

分子生物学常用实验技术

- 第一章 质粒 DNA 的分离、纯化和鉴定
- 第二章 DNA 酶切及凝胶电泳
- 第三章 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化
- 第四章 RNA 的提取和 cDNA 合成
- 第五章 重组质粒的连接、转化及筛选
- 第六章 基因组 DNA 的提取
- 第七章 RFLP 和 RAPD 技术
- 第八章 聚合酶链式反应(PCR)扩增和扩增产物克隆
- 第九章 分子杂交技术
- 第十章 测序技术

第一章 质粒 DNA 的分离、纯化和鉴定

第一节 概述

把一个有用的目的 DNA 片段通过重组 DNA 技术,送进受体细胞中去进行繁殖和表达的工具叫载体(Vector)。细菌质粒是重组 DNA 技术中常用的载体。

质粒(Plasmid)是一种染色体外的稳定遗传因子,大小从 1-200kb 不等,为双链、闭环的 DNA 分子,并以超螺旋状态存在于宿主细胞中。质粒主要发现于细菌、放线菌和真菌细胞中,它具有自主复制和转录能力,能在子代细胞中保持恒定的拷贝数,并表达所携带的遗传信息。质粒的复制和转录要依赖于宿主细胞编码的某些酶和蛋白质,如离开宿主细胞则不能存活,而宿主即使没有它们也可以正常存活。质粒的存在使宿主具有一些额外的特性,如对抗生素的抗性等。F 质粒(又称 F 因子或性质粒)、R 质粒(抗药性因子)和 Col 质粒(产大肠杆菌素因子)等都是常见的天然质粒。

质粒在细胞内的复制一般有两种类型:紧密控制型(Stringent control)和松弛控制型(Relaxed control)。前者只在细胞周期的一定阶段进行复制,当染色体不复制时,它也不能复制,通常每个细胞内只含有 1 个或几个质粒分子,如 F 因子。后者的质粒在整个细胞周期中随时可以复制,在每个细胞中有许多拷贝,一般在 20 个以上,如 Col E1 质粒。在使用蛋白质合成抑制剂-氯霉素时,细胞内蛋白质合成、染色体 DNA 复制和细胞分裂均受到抑制,紧密型质粒复制停止,而松弛型质粒继续复制,质粒拷贝数可由原来 20 多个扩增至 1000-3000 个,此时质粒 DNA 占总 DNA 的含量可由原来的 2%增加至 40-50%。

利用同一复制系统的不同质粒不能在同一宿主细胞中共同存在,当两种质粒同时导入同一细胞时,它们在复制及随后分配到子细胞的过程中彼此竞争,在一些细胞中,一种质粒占优势,而在另一些细胞中另一种质粒却占上风。当细胞生长几代后,占少数的质粒将会丢失,因而在细胞后代中只有两种质粒的一种,这种现象称质粒的不相容性(Incompatibility)。但利用不同复制系统的质粒则可以稳定地共存于同一宿主细胞中。

质粒通常含有编码某些酶的基因,其表型包括对抗生素的抗性,产生某些抗生素,降解复杂有机物,产生大肠杆菌素和肠毒素及某些限制性内切酶与修饰酶等。

质粒载体是在天然质粒的基础上为适应实验室操作而进行人工构建的。与天然质粒相比,质粒载体通常带有一个或一个以上的选择性标记基因(如抗生素抗性基因)和一个人工合成的含有多个限制性内切酶识别位点的多克隆位点序列,并去掉了大部分非必需序列,使分子量尽可能减少,以便于基因工程操作。大多质粒载体带有一些多用途的辅助序列,这些用途包括通过组织化学方法肉眼鉴定重组克隆、产生用于序列测定的单链 DNA、体外转录外源 DNA 序列、鉴定片段的插入方向、外源基因的大量表达等。一个理想的克隆载体大致应有下列一些特性:(1)分子量小、多拷贝、松弛控制型;(2)具有多种常用的限制性内切酶的单切点;(3)能插入较大的外源 DNA 片段;(4)具有容易操作的检

测表型。常用的质粒载体大小一般在 1kb 至 10kb 之间,如 PBR322、PUC 系列、PGEM 系列和 pBluescript (简称 pBS) 等。

从细菌中分离质粒 DNA 的方法都包括 3 个基本步骤:培养细菌使质粒扩增;收集和裂解细胞;分离和纯化质粒 DNA。采用溶菌酶可以破坏菌体细胞壁,十二烷基磺酸钠(SDS)和 Triton X-100 可使细胞膜裂解。经溶菌酶和 SDS 或 Triton X-100 处理后,细菌染色体 DNA 会缠绕附着在细胞碎片上,同时由于细菌染色体 DNA 比质粒大得多,易受机械力和核酸酶等的作用而被切断成不同大小的线性片段。当用强热或酸、碱处理时,细菌的线性染色体 DNA 变性,而共价闭环环状 DNA(Covalently closed circular DNA, 简称 cccDNA)的两条链不会相互分开,当外界条件恢复正常时,线状染色体 DNA 片段难以复性,而是与变性的蛋白质和细胞碎片缠绕在一起,而质粒 DNA 双链又恢复原状,重新形成天然的超螺旋分子,并以溶解状态存在于液相中。

在细菌细胞内,共价闭环质粒以超螺旋形式存在。在提取质粒过程中,除了超螺旋 DNA 外,还会产生其它形式的质粒 DNA。如果质粒 DNA 两条链中有一条链发生一处或多处断裂,分子就能旋转而消除链的张力,形成松弛型的环状分子,称开环 DNA(Open circular DNA, 简称 ocDNA);如果质粒 DNA 的两条链在同一处断裂,则形成线状 DNA(Linear DNA)。当提取的质粒 DNA 电泳时,同一质粒 DNA 其超螺旋形式的泳动速度要比开环和线状分子的泳动速度快。

第二节 材料、设备及试剂

一、材料

含 pBS 的 E. coli DH5 或 JM 系列菌株, 1.5ml 塑料离心管(又称 eppendorf 管),离心管架。

二、设备

微量取液器(20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l), 台式高速离心机, 恒温振荡摇床, 高压蒸汽消毒器(灭菌锅), 涡旋振荡器, 电泳仪, 琼脂糖平板电泳装置和 恒温水浴锅等。

三、试剂

1、LB 液体培养基(Luria-Bertani):称取蛋白胨(Tryptone)10 g, 酵母提取物(Yeast extract) 5 g, NaCl 10 g, 溶于 800ml 去离子水中, 用 NaOH 调 pH 至 7.5, 加去离子水至总体积 1 升,高压下蒸气灭菌 20 分钟。

2、LB 固体培养基:液体培养基中每升加 12g 琼脂粉,高压灭菌。

3、氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)母液:配成 50mg/ml 水溶液, -20 保存备用。

4、溶菌酶溶液:用 10mmol/L Tris · Cl(pH8.0)溶液配制成 10mg/ml,并分装成小份(如 1.5ml)保存于-20 ,每一小份一经使用后即予丢弃。

5、3mol/l NaAc (pH5.2): 50ml 水中溶解 40.81g NaAc · 3H₂O,用冰醋酸调 pH 至 5.2, 加水定容至 100ml, 分装后高压灭菌,储存于 4 冰箱。

6、溶液 : 50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L Tris.Cl (pH8.0), 10mmol/L EDTA (pH8.0)。溶液可成批配制,每瓶 100ml,高压灭菌 15 分钟,储存于 4 冰箱。

7、溶液 : 0.2 mol/L NaOH (临用前用 10mol/L NaOH 母液稀释), 1% SDS。

8、溶液 : 5 mol/L KAc 60ml, 冰醋酸 11.5ml, H₂O 28.5ml, 定容至 100ml, 并高压灭菌。溶液终浓度为: K⁺ 3mol/L, Ac⁻ 5mol/L。

9、RNA 酶 A 母液:将 RNA 酶 A 溶于 10mmol/L Tris · Cl(pH7.5), 15mmol/L NaCl 中,配成 10mg/ml 的溶液,于 100 加热 15 分钟,使混有的 DNA 酶失活。冷却后用 1.5ml eppendorf 管分装成小份保存于-20 。

10、饱和酚:市售酚中含有醌等氧化物,这些产物可引起磷酸二酯键的断裂及导致 RNA 和 DNA 的交联,应在 160 用冷凝管进行重蒸。重蒸酚加入 0.1%的 8-羟基喹啉(作为抗氧化剂),并用等体积的 0.5mol/L Tris · Cl (pH8.0)和 0.1mol/L Tris · Cl(pH8.0)缓冲液反复抽提使之饱和并使其 pH 值达到 7.6 以上,因为酸性条件下 DNA 会分配于有机相。

11、氯仿:按氯仿:异戊醇 = 24:1 体积比加入异戊醇。氯仿可使蛋白变性并有助于液相与有机相的分开,异戊醇则可起消除抽提过程中出现的泡沫。按体积/体积 = 1:1 混合上述饱和酚与氯仿即得酚/氯仿(1:1)。酚和氯仿均有很强的腐蚀性,操作时应戴手套。

12、TE 缓冲液:10 mmol/L Tris · Cl (pH8.0), 1 mmol/L EDTA (pH8.0)。高压灭菌后储存于 4 冰箱中。

13、STET:0.1 mol/L NaCl, 10mmol/L Tris · Cl(pH8.0), 10 mmol/L EDTA (pH8.0), 5% Triton X-100。

14、STE:0.1mol/L NaCl, 10mmol/L Tris · Cl(pH8.0), 1mmol/L EDTA (pH8.0)。

15、电泳所用试剂:(1) TBE 缓冲液 (5×):称取 Tris 54g,硼酸 27.5g,并加入 0.5M EDTA (pH8.0) 20ml,定溶至 1000ml。(2) 上样缓冲液 (6×):0.25% 溴酚蓝,40% (w/v) 蔗糖水溶液。

第三节 操作步骤

一、细菌的培养和收集

将含有质粒 pBS 的 DH5 菌种接种在 LB 固体培养基(含 50 μg/ml Amp)中,37℃ 培养 12-24 小时。用无菌牙签挑取单菌落接种到 5ml LB 液体培养基(含 50 μg/ml Amp)中,37℃ 振荡培养约 12 小时至对数生长期。

二、质粒 DNA 少量快速提取

质粒 DNA 小量提取法对于从大量转化子中制备少量部分纯化的质粒 DNA 十分有用。这些方法共同特点是简便、快速,能同时处理大量试样,所得 DNA 有一定纯度,可满足限制酶切割、电泳分析的需要。

(一) 煮沸法

- 1、将 1.5ml 培养液倒入 eppendorf 管中,4℃ 下 12000 g 离心 30 秒。
- 2、弃上清,将管倒置于卫生纸上几分钟,使液体流尽。
- 3、将菌体沉淀悬浮于 120ml STET 溶液中,涡旋混匀。
- 4、加入 10ml 新配制的溶菌酶溶液(10mg/ml),涡旋振荡 3 秒钟。
- 5、将 eppendorf 管放入沸水浴中,50 秒后立即取出。
- 6、用微量离心机 4℃ 下 12000g 离心 10 分钟。
- 7、用无菌牙签从 eppendorf 管中去除细菌碎片。
- 8、取 20μl 进行电泳检查。

[注意] 1. 对大肠杆菌可从固体培养基上挑取单个菌落直接进行煮沸法提取质粒 DNA。

2. 煮沸法中添加溶菌酶有一定限度,浓度高时,细菌裂解效果反而不好。有时不同溶菌酶也能溶菌。

3. 提取的质粒 DNA 中会含有 RNA,但 RNA 并不干扰进一步实验,如限制性内切酶消化,亚克隆及连接反应等。

(二) 碱法

- 1、取 1.5ml 培养液倒入 1.5ml eppendorf 管中,4℃ 下 12000g 离心 30 秒。
- 2、弃上清,将管倒置于卫生纸上数分钟,使液体流尽。
- 3、菌体沉淀重悬浮于 100 μl 溶液 中(需剧烈振荡),室温下放置 5-10 分钟。
- 4、加入新配制的溶液 200 μl,盖紧管口,快速温和颠倒 eppendorf 管数次,以混匀内容物(千万不要振荡),冰浴 5 分钟。
- 5、加入 150 μl 预冷的溶液,盖紧管口,并倒置离心管,温和振荡 10 秒,使沉淀混匀,冰浴中 5-10 分钟,4℃ 下 12000g 离心 5-10 分钟。
- 6、上清液移入干净 eppendorf 管中,加入等体积的酚/氯仿(1:1),振荡混匀,4℃ 下 12000g 离心 5 分钟。

7、将水相移入干净 eppendorf 管中,加入 2 倍体积的无水乙醇,振荡混匀后置于-20℃ 冰箱中 20 分钟,然后 4℃ 下 12000g 离心 10 分钟。

8、弃上清,将管口敞开倒置于卫生纸上使所有液体流出,加入 1ml 70%乙醇洗沉淀一次,4℃ 下 12000g 离心 5-10 分钟。

9、吸除上清液,将管倒置于卫生纸上使液体流尽,真空干燥 10 分钟或室温干燥。

10、将沉淀溶于 20 μ l TE 缓冲液(pH8.0, 含 20 μ g /ml RNaseA)中,储于-20℃ 冰箱中。

[注意] 1. 提取过程应尽量保持低温。

2. 提取质粒 DNA 过程中除去蛋白很重要,采用酚/氯仿去除蛋白效果较单独用酚或氯仿好,要将蛋白尽量除干净需多次抽提。

3. 沉淀 DNA 通常使用冰乙醇,在低温条件下放置时间稍长可使 DNA 沉淀完全。沉淀 DNA 也可用异丙醇(一般使用等体积),且沉淀完全,速度快,但常把盐沉淀下来,所以多数还是用乙醇。

(三) Wizard 少量 DNA 纯化系统

Promega 公司的 Wizard 少量 DNA 纯化系统可快速有效的抽提质粒 DNA,整个过程只需 15 分钟。提取的质粒可直接用于 DNA 测序、酶切分析和体外转录等。

该系统中所含试剂和柱子可以用于 50 次 1-3ml 质粒培养液的分离和纯化,试剂包括 10ml 细胞悬浮液,10ml 细胞裂解液;10ml 中和液,50ml Wizard 少量 DNA 纯化树脂,50ml 柱洗液(使用前加 95%乙醇至 120ml)和 50 支 Wizard 微型柱。

1、1-3ml 过夜培养细胞液 4℃ 下 12000g 离心 1-2 分钟。

2、去除上清液,菌体细胞悬浮于 200 μ l 细胞悬浮液中,充分混合,并移入 eppendorf 管中。

3、加 200 μ l 细胞裂解液,颠倒离心管数次,直到溶液变清亮。

4、加 200 μ l 中和液,颠倒离心管数次。

5、4℃ 下 12000g 离心 5 分钟,取上清液于新的 eppendorf 管中。

6、加 1ml Wizard 少量 DNA 纯化树脂,颠倒离心管数次以充分混匀。

7、取一次性注射器,取出柱塞,并使注射筒与 Wizard 微型柱连接,用移液枪将上述混合液加入注射筒中,并用柱塞轻推,使混合物进入微型柱。

8、将注射器与微型柱分开,取出柱塞,再将注射筒与微型柱相连,加入 2ml 柱洗液,并用柱塞轻推,使柱洗液进入微型柱。

9、取出微型柱置于 eppendorf 管中,离心 2 分钟以除去微型柱中的柱洗液。

10、将微型柱放在一个新 eppendorf 管中,加 50 μ l TE(或水)于微型柱中,静置 1 分钟后,4℃ 下 12000g 离心 20 秒。

11、丢弃微型柱,将 eppendorf 管中的质粒 DNA 贮于 4℃ 或-20℃ 冰箱。

[注意] 树脂使用前应充分混匀,如有结晶,可将树脂用 25-37℃ 水浴处理 10 分钟。

三、质粒 DNA 的大量提取和纯化

在制作酶谱、测定序列、制备探针等实验中需要高纯度、高浓度的质粒 DNA,为此需要大量提取质粒 DNA。大量提取的质粒 DNA 一般需进一步纯化,常用柱层析法和氯化铯梯度离心法。

(一) 碱法

1、取培养至对数生长后期的含 pBS 质粒的细菌培养液 250ml,4℃ 下 5000g 离心 15 分钟,弃上清,将离心管倒置使上清液全部流尽。

2、将细菌沉淀重新悬浮于 50ml 用冰预冷的 STE 中(此步可省略)。

3、同步骤 1 方法离心以收集细菌细胞。

4、将细菌沉淀物重新悬浮于 5ml 溶液 I 中,充分悬浮菌体细胞。

5、加入 12ml 新配制的溶液 II,盖紧瓶盖,缓缓地颠倒离心管数次,以充分混匀内容物,冰浴 10 分钟。

6、加 9ml 用冰预冷的溶液 III, 摇动离心管数次以混匀内容物,冰上放置 15 分钟,此时应形成白色絮状沉淀。

7、4℃下 5000g 离心 15 分钟。

8、取上清液,加入 50ml RNA 酶 A(10mg/ml), 37℃水浴 20 分钟。

9、加入等体积的饱和酚/氯仿,振荡混匀,4℃下 12000g 离心 10 分钟。

10、取上层水相,加入等体积氯仿,振荡混匀,4℃下 12000g 离心 10 分钟。

11、取上层水相,加入 1/5 体积的 4mol/L NaCl 和 10% PEG(分子量 6000), 冰上放置 60 分钟。

12、4℃下 12000g 离心 15 分钟,沉淀用数 ml 70%冰冷乙醇洗涤,4℃下 12000g 离心 5 分钟。

13、真空抽干沉淀,溶于 500ml TE 或水中。

[注意] 1. 提取过程中应尽量保持低温。

2. 加入溶液 II 和溶液 III 后操作应混和,切忌剧烈振荡。

3. 由于 RNA 酶 A 中常存在有 DNA 酶,利用 RNA 酶耐热的特性,使用时应先对该酶液进行热处理(80℃1 小时),使 DNA 酶失活。

(二) Wizard 大量 DNA 纯化系统

碱法大量提取 DNA 往往需要很长的时间.Promega 公司的 Wizard 大量 DNA 纯化系统既简单又快速,只需要离心和真空抽干,这个系统可以从 500ml 培养液中在 3 小时以内获得 1mg 以上的高质量的质粒 DNA(200-20000bp)。该系统不需要酚和氯仿抽提,纯化后的 DNA 溶于水或 TE 缓冲液中,不含任何盐份,可以直接用于 DNA 序列分析和酶切反应,也可以用于在核酸酶抑制剂(如 RNasin)存在的条件下进行体外转录反应等。

该系统中含有的试剂和柱子可以用于 10 次 100-500ml 质粒培养液的分离和纯化,试剂包括: 150ml 细胞悬浮液, 150ml 细胞裂解液, 150ml 中和液, 100ml Wizard 大量 DNA 纯化树脂, 125ml Wizard 柱子洗脱溶液和 10 支 Wizard 带有存储离心管的柱子。

1、100-500ml 细胞培养液置离心管中, 22-25℃下 5000g 离心 10 分钟, 所得细胞沉淀充分悬浮于细胞悬浮液中。

2、加 15ml 细胞裂解溶液并轻轻混合,可以反复倒置混合,但不能用涡旋振荡,细胞裂解完全时,溶液会变清,这一步需要 20 分钟。

3、加 15ml 中和溶液,立即反复倒置离心管数次,并使之混匀。

4、14000g, 22-25℃离心 15 分钟。

5、小心地将上清液吸出并移至一个新离心管中。

6、加 0.5 倍体积的异丙醇,混合均匀, 14000g 22-25℃下离心 15 分钟。

7、弃上清,悬浮 DNA 沉淀于 2ml TE 缓冲液中。这一步中也许有的沉淀不能溶解。

8、加 10ml Wizard 大量 DNA 纯化树脂溶液, 并涡旋混合。

9、每一个样品,使用一支 Wizard 大量柱子,柱子的头插在真空器上(Promega 产品,与此配套)。

10、将树脂/DNA 混合液转入柱子中,真空抽取树脂/DNA 混合液。

11、将树脂/DNA 混合液抽干后,加 13ml 柱子洗脱溶液至离心管中,对管底部的树脂/DNA 进行洗脱(柱子一边旋转一边加入洗脱液), 并加入柱子中。

12、真空抽干所加入的洗脱。

13、再加 12ml 柱子洗脱液进柱子并抽干。

14、加入 5ml 80%乙醇漂洗柱中的树脂,柱子真空抽干后将柱子放入用户提供的离心管中,2500rpm(1300g)离心 5 分钟。

15、取出柱子,真空抽干 5 分钟,再将柱子放入系统中所提供的离心管中, 2500rpm(1300g)离心 5 分钟。

16、在柱子中加入 1.5ml 65-70℃预热过的灭菌重蒸水或 TE,1 分钟后 2500rpm(1300g)离心柱子

/离心管 5 分钟。

17、取出柱子,离心管中溶液即为提取的质粒 DNA,可以直接放在离心管中,盖上盖子,储存在 4 或-20 备用。

[注意] 1. 在使用之前,系统所提供的柱子洗脱液按 1:1 加入 125ml 95%乙醇。

2. 纯化树脂必须混匀后再用。

(三) Sephrose 2B 柱纯化质粒 DNA

碱法提取的质粒 DNA 即使用 RNA 酶处理,仍会含有少量 RNA。当有些试验需无 RNA 污染的 DNA 制品时,则需进行进一步纯化。一般常用 Sepharose 2B 或 Sepharose 4B 进行纯化,该方法具有快速,条件温和,重复性好,载体物质可以再利用等优点,因而已广泛用于质粒 DNA 纯化。

1、将 Sepharose 2B 经含 0.1% SDS 的 TE (pH8.0) 平衡后上柱。

2、将至多 1ml 的 DNA 溶液铺在 Sepharase 2B 柱上。

3、待 DNA 溶液完全进入柱内后立即在柱的上部连接含有 0.1% SDS 的 TE(pH8.0)贮液瓶。

4、以 1ml 流出液为 1 份进行收集。

5、对每一管测定其 OD260 值,以确定哪些管中含有质粒 DNA。通常质粒 DNA 在柱上流出的第一个峰中。

6、合并所有含质粒的洗脱液,用等体积的酚/氯仿(1:1)抽提,4℃下 12000g 离心 2 分钟,将上层水相转入新管。

7、加入 2 倍体积的冰冷无水乙醇, -20℃下沉淀 10 分钟,然后 4℃下 12000g 离心 10 分钟,弃去上清液。

8、沉淀加 70%乙醇洗涤,4℃下 12000g 离心 10 分钟,弃去上清液。

9、沉淀真空抽干,重新溶于 TE 或无菌水中。

[注意] 在装柱过程中,要防止柱床中出现断裂或气泡现象,要使界面保持平整。对新装成的柱,应用含 0.1% SDS 的 TE 平衡,以使柱内的凝胶均匀。

思考题

1. 质粒的基本性质有哪些?

2. 质粒载体与天然质粒相比有哪些改进?

3. 在碱法提取质粒 DNA 操作过程中应注意哪些问题?

