



Protocols in molecular biology
and cell biology of tumors

肿瘤分子生物学 与 细胞生物学实验手册

◇ 陶永光 主编

CTS
PUBLISHING & MEDIA

湖南科学技术出版社

前 言

近年来随着分子生物学技术在肿瘤研究中的广泛应用，以及新实验技术的涌现，有力地推动了肿瘤分子生物学与肿瘤细胞生物学的发展。为了满足从事肿瘤基础研究和临床研究的科研人员和研究生的需求，我们特组织专家编写了这本《肿瘤分子生物学与细胞生物学实验手册》。

本手册由从事肿瘤分子生物学与肿瘤细胞生物学研究的一线科研人员编写。手册从 DNA、RNA 的操作以及蛋白质处理等基本分子生物学技术开始，着重介绍了基因表达、基因敲除、蛋白质与 DNA、蛋白与蛋白质相互作用等基因功能研究方法，并结合当今肿瘤表观学研究的进展，重点介绍了甲基化、miRNA 研究的主要策略。在细胞培养和稳定细胞系建立的章节中，书中介绍了慢病毒感染及其稳定细胞系、放射抵抗细胞系以及可视化细胞系的建立方法，并针对肿瘤增殖、细胞周期改变、侵袭与转移特性以及细胞凋亡、自噬与程序性坏死异常，阐述了相应的研究手段。根据肿瘤代谢研究的新进展，本手册还介绍了代谢组学、海马分析检测新平台等内容。此外，本手册还就肿瘤研究中多种动物模型作了简述。

本书中每一章都设置了概述，对实验方法的原理进行了简要说明，并列举了实验方法所需的仪器与试剂，结合编者实践经验说明了相应的注意事项，而且每一章的末尾都附有参考文献，让读者可以深入查阅相关信息。本书力求图文并茂，便于读者理解。

五彩缤纷的分子生物学为肿瘤研究不断带来新的诠释。今年是中南大学肿瘤研究所分子生物学研究室成立 25 周年，借此，我们编写了这本《肿瘤分子生物学与细胞生物学实验手册》，与各位从事肿瘤研究的同仁分享经验并欢迎同行们予以批评指正。最后，感谢为此手册编写付出辛勤劳动的编委，感谢湖南科学技术出版社的大力支持。

编 者

2014 年 6 月

图书在版编目 (C I P) 数据

肿瘤分子生物学与细胞生物学实验手册 / 陶永光主编. -- 长沙 : 湖南科学技术出版社, 2014. 11

ISBN 978-7-5357-8340-0

I. ①肿… II. ①陶… III. ①肿瘤学—分子生物学—实验—手册
②肿瘤学—细胞生物学—实验—手册 IV. ①R730.2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 226311 号

肿瘤分子生物学与细胞生物学实验手册

主 编: 陶永光

责任编辑: 曹 鹍

出版发行: 湖南科学技术出版社

社 址: 长沙市湘雅路 276 号

<http://www.hnstp.com>

湖南科学技术出版社天猫旗舰店网址:

<http://hnkjcs.tmall.com>

印 刷: 长沙瑞和印务有限公司

(印装质量问题请直接与本厂联系)

厂 址: 长沙市井湾路 4 号

邮 编: 410004

出版日期: 2014 年 11 月第 1 版第 1 次

开 本: 710mm×1000mm 1/16

印 张: 11.75

插 页: 4

字 数: 195000

书 号: ISBN 978-7-5357-8340-0

定 价: 35.00 元

(版权所有·翻印必究)

目 录

第一章 分子生物学基础研究	1
第一节 DNA 操作	1
一、感受态细胞的制备	1
二、细菌转化	4
三、质粒 DNA 的抽提	5
四、双限制性内切酶酶解反应	6
第二节 RNA 操作	9
一、采用 TRIzol 法抽提总 RNA	9
二、反转录 PCR	12
三、实时荧光定量 PCR	15
第三节 蛋白质操作	17
一、细胞内总蛋白抽提	17
二、胞质和胞核蛋白抽提	18
三、线粒体抽提	20
四、BCA 法蛋白浓度测定	22
五、蛋白质免疫印迹法	23
六、泛素化修饰	30
七、激酶活性检测	34
第二章 基因表达调控研究技术	36
第一节 基因表达研究技术	36
双荧光素酶报告基因系统	36
第二节 基因敲除研究技术	39
RNA 干扰技术	39

