



卫生部“十二五”规划教材
全国高等医药教材建设研究会规划教材

全国高等学校配套教材
供医学检验专业用

临床分子生物学检验 实验指导

第3版

主编 王晓春



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE



卫生部“十二五”规划教材
全国高等医药教材建设研究会规划教材

全国高等学校配套教材
供医学检验专业用

临床分子生物学检验 实验指导

第3版

主 编 王晓春

副主编 高基民

编 者 (以姓氏笔画为序)

王晓春 (中南大学湘雅医学院)	唐冬生 (佛山科学技术学院)
吕建新 (温州医学院)	黄 彬 (中山大学附属第一医院)
庄文越 (北华大学医学检验学院)	倪培华 (上海交通大学医学院)
朱 燕 (中南大学湘雅医学院)	高基民 (温州医学院)
陈昌杰 (蚌埠医学院)	常晓彤 (河北北方学院)
郑 芳 (天津医科大学)	樊绮诗 (上海交通大学医学院)
姜 勇 (吉林医药学院)	

图书在版编目(CIP)数据

临床分子生物学检验实验指导 / 王晓春主编. —3 版.
—北京: 人民卫生出版社, 2012.1
ISBN 978-7-117-15269-3

I. ①临… II. ①王… III. ①临床医学: 分子生物学—医学检验—高等学校—教材 IV. ①R446.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 263533 号

门户网: www.pmph.com	出版物查询、网上书店
卫人网: www.ipmph.com	护士、医师、药师、中医师、卫生资格考试培训

版权所有, 侵权必究!

临床分子生物学检验实验指导
第 3 版

主 编: 王晓春
出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-59780011)
地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号
邮 编: 100021
E-mail: pmph@pmph.com
购书热线: 010-67605754 010-65264830
010-59787586 010-59787592
印 刷: 三河市双峰印刷装订有限公司
经 销: 新华书店
开 本: 787×1092 1/16 印张: 11 插页: 1
字 数: 268 千字
版 次: 2003 年 8 月第 1 版 2012 年 1 月第 3 版第 6 次印刷
标准书号: ISBN 978-7-117-15269-3/R·15270
定 价: 21.00 元
打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com
(凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换)

前 言

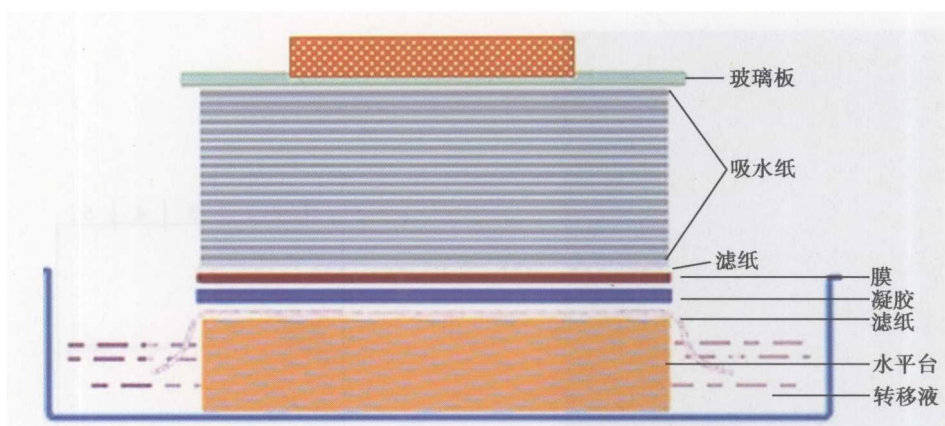
近年来,分子生物学发展迅速,在医学检验中的应用也越来越广泛,已成为医学检验的一个重要分支,在遗传病、肿瘤、感染性疾病、心血管疾病等的诊断和治疗中作用越来越重要。为了适应医学检验教育发展的需要,人民卫生出版社于2003年组织编写了第1版《分子生物学检验技术实验指导》教材,2008年编写了第2版,此教材自出版以来得到了各高校医学检验专业师生的肯定和认可。为了让教材更好的接近临床,紧密结合临床,经卫生部医学检验专业教材评审委员会研究决定,将第3版实验教材更名为《临床分子生物学检验实验指导》,此教材在前两版的基础上进行了较大修改和更新,新增加了自主设计性实验,使之更新颖、更规范、更实用及更贴近临床。《临床分子生物学检验实验指导》是作为吕建新教授、樊绮诗教授主编的《临床分子生物学检验》的配套实验教材,由人民卫生出版社组织编写并出版。

本教材分二十六个实验及自主设计性实验。第一部分分子生物学检验技术实验室,包括分子生物学检验技术实验须知、分子生物学检验技术实验室介绍、分子生物学检验技术常用仪器及分子生物学实验室生物安全。实验内容包括六大部分:核酸的分离与纯化;核酸扩增技术;核酸分子杂交技术;分子克隆技术;其他分子检验技术及自主设计性实验。每个实验包括原理、器材、试剂、操作步骤、结果讨论、注意事项、临床意义。附录包括常用试剂和缓冲液的配制等。有的实验内还包含若干个小实验供选择,各校可根据自身条件、要求的不同,进行取舍和组合,建议实验教学时数为30~60学时。

