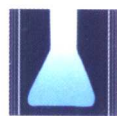
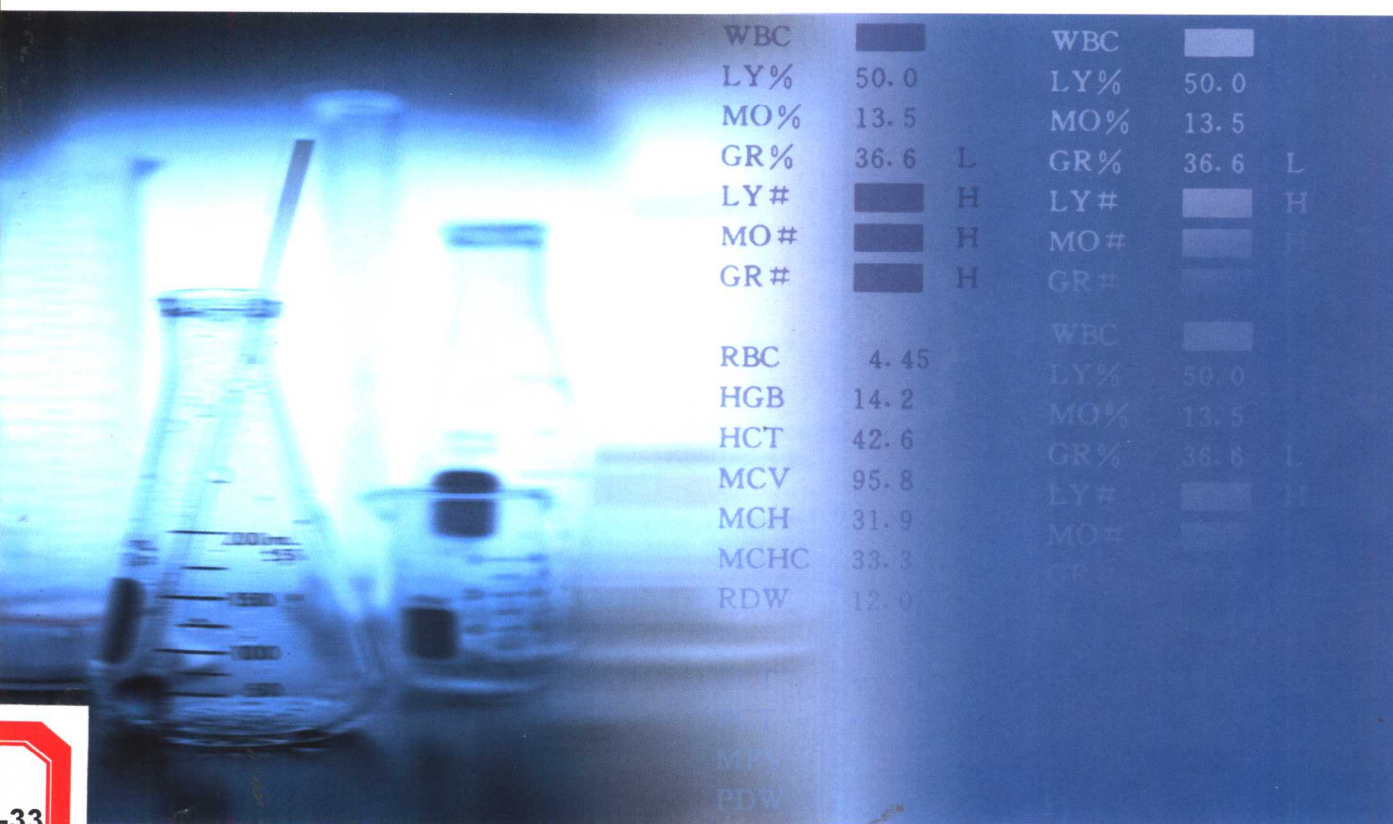


全国高等医药教材建设研究会规划教材·全国高等医药院校配套教材



供医学检验专业用

分子生物学检验技术 实验指导



-33

主编 徐克前



人民卫生出版社

全国高等医药院校配套教材

供医学检验专业用

分子生物学检验技术 实验指导

主编 徐克前

编者（以姓氏笔画为序）

刘北忠（重庆医科大学）

徐克前（中南大学湘雅医学院）

吕建新（温州医学院）

倪培华（上海第二医科大学）

张吉林（北华大学医学院）

黄迪南（广东医学院）

郑芳（武汉大学医学院）

傅桂莲（北华大学医学院）

罗建新（中南大学湘雅医学院）

樊绮诗（上海第二医科大学）

钱晖（江苏大学医学院）

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学检验技术实验指导/徐克前主编.

—北京:人民卫生出版社,2003.6

ISBN 7-117-05549-9

I. 分… II. 徐… III. 分子生物学-生物检验-实验

IV. Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 042104 号

分子生物学检验技术实验指导

主 编:徐克前

出版发行:人民卫生出版社(中继线 67616688)

地 址:(100078)北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: pmph@pmph.com

印 刷:北京铭成印刷有限公司

经 销:新华书店

开 本:787×1092 1/16 印张:12.25

字 数:285 千字

版 次:2003 年 8 月第 1 版 2003 年 8 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号:ISBN 7-117-05549-9/R·5550

定 价:17.00 元

著作权所有,请勿擅自用本书制作各类出版物,违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前言

《分子生物学检验技术实验指导》是作为傅桂莲教授主编的《分子生物学检验技术》的配套实验教材,由卫生部教材办公室组织编写。

本教材分二十五个实验。实验内容大体上包括二大部分,前十五个实验主要是一些基本的分子生物学技术,后十个实验主要是分子生物学技术在检验医学中的应用。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。附录包括分子生物学检验技术实验须知、常用仪器、实验室介绍、常用技术、常用试剂和缓冲液的配制、核酸及蛋白质数据。有的实验内还有若干个小实验供选择,可根据条件、要求的不同进行取舍和组合,建议实验教学时数为 60~80 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本知识和技能的训练,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、基因突变的检测等;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,适合于对学生创新能力的培养。

在编写过程中,得到了中南大学湘雅医学院、上海第二医科大学、北华大学医学院及医学检验系的大力支持,在此表示衷心地感谢。由于这是一本新编教材,分子生物学技术发展又非常迅速,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。

