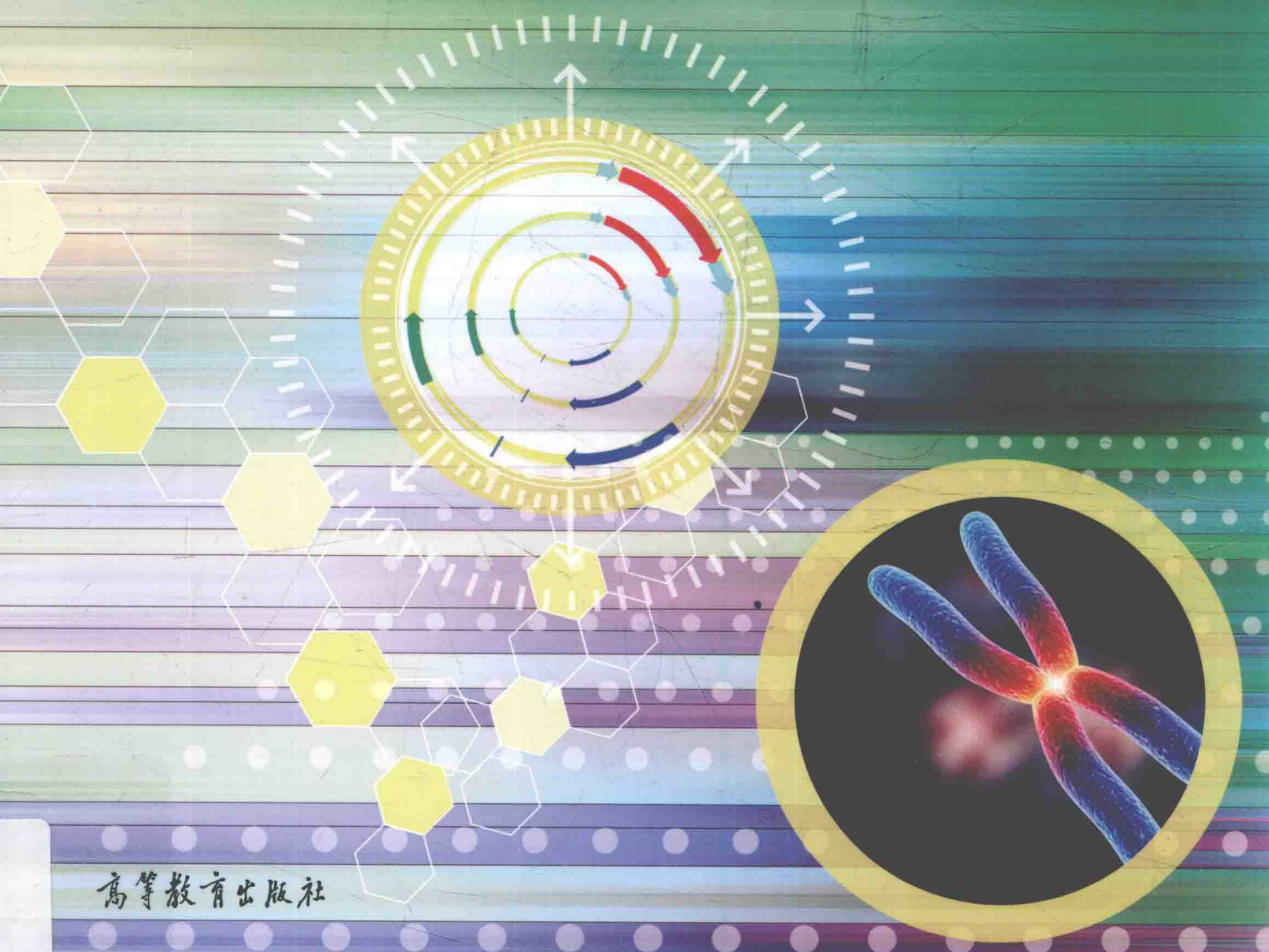


现代分子生物学 模块实验指南 (第2版)

主 编 李玉花 徐启江
副主编 许志茹 蓝兴国 张 旻



高等教育出版社

现代分子生物学 模块实验指南 (第2版)

主 编 李玉花 徐启江

副主编 许志茹 蓝兴国 张 旻

编写人员 (按姓氏笔画排序)

王 宇 许志茹 李玉花 张 旻

徐启江 蓝兴国 解莉楠

高等教育出版社·北京



图书在版编目(CIP)数据

现代分子生物学模块实验指南 / 李玉花, 徐启江主编.

--2 版. -- 北京: 高等教育出版社, 2017.12

ISBN 978-7-04-047057-4

I. ①现… II. ①李… ②徐… III. ①分子生物学-实验-高等学校-教学参考资料 IV. ①Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 273415 号

XIANDAI FENZI SHENGWUXUE MOKUAI SHIYAN ZHINAN

策划编辑 李光跃

责任编辑 李光跃

封面设计 张楠

责任印制 尤静

出版发行 高等教育出版社
社址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
印刷 北京市大天乐投资管理有限公司
开本 889mm×1194mm 1/16
印张 26.25
字数 770千字
购书热线 010-58581118
咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.hepmall.com.cn>
<http://www.hepmall.com>
<http://www.hepmall.cn>
版 次 2007年7月第1版
2017年12月第2版
印 次 2017年12月第1次印刷
定 价 43.60元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题, 请到所购图书销售部门联系调换

