

# 分子生物学实验技术手册

1.0 版

江南大学 · 生物工程学院 · 生物系统与生物加工工程研究室  
2007 年 12 月

# **A Manual of Molecular Microbiology**

**Ver 1.0**

School of Biotechnology  
Jiangnan University  
Lab of Biosystem and Bioprocess Engineering  
Dec., 2007

## 目录

1.	基因组 DNA 提取 .....	9
1.1.	酵母、细菌基因组 DNA 提取 .....	9
1.2.	真核细胞 DNA 的制备与定量 .....	9
1.3.	DNA 片段回收与纯化---冻融法 .....	11
1.4.	琼脂糖凝胶的特点 .....	11
1.5.	琼脂糖核酸电泳 .....	13
2.	聚合酶链式反应 ( PCR ) .....	14
2.1.	PCR 概述 .....	14
2.2.	PCR 引物设计黄金法则 .....	17
2.3.	PCR 反应体系 .....	18
2.4.	PCR 反应的重要因素 .....	19
2.5.	PCR 反应条件的选择 .....	20
2.6.	PCR 常见问题总汇 .....	22
2.7.	减少 PCR 产物中引物二聚体的方法 .....	23
2.8.	<i>pfu</i> 特性 FAQ .....	24
2.9.	增加 PCR 特异性的方法 .....	26
2.10.	反向 PCR ( 染色体步移 ) .....	28
2.11.	PCR 污染与对策 .....	29
2.12.	PCR 产物纯化方法 ( 酚/氯仿 ) .....	32
2.13.	大肠杆菌菌落 PCR .....	32
2.14.	酵母菌落 PCR .....	33
2.15.	胶回收纯化 DNA .....	33
2.16.	PCR 技术片段拼接的 SOE 和 SDL 方法 .....	34
2.17.	SOE-PCR , Fusion-PCR FAQ .....	34
2.18.	聚合酶链反应—单链构象多态性分析 ( PCR-SSCP ) .....	39
2.19.	用 Fusion PCR 构建基因片段 .....	42
3.	载体 DNA 的提取、鉴定与相关操作 .....	43
3.1.	质粒概述 .....	43
3.2.	质粒快速鉴定 .....	45
3.3.	质粒 DNA 的小量制备 ( 20 $\mu$ l ) .....	45
3.4.	质粒 DNA 的大量制备 ( 3 mL ) .....	48
3.5.	$\lambda$ 噬菌体 DNA 提取 .....	49
3.6.	酶切 .....	50
3.7.	单酶切 .....	51
3.8.	单酶切方向问题：注意！ .....	52
3.9.	双酶切 .....	52
3.10.	KpnI+BamHI .....	53
3.11.	XbaI+BamHI .....	53
3.12.	连接 .....	54
3.13.	酶切产物的乙醇沉淀方法 .....	54
4.	TA 克隆、亚克隆、克隆相关 .....	55
4.1.	目的基因的亚克隆 .....	55
4.2.	T4 DNA 连接酶 FAQ .....	57
4.3.	PCR 产物的克隆 .....	59
4.4.	外源 DNA 和质粒载体的连接反应 .....	60

4.5.	克隆 PCR 产物 FAQ.....	62
4.6.	连接反应心得.....	63
4.7.	DNA 重组实验.....	65
4.8.	pfu 的 PCR 产物加 A 尾巴以便于 T 载体连接及 pMD-18T 连接体系.....	67
5.	感受态细胞的制备、转化及转化子的筛选与鉴定.....	68
5.1.	大肠杆菌化学法感受态细胞的制备及转化.....	68
5.2.	大肠杆菌化学法高效率感受态细胞的制备 (详细的).....	69
5.3.	大肠杆菌电转化感受态细胞的制备及转化.....	70
5.4.	重组子的筛选和鉴定.....	71
5.5.	酵母电转化感受态细胞制备及转化.....	72
5.6.	不带抗性的酵母营养缺陷型的富集与筛选.....	73
5.7.	毕赤酵母电转化方法.....	73
5.8.	电击杯处理.....	74
5.9.	真核转染.....	75
5.10.	PDS-1000 基因枪操作手册.....	77
6.	基因敲除、定点突变, 与定向进化.....	78
6.1.	一种可重复利用的酵母基因敲除方法.....	78
6.2.	自杀质粒.....	80
6.3.	基于 DpnI 的定点突变方法.....	81
6.4.	基于 PCR 的定点突变实例.....	82
7.	核酸与蛋白质杂交技术.....	82
7.1.	Southern 杂交 (一).....	82
7.2.	Southern 杂交 (二).....	85
7.3.	Northern 杂交 (一).....	86
7.4.	Northern 杂交 (二).....	88
7.5.	Western 杂交 (一).....	90
7.6.	Western 杂交 (二).....	91
7.7.	抗体制备技术的选择.....	95
7.8.	原位杂交技术简介.....	98
7.9.	原位杂交组织化学常用试剂及处理.....	102
7.10.	荧光原位杂交 (FISH).....	114
8.	酵母双杂交技术.....	116
8.1.	酵母双杂交技术及其在蛋白质组研究中的应用.....	116
8.2.	酵母双杂交系统的发展和应用.....	119
8.3.	LexA 酵母双杂交系统操作方法.....	121
8.4.	酵母双杂交系统的建立与发展.....	132
8.5.	酵母双杂交系统研究及其应用.....	133
8.6.	酵母双杂交实验 FAQ.....	136
<b>9. RNA</b>		<b>136</b>
9.1.	RNA 操作中的一般要求.....	136
9.2.	蛋白酶 K 替代 DEPC 的系统方法.....	137
9.3.	总 RNA 的提取 (Trizol 法提取).....	137
9.4.	一种快速鉴定 RNA 质量的方法.....	137
9.5.	组织和细胞 RNA 的制备.....	139
9.6.	哺乳动物细胞总 RNA 的分离.....	140
9.7.	mRNA 的分离与纯化.....	142

9.8.	RNA 质量的确定	143
9.9.	RNA 酶保护试验	143
9.10.	mRNA 差别显示技术	145
9.11.	RT-PCR 简介	149
9.12.	RT-PCR 引物设计原则和方法	151
9.13.	RT-PCR	152
9.14.	RT-PCR 经验	153
9.15.	荧光 PCR 原理	154
9.16.	RNAi 实验原理与方法	155
9.17.	RNAi 技术新突破：根据 SNP 选择性沉默突变基因	159
9.18.	RNAi：制备 siRNAs 的方法	159
9.19.	dsRNA 和 RNA 干扰技术	164
10.	蛋白质异源表达、分离、纯化与鉴定	168
10.1.	原核表达	168
10.2.	原核表达的插入位点问题	169
10.3.	工程菌发酵	170
10.4.	细胞破碎	170
10.5.	蛋白含量测定方法	170
10.6.	包涵体复性	170
10.7.	重组蛋白质的表达、纯化、复性和定量	171
10.8.	表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析	171
10.9.	选择材料及预处理	172
10.10.	蛋白质的分离纯化	173
10.11.	细胞的破碎	175
10.12.	浓缩、干燥及保存	175
10.13.	细菌蛋白质的透析体会	176
10.14.	表达蛋白的分离与纯化	177
10.15.	蛋白质提取方法例子	178
11.	蛋白质组学	180
11.1.	蛋白质组技术的研究进展	180
11.2.	蛋白质组学及研究技术路线	184
11.3.	电泳技术简介	186
11.4.	等电聚焦电泳	190
11.5.	双向电泳的样品的制备	192
11.6.	双向电泳操作步骤	193
11.7.	SDS-PAGE 胶染色	194
11.8.	双向电泳蛋白点的切取和保存	195
11.9.	数据库搜索(Databases search)	195
11.10.	主要的公共数据库及网址	196
11.11.	双向电泳常见问题与原因	196
11.12.	蛋白质的序列分析流程	197
11.13.	聚丙烯酰胺凝胶的配制	198
11.14.	双向电泳常用溶液配方	199
12.	光滑球拟酵母相关参数测定	201
12.1.	细胞干重	201
12.2.	丙酮酸酶法测定方法	201

12.3.	丙酮酸和 $\alpha$ -KG 浓度 HPLC 测定方法	202
13.	微生物生理	202
13.1.	细菌的生物化学试验	202
13.2.	MTT 法实验原理与 MTT 溶液的配制方法	204
13.3.	酵母菌分类	204
13.4.	细胞凋亡的分子生物学检测方法	208
13.5.	液体培养中细胞凋亡 (PCD) 过程的监测	209
14.	哺乳动物细胞及动物实验	212
14.1.	真核细胞的转染	212
14.2.	转染细胞的稳定筛选	212
14.3.	肿瘤细胞体外传代培养及保种	213
14.4.	肿瘤动物模型的建立	213
14.5.	小鼠尾静脉注射方法	213
14.6.	肿瘤蛋白疫苗预防性动物实验	214
14.7.	人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 培养	214
14.8.	实验动物免疫方案	214
14.9.	血清制备	215
14.10.	ELISA	215
14.11.	血清学筛选克隆新抗原/新基因	215
14.12.	ELISPOT	217
14.13.	藻酸盐包裹实验	217
14.14.	重组腺病毒构建, 扩增及纯化基本技术操作 (细菌内同源重组 AdEasy System)	218
14.15.	免疫组化染色	222
14.16.	流式细胞仪常用的几种检测方法	224
14.17.	人肿瘤抗原的识别与鉴定 - 免疫沉淀实验流程	227
15.	附录-试剂配方	227
15.1.	常用贮液与溶液	228
15.2.	温度对常用缓冲液 pH 的影响	248
15.3.	pH 计的使用方法	248
15.4.	电泳缓冲液、染料和凝胶加样液	250
15.5.	常用溶剂与水的共沸物数据	253
15.6.	不同温度下常见无机化合物的溶解度	254
15.7.	实验室常用技术参数资料	262
15.8.	常用酶的配制	264
15.9.	杂交试验中用于降低背景的封闭剂	264
15.10.	常用凝胶的技术参数	265
15.11.	遗传密码表	267
15.12.	常用酸碱技术参数	268
15.13.	20 种标准氨基酸的命名及性质	269
15.14.	常见的 E.coli End-和 End+ 菌	269
15.15.	常用质粒和粘粒载体的复制起始点和拷贝数	270
15.16.	麦氏浊度计标准管配制方法	270
15.17.	常用培养基	270
15.18.	常用缓冲溶液	302
15.19.	常用抗生素	309
15.20.	细胞化学和细胞组分分离溶液	311

15.21.	细胞培养和细胞融合溶液 .....	313
15.22.	制备电镜标本的溶液 .....	314
15.23.	显影、定影溶液 .....	315
15.24.	微生物学实验常用染色液的配制 .....	316
15.25.	实验用水 .....	319
15.26.	各种核酸材料的贮存 .....	323
15.27.	分子生物学人员常用数据库 .....	324
15.28.	GeneBank 概览 .....	328
15.29.	分子生物学人员常用软件 .....	335
15.30.	分子生物学实验中的细节问题和小技巧 .....	336

## 1. 基因组 DNA 提取

### 1.1. 酵母、细菌基因组 DNA 提取

1. 1 ml 菌体发酵液，10000rpm 离心 10 min，去上清液；
2. 加 500 uL TE 悬浮沉淀，并加 10-20 uL Lysozyme 混匀，37 度保温 0.5 h；
3. 加 30 uL 10% SDS，3 uL 20ug/ml (或 1 mg 干粉) 蛋白酶 K，混匀，37 度保温 1 h；
4. 加 100 ul 5 mol/L NaCl 混匀；
5. 加 8 ul CTAB/NaCl 溶液，混匀，65 度保温 10 min；
6. 用等体积酚：氯仿：异戊醇 (25:24:1) 抽提，10000rpm 离心 5min，将上清液移至干净离心管中；
7. 用等体积氯仿：异戊醇 (24 : 1) 抽提，10000rpm 离心 5 min，取上清液移至干净离心管中；
8. 加等体积异丙醇，颠倒混合，-20 度静止 20 min，沉淀 DNA，10000rpm 离心 5min；
9. 倒出上清液，DNA 沉淀用 70%乙醇漂洗后，吸干，溶解于 50 uL TE；
10. 最后贮存液中加入 1 uL RNase。

### 结果

通常可获得 3-5ugDNA。

### 讨论

1. 在培养箱温度不够稳定等因素的影响下，有时隔夜后没有菌落形成，此时不必急于怀疑实验失败。建议再倒置培养一些时候，比如等到中午，或更晚一些时候，培养皿上会出现菌落。

2. 挑取菌落必须是单菌落，而不是那些融合的菌落。如果培养皿上的菌落全部融合，则建议重新划线培养，直至有单菌落为止。不然一旦混有不同的菌落，可能会给以后的实验带来麻烦。

3. 有关微型离心柱回收的利弊。原理与本实验近似，区别在于在 DNA 的回收阶段，不是采用醋酸钠-乙醇沉淀，而是采用微型柱。回收产物中往往留有痕量乙醇，这将妨碍一些对乙醇敏感的酶的活性，使后续工作困难。

4. 离心要求平衡。方法是保证离心机转子对面两侧的试管孔内有含有相等数量的离心物和试管，使两侧平衡。如果仅有一个离心管，则要求对面放置另一根相同规格的离心管，管内加入与样品数量相等的水。

5. DNA 的离心通常采用 1.4 万转的转速，10 分钟的时间，这足以满足沉淀 DNA 的要求。

6. 沉淀 DNA 或 RNA 离心时，应把 Eppendorf 管盖的连接带指向外侧，以保证离心后沉淀位于管底靠连接带的一侧，当 DNA 或 RNA 量少至难以辨认时，吸取上清之际，可避免吸头触及这一区域把所需沉淀吸起。

7. 室温下，DNA 沉淀容易浮起，所以整个操作过程应保持在 4℃环境下进行，手指持试管上部，切勿接触试管底部。

8. 吸取上清时动作要轻而快，加入 75%乙醇时，应将乙醇沿管壁轻轻加入，以免将沉淀冲起。

9. 通常，实验对 RNA 污染不是有严格要求的话，比如做酶切鉴定的话，实验步骤（加 TE、RNase、NaAC 等）可以免去。这样可以提高实验速度。

10. 离心后大肠杆菌的裂解物会黏附于管壁和浮于离心液表面，为避免大肠杆菌的裂解物堵塞吸头，可以一面将吸头推出气体，一面插入表面含有大肠杆菌的裂解物的离心液。

11. 加入溶液 I 前，可用 200μl 枪头将菌液吸干净。

12. 加入溶液 II、III 后，应轻轻颠倒混匀，切忌剧烈震荡混匀，否则容易打断 DNA。

13. 单纯乙醇沉淀效差，可考虑加醋酸钠等盐。加 75%乙醇是为了清洗菌斑，若菌斑中还有无机盐，25%的水可以把无机盐溶解出来，乙醇可把有机溶剂置换出来。

14. 65℃水浴时要打开盖子，这样可以使乙醇等挥发掉。

**!!! 另各公司都提供原理类似的试剂盒。**

### 1.2. 真核细胞 DNA 的制备与定量

制备基因组 DNA 是进行基因结构和功能研究的重要步骤，通常要求得到的片段的长度不小于 100-200kb。在 DNA 提取过程中应尽量避免使 DNA 断裂和降解的各种因素，以保证 DNA 的完整性，为后续的实验打下基础。一般真核细胞基因组 DNA 有  $10^7-9$ bp，可以从新鲜组织、培养细胞或低温保存的组织细胞中提取，常是采用在 EDTA 以及 SDS 等试剂存在下用蛋白酶 K 消化细胞，随后用酚抽提而实现的。这一方法获得的 DNA 不仅经酶切后可用于 Southern 分析，还可用于 PCR 的模板、文库构建等实验。

根据材料来源不同，采取不同的材料处理方法，而后的 DNA 提取方法大体类似，但都应考虑以下两个原则：

- (1) 防止和抑制 DNase 对 DNA 的降解；(2) 尽量减少对溶液中 DNA 的机械剪切破坏。

## 一、试剂准备

1. TE: 10mM Tris-HCl (pH 7.8); 1mM EDTA (pH 8.0)。
2. TBS: 25mM Tris-HCl (pH 7.4); 200mM NaCl; 5mM KCl。
3. 裂解缓冲液：250mM SDS; 使用前加入蛋白酶 K 至 100 $\mu$ g/ml。
4. 20% SDS
5. 2mg/ml 蛋白酶 K
6. Tris 饱和酚 (pH 8.0)、酚/氯仿 (酚：氯仿=1：1)、氯仿
7. 无水乙醇、75%乙醇

## 二、操作步骤

### (一) 材料处理

1. 新鲜或冰冻组织处理：

- (1) 取组织块 0.3-0.5cm<sup>3</sup>，剪碎，加 TE 0.5ml，转移到匀浆器中匀浆。
- (2) 将匀浆液转移到 1.5ml 离心管中。
- (3) 加 20% SDS 25  $\mu$ l，蛋白酶 K (2mg/ml) 25  $\mu$ l，混匀。
- (4) 60 $^{\circ}$ C 水浴 1-3hr。

2. 培养细胞处理：

- (1) 将培养细胞悬浮后，用 TBS 洗涤一次。
- (2) 离心 4000g $\times$ 5min，去除上清液。
- (3) 加 10 倍体积的裂解缓冲液。
- (4) 50-55 $^{\circ}$ C 水浴 1-2hr。

### (二) DNA 提取

1. 加等体积饱和酚至上述样品处理液中，温和、充分混匀 3min。
2. 离心 5000g $\times$ 10min，取上层水相到另一 1.5ml 离心管中。
3. 加等体积饱和酚，混匀，离心 5000g $\times$ 10min，取上层水相到另一管中。
4. 加等体积酚/氯仿，轻轻混匀，离心 5000g $\times$ 10min，取上层水相到另一管中。如水相仍不澄清，可重复此步骤数次。
5. 加等体积氯仿，轻轻混匀，离心 5000g $\times$ 10min，取上层水相到另一管中。
6. 加 1/10 体积的 3M 醋酸钠 (pH 5.2) 和 2.5 倍体积的无水乙醇，轻轻倒置混匀。
7. 待絮状物出现后，离心 5000g $\times$ 5min，弃上清液。
8. 沉淀用 75%乙醇洗涤，离心 5000g $\times$ 3min，弃上清液。
9. 室温下挥发乙醇，待沉淀将近透明后加 50-100 $\mu$ l TE 溶解过夜。

### (三) DNA 定量和电泳检测

1. DNA 定量：

DNA 在 260nm 处有最大的吸收峰，蛋白质在 280nm 处有最大的吸收峰，盐和小分子则集中在 230nm 处。因此，可以用 260nm 波长进行分光测定 DNA 浓度，OD 值为 1 相当于大约 50 $\mu$ g/ml 双链 DNA。如用 1cm 光径，用 H<sub>2</sub>O 稀释 DNA 样品 n 倍并以 H<sub>2</sub>O 为空白对照，根据此时读出的 OD<sub>260</sub> 值即可计算出样品稀释前的浓度：DNA (mg/ml) = 50 $\times$ OD<sub>260</sub> 读数 $\times$ 稀释倍数/1000。

DNA 纯品的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 为 1.8，故根据 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的值可以估计 DNA 的纯度。若比值较高说明含有 RNA，比值较低说明有残余蛋白质存在。OD<sub>230</sub>/OD<sub>260</sub> 的比值应在 0.4-0.5 之间，若比值较高说明有残余的盐存在。

## 2.电泳检测：

取 1 $\mu$ g 基因组 DNA 用行 0.8%琼脂糖凝胶上电泳，检测 DNA 的完整性，或多个样品的浓度是否相同。电泳结束后在点样孔附近应有单一的高分子量条带。

### 三、注意事项

1. 所有用品均需要高温高压，以灭活残余的 DNA 酶。
2. 所有试剂均用高压灭菌双蒸水配制。
3. 用大口滴管或吸头操作，以尽量减少打断 DNA 的可能性。
4. 用上述方法提取的 DNA 纯度可以满足一般实验（如 Southern 杂交、PCR 等）目的。如要求更高，可参考有关资料进行 DNA 纯化。

### 1.3. DNA 片段回收与纯化----冻融法

质粒、噬菌体等经酶切，电泳；PCR 产物经电泳后，常常需要对一些 DNA 电泳片段进行回收和纯化，用于亚克隆、探针标记等。DNA 回收和纯化常用方法有压碎法、低熔点琼脂糖法、冻融法等，也有现成的试剂盒供应。

1. 紫外灯下仔细切下含待回收 DNA 的胶条，将切下的胶条（小于 0.6 g）捣碎，置于 1.5 ml 离心管中；
2. 加入等体积的 Tris-HCl 饱和酚（pH 7.6），振荡混匀；
3. -20 $^{\circ}$ C 放置 5-10 min；
4. 4 $^{\circ}$ C 离心 10000g $\times$ 5 min，上层液转移置另一离心管中；
5. 加入 1/4 体积 H<sub>2</sub>O 于含胶的离心管中，振荡混匀；
6. -20 $^{\circ}$ C，放置 5-10 min；
7. 4 $^{\circ}$ C 离心 10000g $\times$ 5 min，合并上清液；
8. 用等体积酚/氯仿、氯仿分别抽提一次，取上清；
9. 加入 1/10 体积 3 M NaAc（pH 5.2）、2.5 倍体积预冷的无水乙醇，混匀；
10. -20 $^{\circ}$ C，静置 30 min；
11. 4 $^{\circ}$ C 离心 13000g $\times$ 10 min，弃上清，75%乙醇洗沉淀 1-2 次，晾干；
12. 加适量 H<sub>2</sub>O 或 TE 溶解沉淀。

#### 注意事项

紫外灯下切下含待回收 DNA 的凝胶时，要衬以干净的塑料薄膜，使用**无 DNA 污染的新刀片**，其目的在于防止外源 DNA 的污染。

### 1.4. 琼脂糖凝胶的特点

#### 一、琼脂糖凝胶的特点

天然琼脂（Agar）是一种多聚糖，主要由琼脂糖（Agarose，约占 80%）及琼脂胶（Agaropectin）组成。琼脂糖是由半乳糖及其衍生物构成的中性物质，不带电荷，而琼脂胶是一种含硫酸根和羧基的强酸性多糖，由于这些基团带有电荷，在电场作用下能产生较强的电渗现象，加之硫酸根可与某些蛋白质作用而影响电泳速度及分离效果。因此，目前多用琼脂糖为电泳支持物进行平板电泳，其优点如下。

- （1）琼脂糖凝胶电泳操作简单，电泳速度快，样品不需事先处理就可以进行电泳。
- （2）琼脂糖凝胶结构均匀，含水量大（约占 98%~99%），近似自由电泳，样品扩散较自由电流，对样品吸附极微，因此电泳图谱清晰，分辨率高，重复性好。
- （3）琼脂糖透明无紫外吸收，电泳过程和结果可直接用紫外光灯检测及定量测定。
- （4）电泳后区带易染色，样品极易洗脱，便于定量测定。制成干膜可长期保存。

目前，常用琼脂糖作为电泳支持物，分离蛋白质和同工酶。将琼脂糖电泳与免疫化学相结合，发展成免疫电泳技术，能鉴别其他方法不能鉴别的复杂体系，由于建立了超微量技术，0.1 $\mu$ g 蛋白质就可检出。

琼脂糖凝胶电泳也常用于分离、鉴定核酸，如 DNA 鉴定，DNA 限制性内切核酸酶图谱制作等。由于这种方法操作方便，设备简单，需样品量少，分辨能力高，已成为基因工程研究中常用实验方法之一。

## 二、DNA 的琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖凝胶电泳对核酸的分离作用主要是依据它们的相对分子量质量及分子构型，同时与凝胶的浓度也有密切关系。

### 1、核酸分子大小与琼脂糖浓度的关系

(1) DNA 分子的大小 在凝胶中，DNA 片段迁移距离（迁移率）与碱基对的对数成反比，因此通过已知大小的标准物移动的距离与未知片段的移动距离时行比较，便可测出未知片段的大小。但是当 DNA 分子大小超过 20kb 时，普通琼脂糖凝胶就很难将它们分开。此时电泳的迁移率不再依赖于分子大小，因此，就用琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 时，分子大小不宜超过此值。

(2) 琼脂糖的浓度 如下表所示，不同大小的 DNA 需要用不同浓度的琼脂糖凝胶进行电泳分离。

琼脂糖浓度/%	0.3	0.6	0.7	0.9	1.2	1.5	2.0
线状 DNA 大小/kb	60-5	20-1	10-0.8	7-0.5	6-0.4	4-0.2	3-0.1

### 2、核酸构型与琼脂糖凝胶电泳分离的关系

不同构型 DNA 的移动速度次序为：供价闭环 DNA (covalently closed circular, cccDNA) > 直线 DNA > 开环的双链环状 DNA。当琼脂糖浓度太高时，环状 DNA (一般为球形) 不能进入胶中，相对迁移率为 0 ( $R_m=0$ )，而同等大小的直线双链 DNA (刚性棒状) 则可以长轴方向前进 ( $R_m>0$ )，由此可见，这三种构型的相对迁移率主要取决于凝胶浓度，但同时，也受到电流强度、缓冲液离子强度等的影响。

### 3、电泳方法

#### (1) 凝胶类型

用于分离核酸的琼脂糖凝胶电泳可分为垂直型及水平型 (平板型)。水平型电泳时，凝胶板完全浸泡在电极缓冲液下 1-2mm，故又称为潜水式。目前更多用的是后者，因为它制胶和加样比较方便，电泳槽简单，易于制作，又可以根据需要制备不同规格的凝胶板，节约凝胶，因而较受欢迎。

#### (2) 缓冲液系统

缺少离子时，电流太小，DNA 迁移慢；相反，高离子强度的缓冲液由于电流太大会大量产热，严重时，会造成胶融化和 DNA 的变性。

常用的电泳缓冲液有 EDTA (pH8.0) 和 Tris-乙酸 (TEA)，Tris-硼酸 (TBE) 或 Tris-磷酸 (TPE) 等，浓度约为 50mmol/L (pH7.5~7.8)。电泳缓冲液一般都配制成浓的贮备液，临用时稀释到所需倍数。

TAE 缓冲能力较低，后者有足够高的缓冲能力，因此更常用。TBE 浓溶液长期贮存会出现沉淀，为避免此缺点，室温下贮存 5×溶液，用时稀释 10 倍 0.5×工作溶液即能提供足够缓冲能力。

#### (3) 凝胶的制备

以稀释的电极缓冲液为溶剂，用沸水浴或微波炉配制一定浓度的溶胶，灌入水平胶框或垂直胶膜，插入梳子，自然冷却。

#### (4) 样品配制与加样

DNA 样品用适量 Tris-EDTA 缓冲液溶解，缓冲液内含有 0.25% 溴酚蓝或其他指示染料，含有 10%-15% 蔗糖或 5%~10% 甘油，以增加其比重，使样品集中。**为避免蔗糖或甘油可能使电泳结果产生 U 形条带，可改用 2.5% FicolI (聚蔗糖) 代替蔗糖或甘油。**

#### (5) 电泳

琼脂糖凝胶分离大分子 DNA 实验条件的研究表明，在**低浓度、低电压下，分离效果较好**。在低电压条件下，线性 DNA 分子的电泳迁移率与所用的电压呈正比。但是，在电场强度增加时，较大的 DNA 片段迁移率的增加相对较小。因此随着电压的增高，电泳分辨率反而下降，为了获得电泳分离 DNA 片段的最大分辨率，电场强度不宜高于 **5V/cm**。

电泳系统的温度对于 DNA 在琼脂糖凝胶中的电泳行为没有显著的影响。通常在室温下进行电泳，只有当凝胶浓度低于 0.5% 时，为增加凝胶硬度，可在 4℃ 进行电泳。

#### (6) 染色和拍照

常用荧光染料溴乙锭 (EB) 染色, 在紫外光下观察 DNA 条带, 用紫外分析仪拍照, 或用凝胶成像系统输出照片, 并进行有关的数据分析。

### 三、印迹转移电泳

生物化学与分子生物学的研究工作经常需要对电泳分离后的 DNA 进行分子杂交, 但琼脂糖不适合于进行杂交操作, 1975 年, Southern 创造了将 DNA 区带原位转移到硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上, 再进行杂交的方法, 被称为 Southern 印迹法。随后, Alwine 等将类似方法用于 RNA 印迹, 被戏称为 Northern 印迹, 1979 年 Towbin 等设计了将蛋白质从凝胶转移到硝酸纤维素膜的装置, 将蛋白质转移到膜上, 再与相应的抗体等配体反应, 被戏称为 Western 印迹, 这种装置将膜和凝胶、滤纸等制成夹心饼干状, 用低电压高电流电泳完成转移。1982 年 Reinhardt 等用电转移法将等电聚焦后的蛋白质区带从凝胶转移到特定膜上, 称 Eastern 印迹。

目前国内外有多种核酸、蛋白质印迹转移的电泳装置出售, 使印迹转移速度快效率高、重复性好, 应用更加广泛。聚丙烯酰胺凝胶也可用于印迹转移电泳, 但转移蛋白质时, 凝胶中不可含有 SDS、尿素等变性剂。用于转移电泳的支持膜亦有多种选择, 近些年用尼龙膜较多, 因为尼龙膜机械性能好, 烘烤不变脆, 使用时比硝酸纤维素膜更方便。

进行印迹转移电泳时, 要注意缓冲液的离子强度要低, pH 要远离 pI, 使蛋白质带有较多电荷, 一般用稳定性较好的 Tris-缓冲体系。还要注意凝胶与支持膜之间不能有气泡。适当提高电压或电流可以提高转移速度, 但亦会增加加热效应, 故电压或电流不可过高。

### 四、交变脉冲电场凝胶电泳

一般琼脂糖凝胶电泳只能分离小于 20kb 的 DNA。这是因为在琼脂糖凝胶中, DNA 分子的有效直径超过凝胶孔径时, 在电场作用下, 迫使 DNA 变形挤过筛孔, 而沿着泳动方向伸直, 因而分子大小对迁移率影响不大。如此时改变电场方向, 则 DNA 分子必须改变其构象, 沿新的泳动方面伸直, 而转向时间与 DNA 分子大小关系极为密切。1983 年 Schwartz 等人根据 DNA 分子弹性弛豫时间 (外推为 0 的滞留时间) 与 DNA 分子大小有关的特性, 设计了脉冲电场梯度凝胶, 交替采用两个垂直方向的不均匀电场, 使 DNA 分子在凝胶中不断改变方向, 从而使 DNA 按分子大小分开。后来 Carle 等改进了电泳技术, 并发现周期性的反转换电场 (periodic inversion of the electric field) 亦能使大分子 DNA 通过电泳分开。电泳系统是由一水平式电泳槽和两组独立、彼此垂直的电极组成, 一组电极负极为 N, 正极为 S; 另一组负极为 W, 正极为 E。一块正方形琼脂糖凝胶板 (10cm\*10cm 或 20cm\*20cm) 呈 45 度放中央。电场在 N-S 和 W-E 之间交替建立。电场交替改变的时间长短与欲分离的 DNA 分子大小有关。电泳时, DNA 分子处在连续间隔交替的电场中。首先向 S 极移动, 然后改向 E 极。在每次电场方向改变时, DNA 分子就要有一定的时间松弛, 改变形状和迁移方向。只有当 DNA 分子达到一定构型后, 才能继续前时。DNA 分子净移动方向与加样线垂直, 使样品中各组分沿同一泳道形成各自的区带。交变脉冲电泳可有效分离数百万碱基对的大分子 DNA。较新式的仪器电极间的角度和脉冲时间均可调, 使用更加方便。

此外, 琼脂糖平板常用于免疫扩散技术的电泳技术相结合的多种免疫电泳

#### 1.5. 琼脂糖核酸电泳

1. 用蒸馏水将制胶模具和梳子冲洗干净, 放在制胶平板上, 封闭模具边缘, 架好梳子;
2. 根据欲分离 DNA 片段大小用凝胶缓冲液配制适宜浓度的琼脂糖凝胶: 准确称量琼脂糖干粉, 加入到配胶用的三角烧瓶内, 定量加入电泳缓冲液 (一般 20~30 ml);
3. 放入到微波炉内加热融化。冷却片刻, 加入一滴荧光染料, 轻轻旋转以充分混匀凝胶溶液, 倒入电泳槽中, 待其凝固;
4. 室温下 30~45 分钟后凝胶完全凝结, 小心拔出梳子, 将凝胶安放在电泳槽内;
5. 向电泳槽中倒入电泳缓冲液, 其量以没过胶面 1mm 为宜, 如样品孔内有气泡, 应设法除去;
6. 在 DNA 样品中加入 10× 体积的载样缓冲液 (loading buffer), 混匀后, 用枪将样品混合液缓慢加入被浸没的凝胶加样孔内;
7. 接通电源, 红色为正极, 黑色为负极, 切记 DNA 样品由负极往正极泳动 (靠近加样孔的一端为负)。一般 60~100V 电压, 电泳 20~40min 即可;
8. 根据指示剂泳动的位置, 判断是否终止电泳;

9. 电泳完毕，关上电源，在凝胶成像仪上观察电泳带及其位置，并与核酸分子量标准 Marker 比较被扩增产物的

琼脂糖凝胶浓度与线形 DNA 的最佳分辨范围	
琼脂糖凝胶浓度	线形 DNA 的最佳分辨范围 ( bp )
0.5%	1,000 ~ 30,000
0.7%	800 ~ 12,000
1.0%	500 ~ 10,000
1.2%	400 ~ 7,000
1.5%	200 ~ 3,000
2.0%	50 ~ 2,000

## 2. 聚合酶链式反应 ( PCR )

### 2.1. PCR 概述

#### PCR 技术概论

聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction , PCR)是 80 年代中期发展起来的体外核酸扩增技术。它具有特异、敏感、产率高、快速、简便、重复性好、易自动化等突出优点；能在一个试管内将所要研究的目的基因或某一 DNA 片段于数小时内扩增至十万乃至百万倍，使肉眼能直接观察和判断；可从一根毛发、一滴血、甚至一个细胞中扩增出足量的 DNA 供分析研究和检测鉴定。过去几天几星期才能做到的事情，用 PCR 几小时便可完成。PCR 技术是生物医学领域中的一项革命性创举和里程碑。

#### PCR 技术简史

PCR 的最早设想 核酸研究已有 100 多年的历史，本世纪 60 年代末、70 年代初人们致力于研究基因的体外分离技术，Korana 于 1971 年最早提出核酸体外扩增的设想：“经过 DNA 变性，与合适的引物杂交，用 DNA 聚合酶延伸引物，并不断重复该过程便可克隆 tRNA 基因”。

PCR 的实现 1985 年美国 PE-Cetus 公司人类遗传研究室的 Mullis 等发明了具有划时代意义的聚合酶链反应。其原理类似于 DNA 的体内复制，只是在试管中给 DNA 的体外合成提供以致一种合适的条件---模板 DNA，寡核苷酸引物，DNA 聚合酶，合适的缓冲体系，DNA 变性、复性及延伸的温度与时间。

PCR 的改进与完善 Mullis 最初使用的 DNA 聚合酶是大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段 其缺点是：①Klenow 酶不耐高温，90℃会变性失活，每次循环都要重新加。②引物链延伸反应在 37℃下进行，容易发生模板和引物之间的碱基错配，其 PCR 产物特异性较差，合成的 DNA 片段不均一。此种以 Klenow 酶催化的 PCR 技术虽较传统的基因扩增具备许多突出的优点，但由于 Klenow 酶不耐热，在 DNA 模板进行热变性时，会导致此酶钝化，每加入一次酶只能完成一个扩增反应周期，给 PCR 技术操作程序添了不少困难。这使得 PCR 技术在一段时间内没能引起生物医学界的足够重视。1988 年初，Keohanog 改用 T4 DNA 聚合酶进行 PCR，其扩增的 DNA 片段很均一，真实性也较高，只有所期望的一种 DNA 片段。但每循环一次，仍需加入新酶。1988 年 Saiki 等从温泉中分离的一株水生嗜热杆菌(thermus aquaticus) 中提取到一种耐热 DNA 聚合酶。此酶具有以下特点：①耐高温，在 70℃下反应 2h 后其残留活性大于原来的 90%，在 93℃下反应 2h 后其残留活性是原来的 60%，在 95℃下反应 2h 后其残留活性是原来的 40%。②在热变性时不会被钝化，不必在每次扩增反应后再加新酶。③大大提高了扩增片段特异性和扩增效率，增加了扩增长度(2.0Kb)。由于提高了扩增的特异性和效率，因而其灵敏性也大大提高。为与大肠杆菌多聚酶 I Klenow 片段区别，将此酶命名为 Taq DNA 多聚酶(Taq DNA Polymerase)。此酶的发现使 PCR 广泛的被应用。

#### PCR 技术基本原理

PCR 技术的基本原理 类似于 DNA 的天然复制过程，其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。PCR 由变性--退火--延伸三个基本反应步骤构成：①模板 DNA 的变性：模板 DNA 经加热至 93℃左右一定时间后，使模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离，使之成为单链，以便它与引物结合，为下轮反应作准备；②模板 DNA 与引物的退火(复性)：模板 DNA 经加热变性成单链后，温度降至 55℃左右，引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合；③引物的延伸：DNA 模板--引物结合物在 TaqDNA 聚合酶的作用下，以 dNTP 为反应原料，靶序列

为模板，按碱基配对与半保留复制原理，合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链重复循环变性--退火--延伸三过程，就可获得更多的“半保留复制链”，而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需 2~4 分钟，2~3 小时就能将待扩目的基因扩增放大几百万倍。到达平台期(Plateau)所需循环次数取决于样品中模板的拷贝。

**PCR 的反应动力学** PCR 的三个反应步骤反复进行，使 DNA 扩增量呈指数上升。反应最终的 DNA 扩增量可用  $Y = (1 + X)^n$  计算。Y 代表 DNA 片段扩增后的拷贝数，X 表示平均每次的扩增效率，n 代表循环次数。平均扩增效率的理论值为 100%，但在实际反应中平均效率达不到理论值。反应初期，靶序列 DNA 片段的增加呈指数形式，随着 PCR 产物的逐渐积累，被扩增的 DNA 片段不再呈指数增加，而进入线性增长期或静止期，即出现“停滞效应”，这种效应称平台期数。PCR 扩增效率及 DNA 聚合酶 PCR 的种类和活性及非特异性产物的竞争等因素。大多数情况下，平台期的到来是不可避免的。

**PCR 扩增产物** 可分为长产物片段和短产物片段两部分。短产物片段的长度严格地限定在两个引物链 5' 端之间，是需要扩增的特定片段。短产物片段和长产物片段是由于引物所结合的模板不一样而形成的，以一个原始模板为例，在第一个反应周期中，以两条互补的 DNA 为模板，引物是从 3' 端开始延伸，其 5' 端是固定的，3' 端则没有固定的止点，长短不一，这就是“长产物片段”。进入第二周期后，引物除与原始模板结合外，还要同新合成的链(即“长产物片段”)结合。引物在与新链结合时，由于新链模板的 5' 端序列是固定的，这就等于这次延伸的片段 3' 端被固定了止点，保证了新片段的起点和止点都限定于引物扩增序列以内、形成长短一致的“短产物片段”。不难看出“短产物片段”是按指数倍数增加，而“长产物片段”则以算术倍数增加，几乎可以忽略不计，这使得 PCR 的反应产物不需要再纯化，就能保证足够纯 DNA 片段供分析与检测用。

聚合酶链式反应 ( Polymerase Chain Reaction , PCR ) 是体外酶促合成特异 DNA 片段的一种方法，为最常用的分子生物学技术之一。典型的 PCR 由 ( 1 ) 高温变性模板；( 2 ) 引物与模板退火；( 3 ) 引物沿模板延伸三步反应组成一个循环，通过多次循环反应，使目的 DNA 得以迅速扩增。其主要步骤是：将待扩增的模板 DNA 置高温下 ( 通常为 93°C-94°C ) 使其变性解成单链；人工合成的两个寡核苷酸引物在其合适的复性温度下分别与目的基因两侧的两条单链互补结合，两个引物在模板上结合的位置决定了扩增片段的长短；耐热的 DNA 聚合酶 ( Taq 酶 ) 在 72°C 将单核苷酸从引物的 3' 端开始掺入，以目的基因为模板从 5' → 3' 方向延伸，合成 DNA 的新互补链。

PCR 能快速特异扩增任何已知目的基因或 DNA 片段，并能轻易在皮克 ( pg ) 水平起始 DNA 混合物中的目的基因扩增达到纳克、微克、毫克级的特异性 DNA 片段。因此，PCR 技术一经问世就被迅速而广泛地用于分子生物学的各个领域。它不仅可以用于基因的分选、克隆和核苷酸序列分析，还可以用于突变体和重组体的构建，基因表达调控的研究，基因多态性的分析，遗传病和传染病的诊断，肿瘤机制的探索，法医鉴定等诸多方面。通常，PCR 在分子克隆和 DNA 分析中有着以下多种用途：

- (1) 生成双链 DNA 中的特异序列作为探针；
- (2) 由少量 mRNA 生成 cDNA 文库；
- (3) 从 cDNA 中克隆某些基因；
- (4) 生成大量 DNA 以进行序列测定；
- (5) 突变体的分析；
- (6) 染色体步移；
- (7) RAPD、AFLP、RFLP 等 DNA 多态性分析等。

## 一、试剂准备

1. DNA 模版
2. 对应目的基因的特异引物
3. 10×PCR Buffer
4. 2mM dNTPmix : 含 dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 2mM
5. Taq 酶

## 二、操作步骤

1. 在冰浴中，按以下次序将各成分加入一无菌 0.5ml 离心管中。

10×PCR buffer	5 μl
---------------	------

dNTP mix ( 2mM )	4 $\mu$ l
引物 1 ( 10pM )	2 $\mu$ l
引物 2 ( 10pM )	2 $\mu$ l
Taq 酶 ( 2U/ $\mu$ l )	1 $\mu$ l
DNA 模板 ( 50ng-1 $\mu$ g/ $\mu$ l )	1 $\mu$ l
加 ddH <sub>2</sub> O 至	50 $\mu$ l

视 PCR 仪有无热盖，不加或添加石蜡油。

2. 调整好反应程序。将上述混合液稍加离心，立即置 PCR 仪上，执行扩增。一般：在 93°C 预变性 3-5min，进入循环扩增阶段：93°C 40s → 58°C 30s → 72°C 60s，循环 30-35 次，最后在 72°C 保温 7min。

3. 结束反应，PCR 产物放置于 4°C 待电泳检测或 -20°C 长期保存。

4. PCR 的电泳检测：如在反应管中加有石蜡油，需用 100 $\mu$ l 氯仿进行抽提反应混合液，以除去石蜡油；否则，直接取 5-10 $\mu$ l 电泳检测。

### 三、PCR 反应体系的组成与反应条件的优化

PCR 反应体系由反应缓冲液 ( 10 $\times$ PCR Buffer )、脱氧核苷三磷酸底物 ( dNTPmix )、耐热 DNA 聚合酶 ( Taq 酶 )、寡聚核苷酸引物 ( Primer1, Primer2 )、靶序列 ( DNA 模板 ) 五部分组成。各个组份都能影响 PCR 结果的好坏。

1. 反应缓冲液：一般随 Taq DNA 聚合酶供应。标准缓冲液含：50mM KCl, 10mM Tris-HCl ( pH8.3 室温 )，1.5mM MgCl<sub>2</sub>。Mg<sup>2+</sup> 的浓度对反应的特异性及产量有着显著影响。浓度过高，使反应特异性降低；浓度过低，使产物减少。在各种单核苷酸浓度为 200 $\mu$ M 时，Mg<sup>2+</sup> 为 1.5mM 较合适。若样品中含 EDTA 或其它螯合物，可适当增加 Mg<sup>2+</sup> 的浓度。在高浓度 DNA 及 dNTP 条件下进行反应时，也必须相应调节 Mg<sup>2+</sup> 的浓度。据经验，一般以 1.5-2mM ( 终浓度 ) 较好。

2. dNTP：高浓度 dNTP 易产生错误掺入，过高则可能不扩增；但浓度过低，将降低反应产物的产量。PCR 中常用终浓度为 50-400 $\mu$ M 的 dNTP。四种脱氧三磷酸核苷酸的浓度应相同，如果其中任何一种的浓度明显不同于其它几种时 ( 偏高或偏低 )，就会诱发聚合酶的错误掺入作用，降低合成速度，过早终止延伸反应。此外，dNTP 能与 Mg<sup>2+</sup> 结合，使游离的 Mg<sup>2+</sup> 浓度降低。因此，dNTP 的浓度直接影响到反应中起重要作用的 Mg<sup>2+</sup> 浓度。

3. Taq DNA 聚合酶：在 100 $\mu$ l 反应体系中，一般加入 2-4U 的酶量，足以达到每 min 延伸 1000-4000 个核苷酸的掺入速度。酶量过多将导致产生非特异性产物。但是，不同的公司或不同批次的产品常有很大的差异，由于酶的浓度对 PCR 反应影响极大，因此应当作预试验或使用厂家推荐的浓度。当降低反应体积时 ( 如 20 $\mu$ l 或 50  $\mu$ l )，一般酶的用量仍不小于 2U，否则反应效率将降低。

4. 引物：引物是决定 PCR 结果的关键，引物设计在 PCR 反应中极为重要。要保证 PCR 反应能准确、特异、有效地对模板 DNA 进行扩增，通常引物设计要遵循以下几条原则：

(1) 引物的长度以 15-30bp 为宜，一般 ( G+C ) 的含量在 45-55%，T<sub>m</sub> 值高于 55°C [ T<sub>m</sub>=4(G+C)+2(A+T) ]。应尽量避免数个嘌呤或嘧啶的连续排列，碱基的分布应表现出是随机的。

(2) 引物的 3' 端不应与引物内部有互补，避免引物内部形成二级结构，两个引物在 3' 端不应出现同源性，以免形成引物二聚体。3' 端末位碱基在很大程度上影响着 Taq 酶的延伸效率。两条引物间配对碱基数少于 5 个，引物自身配对若形成茎环结构，茎的碱基对数不能超过 3 个由于影响引物设计的因素比较多，现常常利用计算机辅助设计。

(3) 人工合成的寡聚核苷酸引物需经 PAGE 或离子交换 HPLC 进行纯化。

(4) 引物浓度不宜偏高，浓度过高有两个弊端：一是容易形成引物二聚体 ( primer-dimer )，二是当扩增微量靶序列并且起始材料又比较粗时，容易产生非特异性产物。一般说来，用低浓度引物不仅经济，而且反应特异性也较好。一般用 0.25-0.5pM/ $\mu$ l 较好。

(5) 引物一般用 TE 配制成较高浓度的母液 ( 约 100 $\mu$ M )，保存于 -20°C。使用前取出其中一部分用 ddH<sub>2</sub>O 配制成 10 $\mu$ M 或 20 $\mu$ M 的工作液。

5. 模板：PCR 对模板的要求不高，单、双链 DNA 均可作为 PCR 的样品。虽然 PCR 可以用极微量的样品 ( 甚至是来自单一细胞的 DNA ) 作为模板，但为了保证反应的特异性，一般还宜用  $\mu$ g 水平的基因组 DNA 或 10<sup>4</sup> 拷贝的待扩增片段作为起始材料。原材料可以是粗制品，某些材料甚至仅需用溶剂一步提取之后即可用于扩增，但混有任

何蛋白酶、核酸酶、Taq DNA 聚合酶抑制剂以及能结合 DNA 的蛋白，将可能干扰 PCR 反应。

6. PCR 循环加快，即相对减少变性、复性、延伸的时间，可增加产物的特异性。

#### 四、注意事项

1. PCR 反应应该在一个没有 DNA 污染的干净环境中进行。最好设立一个专用的 PCR 实验室。
2. 纯化模板所选用的方法对污染的风险有极大影响。一般而言，只要能够得到可靠的结果，纯化的方法越简单越好。
3. 所有试剂都应该没有核酸和核酸酶的污染。**操作过程中均应戴手套。**
4. PCR 试剂配制应使用最高质量的新鲜双蒸水，采用 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤除菌或高压灭菌。
5. 试剂都应该以大体积配制，试验一下是否满意，然后分成仅够一次使用的量储存，从而确保实验与实验之间的连续性。
6. 试剂或样品准备过程中都要使用一次性灭菌的塑料瓶和管子，玻璃器皿应洗涤干净并高压灭菌。
7. PCR 的样品应在冰浴上化开，并且要充分混匀。

### 2.2. PCR 引物设计黄金法则

#### 1. 引物最好在模板 cDNA 的保守区内设计。

DNA 序列的保守区是通过物种间相似序列的比较确定的。在 NCBI 上搜索不同物种的同一基因，通过序列分析软件（比如 DNAMAN）比对（Alignment），各基因相同的序列就是该基因的保守区。

#### 2. 引物长度一般在 15~30 碱基之间。

引物长度（primer length）常用的是 18-27 bp，但不应大于 38，因为过长会导致其延伸温度大于 74 $^{\circ}$ C，不适用于 Taq DNA 聚合酶进行反应。

#### 3. 引物 GC 含量在 40%~60% 之间，Tm 值最好接近 72 $^{\circ}$ C。

GC 含量（composition）过高或过低都不利于引发反应。上下游引物的 GC 含量不能相差太大。另外，上下游引物的 Tm 值（melting temperature）是寡核苷酸的解链温度，即在一定盐浓度条件下，50%寡核苷酸双链解链的温度。有效启动温度，一般高于 Tm 值 5~10 $^{\circ}$ C。若按公式  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$  估计引物的 Tm 值，则有效引物的 Tm 为 55~80 $^{\circ}$ C，其 Tm 值最好接近 72 $^{\circ}$ C 以使复性条件最佳。

#### 4. 引物 3' 端要避开密码子的第 3 位。

如扩增编码区域，引物 3' 端不要终止于密码子的第 3 位，因密码子的第 3 位易发生简并，会影响扩增的特异性与效率。

#### 5. 引物 3' 端不能选择 A，最好选择 T。

引物 3' 端错配时，不同碱基引发效率存在着很大的差异，当末位的碱基为 A 时，即使在错配的情况下，也能有引发链的合成，而当末位链为 T 时，错配的引发效率大大降低，G、C 错配的引发效率介于 A、T 之间，所以 3' 端最好选择 T。

#### 6. 碱基要随机分布。

引物序列在模板内应当没有相似性较高，尤其是 3' 端相似性较高的序列，否则容易导致错误引发（False priming）。降低引物与模板相似性的一种方法是，引物中四种碱基的分布最好是随机的，不要有聚嘌呤或聚嘧啶的存在。尤其 3' 端不应超过 3 个连续的 G 或 C，因这样会使引物在 GC 富集序列区错误引发。

#### 7. 引物自身及引物之间不应存在互补序列。

引物自身不应存在互补序列，否则引物自身会折叠成发夹结构（Hairpin）使引物本身复性。这种二级结构会因空间位阻而影响引物与模板的复性结合。引物自身不能有连续 4 个碱基的互补。

两引物之间也不应具有互补性，尤其应避免 3' 端的互补重叠以防止引物二聚体（Dimer 与 Cross dimer）的形成。引物之间不能有连续 4 个碱基的互补。

引物二聚体及发夹结构如果不可避免的话，应尽量使其  $\Delta G$  值不要过高（应小于 4.5 kcal/mol）。否则易导致产生引物二聚体带，并且降低引物有效浓度而使 PCR 反应不能正常进行。

#### 8. 引物 5' 端和中间 $\Delta G$ 值应该相对较高，而 3' 端 $\Delta G$ 值较低。

$\Delta G$  值是指 DNA 双链形成所需的自由能，它反映了双链结构内部碱基对的相对稳定性， $\Delta G$  值越大，则双链越稳定。应当选用 5' 端和中间  $\Delta G$  值相对较高，而 3' 端  $\Delta G$  值较低（绝对值不超过 9）的引物。引物 3' 端的  $\Delta G$  值过高，容易在错配位点形成双链结构并引发 DNA 聚合反应。（不同位置的  $\Delta G$  值可以用 Oligo 6 软件进行分析）

9. 引物的 5'端可以修饰，而 3'端不可修饰。

引物的 5' 端决定着 PCR 产物的长度，它对扩增特异性影响不大。因此，可以被修饰而不影响扩增的特异性。引物 5' 端修饰包括：加酶切位点；标记生物素、荧光、地高辛、Eu<sup>3+</sup>等；引入蛋白质结合 DNA 序列；引入点突变、插入突变、缺失突变序列；引入启动子序列等。

引物的延伸是从 3' 端开始的，不能进行任何修饰。3' 端也不能有形成任何二级结构可能。

10. 扩增产物的单链不能形成二级结构。

某些引物无效的主要原因是扩增产物单链二级结构的影响，选择扩增片段时最好避开二级结构区域。用有关软件（比如 RNAstructure）可以预测估计 mRNA 的稳定二级结构，有助于选择模板。实验表明，待扩区域自由能（ $\Delta G^\circ$ ）小于 58.61 kJmol 时，扩增往往不能成功。若不能避开这一区域时，用 7-deaza-2'-脱氧 GTP 取代 dGTP 对扩增的成功是有帮助的。

11. 引物应具有特异性。

引物设计完成以后，应对其进行 BLAST 检测。如果与其它基因不具有互补性，就可以进行下一步的实验了。

值得一提的是，各种模板的引物设计难度不一。有的模板本身条件比较困难，例如 GC 含量偏高或偏低，导致找不到各种指标都十分合适的引物；用作克隆目的的 PCR，因为产物序列相对固定，引物设计的选择自由度较低。在这种情况下只能退而求其次，尽量去满足条件。

做 Real Time 时，用于 SYBR Green I 法时的一对引物与一般 PCR 的引物，在引物设计上所要求的参数是不同的。引物设计的要求：

1) 避免重复碱基，尤其是 G。

2)  $T_m = 58-60$  度。

3) GC = 30-80%。

4) 3'端最后 5 个碱基内不能有多于 2 个的 G 或 C。

5) 正向引物与探针离得越近越好，但不能重叠。

6) PCR 扩增产物长度：引物的产物大小不要太大，一般在 80-250bp 之间都可；80~150 bp 最为合适（可以延长至 300 bp）。

7) 引物的退火温度要高，一般要在 60 度以上；

要特别注意避免引物二聚体和非特异性扩增的存在。

而且引物设计时应该考虑到引物要有不受基因组 DNA 污染影响的能力，即引物应该跨外显子，最好是引物能跨外显子的接头区，这样可以更有效的不受基因组 DNA 污染的影响。

至于设计软件，PRIMER3，PRIMER5，PRIMER EXPRESS 都应该可以的。

做染料法最关键的就是寻找到合适的引物和做污染的预防工作。对于引物，你要有从一大堆引物中挑出一两个能用的引物的思想准备---寻找合适的引物非常不容易。

关于 BLAST 的作用应该是通过比对，发现你所设计的这个引物，在已经发现并在 GENE BANK 中公开的不物种基因序列当中，除了和你的目标基因之外，还有没有和其他物种或其他序列当中存在相同的序列，如和你的目标序列之外的序列相同的序列，则可能扩出其他序列的产物，那么这个引物的特异性就很差，从而不能用。

Original Link: <http://www.agpr.net/bbs/read.php?tid=147070&page=e&fpage=1>

如果实在满足不了这么多要求，那么就：

**1引物与模板配对好；**

**2两个引物退火温度差不多；**

3每个引物的 GC 含量不要太高或太低；

4引物最好没有回文序列；

就这 4 点就很好了。如果还是满足不了！只要**前 2 点**就够了。

### 2.3. PCR 反应体系

标准的 PCR 反应体系（可按比例缩放）：

10×扩增缓冲液      10ul

4 种 dNTP 混合物	各 200umol/L
引物	各 10~100pmol
模板 DNA	0.1~2ug
Taq DNA 聚合酶	2.5u
Mg <sup>2+</sup>	1.5mmol/L
加双或三蒸水至	100ul

**实验室常用体系（换算后等量）：**

**标准的 50 μL 反应体系（缓冲液中没有 MgCl<sub>2</sub> 时）：**

ddH <sub>2</sub> O:	33.5 μL
10×Buffer:	5 μL
dNTP:	4 μL
MgCl <sub>2</sub> :	4 μL
引物:	各 1 μL
模板:	1 μL
Taq 酶:	0.5 μL

**标准的 50 μL 反应体系（缓冲液中含有 MgCl<sub>2</sub> 时）：**

ddH <sub>2</sub> O:	37.5 μL
10×Buffer:	5 μL
dNTP:	4 μL
引物:	各 1 μL
模板:	1 μL
Taq 酶:	0.5 μL

注：引物按照合成的引物，每 OD 加入所注明的体积的水后，再稀释 10 倍。

## 2.4. PCR 反应的重要因素

参加 PCR 反应的物质主要有五种即引物、酶、dNTP、模板和 Mg<sup>2+</sup>。

### 引物

引物是 PCR 特异性反应的关键，PCR 产物的特异性取决于引物与模板 DNA 互补的程度。理论上，只要知道任何一段模板 DNA 序列，就能按其设计互补的寡核苷酸链做引物，利用 PCR 就可将模板 DNA 在体外大量扩增。设计引物应遵循以下原则：

- ①引物长度：15-30bp，常用为 20 bp 左右。
- ②引物扩增跨度：以 200-500bp 为宜，特定条件下可扩增长至 10kb 的片段。
- ③引物碱基：G+C 含量以 40-60%为宜，G+C 太少扩增效果不佳，G+C 过多易出现非特异条带。ATGC 最好随机分布，避免 5 个以上的嘌呤或嘧啶核苷酸的成串排列。
- ④避免引物内部出现二级结构，避免两条引物间互补，特别是 3'端的互补，否则会形成引物二聚体，产生非特异的扩增条带。
- ⑤引物 3'端的碱基，特别是最末及倒数第二个碱基，应严格要求配对，以避免因末端碱基不配对而导致 PCR 失败。
- ⑥引物中有或能加上合适的酶切位点，被扩增的靶序列最好有适宜的酶切位点，这对酶切分析或分子克隆很有好处。
- ⑦引物的特异性：引物应与核酸序列数据库的其它序列无明显同源性。引物量：每条引物的浓度 0.1~1 umol 或 10~100 pmol，以最低引物量产生所需要的结果为好，引物浓度偏高会引起错配和非特异性扩增，且可增加引物之间形成二聚体的机会。

每条引物的浓度 0.1~1 $\mu$ mol 或 10~100pmol, 以最低引物量产生所需要的结果为好, 引物浓度偏高会引起错配和非特异性扩增, 且可增加引物之间形成二聚体的机会。

### 酶及其浓度

目前有两种 Taq DNA 聚合酶供应, 一种是从栖热水生杆菌中提纯的天然酶, 另一种为大肠菌合成的基因工程酶。催化一典型的 PCR 反应约需酶量 2.5U(指总反应体积为 100ul 时), 浓度过高可引起非特异性扩增, 浓度过低则合成产物量减少。

### dNTP 的质量与浓度

dNTP 的质量与浓度和 PCR 扩增效率有密切关系, dNTP 粉呈颗粒状, 如保存不当易变性失去生物学活性。dNTP 溶液呈酸性, 使用时应配成高浓度后, 以 1M NaOH 或 1M Tris. HCL 的缓冲液将其 PH 调节到 7.0~7.5, 小量分装, -20 $^{\circ}$ C 冰冻保存。多次冻融会使 dNTP 降解。在 PCR 反应中, dNTP 应为 50~200 $\mu$ mol/L, 尤其是注意 4 种 dNTP 的浓度要相等(等摩尔配制), 如其中任何一种浓度不同于其它几种时(偏高或偏低), 就会引起错配。浓度过低又会降低 PCR 产物的产量。dNTP 能与 Mg<sup>2+</sup>结合, 使游离的 Mg<sup>2+</sup>浓度降低。

### 模板(靶基因)核酸

模板核酸的量与纯化程度, 是 PCR 成败与否的关键环节之一, 传统的 DNA 纯化方法通常采用 SDS 和蛋白酶 K 来消化处理标本。SDS 的主要功能是: 溶解细胞膜上的脂类与蛋白质, 因而溶解膜蛋白而破坏细胞膜, 并解离细胞中的核蛋白, SDS 还能与蛋白质结合而沉淀; 蛋白酶 K 能水解消化蛋白质, 特别是与 DNA 结合的组蛋白, 再用有机溶剂酚与氯仿抽提掉蛋白质和其它细胞组份, 用乙醇或异丙醇沉淀核酸。提取的核酸即可作为模板用于 PCR 反应。一般临床检测标本, 可采用快速简便的方法溶解细胞, 裂解病原体, 消化除去染色体的蛋白质使靶基因游离, 直接用于 PCR 扩增。RNA 模板提取一般采用异硫氰酸胍或蛋白酶 K 法, 要防止 RNase 降解 RNA。

### Mg<sup>2+</sup>浓度

Mg<sup>2+</sup>对 PCR 扩增的特异性和产量有显著的影响, 在一般的 PCR 反应中, 各种 dNTP 浓度为 200  $\mu$ mol/L 时, Mg<sup>2+</sup>浓度为 1.5~2.0 mmol/L 为宜。Mg<sup>2+</sup>浓度过高, 反应特异性降低, 出现非特异扩增, 浓度过低会降低 Taq DNA 聚合酶的活性, 使反应产物减少。

## 2.5. PCR 反应条件的选择

PCR 反应条件为**温度、时间和循环次数**。

温度与时间的设置: 基于 PCR 原理三步骤而设置变性-退火-延伸三个温度点。在标准反应中采用三温度点法, 双链 DNA 在 90~95 $^{\circ}$ C 变性, 再迅速冷却至 40~60 $^{\circ}$ C, 引物退火并结合到靶序列上, 然后快速升温至 70~75 $^{\circ}$ C, 在 Taq DNA 聚合酶的作用下, 使引物链沿模板延伸。对于较短靶基因(长度为 100~300bp 时)可采用二温度点法, 除变性温度外, 退火与延伸温度可合二为一, 一般采用 94 $^{\circ}$ C 变性, 65 $^{\circ}$ C 左右退火与延伸(此温度 Taq DNA 酶仍有较高的催化活性)。

①变性温度与时间: 变性温度低, 解链不完全是导致 PCR 失败的最主要原因。一般情况下, 93 $^{\circ}$ C~94 $^{\circ}$ C 1min 足以使模板 DNA 变性, 若低于 93 $^{\circ}$ C 则需延长延长时间, 但温度不能过高, 因为高温环境对酶的活性有影响。此步若不能使靶基因模板或 PCR 产物完全变性, 就会导致 PCR 失败。

②退火(复性)温度与时间: 退火温度是影响 PCR 特异性的较重要因素。变性后温度快速冷却至 40 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C, 可使引物和模板发生结合。由于模板 DNA 比引物复杂得多, 引物和模板之间的碰撞结合机会远远高于模板互补链之间的碰撞。退火温度与时间, 取决于引物的长度、碱基组成及其浓度, 还有靶基序列的长度。对于 20 个核苷酸, G+C 含量约 50%的引物, 55 $^{\circ}$ C 为选择最适退火温度的起点较为理想。引物的复性温度可通过以下公式帮助选择合适的温度:

$$T_m \text{ 值(解链温度)} = 4(G+C) + 2(A+T)$$

$$\text{复性温度} = T_m \text{ 值} - (5 \sim 10^{\circ}\text{C})$$

在 T<sub>m</sub> 值允许范围内, 选择较高的复性温度可大大减少引物和模板间的非特异性结合, 提高 PCR 反应的特异性。复性时间一般为 30~60sec, 足以使引物与模板之间完全结合。

③延伸温度与时间: Taq DNA 聚合酶的生物学活性:

$$70 \sim 80^{\circ}\text{C} \quad 150 \text{ 核苷酸/S/酶分子}$$

$$70^{\circ}\text{C} \quad 60 \text{ 核苷酸/S/酶分子}$$

55°C 24 核苷酸/S/酶分子

高于 90°C 时，DNA 合成几乎不能进行。

PCR 反应的延伸温度一般选择在 70~75°C 之间，常用温度为 72°C，过高的延伸温度不利于引物和模板的结合。PCR 延伸反应的时间，可根据待扩增片段的长度而定，一般 1Kb 以内的 DNA 片段，延伸时间 1min 是足够的。3~4kb 的靶序列需 3~4min；扩增 10Kb 需延伸至 15min。延伸时间过长会导致非特异性扩增带的出现。对低浓度模板的扩增，延伸时间要稍长些。

**循环次数** 循环次数决定 PCR 扩增程度。PCR 循环次数主要取决于模板 DNA 的浓度。一般的循环次数选在 30~40 次之间，循环次数越多，非特异性产物的量亦随之增多。

## PCR 反应条件为温度、时间和循环次数。

### 温度与时间的设置

基于 PCR 原理三步骤而设置变性-退火-延伸三个温度点。在标准反应中采用三温度点法，双链 DNA 在 90~95°C 变性，再迅速冷却至 40~60°C，引物退火并结合到靶序列上，然后快速升温至 70~75°C，在 Taq DNA 聚合酶的作用下，使引物链沿模板延伸。对于较短靶基因(长度为 100~300bp 时)可采用二温度点法，除变性温度外，退火与延伸温度可合二为一，一般采用 94°C 变性，65°C 左右退火与延伸(此温度 Taq DNA 酶仍有较高的催化活性)。

①变性温度与时间：变性温度低，解链不完全是导致 PCR 失败的最主要原因。一般情况下，93°C~94°C 1min 足以使模板 DNA 变性，若低于 93°C 则需延长长时间，但温度不能过高，因为高温环境对酶的活性有影响。此步若不能使靶基因模板或 PCR 产物完全变性，就会导致 PCR 失败。

②退火(复性)温度与时间：退火温度是影响 PCR 特异性的较重要因素。变性后温度快速冷却至 40°C~60°C，可使引物和模板发生结合。由于模板 DNA 比引物复杂得多，引物和模板之间的碰撞结合机会远远高于模板互补链之间的碰撞。退火温度与时间，取决于引物的长度、碱基组成及其浓度，还有靶基序列的长度。对于 20 个核苷酸，G+C 含量约 50% 的引物，55°C 为选择最适退火温度的起点较为理想。引物的复性温度可通过以下公式帮助选择合适的温度：

$$T_m \text{ 值(解链温度)} = 4(G+C) + 2(A+T)$$

$$\text{复性温度} = T_m \text{ 值} - (5 \sim 10^\circ\text{C})$$

在  $T_m$  值允许范围内，选择较高的复性温度可大大减少引物和模板间的非特异性结合，提高 PCR 反应的特异性。复性时间一般为 30~60sec，足以使引物与模板之间完全结合。

③延伸温度与时间：Taq DNA 聚合酶的生物学活性：

70~80°C 150 核苷酸/S/酶分子

70°C 60 核苷酸/S/酶分子

55°C 24 核苷酸/S/酶分子

高于 90°C 时，DNA 合成几乎不能进行。

PCR 反应的延伸温度一般选择在 70~75°C 之间，常用温度为 72°C，过高的延伸温度不利于引物和模板的结合。PCR 延伸反应的时间，可根据待扩增片段的长度而定，一般 1 kb 以内的 DNA 片段，延伸时间 1 min 是足够的。3-4 kb 的靶序列需 3-4 min；扩增 10 kb 需延伸至 15min。延伸时间过长会导致非特异性扩增带的出现。对低浓度模板的扩增，延伸时间要稍长些。

### 循环次数

循环次数决定 PCR 扩增程度。PCR 循环次数主要取决于模板 DNA 的浓度。一般的循环次数选在 30~40 次之间，循环次数越多，非特异性产物的量亦随之增多。

### PCR 反应特点

特异性强 PCR 反应的特异性决定因素为：

- ①引物与模板 DNA 特异正确的结合；
- ②碱基配对原则；
- ③Taq DNA 聚合酶合成反应的忠实性；

#### ④靶基因的特异性与保守性。

其中引物与模板的正确结合是关键。引物与模板的结合及引物链的延伸是遵循碱基配对原则的。聚合酶合成反应的忠实性及 Taq DNA 聚合酶耐高温性，使反应中模板与引物的结合(复性)可以在较高的温度下进行，结合的特异性大大增加，被扩增的靶基因片段也就能保持很高的正确度。再通过选择特异性和保守性高的靶基因区，其特异性程度就更高。

**灵敏度高** PCR 产物的生成量是以指数方式增加的，能将皮克( $pg=10^{-12}g$ )量级的起始待测模板扩增到微克( $ug=10^{-6}g$ )水平。能从 100 万个细胞中检出一个靶细胞；在病毒的检测中，PCR 的灵敏度可达 3 个 RFU(空斑形成单位)；在细菌学中最小检出率为 3 个细菌。

**简便、快速** PCR 反应用耐高温的 Taq DNA 聚合酶，一次性地将反应液加好后，即在 DNA 扩增液和水浴锅上进行变性-退火-延伸反应，一般在 2~4 小时完成扩增反应。扩增产物一般用电泳分析，不一定要用同位素，无放射性污染、易推广。

对本标本的纯度要求低 不需要分离病毒或细菌及培养细胞，DNA 粗制品及总 RNA 均可作为扩增模板。可直接用临床标本如血液、体腔液、洗嗽液、毛发、细胞、活组织等粗制的 DNA 扩增检测。

#### PCR 扩增产物分析

PCR 产物是否为特异性扩增，其结果是否准确可靠，必须对其进行严格的分析与鉴定，才能得出正确的结论。PCR 产物的分析，可依据研究对象和目的不同而采用不同的分析方法。

**凝胶电泳分析：**PCR 产物电泳，EB 溴乙锭染色紫外仪下观察，初步判断产物的特异性。PCR 产物片段的大小应与预计的一致，特别是多重 PCR，应用多对引物，其产物片段都应符合预计的大小，这是起码条件。

**琼脂糖凝胶电泳：**通常应用 1~2%的琼脂糖凝胶，供检测用。

**聚丙烯酰胺凝胶电泳：**6~10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离效果比琼脂糖好，条带比较集中，可用于科研及检测分析。

**酶切分析：**根据 PCR 产物中限制性内切酶的位点，用相应的酶切、电泳分离后，获得符合理论的片段，此法既能进行产物的鉴定，又能对靶基因分型，还能进行变异性研究。

**分子杂交：**分子杂交是检测 PCR 产物特异性的有力证据，也是检测 PCR 产物碱基突变的有效方法。

**Southern 印迹杂交：**在两引物之间另合成一条寡核苷酸链(内部寡核苷酸)标记后做探针，与 PCR 产物杂交。此法既可作特异性鉴定，又可以提高检测 PCR 产物的灵敏度，还可知其分子量及条带形状，主要用于科研。

**斑点杂交：**将 PCR 产物点在硝酸纤维素膜或尼龙薄膜上，再用内部寡核苷酸探针杂交，观察有无着色斑点，主要用于 PCR 产物特异性鉴定及变异分析。

**核酸序列分析：**是检测 PCR 产物特异性的最可靠方法。

## 2.6. PCR 常见问题总汇

### PCR 产物的电泳检测时间

一般为 48 h 以内，有些最好于当日电泳检测，大于 48 h 后带型不规则甚致消失。

### 假阴性，不出现扩增条带

PCR 反应的关键环节有①模板核酸的制备，②引物的质量与特异性，③酶的质量及，④PCR 循环条件。寻找原因亦应针对上述环节进行分析研究。

**模板：**①模板中含有杂蛋白质，②模板中含有 Taq 酶抑制剂，③模板中蛋白质没有消化除净，特别是染色体中的组蛋白，④在提取制备模板时丢失过多，或吸入酚。⑤模板核酸变性不彻底。在酶和引物质量好时，不出现扩增带，极有可能是标本的消化处理，模板核酸提取过程出了毛病，因而要配制有效而稳定的消化处理液，其程序亦应固定不宜随意更改。

**酶失活：**需更换新酶，或新旧两种酶同时使用，以分析是否因酶的活性丧失或不够而导致假阴性。需注意的是有时忘加 Taq 酶或溴乙锭。

**引物：**引物质量、引物的浓度、两条引物的浓度是否对称，是 PCR 失败或扩增条带不理想、容易弥散的常见原因。有些批号的引物合成质量有问题，两条引物一条浓度高，一条浓度低，造成低效率的不对称扩增，对策为：①选定一个好的引物合成单位。②引物的浓度不仅要看 OD 值，更要注重引物原液做琼脂糖凝胶电泳，一定要有引

物条带出现，而且两引物带的亮度应大体一致，如一条引物有条带，一条引物无条带，此时做 PCR 有可能失败，应和引物合成单位协商解决。如一条引物亮度高，一条亮度低，在稀释引物时要平衡其浓度。③引物应高浓度小量分装保存，防止多次冻融或长期放冰箱冷藏部分，导致引物变质降解失效。④引物设计不合理，如引物长度不够，引物之间形成二聚体等。

**Mg<sup>2+</sup>浓度：**Mg<sup>2+</sup>离子浓度对 PCR 扩增效率影响很大，浓度过高可降低 PCR 扩增的特异性，浓度过低则影响 PCR 扩增产量甚至使 PCR 扩增失败而不出扩增条带。

**反应体积的改变：**通常进行 PCR 扩增采用的体积为 20ul、30ul、50ul。或 100ul，应用多 大体积进行 PCR 扩增，是根据科研和临床检测不同目的而设定，在做小体积如 20ul 后，再做大体积时，一定要摸索条件，否则容易失败。

**物理原因：**变性对 PCR 扩增来说相当重要，如变性温度低，变性时间短，极有可能出现假阴性；退火温度过低，可致非特异性扩增而降低特异性扩增效率；退火温度过高影响引物与模板的结合而降低 PCR 扩增效率。有时还有必要用标准的温度计，检测一下扩增仪或水浴锅内的变性、退火和延伸温度，这也是 PCR 失败的原因之一。

**靶序列变异：**如靶序列发生突变或缺失，影响引物与模板特异性结合，或因靶序列某一段缺失使引物与模板失去互补序列，其 PCR 扩增是不会成功的。

### 假阳性

出现的 PCR 扩增条带与目的靶序列条带一致，有时其条带更整齐，亮度更高。

**引物设计不合适：**选择的扩增序列与非目的扩增序列有同源性，因而在进行 PCR 扩增时，扩增出的 PCR 产物为非目的性的序列。靶序列太短或引物太短，容易出现假阳性。需重新设计引物。

**靶序列或扩增产物的交叉污染：**这种污染有两种原因：一是整个基因组或大片的交叉污染，导致假阳性。这种假阳性可用以下方法解决：操作时应小心轻柔，防止将靶序列吸入加样枪内或溅出离心管外。除酶及不能耐高温的物质外，所有试剂或器材均应高压消毒。所用离心管及样进枪头等均应一次性使用。必要时，在加标本前，反应管和试剂用紫外线照射，以破坏存在的核酸。二是空气中的小片段核酸污染，这些小片段比靶序列短，但有一定的同源性。可互相拼接，与引物互补后，可扩增出 PCR 产物，而导致假阳性的产生，可用巢式 PCR 方法来减轻或消除。

### 出现非特异性扩增带

PCR 扩增后出现的条带与预计的大小不一致，或大或小，或者同时出现特异性扩增带 与非特异性扩增带。非特异性条带的出现，其原因：一是引物与靶序列不完全互补、或引物聚合形成二聚体。二是 Mg<sup>2+</sup>离子浓度过高、退火温度过低，及 PCR 循环次数 过多有关。其次是酶的质和量，往往一些来源的酶易出现非特异条带而另一来源的酶 则不出现，酶量过多有时也会出现非特异性扩增。其对策有：必要时重新设计引 物。减低酶量或调换另一来源的酶。降低引物量，适当增加模板量，减少循环次 数。适当提高退火温度或采用二温度点法(93℃变性，65℃左右退火与延伸)。

### 出现片状拖带或涂抹带

PCR 扩增有时出现涂抹带或片状带或地毯样带。其原因往往由于酶量过多或酶的质量 差，dNTP 浓度过高，Mg<sup>2+</sup>浓度过高，退火温度过低，循环次数过多引起。其对策有：减少酶量，或调换另一来源的酶。②减少 dNTP 的浓度。适当降低 Mg<sup>2+</sup>浓 度。增加模板量，减少循环次数。

## 2.7. 减少 PCR 产物中引物二聚体的方法

1. 从引物自身着手，**重新设计引物**，这是最根本解决这一问题的办法；
2. 可能模板有问题；
3. 模板浓度过小，适当加大模板量；
4. Taq 酶，引物，Mg<sup>2+</sup>浓度可能过高，可降低它们的浓度；
5. 取你所要加的上下游引物混合后，**在 100 摄氏度下的沸水中煮 5 min**，然后迅速拿出至于冰块之上瞬时冷却，这时再加入反应体系当中，引物二聚体就会消失的；
6. 所配 MIX 中加 **5%的甘油**或者 **5%的 DMSO**，可以增强特异性；

7. PCR 反应体系的配制在冰上进行,最后加 Taq 酶,PCR 结束后,产物勿放置在室温下过长时间,有人认为室温下有些 Taq 酶会将多余的引物合成为二聚体。
8. 增加循环数;
9. 降低退火温度后有条带,则应逐渐提高温度,若提高温度的同时产物量减少,则考虑增加  $Mg^{2+}$  浓度(根据扩增片段长度而定,片段长则相应  $Mg^{2+}$  浓度应该高一些);
10. 若降低退火温度,发现还是只有引物二聚体,而且  $Mg^{2+}$  的浓度在 20-25 mmol/L 没有区别,则考虑 Buffer 等试剂没有完全融解、混匀,导致吸取的试剂浓度不对。
11. 以上次的 PCR 产物作模板二次 PCR,可以提高引物与模板的特异性,减少引物二聚体,如果两次时间间隔短的话,可以把原产物稀释 100-1000 倍,如果间隔较长可以稀释 50-100 倍。

## 2.8. *pfu* 特性 FAQ

1.加入 Pfu 酶之前将 PCR 所需要的所有成分全部加齐后轻弹管底然后离心,然后加入 Pfu 酶,但是此时不能象加入 Taq 酶一样轻弹管底而是直接离心,放入 PCR 仪器中,效果比较好,但是原理不是很理解。

2.退火时间要延长一般,预延伸时间 4 分半钟,而延伸时间要 15 min,这和 Pfu 酶很低的延伸活性有很大的关系,增加延伸的时间是很有必要的。

### 1、Pfu DNA 聚合酶的精确度如何?

因为具有 3'-5'外切酶(校对)活性,Pfu DNA 聚合酶是现今所描述过的所有热稳定酶中精确度最高的一种。普洛麦格公司的 Pfu DNA 聚合酶的出错率大约是  $1 \times 10^{-6}$ /每碱基对,而 Taq DNA 聚合酶的出错率大约是  $1 \times 10^{-5}$ /每碱基对。普洛麦格公司推荐将 Pfu DNA 聚合酶使用在那些需要高精度的 PCR 应用中,包括克隆、基因表达和突变分析。

### 2、Pfu DNA 聚合酶产生平末端 PCR 片断吗?

因为天然的校对活性,Pfu DNA 聚合酶产生的 PCR 片断是平末端的。收集到的有关 Pfu DNA 聚合酶的数据表明 90% 的 PCR 产物是平末端的。这种特性极大地提高了平末端连接的效率。

### 3、Pfu DNA 聚合酶产生的 PCR 产物怎样才能被克隆到普洛麦格的 T-载体上?

平末端 DNA 片断在经过修饰后,也就是在 dATP 存在的情况下,使平末端片段与 Taq DNA 聚合酶共同保温,就能促进其被克隆进 T-载体。普洛麦格公司的 pGEM®-T 和 pGEM®-T easy 技术手册(TM042)中有讲述尾端加 A 的操作程序。

### 4、Pfu DNA 聚合酶的 PCR 反应条件与常规 PCR 反应条件有什么不同?

为了减少由 3'-5'外切酶活性引起的引物降解,普洛麦格强烈推荐在冰浴上添加所有试剂并且在温度达到 60-65 °C 时加入 Pfu DNA 聚合酶以便进行热启动或者在冰浴上添加试剂后放在预热到 95°C 的 PCR 仪上。

Pfu DNA 聚合酶比 Taq DNA 聚合酶的延伸反应速率低。因此我们推荐的扩增延伸反应时间为每 kb 需 2 分钟,而 Pfu DNA 聚合酶仅需要 1 分钟。

普洛麦格公司为 Pfu DNA 聚合酶提供 10X 反应缓冲液,其中包括 20mM  $MgSO_4$ 。此酶在  $MgSO_4$  中活性最佳,而最佳的镁浓度是 2 mM。

### 5、Pfu DNA 聚合酶怎样影响 PCR 引物设计?

由于校对活性而具有的高精确度可引起引物从 3'端被降解。在设计引物时这个降解速率应考虑进去。最初的 15 个 5'碱基应该具有几乎不被降解的能力。这样,用于 Pfu DNA 聚合酶反应的良好引物长度应是 20-30 碱基。另一个防止引物被降解的办法是在合成引物中引进一个磷酸化(phosphorothioate-coupled)的碱基。

### 6、Pfu DNA 聚合酶怎样与其它热稳定酶相比?

Pfu DNA 聚合酶和其它几种常用的 DNA 聚合酶的性质列在表 1 中,某一个酶在某个特定的应用中也许比其它的酶更有用。当选用酶时,请参考表 2 和表 3。

表 1: 普洛麦格几种热稳定酶的性质

	Taq DNA 聚合酶	Tfi DNA 聚合酶	Pfu DNA 聚合酶	Tli DNA 聚合酶	Taq 珠™ 热启动聚合酶
微生物来源	嗜热水生菌	Thermus flavus	Pyrococcus Furiosus	Thermococcus litoralis	Thermus aquaticus
PCR 最佳条件:					
延伸时间/Δb	1 分钟	1 分钟	2 分钟	2 分钟	1 分钟
延伸温度	70-75°C	70-75°C	70-75°C	70-75°C	70-75°C
镁	1-4mM	1-4mM	2-4mM	2-4mM	1-4mM
PH@25°C	7.0-7.5	7.0-7.5	8.0-9.0	7.0-7.5	7.0-7.5
dNTP	40-200 uM	40-200 uM	40-200uM	40-200uM	40-200uM
引物	0.1-1.0uM	0.1-1.0uM	0.1-1.0uM	0.1-1.0uM	0.1-1.0uM
5'-3' 外切酶活性	有	有	无	无	有
3'-5' 外切酶活性	无	无	有	有	无
PCR 产物末端	3'-A	3'-A	平	平	3'-A
现有包装	100u 500u 2500u	100u 1000u	100u 500u	50u	100 珠
提供的浓度	5u/ul	5u/ul	2-3u/ul	3u/ul	1.25u/珠

表 2：普洛麦格公司热稳定酶的功能比较

	Taq DNA 聚合酶	Tfi DNA 聚合酶	Pfu DNA 聚合酶	Tli DNA 聚合酶	Taq 珠™ 热启动聚合酶
产量	***	***	**	*	**
准确度*/精 度	*	*	***	**	*
特异性**	*	*	*	*	***

- 准确度 指在一个错误的碱基被合成前已合成的碱基数目
- 特异性 在 PCR 中指排除错误引物配对，引物二聚体，或其它在低温下可发生的反应的能力

表 3：PCR 应用的比较

PCR 反应	例子	产物
常规 PCR	检测、PFLP	Taq DNA 聚合酶、Tfi DNA 聚合酶
精度 PCR	克隆、基因表达、突变分析	Pfu DNA 聚合酶
高特异性 PCR 室温准备	多重 PCR	Taq 珠™热启动聚合酶
其它：  操作需要 Vent®  RT-PCR 使用普洛 麦格进入 RT-PCR 系统		  Tfi DNA 聚合酶  Tfi DNA 聚合酶

## 2.9. 增加 PCR 特异性的方法

### 1、引物设计

细心地进行引物设计是 PCR 中最重要的一步。理想的引物对只同目的序列两侧的单一序列而非其他序列退火。设计糟糕的引物可能会同扩增其他的非目的序列。下面的指导描述了一个可以增加特异性的引物所具有的令人满意的特点：

- 1.典型的引物 18 到 24 个核苷长。引物需要足够长，保证序列独特性，并降低序列存在于非目的序列位点的可能性。但是长度大于 24 核苷的引物并不意味着更高的特异性。较长的序列可能会与错误配对序列杂交，降低了特异性，而且比短序列杂交慢，从而降低了产量。
- 2.选择 GC 含量为 40%到 60%或 GC 含量映像模板 GC 含量的引物。
- 3.设计 5'端和中间区为 G 或 C 的引物。这会增加引物的稳定性和引物同目的序列杂交的稳定性。
- 4.避免引物对 3'末端存在互补序列，这会形成引物二聚体，抑制扩增。
- 5.避免 3'末端富含 GC。设计引物时保证在最后 5 个核苷中含有 3 个 A 或 T。
- 6.避免 3'末端的错误配对。3'端核苷需要同模板退火以供聚合酶催化延伸。
- 7.避免存在可能会产生内部二级结构的序列，这会破坏引物退火稳定性。

目的序列上并不存在的附加序列，如限制位点和启动子序列，可以加入到引物 5'端而不影响特异性。当计算引物 Tm 值时并不包括这些序列，但是应该对其进行互补性和内部二级结构的检测。

有时候，对于引物设计仅了解有限的序列信息。比如，如果仅知道氨基酸序列，可以设计兼并引物。兼并引物是指代表编码单个氨基酸所有不同碱基可能性的不同序列的混合物。为了增加特异性，可以参考密码子使用表，根据不同生物的碱基使用偏好，减少兼并性。次黄嘌呤可以同所有的碱基配对，降低引物的退火温度。不要在引物的 3'端使用兼并碱基，因为 3'端最后 3 个碱基的退火足以在错误位点起始 PCR。使用较高的引物浓度（1 $\mu$ M 到 3 $\mu$ M），因为许多兼并混合物中的引物不是特异性针对目的模板。

### 2、引物退火温度

引物的另一个重要参数是溶解温度 (T<sub>m</sub>)。这是当 50%的引物和互补序列表现为双链 DNA 分子时的温度。T<sub>m</sub> 对于设定 PCR 退火温度是必需的。在理想状态下，退火温度足够低，以保证引物同目的序列有效退火，同时还要足够高，以减少非特异性结合。合理的退火温度从 55°C到 70°C。退火温度一般设定比引物的 T<sub>m</sub> 低 5°C。

设定 T<sub>m</sub> 有几种公式。表 4 列出确定引物 T<sub>m</sub> 最常用的两种方法。第一个公式来源于高盐溶液中的杂交，适用于小于 18 碱基的引物。第二个公式根据 GC 含量估算 T<sub>m</sub>。确定引物 T<sub>m</sub> 最可信的方法是近邻分析法。这种方法从序列一级结构和相邻碱基的特性预测引物的杂交稳定性。大部分计算机程序使用近邻分析法。

根据所使用的公式及引物序列的不同，T<sub>m</sub> 会差异很大。因为大部分公式提供一个估算的 T<sub>m</sub> 值，所有退火温度只是一个起始点。可以通过分析几个逐步提高退火温度的反应以提高特异性。开始低于估算的 T<sub>m</sub>5°C，以 2°C为增

量，逐步提高退火温度。较高的退火温度会减少引物二聚体和非特异性产物的形成。为获得最佳结果，两个引物应具有近似的  $T_m$  值。引物对的  $T_m$  差异如果超过  $5^{\circ}\text{C}$ ，就会引物在循环中使用较低的退火温度而表现出明显的错误起始。如果两个引物  $T_m$  不同，将退火温度设定为比最低的  $T_m$  低  $5^{\circ}\text{C}$ 。或者为了提高特异性，可以在根据较高  $T_m$  设计的退火温度先进行 5 个循环，然后在根据较低  $T_m$  设计的退火温度进行剩余的循环。这使得在较为严紧的条件下可以获得目的模板的部分拷贝。

### 3、递减 PCR

递减 PCR 通过在 PCR 的前几个循环使用严紧的退火条件提高特异性。循环开在比估算的  $T_m$  高大约  $5^{\circ}\text{C}$  的退火温度下开始，然后每个循环降低  $1^{\circ}\text{C}$  到  $2^{\circ}\text{C}$ ，直到退火温度低于  $T_m$   $5^{\circ}\text{C}$ 。只有同源性最高的目的模板会被扩增。这些产物在随后的循环中继续扩增，并将扩增的非特异性产物排挤出去。递减 PCR 对于那些不了解引物和目的模板同源性程度的方法较为有用，如 AFLP DNA 指纹分析。

### 4、引物浓度

引物的浓度会影响特异性。最佳的引物浓度一般在  $0.1$  到  $0.5\mu\text{M}$ 。较高的引物浓度会导致非特异性产物扩增。

为了确定引物浓度，可以在  $260\text{nm}$  ( $\text{OD}_{260}$ ) 测量光密度值。然后使用光吸收值和微摩消光系数的倒数 ( $\text{nmol}/\text{OD}$ )，通过 Beers 法则 (公式 1) 计算引物浓度。微摩消光系数可以使用公式 2 计算。与大分子双链 DNA 可以使用平均消光系数不同，确定引物的精确浓度必须使用计算的消光系数。这是因为引物较短，碱基组成差异很大。在 Gibco/BRL 定制引物的质检报告中包含了消光系数 ( $\text{OD}/\mu\text{mol}$ ) 和消光系数的倒数 ( $\mu\text{mol}/\text{OD}$ )。另外，不要使用寡聚核苷酸作为标准，在 EB 染色的胶上估算引物浓度，因为引物和标准的染色能力根据序列不同而差异很大。

### 5、引物纯度和稳定性

定制引物的标准纯度对于大多数 PCR 应用是足够的。因脱盐而除去的苯甲酰基和异丁酰基很少，因此不会干扰 PCR。部分应用需要纯化，以除去在合成过程中的任何非全长序列。这些截断序列的产生是因为 DNA 合成化学的效率不是  $100\%$ 。这是一个循环过程，在每个碱基加入时使用重复化学反应，使 DNA 从  $3'$  到  $5'$  合成。在任何一个循环都可能失败。较长的引物，尤其是大于 50 个碱基，截断序列的比例很大，可能需要纯化。

引物产量受合成化学的效率及纯化方法的影响。Life Technologies 以一个最小 OD 单位确保总寡核苷酸的产量。定制引物以干粉形式运输。最好在 TE 重溶引物，使其最终浓度为  $100\mu\text{M}$ 。TE 比去离子水好，因为水的 pH 经常偏酸，会引起寡核苷酸的水解。

引物的稳定性依赖于储存条件。应将干粉和溶解的引物储存在  $-20^{\circ}\text{C}$ 。以大于  $10\mu\text{M}$  浓度溶于 TE 的引物在  $-20^{\circ}\text{C}$  可以稳定保存 6 个月，但在室温 ( $15^{\circ}\text{C}$  到  $30^{\circ}\text{C}$ ) 仅能保存不到 1 周。干粉引物可以在  $-20^{\circ}\text{C}$  保存至少 1 年，在室温 ( $15^{\circ}\text{C}$  到  $30^{\circ}\text{C}$ ) 最多可以保存 2 个月。

### 6、热启动

热启动 PCR 是除了好的引物设计之外，提高 PCR 特异性最重要的方法之一。尽管 Taq DNA 聚合酶的最佳延伸温度在  $72^{\circ}\text{C}$ ，聚合酶在室温仍然有活性。因此，在进行 PCR 反应配制过程中，以及在热循环刚开始，保温温度低于退火温度时会产生非特异性的产物。这些非特异性产物一旦形成，就会被有效扩增。在用于引物设计的位点因为遗传元件的定位而受限时，如 site-directed 突变、表达克隆或用于 DNA 工程的遗传元件的构建和操作，热启动 PCR 尤为有效。

限制 Taq DNA 聚合酶活性的常用方法是在冰上配制 PCR 反应液，并将其置于预热的 PCR 仪。这种方法简单便宜，但并不能完成抑制酶的活性，因此并不能完全消除非特异性产物的扩增。

热启动通过抑制一种基本成分延迟 DNA 合成，直到 PCR 仪达到变性温度。包括延缓加入 Taq DNA 聚合酶在

内的大部分手工热启动方法十分烦琐，尤其是对高通量应用。其他的热启动方法使用蜡防护层将一种基本成分，入镁离子或酶，包裹起来，或者将反应成分，如模板和缓冲液，物理地隔离开。在热循环时，因蜡熔化而把各种成分释放出来并混合在一起。象手动热启动方法一样，蜡防护层法比较烦琐，易于污染，不适用于高通量应用。

Platinum DNA 聚合酶对于自动热启动 PCR 来说方便高效。Platinum Taq DNA 聚合酶的成分为复合有抗 Taq DNA 聚合酶单克隆抗体的重组 Taq DNA 聚合酶。抗体在 PCR 配制，以至于在室温的延时保温过程中抑制酶的活性。Taq DNA 聚合酶在变性步骤的 94°C 保温过程中被释放到反应中，恢复了完全的聚合酶活性。同经化学修饰用于热启动的 Taq DNA 聚合酶相比，Platinum 酶不需要在 94°C 延时保温（10 到 15 分钟）以激活聚合酶。使用 Platinum Taq DNA 聚合酶，在 94°C 进行 2 分钟就可以恢复 90% 的 Taq DNA 聚合酶活性。

## 7、镁离子浓度

镁离子影响 PCR 的多个方面，如 DNA 聚合酶的活性，这会影响产量；再如引物退火，这会影响特异性。dNTP 和模板同镁离子结合，降低了酶活性所需要的游离镁离子的量。最佳的镁离子浓度对于不同的引物对和模板都不同，但是包含 200 $\mu$ M dNTP 的典型 PCR 起始浓度是 1.5mM（注意：对实时定量 PCR，使用 3 到 5mM 带有荧光探针的镁离子溶液）。较高的游离镁离子浓度可以增加产量，但也会增加非特异性扩增，降低忠实性。为了确定最佳浓度，从 1mM 到 3mM，以 0.5mM 递增，进行镁离子滴定。为减少对镁离子优化的依赖，可以使用 Platinum Taq DNA 聚合酶。Platinum Taq DNA 聚合酶能够在比 Taq DNA 聚合酶更广的镁离子浓度范围内保持功能，因此仅需较少的优化。

## 8、促进 PCR 的添加剂

退火温度，引物设计和镁离子浓度的优化足以对大多数模板进行高特异性的扩增，但是，某些模板，包括高 GC 含量的模板，需要其他的措施。影响 DNA 溶解温度的添加剂提供了提高产物特异性和产量的另外一种方法。为获得最好的结果需要模板的完全变性。另外，二级结构会阻止引物结合和酶的延伸。PCR 添加剂，包括甲酰胺，DMSO，甘油，甜菜碱以及 PCRx Enhancer Solution 可以增强扩增。它们可能的机理是降低溶解温度，从而有助于引物退火并辅助 DNA 聚合酶延伸通过二级结构区。PCRx Solution 还有其他优点。在同 Platinum Taq DNA 聚合酶和 Platinum Pfx DNA 聚合酶一起使用时，仅需很少的镁离子优化。这样，将 Platinum 技术同添加剂结合，增强了特异性，同时减少了第三种方法-镁离子优化的依赖。为获得最佳结果，应优化添加剂的浓度，尤其是会抑制 Taq DNA 聚合酶的 DMSO，甲酰胺和甘油。

增加 PCR 特异性（五）

## 9、巢式 PCR

使用巢式引物进行连续多轮扩增可以提高特异性和灵敏度。第一轮是 15 到 20 个循环的标准扩增。将一小部分起始扩增产物稀释 100 到 1000 倍加入到第二轮扩增中进行 15 到 20 个循环。或者，也可以通过凝胶纯化将起始扩增产物进行大小选择。在第二轮扩增中使用一套巢式引物，其可以同第一套引物内侧的靶序列结合。巢式 PCR 的使用降低了扩增多个靶位点的可能性，因为同两套引物都互补的靶序列很少。而使用同样的引物对进行总数相同的循环（30 到 40）会扩增非特异性靶位点。巢式 PCR 可以增加有限量靶序列（如稀有 mRNA）的灵敏度，并且提高了困难 PCR（如 5' RACE）的特异性。

### 2.10. 反向 PCR（染色体步移）

反向 PCR（Inverse PCR 或 Reverse PCR）的目的在于扩增一段已知序列旁侧的 DNA，也就是说这一反应体系不是在一对引物之间而是在引物外侧合成 DNA。反向 PCR 可用于研究与已知 DNA 区段相连接的未知染色体序列，因此又可称为**染色体缓移**或**染色体步移**。这时选择的引物虽然与核心 DNA 区两末端序列互补，但两引物 3' 端是相互反向的。扩增前先用限制性内切酶酶切样品 DNA，然后用 DNA 连接酶连接成一个环状 DNA 分子，通过反向 PCR 扩增引物的上游片段和下游片段；现已制备了酵母人工染色体（YAC）大的线状 DNA 片段的杂交探针，这对于转座

子插入序列的确定和基因库染色体上 DNA 片段序列的识别十分重要。

该方法的不足是：①需要从许多酶中选择限制酶，或者说必须选择一种合适的酶进行酶切才能得到合理大小的 DNA 片段。这种选择不能在非酶切位点切断靶 DNA。②大多数有核基因组含有大量中度和高度重复序列，而在 YAC 或 Cosmid 中的未知功能序列中有时也会有这些序列，这样，通过反向 PCR 得到的探针就有可能与多个基因序列杂交。

利用反向 PCR 可对未知序列扩增后进行分析，探索邻接已知 DNA 片段的序列，并可仅知部分序列的全长 cDNA 进行分子克隆，建立全长的 DNA 探针。适用于基因游走、转位因子和已知序列 DNA 旁侧病毒整合位点分析等研究。

Takara 有相关试剂盒(Genome Walking Kit)。

## 2.11. PCR 污染与对策

PCR 反应的最大特点是具有较大扩增能力与极高的灵敏性，但令人头痛的问题是易污染，极其微量的污染即可造成假阳性的产生。

### 污染原因

(一)标本间交叉污染:标本污染主要有收集标本的容器被污染，或标本放置时，由于密封不严溢于容器外，或容器外粘有标本而造成相互间交叉污染;标本核酸模板在提取过程中，由于吸样枪污染导致标本间污染;有些微生物标本尤其是病毒可随气溶胶或形成气溶胶而扩散，导致彼此间的污染。

(二)PCR 试剂的污染:主要是由于在 PCR 试剂配制过程中，由于加样枪、容器、双蒸水及其它溶液被 PCR 核酸模板污染。

(三)PCR 扩增产物污染:这是 PCR 反应中最主要最常见的污染问题.因为 PCR 产物拷贝量大(一般为 10<sup>13</sup> 拷贝/ml)，远远高于 PCR 检测数个拷贝的极限，所以极微量的 PCR 产物污染，就可造成假阳就可形成假阳性。

还有一种容易忽视，最可能造成 PCR 产物污染的形式是气溶胶污染；在空气与液体面摩擦时就可形成气溶胶，在操作时比较剧烈地摇动反应管，开盖时、吸样时及污染进样枪的反复吸样都可形成气溶胶而污染.据计算一个气溶胶颗粒可含 48000 拷贝，因而由其造成的污染是一个值得特别重视的问题。

(四)实验室中克隆质粒的污染:在分子生物学实验室及某些用克隆质粒做阳性对照的检验室，这个问题也比较常见.因为克隆质粒在单位容积内含量相当高，另外在纯化过程中需用较多的用具及试剂，而且在活细胞内的质粒，由于活细胞的生长繁殖的简便性及具有很强的生命力.其污染可能性也很大。

### 污染的监测

一个好的实验室，要时刻注意污染的监测，考虑有无污染是什么原因造成的污染，以便采取措施，防止和消除污染。

#### 对照试验

1.阳性对照:在建立 PCR 反应实验室及一般的检验单位都应设有 PCR 阳性对照，它是 PCR 反应是否成功、产物条带位置及大小是否合乎理论要求的一个重要的参考标志.阳性 对照要选择扩增度中等、重复性好，经各种鉴定是该产物的标本，如以重组质粒为阳性对照，其含量宜低不宜高(100 个拷贝以下).但阳性对照尤其是重组质粒及高浓度阳性标本，其对检测或扩增样品污染的可能性很大.因而当某一 PCR 试剂经自己使用稳定，检验人员心中有数时，在以后的实验中可免设阳性对照。

2.阴性对照:每次 PCR 实验务必做阴性对照.它包括①标本对照:被检的标本是血清就用 鉴定后的正常血清作对照;被检的标本是组织细胞就用相应的组织细胞作对照.②试剂 对照:在 PCR 试剂中不加模板 DNA 或 RNA，进行 PCR 扩增，以监测试剂是否污染。

3.重复性试验

4.选择不同区域的引物进行 PCR 扩增

### 防止污染的方法

#### 一. 污染的预防

进行 PCR 操作时，操作人员应该严格遵守一些操作规程，最大程度地降低可能出现的 PCR 污染或杜绝污染的出现。

(一) 划分操作区：目前，普通 PCR 尚不能做到单人单管，实现完全闭管操作，但无论是是否能够达到单人单管，均要求实验操作在三个不同的区域内进行，PCR 的前处理和后处理要在不同的隔离区内进行：

1. 标本处理区，包括扩增模板的制备；
2. PCR 扩增区，包括反应液的配制和 PCR 扩增；
3. 产物分析区，凝胶电泳分析，产物拍照及重组克隆的制备。

各工作区要有一定的隔离，操作器材专用，要有一定的方向性。如：标本制备→PCR 扩增→产物分析→产物处理。

切记：产物分析区的产物及器材不要拿到其他两个工作区。

(二) 分装试剂：PCR 扩增所需要的试剂均应在装有紫外灯的超净工作台或负压工作台配制和分装。所有的加样器和吸头需固定放于其中，不能用来吸取扩增后的 DNA 和其他来源的 DNA：

1. PCR 用水应为高压的双蒸水；
2. 引物和 dNTP 用高压的双蒸水在无 PCR 扩增产物区配制；
3. 引物和 dNTP 应分装储存，分装时应标明时间，以备发生污染时查找原因。

(三) 实验操作注意事项 尽管扩增序列的残留污染大部分是假阳性反应的原因，样品间的交叉污染也是原因之一。因此，不仅要在进行扩增反应是谨慎认真，在样品的收集、抽提和扩增的所有环节都应该注意：

1. 戴一次性手套，若不小心溅上反应液，立即更换手套；
2. 使用一次性吸头，严禁与 PCR 产物分析室的吸头混用，吸头不要长时间暴露于空气中，避免气溶胶的污染；
3. 避免反应液飞溅，打开反应管时为避免此种情况，开盖前稍离心收集液体于管底。若不小心溅到手套或桌面上，应立刻更换手套并用稀酸擦拭桌面；
4. 操作多份样品时，制备反应混合液，先将 dNTP、缓冲液、引物和酶混合好，然后分装，这样即可以减少操作，避免污染，又可以增加反应的精确度；
5. 最后加入反应模板，加入后盖紧反应管；
6. 操作时设立阴阳性对照和空白对照，即可验证 PCR 反应的可靠性，又可以协助判断扩增系统的可信性；
7. 尽可能用可替换或可高压处理的加样器，由于加样器最容易受产物气溶胶或标本 DNA 的污染，最好使用可替换或高压处理的加样器。如没有这种特殊的加样器，至少 PCR 操作过程中加样器应该专用，不能交叉使用，尤其是 PCR 产物分析所用加样器不能拿到其它两个区；
8. 重复实验，验证结果，慎下结论。

## 二. 追踪污染源

如果不慎发生污染情况，应从下面几条出发，逐一分析，排除污染。

(一) 设立阴阳性对照：有利于监测反应体系各成分的污染情况。选择阳性对照时，应选择扩增弱，且重复性好的样品，因强阳性对照可产生大量不必要的扩增序列，反而可能成为潜在的污染源。如果以含靶序列的重组质粒为对照，100 个拷贝之内的靶序列就足以产生阳性扩增。阴性对照的选择亦要慎重，因为 PCR 敏感性极高，可以从其它方法 (Southern 印迹或点杂交等) 检测阴性的标本中检测出极微量的靶分子。此外，每次扩增均应包括 PCR 体系中各试剂的时机对照，即包括 PCR 反应所需的全部成分，而不加模板 DNA，这对监测试剂中 PCR 产物残留污染是非常有益的。如果扩增结果中试剂对照为阳性结果，就是某一种或数种试剂被污染了。此时，要全部更换一批新的试剂进行扩增，扩增时设立不同的反应管，每一管含有一种被检测试剂，在检出污染试剂后，应马上处理。

(二) 环境污染：在排除试剂污染的可能性外，更换试剂后，若不久又发现试剂被污染了，如果预防措施比较严密，则考虑可能为环境污染。

环境污染中常见的污染源主要有：

1. 模板提取时真空抽干装置；
2. 凝胶电泳加样器；
3. 电泳装置；

4. 紫外分析仪；
5. 切胶用刀或手术刀片；
6. 离心机；
7. 冰箱门把手，冷冻架，门把手或实验台面等；

此时可用擦拭实验来查找可疑污染源。1) 用无菌水浸泡过的灭菌棉签擦拭可疑污染源；2) 0.1ml 去离子水浸泡；3) 取 5ml 做 PCR 实验；4) 电泳检测结果。

8. 气溶胶。如果经过上述追踪实验，仍不能查找到确切污染源，则污染可能是由空气中 PCR 产物的气溶胶造成的，此时就应该更换实验场所，若条件不允许，则重新设计新的引物（与原引物无相关性）。

### 三 . 污染处理

#### (一) 环境污染

1. 稀酸处理法：对可疑器具用 1mol/L 盐酸擦拭或浸泡，使残余 DNA 脱嘌呤；
2. 紫外照射（UV）法：紫外波长（nm）一般选择 254/300nm，照射 30min 即可。需要注意的是，选择 UV 作为消除残留 PCR 产物污染时，要考虑 PCR 产物的长度与产物序列中碱基的分布，UV 照射仅对 500bp 以上长片段有效，对短片段效果不大。UV 照射时，PCR 产物中嘧啶碱基会形成二聚体，这些二聚体可使延伸终止，但并不是 DNA 链中所有嘧啶均能形成二聚体，且 UV 照射还可使二聚体断裂。形成二聚体的程度取决于 UV 波长，嘧啶二聚体的类型及与二聚体位点相邻核苷酸的序列。在受照射的长 DNA 链上，形成二聚体缺陷的数量少于 0.065/碱基，其他非二聚体的光照损伤（如环丁烷型嘧啶复合体，胸腺嘧啶乙二醇，DNA 链间与链内的交联和 DNA 断裂等）均可终止 Taq DNA 聚合酶的延伸。这些位点的数量与二聚体位点相当。如果这些位点（0.13/碱基）在 DNA 分子上随机分布，一个 500bp 片段的 DNA 分子链上将有 32 处损伤位点，那么，105 个这样的分子中每个分子中会至少有一处损伤。相反，如果 100bp 的片段，每条链上仅有 6 处损伤，105 个拷贝分子中将有许多分子没有任何损伤。这就是 UV 照射有一定的片段长度限制的原因。

#### (二) 反应液污染

可采用下列方法之一处理：

1. DNase I 法：PCR 混合液（未加模板和 Taq 聚合酶）加入 0.5U DNase I，室温反应 30 min 后加热灭活，然后加入模板和 Taq 聚合酶进行正常 PCR 扩增。该方法的优点是不需要知道污染 DNA 的序列；
2. 内切酶法：选择识别 4 个碱基的内切酶（如 Msp I 和 Taq I 等），可同时选择几种，以克服用一种酶只能识别特定序列的缺陷，室温作用 1h 后加热灭活进行 PCR；
3. 紫外照射法：未加模板和 Taq 聚合酶的 PCR 混合液进行紫外照射，注意事项与方法同上述 UV 照射法；
4. g 射线辐射法：1.5kGy 的辐射可完全破坏 0.1ng 基因组 DNA，2.0 kGy 可破坏 104 拷贝的质粒分子，4.0 kGy 仍不影响 PCR，但高于此限度会使 PCR 扩增效率下降。引物可受照射而不影响 PCR，g 射线是通过水的离子化产生自由基来破坏 DNA 的。

#### (三) 尿嘧啶糖苷酶（UNG）法

由于 UV 照射的去污染作用对 500 bp 以下的片段效果不好，而临床用于检测的 PCR 扩增片段通常为 300 bp 左右，因此 UNG 的预防作用日益受到重视和肯定。

1. 原理：在 PCR 产物或引物中用 dU 代替 dT。这种 dU 化的 PCR 产物与 UNG 一起孵育，因 UNG 可裂解尿嘧啶碱基和糖磷酸骨架间的 N-糖基键，可除去 dU 而阻止 TaqDNA 聚合酶的延伸，从而失去被再扩增的能力。UNG 对不含 dU 的模板无任何影响。UNG 可从单或双链 DNA 中消除尿嘧啶，而对 RNA 中的尿嘧啶和单一尿嘧啶分子则无任何作用。
2. dUTP 法：用 dUTP 代替 dTTP，使产物中掺入大量 dU。在再次进行 PCR 扩增前，用 UNG 处理 PCR 混合液即可消除 PCR 产物的残留污染。由于 UNG 在 PCR 循环中的变性一步便可被灭活，因此不会影响含 dU 的新的 PCR 产物。
3. dU 引物法：合成引物时以 dU 代 dT，这样 PCR 产物中仅 5'端带 dU。UNG 处理后，引物失去了结合位点而不能扩增。对长片段（1-2kb 以上）的扩增用 dUTP 法效率较用 dTTP 低，而用 dU 法就可克服这一缺点。dU 引物最

好将 dU 设计在 3'端或近'端。该法仅能用于引物以外试剂的处理。

4. 优点 : 可以去掉任何来源的污染 ; UNG 处理可以和 PCR 扩增在同一个反应管内进行 ; 由于扩增产物中有大量 dU 存在 , 可彻底消除污染源。

5. 需注意的是掺入 dUTP 的 DNA 不对产物的任何操作有影响 , 在进行 PCR 产物克隆时 , 应该转化 UNG-( UNG 缺陷 ) 大肠杆菌受体菌 , 否则转化产物会被受体菌 UNG 消化掉。

#### (四) 固相捕获法

用于去除标本中污染的核酸和杂质 , 原理如下 : 1 ) 用一生物素标记的单链 RNA 探针与待扩核酸杂交 , 杂交区域是非扩增区 ; 2 ) 用包被链霉亲和素的固相载体来捕获带有生物素探针的杂交核酸 , 通过漂洗可去除污染的扩增产物和杂质 ; 3 ) 洗脱靶分子后用特异引物扩增非 RNA 探针杂交区域。第 2 ) 步的漂洗后可用 PCR 检测以确定标本是否被扩增产物或重组质粒污染。

#### (五) RS-PCR 法 ( RNA-specific PCR )

也称为链特异性 PCR , 主要指用于 RNA 模板的特异性 PCR 法 , 该法可明显降低假阳性而不影响 PCR 的敏感性。其关键在于设计引物 , 逆转录引物的 3'端 ( A 区 ) 有 20 个核苷酸左右为模板的特异性互不序列 , 5'端 20 个核苷酸 ( C 区 ) 为附加修饰碱基。与 mRNA 逆转录后 , 经超速离心使 cDNA 与多余引物分开 , 再用第二引物 ( C ) 以第一链 cDNA 为模板合成第二链 cDNA , 以后的 PCR 循环中用逆转录引物的 B 区和引物 C 进行扩增加尾 cDNA , 而污染的 DNA 或质粒 DNA 才不会被扩增。

#### (六) 抗污染引物法

该对引物扩增时通过病毒 DNA 克隆如入质粒的位点。这一区域只存在完整的原病毒中 , 在重组质粒中 , 这一区域分成两个区域与克隆位点被。如果重组质粒污染了标本 , 也不能扩增出任何条带 , 即使出现了扩增带 , 其大小也与预期的不同。只有原病毒 DNA 才能被引物扩增 , 因此只要出现预期大小的扩增带就可以证明标本是阳性的 , 该法试用于环状靶分子系列。

### 2.12. PCR 产物纯化方法 ( 酚/氯仿 )

1. 取 PCR 产物 ( 此次为 200 ul ) , 加入 50 ul 酚 , 加入 50 ul 氯仿/异戊醇 ( 分相上层应该是澄清的 , 如果不是澄清 , 可以再次离心 5 min , 将澄清上清取出 ) ;
2. 剧烈振荡 ( 100 bp 的小片断没有必要剧烈振荡 ) , 混匀后 , 离心 6000 - 8000 转 ( 一般大片断离心 10000 rpm ) , 5 min。 ( 只能离心 5 min , 过久的话就会酚变成沉淀 ) ;
3. 取上清 , 不要吸到中间箱 , 吸取后再在弃液中加入双蒸水 , 再次离心 , 收集上清 , 反复两次 ;
4. 上清 2 倍体积的 100%乙醇以及 0.2 倍体积的 NaAc 沉淀 , -20°C ( 1 h 也可以 ) 过夜沉淀 ( 异丙醇效果更好 , 但是不纯 ) ;
5. 12000 转 , 离心 20min , 弃去上清。70%乙醇清洗一次 , 离心 , 12000 rpm , 10 min , 重复洗涤 1 - 2 次 ( 多洗几次除去酚杂质 ) ;
6. 弃去乙醇 , 充分晾干 , 双蒸水融解。

### 2.13. 大肠杆菌菌落 PCR

1. 取适量 PCR 薄壁管 , 置于冰上 , 每管先加入 17.3ul 的灭菌水。
2. 用灭过菌的 10ul 小枪头挑取单克隆白斑至灭菌水中 , 振荡混匀。
3. 依次加入 :

10xBuffer	2.5
MgCl <sub>2</sub> ( 25mM )	1.8
DNTP ( 2.5mM )	1
T3 引物 ( 10pmol )	1
T7 引物 ( 10pmol )	1

Taq 酶 0.4

Total 25ul

各试剂均加好后，离心机上甩一下，使之沉底，置于 PCR 仪上

4. 94°C 2 min  
94°C 4 min  
94°C 40 s  
53.6°C 40 s, 35 个循环  
72°C 4 min  
72°C 10 min  
4°C 24 h

5. 待 PCR 反应进入 4°C 后，取下 PCR 薄壁管，取 7ul PCR 产物加入 3ul 溴酚兰跑电泳，同时上 1Kb DNA ladder。半小时后照相，观察胶图，根据胶图粗略鉴定插入片段的大小及小片段率。

6. 将快速鉴定和菌落 PCR 检测合格的文库送检。完全不必要额外煮沸。只需要挑取少许克隆，在配好的 PCR 反应液中涮几下，然后用正常的 PCR 反应程序即可。因为在 PCR 第一个循环 94°C 变性的步骤中（正常设置为 4-5min 即可），质粒或基因组肯定有释放，也足够 PCR 反应的模板用量了，这个我每天都在做，还没有做不出的时候。

只需要挑取少许克隆，在配好的 PCR 反应液中涮几下，然后用正常的 PCR 反应程序即可。因为在 PCR 第一个循环 94°C 变性的步骤中（正常设置为 4-5min 即可），质粒或基因组肯定有释放，也足够 PCR 反应的模板用量了，这个我每天都在做，还没有做不出的时候。

补充几点如下：

1. 沾有菌落的牙签在 PCR 反应液中涮过之后，还可以直接扔到 LB 培养基中用来接种（问题不大，重组质粒一般都含抗性的）。
2. 在做菌落 PCR 的时候，每次都要做阴性、阳性对照，阳性对照可以用抽提好的质粒或基因组，这样可以确定 PCR 主反应液的配制没有问题，不会因为菌落 PCR 阴性而怀疑 PCR 的反应；阴性对照加一点水或者什么都不加，这样可以帮助识别 PCR 反应是否有假阳性产生的可能；如果偷懒的话，阴性对照可以不做，但阳性对照则是必须要做的。
3. 再告诉大家一个偷懒的菌落 PCR 鉴定的方法：按照每次反应 15-20 ul 的体系计算好 PCR 各反应组分的量/次，然后一次性配制 100 次或 50 次反应的量，做成 Ready-to-use 的 PCR 主反应液（除 Primers、Taq 酶不加，模板用的是菌落），每次做菌落 PCR 的时候，只需要根据反应的个数，吸取相应的 PCR 主反应液，补加相应的 Primers、Taq 酶，再分装即可。这样的好处有二：即开即用，节省时间；另外反应组分均一，可减少实验批次之间的误差。

用枪头挑取**半个菌落**，加入 MIX(除了模板其他的都有)，平板放入培养箱继续培养。等 PCR 结果出来了，直接挑取阳性克隆摇菌。

还可以采用菌落裂解电泳的方法直接挑取重组子。一般目的片段如果不是很小，空载体和重组载体比较容易区分的话，都可以采用这种方法。将菌落培养时间稍微延长，挑取半个菌落加入裂解液中，同时挑取蓝斑（如非兰白斑，直接取空载体质粒）作为对照，电泳即可区分。这个方法有现成的试剂盒，也可以自己配制。

菌落 PCR：我的做法是用枪头挑菌落，在分装好的 pcr 反应体系（除了 Taq 酶）中吸几下，然后在 100 度 5 分钟裂解后加入 Taq 酶，然后就可以进行 pcr 循环了。

#### 2.14. 酵母菌落 PCR

用 Lyticase 溶壁酶，推荐用 Tiangene（天根生化）的试剂盒。

用 5 ul 发酵液/挑单菌落，离心，加 Lyticase，加引物 Buffer dNTP 酶 H<sub>2</sub>O。

加 Lyticase 作用 30 min。

#### 2.15. 胶回收纯化 DNA

1. 琼脂糖电泳，将特异电泳带用刀切下放入到 EP 管中，称琼脂糖带的重量；
2. 按照每 100mg 加 400 $\mu$ l 的量加入 binding buffer，放入到 EP 管振荡器中，45 $^{\circ}$ C ~ 55 $^{\circ}$ C 温育振荡，直到所有的琼脂糖都溶解（大概要 5 分钟）；
3. 取出纯化柱，将上述溶解液转移至柱中，室温下放置 2 分钟，8,000rpm 离心 1 分钟，弃 EP 管中的液体，将纯化柱放回 EP 管中；
4. 加 500 $\mu$ l 的 wash buffer 至柱中，8,000rpm 离心 1 分钟。弃管中的溶液；
5. 重复操作 4 步的操作 1 次，最后将纯化柱放入 EP 管中 10,000rpm 离心 30 秒，除去痕量的 wash buffer；
6. 将纯化柱放入一个新的 EP 管。加 30~40 $\mu$ l H<sub>2</sub>O 或者 elution buffer 至纯化柱膜的中央，在 37 $^{\circ}$ C 或 50 $^{\circ}$ C 下放置 2 分钟，10,000rpm 离心 1 分钟洗脱 DNA，将 EP 管中的 DNA 溶液放在 -20 $^{\circ}$ C 保存。
7. 注：若想要不电泳而直接纯化 DNA 溶液，只需要在第 2 步中按 100 $\mu$ l 液量加 400 $\mu$ l 的 binding buffer，其余的步骤不变。

## 2.16. PCR 技术片段拼接的 SOE 和 SDL 方法

PCR 技术（多聚酶链式反应）是现代分子生物学的一个巨大突破，它能在体外迅速、大量、灵敏地扩增基因片段。可是，经 PCR 技术扩增的大量相关基因片段如何能有效拼接，却是一个很值得探讨的问题。传统的方法是引入限制性内切酶位点，这不但操作繁杂，而有时为了构建限制性位点还会影响解读三联密码的正确性，SOE 和 SDL 法能巧妙地解决这个问题。

### SOE 法

1989 年，Horton 等人提出了 SOE 法（Gene splicing by over lap extension），即通过复制时 DNA 链的交错延伸不实现基因拼接。本法可分四步进行。

（1）引物设计：引物 a 和 d 是常规引物；b 的左半段为常规引物，右半段为基因 II 的引物序列；c 同理；则 b 和 c 的部分碱基可互补配对。

（2）基因 I、II 分别扩增，产物相应为片段 A、B 和 C、D。

（3）两种产物混合，经变性及退火处理，A 链和 D 链部分碱基互补配对，成杂交链。

（4）在 DNA polymerase I 作用下，A 和 D 链互为引物和模板，合成出 A'D' 链，即为基因 I 和基因 II 的接产物。若在引物中引入突变的碱基序列，则在接产物中，将按预先设计要求出现定点突变。

### SDL 法

1991 年下半年，Lebedenko 等人提出 SDL 方法（Gene splicing by directed ligation），即直接拼接法，它在 SOE 法基础上又有新的突破。本法的要点如下：

（1）限制性内切酶，EcoRI 核酸内切酶（或其它 II<sub>s</sub> 类限制性内切酶）能专一性识别 6bp 的非回文序列，并能单向特异性地切断 EcoRI 识别的 6bp 以外的 1—5 个核苷酸，产生一个以突出的 4 个核苷酸为结尾的 5' 末端。因而该伸头末端与酶切位点序列无关，而是由切点附近的序列决定的。

（2）扩增时实际运用的引物的构建。以 exon5 的实用引物为例：5' 链引物包括常规 5' 链引物序列和 BamHI 识别位点及起密码序列；3' 链引物包括常规 3' 链引物和 AC 及 EcoRI 识别位点。

（3）唯一性末端的形成。经扩增和限制性内切酶处理后可得供拼接的 exon5，它的右侧突出末端 TCAC 中，TC 为原始 exon5 的一部分，AC 为原始 exon6 的一部分，且 TCAC 与 exon6 的 AGTG 互补配对，其余类推。因为这种结尾相同的几率为 1/259，故可被视作“唯一性末端”。

（4）把经扩增的 exon5、exon6 和 exon7 混合，依据碱基互补配对原则，它们就能按顺序依次拼接。

显而易见，在 SOE 法中，退火时的最希望产物是 AD，杂交链，但 A 链和 B 链，C 链和 D 链配对的可能性更大，另外还有 B、C 链的配对，这些都是不利的；而 SDL 法中就不存在这个问题。另一方面，由于不需 DNA polymerase I，避免了它在复制中可能带来的错误，所以，SDL 法更优越。

## 2.17. SOE-PCR, Fusion-PCR FAQ

一、

首先从引物着手，分析错配、引物二聚体、发夹环等因素是否有影响。引物没有问题的情况下，按照下面的步骤进行：

- 1: 两个片段如果是 PCR 产物, 先回收一下;
- 2: 以这两个片段互为引物和模板, 根据片段的浓度可按一定的比例加入;
- 3: 95 度变性 3 分钟, ( 94 度 30 秒, 72 度 2 分钟, 25 个循环 );
- 4: 电泳检测, 理论上应该有 3 条带: 600bp, 1000bp, 1600bp;
- 5: 按照目的条带的亮度进行稀释作为模板 ( 有时目的条带根本看不出来, 就可以直接作为模板 ), 用两端的引物再 PCR 一次, 为提高目的片段的特异性, 可把退火温度提高 2 度。

## 二、

在实验中, 参照 Jespeson 等 ( BioTechniques, 23 ( 1 ), 1997, July, p48~52 ) 的方法, 为了增加重叠延伸的概率, 我们先建立了不加上下游引物 P1a、P4 的反应体系, 利用 DNA 多聚酶的 5' → 3' 聚合活性及重叠区的可引发性, 在无上、下游引物的情况下以 52°C 为退火温度进行了 8 次循环, 随后加入引物 P1a、P4 在 60°C 进行了 30 次循环, 并获得条带单一的融合基因 PCR 产物, 从而有效地提高 SOE 的效率。另外, 为了避免普通 Taq 酶在产物的 3' 端加上一个模板非依赖性的 dATP 而降低 SOE 的效率并减少 PCR 过程中的错误突变概率, 我们选用了产生钝性末端的 Pyrobest 高保真 DNA 多聚酶。

## 三、

单基因 PCR: 以基因 1 为模板, 以 P1、P2 为引物; 以基因 2 为模板, 以 P3 和 p4 为引物, 进行初次 PCR 扩增, 分别获得加有重叠引物互补序列的 1 和 2 基因片段。反应条件: 95°C 预变性 5min, 94°C 变性 1min, 45°C 退火 1min, 72°C 延伸 0.5min, 35 个循环。最后 72°C 延伸 10min。反应体系为 50ul。

重叠延伸反应: 将基因 1 和 2 初次 PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳回收纯化后, 以其为模板、以 P1 和 P4 为引物进行重叠延伸反应, 获得基因 1-2 融合基因片段。反应体系同前, 反应条件: 95°C 预变性 5min, 94°C 变性 1min, 50°C 退火 1min, 72°C 延伸 1min, 5 个循环后, 72°C 延伸 10min 终止反应。然后加入引物 P1 和 P4, 将反应条件改变为: 95°C 预变性 5min, 94°C 变性 1min, 45°C 退火 1min, 72°C 延伸 1min, 35 个循环, 最后 72°C 延伸 10min。

## 四、

我刚完成一段 550BP 和一段 1300BP 的连接 PCR, 方法如下, 你可以试一试。

第一轮 PCR:

10XPCR buffer 10ul

dNTP 8ul

ddH<sub>2</sub>O 79.5ul

Ex Taq 0.5ul

fragment1 1ul

fragment2 1ul

94°C 30 s, 68°C 60 s, 20cycles

第二轮 PCR:

添加引物各 1 ul。

94°C 2 min.

94°C 30 s; 62°C, 30 s; 72°C 1m, 30 cycles

94°C 30 s; 72°C 1 min, 10 cycles

## 五、

我最近刚好也做了这样的试验, 严格说应该叫做重组 PCR。前些天测序后已经证明两个片断已经通过 18 bp 的街头连在一起。根据我的经验, 我建议楼主这样做:

1. 关于四条引物的设计:

a. csa 上游: 楼主的引物应该没问题。

b. 下游 csa: 从 5 到 3 依次为: 街头 + CSA 下游。关于街头长度, 18bp 已经够用了, 楼主用了 24 个 bp 也

没有问题；CSA 下游引物楼主短了点，17 个 bp 也可以，最好在 20bp 以上。

c. IFNa 上游: 从 5 到 3 依次为：街头 + IFNa 上游。IFNa 上游引物楼主短了点，最好在 20bp 以上。

d. IFNa 下游: 没有问题

2.关于 PCR, 我建议楼主这样做：

a. 先分别扩出 CSA 和 IFN 的目的片断。胶回收。25cycles

b. 重组 PCR 楼主可以有两种方法：

1.将回收的两个片断，分别取 5-10ul，加上其他 PCR 组分至 30ul，注意不加任何引物。PCR 10 cycles。然后取 5-10ul 上述 PCR 的产物，加 PCR 组分至 30ul，注意加入 csa 上游和 IFNa 下游引物。30 cycles.

2. 也可以把第一种方法两个 PCR 反应一起做，即直接在第一个 PCR 反应中加入引物。30cycles。两个方法我都能扩出目的片断。

3.关于酶：我用的是 KOD plus，toyobo 公司的。楼主的这个酶会有 A 加入，建议换。

楼主要先把两个目的片断扩出来。如果楼主两个片断已经分别克隆到载体上，两个片断第二轮 PCR 时连不上，我建议楼主可以把 csa 上游引物和 IFN 下游引物分别设计两个，一个用载体的序列，一个用目的片断的，这样先用载体引物扩出目的片断，回收，然后再用片断引物作重组 PCR，有点类似套式 PCR。

六、

[http://www.archimedes.rwth-aachen.de/MolbioProtocols/Phage%20Display/PCR%20amplification%20of%20variable%20regions%20\(SOE-Protocol\).html](http://www.archimedes.rwth-aachen.de/MolbioProtocols/Phage%20Display/PCR%20amplification%20of%20variable%20regions%20(SOE-Protocol).html)

The SOE-Protocol given below utilises our initial set of primers for mouse and chicken phage display whereby the amplified VH and VL are connected by a primer encoded (Gly4Ser)<sub>3</sub>-linker.

For the amplification of the variable regions, three different murine primer sets can be used:

VH front (MuPD 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 and 12, mix) and VH back (MuPD 34, 35, 36 and 37, mix) for VH amplification, CPDVHF and CPD VH Gly for chicken VH.

VK front (MuPD 19, 20, 21, 22, and 23, mix) and VK back (MuPD 27, 28 and 29, mix) for VK amplification, CPDVLF and CPD VL Ser for chicken VL.

Vlambda front (MuPD 26) and Vlambda back (MuPD 30) for Vlambda amplification.

Every PCR amplification of variable regions was done using 4 to 10 µl of the first strand reaction.

Set up the following PCR reactions (50 µl total volume each, combine 10 pM of forward primer with a total of 10 to max 20 pM of a mixture of all backward primers):

VH amplification from G1 first strand

5-10 µl first-strand reaction (with COH 30 primer)

2 µl VH front primer (10 pmol/µl stock)

2 µl VH back primer mix (10 -20 pmol/µl stock)

2,5 µl DMSO

4 to 4.5 µl PCR 10x buffer

3 µl MgCl<sub>2</sub>, 25 mM

0,3 µl Taq-polymerase (5U/µl)

ad 50 µl Water

VH amplification from G2a/2b first strand

5-10 µl first-strand reaction (with COH 32 primer)

2 µl VH front primer (10 pmol/µl stock)

2 µl VH back primer mix (10 -20 pmol/µl stock)

2,5 µl DMSO

4 to 4.5 µl PCR 10x buffer

3 µl MgCl<sub>2</sub>, 25 mM

0,3 µl Taq-polymerase (5U/µl)  
 ad 50 µl Water  
 Vkappa amplification from kappa first strand  
 5-10 µl first-strand reaction (with MuPD 31 primer)  
 2 µl VH front primer (10 pmol/µl stock)  
 2 µl VH back primer mix (10 -20 pmol/µl stock)  
 2,5 µl DMSO  
 4 to 4.5 µl PCR 10x buffer  
 3 µl MgCl<sub>2</sub>, 25 mM  
 0,3 µl Taq-polymerase (5U/µl)  
 ad 50 µl Water  
 Vlambda amplification from lambda first strand  
 5-10 µl first-strand reaction (with MuPD 31 primer)  
 2 µl VH front primer (10 pmol/µl stock)  
 2 µl VH back primer mix (10 -20 pmol/µl stock)  
 2,5 µl DMSO  
 4 to 4.5 µl PCR 10x buffer  
 3 µl MgCl<sub>2</sub>, 25 mM  
 0,3 µl Taq-polymerase (5U/µl)  
 ad 50 µl Water  
 Start the following program:  
 5 min 95°C  
 then 30 times:  
 40s 95°C  
 2 min 58°C  
 2 min 72°C  
 final:  
 5 min 72°C  
 Check reactions putting 5 µl on a 1,2 % agarose gel.

Purify amplified variable regions by agarose gel (1,2 %) electrophoresis and Gelclean (Macherey Nagel): Load each PCR reaction in one slot of 40 µl, store the remaining 5 µl PCR reaction at -20°C. Later, this can be used for reamplification, if necessary. Cut out the right bands and purify. Two elutions can be done with 30 µl Tris/EDTA buffer, the two elutions are combined (±55 µl final volume per PCR reaction). Check purifications, putting 3 µl of each purification on a 1,2% agarose gel. Calculate the concentration of each purified PCR product.

#### Making scFv's by SOE-PCR

In the SOE-PCR the VH and VL regions are combined randomly by their overlapping linker region. We choose to mix equal amounts of variable regions from heavy chain (G1, G2a/2b, mix 50:50), and light chain (K and lambda regions, mix 95:5). In the 'second step PCR' the synthesized scFv encoding sequences from the SOE-PCR are amplified using two primer mixes: univ VH (MuPD 18) and univ VL (MuPD 33). Finally, these scFv sequences contain SfiI and NotI restriction sites at their borders, so they can be cloned in the phage display vector pHEN1. It is very!!! important to combine equal amounts of variable heavy and light regions for the SOE-PCR. We had good results using 12,5 ng of each variable region, that means 50 ng variable regions in total per SOE. The amount of SOE-PCRs that can be done with the purified variable regions is limited by the variable region with the lowest purification yield. Using more variable regions

than 12,5 ng can give more scFv product, but then you can do less SOE-PCRs. Each SOE-PCR can be divided in five second step PCRs.

For each SOE-PCR, mix the following components:

x  $\mu$ l VH G1  
x  $\mu$ l VH G2  
x  $\mu$ l VK  
x  $\mu$ l Vlambda  
3  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>  
5  $\mu$ l PCR buffer  
4  $\mu$ l 2,5 mM dNTP  
0,2  $\mu$ l Taq polymerase  
x  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  
50  $\mu$ l Total volume

Add 50  $\mu$ l mineral oil and run the following program in the thermocycler (7 cycles):

5 min 95°C  
2 min 55°C  
10 min 72°C


For the second step PCR, mix the following components:

10  $\mu$ l SOE-PCR  
4  $\mu$ l PCR buffer  
2,4  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>  
4  $\mu$ l 2,5 mM dNTP  
0,25  $\mu$ l univ VH primer (10 pM)  
0,25  $\mu$ l univ VL primer (10 pM)  
0,2  $\mu$ l Taq polymerase  
28,9  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  
50  $\mu$ l Total volume

Note: using 10 pmole of each primer instead of 2,5 pmole gave an additional PCR product at  $\pm$ 400 bp!!!

Add 50  $\mu$ l mineral oil and run the following program in the thermocycler:

15 min 95°C  
then 30 times:  
2 min 60°C  
3 min 72°C  
1 min 94°C  
final:  
2 min 60°C  
10 min 72°C

Check the PCR reaction  by running 5 µl PCR reaction on a 0,8% agarose gel.

Purification of the scFv fragments

The scFv fragments are purified from the PCR reaction by special gel filtration, using S-400 sephacryl columns from PHARMACIA (Cat. No. 27-5140-01). These columns take out primers and other PCR material. It is much faster than gel purification. Besides, gel purification can give bad ligation efficiency.



Combine all second step PCR reactions and add 1 µl protease K to release any Taq, sticking to the DNA and incubate for 30 min at 50°C

Add 1 vol PCI, vortex shortly, centrifuge 5 min in microcentrifuge, take off supernatant and purify the scfv fragments in the supernatant through a S-400 sephacryl micro-spin column:

- a. vortex the micro-spin column to homogenize
- b. screw off the top cap but leave it on
- c. break off the bottom cap
- d. put the column in a eppendorf tube and spin for 1 min at 735 xg
- e. pipet the supernatant on the top of the resin, do not touch the resin.
- f. spin 2 min at 735 xg, remove the column
- g. spin the eluate 5 min at topspeed to remove remaining resin
- h. Pipet the supernatant in a new eppendorf

Note: Do one column purification for each two second step PCRs (a. 100 µl).

Before doing the restriction digest, the purified scFv was concentrated by precipitation:

- a. Pool scFv purifications
- b. Add 1/10 volume 2M NaCl and 3 volumes ice cold ethanol
- c. Incubate overnight at -20°C
- d. Centrifuge 10 min topspeed in a microcentrifuge at 4°C
- e. Take off supernatant
- f. Wash the pellet  with 200 µl 70% ethanol (roomtemp)
- g. Spin 5 min at roomtemp, topspeed
- h. Take off supernatant
- i. Dissolve the pellet  in 10 µl H<sub>2</sub>O.

## 2.18. 聚合酶链反应—单链构象多态性分析 (PCR-SSCP)

聚合酶链反应-单链构象多态性分析 (Single Strand Conformation Polymorphism Analysis of Polymerase Chain Reaction Products, PCR-SSCP) 是近年来发展起来的一种基因分析方法。

PCR-SSCP 分析的基本程序为：首先 PCR 扩增特定靶序列，然后将扩增产物变性为单链，进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。在不含变性剂的中性聚丙烯酰胺凝胶中电泳时，DNA 单链的迁移率除与 DNA 链的长短有关外，更主要的是取决于 DNA 单链所形成的构象。在非变性条件下，DNA 单链可自身折叠形成具有一定空间结构的构象。这种构象由 DNA 单链碱基决定，其稳定性靠分子内局部顺序的相互作用（主要为氢键）来维持。相同长度的 DNA 单链其顺序不同，甚至单个碱基不同，所形成的构象不同，电泳迁移率也不同。PCR 产物变性后，单链产物经中性聚丙烯酰胺凝胶电泳，靶 DNA 中含单碱基置换，或数个碱基插入或缺失等改变时，因迁移率变化会出现泳动变位，从而可将变异 DNA 与正常 DNA 区分开。由此可见，PCR-SSCP 分析技术是一种 DNA 单链凝胶电泳技术，它根据形成不同构象的等长 DNA 单链在中性聚丙烯酰胺凝胶中的电泳迁移率变化来检测基因变异。该技术已被广泛用于癌基因和抗癌基因变异的检测、遗传病的致病基因分析以及基因诊断、基因制图等领域。

为了高灵敏特异地显示 SSCP 分析结果, 现已发展多种 PCR-SSCP 技术, 各有其优势及适用领域。例如, 可以在 PCR 扩增中用同位素或荧光素等标记引物或核苷, 也可以在电泳后用银染或溴化乙锭染色以显示结果。这里将重点介绍最常用的放射性同位素 PCR-SSCP 法。在进行 PCR 扩增特定靶基因序列时, 利用 $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP 标记引物或直接在 PCR 反应体系中加入 $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP 进行 PCR 扩增, 使扩增产物带有同位素标记物, 然后将扩增产物变性为单链进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 放射自显影显示结果。利用引物标记或碱基掺入法使 PCR 扩增产物带有同位素标记物, 均可使产物信号增强几个数量级。二者相比较, 前者经济、扩增特异性强, 多用于大样本的检测和筛选; 后者操作简便, 适于一般实验室开展, 可用于小样本或大样本的检测和筛查。本节仅介绍同位素标记碱基掺入法。

## 一、试剂准备

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

## 二、操作步骤

### 1. PCR 扩增

反应总体积为 10 $\mu$ l, 在 0.5ml 微量离心管中加入下列反应成分:

10×buffer	1 $\mu$ l
dNTPmix	70 $\mu$ M
DNA 模板	100ng
引物及 Taq DNA 酶	依实验设计要求按比例加入
$\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP	0.1 $\mu$ l
加 ddH <sub>2</sub> O 至	10 $\mu$ l

按实验设计循环参数进行扩增, 获取扩增产物。

### 2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳

(1) 电泳槽玻璃板的处理: 用洗涤剂清洗玻璃板, 自来水反复冲净洗涤剂, 双蒸水冲洗 3 次, 晾干, 95%乙醇擦拭, 自然干燥。用棉签沾取 SigmaCote 涂于玻璃的贴胶面上, 5~10min 后再用软纸擦拭除去多余的 SigmaCote 溶液。在两块玻璃内的两侧放好衬条对齐, 用固定夹夹紧两块玻璃, 并用玻璃胶带封边。

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

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

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

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

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

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

X 线片显影液显影	1-5min
水洗	1min
定影液定影	5min
流动水冲洗	15min

所有使用液的温度应为 18~20℃ 为宜。

### 三、注意事项

#### 1. 核酸片段的大小

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

#### 2. 游离引物

游离引物可能同 PCR 产物结合而改变其泳动率，即使游离引物量为 6nM 都有明显影响。因此，应尽可能除去游离引物。可以采用不对称引物扩增方法，尽可能消耗多余的引物。也可以运用过柱或磁性球方法纯化 PCR 产物。或者是稀释 PCR 产物，减少游离引物的干扰。

#### 3. 低浓度变性剂

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

#### 4. 电泳温度

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

#### 5. 凝胶的长度

可用测序板进行 SSCP 分析，凝胶板长度在 40cm 以上。

#### 6. 凝胶浓度及厚度

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

#### 7. 假阴性

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

#### 8. 结果分析

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

## 2.19. 用 Fusion PCR 构建基因片段

David Amberg and Ellen Beasley

1) In separate PCR reactions, amplify the 5' and 3' ends of the gene of interest with primers about 200 bases apart. Primer 2 should begin with 24 bp complementary to the m13 forward primer (GTC GTG ACT GGG AAA ACC CTG GCG) and primer 3 should begin with 24 bp complementary to the m13 reverse primer (TCC TGT GTG AAA TTG TTA TCC GCT). PCR amplify the marker using the m13 forward and reverse primers. The Prakash and Jones vectors are useful for the marker PCR. The conditions for these PCR reactions are as follows:

### PCR 体系 :

20ng Plasmid template DNA  
5 ul 5uM Primer1/ m13 forward/ Primer3  
5 ul 5um Primer2/ m13 reverse/ Primer 4  
5 ul 10xVent Buffer  
5 ul 2mM dNTPs  
1 ul Vent  
H<sub>2</sub>O to 50ul

### 10X Vent Buffer:

0.2M TRIS pH 8.8  
0.1M KCl  
0.1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
0.02M MgSO<sub>4</sub>  
1% Triton X-100

94°C 4 min  
94°C 1 min  
55°C 1 min  
72°C 3 min  
30 个循环  
72°C 20 min  
4°C Forever。

2) 用低熔点琼脂糖胶回收 PCR 片段 ;

3) Set up the first fusion PCR by melting the 5' end fragment and marker fragment at 65°C and adding to a PCR reaction as follows:

### PCR 体系

2.5ul of each fragment  
5 ul 5 uM Primer1  
5 ul 5 uM m13 reverse primer  
5 ul 10xTaq Buffer  
5 ul 2 mM dNTPs  
1 ul Taq  
H<sub>2</sub>O to 50 ul

### 10X Taq Buffer:

0.2 M TRIS pH8.3  
15 mM MgCl<sub>2</sub>  
0.25 M KCl  
0.5% Tween20

94°C 4 min  
94°C 1 min  
55°C 1 min  
72°C 3 min  
30 个循环  
72°C 20 min  
4°C Forever。

- 4) 用低熔点琼脂糖凝胶回收第一次 Fusion PCR 的产物；  
5) 65°C 融化第一轮回收的产物和 3' 端的片段，并如下添加到反应体系中：

5 ul of each fragment  
10 ul 5 uM Primer1  
10 ul 5 uM Primer4  
10 ul 10xTaq Buffer  
10 ul 2 mM dNTPs  
2 ul Taq  
H<sub>2</sub>O to 100ul

94°C 4 min  
94°C 1 min  
55°C 1 min  
72°C 3 min  
30 个循环  
72°C 20 min  
4°C Forever。

- 6) Check for product on a mini gel. Phenol/chloroform extract the product and EtOH pptate and use directly to transform a diploid or gel purify the product and transform the diploid with this DNA.

**注意：**If PCR generated errors are of concern then each PCR generated fragment can be extracted from the low melt agarose and EtOH precipitated. Once free of the agarose, Vent should work in the fusion PCR reactions.

