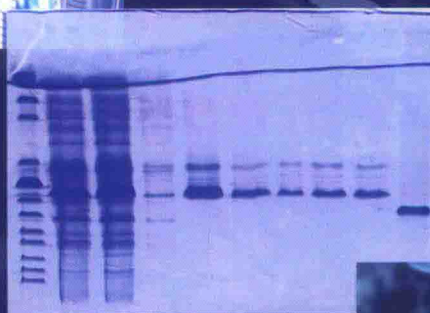


高等院校“十三五”规划/创新实验教材系列：生命科学类

生物技术 综合实验

主 编 陆勇军

Comprehensive Experiments of Biotechnology



中山大学出版社
SUN YAT-SEN UNIVERSITY PRESS

高等院校“十三五”规划/创新实验教材系列：生命科学类

生物技术 综合实验

Comprehensive Experiments of Biotechnology

主 编 陆勇军

参 编 （按姓氏笔画排序）

王 磊 邓庆丽 丛佩清

张添元 谭红铭



中山大学出版社
SUN YAT-SEN UNIVERSITY PRESS

· 广州 ·

版权所有 翻印必究

图书在版编目 (CIP) 数据

生物技术综合实验/陆勇军主编. —广州: 中山大学出版社, 2017. 6
(高等院校“十三五”规划/创新实验教材系列: 生命科学类)
ISBN 978-7-306-06040-2

I. ①生… II. ①陆… III. ①生物工程—实验—高等学校—教材 IV. ①Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 085345 号

Shengwu Jishu Zonghe Shiyān

出 版 人: 徐 劲

策划编辑: 周建华 谢贞静

责任编辑: 谢贞静

封面设计: 刘 犇

责任校对: 邓子华

责任技编: 黄少伟

出版发行: 中山大学出版社

电 话: 编辑部 020-84110771, 84113349, 84111997, 84110779

发行部 020-84111998, 84111981, 84111160

地 址: 广州市新港西路 135 号

邮 编: 510275 传 真: 020-84036565

网 址: <http://www.zsup.com.cn> E-mail: zdcbs@mail.sysu.edu.cn

印 刷 者: 佛山市浩文彩色印刷有限公司

规 格: 787mm × 1092mm 1/16 10 印张 300 千字

版次印次: 2017 年 6 月第 1 版 2017 年 6 月第 1 次印刷

定 价: 29.00 元

如发现本书因印装质量影响阅读, 请与出版社发行部联系调换

▶ 前 言

生物技术学是一门既古老又年轻的应用学科，在一定程度上，可以说生物技术一直伴随并推动着人类文明的进步，生物技术的进展造福了人类的方方面面。进入 21 世纪以来，随着新一代全基因组测序和新型基因编辑技术等出现，生物技术必将获得更为迅猛的发展，势将对人类社会的各个方面产生更为深刻的影响。生命科学发展的历史证明“技术”的发明和应用在学科发展中具有关键的作用。

因此，我们认为，生物技术相关实验知识的教育对于生命科学各专业的本科生来说是非常必要的。而生物技术的核心学科是基因工程。通过基因工程相关实验的学习和操作，学生可以学习到基因工程中克隆、表达、产物纯化（获得高产的目标产物）和产物含量和性质测定等一系列基本实验技能，提高实验设计、实验实施、结果分析、科学表述、有效展示、沟通合作等科学研究素养，体会科学研究的真谛。这也是我们的教学宗旨和编写本教材的目标。

本教材是在中山大学原“微生物生理生化及基因工程实验”和“生物化学大实验”等实验课讲义的基础上，根据本学科的发展，通过不断更新和取舍，最终编写而成。教材凝聚了我校相关教师们数十年的心血和教学经验，限于篇幅，就不一一列举贡献者的名字，在此谨对各位前辈老师们表示诚挚的谢意。教材的相关内容曾以讲义的形式在多届学生中使用，受到同学们的广泛好评，也得到了同学们的许多教学建议。

