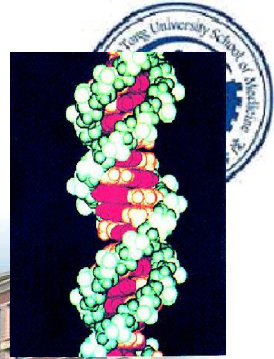




<http://www.shsmu.edu.cn/>



DNA抽取和质粒DNA制备

<http://www.shsmu.edu.cn/>



第一部分 **DNA**提取总论

<http://www.shsmu.edu.cn/>



核酸提取的原则

- 1 保证核酸一级结构的完整性；
- 2 其他生物大分子如蛋白质、多糖和脂类 分子的污染应降低到最低程度；
- 3 核酸样品中不应存在对酶有抑制作用的有机溶剂和高浓度的金属离子；
- 4 其他核酸分子，如RNA，也应尽量去除。

2009年3月

上海交通大学医学院



- ❖ 理论上所有有核真核细胞、细菌、病毒都可以提取**DNA**
- ❖ 样本选择取决于试验目的
- ❖ 全血是基因组提取最常见的样本



2009年3月

上海交通大学医学院



- ❖ 血清、血浆、外周血有核细胞、痰液、体液、棉拭子采集的各种分泌物、组织（包括骨髓）和羊水等都是分子诊断的检验材料，其中全血、血浆（血清）标本占分子诊断的60%以上



2009年3月

上海交通大学医学院



(一) 全血

1. 抗凝剂

EDTA-Na₂

或枸橼酸钠

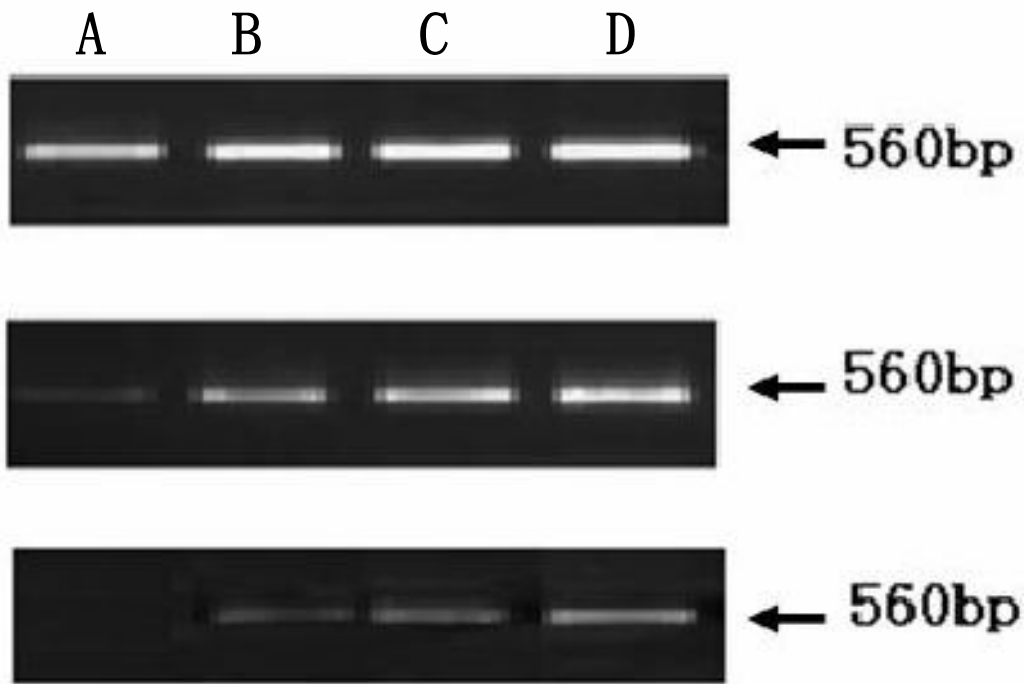
作为抗凝剂

不宜使用肝素

	抗凝剂处理血		
	肝素	柠檬酸*	EDTA*
-80℃	保存2个月, 第10天收率90%		
4℃	第四天收率90%		
	第10天提取效果差	第十天收率85%	
室温	提取效果差	第四天收率90%	
		第十天提取效果差	

2009年3月

上海交通大学医学院



mRNA逆转录后RT-PCR结果 (0、3、6个月)

2009年3月

上海交通大学医学院



❖ 血浆和血清是检测释放入血的游离核酸最主要的标本来源，用来检测病毒、细菌，以及肿瘤细胞等等释放出来的游离核酸和蛋白质产物，在临床上被广泛应用于病原微生物和肿瘤标志基因的检测中

2009年3月

上海交通大学医学院





- ❖ 血浆DNA又称为循环DNA，是一种无细胞状态的胞外DNA，主要是游离的单链、双链DNA或DNA-蛋白质的混合物
- ❖ 它在未来分子诊断的应用中具有广阔前景
- ❖ 血浆DNA成分的来源分为内源性和外源性两个部分，其中入侵的病毒、细菌等病原体释放入血液的核酸是外源性血浆DNA最重要的成分



2009年3月

上海交通大学医学院



血浆DNA

内源性循环DNA

外源性循环DNA

自身基因组来源DNA

入侵的病毒、细菌等病原体

死亡细胞

活细胞释放

2009年3月

上海交通大学医学院





- ❖ 尿液、胸水、腹水和脑脊液等标本离心后取沉淀提取液体中细胞的核酸
- ❖ 对释放入体液中的病毒或细菌的游离核酸，采用超高速离心或体液浓缩后再提取核酸



2009年3月

上海交通大学医学院



(以痰液为例)

- ❖ 痰液是检测呼吸道病原体核酸的主要样本，深部咳痰，患者采集早晨起床后的第一口痰，采集前应先漱口，以避免混入大量的口腔脱落的上皮细胞和唾液等影响检测结果



2009年3月

上海交通大学医学院



- ❖ 结核分枝杆菌的检测，可以用NaOH液化痰液去除粘液和蛋白质；非结核分枝杆菌的核酸，使用生理盐水后取上清液
- ❖ 痰液检测病原体核酸不适宜作定量分析，检测时尽可能提高痰液中细胞成分的回收率

2009年3月

上海交通大学医学院





样本类型	基因组DNA收率
20mg 肝脏组织	8 μg
100mg 豆苗	10 μg
100μl 全血	2 μg
2×10^6 培养细胞	10 μg

2009年3月

上海交通大学医学院



四、DNA提取的基本步骤

1、核酸的释放：

破裂细胞 释放核酸

机械法与非机械法

（非机械法中溶胞法是应最广泛的方法）



2009年3月

上海交通大学医学院



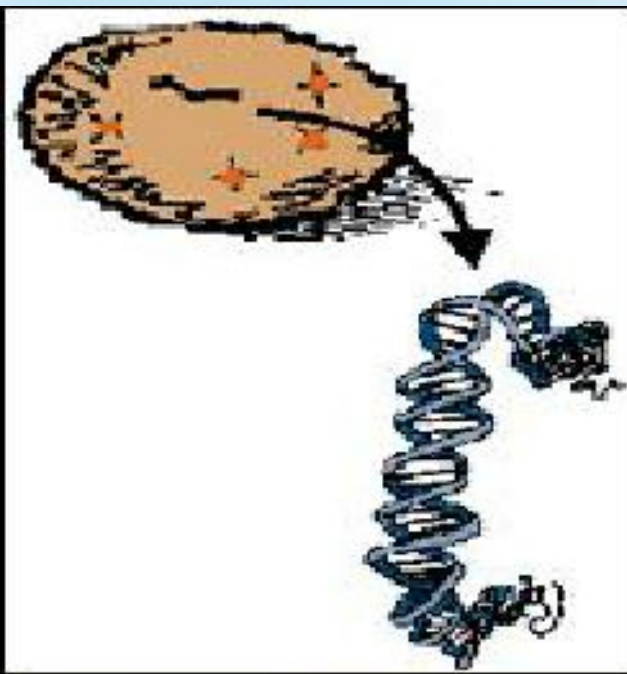
	细胞破碎方法	应用
I 机械法	1匀浆法	机体软组织
	2捣碎法	动物韧性组织
	3研磨法	细菌、酵母
II 物理法	1超声法	细胞混悬液
	2反复冻融法	培养细胞
	3冷热交替法	细菌、病毒
	4低渗裂解	红细胞
III 化学法	1有机溶剂	细菌、酵母
	2去垢剂	组织、培养细胞
	3酶解法	细菌、酵母

2009年3月

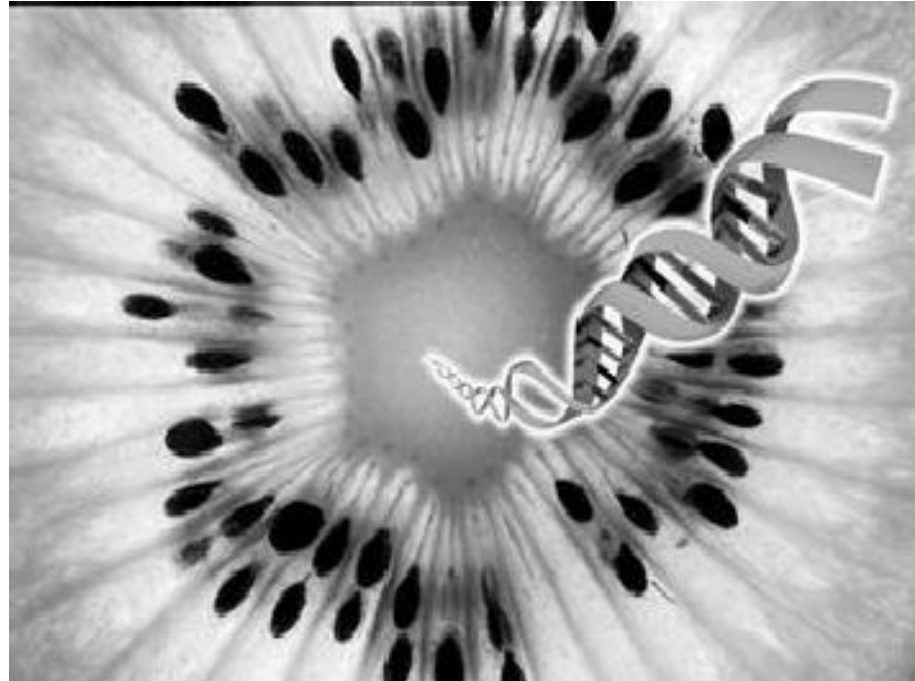
上海交通大学医学院



破裂细胞、释放核酸



Extracting DNA from
and organism.



2009年3月

上海交通大学医学院



2、核酸的分离与纯化:

将含有核酸分子复杂复合物中，将核酸与其他物质分离

非核酸的大分子污染物（蛋白质、多糖和脂类分子）、非需要的核酸分子、试剂和溶液

2009年3月

上海交通大学医学院





3、核酸的浓缩、沉淀与洗涤

沉淀可去除部分杂质与某些盐离子

加入一定的盐类（醋酸钠、氯化钠等）后使用有机溶剂
（如乙醇、异丙醇等）

少数盐类可使用70-75%的乙醇洗涤



2009年3月

上海交通大学医学院



DNA的鉴定

浓度鉴定

纯度鉴定

完整性鉴定



2009年3月

上海交通大学医学院



核酸浓度鉴定

- 1) 紫外分光光度法：测定DNA在 $A_{260\text{nm}}$ 的光吸收值。
如计算DNA浓度

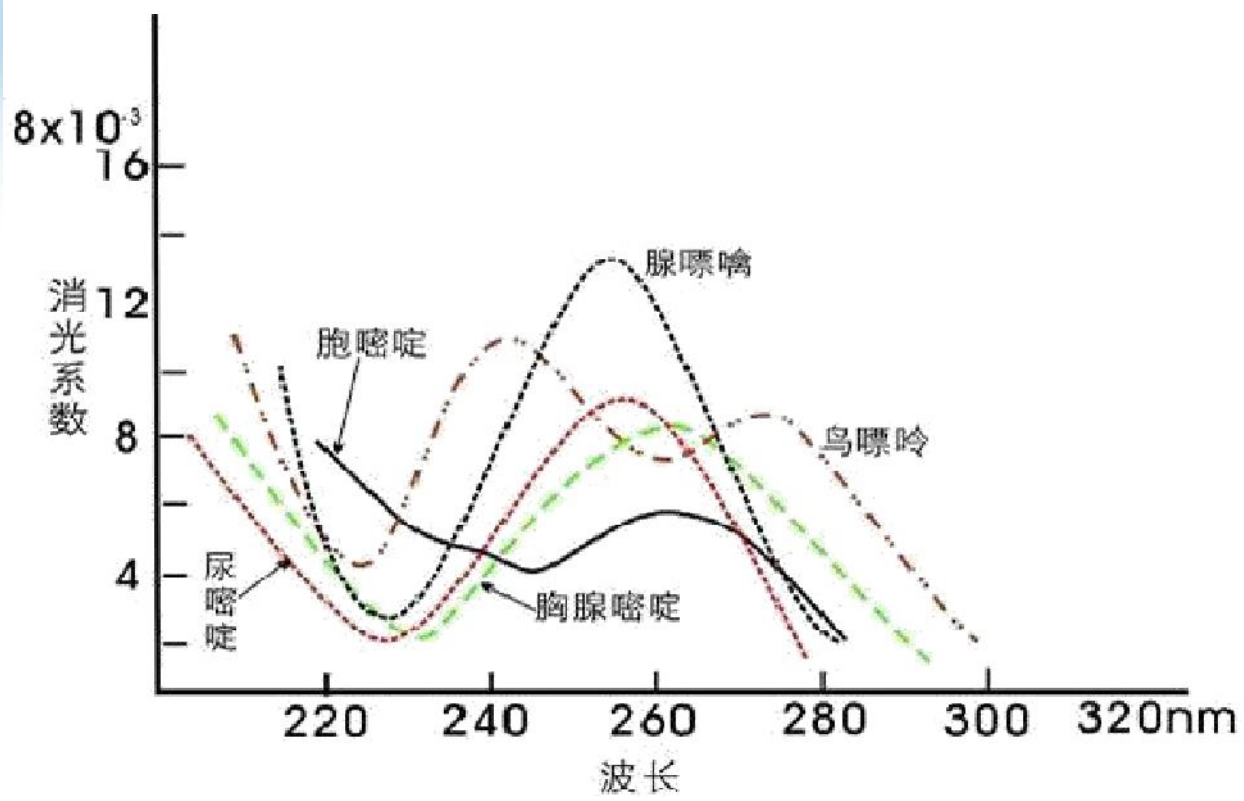
$$A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 50 = \mu\text{g/ml}$$

