

心血管分子生物学 实验技术

主编 惠汝太 周宪梁



3-33

北京医科大学 联合出版社
中国协和医科大学

心血管分子生物学实验技术

主编 惠汝太 周宪梁

主审 刘力生 赵敏顺

编者 (按章次排序)

胡爱华 周宪梁 崔兆强

刘力生 宋艳丽 惠汝太

赵敏顺 许有元 孟宪敏

刘玉清 姜玉新 陈兰英

黄其擎 黄尚志 叶 珏

张慧敏 张春玲

3K01/13

北京医科大学
中国协和医科大学 联合出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

心血管分子生物学实验技术/惠汝太主编, - 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998

ISBN 7-81034-839-6

I. 心… II. 惠… III. 心血管系统-分子生物学-实验-技术 IV. R318.11

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (98) 第 14047 号

心血管分子生物学实验技术

惠汝太 周宪梁 主编

刘力生 赵敏顺 主审

责任编辑: 陈永生

*

北京医科大学
中国协和医科大学 联合出版社出版

北京迪鑫印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

*

850×1168 毫米 1/32 10.25 印张 字数: 271 千字

1998 年 9 月第一版 1998 年 9 月北京第一次印刷

印数: 1—5000

ISBN 7-81034-839-6/R·837

定 价: 21.60 元

内 容 简 介

本书为国内第一本较为全面、系统的心血管分子生物学实验技术教材，作者大多为近几年在国内外获博士学位并从事心血管分子生物学研究的中青年科技工作者，他们具有较丰富的实验工作经验。全书共分十四章，包括核酸的分离提取与鉴定、聚合酶链反应、单链构象多态性分析及微卫星、限制性内切酶酶切分析、核酸探针的制备和标记、核酸分子杂交、cDNA 文库的建立、DNA 序列测定、基因重组、转基因动物技术及其在心血管病研究中的应用、心血管疾病的基因治疗、心血管病致病与相关基因的筛选与克隆、常用遗传统计分析方法、常用分析仪器的使用方法与注意事项、常用试剂的配制、实验室安全规程。

本书可供从事心血管分子生物学技术研究的科研人员、研究生以及临床医师参考。

前 言

人们预言，21 世纪将是生命科学的世纪。以基因工程为主导的分子生物学技术极大地推动了生物科学的发展。由于分子生物学技术的不断发展和完善，分子生物学更加迅速、广泛地渗透到生命科学的各个学科，特别是在临床医学研究中，分子生物学与临床医学实践紧密结合，形成了一门新兴学科——分子医学。分子医学在分子水平上揭示许多疾病的本质，为疾病的诊断、治疗和预防提供了新的手段，为医学研究与临床实践开创了新的模式，引起了一场医学科学的革命。

为了促进我国医学分子生物学技术的发展，国家科委生物技术中心、国家自然科学基金委员会生命科学部、中一加一港生物技术工作站与中国协和医科大学阜外心血管病医院联合举办的“心血管病致病与相关基因筛选与克隆技术”讲习班于 1997 年 11 月 3 日至 7 日在阜外心血管病医院举行。来自全国各地 20 个省市 60 个医药院校、科研单位的 140 名分子生物学专业人员参加了讲习班的学习。讲习班采用理论与实践相结合的方式，对心血管分子生物学常用实验技术进行了理论讲解和实验操作，取得了圆满成功，受到学员们的一致好评，大家深感受益匪浅。本书根据讲习班上所做实验进行系统归纳、整理并结合作者的工作经验及参考国内外

最新技术的发展编写而成。参加本书编写的大多为近年来在国内外获博士学位并从事心血管分子生物学研究的中青年科技工作者。这些作者选择心血管分子生物学研究中最重要和最常用的技术方法作了比较详细的介绍，重点介绍了这些方法的原理、试剂的配制、实验操作方法及操作注意事项等。本书的特点是实用性、系统性和新颖性，可供从事心血管分子生物学及相关学科的各种研究人员参考。

