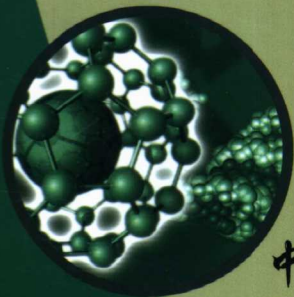


研究生教学用书

**MEDICAL
MOLECULAR BIOLOGY:
A LABORATORY TEXTBOOK**

医学分子生物学实验教程

覃 扬 / 主编



中国协和医科大学出版社

· 研究生教学用书 ·

医学分子生物学实验教程

Medical Molecular Biology: A Laboratory Textbook

主 编 章 扬

副主编 乔中东 江 渝 李 晖

编者 (按姓氏笔划顺序)

方定志 (四川大学)
乔中东 (上海交通大学)
刘立民 (上海交通大学)
江 渝 (第三军医大学)
汪 宁 (昆明医学院)
李 洪 (泸州医学院)
李 晖 (哈尔滨医科大学)
李蓉晖 (四川大学)
钱 伟 (云南大学)
傅 强 (四川大学)
章 扬 (四川大学)
曾昭淳 (重庆医科大学)
彭家和 (第三军医大学)
翟朝阳 (四川大学)
谭德勇 (云南大学)

中国协和医科大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学分子生物学实验教程 / 覃扬主编. —北京: 中国协和医科大学出版社, 2004.1
ISBN 7-81072-473-8

I. 医… II. 覃… III. 医药学: 分子生物学-实验-医学院校-教材
IV. Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 117841 号

医学分子生物学实验教程

主 编: 覃 扬
责任编辑: 左 谦

出版发行: 中国协和医科大学出版社
(北京东单三条九号 邮编 100730 电话 65260378)

网 址: www.pumcp.com
经 销: 新华书店总店北京发行所
印 刷: 北京丽源印刷厂

开 本: 787×1092 毫米 1/16 开
印 张: 16.75
字 数: 400 千字
版 次: 2004 年 3 月第一版 2004 年 3 月第一次印刷
印 数: 1—4000
定 价: 28.00 元

ISBN 7-81072-473-8/R·468

(凡购本书, 如有缺页、倒页、脱页及其他质量问题, 由本社发行部调换)

序

分子生物学是生命科学的带头学科，近30年来发展极为迅速，已渗透到包括医学在内的生命科学各领域，推动了各基础学科及应用学科的蓬勃发展。近20年来各种生物新技术不断涌现。蛋白质工程、酶工程、基因工程、转基因、基因诊断及治疗以及近几年的基因组学、蛋白质组学、生物信息学、生物芯片技术等一大批新兴学科与技术相继出现，不仅为临床医学诊断及防治危害人类健康的重大疾病如肿瘤、心脑血管疾病、神经系统疾病、遗传病及艾滋病等开辟了广阔的应用前景，也对工农业生产产生了深远的影响。

为适应医学发展及培养高素质人才的需要，原华西医科大学生物化学教研室自1982年开始为全校各专业博士和硕士研究生开设了分子生物学有关理论及实验技术课程，受到历届研究生的欢迎。本书是在原内部实验教程的基础上，增加了一些新近发展起来的新技术，由原华西医科大学有多年教学经验的教师及科研人员为主，邀请了第三军医大学、重庆医科大学、上海交通大学、云南大学、哈尔滨医科大学、昆明医学院及泸州医学院的同行共同编写。参与编写的人员均长期从事医学分子生物学的教学和科研工作，具有丰富的教学经验及较高的研究水平。

四川大学华西医学中心覃扬教授主编的这本医学分子生物学实验教程共12章，包括DNA及RNA分离纯化、蛋白质分离纯化及鉴定、分子克隆、cDNA文库的构建、PCR、基因及蛋白质在原核及真核细胞中的表达与鉴定、反转录病毒介导的外源性基因表达、DNA序列测定、生物芯片技术、生物信息学技术以及免疫化学技术等。该书主要介绍医学分子生物学技术的基本原理、操作方法、试剂配制、所需器材及设备以及主要参考文献等。该书内容丰富，简明扼要，可操作性强，不仅可作为高等医药院校相关专业研究生的实验教材，亦可供生命学科相关专业的研究生、青年教师、临床医师及科研人员参考。

刘秉文

2004年1月于成都

前 言

分子生物学是 20 世纪发生发展起来的最重要的新学科。它是集生物学、生物化学、细胞生物学、分子遗传学、蛋白质学等学科于一体的学科。目前分子生物学的理论与实验技术已广泛渗透到生命科学的各个领域,在医学基础理论和临床应用中正显示出日益重要的意义。为此学习和掌握分子生物学基本技术已成为从事和即将从事生命科学工作者的迫切需要与愿望,对研究生进行分子生物学实验技能的训练是非常必要的。

