

RNA、DNA 提取与检测技术

(内容: 目前 RNA 提取有哪些主流试剂, 有什么优点, 价格如何? 提取 RNA 有何注意事项? Northern 杂交分析法的一般过程是怎样的? 提取质粒目前有哪些好用的试剂盒, 提取过程中有些什么注意点? 价格如何? Southern 杂交的一般过程是怎样的? DNA 转染可用哪些方法, 各有何优点和缺点? 目前主流用哪几种转染方法, 所用试剂价格如何, 有哪些好的生物公司提供?)

一. RNA 的提取

完整 RNA 的提取和纯化, 是进行 RNA 方面的研究工作, 如 Northern 杂交、mRNA 分离、RT-PCR、定量 PCR、cDNA 合成及体外翻译等的前提。所有 RNA 的提取过程中都有五个关键点, 即 1) : 样品细胞或组织的有效破碎; 2) , 有效地使核蛋白复合体变性; 3) , 对内源 RNA 酶的有效抑制; 4) 有效地将 RNA 从 DNA 和蛋白混合物中分离; 5) , 对于多糖含量高的样品还牵涉到多糖杂质的有效除去。但其中最关键的是抑制 RNA 酶活性。RNA 的提取目前阶段主要可采用两种途径, 1), 提取总核酸, 再用氯化锂将 RNA 沉淀出来; 2), 直接在酸性条件下抽提, 酸性下 DNA 与蛋白质进入有机相而 RNA 留在水相。第一种提取方法将导致小分子量 RNA 的丢失, 目前该方法的使用频率已很低。

一些公司推出的总 RNA 提取试剂盒, 可以用来制备高质量的可用于建库的 RNA。该总 RNA 纯化系统采用两种著名的 RNA 酶抑制剂, 异硫氰酸胍(GTC)和 β -巯基乙醇, 加上整个操作都在冰浴下进行, 这样就能显著降低 RNA 的降解速率。GTC 和 N-十二烷基肌氨酸钠的联合使用, 将促使核蛋白复合体的解离, 使 RNA 与蛋白质分离, 并将 RNA 释放到溶液中。而进一步从复合体中纯化 RNA, 则根据 Chomczynski 和 Sacchi 的一步快速抽提法进行, 采用酸性酚-氯仿混合液抽提。低 pH 值的酚将使 RNA 进入水相, 这样使其与仍留在有机相中的蛋白质和 DNA 分离。水相中的 RNA 可用异丙醇沉淀浓缩。进一步将上述 RNA 沉淀复溶于 GTC 溶液中, 接着用异丙醇进行二次沉淀, 随后用乙醇洗涤沉淀, 即可去除所有残留的蛋白质和无机盐, 而 RNA 中如含无机盐, 则有可能对以后操作中的一些酶促反应产生抑制。

模板 mRNA 的质量直接影响到 cDNA 合成的效率。由于 mRNA 分子的结构特点, 容易受 RNA 酶的攻击反应而降解, 加上 RNA 酶极为稳定且广泛存在, 因而在提取过程中要严格防止 RNA 酶的污染, 并设法抑制其活性, 这是本实验成败的关键。所有的组织中均存在 RNA 酶, 人的皮肤、手指、试剂、容器等均可能被污染, 因此全部实验过程中均需戴手套操作并经常更换 (使用一次性手套)。所用的玻璃器皿需置于干燥烘箱中 200°C 烘烤 2 小时以上。凡是不能用高温烘烤的材料如塑料容器等皆可用 0.1% 的焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶液处理, 再用蒸馏水冲净。DEPC 是 RNA 酶的化学修饰剂, 它和 RNA 酶的活性基团组氨酸的咪唑环反应而抑制酶活性。DEPC 与氨水溶液混合会产生致癌物, 因而使用时需小心。

试验所用试剂也可用 DEPC 处理, 加入 DEPC 至 0.1% 浓度, 然后剧烈振荡 10 分钟, 再煮沸 15 分钟或高压灭菌以消除残存的 DEPC, 否则 DEPC 也能和腺嘌呤作用而破坏 mRNA 活性。但 DEPC 能与胺和巯基反应, 因而含 Tris 和 DTT 的试剂不能用 DEPC 处理。Tris 溶液可用 DEPC 处理的水配制然后高压灭菌。配制的溶液如不能高压灭菌, 可用 DEPC 处理水配制, 并尽可能用未曾开封的试剂。除 DEPC 外, 也可用异硫氰酸胍、钒氧核苷酸复合物、RNA 酶抑制蛋白等。此外, 为了避免 mRNA 或 cDNA 吸附在玻璃或塑料器血管壁上, 所有器皿一律需经硅烷化处理。

