

野生动物研究法-课程教学改革与实践

实验室操作技术指导

鲍伟东 高福利

北京林业大学生物学院

2010 年 12 月

目录

实验一 动物DNA的提取	3
实验二 琼脂糖凝胶电泳检测DNA	8
实验三 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测外源蛋白的表达.....	10
实验四 PCR体外扩增DNA片段与扩增产物的检测分析	错误！未定义书签。
实验五 从琼脂糖凝胶中回收DNA片断.....	错误！未定义书签。
实验六 目的基因片段与载体连接.....	错误！未定义书签。
实验七 RAPD和ISSR技术.....	20
实验八 SSR简单序列重复标记	22
实验九 PCR 单链构象多态性分析.....	错误！未定义书签。
实验十 DNA指纹图谱分析.....	24
实验十一 动物总 RNA 的提取及含量测定	27
实验十二 动物组织 mRNA 提取实验方法.....	34
实验十三 RNA 的定量和完整性分析.....	35
实验十四 综合实验：逆转录 PCR	38
附录：常用缓冲液的配置.....	41

实验一 动物 DNA 的提取

一、新鲜组织DNA 的提取

1. 实验原理

生物组织中的DNA是以核蛋白(DNP)形式存在于细胞核中，提取前首先应粉碎组织，裂解细胞膜和核膜，使DNP 释放出来，再用苯酚提取蛋白。由于细胞中的核糖核蛋白(RNP)和DNP 往往一起被提取，DNA 沉淀中混有RNA。需用核糖核酸酶(RNase)处理，去除RNA。并用蛋白酶将遗留的少量蛋白质水解除去，再经苯酚处理，乙醇沉淀，最后可得较为纯净的DNA。它的纯度可以从260nm波长处的光密度和280nm 波长处的光密度之比值测知，一般以 $O.D_{260nm} / O.D_{280nm}$ 能达到1.8 左右为标准。

DNA 的定量可采用化学的定磷法、定核酸法。目前多数实验室采用紫外分光光度法测定核酸含量，以下公式可作为紫外定量时参考：双链DNA 含量： $O.D_{260nm} \times \text{样品稀释倍数} \times 50 \mu\text{g} / \text{ml} = \mu\text{g/ml}$ 样品。

2. 试剂及器材

- 1) . 塑料离心管：6
- 2) . 刻度离心管：1
- 3) . 滴管：长： 1 吸酚：氯仿混合液
中： 1 吸乙醇
短(钝口) 1 吸DNA 水溶液
- 4) . 细玻棒：1
- 5) . 移液管：1
- 6) . 微量取样器1
- 7) . 手套：1 副
- 8) . 离心机
- 9) . 紫外分光光度计
- 10) . 37℃水浴，50℃水浴
- 11) . 组织捣碎器
- 12) . 电泳仪及电泳槽
- 13) . 裂解缓冲液：
50mmol / l Tris—HCl pH7.4
20mmol/l EDTA、
0.5% SDS
100mmol/l NaCl (1 mol/l Tris-HCl pH7.4 50ml, 20% SDS
25ml,
2mol/l NaCl 50ml, 0.5mol/l EDTA 40ml, 蒸馏水稀释至 1000ml)

其中Tris-Hcl pH7. 4 维持PH 恒定，防止DNA 变性和水解。EDTA 能络合二价金属离子，当 Mg^{+} 被络合后，细胞内释放出来的DNA 酶的作用被抑制，以避免DNA 的降解，同时金属离子络合后，细胞膜的稳定性下降，有利于膜的裂解；SDS 有使蛋白质变性的作用，它能破坏膜蛋白的构象，因此使膜裂解，它又能使核蛋白中的核酸与蛋白质解离，并且SDS 也具有抑制DNA 酶的作用。

- 14) . 苯酚

重蒸苯酚加入抗氧化剂8—羟喹啉1mg / ml，用1mol/l PH8. 0 Tris-HCl，洗一次，再用0.1mol

/ 1 Tris-HCl PH8.0, 洗二次, 苯酚PH 在7. 6-7. 8 之间。

15) . 苯酚: 氯仿混和液(1: 1)

苯酚加上等体积氯仿并用水饱和, 混和液分层, 上层为水相, 下层为有机相且带黄色。苯酚和氯仿都是蛋白质变性剂, 苯酚使蛋白质变性的作用强于氯仿, 但氯仿具有较好的分层作用。

16) . 无水乙醇

DNA 在PH7. 4 条件下分子带负电, 在NaCl 存在条件下, DNA 盐呈电中性, 乙醇将DNA 分子周围的水分夺去, DNA 失水形成白色絮状沉淀。

17) . TE 缓冲液

50mmol/l Tris-HCl pH7.0

5mmol/l EDTA (1 mol / l Tris-HCl pH7.4 10ml, 0. 5mol/l EDTA蒸馏水稀释至 1000ml)

18) . RNase 10mg/ml 称取RNase 溶解在10mmol / l Tris-HCl(PH7. 5)和

15mmol / L Tris-HCl(PH7.5)和15mmol / lNaCl 溶液中使之浓度为10mg / ml。

100℃加温15 分钟, 使夹杂的少许DNase 失活, 然后慢慢冷却, 分装于小管中—20℃ 保存。

19) . 蛋白酶K(10mg/ml)—20℃保存。

蛋白酶K 优点——水解能力很强, 作用广泛, 可与SDS 及EDTA 合并使用。

20) . 20% SDS

21) . 0. 5mol / L EDTA

22) . 12mol / L 高氯酸

3. 实验步骤

1) . 取新鲜鼠肝用冰生理盐水洗去血水, 用滤纸吸干后, —70℃ 冰箱中保存, 用时取出。

2) . 1克鼠肝加10ml 裂解缓冲液, 在组织匀浆器中匀浆约1 分钟(2 次, 每次1 / 2分钟)

3) . 取塑料离心管1 支加入1 / 3 支匀浆液(若匀浆液太稠, 则再加入1mlTE 缓冲液), 然后再加入等体积苯酚: 氯仿混和液抽提。每次抽提轻缓地来回摇动5 分钟, 然后离心10000 转 / 分钟×5 分钟, 水相吸入另一干净的离心管中, 重复抽提二次。

注意: 每次水相时不要将界面上的变性蛋白质混入, 抽提二次后一般有机相和水相界面上的变性蛋白质极少, 肉眼基本看不见。若界面上变性蛋白质仍较多, 可增加抽提次数。

4) . 水相加入一刻度离心管中后, 加入2. 5 倍体积的冰无水乙醇(可用刻度离心管测量体积)。加5mol / LNaCl 到终浓度为0.1mol / L, 在离心管中轻缓的混匀, 此时可见白色絮状沉淀, 此即DNA 粗制品。

5) . 用玻棒捞起DNA 沉淀, 放入小烧杯中, 用70%乙醇洗涤沉淀一次, 洗涤时动作要轻, 防止DNA 被切断。

6) . 沉淀取出放入一干净的塑料离心管中, 用1mlTE 缓冲液溶解。

7) . 在1mlDNA 溶液中加入10mg / ml 的RNA 酶20 μ l, 使最终浓度达到200ug / ml, 37℃ 保温30 分钟。

8) . 加入20%SDS25ul, 使最终浓度至0. 5%; 加入0. 5mol/l EDTA30ul 至20mmol/l; 加10mg / ml 蛋白酶K20ul, 使最终浓度为200ug / ml, 50℃ 保温30 分钟。

9) . 加等体积苯酚: 氯仿混合液抽提, 重复一次, 去除蛋白酶K 及其它残留的蛋白质,

至界面无明显的变性蛋白质为止。每次抽提轻缓地来回摇动5 分钟，离心10000 转 / 分钟 X5 分钟。

10) . 吸取水相，水相吸至一干净刻度离心管中量出积体，再加入2. 5 倍体积的冰无水乙醇，加5mol / LNaCl 至终浓度为0. 1mol / L，混匀后可得较纯的DNA 沉淀，再用70%乙醇洗涤沉淀一次。

11) . 在一干净的塑料离心管中用0. 3—0. 5ml 缓冲液溶解沉淀，得到提纯的DNA原液。

12) . 吸取DNA 原液100ul，用TE 缓冲液稀释至3ml(1:30 稀释)，(若DNA 原液太浓，取原液50ul，太稀则取原液200u1)。在紫外分光光度计中测定O.D260nm 及O.D280nm 的读数。计算：O.D260nm / O.D280nm 比值，DNA 浓度及DNA 总量。

4. 注意事项

- 1). 为尽可能避免DNA 大分子的断裂，在实验过程中必须
 - (1)匀浆时应保持低温，匀浆时间应短，勿用玻璃匀浆器。
 - (2)实验中使用的吸取DNA 水溶液的滴管管口需粗而短，并烧成钝口。
 - (3)酚抽提时勿剧烈振摇。
- 2). 保持DNA 活性，避免酸、碱或其它变性因素使DNA 变性。 ，
- 3). 苯酚是一种强列的蛋白质变性剂。实验时，应戴手套操作，避免碰到皮肤，以免灼伤。苯酚蒸汽毒性较大，实验中应注意将盛酚的试剂瓶盖好。
- 4). 离心时要注意管于间的重量平衡。管于要对称放置，当离心达到所需速度后再开始计时。

二、 血液DNA的提取

1. 材料

颈静脉采血10 ml，肝素抗凝，人灭菌小瓶，低温带回实验室。抗凝血样12 000 r / min 离心10 min，将红细胞沉淀、白细胞沉淀及血清分离，白细胞沉淀移入5 ml的离心管中并编号，血清移入样品瓶中编号，在仅剩红细胞沉淀的离心管中加入等体积的0. 9% 生理盐水，洗涤离心3次后移入样品瓶并编号，—20 cC保存。

2. 实验步骤

- (1)在装有白细胞沉淀的5 ml离心管中，加入细胞裂解液和蛋白酶K至终浓度为100 g / ml，混匀，55 cC水浴消化过夜至不见有黏稠的团块。
- (2)在消化好的血液中加入等体积Tris饱和酚，缓慢颠倒离心管10 min使溶液的两相充分混匀，4 cC 12 000 r / min离心10 min，转移上清至另一离心管中。
- (3)重复第二步。
- (4)向上清液中加入等体积的饱和酚—氯仿—异戊醇(25: 24: 1)混合液，缓慢颠倒离心管10 min使溶液的两相充分混匀，4 cC 12 000 r / min离心10min，转移上清至另一离心管中。 ’
- (5)重复第四步。
- (6)向上清液中加入等体积氯仿、异戊醇(24: 1)混合液，缓慢颠倒离心管10 min使溶液的两相充分混匀，4 cC 12 000 r / min离心10 min，转移上清至另一离心管中。
- (7)重复第六步。
- (8)向上清液中加入1 / 10体积3 mol / L NH Ac (pH值5. 2)和2倍体积的冰冻无水乙醇沉淀DNA，待出现白色雾状沉淀后，将离心管置于一20 cC冰箱2~3 h或轻柔摇荡至溶液变澄清，絮状DNA沉淀清晰可见。

- (9)将DNA沉淀挑出，置于1.5 ml离心管，75% 乙醇洗涤2次，隔1 h洗1次。
- (10)将DNA自然晾干后溶入适量TE或灭菌双蒸水中，55 °C水浴消化2 h，待完全溶解后置于一20 °C保存。

1.3 DNA浓度与品质测定

- 1.3.1 琼脂糖凝胶电泳取TE溶解的DNA原液5 μ l，加2 $\times$ 1上样缓冲液，混匀，加入1%琼脂糖凝胶电泳，然后利用KODAK凝胶成像系统拍照，保存图片。
- 1.3.2 紫外分光光度计检测取20 μ l DNA原液，加超纯水3 ml，混匀，用紫外分光光度计测定样品OD₂₆₀、OD₂₇₀、OD₂₈₀值。

三、动物粪便中 DNA 的提取

1. 材料

动物粪便样品在采集后立即装入灭过菌的离心管中，用DETs(DMSO / EDTA / Tris盐溶液)或无水乙醇浸泡。

2. 实验步骤

将采集的粪便样品直接在样品管中捣碎，用均质法取样，每管取约200 mg粪便进行DNA提取，提取前用0.9%的生理盐水预处理粪便以清除其中残留的乙醇。具体步骤如下：

- 1) 取200mg粪便于2mL离心管中，加入1 mLCTAB裂解液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 8, 1.4 mol / L NaCl, 20mmol / L EDTA, 2% CTAB)，混匀后55°C水浴2 h；
- 2) 12 000 r / min离心5 min，离心结束后移出700 μ L上清至一无菌1.5 mL离心管中，弃沉淀。向上清中加入等体积酚：氯仿：异戊醇(25: 24: 1)抽提；
- 3) 加入0.1倍体积的3 mol / L NaAc，在旋涡混合器上混匀后加入1.5倍体积(加入盐之后计算的体积)预冷的无水乙醇，充分混匀后-20 °C放置0.5 h~1 h；
- 4) 12 000 r / min离心10 min，吸弃上清，沉淀在室温中凉干；
- 5) 在沉淀中加入1 mL异硫氰酸胍(GuSCN)洗液(5 mol / L GuSCN, 0.1 mol / L Tris-HCl, pH 6.4)，摇匀至沉淀完全溶解；
- 6) 加入100 μ L硅珠悬液，缓慢摇匀吸附DNA 10 min，10 000 r / min离心5 min，吸弃上清；在硅珠沉淀中加入500 μ L GuSCN洗液，混匀后10 000 r / min离心5 min，吸弃上清并重复一次；
- 7) 离心弃上清，用500 μ L 70% 乙醇重新洗涤沉淀2次；
- 8) 离心弃上清，将1.5 mL离心管置于55°C 烘箱内5 min烘干残余乙醇，再向硅珠沉淀中加入100 μ L TE，震荡混匀5 min洗脱DNA，最后12 000 r / min离心5 min，移出约80 μ L上清至一无菌200 μ L或1.5 mL离心管中保存。

四、 从陈旧皮张提取DNA

1. 材料

用于DNA提取的皮张样品

2. DNA提取方法

- ①剪取0.3 cm² (约0.01 g)左右的皮张标本，用消毒的解剖刀去除皮张表面的毛发及其它附着物
- ② 用消毒的剪刀将皮张剪成1 mm以下的微粒，置于Eppendorf管中，以去离子水高速振荡洗涤三次，高速离心，倾去上层清液。
- ③ 在每个Eppendorf管中加入500 μL的消化液，54℃过夜(14 h)。消化液：10 mmol/L Tris-HCl, 0.5% SDS, 1 mmol/L CaCl₂, 0.2 mg/ml蛋白酶K, pH 8.0。
- ④ 消化结束时，加入1 μmol/L EDTA (pH 8.0)。
- ⑤ 加入200 μL 10%的Chelex溶液，高速振荡混匀，置于沸水浴中20 min
- ⑥ 4000 rpm离心5 min，取上清。
- ⑦ 用等体积的酚，氯仿，异戊醇 (25:24:1)抽提样品，4000 rpm离心10min，重复2~3次，
- ⑧ 在DNA溶液中加入1/10体积3 mol/L的NaAc溶液和2倍体积预冷的无水乙醇，混匀，置于一20℃，20 min。
- ⑨ 12000 rpm离心10 min，弃去上清。
- ⑩ 加入1 ml预冷的75%乙醇，颠倒离心管数次，12000 rpm离心3 min，弃去上清。
- ⑩ 真空干燥，将干燥的沉淀物溶于适当体积的TE缓冲液中。在整个提取过程中，进行空白对比实验。

