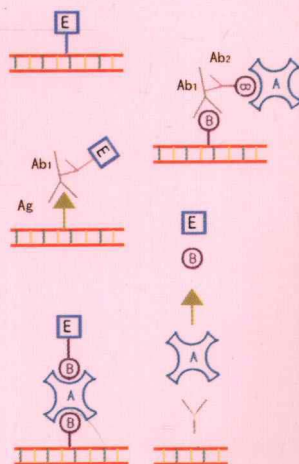




全国高等医药院校医学检验专业规划教材

分子诊断学 实验指导



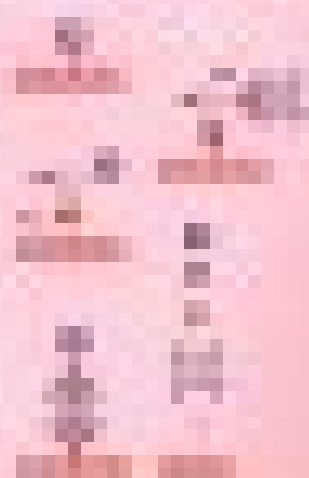
FENZI
ZHENDUAN XUE
SHIYAN ZHIDAO

主编 高基民

 中国医药科技出版社

● 全国高等医药类院校医学检验专业规划教材

分子诊断学 实验指导



第2版
2006年11月第1次印刷
16开 320页 23.50元

主编 唐增智

中国医药出版社

全国高等医药院校医学检验专业规划教材

分子诊断学实验指导

主 编 高基民
副主编 吴英松 李 艳 唐冬生 曹颖平
编 委 (以姓氏笔画为序)

吴英松 (南方医科大学)

应斌武 (四川大学)

张亚莉 (贵阳医学院)

张红艳 (河北工程大学)

张效云 (河北北方学院)

李 艳 (吉林医药学院)

杨清玲 (蚌埠医学院)

金 晶 (温州医学院)

唐冬生 (佛山科学技术学院)

秦 雪 (广西医科大学)

袁丽杰 (哈尔滨医科大学)

高基民 (温州医学院)

曹颖平 (福建医科大学)

黄 彬 (中山大学)

蒋显勇 (湘南学院)

魏 军 (宁夏医科大学附属医院)

内 容 提 要

本书是全国高等医药院校医学检验专业规划教材之一,是《分子诊断学》第2版的配套教材。全书分9章,共33个实验。按核酸的分离与纯化、聚合酶链反应、核酸鉴定与分析、基因工程综合实验和其他相关分子诊断技术顺序编写,实验内容涵盖最基本的分子生物学操作技术、常用的分子生物学实验技术及分子生物学技术在临床医学检验中的应用实验技术,尚有部分较为实用的分子检验技术在附录中详细介绍。

本书可供高等院校医学本科、专科学生实验使用,也可供教师及从事临床检验工作和医学研究的技术人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

分子诊断学实验指导/高基民主编. —北京:中国医药科技出版社,2010.2
全国高等医药院校医学检验专业规划教材

ISBN 978 - 7 - 5067 - 4534 - 5

I. ①分… II. ①高… III. ①分子诊断学 - 实验室诊断 - 医学院校 - 教材
参考资料 IV. ①R446

中国版本图书馆CIP数据核字(2009)第239449号

美术编辑 陈君杞

版式设计 郭小平

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲22号

邮编 100082

电话 发行:010-62227427 邮购:010-62236938

网址 www.cmstp.com

规格 787×1092mm¹/₁₆

印张 8

字数 147千字

版次 2010年2月第1版

印次 2010年2月第1次印刷

印刷 北京地泰德印刷有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978 - 7 - 5067 - 4534 - 5

