

# 目 录

## 第一部分 DNA 的提取与纯化

引言	1
第一章 细胞总 DNA 的分离提取	袁建刚 3
第一节 从培养的动物细胞中提取高分子量 DNA	3
第二节 细菌细胞 DNA 的提取	6
第三节 从动物组织制备高分子量 DNA	8
第二章 DNA 的羟基磷灰石柱层析与 DNA 复性研究方法	袁建刚 12
第一节 DNA 的羟基磷灰石柱层析	12
第二节 DNA 复性动力学简介	15
第三节 与 DNA 复性研究有关的一些实验方法	20
第三章 质粒 DNA 的大量抽提与纯化	王 年 26
引言	26
第一节 菌体的培养和质粒 DNA 的扩增	27
第二节 菌体的裂解	28
第三节 质粒 DNA 的纯化	30
第四章 $\lambda$ 噬菌体 DNA 的制备	强伯勤 36
第一节 裂解生长的 $\lambda$ 噬菌体的感染及其纯化	36
第二节 溶原型噬菌体的诱导及其纯化	40
第三节 $\lambda$ DNA 的抽提	41
第五章 动物病毒的组织培养及核酸提取	王淑凤 43
第一节 动物病毒的组织培养技术	43
第二节 病毒的提纯和病毒核酸的提取	48
第三节 病毒培养常用溶液的配制	52
参考文献	55

## 第二部分 真核生物 mRNA 的分离、纯化与鉴定

引言	57
第一章 真核生物 mRNA 的分离与纯化	张福徽 58
第一节 从聚核蛋白体中分离 RNA	58
第二节 从细胞内直接分离 RNA	59
第三节 mRNA 的纯化	62
第四节 注意事项	64
第二章 mRNA 的鉴定	张福徽 66
第一节 琼脂糖凝胶电泳法	66
第二节 无细胞体系蛋白质的生物合成	66

第三节	SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 .....	68
第四节	免疫沉淀法 .....	70
参考文献	.....	70

### 第三部分 限制性内切酶及其应用

第一章	限制性内切酶 .....	强伯勤 余曙华	72
第一节	酶的命名、分类和识别特异性 .....		72
第二节	限制性内切酶的纯化方法 .....		79
第三节	酶活力的测定和制剂质量检验 .....		84
第四节	酶的反应条件和影响酶活性的因素 .....		87
第二章	限制性内切酶的应用 .....	余曙华 强伯勤	100
第一节	DNA 的酶切降解和再连接 .....		101
第二节	DNA 物理图谱分析 .....		107
第三节	限制性内切酶降解 DNA 的有关公式 .....		112
参考文献	.....		115

### 第四部分 核酸的凝胶电泳

第一章	DNA 的凝胶电泳 .....	杨善蓉	116
第一节	电泳装置和基本技术 .....		116
第二节	DNA 凝胶电泳的应用 .....		123
第三节	从凝胶上回收 DNA 片段 .....		125
第二章	RNA 的电泳 .....	王申五	129
第一节	聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....		129
第二节	RNA 乙二醛变性琼脂糖凝胶电泳 .....		134
参考文献	.....		138

### 第五部分 核苷酸序列分析

第一章	化学法测定 DNA 的核苷酸序列 .....	黄秉仁 蔡良琬 阎 珺	139
第一节	化学法测定 DNA 核苷酸序列的基本程序 .....		139
第二节	设备、材料及使用 .....		140
第三节	DNA 片段的制备 .....		141
第四节	DNA 片段的末端标记 .....		143
第五节	单末端标记 DNA 片段的分离和提纯 .....		147
第六节	特异性的碱基化学裂解反应 .....		150
第七节	测序胶的制备及电泳 .....		155
第八节	放射自显影 X 光片的固定 .....		157
第九节	化学法测序的改进和展望 .....		158
第十节	小结 .....		158
参考文献	.....		159
第二章	末端终止法测定 DNA 的核苷酸序列 .....	琦祖和	160
第一节	概述 .....		160

第二节	M13mp 载体在末端终止法中的应用	162
第三节	被测 DNA 的分子克隆	169
第四节	制备引物	175
第五节	末端终止法序列测定	177
第六节	测序用聚丙烯酰胺凝胶电泳	184
第七节	序列的解读及常见问题	187
参考文献		190
<b>第三章 RNA 的核苷酸序列测定</b> 程振起 肖 啸 191		
第一节	器皿和溶液的准备	192
第二节	小分子 RNA 的提取与纯化	193
第三节	RNA 的末端标记及大分子 RNA 的特异性降解	195
第四节	序列分析酶解直读法	202
第五节	化学裂解直读法	209
第六节	序列分析双向直读法	216
参考文献		221