实验二 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA

1. 实验原理

带电荷的物质在电场中的趋向运动称为电泳。电泳的种类多，应用非常广泛，它已成为分子生物学技术中分离生物大分子的重要手段。琼脂糖凝胶电泳由于其操作简单、快速、灵敏等优点，已成为分离和鉴定核酸的常用方法。不同大小、不同形状和不同构象的DNA分子在相同的电泳条件下（如凝胶浓度、电流、电压、缓冲液等），有不同的迁移率，所以可通过电泳使其分离。凝胶中的DNA可与荧光染料溴化乙锭（EB）结合，在紫外灯下可看到荧光条带，籍此可分析实验结果。

2. 材料与器材

（一）仪器

1. 恒温培养箱
2. 琼脂糖凝胶电泳系统
3. 小型高速离心机
4. 高压灭菌锅
5. 紫外核酸检测仪

（二）材料

1. pQE-31 和 pUC18-CAT 质粒

（三）试剂

1. 50xTAE (50 倍体积的 TAE 贮存液)

配 1000mL 50xTAE:

Tris	242	g
冰醋酸	57	mL
0.5mol / L EDTA	200	mL
pH 8.0		

2. 凝胶加样缓冲液 (6x)

溴酚蓝	0.25%
蔗糖	40%

3. 琼脂糖

4. 溴化乙锭溶液 (EB) 0.5 μ g / mL

5. 250bp DNA 分子量标准

3. 实验步骤

（一）制备琼脂糖凝胶

根据被分离 DNA 的大小，决定凝胶中琼脂糖的百分含量。可参照下表：

琼脂糖凝胶浓度 %	线性 DNA 的有效分离范围 / kb
0.3	5—60
0.6	1—20
0.7	0.8—10

0.9	0.5—7
1.2	0.4—6
1.5	0.2—4
2.0	0.1—3

实验用 1.2% 琼脂糖。称取 1.2g 琼脂糖，放入锥形瓶中，加入 100mL 1xTAE 缓冲液，置微波炉或水浴加热至完全溶化，取出摇匀即可。

(二) 胶板的制备

1. 取干净的有机玻璃内槽，用透明胶带将有机玻璃内槽的两端边缘封好(一定封严，不能留缝隙)。
2. 将有机玻璃内槽放置于一水平位置，并放好样品梳子。
3. 将冷到 60℃左右的琼脂糖凝胶液，缓缓倒入有机玻璃内槽，直至有机玻璃板上形成一层均匀的胶面(注意不要形成气泡)。
4. 待胶凝固后，小心地拔出梳子，撕下透明胶带，然后将有机玻璃内槽放在电泳槽内。注意：DNA 样品孔应朝向负电极一端。
5. 加电泳缓冲液至电泳槽中，加液量要使液面没过胶面 1-1.5 毫米。

(三) 加样

用移液枪将已加入上样缓冲液的 DNA 样品加入加样孔(记录点样顺序及点样量)。

(四) 电泳

1. 接通电泳槽与电泳仪的电源。DNA 的迁移速度与电场强度成正比，一般电场强度不要超过 5V / cm。
2. 当溴酚蓝染料移动到距凝胶前沿 1—2cm 处，停止电泳。

(五) 染色

将电泳后的凝胶浸入溴化乙锭染色液(在 200mL 1xTAE 缓冲液中加两滴 2mg/mL 的溴化乙锭储存液即可)，在脱色摇床上缓慢摇动下染色 20-30 分钟。注意：溴化乙锭为致癌物，须戴一次性塑料薄膜手套操作，并小心污染环境。

4. 实验结果

在紫外灯(360nm 或 254nm)下观察染色后的电泳凝胶。DNA 存在处应显出桔红色荧光条带(在紫外灯下观察时应戴上防护眼镜，以防紫外线对眼睛的伤害作用)。

实验三、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测外源蛋白的表达

1. 实验原理

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS—PAGE）是蛋白分析中最经常使用的一种方法。它是将蛋白样品同离子型去垢剂十二烷基硫酸钠（SDS）以及巯基乙醇一起加热，使蛋白变性，多肽链内部的和肽链之间的二硫键被还原，肽链被打开。打开的肽链靠疏水作用与 SDS 结合而带负电荷，电泳时在电场作用下，肽链在凝胶中向正极迁移。不同的大小的肽链由于在迁移时受到的阻力不同，在迁移过程中逐渐分开，其相对迁移率与分子量的对数间成线性关系。

pGLO 是将绿色荧光蛋白（GFP）的基因克隆在阿拉伯糖启动子之后的一种表达载体。携带有 pGLO 的大肠杆菌在含有相应诱导物和抗菌素的条件下培养，可以表达 GFP，这比不加诱导物的同样的大肠杆菌在 SDS—PAGE 凝胶上要多出一条明显的条带。表达的蛋白也可用非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测，紫外灯下可以看到诱导后的样品在凝胶上有绿色荧光条带出现。还可以通过免疫印迹染色（Western—blotting）的方法，用 GFP 的抗体检测表达的外源蛋白。

2. 仪器、材料和试剂

(一)仪器

1. 垂直板电泳槽及配套的玻璃板，梳子
2. 电泳仪
3. 干式恒温培养器
4. 微波炉

(二)材料

1. pGLO 表达质粒转化的大肠杆菌的培养物：用阿拉伯糖诱导的和没有加阿拉伯糖诱导的

(三)试剂

1. 1.5mol / L Tris • HCl pH 8.8 （已加 SDS）
2. 0.5mol / L Tris • HCl pH 6.8 （已加 SDS）
3. 10% SDS
4. 30% Acr / Bis 29.2g Acr + 08gBis，用双蒸水定容至 100mL，过滤备用，4℃ 存放。
5. 10% Ap (-20℃ 存放)
6. 2x 样品缓冲液

0.5mol / L Tris • HCl pH6.8	2mL
甘油	2mL
20% SDS	2mL
0.1% 溴酚蓝	0.5mL
2—β—巯基乙醇	1.0mL
双蒸水	2.5mL
7. 5x 电极缓冲液

Tris	7.5g
Gly	36 g
SDS	2.5g

双蒸水溶解，定容至 500mL，使用时稀释 5 倍使用
8. 染色液：0.2g 考马斯亮蓝 R250 + 84mL 95% 乙醇 + 20mL 冰醋酸，定容至 200mL，过滤备用。

9. 脱色液： 酒精：冰醋酸：水=7.5： 7.5： 85

3. 实验步骤

1. 装配做胶用的玻璃板“三明治”：做 1.0mm 厚的胶。选择两侧的玻璃夹条为 1mm 的玻璃板，将其夹条面朝上平放在桌面上，把灰色的 U 形硅胶夹条在上面摆好，然后把带两个“耳朵”的凹玻璃放在上面，使 U 形硅胶夹条平整、服帖地夹在两块玻璃板之间。小心地把这玻璃板“三明治”放到“提篮架子”上，用塑料的“楔子”夹紧，注意底部的 U 形硅胶夹条在夹紧的过程中依然保持平整、服帖。在玻璃板“三明治”的夹缝加满蒸馏水，检验是否漏，如果漏水必须重装。
2. 配制浓度为 12% 的分离胶 (凝胶浓度应根据被分离蛋白的分子量进行选择)，配方如下：

双蒸水	3.3 mL
1.5mo1 / L Tris • HCl (pH 8.8)	2.5 mL
Acr / Big(30%)	4.0 mL
10% SDS	100 μ L
TEMED	10 μ L
10%AP	100 μ L
总体积	10 mL (刚好灌制两块胶)

混匀后加入两玻璃夹缝中，并小心在胶面上加入 1cm 蒸馏水(在胶面上加蒸馏水称水封，目的是保持胶面平整，并防止胶与空气接触，影响胶的聚合)，室温放置，等胶自然凝聚后（此时在胶面与水封之间可见清晰的界限），将水封倾去。这时可以开始配制 4% 的浓缩胶，配方如下：

双蒸水	1.8 mL
0.5mo1 / L Tris • HCl pH 6.8	0.75mL
Acr / Bis (30%)	0.4 mL
10% SDS	30 μ L
TEMED	5 μ L
10%Ap	30 μ L
总体积	3.0 mL (够做两块板的浓缩胶)

混匀后加入到“三明治”玻璃板的夹缝中，然后在把 1mm 的梳子插进浓缩胶中，注意在梳子和浓缩胶之间不要留有气泡。如果发现有较大的气泡，一定要想法去掉（可以插拔梳子或指弹气泡处的玻璃等），否则会影响电泳结果。待浓缩胶凝固后，小心拔出梳子。如果发现拔出梳子后形成的加样孔之间的间隔发生扭曲，用注射器的针头小心加以整理，使之齐整。

3. 细菌培养物 SDS-PAGE 样品的制作：同时做 L-阿拉伯糖诱导的和未加 L-阿拉伯糖的两个大肠杆菌样。取细菌培养物 1.5mL 加到 1.5mL 小离心管中，12000r/m 离心 3 分钟，去上清。在离心沉淀中加约等体积的蒸馏水，用枪头小心地吹打，使细菌充分悬浮，直到没有明显的小团块，然后加入等体积的 2×样品缓冲液，在 100℃沸水浴(或干式培养器)中保温 5min。此时如用枪头吸取样品，会发现非常粘稠，呈鼻涕状，这是因为有样品中含有大量 DNA 的结果。要用胰岛素注射器将样品从极细的针头中打出，反复多次才能将 DNA 分子打断，使样品变得不再粘稠为止。将样品 14000r/m 离心 5 分钟，使不溶物沉淀下来，小心吸取上清加样。电泳样品的处理直接关系到电泳结果的好坏，一定要认真做样，否则跑不出好胶来。
4. 琼脂封底：做好胶后，把玻璃板“三明治”从架子中取出，将两玻璃板之间的硅胶

夹条去掉。去掉夹条后在凝胶的底部会留下一空隙,此空隙要用 2%融化的琼脂填满,否则在玻璃板浸到电极缓冲液后空隙中的空气将很难彻底排除掉,电泳时会明显影响导电,严重时会使整个电泳失败。琼脂封底时注意不要产生气泡。

5. 电泳槽组装:封底后将玻璃板“三明治”凹玻璃面向内重新装到“提篮架子”上,固定好后,将整个部件放到电泳槽的外壳中,然后加电极缓冲液。加液时要使内外槽中的液面基本等高,内槽液的液面要高出玻璃板“三明治”的凹玻璃至少 5mm,以保证能够导电,且电场均匀。
6. 加样:按事先设计好的顺序与加样量依次加样。在样品的浓度未知的情况下,同一样品可加一梯度,即每一泳道的加样量依次减半。这样,在做第二次电泳时可以其作为参考,正确加样。蛋白分子量标准可以加在靠中间的加样孔中,也可加在离边的第 2 道处(最靠边的一道样品往往会明显跑斜)。
7. 电泳:将电泳槽的盖子盖上,把电泳槽的两个电极接到电泳仪上(注意电极不要接错),然后接通电源。先将电压调到 80V,当样品进入分离胶时,调节电压使恒定在 150V。当溴酚蓝移动到离底部约 0.5cm 时,关掉电源,停止电泳。将玻璃板从电泳槽中取出,小心地用旧的电话卡撬开两玻璃板,暴露出胶面。将浓缩胶部分去掉不要,分离胶放到塑料盒中染色。
8. 染色和脱色:凝胶在考马斯亮蓝染色液中染色 20 分钟(摇床上缓慢振荡),然后倾去染色液(染色液回收,可反复用数十次),用自来水洗几下,去掉凝胶上和塑料盒中的染色残液,加脱色液脱色(摇床上缓慢振荡),1 小时后换一次脱色液,振荡脱色过夜。彻底脱色后的凝胶蛋白条带清晰,背景透明干净。这时可以将凝胶拍照或用扫描仪进行扫描,作为永久记录。

5. 实验结果

染色后的聚丙烯酰胺凝胶上可见许多大大小小的条带。比较两个大肠杆菌样品,经阿拉伯糖诱导的与未加阿拉伯糖诱导的,前者在约 25kD 处明显多一条带,这就是 GFP 所在的位置。

实验四 PCR 扩增 DNA 片段及扩增产物的检测分析

1. 实验原理

PCR(PolymeraseChainReaction)为聚合酶链反应,或体外扩增技术。PCR 的原理类似于天然DNA 的复制,主要利用DNA 聚合酶依赖于DNA 模板的特性,模仿体内的复制过程,在附加的一对引物之间引发聚合酶反应。

PCR 全过程基于一套“三步曲”: (1)DNA 模板的变性,在95℃高温附近,模板DNA 双链变性形成单链DNA 而游离于反应溶液中; (2)与附加引物退火,在降温过程中,加入反应体系中的两种引物将退火至相应互补的DNA 链上; (3)引物延伸(扩增步骤),将反应体系调节到所选用的DNA 聚合酶的最适温度(72℃左右),在4 种dNTP 存在下, DNA 聚合酶延着引物和模板复合物,由5' →3'端延伸,而新合成的引物延伸链则可作为下一轮反应的模板。以上“三步曲”即构成一个循环,如此重复进行,每循环一次, DNA 分子数即按指数倍增(2n),若循环次数n=25, DNA 即已比原来扩增了百万倍。

PCR扩增反应完成之后,必须通过严格的鉴定,才能确定是否真正得到了准确可靠的预期特定扩增产物。凝胶电泳是检测 PCR产物常用和最简便的方法,能判断产物的大小,有助于产物的鉴定。凝胶电泳常用的有琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳,前者主要用于DNA 片段大于 100bp者,后者主要用来检测小片段DNA。

2. 试剂及器材

1. DNA 扩增仪
2. 20ul, 200ul 微量加样器
3. 电泳仪、电泳槽
4. 紫外透射分析仪
5. 10XPCR 缓冲液: 0. 1mol / L Tris-Cl (pH8. 3), 0. 5mol/l KCl, 15mmol / 1 Mgcl2 0.1% 明胶
6. 引物: 上游引物:
下游引物:
7. 1.25mmol / l dNTP
8. 50%甘油
9. TaqDNA 聚合酶(1u / ul)

3. 实验操作

1) PCR 反应体系的建立。

按顺序在0. 5ml 塑料小试管中加入以下试剂:

10XPCR 缓冲液 2. 5ul

dNTP 4ul

引物 各1ul

待测样品(鼠肝DNA) 3. 0ul

H2O 5.0

甘油 5.0

TaqE 1ul

在震荡器上将各组份充分混匀,短暂离心后加一滴液体石蜡覆盖于液体表面。

2) 扩增

将加好样的试管置于DNA 扩增仪上，按94℃ 20S，45℃ 20S，72℃40S 的条件扩增30 个循环。运行程序进行扩增。

3) 电泳检测扩增结果。

琼脂糖凝胶电泳检测

这是实验室最常用的方法，简便易行，只需少量 DNA 即可进行实验。其原理是不同大小的 DNA 分子通过琼脂糖凝胶时，由于泳动速度不同而被分离，经溴化乙锭 (EB) 染色，在紫外光照射下 DNA 分子发出荧光而判定其分子的大小。

