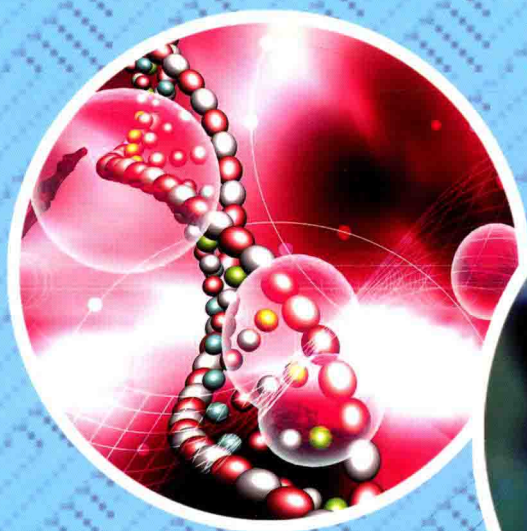


现代分子生物学

实 验 技 术 及其在烟草中的应用

万秀清 颜培强◎主编 ■



现代分子生物学

实 验 技 术 及其在烟草中的应用

万秀清 颜培强◎主编 ■

图书在版编目(CIP)数据

现代分子生物学实验技术及其在烟草中的应用 / 万秀清, 颜培强主编. -- 哈尔滨: 黑龙江大学出版社, 2015. 12

ISBN 978 - 7 - 81129 - 916 - 8

I. ①现… II. ①万… ②颜… III. ①分子生物学 - 实验 - 应用 - 烟草 - 研究 IV. ①TS41

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 108236 号

现代分子生物学实验技术及其在烟草中的应用

XIANDAI FENZI SHENGWUXUE SHIYAN JISHU JI QI ZAI YANCAO ZHONG DE YINGYONG

万秀清 颜培强 主编

责任编辑 魏翕然 李 卉
出版发行 黑龙江大学出版社
地 址 哈尔滨市南岗区学府路 74 号
印 刷 哈尔滨市石桥印务有限公司
开 本 787 × 1092 1/16
印 张 15
字 数 311 千
版 次 2015 年 12 月第 1 版
印 次 2015 年 12 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 978 - 7 - 81129 - 916 - 8
定 价 45.00 元

本书如有印装错误请与本社联系更换。

版权所有 侵权必究

编委会

主 编:万秀清 颜培强

副主编:康 宏 乔 婵 李 若

郭兆奎 边 疆

前 言

现代分子生物学实验技术是一门正在迅速发展的实验技术。在本书中我们尽可能详细地阐述了实验的基本要求、基本的操作步骤以及相关的技术原理,使广大读者能够操作方便、简明易懂。同时在分子生物学实验的基础上,我们将相关的实验手段应用于烟草科学的研究领域,列出详细的实验步骤并进行结果分析,使广大读者能够系统了解其研究方法及得到相应的实验结果。目前,我国已经发现 16 种烟草病毒病,烟草病毒病占烟草侵染性病害的 27.1%。据 1989 ~ 1991 年的统计,仅 TMV、PVY、CMV 及 TEV 等花叶型病毒病所造成的经济损失就占烟草侵染性病害所造成的总损失的 37%,与真菌病害所造成的损失相当。本书对烟草病毒病等方面实验进行了详细阐述。

本书共分为两部分。一是基础实验篇,该篇对分子生物学的基础实验操作进行了详细的阐述,主要包括核酸的定量测定,DNA 和 RNA 的提取,DNA 的连接,DNA 的重组,目的基因的亚克隆,Southern 杂交,Northern 杂交,聚合酶链反应(PCR)技术体外扩增 DNA,实时荧光定量 PCR,RT-PCR 反转录-聚合酶链反应等相关的实验。二是应用实验篇,该篇对烟草病毒病的相关领域进行了详细的阐述,其内容主要包括转基因烟草抗逆性指标和荧光定量 PCR 的检测,黑龙江省烟草马铃薯 Y 病毒株系鉴定,HAL1 基因转化烟草提高烟叶含钾量研究,接头连接 PCR 步行法鉴定转基因烟草,拟南芥 AVP2 基因转化烟草中吸钾相关基因的转录分析,酿酒酵母 NHX1 基因克隆与烟草表达分析,烟草炭疽病拮抗生防菌的筛选,烟草转基因检测标准及 PCR 反应体系的研究,应用 RNAi 技术培育抗 2 种病毒病的转基因烟草,等等。