四川大学华西医学中心生化教研室的刘秉文教授、陈俊杰教授于 2000 年主编了《医学分子生物学——研究生教学用书》,由于该书仅为分子生物学的理论部分,为配套这本理论教材,特编写了《医学分子生物学实验教程》,以完善研究生对这门课程学习的教材。

本教材以原华西医科大学生生化教研室自 1982 年以来为全校博士生和硕士生开设的分子生物学实验教材为基础,结合《医学分子生物学——研究生教学用书》的内容,除保留分子生物学基本实验外,增添一些新近发展起来的分子生物学的新技术。全书共十二章,包括核酸的分离纯化技术,蛋白质分离纯化鉴定技术,分子克隆技术,分子杂交技术,DNA 序列测定,PCR 技术、cDNA 文库的构建、外源基因在哺乳动物细胞中的表达及蛋白质表达、反转录病毒介导的外源性基因表达、生物芯片、生物信息技术、免疫化学技术。每个实验均简明阐述原理和详细操作过程,并附有试剂配置,所需器材及主要参考文献。本书可用作高等医药院校研究生实验教材,也可供七年制学生和普通高校相关专业的研究生使用。由于编写时间紧迫,书中难免有欠缺之处,真诚地希望专家和读者批评指正,以促进该书的不断完善。

参加编写的作者来自于八所高等院校的教授和专家,均长期从事分子生物学教学和科研工作,具有丰富的教学经验和较高的科研水平。他们在编写过程中,付出了辛勤的劳动。本书在编写工作中还得到四川大学及有关院校领导的支持。四川大学华西医学中心基础与法医学院生物化学与分子生物学教研室的教师给予了大力支持,在此一并表示衷心感谢。

章 扬

2004 年 1 月

目 录

第一章 核酸的分离纯化	(1)
第一节 从哺乳动物组织中制备基因组 DNA	(2)
实验一 从哺乳动物组织中制备基因组 DNA	(2)
I 常规制备组织或培养细胞基因组 DNA	(2)
II 快速制备组织或培养细胞基因组 DNA	(4)
III 从血白细胞中制备基因组 DNA	(5)
第二节 核酸的定量和质量检测及贮存	(6)
实验二 核酸的定量和质量检测及贮存	(6)
第三节 从哺乳动物组织中制备总 RNA	(7)
实验三 从哺乳动物组织中制备总 RNA	(7)
I 异硫氰酸胍/氯化铯超离心法制备总 RNA	(7)
II 酸性异硫氰酸胍/酚/氯仿抽提分离总 RNA	(9)
第四节 琼脂糖凝胶电泳	(12)
实验四 琼脂糖凝胶电泳	(15)
I 常规琼脂糖凝胶电泳	(15)
II 碱性琼脂糖凝胶电泳	(16)
第五节 酚/氯仿抽提液的制备	(17)
实验五 酚/氯仿抽提液的制备	(17)
I 酚的重蒸馏	(17)
II SS-酚 (saltsaturatedphenol) 的制备	(18)
第二章 分子杂交	(20)
第一节 核酸分子探针的标记概述	(20)
第二节 Southern 印迹杂交	(26)
实验一 Southern 印迹杂交	(26)
I 虹吸印迹法	(27)
II 电转法	(29)
III 真空转移法	(29)
第三节 Northern 印迹杂交	(30)
实验二 Northern 印迹杂交	(30)
I 聚乙二醛和二甲基亚砷变性电泳	(31)

II 甲醛变性胶电泳法	(32)
III 甲基氢氧化汞电泳	(33)
第四节 斑点及狭缝印迹杂交	(34)
实验三 斑点及狭缝印迹杂交	(34)
I 标准方法	(35)
II 胞质 RNA 的快速提取及点样法	(36)
III 完整细胞斑点吸印法	(36)
第五节 核酸原位杂交	(37)
实验四 核酸原位杂交	(37)
I 组织细胞内 mRNA 的原位杂交	(38)
II 与间期细胞内染色质 DNA 的原位杂交	(40)
III 非放射性核素标记在核酸原位杂交中的应用	(40)
第六节 Western 印迹	(42)
实验五 Western 印迹	(42)
第三章 分子克隆	(45)
第一节 质粒 DNA 的小量提取	(45)
实验一 质粒 DNA 的小量提取	(45)
第二节 DNA 的限制性核酸内切酶消化	(48)
实验二 DNA 的限制性核酸内切酶消化	(48)
第三节 目的 DNA 片段的回收	(52)
实验三 目的 DNA 片段的回收	(52)
I 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收 DNA 片段	(53)
II 透析袋电泳洗脱法回收目的 DNA 片段	(54)
第四节 载体质粒 DNA 与目的 DNA 片段的连接	(56)
实验四 载体质粒 DNA 与目的 DNA 片段的连接	(56)
第五节 重组质粒 DNA 转化细菌	(58)
实验五 重组质粒 DNA 转化细菌	(58)
第六节 重组克隆筛选和鉴定	(61)
实验六 重组克隆筛选和鉴定	(61)
I 平板筛选	(64)
II 酶切分析及凝胶电泳检测鉴定	(65)
III PCR 检测	(66)
IV 序列测定	(66)
V 免疫分析	(66)