用于电泳检测 PCR 产物的琼脂糖浓度常为 1%—2%，应该使用纯度高的电泳纯级琼脂糖，这种琼脂糖已除去了荧光抑制剂及核酸酶等杂质。

(1) 制胶

琼脂糖凝胶厚度约为 3~5mm。过薄则加样孔样品会溢出来，过厚观察时荧光穿透不强以至有些小片段 DNA 带型不易分辨。如配制 2%凝胶 100ml，称取琼脂糖 2g 于三角瓶中，加入 100ml 0.5×TBE 液，微波炉加热 2-5min，使琼脂糖完全溶解（注意不要暴沸），置室温等温度下降至 60℃时，加入终浓度 0.5 μg/ml 的 EB 液，充分混匀后倒板（注意排除气体）。

(2) 加样和电泳

上样时一般取 PCR 反应液 5~10 μl，加入 3 μl 溴酚兰液，充分混匀，加入凝胶加样孔中。电泳仪可用一般稳压可调中压电泳仪，电泳工作液为 0.5×TBE 液，接通电源，使样品由负极向正极移动。60-100V 恒压电泳约 30-60 分钟。

(3) 检测

将凝胶板放在紫外透射仪的石英玻璃台上进行检测，DNA 产物与荧光染料 EB 形成橙黄色荧光复合物。观察各泳道是否有橙黄色荧光带出现，并与扩增时所设的阳性对照比较，判断阳性或阴性结果。也可在电泳时以标准分子量作对照，判断其扩增片段是否与设计的大小相一致。

聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

聚丙烯酰胺凝胶电泳比琼脂糖凝胶电泳繁琐，但在引物纯化、PCR 扩增指纹图、多重 PCR 扩增、PCR 扩增产物的酶切限制性长度多态性分析时常用到。

它与琼脂糖凝胶电泳比较具有如下优点：

- ①分辨率很强，可达 1bp；
- ②能装载的 DNA 量大，达每孔 10 μgDNA；
- ③回收的 DNA 纯度高；
- ④其银染法的灵敏度较琼脂糖中 EB 染色法高 2~5 倍；
- ⑤避免了 EB 迅速退色的弱点，银染的凝胶干燥后可长期保存。

(1) 制胶

在两块制胶玻璃板中间放上垫片，放上制胶架，拧紧制胶螺丝夹紧玻璃板。

制备适量合适浓度的凝胶，使之略多于胶板。制备 100 μl 体积凝胶的配制方法见下表。

不同浓度 (%) 聚丙烯酰胺凝胶的制法

试剂	3.5%	5%	8%	12%	20%
30%丙烯酰胺溶液 (ml)	11.6	16.6	26.6	40	66.6

水 (ml)	67.7	62.7	26.6	40	66.6
5×TBE (ml)	20	20	20	20	20
10%过硫酸铵 (ml)	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
TEMED (ml)	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035

在加入 TEMED 和 10%过硫酸铵后，立即混匀，倒入放置 45℃角的玻璃板内，完全注满（注意不要有气泡），迅速将玻璃板放置水平位置。立即放成型梳子于腔顶并夹紧，待 30-60 分钟胶聚合后，取下胶板，放入电泳槽中固定。

（2）加样和电泳

上下槽中加入 1×TBE 电泳缓冲液，溢过加样孔，拔出梳子，排出加样孔中的气泡，将 PCR 产物或限制性内切酶消化产物 2 与 1 上样缓冲液混匀，用微量注射器加入加样孔底部，使样品在孔底成一层，两侧孔中加入标准分子量的 DNA Marker。

以 2-10V/cm 电压电泳，电泳时间足够长，使片断足以分开，待指示剂走到适宜位置时关闭电源，将胶片取出。

（3）银染

分开两块玻璃板，将凝胶片放入 100ml 银染固定液中振荡 15min，双蒸水洗 3 次，每次 2min，然后将凝胶片转入 100ml 0.2%的 AgNO₃ 中于摇床上染色约 10min，吸去 AgNO₃ 液，用双蒸水洗 3 次，每次 30s，加入 100ml 显色液约 7-10min，待 DNA 带显示清除时，吸去显色液，加入固定液 Na₂CO₃，静置 2-3min，取出凝胶观察。

4. 注意事项

1. 试剂湿热灭菌，小管分装，防止污染。
2. 所用的PCR扩增管、微量移液器的吸头都要灭菌。
3. 试剂混合时要在超净工作台中，戴上一次性手套，防止污染；要离心混匀。
4. 每次反应都要设置阴性和阳性对照。
5. 根据引物的融解温度设定退火温度，防止出现非特异性扩增产物。

实验五 从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片断

1. 实验原理

限制性内切酶切割后的 DNA 片断经过电泳后，按分子量大小被分开，排列在琼脂糖凝胶中。因此可以将某条特定的 DNA 带所在的凝胶切下来，加热或用特殊的试剂熔解，使 DNA 回溶到溶液中，再经过过柱，DNA 片段被吸附到柱上，与溶液其它成分分开。经过乙醇洗涤杂质后，用 TE 缓冲液洗涤柱子即可回收目的 DNA 酶切片断。

2. 试剂及器材

1.) 器材

旋涡混合器，微量移液取样器，双面微量离心管架，台式离心机，琼脂糖凝胶电泳系统，微波炉，水漂，恒温水浴锅，DNA 凝胶回收试剂盒的柱子。移液器吸头和 1.5mL 微量离心管分别进行高压灭活。

2.) 试剂

- (1) 50×TAE电泳缓冲液 (pH约 8.5): Tris碱 242g, 57.1mL冰乙酸, 37.2g Na₂EDTA • 2H₂O, dd water 定容至 1L。使用时稀释成 1×
- (2) 1000×溴化乙锭储存液 (0.5mg/mL): 50mg 溴化乙锭溶于 100mL dd water, 4°C 避光储存。使用时在蒸馏水里滴入适量，使水看起来微微发红即可
- (3) 10×加样缓冲液: 20% Ficoll 400, 0.1mol/L Na₂EDTA pH8.0, 1.0% SDS, 0.25%溴酚蓝
- (4) 6×加样缓冲液: 0.25%溴酚蓝, 40%蔗糖水溶液
- (5) DNA 分子量标准: λDNA HindIII, Tiangen 公司的 Marker II 或 Marker III 等
- (6) 电泳级琼脂糖粉
- (7) DNA 凝胶回收试剂盒

3.) 材料

欲回收的 DNA 酶切产物: pET-Trx 载体的 *EcoRI* + *BamHI* 酶切产物, pMD19-T-NK 的 *EcoRI* + *BamHI* 酶切产物

3. 实验步骤

- 1) 用 1×TAE 配制 1%琼脂糖凝胶，使用较宽的梳子制备加样孔。
- 2) 在胶上选定两个相邻的加样孔，分别加入少量 (10μL) (一般选择位于凝胶的边缘) 和大量 (30~50μL) DNA 酶切产物，电泳 (方法见实验二)。

- 3) 电泳结束后用薄塑料片（如电话卡）切下含有少量 DNA 酶切产物的泳道，EB 染色。
- 在紫外灯下找到目的 DNA 带，用刀片在目的 DNA 带的下上下边缘各切一个小口作为标记。含有大量 DNA 酶切产物的凝胶既不用 EB 染色，也不用紫外灯照射。
- 4) 将做好切口标记的凝胶条用保鲜膜包住，与未染色的凝胶原位对齐，根据小胶条上的切口标记估计未染色的大胶上 DNA 酶切产物的位置。
- 5) 用刀片切下大胶中 DNA 产物所在的凝胶（尽量不要多余的凝胶），转移至一个事先称量过的、灭活的 1.5mL 微量离心管中。再称量后计算出其中胶块的重量。
- 6) 再用 EB 染色切除 DNA 以后的大胶，与小胶条并在一起在紫外灯下检查是否已把 DNA 带切走。
- 7) 按照 DNA 凝胶回收试剂盒的说明书操作，回收 DNA 酶切产物。不同的试剂盒的操作原理相同，但步骤稍有差别，应严格按照试剂盒的说明书进行操作。例如：
- 上海生工 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒操作步骤：
- ①按 400 μ L/100mg 凝胶的比例加入 Binding Buffer II，置于 50-60 $^{\circ}$ C 水浴中 10min，每 2min 混匀一次，使胶彻底熔化。
 - ②将熔化的胶溶液移到套放在 2mL 收集管内的 UNIQ-10 柱中，室温放置 2min。
 - ③5000r/min 室温离心 1min。取下 UNIQ-10 柱，倒掉收集管中的废液。
 - ④将 UNIQ-10 柱放入同一个收集管中，加入 500 μ L Wash Solution，5000r/min 室温离心 1min。
 - ⑤重复上一步洗涤一次。
 - ⑥取下 UNIQ-10 柱，倒掉收集管中的废液，将 UNIQ-10 柱放回到同一个收集管中，12000r/min 室温离心 1min。
 - ⑦将 UNIQ-10 柱放入一个新的 1.5mL 微量离心管中，在柱子膜中央加 30 μ L Elution Buffer（或 dd water，pH>7.0），室温或 37 $^{\circ}$ C 放置 2min（55-80 $^{\circ}$ C 洗脱效果更好）。
 - ⑧8000r/min 室温离心 1min，离心管中的液体就是回收产物。
- （2）其它公司的试剂盒（如 AXYGEN 公司的 AXYprepTM DNA Gel Extraction Kit）的操作步骤与上述大同小异，做实验时按照各家的产品说明书操作即可。
- 8) 可取 2 μ L-5 μ L 回收产物电泳，检测是否有回收到的目的 DNA 带。

实验六 目的基因片段与载体连接

1. 实验原理

在 Mg^{2+} 和ATP存在下，T4 DNA连接酶能催化载体分子的粘性末端与外源DNA的相同粘性末端连接成重组DNA分子。

2. 实验材料

1). 器材

旋涡混合器，微量移液取样器，双面微量离心管架，台式离心机，干式恒温气浴，恒温水浴，泡沫塑料保温盒。移液器吸头和 0.5mL 微量离心管分别进行高压灭活。

2). 试剂

(1) T4 DNA 连接酶

(2) 连接酶缓冲液

(3) 无菌 dd Water 等

3). 材料

(1) pMD19-T 载体。NK PCR 产物

(2) *EcoRI* + *BamHI* 酶切回收的 pET-Trx 载体。*EcoRI* + *BamHI* 酶切回收的 NK 插入片断。

3. 实验步骤

1) PCR 产物与 T 载体直接连接：

(1) 事先将干式恒温仪（或泡沫塑料保温盒里的水）温度调整到 14℃。

(2) 取一个高压灭活的 0.5mL 微量离心管，加入：

PCR 产物混合液	4μL
pMD19-T 载体	1μL
T4 DNA 连接酶（TAKARA, 350U/ul）	0.5μL
连接酶缓冲液	1μL
dd Water	3.5 μL
总体积	10μL

(3) 将上述混合液轻轻震荡后再短暂离心，然后置于 14℃ 水中保温过夜。

(4) 连接后的产物可以立即用来转化感受态细胞或置 4℃ 冰箱备用。

2) DNA 回收片断（NK）与表达载体（pET-Trx）连接：

(1) 取一个灭菌的 0.5mL 微量离心管，加入：

NK 片段回收产物	4μL
-----------	-----

pET-Trx 载体酶切回收产物	1μL
T4 DNA 连接酶 (TAKARA, 350U/μL)	0.5μL
连接酶缓冲液	1μL
dd Water	3.5 μL
总体积	10μL

- (2) 将上述混合液轻轻震荡后再短暂离心，然后置于 14°C 干式恒温仪（或 14°C 水中）中保温过夜。
- (3) 连接后的产物可以立即用来转化感受态细胞或置 4°C 冰箱备用。

实验七 RAPD和ISSR技术

(一) RAPD

1. 实验原理:

DNA 分子水平上的多态性检测技术是进行基因组研究的基础。运用随机引物扩增寻找多态性 DNA 片段可作为分子标记。这种方法即为 RAPD(Random amplified polymorphic DNA, 随机扩增的多态性 DNA)。RAPD 技术建立于 PCR 技术基础上,它是利用一系列(通常数百个)不同的随机排列碱基顺序的寡聚核苷酸单链(通常为 10 聚体)为引物,对所研究基因组 DNA 进行 PCR 扩增. 聚丙烯酰胺或琼脂糖电泳分离, 经 EB 染色或放射性自显影来检测扩增产物 DNA 片段的多态性, 这些扩增产物 DNA 片段的多态性反映了基因组相应区域的 DNA 多态性。

2. 材料与设备:

1). 材料 : 不同来源的 DNA(50ng/ul)。

2). 设备: PCR 仪, PCR 管或硅化的 0.5ml eppendorf 管, 电泳装置。

3). 试剂

随机引物(10mer) (5umol/L): 购买成品。

Taq 酶(5U/ul): 购买成品。

10xPCR 缓冲液:500mmol/L KCl, 100mmol/L Tris•Cl, 在 25℃下, pH9.0, 1.0% Triton X-100。

MgCl₂ : 25mmol/L。

dNTP(1mmol/L): 每种 2.5mmol/L。

5*TBE buffer

注意: 枪头和 Epp 管要灭菌

3. 操作前准备

1). dNTP 工作液处理:

dATP (100Mm) + dGTP (100Mm) + dTTP (100Mm) + dCTP (100Mm) 各取出 10ul 混合, 再从
中取出 4ul+96ulH₂O , 配成 1mM

dNTP 过夜冻融会降解, 各取 4 种 dNTP 各 10ul 混合后作为储液

2). DNA 模板的处理:

DNA 不能反复冻融, 取 DNA 提取液 5ul 与 H₂O 45ul 混合, 即将模板稀释 10 倍, 大约 20ng/
ul

3). 引物 (0.20D)

室温平衡 2min, 离心机最高速度离心 2min, 加入 400ul H₂O, 充分溶解, 成为 5U

4). Taq 酶处理

Taq 母液 5u/ul 稀释 5 倍成为 1u/ul

5). Maker 处理

1ul (50ug) Maker+1ul Loading buffer+4ul ddH₂O

6.5×TBE buffer (5L)

27g Tris—base+13.75g 硼酸+10ml 0.5mol/l EDTA(PH8.0) +ddH₂O

4. 操作步骤:

1). 在 25ul 反应体系中, 加入(1tube) (可以混合多管后分装)

模板DNA (5Uμ) 4ul (50ng)

随机引物(5Uμ) 2ul (约 5pmol)

10xPCR Buffer(1*) 2.5ul

MgCl₂ (25Mm) 2.5ul

dNTP(1Mm) 2.5ul

Taq酶 1 单位 (U) 0.2ul加ddH₂O 至 25ul ()为原浓度

混匀稍离心, 加一滴矿物油。

2). 在加热至 90°C以上的PCR仪中预变性 94°C 2 分钟, 然后循环: 94°C 1 分钟, 36°C 1 分钟, 72°C 2 分钟, 共 40 轮循环。