紫外分光光度法只用于测定浓度为 $0.25\mu\text{g/ml}$ 的核酸溶液(双链DNA或RNA, $20\mu\text{g/ml}$ 单链寡核苷酸)

2009年3月

上海交通大学医学院





各种碱基的紫外吸收光谱

2009年3月

上海交通大学医学院



2) 荧光光度法

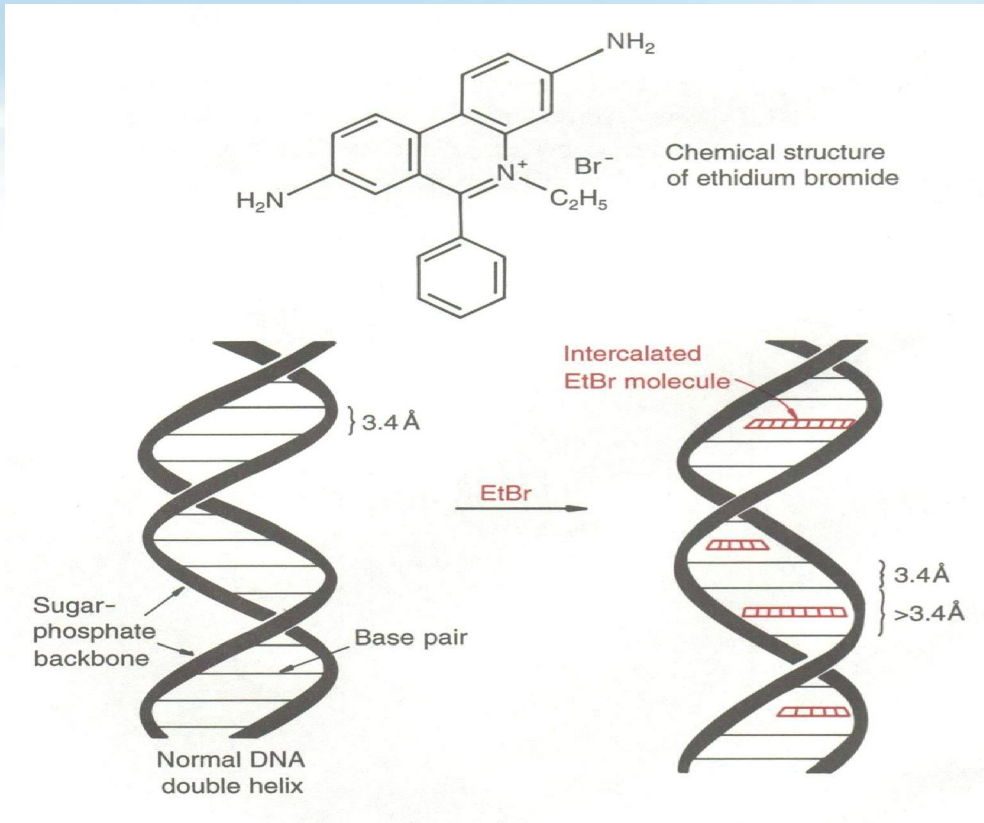
荧光染料溴化乙锭，可嵌入到碱基平面，而发出荧光，且荧光强度与核酸含量呈正比。

适用于低浓度核酸溶液的定量分析。（1-5ng）



2009年3月

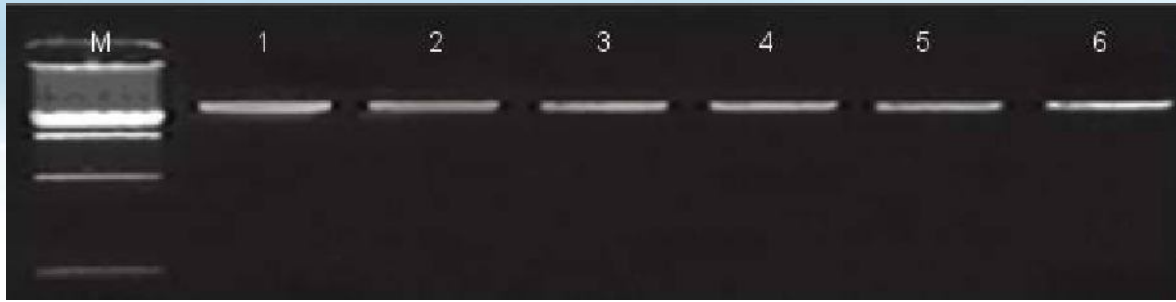
上海交通大学医学院



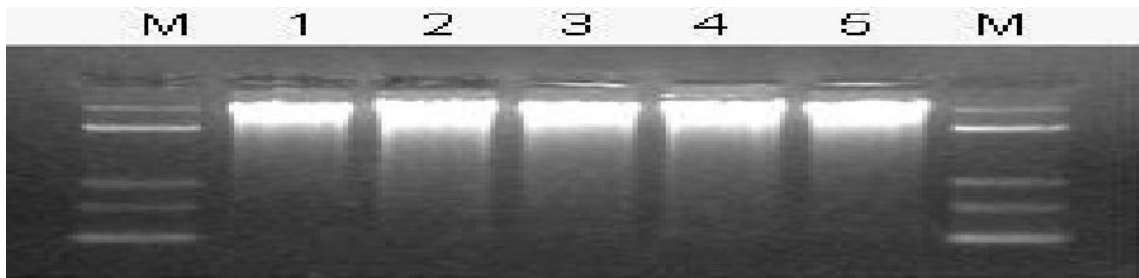
EB与DNA的结合

2009年3月

上海交通大学医学院



500 μ l全血提取的基因组DNA电泳



动物组织提取基因组DNA

2009年3月

上海交通大学医学院



核酸纯度鉴定



紫外分光光度法:

在260nm和280nm处测定DNA溶液的光吸收，纯的DNA，低于此值表明制备物中留有蛋白质成份。高于此值表明有RNA的残留量。

A_{260} 与 A_{280} 之比应在1.80；纯的RNA A_{260} 与 A_{280} 之比应在2.0。

A260/A280比值是纯度检测的重要指标。

2009年3月

上海交通大学医学院



核酸完整性鉴定

凝胶电泳法:

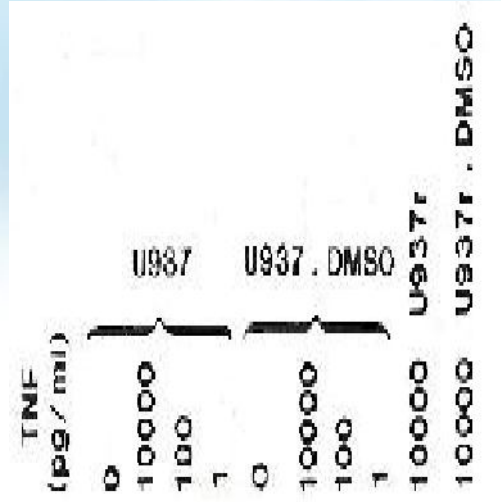
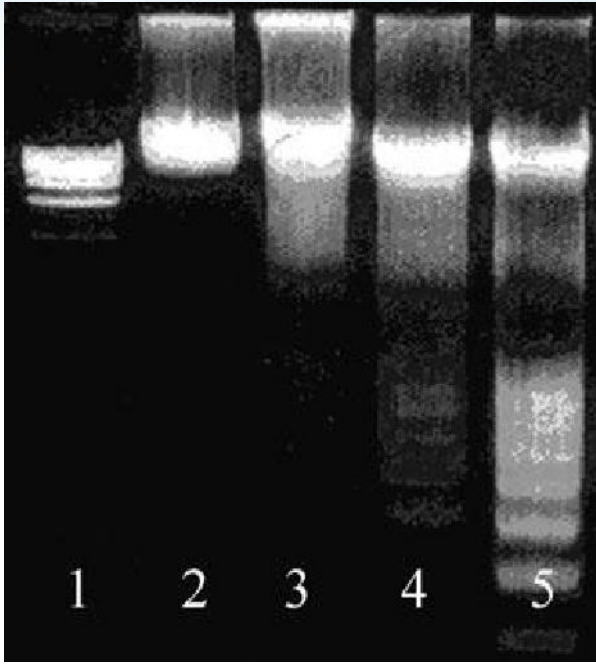
基因组DNA电泳，在电场中泳动慢，如果发生降解，可出现电泳图谱脱尾现象；

总RNA电泳，观测各条带的含量，提示是否存在RNA降解；如加样槽中存在条带，可能是DNA污染。



2009年3月

上海交通大学医学院



2009年3月

上海交通大学医学院



核酸的贮存——DNA保存

1) 短期贮存:

4℃或-20℃存放于TE (tris和EDTA) 缓冲液中。

TE缓冲液的PH与DNA 贮存有关, PH为8时, 可减少DNA脱氨反应, PH低于7.0时DNA容易变性。

2) 长期贮存:

TE缓冲液中-70℃保存数年; 在DNA溶液中加入一滴氯仿可有效防止细菌和核酸的污染。

2009年3月

上海交通大学医学院



第二部分 基因组DNA的分离与纯化

<http://www.shsmu.edu.cn/>



常见的标本：

血液、尿液、唾液、组织及培养细胞等

生物组织：

最好新鲜组织，若不能马上提取，应贮存

— -70°C 或液氮



2009年3月

上海交通大学医学院



DNA提取

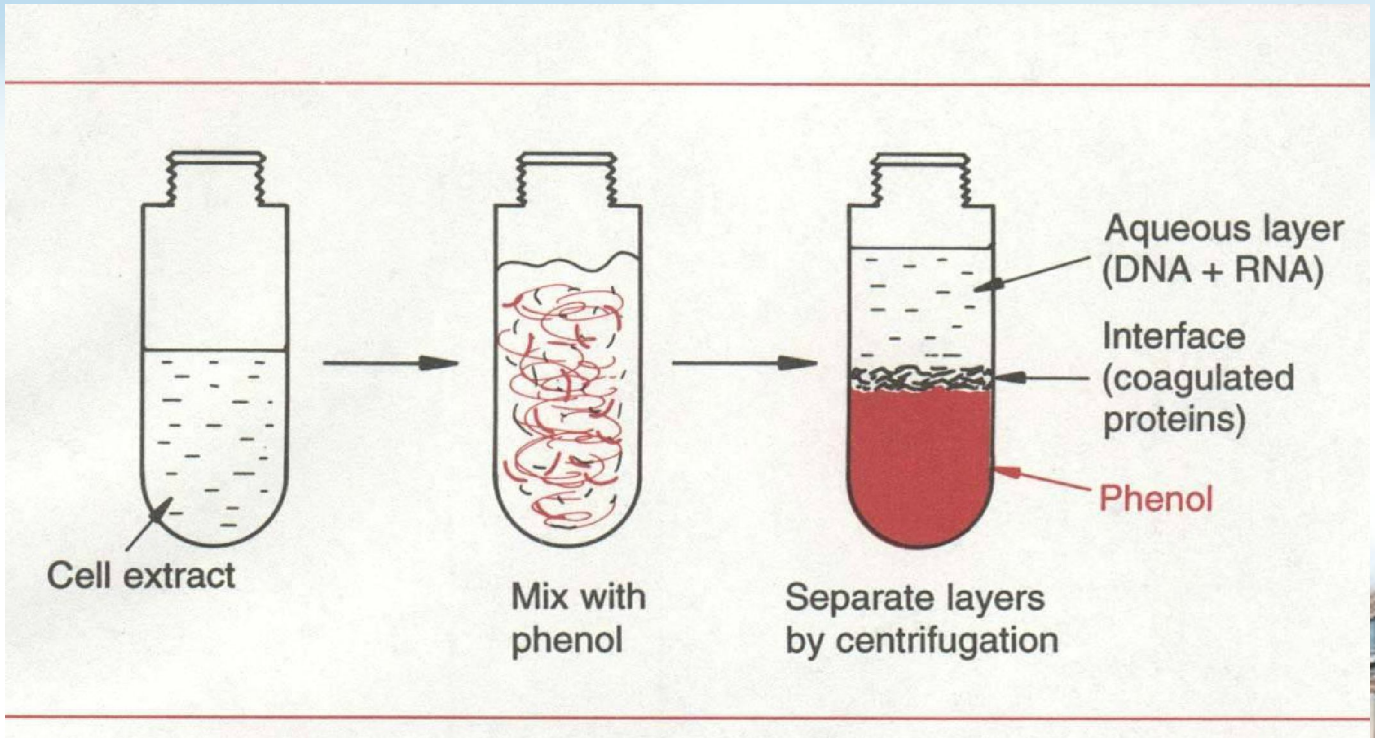
(一) 酚抽提法:

先用EDTA、 SDS 、蛋白酶K破碎细胞，消化蛋白，然后用pH8的Tris饱和酚或酚-氯仿抽提DNA，最后乙醇或异丙醇进行沉淀。获DNA大小为100—150kb。



2009年3月

上海交通大学医学院



DNA酚抽提法示意图

2009年3月

上海交通大学医学院



主要试剂的作用:

- EDTA: 1 二价金属螯合剂, 抑制核酸酶;
- 2 降低细胞膜的稳定性



2009年3月

上海交通大学医学院



SDS的作用:

- 1 溶解膜蛋白和脂肪，从而是细胞膜破裂
- 2 溶解核膜和核小体，使其解聚，将核酸释放出来
- 3 对RNA、DNA酶有抑制作用
- 4 与蛋白质形成R-O-SO₃ R蛋白质复合物，使蛋白质变性

2009年3月

上海交通大学医学院





蛋白酶K:

- ❖ 水解蛋白质的作用，消化DNA酶和细胞中的蛋白质
- ❖ 蛋白酶K与其他蛋白酶相比，它具有更强的水解能力，而且在SDS、EDTA存在时仍保持较高活性，可同时使用



2009年3月

上海交通大学医学院



苯酚的特点:

- ❖ 蛋白质强变性剂、抑制DNA酶活性
- ❖ 苯酚溶于有机溶剂，微溶于水
- ❖ 提取DNA前苯酚用Tris-HCl饱和，防止吸收过多DNA，降低DNA的损失率
- ❖ 氧化苯酚会破坏DNA



2009年3月

上海交通大学医学院



苯酚在空气中经常被氧化生成醌，它能够产生自由基，直接用于DNA分离，会使磷酸二酯键断裂，造成DNA降解。

氧化苯酚需要经过高温重蒸以除去氧化物，并用Tris-HCl饱和酚，并调节至中性。



2009年3月

上海交通大学医学院



- ❖ PH8.0的Tris溶液可以似的抽提出的DNA进入水相，减少在蛋白质层滞留。
- ❖ 在酚或酚-氯仿中加入少许的异戊醇，是可以减少实验中的气泡的产生，而且利于分相，保持分相的稳定性。



2009年3月

上海交通大学医学院



核酸沉淀

1) 无水乙醇沉淀

沉淀前往往加入**NaCl**等盐离子，作用是中和核酸分子表面的负电荷，有助于分子之间的聚集。

无水乙醇可以吸收分子之间的水，使**DNA**沉淀析出，无水乙醇使用前冰冻，可以减少**DNA**沉淀析出过程释放热量对**DNA**的损伤。

2) 异丙醇沉淀

除了使**DNA**沉淀外，还可以溶解少量的小的**RNA**分子

2009年3月

上海交通大学医学院



(二) 甲酰胺解聚法:

- ❖ 破碎细胞同上，然后用高浓度甲酰胺解聚蛋白质与DNA的结合，再透析获得DNA。高浓度甲酰胺可以裂解蛋白质与DNA的复合物，可以使蛋白质变性。减少了酚多次抽提的步骤
- ❖ 甲酰胺解聚法适用于从标本中制备高分子量的DNA样品。可得DNA 200kb左右。



2009年3月

上海交通大学医学院



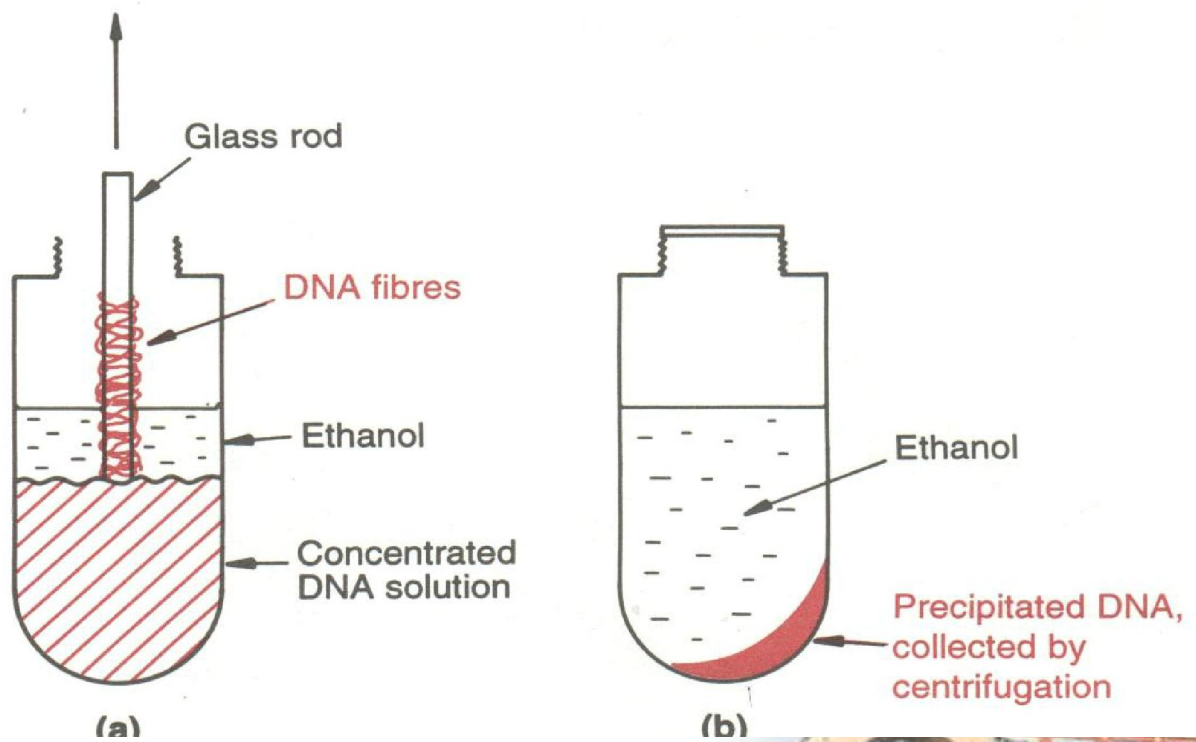
(三) 玻璃棒缠绕法:

- ❖ 用盐酸胍裂解细胞，将裂解物铺于乙醇上，然后用带钩或U型玻璃棒在界面轻搅，DNA沉淀液绕于玻棒。生成DNA约80kb



2009年3月

上海交通大学医学院



DNA玻璃棒缠绕法示意图

2009年3月

上海交通大学医学院

Extracting DNA Glop from Wheat Germ

Extract

DNA

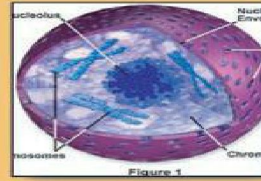
Extract



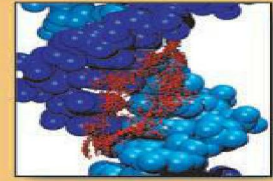
Wheat



Cells



Nucleus



DNA

1. Take a tube with one gram of wheat germ. Find the 20 mark on the tube.

2. Pour water into the tube up to the 20 mark on the tube.



3. Shake the tube for three minutes.



4. Add one soap tube into the big tube.



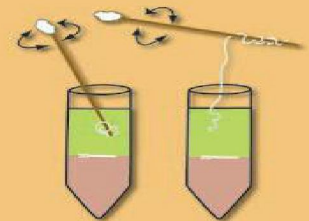
5. Gently rock the tube for three minutes. Try not to make any bubbles.



6. With the tube at an angle, gently pour alcohol into the tube up to the 35 line. Do not shake!!!!



7. Do you see some white glop in the top layer? Take a swab and try to remove the glop with the wooden end.



8. Put some glop into a clear tube. You may keep the tube as a souvenir.



The glop is DNA along with some carbohydrates and protein.



(四) 表面活性剂快速制备法：用Triton X-100或NP40表面活性剂破碎细胞，然后用蛋白酶K或酚去除蛋白，乙醇沉淀或透析。



2009年3月

上海交通大学医学院



- 1、固体聚乙二醇（PEG）浓缩：用透析袋 外敷PEG
至合适量
- 2、丁醇抽提浓缩：DNA溶液中水可分配到正丁醇或仲丁醇，但DNA不会。因此重复几次可显著减少DNA体积



2009年3月

上海交通大学医学院



主要是从电泳中分离回收DNA片段

回收原则： 尽量提高回收率

去除回收DNA样品中的污染物



2009年3月

上海交通大学医学院



➤ (一) 从琼脂糖凝胶中回收DNA片段

➤ (二) 从聚丙烯酰胺凝胶回收DNA片段



2009年3月

上海交通大学医学院



(一) 从琼脂糖凝胶中回收DNA片段

1. 二乙基氨基乙基-纤维素膜插片电泳法
2. 电泳洗脱法
3. 冷冻挤压法
4. 低熔点琼脂糖凝胶挖块回收法



2009年3月

上海交通大学医学院



电泳到DEAE-纤维素膜：

DEAE是一种阴离子交换纤维素，可以吸附带有负电荷的DNA分子

在所需条带前插入DEAE-纤维素膜，继续电泳至条带DNA都到膜上，取出洗下

500bp-5kb的DNA片段回收率较好，纯度高。但不适用于分子量超过10kb和单链DNA



2009年3月

上海交通大学医学院



透析袋电洗脱：

**切下条带的琼脂糖凝胶，放透析袋内，加缓冲液
后继续电泳，DNA出胶后进行抽提DNA回收。**



2009年3月

上海交通大学医学院



低熔点琼脂糖凝胶：

切下胶，加热到65℃融化胶，然后抽提回收

DNA。

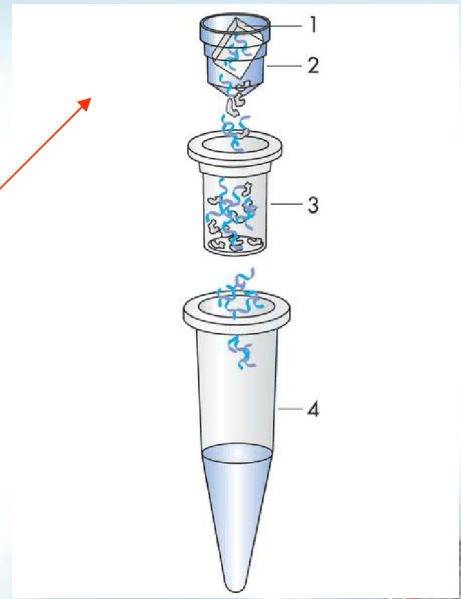
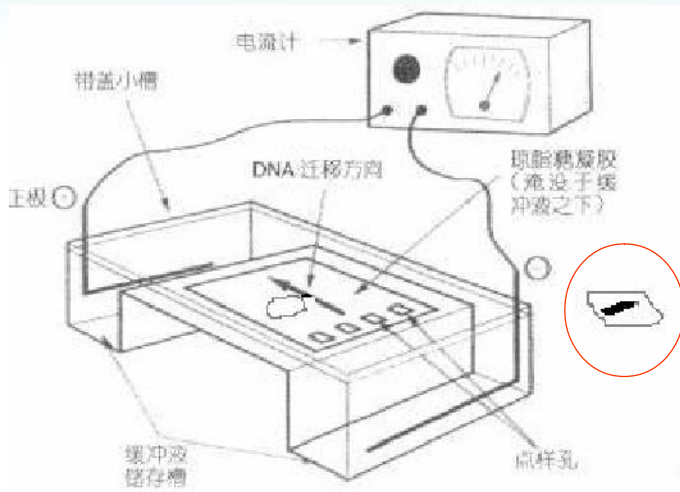
方法：有机溶剂提取法、玻璃珠洗脱法和琼脂

水解酶等。

2009年3月

上海交通大学医学院





2009年3月

上海交通大学医学院





**琼脂水解酶：将含DNA的凝胶进行消化，琼脂糖水
解成二糖，释放DNA，后使用酚抽提方法回收
DNA**



2009年3月

上海交通大学医学院



QIAquick: DNA size vs. recovery

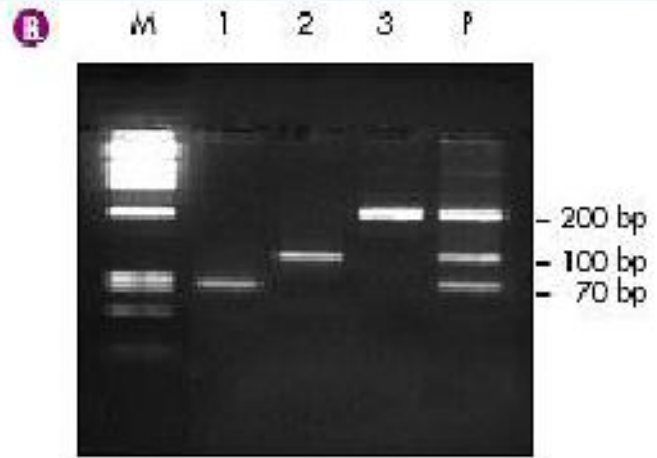
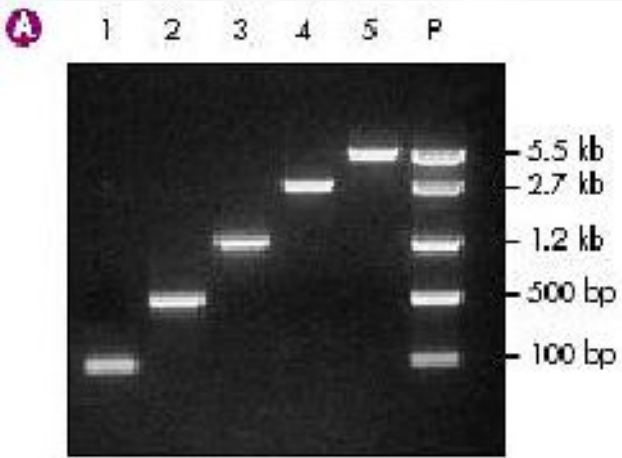
Kit	DNA fragment size	Recovery
QIAquick Gel Extraction Kit	70 bp	70%
	100 bp	80%
	500 bp	80%
	1.2 kb	75%
	2.7 kb	75%
	5.5 kb	75%
	10.5 kb	60%

QIAquick Gel Extraction Kit: quantity of input DNA vs. recovery

Quantity of input DNA	Recovery
10 ng	50%
20 ng	55%
50 ng	60%
100 ng	70%
500 ng	75%
1 µg	80%
5 µg	80%
10 µg	70%

2009年3月

上海交通大学医学院



2009年3月

上海交通大学医学院



(二) 从聚丙烯酰胺凝胶回收DNA片段

聚丙烯酰胺凝胶中回收DNA的标准方法是压碎与浸泡法。虽费时但操作简单，是小片段DNA回收的较好方法。



2009年3月

上海交通大学医学院



❖ 至今尚无一种方法既能有效回收DNA大片段或微量的DNA片段，又能同时回收几种DNA片段并有效清除凝胶中酶促反应抑制剂。

2009年3月

上海交通大学医学院



核酸提取可能遇到的问题



❖ 基因组DNA收率较低或无基因组DNA

样本材料太少

细胞破裂不够充分，DNA释放不完全

离心力偏小

两相分离不完全... ..