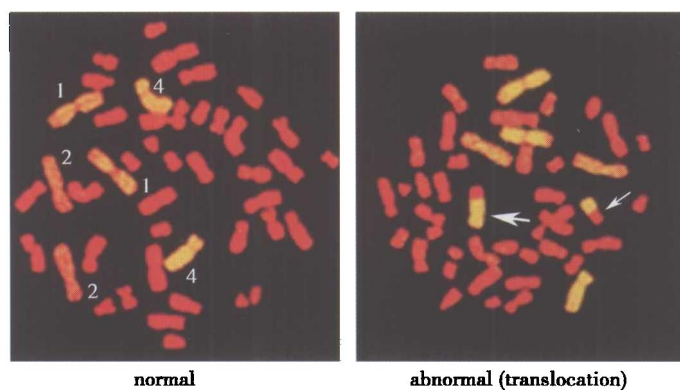
本书具有以下特点:①注重对学生进行分子生物学检验技术的基础知识和技能的训练,从微量取液器的使用到分子生物学实验室的规范操作及基本的实验。分子生物学实验中的试剂配制非常复杂,我们力求尽量详细,以方便教学;②注重对有临床应用或者有应用前景的分子生物学检验技术及项目的介绍,如PCR技术、基础突变的检测等;③注重对综合性、设计性、研究性实验的介绍,加强对学生综合分析能力的培养;实验中有的部分是根据科研课题改编而成,内容新,方法先进,更有利于学生掌握新知识、新技术;④自主设计性实验的开设,能开拓学生思维,提高学生的创新能力。

在本书编写过程中,得到了中南大学湘雅医学院、南京医科大学、温州医学院等单位的大力支持,参加本书编写的包括老专家、教授,还有一些具有博士学位的年轻专家,他们以高度的责任感完成了各自的编写任务,付出了辛勤的劳动,在此一并表示衷心的感谢。由于分子生物学技术发展非常迅速,加之本人水平有限,难免存在不足之处或错误,敬请同行专家及读者批评指正。

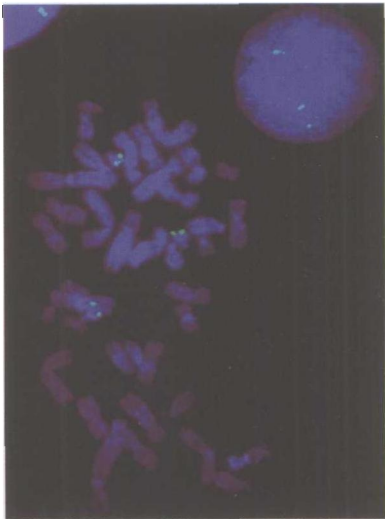
王晓春
2011年9月



彩图 14-1 Southern 印迹示意图



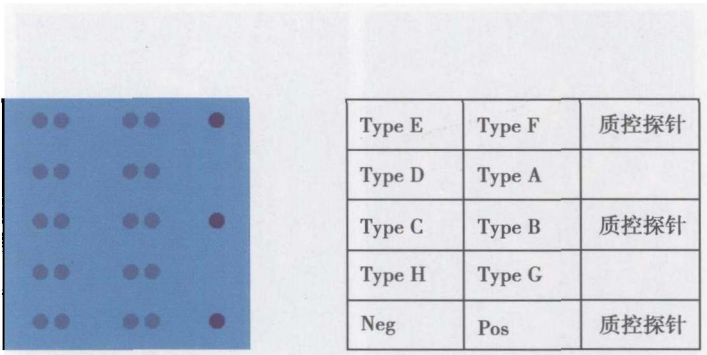
彩图 16-1 以碘化丙啶(PI)染色的染色体荧光原位杂交结果



彩图 16-2 以达派 (DAPI) 染色的
染色体荧光原位杂交结果



图 23-2 Western blot 结果图



彩图 26-1 完成点样基因芯片成品示意图

目 录

第一部分 分子生物学检验技术实验室

一、分子生物学检验技术实验须知	1
二、分子生物学检验技术实验室介绍	3
三、分子生物学检验技术常用仪器	5
四、分子生物学实验室生物安全	7

第二部分 核酸的分离与纯化

实验一 真核基因组 DNA 的分离与纯化	9
实验二 真核细胞 mRNA 的分离与纯化	17
实验三 质粒 DNA 的提取	26
实验四 核酸的鉴定	33

第三部分 核酸扩增技术

实验五 聚合酶链反应	41
实验六 PCR-RFLP 检测 N-ras 癌基因突变	45
实验七 等位基因特异性扩增法检测结核分枝杆菌 <i>rpoB</i> 基因突变	50
实验八 TRAP- 银染法检测端粒酶活性	54
实验九 多重 PCR 检测 α - 地中海贫血基因缺失	60
实验十 PCR-SSCP 检测凝血因子 V 基因突变	64
实验十一 实时 PCR 检测乙型肝炎病毒 (HBV) 核酸	68
实验十二 反转录 - 聚合酶链反应检测 β -actin mRNA	72