第三节	蛋白质与 DNA 相互作用研究技术	43
一、	EMSA 凝胶迁移滞后实验	43
二、	染色质免疫沉淀技术	49
第四节	蛋白质与蛋白质相互作用研究技术	53
一、	免疫共沉淀	53
二、	GST pull-down 实验	56
三、	激光共聚焦荧光显微镜检测	58
第三章	表观遗传学研究技术	61
第一节	表观遗传	61
一、	生物信息学分析基因启动子区 CpG island 的分布情况	61
二、	甲基化特异性的聚合酶链式反应	64
三、	定量甲基化特异性 PCR	68
四、	重亚硫酸盐测序法	68
五、	甲基化/5 羟甲基化 DNA 免疫沉淀	72
六、	五羟甲基化 DNA 斑点杂交	76
第二节	microRNAs	78
一、	miRNA 的抽提和富集	79
二、	miRNA 的检测方法	82
三、	miRNA 靶基因的预测	86
四、	miRNA 靶基因验证	89
五、	miRNA 功能验证方法	92
第四章	细胞培养和稳定细胞系的建立及相关操作	95
第一节	细胞保种	95
第二节	基因转染	97
脂质体介导的基因转染技术	97	
第三节	慢病毒感染稳定细胞系的建立	99
一、	慢病毒包装	99
二、	慢病毒感染	102
第四节	电离辐射的细胞效应	104
一、	放射抵抗细胞系的建立	104

二、细胞存活曲线	106
三、辐射诱导的 DNA 损伤及修复	108
第五节 可视化细胞系模型的建立	110
一、实验原理	110
二、材料	110
三、方法	113
四、注意事项	114
第五章 细胞生物学功能相关研究	115
第一节 细胞增殖检测	115
一、MTS 法	115
二、集落形成实验	117
第二节 细胞周期	120
流式细胞术检测细胞周期	120
第三节 细胞侵袭与转移	121
一、划痕实验	121
二、细胞体外黏附实验	122
三、迁移实验	123
四、Transwell 侵袭实验	125
五、体外血管形成	126
六、伪足实验	127
第四节 细胞凋亡	128
一、Annexin V/PI 细胞凋亡检测	128
二、Caspase 活性检测	129
三、DNA 片段检测	131
四、线粒体膜电位改变检测	133
第五节 细胞自噬与程序性坏死研究方法	134
一、细胞自噬的检测方法	134
二、细胞程序性坏死检测	140
第六节 细胞能量代谢	142
一、葡萄糖和乳酸的体外检测	142

二、细胞内氧化还原物质的检测	144
三、ATPLite Assay 检测细胞内 ATP 含量	146
四、MitoTracker 标记线粒体	148
五、海马 XF 细胞代谢动态分析系统检测技术	149
六、代谢组学	156
第六章 动物实验	162
第一节 移植瘤小鼠模型	162
成瘤实验	162
第二节 可视化的动物模型	165
一、肿瘤原位可视化动物模型	166
二、移植瘤可视化动物模型	168
第三节 药物急性半数致死量 (LD ₅₀) 的测定	168
第四节 免疫组化	172
附录 常见英文名词与缩写	175
后 记	178

第一章 分子生物学基础研究

“分子生物学”一词最早由瓦伦·韦弗（Warren Weaver）提出，是一门以蛋白质、核酸、脂肪酸、多糖等生物大分子为研究对象，涵盖遗传学、生物化学和生物物理学等学科，从分子水平研究生命活动本质的学科。自 20 世纪 50 年代以来，分子生物学是生物学发展的前沿与突破点，其主要致力于对细胞中不同系统之间相互作用的理解，包括 DNA、RNA、蛋白质和脂类物质之间的关系以及它们之间的相互作用是如何被调控的。目前，分子生物学作为一种强有力的手段，在肿瘤研究领域阐明肿瘤的发生发展、诊断、治疗以及预防中，发挥非常重要的作用。本章将介绍涉及 DNA、RNA、蛋白质三方面的分子生物学基础实验技术，为广大读者朋友提供参考。

第一节 DNA 操作

一、感受态细胞的制备

感受态细胞是指通过物理化学方法诱导细胞，使其细胞膜表面出现孔洞，处于最适宜摄入和容纳外源性 DNA 的生理状态。常用的感受态菌种为 DH5 α 和 JM109，主要用于一般质粒的转化。除此之外，还有一些相对特殊的菌种。