## 3. 载体 DNA 的提取、鉴定与相关操作

### 3.1. 质粒概述

载体主要有病毒和非病毒两大类，其中质粒 DNA 是一种新的非病毒转基因载体。

#### 一、一个合格质粒的组成要素

复制起始位点：*Ori*即控制复制起始的位点。原核生物 DNA 分子中只有一个复制起始点。而真核生物 DNA 分子有多个复制起始位点。

抗生素抗性基因：可以便于加以检测，如 *Amp<sup>r</sup>*，*Kan<sup>r</sup>*。

多克隆位点 MCS：克隆携带外源基因片段

P/E：启动子/增强子

Terms：终止信号

加 poly ( A ) 信号可以起到稳定 mRNA 作用。

## 二、如何阅读质粒图谱

第一步：首先看 Ori 的位置，了解质粒的类型（原核/真核/穿梭质粒）

第二步：再看筛选标记，如抗性，决定使用什么筛选标记。

(1) *Amp<sup>r</sup>* 水解  $\beta$ -内酰胺环，解除氨苄的毒性。

(2) *Tet<sup>r</sup>* 可以阻止四环素进入细胞。

(3) *Cam<sup>r</sup>* 生成氯霉素羟乙酰基衍生物，使之失去毒性。

(4) *Neo<sup>r</sup>* (kanr) 氨基糖苷磷酸转移酶 使 G418 (卡那霉素衍生物) 失活

(5) *Hyg<sup>r</sup>* 使潮霉素  $\beta$  失活。

第三步：看多克隆位点 (MCS)。它具有多个限制酶的单一识别位点。便于外源基因的插入。如果在这些位点外有外源基因的插入，会导致某种标志基因的失活，而便于筛选。决定能不能放目的基因以及如何放置目的基因。

第四步：再看外源 DNA 插入片段大小。质粒一般只能容纳小于 10Kb 的外源 DNA 片段。一般来说，外源 DNA 片段越长，越难插入，越不稳定，转化效率越低。

第五步：是否含有表达系统元件，即启动子-核糖体结合位点-克隆位点-转录终止信号。这是用来区别克隆载体与表达载体。克隆载体中加入一些与表达调控有关的元件即成为表达载体。选用那种载体，还是要以实验目的为准绳。

启动子-核糖体结合位点-克隆位点-转录终止信号

启动子-促进 DNA 转录的 DNA 顺序，这个 DNA 区域常在基因或操纵子编码顺序的上游，是 DNA 分子上可以与 RNApol 特异性结合并使之开始转录的部位，但启动子本身不被转录。

增强子/沉默子-为真核基因组 (包括真核病毒基因组) 中的一种具有增强邻近基因转录过程的调控顺序。其作用与增强子所在的位置或方向无关。即在所调控基因上游或下游均可发挥作用。/沉默子-负增强子，负调控序列。

核糖体结合位点/起始密码/SD 序列 (Rbs/AGU/SDs)：mRNA 有核糖体的两个结合位点，对于原核而言是 AUG (起始密码) 和 SD 序列。

转录终止顺序 (终止子)/翻译终止密码子：结构基因的最后一个外显子中有一个 AATAAA 的保守序列，此位点 down-stream 有一段 GT 或 T 富丰区，这 2 部分共同构成 poly ( A ) 加尾信号。结构基因的最后一个外显子中有一个 AATAAA 的保守序列，此位点 down-stream 有一段 GT 或 T 富丰区，这 2 部分共同构成 poly ( A ) 加尾信号。

回答有人之前提出的一个问题：为什么质粒图谱上有的箭头顺时针有的箭头逆时针，那其实是代表两条 DNA 链，即质粒是环状双链 DNA，它的启动子等在其中一条链上，而它的抗性基因在另一条链上。

## 三、关于载体的知识

### 1. 什么是载体

即要把一个有用的基因 (目的基因——研究或应用基因) 通过基因工程手段送到生物细胞 (受体细胞)，需要运载工具 (交通工具) 携带外源基因进入受体细胞，这种运载工具就叫做载体 (Vector)。基因工程所用的 Vector 实际上是 DNA 分子，是用来携带目的基因片段进入受体细胞的 DNA。

### 2. 载体的分类

按功能分成：

(1) 克隆载体 都有一个松弛的复制子，能带动外源基因，在宿主细胞中复制扩增。它是用来克隆和扩增 DNA 片段 (基因) 的载体。(所以有时实验时扩增效率低下，要注意是不是使用的严谨型载体)；

(2) 表达载体 具有克隆载体的基本元件 (*ori*, *Amp<sup>r</sup>*, *Mcs* 等) 还具有转录/翻译所必需的 DNA 顺序的载体。

按进入受体细胞类型分：

(1) 原核载体

(2) 真核载体

(3) 穿梭载体 ( Shuttle Vector ) : 指在两种宿主生物体内复制的载体分子, 因而可以运载目的基因 ( 穿梭往返两种生物之间 )。穿梭质粒含原核和真核生物 2 个复制子, 以确保两类细胞中都能扩增。

### 3. 基因工程载体的 3 个特点 :

(一) 都能独立自主的复制 : 载体 DNA 分子中有一段不影响它们扩增的非必需区域, 如 MCS, 插在其中的外源 DNA 片段, 能被动的跟着载体一起复制/扩增, 就像载体的正常成分一样。

(二) 都能便利的加以检测 : 如载体的药物抗性基因, 多是抗生素抗性基因, 将受体细胞放在含有该抗生素培养板上培养生长时, 只有携带这些抗性基因的载体分子的受体细胞才能存活。

(三) 都能容易进入宿主细胞中去, 也易从宿主细胞中分离纯化出来。

### 4. 载体的选择和制备 :

选择载体主要依据构建的目的, 同时要考虑载体中应有合适的限制酶切位点。如果构建的目的是要表达一个特定的基因, 则要选择合适的表达载体。

载体选择主要考虑下述 3 点 :

【1】构建 DNA 重组体的目的, 克隆扩增/表达表达, 选择合适的克隆载体/表达载体。

【2】载体的类型 :

(1) 克隆载体的克隆能力-据克隆片段大小 ( 大选大, 小选小 )。如 <10kb 选质粒。

(2) 表达载体据受体细胞类型-原核/真核/穿梭, E.coli/哺乳类细胞表达载体。

(3) 对原核表达载体应该注意 3 点 :

①选择合适的启动子及相应的受体菌 ;

②用于表达真核蛋白质时注意克服 4 个困难和阅读框错位 ;

③表达天然蛋白质或融合蛋白作为相应载体的参考。

【3】载体 MCS 中的酶切位点数与组成方向因载体不同而异, 适应目的基因与载体易于链接, 不产生阅读框架错位。

选用质粒 ( 最常用 ) 做载体的 4 点要求 :

①选分子量小的质粒, 即小载体 ( 1-1.5 限 kb ) → 不易损坏, 在细菌里面拷贝数也多 ( 也有大载体 ) ;

②一般使用松弛型质粒在细菌里扩增不受约束, 一般 10 个以上的拷贝, 而严谨型质粒 <10 个。

③必需具备一个以上的酶切位点, 有选择的余地 ;

④必需有易检测的标记, 多是抗生素的抗性基因, 不特指多位 *Amp<sup>r</sup>* ( 试一试 )。

无论选用哪种载体, 首先都要获得载体分子, 然后采用适当的限制酶将载体 DNA 进行切割, 获得分子, 以便于与目的基因片段进行连接。

## 3.2. 质粒快速鉴定

试剂 :

1. 快检液 I : 10 mmol/L EDTA ( pH 8.0 ) ;
2. 快检液 II : 0.2 mol/L NaOH, 0.5% SDS, 20%蔗糖溶液 ;
3. 快检液 III : 3 mol/L KCl, 0.1%溴酚蓝溶液。

步骤 :

1. 挑取筛选培养基上长出的单菌落至 1.5 ml 加有 50 u1 快检液 I 的微量离心管中 ;
2. 加入 50 u1 新配置的快检液 II, 振荡 30 s ;
3. 70°C 水浴 5 min 后冷却到室温 ;
4. 再加入 2 ul 快检液 III, 振荡 30 s, 冰浴 5 min ;
5. 用微量离心机在 4°C 以 12000 g 离心 3 min 去除细菌碎片 ;
6. 取上清进行琼脂糖凝胶电泳, 检测质粒条带大小。

## 3.3. 质粒 DNA 的小量制备 ( 20 μl )

细菌质粒是一类双链、闭环的 DNA，大小范围从 1kb 至 200kb 以上不等。各种质粒都是存在于细胞质中、独立于细胞染色体之外的自主复制的遗传成份，通常情况下可持续稳定地处于染色体外的游离状态，但在一定条件下也会可逆地整合到寄主染色体上，随着染色体的复制而复制，并通过细胞分裂传递到后代。

质粒已成为目前最常用的基因克隆的载体分子，重要的条件是可获得大量纯化的质粒 DNA 分子。目前已有许多方法可用于质粒 DNA 的提取，本实验采用碱裂解法提取质粒 DNA。

碱裂解法是一种应用最为广泛的制备质粒 DNA 的方法，其基本原理为：当菌体在 NaOH 和 SDS 溶液中裂解时，蛋白质与 DNA 发生变性，当加入中和液后，质粒 DNA 分子能够迅速复性，呈溶解状态，离心时留在上清中；蛋白质与染色体 DNA 不变性而呈絮状，离心时可沉淀下来。

纯化质粒 DNA 的方法通常是利用了质粒 DNA 相对较小及共价闭环两个性质。例如，氯化铯-溴化乙锭梯度平衡离心、离子交换层析、凝胶过滤层析、聚乙二醇分级沉淀等方法，但这些方法相对昂贵或费时。对于小量制备的质粒 DNA，经过苯酚、氯仿抽提，RNA 酶消化和乙醇沉淀等简单步骤去除残余蛋白质和 RNA，所得纯化的质粒 DNA 已可满足细菌转化、DNA 片段的分离和酶切、常规亚克隆及探针标记等要求，故在分子生物学实验室中常用。

已经提出过许多方法用于从细菌中提纯质粒 DNA，这些方法都含有以下 3 个步骤：

### （一）细菌培养物的生长

从琼脂平板上挑取一个单菌落，接种到培养物中（含有行当抗生素的液体培养基中生长），然后从中纯化质粒，质粒的提纯几乎总是如此。现在使用的许多质粒载体（如 pUC 系列）都能复制到很高的拷贝数，惟致只要将培养物放在标准 LB 培养基中生长到对数晚期，就可以大量提纯质粒。此时，不必造反性地扩增质粒 DNA。然而，较长一代的载体（如 pBR322）由于不能如此自由地复制，所以需要在得到部分生长的细菌培养物中加入氯霉素继续培养若干小时，以便对质粒进行性扩增。氯霉素可抑制宿主的蛋白质合成，结果阻止了细菌染色体的复制，然而，松弛型质粒仍可继续复制，在若干小时内，其拷贝数持续递增。这样，像 pBR322 类的质粒，从经氯霉素处理和未经处理的培养物中提取质粒的产量迥然不同，前者大为增高。多年来，加入足以完全抑制蛋白质合成的氯霉素（ $\mu\text{g/ml}$ ）已成为标准的操作、用该方法提取的质粒 DNA 量，对于分子克隆中几乎所有想象到的工作任务。

### （二）细菌的收获和裂解

细菌的收获可通过离心来进行，而细菌的裂解则可以采用多种方法中的任意一种，这些方法包括用非离子型或离子型去污剂、有机溶剂或碱进行处理及用加热处理等。选择哪一种方法取决于 3 个因素：质粒的大小、小肠杆菌菌株及裂解后用于纯化质粒 DNA 的技术。尽管针对质粒和宿主的每一种组合分别提出精确的裂解条件不切实际，但仍可据下述一般准则来选择适当方法，以取得满意的结果。

1) 大质粒（大于 15kb）容易受损，故应采用温和裂解法从细胞中释放出来。将细菌悬于蔗糖等渗溶液中，然后用溶菌酶和 EDTA 进行处理，破坏细胞壁和细胞外膜，再加入 SDS 一类去污剂溶解球形体。这种方法最大限度地减小了从具有正压的细菌内部把质粒释放出来所需要的作用力。

2) 可用更剧烈的方法来分离小质粒。在加入 EDTA 后，有时还在加入溶菌酶后让细菌暴露于去污剂，通过煮沸或碱处理使之裂解。这些处理可破坏碱基配对，故可使宿主的线状染色体 DNA 变性，但闭环质粒 DNA 链由于处于拓扑缠绕状态而不能彼此分开。当条件恢复正常时，质粒 DNA 链迅速得到准确配置，重新形成完全天然的超螺旋分子。

3) 一些大肠杆菌菌株（如 HB101 的一些变种衍生株）用去污剂或加热裂解时可释放相对大量的糖类，当随后用氯化铯-溴化乙锭梯度平衡离心进行质粒纯化时它们会惹出麻烦。糖类会在梯度中紧靠超螺旋质粒 DNA 所占位置形成一致密的、模糊的区带。因此很难避免质粒 DNA 内污染有糖类，而糖类可抑制多种限制酶的活性。故从诸如 HB101 和 TG1 等大肠杆菌菌株中大量制备质粒时，不宜使用煮沸法。

4) 当从表达内切核酸酶 A 的大肠杆菌菌株（endA<sup>+</sup> 株，如 HB101）中小量制备质粒时，建议不使用煮沸法。因为煮沸不能完全灭活内切核酸酶 A，以后在温育（如用限制酶消化）时，质粒 DNA 会被降解。但如果通过一个附加步骤（用酚：氯仿进行抽提）可以避免此问题。

5) 目前这一代质粒的拷贝数都非常高，以致于不需要用氯霉素进行选择性的扩增就可获得高产。然而，某些工作者沿用氯霉素并不是要增加质粒 DNA 的产量，而是要降低细菌细胞在用于大量制备的溶液中所占体积。大量高度粘稠的浓缩细菌裂解物，处理起来煞为费事，而在对数中期在增减物中加入氯霉素可以避免这种现象。有氯霉素存在时从少量细胞获得的质粒 DNA 的量与不加氯霉素时从大量细胞所得到的质粒 DNA 的量大致相等。

## 一、试剂准备

1. **溶液 I** : 50 mM 葡萄糖, 25 mM Tris-HCl(pH 8.0), 10 mM EDTA(pH 8.0)。1 M Tris-HCl(pH 8.0) 12.5 ml, 0.5M EDTA (pH 8.0) 10 ml, 葡萄糖 4.730 g, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 500 ml。溶液 I 可成批配制, 每瓶约 100 ml, 在 115 °C 高压灭菌 15 min, 贮存于 4°C。
2. **溶液 II** : 0.2 N NaOH, 1% SDS。2N NaOH 1 ml, 10%SDS 1 ml, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 10 ml。使用前临时配置。
3. **溶液 III** : 醋酸钾 (KAc) 缓冲液, pH 4.8。5 M KAc 300 ml (**称取的时候不要用小口的瓶, KAc 固体是薄片状的, 质地很松!**), 冰醋酸 57.5 ml, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 500 ml。4°C 保存备用。
4. TE : 10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA(pH 8.0)。1 M Tris-HCl (pH 8.0) 1 ml, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 0.2 ml, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 100 ml。121 °C 高压湿热灭菌 20 min, 4°C 保存备用。
5. 苯酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1)。
6. 乙醇 (无水乙醇、70%乙醇)。
7. 5×TBE : Tris 碱 54 g, 硼酸 27.5 g, EDTA-Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 4.65 g, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 1000 ml。121°C 高压湿热灭菌 20 min, 4°C 保存备用。
8. 溴化乙锭 (EB) : 10 mg/ml。
9. RNase A (RNA 酶 A) : 不含 DNA 酶(DNase-free) RNase A 的 10 mg/ml, TE 配制, 沸水加热 15 min, 分装后贮存于 -20°C。
10. 6×Loading buffer (上样缓冲液) : 0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青 FF, 40% (W/V) 蔗糖水溶液。
11. 1% 琼脂糖凝胶 : 称取 1 g 琼脂糖于三角烧瓶中, 加 100 ml 0.5×TBE, 微波炉加热至完全溶化, 冷却至 60 °C 左右, 加 EB 母液 (10 mg/ml) 至终浓度 0.5 μg/ml (**注意** : EB 为强诱变剂, 操作时带手套), 轻轻摇匀。缓缓倒入架有梳子的电泳胶板中, 勿使有气泡, 静置冷却 30min 以上, 轻轻拔出梳子, 放入电泳槽中 (电泳缓冲液 0.5 ×TBE), 即可上样。

## 二、操作步骤

1. 挑取 LB 固体培养基上生长的单菌落, 接种于 2.0 ml LB (含相应抗生素) 液体培养基中, 37°C、200 rpm 振荡培养过夜 (约 12-14hr)。
2. 取 1.5 ml 培养物入微量离心管中, 室温离心 8000 g×1 min, 弃上清, 将离心管倒置, 使液体尽可能流尽。将剩余的培养物贮存于 4°C。
3. 将细菌沉淀重悬于 100 μl 预冷的溶液 I 中, 剧烈振荡, 使菌体分散混匀。**须确使细菌沉淀在溶液 I 中完全分散, 将两个微量离心管的管底部互相接触震荡, 可使沉淀迅速分散。**
4. 加 200 μl 新鲜配制的溶液 II, 颠倒数次混匀 (**不要剧烈振荡**), 并将离心管放置于冰上 2-3 min, 使细胞膜裂解 (**溶液 II 为裂解液, 故离心管中菌液逐渐变清**)。
5. 加入 150 μl 预冷的溶液 III, 将管温和颠倒数次混匀, 见白色絮状沉淀, 可在冰上放置 3-5 min。溶液 III 为中和溶液, 此时质粒 DNA 复性, 染色体和蛋白质不可逆变性, 形成不可溶复合物, 同时 K<sup>+</sup>使 SDS-蛋白复合物沉淀。
6. 加入 450 μl 的苯酚/氯仿/异戊醇, 振荡混匀, 4°C 离心 12000 g×10 min。  
**有些工作者认为不必用酚 : 氯仿进行抽提, 然而由于一些未知的原因, 省略这一步, 往往会得到可耐受限制酶切反应的 DNA。**
7. 小心移出上清于一新微量离心管中, 加入 2.5 倍体积预冷的无水乙醇, 混匀, 室温放置 2-5 min, 4°C 离心 12000 g×15 min。
8. 1 ml 预冷的 70%乙醇洗涤沉淀 1-2 次, 4°C 离心 8000 g×7 min, 弃上清, 将沉淀在室温下晾干。
9. 沉淀溶于 20 μl TE (含 RNase A 20 μg/ml), 37°C 水浴 30 min 以降解 RNA 分子, -20°C 保存备用。

## 三、注意事项

- I. 此法制备的高拷贝数质粒 (如 pUC), 其产量一般约为 : 每毫升原细菌培养物 3-5 μg。
- II. 如果要通过限制酶切割反应来分析 DNA, 可取 1 μl DNA 溶液加到另一含 8 μl 水的微量离心管内, 加 1 μl 10×限制酶缓冲液和 1 单位所需限制酶, 在适宜温育 1-2 h。将剩余的 DNA 贮存于 -20°C。
- III. 此方法按适当比例放大可适用于 100 ml 细菌培养物 :  
本裂解法小量制备质粒 DNA 重复性好, 一般无麻烦。**若所提取质粒 DNA 不能被限制性内切酶切割, 可通过**

### 酚/氯仿再次抽提，以清除杂质来解决问题。

该法极其可靠，重复性也很好，而且一般没有会么麻烦。多年来，在我们实验室中日常使用这两种方法的过程中，只碰到过两个问题：

1) 有些工作者首次进行小量制备时，有时会发现质粒 DNA 不能被限制酶所切割，这几乎总是由于从细菌沉淀或从核酸沉淀中去除所有上清液时注意得不够。大多数情况下，用酚：氯仿对溶液进行抽提可以去除小量备物中的杂质。如果总是依然存在，可用离心柱层析注纯化 DNA。

2) 在十分偶然的情况下，个别小时制备物会出现无质粒 DNA 的现象。这几乎肯定是由于核酸沉淀颗粒已同乙醇一起被弃去。

## 3.4. 质粒 DNA 的大量制备 (3 mL)

### 一. 试剂

#### STE

0.1mol/L NaCl  
10mmol/L Tris-Cl(pH8.0)  
1mmol/L EDTA(pH8.0)

#### 溶菌酶溶液

10 mg/ml Lysozyme  
溶于 10 mmol/L Tris.Cl(pH8.0)

#### 溶液 I

50mmol/L 葡萄糖  
25mmol/L Tris.Cl(pH8.0)  
10mmol/L EDTA(pH8.0)  
溶液 I 可成批配制，在 10 lbf/in<sup>2</sup>(6.895x10<sup>4</sup>Pa)高压下蒸气灭菌 15 分钟，贮存于 4℃。

#### 溶液 II

0.2 mol/L NaOH(临用前用 10mol/L 贮存液现用现稀释)  
1%SDS  
盖紧瓶盖，缓缓颠倒离心瓶数次，以充分混匀内容物。于室温放置 5-10 分钟。

#### 溶液 III

5 mol/L 乙酸钾 60 ml  
冰乙酸 11.5 ml  
水 28.5 ml  
所配成的溶液对钾是 3mol/L，对乙酸根是 5mol/L。

### 二. 在丰富培养基中扩增质粒

许多年来，一直认为在氯霉素存在下扩增质粒只对生长在基本培养基上的细菌有效，然而在带有 pMB1 或 ColE1 复制子的高拷贝数质粒的大肠杆菌菌株中，采用以下步骤可提高产量至每 500ml 培养物 2-5mg 质粒 DNA，而且重复性也很好。

1) 将 30ml 含有目的质粒的细菌培养物培养到对数晚期 (DNA 600 约 0.6)。培养基中应含有相应抗生素，用单菌落或从单菌落中生长起来的小量液体闭关物进行接种。

2) 将含相应抗生素的 500ml LB 培养基 (预加温至 37℃) 加入 25 ml 对数晚期的培养物，于 37℃ 剧烈振荡培养 25 h (摇床转速 300 rpm)，所得培养物的 OD<sub>600</sub> 值约为 0.4。

3) 可做可不做：加 2.5 ml 氯霉素溶液 (34 mg/ml 溶于乙醇)，使终浓度为 170 μg/ml。像 pBR322 一类在

宿主菌内只以中等拷贝数进行复制的质粒,有必要通过扩增。这些质粒只要从生长达到饱和,新一代的质粒(如 pUC 质粒)可复制达到很高的拷贝数,因此无需扩增。这些质粒只要从生长达到饱和的细菌培养物即可大量提纯。**但用氯霉素进行处理,具有抑制细菌复制的优点,可减少细菌裂解物的体积和粘稠度,极大地简化质粒纯化的过程。所以一般说来,尽管要在生长中的细菌培养物里加入氯霉素略显不便,但用氯霉素处理还是利大于弊。**

4) 于 37°C 剧烈振摇 (300 转/分), 继续培养 12-16 h。

### 三. 细菌的收获和裂解

#### 1. 收获

- 1) 用合适转头于 4°C 以 4000 rpm 离心 15 min, 弃上清, 敞开离心管口并倒置离心管使上清全部流尽。
- 2) 将细菌沉淀重悬于 100 ml 用冰预冷的 STE 中。
- 3) 按步骤 1) 所述方法离心, 以收集细菌细胞。

#### 2. 碱裂解法

- 1) 将洗过的 500 ml 培养物的细菌沉淀物[来自收获细菌的步骤 3] 重悬于 10 ml (18 ml) 溶液 I 中。
- 2) 加 1 ml(2 ml) 新配制的溶菌酶溶液。当溶液的 pH 值低于 8.0 时, 溶菌酶不能有效工作。
- 3) 加 20 ml(40 ml) 新配制的溶液 II。
- 4) 加 15 ml(20 ml) 用冰预冷的溶液 III。封住瓶口, 摇动离心瓶数次以混匀内容物, 此时应不再出现分明的两个液相。置冰上放 10 min, 应形成一白色絮状沉淀。于 0°C 放置后所形成的沉淀应包括染色体 DNA、高分子量 RNA 和钾-SDS-蛋白质-膜复合物。
- 5) 用合适转头于 4°C 以 4000 rpm 离心 15 min, 不开刹车而使转头自然停转。如果细菌碎片贴壁不紧, 可以 5000 rpm 再度离心 20 min, 然后尽可能将上清全部转到另一瓶中, 弃去残留在离心管内的粘稠状液体。未能形成致密沉淀块的原因通常是由于溶液 III 与细菌裂解物混合不充分[步骤 4) ]。
- 6) 上清过滤至一 250 ml 离心瓶中, 加 0.6 体积的异丙醇, 充分混匀, 于室温放置 10 min。
- 7) 用合适转头于室温以 500 rpm 离心 15 min, 回收核酸。如于 4°C 离心, 盐也会发生沉淀。
- 8) 小心倒掉上清, 敞开瓶口倒置离心瓶使残余上清液流尽, 于室温用 70% 乙醇洗涤沉积管壁。倒出乙醇, 用与真空装置相联的巴斯德吸出附于瓶壁的所有液滴, 于室温将瓶倒置放在纸巾上, 使最后残余的痕量乙醇挥发殆尽。
- 9) 用 3 ml TE(pH8.0) 溶解核酸沉淀。
- 10) 纯化。

### 3.5. $\lambda$ 噬菌体 DNA 提取

$\lambda$ 噬菌体是最早使用的克隆载体,  $\lambda$ 噬菌体的基因组是一长度约为 50kb 的双链 DNA 分子, 它在宿主细胞有两种生活途径, 其一是裂解生长, 环状 DNA 分子在细胞内多次复制, 合成大量噬菌体基因产物, 装配成噬菌体颗粒, 裂解宿主菌再进行下一次感染; 其二是溶源性生长, 即感染细胞内  $\lambda$ 噬菌体 DNA 整合到宿主菌染色体 DNA 中与之一起复制, 并遗传给子代细胞, 宿主细胞不裂解。平板培养时, 裂解生长形成噬斑。液体培养时, 裂解生长使菌液中宿主菌最后全部被裂解而释放出大量的噬菌体颗粒。经过改造的  $\lambda$ 噬菌体克隆位点可插入几到几十 kb 的外源 DNA。许多 cDNA 和基因组文库是以  $\lambda$ 噬菌体作为克隆载体构建的。因此, 在经文库筛选得到目的克隆后, 我们常常需要利用  $\lambda$ 噬菌体裂解生长的特点, 培养获得大量的噬菌体颗粒, 并提取  $\lambda$ 噬菌体 DNA 来开展进一步的工作。

#### 一、试剂准备

**LB 培养基、LB 平板、PEG 8000、10% SDS、苯酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1)、异丙醇、无水乙醇、70% 乙醇。**

#### 20% 麦芽糖

麦芽糖 20g, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 100ml, 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤。

#### SM 液

NaCl 5.8g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2g, 1M Tris-Cl (PH7.5) 50 ml, 2% 明胶 5 ml, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 1000 ml。15lbf/in<sup>2</sup> 高压灭菌 20min。

#### RNase A

10 mg/ml, TE 配制, 沸水浴 15min, 分装后贮存于-20°C。

#### **DNase I**

10 mg/ml, TE 配制, 分装后贮存于-20°C。

#### **EDTA: 0.5M pH8.0**

### **二、操作步骤**

#### **1. λ噬菌体平板培养**

- (1) 用 SM 液 10 倍梯度稀释 λ噬菌体原种。
- (2) 取 0.1ml 各梯度稀释离心到一消毒微量离心管中, 加 0.2ml 新鲜培养的宿主菌, 加麦芽糖 (0.2%), MgSO<sub>4</sub> (10mm), 37°C 温育 20min, 使噬菌体颗粒吸附于细菌。
- (3) 取融化 (47°C) 0.7% 琼脂 LB 固体培养基 3ml 与上述管混匀, 立即倒入预备 (2-4 天) 的含凝固 1.5% 琼脂 LB 固体培养基的平板内, 轻轻晃动平板使均匀分布。
- (4) 37°C 培养 6-8hr 后, 观察噬斑形成。
- (5) 用剪去部分头部的吸头挖取单个噬斑到 0.5ml 的 SM 液中, 加 0.05ml 氯仿, 震荡。37°C 温育 10min。
- (6) 重复(1)-(4), 获得单个噬斑滴度。

#### **2. λ噬菌体液体培养**

- (1) 取 2 ml 新鲜培养的宿主菌, 离心, 0.4 ml LB 培养基重悬, 加 λ噬菌体 0.1 ml (新鲜获得的单个噬斑, 依滴度使之与宿主菌比约 1/500-1000)。
- (2) 加麦芽糖 (0.2%), MgSO<sub>4</sub> (10 mM), 37°C 温育 20 min, 使噬菌体颗粒吸附于细菌。
- (3) 加到 100ml LB 液体培养基中, 加麦芽糖 (0.2%), MgSO<sub>4</sub> (10 mM), 37°C 摇震培养 9-12 h 后可见裂解发生。
- (4) 加 0.1 ml 氯仿, 37°C 继续摇震培养 10-20min。

### **(二) λ噬菌体 DNA 提取**

1. 将上述裂解液转移至离心管, 离心 8000 g×10min, 去细菌碎片, 取上清液。
2. 加 RNase A、DNaseI 至 1μg/ml, 37°C 温育 30min。
3. 加 9.3 g PEG 8000, 5.8g NaCl, 摇匀至溶解, 冰浴 1hr 或 4°C 过夜。
4. 4°C 离心 10000g×20min, 去上清液。
5. 加 2ml SM 液, 充分洗溶管壁及沉淀, 移到新微量离心管, 加 20μl 10% SDS, 20μl 0.5M EDTA, 68°C 15min。
6. 加等体积苯酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1), 混匀, 离心 12000g×5min, 取上层液到一新微量离心管, 加等体积氯仿/异戊醇 (24 : 1), 混匀, 离心 12000g×5min。
7. 取上层液到一新微量离心管, 加等体积异丙醇, 混匀, -20°C 1hr, 4°C 离心 12000g×10min, 去上清液。
8. 1ml 预冷的 70% 乙醇洗涤沉淀 1-2 次, 4°C 离心 8000g×7min, 弃上清, 将沉淀室温下晾干。
9. 沉淀溶于 20μl TE, -20°C 保存备用。

### **三、注意事项**

1. 用于裂解的噬菌体、宿主菌为新鲜培养获得时, 裂解好、裂解噬菌体收获量大。
2. 液体培养裂解时, 如到培养时间时裂解尚未发生, 可适当提高培养温度或加大摇震速度。
3. RNase A、DnaseI 消化不全, DNA、RNA 可粘走部分噬菌体。
4. 苯酚/氯仿抽提时, 注意 PEG、蛋白质等杂质污染, 它们会影响限制性内切酶切割。

#### **3.6. 酶切**

1. 酶切前确定待切样品的浓度, 并选择合适的限制性内切酶和配套 Buffer。
2. 在离心管中加入如下成分:

10×Buffer 1μl

待切样品	x $\mu$ l
酶	0.5-1 $\mu$ l
加水补足 10 $\mu$ l	

3. 混匀样品并短暂离心使样品沉于管底。
4. 将离心管置于 37°C 中温育 1-3hr, 若待切样品为 PCR 产物, 则可将反应时间适当延长。
5. 用未酶切的质粒作为对照, 琼脂糖电泳鉴定酶切结果。

注: 当酶切样品用于回收而不是鉴定时, 可按比例适当加大反应体积。双酶切可选用二者活性都较高的 Buffer 或者通用 Buffer, 但要注意不能有星反应。)

**技巧:** 在做酶切时, 也可以象 PCR 一样配置主反应液, 每次反应前先列好反应的体系, 算好需要的反应数, 然后按所需反应的体系按所需反应数放大, 加入 Buffer、酶、水, 质粒栏空缺, 然后混合后按除质粒 DNA 的体积分装, 然后再在每管中加入相应体积的质粒 DNA 酶切, 这样做的好处如下, 特别是当同时有十几个阳性克隆需要鉴定时尤为明显:

- 1) 各反应成分均一;
- 2) 可大大减少限制型内切酶的使用;
- 3) 节省时间。

### 3.7. 单酶切

限制性内切酶可特异地结合于一段被称为限制酶识别序列的 DNA 序列位点上并在此切割双链 DNA。绝大多数限制性内切酶识别长度为 4、5 或 6 个核苷酸且呈二重对称的特异序列, 切割位点相对于二重对称轴的位置因酶而异。一些酶恰在对称轴处同时切割 DNA 双链而产生带平端的 DNA 片段, 另一些酶则在对称轴两侧相对的位置上分别切断两条链, 产生带有单链突出端 (即粘端) 的 DNA 片段。1 个单位限制性内切酶是指在最适条件下, 在 50 $\mu$ l 体积 1 小时内完全切开 1 $\mu$ g $\lambda$ 噬菌体 DNA 所需的酶量。不同的限制性内切酶生产厂家往往推荐使用截然不同的反应条件, 甚至对同一种酶也如此。但是, 几乎所有的生产厂家都对其生产的酶制剂优化过反应条件, 因此购买的内切酶说明书上均有其识别序列和切割位点, 同时提供有酶切缓冲液 (buffer, 10 $\times$ 、5 $\times$ ) 和最适条件, 使得酶切反应变得日益简单。

#### 一、限制性内切酶对 DNA 消化的一般方案

1. 限制性内切酶反应一般在灭菌的 0.5ml 离心管中进行。

2. 20 $\mu$ l 体积反应体系如下:

DNA	0.2-1 $\mu$ g
10 $\times$ 酶切 buffer	2.0 $\mu$ l
限制性内切酶	1-2 u (单位)
加 ddH <sub>2</sub> O	至 20 $\mu$ l

限制性内切酶最后加入, 轻轻混匀, 稍加离心, 放置于最适温度水浴并按所需的时间温育, 一般为 37°C 水浴消化 1hr。

3. **用于回收酶切片段时, 反应总体积可达 50-200 $\mu$ l, 各反应组分需相应增加。**
4. 多种酶消化时若缓冲液条件相同, 可同时加入; 否则, 先做低温或低盐的酶消化, 再做高温或高盐的酶消化。
5. 酶切结束时, 加入 0.5M EDTA (pH 8.0) 使终浓度达 10mM, 以终止反应。或将反应管在 65°C 水浴放置 10 min 以灭活限制性内切酶活性。
6. 如消化反应体积过大, 电泳时加样孔盛不下, 可加以浓缩: 终止反应后, 加入 0.6 体积的 5 M 乙酸铵 (或 1/10 体积 3 M NaAc) 和 2 倍体积无水乙醇, 在冰上放置 5 min, 然后于 4°C 离心 12000 g $\times$  5 min。倾去含大部分蛋白质的上清液。于室温晾干 DNA 沉淀后溶于适量 TE 中 (pH 7.6)。
7. 如要纯化消化后的 DNA, 可用等体积酚/氯仿 (1:1) 和氯仿各抽提一次, 再用乙醇沉淀。

#### 二、电泳检测

取质粒酶切产物适量, 加适当 Loading buffer 混匀上样, 以未经酶切的质粒或/和酶切的空载体 (如有) 作对照, 采用 1-5V/cm 的电压, 使 DNA 分子从负极向正极移动, 至合适位置取出置紫外灯下检测, 摄片。

### 三、注意事项

1. 浓缩的限制性内切酶可在使用前以  $1\times$  限制酶缓冲液稀释，切勿用水稀释以免酶变性。
2. 购买的限制性内切酶多保存于 50% 甘油中，于  $-20^{\circ}\text{C}$  是稳定的。进行酶切消化时，将除酶以外的所有反应成分加入后即混匀，再从  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中取出酶，立即放置于冰上。每次取酶时都应更换一个无菌吸头，以免酶被污染。加酶的操作尽可能快，用完后立即将酶放回  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱。
3. 尽量减少反应体积，但要确保酶体积不超过反应总体积的 10%，否则酶活性将受到甘油的抑制。
4. 通常延长反应时间可使所需的酶量减少，在切割大量 DNA 时可用。在消化过程中可取少量反应液进行微量凝胶电泳以检测消化进程。
5. 注意星号酶切活力。

### 3.8. 单酶切方向问题：注意！

重组质粒在菌体内往往存在不稳定性的问题，常常对菌体产生一定的毒性，所以，正向连接产物很可能无法在菌体内复制而被降解，而反向连接产物对菌体产生的毒性可能较小一些。解决这一问题的一个有效途径就是该换感受态的菌株。

### 3.9. 双酶切

前一阵子一直在做双酶切质粒重组，失败了很多次，不过很快改善了实验方法，用 2 周重组了 14 个质粒。现就自己的体会，结合丁香园战友的宝贵经验，谈一下质粒重组的一些个人经验。

#### 1、回收 PCR 产物

在进行 PCR 扩增时候，给引物两端设计好酶切位点，一般说来，限制酶的选择非常重要，尽量选择粘端酶切和那些酶切效率高的限制酶，如 BamHI, HindIII，提前看好各公司的双切酶所用公用的 BUFFER，以及各酶在公用 BUFFER 里的效率。选好酶切位点后，在各个酶的两边加上保护碱基。

#### 2、双酶切时间及其体系

需要强调的是很多人建议酶切过夜，其实完全没有必要，我一般酶切 3 个小时，其实 1 个小时已经足够。应用大体系，如 100 微升。

#### 3、纯化问题

纯化 PCR 产物割胶还是柱式，我推荐柱式，因为割胶手法不准，很容易割下大块的胶，影响纯化效率。现在的柱式纯化号称可以祛除引物，既然如此，酶切掉的几个碱基肯定也会被纯化掉了。所以，PCR 产物和双酶切产物的纯化均可应用柱式纯化。

#### 4、酶量的问题

以 TAKARA 的为例，其对 1 单位酶的定义如下：在 50  $\mu\text{l}$  反应液中， $30^{\circ}\text{C}$  温度下反应 1 小时，将 1  $\mu\text{g}$  的  $\lambda$  DNA 完全分解的酶量定义为 1 个活性单位(U)。而该酶浓度约为 15 单位/微升，在除外酶降解的因素外，该酶可分解 15 $\mu\text{g}$  的 DNA，而一般从 1-4ml 菌液提出的 DNA 约为 3 $\mu\text{g}$ ，而 PCR 纯化后的产物 (50 体系) 约为 3 $\mu\text{g}$ ，所以即便全部加进去，只要纯化的质量好，酶切完全切得动。

#### 5、酶切、回收后的 PCR 产物与载体的连接

摩尔比的计算，很多人凭经验也可以。但对于初学者从头认真计算则非常有必要。回收的载体片段：回收的 PCR 产物片段 = 1 : 10，一般取前者 0.03 $\mu\text{mol}$ ，后者取 0.3 $\mu\text{mol}$ 。

pmol 为单位的 DNA 转换为  $\mu\text{g}$  单位的 DNA： $(X \text{ pmoles} \times \text{长度 bp} \times 650) / 1,000,000$ （注：长度 bp  $\times 650$  是该双链 DNA 的分子量）所得数值即为  $\mu\text{g}$ ，也可以直接用这个公式套。1 $\mu\text{mol}$  1000bp DNA = 0.66 $\mu\text{g}$ ，如载体是 5380bp，则 0.03 $\mu\text{mol}$  为  $0.03 \times 5.38 \times 0.66 = 0.106524 \mu\text{g}$ 。

测 DNA 浓度可以在专用机子上测，注意 OD 值，一般约 1.8-2.0。另外，如果嫌麻烦，也可用 MARKER 进行估测，如 MARKER2000，5 微升的 MARKER 每个条带约 50ng。

连接反应：TAKARA 的连接酶上的说明写的过夜，而其对连接酶单位的定义为：在 20  $\mu\text{l}$  的连接反应体系中，6  $\mu\text{g}$  的  $\lambda$  DNA-Hind III 的分解物在  $16^{\circ}\text{C}$  下反应 30 分钟时，有 90% 以上的 DNA 片段被连接所需要的酶量定义为 1 个

活性单位 ( U )。而它的浓度为 350 U/μl ，所以完全够用。连接酶容易失活，注意低温操作，最好在冰上。时间 3 个小时足已。

## 6、转化

- 全量 ( 10 μl ) 加入至 100 μl JM109 感受态细胞中，冰中放置 30 分钟。
- 42°C 加热 45 秒钟后，再在冰中放置 1 分钟。
- 加入 890 μl AMP 阴性培养基，37°C 振荡培养 60 分钟。

取 100μl 铺板。也可离心后余 100μl

## 7、几个非常重要的问题

1 做转化的时候，进行酶连接反应时，注意保持低温状态，因为 LIGASE 酶很容易降解。为保险起见，一般连接 3 小时，16 度。

2 对含有 AMP-RESISTENCE 的质粒铺板时，注意加 AMP 时的温度，温度过高，会使克隆株无法筛选出来。我的方法是培养基高温消毒后放在烤箱里，烤箱一般温度为 55-60 度，然后做的时候拿出来，这样好掌握温度。铺板前后注意用吹风机吹干

### 3 对照的设置：

为验证双酶切是否成功，可做如下对照：

A 酶切反应时加各单酶分别切，两管，用同一种 BUFFER，跑胶，看单切的两管是否成线性。如两管均成线性可初步判断双酶切成功。

做转化时，也要进行对照。

### 设 4 个：

A. 即拿双酶切的质粒产物也进行连接反应，这个对照可进一步看双酶切是否成功，如果长出克隆，说明很有可能只进行了单酶切，如没长出克隆，则证明双酶切成功，当然要保证感受态，培养基，连接酶都'正常'的情况下。

B. 酶切过的未进行连接反应的双酶切产物，进行转化，这一步可以证明是否有残留的未被任何酶切的原始质粒

C. 设原始质粒为对照，意为检测整个操作过程中是否有误。

D. Amp 阴性板上用同一批感受态细胞铺板 20 ul 足够，检测感受态状况。

4. 所有的试剂切记低温保存，一步一个脚印，不要偷懒，图省事最后却更费事。注意设立对照。

经 PCR 鉴定，克隆 90%-100% 的阳性率，所以在后面的挑克隆中，我只挑选 4 个就足够了。然后双酶切鉴定，测序。

### 3.10. KpnI+BamHI

近来做构建，经常用 KpnI 和 BamHI 做双酶切，但这两个酶的酶切条件不同，KpnI 为 L Buffer 37°C，BamHI 为 K Buffer 30°C，但用双酶切发现效果也很好。反应体系如下：

质粒	10 ul
10x K buffer	5 ul
KpnI	1 ul
BamHI	1 ul ( 注意千万不可多加总酶量必须 < 4% )
加 ddH <sub>2</sub> O 至	50 ul

总体积改变加酶量按比例改变。已经用这个酶切体系构建了 8 个载体，一直很顺利。

### 3.11. XbaI+BamHI

XbaI 和 BamHI 不推荐进行双酶切 ( 提示 Seq 即顺序酶切的双酶切反应 )，但是如果分开做，不仅麻烦，还损失底物 DNA。

一般在同一个体系内进行只是加大反应体积，具体可以如下进行：

#### 先用 Buffer 盐浓度低的 XbaI 酶切：

底物 DNA                      1 ug

NEBuffer 2	2 ul
BSA	0.2 ul
ddH <sub>2</sub> O	至 19.5 ul
XbaI	0.5 ul

总体积 20 ul, 37°C 温育 1 h, 65°C 20 min 失活 XbaI。

#### 再用 Buffer 盐浓度高的 BamHI 酶切

上述 XbaI 酶切产物	20 ul
NEBuffer BamHI	5 ul
BSA	0.5 ul
ddH <sub>2</sub> O	24 ul
BamHI	0.5 ul

总体积 50 ul, 37°C 反应 1 h, 80°C 20 min 失活 XbaI。

### 3.12. 连接

1. 连接前先电泳确定待连接载体与片段的浓度。
2. 在离心管中加入如下成分：

10×连接 Buffer	1μl
待连接的样品（胶回收产物或 PCR 产物，载体：片段 mol 比=1：3-5）	
连接酶	0.5-1μl

---

 加水补足 10μl
3. 混匀样品并短暂离心使样品全部沉于管底。
4. 将离心管置于连接酶要求的温度孵育适当的时间（根据不同公司的酶的要求而定，一般为 22°C 1-3hr 或 16°C 连接过夜）。连接完的样品可直接用于转化，也可放 4°C 冰箱短期保存。

### 3.13. 酶切产物的乙醇沉淀方法

如果有必要的话：先用酚：氯仿（1：1 体积比）抽提一次，12000×g 离心 5min，吸取上层无色透明的液体，重复加酚氯仿抽提三次。否则按下面的步骤进行：

- 1、加入 1/10 体积 3 M 醋酸钠（pH5.2），混匀（在有大量盐的情况下，只需用冰冻无水乙醇在室温条件下放几分钟即可，节省人力成本。）；
- 2、加入 2 倍体积的冰无水乙醇，混匀；
- 3、-20°C，放置 15-30 min（如果提取的不是特别微量的样品，乙醇或异丙醇沉淀的时间最好不要太长，因为过长时间的沉淀会造成沉淀中的盐分升高，影响 PCR 和酶切）；  
无水乙醇沉淀需放置两小时以上，**异丙醇沉淀室温 10 min 以上即可**。-70°C 半小时够了。  
离心沉淀最起码要在 25 min 以上，一般 30-40 min。
- 75%乙醇漂洗损失很大，打散损失更大了，75%乙醇涮一下管子迅速吸干即可。
- 4、15000 r/min 离心 10 min，去上清（**去上清的时候要注意一点，有时会把 DNA 给倒出来**）；
- 5、加 70%乙醇清洗（为了洗涤干净，一般应洗**两次**），12000 r/min 离心 5 min，去上清，置室温晾干（至无乙醇味道），也可把 EP 管放到 37 度烘箱里晾干；
- 6、加 TE 或去离子水溶解（沉淀很难溶于水时，可以在 -20°C 冻融一次可以增加核酸的溶解）；  
如果酶切回收的线性 DNA 量比较少，建议加入适量的**肝素钠**或 Takara 的 DNAMate，有助于将所有的 DNA 沉淀出来。

我的经验：把酶切体系先加入等体积氯仿（一般 10 ul）抽提，然后离心去掉氯仿，取水层，加入 2 倍体积的冷乙醇，混匀，放入 -20°C 的冰箱进行醇沉，然后再离心（13000rpm，15min），小心吸掉乙醇，晾干，然后用水溶解就行了。需要注意的就是醇沉之后的离心，因为连接体系一般都是很小的 10-20 ul 左右，所以沉淀下来的

DNA 是肉眼根本看不到的，所以可以在离心的时候记住 EP 管放的方向，那样就能猜出沉淀在管的什么位置。吸乙醇的时候要小心避开，溶解的时候要在沉淀的位置多冲两遍。如果仔细的操作的话，回收效率不会低于 70%。完全可以满足实验需要。

应该是 2 倍体积的无水乙醇或 0.6 体积的异丙醇沉淀。在 pH 为 8 左右的溶液中，DNA 分子是带负电荷的，加一定浓度的 NaAc 或 NaCl，使 Na<sup>+</sup>中和 DNA 分子上的负电荷，减少 DNA 分子之间的同性电荷相斥力，易于互相聚合而形成 DNA 钠盐沉淀，当加入的盐溶液浓度太低时，只有部分 DNA 形成 DNA 钠盐而聚合，这样就造成 DNA 沉淀不完全，当加入的盐溶液浓度太高时，其效果也不好。在沉淀的 DNA 中，由于过多的盐杂质存在，影响 DNA 的酶切等反应，所以最后需要用 70% 的乙醇洗去多余的盐。**质粒抽提时，溶液 3 中含有大量的盐，所以不必另外加盐。**

因此我个人都是：基因组 DNA：2V 乙醇+0.1V 3 M NaAc,室温 10 min；

质粒（碱裂解法）：2V 乙醇/1V 异丙醇,室温 10min；

RNA：1V 异丙醇，室温 5 min（很多国外 RNA 相关实验的 Kit 专门说明了不要超过 5 有尽有 min，否则有可能影响后续实验）。

低温有助于低丰度/小片段沉淀，因此可以据具体情况-20℃ 沉淀，但沉淀的时间最好不要太长，事实上长时间不会对沉淀量有质的改变，因此结合保证质量和提高效率两大原则，不要选择长时间沉淀。加入醇后的放置，无论时间长短，或者常温低温，目的都只有一个：确保获得足够的核酸。核酸沉淀的速度，主要取决于核酸的浓度：浓度越高，沉淀速度越快；浓度越低，沉淀速度越慢。无论从操作方便程度，还是从核酸的质量考虑，室温片刻静置应该是首选；低温长时间的静置只当做没有办法的办法为好。当室温静置片刻后离心，看不见沉淀，大可以再移入-20℃ 处理的。

## 4. TA 克隆、亚克隆、克隆相关

### 4.1. 目的基因的亚克隆

所谓亚克隆就是对已经获得的目的 DNA 片段进行重新克隆，其目的在于对目的 DNA 进行进一步分析，或者进行重组改造等。亚克隆的基本过程包括：(1)目的 DNA 片段和载体的制备；(2)目的 DNA 片段和载体的连接；(3)连接产物的转化；(4)重组子筛选。

#### 一、试剂准备

1. LB 液体培养基。
2. 1.5%琼脂 LB 固体培养基。
3. IPTG、X-Gal。
4. 0.1 M MgCl<sub>2</sub>：121℃ 高压灭菌 20 min，0℃ 冰浴备用。
5. 0.1 M CaCl<sub>2</sub>（以 20%甘油水溶液配制）：121℃ 高压灭菌 20 min，0℃ 冰浴备用。
6. 限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶。

#### 二、目的 DNA 片段和载体的制备

选择适宜的限制性核酸内切酶，消化已知目的 DNA 和载体，获得线性 DNA，用于重组。根据目的 DNA 和载体的具体情况，选择一种或者两种适当的限制酶切割，分别产生对称性粘性末端（用一种限制性内切酶进行消化而产生带有互补突出端）、不对称粘性末端（用两种不同的限制性内切酶进行消化而产生带有非互补突出端）、平端。在亚克隆时，首选不对称相容末端连接，次选对称性粘性相容性末端连接，由于平末端连接效率较低，通常很少采用。但有时目的片段的末端与载体不匹配，一般先将不匹配末端补平，然后再以平末端连接。（实验操作同前述）

#### 三、利用 T4 DNA 连接酶进行目的 DNA 片段和载体的体外连接

##### （一）连接要求和结果

外源 DNA 片段末端性质	连接要求	连接结果
---------------	------	------

不对称粘性末端	两种限制酶消化后,需纯化载体以提高连接效率	载体与外源 DNA 连接处的限制酶切位点常可保留;非重组克隆的背景较低;外源 DNA 可以定向插入到载体中。
对称性粘性末端	线性载体 DNA 常需磷酸酶脱磷处理	载体与外源 DNA 连接处的限制酶切位点常可保留;重组质粒会带有外源 DNA 的串联拷贝;外源 DNA 会以两个方向插入到载体中。
平端	要求高浓度的 DNA 和连接酶	载体与外源 DNA 连接处的限制酶切位点消失;重组质粒会带有外源 DNA 的串联拷贝;非重组克隆的背景较高。

带有相同末端(平端或粘端)的外源 DNA 片段必须克隆到具有匹配末端的线性质粒载体中,但是在连接反应时,外源 DNA 和质粒都可能发生环化,也有可能形成串联寡聚物。因此,必须仔细调整连接反应中两个 DNA 的浓度,以便使“正确”连接产物的数量达到最佳水平,此外还常常使用碱性磷酸酶去除 5' 磷酸基团以抑制载体 DNA 的自身环化。利用 T4 DNA 连接酶进行目的 DNA 片段和载体的体外连接反应,也就是在双链 DNA 5' 磷酸和相邻的 3' 羟基之间形成新的共价键。如载体的两条链都带有 5' 磷酸(未脱磷),可形成 4 个新的磷酸二酯键;如载体 DNA 已脱磷,则只能形成 2 个新的磷酸二酯键,此时产生的重组 DNA 带有两个单链缺口,在导入感受态细胞后可被修复。

## (二) T4 DNA 连接酶对目的 DNA 片段和载体连接的一般方案

1. 连接反应一般在灭菌的 0.5 ml 离心管中进行。
2. 10 $\mu$ l 体积反应体系中:取载体 50-100 ng,加入一定比例的外源 DNA 分子(一般线性载体 DNA 分子与外源 DNA 分子摩尔数为 1:1-1:5),补足 ddH<sub>2</sub>O 至 8  $\mu$ l。
3. 轻轻混匀,稍加离心,56 $^{\circ}$ C 水浴 5min 后,迅速转入冰浴。
4. 加入含 ATP 的 10 $\times$ Buffer 1 $\mu$ l, T4 DNA 连接酶合适单位,用 ddH<sub>2</sub>O 补至 10 $\mu$ l,稍加离心,在适当温度(一般 14-16 $^{\circ}$ C 水浴)连接 8-14 h。

## 四、连接产物的转化

### 1. 感受态细胞的制备

- (1) 保存于 -70 $^{\circ}$ C 的 DH5 $\alpha$  (或其他菌种)用接种环划菌于 1.5% 琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 恒温倒置培养至单菌落出现(约 14-16 hr)。
  - (2) 挑取单菌落,接种于 2.0ml LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 恒温,250g 振荡培养过夜(约 12hr)。
  - (3) 取 0.5ml 过夜培养液,接种于 100ml LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 2-2.5hr,至 OD<sub>600</sub> 为 0.4-0.5 时,放置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱冷却 1-2 h。
- (注:以下操作均应在冰浴中进行。)
- (4) 将培养液分入两个 50ml 离心管中,4 $^{\circ}$ C 离心,4000g $\times$ 10min,弃去上清,用冰浴的 0.1M MgCl<sub>2</sub> 25ml 悬浮 30min。
  - (5) 4 $^{\circ}$ C 离心,4000g $\times$ 10min,弃去上清,加入冰浴的 0.1M CaCl<sub>2</sub>-甘油溶液 1ml 悬浮。
  - (6) 以 100 $\mu$ l/管分装入 1.5ml 离心管中,-70 $^{\circ}$ C 冻存备用。

注:此法制备感受态细胞,可使每微克超螺旋质粒 DNA 产生  $5 \times 10^6$ - $2 \times 10^7$  个菌落,这样的转化效率足以满足所有在质粒中进行的常规克隆的需要,制备的感受态细胞可贮存于 -70 $^{\circ}$ C,但保存时间过长会使转化效率在一定程度上受到影响,一般三个月以内转化效率无多大改变。

### 2. 连接产物的转化

- (1) 取 100 $\mu$ l 贮存于 -70 $^{\circ}$ C 钙化菌,冰浴化开;
- (2) 加入适量连接产物(一般不超过 10 $\mu$ l,轻轻混匀,冰浴 20min);
- (3) 于 42 $^{\circ}$ C 热休克 90s,迅速转移至冰浴中,继续冰浴 2-3min;
- (4) 加入 LB 液体培养基 200 $\mu$ l,于 37 $^{\circ}$ C 缓摇孵育 45min;
- (5) 将培养物适量涂于 1.5% 琼脂 LB 平板(根据质粒性质添加抗生素或/和 X-Gal/IPTG),待胶表面没有液体流动时,37 $^{\circ}$ C 温箱倒置培养 12-16hr。

## 五、重组子的筛选

根据载体的遗传特征筛选重组子,如 $\alpha$ -互补、抗生素基因等。现在使用的许多载体都带有一个大肠杆菌的 DNA 的短区段,其中有 $\beta$ -半乳糖苷酶基因(lacZ)的调控序列和前 146 个氨基酸的编码信息。在这个编码区中插入了一

个多克隆位点 (MCS)，它并不破坏读框，但可使少数几个氨基酸插入到 $\beta$ -半乳糖苷酶的氨基端而不影响功能，这种载体适用于可编码 $\beta$ -半乳糖苷酶 C 端部分序列的宿主细胞。因此，宿主和质粒编码的片段虽都没有酶活性，但它们同时存在时，可形成具有酶学活性的蛋白质。这样，lacZ 基因在缺少近操纵基因区段的宿主细胞与带有完整近操纵基因区段的质粒之间实现了互补，称为 $\alpha$ -互补。由 $\alpha$ -互补而产生的 LacZ<sup>+</sup>细菌在诱导剂 IPTG 的作用下，在生色底物 X-Gal 存在时产生蓝色菌落，因而易于识别。然而，当外源 DNA 插入到质粒的多克隆位点后，几乎不可避免地导致无 $\alpha$ -互补能力的氨基端片段，使得带有重组质粒的细菌形成白色菌落。这种重组子的筛选，又称为蓝白斑筛选。如用蓝白斑筛选则经连接产物转化的钙化菌平板 37°C 温箱倒置培养 12-16hr 后，有重组质粒的细菌形成白色菌落。

## 六、注意事项

1. 目的 DNA 片段制备、回收、纯化时，应避免外来 DNA 污染。
2. 不同厂家生产的 T4 DNA 连接酶反应条件稍有不同，但其产品说明书上均有最适反应条件，包括对不同末端性质 DNA 分子连接的 T4 DNA 连接酶的用量、作用温度、时间等。同时提供有连接酶缓冲液 (10 $\times$ 、5 $\times$ 、2 $\times$ )，其中多已含有要求浓度的 ATP，应避免高温放置和反复冻融使其分解。
2. 连接产物的转化：细菌细胞经特殊试剂处理后在适当的条件下具有接收外源 DNA 的能力，因此可将上述连接产物通过热刺激或电脉冲转化感受态细胞，当细菌大量增殖的同时，导入的重组 DNA 也得到增殖。
3. 制备感受态细胞所用离心管、培养瓶最好经酸碱处理或使用新的，15 lbf/in<sup>2</sup> 高压灭菌 20min。
5. 白色菌落中重组质粒内插入片段是否是目的片段需通过鉴定。

### 4.2. T4 DNA 连接酶 FAQ

**Q1: What are some potential problems with the ligation reaction using T4 DNA Ligase that can lead to transformation failure?**

A1: \* Ligation failed because there was no ATP or Mg<sup>2+</sup>. Use the supplied buffer or add ATP to a compatible buffer. The ATP in buffers older than one year may have degraded enough to cause problems. When supplementing with ATP, be sure to use ribo ATP as deoxyribo ATP will not work.

\* Ligation failed due to high salt or EDTA in the reaction. Clean up the DNA.

\* CIP, BAP or SAP not completely inactivated from dephosphorylation step. Follow the recommended procedure to remove the phosphatase.

\* Ligation produced only linear DNA because the DNA concentration was too high. Keep the total DNA concentration between 1-10  $\mu$ g/ml.

\* The ligated end was a single base overhang. Use up to 5  $\mu$ l concentrated ligase at 16°C overnight.

\* The insert and the plasmid do not have phosphates. Note: primers may not have phosphates leading to problems blunt end ligating into CIPed vectors. Order primers with phosphates or kinase the primers.

\* Too much ligation mixture was added to the cells. Add between 1-5  $\mu$ l to 50  $\mu$ l competent cells.

\* The insert was large and the conditions didn't allow circularization. Reduce the insert concentration and use concentrated ligase at 16°C overnight.

\* The ligase was inactive. Test on lambda HindIII or other convenient substrate.

\* The ligation mix contained PEG and was incubated overnight. Extended ligation with PEG causes a drop off in transformation efficiency. This could be due to the gradual production of large linear pieces of DNA that can inhibit transformation. The buffer for the Quick Ligation Kit (NEB# M2200) contains PEG.

\* The ligation mix was not purified prior to electroporation. The buffer must be removed or a spark will be generated by the salt. Dialyse the sample or use a spin column to purify. The PEG in the Quick Ligation Kit Buffer (NEB# M2200) prevents sparking but it also prevents electroporation. PEG must be removed using a spin column.

**Q2: What are some other problems that should be considered when trouble shooting a transformation problem?**

- A2: \* The cells are not viable. Run the controls listed below and obtain new cells if needed.
- \* The cells are not competent. Run the controls listed below and obtain new cells if needed.
  - \* The recombinant protein is not well tolerated by E. coli. Try making a fusion with maltose binding protein using the pMAL System (E8000S). Try another expression system that doesn't involve E. coli.
  - \* The ligated DNA included inverted and tandem repeats selected against by E. coli. Remove the repeat sequence if possible. Try another expression system that doesn't involve E. coli.
  - \* The insert DNA was taken from mammal or plant and contains methylated cytosine which is degraded by many E. coli strains. Use a strain deficient in mcrA, mcrBC and mrr.
  - \* Construct is too large (>10,000 bp) for transformation into chemically competent cells. Use electroporation.

**Q3: What problems can be encountered in the restriction digest that can cause ligation using T4 DNA Ligase or subsequent transformation to fail?**

- A3: \* The restriction enzyme did not cleave efficiently. If cleaving near the end of a PCR \* fragment leave at least 6 bases past the restriction site. Test the restriction enzyme on a control substrate.
- \* The restriction enzyme was not completely inactivated. Phenol/ETOH purify the DNA if the enzyme cannot be heat inactivated.
  - \* Star activity from the restriction digest cleaved the vector or insert. Check the DNA on a gel. If there is an extra band, reduce the amount of enzyme or time for the restriction digest.
  - \* The DNA or restriction enzyme contained exonuclease or phosphatase that damaged the ends. Phenol/ETOH purify the DNA. Check the enzyme QC data and notes. If the ligation QC is poor or the exonuclease level is high reduce the amount of enzyme or incubation time.
  - \* The PCR process is covered by patents owned by Roche Molecular Systems, Inc.

**Q4: What controls should be run to test the cells and DNA when using T4 DNA Ligase?**

- A4: Note: Use the same DNA concentration for each control, typically 0.1 -1.0 ng per transformation.
1. Transforming uncut vector in the competent cells checks cell viability and tests the antibiotic resistance of the plasmid. Plate on media and media plus antibiotic.
  2. Linearized vector tests for background due to uncleaved plasmid. Should be <1% of the value obtained in 1.
  3. Cut and religated plasmid tests ligase activity and DNA end integrity. Should be near the value obtained in 1.
  4. Cut, phosphatased, religated plasmid tests background due to incomplete phosphatase treatment. Should be <1% of the value obtained in 1.

**Q5: When should T4 DNA Ligase be the enzyme of choice?**

A5: T4 DNA Ligase should be used to ligate cohesive ends (10 minutes at room temperature) or blunt ends (2 hours at room temperature) or if the ligation is to be done overnight. T4 DNA Ligase should be used if heat inactivation is required. Concentrated T4 DNA Ligase is suggested for ligating single base overhangs or for large constructs which require longer incubation times to circularize, such as BAC (Bacterial Artificial Chromosome) construction.

**Q6: Can the T4 DNA Ligase be used with the Quick Ligase buffer?**

A6: Yes, concentrated T4 DNA Ligase can be substituted directly. When using regular T4DNA Ligase, increase the reaction time to 15 minutes from 5 minutes. Do not heat kill the reaction because heat treating the PEG in the Quick Ligase reaction buffer will inhibit transformation. Transformation efficiency will also decrease if the reaction time is extended.

**Q7: 使用 T4DNA 连接酶时，应该使用多少 DNA ?**

A7: The unit definition uses 0.12  $\mu\text{M}$  (300  $\mu\text{g/ml}$ ) lambda HindIII fragments. The high DNA concentration can be used for linker ligation. To promote circle formation, useful in transformation, a lower total DNA concentration should be used. The overall concentration of vector + insert should be between 1-10  $\mu\text{g/ml}$  for efficient ligation. Insert:vector molar ratios between 2 and 6 are optimal for single insertions. Ratios below 2:1 result in lower ligation efficiency. Ratios above 6:1 promote multiple inserts. If you are unsure of your DNA concentrations, perform multiple ligations with varying ratios.

**Q8: Can T4 DNA Ligase be used in other NEBuffers?**

A8: Ligation can also be performed in any of the four standard restriction endonuclease NEBuffers or in T4 Polynucleotide Kinase Buffer if they are supplemented with 1 mM ATP. Be sure to use riboATP as deoxyriboATP will not work. When using NEBuffer 3 high levels of salt in the DNA preparation may decrease ligation efficiency.

**Q9: T4DNA 连接酶可以热灭活吗 ?**

A9: 可以 ,60°C 20 min 即可。但是当反应缓冲液中含有 PEG 时(如 Quick Ligation Kit buffer (NEB# 2200) ), **千万不要热激活!** 否则会抑制转化!

**Q10: How do Weiss units ( 1 个 Weiss 单位是指在 37°C 下 20 分钟内催化 1 nmol  $^{32}\text{P}$  从焦磷酸根置换到 ( $\gamma,\beta\text{-}^{32}\text{P}$ )ATP 所需酶量,相当于 0.2 个用外切核酸酶耐受试验来定义的单位或 60 个黏端连接单位 ) convert into NEB cohesive end units?**

A10: One Cohesive End Ligation Unit equals 0.015 Weiss units. Equivalently, one Weiss unit equals 67 Cohesive End Ligation Units.

### 4.3. PCR 产物的克隆

PCR 产物克隆大致分为两类，即平头连接和粘头连接。

平头连接是将制备好的平头载体和补平或削平的 PCR 产物直接进行连接。载体可用 EcoRV 或 Sma I 切成平头；PCR 产物纯化后，可以在 22°C 用 DNA 聚合酶 I 作用 30 min ( 利用该酶所具有的 3'  $\rightarrow$  5' 外切酶活性和 5'  $\rightarrow$  3' 的聚合酶活性 )。如果要求不高，PCR 产物也可不加处理。如果使用 Stratagene 公司的 pfu DNA 聚合酶或 NEB 的 Vent DNA 聚合酶，这两种酶有 5'  $\rightarrow$  3' 校对能力，扩增出来的 PCR 产物已经是平头，可以不作平端处理。平端连接的一个显而易见的缺陷是连接效率低下，即使使用很高单位的连接酶，或在反应体系中加入 PEG 8000，也只能很有限地提高效率。

粘头连接也可以大致分为两类，一类粘头连接是用某种方法，在载体和 PCR 产物上产生生长的可互补的粘性末端。最普遍的方法是在引物的 5' 端加入一段某种限制酶的识别序列。如果两个引物选用不同的限制性内切酶识别序列，就可以做到定向连接。另一类利用部分 PCR 产物 3' 端带有一个凸出的 dAMP 的特性，构建 3' 端带有凸出的 dTMP 的载体。一般采用的方法是先把载体用某种限制性内切酶消化成平头，在 70°C 或 72°C 下在只加入一种 dNTP、即 dTTP 的反应体系中用 Taq DNA 聚合酶处理半小时 ( 也有人报道处理 1-2 h 能提高克隆效率，这样加 T 反应会更彻底 )。也可以用末端转移酶来完成加 T 反应。载体自连、PCR 产物串连可以忽略。如果使用 ddTTP，效果会更好。这种方法一般称为加 T/A 法克隆，比平头连接效率高 50 ~ 100 倍。

#### 一、PCR 产物的 TA 克隆

##### 1. TA 克隆构建原理

TA 克隆系统由 Invitrogen 公司 ( San Diego , CA ) 发展而来的商业性试剂盒 , 它用于 PCR 产物的克隆和测序。其原理是利用 Taq 酶能够在 PCR 产物的 3' 末端加上一个非模板依赖的 A , 而 T 载体是一种带有 3' T 突出端的载体 , 在连接酶作用下 , 可以快速地、一步到位地把 PCR 产物直接插入到质粒载体的多克隆位点 ( MCS ) 中。

## 2. 操作步骤

(1) 连接反应一般在灭菌的 0.5 ml 离心管中进行。

(2) 10 $\mu$ l 体积反应体系如下 :

①取 T 载体 1 $\mu$ l (50ng) , 加入等摩尔数 PCR 产物。

②加入含 ATP 的 10 $\times$ Buffer 1 $\mu$ l , T4 DNA 连接酶合适单位 , 用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 10 $\mu$ l 。

(3) 稍加离心 , 通常为 14-16 $^{\circ}$ C 水浴连接 8-14 h , 或 4 $^{\circ}$ C 过夜。

(4) 转染 , 蓝白斑筛选同前。

## 二、注意事项

1. 要获得目的基因的 TA 克隆 , PCR 产物的特异性要好。

2. PCR 产物在 TA 克隆前要通过纯化。

3. 在 PCR 产物回收、纯化过程中防止外来 DNA 污染。

### 4.4. 外源 DNA 和质粒载体的连接反应

外源 DNA 片段和线状质粒载体的连接 , 也就是在双链 DNA 5' 磷酸和相邻的 3' 羟基之间形成的新的共价链。如质粒载体的两条链都带 5' 磷酸 , 可生成 4 个新的磷酸二酯链。但如果质粒 DNA 已去磷酸化 , 则吸能形成 2 个新的磷酸二酯链。在这种情况下产生的两个杂交体分子带有 2 个单链切口 , 当杂本导入感受态细胞后可被修复。相邻的 5' 磷酸和 3' 羟基间磷酸二酯键的形成可在体外由两种不同的 DNA 连接酶催化 , 这两种酶就是大肠杆菌 DNA 连接酶和 T4 噬菌体 DNA 连接酶。实际上在有克隆用途中 , T4 噬菌体 DNA 连接酶都是首选的用酶。这是因为在下沉反应条件下 , 它就能有效地将平端 DNA 片段连接起来。

DNA 一端与另一端的连接可认为是双分子反应 , 在标准条件下 , 其反应速度完全由互相匹配的 DNA 末端的浓度决定。不论末端位于同一 DNA 分子 ( 分子内连接 ) 还是位于不同分子 ( 分子间连接 ) , 都是如此。先考虑一种简单的情况 , 即连接混合物中只含有一种 DNA , 也就是用可产生粘端的单个限制酶切割制备的磷酸化载体 DNA。在瓜作用的底物。如果反应中 DNA 浓度低 , 则配对的两个末端同一 DNA 分子的机会较大 ( 因为 DNA 分子的一个末端找到同一分子的另一末端的概率要高于找到不同 DNA 分子的末端的概率 )。这倦 , 在 DNA 浓度低时 , 质粒 DNA 重新环化将卓有成效。如果连接反应中 DNA 浓度有所增高 , 则在分子内连接反应发生以前 , 某一个 DNA 分子的末端碰到另一 DNA 分子末端的可能性也有所增大。因此在 DNA 浓度高时 , 连接反的初产物将是质粒二聚体和更大一些的寡聚体。Dugaiczky 等 (1975 ; 同时参见 Bethesda Res , Lab. 出版的 Focus 第 2 卷 , 第 2、3 期合刊) 从理论上探讨了 DNA 浓度对连接产物性质的影响。简而言之 , 环化的连接产物与多联体连接产物的比取决于两个参数 : j 和 i。j 是 DNA 分子的一个末端在同一分子的另一末端附近的有效浓度 , j 的数值是根据如下一种假设作出的 : 沉吟液中的 DNA 呈随机卷曲。这样 , j 与 DNA 分子的长度成反比 ( 因为 DNA 越长 , 某一给定分子的两末端的越不可能相互作用 ) , 因此 j 对给定长度的 DNA 分子来说是一个常数 , 与 DNA 深度无关。  $j = [3 / (3\pi l b_0)]^{3/2}$  其中 l 是 DNA 长度 , 以 cm 计 , b 是随机卷曲的 DNA 区段的长度。b 的值以缓冲液的离子强度为转移 , 而后者可影响 DNA 的刚度。

i 是溶液中所有互补末端的深度的测量值 , 对于具有自身互补粘端的双链 dna 而言 ,  $i = 2N_0 M \times 10^{-3}$  末端/ml 这里  $N_0$  是阿佛伽德罗常数 , M 是 DNA 的摩尔浓度 ( 单位 : mol/L )。理论上 , 当  $j = i$  时 , 给定 DNA 分子的一个末端与同一分子的另一末端 , 以及与不同分子的末端相接触的可能性相等。因而在这样的条件下 , 在反应的初始阶段中 , 环状分子与多联体分子的生成速率相等。而当  $j > i$  时 , 有利于重新环化 ; 当  $i > j$  , 则有利于产生多联体。图 1.9 显示了 DNA 区段的大小与连接反应混合物中 j:i 之比分别为 0.5、1、2 和 5 时所需 DNA 浓度之间关系 ( Dugaiczky 等 , 1985 )。现在考虑如下的连接反应混合物 : 其中除线状质粒之外 , 还含有带匹配末端的外源 DNA 片段。对于一个给定的连接混合物而言 , 产生单体环状重组基因组的效率不仅受反应中末端的绝对浓度影响 , 而且还受质粒和外源 DNA 末端的相对浓度的影响。当 i 是 j 的 2-3 倍 ( 即末端的绝对浓度足以满足分子间连接的要求 , 而又不致引起大量寡聚体分子的形成时 ) 外源 DNA 末端浓度的 2 倍时 , 有效重组体的产量可达到最大。这些条件下 , 连接反应

终产物的大约 40%都是由单体质粒与外源 DNA 所形成的嵌合体。当连接混合物中线质粒的量恒定 ( $j:i=3$ ) 而带匹配末端的外源 DNA 的量递增时, 这种嵌合体在连接反应之末的理论产量。

涉及带粘端的线状磷酸化质粒 DNA 的连接反应应包含:

1) 足量的载体 DNA, 以满足  $j:i>1$  和  $j:i<3$ 。对于一个质粒 pUC18 一般大小的质粒, 这意味着连接反应中应含有载体 DNA 为 20-60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2) 末端浓度等于或稍高于载体 DNA 的外源 DNA, 如外源 DNA 浓度比载体低得多, 在连接产物的数量会很低, 这样就很难别小部分带重组质粒的转化菌落。这种情况下, 可考虑采用一些步骤来减少带非重组质粒的背景菌落。如用磷酸酶处理线状质粒 DNA 或发迹克隆策略以便通过定向克隆的方法构建重组质粒。

## (二) 粘端连接

1) 用适当的限制酶消化质粒和外源 DNA。如有必要, 可用凝胶电泳分离片段并 (或) 用碱性磷酸酶处理质粒 DNA。通过酚: 氯仿抽提和乙沉淀来纯化 DNA, 然后用 TE(pH7.6)溶液使其浓度为 100/ml。

2) 按如下所述设立连接反应混合物:

a. 将 0.1 $\mu\text{l}$  载体 DNA 转移到无菌微量离心管中, 加等摩尔量的外源 DNA。

b. 加水至 7.5 $\mu\text{l}$ , 于 45 $^{\circ}\text{C}$  加温 5 分钟以使重新退火的粘端解链, 将混合物冷却到 0 $^{\circ}\text{C}$ 。

c. 加入: 10xT4 噬菌体 DNA 连接酶缓冲液 1 $\mu\text{l}$

T4 噬菌体 DNA 连接酶 0.1Weiss 单位

5 mmol/L ATP 1 $\mu\text{l}$

于 16 $^{\circ}\text{C}$  温育 1-4 小时

10xT4 噬菌体 DNA 连接酶缓冲液

200mmol/L 同 Tris.Cl(pH7.6)

50mmol/L MgCl<sub>2</sub>

50mmol/L 二硫苏糖醇

500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  牛血清白蛋白 (组分 V.Sigma 产品) (可用可不用)

该缓冲液应分装成小份, 贮存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。

另外, 再设立两个对照反应, 其中含有 (1) 只有质粒载体; (2) 只有外源 DNA 片段。如果外源 DNA 量不足, 每个连接反应可用 50-100ng 质粒 DNA, 并尽可能多加外源 DNA, 同时保持连接反应体积不超过 10 $\mu\text{l}$ 。可用至少 3 种不同方法来测定 T4 噬菌体 DNA 连接酶的活性。大多数制造厂商 (除 New England Biolabs 公司外) 现在都用 Weiss 等, (1968) 对该酶进行标化。1 个 Weiss 单位是指在 37 $^{\circ}\text{C}$  下 20 分钟内催化 1 mmol 32P 从焦磷酸根置换到  $[\gamma, \beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  所需酶时, 1 个 Weiss 单位相当于 0.2 个用外切核酸酶耐受试验来定义的单位 (Modrich 和 Lehman, 1970) 或者 60 个粘端单位 (如 New England Biolabs 公司所定义)。因此, 0.015 Weiss 单位的 T4 噬菌体 DNA 连接酶在 16 $^{\circ}\text{C}$  下 30 分钟内可使 50% 的  $\lambda$  噬菌体 HindIII 片段 (5 $\mu\text{g}$ ) 得以连接。在本书中, T4 噬菌体 DNA 连接酶一律用 Weiss 单位表示。目前提供的 T4 噬菌体 DNA 连接酶均为浓溶液 (1-5 单位/ $\mu\text{l}$ ), 可用 20mmol/L Tris.Cl(pH7.6)、60mmol/L KCl、5mmol/L 二硫苏糖醇、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  牛血清白蛋白、50% 甘稀释成 100 单位/ml 的浓度置存。处于这种浓度并在这种缓冲液中的 T4 噬菌体 DNA 连接酶于 -20 $^{\circ}\text{C}$  保存 3 个月可保持稳定。

3) 每个样品各取 1-2 $\mu\text{l}$  转化大肠杆菌感受态细胞。

## (三) 平端 DNA 连接

T4 噬菌体 DNA 连接酶不同于大肠杆菌 DNA 连接酶, 它可以催化平端 DNA 片段的连接 (Sgaramella 和 Khorana, 1972; Sgaramella 和 Ehrlich, 1978), 由于 DNA 很容易成为平端, 所以这是一个极为有用的酶学物性。有了这样的物性, 才能使任何 DNA 分子彼此相连。然而, 相对而言, 平端连接是低效反应, 它要求以下 4 个条件:

1) 低浓度 (0.5mmol/L) 的 ATP (Ferretti 和 Sgarnekka, 1981)。

2) 不存在亚精胺一类的多胺。

3) 极高浓度的连接酶 (50 Weiss 单位 . ml)。

4) 高浓度的平端。

1. 凝聚剂

在反应混合物中加入一些可促进大分子群聚作用并可导致 DNA 分子凝聚成集体的物质, 如聚乙二醇 (Pheiffer 和 Zimmerman, 1983; Zimmerman 和 Pheiffer, 1983; Zimmerman 和 Harrison, 1985) 或氯化六氨全高钷 (Rusche

和 Howard-Flanders, 1985), 可以使如何取得适当浓度的平端 DNA 的总是迎刃而解。在连接反应中, 这些物质具有两作用:

- 1) 它们可使平端 DNA 的连接速率加大 1-3 个数量级, 因此可使连接反应在酶 DNA 浓度不高的条件下进行。
- 2) 它们可以改变连接产物的分布, 分子内连接受到抑制, 所形成的连接产物一律是分子间连接的产物。这样, 即使在有利于自身环化 ( $j=i=10$ ) 的 DNA 浓度下, 所有的 DNA 产物也将是线状多聚体。在设立含凝聚剂的连接反应时, 下列资料可供参考。

#### (1) 聚乙二醇 (PEG8000)

1) 用去离子水配制的 PEG8000 贮存液 (40%) 分装成小份, 冰冻保存, 但加入连接反应混合物之前应将其融化并使其达到室温。在含 15% PEG 8000 的连接反应混合物中, 对连接反刺激效应最为显著。除 PEG 800 和 T4 噬菌体 DNA 连接酶以外, 其他所有连接混合物的组分应于 0°C 混合, 然后加适当体积的 PEG 8000 (处于室温), 混匀, 加酶后于 20°C 进行温育。

2) 连接混合物中含 0.5mmol/L ATP 和 5mmol/L MgCl<sub>2</sub> 时对连接反应的刺激效应最为显著, 甚至 ATP 浓度略有增加或 MgCl<sub>2</sub> 浓度略有降低, 都会严重降低刺激的强度 (Pheiffer 和 Zimmerman, 1983)。

3) 浓度为 15% 的 PEG 8000 可刺激带粘端的 DNA 分子的连接效率提高至原来的 10-100 倍, 反应的主产物是串联的多联体。

4) PEG 8000 可刺激短至 8 个核苷酸的合成寡聚物的平端连接, 在这一方面, 它与氯化六氨合高钴有所不同。

#### (2) 氯化六氨合高钴

1) 氯化六氨合高钴可用水配成 10mmol/L 贮存液贮存于 -20°C, 它对连接反应的刺激具有高度的浓度依赖性。当连接反应混合物中盐浓度为 1.0-1.5μmol/L 时, 其刺激作用最大。氯化六氨合高钴可使平端连接的效率大约提高到原来的 50% 部, 但只能使端连接的效率提高到原来的 5 倍 (Rusche 和 Howard-Flanders, 1985)。

2) 在单价阳离子 (30mmol/L KCl) 存在下, 它对平端连接仍有一定的刺激作用, 但此时连接产物的分布有所改变。连接产物不再是清一色的分子间连接产物, 相反, 环状 DNA 将点尽优势。

3) 与 PEG 8000 不同, 氯化六氨合高钴不能显著提高合成寡核苷酸的连接速率。

## 4.5. 克隆 PCR 产物 FAQ

### 1) 克隆 PCR 产物的最优条件是什么?

最佳插入片段: 载体比需实验确定。1:1 (插入片段: 载体) 常为最佳比, 摩尔数比 1:8 或 8:1 也行。应测定比值范围。连接用 5ul 2X 连接液, 50ng 质粒 DNA, 1 Weiss 单位的 T4 连接酶, 插入片段共 10ul。室温保温 1 小时, 或 4°C 过夜。在这 2 种温度下, 缺 T-凸出端的载体会自连, 产生蓝斑。室温保温 1 小时能满足大多数克隆要求, 为提高连接效率, 需 4°C 过夜。

### 2) PCR 产物是否需要用凝胶纯化?

如凝胶分析扩增产物只有一条带, 不需要用凝胶纯化。如可见其他杂带, 可能是积累了大量引物的二聚体。少量的引物二聚体的摩尔数也很高, 这会产生高比例的带有引物二聚体的克隆, 而非目的插入片段。为此需在克隆前做凝胶纯化。

### 3) 如果没有回收到目的片段, 还需要作什么对照实验?

A) 涂布未转化的感受态细胞。

如有菌落, 表明氨苄失效, 或污染上带有氨苄抗型的质粒, 或产生氨苄抗型的菌落。

B) 转化完整质粒, 计算菌落生长数, 测定转化效率。

例如, 将 1 ug/ul 质粒 1:100 稀释, 1ul 用于 100ul 感受态细胞转化。用 SOC 稀释到 1000 ul 后, 用 100 ul 铺板。培养过夜, 产生 1000 个菌落。转化率为: 产生菌落的总数/铺板 DNA 的总量。

铺板 DNA 的总量是转化反应所用的量除以稀释倍数。具体而言转化用 10ng DNA, 用 SOC 稀释到 1000u 后含 10 ng DNA, 用 1/10 铺板, 共用 1 ng DNA。转化率为:

1000 克隆 X10 (3 次方) ng /铺板 1 ng DNA ug=10 (6 次方) cfu/ ug

转化 pGEM-T 应用 10 (8 次方) cfu/ ug 感受态细胞

如没有菌落或少有菌落，感受态细胞的转化率太低。

C) 如用 pGEM-T 正对照，或 PCR 产物，产生 >20-40 蓝斑（用指定步骤 10（8 次方）cfu/ ug 感受态细胞），表明载体失去 T。可能是连接酶污染了核酸酶。T4 DNA 连接酶（M1801，M1804，M1794）质量标准好无核酸酶污染，不应用其它来源的 T4 DNA 连接酶替换。

D) 用 pGEM-T 或 pGEM-T Easy 载体，连接 pGEM-T 正对照，转化高频率感受态细胞（10（8 次方）cfu/ug），按照指定的实验步骤，可得 100 个菌落，其中 60% 应为白斑，如产生 >20-40 蓝斑，没有菌落或少有菌落，连接有问題。

#### 4) 对照实验结果好，却没有回收到的目的片段，实验出了什么问题？

A) 连接用室温保温 1 小时，能满足大多数克隆，为提高效率，需 4°C 过夜。

B) 插入片段带有污染，使 3'-T 缺失，或抑制连接，抑制转化。为此，将插入片段和 pGEM-T 正对照混合，再连接。如降低了对照的菌落数，插入片段需纯化，或重新制备。如产生大量的蓝斑，插入片段污染有核酸酶，使 pGEM-T 或 pGEM-T Easy 载体 3'-T 缺失。

C) 插入片段不适于连接。用凝胶纯化的插入片段，因受 UV 过度照射，时有发生。UV 过度照射会产生嘧啶二聚体，不利于连接，DNA 必需重新纯化。

D) 带有修复功能的耐热 DNA 聚合酶的扩增产物末端无 A，后者是 pGEM-T 或 pGEM-T Easy 载体克隆所需。加 Taq DNA 聚合酶和核苷酸可在末端加 A。详情查 pGEM-T pGEM-T Easy 载体技术资料（TM042）。

E) 高度重复序列可能会不稳定，在扩增中产生缺失和重排，如发现插入片段高频率地产生缺失和重排，需用重组缺陷大肠杆菌菌株，如 SURE 细胞。

### 4.6. 连接反应心得

最近我在进行转基因载体构建，其中关键步骤包括酶切、酶切片段回收、载体与外源基因 A 的连接、转化以及重组子的鉴定。我的工作首先是将基因 A（5 kb）连接到表达载体 B（22 kb），然后还要将标记基因（6-8 kb）连到带 A 的载体上，这其中包括粘末端连接、平端连接、同尾（相同粘性突出端）连接以及双酶切定向连接。但是我在进行 A 和 B 连接时废了 1 个多月，经高人指点后才连接成功，之后几步连接也相当顺利，经过无数次失败后终于成功，欣喜之余将一点实验心得写下来，供大家参考。

#### 1. 关于不同连接方式的效率：

根据载体自连的可能性大小，可以总结出不同连接方式的效率高低，**双酶切定向连接 > 粘末端连接 = 同尾连接 > 平端连接**。如果将载体双酶切后的非目的片段去除干净，定向连接将很难自连，而平端连接最容易造成载体自连。

#### 2. 关于载体和 Insert 的酶切处理：

这是连接反应中最关键的问题之一。我做的第一步连接失败的原因在于 insert（基因 A）的处理，基因 A 是从一个中间载体（两个 SalI 位点）用 SalI 酶切下来，之后用 Bio101（USA）的 GEL Extraction Kit（Glassmilk 回收）回收，然后与经 XhoI（与 SalI 同尾）酶切的载体连接，重复了十几次，一直很失败，后来才听人说 Glassmilk **回收较大片段时容易造成片段降解，同时有可能破坏粘末端，可能国内大部分胶回收 KIT 回收 2 kb 以上片段时，都会有这种情况。**

于是我采用此人建议在酶切中间载体时，除加 SalI 外，还选用中间载体上非目的片段中特有的酶（基因 A 中千万不能含此酶，选用该酶可以有效防止载体自连）进行酶切，酶切后不回收只是 65°C 保温 15 min 使内切酶变性即进行连接，结果从 22 个克隆中筛得 3 个重组子。尝到甜头后，我在后面的双酶切定向连接中也采用这种处理方法，即对载体进行双酶切时，选用非目的片段中特有的 1-2 个酶同时进行酶切，Insert 也是如此处理，基本上每次连接都取得了好的结果，这种酶切方法最适于双酶切定向连接。采用这种酶切方法，可以减少切胶回收。至于酶切后处理，我对照了 65°C 保温 15 min 直接连接与酚仿抽提后乙醇沉淀两种处理方法，效果无明显差异。而前者省时省力省钱，因此我倾向采用前者。

3. 关于载体和 Insert 的摩尔比：这是连接反应中另外一个关键问题。一般连接反应的载体和 insert 的摩尔比为 1：3-10，增加 Insert 的量主要是减少载体自连，从而提高载体和 insert 的连接效率。但是这个比例并非总是如此，关键看载体和 Insert 哪个更容易自连，如果载体和 Insert 都经上述酶切方法处理，1：1 连接即可；如果载体相对容易自连，则应增加 Insert 的量；相反，则应增加载体的量。

4. 关于连接条件：一般采用低温（12-22°C）连接，但是 4°C，8°C，室温或 37°C 连接也可，低温时连接时间要长（一般 8-16 h），高温则需时间较短（20 min-2 h）。我一般采用室温连接 1-2 h，对于载体构建中所需的重组子个数，这种连接方式足够了。

大片断回收还是推荐使用 QIAGEN 的 gel extraction kit 比较好。

并且，直接变性的方法并不见得适用于所有的酶，有些内切酶的 buffer 很特别，可能会干扰 ligation 的。

"大片断回收还是推荐使用 QIAGEN 的 gel extraction kit 比较好"我不赞成，相反，QIAGEN 的 gel extraction kit 容易将片段打断。

chge,你说的“直接变性的方法并不见得适用于所有的酶，有些内切酶的 buffer 很特别，可能会干扰 ligation 的”，我认为有这种可能，但应是极少数的酶会有这种情况，遇到这种情况还可以采用“酚仿抽提后乙醇沉淀”的处理方法，因此我认为并不是很有必要用 QIAGEN 的 gel extraction kit，而且从我们实验室使用情况来看，它会造成不同程度的降解。

我现在的试验中遇到的情况和 yoyo 的类似，但是我的是中间载体和目的 insert 大小很接近，所以，我一直采用酶切降解载体的方法去除载体，但是我都做 gel extraction，一点没有降解的迹象，从胶上根本看不出来，做连结降解的话不会连结转化的。

做双酶切比单酶切好多了，我现在是没有办法，载体上都只有一个单酶切位点可用，这已经是非常幸运了，不然只能找切两次的酶作部分酶切，更麻烦。单酶切只是需要最后酶切鉴定 insert 在 vector 上的方向，工作量多一些，其余没有什么。

2. 关于载体和 insert 的酶切处理中的对载体进行双酶切时，选用非目的片段中特有的 1-2 个酶同时进行酶切，insert 也是如此处理，基本上每次连接都取得了好的结果，这种酶切方法最适于双酶切定向连接。

我在做 1301 的 EcoRI 和 Hind3 酶切时，先选用他们中间的一个酶如我用 BamH1 切一下，然后用 Eco1 和 Hind3 同时进行双酶切，做载体自连的对比实验（即不加 insert，只加载体本身，及 ligase），先用 BamH1 切一下，然后用 Eco1 和 Hind3 同时进行双酶切的只长出 10 个，而直接用 Eco1 和 Hind3 同时进行双酶切的长出了 70 个之多，

我也不知道为什么它会长 70 多个，实验室有人说了双酶切定向 clone 不可能自连的，意思就是说

我的双酶切不完全。理论上的事我不想管，我只要给我转出我要的 clone，嘿嘿，

总之，yoyo 的方法在这点上真是太妙了，今天挑了 20 个白斑，明天提质粒，我想一定会有我要的东西的，回答 yanggerzi 的问题，可能太晚了

1. 非目的片段经过酶切处理后，不除去与 vector 的目的片段自连的概率也很小，所以不影响 insert 与 vector 连接效果

2. 我是直接将连接酶加入酶切液，连接酶缓冲液的量与平常连接相同

3. 我想你现在应该有进展了吧，或者已经做完；如果没有完成，可以说得更详细一点，让大家讨论一下。

#### **目的 DNA 与载体连接需要注意什么？为何连接不上？**

我在克隆一个新基因，PCR 产物很好，量大而纯。但酶切连接时却总连接不上，用 DH5a 也不行。不知是什么原因？请高人指点！

DH5a 的转化率应该不错，做过对照吗？确定是连接的原因？

是平端连接还是粘端连接？注意目的 DNA 与载体的比例、连接温度。

我的实验步骤大抵是这样的：

引物设计---PCR---PCR产物电泳鉴定和KIT分离纯化---纯化产物酶切过夜---电泳和KIT分离纯化---加入载体和连接酶过夜连接---DH5a转化涂板,但板上常常没有东西,或者只有一个点,又不是需要的东西//sigh

?你确定感受态没有问题么?对照是一定要做的,连接的对照,转化的对照...

SURE,我一般是先连T载体,再连其他的.这样你可以保证酶切位点的准确(因为有过引物不正确不动的情况).另外,感受态也是一个问题,最好做个对照.

年前比较急,我用的是-70度保存的感受态做的,虽然对照长的很好,但转化效率非常低.回来后我新做的感受态,用的同样的连接产物,涂了平板,不要长的太多噢.你还是要注意注意这个问题.

酶切后的产物回收后有没有看看量足不够,我觉得酶切后直接用乙醇沉淀就好了,小片段是沉不下来的,步骤越简单越好.

还是建议用T载体过渡一下吧,关于这个我被耽误了不少时间,还有胶纯化时候要用好的AGAROSE.我有两个多月都耽误在这上面了.还一直以为是自己或者课题设计有问题呢.

如果试验不出来的话,重复的时候一定要做连接对照和转化对照了,最好阴性和阳性的都做.

yog和chge说的对,一定要作对照!!!!!!

如果改用T载体连的话,用PROMEGA或TAKARA(大连宝生物)的,其他公司的最好别用.

我碰见的问题正好跟chge相反,用T载体(生工的)连不上,而用PCR产物酶切的却一下就连上了.

PCR产物酶切后怎样用乙醇沉淀的方法得到目的DNA呢?能否把步骤解释清楚一些?本人是新手,非常感谢!

SKYLARK的意思就是直接EtOH 2点5倍体积.如果片段小,在加些NaAc,-20度沉淀,离心,就OK,我们还是希望你用T载体先连,再酶切连到你需要的载体上,这样哪怕你连接一次不成功,有菌,你可以获得大量的目的片段啊,就容易一些.直接连不是不可以,但有时有些说不清楚的问题,会影响你的进度,其实酶切产物直接往载体连接可以不做回收,只要加热使酶失活就行了.如果非要回收,可以2V或者更大体积的无水乙醇就可以沉淀了,可以-20°C沉淀10-30min,也可以直接离心15,000rpm,5min.

#### 4.7. DNA重组实验

##### 实验目的

要获得表达的基因AKP,必须构建重组子.

我们通过以下的方法构建重组DNA,转入受体菌,就可以表达出目的基因.

之所以重组子要进入细胞,是因为大肠杆菌中有修饰的机制,可以在转入表达载体时不被降解,高效表达.

##### 实验原理及过程

###### 1. 双酶切(单位:uL)

管	核酸	Buffer	ddH <sub>2</sub> O	Hind III	BamH I
1	15(AKP)	2	0	2	1
2	10(质粒)	5	2	2	1

37°C酶解3小时.

在此体系中,我们用HindIII和BamHI这两种限制性内切酶来切目的基因,这样会产生两个不同的粘性末端,这时候如果插入目的基因,可以保证目标序列插入的方向并提高效率.

###### 2. 酶切产物的纯化和回收

2.1. 向酶切体系的管中加入60uL溶液A(6mol/L NaClO<sub>4</sub>, 0.03mol/L NaAc pH 5.2)和15uL溶液B(3mol/L NaAC, pH 5.2),充分混匀.

2.2. 高盐上样.

2.3. 将溶液置于离心柱中,静置5min.

- 2.4. 这是一个类似于吸附层析的过程。DNA 会特异的吸附于硅质的薄膜上，故可以起到分离的效果。高盐能促进吸附。
- 2.5. 8000 rpm，离心 30 s，弃液体。
- 2.6. 加入 500 uL 溶液 C(用时一定按照 1:2 的比例加入无水乙醇，混匀后使用)于离心柱中，8000 rpm，离心 30 s，弃液体。此步骤是洗涤。
- 2.7. 重复步骤 4。再次洗涤。
- 2.8. 12,000 rpm，再离心 60 s，去残余的乙醇。将剩余的乙醇尽量完全甩出去。
- 2.9. 超净台中凉干。挥发乙醇。
- 2.10. 加入 25uL 溶液 D(TE)，50°C 保温 5min。此步骤是解析。让 DNA 释放到溶液中，离心的方法可以将 DNA 纯化。低盐有利于解吸附。
- 2.11. 12000 rpm 离心 2 min，管底溶液即为所需的 DNA。
- 2.12. 1%琼脂糖，0.5 x TBE，5 uL 样品，80V 恒压电泳，检测 AKP 和载体的相对浓度。
- 2.13. 为了使质粒和目标基因浓度比例在 1:3 到 1:10 之间，所以先用电泳的方法预先了解一下样品的浓度，然后再连接。当质粒与目标基因比例合适时，可以由高的连接率，有效降低自连的发生。另外，酶的浓度过高还会有星号活力。

### 3. 连接 (单位: $\mu\text{L}$ )

AKP	质粒	Buffer	ddH <sub>2</sub> O	T4DNA 连接酶
15	2	2	0	1

14°C连接过夜，之后-20°C保存，用于转化受体细胞。

由电泳结果显示，我的质粒切得并不好，所以我用了本组另一名同学的质粒。他的质粒浓度高且纯净，所以用 2 $\mu\text{L}$  就足够。我总共用 20 $\mu\text{L}$  体系。

### 4. 目的基因转化及筛选

将连接好的质粒转入菌 NovaBlue 中 (两个阴性对照)，具体方法见试验一报告。

培养 NovaBlue 要用 1/1000 的 Tet。

在预制的 LB 琼脂平板上，加 40uL X-Gal (20mg/mL) 和 40uL IPTG (20mg/mL) 溶液，均匀涂布于琼脂平板表面。

将复苏后的菌液离心，抽出 0.8mL 上清，剩余的细胞和上清液混匀，取 100uL 细胞悬液涂布在上述含 Tet, Carb 抗生素的培养皿中，平板向上静置 30min，倒置培养过夜。

因为 NovaBlue 中含有 f' 质粒，它是抗 Tet 的，加入 1/1000 的 Tet 可以提供一个竞争压力，才能使这个质粒不丢失，这个菌株才能在有 Tet 的培养基中生长。

NovaBlue 编码 Tet 诱发的 promoter 的 RNA polymerase，培养基中有 Tet，而 petBlue 中的 Tet 诱发的 promoter 可以按其启动方向转录出 lacZ $\alpha$ 肽，NovaBlue 中又含有 lac $\omega$ 肽。这样就可以用互补 $\alpha$ 筛选出重组菌。

X-Gal 和 IPTG 较贵，只涂在培养基的表面，可以节省成本。

之所以将复苏后的菌液离心，抽出 0.8mL 上清，剩余的细胞和上清液混匀，取 100 uL 细胞悬液涂布，是因为 **重组成功的菌数量是很少的**，这样可以增加平板上的菌的数量，有利于筛选出我们要的重组子。

### 5. 重组子的筛选

#### 挑取重组子

挑取重组子是要挑取蓝斑周围的白斑。很多白斑的产生都是因为 Xgal 或 IPTG 之一没有涂均匀，而蓝斑周围的白斑很可能是因为重组子造成的，这样是假阳性的几率会比较小。酶切 (37°C, 1h)

重组质粒	buffer	ddH <sub>2</sub> O	BamHI	HandIII
4 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$

酶切结果可以分析是否是真阳性。具体分析见电泳结果分析。

#### 电泳分析重组质粒

1%琼脂糖，0.5xTBE，80V 恒压电泳

未酶切质粒 (用未重组的质粒作为 Marker)

3uL 质粒 + 0.5 uL 10 x loading + 0.5 uL SYBR

酶切质粒 (用标准 DNA 分子作为 Marker)

8 uL 质粒 + 1 uL 10 x loading + 1 uL SYBR

电泳跑两排,前面的跑切过的质粒,后面的跑没切过的质粒。因为没有被切过质粒分子量大,跑得慢,所以这样就不会追上前面的,这样可以电泳更长的时间,增大分辨率。

### 重组子转化表达菌株

取电泳检验过得真阳性菌提出的质粒做感受态(菌用 DE3placI),复苏后涂平板,平板上要加葡萄糖和 Cam, Carb。过夜。

葡萄糖可以抑制 lacI 本底表达。

DE3placI 是含有 T7RNA polymerase,而 petBlue 含有 T7promoter,这个方向的转录可以才可以按正确的顺序表达目的蛋白。

DE3placI 有 Cam 的抗性基因。Cam 既可以稳定 petBlue 的 f1 区,也可以竞争抑制杂菌。

### 4.8. pfu 的 PCR 产物加 A 尾巴以便于 T 载体连接及 pMD-18T 连接体系

PCR 产物回收,在 10 体系中配置如下:

PCR 产物: 8  $\mu$ l;

10mM dATP: 1  $\mu$ l;

普通 Taq 酶: 1  $\mu$ l。

37°C 反应 15 min 就能加上 A 之后,电泳回收或酚仿抽提乙醇沉淀后,取适量用于 T 载体连接。

PCR 产物 1-7  $\mu$ l

Taq DNA 聚合酶反应缓冲液 1  $\mu$ l

Taq DNA 聚合酶 5 U

dATP 终浓度为 0.2 mM

加水补足体积为 10  $\mu$ l,

70°C 30 min,然后与 T 载体连,效果还可以。

#### pfu 产物加 A 方案:

pfu 扩增回收产物 5 ul

Taq Buffer 1 ul

dATP(2mM) 1 ul

Taq (5 u/ul) 1 ul

H<sub>2</sub>O 2 ul

70°C, 30 min

#### T 载体连接方案:

上面的反应液 4.5ul

solution I 5 ul

T-Vector 0.5 ul

16°C, 2 h

这两周做了 4 个克隆,测序都是对的。

我一般按照下面的程序进行:

1、胶回收高保真酶的 PCR 片段,在回收的最后一步不用试剂盒提供的 TE buffer,而用 20ul 左右带 Mg<sup>2+</sup> 的预热的 1xTaq buffer 回收;

2、用 13.7 ul 的回收 DNA,加 1.2 ul dNTP 和 0.1 ul Taq 酶,72°C,水浴 6 min,即加 A;

3、加 A 后的产物直接用来 TA 载体连接;

- 0.5 ul 的 pMD-18T ;
  - 2.5 ul PCR 产物 ;
  - 2.5 ul 的 Solution I。
- 效果就很好。

我用 pfu 克隆了 5 个片段，将我的经验献上：

1. PCR 产物是应该切胶回收的；
2. dATP 的浓度为 **2.5 um/ml**；
3. 我一般是将回收产物取 10ul 加 A 总体积加到 15 ul；
4. 后面的克隆和 TA 克隆是一样的了；

## 5. 感受态细胞的制备、转化及转化子的筛选与鉴定

### 5.1. 大肠杆菌化学法感受态细胞的制备及转化

#### 感受态制备：

1. 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 菌种于 37 °C，250 r/min 振荡培养过夜；
2. 1%接种于 50 mL LB，37°C振荡培养 2-4 h，待细菌达到对数生长期（OD<sub>600</sub> 为 0.5-0.6）(**云雾状**)；
3. 将菌液在冰上预冷 5 min，倒入 50 mL 离心管中，置冰上 10 min，使菌液冷却；
4. 倒入 50 mL 离心管中，4 °C 5000 r/min 离心 3 min，弃上清；
5. 用 1.5 mL 预冷的 CaCl<sub>2</sub> (0.1 mol/L) 重悬沉淀，并于 4 °C 保存 12-24 h 内可用于转化；
6. 也可以将制备好的感受态细胞以每管 170  $\mu$ L 分装于 1.5 mL 无菌离心管中，再加入 30  $\mu$ L 无菌甘油混匀后，置于 -70°C 保存备用。
7. **仪器和药品：37°C 摇床，离心机，灭菌的 50 mL 离心管，碎冰，0.1 mol/L 1.5 mL 预冷的 CaCl<sub>2</sub>，冰箱，无菌离心管，无菌甘油**

#### 转化：

8. 取 100-200  $\mu$ L 感受态细胞与质粒或连接产物混合，冰上吸附 15 min；
9. 将离心管放到 42 °C 循环水浴中热激 90 sec；
10. **快速**将离心管转移到冰浴中，使细胞冷却 5min；
11. 每管加 800  $\mu$  LB 液体培养基，37°C 培养 45 min；
12. 取 200  $\mu$ L 涂平板，上述培养物分别转移到含相应抗生素的 LB 固体培养基上（如要检测  $\alpha$ -互补，可在菌液中加入适量的 X-Gal 和 IPTG），用一无菌的涂布器将菌液均匀涂满整个平板表面；
13. 平板 37°C 培养，正置 30 min 后倒置培养 12-16 h，可出现菌落。
14. **仪器和药品：碎冰，42 °C 循环水浴，无菌 1.5 mL 离心管，LB 液体培养基，LB 抗性平板，涂布器**  
(萨姆布鲁克和拉塞尔，2002，略作修改)

#### 注意事项：

洁净是最重要的。无菌都无所谓，在操作台上可正常操作。离心力要注意不要超过 2500g，建议 1500-2000g 5min。涂板要注意，不要觉得不匀而多次反复，轻轻在平板上带一下感觉板上大部分地方走过即可，特别在冰箱中保存过或在温箱中温浴 2 小时以上的板。涂完后建议空气晾干（20-30 分钟）这样会减少卫星菌落出现。

**操作应在超净工作台完成。每批感受态应检测其转化效率。**

**预冷是必要的。整个过程的低温也并非特别重要**，只要注意就行了，我在去残液时经常在室温倒置 1min，对感受态效率提高有帮助，第一次多加一点缓冲液，我经常加至 20 ml，效果不错。

关于大肠杆菌的感受态制备及转化的方法很多，最复杂的莫过于电转化，而最简单的则是将 LB 平板上的菌落直接挑入装有缓冲液的 EP 管冰箱即开始转化。对于做克隆工作的人而言，高而稳定的感受态可减轻不少麻烦。现在大肠杆菌转化效率最高的要数电转化，可达到 10<sup>10</sup>，但是操作起来比较麻烦。要想又简单，又能有较高的转化效率，最好的莫过于 1990 年《Gene》上刊登的由 Inoue H. 等提出的高效感受态的制备与转化方法。

根据实验室的实际情况，我们将其稍作修改，做成了 GLP 文件，但其中仍有许多可改进或需要注意的地方，其中有一些对普通感受态效率的提高也有一定的帮助。

- 1、所用器具的洁净程度。这一点非常重要，是所有与感受态有关的方法与文章上必讲的，毋庸置疑。
- 2、培养基的装量：培养基的装量是很重要的，这关系到菌体生长过程中的能量代谢问题，是有氧还是无氧生长。厌氧生长出来的菌体是做不出效率高的感受态的。建议装量不要高于此值为： $\text{培养基体积}/\text{三角瓶容量} = 100\text{ml}/500\text{ml}$ ， $50\text{ml}/250\text{ml}$ 。
- 3、培养基的 pH 值。这是讲的 pH 值并非单指配置或灭菌后的 pH 值，而且还包括整个摇瓶结束后的 pH 值。一般来说，接种前的 pH 值在 6.8-7.2，等菌摇好后，可以测一下 pH 值，不要低于 6.0，最好在 6.5 以上。这表示菌体的代谢为有氧代谢，生长状态良好，按要求做，肯定效率不低。
- 4、培养后的 OD 值。其实这并非一个非常重要的参数，只是当 OD 值大到一定的程度后，菌体要保持对数生长已经不太可能，因此很多指导方法上强调 OD 不得大于 0.6，0.8 等等。同时，OD 值大时菌体总量大，因而感受态绝对数量要大一点，因而需要在 OD 值的两方面影响中找一个平衡点。
- 5、培养基中的各种离子。经验证明，当培养基中存在一定量的  $\text{Mg}^{2+}$  离子时，该方法制得的感受态要相对较高。在制备普通感受态时，使用 20mM  $\text{MgCl}_2$  做为培养基的添加物，在感受态收获之前 20-30 分钟加入，会收到很好的效果。
- 6、培养温度。文献及经验告诉我们，较低的温度培养有利于感受态的形成，这样可以获得较高的感受态，但太低又不实用，因而产生了 Inoue 的高效感受态制备方法，它实际是利用了所有有利于感受态的文献而得出的一个非常理想方法。
- 7、此外文献报道，在保存感受态时，DMSO 要比甘油的效果要好，它会使感受态的效率增加。
- 8、液氮速冻也会使感受态的效率提高，因此推荐用液氮速冻感受态，然后保存于超低温冰箱内。至于在液氮中保存 12 小时以后再转入超低温冰箱，这点未做实验，只是一种感觉，第一次这样做了，没问题，以后就照此办理而已。

## 5.2. 大肠杆菌**化学法高效率**感受态细胞的制备（详细的）

1. 挑取适当菌株的 *E.coli* 单菌落接种于 2 ml SOB 培养液中， $37^\circ\text{C}$  摇床过夜。
2. 取 0.5-1ml 过夜培养的菌液转种到 100 ml SOB 中， $18^\circ\text{C}$  (最高  $24^\circ\text{C}$ ) 剧烈震荡，直到  $\text{OD}_{600} = 0.3-0.5$ （绝对不能  $> 0.6!$ ）（ $24^\circ\text{C} \times 200 \text{ rpm}$  约 24 h， $24^\circ\text{C} \times 300 \text{ rpm}$  约 12 h，由于摇床转速及控温存在差异，此处仅供参考！）。
3. 将培养物转移到 100 ml 离心管中， $4^\circ\text{C}$  2,500rpm/min 离心 10 min。同时在冰浴上配置 TB 溶液。
4. 弃上清，将离心管倒置于滤纸上，使培养液被吸干。
5. 各取 1 ml 刚配的 TB 溶液打散菌体沉淀并转移至一 50 ml 离心管中，再加入 30 ml TB（ $1/3$  体积的起始培养液），冰浴 10-15 min， $4^\circ\text{C}$  4,000rpm/min 离心 10min。
6. 弃上清，沉淀重悬于 8 ml TB（ $1/12.5$  体积的起始培养液），冰浴 10 min。
7. 加入 560  $\mu\text{l}$  DMSO (至终浓度 7%)，**缓缓滴入并轻轻摇晃**，使其充分混合均匀，冰浴 10min。
8. 将 200 $\mu\text{l}$  菌液分装于 EP 管中， $-80^\circ\text{C}$  或液氮冻存。
9. 取两管感受态细胞分别加入 1  $\mu\text{l}$  无菌 ddH<sub>2</sub>O（阴性对照）和 1 $\mu\text{l}$  纯质粒（阳性对照）进行转化（见后），以检测感受态的质量。阴性对照平板上应该无菌落生长，阳性对照平板上菌落数目的多少显示感受态效率的高低。

### SOB 的配制：

蛋白胨	20g
酵母提取物	5g
NaCl	0.58g
KCl	0.186g
100 $\times$ Mg <sup>++</sup> 溶液	10ml

溶解并加水定容至 1 L， $121^\circ\text{C} \times 20 \text{ min}$  高压蒸汽灭菌

### 100 $\times$ Mg<sup>++</sup>溶液：

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

溶解并加水定容至 100 ml, 121°C×20 min 高压蒸汽灭菌

**TB 溶液的配制：**

1M	KCl	5ml
0.55M	MnCl <sub>2</sub>	2ml
0.5M	CaCl <sub>2</sub>	0.6ml
0.1M	K-PIPES (pH 6.7)	2ml
ddH <sub>2</sub> O		10.4ml
Total		20ml

注：上述溶液均需高压蒸汽灭菌处理

**0.1M K-Pipes(pH=6.7)的配制：**

称取 3.02 g Pipes 粉末溶于 80 ml dd H<sub>2</sub>O 中，此时粉末不能完全溶解，用 10 N KOH 或 KOH 固体调节 PH 值，只有当 pH 接近 6.7 时粉末才能完全溶解，此时当小心少量地加入 KOH 直至达到所需 pH 值。

**试剂：**

Transformation Buffer ( TB ):

PIPES	0.75 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.55 g
KCl	4.65 g

加 225 ml dH<sub>2</sub>O 调 pH 至 6.7 ( 2 N KOH ) .

加 2.75 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 溶解。

用 dH<sub>2</sub>O 定容至 250 ml。

0.22 um 滤膜过滤除菌。

4°C 保存。

**材料 ( 均需预冷 ):**

50 ml 离心管 6 支 ( 灭菌 )。

1 ml 枪头。

200 ul 枪头。

关键是感受态细胞要做的好，用**超纯水 ( milliQ 级，电阻 13 兆欧以上 )**，所有器皿仔细冲洗，**一定要保证洁净**，因为一点点有机残留会大大降低感受态效率。另外电转时的低温也很重要，这些注意到了，可提高转化效率几个数量级。

非常需要注意的三点：

- 1. 枪头要预冷 ( 可以吸一下冰冷的无菌水快速冷却，冷却枪头容易有冷凝水，易导致染菌 )，最好是剪过的粗孔枪头。**
- 2. 感受态细胞的浓度不要太大。**
- 3. 感受态细胞最好是新鲜制备，这样会保证转化率。**

**5.3. 大肠杆菌电转化感受态细胞的制备及转化**

**电转化感受态细胞制备：**

1. 单菌落 ( 如 XL1-Blue , DH5α , JM109 ) 挑至装有 20 ml LB 培养基的 250 ml 三角瓶中， 37°C , 200 rpm 摇培过夜培养 ( 约 12 h ) ， 至饱和；
2. 1%接种至三角瓶 LB ( 100 ml ) ， 37°C ， 摇培 3-4 h ， 至 OD<sub>600</sub>=0.5 ~ 0.6 ( 培养 1 h 后每 30 min 测定一次 ) ；
3. 当 OD<sub>600</sub> 值达到 0.5-1.0 时，从摇床中取出摇瓶，置于冰上冷却至少 15 min ( 需要的话这种方式可以存放培养液数小时 ) ；

4. 收集菌体，3000 rpm 离心 10 min，4°C，去上清（如需要，沉淀可在 4°C 的 10%甘油中保存一两天）；
5. 加 1/2 体积灭菌的双蒸水（**预冷至 4°C**），悬浮沉淀，洗涤菌体后，3000 转离心 10min，4°C，去上清；再重复一次；
6. 加 1/2 体积灭菌的 **10%甘油**（**预冷至 4°C**），悬浮沉淀，洗涤菌体后，3000 转离心 10min，4°C，去上清；再重复一次；
7. 用 **10%甘油**（**预冷至 4°C**）重悬浮细胞至最终体积为 2-3 mL；
8. 将细胞按 80 μL 等份装入微量离心管，直接用于电转化；
9. 如果需要，在冰浴下分装 80μl /管，于-80°C 保存；

#### 电转化：

10. 在冰上解冻电感受态细胞添加 1-10 μL DNA，冰上培育约 5 min；
11. 电击杯预冷至 4°C，置于冰浴中；转移 DNA/细胞混合物至冷却后的 2 mm 电穿孔容器（**不要产生气泡**）中；
12. 将受体菌转移至电击杯中，**冰浴 10min**；
13. 电击条件：电压 2.5 kV，电阻 200 Ω，脉冲 3 s 以上；
14. 用吸管快速将受体菌转移至 900 μl LB 的 EP 管中（**电转完成后加入无抗性培养基的速度也较重要，一般不能超过一分钟，否则效率大大降低。**），用 Parafilm 膜封好，37°C，200 转，培养 45~60 min 复原；
15. 取 100 μl 菌液铺相应平板检测。

#### 感受态制备有几个关键点：

1. 甘油的质量
2. 水的质量，最好是 miniQ 的，如果要求完美，洗瓶不要有洗涤剂残留，先将瓶装满 miniQ 水高压灭菌，再弃去，再配置 10%甘油。
3. 收菌以半对数期合适，一般 OD600=0.5 收菌，过则不佳，直接取-80 度菌种摇，次日转种，从盘上菌落摇的要差，33-34 度摇菌结果更理想。
4. 在以冰冷 10%甘油等量，半量，1/4 量洗涤时**一定低温**，重悬时应轻震荡，弃洗涤液应倒干净，那怕损掉部分细菌。最后大概 500ml 能做 3-4ml 感受态，液氮中冻 10 min 转-80 度冰箱，快一点，免的 EP 管爆了，也可不冷冻，直接用来转化。
5. 感受态应以标准浓度质粒电转记算效率，一般大于 10<sup>9</sup>/mg，操做以 1ng/ul 质粒 1ul 加 40ul 感受态置 0.1 杯，电转后以最快的速度加入 1 ml SOC 复活，100-150 转摇 1 h，取 1/1000 铺盘应大于 1000 个菌生长。这样用于**建库**工作才行。
6. 电转时质粒或连接物尽可能少，以减少离子，实际上离子高，电流直接通过，没有场强，质粒是进不去的。

#### 总结：

- 1.任和有关东西都要干净，保证没有离子；
- 2.**从接触甘油开始就保持恒 0 度；**
- 3.电击后复活要快。

不过上面的确麻烦，理解加手熟就能达到，最后效率和菌种有关，一般能达到 10<sup>9</sup>，有的能达到 10<sup>10</sup>。不过现在我做普通转化就不麻烦，过夜菌彻底用 EP 管小离心，常温 10%甘油洗干净，重悬后做电转，用 LB 或 SOC 复活立刻铺盘，只要洗的干净，还没有克隆转不出来的，30 min 就搞定了，只是每次都要鉴定，因为电转杯是反复用，怕别的残留污染。

#### 5.4. 重组子的筛选和鉴定

重组子可通过酶切进行鉴定，也可以利用扩增引物通过 PCR 进行鉴定，阳性重组子能切出所需要的片段或得到相应片段的 PCR 产物。

1. 用牙签挑取平板上的菌落接种于 2ml 含适当抗生素的 LB 培养基中，37°C 摇床培养过夜。
2. 次日取菌液 0.2-0.5ml，13,000rpm×3min 离心，弃上清，加入 20μl ddH<sub>2</sub>O 和 20μl 酚/氯仿，震荡混匀，13,000rpm×5min 离心。

3. 取上清进行琼脂糖电泳，加入载体质粒 DNA 作为阴性对照，根据质粒大小初步筛选重组子，重组子的泳动速度应该慢于载体质粒。
4. 用碱法小量制备可能是重组子的质粒 DNA。
5. 选取适当的酶，对重组子进行酶切分析，酶切体积均为 10 $\mu$ l 体系。酶切样品进行琼脂糖电泳鉴定是否有所需片段。
6. 酶切分析正确的重组子分成两份，一份进行测序反应，另外一份保种。
7. 若用 PCR 法鉴定，则在第 2 步时每个样本取 0.5-1.0 $\mu$ l 菌液为模板进行 PCR 反应，每管反应体系最低可少至 10 $\mu$ l，PCR 产物电泳，能得到所需条带的样本进一步提取质粒酶切鉴定或送样品测序。

### 注意事项

1. 用于连接的 PCR 产物的**浓度不能太低**，最好连接前跑胶看看。
2. 生工的 T 载体的确是不太好，我也换成了 Takara 的 **pMD18-T**。16 度连接过夜（大概 9~12 h），保证了连接效率。
3. X-gal 板子是**现涂现用的**，就是转化之前把 X-gal 和 20%IPTG 涂好，封起来正向放在超净台里等它吸收就可以了。
4. 转化的时候，热激的温度和时间一定是很准的，我用的是 42 $^{\circ}$ C 和 90 s。
5. 热激之后用 LB 摇菌的时间**可以适当延长**，我都是摇 **2 h**。
6. 涂板的时候是等铺菌器**确实凉了**以后再涂的。
7. **培养箱的温度可能容易被忽略**，因为我们的培养箱外面有数字显示的温度，我开始一看 37 度，就没有怀疑的把板子放进去了。后来才发现培养箱坏了，里面的实际温度比外面的显示温度要低 4-5 $^{\circ}$ C。所以我觉得培养箱里应该始终放着 2 根温度计，不要轻易相信显示的温度。

## 5.5. 酵母电转化感受态细胞制备及转化

### 感受态制备：

1. 挑单菌落接种于 5 mL YPD 中，30 $^{\circ}$ C 过夜培养至饱和（24 h）。
2. 0.1%接种至 100 mL YPD 中，30 $^{\circ}$ C 培养约 10 h，细胞密度为 1 $\times 10^8$  细胞/ml（OD600=1.3-1.5 左右）。
3. 培养物分装至两个 50 mL 预冷的无菌离心管中，5000 rpm 5 min 离心去上清，每管加入 8 mL 无菌水重悬，合并成一管。
4. 加入 2 mL 10 $\times$ TE 缓冲液，pH 7.5，摇动混匀，加入 2 mL 18 $\times$ 醋酸锂和 0.5 mL 1 mol/L DTT，旋转混匀，30 $^{\circ}$ C，50 rpm，摇 45 min。
5. 菌悬液稀释至 50 mL 水中，5000 rpm 5 min 沉淀细胞，去上清。
6. 细胞沉淀洗涤两次，5000 rpm 5 min 所用溶液：  
第一次：50 mL 冰冷无菌水；  
第二次：10 mL 冰冷的 1 mol/L 山梨醇；  
每次重悬应剧烈吹打，使细胞分散。
7. 用适量预冷的 1 mol/L 山梨醇重悬，使最终菌悬液 OD=200。
8. 按每份 80  $\mu$ l 分装于 1.5 mL EP 管中，直接转化或保存于 -80 $^{\circ}$ C。

### 电转化：

8. 将 5~20  $\mu$ g 的线性化 DNA 溶解在 5~20  $\mu$ l **双蒸水**中或者 20  $\mu$ l 的 PCR 片段/质粒，与 80  $\mu$ l 的上述步骤 6 所得的菌体混匀，转至 0.2 cm 冰预冷的电转化杯中；

**线性化的质粒纯化后最好用双蒸水溶解。**

9. 将电转化杯冰浴 5 min；

**如有可能，将电击仪器置于冷柜中，整个操作在低温，4 度进行。注意电击杯外面不能带水。**

10. 根据电转化仪提供的资料，参考其他文献及多次摸索，确定合适的电压、电流、电容等参数，按优化的参数，进行电击；

**推荐：电压 1.5kV；电容 25 $\mu$ F；电阻 200 $\Omega$ 。电击时间为 4~10 ms，200 欧姆时大于 4 ms，400 欧姆时应**

大于 8 ms。

11. 电击完毕后，加入 1ml 冰预冷的山梨醇溶液将菌体混匀，转至 1.5ml 的 EP 管中；

**加入质粒后要冰浴，一般是 5min。电击后应该立即加入冰山梨醇并稍微吹匀，最好不要吹出气泡。加山梨醇后温育时间可适当延长 1-2 小时，也可再取出部分加 YPD 温育 1-2 小时。**

12. 将菌体悬液涂布于 YPD-G418 或 MM 平板（根据相应的筛子），每 200~600  $\mu\text{l}$  涂布一块平板；

**涂板剩下的电转化液不要扔掉，放在 4 度冰箱里至少一周没问题。我有一次转化后，放了 1 h 就涂板，涂 100 和 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Zeocin 的板，结果 2000 的没长，我又把放在冰箱中的转化液拿出来，加了点儿 YPD，摇了几个小时，涂 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Zeocin 板，结果长了上百个 Clone。随便挑了 5 个，表达量都要比 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Zeocin 板上高几倍。这 5 个中有一个又是其它几个的数倍。**

13. 将平板置于 30°C 培养，直至单个菌落出现。

**取 10  $\mu\text{L}$  (约 5~10  $\mu\text{g}$ ) 的线性化质粒与 80  $\mu\text{l}$  的感受态，这一步经常为了避免损失，省去做乙醇沉淀，直接用 25  $\mu\text{L}$  水洗脱，然后 20  $\mu\text{L}$  纯化产物与 80  $\mu\text{l}$  的感受态混合，也没发生电击穿现象。**

## 5.6. 不带抗性的酵母营养缺陷型的富集与筛选

1. 电转产物加入 1 mL YPD 静置培养 1 h；
2. 转移入装有 20 mL YPD 的 250 mL 摇瓶中，200 rpm，30°C 培养 24 h；
3. 离心，NFMM 离心洗涤 3 次；
4. NFMM 培养 4-8 h，至胞内氮源耗尽；
5. 离心，加 MM 培养 4-6 h；
6. 加入 Nystatin，加入等体积的 340 g/L 蔗糖至终浓度 170 g/L，30°C 水浴中静置培养 15-90 min，每 10 min 左右轻轻转动使细胞悬浮，**每 15 min 取样按步骤 7 开始进行处理！**）；
7. 无菌生理盐水离心洗涤 2 次去除 Nystatin；
8. 稀释适当浓度，涂 LM、MM、YPD 平板，30°C 48-72 h 培养；
9. 挑 LM 上的小菌落点种 MM 平板；
10. 挑 YPD 上长而 MM 不长的继续划线分离确定营养缺陷型。

**注意事项：**

**MM，NFMM，高渗 MM 用的管子瓶子一定要洗干净，千万不要存在有机物！！！！**

## 5.7. 毕赤酵母电转化方法

### 一、菌体的准备：

1. 挑取酵母单菌落，接种至含有 5ml YPD 培养基的 50ml 三角瓶中，30°C、250-300r/min 培养过夜；

**生长期的重要性毋庸置疑，比如外源 DNA 基因组整合时，酵母通常选取 OD600 值为 1-2 左右。这是因为其时酵母分裂旺盛，细胞核膜较易被攻入(处于有丝分裂的前几期)；同理，基因组 DNA 松散暴露，电转入的外源 DNA 较易整合；细胞生命力也较强。多种因素组合，使得转化率得以提高。**

**制备感受态的细胞一般都是要求新鲜、对数期的，如 1.3-1.5 OD<sub>600</sub>，一定要先用冰水洗涤充分以降低电导。**

2. 取 100-500 $\mu\text{l}$  的培养物接种至含有 500ml 新鲜培养基的 2L 三角摇瓶中，28~30°C、250-300r/min 培养过夜，至 OD600 达到 1.3~1.5；

3. 将细胞培养物于 4°C，1500g 离心 5min，用 500ml 的冰预冷的无菌水将菌体沉淀重悬；

4. 按步骤 3 离心，用 250ml 的冰预冷的无菌水将菌体沉淀重悬；

5. 按步骤 3 离心，用 20ml 的冰预冷的 1mol 的山梨醇溶液将菌体沉淀重悬；

6. 按步骤 3 离心，用 1ml 的冰预冷的 1mol 的山梨醇溶液将菌体沉淀重悬，其终体积约为 1.5ml；

**将细胞洗干净些**，很多新手做细菌酵母电转效率不高的原因有时很简单。最后的细胞悬液中带有太多的离子，导致电流太强。曾看见新手电转时，电转杯中见火光；那已经不是实验成败，而是实验安全问题了。建议不需要严格按书上所写步骤操作。如果自己不放心，可以多洗几遍。比如电转酵母需用水洗两遍，山梨醇洗两遍，我经常水洗

三遍以彻底去除离子，效果很不错的。

7. 备注：可将其分装为 80 $\mu$ l 一份的包装冷冻起来，但会影响其转化效率（2 周之内）。

## 二、电击转化：

8. 将 5~20  $\mu$ g 的线性化 DNA 溶解在 5~10 $\mu$ l **双蒸水**中，与 80  $\mu$ l 的上述步骤 6 所得的菌体混匀，转至 0.2cm 冰预冷的电转化杯中；

**线性化的质粒纯化后最好用双蒸水溶解。**

9. 将电转化杯冰浴 5min；

**如有可能，将电击仪器置于冷柜中，整个操作在低温，4 度进行。注意电击杯外面不能带水。最后，可以通过电击完后的时间参数估计操作成功的可能性。一般来说，1500V，25 $\mu$ F，200 欧姆时大于 4ms，400 欧姆时应大于 8ms。**

10. 根据电转化仪提供的资料，参考其他文献及多次摸索，确定合适的电压、电流、电容等参数，按优化的参数，进行电击；

**推荐：电压 1.5kV；电容 25 $\mu$ F；电阻 200 $\Omega$ 。电击时间为 4~10msec。**

11. 电击完毕后，加入 1ml 冰预冷的山梨醇溶液将菌体混匀，转至 1.5ml 的 EP 管中；

**加入质粒后要冰浴，一般是 5min。电击后应该立即加入冰山梨醇并稍微吹匀，最好不要吹出气泡。加山梨醇后温育时间可适当延长 1-2 小时，也可再取出部分加 YPD 温育 1-2 小时。**

12. 将菌体悬液涂布于 MD 或 RDB 平板上，每 200~600 $\mu$ l 涂布一块平板；

**涂板剩下的电转化液不要扔掉，放在 4 度冰箱里至少一个周没问题。我有一次转化后，放了 1h 就涂板，是 100，和 2000 $\mu$ g/mL Zeocin 的板，结果 2000 的没长，我又把放在冰箱中的转化液拿出来，加了点儿 YPD，摇了几个小时，涂 2000  $\mu$ g/mL Zeocin 板，结果长了上百个 Clone。随便挑了 5 个，表达量都要比 100  $\mu$ g/mL Zeocin 板上高几倍。这 5 个中有一个又是其它几个的数倍，呵呵。**

13. 将平板置于 30 $^{\circ}$ C 培养，直至单个菌落出现。

**如果还想拿到更高的拷贝数，可以用你构建的质粒，再转化一次已得到的高拷贝克隆，不过我没作，有文章是这样作的。取 10 $\mu$ L（约 5~10 $\mu$ g）的线性化质粒与 80 $\mu$ l 的感受态 GS115 菌体，这一步经常为了避免损失，省去做乙醇沉淀，直接用 25 $\mu$ L 水洗脱，然后 20 $\mu$ L 纯化产物与 80 $\mu$ l 的感受态 GS115 混合，也没发生电击穿现象。**

### 5.8. 电击杯处理

新的电击杯无需任何处理即可使用。电击杯可重复用多次直到坏掉为止，如果做抗体库等工作要求转化效率极高时就要选择新杯子为佳，杯子用大量自来水冲。不同载体建议不要用同一个杯子。产生过**电弧**的杯子不要再用。

#### 注意事项：

1. 保证质粒冲洗干净，怕细菌不死，怕质粒存活。
2. 再用时可以放超镜台内紫外灯下晾干，如果胆子大一点又想快的话就在烘箱内进行。
3. 杯子可以经受高压消毒（**但盖子肯定不可以灭菌！铝片也会腐蚀！最好都不要灭！**）。
4. 最好不要放 -80 度冷冻，那样拿出来容易**裂掉**（教训啊！）。
5. 放 -20 度即可（可以用小袋子以最小体积包起来，那样不会在上面产生很多水，导致电击失败，应该准备一张卫生纸搽干，保证外表无水分）。

#### 清洗方法一：

1. 去离子的蒸馏水洗 3 次
2. 70%酒精洗 3 次
3. 消毒:
  - A. 50% 酒精泡 30 分，风干后储藏于密闭容器中。
  - B. 也可紫外线照射消毒。

#### 清洗方法二：

1. 第一次使用完后，立即对着自来水冲洗几次，然后放在泡有洗衣粉的瓶子里泡几小时，
2. 然后用牙签裹住一薄层的棉花深入到夹层里面来回清洗两遍（彻底除去夹缝中残余的菌液）
3. 用干净的容器装住电击杯，同时泡上单蒸水，在 70 度水浴一个小时左右（让残余的 DNA 彻底变形）
4. 倒去单蒸水后，泡上 70% 的酒精
5. 什么时候想用了，拿出来到超净台吹干

### 清洗方法三：

- 1) 电转杯使用后充分清洗，当然使用去离子水；
- 2) 100%乙醇浸泡；
- 3) 温箱中烘干；
- 4) 塑料袋密封，原来的包装可以重复使用；
- 5) 钴源照射灭菌，下次使用

## 5.9. 真核转染

一些真核蛋白在原核宿主细胞中的表达不但行之有效而且成本低廉，然而许多在细菌中合成的真核蛋白或因折叠方式不正确，或因折叠效率低下，结果使得蛋白活性低或无活性。不仅如此，真核生物蛋白的活性往往需要翻译后加工，例如二硫键的精确形成、糖基化、磷酸化、寡聚体的形成或者由特异性蛋白酶进行的裂解等等，而这些加工原核细胞则无能为力。需要表达具有生物学功能的膜蛋白或分泌性蛋白，例如位于细胞膜表面的受体或细胞外的激素和酶，则更需要使用真核转染技术。由于 DNA 导入哺乳动物细胞有关技术的发展，使真核表达成为可能。利用克隆化的真核基因在哺乳动物细胞中表达蛋白质，具有以下多种不同用途：

- (1) 通过对所编码的蛋白质进行免疫学检测或生物活性测定，确证所克隆的基因。
- (2) 对所编码的蛋白质须进行糖基化或蛋白酶水解等翻译后加工的基因进行表达。
- (3) 大量生产从自然界中一般只能小量提取到的某些生物活性蛋白。
- (4) 研究在各种不同类型细胞中表达的蛋白质的生物合成以及在细胞内转运的情况。
- (5) 通过分析正常蛋白质及其突变体的特性，阐明蛋白质结构与功能的关系。
- (6) 使带有内含子而不能在原核生物如酵母中正确转录为 mRNA 的基因组序列得到表达。
- (7) 揭示某些与基因表达调控有关的 DNA 序列元件。

DNA 转染技术现已变成研究基因功能和组分的重要工具，已发展了很多转染方法，并成功应用于转染各种细胞。目前广泛应用方法有磷酸钙共沉淀法、电穿孔法、病毒载体，以及阳离子脂质体介导转染法。

进行真核转染的一般程序：

克隆目的基因（经测序验证）-准备真核表达载体-将目的基因插入表达载体中-转染-筛选-鉴定

下面以 pcDNA3 为载体，p16 为目的基因，介绍真核转染的实验操作。

### 一、试剂准备

1. HBS (Hepes-buffered saline) : 876mg NaCl 溶于 90ml ddH<sub>2</sub>O，加入 1M Hepes，调 pH 到 7.4，补 ddH<sub>2</sub>O 至 100ml，pH7.4，滤过除菌。
2. 核酸贮存液，过滤除菌。
3. 培养基：含血清或不含血清的，用于转染细胞的正常培养。

### 二、操作步骤

#### (一) 克隆目的基因

1. 根据 GenBank 检索的目的基因序列，设计扩增引物，并在上、下游引物的 5' 端分别引入酶切位点 BamH I 和 Xho I，行 RT-PCR。
2. 回收特异性扩增片段，连入 T 载体。
3. 转化 DH5 $\alpha$ ，质粒制备。
4. 酶切初步鉴定，测序证实。

#### (二) 真核重组表达载体的构建：

pcDNA3 载体带有在大肠杆菌中复制的原核序列、便于挑选带重组质粒细菌的抗生素抗性基因,以及表达外源 DNA 序列所必需的所有真核表达组件。

重组质粒与 pcDNA3 分别用 BamH I 和 Xho I 双酶切

回收插入片段和 pcDNA3 线性片段

T4 连接酶连接

转化 DH5 $\alpha$

质粒制备

BamH I 和 Xho I 双酶切鉴定。

(三) 重组 pcDNA3 转染 SHG-44 细胞:

1、G418 筛选浓度测定:SHG-44 培养于 24 孔培养板→G418 分别用 100mg/L、200mg/L、300mg/L、400mg/L、500mg/L、600mg/L 加入,各浓度 3 复孔,设正常对照 3 复孔。以 10-14 天细胞全部死亡的浓度为筛选浓度,结果为 200mg/L。

2、在转染实验前天接种细胞,各种细胞的平板密度依据各种细胞的生长率和细胞形状而定。进行转染当天细胞应达到 60%-80%覆盖。一般要求,6 孔培养皿(35mm),每孔 1-2ml 培养基  $3 \times 10^5$  细胞。依据不同大小培养板调整每平方厘米的细胞数量。

典型贴壁细胞平板密度

培养板大小	生长面积 (cm <sup>2</sup> )	大约细胞数	培养基容积 (ml)
组织培养皿 ( $\phi$ 60mm)	28	$6.6 \times 10^5$	5-6
6 孔培养板 ( $\phi$ 35mm)	9.5	$3 \times 10^5$	1-2
12 孔培养板 $\phi$ 22.6mm)	4	$1.3 \times 10^5$	0.5-1
24 孔培养板 ( $\phi$ 8mm)	0.5	$0.6 \times 10^5$	0.25-0.5

3、SHG-44 细胞的转染:

(1) 转染当天,加入脂质体/ DNA 混合物之前的短时间内,更换 1ml 新鲜的有血清或无血清培养基。

(2) 准备不同比例的 DOSPER/ DNA 混合物,以确定每个细胞系的最佳比例。① 溶液 A:用 HBS 稀释 DNA (pcDNA3、重组 pcDNA3) 各 1.5 $\mu$ g 到总体积 50 $\mu$ l (30 $\mu$ g/ml)。② 溶液 B:用 HBS 稀释 6 $\mu$ l 脂质体到终容积 50 $\mu$ l (120 $\mu$ g/ml)。③ 混合溶液 A 和 B,轻柔混合(不要振荡),室温孵育 15min,以便脂质体/DNA 混合物形成。

(3) 不要移去培养基,逐滴加入 100 $\mu$ l 脂质体/DNA 混合物(从培养孔一边到另一边),边加边轻摇培养板。

(4) 37 $^{\circ}$ C 孵育 6hr。

(5) 6hr 后更换转染培养基,加入 2-3ml 新鲜生长培养基。

(6) 转染 24hr 后施加筛选压力,改用含 G418 的培养基培养。

4、G418 筛选 在 G418 筛选浓度下持续培养 14 天后 挑出单克隆 扩大培养 同时转染 pcDNA3 即 SHG-44-vect,并设对照组细胞即 SHG-44。

(一) 筛选结果鉴定:

(1) 基因组 DNA 提取→PCR 鉴定外源基因

(2) SHG-44-重组 pcDNA3 阳性细胞、SHG-44-vect 裂解→聚丙烯酰胺凝胶电泳→免疫印迹鉴定 P16 蛋白表达 (Western-blot)。

(3) 测定外源性基因对 SHG-44 细胞增殖的影响

① 流式细胞仪分析:SHG-44、SHG-44-vect、SHG-44-重组 pcDNA3→单细胞悬液→70%酒精固定→裂解细胞→核糖核酸酶消化→碘化丙啶染色→上机分析 G<sub>1</sub> 期和 G<sub>2</sub>/M、S 期比例。

② 细胞生长曲线测定:SHG-44、SHG-44-vect、SHG-44-重组 pcDNA3→ $5 \times 10^4$ /孔接种 24 孔培养板→24hr 后各自用苔盼蓝染色计数细胞→计算细胞生长抑制百分率。

③ 软琼脂克隆形成率分析:SHG-44、SHG-44-vect、SHG-44-重组 pcDNA3→ $10^4$  细胞→0.3%低熔点琼脂糖培养→1-2 周后计数不可少于 50 个细胞的克隆数→计算克隆形成率抑制率。

### 三、注意事项

- 1、优化转染条件（脂质体的用量、DNA 密度、细胞密度、脂质体和 DNA 混合孵育时间）每种细胞和质粒均须进行。用于转染的核酸应高度纯化。为避免微生物污染，所用溶液滤过灭菌，以及随后的使用应在无菌条件下，这是细胞惯常的做法。但是，脂质体以及脂质体/ DNA 混合物无需滤过除菌。
  - 2、预备脂质体/DNA 混合物必须在无血清下进行。但是在随后的脂质体/ DNA 与被转染细胞共孵育的过程中，血清又是培养基的一部分。
  - 3、在转染之前更换培养基，可提高转染效率，但所用培养基必须 37°C 预温。
- 脂质体/ DNA 混合物应当逐滴加入，尽可能保持一致，从培养皿一边到另一边，边加入边轻摇培养皿，以确保均匀分布和避免局部高浓度。

### 5.10. PDS-1000 基因枪操作手册

#### 制备金粉：

1. 以 1.5 ml Eppendorf tube 称取 25 mg 金粉；
2. 加入绝对酒精，高速震荡 1-2 分钟；
3. 10,000 rpm 离心 1 分钟；
4. 重复三次；
5. 倒掉上清液，加入 1 ml 无菌水，震荡数秒；
6. 10000 rpm 离心 1 分钟；
7. 重复清洗两次；
8. 加入 1 ml 无菌水，分装成每管 50  $\mu$ l，储存于 -20°C 备用。

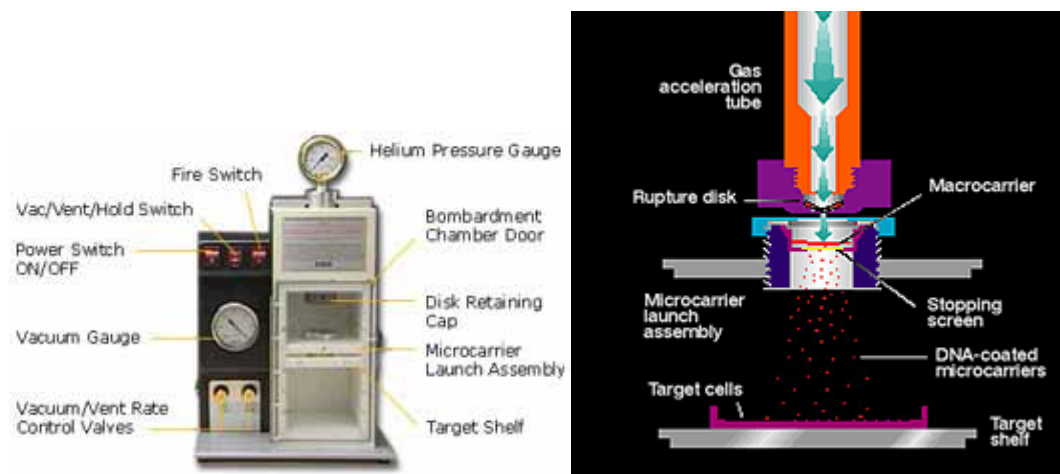
#### 轰击准备工作：

将 Macrocarriers、Holder、Stopping screen、Rupture disk 浸泡在 95 % 酒精中 15 分钟后，晾干备用。

#### 制备轰击用子弹：

1. 取清洗过的金粉，加入 5  $\mu$ l DNA (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)，震荡 1 分钟；
2. 加入 50  $\mu$ l 2.5 M CaCl<sub>2</sub>，震荡 1 分钟；
3. 加入 20  $\mu$ l 0.1 M Spermidine，震荡 1 分钟；
4. 10,000 rpm 离心 10 秒，倒掉上清液；
5. 以 500  $\mu$ l 70 % 酒精清洗二次；
6. 10,000 rpm 离心 10 秒，倒掉上清液；
7. 加入 60 ~ 70  $\mu$ l 绝对酒精，混合均匀，6 ~ 10  $\mu$ l 滴在 macrocarrier 上（一次一滴，慢慢滴）。

#### 轰击操作：



1. 将钢瓶上阀门打开，调整压力表前黑色旋钮至适当压力（至少较所需压力高 200 psi）；
2. 将上述对象组合成上图，调整 sample 与 macrocarrier 之间的距离，关上 chamber；
3. 抽真空至所需真空度，轰击；
4. 待 chamber 恢复压力，取出 sample 及所有零件；

5.重复步骤 2 ~ 4，直到所有实验材料轰击完；

6.使用完毕后，关上钢瓶阀门，抽真空，轰击至钢瓶上压力表降至零，回复 chamber 压力后即可关闭电源。将压力表前黑色旋钮逆时针方向旋松。

## 6. 基因敲除、定点突变，与定向进化

### 6.1. 一种可重复利用的酵母基因敲除方法

#### A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast

Ulrich Güldener, Susanne Heck, Thomas Fiedler, Jens Beinhauer and Johannes H. Hegemann

Heinrich-Heine-Universität, Institut für Mikrobiologie, Geb. 26.12.01 Raum 64, Universitätsstr. 1, 40225

Düsseldorf, Germany, Tel.: +49-211-81-13733, Fax.: +49-211-81-15370, e-mail:

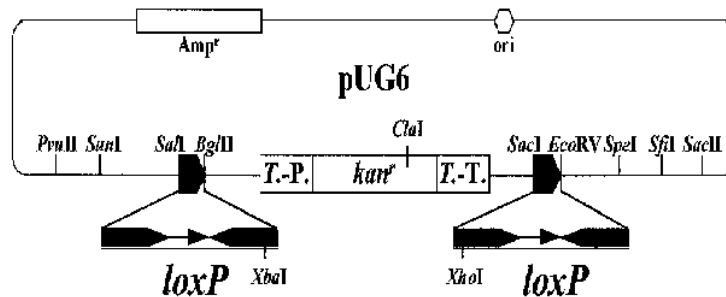
hegemann@uni-duesseldorf.de

#### Abstract

The dominant  $kan^r$  marker gene plays an important role in gene disruption experiments in budding yeast, as this marker can be used in a variety of yeast strains lacking the conventional yeast markers. We have developed a  $loxP$ - $kanMX$ - $loxP$  gene disruption cassette, which combines the advantages of the heterologous  $kan^r$  marker with those from the Cre- $loxP$  recombination system. This disruption cassette integrates with high efficiency via homologous integration at the correct genomic locus (routinely 70%). Upon expression of the Cre recombinase the  $kan^r$  marker is excised by an efficient recombination between the  $loxP$  sites leaving behind a single  $loxP$  site at the chromosomal locus. This system allows repeated use of the  $kan^r$  marker gene and will be of great advantage for the functional analysis of gene families.

#### Map of plasmid pUG6 carrying the $loxP$ - $kanMX$ - $loxP$ disruption module

**Figure 1**

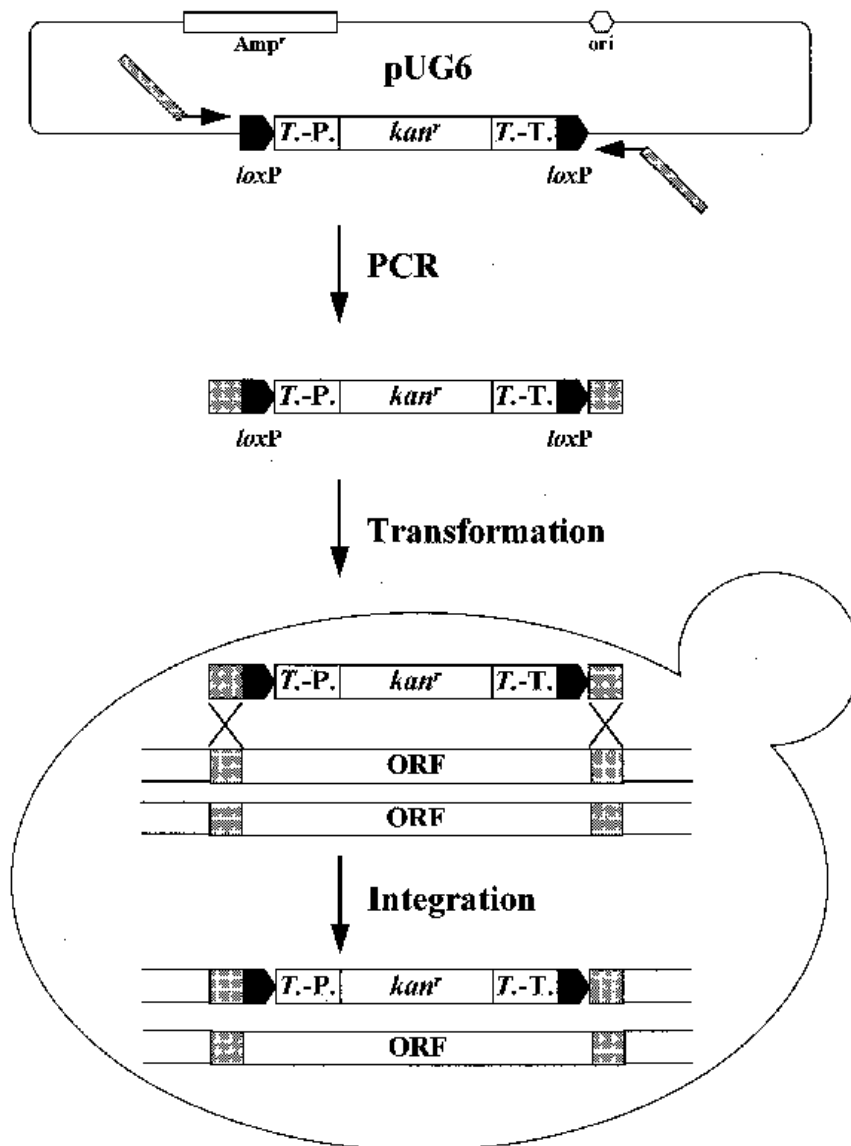


The 2  $loxP$  sites are flanking as direct repeats the  $kan^r$  marker gene ( $kan^r$ ) plus TEF2 promoter (T.-P.) and TEF2 terminator (T.-T.) in plasmid pFAG- $kanMX4$  (A. Wach et al., 1994, YEAST 10:1793-1808). Unique restriction enzymes are indicated in bold letters.

- [click here for the plasmid sequence](#)

#### Gene disruption using the $loxP$ - $kanMX$ - $loxP$ disruption

**Figure 2**



cassette

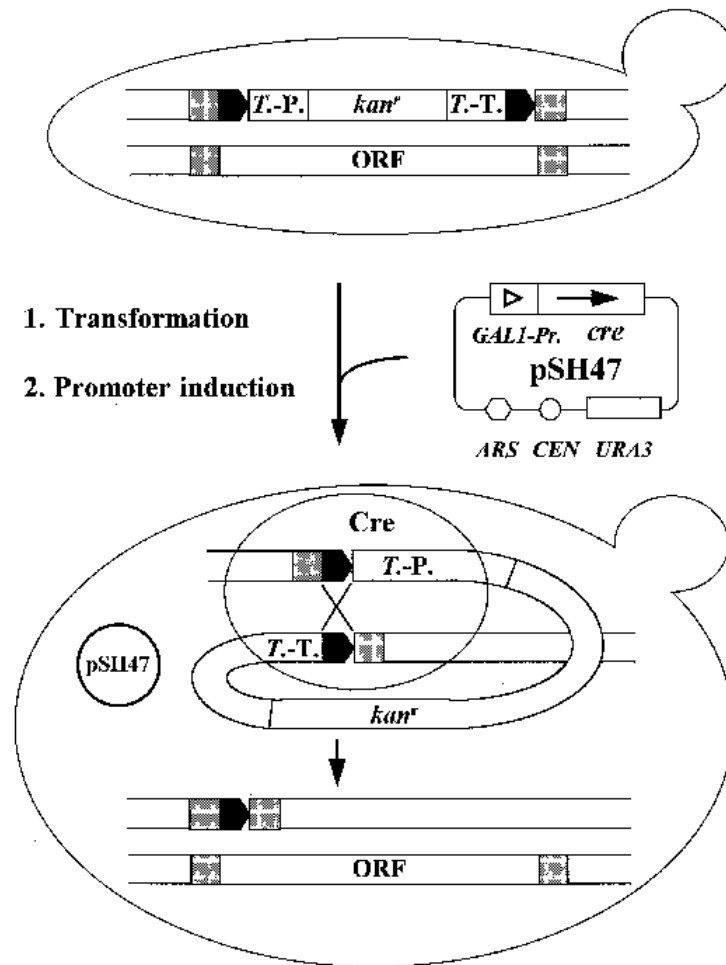
For a gene disruption experiment two oligonucleotides were used that carry at their 3' end a segment (arrow) homologous to sequences left and right of the *loxP*-*kanMX*-*loxP* module on plasmid pUG6 and at their 5' end a segment (shaded box) homologous to the Open Reading Frame (ORF) to be disrupted. Plasmid pUG6 was used as PCR template to generate the disruption cassette.

- [click here for the detailed transformation protocol](#)

---

**kan<sup>r</sup> Marker rescue by expression of the Cre recombinase**

**Figure 3**



The diploid *kan<sup>+</sup>* yeast strain with the relevant genotype *ORF/ORF::loxP-kan nMX-loxP* was transformed with plasmid pSH47 (selection marker: *URA3*). Transformants were grown on glucose plates and then shifted to galactose media to induce expression of the Cre recombinase. The Cre-induced recombination process between the 2 loxP sites removes the marker gene resulting in the genotype *ORF/ORF::loxP*. Additionally 2 other Cre-plasmids are available: pSH62 (*HIS3*) and pSH63 (*TRP1*).