定价 16.00元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

全国高等医药院校医学检验专业规划教材 建设委员会

主任委员 丛玉隆（解放军军医进修学院）

副主任委员 （以汉语拼音为序）

樊绮诗（上海交通大学）

胡丽华（华中科技大学）

刘新光（广东医学院）

吕建新（温州医学院）

王 前（南方医科大学）

吴忠道（中山大学）

姚 智（天津医科大学）

尹一兵（重庆医科大学）

委 员 （以汉语拼音为序）

陈育民（河北工程大学）

洪秀华（上海交通大学）

胡建达（福建医科大学）

胡翊群（上海交通大学）

李咏梅（北华大学）

刘 辉（大连医科大学）

刘成玉（青岛大学）

吕世静（广东医学院）

王 辉（新乡医学院）

徐克前（中南大学）

姚群峰（湖北中医学院）

张进顺（河北北方学院）

吴俊英（蚌埠医学院）

郑铁生（江苏大学）

秘 书 长 王应泉（中国医药科技出版社）

办 公 室 解秀兰（中国医药科技出版社）

浩云涛（中国医药科技出版社）

王宇润（中国医药科技出版社）

出版说明

全国高等医药院校医学检验专业规划教材是由全国高等医药院校医学检验专业规划教材建设委员会组织规划,全国数十所医药院校积极参与编写和使用,中国医药科技出版社出版的全国性医学检验专业教材。本套教材是国内第一套四色印刷的医学检验专业教材,自2004年出版以来,由于其新颖独到的编排设计、图文并茂的四色印刷、与临床紧密结合的实用性,深受广大教师和学生的欢迎,获得了良好的市场效应,为我国的检验专业本科教育做出了重要贡献。

为适应我国医学检验专业本科教育发展的需要,全国高等医药院校医学检验专业规划教材建设委员会在调研和总结一版教材质量和使用情况的基础上,组织上海交通大学医学院、中山大学医学院、华中科技大学同济医学院、中南大学湘雅医学院、南方医科大学、温州医学院、青岛大学医学院、重庆医科大学、新乡医学院等数十所院校的教师共同进行第二轮规划教材的编写修订工作。

第二轮规划教材的编写修订工作,坚持紧扣教育部、卫生部对医学检验专业本科教育的培养目标,以新的医学检验专业教育纲要为基础,以临床实际需求为指导,着重强调培养目标与用人要求相结合的原则,注重体现“三基”(基本理论、基础知识和基本技能)、“五性”(思想性、科学性、先进性、启发性和适用性)。在继承上一版教材优点的基础上,有以下创新:①新增补《临床检验仪器》和六本配套实验指导教材,让本套教材体系更趋完善;②理论课教材每章前保留学习要点,部分教材章后增加病例分析和小结,加强系统性;③原中英文或英中文对照升级为汉英或英汉名词索引,便于查找;④新增大量彩图,版面设计更美观、更活泼、更趋人性化;⑤实验指导更注重全面提高学生动手能力和综合分析解决问题的能力,所选实验更新、更全、更实用。

该套教材主要供全国高等医药院校医学检验及相关专业的学生使用。全套教材书目如下:

1. 临床检验基础(第2版)
2. 临床检验基础实验指导★
3. 临床生物化学检验(第2版)

4. 临床生物化学检验实验指导 (第2版)
5. 临床血液学检验 (第2版)
6. 临床血液学检验实验指导★
7. 临床微生物学检验 (第2版)
8. 临床微生物学检验实验指导★
9. 临床免疫学检验 (第2版)
10. 临床免疫学检验实验指导 (第2版)
11. 临床寄生虫学检验 (第2版)
12. 临床寄生虫学检验实验指导★
13. 分子诊断学 (第2版)
14. 分子诊断学实验指导★
15. 临床输血检验 (第2版)
16. 临床输血检验实验指导★
17. 临床实验室管理 (第2版)
18. 临床检验仪器★