徐克前

2003 年 6 月

目 录

实验一	基因组 DNA 的分离与纯化	(1)
实验二	真核细胞 mRNA 的分离与纯化	(7)
实验三	质粒 DNA 的提取	(14)
实验四	质粒 DNA 的限制性内切酶酶切	(21)
实验五	核酸的浓度和纯度测定	(24)
实验六	DNA 的重组技术	(32)
实验七	感受态细胞的制备及转化	(44)
实验八	真核细胞基因转染技术	(48)
实验九	DNA 序列分析实验	(56)
实验十	探针的制备	(71)
实验十一	放射性标记探针的 DNA 分子杂交	(86)
实验十二	地高辛标记探针的 RNA 分子杂交	(91)
实验十三	核酸原位杂交	(97)
实验十四	Western 印迹分析法	(104)
实验十五	双向聚丙烯酰胺凝胶电泳	(111)
实验十六	PCR 基因扩增	(115)
实验十七	反向点杂交法进行 β -地中海贫血基因诊断	(119)
实验十八	N-ras 癌基因突变的 PCR-RFLP 检测	(124)
实验十九	ApoE 基因多态性的检测	(129)
实验二十	改良 TRAP 法检测端粒酶的活性	(134)
实验二十一	多重 PCR 检测 DMD 基因外显子缺失	(139)
实验二十二	乙型肝炎病毒(HBV)核酸的荧光定量 PCR 检测	(142)
实验二十三	逆转录聚合酶链反应-酶联夹心杂交法检测细胞因子 mRNA	(146)
实验二十四	V 因子的 SSCP 测定	(150)
实验二十五	STR-PCR 基因分型个体识别	(154)
附录一	分子生物学检验技术实验须知	(161)
附录二	分子生物学检验技术常用仪器介绍	(163)
附录三	分子生物学检验技术实验室介绍	(172)
附录四	分子生物学检验技术实验中常用技术	(176)
附录五	分子生物学检验技术实验中常用试剂和缓冲液的配制	(178)
附录六	核酸及蛋白质数据	(188)

实验一 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)。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 pH8.0 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。pH8.0 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,做透析或沉淀处理。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 100kb~150kb。

二、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)、大口径移液管(出口直径大于 0.3cm)、50ml 的聚丙烯离心管(组织标本选用)、专用橡皮细胞刮(单层培养细胞选用)、匀浆机、匀浆器或研磨器(组织标本选用)、透析袋(制备 150~200kb 大小的 DNA 时选用)、U 形玻棒、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、便携式真空吸液装置、化学通风橱、电泳装置、低温冰箱、高压蒸汽灭菌装置、重蒸馏装置、紫外分光光度计、凝胶成像分析系统或透射式的紫外灯装置、微波炉或电炉等加热溶胶装置、微量移液器、Eppendorf 管、微量加样吸头、离心管、刻度吸管及三角烧瓶等。

三、试剂

1. Tris 盐缓冲液(即 TBS 溶液) 称取 8g NaCl、0.2g KCl 及 3g Tris 碱溶于 800ml

蒸馏水中。加入 0.015g 的酚红,以 HCl 调节 pH 至 7.4,然后加蒸馏水至 1 000ml。分装后,1.05kg/cm² 高压蒸汽灭菌 20min。

2. 1mol/L Tris-Cl(pH8.0)贮存液 在 800ml 蒸馏水中溶解 121.1g Tris 碱,加入浓 HCl 调 pH 值至 8.0(约加入浓 HCl42ml,应在溶液冷却至室温后方可最后调定 pH 值),加水定容至 1L,分装后高压灭菌。

3. 0.5mol/L EDTA(pH8.0)贮存液 在 800ml 蒸馏水中加入 186.1g 二水乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂·2 H₂O),在磁力搅拌器上剧烈搅拌,用 NaOH 调 pH 值至 8.0(约需 20g NaOH 颗粒)后定容至 1L,分装后高压灭菌备用。

4. 20%(w/v)的 SDS 贮存液 在 900ml 水中溶解 200g 电泳级 SDS,加热至 68℃助溶,加入几滴浓盐酸调节溶液的 pH 至 7.2,加水定容至 1L,分装备用。

5. 裂解缓冲液 含 10mmol/L 的 Tris-Cl(pH8.0)、0.1mol/L 的 EDTA (pH8.0)、0.5%(w/v)的 SDS 以及 20μg/ml 的无 DNA 酶的胰 RNA 酶。其中无 DNA 酶的胰 RNA 酶需临用时加入,其它溶液需预先分别配制成较高浓度的贮备液并于室温保存。

6. 蛋白酶 K(20mg/ml) 以消毒的 50mmol/L 的 Tris(pH8.0)溶液配制,小量分装, -20℃保存。

7. Tris 饱和酚(pH8.0) 以 0.5mol/L 的 Tris-Cl(pH8.0)与 0.1mol/L 的 Tris-Cl (pH8.0)进行充分的平衡。

8. 10mol/L 的乙酸铵溶液 称取 77g 乙酸铵,室温条件下溶于 70ml 蒸馏水中,补足蒸馏水至 100ml,用 0.22μm 的滤器过滤消毒,4℃或室温密封保存。注意乙酸铵不可用热水溶解与高压消毒。

9. 透析缓冲液(制备 150kb~200kb 大小的 DNA 时选用) 含 50mmol/L 的 Tris-Cl (pH8.0)和 10mmol/L 的 EDTA (pH8.0)。

10. 无水乙醇与 70%的乙醇。

11. TE(pH8.0)缓冲液 含 10mmol/L 的 Tris-Cl(pH8.0)和 1mmol/L 的 EDTA (pH8.0)。

12. 液氮(组织标本选用)。

13. 酸性柠檬酸葡萄糖溶液 B(即 ACD 溶液,新鲜或冻藏血液标本选用)含 0.48% (w/v)的柠檬酸、1.32%(w/v)的柠檬酸钠和 1.47%(w/v)的葡萄糖。

14. 磷酸盐缓冲液(即 PBS,冻藏血液标本选用) 称取 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂HPO₄和 0.24g KH₂PO₄溶于 800ml 蒸馏水中,以 HCl 调节 pH 至 7.4,然后加水至 1 000ml。分装后,1.05kg/cm² 高压蒸汽灭菌 20min。

15. 溴化乙锭 用无菌水配成 10mg/ml 的贮存液,室温保存于不透光的玻璃瓶中。DNA 染色时的终浓度一般为 0.5μg/ml。

16. 0.6%的琼脂糖(w/v)。

17. 高分子量的 DNA marker。

18. 5×TBE 电泳缓冲贮备液 称取 54g Tris 碱和 27.5g 硼酸,溶于 20ml 0.5mol/L 的 EDTA 溶液(pH8.0)。应用液为 0.5×TBE,将贮备液用消毒双蒸水稀释 10 倍即可。

