

分子克隆技术

实验操作手册 2005



生命科学技术学院

课程简介

分子克隆技术是指 DNA 的无性繁殖技术。分子克隆技术课程主要是针对生物技术专业、生物科学专业、生命科学与技术基地班本科生及生物学类专业研究生而开设的实验课。实验内容涉及分子克隆的一些基本方法及基本操作技巧，主要包括分子克隆和分子杂交两大部分：

分子克隆技术：DNA 重组技术是分子生物学的核心内容。本实验利用质粒载体克隆外源 DNA 片段，通过这个实验大家可以掌握质粒载体的抽提、外源 DNA 的准备、酶切、连接及感受态细胞的制备、连接产物的转化以及阳性克隆子的鉴定和验证等。

分子杂交技术：实验室常用的分子杂交技术主要有 Southern blotting, Northern blotting, Western blotting 及 Dot blotting 等。Southern blotting 是通过用一种或多种限制性内切酶消化基因组或其它来源的 DNA，经过琼脂糖凝胶电泳按大小分离酶切所得的片段，随后 DNA 在原位发生变性并从凝胶转移到一固相支持物上（硝酸纤维素膜或尼龙膜）。DNA 转移至固相支持物的过程中各 DNA 的相对位置保持不变，用一定方法(如放射性同位素)标记的 DNA 探针与固着在膜上的 DNA 杂交，经 X-光片自显影显现出与探针 DNA 互补的 DNA 电泳条带的位置，然后进行分析。本实验要求掌握植物总 DNA 的抽提、质量检测、限制性内切酶操作、DNA 的琼脂糖凝胶电泳、转膜、探针的制备、同位素操作等方面的实验技术。在转录水平上研究和了解基因的表达与调控是分子生物学和基因操作的重要内容。为让学生初步了解有关 RNA 的操作过程注意事项，我们还列出 Northern blotting 的操作步骤以供选择。

目 录

系列一 分子克隆技术.....	4
实验一 质粒的制备	4
实验二 DNA 的琼脂糖凝胶电泳.....	5
实验三 外源 DNA 片段在质粒载体中的克隆.....	6
实验四 感受态细胞的制备	9
CaCl ₂ 感受态细胞的制备实验步骤.....	9
电转化法制备大肠杆菌感受态细胞的实验步骤	10
实验五 质粒的转化及转化子的鉴定.....	11
热激法转化实验步骤:	11
质粒电转化大肠杆菌感受态细胞操作步骤	12
实验六 PCR 技术	12
系列二 Southern 杂交技术.....	14
实验一 植物总 DNA 的快速少量抽提 (CTAB 法)	14
实验二 总 DNA 质量检测及酶切	15
实验三 电泳、转膜	16
实验四 Southern Blotting.....	18
系列三 Northern Blotting.....	24
实验一 RNA Extraction (mini prep).....	24
实验二 RT-PCR (Reverse transcription PCR).....	26
实验三 RNA 的电泳, 转膜和杂交	28
附录 试剂配方	29
一 细菌培养试剂	29

二 质粒抽提试剂.....	30
三 DNA 操作试剂.....	31
四 RNA 操作试剂.....	34
Stock Solution:.....	34
Work Solution.....	35

生物药——专心·做生物！
www.bb100.com
 易生物——领先的生物医药商务平台
www.ebioe.com
 生物药论坛——学术交流，资源共享，互助社区
www.bb100.com/bbs/

系列一 分子克隆技术

实验一 质粒的制备

质粒是携带外源基因进入细菌中扩增或表达的主要载体,它在基因操作中具有重要作用。质粒的分离与提取是最常用、最基本的实验技术。

质粒的提取方法很多,大多包括 3 个主要步骤:细菌的培养、细菌的收集和裂解、质粒 DNA 的分离和纯化。本实验以碱裂解法为例,介绍质粒的抽提过程。

实验目的: 掌握碱裂解法抽提质粒的原理、步骤及各试剂的作用。

实验材料: 含有质粒 pUC18 载体的大肠杆菌菌液,克隆有水稻外源片段的 BAC 的大肠杆菌菌液。

实验原理: 在 pH 12.0 ~ 12.6 碱性环境中,细菌的线性大分子量染色体 DNA 变性分开,而共价闭环的质粒 DNA 虽然变性但仍处于拓扑缠绕状态。将 pH 调至中性并有高盐存在及低温的条件下,大部分染色体 DNA、大分子量的 RNA 和蛋白质在去污剂 SDS 的作用下形成沉淀,而质粒 DNA 仍然为可溶状态。通过离心,可除去大部分细胞碎片、染色体 DNA、RNA 及蛋白质,质粒 DNA 尚在上清中,然后用酚、氯仿抽提进一步纯化质粒 DNA。

实验步骤:

1. 取含有 pUC18 质粒的大肠杆菌菌液于 LA 培养基上 37℃ 过夜培养;
2. 用无菌牙签挑取单菌落,接种于含有 Amp 抗生素的 LB 培养基中,37℃ 摇床~250 r/min 过夜培养;
3. 吸取 1.5 ml 菌液,12000 g 离心 2 分钟,收集菌体,倒掉菌液;吸取 1.5 ml 菌液,再次收集菌体,尽量将菌液倒干净;
4. 加入 300 μ l 溶液 I 振荡打匀,重新悬浮细胞,震荡混匀(注意:应彻底打匀沉淀或碎块);
5. 加入 300 μ l 溶液 II,轻柔颠倒混匀,放置至清亮,一般不超过 5 分钟;
6. 加入 300 μ l 溶液 III 颠倒混匀,放置于冰上 10 分钟,使杂质充分沉淀;
7. 12000 g 离心 10 分钟;
8. 吸取 800 μ l 上清液(注意:不要吸取到飘浮的杂质)至另一 Eppendorf 管中,加入 2/3 体积的异丙醇,室温下放置 5 分钟;
9. 12000 g 常温离心 15 分钟;

10. 倒尽上清, 加 75% 乙醇浸洗除盐 (放置片刻或离心 3 分钟后倒去上清);
11. 室温放置或超净台上风干 DNA;
12. 加 40 μ l 灭菌超纯水或 TE 溶解;
13. 质粒、BAC 的质量检测, 于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

附注: 质粒检测

电泳检测: 质粒电泳一般有三条带, 分别为质粒的超螺旋、开环、线型三种构型

吸光值检测: 采用分光光度计检测 260nm、280nm 波长吸光值, 若吸光值 260nm/280nm 的比值介于 1.7—1.9 之间, 说明质粒质量较好, 1.8 为最佳, 低于 1.8 说明有蛋白质污染, 大于 1.8 说明有 RNA 污染。

实验二 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

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。

实验目的: 掌握琼脂糖凝胶电泳的原理, 学习琼脂糖凝胶电泳的操作。

实验材料: 质粒 DNA、BAC、植物总 DNA 或它们的酶切产物。

实验原理: 在 pH 值为 8.0~8.3 时, 核酸分子碱基几乎不解离, 磷酸全部解离, 核酸分子带负电, 在电泳时向正极移动。采用适当浓度的凝胶介质作为电泳支持物, 在分子筛的作用下, 使分子大小和构象不同的核酸分子泳动率出现较大的差异, 从而达到分离核酸片段检测其大小的目的。核酸分子中嵌入荧光染料 (如 EB) 后, 在紫外灯下可观察到核酸片段所在的位置。

实验步骤:

1. 用胶带将洗净、干燥的制胶板的两端封好, 水平放置在工作台上;
2. 调整好梳子的高度;
3. 称取 0.24 g 琼脂糖于 30 ml 0.5 \times TBE 中, 在微波炉中使琼脂糖颗粒完全溶解, 冷却至 45-50 $^{\circ}$ C 时倒入制胶板中;
4. 凝胶凝固后, 小心拔去梳子, 撕下胶带;
5. 将电泳样品与溴酚蓝混合后将样品依次点入加样孔中;

pUC18 5 μ l + ddH₂O 3 μ l + 溴酚蓝 2 μ l 共 10 μ l 于 0.5ml tube 中混合后点样；

6. 将制胶板放入电泳槽中，加入电泳液，打开电泳仪，使核酸样品向正极泳动；
7. 电泳完成后切断电源，取出凝胶，放入 0.5 μ g/ml 的溴化乙锭（EB）溶液中染色 10—15 min，清水漂洗后置于紫外透射仪上观察电泳结果，并照相记录。