版权所有 侵权必究

物料号 47057-00

第2版前言

21 世纪是生命科学的世纪,各种组学研究使得生命科学由描述性的定性科学走向精确定量的科学,对生命现象的认识从还原论到整体论,以分子生物学为先导的生命科学的发展正面临一个新的高峰。分子生物学是从分子水平上研究生命本质的一门新兴边缘学科,以核酸和蛋白质等生物大分子的结构及其在遗传信息和细胞信息传递中的作用为研究对象,是当前生命科学中发展最快并正在与其他学科广泛交叉与渗透的前沿研究领域。分子生物学基本理论的建立与发展都是以实验为基础的,只有通过实验室的实际操作训练,才能进一步理解实验背后的科学理论,达到掌握实验基本技能、培养理论与实践相结合能力、提高科学思维能力和创新能力的目的。

为加强分子生物学实验内容的完整性、先进性,我们结合自己的科研实践,编写了《现代分子生物学模块实验指南》,自2007年由高等教育出版社出版发行以来,被部分高校选用作为生命科学类本科及研究生教材或参考图书,同时也受到相关科研人员的欢迎。近十年来分子生物学技术日新月异,许多新的技术得到了广泛应用。应读者的要求,我们在第1版的基础上进行了增删与修改,予以再版。

为反映现代分子生物学实验技术最新的研究进展与发展趋势,本书第2版立足于基础分子生物学实验的同时增加了实时荧光定量PCR、第二代高通量测序、双分子荧光互补、单核苷酸多态性检测、CRISPR/Cas9等技术的详细操作流程。

我们对全书进行了认真修订,具体分工如下:第一模块目的基因的克隆及序列分析(许志茹),第二模块核酸分子杂交(徐启江),第三模块大规模基因差异表达分析(王宇),第四模块单核苷酸多态性的检测(王宇),第五模块目的基因的遗传转化(张旸),第六模块蛋白质样品的制备、分离与鉴定(解莉楠),第七模块目的蛋白质表达、纯化与检测(蓝兴国),第八模块蛋白质相互作用的研究(蓝兴国),第九模块激光扫描共聚焦显微镜的应用(张旸),第十模块生物信息学软件与数据库应用(王宇)。修订过程中还得到了杨洪一、赵翊丞两位老师的大力支持,同时感谢高等教育出版社生命科学分社的同志们对本书出版的大力协助与支持。

本书受到国家自然科学基金委员会“基础科学人才培养基金科研训练及科研能力提高项目”“中央高校基本科研业务费专项资金项目(2572014EA03)”资助。

本书的编写人员虽然在相关研究领域具有自己的学术专长,并且都是处于教学科研第一线的教师、博士研究生,但限于学术水平和编写经验的不足,难免存在疏漏和差错,恳请各位读者给予批评指正,以便进一步修改完善。

编者

2016年6月

目 录

模块一	目的基因的克隆及序列分析	1
1-1	RNA 的提取及检测	4
1-2	RT-PCR 方法扩增目的基因	13
1-3	cDNA 末端快速扩增法 (RACE) 合成目的基因	22
1-4	目的基因的克隆	37
1-5	目的基因的序列测定及初步分析	54
1-6	cDNA 文库的构建及目的基因的筛选	57
1-7	mRNA 差别显示克隆差异表达基因	72
1-8	电子克隆法获得目的基因	80
1-9	化学合成法获得目的基因	84
模块二	核酸分子杂交	87
2-1	Southern 杂交	90
2-2	Northern 杂交	108
2-3	原位杂交	114
2-4	原位 RT-PCR	127
模块三	大规模基因差异表达分析	132
3-1	基因芯片分析	135
3-2	基于第二代高通量测序技术的转录组测序分析	140
3-3	差异表达基因功能富集分析	146
3-4	实时荧光定量 PCR 检测基因表达	151
模块四	单核苷酸多态性的检测	157
4-1	衍生酶切扩增多态性序列法	160
4-2	Taqman 荧光探针法	165
4-3	高分辨率熔解曲线法	171
4-4	定向诱导基因组局部突变技术	178
模块五	目的基因的遗传转化	182
5-1	PCR 法克隆目的基因全长	185
5-2	Gateway 技术构建表达载体	188
5-3	农杆菌真空渗入法遗传转化	193
5-4	水稻愈伤组织的遗传转化	197
5-5	RNAi 发夹式载体构建及转化	203
5-6	CRISPR/Cas9 技术构建表达载体	208

II 目 录

5-7	大规模突变体库的构建	214
模块六	蛋白质样品的制备、分离与鉴定	219
6-1	蛋白质样品的制备	222
6-2	蛋白质的定量	227
6-3	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质	231
6-4	双向电泳分离蛋白质	238
6-5	荧光标记差异分析凝胶电泳法分析差异表达蛋白质	253
6-6	蛋白质样品的质谱鉴定	264
模块七	目的蛋白质表达、纯化与检测	281
7-1	目的基因原核表达质粒的构建	284
7-2	谷胱甘肽 S-转移酶(GST)融合蛋白的表达与纯化	289
7-3	组氨酸标签融合蛋白的表达与纯化	293
7-4	麦芽糖结合蛋白(MBP)融合蛋白的表达与纯化	296
7-5	免疫印迹检测目的蛋白质的表达	300
模块八	蛋白质相互作用的研究	305
8-1	经典酵母双杂交	308
8-2	Pull-down 分析蛋白质相互作用	319
8-3	蛋白质亚细胞共定位	328
8-4	免疫共沉淀	333
*8-5	T7 噬菌体展示筛选技术	339
*8-6	细胞质酵母双杂交系统	349
模块九	激光扫描共聚焦显微镜的应用	355
9-1	激光扫描共聚焦显微镜的基本使用	358
9-2	花粉管内钙离子梯度分布的观察	363
9-3	动物细胞微丝微管细胞核共定位观察	369
9-4	激光扫描共聚焦显微镜检测荧光蛋白	372
模块十	生物信息学软件与数据库应用	377
10-1	常用分子生物学数据库检索	380
10-2	常用分子生物学软件使用	391
10-3	蛋白质结构及其相互作用预测	405
附录		409