中国协和医科大学刘力生、强伯勤、卢圣栋、袁建刚、陈兰英、黄尚志、加拿大多伦多大学刘宗正及西安医科大学陈念祖、徐仓宝、楚雍烈等中老年专家审改了本书的有关章节；盛华同志承担了书稿的打字与复印工作；阜外心血管病医院高润霖、郭秀荣等对本书的编写及出版给予了大力支持和帮助；北京医科大学中国协和医科大学联合出版社在本书形成与出版过程中给予了热情的指教、帮助与支持，在此一并表示诚挚的谢意！

本书的缺点与错误在所难免，欢迎指正。

编 者

于中国医学科学院、中国协和医科大学阜外心血管病医院

目 录

第一章	核酸的分离提取与鉴定.....	(1)
第二章	聚合酶链反应	(15)
第三章	PCR 产物单链构象多态性分析及微卫星	(22)
第四章	限制性内切酶分析	(32)
第五章	核酸探针的制备和标记	(60)
第六章	核酸分子杂交	(93)
第七章	cDNA 文库的构建	(100)
第八章	DNA 序列测定	(126)
第九章	基因重组.....	(155)
第十章	转基因动物技术及其在心血管病研究中的应用.....	(199)
第十一章	心血管病致病与相关基因的筛选与克隆.....	(223)
第十二章	心血管疾病的基因治疗.....	(230)
第十三章	常用遗传统计分析方法.....	(242)
第十四章	常用分析仪器的使用方法与注意事项.....	(281)
附一	常用试剂的配制.....	(300)
附二	实验室安全规程.....	(311)

第一章 核酸的分离提取与鉴定

第一节 RNA 的制备与分析

一、RNA 的制备

RNA 对 RNase 极为敏感，细胞破碎后，极易遭到 RNase 的破坏，为了制备完整的 RNA，及时使蛋白质（其中包括 RNase）变性是十分关键的。RNase 分布极广、十分稳定并且耐高热，因此，在 RNA 制备过程中，要严格遵守操作注意事项，及时使用 RNase 抑制剂，如苯酚、SDS、肝素、DEPC、盐酸胍等。

细胞内大部分 RNA 以核蛋白的形式存在，首先遇到的是必须使 RNA 与蛋白解离，并除去。实验室多采用苯酚法制备 RNA。方法是先用稀盐溶液将大部分核糖核蛋白溶解，而脱氧核糖核蛋白溶解甚少，及时加入酚使蛋白质变性，避免分子降解，离心除变性蛋白时，DNA 一同除去。这样得到的上清液中主要是 RNA，DNA 含量甚少。

（一）组织 RNA 的分离

1. 试剂及配制

（1）GTC 缓冲液：

4mol/L 异硫氰酸胍 (GTC)

25mol/L 柠檬酸钠 (sodium citrate)

0.5% 十二烷基, N 甲基甘氨酸钠 (lauryl sarcosine)

0.72% β - 巯基乙醇 (用前加)

(2) 2mol/L 乙酸钠 (pH4.0)

(3) 水饱和酚

(4) Sevag (氯仿:异戊醇 24:1)

(5) DEPC 处理过的双蒸水

(6) 无水乙醇

(7) 70% 乙醇

(8) RNAzol

20ml GTC

2ml 乙酸钠 (pH 4.0)