第四部分 核酸分子杂交技术

实验十三 探针的制备	77
实验十四 DNA 分子杂交	87
实验十五 RNA 分子杂交	92

目 录

实验十六 荧光原位杂交·····	97
实验十七 用反向点杂法进行 β -地中海贫血基因诊断 ·····	104

第五部分 分子克隆技术

实验十八 质粒 DNA 的限制性内切酶酶切 ·····	109
实验十九 目的片段的连接·····	113
实验二十 感受态细胞的制备及重组子转化·····	118
实验二十一 重组子的鉴定·····	124

第六部分 其他分子检验技术

实验二十二 真核细胞基因转染技术·····	131
实验二十三 Western 印迹 ·····	142
实验二十四 双向聚丙烯酰胺凝胶电泳·····	149
实验二十五 HLA 基因分型 ·····	154
实验二十六 乙型肝炎病毒基因分型(芯片法) ·····	159

第七部分 自主设计性实验

附录 分子生物学检验技术实验中常用试剂和缓冲液的配制·····	164
---------------------------------	-----

第一部分 分子生物学检验技术实验室

分子生物学检验技术是以 DNA、RNA 或蛋白质为诊断材料,通过分析基因的存在、变异或表达,从而为疾病的诊断提供更加直接、更为科学的信息。随着分子生物学日新月异的发展,分子生物学实验技术已成为生命科学各学科重要的研究工具。随着科学技术的飞速发展,大量新技术、新方法不断引入,使分子生物学检验技术手段不断拓宽,水平不断提高,更加适应临床需求。

分子生物学检验技术实验室在生物医学科研机构中占有举足轻重的地位,目前基础医学的研究大都与分子生物学相关指标的检测有关。分子生物学实验有其自己的特点:实验复杂而细腻,技术性很强,是理论与实践相结合的典型课程。

开展分子生物学实验的目的是:巩固学生所学的基础理论知识,使其对分子生物学实验有一个基本的认识,培养学生的观察能力、综合分析能力以及独立工作的能力。

分子生物学技术已经渗透到生物学的各个分支学科及医药农林的各个分支领域,并正在迅速改变着它们的面貌。对分子生物学实验技术的掌握已经成为这些学科在新的高度和水平揭示生命奥秘的共同需求。希望通过此课程的教学,在全面介绍分子生物学的基本技术的同时,注重对反映当前分子生物学技术发展方向的新技术、新方法进行介绍,激发学生的学习热情,使学生全面掌握分子生物学实验基本原理和技术,为培养基础扎实、适应性强的分子生物学人才奠定基础。

通过本课程的教学使学生了解和掌握现代分子生物学研究的基本原理、方法、技术与技能,包括分子克隆、表达质粒的构建、从表达菌株中分离纯化目的蛋白,以及对目的蛋白进行各种生化鉴定等。通过学生的独立实验设计和实践,训练学生分析问题、解决问题的能力以及实际动手能力,同时培养学生的创新思维以及对生命科学探索的兴趣和爱好。

一、分子生物学检验技术实验须知

分子生物学技术是由传统的生物化学、生物物理学、细胞生物学、遗传学、微生物学及免疫学等专业技术的渗透、综合而形成,同时包含了数学、化学、物理学、计算机科学和信息技术的广泛渗入,并在此基础上发明和创造了一系列特有的技术手段,如 DNA 及 RNA 的印迹转移、核酸分子杂交、DNA 重组、基因体外扩增、DNA 测序等。由于分子生物学涉及的知识领域广泛,许多学科的新进展都很快与它联系起来,故它在一般人眼里具有一种神秘性,对初入分子生物学之门的人来说都有一些畏惧心理。实际上分子生物学的基础理论本身还是比较简单的,同时实验操作也有一些共同的特点。下面就分子生物学检验技术实验中应注意的问题作一介绍。

(一) 严格操作规程

分子生物学实验一般比较复杂,所用试剂、器材多,操作步骤多,易污染,经历时间长,短则一天,多则数日,因此在实验中一定要有整体实验的观念,严格按操作规程进行。实验中不能急于求成,特别是对于入门者,更应反复操作,积累经验。如 DNA 的提取,看似简

单,但不同的人提取的量及纯度相差会非常大,再如体外 DNA 重组,要得到目的基因的阳性克隆并非易事,如果还要高活性表达,那更是难上加难。但我们只要保持一颗平常心,严格按照实验规程不断摸索,总会得到比较满意的结果。