3). 循环结束后, 72°C 7 分钟, 4°C保存。

4). 取PCR产物 20ul加 4ul上样缓冲液 (6x) (1: 5) 于 1.4% 琼脂糖胶上电泳 (可以不换枪头, 于缓冲液中冲洗), 高压 200V 2min使样品离孔, 稳压 60 V 2h (电压低带型整齐, 分辨率高) (小板)。

5). Marker 4ul

6). 电泳结束, 观察、拍照。

[注意]: 1、电泳时一般RAPD带有 5-15 条, 大小 0.1-2.0kb。

2、特异性的DNA带可以克隆 作为一个新的分子标记应用。

(二) ISSR

1. 实验原理:

ISSR(Inter-Simple Sequence Repeats)是一种新型的分子标记, 是于 1994 年创建的一种简单序列重复区间扩增多态性分子标记。它的生物学基础仍是基因组中存在的SSR。ISSR标记根据植物广泛存在SSR的特点, 利用在植物基因组中常出现的SSR本身设计引物, 无需预先克隆和测序。用于ISSR-PCR扩增的引物通常为 16~18 个碱基序列, 由 1~4 个碱基组成的串联重复和几个非重复的锚定碱基组成, 从而保证了引物与基因组DNA中SSR的 5' 或 3' 末端结合, 导致位于反向排列, 间隔不太大的重复序列间的基因组片段进行PCR扩增。SSR在真核生物中的分布是非常普遍的, 并且进化变异速度非常快, 因而锚定引物的ISSR-PCR可以检测基因组许多位点的差异。有时为了增加多态性, 常常采用一个SSR序列和一个随机引物组成的引物对, 这样就又获得了另一种与SSR相关的标记, 这种标记一端可以锚定在SSR序列中, 另一端则可以通过随机引物来筛选, 同一个SSR序列引物与不同的随机引物组合, 可以获得各种各样的组合, 从而得到更多的多态性。

2. 实验步骤:

反应体系: 10xPCR Buffer 2ul

模板 DNA(5Uμ) 4ul (50ng)

引物(5Uμ) 2ul (约 5pmol)

MgCl₂ (25Mm) 2.5ul

dNTP(1Mm) 2.5ul

Taq 酶 1 单位 (U) 0.2ul; 加 ddH₂O 至 20ul

ISSR-PCR 设置: 94°C变性 5min 后, 94°C变性 30sec, 52°C退火 45sec, 72°C延伸 2min, 共 4 5 个循环, 然后 72°C延伸 7min, 最后将结果置于 4°C冰箱中。扩增产物在用 5×TBE 配制的 2.0%的琼脂糖凝胶中电泳分离。

实验八 SSR 简单序列重复标记

1. 实验原理

SSR 简单序列重复标记 (Simple sequence repeat, 简称 SSR 标记), 也叫微卫星序列重复, 是由一类由几个核苷酸 (1-5 个) 为重复单位组成的长达几十个核苷酸的重复序列, 长度较短, 广泛分布在染色体上。由于重复单位的次数的不同或重复程度的不完全相同, 造成了 SSR 长度的高度变异性, 由此而产生 SSR 标记或 SLP 标记。虽然 SSR 在基因组上的位置不尽相同, 但是其两端序列多是保守的单拷贝序列, 因此可以用微卫星区域特定顺序设计成对引物, 通过 PCR 技术, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳, 即可显示 SSR 位点在不同个体间的多态性。

优点:

- (1) 标记数量丰富, 具有较多的等位变异, 广泛分布于各条染色体上;
- (2) 是共显性标记, 呈孟德尔遗传;
- (3) 技术重复性好, 易于操作, 结果可靠。

缺点: 开发此类标记需要预先得知标记两端的序列信息, 而且引物合成费用较高。

2、操作程序

取叶片→磨样→提取 DNA→PCR 扩增→电泳检测→染色→读带标记。

1、DNA 提取

按照 Doyle 和 Dickson (1987) CTAB 法 (Cetyl triethyl ammonium bromide) 并略加改进的程序进行, 具体步骤如下:

- ① 成熟期取叶片加液氮研磨成粉末状, 转入 1.5ml 离心管中, -20°C 冰箱保存;
- ② 加入 $600\mu\text{l}$ 65°C 的 $2\times\text{CTAB}$ 混匀并置于 65°C 水浴中保温 30-60 分钟;
- ③ 取出, 冷却, 上下摇匀后, 加入 600 微升 24:1 的氯仿异戊醇;
- ④ 12000 转/分钟离心 10 分钟, 取上清液于另一个 1.5ml 的离心管中;
- ⑤ 加异丙醇, 12000 转/分钟离心 10 分钟, 倒掉上清液;
- ⑥ 干后用 100% 的酒精清洗, 干后加适量 TE。

2、PCR 扩增

模板 DNA 的浓度大约 $25\text{ng}/\mu\text{l}$, 扩增反应体系为 $20\mu\text{l}$ 。具体如下:

Sterile ddH ₂ O	11 μl
PCR Buffer	3 μl
dNTP-mix	0.5 μl
Primer1	1 μl
Primer2	1 μl
Taq polymerase	0.5 μl (2U/ μl)
DNA	3 μl

PCR 扩增程序为: (2h30min)

- ① 预变性: 94°C , 5 分钟;
- ② 变性: 94°C , 40 秒;
- ③ 退火: 55°C 40 秒;
- ④ 延伸: 72°C , 1 分钟;
- ⑤ 循环: 从 2 到 4 共 38 个循环;
- ⑥ 72°C 下最后延伸 5 分钟; 4°C 5min, 扩增产物置于 4°C 的冰箱保存。

3、扩增产物的电泳分离

制胶→灌胶→上样→电泳。

扩增产物用 8%的聚丙烯酰胺变性胶电泳分离，步骤如下：

- ① 准备电极液（1×TBE）；
- ② 将梳子拨出，并迅速用电极液冲洗胶面；
- ③ 不预电泳；
- ④ 点样，电泳 220V；
- ⑤ 拆板，并及时将内板、边条及梳子洗净。

4、凝胶染色

- ① 固定：10%醋酸，5 分钟；
- ② 染色：10 分钟；
- ③ 漂洗：dH₂O，5-10 秒；
- ④ 显色：甲醛-NaOH，直到满意为止；
- ⑤ 漂洗：dH₂O，2 分钟。

5、出结果：自封带封胶，读带标记，数码照相摄像，室温风干。

实验九 PCR单链构象多态性分析

1. 实验原理

聚合酶链反应-单链构象多态性分析 (Single Strand Conformation Polymorphism

Analysis of Polymerase Chain Reaction Products, PCR-SSCP) 是一种DNA 单链凝胶电泳技术。它根据形成不同构象的等长DNA 单链在中性聚丙烯酰胺凝胶中的电泳迁移率变化来检测基因变异。

PCR-SSCP 分析的基本程序为: 首先PCR 扩增特定靶序列, 然后将扩增产物变性为单链, 进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。在不含变性剂的中性聚丙烯酰胺凝胶中电泳时, DNA 单链的迁移率除与DNA 链的长短有关外, 更主要的是取决于DNA单链所形成的构象。在非变性条件下, DNA 单链可自身折叠形成具有一定空间结构的构象。这种构象由DNA 单链碱基决定, 其稳定性靠分子内局部顺序的相互作用(主要为氢键)来维持。相同长度的DNA 单链其顺序不同, 甚至单个碱基不同, 所形成的构象不同, 电泳迁移率也不同。PCR 产物变性后, 单链产物经中性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 靶DNA中含单碱基置换, 或数个碱基插入或缺失等改变时, 因迁移率变化会出现泳动变位, 从而可将变异DNA 与正常DNA 区分开。

2. 试剂

1. PCR 相关试剂
2. α -32P-dCTP
3. 30%聚丙烯酰胺(29: 1): 丙烯酰胺29g、甲叉双丙烯酰胺 1g, 溶于100ml ddH₂O中, 4 OC 保存。
4. 10%过硫酸胺配制方法: 1g 过硫酸胺, 溶于10ml ddH₂O 中, 4 OC 保存(可用数周)。
5. TEMED (N, N, N, N', N'-四甲基乙二胺)
6. 5×TBE 缓冲液: Tris 碱54g、硼酸27.5g、0.5M EDTA(pH 8.0) 20ml, 加ddH₂O至1000ml。
7. 变性上样液: 95% 甲酰胺、0.03%二甲苯青、0.05%溴酚蓝、 20mM EDTA(pH8.0)

3. 操作步骤

1. PCR扩增

反应总体积为10 μ l, 在0.5ml 微量离心管中加入下列反应成分:

10×buffer 1 μ l

dNTPmix 70 μ M

DNA 模板 100ng

引物及Taq DNA 酶 依实验设计要求按比例加入

α -32P-dCTP 0.1 μ l

加ddH₂O 至 10 μ l

按实验设计循环参数进行扩增, 获取扩增产物。

2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳

(1) 电泳槽玻璃板的处理: 用洗涤剂清洗玻璃板, 自来水反复冲净洗涤剂, 双蒸水冲洗3 次, 晾干, 95%乙醇擦拭, 自然干燥。用棉签沾取SigmaCote 涂于玻璃的贴胶面上, 5~10min 后再用软纸擦拭除去多余的SigmaCote 溶液。在两块玻璃内的两侧放好衬条对齐,

用固定夹夹紧两块玻璃，并用玻璃胶带封边。

(2) 制胶：按照被分离DNA片段的大小、含量及玻璃板、衬条的大小决定凝胶的浓度与体积，一般来讲使用5%~8%的凝胶较为合适。轻轻摇匀配制的胶液于真空抽气(开始时要缓慢)除气泡，加 35 μ l TEMED 至聚丙烯酰胺混合液中，混匀。用10ml 玻璃吸管或50ml 注射器吸取胶液，将玻璃模具倾斜成60°角，缓慢注入两玻璃板间的空隙中，直至灌满模具顶部。立即插入相应的点样梳，(小心勿使梳齿下带进气泡，并且不要将梳齿全部插入胶内，留约2mm 梳齿于玻璃板上端，以免拔梳时把胶孔拔断)。由于凝胶在聚合过程中有回缩，所以应小心添加些胶液于梳子处，水平放置，室温聚合1hr。将封口玻璃胶带掀去，放入电泳槽，凹型玻璃贴紧电泳缓冲液槽，用大号固定夹固定住两侧。在上下电泳槽内灌入1×TBE 电泳缓冲液。小心取出点样梳，用槽内的缓冲液反复冲洗点样孔，以去除可能存在的未聚合的聚丙烯酰胺和气泡。

(3) 扩增产物的处理：将 PCR 扩增产物与变性上样液按1: 5的比例加入0.5ml 微量离心管中，混匀。样品上胶前应98 °C 变性10min，立即冰浴骤冷。取约3~5 μ l 变性样品(根据点样孔的大小决定上样量)，以微量加样器上样，(上样时要注意不要有气泡冲散样品，而且速度要快，时间长了样品易于扩散)。

(4) 电泳：电泳槽接上电极(上槽接负极，下槽接正极)开启电源，根据扩增片段的大小及电泳槽和凝胶的大小，决定电泳的电压及电泳时间。通常室温下以1~5V / cm 电泳。

(5) 剥胶：电泳结束后，倒弃电泳缓冲液，取下电泳胶玻璃，用塑料楔子从玻璃板底部一角小心分开玻璃，凝胶应附着在一块玻璃上，切去凝胶左上角，作为点样顺序标记。剪一张与玻璃同样大小的滤纸，严密覆盖于凝胶上，顺一个方向将凝胶缓慢取下，用保鲜膜盖于胶面并包好，避免膜和胶之间产生气泡或皱折，将凝胶固定在X 线片夹中。

(6) 放射自显影：在暗室中将X 线片贴于胶面，盖严片夹，用黑布将X 线片夹包裹，置-70°C 放射自显影。曝光时间根据同位素的强度而定，约 24h~10d。

(7) 冲洗胶片从-70°C 取出X线片夹，在暗室内迅速取出X线片，立即显影，以免使X 线片上出现过多的冷凝水。(如果想再得到一张放射自显影影像，可立即在片夹中装一张新X 线片并尽快放回到-70°C 继续显影。如果来不及再加入新片即已出现冷凝水则应使样品凝胶和X 线片夹都恢复到室温，并擦去冷凝水后再装入新的X 线片)。依次按以下程序操作进行显影：

X 线片显影液显影 1-5min

水洗 1min

定影液定影 5min

流动水冲洗 15min

所有使用液的温度应为18~20°C 为宜。

【注意事项】

1) 核酸片段的大小：用于SSCP分析的核酸片段越小，检测的敏感性越高。对于<200bp 的片段，SSCP 可发现其中70%的变异；对于300bp 左右的片段则只能发现其中50%的变异；而>500bp 的片段，则仅能检出10%~30%的变异，因此，<300bp，尤其是150bp 左右的核酸片段更适于SSCP 分析。对于大于400bp 的PCR 产物就需要设法进一步处理，可以用限制性酶消化PCR 产物，产生小于400bp 的DNA 片段，再进行SSCP 分析。

2) 游离引物：游离引物可能同 PCR 产物结合而改变其泳动率，即使游离引物量为6nM 都

有明显影响。因此，应尽可能除去游离引物。可以采用不对称引物扩增方法，尽可能消耗多余的引物。也可以运用过柱或磁性球方法纯化PCR产物。或者是稀释PCR产物，减少游离引物的干扰。

3) 低浓度变性剂: 凝胶中加入低浓度的变性剂，如5%-10%甘油、5%尿素或甲酸胺、10%二甲亚砜(DMSO)或蔗糖等有助于提高敏感性，可能是因为轻微改变单链DNA的构象，增加分子的表面积，降低单链DNA的泳动率。但有些变异序列却只能在没有甘油的凝胶中被检出。因此，对同一序列使用2~3种条件做SSCP，可能提高敏感性。

4) 电泳温度: 一般认为保持凝胶内温度恒定是SSCP分析最关键的因素，温度有可能直接影响DNA分子内部稳定力的形成及其所决定的单链构象，从而影响突变的检出。室温下电泳适于大多数情况，但由于在电泳时温度会升高，为确保电泳温度相对恒定，应采取以下措施：减少凝胶厚度，降低电压，有效的空气冷却或循环水冷却等。

5) 凝胶的长度: 可用测序板进行SSCP分析，凝胶板长度在40cm以上。

6) 凝胶浓度及厚度: 凝胶浓度很重要，一般使用5%~8%的凝胶，凝胶浓度不同，突变带的相对位置也不相同，如果在进行未知突变种类的SSCP分析时，最好采用两种以上凝胶浓度，这样可以提高突变种类的检出率。凝胶的厚度对SSCP分析也很重要，凝胶越厚，背景越深，在上样量较多的前提下，尽量使凝胶越薄越好。