有多位老师参与了本教材相关内容的编写，其中陆勇军负责第二编的实验二、七、十、十二和第三编的实验一、二、五、九、十，张添元负责第三编的实验八、十一并与王磊共同编写了第三编的实验四，王磊编写了第二编的实验十一和第三编的三、六、七，邓庆丽编写了第二编的实验六、八、九，丛佩清编写了第二编的实验四、五，谭红铭编写了第二编的实验一、三。最后由陆勇军和丛佩清对全文统稿。特别强调的是，每位老师都参与了各实验内容的讨论、润色和修改，因此，本教材可以说是集体努力的结晶。

本教材的出版得到国家自然科学基金委人才培养基金(No. J1310025)，广东省教育厅，中山大学教务处、设备处和生命科学学院相关教学经费的资助，特此感谢。由于编者水平有限，书中错漏在所难免，希望各位读者不吝指正。

陆勇军

2017 年 4 月于广州小谷围岛抱膝斋

► 内容简介及教学建议

【内容简介】

本教材是与综合性大学“生物技术学”课程内容相对应的实验课程，着重于基础和专业课程知识及实验技术的综合运用，强调基础技能的操作训练和内容的系统性，不一味追求烦难的“最新”技术。教材内容分为两大部分，第一部分是基因工程的基本实验操作，其特点是以基因工程为主线，内容涵盖基因工程的上游技术，包括总RNA的提取、检测，逆转录PCR获得cDNA，质粒的酶切、连接技术，感受态细胞的制备，质粒的转化、提取、纯化、定量，重组质粒的鉴定，以及下游的生化技术，包括目的基因表达调控，目标蛋白产物的提取、纯化和鉴定等技术。在课程安排上，将以上内容分成相关的4个单元，每个实验单元本身既有相对的独立性，单元之间又有紧密的连贯性，形成了“一条龙”的实验流程。这一部分内容的特点是选用的材料直观性强：①以增强型绿色荧光蛋白基因作为操作对象，其重组后表达的产物在可见光和紫外光下即可见其特有的黄绿色荧光，据此可断定其是否重组成功及有无表达；②基因重组子的蓝白斑筛选；③离子交换树脂及亲和层析剂在层析过程中的颜色变化。另外，所设立的实验方法和策略得当，只要操作正确，就会获得结果。

本教材的第二部分属于备选性和探索性实验，主要是第一部分在实验技术和实验材料上的拓展，以及微生物育种、发酵工程和生物化学制备的实验技术。教师可以针对性地选择相关实验内容给有兴趣的同学开设或演示。

【教学建议】

在教学方法上，我们有如下建议：①共同参与：教师讲授每单元内容和实验技术要点，每个同学全程参与，动手操作，包括试剂的配制、仪器的安装调试、样品的处理等；②自主开展：2~4人一组，实行组长制，各组自主开展每个单元的实验，组长负责协调学生与教师、实验员老师和助教的联系（仪器及试剂的领取）；③开放实验：由于综合实验的性质，我们建议实验室全天开放，由学生们自主安排每个单元的进度，只要各单元实验在规定时间内完成即可。建议的课时和实验安排见后文“生物技术综合实验—基本实验部分教学总体安排”和“总体实验流程设计”。

对于采用本教材和本教学建议实施教学的单位，我们可以提供相应的菌株、质粒和教学培训。

目 录

第一编 课程概述	1
教学目标与要求	1
如何养成良好的实验习惯	1
实验报告撰写要点	2
生物技术实验室安全防护常识	2
生物技术综合实验“基本实验”部分教学总体安排	5
总体实验流程设计	6
第二编 基本实验	7
实验一 斑马鱼总 RNA 的提取	7
实验二 核酸的检测——琼脂糖凝胶电泳	15
实验三 逆转录 PCR (RT-PCR)	20
实验四 质粒的提取	28
实验五 PCR 产物的 T 载体克隆	37
实验六 DNA 的酶切、回收及连接	40
实验七 感受态细胞制备及重组质粒的转化	46
实验八 PCR 法筛选重组克隆	51
实验九 重组 DNA 在大肠杆菌中的诱导表达	55
实验十 金属螯合亲和层析分离蛋白质	61
实验十一 蛋白质的 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定与分析	65
实验十二 Western 印迹鉴定目标蛋白	71
第三编 备选、示范性和探索性实验	75
实验一 酿酒酵母基因组 DNA 的提取	75
实验二 酿酒酵母和植物总 RNA 的提取和纯化	78
实验三 真核生物 mRNA 的提取和纯化	81
实验四 cDNA 文库的构建	86