四、操作步骤

1. 细胞的收集与裂解 在此分别介绍了四种不同来源与类型标本的收集与处理方

法,可任选其一进行细胞的收集与裂解。

(1)单层培养细胞的收集与裂解:取出细胞培养皿,立即吸去细胞培养液。用冰预冷的 TBS 约 10ml 洗涤单层培养的贴壁细胞两次,吸去洗涤液。将细胞培养皿置于冰浴中,加入 1ml 冰预冷的 TBS。以专用的橡皮细胞刮刮下贴壁细胞,用巴斯德吸管将细胞悬浮液转入置于冰上的冷离心管中。紧接着加入 0.5ml 的 TBS 洗涤细胞培养皿一次,将洗涤液并入上述离心管中。通过 4°C , $1\,500\text{g}$ 低温离心 10min 收集细胞。以 5~10 倍体积的 TBS 重悬细胞,再离心一次。离心收集的细胞重悬于 TE (pH8.0) 缓冲液中,调节细胞浓度为 $5\times 10^7/\text{ml}$ 。将细胞悬液转入三角烧瓶,按每毫升细胞悬液加入 10ml 裂解缓冲液, 37°C 温育 1h 得到细胞裂解液后立即转入步骤 2。

(2)悬浮生长细胞的收集与裂解:将悬浮生长的细胞悬液转入离心管,通过 4°C , $1\,500\text{g}$ 低温离心 10min,吸去上清液,收集沉淀的细胞。加入与细胞悬液等体积的冰预冷的 TBS 重悬洗涤细胞。经上述离心后,吸去上清液,收集细胞沉淀。再加冰预冷的 TBS 重悬洗涤细胞一次。同样通过上述方法回收细胞沉淀。将细胞沉淀重悬于 TE (pH8.0) 缓冲液中,调节细胞浓度为 $5\times 10^7/\text{ml}$ 。将细胞悬液转入三角烧瓶,按每毫升细胞悬液加入 10ml 裂解缓冲液, 37°C 温育 1h 得到细胞裂解液后立即转入步骤 2。

(3)组织标本的收集与裂解:将清洁的新鲜组织剪成碎块,置于盛有液氮的研钵(研钵需先用液氮预冷)中,以液氮预冷的研杵将组织碎块研磨成粉末状。待液氮蒸发,将组织粉末一点一点地加入盛有约 10 倍体积的裂解缓冲液的烧杯中。使组织粉末分散于裂解缓冲液液面,然后振摇烧杯使组织粉末完全浸没于裂解缓冲液中。将该溶液转入 50ml 聚丙烯离心管中, 37°C 温育 1h 得到细胞裂解液后立即转入步骤 2。

(4)血液标本的收集与裂解:在消毒无菌条件下,收集血液标本,新鲜或冻藏的血液标本均可用于高分子量 DNA 的制备。

对新鲜血液标本,以 3.5ml 的 ACD 或 EDTA 溶液用于 20ml 新鲜血的抗凝。将抗凝血转入离心管, 4°C , $1\,300\text{g}$ 低温离心 15min。吸去上层血浆,用巴斯德吸管将含有白细胞的淡黄层悬浮液小心转入一新的离心管。重复离心一次,弃掉污染的血浆与红细胞。吸出淡黄层悬浮液,重悬于 15ml 裂解缓冲液中, 37°C 温育 1h 得到细胞裂解液后立即转入步骤 2。

对冻藏血液标本,最好采用 ACD 溶液抗凝。以 3.5ml 的 ACD 与 20ml 新鲜血混合抗凝后冻存备用。冻存标本在室温条件下于水浴中解冻,解冻标本转入离心管中,加入等体积的 PBS 溶液, $3\,500\text{g}$ 室温离心 15min,吸去含裂解红细胞的上清液。重悬细胞沉淀于 15ml 裂解缓冲液中, 37°C 温育 1h 得到细胞裂解液后立即转入步骤 2。

2. 蛋白酶 K 的消化 将上述细胞裂解液移入离心管中,液面高度应不超过离心管高度的 $1/3$ 。加入 $20\text{mg}/\text{ml}$ 的蛋白酶 K 至终浓度为 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 。用一玻棒温和地将酶液与粘滞的细胞裂解液混匀。将该溶液置 50°C 水浴 3h,水浴期间不时旋动该粘滞溶液。

3. 酚的抽提 待上述溶液冷却至室温后,加入等体积的 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 的 Tris-Cl (pH8.0) 平衡的酚。温和地来回颠倒离心管 10min,使两相混匀。若两相未能形成乳浊液,则将离心管置旋转器上旋转 1h。然后, $5\,000\text{g}$ 室温离心 15min,使两相分层。以大口径移液管将粘滞的上层水相移入一洁净的离心管中。用酚重复抽提两次,合并水相。

4. DNA 的透析或沉淀

(1)DNA 的透析:用于制备分子量为 150kb~200kb 的 DNA。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,透析 4 次,每次使用透析液 1L,间隔 6h 以上透析一次。

(2)DNA 的沉淀:用于制备分子量为 100kb~150kb 的 DNA。在酚的三次抽提后,将全部水相移入一洁净离心管中。于室温下,加入 0.2 倍体积的 10mol/L 的乙酸铵、2 倍体积的无水乙醇,转动离心管直至溶液充分混匀。DNA 立即形成沉淀,用 U 形玻棒将 DNA 沉淀移出,而污染的寡核苷酸仍存留于乙醇溶液中。如果沉淀的 DNA 为碎片,则 U 形玻棒不适用,此时应于室温下 5 000g 离心 5min 收集 DNA 沉淀。以 70% 的乙醇洗涤 DNA 沉淀两次,5 000g 离心 5min 收集 DNA 样品。尽量吸去 70% 的乙醇溶液。在室温下,打开离心管盖,待可见的残留乙醇挥发完(不可使 DNA 完全干燥,否则 DNA 极难溶解)。按每 0.1ml 的起始细胞(5×10^7 /ml)加入 1ml 的 TE (pH8.0)缓冲液,置离心管于摇床上,4℃ 轻轻旋动溶液 12h~24h,直至 DNA 完全溶解。然后 4℃ 分装保存。

5. DNA 质量鉴定 DNA 的质量鉴定包括浓度分析、纯度鉴定以及大小完整性的分析。有关具体操作与实验方案,请参见实验五。浓度分析与纯度鉴定,最简便快速的方法是紫外分光光度法。通过 A_{260} 可以定量,通过 A_{260}/A_{280} 的比值可以分析其纯度。1 个 OD_{260} 相当于 50 μ g 的双链 DNA, A_{260}/A_{280} 的比值为 1.8 是高纯度 DNA 的标志。但需要注意的是,由于高分子量的 DNA 样品非常粘稠,匀质性不好,因此在常规鉴定时所取的 DNA 样品并不能很好地反映整个 DNA 制品的质量。另外,可通过脉冲场凝胶电泳或常规的 0.6% 的琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 样品的大小与完整性。