Stbl3TM是常规质粒制备的宿主菌，可进行蓝白斑筛选；复制慢病毒载体系统推荐使用的菌株，对慢病毒载体等较大的质粒转化的效果好，有效减低错误重组的可能性。

大肠埃希菌 Stbl3TM菌株能有效地抑制长片段末端重复区的重组，非常适合含有同向重复序列的慢病毒和其他反转录病毒载体的复制。此外，细胞非常稳定，能提高慢病毒载体或其他不稳定载体的克隆效率。

（一）实验原理

感受态细胞的制备常用冰预冷的 CaCl₂ 处理细菌的方法制备，即用低渗

CaCl₂溶液在低温(0℃)时处理快速生长的细菌,从而获得感受态细菌。此时细菌膨胀成球形,外源DNA分子在此条件下易形成抗DNA酶的羟基-钙磷酸复合物黏附在细菌表面,通过热激作用促进细胞对DNA的吸收。

(二) 材料

1. 仪器

- (1) 离心机 5810R。
- (2) 摇床 ZHWY-100B。
- (3) 紫外分光光度计。

2. 试剂

(1) LB液体培养基 1 L: 含胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 加入双蒸水定容至 1 L。

(2) LB固体培养基: 1L LB液体培养基+15 g琼脂。

(3) 50 mM CaCl₂: 称取 0.55 g 无水 CaCl₂, 溶于 90 mL 双蒸水去离子水中, 定容至 100 mL, 高压高温灭菌, 4℃保存。

(4) 50 mM CaCl₂/甘油(15%): 225 mL 甘油+1275 mL 50 mM CaCl₂无菌条件下混合, 4℃放置。

(三) 方法

1. 划线(无抗生素LB平板) 37℃培养, 16~20小时的平板中挑取单个菌落(直径2~3 mm), 转置 100 mL LB培养基中, 37℃, 300 rpm 摇菌 2 小时。

2. 2小时之后菌液浑浊, 测 OD 值, OD₆₀₀=0.15~0.3 为宜(未到则继续摇)。

3. 2 500 g×5 分钟离心。

4. 去上清, 加入 40 mL 50 mM CaCl₂重悬细菌, 冰上静置 30 分钟。

5. 2 500 g×5 分钟, 4℃离心, 去上清。

6. 加入 3 mL 50 mM CaCl₂/甘油(15%)。

7. 轻轻混匀后放入-80℃保存。

(四) 注意事项

1. 菌液 OD 值确保位于 0.15~0.3 之间, 过低或者过高均会影响感受态转化效率。

2. CaCl₂浓度为 50mM。

3. CaCl₂刺激细菌后所有操作均在冰上进行, 离心为 4℃离心。

4. 常用感受态及其特点

(1) DH5 α 菌株: DH5 α 是一种常用于质粒克隆的菌株。 *E. coli* DH5 α 在使用 pUC 系列质粒载体转化时, 可与载体编码的 β -半乳糖苷酶氨基端实现 α -互补。可用于蓝白斑筛选鉴别重组菌株。

(2) BL21 (DE3) 菌株: 该菌株用于高效表达克隆于含有噬菌体 T7 启动子的表达载体 (如 pET 系列) 的基因。T7 噬菌体 RNA 聚合酶位于 λ 噬菌体 DE3 区, 该区整合于 BL21 的染色体上。该菌适合表达非毒性蛋白。

(3) BL21 (DE3) pLysS 菌株: 该菌株含有质粒 pLysS, 因此具有氯霉素抗性。pLysS 含有表达 T7 溶菌酶的基因, 能够降低目的基因的背景表达水平, 但不干扰目的蛋白的表达。该菌适合表达毒性蛋白和非毒性蛋白。基因型: F-, ompT hsdS (rBB-mB-), gal, dcm (DE3, pLysS, Camr)。

(4) JM109 菌株: 该菌株在使用 pUC 系列质粒载体进行 DNA 转化或用 M13 phage 载体进行转染时, 由于载体 DNA 产生的 LacZ α 多肽和 JM09 编码的 LacZ Δ M15 进行 α -互补, 从而显示 β -半乳糖苷酶活性, 由此很容易鉴别重组体菌株。