实验五 菌落原位杂交鉴定重组子（探索性） 99

实验六 分子筛层析法除盐 103

实验七 培养细胞总蛋白的双向聚丙烯酰胺电泳 105

实验八 细胞色素 C 的提取、纯化及测定 109

实验九 重组棒杆菌的赖氨酸合成代谢控制 114

实验十 正交试验法优化工程菌发酵培养基配方 119

实验十一 工程菌的自控发酵罐发酵 123

附录 128

附录一 实验室常用试剂、缓冲液的配制方法 128

附录二 核酸电泳相关试剂、缓冲液的配制方法 132

附录三 核酸、蛋白质杂交用相关试剂、缓冲液的配制方法 134

附录四 菌种的分离、纯化培养及保藏 136

附录五 各种抗生素的贮存溶液及其工作浓度 138

附录六 实验室常用培养基的配制方法 139

附录七 核酸和蛋白质的各种换算 142

附录八 部分实验设备等使用操作说明 143

附录九 限制性内切酶及其使用 146

附录十 常用核酸及蛋白质分子量标准 148

缩略语解析 152

第一编 课程概述

教学目标与要求

(1) 通过本课程,学生能学习和熟练掌握一系列生物大分子的制备、分离和纯化的方法和技术,体验基因工程常规操作的完整过程,了解并掌握各种常规生化仪器及发酵器材的使用和保养。

(2) 学生能综合运用先修的理论知识和基础实验技能解决本课程的实验问题。

(3) 完成本课程后,希望学生能在发现问题、分析和解决问题、逻辑分析能力、团队合作和规范表达等科研素质方面获得进一步的培养和训练,为今后独立从事生物技术及相关学科领域的研究和技术开发奠定基础。

(4) 培养学生严谨求实、积极主动的科研作风。

(5) 要求学生认真、细致、独立、高效地完成每一个实验。

(6) 注重同组之内的有效合作,组间及与老师的良好沟通。

(7) 认真撰写并及时上交实验报告,完成期末的实验总结和展示。

如何养成良好的实验习惯

(1) 带着有准备的头脑开始实验:实验前的认真预习使你能熟悉本次实验的目的和原理,了解每一步实验操作的步骤和意义,有利于你的实验设计。

(2) 及时和如实地实验记录:不论成功或失败,实验结果和数据应及时和如实地记录在实验记录本上,能使你正确分析实验的结果,找出失败的可能原因。

(3) 定量和准确进行微量操作的习惯:记住基因操作往往是以微克(μg)、纳克(ng)和微升(μL)等单位进行实验的。

(4) 细节决定成败:注意每一个实验细节。

(5) 应用统计学方法对你的实验结果进行统计分析,将会使你的结论更加可信。

(6) 节约是一种美德,让节约成为你的习惯,使用药品、试剂和各种物品都请注意节约。

(7) 整洁的实验环境:实验台面应随时保持整洁,仪器、药品摆放整齐;公用试剂用毕请立即盖严放回原处;实验完毕,仪器须清洁后放好,将实验台面抹拭干净,再

离开实验室。

(8) 爱护你使用的仪器设备：清洁和使用仪器时，应小心仔细，如有仪器损坏，应如实向教师报告，并填写损坏仪器登记表；使用贵重精密仪器时应严格遵守操作规程，发现故障须立即报告教师，不得擅自动手检修。