第七节 削减杂交克隆	(66)
实验七 削减杂交克隆	(66)
第四章 DNA 序列的测定	(70)
第一节 DNA 序列测定方法的概述	(70)
第二节 制备序列测定的 DNA 模板	(74)
实验一 制备序列测定的 DNA 模板	(74)
I 从 M13 噬菌体中制备单链模板	(75)
II 从重组质粒中制备双链 DNA 模板	(77)
第三节 测定 DNA 序列	(78)
实验二 双脱氧法测定 DNA 序列	(78)
第四节 变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳	(83)
实验三 重组质粒序列测定反应产物的电泳	(83)
第五章 聚合酶链反应	(86)
第一节 基本 PCR 技术	(86)
第二节 PCR 引物设计	(92)
第三节 RT-PCR 技术	(93)
实验一 RT-PCR	(93)
第四节 反向 PCR	(95)
实验二 反向 PCR	(95)
第五节 差异显示 PCR	(99)
实验三 差异显示 PCR	(99)
第六章 cDNA 文库的构建	(105)
第七章 蛋白质表达	(111)
第一节 外源性基因在大肠杆菌中的诱导表达	(111)
实验一 含重组表达载体的大肠杆菌菌株的构建	(111)
实验二 诱导靶蛋白表达的优化	(113)
实验三 大量表达靶蛋白	(114)
第二节 外源性基因在真核细胞中的表达	(114)
实验四 含重组表达载体的大肠杆菌菌株的构建	(115)
实验五 转染	(116)
I 电穿孔法	(116)
II 磷酸钙共沉淀法	(117)
III DEAE-葡聚糖转染技术	(118)
IV 脂质体法	(118)

实验六 转染克隆的筛选和分离·····	(121)
第三节 在稳定转染的细胞中检测目的基因的表达·····	(123)
实验七 在稳定转染的细胞中检测目的基因的表达·····	(123)
第八章 反转录病毒载体介导的基因转移·····	(127)
实验一 复制缺陷性重组反转录病毒的构建·····	(128)
实验二 磷酸钙介导的重组反转录病毒载体转染·····	(131)
实验三 获取和滴定病毒·····	(132)
第九章 蛋白质的分离纯化和分析·····	(133)
第一节 比色法测定蛋白质含量·····	(133)
实验一 Folin-酚试剂法 (Lowry 法) 测定蛋白质浓度·····	(134)
实验二 改良 Lowry 法测定蛋白质浓度·····	(136)
实验三 考马斯亮蓝染色法 (Bradford 法) 测定蛋白质浓度·····	(139)
实验四 紫外吸收法测定蛋白质含量·····	(141)
第二节 蛋白质的单向聚丙烯酰胺凝胶电泳·····	(143)
实验五 盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白质·····	(145)
实验六 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测定蛋白质分子量·····	(149)
实验七 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法测定蛋白质分子量·····	(154)
第三节 蛋白质的双向凝胶电泳·····	(157)
实验八 IEF/SDS-PAGE 双向电泳分离血清蛋白质·····	(158)
实验九 AGE/PG-PAGE 双向电泳分离鉴定前 β -高密度脂蛋白·····	(163)
第四节 蛋白质的凝胶过滤层析·····	(166)
实验十 葡聚糖凝胶层析法测定蛋白质分子量·····	(168)
第五节 蛋白质的离子交换层析·····	(173)
实验十一 离子交换层析法纯化细胞色素 c·····	(175)
第六节 蛋白质的亲和层析·····	(178)
实验十二 亲和层析法纯化猪胰蛋白酶·····	(180)
实验十三 亲和层析法纯化尿激酶·····	(184)
第七节 高效液相层析分离纯化蛋白质·····	(187)
第八节 质谱法分析蛋白质、多肽·····	(195)
第十章 免疫生物化学·····	(202)
第一节 血清 IgG 的纯化及鉴定·····	(202)
实验一 血清 IgG 的纯化及鉴定·····	(202)
第二节 免疫电泳技术·····	(205)
实验二 单向定量电泳 (火箭免疫电泳)·····	(206)