万秀清负责实验室操作规范及安全,实验 16 至实验 23 以及实验 42 的编写,共计 9 万字;颜培强负责实验 24 至实验 40 以及实验 51 和实验 52 的编写,共计 9 万字;康宏负责实验 1 至实验 15 及其他内容的编写,共计 6.5 万字;乔婵负责实验 45 和实验 46 的编写,共计 2 万字;李若负责实验 43 和实验 44 的编写,共计 1.6 万字;郭兆奎负责实验 47 和实验 48 的编写,共计 1.5 万字;边疆负责实验 49 和实验 50 的编写,共计 1.5 万字。

目 录

实验室操作规范及安全	1
基础实验篇	9
实验 1 核酸的定量测定	11
实验 2 细菌 DNA G + C 含量的测定	14
实验 3 真核细胞 DNA 的制备与定量	17
实验 4 质粒 DNA 的提取	20
实验 5 试剂盒提取质粒 DNA	23
实验 6 碱裂解法提取质粒 DNA	24
实验 7 质粒 DNA 的限制性核酸内切酶酶切	27
实验 8 λ 噬菌体 DNA 的提取	29
实验 9 植物基因组 DNA 的提取	32
实验 10 酵母 RNA 的提取	33
实验 11 植物总 RNA 的提取	35
实验 12 TRIzol 法提取 RNA	38
实验 13 mRNA 的分离与纯化	40
实验 14 DNA 琼脂糖凝胶电泳	42
实验 15 DNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳	45
实验 16 从琼脂糖凝胶中回收 DNA	48
实验 17 感受态细胞的制备及转化	50
实验 18 DNA 分子的限制性内切酶消化	53
实验 19 DNA 的连接	55
实验 20 DNA 重组	57
实验 21 目的基因的亚克隆	61
实验 22 Southern 杂交	64
实验 23 Northern 杂交	68
实验 24 聚合酶链反应(PCR)技术体外扩增 DNA	70
实验 25 实时荧光定量 PCR	75
实验 26 RT - PCR 反转录 - 聚合酶链反应	78
实验 27 PCR 产物的克隆	80
实验 28 RNA 酶保护试验	82
实验 29 放射性同位素标记的 DNA 序列测定分析	85

实验 30	DNA 核苷酸序列分析——银染色法	88
实验 31	16S rRNA 序列分析及其同源性分析	91
实验 32	原核表达	97
实验 33	双脱氧链终止法的 DNA 序列测定	99
实验 34	RT-PCR 法钓取小鼠肝脏 GAPDH 基因	103
实验 35	利用聚合酶链反应定点突变	106
实验 36	外源基因(在大肠杆菌中)的诱导表达和检测	108
实验 37	从琼脂糖凝胶中分离回收 PCR 产物	110
实验 38	GAPDH 基因的 TA 克隆	112
实验 39	脂质体转染实验与荧光素酶活性检测	114
实验 40	Western 杂交	117
应用实验篇	121
实验 41	转基因烟草抗逆性指标和荧光定量 PCR 的检测	123
实验 42	黑龙江省烟草马铃薯 Y 病毒株系鉴定	135
实验 43	HAL1 基因转化烟草提高烟叶含钾量研究	167
实验 44	接头连接 PCR 步行法鉴定转基因烟草	173
实验 45	拟南芥 AVP2 基因转化烟草中吸钾相关基因的转录分析	179
实验 46	酿酒酵母 NHX1 基因克隆与烟草表达分析	187
实验 47	烟草炭疽病拮抗生防菌的筛选	195
实验 48	烟草转基因检测标准及 PCR 反应体系的研究	201
实验 49	应用 RNAi 技术培育抗 2 种病毒病的转基因烟草	207
实验 50	应用 RNAi 技术培育抗 TMV 病毒转基因烟草	213
实验 51	转基因烟草定性检测方法的研究	219
实验 52	转拟南芥 AtKup1 基因高含钾量烟草获得	224
主要参考书目	231