附注：

1. 影响 DNA 在琼脂糖凝胶中迁移速率的因素：

- 1) DNA 分子大小迁移速率 U 与 $\log N$ 成反比（ N 为碱基对数目）。分子大小相等，电荷基本相等（DNA 结构重复性）。分子越大，迁移越慢。等量的空间结构紧密的电泳快（超螺旋>线性 DNA）
- 2) 琼脂糖浓度： $\log U = \log U_0 - Kr\tau$ 胶浓度， U 为迁移率， U_0 为 DNA 的自由电泳迁移率， τ 为胶浓度， Kr 为介质阻滞系数。不同的凝胶浓度，分辨不同范围的 DNA
Agarose: 0.5%: 1-30 kb; 0.7%: 0.8-12 kb
 1.2%: 0.4-7 kb; 1.5%: 0.2-3 kb.
- 3) DNA 构象：一般迁移速率超螺旋环状>线状 DNA>单链开环。当条件变化时，情况会相反，还与琼脂糖的浓度、电流强度、离子强度及 EB 含量有关。
- 4) 所加电压：低电压时，线状 DNA 片段的迁移速率与所加电压成正比。使分辨效果好，凝胶上所加电压不应超过 5V/cm
- 5) 碱基组成与温度：一般影响不大 4-30 $^{\circ}\text{C}$
- 6) 嵌入染料的存在：降低线性 DNA 迁移率，（不提倡加在电泳液中）
- 7) 电泳缓冲液（0.5 \times TBE）的组成及其离子强度影响 DNA 的迁移率，无离子存在时，核酸基本不泳动，离子强度过大产热厉害，熔化凝胶并导致 DNA 变性，一般采用 1 \times TAE，1 \times TBE，1 \times TPE（均含 EDTA pH8.0）。

2. 溴化乙锭（EB）为致癌剂，操作时应戴手套，尽量减少台面污染。

3. 电泳指示剂：核酸电泳常用的指示剂有两种，溴酚蓝（bromophenol blue, Bb）呈蓝紫色；二甲苯腈（xylene cyanol, Xc）呈蓝色，它携带的电荷量比溴酚蓝少，在凝胶中的迁移率比溴酚蓝慢。

实验三 外源 DNA 片段在质粒载体中的克隆

DNA 重组技术包括载体及外源 DNA 片段的酶切消化、目的片段的获得及纯化、

目的片段与克隆载体的体外连接、重组子的筛选和鉴定等内容。DNA 片段的克隆技术是分子操作的核心部分。

实验目的：学习 DNA 的酶切、纯化及外源片段与载体的连接，将 BAC 克隆所携带的外源 DNA 酶切片段亚克隆到 pUC18 载体上。

实验材料：外源片段来自一个含有水稻 DNA 片段的 BAC 克隆的酶切片段；克隆载体为 PUC18。

实验原理：限制性内切酶可识别特定定位点并切割 DNA 产生粘性末端或平端的外源片段，经 DNA 的纯化处理后用于连接反应；选择克隆载体 pUC18 多克隆位点上相应的限制性内切酶切割，并用碱性磷酸酶处理防止载体自连；在连接酶的作用下将外源片段连接到载体上，实现外源片段的克隆。

实验步骤：

1. 载体 pUC18 和外源 DNA 片段的限制性酶切：

(50 μ l 反应体系，用 1.5ml tube，冰上操作)：

DNA	30 μ l
R.E	1 μ l
10 \times buffer	5 μ l
ddH ₂ O	14 μ l

37℃反应 1hr，分别取 8 μ l 外源片段酶切产物和 5 μ l PUC18 酶切产物于 1.0%凝胶检测酶切是否完全；按 2—5 步纯化、回收 DNA

2. 加入 ddH₂O 150 μ l (扩大体积)，加入等体积氯仿/异戊醇 (24:1)，颠倒混匀，12000g 离心 10 min；

3. 吸取上清，加 1/10 体积 3M NaAc 和两倍体积无水乙醇，-20℃放置 15 分钟以上；

4. 12000g 4℃冷冻离心 15 分钟；

5. 倒去上清，用 75%乙醇浸洗沉淀，风干后外源 DNA 溶于 10 μ l ddH₂O (0.5ml tube 中)，PUC18 溶于 20 μ l ddH₂O (1.5ml tube 中)；

6. 按以下反应去除载体 PUC18 的 5'磷酸基团，50℃反应 30 min 以上

DNA	20 μ l
CIAP (TaKaRa)	0.5 μ l
10 \times buffer	4.0 μ l
ddH ₂ O	15.5 μ l

7. 70℃水浴 10 min, 使 CIAP 失活；

8. 按 2—5 步纯化载体，溶于 10 μ l ddH₂O；

9. 连接反应 (15 μ l 体系):

DNA	10 μ l
pUC18	2.5 μ l
5 \times buffer	1.5 μ l
T4 ligase (3U/ μ l)	1 μ l

16°C 水浴过夜

10. 转化大肠杆菌感受态细胞

11. 转化子的鉴定

附注:

1. 根据试验目的和外源片段的不同可选用不同的载体, 采用不同粘性末端的双酶切可实现外源片段的定向克隆。

2. 克隆中用到的几种工具酶:

(1) 限制性内切酶

限制性内切酶的一个活性单位 (1U): 指在 50 μ l 反应体系中, 37°C 下, 经过 1 小时的反应将 1 μ g DNA 完全切割所需要的酶量。

限制性内切酶的 star 活性: 限制酶在某些条件下使用时对 DNA 切割的位点特异性可能降低, 即可以切割与原来识别的特定 DNA 序列不同的碱基序列, 这种现象叫限制酶的 star 活性。它的出现与限制酶、底物 DNA 以及反应条件有关。

(2) 碱性磷酸酶

细菌碱性磷酸酶 (BAP) 和牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP) 都能催化水解 DNA、RNA、dNTP 和 NTP 上的 5'-磷酸残基。比较而言, CIAP 更常用, 因其可在 70°C 10' 内加热灭活或通过苯酚抽提而变性失活, 同时 CIAP 的活性比 BAP 的高 10—20 倍。它主要用于: (1) 克隆时去除载体的 5'-P, 以防载体自连; (2) 在用 Kinase 进行 5' 末端标记前, 去除 DNA 的 5'-P。

(3) 连接酶

体外催化磷酸二酯键的形成可使用两种酶: 大肠杆菌连接酶和 T₄ 噬菌体连接酶, 但几乎在所有的克隆中 T₄ 噬菌体连接酶都是首选的酶, 因其能在正常的反应条件下能有效的将平端连接起来。

3. 氯仿对眼睛、皮肤、粘膜及呼吸道都有刺激作用, 它是致癌剂并可损伤肝脏和肾脏, 操作时需戴手套、安全镜并在通风橱中进行。苯酚是强腐蚀剂, 能引起严重烧伤。操作时应戴手套、安全镜、穿防护服, 并在通风橱中进行。

实验四 感受态细胞的制备

体外连接的 DNA 重组分子导入合适的受体细胞才能大量增殖。为了提高受体菌摄取外源 DNA 的能力，提高转化效率以获得更多的转化子，人们摸索出了不同的方法处理细菌，使其处于感受态。目前主要采用电转化法和 CaCl_2 法将外源 DNA 导入受体细胞中，并需要相应地制备电转化感受态细胞和 CaCl_2 感受态细胞。

实验目的：学习感受态细胞的制备过程

实验材料：大肠杆菌菌株 DH5 α 或 DH10B

实验原理：电转化法是利用瞬间高压在细胞上打孔，因而需用冰冷的超纯水多次洗涤处于对数生长前期的细胞，以使细胞悬浮液中应含有尽量少的导电离子。转化效率为 $10^9 \sim 10^{10}$ 转化子/ μg DNA；对于热激法，是利用冰冷的 CaCl_2 处理对数生长期的细胞，可以诱导其产生短暂的“感受态”，易于摄取外源 DNA。转化效率为 $10^6 \sim 10^7$ 转化子/ μg DNA。

CaCl_2 感受态细胞的制备实验步骤

1. 前夜接种受体菌（DH5 α 或 DH10B），挑取单菌落于 LB 培养基中 37℃ 摇床培养过夜（约 16 小时）；
2. 取 1ml 过夜培养物转接于 100ml LB 培养基中，在 37℃ 摇床上剧烈振荡培养约 2.5-3 小时（250-300rpm）；
3. 将 0.1M CaCl_2 溶液置于冰上预冷；以下步骤需在超净工作台和冰上操作
4. 吸取 1.5ml 培养好的菌液至 1.5ml 离心管中，在冰上冷却 10 分钟；
5. 4℃ 下 3000 g 冷冻离心 5 分钟；
6. 弃去上清，加入 100 μl 预冷 0.1M CaCl_2 溶液，用移液枪轻轻上下吸动打匀，使细胞重新悬浮，在冰放置 20 分钟；
7. 4℃ 下 3000 g 冷冻离心 5 分钟；
8. 弃去上清，加入 100 μl 预冷 0.1M CaCl_2 溶液，用移液枪轻轻上下吸动打匀，使细胞重新悬浮；
9. 细胞悬浮液可立即用于转化实验或添加冷冻保护剂（15% - 20%甘油）后超低温冷冻贮存备用（-70℃）。