(二) 习惯微量操作

在分子生物学实验中,试剂的用量往往很少,液体常常可用到 $1\mu\text{l}$,即 $1\times 10^{-3}\text{ml}$,而普通的一滴水就有 $20\sim 100\mu\text{l}$,固体物质可用到 μg 甚至 ng 级,这是平常肉眼看不见的,所以刚刚接触分子生物学的人往往感到不习惯,总是担心要取的东西能否得到,准不准确,操作的样品是不是会丢失,总是想加大反应体积,认为多总比少好,实际这些想法或做法都是错误的。分子生物学实验中有一整套仪器、设备及实验方法,确保实验成功,如微量移液器可吸取的最小量可达 $0.1\mu\text{l}$,而反应的容器是体积较小的 Eppendorf 管,并不是平常所见的试管或烧杯。另外许多样品量很少,肉眼看不见,而肉眼看不见通常意味着样品的纯度好,不带杂质,超量使用酶等试剂反而会干扰正确的结果,因此实验人员必须在心理上逐渐适应微量概念。

(三) 防止实验污染

分子生物学实验的对象主要是核酸,因此对不同的核酸 DNA 和 RNA 之间,或不同的样品之间,核酸酶等蛋白质与核酸之间,产物与反应物之间都会造成实验污染,最终导致实验的失败。为了减少实验污染,实验所用的器材、试剂等需要消毒灭菌处理;需要专门的实验室用于分子生物学实验,而且往往分区操作;实验工作人员需戴口罩和手套,甚至身穿隔离衣,这并不是由于该实验室有可怕的病原体,而是为了防止人的汗液、唾液或泪液中所含的高活性 RNA 酶混入实验器皿或试剂;实验后台面应及时进行消毒处理,发生污染时应立即消毒;对有些试剂的处理也应特别小心,RNA 酶、蛋白酶(protease)粉剂一般在室外开瓶,而不应在室内,不要用精密天平称量 RNA 酶、protease、SDS 等试剂, $0.1\mu\text{g/ml}$ 以上浓度的 RNA 酶溶液不能直接放入下水道,称量优级纯的试剂时不能将过量的试剂重新放回瓶内,不能将吸头直接插入市售药瓶中吸取试剂,而应先分装,如果处理不当也会导致实验污染。

(四) 正确处理试剂

分子生物学中需要的试剂种类多,而且对试剂的要求十分严格,有些实验不成功往往就是由于试剂处理不当造成的,如:①所用试剂等级不够,当用分析纯的误用化学纯;②试剂配制不当,有的化学试剂是结晶体,含有水分子,在称量时没有扣除它的份额,配制成的试剂浓度偏低;③除菌条件不对,有的需用过滤器过滤,而另一些应高温高压灭菌;④试剂污染,在称量时,取用试剂时都有可能造成污染;⑤试剂储存时间过长,如测序用的丙烯酰胺胶用液,在 4°C 条件下只能存放一个月;⑥试剂保存不当,有的应保存在 -20°C ,另一些只能在室温下保存。

(五) 注意实验安全

分子生物学实验中,实验人员经常接触一些对人体有害的实验试剂,如溴化乙锭、丙烯酰胺、放射性同位素等,它们可能诱发突变甚至癌症,或者对人神经系统产生累积毒害。在体外进行 DNA 重组时,可能造成生物公害,给人、畜带来危害,或破坏生态平衡。因此必须严格按照实验安全要求进行实验操作,否则会给实验者或整个人类带来巨大的危害。

(六) 质量控制

质量控制(quality control, QC)ISO8402:1994 文件将质量控制定义为:“为达到质量要求所采取的作业技术和活动。”ISO9000:2000 文件将质量控制修改为:“质量管理的一部分,

致力于满足质量要求。”质量控制是指直接和分析测定有关的因素,例如仪器使用、测定方法等。质量保证则集中监测质量的指标和结果。质量控制包括以下活动。

1. 通过室内质控评价检测系统是否稳定。
2. 对新的分析方法进行比对实验。
3. 室间质量评价,通过使用未知样本将本实验室的结果与同组其他实验室结果和参考实验结果进行比对。
4. 仪器维护、校准和功能检查。
5. 技术文件、标准的应用。

二、分子生物学检验技术实验室介绍

世界卫生组织(WHO)根据设备和技术条件,将生物实验室分为4级(一般称为P1、P2、P3、P4实验室),1级最低,4级最高。P2实验室即二级生物安全实验室(physical containment level 2 laboratory),P2实验室主要用于初级卫生服务、诊断和研究,其实验对象的危害等级为Ⅱ级(中等个体危害,有限群体危害),具体定义为“能引起人类或动物发病,但一般情况下对健康工作者、群体、家畜或环境不会引起严重危害的病原体”。分子生物学检验技术实验室主要有基因扩增实验室、细胞培养室、重组DNA实验室等。

(一) P2实验室

P2实验室的安全主要通过实验室内部合理的专业设计、合理的功能分区、配备必要的生物安全设备及严格规范的个人防护措施,还有完善的安全管理制度以及标准的实验操作程序来保障的。标准的实验室设施和必要的防护设备是基础,正确规范的个人防护是保证,严格的管理措施是关键。只有三者均达到相应的要求,才能保证实验室的安全。P2实验室一般规范如下。