实验三 单向免疫扩散测定人血清载脂蛋白 B100	(208)
实验四 酶联免疫分析技术	(209)
实验五 双抗体夹心法检测乙型肝炎表面抗原 (HBsAg)	(210)
第十一章 生物芯片技术	(212)
第一节 概述	(212)
第二节 生物芯片的操作	(213)
基因芯片	(213)
蛋白芯片	(220)
芯片实验室	(221)
第三节 生物芯片技术的应用	(221)
第十二章 生物信息学	(229)
第一节 生物信息数据库和查询	(229)
第二节 局部序列相似性对比	(231)
实验一 局部序列相似性对比	(231)
第三节 蛋白质的结构与功能预测	(240)
实验二 蛋白质的结构与功能预测	(240)
第四节 基因芯片表达数据的聚类分析	(246)
实验三 基因芯片表达数据的聚类分析	(246)
附录 1 常用的标准蛋白质 marker 及其分子量参考值	(256)

第一章 核酸的分离纯化

原 理

在进行分子生物学的研究,开展基因诊断、基因治疗时,首先需要制备纯化高分子量的基因组 DNA 及 RNA。提取核酸的样品来源不同和随后实验要求各异,以及技术的不断发展,因而,提取纯化 DNA、RNA 的方法很多,需要根据具体情况加以选择。从细菌、植物和动物细胞提取 DNA 或 RNA 一般包括两个步骤:首先要温和地裂解细胞,将 DNA 或 RNA 溶解出来(这一步因样品的组织、培养细胞系、血液的不同,而方法有异。)然后采取酶解或化学方法,除去蛋白质或其他大分子化合物后,再沉淀纯化 DNA 或 RNA。从含有核酸的样品溶液中分离沉淀核酸最常用又有效的方法是酚/氯仿抽提、乙醇沉淀法。

酚/氯仿抽提,乙醇沉淀法的基本原理:用酚和氯仿变性沉淀蛋白质,使其漂浮在上层水相与下层有机相的交界面上,而核酸溶解在上层水相中。所使用的酚必须重蒸馏纯化及经水饱和以防止酚中氧化物破坏核酸分子。加入异戊醇可防止酚/氯仿抽提时产生大量的泡沫。此有机抽提液配方是酚/氯仿/异戊醇(容积比为 25/24/1)。首选沉淀 DNA 的有机溶剂是乙醇。在上述处理过的无蛋白质含核酸水相液中加入乙醇后,白色的核酸沉淀很易经离心收集。乙醇沉淀核酸的优点是它与盐类的共沉淀较少,而且 DNA 沉淀中所含的痕量乙醇易蒸发去除,而不影响继后实验的进行。在适当的盐浓度下,2 倍容积的无水乙醇或 95%乙醇可有效沉淀 DNA,对 RNA 的沉淀则需将乙醇量增至 2.5 倍。若样品核酸浓度低且体积大,为了不使离心时容积过大,可用异丙醇代替乙醇沉淀 DNA。只需加入 0.54~1.0 倍体积的异丙醇即可选择性沉淀 DNA 和大分子的 rRNA 和 mRNA(但不沉淀 5S rRNA、tRNA 及多糖),其缺点是易与盐共沉淀,所以异丙醇沉淀后,应立即进行常规的乙醇沉淀。

离子和温度会影响乙醇沉淀核酸的效果。核酸是多聚阴离子的水溶性化合物,它与钠、钾、镁等阳离子形成的盐在多种有机溶剂中不溶解,也不被有机溶剂变性。在核酸沉淀中使用最多的是钾、钠、铵和锂等 1 价阳离子,而 2 价镁离子的沉淀效力最高,每一种离子的选用有各自的优缺点和适用范围。常规沉淀核酸多采用 0.3mol/L、pH5.2 的乙酸钠(终浓度)。低温有助于乙醇沉淀核酸,若溶液中核酸浓度很高($>300\mu\text{g/ml}$)时,不需任何冷却可形成可见的沉淀。若核酸浓度很低($<10\mu\text{g/ml}$)则需在 -20°C (或在干冰上)4h~过夜,离心 30 分钟,才能获得沉淀。或者加入酵母 tRNA 以有效沉淀 nanogram 级的核酸,加入 tRNA 使溶液中核酸浓度达到 $10\mu\text{g/ml}$ 后,再进行抽提和沉淀,但会干扰需用 T_4 多核苷酸激酶标记的实验。核酸浓度大于 $10\mu\text{g/ml}$ 时,冰浴 10~15 分钟即可有效沉淀。