## 第六部分 核酸的分子杂交

引言	222
<b>第一章 标记探针的方法</b> 袁建刚 223	
第一节	缺口翻译标记 DNA 探针 223
第二节	<sup>32</sup> P 标记 RNA 和 DNA 226
<b>第二章 液相杂交</b> 袁建刚 230	
<b>第三章 固相杂交</b> 袁建刚 234	
第一节	用于斑点杂交的直接点样法 234
第二节	DNA 的吸印转移 237
第三节	RNA 的吸印转移 239
第四节	DNA 和 RNA 的电泳转移 240
第五节	硝酸纤维素膜固相杂交 242
参考文献 245	

## 第七部分 核酸的电镜观察与应用

引言	246
<b>第一章 核酸电镜标本的制作原理及其方法</b> 蔡良琬 梁 杰 宋国兴 248	
第一节	基本原理 248
第二节	支持膜的制作方法及其特点 248
第三节	样品制作方法 250
<b>第二章 核酸电镜标本的几种制备方法</b> 蔡良琬 梁 杰 宋国兴 254	
第一节	对制备核酸电镜标本的质量要求 254
第二节	病毒 DNA 与 RNA 的电镜标本的制备 254
第三节	DNA-蛋白质复合物的电镜标本的制备 255
第四节	核酸变性标本的制备 256

第五节 DNA 的暗视野观察.....	258
参考文献.....	258

## 附 录

一、常用的数据.....	259
二、DNA 和 RNA 含量的测定.....	259
三、玻璃器皿和塑料器皿的处理.....	260
四、有机试剂及其处理.....	261
五、透析袋的处理.....	261
六、常用的同位素及标记化合物.....	262
七、几种常用的酶.....	267
八、限制性内切酶.....	269
名词缩写.....	274
索引.....	275

# 第一部分 DNA 的提取与纯化

## 引 言

核酸是生物体的重要组成物质,无论动物、植物还是微生物,毫无例外地都含有核酸。

核酸分为两大类: DNA (脱氧核糖核酸)和 RNA (核糖核酸)。DNA 主要存在于细胞核的染色体中,核外也有少量,如线粒体 DNA、叶绿体 DNA、质粒 DNA 等等。RNA 则存在于细胞质中,核蛋白体内最丰富;也存在于细胞核中,核仁部位含量最多。以非细胞形式存在的病毒和噬菌体,有的只含 DNA,也有的只含 RNA。

核酸是遗传信息的携带者,是基因表达的物质基础。在生物的生长、发育和繁殖等正常生命活动中,核酸具有十分重要的作用。另外,它与生命的异常情况,如肿瘤发生、放射损伤、遗传疾病等也有密切关系。因此,核酸是现代生物学、医学研究中的重要课题。但无论是进行核酸结构与功能的研究,还是进行基因工程的研究,首先需要对核酸进行分离和纯化。

DNA 含有生物体的全部基因。一般情况下,随着生物由低级进化到高级,所含 DNA 的分子量也由小到大递增。最小的病毒 DNA 有几千碱基对,细菌 DNA 有几百万碱基对,而高等动植物 DNA 可达几十亿碱基对。制备 DNA 样品时一个值得注意的问题是要尽量保证 DNA 分子的完整性。如果所得到的核酸样品在制备过程中已经降解,则在许多研究工作中难以得到正确的结果。因此,在制备 DNA 样品的过程中,要注意避免以下几点:细胞内核酸酶引起的核酸降解;酸、碱等化学因素引起的核酸降解;温度过高或机械张力、剪切等物理因素引起的核酸降解;真核细胞的 DNA 分子特别大,例如,人的基因组为  $2.9 \times 10^9$ bp (碱基对),这样巨大的分子极易被机械张力所拉断。在制备过程中注意操作步骤要温和,减少机械张力所引起的降解。

制备核酸样品,首先要破碎细胞,除去蛋白质等其它细胞组分。提取 DNA 时,还要去除 RNA 的污染。在分离总 DNA 时,通过蛋白酶、RNase (核糖核酸酶)的处理以及透析等步骤,比较容易得到纯净的 DNA 制品,但要制备某一种特异的 DNA 分子时,则还要根据此 DNA 的特性进行分离纯化。例如,在制备质粒 DNA、噬菌体 DNA 和病毒 DNA 时,不但要除去蛋白质、RNA 等细胞成分。还要除去细胞染色体或寄主细胞 DNA 的污染。因此,制备不同类型或不同材料来源的 DNA 时,分离和纯化的方法也不完全相同。

制备细胞染色体 DNA 时,由于 DNA 分子量很大,还不能分离纯化分子完整的 DNA 制品。应用已有的技术可以获得  $10^8$  道尔顿以上的 DNA,能够满足目前大多数研究工作的需要。一些小分子的质粒、噬菌体、病毒等的 DNA,目前可以制备完整的 DNA 分子。如果是环状双链的小分子 DNA,则可以获得超盘旋的环状分子,这对于基因工程等方面的研究具有重要意义。