电转化法制备大肠杆菌感受态细胞的实验步骤

1. 前夜接种受体菌(DH5 α 或 DH10B), 挑取单菌落于 LB 培养基中 37℃摇床培养过夜;
2. 取 2ml 过夜培养物转接于 200ml LB 培养基中, 在 37℃摇床上剧烈振荡培养至 OD₆₀₀ =0.6 (约 2.5-3 小时);
3. 将菌液迅速置于冰上。以下步骤务必在超净工作台和冰上操作
4. 吸取 1.5ml 培养好的菌液至 1.5ml 离心管中, 在冰上冷却 10 分钟;
5. 4℃下 3000g 冷冻离心 5 分钟;
6. 弃去上清, 加入 1500 μ l 冰冷的 10%甘油, 用移液枪轻轻上下吸动打匀, 使细胞重新悬浮;
7. 4℃下 3000g 冷冻离心 5 分钟
8. 弃去上清, 加入 750 μ l 冰冷的 10%甘油, 用移液枪轻轻上下吸动打匀, 使细胞重新悬浮;
9. 4℃下 3000g 冷冻离心 5 分钟
10. 加入 20 μ l 冰冷 10%的甘油, 用移液器轻轻上下吸动打匀, 使细胞重新悬浮;
11. 立即使用或迅速置于-70℃超低温保存。

附注:

影响感受态细胞转化效率的因素及实际操作过程中应注意的事项:

- 1) 细菌的生长状态: 实验中应密切注视细菌的生长状态和密度, 尽量使用对数生长期的细胞 (一般通过检测 OD₆₀₀ 来控制。DH5 α 菌株 OD₆₀₀ 为 0.5 时细胞密度是 5×10^7 /ml);
- 2) 所有操作均应在无菌条件和冰上进行;
- 3) 经 CaCl₂ 处理的细胞, 在低温条件下, 一定的时间内转化率随时间的推移而增加, 24 小时达到最高, 之后转化率再下降 (这是由于总的活菌数随时间延长而减少造成的);
- 4) 化合物及无机离子的影响: 在 Ca²⁺的基础上联合其他二价金属离子 (如 Mn²⁺或 Co²⁺)、DMSO 或还原剂等物质处理细菌, 可使转化效率大大提高 (100-1000 倍);
- 5) 所使用的器皿必须干净。迹量的去污剂或其它化学物质的存在可能大大降低细菌的转化效率;
- 6) 质粒的大小及构型的影响: 用于转化的应主要是超螺旋的 DNA;
- 7) 一定范围内, 转化效率与外源 DNA 的浓度呈正比;

实验五 质粒的转化及转化子的鉴定

质粒的转化是指将质粒或以它为载体构建的重组子导入细菌的过程。将连接产物转化到感受态细胞中，实现重组克隆的增殖，便于后续分子操作。可以采用多种方法筛选和鉴定目的克隆。

实验目的：掌握热激法或电转化法转化大肠杆菌感受态细胞及转化子的鉴定方法。

实验材料：外源片段与载体的连接产物；大肠杆菌感受态细胞。

实验原理：(1) 热激法：大肠杆菌在 0℃ CaCl₂ 低渗溶液中，菌细胞膨胀成球形，转化混合物中的 DNA 形成抗 DNase 的羟基—钙磷酸复合物粘附于细胞表面，经 42℃ 短时间热冲击处理，促进细胞吸收 DNA 复合物，在丰富培养基上生长数小时后，球状细胞复原并分裂增殖。在被转化的细胞中，重组子基因得到表达，在选择性培养基平板上可挑选所需的转化子。

(2) 电转化法：外加于细胞膜上的电场造成细胞膜的不稳定，形成电穿孔，不仅有利于离子和水进入细菌细胞，也有利于孔 DNA 等大分子进入。同时 DNA 在电场中形成的极性对于它运输进细胞也是非常重要的。

热激法转化实验步骤：

1. 制备选择性培养基平板：在融化的 250ml LA 培养基中 250 μl Amp (100mg/ml)，250 μl X-gal (20mg/ml)，25 μl IPTG (200mg/ml)，混匀后倒入灭菌培养皿中；
2. 取出 3 管制备好的感受态细胞，放在冰上融化；
3. 每 100 μl 感受态细胞加入约 20ng 质粒 DNA，3 管分别加连接产物、标准超螺旋质粒 DNA（阳性对照）及不加入任何 DNA（阴性对照），用移液器轻轻吸打均匀，在冰上放置 30 分钟；
4. 热击：将离心管放置 42℃ 水浴，热击 90 秒，注意：勿摇动离心管；
5. 冰镇：快速将离心管转移至冰浴，放置 1—2 分钟；
6. 复苏：每管加 400 μl SOC 培养基，在 37℃ 摇床温和摇动温育 45 分钟，使细菌复苏；
7. 布皿：取适当体积均匀涂布于含有 IPTG、X-gal、抗生素（Amp）的 LA 平板；
8. 培养：倒置培养皿，于 37℃ 培养 12—16 小时 即可观察到蓝白相间的菌落（其中白色菌落为含有外源插入片段的转化子，蓝色菌落是载体自连的转化子）

质粒电转化大肠杆菌感受态细胞操作步骤

1. 制备选择性培养基平板：在融化的 250ml LA 培养基中 250 μ l Amp (100mg/ml), 250 μ l X-gal (20mg/ml), 25 μ l IPTG (200mg/ml), 混匀后倒入灭菌培养皿中；
2. 取出制备好的感受态细胞，放在冰上融化；
3. 每管感受态细胞加入 1 μ l 连接产物，用移液器轻轻吸打均匀，置冰上；
4. 电转化仪选择 1800V 作为输出电压；
5. 将要转化的混合物加入预冷的 1 mm 的电转化杯中，立即按下按钮电击；
6. 立即加 1ml SOC 培养基到转化杯中重悬细胞；
7. 将细胞转入合适的培养管中 37°C 培养 1 小时；
8. 吸取合适体积的菌液涂布已倒好的选择培养基平板；
9. 37°C 培养过夜，观察结果。

附注：

1. 利用氨苄青霉素抗性筛选转化子时，用转化细胞铺平板的密度要低（90mm 平板上不得超过 10^5 个菌落），同时 37°C 培养不应超过 20 小时，具氨苄青霉素抗性的转化体可将 β -内酰胺酶分泌到培养基中，迅速灭活菌落周围的抗生素，从而导致对氨苄青霉素敏感的卫星菌落的出现。
2. 鉴定转化子中是否含有外源 DNA 片段常用的方法有：
 - 1) α 互补；
 - 2) 杂交筛选；
 - 3) 插入失活（一些老质粒如 pBR322 等）；
 - 4) 小量提取质粒酶切检测、PCR 检测

实验六 PCR 技术

聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）是一种体外核酸扩增系统，是分子克隆技术中的常用技术之一。PCR 具有反应快速、灵敏、操作简便等优点，已广泛应用于分子生物学的各个领域。

实验目的：掌握 PCR 原理，学习 PCR 操作过程

实验材料：转基因水稻叶片总 DNA，外源基因的特异引物

实验原理：PCR 是在模板 DNA、引物和 dNTPs 的存在下依赖于 DNA 聚合酶的酶促反应。PCR 技术的特异性取决于引物和模板结合的特异性。反应分为变性、退火、延伸三步，经过一定的循环，介于两个引物之间的特异 DNA 片段得到大量扩增。

实验步骤：

1. 调整模板浓度至 10 ng/μl;
2. 按下列体系配制反应混合液，混匀，加一滴矿物油，离心 5 秒

Template DNA	2 μl (20 ng)
10× buffer	2.0 μl
MgCl ₂ (25mM)	1.5 μl
Primer F (10μM)	0.2 μl
Primer R (10μM)	0.2 μl
dNTPs (2mM)	2.0 μl
Taq (5U/μl)	0.2 μl
Add ddH ₂ O to	20 μl

3. PCR 反应循环条件设置：

95°C	3'					1 cycle
94°C	1'	55°C	1'	72°C	1'30"	35 cycles
72°C	8'					1 cycle
4°C						forever

4. 检测：加 2 μl 溴酚蓝，混匀，短暂离心，取 15 μl 反应产物点样电泳；
5. 在 1%的琼脂糖凝胶上点样电泳；EB 染色，紫外观察。

附注：

1. 引物设计应具有特异性，依靠引物设计软件进行引物设计；引物分装成多管，不宜反复冻融多次；
2. PCR 反应的各种成份不能遗漏，操作应戴手套，冰上操作；
3. 根据引物的 T_m 值和扩增片段长度以及 PCR 仪的特性来设定 PCR 循环条件；
4. 注意分析电泳检测 PCR 产物时出现拖带或非特异性扩增带、无 DNA 带或 DNA 带很弱的可能原因。

系列二 Southern 杂交技术

Southern 杂交，通过用限制性内切酶消化基因组或其它来源的 DNA，经过琼脂糖凝胶电泳按大小分离酶切所得的片段，随后 DNA 在原位发生变性并从凝胶转移到一固相支持物上（一般是硝酸纤维素膜或尼龙膜）。DNA 转移至固相支持物的过程中各 DNA 的相对位置保持不变，用一定方法（如放射性同位素）标记的 DNA 探针与固着在膜上的 DNA 杂交，经 X-光片自显影显现出与探针 DNA 互补的 DNA 电泳条带的位置。

