive Control RNA 下游引物）	
Control F-1 Primer（20μmol/L）	25μl
（Positive Control RNA 上游引物）	
Positive Control RNA（2×10^5coples/μl）	25μl
（Transcribed poly A^+ RNA of pSPTet3 plasmid）	
储藏温度	–20℃

Random 9 mers、Oligo dT-Adaptor Primer 或特异性下游引物等均可作为反转录引物用于 cDNA 合成（表 1-3）。对于不具有 Hairpin 构造的短链 mRNA，3 种引物中任何一种都可以使用，但一般按表 1-4 所示方法进行选择。

表 1-3　反转录引物序列

引物名称	各引物序列
Random 9 mers	5′(P)-NNNNNNNNN-3′
Oligo dT-Adaptor Primer	包含 dT 区域及 M13 Primer M4 序列

续表

引物名称	各引物序列
Control F-1 Primer	5′-CTGCTCGCTTCGCTACTTGGA-3′
Control R-1 Primer	5′-CGGCACCTGTCCTACGAGTTG-3′
M13 Primer M4	5′-GTTTTCCCAGTCACGAC-3′

表 1-4 反转录引物的选择

引物	适用情况
Random 9 mers	适用于长的或具有 Hairpin 构造的 RNA，包括 rRNA、mRNA、tRNA 等在内的所有 RNA 的反转录反应都可使用本引物。用 Random 9 mers 合成的 cDNA 进行 PCR 反应时，必须使用特异性引物
Oligo dT-Adaptor Primer	适用于具有 poly(A)$^+$尾的 RNA［注意：原核生物的 RNA、真核生物的 rRNA 和 tRNA 及某些种类的真核生物的 mRNA 不具有 poly(A)$^+$尾］ 本 Primer 设计巧妙，反转录效率高。反转录反应后，可用 M13 Primer M4 进行 3′-RACE 实验
特异性下游引物（PCR 时的下游引物）	因其必须与模板序列互补，所以只适用于目的序列已知的情况

阳性对照（positive control）RNA：反转录试剂盒中的阳性对照（图 1-1）是以 pSPTet3 质粒（质粒中的 SP6 启动子下游插入长约 1.4kb 的 pBR322 来源的 DNA 片段，其 DNA 片段上含有抗四环素基因）为模板由 SP6 RNA 聚合酶经体外转录而得到的。control RNA（约 1.4kb）是带有 30 个 A 碱基的具有 Poly（A）$^+$尾的 RNA。当把 control RNA 经 RT-PCR 合成的双链 cDNA 插入质粒时，该质粒便可获得四环素抗性。

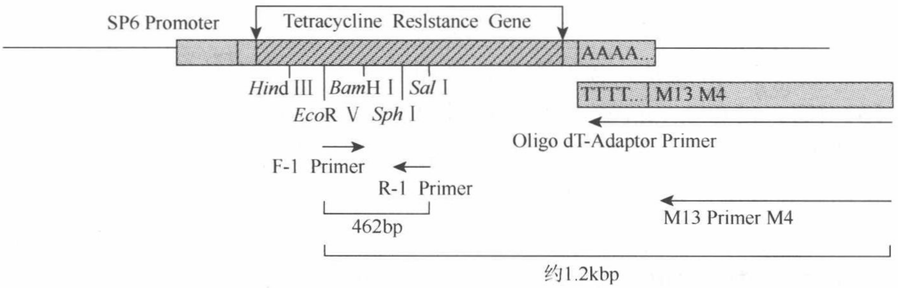

图 1-1 阳性对照简图

3. 仪器

低温台式高速离心机、低温冰箱、紫外检测仪、电泳仪、电泳槽、微量移液器、微量移液器吸头等。

四、实验步骤

（一）总 RNA 提取

第一次使用前应在去蛋白液 RD、漂洗液 RW 中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。

（1）样品处理如下。

1）组织：将组织在液氮中磨碎。每 50～100mg 组织加 1ml 裂解液 RZ，用匀浆仪进行匀浆处理。样品体积应不超过裂解液 RZ 体积的 1/10。

2）单层培养细胞：直接在培养板中加入裂解液 RZ 裂解细胞，每 $10cm^2$ 面积加 1ml 裂解液 RZ。用移液器吹打几次。

注意：裂解液 RZ 的加入量根据培养瓶面积决定，不是由细胞数决定。如果加入量不足，可能导致提取的 RNA 中有 DNA 污染。

3）细胞悬液：离心取细胞，弃上清。每 5×10^6～10×10^6 动物细胞或植物细胞加入 1ml 裂解液 RZ。加裂解液 RZ 前不要洗涤细胞，以免降解 mRNA。