注：★表示本轮规划教材建设的新增品种。

全国高等医药院校医学检验专业规划教材建设委员会

2010年1月

目 录

第一章 核酸的分离纯化与鉴定	(1)
一、概述	(1)
二、核酸分离制备的总原则	(1)
三、核酸提纯的主要步骤	(2)
四、核酸制备的影响因素	(2)
五、真核基因组 DNA 的分离纯化与测定	(3)
六、原核生物基因组 DNA 的分离纯化与鉴定	(3)
七、真核生物 RNA 的分离纯化与鉴定	(6)
实验一 蛋白酶 K - 酚抽提法	(7)
实验二 人血白细胞 DNA 的提取 (NaI 法)	(11)
实验三 小样本中基因组 DNA 的分离	(18)
实验四 碱裂解法提取质粒 DNA 的分离	(20)
实验五 聚乙二醇 - 氯化镁沉淀法纯化质粒 DNA	(23)
实验六 异硫氰酸胍 - 酚 - 三氯甲烷一步法制备组织和细胞中的总 RNA	(25)
实验七 氯化锂 - 尿素法制备总 RNA	(28)
实验八 Trizol 专用试剂分离 RNA	(29)
实验九 磁珠分离 mRNA	(31)
第二章 聚合酶链反应	(34)
一、PCR 原理	(34)
二、PCR 反应体系	(35)
实验十 大肠杆菌的 PCR 检测	(36)
实验十一 流感病毒的 RT - PCR 检测	(38)
实验十二 乙型肝炎病毒 (HBV)	(41)
第三章 分子克隆	(45)
实验十三 DNA 的限制性酶切反应	(46)
实验十四 DNA 片段的回收	(47)
实验十五 DNA 的重组连接	(48)
实验十六 感受态细胞的制备和转化	(51)
实验十七 重组质粒的筛选与鉴定	(53)
实验十八 外源基因的诱导表达与检测	(56)

第四章 核酸分子杂交技术	(63)
实验十九 斑点及狭缝印迹杂交	(64)
实验二十 荧光原位杂交	(66)
第五章 DNA 测序技术	(70)
实验二十一 DNA 序列测定——末端终止法	(70)
实验二十二 DNA 序列的自动化测序——化学降解法	(73)
第六章 蛋白质组学研究技术	(77)
实验二十三 双向凝胶电泳技术分析胃癌蛋白质组	(78)
实验二十四 免疫印迹法检测细胞中 Bcl-2 蛋白水平	(80)
第七章 生物芯片	(84)
实验二十五 乙型肝炎病毒基因分型芯片	(85)
实验二十六 液相芯片技术定量测定人血清 AFP 和 CEA 含量	(88)
第八章 其他分子诊断技术	(92)
实验二十七 PCR - 限制性片段长度多态性分析 (PCR - RFLP)	(93)
实验二十八 PCR - 单链构象多态性分析 (PCR - SSCP)	(96)
实验二十九 等位基因特异性寡核苷酸杂交 (PCR - ASO)	(99)
实验三十 甲基化特异性基因扩增	(101)
第九章 自主设计性实验	(105)
实验三十一 rhGM - CSF 的制备	(105)
实验三十二 HPV 的分型	(105)
实验三十三 MRSA 感染的诊断	(106)
附录	(107)
附录一 核酸和蛋白质数据	(107)
附录二 常用试剂的配制	(109)
附录三 常用词汇的中英文对照	(114)
参考文献	(116)

第一章 核酸的分离纯化与鉴定

核酸是以核苷酸为基本组成单位的重要生物大分子，最基本的功能是贮存并传递遗传信息。它是现代医学分子生物学的主要研究对象。核酸的分离纯化与鉴定是分子生物学检验技术研究重要的基础工作和最常见、最基本的技术，可为临床疾病的分子诊断提供准确判断的依据。

一、概述

细胞内的核酸有 DNA 和 RNA，它们均与蛋白质结合成核蛋白。DNA 与蛋白质结合成脱氧核糖核蛋白，RNA 与蛋白质结合成核糖核蛋白。真核生物的 DNA 分为二类：一类为染色体 DNA 位于细胞核内，约占 95%，分子量大，为双链线性分子；另一类为细胞器 DNA，存在线粒体或叶绿体等细胞器中，约占 5%，分子量小，为双链环状分子。原核生物染色体、质粒为双链环状 DNA。DNA 病毒中，DNA 的分子构型多种多样，有双链环状、双链线状、单链环状、单链线状等。在 RNA 病毒中，RNA 的分子构型有双链线状和单链线状的差异。DNA 分子的总长度在不同生物间差异很大，一般随生物的进化程度而增加。RNA 分子与 DNA 比要小得多，而且与生物进化无明显关系，在大多数生物体内均是单链线性分子，75% 存在于细胞质中，10% 在细胞核中，15% 在细胞器中。RNA 功能的多样性，决定了 RNA 的种类、大小和结构呈多样化。DNA 对碱性溶液相对稳定，RNA 对酸性溶液相对稳定，但过多的酸、碱均可导致二者的变性与降解。DNA 与 RNA 理化性质及细胞定位上的差异决定了二者的最适分离与纯化的条件是不同的。