第一节 从哺乳动物组织中制备基因组 DNA

理论上可以从哺乳动物的任何组织中提取基因组 DNA，但是各组织中的 DNA 稳定性是不同的。稳定性由高到低的组织依次为肺、肌肉、皮肤、淋巴结、肾。虽然肝、脾中 DNA 含量较高，但肝、脾中各种核酸酶活性很高，因此 DNA 极易分解，往往不易得到大分子量的 DNA。取材的组织要尽可能的新鲜，如不立即提取 DNA 应迅速置液氮中冷冻或 -70°C 保存，以备后用。

实验一 从哺乳动物组织中制备基因组 DNA

I 常规制备组织或培养细胞基因组 DNA

此法可从任何动物组织和培养细胞（需离心收集）中制备高分子量基因组 DNA。所制备的 DNA 适于构建基因组文库、限制性内切酶消化、DNA 印迹分析及作为 PCR 模板。

操 作

1. 1~5g 新鲜组织，尽量剪碎弃去结缔组织的组织块，或将已弃去结缔组织的冷冻组织块用数层牛皮纸或铝箔包裹后，用槌砸碎，放入充满液氮的钵中，研磨成细粉后，倒入 50ml 的管中，待液氮蒸发完，加入 10ml RSB 缓冲液（液氮会引起严重冻伤，操作时必须戴上手套和防护镜）。

2. 加入 1ml 10% SDS，轻轻倒转混匀，加入 1ml 蛋白酶 K 液， 37°C 保温 2h，另再加入 1ml 蛋白酶 K 液混匀， 37°C 保温数小时或过夜，直到组织溶解。若仍有不溶解组织碎片时， $1000\text{g} \times 5\text{min}$ ，离心去除。

3. 加入 1.3ml 5mol/L NaCl 液，用 14ml SS-酚/氯仿/异戊醇抽提，多次倒转混匀后（大约 10 分钟）， $2500\text{g} \times 10\text{min}$ 离心。若上层水相中有白色絮状物时，说明有蛋白质残留。没有完全抽提在有机相中，此时则需将水相液转移至另一支 50ml 管中，加入等体积的 SS-酚/氯仿/异戊醇液，反复倒转混匀，然后转移到与离心机相匹配的管中 $10000\text{g} \times 10\text{min}$ 离心，分层上层水相液与下层有机相液。

4. 用大口径 $1000\mu\text{l}$ 微量滴头，将上层水相液转移至新的 50ml 管中，重复 SS-酚/氯仿/异戊醇抽提，如步骤 3 分离水相和有机相层。

5. 取出水相液，加入 14ml 氯仿，反复倒转混匀，如步骤 3 离心，分离水相和有机相层。

6. 将上层水相液转移到一新的 50ml 管中，加入 35ml 冷无水乙醇沉淀 DNA，反复倒转混匀，出现白色纤维状高分子量 DNA，用玻棒缠绕捞出到一新管中，用 5ml 70% 乙醇洗涤之。

7. 将洗涤过的 DNA 转移到 50ml 管中，空气干燥 30min，去除乙醇。

8. 将 DNA 溶于 5ml Tris/Salt 缓冲液中，高分子量 DNA 需几小时或过夜才能完全溶解。

在继后操作前必须完全溶解。

9. 加入 20 μ l 无 DNase 的 RNase A 溶液 (10 mg/ml), 37 $^{\circ}$ C 水浴 30min。

10. 用 5ml SS - 酚/氯仿液抽提样品, 反复倒转混匀, 3 000g \times 10min 离心, 用大口径的 1 000 μ l 微量滴头将水相液转移到新 50ml 管中。

11. 加入 12.5ml 冷无水乙醇, 反复倒转混匀, 如第 6 步骤收获 DNA 纤维, 并转移到新的 50ml 管中。如第 6 步骤用 70% 冷乙醇洗涤 DNA 纤维, 空气干燥 30min, 去除残留的乙醇。将 DNA 溶于 1ml TE 液或无菌双蒸水中, 室温放置或 37 $^{\circ}$ C 水浴轻微振摇过夜, 彻底溶解。

12. DNA 定量及鉴定 采用分光光度法, 以 1:60 比例, 取少量 DNA 溶液, 用无菌双蒸水稀释, 测定 OD₂₆₀、OD₂₈₀, 以测定 DNA 的浓度和纯度 (见后述)。此纯化 DNA 分装后 4 $^{\circ}$ C 贮存可达 1 年。-70 $^{\circ}$ C 贮存时间可更长。一般以 0.4 ~ 0.6 μ g/ μ l 浓度贮存较为理想。要避免反复冻融, 以免剪切高分子量 DNA。此法基因组 DNA 的产量约为 300 ~ 1000 μ g /g 组织。