- click [here](#) for the marker rescue protocol
- click for [plasmid map](#) or [sequence of pSH47 \(URA3\)](#)
- click for [plasmid map](#) or [sequence of pSH62 \(HIS3\)](#)
- click for [plasmid map](#) or [sequence of pSH63 \(TRP1\)](#)

- 
- [click here for ordering plasmids pUG6, pSH47, pSH62, and pSH63](#)
- 

#### Reference

- Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J. and Hegemann, J.H. (1996). *A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast*. Nucleic Acids Res. 24:2519-2524 (1996)

#### 6.2. 自杀质粒

马里兰大学的 pCVD442 不错，可与 Xiaolin Wang 联系：xwang004@umaryland.edu

### **Propagation of the plasmid**

Plasmid pCVD442 and its derivatives can only grow in strains that have the *pir* gene encoding the Pi protein, which is necessary for replication of R6K plasmids. The *pir* gene is usually supplied by a lambda lysogen. Such strains include DH5alpha-lambda*pir*, SY327-lambda*pir*, SM10-lambda*pir*, and S17-lambda*pir*. The last two strains supply the *tra* genes for efficient conjugation.

### **Cloning into pCVD442**

Cloning in pCVD442 may not be as efficient as cloning in other vectors. Plasmid pCVD442 has only a few unique sites for cloning (see above). Additionally, transformation of *pir* containing strains might not be as efficient as is transformation of other strains. When we have difficulty cloning into this plasmid, we sometimes create a hybrid plasmid by joining the plasmid containing the allele we wish to clone to the suicide vector with pCVD442. If the plasmid containing the desired allele does not encode ampicillin resistance, one can transform a high efficiency strain and select for ampicillin resistance. Since pCVD442 is unable to grow in a strain that lacks *pir*, the only ampicillin resistant strains that arise contain the hybrid plasmid. After confirming the orientation, we excise the origin of replication of the original vector and transform DH5alpha-lambda*pir*. Since this is an intramolecular ligation, it is highly efficient.

It is important to have sufficient flanking DNA around the altered allele to allow recombination on both sides. It is ideal to have greater than 1 kb on either side. Having equal amounts of DNA on each side is also important. Recombination is more likely to occur on the side with longer flanking DNA. Since allelic exchange requires recombination first on one side and then on the other, it is important to have equal lengths on each side. One can get away with less flanking DNA and with unequal amounts when one is using an allele that has a selectable marker.

### **Transferring the suicide vector into the host strain; selecting for the first recombination event**

Plasmid pCVD442 containing the allele of interest can be introduced into the parental strain by a variety of methods including electroporation, direct conjugation from a strain that carries *tra* functions, or triparental conjugation along with a strain that carries a broad host-range RP4 type plasmid.

### **Selection for loss of the suicide vector**

Once a partial merodiploid strain containing the integrated suicide vector has been obtained, the next step is a second recombination event that results in loss of the suicide vector and one of the alleles. To select for this event we dilute an overnight LB + ampicillin culture 10<sup>-6</sup> in LB without ampicillin and grow until the culture becomes turbid. Serial dilutions are then plated on LB plates and on plates that contain modified LB that has no NaCl and has 5% sucrose. These plates are incubated overnight at 30°C. Surprisingly, the difference in the number of colonies on the plates containing and lacking sucrose is usually only ~10-fold, but most of the sucrose-resistant colonies are also ampicillin sensitive, indicating loss of the suicide vector. These colonies can then be checked by Southern blot or PCR to determine whether they have retained the wild type or the mutated allele.

## **6.3. 基于 DpnI 的定点突变方法**

### **DpnI mediated site-directed Mutagenesis**

A highly effective simple method for making site directed lesions in plasmids without subcloning based on the work of Fisher and Pei (1997).

#### **1. 突变 DNA 的扩增**

DNA template plasmid	5-20 ng
10x pfu DNA polymerase buffer	5.0 µl
25uM oligo 1	0.5 µl
25uM oligo 2	0.5 µl

10mM dNTP 1.0 μl  
Pfu DNA polymerase (2.5 units) 1.0 μl  
加入 ddH<sub>2</sub>O 至 50 μl。

### PCR 条件

95°C 30 s, 18 cycles of : 95°C 30 s, 55°C 1 min, 68°C 2 min/kb of plasmid length

## 2. Degradation of methylated (parental) DNA with Dpn I

Cool down PCR reaction.

Add 1μl Dpn I (10 unit) to PCR reaction 37°C and incubate for 1 hr.

## 3. 转化 *E. coli*

Place 200 μl highly competent cells (1 x 10<sup>8</sup>/ug efficiency or greater) DH5a on ice.

Add 1-2 μl of digested PCR reaction.

Incubate on ice 15-20 min.

Heat shock 60-90 s, and return to ice for 2 min.

Add 1 ml LB broth. Incubate at 37°C for 1 h.

Plate 100 μl aliquot on appropriate antibiotic plate.

## 4. Miniprep 6 colonies and digest plasmids looking for mutant.

5. Sequence the lesion to confirm the change.

### 注意：

The Stratagene Quickchange<sup>TM</sup> site-directed mutagenesis protocol provides a detailed description of the approach. The manual is available as a PDF file at <http://www.stratagene.com/manuals/200518.pdf>

## 6.4. 基于 PCR 的定点突变实例

CATCTTGATGTAGTAGGAGGAAGAAA GAGTTTGTGCTGCGTTAGCTCCCACATTTTTCTTAC

要扩这一段，**红的**为突变

设计引物为 5 个说明：

前面一段扩增引物：正向：CATCT

反向：aactc

后面一段扩增引物：正向：GAGTT

反向：gtaag

当你扩增前后两个片段后，又用这两个片段作为模版，以 CATCT 和 gtaag 为引物，就可以扩出你要的片段。不过中间的引物长一点

如果是在离两端比较近就麻烦一些。就是要把 GAGTT 改变掉，其他的你肯定不用管，只管引物就行了，引物之间的不用管，PCR 就行了，先把两对引物分别扩出来，以中间引物 GAGTT 为中点，前面的一段单独扩出来，后面的一段单独扩出来，再把这两段混在一起做引物，以 CATCT 和 gtaag 为引物 PCR 就可以扩出整个片段了，PCR 时他自己就连上了，中间的引物不是互补的吗，你先扩的两段再一起不就退火了，就互补，PCR 时自己就连在一起了，把 GAGTT 这个引物中间的随便哪个改变一下就突变了。

## 7. 核酸与蛋白质杂交技术

### 7.1. Southern 杂交 (一)

Southern 杂交是分子生物学的经典实验方法。其基本原理是将待检测的 DNA 样品固定在固相载体上，与标记的核酸探针进行杂交，在与探针有同源序列的固相 DNA 的位置上显示出杂交信号。通过 Southern 杂交可以判断被检测的 DNA 样品中是否有与探针同源的片段以及该片段的长度。该项技术广泛被应用在遗传病检测、DNA 指纹分

析和 PCR 产物判断等研究中。但由于该技术的操作比较烦琐、费时，所以现在有一些其他的方法可以代替 Southern 杂交。但该技术也有它的独特之处，是目前其他方法所不能替代的，如限制性酶切片段的多态性(RFLP)的检测等。

#### 一、基因组 DNA 的制备（前述）

#### 二、基因组 DNA 的限制酶切

根据实验目的决定酶切 DNA 的量。一般 Southern 杂交每一个电泳通道需要 10-30 $\mu$ g 的 DNA。购买的限制性内切酶都附有相对应的 10 倍浓度缓冲液，并可从该公司的产品目录上查到最佳消化温度。为保证消化完全，一般用 2-4U 的酶消化 1 $\mu$ g 的 DNA。消化的 DNA 浓度不宜太高，以 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l 为好。由于内切酶是保存在 50%甘油内的，而酶只有在甘油浓度 < 5% 的条件下才能发挥正常作用，所以加入反应体系的酶体积不能超过 1/10。

具体操作如下：在 1.5ml 离心管中依次加入

DNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	20 $\mu$ g
10 $\times$ 酶切 buffer	4.0 $\mu$ l
限制性内切酶 (10U/ $\mu$ l)	5.0 $\mu$ l
加 ddH <sub>2</sub> O	至 500 $\mu$ l

在最适温度下消化 1-3hr。消化结束时可取 5 $\mu$ l 电泳检测消化效果。如果消化效果不好，可以延长消化时间，但超过 6hr 已没有必要。或者放大反应体积，或者补充酶再消化。如仍不能奏效，可能的原因是 DNA 样品中有太多的杂质，或酶的活力下降。

消化后的 DNA 加入 1/10 体积的 0.5M EDTA，以终止消化。然后用等体积酚抽提、等体积氯仿抽提，2.5 倍体积乙醇沉淀，少量 TE 溶解（参见 DNA 提取方法，但离心转速要提高到 12000g，以防止小片段 DNA 的丢失）。

如果需要两种酶消化 DNA，而两种酶的反应条件可以一致，则两种酶可同时进行消化；如果反应条件不一致，则先用需要低离子强度的酶消化，然后补加盐类等物质调高反应体系的离子强度，再加第二种酶进行消化。

#### 三、基因组 DNA 消化产物的琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖凝胶电泳是目前分离核酸片段最常用的方法，制备简单，分离范围广（200bp-50kb），实验成本低。下表列举了不同浓度琼脂糖凝胶能分离的 DNA 片段范围。

表：不同浓度琼脂糖凝胶分离 DNA 片段的范围

琼脂糖凝胶浓度 (%)	分离 DNA 片段范围 (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

1. 制备 0.8% 凝胶：一般用于 Southern 杂交的电泳胶取 0.8%。

2. 电泳：电泳样品中加入 6 $\times$  Loading 缓冲液，混匀后上样，留一或两泳道加 DNA Marker。1-2V/cm，DNA 从负极泳向正极。电泳至溴酚蓝指示剂接近凝胶另一端时，停止电泳。取出凝胶，紫外灯下观察电泳效果。在胶的一边放置一把刻度尺，拍摄照片。正常电泳图谱呈现一连续的涂抹带，照片摄入刻度尺是为了以后判断信号带的位置，以确定被杂交的 DNA 长度。

#### 四、DNA 从琼脂糖凝胶转移到固相支持物

转移就是将琼脂糖凝胶中的 DNA 转移到硝酸纤维膜（NC 膜）或尼龙膜上，形成固相 DNA。转移的目的是使固相 DNA 与液相的探针进行杂交。常用的转移方法有盐桥法、真空法和电转移法。这里介绍经典的盐桥法（又称为毛细管法）。

##### （一）试剂准备

1. 变性液：0.5M NaOH；1.5 M NaCl。

2. 中和液：1M Tris-HCl(pH 7.4)；1.5M NaCl；

3. 转移液（20 $\times$ SSC）：NaCl 175.3g；柠檬酸三钠 82.2g，NaOH 调 pH 至 7.0，加 ddH<sub>2</sub>O 至 1000ml。

##### （二）操作步骤

1. 碱变性:室温下将凝胶浸入数倍体积的变性液中 30min。
2. 中和:将凝胶转移到中和液 15min。
3. 转移 按凝胶的大小剪裁 NC 膜或尼龙膜并剪去一角作为标记,水浸湿后,浸入转移液中 5min。剪一张比膜稍宽的长条 Whatman 3mm 滤纸作为盐桥,再按凝胶的尺寸剪 3-5 张滤纸和大量的纸巾备用。按下图所示进行转移。  
( 转移过程一般需要 8-24hr,每隔数 hr 换掉已经湿掉的纸巾。转移液用 20×SSC。注意在膜与胶之间不能有气泡。整个操作过程中要防止膜上沾染其他污物。 )
4. 转移结束后取出 NC 膜,浸入 6×SSC 溶液数 min,洗去膜上沾染的凝胶颗粒,置于两张滤纸之间,80°C 烘 2hr,然后将 NC 膜夹在两层滤纸间,保存于干燥处。

## 五、探针标记

进行 Southern 杂交的探针一般用放射性物质标记或用地高辛标记。放射性标记灵敏度高,效果好;地高辛标记没有半衰期,安全性好。这里介绍放射性标记。

探针的标记方法有随机引物法、切口平移法和末端标记法,有一些试剂盒可供选择,操作也很简单。

以下为 Promega 公司随机引物试剂盒提供的标记步骤:

1. 取 25-50ng 模板 DNA 于 0.5ml 离心管中,100°C 变性 5min,立即置冰浴。

2. 在另一个 0.5ml 离心管中加入:

Labeling 5×buffer	10μl
( 含有随机引物 )	
dNTPmix	2μl
(含 dCTP、dGTP、dTTP 各 0.5mM)	
BSA ( 小牛血清白蛋白 )	2μl
[α- <sup>32</sup> P]dATP	3μl
Klenow 酶	5U

3. 将变性模板 DNA 加入到上管中,加 ddH<sub>2</sub>O 至 50μl,混匀。室温或 37°C 1hr。

4. 加 50μl 终止缓冲液终止反应。

标记后的探针可以直接使用或过柱纯化后使用。由于 α-<sup>32</sup>P 的半衰期只有 14 天,所以标记好的探针应尽快使用。探针的比活性最好大于 10<sup>9</sup> 计数/分/μl。

## 六、杂交

Southern 杂交一般采取的是液-固杂交方式,即探针为液相,被杂交 DNA 为固相。杂交发生于一定条件的溶液( 杂交液 ) 中并需要一定的温度,可以用杂交瓶或杂交袋并使液体不断的在膜上流动。杂交液可以自制或从公司购买,不同的杂交液配方相差较大,杂交温度也不同。下面给出的为一杂交液配方:

PEG 6000 10%; SDS 0.5%; 6×SSC; 50%甲酰胺。该杂交液的杂交温度为 42°C。

### 1. 预杂交

NC 膜浸入 2×SSC 中 5min,在杂交瓶中加入杂交液( 8cm×8 cm 的膜加 5ml 即可 ),将膜的背面贴紧杂交瓶壁,正面朝向杂交液。放入 42°C 杂交炉中,使杂交体系升到 42°C。取经超声粉碎的鲑鱼精 DNA ( 已溶解在水或 TE 中 ) 100°C 加热变性 5min,迅速加到杂交瓶中,使其浓度达到 100μg/ml。继续杂交 4hr。鲑鱼精 DNA 的作用是封闭 NC 膜上没有 DNA 转移的位点,降低杂交背景、提高杂交特异性。

### 2. 杂交

倒出预杂交的杂交液 换入等量新的已升温至 42°C 的杂交液,同样加入变性的鲑鱼精 DNA。将探针 100°C 加热 5min,使其变性,迅速加到杂交瓶中。42°C 杂交过夜。

## 七、洗膜与检测

取出 NC 膜,在 2×SSC 溶液中漂洗 5min,然后按照下列条件洗膜:

- 2×SSC/0.1% SDS, 42°C, 10min;
- 1×SSC/0.1% SDS, 42°C, 10min;
- 0.5×SSC/0.1% SDS, 42°C, 10min;
- 0.2×SSC/0.1% SDS, 56°C, 10min;
- 0.1×SSC/0.1% SDS, 56°C, 10min。

在洗膜的过程中，不断振摇，不断用放射性检测仪探测膜上的放射强度。实践证明，当放射强度指示数值较环境背景高 1-2 倍时，是洗膜的终止点。上述洗膜过程无论在哪一步达到终点，都必须停止洗膜。洗完的膜浸入 2×SSC 中 2min，取出膜，用滤纸吸干膜表面的水份，并用保鲜膜包裹，注意保鲜膜与 NC 膜之间不能有气泡。将膜正面向上，放入暗盒中（加双侧增感屏），在暗室的红光下，贴覆两张 X 光片，每一片都用透明胶带固定，合上暗盒，置-70℃低温冰箱中曝光。根据信号强弱决定曝光时间，一般在 1-3 天时间。洗片时，先洗一张 X 光片，若感光偏弱，则再多加两天曝光时间，再洗第二张片子。

影响 Southern 杂交实验的因素很多，主要有：DNA 纯度、酶切效率、电泳分离效果、转移效率、探针比活性和洗膜终止点等。

## 七、注意事项

1. 要取得好的转移和杂交效果，应根据 DNA 分子的大小，适当调整变性时间。对于分子量较大的 DNA 片段（大于 15kb），可在变性前用 0.2M HCl 预处理 10min 使其脱嘌呤。
2. 转移用的 NC 膜要预先在双蒸水中浸泡使其湿透，否则会影响转膜效果；不可用手触摸 NC 膜，否则影响 DNA 的转移及与膜的结合。
3. 转移时，凝胶的四周用 Parafilm 蜡膜封严，防止在转移过程中产生短路，影响转移效率，同时注意 NC 膜与凝胶及滤纸间不能留有气泡，以免影响转移。
4. 注意同位素的安全使用。

### 7.2. Southern 杂交 (二)

1. 正常跑胶。如果是基因组 Southern，那么需要跑 18cm 的胶，可能需要 4-6 h。
2. 将跑的胶的 Marker 旁边放一个尺子，一起拍照，作为参照。
3. 碱转缓冲液：0.5M NaOH (20g/lit)，1.5M NaCl (87.66 g/lit)。每块胶需要 1 L，每多一块胶需要多用 750 mL。
4. 把胶加入 250 mL 的碱转缓冲液中，每多一块胶，多加 125 mL。
5. 把放入胶后的缓冲液放在震荡器上 20 min。注意：低琼脂糖的胶要转慢一点以防破裂。
6. 把剩下的 500 mL 放在转移缸中。

以下的步骤需要戴手套：

7. 切两块大的 3mm 的纸和两块每边大约比胶小 2mm 的纸和一片与胶一样大的尼龙(Hybond N+，Amersham)。

Large gel (HFI)	Medium gel	Mini gel
2 (14 x 19 cm)	2 (15.2 x 10)	2 (9 x 5.2)
2 (14 x 32cm)	2 (15.2 x 32)	2 (18.5 x 5.2)

裁一叠比胶小约 2mm 的纸，厚度约为 6cm。

8. 将尼龙于双蒸水中浸湿，再浸于碱转缓冲液中。
9. 加入缓冲液至转移缸中至平台。把长的纸在转移缓冲液中浸湿并放在转移缸中。
10. 把胶放在平台上，并放在转移缓冲液中。添加尼龙并用手把气泡赶走。

1. Run the gel as normal. Often for genomic Southern's it is desirable to run long gels (18cm) over 4-6hrs.
  2. Photograph the gel with a ruler adjacent to the molecular weight markers as a reference.
  3. Alkali transfer buffer = 0.5M NaOH (20g/lit)，1.5M NaCl (87.66 g/lit). Prepare 1 litre for one gel and another 750ml for each additional gel. BEWARE This buffer is very dangerous，capable of causing severe eye damage. Use the large volumes involved in this procedure with care and wear protective glasses.
  4. Add the gel to 250ml alkali transfer buffer，plus 125ml for each additional gel.
  5. Place gel on rocker with buffer solution for 20 mins. NOTE low % agarose gels must be agitated slowly to prevent tearing.
  6. Keep remaining 500ml for the transfer tank.
- Wear gloves for the following steps
7. Cut 2 pieces of large 3MM paper (wicks) and 2 pieces about 2mm smaller than the gel on each edge and one piece of nylon (Hybond N+，Amersham) the same size as the gel.

Large gel (HFI) Medium gel Mini gel

2 (14 x 19 cm) 2 (15.2 x 10) 2 (9 x 5.2)

2 (14 x 32cm) 2 (15.2 x 32) 2 (18.5 x 5.2)

Cut a stack of paper toweling about 2mm smaller than the gel. The stack needs to be about 6cm thick.

8. Prewet nylon in DDW , then soak in alkali transfer buffer.

9. Add buffer to transfer tank to the level of the platform. Wet the long wicks in transfer buffer and place in the tank.

10. Place gel on platform and spoon on transfer buffer. Add the Nylon and smooth out any bubbles with the back of your finger.

11. Add the 2 slightly smaller 3MM filters , the first prewetted , the second dry.

12. Add the stack of paper towels. NOTE it is very important that the edges of the towel do not touch the wicks that the gel is sitting on or the transfer will be " shortcircuited".

13. Top the stack with a glass or plastic plate and a weight (a bottle with about 200-300ml H<sub>2</sub>O is ideal). Too much weight compresses the gel and terminates the transfer early.

14. Allow to transfer o/n and then remove the stack carefully. Mark the position of the wells on the filter with a biro (and note position of well #1) before removing the filter. Soak the filter in 0.5M Tris pH 7.5 , 1.5M NaCl for 5min. after removal from the gel.

15. Add filter to 200ml 2 X SSC and allow to soak without agitation for 5'.

16. Remove filter and blot dry and bake at 80° for 2hr or place in autoclave for 10' when not operating but warm.

17. Prehybridize with 10ml Aqua. hyb. (Reagents) , 1% SDS and 100ug/ml boiled herring sperm DNA for 20-30 minutes (cloned DNA southern) to several hrs (genomic southern).

18. Boil probe for 3' and add to 3ml of fresh hyb solution/SDS/Herring DNA. Squeeze prehyb from the bag and add probe. Seal , avoiding air bubbles and distribute the probe well. Incubate for 4-6hr+ (cloned DNA) to 16-20hr (genomic southern). Washes are performed in 2 to 0.2X SSC , 0.1% SDS depending on homology of probe to target.

### 7.3. Northern 杂交 (一)

继分析 DNA 的 Southern 杂交方法出现后,1977 年 Alwine 等人提出一种与此相类似的、用于分析细胞总 RNA 或含 poly A 尾的 RNA 样品中特定 mRNA 分子大小和丰度的分子杂交技术,这就是与 Southern 相对应而定名的 Northern 杂交技术。这一技术自出现以来,已得到广泛应用,成为分析 mRNA 最为常用的经典方法。

与 Southern 杂交相似,Northern 杂交也采用琼脂糖凝胶电泳,将分子量大小不同的 RNA 分离开来,随后将其原位转移至固相支持物(如尼龙膜、硝酸纤维膜等)上,再用放射性(或非放射性)标记的 DNA 或 RNA 探针,依据其同源性进行杂交,最后进行放射自显影(或化学显影),以目标 RNA 所在位置表示其分子量的大小,而其显影强度则可提示目标 RNA 在所测样品中的相对含量(即目标 RNA 的丰度)。但与 Soughern 杂交不同的是,总 RNA 不需要进行酶切,即是以各个 RNA 分子的形式存在,可直接应用于电泳;此外,由于碱性溶液可使 RNA 水解,因此不进行碱变性,而是采用甲醛等进行变性电泳。虽然 Northern 也可检测目标 mRNA 分子的大小,但更多的是用于检测目的基因在组织细胞中是否有表达及表达的水平如何。

#### 一、试剂准备

1. 0.5M EDTA: EDTA 16.61g 加 ddH<sub>2</sub>O 至 80ml, 调 pH 至 8.0, 定容至 100ml。
2. 50mM NaAc: NaAc 3.4g 加 ddH<sub>2</sub>O 至 500ml, 加 DEPC 0.5ml, 振荡, 37°C 过夜, 高压灭菌。
3. 5×甲醛凝胶电泳缓冲液: MOPS [3-(N-玛琳代)丙磺酸] 10.3g 加 50mM NaAc 400ml, 用 2N NaOH 调 pH 至 7.0, 再加入 0.5M EDTA 10ml, 加 DEPC H<sub>2</sub>O 至 500ml。无菌抽滤, 室温避光保存。
4. 20×SSC: NaCl 175.3g、柠檬酸三钠 88.2g, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 800ml, 用 2N NaOH 调 pH 至 7.0, 再用 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1000ml。DEPC 处理、高压灭菌。
5. 6×SSC: 20×SSC 300ml 加 ddH<sub>2</sub>O 至 1000ml。DEPC 处理, 高压灭菌。

6. 50×Denhardt: 聚蔗糖 0.5g、聚乙烯吡咯烷酮 0.5g、牛血清白蛋白(BSA)0.5g 加 dd H<sub>2</sub>O 至 50ml, 无菌抽滤、分装。
7. 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 35.81g, 加 dd H<sub>2</sub>O 至 100ml。
8. 1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 15.6g, 加 dd H<sub>2</sub>O 至 100ml。
9. 0.1M 磷酸钠缓冲液(pH 6.6): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 35.2ml 加 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 64.8ml。
10. STE 缓冲液: 1M Tris-HCl(pH 8.0) 2.5ml, 0.5M EDTA, 0.5ml, 5M NaCl 5ml, 加 dd H<sub>2</sub>O 至 250ml。
11. 预杂交液: 20×SSC 5ml, 甲酰胺 10ml, 50×Denhardt 4ml, 1M 磷酸钠缓冲液 0.2ml (pH6.6), 10%SDS 1ml, 总体积 20ml。临用前加入变性鲑鱼精 DNA (10mg/ml), 使终浓度为 4μl/ml。
12. DEPC H<sub>2</sub>O: 1000ml dd H<sub>2</sub>O 中加入 DEPC 1ml, 充分振荡, 37°C 过夜, 高压灭菌。

## 二、操作步骤

1. 总 RNA 提取: 见相关内容。
2. 变性胶的制备: 取琼脂糖 0.2g, 加入 DEPC H<sub>2</sub>O 12.4ml, 加热融化, 于保温状态下加入 5×甲醛凝胶电泳缓冲液 4.0ml、37%甲醛 3.6ml, 混匀、制胶。待胶凝固后, 置 1×甲醛凝胶电泳缓冲液中预电泳 5min。
3. 样品制备: 取总 RNA 4.5μl (约 20-30μg), 加入 5×甲醛凝胶电泳缓冲液 4.0μl、37%甲醛 3.6μl、甲酰胺 10μl, 65°C 温育 15min、冰浴 5min。加入 EB (1μg/μl) 1μl、上样缓冲液 2μl。
4. 电泳: 上样, 50V 电泳 (电泳时间约 2hr 左右)。电泳结束后将胶块置紫外灯下, 观察 RNA 的完整性, 记录 18S、28S 条带的位置 (离加样孔的距离)。
5. 将 RNA 从变性胶转移到硝酸纤维素膜或尼龙膜:
  - (1) 按胶块大小剪取膜一张, 用 DEPC 水中浸湿后, 置于 20×SSC 中浸泡 1hr。剪去膜一角。
  - (2) 将胶块切去一角, 并在 20×SSC 浸泡 15min×2 次。
  - (3) 用长和宽均大于凝胶的一块有机玻璃板作为平台, 将其放入大的干烤皿上, 上面放一张 Whatman 3MM 滤纸, 倒入 20×SSC 使液面略低于平台表面, 当平台上方的 3MM 滤纸湿透后, 用玻棒赶出所有气泡。
  - (4) 将凝胶翻转后置于平台上湿润的 3MM 滤纸中央, 3MM 滤纸和凝胶之间不能滞留气泡。
  - (5) 用 Parafilm 膜围绕凝胶四周, 以此作为屏障, 阻止液体自液池直接流至胶上方的纸巾。
  - (6) 在凝胶上方放置预先已浸湿的尼龙膜, 排除膜与凝胶之间的气泡。
  - (7) 将二张已湿润的、与凝胶大小相同的 3MM 滤纸置于膜的上方, 排除滤纸与滤膜之间的气泡。
  - (8) 将一叠 (5-8cm 厚) 略小于 3MM 滤纸的纸巾置于 3MM 滤纸的上方, 并在纸巾上方放一块玻璃, 然后用一个重约 500 克的重物压在玻璃板上。其目的是建立液体自液池经凝胶向膜上行流路, 以洗脱凝胶中的 RNA 并使其聚集在膜上。
6. 使上述 RNA 转移持续进行 15hr 左右。在转膜过程中, 当纸巾浸湿后, 应更换新的纸巾。
7. 转移结束后, 揭去凝胶上方的纸巾和 3MM 滤纸。将膜在 6×SSC 中浸泡 5 min, 以去除膜上残留的凝胶。
8. 将凝胶置紫外灯下, 观察胶块上有无残留的 RNA。
9. 膜置 80°C, 真空干烤 1-2hr。烤干后的膜用塑料袋密封, 4°C 保存备用。
10. 探针标记 (Prime-a-Gene Labeling System, Promega 公司):
  - (1) 取模板 DNA 25ng 于 0.5ml 离心管中, 95-100°C 变性 5min, 冰浴 5min。
  - (2) dNTPmix 的制备: 取 dGTP 1μl、dATP 1μl、dTTP 1μl 混匀。
  - (3) 将下列反应成份混合, 加入上述微量离心管中:
 

dNTPmix	2.0μl
BSA(10mg/ml)	2.0μl
5×buffer	10.0μl
Klenow 酶(5u/μl)	1.0μl
α- <sup>32</sup> P-dCTP	5.0μl
- 加入适量 dd H<sub>2</sub>O 使反应总体积达 50μl, 轻轻混匀。室温下反应 1hr。
11. 预杂交: 将膜的反面紧贴杂交瓶, 加入预杂交液 5ml, 42°C 预杂交 3hr。
12. 杂交: 将变性的探针 (95-100°C 变性 5min, 冰浴 5min) 加入到预杂交液中, 42°C 杂交 16hr。
13. 洗膜:

- (1)倾去杂交液。
- (2)2×SSC/0.1%SDS 室温洗 15min。
- (3)0.2×SSC/0.1%SDS, 55°C洗 15min×2 次。

14.压片：将膜用 dd H<sub>2</sub>O 漂洗片刻，用滤纸吸去膜上水份。用薄型塑料纸将膜包好，置于暗盒中，在暗室中压上 X 光片。暗盒置-70°C放射自显影 3~7 天左右。

### 三、注意事项

1. 操作时必须仔细、小心，严格按同位素操作规程进行，以防止同位素污染。
2. 必要时，可采用 Sephadex G-50 柱层析法纯化标记的探针（见本节附录），以去除标记反应中未结合的（游离的）核苷酸。
3. 膜的重复使用：结合了待测 RNA 的膜与探针杂交后，可经碱或热变性方法将探针洗脱，膜可反复使用与其它探针杂交。方法如下：杂交的膜（注意：杂交过的膜在保存过程中不能干燥，否则探针将会与膜形成不可逆的结合）置 100°C 0.5% SDS 中煮沸 3min，自然冷却至室温后，将膜放入双蒸水中漂洗 2-3 遍。取出膜，用滤纸吸去膜表面的水份。将膜直接进行另一种探针的杂交或用保鲜膜包好，室温下真空保存。

## 7.4. Northern 杂交（二）

### 经乙二醛和二甲基亚砷变性处理后进行的 RNA 电泳

这一方法原于 McMaster 和 Carmichael(1977)。含有乙二醛-DMSO 的凝胶比含有甲醛的凝胶更易于进行电泳，因为前者泳动速率较慢而且需将电泳液时行循环以避免电泳过程中形成过高的 H<sup>+</sup> 梯度。尽管上述两种凝胶具有近乎相等的分辨率（Miller, 1987），但用含胍乙二醛-DMSO 的凝胶对 RNA 进行分级离，通常 Northern 杂交所显示的 RNA 条带更为锐利。

1) 在灭菌的微理离心管内，混匀下列液体：

6mol/L 乙二醛 5.4μl

DMSO 16.0μl

0.1mol/L 磷酸(pH7.0) 3.0μl

RNA（多达 10μl）5.4μl 市售乙二醛通常为 40%溶液（6mol/L）。由于接触空气的后乙二醛易于氧化，所以使用前需通过混合床树脂（Bio-Rad AG 501-X8 对乙二醛溶液进行去离子处理，直至溶液 pH 值大于 5.0 为止，然后可分装在小份，用盖紧的小管贮存于-20°C。每小份乙二醛溶液只用 1 次，剩余液体应予丢弃。0.1mol/L 磷酸钠（pH7.0）的配法如下：将 3.9ml 1mol/L 磷酸二氢钠、6.1ml 1mol/L 磷酸氢二钠和 90ml 水混合，用 DEPC 处理上述溶液后高压灭菌。每一泳道至多可分析 10μg RNA，通常用 10-20 μg 细胞总 RNA 进行 Northern 杂交，可以检测高丰度 mRNA（占 mRNA 总量的 0.1%以上）如等测 RNA 含量极微，每个泳道应加 0.5-3.0μg poly(A)+RNA。

2) 将微量离心管盖严，将 RNA 溶液置于 0°C 温育 50°C 温育 60 分钟后，用冰水浴冷却样品，离心 5 秒钟，使管内所有液体沉降于管底。

3) 于 50°C 温育 RNA 溶液的同时，灌制琼脂糖水平凝胶，用 1.4% 琼脂糖分析 1kb 以下的 RNA 样品，而用 1% 琼脂糖分析 1kb 以上的 RNA 样品。用 0mmol/L 磷酸钠（pH7.0）后，降温至 70 °C，加入碘乙酸钠固体至终浓度为 10mmol/L（使 RNA 酶失活），再降温至 50°C，制胶，加入 RNA 样品前至少放置 30 分钟使其凝固。用于 RNA 电泳的电泳槽需用去污剂溶液洗净，用水冲洗，用乙醇干燥，然后灌满 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，于室温放置 10 分钟后，用经 DEPC 处理的水彻底冲洗电泳槽。因乙二醛可与溴化乙锭发生化学反应，所以制胶和电泳过程中应避免作用溴化乙锭。

4) 将 RNA 样品冷却至 0°C，加入 4μl 灭菌的并经用 DEPC 处理的胍乙二醛-DMSO 凝胶中样缓冲液，随后立即将上述样品加至凝胶加样孔。用已知大小的乙醛酰 RNA 作为分子量标准参照物，如用 18S 和 28S rRNA 或 9S 兔 β-珠蛋白 mRNA，上述 RNA 长度分别为 6322、2366 和 710 个碱基。也可以从 BRL 购置已知大小的 RNA 混合物作为分子量标准参照物。通常分子量标准参照物的泳道位于凝胶边缘，便于电泳后将其切去进行溴化乙锭染色，可能的话应在分子量标准参照物以及欲转移至硝酸纤维素滤膜或尼龙膜的样品之间留空一个泳道。

乙二醛-DMSO 凝胶加样缓冲液

50%甘油

10mmol/L 磷酸钠 ( pH7.0 )

0.25% 溴酚蓝

0.25% 二甲苯青 FF

5) 将凝胶浸入 10mmol/L 磷酸钠电泳液中, 以 3-4V/cm 电压降进行电泳, 同时按图 7.1 对磷酸钠溶液时行持续再循环, 使溶液 pH 值维持在可被接受的限度内 ( pH>8.0 时乙二醛将从 PNA 分子上解离)。另一方法为电泳时每 30 分钟换一次磷酸钠缓冲液。

6) 电泳结束后 ( 溴酚蓝迁移出区 8cm ), 切下分子量标准参照物的凝胶条, 浸入溴化乙锭溶液 ( 0.5 $\mu$ g/ml, 用 0.1mol/L 乙酸铵配制 ) 中染色 30-45 分钟。在凝胶放置一透明纸, 在紫外灯下照片上每个 RNA 条带至加样孔的距离, 以 RPN 片段大小的 lg 对数值对 RNA 条带的迁移距离作图, 用所得曲线计算从凝胶移到固相支持体后通过杂交检出的 RNA 分子的大小。

7) RNA 从凝胶转移至硝酸纤维素滤膜, 将 RNA 转移至尼龙膜。

#### 将变性 RNA 转移至硝酸纤维素滤膜

电泳完毕后, 可立即将乙醛酞 RNA 自琼脂糖凝胶转移至硝酸纤维素滤膜, 有以下几种转移方法: 毛细管洗脱法、真空转移法和电印迹法。毛细管洗脱法如下所述, 真空转移法和电印迹法则按有关仪器生产厂家产品说明书进行。尽管有人认为在转移前对琼脂糖凝胶进行预处理实属不必 ( Thomas, 1980 ) 甚至有害 ( Thomas, 1983 ),

但我们认为含甲醛的凝胶必须用经 DEPC 处理的水淋洗数次, 除去甲醛。如果琼脂糖中浓度大于 1% 或凝胶厚度大于 0.5cm 或待分析的 RNA 大于 2.5kb, 需用 0.05mol/L 氢氧化钠浸泡凝胶 20 分钟。然后在凝胶上放置硝酸纤维素滤膜或尼龙膜, RNA 随向上迁移的缓冲液转移至固相支持体 ( 硝酸纤维素滤膜或尼龙膜 ) 上。

1) 将凝胶移至一个玻璃皿内, 用锋利刀片修凝胶的无用部分, 在凝胶左上角 ( 加样孔一端为上 ) 切去一角, 以作为下列操作过程中凝胶方位的标记。

2) 用长和宽均大于凝胶的一块 Plexiglas 有机玻璃或一叠玻璃板作为平台, 将其放入大干烤皿内, 上面放一张 Whatman 3MM 滤纸, 倒入 20xSSC 使液面略低于平台表面, 当平上方的 3MM 滤纸温透后, 用玻棒赶出所有的气泡。

3) 用一把新的解剖刀或切纸刀裁一张硝酸纤维素滤膜 ( Schleicher & Schuell BA85 或与之相当的产品 )。滤膜的长度和宽度应分别比凝胶大 1mm, 接触滤膜时须戴手套或用平头镊子 ( 例如 Millipore 镊子 ), 用有油腻的手接触过的硝酸纤维素滤膜不易浸湿。

4) 将硝酸纤维素滤膜浮在去离子水表面, 直至滤膜从下向上湿透为止, 随后用 20xSSC 浸泡滤膜至少 5 分钟, 用干净的解剖刀片切去滤膜一角, 使其与凝胶的切角相对应。不同批号的硝酸纤维膜, 其浸湿速率相差悬殊。如滤膜池浮在水面上几分钟后仍未湿透, 应另换一张新滤膜, 因为未均匀浸湿的滤膜进行 RNA 转移是靠不住的。这种滤膜也不必丢弃, 可将其夹在用 2xSSC 浸湿的 3MM 滤纸中间, 高压 5 分钟。通常上述处理足以使硝酸纤维素滤膜湿透。高压处理的滤膜应夹在经过高压处理并用 2xSSC 浸湿的 3MM 滤纸中间, 装入塑料袋, 密封后于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

5) 将凝胶翻转后置于平台上湿润的 3MM 滤纸中央, 3MM 滤纸和凝胶这间不能滞留气泡。

6) 用 Saran 包装膜或 Parafilm 膜围绕凝胶周边, 但不是覆盖凝胶, 以此作为屏障, 阻止液体自液池直接流至凝胶上方的纸巾层中。并非堆放得十分整齐的纸巾, 易于从凝胶的边缘垂下并与平台接触, 这种液流的短路是导致凝胶中的 RNA 的转移效率下降的主要原因。

7) 在凝胶上方放置湿润的硝酸纤维素滤膜, 并使两者的切角相重叠。滤膜的一条边缘应刚好超过凝胶上部加样孔一线的边缘。滤膜置于凝胶表面适当位置后, 就不应轻易移动, 滤膜与凝胶之间不应留有气泡。

8) 用 2xSSC 溶液浸湿两张与凝胶同样大小的 3MM 滤纸, 湿润的放置在湿润的硝酸纤维滤膜上方。用玻璃棒赶出其间滞留的气泡。

9) 切一叠 ( 5-8cm 高 ) 略小于 3MM 滤纸的纸巾, 将其放置在 3MM 滤纸的上方。并在纸巾上方放一块越境玻璃板, 然后用 500g 的重物压实。其目的是建立液体自液池经凝胶向硝酸纤维素滤膜的上行流路, 以洗脱凝胶中的 RNA 并使其聚集在硝酸纤维素滤膜上。

10) 使上述 RNA 转移持续进行 6-18 小时, 每当纸巾浸湿后, 应换新的纸巾。

11) 转移结束后, 揭去凝胶上方的纸巾和 3MM 滤纸, 翻转凝胶和硝酸纤维素滤膜, 以凝胶的一面在上, 置于一张干的 3MM 滤约纸上, 用一支极软铅笔或圆珠笔, 在滤膜上标记凝胶加样孔的位置。

12) 从硝酸纤维素滤膜上剥离凝胶弃之。以 6x SSC 溶液于室温浸泡滤膜 5 分钟, 这一步可以除去粘着在滤膜上的琼脂糖碎片。从 6xSSC 溶液中取出滤膜, 将滤膜上的溶液滴尽后平放在一张纸巾上。于室温晾干 30 分钟以上。为估计 RNA 的转移效率, 可将胶置于溴化乙锭溶液 (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 以 0.1mol/L 乙酸铵配制) 中染色 45 分钟, 于紫外灯下观察。

13) 将晾干的滤膜放在两张 3MM 滤纸中间, 用真空炉于 80°C 干烤 0.5-2 小时。如干烤时间过长, 滤膜极易脆裂并可能发黄。如果滤膜并不立即用于杂交实验, 可用铝箔宽松地包裹起来, 在真空下贮存于室温。

14) 仅适用于滤膜上含有乙醛酞 PNA 的情况: 杂交前需用 20mmol/L Tris.Cl(pH8.0) 于 65°C 洗膜, 除去 RNA 上的乙二醛分子。

### (三) 转移至硝酸纤维素滤膜前后进行的 RNA 染色

当 RNA 自琼糖凝胶转移至硝酸纤维素滤膜之前, 溴化乙锭的染色时间一般不宜过长, 这是因为被染料饱和的核酸分子, 其转移效率有所降低。然而, 用溴化乙锭作短暂染色, 既不至于对核酸转移过程产生可以察觉的掬作用, 又独具同时检测凝胶和滤膜上的 RNA 的优点。

#### 1. 方法 I

1) 电泳结束后, 含乙二醛-DMSO 的凝胶应浸入含溴化乙锭 (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的 10mmol/L 磷酸钠 (pH7.0) 溶液。甲醛凝胶需用无 RNA 酶的水淋洗, 用 20xSSC 溶液浸泡, 随后用含溴化乙锭 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的 20x SSC 溶液染色。

2) 于室温染色 5-10 分钟, 在紫外灯下观察, 照像。

3) 按前所述方法, 将凝胶中的 RNA 转移至硝酸纤维素滤膜, 转移后能常在学光下也可看出已染色的 RNA 条带。这种方法仅适用于每一泳道均含有相当大量 (如 5  $\mu\text{g}$  以上) 的 RNA 的情况。

#### 2. 方法 II

硝酸纤维素滤膜上的 RNA 也可以用下述方法染色: 从干烤后的硝酸纤维素滤膜上剪下所需的条带进行染色, 也可以用经过杂交并经 X 光片曝光后的整张滤膜进行染色 (A. Efstratiadis, 未了表材料)。

1) 将干燥的滤膜浸入 5% 冰乙酸中, 于室温浸泡 15 分钟。

2) 再将滤膜转移至 0.5mol/L 乙酸钠 (pH5.2)、0.04% 亚甲蓝溶液中, 于室温浸泡 5-10 分钟。

3) 用水淋洗滤膜 5-10 分钟后, 可见 RNA 分子量标准参照物带型锐利而 poly(A)+mRNA 为一模糊带型, 由许多长度范围从 500 碱基以下至 5 kb 以上的各种 mRNA 共同组成, mRNA 的平均长度约为 2kb。

### 杂交和放射自显影

固定于滤膜上的 RNA 的预杂交、杂交及淋洗等条件, 与 DNA 杂交的相应条件基本相同。现简述如下 1) 用下列两种溶液之一进行预杂交, 时间 1-2 小时。若于 42°C 进行, 应采用。

50% 甲酰胺

5xSSPE

2xDenhardt 试剂

0.1%SDS

若于 68°C 进行, 应采用:

6xSSC

2xDenhardt 试剂

0.1%SDS

2) 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 $\mu\text{g}$ , 其放射性比活度应大于 2x10<sup>8</sup> 计数/(分· $\mu\text{g}$ ) 在适宜的温度条件下继续温育 16-24 小时。切记 RNA 只与双链 DNA 中一条单链互补, 因此如用单链探针, 则必须是能与 RNA 互补的一条单链。

3) 用 1xSSC、0.1%SDS 于室温洗膜 20 分钟, 随后用 0.2xSSC、0.1%SDS 于 68°C 洗膜 3 次每次 20 分钟。

4) 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 -17°C 曝光 24-48 小时。

## 7.5. Western 杂交 (一)

Western 免疫印迹 (Western Blot) 是将蛋白质转移到膜上, 然后利用抗体进行检测。对已知表达蛋白, 可用相应抗体作为一抗进行检测, 对新基因的表达产物, 可通过融合部分的抗体检测。

## 一、原理

与 Southern 或 Northern 杂交方法类似,但 Western Blot 采用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳,被检测物是蛋白质,“探针”是抗体,“显色”用标记的二抗。经过 PAGE 分离的蛋白质样品,转移到固相载体(例如硝酸纤维素薄膜)上,固相载体以非共价键形式吸附蛋白质,且能保持电泳分离的多肽类型及其生物学活性不变。以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原,与对应的抗体起免疫反应,再与酶或同位素标记的第二抗体起反应,经过底物显色或放射自显影以检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白成分。该技术也广泛应用于检测蛋白水平的表达。

## 二、试剂准备

- 1、SDS-PAGE 试剂:见电泳实验。
- 2、匀浆缓冲液:1.0M Tris-HCl(pH 6.8)1.0ml; 10%SDS 6.0ml;  $\beta$ -巯基乙醇 0.2ml; ddH<sub>2</sub>O 2.8ml。
- 3、转膜缓冲液:甘氨酸 2.9g; Tris 5.8g; SDS 0.37g; 甲醇 200ml; 加 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1000ml。
- 4、0.01M PBS(pH7.4): NaCl 8.0g; KCl 0.2g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g; 加 ddH<sub>2</sub>O 至 1000ml。
- 5、膜染色液:考马斯亮兰 0.2g; 甲醇 80ml; 乙酸 2ml; ddH<sub>2</sub>O 118 ml。包被液(5%脱脂奶粉,现配): 脱脂奶粉 1.0g 溶于 20ml 的 0.01M PBS 中。
- 6、显色液:DAB 6.0mg; 0.01M PBS 10.0ml; 硫酸镍胺 0.1ml; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 $\mu$ l。

## 三、操作步骤

(一) 蛋白质样品获得:细菌诱导表达后,可通过电泳上样缓冲液直接裂解细胞,真核细胞加匀浆缓冲液,机械或超声波室温匀浆 0.5-1min。然后 4 $^{\circ}$ C, 13, 000g 离心 15min。取上清液作为样品。

(二) 电泳:制备电泳凝胶,进行 SDS-PAGE。

(三) 转移:(半干式转移)

- 1、电泳结束后将胶条割至合适大小,用转膜缓冲液平衡,5min $\times$ 3 次。
- 2、膜处理:预先裁好与胶条同样大小的滤纸和 NC 膜,浸入转膜缓冲液中 10min。
- 3、转膜:转膜装置从下至上依次按阳极碳板、24 层滤纸、NC 膜、凝胶、24 层滤纸、阴极碳板的顺序放好,滤纸、凝胶、NC 膜精确对齐,每一步去除气泡,上压 500g 重物,将碳板上多余的液体吸干。接通电源,恒流 1mA/cm<sup>2</sup>,转移 1.5hr。转移结束后,断开电源将膜取出,割取待测膜条做免疫印迹。将有蛋白标准的条带染色,放入膜染色液中 50s 后,在 50%甲醇中多次脱色,至背景清晰,然后用双蒸水洗,风干夹于两层滤纸中保存,留与显色结果作对比。

(四) 免疫反应:

- 1、用 0.01M PBS 洗膜,5min  $\times$ 3 次。
- 2、加入包被液,平稳摇动,室温 2hr。
- 3、弃包被液,用 0.01M PBS 洗膜,5min $\times$ 3 次。
- 4、加入一抗(按合适稀释比例用 0.01M PBS 稀释,液体必须覆盖膜的全部),4 $^{\circ}$ C 放置 12hr 以上。阴性对照,以 1%BSA 取代一抗,其余步骤与实验组相同。
- 5、弃一抗和 1%BSA,用 0.01M PBS 分别洗膜,5min $\times$ 4 次。
- 6、加入辣根过氧化物酶偶联的二抗(按合适稀释比例用 0.01M PBS 稀释),平稳摇动,室温 2hr。
- 7、弃二抗,用 0.01M PBS 洗膜,5min $\times$ 4 次。
- 8、加入显色液,避光显色至出现条带时放入双蒸水中终止反应。

## 四、注意事项

- 1、一抗、二抗的稀释度、作用时间和温度对不同的蛋白要经过预实验确定最佳条件。
- 2、显色液必须新鲜配置使用,最后加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。
- 3、DAB 有致癌的潜在可能,操作时要小心仔细。

## 7.6. Western 杂交(二)

主要包括以下 4 个基本步骤:

- 样品制备
- 电泳分离
- 蛋白的膜转移

- 免疫杂交与显色—蛋白检测

#### 溶液和试剂

- 1X 磷酸盐缓冲液(PBS)
- Modified RIPA buffer  
Tris-HCl: 50 mM, pH 7.4 ; NP-40: 1% ;Na-deoxycholate: 0.25% ;NaCl: 150 mM ;EDTA: 1 mM ;PMSF: 1 mM ;Aprotinin, leupeptin, pepstatin: 1 microgram/ml each ;Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>: 1 mM ;NaF: 1 mM
- 1X SDS 样品缓冲液  
62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8 于 25°C), 2% w/v SDS, 10%甘油,50 mM DTT, 0.01% w/v溴酚蓝
- 转移缓冲液  
25 mM Tris base, 0.2 M 甘氨酸, 20%甲醇 (pH 8.3)
- 10X Tris缓冲盐 (TBS)  
准备1L 10X TBS: 24.2 g Tris base, 80 g NaCl;用1N HCl调pH为 7.6
- 脱脂奶粉或BSA
- 甲醇
- TBS/T缓冲液  
1X TBS, 0.1% Tween-20
- 封闭缓冲液 ( TBS/T )  
1X TBS, 0.1% Tween-20加5% w/v脱脂奶粉或BSA
- 一抗的稀释  
1X TBS, 0.1% Tween-20 加 5% BSA (多抗)或 5%脱脂奶粉(单抗)  
**Note:** 一般来说, BSA被推荐用于多克隆抗体, 脱脂奶粉用于单克隆抗体, 这样可得到较高的信噪比。抗体的稀释度参考抗体说明书或根据实验确定。
- 预染的蛋白质Marker, 可用于监测转膜的效率

#### 样品制备

原始样品可为细胞、组织、培养上清、免疫沉淀或亲和纯化的蛋白, 以下为定性检测目的蛋白时细胞样品的处理方法, 其余的样品制备方法参阅相关文献。

1. 培养细胞或药物处理。
2. 弃培养基, 用1X PBS漂洗细胞2次, 去尽残留培养基。
3. 加入1X SDS样品缓冲液(6-well plate, 100  $\mu$ l /w或 75 cm<sup>2</sup> plate, 500-1000  $\mu$ l/瓶), 刮落细胞, 转移到Ep管。**注意:** 冰上操作。
4. 超声 10~15秒剪切DNA以减低样品粘性。
5. 煮沸样品5 minutes。
6. 离心12000g, 5 min, 取上清。
7. 电泳分离: 上样15 $\mu$ l~20  $\mu$ l 至 SDS-PAGE 胶 (10 cm x 10 cm)电泳。

如要定量检测某蛋白的表达水平, 应用RIPA裂解液(1 ml per 10<sup>7</sup> cells/100 mm dish/150 cm<sup>2</sup> flask)裂解细胞, 收集裂解液至离心管中, 在振荡器上混匀4~15min, 14000g离心15min (4°C), 弃沉淀, 用Bradford法或其它蛋白质测定方法测定上清中蛋白浓度以调整上样体积和上样量, 进行Western杂交时还需设置内或外参照, 通常用beta-actin。

**注意:** 一般上样20~30  $\mu$ g已足够, 如待检蛋白为低丰度蛋白, 可加大上样量至100 $\mu$ g, 但电泳条带易拖尾, 可制备亚细胞组份或采用更敏感的检测方法。

#### 电泳分离 (参照SDS-PAGE电泳方法)

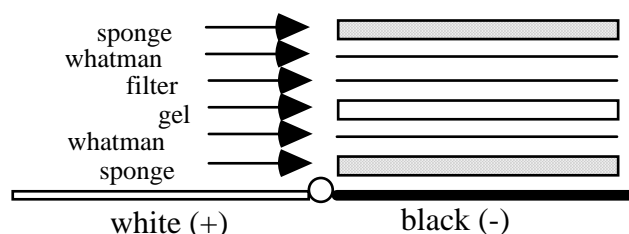
#### 转膜

杂交膜的选择是决定 Western blot 成败的重要环节。应根据杂交方案、被转移蛋白的特性以及分子大小等因素, 选择合适材质、孔径和规格的杂交膜。用于 Western blot 的膜主要有两种: 硝酸纤维素膜(NC) 和 PVDF 膜。NC膜是蛋白印迹实验的标准固相支持物, 在低离子转移缓冲液的环境下, 大多数带负电荷的蛋白质会与膜发生疏水作用而高亲和力的结合在一起, 但在非离子型的去污剂作用下, 结合的蛋白还可以被洗脱下来。根据被转移的蛋白分

子量大小,选择不同孔径的 NC 膜。因为随着膜孔径的不断减小,膜对低分子量蛋白的结合就越牢固。通常用 0.45 $\mu\text{m}$  和 0.2 $\mu\text{m}$  两种规格的 NC 膜。大于 20kD 的蛋白可用 0.45 $\mu\text{m}$  的膜,小于 20kD 的蛋白就要用 0.2 $\mu\text{m}$  的膜了,如用 0.45 $\mu\text{m}$  的膜就会发生“Blowthrough”的现象。PVDF 膜灵敏度、分辨率和蛋白亲和力比常规的膜要高,非常适合于低分子量蛋白的检测。但 PVDF 膜在使用之前必需用纯甲醇浸泡饱和 1-5 秒钟。

蛋白质常用的转移方法主要有两种:槽式湿转和半干转移。前者操作容易,转移效率高;而后者适用于大胶的蛋白转移,所用缓冲液少。以下为槽式湿转的操作步骤。

1. 将胶浸于转移缓冲液中平衡 10min。  
**注意:**如检测小分子蛋白,可省略此步,因小分子蛋白容易扩散出胶。
2. 依据胶的大小剪取膜和滤纸 6 片,放入转移缓冲液中平衡 10min。如用 PVDF 膜需用纯甲醇浸泡饱和 3-5 秒钟。
3. 装配转移三明治:海绵→3 层滤纸→胶→膜→3 层滤纸→海绵,每层放好后,用试管赶去气泡。**切记:胶放于负极面(黑色面)。**
4. 将转移槽置于冰浴中,放入三明治(黑色面对黑色面),加转移缓冲液,插上电极,100V,1h(电流约为 0.3A)。**注意:应再次检查三明治和电极是否装配正确,电源是否接通。**
5. 转膜结束后,切断电源,取出杂交膜



### 免疫杂交与显色

1. 用 25 ml TBS 洗膜 5min, 室温, 摇动。
2. 置膜于 25 ml 封闭缓冲液中 1h, 室温, 摇动。
3. 15ml TBS/T 洗 3 次 (5 min/T)。
4. 加入合适稀释度的一抗, 室温孵育 1-2h 或 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜, 缓慢摇动。
5. 15 ml TBS/T 洗 3 次 (5 min/T)。
6. 加入合适稀释度的碱性磷酸酶 (AP) 或辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗, 室温孵育 1h, 缓慢摇动。
7. 15 ml TBS/T 洗 3 次 (5 min/T)。
8. 15 ml TBS 洗 1 次。
9. 蛋白检测(显色法或发光法, 按相应试剂说明操作)。

### 注意事项:

1. 操作中戴手套, 不要用手触摸。
2. PVDF 膜在甲醇中浸泡时间不要超过 5 秒。
3. 如检测小于 20kD 的蛋白应用 0.2 $\mu\text{m}$  的膜, 并可省略转移时的平衡步骤。
4. 某些抗原和抗体可被 Tween-20 洗脱, 此时可用 1.0% BSA 代替 Tween-20。
5. 关于封闭剂的选择: 5% 脱脂奶/TBS or PBS: 能和某些抗原相互作用, 掩盖抗体结合能力; 0.3~3% BSA in PBS: 低的内源性交叉反应性。
6. 如用 0.1% Tween 20、0.02%  $\text{NaN}_3$  in PBS or TBS 作封闭剂和抗体稀释液, 抗体检测后可进行蛋白染色。
7. 如要同时检测大分子量和低分子量蛋白, 最好用梯度胶分离蛋白。

### PVDF 膜上蛋白的可逆染色

Western 杂交时, 为确认蛋白是否转至 PVDF 膜上, 可用下列方法对膜上蛋白进行可逆性染色。

#### 1. 氨基黑染色

染液: 0.5% Amido Black (w/v), 25% isopropanol (v/v) and 10% acetic acid.

染色: 将 PVDF 膜置于染液中染色数分钟,  $\text{ddH}_2\text{O}$  脱色。

#### 2. 考马氏亮蓝染色

染液：0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v) and 50% methanol (v/v)

脱色液：40% methanol (v/v) with 10% acetic acid (v/v)

染色：将 PVDF 膜置于染液中染色 15 min.，脱色液脱色。

### 3. 丽春红染色 Ponceau S

染液：0.2% w/v Ponceau S in TCA (3% v/v)

染色：将 PVDF 膜置于染液中染色 5min

脱色：ddH<sub>2</sub>O 脱色

## 三、银染

PAGE 胶上蛋白质的银染方法有数百种，其原理相似，具体步骤各不相同。银染为蛋白质的非特异性染色，呈“爆炸性”反应模式，用于蛋白定量时准确性差，但其敏感度高、简便易行，仍被广泛应用。下面列举的这三种方法为常用的双向电泳凝胶染色法，可与质谱兼容。其中方法 1 敏感性最高，方法 3 背景最低、对比度好。

### 1. Blam silver staining protocol (Modified)

程序	溶液	时间
固定	40%ETOH 10%HAC	1 小时
漂洗	30%ETOH	2×20min
致敏	0.02%Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1min
漂洗	H <sub>2</sub> O	3×20Secs
染色	0.1%AgO <sub>3</sub> (预冷)	4°C, 20mins
漂洗	H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O(更换盘子)	3×20Secs 1min
显色	3%Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0.05%甲醛	
漂洗	H <sub>2</sub> O	20Secs
中止	5%Hac	
漂洗	H <sub>2</sub> O	3×10min
贮存	1%Hac,4°C	

### 2. EMBL Silver Staining Protocol

程序	溶液	时间
固定	50%MeOH 5%HAc	20min
漂洗	H <sub>2</sub> O	2hr 或过夜
致敏	0.02%Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1min
漂洗	H <sub>2</sub> O	2×1min
染色	0.1AgNO <sub>3</sub> (预冷)	20min
漂洗	H <sub>2</sub> O	2×1min
显色	2%Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0.04%甲醛	
中止	5% HAc	
贮存	1% HAc, 4°C	

### 3. Vorum Silver Staining Protocol

程序	溶液	时间
固定	50%MeOH 12%HAc 0.05%甲醛	2hr 或过夜

漂洗	35%EtOH	3×20mins
致敏	0.02%Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2min
漂洗	H <sub>2</sub> O	3×5mins
染色	0.2AgNO <sub>3</sub> 0.076%甲醛	20min
漂洗	H <sub>2</sub> O	3×5mins
显色	6% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0.05%甲醛 0.0004% Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5mins
中止	50%MeOH 12%HAc	
贮存	1%HAc, 4°C	

**注意事项：**

1. 应严格按照操作步骤进行；
2. 显色前最好更换新染色盘；
3. 显色时变为黄色或棕色后立即弃去，更换新鲜显色液，一般来说染一块胶应配制 500ml 染液。更换 2-3 次；
4. 市售甲醛的浓度为 37%；

三种方法均与质谱兼容，Blum 法敏感性高，但背景呈淡黄色，EMBL 法次之但背景较低，染色点较黑。Vorum 相对不敏感，但背景清晰，信噪比高。

### 7.7. 抗体制备技术的选择

30 年以来 杂交瘤方法已经成为实验室制备单克隆抗体的主要技术 现在仍然在免疫组化( immunohistochemistry ) 和各种不同的细胞生物学技术中发挥着重大的作用。但是在过去 10 年里，基因工程重组技术带来了组合库和抗体工程等技术，尤其在高端抗体应用领域，包括治疗性抗体药物的开发等。

重组技术例如噬菌体展示等技术需要更高的技巧，假如你的实验对象是一些高毒性和无免疫性抗原，例如一些肿瘤和病毒自身的抗原，抗体重组技术可以帮你解决这些。据 Louis Weiner ( Fox Chase 癌症中心研究员 ) 称，“多年来科学家们致力于通过围绕改变物种和设计新型的杂交瘤技术来解决问题，但对于一些保守的抗原来说，仍然没有能按照预期的效果来制备它们的单克隆抗体。”

如果你的实验需要利用到抗体，无论是否将重组技术带进实验室或者利用它们来制备抗体，下面这些专家提供的需要考虑的地方值得大家留意一下。

#### 杂交瘤技术

杂交瘤技术起源于 1975 年，由 Köhler 和 Milstein 发明，是许多科学家们热衷的一门技术，它的操作流程明了，许多研究机构也建立杂交瘤核心的实验室来一次性处理多组样品。Thomas Jefferson 大学的 Manser 实验室就是使用的重组抗体杂交瘤技术。“我们以前大部分工作都是基于结构基础上的，现在我们有一部分人在做一些定向和随机的基因突变。但是我们的工作变得更以细胞为基础，因此我们将重组技术放弃了。”

选择正确的技术取决于你所需的抗体的用途。假如你需要的高产量的抗体，杂交瘤技术是正确的选择。但是它的问题在于长时间的制备过程和不完全的抗原表位的识别。

#### 优点：

流程直截了当（利用抗原注射小鼠，提取 B 细胞，克隆）  
高产量

高特异性

缺点：

制备时间长（5-15 个月）

不完全的抗原表位识别

不是所有的抗原都可以解决

不能制备无免疫性和高毒性的抗原的抗体

功能筛选只能在克隆筛选和培养之后

抗体需要人源化

### 重组抗体技术

实验室需要结构性抗体的特性或者高度的目标靶向亲和力，尤其在药物开发中，起初都需要使用重组抗体技术。一些研究者包括 Scripps 研究所的科学家豆子利用重组抗体来研究病毒如（HIV）是怎样整合进免疫系统的。还有一些研究人员，利用重组抗体来显示特定蛋白的折叠等。

是否将重组抗体技术引入你的实验室取决于最终的抗体使用目的。如果你想探索抗原的每一个抗原表位的话，你可以选用该技术来获得多样性的抗体。

优点：

制备时间段（10 天-2 个月）

可以解决困难的抗原

抗原表位多样性较多

功能筛选可以与抗体确定同步

可以增加抗体的亲和力

减少实验动物的使用

缺点：

技术精深

抗体产量低

许可性的抗体和蛋白成本较高

存在非特异结合的结果

### 从分离到表达

不同的抗体重组技术可以用于制备不同的抗体，工业上和学术界都发展了许多相关的技术，噬菌体展示就是其中的主导技术（见下图）。昆虫和哺乳动物细胞的表达系统从理论上而言是相似的，但是其它的分子进化类型需要重新提炼和分离抗体。

剑桥抗体技术（Cambridge Antibody Technologies）和其它研究单位的大规模抗体库的筛选通常都是一些方法组合，例如噬菌体展示和核糖体展示组合，进一步提高抗体的亲和力。

然而，较少的抗体库能通过商业途径获得，因为知识产权从某种程度而言已经阻碍了该技术的发展

### 噬菌体展示

噬菌体展示技术就是将天然免疫和获得性免疫个体中分离的抗体基因插进噬菌体 DNA 中。抗体分子包括抗体的可变区域，该区域能与抗原结合，称作 scFv，被连接到噬菌体衣壳蛋白上。噬菌体感染大肠杆菌后，单链 DNA 在宿主内复制，并且噬菌体重新组装，分泌到培养基中去，同时不会裂解宿主大肠杆菌。噬菌体与靶标抗原孵育，结合上去的噬菌体分离后，扩增，纯化。这种方法能轻易的筛选大量的克隆。

### 核糖体展示

该技术是基于一种稳定的抗体-核糖体-mRNA 复合物的构象基础上的。因此与噬菌体展示技术较为相似。抗体蛋白与它的编码序列物理连接。抗体基因转录，产生许多 mRNA 分子，每一个代表着不同抗体基因。mRNA 分子与细菌的核糖体孵育，然后 mRNA 翻译成蛋白质，但 mRNA 分子的 3' 端仍然未成熟，每个复合体展示一种不同的抗

体，当经过一个含有靶标抗原的亲柱子后，一些能结合上去的复合体不会被洗去，该展示技术完全在体外完成，并且不需要克隆就能完成大规模抗体库的构建。

### **酵母展示**

酵母展示利用一个配对因子蛋白 Aga2p 在酿酒酵母来展示 scFv，利用生物素标记抗原来分离想要的细胞。更进一步，可以利用荧光标记抗原，流式细胞仪来追踪实时的结合情况。

加州大学旧金山分校的 James Marks 说：“我们的大部分项目都在酵母上开展，利用酵母，可以轻易的得到生物化学信息。我们更热衷于利用这项技术来制备成熟的高亲和力抗体。”该技术能针对多种抗原表位产生抗体，但需要对酵母的遗传背景较为熟悉和流式细胞仪技术。同时与噬菌体展示技术相比，转化效率较低，需要大量的 DNA 来构建抗体库。但对于一些专家来说，酵母展示正在成为抗体获得和设计的主要技术。

### **杆状病毒展示**

杆状病毒由于其能表达大量的活性蛋白已经成为最常见的昆虫细胞表达系统，已经报道每升昆从细胞能生产 1-500mg 的。抗体基因被插入多角体启动子的下游，使得能高水平分泌到库从细胞培养物中去。

该技术的不足是需要细心的培养，昆虫细胞需要大量的氧气。此外，时间是该技术的关键因素。稳定的转染有几种形式，包括抗生素和启动子的转染，利用杆状病毒展示技术可以避免噬菌体展示技术中遇到的一些蛋白折叠的问题。

### **哺乳细胞展示**

在哺乳动物细胞中表达蛋白的优势是哺乳动物系统能即时的识别抗体。人类 293 细胞系和中国仓鼠细胞系是常用的哺乳动物细胞抗体表达系统，然而该技术需要使用大量的基因工程技术，并且哺乳动物细胞的生长需要耗费大量的时间，同时产量也不尽人意。

## 7.8. 原位杂交技术简介

原位杂交组织(或细胞)化学(In situ Hybridization Histochemistry, ISHH)简称原位杂交(In Situ Hybridization),属于固相分子杂交的范畴,它是用标记的DNA或RNA为探针,在原位检测组织细胞内特定核酸序列的方法。根据所用探针和靶核酸的不同,原位杂交可分为DNA-DNA杂交, DNA-RNA杂交和RNA-RNA杂交三类。根据探针的标记物是否直接被检测,原位杂交又可分为直接法和间接法两类。直接法主要用放射性同位素、荧光及某些酶标记的探针与靶核酸进行杂交,杂交后分别通过放射自显影、荧光显微镜术或成色酶促反应直接显示。间接法一般用半抗原标记探针,最后通过免疫组织化学法对半抗原定位,间接地显示探针与靶核酸形成的杂交体。原位杂交最初是以同位素标记探针进行的。尽管同位素标记(如<sup>35</sup>S, <sup>3</sup>H, <sup>32</sup>P等)仍然广泛使用,但非同位素标记探针的迅速发展(尤其是生物素标记探针和地高辛标记探针),更引起科技工作者的极大兴趣。

### 一、基本要求

**组织取材:**组织取材应尽可能新鲜。由于组织RNA降解较快,所以新鲜组织和培养细胞最好在30min内固定。

**固定:**目的是(1)保持细胞结构;(2)最大限度地保持细胞内DNA或RNA的水平;(3)使探针易于进入细胞或组织。最常用的固定剂是多聚甲醛,与其它醛类固定剂(如戊二醛)不同,多聚甲醛不会与蛋白质产生广泛的交叉连接,因而不会影响探针穿透入细胞或组织。

**增强组织的通透性和核酸探针的穿透性:**(1)稀酸处理和酸酐处理:为防止探针与组织中碱性蛋白之间的静电结合,以降低背景,杂交前标本可用0.25%乙酸酐处理10min,经乙酸酐处理后,组织蛋白中的碱性基团通过乙酰化而被阻断。组织和细胞标本亦可用0.2M HCl处理10min,稀酸能使碱性蛋白变性,结合蛋白酶消化,容易将碱性蛋白移除。(2)去污剂处理:去污剂处理的目的是增加组织的通透性,利于杂交探针进入组织细胞,最常用去污剂是Triton X-100。**注意:**过度的去污剂处理不仅影响组织的形态结构,而且还会引起靶核酸的丢失。(3)蛋白酶处理:蛋白酶消化能使经固定后被遮蔽的靶核酸暴露,以增加探针与靶核酸的可及性。常用的蛋白酶有蛋白酶K(proteinase K),还有链霉菌蛋白酶(pronase)和胃蛋白酶(pepsin)等。

**杂交缓冲液孵育:**杂交前用不含探针的杂交缓冲液在杂交温度下孵育2hr,以阻断玻片和标本中可能与探针产生非特异性结合的位点,达到减低背景的目的。

**防止污染:**由于在手指皮肤及实验室用玻璃器皿上均可能含有RNA酶,为防止其污染影响实验结果,在整个杂交前处理过程中都需要戴消毒手套,实验所用玻璃器皿及镊子都应于实验前一日置高温烘烤(180°C)以达到消除RNA酶的目的。杂交前及杂交时所用的溶液均需经高压消毒处理。

**双链DNA探针和靶DNA的变性:**杂交反应进行时,探针和靶核酸都必须是单链的。如果用双链DNA探针进行杂交(包括检测RNA时),双链DNA探针在杂交前必须进行变性。探针变性后要立即进行杂交反应,不然解链的探针又会重新复性。杂交液:杂交液内除含一定浓度的标记探针外,还含有较高浓度的盐类、甲酰胺、硫酸葡聚糖、牛血清白蛋白及载体DNA或RNA等。杂交液中含有较高浓度的Na<sup>+</sup>可使杂交率增加,可以减低探针与组织标本之间的静电结合。甲酰胺可使T<sub>m</sub>降低,杂交液中含每1%的甲酰胺可分别使RNA:RNA, RNA:DNA, DNA:DNA的杂交温度降低0.35°C, 0.5°C和0.65°C。所以,杂交液中加入适量的甲酰胺,可避免因杂交温度过高而引起的组织形态结构的破坏以及标本的脱落。硫酸葡聚糖能与水结合,从而减少杂交液的有效容积,提高探针有效浓度,以达到提高杂交率的目的(尤其对双链核酸探针)。在杂交液中加入牛血清白蛋白及载体DNA或RNA等,都是为了阻断探针与组织结构成分之间的非特异性结合,以减低背景。

**探针的浓度:**探针浓度依其种类和实验要求略有不同,一般为0.5-5.0μg/ml(0.5-5.0ng/μl)。最适宜的探针浓度要通过实验才能确定。

**探针的长度:**一般应在50-300个碱基之间,最长不宜超过400个碱基。探针短易进入细胞,杂交率高,杂交时间短。

### 二、试剂准备

1. 0.1M PBS (pH7.2): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O 61.6g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O 5.6g、NaCl 9g,加ddH<sub>2</sub>O至2000ml,高压灭菌。
2. 0.2M PB ((pH7.2): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O 61.6g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O 5.6g 加ddH<sub>2</sub>O至1000ml,高压灭菌。
3. 0.1M 甘氨酸: 0.75g 甘氨酸溶于0.1M PBS,定容至100ml,高压灭菌。
4. 4%多聚甲醛:多聚甲醛40g加ddH<sub>2</sub>O 400ml,加热至70°C左右,用1M NaOH调pH至7.0,用ddH<sub>2</sub>O定

容至 500ml, 再加 0.2M PB 500ml, 总体积为 1000ml。

5. 16×Denhardt 溶液: 聚乙烯吡咯酮 0.4g、小牛血清白蛋白 (BSA) 0.4g、聚蔗糖 0.4g, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 10ml, 无菌抽滤、分装, -20℃保存备用。
6. 预杂交液: 去离子甲酰胺 10ml、50%硫酸葡聚糖 4ml, 于 50℃促溶后, 再依次加入 16×Denhardt 液 0.2ml、1M Tris-HCl(pH 8.0) 0.2ml、5M NaCl 1.2ml、0.5M EDTA(pH 8.0) 0.04ml、0.1M 二硫苏糖醇 2 ml、ddH<sub>2</sub>O 2.21ml, 总体积为 10ml。无菌抽滤、分装, -20℃保存备用。临用前加入 50mg/ml 变性鲑鱼精 DNA 75μl/ml。
7. 20×SSC: NaCl 175.3g、柠檬酸三钠 88.2g, 加水至 800ml, 用 2N NaOH 调 pH 至 7.0, 再用 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1000ml。
8. 抗体稀释液: Triton X-100 80μl、BSA 0.2g, 以 0.05M PBS 定容至 20ml。
9. TSM<sub>1</sub>: 1M Tris-HCl(pH 8.0)10ml、5M NaCl 2ml、1M MgCl<sub>2</sub> 1ml, 加 ddH<sub>2</sub>O 100ml。

TSM<sub>2</sub> (新鲜配制): 1M Tris-HCl(pH 9.5)10ml、5M NaCl 2ml、1M MgCl<sub>2</sub> 1ml, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 100ml。

显色液 (临用前现配): 5ml TSM<sub>2</sub> 加显色液原液 (NBT/BCIP) 150μl, 并加适量左旋咪唑使其终浓度为 0.24μg/ml, 避光。

### 三、操作步骤

#### (一) 取材、冰冻切片:

将动物以 3%戊巴比妥钠麻醉, 打开胸腔, 暴露心脏, 刺破右心耳, 将针尖刺入左心室用生理盐水灌注 (灌注量约为动物体重的 2 倍), 再注入等量的 4%多聚甲醛。(见图 2-7)。取材, 置于 4%多聚甲醛中后固定 4hr。以 0.1M PBS 浸泡冲洗 4-5 次 (换液: 1 次/hr)。将组织块入 30%蔗糖/0.1M PBS 液 (4℃), 1-2 天后冰冻切片, 将切片裱贴于原位杂交专用玻片上, 切片厚度为 15-20μm。

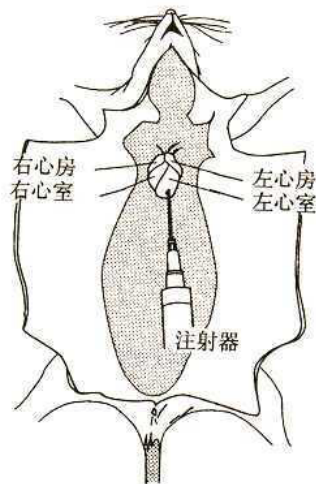


图 2-7 动物灌注

#### (二) 探针制备与检测 (定量):

##### 1. 随机引物制备 cDNA 核酸探针

以 DIG DNA 标记检测试剂盒为例:

##### (1) 探针制备:

- ①模板 DNA(0.5-3μg) 15μl, 100℃变性 10min, 冰浴 5 min。
- ②在冰浴中加: Hexanucleotide mix 2μl, dNTPmix 2μl, Klenow Enzyme 1μl, 反应总体积为 20μl。37℃ 孵育过夜。
- ③在上述 20μl 的标记产物中加 4M LiCl 2.5μl, 75μl (无水乙醇预冷) 轻轻混匀, -20℃放置 2hr。4℃离心 12000g ×15min, 弃上清。70%乙醇(预冷) 50μl 洗涤, 7500g×5min, 弃上清, 晾干沉淀, 加 TE 50μl 溶解沉淀, -20℃保存备用。

##### (2) 探针敏感性检测:

- ①样品稀释: 取 dig-标记探针 1μl 用 ddH<sub>2</sub>O 以 1:10、1:100、1:1000、1:1000、1:10000 梯度稀释。

- ②取一张与点样器大小相近的尼龙膜，标记方向，ddH<sub>2</sub>O 中浸泡 1min，6×SSC 中浸泡 10min，置点样器上，负压抽吸 5min。
- ③将上述样品点于尼龙膜上，继续抽吸 10min。
- ④取下尼龙膜，置紫外灯下 10cm 处照射 5min，晾干。
- ⑤将膜置于适量预杂交液（5-10 ml）中，37℃预杂交 10min。
- ⑥加入 Anti-dig 抗体（1:5000），37℃杂交 30min。
- ⑦洗膜：2×SSC/0.1%SDS 室温洗 10 min×2 次。
- ⑧显色：15 ml TSM<sub>2</sub> 中加 300μl 显色液（NBT/BCIP），37℃避光显色 30min。



图 2-8 采用点样法检测随机引物法标记的 dig-cDNA 探针

### 1. PCR 法制备 cDNA 核酸探针：

#### （1）探针制备：

以 PCR DIG Probe Synthesis Kit 为例：

在 0.5ml 离心管中，依次加入：

PCR 引物 1 (10pM)	2μl
PCR 引物 2 (10pM)	2μl
质粒 DNA 模板 (10-100pg)	2μl
PCR DIG mix	2μl
(含 dNTP 和 DIG-11-dUTP)	
dNTPmix	2μl
10×PCR buffer	5μl
Taq 酶 (2u/μl)	1μl

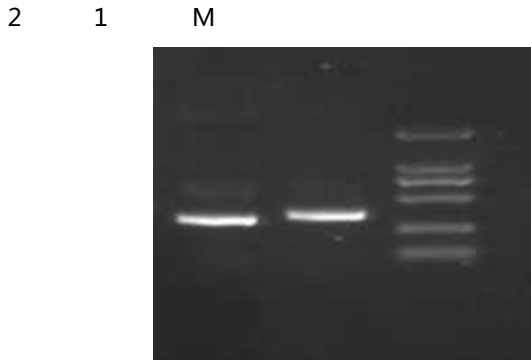
加入适量 ddH<sub>2</sub>O，使总体积达 50μl。

① 将上述混合液稍加离心，立即置 PCR 仪上，执行扩增。一般：在 93℃预变性 3-5min，进入循环扩增阶段：93℃ 45s → 58℃ 45s → 72℃ 60s，循环 30-35 次，最后在 72℃ 保温 7min。

② 在上述 PCR 产物中加入 4M LiCl 12.5μl、预冷无水乙醇 375μl，轻轻混合后置于 -20℃ 2hr，12,000g×15min，弃上清。70%乙醇(预冷) 120μl 洗涤沉淀，离心 7500g×5min，弃上清，晾干沉淀，加 TE 50μl 溶解，-20℃ 保存备用。

#### （2）探针检测：

行琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察 DIG-DNA 探针含量（采用目测法）。



**图 2-9 Dig-NGF 探针的检测**

图注：1. DIG-NGF(由于 DIG-11-dUTP 的掺入，使其分子量变大)  
2. NGF(190bp)                      3. DNA Marker(DL-2000)

(三) 原位杂交反应 (以 DIG-cDNA 探针为例):

1. 0.1M PBS (pH 7.2) 浸 5-10min。
2. 0.1M 甘氨酸/0.1M PBS 浸 5min。
3. 0.3%TritonX-100/0.1M PBS 浸 10-15min。
4. 0.1M PBS 洗 5min×3 次，加蛋白酶 K(1μg/ml)，37°C 孵育 30 min。
5. 4%多聚甲醛浸 5min。
6. 0.1M PBS 洗 5min×2

次，浸入新鲜配制的含 0.25%乙酸酐/0.1M 三乙醇胺中 10min。

7. 预杂交：滴加适量预杂交液，42°C 30 min。

1. 杂交：倾去预杂交液，在每张切片上滴加 10-20μl 杂交液 (将探针变性后稀释在预杂交液中，0.5 ng/μl)，覆以盖玻片或蜡膜，42°C 过夜。(阴性对照)

2. 洗片：

- (1) 4×SSC、2×SSC、1×SSC、0.5×SSC 37°C 各洗 20min；
- 0.2×SSC 37°C 洗 10min；0.2×SSC 与 0.1M PBS 各半洗 10min；
- 0.05M PBS 洗 5min×2 次。

10. 3% BSA/0.05M PBS 包被，37°C 30min。

11. 滴加抗地高辛-抗血清碱性磷酸酶复合物 (以抗体稀释液 1:5000 稀释) 4°C 孵育过夜。

12. 0.05M PBS 洗 15min×4 次; TSM<sub>1</sub> 10min×2 次; 新鲜配制 TSM<sub>2</sub> 10min×2 次。

13. 显色：在玻片上滴加适量显色液，4°C 避光过夜。

14. 将玻片置于 TE 中 10-30min 以终止反应。酒精梯度脱水、二甲苯脱脂，中性树脂封片。

15. 显微镜下观察结果。



**图 2-10 NGF mRNA 在小鼠颌下腺中的表达**

(四) 免疫组化和原位杂交双重染色

1. 免疫组化：

- (1) 将切片浸没于 100ml 甲醇溶液中 (含 20 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 5min。
- (2) 0.01M PBS 洗 3min $\times$ 3 次, 加入含 0.25% Trion X-100 的 0.01M PBS, 5min。
- (3) 0.01M PBS 洗 3min $\times$ 3 次, 加入 1%BSA 包被液, 37 $^{\circ}$ C 30min。
- (4) 0.01M PBS 洗 3min $\times$ 3 次, 滴加适当稀释的一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜。阴性对照组除不加一抗外, 其余步骤相同。
- (5) 0.01M PBS 洗 3min $\times$ 3 次, 滴加适当稀释的二抗 (辣根过氧化酶标记), 室温放置 1-2hr。
- (6) 0.01M PBS 洗 3min $\times$ 3 次, 0.03%DAB/0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 呈色 3-5min。(阳性信号呈棕黄色)
- (7) 用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 轻轻洗涤切片, 以终止反应。

#### 2. 原位杂交:

免疫组化反应结束后, 切片即进入原位杂交的第 (4) 步, 直至结束。(原位杂交阳性信号呈兰紫色)。

### 四、注意事项:

#### 1. 作为 DNA-RNA 的杂交, 需防 RNase 的污染。

cDNA 探针在杂交时必须变性解链。具体方法是: 将探针置 100 $^{\circ}$ C 加热 5min, 冰浴骤冷。

## 7.9. 原位杂交组织化学常用试剂及处理

### 一、杂交前准备

#### (一) DEPC 水是经 DEPC 处理过的灭菌蒸馏水。

DEPC 即二乙基焦碳酸酯 (diethylprocarbonate), 可灭活各种蛋白质, 是 RNA 酶的强抑制剂。原位杂交在杂交及其以前的各步处理中, 所有液体试剂都应经 DEPC 处理。方法是: 取市售 DEPC 1ml, 加入 1L 待处理水 (蒸馏水等) 中, 经猛烈振荡后, 于室温静止数小时, 然后高压灭菌, 以除去降解 DEPC (DEPC 分解为 CO<sub>2</sub> 和乙醇)。有些试剂可直接加入 DEPC, 终浓度一般为 0.1%~0.4%, 原则上在杂交及其以前的步骤中, 所有液体试剂均需用 DEPC 处理, 或用 DEPC 水配制, 包括乙醇的稀释。此外, 接触标本以及标本有关的空气中的洗涤也需 DEPC 水洗涤。

注意: DEPC 是一种潜在的致癌物质, 在操作中应尽量在通风的条件下进行, 并避免接触皮肤。②含有 Tris 缓冲液的溶液中, 不能加入 DEPC。

#### (二) 载玻片的处理

组织原位杂交, 常在载玻片上进行, 故载玻片的洗涤至关重要, 必须保持清洁, 并且不能有任何核酸的污染。

处理方法如下:

(1) 先经洗衣粉浸泡过夜, 次日自来水冲洗后, 泡酸数小时以上, 取出后再用流水冲洗, 双蒸水冲洗 2~3 次, 置 160 $^{\circ}$ C 以上烤箱中烧烤 4h 以上, 或经 15 磅高压灭菌 20min。经以上处理可清除载片上的核酸酶。

#### (2) HCl 处理法

试剂: { ① 1mol/L HCl;  
② DEPC 水;  
③ 95% 乙醇。

步骤: { ① 玻片在室温下于 1 mol/L 的 HCl 中浸泡 30min;  
② DEPC 水中洗片;  
③ 95% 乙醇中洗片;  
④ 空气中干燥;  
⑤ 重复一遍步骤 1~4;  
⑥ 铝箔包好备用。

#### (三) 硅化

【方法 1】(1) 将一扎新的盖玻片散开, 在通风条件下于 0.1mol/L 的 HCl 中煮 20min, 等其冷却后, 倒掉盐酸。

(2) 用去离子水沉漂洗玻片, 竖放在架子上自然干燥。

(3) 硅化盖玻片: 通风条件下, 将单块的盖玻片在二甲二氯硅烷 (dimethyldichorsilane, DMDC) 液中浸几下, 竖入在架子上干燥。

(4) 收集干燥的盖玻片于一能耐热的 petri 氏盘 (或培养皿) 中, 用去离子水漂洗数次, 彻底清洗。

(5) 用铝箔将装有盖玻片的培养皿包好, 于 180°C 烘烤 4h 过夜。取出待冷至室温后, 即可进行后续处理。

附: 2%DMDC

{ DMDC	2ml
{ 三氯乙烷	98ml

配制: 按比例两者充分混匀, 静止待气泡消失即可使用。

用途: 硅化玻片(载片、盖片均可)。

【方法 2】将经过洗净的玻璃盖片分散开放在一金属网中, 并将该网放入一接有真空泵的干燥器中。同时, 在干燥器中放一盛有约 1m 二甲二氯硅烷 (dimethyldiorosilane, DMDC) 的小烧杯。盖好干燥器(确保密闭), 抽真空约 5min, 然后让空气冲入。取出盛有盖片的金属网架, 用锡箔纸包埋, 于 250°C 以上烘烤 4h 以上, 最好过夜。冷却后备用。

本法可用于玻璃及塑料器皿的硅化。塑料器皿只能于 60°C 烧干。

【方法 3】APES (氨丙基三乙氧基硅烷) 法

试剂:	① 2% 的 APES/丙酮(V/V);
	② 丙酮;
	③ DEPC 水。
步骤:	① 玻片先于室温中在 APES 液中浸泡 10s;
	② 丙酮中洗涤;
	③ DEPC 水中漂洗;
	④ 空气中干燥;
	⑤ 4°C 保存(最好用铝箔包好, 避免污染)。

【方法 4】

(1) 49ml 氯仿与 1mg 二甲二氯硅烷 (DMDC) 配液;

(2) 倒入每个拟硅化的试管或离心管中, 浸泡 5min 后用乙醇或重蒸水冲洗;

(3) 玻璃器皿使用前位于 180°C 以上烘烤 2h 以上, 塑料器皿应于 60°C 烘烤过夜。

注意: DMDC 有毒且高度挥发, 应于通风环境操作并戴口罩、手套, 避免接触皮肤或吸入。

(四) 载片的包被(粘贴)

1. 沾附剂

(1) 多聚赖氨酸(poly-L-Lycine, PLL)

储备液(0~5%)

{ PLL	25mg
{ DEPC 水	5ml

按上述剂量充分混合, 即为浓度为 5mg/ml(0.5%)的 PLL 液。常分装成 1ml 的包装, -20°C 存放。该液为储备液, 可反复冻融, 无明显影响。用前充分混合。

工作液(0.01%):

{ 0.5% PPL	1ml
{ DEPC 水	50ml

充分混合, 静止待气泡消失。

(2) 明胶液

配方:	明胶	2.4g
	甲明矾	2.4g
	DEPC 水	~ 1 000ml

配法：先称取明胶溶于 500~800ml DEPC 水中，加热搅拌助溶，待明胶完全溶解以后，加入甲明矾溶解后即可使用。注意，包被玻片时，明胶液温度最好保持在 60°C 左右，效果最佳。方法同 PLL 包被玻片。

## 2. 多聚赖氨酸包被玻片的制备方法（其它包被剂相同）

(1) 将事先准备好的经 160°C 以上烘烤，并冷却至室温的玻片（载片或盖片），在 0.05%（也有用 0.1%）的 PLL 液中上下浸蘸几下，分散开竖放在架子上，于空气中自然干燥，4°C 备用。注意：①浸蘸时，务必使整个玻片完全浸于液体中，否则，包被不完全会产生标本脱落现象；②干燥过程中注意避免尘埃污染；③按上法处理的玻片通常可存放在一定时间（室温 1 月以上，4°C 更长），但仍建议尽早使用。

(2) 多聚赖氨酸 1mg 溶于 10ml 灭菌的去离子水或 1mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中（pH7.0），将其涂布于玻片上，待干燥后即可使用。该法包被的玻片可用于细胞涂片和切片。

(3) 将 PLL 工作液滴至盖玻片上 5 $\mu$ l/片，用另一盖玻片以推血涂片方法推片，或用另一盖玻片紧贴于其上，相互摩擦以使两盖玻片相对的一面涂布上 PLL。该法制备的玻片，只有一面是包被有 PLL，故制备时，待其晾干后，应作好记号，然后保存后备用。

多聚赖氨酸可用于多种核酸杂交，方法简单，结果可靠，有许多其它方法不可比拟的优点。配制好的液体可存放于 4°C 或室温，但时间过长会解聚而失效，故建议使用时尽量新鲜配制。

## (4) Vectabond 粘附剂

该试剂是 Vector 公司新近推出的一种新型粘附剂。它与其它粘附剂的主要区别是：一般的粘附剂是通过物理性覆盖在玻片表面，天长日久，可能由于包被不完全或局部脱落而致切片等标本易于脱落。而 Vectabond 试剂是通过化学性作用，改变玻璃表面的分子结构，使标本贴附牢固，不易脱落，且保持时间长，耗量小，价格便宜，一个包装 7ml 可配成 350ml 工作液使用。操作程序：

标本（铺片、切片等） $\rightarrow$ 丙酮（5min） $\rightarrow$ Vectabond 试剂工作液（5min） $\rightarrow$ dH<sub>2</sub>O（2 $\times$ 5min） $\rightarrow$ 干燥（温箱，数小时过夜） $\rightarrow$ 用铝箔包好，室温备用。

注意：制备和保存过程中避免污染。

经上述处理的载玻片一般可存放半年以上（4°C 可更长）。

## (五) 鲑鱼精子 DNA 的制备

(1) 在 50ml 灭菌聚乙烯管中加入 1g 鲑精 DNA，加入 15ml DEPC 水使其浸泡 5min 至 2h；

(2) 加入 2.5ml 2mol/L HCl，室温放置，DNA 形成白色沉淀，充分振摇至沉淀物相互缠绕在一起，用吸头尖端使之形成一球团状（2~3min）；

(3) 加入 5.0ml 2mol/L 的 NaOH。摇动小管使 DNA 悬浮、溶解，将小管置 50°C 15min 助溶；

(4) 用 DEPC 水将混合物稀释至 175ml（总体积），充分混合，注意确保管内已无颗粒状；

(5) 加入 20ml/l 1mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液（pH7.4）；

(6) 用 2mol/L 的 HCl 滴定至 DNA 溶解 pH 为 7.0~7.5；

(7) 用无菌微孔滤膜过滤液体，去除颗粒。260nm 测定溶液的 OD 值，方法是：取 20 $\mu$ l DNA 液混合于 980 $\mu$ l 水中，混匀后测定，吸收值乘以 50 即为 DNA 浓度（ $\mu$ g/ml）；

(8) 制备好的 DNA 液储于 -20°C 备用，用前取出冻融后煮沸。

## 二、关于探针的标记

### (一) cRNA 探针的同位素标记

#### 1. 标记液（转录标记）

5 $\times$ 转录缓冲液	2 $\mu$ l
DDT(400mmol/L)	1 $\mu$ l
线性化 DNA 探针(模板)(1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 $\mu$ g
<sup>32</sup> P - CTP(12.5 $\mu$ mol/L ~ 50 $\mu$ Ci)	5 $\mu$ l
RNA 多聚酶(20u/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

#### 2. 转录缓冲液

Tris - HCl(pH7.5)	200mmol/L
MgCl <sub>2</sub>	30mmol/L
精脒	10mmol/L
DTT	50mmol/L
BSA(不含 RNA 酶)	0.5mg/ml
HPRI	5000u/ml
ATP	2.5mmol/L
GTP	2.5mmol/L
UTP	2.5mmol/L
CTP*	

※：用地高辛或生物素标记时，用 UTP 替代。

### 3. 标记终止液

无 RNA 酶的 DNA 酶	1 $\mu$ l
tRNA(10mg/ml)	1 $\mu$ l
灭菌 dH <sub>2</sub> O	188 $\mu$ l

### 4. 标记探针水解液

0.4mol/L NaHCO <sub>3</sub>	20 $\mu$ l
0.6mol/L Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20 $\mu$ l
灭菌 dH <sub>2</sub> O	160 $\mu$ l

先用 dH<sub>2</sub>O 悬浮探针，再加入后两种试剂，轻轻振摇混合，于 60℃条件下反应。

### 5. 探针水解时间

$$t = \frac{L_0 - L_f}{K \times L_0 \times I_f}$$

注：L<sub>0</sub>-探针初始长度 (kb)

L<sub>f</sub>-探针的终长度 (kb)

K-0.11kb/min

### 6. 探针水解终止液

		(终浓度)
3mol/L 醋酸钠	6.6 $\mu$ l	(0.1mol/L)
醋酸	1.3 $\mu$ l	(0.5% V/V)

每次加入充分混合，临用前配。

### 7. 探针沉淀液

7mol/L 醋酸胺	100 $\mu$ l
纯酒精	750 $\mu$ l
rRNA(10mg/ml)	2 $\mu$ l

每次加入，充分混合，新鲜配制。

## (二) 寡聚核苷酸 3' 端标记 (cRNA 探针)

### 1. 标记反应液

寡核苷酸	20ng
5 × 转录缓冲液	4 $\mu$ l
<sup>32</sup> P - dATP(3 000Ci/mmol/L)	7 $\mu$ l
CoCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ l
末端转移酶	1 $\mu$ l
灭菌 dH <sub>2</sub> O	20 $\mu$ l

2. 终止液 : 0.2mol/L EDTA

3. 探针沉淀液

tRNA	1 $\mu$ l
7mol/L 醋酸胺	100 $\mu$ l
纯乙醇	750 $\mu$ l

(三) cRNA 探针非同位素标记 (地高辛及生物素)

1. 标记液

5 × 转录缓冲液	2 $\mu$ l
0.2mol/L DTT	1 $\mu$ l
模板 DNA(1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Dig - 11 - UTP(10mmol/L) <sup>△</sup>	1 $\mu$ l
<sup>32</sup> P - CTP <sup>*</sup>	1 $\mu$ l
RNA 聚合酶 (20u/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
无菌 dH <sub>2</sub> O	3 $\mu$ l

<sup>△</sup> : 生物素标记时为 10mmol/L 的生物素-11-UTP

<sup>\*</sup> : 为检测标记率而加。

2. 转录标记终止液

(1) 0.2mol/L EDTA : 用于地高辛标记法

(2) 生物素标记终止液 :

不含 RNA 酶的 DNA 酶 (1u/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
HPRI	1 $\mu$ l
tRNA(10 $\mu$ g/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
灭菌 dH <sub>2</sub> O	186 $\mu$ l

(四) DNA 探针标记常用试剂的配制

(1) 10 × 缺口平移缓冲液 : 200mmol/l Tris-HCl , pH7.4 含 50mmol/L MgCl<sub>2</sub>;100mmol/L $\beta$ -巯基乙醇、1mg/ml BSA。

(2) 缺口平移反应终止液 : 200mmol/L NaCl;10mmol/l Tris-HCl , pH7.4; 11mmol/L EDTA; 0.5% SDS。

(3) DNase I : 干粉状 DNase I (2000 ~ 3000u/mg)溶于 20mmol/l Tris-HCl , pH7.5 中 ( 1mg/ml ) , 10 $\mu$ l 分装 , -20 $^{\circ}$ C保存一年。

(4) 10 × DNA 聚合酶 I ( Klenow 片段 )缓冲液 : 500mmol/l Tris-HCl , pH6.6;100mmol/L Mg-Cl<sub>2</sub>;10mmol/L DTT;0.5mg BSA。

(5) 10 × 激酶缓冲液 : 500mmol/L Tris-HCl , pH7.4 , 50mmol/L MgCl<sub>2</sub>;20mmol/L DTT; 1.0mmol/L 亚精胺。

(6) 10 × 随机引物标记缓冲液 ; 500mmol/l Tris-HCl , pH6.6;100mmol/L MgCl<sub>2</sub>;10mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇 ; 500 $\mu$ g/ml BSA。

- (7) 1×加尾缓冲液：100mmol/L 二甲胂化钾，pH7.0，1mmol/l CoCl<sub>2</sub> 0.2mmol/L DTT。
- (8) 1mol/L MgCl<sub>2</sub>:MgCl<sub>2</sub> 47.60g 溶于 500ml 水中，100ml 分装，高压灭菌，室温保存。
- (9) 0.25mol/L EDTA(Ph8.0):EDTA 52.02g 溶于 400ml 水中，调 pH 至 8.0，加水至 500ml，100ml 分装，高压灭菌，室温保存。
- (10) 4mol/L 醋酸钠：取无水醋酸钠 82g 溶于 200ml 水中，用醋酸调 pH 至 6.5，加水至 250ml，高压灭菌，或 0.45μm 膜过滤，室温保存。
- (11) 10% SDS：10g SDS (十二烷基硫酸钠) 溶于 50ml 水中，加水至 100ml，分装后室温保存。
- (12) 20×SSC：取 NaCl 175.3g;柠檬酸钠 88.2g;加水至 1000ml，用 10mol/l NaOH 调 pH 至 7.0；高压灭菌，室温保存。
- (13) 无菌水：100ml 去离子水或双蒸水，分装，高压灭菌，室温保存，开瓶后仅限一周使用。
- (14) 10×激酶缓冲液：500mmol/L Tris-HCl，pH7.4;100mmol/L MgCl<sub>2</sub>;50mmol/l DTT;10mmol/L 亚精胺 (非必需)。
- (15) T<sub>4</sub> 多聚核苷酸激酶：10u/μl，保存在甘油中，-20℃。
- (16) TE 缓冲液( Tris/EDTA ) :Tris ,10mmol/l pH7.4(0.5ml 2mol/L 贮存液) ,1.0mmol/l ED-TA ,pH8.0(20μl 0.5mol/L)贮存液，加水至 100ml，室温保存。
- (17) 2mol/L Tris-HCl pH7.4:Tris242.2g 溶于 850ml，加浓 HCl 75ml，边加边缓慢搅动，至 pH7.4，于加水至 1000ml。
- (18) 1mol/L DTT(二硫苏糖醇)：3.0g DTT 溶于 20ml 水中，分装，于-20℃贮存。
- (19) 0.5mol/L EDTA (乙二胺四乙酸二钠盐)：在烧杯中先加入 300ml 水，加入 93.5g EDTA-Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O，充分混匀，加 10mol/l NaOH 调 pH 至 8.0，加水至 500ml。
- (20) 10mol/L NaOH：200g NaOH 溶于 450ml 水中，混匀，再加水至 500ml。
- (21) 5mol/L NaCl：292.25g NaCl，加水至 1000ml。
- (22) 1mol/L HCl：加 86.2ml 浓盐酸至 913.8ml 水中。
- (23) 1mol/L CaCl<sub>2</sub>：147g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O，溶于 1000ml 水中，高压灭菌，室温保存。

### 三、固定剂

进行原位杂交的组织或细胞标本常需经固定处理。尽管许多化学物质对组织/细胞有固定作用，但核酸原位杂交的理想固定液应具备如下特点：①能很好地保持组织细胞的状态；②对核酸无抽提、修饰及降解作用；③不改变被检核酸分子在组织细胞内的定位；④对核酸及探针的杂交过程无阻碍作用；⑤固定液本身对杂交信号无遮蔽、掩盖作用，如不使本底增加等；⑥理化性质稳定、价格低廉。

#### 1. 4%多聚甲醛 ( Paraformaldehyde , PFA )

配方：	PFA	40g
	DEPC 水	~ 500ml
	2 × PBS	~ 1 000ml(约 500ml)

配法：称取 40g PFA 溶于装有 500ml DEPC 水的玻璃容器 (烧杯或烧瓶) 中，持续加热磁力搅拌至 60~65℃，使成乳白色悬液。用 1.0mol/L 的 NaOH 值至 7.0，使呈清亮状 (滴加)，再加入约 500ml 2×PBS\*，充分混匀 (在冰浴或冷水浴中)，可再检测一下 pH，过滤后定容至 1000ml，室温或 4℃保存备用。

注意：①配制时应在通风条件下操作，并避免接触皮肤和吸入 (戴手套及口罩)，因 PFA 有较强的固定作用及毒性，对粘膜及皮肤有固定及毒性，刺激作用；②加热时，温度不宜过高，常为 60~65℃，否则，PFA 降解失效；③配制好的 PFA 虽可存放一定时间，但过久的液体，固定效果下降，建议尽早使用。

附：固定液用 PBS 的配制：

		终浓度
配方:	NaCl	7.605g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.13mol/L
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7.0mmol/L
	DEPC 水	3.0mmol/L
		~ 1 000ml

配法：按上述比例称取试剂，溶于 DEPC 水（也可用蒸馏水加 DEPC）500~800ml 中，过滤后，加水定容至 1000ml，高压灭菌。通常配制成 10×PBS 的储备液，2×PBS 和 1×PBS 可用 DEPC 水稀释获得。

除用 DEPC 水配制 PFA 外，也有用灭菌蒸馏水或经 DEPC 处理的 0.01~0.1mol/L 的 PBS 配制的，方法及注意事项同上。

4% PFA 是目前原位杂交组织化学技术中最常用的固定液，它能较好地保持组织及细胞内的 RNA，同时对形态保持也较好。通常组织块固定 4~12h，载片固定时间在 10~15min 以内，RNA 含量较为恒定。过度延长固定时间会引起细胞内生物大分子的过度交联，影响探针的穿透力，降低杂交效率。

## 2. 甲醛

### ①10%甲醛 ( Formaldehyde , FA )

试剂:	市售甲醛(约 40%)	10ml
	DEPC 水	90ml

量取二者充分混合而可。较适于检测 RNA 的组织及细胞固定，也可用于新鲜冰片切片后固定。

### ②10%福尔马林试剂：

10% 福尔马林试剂:	市售甲醛	5ml
	NaCl	9.0g
	DEPC 水	90ml(定容至 100ml)

较适于固定细胞。

### ③10%中性福尔马林

市售甲醛	100ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.5g
DEPC 水	~1000ml

常用于石蜡样品切片的固定。

10%的甲醛由于有促进 DNA 双链分子交联的作用，干扰 DNA 变性，故不适于 DNA 杂交。在组织或细胞原位杂交中，可通过使用含 50%甲酰胺的杂交液使 DNA 变性解链而解决。这类固定液在 DNA/RNA 杂交中有较好的效果。

### 3. 4%戊二醛效果较 40%差。

4. 0.1%戊二醛常用于固定组织，适于新鲜组织冰冻切片及石蜡切片的后固定，常用于检测 DNA 的原位组织杂交方法。

5. 乙醇/醋酸（或冰醋酸）将乙醇与醋酸按 3：1 的体积比充分混合即可。该液较适于固定细胞的原位杂交，尤其检测 DNA 时。

乙醇/醋酸虽广泛应用于原位杂交中，但 RNA 保留较差，可本底很低，即背景染色淡。

6. 甲醇/醋酸（3：1）用前按体积比 3：1 比例充分混合即可。

7. 甲醇/丙酮（1：1）适于培养细胞的原位杂交技术。

8. 4%多聚甲醇-0.5%~1%戊二醛溶液在 pH7.4 磷酸缓冲液中，用于免疫电镜样品固定。

## 四、LB 培养基

### （一）液体 LB 培养基（Luria-Bertani 培养基）

试剂:	胰蛋白胨 (bacto - tryptone)	10g
	酵母提取物 (bacto - yeast extract)	5g
	NaCl	10g
	H <sub>2</sub> O	1 000ml

配制：取一 1000ml 的烧杯，将事先称取好的试剂加入杯内，加 H<sub>2</sub>O 约 500~800ml 搅拌使其溶解完全。用 5N 的 NaOH 调 pH 至 7.0，加入 H<sub>2</sub>O 定容至 1000ml。15 磅高压灭 20min。

### (二) 琼脂糖平板培养基

细菌培养用琼脂 (或琼脂糖)	15g
液体培养基 (如 LB)	~1000ml

按浓度比例，将琼脂加入液体培养基 (如 LB) 中，稍加搅拌，用纱布或纸封好瓶口，15 磅高压灭菌 20min。

### 五、小量质粒提取主要液体

#### 1. 溶液 I

50mmol/L 葡萄糖
25mmol/L Tris - HCl (pH8.0)
10mmol/L EDTA
溶菌酶 5mg/ml (现加)

#### 2. 溶液 II

浓度:	0.2N NaOH	
	1% SDS	
试剂:	2N NaOH	10ml
	10% SDS	10ml
	H <sub>2</sub> O	80ml (~100ml)

#### 3. 溶液 (3mol/L 醋酸钠)

无水醋酸钠	49.2g
ddH <sub>2</sub> O	140ml
ddH <sub>2</sub> O	~200ml

加热溶解后，再用冰醋酸 (约 40ml) 调 pH 至 4.8，补足 H<sub>2</sub>O 至 200ml。

### 六、杂交前处理

1. 蛋白酶 (Proteinase K, Pro.K) 蛋白酶 K 主要用于杂交前标本处理，其作用是使组织达到一定消化，利于检测分子的穿透，从而提高检测方法的敏感性，但各种组织在不同条件下消化程度不一，因此，具体应用时，应根据组织种类、温度确定反应时间及酶的浓度。过度消化可使组织形态结构遭到明显破坏，核酸分子也会受到影响。通常是将其配成储备液 (1mg/ml)，临用前，再配成工作液 (约 0.025mg/ml)。配制方法：

(1) 储备液:	蛋白酶 K	1mg (或 10mg)
	灭菌 ddH <sub>2</sub> O (或 DEPC) 水	1ml (或 10ml)

精心称药，将二者充分混合后，分装成小份，-20°C 存放，用时再取出冻融，余者弃去。

#### (2) 工作液 (临用前配)：

方法一:	Pro.K 储备液 (1mg/ml)	100 $\mu$ l
	灭菌 ddH <sub>2</sub> O 或 DEPC 水	~4ml

取储备液 (1mg/ml) 按 1 : 40 稀释, 充分混合, 即得约含 Pro.K 为 25mg/ml 的工作液。

方法二:	{ Pro.K 储备液 (1mg/ml)	100 $\mu$ l
	{ Pro.K 缓冲液	100ml

(3) 关于 P-K 缓冲液的配制:

① P-K 缓冲液:	{ 0.1mol/L Tris - HCl	
	{ 0.05mol/L EDTA	
配制:	{ 1mol/L Tris - HCl (pH8.0)	10ml
	{ 0.5mol/L EDTA	10ml
	{ ddH <sub>2</sub> O	80ml

称取上述试剂, 充分混合即可。

② 1mol/L 的 Tris-HCl (pH8.0):

{ Tris	121.1g
{ ddH <sub>2</sub> O	~ 1 000ml

先将 Tris 于 800ml ddH<sub>2</sub>O 中溶解, 用 HCl 将 pH 调至 8.0, ddH<sub>2</sub>O 定溶于 1000ml, 高压灭菌, 室温备用即可。

③ 0.5mol/L 的 EDTA:

{ EDTA	186.1g
{ ddH <sub>2</sub> O	~ 1 000ml

称取 EDTA 溶于约 600ml ddH<sub>2</sub>O 中, 常需 60°C 持续搅拌以助溶, 滴加 NaOH 至 pH 接近 8.0 时, EDTA 才开始溶解。待完全溶解后, 冷却至室温, NaOH 调 pH 至 8.0, ddH<sub>2</sub>O 定溶至 1000ml, 高压灭菌, 室温备用。

## 2. 甘氨酸

(1) 1mol/L 甘氨酸:

{ 甘氨酸	75g
{ ddH <sub>2</sub> O (或 DEPC 水)	~ 1 000ml

称取甘氨酸 75g 溶于 ddH<sub>2</sub>O 或 DEPC 水中, 最后补足 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1000ml, 高压灭菌备用。该液为储备液, -20°C 储存。

(2) 甘氨酸工作液 (0.1mol/L):

{ 1mol/L 甘氨酸	100ml
{ PBS	900ml

将二者按 1 : 10 比例稀释, 即得甘氨酸工作液。一般要求临用前新鲜配制。

甘氨酸有终止蛋白酶 K 作用的作用, 以防过度消化。

## 3. 0.25% 醋酸-0.25% 醋酸酐

试剂:	{ 三乙醇胺	13.2ml
	{ NaCl	5.0g
	{ 浓 HCl	4.0ml
	{ DEPC 水	定容至 1 000ml (约 980ml)
	{ 醋酸酐 (临用前加)	2.5ml

配制：按上述配方，先以少许 DEPC 水溶解 NaCl，然后加入三乙醇胺及浓 HCl。DEPC 水定容至约 1000ml(997.5ml)，临用前，一边摇动溶液一边加入醋酸酐，充分混合。注意操作时避免浓 HCl 溅出，最好在通风条件下进行。

生物体内有些组织，如神经组织中的蛋白质，对带负电荷的核酸探针较易吸附。经该液乙酰化处理后，可使切片标本表现带上负电荷，有排斥带负电的核酸探针，减少非特异吸附，降低反应背景的作用。

#### 4. RNA 酶溶液

储备液：	RNA 酶 A	1g
	DEPC 水	100ml

取 RNA 酶 A 溶解于 100ml DEPC 水中，分装成小份（1ml，10mg/ml），-20℃储存。

工作液：	RNA 酶 A 储备液(10mg/ml)	100 $\mu$ l
	2 $\times$ SSC	100ml

临用前，取 RNA 酶 A 储备液，用 2 $\times$ SSC 溶解配成工作液（0.01mg/ml）。

#### 5.0.2%

{	Triton X - 100	2ml
	PBS	998ml

取 2ml Triton X-100 加入 998ml PBS 中，充分振荡使其充分混合。

### 七、杂交用液

#### 1. SSC ( Standard Saline Citrate, SSC )

通常配成 10 $\times$ ，20 $\times$ ，50 $\times$ 的储备液，如下：

	10 $\times$	20 $\times$	50 $\times$	
{	NaCl	87.65	175.3	438.25 (g)
	柠檬酸钠	44.1	88.2	220.5 (g)
	DEPC 水	~ 1 000	~ 1 000	~ 1 000 (ml)

配制：先称取上述两种试剂，溶于约 800ml ddH<sub>2</sub>O 中，滴加 10N 的 NaOH，将 pH 值调至 7.0，补足 ddH<sub>2</sub>O 至 1000ml，加入终浓度为 0.1%~0.2%的 DEPC，分装后高压灭菌，可室温保存。

该液主要用于配制予杂交液及杂交后的各种洗脱液，以保持一定的离子强度。此外，在用于杂交的湿盒内也常用 5 $\times$ 的 SSC 以保持一定湿度。

#### 2. Denhardt' s 液

通常配成 10 $\times$ ，50 $\times$ 或 100 $\times$ 的储备液

	10 $\times$	50 $\times$	100 $\times$	
{	聚蔗糖 (Ficoll 400)	2	10	20g
	聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)	2	10	20g
	牛血清白蛋白 (BSA)	2	10	20g
	灭菌 ddH <sub>2</sub> O (或 DEPC 水)		~ 1000ml	

配制：称取上述试剂，溶于 800ml 左右灭菌 ddH<sub>2</sub>O 中，定容至 1000ml 后，过滤后于 -20℃保存备用。

该液用于配制杂交液及予杂交液等。

#### 3. 杂交液及予杂交液

		终浓度
去离子甲酰胺	500ml	50%
50 × SSC(或 SSPE)	100ml	5 × (或 6 ×)
50 × Denhardt's 液	250ml	5 ×
10% SDS	50ml	0.5%
变性鲑精 DNA <sup>※</sup>		100μg/ml
硫酸葡聚糖 <sup>△</sup>	100g	10%
DEPC 水	~ 1 000ml	

※：临用前加；△予杂交液不加

配制：先以去离子甲酰胺与 SSC 于室温混合，加入硫酸葡聚糖于 50°C 促溶，依次加入其它成份。硫酸葡聚糖在室温常需数小时才能完全溶解。有时需旋涡振荡。定容后充分混合。根据使用方便可分装（最好用铝箔将瓶子包好）存于 4°C，可达数月。注意，杂交缓冲液在使用前切忌污染。

变性被打断的无关 DNA（常为鲑精 DNA 或鲐精 DNA）可在予杂交及杂交前加入。此外，有许多物质如肝素、多聚腺苷酸、醋酸钠等多种成份，可根据需要加入杂交液中，上述配方所列只是不可缺少的基本成份。

配制好的杂交液不宜反复冻融，否则易产生硫酸葡聚糖沉淀现象。使用前最好加热至 50°C，使其充分溶解后再加入探针分子。至于探针的浓度视实验目的、探针类型及标记方法而异。通常 RNA 探针分子浓度为 0.5 ~ 2μg/ml，DNA 探针浓度为 1μg/ml，此外，如使用 <sup>35</sup>S 标记的探针，还需加入终浓度为 100mmol/L 的二硫苏糖醇（Dithiothreitol, DTT）至杂交液及杂交后的洗脱液中。

#### 八、杂交后漂洗溶液

无论用何种标记方法及何种信号显示方法，在杂交后洗脱则是大同小异。在此，归纳几种带有共同性及常用的洗脱液。

1.	{	2 × SSC	
		0.1% Triton X - 100(或 0.01% SDS)	
试剂:	{	20 × SSC	100ml
		10% Triton X - 100(或 10% SDS)	10ml
		灭菌 ddH <sub>2</sub> O	~ 1 000ml(定容)

该液常用于杂交后的初次洗脱，故离子强度（张力）较高。

2.	{	0.1 × SSC	
		0.1% Triton X - 100(或 10% SDS)	
试剂:	{	20 × SSC	5ml
		10% Triton X - 100(或 10% SDS)	10ml
		灭菌 ddH <sub>2</sub> O	~ 1 000ml(定容)

该液常用于杂交后的第二次洗脱，离子强度较低，经过上述两套洗脱液洗后，有的还可用 2×SSC，10% (0.1%) SDS 洗脱。

{	RNA 酶 A(10mg/ml)	100μl
{	2 × SSC	~ 100ml

主要是洗去残留的 RNA，降低背景。用于以 RNA 为探针的原位杂交方法中。

#### 4. Dig 标记探针杂交后处理液

		终浓度	
缓冲液 1: (TSM <sub>1</sub> )	1mol/L Tris(pH7.5)*	100ml	0.1 mol/L
	5mol/L NaCl	20ml	0.1 mol/L
	1mol/L MgCl <sub>2</sub>	2ml	2mmol/L
	BSA	30g	3%.(价贵,不能负担可省略)

用 ddH<sub>2</sub>O 溶液并定容至 1000ml。

缓冲液 2: (TSM <sub>2</sub> )	1mol/L Tris(pH7.5)*	100ml	0.1 mol/L
	5mol/L NaCl	20ml	0.1 mol/L
	1mol/L MgCl <sub>2</sub>	50ml	50mmol/L

用 ddH<sub>2</sub>O 溶解并定容至 1000ml。

缓冲液 3: (终止液)	1mol/L Tris(pH7.5)*	20ml	20mmol/L
	1mol/L EDTA	5ml	5mmol/L

配制同上。

AP 显色液:	缓冲液 2	100ml
	左旋咪唑(levamisole)	25mg
	NBT/70% DMF	35mg/277 $\mu$ l
	BCIP/DMF	17mg/223 $\mu$ l

左旋咪唑有消除内源性磷酸酶的作用。

## 九、原位杂交信号显示

目前应用原位杂交方法中,信号的显示主要有放射自显影,酶底物及免疫金银等方法,在此归纳有关的主要试剂。

### 1. A-B 显影液

A 液:	对苯二酚	0.85g
	柠檬酸钠	2.35
	柠檬酸	2.55
	去离子水(或 ddH <sub>2</sub> O)	50ml
B 液:	硝酸银	93mg
	去离子水(或 ddH <sub>2</sub> O)	50ml

称取上述试剂,按配方分别溶于 50ml ddH<sub>2</sub>O 中,于显影前,在室温将两者(A液及 B 液)按 1:1 混合,稍加摇动促进混合,即可将贴有切片标本的切片放入显影液,于室温避光(可暗室)反应 5~15min。显影时间和温度相关,需自己根据情况摸索。终止反应只需将显影液倒出,自来水冲洗即可。倒出的 AB 显影液可暂时不扔,光镜下观察,若明显显影不够,还可重新或继续显影。AB 显影液要求临用前配制,在显影时才将 AB 二液混合。否则,A 液过久会产生黄色沉淀,增加背景。

AB 液用于免疫金银法中,使金标记颗粒信号放大,形成棕黑色沉淀。

### 2. DAB-H<sub>2</sub>O 显色液

DAB(二氨基联苯胺)	5mg	
	TBS	10ml
	30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 $\mu$ l

配制方法见附录一。

该液用于标本被标记上辣根过氧化物酶 (HRP) 的方法。产物为棕黄色。

### 3. NBT-BCIP 显色液

NBT/DMF(75mg/ml 70% DMF)	20 $\mu$ l
BCIP/DMF(50mg/ml/DMF)	20 $\mu$ l
AP 显色缓冲液	5ml

配制方法, 详见附录一。

该液用于有碱性磷酸酶标记物的方法中。产物为紫蓝色。

### 4. Kodak D-19 显影液

米吐尔	2g
无水亚硫酸钠	72g
对苯二酚	8.8g
无水碳酸钠	4.8g
溴化钾	4g
水	~ 1 000ml

配制: 先将 500ml 水中加温 50°C, 按上述配方顺序加药, 同时充分搅拌, 每加一种药完全溶解后, 再加另一种药品, 否则, 所配的显影液易产生混浊而效果差, 最后补足水至 1000ml 充分混合, 室温或 4°C 避光保存。最好包上纸。

该液用于放射自显影时的显影。

### 5. Kodak F-5 定影液 (酸性坚膜定影液)

海波(硫代硫酸钠)	240g
无水亚硫酸钠	15g
28% 醋酸 <sup>*</sup>	48ml
硼酸(结晶)	75g
钾矾	15g
水	~ 1 000ml

※: 28%醋酸为 3 份冰醋酸和 8 份水混合液。

配制: 同 Kodak D-19 显影液。

## 7.10. 荧光原位杂交 (FISH)

### 实验原理

荧光原位杂交 (Fluorescence in situ hybridization FISH) 是一门新兴的分子细胞遗传学技术, 是 20 世纪 80 年代末期在原有的放射性原位杂交技术的基础上发展起来的一种非放射性原位杂交技术。目前这项技术已经广泛应用于动植物基因组结构研究、染色体精细结构变异分析、病毒感染分析、人类产前诊断、肿瘤遗传学和基因组进化研究待许多领域。FISH 的基本原理是用已知的标记单链核酸为探针, 按照碱基互补的原则, 与待检材料中未知的单链核酸进行异性结合, 形成可被检测的杂交双链核酸。由于 DNA 分子在染色体上是沿着染色体纵轴呈线性排列, 因而可以探针直接与染色体进行杂交从而将特定的基因在染色体上定位。与传统的放射性标记原位杂交相比, 荧光原位杂交具有快速、检测信号强、杂交特异性高和可以多重染色等特点, 因此在分子细胞遗传学领域受到普遍关注。

杂交所用的探针大致可以分类三类: 1) 染色体特异重复序列探针, 例如  $\alpha$  卫星、卫星 III 类的探针, 其杂交靶位常大于 1Mb, 不含散在重复序列, 与靶位结合紧密, 杂交信号强, 易于检测; 2) 全染色体或染色体区域特异性探针, 其由一条染色体或染色体上某一区段上极端不同的核苷酸片段所组成, 可由克隆到噬菌体和质粒中的染色体特异大片段获得; 3) 特异性位置探针, 由一个或几个克隆序列组成。

探针的荧光素标记可以采用直接和间接标记的方法。间接标记是采用生物素标记 DNA 探针，杂交之后用耦联有荧光素亲和素或者链霉亲和素进行检测，同时还可以利用亲和素-生物素-荧光素复合物，将荧光信号进行放大，从而可以检测 500bp 的片段。而直接标记法是将荧光素直接与探针核苷酸或磷酸戊糖骨架共价结合，或在缺口平移法标记探针时将荧光素核苷三磷酸掺入。直接标记法在检测时步骤简单，但由于不能进行信号放大，因此灵敏度不如间接标记的方法。

## 实验用具及材料

材料及试剂	用具
人的 MyoD1 (MYF3) 基因探针	恒温水浴锅
人外周血中期染色体细胞标本	培养箱
指甲油	染色缸
甲酰胺	载玻片
氯化钠	Nikon E-400 荧光显微镜
柠檬酸钠	盖玻片
氢氧化钠	封口膜
	200 $\mu$ L 移液器

## 相关溶液的配制

- 1) 20 $\times$ SSC: 175.3g NaCl, 88.2g 柠檬酸钠, 加水至 1000mL (用 10mmol/L NaOH 调 pH 至 7.0)。
- 2) 去离子甲酰胺 (DF): 将 10g 混合床离子交换树脂加入 100mL 甲酰胺中。电磁搅拌 30min, 用 Whatman 1 号滤纸滤。
- 3) 体积分数 70%甲酰胺/2 $\times$ SSC: 35mL 甲酰胺, 5mL 20 $\times$ SSC, 10mL 水。
- 4) 体积分数 50%甲酰胺/2 $\times$ SSC: 100mL 甲酰胺, 20mL 20 $\times$ SSC, 80mL 水。
- 5) 体积分数 50%硫酸葡聚糖 (DS): 65 $^{\circ}$ C 水浴中融化, 4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C 保存。
- 6) 杂交液: 8 $\mu$ L 体积分数 25%DS, 20 $\mu$ L 20 $\times$ SSC 混合。(或 40 $\mu$ L 体积分数 50%DS, 20 $\mu$ L 20 $\times$ SSC, 40 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 混合) 取上述混合液 50 $\mu$ L, 与 5 $\mu$ L DF 混合即成。其浓度为体积分数 10%DS, 2 $\times$ SSC, 体积分数 50%DF。
- 7) PI/antifade 溶液  
PI 原液: 先以双蒸水配置溶液, 浓度为 100 $\mu$ g/mL, 取出 1mL, 加 39mL 双蒸水, 使浓度为 2.5 $\mu$ g/mL。  
Antifade 原液: 以 PBS 缓冲液配制该溶液, 使其浓度为 10mg/mL, 用 0.5mmol/L 的 NaHCO<sub>3</sub> 调 pH 值为 8.0。取上述溶液 1mL, 加 9mL 甘油, 混匀。  
PI/antifade 溶液: PI 与 antifade 原液按体积比 1:9 比例充分混匀, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。
- 8) DAPI/antifade 溶液: 用去离子水配制 1mL/mg DAPI 储存液, 按体积比 1:300, 以 antifade 溶液稀释成工作液。
- 9) 封闭液 I: 体积分数 5%BSA 3mL, 20 $\times$ SSC 1mL, ddH<sub>2</sub>O 1mL, Tween20 5 $\mu$ L 混合。
- 10) 封闭液 II: 体积分数 5% BSA 3mL, 20 $\times$ SSC 1mL, goat serum 250 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 750 $\mu$ L, Tween20 5 $\mu$ L 混合。
- 11) 荧光检测试剂稀释液: 体积分数 5% BSA 1mL, 20 $\times$ SSC 1mL, ddH<sub>2</sub>O 3mL, Tween20 5 $\mu$ L 混合。
- 12) 洗脱液: 100mL 20 $\times$ SSC, 加水至 500mL, 加 Tween20 500 $\mu$ L。

## 实验方法及步骤

### 1) 探针变性

将探针在 75 $^{\circ}$ C 恒温水浴中温育 5min, 立即置 0 $^{\circ}$ C, 5~10min, 使双链 DNA 探针变性。

### 2) 标本变性

①将制备好的染色体玻片标本于 50 $^{\circ}$ C 培养箱中烤片 2~3h。(经 Giemsa 染色的标本需预先在固定液中退色后再烤片)。

②取出玻片标本, 将其浸在 70~75 $^{\circ}$ C 的体积分数 70%甲酰胺/2 $\times$ SSC 的变性液中变性 2~3min。

③立即按顺序将标本经体积分数 70%、体积分数 90%和体积分数 100%冰乙醇系列脱水, 每次 5min, 然后空气干燥。

### 3) 杂交

将已变性或预退火的 DNA 探针 10 $\mu$ L 滴于已变性并脱水的玻片标本上, 盖上 18 $\times$ 18 盖玻片, 用 Parafilm 封片, 置于潮湿暗盒中 37 $^{\circ}$ C 杂交过夜 (约 15~17h)。由于杂交液较少, 而且杂交温度较高, 持续时间又长, 因此为了保持标本的湿润状态, 此过程在湿盒中进行。

### 4) 洗脱

此步骤有助于除去非特异性结合的探针, 从而降低本底。

- (1) 杂交次日, 将标本从 37 $^{\circ}$ C 温箱中取出, 用刀片轻轻将盖玻片揭掉。
- (2) 将已杂交的玻片标本放置于已预热 42~50 $^{\circ}$ C 的体积分数 50% 甲酰胺/2 $\times$ SSC 中洗涤 3 次, 每次 5min。
- (3) 在已预热 42~50 $^{\circ}$ C 的 1 $\times$ SSC 中洗涤 3 次, 每次 5min。
- (4) 在室温下, 将玻片标本于 2 $\times$ SSC 中轻洗一下。
- (5) 取出玻片, 自然干燥。
- (6) 取 200 $\mu$ L 复染溶液 (PI/antifade 或 DAPI/antifade 染液) 滴加在玻片标本上, 盖上盖玻片。

### 5) 杂交信号的放大 (适用于使用生物素标记的探针)

- (1) 在玻片的杂交部位加 150 $\mu$ L 封闭液 I, 用保鲜膜覆盖, 37 $^{\circ}$ C 温育 20min。
- (2) 去掉保鲜膜, 再加 150 $\mu$ L avidin-FITC 于标本上, 用保鲜膜覆盖, 37 $^{\circ}$ C 继续温育 40min。
- (3) 取出标本, 将其放入已预热 42~50 $^{\circ}$ C 的洗脱液中洗涤 3 次, 每次 5min。
- (4) 在玻片标本的杂交部位加 150 $\mu$ L 封闭液 II, 覆盖保鲜膜, 37 $^{\circ}$ C 温育 20min。
- (5) 去掉保鲜膜, 加 150 $\mu$ L antiavidin 于标本上, 覆盖新的保鲜膜, 37 $^{\circ}$ C 温育 40min。
- (6) 取出标本, 将其放入已预热 42~50 $^{\circ}$ C 的新洗脱液中, 洗涤 3 次, 每次 5min。
- (7) 重复步骤(1)、(2)、(3), 再于 2 $\times$ SSC 中室温清洗一下。
- (8) 取出玻片, 自然干燥。
- (9) 取 200 $\mu$ L PI/antifade 染液滴加在玻片标本上, 盖上盖玻片。

### 6) 封片

可采用不同类型的封片液。如果封片液中不含有 Mowiol (可使封片液产生自封闭作用), 为防止盖片与载片之间的溶液挥发, 可使用指甲油将盖片周围封闭。封好的玻片标本可以在-20~-70 $^{\circ}$ C 的冰箱中的暗盒中保持数月之久。

### 7) 荧光显微镜观察 FISH 结果

先在可见光源下找到具有细胞分裂相的视野, 然后打开荧光激发光源, FITC 的激发波长为 490nm。细胞被 PI 染成红色, 而经 FITC 标记的探针所在的位置发出绿色荧光。

所用不同荧光材料的激发光和发射光波长及滤光镜选择

荧光染料	激发波长(nm)	发射波长(nm)	适用激发光
FITC	490	520	IB
rhodamine	511	572	IG
Texas Red	596	620	IY
Cy3	515	570	B, BV
DAPI	345	455	U
PI	530	615	IB, G, IG

## 8. 酵母双杂交技术

### 8.1. 酵母双杂交技术及其在蛋白质组研究中的应用

作为后基因组时代出现的新兴研究领域之一, 蛋白质组学(proteomics)正受到越来越多的关注。蛋白质组学的研究目标是对机体或细胞的所有蛋白质进行鉴定和结构功能分析。蛋白质组学的研究不局限任何特定的方法。高分辨率的蛋白质分离技术如二维凝胶电泳和高效液相层析, 经典的蛋白质鉴定方法如氨基酸序列分析等, 现代质

谱技术，基因组学研究的各种手段，现代计算机信息学和计算机网络通讯技术等等，任何可用于蛋白质研究的技术手段，蛋白质组学都可能会采用。它体现的是一个开放的思维和研究方式。

蛋白质-蛋白质的相互作用是细胞生命活动的基础和特征。这种千变万化的相互作用以及由此形成的纷繁复杂的蛋白质联系网络同样也是蛋白质组学的研究内容，相应的工作也已经开展。

酵母双杂交系统(yeast two-hybrid system)自建立以来已经成为分析蛋白质相互作用的强有力的方法之一。该方法在不断完善，如今它不但可用来在体内检验蛋白质间的相互作用，而且还能用来发现新的作用蛋白质，在对蛋白质组中特定的代谢途径中蛋白质相互作用关系网络的认识上发挥了重要的作用。实验表明双杂交技术在蛋白质组学上的应用是成功的。本文将就双杂交技术的产生、发展及其在蛋白质组研究方面的初步应用作一介绍。

## 1 蛋白质组学的产生背景

基因组研究自从开展以来已经取得了举世瞩目的成就。在过去几年中，已经陆续完成了包括大肠杆菌、酿酒酵母等十多种结构比较简单的生物的基因组 DNA 的全序列分析<sup>[1]</sup>。线虫(*C.elegans*)的基因组 DNA 测序工作已基本完成<sup>[2]</sup>。规模更为庞大的人类基因组计划预期在下一世纪的前几年(2003~2005年)也将完成全部基因组 DNA 的序列分析。这些进展是非常令人振奋的。但是也随之产生了新问题。大量涌出的新基因数据迫使我们不得不考虑这些基因编码的蛋白质有什么功能这个问题。不仅如此，在细胞合成蛋白质之后，这些蛋白质往往还要经历翻译后的加工修饰。也就是说，一个基因对应的不是一种蛋白质而可能是几种甚至是数十种。包容了数千甚至数万种蛋白质的细胞是如何运转的？或者说这些蛋白质在细胞内是怎样工作、如何相互作用、相互协调的？这些问题远不是基因组研究所能回答得了的。正是在此背景下，蛋白质组学(proteomics)应运而生。

蛋白质组(proteome)一词是马克·威尔金斯(Marc Wilkins)最先提出来的<sup>[3]</sup>，最早见诸于1995年7月的“Electrophoresis”杂志上<sup>[4]</sup>，它是指一个有机体的全部蛋白质组成及其活动方式。蛋白质组研究虽然尚处于初始阶段，但已经取得了一些重要进展。当前蛋白质组学的主要内容是，在建立和发展蛋白质组研究的技术方法的同时，进行蛋白质组分析。对蛋白质组的分析工作大致有两个方面。一方面，通过二维凝胶电泳得到正常生理条件下的机体、组织或细胞的全部蛋白质的图谱，相关数据将作为待检测机体、组织或细胞的二维参考图谱和数据库。一系列这样的二维参考图谱和数据库已经建立并且可通过联网检索。二维参考图谱建立的意义在于为进一步的分析工作提供基础。蛋白质组分析的另一面，是比较分析在变化了的生理条件下蛋白质组所发生的变化。如蛋白质表达量的变化，翻译后修饰的变化，或者可能的条件下分析蛋白质在亚细胞水平上的定位的改变等。关于蛋白质组学的介绍可参阅文献<sup>[5,6]</sup>。

细胞或组织的蛋白质不是杂乱无章的混合物，蛋白质间的相互作用、相互协调是细胞进行一切代谢活动的基础。蛋白质间的相互作用及作用方式同样也是蛋白质组研究所面临的问题。研究蛋白质间的相互作用有多种方法，常用的如酵母双杂交系统、亲和层析、免疫沉淀、蛋白质交联等。其中，酵母双杂交系统是当前发展迅速、应用广泛的主要方法。

## 2 酵母双杂交系统的建立与发展

双杂交系统的建立得力于对真核生物调控转录起始过程的认识。细胞起始基因转录需要有反式转录激活因子的参与。80年代的工作表明，转录激活因子在结构上是组件式的(modular)，即这些因子往往由两个或两个以上相互独立的结构域构成，其中有 DNA 结合结构域(DNA binding domain，简称为 DB)和转录激活结构域(activation domain，简称为 AD)，它们是转录激活因子发挥功能所必需的。单独的 DB 虽然能和启动子结合，但是不能激活转录。而不同转录激活因子的 DB 和 AD 形成的杂合蛋白仍然具有正常的激活转录的功能。如酵母细胞的 Gal4 蛋白的 DB 与大肠杆菌的一个酸性激活结构域 B42 融合得到的杂合蛋白仍然可结合到 Gal4 结合位点并激活转录<sup>[7]</sup>。

Fields 等人的工作标志双杂交系统的正式建立<sup>[8]</sup>。他们以与调控 SUC2 基因有关的两个蛋白质 Snf1 和 Snf2 为模型，将前者与 Gal4 的 DB 结构域融合，另外一个与 Gal4 的 AD 结构域的酸性区域融合。由 DB 和 AD 形成的融合蛋白现在一般分别称之为“诱饵”(bait)和“猎物”或靶蛋白(pre y or target protein)。如果在 Snf1 和 Snf2 之间存在相互作用，那么分别位于这两个融合蛋白上的 DB 和 AD 就能重新形成有活性的转录激活因子，从而激活相应基因的转录与表达。这个被激活的、能显示“诱饵”和“猎物”相互作用的基因称之为报道基因(reporter gene)。通过对报道基因表达产物的检测，反过来可判别作为“诱饵”和“猎物”的两个蛋白质之间是

否存在相互作用。在此 Fields 等人采用编码 $\beta$ -半乳糖苷酶的 LacZ 作为报道基因，并且在该基因的上游调控区引入受 Gal4 蛋白调控的 GAL1 序列。这个改造过的 LacZ 基因被整合到酵母染色体 URA3 位上。而酵母的 GAL4 基因和 GAL80 基因(Gal80 是 Gal4 的负调控因子)被缺失，从而排除了细胞内源调控因子的影响。已经知道在 Snf1 和 Snf2 之间存在相互作用。结果发现只有同时转化了 Snf1 和 Snf2 融合表达载体的酵母细胞才有 $\beta$ -半乳糖苷酶活性，单独转化其中任何一个载体都不能检测出 $\beta$ -半乳糖苷酶活性。

目前发展起来的各种双杂交系统大多是以 Fields 等人建立的系统为基础的。这些新系统主要对报道基因、“诱饵”表达载体以及“猎物”表达载体等做了一些改进。其中一个重要改进是引入额外的报道基因，如广泛采用的 HIS3 基因。经过改造带有 HIS3 报道基因的酵母细胞，只有当 HIS3 被启动表达才能在缺乏组氨酸的选择性培养基上生长。HIS3 报道基因的转录表达是由“诱饵”和“猎物”的相互作用所启动的。大多数双杂交系统往往同时使用两个甚至三个报道基因，其中之一是 LacZ。这些改造后的基因在启动子区有相同的转录激活因子结合位点，因此可以被相同的转录激活因子(如上述的 Gal4 蛋白)激活。通过这种双重或多重选择既提高了检测灵敏度又减少了假阳性现象。其他还有针对“诱饵”或“猎物”表达载体等所作的改进，这里不一一详述。

在双杂交鉴定过程中要经过两次转化，这个工作量是相当大的，特别是寻找新的作用蛋白质的时候尤其如此。而且，酵母细胞的转化效率比细菌要低约 4 个数量级。因此转化步骤就成为双杂交技术的瓶颈。Bendixen 等人通过酵母接合型的引用，避免了两次转化操作，同时又提高了双杂交的效率<sup>[9]</sup>。在酵母的有性生殖过程中涉及到两种配合类型：a 接合型和 $\alpha$ 接合型，这两种单倍体之间接合(mating)能形成二倍体，但 a 接合型细胞之间或 $\alpha$ 接合型细胞之间不能接合形成二倍体。根据酵母有性生殖的这一特点，他们将文库质粒转化 $\alpha$ 接合型酵母细胞，“诱饵”表达载体转化 a 接合型细胞。然后分别铺筛选平板使细胞长成菌苔(lawn)，再将两种菌苔复印到同一个三重筛选平板上，原则上只有诱饵和靶蛋白发生了相互作用的二倍体细胞才能在此平板上生长。单倍体细胞或虽然是二倍体细胞但 DB 融合蛋白和 AD 融合蛋白不相互作用的都被淘汰。长出来的克隆进一步通过 $\beta$ -半乳糖苷酶活力进行鉴定。这项改进不仅简化了实验操作，而且也提高了双杂交的筛选效率。

在研究蛋白质的结构功能特点、作用方式过程中，有时还要通过突变、加抑制剂等手段破坏蛋白质间的相互作用。针对实际工作中的这种需要，Vidal 等人发展了所谓的逆双杂交系统(reverse two-hybrid system)<sup>[10, 11]</sup>。这项技术的关键是报道基因 URA3 的引入。URA3 基因在这里起到了反选择的作用，它编码的酶是尿嘧啶合成的关键酶。该酶能把 5-氟乳清酸(5-FOA)转化成对细胞有毒的物质。Vidal 等人通过改造在 URA3 基因的启动子内引入 Gal4 的结合位点。这个改造的酵母菌株在缺乏尿嘧啶的选择性培养基上只有当“诱饵”和“猎物”相互作用激活 URA3 基因的表达才能生长。在含有 5-FOA 的完全培养基上“诱饵”和“猎物”的相互作用则抑制细胞的生长。然而如果目的蛋白，即与 DB 或 AD 融合的蛋白质发生了突变或者由于外加药物的干扰不再相互作用，URA3 基因不表达，则细胞能在含有 5-FOA 的完全培养基上生长。通过这种方法，Vidal 等人筛选到了转录因子 E2F1 的突变物，这些突变物仍然能结合视网膜母细胞瘤蛋白 RB，但是丧失了同另外一种称为 DP1 蛋白的结合能力。结果得到了体外结合实验的验证。通过对这些突变蛋白基因的测序，他们发现了新的 E2F1 同 DP1 结合的位点。

以上介绍的酵母双杂交系统都是建立在对 RNA 聚合酶 II 的激活的基础上的。这意味着双杂交过程是在细胞核内完成的。然而许多待研究的蛋白质是膜蛋白，它们需定位到膜上之后才能表现正常的生物功能，与其他蛋白质起作用。有些真核细胞蛋白还要经过翻译后的加工修饰如二硫键的形成、糖基化、聚异戊二烯基化等。这些加工修饰在正常的细胞核内不可能发生。有些蛋白质本身具有激活转录的活性，它们可不经双杂交相互作用即能激活报道基因的表达。因此根据需要有人又发展了新的双杂交系统。例如，Aronheim 等人设计了一个 Sos 蛋白介导的双杂交系统<sup>[12]</sup>，也被作者称为 Sos 救活系统(Sos recruitment system)。人的鸟苷酸交换因子-Sos 蛋白是一种胞质蛋白，而酵母的鸟苷酸交换因子-cdc25 蛋白定位在内膜上，可将相关受体信号传导给 Ras 蛋白。由 cdc25 突变产生的一种温度敏感突变型细胞不能在 36 °C 条件下生长。但是，如果 Sos 蛋白可以通过某种方式被定位到酵母细胞内膜上，那么它在这种温度敏感突变型细胞中因替代 cdc25 蛋白的作用，而使酵母恢复在 36 °C 条件下生长的能力。在 Aronheim 等人设计的系统中，待研究的两个蛋白质分别与豆蔻酰基化信号片段和 Sos 蛋白融合，前一个融合蛋白定位于膜上，如果两个待研究蛋白质之间存在相互作用，这将使 Sos 也定位到膜上，从而可激活 Ras 蛋白使酵母在 36 °C 下生长。利用该技术 Aronheim 等人找到了 c-Jun 的两个新的作用伙伴。

此外还有其他类型的双杂交甚至三杂交系统，本文不再详述。

### 3 双杂交系统在蛋白质组研究中的应用

双杂交系统在蛋白质组研究上的应用可以说尚处于尝试阶段，这方面的文献报道还很少，但已显示其在分析鉴定细胞内复杂的蛋白质相互作用方面的潜力。这里以两家实验室的工作为例作一介绍。

Fromont-Racine 等人<sup>[13, 14]</sup>以 10 种功能已知的与 mRNA 前体剪接有关的蛋白质作起始“诱饵”，从含有约  $5 \times 10^6$  个克隆的酿酒酵母基因组文库中进行第一轮筛选(这些基因组 DNA 与 AD 的基因融合构成“猎物”表达载体)。经过对阳性克隆“猎物”DNA 的序列分析，他们把这些 DNA 分成两大类共 5 项(图 1)：编码蛋白质的 DNA 和非编码蛋白质的 DNA，前一类分为四项：A1 是在序列上彼此有部分重叠的克隆群。这一项也是首先分析考虑的对象；A2 和 A3 分别是靠近 ORF 起始密码子的编码蛋白质 N-末端的片段和 ORF 内部的大编码片段，A4 是其他的编码序列。这四项优先考虑的顺序是：A1>A2>A3>A4。根据分析把从中得到的 4 种靶蛋白做成新的“诱饵”进行第二轮筛选。再把从中得到的一种“猎物”做成“诱饵”进行第三轮筛选。如此经过三轮共十五次筛选，他们从中共得到约 700 个阳性克隆并且对大多数作了部分测序。这些筛选到的靶蛋白中，有 9 种是已知的 mRNA 前体剪接因子，5 种是新发现的剪接因子，8 种是与 RNA 其他加工过程有关的因子，还有 45 种与其他的功能有关。另外有 9 种是转录激活因子，这主要来自假阳性克隆。他们不仅发现了已知剪接因子与其他因子的相互作用，鉴定了一些新的因子，而且建立了这个剪接途径与其他代谢途径的联系。

据此 Fromont-Racine 等人声称，如果选择不同的细胞代谢或信号转导途径为出发点，通过类似的双杂交实验最终有可能建立酵母细胞完整的蛋白质联系图谱。推而广之，这项技术同样也能用到人类蛋白质组研究中。

Fromont-Racine 等人能在较短的时间完成如此大量的筛选、分析工作，一个非常关键的因素是他们采用了上述 Bendixen 等人建立的通过酵母的有性接合得到双杂交菌株，并且对此技术作了进一步的改进。Bendixen 等人是通过把两种接合型细胞同时复印到一个平板上使之接合；而 Fromont-Racine 则是把两种细胞直接在滤膜上混合然后铺到选择性平板上，因此避免了烦琐的复印操作，使工作效率进一步提高<sup>[13]</sup>。

与此类似，Hudson 等人也正在对酿酒酵母的蛋白质组的研究分析工作<sup>[14]</sup>。他们把酵母所有的即约 6 000 多种蛋白质开放读码框(ORF)，分别构建成与 DB 和 AD 基因融合的表达载体。两类载体分别转化不同接合型酵母菌株。6 000 株分别表达不同的 AD-ORF 即“猎物”的细胞在 16 张 384 孔微滴定板上培养，再取少许菌液点在只表达一种 BD 融合蛋白的细胞形成的菌苔上使两种细胞接合形成二倍体，然后按照常规的双杂交技术鉴定“诱饵”和 AD 融合蛋白是否发生相互作用(图 2)。整个过程主要是在 384 孔微滴定板上完成的。和 Fromont-Racine 等人的方法相比，这个方法的优点是操作过程可最大程度地自动化，微滴定板的使用也大大提高了处理量。这项工作虽已由 Frederickson 作了介绍，但目前为止尚未见到它正式发表。根据 Frederickson 的评论，这个方法如果成功的话，那末它很有可能在人类蛋白质组研究中得到应用。

### 4 结束语

酵母双杂交技术问世不到十年，但已经在蛋白质间的相互作用研究、筛选新的蛋白质、研究蛋白质的功能等诸方面发挥重要作用。双杂交技术固然有其内在的不足之处，如通过双杂交观察到的蛋白质的相互作用在真实情况下不一定发生，也即所谓的假阳性；假阴性现象也是双杂交分析过程中经常碰到的问题；一些对细胞致命的蛋白质也不适宜通过双杂交系统来分析。双杂交只是反映蛋白质间能发生作用的可能性，这种可能还必须经过其他实验验证，尤其要与生理功能研究相结合，否则可能会误入歧途。虽然如此，该技术已经成为许多实验室研究蛋白质的相互作用和蛋白质的结构与功能的必要手段。技术的发展与创新、研究成果的迅速共享为建立有机体的全部蛋白质(蛋白质组组分)的相互作用及其功能关系图谱提供了基础和条件。我们不奢望通过双杂交系统能发现所有真实的蛋白质相互作用，但在没有更好的方法问世之前，双杂交技术仍是开展这类研究的有力工具。

### 8.2. 酵母双杂交系统的发展和利用

随着对多种重要生物的大规模基因组测序工作的完成，基因工程领域又迎来了一个新的时代---功能基因组时代。它的任务就是对基因组中包含的全部基因的功能加以认识。生物体系的运作与蛋白质之间的互相作用密不可分，例如：DNA 合成、基因转录激活、蛋白质翻译、修饰和定位以及信息传导等重要的生物过程均涉及到蛋白质复合体的作用。能够发现和验证在生物体中相互作用的蛋白质与核酸、蛋白质与蛋白质是认识它们生物学功能的第一步。

酵母双杂交技术作为发现和研究在活细胞体内的蛋白质与蛋白质之间的相互作用的技术平台，在近几年来得到了广泛运用。酵母双杂交系统是在真核模式生物酵母中进行的，研究活细胞内蛋白质相互作用，对蛋白质之间微弱的、瞬间的作用也能够通过报告基因的表达产物敏感地检测得到，它是一种具有很高灵敏度的研究蛋白质之间关系

的技术。大量的研究文献表明，酵母双杂交技术既可以用来研究哺乳动物基因组编码的蛋白质之间的互作，也可以用来研究高等植物基因组编码的蛋白质之间的互作。因此，它在许多的研究领域中有广泛的应用。本文就酵母双杂交的技术平台和应用加以介绍。