20ml 苯酚

2. 操作方法

每克组织样品, 须用 10ml GTC, 1ml 乙酸钠 (pH4.0), 10ml 苯酚, 2ml Sevag。

(1) 1g 组织置于匀浆器中, 加入 GTC 10ml, 在冰浴中迅速进行匀浆, 充分研碎组织。

(2) 即刻加入乙酸钠 (pH4.0) 1ml, 充分混匀。

(3) 加苯酚 10ml, 充分混匀。

(4) 加 Sevag 2ml, 充分混匀摇振。

(5) 冰浴 15min。

(6) 3000r/min, 4℃ 离心, 10min。

(7) 吸取上清液至另一离心管中。

(8) 加相同体积的异丙醇, 混匀。

(9) 静置于 -20℃ 至少 30min, 使 RNA 沉淀。

(10) 1000r/min, 4℃, 离心 10min。

(11) 弃上清, 加 75%乙醇 5ml 洗涤 RNA 沉淀。如 RNA 沉淀悬浮则 4℃离心, 8000r/min, 10min。

(12) 弃上清, 空气干燥 30min。

(13) RNA 溶解于用 DEPC 处理过的双蒸水中。

(14) 紫外分光光度计进行 RNA 定量。

(15) 1%变性琼脂糖凝胶电泳进行 RNA 定性。

(16) 贮存于 -70℃备用。

(二) 从培养细胞中提取 RNA

TRAzol (Gibco 公司) 试剂法

(1) 用预冷的 1 × PBS 5ml 洗涤培养细胞, 2000r/min 离心 10min, 弃上清。

(2) 重复步骤 (1) 两次。

(3) 加 5ml RNAzol 试剂 5ml, 混匀, 置室温 5min。

(4) 加 0.1 体积的 Sevag, 充分混匀。

(5) 加 0.1 体积的氯仿, 摇振, 充分混匀。

(6) 置冰上 15min。

(7) 4℃, 3000r/min, 离心 10min。

(8) 仔细吸取上层水相, 并转移至另一离心管中。

(9) 加相同体积的异丙醇, 混匀, 静置于 -20℃至少 30min, 使 RNA 沉淀。

(10) 10000r/min, 4℃, 离心 10min。

(11) 弃上清, 加 75%乙醇 5ml 洗涤 RNA 沉淀。

(12) 弃上清, 空气干燥 30min。

(13) RNA 溶解于用 DEPC 处理过的双蒸水中, 贮存于 -70℃备用。

(三) 从外周血白细胞中分离 RNA

- (1) 抗凝血 1~5ml, 用 1~2 倍的生理盐水或 PBS 稀释, 混匀。
- (2) 在离心管中加入 1 倍体积的淋巴细胞分离液, 4℃, 1500r/min 离心 15min。
- (3) 吸弃上清, 仔细吸出中间有核细胞层, 转入另一离心管, 用生理盐水或 PBS 洗涤 1 次。
- (4) 加 TRIzol 试剂 5ml, 混匀, 置室温 5min。
- (5) 加 0.1 体积的 Sevag, 充分混匀。
- (6) 加 0.1 体积的氯仿, 摇振, 充分混匀。
- (7) 置冰上 15min。
- (8) 4℃, 3000r/min, 离心 10min。
- (9) 仔细吸取上层水相, 并转移至另一离心管中。
- (10) 10000r/min, 4℃, 离心 10min。
- (11) 弃上清, 加 75%乙醇 5ml 洗涤 RNA 沉淀。
- (12) 弃上清, 空气干燥 30min。
- (13) 贮存于 -70℃ 备用。

(四) mRNA 快速提取

本法是根据 mRNA 3' 末端多聚 (A⁺) 残基与连接到纤维素柱上去的寡 (dT) 残基间配对的原理。非多聚 (A⁺) 片段不能结合上去并很容易从柱上洗下来, 而结合上去的多聚 (A⁺) RNA 要通过降低柱上缓冲液的盐浓度而被洗脱下来。以 Pharmacia Biotech 公司提供的 Quick Prep micro kit 为例:

- (1) 在组织加入提取缓冲液 (4ml/g), 充分匀浆。
- (2) 匀浆液用 2 倍 elution buffer (Tris-HCl 10mmol/L, EDTA 1mmol/l, pH7.5) 稀释。并转移至 Eppendorf 管中, 加入

第一章 核酸的分离提取与鉴定

1ml Oligo (dT) - 纤维素悬浮液 [Oligo (dT) 纤维素以 25mg/ml 的浓度悬浮于 Tris - HCl (pH7.5) 10mmol/L, KCl 0.5mol/L 中]。

(3) 14000r/min, 离心 2min, 用上清液悬浮 Oligo dT 纤维素沉淀, 室温下混匀 10min。

(4) 14000r/min, 离心 5s, 弃上清。

(5) 用 1ml 高盐溶液 [Tris - HCl(pH7.5) 10mmol/L, EDTA 1mmol/L, NaCl 0.5mol/L] 悬浮 Oligo (dT) - 纤维素沉淀。

(6) 充分混匀, 14000r/min 离心 5s, 弃上清。

(7) 如此高盐洗涤重复 4 次。

(8) 用 1ml 低盐溶液 [Tris - HCl(pH7.5) 10mmol/L, EDTA 1mmol/L, NaCl 0.1mol/L] 洗涤两次。

(9) 用 0.3ml 低盐溶液使 Oligo dT 纤维素 - RNA 复合物重新悬浮移至 microspin column 中, 14000r/min 离心 5s。