试剂与器材

一、试剂

1. 液氮。

2. RSB 缓冲液 10mmol/L Tris - Cl (pH7.4); 10mmol/L NaCl; 25mmol/L EDTA.

3. 10% SDS。

4. 蛋白酶 K (10mg/ml) 溶于 10mmol/L Tris - Cl (pH7.4) 液中。蛋白酶 K 溶液不稳定, 应新鲜配制。

5. SS - 酚/氯仿/异戊醇 (25/24/1), SS - 酚/氯仿 (1/1) (见本章实验五)。

6. 无水乙醇或 95% 乙醇 - 20 $^{\circ}$ C 存放。

7. 70% 乙醇, - 20 $^{\circ}$ C 存放。

8. RNase A (10mg/ml 水溶液) 此液可由商品获得或自行配制, 将 RNase A (Sigma) 结晶用双蒸水配制成 10mg/ml 溶液, 于 100 $^{\circ}$ C 加热 10min 灭活 DNase, 分装存于 20 $^{\circ}$ C 即可。配制此液时要注意避免污染实验室设备, 尤其是操作 RNA 的器材。

9. TE 缓冲液 (pH8.0)。

10. Tris/Salt 缓冲液 10mmol/L Tris - Cl (pH7.4); 25mmol/L EDTA; 0.5mol/L NaCl。

二、器材

1. 研钵与杵。

2. 50ml、10ml 有盖聚丙烯管。

3. 大口径 1000 μ l 微量滴头 (micropipette tips) 将滴头用刀片截去 1/3 即成, 用以转移高分子量 DNA 溶液。

4. 玻棒

5. 双蒸水

注: 以上试剂和器材 (除酶制剂、乙醇、SS - 酚/氯仿/异戊醇) 均须高压灭菌或过滤灭菌。

II 快速制备组织或培养细胞基因组 DNA

本法提取的基因组 DNA 适于作 PCR 模板, 限制性内切酶消化及 DNA 印迹分析。此法最初是为分析转基因鼠是否转基因成功而设计的, 样品是幼鼠的 1.5~2 cm 尾巴, 现也适用其它组织如肝、脑或培养细胞等。该方法的优点是样品量小、快速 (约耗时 5h), 但制备时要使用组织匀浆器, 会剪切高分子量基因组 DNA, 故此法制备的 DNA 不适用于构建基因组文库。

现已有许多商品试剂盒供选择, 如 G NOME DNA isolation Kit、BIO101、Puregene、Gentra Systems 等。只需 1~2h 可完成从各种来源的样品中制备基因组 DNA, 由这些试剂盒制备的 DNA 适于限制性内切酶的裂解、DNA 印迹、杂交分析以及作为 PCR 模板。

操 作

1. 将组织或细胞 (<100mg) 放于 10ml 管中, 加 2ml 匀浆缓冲液, 尽量剪碎组织, 然后用匀浆器研磨, 一直到无组织块可见。组织块取材要新鲜, 尽量剪成小碎粒, 所用匀浆器须配套适中, 过大过小均不利研磨组织块。

2. 加入 125 μ l 10% SDS, 倒转混匀, 65 $^{\circ}$ C 水浴 30min。

3. 加入 350 μ l 8mol/L 乙酸钾, 反复倒转混匀, 冰浴 60min, 5 000g \times 5min 离心, 将上清液转移至新的 10ml 管中, 弃去白色沉淀。

4. 加入 4ml SS-酚/氯仿 (1:1) 到上清液中, 反复倒转混匀, 5 000g \times 5min 离心, 将上层水相液转移至新管中。

5. 用 2ml 氯仿抽提水相液, 如步骤 4 操作及转移水相液至新管中, 加入 5ml 无水乙醇, 轻轻倒转混匀以沉淀高分子量 DNA, 1 500g \times 10min 离心, 收集 DNA 沉淀。

6. 轻轻倒出上清液, 弃之。加入 5ml 70% 乙醇, 轻轻倒转混匀, 漂洗沉淀, 然后 1 500g \times 5min 离心, 收集沉淀。

7. 轻轻倒去上清液, 室温空气干燥 30min, 不要抽真空干燥, 若沉淀太干, DNA 很难溶于 TE 中。

8. 将 DNA 沉淀溶于 300 μ l TE 中, 室温轻振荡 1~2 小时, 待完全溶解 (基因组 DNA 需较长时间才能完全溶解)。此 DNA 可在 4 $^{\circ}$ C 贮存 6 个月, -20 $^{\circ}$ C 保存时间更长 (注意避免反复冻融, 以免剪切高分子量 DNA)。