模块一

目的基因的克隆及序列分析

- 1-1 RNA 的提取及检测
- 1-2 RT-PCR 方法扩增目的基因
- 1-3 cDNA 末端快速扩增法(RACE)
合成目的基因
- 1-4 目的基因的克隆
- 1-5 目的基因的序列测定及初步分析
- 1-6 cDNA 文库的构建及目的基因的
筛选
- 1-7 mRNA 差别显示克隆差异表达
基因
- 1-8 电子克隆法获得目的基因
- 1-9 化学合成法获得目的基因

模块实验目的与流程图



模块实验目的

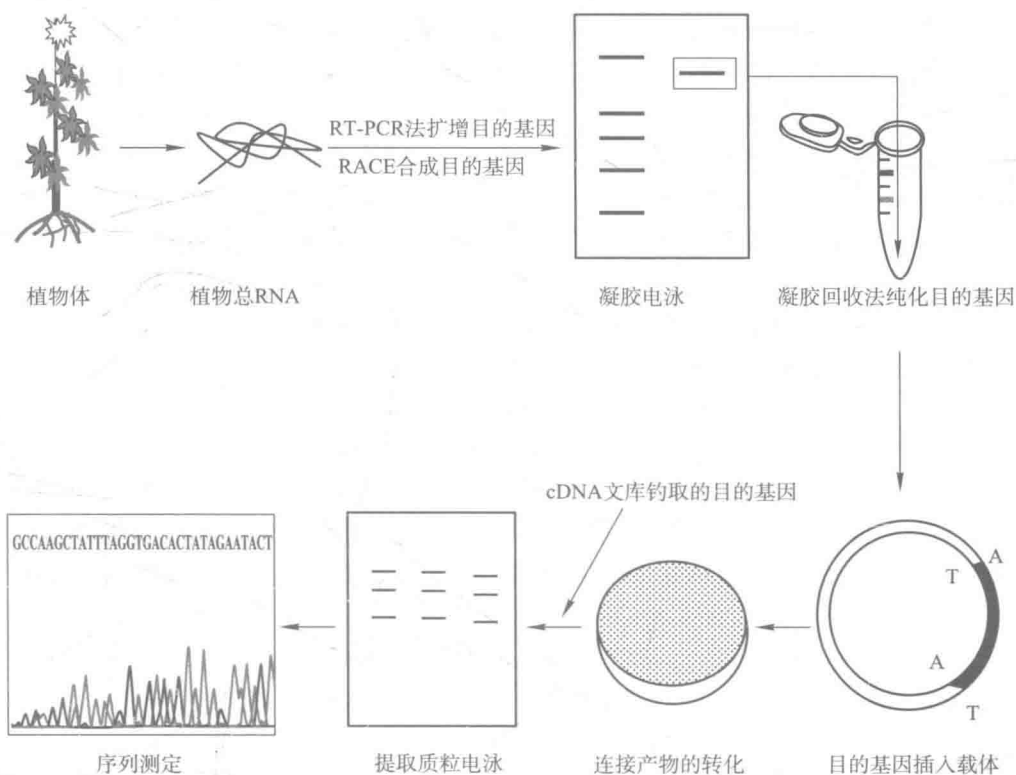
基因是染色体上具有一定功能的核苷酸序列。生物的生长发育是在多种代谢和生理过程基础上发生的基因在时空上表达的综合现象,分离潜在的各种有价值的基因并深入研究其表达机理,对阐释生命现象的分子本质具有重要意义。因此克隆基因并发展与之相关的研究技术已引起人们的关注。

目的基因的分离包括以下几种方法:

1. 利用网络数据库,根据不同物种中目的基因的同源性设计引物,通过 RT-PCR 方法获得全长基因;
2. 构建 cDNA 文库,利用目的基因片段制备的探针钓取全长基因;
3. 通过 RACE (rapid amplification of cDNA end, cDNA 末端快速扩增法) 获得全长基因;
4. 通过物理、化学或生物方法引起某一基因失活或过量表达,产生突变体,然后找出突变体文库和野生型文库中的差异,分离目的基因;
5. mRNA 差别显示技术分离克隆目的基因;
6. 电子克隆获得目的基因及化学合成目的基因等。

本模块实验主要介绍 RT-PCR 法、cDNA 文库法、RACE 分离克隆目的基因的基本原理与具体操作步骤,同时也包括目的基因与载体的连接、连接产物的转化、重组体的鉴定与筛选、碱裂解法提取质粒 DNA 和序列分析等系列实验。另外,本模块也将简要介绍 mRNA 差别显示技术、电子克隆及化学合成法获得目的基因的主要步骤。

模块流程图



1-1 RNA 的提取及检测

RNA 的提取对分子生物学的研究至关重要。纯度高、完整性好的 RNA 可用于 Northern 杂交、荧光定量 PCR 检测、mRNA 纯化、cDNA 文库的构建及 RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction, 反转录聚合酶链反应) 等实验。RNA 主要存在于细胞质中, 其中 mRNA 占总 RNA 的 1% ~ 5%。

不同生物(植物、动物、微生物)的总 RNA 提取方法有所不同; 不同种类或同一种类生物的不同组织因其细胞所含成分不同, 分离总 RNA 的方法也存在差异。因此, 在提取 RNA 过程中必须参照文献和经验建立相应的提取方法, 同时, 提取过程中应考虑去除多糖、蛋白质及多酚类物质等杂质。