酵母双杂交系统的建立是基于对真核生物调控转录起始过程的认识。细胞起始基因转录需要有反式转录激活因子的参与。反式转录激活因子，例如酵母转录因子 GAL4 在结构上是组件式的 (modular)，往往由两个或两个以上结构上可以分开，功能上相互独立的结构域 (domain) 构成，其中有 DNA 结合功能域 (DNA binding domain, DNA-BD) 和转录激活结构域 (activation domain, DNA-AD)。这两个结合域将它们分开时仍分别具有功能，但不能激活转录，只有当被分开的两者通过适当的途径在空间上较为接近时，才能重新呈现完整的 GAL4 转录因子活性，并可激活上游激活序列 (upstream activating sequence, UAS) 的下游启动子，使启动子下游基因得到转录。

根据这个特性，将编码 DNA-BD 的基因与已知蛋白质 Bait protein 的基因构建在同一个表达载体上，在酵母中表达两者的融合蛋白 BD-Bait protein。将编码 AD 的基因和 cDNA 文库的基因构建在 AD-LIBRARY 表达载体上。同时将上述两种载体转化改造后的酵母，这种改造后的酵母细胞的基因组中既不能产生 GAL4，又不能合成 LEU、TRP、HIS、ADE，因此，酵母在缺乏这些营养的培养基上无法正常生长。当上述两种载体所表达的融合蛋白能够相互作用时，功能重建的反式作用因子能够激活酵母基因组中的报告基因 HIS、ADE、LACZ、MEL1，从而通过功能互补和显色反应筛选到阳性菌落。将阳性反应的酵母菌株中的 AD-LIBRARY 载体提取分离出来，从而对载体中插入的文库基因进行测序和分析工作。在酵母双杂交的基础上，又发展出了

酵母单杂交、酵母三杂交和酵母的反向杂交技术。它们被分别用于核酸和文库蛋白之间的研究、三种不同蛋白之间的互作研究和两种蛋白相互作用的结构和位点。

基于酵母双杂交技术平台的特点，它已经被应用在许多研究工作当中。

### 1、利用酵母双杂交发现新的蛋白质和蛋白质的新功能

酵母双杂交技术已经成为发现新基因的主要途径。当我们将已知基因作为诱饵，在选定的 cDNA 文库中筛选与诱饵蛋白相互作用的蛋白，从筛选到的阳性酵母菌株中可以分离得到 AD-LIBRARY 载体，并从载体中进一步克隆得到随机插入的 cDNA 片段，并对该片段的编码序列在 GENE BANK 中进行比较，研究与已知基因在生物学功能上的联系。另外，也可作为研究已知基因的新功能或多个筛选到的已知基因之间功能相关的主要方法。例如：Engelender 等人以神经末端蛋白 alpha-synuclein 蛋白为诱饵蛋白，利用酵母双杂交 CLONTECH MATCHMARKER SYSTEM 3 为操作平台，从成人脑 cDNA 文库中发现了与 alpha-synuclein 相互作用的新蛋白 Synphilin-1，并证明了 Synphilin-1 与 alpha-synuclein 之间的相互作用与帕金森病的发病有密切相关。为了研究两个蛋白之间的相互作用的结合位点，找到影响或抑制两个蛋白相互作用的因子，Michael 等人又利用酵母双杂交技术和基因修饰证明了 alpha-synuclein 的 1-65 个氨基酸残基和 Synphilin-1 的 349-555 个氨基酸残基之间是相互作用的位点。研究它们之间的相互作用位点有利于基因治疗药物的开发。

### 2、利用酵母双杂交在细胞体内研究抗原和抗体的相互作用

利用酶联免疫 (ELISA)、免疫共沉淀 (CO-IP) 技术都是利用抗原和抗体间的免疫反应，可以研究抗原和抗体之间的相互作用，但是，它们都是基于体外非细胞的环境中研究蛋白质与蛋白质的相互作用。而在细胞体内的抗原和抗体的聚积反应则可以通过酵母双杂交进行检测。例如：来源于矮牵牛的黄烷酮醇还原酶 DFR 与其抗体 scFv 的反应中，抗体的单链的三个可变区 A4、G4、H3 与抗原之间作用有强弱的差异。Geert 等利用酵母双杂交技术，将 DFR 作为诱饵蛋白，编码抗体的三个可变区的基因分别被克隆在 AD-LIBRARY 载体上，将 BD-BAIT 载体和每种 AD-LIBRARY 载体分别转化改造后的酵母菌株中，并检测报告基因在克隆的菌落中的表达活性，从而在活细胞的水平上检测抗原和抗体的免疫反应。

### 3、利用酵母双杂交筛选药物的作用位点以及药物对蛋白质之间相互作用的影响

酵母双杂交的报告基因能否表达在于诱饵蛋白与靶蛋白之间的相互作用。对于能够引发疾病反应的蛋白互作可以采取药物干扰的方法，阻止它们的相互作用以达到治疗疾病的目的。例如：Dengue 病毒能引起黄热病、肝炎等疾病，研究发现它的病毒 RNA 复制与依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (NS5) 与拓扑异构酶 NS3，以及细胞核转运受体 BETA-importin 的相互作用有关。研究人员通过酵母双杂交技术找到了这些蛋白之间相互作用的氨基酸序列。如

果能找到相应的基因药物阻断这些蛋白之间的相互作用，就可以阻止 RNA 病毒的复制，从而达到治疗这种疾病的目的。

#### 4、利用酵母双杂交建立基因组蛋白连锁图 (Genome Protein Linkage Map)

众多的蛋白质之间在许多重要的生命活动中都是彼此协调和控制的。基因组中的编码蛋白质的基因之间存在着功能上的联系。通过基因组的测序和序列分析发现了很多新的基因和 EST 序列，HUA 等人利用酵母双杂交技术，将所有已知基因和 EST 序列为诱饵，在表达文库中筛选与诱饵相互作用的蛋白，从而找到基因之间的联系，建立基因组蛋白连锁图。对于认识一些重要的生命活动：如信号传导、代谢途径等有重要意义。

### 8.3. LexA 酵母双杂交系统操作方法

#### 一、LexA 酵母双杂交系统的设计原理

报告质粒 p8op-LacZ 的 GAL4 UAS 编码序列被完全去除，因此在缺乏 LexA 融合激活剂的情况下，报告基因 LacZ 的转录活性为零，该基因的筛选标志为 URA3，可以作为有自主复制能力的质粒存在于酵母 EGY48 菌株中，也可以被整合到 EGY48 基因组 DNA 上。

质粒 pLexA 的筛选标志为 HIS3，在双杂交系统中用于表达 DNA-BD(202 个氨基酸残基组成的 LexA 蛋白)与目标蛋白(诱饵, Bait)的融合蛋白，该融合体的表达受酵母强启动子 ADH1 的调控，选择与报告基因的操纵子 LexA ×8 结合。

质粒 pB42AD 的筛选标志为 TRP1，在其供外源基因插入的多克隆位点(EcoR I 与 Xho I)上游，含有 SV40 核定位(SV40 nuclear localization)、HA(血凝素)及 AD(来自于 E.coli 的 88 个氨基酸残基组成的 B42 蛋白)等几种编码序列，共同组成可以启动报告基因转录表达的激活成份。

在酵母 EGY48 的基因组中还整合有另一个报告基因 Leu，它与 LacZ 报告基因具有相同的操纵子-LexA，但两者启动子不同。

根据双杂交系统的原理，如果某一复合物同时具有 DNA-BD 和 AD 的活性，即可激活报告基因的转录和表达。分别将待测蛋白 X、Y 的编码序列插入 pLexA 质粒载体和 pB42AD 质粒载体的多克隆位点中，然后共同转入含有报告基因的酵母菌株，如果蛋白 X 与 Y 能相互作用，则启动报告基因的转录和表达，通过检测报告基因的表达情况，就可以间接反映蛋白 X、Y 是否具有相互作用以及作用的强弱。

如果将蛋白 Y 换为取自组织或血液的 cDNA 文库，则可用 X 从该文库中筛选出能与其相互作用的蛋白，并且可以获得编码这些蛋白的 cDNA。

#### 二、商品化酵母双杂交系统的组成

1. 载体质粒：pLexA、pB42AD、p8op-LacZ、pB42AD-DNA 文库
2. 酵母菌株：EGY48、EGY48 ( p8op-LacZ )、YM4271 ( EGY48 的伴侣菌株 )
3. 大肠杆菌菌株：E.coli KC8 株
4. 对照质粒：

质粒	用途
pLexA-53, pB42AD-T	阳性对照
pLexA-Pos(LexA/GAL4 AD 融合蛋白)	阳性对照
pLexA-Lam(LaminC 蛋白少与其它蛋白相互作用)	假阳性检测质粒

#### 5. 引物：

pLexA 测序引物及 pB42AD 测序引物。

#### 三、酵母双杂交实验的基本流程

1. 将报告基因 p8op-LacZ 转化酵母 EGY48 菌株，用培养基 SD/-Ura 筛选。
2. 同时构建或扩增 DNA 文库，并纯化足够的质粒以转化酵母细胞。
3. 构建 DNA-BD/靶蛋白质粒 pLexA-X，作为诱饵(bait)。

4. 将上述诱饵质粒 pLexA-X 转化 EGY48(p8op-LacZ)细胞株, 用 SD/-His/-Ura 筛选; 并用固体诱导培养基 SD/Gal/Raf/-His/-Ura 检测此 DNA-BD/靶蛋白是否具有直接激活报告基因的活性, 以及对酵母细胞是否具有杀伤毒性。

转化质粒 选择培养基 克隆生长情况 说明

(含有 Gal/Raf)

pLexA-Pos SD/-His, -Ura 蓝 阳性对照

pLexA SD/-His, -Ura 白 阴性对照

PlexA-X SD/-His, -Ura 白 没有直接激活活性

PlexA-X SD/-His, -Ura 蓝 具有直接激活活性

PlexA-X SD/-His, -Ura 菌落不能生长 酵母细胞毒性

4-1. 如果 pLexA-X -半乳糖苷酶的信号作用。能够自动激活报告基因, 则设法去除其激活活性部位、或者将 LacZ 报告基因整合入基因组, 减少

4-2. 如果 pLexA-X 虽然不会自动激活报告基因, 但对酵母宿主细胞有毒性, 则需要与纯化的文库 DNA 同时转化酵母。

5. 如果 pLexA-X 既不会自动激活报告基因, 也不具有毒性, 则可以与纯化的文库 DNA 同时、或顺序转化酵母细胞, 并检测质粒转化效率。

转 化 质 粒 SD 固体培养基 LacZ 表型

对照 1 pLexA-Pos Gal/Raf/-His/-Ura 蓝

对照 2 pLexA-53 Gal/Raf/-His/-Trp/-Ura/-Leu 蓝

+ pB42AD-T

实 验 pLexA-X Gal/Raf/-His/-Trp/-Ura/-Leu 待测

+ pB42AD-文库

5-1. 用 SD/-His/-Trp/-Ura 培养基选择阳性共转化子, 并扩增, 使宿主细胞中的质粒在诱导前达到最大拷贝数。

-半乳糖苷酶无表达。 5-2. 上述重组子转至含 X-gal 的固体诱导培养基 SD/Gal/Raf/-His/-Trp/-Ura/-Leu, 观察 LacZ 及 Leu 报告基因的表达情形, 蓝色克隆即为阳性。白色克隆为假阳性, 说明 Leu 虽有表达, 但

5-3. 同时用 LacZ、Leu 两个报告基因的目的, 是为了尽可能消除实验的假阳性误差, 譬如: AD 融合蛋白不与目标蛋白结合, 而直接与启动子序列结合域结合等情况。由于 2 个报告基因的启动子不同, 出现上述假阳性的几率就大大减少了。

5-4. 将蓝色阳性克隆进行 1 次以上的划种, 尽可能分离克隆中的多种文库质粒。

6. 阳性克隆的筛选

6-1. 随机选取 50 个阳性克隆, 扩增、抽提酵母质粒, 电转化 E.coli KC8 宿主菌, 抽提大肠杆菌中的质粒, 酶切鉴定是否具有插入片段及排除相同的文库质粒。

6-2. 如果重复的插入序列较多, 可另取 50 个阳性克隆来分析。最后得到数种片段大小不同的插入序列, 再转化新的宿主细胞, 检测是否仍为阳性克隆。

7. 用质粒自然分选法(Natural Segregation)筛除只含有 AD-文库杂合子的克隆

7-1. 将初步得到的阳性克隆接种 SD/-Trp/-Ura 液体培养基, 培养 1-2 天, 含有 HIS3 编码序列的 BD-靶质粒在含有外源 His 培养基中, 将以 10%-20%左右的频率随机丢失。

C 孵育 2-3 天。 7-2. 将上述克隆, 转铺固体培养基 SD/-Trp/-Ura, 30

7-3. 再挑取生长的单克隆，转入 SD/-Trp/-Ura 和 SD/-His/-Trp/-Ura 培养基中，筛选 His 表型缺陷的克隆，即得到只含有 AD-文库杂合子的重组子。

7-4. 将 His 表型缺陷的克隆转化固体诱导培养基 SD/Gal/Raf/-Trp/-Ura，以验证 AD-文库能否直接激活报告基因的表达，弃去阳性克隆，保留阴性克隆。

#### 8. 酵母杂合试验(Yeast Mating)确定真阳性克隆

如下表所示，在酵母 EGY48 及其对应的 YM4271 宿主细胞中分别转入相应的质粒或文库 DNA，通过杂合实验确筛选 pLexA-靶 DNA 与 pB42AD-文库确实具有相互作用的真阳性克隆。

##### 质粒 1

(in YM4271) 质粒 2

(in EGY48) LacZ 表型 Leu 表型

pLexA pB42AD 白 不能生长

pLexA-靶 DNA pB42AD 白 不能生长

pLexA pB42AD-文库 白 不能生长

pLexA-靶 DNA pB42AD-文库 蓝 真 阳 性

pLexA-Lam pB42AD-文库 白 不能生长

#### 9. 阳性克隆的进一步筛选和确证

9-1. 扩增初步确定的阳性克隆，抽提酵母 DNA。该 DNA 为混合成份，既含有酵母基因组 DNA，也含有 3 种转化的质粒 DNA。

9-2. 将上述 DNA 电转化 E.coli KC8 宿主菌。由于在大肠杆菌中，具有不同复制起始调控序列的质粒不相容；同时利用营养缺陷型筛选。因此，在 M9/SD/-Trp 培养基上，只有含有 AD-文库质粒的转化菌才能生长，将其扩增、并抽提质粒 DNA，酶切鉴定。

9-3. 用 pLexA-靶 DNA 与 pB42AD-库 DNA 一一对应、共转化只含有报告基因的酵母菌 EGY48 中，先到 SD/-His/-Trp/-Ura 板扩增，并与后面的诱导板形成对照，说明报告基因的表达与诱导 AD 融合蛋白的表达有关，再确证 LacZ、Leu 报告基因的表达。

9-4. 扩增与靶 DNA 相互作用的文库 DNA，进行序列分析及进一步的结构、功能研究。

#### 10. 对双杂交系统阳性结果的进一步研究

10-1. 用不同的双杂交系统验证

10-1-1. 将载体 pLexA 与 pB42AD 互换后进行双杂交实验。

10-1-2. 选择不同的双杂交系统，如：以 GAL4 转录激活子为基础的双杂交系统。

10-1-3. 将文库质粒移码突变后，再与靶质粒作用，报告基因是否仍能被激活。

一半乳糖苷酶水平，比较作用强度变化。 10-1-4. 去除或突变特定结合位点，定量检测

10-2. 用试剂盒提供的引物测定插入片段的 DNA 序列，证明其编码区域。

10-3. 用其它的检测方法，如：亲和色谱法或免疫共沉淀法来证明双杂交系统筛选的蛋白之间的具有相互作用。

10-4. 进一步研究靶蛋白与筛选蛋白之间的功能关系

#### 构建于 AD 载体的 cDNA 文库的扩增

1. 自-80°C冰箱取出含有 cDNA 文库的甘油菌，置于冰浴中缓慢化冻。

2. 用新鲜的 LB 培养液在 1.5ml 离心管中将上述甘油菌 1:106 和 1:108 稀释。

3. 取稀释菌液各 100 μl (加入 90 mm 培养皿)；37°C 倒置培养过夜或 30°C 培养 24-36hr，计数平板上单克隆菌落数。

LB 培养液在 1.5ml 离心管中振荡混匀，涂布 LB/Amp 平板

4. 确定待扩增的 cDNA 文库滴度(cfu/ml)=克隆数×108(1:106 稀释)或克隆数×1010(1:108 稀释)。

5. 按照 $>150\text{mm}$ ), 共 100 块;  $37^\circ\text{C}$ 倒置培养过夜。  $2-4 \times 10^4\text{cfu/平板}$ 的浓度, 涂布 LB/Amp 平板
6. 在超净工作台上, 在所有生长菌落的平板上加适量 LB 培养液, 将菌落刮下, 转入 2000ml LB/Amp 培养液中,  $37^\circ\text{C}$ 振荡培养 2-4hr。
7. 留取适量培养菌液以 50%无菌甘油稀释至 25%终浓度, 分装, 保存于 $-80^\circ\text{C}$ 。
8. 其余培养菌液离心  $8000\text{g} \times 10\text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ 收集细菌; 用质粒 DNA 纯化试剂盒大量抽提质粒 DNA。

LB 液体培养基,  $121^\circ\text{C}$ ,  $15\text{lb/in}^2$  灭菌 15min

- A. bacto-Tryptone 10.0g
- B. bacto-Yeast Extract 5.0g
- C. NaCl 10.0g
- D. ddH<sub>2</sub>O  $\rightarrow$  1000 ml

\* LB 固体培养平板为含有 1.5%琼脂(Agar)LB 培养基。

\*\* LB/Amp 培养基为含有 Amp g/ml 的 LB 培养基。 50-100

### 构建于 AD 载体的 cDNA 文库的纯化

#### 1. 质粒 DNA 提取缓冲液

名称 缓冲液 配方

g/ml RNase P1 悬浮缓冲液 50mM Tris-HCl(pH8.0); 10mM EDTA; 100 A

P2 裂解缓冲液 200mM NaOH; 1% SDS

P3 中和缓冲液 3.0M Kac(pH5.5)

QBT 平衡缓冲液 750mM NaCl; 50mM MOPS(pH7.0); 15%异丙醇; 0.15% Triton X-100

QC 洗涤缓冲液 1.0 M NaCl; 50mM MOPS(pH7.0); 15%异丙醇

QF 洗脱缓冲液 1.25 M NaCl; 50mM Tris-HCl(pH8.5); 15%异丙醇

2. 培养菌液离心  $6000\text{g} \times 10\text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 每 500ml 培养物(下同)的沉淀重悬于 50ml P1 缓冲液。
  3. 加入 50ml P2 缓冲液, 倒置 4-6 次混匀, 室温孵育 5min。
  4. 加入  $4^\circ\text{C}$ 预冷的 50ml P3 缓冲液, 快速倒置 4-6 次混匀, 冰浴 30min(其间再倒置混匀 4-6 次)。
  5. 将上述混合液再倒置混匀, 离心  $12000\text{g} \times 30\text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 保留上清。
  6. 上清再离心  $12000\text{g} \times 15\text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 留上清。
  7. 将上清液上样于经 35ml QBT 缓冲液平衡的 QIAGEN-tip 层析柱。
  8. 以 100ml QC 缓冲液洗涤层析柱 2 次。
  9. 以 35ml QF 缓冲液洗脱吸附于层析柱上的 DNA。
  10. 以 0.7 倍体积异丙醇沉淀 DNA, 离心  $12500\text{g} \times 30\text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 小心去除上清。
  11. 以 7ml 70%乙醇洗涤沉淀 DNA, 离心  $12500\text{g} \times 10\text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 小心去除上清。
  12. 将沉淀的质粒 DNA 溶于 5ml TE(pH8.0)缓冲液, 转移至新的无菌离心管中, 用 2.5 倍体积无水乙醇; 1/10 体积 3.0M NaAc(pH5.2), 于 $-20^\circ\text{C}$ 静置过夜。
  13. 离心  $12500\text{g} \times 20\text{min}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 去除上清, 沉淀用 70%乙醇洗涤, 超净台风干。
- l), 保存于 $-20^\circ\text{C}$ 。 g/管(用于 1 次转化反应, 约 40 14. 干燥的 DNA 溶于适量体积 TE, 定量, 分装 100-200

### 构建于 DNA-BD 载体的目的 DNA 转化酵母感受态细胞

1. 将酵母菌 EGY48(p8op-lacZ)接种于 5.0ml SD/-Ura 液体培养基中, 缓振打散菌落, 然后转入 95.0ml SD/-Ura 液体培养基中,  $30^\circ\text{C}$ 恒温, 250rpm 振荡培养 16-18hr, 至  $\text{OD}_{600} > 1.0$ 。

SD/-Ura 液体培养基,  $115^\circ\text{C}$ ,  $10\text{lb/in}^2$  灭菌 15min

- A. Difco Nitrogen 0.67g
- B. 葡萄糖 2.00g

- C. 10×DO(-His, -Leu, -Trp, -Ura) 10.0ml
- D. 20×His 5.0ml
- E. 20×Leu 5.0ml
- F. 20×Trp 5.0ml
- G. ddH<sub>2</sub>O → 100.0ml

2. 将上述新鲜培养菌液接种于 300ml YPD, 至 OD<sub>600</sub>=0.2-0.3(约 50ml), 30°C恒温, 250rpm 振荡培养至 OD<sub>600</sub>=0.4-0.5(约 3hr)。

YPD 液体培养基, 115°C, 10lb/in<sup>2</sup> 灭菌 15min

- A. Polypepton 6.0g
- B. bacto-Yeast Extract 3.0g
- C. 葡萄糖 6.0g
- D. ddH<sub>2</sub>O → 300 ml

3. 室温离心 5000xg×5min 弃上清 加入 15-25ml ddH<sub>2</sub>O 重悬洗涤沉淀酵母细胞 离心弃上清 沉淀用 1×TE/LiAc 重悬后, 即为酵母感受态细胞。

4. 准备下列试剂

2×转化反应 10×TE 10×LiAc 50% PEG ddH<sub>2</sub>O

- I | / 120 | 15 A. 1×TE/LiAc 0.15ml 15
- I | / 1960 | 120 B. PEG/LiAc 1.20ml 120
- I | / / 900 C. 1×TE 1.00ml 100

5. 分装待转化的质粒 DNA, 振荡混匀。

- I | g) 3-5 A. pLexA-X(0.1
- B. 10mg/ml I Sperm DNA\*(0.1mg) 10

\* 新配制时水浴煮沸 20min 后, 插入冰浴, 保存于-20°C。

I 用 1×TE/LiAc 重悬的酵母感受态细胞, 振荡混匀。 6. 每管加入 100

I | 7. 各加入 600 PEG/LiAc, 振荡混匀, 30°C恒温, 250rpm 振荡培养 30min。

I | 8. 各加入 70 DMSO 缓和倒置混匀。42°C热休克 15min, 迅速插入冰浴。

9. 室温离心 13000xg×10sec, 尽量弃上清; 以 0.3ml 1×TE 重悬沉淀细胞, 涂布 SD/-Ura, -His 固体培养板, 30°C倒置培养 3-5 天。

SD/-Ura, -His 固体培养基, 115°C, 10lb/in<sup>2</sup> 灭菌 15min 稍冷却后铺板

- A. Difco Nitrogen 1.34g
- B. 葡萄糖 4.00g
- C. 10×DO(-His, -Leu, -Trp, -Ura) 20.0ml
- D. 20×Leu 10.0ml
- E. 20×Trp 10.0ml
- F. Agar 4.00g
- G. ddH<sub>2</sub>O 90-100mm) → 200.0ml 铺 8-10 块平板(

附表 1. 不同规模转化酵母感受态细胞

Small Scale\* Large Scale Library Scale

转化反应 20 1 1

- (1) SD 液体培养基扩增酵母菌 100ml 100ml 300ml
  - (2) YPD 液体培养基扩增酵母菌 300mla 300mla 1000mla
  - (3) TE 或 ddH<sub>2</sub>O 洗涤酵母细胞 15mlc 25-50mlb 500mla
  - (4) 准备 A. 1×TE/LiAc 缓冲液 1.5mld 1.0mld 8.0mlc  
B. PEG/LiAc 缓冲液 12.0mlc 6.0mlc 100.0mlb  
C. 1×TE 缓冲液 6.0mlc 10.0mlc 10.0mlc
  - (5) 分装 A. DNA-BD vector g<sub>d</sub>×20 / 0.2-1.0mgc 0.1  
g<sub>d</sub> 0.1-0.5mg g×20 10-50 B. AD vector 0.1  
C. l 2.0ml l×20 200 Sperm DNA(10mg/ml) 10  
1×TE/LiAc 重悬感受态细胞 1.5mlc 1.0mlc 8.0mlb  
l×20 1.0ml 8.0ml 酵母感受态细胞 100
  - (7) PEG/LiAc 缓冲液 0.6ml×20 6.0ml 60.0ml  
l 7.0ml l×20 700 DMSO 70
  - (9) 室温离心后弃上清 13000xg×10sec 2000xg×5min 2000xg×5min
  - (10) 1×TE 重悬感受态细胞 0.3ml×20 6.0ml 10.0ml  
150mm×50 150mm×30 90mm×20 铺固体选择培养基平板
- 注: \* 即为“构建于 DNA-BD 载体的目的 DNA 转化酵母感受态细胞”  
\*\* 在不同容积的无菌离心管中进行, a: 300 或 500ml ; b: 50ml ; c: 15ml ; d: 1.5ml

#### 文库 cDNA 转化含有 DNA-BD 载体的酵母感受态细胞

1. 以生长于 SD/-Ura, -His 固体培养板上的含有构建于 DNA-BD 载体的目的 DNA 及报告基因(p8op-lacZ)的酵母菌 EGY48 作为宿主菌, 制备酵母感受态细胞。
2. 将酵母宿主菌接种于 5.0ml SD/-Ura, -His 液体培养基中, 缓振打散菌落, 然后转入 95.0ml SD/-Ura, -His 液体培养基中, 30°C 恒温, 250rpm 振荡培养 16-18hr, 至 OD<sub>600</sub>>1.0。

SD/-Ura, -His 液体培养基, 115°C, 10lb/in<sup>2</sup> 灭菌 15min

- A. Difco Nitrogen 0.67g
- B. 葡萄糖 2.00g
- C. 10×DO(-His, -Leu, -Trp, -Ura) 10.0ml
- D. 20×Leu 5.0ml
- E. 20×Trp 5.0ml
- F. ddH<sub>2</sub>O → 100.0ml

3. 将上述新鲜培养菌液接种于 300ml YPD, 至 OD<sub>600</sub>=0.2-0.3(约 50ml), 30°C 恒温, 250rpm 振荡培养至 OD<sub>600</sub>=0.4-0.5(约 3hr)。

YPD 液体培养基, 115°C, 10lb/in<sup>2</sup> 灭菌 15min

- A. Polypepton 6.0g
- B. bacto-Yeast Extract 3.0g
- C. 葡萄糖 6.0g
- D. ddH<sub>2</sub>O → 300 ml

4. 室温离心 5000xg×5min 弃上清 加入 15-25ml ddH<sub>2</sub>O 重悬洗涤沉淀酵母细胞 离心弃上清 沉淀用 1×TE/LiAc 重悬后, 即为酵母感受态细胞。
5. 准备下列试剂

1×转化反应 10×TE 10×LiAc 50% PEG ddH<sub>2</sub>O

I / 800 I 100 A. 1×TE/LiAc 1.0ml 100

I 4.8ml / I 600 B. PEG/LiAc 6.0ml 600

C. 1×TE 10.0ml 1.0ml / / 9.0ml

6. 取 1.0ml 用 1×TE/LiAc 重悬的酵母感受态细胞，加入下列成份，振荡混匀。

I g) 40 A. pB42AD-Library(50-100

B. 10mg/ml I Herring DNA\*(2.0mg) 200

\* 新配制时水浴煮沸 20min 后，插入冰浴，保存于-20℃。

7. 加入 6.0ml PEG/LiAc，振荡混匀，30℃恒温，250rpm 振荡培养 30min。

8. 加入 700 DMSO 缓和倒置混匀。42℃热休克 15min，迅速插入冰浴。

9. 室温离心 2000xg×5min，尽量弃上清。

10. 以 6.0ml 100mm，每稀释度各×2)，30℃倒置培养 3-5 天，确定转化效率在 2×10<sup>6</sup>cfu 以上有效。 I 稀释不

同倍数，涂布 SD/-Ura，-His，-Trp 固体培养板( 1×TE 重悬沉淀细胞，取 10

150mm×30)，30℃倒置培养 3-5 天。 I 涂布 SD/-Ura，-His，-Trp 固体培养板( 11. 按每板 200

SD/-Ura，-His，-Trp 固体培养基，115℃，10lb/in<sup>2</sup> 灭菌 15min 稍冷却后铺板

A. Difco Nitrogen 13.40g

B. 葡萄糖 40.00g

C. 10×DO(-His，-Leu，-Trp，-Ura) 200.0ml

D. 20×Leu 100.0ml

E. Agar 40.00g

F. ddH<sub>2</sub>O 150mm) → 2000.0ml 铺 30 块平板(

12. 在超净工作台上，在所有生长菌落的平板上各加 5ml TE(pH7.0)缓冲液，将菌落刮下。

13. 离心弃上清，加入 10-20ml TE 缓冲液重悬沉淀菌，加入等体积的无菌 65%甘油-MgSO<sub>4</sub> 缓冲液，混匀，分装 1.0ml/管，保存于 4℃ 1 周或-80℃1 年以上。

65%甘油-MgSO<sub>4</sub> 缓冲液: 65%甘油；100mM MgSO<sub>4</sub>；25mM Tris-HCl(pH8.0)

A. 甘油 65.00ml

B. MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 2.465g

C. 2.0 M Tris-HCl(pH8.0) 1.25ml

D. ddH<sub>2</sub>O → 100.00ml

### 酵母双杂合系统阳性克隆的筛选

1. 经过选择培养基筛选的含有 DNA-BD 载体、文库 DNA 及报告基因的酵母感受态细胞，用无菌 TE 稀释至 1:104、1:106 和 1:108 等不同浓度。

90mm)，30℃倒置培养 3-5 天，计数平板上单克隆菌落数。 I，涂布 SD/-Ura，-His，-Trp 固体培养板( 2. 取上述稀释菌液各 100

3. 确定待进一步鉴定的酵母菌滴度(cfu/ml)=克隆数×105(1:104 稀释)、克隆数×107(1:106 稀释)或克隆数×109(1:108 稀释)。

4. 按照以前实验确定的文库转化效率的 5-10 倍的总量、0.5-2×10<sup>6</sup>cfu/平板的菌量，涂布 SD/Gal/Raf/-Ura，-His，-Trp，-Leu 固体诱导培养板，30℃倒置培养 3-5 天。

5. 挑取显蓝色的菌落，再接种于 SD/-Ura, -His, -Trp 固体培养基以及 SD/Gal/Raf/-Ura, -His, -Trp, -Leu 固体诱导培养基，以进一步确证。

SD/Gal/Raf/-Ura, -His, -Trp, -Leu 固体诱导培养基

A. SD/Gal/Raf 3.79g

B. 10×DO(-His, -Leu, -Trp, -Ura) 10.0ml

C. Agar 2.00g

D. ddH<sub>2</sub>O → 85.0ml

灭菌(115°C, 10lb/in<sup>2</sup>)15min, 冷却至 50°C, 加入下列成份后铺板

E. 10×BU 10.0ml

F. 20mg/ml X-gal 0.4ml (90-100mm) 铺 5-6 块平板(

10×BU 缓冲液, 121°C, 15lb/in<sup>2</sup> 灭菌 15min

A. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•12H<sub>2</sub>O 9.30g

B. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O 3.90g

C. ddH<sub>2</sub>O → 100.0ml

20mg/ml X-Gal

A. X-Gal 40mg

B. DMF 2ml

### 酵母双杂合系统阳性克隆的鉴定

-酵母质粒 DNA 的提取

1. 挑取经过酵母选择/诱导培养基初步鉴定的酵母单菌落，接种于 5.0-10.0ml SD/-Trp 液体培养基，30°C 恒温，250rpm 振荡培养 20hr。

SD/-Trp 液体培养基，115°C, 10lb/in<sup>2</sup> 灭菌 15min

A. Difco Nitrogen 0.67g

B. 葡萄糖 2.00g

C. 10×DO(-His, -Leu, -Trp, -Ura) 10.0ml

D. 20×His 5.0ml

E. 20×Leu 5.0ml

F. 20×Ura 5.0ml

G. ddH<sub>2</sub>O → 100.0ml

2. 室温离心 5000xg×1min, 弃上清, 收菌。

酵母裂解液, 振荡重悬沉淀酵母菌。 3. 加入 200

酵母裂解液: 2% Triton X-100; 1% SDS; 100mM NaCl; 10mM Tris-HCl(pH8.0); 1mM EDTA

A. 10% Triton X-100 20.0ml

B. 10% SDS 10.0ml

C. NaCl 0.58g

D. Tris 0.12g

E. EDTANa<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O 0.04g

F. 1.0M HCl 调 pH8.0

G. ddH<sub>2</sub>O → 100.0ml

4. 加入下列试剂, 充分振荡 5min; 液氮冻存 10min, 室温复融; 再充分振荡 5min。

- A. 经酸处理的玻璃珠(Sigma) 0.20g
- B. 苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1) 0.2ml

5. 室温离心 12000xg×10 min, 将上清转移至新的 1.5ml 离心管中, 加入下列试剂, 于-70°C冻存 30-60 min。

- A. 3 M NaAc(1/10 I V) 20
- I B. 无水乙醇(2.5V) 500

6. 离心 12500xg×10 min, 4°C, 弃上清; 70%乙醇洗涤沉淀, 于 37°C烘箱或超净台干燥 DNA; 将干燥的沉淀 DNA 重溶于 I 无菌 ddH<sub>2</sub>O 中, 保存于-20°C。 20-30

### 酵母双杂合系统阳性克隆的鉴定 -酵母质粒 DNA 电转化大肠杆菌

1. 在冰浴条件下, 取待转化 DNA I 感受态细胞中, 混匀。 g), 加入 100 I(5pg-0.5 1.0 F, 200)
2. 将上述混合液加入间距 0.1cm 的样品杯中, 电转化(1.8kV, 25)。
3. 迅速加入 1ml 新鲜的 LB 培养液, 混匀, 转入 1.5ml 离心管中, 37°C恒温, 150rpm 振荡孵育 30-60min。
4. 将上述转化反应液涂布 M9/DO(-Trp)固体培养板, 37°C倒置培养至单菌落出现(16-22hr)。
5. 按常规方法扩增上述阳性转化菌, 碱裂解法少量抽提质粒 DNA, 酶切筛选 AD 载体上含有插入片段的阳性克隆, 保存其于 25%甘油, 待进一步验证。

M9/DO-Trp 固体培养基, 115°C, 10lb/in<sup>2</sup> 灭菌 15min

- A. 葡萄糖 1.2g
  - B. Agar 6.0g
  - C. 5×M9 缓冲液 60 ml
  - D. 10×DO(-His, -Leu, -Trp, -Ura) 30 ml
  - E. 20×His 15 ml
  - F. 20×Leu 15 ml
  - G. 20×Ura 15 ml
  - H. ddH<sub>2</sub>O 165 ml
- 冷却至 50°C左右, 加入下列成份, 混匀铺板
- I. 1.0M Thiamine-HCl(Vit.B1) 0.3 ml
  - J. 100mg/ml Amp 0.3 ml 90-100mm) 铺 10-15 块平板(

### 大肠杆菌感受态细胞的制备(电转化)

1. 挑取 LB 固体培养基上生长的 E.coli KC8 单菌落, 接种于 5ml LB 液体培养基中, 37°C恒温, 250rpm 振荡培养过夜(约 12-14hr)。
2. 将 2.5 ml 新鲜菌液接种于 500ml SOB 培养液中, 37°C恒温, 250rpm 振荡培养至 OD<sub>600</sub>=0.5-0.6(约 2.5-3hr)。

SOB 液体培养基, 115°C, 10lb/in<sup>2</sup> 灭菌 15min

- A. bacto-Tryptone 10.00g
- B. bacto-Yeast Extract 2.50g
- C. NaCl 0.25g
- D. KCl 0.09g
- E. MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O 1.02g
- F. ddH<sub>2</sub>O → 500.0ml

3. 将培养菌液收集于离心管中，冰水浴 15-20min。
4. 离心 6000xg×10min 4°C 弃尽上清 以 5ml 预冷的无菌 ddH<sub>2</sub>O 重悬沉淀菌 再加入 500ml 预冷的无菌 ddH<sub>2</sub>O 洗涤细菌。
5. 重复上述步骤 1 次，以充分去除培养基中残余的盐离子成份。
6. 用 40-50ml 预冷的无菌 10% 甘油重悬沉淀细菌，转移至 50ml 无菌离心管中；离心 6000xg×10min，4°C，弃尽上清；重复此步骤 1 次。
7. 以等体积(约 1.5-2.0ml) 预冷的无菌 10% 甘油重悬上述沉淀的感受态细胞，分装 0.5ml/管(5-6 次转化反应)，保存于-80°C 备用。

### 酵母双杂合系统阳性克隆的确定

1. 以含有报告基因(p8op-lacZ)的酵母菌 EGY48 作为转化宿主菌。
2. 将酵母宿主菌接种于 5.0ml SD/-Ura 液体培养基中，缓振打散菌落，然后转入 95.0ml SD/-Ura 液体培养基中，30°C 恒温，250rpm 振荡培养 16-18hr，至 OD<sub>600</sub>>1.0。

SD/-Ura 液体培养基，115°C，10lb/in<sup>2</sup> 灭菌 15min

- A. Difco Nitrogen 0.67g
- B. 葡萄糖 2.00g
- C. 10×DO(-His, -Leu, -Trp, -Ura) 10.0ml
- D. 20×His 5.0ml
- E. 20×Leu 5.0ml
- F. 20×Trp 5.0ml
- G. ddH<sub>2</sub>O → 100.0ml

3. 将上述新鲜培养菌液接种于 300ml YPD，至 OD<sub>600</sub>=0.2-0.3(约 50ml)，30°C 恒温，250rpm 振荡培养至 OD<sub>600</sub>=0.4-0.5(约 3hr)。

YPD 液体培养基，115°C，10lb/in<sup>2</sup> 灭菌 15min

- A. Polypepton 6.0g
- B. bacto-Yeast Extract 3.0g
- C. 葡萄糖 6.0g
- D. ddH<sub>2</sub>O → 300 ml

4. 室温离心 5000xg×5min 弃上清 加入 15-25ml ddH<sub>2</sub>O 重悬洗涤沉淀酵母细胞 离心弃上清 沉淀用 1×TE/LiAc 重悬后，即为酵母感受态细胞。

5. 准备下列试剂

20×转化反应 10×TE 10×LiAc 50% PEG ddH<sub>2</sub>O

l / 1.2ml l 150 A. 1×TE/LiAc 1.5ml 150

B. PEG/LiAc 12.0ml 1.2ml 1.2ml 9.6ml /

C. 1×TE 10.0ml 1.0ml // 9.0ml

6. 分装待转化的质粒 DNA。

A. pLexA l g) 3-5 or pLexA-X(0.1

l g) 3-5 B. pB42AD-Y(0.1

C. 10mg/ml Sperm l DNA\*(0.1mg) 10

\* 新配制时水浴煮沸 20min 后, 插入冰浴, 保存于-20°C。

I 用 1×TE/LiAc 重悬的酵母感受态细胞, 振荡混匀。 7. 每管加入 100

I 8. 各加入 600 PEG/LiAc, 振荡混匀, 30°C恒温, 250rpm 振荡培养 30min。

I 9. 各加入 70 DMSO 缓和倒置混匀。42°C热休克 15min, 迅速插入冰浴。

10. 室温离心 13000xg×10sec, 尽量弃上清; 以 0.3ml 1×TE 重悬沉淀细胞, 涂布 SD/-Ura, -His, -Trp 固体培养板, 30°C倒置培养 3-5 天。

SD/-Ura, -His, -Trp 固体培养基, 115°C, 10lb/in<sup>2</sup> 灭菌 15min 稍冷却后铺板

A. Difco Nitrogen 3.35g

B. 葡萄糖 10.00g

C. 10×DO(-His, -Leu, -Trp, -Ura) 50.0ml

D. 20×Leu 25.0ml

E. Agar 10.00g

F. ddH<sub>2</sub>O → 500.0ml (90-100mm) 铺 20-25 块平板(

11. 挑取上述固体培养基上生长的含有目的 DNA(X)的 pLexA-X(+)或空载 pLexA(-)单菌落, 分别接种 SD/Gal/Raf/-Ura, -His, -Trp, -Leu 固体诱导培养板, 30°C倒置培养 3-5 天。

SD/Gal/Raf/-Ura, -His, -Trp, -Leu 固体诱导培养基

A. SD/Gal/Raf 3.79g

B. 10×DO(-His, -Leu, -Trp, -Ura) 10.0ml

C. Agar 2.00g

D. ddH<sub>2</sub>O → 85.0ml

灭菌(115°C, 10lb/in<sup>2</sup>)15min, 冷却至 50°C, 加入下列成份后铺板

E. 10×BU 10.0ml

F. 20mg/ml X-gal 0.4ml (90-100mm) 铺 5-6 块平板(

12. 选择含有 pLexA-X 显蓝色, 而相应的不含有插入 DNA 的空载 pLexA 显白色的克隆, 扩增其在 E.coli KC8 中的甘油菌, 按常规抽提质粒 DNA, 进行序列分析。

10×DO(-His, -Trp, -Leu, -Ura)

为不含 His, Trp, Leu, Ura 等成份的 10×Dropout 溶液。

每 1000ml 溶液中含有下列成份, 用 ddH<sub>2</sub>O 配制后保存于 4°C。

(1) L-Isoleucine L-异亮氨酸 300mg

(2) L-Valine L-缬氨酸 1500mg

(3) Adenine 腺嘌呤 200mg

(4) L-Arginine HCl L-精氨酸 200mg

(5) L-Lysine HCl L-赖氨酸盐酸盐 300mg

L-Methionine L-甲硫氨酸 200mg

(7) L-Phenylalanine L-苯丙氨酸 500mg

L-Threonine L-苏氨酸 2000mg

(9) L-Tyrosine L-酪氨酸 300mg

20×氨基酸储存液

每 100ml 溶液中分别含有下列成份, 配制后保存于 4°C。

20×His L-Histidine L-组氨酸 40mg  
20×Trp L-Tryptophan L-色氨酸 40mg  
20×Leu L-Leucine L-白氨酸 200mg  
20×Ura Uracil 尿嘧啶 40mg

酵母转化缓冲液:

缓冲液 体积 缓冲液配制

10×TE 100ml Tris 1.21g ; EDTANa<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.37g ; ddH<sub>2</sub>O 80ml ; 盐酸调 pH7.5 ; ddH<sub>2</sub>O 定容

10×LiAc 100ml LiAc·2H<sub>2</sub>O 10.20g ; ddH<sub>2</sub>O 50ml , 冰醋酸调 pH7.5 ; ddH<sub>2</sub>O 定容

50% PEG 100ml PEG3350 50.0g ; ddH<sub>2</sub>O 定容

其它缓冲液:

缓冲液 体积 缓冲液配制

TE 1000ml Tris 1.21g ; EDTANa<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.37g ; ddH<sub>2</sub>O 800ml ; 盐酸调 pH ; ddH<sub>2</sub>O 定容 ;

STE 1000ml NaCl 5.84g ; Tris 1.21g ; EDTANa<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.37g ; ddH<sub>2</sub>O 800ml ; 盐酸调 pH8.0 ; ddH<sub>2</sub>O 定容

#### 8.4. 酵母双杂交系统的建立与发展

双杂交系统的建立得力于对真核生物调控转录起始过程的认识。细胞起始基因转录需要有反式转录激活因子的参与。80年代的工作表明,转录激活因子在结构上是组件式的(modular),即这些因子往往由两个或两个以上相互独立的结构域构成,其中有DNA结合结构域(DNA binding domain, 简称为DB)和转录激活结构域(activation domain, 简称为AD),它们是转录激活因子发挥功能所必需的。单独的DB虽然能和启动子结合,但是不能激活转录。而不同转录激活因子的DB和AD形成的杂合蛋白仍然具有正常的激活转录的功能。如酵母细胞的Gal4蛋白的DB与大肠杆菌的一个酸性激活结构域B42融合得到的杂合蛋白仍然可结合到Gal4结合位点并激活转录。Fields等人的工作标志双杂交系统的正式建立。他们以与调控SUC2基因有关的两个蛋白质Snf1和Snf2为模型,将前者与Gal4的DB结构域融合,另外一个与Gal4的AD结构域的酸性区域融合。由DB和AD形成的融合蛋白现在一般分别称之为“诱饵”(bait)和“猎物”或靶蛋白(pre y or target protein)。如果在Snf1和Snf2之间存在相互作用,那么分别位于这两个融合蛋白上的DB和AD就能重新形成有活性的转录激活因子,从而激活相应基因的转录与表达。这个被激活的、能显示“诱饵”和“猎物”相互作用的基因称之为报道基因(reporter gene)。通过对报道基因表达产物的检测,反过来可判别作为“诱饵”和“猎物”的两个蛋白质之间是否存在相互作用。在此Fields等人采用编码β-半乳糖苷酶的LacZ作为报道基因,并且在该基因的上游调控区引入受Gal4蛋白调控的GAL1序列。这个改造过的LacZ基因被整合到酵母染色体URA3位上。而酵母的GAL4基因和GAL80基因(Gal80是Gal4的负调控因子)被缺失,从而排除了细胞内源调控因子的影响。已经知道在Snf1和Snf2之间存在相互作用。结果发现只有同时转化了Snf1和Snf2融合表达载体的酵母细胞才有β-半乳糖苷酶活性,单独转化其中任何一个载体都不能检测出β-半乳糖苷酶活性。

目前发展起来的各种双杂交系统大多是以Fields等人建立的系统为基础的。这些新系统主要对报道基因、“诱饵”表达载体以及“猎物”表达载体等做了一些改进。其中一个重要改进是引入额外的报道基因,如广泛采用的HIS3基因。经过改造带有HIS3报道基因的酵母细胞,只有当HIS3被启动表达才能在缺乏组氨酸的选择性培养基上生长。HIS3报道基因的转录表达是由“诱饵”和“猎物”的相互作用所启动的。大多数双杂交系统往往同时使用两个甚至三个报道基因,其中之一是LacZ。这些改造后的基因在启动子区有相同的转录激活因子结合位点,因此可以被相同的转录激活因子(如上述的Gal4蛋白)激活。通过这种双重或多重选择既提高了检测灵敏度又减少了假阳性现象。其他还有针对“诱饵”或“猎物”表达载体等所作的改进。

在双杂交鉴定过程中要经过两次转化,这个工作量是相当大的,特别是寻找新的作用蛋白质的时候尤其如此。而且,酵母细胞的转化效率比细菌要低约4个数量级。因此转化步骤就成为双杂交技术的瓶颈。Bendixen等人通过酵母接合型的引用,避免了两次转化操作,同时又提高了双杂交的效率。在酵母的有性生殖过程中涉及到两种配合类型:a接合型和α接合型,这两种单倍体之间接合(mating)能形成二倍体,但a接合型细胞之间或α接合型细

胞之间不能接合形成二倍体。根据酵母有性生殖的这一特点,他们将文库质粒转化 $\alpha$ 接合型酵母细胞,“诱饵”表达载体转化 $a$ 接合型细胞。然后分别铺筛选平板使细胞长成菌苔(lawn),再将两种菌苔复印到同一个三重筛选平板上,原则上只有诱饵和靶蛋白发生了相互作用的二倍体细胞才能在此平板上生长。单倍体细胞或虽然是二倍体细胞但DB融合蛋白和AD融合蛋白不相互作用的都被淘汰。长出来的克隆进一步通过 $\beta$ -半乳糖苷酶活力进行鉴定。这项改进不仅简化了实验操作,而且也提高了双杂交的筛选效率。

在研究蛋白质的结构功能特点、作用方式过程中,有时还要通过突变、加抑制剂等手段破坏蛋白质间的相互作用。针对实际工作中的这种需要,Vidal等人发展了所谓的逆双杂交系统(reverse two-hybrid system)。这项技术的关键是报道基因URA3的引入。URA3基因在这里起到了反选择的作用,它编码的酶是尿嘧啶合成的关键酶。该酶能把5-氟乳清酸(5-FOA)转化成对细胞有毒的物质。Vidal等人通过改造在URA3基因的启动子内引入Gal4的结合位点。这个改造的酵母菌株在缺乏尿嘧啶的选择性培养基上只有当“诱饵”和“猎物”相互作用激活URA3基因的表达才能生长。在含有5-FOA的完全培养基上“诱饵”和“猎物”的相互作用则抑制细胞的生长。然而如果目的蛋白,即与DB或AD融合的蛋白质发生了突变或者由于外加药物的干扰不再相互作用,URA3基因不表达,则细胞能在含有5-FOA的完全培养基上生长。通过这种方法,Vidal等人筛选到了转录因子E2F1的突变物,这些突变物仍然能结合视网膜母细胞瘤蛋白RB,但是丧失了同另外一种称为DP1蛋白的结合能力。结果得到了体外结合实验的验证。通过对这些突变蛋白基因的测序,他们发现了新的E2F1同DP1结合的位点。

以上介绍的酵母双杂交系统都是建立在对RNA聚合酶II的激活的基础上的。这意味着双杂交过程是在细胞核内完成的。然而许多待研究的蛋白质是膜蛋白,它们需定位到膜上之后才能表现正常的生物功能,与其他蛋白质起作用。有些真核细胞蛋白还要经过翻译后的加工修饰如二硫键的形成、糖基化、聚异戊二烯基化等。这些加工修饰在正常的细胞核内不可能发生。有些蛋白质本身具有激活转录的活性,它们可不经双杂交相互作用即能激活报道基因的表达。因此根据需要有人又发展了新的双杂交系统。例如,Aronheim等人设计了一个Sos蛋白介导的双杂交系统,也被作者称为Sos救活系统(Sos recruitment system)。人的鸟苷酸交换因子-Sos蛋白是一种胞质蛋白,而酵母的鸟苷酸交换因子-cdc25蛋白定位在内膜上,可将相关受体信号传导给Ras蛋白。由cdc25突变产生的一种温度敏感突变型细胞不能在36 $^{\circ}$ C条件下生长。但是,如果Sos蛋白可以通过某种方式被定位到酵母细胞内膜上,那么它在这种温度敏感突变型细胞中因替代cdc25蛋白的作用,而使酵母恢复在36 $^{\circ}$ C条件下生长的能力。在Aronheim等人设计的系统中,待研究的两个蛋白质分别与豆蔻酰基化信号片段和Sos蛋白融合,前一个融合蛋白定位于膜上,如果两个待研究蛋白质之间存在相互作用,这将使Sos也定位到膜上,从而可激活Ras蛋白使酵母在36 $^{\circ}$ C下生长。利用该技术Aronheim等人找到了c-Jun的两个新的作用伙伴。此外还有其他类型的双杂交甚至三杂交系统。

## 8.5. 酵母双杂交系统研究及其应用

白玉杰综述 药立波审校

(第四军医大学生物化学及分子生物学教研室, 西安 710032)

蛋白质是生命功能的物质基础,体内包括复制、转录、分泌、信号转导、代谢等多种生命活动都依赖于蛋白-蛋白、蛋白-核酸间的相互作用,对生命活动过程中蛋白质作用的研究有助于揭示生命过程的许多本质问题。但由于蛋白质与其他生物大分子间作用依赖于细胞内环境,作用时间及作用力差异极大,因而传统生化方法受到较大限制,蛋白-蛋白及蛋白-核酸间作用的研究进展缓慢。新兴起的双杂交系统应用有效的酵母遗传学方法分析蛋白间相互作用,能快速克隆编码与某一蛋白作用的配体蛋白的基因,得到广泛应用,在此基础上相继出现反向双杂交系统、三杂交系统等多种新技术,大大加速了此领域的研究。

### 一、酵母双杂交系统

#### (一) 基本原理

酵母双杂交系统由Fields和Song等首先在研究真核基因转录调控中建立 $i$ 。典型的真核生长转录因子,如GAL4、GCN4、等都含有二个不同的结构域:DNA结合结构域(DNA-binding domain)和转录激活结构域(transcription-activating domain)。前者可识别DNA上的特异序列,并使转录激活结构域定位于所调节的基因的上游,转录激活结构域可同转录复合体的其他成分作用,启动它所调节的基因的转录。二个结构域不但可在其连接区适当部位打开,仍具有各自的功能。而且不同两结构域可重建发挥转录激活作用。酵母双杂交系统利用杂交基因通过激活报道基因的表达探测蛋白-蛋白的相互作用。主要有二类载体: $a$ 含DNA-binding domain的载体;

b 含 DNA-activating domain 的载体。上述二类载体在构建融合基因时，测试蛋白基因与结构域基因必须在阅读框内融合。融合基因在报告株中表达，其表达产物只有定位于核内才能驱动报告基因的转录。例如 GAL4-bd 具有核定位序列(nuclear-localization sequence)，而 GAL4-ad 没有。因此，在 GAL4-ad 氨基端或羧基端应克隆来自 SV40 的 T-抗原的一段序列作为核定位的序列。目前研究中常用 binding-domain 基因有：GAL4(1-147); LexA (E coli 转录抑制因子)的 DNA-bd 编码序列。常用的 activating-domain 基因有：GAL4(768-881)和疱疹病毒 VP16 的编码序列等。

双杂交系统的另一个重要的元件是报道株。报道株指经改造的、含报道基因(reporter gene)的重组质粒的宿主细胞。最常用的是酵母细胞，酵母细胞作为报道株的酵母双杂交系统具有许多优点：(1) 易于转化、便于回收扩增质粒。(2) 具有可直接进行选择标记基因和特征性报道基因。(3) 酵母的内源性蛋白不易同来源于哺乳动物的蛋白结合。一般编码一个蛋白的基因融合到明确的转录调控因子的 DNA - 结合结构域(如 GAL4-bd, LexA-bd); 另一个基因融合到转录激活结构域(如 GAL4-ad, VP16)。激活结构域融合基因转入表达结合结构域融合基因的酵母细胞系中，蛋白间的作用使得转录因子重建导致相邻的报道基因表达(如 lacZ)，从而可分析蛋白间的结合作用。

酵母双杂交系统能在体内测定蛋白质的结合作用，具有高度敏感性。主要是由于：①采用高拷贝和强启动子的表达载体使杂合蛋白过量表达。②信号测定是在自然平衡浓度条件下进行，而如免疫共沉淀等物理方法为达到此条件需进行多次洗涤，降低了信号强度。③杂交蛋白间稳定度可被激活结构域和结合结构域结合形成转录起始复合物而增强，后者又与启动子 DNA 结合，此三元复合体使其中各组分的结合趋于稳定。④通过 mRNA 产生多种稳定的酶使信号放大。同时，酵母表型，X-Gal 及 HIS3 蛋白表达等检测方法均很敏感。

## (二) 酵母双杂交系统的应用

### 1 特点与优点

酵母双杂交系统的最主要的应用是快速、直接分析已知蛋白之间的相互作用及分离新的与已知蛋白作用的配体及其编码基因。酵母双杂交系统检测蛋白之间的相互作用具有以下优点：(1) 作用信号是在融合基因表达后，在细胞内重建转录因子的作用而给出的，省去了纯化蛋白质的繁琐步骤。(2) 检测在活细胞内进行，可以在一定程度上代表细胞内的真实情况。(3) 检测的结果可以是基因表达产物的积累效应，因而可检测存在于蛋白质之间的微弱的或暂时的相互作用。(4) 酵母双杂交系统可采用不同组织、器官、细胞类型和分化时期材料构建 cDNA 文库，能分析细胞浆、细胞核及膜结合蛋白等多种不同亚细胞部位及功能的蛋白。例如已报道成功分析了 RAP1 与 RIF1ii、P21cip1 与 CDK2iii、p16 与 CDK4iv 等之间的相互作用。

### 2 结构组成

酵母双杂交系统可应用于确定两已知有生理作用的蛋白间的作用位点或结构域。利用此系统已分析和测定了多种重要结构域，如 p85 三磷酸肌醇激酶和 p110 亚单位作用的结构域 v，p21cip1 蛋白与增殖细胞膜抗原 (proliferating-cell nuclear antigen, PCNA) 的结合序列 vi 等。

此外酵母双杂交系统还应用于阐明蛋白质相互作用的结构域，绘制蛋白质联系图谱，在药物设计等许多方面。

## (三) 酵母双杂交系统局限性和存在的问题

酵母双杂交系统是分析蛋白-蛋白间相互作用的有效和快速的方法，有多方面的应用，但仍存在一些局限性。(1) 双杂交系统分析蛋白间的相互作用定位于细胞核内，而许多蛋白间的相互作用依赖于翻译后加工如糖基化、二硫键形成等，这些反应在核内无法进行。另外有些蛋白的正确折叠和功能有赖于其他非酵母蛋白的辅助，这限制了某些细胞外蛋白和细胞膜受体蛋白等的研究。(2) 酵母双杂交系统的一个重要的问题是“假阳性”。由于某些蛋白本身具有激活转录功能或在酵母中表达时发挥转录激活作用，使 DNA 结合结构域杂交蛋白在无特异激活结构域的情况下可激活转录。另外某些蛋白表面含有对多种蛋白质的低亲和力区域，能与其他蛋白形成稳定的复合物，从而引起报告基因的表达，产生“假阳性”结果。

许多研究者对双杂交系统进行了改进和发展。例如采用假阳性显示分析法和双筛选系统以减少“假阳性”的发生；发展哺乳动物双杂交系统更好地研究蛋白间的相互作用。其中双筛选系统用二种不同的报告基因(常用 lacZ 和 HIS3)有以下优势 vii:(1) 用不同的启动子表达位于酵母二个染色体上的报告基因，可明显减少假阳性。(2) 通过营养型筛选增强了筛选能力，尤其适用于对较大的库容量而被选蛋白较少情况下的筛选。

哺乳动物双杂交系统 viii 也是一种基因水平上以重建转录因子功能为基础的体内分析方法。在此系统中，一种感兴趣的蛋白与 Gal4--DNA 结合结构域构成融合蛋白，另一种蛋白与单纯疱疹病毒 VP16 蛋白的激活结构域以融合蛋白表达。表达这些融合蛋白的载体与一个报道载体 (CAT) 共同转染哺乳动物细胞系。报道质粒含一个 Gal4 结合位

点下游的 cat 基因。假如两个融合蛋白相互作用则 cat 报道基因表达水平明显增高。用此系统证实了 P53 蛋白与大 T 抗原的相互作用，得到了酵母双杂交系统相同的结果。且较酵母双杂交系统更为快速，在转染 48h 内得到结果。并且在哺乳动物细胞能更好模仿体内的蛋白-蛋白相互作用。因而，哺乳动物双杂交系统可作为酵母双杂交系统的辅助手段

## 二、反向酵母双杂交系统

确定了蛋白之间的相互作用后，更重要的工作是研究其功能、结构及其作用的条件调节。鉴定在相互作用的一对蛋白中的任一蛋白突变对其相互作用的抑制作用，不仅有助于探索相互作用的结构单位，而且可作为研究体内功能的遗传学方法。这对于多个作用分子的蛋白就更为重要。

1996 年 Vidalix x 等建立了反向酵母双杂交系统(reverse two-hybrid system)，提供了简便的鉴定阻断蛋白间相互作用的方法。反向酵母双杂交系统的关键是掺入一种表达产物对细胞生长有毒的报导基因，用于监测蛋白间的相互作用。例如酵母 URA3 基因表达产物是尿嘧啶合成所必需的，同时它又可催化 5-氟乳清酸(5-FOA)转化为有毒物质。Vidal 等构建了一酵母细胞株，其 URA3 的表达由含 GAL4 结合位点的启动子严密控制。此细胞株在缺乏尿嘧啶的培养基中培育需要 GAL4 激活结构域(GAD)和 GAL4 DNA 结合结构域(GBD)的融合蛋白的相互作用的表达。而在含 5-FOA 的完全培养基中则受 GAD 和 GBD 融合蛋白相互作用的抑制。因此可通过筛选 5-FOA 抗性克隆从随机突变库中鉴定阻断蛋白相互作用的突变体。

反向双杂交系统可更有效地蛋白间作用的关键位点或起决定作用的个别氨基酸，进而分析蛋白结构和功能的关系。此外此系统还可筛选能阻止某些蛋白间相互作用的肽或小分子物质用作临床治疗制剂。

## 三、酵母三双杂交系统

三杂交系统(three-binding hybrid system)用于分析蛋白和 RNA 间的相互作用。Senguptaxi 等首先报道了应用三杂交系统分析金属调节蛋白(iron regulatory protein-1, IRP1)与金属反应元件(iron response element, IRE)RNA 序列，以及 HIV 转录激活蛋白(trans-activator protein, Tat)与 HIV 转录激活反应元件(HIV trans-activation response element, TAR)RNA 序列间的作用。

三杂交系统的基本原理是将一个已知的 RNA 结合蛋白与转录因子的 DNA 结合 domain(如 LexA)构建第一个融合蛋白，第二种蛋白(待选的 RNA 结合蛋白)与转录激活结构域构建融合蛋白。此外构建和表达一杂合 RNA，含有二个不同的结合位点。当 RNA 与二个 RNA 结合蛋白的结合位点相互作用时可激活报道基因的转录和表达。如 Dhruva 等在 IRP1 与 IRE 的 RNA 相互作用的研究中，第一个 RNA 结合蛋白选用噬菌体 MS2 被壳蛋白(MS2 coat protein)，MS2 coat protein 可识别 RNA 中的 21nt 的茎环序列，并与之有较高的亲和力。将其与 LexA 融合构建杂合蛋白。IRP1 与 Gal4 的激活结构域(activation domain)融合构建另一个杂合蛋白。IRE mRNA 在非编码区有 21nt 的茎环区序列 编码区编码与 IRP1 特异性结合的蛋白序列。在实验中他们用一质粒表达杂交 RNA 含 2 个 MS2 coat protein 结合位点和 1 个 IRE。

三杂交系统提供了快速、多用的体内检测 RNA-蛋白间相互作用的新方法。与双杂交系统相比，杂交 RNA 与杂交蛋白有些不同：首先，杂交 RNA 分子可能不是生理结构，杂交的不同 RNA 组分对正常结构会有一些影响。但 Dhruva 的研究表明，局部、相对稳定的结构区如 MS2 coat protein，IRP1 识别位点等可在体内共存于同一杂交 RNA 分子中。其次，这些 RNA 中的茎环区结构相当稳定，RNA 只要形成部分正确结构，则足以介导转录激活作用。

象双杂交系统一样，三杂交系统具有广泛的应用。(1) 应用此系统可分析确定 RNA-蛋白作用的精确结构域，甚至单个核苷酸或氨基酸残基。(2) 用于鉴定和克隆识别结合有重要生理功能 RNA(如转录、定位、RNA 病毒包装和感染等)的蛋白质，可用于调控的机理研究、疾病的防治以及抗病毒药物的研制开发。(3) 通过构建杂交 RNA 库，可筛选与特定蛋白结合的 RNA。(4) 有可能在此基础上发展四杂交系统研究 RNA-RNA 间的相互作用。

## 参考文献

- 1.Fields, S. and Song, O-K. Nature 1989; 340: 245-246
- 2.Hardy, E., Sussel, L. and Shore, D. Gene Dev. 1992; 6: 801-814
- 3.Harper, J. W. et al. Cell 1993; 75: 805-816
- 4.Serrano, M., Hannon, G. J. and Beach, D. Nature 1993; 366: 704-707
- 5.Holt, K. H., Olson, A.L. et al. Mol. Cell. Biol. 1994; 14: 42-49
- 6.Warbrick, E., Lane, D. P., et al. Curr. Biol. 1995; 5: 275-282
- 7.Finley, R. L. and Brent, R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994; 91: 12980-12984

- 8.Y. Luo , Batalao , A. and H. Zhou Biotechniques 1997; 22(2): 350-352  
9.Vidal , M. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1996; 93: 10315-10320  
10.Vidal , M. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1996; 93: 10321-10326  
11.Sengupta , D. J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1996; 93: 8496-8501

## 8.6. 酵母双杂交实验 FAQ

### 1.如果诱饵蛋白对酵母细胞是有毒的，该怎么办？

在某些情况下，在液体培养基中培养不好的菌珠可以在固体培养基上生长得很好。首先重悬克隆于 1 ml 的 SD/-Trp，接着将重悬液平铺于 5 个 100-mm 的 SD/-Trp 平板，在 30°C 下温浴，直至平板上的克隆相互粘在一起。用 5ml 0.5X YPDA 刮下每块板上的克隆，并收集到一管中，这样就可以使用这个细胞重悬液进行正常的杂交反应。

### 2.如果诱饵蛋白能直接激活报告基因的表达，该如何处理？

该蛋白很可能有转录激活域，是个转录因子。可以通过基因重组切掉转录激活域，然后重新检测其是否自激活，但要注意重组也有可能破坏蛋白之间的互作。

### 3.转化效率太低怎么办？

可以采用以下方法解决：

- 1) 检测一下 DNA 的纯度，如果可以的话，重新用乙醇纯化。
- 2) DNA-BD/诱饵蛋白很可能是有毒的。
- 3) 不适当的培养基，重新配制培养基，并做对照转化。
- 4) 检测 pGBT9 对照载体的转化效率，放置于 SD/-Trp 平板上，转化效率应该在  $1 \times 10^5$  colonies/mg DNA 以上。

### 4.杂交效率不高，该如何处理？

在杂交中，预转化的诱饵细胞的数量可能不够。当对诱饵菌株进行液体培养过夜时，应挑选大的、新鲜的克隆进行培养，经过离心和重悬后，再使用血球计对细胞进行计数。密度应该在  $1 \times 10^9$ /ml。

一个甚至两个融合蛋白对酵母细胞有毒。你可以通过重组方法来减轻毒性，同时又能保证蛋白的相互作用。或者使用表达水平较低的载体。也可以在琼脂平板或滤膜上进行杂交。但同时必须作杂交对照实验。

## 9. RNA

### 9.1. RNA 操作中的一般要求

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

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

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

#### 一、防止 RNA 酶污染的措施

1. 所有的玻璃器皿均应在使用前于 180°C 的高温下干烤 6hr 或更长时间。
2. 塑料器皿可用 0.1% DEPC 水浸泡或用氯仿冲洗（注意：有机玻璃器具因可被氯仿腐蚀，故不能使用）。
3. 有机玻璃的电泳槽等，可先用去污剂洗涤，双蒸水冲洗，乙醇干燥，再浸泡在 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温 10min，然后用 0.1% DEPC 水冲洗，晾干。

4. 配制的溶液应尽可能的用 0.1% DEPC, 在 37°C 处理 12hr 以上。然后用高压灭菌除去残留的 DEPC。不能高压灭菌的试剂, 应当用 DEPC 处理过的无菌双蒸水配制, 然后经 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤除菌。

5. 操作人员戴一次性口罩、帽子、手套, 实验过程中手套要勤换。

6. 设置 RNA 操作专用实验室, 所有器械等应为专用。

## 二、常用的 RNA 酶抑制剂

1. 焦磷酸二乙酯 (DEPC): 是一种强烈但不彻底的 RNA 酶抑制剂。它通过和 RNA 酶的活性基团组氨酸的咪唑环结合使蛋白质变性, 从而抑制酶的活性。

2. 异硫氰酸胍: 目前被认为是最有效的 RNA 酶抑制剂, 它在裂解组织的同时也使 RNA 酶失活。它既可破坏细胞结构使核酸从核蛋白中解离出来, 又对 RNA 酶有强烈的变性作用。

3. 氧钒核糖核苷复合物: 由氧化钒离子和核苷形成的复合物, 它和 RNA 酶结合形成过渡态类物质, 几乎能完全抑制 RNA 酶的活性。

4. RNA 酶的蛋白抑制剂 (RNasin): 从大鼠肝或人胎盘中提取得来的酸性糖蛋白。RNasin 是 RNA 酶的一种非竞争性抑制剂, 可以和多种 RNA 酶结合, 使其失活。

5. 其它: SDS、尿素、硅藻土等对 RNA 酶也有一定抑制作用。

### 9.2. 蛋白酶 K 替代 DEPC 的系统方法

蛋白酶 K, 威力巨大的广谱蛋白酶, 95°C 加热 10 分钟, 则完全失活。数年前首次使用它替代 DEPC 处理 RNA 抽提用的离心管和枪头, 效果不错; 后来又用于处理 RNase-Free 的水, 效果也是一级棒。

配制 RNA 裂解试剂时, 直接用灭菌的双蒸水配制, 最后, 加入蛋白酶 K 至终浓度 1 $\mu$ g/ml。轻轻混匀, 室温放置 15 分钟后即可。

枪头及离心管去除 RNase: 先将枪头及离心管清洗干净后, 移入预先混好的含 1 $\mu$ g/ml 蛋白酶 K 的双蒸水, 彻底浸入。室温放置 30 分钟后, 连水一起高压灭菌。弃水后, 烘干即可。

RNase-Free 水的获得: 直接在灭菌的双蒸馏水中加入蛋白酶 K 至终浓度 1 $\mu$ g/ml。轻轻混匀, 室温放置 15 分钟后, 灭菌处理即可。该蛋白质的残留对后续实验没有可见的影响。

无蛋白质残留的 RNase-Free 水的获得: 这比较麻烦。直接在灭菌的双蒸馏水中加入蛋白酶 K 至终浓度 1 $\mu$ g/ml。轻轻混匀后, 倒入专用的蒸馏器中。放置 15 分钟后, 加热蒸馏, 流出的就是无蛋白质残留的 RNase-Free 水。要提醒的是, 该专用蒸馏器头几次流出来的水, 只能当普通蒸馏水用, 因为通道中难确保 RNase-Free 的环境; 另外, 一定要主要密闭性, 否则, 流出的水又被污染了。

### 9.3. 总 RNA 的提取 (Trizol 法提取)

在收集到生物材料之后, 最好能即刻进行 RNA 制备工作。若需暂时储存, 则应以液氮将生物材料急速冷冻后, 储存于 -80°C 冷冻柜。在制备 RNA 时, 将储存于冷冻柜的材料取出, 立即以加入液氮研磨的方式打破细胞, 不可以先行解冻, 以避免 RNase 的作用。

1. 提取组织 RNA 时, 每 50~100mg 组织用 1ml Trizol 试剂对组织进行裂解; 提取细胞 RNA 时, 先离心沉淀细胞, 每 5-10 $\times$ 10<sup>6</sup> 个细胞加 1ml Trizol 后, 反复用枪吹打或剧烈振荡以裂解细胞;

2. 将上述组织或细胞的 Trizol 裂解液转入 EP 管中, 在室温 15~30°C 下放置 5 分钟;

3. 在上述 EP 管中, 按照每 1ml TRIZOL 加 0.2ml 氯仿的量加入氯仿, 盖上 EP 管盖子, 在手中用力震荡 15 秒, 在室温下 (15°C~30°C) 放置 2~3 分钟后, 12000g (2°C~8°C) 离心 15 分钟;

4. 取上层水相置于新 EP 管中, 按照每 1ml TRIZOL 加 0.5ml 异丙醇的量加入异丙醇, 在室温下 (15°C~30°C) 放置 10 分钟, 12000g (2°C~8°C) 离心 10 分钟;

5. 弃上清, 按照每 1ml TRIZOL 加 1ml 75%乙醇进行洗涤, 涡旋混合, 7500g (2°C~8°C) 离心 5 分钟, 弃上清;

6. 让沉淀的 RNA 在室温下自然干燥;

用 RNase-free water 溶解 RNA 沉淀。

### 9.4. 一种快速鉴定 RNA 质量的方法

一种快速鉴定 RNA 质量的方法 (A simple method for identifying the quality of total RNA)

## 提 要:

目的 建立一种快速鉴定 RNA 完整性的方法。方法 在常规琼脂糖凝胶电泳的基础上,结合甲醛变性琼脂糖凝胶电泳加以改进而成。

结果 提取的总 RNA 用此方法电泳后可得到 28S、18S、5.8S(5S) 三条清晰的 rRNA 条带。

结论 此方法可以达到对 RNA 完整性进行快速鉴定的目的。

随着分子生物学技术的迅猛发展及在医学领域中的普及,以 RNA 为研究对象的实验与日俱增。RNA 质量的好坏直接关系到后续实验的成败。Northern 印迹杂交分析、寡聚(Oligodt) 纤维素选择分离 mRNA、cDNA 合成及体外翻译等实验的成败,在很大程度上取决于 RNA 的质量。因此在进行这些实验之前对 RNA 的质量进行快速可靠的鉴定就十分必要。目前 RNA 的质量采用变性琼脂糖凝胶电泳方法来鉴定[1],这些方法步骤繁琐、费时、费力。我室在长期进行 RNA 的研究中,摸索出了一套稳定、快速和可靠的鉴定 RNA 质量的方法,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

提取 RNA 的 TriPure Isolation Reagent 试剂盒、DEPC 等购自 B.M 公司,常规试剂如琼脂糖等为进口或国产 AR 级以上。

### 1.2 RNA 的提取

以人胎盘组织提取总 RNA,方法按 TriPure Isolation Reagent 试剂盒说明书进行。对提取的 RNA 在紫外分光光度计上测 A260 值和 A260/A280 比值,确定所提取 RNA 的浓度和纯度。

### 1.3 RNA 的琼脂糖凝胶电泳

电泳方法、步骤大体同文献[2]中的琼脂糖凝胶电泳。为最大限度降低 RNA 在电泳时被降解,结合甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分离 RNA 方法[1],在常规琼脂糖凝胶电泳的基础上进行如下改进。①电泳 RNA 所用器械如制胶的模具、梳子、电泳槽等用肥皂粉洗干净后用双蒸水冲洗二遍后在室温晾干备用。②用新的 1XTBE 配制 1.2%琼脂糖凝胶,倒胶时溴化乙锭(EB)直接加入凝胶中。③制备好的琼脂糖凝胶板放入电泳槽后再加入经高压灭菌过的 1XTBE,液面只能刚好同胶面平齐,缓冲液不要淹过胶面。④点样时,样品 RNA 每 10 $\mu$ l 加入 2 $\mu$ l 上样缓冲液,上样缓冲液是用 DEPC 处理的水配制的 50%甘油,另外单独点一样品孔含有 3 $\mu$ l 溴酚蓝的上样缓冲液作为电泳指示剂,电泳电压 4 V/cm,电泳时间 2 h 左右便可取出凝胶在紫外灯下观看所提取的 RNA 的质量或进行拍照记录。

## 2 结果

取人胎盘组织 RNA 3 $\mu$ g 和 6 $\mu$ g,按本方法以 1.2%的琼脂糖凝胶进行电泳,可见 28S、18S、5.8S(5S) 三条清晰的 rRNA 条带。电泳结果见图 1。

## 3 讨论

RNA 作为分子生物学的主要研究对象之一,但它极易受到 RNase 的水解,在进行 RNA 操作时主要是避免外源 RNase 的污染,特别是在得到 RNA 沉淀以后,无 RNase 抑制剂存在的条件下尤其如此。因此,在 RNA 操作过程中必须对所有实验材料进行彻底的处理,灭活 RNase,如 EP 管、Tip 头等;另外,有一个良好的操作环境也是非常重要的。

RNA 质量如何、是否被降解通常采用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳方法来鉴定。此电泳的主要目的之一是为了 Northern blot 之用。但在 RNA 的其他用途中,如 cDNA 合成和寡聚(OligodT) 纤维素选择分离 mRNA 等实验中要对 RNA 进行质量鉴定,此方法就现得繁琐、费时、费力,而用常规琼脂糖凝胶电泳 RNA 会水解而达不到鉴定的目的,如果用本研究改进的 1.2%琼脂糖凝胶方法电泳鉴定,简单、高效、经济实用,并且能达到同用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳相同的实验结果。因此本方法在常规琼脂糖凝胶电泳的基础上所作的每一项改进均是为了避免 RNA 在电泳过程中被水解,比如对所有电泳器具彻底的清洗处理就是为了尽量清除器具上存在的 RNase;在 RNA 样品中加入用 DEPC 水配制的 50%甘油作为上样缓冲液,目的也是为了在 RNA 样品中避免加入其他试剂时造成 RNase 的污染。

在提取的真核细胞总 RNA 中核糖体 RNA(rRNA)是 28 S 清晰的带型,通常认为所提取的 RNA 未被降解,可以用提取的 RNA 进行后续实验。我们实验室还提取过多种组织 RNA 如外周血淋巴细胞培养后的 RNA、脂肪组织 RNA、肝脏 RNA 等,经此方法鉴定的 RNA 的质量同分子克隆手册等参考书用变性琼脂糖凝胶鉴定的 RNA 完全无异,结果稳定可靠。占总 RNA 的 90 %以上,它们主要由 28 S、18 S、5.8 S、5S 组成,28S(约 4.5 kb)、18S(约 2.1 kb)、5.8 S(5 S) 这三类 rRNA 的摩尔浓度大致相等,但他们的分子量相差较大,在紫外灯下的亮度依次为 28 S > 18 S > 5.8 S(5 S)。在电泳后能观察到 28 S、18 S、5.8 S(5 S),特别是 28 S 清晰的带型,通常认为所提取的 RNA 未被降解,可以用提取的 RNA 进行后续实验。我们实验室还提取过多种组织 RNA 如外周血淋巴细胞培养后的 RNA、脂肪组织 RNA、肝脏 RNA 等,经此方法鉴定的

RNA 的质量同分子克隆手册等参考书用变性琼脂糖凝胶鉴定的 RNA 完全无异,结果稳定可靠。

## 9.5. 组织和细胞 RNA 的制备

### 一、组织和细胞总 RNA 提取：

#### 异硫氰酸胍法

##### (一) 试剂准备

1. CSB 缓冲液：42mM 柠檬酸钠；0.83% N-lauryl sarcosine(十二烷基, N 甲基甘氨酸钠)；0.2 mM  $\beta$ -巯基乙醇。
2. 变性液：异硫氰酸胍(终浓度 4 M) 25g、CSB 缓冲液 33ml, 混合直至完全溶解,可在 65°C助溶。4°C保存备用。
3. 2 M 乙酸钠：pH 4.0。
4. 异丙醇
5. 无水乙醇、70%乙醇
6. 酚：氯仿：异戊醇(25：24：1)
7. DEPC H<sub>2</sub>O：100ml ddH<sub>2</sub>O 中,加入 DEPC 0.1ml, 弃分振荡, 37°C孵育过夜。15 磅高压灭菌, 4°C保存备用。

##### (二) 操作步骤

1. 样品处理：
  - (1) 培养细胞：收集细胞  $1-2 \times 10^7$ , 离心, 500g $\times$ 5min。对于贴壁培养细胞,用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化后, PBS 重悬细胞并转移至 10ml 离心管中；悬浮培养细胞可直接转移离心管；离心：500g $\times$ 5min；PBS 洗涤 2 次。弃上清, 置冰浴。加预冷变性液 2 ml, 充分摇动, 使细胞裂解完全。以下操作均在冰浴中进行。
  - (2) 组织：取 1-2g 组织(新鲜或-70°C及液氮中保存的组织均可)置组织匀浆器中,加入预冷的变性液 12ml, 在冰浴中充分匀浆。
2. 加 2 M 乙酸钠(pH 4.0)0.2ml, 混合后将溶液转移至 5ml 离心管中。
3. 加酚：氯仿：异戊醇 2.2ml, 颠倒混合用力振荡 10s, 冰上放置 10min。
4. 4°C离心, 12000g $\times$ 20min。
5. 小心吸取上层含有 RNA 的水相, 并转移至一新的 5ml 离心管中。避免吸取两相之间的蛋白质。
6. 加等体积的异丙醇, 置-20°C至少 30min, 沉淀 RNA。
7. 4°C离心, 12000g $\times$ 15min。
8. 弃上清, 再加变性液 2ml 重悬 RNA 沉淀物, 振荡直至 RNA 完全溶解(必要时可 65°C水浴促溶)。
9. 加入等体积异丙醇, 置-20°C 30min。
10. 4°C离心, 12000g $\times$ 15min。
11. 弃上清, 加入 70%乙醇 4ml 洗涤 RNA 沉淀。4°C离心, 8000g $\times$ 5min。
12. 弃上清, 将沉淀晾干。
13. 加入适量 DEPC H<sub>2</sub>O 溶液解 RNA (65°C促溶 10-15min)。

##### (三) 注意事项：

1. 所有实验过程均须避免 Rnase 的污染。
2. 要避免沉淀完全干燥, 否则 RNA 难以溶解。

#### TRIzol 法

TRIzol RNA 提取试剂盒是由 GIBCO BRL 公司推出专供提取 RNA 的产品, 其操作方便、快捷。

### (一) 试剂准备

1. TRIzol 试剂。
2. 氯仿
3. 异丙醇
4. 75%乙醇 ( DEPC H<sub>2</sub>O 配制 )
5. DEPC H<sub>2</sub>O

### (二) 操作步骤

#### 1. 样品处理：

( 1 ) 培养细胞：收获细胞  $1-5 \times 10^7$ ，移入 1.5ml 离心管中，加入 1ml Trizol，混匀，室温静置 5min。

( 2 ) 组织：取 50-100mg 组织 ( 新鲜或 -70°C 及液氮中保存的组织均可 ) 置 1.5ml 离心管中，加入 1ml Trizol 充分匀浆，室温静置 5 min。

2. 加入 0.2ml 氯仿，振荡 15s，静置 2min。
3. 4°C 离心， $12000g \times 15min$ ，取上清。
4. 加入 0.5ml 异丙醇，将管中液体轻轻混匀，室温静置 10min。
5. 4°C 离心， $12000g \times 10min$ ，弃上清。
6. 加入 1ml 75%乙醇，轻轻洗涤沉淀。4°C， $7500g \times 5min$ ，弃上清。
7. 晾干，加入适量的 DEPC H<sub>2</sub>O 溶解 ( 65°C 促溶 10-15min )。

### (三) 注意事项

1. 样品量和 Trizol 的加入量一定要按步骤 ( 1 ) 的比例，不能随意增加样品量或减少 Trizol 量，否则会使内源性 RNase 的抑制不完全，导致 RNA 降解。
2. 实验过程必须严格防止 RNase 的污染。

## 二、总 RNA 定量

RNA 定量方法与 DNA 定量相似。RNA 在 260nm 波长处有最大的吸收峰。因此，可以用 260nm 波长分光测定 RNA 浓度，OD 值为 1 相当于大约 40 $\mu$ g/ml 的单链 RNA。如用 1cm 光径，用 ddH<sub>2</sub>O 稀释 DNA 样品 n 倍并以 ddH<sub>2</sub>O 为空白对照，根据此时读出的 OD<sub>260</sub> 值即可计算出样品稀释前的浓度：

$$\text{RNA ( mg/ml )} = 40 \times \text{OD}_{260} \text{ 读数} \times \text{稀释倍数(n)}/1000$$

RNA 纯品的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值为 2.0，故根据 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值可以估计 RNA 的纯度。若比值较低，说明有残余蛋白质存在；比值太高，则提示 RNA 有降解。

## 9.6. 哺乳动物细胞总 RNA 的分离

这一从培养的单层哺乳动物细胞中分离 RNA 的实验程序系为 Favaloro 等 ( 1980 ) 所介绍程序的改良。该程序同样适用于从悬浮培养的哺乳动物细胞中或从易于分散成单个细胞的哺乳动物组织中分离 RNA。但不适用于从固体组织中提取 RNA，因为用这种裂解细胞的方法 ( 在 SDS 存在的条件下用蛋白酶 K 消化 ) 去消化组织速度很慢，导致内源性 RNA 酶在被蛋白酶 K 消化或被抑制剂灭活前有时间发挥作用。原方案中 ( Favaloro 等。1980 ) 采用的裂解缓冲液含有 0.015 % ( W/V ) 的 Macaloid ( 硅藻土 )，用于吸附并灭活 RNA 酶。尽管现仍有 Macaloid 出售 ( NL Chemicals )，但氧钒核糖核苷复合物和 RNA 酶的蛋白质抑制剂更常用。下述程序的优点是速度快，并能同时处理很多样品。

### 一、细胞的裂解

#### [单层细胞的裂解](#)

#### [悬浮培养的细胞或组织单细胞悬液的裂解](#)

##### a. 单层细胞的裂解

a) 吸出培养液，以 7ml 用冰预冷的无钙镁离子磷酸缓冲盐溶液 PBS 冲洗细胞培养皿内的单层细胞，重复 1 次，将平板置于冰上直至所有单层细胞冲洗完毕。也可将平板放在一块铝板上，再将铝板置于冰盘上。

b) 直径为 90mm 的培养皿需加 0.5ml RNA 提取缓冲液，并使之遍布整个平板的表面。

RNA 提取缓冲液

0.14mol/L NaCl

1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>  
10mmol/L Tris.Cl(pH8.6)  
0.5%NP-40  
1mmol/L 二硫苏糖醇 ( DTT )  
100 单位/ml 胎盘 RNA 酶抑制剂或 20mmol/L 氧钒核糖核苷复合物

c ) 加 0.5ml 蛋白酶消化缓冲液, 用刮棒混匀粘稠状裂解物并将其刮到平板的边缘。

蛋白酶消化缓冲液

0.2mol/L Tris.Cl(pH8.0)

25mmol/L EDTA(pH8.0)

0.3mol/L NaCl

2% SDS

d ) 用装有 21 号针头的皮下注射器抽吸细胞裂解物, 再将其注入聚丙烯管内。重复 3-4 次, 剪切 DNA。

c ) 加蛋白酶 K 至终浓度为 200 $\mu$ g/ml, 充分混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。

蛋白酶 K 以贮存液的形式保存, 贮存液为 20mg/ml 蛋白 K 溶液。

b . 悬浮培养的细胞或组织单细胞悬液的裂解

a ) 于 4 $^{\circ}$ C 以 2000g 离心 5 分钟收集细胞, 以 10 倍体积用冰预冷的无钙镁离子磷酸缓冲液悬沉淀, 洗涤细胞 3 次, 每次均用大口径的吸管轻轻吹打细胞沉淀, 使其彻底分散。

b ) 估计细胞沉淀的体积, 用 10-20 倍体积的 RNA 提取缓冲液重悬之。

c ) 加入与步骤 b ) 所加 RNA 提取缓冲液体相同的蛋白酶消化缓冲液, 用振荡器迅速混匀。用装有 21 号针头的皮下注射器抽吸细胞裂解物, 再将其注入聚丙烯管内。重复 3-4 次, 剪切 DNA。

d ) 加蛋白酶 K 至终浓度为 200 $\mu$ g/ml, 充分混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。蛋白酶 K 以贮存的形式保存, 贮存液为 20 $\mu$ g/ml 蛋白酶 K 水溶液。

## 二、提取步骤

1) 用等体积酚: 氯仿抽提 1 次, 以去除蛋白质。

2) 用吊桶式转头于室温以 5000g 离心 10 分钟使水相与有机相相, 将水相吸至一个新的离心管内, 加 2.5 倍体积用冰预次序的乙醇, 充分混匀, 于 0 $^{\circ}$ C 放置 1 小时。

3) 于 0 $^{\circ}$ C 以 5000g 离心 10 分钟沉淀 RNA, 弃上清, 用含 0.1mol/L 乙酸钠 ( pH5.2 ) 的 70% 乙酸洗涤沉淀, 用自动微量移液器尽可能将乙醇吸尽, 随后于室温放置几分钟, 晾干沉淀。切勿抽干沉淀, 因为干的核酸沉淀很难溶解。

4) 每个直径为 90mm 的培养皿或每 107 细胞加 200 $\mu$ l 50mmol/L Tris.Cl( pH7.8)1mmol/L EDTA(pH8.0)溶液重溶沉淀。

5) 分别按 10mmol/L 和 0.1mmol/L 的深度加 MgCl<sub>2</sub> 和二硫苏糖醇( DTT ), 然后分别按 1000 单位/或 10mmol/L 的终深度加台盘 RNA 酶抑制剂或氧钒核糖核苷复合物。

6) 加入无 RNA 酶的胰 DNA 酶 I 至终浓度为 2 $\mu$ g/ml, 混匀, 于 37 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟。

7) 分别按 10mmol/L 和 0.2% 的终浓度加 EDTA 和 SDS。

8) 用等体积酚: 氯仿抽提 1 次。

9) 于室温以 5000g 离心 10 分钟使水相与有机相相, 将水相吸至另一个离心管内, 加 3mol/L 乙酸钠 ( pH5.2 ) 至终浓度为 0.3mol/L, 加 2.5 倍体积用冰预次的乙醇, 充分混匀, 冰浴放置 2 小时。

10) 用微量离心机于 4 $^{\circ}$ C 以 12 000g 离心 5 分钟沉淀 RNA。

11) 吸出所有的乙醇, 将打开管盖的离心管在实验台放置几分钟, 让最后残存的痕量乙醇挥发干净。

12) 用 200 $\mu$ l TE ( pH7.6 ) 重溶沉淀, 加 500 $\mu$ l 乙醇, 于 -70  $^{\circ}$ C 贮存备用。回收 DNA 时, 只须取出 1 小份贮存液, 加入 3mol/L 乙酸钠 ( pH5.2 ) 至终浓度为 0.3mol/L, 充分混匀, 用微量离心机于 4 $^{\circ}$ C 以 12 000g 离心 5 分钟即可。

## 三、注意事项

1. 测定最终所得溶液的 OD<sub>260</sub> 值可以确定 RNA 的浓度。取 10 $\mu$ l 乙醇/TE 混合液[步骤 13 ) ]离心沉淀 RNA, 以 400 水重溶, 测定 OD<sub>260</sub> 值, OD<sub>260</sub> = 1 的 RNA 溶液每毫升约含 40 $\mu$ g RNA。

2.如果需要,可用 oligo(dT)-纤维素层析法从所制备的细胞总 RNA 中纯化无寡脱氧核糖核苷酸污染的 mRNA 或购买试剂盒进行 mRNA 的纯化。

3.某些情况下(例如从感染了 DNA 病毒或用 DNA 转染的细胞中制备 RNA 时),必须从细胞总 RNA 中去除寡脱氧核糖核苷酸。否则,当用这种 RNA 构建 cDNA 库或进行引物延伸反应时应会出问题,反转录过程中法染的模板 DNA 片段可能会与 RNA 杂交而充当引物,从而导致物定 mRNA 5'末端定位的错误或产生截短的 cDNA 克隆。

a) 步骤 12 后,加 200 $\mu$ l 3mol/L 乙酸钠 (pH5.2),用自动微量移液器反复吹吸,以重悬核酸沉淀,将悬浮液移至另一个灭菌的微量离心管内。

b) 用微量离心机于室温以 12 000g 离心 10 分钟, RNA 沉于管底,而绝大部分寡脱氧核糖核苷酸仍在清液中。

c) 弃上清液,用 200 $\mu$ l TE (pH7.6) 重溶沉淀。加入 20 $\mu$ l 3mol/L 乙酸钠 (pH5.2),分混匀,加入 550 $\mu$ l 用冰预冷的乙醇。混匀溶液,在冰上骤冷 30 分钟。用微量离心机于 4 $^{\circ}$ C 以 12 000g 离心 10 分钟,以回收 RNA。小心吸出上清。d) 弃上清液,用 300 $\mu$ l TE (pH7.6) 重溶沉淀,加 1ml 乙醇, -70 $^{\circ}$ C 贮存备用。

回收 RNA 时,只需取出 1 小份贮存液,加 3mol 乙酸钠 (pH5.2) 至终浓度为 0.3mol/L 充分混匀,用微量离心机于 4 $^{\circ}$ C 以 12 000g 离心 5 分钟即可。如需去除氧钒核糖核苷复合物,用含 0.1% 羟喹啉的苯酚[用 0.01mol/L Tris.Cl(pH7.8)平衡]将 RNA 终溶液抽提数次即可。

4. 对大多数细胞株来说,一个直径 90mm 培养皿中培养的 RNA 收率为 100-200 $\mu$ g

### 9.7. mRNA 的分离与纯化

真核细胞的 mRNA 分子最显著的结构特征是具有 5' 端帽子结构 ( $m^7G$ ) 和 3' 端的 Poly(A) 尾巴。绝大多数哺乳类动物细胞 mRNA 的 3' 端存在 20-30 个腺苷酸组成的 Poly (A) 尾,通常用 Poly (A<sup>+</sup>) 表示。这种结构为真核 mRNA 的提取,提供了极为方便的选择性标志,寡聚 (dT) 纤维素或寡聚 (U) 琼脂糖亲和层析分离纯化 mRNA 的理论基础就在于此。

mRNA 的分离方法较多,其中以寡聚 (dT)-纤维素柱层析法最为有效,已成为常规方法。此法利用 mRNA 3' 末端含有 Poly (A<sup>+</sup>) 的特点,在 RNA 流经寡聚 (dT) 纤维素柱时,在高盐缓冲液的作用下,mRNA 被特异地结合在柱上,当逐渐降低盐的浓度时或在低盐溶液和蒸馏水的情况下,mRNA 被洗脱,经过两次寡聚 (dT) 纤维柱后,即可得到较高纯度的 mRNA。

#### 寡聚(dT)纤维素柱纯化 mRNA

##### 一、试剂准备

1. 3M 醋酸钠 (pH 5.2)

2. 0.1M NaOH

3. 1 $\times$ 上样缓冲液: 20mM Tris-HCl(pH 7.6); 0.5M NaCl; 1M EDTA (pH 8.0); 0.1% SLS(十二烷基硫酸钠)。配制时可先配制 Tris-HCl(pH 7.6)、NaCl、EDTA (pH 8.0) 的母液,经高压消毒后按各成分确切含量,经混合后再高压消毒,冷却至 65 $^{\circ}$ C 时,加入经 65 $^{\circ}$ C 温育 (30min) 的 10% SLS 至终浓度为 0.1%。

4. 洗脱缓冲液: 10mM Tris-HCl(pH 7.6); 1mM EDTA(pH 8.0); 0.05% SDS

5. 无水乙醇、70%乙醇

6. DEPC

##### 二、操作步骤

1. 将 0.5-1.0g 寡聚 (dT)-纤维悬浮于 0.1M 的 NaOH 溶液中。

2. 用 DEPC 处理的 1ml 注射器或适当的吸管,将寡聚 (dT)-纤维素装柱 0.5-1ml,用 3 倍柱床体积的 DEPC H<sub>2</sub>O 洗柱。

3. 使用 1 $\times$ 上样缓冲液洗柱,直至洗出液 pH 值小于 8.0。

4. 将 RNA 溶解于 DEPC H<sub>2</sub>O 中,在 65 $^{\circ}$ C 中温育 10min 左右,冷却至室温后加入等体 2 $\times$ 上样缓冲液,混匀后上柱,立即收集流出液。当 RNA 上样液全部进入柱床后,再用 1 $\times$ 上样缓冲液洗柱,继续收集流出液。

5. 将所有流出液于 65 $^{\circ}$ C 加热 5min,冷却至室温后再次上柱,收集流出液。

6. 用 5-10 倍柱床体积的 1 $\times$ 上样缓冲液洗柱,每管 1ml 分部收集,OD<sub>260</sub> 测定 RNA 含量。前部分收集管中流出液的 OD<sub>260</sub> 值很高,其内含物为无 Poly(A) 尾的 RNA。后部分收集管中流出液的 OD<sub>260</sub> 值很低或无吸收。

7. 用 2-3 倍柱容积的洗脱缓冲液洗脱 Poly(A<sup>+</sup>)RNA,分部收集,每部分为 1/3-1/2 柱体积。

8. OD<sub>260</sub> 测定 Poly(A<sup>+</sup>)RNA 分布, 合并含 Poly(A<sup>+</sup>)RNA 的收集管, 加入 1/10 体积 3M NaAc (pH5.2)、2.5 倍体积的预冷无水乙醇, 混匀, -20°C 放置 30min。

9. 4°C 离心, 10000g×15min, 小心吸弃上清。用 70%乙醇洗涤沉淀。[注意: 此时 Poly(A<sup>+</sup>)RNA 的沉淀往往看不到]。4°C 离心, 10000g×5min, 弃上清, 室温晾干。

10. 用适量的 DEPC H<sub>2</sub>O 溶解 RNA。

### 三、注意事项

1. 整个实验过程必须防止 Rnase 的污染。

2. 步骤(4)中将 RNA 溶液置 65°C 中温育然后冷却至室温再上样的目的有两个, 一个是破坏 RNA 的二级结构, 尤其是 mRNA Poly(A<sup>+</sup>)尾处的二级结构, 使 Poly(A<sup>+</sup>)尾充分暴露, 从而提高 Poly(A<sup>+</sup>)RNA 的回收率; 另一个目的是能解离 mRNA 与 rRNA 的结合, 否则会导致 rRNA 的污染。所以此步骤不能省略。

3. 十二烷基肌氨酸钠盐在 18°C 以下溶解度下降, 会阻碍柱内液体流动, 若室温低于 18°C 最好用 LiCl 替代 NaCl。

4. 寡聚(dT)-纤维素柱可在 4°C 贮存, 反复使用。每次使用前应该依次用 NaOH、灭菌 ddH<sub>2</sub>O、上样缓冲液洗柱。

5. 一般而言, 10<sup>7</sup> 哺乳动物培养细胞能提取 1-5μg Poly(A<sup>+</sup>)RNA, 约相当于上柱总 RNA 量的 1%-2%。

## 9.8. RNA 质量的确定

### 1) 检测 RNA 溶液的吸光度

280、320、230、260nm 下的吸光度分别代表了核酸、背景(溶液浑浊度)、盐浓度和蛋白等有机物的值。一般的, 我们只看 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> (Ratio, R)。1.82.0 时, 我们认为 RNA 中蛋白或者时其他有机物的污染是可以容忍的, 不过要注意, 当你用 Tris 作为缓冲液检测吸光度时, R 值可能会大于 2 (一般应该是 <2.2 的)。当 R < 1.8 时, 溶液中蛋白或者时其他有机物的污染比较明显, 你可以根据自己的需要决定这份 RNA 的命运。当 R > 2.2 时, 说明 RNA 已经水解成单核酸了。

### 2) RNA 的电泳图谱

一般的, RNA 的电泳都是用变性胶进行的, 但是根据我的经验, 如果你仅仅是为了检测 RNA 的质量是没有必要进行如此麻烦的实验的, 用普通的琼脂糖胶就可以了。

电泳的目的是在于检测 28S 和 18S 条带的完整性和他们的比值, 或者是 mRNA smear 的完整性。一般的, 如果 28S 和 18S 条带明亮、清晰、条带锐利(指条带的边缘清晰), 并且 28S 的亮度在 18S 条带的两倍以上, 我们认为 RNA 的质量是好。

以上是我们常用的两种方法, 但是这两种方法都无法明确的告诉我们 RNA 溶液中有没有残留的 RNA 酶。如果溶液中有非常微量的 RNA 酶, 用以上方法我们很难察觉, 但是大部分后续的酶学反应都是在 37 度以上并且是长时间进行的。这样, 如果 RNA 溶液中有非常微量的 RNA 酶, 那么在后续的实验中就就会有非常适合的环境和时间发挥它们的作用了, 当然这时你的实验也就完了。

下面, 我们介绍一个可以确认 RNA 溶液中有没有残留的 RNA 酶的方法。

### 3) 保温试验

方法很简单的, 按照样品浓度, 从 RNA 溶液中吸取两份 1000 ng 的 RNA 加入至 0.5 ml 的离心管中, 并且用 pH7.0 的 Tris 缓冲液补充到 10 ul 的总体积, 然后密闭管盖。把其中一份放入 70°C 的恒温水浴中, 保温 1 h。另一份放置在 -20°C 冰箱中保存 1 h。

时间到了之后, 取出两份样本进行电泳。电泳完成后, 比较两者的电泳条带。如果两者的条带一致或者无明显差别(当然, 它们的条带也要符合方法 2 中的条件), 则说明 RNA 溶液中没有残留的 RNA 酶污染, RNA 的质量很好。相反的, 如果 70°C 保温的样本有明显的降解, 则说明 RNA 溶液中有 RNA 酶污染。

## 9.9. RNA 酶保护试验

RNA 酶保护试验(RNase Protection Assay, RPA)是通过液相杂交的方式, 用反义 RNA 探针与样品杂交, 以检测 RNA 表达的技术。与 Northern 杂交和 RT-PCR 比较, RPA 有以下几个优点:

1. 检测灵敏度比 Northern 杂交高。由于 Northern 杂交步骤中转膜和洗膜都将造成样品和探针的损失，使灵敏度下降，而 RPA 将所有杂交体系进行电泳，故损失小，提高了灵敏度。
2. 由于 PCR 扩增过程中效率不均一和反应“平台”问题，基于 PCR 产物量进行分析所得数据的可靠性将下降，而 RPA 没有扩增过程，因此，分析的数据真实性较高。
3. 由于与反义 RNA 探针杂交的样品 RNA 仅为该 RNA 分子的部分片段，因此，部分降解的 RNA 样品仍可进行分析。
4. 步骤较少，耗时短。与 Northern 杂交相比，省去了转膜和洗膜的过程。
5. RNA-RNA 杂交体稳定性高，无探针自身复性问题，无须封闭。
6. 一个杂交体系中可同时进行多个探针杂交，无竞争性问题。
7. 检测分子长度可以任意设置，灵活性大。

RPA 的缺点是需要同位素标记探针。

### 一、试剂准备

1. GACU POOL : 取 100mM ATP、CTP、GTP 各 2.78 $\mu$ l、100mM UTP 0.06 $\mu$ l，加 DEPC H<sub>2</sub>O 至 100 $\mu$ l。
2. 杂交缓冲液:PIPES 0.134g、0.5M EDTA( pH8.0 )20 $\mu$ l、5M NaCl 0.8ml、甲酰胺 8ml，加 DEPC H<sub>2</sub>O 至 10ml。
3. RNase 消化液 :5M NaCl 120 $\mu$ l、1M Tris-HCl(pH7.4) 20 $\mu$ l、0.5M EDTA( pH8.0 )20 $\mu$ l、RNase A(10mg/ml) 8 $\mu$ l、RNase T1(250U/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l，加 DEPC H<sub>2</sub>O 至 2ml

### 二、操作步骤

1. 反义 RNA 可由含 T7 或 SP6 启动子的重组质粒为模板制备，也可以用含启动子的 PCR 产物为模板制备，本文介绍后者。

(1) 设计含 T7 启动子的 PCR 引物

由于 PCR 产物将作为合成反义 RNA 的模板，所以一对引物中的下游引物 5' -端要含 T7 启动子序列:

T7 启动子序列为：5' -TAATACGACTCACTATAGGG

引物设计的其他要求与一般 PCR 引物的设计相同。PCR 产物的长度决定了反义 RNA 探针的长度，具体设计时可考虑 100-400bp 长。最好采用巢式 PCR，即先扩增出一较长的片段，再以该片段为模板扩增出较短的片段，以保证探针的特异性，如下图所示：

上游引物

下游引物 II T7 启动子序列

下游引物 I

(2) PCR

先用上游引物和下游引物 I 进行 PCR，再以 PCR 产物为模板，用上游引物和下游引物 II-T7 进行二次 PCR(具体操作参见 PCR 章节)。

(3) 探针合成标记与纯化

在 0.5ml 离心管中加入下列试剂：

RNasin ( 40U/ $\mu$ l )	0.5 $\mu$ l
GACU POOL GAC ( 含 GTP、CTP、ATP 各 2.75 mM , UTP 61 $\mu$ M )	2 $\mu$ l
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]UTP(10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l)	2.5 $\mu$ l
DTT (二硫苏糖醇, 0.1M)	1 $\mu$ l
5 $\times$ 转录 buffer	2 $\mu$ l
模板 ( 50ng/ $\mu$ l )	1 $\mu$ l
T7 RNA 聚合酶 (15U)	1 $\mu$ l

混合后，短暂离心，37 $^{\circ}$ C 保温 1hr。

加入 DNase I ( 10U/ $\mu$ l ) 1 $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 15min，然后 75 $^{\circ}$ C 10min 以灭活 DNase I 和 T7 RNA 聚合酶。

加入：饱和酚	50 $\mu$ l
氯仿	50 $\mu$ l

酵母 tRNA ( 2 $\mu$ g/ $\mu$ l )	4 $\mu$ l
DEPC H <sub>2</sub> O	100 $\mu$ l

室温下充分混匀,离心 10000g $\times$ 2min。取上层液置另一 0.5 ml 离心管中,加入 100 $\mu$ l 氯仿,混匀,离心 10000g $\times$ 2min。将上层液转移至另一 0.5ml 离心管中,再加入 3M NaAc 10 $\mu$ l、预冷无水乙醇 250 $\mu$ l,混匀后,-20 $^{\circ}$ C 静置 30min。4 $^{\circ}$ C 离心 13500g $\times$ 10min。弃上清液,沉淀用 75%乙醇 100 $\mu$ l 洗涤,4 $^{\circ}$ C 离心 13500g $\times$ 2min,弃上清液。室温下挥发残留乙醇。加入 50 $\mu$ l 杂交缓冲液溶解沉淀,4 $^{\circ}$ C 下保存待用。可用尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测探针质量。(参见本节电泳步骤)。

## 2. 杂交

- (1) RNA 提取后溶解在杂交缓冲液中,浓度为 1 $\mu$ g/ $\mu$ l。
- (2) 取 8 $\mu$ l RNA 加入 1-3 $\mu$ l 探针(根据探针检测结果调整)于 0.5ml 离心管中。
- (2) 80 $^{\circ}$ C 保温 2min,然后 40-45 $^{\circ}$ C 下杂交 12-18hr。

## 3. 消化

- (1) 杂交管于 37 $^{\circ}$ C 保温 15min,加入 RNase 消化液,37 $^{\circ}$ C 保温 30min。
- (2) 加入 10%SDS 10 $\mu$ l、10 $\mu$ g/ $\mu$ l 蛋白酶 K 20 $\mu$ l,混匀,37 $^{\circ}$ C 保温 10min。
- (3) 加入 65 $\mu$ l 饱和酚和 65 $\mu$ l 氯仿,混匀,室温离心,10000g $\times$ 2min。
- (4) 转移上层液到另一 0.5 离心管中,加入 10 $\mu$ l 酵母 tRNA 和 3M NaAc 15 $\mu$ l,再加入 200 $\mu$ l 异丙醇,混匀后,置 -20 $^{\circ}$ C 30min,4 $^{\circ}$ C 离心,13500g $\times$ 10min。
- (5) 弃上清液,室温下挥发乙醇,加入 5-8 $\mu$ l 上样缓冲液溶解沉淀。

## 4. 电泳与放射自显影

- (1) 配制凝胶:(50ml)

40%丙烯酰胺-亚甲双丙烯酰胺 ( 19 : 1 )	6.25ml
5 $\times$ TBE	10ml
尿素	24g

加 H<sub>2</sub>O 至 50ml

溶解后加入 25%过硫酸胺 50 $\mu$ l,TEMED 50 $\mu$ l,混匀,注入电泳槽中,插入梳,待胶凝固。

- (2) 预电泳

以 1 $\times$ TBE 为上下槽电泳缓冲液,加上电压后进行预电泳,如果用测序电泳装置,电压应达 2000v 以上,功率设定为 100w,温度设为 50 $^{\circ}$ C。待胶板温度达 50 $^{\circ}$ C 时,暂停电泳,准备加样。

- (3) 加样

将已溶解在加样缓冲液中的样品 80 $^{\circ}$ C 加热 2min,立即加样到胶孔中,电泳 1-2hr。(电泳条件同预电泳)。

- (3) 电泳结束后,打开胶板,用滤纸取下胶,覆上一层保鲜膜,放置于暗盒中,暗室红光下,压上一张 X 片,盖上暗盒,-70 $^{\circ}$ C 曝光 1-3 天。曝光结束后,将 X 光片显影、定影、水洗、晾干。

## 三、注意事项

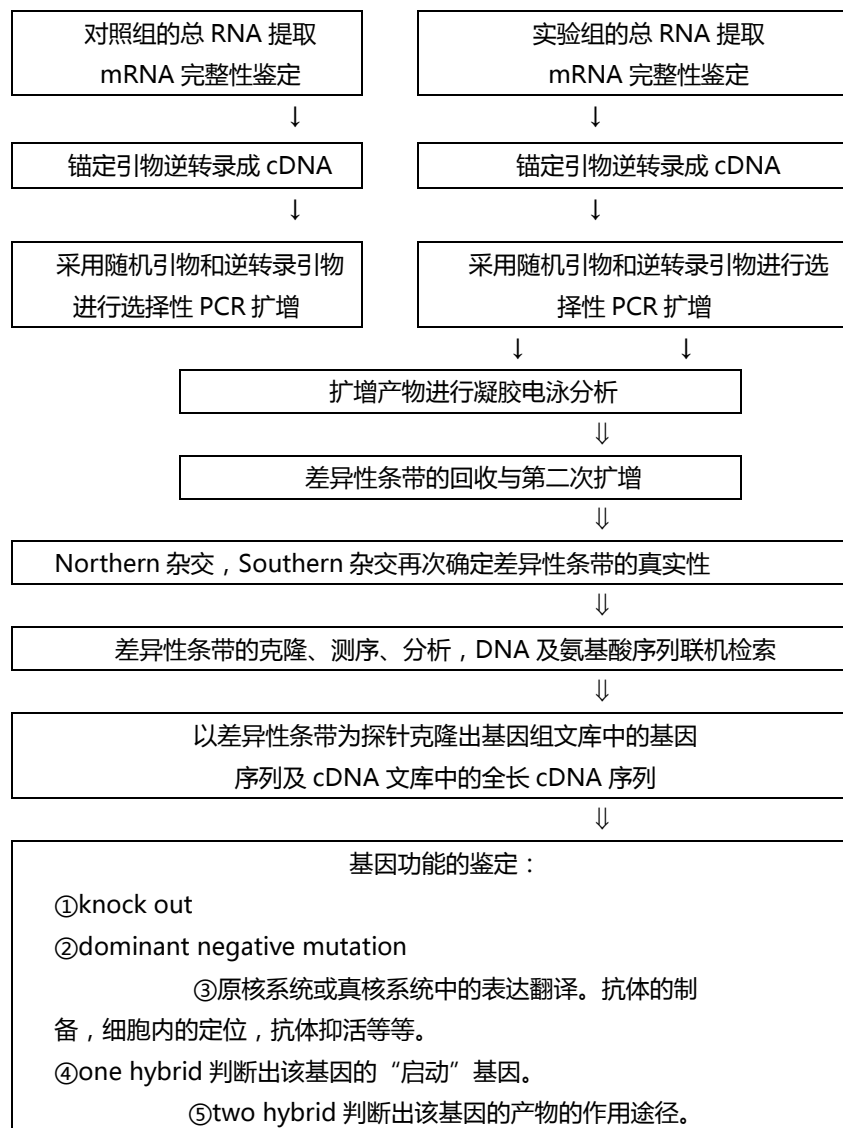
1. 本实验大部分为 RNA 操作,注意 RNA 酶的污染。
2. RNase 消化液消化未杂交的单链 RNA 和探针 RNA,当探针与样品之间有碱基错配时,错配位点也将被消化,因此会产生片段较小的杂交片段。因此进行 PCR 时,采取尽量减少错配的措施。
3. 同位素对 RNA 合成有一定影响,有时会产生非全长的探针。因此,标记时间不宜过长。
4. RNase 消化液有时会产生过度消化而无检测信号,可以将消化液稀释 10-100 倍后使用。

### 9.10. mRNA 差别显示技术

mRNA 差别显示技术也称为差示反转录 PCR ( Differential Display of reverse Transcriptional PCR ) 简称为 ddRT-PCR。它是将 mRNA 反转录技术与 PCR 技术二者相互结合发展起来的一种 RNA 指纹图谱技术。目前已广泛应用于分离鉴定组织特异性表达的基因。差别基因表达 ( differential gene express ) 是细胞分化的基础。mRNA 差别显示技术正是对组织特异性表达的基因进行分离的一种快速而行之有效的办法。该方法的基本原理是首先选取不同的组织样品或不同发育阶段的同一组织样品或同一组织样品经不同药物处理诱导的样品,经总 RNA 提取后,进行 mRNA 反转录合成 cDNA。此 cDNA 的合成是采用 Oligo ( dT )<sub>12</sub> MN 为引物,其中 M 为 A, C, G 中的任意

一种, N 为 A, C, G 或 T 中的任意一种, 所以共有 12 种 oligo (dT)<sub>12</sub> MN 引物, 其中 M 称为锚定碱基, 起增大引物 Tm 值的作用, N 称为分类碱基, 对反转录进行分类。用这 12 种引物分别对同一总 RNA 样品进行 cDNA 合成, 即进行 12 次不同的反转录反应, 从而使反转录的 cDNA 具有 12 种类型, 也就是对 cDNA 进行 12 种归类 (目前较为流行的方法是进行 4 种归类, 即 M 为简并碱基的形式存在), 在此基础上对每一类 cDNA 进行随机引物和反转录引物 PCR 扩增, 通过对组织样品的同一类 cDNA 的 PCR 选择性扩增产物凝胶电泳分析, 从而反映出不同样品间基因的时间和空间上组织特异性的表达。如此众多种类的 mRNA 反转录产物经 PCR 选择扩增后其类型依然为数众多, 很难用电泳系统加以快速准确地分离。因而需要对反转录产物 cDNA 进行归类处理, 减轻不同 PCR 产物电泳分离的难度, 提高分离的准确率。(见示意图)

## 一、实验流程：



这里以 CLONTECH 公司生产的 Delta™ Differential Display Kit 为例, 介绍具体的实验步骤。该试剂盒中含有 10 种任意引物和 9 种 Oligo(dT)引物。

## 二、操作步骤

1. 总 RNA 的提取 (见 Northern 杂交)

2. 第一链合成：

(1)总 RNA 样品 2μg ; cDNA 合成引物 1μl ;加 ddH<sub>2</sub>O 补至 5μl。将管标号为 1A, 2A, PCA 等。PC 为阳性对照。

(2)混匀后稍离心。

(3) 70°C 孵育 3min, 冰浴 2min 后稍离心。

(4) 准备 dNTP mix (以 5 管为例)

	每管	5 管	
5×第一链缓冲液		2μl	10μl
dNTPmix (各 5mM)		2μl	10μl
MMLV 逆转录酶 (200u/μl)		1μl	5μl
	5μl	25μl	

(5) 每管加入 5μl, 混匀后稍离心。

(6) 42°C 孵育 1hr。

(7) 75°C 10min 终止反应后置冰上, 稍离心。

(8) 将 2μl 反应液分别转至新管中 (新管标号为 1B, 2B, PC B 等)。

(9) 将 78μl ddH<sub>2</sub>O 分别加入 B 管中, 混匀。

(10) 将 72μl ddH<sub>2</sub>O 分别加入 A 管中, 混匀。

(11) 将所有 cDNA 稀释液 -20°C 保存待用。

3. dd-PCR: 以引物 P1, T9 为例说明

(0.5ml PCR 管, 1 代表对照组, 2 代表实验组)

管号	cDNA 样品	引物
(1)	1A	P1, T9
(2)	1B	P1, T9
(3)	2A	P1, T9
(4)	2B	P1, T9
(5)	H <sub>2</sub> O	P1, T9
(6)	RNA1	P1, T9
(7)	RNA2	P1, T9

以下为阳性对照反应体系

(8)	PC 1A	P10, T8
(9)	PC 1B	P10, T8
(10)	PC 2A	P10, T8
(11)	PC 2B	P10, T8
(12)	H <sub>2</sub> O	P10, T8
(13)	PC RNA1	P10, T8
(14)	PC RNA2	P10, T8

在 PCR 管中加入:

① cDNA 样品	1μl
P 引物	1μl
T 引物	1μl

② 准备其它 PCR 试剂的混合液: (在另一管中加入)

成分	每管(μl)	所需管数( n=14)
10×buffer	2.0	2n
ddH <sub>2</sub> O	14.0	14n
dNTPmix	0.2	0.2n
α- <sup>32</sup> P dATP	0.4	0.4n
Taq 酶	0.4	0.4n
终体积	17.0	17 n

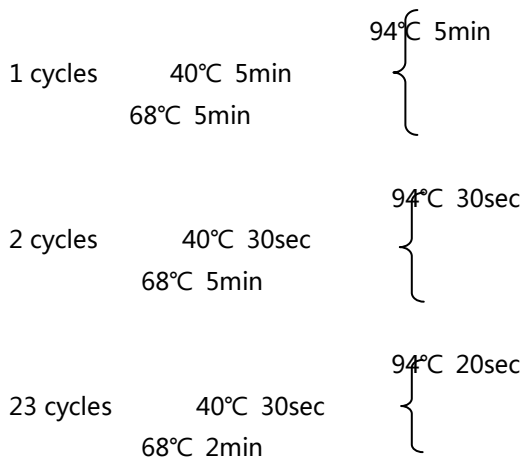
混匀后稍离心。

③ 将 17μl PCR 混合液加入各反应管, 则各管总体积为 20μl。

④ 开始 PCR 扩增。

⑤ PCR 循环参数：

在 GeneAmp PCR Systems 2400 & 9600 扩增仪上执行以下程序：



1 cycles 68°C 7 min。

⑥ 反应结束后置-20°C保存备用。

4. 电泳和放射自显影

- (1) 配制 6%变性聚丙烯酰胺凝胶，灌注测序板。
- (2) 预电泳 30min。
- (3) 每个 dd-PCR 反应取出 5 $\mu$ l 于一新微量离心管中，加 5 $\mu$ l loading buffer，混匀，离心，置 94°C 变性 2min。立即置冰浴。
- (4) 停止预电泳，冲洗加样孔。
- (5) 加样 2 $\mu$ l。70W 电泳 2.75hr 至二甲苯青到达胶的底部。
- (6) 下胶：(同测序胶)
- (7) 干胶：在胶表面覆上保鲜膜，80°C 干胶 30min。
- (8) X 光片-70°C 曝光过夜或更长时间(根据射线强度而定)。

图 2-6 显示了 dd-PCR 放射自显影的 X 光片

5. 差异条带回收再扩增

- (1) X 光片经 D72 显影、酸性定影液定影后，水洗晾干。置 X 光片灯上比较寻找差异条带。
- (1) 用一次性手术刀片在胶上切割差异条带，加 ddH<sub>2</sub>O 20 $\mu$ l，沸水浴 15min，离心取上清为模板。
- (3) 以原引物扩增：

回收 DNA	7 $\mu$ l
10 $\times$ PCR buffer	5 $\mu$ l
5mM dNTPmix	0.5 $\mu$ l
引物 P	2.5 $\mu$ l
引物 T	2.5 $\mu$ l
Taq 酶	2 $\mu$ l

加 ddH<sub>2</sub>O 至总体积为 50 $\mu$ l

(4) 执行 PCR 程序:

93°C3min；93°C1min→60°C1min→68°C2min，20 次循环；68°C5min。

(5) 取 PCR 产物 10 $\mu$ l 2%琼脂糖电泳检测。

(6) PCR 产物乙醇沉淀，10 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 溶解。

6. 以 PCR 产物为探针，标记后进行 Northern 杂交，证实基因的真实性。

7. PCR 产物的 TA 克隆。

8. DNA 序列测定。

## 9. 检索分析。

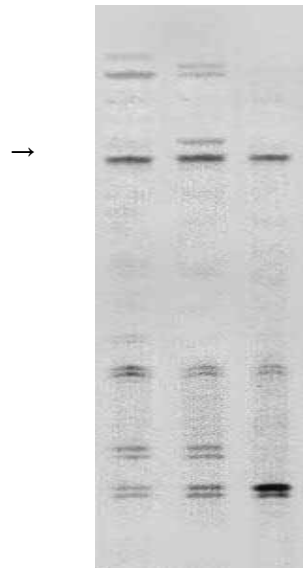


图 2-6 dd-PCR 放射自显影图

(三个泳道中反应了不同处理样品中 mRNA 表达的差异)

### 9.11. RT-PCR 简介

逆转录-聚合酶链反应 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)的原理是:提取组织或细胞中的总 RNA,以其中的 mRNA 作为模板,采用 Oligo(dT)或随机引物利用逆转录酶反转录成 cDNA。再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,而获得目的基因或检测基因表达。RT-PCR 使 RNA 检测的灵敏性提高了几个数量级,使一些极为微量 RNA 样品分析成为可能。该技术主要用于:分析基因的转录产物、获取目的基因、合成 cDNA 探针、构建 RNA 高效转录系统。

#### 一、反转录酶的选择

1. Money 鼠白血病病毒 (MMLV) 反转录酶:有强的聚合酶活性, RNA 酶 H 活性相对较弱。最适作用温度为 37°C。
2. 禽成髓细胞瘤病毒 (AMV) 反转录酶:有强的聚合酶活性和 RNA 酶 H 活性。最适作用温度为 42°C。
3. *Thermus thermophilus*、*Thermus flavus* 等嗜热微生物的热稳定性反转录酶:在  $Mn^{2+}$  存在下,允许高温反转录 RNA,以消除 RNA 模板的二级结构。
4. MMLV 反转录酶的 RNase H 突变体:商品名为 SuperScript 和 SuperScript II。此种酶较其它酶能多将大部分的 RNA 转换成 cDNA,这一特性允许从含二级结构的、低温反转录很困难的 mRNA 模板合成较长 cDNA。

#### 二、合成 cDNA 引物的选择

1. 随机六聚体引物:当特定 mRNA 由于含有使反转录酶终止的序列而难于拷贝其全长序列时,可采用随机六聚体引物这一不特异的引物来拷贝全长 mRNA。用此种方法时,体系中所有 RNA 分子全部充当了 cDNA 第一链模板,PCR 引物在扩增过程中赋予所需要的特异性。通常用此引物合成的 cDNA 中 96%来源于 rRNA。
2. Oligo(dT):是一种对 mRNA 特异的方法。因绝大多数真核细胞 mRNA 具有 3' 端 Poly(A<sup>+</sup>)尾,此引物与其配对,仅 mRNA 可被转录。由于 Poly(A<sup>+</sup>)RNA 仅占总 RNA 的 1-4%,故此引物合成的 cDNA 比随机六聚体作为引物和得到的 cDNA 在数量和复杂性方面均要小。
3. 特异性引物:最特异的引发方法是用含目标 RNA 的互补序列的寡核苷酸作为引物,若 PCR 反应用二种特异性引物,第一条链的合成可由与 mRNA 3' 端最靠近的配对引物起始。用此类引物仅产生所需要的 cDNA,导致更为特异的 PCR 扩增。

#### 二、试剂准备

1. RMA 提取试剂
2. 第一链 cDNA 合成试剂盒
3. dNTPmix : 含 dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 2mM
4. Taq DNA 聚合酶

### 三、操作步骤

1. 总 RNA 的提取：见相关内容。
2. cDNA 第一链的合成：目前试剂公司有多种 cDNA 第一链试剂盒出售，其原理基本相同，但操作步骤不一。现以 GIBICOL 公司提供的 SuperScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis 试剂盒为例。

(1) 在 0.5ml 微量离心管中，加入总 RNA 1-5 $\mu$ g，补充适量的 DEPC H<sub>2</sub>O 使总体积达 11 $\mu$ l。在管中加 10 $\mu$ M Oligo (dT)<sub>12-18</sub> 1 $\mu$ l，轻轻混匀、离心。

(2) 70°C 加热 10min，立即将微量离心管插入冰浴中至少 1min。

然后加入下列试剂的混合物：

10 $\times$ PCR buffer	2 $\mu$ l
25mM MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ l
10mM dNTPmix	1 $\mu$ l
0.1M DTT	2 $\mu$ l

轻轻混匀，离心。42°C 孵育 2-5min。

(3) 加入 Superscript II 1 $\mu$ l，在 42°C 水浴中孵育 50min。

(4) 于 70°C 加热 15min 以终止反应。

(5) 将管插入冰中，加入 RNase H 1 $\mu$ l，37°C 孵育 20min，降解残留的 RNA。 -20°C 保存备用。

### 3. PCR：

(1) 取 0.5ml PCR 管，依次加入下列试剂：

第一链 cDNA	2 $\mu$ l
上游引物 (10pM)	2 $\mu$ l
下游引物 (10pM)	2 $\mu$ l
dNTP(2mM)	4 $\mu$ l
10 $\times$ PCR buffer	5 $\mu$ l
Taq 酶 (2u/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

(2) 加入适量的 ddH<sub>2</sub>O，使总体积达 50 $\mu$ l。轻轻混匀，离心。

(3) 设定 PCR 程序。在适当的温度参数下扩增 28-32 个循环。为了保证实验结果的可靠与准确，可在 PCR 扩增目的基因时，加入一对内参 (如 G3PD) 的特异性引物，同时扩增内参 DNA，作为对照。

(4) 电泳鉴定：行琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察结果。

(5) 密度扫描、结果分析：采用凝胶图像分析系统，对电泳条带进行密度扫描。

### 四、注意事项

1. 在实验过程中要防止 RNA 的降解，保持 RNA 的完整性。在总 RNA 的提取过程中，注意避免 mRNA 的断裂。

2. 为了防止非特异性扩增，必须设阴性对照。

3. 内参的设定：主要为了用于靶 RNA 的定量。常用的内参有 G3PD (甘油醛-3-磷酸脱氢酶)、 $\beta$ -Actin ( $\beta$ -肌动蛋白) 等。其目的在于避免 RNA 定量误差、加样误差以及各 PCR 反应体系中扩增效率不均—各孔间的温度差等所造成的误差。

4. PCR 不能进入平台期，出现平台效应与所扩增的目的基因的长度、序列、二级结构以及目标 DNA 起始的数量有关。故对于每一个目标序列出现平台效应的循环数，均应通过单独实验来确定。

5. 防止 DNA 的污染：

(1) 采用 DNA 酶处理 RNA 样品。

(2) 在可能的情况下，将 PCR 引物置于基因的不同外显子，以消除基因和 mRNA 的共线性。

## 9.12. RT-PCR 引物设计原则和方法

最近刚开始做 PCR，参考了很多与引物设计相关的帖子，结合自己使用 primer5 和 oligo 的体会，想谈谈自己设计引物的方法和步骤，恳请各位前辈指正。

### RT-PCR 引物设计原则和方法

在 NCBI 上搜索到该基因，找到该基因的 mRNA，在 CDS 选项中，找到编码区所在位置，在下面的 origin 中，Copy 该编码序列作为软件查询序列的候选对象。

打开 Primer Premier5，点击 File-New-DNA sequence，出现输入序列窗口，Copy 目的序列在输入框内（选择 As），此窗口内，序列也可以直接翻译成蛋白。点击 Primer，进入引物窗口。

此窗口可以链接到“引物搜索”、“引物编辑”以及“搜索结果”选项，点击 Search 按钮，进入引物搜索框，选择“PCR primers”，“Pairs”，设定搜索区域和引物长度和产物长度。在 Search Parameters 里面，可以设定相应参数。一般若无特殊需要，参数选择默认即可，但产物长度可以适当变化，因为 100~200bp 的产物电泳跑得较散，所以可以选择 300~500bp。

点击 OK，软件即开始自动搜索引物，搜索完成后，会自动跳出结果窗口，搜索结果默认按照评分（Rating）排序，点击其中任一搜索结果，可以在“引物窗口”中，显示出该引物的综合情况，包括上游引物和下游引物的序列和位置，引物的各种信息等。

对于引物的序列，可以简单查看一下，避免出现下列情况：3' 端不要以 A 结尾，最好是 G 或者 C，T 也可以；3' 不要出现连续的 3 个碱基相连的情况，比如 GGG 或 CCC，否则容易引起错配。此窗口中需要着重查看的包括：**T<sub>m</sub>** 应该在 **55~70 度** 之间，**GC%** 应该在 **45%~55%** 间，上游引物和下游引物的 T<sub>m</sub> 值最好不要相差太多，大概在 2 度以下较好。该窗口的最下面列出了两条引物的二级结构信息，包括，发卡，二聚体，引物间交叉二聚体和错误引发位置。若按钮显示为红色，表示存在该二级结构，点击该红色按钮，即可看到相应二级结构位置图示。最理想的引物，应该都不存在这些二级结构，即这几个按钮都显示为“None”为好。但有时很难找到各个条件都满足的引物，所以要求可以适当放宽，比如引物存在错配的话，可以就具体情况考察该错配的效率如何，是否会明显影响产物。对于引物具体详细的评价需要借助于 Oligo 来完成，Oligo 自身虽然带有引物搜索功能，但其搜索出的引物质量感觉不如 Primer5。

在 Primer5 窗口中，若觉得某一对引物合适，可以在搜索结果窗口中，点击该引物，然后在菜单栏，选择 File-Print-Current pair，使用 PDF 虚拟打印机，即可转换为 Pdf 文档，里面有该引物的详细信息。

在 Oligo 软件界面，File 菜单下，选择 Open，定位到目的 cDNA 序列（在 primer 中，该序列已经被保存为 Seq 文件），会跳出来两个窗口，分别为 Internal Stability（Delta G）窗口和 T<sub>m</sub> 窗口。在 T<sub>m</sub> 窗口中，点击最左下角的按钮，会出来引物定位对话框，输入候选的上游引物序列位置（Primer5 已经给出）即可，而引物长度可以通过点击 Change-Current oligo length 来改变。定位后，点击 T<sub>m</sub> 窗口的 Upper 按钮，确定上游引物，同样方法定位下游引物位置，点击 Lower 按钮，确定下游引物。引物确定后，即可以充分利用 Analyze 菜单中各种强大的引物分析功能了。

Analyze 中，第一项为 Key info，点击 Selected primers，会给出两条引物的概括性信息，其中包括引物的 T<sub>m</sub> 值，此值 Oligo 是采用 nearest neighbor method 计算，会比 Primer5 中引物的 T<sub>m</sub> 值略高，此窗口中还给出引物的 Delta G 和 3' 端的 Delta G。3' 端的 Delta G 过高，会在错配位点形成双链结构并引起 DNA 聚合反应，因此此项绝对值应该小一些，最好不要超过 9。

Analyze 中第二项为 Duplex Formation，即二聚体形成分析，可以选择上游引物或下游引物，分析上游引物间二聚体形成情况和下游引物间的二聚体情况，还可以选择 Upper/Lower，即上下游引物之间的二聚体形成情况。引物二聚体是影响 PCR 反应异常的重要因素，因此应该避免设计的引物存在二聚体，至少也要使设计的引物形成的二聚体是不稳定的，即其 Delta G 值应该偏低，一般不要使其超过 4.5kcal/mol，结合碱基对不要超过 3 个。Oligo 此项的分析窗口中分别给出了 3' 端和整个引物的二聚体图示和 Delta G 值。

Analyze 中第三项为 Hairpin Formation，即发夹结构分析。可以选择上游或者下游引物，同样，Delta G 值不要超过 4.5kcal/mol，碱基对不要超过 3 个。

Analyze 中第四项为 Composition and Tm 会给出上游引物、下游引物和产物的各个碱基的组成比例和 Tm 值。上下游引物的 GC% 需要控制在 40% ~ 60%，而且上下游引物之间的 GC% 不要相差太大。Tm 值共有 3 个，分别采用三种方法计算出来，包括 nearest neighbor method、%GC method 和 2(A + T) + 4(G + C) method，最后一种应该是 Primer5 所采用的方法，Tm 值可以控制在 50 ~ 70 度之间。

第五项为 False Priming Sites，即错误引发位点，在 Primer5 中虽然也有 False priming 分析，但不如 oligo 详细，并且 oligo 会给我正确引发效率和错误引发效率，一般的原则要使错误引发效率在 100 以下，当然有时候正确位点的引发效率很高的话，比如达到 400 ~ 500，错误引发效率超过 100 幅度若不大的话，也可以接受。

Analyze 中，有参考价值的最后一项是“PCR”，在此窗口中，是基于此对引物的 PCR 反应 Summary，并且给出了此反应的最佳退火温度，另外，提供了对于此对引物的简短评价。若该引物不利于 PCR 反应的二级结构存在，并且 Delta G 值偏大的话，Oligo 在最后的评价中会注明，若没有注明此项，表明二级结构能值较小，基本可以接受。

引物评价完毕后，可以选择 File-Print，打印为 PDF 文件保存，文件中将会包括所有 Oligo 软件中已经打开的窗口所包括的信息，多达数页。因此，打印前最好关掉 Tm 窗口和 Delta G 窗口，可以保留引物信息窗口、二级结构分析窗口（若存在可疑的异常的话）和 PCR 窗口。

引物确定后，对于上游和下游引物分别进行 Blast 分析，一般来说，多少都会找到一些其他基因的同源序列，此时，可以对上游引物和下游引物的 blast 结果进行对比分析，只要没有交叉的其他基因的同源序列就可以。

有一个问题，引物设计原则里面常常强调，引物所对应模板序列的 Tm 值最好在 72°C 左右，但是软件里面 Search 出来的引物，很少有达到这个值的，一般都在 50 ~ 65 度之间，这是什么原因？软件怎么没有限定这个规则？

### 9.13. RT-PCR

#### Protocol: TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV)

##### 1. 按下列组成在 PCR 反应管中调制反应液

Reagent	Quantity, for 50µl of reaction mixture
10×One Step RNA PCR Buffer	5µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	10µl
10 mM dNTP mix	5µl
RNase Inhibitor (40 U/µl)	1µl
AMV-Optimized Taq	1µl
AMV RTase XL (5 U/µl)	1µl
上游特异 Primer (20 µM)	1µl
下游特异 Primer (20 µM)	1µl

实验样品 RNA ( ≤1 μg Total RNA )	1μl
RNase Free dH <sub>2</sub> O	24μl
Total	50μl /Sample

1. 反应总体积根据实际情况进行调控，可以做 20~50μl 以节约试剂；
2. 将上表各成分加入到 0.2ml 或 0.5ml 灭菌的 PCR 薄壁管中；
3. 如果不用 PCR 仪的加热盖，在反应混合液的上层加 30 ~50μl 的矿物油防止样品在 PCR 的过程中蒸发；

2. 按以下条件进行反应

Step	Temperature, °C	Time, min	Number of cycles	Note
逆转录	50	30	1	
逆转录酶失活	94	2	1	
变性	94	0.5	25-35	退火温度比理论退火温度大概低 5°C ,再根据反应结果优化 Taq 酶每分钟延伸 1000bp
退火	37-65	0.5		
延伸	72	根据扩增产物的大小		
最终延伸	72	10	1	

1. 反应结束后，抽取扩增样品 5μl，用琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果，用 DNA marker 判断扩增片段的大小或冷冻保存，以备以后分析使用。
- 2.