实验一 植物总 DNA 的快速少量抽提（CTAB 法）

DNA 分子是分子生物学研究的基本材料，依不同的实验目的可采取不同的抽提方法获取数量和质量不等的 DNA。

实验目的： 了解植物 DNA 抽提的主要方法，掌握 CTAB 法快速抽提水稻 DNA。

实验材料及试剂： 水稻叶片，1.5×CTAB，氯仿/异戊醇(24:1)，95%乙醇或无水乙醇等

实验原理： 植物 DNA 的抽提常采用两种方法：

(1) SDS 法： 离子去污剂，过程长，纯度高；

(2) CTAB 法： 该方法简便、快速，DNA 产量高(纯度稍次，适用于一般分子生物学操作)。CTAB 是一种非离子去污剂，植物材料在 CTAB 的处理下，结合 65℃ 水浴使细胞裂解、蛋白质变性、DNA 被释放出来。CTAB 与核酸形成复合物，此复合物在高盐 (>0.7mM) 浓度下可溶，并稳定存在，但在低盐浓度 (0.1-0.5mM NaCl) 下 CTAB-核酸复合物就因溶解度降低而沉淀，而大部分的蛋白质及多糖等仍溶解于溶液中。经离心弃上清后，CTAB-核酸复合物再用 70—75%酒精浸泡可洗脱掉 CTAB。再经过氯仿/异戊醇(24:1) 抽提去除蛋白质、多糖、色素等来纯化 DNA，最后经异丙醇或乙醇等 DNA 沉淀剂将 DNA 沉淀分离出来。

实验步骤：

1. 采集适量幼嫩叶片，用液 N₂ 研成粉末，0.4 g 装入 1.5ml 离心管中 (-20℃ 预冷)。
2. 预热 1.5×CTAB 到 95℃，加 1ml 到装有叶片粉末的离心管中，混匀（防止冻融）。

3. 立即置于 65℃ 水浴 30min, 每 5 分钟, 上下颠倒 1 次。
4. 12000g 离心 5 分钟。
5. 吸取上清液约 600μl, 加入等体积 (600μl) 氯仿/异戊醇(24:1), 上下颠倒数次, 至下层液相呈深绿色为止。
6. 12000g 离心 5 分钟。
7. 取 450μl 上清于一新 1.5ml 离心管, 加入 1ml 95%乙醇和 45μl 10M NH₄AC), 混匀, 室温放置 10min。
8. 12000 g 离心 10min, 去上清, 用 75% EtOH 浸洗沉淀, 自然干燥约 30 min。
9. 加入 50μl 1/10 TE 或无菌水 (含 20μg/RNase), 置于 4℃ 过夜, 待 DNA 溶解后, 检测 DNA 浓度及质量。

注意事项:

1. 尽量取材幼嫩叶片, 如太老, 酚类物质多, 必须用 10 mM 的 β-ME 处理
2. 研钵预冻, 粉末至加 CTAB 前不要融化
3. 24:1 的氯仿/异戊醇抽提时动作应轻柔, 转移用的枪头最好是剪宽了的
4. 所用试剂必需灭菌, 手套

思考: (1) DNA 降解的可能原因

(2) 提高 DNA 产量的措施

实验二 总 DNA 质量检测及酶切

实验目的: 了解掌握检测 DNA 质量的方法以及 DNA 定量的方法; 了解影响 DNA 在琼脂糖凝胶中泳动速率的因素; 训练 DNA 的琼脂糖凝胶电泳操作及 DNA 的限制性内切酶操作。

实验原理: 参见系列一中实验二; 限制性内切酶的特点: 见“基因操作原理”。

实验材料及试剂: 水稻总 DNA 或 BAC 克隆 DNA, 琼脂糖, 限制性内切酶 DraI, EcoRI, EcoRV, HindIII

实验步骤:

1. 取 10μl DNA 于 0.8% 凝胶检测;
2. 将 DNA 调节浓度至 300-400 ng/μl ;
2. 仔细阅读将所用的任何一种酶产品说明书, 熟悉反应条件及酶切的贮存浓度 (10U-50U/μl) 厂家配套试剂;

3. 计算据反应条件所需要的各种试剂准确用量：(0.5 ml tube 中)

DNA(3-5 μ g)	10 μ l
10 \times buffer reaction	1.5 μ l
Enzyme (15 U/ μ l)	0.8 μ l (冰上)
ddH ₂ O	2.7 μ l

混匀，短暂离心；

4. 37 $^{\circ}$ C 温浴 1-2 hrs (纯 DNA) 或 10 hrs (粗制 DNA)；

5. 加入上样缓冲液终止酶切反应，也可 65 $^{\circ}$ C 加热 10 min 使酶变性失活；

6. 电泳检测酶切效率：

每个样品取 1/10 量用琼脂糖电泳检测，制胶及点样方法同上。

结果分析

若水稻 DNA 呈现均匀连续分布的一片，则酶切效果好，否则需重做；

DNA 被切烂：DNA 降解，重新提 DNA；

DNA 切不动：杂质多（多糖，蛋白质，酚类，有机溶剂等），重新纯化；

若是 BAC 克隆 DNA，酶切后应出现多条很清晰的不同大小 DNA 带。

思考：

什么是酶星活性？如何避免？

影响酶切效率的因素？

EB 指示剂原理？

实验三 电泳、转膜

转膜是把 DNA 从琼脂糖凝胶中转移到固相支持物（一般是尼龙膜）上固定，是进行各种后续研究（如 RFLP 分析，阳性克隆的筛选验证等所有涉及分子杂交的研究）的前提。

实验目的：掌握 Southern blotting 的原理及操作步骤

实验原理：

1. 转膜的方式：

向上的毛细管转移

向下的毛细管转移

同时向两张膜转移

电转移

真空转移

2. 固相支持物的种类及选择:

硝酸纤维素膜: 非共价结合, 易脆, 易丢失 DNA, < 500 bp 的 DNA 无效, 转膜前的工作 (从提高转膜效率, 利于转膜后使用等)

尼龙膜 (带正电荷的) 高强度, 不易破损, 具有较大的 DNA 结合容量, 它能够吸附变性 DNA, 核酸以共价结合方式不可逆的结合在尼龙膜上。尼龙膜两边均有同样吸附 DNA 功能, 无论用哪边均可以经久耐用, 可反复利用 10 次以上 (10-20 次), 经毛细管 (毛细吸附) 作用, 把 DNA 从凝胶上转到膜上。DNA 转到膜上是复制胶上的带型, 在 80-100℃ 真空干燥 2-4 hrs, 即可固定 DNA。

3. 转移缓冲液 (transfer buffer) 的选择:

带正电荷的尼龙膜: 可用高盐离子强度 (SSC), 但不能充分发挥膜潜能; 0.4N NaOH, 共价结合 DNA 是最大优点。

硝酸纤维膜: 高盐离子强度促进 DNA 与膜结合 (20×SSC), 低盐离子强度导致小片段 DNA 在转移过程中丢失, pH>9, DNA 不能与膜结合。

4. 转膜时间 (duration of transfer) 约 12 hrs

取决于毛细管系统, DNA 大小, 胶厚度 (<5 mm) 及浓度 (<1%)。

DNA 分子量大小决定时间长短, 部分去嘌呤减小 DNA, 碱转移 2hrs 大部分结合到膜。

DNA 转移的效率较难判断, 只有在转膜结束后, 通过 EB 染胶, 及分子杂交才可以鉴别效率高低, 但已无补救措施, 因此, 每一步应严格操作。

实验材料及试剂: 酶消化好的 DNA 样品, 尼龙膜, 0.2N HCl, 0.4N NaOH 等

实验步骤:

1. 0.8% 琼脂糖电泳

制胶: 注意琼脂糖的质量, 胶的浓度, 厚度 (<5mm) 及均一性。一般大电泳槽配制 250ml 0.8% 琼脂糖凝胶, 采用 42 孔梳子 (经济, 高效)

制样, 点样: DNA 样品中指示剂量稍多

电泳: 一般 1-1.5V/cm 的电压, 使 DNA 迁移到适当距离, 一般指示剂约移动 10-11cm (大电泳槽: 40V×12-15hrs, 小电泳槽 30V×4-5 hrs)

2. 转膜前的准备:

依胶大小每块凝胶准备两张比胶稍大的滤纸 (11×12.5 cm), 两张用作盐桥的滤纸,

一张与胶同样大小的尼龙膜（10×10.5cm），两个玻璃盘、两块有机玻璃板、一根玻璃棒，比尼龙膜稍大的一叠吸水纸等。

3. 一玻璃盘中加入足量的 0.4N NaOH，放上洗净的玻璃板，按图示搭制盐桥(操作示范)。

4. 凝胶的预处理:

- a) 从电泳槽中移出凝胶置于塑料板上，用切胶板把胶切成适当大小，切去右上角（最后一个样品的最前端）作为电泳方向记号
- b) 把凝胶翻面，放入加有足量的 0.2N HCl 玻璃盘中，轻轻摇动 10min，使指示剂变黄色为止（脱嘌呤）
- c) 倒去 HCl 溶液，加蒸馏水漂洗凝胶
- d) 倒去蒸馏水，加 0.4N NaOH 中和
- e) 同时在盐桥滤纸上洒些 0.4 NaOH，立即将胶放在盐桥上（忌气泡）