真核生物基因组中含有大量重复序列。重复序列的结构和功能是目前一个重要的研究领域,它在基因的表达与调控、遗传与变异以及生物进化等方面都有重要作用。有些基因,例如 rRNA 基因、tRNA 基因也是重复序列。重复序列最初是通过复性动力学的方法发现的。目前,有些重复序列可通过超离心和限制性内切酶切割方法获得,有许多重复序列是通过复性动力学的方法按重复频率的不同进行富集和分离。

在第一部分我们将讨论研究工作中使用得比较多的 DNA 的制备方法。主要包括细菌、哺乳动物培养细胞和组织中总 DNA 以及一些有代表性的质粒、噬菌体和病毒 DNA 的分离和纯化。另外,对于应用复性动力学研究和分离真核生物 DNA 重复序列的方法,以及有关的羟基磷灰石柱层析技术也作了扼要介绍。

# 第一章 细胞总 DNA 的分离提取

## 第一节 从培养的动物细胞中提取高分子量 DNA

Marmur 于 1961 年建立了用酚和氯仿从生物细胞中分离制备 DNA 的经典方法。但是此法的条件比较剧烈,还只能得到分子量为  $5 \times 10^6 - 2 \times 10^7$  道尔顿的 DNA 制品,而且 DNA 分子中往往含有许多单链缺口,这样的制品不能满足目前核酸研究的需要。从六十年代后半期开始,尤其是蛋白酶 K 的发现,大大促进了从真核生物细胞中分离提取高分子量 DNA 的研究。在 SDS 和 EDTA 的存在下,蛋白酶 K 仍具有很高的活力,因而在抑制 DNA 降解酶活力的条件下用蛋白酶 K 消化去除蛋白质,为制备高纯度、高分子量的 DNA 制品创造了条件。

### 一、材料与试剂

蛋白酶 K: 1mg/ml

RNase A: 1mg/ml

RNase T<sub>1</sub>: 1mg/ml

SDS: 10%

NaHCO<sub>3</sub>: 5%

透析袋: 用 5% NaHCO<sub>3</sub> 煮沸处理,再用 5mmol/L EDTA 洗涤,高压消毒,放于 4℃ 待用。

酚: 分析纯或化学纯试剂,重蒸后分装于棕色瓶中(或用黑纸包好)于 4℃ 保存。

缓冲液 A: 10mmol/L Tris-HCl

10mmol/L EDTA

10mmol/L NaCl

0.5% SDS

pH8

缓冲液 B: 500mmol/L Tris-HCl

10mmol/L EDTA

10mmol/L NaCl

0.5% SDS

pH8

缓冲液 C: 50mmol/L Tris-HCl

0.5mmol/L EDTA

10mmol/L NaCl

pH 8

缓冲液 D: 10mmol/L Tris-HCl  
0.5mmol/L EDTA  
10mmol/L NaCl  
pH 8

生理盐水: 0.9% NaCl

以上溶液都用重蒸水配制,高压消毒后于 4℃ 保存待用。  
所有的玻璃器皿用前必须高压消毒。

## 二、操 作

### 1. 细胞的处理

收集培养细胞,用生理盐水洗两次。

### 2. 蛋白酶消化

将洗好的细胞立刻加入含有蛋白酶K (100 $\mu$ g/ml) 的缓冲液 A。于冰浴中轻轻摇动半小时,然后将粘稠的裂解物于 37℃ 保温 12 小时。

### 3. 酚抽提

将经过蛋白酶K消化过的粘稠的胶体溶液转入三角瓶中,然后加入等体积的用缓冲液 B 饱和的酚,轻轻摇动 10 分钟后于 4℃ 3,500rpm 离心 15 分钟。

用粗口滴管将上层粘稠水相转入另一个三角瓶中,在相同条件下用饱和酚再抽提一次。然后用 24:1 的氯仿-异戊醇 (V/V) 抽提一次。最后将水相转入已处理过的透析袋中。

### 4. 透析

将装有样品的透析袋两端扎紧,漂浮于盛有 1L 缓冲液 C 的烧杯中,于 4℃ 冰箱透析。为加快透析速度,可用电磁搅拌。4—8 小时换一次透析液,直到透析外液于 270nm 的光吸收小于 0.05。

### 5. RNase 消化

向已透析好的样品袋内加入 RNase A 和 RNase T1,使终浓度分别达到每毫升 50  $\mu$ g 和 5 单位(用前先溶于 1ml 缓冲液 C 中,于 80℃ 处理 20 分钟)。混匀后放入盛有缓冲液 C 的烧杯内于 37℃ 保温透析 4 小时。