细胞中核酸是与各种蛋白质结合在一起的。核酸的分离主要是指将核酸与蛋白质、多糖、脂肪等生物大分子分开。分离与纯化核酸的方法很多，各有特点。要根据实验材料的性质与量、待分离核酸的性质与用途来具体选择。各种商业化核酸提取试剂盒基本可以满足所有实验要求。

二、核酸分离制备的总原则

1. 保证核酸一级结构的完整性 因为遗传信息全部储存在核酸一级结构之内，完整的一级结构是核酸结构与功能研究的前提。一级结构还决定其高级结构的形式及和其他大分子结合的方式。

2. 尽量排除其他分子的污染，保证核酸的纯度 应尽量简化操作步骤，缩短操作时间。

三、核酸提纯的主要步骤

1. **细胞裂解** 核酸必须从细胞或其他生物物质中释放出来。通过机械作用、化学作用、酶作用等方法将细胞破碎。

2. **抽提分离** 去除与核酸结合的蛋白质、多糖、脂类等生物大分子。

3. **核酸纯化** 去除其他不需要的核酸、盐类、有机溶剂等杂质。

4. **核酸鉴定** 最常用紫外分光光度法检测核酸的浓度及纯度，此法只能用于测定核酸浓度大于 $0.25\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液。核酸中碱基有苯环结构，最大吸收峰在 260nm 。

(1) **纯度鉴定** 读取 A_{260} 和 A_{280} 光密度值。计算 A_{260}/A_{280} 比值。DNA 纯品 A_{260}/A_{280} 的比值一般为 1.8，低于 1.8 表明存在蛋白质或酚等杂质污染，需要进一步抽提。RNA 纯品的 A_{260}/A_{280} 的比值为 2.0，若比值较低，说明有残余蛋白质存在；比值太高，则提示 RNA 有降解。

(2) **浓度测定** 读取 A_{260} 光密度值。1 个 OD 值的光密度 (A) 大约相当于 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 的双链 DNA、 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 的单链 DNA 或 RNA、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 的单链寡聚核苷酸，以此来计算核酸样品的浓度。如双链 DNA ($\mu\text{g}/\text{ml}$) = A_{260} 光密度值 $\times 50 \times$ 稀释倍数。

荧光分光光度法测定浓度低的核酸溶液，可检测纳克 (ng) 级的 DNA。核酸本身不产生荧光，将荧光染料溴化乙锭嵌入核酸分子的碱基平面之间，形成荧光络合物，在紫外线照射下，发出橙红色荧光。荧光强度与核酸含量成正比。同时与标准液作比较，可计算核酸溶液的浓度。

采用琼脂糖凝胶电泳检测核酸的分子量与完整性，当样品中含核酸量不足 ($<0.25\mu\text{g}/\text{ml}$) 或含有其他能吸收紫外辐射成分妨碍 DNA 等的精确定量时，可利用嵌入 DNA 中的溴化乙锭分子受紫外光激发发射的荧光来进行测定。由于这种荧光的强度与 DNA 总量成正比，通过比较待测样品和一系列标准样品的荧光强度，可测出样品中 DNA 的含量，用这种方法可测出 $1 \sim 5\text{ng}$ 的 DNA。

四、核酸制备的影响因素

为了保持核酸的完整性和纯度，尽量避免各种因素对核酸破坏作用。因此，在实验过程中需注意减少下列因素对核酸的降解作用：①在操作过程中简化步骤，缩短时间；②化学因素，控制缓冲液的 pH4 ~ 10，过酸或过碱对核酸链中的磷酸二酯键均有破坏作用；③物理因素，机械剪切力包括剧烈的溶液振荡、搅拌，低渗溶液及反复冻融等引起 DNA 的降解，机械剪切作用主要危害的是大分子的线性 DNA，对小分子的环状 DNA 影响相对较小，长时间高温煮沸会破坏核酸分子中的化学键，常规操作温度为 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ ，此温度还可降低核酸酶的活性与反应速率，减少核酸的生物降解；④生物因素，各种核酸酶能消化核酸的磷酸二酯键，破坏核酸的一级结构，DNA 酶 (DNase) 需要 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 二价金属的激活，使用二价金属离子螯合剂乙二胺四乙酸 (EDTA)、柠檬酸盐，基本可抑制 DNA 酶的活性，RNA 酶 (RNase) 分布广泛、极易污染，