核酸分子在琼脂糖凝胶中泳动时有电荷效应和分子筛效应。RNA 分子在 pH 高于等电点的溶液中带负电荷, 在电场中向正极移动。核酸中的碱基因含有共轭的苯环结构而具有紫外吸收特性, 核酸的最大紫外吸收波长为 260 nm, 而蛋白质的最大紫外吸收波长为 280 nm, 可利用此特性对核酸进行含量及纯度的检测。



实验目的

了解植物总 RNA 提取和凝胶电泳检测的基本原理以及实验过程中应用到的各种提取试剂的功能; 掌握提取植物总 RNA 及凝胶电泳检测总 RNA 的方法; 掌握 RNA 浓度测定的原理与方法; 掌握紫外 - 可见分光光度计的使用。



实验原理

RNA 极易降解, 要获得完整的 RNA, 必须最大限度地抑制提取过程中内源及外源核糖核酸酶 (RNase) 对 RNA 的降解。硫氰酸胍 - 酚 - 氯仿法抽提 RNA 的基本原理是: 高浓度强变性剂硫氰酸胍可以破坏细胞结构, 溶解蛋白质, 使 RNase 失活, 使核蛋白与核酸分离, 所以从细胞中释放出来的 RNA 不会被降解。通过苯酚和氯仿等有机溶剂处理可以去除蛋白质得到纯化、均一的总 RNA。硫氰酸胍与 β - 巯基乙醇共同作用可以更好地抑制 RNase 活性。CTAB (hexadecyl trimethyl ammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵) 是一种阳离子去污剂, 可溶解细胞膜, 并与 RNA 形成复合物。该复合物在低盐溶液中是可溶的, 通过有机溶剂抽提去除蛋白质、多糖和酚类杂质后, 加入乙醇即可使核酸沉淀出来。

甲醛与谷氨酸残基的单亚氨基基团形成不稳定的碱基配对, 这些配对可以阻止 RNA 链内碱基配对使 RNA 维持变性状态。当缓冲液或凝胶中有甲醛时, 更有利于 RNA 稳定地维持变性状态。由于变性消除了单链 RNA 的二级结构, 使 RNA 在琼脂糖凝胶中电泳时迁移率与其大小的对数成正比。有溴化乙锭存在时, 紫外灯下可以清楚地观察到 28S rRNA 和 18S rRNA, 有时还能看到一条由 tRNA 和 5S rRNA 组成的迁移较快的条带。如果提取的 RNA 完整性较好, 28S rRNA 的亮度应当是 18S rRNA 亮度的 1.5 ~ 2.0 倍, 且这两条带没有弥散现象。一般情况下, mRNA 是不可见的, 除非上样过量。

不同物质由于分子结构不同, 其吸收光谱也各不相同。分光光度法是用来鉴定物质性质及含量的技术, 其理论依据是 Lambert-Beer 定律。RNA 提取后往往需要对其浓度进行测定, 以便于进行定量分析。对于电泳效果良好的 RNA 样品可用紫外分光光度法进行浓度测定。由于提取的 RNA 样品在 260 nm 和 280 nm 处各有一个吸收峰, 可用紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 两个波长处的吸光度, 然后按 A_{260} 为 1 时 (相当于 40 $\mu\text{g/mL}$ 单链 RNA) 计算样品含量。260 nm 和 280 nm 读数比值 (A_{260}/A_{280}) 可反映核酸的纯度, RNA 纯品的 A_{260}/A_{280} 值为 2.0, 若样品中有蛋白质或酚类污染, A_{260}/A_{280} 将明显低于此值。



实验准备

1. 仪器设备

微量移液器(2 μL ; 20 μL ; 100 μL ; 200 μL ; 1 000 μL), 低温离心机, 琼脂糖凝胶电泳系统, 凝胶成像系统, 制冰机, 恒温金属浴, 研钵, 台式摇床, 1.5 mL 离心管, 磁力搅拌器, 微波炉, 紫外-可见分光光度计(CARY-UV 50 Bio, VARIAN), 漩涡振荡器, 比色杯, 超微量分光光度计(Implen NanoPhotometer® P330)。

2. 实验材料

新鲜幼嫩植物组织, 如叶、花瓣、果实、种子、根、表皮等。

3. 试剂

(1) Trizol RNA 提取液: 0.8 mol/L 盐酸胍, 0.4 mol/L 硫氢酸铵, 0.1 mol/L 醋酸钠(pH 5.0), 5% (V/V) 甘油, 38% (V/V) Tris- 饱和酚。

(2) CTAB 抽提液: 2% CTAB (W/V), 1.4 mol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸)(pH 8.0), 100 mmol/L Tris (pH 8.0)。

(3) CTAB 提取缓冲液: 1.4 mol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA (pH 8.0), 100 mmol/L Tris (pH 8.0)。

(4) pBIOZOL 植物总 RNA 提取试剂: 从北京博迈斯科技发展有限公司购买。

(5) 10 $\times$ MOPS 缓冲液[3-(*N*-吗啉代)丙烷磺酸, 3-(*N*-morpholino) propane sulfonic acid]: 0.2 mol/L MOPS, 50 mmol/L 醋酸钠, 10 mmol/L EDTA。

(6) RNA 上样缓冲液: 62.5% (V/V) 去离子甲酰胺, 16% (V/V) 10 $\times$ MOPS, 22% (V/V) 甲醛。

(7) 电泳缓冲液: 用无菌水稀释 10 $\times$ MOPS, 使终浓度为 1 $\times$ MOPS。

(8) 其他试剂: PVP (polyvinyl pyrrolidone; 聚乙烯吡咯烷酮), 琼脂糖, 1 mg/mL 溴化乙锭 (EB, ethidiumbromide), 溴酚蓝上样缓冲液, 甲醛, β -巯基乙醇 (β -ME, β -mercaptoethanol), 氯仿, 异戊醇, 75% (V/V) 乙醇, 6 mol/L LiCl, 无水乙醇, 2.4 mol/L NaCl, 异丙醇, 双蒸水。