(10) 在柱床上加 0.5ml 低盐溶液, 14000r/min 离心 5s, 如此低盐洗涤重复 2 次。

(11) 用加热至 65℃ 的 elution buffer 0.2ml 离心洗脱 2 次, 收集其流出液。

(12) 在 0.4ml 流出液中加入 10 μ l 糖原 (10mg), 40 μ l 醋酸钾 (3mol/L) 和 2.5 倍体积 95% 乙醇沉淀 mRNA。

(13) -20℃ 保存 10 分钟或过夜, 14000r/min 离心 20min, 收集 mRNA 沉淀。

(14) 用 75% 乙醇洗涤沉淀, 空气中干燥 30min。

(15) 将其重新悬浮于 DEPC 处理过的双蒸水中。

(16) 测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值, 计算其浓度, 储存于 -80℃。

(五) 注意事项

- (1) 所有玻璃器皿均应于使用前进行 180℃ 干烤, 至少 4h。
- (2) 塑料制品为新的或经焦碳酸二乙酯 (DEPC) 洗涤处理过。
- (3) 双蒸水需经 DEPC 处理后再使用, 加 DEPC 至 0.1%, 放置 12h, 然后高压灭菌。
- (4) 整个实验过程应戴手套操作。
- (5) 所有步骤均在冰上操作。

二、RNA 的分析

(一) 紫光分度计进行 RNA 定量

在比色杯中加 1000 μ l DEPC 处理过的双蒸水, 再加入 4 μ l 样品; 测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值, 计算:

$$\text{RNA 量 } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260} \times 10$$

$$\text{纯度} = \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280} \text{ (须大于 1.8)}$$

(二) 1% 琼脂糖电泳进行 RNA 定性

(1) 配制 1% 琼脂糖凝胶

(2) 处理 RNA 样品

1 μ l RNA

9 μ l H₂O

1 μ l 上样缓冲液

(3) 然后, 65℃ 水浴加热 5min

(4) 上样, 进行电泳。

(三) RNA 甲醛凝胶电泳

1. 试剂及配制

(1) 10× MOPS

200mmol/L MOPS (3 - N - 吗啉丙磺酸)

10mmol/L EDTA

50mmol/L 醋酸钠

(2) 甲醛凝胶上样缓冲液

甲酰胺 (formamide)	720 μ l
-----------------	-------------

37% 甲醛	260 μ l
--------	-------------

10× MOPS	160 μ l
----------	-------------

无 RNase 水	100 μ l
-----------	-------------

溴化乙锭 (5mg/ml)	100 μ l
---------------	-------------

甘油	70 μ l
----	------------

0.25% (V/V) 溴酚蓝	80 μ l
-----------------	------------

(3) 电泳缓冲液

1× MOPS

2. 操作方法

(1) 配制 1% 甲醛琼脂糖凝胶:

琼脂糖	1.0g
-----	------

10× MOPS	10ml
----------	------

0.1% DEPC 水	85ml
-------------	------

然后加热使胶完全融化

冷却至 55℃, 加入 37% 甲醛溶液 5.4ml。混匀后灌胶。

(2) 将胶在电泳槽中, 125V 预电泳 30min。

(3) 准备 RNA 上样样品: 取 RNA 10 ~ 20 μ g, 加双蒸水至 10 μ l。再加 10 μ l 甲醛凝胶上样缓冲液, 混匀。于 65℃ 水浴加热样品 3min, 然后上样。

- (4) 在电压 100V 下电泳 2 ~ 3h。
- (5) 紫外灯下观察结果。
- (6) 对 mRNA 的片段长度进行估计。

28S $\cong$ 5kb

18S $\cong$ 2.0kb

5S $\cong$ 0.3kb

第二节 DNA 的分离提取

一、原理

DNA 是以核蛋白的形式存在于细胞核中, 由 4 种脱氧核糖核苷酸单体借助磷酸二酯键而连接成的长链大分子。从细胞或组织中提取 DNA 的关键因素是选择能够使蛋白和 DNA 分开的酶和能使细胞膜破裂的化学试剂。真核生物组织细胞在含 SDS 和蛋白酶 K 的溶液中消化分解蛋白质, 再用酚:氯仿:异戊醇抽提的方法去除蛋白质, 得到的 DNA 溶液经乙醇沉淀或透析等方法进一步纯化。