2009年3月

上海交通大学医学院



❖ DNA降解的原因

样本不够新鲜，采集材料过陈旧

样本本身存在大量DNA酶

❖ 提取DNA的生物活性差的原因？

提取的基因组DNA盐浓度过高

基因组DNA中乙醇未清除净

基因组DNA中可能存在其他抑制因素

❖ 提取基因组DNA，有时加入蔗糖的原因

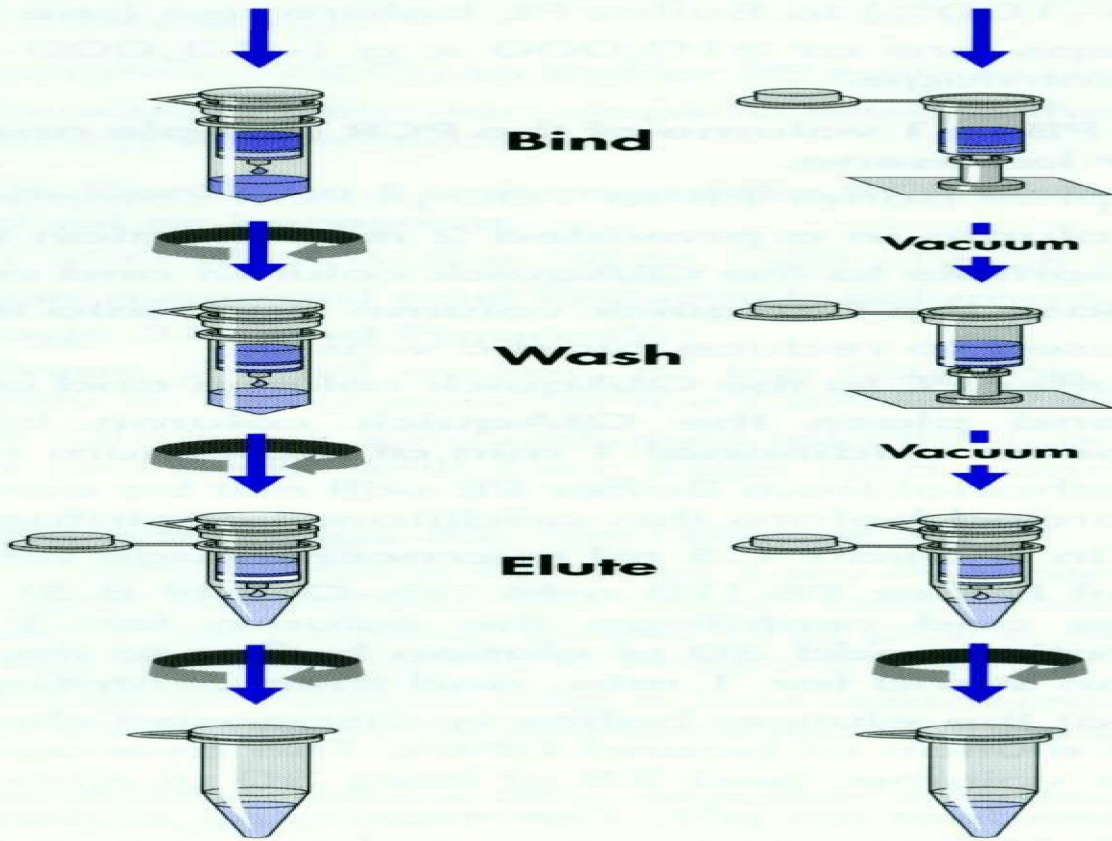
加入多糖，保护DNA长度

2009年3月

上海交通大学医学院



**PCR reaction
or
Solubilized gel slice
or
Enzymatic reaction**



Pure DNA Fragment

A wide-angle photograph of a modern university campus with large, multi-story buildings and green spaces. The text '质粒 DNA 制备' and 'plasmid extraction' is overlaid in blue on the image.

质粒 DNA 制备

plasmid extraction

<http://www.shsmu.edu.cn/>



质粒简介

质粒(plasmid)是细菌内独立于染色体并能自我复制的小环状DNA分子

其大小范围从1kb至200kb以上不等。

已经在形形色色的细菌类群中发现质粒。

这些质粒都是独立于细菌染色体之外进行复制和遗传的辅助性遗传单位。

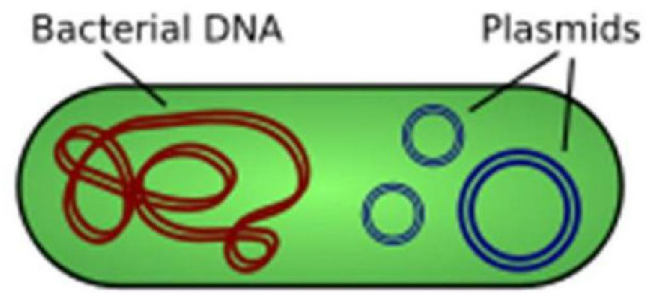
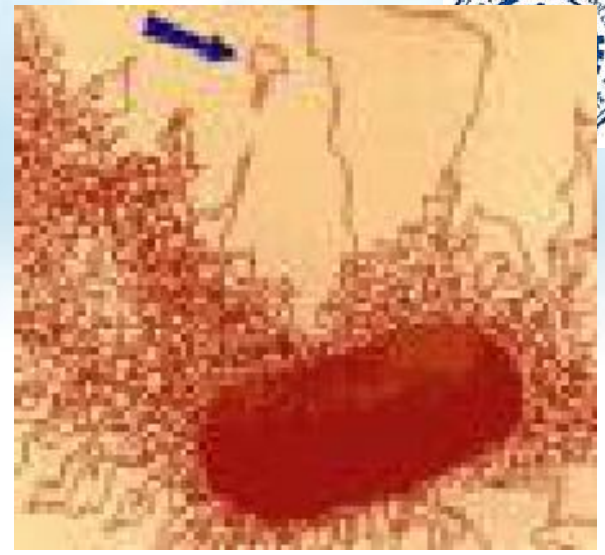
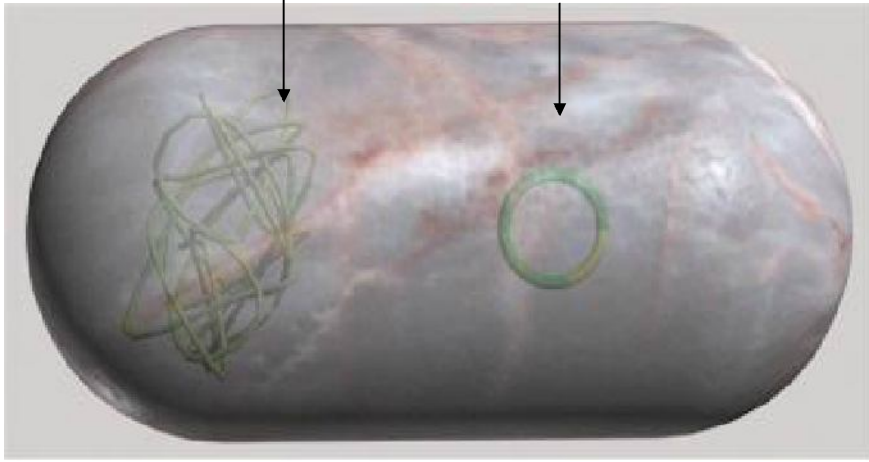


2009年3月

上海交通大学医学院

Chromosome DNA genome

Plasmid DNA



2009年3月

上海交通大学医学院



质粒是携带外源基因进入细菌中扩增或表达的重要媒介物，这种基因运载工具在基因工程中具有极广泛的应用价值，而质粒的分离与提取则是最常用、最基本的实验技术。



2009年3月

上海交通大学医学院



质粒特性

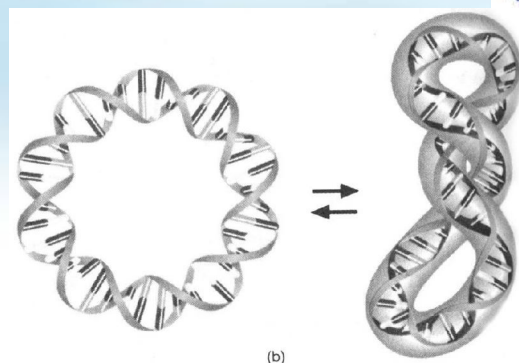
1. 分子相对小
2. 含有高效的自主复制成分
3. 不相容性(incompatibility)
4. 转移性
5. 选择的标记(selective markers)
6. 限制性内切酶单一切口



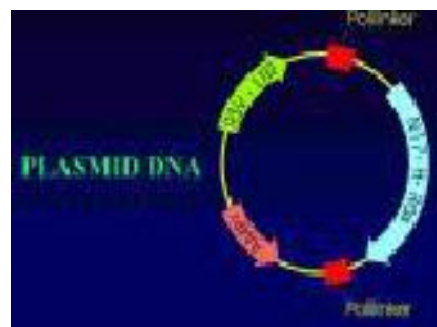
2009年3月

上海交通大学医学院

- ❖ 分子量相对较小
- ❖ 共价闭合分子
- ❖ 双链环状结构



具有更强的抗切割和抗变性能力

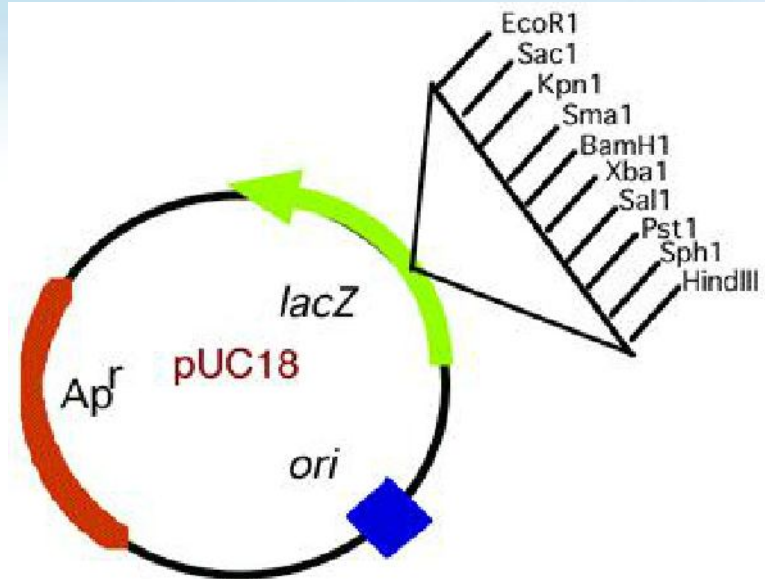
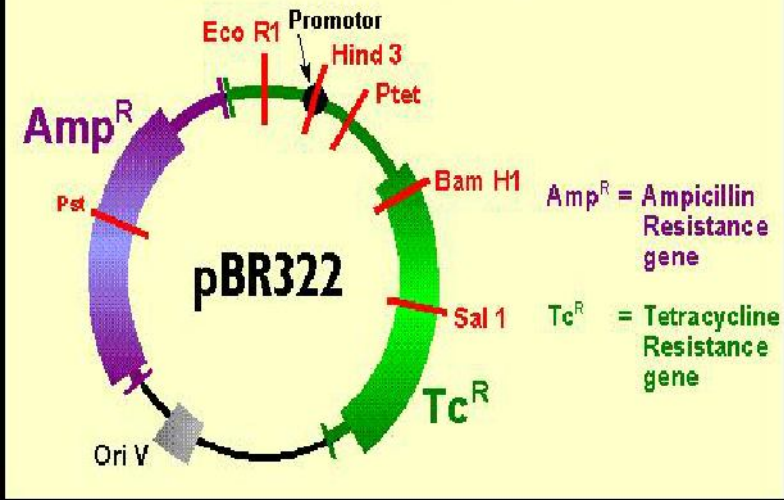


超螺旋DNA分子 > 线性DNA分子 > 半开环DNA分子

2009年3月

上海交通大学医学院

Cloning Vector - pBR322



Plasmid vectors

2009年3月

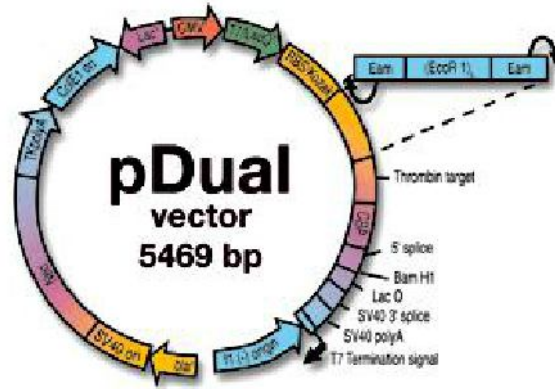
上海交通大学医学院



表达载体



载体含有**tac**启动子、**Lac**操纵基因、**SD**序列、**Lac I**阻遏蛋白基因等



Expression vector

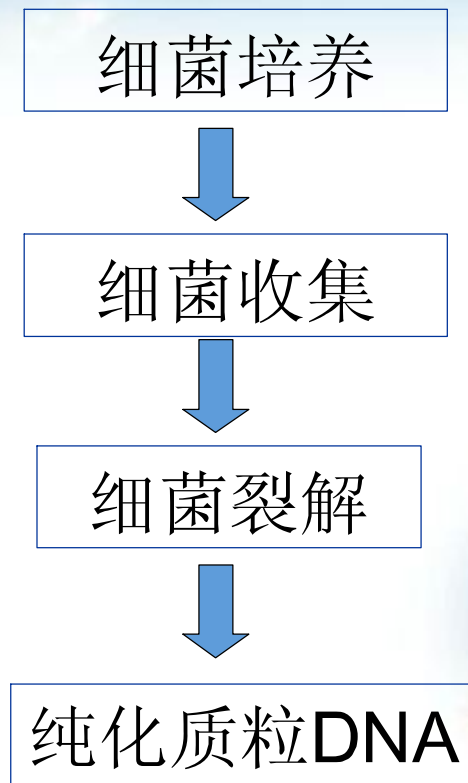


2009年3月

上海交通大学医学院



质粒DNA的提取和纯化



2009年3月

上海交通大学医学院



一、细菌的培养 (bacterial culture)