实验方法

1. 利用 Trizol RNA 提取液提取 RNA (实验材料为芜菁)

(1) 于 1.5 mL 离心管中加入 1 mL Trizol RNA 抽提液, 并加入 30 μL β -巯基乙醇和少许 PVP。

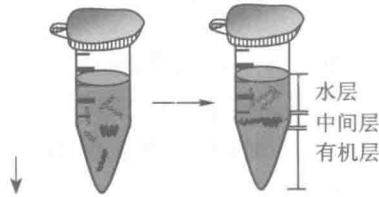


(2) 取 0.5 ~ 2 g 植物材料放入预冷研钵, 加入液氮快速研磨至粉末状。将粉末加到含有抽提液的离心管中, 振荡混匀 5 min^{*1}。



*1 研磨应迅速, 这样可以防止 RNA 降解。研钵和研棒应事先预冷, 可以防止研磨时样品融化粘到研钵壁上, 造成 RNA 的降解。

(3) 加入 350 μL 氯仿 / 异戊醇 (24 : 1, V/V), 振荡混匀 5 min。将离心管放入冷冻离心机, 调节离心机温度至 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 g 离心 15 min。离心结束后, 小心取出离心管。



(4) 取上清液于一新管中^{*2-3}, 加入等体积氯仿 / 异戊醇, 振荡混匀 5 min。将离心管放入冷冻离心机, 调节离心机温度至 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 g 离心 10 min。



^{*2} 尽量吸取上清, 不要搅动中间层。不要吸入下层的有机层, 否则会影响核酸的沉淀及得率。

^{*3} 为了避免吸到有机层, 可以留少许上清液于离心管中。

(5) 小心吸取上清加到一新的离心管中。

(6) 加入 150 μL 2.4 mol/L NaCl 和等体积异丙醇, 混匀。室温放置 10 min^{*4}。

^{*4} 对于某些样品, 如果利用异丙醇沉淀 RNA 的效果不好, 可以改用不同体积的 4 mol/L、6 mol/L 或 8 mol/L LiCl 在冰浴中沉淀 RNA。

(7) 将离心管放入冷冻离心机, 调节离心机温度至 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 g 离心 10 min, 弃上清。



(8) 加入 500 μL 70% 乙醇洗涤沉淀, 12 000 g 离心 5 min^{*5}。

^{*5} 利用 70% ~ 75% 乙醇洗涤沉淀时要将沉淀弹起以便于充分洗涤。

(9) 弃上清, 空气干燥沉淀 15 min, 加 20 μL 无菌水溶解沉淀^{*6}。



^{*6} 注意弃上清应小心操作, 不要丢弃沉淀。另外, RNA 不应过分干燥, 否则影响样品的充分溶解。

(10) 取 1 ~ 2 μL RNA 溶液进行琼脂糖凝胶电泳检测。剩余样品于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2. 利用 CTAB 提取液提取 RNA (实验材料为白桦)

(1) 在 1.5 mL 离心管中加入 1 mL CTAB 抽提缓冲液和 50 μL β - 巯基乙醇, 置于冰上备用。

(2) 取植物材料放入预冷研钵, 加入液氮快速研磨至粉末状。将 0.1 ~ 0.5 g 粉末加到含有 CTAB 抽提缓冲液的离心管中, 振荡混匀。冰上放置 10 ~ 15 min。

- (3) 将离心管放入冷冻离心机,调节离心机温度至 4℃,12 000 g 离心 1 min。
 - ↓
 - (4) 弃上清,加入 1 mL CTAB 抽提缓冲液和 50 μL β-巯基乙醇重新悬浮沉淀,冰上放置 10~15 min。离心弃上清。重复此操作 1~2 次直至离心后实验材料表面清晰平整,无黏稠感^{*7}。
 - ↓
 - (5) 向沉淀中加入 700 μL CTAB 抽提液和 1/10 体积的 β-巯基乙醇,漩涡振荡使其充分混匀。65℃保温 15 min。
 - ↓
 - (6) 加入等体积氯仿,振荡混匀,4℃ 12 000 g 离心 10 min。取上清加到新离心管中,重复此抽提步骤三次。
 - ↓
 - (7) 加入 1/2 体积的 6 mol/L LiCl 和 1/2 体积的无水乙醇,轻微颠倒混匀后置于冰浴中 10 min。
 - ↓
 - (8) 4℃ 12 000 g 离心 10 min。弃上清。加入 500 μL 70% 乙醇洗涤沉淀,4℃ 12 000 g 离心 5 min。
 - ↓
 - (9) 弃上清,空气干燥沉淀,加 20 μL 无菌水溶解沉淀。
 - ↓
 - (10) 取 1~2 μL RNA 溶液进行琼脂糖凝胶电泳检测。剩余样品于 -80℃ 保存。
3. 利用 pBIOZOL 提取液提取 RNA (实验材料为杨树)^{*8}
- (1) 在 1.5 mL 离心管中加入 0.5 mL 预冷的 pBIOZOL 提取液。
 - ↓
 - (2) 用液氮快速研磨植物材料至粉末状。将约 0.1 g 粉末加到含有抽提液的离心管中,振荡混匀,室温放置 5 min。
 - ↓
 - (3) 4℃ 12 000 g 离心 10 min。
 - ↓
 - (4) 取上清液加到一新管中。加入 100 μL 5 mol/L NaCl,混匀。加入 300 μL 氯仿,振荡混匀 5 min。
 - ↓
 - (5) 4℃ 12 000 g 离心 10 min。小心吸取上清加到一新的离心管中。加入 400 μL 异丙醇,混匀。室温放置 10 min。
 - ↓
 - (6) 4℃ 12 000 g 离心 10 min,弃上清。
 - ↓
 - (7) 加入 500 μL 70% 乙醇洗涤沉淀,4℃ 12 000 g 离心 5 min。
 - ↓
 - (8) 弃上清,空气干燥沉淀 15 min,加 20 μL 无菌水溶解沉淀。
 - ↓