#### 9.14. RT-PCR 经验

做 RNA 病毒基因的 RT-PCR 成败的关键首先在于 RNA 模板的制备。本人三年前做过一个正链 RNA 病毒全基因组分段扩增，设计方案是将全基因组分成 7 个片段，0.6kb-3.3kb 不等，分别进行 RT-PCR 扩增，刚开始的三个月，我们课题组三个人辛辛苦苦，什么招都想过了，结果连一个片段都没有拿到。后来有一个周末，我一个人安安静静做了一天，PCR 跑胶的结果足以让我兴奋一个月：一下子隐隐约约出了 3 个片段 !!! 紧接着把胶里的弱带切下，水溶并后做二次扩增(注：跑胶总会吧，在 UV 下，参照 marker，将特异性高，且与预期大小相同的 DNA 带切出，放在一个 ep 管里，加入适量无菌水，用枪头将胶反复搅碎，高速离心，小心吸取 2ul 上清用作模板，进行第二次 PCR 扩增)很快，三个预期的片段都得到了理想的扩增。不到一个月，12kb 的全基因组各片段全部收归囊下。

我这次成功的关键在于：提取 RNA 时，收集沉淀这一步。离心速度不要低于 13000rpm ( r=5cm )，提高离心速度、延长离心时间，在离心前的沉淀也尽可能在低温下长时间进行，这些时我本人总结出来的经验。在后来的实验中，几乎每次 RT-PCR 都非常顺利，除了材料本身就没有目标基因。

这一次谈一下逆转录酶和逆转录反应的问题，在一般的逆转录反应中，较常用的是 MMLV ( 鼠源的 ) 和 AMV ( 禽源的 ) 两种，现在更有各家公司推出的耐热的 ( 50-60 度 )、超长片段的逆转录酶，这方面具有专长的数 gibco ( 现在并购于 invitrogen )。

我们实验室使用的一般是 MMLV，鼠源的酶，虽然活性比较低一点，但是对应的 RNaseH 活性也很低，在长时间的逆转录过程中，不会造成模板的降解，获得 cDNA 的几率大，适用于较长的 cDNA 链的合成。对于从细胞培养物中利用 RT-PCR 方法扩增 mRNA 丰度低的基因也很有效。但是 AMV 也有其自身的优点，酶的活性很高，扩增 1kb 以下的基因时比较常用，我知道临床上血液检测中有时使用 AMV，省时，也省试剂。

另外，MMLV 逆转录反应的条件比较好掌握，反应液的组分简单，AMV 的反应液有的需要添加焦磷酸钠 ( 这种试剂不好找到 )。

反应温度最好每次都控制不变，MMLV 我每次都使用 37 度，虽然 manual 上说使用特异性引物可以升到 42 度进行逆转录反应，但是有一次 42 度没有扩增结果，改为 37 度却扩出了所需要的带（使用的 20mer 特异性引物），从此以后我一直使用 37 度，后来的结果也还可以。

长片段逆转录，比如某些 RNA 病毒的全基因组 RT-PCR 扩增，10kb 左右，可以选用上面提到的耐热、RNaseH-的逆转录酶，可能比较贵一点，但是很多文献报到能够得到很好的扩增，本人尝试过，说实话，可能没有太认真去优化条件，很遗憾连设计的 6kb 都没有得到扩增产物。由此，我建议大家不要轻易尝试这个方法，一则扩增的难度确实存在，另外，扩增的忠实性不能得到很好的保证。不同的实验目的也不一样，一下子得到这样长的片段，后续的改造也很困难。

还有一个需要指出的问题是，有些同行喜欢一下子提很多 RNA，加保护剂如 RNase inhibitor 等，冻存，以后长期使用，我不推荐这样做。RNA 在低量存在时非常容易降解，任何保存方法都比不上不保存<sup>^</sup>，我的做法是马上做 RT，不吃饭也要做上去，为了省去日后不尽的麻烦，切记切记！

## 9.15. 荧光 PCR 原理

### 1. 荧光染料

荧光基团通常各自拥有单一的光吸收峰。在光的刺激下，荧光基团吸收光的能量后通常以三种方式释放出能量：

1) 光能 许多荧光基团吸收光能后仍旧以光能形式释放能量，并且发射光的峰值大于吸收峰。比如荧光染料 Fam 的光吸收峰为 490nm，而发射峰为 530nm。

2) 热能 某些荧光基团吸收光能后，能量转换为热量扩散到环境中，如 Dabcyl。

3) 转移给临近的分子 当临近的分子满足发生能量转移的要求时，能量从荧光基团传递到临近的分子。

### 2. 荧光共振能量转移 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET)

当某个荧光基团的发射谱与另一荧光基团的吸收光谱发生重叠，且两个基团距离足够近时，能量可以从短波长（高能量）的荧光基团传递到长波长（低能量）的荧光基团，这个过程称为荧光共振能量转移(FRET)，实际相当于将短波长荧光基团释放的荧光屏蔽。

### 3. 荧光 PCR

荧光 PCR 不同于其他 PCR 的地方在于 PCR 过程中利用荧光染料在光刺激下释放的荧光能量的变化直接反映出 PCR 扩增产物量的变化，荧光信号变量与扩增产物变量成正比，并通过足够灵敏的自动化仪器实现对荧光的采集和分析以达到对原始模板量定量的目的。主要有以下几类：

1) 荧光染料直接结合扩增产物如 SYBB Green I，类似于 EB，能特异性地区分单双链 DNA，只与双链 DNA 结合。

2) 荧光标记引物对引物进行荧光标记从而使荧光标记基团直接掺入 PCR 扩增产物。

3) 荧光标记探针常规引物以外，引入荧光基团标记的特异性探针，探针可与模板发生一对一结合关系。

a) Taqman 双标记探针 (Taqman<sup>TM</sup> 5-nuclease assay)

b) 分子信标探针 (Molecular beacon<sup>TM</sup>)

c) LightCycler<sup>TM</sup> 杂交双探针

荧光标记探针的最大优点在于其特异性非常强，避免了非特异性扩增造成的假阳性信号。匹基生物开发的荧光 PCR 检测试剂盒主要基于 Taqman 技术 (Taqman<sup>TM</sup> 5-nuclease assay)：

除常规的一对引物以外，PCR 反应体系中另加有一个能与 PCR 产物杂交的荧光双标记探针。该探针的 5 端标记一个荧光基团，3 端标记另一个荧光基团。此时 5 端荧光基团吸收能量后将能量转移给临近的 3' 端荧光淬灭基团（发生 FRET），因此正常情况下检测不到该探针 5 端荧光基团发出的荧光信号，但当溶液中有模板时，模板变性后低温退火时，引物与探针同时与模板结合。在引物的介导下，沿模板向前延伸至探针结合处，发生链的置换；

Taq 酶的 5—3' 外切酶活性将探针 5 端连接的荧光基团从探针上切割下来，游离于反应体系中，从而脱离 3' 端荧光淬灭基团的屏蔽，接受光刺激发出荧光，切割的荧光基团数与 PCR 产物的数量成比例。因此根据 PCR 反应液的荧光强度即可计算出初始模板的数量。

### 4. 荧光定量 PCR (Fluorescent Quantitative PCR, FQ-PCR)

1) Threshold：PCR 扩增信号进入相对稳定对数增长的最下限，通常设定在 S 型扩增曲线的增长拐点处附近。

2) Threshold Cycle (TC or CT) OR Cross Point(CP) : PCR 增长信号与 Threshold 发生交汇的循环数, 也是 FQ-PCR 判断阴阳性和进行定量分析的依据。

3) Standard Curve(标准曲线) : CT/TC/CP 与起始模板量的对数呈反比关系 :  $Y = -aX + b$

其中  $X = \text{Log Concentration}$

$Y = \text{CT/TC/CP}$

PCR 扩增过程中, 引入一系列已知起始浓度的模板与未知样品同时进行扩增, 利用该系列模板的 CT/TC/CP 值与已知浓度对数做直线回归得到标准曲线, 从而计算出未知样品的起始模板浓度。

## 5. 荧光 PCR 的优点

荧光 PCR 区别于其他 PCR 方法主要有以下优点 :

- 1) 全封闭反应, 无需 PCR 后处理
- 2) 特异性强, 灵敏度高
- 3) 采用对数期分析, 摒弃终点数据, 定量准确
- 4) 定量范围宽, 可达到 10 个数量级
- 5) 仪器在线式实时监测, 结果直观, 避免人为判断
- 6) 可实现一管双检或多检
- 7) 操作安全, 缩短时间, 提高效率
- 8) 利于自动化和联网管理

## 9.16. RNAi 实验原理与方法

近年来的研究表明, 将与 mRNA 对应的正义 RNA 和反义 RNA 组成的双链 RNA(dsRNA)导入细胞, 可以使 mRNA 发生特异性的降解, 导致其相应的基因沉默。这种转录后基因沉默机制(post-transcriptional gene silencing, PTGS)被称为 RNA 干扰 (RNAi)。

### 一、RNAi 的分子机制

通过生化和遗传学研究表明, RNA 干扰包括起始阶段和效应阶段(initiation and effector steps)。在起始阶段, 加入的小分子 RNA 被切割为 21-23 核苷酸长的小分子干扰 RNA 片段(small interfering RNAs, siRNAs)。证据表明; 一个称为 Dicer 的酶, 是 RNase III 家族中特异识别双链 RNA 的一员, 它能以一种 ATP 依赖的方式逐步切割由外源导入或者由转基因, 病毒感染等各种方式引入的双链 RNA, 切割将 RNA 降解为 19-21bp 的双链 RNAs(siRNAs), 每个片段的 3' 端都有 2 个碱基突出。

在 RNAi 效应阶段, siRNA 双链结合一个核酶复合物从而形成所谓 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC)。激活 RISC 需要一个 ATP 依赖的将小分子 RNA 解双链的过程。激活的 RISC 通过碱基配对定位到同源 mRNA 转录本上, 并在距离 siRNA 3' 端 12 个碱基的位置切割 mRNA。尽管切割的确切机制尚不明了, 但每个 RISC 都包含一个 siRNA 和一个不同于 Dicer 的 RNA 酶。

另外, 还有研究证明含有启动子区的 dsRNA 在植物体内同样被切割成 21-23nt 长的片段, 这种 dsRNA 可使内源相应的 DNA 序列甲基化, 从而使启动子失去功能, 使其下游基因沉默。

### 二、如何进行 RNAi 试验

#### (一)siRNA 的设计

1. 在设计 RNAi 实验时, 可以先在以下网站进行目标序列的筛选 :

<http://www.genesil.com/business/products/order2.htm>

[http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)

<http://www.ic.sunysb.edu/Stu/shilin/rnai.html>

<http://design.dharmacon.com/rnadesign/default.aspx?SID=45358710>

2. RNAi 目标序列的选取原则 :

(1)从转录本 (mRNA) 的 AUG 起始密码开始, 寻找 "AA" 二连序列, 并记下其 3' 端的 19 个碱基序列, 作为潜在的 siRNA 靶位点。有研究结果显示 GC 含量在 45%—55% 左右的 siRNA 要比那些 GC 含量偏高的更为有效。

Tuschl 等建议在设计 siRNA 时不要针对 5'和 3'端的非编码区 ( untranslated regions , UTRs) , 原因是这些地方有丰富的调控蛋白结合区域, 而这些 UTR 结合蛋白或者翻译起始复合物可能会影响 siRNP 核酸内切酶复合物结合 mRNA 从而影响 siRNA 的效果。

(2)将潜在的序列和相应的基因组数据库(人, 或者小鼠, 大鼠等等)进行比较, 排除那些和其他编码序列/EST 同源的序列。

例如使用 BLAST ( [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) )

(3)选出合适的目标序列进行合成。通常一个基因需要设计多个靶序列的 siRNA , 以找到最有效的 siRNA 序列。

### 3.阴性对照

一个完整的 siRNA 实验应该有阴性对照, 作为阴性对照的 siRNA 应该和选中的 siRNA 序列有相同的组成, 但是和 mRNA 没有明显的同源性。通常的做法是将选中的 siRNA 序列打乱, 同样要检查结果以保证它和目的靶细胞中其他基因没有同源性。

4.目前已证实的 siRNA 可以在下面的网页找到 :

<http://design.dharmacon.com/catalog/category.aspx?key=49>

[http://www.ambion.com/techlib/tb/tb\\_502.html](http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_502.html)

<http://web.mit.edu/mmcmanus/www/siRNADB.html>

[http://python.penguindreams.net/Order\\_Entry/jsp/BrowseCatalog.jsp?Category=Published](http://python.penguindreams.net/Order_Entry/jsp/BrowseCatalog.jsp?Category=Published)

## (二)siRNA 的制备

目前为止较为常用的方法有通过化学合成, 体外转录, 长片断 dsRNAs 经 RNase III 类降解 (e.g. Dicer , E. coli , RNase III)体外制备 siRNA , 以及通过 siRNA 表达载体或者病毒载体, PCR 制备的 siRNA 表达框在细胞中表达产生 siRNA。

### 体外制备

#### 1.化学合成

许多国外公司都可以根据用户要求提供高质量的化学合成 siRNA。主要的缺点包括价格高, 定制周期长, 特别是有特殊需求的。由于价格比其他方法高, 为一个基因合成 3—4 对 siRNAs 的成本就更高了, 比较常见的做法是用其他方法筛选出最有效的序列再进行化学合成。

最适用于: 已经找到最有效的 siRNA 的情况下, 需要大量 siRNA 进行研究

不适用于: 筛选 siRNA 等长时间的研究, 主要原因是价格因素

#### 2.体外转录

以 DNA Oligo 为模版, 通过体外转录合成 siRNAs , 成本相对化学合成法而言比较低, 而且能够比化学合成法更快的得到 siRNAs。不足之处是实验的规模受到限制, 虽然一次体外转录合成能提供足够做数百次转染的 siRNAs , 但是反应规模和量始终有一定的限制。而且和化学合成相比, 还是需要占用研究人员相当的时间。值得一提的是体外转录得到的 siRNAs 毒性小, 稳定性好, 效率高, 只需要化学合成的 siRNA 量的 1/10 就可以达到化学合成 siRNA 所能达到的效果, 从而使转染效率更高。

最适用于: 筛选 siRNAs , 特别是需要制备多种 siRNAs , 化学合成的价格成为障碍时。

不适用于: 实验需要大量的, 一个特定的 siRNA。长期研究。

#### 3.用 RNase III 消化长片断双链 RNA 制备 siRNA

其他制备 siRNA 的方法的缺陷是需要设计和检验多个 siRNA 序列以便找到一个有效的 siRNA。而用这种方法——制备一份混合有各种 siRNAs “混合鸡尾酒” 就可以避免这个缺陷。选择通常是 200—1000 碱基的靶 mRNA 模版, 用体外转录的方法制备长片断双链 dsRNA , 然后用 RNase III (or Dicer) 在体外消化, 得到一种 siRNAs “混合鸡尾酒”。在除掉没有被消化的 dsRNA 后, 这个 siRNA 混合物就可以直接转染细胞, 方法和单一的 siRNA 转染一样。由于 siRNA 混合物中有许多不同的 siRNAs , 通常能够保证目的基因被有效地抑制。

dsRNA 消化法的主要优点在于可以跳过检测和筛选有效 siRNA 序列的步骤, 为研究人员节省时间和金钱 (注意: 通常用 RNase III 通常比用 Dicer 要便宜)。不过这种方法的缺点也很明显, 就是有可能引发非特异的基因沉默, 特别是同源或者是密切相关的基因。现在多数的研究显示这种情况通常不会造成影响。

最适用于: 快速而经济地研究某个基因功能缺失的表型

不适用于：长时间的研究项目，或者是需要一个特定的 siRNA 进行研究，特别是基因治疗

体内表达

前面的 3 种方法主要都是体外制备 siRNAs，并且需要专门的 RNA 转染试剂将 siRNAs 转到细胞内。而采用 siRNA 表达载体和基于 PCR 的表达框架则属于：从转染到细胞的 DNA 模版中在体内转录得到 siRNAs。这两种方法的优点在于不需要直接操作 RNA。

#### 4. siRNA 表达载体

多数的 siRNA 表达载体依赖三种 RNA 聚合酶 III 启动子(pol III)中的一种，操纵一段小的发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)在哺乳动物细胞中的表达。这三类启动子包括大家熟悉的人源和鼠源的 U6 启动子和人 H1 启动子。之所以采用 RNA pol III 启动子是由于它可以在哺乳动物细胞中表达更多的小分子 RNA，而且它是通过添加一串（3 到 6 个）U 来终止转录的。要使用这类载体，需要订购 2 段编码短发夹 RNA 序列的 DNA 单链，退火，克隆到相应载体的 pol III 启动子下游。由于涉及到克隆，这个过程需要几周甚至数月的时间，同时也需要经过测序以保证克隆的序列是正确的。

siRNA 表达载体的优点在于可以进行较长期研究——带有抗生素标记的载体可以在细胞中持续抑制靶基因的表达，持续数星期甚至更久。

病毒载体也可用于 siRNA 表达，其优势在于可以直接高效率感染细胞进行基因沉默的研究，避免由于质粒转染效率低而带来的种种不便，而且转染效果更加稳定。

最适用于：已知一个有效的 siRNA 序列，需要维持较长时间的基因沉默。

不适用于：筛选 siRNA 序列（其实主要是指需要多个克隆和测序等较为费时、繁琐的工作）。

#### 5. siRNA 表达框架

siRNA 表达框架(siRNA expression cassettes, SECs)是一种由 PCR 得到的 siRNA 表达模版，包括一个 RNA pol III 启动子，一段发夹结构 siRNA，一个 RNA pol III 终止位点，能够直接导入细胞进行表达而无需事前克隆到载体中。和 siRNA 表达载体不同的是，SECs 不需要载体克隆、测序等颇为费时的步骤，可以直接由 PCR 得到，不用一天的时间。因此，SECs 成为筛选 siRNA 的最有效工具，甚至可以用来筛选在特定的研究体系中启动子和 siRNA 的最适搭配。如果在 PCR 两端添加酶切位点，那么通过 SECs 筛选出的最有效的 siRNA 后，可以直接克隆到载体中构建 siRNA 表达载体。构建好的载体可以用于稳定表达 siRNA 和长效抑制的研究。

这个方法的主要缺点是①PCR 产物很难转染到细胞中（晶赛公司的 Protocol 可以解决这一问题）②不能进行序列测定，PCR 和 DNA 合成时可能差生的误读不能被发现导致结果不理想。

最适用于：筛选 siRNA 序列，在克隆到载体前筛选最佳启动子

不适用于：长期抑制研究。（如果克隆到载体后就可以了）

#### (三)siRNA 的转染

将制备好的 siRNA，siRNA 表达载体或表达框架转导至真核细胞中的方法主要有以下几种：

##### 1.磷酸钙共沉淀

将氯化钙，RNA(或 DNA)和磷酸缓冲液混合，沉淀形成包含 DNA 且极小的不溶的磷酸钙颗粒。磷酸钙-DNA 复合物粘附到细胞膜并通过胞饮进入目的细胞的细胞质。沉淀物的大小和质量对于磷酸钙转染的成功至关重要。在实验中使用的每种试剂都必须小心校准，保证质量，因为甚至偏离最优条件十分之一 pH 都会导致磷酸钙转染的失败。

##### 2.电穿孔法

电穿孔通过将细胞暴露在短暂的高场强电脉冲中转导分子。将细胞悬浮液置于电场中会诱导沿细胞膜的电压差异，据认为这种电压差异会导致细胞膜暂时穿孔。电脉冲和场强的优化对于成功的转染非常重要，因为过高的场强和过长的电脉冲时间会不可逆地伤害细胞膜而裂解细胞。一般，成功的电穿孔过程都伴随高水平（50%或更高）的毒性。

##### 3.DEAE-葡聚糖和 polybrene

带正电的 DEAE-葡聚糖或 polybrene 多聚体复合物和带负电的 DNA 分子使得 DNA 可以结合在细胞表面。通过使用 DMSO 或甘油获得的渗透休克将 DNA 复合体导入。两种试剂都已成功用于转染。DEAE-葡聚糖仅限于瞬时转染。

##### 4.机械法

转染技术也包括使用机械的方法，比如显微注射和基因枪（biolistic particle）。显微注射使用一根细针头将 DNA，RNA 或蛋白直接转入细胞质或细胞核。基因枪使用高压 microprojectile 将大分子导入细胞。

##### 5.阳离子脂质体试剂

在优化条件下将阳离子脂质体试剂加入水中时,其可以形成微小的(平均大小约 100-400nm)单层脂质体。这些脂质体带正电,可以靠静电作用结合到 DNA 的磷酸骨架上以及带负电的细胞膜表面。因此使用阳离子脂质体转染的原理与以前利用中性脂质体转染的原理不同。使用阳离子脂质体试剂, DNA 并没有预先包埋在脂质体中,而是带负电的 DNA 自动结合到带正电的脂质体上,形成 DNA-阳离子脂质体复合物。据称,一个约 5kb 的质粒会结合 2-4 个脂质体。被俘获的 DNA 就会被导入培养的细胞。现存对 DNA 转导原理的证据来源于内吞体和溶酶体。

为了达到高的转染效率,在转染实验过程中,需要注意以下几点:

#### 1.纯化 siRNA

在转染前要确认 siRNA 的大小和纯度。为得到高纯度的 siRNA,推荐用玻璃纤维结合,洗脱或通过 15-20%丙烯酰胺胶除去反应中多余的核苷酸,小的寡核苷酸,蛋白和盐离子。注意:化学合成的 RNA 通常需要跑胶电泳纯化(即 PAGE 胶纯化)。

#### 2.避免 RNA 酶污染

微量的 RNA 酶将导致 siRNA 实验失败。由于实验环境中 RNA 酶普遍存在,如皮肤,头发,所有徒手接触过的物品或暴露在空气中的物品等,此保证实验每个步骤不受 RNA 酶污染非常重要。

#### 3.健康的细胞培养物和严格的操作确保转染的重复性

通常,健康的细胞转染效率较高。此外,较低的传代数能确保每次实验所用细胞的稳定性。为了优化实验,推荐用 50 代以下的转染细胞,否则细胞转染效率会随时间明显下降。

#### 4.避免使用抗生素

Ambion 公司推荐从细胞种植到转染后 72 小时期间避免使用抗生素。抗生素会在穿透的细胞中积累毒素。有些细胞和转染试剂在 siRNA 转染时需要无血清的条件。这种情况下,可同时用正常培养基和无血清培养基做对比实验,以得到最佳转染效果。

#### 5.选择合适的转染试剂

针对 siRNA 制备方法以及靶细胞类型的不同,选择好的转染试剂和优化的操作对 siRNA 实验的成功至关重要。

#### 6.通过合适的阳性对照优化转染和检测条件

对大多数细胞,看家基因是较好的阳性对照。将不同浓度的阳性对照的 siRNA 转入靶细胞(同样适合实验靶 siRNA),转染 48 小时后统计对照蛋白或 mRNA 相对于未转染细胞的降低水平。过多的 siRNA 将导致细胞毒性以至死亡。

#### 7.通过标记 siRNA 来优化实验

荧光标记的 siRNA 能用来分析 siRNA 稳定性和转染效率。标记的 siRNA 还可用作 siRNA 胞内定位及双标记实验(配合标记抗体)来追踪转染过程中导入了 siRNA 的细胞,将转染与靶蛋白表达的下调结合起来。

### 三、RNAi 的应用前景

#### 1. 研究基因功能的新工具

已有研究表明 RNAi 能够在哺乳动物中灭活或降低特异性基因的表达,制作多种表型,而且抑制基因表达的时间可以随意控制在发育的任何阶段,产生类似基因敲除的效应。线虫和果蝇的全部基因组序列已测试完毕,发现大量未知功能的新基因, RNAi 将大大促进对这些新基因功能的研究。与传统的基因敲除技术相比,这一技术具有投入少,周期短,操作简单等优势,近来 RNAi 成功用于构建转基因动物模型报道日益增多,标志着 RNAi 将成为研究基因功能不可或缺的工具。

#### 2. 研究信号传导通路的新途径

联合利用传统的缺失突变技术和 RNAi 技术可以很容易地确定复杂的信号传导途径中不同基因的上下游关系, Clemensy 等应用 RNAi 研究了果蝇细胞系中胰岛素信息传导途径,取得了与已知胰岛素信息传导通路完全一致的结果,在此基础上分析了 DSH3PX1 与 DACK 之间的关系,证实了 DACK 是位于 DSH3PX1 磷酸化的上游激酶。RNAi 技术较传统的转染实验简单、快速、重复性好,克服了转染实验中重组蛋白特异性聚集和转染效率不高的缺点,因此认为 RNAi 技术将可能成为研究细胞信号传导通路的新途径。

#### 3.开展基因治疗的新策略

RNAi 具有抵抗病毒入侵,抑制转座子活动,防止自私基因序列过量增殖等作用,因此可以利用 RNAi 现象产生抗病毒的植物和动物,并可利用不同病毒转录序列中高度同源区段相应的 dsRNA 抵抗多种病毒。

肿瘤是多个基因相互作用的基因网络调控的结果,传统技术诱发的单一癌基因的阻断不可能完全抑制或逆转肿瘤的

生长，而 RNAi 可以利用同一基因家族的一个基因具有一段同源性很高的保守序列这一特性，设计针对这一区段序列的 dsRNA 分子，只注射一种 dsRNA 即可以产生多个基因同时剔除的表现，也可以同时注射多种 dsRNA 而将多个序列不相关的基因同时剔除。

尽管目前 RNAi 技术在哺乳动物中的应用还处于探索阶段，但它在斑马鱼和老鼠等脊椎动物中的成功应用预示着 RNAi 将成为基因治疗中重要的组成部分，人工合成的 dsRNA 寡聚药物的开发将可能成为极具发展前途的新兴产业。

### 9.17. RNAi 技术新突破：根据 SNP 选择性沉默突变基因

对于某些遗传病而言，从双亲继承一个拷贝的突变基因就足以致病。现在，爱荷华大学的研究人员证明有可能在沉默一个基因的突变拷贝的同时不影响另一个正常拷贝的表达。

这一发现表明有一天基因沉默技术或许可以用于多种人类疾病的治疗，包括癌症、亨廷氏症及类似遗传病、病毒感染等，治疗这些疾病都需要选择性关闭某些引起麻烦的基因的表达。

应特别指出的是，爱荷华大学的研究人员沉默突变基因的同时，没有影响正常基因拷贝的表达，即使正常拷贝与突变拷贝只有一个碱基的差异。有关研究结果发表在美国《国家科学院院刊》(PNAS)的早期网络版上。

“如果你携带一个拷贝的“坏”基因，只需将其关闭，留下好的那个拷贝独自执行正常功能就可以了。”研究的第一作者、爱荷华大学的研究生 Victor Miller 说。“这在理论上很简单，但技术上却很难做到。我们证明正常基因与突变基因之间的一个单核苷酸差异可用于关闭突变基因，而保留正常基因的表达。”

“这项研究是一次重要的概念认证，但要走向临床应用，还有很长的路。” Miller 补充说。

关闭一个突变基因、同时又维持正常基因的表达，这对于治疗所谓的显性遗传病尤其有用。显性遗传病中，从双亲之一继承而来的一个基因的单拷贝突变表达，而正常基因拷贝不表达，产生的蛋白对细胞有毒。因此，要想成功治疗显性遗传病必需除去或抑制致病基因的表达而不是简单地导入一个正确的基因拷贝。同时，正常的基因拷贝可能是细胞必需的，因此沉默致病突变的同时不影响正常拷贝的表达十分重要。许多神经退行性疾病如亨廷氏症等都是显性遗传病。亨廷氏症基因就是其正常基因拷贝是细胞正常功能所必需的一个典型实例。

研究人员利用 RNA 干扰 (RNAi) 技术沉默细胞培养物中引起神经退行性病变--Machado-Joseph 病 (MJD) 的突变基因，同时维护正常基因拷贝的表达不变。

Machado-Joseph 病，亨廷氏症以及至少 7 种其它神经退行性疾病都是由同一类型的遗传突变引起的。这些疾病中的遗传缺陷产生的突变蛋白氨基酸链特别地长。这些疾病中的每一种突变蛋白都倾向于簇集到一起，形成聚集体，对脑组织造成损害。其它神经退行性疾病如阿尔茨海默氏症和帕金森氏症的特点也是大脑中的蛋白倾向于错折叠或簇集。爱荷华大学的研究小组之所以选择 Machado-Joseph 病为研究对象是因为该病是研究这类神经退行性疾病的一个良好模型。

起初，研究人员曾尝试将小 RNA 干扰分子靶向突变基因的重复扩张部分来沉默 MJD 的突变基因，但没有成功。因此研究人员将焦点集中到一个单碱基序列差异上，也就是所谓的单核苷酸多态性 (SNP)，约有 70% 的 Machado-Joseph 病突变基因其突变序列的旁侧都出现这个 SNP。

“当我们尝试靶向突变本身时，干扰 RNA 无法区分突变基因与正常基因，因此两个拷贝都被抑制了。”研究的主要作者之一、爱荷华大学神经学助理教授 Henry Paulson 博士说。“接下来我们注意到大多数情况下，MJD 突变基因的突变序列旁侧都伴随有一个 SNP。我们用小干扰 RNA 靶向这个 SNP，这样就能区分突变拷贝与正常拷贝了，从而特异性只敲除了突变基因。”

Paulson 补充说，RNA 干扰能够根据 SNP 区分基因这一发现十分激动人心，因为每个人的 DNA 差异大都是 SNP 差异。因此有可能用 RNA 干扰技术靶向独一无二的与特殊基因相连的 SNP，以此来操作这些基因。

“甚至当我们不能靶向某个致病突变时，我们有可能也可以靶向伴随该突变出现的 SNP。” Paulson 说。

研究小组还用 RNA 干扰技术靶向由于单碱基变化而致病的基因突变。Tau 是一种重要的细胞蛋白，在某些与阿尔茨海默氏症有些类似的遗传性痴呆症中发生突变。研究人员指引小干扰 RNA 靶向 Tau 基因已知引起痴呆症的一个特殊突变。这个方法再次成功只抑制突变基因而对正常基因的表达无影响。

“RNA 干扰是一个激动人心的新工具，用于疾病治疗大有希望。” Paulson 说。“我们的研究使这个希望离我们更近了。如果我们能够用 RNA 干扰技术特异性靶向一个致病基因，这将极有价值。”

### 9.18. RNAi : 制备 siRNAs 的方法

越来越多的研究人员开始采用小分子干扰 RNA ( small interfering RNAs , siRNAs)来抑制特定的哺乳动物基因表达。siRNA 是一种短片断双链 RNA 分子,能够以同源互补序列的 mRNA 为靶目标降解特定的 mRNA,这个过程就是 RNA 干扰途径 ( RNA interference pathway )。RNAi 的应用包括功能基因组学, 药物靶筛选, 细胞信号传导通路分析等等。

目前为止较为常用的 5 种制备 siRNAs 的方法包括

- 化学合成
- 体外转录
- 长片断 dsRNAs 经 RNase III 类降解 (e.g. Dicer , E. coli , RNase III)
- siRNA 表达载体或者病毒载体在细胞中表达 siRNAs
- PCR 制备的 siRNA 表达框在细胞中表达

前面 3 种方法包括体外制备 siRNAs 然后经过转染或者电转导入哺乳动物细胞后面两种方法则依赖能够表达 siRNAs 的 DNA 载体或者表达框转染到细胞中。每种方法都有自己的优点和缺点。哪种是最好的方法, 其实取决于实验目的。这里简单介绍这 5 种方法, 优点和缺点, 以及它们最适合的应用。

### siRNA 的设计

除了方法 3 以外 其他的方法都在制备 siRNA 前都需要单独设计 siRNA 序列。关于怎样设计 siRNA 以及 siRNA 设计对 siRNA 功能的影响, 尽管我们不断掌握越来越多有关设计原则的信息。但这仍然不是精确的。通常来说, 每个目标序列设计 3—4 对 siRNAs, 在后面的实验中选择最有效的那个。网上有提供免费的 siRNA 设计工具。

### 体外制备

#### 1.化学合成

尽管化学合成是最贵的方法,但是却是最方便的——研究人员几乎不需要做什么工作。包括 Ambion 和 Qiagen 公司都可以根据用户要求提供高质量的化学合成 siRNA。主要的缺点包括价格高, 定制周期长, 特别是有特殊需求的。由于价格比其他方法高, 为一个基因合成 3—4 对 siRNAs 的成本就更高了, 比较常见的做法是用其他方法筛选出最有效的序列再进行化学合成。

**最适用于:** 已经找到最有效的 siRNA 的情况下, 需要大量 siRNA 进行研究

**不适用于:** 筛选 siRNA 等长时间的研究, 主要原因是价格因素

#### 2.体外转录

通过体外转录的方法可以合成 siRNAs, 这样的成本相对化学合成法而言比较低, 是一种性价比高的筛选 siRNAs 的好方法。更重要的是采用这种方法能够比化学合成法更快的得到 siRNAs。以 Silencer siRNA Construction Kit 为例, 一旦得到 DNA Oligo 模版 ( 这个还是需要 DNA 合成的, 不过 DNA 合成的成本就比较低了), 只要 24 小时就可以, 不需要等很久。这个方法的不足之处是实验的规模受到限制, 虽然一次体外转录合成能提供足够做数百次转染的 siRNAs, 但是反应规模和量始终有一定的限制。而且和化学合成相比, 还是需要占用研究人员相当的时间——毕竟, 化学合成只需要订购就可以了。值得一提的是体外转录得到的 siRNAs 只要较低的浓度就可以达到化学合成 siRNAs 较高浓度得到的效果 ( 0.5-20 nM vs. 50-100 nM per transfection , 图 2 )

**最适用于:** 筛选 siRNAs, 特别是需要制备多种 siRNAs, 化学合成的价格成为障碍时。

**不适用于:** 实验需要大量的, 一个特定的 siRNA。长期研究。

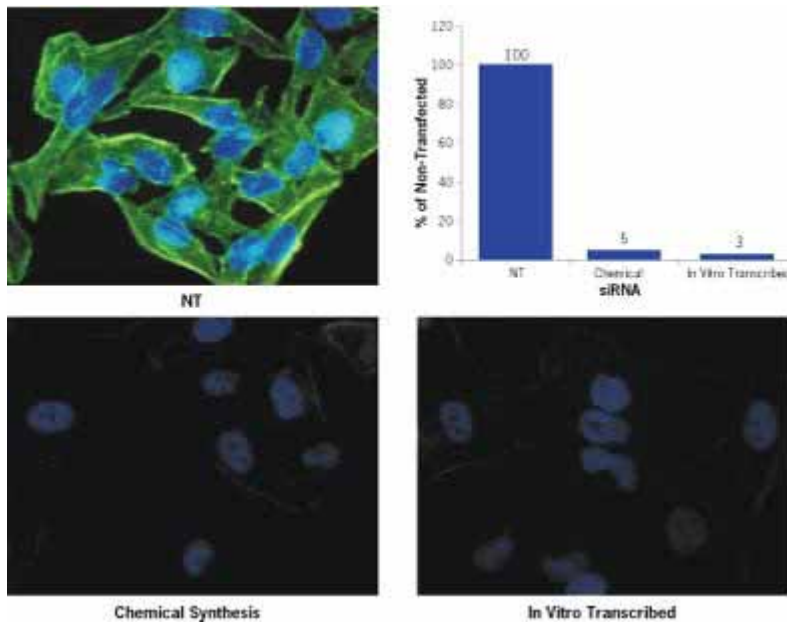


Figure 2. Use of Chemically Synthesized and in Vitro Transcribed siRNAs to Induce Gene Silencing. siRNAs targeting  $\beta$ -Actin were prepared by chemical synthesis (Ambion) or by in vitro transcription using Ambion's Silencer™ siRNA Construction Kit. HeLa cells were plated at 30,000 cells per well in a 24 well tissue culture plate containing glass slides. The cells were transfected 24 hours after plating, using 2  $\mu$ l siPORT™ Lipid (Ambion) according to the manufacturer's protocol, at a final

siRNA concentration of 75 nM. Immunofluorescence analysis was performed 96 hr post transfection using mouse anti-Human  $\beta$ -Actin primary antibody and a FITC conjugated anti-mouse IgG secondary antibody. Photographs were taken using the appropriate fluorescent filters and quantified using MetaMorph software. Note that both siRNA preparation methods resulted in > 95% reduction in  $\beta$ -actin protein levels.

### 3.用 RNase III 消化长片断双链 RNA 制备 siRNA

其他制备 siRNA 的方法的缺陷是需要设计和检验多个 siRNA 序列以便找到一个有效的 siRNA。而用这种方法——制备一份混合有各种 siRNAs “混合鸡尾酒” 就可以避免这个缺陷。这个方法是选择通常是 200—1000 碱基的靶 mRNA 模版，用体外转录的方法制备长片断双链 dsRNA，然后用 RNase III (or Dicer) 在体外消化，得到一众 siRNAs “混合鸡尾酒”。在除掉没有被消化的 dsRNA 后，这个 siRNA 混合物就可以直接转染细胞，方法和单一的 siRNA 转染一样。由于 siRNA 混合物中有许多不同的 siRNAs，通常能够保证目的基因被有效地抑制。

dsRNA 消化法的主要优点在于可以跳过检测和筛选有效 siRNA 序列的步骤，为研究人员节省时间和金钱（注意：通常用 RNase III 通常比用 Dicer 要便宜）。不过这种方法的缺点也很明显，就是有可能引发非特异的基因沉默，特别是同源或者是密切相关的基因。现在多数的研究显示这种情况通常不会造成影响(1-4)。Ambion 公司曾经用它的 Silencer siRNA Cocktail Kit(RNase III)试剂盒成功关闭几个基因，包括 c-fos， GAPDH， La，  $\beta$ -actin， 和 Ku-70。

**最适用于：**快速而经济地研究某个基因功能缺失的表型

**不适用于：**长时间的研究项目，或者是需要一个特定的 siRNA 进行研究，特别是基因治疗

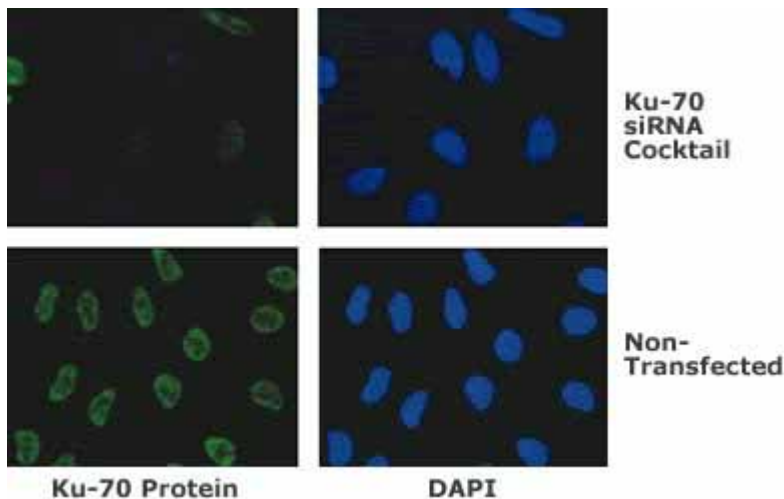


Figure 3. Gene Silencing with the Silencer™ siRNA Cocktail Kit. A population of siRNAs targeting 200 nt of the Ku-70 mRNA was prepared with the Silencer siRNA Cocktail Kit (RNase III) and transfected into HeLa cells at a final concentration of 100 nM. Cells were analyzed 48 hours later by immunofluorescence. Ku-70 levels were reduced 86% in cells transfected with the siRNA cocktail, compared to non-transfected controls.

## 体内表达

前面的3种方法主要都是体外制备 siRNAs 并且需要专门的 RNA 转染试剂将 siRNAs 转到细胞内。而采用 siRNA 表达载体和基于 PCR 的表达框架则属于：从转染到细胞的 DNA 模版中在体内转录得到 siRNAs。这两种方法的优点在于不需要直接操作 RNA。

### 4. siRNA 表达载体

多数的 siRNA 表达载体依赖 3 种 RNA 聚合酶 III 启动子(pol III)中的一种，操纵一段小的发夹 siRNA 在哺乳动物细胞中的表达(1-4)。这 3 类启动子包括大家熟悉的人源和鼠源的 U6 启动子和人 H1 启动子。之所以采用 RNA pol III 启动子是由于它可以在哺乳动物细胞中表达更多的小分子 RNA，而且它是通过添加一串（3 到 6 个）U 来终止转录的。要使用这类载体，需要订购 2 段编码短发夹 RNA 序列的 DNA 单链，退火，克隆到相应载体的 pol III 启动子下游。由于涉及到克隆，这个过程需要几天的时间，同时也需要经过测序以保证克隆的序列是正确的。不过幸好载体容易大量扩增，这个优点足以弥补所有缺陷，特别是当载体在实验中确实有效的时候。

毫无疑问，siRNA 表达载体的优点在于这是众多方法中唯一可以进行长期研究的方法——带有抗生素标记的载体可以在细胞中持续抑制靶基因的表达，持续数星期甚至更久。即使是对转染带有筛选标记质粒的细胞进行瞬时筛选，也有助于富集带质粒的细胞。这也可以帮助解决一些难转染的细胞由于转染效率低造成的问题。

最近多个厂家开始研究逆转录病毒和其他病毒载体用于 siRNA 表达，其优势在于可以直接高效率感染细胞进行基因沉默的研究，避免由于质粒转染效率低而带来的种种不便。

**最适用于：**已知一个有效的 siRNA 序列，需要维持较长时间的基因沉默，或者需要用抗生素筛选能表达 siRNA 的细胞。长期研究。

**不适用于：**筛选 siRNA 序列（其实主要是指需要多个克隆和测序等较为费时、繁琐的工作）

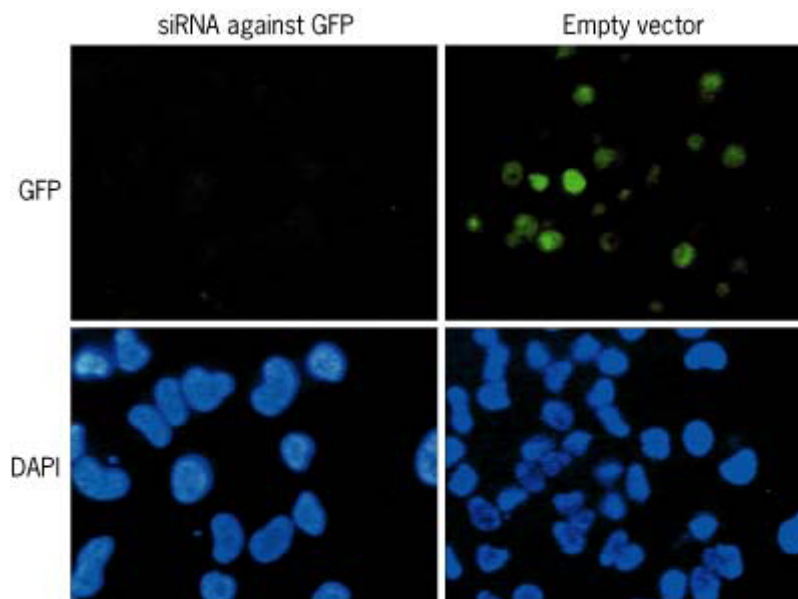


Figure 4. Long Term Silencing of GFP with pSilencer™ 2.1-U6 hygro. HeLa cells expressing cycle 3 GFP were transfected with pSilencer 2.1-U6 hygro containing an insert encoding an siRNA targeting cycle 3 GFP or pSilencer 2.1-U6 hygro without an siRNA-encoding insert. Following transfection, the cells were selected with hygromycin. Three weeks following selection, the cells were analyzed for GFP expression by fluorescence microscopy. Green: GFP. Blue: DAPI stained nuclei. GFP levels were remarkably reduced (94%) in cells transfected with the GFP siRNA-encoding pSilencer 2.1-U6 hygro siRNA Expression Vector as compared to those transfected with an "empty" siRNA expression vector.

### 5. siRNA 表达框架

siRNA 表达框架(siRNA expression cassettes, SECs)是一种由 PCR 得到的 siRNA 表达模版，能够直接导入细胞进行表达而无需事前克隆到载体中。这个方法最早是由 Castanotto 和其同事(5)采用，包括一个 RNA pol III 启动子，一段发夹结构 siRNA，一个 RNA pol III 终止位点。和 siRNA 表达载体不同的是，SECs 不需要载体克隆、测序

等颇为费时的步骤，可以直接由 PCR 得到，不用一天的时间。因此，SECs 成为筛选 siRNA 的最有效工具，甚至可以用来筛选在特定的研究体系中启动子和 siRNA 的最适搭配！如果在 PCR 两端添加酶切位点，那么通过 SECs 筛选出的最有效的 siRNA 后，可以直接克隆到载体中构建 siRNA 表达载体。构建好的载体可以用于稳定表达 siRNA 和长效抑制的研究。

这个方法的主要缺点是 PCR 产物很难转染到细胞中。如果有适合的新型转染试剂能提高 SEC 的转染效率的话，那问题就可以解决了。另外，没有克隆到载体中的 PCR 片段并不适于大规模制备。

Silencer Express siRNA Expression Cassette Kits 提供人源和鼠源的 U6 启动子或者人源 H1 启动子元件可供选择，并已经过 c-fos 基因抑制的检验。

**最适用于：**筛选 siRNA 序列，在克隆到载体前筛选最佳启动子

**不适用于：**长期抑制研究。（如果克隆到载体后就可以了）

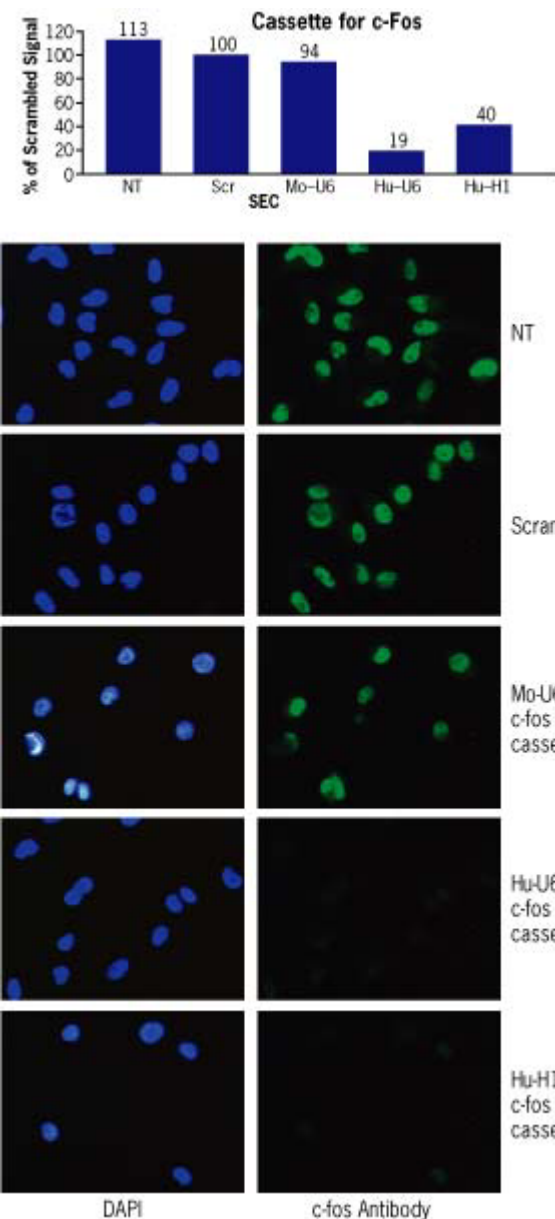


Figure 5. Variable Reduction in Target Gene Expression Using SECs with Different Promoters. siRNA Expression Cassettes featuring the mouse U6 (Mo-U6), human U6 (Hu-U6), and human H1 (Hu-H1) promoters and encoding a c-fos-specific hairpin siRNA were transfected into HeLa cells. 72 hours post-transfection, the cells were assessed using nuclear staining with DAPI and immunofluorescence using a c-FOS antibody. Non-transfected cells (NT) as well as cells transfected with an SEC expressing a negative control siRNA (scramble) demonstrate wild-type levels of c-FOS. The relative level of reduction in gene expression was quantified and is provided in the bar graph.

### 小结

运用 RNAi 来诱导基因表达的沉默是一种制备基因功能缺失表型的有效的新方法。下表总结了 5 中不同的制备 siRNA 的方法。

材料需求	21-mer RNA oligos(一对)	29-mer DNA oligos(一对)	转录模版 (200-1000bp 两侧带 T7 启动子)	55-60-mer DNA oligos(一对)	~50-mer DNA oligos(一对)
全部制备/合成时间所需时间	4天—2周	24 小时 + DNA oligo 合成时间	1 天 + 转录模版制备时间	5 天以上 + DNA oligo 合成时间	~ 6 小时 + DNA oligo 合成时间
个人所需操作时间	几乎不需要*	中等	中等	多	中等
是否需要验证和寻找最有效 siRNA	需要	需要	不需要	需要	需要
能否标记 siRNA (例如用于荧光显微镜分析 siRNA 进入细胞过程或者在细胞中的定位)	能	能	能	不能	不能
转染的相对难易程度	好	好	好	差	差
可筛选性 (例如抗生素筛选)	不可以	不可以	不可以	可以	不可以
能否用于长效抑制	不可以	不可以	不可以	可以 ( 抗生素筛选 )	不可以
能否大规模制备	可以	有限	有限	可以	有限
检测总体转染效率	不可以	不可以	不可以	可以	不可以
每个基因的相对费用 ( 不包含人力 )	高	中等	低	中等	中等

\*取决于合成后是否包含纯化、去保护，以及厂家提供的是已经退火的即用型双链还是冻干的单链

### 9.19. dsRNA 和 RNA 干扰技术

**摘要 :** dsRNA 在细胞内诱导同源序列的基因表达受抑的现象称为 RNA 干扰。其机理的日渐阐明使它有可能在基因敲除，基因功能测定等方面成为一项成熟的技术，这将在生命科学领域中引起深刻变化。本文就 dsRNA 和 RNA 干扰的关系，RNA 干扰的机制和特点，RNA 干扰技术的应用前景等作一综述。

**关键词 :** dsRNA; RNA 干扰 ; RNA 干扰技术; 基因沉寂

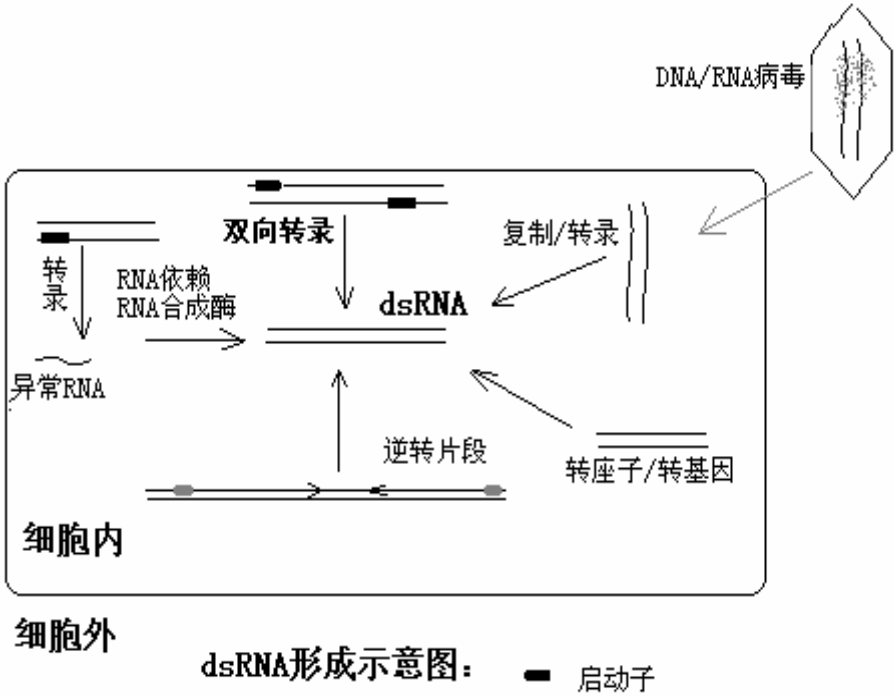
外源和内源性双链 RNA ( double-stranded RNA dsRNA ) 在细胞内诱导同源序列的基因表达受抑的现象称为 RNA 干扰。早在十年前，科学家们在向牵牛花转导色素合成基因时，观察到“共抑制” ( cosuppression )，不仅是转入的基因为表达，而且自身的色素合成也减弱了。相似的现象还发生在真菌的研究中，当把合成类胡萝卜素的基因转入到红色面包霉中时，却导致了大约 30% 转染细胞自身基因的失活，这种现象称为“缓解” ( quelling )。但是这种现象一直得不到令人信服的解释。1998 年，在研究秀丽隐杆线虫基因沉默机制时发现，将反义 RNA、正义 RNA 和双链 RNA 分别导入虫体内，作为对照组的正义核酸，虽不能与活性基因或 mRNA 结合，却同反义核酸有相似的阻断基因表达能力，与反义 RNA 传统机制相违背、而另人惊奇的是，双链 RNA 较正义 RNA 和反义 RNA 能更高效地阻断相应基因的表达，一直基因表达的效率比单链 RNA 至少高 2 个数量级。Fire 等称这种现象为 RNA 干扰现象。RNA 干扰现象已证实一系列的生物中存在，包括植物[1]、真菌[2]、锥虫[3]、囊虫[4]、果蝇[5]和线虫 [6]。新近科学家在哺乳动物细胞中也观察到了这一现象[7]。生物界普遍存在的 RNA 干扰现象给现代生命科学所带来的冲击将是无法估量的，它将不仅能提供一种经济、快捷、高效的抑制基因表达的技术手段，而且有可能在基因功能测定，基因治疗等方面开辟一条新思路。

#### 一、dsRNA 的形成

由于 dsRNA 抑制基因表达具有潜在高效性，正常机体任何导致 dsRNA 形成的情况都会引起不需要的相应基因沉寂。所以正常机体内各种基因有效表达显然需要一套严密防止 dsRNA 形成的机制。这些机制包括：在进化水平上淘

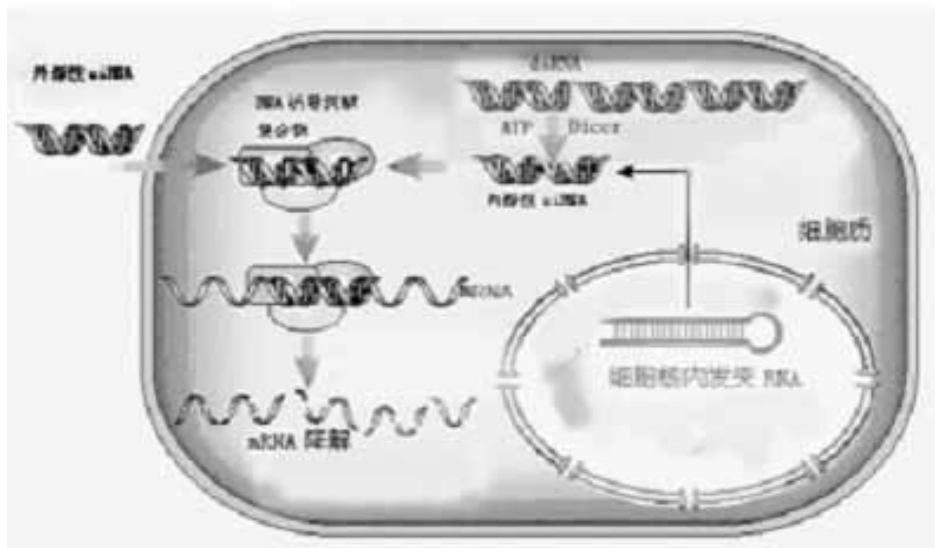
汰那些在两条 DNA 链上相应位置上都有启动子的基因，否则两条 DNA 链同时转录出两条互补的 RNA 就可能形成 dsRNA；在正常生理条件下 dsRNA 的形成必须具有一定的条件如两条互补 RNA 链相遇，互相识别和一定浓度的 RNA 连接蛋白存在；在偶然情况下形成的 dsRNA 还必须具有抵御解链，共价修饰和降解双链 RNA 等酶作用的能力。此外，细胞对于外来的 RNA 和自身转录过程中生成的变异 RNA ( aberrant RNA ) 所产生的 dsRNA 引发 RNA 干扰能力大于拥有自身 mRNA 序列的 dsRNA。与这些设想一致的实验在线虫和锥虫中得到证实[8]。

引发 RNA 干扰的 dsRNA 产生机制是通过对 RNA 干扰现象深入研究推断而来的。它包括内源性和外源性两个方面：RNA 干扰作为一种防御外来核酸的免疫机制，外来核酸（包括 DNA 和 RNA）的侵入就可能导致 dsRNA 的产生，如 RNA 病毒的入侵，DNA 病毒在胞内的转录，基因工程中导入转基因，插入逆转的 DNA 片段等；内源性的 dsRNA 产生主要是通过 RNA 依赖的 RNA 合成酶 ( RDRP ) 的作用，它催化合成与机体转录过程中形成的异常 RNA 互补 RNA 链而形成 dsRNA[9]。



二、dsRNA 介导 RNA 干扰的机制

1998 年 Andrew Fire 将 dsRNA 导入线虫内观察到 RNA 干扰现象后[6]，科学家又在一系列的低等生物中观察到同样的现象，然而将 dsRNA（长度 > 30bp）导入常用哺乳动物细胞培养株时却不能观察到特异的 RNA 干扰现象，而是出现诱生干扰素，活化核糖核酸酶 L，细胞的基因表达全面受抑和细胞凋亡的现象[5，9]。这不禁使人疑问，哺乳动物中能不能被 dsRNA 诱导出 RNA 干扰。但是，实验证明，小鼠的卵母细胞和早期的胚胎中存在这一现象[10]。随后，Zamore 的研究小组发现诱发 RNA 干扰时 dsRNA 被切成 21-25 个碱基的 RNA 片段[11]，同样，这些小片段的 RNA 也在果蝇细胞外 RNA 干扰模型中出现[12]。科学家把这种小片段的 RNA 称为小干扰 RNA ( small interfering RNA siRNA )，并且猜测 RNA 干扰正是由 siRNA 诱导。Elbashir SM 工作组将体外合成的 21nt 的 siRNA 导入哺乳动物细胞培养株中也检测到了特异的 RNA 干扰现象[7]。



RNA 干扰示意图

如图所示：内源性 dsRNA 在细胞内 ATP 和 Dicer 酶作用下切割为小片段干扰的干扰 RNA，siRNA 和另外几种蛋白结合形成 RNA 诱导的沉默复合物（RISC）。RISC 结合与 siRNA 互补的同源基因的 mRNA 后，mRNA 被复合物中具有 RNA 酶作用蛋白酶降解。从而导致该基因的表达沉默。外源性的 siRNA，和细胞内产生的发夹 RNA 都是在细胞质中形成 RNA 的沉默复合物发挥作用。

尽管 RNA 干扰的具体的机制和过程还不十分的清楚，研究资料显示 RNA 干扰过程可概括如下：第一步是 dsRNA 的处理；dsRNA 经过一种核酸酶 III 类类似的 RNA 内切酶 Dicer 作用，把 dsRNA 链酶切成长约 21 到 25nt 的 dsRNA 链，每条链都有 2 个碱基的突出。对线虫和哺乳动物 Dicer 分析表明，该酶包含三个区域：螺旋酶区，dsRNA 结合区，PAZ 区[13]。第二步是 siRNA 介导的同源 mRNA 降解：siRNA 和另一些尚未完全确认的蛋白结合形成复合物——RNA 诱导沉默复合物（RNA-inducing silence complex，RISC）。RISC 再识别，结合与 siRNA 中的反义链互补的 mRNA。RISC 具有核酸酶的功能，在结合部位切割 mRNA[14]，切割位点即是与 siRNA 中反义链互补结合的两端[11]。被切割后的断裂 mRNA 随即降解，从而使该基因的表达受抑，这就是转录后的基因沉默（post-transcription gene silencing PTGS）。RISC 的大多数蛋白质成分没有得到确认，推测它们可能包括核酸内切酶，核酸外切酶，螺旋酶和同源搜寻活性结构域[14]。

值得注意的是 dsRNA (> 30bp) 不能在哺乳动物中诱导特异的 RNA 干扰，而是细胞全面的基因表达受抑和凋亡。研究显示 dsRNA (> 30bp) 导入哺乳动物细胞可诱导干扰素的合成。在这一过程中，dsRNA 结合并激活蛋白激酶 K (PKR) [15] 和 2'5'-寡腺苷酸合成酶 (2'5'-AS) [16]。活化的 PKR 磷酸化翻译起始因子 eIF2 $\alpha$  使其活性降低从而抑制基因表达；经激活的 2'5'-AS 合成 2'5'-寡腺苷酸则可活化一种核糖核酸酶 L 降解 mRNA。结果是非特异性的和全面的抑制基因表达，最终导致细胞凋亡。

### 三、RNA 干扰的特点

RNA 干扰以被美国科学杂志评为 2001 年十大科技突破之一，有关研究文献相继在权威杂志发表，科学家对 RNA 干扰现象之所以表现出极大关注和兴趣，就在于 RNA 干扰在基因功能和相关方面的研究中具有许多传统方法无法比拟的特点和优势。

1. 特异性 RNA 干扰的最显著特征就是只引起与 dsRNA 同源的 mRNA 降解。实验表明，dsRNA 能在果蝇雌

胞中特异性的抑制外来的短暂表达，稳定表达的转基因和细胞内自身固有的内源基因表达，而对其它无关基因的表达不受影响。

2. 高效性 无论是在体内还是体外实验中，仅需少量的 dsRNA（每个细胞几个分子）就能有效的抑制靶基因表达，抑制的效率在低等动物中 > 90%。这表明 dsRNA 介导的 RNA 干扰是一个以催化放大的方式进行的[6]。

3. dsRNA 长度限制性 引发有效 RNA 干扰的 dsRNA 最短不得短于 21 碱基，而且长链 ds RNA 也在细胞内被 Dicer 酶切割为 21nt 左右的 siRNA，并由 siRNA 来介导 mRNA 切割。

4. 可传播性 RNA 干扰有一种令人惊奇的跨越细胞界限的能力，在果蝇细胞中可在细胞群落之间传播[5]。在线虫中可在局部注射 dsRNA 而传播到整个机体[6]。研究人员给实验鼠尾部的血管注入旨在“沉默”FAs 基因的小干扰 RNA，发现有 90% 的肝细胞接收到了这种 RNA 分子。

5. ATP 依赖性 在去除 ATP 的样品中 RNA 干扰现象降低或消失显示 RNA 干扰是一个 ATP 依赖的过程[11]。可能是 Dicer 和 RISC 的酶切反应是必须由 ATP 提供能量。

#### 四、RNA 干扰技术的意义

依据 RNA 干扰现象，科学家建立了 RNA 干扰技术，即人为设计合成针对某特定基因序列的 dsRNA 来关闭或抑制该基因的表达。尽管 RNA 干扰尚存在一些问题，要成为一项成熟的技术还有待时日。但 RNA 干扰已被多次证实是一种特异、高效、经济的使基因表达受抑的技术手段。它可有效地将靶基因的表达水平降到一个低的水平，甚至于完全的清除。美国麻省理工大学医学中心 Phillip Zamore 预言“RNA 干扰将在哺乳动物细胞遗传学上引起革命性的变化。”人们不再需要花 6 个月的时间设法去关闭某个基因的表达，利用这项技术，可以在一周之内就可关闭 10 个基因。

一旦 RNA 干扰技术得到完善，它给生命科学领域的冲击是无法估量的。它有可能在以下几方面发挥重要的作用。①基因功能的研究：与使用基因敲除技术来检测基因功能相比，RNA 技术却更方便，快捷的达到这一目的，即使是在一般条件的实验室也可开展这项工作。科学家已经利用它检测了线虫两个染色体上几乎所有的基因功能[17, 18]。RNA 干扰技术可在功能基因组的研究中发挥重要作用。②抗病毒作用 我们可将病毒在复制中起关键作用的基因作为目标设计 dsRNA 来抑制病毒的复制。自 1986 年植物学家首次利用转入烟草花叶病毒（TMV）的核衣壳（CP）基因导入植株培育出抗病毒植株后，已培育了一大批抗病毒植株[19]。最近，斯坦福大学在小鼠内进行 RNA 干扰实验成功的防止细胞受丙型肝炎病毒感染[20]。麻省理工学院用 RNA 干扰技术封锁了艾滋病病毒的基因[21]。③基因治疗 RNA 干扰技术开辟了基因治疗的新思路。我们可以用抑制疾病基因表达的办法来达到治疗目的，譬如导入针对致癌基因的 dsRNA 来防治癌症。哈佛医学院在实验小鼠中设计针对凋亡相关蛋白质（Fas）基因的干扰 RNA 成功的治疗了小鼠的肝炎[22]。

#### 五、RNA 干扰中存在的问题

如前所述 RNA 干扰现象的发现和 RNA 干扰技术的建立给生命科学领域带来巨大的冲击和光明的前景。但已有的实验也表明，RNA 干扰尚存在一些问题待解决如：可能存在一些基因或组织具有抵抗 RNA 干扰的能力，线虫的神经系统即具有这种能力[8]；dsRNA 序列选择不同可能导致不同的抑制效果，并且只能在外显子序列中选择[7]；在哺乳动物中诱导 RNA 干扰必须是 21nt 左右的 siRNA，而且其抑制效果不如在低等生物中。RNA 干扰对稳定，丰富表达的靶基因抑制效率不高[23]；此外，RNA 干扰和反义 RNA 技术一些相似的缺点，如寡聚核酸合成困难，易被降解，细胞摄取效率低等。

这些问题的最终解决尚有待于 RNA 干扰机制的彻底阐明。目前科学家采取的策略是针对靶基因外显子不同序列体外合成多对 21nt 的 siRNA，并在其 3'端设计两个胸腺嘧啶 T 突出以防止 RNA 酶的降解，观察并确认抑制效果最大的序列。

#### 参考文献

1. Waterhouse PM, Graham MV, Wang MB. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. Proc Natl Acad Sci USA (1998)95:13959-13964.
2. Cogoni C, Macino G. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. Nature, (1999)399:166-169.

3. Ngo H , Tschudi C , Gull K .Double-stranded RNA induces mRNA degradation in Trypanosoma brucei. Proc Natl Acad Sci USA , (1998)95:14687-14692
4. Lohman JU , Endl I , Bosch TC et al. Silencing of developmental genes in hydra. Dev Biol , (1999)214:211-214.
5. Caplen N J , Jamie Fleenor , Andrew Fire et al.DsRNA-mediated gene silencing in cultured Drosophila cells. Gene , (2000)252:95-105.
6. Fire A , Xu S , Montgomery MK et al. Potent and specific genetic interference by dsRNA in caenorhabditis elegans Nature , (1998)391:806-811.
7. Elbashir SM , Harborth , Lendackel et al.Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature , (2000)411:494-498.
8. Fire A. RNA-triggered gene silencing.TIG , (1999)15:358-361.
9. Ui-Tei K , Zenno S , Miyata Y et al. Sensitive assay of RNA interference in Drosophila and Chinese hamster cultured cells using firefly luciferase gene as target.FEBS Lett , (2000)3:79-82.
10. Svoboda P , Stein P , Hayashi H et al. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference.Development , (2000)127:4147-4156.
11. Zamore PD , Tuschl T , Sharp PA et al.RNAi:dsRNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell , (1999)101:25-33
12. Hammond S M .An RNA-directed nuclease mediates PTGS in Drosophila cells . Nature , (2000)404:293-296.
13. Pairish S , Fleenor J , Xu S et al. Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. Mol Cell , 6:1077-1087.
14. Tuschl T. RNA Interference and Small Interfering RNAs.
15. Chembiochem , 2001 , 2:239-245.
16. Manche L , Green SR , Schmedt C et al. Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinaseDAI. Mol Cell Biol(1992)125:5238-5248.
17. Minks M A , West Dk , Benven S et al. Structural requirements of double-stranded RNA for the activation of 2' , 5'-oligo(A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells. J Biol Chem , 1979 , 254:10180-10183.
18. Fraser AG. Functional genomic analysis of cell division in C elegans chromosome 1 by systematic RNAi.Nature , (2000)408:325-330.
19. Gonczy P ,Echeverri G , Oegema K et al. Functional genomic analysis of cell division in C. elegans using RNAi of genes on chromosome III. Nature , 2000 , 408:331-336
20. Prins M .RNA-mediated virus resistance in transgenic plants . Arch Virology , 1996 , 141:2259-2276.
21. Kapadia SB , Brideau-Andersen A , Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Feb 18;100(4):2014-20148.
22. Capodici J , Kariko K , Weissman D. Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference.J Immunol. 2002 Nov 1;169(9):5196-5201.
23. Song E , Lee SK , Wang J , et al RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis.Nat Med. 2003 Mar;9(3):347-351.
24. Tuschl T. A fast way to shut down gene. Science , 2001 , 292:1469-1471.

## 10. 蛋白质异源表达、分离、纯化与鉴定

### 10.1. 原核表达

将克隆化基因插入合适载体后导入大肠杆菌用于表达大量蛋白质的方法一般称为原核表达。这种方法在蛋白纯化、定位及功能分析等方面都有应用。大肠杆菌用于表达重组蛋白有以下特点：易于生长和控制；用于细菌培养的

材料不及哺乳动物细胞系统的材料昂贵；有各种各样的大肠杆菌菌株及与之匹配的具各种特性的质粒可供选择。但是，在大肠杆菌中表达的蛋白由于缺少修饰和糖基化、磷酸化等翻译后加工，常形成包涵体而影响表达蛋白的生物学活性及构象。

表达载体在基因工程中具有十分重要的作用，原核表达载体通常为质粒，典型的表达载体应具有以下几种元件：

- (1) 选择标志的编码序列；
- (2) 可控转录的启动子；
- (3) 转录调控序列(转录终止子，核糖体结合位点)；
- (4) 一个多限制酶切位点接头；
- (5) 宿主体内自主复制的序列。

原核表达一般程序如下：

获得目的基因-准备表达载体-将目的基因插入表达载体中(测序验证)-转化表达宿主菌-诱导靶蛋白的表达-表达蛋白的分析-扩增、纯化、进一步检测

### 一、试剂准备

- 1、LB 培养基。
- 2、100mM IPTG (异丙基硫代-β-D-半乳糖苷)：2.38g IPTG 溶于 100ml ddH<sub>2</sub>O 中，0.22μm 滤膜抽滤，-20℃保存。

### 二、操作步骤

#### (一) 获得目的基因

- 1、通过 PCR 方法：以含目的基因的克隆质粒为模板，按基因序列设计一对引物(在上游和下游引物分别引入不同的酶切位点)，PCR 循环获得所需基因片段。
- 2、通过 RT-PCR 方法：用 TRIzol 法从细胞或组织中提取总 RNA，以 mRNA 为模板，逆转录形成 cDNA 第一链，以逆转录产物为模板进行 PCR 循环获得产物。

#### (二) 构建重组表达载体

- 1、载体酶切：将表达质粒用限制性内切酶(同引物的酶切位点)进行双酶切，酶切产物行琼脂糖电泳后，用胶回收 Kit 或冻融法回收载体大片段。
- 2、PCR 产物双酶切后回收，在 T4DNA 连接酶作用下接入载体。

#### (三) 获得含重组表达质粒的表达菌种

- 1、将连接产物转化大肠杆菌 DH5α，根据重组载体的标志(抗 Amp 或蓝白斑)作筛选，挑取单斑，碱裂解法小量抽提质粒，双酶切初步鉴定。
- 2、测序验证目的基因的插入方向及阅读框架均正确，进入下步操作。否则应筛选更多克隆，重复亚克隆或亚克隆至不同酶切位点。
- 3、以此重组质粒 DNA 转化表达宿主菌的感受态细胞。

#### (四) 诱导表达

- 1、挑取含重组质粒的菌体单斑至 2ml LB (含 Amp50μg/ml) 中 37℃过夜培养。
- 2、按 1:50 比例稀释过夜菌，一般将 1ml 菌加入到含 50ml LB 培养基的 300ml 培养瓶中，37℃震荡培养至 OD<sub>600</sub> ≈ 0.4-1.0 (最好 0.6，大约需 3hr)。
- 3、取部分液体作为未诱导的对照组，余下的加入 IPTG 诱导剂至终浓度 0.4mM 作为实验组，两组继续 37℃震荡培养 3hr。
- 4、分别取菌体 1ml，离心 12000g×30s 收获沉淀，用 100μl 1%SDS 重悬，混匀，70℃10min。
- 5、离心 12000g×1min，取上清作为样品，可做 SDS-PAGE 等分析。

### 三、注意事项

- 1、选择表达载体时，要根据所表达蛋白的最终应用考虑。如为方便纯化，可选择融合表达；如为获得天然蛋白，可选择非融合表达。
- 2、融合表达时在选择外源 DNA 同载体分子连接反应时，对转录和转译过程中密码结构的阅读不能发生干扰。

## 10.2. 原核表达的插入位点问题

利用细菌的 16s rDNA 序列作插入即可, 16s rDNA 属多拷贝, 插入一个基因不会对菌体的生长有影响, 这方面有成功的例子。看一下相关文献会有比较明白了。

具体方法就是做一个双交换, 首先用 16s 通用的引物将细菌的序列扩初来, 连入 T-vector 测序, 分析酶切位点, 然后从中间设计引物得到上下臂, 中间连入目的基因, 用合适的自杀载体将目的基因双交换到染色体上即可。这样不会引入抗性, 便于以后的操作。当然单交换也行, 不过有抗性了, 并且可能不稳定。**当然用 SOE-PCR 做上下臂和目的片断的连接比较省事, 但是不成功的几率也是很大的。**

### 同源重组法构建多功能农药降解基因工程菌研究

蒋建东 顾立锋 孙纪全 代先祝 文阳 李顺鹏

南京农业大学生命科学学院、农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095

**摘 要:**构建遗传稳定的多功能农药降解基因工程菌可以为农药污染的生物修复提供良好的菌种资源, 然而, 构建遗传稳定且不带入外源抗性的基因工程菌是一个难点。通过以受体菌的 16S rDNA 为同源重组指导序列、*sacB* 基因为双交换正筛选标记构建同源重组载体, 二亲结合的方法将甲基对硫磷水解酶基因 (mpd) 整合到味喃丹降解菌 *Sphingomonas sp. CDS-1* 染色体的 16SrDNA 位点, 分别成功构建了含 1 个和 2 个 mpd 基因插入到 rDNA 位点且不带入外源抗性的基因工程菌株 CDS + mpd 和 CDS-2mpd。同源重组单交换的效率为  $3.7 \times 10^{-7} \sim 6.8 \times 10^{-7}$ 。通过 PCR 和 Southern 杂交的方法验证了同源重组事件。基因工程菌遗传稳定, 能同时降解甲基对硫磷和味喃丹。甲基对硫磷水解酶 (MPH) 的比活在各生长时期均高于原始出发菌株, 比活最高达 6.22 mu/μg。[著者文摘]

#### 10.3. 工程菌发酵

1. 挑取少量 pET11a-phoA/BL21(DE3) 菌体接种于含 Ap (终浓度 100 μg/ml) 的 30 ml LB 液体培养基中, 于 37 °C 培养过夜; 以相同条件接种 pET11a/BL21(DE3) 为对照。
2. 以 1% 的接种量将上述一级培养物接种于含 Ap (终浓度 100 μg/ml) 的 100 ml LB 液体培养基中, 恒温培养 2 h 后 (OD600 约为 0.5), 加入诱导剂 IPTG 终浓度 1 mM, 继续 37 °C 培养。
3. 诱导后培养 3 h 后收集菌体, 4 °C, 6000 rpm 离心 10 min, 弃上清液, 菌体沉淀置于 -20 °C 保存待用。

#### 10.4. 细胞破碎

1. 将重组菌的培养液 (100 ml) 置于离心杯中, 4000 r/min, 常温离心 20 min, 分别收集菌体, 置于塑料离心管, -20 °C 保存。
2. 在重组菌中加入 4 ml 0.01 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液, 搅拌混匀。
3. 将上述菌体悬浮液盛放在 10 ml 小烧杯中, 冰浴条件下在超声波仪中进行细胞破壁, 超声波仪设定: 功率 400 W, 工作 5 s, 间隔 5 s, 工作 60 次。
4. 将细胞破壁液置于塑料离心管中, 低温高速离心机, 于 4 °C、12000 r/min、离心 20 min。
5. 将离心后的上清液倒入另一试管, 测定酶活后 -20 °C 保存。
6. 在包涵体中加入 6 ml 去离子水, 搅匀洗涤后, 放入低温高速离心机, 于 4 °C、12000 r/min、离心 20 min, 倾去上清液。同上再重复洗涤一次, 保留沉淀。

#### 10.5. 蛋白含量测定方法

1. 取样品适当稀释, 从中取 400 μl, 加入 2 ml 考马斯亮蓝, 混匀后测量 O.D.595。空白对照管中以 400 μl buffer 加 2 ml 考马斯亮蓝混匀。
2. 酶活测定方法
3. 取样品适当稀释, 处理后取 10 μl, 加入 240 μl buffer, 再加入 250 μl, 0.02 mol/L 的 NPP 及 750 μl, PH 10.0 的 0.1 M 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液, 混匀后置于 37 °C 水浴保温 20 min, 加入 500 μl, 0.5 mol/L 的 NaOH 中止反应, 测量 O.D.405。空白管中以 buffer 代替 10 μl 复性液。

#### 10.6. 包涵体复性

1. 在细胞破碎后，沉淀中加入 1 ml 包涵体溶解液（8 M 尿素），搅匀后，置入冰箱放置，溶解 2 h。
2. 从冰箱中取出包涵体溶解液，放入低温高速离心机，于 4°C、12000 r/min、离心 20 min，取上清液。
3. 在烧杯中加入包涵体复性液 75 ml。用滴管吸取上清液，冰浴条件下缓慢地滴入 75 ml 包涵体复性液中，同时用玻棒轻轻搅匀（整个过程控制在 30~60 min 左右）。用薄膜封住烧杯杯口，放入冰箱，复性 48 h 左右，测活。

### 10.7. 重组蛋白质的表达、纯化、复性和定量

按 Qiagen 公司的操作手册进行，具体步骤如下。

#### 一、重组蛋白质的诱导表达

1. 挑取转化有质粒的单菌落，接种于 3ml 选择性 LB 液体培养基中，37 °C，250 rpm/min 振摇培养过夜。
2. 次日将培养过夜的菌液 500  $\mu$ l 再接种于 10 ml (1:20) 选择性 LB 液体培养基中，37 °C，250 rpm/min 振摇培养至光密度 ( $OD_{600}=0.6$ ) 时，取 1 ml 样本作为诱导前标本，10000g 离心 1 min 收集菌体沉淀，- 20 °C 冻存备用。
3. 加入 1 mol/L IPTG 于菌液中，使 IPTG 终浓度为 1 mM，37 °C，250 rpm/min 振摇培养 4~5 小时。取 1 ml 样本作为诱导后标本，同上法收集菌体沉淀，- 20 °C 冻存备用。
4. 将诱导前后菌体沉淀用 20 ~ 40  $\mu$ l PBS (pH= 8.0) 重悬，加入等体积的 2 $\times$ SDS 上样缓冲液，煮沸加热 5 min，SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离，考马斯亮蓝染色 3 小时后，脱色观察结果。
5. 选取诱导成功的细菌克隆，扩大诱导规模，收集菌体沉淀，于 - 20 °C 保存，准备做下一步分析及纯化。

#### 二、重组蛋白质的分离纯化

##### 重组蛋白质的可溶性鉴定

1. 将按上法诱导培养后收集的菌体重悬于裂解液 1 (Lysis buffer under native conditions) 中，然后在 - 80 °C 低温冰箱中放置 10 min。
2. 冰中解冻。
3. 在冰浴上用超声破碎仪破菌 6 次，每次 10 sec，间歇 10 sec，电压 200-300 V。
4. 10000g，4°C，离心 20 min，取上清 (为溶液 A)，- 20 °C 保存；另将沉淀用同样裂解液 1 溶解 (为溶液 B)，同样 - 20 °C 保存，供后继分析使用。
5. 将上述 A、B 溶液和诱导前后的细菌进行 SDS-PAGE 电泳，考马斯亮蓝染色，比较分析重组蛋白质的溶解性。如果诱导表达的蛋白质位于 A 溶液中，则为可溶性蛋白；如果是在 B 溶液中，则为非可溶蛋白。

##### 重组蛋白质为非可溶性蛋白 (变性条件下) 的分离纯化

1. 将菌体沉淀溶于适量裂解液 2 (Lysis buffer under denaturing conditions) 中，室温下搅拌和吹打沉淀，避免泡沫生成。
2. 10000g，4 °C，离心 30 min，收集上清液。
3. 将 Ni-NTA Agarose 充填柱子，并连接于 Pharmacia 低压液相层析系统，用 5 倍柱体积的裂解液 2 平衡 Ni-NTA Agarose，调节  $A_{280}$  值至零线。
4. 将适量上清液上样到 Ni-NTA Agarose 柱子中，并用 lysis buffer 冲洗至  $A_{280}$  值低于 0.01。
5. 分别用 5~10 倍柱体积的清洗液 1 和清洗液 2 (Wash buffer 1 and 2) 清洗柱子，直至  $A_{280}$  值低于 0.01。
6. 用洗脱液 (Elution buffer) 洗脱重组蛋白质，在  $A_{280}$  值监测下，收集出现峰线后含有重组蛋白的所有洗脱液。

#### 三、重组蛋白质的复性、冻干和定量

纯化后的蛋白用梯度降低的尿素溶液缓慢透析，最终用 0.01 $\times$ PBS 透析，透析后的蛋白质溶液经冻干成粉状。以牛血清白蛋白(BSA)为标准，采用 BIO-RAD 公司蛋白质定量试剂(protein assay)比色测定蛋白质的含量。

### 10.8. 表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

#### 一、原理

细菌体中含有大量蛋白质，具有不同的电荷和分子量。强阴离子去污剂 SDS 与某一还原剂并用，通过加热使蛋白质解离，大量的 SDS 结合蛋白质，使其带相同密度的负电荷，在聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 上，不同蛋白质的迁移率仅取决于分子量。采用考马斯亮蓝快速染色，可及时观察电泳分离效果。因而根据预计表达蛋白的分子量，可筛选阳性表达的重组体。

## 二、试剂准备

- 1、30%储备胶溶液：丙烯酸 (Acr) 29.0g，亚甲双丙烯酸胺 (Bis) 1.0g，混匀后加 ddH<sub>2</sub>O，37°C 溶解，定容至 100ml，棕色瓶存于室温。
- 2、1.5M Tris-HCl(pH 8.0)：Tris 18.17g 加 ddH<sub>2</sub>O 溶解，浓盐酸调 pH 至 8.0，定容至 100 ml。
- 3、1M Tris-HCl(pH 6.8)：Tris 12.11 g 加 ddH<sub>2</sub>O 溶解，浓盐酸调 pH 至 6.8，定容至 100 ml。
- 4、10% SDS：电泳级 SDS 10.0 g 加 ddH<sub>2</sub>O 68°C助溶，浓盐酸调至 pH 7.2，定容至 100 ml。
- 5、10×电泳缓冲液(pH 8.3)：Tris 3.02 g，甘氨酸 18.8 g，10% SDS 10ml 加 ddH<sub>2</sub>O 溶解，定容至 100 ml。
- 6、10%过硫酸铵 (AP)：1 g AP 加 ddH<sub>2</sub>O 至 10ml。
- 7、2×SDS 电泳上样缓冲液：1 M Tris-HCl (pH 6.8)2.5 ml，β-巯基乙醇 1.0 ml，SDS 0.6 g，甘油 2.0 ml，0.1% 溴酚兰 1.0 ml，ddH<sub>2</sub>O 3.5 ml。
- 8、考马斯亮兰染色液：考马斯亮兰 0.25 g，甲醇 225 ml，冰醋酸 46 ml，ddH<sub>2</sub>O 225 ml。
- 9、脱色液：甲醇、冰醋酸、ddH<sub>2</sub>O 以 3：1：6 配制而成。

## 二、操作步骤

采用垂直式电泳槽装置

### (一) 聚丙烯酰胺凝胶的配制

#### 1、分离胶(10%)的配制:

ddH <sub>2</sub> O	4.0 ml
30%储备胶	3.3 ml
1.5M Tris-HCl	2.5 ml
10% SDS	0.1 ml
10% AP	0.1 ml

取 1ml 上述混合液，加 TEMED(N, N, N', N' -四甲基乙二胺)10μl 封底，余加 TEMED 4μl，混匀后灌入玻璃板间，以水封顶，注意使液面平。(凝胶完全聚合需 30-60min)

#### 2、积层胶 (4%) 的配制：

ddH <sub>2</sub> O	1.4 ml
30%储备胶	0.33 ml
1M Tris-HCl	0.25 ml
10%SDS	0.02 ml
10%AP	0.02 ml
TEMED	2 μl

将分离胶上的水倒去，加入上述混合液，立即将梳子插入玻璃板间，完全聚合需 15-30min。

(二) 样品处理：将样品加入等量的 2×SDS 上样缓冲液，100°C加热 3-5min，离心 12000g×1min，取上清作 SDS-PAGE 分析，同时将 SDS 低分子量蛋白标准品作平行处理。

(三) 上样：取 10μl 诱导与未诱导的处理后的样品加入样品池中，并加入 20μl 低分子量蛋白标准品作对照。

(三) 电泳：在电泳槽中加入 1×电泳缓冲液，连接电源，负极在上，正极在下，电泳时，积层胶电压 60V，分离胶电压 100V，电泳至溴酚兰行至电泳槽下端停止 (约需 3hr)。

(四) 染色：将胶从玻璃板中取出，考马斯亮兰染色液染色，室温 4-6hr。

(五) 脱色：将胶从染色液中取出，放入脱色液中，多次脱色至蛋白带清晰。

(六) 凝胶摄像和保存：在图像处理系统下将脱色好的凝胶摄像，结果存于软盘中，凝胶可保存于双蒸水中或 7% 乙酸溶液中。

## 三、注意事项

- 1、实验组与对照组所加总蛋白含量要相等。
- 2、为达到较好的凝胶聚合效果，缓冲液的 pH 值要准确，10%AP 在一周内使用。室温较低时，TEMED 的量可加倍。
- 3、未聚合的丙烯酸酰胺和亚甲双丙烯酸酰胺具有神经毒性，可通过皮肤和呼吸道吸收，应注意防护。

## 10.9. 选择材料及预处理

以蛋白质和结构与功能为基础，从分子水平上认识生命现象，已经成为现代生物学发展的主要方向，研究蛋白质，首先要得到高度纯化并具有生物活性的目的物质。蛋白质的制备工作涉及物理、化学和生物等各方面知识，但基本原理不外乎两方面。一是得用混合物中几个组分分配率的差别，把它们分配到可用机械方法分离的两个或几个物相中，如盐析，有机溶剂提取，层析和结晶等；二是将混合物置于单一物相中，通过物理力场的作用使各组分分配于来同区域而达到分离目的，如电泳，超速离心，超滤等。在所有这些方法的应用中必须注意保存生物大分子的完整性，防止酸、碱、高温，剧烈机械作用而导致所提物质生物活性的丧失。蛋白质的制备一般分为以下四个阶段：选择材料和预处理，细胞的破碎及细胞器的分离，提取和纯化，浓缩、干燥和保存。

微生物、植物和动物都可做为制备蛋白质的原材料，所选用的材料主要依据实验目的来确定。对于微生物，应注意它的生长期，在微生物的对数生长期，酶和核酸的含量较高，可以获得高产量，以微生物为材料时有两种情况：（1）得用微生物菌体分泌到培养基中的代谢产物和胞外酶等；（2）利用菌体含有的生化物质，如蛋白质、核酸和胞内酶等。植物材料必须过去壳，脱脂并注意植物品种和生长发育状况不同，其中所含生物大分子的量变化很大，另外与季节性关系密切。对动物组织，必须选择有效成份含量丰富的脏器组织为原材料，先进行绞碎、脱脂等处理。另外，对预处理好的材料，若不立即进行实验，应冷冻保存，对于易分解的生物大分子应选用新鲜材料制备。

## 10.10. 蛋白质的分离纯化

### 一、蛋白质（包括酶）的提取

大部分蛋白质都可溶于水、稀盐、稀酸或碱溶液，少数与脂类结合的蛋白质则溶于乙醇、丙酮、丁醇等有机溶剂中，因此，可采用不同溶剂提取分离和纯化蛋白质及酶。

#### （一）水溶液提取法

稀盐和缓冲系统的水溶液对蛋白质稳定性好、溶解度大、是提取蛋白质最常用的溶剂，通常用量是原材料体积的1-5倍，提取时需要均匀的搅拌，以利于蛋白质的溶解。提取的温度要视有效成份性质而定。一方面，多数蛋白质的溶解度随着温度的升高而增大，因此，温度高利于溶解，缩短提取时间。但另一方面，温度升高会使蛋白质变性失活，因此，基于这一点考虑提取蛋白质和酶时一般采用低温（5度以下）操作。为了避免蛋白质提以过程中的降解，可加入蛋白水解酶抑制剂（如二异丙基氟磷酸，碘乙酸等）。下面着重讨论提取液的pH值和盐浓度的选择。

##### 1、pH值

蛋白质，酶是具有等电点的两性电解质，提取液的pH值应选择偏离等电点两侧的pH范围内。用稀酸或稀碱提取时，应防止过酸或过碱而引起蛋白质可解离基团发生变化，从而导致蛋白质构象的不可逆变化，一般来说，碱性蛋白质用偏酸性的提取液提取，而酸性蛋白质用偏碱性的提取液。

##### 2、盐浓度

稀浓度可促进蛋白质的溶，称为盐溶作用。同时稀盐溶液因盐离子与蛋白质部分结合，具有保护蛋白质不易变性的优点，因此在提取液中加入少量NaCl等中性盐，一般以0.15摩尔/升浓度为宜。缓冲液常采用0.02-0.05小M磷酸盐和碳酸盐等渗盐溶液。

#### （二）有机溶剂提取法

一些和脂质结合比较牢固或分子中非极性侧链较多的蛋白质和酶，不溶于水、稀盐溶液、稀酸或稀碱中，可用乙醇、丙酮和丁醇等有机溶剂，它们具的一定的亲水性，还有较强的亲脂性、是理想的提脂蛋白的提取液。但必须在低温下操作。丁醇提取法对提取一些与脂质结合紧密的蛋白质和酶特别优越，一是因为丁醇亲脂性强，特别是溶解磷脂的能力强；二是丁醇兼具亲水性，在溶解度范围内（度为10%，40度为6.6%）不会引起酶的变性失活。另外，丁醇提取法的pH及温度选择范围较广，也适用于动植物及微生物材料。

### 二、蛋白质的分离纯化

蛋白质的分离纯化方法很多，主要有：

#### （一）根据蛋白质溶解度不同的分离方法

##### 1、蛋白质的盐析

中性盐对蛋白质的溶解度有显著影响，一般在低盐浓度下随着盐浓度升高，蛋白质的溶解度增加，此称盐溶；当盐浓度继续升高时，蛋白质的溶解度不同程度下降并先后析出，这种现象称盐析，将大量盐加到蛋白质溶液中，高浓度的盐离子（如硫酸铵的SO<sub>4</sub>和NH<sub>4</sub>）有很强水化力，可夺取蛋白质分子的水化层，使之“失水”，于是蛋

白质胶粒凝结并沉淀析出。盐析时若溶液 pH 在蛋白质等电点则效果更好。由于各种蛋白质分子颗粒大小、亲水程度不同，故盐析所需的盐浓度也不一样，因此调节混合蛋白质溶液中的中性盐浓度可使各种蛋白质分段沉淀。

影响盐析的因素有：（1）温度：除对温度敏感的蛋白质在低温（4 度）操作外，一般可在室温中进行。一般温度低蛋白质溶解度降低。但有的蛋白质（如血红蛋白、肌红蛋白、清蛋白）在较高的温度（25 度）比 0 度时溶解度低，更容易盐析。（2）pH 值：大多数蛋白质在等电点时在浓盐溶液中的溶解度最低。（3）蛋白质浓度：蛋白质浓度高时，欲分离的蛋白质常常夹杂着其他蛋白质地一起沉淀出来（共沉现象）。因此在盐析前血清要加等量生理盐水稀释，使蛋白质含量在 2.5-3.0%。

蛋白质盐析常用的中性盐，主要有硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、氯化钠、磷酸钠等。其中应用最多的硫酸铵，它的优点是温度系数小而溶解度大（25 度时饱和溶液为 4.1M，即 767 克/升；0 度时饱和溶解度为 3.9 M，即 676 g/L），在这一溶解度范围内，许多蛋白质和酶都可以盐析出来；另外硫酸铵分段盐析效果也比其他盐好，不易引起蛋白质变性。硫酸铵溶液的 pH 常在 4.5-5.5 之间，当用其他 pH 值进行盐析时，需用硫酸或氨水调节。

蛋白质在用盐析沉淀分离后，需要将蛋白质中的盐除去，常用的办法是透析，即把蛋白质溶液装入透析袋内（常用的是玻璃纸），用缓冲液进行透析，并不断的更换缓冲液，因透析所需时间较长，所以最好在低温中进行。此外也可用葡萄糖凝胶 G-25 或 G-50 过柱的办法除盐，所用的时间就比较短。

## 2、等电点沉淀法

蛋白质在静电状态时颗粒之间的静电斥力最小，因而溶解度也最小，各种蛋白质的等电点有差别，可利用调节溶液的 pH 达到某一蛋白质的等电点使之沉淀，但此法很少单独使用，可与盐析法结合用。

## 3、低温有机溶剂沉淀法

用与水可混溶的有机溶剂，甲醇，乙醇或丙酮，可使多数蛋白质溶解度降低并析出，此法分辨率比盐析高，但蛋白质较易变性，应在低温下进行。

### （二）根据蛋白质分子大小的差别的分离方法

#### 1、透析与超滤

透析法是利用半透膜将分子大小不同的蛋白质分开。

超滤法是利用高压或离心力，强使水和其他小的溶质分子通过半透膜，而蛋白质留在膜上，可选择不同孔径的滤膜截留不同分子量的蛋白质。

#### 2、凝胶过滤法

也称分子排阻层析或分子筛层析，这是根据分子大小分离蛋白质混合物最有效的方法之一。柱中最常用的填充材料是葡萄糖凝胶（Sephadex gel）和琼脂糖凝胶（agarose gel）。

### （三）根据蛋白质带电性质进行分离

蛋白质在不同 pH 环境中带电性质和电荷数量不同，可将其分开。

#### 1、电泳法

各种蛋白质在同一 pH 条件下，因分子量和电荷数量不同而在电场中的迁移率不同而得以分开。值得重视的是等电聚焦电泳，这是利用一种两性电解质作为载体，电泳时两性电解质形成一个由正极到负极逐渐增加的 pH 梯度，当带一定电荷的蛋白质在其中泳动时，到达各自等电点的 pH 位置就停止，此法可用于分析和制备各种蛋白质。

#### 2、离子交换层析法

离子交换剂有阳离子交换剂（如：羧甲基纤维素；CM-纤维素）和阴离子交换剂（二乙氨基乙基纤维素；DEAE-纤维素）；当被分离的蛋白质溶液流经离子交换层析柱时，带有与离子交换剂相反电荷的蛋白质被吸附在离子交换剂上，随后用改变 pH 或离子强度办法将吸附的蛋白质洗脱下来。（详见层析技术章）

### （四）根据配体特异性的分离方法-亲和色谱法

亲和层析法（affinity chromatography）是分离蛋白质的一种极为有效的方法，它经常只需经过一步处理即可使某种待提纯的蛋白质从很复杂的蛋白质混合物中分离出来，而且纯度很高。这种方法是根据某些蛋白质与另一种称为配体（Ligand）的分子能特异而非共价地结合。其基本原理：蛋白质在组织或细胞中是以复杂的混合物形式存在，每种类型的细胞都含有上千种不同的蛋白质，因此蛋白质的分离（Separation），提纯（Purification）和鉴定（Characterization）是生物化学中的重要的一部分，至今还没的单独或一套现成的方法能移把任何一种蛋白质从复杂的混合蛋白质中提取出来，因此往往采取几种方法联合使用。

## 10.11. 细胞的破碎

### 1、高速组织捣碎

将材料配成稀糊状液，放置于筒内约 1/3 体积，盖紧筒盖，将调速器先拨至最慢处，开动开关后，逐步加速至所需速度。此法适用于动物内脏组织、植物肉质种子等。

### 2、玻璃匀浆器匀浆

先将剪碎的组织置于管中，再套入研杆来回研磨，上下移动，即可将细胞研碎，此法细胞破碎程度比高速组织捣碎机为高，适用于量少和动物脏器组织。

### 3、超声波处理法

用一定功率的超声波处理细胞悬液，使细胞急剧震荡破裂，此法多适用于微生物材料，用大肠杆菌制备各种酶，常选用 50-100 mg 菌体/mL 浓度，在 1 kg 至 10 kg 频率下处理 10-15 min，此法的缺点是在处理过程会产生大量的热，应采取相应降温措施。对超声波敏感和核酸应慎用。

### 4、反复冻融法

将细胞在 -20 度以下冰冻，室温融解，反复几次，由于细胞内冰粒形成和剩余细胞液的盐浓度增高引起溶胀，使细胞结构破碎。

### 5、化学处理法

有些动物细胞，例如肿瘤细胞可采用十二烷基磺酸钠 (SDS)、去氧胆酸钠等细胞膜破坏，细菌细胞壁较厚，可采用溶菌酶处理效果更好。

无论用哪一种方法破碎组织细胞，都会使细胞内蛋白质或核酸水解酶释放到溶液中，使大分子生物降解，导致天然物质质量的减少，加入**二异丙基氟磷酸 (DFP)**可以抑制或减慢自溶作用；加入**碘乙酸**可以抑制那些活性中心需要有巯基的蛋白水解酶的活性，加入**苯甲磺酰氟化物 (PMSF)**也能清除蛋白水解酶活力，但不是全部，还可通过选择 pH、温度或离子强度等，使这些条件都要适合于目的物质的提取。

## 10.12. 浓缩、干燥及保存

### 一、样品的浓缩

生物大分子在制备过程中由于过柱纯化而样品变得很稀，为了保存和鉴定的目的，往往需要进行浓缩。常用的浓缩方法的：

#### 1、减压加热蒸发浓缩

通过降低液面压力使液体沸点降低，减压的真空气度愈高，液体沸点降得愈低，蒸发愈快，此法适用于一些不耐热的生物大分子的浓缩。

2、空气流动蒸发浓缩 空气的流动可使液体加速蒸发，铺成薄层的溶液，表面不断通过空气流；或将生物大分子溶液装入透析袋内置于冷室，用电扇对准吹风，使透过膜外的溶剂不蒸发，而达到浓缩目的，此法浓缩速度慢，不适于大量溶液的浓缩。

3、冰冻法 生物大分子在低温结成冰，盐类及生物大分子不进入冰内而留在液相中，操作时先将待浓缩的溶液冷却使之变成固体，然后缓慢地融解，利用溶剂与溶质熔点介点的差别而达到除去大部分溶剂的目的。如蛋白质和酶的盐溶液用此法浓缩时，不含蛋白质和酶的纯冰结晶浮于液面，蛋白质和酶则集中于下层溶液中，移去上层冰块，可得蛋白质和酶的浓缩液。

4、吸收法 通过吸收剂直接吸收除去溶液中溶液分子使之浓缩。所用的吸收剂必需与溶液不起化学反应，对生物大分子不吸附，易与溶液分开。常用的吸收剂有聚乙二醇，聚乙稀吡咯酮、蔗糖和凝胶等，使用聚乙二醇吸收剂时，先将生物大分子溶液装入半透膜的袋里，外加聚乙二醇复盖置于 4 度下，袋内溶剂渗出即被聚乙二醇迅速吸去，聚乙二醇被水饱和后要更换新的直至达到所需要的体积。

5、超滤法 超滤法是使用一种特别的薄膜对溶液中各种溶质分子进行选择性的过滤的方法，不液体在一定压力下（氮气或真空泵压）通过膜时，溶剂和小分子透过，大分子受阻保留，这是近年来发展起来的新方法，最适于生物大分子尤其是蛋白质和酶的浓缩或脱盐，并具有成本低，操作方便，条件温和，能较好地保持生物大分子的活性，回收率高等优点。应用超滤法关键在于膜的选择，不同类型和规格的膜，水的流速，分子量截止值（即大体上能被膜

保留分子最小分子量值)等参数均不同,必须根据工作需要来选用。另外,超滤装置形式,溶质成份及性质、溶液浓度等都对超滤效果的一定影响。Diaflo 超滤膜的分子量截留值:

膜名称	分子量截留值	孔的大平均直径
XM-300	300,000	140
XM-200	100,000	55
XM-50	50,000	30
PM-30	30,000	22
UM-20	20,000	18
PM-10	10,000	15
UM-2	1,000	12
UM05	500	10

用上面的超滤膜制成空心的纤维管,将很多根这样的管拢成一束,管的两端与低离子强度的缓冲液相连,使缓冲液不断地在管中流动。然后将纤维管浸入待透析的蛋白质溶液中。当缓冲液流过纤维管时,则小分子很易透过膜而扩散,大分子则不能。这就是纤维过滤透析法,由于透析面积增大,因而使透析时间缩短 10 倍。

## 二、干燥

生物大分子制备得到产品,为防止变质,易于保存,常需要干燥处理,最常用的方法是冷冻干燥和真空干燥。真空干燥适用于不耐高温,易于氧化物质的干燥和保存,整个装置包括干燥器、冷凝器及真空干燥原理外,同时增加了温度因素。在相同压力下,水蒸汽压随温度下降而下降,故在低温低压下,冰很易升华为气体。操作时一般先将待干燥的液体冷冻到冰点以下使之变成固体,然后在低温低压下将溶剂变成气体而除去。此法干后的产品具有疏松、溶解度好、保持天然结构等优点,适用于各类生物大分子的干燥保存。

## 三、贮存

生物大分子的稳定性与保存方法的很大关系。干燥的制品一般比较稳定,在低温情况下其活性可在数日甚至数年无明显变化,贮藏要求简单,只要将干燥的样品置于干燥器内(内装有干燥剂)密封,保持 0-4 度冰箱即可,液态贮藏时应注意以下几点。

- 1、样品不能太稀,必须浓缩到一定浓度才能封装贮藏,样品太稀易使生物大分子变性。
- 2、一般需加入防腐剂和稳定剂,常用的防腐剂有甲苯、苯甲酸、氯仿、百里酚等。蛋白质和酶常用的稳定剂有硫酸铵糊、蔗糖、甘油等,如酶也可加入底物和辅酶以提高其稳定性。此外,钙、锌、硼酸等溶液对某些酶也有一定保护作用。核酸大分子一般保存在氯化钠或柠檬酸钠的标准缓冲液中。
- 3、贮藏温度要求低,大多数在 0 度左右冰箱保存,有的则要求更低,应视不同物质而定。

### 10.13.细菌蛋白质的透析体会

我做原核表达,蛋白表达在细菌的周质腔。提取的方法是用冻融加高渗裂解,可溶的蛋白在裂解液中。纯化上柱前需要用透析袋在 1XPBS 中透析。做了几次,逐渐有了些体会,敲在这里和大家探讨。

透析袋的处理,按照分子克隆上的方法,先后用碳酸氢钠和 EDTA 处理即可使用。不过对于透析袋的选择一定注意分子量的范围。我表达的蛋白大小是 22kd,选择的透析袋是绿鸟的,分子量 7000。要注意的是 7000 只是一个大致的数值,会有一些的误差。也许,分子量 8000 的分子也能够透析出来。透析袋的长度可以根据需要透析的液体量来定。一般不要太短。因为两端用夹子封闭要占用一定距离,等于你的可用空间缩短了。而且夹子夹住的地方,很可能会有缝隙,使你的蛋白样品丢失。我用的长度一般是 25-50 cm。

关于每次样品的透析量,加入透析袋中,应该大致使透析袋留有大约 1/3 的空间。否则,溶液体积的迅速膨胀,可能会使透析袋破裂,损失可就大了。而且,透析袋使用时,要求**不要成角**,也是为了防止局部压力过大导致破裂。如果空余够多,这点也就不是问题了。

1XPBS 的更换,最初要频繁一些,大概 1-2 h 一次,更换三四次后,可以间隔 3-4 h 换一次。有一点值得留意,那就是透析袋内的液体体积增加的是否迅速和明显。如果不是,那么,提示其中的蛋白浓度不高,可能你的裂解过程不够彻底,自然你的目的产物就不会多。虽说是周质腔的可溶蛋白,各种蛋白加在一起,也是多种多样的。因此,没有体积的明显增加,透析这种高渗体系中的蛋白就失去意义了。我的高渗裂解液的主要成分是 20% 蔗糖,但我发现只把裂解液放在透析袋中,体积基本不会增加。

## 10.14. 表达蛋白的分离与纯化

大肠杆菌表达蛋白以可溶和不溶两种形式存在，需要不同的纯化策略。现在，许多蛋白质正在被发现而事先并不知道它们的功能，这些自然需要将蛋白质分离出来后，进行进一步的研究来获得。分析蛋白质的方法学现已极大的简化和改进。必须承认，蛋白质纯化比起 DNA 克隆和操作来是更具有艺术性的，尽管 DNA 序列具有异乎寻常的多样性（因而是唯一适合遗传物质的），但它却有标准的物理化学性质，而每一种蛋白质则有它自己的由氨基酸序列决定的物理化学性质（因而它具有执行众多生物学功能的用途）。正是蛋白质间的这些物理性质上的差异使它们得以能进行纯化但这也意味着需要对每一种待纯化的蛋白质研发一套新的方法。所幸的是，尽管存在这种固有的困难，但现已有多种方法可以利用，蛋白质纯化策略也已实际可行。目前，待研究蛋白或酶的基因的获得已是相当普遍的事。可诱导表达系统特别是 Studier 等发展的以噬菌体 T7RNA 聚合酶为基础的表达系统的出现使人们能近乎常规地获得过表达（overexpression），表达水平可达细胞蛋白的 2% 以上，有些甚至高达 50%。

### 一、可溶性产物的纯化（融合 T7-Tag 的表达蛋白）

#### （一）试剂准备

采用 T7-Tag Affinity Purification Kit

1. T7-Tag 抗体琼脂。
2. B/W 缓冲液：4.29mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，2.7 mM KCl，3. 0.137mM NaCl，1%吐温-20，pH7.3。
4. 洗脱缓冲液：0.1M 柠檬酸，pH2.2。
5. 中和缓冲液：2M Tris，pH10.4。

#### （二）操作步骤

1. 100ml 含重组表达质粒的菌体诱导后，离心 5000 g×5 min，弃上清，收获菌体，用 10ml 预冷的 B/W 缓冲液重悬。
2. 重悬液于冰上超声处理，直至样品不再粘稠，4°C 离心 14000 g×30 min，取上清液，0.45μm 膜抽滤后作为样品液。
3. 将结合 T7-Tag 抗体的琼脂充分悬起，平衡至室温，装入层析柱中。
4. B/W 缓冲液平衡后样品液过柱。
5. 10 ml B/W 缓冲液过柱，洗去未结合蛋白。
6. 用 5 ml 洗脱缓冲液过柱，每次 1 ml，洗脱液用含 150 μl 中和缓冲液的离心管收集，混匀后置于冰上，直接 SDS-PAGE 分析。
7. 将洗脱下来的蛋白放入透析袋中，双蒸水透析 24 h，中间换液数次。
8. 用 PEG 20000 浓缩蛋白。

#### （三）注意事项

蛋白在过层析柱前，要 0.45 μm 膜抽滤，否则几次纯化后，柱子中会有不溶物。

### 二、包涵体的纯化

包涵体是外源基因在原核细胞中表达时，尤其在大肠杆菌中高效表达时，形成的由膜包裹的高密度、不溶性蛋白质颗粒，在显微镜下观察时为高折射区，与胞质中其他成分有明显区别。包涵体形成是比较复杂的，与胞质内蛋白质生成速率有关，新生成的多肽浓度较高，无充足的时间进行折叠，从而形成非结晶、无定形的蛋白质的聚集体；此外，包涵体的形成还被认为与宿主菌的培养条件，如培养基成分、温度、pH 值、离子强度等因素有关。细胞中的生物学活性蛋白质常以可融性或分子复合物的形式存在，功能性的蛋白质总是折叠成特定的三维结构型。包涵体内的蛋白是非折叠状态的聚集体，不具有生物学活性，因此要获得具有生物学活性的蛋白质必须将包涵体溶解，释放出其中的蛋白质，并进行蛋白质的复性。包涵体的主要成分就是表达产物，其可占据集体蛋白的 40%~95%，此外，还含有宿主菌的外膜蛋白、RNA 聚合酶、RNA、DNA、脂类及糖类物质，所以分离包涵体后，还要采用适当的方法（如色谱法）进行重组蛋白质的纯化。

#### （一）试剂配制

1. 缓冲液 A：50 mM Tris-HCl (pH8.0)，2 mM EDTA，100 mM NaCl。

2. 缓冲液 B : 50 mM Tris-HCl ( pH8.0 ) , 1 mM EDTA , 100 mM NaCl , 1% NP-40。
3. 缓冲液 I : 50 mM Tris-HCl ( pH8.0 ) , 2 mM EDTA , 100 mM NaCl , 0.5% Triton X-100(V/V) , 4 M 脲素。
4. 缓冲液 II : 50 mM Tris-HCl ( pH8.0 ) , 2 mM EDTA , 100 mM NaCl , 3% Triton X-100 。
1. 缓冲液 III : 50 mM Tris-HCl ( pH8.0 ) , 2 mM EDTA , 100 mM NaCl , 0.5% Triton X-100 , 2M 盐酸胍。
5. 缓冲液 C : 8 M 脲素 , 10 mM  $\beta$ -巯基乙醇 , 100 mM Tris-HCl ( pH8.0 ) , 2 mM EDTA 及脱氧胆酸钠。

## (二) 操作步骤

1. 用缓冲液 A 漂洗菌体细胞 ( 10 ml/g ) , 离心 6000 g $\times$ 15 min , 收集菌体细胞 , 重复此步骤 , 将菌体细胞再在缓冲液 A 中洗涤一次。
2. 将漂洗过的菌体细胞悬浮于缓冲液 B 中 , 超声破碎 , 镜检 , 破碎率高于 95% , 离心 1500g $\times$ 30min , 收集包涵体沉淀。
3. 将包涵体沉淀用缓冲液 I、缓冲液 II、缓冲液 III 分别超声洗涤一次 , 1500 g 离心收集包涵体沉淀。
4. 包涵体的溶解 : 用含高浓度脲素的缓冲液室温放置 30min , 然后离心 1500 g $\times$ 30 min , 留上清。将溶解后的蛋白质适当稀释 , 磁力搅拌 , 透析过夜。
5. 溶解后的包涵体蛋白可通过亲和层析进一步纯化。

## 10.15. 蛋白质提取方法例子

### 一、植物组织蛋白质提取方法

- 1、根据样品重量 ( 1g 样品加入 3.5 ml 提取液 , 可根据材料不同适当加入 ) , 准备提取液放在冰上。
- 2、把样品放在研钵中用液氮研磨 , 研磨后加入提取液中在冰上静置 ( 3-4 h ) 。
- 3、用离心机离心 8000 rpm 40 min 4 $^{\circ}$ C 或 11100 rpm 20 min 4 $^{\circ}$ C
- 4、提取上清液 , 样品制备完成。

蛋白质提取液 : 300 ml

- 1、1M Tris-HCl ( pH8 ) 45 ml
- 2、甘油 ( Glycerol ) 75 ml
- 3、聚乙烯吡咯烷酮 ( Polyvinylpyrrolidone ) 6 g

这种方法针对 SDS-PAGE , 垂直板电泳 !

### 二、植物组织蛋白质提取方法-三氯醋酸—丙酮沉淀法

- 1、在液氮中研磨叶片
- 2、加入样品体积 3 倍的提取液在 -20 $^{\circ}$ C 的条件下过夜 , 然后离心 ( 4 $^{\circ}$ C 8000rpm 以上 1 小时 ) 弃上清。
- 3、加入等体积的冰浴丙酮 ( 含 0.07% 的  $\beta$ -巯基乙醇 ) , 摇匀后离心 ( 4 $^{\circ}$ C 8000rpm 以上 1 小时 ) , 然后真空干燥沉淀 , 备用。
- 4、上样前加入裂解液 , 室温放置 30 分钟 , 使蛋白充分溶于裂解液中 , 然后离心 ( 15 $^{\circ}$ C 8000rpm 以上 1 小时或更长时间以没有沉淀为标准 ) , 可临时保存在 4 $^{\circ}$ C 待用。
- 5、用 Bradford 法定量蛋白 , 然后可分装放入 -80 $^{\circ}$ C 备用。

药品 :

提取液 : 含 10% TCA 和 0.07% 的  $\beta$ -巯基乙醇的丙酮

裂解液 : 2.7 g 尿素 0.2 g CHAPS 溶于 3 ml 灭菌的去离子水中 ( 终体积为 5 ml ) , 使用前再加入 1M 的 DTT 65  $\mu$ l/ml。

这种方法针对双向电泳 , 杂质少 , 离子浓度小的特点 ! 当然单向电泳也同样适用 , 只是电泳的条带会减少 !

### 三、肠黏膜蛋白

组织 : 肠黏膜 ( Newinbio )

目的 : WESTERN BLOT 检测凋亡相关蛋白的表达

应用 TRIPURE 提取蛋白质步骤 :

含蛋白质上清液中加入异丙醇：( 1.5 ml 每 1 ml TRIPURE 用量 )

倒转混匀，置室温 10min

离心：12000 g，10min，4 度，弃上清

加入 0.3M 盐酸胍/95%乙醇：( 2ml 每 1mlTRIPURE 用量 )

振荡，置室温 20min

离心：7500 g，5 min，4 度，弃上清

重复 0.3 M 盐酸胍/95%乙醇步 2 次

沉淀中加入 100%乙醇 2 ml

充分振荡混匀，置室温 20 min

离心：7500g，5min，4 度，弃上清吹干沉淀

1%SDS 溶解沉淀

离心：10000 g，10 min，4°C

取上清-20 °C 保存 ( 或可直接用于 WESTERN BLOT )

存在的问题：加入 1%SDS 后沉淀不溶解，还是很大的一块，4°C 离心后又多了白色沉淀，SDS 结晶？测浓度，含量才 1mg/ml 左右。

解决：提蛋白试剂盒，另外组织大小适中，要碎，立即加 2X BUFFER，然后煮 5-10 min，效果很好的。

#### 四、

lysis solution: ( yog )

Protein extraction buffer (Camiolo buffer):

100 ml= (0.075M Potassium Acetate) 0.736g

(0.3M) NaCl 1.753g

(0.1M) L-arginine basic salt 1.742g

(0.01M) EDTA-HCl 0.292g

(0.25%) Triton X-100 250. ul

up to 100 ml with dH<sub>2</sub>O. pH 7.4. Then 0.2 um filter.

1. Freeze tissue in liquid nitrogen.
2. Rinse in PBS then mince.
3. Add 1 ml Camiolo extraction buffer per 100 mg of tissue.
4. Homogenize for 1 minute at 4°C.
5. Spin at 3,000. rpm/15 minutes/4°C.
6. Remove supernatant and save in another tube.
7. If necessary, dialize the supernatant against PBS with 50 mM/L Tris-HCl pH 7.4.

#### 五、植物材料蛋白提取

植物材料：水稻苗，叶鞘，根 ( ynibcas )

- 1、200 毫克样品置于冰上磨碎
- 2、加 lysis buffer，离心，10000rpm，4 度，5min 取上清
- 3、重复离心 5min

lysis buffer : Urea np-40 ampholine 2-me pvp-40

#### 六、蛋白质样品制备 ( sigma )

秧苗蛋白质样品的提取按 Davermal 等 ( 1986 ) 的方法进行。

100mg 材料剪碎后加入 10mgPVP-40(聚乙烯吡咯烷酮)及少量石英砂，用液氮研磨成粉，加入 1.5 ml 10% 三

氯乙酸（丙酮配制，含 10mM 即 0.07%β-巯基乙醇），混匀，-20℃沉淀 1 小时，4℃，15000 r/min 离心 15

min，弃上清，沉淀复溶于 1.5ml 冷丙酮(含 10 mMβ-巯基乙醇)，再于-20℃沉淀 1 小时，同上离心弃上清，（有必要再用 80%丙酮(含 10 mMβ-巯基乙醇)所得沉淀低温冷冻真空抽干。

按每 mg 干粉加入 20μl（可调）UKS 液[9.5 M 尿素，5mM 碳酸钾，1.25%SDS，0.5%DTT(二硫苏糖醇)，2% Ampholine (Amersham Pharmacia Biotech Inc，pH3.5-10)，6% Triton X-100]，37℃温育 30min，期间搅

动几次，28 度（温度低，高浓度的尿素会让溶液结冰）16000 r/min 离心 15 min，离心力越大时间长一点越好！上清即可上样电泳。或者-70 度保存

## 七、植物根中蛋白质的抽取（phenol）

- (1) 样品加液氮研磨；
- (2) 装入 1.5 ml 离心管中；
- (3) 加 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$  700 ul；
- (4) 12000 rpm，4℃离心 10-15 min；
- (5) 取上清，蛋白质就在里面。

## 八、SDS 抽提+丙酮沉淀法（不需要酚的简易抽提方法）

Recommended start protocol for whole tissue extractions. ( hgp )

1. Grind 1 g of fresh tissue to a powder with liquid nitrogen in a mortar and pestle.
2. Add 5 mL of extraction media (0.175 M Tris-HCl, pH 8.8, 5% SDS, 15% glycerol, 0.3 M DTT) directly to mortar and continue grinding for an additional 30 sec.
3. Filter homogenate through two layers of miracloth into a 50 mL Falcon tube at room temperature.
4. Immediately add 4 volumes of ice cold 100% acetone to filtered homogenate, mix by vortexing and place at -20℃ for at least one hour to precipitate proteins.
5. Centrifuge at 5000 g for 15 min to collect precipitated protein, decant supernatant.
6. Gently blot residual acetone from container with Kimwipe and then wash pellet in 15-20 mL of cold 80% acetone. Be sure to thoroughly break-up pellet by pipetting, vortexing or sonication.
7. Repeat steps 5 and 6.
8. Collect final protein precipitate by centrifugation at 5000 g for 15 min and dry pellet by inverting on Kimwipe for 15 min at 37 °C.
9. Resuspend final pellet in 0.5-1 mL of IEF extraction solution (8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 2% Triton X-100, 50 mM DTT, 0.2% pH 3-10 ampholytes) by pipetting and vortexing at 25-30 C. Incubate sample for 1 h at room temperature with agitation. Do not heat sample under any circumstances as this will lead to carbamylation of proteins.
10. Centrifuge for 10 min at 12,000 g and use supernatant to rehydrate IPG strips.
11. If protein quantitation is necessary, precipitate protein sample with TCA or acetone prior to performing Bradford or Lowry assay as detergents and reducing agents interfere with these assays. Phenol extraction followed by methanolic ammonium acetate precipitation – an effective protocol for sample preparation from protein-poor, recalcitrant tissues such as plants (see Hurkman and Tanaka, 1986, Plant Physiology 81:802-80

## 11. 蛋白质组学

### 11.1. 蛋白质组技术的研究进展

大规模基因组测序计划的实施已改变生命科学的重心,在相当短的时期内,一些原核生物和某些低等真核生物的基因组序列已被测定.1995年,流感嗜血杆菌基因组序列首次被破译,在此后不到两年的时间,近50个细菌的基因组序列已被完成.然而,这仅仅是理解有机物功能的一个起点.在基因组时代,许多DNA序列信息仅提供相关基因组的结构和功能.然而,对基因产物(mRNA和蛋白质)的理解是理解细胞生物学的一个不可缺少的部分.DNA序列信息不能预测:1)基因表达产物是否或何时被翻译;2)基因产物的相应含量;3)翻译后修饰的程度;4)基因剔除或过表达的影响;5)遗留的小基因或<300 bp的ORFs的出现;6)多基因现象的表型.此外,mRNA水平的测量并不能完全揭示细胞调节;且蛋白质的样品较mRNA稳定;蛋白质和mRNA之间的相关系数仅为0.4~0.5,还存在转录后加工、翻译调节以及翻译后加工等.故而,“基因组时代”的迅猛发展同时激起了人们对“后基因组时代”中蛋白质组研究的需求.

## 1 蛋白质组的含义

蛋白质组(Proteome)的概念最先由 Marc Wilkins<sup>[1]</sup>提出,指由一个基因组(genOME),或一个细胞、组织表达的所有蛋白质(PROTein).蛋白质组的概念与基因组的概念有许多差别,它随着组织、甚至环境状态的不同而改变.在转录时,一个基因可以多种mRNA形式剪接,并且,同一蛋白可能以许多形式进行翻译后的修饰<sup>[2]</sup>.故一个蛋白质组不是一个基因组的直接产物,蛋白质组中蛋白质的数目有时可以超过基因组的数目<sup>[3]</sup>.

蛋白质组学(Proteomics)处于早期“发育”状态,这个领域的专家否认它是单纯的方法学<sup>[4]</sup>,就像基因组学一样,不是一个封闭的、概念化的稳定的知识体系,而是一个领域.蛋白质组学集中于动态描述基因调节,对基因表达的蛋白质水平进行定量的测定,鉴定疾病、药物对生命过程的影响,以及解释基因表达调控的机制<sup>[5]</sup>.作为一门科学,蛋白质组研究并非从零开始,它是已有20年历史的蛋白质(多肽)谱和基因产物图谱技术的一种延伸.多肽图谱依靠双向电泳(Two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)和进一步的图象分析;而基因产物图谱依靠多种分离后的分析,如质谱技术、氨基酸组分分析等.

## 2 蛋白质组研究的核心 用于分离的双向电泳(2-DE)

蛋白质组研究的发展以双向电泳技术作为核心.双向电泳由 O' Farrell's<sup>[6]</sup>于1975年首次建立并成功地分离约1000个*E.coli*蛋白,并表明蛋白质谱不是稳定的,而是随环境而变化.双向电泳原理简明,第一向进行等电聚焦,蛋白质沿pH梯度分离,至各自的等电点;随后,再沿垂直的方向进行分子量的分离.目前,随着技术的飞速发展,已能分离出10000个斑点(spot)<sup>[7]</sup>.当双向电泳斑点的全面分析成为现实的时候,蛋白质组的分析变得可行.

样品制备(sample preparation)和溶解同样事关2-DE的成效,目标是尽可能扩大其溶解度和解聚,以提高分辨率.用化学法和机械裂解法破碎以尽可能溶解和解聚蛋白,两者联合有协同作用.对IEF(isoelectric focusing)样品的预处理涉及溶解、变性和还原来完全破坏蛋白间的相互作用,并除去如核酸等非蛋白物质.理想的状态是人们应一步完成蛋白的完全处理<sup>[2]</sup>.近来,在“变性剂鸡尾酒”中,含14~16个碳的磺基甘氨酸三甲内盐(ASB<sub>14~16</sub>)的裂解液效果最好<sup>[8]</sup>.而离液剂2 mol/L 硫脲和表面活性剂4%CHAPS的混合液促使疏水蛋白从IPG(immobilized pH gradients)胶上的转换<sup>[9]</sup>.三丁基膦(Tributyl phosphine, TBP)取代β-巯基乙醇或DTT完全溶解链间或链内的二硫键,增强了蛋白的溶解度,并导致转至第二向的增加<sup>[10]</sup>.两者通过不同的方法来增加蛋白的溶解度,作为互补试剂会更有效.在保持样品的完整性的前提下,可利用超离<sup>[2]</sup>和核酸内切酶<sup>[11]</sup>去除核酸(DNA).除此之外,机械力被用来对蛋白分子解聚,如超声破碎<sup>[12]</sup>等.另外,添加PMSF等蛋白酶抑制剂<sup>[13]</sup>,可保持蛋白完整性.由于商品化的IPG胶条是干燥脱水的,可在其水化的过程中加样,覆盖整个IPG胶,避免在样品杯中的沉淀所致的样品丢失<sup>[14]</sup>.此外,低丰度蛋白(low abundance protein)在细胞内可能具有重要的调节功能,代表蛋白质组研究的“冰山之尖”,故分离低丰度蛋白是一种挑战<sup>[15]</sup>.亚细胞分级和蛋白质预分级、提高加样量(已达到1~15 mg级的标准)<sup>[16, 17]</sup>、应用敏感性检测,可以提高其敏感性.如一种多肽免疫2-DE印迹(MI-2DE)是利用几种单克隆抗体技术来分析和检测<sup>[18]</sup>.提高组蛋白和核糖体蛋白等碱性蛋白(basic proteins)的分离是另一难点.由于碱性pH范围内凝胶基质的不稳定及逆向电渗流(EOF)的产生,对PI(等电点)超过10的碱性蛋白<sup>[11]</sup>,通过产生0~10%的山梨醇梯度和16%的异丙醇可减少之.亦可用双甲基丙烯酸胺来增加基质的稳定性<sup>[19]</sup>.

2-DE面临的挑战是高分辨率和重复性.高分辨率确保蛋白最大程度的分离,高重复性允许进行凝胶间配比(match).对2-DE而言,有3种方法分离蛋白:1)ISO-DALT(isoelectric focus)以O' Farrell's技术为基础.第一向应用载体两性电解质(carrier ampholyte, CA),在管胶内建立pH梯度.随着聚焦时间的延长,pH梯度不稳,易产生阴极漂移.2)NEPHGE(non-equilibrium pH gradient electrophoresis)<sup>[20]</sup>用于分离碱性蛋白(pH>7.0).如果聚焦达到平衡状态,碱性蛋白会离开凝胶基质而丢失.因此,在等电区域的迁移须在平衡状态之前完成,但很难控

制. 3)IPG-DALT 发展于 80 年代早期. 由于固相 pH 梯度(Immobilized pH gradient, IPG)<sup>[21]</sup>的出现解决了 pH 梯度不稳的问题. IPG 通过 immobiline 共价偶联于丙烯酰胺产生固定的 pH 梯度, 克服了 IEF 的缺点, 从而达到高度的重复性. 目前可以精确制作线性、渐进性和 S 型曲线, 范围或宽或窄的 pH 梯度. 新的酸性 pH 3~5 或碱性 pH 6~11 的 IPG 凝胶梯度联合商品化的 pH 4~7 的梯度可对蛋白质形成蛋白质组重叠群(proteomic contigs)从而有效分离<sup>[13]</sup>.

分离后的斑点检测(spot detection)亦很重要. 所采用的检测策略和分离后所采用的方法的相互作用是很重要的. 此外, 还需考虑反应的线性、饱和阈/动态范围、敏感性、对细胞蛋白群的全体定量分析的适应性、可行性. 目前, 没有一种蛋白染色覆盖广泛的浓度和 PI 及分离后分析技术. 银染已成为一种检测 2-DE 的流行方法, 可检测少到 2~5ng 的蛋白, 因此较考马斯亮蓝 R-250 敏感. 多数糖蛋白不能被考马斯亮蓝染色, 一些有机染料不适于 PVDF 膜. 放射性标记不依赖其代谢的活性, 并仅适于对合成的蛋白质检测<sup>[2]</sup>. 另有一种改良的 2-DE(差异凝胶电泳), 即应用两种不同的染料荧光标记两个样品, 使在同一凝胶上电泳后的凝胶图象为两个, 避免了几种 2-DE 的比较, 可在纳克级进行检测<sup>[22]</sup>.

较早期相比, 2-DE 有两个主要的进步: 首先, 极高的重复性使有机体的参考图谱, 可通过 Internet 获得, 来比较不同组织类型、不同状态的基因表达; 其次, 高加样量使得 2-DE 成为一项真正的制备型技术.

### 3 蛋白质组技术的支柱---鉴定技术(Identification)

如果目前分离蛋白质组的最好技术是 2-DE, 那么随之而来的挑战是数百数千个蛋白如何被鉴定. 在这里, 我们不考虑传统的蛋白鉴定方法, 如免疫印迹法、内肽的化学测序、已知或未知蛋白的 comigration 分析, 或者在一个有机体中有意义的基因的过表达. 并不是因为这些方法无效, 而是因为它们通常耗时、耗力, 不适合高通量的筛选. 目前, 所选用的技术包括对于蛋白鉴定的图象分析、微量测序; 进一步对肽片段进行鉴定的氨基酸组分分析和与质谱相关的技术.

(1) 图象分析技术(Image analysis). “满天星”式的 2-DE 图谱分析不能依靠本能的直觉, 每一个图象上斑点的上调、下调及出现、消失, 都可能在生理和病理状态下产生, 必须依靠计算机为基础的数据处理, 进行定量分析. 在一系列高质量的 2-DE 凝胶产生(低背景染色, 高度的重复性)的前提下, 图象分析包括斑点检测、背景消减、斑点配比和数据库构建. 首先, 采集图象通常所用的系统是电荷耦合 CCD(charge coupled device)照相机; 激光密度仪(laser densitometers)和 Phospho 或 Fluoro imagers, 对图象进行数字化. 并成为以象素(pixels)为基础的空间和网格. 其次, 在图象灰度水平上过滤和变形, 进行图象加工, 以进行斑点检测. 利用 Laplacian, Gaussian, DOG(difference of Gaussians) operator 使有意义的区域与背景分离, 精确限定斑点的强度、面积、周长和方向. 图象分析检测的斑点须与肉眼观测的斑点一致. 在这一原则下, 多数系统以控制斑点的重心或最高峰来分析, 边缘检测的软件可精确描述斑点外观, 并进行边缘检测和邻近分析, 以增加精确度. 通过阈值分析、边缘检测、销蚀和扩大斑点检测的基本工具还可恢复共迁移的斑点边界. 以 PC 机为基础的软件 Phoretix-2D 正挑战古老的 Unix 为基础的 2-D 分析软件包. 第三, 一旦 2-DE 图象上的斑点被检测, 许多图象需要分析比较、增加、消减或均值化. 由于在 2-DE 中出现 100%的重复性是很困难的, 由此凝胶间的蛋白质的配比对于图象分析系统是一个挑战. IPG 技术的出现已使斑点配比变得容易. 因此, 较大程度的相似性可通过斑点配向量算法在长度和平行度观测. 用来配比的著名软件系统包括 Quest, Lips, Hermes, Gemini 等, 计算机方法如相似性、聚类分析、等级分类和主要因素分析已被采用, 而神经网络、子波变换和实用分析在未来可被采用<sup>[2]</sup>. 配比通常由一个人操作, 其手工设定大约 50 个突出的斑点作为“路标”, 进行交叉配比. 之后, 扩展至整个胶. 例如: 精确的 PI 和 MW(分子量)的估计通过参考图上 20 个或更多的已知蛋白所组成的标准曲线来计算未知蛋白的 PI 和 MW<sup>[3]</sup>. 在凝胶图象分析系统依据已知蛋白质的 pI 值产生 PI 网络, 使得凝胶上其它蛋白的 PI 按此分配. 所估计的精确度大大依赖于所建网络的结构及标本的类型. 已知的未被修饰的大蛋白应该作为标志, 变性的修饰的蛋白的 PI 估计约在 $\pm 0.25$ 个单位. 同理, 已知蛋白的理论分子量可以从数据库中计算, 利用产生的表观分子量的网格来估计蛋白的分子量. 未被修饰的小蛋白的错误率大约 30%, 而翻译后蛋白的出入更大. 故需联合其他的技术完成鉴定<sup>[18]</sup>.

(2) 微量测序(microsequencing). 蛋白质的微量测序已成为蛋白质分析和鉴定的基石, 可以提供足够的信息. 尽管氨基酸组分分析和肽质指纹谱(PMF)可鉴定由 2-DE 分离的蛋白, 但最普通的 N-末端 Edman 降解仍然是进行鉴定的主要技术. 目前已实现蛋白质微量测序的自动化. 首先使经凝胶分离的蛋白质直接印迹在 PVDF 膜或玻璃纤维膜上, 染色、切割, 然后直接置于测序仪中, 可用于 subpicomole 水平的蛋白质的鉴定<sup>[2]</sup>. 但有几点需注意: Edman 降解很缓慢, 序列以每 40 min 1 个氨基酸的速率产生; 与质谱相比, Edman 降解消耗大; 试剂昂贵, 每个氨基酸

花费 3~4\$。这说明泛化的 Edman 降解蛋白质不适合分析成百上千的蛋白质。然而, 如果在一个凝胶上仅有几个有意义的蛋白质, 或者如果其他技术无法测定而克隆其基因是必需的, 则需要进行泛化的 Edman 降解测序。

近来, 应用自动化的 Edman 降解可产生短的 N-末端序列标签, 这是将质谱的序列标签概念用于 Edman 降解, 业已成为一种强有力的蛋白质鉴定。当对 Edman 的硬件进行简单改进, 以迅速产生 N-末端序列标签达 10~20 个/d, 序列标签将适于在较小的蛋白质组中进行鉴定。若联合其他的蛋白质属性, 如氨基酸组分分析、肽质量、表现蛋白质分子量、等电点, 可以更加可信地鉴定蛋白质。选择 BLAST 程序, 可与数据库相比<sup>[18]</sup>。目前, 采用一种 TagIdent 的检索程序, 还可以进行种间比较鉴定, 又提高了其在蛋白质组研究中的作用<sup>[23]</sup>。

(3) 与质谱(mass spectrometry)相关的技术。质谱已成为连接蛋白质与基因的重要技术, 开启了大规模自动化的蛋白质鉴定之门。用来分析蛋白质或多肽的质谱有两个主要的部分, 1)样品入机的离子源, 2)测量被介入离子的分子量的装置。首先是基质辅助激光解吸附电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)为一脉冲式的离子化技术。它从固相标本中产生离子, 并在飞行管中测其分子量。其次是电喷雾质谱(ESI-MS), 是一连续离子化的方法, 从液相中产生离子, 联合四极质谱或在飞行时间检测器中测其分子量<sup>[24]</sup>。近年来, 质谱的装置和技术有了长足的进展。在 MALDI-TOF 中, 最重要的进步是离子反射器(ion reflectron)和延迟提取(delayed ion extraction), 可达相当精确的分子量。在 ESI-MS 中, 纳米级电雾源(nano-electrospray source)的出现使得微升级的样品在 30~40 min 内分析成为可能。将反相液相色谱和串联质谱(tandem MS)联用, 可在数十个 picomole 的水平检测; 若利用毛细管色谱与串联质谱联用, 则可在低 picomole 到高 femtomole 水平检测; 当利用毛细管电泳与串联质谱连用时, 可在小于 femtomole 的水平检测<sup>[25]</sup>。甚至可在 attomole 水平进行<sup>[26]</sup>。目前多为酶解、液相色谱分离、串联质谱及计算机算法的联合应用鉴定蛋白质。下面以肽质指纹术和肽片段的测序来说明怎样通过质谱来鉴定蛋白质<sup>[2]</sup>。

1)肽质指纹术(peptide mass fingerprint, PMF)是由 Henzel 等人<sup>[27]</sup>于 1993 年提出。用酶(最常用的是胰酶)对由 2-DE 分离的蛋白在胶上或在膜上于精氨酸或赖氨酸的 C-末端处进行断裂, 断裂所产生的精确的分子量通过质谱来测量(MALDI-TOF-MS, 或为 ESI-MS), 这一技术能够完成的肽质量可精确到 0.1 个分子量单位。所有的肽质量最后与数据库中理论肽质量相比(理论肽是由实验所用的酶来“断裂”蛋白所产生的)。配比的结果是按照数据库中肽片段与未知蛋白共有的肽片段数目作一排行榜, “冠军”肽片段可能代表一个未知蛋白。若冠军之间的肽片段存在较大差异, 且这个蛋白可与实验所示的肽片段覆盖良好, 则说明正确鉴定的可能性较大<sup>[18]</sup>。

2)肽片段(peptide fragment)的部分测序。肽质指纹术对其自身而言, 不能揭示所衍生的肽片段或蛋白质。为进一步鉴定蛋白质, 出现了一系列的质谱方法来描述肽片段。用酶或化学方法从 N-或 C-末端按顺序除去氨基酸, 形成梯形肽片段(ladder peptide)<sup>[28]</sup>。首先以一种可控制的化学模式从 N-末端降解, 可产生大小不同的一系列梯形肽片段, 所得一定数目的肽质量由 MALDI-TOF-MS 测量。另一种方法涉及羧基肽酶的应用, 从 C-末端除去不同数目的氨基酸形成肽片段。化学法和酶法可产生相对较长的序列, 其分子量精确至以区别赖氨酸(128.09)和谷氨酰胺(128.06)<sup>[18]</sup>。或者, 在质谱仪内应用源后衰变(post-source decay, PSD)和碰撞诱导解离(collision-induced dissociation, CID), 目的是产生包含有仅异于一个氨基酸残基质量的一系列肽峰的质谱。因此, 允许推断肽片段序列<sup>[29]</sup>。肽片段 PSD 的分析在 MALDI 反应器上能产生部分序列信息。首先进行肽质指纹鉴定。之后, 一个有意义的肽片段在质谱仪被选作“母离子”, 在飞行至离子反应器的过程中降解为“子离子”。在反应器中, 用逐渐降低的电压可测量至检测器的不同大小的片段<sup>[30]</sup>。但经常产生不完全的片段。现在用肽片段来测序的方法始于 70 年代末的 CID, 可以一个三联四极质谱 ESI-MS 或 MALDI-TOF-MS 联合碰撞器内来完成。在 ESI-MS 中, 由电雾源产生的肽离子在质谱仪的第一个四极质谱中测量, 有意义的肽片段被送至第二个四极质谱中, 惰性气体轰击使其成为碎片, 所得产物在第三个四极质谱中测量<sup>[31]</sup>。与 MALDI-PSD 相比, CID 稳定、强健、普遍, 肽离子片段基本沿着酰胺键的主架被轰击产生梯形序列。连续的片段间差异决定此序列在那一点的氨基酸的质量。由此, 序列可被推测。由 CID 图谱还可获得的几个序列的残基, 叫做“肽序列标签”。这样, 联合肽片段母离子的分子量和肽片段距 N-、C 端的距离将足以鉴定一个蛋白质<sup>[32]</sup>。

(4) 氨基酸组分分析。1977 年首次作为鉴定蛋白质的一种工具, 是一种独特的“脚印”技术。利用蛋白质异质性的氨基酸组分特征, 成为一种独立于序列的属性, 不同于肽质量或序列标签。Latter 首次表明氨基酸组分的数据能用于从 2-DE 凝胶上鉴定蛋白质<sup>[33]</sup>。通过放射标记的氨基酸来测定蛋白质的组分, 或者将蛋白质印迹到 PVDF 膜上, 在 155°C 进行酸性水解 1 h, 通过这一简单步骤的氨基酸的提取, 每一样品的氨基酸在 40min 内自动衍生并由色谱分离, 常规分析为 100 个蛋白质/周<sup>[3]</sup>。依据代表两组分间数目差异的分数, 对数据库中的蛋白质进行排榜, “冠军”蛋白质具有与未知蛋白质最相近的组分, 考虑冠军蛋白质分数之间的差异, 仅处于冠军的蛋白质的可信度大。

Internet 上存在多个程序可用于氨基酸组分分析, 如 AACompIdent, ASA, FINDER, AAC-PI, PROP-SEARCH 等, 其中, 在 PROP-SEARCH 中, 组分、序列和氨基酸的位置被用来检索同源蛋白质<sup>[2]</sup>。但仍存在一些缺点, 如由于不足的酸性水解或者部分降解会产生氨基酸的变异。故应联合其他的蛋白质属性进行鉴定。

#### 4 蛋白质组研究的百科全书 数据库(database)

蛋白质组数据库(proteome database)被认为是蛋白质组知识的储存库, 包含所有鉴定的蛋白质信息, 如蛋白质的顺序、核苷酸顺序、2-D PAGE、3-D 结构、翻译后的修饰、基因组及代谢数据库等。例如, SWISS-2DPAGE 数据库包括人类, 细菌, 细胞等物种的信息<sup>[34]</sup>。其中, *E.coli* SWISS-2DPAGE 数据库是 EXPASY 分子生物学服务器的一部分, 通过 www 的 URL 网址 <http://www.expasy.ch/ch2d/ch2d-top.html><sup>[35]</sup> 可以查询。

当前的计算机和网络技术, 让我们将所有的数据库连在一起, 并允许我们从一个数据库中的一条信息遨游到其他的数据库; 将一个研究对象的数据与其他各种蛋白质组中的相关数据或图谱相连。分析型软件工具被称为蛋白质组分析机器人、数据分析软件包。在既定的状态下, 定量研究蛋白质的表达水平, 或者计算机辅助数据库系统建立可将实验推进一步。因此, 蛋白质组分析技术联合蛋白质数据库, 计算机网络和其他软件包含在一起称为蛋白质组的机控百科全书(Cyber-encyclopaedia of the proteome)<sup>[18]</sup>。

蛋白质组和基因组共同分析可以产生大量的数据。当评估每一个数据库的价值时, 难免要考虑两个条件: 1) 数据库是否在任一时刻保持最新; 2) 何时能够相互连接, 且以整体状态评估。目前的发展趋势: 1) 信息量呈指数增长; 2) 蛋白质组计划的实施会产生新的数据库; 3) 致力于模拟细胞内蛋白质的相互作用的新型数据库; 4) 建立高级、智慧型的咨询工具是必需的<sup>[18]</sup>。

#### 5 蛋白质组技术的规模 高通量筛选 (HTS)

HTS(High throughput screening)至今在蛋白质组研究中已成为现实。在最近的一年内, 由于制药工业对此的需求, 样品输入自动化得以进展。目前, 正在设计的机器人可自动处理 2-DE 后电转至 PVDF 膜。原形机器人加工、传输蛋白质至质谱或以液相色谱为基础的分析仪, 如进行斑点切割, 操纵、控制多种 PMF、氨基酸组分分析所需的化学反应, 使每天最小的流通量达 1000 个蛋白。此外, 必须选择适用的软件包, 如应用第二代 COMBINED 来处理输出的数据, 自动咨询本地或网上的数据库而进行系列的评估。大量的数据分析表明 HTS 是刻不容缓的。目前, 对质谱已设想一个三级方案来处理大规模的蛋白质组: 1) MALDI-TOF-MS 以每天大于 1000 个蛋白的速率分析; 2) 通过 ESI-MS/MS 或 SEQUEST, 以每天每台机器分析几打蛋白质的速率进行序列标签; 3) 对由串联质谱所得的新蛋白或有意义蛋白进行全长肽段的测序, 从而提供足够的信息通过核酸探针或简并 PCR 引物获得有意义的基因<sup>[2, 36]</sup>。

综上所述, 高分辨率、高敏感性和高通量的分离和分离后鉴定技术, 结合准确、全面的数据库技术, 使蛋白质组技术用于生物研究卓有成效。但仅鉴定蛋白质是不够的, 蛋白质组世界的挑战是完善蛋白质质的分析, 设想细胞活性、功能的全体性概念。在此基础上, 蛋白质组分析将会促进未来生命科学的整体发展。

### 11.2. 蛋白质组学及研究技术路线

基因组(genome)包含的遗传信息经转录产生 mRNA, 一个细胞在特定生理或病理状态下表达的所有种类的 mRNA 称为转录子组(transcriptome)。很显然, 不同细胞在不同生理或病理状态下转录子组包含的 mRNA 的种类不尽相同。mRNA 经翻译产生蛋白质, 一个细胞在特定生理或病理状态下表达的所有种类的蛋白质称为蛋白质组(proteome)。同理, 不同细胞在不同生理或病理状态下所表达的蛋白质的种类也不尽相同。蛋白质是基因功能的实施者, 因此对蛋白质结构, 定位和蛋白质-蛋白质相互作用的研究将为阐明生命现象的本质提供直接的基础。

生命科学是实验科学, 因此生命科学的发展极大地依赖于实验技术的发展。以 DNA 序列分析技术为核心的基因组研究技术推动了基因组研究的日新月异, 而以基因芯片技术为代表的基因表达研究技术为科学家了解基因表达规律立下汗马功劳。在蛋白质组研究中, 二维电泳和质谱技术的黄金组合又为科学家掌握蛋白质表达规律再铸辉煌。蛋白质组学(proteomics)就是指研究蛋白质组的技术及这些研究得到的结果。

蛋白质组学的研究试图比较细胞在不同生理或病理条件下蛋白质表达的异同, 对相关蛋白质进行分类和鉴定。更重要的是蛋白质组学的研究要分析蛋白质间相互作用和蛋白质的功能。

蛋白质组学的研究内容包括:

1.蛋白质鉴定：可以利用一维电泳和二维电泳并结合 Western 等技术，利用蛋白质芯片和抗体芯片及免疫共沉淀等技术对蛋白质进行鉴定研究。

2.翻译后修饰：很多 mRNA 表达产生的蛋白质要经历翻译后修饰如磷酸化，糖基化，酶原激活等。翻译后修饰是蛋白质调节功能的重要方式，因此对蛋白质翻译后修饰的研究对阐明蛋白质的功能具有重要作用。

3.蛋白质功能确定：如分析酶活性和确定酶底物，细胞因子的生物分析/配基-受体结合分析。可以利用基因敲除和反义技术分析基因表达产物-蛋白质的功能。另外对蛋白质表达出来后在细胞内的定位研究也在一定程度上有助于蛋白质功能的了解。Clontech 的荧光蛋白表达系统就是研究蛋白质在细胞内定位的一个很好的工具。

4.对人类而言，蛋白质组学的研究最终要服务于人类的健康，主要指促进分子医学的发展。如寻找药物的靶分子。很多药物本身就是蛋白质，而很多药物的靶分子也是蛋白质。药物也可以干预蛋白质-蛋白质相互作用。

在基础医学和疾病机理研究中，了解人不同发育、生长期和不同生理、病理条件下及不同细胞类型的基因表达的特点具有特别重要的意义。这些研究可能找到直接与特定生理或病理状态相关的分子，进一步为设计作用于特定靶分子的药物奠定基础。

不同发育、生长期和不同生理、病理条件下不同的细胞类型的基因表达是不一致的，因此对蛋白质表达的研究应该精确到细胞甚至亚细胞水平。可以利用免疫组织化学技术达到这个目的，但该技术的致命缺点是通量低。LCM 技术可以精确地从组织切片中取出研究者感兴趣的细胞类型，因此 LCM 技术实际上是一种原位技术。取出的细胞用于蛋白质样品的制备，结合抗体芯片或二维电泳-质谱的技术路线，可以对蛋白质的表达进行原位的高通量的研究。很多研究采用匀浆组织制备蛋白质样品的技术路线，其研究结论值得怀疑，因为组织匀浆后不同细胞类型的蛋白质混杂在一起，最后得到的研究数据根本无法解释蛋白质在每类细胞中的表达情况。虽然培养细胞可以得到单一类型细胞，但体外培养的细胞很难模拟体内细胞的环境，因此这样研究得出的结论也很难用于解释在体实际情况。因此在研究中首先应该将不同细胞类型分离，分离出来的不同类型细胞可以用于基因表达研究，包括 mRNA 和蛋白质的表达。

LCM 技术获得的细胞可以用于蛋白质样品的制备。可以根据需要制备总蛋白，或膜蛋白，或核蛋白等，也可以富集糖蛋白，或通过去除白蛋白来减少蛋白质类型的复杂程度。相关试剂盒均有厂商提供。

蛋白质样品中的不同类型的蛋白质可以通过二维电泳进行分离。二维电泳可以将不同种类的蛋白质按照等电点和分子量差异进行高分辨率的分离。成功的二维电泳可以将 2000 到 3000 种蛋白质进行分离。电泳后对胶进行高灵敏度的染色如银染和荧光染色。如果是比较两种样品之间蛋白质表达的异同，可以在同样条件下分别制备二者的蛋白质样品，然后在同样条件下进行二维电泳，染色后比较两块胶。也可以将二者的蛋白质样品分别用不同的荧光染料标记，然后两种蛋白质样品在一块胶上进行二维电泳的分离，最后通过荧光扫描技术分析结果。

胶染色后可以利用凝胶图象分析系统成像，然后通过分析软件对蛋白质点进行定量分析，并且对感兴趣的蛋白质点进行定位。通过专门的蛋白质点切割系统，可以将蛋白质点所在的胶区域进行精确切割。接着对胶中蛋白质进行酶切消化，酶切后的消化物经脱盐/浓缩处理后就可以通过点样系统将蛋白质点样到特定的材料的表面

(MALDI-TOF)。最后这些蛋白质就可以在质谱系统中进行分析，从而得到蛋白质的定性数据；这些数据可以用于构建数据库或和已有的数据库进行比较分析。实际上像人类的血浆，尿液，脑脊液，乳腺，心脏，膀胱癌和磷状细胞癌及多种病原微生物的蛋白质样品的二维电泳数据库已经建立起来，研究者可以登录 [www.expasy.ch/www/tools.html](http://www.expasy.ch/www/tools.html) 等网站进行查询，并和自己的同类研究进行对比分析。

Genomic Solution 可以为研究者提供除质谱外的所有蛋白质组学研究工具，包括二维电泳系统，成像系统及分析软件，胶切割系统，蛋白质消化浓缩工作站，点样工作站等；同时还可以提供相关试剂和消耗品。

LCM-二维电泳-质谱的技术路线是典型的一条蛋白质组学研究的技术路线，除此以外，LCM-抗体芯片也是一条重要的蛋白质组学研究的技术路线。即通过 LCM 技术获得感兴趣的细胞类型，制备细胞蛋白质样品，蛋白质经荧光染料标记后和抗体芯片杂交，从而可以比较两种样品蛋白质表达的异同。Clontech 最近开发了一张抗体芯片，可以对 378 种膜蛋白和胞浆蛋白进行分析。该芯片同时配合了抗体芯片的全部操作过程的重要试剂，包括蛋白质制备试剂，蛋白质的荧光染料标记试剂，标记体系的纯化试剂，杂交试剂等。

对于蛋白质相互作用的研究，酵母双杂交和噬菌体展示技术无疑是很好的研究方法。Clontech 开发的酵母双杂交系统和 NEB 公司开发的噬菌体展示技术可供研究者选用。

关于蛋白质组的研究，也可以将蛋白质组的部分或全部种类的蛋白质制作成蛋白质芯片，这样的蛋白质芯片可以用于蛋白质相互作用研究，蛋白表达研究和小分子蛋白结合研究。Science, Vol. 293, Issue 5537, 2101-2105,

September 14, 2001 发表了一篇关于酵母蛋白质组芯片的论文。该文主要研究内容为：将酵母的 5800 个 ORF 表达成蛋白质并进行纯化点样制作芯片，然后用该芯片筛选钙调素和磷脂分子的相互作用分子。

最后有必要指出的是，传统的蛋白质研究注重研究单一蛋白质，而蛋白质组学注重研究参与特定生理或病理状态的所有的蛋白质种类及其与周围环境(分子)的关系。因此蛋白质组学的研究通常是高通量的。适应这个要求，蛋白质组学相关研究工具通常都是高度自动化的系统，通量高而速度快，配合相应分析软件和数据库，研究者可以在最短的时间内处理最多的数据。

### 11.3. 电泳技术简介

电泳法，是指带电电荷的供试品（蛋白质、核苷酸等）在惰性支持介质（如纸、醋酸纤维素、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等）中，于电场的作用下，向其对应的电极方向按各自的速度进行泳动，使组分分离成狭窄的区带，用适宜的检测方法记录其电泳区带图谱或计算其百分含量的方法。

#### 电泳技术的基本原理和分类

在电场中，推动带电质点运动的力（ $F$ ）等于质点所带净电荷量（ $Q$ ）与电场强度（ $E$ ）的乘积。 $F = QE$  质点的前移同样要受到阻力（ $F'$ ）的影响，对于一个球形质点，服从 Stoke 定律，即： $F' = 6\pi r\eta v$  式中  $r$  为质点半径， $\eta$  为介质粘度， $v$  为质点移动速度，当质点在电场中作稳定运动时： $F = F'$  即  $QE = 6\pi r\eta v$

可见，球形质点的迁移率，首先取决于自身状态，即与所带电量成正比，与其半径及介质粘度成反比。除了自身状态的因素外，电泳体系中其它因素也影响质点的电泳迁移率。

电泳法可分为自由电泳（无支持体）及区带电泳（有支持体）两大类。前者包括 Tise-leas 式微量电泳、显微电泳、等电聚焦电泳、等速电泳及密度梯度电泳。区带电泳则包括滤纸电泳（常压及高压）、薄层电泳（薄膜及薄板）、凝胶电泳（琼脂、琼脂糖、淀粉胶、聚丙烯酰胺凝胶）等。

自由电泳法的发展并不迅速，因为其电泳仪构造复杂、体积庞大，操作要求严格，价格昂贵等。而区带电泳可用各种类型的物质作支持体，其应用比较广泛。本节仅对常用的几种区带电泳分别加以叙述。

#### 影响电泳迁移率的因素

1. 电场强度 电场强度是指单位长度（ $cm$ ）的电位降，也称电势梯度。如以滤纸作支持物，其两端浸入到电极液中，电极液与滤纸交界面的纸长为  $20cm$ ，测得的电位降为  $200V$ ，那么电场强度为  $200V/20cm = 10V/cm$ 。当电压在  $500V$  以下，电场强度在  $2-10v/cm$  时为常压电泳。电压在  $500V$  以上，电场强度在  $20-200V/cm$  时为高压电泳。电场强度大，带电质点的迁移率加速，因此省时，但因产生大量热量，应配备冷却装置以维持恒温。

2. 溶液的 pH 值 溶液的 pH 决定被分离物质的解离程度和质点的带电性质及所带净电荷量。例如蛋白质分子，它是既有酸性基团（ $-COOH$ ），又有碱性基团（ $-NH_2$ ）的两性电解质，在某一溶液中所带正负电荷相等，即分子的净电荷等于零，此时，蛋白质在电场中不再移动，溶液的这一 pH 值为该蛋白质的等电点（ $isoelectric\ point, pI$ ）。若溶液 pH 处于等电点酸侧，即  $pH < pI$ ，则蛋白质带正电荷，在电场中向负极移动。若溶液 pH 处于等电点碱侧，即  $pH > pI$ ，则蛋白质带负电荷，向正极移动。溶液的 pH 离  $pI$  越远，质点所带净电荷越多，电泳迁移率越大。因此在电泳时，应根据样品性质，选择合适的 pH 值缓冲液。

3. 溶液的离子强度 电泳液中的离子浓度增加时会引起质点迁移率的降低。其原因是带电质点吸引相反符合的离子聚集其周围，形成一个与运动质点符合相反的离子氛（ $ionic\ atmosphere$ ），离子氛不仅降低质点的带电量，同时增加质点前移的阻力，甚至使其不能泳动。然而离子浓度过低，会降低缓冲液的总浓度及缓冲容量，不易维持溶液的 pH 值，影响质点的带电量，改变泳动速度。离子的这种障碍效应与其浓度和价数相关。可用离子强度  $I$  表示。

4. 电渗 在电场作用下液体对于固体支持物的相对移动称为电渗（ $electro-osmosis$ ）。其产生的原因是固体支持物多孔，且带有可解离的化学基团，因此常吸附溶液中的正离子或负离子，使溶液相对带负电或正电。如以滤纸作支持物时，纸上纤维素吸附  $OH^-$  带负电荷，与纸接触的水溶液因产生  $H_3O^+$ ，带正电荷移向负极，若质点原来在电场中移向负极，结果质点的表现速度比其固有速度要快，若质点原来移向正极，表现速度比其固有速度要慢，可见应尽可能选择低电渗作用的支持物以减少电渗的影响。

#### 电泳分析常用方法

### (一) 醋酸纤维素薄膜电泳

醋酸纤维素是提纤维素的羟基乙酰化形成的纤维素醋酸酯。由该物质制成的薄膜称为醋酸纤维素薄膜。这种薄膜对蛋白质样品吸附性小，几乎能完全消除纸电泳中出现的“拖尾”现象，又因为膜的亲水性比较小，它所容纳的缓冲液也少，电泳时电流的大部分由样品传导，所以分离速度快，电泳时间短，样品用量少，5 $\mu$ g的蛋白质可得到满意的分离效果。因此特别适合于病理情况下微量异常蛋白的检测。

醋酸纤维素膜经过冰醋酸乙醇溶液或其它透明液处理后可使膜透明化有利于对电泳图谱的光吸收扫描测定和膜的长期保存。

1. 材料与试剂 醋酸纤维素膜一般使用市售商品，常用的电泳缓冲液为 pH8.6 的巴比妥缓冲液，浓度在 0.05-0.09mol/L。

#### 2. 操作要点

(1)膜的预处理：必须于电泳前将膜片浸泡于缓冲液，浸透后，取出膜片并用滤纸吸去多余的缓冲液，不可吸得过干。

(2)加样：样品用量依样品浓度、本身性质、染色方法及检测方法等因素决定。对血清蛋白质的常规电泳分析，每 cm 加样线不超过 1 $\mu$ l，相当于 60-80 $\mu$ g 的蛋白质。

(3)电泳：可在室温下进行。电压为 25V/cm，电流为 0.4-0.6mA/cm 宽。

(4)染色：一般蛋白质染色常使用氨基黑和丽春红，糖蛋白用甲苯胺蓝或过碘酸-Schiff 试剂，脂蛋白则用苏丹黑或品红亚硫酸染色。

(5)脱色与透明：对水溶性染料最普遍应用的脱色剂是 5%醋酸水溶液。为了长期保存或进行光吸收扫描测定，可浸入冰醋酸：无水乙醇 = 30:70 (V/V) 的透明液中。

### (二) 凝胶电泳

以淀粉胶、琼脂或琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等作为支持介质的区带电泳法称为凝胶电泳。其中聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 普遍用于分离蛋白质及较小分子的核酸。琼脂糖凝胶孔径较大，对一般蛋白质不起分子筛作用，但适用于分离同工酶及其亚型，大分子核酸等应用较广，介绍如下：

1. 琼脂糖凝胶电泳的原理概述 琼脂糖是由琼脂分离制备的链状多糖。其结构单元是 D-半乳糖和 3,6-脱水-L-半乳糖。许多琼脂糖链依氢键及其它力的作用使其互相盘绕形成绳状琼脂糖束，构成大网孔型凝胶。因此该凝胶适合于免疫复合物、核酸与核蛋白的分离、鉴定及纯化。在临床生化检验中常用于 LDH、CK 等同工酶的检测。