1. 隔离的设备

- (1) 需设置生物安全操作装置,且要做定期检查。
 - (2) 实验室门应带锁并可自动关闭。实验室的门应有可视窗。
 - (3) 应有足够的存储空间摆放物品以方便使用。在实验室工作区域外还应当有供长期使用的存储空间。
 - (4) 在实验室内应使用专门的工作服;应戴乳胶手套。
 - (5) 在实验室的工作区域外应有存放个人衣物的条件。
 - (6) 在实验室所在的建筑内应配备高压蒸气灭菌器,并按期检查和验证,以保证符合要求。
 - (7) 应在实验室内配备生物安全柜。
 - (8) 应设洗眼设施,必要时应有应急喷淋装置。
 - (9) 应通风,如使用窗户自然通风,应有防虫纱窗。
 - (10) 有可靠的电力供应和应急照明。必要时,重要设备如培养箱、生物安全柜、冰箱等应设备用电源。
 - (11) 实验室出口应有在黑暗中可明确辨认的标识。
- #### 2. 实验室安全实施要项
- (1) 进行实验时,需关闭实验室的门窗。

第一部分 分子生物学检验技术实验室

(2) 每天实验结束之后一定要灭菌实验台及安全操作装置。如实验中发生污染,需立即加以灭菌。

(3) 与实验有关之生物材料之废弃物,在丢弃前需做灭菌处理。被污染的器具需先经高压灭菌后,再清洗使用或丢弃。

(4) 不得用口做吸量操作。

(5) 实验室内禁止饮食、吸烟及保存食物。

(6) 操作重组体时需戴手套以防污染,操作完毕后及离开实验室前需洗手。

(7) 在所有的操作中,应尽量避免产生气雾(例如,把烧热的接种用白金环及接种针插入培养基时,若发生大量气雾,就可能造成污染)。亦应避免将吸管或针筒内之液体用力射出。

(8) 要从实验室搬离被污染物品时,必须将其放入坚固且不外漏的容器,并在实验室内密封之后,才可运出。

(9) 防除实验室的非实验用生物,如昆虫及鼠类等。

(10) 若有其他方法可用,应避免使用针头。

(11) 实验室内,要穿着实验衣,离开前要脱掉。

(12) 禁止对实验性质不了解的人进入实验室。

(13) 实验进行中,要在实验室之入口,标示“P2 级实验室”,并挂上“P2 级实验进行中”的标示。而且保存重组体之冰箱及冷冻库也要做同样的标示。

(14) 实验室要经常清理,保持清洁,不得放置与实验无关的物品。

(15) 安全操作装置内的 HEPA 过滤器,在更换前、定期检查时及实验内容变更时,需密封安全操作装置。

(16) 若在此级实验室内同时进行 P1 级的实验时,需明确划分实验区域,小心进行操作。

(二) 基因扩增实验室

基因扩增实验室是以体外扩增检测 DNA 或 RNA 为目的的实验室。由于体外基因扩增的高灵敏度,因此对其实验室有较严格的要求。

基因扩增实验室应严格分区操作,各个区域需要有专用的仪器设备。一般要求基因扩增实验在四个分隔开的工作区域内进行,即分成四个区:试剂贮存和准备区、样本制备区、扩增反应混合物配制和扩增区、扩增产物分析区。试剂贮存和准备区主要进行贮存试剂的制备、试剂的分装和主反应混合液的制备。此区域需配备的仪器设备有普通冰箱、混匀器、微量移液器及消耗品等。样本制备区主要进行样本的处理与保存、核酸(DNA、RNA)提取、贮存及加入到扩增反应管和测定 mRNA 时 cDNA 的合成等。需要配备的仪器设备包括普通冰箱、低温冰箱、高速台式离心机、混匀器、水浴箱、微量移液器、超净工作台等。扩增反应混合物配制和扩增区主要进行 DNA 或 cDNA 的扩增。由于扩增后的核酸量特别大,是最易导致污染(即所谓“产物污染”)的地方。配备的仪器设备包括核酸扩增仪、微量移液器等。最后一个区域是扩增产物分析区,主要进行扩增产物的分析、鉴定,如琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、膜上或微孔板上探针杂交、印迹转移、核酸测序等。

(三) 细胞培养室

细胞培养室是进行体外培养工作的实验室,它有别于一般的实验室。细胞培养室最好是按标准培养室的设计方案建立专用的实验室,设计原则是防止微生物污染和有害物的影响,环境要求清洁、空气清新、无尘和干燥。理想的培养室可分为以下几个部分:准备室、

