

细胞分子生物学

实验操作指南

编著: 郭葆玉

A

**PROTOCOL OF
CELL MOLECULAR BIOLOGY
EXPERIMENT**

第二军医大学出版社

内 容 提 要

本书以分子生物学,特别是细胞分子生物学及基因的方法学为主,详细地介绍了有关当前最新的分子生物学实验方法,其特征是采用了实验室中实验方案的流程式,清晰明了,步骤连贯,内容丰富,基本反映了90年代以来的细胞分子生物学技术的飞速发展。书后附有常用试剂配制、名词解释、限制性内切酶、基因编码等内容,对于从事生物学、分子生物学、生物化学、基础医学研究的人员,以及医学及其他相关院校的师生和临床医师,特别是研究生很有参考价值。

图书在版编目(CIP)数据

细胞分子生物学实验操作指南/郭葆玉编著. - 上海:
第二军医大学出版社,1998.3

ISBN 7-81060-003-6

I.细… II.郭… III.细胞学:分子生物学-实验-指南 IV.Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(98)第 00431 号

细胞分子生物学实验操作指南

编 著:郭葆玉

责任编辑:李春德

第二军医大学出版社出版

(上海翔殷路 800 号 邮编:200433)

新华书店上海发行所发行

第二军医大学出版社排版 昆山市亭林印刷总厂印刷

开本:850×1168 1/32 印张:6.25 字数:165 648

1998 年 4 月第 1 版 1998 年 4 月第 1 次印刷

印数:1~3500

ISBN 7-81060-003-6/Q·001

定价:15.00 元

前 言

分子生物学是生命科学中发展很快的学科之一,尤其是近20年来,我国生命科学的研究也进入了分子水平,并取得了令人瞩目的成就。现在,分子生物学的理论已在生命科学、医药学和工农业生产等各个领域里得到广泛的应用。为了迅速适应学科发展的需要,许多高等院校已相继给本科生、研究生开设分子生物学课程,以期赶上国际上日新月异的发展。

与一些发达国家相比,我国的生命科学分子水平的研究仍然需要建立更多的实验室,投入更多的人力、物力和财力。在实验课程和实验室的数量和质量上仍需做出更多的努力。笔者认为,如果没有一个好的实验室就很难做出一流的成果。鉴于这个初衷,本人感到有责任将一些已经常规化的和一些新的方法介绍给众多的青年同道。

本书在内容上刻意追求规范、新颖、全面,同时注意系统地介绍分子生物学,特别是细胞分子生物学的新方法、新技术。如DNA、RNA的提取,基因工程的基本方法、PCR、SS-CP-PCR、RT-PCR等,同时还介绍了基因作图、序列分析技术。基因的转染即真核细胞基因的导入,如磷酸钙沉淀共转染,DEAE-dextran, lipotransfer及电穿孔法。同时还介绍了失控转录分析,足迹法等细胞核和转录调控方面的研究方法。书后还附有一些基因工程中的名词,限制性内切酶和有关的参考资料。

总之,作者想尽可能地包罗更多、更新的方法和技术,但因本书完成于博士生在读和在国外留学期间,时间紧、任务重,只能抽出晚上或节假日疾笔挥就,加上本人学识水平有限,所涉及专业跨度很大,错误之处在所难免,竭诚希望国内同行及先辈批评指正。

郭葆玉

1997年11月于上海

目 录

人和哺乳动物细胞基因组 DNA 制备法	(1)
一、从培养物和组织细胞中提取 DNA	(1)
二、从人全血细胞中提取基因组 DNA	(4)
从真核细胞中抽提总 RNA	(7)
一、异硫氰酸胍-超离心法	(7)
二、NP ₄₀ 法	(10)
三、胍酚氯仿法	(13)
制备高纯度 mRNA——寡脱氧胸苷纤维素柱层析法	(18)
制备高纯度 mRNA-寡脱氧胸苷乳胶法	(21)
寡聚脱氧胸苷纤维素柱精制 mRNA	(24)
质粒 DNA 的提取	(27)
氯化铯密度梯度超离心提取质粒 DNA	(33)
噬菌体 DNA 的制备和纯化	(37)
少量酵母 DNA 制备法	(43)
聚合酶链反应技术	(45)
聚合酶链反应-单股构型多态性方法	(51)
反转录聚合酶链反应法	(54)
原位杂交技术	(56)
缺口平移和多头引物	(64)
缺口平移法制备 α - ³² P 标记的探针	(66)
随机引物法制备 α - ³² P-dNTP 标记 DNA 探针	(69)
末端标记法	(70)
琼脂糖凝胶电泳	(72)
DNA 连接前的脱磷反应	(74)
一、脱磷反应 I	(75)
二、脱磷反应 II	(76)
DNA 序列分析	(81)
DNA 酶 I “足迹”法	(86)
核失控转录测定法	(92)
分离酵母人工染色体插入片段	(99)
人基因组限制性酶切片段的制备和分离	(102)
DNA 的部分酶解	(104)
哺乳动物细胞基因的导入	(107)