(5) TOP10 菌株: 该菌株适用于高效的 DNA 克隆和质粒扩增, 能保证高拷贝质粒的稳定遗传。

(6) HB101 菌株: 该菌株遗传性能稳定, 使用方便, 适用于各种基因重组实验。

(7) M110 或 SCS110: 大多数大肠埃希菌菌株中含有 Dam 甲基化酶和 Dcm 甲基化酶, 前者可以在 GATC 序列中腺嘌呤 N-6 位上引入甲基, 后者在 CCA/TGC 序列的第一个胞嘧啶 C-5 位置上引入甲基。常用的菌株都会产生 dam, dcm, 从而受到甲基化的影响部分限制性内切酶对甲基化的 DNA 不能切割, 如 *FbaI* 和 *MboI* 等, 一般生物公司提供的内切酶说明中均有说明。大多数酶切位点的甲基化不影响切割, 而有些会影响, 如 *XbaI*, *BclI* 等。而且甲基化只发生在特定序列, 以 *XbaI* 为例, 只有在位点序列旁出现 GA 或 TC, 该 *XbaI* 位才会被甲基化。而要解除这种限制修饰作用通常有两种方法: ①选用上述酶的同工酶, 如 *Sau3AI*, DNA 识别切割位点与 *MboI* 相同; 但不受甲基化影响; ②利用甲基化酶缺失的受体细胞进行 DNA 的制备, 如 *E. coli* JM110 和链霉菌等, 前者 Dam 和 Dcm 甲基化酶已敲出, 而后者细胞内本就没有甲基化酶, 从这些细胞中抽提的 DNA 就能被上述酶切割。

(8) *E. coli* JM110: 要排除 *dam*, *dcm* 甲基化的影响, 需要用特定的 *dam*⁻, *dcm*⁻ 的菌株, 如 JM110 如果由 JM110 或 SCS110 等甲基化缺失的菌株产生的质粒, 则不会被甲基化。

二、细菌转化

细菌转化是指某一受体细菌通过直接吸收来自另一供体细菌的含有特定基因的脱氧核糖核酸 (DNA) 片段, 从而获得了供体细菌的相应遗传性状, 这种现象称为细菌转化。细菌转化是细菌融合的一种形态, 亦即某一菌株 (供体菌) 的一部分遗传性状移到另一菌株 (变体菌) 的一种遗传杂交形态。转化是指外源 DNA, 即从供体菌抽提出来的高分子 DNA 直接被受体菌所摄取, 并在该受体菌细胞中进行重组的现象。

(一) 实验原理

质粒 DNA 黏附在细菌细胞表面, 经过 42°C 短时间的热击处理, 促进吸收 DNA。然后在非选择培养基中培养一代, 待质粒上所带的抗菌素基因表达, 就可以在含抗菌素的培养基中生长。

(二) 材料

1. 试剂

(1) LB 液体培养基 (无抗生素)。

(2) LB 固体培养基 (含抗性基因相对应的抗生素)。

2. 感受态 冻存 (或新制备) 的感受态细胞。目前感受态细胞已实现商业化, 可根据实验具体要求向公司采购特定的感受态细胞, 如较为常用的有 DH5 α 、JM109、XL1-Blue、BL21、BL21(DE3)、BL21(DE3)*plysS*、M15 等。

(三) 方法

1. 将冻存的感受态细胞从 -80°C 冰箱取出, 放置冰上, 3 分钟解冻, 轻轻摇匀。

2. 用加样吸头或接种环沾取少量质粒 (大约 50 ng), 放入感受态细胞中, 轻轻旋转混匀, 在冰上放置 20 分钟。

3. 42°C 热休克 90 秒, 不要摇动试管。

4. 每管加入 900 μ L 无抗生素 LB 液体培养基, 37°C 摇床 200 rpm, 温和摇振 1 小时。

5. 用无菌弯头涂布器将 200 μ L 菌液涂于 LB 固体培养基 (含抗性基因相对

应的抗生素) 平板表面, 37°C 平放 30 分钟, 然后倒置培养 10~14 小时 (或过夜)。

(四) 注意事项

1. 转染质粒体积不可超过感受态细胞的 1/10。
2. 转染质粒总量为 10~50 ng。
3. 对亚克隆转化时可通过低速离心富集细菌留 200 μL 进行铺板。

三、质粒 DNA 的抽提

质粒是一种存在于染色体外的稳定遗传单位, 它们是一类双链、环状闭合的 DNA 分子, 其大小在 1~200 kb 之间。提取质粒 DNA 的方法有很多种, 从产量上可分为小量抽提与大量抽提, 从使用仪器上可分为一般提取和试剂盒方法提取。目前试剂盒提取法已非常成熟, 且价格合适, 并能够保证抽提得到的质粒质量, 所以试剂盒法得到广泛应用。