5. 胶的四周用塑料片与胶紧紧相连，防止短路（吸水纸与盐桥相接）

6. 在胶面上倒足量 0.4N NaOH，小心放置膜（预湿 0.4N NaOH）使膜覆盖整块胶（要求一次成功，不能移动）

7. 膜上放 2 张滤纸，滤纸大小为 15×12cm

8. 放不少于 5cm 厚的吸水纸，放上玻板，其上压约 500g 的重物，转膜 12 hrs 左右

9. 转膜完毕，用 2×SSC 漂洗膜两次，各五分钟。用 EB 染胶以检测转移效果。

10. 用两张滤纸包住膜，置于 80-100℃ 的真空干燥箱中，干燥 2-4 hrs。

思考:

- (1) 为什么转膜前要对凝胶预处理？如何处理？
- (2) 怎样提高转移效率

实验四 Southern Blotting

对于大的基因组，DNA 酶切图谱凭肉眼是分辨不开的（EB 染色），因为大小不等的分子呈现弥散分布，只有借助灵敏的放射性同位素（或其他化学发光物质），将靶 DNA 在凝胶上（膜上）的带型通过特定的探针与之杂交，转换成 X 光片上直观的带型，才能进行相关分析。另外如果需要鉴定或寻找与已知 DNA 同源的 DNA 片段如：染色体步查、基因组文库的评价和利用、阳性克隆的分析鉴定、转基因拷贝数分析等也都需进行 DNA 的分子杂交实验。

实验目的：掌握同位素的操作及防护方法；掌握预杂交、探针的标记及分子杂交技术

实验原理：依据碱基配对原则，用放射性同位素标记的 DNA 探针，与固着在膜上的靶 DNA 杂交，经放射自显影，确定靶 DNA 的位置。

1. 预杂交：膜上有许多没有结合 DNA 分子的地方，若不在杂交前用一些封闭剂结合位点，加入探针后，探针 DNA 分子将会结合在这些位点上，导致杂交背景深，预杂交的目的是用非特异性 DNA 分子（鲑精 DNA）及其它高分子化合物（封闭剂）将待杂交膜中的非特异性位点封闭，从而减少杂交背景。

2. 探针的标记：体外标记 DNA 或 RNA 的方法有多种，如：末端标记，随机引物标记，缺刻平移（nick translation），体外转录（in vitro transcription）及各类 PCR 等。这些方法有的是在特定位置标记核酸（5'或 3'末端），有的标记核酸分子内部的多个位点。有的产物是标记单链，有的产物是标记双链。有的方法产生一定长度的标记产物，有的得到的是长短不一的标记产物。

随机引物标记：在 DNA 聚合酶的作用下，寡核苷酸通过与单链的模板配对可以启动 DNA 的合成。如果寡核苷酸序列是不同的（heterogeneous），引物中包含所有可能的随机序列（如 6 碱基引物则有 $4^6=4096$ 种），可以与任意模板序列相配对在许多位置形成杂交链，四种核苷酸底物中有一种是用同位素标记的，因而可产生均匀一致高比活放射性探针。同位素标记的探针 DNA 的平均长度与引物的浓度成反比，The klenow fragment 去除了 E. Coli DNA polymerase I 的 5'→3'的外切酶活性，具有 5'→3'的聚合酶活性及 3'→5' 外切酶活性；

Primer：可通过用 DNase I 消化牛胸腺 DNA，DNA 合成仪合成或直接从公司购买。同位素标记的探针 DNA 的平均长度与引物的浓度成反比 $[=k/(\ln Pc)^{1/2}]$ ，Pc 是引物的浓度]，一般可产生约 400-600 bp 的标记产物。

模板 DNA：线状双连 DNA。环状 DNA 用限制性内切酶切成线状，再标记。用纯化的 DNA 片段作模板标记的探针与用完整的质粒作模板比较，可减少背景。

dNTPs：其中一种用放射性同位素标记

3. 杂交：将标记好的探针，加到杂交液中，在一定（温度下）条件下，使探针与膜上的 DNA 杂交。

4. 洗膜：用不同组成及离子强度的（严谨度）溶液，洗去膜上的封闭剂及非特异性杂交的探针

实验材料及试剂：已转移上 DNA 的尼龙膜， ^{32}P 标记的 dCTP，随机引物，20×SSC，10%SDS，X-光片，显影液及定影液等

实验步骤：

1. 预杂交：将尼龙膜在 $2\times\text{SSC}$ 中浸湿，放入杂交袋或杂交管中，加入适量杂交液（杂交液浸没膜），赶气泡，封口，放入 65°C 的杂交箱或恒温摇床中，预杂交 3 个小时以上，一般 6-12hrs。

2. 标记探针：

反应体系：1-2blots($19.5\times 9.5\text{cm}^2$)

DNA	100ng
DNTP	2.0 μl
Random primer	5.0 μl
Klenow (1u/ μl)	1 μl
α - dCTP*	1.0 μl
add ddH ₂ O to	17.0 μl

按先将水和 DNA 按反应体系所需的量取至一 1.5 毫升离心管中，混匀，短暂离心至管底，放至 100°C 干浴中变性 10 min，变性探针迅速置于冰浴上 5 min，按反应体系将反应混合液（dNTP, Random primer, Klenow）加入变性 DNA 中，在同位素操作台上，加入 ^{32}P 标记的 dNTP（ α - ^{32}P dCTP*，放射性比活 $>3000\text{Ci}/\text{mmol}$ ）， 30°C 温育 3 小时以上。

3. 杂交

将标记好的探针，补加 300 μl 杂交液， 100°C 变性（or 0.4N NaOH 变性），加入杂交袋（盒）中（忌直接加于膜上）。杂交前作标记效率测定， $>25\%$ 以上可以往下做杂交，过夜杂交。杂交效率受杂交速率及杂交稳定性影响。

4. 洗膜：从低严谨度到高严谨度洗膜液（具体情况而定）：

1 $\times\text{SSC}/0.1\%\text{SDS}$ 洗膜两次（冷 5min，热 65°C ，15min） \rightarrow 检测信号强度
 $\rightarrow 0.5\times\text{SSC}/0.1\%\text{SDS}$ 热洗 65°C ，15min \rightarrow 依情况可有改动 0.2 $\times\text{SSC}/0.1\%\text{SDS}$ or 0.1 $\times\text{SSC}/0.1\%\text{SDS}$ 。

5. 包膜：膜从洗膜液中捞出，在滤纸上晾干，膜表面无可见水膜为止（注意：不能太干，以防探针难以洗脱影响再次使用），用保鲜膜包膜，压 X-光片，置于 -20 或 -70°C 3—7 天（依据信号强弱掌握曝光时间）

6. 冲洗 X-光片

在暗室红灯下取出 X-光片，置入显影液中至杂交带显现出来（显影时间依据信号强弱及曝光时间长短可由几秒钟到 2 分钟），转入清水中漂洗，然后放入定影液中定影至清亮（约 10 分钟）。自来水冲洗干净后，晾干，读片。

7. 膜上探针洗脱

再次使用膜前，必须洗去上次探针！

- | | |
|-------------------------------------|--------|
| (1) 0.1%SDS, 0.1×SSC | 10min |
| (2) 0.1NaOH, 0.2%SDS | 2-3min |
| (3) 0.2M Tris.HCL, 0.2%SDS, 0.1×SSC | 20min |

只洗去探针，而不影响膜上的靶 DNA（因为 DNA 与膜是共价键结合，而 DNA 与探针的结合是氢键结合）。

附注：

1. 杂交效率的影响因素

- 杂交温度：双链 DNA 分子， $T=T_m-20-25^{\circ}\text{C}$ 可达最大杂交率，DNA-RNA 杂交分子则低于 T_m 值 $10-15^{\circ}\text{C}$ 。
- 离子强度(1.5M/L NaCl 杂交率最高)
- 双链长度(形成杂交物长度)：杂交率与双链长度成正比
- 探针的复杂程度（重复性探针可以增加杂交率）
- pH5.0-9.0 基本无影响。

2. 影响杂交稳定性（影响解链温度的）因素

- 离子强度 在 0.01-0.4M NaCl 之间，每 $\uparrow 10\times$ 单价阳离子， $T_m\uparrow 16.6^{\circ}\text{C}$
- 碱基组成 $AT<CG$ （在 NaCl 溶液中）；
- 去稳定剂（destabilizer） DNA-DNA 杂交分子，每 1%formamide, $T_m\downarrow 0.6^{\circ}\text{C}$ ；6M urea 可降低 $T_m 30^{\circ}\text{C}$
- 碱基错配：每 1%的错配可使 T_m 降低 1°C
- 双链长度（探针杂交物） $>500\text{bp}$ 基本无影响