一、磷酸钙共转染法	(107)
二、DEAE-葡聚糖法导入基因	(109)
三、脂质转染	(110)
四、电穿孔法	(112)
融合蛋白表达及其多克隆抗体的制备	(115)
附一	(120)
附二	(124)
Southern 印迹杂交	(125)
用 Southern 印迹法分析 DNA 分子上的 DNA 酶 I 高敏感位点	(130)
Northern 印迹杂交	(134)
感受态细菌制备及转化实验	(137)
cDNA 的合成和克隆	(141)
一、单链 cDNA 的合成	(141)
二、双链 cDNA 的合成	(144)
三、核酸酶 S_1 消化双链 cDNA	(145)
四、核酸酶 S_1 消化产物的分离——蔗糖密度梯度离心法	(146)
五、双链 DNA 加尾	(147)
六、退火	(149)
七、转化	(149)
λ gt11 cDNA 文库扩增及免疫法筛选	(151)
一、文库扩增	(151)
二、免疫筛选 λ gt11 cDNA 文库	(153)
十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 印迹	(156)
一、十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳	(157)
二、Western 印迹	(158)
^{35}S 和 ^{32}P 标记细胞	(162)
一、 ^{35}S -甲硫氨酸标记	(162)
二、 ^{32}P -正磷酸盐标记	(163)
附录一 常用试剂配制	(165)
附录二 有关技术	(171)
附录三 名词解释	(172)
附录四 限制性内切酶的使用方法说明	(178)
附录五 常用限制酶识别序列	(179)
附录六 遗传密码	(187)
附录七 氨基酸符号及密码子	(188)
附录八 相关技术资料	(189)

人和哺乳动物细胞基因组 DNA 制备法

在研究人类基因组和动物细胞基因组染色体的基因定位、文库构建、大尺度和精细物理图谱分析、指纹图谱分析中,必须分离、制备染色体 DNA,经典的方法是在 SDS 和 EDTA 溶液中,由蛋白酶 K 消化细胞蛋白质,由 SDS 或 sarkosyl 破坏核膜而使 DNA 释放入水溶液。其中 EDTA 螯合 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等金属离子,抑制 DNA 酶对 DNA 的降解作用,SDS 还可破坏细胞膜上的脂肪与蛋白,并与蛋白质结合成为 $\text{R}_1\text{-O-SO}_3^- \cdots \text{R}_2\text{-}$ 蛋白质复合物使蛋白质变性而沉淀下来。这时大分子 DNA 在酒精中析出絮状物,以无菌玻璃棒或细塑料棒搅拌缠绕将 DNA 挑出,在 70% 酒精中漂洗脱盐,真空干燥后溶解在 TE 中。此方法制备的 DNA 大小一般为 40 ~ 150 kb,经部分酶解后可供 P_1 、Cosmid 及噬菌体文库构建。如制备更大的基因组 DNA,则需用完整细胞基因组 DNA 的低熔点胶包块法,可得 1 000 kb 左右的基因组 DNA。

一、从培养物和组织细胞中提取 DNA

(一) 操作方法

取 2 瓶或 2 皿人或动物细胞系或原代细胞



倾去培养液



用冷 PBS(-)10 ml 洗涤 1 次



用细胞刮匙轻刮下细胞,将这些细胞放入 15 ml 离心管

↓
加入 10 ml 预冷的 PBS(-)到离心管

↓
以 800 r/min 水平离心机上离心 5 min, 室温下倾去上清, 向沉淀加入 20 倍
体积蛋白酶 K(终浓度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