(9) 良好的课堂纪律：会提高实验的效率，减少人为错误的出现，而迟到、早退和实验过程中的大声谈笑也会影响同组和其他同学的工作。

(10) 做好你的值日生工作，包括负责当天实验室的卫生、安全和其他服务性的工作。

(11) 最后也是重要的是开展实验前请认真阅读后附的生物实验室安全防护手册。

实验报告撰写要点

(1) 如实记录实验现象和数据，包括拍照、画示意图等。

(2) 整理实验结果：包括数据统计分析、图片裁切、结果图整理、图片说明等均应按照规定进行。

(3) 如实描述实验结果，并对正结果或负结果进行分析，必要时援引文献进行佐证和讨论。

(4) 撰写实验意义和实验目的部分。

(5) 简要写出实验流程和所用技术及方法。

(6) 回答教材中每个实验后面所提的问题。

(7) 上交书写和编排整齐、图表清晰和规范的实验报告。

生物技术实验室安全防护常识

1. 安全用电

(1) 注意仪器的电压和电流是否符合仪器的负载要求。

(2) 严格按照电器使用规程操作，不能随意拆卸和玩弄电器。

(3) 严防触电。绝不可用湿手或眼睛旁视时开电闸和电器开关，检查电器设备是否漏电时，应使用试电笔，或将手背轻轻触及仪器表面；凡是漏电仪器一律不能使用。

2. 防止火灾

(1) 实验室起火的原因有电流短路，不安全地使用电炉、煤气灯和易燃易爆药物等导致着火。为防患未然，实验必须配备一定数量的消防器材，并按消防规定保管使用，最重要的是每个实验者都应有实验室安全观念，时刻保持警惕。

(2) 实验室内严禁吸烟。

(3) 使用煤气灯时应先将火种点燃,一手执火种靠近灯口,一手慢慢打开煤气灯,火焰大小和火力强弱应根据实验的需要来调节。煤气灯应随用随关,严防煤气泄漏;用火时应做到火着人在,人走火灭。

(4) 乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热,并要远离火源操作和放置。

(5) 实验室内严禁贮存大量的易燃物(如乙醚、丙酮、乙醇,苯等)。应在远离火源处或将火焰熄灭后,才可大量倾倒这些液体。低沸点的有机溶剂不准在火焰上直接加热,只能利用带回流冷凝管的装置在水浴上加热或蒸馏。

(6) 离开实验室以前应认真、负责地进行安全检查,关好煤气开关和水龙头,拉下电闸。

3. 严防中毒

(1) 化学试剂有相对无毒、中度毒性和剧毒之分,在处理剧毒药物时要特别谨慎、小心。国际上常用某些标志表示不同毒型的实验化学药品。生物危险品或放射性物质存放或操作的实验室也要有指定的标志。生物技术实验中会用到溴化乙啶、氯仿、酚、丙烯酰胺等致癌、有毒和有害物质。

(2) 使用毒性物质和致癌物必须根据试剂瓶上标签说明严格操作,安全称量、转移和保管。操作戴手套,必要时戴口罩,并在通风橱中进行。沾过毒性、致癌物的容器应单独清洗和处理。

(3) 水银温度计、气量计等汞金属设备破损时必须立即采取措施回收汞,并在污染处撒上一层硫磺粉以防汞蒸气中毒。

(4) 所有实验用废弃物如琼脂糖凝胶、滤纸、玻璃碎片等,都要收集在废物桶里,不能倒在水槽内或到处乱扔。

4. 避免烧伤和创伤

(1) 使用玻璃、金属器材时注意防止割伤及机械创伤。

(2) 浓酸、浓碱腐蚀性很强,必须极为小心地操作,用吸量管量取这些试剂(包括有毒物)时,必须使用橡皮球,绝对不能用品口吸取。

5. 预防生物危害

(1) 生物材料如微生物、动物的组织、细胞培养液、血液和分泌物都可能存在细菌和病毒感染的潜在危险,如通过血液感染的血清性肝炎就是最大的生物危害之一。感染主要途径除血液外,其他体液也能传递病毒,因此,处理各种生物材料必须谨慎、小心,做完实验必须用肥皂、洗涤剂或消毒液充分洗净双手。