五、结果讨论

1. 利用本法,从 5×10^7 培养的非整倍体哺乳动物细胞(如 HeLa 细胞)大约可以制备分子量在 100kb~150kb 的 DNA 200 μ g,自 20ml 血液标本可得 250 μ g 的高分子量 DNA,组织标本则因含有大量的纤维结缔成分,其产量一般都不高,且因不同的组织类型而有较大的差异。

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。但比值为 1.8 的 DNA 溶液也不能完全断定为纯的 DNA 溶液,可能兼有蛋白质、酚与 RNA 的污染。其中蛋白质与酚的污染均使比值下降,而 RNA 的污染则使比值升高。一般情况下, A_{260}/A_{280} 的比值在 1.75~1.80 之间是可以接受的。但 A_{260}/A_{280} 的比值若低于 1.75,则表明有显著量的蛋白质污染。此时需要加入终浓度为 0.5% 的 SDS,并重复步骤 2~4。

3. 通过脉冲场凝胶电泳或常规的 0.6% 的琼脂糖凝胶电泳分析,DNA 样品的大小一般应在 100kb~150kb。0.6% 的琼脂糖凝胶电泳较 0.3% 的琼脂糖凝胶电泳易于操作,更常使用。目前,脉冲场凝胶电泳对线性 DNA 分子的有效分离上限已达 5 000kb 以上,完全可以胜任本法制备的 DNA 大小的分析,但需要特殊的装置。常规的琼脂糖凝胶电泳是一替代的方法,还可以很容易的判定样品中是否有 RNA 的污染,但其分离能力有限。

4. 运用该法可以从单层或悬浮培养细胞、新鲜组织及血液标本中制备少于 10 μ g 至大到数百 μ g 的 DNA 样品。由于分离纯化的每一步都有剪切力的影响,最后得到的 DNA 样品中分子量超过 100kb~150kb 的很少。但这种大小的 DNA 足以作为 PCR 反

应的模板和进行 Southern blotting 分析以及构建以 λ 噬菌体为载体的基因组 DNA 文库。

5. 要制备分子量大于 200kb 的 DNA, 可选用甲酰胺解聚法, 该法制备的 DNA 样品可以高容量的粘粒为载体, 构建基因组 DNA 文库。另外, 为避免 DNA 分子在分离提取的操作中受到剪切力的影响, 可以将细胞悬浮在融化的低熔点琼脂糖中进行细胞的原位裂解与蛋白水解, 然后通过漂洗去除细胞碎片, 就可以获得完整的 DNA 分子。DNA 分子经切点很稀少的限制性内切酶进行原位的限制酶消化, 所得分子量巨大的 DNA 片段可以用于构建以酵母人工染色体 (yeast artificial chromosome, YAC) 为载体的基因组文库。

6. 就最常用的一些 PCR 来讲, 并不需要制备分子量很大的 DNA 样品。20kb~50kb 大小的 DNA 足以作为 PCR 的模板或用于克隆、限制性内切酶反应和进行单泳道的 Southern 杂交分析。因此可以选用步骤简化、无需特别小心谨慎操作的 DNA 的快速提取法或直接从 96 孔细胞培养板上进行 DNA 的快速提取。

六、注意事项

1. 对高分子量 DNA 的制备, 由于剪切力的危害甚大, 因此每一步都要特别小心温和地操作, 避免激烈的吸取、振荡与混匀。

2. 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, 操作时须穿戴手套、防护镜及防护衣。与酚接触过的皮肤, 应使用大量的水清洗, 并用肥皂与水洗涤, 忌用乙醇。另一方面, 用于 DNA 制备的酚应重蒸馏后, 用 0.5mol/L 的 Tris-Cl (pH8.0) 平衡一次, 并用 0.1mol/L 的 Tris-Cl (pH8.0) 进行多次充分的平衡, 直至有机酚相的 pH 值在 7.8~8.0 之间。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, 在其上面覆盖一层 0.01mol/L 的 Tris-Cl (pH 8.0) 缓冲液, 于 4℃ 可保存一个月。

3. 对单层培养或悬浮生长的细胞, 在加入细胞裂解缓冲液时, 应确保细胞呈分散状态, 避免细胞成块、成团而难于处理。

4. 进行组织标本的高分子量 DNA 提取时, 最好是新鲜的标本。由于组织标本含有大量的纤维结缔组织, 要得到产量较高的高分子量 DNA 比较困难, 需要首先清除血液及筋膜等纤维结缔组织, 并将组织搅切或研磨成粉末状。

5. 对血液标本应避免使用肝素抗凝, 因为肝素是 PCR 反应的抑制剂。

6. 使用液氮时要特别小心地防护, 避免吸入液氮汽, 避免直接的冻伤。

7. 对冻藏的标本, 应避免反复多次的冻融, 因为每次冻融都大大降低高分子量 DNA 的产率。

8. 钙离子有助于蛋白酶 K 的构象稳定, 缺钙情况下, 蛋白酶 K 的水解活性有部分丧失。但钙离子的结合位点与蛋白酶 K 的催化位点有一定距离, 并不直接影响蛋白酶 K 的活性。在有 EDTA 存在的条件下, 残存的蛋白酶 K 活性足以消化大部分的蛋白质。

9. 以 ACD 或 EDTA 溶液抗凝的血液标本, 可在 0℃ 下保存数天或 -70℃ 下长期保存备用。但对于高分子量 DNA 的制备, ACD 溶液保存血液的效果优于 EDTA, 应作为首选。

10. DNA 的裂解缓冲液曾使用 0.5mol/L 的 EDTA,但由于其与抽提用的酚的密度很接近,使得抽提后的两相分层困难。目前使用 0.1mol/L 的 EDTA,不但能通过整合重金属、抑制核酸酶活性而有效避免 DNA 的降解,而且有利于有机酚与水相的分层。

11. 本法使用的 DNA 的裂解缓冲液中含有较高浓度的无 DNA 酶的胰 RNA 酶 (20 μ g/ml),一是因为裂解液中还含有 0.5% 的 SDS,使 RNA 酶不处于最高活性状态;二是可以省去传统方法在 DNA 抽提后再加 RNA 酶消化的步骤,从而缩短 DNA 的制备时间,减轻各种有害因素对 DNA 完整性的破坏。

12. 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。此时可通过缓慢抽吸掉下层的有机酚相,直至处于界面的蛋白质层处于管底。经 5 000g 室温离心 20min,蛋白质可较强地沉积、吸附于管底,此时将含 DNA 的上层水相轻缓倒入另一洁净的离心管中即可。