↓
在 55 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中, 15 ~ 20 r/h 转鼓上旋转温育过夜

↓
加等量饱和酚(用 TNES 饱和)

↓
轻轻旋转, 室温下 10×10^3 r/min 离心 10 min

↓
取液相, 加等量酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1)

↓
强烈振摇, 室温下以 10×10^3 r/min 离心 10 min

↓
取液相, 加 2 倍体积 -20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷乙醇, 置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜(至少 2 h)

↓
用无菌玻璃棒缠绕 DNA

↓
70% 乙醇蘸洗 2 次

↓
真空抽干, 溶解在 pH8.0 的 50 ~ 100 μl TE 中

↓
在紫外分光光度计上测 D 值, $\lambda = 260/280$ nm

↓
0.8% ~ 1% 琼脂糖凝胶上电泳分析

↓
照像, 加入 10 μl 氯仿, 4 $^{\circ}\text{C}$ 贮存。

(二) 注意事项

1. 本法简便易行,在一般低速离心机上进行即可完成。
2. 本法的成功与否,关键步骤是蛋白酶 K 消化要好,55℃过夜,不时轻轻振摇,否则蛋白质不易去除,且 DNA 得率低。也可自制一小型转鼓,置 55℃孵箱内,30~40 r/h,效果更好。
3. 加入 -20℃冷酒精后,轻轻翻转,逐步可见絮状物出现,用一头部圆形的塑料棒(或玻璃棒)轻轻挑出 DNA。
4. 挑出后在一盛 70%酒精的平皿中轻轻蘸洗 5 s。
5. 整个试验过程中动作要轻,防止猛烈振动使 DNA 断裂。
6. 琼脂糖凝胶电泳用 0.5×TBE 缓冲液。
7. 如需长期保存,亦可加一滴甘油,置 4℃冰箱。
8. 一般 10^6 细胞可得 15~20 μg DNA, $D_{260} = 20$,约 1 mg/ml。
9. 组织细胞则先行在匀浆器中匀浆,其余步骤同上。

(三) 试剂配制

TNES 缓冲液:

- 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0);
- 0.15 mol/L NaCl;
- 10 mmol/L EDTA;
- 0.1% SDS。

取:

- 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 10 ml;
- 5 mol/L NaCl 30 ml;
- 0.25 mol/L EDTA 40 ml;
- 10% SDS 10 ml;
- ddH₂O 910 ml;

蛋白酶 K 溶液 (10 mg/ml):

- 蛋白酶 K 1.0 mg;

10% SDS 50 μ l;
0.25 mol/L EDTA (pH7.4) 10 μ l;
ddH₂O 40 μ l。
PBS(-):
NaCl 8.0 g;
KCl 0.2 g;
Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g;
KH₂PO₄ 0.2 g;
ddH₂O 定容至 1 000 ml。

PBS(-)、TNES 需高压灭菌处理(通常在 1.034×10^5 Pa 下灭菌 30 min)。

二、从人全血细胞中提取基因组 DNA

(一) 操作方法

取 5 ml 新鲜抗凝全血(包括待检病人,正常人标本)

↓

加 5 倍体积红细胞裂解缓冲液,在冰上冷育 30 min、间隔 5 min 猛烈振摇 1 次

↓

室温下 1 000 r/min 离心 10 min

↓

弃上清,加入红细胞裂解液后重复上述步骤 1 次

↓

加入 5 ml TNES 和蛋白酶 K(终浓度 100 μ g/ml),55℃ 旋转温育过夜

↓

加 5 ml ddH₂O 和 5 ml NaCl 饱和液(6 mol/L 浓度),振摇

↓

室温下 3 000 r/min 离心 10 min

↓
将上清移入新的离心管中
↓
加 2.2 倍 -20℃ 预冷乙醇, 轻轻振摇
↓
用无菌玻璃棒挑取 DNA
↓
70% 乙醇蘸洗 1 次
↓
真空抽干, 加 200 ~ 300 μ l TE, 37℃ 溶解
↓
紫外分光光度计测 D 值, 加 1 滴氯仿置 4℃ 保存。