实验室操作规范及安全

一、实验室一般规则

1. 实验环境要整洁、安静、有序。
2. 实验时应穿专门的工作服,个人物品应按照实验室规定摆放整齐。
3. 实验室器皿应轻拿轻放,严格遵守操作规程并做好实验记录,认真如实填写实验报告,实验器皿专材、专用、专放,避免交叉污染。
4. 实验时严格按照实验操作要求完成,注意危险物品的防护,防止人为造成污染。如有疑问,应立即报告指导教师或实验室管理人员。
5. 实验结束后,所有实验物品要放回原处,清洁工作台,彻底清洗试管、烧杯等实验器材,实验垃圾务必放到指定位置,不得随意乱丢。
6. 节约水电,杜绝浪费。珍惜实验标本和实验器材,不得无故损坏,随意拆卸。
7. 实验仪器要定期保养,实验室内严禁吸烟,实验完毕后要做好地面的清洁工作,关好水、电、门、窗等。

二、实验室操作规范

1. 谨慎使用贵重仪器。应先了解贵重仪器的使用方法,才能使用仪器。在操作过程中,应严格遵守操作规程,如遇到操作问题,不可擅自拆毁仪器,自行维修。
2. 当使用到具有挥发特性、有毒的试剂时,均必须在通风橱内进行操作。用后试剂严密封口,尽量缩短操作时间、减少外泄,操作者最好戴口罩、手套。
3. 应在实验进行前充分了解实验材料、试剂的物化性质。比如见光容易分解变质的物品应采用棕色或深色容器包装储存,尤其性质不稳定的试剂,每次尽量少量配制。
4. 加热试管时,试管口不能对人。应用硫酸纸称量试剂,不可用滤纸。量瓶是量器,不能当作容器盛取溶液和试剂。
5. 将标签纸贴在试剂瓶的适当位置,标签纸大小应与容器相吻合,并要注明试剂名称、浓度、规格、配制日期等。
6. 取用试剂或溶液后,应立即盖严瓶盖,放回原处。取出的试剂或溶液,如未用尽,切勿倒回瓶内,以免掺混。
7. 配制试剂完毕,应尽快将用过的器皿清理干净,以减少试剂溶液对器皿的腐蚀。洗净的器皿应自然干燥,不能用抹布或纸巾擦拭,并倒立放置。

8. 观察紫外线时应佩戴防护眼镜或使用防护板,而不能用眼睛直视。

三、实验室安全常识

生物实验常常涉及毒性较强、具有腐蚀性或易燃性的化学药品,甚至在操作上会直接接触具有爆炸性、传染性的细菌或病毒等,所以生物实验人员要务必重视其安全程度。《实验室生物安全通用要求(GB 19489—2008)》是国家对生物安全等级、实验室安全规范及实验室配备的设施设备、个人防护等方面做出的若干标准规定,要求生物实验的参加者必须按此要求严格执行。

1. 高温高压灭菌,必须有现场操作人员严格监督。

2. 离心机、电泳仪、恒温水浴锅、烘箱是实验室使用频率较高的用电设备,使用这些仪器时,主要应防止触电的发生,不可近水源或潮湿,启动、关闭电器设备时应眼睛直视开关的指示灯。并且应定期检修电器设备,严防漏电现象发生。

3. 易燃、易爆、易腐蚀、有毒物品应远离高热设备,尤其不能放在高压或高温设备内灭菌,否则易发生爆炸,会造成人员伤亡。

4. 易燃物如乙醇、乙醚、丙酮等应谨慎使用。如果不慎将易燃液体溅出试管或容器外部,应立即处理:打开窗户,关闭所有电源,用棉质易吸收物品擦拭液体,并将外溅液体回收到容积较大的容器内,最后再回收至能够密闭的容器中。

5. 有毒物品只有经严格的审批后,才可以使用,用量、领取人要有真实清晰的记录,用后按照规定处理。

6. 挥发性酸、浓酸、浓碱均有腐蚀性,应防止液体溅出,实验操作要在通风橱内完成,若有液体溅到实验台甚至地面上,必须及时反复清洗干净。

7. 废液应先稀释再倒入水池,并用大量的自来水冲洗水池及下水通道,而不能直接倾倒入下水通道。

8. 使用高压蒸汽时,要时刻观察锅内的水量,水过少,容易烧干引起炸裂事故。同时被消毒物品不能过多,否则会影响高压锅内的气体流通,高压锅底部的导气管也要伸直,防止堵塞。灭菌完毕后一定要先开放阀门放气,直到锅内压力降为“0”,最好等被消毒物品自然冷却后,才可以开盖。