7) 假阴性: 一般认为，如没有污染，PCR-SSCP分析不存在假阳性结果，但可能出现假阴性结果，后者是由于点突变引起的空间构象变化甚微，迁移率相差无几所致，尤其是点突变发生在扩增片段的两端时。如果有阳性和阴性对照，结果可以重复确定的突变带是可信的，如果没有阳性对照，应经测序来确定其是否为突变带。由于PCR-SSCP的不足之处主要是可能检出假阴性结果。应通过设置阳性对照，摸索电泳条件，假阴性结果在很大程度上是可以避免的。但对未知基因变异的检测，假阴性结果就难以百分之百地消除。

8) 结果分析: 单链凝胶电泳时，互补单链迁移率不同，一般形成两条单链带。PCR产物进行单链凝胶电泳之前，通过加热变性产生单链。如变性不彻底，残留双链亦可形成一条带。因此，PCR-SSCP分析结果至少显示三条带。但是，由于一种DNA单链有时可形成两种或多种构象，检出三条或四条单链带就不足为奇。

实验十 DNA 指纹图谱分析[DNA Fingerprinting]

1. 实验原理

1984年英国莱斯特大学的遗传学家 Jefferys 及其合作者首次将分离的人源小卫星 DNA 用作基因探针，同人体核 DNA 的酶切片段杂交，获得了由多个位点上的等位基因组成的长度不等的杂交带图纹，这种图纹极少有两个人完全相同，故称为"DNA 指纹"，意思是它同人的指纹一样是每个人所特有的。DNA 指纹图谱，开创了检测 DNA 多态性（生物的不同个体或不同种群在 DNA 结构上存在着差异）的多种多样的手段，如 RFLP（限制性内切酶酶切片段长度多态性）分析、串联重复序列分析、RAPD（随机扩增多态性 DNA）分析等等。各种分析方法均以 DNA 的多态性为基础，产生具有高度个体特异性的 DNA 指纹图谱，由于 DNA 指纹图谱具有高度的变异性和稳定的遗传性，且仍按简单的孟德尔方式遗传，成为目前最具吸引力的遗传标记。

DNA 指纹图谱法的基本操作：从生物样品中提取 DNA（DNA 一般都有部分的降解），可运用 PCR 技术扩增出高可变位点（如 VNTR 系统，串联重复的小卫星 DNA 等）或者完整的基因组 DNA，然后将扩增出的 DNA 酶切成 DNA 片断，经琼脂糖凝胶电泳，按分子量大小分离后，转移至尼龙滤膜上，然后将已标记的小卫星 DNA 探针与膜上具有互补碱基序列的 DNA 片段杂交，用放射自显影便可获得 DNA 指纹图谱。

2. 试剂及器材

产生 DNA 指纹图谱的主要试剂及器材如下：限制性内切酶 Hinf I、HaeIII等；电泳级琼脂糖；尼龙膜； λ DNA / EcoR I +HindIII；H4 型（24×20cm）水平电泳槽装置；Model 250 型电泳仪；标记试剂盒 Prime-a-Gene® Labeling system； α -32P) dCTP；X 光胶片；LS5801 型液闪仪；FYY-1 型多功能生化反应仪

有关试剂的配制

（1）ACD 抗凝剂

柠檬酸 0.48g

柠檬酸钠 1.32g

葡萄糖 1.47g

加水至 100ml

（2）T10E10 缓冲液

第 10 章 DNA 指纹图谱分析方法 123

Tris-HCl 10mmol / dm³

EDTA 10mmol / dm³

pH 值：8.0

（3）TE 缓冲液

Tris-HCl 10mmol / dm³

EDTA 1mmol / dm³

pH 值：8.0

（4）20%SDS（100ml）

SDS 20g

溶于 100ml 蒸馏水中, 30℃以上贮存。

(5) USSTE 裂解液

Urea 8mmol / dm³

NaCl 0.3mol / dm³

SDS 2%

Tris-HCl 150mmol / dm³

EDTA 1mmol / dm³

pH 值: 7.5

(6) Tris 饱和酚

新蒸苯酚加入 8-羟基喹啉至终浓度为 0.1%, 用 1mol / dm³ Tris-HCl 和 0.5mol / dm³ Tris-HCl 溶液饱和至 pH 值 8.0, 去掉上层水相, 加适量 (约 1 / 10 体积) 的 0.1mol / dm³ Tris-HCl

(pH 值 8.0) 覆盖在酚相上, 保持 4℃, 放在棕色瓶中保存。

(7) 50×TAE 缓冲液 (1 000ml)

Tris 242g

冰醋酸 57.1ml

0.5mol / dm³ EDTA (pH 值 8.0) 100ml

(8) 10× BPB 贮存液

聚蔗糖 20%

EDTA 0.2mol / dm³

溴酚蓝 0.25 %

二甲基脒蓝 0.25%

本贮存液可在室温存放。

(9) 40mmol / dm³ 亚精胺

亚精胺 0.58g

将亚精胺溶于 10ml 蒸馏水中, 4℃下存放。

(10) 溴化乙锭 (EtBr) 贮存液 (10mg / ml)

EtBr 1g

将 EtBr 溶于 100ml 蒸馏水中, 在棕色瓶存放, 温度保持在 4℃。

(11) 变性液

NaCl 1.5mol / dm³

NaOH 0.5mol / dm³

124 遗传多样性研究的原理与方法

(12) 20×SSC (1 000ml)

NaCl 175.3g

柠檬酸钠 88.2g

用 10mol / dm³ NaOH 调 pH 值至 7.0, 高压灭菌。

(13) 杂交液

NaPO₄ 0.5mol / dm³

SDS 7 %

EDTA 1mmol / dm³

(14) 标记反应终止液

聚葡萄糖蓝 0.9%

溴甲酚紫 0.03%

EDTA 20mmol / dm³

4℃下存放。

(15) SephadexG-50 的水化

SephadexG-50 10g

将 SephadexG-50 溶于约 300ml TE (pH 值 8.0) 中, 高压灭菌, 4℃下存放。

(16) 闪烁液 (500ml)

无水乙醇 10ml

PP0 2g

PoPoP 50mg

二甲苯 490ml

室温棕色瓶存放。

3. 操作步骤

基因组 DNA 的提取

(1) 10ml 全血与 40mlT10E10 缓冲液混匀, 4 000r / min 离心 10 分钟。

(2) 弃上清液, 在沉淀中加入 40mlT10E10 缓冲液混匀, 4 000r / min 离心 10 分钟。

(3) 弃上清液, 在沉淀中加入 40mlTE 缓冲液混匀, 4 000r / min 离心 10 分钟。

(4) 弃上清液, 在沉淀中加入 10mlUSSTE 裂解液, 混匀呈浊液, 置摇床过夜, 温度保持在 37℃。

(5) 加入 10ml 苯酚, 缓慢上下混匀至少 20 分钟, 4 500r / min 离心 20 分钟。

(6) 用移液枪小心地将上层水相转移到另一离心管中, 吸头的尖端剪去一小段, 以免在吸取过程中损伤大分子 DNA。

(7) 向水相中加入等体积的酚、氯仿、异戊醇 (体积比为 24:23:1), 缓慢上下混匀 15 分钟, 4 500r / min 离心 20 分钟。

(8) 如前述吸出水相, 向水相中加入等体积的氯仿、异戊醇 (23:1), 上下缓慢混合 10 分钟, 4 500r / min 离心 20 分钟。

(9) 吸出水相, 向水相中加入 2 倍体积的预冷 (—20℃) 无水乙醇, 盖紧管盖, 上下颠倒即可看见白色絮状 DNA。

(10) 小心将絮状 DNA 吸 (吸头尖端剪去一小段, 端部必须光滑) 至 1.5ml 离心管中, 加入 1ml 70% 的乙醇, 来回颠倒数次离心管, 10 000r / min 离心 2~5 分钟。

(11) 小心地倒掉管中乙醇, 将管倒置在干净的吸水纸上, 以让乙醇流尽。

(12) 将离心管正立, 置 45℃烘箱中烤 20 分钟左右, 以便让乙醇完全挥发掉, 如有条件, 可置于真空干燥器中抽气 10 分钟。

(13) 取出离心管, 视沉淀块的大小加入 100~200 μl TE 缓冲液, 置 55℃水浴中过夜, 以溶解 DNA。

(14) 将溶解后的 DNA 置于 4℃或—20℃下贮存。

基因组 DNA 的酶切

(1) 每样酶切反应为:

10 μ g DNA

1.5ml (15u) 限制性内切酶

6 μ l 10 倍 buffer

6 μ l 40mmol / dm³ 亚精胺

加双蒸水至体积为 60 μ l, 用吸头混匀。

(2) 37℃水浴, 保持 6~8 小时。

(3) 取出酶切样品置于 4℃下。

基因组 DNA 酶切情况检查

(1) 从每个酶切样品中取出 3 μ l 消化液, 加入 3 μ l 2 倍 BPB 混匀后点样。

(2) 用 0.8%琼脂糖凝胶 (内含 0.5 μ g / ml EtBr) 和 1 倍 TAE 缓冲液进行电泳, 电压为 60V。

(3) 1 小时后, 在紫外灯下检查酶切是否完全及各样品的 DNA 浓度是否一致, 以确保每个样品进行电泳时上样量一致。

(4) 如果发现某个样品酶切不完全, 则另外加入 5 μ l 左右的酶, 在 37℃条件下水浴保温 6 小时。

(5) 已完全酶切的样品, 加入 1 / 10 体积 (6 μ l) 的电泳上样缓冲液 (10 倍 BPB), 混匀后置 4℃ (短期) 或 -20℃ (长期) 保存。

大板凝胶的制备和电泳

(1) 称取 3.75g 琼脂糖, 将其倒入一个 500ml 容积的普通试剂瓶 (透明度要高) 中。用蒸馏水将 50 倍 TAE 贮存液稀释成 1 倍 TAE, 量取 375ml 1 倍 TAE 加入瓶中, 配制的凝胶浓度为 1.0%。

(2) 盖上瓶盖, 但不能旋得太紧。将瓶放入微波炉中加热, 待琼脂糖完全熔化后, 溶液是透明的。

(3) 取出瓶子放在 55℃的水浴箱中, 约 30 分钟后就能冷却至 55℃。

(4) 洗净并擦干制胶板 (24cm × 22cm), 用 2cm 左右宽的透明胶布将制胶板的两个开口端封牢, 放置在水平台面上用水平仪调平。将样品梳 (6mm × 3mm) 插入制胶板离最近开口端 2cm 位置。将冷却至 55℃的凝胶摇匀, 缓慢地倒入制胶板中央, 如果有气泡出现, 应用吸头将气泡吸掉, 60 分钟后, 制胶板中的凝胶将完全凝固。

(5) 将 50ml 50 倍 TAE 贮存液倒入电泳槽中, 再加入 2450ml 蒸馏水与其混匀, 电泳槽也应置于水平台面上。

(6) 将制胶板两端的透明胶布剥离, 然后将制胶板放在电泳槽的中部, 小心地拔出加样梳, 以免加样孔破裂。

(7) 从 4℃冰箱中取出 DNA 样品, 另取两个离心管, 各加入 12 μ l (1 μ g / 8 μ l) 的分子量标志物 λ DNA / EcoR I + Hind III 及 1 / 10 体积的 (1.2 μ l) 10 倍 BPB, 混匀。将 DNA 样品及分子量标记物一起置于 55℃水浴箱保温 10 分钟, 取出后立即置于冰水混和物中, 2~3 分钟后点样, 这样可防止粘性末端之间的粘接。

(8) 加样时每个样品用一个吸头, 以免交叉污染。吸出样品后应迅速插入加样孔中下部, 轻轻推出样品, 在两端加样孔中各点入分子量标志物。

(9) 盖上电泳槽盖, 插上导线, 在加样后 5 分钟接通电流, 以留出时间使加样孔内的样品通过扩散而均匀分布, 将电压调至 30V, 电泳 60 小时。

Southern 转移

(1) 电泳结束后, 将制胶板连同凝胶一起放在一个方形塑料盘中, 倒入约 350ml (浸没凝

胶)的 $0.2\text{mol} / \text{dm}^3\text{HCl}$ 处理 25 分钟,并每过约 5 分钟摇动一次。

(2) 倒掉稀盐酸溶液,加入蒸馏水简单地洗涤一下凝胶,然后倒掉蒸馏水,加入约 350ml 的变性液浸泡 30 分钟,间断性地摇动。

(3) 倒掉变性液,加入 350ml 0.5 倍变性液浸泡 25 分钟,间断性地摇动。

(4) 将制胶板连同凝胶一起取出,将一块约 $28\text{cm} \times 19.5\text{cm}$ 的玻璃板盖在凝胶上,极其小心地将制胶板倒翻过来,这时玻璃板在下,凝胶在上,轻轻地滑出制胶板,将玻璃板连同其上的凝胶放在水平的桌面上。

(5) 将一张 $20\text{cm} \times 19\text{cm}$ 的尼龙膜(注明样品排列方向及电泳方向)在 0.5 倍变性液中浸湿,然后对齐凝胶小片段区域的顶端将尼龙膜铺在凝胶的表面,用一根玻璃棒从膜的表面推过以赶走膜与凝胶之间的气泡,用墙纸刀切除掉凝胶的无用部分(未被尼龙膜覆盖住的部分)。操作时应戴上手套或用镊子。

(6) 将 3 张稍大于膜的滤纸($20\text{cm} \times 20\text{cm}$)依次在 0.5 倍变性液中浸湿,放置在膜上,每放一张滤纸后都应用玻璃棒轻轻赶走气泡。

(7) 将一打(约 4~5cm 厚)已裁至滤纸大小的干吸水纸放在滤纸层上,再将一块玻璃板放在吸水纸上,然后抓紧上下两块玻璃板迅速翻转放在水平桌面上,抽去凝胶上面的玻璃板。

(8) 在凝胶的四周露出的滤纸及吸水纸上放上保鲜膜,以防止凝胶上下的滤纸直接接触。然后将 5 张稍大于凝胶的滤纸($20\text{cm} \times 20\text{cm}$)依次在 0.5 倍变性液中浸湿,放置在膜上,每放一张滤纸后都应用玻璃棒轻轻赶走气泡。

(9) 用一层保鲜膜将整个转移装置围盖住,以防水分蒸发,将一块玻璃板压在顶部。

(10) 持续转移 3~4 小时后,去掉上面的滤纸和凝胶,取下尼龙膜放在 2 倍 SSC 中浸泡 20 分钟,间断性摇动,然后取出放在一张干净的滤纸上,置 60°C 烘箱中烘 30 分钟,使 DNA 固定于尼龙膜上。

(11) 将烤干的膜夹在两张干燥滤纸之间,置于室温下保存待用。

DNA 指纹图谱分析方法

探针的标记

(1) 将 80ng 探针 DNA (体积 $<30\mu\text{l}$) 倒进一个新的 0.5ml 离心管中,在沸水中煮 5~10 分钟,取出,插入碎冰中。