### 6. 蛋白酶二次消化

在盛有样品的透析袋内加入终浓度为每毫升 50  $\mu$ g 的蛋白酶K和 0.5% 的 SDS,混匀后放入盛有缓冲液 A 的烧杯内,于 37℃ 保温透析 12 小时。

### 7. 二次酚抽提

将样品转入三角瓶中再用酚抽提一次,氯仿-异戊醇抽提一次。



## 8. 透析

将样品转入已处理过的透析袋内,放入盛有缓冲液D的烧杯中,于4℃透析到外液在260nm的光吸收为零。

## 9. DNA 的测定

测定DNA样品在260nm的光吸收,然后按 $A_{260}$ 为200计算DNA的含量。

## 10. RNA 的检测

将制备的DNA样品进行琼脂糖凝胶电泳(0.7%琼脂糖,Tris-醋酸或Tris-硼酸缓冲液),于4V/cm场强下电泳6小时左右,以溴酚蓝为示踪染料,电泳后用溴化乙锭染色,紫外灯下观察或照相,可检测溴酚蓝附近是否有RNA的荧光区带出现。

## 11. 蛋白质的检测

于紫外分光光度计上测定280nm和260nm的光密度,计算二者的比值;或以结晶纯牛血清清蛋白为标准,用Lowry方法检测DNA制品中是否含有残存蛋白质。

# 三、DNA 制品的质量

## 1. 纯度

应用两种酶和重复酚抽提方法所得到的DNA制品的纯度很高,280/260nm和230/260nm波长的光吸收比值为0.51—0.53。一般情况下,用这种方法获得的DNA制品不再需要用其它方法进一步纯化。如果发现纯度不符合要求,可再进行一次RNase与蛋白酶消化、酚抽提和透析。

## 2. 分子量

在整个制备过程中,如始终注意使用温和条件,DNA制品的分子量一般可达 $10^8$ 道尔顿以上,并且DNA分子中很少有单链缺口。适用于核酸结构和功能的研究。

# 四、制备过程中应注意的问题

制备真核细胞DNA时,最好使用新收获的细胞。如果细胞放置时间过久,容易引起DNA降解。在提取过程中,如很快引起裂解液粘度降低,说明DNA已被降解。有时为了充分抑制DNase活性,在裂解细胞之前,先加入不含SDS的缓冲液A,在冰水浴中缓缓摇动30分钟,同时将EDTA的浓度加大到50—100mmol/L,随后补加蛋白酶K和10%SDS到所需浓度,再于37℃保温过夜。如果这一步取得成功,在以下的步骤中一般不会再出现太大问题。

因为真核生物的DNA分子很大,机械张力极易引起DNA分子的断裂,因此操作时条件要缓和,摇动时速度不要过快,更要避免剧烈振荡。溶液转移次数要尽量减少,而

且转移时一定要用粗口滴管。

## 五、DNA 制品的保存

用此方法所得到的高分子量 DNA 一般不再沉淀制成干品。因为分子量太大,制成干品后很难溶解,而搅拌溶解又易引起 DNA 分子断裂。在制备的最后一步,即用缓冲液 D 透析结束后,就可以分装于小试剂瓶内,置于低温冰箱保存,可以保存一年以上。

## 第二节 细菌细胞 DNA 的提取

细菌细胞和动物细胞不同,它有一层细胞壁,很不容易破裂。从细菌细胞分离 DNA,首先需要破碎细胞壁。

裂解细菌细胞可通过三种方法:(1)机械方法:如超声波、玻璃珠磨以及一些特殊破碎机械等;(2)化学方法:如用 SDS 等化学试剂;(3)溶菌酶与化学试剂相结合的方法:先用溶菌酶处理,再用 SDS 等化学试剂处理。用机械方法进行破碎时,很容易引起 DNA 分子断裂。目前,制备 DNA 一般不用机械方法裂解细菌细胞。许多细菌的细胞壁比较厚,单纯用化学试剂一般难以充分裂解。因此,一般情况下都是先用溶菌酶处理,再用 SDS 等化学试剂裂解。溶菌酶处理是最常用的方法。

在许多细菌细胞中,不但含有染色质 DNA,还含有质粒等一些染色质外的 DNA,被噬菌体转染的细菌细胞内也含有噬菌体 DNA。质粒和噬菌体 DNA 是重要的基因载体。在基因工程研究中具有重要的作用。有关质粒和噬菌体的分离和纯化方法将在第三章介绍。本节只介绍细菌细胞总 DNA 的提取方法。