缓冲室、培养室(一间或几间)。其布局可因地制宜安排,但一般要求培养室和缓冲间与实验室相邻,准备室和办公室可不必相邻。

三、分子生物学检验技术常用仪器

(一) 微量移液器

微量移液器(pipette)是分子生物学中最常用的计量仪器。其工作原理是通过内部密封的不锈钢活塞和弹簧,用手指按压和放松按钮来吸取和排出液体。

在使用移液器的过程中,还应注意以下几方面:①必须根据设计容量选用适当型号的移液器,调整数轮的读数不得超过其标称的容量范围,否则会损坏移液器。②吸不同类别的溶液应更换吸头,防止试样之间交叉污染,不同个体的体液标本也应更换吸头,否则会严重影响检验结果。③新吸头在使用前可吸排溶液几次,浸渍吸头以消除测量误差。④移液器吸液后严禁倒置、平放,以免溶液流入内腔,损坏活塞。⑤移液器不用时应存放在专用的支架上,不得任意放置。⑥长时间不用或刚取出的新移液器应轻轻用手推动按钮上下按压几次,再进行正常使用。⑦注意正确读数,目前的移液器是电子显示,一般难以出错,但对于手动调节的应特别注意。吸取液体时只能轻按第一挡,排出液体时需要按到第二挡;吸取液体时不可快速吸取。

(二) 水纯化装置

分子生物学实验对用水质量要求极高,器皿需经酸泡和自来水洗净后用双蒸水漂洗数次,配制各种溶液更是要求用三蒸水或超纯水。水纯化装置主要包括:单蒸器、石英玻璃双蒸馏器、离子交换器及超纯水装置等。

(三) 离心机

离心机是分子生物学实验中最常用的一类仪器,主要用于收集和分离细胞、细胞器和生物大分子等。实验用离心机可按其转速分为低速离心机(普通离心机)、高速离心机和超速离心机三种类型。

在分子生物学实验中应用得最多的是台式高速离心机,一般分为常温 and 冷冻两种,最大转速一般在 12 000~20 000r/min,这类仪器特别适合于生物大分子在 Eppendorf 管内的微量操作后处理,最少可供 0.05ml 样品的离心。

(四) 电泳装置

电泳装置由电泳仪和电泳槽两部分组成。它主要用于检测、鉴定各种生物大分子的纯度、含量及描述它们的特征,此外它还是分离、纯化、回收和浓缩样品的主要工具。

1. 电泳仪 它是作为电泳时的外加电源设备,将 220V 交流电整流后通过稳压器,它既能输出稳定的电流,又能输出稳定的电压,起到在被分离样品两端加外接电场的作用。常见的电泳仪有常压电泳仪(输出电压为 0~500V 和电流 0~150mA)、中压电泳仪(输出电压 400~1000V)、高压电泳仪(输出电压高于 1kV),另外还有一些特殊的电泳仪如毛细管电泳仪、脉冲电场凝胶电泳仪、转移电泳仪等。

2. 电泳槽 电泳槽是电泳的主要部件,是样品分离的场所。槽内装有电极、缓冲液槽、电泳支持架等,有的还有散热装置如循环水等。电泳槽种类很多,有平卧式、垂直板式、圆柱式、立板式、悬挂式等。在分子生物学中常用的电泳槽有琼脂糖水平电泳槽、垂直夹心电泳槽、DNA 序列分析电泳槽、转移电泳槽、等电聚焦电泳槽等。

(五) 灭菌设备

细菌、细胞培养以及核酸等有关实验所用培养基、试剂、器皿、实验用具等,应严格灭菌。有关核酸的实验要求没有核酸酶的污染,还应将试剂、器械进行高压消毒。对于经过导入 DNA 重组分子的菌株,操作后必须经严格的高压消毒灭菌处理。在分子生物中常用的消毒设备包括高压蒸气灭菌器、滤膜过滤器等。

(六) 超净工作台

超净工作台(super clean bench),又称为 laminar flow cabinet,译作层流室,一般简称为净化台或 hood。超净工作台是目前普遍应用的无菌操作装置。其工作原理是:利用鼓风机驱动空气通过高效空气微柱滤层(high efficiency particulate air filter, HEPA)净化后,徐徐通过工作台面,在操作场地形成无菌环境。超净工作台按气流方向的不同可分为外流式和侧流式两种类型。

(七) 紫外观察仪及照相器材

主要是用于对琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶电泳后结果的观察及记录。

1. 紫外分析仪 电泳后的 DNA 肉眼是观察不到的,它必须与溴化乙锭(EB)结合,在紫外灯的照射下产生荧光来进行观察。用于核酸分析的紫外分析仪常采用 254nm、300nm、365nm 等几个波长,在此波长范围内, DNA 与 EB 结合物对紫外光吸收较强,从而诱导产生 590nm 波长的橙红色荧光。产生荧光的强度与 DNA 量相关。紫外分析仪有多种类型,有透射式紫外分析仪、反射式紫外分析仪。

2. 核酸凝胶电泳图谱的记录 通过紫外分析仪只能对核酸凝胶电泳图谱进行观察,如果需将结果记录下来,那么需拍摄成像,大部分实验室采用凝胶成像分析系统,由于它具有强大的图像采集、分析软件能力,可以对 DNA、RNA、蛋白质电泳凝胶以及各类杂交,放射自显影结果进行拍摄、处理、分析和保存。由于可以在计算机上进行分析处理,其应用越来越广泛。