(二) 注意事项

1. 凡未注明离心温度者可在室温下进行。
2. 凡未注明酒精浓度者均为无水乙醇。
3. 本法既避免了酚/氯仿等有机试剂对人体伤害, 又简化了 DNA 的提取步骤。实验结果表明, 1 ml 抗凝血可得 DNA 20 ~ 60 μ g, $D_{260/280}$ 为 1.5 ~ 1.8, 分子量大于 23 kb 且无降解。
4. 开始溶解红细胞以冰浴后裂解液透明表示红细胞已裂解。
5. 如 3 000 r/min 离心后无蛋白质沉淀, 可再重复上一步骤。
6. 该法成功的关键有二, 一是裂解红细胞要完全(可用力振摇帮助裂解), 二是蛋白酶 K 消化要彻底。

(三) 试剂配制

红细胞裂解缓冲液:

- 155 mmol/L NH_4Cl ;
- 10 mmol/L NH_4HCO_3 ;
- 1 mmol/L $\text{EDTA}\cdot 2\text{Na}$;

NH_4Cl 4.145 g;

NH_4HCO_3 0.035 g;

0.1 mol/L EDTA(pH7.4) 5 ml;

ddH₂O 350 ml。

将 pH 调至 7.4, 加 ddH₂O 至 500 ml, 在 1.034×10^5 Pa 下灭菌
30 min。

蛋白酶 K 溶液:

蛋白酶 K(10 mg/ml) 5 mg;

10% SDS 50 μl ;

0.25 mol/L EDTA·2Na 4 μl ;

加 ddH₂O 定容至 500 μl 。

从真核细胞中抽提总 RNA

在提取总 RNA 时一个非常值得注意的问题是防止 RNA 酶的混入,一般实验室的玻璃器皿、唾液和汗液都可能是 RNA 酶的污染源,故在操作时始终应戴一次性手套进行,玻璃器皿应在 250℃ 烘烤 4 h 以上或 180℃ 5 h 以上,其他器具如电泳仪,应用 3% H₂O₂ 浸泡 2 h 以上,用 0.2% DEPC 处理的高压灭菌的蒸馏水冲洗 3 次以上,烘干待用。

一、异硫氰酸胍-超离心法

异硫氰酸胍(guanidine isothiocyanate)是一类有效解偶剂,当细胞被它溶解后,蛋白质二级结构消失、细胞结构降解,核蛋白迅速与核酸解离。在 4 mol/L 异硫氰酸胍和 β-巯基乙醇存在下,RNA 酶失活,可提取完整的总 RNA。

(一) 试剂、器械

H₂O 用 Millipore 滤器 Mili-Q 过滤后,高压灭菌(121℃ 30 min)后使用。

异硫氰酸胍溶液:

6 mol/L 异硫氰酸胍,称取粉末 141.7 g;

10 mmol/L 柠檬酸钠,取 1 mol/L 储存液 2 ml;

0.5% 十二烷基肌胺酸钠,称取粉末 1.0 g;

ddH₂O 198.6 ml。

上述试剂混合后置热搅拌器上,微微加热溶解,经过 0.45 μm 滤膜过滤,再加 2-巯基乙醇(原液 14.2 mol/L) 1.41 ml,倒入塑料容器内

贮存。如使用时有泡沫产生,可考虑适当添加 2~3 滴抗泡沫剂。

PBS: × 10 贮存液:

NaCl 80 g;

KCl 2.0 g;

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 29 g;

KH_2PO_4 2.0 g;

ddH₂O 1 000 ml。

溶解后置 4℃ 冰箱保存,使用时 10 倍稀释,因直接接触细胞,故用重蒸水配制。使用前经高压灭菌(121℃ 30 min)。

氯化铯溶液:

5.7 mol/L 氯化铯(CsCl) 粉末 48 g;

0.1 mol/L EDTA-Na pH7.5,取 0.5 mol/L 贮存液 10 ml;

加 ddH₂O 至 50 ml 后,高压灭菌,室温保存。

氯仿/异丁醇(4:1)。

(二) 操作方法

每个细胞系准备 10 只培养皿(15 cm 直径)