### 一、试剂和材料

溶菌酶:结晶纯

TES 溶液: 50mmol/L Tris-HCl

50mmol/L NaCl

5mmol/L EDTA

pH8.0

蔗糖-TES 溶液: 10% 蔗糖

50mmol/L Tris-HCl

50mmol/L NaCl

5mmol/L EDTA

pH8.0

EDTA 溶液: 0.25mol/L EDTA<sub>Na<sub>4</sub></sub>

SDS 溶液: 10%

RNase A: 1mg/ml

RNase T<sub>1</sub>: 1mg/ml

酚：分析纯试剂，用前重蒸

NaHCO<sub>3</sub>：5%

透析袋：用 5% NaHCO<sub>3</sub> 煮沸处理，再用 5mmol/L EDTA 洗涤，高压消毒，存放于 4℃ 待用。

所有器皿用前均要消毒。

## 二、操 作

### 1. 细胞处理

细菌培养液在 4℃ 3500rpm 离心 15 分钟，收集菌体，将菌体悬浮于 TES 溶液中洗一次，再于 4℃ 3500rpm 离心 15 分钟，收集菌体。

### 2. 溶菌酶处理

称量菌体的重量，按每克湿菌体大致 1ml 的体积计算加入五倍体积预冷的蔗糖-TES 溶液，在冰浴中用玻璃棒充分悬浮。加入溶菌酶至终浓度为 1mg/ml。充分混匀后在 0℃ 处理 15 分钟。

### 3. 细胞裂解

加入 0.25mol/L EDTA 至终浓度为 0.1mol/L，轻轻混匀后处理 10 分钟，充分抑制 DNase 活性。再加入 SDS 溶液至终浓度为 1%，混匀后于室温裂解 30 分钟。

### 4. 酚抽提

在细胞裂解物中加入等体积的用 TES 溶液饱和的冷酚溶液，轻摇 20 分钟后，于 4℃ 4,000rpm 离心 15 分钟，用粗口滴管取出上层水相。再于同样条件下用饱和酚抽提二、三次，直到酚相和水相的界面上没有明显的白色沉淀物为止。

### 5. 透析

最后一次酚抽提后，将上层粘稠水相转入处理过的透析袋中，于 4℃ 对 TES 溶液透析，直到透析外液在 270nm 的光吸收小于 0.05 为止。

### 6. RNase 处理

向透析后的 DNA 粗制品中加入 RNase A 和 RNase T1 到终浓度分别为 50 μg/ml 和 30 μg (用前在 80℃ 处理 20 分钟)。在透析袋内混匀后，于 37℃ 对 TES 溶液保温透析半小时到一小时。

### 7. 二次酚抽提

用 RNase 处理后，将 DNA 提取物转入带磨口塞的锥形瓶中，加 TES 溶液饱和的酚，轻轻摇动 15 分钟，于 4℃ 4,000rpm 离心 15 分钟，将上层水相转入处理过的透析袋中。

## 8. 透析

将盛有 DNA 的透析袋于 4℃ 对 TES 溶液透析,直到透析外液在 260nm 的光吸收为零。这时即可将 DNA 溶液分装于小试剂瓶中,于低温冰箱保存。

## 三、制备大分子细菌 DNA 的几个关键步骤

(1) 破碎细胞壁时,最好用溶菌酶处理,尽量避免使用超声波等机械方法。不同种属的细菌对溶菌酶的敏感性不同,溶菌酶的用量可以增加或减少。对溶菌酶不敏感的某些菌株或细菌孢子可加入巯基试剂协同处理。溶菌酶处理要在低温进行。

(2) 在溶菌酶处理之前,先将细菌悬浮于高渗的蔗糖-*TES* 溶液中。因为在高渗溶液中质膜不易胀破,溶菌酶破碎细胞壁时不会引起细胞的骤然裂解,保持细胞内部各亚细胞结构的完整,防止 DNA 被 *DNase* 降解。

(3) 先用 *EDTA* 充分抑制 *DNase* 活性,再用 *SDS* 或 *Sarkosyl* 等去污剂裂解细胞,可防止 *DNase* 降解,保证 DNA 分子的完整性。

(4) 一些比较早期的文献中,在进行酚抽提之后用乙醇沉淀,用玻璃棒捞取 DNA 纤维状沉淀的方法进行分离,这样可以保证 DNA 的纯度。但在反复沉淀和溶解过程中容易引起 DNA 的断裂,使 DNA 制品的分子量降低。用透析方法脱酚条件缓和,适用于制备高分子量 DNA。