^{*7} 木本植物白桦成熟叶片中含有大量多糖、酚类化合物、蛋白质和某些尚无法确定的次级代谢产物,这些物质的含量远远高于幼嫩叶片及其他的一般植物。RNA 沉淀中含有的大量多糖等次生代谢物,如无法去除,所形成的黏稠胶状物会使后续操作无法进行。此提取方法中,CTAB 抽提缓冲液中的研磨粉末在冰浴中保存后离心弃上清,可以有效地去除白桦中的多糖和多酚等次生代谢产物并防止 RNase 的污染。

^{*8} 本方法可以充分抑制实验材料中的多酚褐化,提高 RNA 产率;同时可以最大限度地去除蛋白质、多糖及次生代谢物质,避免与 RNA 共沉淀。

(9) 取 $1 \sim 2 \mu\text{L}$ RNA 溶液进行琼脂糖凝胶电泳检测。剩余样品于 -80°C 保存。

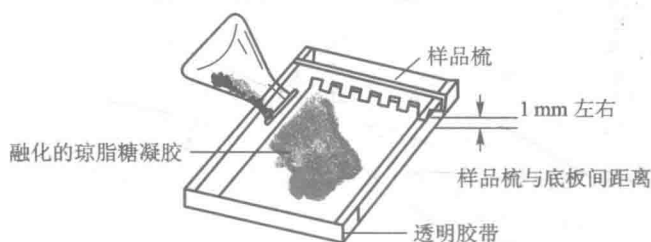
4. 甲醛凝胶电泳检测总 RNA 提取质量

(1) 称取 0.16 g 琼脂糖, 加入 18 mL 无菌水和 $2 \text{ mL } 10\times \text{MOPS}$ 缓冲液。微波炉内熔化。



(2) 等凝胶的温度降到约 65°C 时, 加入 1 mL 甲醛^{*9} 和 $2 \mu\text{L}$ 溴化乙锭^{*10}, 混匀。

(3) 用透明胶带封好胶板的两端。将温热的琼脂糖凝胶倒入放置了样品梳的胶板中 (注意不要出现气泡); 样品梳距底板 $0.5 \sim 1.0 \text{ mm}$; 凝胶厚度为 $3 \sim 5 \text{ mm}$ 。

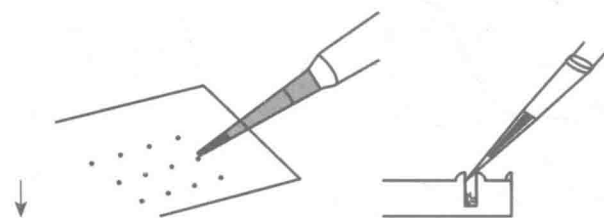


(4) RNA 样品变性: 在离心管中加入 $3.2 \mu\text{L}$ RNA 上样缓冲液和 $1.3 \mu\text{L}$ RNA 样品, 混合。短暂离心。

(5) 65°C 保温 5 min ^{*11}, 冰上冷却后, 瞬时离心 10 s 。

(6) 在凝胶完全凝固后 (室温下 $30 \sim 40 \text{ min}$), 去除胶带, 将胶板移至装有 $1\times \text{MOPS}$ 的电泳槽中, 轻轻地拨去样品梳, 使缓冲液没过胶面约 1 mm ^{*12}。

(7) 点样: 将冷却的变性 RNA 样品与 $1 \mu\text{L}$ 溴酚蓝上样缓冲液混合后, 用微量移液器将混合液慢慢加到上样孔中。



(8) 电泳: 盖上电泳槽并通电, 使 RNA 向阳极移动。采用适当电压进行电泳 [$V = \text{正负极之间的长度 (cm)} \times 5 \text{ V/cm}$]^{*13}。

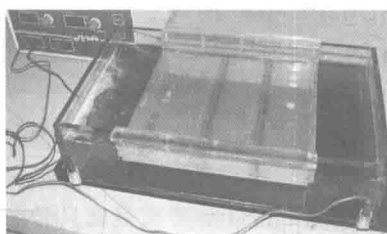
*9 甲醛可以阻止 RNA 链内的碱基配对而使 RNA 维持变性状态。凝胶中的甲醛可以稳定 RNA 的这种变性状态。变性的 RNA 可以消除分子内的二级结构, 以相对分子质量大小进行迁移。由于甲醛具有刺激性气味, 制备凝胶应在通风橱中进行。

*10 目前, 为了降低凝胶染料的毒性, 实验室可使用 GelGreen、GelRed、GoldView 和 SYBR[®] Safe DNA 凝胶染料染色凝胶, 具体的染色方法参看相应的染料说明书。

*11 65°C 加热可打开 RNA 分子中的二级结构。

*12 用双手拔掉样品梳, 以免点样孔不规则影响电泳结果。

*13 影响电泳速度的主要因素包括带电颗粒的形状、大小及所带净电荷数量。一般情况下, 颗粒带净电荷越多、直径越小并近于球形, 在电场中泳动速度越快。另外, 电场强度及支持介质也影响电泳速度。理论上, 电压越大电泳速度越快, 但是凝胶电泳的电场强度一般不超过 5 V/cm 。核酸的凝胶电泳常使用琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶。通过这两种介质的浓度变化可以分离不同相对分子质量的核酸片段。琼脂糖凝胶可以分离大片段的核酸分子; 聚丙烯酰胺凝胶的孔径较小, 分离小片段核酸效果较好。