9. 由此法制备的 DNA 伴有较多的 RNA, 因此用测定 OD₂₆₀ 的方法定量, 所得结果偏高, 建议采用荧光分光光度法定量。若所获的 DNA 不能很好地作为 PCR 模板或不能完全酶解, 则需进一步纯化, 重复一轮 SS-酚/氯仿抽提及乙醇沉淀。根据所用组织分量不同, DNA 的产量通常为 50~200 μ g。

试剂与器材

一、试剂

1. 匀浆缓冲液 0.1 mol/L NaCl; 0.2 mol/L 蔗糖; 0.02 mol/L EDTA。

2. 8 mol/L pH 乙酸钾。

3. 无水乙醇或 95% 乙醇, -20°C 存放。
4. 70% 乙醇, -20°C 存放
5. TE 缓冲液 (pH8.0)。

二、器材

1. 组织匀浆器 (Polytron)。

注: 试剂与器材的处理同 I

III 从血白细胞中制备基因组 DNA

在进行基因诊断等工作中, 最方便的基因组 DNA 来源是外周血白细胞。白细胞的分离, 除可用淋巴细胞分离液分离外, 最简便的方法是低渗溶血法。红细胞与白细胞对低渗溶液的抗性差别很大, 红细胞在水中极易破裂。利用这一特点, 用蒸馏水稀释血细胞, 待红细胞完全破坏后离心得到白细胞沉淀, 即可达到分离白细胞的目的, 然后按常规制备 DNA。此法操作简便, 一般实验室和医院均可进行。标本新鲜时采用本法从 5ml 外周血中可提取基因组 DNA 200 ~ 250 μg 。

操 作

1. 取静脉血 5ml, 加 ACD 抗凝剂 1ml。
2. 低速 (大约 1500r/min) 室温离心 10min。
3. 吸去上层血浆, 注意不要吸掉中间白细胞层。
4. 加 5 倍体积无菌双蒸水, 混匀。
5. 室温下静置 5 ~ 10min。注意此溶血过程控制在 10min 以内, 过久会有部分白细胞破坏。
6. 1300g 4°C 离心 20min。若无冷冻离心机, 室温不超过 25°C 。
7. 吸去上清溶血液, 不要吸出沉淀的白细胞。
8. 加 10ml 生理盐水, 使白细胞恢复等渗状态。
9. 1300g 4°C 离心 15min。若无冷冻离心机时, 室温不超过 25°C 。
10. 吸掉上清液, 重复 8、9、10 步骤操作二次。
11. 得到的白细胞即刻提取 DNA, 或冻存于液氮中备用。
12. 加入 5ml RSB 缓冲液悬浮白细胞, 加蛋白酶 K 至终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10% SDS 至终浓度 0.5%。
13. 充分混匀, 置 50°C 水浴中保温 3 ~ 5h, 其间振摇 2 ~ 3 次。
14. 冷却至 4°C , 加等体积 SS-酚/氯仿/异戊醇, 多次倒转混匀后, 2500g \times 10min 离心。此时 DNA 溶液在上层, 酚等有机液位于下层, 中间是变性蛋白层。
15. 用大口径滴头小心吸取上层粘稠溶液, 移至另一离心管中, 注意尽量不要带出中间蛋白层。
16. 加等体积 SS-酚/氯仿/异戊醇再抽提一次, 按 14、15 步骤操作
17. 在取出的上层水相液中, 加入等体积的氯仿, 按 14、15 步骤操作。
18. 将上层水相液转移到一新的 50ml 管中, 放入冰浴冷却, 加入等体积冷无水乙醇沉

淀 DNA, 反复倒转混匀, 可见纤维状 DNA 白色沉淀出现。

19. 用玻棒捞出 DNA 沉淀, 用冷的 70% 乙醇洗涤 3~4 次 (每次 10~20ml 乙醇)。

20. 将 DNA 沉淀放入小塑料管中, 打开管盖空气干燥, 挥发掉残余的乙醇。

21. 将 DNA 溶于适量的 TE 或无菌双蒸水中, 室温放置或 37℃ 水浴轻微振摇过夜, 彻底溶解。

22. 按常规鉴定和定量。(见本章实验二)