3. 整个实验过程中应注意的事项：

- 保证转膜质量；
- 操作规范；
- 提高杂交灵敏度（信号强度）；
 - 探针量及标记量（探针变性）；
 - 比活（性）度 $\geq 10^8\text{dpm/u}$ ($<10^8$ 弱)；
 - 靶 DNA 量（绝对量，酶切转膜决定；相对量，靶 DNA 相对于探针过量时，完全配对杂交，探针过剩时，完全配对和非严格的完全配对均有发生）；
 - 有惰性聚合物增加灵敏度；10%(w/v)500,000(mw)dextran sulfate 或 8%(w/v)PEG6000。对于单链探针，可以增加 10-fold 杂交信号，dsDNA 成 100-fold 地增加杂交信号

4) 提高特异性：

- 高盐溶液促进探针与靶序列的碱基配对 20×SSC 3M NaCl/0.3M Na_3Ci

- b) 杂交后洗膜温度 $T \rightarrow T_m$
- c) 杂交后洗膜液浓度组成, 高严谨度洗膜液使不完全配对的杂交失去稳定, 致使探针脱落
- d) 杂交时间 8hrs 以后, DNA 探针逐渐退火, 少量自由与靶 DNA 杂交.
- e) 探针长度 (>1000bp) 过长, 高严谨度下难洗脱非完全配对杂交探针。

4. 放射性同位素:

1) 放射性同位素发出的射线主要有:

- α 粒子: 外照射, 一般能量的 α 粒子穿透能力较弱, 射程短, 危害性小, 稍加防护即可 (如手套); 内照射, 电离密度大, 危害大。
- β 粒子: 穿透能力比 α 粒子强, 外照射危害比 α 粒子大, 可引起皮肤的放射损伤。
- γ 射线: 穿透能力很强, 外照射时危害性很大, 应采取切实有效的防护措施。

2) 放射性活度及单位:

放射性活度 A 是指一定量的放射性核素在时间间隔 dt 内发生自发核衰变数 dN 与此时间间隔的比值。即 $A=dN/dt$

放射性活度的单位是 Becquerel(贝克勒而), 简称 Bq。

1Bq=1 个衰变/秒; 1 居里= 3.7×10^{10} Bq

其不表示放射出射线的多少 (如 ^{60}Co 一个原子衰变放出 1 个 β 粒子和一个 γ 光子, 而一个 ^{32}P 原子只衰变出一个 β 粒子), 也不表示射线能量的大小。

3) 辐射防护的目的:

防止发生对健康有害的确定性效应(接受放射性治疗的患者除外), 并将随机性损害效应的发生降低到被认为可以接受的水平, 从而保障放射工作人员、公众及其后代的健康与安全, 提高放射防护措施的效益, 促进放射工作的发展。

4) 放射防护的原则:

- a) 辐射实践的正当化: 生产必须, 医疗必须, 科研教学必须
- b) 辐射防护的最优化: 即综合考虑社会、经济等诸因素之后, 使个人剂量的大小、受照人数的多少和不确定发生的照射事件的发生概率可合理达到的低水平。
- c) 个人剂量限制: 为了保证每个人不致受到不合理的危害, 必须制定一个个人剂量限值, 放射工作人员的剂量限制: 全身均匀照射的年当量剂量限值 $H_{\text{全身}}=50\text{mSv}$; 不均匀照射时, 有效剂量 E 不应超过 $H_{\text{全身}}$ 。

5) 外照射的防护措施:

- a) 距离防护: 人体受到照射的剂量率随着离开电离辐射源的距离的增大而减少。剂量率与距离的平方成反比。
- b) 时间防护: 在剂量率不变时, 剂量与时间成正比, 即操作时间越短, 人员所受到的

照射剂量越小。(要求放射性作业应操作熟练、操作步骤应尽量简单易行,尽量减少在辐射场所逗留的时间。)

- c) 屏蔽防护: 利用射线通过物质时, 与物质相互作用使其能量被物质吸收而逐渐减弱的原理, 可以设置一定的屏障物来进行防护。常用的材料有水、砖、大理石、混凝土、重金属铅等。
 - d) 利用衰变: 可利用放射性物质存在自发衰变, 其活性随之减少的原理进行外照射防护。如: 半衰期小于 15 天的放射性废物, 允许放置 10 个半衰期后作一般废物处理。
- 6) 内照射的防护措施
- 防止放射性物质经呼吸道吸入
 - 防止放射性物质食入
 - 防止放射性物质经体表进入

系列三 表达检测

在转录水平上研究和了解基因的表达与调控是分子生物学和基因操作的重要内容。Northern 杂交可以测定总 RNA 或 poly(A)⁺ RNA 中特定 mRNA 分子的大小和表达丰度，RNA 分子在变性琼脂糖凝胶中电泳，按其分子的大小分开，然后将 RNA 转至尼龙膜或硝酸纤维素膜上，经过体外交链固定，用放射性同位素标记的 DNA 或 RNA 探针与之杂交，放射自显影后即可得到待测基因 RNA 表达水平的情况；RT-PCR 以 mRNA 反转录生成的 cDNA 作为 PCR 的模板进行扩增，比 Northern 杂交更灵敏，对 RNA 的质量要求较低，操作简便，它是在转录水平上检测基因时空表达的常用方法。

实验一 RNA Extraction (mini prep)

RNA 的制备与分析对于了解基因在转录水平上的表达与调控和 cDNA 的合成都是必须的，RNA 的纯度和完整性对于 Northern blot，RT-PCR 和 cDNA 文库的构建等分子生物学实验都至关重要。RNA 分离的方法很多，其中最关键的因素是尽量减少 RNA 酶的污染

方法一：氯化锂沉淀法

实验目的：学习 RNA 的简易制备过程，通过 RNA 电泳带评价 RNA 质量

实验材料：水稻幼嫩叶片

实验原理：SDS 是一种去污剂，可以抑制内源 RNA 酶的活性，它不但可解聚核酸与蛋白质的结合，还可与蛋白质带正电荷的侧链结合，形成 SDS-蛋白质复合物而沉淀。4 M LiCl 可选择性沉淀 RNA。

实验步骤：

1. Harvest fresh leaf discs in 2 ml eppendorf tubes and freeze quickly in liquid nitrogen and store at -80°C until use.
2. Grind leaf discs using a steel bar (precooled in liquid nitrogen) that perfectly fits the eppendorf tube. Keep the plant material frozen allows easy grinding to a fine powder.
3. After grinding , add 500μl of **hot extraction buffer** (80°C) and **phenol (1:1)** (250 μl of each). (**Extraction buffer: 0.1 M LiCl, 100 mM Tris.HCl pH=8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS**)
4. Homogenized the mixtures by vortex for 30 seconds, and add 250 μl

chloroform/isoamylalcohol (24:1) and vortex.

5. Centrifuge for 5 min, remove the waterphases and mix with one volume of 4 M LiCl.
6. Store RNAs at 4°C overnight and centrifuge for 10 min.
7. Dissolve the pellets in 250 µl DEPC water, add 0.1 vol. of 3 M NaOAc (pH 5.2), and precipitate the RNAs with 2.5 vols of ethanol.
8. Centrifuge for 10 min for 4°C, wash the RNA pellets with 70% EtOH and dry the pellets.
9. Dissolve the pellets in 15 µl DEPC water.

(Routinely between 25 and 50 µg of total RNA is obtained from 100 mg tobacco, tomato or potato leaf tissue)

方法二：Trizol 法

实验原理：Trizol 试剂是由苯酚和硫氰酸胍配制而成的单相的快速抽提总 RNA 的试剂，在匀浆和裂解过程中，能在破碎细胞、降解细胞其它成分的同时保持 RNA 的完整性。在氯仿抽提、离心分离后，RNA 处于水相中，将水相转管后用异丙醇沉淀 RNA。用这种方法得到的总 RNA 中蛋白质和 DNA 污染很少，可以用来做 Northern, RT-PCR, 分离 mRNA，体外翻译和分子克隆等。

实验步骤：

1. 液氮研磨样植物叶片，每 1.5ml tube 分装 0.1 克样品；
2. 每管加 1 毫升 Trizol 试剂（样品体积不超过 Trizol 试剂体积的 10%），迅速混匀（若样品较多可先将混好的样品置于冰上）；室温下静置 5—10 分钟以利于核酸蛋白质复合体的解离；
3. 加 200 µl 的氯仿，用手剧烈摇荡 15 秒，室温下静置 5 分钟左右；
4. 2-8 °C，12000×g 离心 10-15 分钟；
5. 将水相（上清）转入一新离心管，加 0.5ml 异丙醇室温下沉淀 10 分钟；
6. 2-8 °C，12000×g 离心 15 分钟；
7. 弃上清，加 1ml 75% 乙醇清洗 RNA，振荡片刻后（务必使沉淀悬浮起来，以确保洗涤干净），7500×g 离心 5 分钟，小心弃上清；
8. 室温静置 5—15 分，使 RNA 沉淀恰好干燥，加入 20 µl DEPC 水溶解，取 2 µl 琼脂糖电泳检测 RNA 质量。采用分光光度计测定 RNA 浓度，将样品保存于 -70 °C 超低温冰箱中备用。

注意事项：

抽提及操作 RNA 中要谨防 RNase 的污染，因此操作 RNA 的试剂及器皿都要进行相应的处理。

RNase-free water: Draw water to RNase-free glass bottles. Add diethylpyrocarbonate (DEPC) to 0.01% . Let stand overnight and autoclave.