且耐高温、耐酸碱，不易灭活，所以生物降解是 RNA 提取过程的主要危害因素。

五、真核基因组 DNA 的分离纯化与测定

基因组（genome）是一个生物体的全部基因序列。人、动物、植物和真菌都属于真核生物。真核生物中的 DNA 是一种独特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，分布在细胞核内，外以核膜包裹。提取 DNA 时首先要使细胞呈分散状态，通过破碎细胞和核膜，将染色体释放出来，去除与 DNA 结合的蛋白质。

真核生物染色体 DNA 双链由氢键紧密相连，使潜在的反应基团隐藏在螺旋内部。碱基对外侧受磷酸和糖的保护，因其内部的碱基堆积力而相互作用进一步加强，使 DNA 在细胞内比在其他成分更具化学耐久性。尽管如此，高分子量 DNA 在物理上仍是易碎的，它在溶液中呈现长且弯曲的形态，容易发生随机卷曲，并因碱基堆积力和磷酸基团间的静电排斥力变得黏滞，容易受到吸液、振荡、搅拌等引起的剪切力作用而断裂。因此，基因组 DNA 容易以片段形式被获取。所需 DNA 分子的分子量越大，获得的难度也相应增加，大于 150kb 的 DNA 分子在常规分离方法中多被切断。

真核细胞的破碎常用的有超声波破碎法、匀浆法、液氮破碎法、低渗法等物理方法及蛋白酶 K 和去污剂温和处理法，后者温和裂解细胞可获得分子量大的 DNA。DNA 分离纯化的方法主要有酚抽提法、甲酰胺解聚法、玻棒缠绕法及各种快速方法。可根据不同的实验要求选择不同的实验方法，见表 1-1。

表 1-1 哺乳动物 DNA 提取方法比较

方法	DNA 长度	得率	适用范围
蛋白酶 K-酚抽提	100 ~ 150kb	高	PCR、Southern、文库构建
甲酰胺解聚	7200kb	低	文库构建、脉冲电泳
培养板细胞 DNA 提取	常规	中	PCR、Southern
小样本制备 DNA	常规	中	PCR、Southern（<20kb）转基因检测
哺乳动物 DNA 快速分离	20 ~ 50kb	高	PCR

常用酚抽提法制备哺乳动物细胞 DNA。适用于多种来源的标本，如单层细胞培养、悬浮生长细胞、新鲜的组织及血液标本等。

用紫外分光光度法和荧光分光光度法检测核酸的浓度及纯度。紫外分光光度法只能用于测定核酸浓度大于 0.25μg/ml。对于浓度低的核酸溶液要用荧光光度法测定。

用琼脂糖平板凝胶电泳检测核酸的分子量与完整性，是分离、鉴定和纯化 DNA 片段的首选标准方法。

六、原核生物基因组 DNA 的分离纯化与鉴定

原核生物指细菌、支原体、衣原体、立克次体、螺旋体、放线菌和蓝绿藻

等原始生物的总称,是最简单的细胞生物体。原核生物与真核生物的主要区别是没有典型的细胞核结构,其基因组 DNA 位于细胞中央的核区,无核膜将其与细胞质隔开,但能在蛋白质的协助下,以一定的组织形式盘曲、折叠包装,形成类核 (nucleoid),也称拟核。

原核生物基因组 DNA 较小,一般在 $10^6 \sim 10^7$ bp 之间,例如大肠杆菌基因组 DNA 由 4.6×10^6 bp 组成,是人类基因组 3×10^9 bp 的 1%,基因数目较少,约含 3500 个。原核生物基因组一般由一条环状双链 DNA (double strand, dsDNA) 分子组成,习惯上称之为染色体,基因组中只有一个 DNA 复制起点。在细菌细胞中不但含有染色体 DNA,还含有质粒等一些染色体外的 DNA。把一个目的 DNA 片段通过重组 DNA 技术,送进受体细胞中去进行增殖和表达的工具叫载体 (vector)。细菌质粒是重组 DNA 技术中常用的载体。