第二章 DNA 酶切及凝胶电泳

第一节 概述

一. DNA 的限制性内切酶酶切分析

限制性内切酶能特异地结合于一段被称为限制性酶识别序列的 DNA 序列之内或其附近的特异位点上,并切割双链 DNA。它可分为三类: I 类和 II 类酶在同一蛋白质分子中兼有切割和修饰(甲基化)作用且依赖于 ATP 的存在。I 类酶结合于识别位点并随机的切割识别位点不远处的 DNA,而 II 类酶在识别位点上切割 DNA 分子,然后从底物上解离。I 类由两种酶组成:一种为限制性内切核酸酶(限制酶),它切割某一特异的核苷酸序列;另一种为独立的甲基化酶,它修饰同一识别序列。II 类中的限制性内切酶在分子克隆中得到了广泛应用,它们是重组 DNA 的基础。绝大多数 II 类限制酶识别长度为 4 至 6 个核苷酸的回文对称特异核苷酸序列(如 EcoR 识别六个核苷酸序列:5'- G AATTC-3'),有少数酶识别更长的序列或简并序列。II 类酶切割位点在识别序列中,有的在对称轴处切割,产生平末端的 DNA 片段(如 Sma :5'-CCC GGG-3');有的切割位点在对称轴一侧,产生带有单链突出末端的 DNA 片段称粘性末端,如 EcoR 切割识别序列后产生两个互补的粘性末端。

5'...G AATTC...3' 5'... G AATTC...3'
3'...CTTAA G ...5' 3'... CTTAA G...5'

DNA 纯度、缓冲液、温度条件及限制性内切酶本身都会影响限制性内切酶的活性。大部分限制性内切酶不受 RNA 或单链 DNA 的影响。当微量的污染物进入限制性内切酶贮存液中时,会影响其进一步使用,因此在吸取限制性内切酶时,每次都要用新的吸管头。如果采用两种限制性内切酶,必须要注意分别提供各自的最适盐浓度。若两者可用同一缓冲液,则可同时水解。若需要不同的盐浓度,则低盐浓度的限制性内切酶必须首先使用,随后调节盐浓度,再用高盐浓度的限制性内切酶水解。也可在第一个酶切反应完成后,用等体积酚/氯仿抽提,加 0.1 倍体积 3mol/L NaAc 和 2 倍体积无水乙醇,混匀后置 -70℃ 低温冰箱 30 分钟,离心、干燥并重新溶于缓冲液后进行第二个酶切反应。

DNA 限制性内切酶酶切图谱又称 DNA 的物理图谱,它由一系列位置确定的多种限制性内切酶酶切位点组成,以直线或环状图式表示。在 DNA 序列分析、基因组的功能图谱绘制、DNA 的无性繁殖、基因文库的构建等工作中,建立限制性内切酶图谱都是不可缺少的环节,近年来发展起来的 RFLP(限制性片段长度多态性)技术更是建立在它的基础上。

构建 DNA 限制性内切酶图谱有许多方法。通常结合使用多种限制性内切酶,通过综合分析多种酶单切及不同组合的多种酶同时切所得到的限制性片段大小来确定各种酶的酶切位点及其相对位置。酶切图谱的使用价值依赖于它的准确性和精确程度。

在酶切图谱制作过程中,为了获得条带清晰的电泳图谱,一般 DNA 用量约为 0.5-1 μg。限制性内切酶的酶解反应最适条件各不相同,各种酶有其相应的酶切缓冲液和最适反应温度(大多数为 37℃)。对质粒 DNA 酶切反应而言,限制性内切酶用量可按标准体系 1 μg DNA 加 1 单位酶,消化 1-2 小时。但要完全酶解则必须增加酶的用量,一般增加 2-3 倍,甚至更多,反应时间也要适当延长。

二. 凝胶电泳

琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳是分离鉴定和纯化 DNA 片段的标准方法。该技术操作简便快速,可以分辨用其它方法(如密度梯度离心法)所无法分离的 DNA 片段。当用低浓度的荧光嵌入染料溴化乙啶(Ethidium bromide, EB)染色,在紫外光下至少可以检出 1-10ng 的 DNA 条带,从而可以确定 DNA 片段在凝胶中的位置。此外,还可以从电泳后的凝胶中回收特定的 DNA 条带,用于以后的克隆操作。

琼脂糖和聚丙烯酰胺可以制成各种形状、大小和孔隙度。琼脂糖凝胶分离 DNA 片段大小范围较广,不同浓度琼脂糖凝胶可分离长度从 200bp 至近 50kb 的 DNA 片段。琼脂糖通常用水平装置在强度和方向恒定的电场下电泳。聚丙烯酰胺分离小片段 DNA(5-500bp)效果较好,其分辨率极高,甚至相差 1bp 的 DNA 片段就能分开。聚丙烯酰胺凝胶电泳很快,可容纳相对大量的 DNA,但制备和操作比琼脂糖凝胶困难。聚丙烯酰胺凝胶采用垂直装置进行电泳。目前,一般实验室多用琼脂糖水平平板凝胶电泳装置进行 DNA 电泳。

琼脂糖主要在 DNA 制备电泳中作为一种固体支持基质,其密度取决于琼脂糖的浓度。在电场中,在中性 pH 值下带负电荷的 DNA 向阳极迁移,其迁移速率由下列多种因素决定:

1、 DNA 的分子大小:

线状双链 DNA 分子在一定浓度琼脂糖凝胶中的迁移速率与 DNA 分子量对数成反比,分子越大则所受阻力越大,也越难于在凝胶孔隙中爬行,因而迁移得越慢。

2、 琼脂糖浓度

一个给定大小的线状 DNA 分子,其迁移速度在不同浓度的琼脂糖凝胶中各不相同。DNA 电泳迁移率的对数与凝胶浓度成线性关系。凝胶浓度的选择取决于 DNA 分子的大小。分离小于 0.5kb 的 DNA 片段所需胶浓度是 1.2-1.5%,分离大于 10kb 的 DNA 分子所需胶浓度为 0.3-0.7%,DNA 片段大小介于两者之间则所需胶浓度为 0.8-1.0%。

3、 DNA 分子的构象

当 DNA 分子处于不同构象时,它在电场中移动距离不仅和分子量有关,还和它本身构象有关。相同分子量的线状、开环和超螺旋 DNA 在琼脂糖凝胶中移动速度是不一样的,超螺旋 DNA 移动最快,而线状双链 DNA 移动最慢。如在电泳鉴定质粒纯度时发现凝胶上有数条 DNA 带难以确定是质粒 DNA 不同构象引起还是因为含有其他 DNA 引起时,可从琼脂糖凝胶上将 DNA 带逐个回收,用同一种限制性内切酶分别水解,然后电泳,如在凝胶上出现相同的 DNA 图谱,则为同一种 DNA。

4、 电源电压

在低电压时,线状 DNA 片段的迁移速率与所加电压成正比。但是随着电场强度的增加,不同分子量的 DNA 片段的迁移率将以不同的幅度增长,片段越大,因场强升高引起的迁移率升高幅度也越大,因此电压增加,琼脂糖凝胶的有效分离范围将缩小。要使大于 2kb 的 DNA 片段的分辨率达到最大,所加电压不得超过 5v/cm。

5、 嵌入染料的存在

荧光染料溴化乙锭用于检测琼脂糖凝胶中的 DNA,染料会嵌入到堆积的碱基对之间并拉长线状和带缺口的环状 DNA,使其刚性更强,还会使线状 DNA 迁移率降低 15%。

6、 离子强度影响

电泳缓冲液的组成及其离子强度影响 DNA 的电泳迁移率。在没有离子存在时(如误用蒸馏水配制凝胶),电导率最小,DNA 几乎不移动,在高离子强度的缓冲液中(如误加 10 × 电泳缓冲液),则电导很高并明显产热,严重时会引起凝胶融化或 DNA 变性。

对于天然的双链 DNA,常用的几种电泳缓冲液有 TAE[含 EDTA (pH8.0)和 Tris-乙酸],TBE(Tris-硼酸和 EDTA),TPE(Tris-磷酸和 EDTA),一般配制成浓缩母液,储于室温。

第二节 材料、设备及试剂

一、 材料

DNA: 购买或自行提取纯化; 重组 pBS 质料或 pUC19 质粒; EcoRI 酶及其酶切缓冲液: 购买成品; Hind 酶及其酶切缓冲液: 购买成品; 琼脂糖(Agarose): 进口或国产的电泳用琼脂糖均可。

二、 设备

水平式电泳装置,电泳仪,台式高速离心机, 恒温水浴锅, 微量移液枪, 微波炉或电炉,紫外透射仪,照相支架,照相机及其附件。

三、 试剂

- 1、 5 × TBE 电泳缓冲液: 配方见第一章。
- 2、 6 × 电泳载样缓冲液: 0.25% 溴酚蓝, 40%(w/v) 蔗糖水溶液, 贮存于 4℃。
- 3、 溴化乙锭(EB)溶液母液: 将 EB 配制成 10mg/ml,用铝箔或黑纸包裹容器,储于 室温即可。

第三节 操作步骤

一、 DNA 酶切反应

1、 将清洁干燥并经灭菌的 eppendorf 管(最好 0.5ml)编号,用微量移液枪分别加入 DNA 1 μg 和相应的限制性内切酶反应 10 × 缓冲液 2 μl,再加入重蒸水使总体积为 19 μl,将管内溶液混匀后加入 1 μl 酶液,用手指轻弹管壁使溶液混匀,也可用微量离心机甩一下,使溶液集中在管底。此步操作是整个实验成败的关键,要防止错加,漏加。使用限制性内切酶时应尽量减少其离开冰箱的时间,以免活性降低。

2、 混匀反应体系后,将 eppendorf 管置于适当的支持物上(如插在泡沫塑料板上),37℃ 水浴保温 2-3 小时,使酶切反应完全。

3、 每管加入 2 μl 0.1mol/L EDTA(pH8.0),混匀,以停止反应,置于冰箱中保存备用。

二、 DNA 分子量标准的制备

采用 EcoR 或 Hind 酶解所得的 DNA 片段来作为电泳时的分子量标准。DNA 为长度约 50kb

的双链 DNA 分子,其商品溶液浓度为 0.5mg/ml,酶解反应操作如上述。HindIII 切割 DNA 后得到 8 个片段,长度分别为 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0, 0.56 和 0.12kb。EcoRI 切割 IDNA 后得到 6 个片段,长度分别为 21.2, 7.4, 5.8, 5.6, 4.9 和 2.5kb。

三、琼脂糖凝胶的制备

1、取 5 × TBE 缓冲液 20ml 加水至 200ml,配制成 0.5 × TBE 稀释缓冲液,待用。

2、胶液的制备:称取 0.4g 琼脂糖,置于 200ml 锥形瓶中,加入 50ml 0.5 × TBE 稀释缓冲液,放入微波炉里(或电炉上)加热至琼脂糖全部熔化,取出摇匀,此为 0.8%琼脂糖凝胶液。加热过程中要不时摇动,使附于瓶壁上的琼脂糖颗粒进入溶液。加热时应盖上封口膜,以减少水份蒸发。

3、胶板的制备:将有机玻璃胶槽两端分别用橡皮膏(宽约 1cm)紧密封住。将封好的胶槽置于水平支持物上,插上样品梳子,注意观察梳子齿下缘应与胶槽底面保持 1mm 左右的间隙。

向冷却至 50-60 的琼脂糖胶液中加入溴化乙锭(EB)溶液使其终浓度为 0.5 μg/ml(也可不把 EB 加入凝胶中,而是电泳后再用 0.5 μg/ml 的 EB 溶液浸泡染色)。用移液器吸取少量融化的琼脂糖凝胶封橡皮膏内侧,待琼脂糖溶液凝固后将剩余的琼脂糖小心地倒入胶槽内,使胶液形成均匀的胶层。倒胶时的温度不可太低,否则凝固不均匀,速度也不可太快,否则容易出现气泡。待胶完全凝固后拨出梳子,注意不要损伤梳底部的凝胶,然后向槽内加入 0.5 × TBE 稀释缓冲液至液面恰好没过胶板上表面。因边缘效应样品槽附近会有一些隆起,阻碍缓冲液进入样品槽中,所以要注意保证样品槽中应注满缓冲液。

4、加样:取 10 μl 酶解液与 2 μl 6 × 载样液混匀,用微量移液枪小心加入样品槽中。若 DNA 含量偏低,则可依上述比例增加上样量,但总体积不可超过样品槽容量。每加完一个样品要更换 tip 头,以防止互相污染,注意上样时要小心操作,避免损坏凝胶或将样品槽底部凝胶刺穿。

5、电泳:加完样后,合上电泳槽盖,立即接通电源。控制电压保持在 60-80V,电流在 40mA 以上。当溴酚蓝条带移动到距凝胶前沿约 2cm 时,停止电泳。

6、染色:未加 EB 的胶板在电泳完毕后移入 0.5 μg/ml 的 EB 溶液中,室温下染色 20-25 分钟。

7、观察和拍照:在波长为 254nm 的长波长紫外灯下观察染色后的或已加有 EB 的电泳胶板。DNA 存在处显示出肉眼可辨的桔红色荧光条带。紫光灯下观察时应戴上防护眼镜或有机玻璃面罩,以免损伤眼睛。经照相机镜头加上近摄镜片和红色滤光片后将相机固定于照相架上,采用全色胶片,光圈 5.6,曝光时间 10-120 秒(根据荧光条带的深浅选择)。

8、DNA 分子量标准曲线的制作:在放大的电泳照片上,以样品槽为起点,用卡尺测量 DNA 的 EcoR 和 Hind 酶切片段的迁移距离,以厘米为单位。以核苷酸数的常用对数为纵坐标,以迁移距离为横坐标,在坐标纸上绘出连结各点的平滑曲线,即为该电泳条件下 DNA 分子量的标准曲线。

9、DNA 酶切片段大小的测定:在放大的电泳照片上,用卡尺量出 DNA 样品各片段的迁移距离,根据此数值,在 DNA 分子量标准曲线上查出相应的对数值,进一步计算出各片段的分子量大小(若用单对数坐标纸来绘制标准曲线,则可根据迁移距离直接查出 DNA 片段的大小)。反之,若已知 DNA 片段的大小亦可由标准曲线上查出它预计的迁移距离。

10、DNA 酶切片段排列顺序的确定:根据单酶切,双酶切和多酶切的电泳分析结果,对照 DNA 酶切片段大小的数据进行逻辑推理,然后确定各酶切片段的排列顺序和各酶切位点的相对位置。以环状图或直线图表示,即成该 DNA 分子的限制性内切酶图谱。

[注意] 1.酶切时所加的 DNA 溶液体积不能太大,否则 DNA 溶液中其他成分会干扰酶反应。

2、酶活力通常用酶单位(U)表示,酶单位的定义是:在最适反应条件下,1 小时完全降解 1mg IDNA 的酶量为一个单位,但是许多实验制备的 DNA 不象 IDNA 那样易于降解,需适当增加酶的使用量。反应液中加入过量的酶是不合适的,除考虑成本外,酶液中的微量杂质可能干扰随后的反应。

3、市场销售的酶一般浓度很大,为节约起见,使用时可事先用酶反应缓冲液(1 ×)进行稀释。另外,酶通常保存在 50%的甘油中,实验中,应将反应液中甘油浓度控制在 1/10 之下,否则,酶活性将受影响。

4、观察 DNA 离不开紫外透射仪,可是紫外光对 DNA 分子有切割作用。从胶上回收 DNA 时,应尽

量缩短光照时间并采用长波长紫外灯(300-360nm),以减少紫外光切割 DNA。

5、EB 是强诱变剂并有中等毒性,配制和使用时应戴手套,并且不要把 EB 洒到桌面或地面上。凡是沾污了 EB 的容器或物品必须经专门处理后才能清洗或丢弃。

6、当 EB 太多,胶染色过深,DNA 带看不清时,可将胶放入蒸馏水冲泡,30 分钟后再观察。

思考题

1. 如果一个 DNA 酶解液在电泳后发现 DNA 未被切动,你认为可能是什么原因?

2. 琼脂糖凝胶电泳中 DNA 分子迁移率受哪些因素的影响?

第三章 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化

第一节 概述

在自然条件下,很多质粒都可通过细菌接合作用转移到新的宿主内,但在人工构建的质粒载体中,一般缺乏此种转移所必需的 mob 基因,因此不能自行完成从一个细胞到另一个细胞的接合转移。如需将质粒载体转移进受体细菌,需诱导受体细菌产生一种短暂的感受态以摄取外源 DNA。

转化(Transformation)是将外源 DNA 分子引入受体细胞,使之获得新的遗传性状的一种手段,它是微生物遗传、分子遗传、基因工程等研究领域的基本实验技术。

转化过程所用的受体细胞一般是限制修饰系统缺陷的变异株,即不含限制性内切酶和甲基化酶的突变体(R^- , M^-),它可以容忍外源 DNA 分子进入体内并稳定地遗传给后代。受体细胞经过一些特殊方法(如电击法, $CaCl_2$, $RbCl(KCl)$ 等化学试剂法)的处理后,细胞膜的通透性发生了暂时性的改变,成为能允许外源 DNA 分子进入的感受态细胞(Competent cells)。进入受体细胞的 DNA 分子通过复制,表达实现遗传信息的转移,使受体细胞出现新的遗传性状。将经过转化后的细胞在筛选培养基中培养,即可筛选出转化子(Transformant,即带有异源 DNA 分子的受体细胞)。目前常用的感受态细胞制备方法有 $CaCl_2$ 和 $RbCl(KCl)$ 法, $RbCl(KCl)$ 法制备的感受态细胞转化效率较高,但 $CaCl_2$ 法简便易行,且其转化效率完全可以满足一般实验的要求,制备出的感受态细胞暂时不用时,可加入占总体积 15% 的无菌甘油于 -70℃ 保存(半年),因此 $CaCl_2$ 法为使用更广泛。

为了提高转化效率,实验中要考虑以下几个重要因素:

1. 细胞生长状态和密度: 不要用经过多次转接或储于 4℃ 的培养菌,最好从 -70℃ 或 -20℃ 甘油保存的菌种中直接转接用于制备感受态细胞的菌液。细胞生长密度以刚进入对数生长期时为好,可通过监测培养液的 OD600 来控制。DH5 菌株的 OD600 为 0.5 时,细胞密度在 5×10^7 个/ml 左右(不同的菌株情况有所不同),这时比较合适。密度过高或不足均会影响转化效率。

2. 质粒的质量和浓度: 用于转化的质粒 DNA 应主要是超螺旋态 DNA(cccDNA)。转化效率与外源 DNA 的浓度在一定范围内成正比,但当加入的外源 DNA 的量过多或体积过大时,转化效率就会降低。1ng 的 cccDNA 即可使 50 μ l 的感受态细胞达到饱和。一般情况下,DNA 溶液的体积不应超过感受态细胞体积的 5%。

3. 试剂的质量: 所用的试剂,如 $CaCl_2$ 等均需是最高纯度的(GR.或 AR.),并用超纯水配制,最好分装保存于干燥的冷暗处。

4. 防止杂菌和杂 DNA 的污染: 整个操作过程均应在无菌条件下进行,所用器皿,如离心管, tip 头等最好是新的,并经高压灭菌处理,所有的试剂都要灭菌,且注意防止被其它试剂、DNA 酶或杂 DNA 所污染,否则均会影响转化效率或杂 DNA 的转入,为以后的筛选、鉴定带来不必要的麻烦。

本实验以 E.coli DH5a 菌株为受体细胞,并用 $CaCl_2$ 处理,使其处于感受态,然后与 pBS 质粒共保温,实现转化。由于 pBS 质粒带有氨苄青霉素抗性基因(Amp^r),可通过 Amp 抗性来筛选转化子。如受体细胞没有转入 pBS,则在含 Amp 的培养基上不能生长。能在 Amp 培养基上生长的受体细胞(转化子)肯定已导入了 pBS。转化子扩增后,可将转化的质粒提取出,进行电泳、酶切等进一步鉴定。

本实验以 E.coli DH5a 菌株为受体细胞,并用 $CaCl_2$ 处理,使其处于感受态,然后与 pBS 质粒共保温,

实现转化。由于 pBS 质粒带有氨苄青霉素抗性基因(Amp^r)，可通过 Amp 抗性来筛选转化子。如受体细胞没有转入 pBS，则在含 Amp 的培养基上不能生长。能在 Amp 培养基上生长的受体细胞(转化子)肯定已导入了 pBS。转化子扩增后，可将转化的质粒提取出，进行电泳、酶切等进一步鉴定。

第二节 材料、设备及试剂

一. 材料

E. coli DH5 菌株: R⁻, M⁻, Amp⁻ ; pBS 质粒 DNA: 购买或实验室自制, eppendorf 管。

二. 设备

恒温摇床,电热恒温培养箱,台式高速离心机,无菌工作台,低温冰箱,恒温水浴锅,制冰机,分光光度计,微量移液枪。

三. 试剂

1.LB 固体和液体培养基:配方见第一章。

2.Amp 母液:配方见第一章。

3.含 Amp 的 LB 固体培养基:将配好的 LB 固体培养基高压灭菌后冷却至 60℃ 左右,加入 Amp 储存液,使终浓度为 50ug/ml,摇匀后铺板。

4.麦康凯培养基(MacConkey Agar):取 52g 麦康凯琼脂,加蒸馏水 1000ml,微火煮沸至完全溶解,高压灭菌,待冷至 60℃ 左右加入 Amp 储存液使终浓度为 50ug/ml,然后摇匀后涂板。

5.0.05mol/L CaCl₂ 溶液:称取 0.28g CaCl₂(无水,分析纯),溶于 50ml 重蒸水中,定容至 100ml,高压灭菌。

6.含 15%甘油的 0.05mol/L CaCl₂: 称取 0.28g CaCl₂(无水,分析纯),溶于 50ml 重蒸水中,加入 15ml 甘油,定容至 100ml,高压灭菌。

第三节 操作步骤

一、受体菌的培养

从 LB 平板上挑取新活化的 E. coli DH5 单菌落,接种于 3-5ml LB 液体培养基中,37℃ 下振荡培养 12 小时左右,直至对数生长后期。将该菌悬液以 1:100-1:50 的比例接种于 100ml LB 液体培养基中,37℃ 振荡培养 2-3 小时至 OD₆₀₀ = 0.5 左右。

二、感受态细胞的制备 (CaCl₂ 法)

1、将培养液转入离心管中,冰上放置 10 分钟,然后于 4℃ 下 3000g 离心 10 分钟。

2、弃去上清,用预冷的 0.05mol/L 的 CaCl₂ 溶液 10ml 轻轻悬浮细胞,冰上放置 15-30 分钟后,4℃ 下 3000g 离心 10 分钟。

3、弃去上清,加入 4ml 预冷含 15%甘油的 0.05mol/L 的 CaCl₂ 溶液,轻轻悬浮细胞,冰上放置几分钟,即成感受态细胞悬液。

4、感受态细胞分装成 200 μl 的小份,贮存于 -70℃ 可保存半年。

三、转化

1、从 -70℃ 冰箱中取 200 μl 感受态细胞悬液,室温下使其解冻,解冻后立即置冰上。

2、加入 pBS 质粒 DNA 溶液(含量不超过 50ng,体积不超过 10 μl),轻轻摇匀,冰上放置 30 分钟后。

3、42℃ 水浴中热击 90 秒或 37℃ 水浴 5 分钟,热击后迅速置于冰上冷却 3-5 分钟。

4、向管中加入 1ml LB 液体培养基(不含 Amp),混匀后 37℃ 振荡培养 1 小时,使细菌恢复正常生长状态,并表达质粒编码的抗生素抗性基因(Amp^r)。

5、将上述菌液摇匀后取 100 μl 涂布于含 Amp 的筛选平板上,正面向上放置半小时,待菌液完全被培养基吸收后倒置培养皿,37℃ 培养 16-24 小时。

同时做两个对照:

对照组 1: 以同体积的无菌双蒸水代替 DNA 溶液,其它操作与上面相同。此组正常情况下在含抗

生素的 LB 平板上应没有菌落出现。

对照组 2: 以同体积的无菌双蒸水代替 DNA 溶液,但涂板时只取 5 μ l 菌液涂布于不含抗生素的 LB 平板上,此组正常情况下应产生大量菌落。

四、 计算转化率

统计每个培养皿中的菌落数。

转化后在含抗生素的平板上长出的菌落即为转化子,根据此皿中的菌落数可计算出转化子总数和转化频率,公式如下:

转化子总数 = 菌落数 \times 稀释倍数 \times 转化反应原液总体积 / 涂板菌液体积

转化频率 (转化子数 / 每 mg 质粒 DNA) = 转化子总数 / 质粒 DNA 加入量(mg)

感受态细胞总数 = 对照组 2 菌落数 \times 稀释倍数 \times 菌液总体积 / 涂板菌液体积

感受态细胞转化效率 = 转化子总数 / 感受态细胞总数

[注意] 本实验方法也适用于其它 E.coli 受体菌株的不同的质粒 DNA 的转化。但它们的转化效率并不一定一样。有的转化效率高,需将转化液进行多梯度稀释涂板才能得到单菌落平板,而有的转化效率低,涂板时必须将菌液浓缩(如离心),才能较准确的计算转化率。

思考题

1. 制备感受态细胞的原理是什么?
2. 如果实验中对照组本不该长出菌落的平板上长出了一些菌落,你将如何解释这种现象?

第四章 RNA 的提取和 cDNA 合成

第一节 概述

从真核生物的组织或细胞中提取 mRNA,通过酶促反应逆转录合成 cDNA 的第一链和第二链,将双链 cDNA 和载体连接,然后转化扩增,即可获得 cDNA 文库,构建的 cDNA 文库可用于真核生物基因的结构、表达和调控的分析;比较 cDNA 和相应基因组 DNA 序列差异可确定内含子存在和了解转录后加工等一系列问题。总之 cDNA 的合成和克隆已成为当今真核分子生物学的基本手段。自 70 年代中叶首例 cDNA 克隆问世以来,已发展了许多种提高 cDNA 合成效率的方法,并大大改进了载体系统,目前 cDNA 合成试剂已商品化。cDNA 合成及克隆的基本步骤包括用反转录酶合成 cDNA 第一链,聚合酶合成 cDNA 第二链,加入合成接头以及将双链 DNA 克隆到于适当载体(噬菌体或质粒)。

一、RNA 制备

模板 mRNA 的质量直接影响到 cDNA 合成的效率。由于 mRNA 分子的结构特点,容易受 RNA 酶的攻击反应而降解,加上 RNA 酶极为稳定且广泛存在,因而在提取过程中要严格防止 RNA 酶的污染,并设法抑制其活性,这是本实验成败的关键。所有的组织中均存在 RNA 酶,人的皮肤、手指、试剂、容器等均可能被污染,因此全部实验过程中均需戴手套操作并经常更换(使用一次性手套)。所用的玻璃器皿需置于干燥烘箱中 200 $^{\circ}$ C 烘烤 2 小时以上。凡是不能用高温烘烤的材料如塑料容器等皆可用 0.1% 的焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶液处理,再用蒸馏水冲净。DEPC 是 RNA 酶的化学修饰剂,它和 RNA 酶的活性基团组氨酸的咪唑环反应而抑制酶活性。DEPC 与氨水溶液混合会产生致癌物,因而使用时需小心。试验所用试剂也可用 DEPC 处理,加入 DEPC 至 0.1% 浓度,然后剧烈振荡 10 分钟,再煮沸 15 分钟或高压灭菌以消除残存的 DEPC,否则 DEPC 也能和腺嘌呤作用而破坏 mRNA 活性。但 DEPC 能与胺和巯基反应,因而含 Tris 和 DTT 的试剂不能用 DEPC 处理。Tris 溶液可用 DEPC 处理的水配制然后高压灭菌。配制的溶液如不能高压灭菌,可用 DEPC 处理水配制,并尽可能用未曾开封的试剂。除 DEPC 外,也可用异硫氰酸胍、钒氧核苷酸复合物、RNA 酶抑制蛋白等。此外,为了避免 mRNA 或 cDNA 吸附在玻璃或塑料器皿壁上,所有器皿一律需经硅烷化处理。

细胞内总 RNA 制备方法很多,如异硫氰酸胍热苯酚法等。许多公司有现成的总 RNA 提取试剂盒,可快速有效地提取到高质量的总 RNA。分离的总 RNA 可利用 mRNA 3'末端含有多聚(A)⁺ 的特点,当

RNA 流经 oligo (dT)纤维素柱时,在高盐缓冲液作用下,mRNA 被特异的吸附在 oligo(dT)纤维素上,然后逐渐降低盐浓度洗脱,在低盐溶液或蒸馏水中,mRNA 被洗下。经过两次 oligo(dT)纤维素柱,可得到较纯的 mRNA。纯化的 mRNA 在 70%乙醇中-70℃可保存一年以上。

二、cDNA 第一链的合成

所有合成 cDNA 第一链的方法都要用依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶(反转录酶)来催化反应。目前商品化反转录酶有从禽类成髓细胞瘤病毒纯化到的禽类成髓细胞病毒(AMV)反转录酶和从表达克隆化的 Moloney 鼠白血病病毒反转录酶基因的大肠杆菌中分离到的鼠白血病病毒(MLV)反转录酶。AMV 反转录酶包括两个具有若干种酶活性的多肽亚基,这些活性包括依赖于 RNA 的 DNA 合成,依赖于 DNA 的 DNA 合成以及对 DNA:RNA 杂交体的 RNA 部分进行内切降解(RNA 酶 H 活性)。MLV 反转录酶只有单个多肽亚基,兼备依赖于 RNA 和依赖于 DNA 的 DNA 合成活性,但降解 RNA-DNA 杂交体中的 RNA 的能力较弱,且对热的稳定性较 AMV 反转录酶差。MLV 反转录酶能合成较长的 cDNA(如大于 2-3kb)。AMV 反转录酶和 MLV 反转录酶利用 RNA 模板合成 cDNA 时的最适 pH 值,最适盐浓度和最适温度各不相同,所以合成第一链时相应调整条件是非常重要的。

AMV 反转录酶和 MLV 反转录酶都必须有引物来起始 DNA 的合成。cDNA 合成最常用的引物是与真核细胞 mRNA 分子 3'端 poly(A)结合的 12-18 核苷酸长的 oligo(dT)。

三、cDNA 第二链的合成

cDNA 第二链的合成方法有以下几种:

(1) 自身引导法 合成的单链 cDNA 3'端能够形成一短的发夹结构,这就为第二链的合成提供了现成的引物,当第一链合成反应产物的 DNA:RNA 杂交链变性后利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 Klenow 片段或反转录酶合成 cDNA 第二链,最后用对单链特异性的 S1 核酸酶消化该环,即可进一步克隆。但自身引导合成法较难控制反应,而且用 S1 核酸酶切割发夹结构时无一例外地将导致对应于 mRNA 5'端序列出现缺失和重排,因而该方法目前很少使用。