9. 实验室应急措施。

伤口处理:先检查一下伤口内有无玻璃或金属的碎片,然后用硼酸水洗净,再用碘酒消毒,最后用无菌纱布包扎。如果伤口比较严重并大量出血,则应迅速止血,同时送医院进行医治。

灼伤皮肤:(1)强碱。首先要用大量清水冲洗,再用5%硼酸溶液或2%乙酸溶液等弱酸性溶液进行冲洗。(2)强酸。先用大量自来水冲洗,再用5%NaHCO₃溶液等弱碱性溶液洗涤。(3)苯酚。用乙醇清洗。

煤气中毒:及时开窗换气或者到户外呼吸新鲜空气,严重时送医院就医。

烫伤:一般用乙醇消毒,然后涂2%苦味酸或5%鞣酸。若皮肤起泡,不要弄破水

泡,防止感染。对于烧伤严重者,应用无菌纱布敷好伤口后,急送医院处理。

触电:先关闭电源,立即绝缘。

火灾:火灾发生时,同样先关闭电源,撤离易燃易爆物品,迅速扑灭火源。根据火源性质及火势大小,采取相应的灭火方法,衣服着火,切勿奔跑,最宜滚灭。

四、常用器皿、仪器及溶液

1. Eppendorf 管

Eppendorf 管是 DNA 操作中普遍使用的塑料制品,常用的是半透明的聚丙烯产品,通常有 1.5 mL 和 0.5 mL 两种型号,应考虑其强度、透明度、化学稳定性及耐热性等情况选择适合实验目的的用具。Eppendorf 管等小塑料制品也可在实验中进行高温高压灭菌。

2. 微量移液器

生物学实验中移取溶液常常用移液管或微量注射器来完成,型号从 2 μL 到 10 mL 不等。量程不同的微量移液器使用方法一般都相同,都是调节其刻度值范围到某一量程,然后缓慢吸取试剂或溶液。一般要戴上一次性手套将枪尖放入专用盒中进行高温高压灭菌后,方可使用。

3. 恒温水浴锅

恒温水浴锅一般恒温 37 $^{\circ}\text{C}$,反应时常将 Eppendorf 管固定于某一漂浮物或泡沫上,在水面上进行酶促反应。恒温水浴锅大多用于进行酶促反应实验,若反应需要温度高于或低于 37 $^{\circ}\text{C}$,就需要使用附有制冷设备的或高温度量程水浴锅。

4. 台式离心机

通常离心机根据转头种类的区别分为三种类型,即水平式、吊式和角式三种。在分子生物学实验中,使用频率最高的仪器就是离心机,所以最好购买体积较小、性能稳定的台式离心机。离心机转速一般能达到 15000 r/min。有些实验需要在低温下进行,如回收乙醇沉淀物等实验,因此带有制冷功能的离心机最佳。

5. 离心干燥机

离心干燥机是用来使 DNA 样品快速干燥的仪器。

6. 真空泵

有些实验,比如乙醇沉淀后,为了使 Eppendorf 管内的 DNA 快速干燥,常用真空泵。真空泵是利用真空吸走残留液体的装置,其作用与离心干燥机类似。一般来说,简易的真空泵可以用于大多数的生物学实验,带有漏水阀装置的机械式真空泵可防止溶液直接流向机器内。

7. 漩涡混合器

漩涡混合器的原理是利用不对称的旋转混匀 Eppendorf 管内的溶液。漩涡混合器

在市场上种类很多,多数为接触式的。Eppendorf 管底部接触混合器的橡胶头后就会转动,并带动 Eppendorf 管内的溶液产生振荡,从而达到混匀溶液的目的。

8. 振荡器

振荡器的作用是加速搅拌离心管内的溶液、加速溶解难溶物,还有利于盛装不溶物的容器的清洗等操作。根据振荡方式,振荡器分为摇摆式、水平旋转式、水平往复式、多角度旋转式等类型。

9. 紫外发光装置

紫外发光装置,简称紫外线灯,其发射的紫外线通过定制的过滤板可过滤出一定的波长。根据过滤板种类,紫外线可分为短波、中波和长波等类型。一般使用中波能清楚地看见染上溴化乙锭的 DNA,波长短与对 DNA 的损伤有着直接关系。同时紫外线灯还能起到灭菌消毒的作用,专门用于工作台或无法用其他灭菌装置灭菌的设备。此外,紫外线灯管和过滤板应定期更换,不能超过规定的使用寿命,实验结束后应立即关闭电源。