13. 进行分子量 DNA 样品的透析处理时,透析袋要预留足够的空间,以防样品体积增大后胀破透析袋。由于高分子量的 DNA 溶液非常粘滞,因此透析时间要足够,一般 ≥ 24 h。

14. 进行分子量 DNA 样品的沉淀处理时,最后一步要去掉乙醇。但要注意不可使 DNA 完全干燥,只要可见的乙醇挥发完即可,否则 DNA 极难溶解。

15. 对本法制备的 DNA 样品的凝胶电泳分析,通常使用 λ 噬菌体 DNA 及其线性多联体作为分子量大小的标准参照物。 λ 噬菌体 DNA 单体的完整大小为 48.5kb,通过 T_4 噬菌体 DNA 连接酶催化的连接反应,可得到 λ 噬菌体 DNA 的 2~20 个线性连接的多联体,其分子量为 λ 噬菌体 DNA 单体的整倍数。

16. 溴化乙锭是一种强烈诱变剂和毒性物质,操作时必须戴好手套,避免直接接触和吸入含有溴化乙锭的灰尘。另外,一般是将溴化乙锭掺入融化的琼脂糖凝胶中进行 DNA 的着色。

17. 紫外线有危害,对眼睛尤甚,要注意屏蔽,并配戴护目镜或安全面罩。

(刘北忠)

参 考 文 献

1. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd edition. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
2. 卢圣栋, 主编. 现代分子生物学实验技术. 第二版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999
3. Ausubel FM, et al. Short protocols in Molecular Biology, 3rd edition. USA: John Wiley & Sons, Inc., 1995
4. 李永明, 主编. 实用分子生物学方法手册. 北京: 科学出版社, 1998
5. Jeffery S, et al. Molecular diagnosis. UK: BIOS Scientific Publisher Limited, 1999
6. 傅桂莲, 主编. 实用分子生物学技术. 吉林: 吉林科学技术出版社, 1999

实验二 真核细胞 mRNA 的分离与纯化

除血红蛋白及某些组蛋白外,绝大多数真核生物的 mRNA 在其 3' 末端都带有一个长短不一的多聚腺苷酸(polyadenylic acid)的结构,即 poly(A)尾巴。以总 RNA 制品为起始材料,利用核酸分子的碱基配对原理,通过 oligo(dT)-纤维素或 poly(U)-琼脂糖凝胶的亲和层析,我们可以很容易地同时分离到不同种类与大小的 mRNA 的分子群体。mRNA 分离纯化的常用方法有 oligo(dT)-纤维素柱层析法、oligo(dT)-纤维素液相结合离心法、oligo(dT)-纤维素柱离心法、顺磁性球珠分离法以及 poly(U)-琼脂糖凝胶层析等。本实验介绍哺乳动物细胞 mRNA 的 oligo(dT)-纤维素柱层析法,该法是真核细胞 mRNA 制备的标准方法。

尽管目前已有商品化的快速提取试剂盒,不经总 RNA 提取的中间过程,可一次直接完成 mRNA 的提取,但目前 mRNA 的常规提取仍然是以总 RNA 为起始材料。因此, mRNA 的分离纯化包括两个主要步骤,即总 RNA 的制备与 mRNA 的纯化。关于总 RNA 的制备方法主要有经典的硫氰酸胍-酚氯仿一步法、可同时制备 RNA、DNA 与蛋白质的以异硫氰酸胍-酚的单相裂解试剂裂解细胞的一步法以及其它多种方法。本实验介绍哺乳动物细胞总 RNA 的硫氰酸胍-酚氯仿一步法。

无论总 RNA 的制备还是 mRNA 的制备,由于 RNA 酶的广泛存在与不易失活的特点,决定了生物降解是 RNA 提取过程中的主要危害因素。因此,在 RNA 的制备过程中,尽量排除 RNA 酶的污染,创造一个无 RNA 酶的环境是最为关键的。

一、原理

硫氰酸胍-酚氯仿一步法制备总 RNA。该法以含 4mol/L 的硫氰酸胍与 0.1mol/L 的 β -巯基乙醇的变性溶液裂解细胞,然后在 pH4.0 的酸性条件下,用酚/氯仿抽提裂解溶液,最后通过异丙醇沉淀与 75% 的乙醇洗涤来制备总 RNA。

其中在 β -巯基乙醇的协同作用下,高浓度的 4mol/L 的硫氰酸胍可以极大极快地抑制 RNase 的活性,从而避免 RNA 的降解,保证 RNA 制品的产量与完整性。pH 4.0 的酸性环境,既有利于 DNA 的变性又有利于 RNA 的分离。因为 RNA 尽管对剪切力不敏感,但 RNA 具有碱易变性,需要严格控制 pH 值。酚与氯仿的联合使用,主要在于两者合用时去除蛋白的效果更好。而且氯仿还能有效抑制 RNase 的活性,并通过使酚脱水来防止 mRNA 的丢失,同时能加速有机相与水相的分层,去除植物色素、蔗糖以及核酸样品中的痕量酚。

oligo(dT)-纤维素柱层析法从总 RNA 中分离纯化 mRNA。它是以 oligo(dT)-纤维素填充层析柱,加入待分离的总 RNA 样品,其中 poly(A)⁺ RNA 在高盐条件下,通过碱基互补,与 oligo(dT)-纤维素形成稳定的 RNA-DNA 杂交体,洗去未结合的其它 RNA,然后在低盐缓冲液中洗脱并回收 poly(A)⁺ RNA。

二、器材

组织或培养的细胞、低温冷冻高速离心机、恒温水浴箱、研磨器、匀浆器或匀浆机、混

匀器或旋转器、磁力搅拌子与可调温的磁力搅拌器、300℃以上的烤箱、化学通风橱、一次性层析柱或底部用玻璃棉添塞的巴斯德吸管、凝胶成像分析系统或透射式的紫外灯装置、紫外分光光度计、便携式真空吸液装置、低温冰箱、电泳装置、重蒸馏装置、高压蒸汽灭菌装置、刻度吸管、离心管、微量移液器、加样吸头。

三、试剂

1. 0.1%的 DEPC 水 用双蒸馏水配制并经高压蒸汽消毒。

2. 氯仿/异戊醇(49:1,v/v) 分析纯,无污染的新包装。

3. 无水乙醇 分析纯,无污染的新包装。

4. 异丙醇 分析纯,无污染的新包装。

5. 液氮

6. 水饱和酚(pH 6.0)