(2) 置换合成法 该方法利用第一链在反转录酶作用下产生的 cDNA:mRNA 杂交链不用碱变性,而是在 dNTP 存在下,利用 RNA 酶 H 在杂交链的 mRNA 链上造成切口和缺口。从而产生一系列 RNA 引物,使之成为合成第二链的引物,在大肠杆菌 DNA 聚合酶的作用下合成第二链。该反应有 3 个主要优点: (1) 非常有效; (2) 直接利用第一链反应产物,无须进一步处理和纯化; (3) 不必使用 S1 核酸酶来切割双链 cDNA 中的单链发夹环。目前合成 cDNA 常采用该方法。

四、cDNA 的分子克隆

已经制备好的双链 cDNA 和一般 DNA 一样,可以插入到质粒或噬菌体中,为此,首先必需连接上接头(Linker),接头可以是限制性内切酶识别位点片段,也可以利用末端转移酶在载体和双链 cDNA 的末端接上一段寡聚 dG 和 dC 或 dT 和 dA 尾巴,退火后形成重组质粒,并转化到宿主菌中进行扩增。合成的 cDNA 也可以经 PCR 扩增后再克隆入适当载体。

第二节 动植物组织 mRNA 提取

一、材料

水稻叶片或小鼠肝组织。

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) 动植物总 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。

第三节 植物病毒 RNA 提取

大多植物病毒 RNA 为单链 RNA，并且其极性与 mRNA 极性相同，植物病毒 RNA 提取较为简单，一般使用酚/氯仿即可获得满意结果。

一、材料

提纯 TMV 病毒液 (10mg/ml)

二、设备

冷冻台式离心机，低温真空干燥仪，电泳仪，电泳槽。

三、试剂

TE-饱和酚:氯仿 (1:1)，氯仿，3M NaAc(pH5.2)，乙醇(100%和 70%)，TE 缓冲液，无 RNA 酶的双菌水。

四、操作步骤

1、取一 eppendorf 管加入提纯 TMV (10mg/ml)400ml，再加入等体积酚/氯仿，盖紧管盖后用手充分振荡 1 分钟，4℃ 下 12000g 离心 10 分钟。

2、吸取水相于一新 eppendorf 管，再用酚/氯仿抽提，直至水相和有机相交界面无蛋白为止。

3、吸取水相于新 eppendorf 心管，加入等体积氯仿，用手倒置离心管数十秒，4℃ 下 12000g 离心 10 分钟。

4、取水相，加入 1/10 倍体积的 3mol/L NaAc(pH5.2)，2.5 倍体积的冰冷乙醇，混匀，-20℃ 30 分钟。

5、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。

6、小心弃去上清液，沉淀真空干燥 5 分钟或空气干燥 10 分钟，并溶于无 RNA 酶的双菌水或 TE 缓冲液中。

7、取 10ml 进行电泳分析，另 10ml 用于 cDNA 合成。

[注意] 1、整个操作应尽可能在低温下进行。

2、由于病毒 RNA 镶嵌于外壳蛋白里面，因此要充分剥去病毒外壳蛋白，一般需要多次进行酚/氯仿的抽提。

第四节 cDNA 合成技术

一、Riboclone M-MLV(H-) cDNA 合成技术

Promega 公司的 RibocloneR M-MLV(H-) cDNA 合成系统采用 M-MLV 反转录酶的 RNase H 缺失突变株取代 AMV 反转录酶,使合成的 cDNA 更长。该系统的第一链合成使用 M-MLV 反转录酶,cDNA 第二链合成采用置换合成法,采用 RNaseH 和 DNA 聚合酶 进行置换合成,最后用 T4 DNA 聚合酶切去单链末端,方法简便易行。该系统试剂包括：

20 μg 特异性引物

200 μl M-MLV 第一链缓冲液(5×),配方如下: 250mmol/L Tris ·Cl pH8.3(37℃ 时); 375mmol/l KCl; 15mmol/L MgCl₂; 50mmol/L DTT; 10mmol/L dATP, dCTP, dGTP, dTTP 混合物(各 2.5mmol/L)

2 × 625 μ rRNasinR RNA 酶抑制剂

10,000 μ M-MLV 反转录酶, RNase H-

5 μg 对照 RNA

400 μl M-MLV 第二链缓冲液(10×), 配方如下：

400mmol/L Tris · Cl ,pH7.2; 850mmol/L KCl; 44mmol/L MgCl₂;

30mmol/L DTT; 0.5mg/ml BSA。

500 μ RNase H

500 μ DNA 聚合酶

100 μ T4 DNA 聚合酶

2 \times 1.25ml 不含核酸酶的水

以上所有试剂除对照 RNA 需在-70 $^{\circ}$ C 保存外,其余均可保存于-20 $^{\circ}$ C,可以合成 40 μ g mRNA。

(一) 第一链合成

1. 试剂

[γ -³²P] dCTP (>400Ci/mmol), EDTA (50mM 和 200mM), TE-饱和酚:氯仿(1:1), 7.5M NH₄Ac, 乙醇(100%和 70%), TE 缓冲液。

2. 操作步骤

(1) 取一灭菌的无 RNA 酶的 eppendorf 管,加入 RNA 模板和适当引物,每 μ g RNA 使用 0.5 μ g 引物(如使用 NotI 引物接头,使用 0.3 μ g),用 H₂O 调整体积至 15 μ l, 70 $^{\circ}$ C 处理 5 分钟,冷却至室温,离心使溶液集中在管底,再依次加入

5 \times 第一链缓冲液 5 μ l

rRNasin RNA 酶抑制剂 25U

M-MLV(H⁻)反转录酶 200U

H₂O 调至总体积 25 μ l

(2) 用手指轻弹管壁,吸取 5 μ l 至另一 eppendorf 管,加入 2-5 μ Ci [γ -³²P] dCTP (>400Ci/mmol),用以第一链同位素掺入放射性活性测定。

(3) 37 $^{\circ}$ C (随机引物)或 42 $^{\circ}$ C (其它引物)温浴 1 小时

(4) 取出置于冰上

(5) 掺入测定的 eppendorf 管加入 95 μ l 50mM EDTA 终止反应,并使总体积为 100 μ l。可取 90 μ l 进行电泳分析(先用苯酚抽提),另 10 μ l 进行同位素掺入放射性活性测定。

 第一链合成 eppendorf 管可直接用于第二链合成

注:以上 25 μ l 反应总体积中所用 RNA 量为 1 μ g,如合成 5 μ g RNA,则可按比例扩大反应体积, 倒 5 μ g RNA 使用 125 μ l 总体积进行合成。

(二) 第二链合成

1、 取第一链反应液 20 μ l, 再依次加入

10 \times 第二链缓冲液 20 μ l

DNA 聚合酶 23 μ l

RNase H 0.8 μ l

H₂O 加至终体积为 100 μ l

2、 轻轻混匀,如需进行第二链同位素掺入放射性活性测定,可取出 10 μ l 至另一 eppendorf 管,加入 2-5 μ Ci [γ -³²P] dCTP。

3、 14 $^{\circ}$ C 温浴 2 小时(如需合成长于 3kb 的 cDNA, 则需延长至 3-4 小时)。

4、 掺入测定 eppendorf 管中加入 90 μ l 50mM EDTA, 取 10 μ l 进行同位素掺入放射性测定,余下的可进行电泳分析。

5、 cDNA 第二链合成离心管反应液 70 $^{\circ}$ C 处理 10 分钟, 低速离心后置冰上。

6、 加入 2 μ l T4 DNA 聚合酶, 37 $^{\circ}$ C 温浴 10 分钟。

7、 加入 10 μ l 200mmol/L EDTA 终止反应。

8、 用等体积酚:氯仿抽提 cDNA 反应液,离心 2 分钟。

9、水相移至另一 eppendorf 管,加入 0.5 倍体积的 7.5M 醋酸铵(或 0.1 倍体积的 1.5M 醋酸钠,pH5.2), 混匀后再加入 2.5 倍体积的冰冷乙醇(-20℃), -20℃ 放置 30 分钟后离心 5 分钟。

10、小心丢去上清液,加入 0.5ml 冰冷的 70%乙醇,离心 2 分钟。

11、小心移去上清液,干燥沉淀。

12、沉淀溶于 10-20 μ l TE 缓冲液。

(三) 同位素掺入放射性活性测定、计算和电泳分析

1. 试剂

1mg/ml 鲑鱼精 DNA, 三氯乙酸(TCA, 5%和 7%), 碱性琼脂糖胶, 碱性胶电泳缓冲液, (30mM NaOH, 1mM EDTA), 2 \times 样品缓冲液, (20mM NaOH, 20% 甘油, 0.025%溴酚蓝)。

2. 操作步骤

(1) 各取一 2(5)中和二(4)反应液各 3 μ l, 点于玻璃纤维滤纸, 室温干燥, 这些样品代表总放射性活性。

(2) 同样各取 3 μ l 中反应液至含有 100 μ l (1mg/ml) 鲑鱼精 DNA 中, 混匀, 加入 0.5ml 5% TCA, 涡旋混合仪混合后置冰上 5-30 分钟。

(3) 用玻璃纤维滤纸过滤, 用冰冷的 5% TCA 洗三次, 每次用 5ml TCA, 再用 5ml 丙酮或乙醇漂洗, 这些样品代表掺入放射性活性。

(4) 分别测定总放射性活性强度和掺入放射性活性强度, 可用盖革计数器, 也可用液闪计数。

3. 第一链产量测定

第一链掺入率(%) = $\frac{\text{掺入 cpm}}{\text{总 cpm}} \times 100\%$

掺入 dNTP(nmol) = $2\text{nmol dNTP} / \mu\text{l} \times \text{反应体积}(\mu\text{l}) \times (\text{第一链掺入率})$

设 330 为每 mol dNTP 的平均分子量

合成 cDNA 量(ng) = $\text{掺入 dNTP}(\text{nmol}) \times 330\text{ng/nmol}$

mRNA 向 cDNA 转变率 = $\frac{\text{合成 cDNA 量(ng)}}{\text{模板 RNA 量(ng)}} \times 100\%$

例如总放射性活性强度为 254,000cpm, 掺入放射性活性强度为 3040cpm, 所用 RNA 模板量为 1 μ g, 反应体积为 25 μ l, 则:

掺入率 = $3040 / 254000 \times 100\% = 1.2\%$

掺入 dNTP 量 = $2\text{nmol dNTP} / \mu\text{l} \times 25 \times 1.2\% = 0.6\text{nmol}$

合成 cDNA 量 = $0.6\text{nmol dNTP} \times 330\text{ng/nmol} = 198\text{ng}$

mRNA 向 cDNA 转变率 = $198\text{ng} / 1000\text{ng} \times 100\% = 19.8\%$

由于 1000ng RNA 中 20%(5 μ l/25 μ l) 用于掺入测定, 而反应体积占总体积 80%, 因而实际第一链 cDNA 合成量为 $0.8 \times 198\text{ng} = 158\text{ng}$ 。

4. 第二链产量计算

除需去除第一链掺入 dNTP 外, 方法同第一链产量计算

第二链掺入率 = $\frac{\text{掺入放射性活性}}{\text{总放射性活性}}$

掺入 dNTP 量(nmol) = $[(0.4\text{nmol dNTP} / \mu\text{l} \times \text{反应体积}(\mu\text{l}) - \text{第一链掺入 nmol}) \times \text{第二链掺入率}]$

第二链 cDNA 合成量(ng) = $\text{nmol dNTP} \times 330\text{ng/nmol}$

双链 cDNA 转变率 = $\frac{\text{双链 cDNA 合成量(ng)}}{\text{单链 cDNA 合成量(ng)}}$

例: 第二链掺入放射性活性强度为 2780cpm, 总放射性活性强度为 235000cpm。

第二链掺入率 = $2780 / 235000 \times 100\% = 1.18\%$

第二链合成 dNTP 量 = $[(0.4\text{nmol} / \mu\text{l} \times 100 \mu\text{l}) - 0.48\text{nm}] \times 1.18\% = 0.47\text{nmol}$

合成第二链 cDNA 量(ng) = $0.47\text{nmol} \times 330\text{ng/nmol} = 155\text{ng}$

双链 cDNA 转变率 = $155\text{ng} / 158\text{ng} \times 100\% = 98\%$

一般 cDNA 第一链转变率和双链转变率以 12-50% 和 50-200% 为好。

(四) 电泳分析

通常合成的 cDNA 第一链和第二链长度为 350-6000 碱基,需进行 1.4%碱性琼脂糖电泳。将第一链和第二链掺入测定管中的反应液先用酚抽提,乙醇沉淀,方法见本章(二)第二链合成中的 9-12 步,一般第一链和第二链上样量相同。

1. 标准分子量 DNA 参照物的同位素标记

(1) 通常使用 DNA/Hind 片段,用 Klenow DNA 聚合酶进行 ^{32}P 标记

10 × Hind 缓冲液 2.5 μl

dATP 0.2mmol/L

dGTP 0.2mmol/L

[^{-32}P]dCTP(400Ci/mmol) 2 μCi

DNA/Hind 标准 DNA 1 μg

Klenow DNA 聚合酶 1 μ

加 H₂O 到总体积 25 μl

(2) 室温放置 10 分钟,加 2.5 μl 200mM EDTA 终止反应,加入 2 × 样品缓冲液,贮存于-20 。

2. 电泳分析

(1) 用 50mM NaCl, 1mM EDTA 制备 1.4%的碱性琼脂糖电泳,并置碱性电泳缓冲液中 30 分钟。

(2) 取样品液,用 TE 调整体积,使第一链和第二链产率测定液的体积相同,加入等体积的 2 × 样品缓冲液(20mmol/L NaOH, 20%甘油, 0.025%溴酚兰)。

(3) 加样,电泳到染料距前沿线只剩胶长度的 1/3 处,电泳缓冲液为 30mmol/L NaOH, 1mmol/L EDTA。

(4) 将胶浸入 7% TCA 中,室温放置 30 分钟(直至染料由蓝色变至黄色),取出置滤纸上,干燥数小时。

(5) 用保鲜膜包裹干燥的胶,室温压 X 光片(用增感屏时-70 压片)。

二、其它 cDNA 合成技术

除 Riboclone M-MLV(H-)cDNA 合成技术外, Promega 公司还提供有多个 AMV 合成试剂盒,不同试剂盒所提供的引物或引物一延接头(Primpr-Adaptor)不同,有 oligo(dT)15 引物、随机引物、Xba 引物-延接头、Not 引物-延接头等,其余试剂一样,这些系统包括:

20mg 引物

20ml 5 × 第一链缓冲液, 配方如下:

250mmol/L Tris · Cl, pH8.3(42); 250mmol/L KCl; 50mmol/L

MgCl₂; 2.5mmol/L 亚精胺(Spermidine); 50mmol/L DTT;

20mmol/L dATP, dCTP, dGTP, dTTP(各 5mmol/L)。

50ml 40mM 焦碳酸钠

625m rRNasin RNA 酶抑制剂

600m AMV 反转录酶

5mg 1.2kb 对照 RNA

200ml 10 × 第二链缓冲液, 配方如下:

400mmol/L Tris · Cl, pH7.2; 900mmol/L KCl; 30mmol/L

MgCl₂; 30mmol/L DTT; 0.5mg/ml BSA。

2m E.Coli RNaseH

500m E.Coli DNA Polymerase

100m T4 DNA Polymerase

1.5ml 不含核酸酶的水

以上所有试剂除对照 RNA 需在-70℃保存外，其余均可保存于-20℃，可以合成 40mg mRNA。

(一) 第一链合成

下面介绍的是 25ml 体积反应系统，该系统可合成多至 2mg mRNA，每增加 1mg mRNA，需增加反应体积 10ml，如 5mg mRNA 需 55ml 反应体积。

引物或引物-延接头和反转录酶与 mRNA 的比例应分别保持为 0.5mg/mg (对 NotI 引物-延接头为 0.3mg/mg) 和 15m/mg。

1、试剂：

[α -³²P]dCTP (>400ci/mmol), EDTA (50mM 和 200mM), TE 饱和酶/氯仿, 7.5mM NH₄Ac, 100% 和 70%乙醇, TE 缓冲液 (10mM Tris · Cl, pH8.0, 1mM EDTA)。

2、操作步骤：

(1) 取一灭菌的无 RNA 酶的 eppendorf 管加入的 RNA 样品，及引物或引物-延接头，用 H₂O 调节 0.5mg 引物/mg mRNA (或 0.3mg NotI 引物-延接头/mg mRNA) 的体积至 15ml，70℃加热 5 分钟，待冷至室温，离心数秒钟使溶液集中在管底，然后依次加入：

5× 第一链缓冲液 5ml

rRNasinR RNA 酶抑制剂 25ml

40mM 焦碳酸钠 2.5ml

AMV 反转录酶 15m/mg RNA

加无水 RNA 酶水至总体积 25ml

在加入焦碳酸钠和 AMV 反转录酶前，需将反应液 42℃温浴 5 分钟，以阻止焦碳酸钠沉淀。焦碳酸钠主要用于抑止第一链形成发夹结构。

(2) 轻弹 eppendorf 管，取出 5ml 至另一加有 2-5m [α -³²P]dCTP (>400ci/mmol) (其体积不能超过 1ml)，用以第一链同位素掺入放射性活性测定。

(3) 42℃温浴 1 小时。

(4) 取出置冰上。

(5) 掺入测定的 eppendorf 管加入 50mM EDTA，终止反应，并使总体积为 100ml。可取 90ml 进行电泳分析，另 10ml 进行同位素掺入测定。

(6) 第一链合成离心管可直接用于第二链合成。

(二) 第二链合成

第二链合成可在第一链合成反应液中直接进行。

1、第一链反应液 (20ml) 中依次加入

10X 第二链缓冲液 10ml

E.Coli DNA polymerase 23m

E.Coli RNaseH 0.8m

加无核酸酶水至总体积 100ml

余下步骤同本章第四节一 (二) 2-12 步及 (三) 和 (四)。

思考题：

1. 为什么 mRNA 提取是 cDNA 合成成败的关键？
2. 试比较自导引法和置换合成法合成 cDNA 的优缺点。

第五章 重组质粒的连接、转化及筛选

第一节 概述

质粒具有稳定可靠和操作简便的优点。如果要克隆较小的 DNA 片段(< 10kb)且结构简单,质粒要比其它任何载体都要好。在质粒载体上进行克隆,从原理上说是很简单的,先用限制性内切酶切割质粒 DNA 和目的 DNA 片段,然后体外使两者相连接,再用所得重组质粒转化细菌,即可完成。但在实际工作中,如何区分插入有外源 DNA 的重组质粒和无插入而自身环化的载体分子是较为困难的。通过调整连接反应中外源 DNA 片段和载体 DNA 的浓度比例,可以将载体的自身环化限制在一定程度之下,也可以进一步采取一些特殊的克隆策略,如载体去磷酸化等来最大限度的降低载体的自身环化,还可以利用遗传学手段如 互补现象等来鉴别重组子和非重组子。

外源 DNA 片段和质粒载体的连接反应策略有以下几种:

1、带有非互补突出端的片段 用两种不同的限制性内切酶进行消化可以产生带有非互补的粘性末端,这也是最容易克隆的 DNA 片段,一般情况下,常用质粒载体均带有多个不同限制酶的识别序列组成的多克隆位点,因而几乎总能找到与外源 DNA 片段末端匹配的限制酶切位点的载体,从而将外源片段定向地克隆到载体上。也可在 PCR 扩增时,在 DNA 片段两端人为加上不同酶切位点以便与载体相连。

2、带有相同的粘性末端 用相同的酶或同尾酶处理可得到这样的末端。由于质粒载体也必须用同一种酶消化,亦得到同样的两个相同粘性末端,因此在连接反应中外源片段和质粒载体 DNA 均可能发生自身环化或几个分子串连形成寡聚物,而且正反两种连接方向都可能。所以,必须仔细调整连接反应中两种 DNA 的浓度,以便使正确的连接产物的数量达到最高水平。还可将载体 DNA 的 5'磷酸基团用碱性磷酸酯酶去掉,最大限度地抑制质粒 DNA 的自身环化。带 5'端磷酸的外源 DNA 片段可以有效地与去磷酸化的载体相连,产生一个带有两个缺口的开环分子,在转入 E. coli 受体菌后的扩增过程中缺口可自动修复。

3、带有平末端 是由产生平末端的限制酶或核酸外切酶消化产生,或由 DNA 聚合酶补平所致。由于平端的连接效率比粘性末端要低得多,故在其连接反应中,T4 DNA 连接酶的浓度和外源 DNA 及载体 DNA 浓度均要高得多。通常还需加入低浓度的聚乙二醇(PEG 8000)以促进 DNA 分子凝聚成聚集体的物质以提高转化效率。

特殊情况下,外源 DNA 分子的末端与所用的载体末端无法相互匹配,则可以在线状质粒载体末端或外源 DNA 片段末端接上合适的接头(linker)或衍接头(adapter)使其匹配,也可以有控制的使用 E. coli DNA 聚合酶 的 klenow 大片段部分填平 3'凹端,使不相匹配的末端转变为互补末端或转为平末端后再进行连接。

本实验所使用的载体质粒 DNA 为 pBS,转化受体菌为 E. coli DH5 菌株。由于 pBS 上带有 Amp^r 和 lacZ 基因,故重组子的筛选采用 Amp^r 抗性筛选与 -互补现象筛选相结合的方法。

因 pBS 带有 Amp^r 基因而外源片段上不带该基因,故转化受体菌后只有带有 pBS DNA 的转化子才能在含有 Amp 的 LB 平板上存活下来;而只带有自身环化的外源片段的转化子则不能存活。此为初步的抗性筛选。

pBS 上带有 -半乳糖苷酶基因(lacZ)的调控序列和 -半乳糖苷酶 N 端 146 个氨基酸的编码序列。这个编码区中插入了一个多克隆位点,但并没有破坏 lacZ 的阅读框架,不影响其正常功能。E. coli DH5

菌株带有 -半乳糖苷酶 C 端部分序列的编码信息。在各自独立的情况下,pBS 和 DH5 编码的 -半乳糖苷酶的片段都没有酶活性。但在 pBS 和 DH5 融为一体时可形成具有酶活性的蛋白质。这种 lacZ 基因上缺失近操纵基因区段的突变体与带有完整的近操纵基因区段的 -半乳糖苷酶阴性突变体之间实现互补的现象叫 -互补。由 -互补产生的 Lac⁺ 细菌较易识别,它在生色底物 X-gal(5-溴-4-氯-3-吡啶- -D-半乳糖苷)下存在下被 IPTG(异丙基硫代- -D-半乳糖苷)诱导形成蓝色菌落。当外源片段插入到 pBS 质粒的多克隆位点上后会导致读码框架改变,表达蛋白失活,产生的氨基酸片段失去 -互补能力,因此在同样条件下含重组质粒的转化子在生色诱导培养基上只能形成白色菌落。在麦康凯培养基上, -互补产生的 Lac⁺细菌由于含 -半乳糖苷酶,能分解麦康凯培养基中的乳糖,产生乳

酸,使 pH 下降,因而产生红色菌落,而当外源片段插入后,失去 α -互补能力,因而不产生 α -半乳糖苷酶,无法分解培养基中的乳糖,菌落呈白色。由此可将重组质粒与自身环化的载体 DNA 分开。此为 α -互补现象筛选。

第二节 材料、设备及试剂

一、材料

外源 DNA 片段:自行制备的带限制性末端的 DNA 溶液,浓度已知;载体 DNA: pBS 质粒 (Ampr, lacZ),自行提取纯化,浓度已知;宿主菌: E. coli DH5⁺ 或 JM 系列等具有 α -互补能力的菌株。

二、设备

恒温摇床,台式高速离心机,恒温水浴锅,琼脂糖凝胶电泳装置,电热恒温培养箱,电泳仪无菌,工作台,微量移液枪, eppendorf 管。

三、试剂

1、连接反应缓冲液($10\times$): 0.5mol/L Tris·Cl (pH7.6), 100mol/L MgCl₂, 100mol/L 二硫苏糖醇(DTT)(过滤灭菌), 500 μ g/ml 牛血清清蛋白(组分 V.Sigma 产品)(可用可不用), 10mol/L ATP(过滤灭菌)。

2、T4 DNA 连接酶(T4 DNA ligase); 购买成品。

3、X-gal 储液(20mg/ml): 用二甲基甲酰胺溶解 X-gal 配制成 20mg/ml 的储液,包以铝箔或黑纸以防止受光照被破坏,储存于-20 $^{\circ}$ 。

4、IPTG 储液(200mg/ml): 在 800 μ l 蒸馏水中溶解 200mg IPTG 后,用蒸馏水定容至 1ml,用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌,分装于 eppendorf 管并储于-20 $^{\circ}$ 。

5、麦康凯选择性培养基(Macconkey Agar): 取 52g 麦康凯琼脂加蒸馏水 1000ml,微火煮沸至完全溶解,高压灭菌,待冷至 60 $^{\circ}$ 左右加入 Amp 储存液使终浓度为 50mg/ml,然后摇匀后涂板。

6、含 X-gal 和 IPTG 的筛选培养基:在事先制备好的含 50 μ g/ml Amp 的 LB 平板表面加 40ml X-gal 储液和 4 μ l IPTG 储液,用无菌玻棒将溶液涂匀,置于 37 $^{\circ}$ 下放置 3-4 小时,使培养基表面的液体完全被吸收。

7、感受态细胞制备试剂: 见第三章。

8、煮沸法快速分离质粒试剂: 见第一章。

9、质粒酶及电泳试剂: 见第二章。

第三节 操作步骤

一、连接反应

1、取新的经灭菌处理的 0.5ml eppendorf 管,编号。

2、将 0.1 μ g 载体 DNA 转移到无菌离心管中,加等摩尔量(可稍多)的外源 DNA 片段。

3、加蒸馏水至体积为 8 μ l,于 45 $^{\circ}$ 保温 5 分钟,以使重新退火的粘端解链。将混和物冷却至 0 $^{\circ}$ 。

4、加入 $10\times$ T4 DNA ligase buffer 1 μ l, T4 DNA ligase 0.5 μ l,混匀后用微量离心机将液体全部甩到管底,于 16 $^{\circ}$ 保温 8-24 小时。

同时做二组对照反应,其中对照组一只有质粒载体无外源 DNA;对照组二只有外源 DNA 片段没有质粒载体。

二、E. coli DH5⁺ 感受态细胞的制备及转化

每组连接反应混和物各取 2 μ l 转化 E. coli DH5⁺ 感受态细胞。具体方法见第三章。

三、重组质粒的筛选

1、每组连接反应转化原液取 100 μ l 用无菌玻棒均匀涂布于筛选培养基上,37 $^{\circ}$ 下培养半小时以上,直至液体被完全吸收。

2、倒置平板于 37 $^{\circ}$ 继续培养 12-16 小时,待出现明显而又未相互重叠的单菌落时拿出平板。

3、放于 4℃ 数小时,使显色完全(此步麦康凯培养基不做)。

不带有 pBS 质粒 DNA 的细胞,由于无 Amp 抗性,不能在含有 Amp 的筛选培养基上成活。带有 pBS 载体的转化子由于具有 β -半乳糖苷酶活性,在麦康凯筛选培养基上呈现为红色菌落。在 X-gal 和 IPTG 培养基上为蓝色菌落。带有重组质粒转化子由于丧失了 β -半乳糖苷酶活性,在麦康凯选择性培养基和 x-gal 和 IPTG 培养基上均为白色菌落。

四、酶切鉴定重组质粒

用无菌牙签挑取白色单菌落接种于含 Amp 50 μ g/ml 的 5ml LB 液体培养基中,37℃ 下振荡培养 12 小时。使用煮沸法快速分离质粒 DNA 直接电泳,同时以煮沸法抽提的 pBS 质粒做对照,有插入片段的重组质粒电泳时迁移率较 pBS 慢。再用与连接末端相对应的限制性内切酶进一步进行酶切检验。还可用杂交法筛选重组质粒。

[注意] 1、DNA 连接酶用量与 DNA 片段的性质有关,连接平齐末端,必须加大酶量,一般使用连接粘性末端酶量的 10-100 倍。

2、在连接带有粘性末端的 DNA 片段时,DNA 浓度一般为 2-10mg/ml,在连接平齐末端时,需加入 DNA 浓度至 100-200mg/ml。

3、连接反应后,反应液在 0℃ 储存数天,-80℃ 储存 2 个月,但是在-20℃ 冰冻保存将会降低转化效率。

4、粘性末端形成的氢键在低温下更加稳定,所以尽管 T4 DNA 连接酶的最适反应温度为 37℃,在连接粘性末端时,反应温度以 10-16℃ 为好,平齐末端则以 15-20℃ 为好。

5、在连接反应中,如不对载体分子进行去 5'磷酸基处理,使用过量的外源 DNA 片段(2-5 倍),这将有助于减少载体的自身环化,增加外源 DNA 和载体连接的机会。

6、麦康凯选择性琼脂组成的平板,在含有适当抗生素时,携有载体 DNA 的转化子为淡红色菌落,而携有带插入片段的重组质粒转化子为白色菌落。该产品筛选效果同蓝白斑筛选,且价格低廉。但需及时挑取白色菌落,当培养时间延长,白色菌落会逐渐变成微红色,影响挑选。

7、X-gal 是 5-溴-4-氯-3-吲哚-b-D-半乳糖(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactoside)以半乳糖苷酶(β -galactosidase)水解后生成的吲哚衍生物显蓝色。IPTG 是异丙基硫代半乳糖苷(Isopropylthiogalactoside),为非生理性的诱导物,它可以诱导 lacZ 的表达。

8、在含有 X-gal 和 IPTG 的筛选培养基上,携带载体 DNA 的转化子为蓝色菌落,而携带插入片段的重组质粒转化子为白色菌落,平板如在 37℃ 培养后放于冰箱 3-4 小时可使显色反应充分,蓝色菌落明显。

思考题

1. 在用质粒载体进行外源 DNA 片段克隆时主要应考虑哪些因素?
2. 利用 β -互补现象筛选带有插入片段的重组克隆的原理是什么?