(2) 然后依次在试管中加入下列成分: $10\mu\text{l}$ 5 倍标记缓冲液(含随机引物), $2\mu\text{l}$ BSA ($10\text{mg} / \text{ml}$), $2\mu\text{l}$ dATP、dGTP、dTTP 等量混合物(浓度为各 $20\mu\text{mol} / \text{dm}^3$); $30\mu\text{l}$ 灭菌蒸馏水, $50\mu\text{l}$ (α - ^{32}P) dCTP ($10\mu\text{Ci} / \mu\text{l}$, $3000\text{Ci} / \text{mmol}$) (至浓度为 $333\text{nmol} / \text{dm}^3$); $1\mu\text{l}$ Klenow 酶 ($3\text{u} / \mu\text{l}$); 最后体积为 $50\mu\text{l}$ 。

(3) 将全部试剂混匀后置 37°C 保温壶中保温 6 小时。

(4) 加入等体积 ($50\mu\text{l}$) 的标记反应终止液终止反应。

未掺入核苷酸前体的除去

(1) 取一 0.5ml 离心管,在管底部打一小孔,用玻璃棉塞住小孔,外套一个 1.5ml 离心管。

(2) 向 0.5ml 的管中加满 TE 饱和的 Sephadex G-50。

(3) $3000\text{r} / \text{min}$ 离心 5 秒钟,重新加满 Sephadex G-50 后再离心,直到 Sephadex G-50 加满 0.5ml 小管的 $3/4$ 。

(4) 将标记反应液加入 0.5ml 管中, $3000\text{r} / \text{min}$ 离心数秒钟。

(5) 将 1.5ml 管中的液体(蓝色)移入另一 1.5ml 离心管中。

(6) 向 0.5ml 管中加入 $40\mu\text{l}$ TE, $3000\text{r} / \text{min}$ 离心数秒钟。

(7) 重复(5)、(6)步骤 2~3 次,直到凝胶中的紫色即将到达 0.5ml 管底部。

(8) 将回收的探针置于 4°C 下待用。

探针放射性强度的测定

- (1) 取两个液闪瓶，各加 2ml 闪烁液。
- (2) 在其中一个液闪瓶内加入 $2\mu\text{l}$ 原标记反应液。
- (3) 在另一个液闪瓶内加入 $2\mu\text{l}$ 去除了未掺入核苷酸的回收液。
- (4) 将 2 个液闪瓶置于液闪仪中，测定其 cpm。

Southern 杂交

- (1) 将 25ml 杂交液放入方形塑料盒中，于 55°C 下预热。
 - (2) 将待杂交的膜和杂交液一起放入水浴摇床中。
 - (3) 在 55°C 下预杂交 1.5 小时左右。
 - (4) 将放射性探针放在沸水中 5 分钟，取出后迅速插入冰水中。
 - (5) 在杂交液中按 $5 \times 10^5 \text{cpm} / \text{ml}$ 的浓度加入变性的探针。
 - (6) 在 55°C 下杂交约 15 小时。
 - (7) 将杂交液中的膜取出，放入 1 倍 SSC 溶液并于 55°C 下漂洗 10 分钟。
 - (8) 倒去 1 倍 SSC 溶液，在 55°C 下用 1 倍 SSC 溶液及 0.1 % SDS 洗脱液漂洗 40 分钟。
 - (9) 倒去洗脱液， 55°C 下用新的 1 倍 SSC 溶液及 0.1 % SDS 洗脱液漂洗 30 分钟。
- 128 遗传多样性研究的原理与方法
- (10) 将膜放入 1 倍 SSC 溶液中，于室温下漂洗 10 分钟。
 - (11) 取出膜，平摊在洁净、干燥的滤纸上。
 - (12) 当膜上无水珠、膜仍湿润时，用保鲜膜将膜包好准备压片。

放射自显影

- (1) 在暗室或微弱安全光条件下，打开 X 光曝光暗盒。
- (2) 放入一张增感屏，光滑面朝上。
- (3) 将膜放在增感屏上（膜与膜之间不能重叠）。
- (4) 置 X 光胶片于膜上。
- (5) 将另一张增感屏光滑面朝下放在 X 光胶片上。
- (6) 盖紧 X 光暗盒，置 -70°C 冰箱内曝光 1~7 天。

X 光胶片的冲洗

- (1) 显影：将 X 光胶片从暗盒中取出，放入显影液中，间断性摇动数分钟。
- (2) 停显影：将 X 光胶片放入 1.5 % 的冰醋酸溶液中漂洗数秒钟。
- (3) 定影：将 X 光胶片转入定影液中定影数分钟。
- (4) 冲洗：将定影完毕的 X 光胶片放在流水中冲洗 20 分钟，然后晾干。

放射性探针的除去

- (1) 将 300~500ml 蒸馏水煮沸。
- (2) 往蒸馏水中加 SDS，至最终浓度 0.1 %。
- (3) 将放射自显影后的膜浸入其中。
- (4) 待冷却至室温时将膜取出、烘干，即可用于另一种探针的杂交。

DNA 指纹数据处理

分析范围及标准

所有图带分析均在X光胶片上进行，所分析的图带大小范围为2.0~23.0kb。胶片上那些位置相同（即分子量相同）、显影强度基本一致的图带被看作是相同的带。将同一胶片上的个体两两配对比较，找出相同的图带。在分析过程中，假定所有相同的带均来自同一位点上的同一等位基因。

DNA 指纹图谱的共有带率（Band-sharing，简称BS）

BS 的计算公式为：

$$BS = 2NAB / (NA + NB)$$

式中：NA 指个体A 的图带数，NB 为个体B 的图带数，NAB 指个体A 和个体B 共有的图带数。

平均等位基因频率（q）及最低平均杂合率（Ht）

计算公式为：

$$q = 1 - (1 - BS) / 2, Ht = 1 - q$$

式中BS 为共有带率。

两个个体具有完全相同的DNA 指纹图谱的概率（P）

两个无关个体具有完全相同的DNA 指纹图谱的概率为： $P1 = (1 - 2BS + 2BS^2)^n / BS$ ；两个同胞个体具有完全相同的DNA 指纹图谱的概率为： $P2 = [1 - 0.5q(1 - q)^2(4 - q)]^n / BS$ 。

式中：n 为个体的平均图带数，q 为平均等位基因频率。

一个探针可能检测到的位点总数（N）和可检测到的不同位点数（L）的估计

计算公式为：

$$N = [(n - b)(n - b - 1) / 2a + 1] / 2; L = n - a - b$$

式中：n 为可见带数，a 为等位位点数，b 为连锁位点数。

DNA 指纹图带的家系遗传分析

根据孟德尔遗传规律，可以假定每一条只在一个亲本上存在的图带（杂合带），遗传给后代的概率为0.5（小卫星位点之间没有连锁和突变）。一个亲本的所有杂合带在子代中出现的次数符合二项式分布，对二项式分布进行适合性检验，即可判定这些杂合带是否符合孟德尔遗传规律。

卡方的计算公式为：

$$\chi^2 = \sum [(O - E)^2 / E]$$

式中：O 为观察到的杂合带出现的次数，E 为期望次数（二项式对应的每一项概率乘以总次数）。自由度df = N - 1。

传递率的计算方法为亲本DNA 指纹图谱中每一条带在所有后代中出现的次数与后代个体数之比的算术平均值。

实验十一 动物总 RNA 的提取及含量测定

1. 实验原理

细胞内大部份 RNA 均与蛋白质结合在一起,并且多以核蛋白的形式存在。因此分离制备 RNA 时,首先遇到的是必须使 RNA 与蛋白解离,并除去蛋白质。由于 RNA 的种类来源和存在形式不同,所用的制备方法各异,一般常用的方法有,盐酸法,稀碱法和苯酚法。其中,以苯酚法使用较为广泛。产品纯度高,适合小规模生产。

动物组织中以肝脏器官 RNA 含量较为丰富。本实验就是将兔肝组织匀浆,在酚与十二烷基硫酸钠的存在下, RNA 与蛋白质分离使蛋白质变性凝固。RNA 溶解在水相中,用乙醇使 RNA 从水相中沉淀,达到分离。RNA 与浓盐酸共热时,即发生降解,形成的核糖继而转变成糠醛,后者与 3, 5-二羟甲苯反应呈鲜绿色,该反应需用三氯化铁和氯化铜作催化剂,反应产物在 670nm 处有最大吸收。RNA 在 20—250 微克范围内,光吸收与 RNA 浓度成正比。地衣酚反应特异性较差,凡是戊糖均有此反应。RNA 和其他杂质也能给出类似的颜色。

2. 试剂与器材

冰箱、恒温水浴、离心机、真空干燥器、煤气灯、冰盐浴等。

0.05mol/L 醋酸缓冲液 (PH5.0)、25%SDS、80%酚、2mol/L 醋酸钠、95%乙醇 RNA 标准溶液、样品待测液、地衣酚试剂

3. 操作方法

- 1) RNA 提取: 将新鲜兔肝浸入预冷 0 度 0.05mol/L 醋酸钠缓冲液(PH5.0)中,除去肝脏处的结缔组织,除去血凝,用滤纸吸干,称取 0.9 克.(已称好)
- 2) 取 0.9 克肝脏,加入 0.05mol/L 醋酸缓冲液(PH5.0)9 毫升,250 克/升.SDS1.5 毫升,移入匀浆管中,匀浆后再加入等体积 80%酚,再匀浆一次.
- 3) 移入三角瓶中,置 65 度水浴中继续振摇 5-8 分,取出流水冷却.
- 4) 离心,3000 转/分,10-15 分,上层为稍混浊,含有 RNA 的水相,中层为变性蛋白,下层为酚液,管底残渣,含有 RNA.吸出上层水溶液要 RNA 的收获量,可向中下层液中再加 1/2 体积的醋酸缓冲液,同样在 65 度水浴中振摇提取一次,离心后所取得的上层水液,可与上述水液合并,本次实验只提取一次.
- 5) 用量筒测水液的量,加入 1/10 体积的 2mol/L 醋酸钠混匀.再加入 2.5 倍体积预冷的 95%乙醇混匀,冷却放置絮状沉淀充分形成.
- 6) 离心 3000 转/分,10 分钟,倾出上清.
- 7) 沉淀用蒸馏水 4 毫升溶解,慢慢向沉淀中加入蒸馏水,不断搅拌,至沉淀完全溶解即可,待作含量测定.

4. 关键步骤与注意事项

- ① 一定要严格控制温度对 RNA 的影响
- ② 防止核酸酶的降解作用

实验十二 动物组织 mRNA 提取实验方法

一、材料

小鼠肝组织。

二、设备

研钵，冷冻台式高速离心机，低温冰箱，冷冻真空干燥器，紫外检测仪，电泳仪，电泳槽。

三、试剂

1、无 RNA 酶灭菌水：用将高温烘烤的玻璃瓶（180℃ 2 小时）装蒸馏水，然后加入 0.01% 的 DEPC（体积/体积），处理过夜后高压灭菌。

2、75%乙醇：用 DEPC 处理水配制 75%乙醇，（用高温灭菌器皿配制），然后装入高温烘烤的玻璃瓶中，存放于低温冰箱。

3、1×层析柱加样缓冲液：20mmol/L Tris·Cl(pH7.6)，0.5mol/L NaCl，1mmol/L EDTA(pH8.0)，0.1% SDS。

4、洗脱缓冲液：10mmol/L Tris·Cl (pH7.6)，1mmol/L EDTA (pH8.0)，0.05% SDS。

四、操作步骤

（一）动物总 RNA 提取-Trizol 法

Trizol 法适用于人类、动物、植物、微生物的组织或培养细菌，样品量从几十毫克至几克。用 Trizol 法提取的总 RNA 绝无蛋白和 DNA 污染。RNA 可直接用于 Northern 斑点分析，斑点杂交， Poly(A)+分离，体外翻译，RNase 封阻分析和分子克隆。

1、将组织在液 N 中磨成粉末后，再以 50-100mg 组织加入 1ml Trizol 液研磨，注意样品总体积不能超过所用 Trizol 体积的 10%。

2、研磨液室温放置 5 分钟，然后以每 1ml Trizol 液加入 0.2ml 的比例加入氯仿，盖紧离心管，用手剧烈摇荡离心管 15 秒。

3、取上层水相于一新的离心管，按每 ml Trizol 液加 0.5ml 异丙醇的比例加入异丙醇，室温放置 10 分钟，12000g 离心 10 分钟。

4、弃去上清液，按每 ml Trizol 液加入至少 1ml 的比例加入 75%乙醇，涡旋混匀，4℃下 7500g 离心 5 分钟。

5、小心弃去上清液，然后室温或真空干燥 5-10 分钟，注意不要干燥过分，否则会降低 RNA 的溶解度。然后将 RNA 溶于水中，必要时可 55℃-60℃水溶 10 分钟。RNA 可进行 mRNA 分离，或贮存于 70%乙醇并保存于-70℃。

[注意] 1、整个操作要带口罩及一次性手套，并尽可能在低温下操作。

2、加氯仿前的匀浆液可在-70℃保存一个月以上，RNA 沉淀在 70%乙醇中可在 4℃保

存一周, -20℃保存一年。

(二) mRNA 提取

由于 mRNA 末端含有多 poly(A)+, 当总 RNA 流经 oligo(dT)纤维素时, 在高盐缓冲液作用下, mRNA 被特异的吸附在 oligo(dT)纤维素柱上, 在低盐浓度或蒸馏水中, mRNA 可被洗下, 经过两次 oligo(dT) 纤维素柱, 可得到较纯的 mRNA。

- 1、用 0.1mol/L NaOH 悬浮 0.5-1.0g oligo(dT)纤维素。
 - 2、将悬浮液装入灭菌的一次性层析柱中或装入填有经 DEPC 处理并经高压灭菌的玻璃棉的巴斯德吸管中, 柱床体积为 0.5-1.0ml, 用 3 倍柱床体积的灭菌水冲洗柱床。
 - 3、用 1x 柱层析加样缓冲液冲洗柱床, 直到流出液的 pH 值小于 8.0。
 - 4、将 (一) 中提取的 RNA 液于 65℃温育 5 分钟后迅速冷却至室温, 加入等体积 2x 柱层析缓冲液, 上样, 立即用灭菌试管收集洗出液, 当所有 RNA 溶液进入柱床后, 加入 1 倍柱床体积的 1x 层析柱加样溶液。
 - 5、测定每一管的 OD₂₆₀, 当洗出液中 OD 为 0 时, 加入 2-3 倍柱床体积的灭菌洗脱缓冲液, 以 1/3 至 1/2 柱床体积分管收集洗脱液。
 - 6、测定 OD₂₆₀, 合并含有 RNA 的洗脱组分。
 - 7、加入 1/10 体积的 3M NaAc (pH5.2), 2.5 倍体积的冰冷乙醇, 混匀, -20℃30 分钟。
 - 8、4℃下 12000g 离心 15 分钟, 小心弃去上清液, 用 70%乙醇洗涤沉淀, 4℃下 12000g 离心 5 分钟。
 - 9、小心弃去上清液, 沉淀空气干燥 10 分钟, 或真空干燥 10 分钟。
 - 10、用少量水溶解 RNA 液, 即可用于 cDNA 合成 (或保存在 70%乙醇中并贮存于 -70℃)。
- [注意]** 1、mRNA 在 70%乙醇中 -70℃可保存一年以上。
- 2、oligo(dT)纤维素柱用后可用 0.3mol/l NaOH 洗净, 然后用层析柱加样缓冲液平衡, 并加入 0.02%叠氮钠 (NaN₃)冰箱保存, 重复使用。每次用前需用 NaOH 水层析柱加样缓冲液依次淋洗柱床。