(八) PCR 仪

PCR 仪是体外扩增基因最常用的设备,主要由机械自动装置、温度循环系统及附属设备等构成。根据温度循环系统的原理不同有梯度水浴法、循环水变温法、空气驱动循环恒温装置、变温金属块恒温装置等。附属设备包括软件、记录仪、自动控制一体化以及进行原位杂交或原位扩增的原位载盘等。

PCR 仪根据用途不同有不同的类型,常见的有用于基因扩增的普通 PCR 仪和荧光定量 PCR 仪,荧光定量 PCR 仪不仅可对核酸进行扩增,而且可通过 Taq Man 荧光探针, SYBR Green 荧光染料等方法对扩增后的样品进行定量测定,它一次可同时检测的样品量可达数百个,是一种高通量型仪器,能有效地进行单核苷酸多态性(SNP)的检测。

(九) 温度控制设备

1. 冷冻设备 普通冰箱、4℃冷柜、-20℃冰箱、-70℃冰箱、液氮罐。
2. 培养箱 隔水式电热恒温培养箱及 CO₂ 培养箱。
3. 水浴箱 有不同的类型的水浴箱,常用的有电热恒温水浴箱及水浴摇床。
4. 烤箱 温控范围 25~300℃,主要用于烘干和干热消毒玻璃器皿。

(十) 其他设备

1. 紫外可见分光光度计 常用紫外 260nm、280nm 检测核酸的含量及纯度。

2. 微波炉 用于溶液的快速加热和定温加热, 特别适合于琼脂糖凝胶电泳时琼脂糖凝胶的溶化处理。
3. 凝胶干燥器 用于电泳后凝胶的脱水干燥, 以便保存。
4. 真空干燥仪 一般用于 DNA、蛋白质样品中有机溶剂的干燥; 电泳凝胶的干燥; Southern、Northern 转移及斑点杂交的核酸样品点样制膜的固定; 负压除菌等。

四、分子生物学实验室生物安全

实验室生物安全 (laboratory biosafety) 一词用来描述那些用以防止发生病原体或毒素无意中暴露及意外释放的防护原则、技术以及实践。有效的生物安全规范是实验室生物安全保障活动的根本。每个实验室都必须根据本实验室的需要、工作的类型以及实际情况等来制定和实施特定的实验室生物安全保障规划。

(一) 实验室生物安全保障

实验室生物安全保障 (laboratory biosecurity) 就是在实验研究过程中, 为避免危险生物因子造成实验室人员暴露, 向实验室外扩散并导致危害而采取的综合措施, 达到对人、生态环境和社会的安全防护。为达到预期的目的, 必须对实验室的危害因子进行评估、分类, 并制订相应的物理防护对策。

(二) 实验室安全设备

实验室设备包括: 生物安全柜及相关的安全设备。

1. 生物安全柜 生物安全柜 (biological safety cabinets, BSCs) 是用于保护操作者、实验室环境、实验材料免受暴露于感染性气溶胶以及当操作含有传染性实验材料 (如初期的培养物、原料、诊断标本) 时可能产生的飞溅污物所带来之危害的装置, 是生物安全装备核心仪器。已经表明, 正确使用生物安全柜可以有效减少由于气溶胶暴露所造成的实验室感染以及培养物交叉污染。生物安全柜同时也能保护环境。

2. 其他安全设备及其安全控制

(1) 负压柔性薄膜隔离装置: 负压柔性薄膜隔离装置是一种对生物学危害性材料提供最佳防护的基本防护装置。

(2) 匀浆器、摇床、搅拌器和超声处理器: 应只使用专为实验室设计的、结构上可以最大限度地减少或避免气溶胶释放的仪器设备。现在已有不同大小的消化器 (stomacher) 可供使用, 但也有生成气溶胶的危险性。当用匀浆器处理危险度 3 级的微生物时, 通常应该在生物安全柜中进行装样及重新开启。超声处理器可能释放气溶胶, 应该在生物安全柜中进行操作, 或者在使用期间用护罩盖住。在使用后应该清除护罩和超声处理器的外部污染。

(3) 一次性接种环: 一次性接种环的优点是无须灭菌, 因此可以在生物安全柜中使用。否则, 使用本生灯和微型加热器会扰乱气流。一次性接种环使用后应置于消毒剂中, 并按污染性废弃物处理。

(4) 微型加热器: 气体和电加热的微型加热器配有硼硅酸玻璃或陶瓷保护罩, 从而减少接种环灭菌时感染性物质的飞溅和散布。但微型加热器会扰乱气流, 因此应置于生物安全柜中靠近工作表面后缘的地方。