研钵处理: 0.4N NaOH 浸泡过夜, DEPC 水洗涤 3 遍;

应戴口罩和手套, 环境洁净; 玻璃器皿 180°C 烘烤 3hrs 以上; 塑料制品 DEPC 水清洗, 蛋白质变性剂处理; 一次性用品如 tube, tip 等用新的, 高温高压消毒。

实验二 RT-PCR (Reverse transcription PCR)

实验目的: 学习 RT-PCR 的原理及其操作过程。

实验材料: 水稻叶片的 RNA。

实验原理: 目前 PCR 技术只能扩增 DNA 模板, 对 RNA 模板不能直接扩增。mRNA 反转录生成的 cDNA 可作为 PCR 的模板进行扩增, 这种在 mRNA 反转录后进行的 PCR 扩增称为 RT-PCR。RT-PCR 比 Northern 杂交更灵敏, 对 RNA 的质量要求较低, 操作简便, 它是在转录水平上检测基因时空表达的常用方法。本实验以水稻叶片 RNA 为材料, 检测 β -actin 基因的表达。实验中设定 2 个阴性对照: 一个不加模板 RNA, 另一个不加反转录酶, 主要是消除 DNA 及 PCR 试剂方面引起的假阳性; 同时以叶片 DNA 为阳性对照, 检验 PCR 试剂和扩增过程是否有问题。

实验步骤:

RNA Preparation

1. Prepare the plant total RNA by TRIzol Reagent.
2. Dilute the Total RNA to the final concentration of 1 μg / μl by DU640.
3. Combine the following in a 0.5 ml sterile eppendorf tube:

Total RNA	0.5- 1 μg
RNase-free DNase I	1 μl (1 u / μl)
10 \times DNase I buffer	1 μl
DEPC-treated ddH ₂ O	5 μl
4. Incubate at 37°C for 15 min, then 70°C for 10 min.

Reverse Transcriptase Reaction

1. Add 1 μl 500 μg / ml oligo (dT) 15 primer, mix the contents of the tube by gently vortexing and collect the reaction by brief centrifugation.
2. Heat the mixture at 65°C dry bath for 10 minutes, then place at room temperature for 10 minutes. Add the following contents:

5 \times first strand buffer	4 μl
--------------------------------	-----------------

0.1 M DTT	2 μ l
10 μ M dNTP	1 μ l

- Mix the contents of the tube by gently vortexing and collect the reaction by brief centrifugation. Place the tube at 37°C water bath for 2 min.
- Add 2 μ l 200 U / μ l M-MLV Reverse Transcriptase. Mix gently and incubate at 37°C for 1 h. The total volume should now be 20 μ l.
- Inactivate the reaction by heating at 70°C for 15 min, then add 20 μ l ddH₂O and the first strand of cDNA can be used as a template to amplification in PCR.
- To remove the RNA complementary to the cDNA, add 1 μ l (2 units) of RNase H and incubate at 37°C for 20 min.

PCR Amplification

- Prepare the mixture containing the following on ice:

cDNA first strand	1 μ l
TaKaRa Ex Taq (5 u / 1 μ l)	0.5 μ l
10 \times Ex Taq buffer	5 μ l
dNTP mixture (2 mM)	4 μ l
Primer F (10 mM)	2 μ l
Primer R (10 mM)	2 μ l
ddH ₂ O	35.5 μ l

- Commence PCR program

	94°C	60°C	72°C	4°C	Cycles
Step 1	3 min				1
Step 2	1 min	1 min	1 min		30-40
Step 3			5 min		1
Step 4				forever	

- The β -actin is used as the internal standard for each RT-PCR, DNA contamination in the RNA sample is tested by replacing the reverse transcriptase with water in the RT-PCR.

Reagents

5 \times first strand buffer (GIBCO Part No.Y00146)
 100 mM DTT (GIBCO Part No.Y11147)
 200 U / μ l M-MLV Reverse transcriptase (GIBCO Part No.28025-021)
 500 μ g / ml oligo (dT)₁₅ primer (Promega Cat. No. C110A 9362612)
 10 mM dNTP mix
 RNase-free DNase I (TaKaRa Code No. 2215 CA)
 5 U / μ l Ex Taq polymerase and 10 \times buffer (TaKaRa Code No. RR001D CA)
 10 μ l M gene specific Primer F and R
 Sterile ddH₂O
 Mineral oil

实验三 RNA 的电泳，转膜和杂交

实验原理：基本同 Southern Blotting，但因 RNA 是单链分子，必须消除局部区域形成的二级结构，在电场中泳动的距离才能反映它本身的大小，因而需使用变性胶进行电泳；操作过程中应特别注意防止 RNA 的降解。

实验材料：经检测质量好的 RNA 样品

实验步骤：

1. 制胶：

Agarose 1%-1.2%，1×MOPS buffer。

用灭菌的 DEPC 水定容，加热融化，冷却至 70℃加甲醛，使终浓度为 2%，通风橱中放 1hr。

2. 准备电泳液：1×MOPS buffer（小号槽约配 500ml，中号槽约配 900ml）

3. 制样：测好浓度后按以下体系加样

15 μg RNA + 灭菌的 DEPC 水 10 μl

Sample buffer 8 μl

loading buffer 2 μl

EB (10mg/ml,专用于 RNA) 0.03 μl

65℃水浴变性 10 min，立即放冰上，直至点样

4. 点样：点样要仔细，不要漏出，并记录点样顺序。

5. 电泳：中号槽：电压 100V 电泳 1hr 左右，至溴酚兰离点样孔约 3.5-4cm（凝胶在紫外灯下可看到 28S 和 18S 刚好分开即可）

6. 转膜：转膜液用 500ml 4×SSC 加 27ml 37%甲醛(终浓度为 2%);转膜步骤同 Southern。注意加溶液后一切操作均在通风橱内进行，以避免甲醛对人体的伤害

7. 照相：将胶及膜取下，分别在凝胶成像系统下看胶上 RNA 是否有残留，膜上 RNA 效果是否完好。

8. 风干：在超净工作台上吹干。

9. 固定：于紫外交联仪内以 1200 ENERGY 照一次约半分钟，再重复一次，再在超净工作台上吹干。

10. 杂交：在杂交管内加约 50ml 杂交液，将膜卷起放入，注意 RNA 面朝内,于 64℃预杂交 1-4hr

11. 探针准备：预先挖胶回收的 PCR 产物或酶切产物（better），测浓度，跑胶验证

后，按以下体系加入

DNA	3 μ l (约 200ng)
ddH ₂ O	10 μ l
DNTP (1.67mM)	4 μ l
杂交 Buffer	10 μ l
Klenow Fragment	2 μ l
α -dCTP*	5 μ l

先加入 DNA 和 ddH₂O, 100℃变性 10min, 冰上放 5min, 再加入 DNTP 和杂交 primer, 加酶时注意低温操作, 先加在管壁上, 立即到同位素室加同位素, 混匀离心, 于室温下反应半小时。

12. 探针纯化: 在原反应体系中继续加入

ddH ₂ O	66 μ l
NaAc	10 μ l
无水乙醇	250 μ l

混匀离心 12000rpm 5min, 倒去上清后加 500 μ l 无水乙醇洗, 离心 2 min, 12000 rpm, 倒去上清, 检测信号, 达 103-104 较好, 加 40 μ l ddH₂O 和 400 μ l 杂交液之后混匀离心, 于 100℃变性 10min, 冰上放置 5min

13. 13 探针: 取出杂交管倒去杂交液, 加入 15ml 杂交液, 将探针加入, 盖紧, 于 64℃杂交过夜

14. 洗膜, 压片: 将杂交管中液体倒出, 先加少量洗膜液 I, 冷洗 5min, 倒出, 再加些洗膜液 I, 冷洗 10min, 将膜取出测信号, 根据信号大小决定是否热洗, 若信号高, 用洗膜液 II, III 继续洗, 直到信号值达到适宜值为止, 即膜上某一区域信号强, 而其他区域信号弱代表杂交上了, 然后包膜压片, 放于 -20℃或 -80℃3 天左右即可洗 X 片。

15. 结果观察与分析

附录 试剂配方

一 细菌培养试剂

LB 培养基

NaCl	10 g
Yeast extract	5 g
Peptone	10 g

Add dH₂O to 1000 ml
 Aliquot to 500ml flasks (250 ml per flask). Seal with sealfilm
 and autoclave them. Store at room temperature.

LA 固体培养基

NaCl 10 g
 Yeast extract 5 g
 Peptone 10 g
 Agar powder 13~15 g
 Add dH₂O to 1000 ml
 Aliquot to 500 ml flasks (250 ml per flask). Seal with sealfilm
 and autoclave them. Store at room temperature.