2. 琼脂糖凝胶电泳分离核酸的基本技术 在一定浓度的琼脂糖凝胶介质中，DNA 分子的电泳迁移率与其分子量的常用对数成反比；分子构型也对迁移率有影响，如共价闭环 DNA > 直线 DNA > 开环双链 DNA。当凝胶浓度太高时，凝胶孔径变小，环状 DNA (球形) 不能进入胶中，相对迁移率为 0，而同等大小的直线 DNA (刚性棒状) 可以按长轴方向前移，相对迁移率大于 0。

(1)设备与试剂：琼脂糖凝胶电泳分为垂直及水平型两种。其中水平型可制备低浓度琼脂糖凝胶，而且制胶与加样都比较方便，故应用比较广泛。核酸分离一般用连续缓冲体系，常用的有 TBE (0.08mol/L Tris-HCl, pH8.5, 0.08mol/L 硼酸, 0.0024mol/L EDTA) 和 THE (0.04mol/L Tris-HCl, pH7.8, 0.2mol/L 醋酸钠, 0.0018mol/L EDTA)。

(2)凝胶制备：用上述缓冲液配制 0.5%-0.8%琼脂糖凝胶溶液，沸水浴或微波炉加热使之融化，冷至 55 $^{\circ}$ C 时加入溴化乙锭 (EB) 至终浓度为 0.5 $\mu$ g/ml，然后将其注入玻璃板或有机玻璃板组装好的模子中，厚度依样品浓度而定。注胶时，梳齿下端距玻璃板 0.5-1.0mm，待脱凝固后，取出梳子，加入适量电极缓冲液使板胶浸没在缓冲液下 1mm 处。

(3)样品制备与加样：溶解于 TBE 或 THE 内的样品应含指示染料 (0.025%溴酚蓝或桔黄橙)、蔗糖 (10%-15%) 或甘油 (5%-10%)，也可使用 2.5%Fico II 增加比重，使样品集中，每齿孔可加样 5-10 $\mu$ g。

(4)电泳：一般电压为 5-15V/cm。对大分子的分离可用电压 5V/cm。电泳过程最好在低温条件下进行。

(5)样品回收：电泳结束后在紫外灯下观察样品的分离情况，对需要的 DNA 分子或特殊片段可从电泳后的凝胶中以不同的方法进行回收，如电泳洗脱法：在紫外灯下切取含核酸区带的凝胶，将其装入透析袋 (内含适量新鲜电泳缓冲液)，扎紧透析袋后，平放在水平型电泳槽两电极之间的浅层缓冲液中，100V 电泳 2-3 小时，然后正负电极交换，反向电泳 2 分钟，使透析袋上的 DNA 释放出来。吸出含 DNA 的溶液，进行酚抽提、乙醇沉淀等步骤即可完成样品的回收。

其它还有低熔点琼脂糖法、醋酸铵溶液浸出法、冷冻挤压法等,但各种方法都仅仅有利于小分子量 DNA 片段( $< 1\text{kb}$ )的回收,随着 DNA 分子量的增大,回收量显著下降。

### (三) 等电聚焦电泳技术

等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)是60年代中期间世的一种利用有pH梯度的介质分离等电点不同的蛋白质的电泳技术。由于其分辨率可达0.01pH单位,因此特别适合于分离分子量相近而等电点不同的蛋白质组分。

1. IEF的基本原理 在IEF的电泳中,具有pH梯度的介质其分布是从阳极到阴极,pH值逐渐增大。如前所述,蛋白质分子具有两性解离及等电点的特征,这样在碱性区域蛋白质分子带负电荷向阳极移动,直至某一pH位点时失去电荷而停止移动,此处介质的pH恰好等于聚焦蛋白质分子的等电点( $pI$ )。同理,位于酸性区域的蛋白质分子带正电荷向阴极移动,直到它们的等电点上聚焦为止。可见在该方法中,等电点是蛋白质组分的特性量度,将等电点不同的蛋白质混合物加入有pH梯度的凝胶介质中,在电场中经过一定时间后,各组分将分别聚焦在各自等电点相应的pH位置上,形成分离的蛋白质区带。

2. pH梯度的组成 pH梯度的组成方式有二种,一种是人工pH梯度,由于其不稳定,重复性差,现已不再使用。另一种是天然pH梯度。天然pH梯度的建立是在水平板或电泳管正负极间引入等电点彼此接近的一系列两性电解质的混合物,在正极端吸入酸液,如硫酸、磷酸或醋酸等,在负极端引入碱液,如氢氧化钠、氨水等。电泳开始前两性电解质的混合物pH为一均值,即各段介质中的pH相等,用 $pH_0$ 表示。电泳开始后,混合物中pH最低分子,带负电荷最多, $pI_1$ 为其等电点,向正极移动速度最快,当移动到正极附近的酸液界面时,pH突然下降,甚至接近或稍低于 $pI_1$ ,这一分子不再向前移动而停留在此区域内。由于两性电解质具有一定的缓冲能力,使其周围一定的区域内介质的pH保持在它的等电点范围。pH稍高的第二种两性电解质,其等电点为 $pI_2$ ,也移向正极,由于 $pI_2 > pI_1$ ,因此定位于第一种两性电解质之后,这样,经过一定时间后,具有不同等电点的两性电解质按各自的等电点依次排列,形成了从正极到负极等电点递增,由低到高的线性pH梯度,如图16-3所示。

3. 两性电解质载体与支持介质 理想的两性电解质载体应在 $pI$ 处有足够的缓冲能力及电导,前者保证pH梯度的稳定,后者允许一定的电流通过。不同 $pI$ 的两性电解质应有相似的电导系数从而使整个体系的电导均匀。两性电解质的分子量要小,易于应用分子筛或透析方法将其与被分离的高分子物质分开,而且不应与被分离物质发生反应或使之变性。

常用的pH梯度支持介质有聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶、葡聚糖凝胶等,其中聚丙烯酰胺凝胶为最常应用。电泳后,不可用染色剂直接染色,因为常用的蛋白质染色剂也能和两性电解质结合,因此应先将凝胶浸泡在5%的三氯醋酸中去除两性电解质,然后再以适当的方法染色。

### (四) 其他电泳技术

1. IEF/SDS-PAGE双向电泳法 1975年O'Farrall等人根据不同组份之间的等电点差异和分子量差异建立了IEF/SDS-PAGE双向电泳。其中IEF电泳(管柱状)为第一向,SDS-PAGE为第二向(平板)。在进行第一向IEF电泳时,电泳体系中应加入高浓度尿素、适量非离子型去污剂NP-40。蛋白质样品中除含有这两种物质外还应有二硫苏糖醇以促使蛋白质变性和肽链舒展。

IEF电泳结束后,将圆柱形凝胶在SDS-PAGE所应用的样品处理液(内含SDS、 $\beta$ -巯基乙醇)中振荡平衡,然后包埋在SDS-PAGE的凝胶板上端,即可进行第二向电泳。

IEF/SDS-PAGE双向电泳对蛋白质(包括核糖体蛋白、组蛋白等)的分离是极为精细的,因此特别适合于分离细菌或细胞中复杂的蛋白质组分。

2. 毛细管电泳 Neuhoff等人于1973年建立了毛细管均一浓度和梯度浓度凝胶用来分析微量蛋白质的方法,即微柱电泳。均一浓度的凝胶是将毛细管浸入凝胶混合物中,使凝胶充满总体积的2/3左右,然后将其嵌入约厚2mm的代用粘土垫上,封闭管底,用一支直径比盛凝胶的毛细管更细的硬质玻璃毛细管吸水铺在凝胶上。聚合后,除去水层并用毛细管加蛋白质溶液(0.1-1.0 $\mu\text{l}$ ,浓度为1-3mg/ml)于凝胶上,毛细管的空隙用缓冲液注满,切除插入粘土部分,即可电泳。

目前毛细管电泳分析仪的诞生,特别是美国生物系统公司的高效电泳色谱仪为DNA片段、蛋白质及多肽等生物大分子的分离、回收提供了快速、有效的途径。高效电泳色谱法是将凝胶电泳解析度和快速液相色谱技术溶为一体,

在从凝胶中洗脱样品时，连续的洗脱液流载着分离好的成分，通过一个联机检测器，将结果显示并打印记录。高效电泳色谱法既具有凝胶电泳固有的高分辨率，生物相容性的优点，又可方便地连续洗脱样品。

各电泳法，除另有规定外，照下述方法操作。

一、纸电泳法 1. 仪器装置 包括电泳室及直流电源两部分。常用的水平式电泳室装置如图，包括两个电泳槽 A 和一个可以密封的玻璃(或相应材料)盖 B；两侧的电泳槽均用有机玻璃(或相应材料)板 C 分成两部分；外格装有铂电极(直径 0.5~0.8cm)D；里格为可放滤纸 E 的有机玻璃电泳槽架 F，此架可从槽中取出；两侧电泳槽 A 内的铂电极 D 经隔离导线穿过槽壁与外接电泳仪电源相连。电源为具有稳压器的直流电源，常压电泳一般在 100~500V，高压电泳一般在 500~10 000V。

2. 操作法 (1) 电泳缓冲液 枸橼酸盐缓冲液(pH3.0) 取枸橼酸 (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O)39.04g 与枸橼酸钠 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O)4.12g，加水 4000ml，使溶解。(2) 滤纸 取色谱滤纸置 1mol/L 甲酸溶液中浸泡过夜，次日取出，用水漂洗至洗液的 pH 值不低于 4，置 60℃烘箱烘干，备用。可按需要裁成长 27cm、宽 18cm 的滤纸，或根据电泳室的大小裁剪，并在距长度方向一端 5~8cm 处划一起始线，每隔 2.5~3cm 处做一记号备点样用。(3) 点样 有湿点法和干点法。湿点法是将裁好的滤纸全部浸入枸橼酸盐缓冲液(pH3.0)中，湿润后，取出，用滤纸吸干多余的缓冲液，置电泳槽架上，使起始线靠近阴极端，将滤纸两端浸入缓冲液中，然后用微量注射器精密点加供试品溶液，每点 10μl，共 3 点，并留 2 个空白位置。干点法是将供试品溶液点于滤纸上，吹干、再点，反复数次，直至点完规定量的供试品溶液，然后用喷雾器将滤纸喷湿，点样处最后喷湿，本法适用于稀的供试品溶液。(4) 电泳 于电泳槽中加入适量电泳缓冲液，浸没铂电极，接通电泳仪稳压电源挡，调整电压梯度为 18~20V/cm，电泳约 1 小时 45 分钟，取出，立即吹干，置紫外光灯(254nm)下检视，用铅笔划出紫色斑点的位置。(5) 含量测定 剪下供试品斑点和与斑点位置面积相近的空白滤纸，剪成细条，分别置试管中，各精密加入 0.01mol/L 盐酸溶液 5ml，摇匀，放置 1 小时，用 3 号垂熔玻璃漏斗滤过，也可用自然沉降或离心法倾取上清液，按各药品项下的规定测定吸收度，并按吸收系数计算含量。

二、醋酸纤维素薄膜电泳法 1. 仪器装置 电泳室及直流电源同纸电泳。

2. 试剂 (1) 巴比妥缓冲液(pH8.6)取巴比妥 2.76g，巴比妥钠 15.45g，加水溶解使成 1000ml。(2) 氨基黑染色液 取 0.5g 的氨基黑 10B，溶于甲醇 50ml、冰醋酸 10ml 及水 40ml 的混合液中。(3) 漂洗液 取乙醇 45ml、冰醋酸 5ml 及水 50ml，混匀。(4) 透明液 取冰醋酸 25ml，加无水乙醇 75ml，混匀。3. 操作法 (1) 醋酸纤维素薄膜 取醋酸纤维素薄膜，裁成 2cm×8cm 的膜条，将无光泽面向下，浸入巴比妥缓冲液(pH8.6)中，待完全浸透，取出夹于滤纸中，轻轻吸去多余的缓冲液后，将膜条无光泽面向上，置电泳槽架上，经滤纸桥浸入巴比妥缓冲液(pH8.6)中。(2) 点样与电泳 于膜条上距负极端 2cm 处，条状滴加蛋白含量约 5%的供试品溶液 2~3μl，在 10~12V/cm 电位梯度下电泳。电泳区带距离以 4~5cm 为宜。(3) 染色 电泳完毕，将膜条取下浸于氨基黑染色液中，2~3 分钟后，用漂洗液浸洗数次，直至脱去底色为止。(4) 透明 将洗净并完全干后的膜条浸于透明液中 10~15 分钟，取出平铺于洁净的玻璃板上，干后即成透明薄膜，可于分光光度计上测定和作标本长期保存。(5) 含量测定 未经透明处理的醋酸纤维素薄膜电泳图可按各药品项下规定的方法测定，一般采用洗脱法或扫描法，测定各蛋白质组分的相对百分含量。洗脱法 将洗净的膜条用滤纸吸干，剪下供试品溶液各电泳图谱的电泳区带，分别浸于 1.6%的氢氧化钠溶液中，振荡数次，至洗脱完全，于一定波长下测定吸收度。同时剪取与供试品膜条相应的无蛋白部位，同法操作作对照。先计算吸收值总和，再计算各蛋白组分所占百分率。扫描法 将干燥的醋酸纤维素薄膜用色谱扫描仪通过反射(未透明薄膜)或透射(已透明薄膜)方式在记录器上自动绘出各蛋白组分曲线图，横坐标为膜条的长度，纵坐标为吸收度，计算各蛋白组分的百分含量。亦可用微机处理积分计算。

三、琼脂糖凝胶电泳法 1. 仪器装置 电泳室及直流电源同纸电泳。

2. 试剂 (1) 醋酸-锂盐缓冲液(pH3.0) 取冰醋酸 50ml，加水 800ml 混合后，用氢氧化锂调节 pH 至 3.0，再加水至 1000ml。(2) 甲苯胺蓝溶液 取甲苯胺蓝 0.1g，加水 100ml 使溶解。3. 操作法 (1) 制胶 取琼脂糖约 0.2g，加水 10ml，置水浴中加热使溶胀完全，加温热的醋酸-锂盐缓冲液(pH3.0)10ml，混匀，趁热将胶液涂布于大小适宜(2.5cm×7.5cm 或 4cm×9cm)的玻璃板上，厚度约 3mm，静置，待凝胶结成无气泡的均匀薄层，即得。(2) 标准品溶液及供试品溶液的制备 照各药品项下规定配制。(3) 点样与电泳 在电泳槽内加入醋酸-锂盐缓冲液(pH3.0)，

将凝胶板置于电泳槽架上，经滤纸桥浸入缓冲液。于凝胶板负极端分别点样 1 $\mu$ l，立即接通电源，在电压梯度约 30V/cm，电流强度 1~2mA/cm 的条件下，电泳约 20 分钟，关闭电源。(4) 染色与脱色 取下凝胶板，用甲苯胺蓝溶液染色，用水洗去多余的染色液至背景无色为止。

四、聚丙烯酰胺凝胶电泳法 1. 仪器装置 通常由稳流电泳仪和圆盘或平板电泳槽组成。其电泳室有上、下两槽，每个槽中都有固定的铂电极，铂电极经隔离电线接于电泳仪稳流挡上。

2. 试剂 (1) 溶液 A 取三羟甲基氨基甲烷 36.6g，四甲基乙二胺 0.23ml，加 0.1mol/L 盐酸溶液 48ml，再加水溶解并稀释至 100ml，置棕色瓶内，在冰箱中保存。(2) 溶液 B 取丙烯酰胺 30.0g、次甲基双丙烯酰胺 0.74g，加水溶解并稀释至 100ml，滤过，置棕色瓶内，在冰箱中保存。(3) 电极缓冲液(pH8.3) 取三羟甲基氨基甲烷 6g、甘氨酸 28.8g，加水溶解并稀释至 1000ml，置冰箱中保存，用前稀释 10 倍。(4) 溴酚蓝指示液 取溴酚蓝 0.1g，加 0.05mol/L 氢氧化钠溶液 3.0ml 与 90%乙醇 5ml，微热使溶解，加 20%乙醇制成 250ml。(5) 染色液 取 0.25%(W/V)考马斯亮蓝 G<[250]>溶液 2.5ml，加 12.5%(W/V)三氯醋酸溶液至 10ml。(6) 稀染色液 取上述染色液 2ml，加 12.5%(W/V)三氯醋酸溶液至 10ml。(7) 脱色液 7%醋酸溶液。

3. 操作法 (1) 制胶 取溶液 A 2ml，溶液 B 5.4ml，加尿素 2.9g 使溶解，再加水 4ml，混匀，抽气赶去溶液中气泡，加 0.56%过硫酸铵溶液 2ml，混匀制成胶液，立即用装有长针头的注射器或细滴管将胶液沿管壁加至底端有橡皮塞的小玻璃管(10 $\times$ 0.5cm)中，使胶层高度达 6~7cm，然后徐徐加水少量，使覆盖胶面，管底气泡必须赶走，静置约 30 分钟，待出现明显界面时即聚合完毕，吸去水层。(2) 标准品溶液及供试品溶液的制备 照各药品项下的规定。(3) 电泳 将已制好的凝胶玻璃管装入圆盘电泳槽内，每管加供试品或标准品溶液 50~100 $\mu$ l，为防止扩散可加甘油或 40%蔗糖溶液 1~2 滴及 0.04%溴酚蓝指示液 1 滴，也可直接在上槽缓冲液中加 0.04%溴酚蓝指示液数滴，玻璃管的上部用电极缓冲液充满，上端接负极、下端接正极。调节起始电流使每管为 1mA，数分钟后，加大电流使每管为 2~3mA，当溴酚蓝指示液移至距玻璃管底部 1cm 处，关闭电源。(4) 染色和脱色 电泳完毕，用装有长针头并吸满水的注射器，自胶管底部沿胶管壁将水压入，胶条即从管内滑出，将胶条浸入稀染色液过夜或用染色液浸泡 10~30 分钟，以水漂洗干净，再用脱色液脱色至无蛋白区带凝胶的底色透明为止。(5) 结果判断 将胶条置灯下观察，根据供试品与标准品的色带位置和色泽深浅程度进行判断。相对迁移率 供试品和标准品的电泳区带有时可用相对迁移率( $R'_{[m]}$ )进行比较。其计算式如下：
$$\text{相对迁移率}(R'_{[m]}) = \frac{\text{进胶端到供试品或标准品区带的距离}}{\text{进胶端到溴酚蓝区带的距离}}$$
扫描 将清晰的胶条置双波长薄层扫描仪或凝胶电泳扫描仪中扫描并积分，由各组分的峰面积计算百分含量。

五、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白分子量，是根据大多数蛋白都能与阳离子表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)按重量比结合成复合物，使蛋白分子所带的负电荷远远超过天然蛋白分子的负电荷，消除了不同蛋白分子的电荷效应，使蛋白分子相对迁移率( $R'_{[m]}$ )的大小完全取决于分子量的高低，因此可从已知分子量的标准蛋白的对数和相对迁移率所作的标准曲线中求出供试品的分子量。

1. 仪器装置 除另有规定外，同聚丙烯酰胺凝胶电泳。

2. 试剂 (1) 丙烯酰胺液 称取丙烯酰胺 22.2g 与双丙烯酰胺 0.6g，溶于 100ml 水中，贮于褐色瓶中低温保存。(2) 凝胶缓冲液 称取磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )8.82g、磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )51.55g 与十二烷基硫酸钠 2.0g，加水至 1000ml(若有沉淀析出，可加温至 37 $^\circ\text{C}$ 溶解)。(3) 电泳缓冲液 将凝胶缓冲液稀释 1 倍。(4) 染色液 称取 25mg 考马斯亮蓝 R<[250]>，溶于 57%乙醇与 9.2%醋酸混合液 100ml 中。(5) 脱色液 取无水乙醇 75ml，加冰醋酸 50ml，用水稀释至 1000ml。

3. 操作法 除下列规定外，其他均同聚丙烯酰胺凝胶电泳。(1) 制胶 用丙烯酰胺溶液-凝胶缓冲液-水-1.6%过硫酸铵溶液-四甲基乙二胺(需冷却)(10.1:15.0:3.4:1.5:0.045) 配制而成。(2) 标准蛋白溶液及供试品溶液的制备 取标准蛋白 加水制成每 1ml 中含 2~5mg 的溶液 与水解液(取尿素 21.6g 和十二烷基硫酸钠 0.04g 溶于 40ml 水中)1:3 混合，置冰箱中过夜。供试品照上述方法配制。(3) 电泳 调节电流使每管为 8mA。

4. 相对迁移率和分子量计算 将电泳脱色后的区带用卡尺或用扫描定位法测量染料移动的距离、染色前胶条长度、蛋白移动距离和脱色后的胶条长度。按下式计算相对迁移率：
$$\text{相对迁移率}(R'_{[m]}) = \frac{\text{蛋白移动的距离}}{\text{染色前的胶条长度}}$$
以  $R'_{[m]}$  为横坐标，已知分子量标准蛋白的对数为纵坐标，在半对数坐标纸上绘图，由标准曲线中查出供试品分子量。

#### 11.4. 等电聚焦电泳

等电点聚焦就是在电泳槽中放入载体两性电解质，当通以直流电时，两性电解质即形成一个由阳极到阴极逐步增加的 pH 梯度，当蛋白质放进此体系时，不同的蛋白质即移动到或聚焦于与其等电点相当的 pH 位置上，电聚焦的优点是：有很高的分辨率，可将等电点相差 0.01-0.02pH 单位的蛋白质分开；一般电泳由于受扩散作用的影响，随着时间和所走的距离加长，区带越走越宽，而电聚焦能抵消扩散作用，使区带越走越窄；由于这种电聚焦作用，不管样品加在什么部位，都可聚焦到其电点，很稀的样品也可进行分离；可直接测出蛋白质的等电点，其精确度可达 0.01pH 单位。电聚焦技术的缺点是：一是电聚焦要求用无盐溶液，而在无盐溶液中蛋白质可能发生沉淀，二是样品中的成分必需停留于其等电点，不适用在等电点不溶或发生变性的蛋白质。

电聚焦技术要求有稳定的 pH 梯度，要求极防止对流和防止已分离区带再混合的措施，其办法有三：密度梯度，聚丙烯酰胺凝胶和区带对流聚焦，以第一种方法为常用。

### 一、基本原理

(1) 人工 pH 梯度：在分离蛋白质时常用一个直立的性，以蔗糖密度梯度防止对流。当两个不同 pH 的缓冲液互相扩散时，在其混合区间即形成 pH 梯度，称为“人工 pH 梯度”。因为缓冲液是电解质，在电场中的它的离子移动会引起 pH 梯度的改变，所以不稳定。

(2) 天然 pH 梯度：这种梯度是由电流本身所引起并保持的，比较稳定，其形成过程是，当电解硫酸钠的稀溶液时，在阳极聚焦硫酸而在阴极聚焦氢氧化钠。若将一些两性电解质放入槽中，则它们在阳极的酸性介质中就会得到质子而带正电，在阴极的碱性介质中则失掉质子而带负电，这样就会受其附近的电极所排斥而向相反方向移动。设其中有一个酸性最强的两性电解质（甲），当它由阴极逐渐接近阳极的硫酸时，就会失去电荷而停止运动，（甲）所在的位置就是它的等电点，另有一个等电点稍高于（甲）的物质（乙），当向阳极运动靠近（甲）时，它不能超过（甲），因为那里低于它的等电点。于是（乙）将带正电荷而向阴极移动，它只能排要（甲）的阴极侧。假如有很多两性电解质，它们就会按照等电点由低到高的顺序依次排列，形成一个由阳极向阴极逐步升高的平稳的 pH 梯度，此梯度的进程取决于两性电解质的 pH 值，浓度和缓冲性质。防止对流的情况下，只要电流稳定，这个 pH 梯度将保持不变。

(3) 两性电解质互相分离的条件：上述经验甲乙两物质形成两个相邻的不同 pH 的等电点层，因为在它们中间不能形成纯水层，所以它们不是完全分离开的，中间部分互相扩散，互相粘连。要使两物质完全分开，中间必须有一个介于其间 pH 值的物质，例如，当甲乙两物质的 pH 值正好一个在 7 以下，一个在 7 以上，即可以分开，因为中间形成了纯水层（pH=7），这时水是作为一个两性电解质而存在。

(4) 蛋白质的电聚焦分离：蛋白质及多肽是两性电解质，它们比氨基酸更适于电聚焦，因为它们在等电点附近仍有电荷而能进行电迁移，大部分中性氨基酸在接近等电点时就失去电荷而停止运动，不能过到真正的等电点。但在没有第三种居间两性电解质存在时也不能将两种蛋白质完全分开，必须有很多不同 pH 值的是电解质（载体两性电解质）才能解决这个问题。

### 二、载体两性电解质

(1) 载体两性电解质必需具备的条件：

(i) 在等电点处必需有足够的缓冲能力，以便能控制 pH 梯度，而不致被样品蛋白质或其他两性物质的缓冲能力改变 pH 梯度的进程。

(ii) 在等电点必需的足够高电导，以便使一定的电流通过，而且要求具备不同 pH 值的载体有相同的电导系数，使整个体系中的电导均匀，如果有局部电导过小，就会产生极大的电位降，从而其他部分电压就会太小，以致不能保持梯度，也不能使应聚焦的成分进行电迁移，达到聚焦。

(iii) 分子量要小，便于与被分离的高分子物质用透析或凝胶过滤法分开。

(iv) 化学组成应不同于被分离物质，不干扰测定。

(v) 应不与分离物质反应或使之变性。总起来说，当一个两性电解质的等电点介于两个很近的 pK 值之间时，它在等电点的解离度大，缓冲能力强，而且电导系数高，这就是好的载体两性电解质。

(2) 理想的载体两性电解质的合成：

用具有几个 pH 值很相近的多乙烯多胺（如五乙烯六胺）为原料，与不饱和酸（如丙烯酸）发生加合反应：加合反应优先加在  $\alpha$ 、 $\beta$  饱和酸的  $\beta$  碳原子上，调节胺和酸的比例可以加上一个或多个羧基，这种合成方法与一般有机合成不同，有机合成一般要求合成的产物愈纯愈好，而这里要求合成出的产物愈复杂愈好，要有多异构物和同系物，以保证的很多具有不同而又互相接近的 pK 值和 pI 值，从而得到平滑的 pH 梯度。载体两性电解质的等电点在 pH3-10 的范围，分子量在 300-1000 之间，它们的缓冲能力等于或优于组氨酸，电导性能良好，可以使电场强度

分布较均匀，它们的水溶性良好，在 1%水溶液中的紫外吸收值（260m $\mu$ ）很低。

### 三、密度梯度等电点聚焦

#### （一）密度梯度

密度梯度是用以防止对流保持 pH 梯度，避免已分离物质再混合的重要措施则由重溶液和轻溶液以梯度混合形成。用做密度梯度的溶质应具有以下条件：溶解度高，粘度低；密度大，得到的密度差不低于 0.12 克/厘米<sup>3</sup>，不与样品蛋白质起反应，不解离。最常用的是蔗糖（分析纯），它对蛋白质不仅无害还有保护作用。重溶液含蔗糖 50%（W/V），这时柱上和柱下最大密度差为 0.2 克/厘米<sup>3</sup>，浓度太高则粘度过大适用。蔗糖在高 pH 值时会分解，影响 pH 梯度及 pI 值测定，这种情况下可改用甘油，也可用甘露醇，山梨醇，右旋糖酐等。

#### （二）pH 梯度的选择

在测定未知蛋白时，可先采用 pH3-10 的载体，经初步测定后改用较窄的以提高分辨率，在使用 pH7 以上或以下范围时，因缺少中性载体，在聚焦过程中载体与电极之间在 pH7 部位就会形成纯水区带，纯水的电导极低，必须避免此现象。凡使用离开中性的 pH 范围的载体时应加入相当于 0.1 载体量的 pH6-8 或 pH3-10 的载体。在用 pH 低于 3 的范围时，可加有机酸如一氯醋酸，二氯醋酸，甲酸，乙酸，pH 离于 10 时，可补加胺使 pH 增加到 11。载体在 pH6 附近电导较低，可以与蔗糖密度梯度互相补偿，蔗糖浓度高时电导低，所以可把 pH6 电导低部位放在柱上部，也就是用 pH6 以下范围时，阴极在上，而用 pH6 以上范围时，阳极在上方。

#### （三）蛋白质样品及分离容量

电聚焦有高的分辨力，一般样品不需提纯，分析上可用来测定混合物中某一成分的相对比例：如大量提纯蛋白质，则应预先初步提纯。有些物质（如核酸）聚焦时会沉淀，应预先除去。蛋白质应不含盐，因盐浓度高电流大，易发热，而且盐离子迁移至两极产生酸碱，占据了分离的有效部位。加样体积不受限制，最高可达 80-85 毫升。等电点聚焦的分离容量受下列几个因素影响：聚焦后每一区带的蛋白量取决于密度梯度所能支持的蛋白质，提高密度可以提高分离容量；容量与区带高度的平方成正比，降低电压可使区带变宽，提高容量，但分辨率降低，聚焦时间长，用窄的 pH 梯长范围可以使区带变宽，提高分辨率。用 110 毫升柱时，每一区带蛋白质含量最高可达 20-25 毫克，由于粗蛋白样品可分为很多区带，所以总量可以加至几百毫克；分离的容量与柱的横截面成正比，用 440 毫克柱时，可加粗蛋白质 5 克，每一区带可达一克。

## 11.5. 双向电泳的样品的制备

### 样品制备原则

样品制备是双向电泳中最关键的一步，将直接影响 2-DE 结果好坏。目前并没有一个通用的样品制备方法，尽管处理方法多种多样，但都遵循几个基本的原则：1）尽可能的提高样品蛋白的溶解度，抽提最大量的总蛋白，减少蛋白质的损失；2）减少对蛋白质的人为修饰；3）破坏蛋白质与其他生物大分子的相互作用，并使蛋白质处于完全变性状态。

根据这一原则，样品制备需要四种主要的试剂：离液剂 chaotropes，主要包括尿素（Urea）和硫脲（thiourea）；表面活性剂（surfactants），也称去垢剂，如 CHAPS 与 Zwittergent 系列等两性离子去垢剂；还原剂（reducing agents），最常用的是二硫苏糖醇（DTT）和磷酸三丁酯（TBP）等。当然，也可以选择性的加入 Tris-base，蛋白酶抑制剂以及核酸酶。

样品的来源不同，其裂解的缓冲液也各不相同。通过不同试剂的合理组合，以达到对样品蛋白的最大抽提。在对样品蛋白质提取的过程中，必须考虑到去除影响蛋白质可溶性和 2DE 重复性的物质，比如核酸、脂、多糖等大分子以及盐类小分子。大分子的存在会阻塞凝胶孔径，盐浓度过高会降低等电聚焦的电压，甚至会损坏 IPG 胶条，这样都会造成 2-DE 的失败。样品制备的失败很难通过后续工作的完善或改进获得补偿。

核酸的去除可采用超声或核酸酶处理，超声处理应控制好条件，并防止产生泡沫；而加入的外源核酸酶则出现在最终的 2D 胶上。脂类和多糖都可以通过超速离心除去。透析可以降低盐浓度，但时间太长；也可以采取凝胶过滤或沉淀/重悬法脱盐，但会造成蛋白质的部分损失。

因此，样品制备方法必须根据不同的样品、所处的状态以及实验目的和要求来进行选择。目前有很多方法适于 2-DE，如组织或细胞的总蛋白提取物、亚细胞组份或细胞器蛋白、免疫沉淀的蛋白及其它亚组份蛋白（如磷酸化蛋白、采用亲和纯化凝集素结合蛋白等）。

### 一、细胞样品

1. 细胞培养，加药与处理。
2. 胰酶消化贴壁细胞，PBS 漂洗 3 次(1500g，5min)，弃上清，再次离心，去尽残液（**非常重要!**）。如要比较细胞膜蛋白组的差别，最好用细胞刮收获细胞。如用 10mM Tris/ 250 mM Sucrose(pH 7.0)代替 PBS，可有效降低样品的盐浓度。

加入 5 倍体积裂解液，混匀（或将  $1 \times 10^6$  细胞悬于 60~100 $\mu$ l 裂解液中）。

3. 加 50ug/ml RNase 及 200ug/ml Dnase，在 4°C 放置 15 分钟。
4. 15,000 转，4°C 离心 60 分钟（或 40,000 转，4°C 离心 30 分钟）。
5. 收集上清。
6. 测定蛋白浓度(采用 BioRad RC/DC protein assay kit)。
7. 分装样品，冻存于 -70°C。

## 二、组织样品

1. 碾钵碾磨组织，碾至粉末状。
2. 将适量粉末状组织转移至匀浆器，加入适量裂解液，进行匀浆。
3. 加 50ug/ml RNase 及 200ug/ml DNase，在 4°C 放置 15 分钟。
4. 15,000 转，4°C 离心 60 分钟（或 40,000 转，4°C 离心 30 分钟）。
5. 收集上清，测定蛋白浓度。
6. 分装样品，冻存于 -70°C。

### 注意事项：

1. 8 mmol/L PMSF 必须在添加还原剂之前用，否则 PMSF 会失去活性。
2. 40 mmol/L 浓度以下的 Tris 可使有些蛋白酶在高 pH 值下失活。
3. 细胞清洗大多用 PBS，若 PBS 残留于细胞表面会造成胶上出现水平条纹，则可利用(10 mmol/L Tris, 250 mmol/L sucrose pH 7.0)来解决此问题。

## 11.6. 双向电泳操作步骤

### 水化上样(被动上样)

1. 从冰箱中取出 IPG 胶条，室温放置 10min。
2. 沿水化盘槽的边缘从左向右线性加入样品，槽两端各 1cm 左右不加样，中间的样品液一定要连贯。**注意**：不要产生气泡，否则会影响胶条中蛋白质的分布。
3. 用镊子轻轻撕去 IPG 胶条上的保护层。**注意**：碱性端较脆弱，应小心操作。
4. 将 IPG 胶条胶面朝下轻轻置于水化盘中样品溶液上。**注意**：不要将样品溶液弄到胶条背面，因为这些溶液不会被胶条吸收；还使胶条下面的溶液产生气泡。如产生了气泡，用镊子轻轻地提起胶条的一端，上下移动胶条，直到气泡被赶走。
5. 放置 30~45min 大部分样品被胶条吸收，沿着胶条缓慢加入矿物油，每根胶条约 3ml(17cm IPG)，防止胶条水化过程中液体蒸发。
6. 置等电聚焦仪于 -20°C 水化 11~15h。

### 第一向 等电聚焦

1. 将纸电极置于聚焦盘的正负极上，加 ddH<sub>2</sub>O 5~8 $\mu$ l 润湿。
2. 取出水化好的胶条，提起一端将矿物油沥干，胶面朝下，将其置于刚好润湿的滤纸片上杂交以去除表面上的不溶物。
3. 将 IPG 胶条胶面朝下置于聚焦盘中，胶条的正极（标有+）对应于聚焦盘的正极，确保胶条与电极紧密接触。
4. 在每根胶条上覆盖 2-3ml 矿物油。
5. 对好正、负极，盖上盖子。设置等电聚焦程序。
6. 聚焦结束的胶条，立即进行平衡、第二向 SDS-PAGE 电泳。或将胶条置于样品水化盘中，-20°C 冰箱保存，电泳前取出胶条，室温放置 10 分钟，使其溶解。

### 第二向 SDS-PAGE 电泳

1. 配制 12% 的丙烯酰胺凝胶。

2. 待凝胶凝固后，倒去分离胶表面的 MilliQ 水、乙醇或水饱和正丁醇，用 MilliQ 水冲洗。
3. 配制胶条平衡缓冲液 I
4. 在桌上先放置干的厚滤纸，聚焦好的胶条胶面朝上放在干的厚滤纸上。将另一份厚滤纸用 MilliQ 水浸湿，挤去多余水分，然后直接置于胶条上，轻轻吸干胶条上的矿物油及多余样品，这样可以减少凝胶染色时出现的纵条纹。
5. 将胶条转移至样品水化盘中，加入 6ml(17cm IPG)平衡缓冲液 I，在水平摇床上缓慢摇晃 15 分钟。
6. 配制胶条平衡缓冲液 II。
7. 第一次平衡结束后，取出胶条将之竖在滤纸上沥去多余的液体，放入平衡缓冲液 II 中，继续在水平摇床上缓慢摇晃 15 分钟。
8. 用滤纸吸去 SDS-PAGE 胶上方玻璃板间多余的液体，将二向凝胶放在桌面上，凝胶的顶部面对自己。
9. 将琼脂糖封胶液加热溶解。
10. 在 100ml 量筒中加入 TGS 电泳缓冲液。
11. 第二次平衡结束后，取出胶条，用滤纸吸去多余的平衡液（将胶条竖在滤纸上，以免损失蛋白或损坏凝胶表面）。
12. 用镊子夹住胶条的一端使胶面完全浸末在 1×电泳缓冲液中漂洗数次。
13. 将胶条背面朝向玻璃板，轻轻放在长玻板上，加入低熔点琼脂糖封胶液。
14. 用适当厚度的胶片，轻轻地胶条向下推，使之与聚丙烯酰胺凝胶胶面完全接触。**注意:**不要在胶条下方产生气泡，应推动凝胶背面的支撑膜，不要碰到胶面。
15. 放置 5 分钟，使低熔点琼脂糖封胶液凝固。
16. 打开二向电泳制冷仪，调温度为 15°C。
17. 将凝胶转移至电泳槽中，加入电泳缓冲液，接通电源，起始时用的低电流（5mA~10mA/gel/17cm），待样品在完全走出 IPG 胶条，浓缩成一条线后，再加大电流（20-30mA/gel/17cm）待溴酚蓝指示剂达到底部边缘时即可停止电泳。
18. 电泳结束后，轻轻撬开两层玻璃，取出凝胶，并切角以作记号（戴手套，防止污染胶面）。
19. 进行染色。

## 11.7. SDS-PAGE 胶染色

### 一、各种蛋白染色方法的灵敏度比较

染色方法	灵敏度	与质谱的兼容性
Silver	1-10ng	-
Silver (MS compatible)	10ng	+
Comassie G-250 or R-250	>30ng	+
Antibody (Western blot)	1ng	-

### 二、考马斯亮蓝染色

#### CBB 染色液

0.5%考马斯亮蓝 G250 或 R250

40%甲醇

10%乙酸

将 CBB 溶于甲醇中并不停的搅拌 15min。加入乙酸与 ddH<sub>2</sub>O

脱色液：30%甲醇

10%乙酸

染色方法：1.在摇床上染色 30min.

2.脱色至蛋白点或条带清晰可见

3. ddH<sub>2</sub>O 洗 3-5 次

### 三、胶体考马氏亮蓝染色 Colloidal Coomassie Staining ( Cambridge centre for proteomics )

sensitivity = ~100ng

1. 固定：甲醇/醋酸/H<sub>2</sub>O(45:1:54)至少 20min.
2. 染色 12-18hr。  
染色液： 17% (w/v) 硫酸铵  
34%甲醇  
0.5%醋酸  
0.1% (w/v) Coomassie G250
3. 脱色：用 H<sub>2</sub>O 脱色至蛋白点和背景清晰.

### 11.8. 双向电泳蛋白点的切取和保存

1. 用 PDQuest 软件或肉眼比对，找出感兴趣的蛋白点，并做好标记和记录。
2. 用 MilliQ 水冲洗胶 2 次。
3. 用色谱纯甲醇和 MilliQ 水冲洗 Ep 管
4. 将枪头(200μl)下端剪去，使其内径略小于蛋白斑点的直径，用色谱纯甲醇和 MilliQ 水冲洗枪头。
5. 对准斑点中央小心将蛋白切割下来，放入 Ep 管，MilliQ 水漂洗 2 次，如胶块太大，将其切成 1 x 1 mm 的胶片。
6. 将切好的点做好标记和记录，置 -80°C 保存或冻干后 -20°C 存放。

#### 注意事项：

1. 尽量避免皮肤和头发的角蛋白的污染，在操作过程中应戴一次性的 PE 手套（不用乳胶手套）和帽子。
2. 不要将胶长期存放于乙酸溶液中。
3. Ep 管及染胶的容器必须用甲醇和水充分清洗，尤其应与进行 Western blotting 的容器分开，以避免 casein 或 BSA 的污染。

### 11.9. 数据库搜索(Databases search)

一般来说,利用质谱数据鉴定蛋白质主要有两种方法:肽质量指纹图谱( PMF )和肽序列标签分析( sequence tag analysis )。这两种方法较传统的 N 端测序或内部 Edman 测序法敏感数百倍,其检测低限为飞摩尔( fmol )水平(如银染的 2D 胶点或 1D 胶带)。然而,足够多的样品蛋白量可以增加识别的成功率,这是因为增大样品蛋白量可以克服一些污染物的干扰(如角蛋白,在样品中的存在非常常见)。数据库的检索是利用计算机程序算法将实验测得的肽质量数据与蛋白质序列数据库中的蛋白质的肽质量计算值进行相关性比较分析,从而得出可能蛋白质的概率并将相关性最好的结果排序,这是凝胶分离蛋白质鉴定的最常用手段。

这种检索途径有一个明显的限制,就是被鉴定的蛋白质必须在序列数据库(蛋白质数据库和核酸序列翻译数据库)中存在。PMF 检索鉴定蛋白质是依据实验中获得蛋白质的多个肽段质量数据与同一蛋白质肽段质量理论计算值的之间的相关性比较。因此,这一技术不适用于检索 EST 翻译序列,也不适用于鉴定蛋白质的混合物。而肽序列标签分析( sequence tag analysis )可适用于检索 EST 数据库。

对 PMF 数据,主要搜索 Swiss Prot (速度快但不全面)和 NCBI (速度虽慢但包含更多的信息)数据库。如果你认为你的蛋白质可能为新的蛋白质,选择 NCBI 数据库,标准搜索选择 Swiss Prot 数据为好。如果需要,也可搜索 EST 数据库(用 MS/MS 数据按搜索更有效)。

#### 检索条件的设置与结果判断：

1. 肽片段质量选择在 800-4000Da 范围。
2. 氨基酸残基的修饰( Modifications ): 半胱氨酸为脲甲基半胱氨酸( Carbamidomethyl-Cys ), 蛋氨酸选择可变修饰—氧化。
3. 最大允许的肽质量误差( Mass Tolerances ), 与仪器性能和数据质量有关,一般设为 ±0.1Da, 最大为 ±0.5Da, 质量误差愈小, 搜索的特异性愈高。
4. 不完全酶解位点数目( Missed cleavages ): 每个肽允许有 2 个不完全裂解位点, 一般选 1 (如果蛋白充分变性且酶解完全)。
5. 参考蛋白质表观分子量和等电点, 表观 PI 误差范围为 ±0.5pH, 表观 Mr 误差为范围为 ±20%。一般情况下不选此项, 在判读结果时参考。
6. 物种选择: 限定物种。

7. 离子选择：[M+H]<sup>+</sup>，单同位素
8. 最少匹配肽片段规定为 4。

### 11.10. 主要的公共数据库及网址

Mascot

<http://www.matrixscience.com/home.html>

MOWSE

<http://www.seqnet.dl.ac.uk/Bioinformatics/Webapp/mowse/>

Peptide Search

<http://www.mann.embl-heidelberg.de/Services/PeptideSearch/>

Protein Prospector

<http://prospector.ucsf.edu/>

Prowl

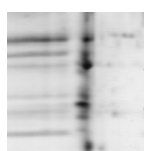
<http://prowl.rockefeller.edu/>程序：ProFound ( [www.expacy.ch](http://www.expacy.ch) )

EXPASY 中国镜像站点 ( BI peptident )

<http://www.pku.edu.cn>

### 11.11. 双向电泳常见问题与原因

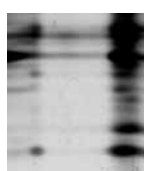
#### IEF



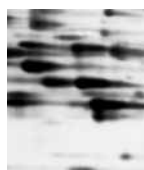
Too much salt in the sample (disturbs IEF)  
acetone precipitation to remove salts and other contaminants



Charged impurities in the sample  
acetone precipitation to remove salts and other contaminants

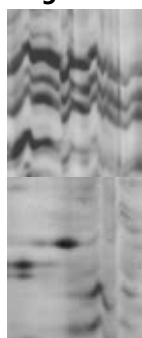


Impurities in the sample or rehydration solution  
acetone precipitation to remove salts and other contaminants  
Prepare new rehydration solution



Lower pH left (e.g. pH 4-7): overfocused  
Lower pH right (e.g. pH 7-4): underfocused  
Prolong or lower the focusing time of the IEF

#### SDS-PAGE, staining

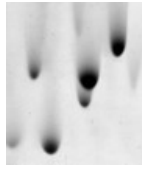


Gel surface during polymerization not overlaid with water (or too low amount of water used)

Apply at least 1 ml to overlay the gel surface

No uniform gel polymerization (e.g. impurities at gel cassettes, air bubbles in the polymerized gel)

Clean gel cassettes with ethanol



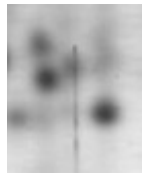
Cast the slab gel slowly (approx. 1 min)  
Overlay the gel carefully with distilled water  
Not all proteins (especially high molecular mass proteins)  
saturated with SDS

Use 0.15 % instead of 0.1 % (w/ v) SDS in the 1 x SDS  
buffer for SDS-PAGE



High sample load (protein disturbs of other spots or may not  
be fully saturated with SDS)

Lower the protein amount



Impurities on or within the 2-D gel still present during silver  
staining

Clean the gel cassettes prior casting with ethanol  
Incubate the 2-D gels long enough (and with at least  
100 ml/ gel) in fixing and washing solution prior staining

## 11.12. 蛋白质的序列分析流程

### 1 蛋白质序列的检索

1.1 从 NCBI 检索蛋白质序列

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?db=Protein>

1.2 利用 SRS 系统从 EMBL 检索蛋白质序列

<http://srs.ebi.ac.uk/>

### 2 蛋白质序列的基本性质分析

2.1 蛋白质序列的信号肽分析

<http://genome.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>

<http://genome.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

2.2 蛋白质序列的跨膜区分析

<http://genome.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-1.0/>

[http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)

2.3 蛋白质序列的亚细胞定位分析

[http://predict.sanger.ac.uk/nnpsl/nnpsl\\_mult.cgi](http://predict.sanger.ac.uk/nnpsl/nnpsl_mult.cgi)

### 3 蛋白质序列的同源性分析

3.1 基于 NCBI/Blast 软件的蛋白质序列同源性分析

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>

3.2 基于 WU/Blast2 软件的蛋白质序列同源性分析

<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/>

3.3 基于 FASTA 软件进行蛋白质序列同源性分析

<http://www2.ebi.ac.uk/fasta3>

3.4 两条蛋白质序列之间的同源性分析

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>

### 3.5 蛋白质序列的批量联网同源性分析

## 4 蛋白质序列的结构功能域分析

### 4.1 蛋白序列的 motif 和 Prosite 分析

[http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN\\_form.html](http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN_form.html)

### 4.2 蛋白质的结构功能域分析

<http://smart.embl-heidelberg.de/>

<http://www.ebi.ac.uk/interpro/interproscan/ipsearch.html>

## 5 蛋白质家族分析及其进化树的构建(方案)

### WEB RESOURCES FOR PROTEIN SCIENTISTS

<http://www.faseb.org/protein/docs/WWWResources.html>

蛋白质数据库(Protein databank, PD)由美国自然科学基金会、能源部和国立卫生研究院共同投资建立,主要由 X-射线晶体衍射和核磁共振(NMR)测得的生物大分子三维结构所组成,用户可直接查询、调用和观察库中所收录的任何大分子三维结构。该数据库同时提供蛋白质序列及其三维空间晶体学原子坐标。其中受体-配体、抗原-抗体、底物-酶复合物等相互作用分子的共结晶图谱是基于同源比较的分子设计所需的最佳模型,因此 PDB 数据库为初步的蛋白质合理设计提供了重要的知识来源。由于 PDB 主要由生物大分子三维结构所组成,它具有以下几种功能:

- (1)能够查找目的蛋白质的结构;
- (2)可进行一级或高级结构的简单分析;
- (3)与互联网上的其它一些数据库,如 GDB、GenBank、SWISS-PROT、PIR 等链接,从而可查询蛋白质的其它信息;
- (4)可下载有关结构信息以供进一步使用。可通过关键词,PDB 标识符等进行查询。

在序列分析中,PDB 主要可应用于蛋白质结构预测和结构同源性比较。其中 NRL-3D 数据库则是 PDB 数据库中所有蛋白质序列的信息。该数据库允许进行基于结构的序列比较,网址为:<http://www.rcsb.org/pdb/>。

### 11.13. 聚丙烯酰胺凝胶的配制

表 1 配制 Tris-甘氨酸 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶所用溶液

溶液成分	不同体积 ( ml ) 凝胶液中各成分所需体积 ( ml )							
	5	10	15	20	25	30	40	50
6%								
水	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30%丙烯酰胺溶液	1	2	3	4	5	6	8	10
1.5 mol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸氨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8%								
水	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
30%丙烯酰胺溶液	1.3	2.7	4	5.3	6.7	8	10.7	13.3
1.5 mol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸氨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10%								
水	1.9	4	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30%丙烯酰胺溶液	1.7	3.3	5	6.7	8.3	10	13.3	16.7

1.5 mol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸氨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12%								
水	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30%丙烯酰胺溶液	2	4	6	8	10	12	16	20
1.5 mol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸氨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%								
水	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30%丙烯酰胺溶液	2.5	5	7.5	10	12.5	15	20	25
1.5 mol/L Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10%过硫酸氨	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

表 2 配制 6% Tris-甘氨酸 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳 5%积层胶所用溶液

溶液成分	不同体积 ( ml ) 凝胶液中各成分所需体积 ( ml )								
	1	2	3	4	5	6	8	10	
水	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8	
30%丙烯酰胺溶液	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1	1.3	1.7	
1.5 mol/L Tris (pH8.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	0	1.25	
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1	
10%过硫酸氨	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1	
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01	

#### 11.14. 双向电泳常用溶液配方

##### A. 水化/上样缓冲液(rehydration/sample lysis buffer)

###### 水化上样缓冲液 ( I ) 1ml

urea	8M	0.48g
CHAPS	4%	40mg
DTT	50~65mM	7~9.8mg
or TBP	2mM	10 $\mu$ l
40% Bio-Lyte	0.2%(w/v)	5 $\mu$ l
1%溴酚蓝	0.001%	1 $\mu$ l
MilliQ水		650 $\mu$ l

###### 水化上样缓冲液 ( II )

1ml

urea	7M	0.42g
thiourea	2M	0.152g
CHAPS	4%	40mg
DTT	50~65mM	7~9.8mg

or TBP	2mM	10 $\mu$ l
40% Bio-Lyte	0.2%(w/v)	5 $\mu$ l
1%溴酚蓝	0.001%	1 $\mu$ l
MilliQ水		650 $\mu$ l

1. 水化上样缓冲液 ( I ) 中的尿素浓度可以调高到9或者9.8M ; 用7M Urea和2M Thioiurea溶解蛋白的能力较单用尿素强。
2. 目前常用的去垢剂为CHAPS , 也可用Triton X-100、 NP-40等代替。
3. 可以加蛋白质酶的抑制剂和/核酸酶。
4. 还原剂可用DTT或TBP , 分离碱性蛋白时最好用TBP。
5. 5溴酚蓝作为指示剂 , 可以监测上样和聚焦过程 , 如操作熟练 , 可以不加。 .

#### B . 溴酚蓝储液

	Final concentration	Amount
Bromophenol blue	1%	10mg
Tris-base	50mM	6mg
MilliQ H <sub>2</sub> O		to 1ml

#### C. 胶条平衡液贮存液 ( SDS equilibration buffer )

(50mM Tris-cl pH8.8, 6M Urea, 30% glycerol, 2% SDS, bromophenol blue, 200ml)

	Final concentration	Amount
1.5M Tris-cl,pH8.8	50mM	6.7ml
Urea (Fw 60.06)	6M	72.07g
Glycerol(87% v/v)	30%(v/v)	69ml
SDS(Fw 288.38)	2%(w/v)	4.0g
1%Bromophenol blue solution	0.002%(w/v)	400 $\mu$ l
		<b>To 200ml</b>

分装后贮存于-20 $^{\circ}$ C ; 溴酚蓝可以不加 ;

用之前加DTT(20mg/ml)或者碘乙酰胺(25mg/ml)。

#### D. 10% (v/v)SDS溶液

SDS(Fw 288.38)	10.0g
MilliQ H <sub>2</sub> O	<b>To 100 ml</b>

用0.45微米的滤纸过滤室温保存(高纯试剂一般不用过滤)

#### E. 聚丙烯酰胺单体贮存液 ( Monomer stock solution )

	Final concentration	Amount
Acrylamide	30%	150g
N,N' -methylenebisacrylamide or PDA	0.8%	4.0g 5.0g
MilliQ H <sub>2</sub> O		<b>To 500ml</b>

用0.45微米的滤纸过滤(可不过滤), 4 $^{\circ}$ C避光保存

#### F. 4x分离胶溶液(4x Resolving gel buffer, 1.5M Tris-Cl pH8.8)

	Final concentration	Amount
--	---------------------	--------

Tris-base(Fw 121.1) MilliQ H <sub>2</sub> O HCl(Fw 36.46)	1.5M	181.5g 750ml Adjust to pH8.8
MilliQ H <sub>2</sub> O		<b>To 1000ml</b>

用0.45微米的滤纸过滤，4℃保存

#### G. 10%过硫酸铵

	Final concentration	Amount
Ammonium persulphate(APS) MilliQ H <sub>2</sub> O	10%	1g To 10ml

当加入水时，新鲜的过硫酸铵会发出“咔嚓”声音。如果没有声音，则需要换新的药品。可少量(10ml)配制，分装后4℃保存。

#### H. 电泳缓冲液 ( TGS electrophoresis buffer )

(25mM Tris,192 mM glycine, 0.1%SDS)

	Final concentration	Amount	
Tris base	25 mM	15.1g	7.55g
Glycine	192mM	72.1g	36.05g
SDS	0.1%(w/v)	5.0g	2.5g
MilliQ H <sub>2</sub> O		<b>To 5000ml</b>	<b>To 2500ml</b>

该溶液的pH值不需调整，可直接在大试剂瓶中配制溶液，室温保存。

#### J. 琼脂糖封胶液 ( Agrose sealing solution )

	Final concentration	Amount
TGS electrophoresis buffer	---	50ml
Agrose (NA or M)	0.5%	0.25g
1% Bromophenol blue	0.002%(w/v)	100μl

可在锥形瓶配制，微波炉加热融化。小份分装，室温保存。

## 12. 光滑球拟酵母相关参数测定

### 12.1. 细胞干重

吸取 0.1ml 发酵液，加入已含有 1 ml 2 mol/L HCl 的 10mL 容量瓶中，定容后以水为空白，在 660 nm 处测定 OD 值。然后根据 1 OD=0.23 g/L 细胞干重的换算关系，计算得出细胞干重。

注：Shimaduz UV-120-02 分光光度计。

### 12.2. 丙酮酸酶法测定方法

标准反应体系 ( 3.5 mL ) 中含有 0.1 mol/L 磷酸钾 ( pH 7.5 )，缓冲液 2.3 ml，50 U/ml 乳酸脱氢酶 ( LDH ) 0.1 ml，50 umol/L NADH 二钠盐 1.0 ml 和经过适当稀释的样品溶液 0.1 ml。空白中不含样品，磷酸钾溶液加量为 2.4 ml。根据 340 nm 处 OD 值的减少计算丙酮酸质量浓度。

### 12.3. 丙酮酸和 $\alpha$ -KG 浓度 HPLC 测定方法

StableBond C18 反相柱，柱温 28°C

检测波长： UV 210 nm

流动相： 0.1%(V/V) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 或 0.7

流速： 1.0 ml/min

进样体积： 10  $\mu$ L

100\*10/11\*0.99=85 g/L

## 13. 微生物生理

### 13.1. 细菌的生物化学试验

各种细菌具有各自独特的酶系统，因而对底物的分解能力不同，其代谢产物也不同。用生物化学方法测定这些代谢产物，可用来区别和鉴定细菌的种类。利用生物化学方法来鉴别不同细菌，称为细菌的生物化学试验或称生化反应。生物化学试验的方法很多，主要有以下几类。

#### 一、碳水化合物的代谢试验

##### 1. 糖（醇、苷）类发酵试验

(1)原理：不同种类细菌含有发酵不同糖（醇、苷）类的酶，因而对各种糖（醇、苷）类的代谢能力也有所不同，即使能分解某种糖（醇、苷）类，其代谢产物可因菌种而异。检查细菌对培养基中所含糖（醇、苷）降解后产酸或产酸产气的能力，可用以鉴定细菌种类。

(2)方法：在基础培养基中（如酚红肉汤基础培养基 pH7.4）加入 0.5~1.0%（w/v）的特定糖（醇、苷）类。所使用的糖（醇、苷）类有很多种，根据不同需要可选择单糖、多糖或低聚糖、多元醇和环醇等，见表 6-4-1。将待鉴定的纯培养细菌接种入试验培养基中，置 35°C 孵育箱内孵育数小时到两周（视方法及菌种而定）后，观察结果。若用微量发酵管，或要求培养时间较长时，应注意保持其周围的湿度，以免培养基干燥。

(3)结果：能分解糖（醇、苷）产酸的细菌，培养基中的指示剂呈酸性反应（如酚红变为黄色），产气的细菌可在小倒管（Durham 小管）中产生气泡，固体培养基则产生裂隙。不分解糖则无变化。

(4)应用：糖（醇、苷）类发酵试验，是鉴定细菌的生化反应试验中最主要的试验，不同细菌可发酵不同的糖（醇、苷）类，如沙门菌可发酵葡萄糖，但不能发酵乳糖，大肠埃希菌则可发酵葡萄糖和乳糖。即便是两种细菌均可发酵同一种糖类，其发酵结果也不尽相同，如志贺菌和大肠埃希菌均可发酵葡萄糖，但前者仅产酸，而后者则产酸、产气，故可利用此试验鉴别细菌。

表 6-4-1 常用于细菌糖发酵试验的糖、醇类

单糖	四碳糖：赤藓糖，五碳糖：核糖 核酮糖 木糖 阿拉伯糖，六碳糖：葡萄糖 果糖 半乳糖 甘露糖
双糖	蔗糖（葡萄糖 + 果糖） 乳糖（葡萄糖 + 半乳糖） 麦芽糖（两分子葡萄糖）
三糖	棉子糖（葡萄糖 + 果糖 + 半乳糖）
多糖	菊糖（多分子果糖） 淀粉
醇类	侧金盏花醇 卫茅醇 甘露醇 山梨醇
非糖类	肌醇

##### 2. 葡萄糖代谢类型鉴别试验

(1)原理：细菌在分解葡萄糖的过程中，必须有分子氧参加的，称为氧化型；能进行无氧降解的为发酵型；不分解葡萄糖的细菌为产碱型。发酵型细菌无论在有氧或无氧环境中都能分解葡萄糖，而氧化型细菌在无氧环境中则不能分解葡萄糖。本试验又称氧化发酵（O/F 或 Hugh - Leifson, HL）试验，可用于区别细菌的代谢类型。

(2)方法：挑取少许纯培养物（不要从选择性平板中挑取）接种 2 支 HL 培养管中，在其中一管加入高度至少为 0.5cm 的无菌液体石蜡以隔绝空气（作为密封管），另一管不加（作为开放管）。置 35°C 孵育箱孵育 48h 以上。

(3)结果：两管培养基均不产酸（颜色不变）为阴性；两管都产酸（变黄）为发酵型；加液体石蜡管不产酸，不加液体石蜡管产酸为氧化型。

(4)应用：主要用于肠杆菌科与其它非发酵菌的鉴别。肠杆菌科、弧菌科细菌为发酵型，非发酵菌为氧化型或产碱型。也可用于鉴别葡萄球菌（发酵型）与微球菌（氧化型）。

### 3. 甲基红（MR）试验

(1)原理：某些细菌在糖代谢过程中，分解葡萄糖产生丙酮酸，丙酮酸进一步被分解为甲酸、乙酸和琥珀酸等，使培养基 pH 下降至 4.5 以下时，加入甲基红指示剂呈红色。如细菌分解葡萄糖产酸量少，或产生的酸进一步转化为其它物质（如醇、醛、酮、气体和水），培养基 pH 在 5.4 以上，加入甲基红指示剂呈桔黄色。

(2)方法：将待试菌接种于葡萄糖磷酸盐蛋白胨水中，35℃ 孵育 48h~96h 后，于 5ml 培养基中滴加 5~6 滴甲基红指示剂，立即观察结果。

(3)结果判定：呈现红色者为阳性，桔黄色为阴性，桔红色为弱阳性。

(4)应用：常用于肠杆菌科内某些种属的鉴别，如大肠埃希菌和产气肠杆菌，前者为阳性，后者为阴性。肠杆菌属和哈夫尼亚菌属为阴性，而沙门菌属、志贺菌属、枸橼酸杆菌属和变形杆菌属等为阳性。

### 4. $\beta$ -半乳糖苷酶试验（ONPG 试验）

(1)原理：乳糖发酵过程中需要乳糖通透酶和 $\beta$ -半乳糖苷酶才能快速分解。有些细菌只有半乳糖苷酶，因而只能迟缓发酵乳糖，所有乳糖快速发酵和迟缓发酵的细菌均可快速水解邻硝基酚- $\beta$ -D-半乳糖苷（O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, ONPG）而生成黄色的邻硝基酚。用于枸橼酸菌属、亚利桑那菌属与沙门菌属的鉴别。

(2)方法：将待试菌接种于 ONPG 肉汤中，35℃ 水浴或孵箱孵育 18~24h，观察结果。

(3)结果：呈现亮黄色为阳性，无色为阴性。

(4)应用：可用于迟缓发酵乳糖细菌的快速鉴定，本法对于迅速及迟缓分解乳糖的细菌均可短时间内呈现阳性。埃希菌属、枸橼酸杆菌属、克雷伯菌属、哈夫尼亚菌属、沙雷菌属和肠杆菌属等均为试验阳性，而沙门菌属、变形杆菌属和普罗威登斯菌属等为阴性。

### 5. VP 试验

(1)原理：测定细菌产生乙酰甲基甲醇的能力。某些细菌如产气肠杆菌，分解葡萄糖产生丙酮酸，丙酮酸进一步脱羧形成乙酰甲基甲醇。在碱性条件下，乙酰甲基甲醇被氧化成二乙酰，进而与培养基中的精氨酸等含氨基的物质结合形成红色化合物。即 V-P 试验阳性。

(2)方法：将待检菌接种于葡萄糖磷酸盐蛋白胨水中，35℃ 孵育 24~48h，加入 50g/L $\alpha$ -萘酚（95%乙醇溶液）0.6ml，轻轻振摇试管，然后加 0.2ml 400g/L KOH，轻轻振摇试管 30s 至 1min，然后静置观察结果。

(3)结果：红色者为阳性，黄色或类似铜色为阴性。

(4)应用：主要用于大肠埃希菌和产气肠杆菌的鉴别。本试验常与 MR 试验一起使用，一般情况下，前者为阳性的细菌，后者常为阴性，反之亦然。但肠杆菌科细菌不一定都这样规律，如蜂房哈夫尼亚菌和奇异变形杆菌的 VP 试验和 MR 试验常同为阳性。

### 6. 胆汁七叶苷水解试验

(1)原理：在 10%~40% 胆汁存在下，测定细菌水解七叶苷的能力。七叶苷被细菌分解生成的七叶素，七叶素与培养基中的枸橼酸铁的二价铁离子发生反应形成黑色化合物。

(2)方法：将被检菌接种于胆汁七叶苷培养基中，35℃ 孵育 18~24h 后，观察结果。

(3)结果：培养基完全变黑为阳性，不变黑为阴性。

(4)应用：主要用于鉴别 D 群链球菌与其它链球菌的区别，以及肠杆菌科的某些种、某些厌氧菌（如脆弱拟杆菌等）的初步鉴别。D 群链球菌本试验为阳性。

### 7. 淀粉水解试验

(1)原理：产生淀粉酶的细菌能将淀粉水解为糖类，在培养基上滴加碘液时，可在菌落周围出现透明区。

(2)方法：将被检菌划线接种于淀粉琼脂平板或试管中，35℃ 孵育 18~24h，加入革兰碘液数滴，立即观察结果。

(3)结果：阳性反应，菌落周围有无色透明区，其它地方蓝色；阴性反应，培养基全部为蓝色。

(4)应用：用于白喉棒状杆菌生物型的分型，重型淀粉水解试验阳性，轻、中型阴性；芽胞杆菌属菌种和厌氧菌某些种的鉴定。

### 8. 甘油复红试验

- (1)原理：甘油可被细菌分解生成丙酮酸，丙酮酸脱去羧基为乙醛，乙醛与无色的复红生成醌式化合物，呈深紫红色。
- (2)方法：取被检菌接种于甘油复红肉汤培养基中，于 35°C 孵育，观察 2~8d。应同时做阴性对照。
- (3)结果：紫红色为阳性，与对照管颜色相同为阴性。
- (4)应用：主要用于沙门菌属内各菌种间的鉴别。伤寒沙门菌、甲（丙）型副伤寒沙门菌、猪霍乱沙门菌、孔道夫沙门菌和仙台沙门菌本试验为阴性，乙型副伤寒沙门菌结果不定，其它不常见沙门菌多数为阳性。

#### 9. 葡萄糖酸氧化试验

- (1)原理：某些细菌可氧化葡萄糖酸钾，生成 $\alpha$ -酮基葡萄糖酸。 $\alpha$ -酮基葡萄糖酸是一种还原性物质，可与班氏试剂起反应，出现棕色或砖红色的氧化亚铜沉淀。
- (2)方法：将待检菌接种于葡萄糖酸盐培养基中(1ml)，置 35°C 孵育 48h,加入班氏试剂 1ml，于水浴中煮沸 10min 并迅速冷却，观察结果。
- (3)结果：出现黄到砖红色沉淀为阳性。不变或仍为蓝色为阴性。
- (4)应用：主要用于假单胞菌的鉴定和肠杆菌科菌分群。

### 13.2. MTT 法实验原理与 MTT 溶液的配制方法

但凡做过细胞培养的人，没有不知道 MTT 法的。这篇文章仅为入门者扫盲之用，高手请绕道：)

#### MTT 原理

MTT 全称为 3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide，是一种黄颜色的染料。**活细胞线粒体中琥珀酸脱氢酶能够代谢还原 MTT，同时在细胞色素 C 的作用下，生成蓝色（或蓝紫色）不溶于水的甲臜（Formazan），甲臜的多少可以用酶标仪在 570 nm 处进行测定。**在通常情况下，甲臜生成量与活细胞数成正比，因此可根据光密度 OD 值推测出活细胞的数目。由于死细胞中不含琥珀酸脱氢酶，因此加入 MTT 不会有反应。

#### MTT 溶液的配制方法

通常，此法中的 MTT 浓度为 5 mg/ml。因此，可以称取 MTT 0.5 克，溶于 100 ml 的磷酸缓冲液（PBS）或无酚红的培养基中，用 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤以除去溶液里的细菌，放 4°C 避光保存即可。在配制和保存的过程中，容器最好用铝箔纸包住。

需要注意的是，MTT 法只能用来检测细胞相对数和相对活力，但不能测定细胞绝对数。在用酶标仪检测结果的时候，为了保证实验结果的线性，**MTT 吸光度最好在 0-0.7 范围内。**

### 13.3. 酵母菌分类

根据荷兰 Lodder & Kreger-van Rij 所著 “The Yeasts, A Taxonomy Study”。分类主要依据是：

1. 形态
2. 对硝酸盐或碳源的利用
3. 对糖的发酵性

形态与大小：因酵母种类不同而不同，同一种也会因培养条件或发育时期不同而有异，一般直径约在 5  $\mu$ m，显微镜 40X 及 100X 接物镜下皆可观察到。

cerevisiae 型：球形与卵形（如啤酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*）

ellipsoideus 型：椭圆形（如葡萄酒酵母 *Saccharomyces ellipsoideus*）

pastorianus 型：香肠形

apiculatus 型：柠檬形

trigonopsis 型：三角形

增殖法：主要为营养增殖（即出芽生殖(budding)），偶而发生有性生殖时则行子囊孢子来增殖。

母细胞(mother cell)：原来的细胞

子细胞 daughter cell)：增殖后的细胞

多极出芽(multilateral budding)：同一个细胞上数个地方可以出芽者

两极出芽(bipolar budding)：只有细胞两端才会出芽者(如 *Kloeckera* spp.)

伪菌丝(pseudomycelium)：出芽后的细胞一直连成很长，呈菌丝状者(如 *Candida* spp.)

真菌丝(true mycelium)：有些酵母会形成如同霉菌具有隔膜(septum)的真菌丝(如 *Endomycopsis* spp., *Trichosporum* spp.)

分裂酵母(fission yeast)：非出芽，而是在细胞中央形成隔膜再分裂成两个细胞者(如 *Schizosaccharomyces* spp.)

出芽分裂(bud fission)：出芽后基部不缩小，在子细胞与母细胞之间直接分裂的酵母谓之(如 *Saccharomyces* spp.)

子囊孢子(ascospore)：在不利的环境下，在酵母的生活史中某一部分会形成子囊孢子

有孢子酵母(sporogenous yeasts)：能产生子囊孢子的酵母称之

无孢子酵母(asporogenous yeasts)：不形成子囊孢子之酵母

一倍体营养细胞(haploid)：

由二个一倍体细胞接合后再形成子囊孢子者(如 *Schizosaccharomyces*)

出芽时分裂的二个核融合后在母细胞内形成子囊孢子者(如 *Debaryomyces*)

母细胞与出芽细胞间融合后的核，移到另一个出芽细胞内形成子囊孢子者(如 *Nadsonia*)

二倍体营养细胞(diploid)：环境不合适时，停止出芽生殖，直接减数分裂产生子囊孢子(如 *Saccharomyces* (孢子能在子囊内直接接合成两倍体)或 *Saccharomyces* (发芽后的孢子间才接合成两倍体))

子囊(ascus) 内的孢子数，通常为 2 or 4，多者可 8 or 16，偶而会有奇数，其形状有：

无孢子的酵母则无核融合或细胞接合，且营养细胞上突出的小柄(sterigma)长出子细胞，并以弹射的方式形成射出孢子(ballistospore) (如 *Sporobolomyces*)，有些会形成特有的厚膜休眠孢子(teliospore) (如 *Rhodosporidium*)，这类的酵母都是属于担子菌类(Basidiomycetes)。

酵母的分类

**Basidiomycetaceous Yeasts (担子菌酵母)：**

**Ustilaginales**

**Rhodosporidium**

**Leucosporidium**

**Ascomycetaceous Yeasts (子囊菌酵母)：**

**Endomycetales (具有 ascus)**

**Saccharomycetaceae：子囊的形状为球形或椭圆形**

**Schizosaccharomycoideae：分裂生殖**

*Schizosaccharomyces*

**Nadsonioideae：两极出芽**

*Saccharomyces*

*Hanseniaspora*

**Saccharomycoideae：多极出芽**

*Saccharomyces*

*Kluyveromyces*

*Pichia*

*Hansenula*

Debaryomyces

**Lipomyceitoideae : 母细胞突出形成袋状的子囊**

Lipomyces

**Spermophthoraceae : 子囊形状为针形或纺锤形**

Nematospora

**Fungi imperfecti yeast (不完全菌酵母) :**

**Moniliales**

**Sporobolomycetaceae (具 ballistospore , 与担子菌有密切关系)**

Bullera

Sporobolomyces

Sporidiobolus

**Cryptococcaceae : 无 ascus**

Bettanomyces

Candida

Cryptococcus

Kloeckera

Oosporidium

Pityrosporum

**Rhodotorula**

Schizoblastosporium

Sterigmatomyces

Torulopsis

**Trichosporon**

Trigonopsis

Brewer' s yeast 啤酒酵母

Sake yeast 清酒酵母

Wine yeast 葡萄酒酵母

Alcohol yeast 酒精酵母

Baker' s yeast 面包酵母

Soysauce yeast 酱油酵母

Fodder yeast 饲料酵母

Petroleum yeast 石油酵母

Top yeast 啤酒发酵中, 酵母会浮在液面上层者(英国)

Bottom yeast 啤酒发酵中, 酵母会沈在液面底层者(德国)

Red yeast 红色酵母(如 Rhodotorula or Sporobolomyces)

Black yeast 黑色酵母

Film yeast 产膜酵母: 在液面形成皮膜来增殖者(如 Pichia, Hansenula)

主要酵母菌的属介绍:

### **1. Schizosaccharomyces 属**

营养细胞圆筒形, 分裂生殖形成子囊, 主要在热带。代表种 *S. pombe*: 是从非洲人的 Pombe 酒中分离出的酵母, 酒精发酵能力很强。

*Schizosaccharomyces octosporus*: 主要由果实中分离出。

*Schizosaccharomyces pombe*

## 2. Saccharomyces 属

出芽分裂的酵母，此属只一种 *S. ludwigii*，蔗糖会发酵，但对 maltose 不会发酵，故麦汁的发酵因 maltose 会残留可酿成具有甜味的酒。

## 3. Hanseniaspora 属

柠檬形两极出芽，为果实上之野生酵母，在葡萄酒酿造初期会出现，不久即被淘汰。代表种为 *H. valbyensis*。

## 4. Saccharomyces 属

酒精发酵能力很强，为酵母中最重要的属，是传统以来各类酒、制造酒精、制造面包等所使用的。细胞有球形、卵形或椭圆形，多极出芽。代表种有：

*S. cerevisiae*=*S. sake*=*S. ellipsoideus*=*S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*=*S. formosensis* ? (or =*S. cerevisiae* var. *formosensis*? 早期台研 396 酿酒精菌种)

为制造啤酒、葡萄酒、清酒、酒精、面包等最常使用之菌种。

*S. carlsbergensis*=*S. uvarum* : 从 Carlberg 的啤酒酿造场所分离之下面酵母(bottom yeast)。

*S. bayanus*=*S. pastorianus* : 为不良酵母，造成啤酒发酵过程中有臭气产生，严重影响啤酒质量(有害菌)。

*S. diastaticus* : 会分解 dextrin & starch，不利于啤酒发酵，为啤酒制造过程中之有害菌。

*S. rouxii*=*Zygosaccharomyces major* (酱油有益菌)=*Z. soja* (酱油有益菌)=*Z. salus* (有害菌，会于酱油表面形成皮膜)=*Z. japonicus* (有害菌，会于酱油表面形成皮膜)：为耐盐性酵母，在酱油胶中常被发现，为一种有用酵母。

## 5. Kluyveromyces 属

具有可使乳糖发酵产生酒精或乳酸。代表种：

*K. fragillis* = *Saccharomyces fragilis* (从乳酒中分离出者)

*K. lactis* = *S. lactis* (从牛乳或 cheese 中分离出者)

## 6. Pichia 属

在酿造物表面常会形成皱纹状薄膜的产膜酵母，多半为有害菌。代表种为 *P. membranaefaciens*，会消耗 ethanol，对糖无发酵能力，常在盐渍物液的表面形成皮膜，是啤酒及葡萄酒发酵过程中的有害菌。

## 7. Hansenula 属

同 *Pichia* 为产膜酵母，但 *Pichia* 不利用硝酸盐，而 *Hansenula* 则可以利用硝酸盐。对酒精生成 ester 的能力很强，代表种为 *H. anomala*，ascospore 为帽子形。会消耗酒精的有害菌，但对清酒的芳香生成有关，故又称为清酒后熟酵母。

## 8. Debaryomyces 属

会形成表面有突起的子囊孢子，无发酵性，耐盐(会有皮膜，如盐渍或腌肉常见)及耐糖能力很强，会产生 riboflavin。代表种为 *D. hansenii*，从 cheese & sausage 中分离。

## 9. Lipomyces 属

细胞具粘性荚膜，老细胞会有很大的脂肪球，故又称脂肪酵母。代表种为 *L. starkeyi*，干燥菌体中含有 60% 脂肪，为将来可能具有油脂生成能力的潜力菌种。

## 10. Brettanomyces 属

在好气情形下使糖产生醋酸，细胞常呈特有的尖头椭圆形状，无 ascus 产生。代表种为 *B. bruxellensis*，为下面发酵啤酒的有害菌，与上面发酵啤酒的后发酵有关。

## 11. Candida 属

细胞球形、卵形或圆筒形，易产生伪菌丝，具酒精发酵能力之种很多。常见的种有：*C. utilis*=*Torulopsis utilis*=*Torula utilis*：能利用 xylose，故可以利用亚硫酸纸浆之废液来培养菌体当饲料酵母，也可当 inosinic acid 的原料。

*C. tropicalis* 为饲料酵母，具利用碳化氢能力。

*C. lipolytica* 具利用碳化氢能力，为重要的石油酵母，主要是生产菌体以获得蛋白质，也能由 n-paraffin 产生多量的  $\alpha$ -ketoglutaric acid or citric acid。(ps. Citric acid 亦可由糖的生化反应来生产)。

*C. guilliermondii* & *C. robusta* 为生产 riboflavin，尤其 *C. robusta* 能利用 acetic acid 为单一碳源来生产大量的 riboflavin。

*C. albicans* 为引起人类及动物皮肤及粘膜病变(Candida 症)的病原菌。

## 12. Cryptococcus 属

为球状或卵形之细胞，无伪菌丝，细胞具粘性荚膜，无发酵能力，能形成 starch-like 物质。 *C. neoformans* 可感染人畜 Cryptococcus 症的病原菌。

## 13. Kloeckera 属

只会发酵 glucose，常见于果实及果汁中，柠檬形两极出芽细胞，代表种为 *K. apiculata*。

## 14. Rhodotorula 属

会产生 carotenoid 色素，故称红色酵母，无发酵能力，但会污染食品。代表种为 *R. glutinis*，干燥菌体内脂肪量可达 60%以上，与 *Lipomyces* 属同为具有油脂生产能力之潜力菌种。

会产生 carotenoid 红色色素的酵母还有 *Sporobolomyces* 属 (具 ballistospore) 及 *Rhodosporidium* 属 (会形成 teliospore)。

## 15. Torulopsis 属

小型球形或卵形细胞，无 ascus，亦无 pseudomycelium，故能与 *Candida* 属区别，又不形成 starch-like 物质，故能与 *Cryptococcus* 属区别。代表种：*T. versatilis*=*T. etchellsii*：为好盐性，会产生酱油的芳香成分，为酱油后熟的重要酵母。

### 13.4. 细胞凋亡的分子生物学检测方法

细胞凋亡中染色体 DNA 的断裂是个渐进的分阶段的过程，染色体 DNA 首先在内源性的核酸水解酶的作用下降解为 50-300kb 的大片段。然后大约 30 % 的染色体 DNA 在  $Ca^{2+}$  和  $Mg^{2+}$  依赖的核酸内切酶作用下，在核小体单位之间被随机切断，形成 180~200bp 核小体 DNA 多聚体。DNA 双链断裂或只要一条链上出现缺口而产生的一系列 DNA 的 3' -OH 末端可在脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT) 的作用下，将脱氧核糖核苷酸和荧光素、过氧化物酶、碱性磷酸化酶或生物素形成的衍生物标记到 DNA 的 3' -末端，从而可进行凋亡细胞的检测，这类方法一般称为脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法 (TUNEL)。由于正常的或正在增殖的细胞几乎没有 DNA 的断裂，因而没有 3' -OH 形成，很少能够被染色。低分子量的 DNA 分离后，也可使用 DNA 聚合酶进行缺口翻译 (nick translation)，使低分子量的 DNA 标记或染色，然后分析凋亡细胞。TUNEL 或缺口翻译法实际上是分子生物学与形态学相结合的研究方法，对完整的单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色，能准确的反应细胞凋亡最典型的生物化学和形态特征，可用于石蜡包埋组织切片、冰冻组织切片、培养的细胞和从组织中分离的细胞的细胞凋亡测定，并可检测出极少量的凋亡细胞，灵敏度远比一般的组织化学和生物化学测定法要高，因而在细胞凋亡的研究中已被广泛采用。

#### 一、过氧化物酶标记测定法

原理：脱氧核糖核苷酸衍生物地高辛 (digoxigenin)-11-dUTP 在 TdT 酶的作用下，可以掺入到凋亡细胞双链或单链 DNA 的 3-OH 末端，与 dATP 形成异多聚体，并可与连接了报告酶 (过氧化物酶或碱性磷酸酶) 的抗地高辛抗体结合。在适合底物存在下，过氧化物酶可产生很强的颜色反应，特异准确的定位出正在凋亡的细胞，因而在普通光学显微镜下进行观察。

毛地黄植物是地高辛的唯一来源。在所有动物组织中几乎不存在能与抗地高辛抗体结合的配体，因而非特异性反应很低。抗地高辛的特异性抗体与脊椎动物垂体激素的交叉反应不到 1%，若此抗体的 Fc 部分通过蛋白酶水解的方法除去后，则可完全排除细胞 Fc 受体非特异性的吸附作用。

本方法可以用于福尔马林固定的石蜡包埋的组织切片、冰冻切片和培养的或从组织中分离的细胞凋亡测定。

##### (一)试剂配制

- 1、磷酸缓冲液 PBS (pH7.4)：磷酸钠盐 50 mM，NaCl 200 mM。
- 2、蛋白酶 K (200  $\mu$ g/ml，pH7.4)：蛋白酶 K 0.02g；PBS 100 ml。
- 3、含 2%  $H_2O_2$  的 PBS 缓冲液 (pH7.4)： $H_2O_2$  2.0 ml；PBS 缓冲液 98.0 ml。
- 4、TdT 酶缓冲液 (新鲜配)：Trizma 碱 3.63 g 用 0.1 N HCl 调节 pH 至 7.2，加 ddH<sub>2</sub>O 定容到 1000 ml；再加入二甲砷酸钠 29.96 g 和氯化钴 0.238 g。
- 5、TdT 酶反应液：TdT 酶 32  $\mu$ l；TdT 酶缓冲液 76  $\mu$ l，混匀，置于冰上备用。
- 6、洗涤与终止反应缓冲液：氯化钠 17.4 g；柠檬酸钠 8.82 g；ddH<sub>2</sub>O 1000 ml
- 7、0.05% 二氨基联苯 (DAB) 溶液：DAB 5 mg；PBS 10 ml，pH7.4，临用前过滤后，加过氧化氢至 0.02%。

- 8、0.5%甲基绿 ( pH4.0 ) : 甲基绿 0.5 g ; 0.1M 乙酸钠 100 ml。
- 9、100%丁醇, 100%、95%、90%、80%和 70%乙醇, 二甲苯, 10%中性甲醛溶液, 乙酸, 松香水等。
- 10、 过氧化物酶标记的抗地高辛抗体 ( ONCOR )

## (二) 实验步骤

### 1、标本预处理:

(1) 石蜡包埋的组织切片预处理: 将组织切片置于染色缸中, 用二甲苯洗两次, 每次 5min。用无水乙醇洗两次, 每次 3min。用 95%和 75%乙醇各洗一次, 每次 3min。用 PBS 洗 5min 加入蛋白酶 K 溶液 ( 20ug / ml ) , 于室温水解 15min, 去除组织蛋白。用蒸馏水洗 4 次, 每次 2min, 然后按下述步骤 2 进行操作。

(2) 冰冻组织切片预处理: 将冰冻组织切片置 10%中性甲醛中, 于室温固定 10min 后, 去除多余液体。用 PBS 洗两次, 每次 5min。置乙醇: 乙酸 ( 2 : 1 ) 的溶液中, 于 -20°C 处理 5min, 去除多余液体。用 PBS 洗两次, 每次 5min, 然后按下述步骤 2 进行操作。

(3) 培养的或从组织分离的细胞的预处理: 将约  $5 \times 10^7$  个/ml 细胞于 4%中性甲醛室温中固定 10min。在载玻片上滴加 50~100 $\mu$ l 细胞悬液并使之干燥。用 PBS 洗两次, 每次 5min, 然后按下述步骤 2 进行操作。

2、色缸中加入含 2%过氧化氢的 PBS, 于室温反应 5min。用 PBS 洗两次, 每次 5min。

3、用滤纸小心吸去载玻片上组织周围的多余液体, 立即在切片上加 2 滴 TdT 酶缓冲液, 置室温 1~5min。

4、用滤纸小心吸去切片周围的多余液体, 立即在切片上滴加 54 $\mu$ l TdT 酶反应液, 置湿盒中于 37°C 反应 1hr ( 注意: 阴性染色对照, 加不含 TdT 酶的反应液 ) 。

5、将切片置于染色缸中, 加入已预热到 37°C 的洗涤与终止反应缓冲液, 于 37°C 保温 30min, 每 10min 将载玻片轻轻提起和放下一次, 使液体轻微搅动。

6、组织切片用 PBS 洗 3 次, 每次 5min 后, 直接在切片上滴加两滴过氧化物酶标记的抗地高辛抗体, 于湿盒中室温反应 30min。

7、用 PBS 洗 4 次, 每次 5min。

8、在组织切片上直接滴加新鲜配制的 0.05% DAB 溶液, 室温显色 3~6min。

9、用蒸馏水洗 4 次, 前 3 次每次 1min, 最后 1 次 5min。

10、于室温用甲基绿进行复染 10min。用蒸馏水洗 3 次, 前两次将载玻片提起放下 10 次, 最后 1 次静置 30s。依同样方法再用 100%正丁醇洗三次。

11、用二甲苯脱水 3 次, 每次 2min, 封片、干燥后, 在光学显微镜下观察并记录实验结果。

## (三) 注意事项

一定要设立阳性和阴性细胞对照。阳性对照的切片可使用 DNaseI 部分降解的标本, 阳性细胞对照可使用地塞米松 ( 1 $\mu$ M ) 处理 3-4hr 的大、小鼠胸腺细胞或人外周血淋巴细胞。阴性对照不加 TdT 酶, 其余步骤与实验组相同。

## 13.5. 液体培养中细胞凋亡 ( PCD ) 过程的监测

### 1. 药瓶培养菌体

100ml 装液量, 培养 12、24、36、48、60、72、84、96h。

### 2. 取样、分析

每次取 2 ml 发酵液 ( 用 2 ml 的破口移液管 ) , 用 8ml 磷酸钾 Buffer ( pH 7.0, 10 mM ) 冲洗, 获得粗菌悬液。取其中 3 ml 测菌体干重。粗菌悬液 ( 7 ml ) 离心, 加 10 ml 磷酸钾 Buffer 清洗, 再离心, 重新悬浮于 6 ml 磷酸钾 Buffer, 获得干净的菌悬液。其中 3 ml 分装于三个管内, 冻存于超低温冰箱, 待抽提 DNA 用。另外 3 ml 用于菌体破碎, 测定 RNA 和蛋白质浓度。

### 3. 菌体破碎及测定 RNA 和蛋白质浓度

悬浮液超声破碎, 使用 MSE Soniprep 150 sonicator ( 150 倍音速 ) , 最大功率破碎 2 min。含有破碎菌丝体菌的悬液 ( 1 ml, 一式三份 ) 中加入 1 ml 的 0.5 N 的高氯酸, 置于冰浴保持 0°C, 30 min。离心, 沉淀用 0.5N 的高氯酸萃取三次, 温度为 70 度。上清液被收集用于测定 RNA 浓度 ( Ornicol 法 ) 。沉淀溶于 1.0 mol/L 的 NaOH, 用于测定蛋白质浓度 ( Lowry 法 ) 。

### 4. DNA 萃取和核酸电泳

使用标准的 DNA 萃取方法。主要是，收集到的菌体悬浮于消化溶液，含 5 mM 的 Tris-HCl ( pH8.0 ) ， 25% 的蔗糖，和溶菌酶 ( 1 mg/ml ) 。 37 度反应 1h，继续用链蛋白酶 ( 1mg/ml ) 和 1%SDS 处理。经苯酚/氯仿抽提，DNA 溶液在 RNase ( 40ug/ml ) 存在的条件下 37 度培养 1h，之后用同体积的 100%的乙醇沉淀。沉淀的 DNA 用 70%的乙醇清洗，并悬浮于 TE 溶液中。最终的 DNA 溶液用比色法检验纯度和浓度。各样品中提取的等量的 DNA 使用 1%的琼脂糖凝胶，TBE buffer，60-80mA 电泳 1-2h。

## 5.

### 购买试剂

需要 RNA 最少 1 mg ;

1.EL0042 核糖核酸 ( 酵母 ) /RNA BR 5g SCHBT 31.5 ;

2.EL0044 脱氧核糖核酸 ( 鱼精 ) /DNA ( 鱼精 ) BR 1g SCHBT 87 , 1g Sigma 120 ; EL0045 脱氧核糖核酸 ( 小牛胸腺 ) /DNA ( 小牛胸腺 ) BR 50mg Sigma 360 , 0.1g Sigma 600 ; EL0046 脱氧核糖核酸(鲑鱼精)/DNA(鲑鱼精) BR 0.1g Sigma 97.5 ; EL0047 脱氧核糖核酸(鲑鱼精)/DNA(鲑鱼精) BR 5g Sigma 336。

[上海斯高勒生物科技有限公司](http://www.shs.com) ; 促销价 请致电 021-51876001 或 e-mail:shscholar@vip.sina.com

## 3.

### Calf Thymus DNA 小牛胸腺 DNA

名称	厂家	规格	价格 (元)
Calf Thymus DNA 小牛胸腺 DNA	Sigma D1501	50mg	¥ 245
Calf Thymus DNA 小牛胸腺 DNA	Sigma D1501	100mg	¥ 450
Calf Thymus DNA 小牛胸腺 DNA	Sigma D1501	500mg	¥ 2100
Calf Thymus DNA 小牛胸腺 DNA	Sigma D1501	1g 原装	¥ 3620

北京拜尔迪生物技术有限公司

公司地址：北京市海淀区中关村北二街 4 号水清木华园 1 号楼 910 室 ( 100080 )

ADDRESS :RM 910 , No.1 Building , Shuiqingmuhua Plaza , No.4 , No.2 North Street , ZhongGuanCun , Haidian Distict , Beijing , China

POSTAL: 100080

电话 ( TEL ) : 010-82642396

传真 ( FAX ) : 010-82642395

E-MAIL : [market@biodee.net](mailto:market@biodee.net) , [biodee@163.com](mailto:biodee@163.com)

上海贝基生物科技有限公司

杨浦区靖宇中路 1 弄 6 号 601 (200093)

电话： 021-65300698

传真： 021-65300268

联系人： [张先生](#)

所在区域： 上海.上海

邮件地址： [sales@shellgene.com](mailto:sales@shellgene.com)

公司网站： <http://www.shellgene.com>

4. 3-5 二羟基甲苯 ( 地衣酚 , orcinol ) ;

5. FeCl<sub>3</sub>; HCl;CuO

6.结晶二苯胺，冰醋酸中，过氯酸，乙醛溶液。

### RNA 浓度的测定

## 一、材料

RNA 标准品, 0.2%NaOH 溶液, 0.05mol/L NaOH 溶液, 乙酸, 95%, 无水乙醚。

### 1.标准 RNA 母液 (须经定磷法测定其纯度)

准确称取 RNA10.0mg, 用少量 0.05mol/L NaOH 湿透, 用玻棒研磨至糊状的混浊液, 加入少量蒸馏水, 混匀, 调 pH7.0, 再用蒸馏水定容至 10mL, 此溶液每毫升含 RNA1mg。

### 2.标准 RNA 溶液

取母液 1.0mL 置 10mL 容量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度。此溶液为 100 $\mu$ gRNA/mL。

### 3.样品溶液

控制 RNA 浓度在 10—100 $\mu$ g/mL 范围内。本实验称量自制干燥 RNA 粗制品 10mg (估计其纯度约为 50%), 按标准 RNA 溶液方法配制到 100mL。

### 4.地衣酚—铜离子试剂

将 100 mg 地衣酚溶于 100 mL 浓盐酸中, 再加入 100 mg CuO, 临用前配制。

## 二、器材

容量瓶 (10mL), 吸量管 (2.0mL, 5.0mL), 量筒 (10, 50mL), 沸水浴, 离心机, 布氏漏斗, 抽滤瓶, 石蕊试纸等。

## RNA 地衣酚显色测定

### 1、标准曲线的制作

取 12 支干净烘干试管, 按下表编号及加入试剂。平行作两份。加毕置沸水浴加热 25min 取出冷却, 以零号管作对照, 于 670nm 波长处测定光吸收值。取两管平均值, 以 RNA 浓度为横坐标, 光吸收为纵坐标作图, 绘制标准曲线。

试管编组( $\times 2$ ) 试剂	0	1	2	3	4	5
标准 RNA 溶液/mL	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
蒸馏水/mL	2.0	1.6	1.2	0.8	0.4	0.0
地衣酚-Cu <sup>2+</sup> /mL	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

### 2、样品的测定

取两支试管, 各加入 2.0mL 样品注液, 再加 2.0mL 地衣酚—Cu<sup>2+</sup>试剂。如前述进行测定。

### 3、RNA 含量的计算

根据测得的光吸收值, 从标准曲线上查出相当该光吸收的 RNA 含量。按下式计算出制品中 RNA 的百分含量:

$$\text{RNA}\% = \frac{\text{待测液中测得的 RNA 含量}(\mu\text{g/mL})}{\text{待测液中制品的含量}(\mu\text{g/mL})} \times 100$$

## 二苯胺法测定 DNA 含量

【实验原理】DNA 分子中 2-脱氧核糖残基在酸性溶液中加热降解, 产生 2-脱氧核糖并形成  $\omega$ -羟基- $\gamma$ -酮基戊酸, 后者与二苯胺试剂反应产生蓝色化合物。

蓝色化合物在 595nm 处有最大吸收, 且 DNA 在 40 $\mu$ g ~ 400 $\mu$ g 范围内时, 吸光度与 DNA 浓度成正比。在反应液中加入少量乙醚, 可以提高反应灵敏度。

### 【实验材料】

#### 1. 实验器材

恒温水浴, 721 分光光度计。

#### 2. 实验试剂

(1) DNA 标准溶液: 准确称取小牛胸腺 DNA10 mg, 以 0.1 mol/L NaOH 溶液溶解, 转移至 50ml 容量瓶中, 用 0.1 mol / L NaOH 溶液稀释至刻度。浓度为 200 $\mu$ g/m<sup>1</sup>;

(2) DNA 样品液: 用上述实验方法提取的 DNA 样品

(3) 二苯胺试剂: 使用前称取 1 g 结晶二苯胺, 溶于 100m<sup>1</sup> 分析纯冰醋酸中, 加 60%过氧酸 10m<sup>1</sup> 混匀。临用前加入 1 m<sup>1</sup> 1.6%乙醚溶液。此溶剂应为无色。

### 【实验操作】

#### 1. 标准曲线的绘制

取干燥试管 6 支, 编号, 按表所示加入试剂。

##### 1. 试剂

管号	DNA 标准溶液, ml	蒸馏水, ml	二苯胺试剂, ml
0	0.0	2.0	4.0
1	0.4	1.6	4.0
2	0.8	1.2	4.0
3	1.2	0.8	4.0
4	1.6	0.4	4.0
5	2.0	0	4.0

加完毕, 混匀, 于 60°C 恒温水浴中保温 1h, 冷却后于 595nm 处测定吸光度, 以零号管作对照, 绘制标准曲线。

#### 2. 样品测定

取试管 3 支, 两支为样品管, 一支为对照管。对照管操作与标准曲线零号管相同。向每支样品管中加入 2ml 样品液及 4ml 二苯胺试剂, 60°C 保温 1h, 冷却后于 595nm 测定吸光度, 以对照管调零点。根据测得的吸光度, 从标准曲线上查出相应吸光度的 DNA 含量。

### 【实验结果讨论】

1. 该反应灵敏度较低, 但方法简便, 目前仍广泛使用。
2. 其他糖及糖的衍生物、芳香醛、羟基醛和蛋白质等, 对此反应由干扰, 测定前应尽量除去。

## 14. 哺乳动物细胞及动物实验

### 14.1. 真核细胞的转染

该操作以 Invitrogen 公司的脂质体转染试剂 LipofectAMINE 为例, 其它转染试剂可参照各自的使用说明书进行。

1. 在 6 孔板中接种  $1-3 \times 10^5$  细胞/孔, 加入 2ml 完全培养基, 置 CO<sub>2</sub> 孵箱中 37°C 培养过夜。
2. 待细胞长到 50-80% 单层时, 在无菌离心管中配制如下溶液:
  - i. 溶液 A: 将 1-2 $\mu$ g 待转染的超纯 DNA 稀释到 100 $\mu$ l 无血清培养基中
  - ii. 溶液 B: 将 2-25 $\mu$ l LipofectAMINE 稀释到 100 $\mu$ l 无血清培养基中
3. 混合溶液 A 和 B, 轻轻混匀, 室温放置 15-45min。
4. 用 2ml 无血清培养基轻轻洗涤细胞, 加入 0.8ml 无血清培养基/孔, 将脂质体复合物滴加到孔中, 轻轻摇晃混匀, 置 CO<sub>2</sub> 孵箱中 37°C 孵育 2-24hr。
5. 用完全培养基替换转染液, 继续培养。
6. 24-72hr 后检测蛋白质的表达或传代并加入选择性抗生素以筛选稳定表达株。

### 14.2. 转染细胞的稳定筛选

#### 1. 确定抗生素作用的最佳浓度:

不同的细胞株对各种抗生素有不同的敏感性, 因此在筛选前要做预试验, 确定抗生素对所选择细胞的最低作用浓度。

- 1) 提前 24 小时在 96 孔板或 24 孔板中接种细胞 8 孔, 接种量以第二天长成 25% 单层为宜, 置 CO<sub>2</sub> 孵箱中 37°C 培养过夜。
- 2) 将培养液换成含抗生素的培养基, 抗生素浓度按梯度递增 (0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 和 1000 $\mu$ g/ml)。
- 3) 培养 10-14 天以绝大部分细胞死亡浓度为准, 一般为 400-800 $\mu$ g/ml, 筛选稳定表达克隆时可比该浓度适当

提高一个级别维持时使用筛选浓度的一半。

2. 转染按前面的步骤进行。

3. 转染 72 小时后按 1:10 的比例将转染细胞在 6 孔板中传代, 换为含预试验中确定的抗生素浓度的选择培养基。在 6 孔板内可见单个细胞, 继续培养可见单个细胞分裂繁殖形成单个抗性集落, 此时可用两种方法挑选单克隆。

1) 滤纸片法: 用消毒的 5x5mm 滤纸片浸过胰酶, 将滤纸片贴在单细胞集落上 10-15 秒, 取出粘附有细胞的滤纸片放于 24 孔板中继续加压培养。细胞在 24 孔板中长满后转入 25cm<sup>2</sup> 培养瓶中, 长满后再转入 75cm<sup>2</sup> 培养瓶中培养。

2) 有限稀释法: 将细胞消化下来后做连续的 10 倍稀释 (10<sup>-2</sup>—10<sup>-10</sup>), 将每一稀释度的细胞滴加到 96 孔板中培养, 7-10 天后, 选择单个克隆生长的孔再一次进行克隆。

4. ELISA 或 Western blot 检测单克隆细胞中外源蛋白的表达情况由于不同克隆的表达水平存在差异因此可同时挑选多个克隆选择表达量最高的克隆传代并保种。

### 14.3. 肿瘤细胞体外传代培养及保种

#### 一. 细胞复苏与培养

将液氮或 -80°C 保存的肿瘤细胞于 37°C 水浴, 快速溶化, 用 8.0ml 培养基混匀已融化的肿瘤细胞悬液, 于 1500 转/分, 离心 3 分钟。弃上清, 再吸取 8.0ml 培养基混匀细胞沉淀, 再 1500 转/分, 离心 3 分钟, 弃上清, 细胞沉淀用 1.0ml 培养基混匀, 备用。另取一个 75cm<sup>2</sup> 方瓶, 加入 14.0ml 培养基, 将上述制备的含肿瘤细胞悬液 (1.0ml) 加入此方瓶中, 于 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养。

若此肿瘤细胞悬浮生长, 大约 3 - 4 天细胞基质会变黄, 5.0ml 细胞悬液可传代一个方瓶培养, 可用 3 - 4 个方瓶培养, 一个方瓶中呈对数生长的肿瘤细胞可达 1—1.5×10<sup>7</sup> 个, 根据试验所需, 可决定传代的次数。若此肿瘤细胞呈贴壁生长, 经过 3—4 天, 肿瘤细胞生长至 80%—95% 单层时, 弃上清, 用 0.5mM 的 EDTA(难消化的肿瘤细胞用 0.25%胰酶 1.0ml), 处理肿瘤细胞大约 3—5 分钟, 用倒置显微镜观察, 当 90% 的肿瘤细胞变圆时, 即可用弯管吹打并将消化的细胞转移到 15ml 离心管中, 于 1500 转/分下, 离心 3 分钟, 弃上清, 加少许培养基混匀, 可传代 3 个 75cm<sup>2</sup> 方瓶扩大培养。

#### 二. 细胞冻存

将对数生长的肿瘤细胞用 1 个 75cm<sup>2</sup> 方瓶按上述方法收集, 于 1500 转/分 离心 3 分钟, 弃上清, 用保种液(含 10% DMSO 的小牛血清)3.0ml 混匀, 分别加入到 2—3 只保种管中, 写上肿瘤细胞名称, 时间, 保种者姓名, 放 -80°C 保存, 次日将它们转移到液氮中保存(注: -80°C 下可保存细胞半年至一年, 液氮可保存细胞 5—10 年, 甚至更长的时间)。以上所有物品均需经过高温灭菌(121°C, 30 分钟), 培养基质则经过过滤(0.22μm)除菌, 所有操作均必须遵守无菌操作技术, 避免细菌、真菌、病原体、衣原体等污染。

### 14.4. 肿瘤动物模型的建立

将对数生长的肿瘤细胞收集, 用无血清基质 10.0ml, 于 1500 转/分, 离心 3min, 连续洗 3 次, 最后用无血清基质混匀, 用血球计数器计算肿瘤细胞数量(平均 5 个中方格的细胞计数×10<sup>4</sup> 即是肿瘤数/毫升)。计算完肿瘤细胞总数, 再将肿瘤细胞密度调至 4×10<sup>6</sup> 个/ml, 每只小鼠腋下接种 50ul(即 2×10<sup>5</sup> 个肿瘤细胞), 2 周左右可扪及肿瘤小结。一般选取 6—8 周的小鼠, 不同的肿瘤细胞接种的数量和动物不一样, 比如 LL/2, B16, Hep 可接种 C57 和 BALB/C 小鼠, NS-1, EL-4, C26, Meth A 可接种 BALB/C 小鼠, H22 接种昆明鼠。从肿瘤接种后可扪及小结节开始, 每 3 天用游标卡尺量肿瘤纵横大小(单位: mm), 至少连续一个月时间。注意要设计不同的实验组和对照组, 每组动物数一般为 5—10 只, 一般接种肿瘤 6—8 周后, 小鼠的肿瘤可生长至直径为 15—20mm (即小鼠会濒临死亡)时, 可眼球取血, 分离血清并保存血清, 处死小鼠, 取肿瘤组织照相, 取部分肿瘤组织作冰冻组织切片(或 -80°C 保存), 作相应的免疫组织化学染色, 取部分肿瘤组织用 3%中性的甲醛固定, 石蜡包埋, 作常规 HE 染色。

### 14.5. 小鼠尾静脉注射方法

在靠近实验台边缘处, 用大培养皿扣住小鼠, 左手抓住小鼠尾巴, 用酒精棉球擦尾巴, 可见到两侧静脉; 注射前应确认针管内无气泡, 注射时由尾尖开始, 顺向刺入。失败后再逐渐移向根部重刺, 若准确刺入静脉内, 推进时无阻力, 一般可注入 0.1—0.5ml。

#### 14.6. 肿瘤蛋白疫苗预防性动物实验

一般肿瘤蛋白疫苗首次免疫剂量 10ug/只小鼠, 与相应佐剂混匀, 在背部皮下注射, 第 2 次免疫间隔 2 周, 同样加佐剂在皮下注射; 第 3 次免疫间隔 2 周, 同样加佐剂在皮下注射; 第 3 次免疫后 2 周, 用 ELISA 检测其血清效价, 当效价达到要求时; 在接种肿瘤细胞前 3 天, 于腹腔或尾静脉加强注射 20ug /只。

#### 14.7. 人脐静脉内皮细胞 ( HUVEC ) 培养

1. 将 15-20cm 长的新生儿脐带放入无菌的 PBS 溶液中储存。  
(注: 4°C下最多贮存 24 小时, 室温下不超过 6 小时, 否则废弃)
2. 用一个钝头的针头扎入脐带静脉管中, 用无菌的 PBS 溶液冲洗 3-5 次, 将污血冲洗干净为止。
3. 用手术钳夹紧脐带下端, 加入 15ml 的胶原酶 (1mg/ml) 室温下消化 15-20 分钟, 并不时上下摇动脐带。
4. 消化完后, 将下端手术钳松开, 消化液流入一个 50 ml 无菌离心管中, 用无菌的 PBS 溶液冲洗脐带 2-3 次。
5. 将收集液离心 (2000 转/分) 3 分钟。
6. 倒去上清, 加入 10ml M199 培养基 (加入 10U/ml 的 bFGF), 用弯管吹散细胞, 将所有液体转入一个用明胶包被好的培养瓶中, 37°C 培养。  
(注: 每个培养瓶中加入 3-4ml 无菌的 1% 的明胶溶液, 摇匀使得明胶溶液完全铺满瓶底, 放入 37°C 孵育, 最少 2 小时, 用前将明胶溶液倒了即可, 明胶包被有利于细胞贴壁。)
7. 培养 24 小时后, 倒掉培养基, 并用无菌的 PBS 溶液清洗 2-3 次, 洗掉红细胞和死细胞, 加入 10 ml 新鲜的 M199 培养基。
8. 以后每 2 天换一次培养基 (每次换掉 2/3 的培养基)。
9. 一般培养 5-7 天, 细胞可长满至 80-90% 单层, 这时可以传代。
10. 倒掉培养基, 用无菌的 PBS 溶液清洗 2-3 次, 加入 2-3ml 消化液 (0.25% 胰酶+0.1% EDTA) 消化细胞, 在显微镜下观察, 一旦细胞变圆, 即加入 2-3 倍的有血清的 DMEM 培养基终止反应。
11. 用弯管将细胞吹打下来, 并将所消化的细胞转移到一个 50 ml 无菌离心管中, 2000 转/分, 离心 3 分钟。
12. 倒掉上清, 加入 10ml 新鲜培养基, 一般一瓶细胞可传代 3-4 瓶, 以后照此传代培养。
13. 一般传代 2-3 代 (培养了 20 天左右) 用于做各种实验效果最好。

#### 14.8. 实验动物免疫方案

- 1、**抗原:** 蛋白质、多肽、细胞器、细胞、组织等。
- 2、**免疫方式:** 皮下注射、腹腔注射、静脉注射、肌肉注射等。
- 3、**不同动物免疫所需抗原量 (以蛋白免疫为例)**

动物	>18-20kDa		<18-20kDa	
	抗原量	最佳抗原量	抗原量	最佳抗原量
兔子	20-200	100	50-400	200
小鼠	2-40	15	4-60	40
大鼠	10-50	30	20-150	50
绵羊	100-1000	200	200-1000	400
母鸡	20-200	100	50-400	200

单位: 微克

#### 4、免疫方案 (以免疫兔子为例):

天数	0	14	28	38	56	66	87
注射	x	x	x		x		
采血	2ml			2ml		2+20ml	2+50-70ml

#### 5、注意:

- ◇ 第一次免疫用完全佐剂与免疫原混合, 以后加强免疫用不完全佐剂与免疫原混合, 采取多点, 时间间隔式免疫法。

- ◇ 如果用细胞免疫兔子，那么每次免疫所需细胞量为  $2-3 \times 10^7$  cells。
- ◇ 在连续免疫完三次后，需要少量取血进行 ELISA 检测，检测所免疫动物的抗体滴度，一般滴度能达到 1:10,000-50,000。在处死所免疫的动物前一周应加强一次免疫。
- ◇ 如果用小鼠免疫，可以尾静脉小量采血（大约 50 $\mu$ l），最后取眼球大量采血（大约 500-1000 $\mu$ l）；如果用兔子免疫，可以耳缘静脉小量取血（大约 2mL），最后心脏大量取血（50-100mL）
- ◇ 按血清制备的标准方法将血清分离，并且分装成小份，储藏在 -80 $^{\circ}$ C。

#### 14.9. 血清制备

1. 取血后，37 $^{\circ}$ C 下，让血液凝固 1 到 2 小时（不加抗凝剂）；
2. 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜（让血块固缩）；
3. 当血清自然析出后，4 $^{\circ}$ C，3000 转/分，离心 10 分钟，分离血清，弃去不溶物；
4. 将血清移至一干净试管，并分装成小份，储藏在 -80 $^{\circ}$ C。

#### 14.10. ELISA

##### 一、包被抗原

1. 用 50mM 的碳酸盐包被缓冲液（pH 9.6）溶解抗原，使抗原浓度为 10-20  $\mu$ g/ml，加 100  $\mu$ l/孔到 96 孔酶标板，4  $^{\circ}$ C 放置过夜。
2. 第二天弃去包被液后，用 PBST 洗涤 3 次，每孔加入 150  $\mu$ l 1% BSA 37  $^{\circ}$ C 封闭 1 小时。
3. PBST 洗涤 3 次后，每孔加入 100  $\mu$ l 不同倍比稀释度的血清，并加入对照样品，37  $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。
4. PBST 洗涤 5 次后，加入 100 $\mu$ l 稀释后的 HRP 标记的二抗，37  $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。
5. PBST 洗涤 5 次后，显色剂显色 20 min 后，酶标仪上读取 A<sub>405</sub> 吸收值。

##### 二、包被细胞

1. 在 96 孔培养板上接种细胞数为  $1 \times 10^4$  cells/well，37 $^{\circ}$ C 过夜培养。
  2. 第二天用 PBS 洗涤培养板 2-3 次。
  3. 加入 125  $\mu$ l/well 10% Formalin（1:10 稀释），室温下固定 15 min。
  4. 用 ddH<sub>2</sub>O 洗涤培养板 3 次，并晾干，储藏在 2-8 $^{\circ}$ C 备用。
  5. 用 PBST 洗涤 3 次，每孔加入 150  $\mu$ l 1% BSA 37  $^{\circ}$ C 封闭 1 小时。
  6. PBST 洗涤 3 次后，每孔加入 100  $\mu$ l 不同倍比稀释度的血清，并加入对照样品，37  $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。
  7. PBST 洗涤 5 次后，加入 100  $\mu$ l 稀释后的 HRP 标记的二抗，37  $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。
  8. PBST 洗涤 5 次后，显色剂显色 20 min 后，酶标仪上读取 A<sub>405</sub> 吸收值。
- 🌈 50mM 的碳酸盐包被缓冲液 0.05mol/L pH9.6 碳酸缓冲液，4 $^{\circ}$ C 保存，Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.15 克，NaHCO<sub>3</sub> 0.293 克，蒸馏水稀释至 100 ml。

🌈 ABTS 作为底物进行显色反应(10ml)：

- ◇ 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.4ml
- ◇ 0.1M 柠檬酸 2.6ml
- ◇ ddH<sub>2</sub>O 5ml
- ◇ ABTS 5mg
- ◇ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(30%) 4  $\mu$ l（用前加入）

##### 注意：

- ◇ 一般做倍比稀释进行检测，需要有相应的对照血清。
- ◇ 不同的显色系统对应不同的光吸收值。

#### 14.11. 血清学筛选克隆新抗原/新基因

##### 一、E.coli/phage 裂解液预吸附血清

1. 将 E.coli/phage lysate 以 1:10-20 稀释在 TBST 溶液中。
2. 将 4 张 82mm 的 nitrocellulose membranes（NC）浸入稀释后的 E.coli/phage lysate 中，室温下水平摇动

- 30 分钟，取出 NC 并使膜沥干。
3. 用 50ml TBST 溶液洗膜 3 次，每次 10 分钟。
  4. 用滤纸轻轻吸去膜上的液体。
  5. 将膜放入 50ml 封闭液中，室温下水平摇动最少 30 分钟。
  6. 将膜从封闭液中取出，用 50ml TBST 溶液洗膜 3 次，每次 10 分钟。
  7. 将血清按 1:5 稀释在 TBST 溶液中，将一张膜放入溶液中，37°C 下轻轻水平摇动 10 分钟。
  8. 从血清稀释液中取出膜并丢弃，加入另外一张新膜，37°C 下轻轻水平摇 10 分钟。
  9. 重复步骤 8，直至所有 4 张膜都处理完。
  10. 除去最后一张膜，收集血清（primary antibody），分装成小份储存于 -80°C 冰箱中待用。

**注意：**

- ◇ 该步处理过程是为了去除血清中能与细菌和噬菌体裂解蛋白进行免疫反应的抗体，这样可以减少假阳性率；
- ◇ 一抗不能反复冻融，化冻后不要再次冰冻，可放于 4°C 作短暂保存；
- ◇ 可以是病人血清，也可以是免疫血清，如果是病人血清，则需要至少 10 个病人血清进行混合；

**二、噬菌体筛选**

1. 准备 NZY agar plates（至少用前 24 小时倒好），用前在 37°C 培养箱中烘烤 1-2 小时以去除水滴。
2. 将过夜培养的 XL1-blue MRF' 细菌 2000 转/分，离心 10 分钟，将细菌溶解在 10mM MgSO<sub>4</sub> 中，调整细菌浓度为 OD<sub>600</sub>=0.5。
3. 融化 NZY top，并将 NZY top 放在 50°C 水浴中。
4. 将适量的 XL1-blue MRF' 细菌溶液与一定稀释度的 phage 文库混合，37°C 下共同作用 15 分钟。
  - ◇ 直径 90mm 平板：200μl XL1-blue 细菌+适量的 phage 文库
  - ◇ 直径 150mm 平板：600μl XL1-blue 细菌+适量的 phage 文库（噬菌斑数量一般保持在 3000pfu/90mm; 12000pfu/150mm）
5. 将步骤 4 中的混合液与 NZY top 溶液混合（200μl 混合液+3-4ml NZY top 溶液；600μl 混合液+8-10 ml NZY top 溶液），倒入到 NZY agar plates 中，室温下放 10 分钟左右，然后倒置放于 37°C 下培养。
6. 当噬菌斑刚好可看到时（大约 5-8 小时），从培养箱中拿出平板。
7. 将 NC 放入 10mM IPTG 溶液中完全浸湿，在空中使膜沥干，并做好 3 个不对称的标记。
8. 将 IPTG 处理好的 NC 贴在平板上，不留气泡，然后倒置放于 37°C 下培养。
9. 过夜培养后，第二天早上取出平板，用镊子将膜轻轻掀起，注意不要将培养基粘在膜上。
10. 将膜放于 50ml TBST 溶液中，水平脱色摇床上震荡洗膜 3 次，每次 10 分钟。
11. 将膜放入 50ml 封闭液中，水平摇动，封闭 4-6 小时。
12. 在封闭液中加入适当滴度的一抗，水平摇动处理过夜。
13. 将膜放于 50ml TBST 溶液中，洗膜 3 次，每次 10 分钟。
14. 在封闭液中加入适当滴度的二抗（各个公司的二抗使用滴度不同），室温水平摇动 1-2 小时。
15. 将膜放于 50ml TBST 溶液中，洗膜 3 次，每次 10 分钟，最后用 50ml TBS 溶液洗膜 15-20 分钟，取出膜空气中沥干。
16. 将膜放入 BCIP-NBT 显色液中避光显色，水平摇动直到阳性斑点可见为止。
17. 从显色液中取出膜放在 TBS 溶液中，空气中使膜干燥。
18. 根据所做的标记，将膜与平板对齐，将平板上对应的阳性克隆区域的培养基挖出放入 500μl SM buffer 中，并加入 25 ml chloroform，4°C 贮存（最多可贮 6 月）。
19. 第一轮筛选得到阳性克隆需要进行第二轮筛选以去除假阳性并获得阳性单克隆噬菌体。过程如第一轮筛选，只不过用直径 90mm 平板；具体过程见步骤 4，这时所加入的噬菌体溶液是第一轮筛选得到的噬菌体上清（见步骤 18），在用前要滴定好噬菌体的滴度，噬菌斑的数量以可区分出单个克隆，同时密度不能太稀为标准（一般 100-200 pfu/90mm）。
20. 按第一轮相似的过程进行实验，最后显色，确定真正的阳性克隆，并将阳性单克隆所在的培养基挖出放入 500μl SM buffer 中，并加入 25 ml chloroform，4°C 贮存（最多可贮存 6 月）。

### 注意：

- ◇ 封闭液一般可用：5%的脱脂牛奶或 1%的 BSA 溶解在 TBST 溶液中。
- ◇ 第一轮筛选用 150mm 的平板；第二轮筛选用 90mm 的平板，一般需要筛选至少  $1 \times 10^6$  pfu。
- ◇ 认真做好三个不对称的标记，特别在第二轮挑选阳性克隆时要仔细将膜与平板吻合好，不能挑错。

### 三、单克隆剪切

1. 取第二轮筛选得到的阳性克隆贮存液上清。
2. 将过夜培养的 XL1-blue MRF' 细菌 2000 转/分离心 10 分钟，将细菌溶解在 10mM MgSO<sub>4</sub> 中，调整细菌溶度到 OD<sub>600</sub>=1.0。
3. 在一个 EP 管中加入：200μl XL1-blue MRF' 细菌+250ul phage stock (步骤 1) +1 ul ExAssist helper phage。
4. 将以上三种样品混合，37°C下共同保温 15 分钟。
5. 将样品混合物加入到 3 ml LB 培养基中，37°C震荡培养 3-4 小时。
6. 将试管放于 65-70°C水浴 20 分钟，3000 转/分，离心 15 分钟。
7. 将上清转入新的离心管中，已发生剪切的 phage particles 在上清中（上清可在 4°C下储存 1-2 月）。
8. 将 100ul phage 上清+200ul SOLR cells (OD<sub>600</sub>=1.0) 混合，37°C保温 15 分钟。
9. 取步骤 8 中溶液 5-10 ul 涂于 LB-amp agar plates (amp=50ug/ml)，过夜培养。
10. 第二天细菌长出，随机挑取单克隆接种到 LB-amp 培养基中培养过夜。
11. 过夜培养细菌分为三部分：(1) 提取质粒做双酶切，鉴定外源基因的大小；(2) 送样品进行 DNA 测序 (3) 加入 30-40%的甘油进行保种，分装成小份储存于-80°C备用。

### 附录：

#### 1、SM buffer (1L):

(5.8 g NaCl+2.0 g magnesium sulfate+50 ml 1M Tris (pH=7,5)+0.1 g gelatin)

#### 2、AP-buffer:

(100 mM Tris HCl (pH 9.5); 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>)

#### 3、10xTBS (1L) :

(0.1 M Tris-HCl (pH 8.0); 1.5 M NaCl)

#### 4、LB Broth (1L) :

(10 g NaCl+10 g of tryptone+5 g of yeast extract)

### 14.12. ELISPOT

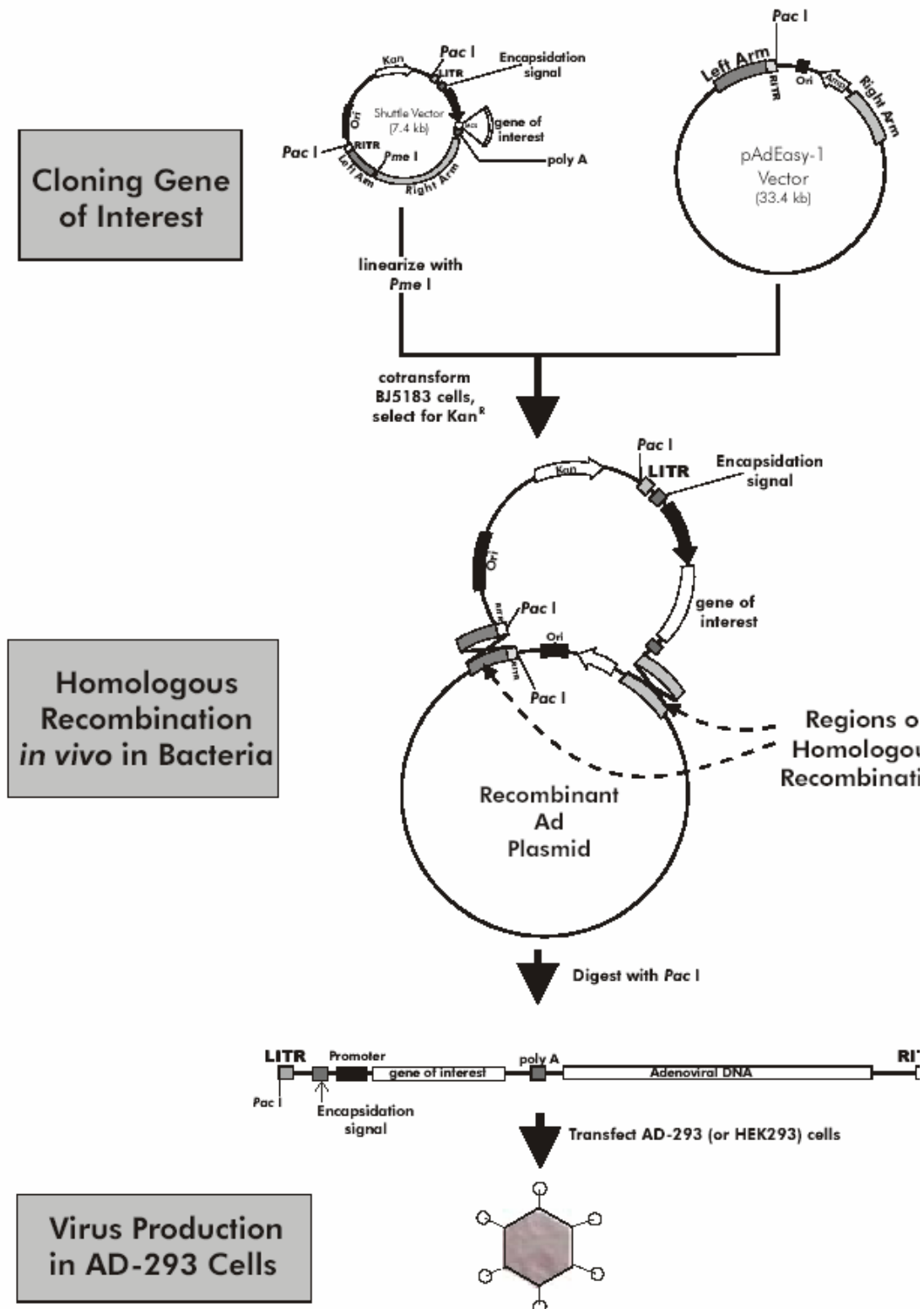
1. PBS 溶解抗原为 30 μg/ml，加 100 μl/孔于 PVDF 膜铺底的 96 孔灭菌板过夜；
2. 第二天吸去包被液后，加 5%FCS 的 PRMI 1640 培养基 100 μl 封闭 1 小时，37 °C；
3. 准备脾细胞悬液（用氯化铵去除红细胞，制备成单个脾淋巴细胞悬液）；
4. 从  $1 \times 10^6$ /孔开始，按 1:3 的稀释度开始逐孔稀释做不同浓度梯度，并做 3 个复孔，37 °C 静置培养 5 小时；
5. PBS 洗 3~5 次，生物素化的抗鼠 IgG 二抗孵育 30 min；
6. PBS 洗 3~5 次，链亲和素标记的碱性磷酸酶孵育 30 min；
7. PBS 洗 3~5 次，用底物 BCIP/NBT 显色，显微镜下观察显色反应，显色后及时终止反应；
8. 计数每孔中的斑点数目，计算每  $10^6$  个脾细胞中抗体分泌细胞数量。

### 14.13. 藻酸盐包裹实验

1. 将藻酸钠溶于无菌生理盐水，终浓度为 1.5%；
2. 收集培养的肿瘤细胞，用无血清的培养基洗涤 1 次，将细胞沉淀重悬于 1.5%藻酸钠溶液中；
3. 将上述肿瘤细胞悬液用 1 ml 加样枪缓慢滴入磁力搅拌的 250 mM CaCl<sub>2</sub> 溶液中，形成乳白色的藻酸盐小珠。继续静置于 250 mM CaCl<sub>2</sub> 中 30 min 即可使用。以上操作步骤均在无菌条件下进行；
4. 将第 4 次免疫后 7 天的小鼠用苯巴比妥钠 0.1ml (按 100 mg/kg 计) 腹腔注射麻醉，小鼠麻醉后置于解剖台上，

- 切开背部皮肤，皮下植入 4 粒藻酸盐包裹颗粒，缝合皮肤，外敷手术胶膜；
5. 天以后，小鼠经尾静脉注入 100  $\mu$ l (按 100 mg/kg 计) FITC 标记的葡聚糖(FITC-Dextran)；
  6. 20 min 后处死动物，取出藻酸盐颗粒，常温下加入 1 ml 的生理盐水，剪碎研磨颗粒，再加入 1 ml 的生理盐水，混匀标本，放置 1 小时，1500 rpm 离心 5 min。取上清液用荧光酶标仪测定；
  7. 用不同浓度的 FITC-Dextran 制备标准曲线。

#### 14.14. 重组腺病毒构建，扩增及纯化基本技术操作（细菌内同源重组 AdEasy System）



## 一 目的基因的克隆 (以 pshuttle-CMV 质粒为例)

1. 选择适当酶切位点, 进行酶切连接, 将目的片段插入 pshuttle-CMV 质粒多克隆位点。
2. 重组质粒鉴定: 酶切鉴定或测序。
3. 重组质粒扩增, 纯化并准备适量含目的基因的穿梭质粒。
4. 用 PmeI 单酶切线性化重组穿梭质粒, 电泳鉴定质粒完全被切开。
5. 胶回收线性化质粒, 以备共转化使用。

## 二 共转化

### 1 大肠杆菌 BJ5183 电转感受态制备

- ◇ 从新鲜琼脂板上挑取单个 BJ5183 细菌, 接种于 LB 培养基中, 37°C 振荡过夜。
- ◇ 接种 25ml 过夜培养物于 500ml LB 培养基, 37°C 振荡, 至 OD<sub>600</sub> 达到 0.4。
- ◇ 迅速将培养物置于冰浴中 30min, 至充分冷却。
- ◇ 将菌液转移至预冷的离心管中, 4°C 下以 2500r/min 离心 15 min, 弃培养液, 回收细胞。
- ◇ 以 10ml 预冷的 10% 甘油洗涤沉淀, 低温离心, 共两次。
- ◇ 加约 1ml (适量) 预冷的 10% 甘油重悬沉淀, 稀释悬液 100 倍, 测量 OD<sub>600</sub>, 至稀释浓度为 2-3×10<sup>10</sup> 个细胞/ml (1.0 OD<sub>600</sub> 约 2.5×10<sup>10</sup> 个细胞/ml)。分装, -80°C 或液氮保存待用。

### 2 病毒骨架质粒转化大肠杆菌, 扩增, 纯化。

- 3 将 1-5μl (约 1μg) 线性化的穿梭质粒及 1μl (约 100ng/μl) 病毒骨架质粒 (如 pAdEasy-1) 加入至含约 40μl BJ5183 电转感受态的 EP 管中混匀, 冰上冷却。
- 4 将混合物加入电转杯, 电击 (1250-1500V/mm, 5ms)。
- 5 电击结束取出样品, 加入 1ml SOC 或 LB 培养液, 37°C 低速振荡 40min。
- 6 取适当体积的电击转化细胞液涂于数个卡那霉素抗性平板 (25-50mg/ml), 37°C 培养 16-20hr。
- 7 次日挑取平板上长出的菌落 (选择最小的菌落), 接种于 3ml 含 25-50mg/ml 的 LB 培养基, 37°C 培养 10-15hr。
- 8 碱裂法提取质粒, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳筛选, 大质粒为可能阳性克隆, 进一步酶切鉴定。以 PacI 单酶切, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳如显示出一条大片段 (约 30kb), 及一条小片段 (约 3.0 或 4.5kb) (同时可进行其它酶切鉴定), 则基本确定为阳性克隆。
- 9 取 1-5μl 阳性质粒转化至 DH5α 大肠杆菌细胞 (BJ5183 为 recA+, 质粒 DNA 易发生突变, DH5α 或 JM109, XL1-blue 菌株为重组缺陷性菌株, 可稳定扩增已鉴定的重组质粒), 扩增细菌并纯化质粒。

## 三 重组病毒质粒转导 293 细胞

- 1 293 细胞培养: 转导 24 小时前, 以方瓶为例, 接种 2×10<sup>6</sup> 293 细胞于 25cm<sup>2</sup> 方瓶, 使生长密度约 50-70%。(也可以使用 6 孔或 96 孔板)
- 2 以 PacI 单酶切重组病毒质粒 (转导 25cm<sup>2</sup> 方瓶约需 4μg DNA), 完全线性化后, 乙醇沉淀, 再以 20 μl ddH<sub>2</sub>O 溶解。
- 3 脂质体包裹质粒 (以 Lipofectamine 为例): 每 4μg PacI 约需 20μl Lipofectamine 包裹。质粒及脂质体分别稀释于 500μl 无血清培养基再混合, 置于室温下 15-30min。
- 4 以无血清培养基轻轻洗涤培养瓶, 另加 2.5ml 无血清培养基, 37°C 放置 10min。
- 5 将 Lipofectamine-DNA 混合物加入培养瓶, 37°C 孵育 4hr。
- 6 4hr 后, 弃 Lipofectamine-DNA 混合液, 另加入 6ml DMEM 完全培养基 (含 10% FCS)。如有大量细胞漂浮, 可不弃 Lipofectamine-DNA 液, 加入 6ml DMEM 完全培养基, 37°C 孵育过夜, 再换液。
- 7 培养过程中观察细胞生长情况。约 2 周后可观察到细胞病变 (CPE) 出现 (如用 pAdTrack-CMV 质粒, 由于含 GFP, 可观察到绿色荧光)。

## 四 重组病毒鉴定

- 1 转导 10-14d 后, 收集细胞沉淀, 加入 2ml 灭菌的 PBS 混悬, 冻融细胞, 离心后收集上清保存于 -80°C。
- 2 取 30-50% 步骤 1 中上清, 感染 50-70% 饱和度的 25cm<sup>2</sup> 方瓶中 293 细胞。2-3d 后出现明显细胞病变。
- 3 感染后 3-5d, 当 1/3-1/2 细胞漂浮时收集病毒。按步骤 1 收集细胞并准备病毒上清。通过 Western blot 和/或 PCR 鉴定重组腺病毒产生。
- 4 PCR 鉴定重组病毒。取 5μl 病毒上清加入 10μl 蛋白酶 K, 55°C 孵育 1hr, 再煮沸 5min, 离心后取 1-2μl 作 PCR。

## 五 重组病毒扩增，纯化

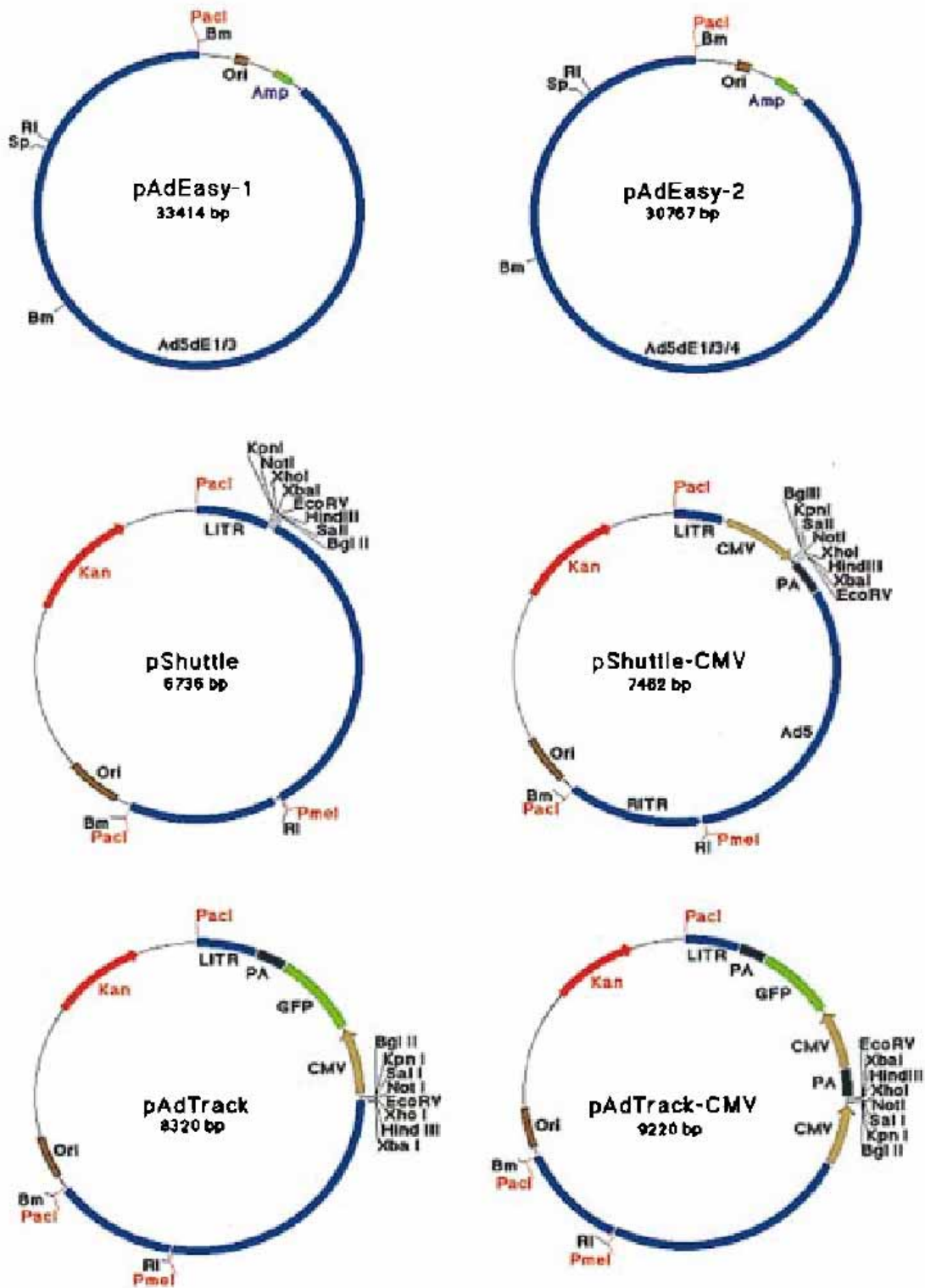
- 1 75cm<sup>2</sup> 方瓶中接种 293 细胞，至密度达到 90%，加入适量病毒上清感染细胞。3-4d 后，细胞几乎变圆，且有一半细胞漂浮，则收集所有细胞。约 500g 转速离心，弃上清。
- 2 以灭菌 PBS 重悬沉淀，反复冻融 4 次。4℃下 7000g 离心 5min。病毒纯化至少需要 30 瓶 75cm<sup>2</sup> 方瓶细胞。
- 3 CsCl 连续梯度离心纯化：50ml 离心管中称量 4.4g CsCl，加入 8ml 病毒裂解上清液，混匀，体积约为 10ml。转移至 12ml 超速离心管(用于 SW41 转头)中，覆盖约 2ml 矿物油。平衡后，10℃下 32000 rpm 离心 18-24hr，用注射器抽吸离心出的病毒带。  
(也可 CsCl 不连续梯度离心：20ml 超速离心管中缓慢加入 8ml CsCl 1.4 (53 g + 87 mL 10 mM Tris-HCl, pH=7.9)，上面小心加入 6 mL CsCl 1.2 (26.8 g + 92 mL 10 mM Tris-HCl, pH=7.9)，再小心加入病毒上清液至体积达到 20ml。平衡后，4℃下 23000rpm 离心 90min (SW28 转头)，用注射器抽吸下层蓝白色病毒带)
- 4 病毒透析去盐：配置透析液 (10 mM Tris pH 8.0, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% sucrose)，灭菌处理。4℃透析，更换 3 次透析液，可基本去除 CsCl，病毒保存于 -80℃。

## 六 病毒滴度测定 (TCID<sub>50</sub>)

- 1 细胞准备:96孔板中接种100μl 293细胞,每孔细胞数约10<sup>4</sup>个,以2% DMEM培养
- 2 稀释病毒液准备：以2% DMEM将病毒液稀释成8个较高浓度 (如10<sup>-3</sup>-10<sup>-10</sup>)，每个浓度重复10个，每孔加入病毒稀释液100μl。另留两排不加病毒液作为阴性对照。37℃下，孵箱培养10天。
- 3 10d后观察细胞，记数每排出现CPE的孔数，计算细胞病变率。(如某一浓度各孔细胞全部病变，比率为1，如无细胞病变，则比率为0)。
- 4 计算  $T = 10 \times 10^{1+d(S-0.5)} / ml$   
d = Log 10 稀释度 (如为10倍稀释℃, d=1)  
S = 各浓℃细胞病变比率之和

实验室重组腺病毒常用质粒：病毒骨架质粒：pAdEasy-1, pAdEasy-2

穿梭质粒：p-Shuttle, p-Shuttle-CMV, pAdTrack, pAdTrack-CMV



### 组织病理技术

#### 组织处理：

1. 取新鲜组织厚度不超过 5mm，10% 中性福尔马林固定，大于 24 小时。
2. 固定后冲水 12-24 小时，
3. 75%酒精， 1 次，1 小时，
4. 85%酒精， 1 次，1 小时，
5. 95%酒精， 3 次，1 小时，
6. 100%酒精， 3 次，1 小时，

7. 二甲苯, 2次, 1小时,
8. 石蜡浸泡, 3次, 2小时,

**HE 染色:**

**{水化}**

1. 二甲苯, 2次, 5-10分钟,
2. 100%酒精, 1次, 1-2分钟,
3. 95%酒精, 1次, 1-2分钟,
4. 85%酒精, 1次, 1-2分钟,
5. 75%酒精, 1次, 1-2分钟,
6. 过蒸馏水,

**{染色}**

1. Mayer 氏苏木素, 1分钟,
2. 温水冲洗, 5-10分钟,
3. 75% 盐酸酒精, 1-2分钟,
4. 自来水冲洗, 30秒钟,
5. 依红复染, 1-2分钟,
6. 自来水洗, 30秒钟,
7. 85%酒精, 1次, 1-2分钟,
8. 95%酒精, 2次, 1-2分钟,
9. 100%酒精, 2次, 1-2分钟,
10. 二甲苯, 2次, 5-10分钟,
11. 中性树胶封片。

**14.15. 免疫组化染色**

**一. 石蜡切片免疫组化染色实验步骤:**

**1. 石蜡切片脱蜡至水:**(石蜡切片染色前应置 60°C 1 小时)。

- (1) 二甲苯I、II,各 10 分钟。
- (2) 梯度酒精: 100%, 2分钟→ 95%, 2分钟→ 80%, 2分钟→ 70% 2分钟。
- (3) 蒸馏水洗: 5分钟, 2次(置于摇床)。

**2. 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶:** 3% $H_2O_2$ , 室温 10 分钟(避光)。

**3. 蒸馏水洗:** 5分钟, 2次(置于摇床)。

**4. 抗原修复:** 根据待检测的抗原, 选择适当的方法。

附: 抗原修复液(10mM pH 6.0 枸橼酸钠缓冲液)的配制

(1) 储备液的配制:

A 液: 枸橼酸三钠- $2H_2O$  29.41g + 蒸馏水 1000ml

B 液: 枸橼酸 21g + 蒸馏水 1000ml

(2) 工作液的配制: A 液 82ml + B 液 18ml + 蒸馏水 900ml

抗原修复的方法:

- (1) 高压锅处理技术: 枸橼酸钠缓冲液(10mM, PH6.0), 淹没切片, 盖上锅盖, 高压锅内煮沸, 上汽 3 分钟后缓慢冷却(可用自来水在高压锅外冲, 以助冷却)。
- (2) 微波处理技术: 用塑料切片架, 置于塑料或耐温玻璃容器内, 枸橼酸钠缓冲液淹没切片, 选择中高或高档, 5 分钟; 取出并补充已预热的枸橼酸钠缓冲液; 再选择中高或高档, 5 分钟。(最佳温度为 92~95°C)
- (3) 酶消化处理: 此略。

**抗原修复的注意事项:**

- (1) 组织不能干。

- (2) 选择抗原修复方法要因抗体而异。
- (3) 该方法主要用于 10%福尔马林固定、石蜡包埋组织。
- (4) 抗原修复后至 DAB 显色的过程中, 均需用 PBS 缓冲液。

5. **PBS**: 5 分钟, 2 次(置于摇床)。

6. **正常血清封闭**: 从染片缸中取出切片, 擦净切片背面水分及切片正面组织周围的水分(保持组织呈湿润状态), 滴加正常山羊或兔血清(与**第二抗体**同源动物血清)处理, 37°C, 15 分钟。

附: 正常血清配制(或按试剂盒规定的浓度配制)

按 1:20 比例, 用 PBS 配制, 每张切片需要量按 50 $\mu$ l+5 $\mu$ l (10%抛洒量)计算。

7. **滴加第一抗体**: 用滤纸吸去血清, 不洗, 直接滴加第一抗体, 37°C 2 小时(也可置于 4°C 冰箱过夜)。

8. **PBS**: 5 分钟, 2 次(置于摇床)。

9. **滴加生物素化的二抗**, 37°C, 40 分钟。

10. **PBS**: 5 分钟, 2 次(置于摇床)。

11. **滴加三抗 (SAB 复合物)**, 37°C, 40 分钟。

12. **PBS**: 5 分钟, 2 次(置于摇床)。

13. **DAB 显色**, 镜下观察, 适时终止(自来水冲终止)。

附: DAB 的配制

(1) 储备液(DAB 25mg/ml)的配制: DAB 250mg + PBS 10ml, 待完全溶解后分装成 1ml, 100 $\mu$ l, 50 $\mu$ l, 20 $\mu$ l 等, -20°C, 冻存。

(2) 工作液: DAB 储备液 20 $\mu$ l + PBS 1000 $\mu$ l + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 $\mu$ l

14. **自来水(细水)充分冲洗**。

15. **苏木素复染**, 室温, 30 秒, 自来水冲洗。

16. **自来水冲洗返蓝**, 15 分钟。

17. **梯度酒精脱水**:

80%, 2 分钟 → 95%, 2 分钟 → 100%, 2 次, 5 分钟。

18. **二甲苯透明**:

I, III (二甲苯) 各 5 分钟

19. **封片**: 加拿大树胶(或中性树胶)封片。

## 二. 细胞爬片的免疫组化染色:

1. 取出细胞爬片, 迅速置入冷丙酮固定 20~30 分钟。
2. 蒸馏水浸泡 5 分钟, 2 次。
3. 打孔液浸泡 5 分钟。
4. 蒸馏水浸泡 5 分钟, 2 次。
5. 后接前述实验步骤的第 6 步(正常血清封闭)。

注: 第 3、4 步仅用于检测细胞内抗原, 检测细胞膜抗原时不用。

## 三. 冰冻切片的免疫组化染色:

1. 新鲜组织立即在恒冷冰冻切片机内切片(也可-80°C 保存), 厚度为 5~6 $\mu$ m。
2. 载玻片可不打底, 裱片后, 立即用电吹风吹干。
3. 如不马上染色, 可密封后-20°C 保存。
4. 染色前用冷丙酮在 4°C 固定 10-20 分钟。
5. PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟, (必要时应用 0.1%柠檬酸钠+0.1%triton 打孔)
6. 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 灭活内源性过氧化物酶, 20 分钟, 避光;
7. 用 PBS 洗 2 次, 每次 5 分钟;
8. 接前面实验步骤第六步。

## 四. 切片的预处理:

1. 洗衣粉液浸泡 30 分钟，冲洗，晾干。
2. 洗液（含强酸、高锰酸钾等）浸泡 24 小时，冲洗，晾干。
3. APES（1:50 丙酮溶液）10-20 秒（注意：不能用塑料容器及塑料切片架）。
4. 纯丙酮 I，约 10 秒。纯丙酮 II，约 5 秒
5. 晾干或烤箱内烤干，备用。

#### 14.16. 流式细胞仪常用的几种检测方法

##### 一、测定用乙醇固定的 DNA 的含量

###### 1、培养细胞的 DNA 含量的测定

制备单细胞悬液于 200 $\mu$ l 的 PBS 缓冲液中；

加入 2ml 预冷的 70%乙醇，4 $^{\circ}$ C 保存；

###### 附:细胞固定的一般步骤

- 1) 取单细胞悬液 1~2 $\times$ 10<sup>6</sup> 个细胞于 PBS (PH=7.2) 缓冲液中；
- 2) 300g 离心 5 分钟，弃上清，反复两次；
- 3) 重悬细胞于 0.5ml PBS 缓冲液中；
- 4) 将细胞悬液放置于 2~3ml 冷 70%乙醇中，混匀，保存于 4 $^{\circ}$ C，至少 30 分钟。在 4 $^{\circ}$ C 条件下可保存 2~3 周。

###### 注意：

- ◇ 根据实验的要求，固定剂也可选用 1~3%多聚甲醛；
- ◇ 将乙醇作为固定剂时，乙醇应预冷至 0~4 $^{\circ}$ C；
- ◇ 细胞在固定时，固定剂应缓慢滴入细胞悬液中，使固定剂的浓度缓慢增加，并不断震摇，以免细胞成团（特别是用乙醇固定时）。
- ◇ 300g 离心 5 分钟，去上清，再重悬于 400 $\mu$ l PBS 中；
- ◇ 显微镜下观察，若有明显的黏附，须再用筛网过滤；
- ◇ 加入 PI（含 Rnase），避光孵育 30 分钟；
- ◇ 上机检测。

###### 2、新鲜组织的 DNA 含量的测定

- 1) 用 200mg 湿重组织用机械法制成单细胞悬液；
- 2) 500g 离心 5 分钟；
- 3) 弃上清，重悬于 10ml 染色-去污剂中；
- 4) 再过滤，用 200 目的筛网或 70~80 $\mu$ m 的筛网过滤；
- 5) 上机检测。

###### 3、石蜡包埋组织切片的 DNA 含量的测定

- 1) 从石蜡包埋切取切片 50  $\mu$ m 厚，2~3 片，制成单细胞悬液；
- 2) 用 PBS 缓冲液洗涤，500g 离心 5 分钟，弃上清；
- 3) 加入 PI 液 1ml 室温避光 30 分钟；
- 4) 调整细胞浓度为 1 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml；
- 5) 上机检测。

##### 二、细胞凋亡检测及相关分子检测

###### 1、细胞 DNA 含量分布（由细胞 DNA 降解方式检测细胞凋亡）

- ◇ 收集已固定的单细胞悬液约 5 $\times$ 10<sup>5</sup>~1 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml；
- ◇ 离心除去固定液，3ml PBS 重悬细胞；
- ◇ 1500rpm 离心，5 分钟，弃去 PBS；
- ◇ 加 PI 染液 1ml，室温避光 20 分钟；
- ◇ 调整细胞浓度 5 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml；
- ◇ 上机检测。