↓

倾去培养基,用冷 PBS 洗 2 次

↓

每皿加数滴异硫氰酸胍溶液

↓

用刮匙轻轻刮起细胞层

↓

收集细胞并在匀浆器中溶解

↓

用乳钵槌小心匀浆破碎

↓

将溶液通过 18 号针头 12 次乳化

↓
加 CsCl(0.5%) 2.5 ml 匀浆
↓
将上述匀浆放入含 12 ml CsCl-EDTA-Na 的超净离心管中
↓
25 000 r/min 离心 12 h, 20℃
↓
弃去上清液, 每次用 1 ml 异硫氰酸胍溶液清洗管壁 3 次
↓
切断上部离心管
↓
弃去 CsCl 液
↓
用 1 ml 95% 冷乙醇将 RNA 沉淀洗 3 次
↓
空气干燥
↓
悬浮在 2 ml ddH₂O 中
↓
加等体积氯仿/异丁醇(4:1)
↓
反转混匀 2 min, 3 000 r/min 离心 10 min
↓
取液相加 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠(pH7.0)
↓
加 2.5 倍体积冷酒精
↓
置干冰 10 min 或 -20℃ 过夜
↓
3 000 r/min 离心 1 h, 4℃ 弃上清
↓

80% 酒精洗 2 次沉淀



空气干燥



悬浮在 1 ml ddH₂O 中, -80℃ 贮存。

(三) 注意事项

1. 如用 15 cm 直径平皿 10 只一般可得 3 ~ 10 mg 的总 RNA (细胞总数达 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$), 最佳细胞龄以 4 ~ 12 h 为宜, 此时 RNA 丰度较高。可用 75 ml 容量的培养瓶 10 只代替平皿。

2. 10 只平皿共用 20 ml 左右异硫氰酸胍, 每 2 只皿可用 4 ml, 然后合并。

3. 有时可省略用刮匙刮细胞层, 而是吹打细胞后直接吸出。

4. 20 ml 异硫氰酸胍加细胞溶解产物及洗皿用异硫氰酸胍溶液后共得约 26 ml 匀浆。

5. 停止离心机以不用刹车为好。

6. 在离心中 RNA 在管底部形成沉淀, DNA 和蛋白因浮力密度小, 故在 CsCl 中向上移, 最后 DNA 在管底部向上 1/3 白色处, RNA 在底部。

7. 用 1 ml 异硫氰酸胍溶液沿内壁轻轻清洗, 再吸除。

8. 在异硫氰酸胍溶液清洗部分切断。

9. 室温放置 20 min。

10. 如用组织块抽提, 则先剪成 1 mm³ 大小组织块, 胰酶消化, 洗涤, 然后按上述过程进行。一般 1 ~ 3 g 为宜, 如不立即抽提, 需储存 -70℃ 或液氮中, 使用时速溶。

二、NP₄₀ 法

该法可用 10 cm 直径的培养皿数只或小的培养瓶数只, 操作过

程可在 1.5 ml 的 Eppendorf 管中进行,此法较多用于斑点印迹(dot blot)分析。

(一) 试剂与器材

溶液 I:

10 mmol/L Tris-HCl (pH7.4), 1 mol/L 贮存液 1.0 ml;

10 mmol/L NaCl, 5 mol/L 贮存液 0.2 ml;

3 mmol/L MgCl₂, 1 mol/L 贮存液 0.3 ml;

dd H₂O, 定容至 100 ml。

高压灭菌,室温保存。

蛋白酶 K:

2 × 缓冲液:

200 mmol/L Tris-HCl (pH7.5) 1 mol/L 贮存液 20 ml;

300 mmol/L NaCl, 5 mol/L 贮存液 6 ml;

40 mmol/L EDTA-Na (pH7.5), 0.25 mol/L 贮存液 16 ml;

ddH₂O, 定容至 100 ml;

高压灭菌,室温保存。

PBS 见有关章节。

氧钒核苷复合物(vanadyl ribonucleoside complex, VRC) BRL 编码 5522SA;200 mmol/L 溶液;ddH₂O Milli-Q 高压灭菌后过滤。

(二) 操作方法

用冷 PBS 洗平皿或培养瓶中的细胞培养物 1 次

↓

将细胞刮入 50 ml 离心管中,加 20 ml PBS

↓

800 r/min 离心 10 min,室温

↓