第六章 基因组 DNA 的提取

第一节 概述

基因组 DNA 的提取通常用于构建基因组文库、Southern 杂交(包括 RFLP)及 PCR 分离基因等。利用基因组 DNA 较长的特性,可以将其与细胞器或质粒等小分子 DNA 分离。加入一定量的异丙醇或乙醇,基因组的大分子 DNA 即沉淀形成纤维状絮团飘浮其中,可用玻棒将其取出,而小分子 DNA 则只形成颗粒状沉淀附于壁上及底部,从而达到提取的目的。在提取过程中,染色体会发生机械断裂,产生大小不同的片段,因此分离基因组 DNA 时应尽量在温和的条件下操作,如尽量减少酚/氯仿抽提、混匀过程要轻缓,以保证得到较长的 DNA。一般来说,构建基因组文库,初始 DNA 长度必须在 100kb 以上,否则酶切后两边都带合适末端的有效片段很少。而进行 RFLP 和 PCR 分析,DNA 长度可短至 50kb,在该长度以上,可保证酶切后产生 RFLP 片段(20kb 以下),并可保证包含 PCR 所扩增的片段(一般 2kb 以下)。

不同生物（植物、动物、微生物）的基因组 DNA 的提取方法有所不同；不同种类或同一种类的不同组织因其细胞结构及所含的成分不同，分离方法也有差异。在提取某种特殊组织的 DNA 时必须参照文献和经验建立相应的提取方法，以获得可用的 DNA 大分子。尤其是组织中的多糖和酶类物质对随后的酶切、PCR 反应等有较强的抑制作用，因此用富含这类物质的材料提取基因组 DNA 时，应考虑除去多糖和酚类物质。

本实验以水稻幼苗(禾本科)、李(苹果)叶子、动物肌肉组织和大肠杆菌培养物为材料,学习基因组 DNA 提取的一般方法。

第二节 从植物组织提取基因组 DNA

一、材料

水稻幼苗或其它禾本科植物，李（苹果）幼嫩叶子。

二、设备

移液器，冷冻高速离心机，台式高速离心机，水浴锅，陶瓷研钵，50ml 离心管（有盖）及 5ml 和 1.5ml 离心管，弯成钩状的小玻棒。

三、试剂

1、提取缓冲液：100mmol/L Tris · Cl, pH8.0, 20mmol/L EDTA, 500mmol/L NaCl, 1.5% SDS。

2、提取缓冲液：18.6g 葡萄糖，6.9g 二乙基二硫代碳酸钠，6.0gPVP，240ul 巯基乙醇，加水至 300ml。

3、80:4:16/氯仿:戊醇:乙醇

4、RnaseA 母液：配方见第一章。

5、其它试剂：液氮、异丙醇、TE 缓冲液，无水乙醇、70%乙醇、3mol/L NaAc。

四、操作步骤：

（一）水稻幼苗或其它禾本科植物基因组 DNA 提取

1. 在 50ml 离心管中加入 20ml 提取缓冲液，60℃ 水浴预热。

2. 水稻幼苗或叶子 5-10g，剪碎，在研钵中加液氮磨成粉状后立即倒入预热的离心管中，剧烈摇动混匀，60℃ 水浴保温 30-60 分钟(时间长,DNA 产量高)，不时摇动。

3. 加入 20ml 氯仿/戊醇/乙醇溶液，颠倒混匀(需带手套，防止损伤皮肤)，室温下静置 5-10 分钟，使水相和有机相分层(必要时可重新混匀)。

4. 室温下 5000rpm 离心 5 分钟。

5. 仔细移取上清液至另一 50ml 离心管,加入 1 倍体积异丙醇,混匀,室温下放置片刻即出现絮状 DNA 沉淀。

6. 在 1.5ml eppendorf 中加入 1ml TE。用钩状玻璃棒捞出 DNA 絮团,在干净吸水纸上吸干,转入含 TE 的离心管中,DNA 很快溶解于 TE。

7. 如 DNA 不形成絮状沉淀,则可用 5000rpm 离心 5 分钟，再将沉淀移入 TE 管中。这样收集的沉淀,往往难溶解于 TE,可在 60℃ 水浴放置 15 分钟以上，以帮助溶解。

8. 将 DNA 溶液 3000rpm 离心 5 分钟，上清液倒入干净的 5ml 离心管。

9. 加入 5 μ l RNaseA(10 μ g/ μ l), 37℃ 10 分钟，除去 RNA(RNA 对 DNA 的操作、分析一般无影响，可省略该步骤)。

10. 加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc 及 2 \times 体积的冰乙醇,混匀,-20℃ 放置 20 分钟左右,DNA 形成絮状沉淀。

11. 用玻棒捞出 DNA 沉淀,70%乙醇漂洗,再在干净吸水纸上吸干。

12. 将 DNA 重溶解于 1ml TE, -20℃ 贮存。

13. 取 2 μ l DNA 样品在 0.7% Agarose 胶上电泳，检测 DNA 的分子大小。同时取 15 μ l 稀释 20 倍，测定 OD260/OD280，检测 DNA 含量及质量。

[注意] 5g 样品可保证获得 500 μ g DNA, 足供 RFLP、PCR 等分析之用。

(二) . 从李(苹果)叶子提取基因组 DNA

1. 取 3-5 克嫩叶, 液氮磨成粉状。
2. 加入提取缓冲液 10ml, 再研磨至溶浆状。10000rpm, 10min。
3. 去上清液, 沉淀加提取液 20ml, 混匀。65 $^{\circ}$ C, 30-60min, 常摇动。
4. 同本节 (一) 中步骤 3-13 操作。

第三节 从动物组织提取基因组 DNA

一、材料

哺乳动物新鲜组织。

二、设备

移液管、高速冷冻离心机、台式离心机、水浴锅。

三、试剂

- 1、分离缓冲液: 10mmol/L Tris \cdot Cl pH7.4, 10mmol/L NaCl, 25mmol/L EDTA。
- 2、其它试剂: 10% SDS, 蛋白酶 K (20mg/ml 或粉剂), 乙醚, 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1), 无水乙醇及 70%乙醇, 5mol/L NaCl, 3mol/L NaAc, TE。

四、操作步骤:

1. 切取组织 5g 左右, 剔除结缔组织, 吸水纸吸干血液, 剪碎放入研钵(越细越好)。
2. 倒入液氮, 磨成粉末, 加 10ml 分离缓冲液。
3. 加 1ml 10% SDS, 混匀, 此时样品变得很粘稠。
4. 加 50 μ l 或 1mg 蛋白酶 K, 37 $^{\circ}$ C 保温 1-2 小时, 直到组织完全解体。
5. 加 1ml 5mol/L NaCl, 混匀, 5000rpm 离心数秒钟。
6. 取上清液于新离心管, 用等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提。待分层后, 3000rpm 离心 5 分钟。
7. 取上层水相至干净离心管, 加 2 倍体积乙醚抽提(在通风情况下操作)。
8. 移去上层乙醚, 保留下层水相。
9. 加 1/10 体积 3mol/L NaAc, 及 2 倍体积无水乙醇颠倒混合沉淀 DNA。室温下静止 10-20 分钟, DNA 沉淀形成白色絮状物。
10. 用玻棒钩出 DNA 沉淀, 70%乙醇中漂洗后, 在吸水纸上吸干, 溶解于 1ml TE 中, -20 $^{\circ}$ C 保存。
11. 如果 DNA 溶液中有不溶解颗粒, 可在 5000rpm 短暂离心, 取上清; 如要除去其中的 RNA, 可加 5 μ l RNaseA(10 μ g/ μ l), 37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟, 用酚抽提后, 按步骤 9-10 重沉淀 DNA。

第四节 细菌基因组 DNA 的制备

一、材料

细菌培养物。

二、设备

移液管, 高速冷冻离心机, 台式离心机, 水浴锅。

三、试剂

- 1、CTAB/NaCl 溶液: 4.1g NaCl 溶解于 80ml H₂O, 缓慢加入 10g CTAB, 加水至 100ml。
- 2、其它试剂: 氯仿:异戊醇(24:1), 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1), 异丙醇, 70%乙醇, TE, 10% SDS, 蛋白酶 K (20mg/ml 或粉剂), 5mol/L NaCl。

四、操作步骤:

1. 100ml 细菌过夜培养液, 5000rpm 离心 10 分钟, 去上清液。
2. 加 9.5ml TE 悬浮沉淀, 并加 0.5ml 10% SDS, 50 μ l 20mg/ml(或 1mg 干粉)蛋白酶 K, 混匀,

37 保温 1 小时。

3. 加 1.5ml 5mol/L NaCl, 混匀。

4. 加 1.5ml CTAB/NaCl 溶液, 混匀, 65 °C 保温 20 分钟。

5. 用等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提, 5000rpm 离心 10 分钟, 将上清液移至干净离心管。

6. 用等体积氯仿:异戊醇(24:1)抽提, 取上清液移至干净管中。

7. 加 1 倍体积异丙醇, 颠倒混合, 室温下静置 10 分钟, 沉淀 DNA。

8. 用玻棒捞出 DNA 沉淀, 70%乙醇漂洗后, 吸干,溶解于 1ml TE, -20 °C 保存。如 DNA 沉淀无法捞出,可 5000rpm 离心, 使 DNA 沉淀。

9. 如要除去其中的 RNA, 可以按本章第三节中操作步骤处理。

第五节 基因组 DNA 的检测

上述方法得到的 DNA 一般可以用作 Southern, RFLP、PCR 等分析。由于所用材料的不同,得到的 DNA 产量及质量均不同,有时 DNA 中含有酚类和多糖类物质,会影响酶切和 PCR 的效果。所以获得基因组 DNA 后,均需检测 DNA 的产量和质量。

1. DNA 溶液稀释 20-30 倍后,测定 OD₂₆₀ /OD₂₈₀ 比值, 明确 DNA 的含量和质量。

2. 取 2-5 μl 在 0.7% agarose 胶上电泳, 检测 DNA 的分子大小。

3. 取 2 μg DNA, 用 10 单位(U)Hind III 酶切过夜, 0.7% agarose 胶上电泳, 检测能否完全酶解(做 RFLP, DNA 必须完全酶解)。

如果 DNA 中所含杂质多, 不能完全酶切, 或小分子 DNA 多, 影响接续的分析和操作,可以用下列方法处理:

(1) 选用幼嫩植物组织, 可减少淀粉类的含量。

(2) 酚:氯仿抽提, 去除蛋白质和多糖。

(3) Sepharose 柱过滤, 去除酚类、多糖和小分子 DNA。

(4) CsCl 梯度离心, 去除杂质, 分离大片段 DNA(可用作文库构建)。

思考题:

1. 为什么构建 DNA 文库时,一定要用大分子 DNA ?

2. 如何检测和保证 DNA 的质量 ?

第七章 RFLP 和 RAPD 技术

第一节 概述

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。RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism,限制片段长度多态性)已被广泛用于基因组遗传图谱构建、基因定位以及生物进化和分类的研究。RFLP 是根据不同品种(个体)基因组的限制性内切酶的酶切位点碱基发生突变,或酶切位点之间发生了碱基的插入、缺失,导致酶切片段大小发生了变化,这种变化可以通过特定探针杂交进行检测,从而可比较不同品种(个体)的 DNA 水平的差异(即多态性),多个探针的比较可以确立生物的进化和分类关系。所用的探针为来源于同种或不同种基因组 DNA 的克隆,位于染色体的不同位点,从而可以作为一种分子标记(Mark),构建分子图谱。当某个性状(基因)与某个(些)分子标记协同分离时,表明这个性状(基因)与分子标记连锁。分子标记与性状之间交换值的大小,即表示目标基因与分子标记之间的距离,从而可将基因定位于分子图谱上。分子标记克隆在质粒上,可以繁殖及保存。不同限制性内切酶切割基因组 DNA 后,所切的片段类型不一样,因此,限制性内切酶与分子标记组成不同组合进行研究。常用的限制性内切酶一般是 Hind III, BamH I, EcoR I, EcoRV, Xba I, 而分子标记则有几个甚至上千个。分子标记越多,则所构建的图谱就越饱和。构建饱和图谱是 RFLP 研究的主要目标之一。

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)。尽管 RAPD 技术诞生的时间很短,但由于其独特的检测 DNA 多态性的方式以及快速、简便的特点,使这个技术已渗透于基因组研究的各个方面。该 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。RAPD 所用的一系列引物 DNA 序列各不相同,但对于任一特异的引物,它同基因组 DNA 序列有其特异的结合位点。这些特异的结合位点在基因组某些区域内的分布如符合 PCR 扩增反应的条件,即引物在模板的两条链上有互补位置,且引物 3'端相距在一定的长度范围之内,就可扩增出 DNA 片段。因此如果基因组在这些区域发生 DNA 片段插入、缺失或碱基突变就可能导致这些特定结合位点分布发生相应的变化,而使 PCR 产物增加、缺少或发生分子量的改变。通过对 PCR 产物检测即可检出基因组 DNA 的多态性。分析时可用的引物数很大,虽然对每一个引物而言其检测基因组 DNA 多态性的区域是有限的,但是利用一系列引物则可以使检测区域几乎覆盖整个基因组。因此 RAPD 可以对整个基因组 DNA 进行多态性检测。另外, RAPD 片段克隆后可作为 RFLP 的分子标记进行作图分析。

本实验将学习 RFLP 的酶切,电泳和膜的制作以及 RAPD 技术。探针标记及杂交检测方法请另详见分子杂交技术。

第二节 RFLP 技术

一、材料

基因组 DNA(大于 50kb,分别来自不同的材料)。

二、设备

电泳仪及电泳槽, 照相用塑料盆 5 只,玻璃或塑料板(比胶块略大) 4 块,吸水纸若干,尼龙膜(依胶大小而定),滤纸, eppendorf 管(0.5ml)若干。

三、试剂:

- 1、限制性内切酶(BamH¹, EcoR¹, Hind³, Xba¹)及 10×酶切缓冲液。
- 2、5×TBE 电泳缓冲液:配方见第一章。
- 3、变性液:0.5mol/L NaOH, 1.5mol/L NaCl。
- 4、中和液:1mol/L Tris·Cl, pH7.5/1.5mol/L NaCl。
- 5、10×SSC:配方见第九章。
- 6、其它试剂:0.4mol/L NaOH, 0.2mol/L Tris·Cl, pH7.5/2×SSC, ddH₂O, Agarose 0.8%, 0.25mol/L HCl。

四. 操作步骤

1. 基因组 DNA 的酶解

(1) 大片断 DNA 的提取详见基因组 DNA 提取实验,要求提取的 DNA 分子量大于 50kb, 没有降解。

(2) 在 50 μl 反应体系中,进行酶切反应:

5 μg 基因组 DNA

5 μl 10×酶切缓冲液

20 单位(U) 限制酶(任意一种)

加 ddH₂O, 至 50 μl

(3) 轻微振荡, 离心,37℃ 反应过夜。

(4) 取 5 μl 反应液,0.8%琼脂糖电泳观察酶切是否彻底,这时不应有大于 30kb 的明显亮带出现。

[注意] 未酶切的 DNA 要防止发生降解,酶切反应一定要彻底。

2. Southern 转移

- (1) 酶解的 DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳(可 18V 过夜)后 EB 染色观察。
- (2) 将凝胶块浸没于 0.25mol/L HCl 中脱嘌呤, 10 分钟。
- (3) 取出胶块, 蒸馏水漂洗, 转至变性液变性 45 分钟。经蒸馏水漂洗后转至中和液中和 30 分钟。
- (4) 预先将尼龙膜、滤纸浸入水中, 再浸入 $10 \times \text{SSC}$ 中, 将一玻璃板架于盆中铺一层滤纸(桥)然后将胶块反转放置, 盖上尼龙膜, 上覆二层滤纸, 再加盖吸水纸, 压上半公斤重物, 以 $10 \times \text{SSC}$ 盐溶液吸印, 维持 18-24 小时。也可用电转移或真空转移。
- (5) 取下尼龙膜, 0.4mol/L NaOH 30 秒, 迅速转至 0.2mol/L Tris · Cl, pH7.5/2 $\times \text{SSC}$ 溶液中, 5 分钟。
- (6) 将膜夹于 2 层滤纸内, 80 °C 真空干燥 2 小时。
- (7) 探针的制备和杂交见第九章分子杂交。

第七章 RFLP 和 RAPD 技术

第一节 概述

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。RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism, 限制片段长度多态性)已被广泛用于基因组遗传图谱构建、基因定位以及生物进化和分类的研究。RFLP 是根据不同品种(个体)基因组的限制性内切酶的酶切位点碱基发生突变, 或酶切位点之间发生了碱基的插入、缺失, 导致酶切片段大小发生了变化, 这种变化可以通过特定探针杂交进行检测, 从而可比较不同品种(个体)的 DNA 水平的差异(即多态性), 多个探针的比较可以确立生物的进化和分类关系。所用的探针为来源于同种或不同种基因组 DNA 的克隆, 位于染色体的不同位点, 从而可以作为一种分子标记(Mark), 构建分子图谱。当某个性状(基因)与某个(些)分子标记协同分离时, 表明这个性状(基因)与分子标记连锁。分子标记与性状之间交换值的大小, 即表示目标基因与分子标记之间的距离, 从而可将基因定位于分子图谱上。分子标记克隆在质粒上, 可以繁殖及保存。不同限制性内切酶切割基因组 DNA 后, 所切的片段类型不一样, 因此, 限制性内切酶与分子标记组成不同组合进行研究。常用的限制性内切酶一般是 Hind III, BamHI, EcoRI, EcoRV, XbaI, 而分子标记则有几个甚至上千个。分子标记越多, 则所构建的图谱就越饱和。构建饱和图谱是 RFLP 研究的主要目标之一。

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)。尽管 RAPD 技术诞生的时间很短, 但由于其独特的检测 DNA 多态性的方式以及快速、简便的特点, 使这个技术已渗透于基因组研究的各个方面。该 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。RAPD 所用的一系列引物 DNA 序列各不相同, 但对于任一特异的引物, 它同基因组 DNA 序列有其特异的结合位点。这些特异的结合位点在基因组某些区域内的分布如符合 PCR 扩增反应的条件, 即引物在模板的两条链上有互补位置, 且引物 3'端相距在一定的长度范围之内, 就可扩增出 DNA 片段。因此如果基因组在这些区域发生 DNA 片段插入、缺失或碱基突变就可能导致这些特定结合位点分布发生相应的变化, 而使 PCR 产物增加、缺少或发生分子量的改变。通过对 PCR 产物检测即可检出基因组 DNA 的多态性。分析时可用的引物数很大, 虽然对每一个引物而言其检测基因组 DNA 多态性的区域是有限的, 但是利用一系列引物则可以使检测区域几乎覆盖整个基因组。因此 RAPD 可以对整个基因组 DNA 进行多态性检测。另外, RAPD 片段克隆后可作为 RFLP 的分子标记进行作图分析。

本实验将学习 RFLP 的酶切、电泳和膜的制作以及 RAPD 技术。探针标记及杂交检测方法请另详见分子杂交技术。

第二节 RFLP 技术

一、材料

基因组 DNA(大于 50kb,分别来自不同的材料)。

二、设备

电泳仪及电泳槽, 照相用塑料盆 5 只,玻璃或塑料板(比胶块略大) 4 块,吸水纸若干,尼龙膜(依胶大小而定),滤纸, eppendorf 管(0.5ml)若干。

三、试剂:

- 1、限制性内切酶(BamH¹, EcoR¹, Hind¹, Xba¹)及 10× 酶切缓冲液。
- 2、5× TBE 电泳缓冲液: 配方见第一章。
- 3、变性液: 0.5mol/L NaOH, 1.5mol/L NaCl。
- 4、中和液: 1mol/L Tris · Cl, pH7.5/1.5mol/L NaCl。
- 5、10× SSC: 配方见第九章。
- 6、其它试剂: 0.4mol/L NaOH, 0.2mol/L Tris · Cl, pH7.5/2× SSC, ddH₂O, Agarose 0.8%, 0.25mol/L HCl。

四. 操作步骤

1. 基因组 DNA 的酶解

(1) 大片断 DNA 的提取详见基因组 DNA 提取实验,要求提取的 DNA 分子量大于 50kb, 没有降解。

(2) 在 50 μl 反应体系中,进行酶切反应:

5 μg 基因组 DNA

5 μl 10× 酶切缓冲液

20 单位 (U) 限制酶(任意一种)

加 ddH₂O, 至 50 μl

(3) 轻微振荡, 离心,37⁰ 反应过夜。

(4) 取 5 μl 反应液,0.8% 琼脂糖电泳观察酶切是否彻底,这时不应有大于 30kb 的明显亮带出现。

[注意] 未酶切的 DNA 要防止发生降解, 酶切反应一定要彻底。

2. Southern 转移

(1) 酶解的 DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳(可 18V 过夜)后 EB 染色观察。

(2) 将凝胶块浸没于 0.25mol/L HCl 中脱嘌呤, 10 分钟。

(3) 取出胶块, 蒸馏水漂洗, 转至变性液变性 45 分钟。经蒸馏水漂洗后转至中和液中和 30 分钟。

(4) 预先将尼龙膜,滤纸浸入水中,再浸入 10× SSC 中,将一玻璃板架于盆中铺一层滤纸(桥)然后将胶块反转放置,盖上尼龙膜,上覆二层滤纸,再加盖吸水纸,压上半公斤重物,以 10× SSC 盐溶液吸印,维持 18-24 小时。也可用电转移或真空转移。

(5) 取下尼龙膜, 0.4mol/L NaOH 30 秒, 迅速转至 0.2mol/L Tris · Cl,pH7.5/2× SSC,溶液中, 5 分钟。

(6) 将膜夹于 2 层滤纸内, 80⁰ 真空干燥 2 小时。

(7) 探针的制备和杂交见第九章分子杂交部分。

[注意] 1、 步骤 (2) 中脱嘌呤时间不能过长。

2、 除步骤 (1) \ (4) \ (5) 外, 其余均在摇床上进行操作。

3、 步骤 (4) 中,当尼龙膜覆于胶上时, 绝对防止胶与膜之间有气泡发生, 加盖滤时也不应有气泡发生。

4、 有时用一种限制性内切酶不能发现 RFLP 的差异, 这时应该试用另一种酶。

第三节 RAPD 技术

一、材料

不同来源的 DNA(50ng/ul)。

二、设备

PCR 仪, PCR 管或硅化的 0.5ml eppendorf 管, 电泳装置。

三、试剂

1、随机引物(10mer) (5umol/L) : 购买成品。

2、Taq 酶: 购买成品。

3、10xPCR 缓冲液: 配方见第八章。

4、MgCl₂ : 25mmol/L。

5、dNTP : 每种 2.5mmol/L。

四、操作步骤:

1. 在 25ul 反应体系中,加入

模板 DNA 1ul (50ng)

随机引物 1ul (约 5pmol)

10xPCR Buffer 2.5ul

MgCl₂ 2ul

dNTP 2ul

Taq 酶 1 单位 (U)

加 ddH₂O 至 25ul

混匀稍离心, 加一滴矿物油。

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

3. 循环结束后, 72 ° 10 分钟, 4 ° 保存。

4. 取 PCR 产物 15ul 加 3ul 上样缓冲液(6x)于 2% 琼脂糖胶上电泳, 稳压 50-100 V (电压低带型整齐, 分辨率高)。

5. 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。

思考题

1. DNA 酶切反应不彻底会有何结果? DNA 发生降解有何影响?

2. Southern 转移中脱嘌呤时间为何不能太长?

3. 随机引物扩增, 为什么会产生 DNA 双链产物?