(一) 质粒的生物学性状

质粒是指细菌体内染色体以外的能独立复制并稳定遗传的共价闭合环状分子。质粒 DNA 主要存在于细菌、放线菌、真菌细胞内,并游离于细胞质中,其分子为 1~200kb 大小不等。在特定条件下质粒 DNA 可逆地整合到宿主细胞染色体上,它们与宿主染色体一样,也有复制能力,经细菌分裂时能恒定地传给子代细胞。质粒与细菌或宿主之间类似寄生关系,质粒不能单独生存,必须依赖于细菌,而细菌离开质粒却仍能生存。因此,转化后的细菌表现特定的遗传性状,如抗药性、产生抗生素、产生毒素,合成限制酶与修饰酶等。

分子量在 2.5×10^7 以上的质粒,能够在同种或同属的细菌内转移,将携带的遗传物质从供体菌转移给受体菌。某些质粒还能与染色体整合;某些质粒带有抗药性基因,如四环素抗性基因、氨苄青霉素抗性基因及卡那霉素抗性基因等,这些抗药性基因在基因克隆中成为筛选阳性重组子的重要标志。由于质粒具有复制能力、转移性以及选择标记等基本特性,在分子生物技术中质粒被广泛地用作目的基因载体。质粒 DNA 的分离纯化是基本、常用的分子生物学实验技术。

(二) 质粒的分离纯化

分离纯化质粒 DNA 主要是利用宿主染色体与质粒之间的差异来进行的。染色体 DNA 分子量比质粒 DNA 大得多,染色体 DNA 在提取过程中大多断裂成线状分子,而质粒 DNA 为共价闭合环状结构。

分离质粒 DNA 的方法有三个基本步骤:首先培养细菌使质粒 DNA 大量扩增;其次将细菌裂解释放质粒 DNA;最后进行质粒 DNA 的分离、纯化与鉴定。按制备量的不同,质粒 DNA 提取与纯化的方法可分为质粒 DNA 的小量 (1~2ml) 制备、中量 (20~50ml) 制备及大量 (500ml) 制备。尽管制备量不同,具体方案有差异,但方法与原理是相同。

1. 培养细菌使质粒扩增 挑取单个菌落接种到含有适当抗生素的液体培养基中扩增。随着细菌的生长,质粒 DNA 也在自主复制。

2. 细菌的收集和裂解

(1) 细菌的收集 采用离心的方法来收集细菌。由于细菌生长过程中产生

了大量的代谢产物，离心收集细菌时上清液应去除干净。

(2) 细菌裂解 细菌细胞与动物细胞不一样，有一层细胞壁，不易破裂。裂解细菌细胞有多种方法：如机械法，超声波、玻璃珠、细胞破碎机等，溶菌酶、去污剂法，碱变性法，煮沸法等。不同的方法各有利弊，要根据宿主菌、质粒的性质及后续的纯化方法等多种因素加以选择，见表 1-2。

表 1-2 质粒提取方法比较

方法	纯度	用途	注意事项
碱裂解	较高	酶切、测序	简单，重复性好，成本低，广泛应用，可大量提取，产量与菌株种类无关
煮沸裂解	低	酶切、测序	<1.5kb DNA，方便，费用低，产量低，方法剧烈，富含耐热核酸酶的菌株（如 HB101 等），质粒产量低
SDS 裂解		酶切	>1.5kb 的质粒 DNA 提取，温和，产量低
碱性 CsCl	高	保存、转化、转录模板	大量获取高纯度标准品，区分不同形式的 DNA（环状、闭合环状等），费用高，需要超速离心