(一) 实验原理

通过裂解大肠埃希菌将其基因组 DNA 和质粒 DNA 释放出来, 并通过基因组 DNA 和质粒 DNA 大小不一致的特性, 使用不同盐离子浓度的溶液进行沉淀分离。

(二) 材料

小量质粒抽提试剂盒: E. Z. N. A. ® Endo-free Plasmid mini Kit II。

(三) 方法

1. 将带有目的质粒的 *E. coli* 接种到装有 10~15 mL 含有氨苄 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 抗性的 LB 培养基中, 37°C 摇床 300 rpm 培养 12~16 小时。
2. 将菌液转移到离心管中离心, 5 000 g, 10 分钟, 室温。
3. 离心后管底会出现沉淀的细菌团, 倒掉或吸去培养基, 并将离心管倒置于吸纸以尽可能地吸干培养基, 向管中加入 500 μL 溶液 I /RNase A, 吹打菌团溶解至匀浆。
4. 将匀浆转移至新的 2 mL 离心管, 加入 500 μL 溶液 II, 轻轻地上下颠倒混匀 7~10 次直到溶液变为透明, 室温孵育 2 分钟。混匀过程不能剧烈的进行, 这样会使染色体 DNA 断裂影响质粒纯度。
5. 加入 250 μL 冰浴的缓冲液 N3, 颠倒混匀至出现白色絮状沉淀, 4°C 离心 10 分钟, 离心力 $\geq 12\ 000\ \text{g}$ 。

6. 离心后小心地将上清转移到新的 1.5 mL 收集管中, 转移溶液时注意记录体积。向收集管中加入 0.1 体积的 ETR 溶液, 颠倒混匀后冰上孵育 10 分钟, 在孵育过程中注意时常将溶液上下颠倒混匀。加入 ETR 溶液后液体会出现浑浊, 但在冰上孵育过程中又将会澄清状态。

7. 将溶液在 42°C 水浴中孵育 5 分钟, 溶液将再次出现浑浊。25°C 离心, 12 000 g, 3 分钟。ETR 溶液将会在管底产生蓝色沉淀层。

8. 将上层液体转移到新的 2 mL 收集管中, 转移时记录体积, 加入 0.5 体积的无水乙醇, 颠倒混匀, 室温孵育 1~2 分钟。

9. 转移 700 μL 溶液至 HiBind™ DNA 抽提柱 II 中, 室温离心 1 分钟, 10 000 g, 过柱, 弃去滤液, 重用收集管。

10. 重复第 9 步的操作, 使所有的溶液都进行过柱, 弃去滤液重用收集管。

11. 加入 500 μL 缓冲液 HB 洗柱, 室温, 10 000 g 离心 1 分钟。

12. 弃去滤液, 加 700 μL DNA 洗脱缓冲液洗柱, 与上述相同条件进行离心, 弃去滤液。

13. 另加入 700 μL DNA 洗脱缓冲液, 重复第 12 步操作。

14. 弃去滤液, 将空管满速离心 3 分钟, 至柱中完全干燥。此步骤对于除去柱中的乙醇非常重要。

15. 将柱子放入新的 1.5 mL 离心管, 加入 50 μL 无内毒素的洗脱液到柱膜中间, 室温等待 2 分钟后离心 1 分钟, 离心力 $\geq 13\ 000\ \text{g}$, 最终获得质粒 DNA。

(四) 注意事项

1. 对于高拷贝菌种, 每个反应建议抽提菌液体积为 15~20 mL, 过多的菌液可能导致裂解不充分, 并不能显著提升产量。

2. 加入溶液 I 之后充分重悬菌液对质粒产量至关重要。

3. 加入溶液 II 后混匀过程需轻柔, 不能剧烈地进行, 否则会导致染色体 DNA 断裂影响质粒纯度。

4. 新使用的试剂盒必须查看 DNA 洗脱缓冲液是否已添加无水乙醇, 并做好标记。

5. 已添加 Rnase A 的溶液 I 和 ETR 溶液必须 4°C 保存。

四、双限制性内切酶酶解反应

生物体内具有能识别并切割特异的双链 DNA 序列的一种内切核酸酶。它是

可以将外来的 DNA 切断的酶，即能够限制异源 DNA 的侵入并使之失去活力，但对自己的 DNA 却无损害作用，这样可以保护细胞原有的遗传信息。由于这种切割作用是在 DNA 分子内部进行的，故名限制性内切酶。以下以 Takara 公司限制性内切酶为例。