(9) 电泳结果观察:当溴酚蓝在凝胶中移出适当距离后,切断电流,取出凝胶,利用凝胶成像仪检查电泳结果(图 1-1-1)。

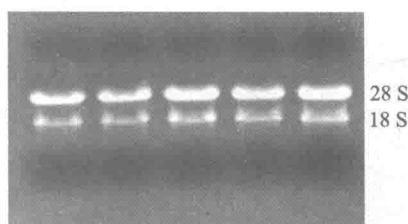
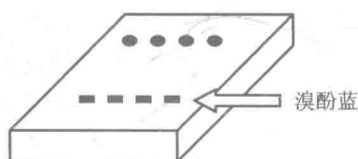
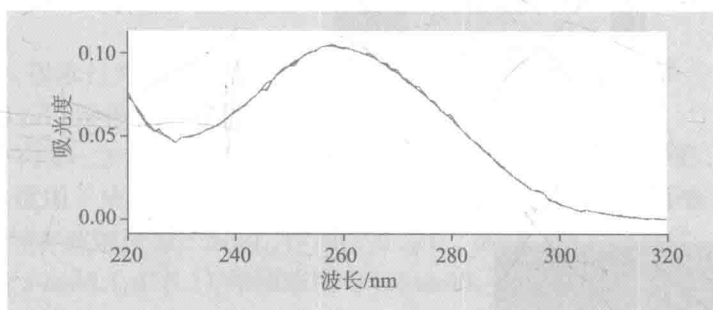


图 1-1-1 芜菁块根皮总 RNA

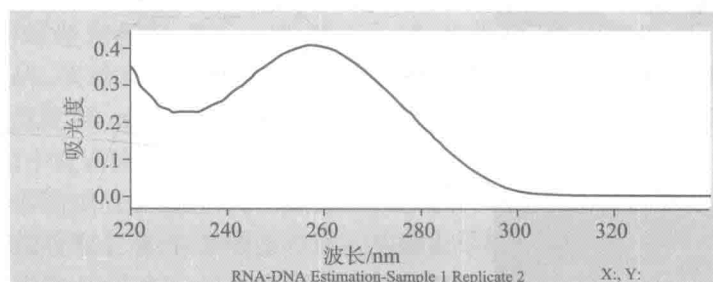
5. RNA 样品浓度的测定

方案一 利用紫外-可见分光光度计(CARY-UV 50 Bio, VARIAN)测定 RNA 样品的浓度

(1) 向石英比色杯中加入 199 μL 无菌去离子水,放入分光光度计中,选用 DNA/RNA 程序,设定波长为 220 ~ 320 nm 进行基线扫描(下图)。调零。



(2) 吸取 1 μL RNA 样品加入比色杯中,混匀后放入分光光度计中进行扫描,记录 260 nm 和 280 nm 处的 OD 值及比值^{*14}。



Collection time 05-11-11 21:19:52

Sample	A[260]	A[280]	Ratio	SD	%RSD	Mean
Sample 1	0.407 7	0.193 8	2.104 2			
	0.406 5	0.193 9	2.096 1			
	0.404 1	0.190 9	2.116 8	0.010 5	0.50	2.105 7

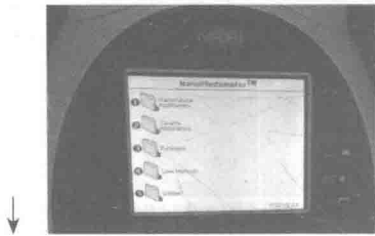
*14 碱基的共轭苯环结构使核酸具有紫外吸收特性,DNA 和 RNA 的紫外光吸收最大波长为 260 nm,而蛋白质则为 280 nm。利用此特性可对核酸进行含量及纯度检测。比较而言,核苷酸在 260 nm 的光吸收值最大,其次是单链 DNA 或 RNA,而双链 DNA 最小,这是由于碱基在疏水环境中的堆积造成的;双链 DNA 的紫外吸收值低于单链 DNA 的特性被称为减色效应。反之,单链 DNA 相对于双链 DNA 具有增色效应;双链 DNA 加热变性过程中,会出现增色效应。

(3) 根据 OD₂₆₀ 处的吸光度计算 RNA 样品的浓度 (μg/μL): OD₂₆₀ × 40 × 稀释倍数 / 1 000。如果测得 OD₂₆₀ 为 0.4, 稀释倍数为 200 倍, 则 RNA 的浓度为:

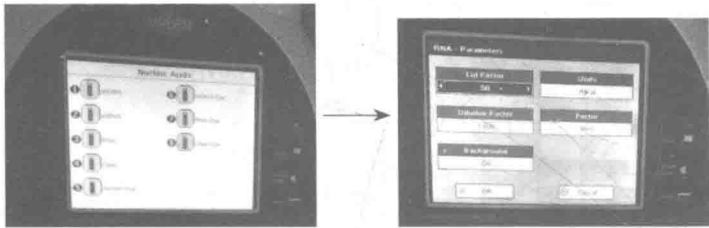
$$OD_{260} \times 40 \times \text{稀释倍数} / 1\,000 = 0.4 \times 40 \times 200 / 1\,000 = 3.2 (\mu\text{g}/\mu\text{L})$$