4）血液：直接取新鲜血液，加入 3 倍体积的裂解液 RZ（推荐 0.25ml 血液＋0.75ml 裂解液 RZ），充分振荡混匀。

（2）将匀浆样品在 15～30℃放置 5min，使得核蛋白体完全分离。

（3）可选步骤：4℃，12 000r/min 离心 5min，取上清，转入一个新的无 RNase 的离心管中。

注意：如果样品中含有较多蛋白质、脂肪、多糖或肌肉、植物结节部分等，可加此步骤离心去除。离心得到的沉淀中包括细胞外膜、多糖、高分子量 DNA，RNA 存在于上清溶液中。

（4）加入 200μl 氯仿，盖好管盖，剧烈振荡 15s，室温放置 3min。

（5）4℃，12 000r/min 离心 10min，样品会分成 3 层：黄色的有机相，中间层和无色的水相，RNA 主要在水相中，水相的体积约为所用裂解液 RZ 的 50%。把水相转移到新管中，进行下一步操作。

（6）缓慢加入 0.5 倍体积无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀）。将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱 CR3 中，4℃，12 000r/min 离心 30s，若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱 CR3，可分两次转入，再 4℃，12 000r/min 离心 30s，弃掉收集管中的废液。

（7）向吸附柱 CR3 中加入 500μl 去蛋白液 RD（使用前请先检查是否已加入乙醇），4℃，12 000r/min 离心 30s，弃废液。

（8）向吸附柱 CR3 中加入 700μl 漂洗液 RW（使用前请先检查是否已加入乙

醇），室温静置 2min，4℃，12 000r/min 离心 30s，弃废液。

（9）向吸附柱 CR3 中加入 500μl 漂洗液 RW，室温静置 2min，4℃，12 000r/min 离心 30s，去除残余液体。

（10）将吸附柱放入 2ml 收集管中，4℃，12 000r/min 离心 2min，去除残余液体（注意：此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后将吸附柱 CR3 在室温放置片刻，或置于超净工作台上通风片刻，以充分晾干。如果有漂洗液残留，可能会影响后续的反转录等实验操作）。

（11）将吸附柱 CR3 转入一个新的离心管中，加 30～100μl RNase-free ddH_2O，室温放置 2min，4℃，12 000r/min 离心 2min。洗脱缓冲液体积应不少于 30μl，体积过小影响回收效率。且 RNA 应保存在−70℃，以防降解。

注意：如果想提高 RNA 得率，可重复上步操作一次，合并两次得到的溶液。

（二）反转录

合成的 cDNA 引物可结合实际情况从 Oligo dT-Adaptor Primer、Random 9 mers 或特异性下游引物中任选一种。

（1）按表 1-5 配制反转录反应液。

表 1-5　反转录反应液组成

试剂	体积/μl
$MgCl_2$	2.00
10×RT Buffer	1.00
RNase-free dH_2O	3.75
dNTP Mixture（各 10mmol/L）	1.00
RNase Inhibitor	0.25
AMV Reverse Transcriptase（反转录酶）	0.50
Random 9 mers 或 Oligo dT-Adaptor Primer（常用） 或特异性下游引物	0.50
实验样品 RNA（≤500ng Total RNA）	1.00
合计	10.00

（2）按以下条件进行反转录反应。

（30℃	10min）*	1个循环
42～55℃	15～30min	
99℃	5min	
5℃	5min	

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

＊ 使用 Random 9 mers 进行反转录时，首先在 30℃下保温 10min，使 Random 9 mers 延伸达到足够长度，以便在 42～55℃退火时与模板 RNA 充分结合。

五、RNA 质量的判断

（一）完整性判断

通常使用琼脂糖凝胶电泳判断 RNA 的完整性。理论上，完整的 RNA 拥有 28S∶18S=2.6∶1 左右的比例（即相对分子质量之比）。由于大分子 rRNA 的二级及三级结构程度更高。较小分子的 rRNA 更容易降解，再加上 RNA 电泳受许多因素影响，包括电泳条件、上样量、被 EB 饱和的程度等，因此准确评估 28S∶18S 并不容易。另外，来自不同器官组织，在确定其 mRNA 没有降解的前提下，其比例也有区别（如肝和肺的比例较低）。可以说，2∶1 是高质量的标准，但低于 2∶1 并不就是质量低。一般的，如果 28S 和 18S 条带清晰，且 28S∶18S＞1，该完整性就可以满足绝大部分后续实验。如图 1-2 所示。