(5) 操作过程中要始终注意使用温和条件,避免剧烈摇动和振荡,尽量减少机械张力所引起的 DNA 降解。

## 第三节 从动物组织制备高分子量 DNA

在许多 DNA 研究工作中,需要直接从动物组织制备高分子量 DNA。与培养细胞相比,从动物组织制备高分子量 DNA 更为困难。动物组织难于破碎,用一般匀浆方法捣碎组织易引起 DNA 断裂,而且时间比较长,在此期间 DNA 可能会被 *DNase* 降解,因此用一般方法难以从动物组织大量制备高分子量的 DNA。为了解决这一问题,可在液氮中用组织匀浆捣碎机将动物组织打成细粉,然后在 *EDTA* 充分抑制 *DNase* 活性的条件下,用蛋白酶 *K* 和去污剂共同裂解细胞。这种将液氮冷冻法与强活性蛋白酶 *K* 相结合,可以直接从动物组织大量制备高分子量 DNA。裂解组织细胞效果比较好的是阴离子去污剂 *Sarkosyl*,用 *SDS* 也能得到良好的结果。

### 一、试 剂

1. *SDS* 溶液: 10%

2. 缓冲溶液 1: 50mmol/L *Tris-HCl*  
200mmol/L *EDTA*  
10mmol/L *NaCl*

pH8.0

3. 缓冲溶液 2: 100mmol/L Tris-HCl  
10mmol/L EDTA  
10mmol/L NaCl  
0.5% SDS

pH8.0

4. 缓冲液 3: 50mmol/L Tris-HCl  
0.5mmol/L EDTA  
10mmol/L NaCl

pH8.0

5. 缓冲液 4: 10mmol/L Tris-HCl  
0.5mmol EDTA  
10mmol/L NaCl

pH8.0

以上溶液用重蒸水配制,高压灭菌后于 4℃ 保存。

6. 蛋白酶 K 溶液: 1mg/ml  
7. RNase A: 1mg/ml  
8. RNase T<sub>1</sub>: 1mg/ml  
9. 重蒸酚: 分析纯酚,用前重蒸,分装于棕色试剂瓶(或用黑纸包好),置于冰箱保存。颜色变粉红时不能再用。  
10. 透析袋: 用 5% NaHCO<sub>3</sub> 煮沸 10 分钟后,再用 5mmol/L EDTA<sub>Na<sub>2</sub></sub> 洗涤,高压消毒后使用。  
11. 玻璃器皿: 用前都要高压消毒。

## 二、操 作

### 1. 组织破碎

处死动物后立即取出所用的组织(一般取肝脏、肾脏、脾脏、胸腺等结缔组织少、易破碎的器官,正常人可用胎盘组织),剔除结缔组织和凝血块之后立即投入液氮中,彻底冻透后,放入匀浆捣碎机的不锈钢筒中,加入液氮将组织打成细粉。如实验室中没有这种带不锈钢筒的匀浆捣碎机,则可用瓷研钵代替。具体做法是,用前先将瓷研钵高温灭菌。将液氮冻透的组织包在几层消毒纱布中,用木榔头砸成小块,放入研钵中,加入少量液氮进行研磨,边加液氮边研磨,直到研成细粉(操作时要带手套以免手被冻伤)。

### 2. DNA 的制备

将研磨好的组织细粉转入一个带磨口塞的三角瓶内,按每克组织 10ml 的比例加入缓冲液 1,在冰水浴中轻轻摇动半小时到 1 小时,然后加入蛋白酶 K 至终浓度为 100μg/ml,再加入 SDS 至终浓度为 0.5%。轻轻摇动混匀和裂解细胞,半小时后,于 37℃ 保温 12 小时。

蛋白酶消化后,加入等体积用缓冲液 2 饱和的酚,轻轻摇动 15 分钟,于 4℃ 3,500rpm 离心 15 分钟。在相同条件下,再用酚和 24:1 的氯仿-异戊醇 (V/V) 各抽提一次。最后将粘稠的水相用粗口滴管转入已处理过的透析袋内。

将透析袋置于盛有缓冲液 3 的烧杯内,于 4℃ 冰箱透析,4—8 小时换一次透析液,直到透析外液于 270nm 的光吸收小于 0.05,为了加快透析速度可用电磁搅拌。

透析结束后,加入终浓度为 50 μg/ml 的 RNaseA 和 RNase T1 (用前于 80℃ 处理 20 分钟)充分混匀,放入盛有缓冲液 3 的烧杯内,保温消化和透析 4 小时。

· RNase 消化后再往透析袋内加入终浓度为 50 μg/ml 的蛋白酶 K 和 0.5% 的 SDS,放入盛有缓冲液 3 的烧杯内保温消化 12 小时。然后,再进行两次酚抽提。