- 1 先分离单个菌落，接种到含少量适当抗生素的培养基中扩增，随着细菌的生长，质粒DNA也在自主复制。



2009年3月

上海交通大学医学院



对于松弛型质粒，由于它的复制在一定程度上不受到宿主细胞的控制，故在细菌对数生长后期，加入氯霉素（chloromycetin）抑制宿主蛋白质的合成和染色体DNA的复制。质粒DNA的复制不受影响而大量扩增

2009年3月

上海交通大学医学院





- 所以使用氯霉素的主要目的，是在不降低质粒产量的前提下，减少细菌的培养体积和细菌的数量。

有时质粒在细菌中的扩增状况很差，常是由于质粒携带外源基因或质粒分子量过大所致。



2009年3月

上海交通大学医学院



❖ 细胞生长过程中，排出大量代谢产物，为了提高质粒DNA的纯度，离心弃上清，细菌沉淀最好用STE或生理盐水悬浮，漂洗1-2次，离心管壁上的液体也应该仔细去除干净。



2009年3月

上海交通大学医学院



❖ 细胞的裂解方法很多，如去污剂法，沸水热裂法、碱变性法，有机溶剂法和溶菌酶法等。不同方法各有利弊，一般要根据质粒性质、宿主菌的特性及后继的纯化方法等多种因素综合后加以选择。

2009年3月

上海交通大学医学院





❖ 碱裂解法 (Alkaline)

❖ 煮沸裂解法

❖ **SDS**裂解法

❖ 其他

2009年3月

上海交通大学医学院





- 常用的煮沸法，碱法，SDS法均可获得较满意效果。至于有人采用碱法提取少量细菌培养物的质粒，用煮沸法或SDS法进行质粒DNA的大量分离，只是各个实验室的习惯问题。



2009年3月

上海交通大学医学院



●选择哪种方法制备质粒DNA，应考虑以下因素：

1. 菌株类型 (type)
2. 质粒的大小 (size)
3. 细菌染色体DNA变性条件强弱的控制 (denaturation condition)

质粒DNA的小量制备 **2-5ml**
质粒DNA的大量制备 **500ml**

Mini	20 μ g
Midi	100 μ g
Maxi	500 μ g

2009年3月

上海交通大学医学院



❖ 大质粒 (>15kb) 的处理方法:

采用温和处理方法, 使用蔗糖、溶菌酶、**EDTA**, 后再使用**SDS**裂解, 使**plasmid**损伤减少

❖ 小质粒 (<15kb) 的处理方法:

无需特殊处理, 碱裂解方法等均可使用



2009年3月

上海交通大学医学院

细菌的裂解和质粒DNA的提取

(bacterial and plasmid extraction)



(一) 碱裂解法(Alkaline)

- ❖ 在NaOH存在的强碱性 (pH12.0—12.6) 条件下，用SDS破坏细胞壁和裂解细胞，并使细胞的蛋白质与DNA发生变性，释放出质粒DNA



2009年3月

上海交通大学医学院

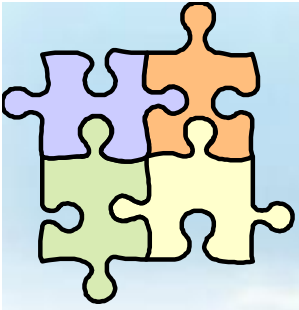


- ❖ 细胞被裂解后，细胞壁、膜的碎片、变性的蛋白质和染色体DNA形成大的复合物
- ❖ 当pH调至中性，质粒DNA重新恢复天然的超螺旋
- ❖ 在高盐条件下沉淀，经离心分离，质粒DNA保留在上清液中



2009年3月

上海交通大学医学院



在pH12.0-12.6碱性环境中，线性的大分子量细菌染色体DNA变性，而共价闭环(CC)质粒DNA仍为自然状态。



2009年3月

上海交通大学医学院



B 将pH调至中性并有高盐浓度存在的条件下，染色体DNA之间交联形成不溶性网状结构。大部分DNA和蛋白质在去污剂SDS的作用下形成沉淀，而CC质粒DNA仍然为可溶状态。

2009年3月

上海交通大学医学院



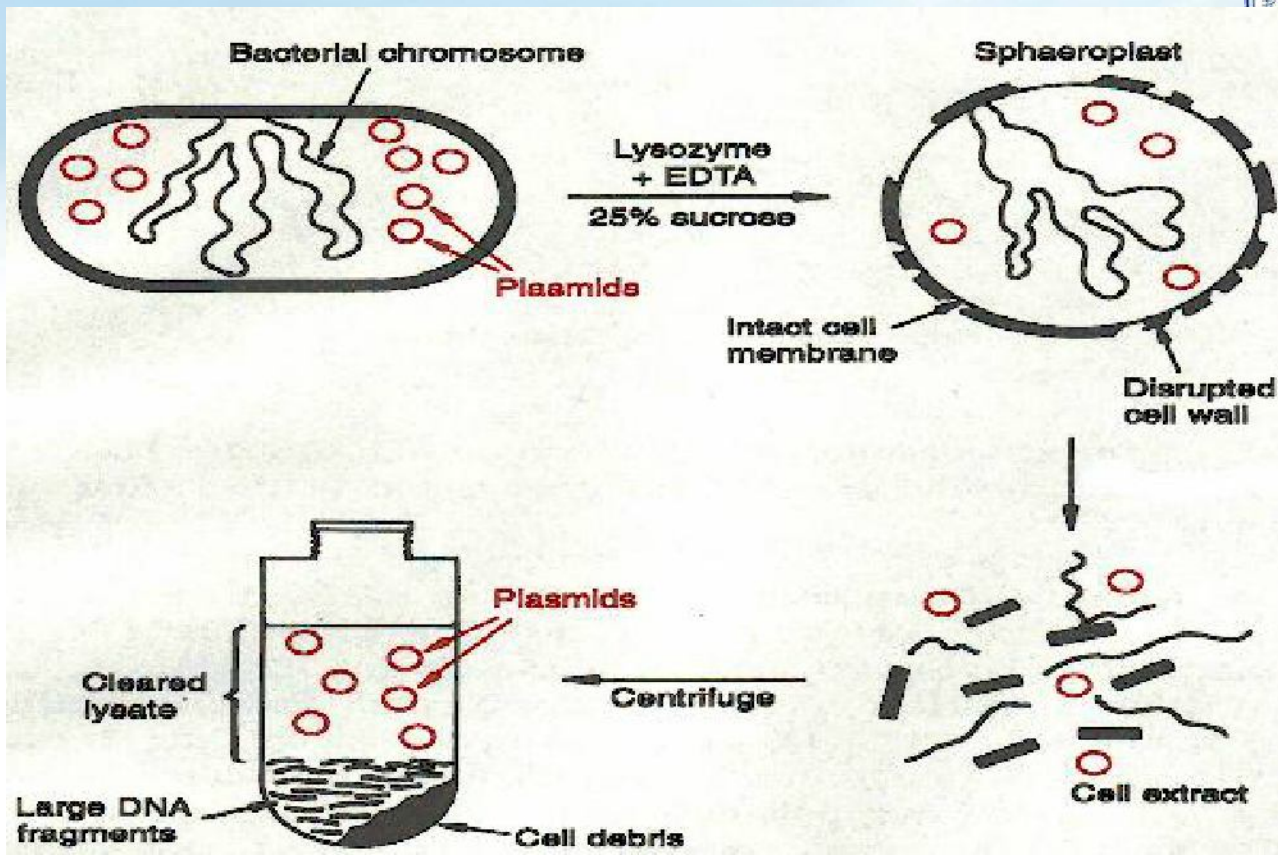


C、通过离心，可去除大部分细胞碎片染色体DNA、RNA及蛋白质，质粒DNA尚在上清中，再用酚、氯仿抽提进一步纯化质粒DNA。



2009年3月

上海交通大学医学院



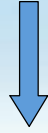
碱裂解法示意图

2009年3月

上海交通大学医学院



1~4ml培养细菌收集



细菌破裂溶解

Solution I

染色体基因组和蛋白质变性、质粒变性

Solution II

变性的细菌基因组形成网状、蛋白质变性、质粒复性

Solution III



分离、纯化质粒DNA



2009年3月

上海交通大学医学院



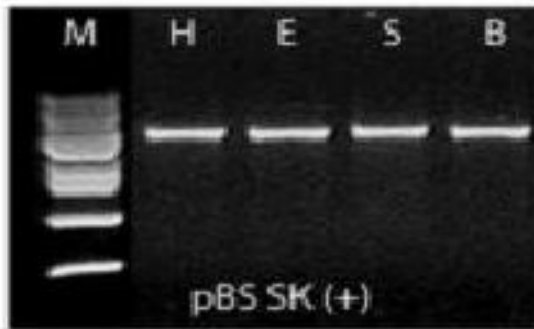
碱裂解法提取质粒的试剂及主要成分： (main reagents and components)

- ❖ **Solution I: Tris-HCl; EDTA; glucose**
- ❖ **Solution II: NaOH; SDS**
- ❖ **Solution III: CH₃COOH**

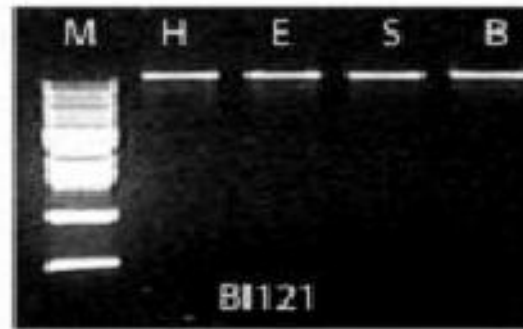
2009年3月

上海交通大学医学院





M: 1 kb DNA Ladder (D-1040)
Lane H: Plasmid digested with Hind III
Lane E: Plasmid digested with EcoR I



Lane S: Plasmid digested with Sma I
Lane B: Plasmid digested with BamH I



2009年3月

上海交通大学医学院



碱裂解提取质粒可能存在的问题

❖ 少量纯化质粒是，多少菌液比较合适？

2ml细菌可获得10~15 μ g质粒

❖ 加入**Solution II** 后溶液应该澄清，如出现浑浊可能存在的情况？

菌体量过大

菌液与**Solution I**混合不充分



2009年3月

上海交通大学医学院



❖ 在热或碱的条件下时间过长会导致什么结果？

质粒的超螺旋结构不可逆变性

如：环状DNA不能被限制酶酶切

迁移速率在凝胶中是超螺旋近2倍

Br 染色较弱等



2009年3月

上海交通大学医学院



❖ 将细菌悬浮于含 **TritonX-100** 和 **溶菌酶** 的缓冲液中，TritonX-100 和溶菌酶能破坏细胞壁，再用沸水浴裂解细胞，并使宿主细胞的蛋白质与DNA变性。

2009年3月

上海交通大学医学院





- ❖ 质粒DNA因结构紧密不会解链，当温度下降后，可重新恢复其天然超螺旋结构
- ❖ 通过离心去除变性的蛋白质和染色体DNA，然后回收上清液中的质粒DNA

2009年3月

上海交通大学医学院





❖ 煮沸裂解法比较剧烈，只用于提取小质粒。对于会释放出大量糖类的菌株不适宜。如HB101及衍生菌。

2009年3月

上海交通大学医学院





❖ 将细菌悬浮于等渗的蔗糖溶液中，用溶菌酶和 EDTA 处理以破坏细胞壁，再用 SDS 裂解去壁细胞，从而温和地释放质粒到等渗液中，然后酚/氯仿抽提，乙醇沉淀、洗涤质粒 DNA。

2009年3月

上海交通大学医学院



❖ 由于条件温和，该法特别适用于大质粒DNA (>15kb) 的提取。但有一部分质粒DNA会与细胞碎片缠绕在一起而丢失，故产率不高。



2009年3月

上海交通大学医学院



1、 小量一步提取法

2、 牙签少量制备法



2009年3月

上海交通大学医学院



1、 小量一步提取法

直接将酚/氯仿与细菌培养物混合，然后离心去除大部分蛋白质和染色体DNA，最后从上清液中回收质粒DNA。本法简单快捷、成本低，提取的质粒可用于限制性内切酶图谱分析。



2009年3月

上海交通大学医学院



(二) 牙签少量制备法

用牙签直接挑取生长在琼脂平板上的细菌菌落制备质粒DNA。

由于制备的质粒DNA有较多污染，不能用于分子克隆中的酶学反应，但可用于质粒的鉴定。



2009年3月

上海交通大学医学院

质粒DNA的纯化



1. CsCl-EB法
2. 聚乙二醇沉淀法
3. 柱层析法



2009年3月

上海交通大学医学院



EB—CsCl密度梯度离心法

- ❖ EB插入相邻的碱基之间，降低了DNA的浮力密度，但超螺旋的DNA结合EB浮力密度降低较小，仅有 $0.085\text{g}/\text{cm}^3$ 。
- ❖ CsCl可以用丁醇抽提，透析除去。纯度可达100%。