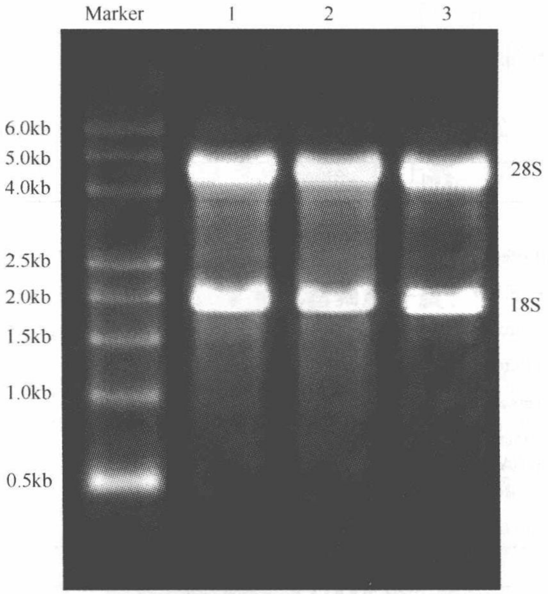

图 1-2 1%琼脂糖 RNA 电泳图

1～3. RNA 样品，28S∶18S=2.6∶1

（二）纯度的判断

260nm、320nm、230nm、280nm 下的吸光度分别代表了核酸、背景（溶液浑

浊度）、盐浓度和蛋白质等有机物的吸光度。OD_{260}/OD_{280}（R）体现了 RNA 中的蛋白质等有机物的污染程度，质量较好的 RNA 的 R 值应为 1.8～2.0，当 $R<1.8$ 时，溶液中的蛋白质等有机物的污染比较明显；当 $R>2.2$ 时，说明 RNA 已经被水解成了单核苷酸。

六、常见问题及解决方法

（一）RNA 提取实验前的准备

RNA 制备的关键是要抑制细胞中的 RNA 分解酶和防止所用器具及试剂中的 RNA 分解酶的污染。因此，在实验中必须采取以下措施。

（1）应经常更换手套，在操作过程中避免讲话等，防止实验者的汗液、唾液中的 RNA 分解酶（RNase）污染标本。

（2）使用 RNA 操作专用实验台、无 RNase 的塑料制品和枪头，避免交叉污染。

（3）RNA 在裂解液 RZ 中不会被 RNase 降解，但在提取后的继续处理过程中应使用不含 RNase 的塑料或玻璃器皿。

（4）配制溶液应使用无 RNase 的水。

（5）尽量使用一次性塑料器皿，若用玻璃器皿，须干热灭菌（180℃，60min）或使用 0.1% DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液在 37℃下处理 12h 后，在 120℃下高压灭菌 30min 以除去残留的 DEPC。

（二）组织或细胞中 RNA 提取量

一般情况下，组织或细胞中所能提取的 RNA 量如表 1-6 所示。

表 1-6　组织或细胞中的 RNA 提取量

组织材料	起始样品量	总 RNA 提取量
血	1ml	15～20μg
白细胞	1×10^7个	约 100μg
肝	1g	约 5000μg
HL-60 培养细胞	1×10^7个	约 100μg
烟草叶片	1g	约 1000μg
肾	1g	约 3000μg
骨骼肌	1g	约 1500μg
脑	1g	约 1500μg

（三）RNA 提取量较低怎么办？

（1）向组织材料中加入裂解液 RZ 后，请充分研磨匀浆使其充分裂解。

（2）分离后请尽量完全回收上清液。

（四）OD_{260}/OD_{280}＜1.65 的原因？

（1）样品裂解时加入的裂解液 RZ 量偏少，造成蛋白质变性不充分，可以再次对 RNA 溶液进行苯酚/氯仿抽提，以除去蛋白质。

（2）含有裂解液 RZ 的样品经匀浆混匀后未在室温静置，或静置时间不足 5min。

（3）相分层后，吸取上清液时不小心接触蛋白质层造成污染。

（五）提取的 RNA 发生降解，为什么？

（1）使用的组织材料不够新鲜。提取 RNA 的组织材料应采用新鲜的组织材料，或将新鲜的组织材料用液氮迅速冷冻后置于–80℃保存。

（2）提取 RNA 时使用的试剂及器材中有 RNA 分解酶。

（3）提取的组织材料中含有大量的 RNA 分解酶，而裂解液 RZ 的添加量不够。

（六）提取的 RNA 中含有 DNA 污染的原因

（1）裂解组织或细胞使用的裂解液 RZ 量偏少。

（2）使用的组织材料中含有大量的有机溶剂（如乙醇、异丙醇等）、高浓度的 Buffer、碱性溶剂等。

（3）如果提取的 RNA 中含有 DNA 时，可以使用 DNase（RNase free）Ⅰ进行 DNA 消化。

（七）反应温度的控制

AMV 由来的反转录酶，即使在 55℃下也能进行反转录反应。但在反转录长链 RNA（＞2kb）时，建议在 42℃左右进行。

（八）反转录酶对反应的影响

反转录酶能与 cDNA 结合，直接进行 PCR 反应有阻害作用。因此，PCR 反

应前，必须进行 99℃，5min 加热使反转录酶失活。反应液中反转录酶的浓度增加会使失活变得困难，在使用长链 RNA 进行反转录反应时，不要增加反转录酶的量，可将延伸反应时间延长。