将酚抽提后的粘稠水相转入另一处理过的透析袋内,放入盛有缓冲液 4 的烧杯内;于 4℃ 透析至透析外液在 260nm 的光吸收为零。

### 3. DNA 的测定

DNA 样品经过稀释后测定在 260nm 的光吸收,按  $A_{260}$  为 200 计算 DNA 的含量。

### 4. 残存蛋白质和 RNA 的检测

将 DNA 制品进行琼脂糖凝胶电泳,以溴酚蓝为示踪染料,电泳后用溴化乙锭染色,紫外灯下观察和照相,可检测出溴酚蓝附近是否含有 RNA 的荧光区带。如同时上样一个已知分子量的 DNA,以此为标准(如 λ DNA)可大致判断所得 DNA 的平均分子量。

DNA 样品经过稀释后,在紫外分光光度计上分别测定 280nm 和 260nm 的光吸收。计算二者之间的比值,可判断残存蛋白质的量。也可以标准蛋白质为对照,用 Lowry 方法检测 DNA 制品中残存的蛋白质。

一般情况下,经过酶的反复消化和数次酚抽提之后,应没有可检测到的 RNA 和蛋白质存在。280nm 与 260nm 的光吸收比值一般在 0.51 至 0.53。如仍有可检测到的 RNA 和蛋白质,可再用 RNase、蛋白酶 K 和酚各处理一次。在制备过程中如能始终保持温和条件。尽量减少机械张力的作用,同样可从动物组织制备  $10^9$  道尔顿以上的 DNA 制品。

## 三、制备过程中应注意的问题

处死动物取出所用的脏器,应尽快放入液氮中,以免 DNase 引起 DNA 的降解。用研钵研磨组织时,一定要边研磨边加液氮,避免组织融化变软。组织要尽量研磨得细一些,颗粒如太大,细胞裂解不易彻底,在随后的保温过程中会导致 DNA 严重降解。有时也会因为 DNase 活性不能充分抑制而引起 DNA 降解。因此,在用蛋白酶 K 和去污剂裂解细胞之前,最好先用不含去污剂和蛋白酶的缓冲液 1 在冰浴中悬浮组织粉。因缓冲液 1 中含有浓度比较高的 EDTA,可充分抑制 DNase 活性,随后再加入蛋白酶 K 和去污剂裂解细胞,可获得良好结果。

#### 四、DNA 制品的保存

DNA 制品经过缓冲液 4 透析之后,即分装于小试剂瓶,置于低温保存。用完一个包装后再用另一个包装,尽量避免反复冻融。

## 第二章 DNA 的羟基磷灰石柱层析与 DNA 复性研究方法

### 第一节 DNA 的羟基磷灰石柱层析

#### 一、概 述

羟基磷灰石 (HA) 是由磷酸氢钙晶体 ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 加碱经热处理后得到的碱式磷酸钙 [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] 结晶。核酸分子与羟基磷灰石之间的相互作用是一个比较复杂的物理化学过程。其最主要的结合力是核酸分子上的磷酸基团和羟基磷灰石晶体表面的钙之间的极性吸附。这有以下几个方面的实验证据: (1) 核苷一磷酸、核苷二磷酸和核苷三磷酸相比, 核苷三磷酸与羟基磷灰石的亲和力最大。(2) 当有与钙有较强亲和力的 EDTA 等螯合剂存在时, 可降低核酸分子与羟基磷灰石间的亲和力。(3) 在羟基磷灰石悬浮液中加入 DNA 后, 由于降低了晶体颗粒之间的排斥力, 使沉降速度增加。(4) 羟基磷灰石在  $1\text{mmol/L}$ ,  $\text{pH}6.8$  的磷酸缓冲液中电泳时, 证明带正电荷。(5) 磷酸化蛋白质比非磷酸化蛋白质对羟基磷灰石有较大的亲和力。利用羟基磷灰石的这一性质, 在低磷酸盐缓冲体系中上样, 使核酸分子吸附到羟基磷灰石上, 然后增高磷酸盐浓度进行洗脱分离。

羟基磷灰石对分子量的分辨力比较低, 对不同的碱基组成有一定分辨力, 而对单链与双链、天然与变性等核苷酸分子高级结构上的差异分辨力很高。因此, 特别适用于分离单链与双链 DNA 以及分离双链 DNA 与 RNA。总之, 羟基磷灰石对于刚性有序结构的大分子的亲和力大于柔性的无序结构的大分子。用它分离天然生物大分子与变性生物大分子常可得到满意的结果。

羟基磷灰石的吸附能力和所用试剂有很大关系。如果溶液中含有与  $\text{Ca}^{2+}$  有较强亲和力的 EDTA、柠檬酸盐等螯合剂, 则导致对核酸分子的吸附作用大大降低。在制备核酸样品时, 缓冲溶液中常含有这类试剂, 在柱层析前, 要通过透析降低其含量。

羟基磷灰石具有承载量大、重复性好、回收率高、使用温度范围广等优点, 它是目前常用的核酸层析方法之一。在核酸的分离纯化和复性动力学、液相杂交等方面的研究工作中有广泛的应用。