(5) 实验服、隔离衣、连体衣及围裙等。

(6) 护目镜、安全眼镜、面罩及手套等。

(三) 重组 DNA 实验室的生物安全

在体外进行 DNA 重组实验时,有可能造成生物公害(biohazard),因此对实验室的要求较高。DNA 重组实验导致生物公害的原因包括:①在 DNA 重组实验时,可能意外地造出一些对人、畜有害的细菌或病毒,而这些微生物又获得了异常旺盛的繁殖力,可能伴有高度的传染性、侵袭性、毒性和抗药性。它们闯进自然界,可能会引起意想不到的疾病流行;②感染带有致癌基因的病毒时,可能使人、畜患癌症;③有些重组体可能不直接给人、畜带来危害,但是可能给其他生物(如植物、微生物、昆虫)带来影响,使地球生态平衡受到破坏。基于以上原因制订 DNA 重组实验安全规则,采取一定的安全监督和防护措施,控制可能产生的生物公害,这是对每一个基因工程研究者的神圣职责。

1. 生物防护(biological containment) 进行 DNA 重组实验时,要选择生物安全性高的载体和受体细胞。使用的载体应当只进入实验者想把它引入选定的受体细胞,很难进入其他受体细胞。这种载体对特定受体细胞的依存性应当是很高的。实验用的受体细胞应当具有在特定的有选择性的条件下生存、繁殖,而在一般自然条件下很难生存和繁殖的生物特性,如营养缺陷性菌株、低温条件下生长菌株等。特别是新获得的 DNA 重组体,在自然条件下对生物环境应当是安全无害的。

从事 DNA 重组实验前应了解载体、受体细胞涉及安全方面的生物特性,包括:自然条件下的生态特性,生理特点,基因交换的范围和结构,致病性,寄生性,腐生性和人类接触的历史,是否容易消除污染,载体对受体的依存性,载体、受体细胞的来源等。

2. 物理防护 物理防护(physical containment)的基本目的是在基因操作中把重组体限制在实验室内和特殊的安全设备的空间内,从而防止实验人员本身被感染,也防止了重组体被扩散到外界。物理防护由三部分组成:操作规程、安全防护操作箱、实验室设计。

(王晓春)

第二部分 核酸的分离与纯化

实验一

真核基因组 DNA 的分离与纯化

一个生物体的全部基因序列称为基因组(genome)。真核生物中的 DNA 在细胞中的包装是一种独特的、紧凑和高度凝聚的结构,经过多级螺旋盘绕压缩,与蛋白质结合形成染色体。整个基因组分布在细胞核内的多条染色体中,外面以核膜包裹。因此,从组织细胞中提取 DNA 时首先要保证细胞呈分散状态,通过破碎细胞膜和核膜,使染色体释放出来,然后去除与 DNA 结合的蛋白质。

基因组 DNA 因来源不同、性质不同以及用途不同,其分离纯化的方法不尽相同。哺乳动物细胞基因组 DNA 的分离与纯化的方法主要有酚抽提法、甲酰胺解聚法、玻棒缠绕法以及各种快速方案。本实验以哺乳动物细胞为例,介绍制备高分子量 DNA 样品的酚抽提法。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、新鲜的组织以及血液标本等。

一、原 理

本实验所用的酚抽提法源自对 1976 年 Stafford 及其同事提出的方案的改进。它以含 EDTA、SDS 及无 DNA 酶的 RNA 酶的裂解缓冲液裂解细胞,经蛋白酶 K 处理后,用 pH 8.0 的 Tris 饱和酚进行抽提,离心分层后,蛋白质因变性位于有机相与水相的界面,而 DNA 进入水相,重复抽提 DNA 至一定纯度后,根据不同需要行透析或沉淀处理,获得所需大小范围的高分子量 DNA 样品。

其中 EDTA 为二价金属离子螯合剂,可以抑制 DNA 酶的活性,同时降低细胞膜的稳定性。SDS 为生物阴离子去垢剂,主要引起细胞膜的降解并能乳化脂质和蛋白质,SDS 与这些脂质和蛋白质的结合可以使它们沉淀,SDS 的非极性端与膜磷脂结合,极性端使蛋白质变性、降解,所以 SDS 同时还有降解 DNA 酶的作用。无 DNA 酶的 RNA 酶可以有效水解 RNA,而避免 DNA 的消化。蛋白酶 K 则有水解蛋白质的作用,可以消化 DNA 酶、DNA 上的蛋白质,也有裂解细胞的作用。酚可以使蛋白质变性沉淀,也抑制 DNA 酶的活性。pH 8.0 的 Tris 缓冲液能保证抽提后 DNA 进入水相,而避免滞留于蛋白质层。多次抽提,可提高 DNA 的纯度。一般在第三次抽提后,移出含 DNA 的水相,作透析或沉淀处理。透析处理能减少对 DNA 的剪切效应,因此可以得到 200kb 的高分子量 DNA。沉淀处理常以乙酸铵为沉淀用盐,用无水乙醇沉淀,并用 70% 的乙醇洗涤,最后得到的 DNA 大小在 100~150kb。