7. 磷酸盐缓冲液(即 PBS,单层培养或悬浮生长细胞选用) 称取 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na_2HPO_4 和 0.24g KH_2PO_4 溶于 800ml 蒸馏水中,以 HCl 调节 pH 至 7.4,然后加水至 1000ml。分装后,1.05kg/cm² 高压蒸汽灭菌 20min。

8. 2mol/L 的乙酸钠溶液(pH4.0) 在 800ml 水中溶解 272.1g 三水乙酸钠,用冰乙酸调节 pH 至 4.0,加水定容到 1L,分装后高压灭菌。

9. 3mol/L 的乙酸钠溶液(pH5.2) 在 800ml 水中溶解 408.1g 三水乙酸钠,用冰乙酸调节 pH 至 5.2,加水定容到 1L,分装后高压灭菌。

10. 变性裂解液 含 4mol/L 的硫氰酸胍、25mmol/L 的柠檬酸钠、0.5%的十二烷基肌氨酸钠和 0.1mol/L 的 β -巯基乙醇。配制方法如下:称 250g 硫氰酸胍溶于 293ml 的 DEPC 水中,加入 17.6ml 的 0.75mol/L 的柠檬酸钠(pH 7.0)和 26.4ml 的 10%(w/v)的十二烷基肌氨酸钠。于混合液中加入磁力搅拌子,置磁力搅拌器上,65℃加热搅拌,直至所有成分溶解。该液可室温保存数月,但要注意避光。临用前,每 50ml 该液加入 0.36ml 的 14.4mol/L 的 β -巯基乙醇混匀。

11. 去离子的甲酰胺(RNA 保存时选用)

12. 1mol/L Tris-Cl(pH 8.0)贮存液:在 800ml DEPC 处理水中溶解 121.1g Tris 碱,加入浓 HCl 调 pH 值至 8.0(约加入浓 HCl 42ml,应在溶液冷却至室温后方可最后调定 pH 值),加水定容至 1L,分装后高压灭菌。

13. 5mol/L NaCl 贮存液 在 800ml DEPC 处理水中溶解 292.2g NaCl,加水定容至 1L,分装后高压灭菌备用。

14. 0.5mol/L EDTA(pH8.0)贮存液 在 800ml DEPC 处理水中加入 186.1g 二水乙二胺四乙酸二钠($\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$),在磁力搅拌器上剧烈搅拌,用 NaOH 调 pH 值至 8.0(约需 20g NaOH 颗粒)后定容至 1L,分装后高压灭菌备用。

15. 2×层析柱上样缓冲液 含 40mmol/L 的 Tris-Cl(pH7.6)、1mmol/L 的 NaCl、2mmol/L 的 EDTA(pH8.0)及 0.2%(w/v)的十二烷基肌氨酸钠。配制方法如下:在 DEPC 水处理并经高压蒸汽灭菌的玻璃瓶中,加入 DEPC 水配制的 Tris-Cl(pH7.6)、NaCl 与 EDTA(pH8.0)贮存液。混匀,37℃放置 12h 以上,然后高压蒸汽灭菌 15min。待混合液冷至 65℃时,加入已在 65℃预热了 30min 的 10%十二烷基肌氨酸钠贮存液至所需浓度即可。其中 Tris-Cl 液可用 0.05mol/L 的柠檬酸钠代替。室温保存 2×层析柱

上样缓冲液。

16. 1×层析柱上样缓冲液 用等体积的 DEPC 水稀释 2×层析柱上样缓冲液即可。

17. 20%(w/v)的 SDS 贮存液 在 900ml 水中溶解 200g 电泳级 SDS,加热至 68℃ 助溶,加入几滴浓盐酸调节溶液的 pH 至 7.2,加水定容至 1L,分装备用。

18. 洗脱缓冲液 含 10mmol/L 的 Tris-Cl(pH7.6)、1mmol/L 的 EDTA(pH8.0)及 0.05%的 SDS。Tris-Cl(pH7.6)与 EDTA(pH8.0)贮存液应在临用前高压蒸汽灭菌 15min,然后用 DEPC 水稀释到所需浓度,并加入 SDS 贮存液(10%或 20%)至所需浓度。配好的洗脱缓冲液在高压消毒时会大量起泡,故不能高压处理。

19. 5mol/L 的 NaCl 溶液 用 DEPC 水配。

20. 10mol/L 的 NaOH 贮存液 0.1mol/L 的工作液用 DEPC 水稀释而成。

21. oligo(dT)-纤维素

22. pH 试纸

23. 溴化乙锭 用无菌水配成 10mg/ml 的贮存液,室温保存于不透光的玻璃瓶中。RNA 染色时的终浓度一般为 0.5μg/ml。

24. 1.2%琼脂糖凝胶

25. 5×TBE 电泳缓冲液 称取 54g Tris 碱和 27.5g 硼酸,溶于 20ml 0.5mol/L 的 EDTA 溶液(pH8.0)。应用液为 0.5×TBE,将贮备液用消毒双蒸水稀释 10 倍即可。

四、操作步骤

1. 总 RNA 的制备

(1)细胞的收集与变性裂解:在此分别介绍了三种不同来源与类型标本的收集与处理方法,可任选其一进行细胞的收集与裂解。

①组织细胞的收集与变性裂解:取组织碎片约 100mg,立即置于盛有液氮的研钵中,用液氮预冷的研杵将其研磨成粉末状。将组织粉移入聚丙烯匀浆管中,待液氮蒸发,立即加入 3ml 变性裂解液,匀浆 15s~30s,即得组织细胞的裂解液。然后转入步骤 2。

②浮生长细胞的收集与变性裂解:细胞悬浮液经 500g~2 000g 室温离心 5min~10min,吸去培养基,收集沉淀的细胞。沉淀细胞用 1ml~2ml 冰预冷的 PBS 重悬、洗涤一次,离心后吸去 PBS 溶液。每 10⁶ 细胞加入变性裂解液 2ml,匀浆 15s~30s,即得悬浮生长细胞的裂解液。然后转入步骤 2。

③单层培养细胞的收集与变性裂解:吸去细胞培养基,用 5ml~10ml 冰预冷的 PBS 漂洗一次。吸去 PBS 后,每个 90mm 的细胞培养皿加入 2ml 的变性裂解液(60mm 加 1ml),匀浆 15s~30s,即得单层培养细胞的裂解液。然后转入步骤 2。

(2)酚/氯仿的抽提:将裂解液转入一洁净的聚丙烯离心管中,按每 ml 裂解液依次加入 2mol/L 的乙酸钠(pH4.0)0.1ml、水饱和酚(pH6.0)1ml、氯仿-异戊醇(49:1)0.2ml。加盖后,充分颠倒混匀。接着于旋转器上剧烈旋混 10s,然后置冰上 15min,使核蛋白完全解离。通过 10 000g,4℃ 高速离心 20min 使分层。