七、思考题

1. 提取的 RNA 降解，为什么？
2. 提取的 RNA 中含有 DNA 污染，为什么？
3. 当 $R<1.8$ 时和当 $R>2.2$ 时，说明什么？

（史小玲　李　燕）

实验二　核酸分子的定量

一、实验目的

掌握核酸定量的原理和方法。

二、实验原理

组成核酸分子的碱基，均具有一定的吸收紫外线特性，最大紫外线吸收值为250～270nm。腺嘌呤的最大紫外线吸收值为260.5nm，胞嘧啶为267nm，鸟嘌呤为276nm，胸腺嘧啶为264.5nm，尿嘧啶为259nm。这些碱基与戊糖、磷酸形成核苷酸后，其最大吸收峰不会改变，但核酸的最大吸收波长是260nm，吸收低谷在230nm。在波长为260nm的光程中，吸光度A_{260}=1相当于双链DNA浓度50μg/ml，单链DNA 37μg/ml，RNA的浓度40μg/ml和寡核苷酸30μg/ml，即双链DNA的转化系数是50μg/ml，单链DNA 37μg/ml，RNA 40μg/ml和寡核苷酸30μg/ml，因此测出核酸溶液的A_{260}值后，即可据此定量溶于缓冲液的双链DNA、单链DNA、RNA及寡核苷酸的浓度。

计算原液DNA或RNA浓度：原始浓度（μg/ml）= A_{260}×转化系数×稀释率。

三、材料、试剂与仪器

1. 材料

待检测DNA或RNA溶液。

2. 试剂

DNA或RNA的洗脱液（如Rnase-free H_2O、TE buffer等）、ddH_2O。

3. 仪器

核酸蛋白定量仪、微量移液器（0.5～10μl）、微量移液器枪头（0.5～10μl）、棉签等。

四、实验步骤

（1）选择相应的洗脱液（如 Rnase-free H_2O、TE buffer 等）2μl，调零。

（2）取 1～2μl DNA 或 RNA 溶液测定并记录样品液的 A_{260} 值、A_{260}/A_{280}（R）值，R 值可以体现 DNA 或 RNA 中蛋白质等有机物的污染程度。质量较好的 DNA 或 RNA 的 R 值应为 1.8～2.0。当 R 值小于 1.8，表明溶液中的蛋白质等有机物的污染比较明显，可以增加酚提步骤；当 R 值大于 2.2，意味着 DNA 或 RNA 已经被水解。A_{260}/A_{230} 可用来估计去盐的程度。对于 RNA 纯制品，$A_{260}/A_{230}<2$ 说明去盐不充分，可以再次沉淀和 70%乙醇洗涤。

（3）记录浓度值（μg/ml）及 R 值。

五、注意事项

（1）260nm 是核酸最高吸收峰的吸收波长，最佳测量值为 0.1～1.0。假如不在此范围，稀释或浓缩样品，使之在此范围内。假如吸光度小于 0.05，检查是否存在操作因素（如移液不准确、混匀不充分、样品内有悬浮物等）影响。

（2）核酸的吸光度 A_{260} 必须大于 0.1，才有效和可靠，因为样品中的杂质和颗粒等不纯物的干扰通常会对光有一定吸收，其值小于 0.1。

（3）待测样品必须经过充分混匀，这样才能保证测定值的均一。

（4）待测样品中有相当含量的杂质。A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 是 DNA 纯度的指示值，纯度好的 DNA，在 pH 7.0～8.5 时其比值应该为 2.0 或 2.5，A_{230} 是多肽、芳香基团、苯酚和一些碳氢化合物的吸光度，A_{280} 是蛋白质的吸光度。

（5）操作前仅能提起手柄上样，不能通过手拉光缆操作。

（6）操作完毕后用蒸馏水清洗探头，然后退出。

六、思考题

1. 核酸的最大吸收波长是多少？
2. 简述 DNA 或 RNA 定量前，使用相应洗脱液的作用？
3. 质量较好的 DNA 或 RNA 的 R 值范围是多少，造成超过上限、下限的原因是什么？

（卞铁荣　李　燕）

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com