第八章 聚合酶链式反应(PCR)扩增和扩增产物克隆



第一节 概述

PCR(Polymerase Chain Reaction, 聚合酶链反应)是一种选择性体外扩增 DNA 或 RNA 的方法. 它包括三个基本步骤: (1) 变性(Denature): 目的双链 DNA 片段在 94 ° 下解链; (2) 退火(Anneal): 两种寡核苷酸引物在适当温度(50 ° 左右)下与模板上的目的序列通过氢键配对; (3) 延伸(Extension): 在 Taq DNA 聚合酶合成 DNA 的最适温度下, 以目的 DNA 为模板进行合成. 由这三个基本步骤组成一轮循环, 理论上每一轮循环将使目的 DNA 扩增一倍 (图 4), 这些经合成产生的 DNA 又可作为下一轮循环的模板, 所以经 25-35 轮循环就可使 DNA 扩增达 10⁶ 倍。

一、PCR 反应中的主要成份

1. 引物: PCR 反应产物的特异性由一对上下游引物所决定。引物的好坏往往是 PCR 成败的关键。

引物设计和选择目的 DNA 序列区域时可遵循下列原则：(1) 引物长度约为 16-30bp，太短会降低退火温度影响引物与模板配对，从而使非特异性增高。太长则比较浪费，且难以合成。(2) 引物中 G+C 含量通常为 40%-60%，可按下式粗略估计引物的解链温度 $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ 。(3) 四种碱基应随机分布，在 3'端不存在连续 3 个 G 或 C，因这样易导致错误引发。(4) 引物 3'端最好与目的序列阅读框架中密码子第一或第二位核苷酸对应，以减少由于密码子摆动产生的不配对。(5) 在引物内，尤其在

3'端应不存在二级结构。 两引物之间尤其在 3'端不能互补，以防出现引物二聚体，减少产量。两引物间最好不存在 4 个连续碱基的同源性或互补性。(7) 引物 5'端对扩增特异性影响不大，可在引物设计时加上限制酶位点、核糖体结合位点、起始密码子、缺失或插入突变位点以及标记生物素、荧光素、地高辛等。通常应在 5'端限制酶位点外再加 1-2 个保护碱基。 引物不与模板结合位点以外的序列互补。所扩增产物本身无稳定的二级结构，以免产生非特异性扩增，影响产量。(9) 简并引物应选用简并程度低的密码子，例如选用只有一种密码子的 Met，3'端应不存在简并性。否则可能由于产量低而看不见扩增产物。

一般 PCR 反应中的引物终浓度为 0.2-1.0 $\mu\text{mol/L}$ 。引物过多会产生错误引导或产生引物二聚体，过低则降低产量。利用紫外分光光度计，可精确计算引物浓度，在 1cm 光程比色杯中，260nm 下，引物浓度可按下式计算：

$$X \text{ mol/L} = \text{OD}_{260} / (A(16000) + C(70000) + G(12000) + T(9600))$$

X：引物摩尔浓度，A、C、G、T：引物中 4 种不同碱基个数。

2. 4 种三磷酸脱氧核苷酸(dNTP)：dNTP 应用 NaOH 将 pH 调至 7.0，并用分光光度计测定其准确浓度。dNTP 原液可配成 5-10mmol/L 并分装，-20℃ 贮存。一般反应中每种 dNTP 的终浓度为 20-200 $\mu\text{mol/L}$ 。理论上 4 种 dNTP 各 20 $\mu\text{mol/L}$ ，足以在 100 μl 反应中合成 2.6 μg 的 DNA。当 dNTP 终浓度大于 50mmol/L 时可抑制 Taq DNA 聚合酶的活性。4 种 dNTP 的浓度应该相等，以减少合成中由于某种 dNTP 的不足出现的错误掺入。

3. Mg^{2+} ： Mg^{2+} 浓度对 Taq DNA 聚合酶影响很大，它可影响酶的活性和真实性，影响引物退火和解链温度，影响产物的特异性以及引物二聚体的形成等。通常 Mg^{2+} 浓度范围为 0.5-2mmol/L。对于一种新的 PCR 反应，可以用 0.1-5mmol/L 的递增浓度的 Mg^{2+} 进行预备实验，选出最适的 Mg^{2+} 浓度。在 PCR 反应混合物中，应尽量减少有高浓度的带负电荷的基团，例如磷酸基团或 EDTA 等可能影响 Mg^{2+} 离子浓度的物质，以保证最适 Mg^{2+} 浓度。

4. 模板：PCR 反应必须以 DNA 为模板进行扩增，模板 DNA 可以是单链分子，也可以是双链分子，可以是线状分子，也可以是环状分子(线状分子比环状分子的扩增效果稍好)。就模板 DNA 而言，影响 PCR 的主要因素是模板的数量和纯度。一般反应中的模板数量为 10^2 - 10^5 个拷贝，对于单拷贝基因，这需要 0.1 μg 的人基因组 DNA，10ng 的酵母 DNA，1ng 的大肠杆菌 DNA。扩增多拷贝序列时，用量更少。灵敏的 PCR 可从一个细胞，一根头发，一个孢子或一个精子提取的 DNA 中分析目的序列。模板量过多则可能增加非特异性产物。DNA 中的杂质也会影响 PCR 的效率。

5. Taq DNA 聚合酶：一般 Taq DNA 聚合酶活性半衰期为 92.5℃ 130min，95℃ 40min，97℃ 5min。现在人们又发现许多新的耐热的 DNA 聚合酶，这些酶的活性在高温下活性可维持更长时间。Taq DNA 聚合酶的酶活性单位定义为 74℃ 下，30min，掺入 10nmol/L dNTP 到核酸中所需的酶量。Taq DNA 聚合酶的一个致命弱点是它的出错率，一般 PCR 中出错率为 2×10^{-4} 核苷酸/每轮循环，在利用 PCR 克隆和进行序列分析时尤应注意。在 100 μl PCR 反应中，1.5-2 单位的 Taq DNA 聚合酶就足以进行 30 轮循环。所用的酶量可根据 DNA、引物及其它因素的变化进行适当的增减。酶量过多会使产物非特异性增加，过少则使产量降低。反应结束后，如果需要利用这些产物进行下一步实验，需要预先灭活 Taq DNA 聚合酶，灭活 Taq DNA 聚合酶的方法有：(1) PCR 产物经酚：氯仿抽提，乙醇沉淀。(2) 加入 10mmol/L 的 EDTA 螯合 Mg^{2+} 。(3) 99-100℃ 加热 10min。目前已有直接纯化 PCR 产物的 Kit 可用。

6. 反应缓冲液：反应缓冲液一般含 10-50mmol/L Tris · Cl (20℃ 下 pH8.3-8.8), 50mmol/L KCl 和适当浓度的 Mg²⁺。Tris · Cl 在 20℃ 时 pH 为 8.3-8.8,但在实际 PCR 反应中,pH 为 6.8-7.8. 50mmol/L 的 KCl 有利于引物的退火.另外,反应液可加入 5mmol/L 的二硫苏糖醇(DDT)或 100 μg/ml 的牛血清白蛋白(BSA),它们可稳定酶活性,另外加入 T4 噬菌体的基因 32 蛋白则对扩增较长的 DNA 片段有利.各种 Taq DNA 聚合酶商品都有自己特定的一些缓冲液。

二、PCR 反应参数

1. 变性：在新一轮循环前,在 94℃ 下变性 5-10min 非常重要,它可使模板 DNA 完全解链,然后加入 Taq DNA 聚合酶(hot start),这样可减少聚合酶在低温下仍有活性从而延伸非特异性配对的引物与模板复合物所造成的错误。变性不完全,往往使 PCR 失败,因为未变性完全的 DNA 双链会很快复性,减少 DNA 产量.一般变性温度与时间为 94℃ 1min。在变性温度下,双链 DNA 解链只需几秒钟即可完全,所耗时间主要是为使反应体系完全达到适当的温度。对于富含 GC 的序列,可适当提高变性温度.但变性温度过高或时间过长都会导致酶活性的损失。

2. 退火：引物退火的温度和所需时间的长短取决于引物的碱基组成,引物的长度、引物与模板的配对程度以及引物的浓度.实际使用的退火温度比扩增引物的 T_m 值约低 5℃。一般当引物中 GC 含量高,长度长并与模板完全配对时,应提高退火温度。退火温度越高,所得产物的特异性越高。有些反应甚至可将退火与延伸两步合并,只用两种温度(例如用 60℃ 和 94℃)完成整个扩增循环,既省时间又提高了特异性。退火一般仅需数秒钟即可完成,反应中所需时间主要是为使整个反应体系达到合适的温度。通常退火温度和时间 37℃-55℃,1-2min。

3. 延伸：延伸反应通常为 72℃,接近于 Taq DNA 聚合酶的最适反应温度 75℃。实际上,引物延伸在退火时即已开始,因为 Taq DNA 聚合酶的作用温度范围可从 20℃-85℃。延伸反应时间的长短取决于目的序列的长度和浓度.在一般反应体系中,Taq DNA 聚合酶每分钟约可合成 2kb 长的 DNA。延伸时间过长会导致产物非特异性增加.但对很低浓度的目的序列,则可适当增加延伸反应的时间。一般在扩增反应完成后,都需要一步较长时间(10-30min)的延伸反应,以获得尽可能完整的产物,这对以后进行克隆或测序反应尤为重要。

4. 循环次数：当其它参数确定之后,循环次数主要取决于 DNA 浓度。一般而言 25-30 轮循环已经足够。循环次数过多,会使 PCR 产物中非特异性产物大量增加。通常经 25-30 轮循环扩增后,反应中 Taq DNA 聚合酶已经不足,如果此时产物量仍不够,需要进一步扩增,可将扩增的 DNA 样品稀释 103-105 倍作为模板,重新加入各种反应底物进行扩增,这样经 60 轮循环后,扩增水平可达 10⁹-10¹⁰。

扩增产物的量还与扩增效率有关,扩增产物的量可用下列公式表示: $C = C_0 (1 + P)^n$ 。其中:C 为扩增产物量,C₀ 为起始 DNA 量,P 为扩增效率,n 为循环次数。

在扩增后期,由于产物积累,使原来呈指数扩增的反应变成平坦的曲线,产物不再随循环数而明显上升,这称为平台效应。平台期会使原先由于错配而产生的低浓度非特异性产物继续大量扩增,达到较高水平。因此,应适当调节循环次数,在平台期前结束反应,减少非特异性产物。

三、PCR 产物的克隆

在许多研究中,需要将 PCR 产物克隆,以获得目的 DNA 片段.此时,所用 PCR 循环数应尽量小,以减少平台效应或非特异性扩增产物的干扰。通常将 PCR 产物插入到载体中有下列一些方法。

1. 平末端连接：由于 Taq DNA 聚合酶往往在 PCR 产物 3'端加上多余的非模板依赖碱基,在用平末端连接克隆 PCR 产物前,可用 Klenow 片段或 T4 DNA 聚合酶处理补平末端。

2. 在 PCR 产物尾部加 dT 或 ddT：Taq DNA 聚合酶会在 3'端加上多余的非模板依赖碱基,而且对 A 优先聚合,所以 PCR 产物末端的多余碱基大部分都是 A。利用这一特点,可以经限制酶切割产生的平末端用酶加上 dT 或 ddT,使载体与 PCR 产物末端互补并进行连接.载体末端加 dT 尾可直接用 Taq DNA 聚合酶和 dTTP 或 ddTTP,ddTTP 因缺少 3-OH 而不能再形成磷酸二酯键,保证在载体 3'端只加上一个 ddTTP,而其 5'端所含的磷酸基团可与 PCR 产物的 3'端 OH 连接,连接产物在载体和 PCR 产物之间的双

链上带两个切口,这种重组 DNA 仍可转化合适的受体菌,并在细菌体内修复.目前一些公司已开发出可直接用于克隆 PCR 产物的带 3'-T 的 T-Vector。

3. 粘性末端连接 :利用引物中附加在 5'端的限制酶位点,直接将 PCR 产物经适当的限制酶切割后产生粘性末端,与载体连接,产生重组 DNA.如果下游两个引物中含有两个不同的限制酶位点.经酶切后定向克隆到载体中。

第二节 材料、设备及试剂

一、材料

不同来源的模板 DNA。

二、设备

移液器及吸头,硅烷化的 PCR 小管,DNA 扩增仪(PE 公司),琼脂糖凝胶电泳所需设备(电泳槽及电泳仪),台式高速离心机。

三、试剂 :

1、10×PCR 反应缓冲液 : 500mmol/L KCl, 100mmol/L Tris · Cl, 在 25℃ 下, pH9.0, 1.0% Triton X-100。

2、MgCl₂ : 25mmol/L。

3、4 种 dNTP 混合物:每种 2.5mmol/L。

4、Taq DNA 聚合酶 5U/μl。

5、T4 DNA 连接酶及连接缓冲液 : 配方见第五章。

6、经 Sma 酶切和加 dT 的 pUC 质粒。

7、其它试剂 : 矿物油 (石蜡油), 1% 琼脂糖, 5×TBE, 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1), 无水乙醇和 70% 乙醇。

第三节 操作步骤

一、PCR 反应

1. 依次混匀下列试剂

35 μl H₂O

5 μl 10×PCR 反应缓冲液

4 μl 25mmol/L MgCl₂

4 μl 4 种 dNTP

0.5 μl 上游引物 (引物 1)

0.5 μl 下游引物 (引物 2)

0.5 μl 模板 DNA(约 1ng)

混匀后离心 5 秒。

2. 将混合物在 94℃ 下加热 5 分钟后冰冷,迅速离心数秒,使管壁上液滴沉至管底,加入 Taq DNA 聚合酶 (0.5 μl 约 2.5U), 混匀后稍离心,加入一滴矿物油覆盖于反应混合物上。

3. 用 94℃ 变性 1 分钟, 45℃ 退火 1 分钟, 72℃ 延伸 2 分钟, 循环 35 轮,进行 PCR。最后一轮循环结束后, 于 72℃ 下保温 10 分钟,使反应产物扩增充分。

二、电泳

按第二章所述,取 10 μl 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶进行电泳分析,检查反应产物及长度。

三、PCR 产物的纯化

扩增的 PCR 产物如利用 T-Vector 进行克隆,可直接使用,如用平末端或粘性末端连接,往往需要将产物纯化。

(一) 酚/氯仿法

1.取反应产物加 100 μl TE。

2.加等体积氯仿混匀后用微型离心机 10000rpm 离心 15 秒,用移液器将上层水相吸至新的小管中.这样抽提一次,可除去覆盖在表面的矿物油。

3.再用酚:氯仿:异戊醇抽提二次,每次回收上层水相。

4.在水相中加 300 μ l 95%乙醇,置-20 $^{\circ}$ C 下 30min 沉淀。

5.在小离心机上 10000rpm 离心 10min,吸净上清液。加入 1ml 70%乙醇,稍离后,吸净上清液.重复洗涤沉淀 2 次。将沉淀溶于 7ml ddH₂O 中,待用。

(二) Wizard PCR DNA 纯化系统

Wizard PCR DNA 纯化系统可以快速、有效、可靠地提取 PCR 扩增液中的 DNA,提纯后的 DNA 可用于测序、标记、克隆等。

该系统中含有的试剂和柱子可供 50 次 PCR 产物的纯化,试剂包括:

50ml Wizard PCR DNA 纯化树脂

5ml 直接提取缓冲液

50 支 Wizard 微型柱

1、吸取 PCR 反应液水相放于 1.5ml eppendorf 管中。

2、加 100 μ l 直接提取缓冲液,涡旋混匀。

3、加 1ml PCR DNA 纯化树脂,1 分钟内涡旋混合 3 次。

4、取一次性注射器,取出注塞,并使注射筒与 Wizard 微型柱连接,用移液枪将上述混合液加入注射筒中,并用注塞轻推,使混合物进入微型柱。

5、将注射器与微型柱分开,取出注塞,再将注射筒与微型柱相连,加入 2ml 80%异丙醇,对微型柱进行清洗。

6、取出微型柱置于 eppendorf 管中,12000g 离心 20 秒,以除去微型柱中的洗液。

7、将微型柱放在一个新 eppendorf 管中,加 50 μ l TE 或水,静置 1 分钟后,12000g 离心 20 秒。

8、丢弃微型柱,eppendorf 管中的溶液即为纯化 DNA,存放于 4 $^{\circ}$ C 或-20 $^{\circ}$ C。

[注意] 1、纯化树脂在使用前必须充分混匀。

2、PCR 产物中矿物油应尽量吸去,否则会影响提取 DNA 的产量。

四、载体加 dT 尾

1.将 1 μ g pUC19 用 Sma 全酶切。

2.在小管中按上述 PCR 反应,加入各种混合物,除将 4 μ l 4 种 dNTP 改为 4 μ l 25mM dTTP。

3.加入 1 μ l(5U)的 Taq DNA 聚合酶在 72 $^{\circ}$ C 下加热 2h。

4.按前面三中所述,用酚:氯仿:异戊醇抽提二次。

5.加入 2 倍体积 95%乙醇,在-20 $^{\circ}$ C 下沉淀 1hr。

6、离心,用 70%乙醇漂洗后,真空抽干,溶于 10ml ddH₂O 中。

五、PCR 产物与载体粘末端连接

1、在 7ml PCR 产物中加 1ml 带 dT 尾的 pUC 质粒。

2、加 1ml T4DNA 连接酶,1ml 10 \times 连接缓冲液,混匀,16 $^{\circ}$ C 连接过夜。

3、取 5ml 连接产物转化感受态细胞并筛选重组子。

六、PCR 产物 3'突出端切平及平末端连接

1. 在 50 μ l 的 PCR 产物中,直接加 0.5ml T4 DNA 聚合酶混匀。

2. 37 $^{\circ}$ C 反应 10 分钟后,70 $^{\circ}$ C 灭活 10 分钟。

3. 用酚:氯仿抽提 2 次。

4. 乙醇沉淀。沉淀用 70%乙醇漂洗后,真空抽干,溶于 7ml ddH₂O 中。

5. 质粒用 SmaI 切开后,70 $^{\circ}$ C 15 分钟灭活酶,取 1ml (约 0.1mg) 加入上述 PCR 产物中。加 T4 DNA 连接酶 1ml,连接缓冲液 1ml。

6. 取 5ml 连接产物转化感受态细胞并筛选重组子。

[注意]1.PCR 非常灵敏,操作应尽可能在无菌操作台中进行。

2.吸头、离心管应高压灭菌,每次吸头用毕应更换,不要互相污染试剂。

3.加试剂前,应短促离心 10 秒钟,然后再打开管盖,以防手套污染试剂及管壁上的试剂污染吸头侧面。

4.应设含除模板 DNA 所有其它成分的负对照。

思考题

1.降低退火温度对反应有何影响?

2.延长变性时间对反应有何影响?

3.循环次数是否越多越好?为何?

4.如果出现非特异性带,可能有哪些原因?

第九章 分子杂交技术

互补的核苷酸序列通过 Walson-Crick 碱基配对形成稳定的杂合双链分子 DNA 分子的过程称为杂交。杂交过程是高度特异性的,可以根据所使用的探针已知序列进行特异性的靶序列检测。

杂交的双方是所使用探针和要检测的核酸。该检测对象可以是克隆化的基因组 DNA,也可以是细胞总 DNA 或总 RNA。根据使用的方法被检测的核酸可以是提纯的,也可以在细胞内杂交,即细胞原位杂交。探针必须经过标记,以便示踪和检测。使用最普遍的探针标记物是同位素,但由于同位素的安全性,近年来发展了许多非同位素标记探针的方法。


核酸分子杂交具有很高的灵敏度和高度的特异性,因而该技术在分子生物学领域中已广泛地用于克隆基因的筛选、酶切图谱的制作、基因组中特定基因序列的定性、定量检测和疾病的诊断等方面。因而它不仅在分子生物学领域中具有广泛地应用,而且在临床诊断上的应用也日趋增多。



第一节 核酸探针标记的方法

核酸探针根据核酸的性质,可分为 DNA 和 RNA 探针;根据是否使用放射性标记物的与否,可分为放射性标记探针和非放射性标记探针;根据是否存在互补链,可分为单链和双链探针;根据放射性标记物掺入情况,可分为均匀标记和末端标记探针。下面将介绍各种类型的探针及标记方法。

一、双链 DNA 探针及其标记方法

分子生物研究中,最常用的探针即为双链 DNA 探针,它广泛应用于基因的鉴定、临床诊断等方面。双链 DNA 探针的合成方法主要有两种:切口平移法和随机引物合成法。

1. 切口平移法(nick translation) 当双链 DNA 分子的一条链上产生切口时,E.coli DNA 聚合酶 就可将核苷酸连接到切口的 3'羟基末端。同时该酶具有从 5' 3'的核酸外切酶活性,能从切口的 5'端除去核苷酸。由于在切去核苷酸的同时又在切口的 3'端补上核苷酸,从而使切口沿着 DNA 链移动,用放射性核苷酸代替原先无放射性的核苷酸,将放射性同位素掺入到合成新链中。最合适的切口平移片段一般为 50-500 个核苷酸。切口平移反应受几种因素的影响:  产物的比活性取决于[-32 P]dNTP 的比活性和模板中核苷酸被置换的程度。

 DNA 酶 的用量和 E.coli DNA 聚合酶的质量会影响产物片段的大小。 DNA 模板中的抑制物如琼脂糖会抑制酶的活性,故应使用仔细纯化后的 DNA。

材料: 待标记的 DNA。

设备: 高速台式离心机,恒温水浴锅等。

试剂:

(1)10 × 切口平移缓冲液:0.5mol/L Tris ·Cl (pH7.2); 0.1mol/L MgSO₄; 10mmol/L DTT; 100 μg/ml BSA。

(2)未标记的 dNTP 原液:除同位素标记的脱氧三磷酸核苷酸外,其余 3 种分别溶解于 50mmol/L

Tris · Cl (pH7.5)溶液中,浓度为 0.3mmol/L。

(3) [$^{-32}$ P] dCTP 或 [$^{-32}$ P] dATP: 400 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l。

(4) E.coli DNA 聚合酶 (4 单位/ μ l): 溶于 50 μ g/ml BSA, 1mmol/L DTT, 50%甘油, 50mmol/L

Tris · Cl(pH7.5)中。

(5) DNA 酶 : 1mg/ml。

 EDTA : 200mmol/L (pH8.0)。

(7) 10mol/L NH₄Ac。

操作步骤:

(1) 按下列配比混合:

未标记的 dNTP 10 μ l

10 \times 切口平移缓冲液 5 μ l

待标记的 DNA 1 μ g

[$^{-32}$ P] dCTP 或 dATP (70 μ Ci) 7 μ l

E.coli DNA 聚合酶 4 单位

DNA 酶 1 μ l

加水至终体积 50 μ l

(2) 置于 15 $^{\circ}$ C 水浴 60 分钟。

(3) 加入 5 μ l EDTA 终止反应。

(4) 反应液中加入醋酸铵,使终浓度为 0.5mol/L, 加入两倍体积预冷无水乙醇沉淀回收 DNA 探针。

[注意] 1、3H, 32 P 及 35 S 标记的 dNTP 都可使用于探针标记, 但通常使用 [$^{-32}$ P]-dNTP。

2、DNA 酶 的活性不同, 所得到的探针比活性也不同, DNA 酶 活性高, 则所得探针比活性高, 但长度比较短。

2. 随机引物合成法 随机引物合成双链探针是使寡核苷酸引物与 DNA 模板结合, 在 Klenow 酶的作用下, 合成 DNA 探针。合成产物的大小、产量、比活性依赖于反应中模板、引物、dNTP 和酶的量。通常, 产物平均长度为 400-600 个核苷酸。利用随机引物进行反应的优点是: (1) Klenow 片段没有 5' $^{3'}$ 外切酶活性, 反应稳定, 可以获得大量的有效探针。(2) 反应时对模板的要求不严格, 用微量制备的质粒 DNA 模板也可进行反应。(3) 反应产物的比活性较高, 可达 4×10^9 cpm/ μ g 探针。(4) 随机引物反应还可以在低熔点琼脂糖中直接进行。

材料: 待标记的 DNA 片段。

设备: 高速台式离心机, 恒温水浴锅等。

试剂:

(1) 随机引物 (随机六聚体或断裂的鲑鱼精子 DNA)。

(2) 10 \times 随机标记缓冲液: 900mmol/L HEPES (pH6.6); 10mmol/L MgCl₂。

(3) Klenow 片段。

(4) 20mmol/L DTT。

(5) 未标记的 dNTP 溶液: dGTP、dCTP 和 dTTP 溶液, 各 5mmol/L。

 [$^{-32}$ P] dATP : 比活性 > 3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l。

(7) 缓冲液 A: 50mmol/L Tris · Cl (pH7.5); 50mmol/L NaCl; 5mmol/L EDTA (pH8.0); 0.5% SDS。

操作步骤:

(1) 200ng 双链 DNA (1 μ l) 和 7.5ng 随机引物 (1 μ l) 混合后置于 eppendorf 管内, 水浴煮沸 5 分钟后,

立即置于冰浴中 1 分钟。

(2) 与此同时,尽快在一置于冰浴中的 0.5ml eppendorf 管内混合下列化合物:

20mmol/L DTT 1 μ l

未标记的 dNTP 溶液 1 μ l

10 \times 随机标记缓冲液 1 μ l

[γ -³²P] dATP(比活性>3000Ci/mmol; 10 μ Ci/ μ l) 3 μ l

ddH₂O 1 μ l

(3) 将步骤(1)eppendorf 管中的溶液移到步骤(2)管中。

(4) 加入 5 单位(约 1 μ l) Klenow 片段, 充分混合,在微型离心机中以 12000g 离心 1-2 秒, 使所有溶液沉于试管底部,在室温下保温 3-16 小时。

(5) 在反应液中加入 10 μ l 缓冲液 A 后,将放射性标记的探针保存在-20 $^{\circ}$ C 下备用。同时计算放射比活性。

[注意]1、引物与模板的比例应仔细调整,当引物高于模板时,反应产物比较短,但产物的累积较多;反之,则可获得较长片段的探针。

2、模板 DNA 应是线性的,如为超螺旋 DNA,则标记效率不足 50%。

二、单链 DNA 探针

用双链探针杂交检测另一个远缘 DNA 时,探针序列与被检测序列间有很多错配。而两条探针互补链之间的配对却十分稳定,即形成自身的无效杂交,结果使检测效率下降。采用单链探针则可解决这个问题。单链 DNA 探针的合成方法主要有两种: (1) 以 M13 载体衍生序列为模板,用 Klenow 片段合成单链探针; (2) 以 RNA 为模板,用反转录酶合成单链 cDNA 探针。