2009年3月

上海交通大学医学院



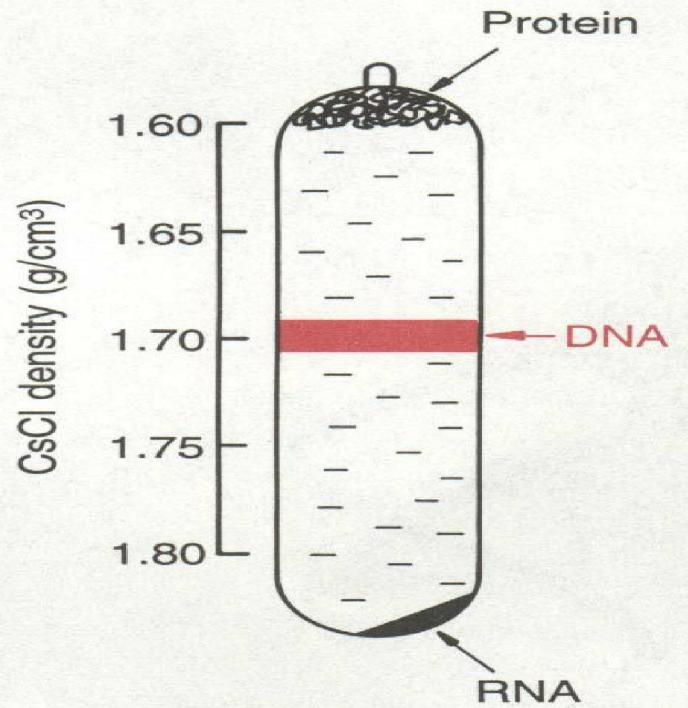
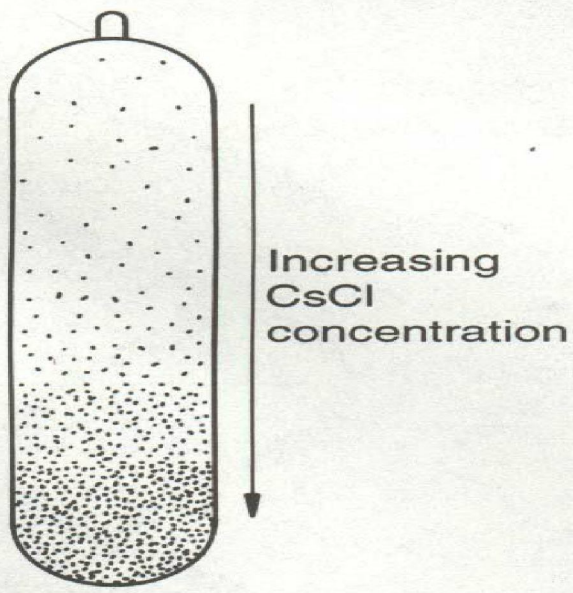


超速离心将介质CsCl形成一连续的密度梯度，在过量EB存在下，蛋白质的密度最小位于最上层；RNA密度最大沉于管底；DNA位于中间，由于不同结构的DNA与EB结合度不一致，因此密度下降不一致，故将线性、开环、闭环的DNA区分开。



2009年3月

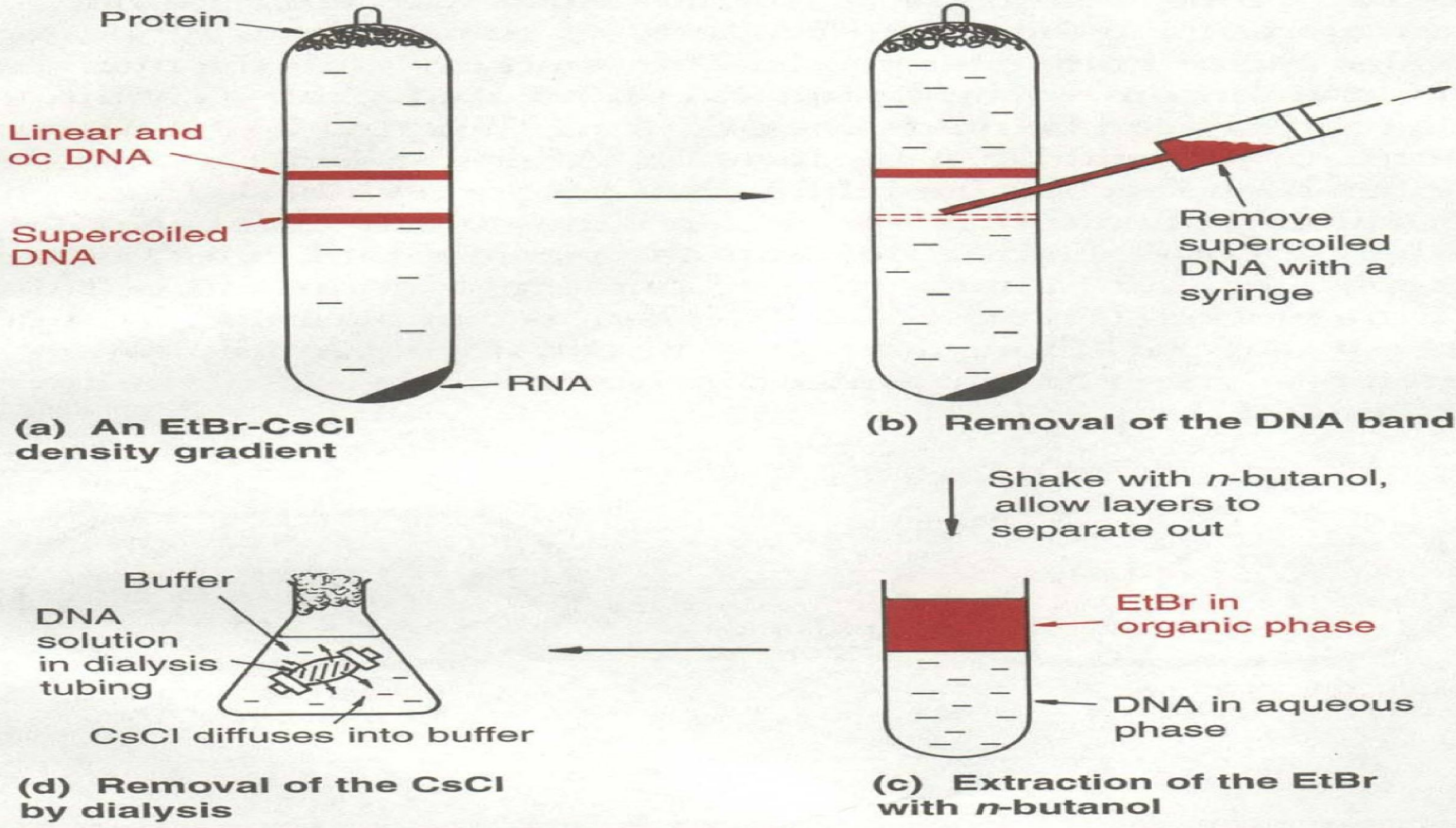
上海交通大学医学院



EB—CsCl密度梯度离心法示意图

2009年3月

上海交通大学医学院



2009年3月

上海交通大学医学院



- 转基因动物，真核细胞转染及DNA外切酶酶切缺失等实验，对闭合环状双链DNA的要求较高，一般还是用超速离心法纯化质粒。

对于DNA片段酶切回收，内切酶图谱分析、细菌转化、亚克隆及探针放射性标记等实验，直接用少量或中量提取的DNA样品，并不需要超速离心纯化，一般可满足实验要求。



2009年3月

上海交通大学医学院



2 聚乙二醇沉淀法

分级沉淀，首先利用LiCl沉淀大分子RNA，用Rnase酶消化小分子RNA；在利用乙二醇选择性沉淀大质粒DNA，再利用酚-氯仿抽提。

方法简单实用，但是不能区分环状或开链质粒DNA



2009年3月

上海交通大学医学院

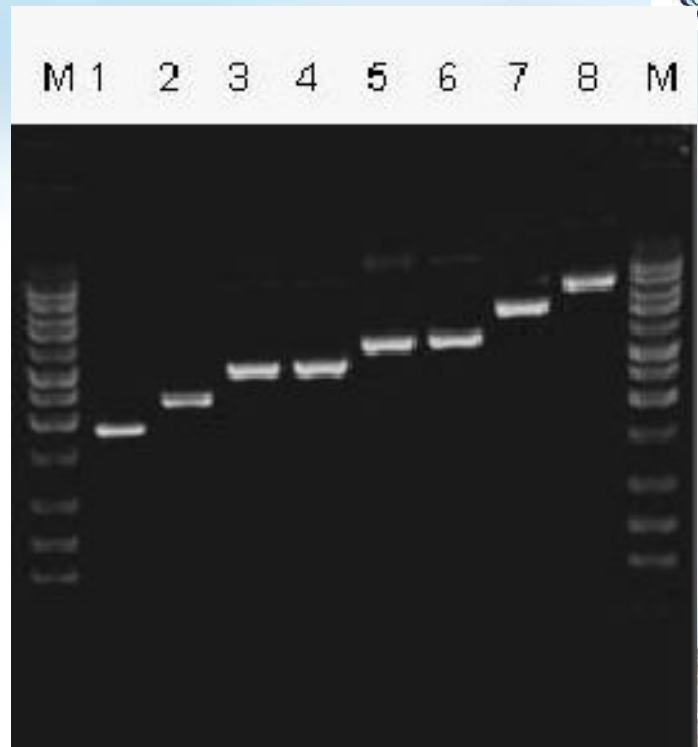
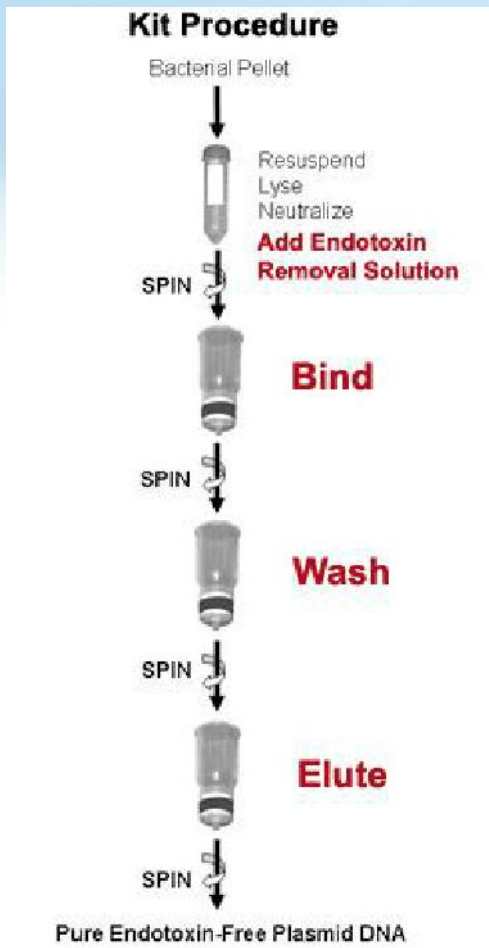


- ❖ 以硅基质作为填充层析柱的树脂，在多盐的条件下，DNA与硅基质可逆性的结合进行纯化。
- ❖ 多盐造成磷酸二酯骨架脱水，通过暴露的磷酸盐残基与硅基质结合，然后用50%的乙醇洗去RNA和糖类物质，再加入TE或水，离心洗脱。

2009年3月

上海交通大学医学院





2009年3月

上海交通大学医学院



RNA的分离与纯化

RNA isolation and purification

<http://www.shsmu.edu.cn/>

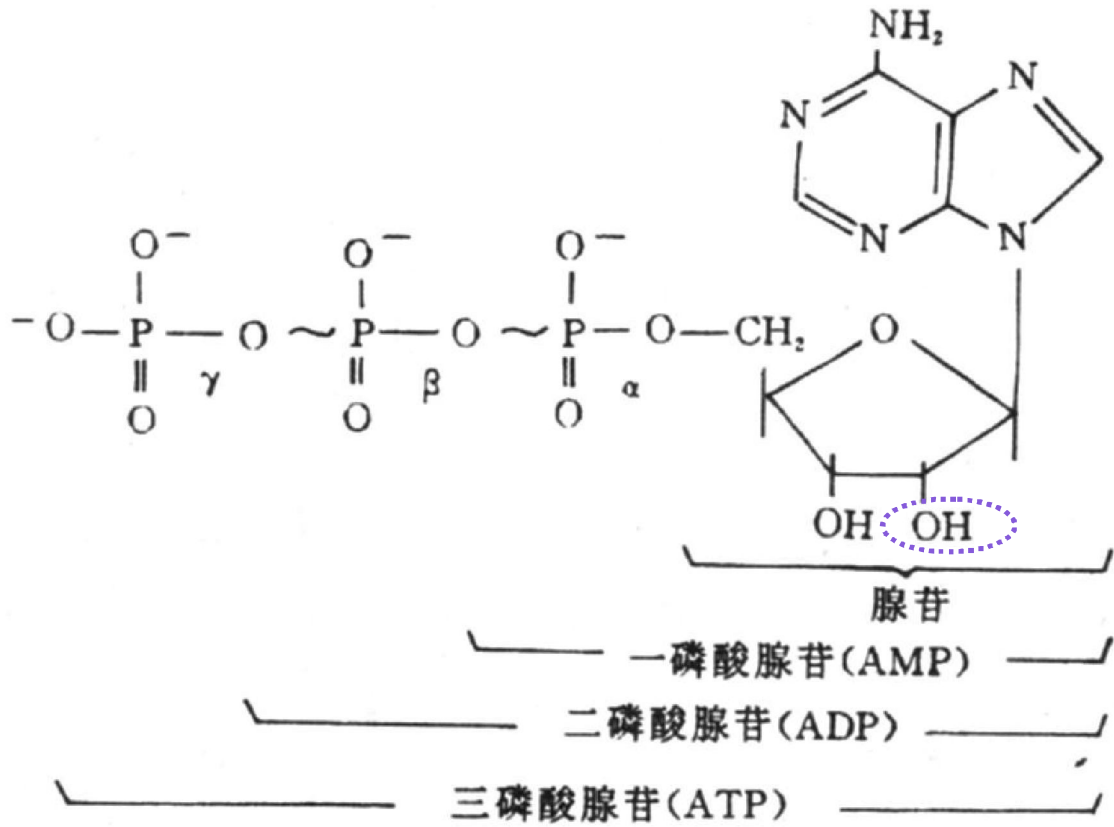


图 3-5 核苷酸的磷酸连接



每个细胞的RNA量约为 10^{-5} μ g

80%-85% rRNA

10%-15% tRNA

1%-5% mRNA

其他RNA: hnRNA、snRNA、snoRNA...