(3)总 RNA 的首次沉淀:将含 RNA 的上层水相移入一洁净离心管,然后加入等体积的异丙醇,充分混匀后,置-20℃使 RNA 沉淀 1h 以上。10 000g,4℃ 高速离心 30min,将上清异丙醇轻轻倒入另一洁净离心管,收集沉淀的 RNA。

(4)首次沉淀 RNA 的再次 RNA 酶变性处理:按最初组织细胞变性裂解时,变性裂解

液用量的 30%，加入变性裂解液溶解沉淀的 RNA，以进一步灭活残留的 RNA 酶。

(5)总 RNA 的第二次沉淀：将上述溶液转入离心管，合盖后充分混匀，然后加入等体积的异丙醇，于 -20°C 使 RNA 沉淀 1h 以上。 4°C ，最高速离心 10min 后，收集沉淀的 RNA。用 75% 的乙醇洗涤 RNA 沉淀两次，吸去乙醇。开盖几分钟，让可见的乙醇挥发完。加入 $50\mu\text{l}\sim 100\mu\text{l}$ 的 DEPC 水溶解 RNA 沉淀， -70°C 分装保存。

(6)总 RNA 的质量鉴定：RNA 的质量鉴定包括浓度分析、纯度鉴定以及大小完整性的分析。有关具体操作与实验方案，请参见实验五。浓度分析与纯度鉴定，最简便快速的方法是紫外分光光度法。通过 A_{260} 可以定量，通过 A_{260}/A_{280} 的比值可以分析其纯度。1 个 OD_{260} 相当于 $38\mu\text{g}$ 的单链 RNA， A_{260}/A_{280} 的比值为 2.0 是高纯度 RNA 的标志。另外，通过常规的琼脂糖凝胶电泳，观察并分析 RNA 的三条特征性区带，可以判定 RNA 的完整性。

从组织提取的总 RNA，DNA 的污染一般不大，但从培养细胞提取 RNA 时，往往因细胞的自发性或诱导性凋亡而引入基因组 DNA 片段的污染。另外，从转染细胞制备 RNA 时，转染的 DNA 片段的污染很难避免。此时，可在 RNA 制备的最后一步，增加一个无 RNA 酶的 DNA 酶消化步骤加以清除。或者通过 oligo(dT)的亲层析以纯化 mRNA。

2. mRNA 的纯化

(1)oligo(dT)-纤维素层析柱与 RNA 样品的准备：用 0.1mol/L 的 NaOH 悬浮 $0.5\text{g}\sim 1.0\text{g}$ 的 oligo(dT)-纤维素。将悬浮液灌入一次性的层析柱或底部添塞有玻璃棉的巴斯德吸管中，使柱床体积达 $0.5\text{ml}\sim 1.0\text{ml}$ 。先用 3 倍体积的 DEPC 水洗柱，接着用 $1\times$ 层析柱上样缓冲液洗柱，直至流出液的 pH 值小于 8.0。将灭菌双蒸水溶解的总 RNA， 65°C 加热 5 分钟后迅速冷却至室温，然后加入等体积的 $2\times$ 层析柱上样缓冲液。

(2)poly(A)⁺RNA 的亲结合与 poly(A)-RNA 的洗出：将准备好的 RNA 样品上样，立即用灭菌试管收集流出液。待样品全部进入柱床后，加 1 倍柱床体积的 $1\times$ 层析柱上样缓冲液，继续收集流出液。当溶液全部流出后，将全部收集液 65°C 加热 5min 后再次上样并收集流出液。用 5~10 倍体积的 $1\times$ 层析柱上样缓冲液洗柱，分部收集流出液，每管 1ml。以 $1\times$ 层析柱上样缓冲液为空白对照并对各管做 1:20 的稀释，测定各管的 OD_{260} 值。先出柱的 OD_{260} 值高，含大量 poly(A)-RNA，可用 2.5 体积的无水乙醇沉淀出来以作它用；后出柱的 OD_{260} 值很低，甚至无吸收，表明已无 RNA 洗出。

(3)poly(A)⁺RNA 的洗脱：用 2~3 倍柱体积的洗脱缓冲液洗出与 oligo(dT)-纤维素结合的 poly(A)⁺RNA，以 $1/3\sim 1/2$ 的柱体积分部收集洗脱液。测定各管的 OD_{260} 值，合并含有 poly(A)⁺RNA 的洗脱组分。

(4)poly(A)⁺RNA 的进一步纯化(可选)：通常经一轮 oligo(dT)-纤维素的亲和层析后，所得 poly(A)⁺RNA 与 poly(A)-RNA 的量近乎相等。为进一步纯化 poly(A)⁺RNA，可按如下操作进行：将粗制的 poly(A)⁺RNA 经 65°C 加热 5min 后迅速冷却至室温，以 5mol/L 的 NaCl 溶液调整该 RNA 洗脱液的 NaCl 浓度为 0.5mol/L ，用同一个 oligo(dT)-纤维素层析柱进行第二轮层析，再次收集洗脱的 poly(A)⁺RNA；在 poly(A)⁺RNA 溶液中加入 3mol/L 的乙酸钠溶液(pH5.2)使终浓度为 0.3mol/L ，混匀后加入 2.5 倍体积冰预冷的乙醇混匀，冰浴沉淀 30min 以上； $10\,000\text{g}$ ， 4°C 离心 15min，回收 poly

(A)⁺RNA 沉淀,用 70% 的乙醇洗涤一次,再离心沉淀,吸去上清,开盖晾干后,用 DEPC 水溶解 poly(A)⁺RNA 沉淀,测定各管的 OD₂₆₀ 值,合并含有 poly(A)⁺RNA 的洗脱组分,混匀各组分,-70℃ 分装保存。

(5)poly(A)⁺RNA 的质量鉴定;poly(A)⁺RNA 的质量鉴定包括浓度分析、纯度鉴定以及大小完整性的分析。具体操作与实验方案,请参见实验五。需要指出的是,用该法制备的 poly(A)⁺RNA 具有良好的完整性,而且有关 poly(A)⁺RNA 的完整性分析较为复杂,一般不做。如果有足量的 mRNA,可通过凝胶电泳分离 mRNA 并用溴化乙锭染色,完整性良好的 mRNA 应呈现为大约介于 500bp 至 8kb 之间的一片拖影,且大部分 mRNA 位于 1.5kb~2kb 之间。常规实验中,用经过质量鉴定的总 RNA 来制备 poly(A)⁺RNA 时,应主要检测其含量。与总 RNA 的定量相同,1 个 OD₂₆₀ 大约相当于 38μg 的 poly(A)⁺RNA。