1. 从 M13 载体衍生序列合成单链 DNA 探针 合成单链 DNA 探针可将模板序列克隆到噬粒或 M13 噬菌体载体中,以此为模板,以特定的通用引物或以人工合成的寡核苷酸为引物,在 [γ -³²P]-dNTP 的存在下,由 Klenow 片段作用合成放射标记探针,反应完毕后得到部分双链分子。在克隆序列内或下游用限制性内切酶切割这些长短不一的产物,然后通过变性凝胶电泳(如变性聚丙烯酰胺凝胶电泳)将探针与模板分离开。双链 RF 型 M13 DNA 也可用于单链 DNA 的制备,选用适当的引物即可制备正链或负链单链探针。

材料: 已制备好的单链 DNA 模板 (方法参见第十章中有关内容)。

设备: 高速台式离心机, 恒温水浴锅等。

试剂:


(1) 10 \times Klenow 缓冲液: 0.5mol/L NaCl, 0.1mol/L Tris \cdot Cl(pH7.5); 0.1mol/L MgCl₂。

(2) 0.1mol/L DTT 溶液。

(3) [γ -³²P] dATP: 3000Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l。

(4) 40mmol/L 和 20mmol/L 的未标记的 dNTP 溶液。

(5) dCTP, dTTP, dGTP 各 20mmol/L 的溶液。

 Klenow 片段 (5 单位/ml)。

(7) 适宜的限制酶, 如 EcoR、Hind 等。

 0.5mol/L EDTA (pH8.0)。

操作步骤:

(1) 在 0.5ml eppendorf 管中混合如下溶液:

单链模板 (约 0.5 μ mol) 1mg

适当引物 5 μ mol

10 × Klenow 缓冲液 3ml

加水至 20ml

(2)将 eppendorf 管加热到 85 °C 5 分钟，在 30 分钟内，使小离心管降到 37 °C ；

(3)依次加入：

DTT 2ml

[α -³²P]dATP 5ml


未标记的 dATP 1ml

dGTP,dCTP,dTTP 混合液 1ml


混合均匀后，稍离心使之沉于试管底部。

(4)加 1ml (5 单位) Klenow 酶室温下 30 分钟。

(5)加 1ml20mmol/L 未标记的 dATP 溶液 20 分钟。

 68 °C 加热 10 分钟，使 Klenow 片段失活。调整 NaCl 浓度，使之适宜于酶切。

(7)加入 20 单位限制性内切酶（如 EcoR⁺，Hind⁺ 等）酶切 1 小时。

 酚/氯仿抽提 DNA，乙醇沉淀以去除 dNTP 或加 0.5mol/L EDTA(pH8.0)至终浓度 10mmol/L。

(9)用电泳方法分离放射性标记的探针。

2. 从 RNA 合成单链 cDNA 探针 cDNA 单链探针主要用来分离 cDNA 文库中相应的基因。用 RNA 为模板合成 cDNA 探针所用的引物有两种：(1)用寡聚 dT 为引物合成 cDNA 探针。本方法只能用于带 Poly(A)的 mRNA,并且产生的探针极大多数偏向于 mRNA 3'末端序列。(2) 可用随机引物合成 cDNA 探针。该法可避免上述缺点,产生比活性较高的探针。但由于模板 RNA 中通常含有多种不同的 RNA 分子,所得探针的序列往往比以克隆 DNA 为模板所得的探针复杂得多，应预先尽量富集 mRNA 中的目的序列。

反转录得到的产物 RNA/DNA 杂交双链经碱变性后, RNA 单链可被迅速地降解成小片段,经 Sephadex G-50 柱层析即可得到单链探针。 材料：已提纯的 RNA 或 mRNA

设备：高速台式离心机，恒温水浴锅等。

试剂：

(1)合适的引物：随机引物或 oligo(dT)15-18。

(2)5mmol/L dGTP, dATP dCTP, dTTP。

(3) [α -³²P]dCTP(>3000Ci/mmol, 10mCi/ml)。

(4)反转录酶(200000 单位/ml)。

(5)100mmol/L DTT。

 250mmol/L MgCl₂。

(7)1mol/L KCl。

 0.5mol/L EDTA (pH8.0)。

(9)10% SDS。

(10)RNasin(40 单位/ml)。

操作步骤：

(1)在已置于冰浴中的灭菌离心管中加入下列试剂：

RNA 或 mRNA 10.0ml

合适的产物(1mg/ml) 10.0ml

1mol/L Tris · Cl(pH7.6) 2.5ml

1mol/L KCl 3.5ml
250mmol/L MgCl₂ 2.0ml
5mmol/L dNTP 10.0ml
[α -³²P]dCTP 10.0ml
0.1mol/L DTT 2.0ml
Rnasin 20U
加水至 48ml
反转录酶(200000 单位/ml) 2ml

混匀后,稍稍离心, 37 °C 保温 2 小时。

(2) 反应完毕后加入下列试剂: 0.5mol/L EDTA (pH8.0) 2ml 10% SDS 2ml

(3) 加入 3ml 3mol/L NaOH。68 °C 保温 30 分钟以水解 RNA。

(4) 冷却至室温后, 加入 10ml 1mol/L Tris · Cl (pH7.4)。混匀。然后加入 3ml 2mol/L HCl。

(5) 酚/氯仿抽提后, 用 Sephadex G-50 柱层析或乙醇沉淀法分离标记的探针。 [注意] RNA 极易降解, 因而实验中的所有试剂和器皿均应在 DEPC 处理后, 灭菌备用。

三、 末端标记 DNA 探针

现以 Klenow 片段标记 3'末端为例说明末端标记的方法。

1、材料: 待标记的双链含凹缺 3'末端的 DNA。

2、设备: 高速台式离心机, 水浴锅等。

3、试剂:

(1) 3 种不含标记的 dNTP 各为 200mmol/L。

(2) 合适的限制酶。

(3) [γ -³²P] dNTP: 3000Ci/mmol, 10mCi/ul。

(4) Klenow 片段(5U/ml)。

(5) 10 × 末端标记缓冲液: 0.5mol/L Tris · Cl (pH7.2), 0.1mol/L MgSO₄, 1mmol/L DTT, 500mg/ml BSA。

4、操作步骤:


(1) 25 μ l 反应体系中用合适的限制酶酶切 1 μ g 的 DNA。

(2) 按下列成分加入试剂并混匀: 已酶切的 DNA 1mg (25ml) 10 × 末端标记缓冲液 5ml 2mmol/L 3 种 dNTP 1ml [α -³²P]-dNTP 适量 加水至 50ml

(3) 加入 1 单位的 Klenow 片段, 室温下反应 30 分钟。

(4) 加入 1ml 2mmol/L 第四种核苷酸溶液, 室温保温 15 分钟。

(5) 70 °C 加热 5 分钟, 终止反应。

 用酚/氯仿抽提后, 用乙醇沉淀来分离标记的 DNA, 或用 Sephadex G-50 柱层析分离标记的 DNA。

[注意]

1、利用本方法可对 DNA 分子量标准进行标记, 利用它可定位因片段太小而无法在凝胶中观察的 DNA 片段。

2、对 DNA 的纯度不很严格, 少量制备的质粒也可进行末端标记合成探针。

3、末端标记还有其他的一些方法, 如利用 T4 多核苷酸激酶标记脱磷的 5'端突出的 DNA 和平末端凹缺 DNA 分子, 也可利用该酶进行交换反应标记 5'末端。

四、寡核苷酸探针

利用寡核苷酸探针可检测到靶基因上单个核苷酸的点突变。常用的寡核苷酸探针主要有两种:单一已知序列的寡核苷酸探针和许多简并性寡核苷酸探针组成的寡核苷酸探针库。单一已知序列寡核苷酸探针能与它们的目的序列准确配对,可以准确地设计杂交条件,以保证探针只与目的序列杂交而不与序列相近的非完全配对序列杂交,对于一些未知序列的目的片段则无效。

1、材料:待标记的寡核苷酸(10pmol/ μ l)。

2、设备:高速离心式离心机,恒温水浴锅等。

3、试剂:

(1)10 \times T4 多核苷酸激酶缓冲液:0.5mol/L Tris \cdot Cl (pH7.6), 0.1mol/L MgCl₂, 50mmol/L DTT, 1mmol/L Spermidine \cdot HCl, 1mmol/L EDTA (pH8.0)。

(2)[γ -³²P] ATP(比活性 7000Ci/mmol; 10mCi/ml)。

(3)T4 多核苷酸激酶 (10 单位/ml)。

4、操作步骤:

(1)100ng 寡核苷酸溶于 30ml 水中。置 65 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟,迅速置冰浴中。

(2)立即加入下列试剂:

10 \times 激酶缓冲液 5ml

[γ -³²P]ATP(比活性 7000Ci/mmol;10mCi/ml) 10ml

T4 多核苷酸激酶 2ml

加水至 50ml

混匀后置 37 $^{\circ}$ C 水浴 20 分钟。

(3)再加入 20 单位 T4 多核苷酸激酶,置 37 $^{\circ}$ C 水浴 20 分钟后立即置冰浴中。

(4)Sephadex G-50 柱层析。

此方法是在每个探针的 5'末端多加了一个磷酸,理论上,这会影响其与 DNA 的杂交。因此,建议使用 Klenow DNA 聚合酶的链延伸法获得高放射性的寡核苷酸探针。

除了常见的同位素标记探针外,还有利用非同位素标记探针和杂交的方法,许多公司都有不同的非同位素标记探针的杂交系统出售,可根据这些公司所提供的操作步骤进行探针的标记和杂交。

五、RNA 探针

许多载体如 pBluescript, pGEM 等均带有来自噬菌体 SP6 或 E.coli 噬菌体 T7 或 T3 的启动子,它们能特异性地被各自噬菌体编码的依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶所识别,合成特异性的 RNA。在反应体系中若加入经标记的 NTP,则可合成 RNA 探针。RNA 探针一般都是单链,它具有单链 DNA 探针的优点,又具有许多 DNA 单链探针所没有的优点,主要是:RNA:RNA 杂交体比 DNA:RNA 杂交体有更高的稳定性,所以在杂交反应中 RNA 探针比相同比活性的 DNA 探针所产生信号要强。RNA:RNA 杂交体用 RNA 酶 A 酶切比 S1 酶切 DNA:RNA 杂交体容易控制,所以用 RNA 探针进行 RNA 结构分析比用 DNA 探针效果好。

噬菌体依赖 DNA 的 RNA 聚合酶所需的 rNTP 浓度比 Klenow 片段所需的 dNTP 浓度低,因而能在较低浓度放射性底物的存在下,合成高比活性的全长探针。用来合成 RNA 的模板能转录许多次,所以 RNA 的产量比单链 DNA 高。并且用来合成 RNA 的模板能转录多次,可获得比单链 DNA 更高产量的 RNA。

反应完毕后,用无 RNA 酶的 DNA 酶处理,即可除去模板 DNA,而单链 DNA 探针则需通过凝胶电泳纯化才能与模板 DNA 分离。

另外噬菌体依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶不识别克隆 DNA 序列中的细菌、质粒或真核生物的启动子,对模板的要求也不高,故在异常位点起始 RNA 合成的比率很低。因此,当将线性质粒和相应的依赖 DNA 的 RNA 聚合酶及四种 rNTP 一起保温时,所有 RNA 的合成,都由这些噬菌体启动子起始。而在单链 DNA 探针合成中,若模板中混杂其他 DNA 片段,则会产生干扰。但它也存在着不可避免的缺点,因

为合成的探针是 RNA，它对 RNase 特别敏感，因而所用的器皿试剂等均应仔细地去除 RNase；另外如果载体没有很好地酶切则等量的超螺旋 DNA 会合成极长的 RNA，它有可能带上质粒的序列而降低特异性。

第二节 几种常见的杂交

分子杂交是通过各种方法将核酸分子固定在固相支持物上，然后用放射性标记的探针与被固定的分子杂交，经显影后显示出目的 DNA 或 RNA 分子所处的位置。根据被测定的对象，分子杂交基本可分为以下几大类：

(1) Southern 杂交 DNA 片段经电泳分离后，从凝胶中转移到硝酸纤维素滤膜或尼龙膜上，然后与探针杂交。被检对象为 DNA，探针为 DNA 或 RNA。

(2) Northern 杂交：RNA 片段经电泳后，从凝胶中转移到硝酸纤维素滤膜上，然后用探针杂交。被检对象为 RNA，探针为 DNA 或 RNA。

根据杂交所用的方法，另外还有斑点(dot)杂交、狭槽(slot)杂交和菌落原位杂交等。有 3 种固相支持体可用于杂交：硝酸纤维素滤膜、尼龙膜和 Whatman 541 滤纸。不同商标的尼龙膜需要进行不同的处理，在 DNA 固定和杂交的过程中要严格按生产厂家的说明书来进行。Whatman 541 滤纸有很高的湿强度，最早用于筛选细菌菌落。该滤纸主要用于筛选一些基因文库。固定化 DNA 的杂交条件基本与使用硝酸纤维素滤膜时所建立的条件相同。Whatman 541 滤纸与硝酸纤维素滤膜相比有一些优点：它更便宜，杂交中更耐用，干燥过程中不易变形和碎裂等。然而若变性过程不小心，杂交信号的强度会明显弱于用硝酸纤维素滤膜时所得到的信号强度。因此，常规的细菌筛选和各种杂交时仍选用硝酸纤维素滤膜作为固相支持体。

一、Southern 杂交

Southern 杂交可用来检测经限制性内切酶切割后的 DNA 片段中是否存在与探针同源的序列，它包括下列步骤：

- (1) 酶切 DNA，凝胶电泳分离各酶切片段，然后使 DNA 原位变性。
- (2) 将 DNA 片段转移到固体支持物(硝酸纤维素滤膜或尼龙膜)上。
- (3) 预杂交滤膜，掩盖滤膜上非特异性位点。
- (4) 让探针与同源 DNA 片段杂交，然后漂洗除去非特异性结合的探针。
- (5) 通过显影检查目的 DNA 所在的位置。

Southern 杂交能否检出杂交信号取决于很多因素，包括目的 DNA 在总 DNA 中所占的比例、探针的大小和比活性、转移到滤膜上的 DNA 量以及探针与目的 DNA 间的配对情况等。在最佳条件下，放射自显影曝光数天后，Southern 杂交能很灵敏地检测出低于 0.1pg 与 ^{32}P 标记的高比活性探针的(>109 cpm/ μg)互补 DNA。如果将 10 μg 基因组 DNA 转移到滤膜上，并与长度为几百个核苷酸的探针杂交，曝光过夜，则可检测出哺乳动物基因组中 1kb 大小的单拷贝序列。

将 DNA 从凝胶中转移到固体支持物上的方法主要有 3 种(1)毛细管转移。本方法由 Southern 发明，故又称为 Southern 转移(或印迹)。毛细管转移方法的优点是简单，不需要用其他仪器。缺点是转移时间较长，转移后杂交信号较弱。(2)电泳转移。将 DNA 变性后，可电泳转移至带电荷的尼龙膜上。该法的优点是不需要脱嘌呤/水解作用，可直接转移较大的 DNA 片段。缺点是转移中电流较大，温度难以控制。通常只有当毛细管转移和真空转移无效时，才采用电泳转移。(3)真空转移。有多种真空转移的商品化仪器，它们一般是将硝酸纤维素膜或尼龙膜放在真空室上面的多孔屏上，再将凝胶置于滤膜上，缓冲液从上面的一个贮液槽中流下，洗脱出凝胶中的 DNA，使其沉积在滤膜上。该法的优点是快速，在 30 分钟内就能从正常厚度(4-5mm)和正常琼脂糖浓度(<1%)的凝胶中定量地转移出来。转移后得到的杂交信号比 Southern 转移强 2-3 倍。缺点是如不小心，会使凝胶碎裂，并且在洗膜不严格时，其背景比毛细转移要高。

1、材料：待检测的 DNA，已标记好的探针。

2、设备：电泳仪，电泳槽，塑料盆，真空烤箱，放射自显影盒，X-光片，杂交袋，硝酸纤维素

滤膜或尼龙膜，滤纸。

3、试剂：

(1)10mg/ml 溴化乙锭 (EB)。

(2)50 × Denhardt's 溶液：5g Ficoll-40, 5g PVP, 5g BSA 加水至 500ml,过滤除菌后于-20℃ 储存。


(3)1 × BLOTTO:5g 脱脂奶粉，0.02%叠氮钠，储于 4℃。

(4)预杂交溶液:6 × SSC, 5 × Denhardt, 0.5% SDS, 100mg/ml 鲑鱼精子 DNA, 50%甲酰胺。

(5)杂交溶液:预杂交溶液中加入变性探针即为杂交溶液。

 0.2mol/L HCl。

(7)0.1% SDS。

 0.4mol/L NaOH。

(9)变性溶液:87.75g NaCl, 20.0g NaOH 加水至 1000ml。

(10)中和溶液:175.5g NaCl, 6.7g Tris · Cl, 加水至 1000ml。

(11)硝酸纤维素滤膜。

(12)20 × SSC: 3mol/L NaCl, 0.3mol/L 柠檬酸钠,用 1mol/L HCl 调节 pH 至 7.0;

(13)2 ×、1 ×、0.5 ×、0.25 × 和 0.1 × SSC:用 20 × SSC 稀释。

4、操作步骤：


(1) 约 50 μl 体积中酶切 10pg-10 μg 的 DNA, 然后在琼脂糖凝胶中电泳 12-24 小时(包括 DNA 分子量标准物)。

(2) 500ml 水中加入 25 μl 10mg/ml 溴化乙锭,将凝胶放置其中染色 30 分钟, 然后照相。


(3) 依次用下列溶液处理凝胶,并轻微摇动: 500ml 0.2mol/L HCl 10 分钟, 倾去溶液(如果限制性片段>10kb, 酸处理时间为 20 分钟), 用水清洗数次,倾去溶液; 500ml 变性溶液两次,每次 15 分钟,倾去溶液; 500ml 中和溶液 30 分钟。如果使用尼龙膜杂交, 本步可以省略。

(4) 戴上手套,在盘中加 20 × SSC 液,将硝酸纤维素滤膜先用无菌水完全湿透,再用 20 × SSC 浸泡。将硝酸纤维素滤膜一次准确地盖在凝胶上,去除气泡。用浸过 20 × SSC 液的 3 滤纸盖住滤膜,然后加上干的 3 滤纸和干纸巾,根据 DNA 复杂程度转移 2-12 小时。当使用尼龙膜杂交时, 该膜用水浸润一次即可, 转移时用 0.4mol/L NaOH 代替 20 × SSC。简单的印迹转移 2-3 小时,对于基因组印迹,一般需要较长时间的转移。

(5) 去除纸巾等,用蓝色圆珠笔在滤膜右上角记下转移日期,做好记号,取出滤膜,在 2 × SSC 中洗 5 分钟,凉干后在 80℃ 中烘烤 2 小时。注意在使用尼龙膜杂交时, 只能空气干燥, 不得烘烤。

 将滤膜放入含 6-10ml 预杂交液的密封小塑料袋中,将预杂交液加在袋的底部,前后挤压小袋,使滤膜湿透。在一定温度下(一般为 37-42℃)预杂交 3-12 小时, 弃去预杂交液。

(7) 制备同位素标记探针 (参见第一节), 探针煮沸变性 5 分钟。

 在杂交液中加入探针,混匀。如步骤 (6) 将混合液注入密封塑料袋中,在与预杂交相同温度下杂交 6-12 小时。

(9) 取出滤膜,依次用下列溶液处理,并轻轻摇动: 在室温下, 1 × SSC/0.1% SDS, 15 分钟, 两次。在杂交温度下, 0.25 × SSC/0.1% SDS, 15 分钟, 两次。

(10) 空气干燥硝酸纤维素滤膜,然后在 X 光片上曝光。通常曝光 1-2 天后可见 DNA 谱带。对于 108 cpm/μg 从缺口平移所得探针,可很容易地从 10 μg 哺乳 DNA 中检测到 10pg 的单拷贝基因。

二、Northern 杂交

Northern 杂交与 Southern 杂交很相似。主要区别是被检测对象为 RNA,其电泳在变性条件下进行,以去除 RNA 中的二级结构,保证 RNA 完全按分子大小分离。变性电泳主要有 3 种:乙二醛变性电泳、甲醛变性电泳和羟甲基汞变性电泳。电泳后的琼脂糖凝胶用与 Southern 转移相同的方法将 RNA 转移到硝酸纤维素滤膜上,然后与探针杂交。

1、材料:待检测的 RNA 及制备好的探针。

2、设备:电泳仪,电泳槽,塑料盆,真空烤箱,放射自显影盒,X-光片,杂交袋,硝酸纤维素膜或尼龙膜。

3、试剂:

(1)20 × SSPE:175.3g NaCl, 88.2g 柠檬酸钠,溶于 800ml 水中,用 10mol/LNaOH 调 pH 至 7.4,定溶到 1L。

(2)其他试剂:与 Southern 杂交试剂类似,只是所有的试剂均应用 DEPC 处理。

4、操作步骤:


(1)RNA 经变性电泳完毕后,可立即将乙醛酐 RNA 转移至硝酸纤维素滤膜上。转移方法与转移 DNA 的方法相似。

(2)转移完毕后,以 6 × SSC 溶液于室温浸泡此膜 5 分钟,以除去琼脂糖碎片。

(3)将该杂交膜夹于两张滤纸中间,用真空烤箱于 80 °C 干燥 0.5-2 小时。

(4)用下列两种溶液之一进行预杂交,时间为 1-2 小时。若于 42 °C 进行,应采用:50%甲酰胺,5 × SSPE,2 × Denhardt's 试剂,0.1% SDS;若于 68 °C 进行,应采用:6 × SSC,2 × Denhardt's 试剂,0.1% SDS,(注意:BLOTTO 不能用于 Northern 杂交)。

(5)在预杂交液中加入变性的放射性标记探针,如欲检测低丰度 mRNA,所用探针的量至少为 0.1 μg,其放射性比活度应大于 2 × 10⁸ cpm/分 · μg,放在适宜的温度条件下杂交 16-24 小时。

 用 1 × SSC、0.1% SDS 于室温洗膜 20 分钟,随后用 0.2 × SSC、0.1% SDS 于 68 °C 洗膜 3 次,每次 20 分钟。

(7)用 X 光片(Kodak XAR-2 或与之相当的产品)进行放射自显影,附加增感屏于-70 °C 曝光 24-48 小时。

[注意]


(1)如果琼脂糖浓度高于 1%,或凝胶厚度大于 0.5cm,或待分析的 RNA 大于 2.5kb,需用 0.05mol/LNaOH 浸泡凝胶 20 分钟,部分水解 RNA 并提高转移效率。浸泡后用经 DEPC 处理的水淋洗凝胶,并用 20 × SSC 浸泡凝胶 45 分钟。然后再转移到滤膜上。

(2)在步骤(3)的操作中,如果滤膜上含有乙醛酐 RNA,杂交前需用 20mmol/L Tris · Cl (pH8.0)于 65 °C 洗膜,以除去 RNA 上的乙二醛分子。

(3)RNA 自凝胶转移至尼龙膜所用方法,与 RNA 转移至硝酸纤维素滤膜所用方法类似。

(4)含甲醛的凝胶在 RNA 转移前需用经 DEPC 处理的水淋洗数次,以除去甲醛。当使用尼龙膜杂交时注意,有些带正电荷的尼龙膜在碱性溶液中具有固着核酸的能力,需用 7.5mmol/LNaOH 溶液洗脱琼脂糖中的乙醛酐 RNA,同时可部分水解 RNA,并提高较长 RNA 分子(>2.3kb)转移的速度和效率。此外,碱可以除去 mRNA 分子的乙二醛加合物,免去固定后洗脱的步骤。乙醛酐 RNA 在碱性条件下转移至带正电荷尼龙膜的操作也按 DNA 转移的方法进行,但转移缓冲液为 7.5mmol/LNaOH,转移结束后(4.5-6.0 小时),尼龙膜需用 2 × SSC、0.1%SDS 淋洗片刻、于室温晾干。

(5)尼龙膜的不足之处是背景较高,用 RNA 探针时尤为严重。将滤膜长时间置于高浓度的碱性溶液中,会导致杂交背景明显升高,可通过提高预杂交和杂交步骤中有关阻断试剂的量来予以解决。

 如用中性缓冲液进行 RNA 转移,转移结束后,将晾干的尼龙膜夹在两张滤纸中间,80 °C 干烤 0.5-2 小时,或者 254nm 波长的紫外线照射尼龙膜带 RNA 的一面。后一种方法较为繁琐,但却优先使用,

因为某些批号的带正电荷的尼龙膜经此处理后,杂交信号可以增强。然而为获得最佳效果,务必确保尼龙膜不被过度照射,适度照射可促进 RNA 上小部分碱基与尼龙膜表面带正电荷的胺基形成交联结构,而过度照射却使 RNA 上一部分胸腺嘧啶共价结合于尼龙膜表面,导致杂交信号减弱。

三、菌落原位杂交

对分散在若干个琼脂平板上的少数菌落(100-200)进行克隆筛选时,可采用本方法。将这些菌落归并到一个琼脂主平板以及已置于第二个琼脂平板表面的一张硝酸纤维素滤膜上。经培养一段时间后,对菌落进行原位裂解。主平板应贮存于4℃直至得到筛选结果。

1、材料:待检测的细菌平皿,已标记好的探针,硝酸纤维素滤膜等。

2、设备:恒温烤箱,恒温水浴,台式高速离心机等。

3、试剂:

(1)LB 固体培养基。

(2)0.5mol/L NaOH。

(3)1mol/L Tris · Cl。

(4)1.5mol/L NaCl。

(5)0.5mol/L Tris · Cl。

 预洗液:5×SSC, 0.5%SDS, 1mmol/L EDTA (pH8.0)。

(7)预杂交液:50%甲酰胺,6×SSC(或6×SSPE),0.05×BLOTTO(甲酰胺可不用)。

 其余试剂:与 Southern 杂交相同。

4、操作步骤:

1. 将少数菌落转移到硝酸纤维素滤膜上:


(1) 在含有选择性抗生素的琼脂平板上放一张硝酸纤维素滤膜。

(2) 用无菌牙签将各个菌落先转移至滤膜上,再转移至含有选择性抗生素但未放滤膜的琼脂主平板上。应按一定的格子进行划线接种(或打点)。每菌落应分别划线于两个平板的相同位置上。最后,在滤膜和主平板上同时划一个含有非重组质粒(如 pBR322)的菌落。

(3) 倒置平板,于37℃培养至划线的细菌菌落生长到0.5-1.0mm的宽度。

(4) 用已装防水黑色绘图墨水的注射器针头穿透滤膜直至琼脂,在3个以上的不对称位置作标记。在主平板大致相同的位置上也作上标记。

(5) 用 Parafilm 膜封好主平板,倒置贮放于4℃,直至获得杂交反应的结果。

 裂解细菌,按本段下面所述方法,使释放的 DNA 结合于硝酸纤维素滤膜。

2. 菌落的裂解及 DNA 结合于硝酸纤维素滤膜

(1) 在一张保鲜膜上制作一个装有0.5mol/L NaOH的小洼(0.75ml),使菌落面朝上,将滤膜放到小洼上,展平保鲜膜,使滤膜均匀湿润,让滤膜留于原处2-3分钟。