2009年3月

上海交通大学医学院



组织材料	起始样品量	Total RNA提取量
blood	1ml	15~20 μ g
leucocytes	1×10^7 个	约100 μ g
Liver tissue	1g	约5000 μ g
Culture cells	1×10^7 个	约100 μ g
Renal tissue	1g	约3000 μ g
Skeleton tissue	1g	约1500 μ g
Cerebral tissue	1g	约1500 μ g

2009年3月

上海交通大学医学院



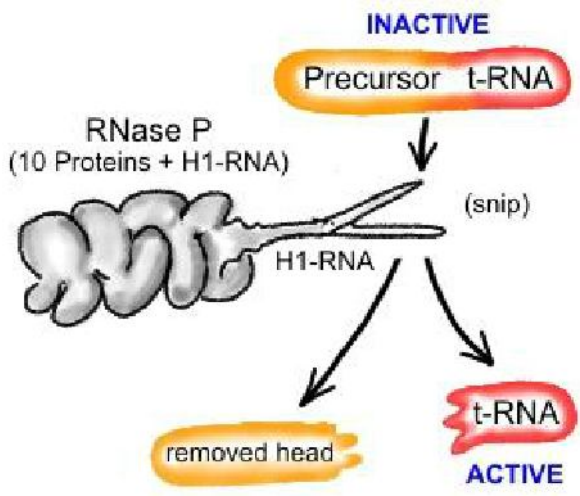
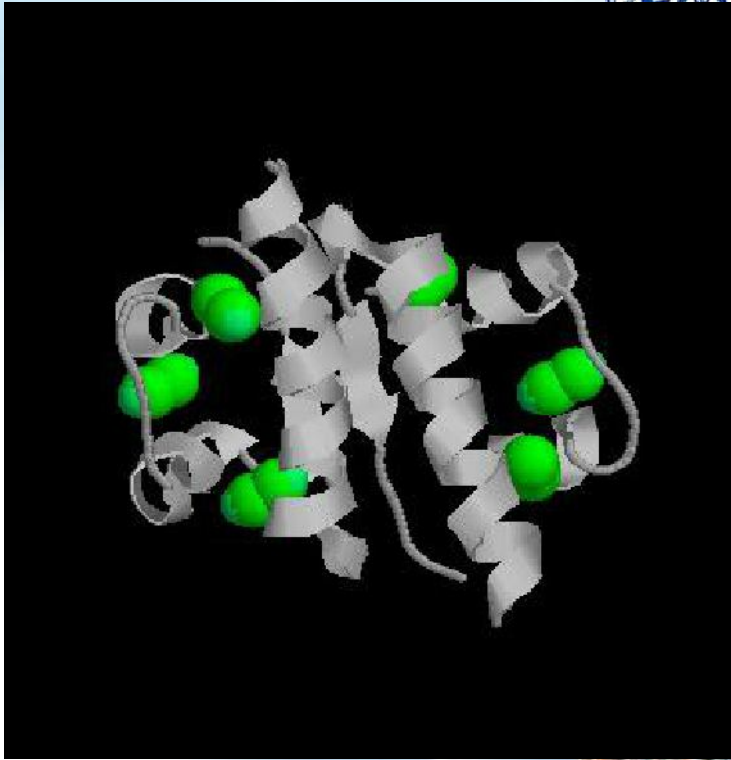
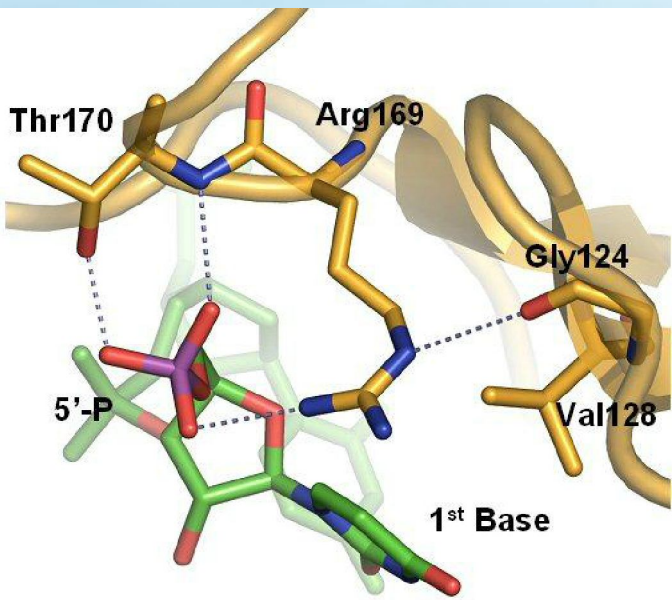
一、关于RNase酶

- ❖ RNA易被RNase水解，RNase除胞内还广泛存在于人的皮肤、唾液、汗液及周围的环境中
- ❖ RNase具有水解核糖残基和磷酸二酯键
- ❖ RNase分子结构中的二硫键使其生物学活性非常稳定，去除变性剂后，RNase的活性又可恢复。
- ❖ RNase不需要二价阳离子激活



2009年3月

上海交通大学医学院



上海交通大学医学院



1. 内源性RNA酶 (intrinsic RNase)

- ❖ 去除RNase的污染及强有力地抑制其活性是RNA制备成功与否的关键。
- ❖ 必须在总RNA提取分离的**最初阶段**，尽可能地灭活胞内RNase的活性。



2009年3月

上海交通大学医学院



2.外源性RNA酶(extrinsic RNase)

主要来源:

❖ 被污染的缓冲液

细菌或微生物污染，高压不能去除RNA酶，
必须丢弃

❖ 自动移液装置



2009年3月

上海交通大学医学院



3.实验室采取避免**RNA**酶污染的措施

- ❖ 设置专门**RNA**移液装置
- ❖ 小份保存缓冲液
- ❖ 设置专门的**RNA**电泳装置
- ❖ 准备溶液或缓冲液时，使用无**RNA**酶的器皿、**DEPC**处理水等
- ❖ 分离**RNA**过程中使用**RNA**酶抑制剂

2009年3月

上海交通大学医学院





二、RNA酶抑制剂和变性剂

1. 变性剂(denaturant)

- ❖ 选择性地使用RNase的变性剂（如酚、氯仿及强烈的胍类变性剂）
- ❖ 使用蛋白酶K(proteinase K)
- ❖ 使用阴离子去污剂如SDS、十二烷基肌氨酸钠或脱氧胆酸钠



2009年3月

上海交通大学医学院



- ❖ 胍类变性剂(carbamidine): 胍盐是破坏蛋白质三维结构的离液剂。
- ❖ 蛋白质变性剂中作用最强的是异硫氰酸胍和盐酸胍，使蛋白质转换成随机卷曲状态。
- ❖ 盐酸胍抑制**RNA**酶作用强，变性作用较异硫氰酸胍弱。异硫氰酸胍自身可形成氢键，在还原剂存在下断裂氢键。

2009年3月

上海交通大学医学院



2. RNA酶抑制剂 (RNase inhibitor)

- ❖ 联合使用RNase的特异抑制剂（如RNasin与DEPC等）能极大地防止内源性RNase对RNA的降解。



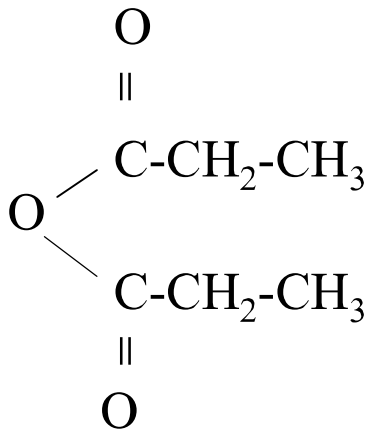
2009年3月

上海交通大学医学院



(1) DEPC (焦碳酸二乙酯)

- ❖ 高度活化的烷基化试剂，破坏RNA酶活性。用来灭活缓冲液或器皿中的RNA酶。



DEPC水制备：0.1%DEPC
在37° C处理1h，并高压
灭菌15min。

玻璃制品和塑料制品应浸
泡在0.1%的DEPC水溶液
中，37° C处理1h或室温
下过夜。

DEPC非选择性的修饰蛋白质和RNA，且与一些缓冲液不相容，故在分离和纯化RNA的过程中不使用DEPC。



(2) RNA酶的蛋白抑制剂

- ❖ 许多RNA酶可以与该类蛋白质结合形成非共价复合物从而是RNA酶失活。
- ❖ RNA酶蛋白抑制剂与靶蛋白的亲合力大。
- ❖ 商品化的RNA酶蛋白抑制剂的名称各异（如RNAsin等）。



2009年3月

上海交通大学医学院



3. 还原剂

- ❖ 加入 β -巯基乙醇、二硫苏糖醇 (DTT) 等还原剂可以还原RNase中的二硫键，有利于RNase的变性、水解与灭活。



2009年3月

上海交通大学医学院



RNA提取实验前的准备

【使用器具】

尽量使用一次性塑料器皿，若使用玻璃器皿，则使用0.1%DEPC水溶液在37℃处理12h，后120℃高压30min，去除残留DEPC

【试剂配制】

无菌水须用0.1%DEPC处理后高温高压灭菌

RNA实验试剂应RNA提取专用，避免其他试剂交叉污染

【其他】

实验过程中使用一次性手套，并经常更换；在RNA专用区操作，操作过程中避免交谈... ..

2009年3月

上海交通大学医学院



三、酸性异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法

- ❖ 首先以含异硫氰酸胍、 β -巯基乙醇和十二烷基肌氨酸钠的变性溶液裂解细胞。
- ❖ 然后在pH4.0的条件下，酚/氯仿抽提细胞裂解溶液。
- ❖ 最后通过异丙醇沉淀与75%的乙醇洗涤而获得总RNA。

2009年3月

上海交通大学医学院





- ❖ 本法具有简便、快速、经济、高效及提取的RNA质量高等优点，能在3小时内迅速处理多个标本。
- ❖ 总RNA产量取决于标本的起始量，每mg组织大约能制备4~7μg总RNA，每10⁶个细胞大约为4~10μg。



2009年3月

上海交通大学医学院



四、商品化的单相裂解试剂法分RNA

- ❖ 本法是异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法的改进方案。
- ❖ 以异硫氰酸胍-酚的单相裂解液裂解细胞，再加入氯仿后形成两相。



2009年3月

上海交通大学医学院



- ❖ 变性的DNA与蛋白质介于两相的界面，可使用乙醇和异丙醇分级沉淀出来。
- ❖ 保留于上层水相的RNA，通过异丙醇沉淀与75%乙醇洗涤而制备。



2009年3月

上海交通大学医学院



四、商品化的单相裂解试剂法分RNA

- ❖ 目前，该法已成为实验室最常用的总RNA提取法，其产量及质量与前法相当。



2009年3月

上海交通大学医学院



五、mRNA的分离纯化

- ❖ 除血红蛋白及组蛋白的mRNA外，绝大多数mRNA在其3'末端带有长短不同的poly (A) 尾巴。
- ❖ 利用碱基配对原则，通过oligo (dT) -纤维素或poly (U) -琼脂糖凝胶的亲亲和层析，可以很容易地从总RNA制品中分离纯化mRNA。



2009年3月

上海交通大学医学院



1. oligo (dT) -纤维素柱层析法
2. oligo (dT) -纤维素柱离心法
3. oligo (dT) -纤维素液相结合离心法
4. 磁性球珠分离法