防止 RNA 酶污染的措施

在所有 RNA 实验中, 最关键的因素是分离得到全长的 RNA。而实验失败的主要原因是核糖核酸酶 (RNA 酶) 的污染。由于 RNA 酶广泛存在而稳定, 一般反应不需要辅助因子。因而 RNA 制剂中只要存在少量的 RNA 酶就会引起 RNA 在制备与分析过程中的降解, 而所制备的 RNA 的纯度和完整性又可直接影响 RNA 分析的结果, 所以 RNA 的制备与分析操作难度极大。

在实验中, 一方面要严格控制外源性 RNA 酶的污染; 另一方面要最大限度地抑制内源性的 RNA 酶。RNA 酶可耐受多种处理而不被灭活, 如煮沸、高压灭菌等。

外源性的 RNA 酶存在于操作人员的手汗、唾液等, 也可存在于灰尘中。在其它分子生物学实验中使用的 RNA 酶也会造成污染。这些外源性的 RNA 酶可污染器械、玻璃制品、塑料制品、电泳槽、研究人员的手及各种试剂。而各种组织和细胞中则含有大量内源性的 RNA 酶。

1、防止 RNA 酶污染 的措施

- 1). 所有的玻璃器皿均应在使用前于 180℃的高温下干烤 6hr 或更长时间。
- 2). 塑料器皿可用 0.1% DEPC 水浸泡或用氯仿冲洗（注意：有机玻璃器具因可被氯仿腐蚀，故不能使用）。
- 3). 有机玻璃的电泳槽等，可先用去污剂洗涤，双蒸水 冲洗，乙醇干燥，再浸泡在 3% H₂O₂ 室温 10min，然后用 0.1% DEPC 水冲洗，晾干。
- 4). 配制的溶液应尽可能的用 0.1% DEPC，在 37℃处理 12h 以上。然后用高压灭菌除去残留的 DEPC。不能高压灭菌的试剂，应当用 DEPC 处理过的无菌双蒸水 配制，然后经 0.22μm 滤膜过滤除菌。
- 5). 操作人员戴一次性口罩、帽子、手套，实验过程中手套要勤换。
- 6). 设置 RNA 操作专用实验室，所有器械等应为专用。

实验十三 RNA 的定量和完整性分析

RNA 的完整性可以通过琼脂糖变性电泳分析检测,而含量则通过紫外分光光度计确定。常见的变性电泳有甲醛变性电泳, 戊二醛变性电泳等。

(一)、甲醛变性电泳检测 RNA 完整性

1、材料、试剂和仪器

1 材料: 植物总 RNA 5-10 μ g

2 试剂:

1) 加样运载缓冲液 (Loading buffer), 50% 甘油, 1mmol/L EDTA (pH 8.0), 0.25%溴酚蓝, 25%二甲苯氰 FF

2) 10 $\times$ TAE Buffer

3) 5 $\times$ 甲醛凝胶电泳缓冲液:, 0.1mol/L MOPs (pH7.0), 40mmol/L 乙酸钠, 5mmol/L DETA(pH8.0)

4) 甲醛, 甲酰胺

3 仪器: 电泳装置, 紫外透射观测仪

2、实验程序

1 甲醛变性的琼脂糖(Agarose) 凝胶的配制

在 250mL 的锥形瓶中准确称量 2g Agarose (Sigama), 再加 20mL 10 $\times$ TAE Buffer, 144mL DEPC 处理过的双蒸水, 微波炉中化胶, 待冷却至 50-60 $^{\circ}$ C加 EB 至终浓度 $\leq 0.5\mu$ g/mL。在通风橱中加入 36 mL 甲醛, 放置一段时间以减少甲醛蒸汽。

2 RNA 的甲醛变性电泳

1) 样品制备, RNA 总量 10 μ g, 5 $\times$ 甲醛凝胶电泳缓冲液 4 μ l, 甲醛 3.5 μ l, 甲酰胺 10 μ l, 加入无菌离心管中混合, 95 $^{\circ}$ C水浴变性 2min(或 55 $^{\circ}$ C,15min), 取出后放入冰中冷却。

2) 加入 2 μ l 无菌的 DEPC 处理的加样运载液。(使用加样运载液的目的有三: 增大样品密度, 以确保 DNA 均匀进入样品孔内; 使样品呈现颜色, 便于加样操作; 能明确显现样品在电泳胶上的泳动位置. 以 0.5 X TBE 作电泳液时, 溴苯酚在琼脂糖中的泳动速率与长 300 bp 的双链线状 DNA 相同, 而二甲苯氰 FF 的泳动速率与长 4kb 的双链线状 DNA 相同)

3) 将胶板浸没在 1 $\times$ 甲醛凝胶电泳缓冲液中, 点样前 5V/cm 预跑 5min。点

样后 3-4V/cm 电泳。

4) 电泳结束后 (溴苯酚蓝迁移到约 8cm 处), 紫外灯下观察, 照相。

(二)、RNA 含量和纯度的测定

1、材料，试剂和仪器

- 1 材料: 待检测的 RNA 样品
- 2 试剂: DEPC-H₂O
- 3 仪器: 紫外分析仪, 石英比色杯

2、实验程序

1. 开机设定参数, 具体操作参照仪器说明。
2. 用 DEPC-H₂O 做空白调零。
3. 将 RNA 样品按一定的比例稀释于 DEPC-H₂O。
4. 混匀样品后在 230nm、260nm、280nm 和 310nm 波长下读数, 还可扫描动态吸收图谱。

3 结果与分析

1. 完整的 RNA 的甲醛电泳可明显地观察到 28S 和 18S 两条带(见图 3.1), 并且 28S 大约是 18S 的两倍宽。若两条带不明显, 则说明 RNA 部分降解, 可能的原因是污染了 RNase, 或操作剧烈。
2. 定量测定 DNA 或 RNA, 应选 260nm、230nm、280nm 和 310nm 波长读数。其中 260nm 读数用来估算样品中核酸浓度, 310nm 为背景吸收值。1 个 OD₂₆₀ 值相当于 40 μ g/mL RNA。样品浓度 (μ g/mL) = [OD₂₆₀ - OD₃₁₀] $\times$ 稀释倍数 $\times$ 40, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值用于估计核酸的纯度, OD₂₆₀/OD₂₃₀ 估计去盐的程度。对于 RNA 纯制品, 其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ $\approx$ 2.0, OD₂₆₀/OD₂₃₀ 应大于 2。OD₂₆₀/OD₂₈₀ < 2.0 可能是蛋白污染所致, 可以增加酚抽提; OD₂₆₀/OD₂₃₀ < 2 说明去盐不充分, 可能是 GIT 污染所致, 可以再次沉淀和 70%乙醇洗涤。

RNA 操作注意事项与实验技巧

操作注意事项:

由于 RNA 酶的广泛存在与难以灭活的顽固特性。使得 RNA 的提取纯化和后续工作变得非常困难。为了保证 RNA 的研究工作成功, 请仔细阅读下列注意事项, 相信它能帮助您解决常见的问题。

归根究底, RNA 工作的主要问题是防止 RNA 酶的污染。RNA 酶无处不在, 在实验操作的任何一步, 任何偶然的疏忽或不当操作都有可能造成 RNA 酶污染, 从而导致整个实验失败。因此, 严格控制实验条件, 避免任何可能的污染是保证实验成功的关键, 必须做到以下几点:

1. 如果可能, 实验室应辟出专门 RNA 操作区, 离心机、移液枪、试剂等均应专用。RNA 操作区应保持清洁, 并定期进行消毒。
2. 操作过程中应自始至终佩戴抛弃式橡胶或乳胶手套, 并经常更换, 以避免将手、臂上的细菌和真菌以及人体自身分泌的 RNA 酶带入试管或污染用具。尽量避免使用抛弃式塑料手套。塑料手套不贴身, 常常造成操作不便, 而且多出部分还容易在器具上遭 RNA 酶污染并向未污染处传递, 扩大污染。

3.尽量使用一次性枪头、离心管等塑料制品，尽量避免与其它实验共享器具，以防止交叉污染。推荐使用出厂前已经灭菌的枪头和离心管，大多国外厂商供应的无菌塑料制品很少有RNA酶污染，买来后可直接用于RNA操作。许多研究者用DEPC等处理的塑料制品，往往由于二次污染而带有RNA酶，从而导致实验失败。

4.配制溶液用的酒精，异丙醇、Tris等应采用未开封的新品。溶液需用DEPC水配制（加0.01%(体积比)DEPC至重蒸水或Mili Q级水中，处理过夜，灭菌即成DEPC水）。

5.所有玻璃制品都必须在240°C烘烤4小时。所有旧塑料制品都必须用0.5M的NaOH处理10分钟，并用DEPC-H₂O彻底冲洗后灭菌，也可考虑用0.01%的DEPC水浸泡过夜，然后灭菌，烘干。无法用DEPC处理的用具可以用氯仿擦拭若干次，这样通常可以消除RNA酶的活性。

样本保存的注意事项：

样本一旦从生物体中分离后，细胞内的RNA就变得非常不稳定，容易降解。因此取样后，如何保证取样前后基因的表达模式不变，就变得非常重要。传统方法是用液氮速冻，再放到超低温冰箱中保存。

目前有些厂家开发出专门的RNA保护剂，如Qiagen公司的RNAlater是具有抑制RNase和稳定RNA作用的试剂，将采集的组织样本等直接放入到RNAlater中，即可起到稳定样本中RNA的作用。无需液氮或干冰，方便安全地在室温下保存一段时间，低温可长期保存。还有对细菌样本专用的RNAprotect Bacteria Reagent及对血液样本专用的PAXgene™ Blood RNA System。

RNA的定量与纯度：

RNA通常用分光光度计定量，测量在260 nm处的吸收值（A₂₆₀）。通常分光光度计A₂₆₀的读数要介于0.15-1.0之间才是可靠的，因此RNA提取结束后，要根据大概产量稀释（推荐用10 mM Tris.HCl, pH 7.0稀释）到适当浓度范围，再用分光光度计测量。A₂₆₀为1相当于RNA的浓度为40 μg/ml。

为了检测RNA的纯度，可以测量A₂₆₀与A₂₈₀的比值，通常纯RNA的A₂₆₀/A₂₈₀为1.9-2.1。

实验十四 综合实验：逆转录PCR

1. 实验原理

逆转录 PCR, 或者称反转录PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR), 是聚合酶链式反应(PCR)的一种广泛应用的变形。在RT-PCR中, 一条RNA 链被逆转录成为互补DNA, 再以此为模板通过PCR 进行DNA 扩增。由一条RNA 单链转录为互补DNA(cDNA)称作“逆转录”, 由依赖RNA 的DNA 聚合酶(逆转录酶)来完成。随后, DNA 的另一条链通过脱氧核苷酸引物和依赖DNA 的DNA 聚合酶完成, 随每个循环倍增, 即通常的PCR。原先的RNA 模板被RNA 酶 H 降解, 留下互补DNA。RT-PCR的指数扩增是一种很灵敏的技术, 可以检测很低拷贝数的RNA。RT-PCR广泛应用于遗传病的诊断, 并且可以用于定量监测某种RNA 的含量。

2. 实验操作

RNA 抽提

【材料与器材】

1). 准备

- (1) 移液枪: 1ml、200ul、10ul
- (2) 吸头: 1ml、200ul、20ul
- (3) 吸头台: 放置1ml 吸头的一个, 放置200ul 和20ul 的吸头一个
- (4) EP 管1.5ml、100ul
- (5) 玻璃研磨器
- (6) 容量瓶: 1000ml
- (7) 盐水瓶: 100ml
- (8) 15ml 塑料管一个(配75%乙醇用)

2). 实验器具的处理

(1) 塑料制品: (包括吸头、EP 管等)将塑料制品逐个浸泡于1%DEPC 水中(必要时小枪头需要用吸管打入DEPC水) 37℃过夜, 然后送至高压3 次, 后在80℃烘烤箱中烘干(或置于37℃中8小时左右烘干), 试验前将枪头放入吸头台。

(2) 玻璃制品: (主要是玻璃研磨器)先泡酸过夜, 冲洗干净后, 在1%DEPC 水中泡8 小时左右, 37℃烘干, 用蒙锡纸包裹送至干烤3 次。

(3) 金属制品: (镊子等)先洗干净, 再送干烤3 次。(不需要泡DEPC 水)

3). 试剂配制和准备:

(1) DEPC 水: 泡实验器具的DEPC 水的配制: 1000ml 双蒸水中加1mlDEPC, 放在 1000ml 容量瓶中静置4 小时后备用。配75%乙醇的DEPC 水的配制: 100ml盐水瓶内装40ml 双蒸水, 加40ulDEPC, 37℃过夜, 送至高压。

(2) 75%乙醇(要在抽提时现配): 用无水乙醇和DEPC 水配制(DEPC 水:无水乙醇= 1:3), 然后放于-20℃备用。

(3) 异丙醇: 放入棕色瓶

(4) 氯仿: 放入棕色瓶

(5) Trizol: 100ml/瓶存放于4℃

【注意事项】

全程佩戴一次性手套和口罩, 手套要勤换, 避免戴上的一次性的手套接触可疑污染物。

【抽提RNA 步骤】

1. 匀浆化作用

取约100mg 鼠脑组织放于玻璃研磨器内，先加0.2ml 的Trizol 溶液，研磨组织后，倒入1.5mlEP 管中，再在研磨器内加入0.8ml 的Trizol 溶液洗，后全部再倒入EP 管中。颠倒混匀10 下，室温静置5 分钟。

2. 分离阶段

每1mlTrizol 中加0.2ml 氯仿。盖紧样品管盖，用手用力摇晃试管15 秒，使其充分混匀，室温静置5 分钟。后12000rpm 离心15 分钟。

3. RNA 的沉淀

将上层水相转入新的1.5mlEP 管中（约400-500ul），加入0.5ml 异丙醇，混匀后放于-20℃中1 小时，后12000rpm 离心10 分钟。

4. RNA 的洗脱

小心倒掉上清，留取沉淀。加1ml 现配的75%的乙醇（预冷）振荡洗涤RNA沉淀一次，后7500rpm 离心5 分钟。

5. RNA 的再溶解

小心倒掉上清，取沉淀置超净工作台开风机吹干（约30 分钟，此时RNA 沉淀变透明）。注意不能让RNA 沉淀完全干燥（会极大地降低它地可溶性）。再在管中加20ul 的DEPC 水溶解，在55-60℃下孵育10 分钟助溶。