(2) 用干纸巾从滤膜的下方吸干滤膜,用一张新的保鲜膜和新配制的0.5mol/L NaOH 重复步骤(1)。

(3) 吸干滤膜,将滤膜转移到新的带有1mol/L Tris · Cl(pH7.4)的保鲜膜洼上。5分钟后吸干滤膜,再重复一次该步骤。

(4) 吸干滤膜,把它转移到有1.5mol/L NaCl、0.5mol/L Tris · Cl (pH7.4)的保鲜膜小洼上5分钟后吸干滤膜,转移到一张干的滤纸上,置于室温20-30分钟,使滤膜干燥。

(5) 将滤膜夹在两张干的滤纸之间,在真空烤箱中于80℃干烤2小时,固定DNA。

 将固定在膜上的DNA与³²P标记的探针杂交。

5. 杂交


(1) 盛有 $2 \times \text{SSC}$ 的塑料盘同，将干烤的滤膜飘浮在液面上，彻底浸湿 5 分钟。

(2) 将滤膜转到 200ml 预洗液的玻璃皿中。滤膜何叠在一起，放于溶液中。用保鲜膜盖住玻璃皿，放到位于培养箱内的旋转平台上。于 50°C 处理 30 分钟。在这一步及以后的所有步骤中，应缓缓摇动滤膜，防止它们粘在一起。


(3) 用泡过预洗液的吸水棉纸轻轻地从膜表面拭去细菌碎片，以降低杂交背景而不影响阳性杂交信号的强度和清晰度。

(4) 将滤膜转到盛有 150ml 预杂交液的玻璃中，在适宜温度(即在水溶液中杂交时用 68°C ，而在 50% 甲酰胺中杂交时用 42°C) 下，预杂交 1-2 小时。

(5) 将 ^{32}P 标记的双链 DNA 探针于 100°C 加热 5 分钟，迅速置于冰浴中。单链探针不必变性。将探针加到杂交袋中杂交过夜。杂交期间，盛滤膜的容器应盖严，以防液体蒸发。

 杂交结束后，去除杂交液，立即于室温把滤膜放入大体积(300-500ml)的 $2 \times \text{SSC}$ 和 0.1% SDS 溶液中，轻轻振摇 5 分钟，并将滤膜至少翻转一次。重复洗 一次，同时应避免膜干涸。

(7) 68°C 用 300-500ml $1 \times \text{SSC}$ 和 0.1% SDS 溶液洗膜两次，每次 1-1.5 小时。此时已可进行放射自显影。如背景很高或实验要求严格的洗膜条件，可用 300-500ml $0.2 \times \text{SSC}$ 和 0.1% SDS 的溶液于 68°C 将滤膜浸泡 60 分钟。

 把滤膜放在纸巾上于室温晾干后，把滤膜(编号面朝上)放在一张保鲜膜上，并在保鲜膜上作几个不对称的标记，以使滤膜与放射性自显影片位置对应。

(9) 用第二张保鲜膜盖住滤膜。加 X 光片并加上增感屏于 -70°C 曝光 12-16 小时。

(10) 底片显影后，在底片上贴一张透明硬纸片。在纸上标记阳性杂交信号的位置，同时在不对称分布点的位置上作出标记。可从底片上取下透明纸，通过对比纸上的点与琼脂上的点来鉴定阳性菌落。

四、斑点杂交

斑点杂交是指将 DNA 或 RNA 样品直接点在硝酸纤维素滤膜上，然后与核酸探针分子杂交，以显示样品中是否存在特异的 DNA 或 RNA。同一种样品经不同倍数的稀释，还可以得到半定量的结果。所以它是一种简便、快速、经济的分析 DNA 或 RNA 的方法，在基因分析和基因诊断中经常用到，是研究基因表达的有力工具。但由于目的序列未与非目的序列分离，不能了解目的序列的长度。尤其当本底干扰较高时，难以区分目的序列信号和干扰信号。

1、材料：待分析的 DNA 或 RNA 样品，已标记的探针。

2、设备：狭槽点样器，真空泵，恒温水浴，真空烤箱等。

3、试剂：

(1) 100% 甲酰胺。

(2) 甲醛(37%)。

(3) $20 \times \text{SSC}$ 。

(4) 0.1mol/L NaOH。

(5) 硝酸纤维素滤膜。

(6) 滤纸。

4、操作步骤：

(1) $10 \mu\text{l}$ 样品与 $20 \mu\text{l}$ 100%甲酰胺、 $7 \mu\text{l}$ 37%甲醛、 $2 \mu\text{l}$ $20 \times \text{SSC}$ 混合。混合置于 68°C ，15 分钟后置冰浴中。

(2) 用 0.1mol/L NaOH 清洗点样器，再用无菌水充分冲洗。将一张经 $20 \times \text{SSC}$ 浸润的滤纸铺在点样器上，上面再铺上一张经 $20 \times \text{SSC}$ 浸润 1 小时的硝酸纤维素滤膜，加盖并夹紧，接通真空泵。

(3) 用 $10\times$ SSC 清洗各样孔。在每一样品中加两倍体积的 $2\times$ SSC,混合后加样于孔中。外围几个孔中加 $2\mu\text{l}$ 染料定位,缓慢抽吸。每孔用 1ml $10\times$ SSC 清洗两次。继续抽吸 5 分钟,吸干滤膜。

(4) 取出滤膜,夹在两张滤纸中间, 80°C 真空烘干 2 小时。按上述 Southern 或 Northern 杂交所述的方法与放射性标记探针杂交。

[注意]

1、在放射自显影时应注意滤膜必须干燥,并覆盖上保鲜膜,否则,滤膜将与 X-光片粘在一起,使以后的操作困难。

2、在杂交过程中,整个滤膜应一直是湿润的,不得干涸。

第三节 杂交反应的条件及参数的优化

不同的反应条件对杂交结果的影响如下:


(1) 根据杂交液的体积确定杂交的时间:一般来说使用较小体积的杂交液比较好,因为在小体积溶液中,核酸重新配对的速度快、探针用量少,从而使滤膜上的 DNA 在反应中起主要作用。但在杂交中必须保证有足够的杂交溶液覆盖杂交膜。

(2) 根据所用的杂交溶液确定杂交的温度:一般来说,杂交相为水溶液时,则在 68°C 杂交,而在 50% 甲酰胺溶液中时,则在 42°C 下杂交。

(3) 选用不同的封闭试剂:如 Denhardt's 试剂、肝素或一种由 5% 脱脂奶粉组成的 BLOTTO,这些试剂中需加入断裂的鲑鱼精子 DNA 或酵母 DNA,并和 SDS 一起使用。与 Denhardt's 试剂相比,BLOTTO 价格便宜,使用方便,同样可获得满意的结果,但它不能用于 RNA 杂交。一般而言,尼龙膜用 Denhardt's 试剂比用 BLOTTO 能得到更高的信噪比。对硝酸纤维素滤膜而言,通常在预杂交溶液和杂交溶液中都含有封闭剂。但是对尼龙膜,经常从杂交溶液中省去封闭剂,因为高浓度的蛋白质会干扰探针和目的基因的退火。

(4) 根据需要在杂交过程中选用不同的振荡方法和程度,许多杂交膜一起反应时,连续的轻微振荡可获得较好的杂交结果。

(5) 在杂交过程中加入其他化合物,如反应体系中加入 10% 硫酸葡聚糖或 10% PEG,杂交速度可增加约 10 倍。检测稀有序列时常用该方法,但它们有时会导致本底较高,并由于溶液的粘稠性而使操作困难。因此,除非在滤膜上含有的目的 DNA 量很少,或放射性探针的量有限,一般不用硫酸葡聚糖或 PEG。

 根据探针与被检测目标之间的同源程度选择清洗的程度,如具有很高的同源性可选用严紧型洗脱方式(高浓度 SSC),反之则选用非严紧型洗脱方式(低浓度 SSC)。洗脱通常在低于杂交体解链温度 $12-20^\circ\text{C}$ 的条件下进行。解链温度(melting temperature, T_m)是指在双链 DNA 或 RNA 分子变性形成分开的单链时光吸收度增加的中点处温度。通常富含 G·C 碱基对的序列比富含 A·T 碱基对序列的 T_m 温度高。有关 T_m 的计算方法,请参考第八章。

(7) 根据标记探针的浓度及其比活性,选择不同的杂交条件及检测方法。一般使用新的同位素可获得较强的信号。

 在水溶液中杂交时,用 $6\times$ SSC 或 $6\times$ SSPE 溶液的效果都一样。但在甲酰胺溶液中杂交时,应该用具有更强缓冲能力的 $6\times$ SSPE。

上述这些条件的改变,对杂交的结果有不同的影响,应根据研究的具体情况,选用适当的方法。

思考题:

- 1、核酸探针的标记方法有哪些?
- 2、要获得好的杂交结果,需注意哪些因素?
- 3、如果放射自显影后,如 X-光片背景很黑,请分析原因及写出预防措施。

第十章 测序技术

在分子生物学研究中, DNA 的序列分析是进一步研究和改造目的基因的基础。目前用于测序的技术主要有 Sanger 等 (1977) 发明的双脱氧链末端终止法和 Maxam 和 Gilbert (1977) 发明的化学降解法。这二种方法在原理上差异很大, 但都是根据核苷酸在某一固定的点开始, 随机在某一个特定的碱基处终止, 产生 A, T, C, G 四组不同长度的一系列核苷酸, 然后在尿素变性的 PAGE 胶上电泳进行检测, 从而获得 DNA 序列。目前 Sanger 测序法得到了广泛的应用。

Sanger 法测序的原理就是利用一种 DNA 聚合酶来延伸结合在待定序列模板上的引物。直到掺入一种链终止核苷酸为止。每一次序列测定由一套四个单独的反应构成, 每个反应含有所有四种脱氧核苷酸三磷酸(dNTP), 并混入限量的一种不同的双脱氧核苷三磷酸(ddNTP)。由于 ddNTP 缺乏延伸所需要的 3-OH 基团, 使延长的寡聚核苷酸选择性地在 G、A、T 或 C 处终止。终止点由反应中相应的双脱氧而定。每一种 dNTPs 和 ddNTPs 的相对浓度可以调整, 使反应得到一组长几百至几千碱基的链终止产物。它们具有共同的起始点, 但终止在不同的核苷酸上, 可通过高分辨率变性凝胶电泳分离大小不同的片段, 凝胶处理后可用 X-光胶片放射自显影或非同位素标记进行检测。

第一节 非同位素银染测序系统操作技术

一、概述：

Promega 公司的 SILVER SEQUENCETM DNA 测序系统是一种无放射性的序列分析系统, 它通过灵敏的银染方法检测凝胶中的条带。银染提供了一种对于放射性或荧光法来说更加快速, 廉价的替代方法。测序结果可以在同一天内得到; 电泳完成后经 90 分钟就可读序, 这是常规的放射性测序法做不到的。此外, SILVER SEQUENCETM 系统用未修饰的 5'OH 寡聚核苷酸作为引物, 减少了特殊修饰寡聚核苷酸的花费。该系统不需要放射性方法中对同位素的谨慎操作, 也不需要荧光法或化学发光技术的昂贵试剂。另外, 也不需要象大多数荧光法那样用仪器来检测序列条带。

Taq DNA 聚合酶在 95℃ 时极强的热稳定性。本系统利用的测序级 Taq DNA 聚合酶是一种 Taq DNA 聚合酶的修饰产品, 对于双链 DNA 模板有非常好的效果, 具有高度的准确性, 能产生均一的条带, 且背景低。

SILVER SEQUENCETM 系统包含被修饰的核苷酸混合物, 如 7-去氮 dGTP(7-deaza dGTP, 或 dITP) 替代 dGTP 可清除由 GC 丰富区域所引起的条带压缩现象。

退火温度是热循环测序中最重要的因素。高退火温度可减少模板二级结构。提高引物结合模板配对的严谨性。链重退火和模板二级结构则限制了小片段 PCR 产物(<500bp)得到清楚的序列数据的能力。引物延伸起始于每个循环的退火阶段。在较低温度时, 聚合酶可能会遇到坚固的二级结构区域, 它可导致聚合酶解离。则在四个电泳道中均有同一相对位置的条带。因为这些原因, 应该使用尽可能高的退火温度。对于有牢固二级结构的模板建议使用 95℃ 变性、70℃ 退火/延伸的循环模式。一般来说, 较长的引物及 GC 含量高的引物能得到较强的信号。实验结果表明, >24mer 的 GC 含量约为 50% 的引物可得到最佳结果。

由于本系统采用热循环装置, 与常规的测序方法相比具有如下几点好处: (1). 本方法线性扩增模板 DNA 产生足够的产物使银染技术能够检测序列条带, 测序反应需要 0.03--2pmol 模板 DNA, 随模板种类而定。(2). 在每一个变性循环中的高温可以取代对双链 DNA(dsDNA)模板的碱变性及乙醇沉淀过程, 变性循环也有助于消除由于线性 dsDNA 模板(如 PCR 反应产物)快速重退火所引起的问题。(3). 高温聚合酶反应减弱了 DNA 模板的二级结构, 允许聚合酶穿过高度二级结构化的区域。

二、材料 待测已提纯的 DNA, 可为单链, 也可为双链。

三、设备 高压电泳仪, 测序用电泳槽, 制胶设备, PCR 仪。

四、试剂

(1) SILVER SEQUENCETM DNA 测序试剂盒。

(2) 丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺储备液 (38%丙烯酰胺 W/V, 2%甲叉双丙烯酰胺 W/V): 95g 丙烯酰胺, 5g 甲叉双丙烯酰胺溶于 140ml 双蒸水中, 定容至 250ml, 0.45mm 过滤器过滤后, 贮于

棕色瓶中，置于 4℃ 冰箱可保存 2 周。

(3) 10%过硫酸铵，0.5g 过硫酸铵溶于 4ml 水中，定容至 5ml，应新配新用。

(4) 10×TBE 缓冲液 (1 mol/L Tris, 0.83mol/L 硼酸, 10mmol/L EDTA): 121.1g Tris, 51.35g 硼酸, 3.72g Na₂EDTA · 2H₂O, 溶于双蒸水中定容至 1 升, 置于 4℃ 下可贮存 2 周, 其 pH 约为 8.3。

(5) TBE 电极缓冲液: 10×TBE 缓冲液稀释至 1×TBE 备用。

(6) TEMED

(7) 固定/停止溶液: 10%冰醋酸 (V/V) 配制 2 升备用。

(8) 染色溶液: 硝酸银 2 克, 甲醛 3ml, 溶于 2 升超纯水中备用。

(9) 显影溶液: 60 克碳酸钠 (Na₂CO₃)溶于 2 升超纯水中, 使用前加 3ml 37% 甲醛和 40ml 硫代硫酸钠溶液 (10mg/ml)。

(10) 95%乙醇。

(11) 0.5%冰乙酸。

(12) Sigmacote (Sigma CAT. #SL-2)。

五、操作步骤:

成功地使用银染测序系统需要对提供的操作方法进行仔细考虑。银染不如放射性检测法灵敏, 而需要更多的模板量, 此外, 也不可能通过延长 X-光胶片曝光时间的方法增加信号强度。因此, 请使用推荐的 DNA 模板量, 每次均使用所提供的对照检查系统的可靠性, 并且注意如下几点:

(1) DNA 的浓度和纯度必须经过琼脂糖凝胶电泳或荧光法测定, 样品应与已知量 DNA 一起电泳。

(2) 分光光度法对于很多 DNA 提取物包括质粒小量制备来说, 并不能给出一个可信的 DNA 浓度估计, 混杂的染色体 DNA、蛋白、RNA、有机物及无机化合物均可能有 260 nm 光吸收。因此, 分光光度法常常错误地高估 DNA 浓度。

(3) DNA 制备过程中用核糖核酸酶处理所产生核糖核苷酸, 虽然它们在电泳后 DNA 样品的前面, 并不能观察到, 但它们仍会有 260nm 光吸收。

(一) 测序反应:

1. 对于每组测序反应, 标记四个 0.5ml eppendorf 管(G、A、T、C)。每管加入 2ml 适当的 d/ddNTP 混合物(d/ddNTP Mix)。各加入 1 滴(约 20μl)矿物油, 盖上盖子保存于冰上或 4℃ 备用。

2. 对于每组四个测序反应, 在一个 eppendorf 管中混合以下试剂:

(1) 样品反应:

质粒模板 DNA 2.1pmol

5× 测序缓冲液 5ml

引物 4.5pmol

无菌 ddH₂O 至终体积 16ml

(2) 对照反应

pGEM-3Zf(+)对照 DNA(4mg) 4.0ml

5× 测序缓冲液 5ml

pUC/M13 正向引物(4.5pmol) 3.6ml

无菌 ddH₂O 至终体积 16 ml

3. 在引物/模板混合物(以上第 2 步)中加入 1.0ml 测序级 Taq DNA 聚合酶(5u/ml)。用吸液器吸动几次混匀。

4. 从第 3 步的酶/引物/模板混合物中吸取 4μl 加入每一个 d/ddNTP 混合物的管内。

5. 在微量离心机中离心一下, 使所有的溶液位于 eppendorf 管底部。

6. 把反应管放入预热至 95 的热循环仪, 以[注意]中循环模式为基准, 开始循环程序。对于每个引物/模板组合都必须选择最佳退火温度。下列程序一般能读出从引物开始 350 碱基的长度。

7. 热循环程序完成后, 在每个小管内加入 3 μ l DNA 测序终止溶液, 在微量离心机中略一旋转, 终止反应。

[注意] 1、测序所用模板 DNA 的量一般按下面要求加入:

模板种类/长度 模板量

200bp (PCR 产物) 16ng(120fmol)

3000-5000bp (超螺旋质粒 DNA) 4mg (2pmol)

48000bp(,粘粒 DNA) 1mg(31fmol)

由于超螺旋质粒产生的信号比松弛的线性双链 DNA 弱, 因此使用超螺旋质粒作为模板时其用量要比其它模板大一些。

2、计算与 4.5pmol 相当的引物纳克数可用以下一般公式:

$4.5\text{pmol} = 1.5\text{ng} \times n$, 其中 n 为引物碱基数

计算与 1pmol 相当的引物微克数可用以下一般公式:

$\text{dsDNA}: 1\text{pmol} = (6.6 \times 10^{-4} \text{ mg}) \times n$, 其中 n 为模板碱基对数

$\text{ssDNA}: 1\text{pmol} = (3.3 \times 10^{-4} \text{ mg}) \times n$, 其中 n 为模板碱基数

3、为阻止 Taq DNA 聚合酶延伸非特异性退火引物, 热循环仪必须预热至 95。温度变换应越快越好。下面的循环时间不包括变温时间。如果你无法确定使用何种模式, 建议从模式 1 开始。

模式 1: 适用于引物 < 24 碱基或 GC 含量 < 50%

95 2 分钟。然后: 95 30 秒(变性), 42 30 秒(退火), 70 1 分钟(延伸)。

模式 2: 适用于 24 碱基或略短的 GC 含量 50% 的引物。

95 2 分钟, 然后: 95 30 秒(变性), 70 30 秒(退火/延伸)。4. 在加入终止溶液之后样品可在 4 保存过夜。

(二) 测序凝胶板的制备

1、玻璃板的处理:

银染测序的玻璃板一定要非常清洁, 一般先用温水和去污剂洗涤, 再用去离子水冲洗玻璃板, 除去残留的去污剂, 最后用乙醇清洗玻璃板。玻璃板上遗留的去污剂微膜可能导致凝胶染色时背景偏高(棕色)。短玻璃板经粘合溶液处理可将凝胶化学交联于玻璃板上。这一步对于在银染操作过程中防止凝胶撕裂至关重要。

(1) 短玻璃板的处理

A. 在 1ml 95%乙醇, 0.5%冰乙酸中加入 5ml 粘合硅烷(Bind Silane), 配成新鲜的粘合溶液。

B. 用经浸透新配的粘合溶液浸透的吸水棉纸擦拭仔细清洗过并已经自然干燥的玻璃板, 整个板面都必须擦拭。

C. 4-5 分钟后, 用 95%乙醇单向擦玻璃板, 然后略用力沿垂直方向擦拭。重复三次这一清洗过程, 每次均须换用干净的纸, 除去多余的粘合溶液。

[注意] 1. 在 95%乙醇单向擦玻璃板时过度用力会带走过多的粘合硅烷, 使凝胶不能很好地粘附。

2. 准备长玻璃板之前要更换手套, 防止沾染粘合硅烷。

3、防止粘合溶液沾染在长玻璃板上是很重要的, 否则将导致凝胶撕裂。

(2)、长玻璃板的处理

A. 用浸透 SigmaCote 溶液的棉纸擦拭清洗过的长玻璃板。

B. 5-10 分钟后用吸水棉纸擦拭玻璃板以除去多余的 Sigmacote 溶液。

[注意] 1. 用过的凝胶可在水中浸泡后用剃须刀片或塑料刮刀刮去。玻璃板须用去污剂完全清洗。或者凝胶用 10% NaOH 浸泡后除去。为防止交叉污染, 用于清洗短玻璃板的工具必须与清洗长玻璃板的工具分开, 如果出现交叉污染, 以后制备的凝胶可能撕裂或变得松弛。

2、凝胶的制备:

(1) 玻璃板经粘合硅胶和 Sigmacote 处理后, 即可固定玻璃板。该方法是用 0.2mm 或 0.4mm 厚的边条置于玻璃板左右两侧, 将另一块玻璃板压于其上。在长玻璃板的一侧插入鲨鱼齿梳平的一面边缘, 用夹子固定住。

(2) 根据所需要的凝胶浓度, 按下表制备测序凝胶, 一般 6%-8% 的胶浓度可获得较好的结果。配制过程中, 先用适量双蒸水溶解尿素, 再加入 Acr&Bis 和 10×TBE 缓冲液, 再用双蒸水调终体积至 99.2ml, 并用 0.45mm 的滤膜过滤, 然后加过硫酸铵和 TEMED。溶解尿素时不必加热。如果确需加热则应等溶液完全冷却后, 方可加入 TEMED 和过硫酸铵。一般在胶灌制后 4-6 分钟, 即开始聚合, 如果聚合不好, 则应使用高浓度的 TEMED 和过硫酸铵。

凝胶终浓度

3 4 5 6 8 12 16 18

尿素 42.0 42.0 42.0 42.0 42.0 42.0 42.0 42.0

Acr&Bis(ml) 7.5 10.0 12.0 14.5 20.0 30.0 40.0 50.0

10×TBE 缓冲液(ml) 10.0 10.0 10.0 10.0 10.0 10.0 10.0 10.0

双蒸水(ml) 47.5 45.0 43.0 40.5 35.0 25.0 15.0 5.0

10%过硫酸铵(ml) 0.8 0.8 0.8 0.8 0.8 0.8 0.7 0.7

TEMED(ml) 87 80 80 80 80 70 47 40

(3) 胶配制好后, 即可灌制胶板。一般是将凝胶沿着压条边缘缓慢地倒入玻璃板的槽中, 倒完后, 静止放置使之聚合完全。

[注意] 1、使用夹子固定玻璃板时, 最好夹子的力量稍大一些, 防止因力量不足使灌胶的过程中出现漏胶液现象。

2、灌制凝胶的过程中要严防产生气泡, 否则影响测序的结果。

(三) 电泳:

1、预电泳

(1) 当凝胶聚合完全后, 拔出鲨鱼齿梳, 将该梳子反过来, 把有齿的一头插入凝胶中, 形成加样孔。

(2) 立即将胶板固定在测序凝胶槽中, 一般测序凝胶槽的上下槽是分开的, 因而只有在固定好凝胶板后, 方能加入 TBE 缓冲液。

(3) 稀释 10×TBE 缓冲液至 1×TBE, 将该缓冲液加入上下二个电泳槽中, 去除产生的气泡, 接上电源准备预电泳。

(4) 有些电泳槽, 如 LKB 的 Macrophor 等是使用水浴加热的, 则应先将水浴加热至 55℃ 后进行预电泳。有的不使用水浴加热, 依靠电泳过程中自身产生的热进行保温, 如上海求精有机玻璃仪器生产的测序电泳槽, 这种槽需夹上二块散热铝板, 使整个凝胶板的温度一致。

(5) 按 30V/cm 的电压预电泳 20-30 分钟。预电泳的过程是去除凝胶的杂质离子, 同时使凝胶板达到所需的温度。高温电泳可防止 GC 丰富区形成的发夹状结构, 影响测序的结果。

[注意]

(1). 用鲨鱼齿梳制作加样孔时, 应注意将齿尖插入胶中 0.5mm 左右, 千万注意不能使加样孔渗漏, 否则得不到正确的结果。

(2). 应时刻注意上面电泳槽中的缓冲液是否渗漏, 否则极易造成短路而损坏电泳仪。

2、样品的制备：

当在预电泳时，即可进行样品的制备，将反应完毕的样品在沸水浴中加热 1-3 分钟，立即置于冰上即可。如果样品长时间不用，则应重新处理。可使用 4-6%聚丙烯酰胺凝胶，胶厚 0.4mm。厚度小于 0.4mm 的胶可能导致信号太弱。加样时不必吸去上层覆盖的矿物油，但要小心地吸取矿物油下的蓝色样品。

3、上样及电泳

关闭电泳仪，用移液枪吸缓冲液清洗样品孔，去除在预电泳时扩散出来的尿素，然后立即用毛细管进样器吸取样品，加入样品孔中。上样顺序一般为 G、A、T、C。加样完毕后，立即电泳。开始可用 30V/cm 进行电泳，5 分钟后可提高至 40-60V/cm，并保持恒压状态。一般来说，一个 55cm 长，0.2mm 厚的凝胶板，在 2500V 恒压状态下电泳 2 小时即可走到底部，同时在电泳过程中，电流可稳定地从 28mA 降至 25mA。为了能读到更长的序列，可采用两轮或多轮上样。

[注意]

1、上样电泳时，一定要注意凝胶板的温度是否达到 55 左右，如果还没有达到，则应等温度达到后才能上样电泳。

2、一般来说电泳时，不宜使用太高的电压，因为太高的电压会使凝胶的分辨率降低，并且使带扩散。电泳中可进行恒功率电泳。

(四) 测序凝胶的银染

染色过程要求凝胶浸在塑料盘中。因而至少使用两个盘子，大小与玻璃板类似。在盘中加入新鲜溶液之前须用高质量的水洗涤盘子。

1. 电泳完毕后用一个塑料片子小心地分开两板，凝胶应该牢固地附着在短玻璃板上。

2. 固定凝胶：将凝胶(连玻璃板)放入塑料盘，用固定/停止溶液浸没，充分振荡 20 分钟或直至样品中染料完全消失，胶可在固定/停止溶液中保存过夜(不振荡)。保留固定/停止溶液，用于终止显影反应。