(一) 实验原理

限制性核酸内切酶是一类能识别双链 DNA 中特定碱基顺序的核酸水解酶（水解磷酸二酯键），它们以内切方式水解核酸链中的磷酸二酯键，产生的 DNA 片段 5'端为 P，3'端为 OH。根据酶的识别切割特性、催化条件及是否具有修饰酶活性，可分为 I、II、III 型三大类。通常所指的 DNA 限制性核酸内切酶就是 II 型酶，它能识别双链 DNA 分子中特定的靶序列（4~8 bp），并在该序列内切断 DNA，形成特有的黏末端或平端。

使用两种酶同时进行 DNA 双酶切反应（Double Digestion）时，为了节省反应时间，通常希望在同一反应体系内进行。Takara 采用通用酶切缓冲液（Universal Buffer）表示系统，并对每种酶表示了在各通用酶切缓冲液中的相对活性。尽管如此，在进行双酶切反应时，有时还会难以找到合适的通用酶切缓冲液。

(二) 材料

1. 仪器 恒温水浴箱 Cole Parmer。
2. 试剂 Takara 公司限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III，10×酶切缓冲液。

(三) 方法

1. 设计酶切体积为 20~30 μL ，计算清楚酶切系统中各成分的用量，清晰做好记录，如果是同一条件下进行多个酶切反应，建议统一加好共同的组份后，分装。

2. 先加入正确体积的无菌双蒸水，加入 1/10 体积的 10X 酶切缓冲液，混匀。

3. 在冰浴条件下加入适量的限制性内切酶。

4. 加入适量的 DNA 样品。

5. 轻弹混匀，瞬时离心。

6. 将反应体系放入 37°C 水浴酶切 1~3 小时，酶切过夜则建议改用稍大的酶切体积，以避免水分蒸发过多影响的酶切体系各组份浓度改变过大。

7. 置 65°C 水浴 10 分钟，对限制性内切酶进行灭活，不同的酶灭活条件可能不同。

8. 进行琼脂糖凝胶电泳检测酶切反应的结果。
9. 反应体系以 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切反应体系为例 (表 1-1)。

表 1-1 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切反应体系

酶切体系	体积
10×RE 缓冲液 (E)	6 μL
100×BSA	0.6 μL
DNA	6 μg
<i>EcoR</i> I 酶	0.6 μL
<i>Hind</i> III 酶	0.6 μL
双蒸水	X μL
	→合计 60 μL

充分混匀后, 于 37°C 保温 3~4 小时或过夜, 65°C 保温 10 分钟使限制性内切酶失活。

(四) 注意事项

1. 酶的定义 在标准条件下, 1 小时完全消化 1 μg 线型 DNA 分子所需的酶量定义为 1 U。

2. 影响限制性内切酶活性的生物因子

(1) 酶切割位点周围核苷酸两侧的碱基的性质。

(2) 识别序列在 DNA 中的分布频率。

(3) 与 DNA 的构象有关。

(4) DNA 的中可能混有蛋白、氯仿、SDS、EDTA、甘油等, 会影响 DNA 的纯度。

3. 1 μg DNA 中添加 10 U 的限制酶, 在 50 μL 的反应体系中, 37°C 下反应 1 小时可以完全降解 DNA。

4. 为防止星形活性 (是指由于反应条件不同而产生的切断与原来认识序列不同的位点的现象, 不但可以切断特异性的识别位点, 还可以切断非特异性的位点) 的产生, 请将反应体系中的甘油含量, 尽量控制在 10% 以下。

5. 根据 DNA 的种类, 各 DNA 的立体结构的差别, 或当限制酶识别位点邻接时, 有时会发生双酶切不能顺利进行的可能。

6. Takara 公司限制性内切酶缓冲液的使用可参照其网站说明。

第二节 RNA 操作

一、采用 TRIzol 法抽提总 RNA

核糖核酸（缩写为 RNA，即 Ribonucleic Acid），存在于生物细胞以及部分病毒、类病毒中的遗传信息载体。RNA 由核糖核苷酸经磷酸键缩合而成链状分子。一个核糖核苷酸分子由磷酸、核糖和碱基构成。RNA 的碱基主要有 4 种，即腺嘌呤（A）、鸟嘌呤（G）、胞嘧啶（C）和尿嘧啶（U）。其中，U（尿嘧啶）取代了 DNA 中的胸腺嘧啶 T 而成为 RNA 的特征碱基。