2009年3月

上海交通大学医学院

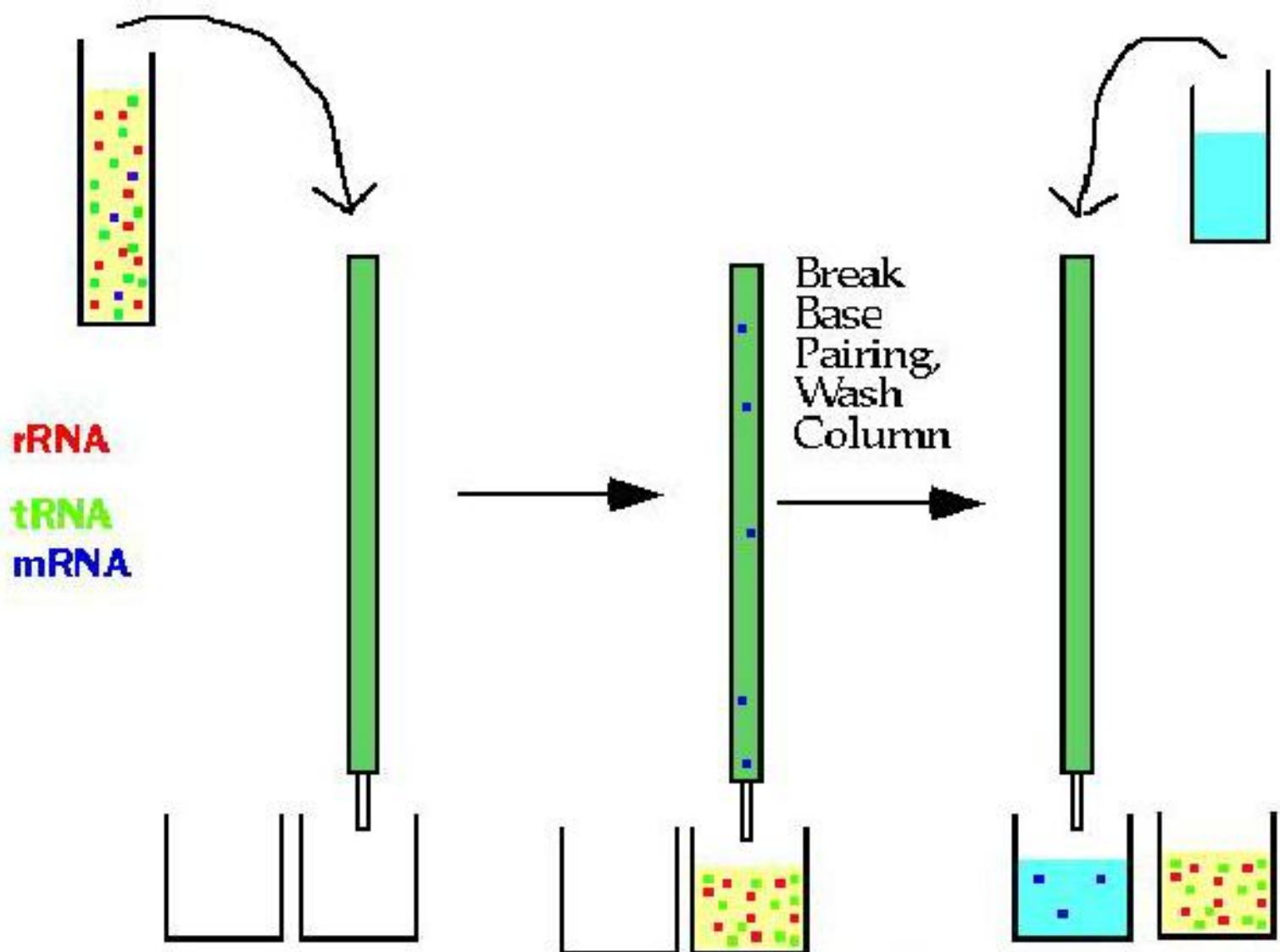


(1) oligo(dT)-纤维素层析柱法

2009年3月



上海交通大学医学院





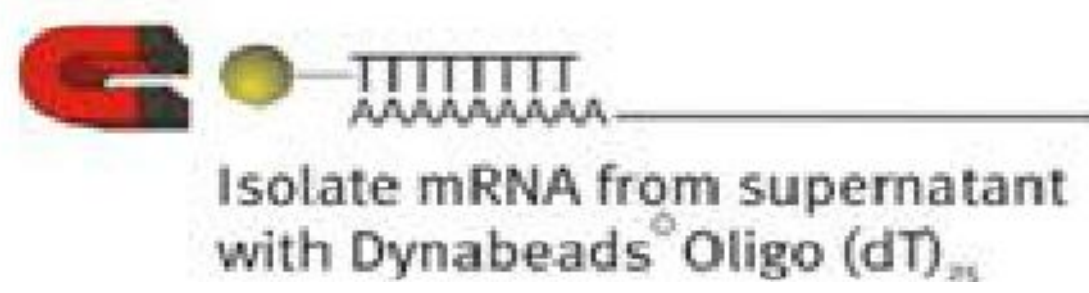
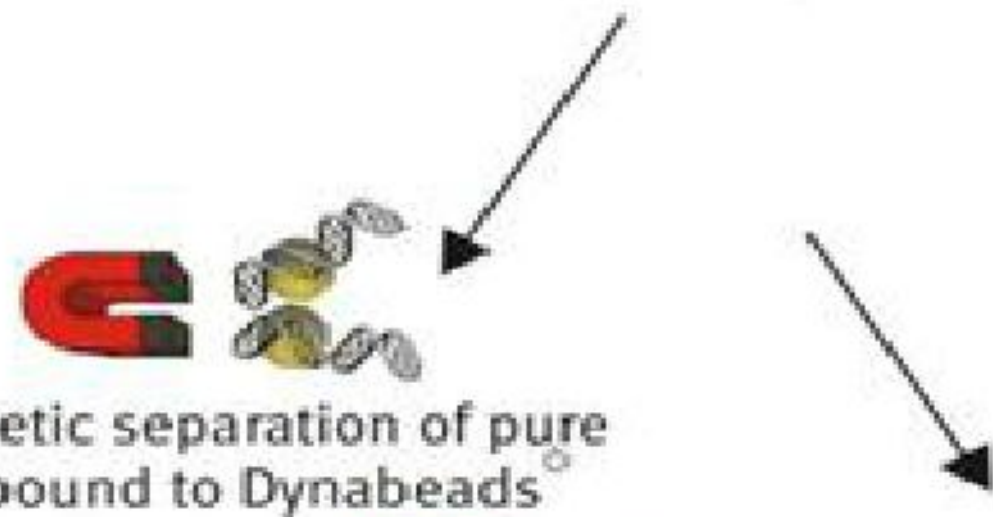
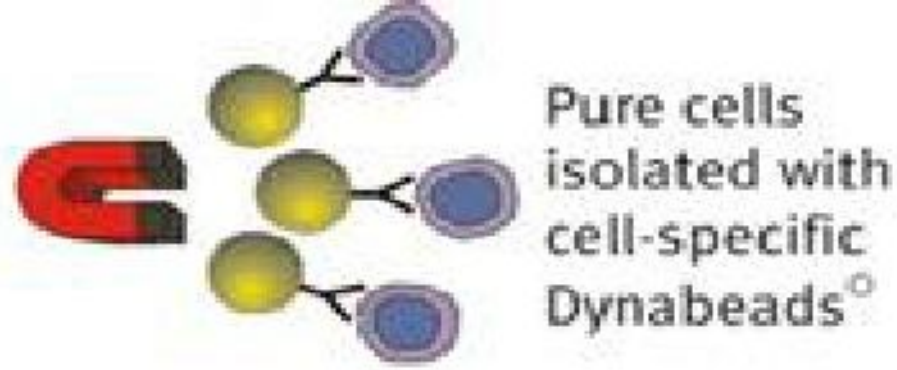
(2) oligo(dT)-纤维素液相结合离心法

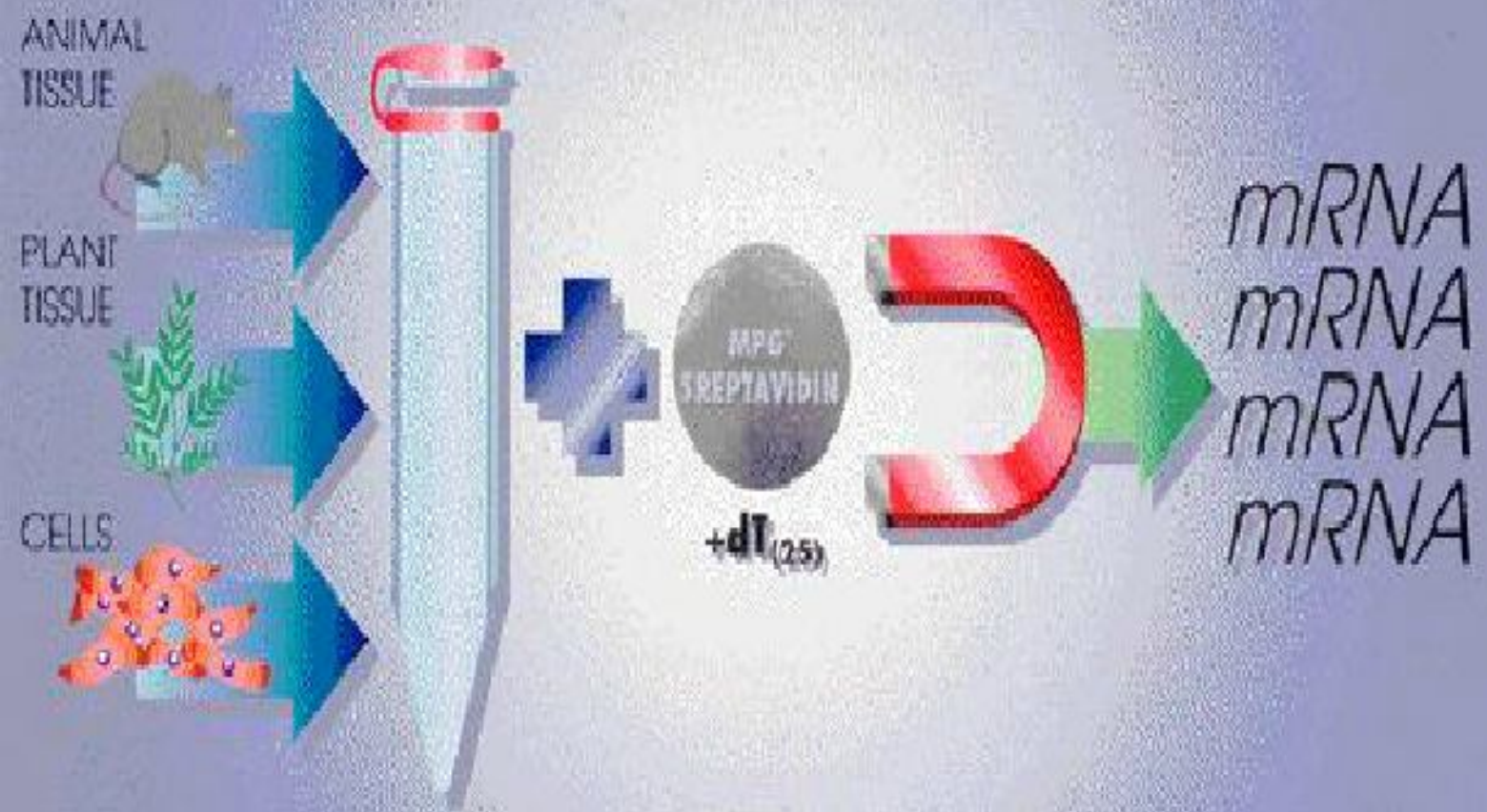
(3) 磁珠分离法



2009年3月

上海交通大学医学院







实验步骤

- 1 每mg组织中加入1mlTrizol试剂，高速破碎组织（使用高速组织捣碎器）
- 2 加入氯仿0.2ml,轻轻颠倒混匀，室温静置分层。
3. 高速离心12000rpm，4-8 ° C ， 10分钟
- 4.吸上清液至新离心管中，约600ul
- 5 加入500ul异丙醇，混匀，室温静置10分钟

2009年3月

上海交通大学医学院





6. 高速离心12000rpm, 4-8 ° C , 10分钟
7. 弃上清液, 沉淀为RNA
8. 加入1mlDEPC处理的75%乙醇, 混匀, 7500rpm离心, 4-8 ° C, 5分钟
9. 加入DEPC处理水30ul, 混匀, 55-60 ° C水浴
10. 3ul加入297ulDEPC水, 测定浓度和纯度

RNA浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) = $A_{260} \times 40 \times 1/\text{光径} \times \text{稀释倍数}$

RNA纯度 = A_{260}/A_{280} 比值为2.0表明RNA较纯

2009年3月

上海交通大学医学院



❖ 浓度鉴定

❖ 紫外吸光光度法:

$$A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40 = \quad \mu \text{ g/ml}$$

$$(\text{OD}_{260} - \text{OD}_{320}) \times \text{稀释倍数} \times 40 = \quad \mu \text{ g/ml}$$



2009年3月

上海交通大学医学院



❖ 纯度鉴定

❖ **OD260/OD280 (1.8~2.0)**

Ratio<1.8 : 蛋白质污染

Ratio>2.2 : **RNA**可能已经水解成单核苷酸

注：测定吸光值，稀释液应使用 T E

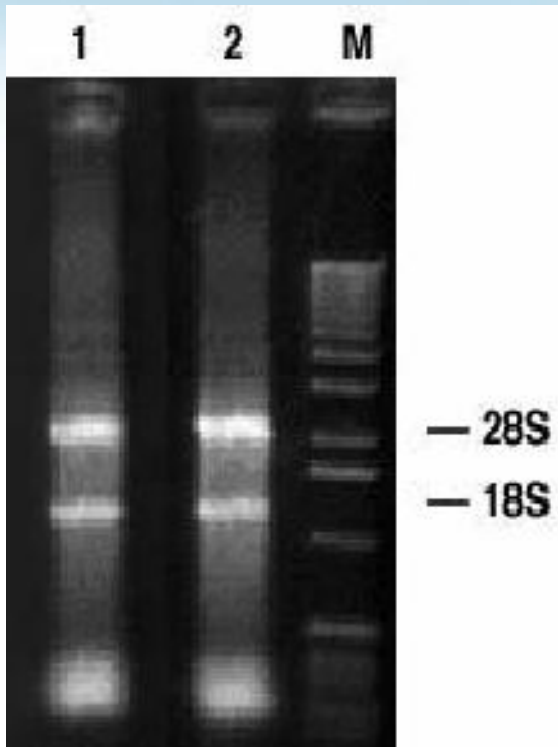


2009年3月

上海交通大学医学院



完整性鉴定：



正常时，**28S**

RNA的荧光强度

约为**18S RNA**的

2倍，否则提示

RNA的降解

2009年3月

上海交通大学医学院



❖ 如何避免RNA含量较低?

❖ $OD_{260} / OD_{280} < 1.65$ 时可能存在的问题?



2009年3月

上海交通大学医学院



- ❖ RNA可溶于0.3mol/L的醋酸钠溶液或双蒸水，在-70℃保存。
- ❖ RNA可溶于70%的乙醇溶液或去离子的甲酰胺溶液中，可在-20℃保存。
- ❖ RNA如果以DEPC（焦碳酸二乙酯）可以抑制RNA酶对RNA的降解

2009年3月

上海交通大学医学院