10. 实验用纸

吸走残留溶液、擦拭实验用具需要专用的、不带毛屑的实验用纸。

11. 实验用水

除了实验室常常备用的蒸馏水之外,目前的净水装置可以利用活性炭吸附、离子交换等技术制备一定纯度的实验用水。一次蒸馏水多用于电泳缓冲液配制、大肠杆菌培养基制备、实验器皿清洗等操作,其纯度与离子交换蒸馏水差不多;双蒸水由一次蒸馏水再次蒸馏而成,与纯净水的纯度差不多,用于生物化学及组织培养实验。

五、实验基本操作技术

1. 除(灭)菌操作技术

分子生物学实验的除(灭)菌技术,目的有两个,一是避免或防范微生物污染,二是减少蛋白酶等的影响。而且大部分分子生物学实验均要求对所有器材、培养基和工作场所进行全面消毒,这样才能保证实验工作顺利进行。根据被灭菌物品的材料性质和实验要求,可采取不同的除(灭)菌方法。下面介绍几种常用的除(灭)菌方法。

(1) 干热灭菌

干热灭菌包括火焰灼烧灭菌和热空气灭菌、高压蒸汽灭菌。

火焰灼烧适用于金属用具、试管口和瓶口、玻璃棒的灭菌处理,这种方法灭菌迅速彻底。热空气灭菌一般使用 170 ℃ 烤箱,利用高温干燥空气给玻璃器皿和培养皿进行灭菌,灭菌后的器皿干燥易保存。高压蒸汽灭菌是在密闭的高压蒸汽锅中进行的灭菌方法,它利用高压产生的蒸汽将原有空气驱尽并密闭,再继续加热使锅内蒸汽压强逐渐上升。高压蒸汽灭菌时,需要灭菌的物品不同,压强和灭菌时间的选择也不同,玻璃器皿的要求是 0.15 MPa 下 15 min,培养液和橡胶制品为 0.1 MPa 下 10 min。

(2) 紫外线杀菌

紫外线灯是人工制造的低压汞灯,能辐射出 257.3 nm 的紫外线,它一般被蛋白质(吸收波长是 280 nm)和核酸(吸收波长是 260 nm)吸收,造成这些物质分子的变性和失活。紫外线杀菌能力强而且比较稳定,主要用于实验室内的空气、无菌操作台的表面和不能够使用其他方法进行灭菌的物品等。无菌室的紫外线灯管应距地面不超过 2.5 m。要注意的是,需要消毒的物品不应该相互遮挡,在紫外线照射不到的地方不能进行消毒,因为紫外线不能穿透玻璃、衣物、纸张和大多数其他物体;紫外线消毒会产生臭氧,对空气有污染,对试剂及培养液都有不好的影响,对人皮肤也会有很大伤害。

(3) 过滤除菌

许多具有生物活性的液体是不能采用高压灭菌的方法处理的,如血清、合成培养液、酶溶液等,或者遇热易分解、易挥发有机溶剂及具有腐蚀性、刺激性强的试剂,因此采用过滤除菌的方法非常有效,常用的滤器为微孔滤膜过滤器。用过滤除菌法除菌时,滤膜规格为 0.22 μm 最适宜(可过滤细菌和霉菌)。同时,滤膜需要谨慎安装,以保证细菌得到有效过滤。滤膜用完后,需用去离子水冲洗。

(4) 化学试剂除菌

高锰酸钾、乙醇、乙酸、福尔马林等是最常用的进行灭菌的化学试剂,并且操作方法简单、有效。

(5) 抗生素灭菌

主要适用于液体培养基的灭菌或培养物及培养液污染的预防。要注意抗生素不能完全达到消毒灭菌的目的,还应严格进行无菌操作来配合。常用的抗生素一般为青霉素和链霉素。

2. 无菌操作技术

大部分分子生物学实验过程都需要无菌操作,以防微生物干扰实验过程,影响实验结果,所以保证物品清洁和操作区域不被污染相关的操作技术都属于无菌操作技术,它是分子生物学实验过程中控制和预防微生物污染的一项重要工作。

无菌操作技术主要包括:实验用具、试剂的无菌处理和无菌操作环境的处理,以及实验者自身的无菌操作技术。这里主要介绍的是无菌操作环境的处理和实验者自身的无菌操作技术的培养两个方面。