（一）实验原理

TRIzol 试剂适用于从细胞和组织中快速分离 RNA。TRIzol 试剂有多组份分离作用，与其他方法如硫氰酸胍/酚法、酚/SDS 法、盐酸胍法、硫氰酸胍法等相比，最大特点是可同时分离一个样品的 RNA/DNA/蛋白质。TRIzol 使样品匀浆化，细胞裂解，溶解细胞内含物，同时因含有 RNase 抑制剂可保持 RNA 的完整性。在加入氯仿离心后，溶液分为水相和有机相，RNA 在水相中。取出水相用异丙醇沉淀可回收 RNA；用乙醇沉淀中间层可回收 DNA；用异丙醇沉淀有机相可回收蛋白质。

TRIzol 试剂可用于少量样品（50~100 mg 组织、 5×10^6 细胞）也适用于大量样品（ ≥ 1 g 组织， $> 10^7$ 细胞）。对人、动物、植物组织和细菌均适用，可同时处理大量不同样品，整个提取过程在 1 小时内即可完成。分离的总 RNA 无蛋白质和 DNA 污染，可用于 Northern Blot, Dot Blot, ployA 筛选，体外翻译，RNase 保护分析和分子克隆。在用于 RT-PCR 时如果两条引物存在于一个单一外显子内，建议用无 RNase 的 DNase I 处理 RNA 样品，避免出现假阳性。共纯化的 DNA 可用作标准，比较不同样品 RNA 的得率，也可用于 PCR 和酶切。蛋白质可用于蛋白质免疫印迹法。

（二）材料

1. 仪器

- (1) 洁净工作台 AIR TECH, VD-650-U。
- (2) 恒温水浴箱 Cole Parmer。

2. 试剂

- (1) TRIzol 试剂。
- (2) 无核酶水。
- (3) RnaseZap。

(三) 方法

实验操作全程在 RNA 抽提专用洁净工作台 (AIR TECH, VD-650-U 洁净工作台) 中进行, 实验开始前可使用 RnaseZap 清洁工作台面, 抑制 RNase 活性。

1. 匀浆处理

(1) 组织: 将组织在液氮中磨碎, 每 50~100 mg 组织加入 1 mL TRIzol, 用匀浆仪进行匀浆处理。样品体积不应超过 TRIzol 体积 10%。

(2) 单层贴壁细胞: 直接在培养板中加入 TRIzol 裂解细胞, 每 10 cm² 面积 (即 3.5 cm 直径的培养板) 加 1 mL, 用移液器吸打几次。TRIzol 的用量应根据培养板面积而定, 不取决于细胞数。TRIzol 加量不足可能导致提取的 RNA 有 DNA 污染。

(3) 悬浮细胞: 离心收集细胞, 每 (5~10)×10⁶ 动物、植物、酵母细胞或 1×10⁷ 细菌细胞加入 1 mL TRIzol, 反复吸打。加 TRIzol 之前不要洗涤细胞以免 mRNA 降解。一些酵母和细菌细胞需用匀浆仪处理。

2. 液相分离

(1) 将匀浆样品在室温 (15℃~30℃) 放置 5 分钟, 使核酸蛋白复合物完全分离。

可选步骤: 如样品中含有较多蛋白质、脂肪、多糖或胞外物质 (肌肉、植物结节部分等) 可于 2℃~8℃, 10 000×g 离心 10 分钟, 取上清液。离心得到的沉淀中包括细胞外膜、多糖、高分子量 DNA, 上清中含有 RNA。处理脂肪组织时, 上层有大量油脂应去除。取澄清的匀浆液进行下一步操作。

(2) 每使用 1 mL TRIzol 加入 0.2 mL 氯仿, 剧烈振荡 15 秒, 室温放置 3 分钟。

(3) 2℃~8℃, 10 000 g 离心 15 分钟。样品分为 3 层: 底层为黄色有机相, 上层为无色水相和一个中间层。RNA 主要在水相中, 水相体积约为所用 TRIzol 试剂的 60%。

3. RNA 沉淀