试剂与器材

1. ACD 抗凝剂 柠檬酸 0.48g; 柠檬酸钠 1.32g; 葡萄糖 1.47g。

2. 生理盐水。

注: 其他试剂及器材同实验 I。

第二节 核酸的定量和质量检测及贮存

原 理

组成核酸分子的碱基均具有一定的吸收紫外线特性, 核酸的最大吸收波长是 260nm, 吸收低谷在 230nm, 这个物理特性为测定核酸溶液浓度提供了基础。在波长 260nm 紫外线下, 1OD 值的光密度相当于双链 DNA 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 单链 DNA 或 RNA 浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 单链寡聚核苷酸浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 以此可计算出核酸的浓度。分光光度法还可通过测定在 260nm 和 280nm 紫外线吸收值的比值 (A_{260}/A_{280}) 估计核酸纯度。DNA 的比值为 1.8, RNA 的比值为 2.0。若 DNA 的比值高于 1.8, 说明制剂中 RNA 尚未除尽。RNA、DNA 溶液中含有酚和蛋白质将导致比值降低。270nm 存在高吸收表明有酚的干扰。当然也会出现既含蛋白质又含 RNA 的 DNA 溶液比值为 1.8 情况, 所以有必要结合凝胶电泳等方法鉴定有无 RNA, 或用测定蛋白质的方法检测是否存在蛋白质。紫外分光光度法只适用于测定浓度大于 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的核酸溶液。

实验二 核酸的定量和质量检测及贮存

操 作

1. 取 5 μl DNA 样品或 4 μl RNA 样品, 加水至 1ml 混匀后, 转入分光光度计的石英比色杯中。如果样品很少, 可用 0.5ml 的比色杯, 上述核酸样品与水容积均缩小一半。

2. 分光光度计先用 1ml 水校正零点。

3. 在 260nm 和 280nm 分别读出光密度。

4. 计算 DNA 样品浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) = OD₂₆₀ 值 \times 核酸稀释倍数 \times 50/1 000
 即 = OD₂₆₀ 值 \times 1 000/5 \times 50/1 000
 = OD₂₆₀ 值 \times 10

$$\begin{aligned}\text{RNA 样品浓度 } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) &= \text{OD}_{260} \text{ 值} \times 1\,000/4 \times 40/1\,000 \\ \text{即} &= \text{OD}_{260} \text{ 值} \times 1\,000 \\ &= \text{OD}_{260} \text{ 值} \times 10\end{aligned}$$

这样的稀释倍数非常便于计算。

5. 核酸的贮存: DNA 最好溶于 TE 中 4℃ 保存, 其中 EDTA 可螯合金属 2 价离子, 而且抑制 DNase 活性。TE 的 pH 为 8.0, 是为了减少 DNA 的脱氨反应, -70℃ 能保存 5 年以上。若要长期保存可在 DNA 样品中加 1 滴氯仿, 避免细菌和核酸酶的污染。RNA 则溶于 0.3mmol/L 乙酸钠, pH5.2, 或无菌双蒸水于 -70℃ 贮存。RNA 的长期保存可以以沉淀形式贮存于乙醇中, 在 -20℃ 非常安全。

注: DNA 样品 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值大于 1.8 说明仍存在 RNA, 可考虑用 RNase 处理样品。若小于 1.6 说明样品中存在蛋白质或酚, 应再用酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀纯化 DNA。RNA 样品 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值一般在 1.7~2.0, 一般来说, 若比值小于此范围, 主要由于蛋白质污染, 也应考虑再用酚/氯仿抽提。时 RNA 样品的比值大于 2, 并不表示 RNA 纯度有问题。因此低于此值时则表示有异硫氰胍的污染, 则需重新用乙醇沉淀样品, 去除小分子胍类的污染。若核酸溶液浓度小于 0.25μg/ml, 可用荧光光度法测定。(略)。此外将核酸样品与分子量标准同时进行琼脂糖凝胶电泳可检查核酸的完整性。

仪 器

带氩灯的分光光度计, 使用前预热稳定 10 分钟。

第三节 从哺乳动物组织中制备总 RNA

原 理

从细胞系和组织中分离完整的 RNA, 对克隆实验很重要, 如分析细胞基因表达图谱、阐明基因表达的调节机制以及制备 cDNA 克隆等。

一个典型的哺乳动物细胞大约含有 20 pg 的 RNA, RNA 主要分布于胞质中, 80% 为 rRNA (28S、18S 及 5S), 10% 为小分子 RNA 如 tRNA 及小核 RNA 而 mRNA 只占 1%~3%, 但其分子量大小及顺序十分的非均一性, 大约有 250 000 种之多, 但哺乳动物 mRNA 在 3' 末端都含有一个由 50~150 个腺苷酸组成的多腺苷酸链即 3'-poly-A 尾, 这为快速、有效分离 mRNA 提供了有利条件。

实验三 从哺乳动物组织中制备总 RNA

I 异硫氰胍/氯化铯超离心法制备总 RNA

此法可从多种组织和培养细胞中有效制备总 RNA, 并适用于那些内源性 RNase 水平很高