3. 质粒 DNA 的纯化 各种裂解法制备的质粒 DNA，常有 RNA 与染色体 DNA 污染。提取的质粒也有共价闭合环状、线性和开环状三种不同构型。质粒 DNA 的粗制品可进行电泳鉴定，也能用于限制性酶切反应和 PCR 反应。但对要求较高的实验，如用于哺乳动物细胞的转染，不但要求没有非质粒 DNA 的杂质，而且不能使用开环的或带有切口的环状质粒 DNA。因此，必须对质粒 DNA 做进一步纯化。纯化的原理主要依据染色体 DNA 比质粒 DNA 分子大得多，且染色体 DNA 被断裂成线状分子，但质粒 DNA 为共价闭环结构，当加热或用酸、碱处理 DNA 溶液时，线状染色体 DNA 容易发生变性，而共价闭环的质粒 DNA 在冷却和回到中性 pH 时又恢复其天然构象。纯化的方法较多，主要有氯化铯-溴化乙锭密度梯度超速离心法、聚乙二醇沉淀法和柱色谱法等。也可选择不同的商品化试剂盒，制备不同纯度和不同数量的质粒 DNA。

用上述方法纯化后的质粒 DNA，还会含有小分子 RNA 与 DNA 片段的污染。因此，对于要求较高纯度的实验（如 DNA 末端的酶促反应和测序反应），需要用分子筛或 RNase 消化等方法去除污染，可得到高纯度的质粒 DNA。

(三) 质粒 DNA 的鉴定

- 1. 紫外吸收法检测 DNA 的浓度和纯度。
- 2. 琼脂糖凝胶电泳法检测质粒 DNA 的完整性和大小。
- 3. 限制性内切酶鉴定粗略鉴定分离纯化的质粒 DNA。

限制性内切酶是一种工具酶，能够识别双链 DNA 分子上的特异核苷酸顺序并将其切断，形成一定长度和顺序的 DNA 片段。质粒 DNA 分子中含有限制性核酸内切酶的识别序列。因此，在限制性核酸内切酶的作用下，质粒 DNA 的环状结构可被切开，由共价闭环状或开环状转变为线状 DNA。用已知分子量的线状 DNA（marker）为对照，通过电泳迁移率的比较，可以粗略鉴定分离纯

化的质粒 DNA。

(四) 质粒的保存

可将微量的质粒溶于 TE 中, 4℃ 短期保存, 或 -20℃ 和 -70℃ 长期保存。也可在含有质粒的细菌培养液中加入等体积的甘油或 7% 的 DMSO, -70℃ 长期保存。

七、真核生物 RNA 的分离纯化与鉴定

目的基因转录成 RNA 后开始发挥作用, RNA 是联系 DNA 与蛋白质的重要桥梁, RNA 的分离纯化与鉴定也是分子生物技术的重要方法。

细胞 RNA 中 rRNA 的数量最多, 占总量的 80% ~ 85%; tRNA 及核内小分子 RNA、占 15% ~ 20%; mRNA 仅占 1% ~ 5%。因各种 rRNA、tRNA 及核内小分子 RNA 的结构与功能已基本阐明。日前对 RNA 的分离纯化主要指总 RNA 与 mRNA 的分离纯化。

(一) RNA 特征

RNA 是单链分子, 在核糖 2'、3' 位带有羟基, 遇水易发生变构, 并在碱性条件下加速, 使其结构不稳定。因此, RNA 的长期保存比较困难, 不适宜的缓冲液缩短了保存时间, RNA 的完整性也受到破坏。

细胞内外存在大量的 RNA 酶 (RNase), 对 RNA 产生降解作用。RNase 分子结构中二硫键的存在使其生物学活性非常稳定, 加热煮沸及酸、碱、蛋白质变性剂均不能使 RNase 完全灭活, 一旦去除变性剂后其活性又可恢复。另外, RNase 的活性不需要辅助因子的激活, 二价金属离子螯合剂对其活性无任何影响。RNase 广泛存在于人的皮肤、唾液、汗液、各种实验器材、试剂、环境灰尘等中。因此, 在 RNA 的提取过程中, 排除 RNase 的污染及强有力地抑制其活性, 创造一个无 RNase 的环境最为关键。

RNA 是单链分子, 在合适的条件下易出现分子内部配对, 导致 RNA 分子形态的改变, 并在普通电泳中不能正确表现其大小。因此要使用变性剂凝胶电泳, 利用变性剂破坏其分子内部配对, 使 RNA 显示出完整的单链状态。