###### 2、磷脂酰丝氨酸外翻分析检测细胞凋亡

- 1) 常规制备单细胞悬液,用 PBS 洗两次.(若为全血要先溶血),取约  $5 \times 10^6$  个细胞, 1500rpm 离心,弃上清,用 400 $\mu$ l 1 $\times$ Binding Buffer 重悬;
- 2) 分成 a、b、c、d、e 五管,每管约  $1 \times 10^6$  个细胞
  - a) 阴性对照,不加任何试剂;
  - b) 阳性对照,加 2%多聚甲醛固定 30 分钟,加 AnnexinV 5 $\mu$ l,室温 10min,用 1 $\times$ Binding Buffer 洗一次,弃上清再加 190 $\mu$ l 缓冲液、10 $\mu$ l PI 避光 15 分钟
  - c) 加 10 $\mu$ l PI,避光孵育 15 分钟;
  - d) 加 5 $\mu$ l AnnexinV 液,室温避光孵育 15min;
  - e) 加 10 $\mu$ l PI 和 5 $\mu$ l AnnexinV 液,室温避光孵育 5min;
- 3) 每管各加 400 $\mu$ l 1 $\times$ Binding Buffer。
- 4) 上机检测。

注意 a. 操作动作要尽量轻柔,勿用力吹打细胞;  
 b. 操作时注意避光;  
 c. 反应完毕后尽快检测,最好在一小时内检测。

### 3、用单克隆抗体 APO2.7 检测细胞凋亡

- 1) 放置  $0.5 \sim 1 \times 10^6$  个细胞到试管中;
- 2) 室温离心 200g, 6min;
- 3) 弃上清,加入 100 $\mu$ l 冷的 (4 $^{\circ}$ C) 在 PBSF 溶液中含 100 $\mu$ g/ml 的 digitonin,轻轻地重悬细胞,在冰上孵育 20min;
- 4) 加入 2ml 冷的 (4 $^{\circ}$ C) PBSF 液,室温离心 200g, 6min;
- 5) 弃上清,加入 20 $\mu$ l PE 标记的 Apo2.7 单克隆抗体和 80 $\mu$ l PBSF 液,用 vortex 轻轻震荡,室温避光孵育 15 分钟;
- 6) 加入 2ml PBSF 液,室温离心 200g, 6min;
- 7) 弃上清,加入 1ml PBSF 液重悬细胞;
- 8) 避光保存,直到流式细胞仪检测。

PBSF : 含 2.5% FCS (v/v) 和 0.01%NaN<sub>3</sub> (w/v) 的 PBS。

## 三、用流式细胞术进行 DNA 周期分析

1、方法:同 DNA 含量检测

2、注意:

单细胞浓度应约  $10^6$ /ml,以免影响检测的 CV 值和检测结果;

制备完成后的标本应用光学显微镜检查其质量(如细胞是否聚集或过多碎片),以保证得到足够的细胞含量;

醛类固定会影响 PI 与核酸的结合。

## 四、免疫荧光标记法

### 1、细胞膜上的免疫荧光检测法

#### 间接标记法

- 1) 制备单细胞悬液;
- 2) 细胞计数,取出  $1 \times 10^6$  个细胞于试管中;
- 3) 用台盼蓝染色计活细胞数,要求活细胞数 >90~95%;
- 4) 在试管中加入一抗,(剂量按照说明书的要求),孵育 30~60 分钟;
- 5) PBS 洗涤 1~2 次,1500rpm,离心 3 分钟,弃上清;
- 6) 加入二抗,孵育 20~30 分钟;
- 7) PBS 洗一次,1500rpm,离心 3 分钟,弃上清;
- 8) 加 300 $\mu$ l PBS,上机检测(若不能及时上机检测,可加 1ml 1%多聚甲醛固定,可放置 1 周)。

#### 直接标记法

①~③同间接标记法

- ④在试管中加入荧光标记的抗体，混匀，孵育 30 分钟；
- ⑤用 PBS 洗 2 次，1500rpm，离心 3 分钟，弃上清；
- ⑥加 300 $\mu$ l PBS(PH=7.4)，上机检测。

## 2、细胞膜内的免疫荧光标记法

### 间接免疫荧光标记法

- 1) 取已制备好的单细胞悬液，用 1~3%的多聚甲醛固定 30 分钟（也可 4 $^{\circ}$ C 保存过夜）；
- 2) 用 PBS 洗两次，弃上清；
- 3) 细胞膜打孔，加入 0.1%皂素 200 $\mu$ l，室温 10 分钟；
- 4) 用 PBS 洗涤两次；
- 5) 加入第一抗体，室温 30~60 分钟，或 4 $^{\circ}$ C 过夜，同时须设阴性对照或同型对照管；
- 6) 用 PBS 洗涤两次；
- 7) 加入二抗（荧光标记的抗体）室温 20 分钟，避光；
- 8) 用 PBS 洗涤 1~2 次，弃上清；
- 9) 重悬细胞于 500 $\mu$ l PBS 中，上机检测。

### 直接荧光标记法

- ①~⑤同间接荧光标记法；
- 加入荧光素标记好的抗体，避光 30 分钟（同时做同型对照管）；
- 用 PBS 洗涤 1~2 次，弃上清；
- 加 300 $\mu$ l PBS 上机检测。

### 细胞膜上及细胞内双标记法（直标法）

- 1) 取出已制备好的未固定的单细胞悬液  $1 \times 10^6$  个细胞于试管中；
- 2) 用 PBS 洗涤两次；
- 3) 加入用荧光素标记的抗体来标记细胞膜上的抗原，同时加上阴性对照管，室温孵育 20 分钟；
- 4) 在试管中加入 1%~3%多聚甲醛 1ml，固定 30 分钟；
- 5) PBS 洗涤两次 1500rpm 3 分钟，弃上清；
- 6) 打孔，加入 0.1%皂素 200 $\mu$ l 室温 10 分钟；
- 7) 用 PBS 洗涤两次，弃上清；
- 8) 加入用荧光素标记的抗体，标记膜内的抗原（标记膜内的抗体的荧光素的颜色与膜上标记的荧光素的颜色务必不相同）室温 20 分钟孵育；
- 9) 用 PBS 洗一遍弃上清；
- 10) 用 300 $\mu$ l PBS 重悬细胞，上机检测

## 五、流式细胞术中的几点注意事项：

### 1、对照组的设置：

在流式细胞术中所测得的量都是相对值，不是绝对值。如需知道绝对值时必须设置对照组样品。对照组样品包括有阴性对照和阳性对照。

#### （1）阴性对照的设置

- ◇ 在实验过程中，如做间接标记法，可设置与一抗无关的实验，即在实验中不加一抗而只加上带有荧光标记的第二抗体作为阴性对照管，作为阴性对照。
- ◇ 在实验过程中，假设做直接标记法，可设置理论上的阴性细胞作为阴性对照管，实验过程及步骤与实验组务必相同。（做间接标记法时，同样也可同时设置“阴性细胞”的阴性对照管作为阴性对照。
- ◇ 在实验过程中，假设做直接标记法，可将实验组细胞，取一管，加上与实验抗体所标记的荧光颜色相同的同型对照来作为阴性对照。

#### （2）阳性对照的设置：

在实验过程中如涉及到表达缺失或减少的实验，应设置阳性对照组，其设置方法与阴性对照设置相同。

### 2、几点建议：

- 1) 在实验过程中，在保证实验的科学性和准确性的基础上，应尽量减少实验工序和过程。由于间接标记法的工序

多, 实验过程长, 如再加之操作的不熟练, 细胞更容易丢失和受损, 而造成实验结果的误差。因此, 在条件允许的范围内, 建议尽量做直接标记法而不去做间接标记法, 以保证实验的真实性和准确性。

- 2) 建议送检细胞一定要足够量, 一般要求  $1 \times 10^6$  个细胞。不要过少。因为, 如细胞太少检测时样本流量相对会增大从而影响变异系数, 结果也不可信。细胞量也不宜过多, 因细胞量太多加入的抗体或染料相对不足, 结果也由此受影响。
- 3) 同一种细胞需同时做双标记时, 须做双标记的同型对照, 且两种抗体所标记的荧光颜色务必不同。

#### 14.17. 人肿瘤抗原的识别与鉴定 - 免疫沉淀实验流程

##### 一、裂解细胞

1. 收集细胞。将培养瓶置于冰上, 倒掉培养基, 用 PBS 或生理盐水漂洗两次, 留适量液体于瓶内, 然后用特制的细胞刮棒朝一个方向刮取细胞。将细胞悬液转移到离心管, 离心取沉淀,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。(收集细胞要迅速, 低温下进行, 以减弱蛋白酶的作用)
2. 裂解细胞。采用 RIPA 裂解体系, 使用前  $4^{\circ}\text{C}$  预冷, 按  $10^7$  个细胞加入 1.0ml 裂解液, 吹打混匀, 加入适量的蛋白酶抑制剂 (如 cocktail), 冰上放置 3~5 分钟。
3. 超声处理裂解液。使用探针型超声进行多次适当频率的短促冲击, 10~20 秒/次, 重复 3 次, 中间间隔 10~20 秒, 冰浴下进行。
4.  $15,000\text{rpm}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  离心 15min, 吸取上清液于另一 Ep 管中, 置冰上。上清液用于下一步的预处理。

##### 二、裂解物的预处理

使用正常人的血清对裂解物进行预处理。

- 1、按 1ml 裂解物加  $2\mu\text{l}$  对照血清的比例加入正常人血清。
- 2、室温孵育 2~3 小时, 缓慢摇动。

##### 三、免疫复合物的纯化

- 1) 用 Dynabeads proteinA 进行免疫复合物的纯化。
- 2) 将 Dynabeads proteinA 振荡混匀, 吸取  $100\mu\text{l}$  磁珠于 Ep 管中, 置于磁铁架 (DynaL MPC) 上, 磁珠吸附到管壁上, 弃上清。
- 3) 加  $500\mu\text{l}$  0.1M Na-phosphate (pH 8.1) 至 Ep 管, 轻柔搓动管子约 2~3min, 将 Ep 管置于磁铁架上, 磁珠吸附到管壁上, 弃上清。
- 4) 重复 2 步骤两次。
- 5) 清洗完磁珠后, 加  $500\mu\text{l}$  预处理后的裂解物, 反复摇动管子, 室温下反应 10~20min。
- 6) 将 Ep 管置于磁铁架上, 磁珠吸附到管壁上, 将上清转移至另一 Ep 管中。
- 7) 用 RIPA 裂解液清洗磁珠 3 次。
- 8) 洗脱抗原-抗体复合物。加 0.1M citrate (pH 3.1)  $30\mu\text{l}$  于 Ep 管中, 轻柔搓动管子约 2~3min, 将 Ep 管置于磁铁架上, 吸取上清于一 Ep 管。
- 9) 重复步骤 7, 将上清收集于同一个 Ep 管洗脱样品总体积为  $60\mu\text{l}$ , 作对照用。
- 10) 磁珠用 0.1M Na-phosphate (pH 8.1) 清洗三次后备用。
- 11) 在步骤 5 留取的上清中加入病人血清 (1ml 加  $2\mu\text{l}$  血清), 缓慢摇动, 室温孵育 2~3h。
- 12) 将 Ep 管置于磁铁架上, 磁珠吸附到管壁上, 弃上清。
- 13) 重复步骤 6~8。共收集到两份样品, 对照与病人的纯化免疫复合物各  $60\mu\text{l}$ 。
- 14) 磁珠用 0.1M Na-phosphate (pH 8.1) 清洗三次后加入柱储液  $100\mu\text{l}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  保存。
- 15) 在样品中加入  $2 \times \text{SDS}$  上样缓冲液并用 1M NaOH 调节 pH 至使溴酚蓝呈蓝色。

##### 四、1D SDS-PAGE

用免疫沉淀后的样品可直接进行一维凝胶电泳, 或者对磁珠上的蛋白 A 或蛋白 G 进行耦联剂修饰, 洗脱后的样品可进行 Western Blot。

**RIPA 裂解液:** 150mmol/L NaCl; 1.0%NP-40; 0.5%脱氧胆酸钠; 0.1%SDS; 50mmol/L Tris, (pH 8.0)

#### 15. 附录-试剂配方

## 15.1. 常用贮液与溶液

### 分子生物学常用缓冲液的配制

#### TE (用于悬浮和贮存 DNA)

成分及终浓度	配制 100ml 溶液各成分的用量
10mmol/L Tris-HCl	1 ml 1mol/L Tris-HCl ( pH7.4-8.0 , 25°C )
1mmol/L EDTA	200 ul 0.5 mol/L EDTA ( pH 8.0 )
水	98.8ml

#### STE (即 TEN)

0.1 mmol/L NaCl , 10 mmol/L Tris-Cl ( pH8.0 ) , 1 mmol/L EDTA ( pH8.0 )

#### STET

0.1 mmol/L NaCl , 10 mmol/L Tris-Cl ( pH8.0 ) , 1 mmol/L EDTA ( pH8.0 )  
5% Triton X-100

#### TNT

10 mmol/L Tris-Cl ( pH8.0 ) , 150 mmol/L NaCl , 0.05% Tween 20

#### 碱性缓冲液

1×使用液 (每升) : 5ml 10mol/L NaOH , 2 ml 0.5 mmol/L EDTA ( pH8.0 )

#### Tris-甘氨酸 5×浓贮存液 (每升)

15.1g Tris 碱  
94 g 甘氨酸 (电泳级) ( pH8.3 )  
50 ml 10% SDS (电泳级)

#### 2×SDS 凝胶加样缓冲液

100 mmol/L Tris-HCl ( pH6.8 )  
200 mmol/L 二硫苏糖醇 ( DTT )  
4% SDS (电泳级)  
0.2% 溴酚蓝  
20% 甘油

#### 30%丙烯酰胺溶液

##### 【配制方法】

将 29g 丙烯酰胺和 1g N, N' -亚甲双丙烯酰胺溶于总体积为 60ml 的水中。加热至 37°C 溶解之, 补加水至总体积为 100ml。用 Nalgene 滤器 ( 0.45μm 孔径 ) 过滤除菌, 查证该溶液的 pH 值应不大于 7.0, 置棕色瓶中保存于室温。

##### 【注意】

丙烯酰胺具有很强的神经毒性并可以通过皮肤吸收, 其作用具累积性。称量丙烯酰胺和亚甲双丙烯酰胺时应戴手套和面具。可认为聚丙烯酰胺无毒, 但也应谨慎操作, 因为它还可能会含有少量未聚合材料。

一些价格较低的丙烯酰胺和双丙烯酰胺通常含有一些金属离子, 在丙烯酰胺贮存液中加入大约 0.2 体积的单床混合树脂 ( MB-1Mallinckrodt ), 搅拌过夜, 然后用 Whatman 1 号滤纸过滤以纯化之。

在贮存期间, 丙烯酰胺和双丙烯酰胺会缓慢转化成丙烯酰胺和双丙烯酸。

#### **40%丙烯酰胺**

##### **【配制方法】**

把 380g 丙烯酰胺 ( DNA 测序级 ) 和 20g N, N' -亚甲双丙烯酰胺溶于总体积为 600ml 的蒸馏水中。继续按上述配制 30%丙烯酰胺溶液的方法处理, 但加热溶解后应以蒸馏水补足至终体积为 1L。

##### **【注意】**

见上述配制 30%丙烯酰胺的说明, 40%丙烯酰胺溶液用于 DNA 序列测定。

#### **0.1mol/L 腺苷三磷酸 ( ATP ) 溶液**

##### **【配制方法】**

在 0.8ml 水中溶解 60mg ATP, 用 0.1mol/L NaOH 调至 pH 值至 7.0, 用蒸馏水定容 1ml, 分装成小份保存于 -70°C

#### **10mol/L 乙酸酐溶液**

##### **【配制方法】**

把 770g 乙酸酐溶解于 800ml 水中, 加水定容至 1L 后过滤除菌。

#### **10%过硫酸铵溶液**

##### **【配制方法】**

把 1g 过硫酸铵溶解于终量为 10ml 的水溶液中, 该溶液可在 4°C保存数周。

#### **BCIP 溶液**

##### **【配制方法】**

把 0.5g 的 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸二钠盐 ( BCIP ) 溶解于 10ml 100%的二甲基甲酰胺中, 保存于 4°C

#### **2×BES 缓冲盐溶液**

##### **【配制方法】**

用总体积 90ml 的蒸馏水溶解 1.07g 盐溶液 BES[N, N-双 ( 2-羟乙基 ) -2-氨基乙磺酸]、1.6g NaCl 和 0.027g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 室温下用 HCl 调节 该溶液的 pH 值至 6.96、然后加入蒸馏水定容至 100ml, 用 0.22μm 滤器过滤除菌, 分装成小份, 保存于-20°C。

#### **1mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液**

##### **【配制方法】**

在 200ml 蒸馏水中溶解 54g CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 用 0.22μm 滤器过滤除菌, 分装成 10ml 小份贮存于-20°C。

##### **【注意】**

制备感受态细胞时, 取出一小份解冻并用蒸馏水稀释至 100ml, 用 Nalgene 滤器 ( 0.45μm 孔径 ) 过滤除菌, 然后骤冷至 0°C。

#### **2.5mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液**

##### **【配制方法】**

在 20ml 蒸馏水中溶解 13.5g CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 用 0.22μm 滤器过滤除菌, 分装成 1ml 小份贮存于-20°C。

#### **1mol/L 二硫苏糖醇 ( DTT ) 溶液**

##### **【配制方法】**

用 20ml 0.01mol/L 乙酸钠溶液 ( pH5.2 ) 溶解 3.09g DTT, 过滤除菌后分装成 1ml 小份贮存于-20°C。

##### **【注意】**

**DTT 或含有 DTT 的溶液不能进行高压处理。**

### 脱氧核苷三磷酸 ( dNTP ) 溶液

#### 【配制方法】

把每一种 dNTP 溶解于水至浓度各为 100mmol/L 左右,用微量移液器吸取 0.05mol/l Tris 碱分别调节 每一 dNTP 溶液的 pH 值 7.0 (用 pH 试纸检测),把中和后的每种 dNTP 溶液各取一份作适当稀释,在下表中给出的波长下读取光密度计算出每种 dNTP 的实际浓度,然后用水稀释成终浓度为 50mmol/L 的 dNTP,分装成小份贮存于 -70°C。

碱基	波长 ( nm )	消化系数 ( $\epsilon$ ) [L / ( mol·cm ) ]
A	259	$1.54 \times 10^4$
G	253	$1.37 \times 10^4$
C	271	$9.10 \times 10^3$
T	260	$7.40 \times 10^3$

比色杯光径为 1cm 时,吸光度= $\epsilon M$

### 0.5mol/l EDTA(pH8.0)溶液

#### 【配制方法】

在 800ml 水中加入 186.1g 二水乙二胺四乙酸二钠 ( EDTA-Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O ),在磁力搅拌器上剧烈搅拌,用 NaOH 调节 溶液的 pH 值至 8.0 (约需 20g NaOH 颗粒)然后定容至 1L,分装后高压灭菌备用。

#### 【注意】

EDTA 二钠盐需加入 NaOH 将溶液的 pH 值调至接近 8.0,才能完全溶解。

### 溴化乙锭 ( 10mg/ml 溶液 )

#### 【配制方法】

在 100ml 水中加入 1g 溴化乙锭,磁力搅拌数小时以确保其完全溶解,然后用铝箔包裹容器或转移至棕色瓶中,保存于室温。

#### 【注意】

小心:溴化乙锭是强诱变剂并有中度毒性,使用含有这种染料的溶液时务必戴上手套,称量染料时要戴面罩。

### 2×HEPES 缓冲盐溶液

#### 【配制方法】

用总量为 90ml 的蒸馏水溶解 1.6g NaCl、0.074g KCl、0.027g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、0.2g 葡聚糖和 1g HEPES,用 0.5mol/l NaOH 调节 pH 值至 7.05,再用蒸馏水定容至 100ml。用 0.22 $\mu$ m 滤器过滤除菌,分装成 5ml 小份,贮存于 -20°C。

### IPTG 溶液

#### 【配制方法】

IPTG 为异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷(分子量为 238.3)在 8ml 蒸馏水中溶解 2g IPTG 后,用蒸馏水定容至 10ml,用 0.22 $\mu$ m 滤器过滤除菌,分装成 1ml 小份贮存于 -20°C。

### 1mol/L 乙酸镁溶液

#### 【配制方法】

在 800ml 水中溶解 214.46g 四水乙酸镁,用水定容至 1L 过滤除菌。

### 1mol/L MgCl<sub>2</sub> 溶液

#### 【配制方法】

在 800ml 水中溶解 203.4g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O,用水定容至 1L,分装成小份并高压灭菌备用。

**【注意】**

MgCl<sub>2</sub> 极易潮解，应选购小瓶（如 100g）试剂，启用新瓶后勿长期存放。

**β-巯基乙醇（BME）溶液**

**【配制方法】**

一般得到的是 14.4mol/L 溶液，应装在棕色瓶中保存于 4℃。

**【注意】**

BME 或含有 BME 的溶液不能高压处理。

**NBT 溶液**

**【配制方法】**

把 0.5g 氯化氮蓝四唑溶解于 10ml 70%的二甲基甲酰胺中，保存于 4℃。

**酚/氯仿溶液**

**【配制方法】**

把酚和氯仿等体积混合后用 0.1mol/L Tris-HCl(pH7.6)抽提几次以平衡这一混合物，置棕色玻璃瓶中，上面覆盖等体积的 0.01mol/l Tris-HCl(pH7.6)液层，保存于 4℃。

**【注意】**

酚腐蚀性很强，并可引起严重灼伤，操作时应戴手套及防护镜，穿防护服。所有操作均应在化学通风橱中进行。与酚接触过的部位皮肤应用大量的水清洗，并用肥皂和水洗涤，忌用乙醇。

**10mmol/L 苯甲基磺酰氟（PMSF）溶液**

**【配制方法】**

用异丙醇溶解 PMSF 成 1.74mg/ml（10mmol/L），分装成小份贮存于-20℃。如有必要可配成浓度高达 17.4mg/ml 的贮存液（100mmol/L）。

**【注意】**

PMSF 严重损害呼吸道粘膜、眼睛及皮肤，吸入、吞进或通过皮肤吸收后有致命危险。一旦眼睛或皮肤接触了 PMSF，应立即用大量水冲洗之。凡被 PMSF 污染的衣物应予丢弃。

PMSF 在水溶液中不稳定。应在使用前从贮存液中现用现加于裂解缓冲液中。PMSF 在水溶液中的活性丧失速率随 pH 值的升高而加快，且 25℃的失活速率高于 4℃。pH 值为 8.0 时，20μmmol/l PMSF 水溶液的半寿期大约为 85min，这表明将 PMSF 溶液调节为碱性（pH>8.6）并在室温放置数小时后，可安全地予以丢弃。

**磷酸盐缓冲溶液（PBS）溶液**

**【配制方法】**

在 800ml 蒸馏水中溶解 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和 0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4 加水定容至 1L，在 15lbf/in<sup>2</sup>(1034×10<sup>5</sup>Pa)高压下蒸气灭菌 20min。保存于室温。

**1mol/L 乙酸钾（pH7.5）溶液**

**【配制方法】**

将 9.82g 乙酸钾溶解于 90ml 纯水中，用 2mol/L 乙酸调节 pH 值至 7.5 后加入纯水定容到 1L，保存于-20℃。

**5 mol/L 乙酸钾溶液（用于碱裂解）**

**【配制方法】**

在 60ml 5mol/L 乙酸钾溶液中加入 11.5ml 冰乙酸和 28.5ml 水，即成钾浓度为 3mol/L 而乙酸根浓度为 5mol/L 的溶液。

### 3mol/L 乙酸钠 ( pH5.2 和 pH7.0 ) 溶液

#### 【配制方法】

在 80ml 水中溶解 408.1g 三水乙酸钠, 用冰乙酸调节 pH 值至 5.2 或用稀乙酸调节 pH 值至 7.0, 加水定容到 1L, 分装后高压灭菌。

### 5mol/L NaCl 溶液

#### 【配制方法】

在 800ml 水中溶解 292.2g NaCl 加水定容至 1L, 分装后高压灭菌。

### 10%十二烷基硫酸钠 ( SDS ) 溶液

#### 【配制方法】

在 900ml 水中溶解 100g 电泳级 SDS, 加热至 68°C 助溶, 加入几滴浓盐酸调节溶液的 pH 值至 7.2, 加水定容至 1L, 分装备用。

#### 【注意】

SDS 的微细晶粒易扩散, 因此称量时要戴面罩, 称量完毕后要清除残留在称量工作区和天平上的 SDS, 10% SDS 溶液无须灭菌。

### 20×SSC 溶液

#### 【配制方法】

在 800ml 水中溶解 175.3g NaCl 和 88.2g 柠檬酸钠, 加入数滴 10mol/l NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0, 加水定容至 1L, 分装后高压灭菌。

### 20×SSPE 溶液

#### 【配制方法】

在 800ml 水中溶解 17.5g NaCl、27.6g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  和 7.4g EDTA, 用 NaOH 溶液调节 pH 值至 7.4 ( 约需 6.5ml 10ml/L NaOH ), 加水定容至 1L, 分装后高压灭菌。

### 100%三氯乙酸溶液

#### 【配制方法】

在装有 500g TCA 的瓶中加入 227ml 水, 形成的溶液含有 100% ( M/V ) TCA。

### 1mol/L Tris 溶液

#### 【配制方法】

在 800ml 水中溶解 121.91g Tris 碱, 加入浓 HCl 调节 pH 值至所需值。

pH	HCl
7.4	70ml
7.6	60ml
8.0	42ml

应使溶液冷至室温后方可最后调定 pH 值, 加水定容至 1L, 分装后高压灭菌。

#### 【注意】

如 1mol/L 溶液呈现黄色, 应予丢弃并置备质量更好的 Tris。

尽管多种类型的电极均不能准确测量 Tris 溶液的 pH 值, 但仍可向大多数厂商购得合适的电极。

Tris 溶液的 pH 值因温度而异, 温度每升高 1°C, pH 值大约降低 0.03 个单位。例如: 0.05mol/L 的溶液在 5°C、25°C、和 37°C 时的 pH 值分别为 9.5、8.9 和 8.6。

### Tris 缓冲盐溶液 ( TBS ) ( 25mmol/l Tris )

#### 【配制方法】

在 800ml 蒸馏水中溶解 8g NaCl、0.2g KCl 和 3g Tris 碱，加入 0.015g 酚并用 HCl 调至 pH 值至 7.4，用蒸馏水定容至 1L，分装后在 151bf/in<sup>2</sup>(1.034×10<sup>5</sup>Pa)高压下蒸汽灭菌 20min，于室温保存。

#### X-gal 溶液，

##### 【配制方法】

X-gal 为 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D 半乳糖苷。用二甲基酰胺溶解 X-gal 配制成的 20mg/ml 的贮存液。保存于一玻璃管或聚丙烯管中，装有 X-gal 溶液的试管须用铝箔封裹以防因受光照而被破坏，并应贮存于-20℃。X-gal 溶液无须过滤除菌。

#### 10 mol/L 乙酸铵

把 770 g 乙酸铵溶解于 800ml 水中，加水定容至 1 L 后过滤除菌。

#### 8 mol/L 乙酸钾 (potassium acetate)

溶解 78.5g 乙酸钾于足量的水中，加水定容到 100ml。

#### 1 mol/L Tris 缓冲液 (Tris-HCl buffer)

将 121.1 g Tris 碱溶解于约 0.9 L 水中，再根据所要求的 pH (25℃下) 加一定量的浓盐酸 (11.6 mol/L) 后，用水定容至 1 L，分装后高压灭菌。

浓盐酸的体积 ( ml )	pH
8.6	9.0
14	8.8
21	8.6
28.5	8.4
38	8.2
46	8.0
56	7.8
66	7.6
71.3	7.4
76	7.2

#### Tris 缓冲盐溶液 (TBS)

在 800ml 蒸馏水中溶解 8 g NaCl、0.2 g KCl 和 3 g Tris 碱，加入 0.015 酚红并用 HCl 调 pH 值至 7.4，用蒸馏水定容至 1 L，分装后 121℃灭菌 20 min，于室温保存。

#### 5 mmol/L NH<sub>4</sub>Ac 溶液

称取乙酸铵 192.7 g，加重蒸水 250 ml 混匀，加重蒸水定容至 500ml，1.1 kg/cm<sup>2</sup> 灭菌 20min。

#### 3, 5-二硝基水杨酸 (DNS) 试剂

称取酒石酸钾钠 (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>KNa·4H<sub>2</sub>O, MW=282.22) 182.0 g，溶解于 500 ml 蒸馏水中，加热( 不超过 50℃ )，于热溶液中依次加入 **3, 5 二硝基水杨酸** 6.3 g，**氢氧化钠** 21.0 g，**苯酚** (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH, MW=94.11) 5.0 g，**无水硫酸钠** (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, MW=126.04) 5.0 g，搅拌均匀至溶，冷却后用蒸馏水定容至 1000 ml，储存于**棕色瓶**中，室温保存，**避 CO<sub>2</sub> 保存**，**操作中戴手套**，用细纱布过滤蔽光保存，7-10 天后使用。

### **1 mol/L 亚精胺 ( Spermidine )**

溶解 2.55g 亚精胺于足量的水中，使终体积为 10ml。分装成小份贮存于-20°C。

### **1 mol/L 精胺 ( Spermine )**

溶解 3.48g 精胺于足量的水中，使终体积为 10ml。分装成小份贮存于-20°C。

### **10 mol/L 乙酸胺 ( ammonium acetate )**

将 77.1g 乙酸胺溶解于水中，加水定容至 1L 后，用 0.22um 孔径的滤膜过滤除菌。

### **10 mg/ml 牛血清蛋白(BSA)**

加 100mg 的牛血清蛋白（组分 V 或分子生物学试剂级，无 DNA 酶）于 9.5ml 水中（为减少变性，须将蛋白加入水中，而不是将水加入蛋白），盖好盖后，轻轻摇动，直至牛血清蛋白完全溶解为止。不要涡旋混合。加水定容到 10ml，然后分装成小份贮存于-20°C。

### **1 mol/L 氯化钾 ( KCl )**

溶解 7.46g 氯化钾于足量的水中，加水定容到 100ml。

### **0.5 mol/L EDTA**

配制等摩尔的 Na<sub>2</sub>EDTA 和 NaOH 溶液 (0.5mol/L) 混合后形成 EDTA 的三钠盐。或称取 186.1g 的 Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 和 20g 的 NaOH，并溶于水中，定容至 1L。

### **1 mol/L HEPES**

将 23.8g HEPES 溶于约 90ml 的水中，用 NaOH 调 pH (6.8-8.2)，然后用水定容至 100ml。

### **1 mol/L HCl**

加 8.6 ml 的浓盐酸至 91.4 ml 的水中。

### **25 mg/ml IPTG**

溶解 250mg 的 IPTG（异丙基硫代-β-D-半乳糖苷）于 10ml 水中，分成小份贮存于-20°C。

### **1 mol/L MgCl<sub>2</sub>**

溶解 20.3 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 于足量的水中，定容到 100ml。

### **20 mg/ml 蛋白酶 K ( proteinase K )**

将 200mg 的蛋白酶 K 加入到 9.5ml 水中，轻轻摇动，直至蛋白酶 K 完全溶解。不要涡旋混合。加水定容到 10ml，然后分装成小份贮存于-20°C。

### **10 mg/ml Rnase ( 无 DNase ) ( DNase-free RNase )**

溶解 10mg 的胰蛋白 RNA 酶于 1ml 的 10mmol/L 的乙酸钠水溶液中 (pH 5.0)。溶解后于水浴中煮沸 15min，使 DNA 酶失活。用 1mol/L 的 Tris-HCl 调 pH 至 7.5，于-20°C 贮存。（配制过程中要戴手套）

### **5 mol/L 氯化钠 ( NaCl )**

溶解 29.2g 氯化钠于足量的水中，定容至 100ml。

### **10 mol/L 氢氧化钠 ( NaOH )**

溶解 400g 氢氧化钠颗粒于约 0.9 L 水的烧杯中（磁力搅拌器搅拌），氢氧化钠完全溶解后用水定容至 1L。

### 2 mol/L 山梨(糖)醇 (Sorbitol)

溶解 36.4g 山梨(糖)醇于足量水中使终体积为 100ml。

### 100%三氯乙酸 (TCA)

在装有 500gTCA 的试剂瓶中加入 100ml 水，用磁力搅拌器搅拌直至完全溶解。(稀释液应在临用前配制)

### 2.5% X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚-β-半乳糖苷)

溶解 25mg 的 X-gal 于 1 ml 的二甲基甲酰胺 (DMF)，用铝箔包裹装液管，贮存于-20°C。

### 100×Denhardt 试剂 (Denhardt's reagent)

成分及终浓度	配制 100ml 溶液各成分的用量
2%聚蔗糖 (Ficoll, 400 型)	2g
2%聚乙烯吡咯烷酮 (PVP-40)	2g
2%BSA (组分 V)	2g
水	加水至总体积为 100ml

依照上表称取各组分，溶于水中定容。过滤除菌及杂质，分装成小份于-20°C贮存。

### 10×标准 DNA 连接酶缓冲液 (standard DNA ligase buffer) (粘端、平端连接)

成分及终浓度	配制 10ml 溶液各成分的用量
0.5mol/L Tris-HCl	5ml 1mol/L 贮液
100mmol/L MgCl <sub>2</sub>	1ml 1mol/L 贮液
100mmol/L DTT	1ml 1mol/L 贮液
2mmol/L ATP	200ul 100 mmol/L 贮液
5mmol/L 盐酸亚精胺 (可选)	50ul 1 mmol/L 贮液
0.5mg/ml BSA (组分 V) (可选)	0.5ml 10 mg/mL 贮液
水	2.25ml

将配制好的缓冲液分装成小份，贮存于-20°C。

### 100 mmol/L dNTP 溶液 (dNTP solutions)

可以购买到 100mmol/L 纯 dNTPs 贮液，-80°C可贮存至少 6 个月。

### 10mmol/L dNTP 混合液

成分及终浓度	配制 20ul 溶液各成分的用量
10mmol/L dATP	2ul 100 mmol/L dATP 贮液
10mmol/L dCTP	2ul 100 mmol/L dCTP 贮液
10mmol/L dGTP	2ul 100 mmol/L dGTP 贮液
10mmol/L dTTP	2ul 100 mmol/L dTTP 贮液
水	12ul

### 20%PEG 8000/2.5M NaCl

成分及终浓度	配制 10ml 溶液各成分的用量
质量浓度为 20% 聚乙二醇 2.5mol/L 氯化钠	20g 50ml 5 mol/L 氯化钠 或 14.6g 固体氯化钠

水	补足 100ml
---	----------

加聚乙二醇于含有氯化钠的烧杯中，加水至终体积 100ml，用磁力搅拌器搅拌溶解。

### 20×SSC

成分及终浓度	配制 1 L 溶液各成分的用量
300mmol/L 柠檬酸三钠 (二水)	88.2g
3mol/L 氯化钠	175.3g
水	补足 1L

溶解柠檬酸三钠 (二水) 和氯化钠于约 0.9L 水中，加几滴 10N NaOH 溶液调 pH 为 7.0，用水补足体积至 1L。

### DEPC (焦碳酸二乙酯) 处理水

加 100ul DEPC 于 100ml 水中，使 DEPC 的体积分数为 0.1%。在 37°C 温浴至少 12h，然后在 15 psi 条件下高压灭菌 20min，以使残余的 DEPC 失活。DEPC 会与胺起反应，不可用 DEPC 处理 Tris 缓冲液。

### 甲酰胺 (deionized formamide)

直接购买或加 Dowex XG8 混合树脂于装有甲酰胺的玻璃烧杯中，用磁力搅拌器轻轻搅拌 1h，可去除甲酰胺中的离子。经 Whatman 1 号滤纸过滤除去树脂后分成小份，充氮气于 -80°C 贮存 (防止氧化)。

### 10% MSG (for 200 ml)

Glutamic acid (Na) 20.0 g

Add 188 ml water.

Autoclave.

---

### 40% Glucose (per 200 ml)

Glucose(dextrose) 80.0 g

Add water to 200 ml

(~145-150 ml).

Autoclave.

---

### 10% CAA (per 200 ml)

Casein Acid Hydrolysate 20.0 g

Add 186 ml water.

Autoclave.

---

### 20% Succinate (for 500 ml)

Succinic acid 100 g

KOH 90 g

Add to 400 ml **ice cold** water.

Measure pH to 6.4, filter sterilize.

---

### 10X TBE (electrophoresis buffer)

Tris base 108.0 g

Na<sub>2</sub>EDTA 9.3 g

Boric Acid 55.0 g

Bring volume to 1 L with water.

Use double distilled water.

pH should be 8.3; if not adjust dropwise with conc. NaOH.

---

**Water agar stock** (for 190 ml)

Agar 3.0 g

Add 190 ml H<sub>2</sub>O.

Autoclave , store in 60C water bath.

---

**R agar stock**

	<u>200 ml</u>	<u>500 ml</u>
Tryptone.....	2.0 g	5.0 g
NaCl.....	1.0 g	2.5 g
Agar.....	3.0 g	7.5 g
Add H <sub>2</sub> O.....	194.0 ml	485.0 ml

Autoclave , store in 60C water bath.

---

**LB agar 200 ml 1000 ml**

Tryptone .....	2 g	10 g
NaCl .....	1 g	5 g
Yeast extract .	1 g	5 g
Agar .....	3 g	15 g
Add H <sub>2</sub> O .....	193 ml	990 ml

Autoclave , store in 60C water bath. LB agar can also be made by adding 10 ml 10% yeast extract and 10 ml 20X Tryptone/NaCl to 190 ml WA.

---

**NZ 200 ml 500 ml**

NZ amine ....	2.0 g	5.0 g
NaCl .....	1.0 g	2.5 g
MgSO <sub>4</sub> (anhydrous)..	0.2 g	0.5 g

Add 10 M NaOH (1 drop/100 ml) after adding water.  
Autoclave.

For agar media:

Agar .....	2.4 g	6.0 g
------------	-------	-------

Stir before and after autoclaving.

---

**GYPC to WA stock: 200 ml 1000 ml**

Glucose (40%) .....	2.0 ml	10.0 ml
Yeast extract (10%)	4.0 ml	20.0 ml
100X P .....	2.0 ml	10.0 ml
CAA (10%) .....	4.0 ml	20.0 ml
Succinate (20%)....	1.0 ml	5.0 ml

Add appropriate antibiotics.

Pour plates.

---

**ORS minimal 200 ml 1000 ml**

10X M9 .....	10 ml	50 ml
Succinate (20%).	2 ml	10 ml
MSG (10%) .....	2 ml	10 ml
Glucose (40%) ..	1 ml	5 ml
MgSO <sub>4</sub> (0.1 M) ..	1 ml	5 ml
CaCl <sub>2</sub> (0.5 M) ..	200 ul	1 ml
1000X vitamins .	200 ul	1 ml
Water .....	184 ml	920 ml

Omit succinate and add 10 ml glucose for storage medium.

---

**E. coli minimal 200 ml 1000 ml**

10X M9 .....	20 ml	100 ml
MgSO <sub>4</sub> (0.1 M) ...	2 ml	10 ml
CaCl <sub>2</sub> (0.5 M) ...	0.2 ml	1 ml
1000X vitamins ..	0.2 ml	1 ml
Glucose (40%) ...	2 ml	10 ml

---

**XC minimal 200 ml 1000 ml**

10X M9 .....	5.0 ml	25 ml
MgSO <sub>4</sub> (0.1 M) ...	1.0 ml	5 ml
CaCl <sub>2</sub> (0.5 M) ...	0.2 ml	1 ml
200X 7 aa stock..	0.2 ml	1 ml
Glucose (40%) ...	0.5 ml	2.5 ml
Glycerol (50%) ..	4.0 ml	20 ml

---

**Nif plates**

10X Nif buffer	100 ml
10X trace elements	100 ml
1000X vitamins	1 ml
Sterile dd H <sub>2</sub> O	799 ml
Agarose	6 g
Succinate (20%)	20 ml

(Succinate is already 0.4% from that in 10X nif buffer)

---

**10X Nif buffer 1000 ml**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	34.02 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	57.06 g
Succinate (20%)	200.00 ml

pH should be 6.4 after 10X dilution.

---

**1000X ORS vitamins**

Nicotinic acid	2.0 mg/ml
Pantothenate	1.0 mg/ml
Biotin	0.2 mg/ml

Stir , filter sterilize.

---

**Trace elements**

MgSO <sub>4</sub> (0.1 M)	25 ml
CaCl <sub>2</sub> (0.5 M)	5 ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> (1 mg/ml)	5 ml
FeCl <sub>3</sub> (1 mg/ml)	5 ml
Water	460 ml

---

**YEM** (per 500 ml)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Mannitol	10.0 g
Yeast extract	0.4 g
Agar	15.0 g
pH to 6.9	

---

**YEM substitute** (per 200 ml)

To 180 ml WA stock:

10X M9	8.0 ml
Mannitol (20%)	20.0 ml
Yeast extract (10%)	1.6 ml

---

**SM10 selective media** (for storage)

10X versatile Mg	100 ml
Thiamine	5 ml
Threonine	5 ml
Leucine	5 ml
Glucose (40%)	10 ml
Water	875 ml

---

**Amino acids**

SM10 stocks:	Thiamine (0.337%)
	Threonine (0.71%)
	Leucine (0.79%)
Klebsiella:	Histidine (0.31%)

---

**10X versatile Mg** (for 200 ml)

MgSO <sub>4</sub>	2.0 ml
Thiamine (1 mg/ml)	2.0 ml
CaCl <sub>2</sub>	0.2 ml

---

**200X PLT** (for 200 ml)

Proline	9.20 g
Leucine	1.60 g
Thiamine	0.67 g
Autoclave.	

---

**Mg PLT**

10X versatile Mg	100 ml
200X PLT	5 ml
40% glucose	10 ml
Water	885 ml

---

**Z buffer (lacZ assays)**

	<u>200 ml</u>	<u>1000 ml</u>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O ....	3.22 g	16.10 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O .....	1.10 g	5.50 g
KCl .....	0.15 g	0.75 g
MgSO <sub>4</sub> (0.1 M) ....	1.00 ml	0.20 ml
β-mercaptoethanol.	2.70 ml	0.54 ml

Filter sterilize.

---

**ONPG stock**

4 mg/ml in phosphate buffer (pH 7)

---

**Phosphate buffer** (pH 7.0) per 100 ml:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	1.64 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1.38 g

---

**0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** (100 ml)

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (anhydr.) 10.6 g

---

**Nodule grinding buffer** (500 ml)

50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.6) , 0.15 M NaCl

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1M) 3.25 ml

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1M) 21.75 ml

NaCl 4.38 gm

Add to 450 ml distilled water , pH to 7.6 , and adjust volume to 500 ml.

---

**Rapidyne germicide**

For working solution:

Dilute concentrated stock at 0.6ml/L.

---

**1 M Tris-Cl (500 ml)**

To 400 ml , add:

Tris base 60.5 g

Add conc. HCl to pH

bring to volume.

---

**Tris buffer mixtures for pH**

pH	Tris HCl	Tris base
7.0	.923	.077

---

7.1	.905	.095
7.2	.90	.10
7.3	.865	.135
7.4	.84	.16
7.5	.82	.18
7.6	.78	.22
7.7	.74	.26
7.8	.67	.33
7.9	.63	.37
8.0	.50	.50

---

### **Southern Transfer solutions**

#### I. 0.25 N HCl:

21.5 ml conc. HCl (11.6N) to 1 liter volume.

#### II. 0.5 M NaOH , 1.5 M NaCl:

87.7 g NaCl , 20.0 g NaOH to 1 liter volume.

#### III. 1.0 M Tris , 1.5 M NaCl:

121.1 g Tris base , 87.7 g NaCl , pH to 8.0 with conc. HCl (~50 ml) , adjust to 1 liter volume.

#### IV. 20X SSC:

175.3 g NaCl , 88.2 g Na3citrate , pH to 7.0 with conc. HCl (~1 drop) , adjust to 1 liter volume.

---

### **Random-primer oligonucleotide labelling**

#### Mix:

9.00 ul DNA (not more than 200 ng)

1.25 ul hexamers

#### Boil , then place on ice , then add:

5.0 ul HEPES buffer

5.0 ul nucleotides [in 250 mM Tris (pH 8) , 25 mM MgCl<sub>2</sub> , 50 mM β-mercaptoethanol]

1.0 ul BSA (40 mg/ml)

0.5 ul Klenow

5.0 ul -32P CTP

Let reaction go at room temperature for at least 4 hours , or overnight.

### **PHEM (500 mls) 2x**

18.14 g Pipes

6.5 g Hepes

3.8 g EGTA

0.99 g MgSO<sub>4</sub>

pH 7.0 w/ KOH

### **PBS (5x in 500 mls)**

20.45 g NaCl

0.465 g KCl

10.142 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$   
0.545 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
pH 7.2

### **Mounting Media**

20mM Tris pH 8.0  
0.5% N-propyl gallate  
90% Glycerol  
Store at 4°C

### **PM Buffer\***

100 ml 1 M PIPES (100 mM PIPES pH= 6.9)  
2 ml 1 M  $\text{MgSO}_4$  , (2 mM  $\text{MgSO}_4$ )  
2 ml 0.5 M EGTA (1 mM EGTA , )  
distilled water to 900 ml  
adjust pH to 6.9  
distilled water to 1 liter  
store at 4°C

### **Valap\***

Put 50 g Vaseline , 50 g lanolin , and 50 g paraffin (all available from Fisher) in a 1 L Pyrex beaker  
Heat on "low" setting on a hotplate , stirring occasionally , until all components are melted and well mixed  
Pour into several small screw-cap jars (~50 ml capacity)  
Store at room temperature

### **20 x Energy Regeneration System\***

150 mM creatine phosphate (Boehringer #127574)  
2 ml of 100 mM  $\text{MgATP}$  Stock (20 mM ATP , 20 mM  $\text{MgSO}_4$ )  
40ml 0.5 M EGTA (2 mM EGTA)  
distilled water to 10 ml  
Disburse into 100 ml aliquots and store at -20°C

### **Isolation Buffer\***

20 ml 5 M NaCl Stock (0.1 M NaCl)  
4 ml of 1 M  $\text{MgSO}_4$  Stock (4 mM  $\text{MgSO}_4$ )  
2 ml of 0.5 M EDTA (1mM EDTA)  
10 ml of 1 M HEPES Stock (10 mM HEPES)  
distilled water to 900 ml  
adjust pH to 7.0  
distilled water to 1 liter  
store at 4°C

### **High Salt Buffer\***

120 ml of 5 M NaCl Stock (0.6 M NaCl)  
4 ml of 1 M  $\text{MgSO}_4$  Stock(4 mM  $\text{MgSO}_4$ )

2 ml of 0.5 M EDTA (1mM EDTA)  
10 ml of 1 M HEPES Stock (10 mM HEPES)  
distilled water to 900 ml  
adjust pH to 7.0  
distilled water to 1 liter  
store at 4oC

**10 x Column Buffer\***

500 ml 1 M PIPES Stock (250 mM PIPES)  
40 ml of 0.5 M EGTA Stock (10 mM EGTA)  
40 ml of 1 M MgSO<sub>4</sub> Stock (5 mM MgSO<sub>4</sub>)  
distilled water to 1800 ml  
adjust pH to 6.7  
distilled water to 2 liters  
Store at 4oC

**Homogenization Buffer\***

300 ml PM buffer  
52.3 mg PMSF (1mM PMSF)  
3 g leupeptin (10 mg/ml leupeptin)  
300 mg pepstatin A (1 ug/ml pepstatin A)  
3 mg TAME (10 ug/ml TAME)  
mix well to dissolve , use immediately

**PMG Buffer\***

80 ml 1 M PIPES Stock (80 mM PIPES)  
2 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> Stock , (2 mM MgSO<sub>4</sub>)  
2 ml 0.5 M EGTA Stock (1 mM EGTA , )  
600 ml Glycerol  
distilled water to 900 ml , mix well  
adjust pH to 6.9  
distilled water to 1 liter  
store at 4oC

**PBS\***

8.18 g NaCl (140 mM NaCl)  
0.186 g KCl (2.5 mM KCl)  
0.218 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)  
2.15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (15 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)  
distilled water to 1 liter  
Store at room temperature

**1M MgSO<sub>4</sub> Stock\***

24.074 g MgSO<sub>4</sub>  
distilled water to 200 ml  
store at room temperature

**1 M HEPES , pH = 7.0 Stock\***

119.15 g HEPES (free acid)  
distilled water to 400 ml  
add solid NaOH a few pellets at a time while mixing until the pH is ~6.8  
add concentrated NaOH dropwise to achieve pH = 7.0  
distilled water to 500 ml  
sterile filter and store at 4°C

**1 M PIPES , pH = 6.9 Stock\***

151.2 g PIPES (free acid)  
distilled water to 400 ml  
add solid NaOH a few pellets at a time while mixing until the pH is ~6.7  
add concentrated NaOH dropwise to achieve pH = 6.9  
distilled water to 500 ml  
sterile filter and store at 4°C

**0.5 M EDTA Stock\***

16.81 g EDTA (Sodium Salt)  
distilled water to 90 ml  
Adjust pH to 7.0  
Distilled water 100 ml  
Store at room temperature

**0.5 M EGTA Stock\***

19.02 g EGTA (Sodium Salt)  
distilled water to 90 ml  
Adjust pH to 7.0  
Distilled water to 100 ml  
Store at room temperature

**1 M KCl Stock\***

74.55 g KCl  
distilled water to 1 liter  
store at room temperature

**10 M NaOH Stock\***

40 g NaOH  
distilled water to 100 ml  
store at room temperature

**100 mM MgGTP Stock\***

check formula weight of the lot of GTP you have , determine the amount required for 10 ml of a 100 mM solution.  
add 8.5 ml distilled water to the determined amount  
add 1 ml of 1M MgSO<sub>4</sub> Stock

adjust pH to 7.0 ,  
distilled water to 10 ml  
disburse into 200 ml aliquots , store at -20oC

#### **100 mM MgATP Stock\***

check formula weight of the lot of ATP you have , determine the amount required for 10 ml of a 100 mM solution.

add 8.5 ml distilled water to the determined amount  
add 1 ml of 1M MgSO<sub>4</sub> Stock  
adjust pH to 7.0  
distilled water to 10 ml  
disburse into 200 ml aliquots , store at -20oC

#### **5 M NaCl Stock\***

292.2 g NaCl  
distilled water to 1 liter  
store at room temperature

#### **3.6 mM Brefeldin A\***

10 mg Brefeldin A (available from Epicenter Technologies Madison , WI)  
absolute ethanol to 12 ml  
store at -20oC

#### **30 x NaF\***

378 mg NaF (0.9 M NaF)  
distilled water to 10 ml  
Store at -20oC

#### **30 x AlCl<sub>3</sub>\***

20 mg (1.5 mM AlCl<sub>3</sub>)  
distilled water to 100 ml  
Store at room temperature

#### **30 mM Mg GTP-g-S\***

10 mg GTP-g-S tetralithium salt (available from Boehringer Mannheim #220 467)  
18 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> Stock (30 mM MgSO<sub>4</sub>)  
add 572 ml distilled water (to 592 ml)  
Store at -20oC

#### **150 mM Mg AMP-PNP\***

25 mg AMP-PNP (available from Boehringer Mannheim #102 547)  
90 ul 1 M MgSO<sub>4</sub> Stock (150 mM MgSO<sub>4</sub>)  
add 225 ml distilled water (to 315 ml)  
Store at -20oC

#### **100 mM Sodium orthovanadate\***

1.839 g Sodium orthovanadate  
 distilled water to 8 ml in a screw cap tube  
 adjust pH to 10  
 if solution is yellow , place in boiling water until clear  
 recheck pH , repeat as necessary  
 adjust to final concentration by checking A265 nm , ext. coeff.= 2925M-1cm-1and adding distilled water  
 as needed  
 store at -20oC

### 3 M KI\*

4.98 g KI  
 add distilled water to 10 ml  
 store at room temperature

### 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>\*

531 mg Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
 add distilled water to 10 ml  
 store at room temperature

### 1/15mol/L PBS(磷酸缓冲液 Phosphate Buffer Solution , PBS)

甲液 : 1/15mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>            9.465g  
 蒸馏水                加至 1000ml

乙液 : 1/15mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>            9.07g  
 蒸馏水                加至 1000ml

分装在棕色瓶内 , 于 4°C 冰箱中保存 , 用时甲、乙两液各按不同比例混合 , 即可得所需 pH 的缓冲液 , 见下表:

pH	甲液 ml	乙液 ml	pH	甲液 ml	乙液 ml
5.29	2.5	97.5	6.81	50.0	50.0
5.59	5.0	95.0	6.98	60.0	40.0
5.91	10.0	90.0	7.17	70.0	30.0
6.24	20.0	80.0	7.38	80.0	20.0
6.47	30.0	70.0	7.73	90.0	10.0
6.64	40.0	60.0	8.04	95.0	5.0

### 0.3%台盼兰染液

称取台盼兰(Trypan blue)粉 0.3 克 , 溶于 100ml 生理盐水中 , 加热使之完全溶解 , 用滤纸过滤除渣 , 装入瓶内室温保存。

### 0.5%酚红指示剂

酚红                    0.5g  
 0.1N(0.4%)NaOH    15ml  
 双蒸水                85ml

将 0.5 克酚红置研钵中 , 缓慢滴加 0.1NNaOH 溶液边加边磨 , 并不断吸出已溶解的酚红液 , 直至全部溶解 , 然后加入 85ml 双蒸水 , 颜色为深红 , 经粗滤纸过滤后使用 , 室温保存。

### 5.6%NaHCO<sub>3</sub>溶液

称 NaHCO<sub>3</sub>5.6 克，溶于 100ml 蒸馏水中，室温保存即可(如需要也可 10 磅 15 分钟高压灭菌，4℃冰箱保存)

### 10μg / ml 秋水仙素

秋水仙素	10mg
生理盐水	100ml

装入茶色瓶中，为贮备液，4℃冰箱中保存。用时取贮备液 1ml 加生理盐水 9ml 即可。

### 0.4%KCl-0.4%柠檬酸钠低渗液

将 0.4%KCl 和 0.4%柠檬酸钠两液等量混合即可，室温保存。

### 2%柠檬酸钠

称取柠檬酸钠 2 克，加 100ml 双蒸水即可，室温保存。

### 0.2%次甲基兰染液

称次甲基兰(Methylene blue)0.2 克，加蒸馏水 100ml，室温保存。

### 0.5%醋酸洋红(Aceio Carmine)染液

洋红	1g
醋酸	90ml
蒸馏水	110ml

将 90ml 醋酸加入 110ml 蒸馏水煮沸，然后将火焰移去，立即加入 1 克洋红，使之迅速冷却过滤，加饱和氢氧化铁(媒染剂)水溶液数滴，直到呈葡萄酒色。室温保存。加铁使洋红沉淀于组织而着色。此染液室温存放时间越长效果越好，室温保存。

### 1%甲苯胺兰(Toluidine blue)

称取甲苯胺兰 1 克，加蒸馏水 100ml。

### 1/3000 中性红染液

取中性红(Neutral red)0.1 克，加蒸馏水 300ml。室温保存。

### Giemsa 染液

#### 1. 贮备液

Giemsa 粉	1g
纯甘油	66ml
甲醇	66ml

先将 Giemsa 粉置于研钵中加少量甘油，充分研磨，呈无颗粒的糊状。再将全部甘油加入，放入 56℃温箱中 2 小时，然后加入甲醇，保存于茶色瓶中。一般两周后使用为好。

#### 2. 工作液

临时时将贮备液与 pH6.8 的磷酸缓冲液按照 1:20 混合。

### 埃利希(Ehrlich)苏木精染液

苏木精	1.0g
乙醇	50ml
醋酸	5ml

甘油	50ml
硫酸铝钾	5g
蒸馏水	50ml

将苏木精溶于少量的乙醇中，再加醋酸并搅拌，以加速其溶解。当苏木精溶解后将甘油加入并摇动容器，同时加入其余的乙醇；硫酸铝钾需研磨并加热，然后溶解于蒸馏水中，将其一滴一滴地加入上边的溶液，并不断摇动，此液配好后，将瓶口用纱布盖好，置通风处，经常摇动以加速其成熟，成熟约需 4 周左右，成熟的染液为深红色。

### 15.2. 温度对常用缓冲液 pH 的影响

缓冲体系	pKa(20°C)	$\Delta$ pKa/10°C
Mes	6.15	-0.110
Ada	6.60	-0.110
PiPes	6.80	-0.085
Aces	6.90	-0.200
Bes	7.15	-0.160
Mops	7.20	-0.013
Tes	7.50	-0.200
Hepes	7.55	-0.014
Tricine	8.15	-0.210
Tris	8.30	-0.310
Bicine	8.35	-0.180
Glycylglycine	8.40	-0.280

### 15.3. pH 计的使用方法

酸度计简称 pH 计，由电极和电计两部分组成。使用中若能够合理维护电极、按要求配制标准缓冲液和正确操作电计，可大大减小 pH 示值误差，从而提高化学实验、医学检验数据的可\*性。

#### 一、正确使用与保养电极

目前实验室使用的电极都是复合电极，其优点是使用方便，不受氧化性或还原性物质的影响，且平衡速度较快。使用时，将电极加液口上所套的橡胶套和下端的橡皮套全取下，以保持电极内氯化钾溶液的液压差。下面就把电极的使用与维护简单作一介绍：

1. 复合电极不用时，可充分浸泡 3M 氯化钾溶液中。切忌用洗涤液或其他吸水性试剂浸洗。
2. 使用前，检查玻璃电极前端的球泡。正常情况下，电极应该透明而无裂纹；球泡内要充满溶液，不能有气泡存在。
3. 测量浓度较大的溶液时，尽量缩短测量时间，用后仔细清洗，防止被测液粘附在电极上而污染电极。
4. 清洗电极后，不要用滤纸擦拭玻璃膜，而应用滤纸吸干，避免损坏玻璃薄膜、防止交\*污染，影响测量精度。
5. 测量中注意电极的银—氯化银内参比电极应浸入到球泡内氯化物缓冲溶液中，避免电计显示部分出现数字乱跳现象。使用时，注意将电极轻轻甩几下。
6. 电极不能用于强酸、强碱或其他腐蚀性溶液。
7. 严禁在脱水性介质如无水乙醇、重铬酸钾等中使用。

#### 二、标准缓冲液的配制及其保存

1. pH 标准物质应保存在干燥的地方，如混合磷酸盐 pH 标准物质在空气湿度较大时就会发生潮解，一旦出现潮解，pH 标准物质即不可使用。
2. 配制 pH 标准溶液应使用二次蒸馏水或者是去离子水。如果是用于 0.1 级 pH 计测量，则可以用普通蒸馏水。
3. 配制 pH 标准溶液应使用较小的烧杯来稀释，以减少沾在烧杯壁上的 pH 标准液。存放 pH 标准物质的塑料袋或其它容器，除了应倒干净以外，还应用蒸馏水多次冲洗，然后将其倒入配制的 pH 标准溶液中，以保证配制的 pH 标准溶液准确无误。
4. 配制好的标准缓冲溶液一般可保存 2—3 个月，如发现有浑浊、发霉或沉淀等现象时，不能继续使用。

5.碱性标准溶液应装在聚乙烯瓶中密闭保存。防止二氧化碳进入标准溶液后形成碳酸，降低其 pH 值。

### 三、pH 计的正确校准

pH 计因电计设计不同而类型很多，其操作步骤各有不同，因而 pH 计的操作应严格按照其使用说明书正确进行。在具体操作中，校准是 pH 计使用操作中一重要步骤。表 1 的数据是精度为 0.01 级、经过计量检定合格的 pH 计在未校准时与校准后的测量值，从中可以看出校准的重要性。

标准 pH	校准前误差 (pH)	校准后误差 (pH)
13.000	00.0600	00.0000
12.000	00.0450	00.0005
11.000	00.0500	00.0010
10.000	00.0300	00.0000
9.000	00.0200	00.0005
8.000	00.010	00.0005
7.000	00.0015	00.0000
6.000	-00.0100	-00.0005
5.000	-00.0105	00.0005
4.000	00.0150	00.0000
3.000	-00.0300	00.0000
2.000	-00.0200	-00.0003
1.000	-00.0350	-00.0001

尽管 pH 计种类很多，但其校准方法均采用两点校准法，即选择两种标准缓冲液：一种是 pH7 标准缓冲液，第二种是 pH9 标准缓冲液或 pH4 标准缓冲液。先用 pH7 标准缓冲液对电计进行定位，再根据待测溶液的酸碱性选择第二种标准缓冲液。如果待测溶液呈酸性，则选用 pH4 标准缓冲液；如果待测溶液呈碱性，则选用 pH9 标准缓冲液。若是手动调节的 pH 计，应在两种标准缓冲液之间反复操作几次，直至不需再调节其零点和定位（斜率）旋钮，pH 计即可准确显示两种标准缓冲液 pH 值。则校准过程结束。此后，在测量过程中零点和定位旋钮就不应再动。若是智能式 pH 计，则不需反复调节，因为其内部已贮存几种标准缓冲液的 pH 值可供选择、而且可以自动识别并自动校准。但要注意标准缓冲液选择及其配制的准确性。智能式 0.01 级 pH 计一般内存有三至五种标准缓冲液 pH 值，如科立龙公司的 KL-016 型 pH 计等。

其次，在校准前应特别注意待测溶液的温度。以便正确选择标准缓冲液，并调节电计面板上的温度补偿旋钮，使其与待测溶液的温度一致。不同的温度下，标准缓冲溶液的 pH 值是不一样的。如表 2 所示：

温度 (°C)	pH7	pH4	pH9.2
10	6.92	4.00	9.33
15	6.90	4.00	9.28
20	6.88	4.00	9.23
25	6.86	4.00	9.18
30	6.85	4.01	9.14
40	6.84	4.03	9.01
50	6.83	4.06	9.02
50	6.83	4.06	9.02

校准工作结束后，对使用频繁的 pH 计一般在 48 小时内仪器不需再次定标。如遇到下列情况之一，仪器则需要重新标定：

- (1)溶液温度与定标温度有较大的差异时.
- (2)电极在空气中暴露过久,如半小时以上时.
- (3)定位或斜率调节器被误动;
- (4)测量过酸 ( pH < 2 ) 或过碱 ( pH > 12 ) 的溶液后;
- (5)换过电极后;
- (6)当所测溶液的 pH 值不在两点定标时所选溶液的中间,且距 7pH 又较远时。

#### 15.4. 电泳缓冲液、染料和凝胶加样液

##### 不同琼脂糖凝胶浓度的最佳 DNA 分辨范围

琼脂糖凝胶浓度	最佳线性 DNA 分辨范围 ( bp )
0.5%	1000~30000
0.7%	800~12000
1.0%	500~10000
1.2%	400~7000
1.5%	200~3000
2.0%	50~2000

##### 10×Tris-乙酸 ( TAE ) 缓冲液

成分及终浓度	配制 1L 溶液各成分的用量
2mol/L Tris 碱	242g
1mol/L 乙酸	57.1 ml 的冰乙酸 ( 17.4 mol/L )
100 mmol/L EDTA	200ml 的 0.5 mol/L EDTA ( pH 8.0 )
水	定容至 1 L

使用时再稀释 50 倍。

##### 5×Tris-硼酸 ( TBE ) 缓冲液

成分及终浓度	配制 1L 溶液各成分的用量
445 mmol/L Tris 碱	54g
445 mmol/L 硼酸盐	27.5g 硼酸
10 mmol/L EDTA	20 ml 的 0.5 mol/L EDTA ( pH 8.0 )
水	定容至 1 L

使用时再稀释 10 倍。

Tris-乙酸 ( TEA ) , Tris-硼酸 ( TBE ) 或 Tris-磷酸 ( TPE ) 等是跑凝胶电泳常用的电泳缓冲液,电泳缓冲液一般都配制成浓的贮备液,临时时稀释到所需倍数。一般情况下这二种缓冲液对大多数的电泳结果,并不会造成太大的差异。但是二者在使用时也用一定的区别:

1. TAE 缓冲能力较低,后两者有足够高的缓冲能力, DNA 分离效果好,因此更常用。
2. TBE 成本略高但反复使用的次数可以多一些;TAE 缓冲容量低,但价格较便宜。
3. TBE 浓溶液长期贮存会出现沉淀,为避免此缺点,室温下贮存 5×溶液,用时稀释 10 倍 0.5×工作溶液即能提供足够缓冲能力。pH8.3-8.6 的 10×TBE 电泳缓冲液,长期保存时易于产生沉淀,用 NaOH 调 PH 到 8.9 可以避免此现象,且不会影响电泳效果。
4. TBE 的缓冲能力比 TAE 高,用 TBE 来跑出来的凝胶,分辨率会更高。
5. TBE 的缓冲能力较强,一般用来跑大片段,或者电泳时间较长的脉冲场电泳。普通的就用 TAE 了。

6. TAE 的缓冲能力很低, 长时间电泳会导致阴极变为碱性, 阳极变为酸性, 使缓冲能力丧失殆尽, 所以使用 TAE 电泳需在两个贮液槽之间使用蠕动泵进行液体循环。TBE 则有较高的缓冲能力, 不需要缓冲液体循环即可获得良好的 DNA 分离效果。跑的时间长还是不要用 TAE, 效率可能会很低。
7. 在回收 DNA 时, 必需选用 TAE 才不致影响回收率。

说明:

①TBE 溶液长时间存放后会形成沉淀物, 为避免这一问题, 可在室温下用玻璃瓶保存 5×溶液, 出现沉淀后则予以废弃。

以片都以 1×TBE 作为使用液 (即 1:5 稀释浓贮液) 进行琼脂糖凝胶电泳。但 0.5×的使用液已具备足够的缓冲容量。目前几乎所有的琼脂糖胶电泳都以 1:10 稀释的贮存液作为使用液。

进行聚丙烯酰胺凝胶垂直槽的缓冲液槽较小, 故通过缓冲液的电流量通常较大, 需要使用 1×TBE 以提供足够的缓冲容量。

②碱性电泳缓冲液应现用现配。

③Tris-甘氨酸缓冲液用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

2×SDS 凝胶加样缓冲液:

100mmol/L Tris-HCl(6.8)

200mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT)

4%SDS (电泳级)

0.2%溴酚蓝

20%甘油

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

#### 50×Tris-磷酸 (TPE) 缓冲液

成分及终浓度	配制 1L 溶液各成分的用量
2mol/L Tris 碱	108 g Tris 碱
1mol/L 乙酸	15.5ml 85%磷酸 (1.679 g/ml)
100 mmol/L EDTA	40ml 0.5 mmol/L EDTA (pH8.0)
水	定容至 1 L

使用时再稀释 50 倍。

TPE 在 DNA 回收时容易和 DNA 一起沉淀, 一般不用。

#### 染料

##### 1%溴酚蓝 (Bromophenol blue)

加 1g 水溶性钠型溴酚蓝于 100ml 水中, 搅拌或涡旋混合直到完全溶解。

##### 1%二甲苯青 FF (Xylene cyanole FF)

溶解 1g 二甲苯青 FF 于足量水中, 定容到 100ml。

##### 10mg/ml 的溴化乙锭 (Ethidium bromide)

小心称取 1g 溴化乙锭, 转移到广口瓶中, 加 100ml 水, 用磁力搅拌器搅拌直到完全溶解。用铝箔包裹装液管, 于 4°C 贮存。

#### 凝胶上样液 (Gel loading solutions)

##### 6×碱性凝胶上样液 (室温贮存)

成分及终浓度	配制 10 ml 溶液各成分用量
--------	------------------

0.3 N 氢氧化钠	300 ul 10 mol/L 氢氧化钠
6 mmol/L EDTA	120 ul 0.5 mol/L EDTA ( pH8.0 )
18%聚蔗糖 ( 400 型 )	1.8 g
0.15%溴甲酚绿	15 mg
0.25%二甲苯青 FF	25 mg
水	定容至 10 ml

#### 6×聚蔗糖凝胶上样液 ( 室温贮存 )

成分及终浓度	配制 10ml 溶液各成分用量
0.15%溴酚蓝	1.5ml 1%溴酚蓝
0.15%二甲苯青 FF	1.5ml 1%二甲苯青 FF
5 mmol/L EDTA	100ul 0.5mol/L EDTA ( pH8.0 )
15%聚蔗糖 ( 400 型 )	1.5g
水	定容至 10ml

#### 6×溴酚蓝/二甲苯青/聚蔗糖凝胶上样液 ( 室温贮存 )

成分及终浓度	配制 10ml 溶液各成分用量
0.25%溴酚蓝	2.5ml 1%溴酚蓝
0.25%二甲苯青 FF	2.5ml 1%二甲苯青 FF
15%聚蔗糖 ( 400 型 )	1.5g
水	定容至 10ml

#### 6×甘油凝胶上样液 ( 4°C贮存 )

成分及终浓度	配制 10ml 溶液各成分用量
0.15%溴酚蓝	1.5ml 1%溴酚蓝
0.15%二甲苯青 FF	1.5ml 1%二甲苯青 FF
5 mmol/L EDTA	100ul 0.5mol/L EDTA ( pH8.0 )
50%甘油	3ml
水	3.9ml

#### 6×蔗糖凝胶上样液 ( 室温贮存 )

成分及终浓度	配制 10ml 溶液各成分用量
0.15%溴酚蓝	1.5ml 1%溴酚蓝
0.15%二甲苯青 FF	1.5ml 1%二甲苯青 FF
5 mmol/L EDTA	100ul 0.5mol/L EDTA ( pH8.0 )
40%聚蔗糖	4g
水	定容至 10ml

#### 10×十二烷基硫酸钠/甘油凝胶上样液 ( 室温贮存 )

成分及终浓度	配制 10ml 溶液各成分用量
0.2%溴酚蓝	20 mg
0.2%二甲苯青 FF	20 mg
200 mmol/L EDTA	4 ml 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)
0.1%SDS	100 ul 10% SDS
50%甘油	5 ml

水	定容至 10 ml
---	-----------

使用凝胶加样缓冲液的目的有三：增大样品密度以确保 DNA 均匀进入样品孔内；使样品呈现颜色，从而使加样操作更为便利；含有在电块中能以可预知速率向阳极泳动的染料。溴酚蓝在琼脂糖中移动的速率约为二甲苯青 FF 的 2.2 倍，而与琼脂糖浓度无关。以 0.5×TBE 作电泳液时，**溴酚蓝在琼脂糖中的泳动速率约与长 300bp 的双链线状 DNA 相同**，而**二甲苯青 FF 的泳动则与长 4kb 的双链线状 DNA 相同**。在琼脂糖浓度为 0.5%~1.4% 的范围内，这些对应关系受凝胶浓度变化的影响并不显著。选用哪一种加样染料纯属个人喜恶。但是，对于碱性凝胶应当使用溴甲酚绿作为示踪染料，因为在碱性 pH 条件下其显色较溴酚更蓝为鲜明。

### 15.5. 常用溶剂与水的共沸物数据

溶剂	沸点/°C	共沸点°C	含水量/%
氯仿	61.2	56.1	2.5
乙醇	78.3	78.1	4.4
乙醚	35	34	1.0
甲苯	110.5	85.0	20
乙酸乙酯	77.1	70.4	8.0
二甲苯	137-40.5	92.0	37.5
乙腈	82.0	76.0	16.0

15.6. 不同温度下常见无机化合物的溶解度

序号	化学式	273K	283K	293K	303K	313K	323K	333K	343K	353K	363K	373K
*1	AgBr	-	-	$8.4 \times 10^{-6}$	-	-	-	-	-	-	-	$**3.7 \times 10^{-4}$
2	AgC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	0.73	0.89	1.05	1.23	1.43	1.64	1.93	2.18	2.59	-	-
*3	AgCl	-	$8.9 \times 10^{-5}$	$1.5 \times 10^{-4}$	-	-	$5 \times 10^{-4}$	-	-	-	-	$2.1 \times 10^{-3}$
*4	AgCN	-	-	$2.2 \times 10^{-5}$	-	-	-	-	-	-	-	-
*5	Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	-	$3.2 \times 10^{-3}$	-	-	-	-	-	-	-	$5 \times 10^{-2}$
*6	Ag <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	$1.4 \times 10^{-3}$	-	-	$3.6 \times 10^{-3}$	-	$5.3 \times 10^{-3}$	-	$8 \times 10^{-3}$	-	-	$1.1 \times 10^{-2}$
**7	AgI	-	-	-	$3 \times 10^{-7}$	-	-	$3 \times 10^{-6}$	-	-	-	-
8	AgIO <sub>3</sub>	-	$3 \times 10^{-3}$	$4 \times 10^{-3}$	-	-	-	$1.8 \times 10^{-2}$	-	-	-	-
9	AgNO <sub>2</sub>	0.16	0.22	0.34	0.51	0.73	0.995	1.39	-	-	-	-
10	AgNO <sub>3</sub>	122	167	216	265	311	-	440	-	585	652	733
11	Ag <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.57	0.70	0.80	0.89	0.98	1.08	1.15	1.22	1.30	1.36	1.41
12	AlCl <sub>3</sub>	43.9	44.9	45.8	46.6	47.3	-	48.1	-	48.6	-	49.0
13	AlF <sub>3</sub>	0.56	0.56	0.67	0.78	0.91	-	1.1	-	1.32	-	1.72
14	Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	60.0	66.7	73.9	81.8	88.7	-	106	-	132	153	160
15	Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	31.2	33.5	36.4	40.4	45.8	52.2	59.2	66.1	73.0	80.8	89.0
16	As <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	59.5	62.1	65.8	69.8	71.2	-	73.0	-	75.1	-	76.7
*17	As <sub>2</sub> S <sub>5</sub>	-	-	$5.17 \times 10^{-5}(291)$	-	-	-	-	-	-	-	-
**18	B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.1	1.5	2.2	-	4.0	-	6.2	-	9.5	-	15.7
19	BaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	31.2	33.5	35.8	38.1	40.8	43.6	46.2	49.4	52.5	55.8	59.4
**20	BaCO <sub>3</sub>	-	$1.6 \times 10^{-3}(281)$	$2.2 \times 10^{-3}(291)$	$2.4 \times 10^{-3}(297.2)$	-	-	-	-	-	-	$6.5 \times 10^{-3}$
*21	BaC <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-	-	$9.3 \times 10^{-3}(291)$	-	-	-	-	-	-	-	$2.28 \times 10^{-2}$
**22	BaCrO <sub>4</sub>	$2.0 \times 10^{-4}$	$2.8 \times 10^{-4}$	$3.7 \times 10^{-4}$	$4.6 \times 10^{-4}$	-	-	-	-	-	-	-
23	Ba(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4.95	6.67	9.02	11.48	14.1	17.1	20.4	-	27.2	-	34.4
24	Ba(OH) <sub>2</sub>	1.67	2.48	3.89	5.59	8.22	13.12	20.94	-	101.4	-	-
**25	BaSO <sub>4</sub>	$1.15 \times 10^{-4}$	$2.0 \times 10^{-4}$	$2.4 \times 10^{-4}$	$2.85 \times 10^{-4}$	-	$3.36 \times 10^{-4}$	-	-	-	-	$4.13 \times 10^{-4}$
26	BeSO <sub>4</sub>	37.0	37.6	39.1	41.4	45.8	-	53.1	-	67.2	-	82.8

<b>**27</b>	Br <sub>2</sub>	4.22	3.4	3.20	3.13	-	-	-	-	-	-	-
<b>**28</b>	Bi <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	-	-	1.8×10 <sup>-5</sup> (291)	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>29</b>	CaBr <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	125	132	143	185(307)	213	-	278	-	295	-	312(378)
<b>30</b>	Ca(H <sub>2</sub> C <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	37.4	36.0	34.7	33.8	33.2	-	32.7	-	33.5	-	-
<b>31</b>	CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	59.5	64.7	74.5	100	128	-	137	-	147	154	159
<b>**32</b>	CaC <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-	6.7×10 <sup>-4</sup> (286)	6.8×10 <sup>-4</sup> (298)	-	-	9.5×10 <sup>-4</sup>	-	-	-	14×10 <sup>-4</sup>	-
											( 368 )	
<b>*33</b>	CaF <sub>2</sub>	1.3×10 <sup>-3</sup>	-	1.6×10 <sup>-3</sup> (298)	1.7×10 <sup>-3</sup> (299)	-	-	-	-	-	-	-
<b>34</b>	Ca(HCO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	16.15	-	16.60	-	17.05	-	17.50	-	17.95	-	18.40
<b>35</b>	CaI <sub>2</sub>	64.6	66.0	67.6	69.0	70.8	-	74	-	78	-	81
<b>36</b>	Ca(IO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.090	0.17	0.24	0.38	0.52	-	0.65	-	0.66	0.67	-
<b>37</b>	Ca(NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	63.9	-	84.5(291)	104	-	-	134	-	151	166	178
<b>38</b>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	102.0	115	129	152	191	-	-	-	358	-	363
<b>39</b>	Ca(OH) <sub>2</sub>	0.189	0.182	0.173	0.160	0.141	0.128	0.121	0.106	0.094	0.086	0.076
<b>40</b>	CaSO <sub>4</sub> ·1/2H <sub>2</sub> O	-	-	0.32	0.29(298)	0.26(308)	0.21(318)	0.145(338)	0.12(348)	-	-	0.071
<b>41</b>	CdCl <sub>2</sub> ·2.5H <sub>2</sub> O	90	100	113	132	-	-	-	-	-	-	-
<b>42</b>	CdCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	135	135	135	135	-	136	-	140	-	147
<b>**43</b>	Cl <sub>2</sub> ①	1.46	0.980	0.716	0.562	0.451	0.386	0.324	0.274	0.219	0.125	0
<b>**44</b>	CO①	0.0044	0.0035	0.0028	0.0024	0.0021	0.0018	0.0015	0.0013	0.0010	0.0006	0
<b>**45</b>	CO <sub>2</sub> ①	0.3346	0.2318	0.1688	0.1257	0.0973	0.0761	0.0576	-	-	-	0
<b>46</b>	CoCl <sub>2</sub>	43.5	47.7	52.9	59.7	69.5	-	93.8	-	97.6	101	106
<b>47</b>	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	84.0	89.6	97.4	111	125	-	174	-	204	300	-
<b>48</b>	CoSO <sub>4</sub>	25.50	30.50	36.1	42.0	48.80	-	55.0	-	53.8	45.3	38.9
<b>49</b>	CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	44.8	56.3	65.4	73.0	88.1	-	101	-	-	-	-
<b>50</b>	CrO <sub>3</sub>	164.9	-	167.2	-	172.5	183.9	-	-	191.6	217.5	206.8
<b>51</b>	CsCl	161.0	175	187	197	208.0	218.5	230	239.5	250.0	260.0	271
<b>*52</b>	CsOH	-	-	395.5(288)	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>53</b>	CuCl <sub>2</sub>	68.6	70.9	73.0	77.3	87.6	-	96.5	-	104	108	120

<b>**54</b>	CuI <sub>2</sub>	-	-	1.107	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>55</b>	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	83.5	100	125	156	163	-	182	-	208	222	247
<b>56</b>	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	23.1	27.5	32.0	37.8	44.6	-	61.8	-	83.8	-	114
<b>57</b>	FeCl <sub>2</sub>	49.7	59.0	62.5	66.7	70.0	-	78.3	-	88.7	92.3	94.9
<b>58</b>	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	74.4	81.9	91.8	106.8	-	315.1	-	-	525.8	-	535.7
<b>59</b>	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	113	134	-	-	-	-	266	-	-	-	-
<b>60</b>	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	28.8	40.0	48.0	60.0	73.3	-	100.7	-	79.9	68.3	57.8
<b>61</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.67	3.72	5.04	6.72	8.72	11.54	14.81	18.62	23.62	30.38	40.25
<b>62</b>	HBr①	221.2	210.3	204(288)	-	-	171.5	-	-	150.5(348)	-	130
<b>63</b>	HCl①	82.3	77.2	72.6	67.3	63.3	59.6	56.1	-	-	-	-
<b>64</b>	H <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	3.54	6.08	9.52	14.23	21.52	-	44.32	-	84.5	125	-
<b>*65</b>	HgBr	-	-	4×10 <sup>-6</sup> (299)	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>66</b>	HgBr <sub>2</sub>	0.30	0.40	0.56	0.66	0.91	-	1.68	-	2.77	-	4.9
<b>**67</b>	Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.00014	-	0.0002	-	0.0007	-	-	-	-	-	-
<b>68</b>	HgCl <sub>2</sub>	3.63	4.82	6.57	8.34	10.2	-	16.3	-	30.0	-	61.3
<b>69</b>	I <sub>2</sub>	0.014	0.020	0.029	0.039	0.052	0.078	0.100	-	0.225	0.315	0.445
<b>70</b>	KBr	53.5	59.5	65.3	70.7	75.4	80.2	85.5	90.0	95.0	99.2	104.0
<b>71</b>	KBrO <sub>3</sub>	3.09	4.72	6.91	9.64	13.1	17.5	22.7	-	34.1	-	49.9
<b>72</b>	KC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	216	233	256	283	324	-	350	-	381	398	-
<b>73</b>	K <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	25.5	31.9	36.4	39.9	43.8	-	53.2	-	63.6	69.2	75.3
<b>74</b>	KCl	28.0	31.2	34.2	37.2	40.1	42.6	45.8	48.3	51.3	54.0	56.3
<b>75</b>	KClO <sub>3</sub>	3.3	5.2	7.3	10.1	13.9	19.3	23.8	-	37.6	46	56.3
<b>76</b>	KClO <sub>4</sub>	0.76	1.06	1.68	2.56	3.73	6.5	7.3	11.8	13.4	17.7	22.3
<b>77</b>	KSCN	177.0	198	224	255	289	-	372	-	492	571	675
<b>78</b>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	105	108	111	114	117	121.2	127	133.1	140	148	156
<b>79</b>	K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	56.3	60.0	63.7	66.7	67.8	-	70.1	70.4	72.1	74.5	75.6
<b>80</b>	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	4.7	7.0	12.3	18.1	26.3	34	45.6	52	73	-	80
<b>81</b>	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	30.2	38	46	53	59.3	-	70	-	-	-	91

<b>82</b>	K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	14.3	21.1	28.2	35.1	41.4	-	54.8	-	66.9	71.5	74.2
<b>83</b>	KHC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	0.231	0.358	0.523	0.762	-	-	-	-	-	-	-
<b>84</b>	KHCO <sub>3</sub>	22.5	27.4	33.7	39.9	47.5	-	65.6	-	-	-	-
<b>85</b>	KHSO <sub>4</sub>	36.2	-	48.6	54.3	61.0	-	76.4	-	96.1	-	122
<b>86</b>	KI	128	136	144	153	162	168	176	184	192	198	208
<b>87</b>	KIO <sub>3</sub>	4.60	6.27	8.08	10.03	12.6	-	18.3	-	24.8	-	32.3
<b>88</b>	KMnO <sub>4</sub>	2.83	4.31	6.34	9.03	12.6	16.98	22.1	-	-	-	-
<b>89</b>	KNO <sub>2</sub>	279	292	306	320	329	-	348	-	376	390	410
<b>90</b>	KNO <sub>3</sub>	13.9	21.2	31.6	45.3	61.3	85.5	106	138	167	203	245
<b>91</b>	KOH	95.7	103	112	126	134	140	154	-	-	-	178
<b>92</b>	K <sub>2</sub> PtCl <sub>6</sub>	0.48	0.60	0.78	1.00	1.36	2.17	2.45	3.19	3.71	4.45	5.03
<b>93</b>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.4	9.3	11.10	13.0	14.8	16.50	18.2	19.75	21.4	22.9	24.1
<b>94</b>	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	1.65	2.67	4.70	7.75	11.0	-	-	-	-	-	-
<b>95</b>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	3.00	3.99	5.90	8.39	11.70	17.00	24.80	40.0	71.0	109.0	-
<b>96</b>	LiCl	69.2	74.5	83.5	86.2	89.8	97	98.4	-	112	121	128
<b>97</b>	Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.54	1.43	1.33	1.26	1.17	1.08	1.01	-	0.85	-	0.72
<b>*98</b>	LiF	-	-	0.27(291)	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>99</b>	LiOH	11.91	12.11	12.35	12.70	13.22	13.3	14.63	-	16.56	-	19.12
<b>*100</b>	Li <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	0.039(291)	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>101</b>	MgBr <sub>2</sub>	98	99	101	104	106	-	112	-	113.7	-	125.0
<b>102</b>	MgCl <sub>2</sub>	52.9	53.6	54.6	55.8	57.5	-	61.0	-	66.1	69.5	73.3
<b>103</b>	MgI <sub>2</sub>	120	-	140	-	173	-	-	-	186	-	-
<b>104</b>	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	62.1	66.0	69.5	73.6	78.9	-	78.9	-	91.6	106	-
<b>*105</b>	Mg(OH) <sub>2</sub>	-	-	0.0009(291)	-	-	-	-	-	-	-	0.004
<b>106</b>	MgSO <sub>4</sub>	22.0	28.2	33.7	38.9	44.5	-	54.6	-	55.8	52.9	50.4
<b>107</b>	MnCl <sub>2</sub>	63.4	68.1	73.9	80.8	88.5	98.15	109	-	113	114	115
<b>108</b>	Mn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	102	118.0	139	206	-	-	-	-	-	-	-
<b>109</b>	MnC <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	0.020	0.024	0.028	0.033	-	-	-	-	-	-	-

<b>110</b>	MnSO <sub>4</sub>	52.9	59.7	62.9	62.9	60.0	-	53.6	-	45.6	40.9	35.3
<b>111</b>	NH <sub>4</sub> Br	60.5	68.1	76.4	83.2	91.2	99.2	108	116.8	125	135	145
<b>112</b>	NH <sub>4</sub> SCN	120	144	170	208	234	-	346	-	-	-	-
<b>113</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	2.2	3.21	4.45	6.09	8.18	10.3	14.0	-	22.4	27.9	34.7
<b>114</b>	NH <sub>4</sub> Cl	29.4	33.3	37.2	41.4	45.8	50.4	55.3	60.2	65.6	71.2	77.3
<b>115</b>	NH <sub>4</sub> ClO <sub>4</sub>	12.0	16.4	21.7	27.7	34.6	-	49.9	-	68.9	-	-
<b>116</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·Co(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	6.0	9.5	13.0	17.0	22.0	27.0	33.5	40.0	49.0	58.0	75.1
<b>117</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	25.0	29.2	34.0	39.3	45.3	-	59.0	-	76.1	-	-
<b>118</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	18.2	25.5	35.6	46.5	58.5	-	86	-	115	-	156
<b>119</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·Cr <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub>	3.95	-	10.78(298)	18.8	32.6	-	-	-	-	-	-
<b>**120</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	12.5	17.2	-	-	33	40	-	52	-	-	-
<b>*121</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub>	-	-	-	44.15(298)	-	-	-	-	-	-	-
<b>*122</b>	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	11.9	16.1	21.7	28.4	36.6	-	59.2	-	109	170	354
<b>123</b>	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	22.7	29.5	37.4	46.4	56.7	-	82.5	-	118	-	173
<b>124</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	42.9	62.9	68.9	75.1	81.8	-	97.2	-	-	-	-
<b>125</b>	NH <sub>4</sub> I	155	163	172	182	191	199.6	209	218.7	229	-	250
<b>**126</b>	NH <sub>4</sub> MgPO <sub>4</sub>	0.0231	-	0.052	-	0.036	0.03	0.040	0.016	0.019	-	0.0195
<b>*127</b>	NH <sub>4</sub> MnPO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	0.0031(冷水)	-	-	-	-	-	0.05(热水)	-	-	-
<b>128</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	118.3	-	192	241.8	297.0	344.0	421.0	499.0	580.0	740.0	871.0
<b>129</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PtCl <sub>6</sub>	0.289	0.374	0.499	0.637	0.815	-	1.44	-	2.16	2.61	3.36
<b>130</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	70.6	73.0	75.4	78.0	81.0	-	88.0	-	95	-	103
<b>131</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	2.1	5.0	7.74	10.9	14.9	20.10	26.70	-	-	-	109.7(368)
<b>*132</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	58.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>133</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> SbS <sub>4</sub>	71.2	-	91.2	120	-	-	-	-	-	-	-
<b>*134</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	-	117(280)	-	-	-	-	-	-	-	-	197
<b>135</b>	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	-	-	0.48	0.84	1.32	1.78	2.42	3.05	-	-	-
<b>136</b>	NaBr	80.2	85.2	90.8	98.4	107	116.0	118	-	120	121	121

<b>137</b>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	1.11	1.6	2.56	3.86	6.67	10.5	19.0	24.4	31.4	41.0	52.5
<b>138</b>	NaBrO <sub>3</sub>	24.2	30.3	36.4	42.6	48.8	-	62.6	-	75.7	-	90.8
<b>139</b>	NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	36.2	40.8	46.4	54.6	65.6	83	139	146	153	161	170
<b>140</b>	Na <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	2.69	3.05	3.41	3.81	4.18	-	4.93	-	5.71	-	6.50
<b>141</b>	NaCl	35.7	35.8	35.9	36.1	36.4	37.0	37.1	37.8	38.0	38.5	39.2
<b>142</b>	NaClO <sub>3</sub>	79.6	87.6	95.9	105	115	-	137	-	167	184	204
<b>143</b>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	7.0	12.5	21.5	39.7	49.0	-	46.0	-	43.9	43.9	-
<b>144</b>	Na <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	31.70	50.10	84.0	88.0	96.0	104	115	123	125	-	126
<b>145</b>	Na <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	163.0	172	183	198	215	244.8	269	316.7	376	405	415
<b>146</b>	Na <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	11.2	14.8	18.8	23.8	29.9	-	43.7	-	62.1	-	-
<b>147</b>	NaHCO <sub>3</sub>	7.0	8.1	9.6	11.1	12.7	14.45	16.0	-	-	-	-
<b>148</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	56.5	69.8	86.9	107	133	157	172	190.3	211	234	-
<b>149</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.68	3.53	7.83	22.0	55.3	80.2	82.8	88.1	92.3	102	104
<b>150</b>	NaI	159	167	178	191	205	227.8	257	294	295	-	302
<b>151</b>	NaIO <sub>3</sub>	2.48	2.59	8.08	10.7	13.3	-	19.8	-	26.6	29.5	33.0
<b>152</b>	NaNO <sub>3</sub>	73.0	80.8	87.6	94.9	102	104.1	122	-	148	-	180
<b>153</b>	NaNO <sub>2</sub>	71.2	75.1	80.8	87.6	94.9	-	111	-	133	-	160
<b>154</b>	NaOH	-	98	109	119	129	-	174	-	-	-	-
<b>155</b>	Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	4.5	8.2	12.1	16.3	20.2	-	29.9	-	60.0	68.1	77.0
<b>**156</b>	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	3.16	3.95	6.23	9.95	13.50	17.45	21.83	-	30.04	-	40.26
<b>157</b>	Na <sub>2</sub> S	9.6	12.10	15.7	20.5	26.6	36.4	39.1	43.31	55.0	65.3	-
<b>*158</b>	NaSb(OH) <sub>6</sub>	-	0.03(285.2)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3
<b>159</b>	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	14.4	19.5	26.3	35.5	37.2	-	32.6	-	29.4	27.9	-
<b>160</b>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.9	9.1	19.5	40.8	48.8	46.7	45.3	-	43.7	42.7	42.5
<b>161</b>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	19.5	30.0	44.1	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>162</b>	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	50.2	59.7	70.1	83.2	104	-	-	-	-	-	-
<b>163</b>	NaVO <sub>3</sub>	-	-	19.3	22.5	26.3	-	33.0	-	40.8	-	-
<b>164</b>	Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub>	71.5	-	73.0	-	77.6	-	-	-	90.8	-	-

<b>*165</b>	NiCO <sub>3</sub>	-	-	0.0093(298)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>166</b>	NiCl <sub>2</sub>	53.4	56.3	60.8	70.6	73.2	78.3	81.2	85.2	86.6	-	-	87.6
<b>167</b>	Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	79.2	-	94.2	105	119	-	158	-	187	188	-	-
<b>168</b>	NiSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	26.2	32.4	37.7	43.4	50.4	-	-	-	-	-	-	-
<b>169</b>	Pb(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	19.8	29.5	44.3	69.8	116	-	-	-	-	-	-	-
<b>170</b>	PbCl <sub>2</sub>	0.67	0.82	1.00	1.20	1.42	1.70	1.94	-	2.54	2.88	-	3.20
<b>171</b>	PbI <sub>2</sub>	0.044	0.056	0.069	0.090	0.124	0.164	0.193	-	0.294	-	-	0.42
<b>172</b>	Pb(NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	37.5	46.2	54.3	63.4	72.1	85	91.6	-	111	-	-	133
<b>**173</b>	PbSO <sub>4</sub>	0.0028	0.0035	0.0041	0.0049	0.0056	-	-	-	-	-	-	-
<b>174</b>	SbCl <sub>3</sub>	602	-	910	1087	1368	-	-	345K 以				
									后完全混				
									溶				
<b>*175</b>	Sb <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	-	-	0.000175(291)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>*176</b>	SnCl <sub>2</sub>	83.9	-	259.8(288)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>*177</b>	SnSO <sub>4</sub>	-	-	33(298)	-	-	-	-	-	-	-	-	18
<b>178</b>	Sr(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	37.0	42.9	41.1	39.5	38.3	37.4	36.8	36.2	36.1	39.2	-	36.4
<b>**179</b>	SrC <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	0.0033	0.0044	0.0046	0.0057	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>180</b>	SrCl <sub>2</sub>	43.5	47.7	52.9	58.7	65.3	72.4	81.8	85.9	90.5	-	-	101
<b>181</b>	Sr(NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	52.7	-	65.0	72	79	83.8	97	-	130	134	-	139
<b>182</b>	Sr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	39.5	52.9	69.5	88.7	89.4	-	93.4	-	96.9	98.4	-	-
<b>183</b>	SrSO <sub>4</sub>	0.0113	0.0129	0.0132	0.0138	0.0141	-	0.0131	-	0.0116	0.0115	-	-
<b>184</b>	SrCrO <sub>4</sub>	-	0.0851	0.090	-	-	-	-	-	0.058	-	-	-
<b>185</b>	Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	98	-	118.3	138	211	-	-	-	-	-	-	-
<b>186</b>	ZnSO <sub>4</sub>	41.6	47.2	53.8	61.3	70.5	-	75.4	-	71.1	-	-	60.5

- 单位：g/100g 水
- 摘自 J.A.dean Ed, Lange's Handbook of Chemistry, 13th.edition, 1985;
- 注：表中括号内数据指温度 (K)；①表示在压力 1.01325×10<sup>5</sup> 帕下；
- \*\*摘自顾庆超等编.化学用表.江苏省科学技术出版社, 1979;

- \*摘自 R.C.Weast , Handbook of chemistry and physics , 70th.edition , 1989-1990 ;

## 15.7. 实验室常用技术参数资料

### 一、核酸及蛋白质常用数据

#### 1. 核苷三磷酸的物理常数

化合物	分子量	$\lambda_{\max}(\text{pH}7.0)$	1M 溶液 ( pH7.0 ) 中 $\lambda_{\max}$ 时的最大吸收值	$\text{OD}_{280}/\text{OD}_{260}$
ATP	507	259	15400	0.15
CTP	483	271	9000	0.97
GTP	523	253	13700	0.66
UTP	484	262	10000	0.38
dATP	494	259	15200	0.15
dCTP	467	271	9300	0.98
dGTP	507	253	13700	0.66
dTTP	482	267	9600	0.71

#### 2. 常用核酸的长度与分子量

核酸	核苷酸数	分子量
$\lambda$ DNA	48502 ( 双链环状 )	$3.0 \times 10^7$
pBR322	4363 ( 双链 )	$2.8 \times 10^6$
28SrRNA	4800	$1.6 \times 10^6$
23SrRNA	3700	$1.2 \times 10^6$
18SrRNA	1900	$6.1 \times 10^5$
19SrRNA	1700	$5.5 \times 10^5$
5SrRNA	120	$3.6 \times 10^4$
tRNA ( 大肠杆菌 )	75	$2.5 \times 10^4$

#### 3. 常用核酸蛋白换算数据

##### (1) 重量换算

$$1\mu\text{g} = 10^{-6}\text{g} \quad 1\text{pg} = 10^{-12}\text{g}$$

$$1\text{ng} = 10^{-9}\text{g} \quad 1\text{fg} = 10^{-15}\text{g}$$

##### (2) 分光光度换算：

$$1A_{260} \text{ 双链 DNA} = 50\mu\text{g/ml}$$

$$1A_{260} \text{ 单链 DNA} = 30\mu\text{g/ml}$$

$$1A_{260} \text{ 单链 RNA} = 40\mu\text{g/ml}$$

##### (3) DNA 摩尔换算：

$$1\mu\text{g} \text{ 100bp DNA} = 1.52\text{pmol} = 3.03\text{pmol 末端}$$

$$1\mu\text{g} \text{ pBR322 DNA} = 0.36\text{pmol}$$

$$1\text{pmol} \text{ 1000bp DNA} = 0.66\mu\text{g}$$

$$1\text{pmol} \text{ pBR322} = 2.8\mu\text{g}$$

$$1\text{kb} \text{ 双链 DNA ( 钠盐 )} = 6.6 \times 10^5 \text{ 道尔顿}$$

$$1\text{kb} \text{ 单链 DNA ( 钠盐 )} = 3.3 \times 10^5 \text{ 道尔顿}$$

$$1\text{kb} \text{ 单链 RNA ( 钠盐 )} = 3.4 \times 10^5 \text{ 道尔顿}$$

##### (4) 蛋白摩尔换算：

$$100\text{pmol} \text{ 分子量 } 100,000 \text{ 蛋白质} = 10\mu\text{g}$$

$$100\text{pmol} \text{ 分子量 } 50,000 \text{ 蛋白质} = 5\mu\text{g}$$

$$100\text{pmol} \text{ 分子量 } 10,000 \text{ 蛋白质} = 1\mu\text{g}$$

$$\text{氨基酸的平均分子量} = 126.7 \text{ 道尔顿}$$

##### (5) 蛋白质/DNA 换算：

1kb DNA=333 个氨基酸编码容量=3.7×10<sup>4</sup>MW 蛋白质

10,000MW 蛋白质=270bp DNA

30,000MW 蛋白质=810bp DNA

50,000MW 蛋白质=1.35kb

100,000MW 蛋白质=2.7kb DNA

#### 4.常用蛋白质分子量标准参照物

(1) 高分子量标准参照		(2) 中分子量标准参照		(3) 低分子量标准参照	
肌球蛋白	分子量	磷酸化酶 B	97,400	碳酸酐酶	31,000
肌球蛋白	212,000	牛血清白蛋白	66,200	大豆胰蛋白酶	21,500
β-半乳糖苷酶 B	116,000	谷氨酶脱氢酶	55,000	抑制剂	
磷酸化酶 B	97,400	卵白蛋白	42,700	马心肌球蛋白	16,900
牛血清白蛋白	66,200	醛缩酶	40,000	溶菌酶	14,400
过氧化氢酶	57,000	碳酸酐酶	31,000	肌球蛋白 (F1)	8,100
醛缩酶	40,000	大豆胰蛋白酶	21,500	肌球蛋白 (F2)	6,200
		抑制剂		肌球蛋白 (F3)	2,500
		溶菌酶	14,400		

#### 5.常用 DNA 分子量标准参照物

λDNA/Hind	λDNA/EcoR	λ/Hind	pBR322/Hae	pBR322/Hinf	φχ174/Hinf	φχ174/Hae	φχ174/Tap
III	I	III +EcoR I	III	I	I	III	I
23130	21226	21227	587	1631	726	1353	2914
9416	7421	5148	405	517	713	1078	1175
6557	5804	4973	504	506	553	872	404
4361	5643	4268	458	396	500	603	327
2322	4843	3530	434	344	417	310	231
2027	3530	2027	267	298	413	281	141
564		1904	234	221	311	271	87
125		1584	213	220	249	234	54
		1375	192	154	200	194	33
		974	184	75	151	118	20
		831	124		140	72	
		564	123		118		
		125	104		100		
			89		82		
			80		66		
			64		48		
			57		42		
			51		40		
			21		24		
			18				
			11				
			7				

## 15.8. 常用酶的配制

### 1. 溶菌酶

用水配制成 50mg/ml 的溶菌酶溶液，分装成小份并保存于-20°C。每一小份一经使用后便予丢弃。

### 2. 蛋白水解酶类

	贮存液	贮存温度	反应浓度	反应缓冲液	温度	预处理
链霉蛋白酶 <sup>a</sup>	20mg/ml	-20°C (溶于水)	1mg/ml	0.01mol/L Tris(pH7.8) 0.01mol/L EDTA 0.5% SDS	37°C	自消化 <sup>b</sup>
蛋白酶 K <sup>c</sup>	20mg/ml	-20°C (溶于水)	50μg/ml	0.01mol/L Tris(pH7.8) 0.005mol/L EDTA 0.5% SDS	37 ~ 56 °C	无须预处理

a: 链霉蛋白酶是从链球菌 ( *Streptomyces griseus* ) 中分离到的一种丝氨酸酶和酸性蛋白酶的混合物。

b: 自消化可消除 DNA 酶和 RNA 酶的污染，经自消化的链霉蛋白酶的配制方法如下：把该酶的粉末溶解于 10mmol/l Tris-HCl(pH7.5)、10mmol/l NaCl 中，配成 20mg/ml 浓度，于 37°C 温育 1h。经消化的链霉蛋白酶分装成小份放在密封试管中，保存-20°C。

c 蛋白酶 K 是一种枯草蛋白酶类的高活性蛋白酶，从林伯氏白色念珠菌 ( *Tritirachium album Limber* ) 中纯化得到。该酶有两个 Ca<sup>2+</sup> 结合位点，它们离酶的活性中心有一定距离，与催化机理并无直接关系。然而，如果从该酶中除去 Ca<sup>2+</sup>，由于出现远程的结构变化，催化活性将丧失 80% 左右，但其剩余活性通常已足以降解在一般情况下污染酸制品的蛋白质。所以，蛋白酶 K 消化过程中通常加入 EDTA ( 以抑制依赖于 Mg<sup>2+</sup> 的核酸酶的作用 )。但是，如果要消化对蛋白酶 K 具有较强耐性的蛋白，如角蛋白一类，则需要使用含有 1mmol/l Ca<sup>2+</sup> 而不含 EDTA 的缓冲液。在消化完毕后、纯化核酸前要加入 EGT ( pH8.0 ) 至终浓度为 2mmol/L，以螯合 Ca<sup>2+</sup>。

### 3. 无 DNA 酶的 RNA 酶

将胰 RNA 酶 ( RNA 酶 A ) 溶于 10mmol/l Tris-HCl(pH7.5)、15mmol/l NaCl 中，配成 10mg/ml 的浓度，于 100°C 加热 15min，缓慢冷却至室温，分装成小份保存于-20°C。

## 15.9. 杂交试验中用于降低背景的封闭剂

试剂	用途
Denhardt 试剂	Northern 杂交 使用 RNA 探针的杂交 单拷贝序列的 Southern 杂交 将 DNA 固定于尼龙膜上的杂交
Denhardt 试剂通常配制 50×贮存液，过滤后保存于-20°C。可将该贮存液 10 倍稀释于预杂交液 ( 常为含有 0.5%SDS 和 100μg/ml 经变性被打断的鲑精 DNA 的 6×SSC 或 6×SSPE ) 中。50×Denhardt 液中含 5g 聚蔗糖 ( Ficoll, 400 型, Pharmacia )、5g 聚乙烯吡咯烷酮和 5g 牛血清白蛋白 ( 组分 V <sup>™</sup> Sigmal )，加水至终体积为 500ml。	
BLOTTO	Grunstein-Hogness 杂交 Benton-Davis 杂交 除单拷贝序列 Southern 杂交以外的所有 Southern 杂交

### 斑点印迹

1×BLOTT (牛乳转移技术优化液, Bovine Lacto Transfer Technique Optimizer), 是含 5% 胶脂奶粉和 0.02% 叠氮钠的水溶液, 应保存于 4°C。使用前可用预杂交液稀释 25 倍。BLOTTO 不应与高浓度的 SDS 并用, 因为后者会导致牛奶中蛋白质析出。如果杂交背景不合要求, 可在杂交液中加入 NP-40 至终浓度为 1%。BLOTTO 不能用作 Northern 杂交的封闭剂, 因为这一封闭剂中可能含有 RNA 酶, 其活性之高使人无法接受。

注意: 叠氮钠有毒性, 取用时需戴手套小心操作。含叠氮钠的溶液应予明确标记。

肝素

Southern 杂交

原位杂交

肝素 (Sigma H-7005, 从猪中提取的二级产品或相当等级的产品) 用 4×SSPE 或 4×SSC 溶解配制成 50mg/ml 的浓度, 保存于 4°C。肝素在含有葡聚糖硫酸酯的杂交液中用作封闭剂的浓度为 500µg/ml, 在不含葡聚糖硫酸酯的杂交液中的浓度为 50µg/ml。

经变性并被打断的鲑精 DNA

southern 和 Northern 杂交

把鲑鱼精子 DNA (Sigma, III, 盐钠) 溶解于水配制成 10mg/ml 的浓度, 必要时于室温磁力搅拌 2~4h 助溶。把溶液中 NaCl 的浓度调至 0.1mol/L, 并用酚和酚/氯仿各抽提一次, 回收水相。合 DNA 溶液快速通 17 号皮下注射针头 12 次, 以剪切 DNA。加入 2 倍体积用冰预冷的乙醇沉淀 DNA。离心回收 DNA 并重溶于水, 配制成 10mg/ml 的浓度, 测定溶液的 OD<sub>260</sub> 值并计算出精确的 DNA 浓度, 然后煮沸 10min, 分装成小份保存于 -20°C。使用前置沸水浴中加热 5min, 然后迅速在冰浴中骤冷。预杂交液中应含有 100µg/ml 经变性并被打断的鲑鱼精子 DNA

## 15.10. 常用凝胶的技术参数

### 1. 葡聚糖凝胶的某些技术数据

种类	干颗粒直径 (µ)	分子量分级范围		床体积 毫升/克 干分子 筛	得水值	溶胀最少 平衡时间 (h)		柱头压力 (kPa) (2.5cm 直 径柱)
		肽及球形 蛋白质	葡聚糖 (线性分 子)			室	沸 温 水 浴	
Sephadex G-10	40~120	~700	~700	2~3	1.0±0.1	3	1	
Sephadex G-10	40~120	~1500	1500	2.5~ 3.5	1.5±3.5	3	1	
Sephadex G-25								
粗级	100~300 (≈5~ 100 目)							
中级	50~150 (≈100~ 200 目)	1,000~	100~	4~6	1.5±0.2	6	2	
细级	20~ 800(≈200~ 400 目)	5,000	5,000					

超细	10~40							
Sephadex G-50								
粗级	100~200							
中级	50~150	1,500~	500~					
细级	20~80	30,000	10,000	9~11	5.0±0.3	6	2	
超细	10~40							
Sephadex G-75								
	40~120	3,000~	1,000~					
超细	10~40	70,000	950,000	12~15	7.5±0.5	24	3	3.92~ 15.86
Sephadex G-100								
	40~120	4,000~	1,000~					
超细	10~40	1,500,000	150,000	15~20	10.0±1.0	48	5	2.35~9.41
Sephadex G-150								
	40~120	5,000~	1,000~	20~30				
超细	10~40	400,000	150,000	18~22	15.0±1.5	72	5	0.88~3.53
Sephadex G-200								
	40~120	5000~	1000~	30~40				
	10~40	800,000	200,000	20~25	20.0±2.0	72	5	0.39~1.57

## 2. 聚丙烯酰胺凝胶的技术数据

型号	排阻的下限 (分子量)	分级分离范围 (分子量)	膨胀后的床体积 (ml/g 干凝胶)	膨胀所需最少时间 (室温, h)
Bio-gel-P-2	1,600	200~2,000	3.8	2~4
Bio-gel-P-4	3,600	500~4,000	5.8	2~4
Bio-gel-P-6	4,600	1,000~5,000	8.8	2~4
Bio-gel-P-10	10,000	5,000~17,000	12.4	2~4
Bio-gel-P-30	30,000	20,000~50,000	14.9	10~12
Bio-gel-P-60	60,000	30,000~70,000	19.0	10~12
Bio-gel-P-100	100,000	40,000~100,000	19.0	24
Bio-gel-P-150	150,000	50,000~150,000	24.0	24
Bio-gel-P-200	200,000	80,000~200,000	34.0	48
Bio-gel-P-300	300,000	100~400,000	40.0	48

## 3. 琼脂糖凝胶的技术数据

型号	琼脂糖含量 (% (W/W))	排阻的下限 (分子量)	分级分离的范围(分子量)	生产厂家
Sepharose 4B	4		0.3×10 <sup>6</sup> ~3×10 <sup>6</sup>	Pharmacia
Sepharose 2B	2		2×10 <sup>6</sup> ~25×10 <sup>6</sup>	
Sagavac 10	10	2.5×10 <sup>5</sup>	1×10 <sup>4</sup> ~2.5×10 <sup>5</sup>	
Sagavac 8	8	7×10 <sup>5</sup>	2.5×10 <sup>4</sup> ~7×10 <sup>5</sup>	

Sagavac 6	6	$2 \times 10^6$	$5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$	Seravac
Sagavac 4	4	$15 \times 10^6$	$2 \times 10^5 \sim 15 \times 10^6$	
Sagavac 2	2	$150 \times 10^6$	$5 \times 10^5 \sim 15 \times 10^7$	
Bio-gel A-0.5M	10	$0.5 \times 10^6$	$< 1 \times 10^4 \sim 0.5 \times 10^6$	
Bio-gel A-1.5M	8	$1.5 \times 10^6$	$< 1 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^6$	
Bio-gel A-5M	6	$5 \times 10^6$	$1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$	
Bio-gel A-15M	4	$15 \times 10^6$	$4 \times 10^4 \sim 15 \times 10^6$	Bio-Rad
Bio-gel A-50M	2	$50 \times 10^6$	$1 \times 10^5 \sim 50 \times 10^6$	
Bio-gel A-150M	1	$150 \times 10^6$	$1 \times 10^6 \sim 150 \times 10^6$	

#### 4. 各处凝胶所允许的最大操作压

凝胶	最大静水压 (kPa)
Sephadex	
G-10	9.8
G-15	9.8
G-25	9.8
G-50	9.8
G-75	4.9

#### 5. 琼脂糖凝胶浓度与线性 DNA 分辨范围

凝胶浓度 (%)	线性 DNA 长度 (bp)
0.5	1000 ~ 30000
0.7	800 ~ 12000
1.0	500 ~ 10000
1.2	400 ~ 7000
1.5	200 ~ 3000
2.0	50 ~ 2000

#### 6. 染料在变性聚丙烯酰胺凝胶中的迁移速度

凝胶浓度 (%)	溴酚蓝	二甲苯青 FF
5.0	35bp	140bp
6.0	26bp	106bp
8.0	19bp	75bp
10.0	12bp	55bp
20.0	8bp	28bp

#### 7. 染料在非变性聚丙烯酰胺凝胶中的迁移速度

凝胶浓度 (%)	溴酚蓝	二甲苯青 FF
3.5	100bp	460bp
5.0	65bp	260bp
8.0	45bp	160bp
12.0	20bp	70bp
15.0	15bp	50bp
20.0	12bp	45bp

#### 15.11. 遗传密码表

密码子的第二位

密码子	U	C	A	G	密码子
的	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Gys	U
第	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGG Gys	C
一	UUA Leu	UCA Ser	UAA 终止(赭石)	UGA 终止(乳白)	A
位	UUG Leu	UGG Ser	UAG 终止(琥珀)	UGG Trp	G
(	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGA Arg	U
5'	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
端	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
)	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGC Arg	G
	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGC Arg	G
	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

## 15.12. 常用酸碱技术参数

### 1. 常见的市售酸碱的浓度

溶质	分子式	分子量	mol/L	g/L	重量(%)	比重	配制 mol/L 溶液的加入量 (ml/L)
冰乙酸	CH <sub>3</sub> COOH	60.05	17.40	1045	99.5	1.050	57.5
乙酸		60.05	6.27	376	36	1.045	159.5
甲酸	HCOOH	46.02	23.40	1080	90	1.200	42.7
盐酸	HCl	36.50	11.60	424	36	1.180	86.2
			2.90	105	10	1.050	344.8
硝酸	HNO <sub>3</sub>	63.02	15.99	1008	71	1.420	62.5
			14.90	938	67	1.400	67.1
			13.30	837	61	1.370	75.2
高氯酸	HClO <sub>3</sub>	100.50	11.65	1172	70	1.670	85.8
			9.20	923	60	1.540	108.7
磷酸	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	80.00	18.10	1445	85	1.700	55.2
硫酸	H <sub>2</sub> P · O <sub>4</sub>	98.10	18.00	1776	96	1.840	55.6
氢氧化铵	NH <sub>4</sub> OH	35.00	14.80	251	28	0.898	67.6
氢氧化钾	KOH	56.10	13.50	757	50	1.520	74.1
			1.94	109	10	1.090	515.5
氢氧化钠	NaOH	40.00	19.10	763	50	1.530	52.4
			2.75	111	10	1.110	363.4

### 2. 各种浓度的酸碱贮存液的近似 pH 值

溶质	1N <sup>a</sup>	0.1N <sup>a</sup>	0.01N <sup>a</sup>	0.001N <sup>a</sup>
乙酸	0.40	2.90	3.40	3.90
盐酸	0.10	1.07	2.02	3.01
硫酸	0.30	1.20	2.10	

柠檬酸		2.10	2.60	
氢氧化铵	11.80	11.30	10.80	10.30
氢氧化钠	14.05	13.07	12.12	11.13
碳酸氢钠		8.40		
碳酸钠		11.50	11.00	

a. N 为光量浓度[ $1 N \approx (1 \text{ mol/L}) \times \text{离子价数}$ ].

### 15.13.20 种标准氨基酸的命名及性质

氨基酸名称	三字母缩写	单字母缩写	质量	侧链电离的 pKa 值	全名
丙氨酸	Ala	A	89.09		Alanine
精氨酸	Arg	R	174.2	12.48	Arginine
天冬酰胺	Asn	N	132.1		Asparagine
天冬氨酸	Asp	D	133.1	3.86	Aspartic
半胱氨酸	Cys	C	121.12		Cysteine
谷氨酰胺	Gln	Q	146.15		Glutamic
谷氨酸	Glu	E	147.13	4.25	Glutamine
甘氨酸	Gly	G	75.07		Glycine
组氨酸	His	H	155.16	6.0	Histidine
异亮氨酸	Ile	I	131.17		Isoleucine
亮氨酸	Leu	L	131.17		Leucine
赖氨酸	Lys	K	146.19		Lysine
甲硫氨酸	Met	M	149.21		Methionine
苯丙氨酸	Phe	P	165.19		Phenylalanine
脯氨酸	Pro	P	115.13		Proline
丝氨酸	Ser	S	105.06		Serine
苏氨酸	Thr	T	119.12		Threonine
色氨酸	Trp	W	204.22		Tryptophan
酪氨酸	Tyr	Y	181.19	10.07	Tyrosine
缬氨酸	Val	P	117.15		Valine

### 15.14. 常见的 E.coli End-和 End+ 菌

End-	End-	End+	End+
BJ5183	JM108	BL21(DE3)	PR700
DH1	JM109	CJ236	Q358
DH20	MM294	HB101	P2392
DH21	Select96™	JM83	ES1301
DH5	SK1590	JM110	RR1
JM101	SK1592	LE392	TB1
JM103	SK2267	MC1061	TG1
JM105	SRB	NM522	Y1088
JM106	TOP10	NM554	BMH 71-18
JM107	XL1-Blue	JM101	

### 15.15. 常用质粒和粘粒载体的复制起始点和拷贝数

载体名称	复制起点	拷贝数	拷贝类型	抗性
pUC vectors	pMB1	500–700	high copy	Amp
pBluescript vectors	ColE1	300–500	high copy	Amp
pGEM® vectors	pMB1	300–400	high copy	Amp
pBR322 and derivatives	pMB1	15–20	low copy	Amp/Tet
pACYC and derivatives	p15A	10–12	low copy	Kan/Amp
pSC101 and derivatives	pSC10	1 – 5	very low copy	Tet

### 15.16. 麦氏浊度计标准管配制方法

#### 麦氏标准管 (McFarland Standards) 配制

麦氏标准管号	体积 (ml)		细菌数 × 10 <sup>8</sup> /ml
	BaCl <sub>2</sub> (1.175%)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1%)	
0.5	0.5	99.5	1.5
1	1.0	99.0	3.0
2	2.0	98.0	6.0
3	3.0	97.0	9.0
4	4.0	96.0	12.0
5	5.0	95.0	15.0
6	6.0	94.0	18.0
7	7.0	93.0	21.0
8	8.0	92.0	24.0
9	9.0	91.0	27.0
10	10.0	90.0	30.0

### 15.17. 常用培养基

#### 光滑球拟酵母培养基：

#### 斜面 and 种子培养基 (/L)

葡萄糖	30 g
蛋白胨	10 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
琼脂	20 g (斜面用)
自来水定容至 1 L, pH 5.5	

#### 摇瓶培养方法：

从新鲜斜面上接一环菌入种子培养基 (每 500ml) 锥形瓶装 50 ml 培养基, 于 30 度, 200 rpm 下摇瓶培养 24h, 以 10%接种量 (体积比) 接入发酵培养基 (每 500ml 锥形瓶装 50ml 培养基) 于 30°C,

200 rpm 下培养 48h。

#### 分批发酵培养：

5 L 发酵罐中发酵培养基体积为 3 L ,温度 30°C ,通气量 1 L/(L.min) ,搅拌转速 700 r/min ,用 5 mol/L KOH 控制 pH 恒定在 5.0±0.1。

#### 维生素浓缩液 ( 1 L 加入 10 mL ):

NA	0.8	g/L	Biotin	0.004	g/L
B1	0.002	g/L	B6	0.04	g/L

#### 微量元素浓缩液 ( 1 L 加入 10 mL ):

CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.05	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.2	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2
ZnCl <sub>2</sub>	0.5		

#### 发酵培养基 ( 1 L ):

Glucose	100	g/L
NH <sub>4</sub> Cl	7	g/L
乙酸钠	6	g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.8	g/L
维生素浓缩液	10	mL
金属离子液	10	mL

#### 营养缺陷型筛选用限制培养基 ( /100 mL )

Glucose	30	g/L
NH <sub>4</sub> Cl	5	g/L
乙酸钠	5	g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.8	g/L
维生素浓缩液	10	mL
金属离子液	1	mL
琼脂	2	g
自来水定容至 1000 mL , pH 5.5		

#### LB 培养基

将下列组分溶解在 0.9L 水中：

蛋白胨	10g
酵母提取物	5g
氯化钠	10g

如果需要用 1N NaOH ( ~1ml ) 调整 pH 至 7.0 , 再补足水至 1L。注：琼脂平板需添加琼脂粉 12g/L , 上层琼脂平板添加琼脂粉 7g/L。

#### SOB 培养基

将下列组分溶解在 0.9L 水中：

蛋白胨	20g
酵母提取物	5g
氯化钠	0.5g
1 mol/L 氯化钾	2.5ml

用水补足体积到 1L。分成 100ml 的小份，高压灭菌。培养基冷却到室温后，再在每 100ml 的小份中加 1ml 灭过菌的 1mol/L 氯化镁。

### SOC 培养基

成分、方法同 SOB 培养基的配制，只是在培养基冷却到室温后，除了每 100ml 的小份中加 1ml 灭过菌的 1mol/L 氯化镁外，再加 2ml 灭过菌的 1mol/L 葡萄糖（18g 葡萄糖溶于足够水中，再用水补足到 100ml，用 0.22um 的滤膜过滤除菌）。

### TB 培养基

将下列组分溶解在 0.9L 水中：

蛋白胨	12g
酵母提取物	24g
甘油	4ml

各组分溶解后高压灭菌。冷却到 60°C，再加 100ml 灭过菌的 170mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/0.72 mol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 的溶液（2.31g 的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 12.54g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶在足量的水中，使终体积为 100ml。高压灭菌或用 0.22um 的滤膜过滤除菌）。

### 2×YT 培养基

将下列组分溶解在 0.9L 水中：

蛋白胨	16g
酵母提取物	10g
氯化钠	4ml

如果需要用 1N NaOH（~1ml）调整 pH 至 7.0，再补足水至 1L。注：琼脂平板需添加琼脂粉 12g/L，上层琼脂平板添加琼脂粉 7g/L。

### YPD (YPAD, YPG) 培养基

将下列组分溶解在 0.9L 水中：

蛋白胨	20g
酵母提取物	10g
葡萄糖	20g

用水补足体积为 1L 后，高压灭菌。建议在高压灭菌之前，对色氨酸营养缺陷型每升培养基添加 1.6g 色氨酸，因为 YPD 培养基是色氨酸限制型培养基。为了配制平板，需要在高压灭菌前加入 20g 琼脂粉。

### PM 培养基(g/L)

蛋白胨 10g，葡萄糖 5g，酵母膏 2g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g，FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.102g，ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.102g，MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.102g，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.13g，pH7.10；

### 改良 PM 培养基

PM 培养基中加入

CaCO<sub>3</sub> (1g/L)，pH7.10；

A 培养基(g/L)：黄豆粉 25g，淀粉 10g，葡萄糖 10g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g，FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.102g，CaCO<sub>3</sub> 1g，pH7.10。

**ISP 2**

酵母膏 4.0g  
麦芽汁 10.0g  
葡萄糖 4.0g  
琼脂 20.0g  
蒸馏水 1000ml pH 7.0

**ISP3 (IFO 245)**

燕麦粉 20.0g  
微量元素溶液 1ml  
pH 7.2  
微量元素：  
FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g  
MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.1g  
ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g

**ISP 4**

可溶性淀粉 10.0g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0g  
NaCl 1.0g  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0g  
CaCO<sub>3</sub> 2.0g  
FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001g  
MnCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001g  
琼脂 20.0g  
蒸馏水 1000ml

**ISP5 (IFO 265)**

L-天门冬氨酸 1.0g  
甘油 10.0g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0g  
微量元素溶液 1ml  
琼脂 20.0g  
蒸馏水 1000ml pH 7.2  
\* 微量元素溶液：  
FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g  
MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.1g  
ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g

**Acetobacter Medium (醋酸菌培养基)**

葡萄糖	100g
酵母膏	10g
CaCO <sub>3</sub>	20g

琼脂 15g  
蒸馏水 1000 ml pH=6.8  
适用范围：恶臭醋酸杆菌混浊变种

#### **Nutrient Agar (营养肉汁琼脂)**

蛋白胨 5g  
牛肉膏 30g  
NaCl 5g  
琼脂 15g  
蒸馏水 1000 ml pH=7.0-7.2

\*: 培养芽孢杆菌的时候，需添加 5mg  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ，可以促进芽胞形成。

适用范围：产气气杆菌、粪产碱杆菌、蜡状芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌蕈状变种、地衣形芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、多粘芽孢杆菌、尘埃芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌深黑变种、苏云金芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌蜡螟亚种(青虫菌)、苏云金芽孢杆菌戈尔斯德变种、苏云金芽孢杆菌猝倒亚种、产氨短杆菌、黄色短杆菌、谷氨酸棒状杆菌、北京棒杆菌、大肠埃希氏菌(大肠杆菌)、铜绿假单胞菌(绿脓杆菌)、凸形假单胞杆菌、荧光假单胞菌、弯曲假单胞菌、恶臭假单胞菌、假单胞杆菌、藤黄八叠球菌、亚黄八叠球菌、尿素八叠球菌、金黄色葡萄球菌、运动发酵单胞菌

#### **Azotobacter Medium (固氮菌培养基)**

$KH_2PO_4$  0.2g  
 $K_2HPO_4$  0.8g  
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2g  
 $CaSO_4 \cdot 2H_2O$  0.1g  
 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  微量  
酵母膏 0.5g  
甘露醇 20g  
 $FeCl_3$  微量  
琼脂 15g

蒸馏水 1000ml pH 7.2

适用范围：固氮菌、胶质芽孢杆菌

#### **Corn Meal Medium (玉米粉培养基)**

玉米粉 5g  
蛋白胨 0.1g  
葡萄糖 1g  
自来水 1000ml

\*: 121°C蒸煮 1 小时，分装入 18 × 18 毫米试管，每管深度达 6 厘米。121°C再次灭菌 1 小时。

#### **Lactic-bacteria Medium I (乳酸菌培养基 I)**

酵母膏 7.5g  
蛋白胨 7.5g  
葡萄糖 10g  
 $KH_2PO_4$  2g  
西红柿汁 100ml

吐温 80 0.5ml

蒸馏水 900ml pH 7.0

适用范围：植物乳杆菌(胚芽乳杆菌)、嗜热乳酸链球菌

#### **Lactic-bacteria Midium II (乳酸菌培养基 II)**

Lacto-casein peptone (乳酪蛋白胨)	10g
Beef extract (蛋白胨)	10g
Yeast extract (酵母膏)	5g
葡萄糖	5g
吐温 80	1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2g
醋酸钠	5g
柠檬酸二胺	2g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.05g

蒸馏水 1000ml pH 6.5-6.8

适用范围：植物乳杆菌(胚芽乳杆菌)

#### **Peotone Glucose Yeast extract Medium PGY (蛋白胨、酵母膏、葡萄糖培养基)**

蛋白胨	10g
酵母膏	5g
葡萄糖	1g
蒸馏水	1L

#### **Glycerol Agar (甘油琼脂)**

蛋白胨	5g
Beef extract (酵母膏)	3g
甘油	20g
琼脂	15g

自来水 1000ml , pH 7.0-7.2

#### **Rhizobium medium (根瘤菌培养基)AS 9**

酵母膏	1g
土壤浸提液	200ml
甘露醇	10g
琼脂	15g

蒸馏水 800ml pH=7.2

土壤浸提液的制法：取土壤 50 克，加水 200 毫升，121℃蒸煮 1 小时，经滤纸过滤后加水补足到 200 毫升。)

适用范围：大豆根瘤菌(慢生型)、豇豆慢生根瘤菌、花生根瘤菌、紫云英根瘤菌、大豆根瘤菌(快生型)、大豆根瘤菌、豌豆根瘤菌、苜蓿根瘤菌、田菁根瘤菌

#### **Mannitol Agar (甘露醇琼脂)**

酵母膏	5g
-----	----

蛋白胨	3g
甘露醇	25g
琼脂	15g
蒸馏水	1000ml

#### Glucose Asparagine (葡萄糖、天门冬素琼脂)

葡萄糖	10g
Asparagine (天门冬素)	0.5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5g

水 1000ml pH=7.2-7.4

适用范围：刺孢小单孢菌绛红变种、紫色小单孢菌(绛红小单孢菌)

#### Gause's Synthetic Agar (高氏合成一号琼脂)

KNO <sub>3</sub>	1g
可溶性淀粉	20g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5g
NaCl	0.5g
FeSO <sub>4</sub>	0.01g
琼脂	20g

水 1000ml pH=7.2-7.4

适用范围：刺孢小单孢菌绛红变种、紫色小单孢菌(绛红小单孢菌)、白黄链霉菌、白色链霉菌、抗生链霉菌、双重轮丝链霉菌、产色链霉菌、烬灰链霉菌、天蓝色链霉菌、灭蚊链霉菌、红霉素链霉菌、青色链霉菌、球孢链霉菌、浅灰链霉菌、灰色链霉菌、吸水链霉菌、淡紫灰链霉菌、黄色长孢链霉菌、藤黄色链霉菌、细黄链霉菌、黑化链霉菌、玫瑰色链霉菌、华美链霉菌、嗜热链霉菌、委内瑞拉链霉菌、紫色直丝链霉菌、紫色链霉菌、绿色链霉菌

#### Wort Agar (麦芽汁琼脂)

将发酵啤酒的原料(未加酒花)，稀释至 12 Brix，加琼脂 15 克，溶化后分装。15 磅灭菌 30 分钟。

适用范围：克鲁斯假丝酵母、郎比可假丝酵母、解脂假丝酵母、马其顿假丝酵母、拟热带假丝酵母、粗壮假丝酵母、皱褶假丝酵母、热带假丝酵母、产脲假丝酵母、阿舒假囊酵母、白地霉、果香地霉、地霉属、异常汉逊酵母、异常汉逊酵母变种、阿拉伯糖醇汉逊酵母、施氏汉逊酵母、菅囊酵母、伯顿毕赤酵母、膜醭毕赤酵母、粘红酵母、小红酵母、胶红酵母、深红酵母、卡尔斯伯酵母、酿酒酵母、椰园酿酒酵母、发酵性酵母、洛格酵母、罗斯酵母、鲁氏酵母多形鲁氏酵母、威尔酵母、酵母、路德类酵母、栗酒裂殖酵母、掷孢酵母、贝雷丝孢酵母、皮状丝孢酵母、糙孢曲霉、无壳曲霉、鲜橙曲霉、红曲霉、紫红曲霉、红色红曲霉、红曲霉菌

#### Potato Dextrose Agar PDA (马铃薯、葡萄糖琼脂)

马铃薯汁*	1000ml
葡萄糖	20g
琼脂	20g

\*：取去皮马铃薯 200 克，切成小块，加水 1000 毫升煮沸 30 分钟，滤去马铃薯块，将滤液补足至 1000 毫升，加葡萄糖 20 克，琼脂 15 克，溶化后分装，15 磅灭菌 30 分钟。

适用范围：酵米面假单胞菌(酵米面黄杆菌)、白色链霉菌、烬灰链霉菌、青色链霉菌、球孢链霉菌、灰色

链霉菌、龟裂链霉菌、伞枝梨头霉、雅致放射毛霉、棒曲霉、米曲霉、出芽短梗霉、白僵霉、灰葡萄孢、顶头孢霉、巴西毛壳、长刺毛壳、橄榄包毛壳、反曲毛壳、琥珀毛壳、圆酵毛壳、束状刺盘孢、新月弯孢霉、奇异翅孢壳、地生翅孢壳、串珠镰孢、尖镰孢、盘长孢菌(鲁保一号)、银白杨盘长孢、玉蜀黍长蠕孢、深黄被孢霉、小被孢霉、多头被孢、拉曼被孢霉、葡萄色被孢霉、生香毛霉、卷枝毛霉、两型孢毛霉、直立毛霉、球孢毛霉、丝球毛霉、大毛霉、多型孢毛霉、总状毛霉、鲁氏毛霉、五通桥毛霉、黑球漆斑菌、露湿漆斑菌、玫烟色拟青霉、棉铃虫拟青霉、拟青霉、球形阜孢、白腐菌、少根根霉、华根霉、科恩根霉、戴尔根霉、日本根霉、爪哇根霉、米根霉、点头根霉、绿穗霉、簇孢匍柄霉、雅致枝霉、康宁木霉、绿色木霉、黄菱轮枝孢、大丽花轮枝孢

### **Czapek's Agar(察氏琼脂)**

蔗糖 30g  
NaNO<sub>3</sub> 3g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g  
KCl 0.5g  
FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g  
琼脂 13g  
蒸馏水 1000ml, pH=7.2

适用范围：红霉素链霉菌、洋葱曲霉、金头曲霉、泡盛曲霉、泡盛曲霉烟色变种、亮白曲霉、炭黑曲霉、鹿皮色曲霉、棒曲霉、无花果曲霉、黄柄曲霉、黄曲霉、烟曲霉、构巢曲霉、黑曲霉、赭曲霉、米曲霉、寄生曲霉、酱油曲霉、土曲霉、宇佐美曲霉、焦曲霉、杂色曲霉、温特曲霉、阿达青霉、产黄青霉、黄绿青霉、桔青霉、顶青霉、园弧青霉、绳状青霉、灰黄青霉、岛青霉、淡紫青霉、特异青霉、赭绿青霉、产紫青霉、萎地青霉、小刺青霉、荨麻青霉、

### **Concentrated Sucrose Czapek's (浓糖察氏琼脂)**

蔗糖 200g  
NaNO<sub>3</sub> 3g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g  
KCl 0.5g  
FeSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.01g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g  
琼脂 13g  
蒸馏水 1000ml

适用范围：谢瓦曲霉

### **Synthetic Potato Medium (综合马铃薯培养基)**

20%马铃薯汁 1L  
葡萄糖 20g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5g  
VB1 (硫胺素) 微量  
琼脂 15g  
pH 6

适用范围：米曲霉、酱油曲霉、栖土曲霉、宇佐美曲霉、出芽短梗霉、白僵霉、灰葡萄孢、顶头孢霉、巴

西毛客、长刺毛壳、球毛壳、橄榄包毛壳、反曲毛壳、琥珀毛壳、圆酵毛壳、多主枝孢、束状刺盘孢、葫芦科刺盘孢、新月弯孢霉、奇异翅孢壳、地生翅孢壳、串珠镰孢、蚀脉镰孢霉、盘长孢菌(鲁保一号)、银白杨盘长孢、瓶毛壳、金龟子绿僵菌、生香毛霉、卷枝毛霉、两型孢毛霉、直立毛霉、球孢毛霉、丝球毛霉、大毛霉、多型孢毛霉、总状毛霉、鲁氏毛霉、五通桥毛霉、黑球漆斑菌、露湿漆斑菌、玫烟色拟青霉、棉铃虫拟青霉、淡紫色拟青霉、拟青霉、白腐菌、少根根霉、根霉属的菌、华根霉、科恩根霉、戴尔根霉、台湾根霉、日本根霉、爪哇根霉、黑根霉、雪白根霉、少根根霉、米根霉、点头根霉、三宝垄根霉、根霉属的种、绿穗霉、康宁木霉、木素木霉、拟康氏木霉、木霉、粉红木霉、绿色木霉、黄菱轮枝孢、大丽花轮枝孢、双孢蘑菇、大肥菇、发光假蜜环菌、木耳、皱木耳、毛木耳、大秃马勃、长根菇、金针菇、棘托竹荪、短裙竹荪、短裙竹荪东北变种(暂定)、长裙竹荪、白鬼笔、无裙竹荪、宽鳞大孔菌、凸圆灵芝(白芝)、紫芝、灵芝(红芝, 赤芝, 日本灵芝, 韩国灵芝)、灰树花、猴头菌、香菇、粗毛斗菇、洁丽香菇、豹皮菇、玉蕈、真姬菇、安络小皮伞菌、鬼毛针、黑柄皮伞菌、尖顶羊肚菌、圆锥羊肚菌、高羊肚菌、黑脉羊肚菌、羊肚菌、滑菇、光帽黄伞、尖鳞黄伞、金顶侧耳、榆黄磨、金顶磨、白黄侧耳、紫孢平菇、姬菇、裂皮侧耳、拟囊体侧耳(鲍鱼菇)、真线侧耳短孢变种、真线侧耳、扇形平菇、扁形平菇、佛罗里达无孢子侧耳、佛罗里达侧耳、蚝菇、糙皮侧耳、平菇、贝形侧耳、鹰翅菌、肺形侧耳、柳树菌、树窝、扁柄侧耳、美味侧耳、紫孢侧耳、粉褶侧耳、粉红侧耳、凤尾菇、漏斗状侧耳、榆干侧耳、大榆磨、侧耳、茯苓、黑菇、烟色红菇、裂褶菌、鸡纵、金耳、黄木耳、银耳、白木耳、紫晶口磨、银丝菇、丝盖小包脚菇、草菇

#### **Corn Meal Medium (玉米粉培养基)**

20%玉米粉装瓶, 121°C灭菌 30 分钟。

#### **Filter Paper Medium (滤纸培养基)**

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.7g

NaCl 0.5g

蒸馏水 1000ml A strip of filter paper (滤纸条) 6 × 1cm (厘米)

#### **Soybean Cake Meal Agar (黄豆饼粉琼脂)**

10%黄豆饼粉浸汁 1000ml

葡萄糖 10g

NaCl 2.5g

#### **Sawdust , Wheat-bran Medium (木屑、麸皮培养基)**

壳斗科植物或阔叶树的木屑 75 克

麸皮 25 克

制法：加水适量充分混匀，水量以手捏时指间有水珠为宜，装瓶并压紧，在中心处扎一小洞，堵上棉塞，121 度灭菌 1 h。

#### **Pine Block or Pine Sowdust Medium (松木条或松木屑培养基)**

1.将 10 × 2 × 1 厘米的松木条浸泡在 1-2%的蔗糖水中。使木条吸足糖水，装瓶不宜过紧，用纸包好，121 度灭菌 1 h。)

2. Pine Sawdust Medium

Pine Sawdust (松木屑) 75%

Rice bran (米糠) 23-24%

Socrose (蔗糖) 1-2%  
 Water (appropriate)水 (适量)  
 121 度灭菌 1 小时 .