3. 洗胶：用超纯水振荡洗胶 3 次，每次 2 分钟。从水中取出，当转移至下一溶液时拿着胶板边缘沿静止 10-20 秒，使水流尽。

4. 凝胶染色：把凝胶移至染色溶液充分摇动 30 分钟。

5. 凝胶显影：

(1). 在显影溶液中加入甲醛(3ml)和硫代硫酸钠溶液(400 μ l)以完成显影液的配制。

(2). 从染色溶液中取出凝胶放入装有超纯水的盘中浸洗 5-10 秒。注意，把凝胶从超纯水转移到显影溶液的总时间不能长于 5-10 秒。浸泡时间过长则导致信号微弱或丧失信号。若浸泡时间过长，可重复第五步用染色液浸泡。

(3). 立刻将凝胶转移至 1 升(总量的一半)预冷的显影液充分振荡直至模板带开始显现或开始出现第一批条带，把凝胶移入剩下的 1 升显影液中继续显影 2--3 分钟，或直至所有条带出现。

6. 固定凝胶：在显影液中直接加入等体积的固定/停止溶液。停止显影反应，固定凝胶。

7. 在超纯水中浸洗凝胶两次，每次 2 分钟，注意在本操作中戴手套拿着胶板边缘避免在胶上印上指纹。

8. 将凝胶置于室温干燥或用抽气加热法干燥。在可见光灯箱或亮白，黄色背景(如纸)上观察凝胶，若需永久保存的记录，则可用 EDF 胶片保留实验结果。

[注意] 测序产物的银染是显现序列信息的一种新方法，本系统的成败受几个因素的影响。

1. 水的质量对于染色的成功极其重要。超纯水(NANOpureR 或 Milli-QR 的水)或双蒸水可获得较好的效果，如果水中有杂质，则低分子量条带可能无法出现。

2. 碳酸钠也非常重要。使用新鲜的，美国化学学会级碳酸钠较好，如 Fisher 和 Kodak ACS 试剂级碳酸钠(Fisher Cat #S263-500 或 S262-3，或 Kodak Cat #109-1990)，一般可获得较好的结果。

3. 染色后的洗涤步骤是非常关键的。如果凝胶洗涤时间太长，银颗粒会脱离 DNA，产生很少或没有序列信号。如果洗涤时间过长，染色步骤可以重新进行。

4. 如果凝胶厚度超过 0.4mm 或丙烯酰胺浓度高于 4-6%，则有必要延长固定和染色的时间。如果凝胶比 0.4mm 薄，染色反应后的洗涤必须缩短至不超过 5 秒。

5. 在室温下进行所有步骤，显影反应除外。显影溶液必须预冷至 10-12℃ 以减小背景杂色。注意：临用前在显影溶液中加入甲醛和硫代硫酸钠。用新配的染色及显影溶液。不要重复使用任何溶液。

（五）EDF 胶片显影

使用 EDF 胶片可增强测序条带的对比度，如果测序胶上条带很淡，我们建议把数据转移至 EDF 胶片，银染胶在其影像转移至 EDF 胶片之后可增强条带可读性。

1. 在暗室内，将染色过的粘于玻璃板的凝胶(胶面向上)置于荧光灯箱上。如有合适的漫射板，亦可用白灯箱，为确保曝光时间，用一小条 EDF 胶片曝光不同时间，检查不同的曝光强度，一般曝光 20--40 秒可得较好结果。

2. 在红灯下找到 EDF 胶片有缺刻的一角，然后把胶片置于凝胶上，使缺口位于左上角。由于 EDF 胶片是单面的，因此必须确保缺口在左上角。

3. 在 EDF 胶片上放置一干净、干燥的玻璃板，开亮灯箱约 20 秒。

4. 用冲显放射自显影胶片的步骤手工显影 EDF 胶片，可使用下列操作过程：

- a. 在 Kodak GBX 显影液中显影 1-5 分钟；
- b. 水洗 1 分钟；
- c. 在 Kodak GBX 定影液中定影 3 分钟；
- d. 水洗 1 分钟。

[注意] 1. 进行 EDF 胶片显影之前凝胶必须完全干燥。戴手套进行操作，以免印上指纹。同时注意 EDF 胶片不能用自动胶片处理器。

2. 对于不同的光源最佳曝光时间可能不同，通过对一小条 EDF 胶片曝光不同时间以选择你所用光源的最佳曝光时间，参阅胶片说明书。

3. 曝光时间短则 EDF 胶片影像较深，曝光时间长则有助于减弱背景。

第二节 T7 DNA 聚合酶测序技术

一、概述

T7 DNA 聚合酶最初具有 5' 3'聚合酶活性以及单链和双链 3' 5'外切酶活性。当 T7 DNA 聚合酶用适当方法处理后，可使 3' 5'外切酶活力明显下降。改造后的 T7 DNA 聚合酶又称 T7 测序酶。使用 T7 测序酶得到的测序数据具有在每个碱基位置都有相对均匀的配对掺入。因此，放射自显影所得到的结果较为清晰易辨，对于许多模板来说，使用含有 dGTP 的混合物即可得到理想的测序结果。然而，如果出现了带压缩的问题，则用含 dITP 的混合物来取代常规的 dGTP。dITP 的掺入，使在富含 GC 的模板中也能有效地消除带压缩现象。

T7 测序酶具有很高的聚合速度，并有高度的延续性，正因如此，该酶在使用中不同于 Klenow 片段和反转录酶。它几乎没有错误性的终止，整个反应在很短的时间内完成，并且不需要进行追加反应(Chase step)。然而对于有紧密二级结构的区域，错误的终止反应会给阅读序列带来困难。如果碰到这些情况，应使用一些高温 DNA 聚合酶，如 Promega 公司的测序级 Taq DNA 酶。利用高温 DNA 聚合酶独有的耐热特性，测序反应可在不利于形成二级结构的高温条件下进行。

T7 DNA 聚合酶测序的快速而简便的方法是从 Klenow 酶和 AMV 反转录酶测序的操作步骤修改而来的，它的最大优点是具有很高的 5'-3'的 DNA 合成活性和极低的 3'-5'端外切酶的活性。在测序过程中，若以同位素标记则相对于大肠杆菌 DNA 聚合酶 的大片段 Klenow，或反转录酶 AMV 而言，则可使条带非常的均一，并且它的放射性背景极低。

T7 DNA 聚合酶测序时 DNA 的合成过程是分二步完成的。第一步为标记反应阶段，第二步方为双脱氧链末端终止的 DNA 合成过程。在第一步过程中，引物的延伸是在较低浓度的脱氧三磷酸核苷酸的存在下完成的，在此反应过程中，已含有经放射性标记的 dATP。第二步过程中，脱氧三磷酸核苷酸浓度提高，并且加入双脱氧的三磷酸核苷酸，DNA 在合成过程中，因加入的双脱氧三磷酸核苷酸而随机终止，形成长短不一的 DNA 片段。

二、材料 待测的 DNA 模板，可用双链或单链模板。

三、设备 高压电泳仪，测序用电泳槽，照相显影用大号塑料盆，制胶设备，吹风机，放射自显影盒，X-光片。

四、试剂

1、5 × T7 DNA 聚合酶缓冲液：200mmol/L Tris · Cl, pH7.5, 100mmol/L MgCl₂, 250mmol/L NaCl。

2、引物：使用通用引物 pUC/M13 正向或逆向引物。

3、DTT：0.1mol/L。

4、5 × 常规标记混合物：7.5mmol/L dGTP, 7.5mmol/L dCTP, 7.5mmol/L dTTP。

5、5 × dITP 标记混合物：15mmol/L dITP, 7.5mmol/L dCTP, 7.5mmol/L dTTP。

6、dNTP A 溶液（适用于 dGTP）：80mmol/L dGTP, 80mmol/L dATP, 80mmol/L dCTP, 80mmol/L dTTP, 50mmol/L NaCl。

7、ddG 终止混合物（适用于 dGTP）：dNTP A 溶液再加 8mmol/L ddGTP。

8、ddA 终止混合物（适用于 dGTP）：dNTP A 溶液再加 8mmol/L ddATP。

9、ddT 终止混合物（适用于 dGTP）：dNTP A 溶液再加 8mmol/L ddTTP。

10、ddC 终止混合物（适用于 dGTP）：dNTP A 溶液再加 8mmol/L ddCTP。

11、dNTP B 溶液（适用于 dITP）：160mmol/L dITP, 80mmol/L dATP, 80mmol/L dCTP, 80mmol/L dTTP, 50mmol/L NaCl。

12、ddG 终止混合物（适用于 dITP）：dNTP B 溶液再加 1.6mmol/L ddGTP。

13、ddA 终止混合物（适用于 dITP）：dNTP B 溶液再加 1.6mmol/L ddATP。

14、ddT 终止混合物（适用于 dITP）：dNTP B 溶液再加 1.6mmol/L ddTTP。

15、ddC 终止混合物（适用于 dITP）：dNTP B 溶液再加 1.6mmol/L ddCTP。

16、测序用 T7 DNA 测序酶。

17、酶稀释缓冲液：10mmol/L Tris · HCl, pH7.5, 5mmol/L DTT, 0.5mg/ml BSA。

18、终止溶液：95%甲酰胺，20mmol/L EDTA, 0.05%溴酚兰，0.05%二甲苯兰。

19、[α-32P]dATP 或 [α-35S]-dATP, 35S 的优点是可使条带为窄而清晰，并且操作更为安全。放射强度为：1000-1500Ci/mmol，10mCi/ml。

20、TE 缓冲液：10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH7.5。

21、上节所述的凝胶制备过程中的全套试剂。

22、X 光显影液：H₂O：50 800ml，米吐尔 2.2g，无水 Na₂SO₃ 72g，对苯二酚 8.8g，无水 NaCO₃ 48g，KBr 4g，定容至 1000ml 备用。

23、F-5 坚膜定影液：水 600ml，Na₂S₂O₃ 240g，Na₂SO₃ 15g，冰醋酸 13.4ml；硼酸 7.5g，粉状钾矾 15g，定容至 1000ml 备用。

24、TYP 肉汁培养基：16g 蛋白胨，16g 酵母提取物，5g NaCl, 2.5g K₂HPO₄，加水溶解，定容至 1000ml。

25、20%PEG/3.75mol NH₄Ac 溶液：40% PEG（分子量 8000）储备液和 7.5mol/L pH7.2 NH₄Ac 储备液等体积混合。

五、操作步骤：

（一）模板制备

1、M13 单链模板制备：在转化入合适的大肠杆菌宿主菌且在含有指示剂如 X-gal/IPTG 的培养基

上铺板之后, 含有 M13 重组子的细胞将表现出无色的"噬菌斑", 事实上受感染的细胞并非被噬菌体溶菌或杀死, 出现噬菌斑是因为被感染的细菌在生长速度上比其周围未感染的细菌慢的缘故, 从无色噬菌斑上得到的感染细胞经培养便能产生测序反应所需的单链模板。

(1) 过夜培养的宿主细胞(如 NM522 或 JM101)用 3ml TYP 肉汁培养基以 1:100 稀释。在 37℃ 强烈震荡 1 小时之后, 细胞进入对数早期。此时, 将一个合适的含有重组 M13 的噬菌斑(连同琼脂)用滴管转入该细胞培养液中。

(2) 37℃ 强烈震荡(300rpm) 培养 6 小时。

(3) 把细胞培养液转入两只 1.5ml eppendorf 管, 12000g 离心 15 分钟。上清液转移到新的 eppendorf 管再离心 15 分钟。小心地取出 1-1.2ml 上清液(注意不能触及沉淀), 再转到新的 eppendorf 管。

(4) 将 0.25 体积的含 20%PEG(-8000)的 3.75M 醋酸铵(pH7.5)加入上清液以沉淀噬菌体。混匀后置冰上 30 分钟, 再以 12000g 离心 15 分钟, 倾去上清液, 再以同样方法离心一次, 用吸液器尖头将残留的 PEG 充分吸干净。此时应能见管底有芝麻大小的噬菌体颗粒沉淀。

(5) 将沉淀物重溶于 400ml TE 缓冲液中。

(6) 加等体积氯仿/异戊醇(24:1)混合液, 强烈震荡 1 分钟, 12000g 离心 5 分钟。

(7) 将水相转入一新的 eppendorf 管, 注意不能触动原管中两相交界面。加等体积苯酚/氯仿(1:1)混合液, 强烈振荡 1 分钟, 12000g 离心 5 分钟。

(8) 将上层水相转入另一新的 eppendorf 管, 重复第 7 步的提取, 如有必要重复多次直至二相之间无可见物质存在。

(9) 将上层水相转入一新的 eppendorf 管, 加等体积氯仿, 强烈振荡 1 分钟后, 12000g 离心 5 分钟, 多次重复此步骤。

(10) 将上层水相转入新的 eppendorf 管, 加 0.5 倍体积的 7.5 mol/L 醋酸铵, 2 倍体积乙醇, 混匀后-20℃ 放置 30 分钟。

(11) 12000g 离心 15 分钟, 去除上清液, 用 70%乙醇小心清洗沉淀, 如果沉淀已被搅起, 重新离心, 倾去酒精, 真空干燥沉淀物。

(12) 将 DNA 的沉淀物溶解于 20ml 去离子水中, 取 2ml 样品进行琼脂糖凝胶电泳定量, 如果 DNA 量充足, 则可进行退火测序。

2、噬粒(Phagemid)单链模板的制备:

噬粒是指含有丝状单链 DNA 噬菌体复制区的嵌合质粒。分子克隆中常用的 pBluescript 系列和 pGEM 系列的质粒均属噬粒。含重组噬粒的细胞单菌落经液体培养并用辅助噬菌体超感染后就能产生测序反应所需的单链 DNA 模板。

(1) 从新鲜平板上挑得含 pGEM 质粒 DNA 的抗 Amp 单菌落, 并接种到 100ml 含有 50mg/ml 氨苄的 TYP 肉汤培养基中, 在 37℃ 振荡过夜。

(2) 取 100ml 过夜培养物接种到另一新的装有 5ml 含 50mg/mlAmp 的 TYP 肉汁培养基的试管中, 在 37℃ 强烈振荡 30 分钟。

(3) 加 40 μl 辅助噬菌体 R408 或 M13 K07, 继续剧烈搅拌振荡培养 6-8 小时, 使辅助噬菌体超感染。

(4) 12000g 离心 15 分钟后, 去除沉淀, 取上清, 转移到一新 eppendorf 管中再次离心 15 分钟。

五、操作步骤:

(一) 模板制备

1、M13 单链模板制备: 在转化入合适的大肠杆菌宿主菌且在含有指示剂如 X-gal/IPTG 的培养基上铺板之后, 含有 M13 重组子的细胞将表现出无色的"噬菌斑", 事实上受感染的细胞并非被噬菌体溶菌或杀死, 出现噬菌斑是因为被感染的细菌在生长速度上比其周围未感染的细菌慢的缘故, 从无色噬

菌斑上得到的感染细胞经培养便能产生测序反应所需的单链模板。

(1) 过夜培养的宿主细胞(如 NM522 或 JM101)用 3ml TYP 肉汁培养基以 1:100 稀释。在 37℃ 强烈震荡 1 小时之后,细胞进入对数早期。此时,将一个合适的含有重组 M13 的噬菌斑(连同琼脂)用滴管转入该细胞培养液中。

(2) 37℃ 强烈震荡(300rpm) 培养 6 小时。

(3) 把细胞培养液转入两只 1.5ml eppendorf 管, 12000g 离心 15 分钟。上清液转移到新的 eppendorf 管再离心 15 分钟。小心地取出 1-1.2ml 上清液(注意不能触及沉淀), 再转到新的 eppendorf 管。

(4) 将 0.25 体积的含 20%PEG(-8000)的 3.75M 醋酸铵(pH7.5)加入上清液以沉淀噬菌体。混匀后置冰上 30 分钟,再以 12000g 离心 15 分钟,倾去上清液,再以同样方法离心一次,用吸液器尖头将残留的 PEG 充分吸干净。此时应能见管底有芝麻大小的噬菌体颗粒沉淀。

(5) 将沉淀物重溶于 400ml TE 缓冲液中。

(6) 加等体积氯仿/异戊醇(24:1)混合液,强烈震荡 1 分钟,12000g 离心 5 分钟。

(7) 将水相转入一新的 eppendorf 管,注意不能触动原管中两相交界面。加等体积苯酚/氯仿(1:1)混合液,强烈振荡 1 分钟,12000g 离心 5 分钟。

(8) 将上层水相转入另一新的 eppendorf 管,重复第 7 步的提取,如有必要重复多次直至二相之间无可见物质存在。

(9) 将上层水相转入一新的 eppendorf 管,加等体积氯仿,强烈振荡 1 分钟后,12000g 离心 5 分钟,多次重复此步骤。

(10) 将上层水相转入新的 eppendorf 管,加 0.5 倍体积的 7.5 mol/L 醋酸铵,2 倍体积乙醇,混匀后-20℃ 放置 30 分钟。

(11) 12000g 离心 15 分钟,去除上清液,用 70%乙醇小心清洗沉淀,如果沉淀已被搅起,重新离心,倾去酒精,真空干燥沉淀物。

(12) 将 DNA 的沉淀物溶解于 20ml 去离子水中,取 2ml 样品进行琼脂糖凝胶电泳定量,如果 DNA 量充足,则可进行退火测序。

2、噬粒(Phagemid)单链模板的制备:

噬粒是指含有丝状单链 DNA 噬菌体复制区的嵌合质粒。分子克隆中常用的 pBluescript 系列和 pGEM 系列的质粒均属噬粒。含重组噬粒的细胞单菌落经液体培养并用辅助噬菌体超感染后就能产生测序反应所需的单链 DNA 模板。

(1) 从新鲜平板上挑得含 pGEM 质粒 DNA 的抗 Amp 单菌落,并接种到 100ml 含有 50mg/ml 氨苄的 TYP 肉汤培养基中,在 37℃ 振荡过夜。

(2) 取 100ml 过夜培养物接种到另一新的装有 5ml 含 50mg/mlAmp 的 TYP 肉汁培养基的试管中,在 37℃ 强烈振荡 30 分钟。

(3) 加 40 μ l 辅助噬菌体 R408 或 M13 K07,继续剧烈搅拌振荡培养 6-8 小时,使辅助噬菌体超感染。

(4) 12000g 离心 15 分钟后,去除沉淀,取上清,转移到一新 eppendorf 管中再次离心 15 分钟,小心地取 1-1.2ml 上清液(注意不能触及沉淀)。

(5) 将 0.25 体积的含 20% PEG-的 3.75M 醋酸铵加入上清液以沉淀噬菌体颗粒。混匀后置冰上 30 分钟,再以 12000g 离心 15 分钟,倾去上清液,再以同样方法离心一次,用移液器尖头将残留的 PEG 溶液吸净。此时应能看到管底有芝麻大小的噬菌体颗粒沉淀。

(6) 将沉淀物溶解于 400ml TE 缓冲液(10mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1mmol/L EDTA)。

(7) 加等体积氯仿/异戊醇(24:1)混合液,强烈振荡 1 分钟,再以 12000g 离心 5 分钟。

(8) 将水相转入一干净 eppendorf 管(不要触动原管中两相交界面),加等体积酚/氯仿(1:1)混合液,强烈振荡 1 分钟,12000g 离心 5 分钟。

(9) 上层水相转入一干净 eppendorf 管重复第 8 步骤提取, 如有必要重复多次直至二相之间无可见物质。

(10) 将上层水相转入一干净 eppendorf 管加等体积氯仿, 强烈振荡 1 分钟后离心, 多次重复此步骤。

(11) 将上层水相转入一干净 eppendorf 管加 0.5 倍体积 7.5mol/L pH7.5 醋酸铵, 再加 2 倍体积乙醇, 混和后-20℃ 放置 30 分钟。

(12) 12000g 离心 15 分钟, 去除上清液, 用 70%乙醇小心清洗沉淀, 如沉淀已被搅起, 重新离心, 倾去乙醇, 真空干燥沉淀。

(13) 将沉淀物溶解于 20ml 去离子水中, 取 2ml 样品进行琼脂糖凝胶电泳进行定量, 如果 DNA 量充足, 则进行退火和测序。

3、质粒膜板制备: 参照第一章所述的方法。

(二) 超螺旋质粒 DNA 的碱变性:

1、取 4mg (约 2pmol) 超螺旋质粒 DNA 至一 eppendorf 管中, 加无离子水到终体积 18ml。

2、加 2ml 2mmol/L NaOH/2mmol/L EDTA 溶液, 置于室温(25℃ 下) 保温 5 分钟。

3、加 2ml 2mol/L NaAc 溶液(pH4.6)涡旋混匀, 使之中和。

4、加 75ml 无水乙醇, 充分混匀后, 置于干冰或-70℃ 沉淀 10 分钟。

5、于 12000g 离心 10 分钟, 弃去上清, 用 200ml 预冷的 70%乙醇洗沉淀后, 干燥沉淀, 溶于 20ml 无离子水中。

(三) 测序反应:

1、引物和模板的退火:

(1) 在一离心管中, 混合如下几种试剂:

引物 约 1-2pmol

5 × T7 DNA 聚合酶测序反应缓冲液 2ml

DNA 约 1mg

加 ddH₂O 终体积至 10ml。

(2) 将试管盖盖好后, 65℃ 加热 2 分钟, 然后在大约 30 分钟左右的时间内, 使试管的温度缓慢地降到室温。降温的过程中可使用小的加热板或小型的保温仪, 也可使用已调至 65℃ 的水浴, 使它们的温度在室温下缓慢地降至室温即可。当温度降至 30℃ 以下时, 退火结束。可将小试管置于冰上, 退火完毕的模板须在 4 小时内使用。

2、标记反应

(1) 在一个标准的反应过程中(从引物处开始, 可读至 500 个碱基以上), 首先需要按 1:5 稀释标记混合物。如 4ml 混合物则加双蒸无离子水 16ml。该稀释液储存在 -20℃ 可使用数周。如果所要测定的序列小于 30 个碱基, 可将标记缓冲液稀释 15 倍, 同时, 模板 DNA 要高于 0.5pmol。由于 DNA 模板量的不足, 会降低标记反应的程度, 即只标记引物后的几个核苷酸。

(2) 用冰预冷的 TE 缓冲液按 1:8 稀释 T7 DNA 聚合酶。酶液稀释后应立即使用, 置于冰浴不宜超过 60 分钟。不得使用标记混合物、DTT 溶液或非缓冲液类溶液稀释酶液。

(3) 在已退火的引物-模板混合物中, 依次加入:

0.1mol/L DTT 1.0ml

标记混合物 2.0ml

[α -35P]dATP 或[α -35S]dATP 0.5ml

已稀释好的 T7 DNA 聚合酶 2.0ml

混合充分(注意不得产生气泡), 置于室温 5-10 分钟。

如果在电泳时碰到带压缩问题, 则 dITP 混合物的效果优于 dGTP 混合物, dITP 混合物的使用方法与 dGTP 混合物的使用是相似的。

[注意] 1、稀释时应将所有的溶液预先混合完全后再加入酶液。

2、在第(3)步的过程中,如果反应中有几次冷却,保温的时间过长或温度太高的话,则会使测序反应短于100个碱基。

3、链终止反应:

(1)取4支 eppendorf 管分别标上 G, A, T, C。

(2)每个管分别加入 2.5ml G, A, T, C 链末端终止混合物,立即盖上盖子以防液体蒸发(本反应最好在标记反应前做好)。dGTP 和 dITP 混合物依据各自需要选用。

(3)将 eppendorf 管预热至 37 1 分钟。

(4)待标记反应完毕后,取 3.5ml 标记反应液至上述 4 支 eppendorf 管中,稍微离心一下,并将上述四管置于 37 保温。注意在每一次反应中,均应使用新的吸液头,以免交叉污染。

(5)继续保温 3-5 分钟(若使用 dITP 时,保温时间可延长至 30 分钟,对反应产物没有任何影响。

(6)在上述四管中各加入 4ml 终止缓冲液。混合均匀后,置于冰浴中。本样品即可上样电泳。用 35S 标记反应的样品可置于-20 保存一周,此时样品只有极少量的降解。而 32P 标记的则需在当天电泳以免降解。

(四)测序凝胶板的制备及电泳 参考第一节测序凝胶板的制备及电泳部分。样品加热至 75-80 2 分钟,立即上样,每个泳道的使用量为 2-3ml

(五)测序凝胶板的干燥及放射自显影。

电泳完毕后,经 32P 或 35S 标记的产物可用对 b-射线敏感的 X-光胶片放射自显影检测。

1、取下电泳的玻璃板,去除两边的压条,用小的薄钢片撬开玻璃板。若玻璃板用粘合硅烷处理过,凝胶会紧紧地粘合于玻璃板上,则凝胶与玻璃板一起进行下面步骤的处理。如果玻璃板没有经过粘合硅烷的处理,则可用 3MM 大滤纸贴在有凝胶的玻璃板上,小心地揭下凝胶,准备下一步的处理。

2、去除尿素,将含有凝胶的玻璃板或滤纸浸于含有 2 升 10%冰醋酸的大号显液盆中,轻轻振荡 15 分钟,去除尿素。

3、干胶:含有凝胶的玻璃板可用电吹风吹干,而含有凝胶的滤纸则可用专用的干胶设备如真空加热干胶仪抽干。

4、已经干燥的凝胶即可进行放射自显影。在玻璃板含有凝胶的这一面加上 X-光片后,用另一块相似大小的玻璃板夹住,然后用夹子固定,置于暗盒中曝光。而含有凝胶的滤纸则可置于 X-光曝光盒中放射自显影。一般 32P 曝光过夜即可,而 35S 为 2-3 天。

5、曝光完毕后的 X-光片即可冲洗,获得序列信息。将 X 光片置于水中先湿润,然后置于显影液中显影,直至条带清晰显示为止。X-光片用水淋洗片刻后置于定影液中定影 15 分钟以上。取出 X-光片干燥并读出序列。

[注意] 1、去除尿素是非常重要的,如果有残存的尿素,则在干胶过程中会使凝胶很粘,而无法进行放射自显影。可以用 10%冰醋酸洗二次,第一次 15 分钟,第二次 10 分钟。如果胶浓度高于 12%,则有可能在干胶过程中会产生皱纹,防止的方法有二种:(1)冰醋酸溶液中加入 1%-2%的甘油;(2)不干燥胶,直接在冰箱中以冰冻状态曝光,应注意的是在使用这个方法时,要在凝胶和 X-光片之间加一层薄的塑料薄膜。一般来说都使用第一种方法。

2、凝胶一定要充分干燥方可进行曝光,否则 X-光片会粘在胶的表面,致使以后的操作困难。

3、曝光时间应根据所使用的同位素而定,如果同位素已过半衰期则应相应延长曝光的时间。

(完)