RNA 在微酸性 (pH6.0) 环境下相对稳定, 在碱性环境下易分解。

(二) RNA 分离基本过程

①充分裂解细胞或组织; ②变性核蛋白复合物, 释放 RNA; ③灭活内源性核糖核酸酶 (RNase); ④分离纯化 RNA。

(三) 真核细胞总 RNA 的制备

总 RNA 的制备方法主要分为两类: ①有机溶剂分级提取 RNA, 如氯化锂-尿素法、Trizol 试剂以及由异硫氰酸胍-酚-三氯甲烷一步法改进的同时回收 RNA、DNA 和蛋白质的方法等; ②利用差速离心沉淀将高分子量 RNA 和其他类型核酸分离开来。因制备细胞来源不同, 所使用的方法和试剂有不同。

(四) 真核细胞 mRNA 的制备

真核细胞中 mRNA 含量少, 种类多且分子量大小不一。除血红蛋白及组蛋

白的 mRNA 外, 大多数 mRNA 在其 3' 端带有一个长短不等 (20 ~ 250 个) 多聚腺苷酸的结构, 即 poly (A) 尾。具有 poly (A) 尾的 RNA 叫 poly (A)⁺ RNA。rRNA 和 tRNA 不具有 poly (A), 根据这个结构特征, 利用碱基配对原则, 通过 oligo (dT) - 纤维素或 poly (U) - 琼脂糖凝胶的亲色谱, 容易地从总 RNA 中分离纯化 mRNA。因此, mRNA 的分离纯化主要有两个步骤, 即总 RNA 的制备与 mRNA 的纯化。现已经有各种商品化的快速提取试剂盒。

(五) RNA 的鉴定

紫外分光光度法是总 RNA 与 mRNA 浓度分析与纯度鉴定的最简便快速的方法。

变性琼脂糖凝胶电泳是检查 RNA 完整性的方法。若 RNA 未被降解, 清晰可见 18S 和 28S 核糖体 RNA 带, 并且 28S 带的亮度约为 18S 的 2 倍, 否则提示 RNA 有降解。如在加样孔附近有色带, 说明有 DNA 污染。

poly (A)⁺ RNA 完整性分析较为复杂, 一般不做。如有足量的 mRNA 且完整良好, 电泳时应显示在 5 ~ 20kb 之间的一片拖影, 大部分在 5 ~ 10kb 之间。

(六) RNA 的保存

1. 75% 乙醇溶解 RNA 沉淀, -20℃ 长期保存, 使用前离心沉淀回收 RNA。

2. 在 RNA 溶液中加入 1 滴 0.2mol/L 的 VRC (氧钒核糖核苷复合物), -70℃ 保存数年。VRC 能抑制 RNAase 对 RNA 的降解, 对大多数实验无干扰作用, 但用于体外翻译实验, 用前用酚/三氯甲烷抽提一次, 以除去 VRC; 低于 5mmol/L 的 VRC 对体外翻译无影响。

3. 用去离子甲酰胺溶解 RNA 沉淀, -20℃ 保存。去离子甲酰胺可保护 RNA 免遭 RNA 酶的降解, 此 RNA 样品可直接用于凝胶电泳分析和 RT-PCR 等实验。如需要, 用 4 倍体积的乙醇沉淀回收 RNA。

4. 用 0.1mmol/L EDTA (pH7.5) 的 DEPC 水或含 0.1% ~ 0.5% SDS 的 TE 缓冲液 (pH7.6) 溶解 RNA 沉淀, -70℃ 保存。在 RNA 酶促反应前, 用三氯甲烷抽提、乙醇沉淀除去 SDS。

实验一 蛋白酶 K - 酚抽提法

【目的】

掌握蛋白酶 K - 酚抽提法提取真核细胞 DNA 的原理与方法; 熟悉影响因素及注意事项。

【原理】

将真核组织细胞破碎, 用组织细胞裂解液溶解细胞膜、核膜, 使组蛋白与 DNA 分离, 再用酚、三氯甲烷/异戊醇抽提去除蛋白质, 最后经乙醇沉淀 DNA, 可得到基因组 DNA 片段。

组织细胞裂解液中有蛋白酶 K、EDTA、十二烷基硫酸钠 (SDS) 及 RNA 酶。蛋白酶 K 有水解蛋白质、消化 DNA 酶 (DNase)、DNA 上的蛋白质及裂