**Rice Straw. Dung Medium (稻草、马粪培养基)**

Dried horse dung (or cow dung) (干马粪或牛粪) 65%  
 Dried straw (干稻草) 35%  
 Urea (尿素) 0.5%  
 Calcium superphosphate (过磷酸钙) 0.7%  
 Gypsum powder(石膏粉) 1%  
 Ammonium sulphate (硫酸铵) 0.3%

[Note]: Add appropriate water , pile them up and cause them fermentation. (水适量进行堆积发酵)

**Straw Rice Bran Medium (稻草、米糠培养基)**

Dried straw (干稻草) 75-80% Rice bran (米糠) 20-25%

[Note] : Select no mouldy straw and cut them about 3 cm in length. Immerse them in fresh water for 12 hr. Allow the straw fully (the amount of water added may be decided by kneading with fingers. It is right when a drop of water appeared between fingers). ( [注] : 选无霉稻草, 切成长约 3 厘米的小段, 用清水浸泡 12 小时, 使充分吸水, 然后倾去水, 加米糠和水, 水量以用手捏时指间有水珠为宜。 )

**Rice Medium (米饭培养基)**

Fill 10g of rice into a 50ml of Erlenmeyer flask. Add 20-30ml water. Autoclave at 121°C for 30 minutes (or fill 2g of rice into a 15 x 150mm tube). Add 6 ml of water. Autoclave at 121°C for 30 minutes. (取大米 10 克, 入 50 毫升锥形瓶中, 水 20-30 毫升于 15 磅灭菌 30 分钟即成, 或取大米 2 克, 装入 15 x 150 毫米试管中, 加水 6 毫升, 于 15 磅灭菌 30 分钟。)

**Filter Paper Medium (滤纸条培养基)**

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g  
 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g  
 Yeast Extract (酵母膏) 0.1g  
 蒸馏水 1000ml

Strip of filter paper 1 x 7 cm (滤纸条 1 x 7 厘米)

[Note] : Dissolve the above ingredients. Distribute the liquid medium into tubes (each tube contains 1ml of the broth). Autoclave at 121°C for 30 minutes. Then put one or two sterilized strips of filter paper into a tube aseptically. (将上述溶液分配成溶液后分装入试管, 每管 1 毫升, 15 磅灭菌 30 分钟。再将灭菌的滤纸条(1 条或 2 条)投入试管中即好使用。)

**Yeast Extract-Medium Extract Agar I (酵母膏、麦芽膏琼脂)**

Yeast extract (酵母膏) 10g  
 Malt extract (麦芽膏) 10g  
 Glucose (葡萄糖) 4g  
 蒸馏水 1000ml

Agar (琼脂) 20g pH 7.0

适用范围：红霉素链霉菌

#### **Yeast Extract Peptone (酵母膏、蛋白胨琼脂)**

Yeast extract (酵母膏) 1g  
Multi-peptone(多蛋白胨) 2g  
Beef extract (牛肉膏) 1g  
Glucose (葡萄糖) 10g  
Agar (琼脂) 20g  
蒸馏水 1L pH 7.0

#### **Glucose Yeast Extract Starch Agar (葡萄糖、酵母、淀粉琼脂)**

Glucose (葡萄糖) 10g  
Yeast extract (酵母膏) 10g  
Starch (淀粉) 10g  
NaCl 5g  
CaCO<sub>3</sub> 3g  
Agar (琼脂) 20g  
蒸馏水 1L pH 7.0

#### **Wheat Bran Medium (麸皮培养基)**

Wheat bran (麸皮) 36g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g  
Agar (琼脂) 20g Distilled water (蒸馏水) 1L  
pH 7.0

#### **Yeast Sporulation Medium (酵母菌产生子囊孢子培养基)**

##### **(1) Kleyn Medium**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.012% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.02%  
Sodium acetate (醋酸钠) 0.5% Glucose (葡萄糖) 0.062%  
NaCl 0.062% Peptone (蛋白胨) 0.25%  
Biotin (生物素) 2μg% Agar (琼脂) 2%  
Trace element solution (混合盐类) 1ml/100ml  
[Note]: Trace element solution (混合盐类溶液) : MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4% , NaCl 0.4% , CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.002% , MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.2% , FeSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.2%

##### **(2) Gorodkova Medium**

Glucose (葡萄糖) 0.1% Peptone (蛋白胨) 1%  
NaCl 0.5% Agar (琼脂) 2%

##### **(3) McClary Medium**

Glucose (葡萄糖) 0.1% KCl 0.18%  
Yeast juice (酵母汁) 0.25% Sodium acetate (醋酸钠) 0.82%  
Agar (琼脂) 1.5%

#### **BPY Medium (BPY 培养基)**

牛肉膏 5.0g  
酵母膏 5.0g  
葡萄糖 5.0g  
蛋白胨 10.0g  
NaCl 5.0g  
琼脂 20.0g  
蒸馏水 1000ml pH 7.2  
适用范围：大肠埃希氏菌(大肠杆菌)、恶臭假单胞菌

### **Penssay Broth (Penssay 肉汤)**

Beef extract (牛肉膏) 1.5g Yeast extract (酵母膏) 1.5g  
Tryptone (胰蛋白胨) 5g NaCl 3.5g  
Glucose (葡萄糖) 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 4.8g  
Distilled water (蒸馏水) 1000ml pH 7.2

### **Blond Agar (血琼脂培养基)**

Peptone (蛋白胨) 10g Glucose (葡萄糖) 2g  
NaCl 5g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5g  
Sodium citrate (柠檬酸钠) 5g Brain infusion (脑浸汁) 800ml  
Pig heart infusion (猪心浸) 200ml Sleep Blood (羊血) 10%  
pH 7.2

[Note] : Preparation of pig brain and pig heart infusion :

- (1) Smash up 100g fresh pig heart (without fat and blood vessel). Add distilled water up to 1000ml;
- (2) Cut 200g fresh pig brain (without blood vessel). Add distilled water up to 1000ml;
- (3) Keep the two infusions at 50°C for 1 hr , then boil for 15 minutes;
- (4) Cool and filtrate through gauze . [注]猪心和猪脑浸汁法：(1)新鲜猪心除去心头和脂肪，搅碎 100 克加蒸馏水至 1000 毫升；(2)新鲜猪脑除去血管，取 200 克加蒸馏水至 1000 毫升；(3)50°C保温 1 小时，然后煮开 15 分钟；(4)冷却后用纱布过滤备用。

### **Cellulose - decomposing Bacteria Synthetic Medium (纤维细菌合成培养基)**

NaCl 6g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g CaCl<sub>2</sub> 0.1g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0g Yeast extract (酵母膏) 1.0g  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0g Distilled water (蒸馏水) 1000ml  
Filter paper strip: one strip (滤纸条：一片) pH 7.0-7.4  
[Note]: Solid medium for cellulose-decomposing bacteria: Carboxymethyl Cellulose 2% Agar 2%.  
(斜面培养基去滤纸条用 2%琼脂及 2%羧甲基纤维素钠 CMCNa )

### **Clostridium Pasreurianum Synthetic Medium (巴氏梭状芽孢杆菌合成培养基)**

Glucose (葡萄糖) 1% MnSO<sub>4</sub> 0.001%  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05% FeSO<sub>4</sub> 0.001%  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05% Yeast extract(酵母膏) 0.1%  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02% Peptone (蛋白胨) 0.01%

NaCl 0.001% CaCO<sub>3</sub> 0.5%  
Distilled water (蒸馏水) 100% pH 7.0

#### **Yeast Extract-Medium Extract Agar II (酵母膏、麦芽膏琼脂 II)**

Yeast extract (酵母膏) 4g Malt extract (麦芽膏) 10g  
Glucose (葡萄糖) 4g Agar (琼脂) 17g  
Distilled water (蒸馏) 1000ml pH 7.3

#### **Oatmeal Agar (燕麦粉琼脂)**

Oatmeal(infusion)[燕麦粉浸液] 20g Agar (琼脂) 18%  
Trace element solution (微量盐溶液) 1ml  
Distilled water up to (用蒸馏水补充至 1000 毫升) 1000ml pH 7.2  
[Note] : Trace element solution (微量盐溶液) :  
FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.1g  
ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g Distilled water (蒸馏水) 100ml

#### **Calcium Malate Agar (苹果酸钙琼脂)**

Calcium malate (苹果酸钙) 10g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g  
NH<sub>4</sub>Cl 0.5g Glycerol (甘油) 10g  
Agar (琼脂) 15g Distilled water (蒸馏水) 1000ml

#### **Thiobacillus Ferrooxidans Medium (氧化亚铁硫杆菌培养基)**

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.15g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05g  
KCl 0.05g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g  
Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.01g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 50g  
Distilled water (蒸馏水) 1000ml pH 2.0

#### **Thiobacillus Thiooxidans Medium (氧化硫硫杆菌培养基)**

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3-4g  
CaCl<sub>2</sub> (anhydrous) [无水] 0.25g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g  
FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001g Distilled water (蒸馏水) 1000ml  
pH 3.5-4

#### **Plasma Substitute Medium (代血浆培养基)**

Sucrose (蔗糖) 12.5-15% Peptone (蛋白胨) 0.5%  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.03% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0.14%  
pH 7.0-7.2

#### **Skim Milk Medium (脱脂牛奶培养基) ATCC 183**

脱脂牛奶 100g 去离子水 1000ml  
适用范围：保加利亚乳杆菌、嗜热乳酸链球菌

#### **Pea Agar (豌豆琼脂)**

Glucose (葡萄糖) 1% Peptone (蛋白胨) 0.5%

NaCl 0.5% Agar (琼脂) 2.0%

Pea infusion (counted by NH<sub>2</sub>) [豌豆浸汁(以 NH<sub>2</sub> 计)] 12-14 mg/100

pH (before sterilization) [消前] 7.2-7.5

[Note]: Preparation of pea infusion (豌豆浸汁的制法) :

Preparation 900g of pea. Put them into a 5L bottle , and add 3L of tap water. Adjust pH to 4.3-4.5 by using of sulphuric acid. Add 30ml of chloroform for antiseptis. Plug with rubber stopper and bind up the bottle mouth with gauge in order to avoid that the stopper fall off due to gas pressure. Place the bottle at 37°C for 7-10 days. Filter the infusion , then boil the filtrate to escape the chloroform. Filter again Distribution and autoclave at 120°C for 30 minutes. Store at cool contition . (称取白豌豆 900 克, 置于 5 公升广口瓶中, 加自来水 3 公升, 用硫酸调 pH 至 4.3-4.5, 再加氯仿 30 毫升(防腐), 加胶塞并用纱布扎口(防止冲脱), 放 37°C 恒温室 7-10 天。取出用滤纸过滤, 滤液煮沸 20 分钟, 以除氯仿, 并再次以滤纸过滤, 除沉淀。滤液分装, 于 120°C 30 分钟灭菌。后冷藏备用。)

The standard quality of pea infusion as following (豌豆浸汁质量标准) :

Aminonitrogen(氨基酸): 160-200 mg/100ml

Soluble phosphoruse(溶磷): 400-600 µg/ml

Color(色泽): auratus , transparent (金黄、透明)

#### **Wheat Bran Medium (麦麸琼脂)**

Wheat bran (麦麸) 3.6% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3%

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.02% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01%

Agar (琼脂) 2% pH 7.0

适用范围 : 金霉素链霉菌、红霉素链霉菌

#### **Glucose Yeast Extract Agar (葡萄糖、酵母膏琼脂)**

Glucose (葡萄糖) 10g Yeast extract (酵母膏) 10g

Water (水) 1000ml Agar (琼脂) 15g

pH 7.2

#### **MMN Medium (MMN 培养基)**

CaCl<sub>2</sub> 0.05g MgSO<sub>4</sub> 0.15g

NaCl 0.025g FeCl<sub>3</sub> (1%) 1.2ml

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g Vitamib B1 (硫胺素) 100µg

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25g Wort (12 Be') 100ml

Glucose (葡萄糖) 10-15g Citric acid (柠檬酸) 0.2g

Distilled water (蒸馏水) 900ml pH 5.5 (左右)

适用范围 : 蜜环菌

#### **Starch Agar (淀粉琼脂)**

Soluble starch (可溶性淀粉) 10g NaNO<sub>3</sub> 1g

MgCO<sub>3</sub> 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3g

NaCl 0.5g Agar (琼脂) 20g

Distilled water (蒸馏水) 1000ml

#### **发根农杆菌培养基(YEB)**

Beef extract (牛肉浸膏) 5g/L Yeast extract (酵母膏) 1g/L  
Peptone (蛋白胨) 5g/L Sucrose (蔗糖) 5g/L  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4g/100ml Agar (琼脂) 1.5g/100ml  
pH 7.4  
适用范围:青枯假单胞菌

#### **青枯菌培养基 (Tm)**

Peptone (蛋白胨) 10g Casein (干酪素水解物产) 1g  
Glucose (葡萄糖) 5g Ddhro (纯水) 1000ml  
Agar(琼脂) 15g pH 7.0

#### **YM (Yeast Malt Agar)**

酵母膏 3.0g 麦芽汁 3.0g  
蛋白胨 5.0g 琼脂 20.0g  
蒸馏水 1000ml

#### **Trypton Soy Agar**

胰蛋白胨 17.0g 大豆胨 3.0g  
葡萄糖 2.5g 琼脂 20.0g  
NaCl 5.0g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5g  
蒸馏水 1000ml

#### **NA (Nutrient Agar)**

牛肉膏 3.0g 蛋白胨 5.0g  
琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml  
pH 6.6-7.0

#### **甘露(糖)醇琼脂 (ATCC 1)**

酵母膏 5.0g 蛋白胨 3.0g  
甘露(糖)醇 25.0g 琼脂 15.0g  
蒸馏水 1000ml

#### **Marine 琼脂 2216 (ATCC 2)**

蛋白胨 5.0g 酵母膏 1.0g  
柠檬酸铁 0.1g 溴化钾 0.08g  
NaCl 19.45g MgCl<sub>2</sub> 8.8g  
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.24g CaCl<sub>2</sub> 1.8g  
KCl 0.55g NaHCO<sub>3</sub> 0.16g  
NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.0016g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.008g  
氯化锶 0.034g 硼酸 0.022g  
硅酸钠 0.004g 氟化钠 0.0024g  
琼脂 15.0g 蒸馏水 1000ml  
pH 7.4-7.8

**兔血琼脂(ATCC 4)**

牛心(取其浸液) 500.0g 胰蛋白胍 (Tryptose) 10.0g  
NaCl 5.0g 琼脂 15.0g  
蒸馏水 1000ml pH 6.6-7.0

**孢子形成培养基 (ATCC 5)**

酵母膏 1.0g 牛肉膏 1.0g  
胰蛋白胍 2.0g 葡萄糖 10.0g  
FeSO<sub>4</sub> 微量 琼脂 15.0g  
蒸馏水 1000ml pH 7.2

**Trypticase Soy Agar (ATCC 18)**

Trypticase Soy Broth 30.0g 琼脂 15.0g  
蒸馏水 1000ml

**SP (ATCC 432)**

棉子糖 1.0g 蔗糖 1.0g  
半乳糖 1g 可溶性淀粉 5g  
水解酪蛋白 2.5g 琼脂 20.0g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25g  
蒸馏水 1000ml pH 自然

**胰酪胍大豆酵母浸膏琼脂 (TSA-YE)**

胰蛋白胍 15.5g 大豆蛋白胍 5.0g  
NaCl 5.0g 酵母膏 6.5g  
琼脂 15.0g 蒸馏水 1000ml  
pH 7.3

**ATCC 20**

蛋白胍 5.0g 酵母膏 15.0g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.0g 葡萄糖 2.0g  
琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml  
pH 7.3-7.5

**TY (Yeast Tryptone Agar)**

蛋白胍 10.0g 酵母膏 5.0g  
葡萄糖 1.0g NaCl 5.0g  
琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml  
pH 7.0

**硫醇(Thiol)培养基 (ATCC 49)**

示蛋白胍(Proteose Peptone No.3 , Difco) 10.0g 酵母膏 5.0g  
葡萄糖 1.0g NaCl 5.0g

硫醇复合物 8.0g 琼脂 1.0g  
p-氨基苯甲酸 0.05g pH 6.9-7.3

**Czapek ' Dox 琼脂培养基 (ATCC 134)**

Czapek ' Dox Broth 35.0g 琼脂 15.0g  
蒸馏水 1000ml

**MG/L**

蛋白胨 5.0g 甘露醇 5.0g  
谷氨酸钠 1.15g 生物素 0.0001g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25g NaCl 0.1g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g 酵母膏 2.5g  
琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml  
氯霉素(终浓度) 50μg/ml  
pH 7.0

**Bennetts Agar (IFO 228)**

酵母膏 1.0g 牛肉膏 1.0g  
NZ Amine , type A 2.0g 葡萄糖 10.0g  
琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml  
pH 7.3

**Harrold's M40Y (ATCC 319)**

麦芽膏 20.0g 酵母膏 5.0g  
蔗糖 400.0g 琼脂 20.0g  
蒸馏水 1000ml

**PSA (Potato Sucrose Agar)**

土豆 200g 蔗糖 20g  
蒸馏水 1000ml 琼脂 20g  
pH 6.0-6.5

**马铃薯牛肉汁培养基**

麦芽糖 20.0g 牛肉膏 5.0g  
蛋白胨 3.0g 马铃薯 200.0g  
pH 7.0-7.2

**BHI (Brain Heart Infusion)**

牛脑 200.0g 牛心浸出汁 250.0g  
蛋白胨 10.0g 葡萄糖 2.0g  
NaCl 5.0g 琼脂 20.0g  
蒸馏水 1000ml pH 6.8-7.2

#### **兔食琼脂培养基(ATCC 340)**

兔食(商店出售) 25.0g 琼脂 20.0g

蒸馏水 1000ml

\*煮沸兔食，并浸泡 1/2 小时，用多层纱布过滤，加琼脂于滤液中。

#### **土豆琼脂(ATCC 423)**

200 克去皮土豆切成小块于 1000ml 自来水中煮沸 1 小时，用细棉布过滤。加进 5.0mgMnSO<sub>4</sub>，pH 调至 6.8，用自来水定容至 1000ml。加进 15.0g 琼脂，溶化，分装并灭菌。

#### **土豆浸汁加无机盐培养基(ATCC 470)**

土豆 2000g MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.02g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g

CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.01g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g

\* 称取 200g 去皮块状土豆，加入 1000ml 蒸馏水煮沸 30 分钟，多层纱布过滤，滤液中加入以上成分，溶解后定容至 1000ml。

#### **无机盐淀粉琼脂培养基(ATCC 527)**

可溶性淀粉 10.0g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0g

MgSO<sub>4</sub> 1.0g NaCl 1.0g

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0g CaCO<sub>3</sub> 2.0g

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001g MnCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001g

ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001g 琼脂 20.0g

pH 7.0-7.4

#### **AS125**

新鲜鸡蛋 15-16 蒸馏水 375ml

2%孔雀(石)绿 10.0g K<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.375g 天冬酰胺 2.25g

甘油 7.5ml 土豆粉 18.8g

#### **燕麦片(Oatmeal)琼脂培养基**

燕麦片 60.0g 琼脂 12.5g

蒸馏水 1000ml

\* 将燕麦片加 600ml 水中，制成匀浆，加热至 45-50oC，然后加入已溶化琼脂的另 400ml 水，121oC 灭菌 90 分钟。

#### **细菌培养基(ATCC 573)**

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.3g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.37g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.07g

FeCl<sub>3</sub> 0.02g 葡萄糖 1.0g

酵母膏 1.0g 蒸馏水 1000ml

用 10 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 调 pH 至 4.0。若配制固体培养基，为增强上述溶液的强度，pH 需调至 3.5，琼脂水溶液

浓度为 40g/L。两者分别高压灭菌，冷却至约 50°C，无菌操作将两种溶液等体积混合，这一过程可避免琼脂被酸水解。

### **碎肉培养基(ATCC 593)**

牛肉(去脂肪) 500.0g 蒸馏水 1000ml

NaOH 25.0ml

\* 所用瘦牛肉或马肉(碾)磨碎前需去脂肪和周围的组织。将肉、水、NaOH 混合后边搅拌边加热，冷至室温，去掉表面油脂，过滤，留下肉末和滤液。滤液加蒸馏水至 1000ml。滤液中加下列成分：

蛋白胨 30.0g 酵母膏 5.0g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.0g 0.025%刃天青(Resazurin)溶液 4.0ml

然后煮沸，冷却，加 0.5g L-半胱氨酸 HCl。H<sub>2</sub>O，pH 调至 7.0。在氧气、氮气(O<sub>2</sub>-free nitrogen)和 3% 氢气条件下，按 1 份碎肉加 4-5 份以上溶液的比例分装于每支试管。在氮气和氢气条件下，使用橡皮塞，快排气，高压灭菌 15 分钟。

### **YMPG**

酵母膏 3.0g 麦芽汁 3.0g

蛋白胨 5.0g 葡萄糖 10.0g

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g 琼脂 20.0g

蒸馏水 1000ml pH 6.8

灭菌：110°C，35 分钟

### **TGYM 培养基(ATCC 679)**

胰蛋白胨 5.0g 葡萄糖 1.0g

酵母膏 3.0g 蒸馏水 1000ml

DL-蛋氨酸(DL-Meth 0.5g

### **TYG 培养基(ATCC 741)**

胰蛋白胨 3.0g 酵母膏 3.0g

葡萄糖 3.0g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0g

琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml

pH 7.4

### **M9**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12.8g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0g

NaCl 0.5g NH<sub>4</sub>Cl 0.5g

葡萄糖(单独灭菌) 10.0g 维生素 B1(单独灭菌) 1μg/ml

pH 自然

### **Oatmeal Agar**

琼脂 5.0g 蒸馏水 500ml

加热溶化速溶燕麦粉 40.0g 蒸馏水 250ml

加热溶化后与琼脂液混合加水至 1000ml pH 5.8

**V8-Juice Agar (AYCC 343)**

V-8 果汁 200g CaCO<sub>3</sub> 3.0g  
琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml  
pH 5.8

**Czapek-Dox Agar (ATCC 312)**

NaNO<sub>3</sub> 3.0g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g KCl 0.5g  
FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g 蔗糖(单独灭菌) 30.0g  
琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml  
pH 5.6

**GC 培养基 (ATCC 814)****A 液**

琼脂 5.0g GC 琼脂培养基(BBL 11275) 36.0g  
蒸馏水 500.0ml

**B 液**

干燥色牛血红蛋白(BBL 11871) 10.0g 蒸馏水 500.0ml  
Iso Vitale X (BBL 11876) 10.0ml

**固氮螺菌培养基 (ATCC 838)**

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g NaCl 0.1g  
CaCl<sub>2</sub> 0.02g FeCl<sub>3</sub> 0.01g  
NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.002g 苹果酸钠(Na malate) 5.0g  
酵母膏 0.05g 蒸馏水 1000ml  
pH 7.2-7.4

**BG-11**

NaNO<sub>3</sub> 1.5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.04g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.075g CaCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.036g  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.02g 柠檬酸 0.006g  
柠檬酸铁 0.006g \*微量元素溶液 A5 1ml  
氨苄青霉素 (终浓度) 50μg/ml 蒸馏水 1000ml  
琼脂 20.0g  
\* 微量元素溶液 A5  
H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> 2.86g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1.81g  
ZnSO<sub>4</sub> 0.222g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.39g  
CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.079g Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 49.4g

**Marine Agar**

蛋白胨 5.0g 酵母膏 1.0g  
柠檬酸铁 0.1g NaCl 19.45g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5.9g KCl 0.55g

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.24g CaCl<sub>2</sub> 1.8g

NaHCO<sub>3</sub> 0.16g KI 0.08g

微量元素 10ml pH 7.0-7.6

\* 微量元素溶液：

氯化锶 0.034g 硅酸钠 0.004g

蒸馏水 1000ml H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> 0.022g

NaCl 0.0024g NaNO<sub>3</sub> 0.0016g

NaHPO<sub>4</sub> 0.008g 蒸馏水 1000ml

### **Yeast Starch Agar**

酵母膏 2.0g 可溶性淀粉 10.0g

琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml

pH 7.2-7.4

### **GYMC**

葡萄糖 4.0g 酵母膏 2.0g

麦芽汁 20.0g 琼脂 20.0g

CaCO<sub>3</sub> 1.5g 蒸馏水 1000ml

pH 6.8-7.0

### **LCSB**

乳糖 15.0g 玉米浆 5.0g

蛋白胨 5.0g NaCl 4.0g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.6g

FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.005g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.002g

琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml

相对湿度 65% pH 4.8

### **高氏 1 号(G)**

可溶性淀粉 20.0g KNO<sub>3</sub> 1.0g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g

NaCl 0.5g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g

琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml

pH 7.0-7.2

### **葡萄糖-酵母膏琼脂(ATCC 846)**

酵母膏 5.0g 蛋白胨 1.0g

KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0g NaCl 1.0g

琼脂 20.0g 蒸馏水 950.0ml

pH 6.8

补加 50ml 10% 葡萄糖(葡萄糖溶液单独过滤灭菌)。

### **Tep 尿液(Uric Acid)琼脂(ATCC 894)**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 9.0g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g 柠檬酸铁铵(绿色) 1.2g  
CaCl<sub>2</sub> 20.0mg MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1.0mg  
Trypticase Soy Broth (BBL 11768) 3.0g 尿素 4.0g  
琼脂 20.0 蒸馏水 1000ml  
pH 7.2

#### **增强梭菌生长的培养基 (ATCC 1053)**

胰蛋白胨 10.0g 牛肉膏 10.0g  
酵母膏 3.0g 葡萄糖 5.0g  
NaCl 5.0g 可溶性淀粉 1.0g  
半胱氨酸盐酸盐 0.5g 醋酸钠 3.0g  
琼脂 15.0g 蒸馏水 1000ml  
pH 6.6-7.0

#### **酵母膏-甘露(糖)醇琼脂 (ATCC 1205)**

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g  
NaCl 0.1g 甘露(糖)醇 10.0g  
酵母膏 0.4g 蒸馏水加至 1000ml

#### **Tomato Dextrin Agar (ATCC 965)**

番茄汁 20.0g 糊精 20.0g  
酵母膏 10.0g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5.0mg  
琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml  
pH 7.2-7.4

#### **嗜热菌无机盐溶液 (ATCC 1554)**

FeSO<sub>4</sub> 1.0mg MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 200.0mg  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 210.0mg NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 90.0mg  
KCl 40.0mg CaCl<sub>2</sub> 15.0mg  
NaNO<sub>3</sub> 0.25g NH<sub>4</sub>Cl 0.25g  
微量元素溶液(见下面) 10.0ml  
n-Heptadecane(C17) 0.1%(v/v) 蒸馏水 1000ml  
微量元素溶液：  
CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 500mcg H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> 1.0mg  
MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 7.0mcg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 7.0mg  
MoO<sub>3</sub> 1.0mg CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 18.0mcg  
蒸馏水 1000ml

#### **醋杆菌培养基 (AS 1)**

葡萄糖 100.0g 酵母膏 10.0g  
CaCO<sub>3</sub> 20.0g 琼脂 15.0g  
蒸馏水 1000ml pH 6.8

#### **葡萄糖天冬酰胺琼脂培养基 (AS 11)**

葡萄糖 10.0g 天冬酰胺 (Asparagine) 0.5g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g 蒸馏水 1000ml  
pH 7.2-7.4

#### **麦芽汁琼脂 (AS13)**

稀释去除啤酒花的麦芽汁至浓度为 12Brix(白利-糖浓度单位)。按 1.5%的比例将琼脂加进上述麦芽汁中，加热溶解，然后将此培养基分装试管中。高压灭菌：110℃，30 分钟。

#### **ATCC 805**

酵母膏 1.0g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0g 甘露糖醇 5.0g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1g 蒸馏水 1000ml  
琼脂 20.0g pH 7.4

#### **Todd-Hewitt Medium**

牛心脏 500.0g 蛋白胨 20.0g  
葡萄糖 2.0g NaCl 2.0g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.5g  
琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml  
pH 7.8

#### **MSK**

酵母膏 1.0g 脱脂奶粉 100.0g  
琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml  
pH 6.9

#### **土豆葡萄糖琼脂培养基 (AS 14)**

土豆 500g 葡萄糖 20.0g  
琼脂 20.0g

\* 称取 500 克土豆，去皮切成丁，立即加入 1000ml 水，充分煮沸，用棉布过滤。滤液用水定容至 1000ml，再加入其它成分。高压灭菌：115℃，20 分钟。

#### **PCA (ATCC 343)**

土豆 20.0g 胡萝卜 20.0g  
琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml  
pH 5.8

#### **Mueller-Hinton Agar**

牛肉膏 300.0g 水解酪蛋白 17.5g  
淀粉 1.5g 磺胺嘧啶(终浓度) 50µg/ml  
琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml  
氨苄青霉素(终浓度) 50µg/ml  
pH 7.2

**豆饼粗粉琼脂培养基 (AS 20)**

10%豆饼粗粉浸液 1000g 葡萄糖 10.0g  
NaCl 2.5g 琼脂 15.0g

**北京棒状杆菌噬菌体培养基 (AS 48)**

(1)牛肉膏 3.0g 蛋白胨 5.0g  
NaCl 5.0g 葡萄糖 10.0g  
蒸馏水 1000ml pH 7.0  
(2)葡萄糖 20.0g 玉米浆 8.0g  
K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 1.0g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4g  
尿素(Urea) 5.0g Fe<sup>+</sup> , Mn<sup>+</sup>分别为 2 ppm  
蒸馏水 1000ml pH 7.0

**营养肉汤和葡萄糖培养基 (AS 100)**

牛肉膏 10.0g 蛋白胨 10.0g  
葡萄糖 10.0g NaCl 5.0g  
琼脂 15.0-20.0g 蒸馏水 1000ml  
pH 7.0

**Trypticase Soya Agar**

胰蛋白胨 17.0g 大豆胨 3.0g  
葡萄糖 2.5g NaCl 5.0g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5g 甘油(50%)  
琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml  
pH 7.0

**尿囊素无机盐培养基 (DSM 6)**

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.8g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.05g  
FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 1.0mg  
尿囊素(Allantion) 20.0g 琼脂 15.0g  
蒸馏水 1000ml

**碱性营养琼脂培养基 (DSM 31)**

蛋白胨 5.0g 牛肉膏 3.0g  
琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml  
灭菌后,加入无菌的 1M Na - Sesquicarb - bonate 溶液 : (1:10v/v) , 至 pH9.7。  
Na - Sesquicarbbonate 溶液 :  
NaHCO<sub>3</sub> 4.2g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5.3g  
蒸馏水 100.0ml

**Trypticase Soy 琼脂培养基(DSM 220)**

酪蛋白胨(Peptone from casein)5.0g 豆粉蛋白胨(Peptone from soymeal)5.0g  
NaCl 5.0 琼脂 15.0g

蒸馏水 1000ml pH 7.3

### **IFO 203**

蛋白胨 10.0g 酵母膏 5.0g

肝浸出液 25.0g 葡萄糖 3.0g

甘油(Glycerol) 15.0g NaCl 3.0g

琼脂 20.0g 蒸馏水定容至 1000ml

pH 7.2

\* Wako Pure Chemicals Ind.Lte. , Osaka Japan.

### **IFO 231**

酵母膏 1.0g 牛肉膏 1.0g

NZ 胺(Amine) , typeA 2.0g 麦芽糖(Maltose) 10.0g

琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml

pH 7.3

\* Sheffield Chemical Co. , San Ramon , CA 94583 , USA or wako Pure Chemical Ind.Ltd. , Osaka , Japan.

### **胰酪胨大豆酵母浸膏琼脂 (TSA - YE)**

胰蛋白胨 15.5g 大豆蛋白胨 5.0g

NaCl 5.0g 酵母膏 6.5g

琼脂 15.0g 蒸馏水 1000ml

pH 7.1-7.5

### **MRS**

蛋白胨 10.0g 牛肉膏 10.0g

酵母膏 5.0g 葡萄糖 10.0g

琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml

pH 6.5

### **SEM**

蔗糖 10.0g  $K_2HPO_4$  0.5g

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2g  $MgCl_2$  0.2g

$CaCO_3$  1.0g 酵母膏 0.4g

琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml

pH 7.0-7.2

注：用无水  $MgSO_4$  量减半

### **无氮 M**

酵母膏 1.0g

土壤浸汁液 200g

琼脂 20.0g

蒸馏水 800g

甘露醇 10.0g pH 7.2

土壤浸汁液制法：取沃土 50g 加水 200ml，15 磅灭菌 1 小时，过滤取滤液，加水到 200ml。

### **M 17**

胰蛋白胨 50.0g  
大豆胨 50.0g  
牛肉膏 50.0g  
酵母膏 25.0g  
抗坏血酸 5.0g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.5g  
蔗糖 10.0g  
磷酸甘油二钠 190.0g  
琼脂 20.0g  
蒸馏水 1000ml pH 6.9

### **乳酸钠 M**

乳酸钠 10.0g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.67g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.87g  
NaCl 0.05g  
CaCl<sub>2</sub> 40mg  
FeCl<sub>3</sub> 4mg  
酵母膏 1.0g  
琼脂 20.0g  
蒸馏水 1000ml pH 6.8

### **RVVBN**

苹果酸 4.0g  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 120mg  
CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 75mg  
Na<sub>2</sub>EDTA 20mg  
磷酸缓冲液(钾盐) 10mM  
生物素 15μg 维生素 B1 1mg  
微量元素溶液 1ml  
\* 微量元素溶液：  
HBO<sub>3</sub> 0.7g  
MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 398mg  
ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 60mg  
NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 188mg  
Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O 10mg  
NaCl 3.0g  
蒸馏水 250ml

**R2YE , R5**

蔗糖 103.0g  
K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.25g  
MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 10.12g  
葡萄糖 10.0g  
水解酪蛋白 0.1g  
微量元素溶液 2.0g  
酵母膏 5.0g  
TES 缓冲液 57.3ml  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(0.5%) 10ml  
CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O(5M) 4ml  
L-脯氨酸(20%) 150ml  
NaOH(1N) 7ml  
琼脂 20.0g  
蒸馏水 1000ml pH 7.2

**\* 微量元素溶液(每升)**

ZnCl<sub>2</sub> 40mg  
FeCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 200mg  
CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10mg  
MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 10mg  
Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O 10mg  
(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 10mg  
后 4 种试剂单独灭菌，使用时加入。

**MRS (DSM 11)**

水解酪蛋白 10.0g  
酵母膏 5.0g  
葡萄糖 20.0g  
吐温 80 1.0g  
柠檬酸铵 2.0g  
K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0g  
NaAc 2.0g  
MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g  
MgSO<sub>4</sub> 0.05g  
琼脂 20.0g  
蒸馏水 1000ml pH 6.2-6.5

**羧基纤维素酵母培养基**

羧甲基纤维素 15.0g  
酵母浸膏 1.0g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0g

琼脂 20.0g

蒸馏水 1000ml

\* 各成分依次溶于水中，121℃灭菌 15 分钟

#### **ATCC 464**

蛋白胨 5.0g 胰蛋白胨 5.0g

酵母膏 5.0g 葡萄糖 5.0g

琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml

#### **IFFI 24 M**

牛肉膏 5.0g 酵母膏 5.0g

蛋白胨 10.0g 葡萄糖 10.0g

乳糖 5.0g NaCl 5.0g

琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml

pH 6.8

#### **IFFI 8 M**

麦芽汁或麦芽浸膏 3.0g 酵母膏 5.0g

CaCO<sub>3</sub> 6.0g 蒸馏水 1000ml

琼脂 20.0g pH 自然

#### **土壤浸汁-蛋白胨牛肉膏培养基(ATCC 654)**

蛋白胨 5.0g 牛肉膏 3.0g

琼脂 15.0g 土壤浸汁 1000ml

土壤浸汁：取干燥去杂石的土壤 400g 加入 960ml 自来水中。121℃高压灭菌 1 小时，到达压力后，至少保压 30 分钟。棉布初滤，再用滤纸过滤。再次灭菌 121℃，20 分钟。滤液用于配制培养基。

#### **AS 95**

牛肉膏 5.0g 酵母膏 5.0g

蛋白胨 10.0g 葡萄糖 10.0g

乳糖 5.0g NaCl 5.0g

琼脂 20.0g 蒸馏水 1000ml

pH 6.8

#### **Oxoid CM3**

"Lab-Lemco" beef extract 1g

酵母膏 2g

蛋白胨 5g

NaCl 5g

琼脂 15g

蒸馏水 1000ml pH 7.4

综合 PDA 琼脂(AS 17)

葡萄糖 20.0g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0g  
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5g  
维生素 B1 微量  
琼脂 15.0 g  
马铃薯提取液 1000 ml

**Jensen's Medium (Sesbania)**

10X Macro nutrients (1000 ml):

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3 H <sub>2</sub> O	2.6 g
NaCl	2.0 g
MgSO <sub>4</sub>	0.97 g
CaCl <sub>2</sub>	10.0 g
FeCl <sub>3</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	1.4 g
KNO <sub>3</sub>	3.0 g

---

**Jensen's Medium (Sesbania)**

1X solution (1000 ml):

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3 H <sub>2</sub> O	0.20 g
NaCl	0.20 g
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0.20 g
CaHPO <sub>4</sub>	1.00 g
FeCl <sub>3</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	0.10 g
or Fe EDTA	0.26 g
KNO <sub>3</sub> .(only for 10X)	3.00 g

---

**Jensen's Medium (1942)**

see Vincent 1970 p. 75.

per Liter:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3 H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0.2 g
CaHPO <sub>4</sub>	1.0 g
FeCl <sub>3</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	0.1 g
or Fe-EDTA	0.26 g

Dilute 1:5 when used.

15 ml diluted medium/pouch.

**1000X Micronutrients (200 ml)**

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	572 mg
MnCl <sub>2</sub>	406 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	44 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	16 mg
NaMoO <sub>4</sub> ·BH <sub>2</sub> O	18 mg

Co <sup>2+</sup>	20 mg
Ni <sup>2+</sup>	20 mg

**10% Yeast** (per 200 ml)

Yeast extract	20.0 g
---------------	--------

Add 150-160 ml water. Autoclave.

Add 150 ul β-mercaptoethanol  
after autoclaving.

---

**20X Tryptone/NaCl** (per 200 ml)

Tryptone	40.0 g
----------	--------

NaCl	20.0 g
------	--------

Add 190 ml water. Autoclave.

Add 150 ul β-mercaptoethanol  
after autoclaving.

---

**10X M9 stock** (for 200 ml)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydr.)	12.0 g
--	--------

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.0 g
---------------------------------	-------

NaCl	1.0 g
------	-------

NH <sub>4</sub> Cl	2.0 g
--------------------	-------

Add 196 ml H<sub>2</sub>O. Autoclave.

Note: leave out NH<sub>4</sub>Cl to prepare 10X M9-N.

---

**10X M9 - N stock** (for 200 ml)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydr.)	12.0 g
--	--------

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.0 g
---------------------------------	-------

NaCl	1.0 g
------	-------

Add 196 ml H<sub>2</sub>O. Autoclave.

Note: **leave out NH<sub>4</sub>Cl!**

---

**100X P** (for 200 ml)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	18.1 g
---------------------------------	--------

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.0 g
---------------------------------	-------

**pH to 6.3 with 10 N KOH!**

Add 192 ml H<sub>2</sub>O. Autoclave.

---

**1X SM** (for 200 ml)

NaCl	1.16 g
------	--------

MgSO <sub>4</sub>	0.20 g
-------------------	--------

Gelatin (2%)	1.00 ml or 20 mg
--------------	------------------

Add 190 ml H<sub>2</sub>O , then add:

Tris (1 M , pH 7.5)	10.0 ml
---------------------	---------

Autoclave.

**2% Gelatin** (per 500 ml)

Gelatin 10 g

Add 500 ml water.

Autoclave.

**MS MEDIUM FOR ARABIDOPSIS**

To 990 ml H<sub>2</sub>O add:

Sucrose ..... 10.0 g

MOPS ..... 0.5 g

Agar ..... 8.0 g

Adjust pH to 5.7 with 1 M KOH.

Autoclave.

When cooled add sterile stock solutions of:

KNO<sub>3</sub>..... 20.0 ml 940 mM (95.00 g/L)

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>..... 20.0 ml 1000 mM (80.04 g/L)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>..... 12.5 ml 100 mM (13.60 g/L)

MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O..... 15.0 ml 100 mM (24.65 g/L)

CaCl<sub>2</sub>7H<sub>2</sub>O..... 10.0 ml 300 mM (44.00 g/L)

Glycine..... 2.67 ml 10 mM

Nicotinate..... 0.4 ml 10 mM

Thiamin..... 0.02 ml 10 mM

PyridoxineHCl..... 0.24 ml 10 mM

Myoinositol..... 5.5 ml 100 mM

FeSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O ..... 1.0 ml (2.780 g/100 ml)

Na<sub>2</sub>EDTA ..... 1.0 ml 100 mM (3.720 g/100 ml)

MnSO<sub>4</sub>4H<sub>2</sub>O..... 1.0 ml 100 mM (1.690 g/100 ml)

ZnSO<sub>4</sub>4H<sub>2</sub>O..... 3.0 ml 10 mM (0.288 g/100 ml)

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ..... 1.0 ml 100 mM (0.618 g/100 ml)

KI..... 0.5 ml 10 mM (0.166 g/100 ml)

CuSO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O ..... 0.01 ml 10 mM (0.170 g/100 ml)

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O ..... 0.1 ml 10 mM (0.242 g/100 ml)

CoCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O ..... 0.01 ml 10 mM (0.238 g/100 ml)

**B5 MEDIUM FOR ARABIDOPSIS**

To 990 ml H<sub>2</sub>O add:

Sucrose ..... 20.0 g

MOPS ..... 0.5 g

Agar ..... 8.0 g

Adjust pH to 5.7 with 1 M KOH.

Autoclave.

When cooled add sterile stock solutions of:

KNO<sub>3</sub>..... 26.3 ml 940 mM (95.00 g/L)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O..... 11.0 ml 100 mM

MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	10.0	ml	100 mM (24.65 g/L)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> .....	10.0	ml	100 mM
CaCl <sub>2</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	3.3	ml	300 mM (44.00 g/L)
Myoinositol.....	5.5	ml	100 mM
Thiamine.....	3.0	ml	10 mM
Nicotinate.....	0.8	ml	10 mM
PyridoxineHCl.....	0.48	ml	10 mM
10X Micronutrients.	10.0	ml	(see below)
Sequestrene 330 Fe.	10.0	ml	(0.28 g/100 ml)

For Callus Inducing Medium (CIM) add:

2, 4-D.....	0.50	ml
Kinetin.....	0.05	ml

For Shoot Inducing Medium (SIM) add:

IAA.....	0.15	ml
6-dimethylaminopurine.....	5.00	ml

**10X Micronutrients** (per 100 ml)

MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O.....	0.6	ml	100 mM (1.690 g/100 ml)
ZnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O.....	10.07	ml	10 mM (0.288 g/100 ml)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	4.9	ml	100 mM (0.618 g/100 ml)
KI.....	4.5	ml	10 mM (0.166 g/100 ml)
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O .....	2.3	ml	10 mM (0.170 g/100 ml)
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O .....	1.0	ml	10 mM (0.242 g/100 ml)
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O .....	1.0	ml	10 mM (0.238 g/100 ml)

**CA (Complete Agar)**

Casein Hydrolysate	10	g
Yeast Extract	5	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4	g
Agar	15	g
H <sub>2</sub> O up to 1 L		

**Stab Agar**

Nutrient Broth	10	g
NaCl	5	g
Agar	6	g
H <sub>2</sub> O up to 1 L		

Mix well and autoclave for 15 min at 121 C.

**S.O.C. (from BRL)**

2 % Bacto-Tryptone	2.0	g
0.5 % Yeast Extract	0.5	g

10 mM NaCl	2.92 g
2.5 mM KCl	3.73 g
20 mM MgCl <sub>2</sub>	20.2 g
20 mM MgSO <sub>4</sub>	24.6 g
20 mM Glucose	9.0 g

Mix above , bring to 100 ml , and filter through a sterile 0.45 μm filter. Store the stock solution at -20 C or -70 C.

### **Bacillus Thuringiensis Medium**

Component	G/L
Glucose	3.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.0
Yeast Extract	2.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3H <sub>2</sub> O	0.5
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.2
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.08
MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	0.05

Add componenets to distilled water. Mix throughly and bring pH to 7.3.

Autoclave for 15 min at 121°C

## 15.18. 常用缓冲溶液

### 磷酸缓冲液

#### ( 1 ) 25°C下 0.1mol/L 磷酸钾缓冲液的配制\*

pH	1mol/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (ml)	1mol/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (ml)
5.8	8.5	91.5
6.0	13.2	86.8
6.2	19.2	80.8
6.4	27.8	72.2
6.6	38.1	61.9
6.8	49.7	50.3
7.0	61.5	38.5
7.2	71.7	28.3
7.4	80.2	19.8
7.6	86.6	13.4
7.8	90.8	9.2
8.0	94.0	6.2

#### ( 2 ) 25°C下 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液的配制\*

pH	1mol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (ml)	1mol/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (ml)
5.8	7.9	92.1
6.0	12.0	88.0
6.2	17.8	82.2
6.4	25.5	74.5
6.6	35.2	64.8

6.8	46.3	53.7
7.0	57.7	42.3
7.2	68.4	31.6
7.4	77.4	22.6
7.6	84.5	15.5
7.8	89.6	10.4
8.0	93.2	6.8

※:用蒸馏水将混合的两种 1mol/L 贮存液稀释至 1000ml 根据 Henderson-Hasselbalch 方程计算其 pH 值:

$$\text{pH} = \text{pK}' + 1 \lg([\text{质子受体}]/[\text{质子供体}])$$

在此,  $\text{pK}' = 6.86(25^\circ\text{C})$ 。

### 3.电泳缓冲液

测序凝胶加样缓冲液  
98%去离子甲酰胺  
10mol/L EDTA(pH8.0)  
0.025%二甲苯青 FF  
0.025%溴酚蓝

**甲酰胺**:许多批号的试剂级甲酰胺,其纯度符合使用要求,无须再进行处理。不过,一旦略呈黄色,则应用在磁力搅拌器上将甲酰胺与 Dowex XG<sub>8</sub> 混合床树脂共同搅拌 1 小时进行去离子处理,并用 Whatman 1 号滤纸过滤 2 次,去离子甲酰胺分装成小份,充氮存于-70°C。

### 5.各种 pH 值的 Tris 缓冲液的配制

所需 pH 值 (25°C)	各种 pH 值的 Tris 缓冲液的配制	
	0.1mol/L HCl 的体积	
7.1	45.7	
7.2	44.7	
7.3	43.4	
7.4	42.0	
7.5	40.3	
7.6	38.5	
7.7	36.6	
7.8	34.5	
7.9	32.0	
8.0	29.2	
8.1	26.2	
8.2	22.9	
8.3	19.9	
8.4	17.2	
8.5	14.7	
8.6	12.4	
8.7	10.3	
8.8	8.5	
8.9	7.0	

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

**( 2 ) 温度对 50mmol/L Tris-HCl 液 pH 值的影响**

4°C	25°C	37°C
8.1	7.5	7.2
8.2	7.6	7.3
8.3	7.7	7.4
8.4	7.8	7.5
8.5	7.9	7.6
8.6	8.0	7.7
8.7	8.1	7.8
8.8	8.2	7.9
8.9	8.3	8.0
9.0	8.4	8.1
9.1	8.5	8.2
9.2	8.6	8.3
9.3	8.7	8.4
9.4	8.8	8.5

**( 6 ) 常用缓冲液的 pKa 值**

缓冲液	分子量	pKa 值	缓冲范围
Tris <sup>a</sup>	121.1	8.08	7.1 ~ 7.9
HEPES <sup>b</sup>	283.3	7.47	7.2 ~ 8.2
MPOSC <sup>c</sup>	209.3	7.15	6.6 ~ 7.8
PIPES <sup>d</sup>	304.3	6.76	6.2 ~ 7.3
MES <sup>e</sup>	195.2	6.09	5.4 ~ 6.8

a : 三羟甲基氨基甲烷 ; b : N-2-羟乙基哌嗪-N' -2-乙磷酸 ; c : 3-( N-吗啉代 ) 丙磺酸 ; d : N , N' - 双 ( 2-乙磺酸 ) 哌嗪 ; e : 2-( N-吗啉代 ) 乙磺酸。

**1 . 甘氨酸-盐酸缓冲液 ( 0.05mol/L )**

X 毫升 0.2 mol/L 甘氨酸+Y 毫升 0.2 mol/L HCl , 再加水稀释至 200 毫升

pH	X	Y	pH	X	Y
2.0	50	44.0	3.0	50	11.4
2.4	50	32.4	3.2	50	8.2
2.6	50	24.2	3.4	50	6.4
2.8	50	16.8	3.6	50	5.0

甘氨酸分子量 = 75.07 , 0.2 mol/L 甘氨酸溶液含 15.01 克/升。

**2 . 邻苯二甲酸-盐酸缓冲液 ( 0.05 mol/L )**

X 毫升 0.2 mol/L 邻苯二甲酸氢钾 + 0.2 mol/L HCl , 再加水稀释到 20 毫升

pH(20°C)	X	Y	pH(20°C)	X	Y
2.2	5	4.070	3.2	5	1.470
2.4	5	3.960	3.4	5	0.990
2.6	5	3.295	3.6	5	0.597

2.8	5	2.642	3.8	5	0.263
3.0	5	2.022			

邻苯二甲酸氢钾分子量 = 204.23, 0.2 mol/L 邻苯二甲酸氢溶液含 40.85 克/升

### 3. 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液

pH	0.2mol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (毫升)	0.1mol/L 柠檬酸 (毫升)	pH	0.2mol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (毫升)	0.1mol/L 柠檬酸 (毫升)
2.2	0.40	10.60	5.2	10.72	9.28
2.4	1.24	18.76	5.4	11.15	8.85
2.6	2.18	17.82	5.6	11.60	8.40
2.8	3.17	16.83	5.8	12.09	7.91
3.0	4.11	15.89	6.0	12.63	7.37
3.2	4.94	15.06	6.2	13.22	6.78
3.4	5.70	14.30	6.4	13.85	6.15
3.6	6.44	13.56	6.6	14.55	5.45
3.8	7.10	12.90	6.8	15.45	4.55
4.0	7.71	12.29	7.0	16.47	3.53
4.2	8.28	11.72	7.2	17.39	2.61
4.4	8.82	11.18	7.4	18.17	1.83
4.6	9.35	10.65	7.6	18.73	1.27
4.8	9.86	10.14	7.8	19.15	0.85
5.0	10.30	9.70	8.0	19.45	0.55

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>分子量 = 149.8, 0.2 mol/L 溶液为 28.40 克/升。

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 分子量 = 178.05, 0.2 mol/L 溶液含 35.01 克/升。

C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O 分子量 = 210.14, 0.1 mol/L 溶液为 21.01 克/升。

### 4. 柠檬酸-氢氧化钠-盐酸缓冲液

pH	钠离子浓度 (mol/L)	柠檬酸(克) C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ·H <sub>2</sub> O	氢氧化钠(克) NaOH 97%	盐酸(毫升) HCl(浓)	最终体积(升) <sup>①</sup>
2.2	0.20	210	84	160	10
3.1	0.20	210	83	116	10
3.3	0.20	210	83	106	10
4.3	0.20	210	83	45	10
5.3	0.35	245	144	68	10
5.8	0.45	285	186	105	10
6.5	0.38	266	156	126	10

① 使用时可以每升中加入 1 克克酚,若最后 pH 值有变化,再用少量 50% 氢氧化钠溶液或浓盐酸调节,冰箱保存。

### 5. 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(0.1 mol/L)

pH	0.1 mol/L 柠檬酸 (毫升)	0.1 mol/L 柠檬酸钠 (毫升)	pH	0.1 mol/L 柠檬酸 (毫升)	0.1 mol/L 柠檬酸钠 (毫升)
3.0	18.6	1.4	5.0	8.2	11.8

3.2	17.2	2.8	5.2	7.3	12.7
3.4	16.0	4.0	5.4	6.4	13.6
3.6	14.9	5.1	5.6	5.5	14.5
3.8	14.0	6.0	5.8	4.7	15.3
4.0	13.1	6.9	6.0	3.8	16.2
4.2	12.3	7.7	6.2	2.8	17.2
4.4	11.4	8.6	6.4	2.0	18.0
4.6	10.3	9.7	6.6	1.4	18.6
4.8	9.2	10.8			

柠檬酸  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$  : 分子量 210.14 , 0.1 mol/L 溶液为 21.01 克/升。

柠檬酸钠  $Na_3 C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$  : 分子量 294.12 , 0.1 mol/L 溶液为 29.41 克/毫升。

### 6 . 乙酸-乙酸钠缓冲液 ( 0.2 mol/L )

pH(18°C)	0.2 mol/L NaAc (毫升)	0.3 mol/L HAc (毫升)	pH(18°C)	0.2 mol/L NaAc (毫升)	0.3 mol/L HAc (毫升)
2.6	0.75	9.25	4.8	5.90	4.10
3.8	1.20	8.80	5.0	7.00	3.00
4.0	1.80	8.20	5.2	7.90	2.10
4.2	2.65	7.35	5.4	8.60	1.40
4.4	3.70	6.30	5.6	9.10	0.90
4.6	4.90	5.10	5.8	9.40	0.60

$Na_2Ac \cdot 3H_2O$  分子量 = 136.09 , 0.2 mol/L 溶液为 27.22 克/升。

### 7 . 磷酸盐缓冲液

#### ( 1 ) 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 ( 0.2 )

pH	0.2 mol/L $Na_2HPO_4$ (毫升)	0.3 mol/L $NaH_2PO_4$ (毫升)	pH	0.2 mol/L $Na_2HPO_4$ (毫升)	0.3 mol/L $NaH_2PO_4$ (毫升)
5.8	8.0	92.0	7.0	61.0	39.0
5.9	10.0	90.0	7.1	67.0	33.0
6.0	12.3	87.7	7.2	72.0	28.0
6.1	15.0	85.0	7.3	77.0	23.0
6.2	18.5	81.5	7.4	81.0	19.0
6.3	22.5	77.5	7.5	84.0	16.0
6.4	26.5	73.5	7.6	87.0	13.0
6.5	31.5	68.5	7.7	89.5	10.5
6.6	37.5	62.5	7.8	91.5	8.5
6.7	43.5	56.5	7.9	93.0	7.0
6.8	49.5	51.0	8.0	94.7	5.3
6.9	55.0	45.0			

$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  分子量 = 178.05 , 0.2 mol/L 溶液为 85.61 克/升。

$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  分子量 = 358.22 , 0.2 mol/L 溶液为 71.64 克/升。

$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  分子量 = 156.03 , 0.2 mol/L 溶液为 31.21 克/升。

#### ( 2 ) 磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液 ( 1/15 mol/L )

pH	mol/L/15Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (毫升)	mol/L//15KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (毫升)	pH	mol/L//15Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (毫升)	mol/L//15KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (毫升)
4.92	0.10	9.90	7.17	7.00	3.00
5.29	0.50	9.50	7.38	8.00	2.00
5.91	1.00	9.00	7.73	9.00	1.00
6.24	2.00	8.00	8.04	9.50	0.50
6.47	3.00	7.00	8.34	9.75	0.25
6.64	4.00	6.00	8.67	9.90	0.10
6.81	5.00	5.00	8.18	10.00	0
6.98	6.00	4.00			

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 分子量 = 178.05 , 1/15M 溶液为 11.876 克/升。

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>分子量 = 136.09 , 1/15M 溶液为 9.078 克/升。

### 8 . 磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液 ( 0.05M )

X 毫升 0.2M K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + Y 毫升 0.2N NaOH 加水稀释至 29 毫升

pH(20°C)	X (毫升)	Y ( 毫升 )	pH(20°C)	X (毫升)	Y ( 毫升 )
5.8	5	0.372	7.0	5	2.963
6.0	5	0.570	7.2	5	3.500
6.2	5	0.860	7.4	5	3.950
6.4	5	1.260	7.6	5	4.280
6.6	5	1.780	7.8	5	4.520
6.8	5	2.365	8.0	5	4.680

### 9 . 巴比妥钠-盐酸缓冲液 ( 18°C )

pH	0.04M 巴比妥钠溶 液	0.2V 盐酸	pH	0.04M 巴比妥钠 溶液(毫升)	0.2N 盐酸(毫升)
6.8	100	18.4	8.4	100	5.21
7.0	100	17.8	8.6	100	3.82
7.2	100	16.7	8.8	100	2.52
7.4	100	15.3	9.0	100	1.65
7.6	100	13.4	9.2	100	1.13
7.8	100	11.47	9.4	100	0.70
8.0	100	9.39	9.6	100	0.35
8.2	100	7.21		100	

巴比妥钠盐分子量=206.18;0.04M 溶液为 8.25 克/升

### 10 . Tris-盐酸缓冲液 ( 0.05M , 25°C )

50 毫升 0.1M 三羟甲基氨基甲烷 ( Tris ) 溶液与 X 毫升 0.1N 盐酸混匀后, 加水稀释至 100 毫升。

pH	X(毫升)	pH	X(毫升)
7.10	45.7	8.10	26.2
7.20	44.7	8.20	22.9
7.30	43.4	8.30	19.9
7.40	42.0	8.40	17.2

7.50	40.3	8.50	14.7
7.60	38.5	8.60	12.4
7.70	36.6	8.70	10.3
7.80	34.5	8.80	8.5
7.90	32.0	8.90	7.0
8.00	29.2		

三羟甲基氨基甲烷 ( Tris ) 分子量=121.14;

0.1 M 溶液为 12.114 克/升。Tris 溶液可从空气中吸收二氧化碳, 使用时注意将瓶盖严。

### 11. 硼酸-硼砂缓冲液 ( 0.2M 硼酸根 )

pH	0.05M 硼砂 ( 毫升 )	0.2M 硼砂 ( 毫升 )	pH	0.05M 硼砂 ( 毫升 )	0.2M 硼砂 ( 毫升 )
7.4	1.0	9.0	8.2	3.5	6.5
7.6	1.5	8.5	8.4	4.5	5.5
7.8	2.0	8.0	8.7	6.0	4.0
8.0	3.0	7.0	9.0	8.0	2.0

硼砂  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 分子量=381.43; 0.05M 溶液 ( =0.2M 硼酸根 ) 含 19.07 克/升。

硼酸  $\text{H}_2\text{BO}_3$ , 分子量=61.84, 0.2M 溶液为 12.37 克/升。

硼砂易失去结晶水, 必须在带塞的瓶中保存。

### 12. 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 ( 0.05M )

X 毫升 0.2M 甘氨酸+Y 毫升 0.2N NaOH 加水稀释至 200 毫升

pH	X	Y	pH	X	Y
8.6	50	4.0	9.6	50	22.4
8.8	50	6.0	9.8	50	27.2
9.0	50	8.8	10.0	50	32.0
9.2	50	12.0	10.4	50	38.6
9.4	50	16.8	10.6	50	45.5

甘氨酸分子量=75.07; 0.2M 溶液含 15.01 克/升。

### 13. 硼砂-氢氧化钠缓冲液 ( 0.05M 硼酸根 )

X 毫升 0.05M 硼砂+Y 毫升 0.2N NaOH 加水稀释至 200 毫升

pH	X	Y	pH	X	Y
9.3	50	6.0	9.8	50	34.0
9.4	50	11.0	10.0	50	43.0
9.6	50	23.0	10.1	50	46.0

硼砂  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 分子量=381.43; 0.05M 溶液为 19.07 克/升。

### 14. 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 ( 0.1M )

$\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  存在时不得使用

pH		0.1M $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (毫升)	0.1M $\text{NaHCO}_3$ (毫升)
20°C	37°C		
9.16	8.77	1	9

9.40	9.12	2	8
9.51	9.40	3	7
9.78	9.50	4	6
9.90	9.72	5	5
10.14	9.90	6	4
10.28	10.08	7	3
10.53	10.28	8	2
10.83	10.57	9	1

$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  分子量=286.2;0.1M 溶液为 28.62 克/升。

$\text{Na}_2\text{HCO}_3$  分子量=84.0;0.1M 溶液为 8.40 克/升。

### 15 . “PBS” 缓冲液

PH	7.6	7.4	7.2	7.0
H <sub>2</sub> O	1000	1000	1000	100ml
NaCl	8.5	8.5	8.5	8.5g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.2	2.2	2.2	2.2g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1	0.2	0.3	0.4g

### 15 . HEPES buffer 缓冲溶液的配制方法

关于 HEPES 缓冲溶液的配制，不同的文献资料有不同的说法。根据用途，一种是单纯的 HEPES + NaOH，另一种是 HEPES + 盐。各种配制方法总结如下：

#### 一、500ml 1 M HEPES , pH = 7.0 Stock solution 的配制

119.15 g HEPES 溶解在 400ml 蒸馏水中，加 0.5~1M 的 NaOH 水溶液调节至少所需 pH ( HEPES 的有效 pH 范围是 6.8~8.2 )，然后用蒸馏水定容至 500ml，于 4 摄氏度保存。

#### 二、加少量盐的 HEPES Buffer 配方 ( 500ml )

HEPES 6.5g、NaCl 8.0g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.198g、用 0.5M NaOH 水溶液调节 pH 值，最后定容。

#### 三、2×HEPES 缓冲盐溶液的配制

将 1.6g NaCl、0.074g KCl、0.027g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、0.2 g 葡聚糖(glucan or dextran)和 1 g HEPES 溶解在 90 ml 的蒸馏水，用 0.5M NaOH 调节至所需 pH 值，再用蒸馏水定容至 100 ml 即可。

### 15.19.常用抗生素

#### 氨苄青霉素 ( ampicillin ) ( 100 mg/ml )

溶解 1g 氨苄青霉素钠盐于足量的水中，最后定容至 10 ml。分装成小份于 -20℃ 贮存。常以 25 ug/ml ~ 50 ug/ml 的终浓度添加于生长培养基。

#### 羧苄青霉素 ( carbenicillin ) ( 50 mg/ml )

溶解 0.5g 羧苄青霉素二钠盐于足量的水中，最后定容至 10 ml。分装成小份于 -20℃ 贮存。常以 25 ug/ml ~ 50 ug/ml 的终浓度添加于生长培养基。

#### 甲氧西林 ( methicillin ) ( 100 mg/ml )

溶解 1g 甲氧西林钠于足量的水中，最后定容至 10ml。分装成小份于 -20℃ 贮存。常以 37.5ug/ml 终浓度与 100ug/ml 氨苄青霉素一起添加于生长培养基。

#### 卡那霉素 ( kanamycin ) ( 10 mg/ml )

溶解 100mg 卡那霉素于足量的水中,最后定容至 10ml。分装成小份于-20℃贮存。常以 10ug/ml ~ 50ug/ml 的终浓度添加于生长培养基。

#### 氯霉素 (chloramphenicol) (25 mg/ml)

溶解 250mg 氯霉素足量的无水乙醇中,最后定容至 10ml。分装成小份于-20℃贮存。常以 12.5ug/ml ~ 25ug/ml 的终浓度添加于生长培养基。

#### 链霉素 (streptomycin) (50 mg/ml)

溶解 0.5g 链霉素硫酸盐于足量的无水乙醇中,最后定容至 10ml。分装成小份于-20℃贮存。常以 10ug/ml ~ 50ug/ml 的终浓度添加于生长培养基。

#### 萘啶酮酸 (nalidixic acid) (5 mg/ml)

溶解 50mg 萘啶酮酸钠盐于足量的水中,最后定容至 10ml。分装成小份于-20℃贮存。常以 15ug/ml 的终浓度添加于生长培养基。

#### 四环素 (tetracycline) (10 mg/ml)

溶解 100 mg 四环素盐酸盐于足量的水中,或者将无碱的四环素溶于无水乙醇,定容至 10 ml。分装成小份用铝箔包裹液管以免溶液见光,于-20℃贮存。常以 10 ug/ml ~ 50 ug/ml 的终浓度添加于生长培养基。

#### 放线菌素 D 溶液

##### 【配制方法】

把 20mg 放线菌素 D 溶解于 4ml 100%乙醇中,1 : 10 稀释贮存液,用 100%乙醇作空白对照读取 OD<sub>440</sub> 值。放线菌素 D (分子量为 1255) 纯品在水溶液中的摩尔消光系数为 21, 900, 故而 1mg/ml 的放线菌素 D 溶液在 440nm 处的吸光值为 0.182, 放线菌素 D 的贮存液应放在包有箔片的试管中,保存于 -20℃。

##### 【注意】

放线菌素 D 是致畸剂和致癌剂,配制该溶液时必须戴手套并在通风橱内操作,而不能在开放在实验桌面上进行,谨防吸入药粉或让其接触到眼睛或皮肤。

药厂提供的作治疗用途的放线菌素 D 制品常含有糖或盐等添加剂。只要通过测量贮存液在 440nm 波长处的光吸收确定放线菌素 D 的浓度,这类制品便可用于抑制自身引导作用。

抗生素	贮存液 <sup>a</sup>		工作浓度	
	浓度	保存条件	严紧型质粒	松弛型质粒
氨苄青霉素	50mg/ml(溶于水)	-20℃	20μg/ml	60μg/ml
羧苄青霉素	50mg/ml(溶于水)	-20℃	20μg/ml	60μg/ml
氯霉素	34mg/ml(溶于乙醇)	-20℃	25μg/ml	170μg/ml
卡那霉素	10mg/ml(溶于水)	-20℃	10μg/ml	50μg/ml
链霉素	10mg/ml(溶于水)	-20℃	10μg/ml	50μg/ml
四环素 <sup>b</sup>	5mg/ml(溶于乙醇)	-20℃	10μg/ml	50μg/ml
G418	40mg/ml	-20℃		400μg/ml

a 以水为溶剂的抗生素贮存液通过 0.22μm 滤器过滤除菌。以乙醇为溶剂的抗生素溶液无须除菌处理。所有抗生素溶液均应放于不透光的容器保存。

b : 镁离子是四环素的拮抗剂, 四环素抗性菌的筛选应使用不含镁盐的培养基 (如 LB 培养基)。

**氨苄、卡那、四环素平板, 4°C可以放很久, 四环素要避光贮存。**

## 15.20. 细胞化学和细胞组分分离溶液

### (一)M 一缓冲液

咪唑(Imidazole)	3.404g
KCl	3.7g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	101.65mg
ECTA	380.35mg
EDTA	29.224mg
巯基乙醇	0.07ml
甘油	297ml
蒸馏水	加至 1000ml

用 IN HCl 调 pH 至 7.2 室温保存。

### (二)2%Triton X — 100 溶液

量取 2mlTriton X — 100(聚乙二醇辛基苯基醚)液, 加 M 缓冲液 98ml 即可。

### (三)0.2%考马斯亮兰 R-250 染液

甲醇	46.5ml
醋酸	7.0ml
考马斯亮兰	0.2g
蒸馏水	加至 100ml

### (四)A . 0.1%碱性固绿染液(pH8.0 ~ 8.5)

1 . 0.1%固绿水溶液

固绿(Fast green)	0.1g
蒸馏水	100ml

2 . 0.05%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	50mg
蒸馏水	100ml

用时按 1:1 体积混合即可。

B . 0.1%酸性固绿染液(pH2.2)

1 . 0.1%固绿水溶液。

2 . mol / L×75 盐酸液

盐酸(比重 1.19)0.109ml 加蒸馏水至 100ml

用时按 1:1 混合。

### (五)甲基绿—吡咯宁染液

#### 1. 1mol / L 醋酸缓冲液(pH4.8) :

(1)醋酸	17ml
蒸馏水	加至 200ml
(2)醋酸水	13.5g
蒸馏水	加至 100ml

用时分别取两液 40ml、60ml 混匀即可。

#### 2 . 甲基绿—吡咯宁(methyl green—Pyrnln)

5%吡咯宁水溶液	6ml
2%甲基绿水溶液	6ml

蒸馏水 16ml  
1mol/L 醋酸缓冲液 16ml

1mol/L 醋酸缓冲液临用时才可加入染液中。

#### (六)Schiff 试剂

将碱性品红 0.5 克加入 100ml 沸水，持续煮沸 5 分钟，并随时搅拌，待冷却到 50°C 时过滤到棕色瓶中，加 1N HCl 10 毫升，冷却至 25°C 时加入 1 克 NaHSO<sub>3</sub>，此时需很好的振荡，避光过夜。次日取出(呈淡黄色)加 0.25 克活性炭剧烈振荡 1 分钟。过滤后即得 Schiff 试剂。避光低温保存。

#### (七)联苯胺混合液

联苯胺(4,4 Diamino benzidine) 0.2g  
95%乙醇 100ml  
3%过氧化氢 2 滴

此液临用时配制。

#### (八)1%番红水溶液

番红(Safranin) 1.0g  
蒸馏水 100ml

#### (九)1%SDS(十二烷基硫酸钠 Sodium dodecyl sulfate , SDS)

SDS 10g  
45%乙醇 100ml

#### (十)1mol / LTris(三羟甲基氨基甲烷/盐酸缓冲液 Trihydroxy methylaminomethane Tris/HCL)pH7.8

Tris 12.114g  
蒸馏水 100ml

先将 Tris 溶于少量蒸馏水，用 HCl 调 pH 至 7.8，然后加水至 100ml

#### (十一)Ringer Solution

氯化钠(冷血动物用 0.65 克) 0.9 克  
氯化钾 0.042 克  
氯化钙 0.025 克  
蒸馏水 100ml

#### (十二)淀粉肉汤培养基

蛋白 2g  
淀粉 6g  
牛肉汤 100ml

用 10%NaHCO<sub>3</sub> 调 pH 至 7.0~7.2

#### (十三)0.25mol / L 蔗糖—0.003mol / L 氯化钙溶液

蔗糖 85.5g  
氯化钙 0.33g  
蒸馏水 1000ml

#### (十四)1%詹纳斯绿 B 染液

取詹纳斯绿(Janus green B)1.0g Ringer 氏液 100ml

#### (十五)1%刚果红染液

刚果红 1g  
蒸馏水 100ml

#### (十六)Gomori 硝酸铅作用液

0.05mol / L 醋酸缓冲液(pH5) 100ml

0.6 醋酸加蒸馏水 200ml、取其 42ml  
 醋酸钠 1.36g 加蒸馏水 200ml，取其 158ml 共 200ml  
 B-甘油磷酸钠 2g  
 醋酸铅 2g  
 5%氯化镁 5ml

以上作用液在临用时配制，最终在 pH5 ~ 5.2，过滤使用。

(王世藩 汇编)

### 15.21. 细胞培养和细胞融合溶液

#### (一)0.01mol / L PBS(磷酸盐缓冲液 Phosphate Buffer Saline , PBS)pH7.2.

0.2mol / L 磷酸氢二钠液(甲液) :

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 35.814g

双蒸水 加至 500ml

0.2mol / L 磷酸二氢钠液(乙液):

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 15.601g

双蒸水 加至 500ml

取甲液 36ml，乙液 14ml 和 NaCl8.2 克，加双蒸水至 1000ml。混匀待完全溶解分装，经高压灭菌后保存于 4°C 冰箱备用。

#### (二)50%PEG(聚乙二醇 Polyethyleneglycol mw1500)

称取 0.5 克 PEG，用前放入试管中在酒精灯火焰上融化，加入等量 37°C 预热的 MEM 培养液，混匀，保温在 37°C 水浴中待用。

#### (三)MEM 培养液(含 10%小牛血清)

MEM 培养液(日本制药株式会社) 9.4g

双蒸水 1000ml

NaHCO<sub>3</sub> 1.5g

谷氨酰胺(L-glutamin) 0.292g

56°C 灭活 30 分钟的小牛血清 110ml

MEM 粉末加水溶解后，用 NaHCO<sub>3</sub> 调 pH 到 7.1(因在抽滤过程中 pH 升高 0.2 ~ 0.3)，然后加灭活的小牛血清和谷氨酰胺，待完全溶解后，立即用 G<sub>6</sub> 抽滤除菌，分装，置 4°C 冰箱保存备用。

#### (四)0.25%胰蛋白酶— 0.02%EDTA 混合消化液

胰蛋白酶(Trypsin)粉 0.25g

EDTA 粉 20.0mg

0.01mol / L PBS 100ml

先用少量 PBS 溶解胰蛋白酶，然后将 EDTA 粉末和剩下的液体加入混合，置 37°C 水浴中 1 小时左右(待彻底溶解，液体呈透明为止)，用 G<sub>5</sub> 抽滤，分装置 4°C 冰箱中保存。

#### (五)Hanks 液

1. 原液甲

NaCl 160g

KCl 8g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2g

MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 2g

溶于 800ml 馏水中。

CaCl<sub>2</sub>(无水) 2.8g

溶于 100ml 蒸馏水中。

将两种液体混合后，加水至 1000ml 用滤纸滤过，再加 2ml 氯仿防腐，置 4°C 冰箱备用。

原液乙

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 3.04g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2g

葡萄糖 20.0g

溶于 800ml 蒸馏水中，用滤纸过滤，然后加 0.5% 酚红 80ml，再加水至 1000ml，最后加入 2ml 氯仿防腐，置 4°C 冰箱备用。

## 2. 使用液

甲乙两液各 1 份，双蒸水 18 份，混匀分装包扎好瓶口，经 10 磅 15 分钟高压灭菌后置 4°C 冰箱中保存。使用时用 5.6% NaHCO<sub>3</sub> 调 pH 值到所要求。

### (六)1640 培养液(含 10% 小牛血清)

RPMI-1640 粉 10.39g

双蒸水 加至 1000ml

通入适量的 CO<sub>2</sub> 气体，边通入 CO<sub>2</sub> 边慢慢搅拌，使其(呈透明)完全溶解。用 NaHCO<sub>3</sub> 1.5 克调 pH 值到 7.2。

双抗 1 万 u/ml 10ml

灭活小牛血清 110ml

混匀上述液体，立即用 G<sub>6</sub> 抽滤除菌分装，置 4°C 冰箱备用。

### (七)青、链霉素溶液

青霉素钠盐(40 万 u / 瓶) 5 瓶

链霉素(100 万 u / 瓶) 2 瓶

将两者溶于 200ml 0.9% 的无菌生理盐水，分装小瓶，-30°C 保存。双抗在培养基中的终浓度为各 100u 为宜。

### (八)二甲基亚砷诱导 HL-60 细胞分化使用的终浓度为 1.4%。

### (九)BrdU 溶液(200ug/ml)

用无菌青霉素瓶，在室温下称取 1.0mg，在无菌条件下加入灭菌生理盐水 9.0ml，溶解，混匀，用黑纸包严，避光置冰箱冰格中保存。最好用时现配。

### (十)2×SSC 溶液

用分析天平称取氯化钠 17.53 克，柠檬酸钠 8.82 克溶于蒸馏水中，加蒸馏水至 1000 毫升。

### (十一) 3% 琼脂：

取琼脂粉 3 克，加入双蒸水到 100 毫升，搅匀，高压消毒后(15 磅 20 分钟)，冷藏备用，使用前重新加热煮沸(贮存时间不宜过长)。

## 15.22. 制备电镜标本的溶液

### (一)2.5% 戊二醛溶液

25% 戊二醛 10ml

0.1mol / L 二甲砷酸钠缓冲液

装入茶色瓶中，保存于 4°C 冰箱备用。

### (二)0.1mol / L 二甲砷酸钠缓冲液

二甲砷酸钠 10.70g

蒸馏水 500ml

将二甲砷酸钠置于 500ml 容量瓶中，先加水约 400ml，震荡使其溶解，用 HCl 调 pH 到 7.4，加入剩余蒸馏水，4°C 冰箱保存。

### (三)包埋剂

环氧树脂 Epon812 56.30g

DDSA(十二烷基琥珀酸酐 Dodecenyl succinic

anhydride, DDSA) 14.60g

MNA(甲基内次甲基邻苯二甲酸酐 Methyl Nadic)

anhydride, MNA 29.00g

混合上述三种包埋剂成分, 搅拌 30 分钟使其充分混匀。再加加速剂 2, 4, 6-三(二甲氨基甲基)苯酚(2, 4, 6-tridimethyl aminomethylphenol, DMP-30)1.5ml, 继续搅拌 30 分钟, 置于干燥罐中(室温)备用。

#### (四)2%单宁酸

单宁酸 2g

双蒸水 100ml

溶解后过滤装茶色瓶中, 4°C冰箱保存。

#### (五)高锰酸钾固定剂

柠檬酸三钠 60mmol/L

氯化钾 25mmol/L

氯化镁 35mmol/L

高锰酸钾 125mmol/L

pH 为 7.4-7.8, 装茶色瓶中, 4°C冰箱中保存, 有效期 2 个月左右。

#### (六)1%OsO<sub>4</sub>溶液

OsO<sub>4</sub> 0.5g

0.1mol/L 二甲砷酸钠缓冲液。 50ml

OsO<sub>4</sub>一般为 0.5 或 1 克安瓶中封闭包装, 配制时剥去商标, 用自来水洗净, 放洗涤液中泡 4~12 小时后用水冲洗, 在安瓶上划痕, 用蒸馏水洗净, 投入茶色瓶中, 加缓冲液, 用玻璃棒在瓶中捣碎, 轻轻摇动放冰箱中, 48 小时后完全溶解。此药蒸气对人眼、角膜、鼻腔和口腔粘膜有固定作用, 用时特别小心, 在通风橱内操作。

### 15.23. 显影、定影溶液

#### (一)D-72 显影液

温水(52°C) 750ml

米吐尔 3g

无水亚硫酸钠 45g

对苯二酚 12g

无水碳酸钠 67.5g

溴化钾 19g

水 加至 1000ml

D-72 显影液为通用显影液, 既能显影胶片又能用于相纸显影。

使用原液, 20°C显影时间 1~2 分钟可得高反差。

加水 1:2 稀释后使用可得较低反差。1:1 稀释使用。20°C时显影时间 3~4 分钟可得正常反差。

#### (二)SB-1 停显液配方

水 1000ml

28%醋酸 48ml

停显时间 10 秒左右。

#### (三)F-5 酸性坚膜定影液

水 750ml

硫代硫酸钠 240g

无水亚硫酸钠 15g

28%醋酸 48ml

硼酸 7.5g

钾矾 15g

水 1000ml

定影时，药液温度应保持在 18~20℃定影时间 10~15 分钟。

#### 配药原则

配制时先取容量 3/4 的清水，水温 50℃左右，按配方的顺序，把称好的药逐一加入，只有前一药品溶解后，方可放入第二种药品，并继续溶解下去，最后将清水加至全量。

配完后要经 12 小时，待各种药品充分作用后才能使用。

上述各种溶液配制好后，匀应贴瓶签，注明名称，浓度及配制日期，并按规定方法保存，用前检查有无变质或污染现象后，方可使用

---

### 15.24. 微生物学实验常用染色液的配制

#### 1、 吕氏 (Loeffler) 碱性美蓝染液

A 液：

美蓝 ( methylene blue ) 0.06g

95%乙醇 30mL

B 液：

KOH 0.01g

蒸馏水 100mL

分别配制 A 液和 B 液，配好后混合即可。

#### 2、 齐氏 ( Ziehl ) 石炭酸复红染色液

A 液：

碱性复红 ( basic fuchsin ) 0.3 g

95%乙醇 10mL

B 液：

石炭酸 5.0 g

蒸馏水 95 mL

配制方法：将碱性复红在研钵中研磨后，逐渐加入 95%乙醇，继续研磨使其溶解，配成 A 液。

将石炭酸溶于水中，配成 B 液。

混合 A 液及 B 液即成。通常可将此混合液稀释 5~10 倍使用，稀释液易变质失效，一次不宜多配。

#### 3、 革兰氏 ( Gram ) 染色液

##### ( 1 ). 草酸铵结晶紫染液

A 液：

结晶紫 ( crystal violet ) 2g

95%乙醇 20mL

B 液：

草酸铵 ( ammonium oxlate ) 0.8g

蒸馏水 80mL

混合 A 液及 B 液，静置 48h 后使用。

##### ( 2 ). 卢戈氏 ( Lugol ) 碘液

碘片 1g

碘化钾 2g

蒸馏水 300mL

配制方法：先将碘化钾溶解在少量水中，再将碘片溶解在碘化钾溶液中，待碘全溶后，加足水分既成。

##### ( 3 ). 95%的乙醇溶液

##### ( 4 ). 番红复染液

番红 (safranin O) 2.5g

95%乙醇 100mL

取上述配好的番红乙醇溶液 10mL 与 80mL 蒸馏水混匀既成。

#### 4、芽孢染色液

##### (1). 孔雀绿染液

孔雀绿 (malachite green) 5g

蒸馏水 100mL

##### (2). 番红水溶液

番红 0.5g

蒸馏水 100mL

##### (3). 苯酚品红溶液

碱性品红 11g

无水乙醇 100mL

配制方法：取上述溶液 10mL 与 100mL 5% 的苯酚溶液混合，过滤备用。

##### (4). 黑色素 (nigrosin) 溶液

水溶性黑色素 10g

蒸馏水 100mL

配制方法 称取 10g 黑色素溶于 100mL 蒸馏水中 置沸水浴中 30min 后 滤纸过滤两次 补充水到 100mL，加 0.5g 甲醛，备用。

#### 5、荚膜染色液

##### (1). 黑色素水溶液

黑色素 5g

蒸馏水 100mL

福尔马林 (40% 甲醛) 0.5mL

配制方法：将黑色素在蒸馏水中煮沸 5min，然后加入福尔马林作防腐剂。

##### (2). 番红染液

与革兰氏染液中番红复染液相同。

#### 6、鞭毛染色液

##### (1). 硝酸银鞭毛染色液

**A 液：**

单宁酸 5g

FeCl<sub>3</sub> 1.5g

蒸馏水 100mL

福尔马林 (15%) 2mL

NaOH (1%) 1mL

冰箱内可以保存 3~7 天，延长保存期会产生沉淀，但用滤纸除去沉淀后，仍能使用。

**B 液：**

AgNO<sub>3</sub> 2g

蒸馏水 100mL

配制方法：待 AgNO<sub>3</sub> 溶解后，取出 10mL 备用，向其余的 90mL AgNO<sub>3</sub> 中滴入 NH<sub>4</sub>OH，使之成为很浓厚的悬浮液，再继续滴加 NH<sub>4</sub>OH，直到新形成的沉淀又重新刚刚溶解为止。再将备用的 10mL AgNO<sub>3</sub> 慢慢地滴入，则出现薄雾，但轻轻摇动后，薄雾状沉淀又消失，再滴入 AgNO<sub>3</sub>，直到摇动后仍呈现轻微而稳定的薄雾状沉淀为止。冰箱内保存通常 10 天内仍可使用。如雾重，则银盐沉淀出，不宜使用。

## (2). Leifson 氏鞭毛染色液

### A 液：

碱性复红 1.2g  
95%乙醇 100mL

### B 液：

单宁酸 3g  
蒸馏水 100mL

### C 液：

NaCl 1.5g  
蒸馏水 100mL

临用前将 A, B, C 液等量混合均匀后使用。三种溶液分别于室温保存可保存几周,若分别置冰箱保存,可保存数月。混合液装密封瓶内置冰箱几周仍可使用。

## (一)天然染料

### 1、苏木精

苏木精是从南美的苏木(热带豆科植物)干枝中用乙醚浸制出来的一种色素,是最常用的染料之一。苏木精不能直接染色,必须暴露在通气的地方,使他变成氧化苏木精(又叫苏木素)后才能使用,这叫做“成熟”。苏木精的“成熟”过程需时较长,配置后时间愈久,染色力愈强。被染材料必须经金属盐作媒剂作用后才有着色力。所以在配制苏木精染剂时都要用媒染剂。常用的媒染剂有硫酸铝按、钾明矾和铁明矾等。苏木精是淡黄色到锈紫色的结晶体,易溶于酒精,微溶于水和甘油,是染细胞核的优良材料,他能把细胞中不同的结构分化出各种不同的颜色。分化时组织所染的颜色因处理的情况而异,用酸性溶液(如盐酸—酒精)分化后呈红色,水洗后仍恢复青蓝色,用碱性溶液(如氨水)分化后呈蓝色,水洗后呈蓝黑色。

### 2、洋红

洋红又叫胭脂红或卡红。一种热带产的雌性胭脂虫干燥后,磨成粉末,提取出虫红,再用明矾处理,除去其中杂质,就制成洋红。单纯的洋红不能染色,要经酸性或碱性溶液溶解后才能染色。常用的酸性溶液有冰醋酸或苦味酸,碱性溶液有氨水、硼砂等。

洋红使细胞核的优良染料,染色的标本不易褪色。用作切片或组织块染都适宜,尤其适宜于小型材料的整体染色。用洋红配成的溶液染色后能保持几年。洋红溶液出现浑浊时要过滤后再用。

## (二)人工染料

人工染料,即苯胺染料或煤焦油染料,种类很多,应用极广。它的缺点是经日光照射容易褪色,苯胺蓝、亮绿、甲基绿等更易褪色。在制片中注意掌握酸碱度,并避免日光直射,也能经几年不褪色。

### 1、酸性品红

酸性品红是酸性染料,呈红色粉末状,能溶于水,略溶于酒精(0.3%)。他是良好的细胞制染色剂,在动物制片上应用很广,在植物制片上用来染皮层、髓部等薄壁细胞和纤维素壁。他跟甲基绿同染,能显示线粒体。

组织切片在染色前先浸在带酸性的水中,可增强它的染色力。酸性品红容易跟碱起作用,所以染色过度,易在自来水中褪色。

### 2、刚果红

刚果红是酸性染料,呈枣红色粉末状,能溶于水喝酒精,遇酸呈蓝色。他能作染料,也用作指示剂。他在植物制片中常作为苏木精或其他细胞染料的衬垫剂。他用来染细胞质时,能把胶制或纤维素染成红色。在动物组织制片中用来染神经轴、弹性纤维、胚胎材料等。刚果红可以跟苏木静作二重染色,也可用作类淀粉染色,由于他能溶于水和酒精,所以洗涤和脱水处理要迅速。

### 3、甲基蓝

甲基蓝是弱酸性染料，能溶于水和酒精。甲基蓝在动植物的制片技术方面应用极广。他跟伊红合用能染神经细胞，也是细菌制片中不可缺少的染料。它的水溶液是原生动物的活体染色剂。甲基蓝极易氧化，因此用他染色后不能长久保存。

#### 4、固绿

固绿是酸性染料，能溶于水（溶解度为 4%）和酒精（溶解度为 9%）。固绿是一种染含有浆质的纤维素细胞组织的染色剂，在染细胞和植物组织上应用极广。他和苏木精、番红并列为植物组织学上三中最常用的染料。

#### 5、苏丹Ⅲ

苏丹Ⅲ是弱酸性染料，呈红色粉末状，易溶于脂肪和酒精（溶解度为 0.15%）。苏丹Ⅲ是脂肪染色剂。

#### 6、伊红

这类染料种类很多。常用的伊红 Y，是酸性染料，呈红色带蓝的小结晶或棕色粉末状，溶于水（15 摄氏度是溶解度达 44%）和酒精（溶于无水酒精的溶解度为 2%）。伊红在动物制片中广泛应用，是很好的细胞质染料，常用作苏木精的衬染剂。

#### 7、碱性品（复）红

碱性品红是碱性染料，呈暗红色粉末或结晶状，能溶于水（溶解度 1%）和酒精（溶解度 8%）。碱性品红在生物学制片中用途很广，可用来染色胶原纤维、弹性纤维、嗜复红性颗粒和中枢神经组织的核质。在生物学制片中用来染维管束植物的木质化壁，又作为原球藻、轮藻的整体染色。在细菌学制片中，长用来鉴别结核杆菌。在 尔根氏反应中用作组织化学试剂，已核查脱氧核糖核酸。

#### 8、结晶紫

结晶紫是碱性染料，能溶于水（溶解度 9%）和酒精（溶解度 8.75%）。结晶紫在细胞学、组织学和细菌学等方面应用极广，是一种优良的染色剂。他是细胞核染色常用的，用来显示染色体的中心体，并可染淀粉、纤维蛋白、神经胶质等。凡是用番红和苏木精或其他染料染细胞核不能成功时，用它能得到良好的结果。用番红和结晶紫作染色体的二重染色，染色体染成红色，纺锤丝染成紫色，所以也是一种显示细胞分裂的优良染色剂。用结晶紫染纤毛，效果也很好。用结晶紫染色的切片，缺点是不易长久保存。

#### 9、龙胆紫

龙胆紫是混合的碱性染料，主要是结晶紫和甲基紫的混合物。在必要是，龙胆紫能跟结晶紫互相替用。医药上用的紫药水，主要成分是甲基紫，需要时能代替龙胆紫和结晶紫。

#### 10、中性红

中性红是弱碱性染料，呈红色粉末状，能溶于水（溶解度 4%）和酒精（溶解度 1.8%）。它的碱性溶液中呈现黄色，在强碱性溶液中呈蓝色，而在弱酸性溶液中呈红色，所以能用作指示剂。中性红无毒，常做活体染色的染料，用来染原生动物和显示动植物组织中活细胞的内含物等。陈久的中性红水溶液，用作显示尼尔体的常用染料。

#### 11、番红

番红是碱性染料，能溶于水和酒精。番红是细胞学和动植物组织学常用的染料，能染细胞核、染色体和植物蛋白质，示维管束植物木质化、木栓化和角质化的组织，还能染孢子囊。

#### 12、亚甲蓝或美蓝

亚甲蓝或美蓝是碱性染料，呈蓝色粉末状，能溶于水（溶解度 9.5%）和酒精（溶解度 6%）。亚甲蓝是动物学和细胞学染色上十分重要的细胞核染料，其优点是染色不会过深。

#### 13、甲基绿

甲基绿是碱性染料。它是绿色粉末状，能溶于水（溶解度 8%）和酒精（溶解度 3%）。甲基绿是最有价值的细胞和染色剂，细胞学上常用来染染色质，跟酸性品红一起可作植物木质部的染色。

### 15.25. 实验用水

实验室常见的水的种类：

### 1、蒸馏水 ( Distilled Water ):

实验室最常用的一种纯水，虽设备便宜，但极其耗能和费水且速度慢，应用会逐渐减少。蒸馏水能去除自来水内大部分的污染物，但挥发性的杂质无法去除，如二氧化碳、氨、二氧化硅以及一些有机物。新鲜的蒸馏水是无菌的，但储存后细菌易繁殖；此外，储存的容器也很讲究，若是非惰性的物质，离子和容器的塑形物质会析出造成二次污染。

### 2、去离子水 ( Deionized Water ):

应用离子交换树脂去除水中的阴离子和阳离子，但水中仍然存在可溶性的有机物，可以污染离子交换柱从而降低其功效，去离子水存放后也容易引起细菌的繁殖。

### 3、反渗透水 ( Reverse osmosis Water ):

其生成的原理是水分子在压力的作用下，通过反渗透膜成为纯水，水中的杂质被反渗透膜截留排出。反渗透水克服了蒸馏水和去离子水的许多缺点，利用反渗透技术可以有效的去除水中的溶解盐、胶体，细菌、病毒、细菌内毒素和大部分有机物等杂质，但不同厂家生产的反渗透膜对反渗透水的质量影响很大。

### 4、超纯水 ( Ultra-pure grade water ):

其标准是水电阻率为  $18.2\text{M}\Omega\text{-cm}$ 。但超纯水在 TOC、细菌、内毒素等指标方面并不相同，要根据实验的要求来确定，如细胞培养则对细菌和内毒素有要求，而 HPLC 则要求 TOC 低。

评价水质的常用指标：

#### 1、电阻率 ( electrical resistivity ):

衡量实验室用水导电性能的指标，单位为  $\text{M}\Omega\text{-cm}$ ，随着水内无机离子的减少电阻加大则数值逐渐变大，实验室超纯水的标准:电阻率为  $18.2\text{M}\Omega\text{-cm}$ 。

#### 2、总有机碳 ( Total Organic Carbon , TOC ):

水中碳的浓度，反映水中氧化的有机化合物的含量，单位为 ppm 或 ppb。

#### 3、内毒素 ( Endotoxin ):

革兰氏阴性细菌的脂多糖细胞壁碎片，又称之为“热原”，单位 cfu/ml。

**问题：实验室中常见规格的水及使用注意点？**

### 1、自来水 ( Tap water )

Tap water is usually of uncontrolled quality , may have seasonal variations such as level of suspended sediment depending on the source (municipal reservoir , river , well) , may contain other chemicals purposely added to drinking water (chlorine , fluoride) , and is generally unsuitable for use in important experiments.Tap water is fine for washing glassware but should always be followed by a rinse with a higher-grade water (distilled , deionized , etc.).

### 2、蒸馏水 ( Distilled Water )

Distillation generally eliminates much of the inorganic contamination and particularly sediments present in tap water feedstock. It will also help reduce the level of some organic contaminants in the water. Double distilling simply gives a slightly higher grade distilled water , but cannot eliminate either inorganic or organic contaminants.

Distilled water is often produced in large stills that serve an entire department , or building. The quality of the water is dependent on how well the equipment is maintained. A significant stir occurred within a large university' s biochemistry department when the first mention of a problem with the house distilled water was a memo that came out from the maintenance department that stated: "We would like to inform you that the repairs have been made to the

still serving the department. There is no longer any radium in the water.” The next day , a follow-up memo was issued that stated: “Correction—there is no longer any sodium in the dis-tilled water.”

### 3、去离子水 ( Deionized Water )

Deionized water can vary greatly in quality depending on the type and efficiency of the deionizing cartridges used. Ion exchange beds used in home systems , for instance , are used primarily to reduce the “hardness” of the water usually due to high levels of divalent cations such as magnesium and calcium. The resin bed consists of a cation exchanger , usually in the sodium form , which releases sodium into the water in exchange for removing the divalent ions. (Remember that when you attempt to reduce your sodium intake!) These beds therefore do not reduce the ionic content of the water but rather exchange one type of ion for another.

Laboratory deionizing cartridges are usually mixed-bed cartridges designed to eliminate both anions and cations from the water. This is accomplished by preparing the anion-exchange bed in the hydroxide (OH-) form and the cation-exchange resin in the acid (H+) form. Anions or cations in the water (including monovalent) are exchanged for OH-or H+ , respectively , which combine to form neutral water. Any imbalance in the removal of the ions can result in a pH change of the water. Typically water from deion-izing beds is slightly acidic , often between pH 5.5 to 6.5.

The deionizing resins can themselves increase the organic con-taminant level in the water by leaching of resin contaminants , monomer , and so on , and should always be followed by a bed of activated carbon to eliminate the organics so introduced.

### 4、18MΩ 水 (Reverse Osmosis/MilliQ™)

The highest grade of water available is generally referred to as 18MW water. This is because when the inorganic ions are completely removed , the ability of the water to conduct electric current decreases dramatically , giving a resistance of 18 MW. Commercial systems that produce this grade of water usually apply a multiple-step cleanup process including reverse osmosis , mixed-bed ion exchangers , carbon beds , and filter disks for particulates. Some may include filters that exclude microorganisms , resulting in a sterile water stream. High-grade 18 MW water tends to be fairly acidic—near pH 5. Necessary pH adjustments of dilute buffer solutions prepared using 18 MW water could cause discrepancies in the final ionic concentration of the buffer salts relative to buffers prepared using other water sources.

### 5、When Is 18MΩ Water Not 18MΩWater?

Suppose that your research requires 18 MW water , and you purchased the system that produces 500ml/min instead of the 2L/min version. If your research doesn’ t require a constant flow of water , you can connect a 20L carboy to your system to store your pristine water. Bad Move.

18MW is not the most inert solvent; in practice , it is very aggressive. Water prefers the presence of some ions so as your 18 mW water enters the plastic carboy , it starts leaching anything it can out of the plastic , contaminating the quality of the water. The same thing happens if you try to store the water in glass. 18mW water loves to attack glass , leaching silicates and other ions from the con-tainer. If you need the highest purity water , it’ s best not to store large quantities , but rather prepare it fresh.

For the same reason , the tubing used to transfer your high-grade water should always be the most inert available , typically Teflon™ or similar materials. **Never use highly plasticized flexible plastic tubing. Absolutely avoid metals such as copper or stainless steel , as these almost always guarantee some level of contaminants in your water.**

#### 6、水的初始 pH 值是多少？

As mentioned above , **the initial pH of typical laboratory-grade distilled and deionized water is often between 5.5 and 6.5.** Check your water supply from time to time , particularly when deionizing beds are changed to ensure that no major change in pH has occurred because of seasonal variation or improperly conditioned resin beds.

Although the initial pH of laboratory water may be slightly acidic , the good news is deionized water should have little or no buffer capacity , so your normal pH adjustment procedures should not be affected much. **Pay particular attention if your buffer concentrations are very low (<10mM) resulting in low buffer capacity.**

#### 7、水中有哪些有机物质：

The answer to this important question depends on the upstream processing of the water and the initial water source. Municipal water drawn from lakes or streams can have a whole host of organics in them to start with , ranging from petroleum products to pesticides to humic substances from decaying plant material to chlorinated species like chloroform resulting from the chlorination process. Well water may have lower levels of these contaminants (since the water has been filtered through lots of soil and rock , but even groundwater may contain pesticides and chlorinated species like trichloroethylene depending on land use near the aquifer.

Municipal processing will remove many organic contaminants from the tap water , but your in-lab water purifier is responsible for polishing the water to a grade fit for experimental use. Most commercial systems do a good job of that , but as mentioned previously , care must be taken to not introduce contaminants after the water has been polished. Plasticizers from tubing or plastic storage tanks , monomer or resin components from deionizer beds , and surfactants or lubricants on filters or other system components are the most common type of organic to be found in a newly installed system.

**Another common , yet often overlooked source is microbial contamination.** In one case , a high-grade water purifier mounted on a wall near a window suddenly started showing evidence of organic background. Changing the carbon cartridge did not help the situation. Close inspection of the system showed the translucent plastic tubing connecting the reverse osmosis holding tank to the deionizer beds , and ultimately the lines that delivered the polished water to the spigot , had been contaminated by microbial growth. It was surmised that the intense sunlight during part of the day was providing a more hospitable environment for microorganisms to gain a foothold in the system. The clear tubing was replaced with opaque tubing and the problem disappeared.

In a second instance , a facility changed its water source from wells to a river draw-off. This drastically changed the stability of the incoming water quality. During periods of heavy rain , silt levels in the incoming water increased dramatically , quickly destroying expensive reverse osmosis cartridges in the water purifier system. The solution was to install two pre-filters of decreasing porosity in line ahead of the reverse osmosis unit. The first filter needed replacing

monthly, but the second filter was good for three to six months. The system functioned properly for a while, but then problems reappeared in the reverse osmosis unit. Inspection showed heavy microbial contamination in the second pre-filter which had a clear housing, admitting sunlight. After cleaning and sterilizing the filter unit, the outside of the housing was covered with black electrical tape, and the microbial contamination problem never returned.

As discussed in Chapter 12, dispensing hoses from water reservoirs resting in sinks can also lead to microbial contamination.

## 8. 在水的使用中还有哪些问题？

### Leaks

Leaks are sometimes one of the most serious problems that can occur with in-lab water purification systems. Leaks come in three kinds, typically. Leaks of the first kind start as slow drips, and can be spotted and corrected before developing into big unfriendly leaks.

Leaks of the second kind are generally caused by a catastrophic failure of a system component (tubing, valve, automatic shutoff switch, or backwash drain). Although highly uncommon, they usually occur around midnight on Fridays so as to maximize the amount of water that can escape from the system, therefore maximizing the resulting flooding in the lab. The likelihood of a leak of the second kind seems to increase exponentially with the cost of instrumentation in laboratories on floors directly below the lab with the water purifier system.

Leaks of the third kind result when a person places a relatively large vessel beneath the water system, begins filling, and walks away to tend to a few minor tasks or is otherwise distracted. The vessel overflows, flooding the lab with the extent of the flood depending on the duration of the distraction.

Leaks of the third kind are by far the most common type of leak, and are also the most preventable. Locating the water purification system immediately above a sink, so that any vessel being filled can be placed in the sink, usually prevents this type of catastrophe. If placement above a sink is not possible, locating the water purification system in a (relatively) high-traffic or well-used location in the lab can also minimize or eliminate the possibility of major spills, since someone is likely to notice a spill or leak.

Leaks of the first or second type are highly uncommon, but do occur. The best prevention is to have the system periodically

inspected and maintained by qualified personnel, and never have major servicing done on a Friday. Problems seem to be most likely after the system has been poked and prodded, so best to do that early in the week. Then the system can be closely watched for a few days afterward before leaving it unattended.

## 15.26. 各种核酸材料的贮存

### RNA

可以放在 1.5 ml 的 Eppendorf 管中加 1 ml 75%乙醇, -80°C 保存。大约可保存一年。一般未纯化的 RNA 直接在 -80°C 放置二周会有明显的降解

### cDNA, DNA

这两者的保存方法一样, 逆转录出来的 cDNA 可以直接放在 4°C 保存, 若长期不用, 可分装, 然后 -20 度保存。DNA 应该溶于 TE 中, 4 度保存, 若长期不用, 可分装, 然后 -20°C 保存。

cDNA, DNA 均不宜放置 4°C, cDNA 大概两天 PCR 效果会有明显降低, 毕竟 cDNA 要先取材料--提 RNA--反转录, 谁也不希望自己辛苦得到的 cDNA 一周后基本不能用了吧。两者均应用 TE 稀释后-20°C 保存。

### PCR 产物的保存

可以直接放在 4°C 保存, 若长期不用, 可分装, 然后-20°C 保存。同样就用 TE 稀释后-20°C 保存。

## 15.27. 分子生物学人员常用数据库

数据库是生物信息学的主要内容, 各种数据库几乎覆盖了生命科学的各个领域。核酸序列数据库有 GenBank, EMBL, DDB 等, 蛋白质序列数据库有 SWISS-PROT, PIR, OWL, NRL3D, TrEMBL 等, 蛋白质片段数据库有 PROSITE, BLOCKS, PRINTS 等, 三维结构数据库有 PDB, NDB, BioMagResBank, CCSD 等, 与蛋白质结构有关的数据库还有 SCOP, CATH, FSSP, 3D-ALI, DSSP 等, 与基因组有关的数据库还有 ESTdb, OMIM, GDB, GSDB 等, 文献数据库有 Medline, Uncover 等。另外一些公司还开发了商业数据库, 如 MDL 等。生物信息学数据库覆盖面广, 分布分散且格式不统一, 因此一些生物计算中心将多个数据库整合在一起提供综合服务, 如 EBI 的 SRS(Sequence Retrieval System)包含了核酸序列库、蛋白质序列库、三维结构库等 30 多个数据库及 CLUSTALW、PROSITESEARCH 等强有力的搜索工具, 用户可以进行多个数据库的多种查询。

下面循序简介一些著名和有特色的生物信息数据库。

### 基因和基因组数据库

#### 1. Genbank 库

包含了所有已知的核酸序列和蛋白质序列, 以及与它们相关的文献著作和生物学注释。它是由美国国立生物技术信息中心(NCBI)建立和维护的。它的数据直接来源于测序工作者提交的序列; 由测序中心提交的大量 EST 序列和其它测序数据; 以及与其它数据机构协作交换数据而来。Genbank 每天都会与欧洲分子生物学实验室(EMBL)的数据库, 和日本的 DNA 数据库(DDBJ)交换数据, 使这三个数据库的数据同步。Genbank 的数据可以从 NCBI 的 FTP 服务器上免费下载完整的库, 或下载积累的新数据。NCBI 还提供广泛的数据查询、序列相似性搜索以及其它分析服务, 用户可以从 NCBI 的主页上找到这些服务。

Genbank 库里的数据按来源于约 55, 000 个物种, 其中 56%是人类的基因组序列(所有序列中的 34%是人类的 EST 序列)。每条 Genbank 数据记录包含了对序列的简要描述, 它的科学命名, 物种分类名称, 参考文献, 序列特征表, 以及序列本身。序列特征表里包含对序列生物学特征注释如: 编码区、转录单元、重复区域、突变位点或修饰位点等。所有数据记录被划分在若干个文件里, 如细菌类、病毒类、灵长类、啮齿类, 以及 EST 数据、基因组测序数据、大规模基因组序列数据等 16 类, 其中 EST 数据等又被各自分成若干个文件。

NCBI 的网址是: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

Entrez 的网址是: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>。

BankIt 的网址是: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt>。

Sequin 的相关网址是: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/>。

#### 2. EMBL 核酸序列数据库

EMBL 核酸序列数据库由欧洲生物信息学研究所(EBI)维护的核酸序列数据构成, 由于与 Genbank 和 DDBJ 的数据合作交换, 它也是一个全面的核酸序列数据库。该数据库由 Oracal 数据库系统管理维护, 查询检索可以通过通过因特网上的序列提取系统(SRS)服务完成。向 EMBL 核酸序列数据库提交序列可以通过基于 Web 的 WEBIN 工具, 也可以用 Sequin 软件来完成。

数据库网址是: <http://www.ebi.ac.uk/embl/>。

SRS 的网址是: <http://srs.ebi.ac.uk/>。

WEBIN 的网址是: <http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/webin.html>。

#### 3. DDBJ 数据库

日本 DNA 数据仓库(DDBJ)也是一个全面的核酸序列数据库,与 Genbank 和 EMBL 核酸库合作交换数据。可以使用其主页上提供的 SRS 工具进行数据检索和序列分析。可以用 Sequin 软件向该数据库提交序列。

DDBJ 的网址是：<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>。

#### 4. GDB

基因组数据库(GDB)为人类基因组计划(HGP)保存和处理基因组图谱数据。GDB 的目标是构建关于人类基因组的百科全书,除了构建基因组图谱之外,还开发了描述序列水平的基因组内容的方法,包括序列变异和其它对功能和表型的描述。目前 GDB 中有:人类基因组区域(包括基因、克隆、amplimers PCR 标记、断点 breakpoints、细胞遗传标记 cytogenetic markers、易碎位点 fragile sites、EST 序列、综合区域 syndromic regions、contigs 和重复序列);人类基因组图谱(包括细胞遗传图谱、连接图谱、放射性杂交图谱、content contig 图谱和综合图谱等);人类基因组内的变异(包括突变和多态性,加上等位基因频率数据)。GDB 数据库以对象模型来保存数据,提供基于 Web 的数据对象检索服务,用户可以搜索各种类型的对象,并以图形方式观看基因组图谱。

GDB 的网址是：<http://www.gdb.org>。

GDB 的国内镜像是：<http://gdb.pku.edu.cn/gdb/>。

#### 蛋白质数据库

##### 1. PIR 和 PSD

PIR 国际蛋白质序列数据库(PSD)是由蛋白质信息资源(PIR)、慕尼黑蛋白质序列信息中心(MIPS)和日本国际蛋白质序列数据库(JIPID)共同维护的国际上最大的公共蛋白质序列数据库。这是一个全面的、经过注释的、非冗余的蛋白质序列数据库,其中包括来自几十个完整基因组的蛋白质序列。所有序列数据都经过整理,超过 99%的序列已按蛋白质家族分类,一半以上还按蛋白质超家族进行了分类。PSD 的注释中还包括对许多序列、结构、基因组和文献数据库的交叉索引,以及数据库内部条目之间的索引,这些内部索引帮助用户在包括复合物、酶-底物相互作用、活化和调控级联和具有共同特征的条目之间方便的检索。每季度都发行一次完整的数据库,每周可以得到更新部分。

PSD 数据库有几个辅助数据库,如基于超家族的非冗余库等。PIR 提供三类序列搜索服务:基于文本的交互式检索;标准的序列相似性搜索,包括 BLAST、FASTA 等;结合序列相似性、注释信息和蛋白质家族信息的高级搜索,包括按注释分类的相似性搜索、结构域搜索 GeneFIND 等。

PIR 和 PSD 的网址是：<http://pir.georgetown.edu/>。

数据库下载地址是：<ftp://nbrfa.georgetown.edu/pir/>。

##### 2. SWISS-PROT

SWISS-PROT 是经过注释的蛋白质序列数据库,由欧洲生物信息学研究所(EBI)维护。数据库由蛋白质序列条目构成,每个条目包含蛋白质序列、引用文献信息、分类学信息、注释等,注释中包括蛋白质的功能、转录后修饰、特殊位点和区域、二级结构、四级结构、与其它序列的相似性、序列残缺与疾病的关系、序列变异体和冲突等信息。SWISS-PROT 中尽可能减少了冗余序列,并与其它 30 多个数据建立了交叉引用,其中包括核酸序列库、蛋白质序列库和蛋白质结构库等。

利用序列提取系统(SRS)可以方便地检索 SWISS-PROT 和其它 EBI 的数据库。SWISS-PROT 只接受直接测序获得的蛋白质序列,序列提交可以在其 Web 页面上完成。

SWISS-PROT 的网址是：<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>。

##### 3. PROSITE

PROSITE 数据库收集了生物学有显著意义的蛋白质位点和序列模式,并能根据这些位点和模式快速和可靠地鉴别一个未知功能的蛋白质序列应该属于哪一个蛋白质家族。有的情况下,某个蛋白质与已知功能蛋白质的整体序列相似性很低,但由于功能的需要保留了与功能密切相关的序列模式,这样就可能通过 PROSITE 的搜索找到隐含的功能 motif,因此是序列分析的有效工具。PROSITE 中涉及的序列模式包括酶的催化位点、配体结合位点、与金属离子结合的残基、二硫键的半胱氨酸、与小分子或其它蛋白质结合的

区域等；除了序列模式之外，PROSITE 还包括由多序列比对构建的 profile，能更敏感地发现序列与 profile 的相似性。PROSITE 的主页上提供各种相关检索服务。

PROSITE 的网址是：<http://www.expasy.ch/prosite/>。

#### 4. PDB

蛋白质数据仓库(PDB)是国际上唯一的生物大分子结构数据档案库，由美国 Brookhaven 国家实验室建立。PDB 收集的数据来源于 X 光晶体衍射和核磁共振(NMR)的数据，经过整理和确认后存档而成。目前 PDB 数据库的维护由结构生物信息学研究合作组织(RCSB)负责。RCSB 的主服务器和世界各地的镜像服务器提供数据库的检索和下载服务，以及关于 PDB 数据文件格式和其它文档的说明，PDB 数据还可以从发行的光盘获得。使用 Rasmol 等软件可以在计算机上按 PDB 文件显示生物大分子的三维结构。

RCSB 的 PDB 数据库网址是：<http://www.rcsb.org/pdb/>。

#### 5. SCOP

蛋白质结构分类(SCOP)数据库详细描述了已知的蛋白质结构之间的关系。分类基于若干层次：家族，描述相近的进化关系；超家族，描述远源的进化关系；折叠子(fold)，描述空间几何结构的关系；折叠类，所有折叠子被归于全  $\alpha$ 、全  $\beta$ 、 $\alpha/\beta$ 、 $\alpha + \beta$  和多结构域等几个大类。SCOP 还提供一个非冗余的 ASTRAL 序列库，这个库通常被用来评估各种序列比对算法。此外，SCOP 还提供一个 PDB-ISL 中介序列库，通过与这个库中序列的两两比对，可以找到与未知结构序列远缘的已知结构序列。

SCOP 的网址是：<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>。

#### 6. COG

蛋白质直系同源簇(COGs)数据库是对细菌、藻类和真核生物的 21 个完整基因组的编码蛋白，根据系统进化关系分类构建而成。COG 库对于预测单个蛋白质的功能和整个新基因组中蛋白质的功能都很有用。利用 COGNITOR 程序，可以把某个蛋白质与所有 COGs 中的蛋白质进行比对，并把它归入适当的 COG 簇。COG 库提供了对 COG 分类数据的检索和查询，基于 Web 的 COGNITOR 服务，系统进化模式的查询服务等。

COG 库的网址是：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>。

下载 COG 库和 COGNITOR 程序在：<ftp://ncbi.nlm.nih.gov/pub/COG>。

### 功能数据库

#### 1. KEGG

京都基因和基因组百科全书(KEGG)是系统分析基因功能，联系基因组信息和功能信息的知识库。基因组信息存储在 GENES 数据库里，包括完整和部分测序的基因组序列；更高级的功能信息存储在 PATHWAY 数据库里，包括图解的细胞生化过程如代谢、膜转运、信号传递、细胞周期，还包括同系保守的子通路等信息；KEGG 的另一个数据库是 LIGAND，包含关于化学物质、酶分子、酶反应等信息。KEGG 提供了 Java 的图形工具来访问基因组图谱，比较基因组图谱和操作表达图谱，以及其它序列比较、图形比较和通路计算的工具，可以免费获取。

KEGG 的网址是：<http://www.genome.ad.jp/kegg/>。

#### 2. DIP

相互作用的蛋白质数据库(DIP)收集了由实验验证的蛋白质-蛋白质相互作用。数据库包括蛋白质的信息、相互作用的信息和检测相互作用的实验技术三个部分。用户可以根据蛋白质、生物物种、蛋白质超家族、关键词、实验技术或引用文献来查询 DIP 数据库。

DIP 的网址是：<http://dip.doe-mbi.ucla.edu/>。

#### 3. ASDB

可变剪接数据库(ASDB)包括蛋白质库和核酸库两部分。ASDB(蛋白质)部分来源于 SWISS-PROT 蛋白质序列库，通过选取有可变剪接注释的序列，搜索相关可变剪接的序列，经过序列比对、筛选和分类构建而成。ASDB(核酸)部分来自 Genbank 中提及和注释的可变剪接的完整基因构成。数据库提供了方便的搜索服务。

ASDB 的网址是：<http://cbcg.nersec.gov/asdb>。

#### 4. TRRD

转录调控区数据库(TRRD)是在不断积累的真核生物基因调控区结构-功能特性信息基础上构建的。每一个 TRRD 的条目里包含特定基因各种结构-功能特性：转录因子结合位点、启动子、增强子、静默子、以及基因表达调控模式等。TRRD 包括五个相关的数据表：TRRDGENES(包含所有 TRRD 库基因的基本信息和调控单元信息)；TRRDSITES(包括调控因子结合位点的具体信息)；TRRDFACTORS(包括 TRRD 中与各个位点结合的调控因子的具体信息)；TRRDEXP(包括对基因表达模式的具体描述)；TRRDBIB(包括所有注释涉及的参考文献)。TRRD 主页提供了对这几个数据表的检索服务。

TRRD 的网址是：<http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/mgs/dbases/trrd4/>。

#### 5. TRANSFAC

TRANSFAC 数据库是关于转录因子、它们在基因组上的结合位点和与 DNA 结合的 profiles 的数据库。由 SITE、GENE、FACTOR、CLASS、MATRIX、CELLS、METHOD 和 REFERENCE 等数据表构成。此外，还有几个与 TRANSFAC 密切相关的扩展库：PATHODB 库收集了可能导致病态的突变的转录因子和结合位点；S/MART DB 收集了与染色体结构变化相关的蛋白因子和位点的信息；TRANSPATH 库用于描述与转录因子调控相关的信号传递的网络；CYTOMER 库表现了人类转录因子在各个器官、细胞类型、生理系统和发育时期的表达状况。TRANSFAC 及其相关数据库可以免费下载，也可以通过 Web 进行检索和查询。

TRANSFAC 的网址是：<http://transfac.gbf.de/TRANSFAC/>。

#### 其它数据库资源

##### 1. DBCat

DBCat 是生物信息数据库的目录数据库，它收集了 500 多个生物信息学数据库的信息，并根据它们的应用领域进行了分类。包括 DNA、RNA、蛋白质、基因组、图谱、蛋白质结构、文献著作等基本类型。数据库可以免费下载或在网络上检索查询。

DBCat 的网址是：<http://www.infobiogen.fr/services/dbcat/>。

下载 DBCat 在：<ftp://ftp.infobiogen.fr/pub/db/dbcat>。

##### 2. PubMed

PubMed 是 NCBI 维护的文献引用数据库，提供对 MEDLINE、Pre-MEDLINE 等文献数据库的引用查询和对大量网络科学类电子期刊的链接。利用 Entrez 系统可以对 PubMed 进行方便的查询检索。

PubMed 的网址是：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>。

#### 蛋白质信息：

SwissProt <http://www.expasy.hcuge.ch/sprot/sprot-top.html>

ENZYME <http://www.expasy.ch/sprot/enzyme.html>

OMIM <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

ProteinDataBank <http://www.rcsb.org/>

#### 基因组工程：

HumanGenomeProject <http://www.ornl.gov/TechResources/Human/Genome/home.html>

#### 搜索算法：

BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

FastA <http://www2.ebi.ac.uk/fasta3>

#### 模体和结构域数据库：

Dali <http://mercury.ebi.uk/dali/>

ProDom <http://proteoin.toulouse.inra.fr/prodom.html>

PROSITE <http://www.expasy.ch/sprot/prosite.html>

## 15.28. GeneBank 概览

### 基本信息

什么是 GenBank? GenBank 是一个有来自于 70,000 多种生物的核苷酸序列的数据库。每条纪录都有编码区 (CDS) 特征的注释,还包括氨基酸的翻译。GenBank 属于一个序列数据库的国际合作组织,包括 EMBL 和 DDBJ。

纪录样本 - 关于 GenBank 的各个字段的详细描述,以及同 Entrez 搜索字段的交叉索引。

访问 GenBank - 通过 Entrez Nucleotides 来查询。用 accession number, 作者姓名, 物种, 基因/蛋白名字, 还有许多其他的文本术语来查询。关于 Entrez 更多的信息请看下文。用 BLAST 来在 GenBank 和其他数据库中进行序列相似搜索。用 E-mail 来访问 Entrez 和 BLAST 可以通过 Query 和 BLAST 服务器。另外一种选择是可以用 FTP 下载整个的 GenBank 和更新数据。

增长统计 - 参见公布通知的 2.2.6 (每个分类的统计), 2.2.7 (每个物种的统计), 2.2.8 (GenBank 增长) 小节。

公布通知, 最新 - 最近和即将有的变化, GenBank 的分类, 数据增长统计, GenBank 的引用。

公布通知, 旧 - 同上相同, 是过去公布的统计。

遗传密码 - 15 个遗传密码的概要。用来确保 GenBank 中纪录的编码序列被正确的翻译。

(向) GenBank 提交 (数据)

关于提交序列数据, 收到 accession number, 和对纪录作更新的一般信息。

BankIt - 用于一条或者少数条提交的基于 WWW 的提交工具软件。(请在提交前用 VecScreen 去除载体)

Sequin - 提交软件程序, 用于一条或者很多条的提交, 长序列, 完整基因组, alignments, 人群/种系/突变研究的提交。可以独立使用, 或者用基于 TCP/IP 的 "network aware" 模式, 可以链接到其他 NCBI 的资源 and 软件比如 Entrez 和 PowerBLAST。(请在提交前用 VecScreen 去除载体)

ESTs - 表达序列标签, 短的、单次 (测序) 阅读的 cDNA 序列。也包括来自于差异显示和 RACE 实验的 cDNA 序列。

GSSs - 基因组调查序列, 短的、单次 (测序) 阅读的 cDNA 序列, exon trap 获得的序列, cosmid/BAC/YAC 末端, 及其他。

HTGs - 来自于大规模测序中心的高通量基因组序列, 未完成的 (阶段 0, 1, 2) 和完成的 (阶段 3) 序列。(注意: 完成的人类的 HTG 序列可以同时 GenBank 和 Human Genome Sequencing 页面上访问。)

STSs - 序列标签位点。短的在基因组上可以被唯一操作的序列, 用于产生作图位点。

注: SNPs - 人类的和其他物种的遗传变异数据可以提交到 NCBI 数据库的单核苷酸多态性库中 (dbSNP)。

国际核苷酸序列数据库合作组织

GenBank, DDBJ, EMBL - 合作计划的概述, 并链接到相应的主页。GenBank, DDBJ (DNA Data Bank of Japan), and EMBL (European Molecular Biology Laboratory) 数据库共享的数据是每天都交换的, 因此他们是相等的。数据纪录的格式和搜索方式可能会不一样, 但是 accession number, 序列数据和注解都是一模一样的。即, 你可以用 accession number U12345 在 GenBank, DDBJ 或 EMBL 中查找相应纪录, 得到的结果是完全一样的序列数据, 参考内容等等。

DDBJ/EMBL/GenBank 特性表 — 特性表格式和标准被合作数据库用在序列记录的注释上, 使得数据共享成为可能, 包括详细的描述生物特性和特性限定语的附录, 以及 IUPAC 规定的核苷酸和氨基酸的代号。

---

FTP GenBank and Daily Updates

GenBank 普通文件格式 — 参见 GenBank 记录样本和在 GenBank 公布通知中的详细描述, 下载大

多数最近的完全公告和日常积累或非积累更新数据。

ASN.1 格式 — 摘要句法记号 1, 国际标准组织 (ISO) 数据表示格式, 下载大多数最近的完全公告和日常积累或非积累更新数据。

FASTA 格式 — 定义行号后只跟随序列数据 (示例), 参见描述数据库的 readme 文件, 包括 nt.Z (每天更新的非冗余 BLAST 核酸数据库, 包括 GenBank+EMBL+DDBJ+PDB 序列, 但是不包括 EST, STS, GSS, or HTGS 序列), nr.Z (每日更新的非冗余蛋白质), est.Z, gss.Z, htg.Z, sts.Z, 和其它文件。

分子数据库概览

核酸序列

Entrez 核酸 — 用 Accession Number, 作者姓名, 物种, 基因/蛋白名字, 以及很多其它的文本术语来搜索核酸序列记录 (在 GenBank + PDB 中)。更多的关于 Entrez 的信息见下。如果要检索大量数据, 也可使用 Batch Entrez (批量 Entrez)。

RefSeq — NCBI 数据库的参考序列。校正的, 非冗余集合, 包括基因组 DNA contigs, 已知基因的 mRNAs 和蛋白, 在将来, 整个的染色体。Accession Numbers 用 NT\_XXXXXX, NM\_XXXXXX, NP\_XXXXXX, 和 NC\_XXXXXX 的形式来表示。

dbEST — 表达序列标签数据库, 短的、单次 (测序) 阅读的 cDNA 序列。也包括来自于差异显示和 RACE 实验的 cDNA 序列。

dbGSS — 基因组调查序列的数据库, 短的、单次 (测序) 阅读的 cDNA 序列, exon trap 获得的序列, cosmid/BAC/YAC 末端, 及其他。

dbSTS — 序列标签位点的数据库, 短的在基因组上可以被唯一操作的序列, 用于产生作图位点。

dbSNP — 单核苷酸多态性数据库, 包括 SNPs, 小范围的插入/缺失, 多态重复单元, 和微卫星变异。

完整的基因组

参见下面 Genome 和 Maps 部分, 包括各种物种资源, 人, 小鼠, 大鼠, 酵母, 线虫, 疟原虫, 细菌, 病毒, viroids, 质粒。

UniGene — 被整理成簇的 EST 和全长 mRNA 序列, 每一个代表一种特定已知的或假设的人类基因, 有定位图和表达信息以及同其它资源的交叉参考。序列数据可以以 cluster 形式在 Unigene 网页下载, 完整的数据可以从 FTP 站点 repository/UniGene 目录下下载。

人类 UniGene

小鼠 UniGene

大鼠 UniGene

斑马鱼 UniGene

BLAST — 将你的序列同核酸库中的的序列比较, 检索相似的序列。(更详细的信息见下面 Tools/Sequence 相似搜索部分)

蛋白序列

Entrez 蛋白 — 用 accession number, 作者姓名, 物种, 基因/蛋白名字, 以及很多其它的文本术语来搜索蛋白序列记录 (在 GenPept + Swiss-Prot + PIR + RPF + PDB 中)。更多的关于 Entrez 的信息见下。如果要检索大量数据, 也可使用 Batch Entrez (批量 Entrez)。

RefSeq — NCBI 数据库的参考序列。Curated, 非冗余集合包括基因组 DNA contigs, 已知基因的 mRNAs 和蛋白, 在将来, 整个的染色体。Accession numbers 用 NT\_XXXXXX, NM\_XXXXXX, NP\_XXXXXX, 和 NC\_XXXXXX 的形式来表示。

FTPGenPept — 下载 “genpept.fsa.Z” 文件, 这个文件包含了从 GenBank/EMBL/DDBJ 记录中翻译过来的 FASTA 格式的氨基酸序列, 这些记录都有一到两个 CDS 特性的描述。

完整基因组

参见下面 Genome 和 Maps 部分, 包括各种物种资源, 人, 小鼠, 大鼠, 酵母, 线虫, 疟原虫, 细菌, 病毒, viroids, 质粒。

Entrez 基因组 — 提供了一个编码区的概要和各种物种的分类表 (TaxTable)。编码区概要列出了在基因组中所有的蛋白,并提供链接到 FASTA 文件和 BLAST。分类表总结了蛋白 BLAST 分析的结果,建议他们的可能功能,并用颜色编码的图来显示物种同其它物种之间的关系(参见下面'Genomes 和 Maps,'部分 Entrez 基因组的一般描述)

FTP 基因组蛋白 — 从 ftp 站点的 genbank/genomes 目录下下载各种物种的 FASTA 格式的氨基酸序列\*.faa 和蛋白表文件\*.ptt。参见 readme 文件。蛋白表也可以在 Entrez 基因组中看到。

PROW — Web 上的蛋白资源,关于大约 200 种人类的 CD 细胞表面分子的简短官方向导。互相检索,为每个 CD 抗原提供大约 20 中标准信息的分类(生化功能,配体,等等)

BLAST — 将你的序列同蛋白库中的的序列比较,检索相似的序列。(更详细的信息见下面 Tools/Sequence 相似搜索部分)

### 结构

结构主页 — 关于 NCBI 结构小组的一般信息和他们的研究计划,另外也可以访问分子模型数据库 (MMDB) 和用来搜索和显示结构的相关工具。

MMDB: 分子模型数据库 — 一个关于三维生物分子结构的数据库,结构来自于 X-ray 晶体衍射和 NMR 色谱分析。MMDB 是来源于 Brookhaven 蛋白数据库 (PDB) 三维结构的一部分,排除了那些理论模型。MMDB 重新组织和验证了这些信息,从而保证在化学和大分子三维结构之间的交叉参考。数据的说明书包括生物多聚体的空间结构,这个分子在化学上是如何组织的,以及联系两者的一套指针。利用将化学,序列,和结构信息整合在一起,MMDB 计划成为基于结构的同源模型化和蛋白结构预测的资源服务。MMDB 的记录以 ASN.1 格式存储,可以用 Cn3D, Rasmol, 或 Kinemage 来显示。另外,数据库中类似的结构已经被用 VAST 确认,新的结构可以用 VASTsearch 来同数据库进行比较。

Cn3D — "See in 3-D", 一个用于 NCBI 数据库的结构和序列相似显示工具,它允许观察 3-D 结构和序列—结构或结构—结构同源比较。Cn3D 用起来就象你浏览器上的一个帮助工具。

VAST — 矢量同源比较搜索工具—一个在 NCBI 开发的计算算法,用于确定相似的蛋白三维结构。每一个结构的“结构邻居”都是预先计算好的,而且可以通过 MMDB 的结构概要页面的链接访问。这些邻居可以用来确认那些不能被序列比较识别的远的同源性。

VAST 搜索 — 结构—结构相似搜索服务。比较一个新解出的蛋白结构和在 MMDB/PDB 数据库中的结构的三维坐标。VAST 搜索计算一系列可能会被交互浏览的结构邻居,用分子图形来观察重叠和同源相似。

### 分类学

NCBI 的分类数据库主页 — 关于分类计划的一般信息,包括分类资源和同 NCBI 分类学家合作的外部管理者的列表。

分类浏览器 — 搜索 NCBI 的分类数据库,包括大于 70000 个物种的名字和种系,这些物种都至少在遗传数据库中的一条核酸或蛋白序列。可以检索一个特定种或者更高分类(如属,科)的核酸,蛋白,和结构记录。如果有新物种的序列数据被放到数据库中,这个物种就北加到(分类)数据库中。NCBI 的分类数据库的目的是为序列数据库建立一个一致的种系发生分类学。

### 文献数据库概要

PubMed — 一个关于生物医药科学的检索系统,包括引用,摘要,和杂志的索引术语。它包括直接由出版商提供给 NCBI 的文献引用以及链接到在出版商网址上的全文的 URLs。PubMed 包括 MEDLINE 和 PREMEDLINE 的完整内容。它还包括一些被 MEDLINE 认为超出范围的文章和杂志(这些文章或杂志)由于内容或在某一时期不在索引范围内。因此 PubMed 是比 MEDLINE 的更大的集合。

杂志浏览器 — 允许你去查找收录到 PubMed 系统的杂志的名字, MEDLINE 的缩写,或 ISSN 号码。

PubRef (开发中) — 一个关于来自于广大范围的科学杂志的数目记录,和链接到出版商网址的全文。PubRef 包含了 PubMED,加上了来自其它学科的杂志出版商提供的引用和摘要。因此它是比 PubMed 更大的集合。这个计划的启动是因为 NAS 要求为科学领域的电子杂志提供一个“白皮书”服务。

PubMed 中心（开发中） — PubMed 中心是一个无障碍的 NIH 资源，用于在生命科学领域中同业互查的基础研究报告。从 2000 年一月开始接受杂志文章。所有在 PubMed 中心材料将由目前任一主要的摘要和索引服务中列出的杂志提供，或者在编辑委员会中拥有 3 个以上有主要资金机构的研究经费的拥有人的杂志提供。

OMIM — 在线人类孟德尔遗传 — 经常更新的人类基因和遗传失调的目录，有链接到其它相关的文献参考，序列记录，和相关数据库。

书籍 — 同书籍出版商合作 NCBI 为网络改编了教科书，并把他们链接到 PubMed—生物医药书目数据库。这是为了给 PubMed 提供背景信息，这样使用者可以探究在 PubMed 搜索结果中不熟悉的概念。目前收录的书有：

Molecular Biology of the Cell, 3rd ed. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., 1994, Garland Publishing.

外部链接 — 一个登记服务，用于建立从在 Entrez 中的特定的文章，杂志，或生物数据到外部网址的链接。第三方可以提供 URL，资源名字，关于他们网址的简要的描述，和关于从 NCBI 数据的哪里他们希望建立链接的详细说明。这个详细说明可以用对 Entrez 有效的布尔查询来写，也可以用特定的文章或序列的标志列表来写。这样 NCBI PubMed 的用户将可以通过“NCBI 小房间”服务（开发中）来选择哪个外部链接在他们的搜索中是可见的。

引用匹配 — 允许你找到任何一篇在 PubMed 数据库中的文章的 PubMed ID 或 MEDLINE UID，给出书目信息（杂志，卷，页码等）。

单篇文章的引用匹配。

许多文章的批量引用匹配。

E-mail 引用匹配也是可以的，也可以用于单篇或许多文章。如果要获得帮助文件，给 citation\_matcher@ncbi.nlm.nih.gov 写一封只有内容为 HELP 的 E-Mail。

Genomes and Maps Overview

Entrez 基因组：人，小鼠，大鼠，酵母，线虫，疟原虫，细菌，病毒，viroids，质粒，和真核细胞器。

Entrez 基因组（各种物种）

Entrez 基因组 — 超过 800 种在 GenBank 中被完整测序的物种，包括大于 500 种病毒，>25 种细菌，酵母，和许多 viroids，质粒，和细胞器。还包括正在进行的基因组，比如人，小鼠，线虫，疟原虫，果蝇，利什曼原虫，水稻，和玉米。提供完成的基因组/染色体的图形概览，并可以探究那些逐步细化的区域。也提供那些已经被 NCBI 工作人员分析过的物种的编码区的摘要和 TaxTables。另外，Entrez Map Viewer，Entrez 基因组的一个软件组成部分，提供整合的果蝇（细胞遗传学和序列图谱）和人类（细胞遗传学，遗传连锁，序列，放射杂交，和其它图谱）的染色体图谱的浏览。

通过每个物种的 Entrez 基因组页面来下载 <350kb 的基因组。

通过 NCBI FTP 站点来下载 >350kb 的基因组—参见在 genbank/genomes 目录下的 readme 文件，FTP 链接在每个物种的 Entrez 基因组页面上也有。

NCBI 站点地图

Human Genome 人类基因组数据介绍

[NCBI 资源介绍](#)

向导

人类基因组资源向导 — 可用的人类基因组数据资源概览。包括关于人类基因组的公告和进展报告和提供对以前分离的数据的集中访问。

人类基因组序列数据的状态 — 描述了目前在 GenBank 中的数据范围，包括完成的和草图高通量基因组序列数据的讨论。

染色体

人类基因组测序 — 每一条染色体，概述了人类基因组计划的测序进展（图示和统计）。提供对基因组

序列数据的访问,也有链接到参与的国际基因组中心,各种 STS 图谱,疾病基因信息,和选择出的参考文献。列出完成的 contig 的大小和位置。Contig 可以被显示出来,以表示组成他们的 GenBank 中的记录的成分,或者那些由 e-PCR 确定的位于其上的 STS 标记。Contig 用在 GenBank 中处于第三期的 HTG 序列记录来组装起来,组装的办法是用 Jang, et al 描述的过程,并给于一个 NT\_\* 的 accession number,作为 RefSeq 计划的一部分。关于各期 HTG 序列的详细说明见 HTG 网页。

Entrez 图谱浏览器 — 整合的染色体图谱—图谱浏览器是 Entrez 基因组的一个软件组成部分,用来显示一个或多个用共同标记或基因名字互相 align 过的图谱,以及用相同序列进行比较过的序列图谱。在人类基因组数据和搜索技巧文件中有关于 20 种序列,细胞遗传,遗传连锁,放射杂交,和其它的图谱。Entrez 图谱浏览器的帮助文件提供了关于如何使用这个工具的一般说明。

FTP — 每个染色体都有一个文件目录包含各种格式的完成的基因组 contig ( NT\_\* 记录):

hs\_chr\*.asn ASN.1 格式 (description above)

hs\_chr\*.fna.gz FASTA 格式(description above)

hs\_chr\*.gbk.gz GenBank flat file 格式

( 目前注解包括 STS 标记, 已知和预期的基因将在将来几个月中加入 )

hs\_chr\*.gbs GenBank summary 格式

( 这个格式不含有序列数据,但是包含一个“CONTIG”字段,表明这个 contig 是如何有独立的 GenBank 记录组装起来的。)

BLAST 人类基因组序列数据

BLAST 人类染色体 — 将一个核酸或蛋白序列同已经完成的 HTG contig 比较。Contig 用在 GenBank 中处于第三期的 HTG 序列记录来组装起来,组装的办法是用 Jang, et al 描述的过程,并给于一个 NT\_\* 的 accession number,作为 RefSeq 计划的一部分。关于各期 HTG 序列的详细说明见 HTG 网页。同人类染色体作 BLAST 是人类基因组测序页面的一个组成部分。

BLAST htgs 数据库 — 将一个核酸或蛋白序列同未完成的 HTG 序列 ( 第 0, 1, 2 期 ) 进行比较 ( 关于各期 HTG 序列的详细说明见 HTG 网页 )。尽管 htgs 数据库包含有来自许多物种的序列,你可以使用 Advanced BLAST 页面来限定你的搜索只在人类。

BLAST gss 数据库 — 将一个核酸或蛋白序列同随机的“单次(测序)阅读”的基因组调查序列比较,如同 cosmid/BAC/YAC 末端序列,exon trap 获得的基因组序列,和 Alu PCR 序列。尽管 gss 数据库包含有来自许多物种的序列,你可以使用 Advanced BLAST 页面来限定你的搜索只在人类。

基因

位点链接( LocusLink ) — 为校正过的序列和遗传位点的描述信息提供一个单次查询界面。LocusLink 给每个位点发布一个稳定的 ID,并提供官方的命名,同名,序列 accesssion number,表型,EC 号码,OMIM 号码,Unigene 簇,图谱信息,和相关的网址。LocusLink 是 NCBI,人类基因命名委员会,OMIM 和其它组织的合作结果。LocusLink 目前包含人类,小鼠,大鼠,斑马鱼,和果蝇的位点,物种可以被分开或合在一起查询。

OMIM — 在线人类孟德尔遗传—经常更新的人类基因和遗传失调的目录,有链接到其它相关的文献参考,序列记录,和相关数据库。

RefSeq — NCBI 数据库的参考序列。校正的,非冗余集合,包括基因组 DNA contigs,已知基因的 mRNAs 和蛋白,在将来,整个的染色体。Accession numbers 用 NT\_XXXXXX, NM\_XXXXXX, NP\_XXXXXX, 和 NC\_XXXXXX 的形式来表示。

UniGene — 被整理成簇的 EST 和全长 mRNA 序列,每一个代表一种特定已知的或假设的人类基因,有定位图和表达信息以及同其它资源的交叉参考。序列数据可以以 cluster 形式在 Unigene 网页下载,完整的数据可以从 FTP 站点 repository/UniGene 目录下下载。

序列

人类基因组测序 — 每一条染色体,概述了人类基因组计划的测序进展(图示和统计)。提供对基因组

序列数据的访问,也有链接到参与的国际基因组中心,各种 STS 图谱,疾病基因信息,和选择出的参考文献。列出完成的 contig 的大小和位置。Contig 可以被显示出来,以表示组成他们的 GenBank 中的记录的成分,或者那些由 e-PCR 确定的位于其上的 STS 标记。Contig 用在 GenBank 中处于第三期的 HTG 序列记录来组装起来,组装的办法是用 Jang, et al 描述的过程,并给于一个 NT\_\* 的 accession number,作为 RefSeq 计划的一部分。关于各期 HTG 序列的详细说明见 HTG 网页。

RefSeq — NCBI 数据库的参考序列。校正的,非冗余集合,包括基因组 DNA contigs,已知基因的 mRNAs 和蛋白,在将来,整个的染色体。Accession numbers 用 NT\_XXXXXX, NM\_XXXXXX, NP\_XXXXXX, 和 NC\_XXXXXX 的形式来表示。

Entrez — 对 GenBank, EMBL, DDBJ, PIR-International, PRF, Swiss-Prot, and PDB 数据库中的核酸和蛋白序列数据提供整合的访问,同时提供对 3D 蛋白结构,基因组图谱信息和 PubMed MEDLINE 的访问。Entrez 包含了对每个数据库记录的预先计算好的相似搜索,产生一个相关序列,结构和 MEDLINE 记录的表。包括了来自 70000 个物种的序列数据,可以用物种字段来限制记录只在人类搜索。

UniGene — 被整理成簇的 EST 和全长 mRNA 序列,每一个代表一种特定已知的或假设的人类基因,有定位图和表达信息以及同其它资源的交叉参考。序列数据可以以 cluster 形式在 Unigene 网页下载,完整的数据可以从 FTP 站点 repository/UniGene 目录下载。

DbEST — 表达序列标签数据库—短的 (300—500bp) 的 cDNA 序列,代表 mRNA 的单个 (测序) 阅读。常常有大量的 EST 被测序,并代表了在一个给定的组织或一个给定的发育阶段的基因表达的快照。同时包含了由 CGAP 计划产生的 ESTs,和来自差异显示及 RACE 实验的序列。

#### 克隆

克隆登记 — 由多方人类基因组测序中心使用的数据库,用来记录哪些克隆已经被选来测序,哪些正在被测序,哪些已经完成,哪些已经被送到 GenBank 中去了。包括 BACs, PACs, cosmids, fosmids。使用统一的克隆名字表示克隆在微量板上的位置 (板号,行,和列),位置前面加上库的缩写,来产生唯一的名字。包括了克隆订购的信息。

#### 基因组图谱

Entrez 基因组 — 链接到人类基因组测序站点的人类染色体视图。Entrez 基因组同时包括了一个人类线粒体的视图 (通过真核细胞器来访问),可以查看完整情况或查看逐步详细的信息。

Entrez 图谱浏览器 — 整合的染色体图谱—图谱浏览器是 Entrez 基因组的一个软件组成部分,用来显示一个或多个用共同标记或基因名字互相 align 过的图谱,以及用相同序列进行比较过的序列图谱。在人类基因组数据和搜索技巧文件中有关于 20 种序列,细胞遗传,遗传连锁,放射杂交,和其它的图谱。Entrez 图谱浏览器的帮助文件提供了关于如何使用这个工具的一般说明。

GeneMap' 99 — 35000 个人类基因标记的物理图谱,由国际放射杂交图谱联合用一致的 RH 试剂和方法建成。提供了突出了染色体上关键标志 (富含基因区) 的框架,从而加速了测序,代表了超过 100 名科学家的国际合作努力。

NCBI RH 图谱 — NCBI 整合的 RH 图谱,包括来自 GeneMap' 99 的 G3 和 GB4 的 RH 单子上的 23723 个标记。这些标记相对于 1084 个框架标记 (一个 G3 和 GB4 共同的子集) 被绘制。所有的标记被统一在 GB4 的尺度上。R. Agarwala et al. 的文章提供了详细的整合策略,以及评估整合图谱质量的方法。

Mitelman 癌症染色体变异摘要 — 由 Drs. Mitelman, Mertens, 和 Johansson 建立的基因组范围的人类癌症中染色体断裂位点图谱。参见 Nature Genetics, Vol. 15(Spec. No.):417-74 (April 1997) 的超文本版本。

OMIM 基因图 — 被报道的和被许多定位方法决定的基因的细胞遗传位点。可以用基因代号或细胞遗传染色体位点来搜索。可以从 OMIM 页面上访问。

OMIM 致病图 — 按字母排列的疾病和相应的细胞遗传图位点,链接到 OMIM 的条目。可以从 OMIM 页面访问。

人类/小鼠同源图 — University of California at Davis 的 M. F. Seldin 建立，一张比较人和老鼠在同源区段 DNA 上基因的表，按在每个基因组上的位置排列。

绘制的标记

dbSTS — 序列标签位点的数据库，短的在基因组上可以被唯一操作的序列，因而可以确定在物理图谱上的特定位置。

电子 PCR ( e-PCR ) — 找到一个查询序列的假设位点图。用于在 DNA 序列上发现 STS 位点计算过程。

GeneMap' 99 — >35000 个人类基因标记的物理图谱，由国际放射杂交图谱联合一致的 RH 试剂和方法建成。提供了突出了染色体上关键标志（富含基因区）的框架，从而加速了测序，代表了超过 100 名科学家的国际合作努力。

人类基因组测序 — 绘制的标记已经用 e-PCR 自动被放到完成的 HTG 序列组成的 contig 上。标记来源于 dbSTS，GeneMap'99（基于基因的标记），Stanford G3 RH 单子（又有基因标记也有非基因标记），Whitehead GB4 RH 单子和 YAC 图谱（又有基因标记也有非基因标记），Genethon 遗传图谱，和一些染色体特异的图谱，如 NHGRI 的 7 号染色体图谱，Washington University 的 X 染色体图谱。

OMIM 基因图 — 被报道的和被许多定位方法决定的基因的细胞遗传位点。可以用基因代号或细胞遗传染色体位点来搜索。可以从 OMIM 页面上访问。

基因表达

CGAP cDNA 表达谱 — 在 UniGene 簇和 cDNA 库中的 ESTs 分布。可以在 CGAP 页面上访问。

SAGEmap — CGAP SAGE ( Serial Analysis of Gene Expression ) 库的差异显示。也包含了对在人类 GenBank 记录中的 SAGE 标签的完整分析，在人类 GenBank 记录中一个 UniGene 的标志被分配给了每个含有一个 SAGE 标签的人类序列

遗传变异

dbSNP — 单核苷酸多态性数据库，包括 SNPs，小范围的插入/缺失，多态重复单元，和微卫星变异。DbSNP 包含种族特异的频率和基因型数据，实验条件，分子上下文，及中性多态和临床变异的定位信息。

OMIM — 在线人类孟德尔遗传—约 900 个 OMIM 记录的等位变异。为了查看这些 OMIM 记录的列表，在等位变异字段上搜索“0001”。或者，把一个疾病的名字同“0001”放到一起。如：Gaucher & 0001。

位点特异突变数据库 — 从 OMIM 主页和相关的 LocusLink 条目链接到许多外部数据库。

失调

基因和疾病 — 介绍遗传因素和人类疾病的关系。有约 60 种遗传疾病的概要信息，以及链接到相关数据库和组织。

Mitelman 癌症染色体变异摘要 — 由 Drs. Mitelman，Mertens，和 Johansson 建立的基因组范围的人类癌症中染色体断裂位点图谱。参见 Nature Genetics，Vol. 15(Spec. No.):417-74 (April 1997) 的超文本版本。

OMIM — 在线人类孟德尔遗传—经常更新的人类基因和遗传失调的目录，有链接到其它相关的文献参考，序列记录，和相关数据库。

OMIM Morbid Map - alphabetical listing of diseases and corresponding cytogenetic map locations，with links to OMIM entries. Accessible from OMIM page (see Genes).

OMIM 致病图 — 按字母排列的疾病和相应的细胞遗传图位点，链接到 OMIM 的条目。可以从 OMIM 页面访问。

癌症研究

CCAP — 癌症染色体变异计划—计划用来加速同恶性转移相关的显著染色体变异的定义和详细的特征描述。

CGAP — 癌症基因组剖析计划 — 交叉学科项目，目的是基于 cDNA 库，鉴定在不同癌症阶段的人类基因表达，和决定正常，癌前和恶性细胞的分子表达谱。是 NCI，NCBI 和其它许多实验室的合作。

Mitelman 癌症染色体变异摘要 — 由 Drs. Mitelman, Mertens, 和 Johansson 建立的基因组范围的人类癌症中染色体断裂位点图谱。参见 Nature Genetics, Vol. 15(Spec. No.):417-74 (April 1997) 的超文本版本。

SAGE 分析 — 在癌症库中的 SAGE 标签的差异表达。

### 15.29. 分子生物学人员常用软件

#### 文献管理与分析：

EndNote X1, 文献管理软件, 平时方便论文管理, 写文章的时候插入文献也是相当的方便;

RefViz 2.1, 文献分析软件, 与 EndNote 结合使用, 分析文献, 可以省掉大把自己看自己归纳的时间;

#### 分子生物学软件：

Vector NTI 10.3, 分子生物学的综合软件, 什么功能几乎都全了;

Primer premier 5, 引物设计软件, 大家都用, 我也用;

Oligo 6.71, 引物设计软件, 大家都用, 我还用, 设计 Fusion PCR 和 In-Fusion 连接的引物的时候, 比 Primer premier 直观一些;

BioEdit 7, 杂七杂八的功能凑在一起的一个分子生物学软件, 有些罕见的 Vector NTI 所没有的功能;

DNAMAN 6, 与 Vector NTI 类似的一个软件, 但是图型化上做的很差, 集成度和序列的管理功能比 Vector NTI 差的不是那一点点, 罕用, 但有时候有些序列的格式非得要用它的样子排, 没有办法;

SimVector 4, 画质粒的一个软件, 效果还行, 与 VectorNTI 画出来的风格不一样, 有的杂志喜欢;

PyMol 0.99, 有 1.0, 可惜要钱了, 也没有 P-J。蛋白质三维结构查看软件, 神奇的就在于它可以编辑小范围内的结构;

RasMol 2.7, 蛋白质三维结构查看软件, 带命令行;

RNA Draw 1.1, RNA 和 DNA 二级结构的分析软件, 可以分析做 PCR 的时候的引物的二聚体, 更直观一些;

GelPro Analyzer 4.5, 跑胶和杂交以及菌落的分析软件;

PathwayStudio 4.0, 有 5.0, 可惜没有\*\*\*, 蛋白质相互作用、细胞信号转导和代谢分析的软件;

#### 办公软件：

Microsoft WORD 2003, 不说了;

Microsoft Excel 2003, 不说了;

Microsoft PowerPoint 2003, 不说了;

Adobe Acrobat Professional 8.1, 不说了;

PDF2Office 2.0, 把 PDF 转成 WORD, 中文支持大大的好, 但页面格局往往破坏的一塌糊涂;

Adult PDF Password Recovery 2.3, 看名字就知道干什么的了, 相当强大, 加密的 PDF 往往不能取词不能打印;

SolidPDFConverter 3.0, 把 PDF 转成 WORD, 中文支持大大的不好;

#### 图片处理：

图片是用来表达思想最有力的工具了, 所以在这里就多了一些。

Adobe Photoshop CS3 Extended, 修改图片了;

Image-Pro Plus 6.0, 对图象进行加工处理并得到数据的软件, 专业, 相当的专业;

SmartDraw 7.7, 画流程图和一些复杂的示意图;

Adobe Fireworks CS3, 矢量图和位图工具二合一, 可以画一些复杂的图;

Adobe Streamline 4, 好久没有升级的一个软件, 把位图转成矢量图的一个软件, 很好用;

Microsoft Visio 2003, 画流程图和一些复杂的示意图, 与 SmartDraw 类似, 但是在 PPT 里面的显示效果远胜 SmartDraw, 因为与 PPT 是一家的, 兼容性更好, 更方便;

ChemSketch 10, 画分子结构式的;

SnagIt 8.5, 抓图软件, 同类软件里面最好用的一个了, 连续截屏和延迟截屏是最大特色了;

#### **数学软件:**

OriginPro 7.5 SR6, 画各种各样的曲线图, 兼做简单的数据处理;

SigmaPlot 10.0, 与 Origin 类似, 画出来的图风格不大一样;

SigmaStat 3.5, 分析为主的一个小统计软件, 在 SigmaPlot 中可以调用它;

SPSS 15, 大型的分析软件了;

MatLab 7.1, 呵呵, 这样说吧, 数学里面的, 几乎什么都可以;

#### **其它:**

UltraEdit 12.20b, 取代记事本的一个强大软件, 很多时候会用到, 比如把 CNKI 的数据导到 EndNote, 有些软件的 16 进制下的 P-J;

### **15.30. 分子生物学实验中的细节问题和小技巧**

多设置**对照**, 正负对照都要, 这样出了差错容易找到哪个环节出问题。

有些环节可以粗放, 有些环节要仔细, 你弄清楚原理, 不要死抠 Protocol 可以提高效率; 有些温度不用讲究, 一般酶作用温度有个很宽的范围的。

#### **关于转化和筛选:**

做克隆挑斑时, 可以在将沾有菌体的牙签丢到试管前, 在一块相应抗性的平板上点一下, 标注清楚, 培养时间稍长一点, 待长成较大菌落后收取。以后需要哪一个菌, 就在平板上挑取。这样既方便快捷, 又可以保证菌的一致。

#### **关于抽提质粒:**

1) 抽提质粒时, 加入 Solution II 和 III 后要求轻柔混匀。我个人觉得不用这样, 只要不是非常剧烈, 可以快速混匀。尤其可以运用在一次抽提多管质粒的时候, 这样可以快速, 而且效果一点也不差。

2) 抽提质粒时, 用无水乙醇沉淀的时间可以由实验操作者来决定, 如果时间充裕可以 30 min, 否则 8-10 min 也可以。至于温度, 个人觉得 -20°C 好于常温。如果加入可醋酸钠, 会较容易形成盐类杂质, 所以时间短一些更好!

3) 质粒小提如果是用作鉴定或酶切, 不必进行酚仿抽提, 将溶液 1, 2, 3 离心后的清液移入一个新的 1.5ml 离心管中, 再次离心 3-5 min, 小心取出上清液后, 直接沉淀, 不必担心 DNA 切不开, 我已经这样使用一年多, 没出过什么问题。当然这样的质粒不很干净, 但是做鉴定足够了。尤其是实验室女同胞们, 可以减少酚仿的侵害, 而且节省时间。

4) 有时沉淀东西, 由于沉淀量很少, 离心完之后不知道到底有没沉淀下来东西, 由于量很少, 不好观察, 所以离心时建议按特定的方向放置离心管, 这样你就可以在离心之前确定沉淀该沉淀到管子的大致部位, 这样离心后就可直接观察那有没有沉淀, 避免满管子找, 另外看沉淀时可以对光看, 这样就是颗粒状的细小沉淀也能看见的, 我觉得我们制备好了一批感受态, 最好马上转化一种已知质粒。与此同时, 取一点感

受态接种到含抗性的固/液体培养基培养来做对照。这样第二天即可以知道这批感受态是否还有外源质粒，又可以知道这批感受态转化效率的高低。如果合格，那以后就可以放心使用！因为我也曾经遇到其实是因感受态不好而导致试验不成功，但是当时不知道，结果费时费力。

5) 提取质粒的时候，最后一步的**酒精挥发**很关键，基本上是其后续的酶切反应的决定性因素。所以这一步尽量挥发长一点时间，最好是空调吹热风，或是 37°C 温箱放长一点的时间，我试过室温过夜，酶切很好。

6) 在做克隆鉴定的时候经常需要在酶切鉴定前进行 PCR 鉴定，每次配置 PCR 反应液很繁琐，可以将其配置类似 Kit 的形式，按你需要的反应体系列表，然后放大 100 倍配置 100×主反应液（100 次反应），其中含 Buffer，Mg<sup>2+</sup>，dNTPs，但不含引物和 Taq 酶，然后可以 10×分装或一管储存在 -20°C，在需要的时候拿出融开，然后按所需的 PCR 反应个数吸取相应的倍数，再补加相应反应倍数的 Taq 和引物，混匀后分装，这样做的好处如下：1) 节省时间；2) 避免每次反应加样不均的可能；3) 大大减少 PCR 假阳性的产生。

### 有关 SDS-PAGE：

1) 可将 SDS-PAGE 的积层胶，分离胶预先配好大体积如 100 ml 储存在 4°C 冰箱（注：10%AP，TEMED 不加，切记!!!），每次配置时只需吸取相应体积的预制胶加入 AP，TEMED 即可，没必要每次制胶时候翻分子克隆，特别方便，而且，这样的预制胶可储存半年以上，不失为偷懒的绝佳方法；更关键的是可大大减少与丙稀酰胺的接触，因此大大减少中毒的机会。

2) 电泳时虽然小电压分离效果要好一些，但 2 h 以上的等待的时间实在是痛苦，因此可以提高电泳至 150V，但需要将整个电泳槽放在放满冰水的脸盆里散热，这样跑出来的胶分离效果丝毫不比低电压来的差，关键是时间大大节省，不需 1 h 即可看结果了。

3) 做 SDS-PAGE 的时候，除了蛋白量上样一致，最好体积也一致，这样跑出来的胶各个泳道之间的 Band 能做到一样宽，方便后面的比较，特别是 Western Blotting。做法就是拿 1X 的上样缓冲液补全要加的样做到体积一致，否则跑出来会有宽的窄，特别是上样体积相差较大的。

4) 跑 PAGE 胶的时候，小电压跑会避免高电压产生的热量导致的胶层变形；低电压泳道会比大电压泳道跑的直一些，且分离效果更高，有利于分子量相差不大的蛋白分离。

5) 做 SDS-PAGE 跑胶通常都是现配现用，但配胶要 > 1h，所以如果想第二天睡个懒觉而又不耽误跑胶可以于前一天晚上做好浓缩胶和分离胶，待凝聚后不要拔下梳子，把含胶玻璃板从制胶槽取下，用保鲜膜包上，注意玻璃板上下两边缘会有气体，所以需要加一点电泳缓冲液以避免胶内水分蒸发。然后放 4°C 过夜，第二天直接拔下梳子行后续。国外好多公司出售脚既是如此，可以保存上星期。

6) 在把蛋白胶做成干胶时，很多时候会因为气泡使胶裂掉，我的经验是在做胶时加上层膜前在胶上加些水就不容易进气泡了，还有就是高温烘胶，我喜欢放到 60°C 烘箱里烘，这样水分蒸发速度快，即使有一些小的气泡也不会有影响，呵呵，这是经验之谈，我从来都没失手过，大家可以试试。

7) 配置分离胶或者非变性胶时因胶凝时收缩可导致加样孔变浅。可以将加剩的胶放入 4°C 以降低凝聚速度，而将凝胶放入 37°C 促聚，并随时用 4°C 加剩的胶补充下降的胶面。另外将胶横放与水平面成 ~10 度角也可以减少收缩的影响。

做大肠表达时确定蛋白是否表达一般要煮样做诱前诱后检测，但很多时候煮出来的很粘影响跑胶效果。如果现用 8 M Urea 重悬细菌再煮效果会有极大改善（**注：不能用 Gu-HCl 代替!**）。

分离蛋白质的：质粒小提如果是用作鉴定或酶切，不必进行酚仿抽提，将溶液 1.2.3 离心后的清液移入一个新的 1.5ml 离心管中，再次离心 3-5 分钟，小心取出上清液后，直接沉淀，不必担心 DNA 切不开，我已经这样使用一年多，没出过什么问题。当然这样的质粒不很干净，但是做鉴定足够了。可以减少酚仿的侵害，而且节省时间。