6, RNA 的保存

提取的RNA 保存于-70℃超低温冰箱中，或立即用于逆转录。

【TRIZol 法抽提总RNA】

【实验步骤】

1. 细胞 1×10^7 ，组织100mg，加1mlTRIZol，细胞用1ml 加样器吹至液体澄清且无细胞团块
2. 匀浆（要彻底，后转至EP 管）（组织匀浆量>100mg 时分装1ml/每EP 管）颠倒混匀10 下，室温5 分钟。
3. 加氯仿1/5 体积（0.2ml）（必须按总体积的1/5）颠倒混匀15S，室温5 分钟，4℃，离心12000rpm，15 分钟，转上层水相（约400-500 μ l）于另一新1.5mlEP管中。
4. 加等体积异丙醇（约400 -500 μ l），混匀后，20℃中1 小时，4℃，离心12000rpm，10分钟，弃上清。
5. 加冰预冷的75%乙醇（用高压后的DEPC 水配）1ml，4℃离心7500rpm，5 分钟弃上清，超净工作台开风机干燥约30 分钟（不能完全干燥）。
6. 溶于DEPC 水中至20 μ l（10 μ l-20 μ l）（可在55-60℃水中，<10 分钟助溶）。
7. 立即保存于-70℃超低温冰箱中，或立即用于逆转录。

【逆转录（RT）】

【器材与试剂】

1, 实验器具与材料:

- （1）移液枪：200ul、10ul
- （2）吸头：200ul、20ul
- （3）EP 管1.5ml、100ul
- （4）水浴箱

2, 实验器具的处理与准备

塑料制品：（包括吸头、EP 管等）将塑料制品逐个浸泡于1%DEPC 水中（必要时小枪头需要用吸管打入DEPC 水）37℃过夜，然后送至高压3 次，后在80℃烘烤箱中烘干（或置于37℃

中8 小时左右烘干），试验前将枪头放入吸头台。

3, 试剂配制和准备:

(1) DEPC 水: 泡实验器具的DEPC 水的配制: 1000ml 双蒸水中加1mlDEPC, 放在 1000ml 容量瓶中静置4 小时后备用。逆转录中所用的DEPC 水的配制100ml 盐水瓶内装40ml 双蒸水, 加40ulDEPC, 37℃过夜, 送至高压, 后分装到几个1.5mlEP 管中, -20℃中保存备用。

(2) RT 中所需要的各种试剂

(3) 引物浓度计算方法: (新合成的引物的稀释)

假如终浓度为X uM(pmol/ul), 加DEPC 水体积 (ul) = (OD×33×1000000) / (分子量×X)

【RT 时注意事项】

为避免RNA 酶污染, 在RT 中仍要佩戴一次性手套和口罩。

【RT 实验步骤】

用SSIII逆转录酶进行RT (20ul 体积)

- 1, 准备0.65ml 的EP 管
- 2, 冰上操作: 在EP 管中加入10ulDEPC 水, 1ul 引物, 1ul 模板RNA, 1uldNTP, 短暂离心。
- 3, 65℃水浴5 分钟后, 立刻0℃冰水浴至少1 分钟。
- 4, 短暂离心后, 冰上操作: 加入4ul 5×First-Strand Buffer, 1ul 0.1MDTT, 1ulRNAse Inhibitor, 1ul SSIII逆转录酶。
- 5, 短暂离心
- 6, 50℃水浴60 分钟进行逆转录。
- 7, 70℃水浴15 分钟灭活逆转录酶
- 8, -20℃保存, 或立即进行PCR。

用AMV 逆转录酶进行RT (10ul 体积)

- 1, 准备0.65mlEP 管
- 2, 加入4.5ul DEPC 水, 1ul 引物, 1ul 模板RNA
- 3, 稍离心, 100℃沸水浴1min
- 4, 加入0.5uldNTP, 2ul 5×Buffer, 1ul AMV 逆转录酶
- 5, 稍离心, 封口膜封口, 42℃水浴90℃作RT
- 6, 100℃沸水浴3min 灭活AMV
- 7, 立即PCR 或-20℃保存。

聚合酶链式反应 (PCR)

【器材与试剂】

1, 实验器具与材料:

- (1) 移液枪: 200ul、10ul
- (2) 吸头: 200ul、20ul
- (3) 吸头台: 放置200ul 和20ul 的吸头一个
- (4) EP 管1.5ml、100ul

2, 实验器具的处理与准备

(1) 塑料制品: (包括吸头、EP 管等) 送至高压3 次, 试验前将枪头放入吸头台。

3, 试剂配制和准备:

(1) 双蒸水: 100ml 盐水瓶内装40ml 蒸馏水, 送至高压, 后分装到几个1.5mlEP管中, -20℃中保存备用。

(2) PCR 中所需要的各种试剂

【PCR 时注意事项】

佩戴一次性手套，同时避免戴上的一次性的手套接触可疑污染物。

【PCR 实验步骤】

- 1, 准备100ul EP 管
- 2, 依次在管中加入：（50ul 反应体系）
ddH₂O 37.5ul ×?
10mM dNTP 1ul ×?
10×PCR buffer 5ul ×?
25mM MgCl₂ （加之前要摇匀） 3ul ×?
上游引物1ul ×?
下游引物1ul ×?
模板cDNA 1ul
- 3, 稍离心
- 4, 100℃沸水浴1 分钟
- 5, 趁热加入Tag 酶0.5ul（冰上操作）
- 6, 再加入50ul 液体石蜡封闭
- 7, 10000rpm 离心1 分钟
- 8, PCR 条件：94℃ 1min, 58℃ 50sec, 72℃ 1min30sec, 进行40 个循环，然后72℃ 10min 完后4℃保温。
- 9, 10000rpm 离心5min
- 10, 将下层水相转入新的0.65mlEP 管中，-20℃保存。

电泳鉴定

【器材与试剂】

- 1, 实验器具与材料：
 - (1) 移液枪：10ul
 - (2) 吸头：20ul
 - (3) 吸头合：放置200ul 和20ul 的吸头一个
 - (4) 三角烧瓶：50ml 一个
 - (5) 琼脂糖
- 2, 实验器具的处理与准备
 - (1) 塑料制品：（包括吸头等）送至高压3 次，试验前将枪头放入吸头合。
 - (2) 电泳板及电泳槽：用自来水冲洗干净备用
- 3, 试剂配制和准备

(1) 电泳缓冲液（TAE）：

先配制0.5mol/L,PH8.0 的EDTA 溶液：将37.2g EDTA-Na 加入160ml 蒸馏水中，在搅拌器上剧烈搅拌。在用NaOH 调节溶液PH 值至8.0（约需4gNaOH）。用蒸馏水定容至200ml。后送至高压灭菌。室温保存。

再配制50×TAE 溶液：在400ml 蒸馏水中溶解121g Tris 碱，加入28.55ml 冰乙酸和50ml 0.5ml/L EDTA 溶液，再加蒸馏水定容至500ml，室温保存。

（2）琼脂糖溶液（1.0%）：50×TAE 溶液取10ml，稀释成 500ml，取50ml 溶解0.5g 琼脂糖，溶化的琼脂物冷却至60℃左右时加入10mg/ml EB 5ul，充分混匀，将温热的凝胶倒入已置好梳子的电泳板中，在室温下放置45min 左右后进行电泳。

（3）溴化乙锭（EB）（10mg/ml）：在20ml 水中加入0.2g 溴化乙锭，磁力搅拌数小时。然后用铝箔包裹容器或将溶液转移至棕色瓶中，室温保存。

（4）加样缓冲液（Loading Buffer）一般为6×Loading Buffer.

【电泳鉴定时注意事项】

佩戴一次性手套，避免皮肤接触EB。

【电泳实验步骤】

- 1， 加样：PCR Marker：1ul Marker+1ul Loading Buffer+4ul TAE 混匀，加入孔中。PCR 样品：5ul 样品DNA+1ul Loading Buffer 混匀后依次加入孔中。
- 2， 接上电源，电压120V，电流50mA 进行电泳。
- 3， 电泳约1 小时后，紫外灯检测。

附录：常用缓冲液的配制

1. 常用缓冲液的pKa值

缓冲液	相对分子质量	pKa值	缓冲范围
Tris (三羟甲基氨基甲烷)	121.1	8.08	7.1-8.9
HEPES (N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸)	238.3	7.47	7.2-8.2
MOPS (3-(N-吗啉代)丙磺酸)	209.3	7.15	6.6-7.8
PIPES (N,N'-双(2-乙磺酸)哌嗪)	304.3	6.76	6.2-7.3
MES (2-(N-吗啉代)乙磺酸)	195.2	6.09	5.4-6.8

2. 各种pH值Tris 缓冲液的配制

所需pH值(25° C)	0.1 mol/L HCl的体积/mL
7.10	45.7
7.20	44.7
7.30	43.4
7.40	42.0
7.50	40.3
7.60	38.5
7.70	36.6
7.80	34.5
7.90	32.0
8.00	29.2
8.10	26.2
8.20	22.9
8.30	19.9
8.40	17.2
8.50	14.7
8.60	12.4
8.70	10.3
8.80	8.5
8.90	7.0

某一特定pH的0.05 mol/L Tris缓冲液的配制：将 50mL 0.1 mol/L Tris碱溶液与上表所示相应体积(单位：mL)的0.1 mol/L HCl混合，加水将体积调至100mL。

3. 分子生物学中的常用缓冲液

(1) TE

pH7.4

10 mmol/L Tris.HCl (pH7.4)

1 mmol/L EDTA (pH8.0)

pH7.6
 10 mmol/L Tris.HCl (pH7.6)
 1 mmol/L EDTA (pH8.0)

pH8.0
 10 mmol/L Tris.HCl (pH8.0)
 1 mmol/L EDTA (pH8.0)

(2) STE (亦称TEN)
 0.1 mol/L 氯化钠
 10 mmol/L Tris.HCl (pH8.0)
 1 mmol/L EDTA (pH8.0)

(3) STET
 0.1 mol/L 氯化钠
 10 mmol/L Tris.HCl (pH8.0)
 1 mmol/L EDTA (pH8.0)
 5% Triton X-100

(4) TNT
 10 mmol/L Tris.HCl (pH8.0)
 150 mmol/L 氯化钠
 0.05% Tween 20

4. 常用电泳缓冲液

常用电泳缓冲液

缓冲液	使用液	浓贮存液 (1000mL)
Tris-乙酸 (TAE)	1×: 0.04 mol/L Tris-乙酸 0.001 mol/L EDTA	50×: 242 g Tris 碱 57.1 mL 冰乙酸 100 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)
Tris-磷酸 (TPE)	1×: 0.09 mol/L Tris-磷酸 0.02 mol/L EDTA	10×: 108 g Tris 碱 15.5 mL 85%磷酸 (1.679g/mL) 40 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)
Tris-硼酸 (TBE) *	0.5×: 0.045 mol/L Tris-硼酸 0.001 mol/L EDTA	5×: 54 g Tris 碱 27.5 g 硼酸 20 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)
碱性缓冲液 **	1×: 50 mmol/L 氢氧化钠 1 mmol/L EDTA	1×: 5 mL 10 mol/L 氢氧化钠 2 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)
Tris-甘氨酸 ***	1×: 25 mmol/L Tris 250 mmol/L 甘氨酸 0.1 % SDS	5×: 15.1 g Tris 碱 94 g 甘氨酸 (电泳级) (pH8.3) 50 mL 10% SDS (电泳级)

* TBE 浓溶液长时间存放后会形成沉淀物，为避免这一问题，可在室温下用玻璃瓶保存5×溶液，出现沉淀后则予以废弃。

目前几乎所有的琼脂糖凝胶电泳都以1:10稀释的贮存液作为使用液。

进行聚丙烯酰胺凝胶电泳使用1×TBE，是琼脂糖凝胶电泳时使用液浓度的2倍。聚丙烯酰胺凝胶垂直槽的缓冲液槽较小，故通过缓冲液的电流通常较大，需要使用1×TBE以提供足够的缓冲容量。

- ** 碱性电泳缓冲液应现用现配。
- *** Tris-甘氨酸缓冲液用于SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

5. 常用的凝胶加样缓冲液

缓冲液类型	6×缓冲液	贮存温度/° C
	0.25% 溴酚蓝	
(1)	0.25% 二甲苯青FF 4	
	40% (W/V) 蔗糖水溶液	
	0.25% 溴酚蓝	
(2)	0.25% 二甲苯青FF 室温	
	15% 聚蔗糖 (Ficoll) (400型)水溶液	
	0.25% 溴酚蓝	
(3)	0.25% 二甲苯青FF 4	
	30% 甘油水溶液	
	0.25% 溴酚蓝	
(4)	40% (W/V) 蔗糖水溶液 4	
	碱性加样缓冲液	
	300 mmol/L 氢氧化钠	
	6 mmol/L EDTA	
(5)	18% 聚蔗糖 (Ficoll) (400型)水溶液 4	
	0.15% 溴甲酚绿	
	0.25% 二甲苯青 FF	

使用以上凝胶加样缓冲液的目的有三：增大样品密度，以确保DNA均匀进入样品孔内；使样品呈现颜色，从而使加样操作更为便利；含有在电场中预知速率向阳极泳动的染料。溴酚蓝在琼脂糖凝胶中移动的速率约为二甲苯青FF的2.2倍，而与琼脂糖浓度无关。以0.5×TBE作电泳液时，溴酚蓝在琼脂糖中的泳动速率约与长300 bp的双链线状DNA相同，而二甲苯青FF的泳动则与长4 kb的双链线状DNA相同。在琼脂糖浓度为0.5%–1.4%的范围内，这些对应关系受凝胶浓度变化的影响并不显著。

对于碱性凝胶应当使用溴甲酚绿作为示踪染料，因为在碱性pH条件下其显色较溴酚蓝更为鲜明。

6. 2×SDS凝胶加样缓冲液

100 mmol/L Tris.HCl (pH6.8)

200 mmol/L二硫苏糖醇 (DTT)

4% SDS(电泳级)

0.2% 溴酚蓝

20%甘油

不含二硫苏糖醇 (DTT) 的2×SDS凝胶加样缓冲液可保存于室温，应在临用前取1 mol / L二硫苏糖醇贮存液现加于上述缓冲液中。

7. 测序凝胶加样缓冲液

98%去离子甲酰胺 0.025%二甲苯青FF

10 mmol / L EDTA (pH8.0) 0.025% 溴酚蓝

甲酰胺：许多批号的试剂甲酰胺，其纯度符合使用要求，无须再进行处理。不过，一旦略呈黄色，则应在磁力搅拌器上将甲酰胺与Dowex XG8混合床树脂共同搅拌1 h进行去离子处理；并用Whatman 1号滤纸过滤2次。去离子甲酰胺分装成小份，充氮存于-70℃。有的公司出售经过蒸馏并充氮包装的甲酰胺，用前不必纯化。

8. 常见限制性内切酶酶切缓冲液

各种限制性内切酶缓冲液常配制成10倍浓缩液。

根据各酶所需的盐浓度，常配制高盐、中盐和低盐贮存液：

10×低盐缓冲液：

100 mmol/L Tris.HCl (pH7.5)

100 mmol/L氯化镁

10 mmol/L DTT

10×中盐缓冲液：

0.5 mol/L氯化钠

100 mmol/L Tris.HCl (pH7.5)

100 mmol/L氯化镁

10 mmol/L DTT

10×高盐缓冲液：

1 mol/L氯化钠

500 mmol/L Tris.HCl (pH7.5)

100 mmol/L氯化镁

10 mmol/L DTT