方案二 利用超微量分光光度计 (Implen NanoPhotometer® P330) 测定 RNA 样品的浓度^{*15}

(1) 打开仪器, 在 “NanoPhotometer™” 菜单中选择 “NanoVolume Applications” 程序。



(2) 进入界面后, 选择 “Nucleic Acids” 选项。在此界面选择 RNA 选项。进入界面后, 选择 “Lid Factor 50” 选项, 按 “sample” 按钮 (即 OK 键) 进入下一界面。



(3) 在机器上安放微量检测平台, 在平台上方中央点样区滴加 1 μL 灭菌的去离子水, 盖上 Lid 50 IMPLLEN 0.2 mm 盖子。按 “blank” 按钮调零。



(4) 取下盖子, 用吸水纸将盖子内部及点样区的水擦干。在点样区滴加 1 μL RNA 样品, 盖盖子。按 “sample” 按钮测定 RNA 浓度。在仪器的显示屏上可以直接读取 RNA 样品的浓度 (ng/μL)。



*15 利用此法测定的主要优点: 检测所需样品量最低只需 0.3 μL; 对于多数样品而言无需稀释即可直接测定; 仪器使用方便快速, 开机无需预热, 直接测量; 仪器体积小, 设备便携, 完全可以满足现场检测的需求; 仪器自带漩涡振荡器, 保证样品的均匀性; 具有两种检测模式, 既可使用常规比色皿模式, 亦可选择微量检测平台模式。



注意事项与建议

1. RNase 的特点

RNase 广泛存在于实验器皿、仪器、试剂、汗液及唾液中。RNase 活性稳定,耐热、耐酸碱,发挥活性时不需要辅助因子存在,二价离子螯合剂不能抑制其活性。

2. RNA 提取过程中应创造无 RNase 的环境

(1) 去除外源 RNase 的污染:实验过程中应戴口罩、手套,并经常更换,以避免手、唾液所携带的 RNase 造成污染。玻璃器皿用水清洗干净后应高压灭菌。尽量使用一次性塑料制品,并高压灭菌。

(2) 去除内源 RNase 的污染:RNase 在细胞破碎时被释放出来,提取过程中应尽早抑制细胞内 RNase 活性。由于 RNase 是一种蛋白质,酚和氯仿等去除蛋白质的试剂可非特异地抑制 RNase 活性。

(3) 盐酸胍和异硫氰酸胍等胍类是一种最有效的 RNase 抑制剂。提取 RNA 时,如果缓冲液中含有此类试剂,则可在破碎细胞的同时使 RNase 失活。异硫氰酸胍与 β - 巯基乙醇(破坏蛋白质的二硫键)合用,使 RNase 被最大限度地抑制。

(4) DEPC(diethyl pyrocarbonate, 焦碳酸二乙酯)是很强的 RNase 抑制剂,与蛋白质中组氨酸的咪唑环结合以使蛋白质变性。无法用高温烘烤的材料可用 DEPC 处理(0.1% DEPC 溶液过夜浸泡后用蒸馏水冲净即可。试剂用 DEPC 处理后煮沸 15 min 或高压灭菌以除去残存的 DEPC)。如果不彻底地去除 DEPC,将导致嘌呤羟甲基化从而破坏 mRNA 的活性。另外,配制含有 Tris 的试剂不能用 DEPC 处理,因为 DEPC 在 Tris 溶液中迅速分解。

(5) 若不能有效防止 RNase 污染,易导致提取的 RNA 样品降解(图 1-1-2)。

3. RNA 提取过程中沉淀液及助沉试剂的选用:一般用异丙醇、无水乙醇和 LiCl 溶液作为沉淀剂

(1) 异丙醇:加入与上清液等体积的异丙醇即可快速沉淀 RNA。此法适用于浓度低、体积大的 RNA 样品的沉淀。应用时经常加入 NaCl(储存液浓度为 5 mol/L,作用浓度为 0.2 mol/L)或 NaAc[储存液浓度为 3 mol/L(pH 5.2),作用浓度为 0.3 mol/L]作为助沉剂。

(2) 无水乙醇:加入上清液体积 2~2.5 倍的水乙醇即可沉淀 RNA。应用时经常加入终浓度为 0.2 mol/L NaCl 或终浓度为 0.3 mol/L(pH 5.2) NaAc 作为助沉剂。

(3) LiCl 溶液:可直接沉淀 RNA,不用加入其他盐类助沉。LiCl 在使用时经常配制成 8 mol/L 或 6 mol/L 的母液,作用浓度为 0.5~2.5 mol/L,实验室经常使用的作用浓度为 2.5 mol/L。利用 LiCl 沉淀 RNA 时,加入了 LiCl 的混合物至少应在 -20°C 沉淀 30 min。

4. 实验中应该注意的其他问题

(1) 研磨组织应迅速进行。为防止褐化现象,可使用一定量的 PVP 以防止酚类和醌类化合物的产生。

(2) 仔细吸取上清,在勿吸蛋白质的基础上尽量避免核酸的损失。

(3) 在提取 RNA 的全过程中都应该避免 RNase 污染。

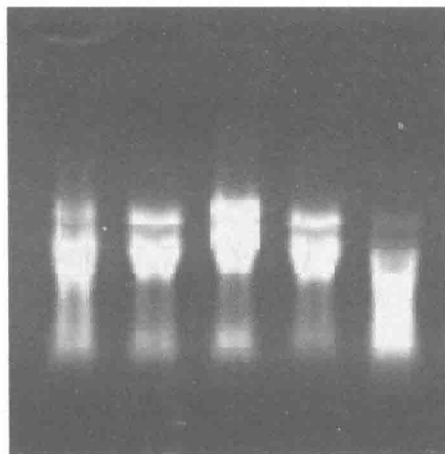


图 1-1-2 降解的草原龙胆花器官总 RNA