#### 二、羟基磷灰石的制备

$0.5\text{mol/L}$   $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  和  $0.5\text{mol/L}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  溶液各两升, 于室温以每小时  $250\text{ml}$  的速度分别滴到盛有  $200\text{ml}$   $1\text{mol/L}$   $\text{NaCl}$  溶液的大烧杯内, 同时不断搅拌, 使生成的  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  结晶不沉积在烧杯底部。滴加完毕, 继续搅拌 1 小时, 静置使沉淀完全。吸去上清, 沉淀用  $4\text{L}$  蒸馏水洗两次, 悬浮于  $4\text{L}$  蒸馏水中, 搅拌滴加  $100\text{ml}$



40% 的 NaOH (W/W), 于 40—50 分钟内将悬浮液迅速加热至沸腾并持续半小时到 1 小时。静置使  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{OH})_2$  自然沉下, 倾去上清, 用 4L 蒸馏水洗, 静置使沉淀自然沉下, 当沉淀达 2cm 厚度时, 迅速倾去含细颗粒的上层液, 用 4L 蒸馏水漂洗两次, 沉淀悬浮于 4L 10mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH6.8) 中, 迅速加热至沸腾, 立即停止加热, 静置使之沉淀, 吸去上清液, 用 1mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH6.8) 悬浮洗三次。沉淀再悬浮于 4L 1mmol/L 磷酸钠缓冲液洗沉淀两次(使最终 pH = 6.8), 最后悬浮于 1mmol/L 磷酸钠缓冲液中, 分装消毒后置于冰箱保存。

### 三、柱层析方法

#### 1. 装柱

选取大小适用的柱子, 夹住出口。先注入一定体积的 0.001mol/L 磷酸钾缓冲液(一般所用磷酸盐缓冲液的 pH 均为 6.8, 以下相同), 然后慢慢加入羟基磷灰石悬浮液, 使羟基磷灰石自然沉积于柱子底部, 当达到 1cm 高度时, 打开柱子底部的出口夹, 使缓冲液自然滴下, 同时不断加入悬浮液, 当羟基磷灰石达到所需要的高度时, 则停止加入。也可把羟基磷灰石悬浮液加入到一个分液漏斗, 把分液漏斗架到柱子的顶端, 然后进行装柱。装柱过程中不断小心地搅动分液漏斗中的悬浮液, 这样可使柱子上下比较均一。

#### 2. 加样

柱子下端出口连在紫外监测仪上进行监测, 上样前先用 0.5 mol/L 磷酸钾缓冲液洗到仪器基线, 再用 0.001mol/L 磷酸钾缓冲液洗到仪器基线后即可加样。样品浓度可为 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  到 1mg/ml。每毫升床体积的羟基磷灰石总的加样量不能超过 0.5mg。溶解 DNA 样品的缓冲溶液为磷酸盐缓冲液或 NaCl 溶液。但溶液中要尽量避免存在 EDTA、柠檬酸盐等  $\text{Ca}^{2+}$  的络合剂。样品中残存的氯仿、异戊醇、酚、甲醛、尿素等对层析行为无太大影响。

#### 3. 洗脱

洗脱液一般使用 pH6.8 的磷酸钾或磷酸钠缓冲液, 在比较低的温度时(例如 4 $^{\circ}\text{C}$ ), 磷酸的钠盐溶解度比钾盐低, 超过 0.3mol/L 浓度时, 最好用磷酸钾缓冲液。洗脱过程中可保持 30—50cm 水柱高的流体静压力, 或用微量泵控制流速在每小时 5—50ml/cm<sup>2</sup>。要保证有一定时间使核酸分子与羟基磷灰石之间达到吸附平衡, 防止洗脱峰扩展。可自紫外监测的自动收集器收集各洗脱峰。洗脱过程可通过以下两种方法进行。

(1) 递增浓度的分步洗脱: 洗脱液的浓度顺序可以为 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.20, 0.25, 0.3, 0.5mol/L 等的磷酸钾缓冲液, 根据具体需要进行调整和选用。这种方法对于含有预知洗脱浓度不同的物质样品是很适用的。操作方便, 步骤简单。但是也有缺点, 一种物质有时在一种浓度下不能完全洗脱干净, 从而导致拖尾和出现假峰。

(2) 线性浓度梯度洗脱: 进行线性梯度洗脱时, 洗脱液的浓度改变是连续的。最简单和常用的梯度洗脱装置是双筒梯度仪。洗脱核酸常用的低浓度溶液为 0.001 mol/L 的磷酸钾缓冲液。高浓度为 0.5mol/L 磷酸钾缓冲液。为了得到相同离子强度的线性梯度