(2) 使用微生物作为实验材料时,尤其要注意安全和清洁卫生。被污染的物品必须进行高压消毒或烧成灰烬。被污染的玻璃用具应在清洗和高压灭菌之前立即浸泡在适当的消毒液中。

(3) 进行遗传重组操作的实验室更应根据有关规定加强生物伤害的防范措施。

其他实验室安全措施请参看卫生部发布的 WS 233 - 2002 “微生物和生物医学实验室生物安全通用准则”(<http://www.moh.gov.cn/publicfiles//business/htmlfiles/wsb/index.htm>)。

6. 实验室警示标识

实验室警示标识见图 1-1。



图 1-1 实验室警示标识



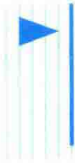
生物技术综合实验“基本实验”部分教学总体安排

生物技术综合实验“基本实验”部分教学总体安排见表 1-1。

表 1-1 教学总体安排

周数	天数	教学单元	实验内容
1	4	目的基因的获取	实验一：斑马鱼总 RNA 的提取和纯化 实验二：核酸的检测——琼脂糖凝胶电泳技术 实验三：逆转录 PCR（RT-PCR）
2	4	基因克隆、转化和重组子筛选	实验四：质粒的提取 实验五：PCR 产物的 T 载体克隆 实验六：DNA 的酶切鉴定、回收和连接 实验七：感受态细胞制备及重组质粒的转化 实验八：PCR 法筛选重组克隆
3	4	重组 DNA 在细菌中的表达调控	实验九：重组 DNA 在大肠杆菌中的诱导表达
4	4	表达蛋白的分离纯化及检测、鉴定	实验十：金属螯合亲和层析分离目的蛋白质 实验十一：重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳技术 实验十二：Western 印迹鉴定目标蛋白
5	1	考试	笔试和总结报告