X-gal (20mg/ml):

20mg X-gal 溶于 1ml 二甲基甲酰胺中, -20℃避光保存;

IPTG (200mg/ml):

1g IPTG 溶于 4ml 去离子双蒸水中, 定容至 5ml, 过滤灭菌后-20℃保存;

Amp (100mg/ml):

1g Amp 溶于 4ml 去离子灭菌双蒸水中, 定容至 5ml, -20℃保存

二 质粒抽提试剂

Solution I

Cell resuspension solution (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, RNase A 100 µg/ml)

1 M Tris-HCl (pH 7.6)	2.5 ml
0.25 M EDTA	2.0 ml
ddH ₂ O	45 ml
sterile by autoclave	
add 1% RNase	0.5ml
store at room temperature	

Solution II

Cell lysis solution (0.2 N NaOH, 1% SDS)

Mix 0.4 N NaOH and 2% SDS in same volume.

Solution III

Neutralization solution (1.32 M potassium acetate, pH 5.2)

5 M potassium acetate	13.2 ml
Hac	27 ml
adjust pH to 5.2	
add ddH ₂ O to	50 ml

sterile by autoclave

store at room temperature

RNaseA: 10mg/ml 溶于 TE 中，在沸水中煮 10 - 30 分钟之后分成小份储存于 -20℃

三 DNA 操作试剂

1.5×CTAB

CTAB	15 g
1 M Tris·Cl (pH 8.0)	75 ml
0.5 M EDTA	30 ml
NaCl	61.4 g
add ddH ₂ O to	1000 ml

0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA-Na·2H ₂ O	186.1 g
NaOH	~20 g
Adjust to pH 8.0	
dH ₂ O to	1000 ml
sterilize by autoclaving	

1 M Tris·HCl

	pH 7.4	pH 7.6	pH 8.0
Tris base	121.1 g	121.1 g	121.1 g
Concentrated HCl	~70 ml	~64 ml	~42 ml
dH ₂ O to	1000 ml	1000 ml	1000 ml
Sterilize by autoclaving			

TE (pH 8.0)

	Stock	vol.
10 mM Tris·HCl (pH 8.0)	1 M	10 ml
1 mM EDTA (pH 8.0)	0.5 M	2 ml
dH ₂ O to		1000 ml
sterilize by autoclaving		

10 M NH₄Ac

NH ₄ Ac	385 g	770 g
H ₂ O to	500 ml	1000 ml

10×PCR buffer

	stock	vol.
500 mM KCl	2.5 M(sterilized)	200 ml

100 mM Tris-HCl	1 M pH 9.0(sterilized)	100 ml
1% Triton X-100	100%	10 ml
ddH ₂ O		690 ml
sterilize by autoclaving		

5×TBE

Tris	54 g
Boric acid	27.5 g
0.5 M EDTA (pH 7.9)	20 ml
dH ₂ O to	1000 ml

10×TAE

Tris	121.1 g	484.4 g
EDTA(0.5 M)	20 ml	80 ml
NaAc·3H ₂ O	17 g	68 g
glacial acetic acid	~30 ml	~200 ml
adjust to pH 8.1		
dH ₂ O to	1000ml	4000ml

NaOH

	10 N	4 N
NaOH	400 g	160 g
dH ₂ O to	1000 ml	1000 ml

2 N HCl

concentrated HCl	365 ml	182.5 ml
dH ₂ O to	2000 ml	1000 ml

5 mg/ml ssDNA

Salmon sperm DNA	1 g
ddH ₂ O to	200 ml

0.5 M P.B (phosphate Buffer) pH 6.8

Na ₂ HPO ₄	16.44 g	131.52 g
NaH ₂ PO ₄	16.11 g	128.88 g
dH ₂ O to	500 ml	4000 ml

20×SSC

NaCl	175.3 g	701.2 g
Na ₃ Citrate	88.2 g	352.8 g
dH ₂ O to	1000 ml	4000 ml
Sterilize by autoclaving		

10% SDS

SDS 100 g
 dH₂O to 1000 ml
 Heat to 68 °C to assist dissolution

50×Denhart's Solution

Ficoll 400 10 g
 PVP-360 10 g
 BSA (Fraction V) 10 g
 ddH₂O to 1000 ml

Southern Blot Hybridization Buffer (Saghai's Lab)

Final conc.	Stock	Vol.
5×SSC	20×	250 ml
50 mM PB (pH 6.8)	0.5 M	100 ml
5×Denhardt's	50×	100 ml
2.5 mM EDTA (pH 8.0)	0.5 M	5 ml
100 µg/ml ssDNA	5 mg/ml	20 ml
0.4%SDS	20%	20 ml
Dextran sulfate		50 g
ddH ₂ O to		1000 ml

(Place a beaker on a stirrer, add these solution in the order of appearance one by one. SDS should be the very last item.)

Washing off Probe for Re-hybridization of Blots (I)

Washing time: 10 min

Final conc.	Stock	Vol.
0.1×SSC	20×SSC	20 ml
0.1% SDS	10% SDS	40 ml
dH ₂ O to		4000 ml

Washing off Probe for Re-hybridization of Blots (II)

Washing time: 3 min

Final conc.	Stock	Vol.
0.1 N NaOH	10 N NaOH	40 ml
0.2% SDS	10% SDS	80 ml
dH ₂ O to		4000 ml

Washing off Probe for Re-hybridization of Blots(III)

Washing time: 20 min

Final conc.	Stock	Vol.
0.2 M Tris. (pH 7.5)	1 M Tris. (pH 7.5)	800 ml
0.1×SSC	20×SSC	20 ml
0.2% SDS	10% SDS	80ml
dH ₂ O to		4000ml

Blue Juice

Final conc.	Stock	Vol.	Vol.
70% Glycerol	100%	35 ml	70 ml
0.5×TBE	5×	5 ml	10 ml
0.2% SDS	10%	1 ml	2 ml
20 mM EDTA	0.5 M	2 ml	4 ml
5 mg/ml Bromphenol Blue		0.25 g	0.5 g
5 mg/ml Xylene cyanol		0.25 g	0.5 g
dH ₂ O to		50 ml	100 ml

EB (10 mg/ml)

ehidium bromide 1 g
dH₂O to 100 ml

Stir on a magnetic stirrer for several hours. Transfer the solution to a dark bottle and store at 4°C.

The concentration of work solution: 0.5 µg/µl (50 µl stock solution In 1000 ml dH₂O).

Decontamination of EB

Reduce the concentration of EB <0.5 mg/ml, add 1 volume of 0.5 M KMnO₄, mix carefully then add 1 volume of 2.5 N HCl, mix carefully and allow the solution to stand at room temperature for several hours. Add 1 volume of 2.5 N NaOH, mix and discard.

四 RNA 操作试剂

Stock Solution:

1M NaAc(PH7.0): 82g NaAc 先加一定量 ddH₂O, 用 NaOH 调 PH 值至 7.0, 再用 ddH₂O 定容至 1L, 灭菌

0.5M EDTA(PH8.0): 186.1g EDTA 先加一定量 ddH₂O, 用 NaOH 调 PH 值至 8.0, 再用 ddH₂O 定容至 1L, 灭菌

10×MOPS buffer: (用 DEPC 水配, 再灭菌)

MOPS 41.85g
1M NaAc(PH7.0) 50ml

0.5M EDTA(PH8.0) 20ml

先加一定量 DEPC 水，再用 4N NaOH 调 PH 至 7.0（约加 7ml），再用 DEPC 水定容至 1L，灭菌

1M NaH₂PO₄ buffer (PH7.2):

NaH₂PO₄ 71g

H₃PO₄(85%) 4ml

用灭菌的 DEPC 水定容至 1L

20×SSC:

NaCl 175.3g

Na₃Citrate 88.2g

用 ddH₂O 定容至 1L，灭菌

10%SDS:

SDS 100.0g

用灭菌的 ddH₂O 定容至 1L(将水加热到 68℃有助于溶解)

Work Solution

Sample buffer:

Deionized formamide 1000 μl

10×MOPS buffer 200 μl

37% formaldehyde 320 μl

Blue juice(loading buffer):

Glycerol 70ml

5×TBE 10ml

10%SDS 2ml

0.5M EDTA(PH8.0) 4ml

Bromphenol Blue 0.5g

Xylene Cyanol 0.5g

加灭菌的 ddH₂O 定容至 100ml

Hybridization buffer:

1M NaH₂PO₄ buffer 500ml

0.5M EDTA(PH8.0) 2ml

10% SDS 70g

BSA 10g

用灭菌的 DEPC 水定容至 1L，贮存于室温下

洗膜液 I : (for 1 litre)

20×SSC 100ml

10%SDS 10ml

洗膜液 II : (for 1 litre)

20×SSC 25ml

10%SDS 10ml

洗膜液 III: (for 1 litre)

20×SSC 5ml

10%SDS 10ml

4×SSC:

20×SSC 200ml

用灭菌的 DEPC 水定容至 1L

2×SSC:

20×SSC 100ml

用灭菌的 ddH₂O 定容至 1L