首先,要确立无菌的观念,非常准确地掌握各种无菌技术,并严格遵守实验过程中的无菌操作规定事项,尤其是微生物、细胞及胚胎的培养。注意在无菌实验的操作过程中,任何环节都不可以违反操作规则,否则会直接导致实验失败。

在实验进行前,用 70% 的乙醇擦拭超净工作台,用紫外线灯照射无菌室 60 min,然后打开超净工作台风机,运转 10 min 后,再正式开始实验。实验过程中的所有操作步骤应在超净工作台的中央无菌区域完成。

其次,工作台要有合理的布局,用品摆放应采取就近原则。在超净工作台上工作时,应着长袖的清洁工作服,并在操作前用 75% 的乙醇反复擦拭双手,如果实验过程



中双手碰触了容易造成污染的物品,要重新进行消毒清洗,进入或离开培养室也都要重新消毒;而进入细胞培养室则需要完全消毒清洗,戴口罩、着消毒衣帽及鞋等。

在进行无菌操作时,首先要点燃酒精灯。多数器具操作前,如安装吸管帽、开启或封闭瓶口等之前,都需在火焰处进行灼烧灭菌。但是要注意,实验器具,特别是金属材质的器具不能在酒精灯上灼烧过长时间,并且要在冷却后才可以使用,以免造成组织细胞的损伤。使用过的吸管不能再用酒精灯烧灼,因为吸管头中有留存的营养液,酒精灯灼烧后能生成炭,重复使用自然会把有害物质带进实验操作中。

内部长有细胞或微生物的培养瓶在火焰处灼烧的时间要短,防止因长时间加热烧死细胞或微生物。当然,对于胶塞这种过火时间长容易烧焦产生有毒气体的器具更应做到准确敏捷,以防危害到实验培养的细胞或微生物,减少其受到污染的机会。同时注意,实验操作有一定的步骤和顺序,最好不要在处理之前使组织、细胞或微生物过早暴露在空气中,更不能用手碰触已充分消毒的器皿,如有接触,要重新消毒或者更新器皿。

如前所述,培养液及其他溶液在使用前,不能过早置于空气中;打开瓶盖的操作是使瓶口朝上,与水平面成 45° 角,以减少遗落菌体的机会;用过之后也同样不能再重复使用,应立即将瓶口封闭。同时,吸取各种营养液、缓冲液、细胞悬浮液时,要分别使用不同的吸管,严禁混用,避免影响实验效果,造成污染的扩大和细胞交叉污染。而且个人在实验工作中要注意不能对着操作台讲话和咳嗽,因为唾液会把细菌或支原体实验操作平台污染。

总之,对于细胞和微生物而言,每次只能对一种微生物或一种菌株进行操作,即使要用相同的培养基也不能共享同一培养基,以防止微生物和细胞间的污染。

最后,实验完毕要及时清理工作台和用过的废液(前面已提到),关闭风机及电源,用70%乙醇重新擦拭无菌工作台,最好也同时打开紫外线灯进行消毒,特别是在温度较高的夏季,要防止霉菌和细菌的滋生。除此之外,要将实验用品放回原处,保持工作台的洁净。

3. 微量操作技术

分子生物学实验中的计量单位范围很广,除了通常使用的毫升(mL)、克(g)、毫克(mg)、微克(μg)以外,还会用到更小的单位,如纳克(ng)、皮克(pg)及纳升(nL)等。进行微量操作实验,应当注意以下几点:

熟悉、掌握微量称量工具的正确使用方法。微量电子天平和微量移液器是使用频率较高的微量称量器具,精准称量是完成实验最基础也是最重要的一个步骤。

学会使用移液器往 Eppendorf 管中添加一种或几种成分不同的液体,而且在取出移液器时,保证吸头的上部不能带出可见液珠。

学会将各种微量液体集中混匀。将全部微量液体加入 Eppendorf 管中,总体积有的只有几十微升,很难用肉眼观察,常规的混匀方法也难以彻底混匀多种微量液体。通常要经高速旋转混匀,然后才使用高速台式离心机进行离心。

微量操作一般无法用肉眼直接观测到实验结果,通常都是通过一定的检测和鉴定方法显现出来的,所以为保证实验的有效性,在分子生物学实验中,必须确保每一步的实验结果都正确,才能进行下一步骤的操作。

基础实验篇