注：如果是 8 学时每周或 16 学时每周（即 2 天），则上课周数相应延长。



总体实验流程设计

总体实验流程设计见图 1-2。

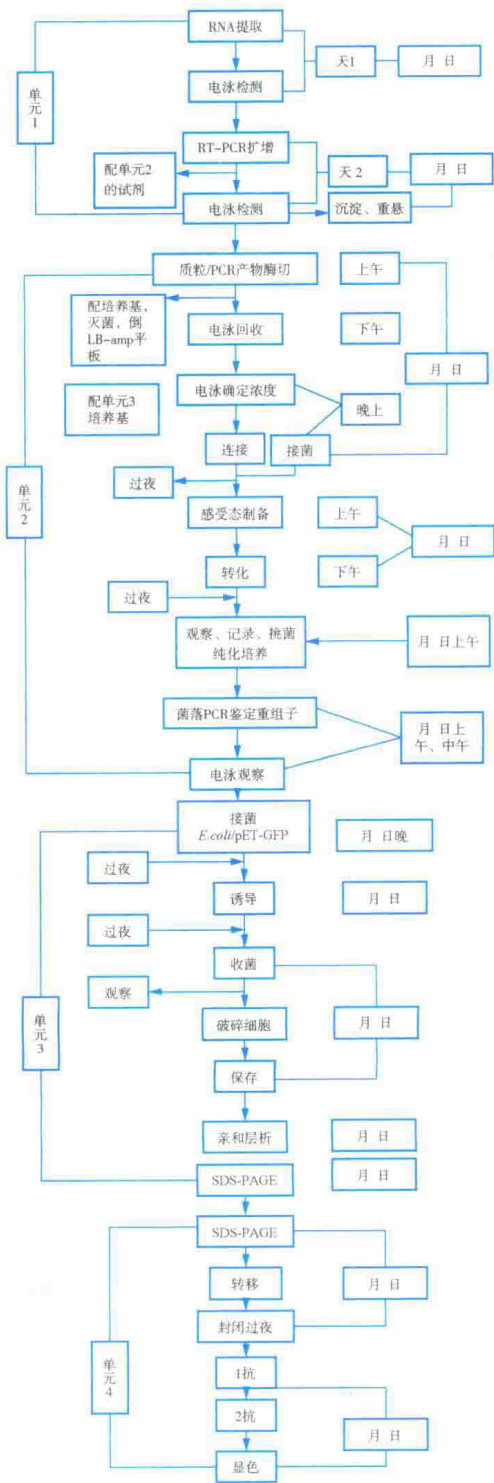


图 1-2 总体实验流程设计

第二编 基本实验

实验一

斑马鱼总 RNA 的提取

【实验目的】

- (1) 掌握提取总 RNA 的原理和技术。
- (2) 学习和掌握控制 RNA 酶活性的方法。

【实验原理】

分离纯净、完整的 RNA 对于分子克隆的实验是很重要的，这也是进行基因表达分析的基础。在总 RNA 中，75% ~ 85% 为 rRNA（主要是 28S ~ 26S/23S 或 18S/16S rRNA），其余的由分子量大小和核苷酸序列各不相同的 mRNA 和小分子 RNA 如 tRNA、snRNA 及 snoRNA 等组成。mRNA 一般只占总 RNA 的 1% 左右，而且由于核糖核酸酶（RNase，RNA 酶）广泛存在、活性稳定，其反应也不需要辅助因子，因而在 RNA 的制备过程中只要存在少量的 RNA 酶就难以获得完整的 RNA；而所制备的 RNA 的纯度和完整性又直接影响着 RNA 分析的结果，长度大于 4 kb 的转录本本身存在的几率更小，其对于痕量 RNA 酶的降解也比小转录本更敏感，所以 RNA 的制备与分析操作难度极大，克隆长片段的基因更加是一门艺术。总之在所有 RNA 实验中，归根结底就是防止 RNA 酶的污染，分离到全长的 RNA。

在实验中，一方面要最大限度地抑制内源性的 RNA 酶，因为各种组织和细胞中含有大量内源性的 RNA 酶，所以所有分离提取 RNA 的方案都是在能导致 RNA 酶变性或失活的化学环境中使 RNA 释放出来。另一方面要严格控制外源性 RNA 酶的污染。RNA 酶可耐受多种处理而不被灭活，如煮沸、高压灭菌等。外源性的 RNA 酶存在于操作人员的手汗、唾液等，也可存在于灰尘中。在其他分子生物学实验中使用的 RNA 酶也会造成污染。这些外源性的 RNA 酶可污染器械、玻璃制品、塑料制品、电泳槽、研究人员的手及各种试剂。而为避免 RNA 酶的污染，实验中所用到的全部溶液、玻璃器皿、塑料制品等都需特别处理。

近年来，常用的 RNA 酶抑制剂主要有：①异硫氰酸胍。异硫氰酸胍是目前被认为最有效的 RNA 酶抑制剂，它在裂解组织的同时也使 RNA 酶失活；它既可破坏细胞结构

使核酸从核蛋白中解离出来, 又对 RNA 酶有强烈的变性作用。②焦碳酸二乙酯 (DEPC)。是一种强烈但不彻底的 RNA 酶抑制剂。DEPC 通过和 RNA 酶的活性基团组氨酸的咪唑环反应而抑制酶活性, 使用浓度为 $0.05\% \sim 0.1\%$ 。③钒氧核糖核苷复合物。由氧化钒离子和核苷形成的复合物, 它和 RNA 酶结合形成过渡态类物质, 因而能百分之百地抑制 RNA 酶的活性。其使用浓度为 10 mmol/L 。④RNA 酶的蛋白质抑制剂 (RNasin)。是一种从大鼠肝或人胎盘中分离出来的酸性糖蛋白。RNasin 是 RNA 酶的一种非竞争性抑制剂, 可以和多种 RNA 酶紧密结合形成复合物从而使其失活。⑤其他: SDS、尿素、硅藻土等对 RNA 酶也有一定抑制作用。