五、结果讨论

1. 总 RNA 的产量取决于标本的起始量,每毫克组织总 RNA 的产量大约为 4μg~7μg,每 10⁶ 细胞大约为 5μg~10μg。

2. A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值为 2.0 是高纯度 RNA 的标志,但由于受 RNA 二级结构不同的影响,RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值可能会有一些波动,一般在 1.8~2.1 之间都可以接受。

3. 另外,鉴定 RNA 纯度所用溶液的 pH 值会影响 A₂₆₀/A₂₈₀ 的读数。如 RNA 在水溶液中的 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值就比其在 Tris 缓冲液(pH7.5)中的读数低 0.2~0.3。故有资料指出,要精确测定 RNA 的浓度,应使用水溶液并加空白对照来测定 A₂₆₀ 的读数;要精确测定 RNA 的纯度,则需使用 Tris(10mmol/L, pH7.5)溶液及空白对照来测定并计算 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值。

4. 真核生物的 RNA 经琼脂糖凝胶电泳后,应出现特征性的三条区带,包括 28S、18S rRNA 的慢迁移带及由 tRNA 和 5S、5.8S 的 rRNA 构成的相对有些扩散的快迁移条带。若条件控制不好或上样量较少,快迁移带不易观察到。除此之外,应分析三条带的荧光强度,一般 28S rRNA 的荧光强度约为 18S rRNA 的 2 倍,否则提示有 RNA 的降解。如果在加样槽附近有着色条带,则说明有 DNA 的污染。

5. 通过本实验方案,从制备好的总 RNA 中纯化 mRNA,其回收的 poly(A)⁺RNA 量可达总 RNA 上样量的 5%~10%。

6. 本实验第一步采用的硫氰酸胍-酚氯仿一步法能同时迅速地处理多个标本,且制备的总 RNA 的完整性与纯度均很高,可用于体外翻译、点杂交、Northern 杂交、合成 cDNA、构建 cDNA 文库及分离纯化 mRNA 等。适合于从培养细胞和大多数动物组织中分离纯化总的 RNA。但该方法不适合从富含甘油三酯的脂肪组织中提取 RNA,而且有时 RNA 会带有多糖和蛋白多糖的污染,这些污染将影响乙醇沉淀后 RNA 的溶解,同时抑制 RT-PCR 反应,并通过结合到杂交膜上而影响 RNA 杂交中的印迹步骤。

7. 本实验第二步采用的 oligo(dT)-纤维素柱层析法,是从哺乳动物细胞中进行大量的非放射性 RNA 提取的首选方法。制备的 mRNA 可用于点杂交、Northern 杂交、RNA 的 S1 核酸酶或 RNA 酶作图、RNA 酶保护试验、RNA 的引物延伸分析及 cDNA 的合成与文库构建等。但该方法分离速度慢,易阻塞,不适合同时对多个标本的处理,而且很难回收全部的 poly(A)⁺RNA,故不适合对少量 RNA 样品的分离。

六、注意事项

1. 空气中弥漫的烟雾与飞扬的灰尘都可能因携带细菌、霉菌等微生物而带来 RNA 酶的污染,所以应选择一个比较洁净的实验室进行操作。

2. 操作者本人也是 RNA 酶的一个重要的污染源,可以通过戴手套与口罩来避免。因头发带来的 RNA 酶污染往往比手更多,必要时应戴发套。当手套接触了皮肤或不洁的仪器设备后,应及时更换。

3. 提取 RNA 的所有试剂与玻璃器皿均应用 0.1% 的 DEPC 水进行配制与处理,并在处理完后通过高压消毒 15min~30min 或 70℃ 加热 1h 或 60℃ 过夜以除去残留的 DEPC。注意 DEPC 有致癌性,应小心操作。

4. 玻璃器皿常规洗净后,用 0.1% 的 DEPC 水 37℃ 浸泡 2h,再用双蒸灭菌水漂洗几次,然后高压消毒去除 DEPC。由于玻璃器皿经高压消毒后并不能有效灭活 RNA 酶的活性,还应置 250~300℃ 烘烤 4h 或 200℃ 干烤过夜。

5. 最好选用新的一次性塑料制品,使用前高压蒸汽消毒,并于常温下烤干备用。

6. RNA 提取用的酚,应单独配制和使用。与 DNA 提取用的酚不同,应使用 DEPC 处理过的双蒸灭菌水进行饱和,所得水饱和酚为酸性(pH6.0)。

7. RNA 定量用的石英杯,应在使用前后,以 1:1 的盐酸/甲醇溶液浸泡 30min 以上,并用大量的无菌水冲洗干净。

8. RNA 制备与分析用的仪器设备应保持洁净。尤其是电泳槽等,应该严格处理。建议去污剂洗后用水冲洗,然后用酒精擦干,接着灌满 3% 的 H_2O_2 溶液,室温消毒 10min,最后用 0.1% 的 DEPC 水冲洗干净。

9. 使用液氮时要特别小心地防护,避免吸入液氮汽,避免直接的冻伤。

10. 硫氰酸胍可通过呼吸、摄入或皮肤吸收对人体造成伤害,应小心防护。

11. 通过呼吸、摄入或皮肤吸收, β -巯基乙醇可造成粘膜、上呼吸道、皮肤及眼睛的严重伤害,并且 β -巯基乙醇很难闻,除小心防护外还应在化学通风橱中操作。

12. 变性溶液有很强的腐蚀性,特别小心地防护。在准备、操作及使用中应配戴手套、实验服及防护镜。

13. 从富含 RNA 酶的胰腺或肠组织中制备 RNA 时,最好先将组织块剪成约 100mg 大小的碎片,然后立即置于液氮中。迅速冷冻的组织碎片可直接用于 RNA 的提取,也可以置 -70℃ 保存数月而不影响 RNA 的产量与完整性。

14. 用于 RNA 提取的试剂最好小量分装保存,使用后的分装试剂最好弃掉不再使用。

15. 对于 RNA 酶含量不高的组织,可在剪成碎片后直接加入变性裂解液进行变性裂解,无需液氮冷冻和预先研磨成粉末状。

16. 在总 RNA 制备过程中,移取含 RNA 的水相时,为减少界面 DNA 的污染,不要吸取靠近界面的下层水相。

17. RNA 经异丙醇沉淀后,倒出上清异丙醇时,RNA 沉淀容易随上清一起倒掉,故倒出的上清不要立即扔掉。

18. 从富含 RNA 酶的巨噬细胞、胰腺和小肠等组织细胞提取 RNA 时,为防止残留有较高的 RNA 酶活性,可多增加一次变性裂解液对沉淀 RNA 的变性处理。