蛋白酶 K 是目前被认为能使蛋白质与 DNA 分开的有效酶, 它是广谱蛋白酶。SDS 是表面去污剂, 可以使细胞膜、核膜破坏, 并能使组蛋白与 DNA 分开; EDTA 是金属离子络合剂, 可抑制细胞内 DNA 酶活性, 以保证在提取过程中保持 DNA 分子的完整性。

二、血液中白细胞 DNA 的提取

1. 试剂及其配制

(1) 15mmol/L TES: 15mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、15mmol/L EDTA (pH8.0)、15mmol/L NaCl。

(2) 10% SDS: 称 10g SDS 液于 90ml 水中, 调 pH 至 7.2, 加水定溶至 100ml。

(3) 15mmol/L TES 饱和酚: 重蒸酚加热熔化后加入 1/3 体积的 15mmol/L TES 溶液, 充分混匀, 置冰箱中过夜, 次日收掉上层多余的 TES 溶液, 于冰箱中保存。

(4) 氯仿/异戊醇 (24:1): 量取 24 体积氯仿及 1 体积异戊醇, 混匀, 于冰箱中保存。

(5) TE: 10mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA pH7.5。

2. 操作方法

(1) 白细胞的分离: 有两种方法。

①淋巴细胞分离液分离白细胞:

- 取人外周静脉血 5ml, 2% EDTA 抗凝。
- 沿管壁缓慢加入盛有 2~3ml 的淋巴细胞分离液的试管中, 保持血液与分离液界面清晰。
- 置水平离心机, 2000r/min, 离心 20min。
- 吸取呈白膜状分布的白细胞层于另一无菌螺口试管中。
- 用 PBS 洗两次, 每次 1500r/min, 10min。
- 吸掉上清, 得到白细胞沉淀。
- 得到的白细胞直接用酚抽提或冻存于 -70℃ 冰箱中备用。

②低渗溶血法:

- 取静脉血 1ml, 加 0.2ml 2% EDTA 溶液混匀抗凝。
- 加 5 倍体积的消毒蒸馏水, 室温放置 10min, 注意这期

间要经常振摇以达到红细胞完全溶血。

c. 5000r/min 离心 10min。

d. 弃上清，沉淀加适量生理盐水悬浮。

e. 5000r/min 离心 10min，倒掉上清，得到沉淀即为白细胞和细胞膜的碎片混合物，液氮贮存或立即提取 DNA。

(2) DNA 的提取：采用酚抽提法。

①在 5ml 15mmol/L TES 中悬浮白细胞，加蛋白酶 K250 μ g (50 μ g/ml)，10%SDS 至终浓度 0.5%。

②充分混匀，放 50℃水中保温 3~5h，其间振荡 2~3 次。

③冷却至 4℃，加等体积 15mmol/L TES 饱和酚，振荡，使水相和酚层充分混匀。

④4℃，5000r/min 离心 15min，此时 DNA 溶液在上层，酚位于下层，中间为变性蛋白质。

⑤用吸管小心吸取上层粘稠溶液，移至另一离心管中。

⑥重复步骤③~⑤两次。

⑦加入等体积氯仿/异戊醇，按步骤④、⑤抽提 3 次。

⑧用吸管将上层溶液移至小烧杯中，放入冰水中冷却至 0℃。

⑨加 2.5 倍体积无水乙醇，此时可见白色沉淀析出，轻轻摇动烧杯，待所有 DNA 均沉淀出来，并绕成一小团。

⑩用吸管捞出 DNA 沉淀，在 70%冰乙醇中洗 3 次。

⑪将 DNA 沉淀放入 1.5ml Eppendorf 管中，打开管盖，让残存的乙醇在室温挥发，或放入冷冻干燥机中冷冻干燥。

⑫加适量 TE 溶解 DNA。

3. 注意事项

(1) 低渗溶血法分离血细胞，完全是利用红细胞与白细胞的渗透脆性的不同进行分离。红细胞渗透脆性强，所以当环境处于低渗时细胞很易吸水而涨破，相反，白细胞渗透脆性弱，抗低渗