总 RNA 制备的方法很多, 如: ①异硫氰酸胍 - 苯酚法, 许多公司有现成的总 RNA 提取试剂盒 (如 Trizol 试剂盒, 其实质也是异硫氰酸胍 - 苯酚法), 从而可快速有效地提取到高质量的总 RNA。②超离心方法, 可以获得丰富且质量高的 RNA。缺点是实验时间比较长, 要求离心过夜。③其他一些试剂盒, 主要是利用某些特定的介质吸附 RNA, 驱除其他杂质以后, 将纯净的 RNA 洗脱下来, 这样就可以在短时间内获得纯净的 RNA, 但是价格比较昂贵。

目前, 最常用的 RNA 纯化方法是使用异硫氰酸胍/酸性酚的一步法。异硫氰酸胍 - 苯酚法的基本过程是: 先将样品 (以动物的腺体或组织为例) 放进匀浆器中加入异硫氰酸胍变性液进行匀浆裂解, 再用酸性苯酚 (水饱和酚)、氯仿抽提除去 DNA 和变性的蛋白质, 最后用异丙醇沉淀出 RNA。Trizol 试剂法进一步提高了 RNA 的提取能力, 可以从多种组织和细胞中提取高质量的非降解 RNA。该法甚至可以从最少 100 个细胞或 1 mg 组织中提取 RNA。

本实验采用 Trizol 试剂盒, 从斑马鱼中提取总 RNA, 以进行反转录获得特异的 cDNA (参见实验三)。

【试剂与器材】

1. 试剂

(1) Trizol: 其含有苯酚、异硫氰酸胍等物质, 能迅速破碎细胞并抑制细胞释放出的核酸酶。

(2) 氯仿。

(3) 异丙醇。

(4) 75% 乙醇 (需用无 RNA 酶水配置)。

(5) 灭菌的 DEPC 水 (选做): 量取一定体积的三蒸水, 加入 $0.05\% \sim 0.1\%$ 的 DEPC, 以磁力搅拌器搅拌过夜或者摇床低速振荡过夜, 121°C 高压蒸汽灭菌 50 min , 冷却后, 作为试剂配制用水。

以下 (6) ~ (9) 为选做部分的实验试剂:

(6) 变性液 (选做)。

表 2-1-1 变性液的配制

成分	称量	终浓度
异硫氰酸胍	236.32 g	4.0 mol/L
醋酸钠, pH =7	1.02 g	0.015 mol/L
巯基乙醇	0.7 mL	20 mmol/L
Triton X-100	2.5 mL	0.5%
NP 40	2.5 mL	0.5%
异戊醇	1.25 mL	0.25%
溶于水至终体积	500 mL	

- (7) 水饱和酚（选做）。

用 DEPC 处理过的水饱和重蒸酚：取适量重蒸酚，加等体积的 DEPC 处理水，磁力搅拌器搅拌过夜，经常更换上层的水，直到 pH 为 4.0～5.0 之间。上层仍用水覆盖，置于 4℃ 冰箱保存。
- (8) 酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）（选做）。
- (9) 2 mol/L 醋酸钠（pH 4.0）（选做）。

2. 器材

- (1) 烧杯（1000，500，100，50 mL 若干）。
- (2) 量筒（1000，500，250，50，20 mL 若干）。
- (3) 玻璃棒，药勺，试剂瓶，三角瓶，上列器皿均用锡箔纸密封，然后置 180℃ 干烤 5 h。
- (4) 枪头（1000、200、20 μL），枪头盒。
- (5) 离心管（1.5 mL、2 mL、7 mL 离心管），上列塑料制品均用含 0.05‰～0.1‰ DEPC 的水浸泡过夜。
- (6) 冷冻高速离心机。
- (7) 超微量蛋白核酸分析仪。

【操作步骤】

1. Trizol Reagent 处理法（参照 Ambion 公司 Trizol 试剂盒）

- (1) 处理样品：取斑马鱼 1 条，用滤纸稍吸干水，称重后置于研钵内，加入液氮浸没鱼体，连续加两次。把鱼体打碎成小颗粒，冷冻研磨。其间需补充液氮保持低温，磨成面粉状细末为止。注意：要始终保持粉末状，不能成为浆状。
- (2) 按斑马鱼重量粗略将磨成的粉末分成 4 份，每份约 80 mg（在研钵中分），用液氮冷却过的不锈钢勺挑取 1 份加入预先装有 1 mL Trizol 试剂的管中，共 4 管，用漩涡振荡器剧烈振荡使之分散均匀。振荡后可见小颗粒为正常。

- (3) 室温静置 5 min。
- (4) 加入 0.2 mL 氯仿，剧烈振荡 15 s，室温静置 5 min。
- (5) 室温离心，12 000 r/min，15 min。
- (6) 小心吸取上层水相约 0.5 ~ 0.6 mL，转入另一干净离心管。注意：宁少勿多，不要吸到中间层（细胞碎片及变性的蛋白质）。
- (7) 加入 0.5 mL 异丙醇，颠倒多次混匀。室温静置 10 min。
- (8) 室温离心，12 000 r/min，15 min。
- (9) 小心弃去上清，加入适量（约 0.5 mL）75% 乙醇（需用无 RNA 酶水配制），洗涤沉淀，较轻柔地颠倒几次即可，让沉淀悬浮（为避免把沉淀倒掉，可用移液器吸上清）。
- (10) 室温离心，8 000 r/min，5 min。
- (11) 用移液器小心吸去上清，将离心管平卧于干净滤纸上，室温干燥 10 min，至白色沉淀刚消失为好（周边透明，中间有一点白色），勿干透！注：为避免污染，也可放超净工作台干燥。
- (12) 室温离心，8 000 r/min，5 min。
- (13) 加入 20 ~ 30 μ L 超纯水（无 RNA 酶去离子水）溶解后，置冰上或 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

2. 异硫氰酸胍 - 苯酚法（选做）

- (1) 处理样品：取斑马鱼 1 条，用滤纸吸干水，称重后，取 100 ~ 150 mg 加入 1.0 ~ 1.5 mL 变性液，置于匀浆器中进行匀浆。
- (2) 将匀浆后的组织样品（含变性液）移至 7 mL 离心管中，加入 0.1 倍体积的 2 mol/L 醋酸钠（pH = 4.0），加盖并轻轻颠倒混匀。
- (3) 加入等体积的酚：氯仿：异戊醇（25 : 24 : 1），颠倒混匀，用力振荡 10 s，然后冰上放置 15 min。
- (4) 离心，4 $^{\circ}$ C，10 000 r/min，20 min。
- (5) 小心吸取上层水相至一个新的离心管。注意：不要吸出中间层（该层富含蛋白质和 DNA）。
- (6) 加等体积预冷的异丙醇与样品混匀，置 -20 $^{\circ}$ C 30 min 以沉淀 RNA。对于 RNA 含量很少的样品可沉淀过夜以提高回收率。
- (7) 离心沉淀 RNA，4 $^{\circ}$ C，10 000 r/min，15 min。
- (8) 用移液器吸去上清，将 RNA 沉淀重新悬浮于适量变性液中，置于旋转摇床上多角度摇晃至 RNA 溶解，也可加热到 65 $^{\circ}$ C 促进溶解（时间尽可能短）。
- (9) 重复步骤（2）~（6）。
- (10) 用移液器吸去上清，加预冷的 75% 乙醇，洗涤沉淀。
- (11) 离心，4 $^{\circ}$ C，10 000 r/min，15 min，用移液器吸去上清。
- (12) 真空或室温干燥使样品中的乙醇挥发殆尽，但不宜过分干燥，否则沉淀难以完全溶解。