细胞内总 RNA 制备方法很多, 如异硫氰酸胍热苯酚法等。许多公司有现成的总 RNA 提取试剂盒, 可快速有效地提取到高质量的总 RNA。分离的总 RNA 可利用 mRNA 3' 末端含有多聚 (A)⁺ 的特点, 当 RNA 流经 oligo (dT) 纤维素柱时, 在高盐缓冲液作用下, mRNA 被特异的吸附在 oligo (dT) 纤维素上, 然后逐渐降低盐浓度洗脱, 在低盐溶液或蒸馏水中, mRNA 被洗下。经

过两次 oligo(dT) 纤维素柱, 可得到较纯的 mRNA。纯化的 mRNA 在 70%乙醇中-70℃可保存一年以上。

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℃的高温下干烤 6hr 或更长时间。
2. 塑料器皿可用 0.1% DEPC 水浸泡或用氯仿冲洗 (注意: 有机玻璃器具因可被氯仿腐蚀, 故不能使用)。
3. 有机玻璃的电泳槽等, 可先用去污剂洗涤, 双蒸水冲洗, 乙醇干燥, 再浸泡在 3% H₂O₂ 室温 10min, 然后用 0.1% DEPC 水冲洗, 晾干。
4. 配制的溶液应尽可能的用 0.1% DEPC, 在 37℃处理 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 μm 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。

TRNzol 是可即用的从细胞和组织中提取总 RNA 的试剂，在样品裂解或匀浆过程中，TRNzol 可保持 RNA 完整性，同时裂解细胞，溶解细胞内含物。加入氯仿后，溶液分为水相和有机相，RNA 在水相中。取出水相，用异丙醇可沉淀回收 RNA；中间层用乙醇沉淀可回收 DNA；有机相用异丙醇沉淀可回收蛋白。

TRNzol 试剂可用于小量样品（50-100 mg 组织、 5×10^6 细胞），也可用于大量样品（ > 1 g 组织或 $> 10^7$ 细胞），对人、动物、植物和细菌组织提取都适用，可同时处理大量不同样品。一个小时内即可完成反应，提取的总 RNA 没有 DNA 和蛋白的污染，可用于 Northern Blot、Dot blot、cDNA 合成等。

→ RNA 提取步骤：匀浆处理 → 分层（加氯仿） → 沉淀 RNA → 洗涤并溶出

二. RNA 的检测（Northern 杂交分析法）

[方法与步骤]

1. 用具的准备：

180 度烤器皿：三角锥瓶、量筒、镊子、刀片等 4 小时。

电泳槽：清洗梳子和电泳槽，并用双氧水浸泡过夜，用 DEPC 水冲洗，干燥备用。
处理 DEPC 水 (2 L) 备用。

2. 用 RNAZaP 去除用具表面的 RNase 酶污染

用 RNAZap 擦洗梳子，电泳槽，刀片等，然后用 DEPC 水冲洗二次，去除 RNAZap。

3. 制胶：

1. 称取 0.36mg 琼脂糖加入三角锥瓶中，加入 32.4ml DEPC 水后，微波炉加热至琼脂糖完全熔解。60℃ 空气浴平衡溶液（需加 DEPC 水补充蒸发的水分）

2. 在通风厨中加入 3.6ml 的 10× Denaturing Gel buffer，轻轻振荡混匀。

注意尽量避免产生气泡。

3. 将熔胶倒入制胶板中，插上梳子

如果胶溶液上存在气泡，可以用热的玻璃棒或其它方法去除，或将气泡推到胶的边缘。注：胶的厚度不能超过 0.5cm。

4. 胶在室温下完全凝固后，将胶转移到电泳槽中，加入 1x MOPS Gel Running buffer 盖过胶面约 1cm，小心拔出梳子。（配制 250ml 1× MOPS Gel Running buffer，在电泳过程中补充蒸发的 buffer。）

5. 检查点样孔。

4. RNA 样品的制备

在 RNA 样品中加入 3 倍体积的 formaldehyde load dye 和适当的 EB (终浓度为 10ug/ml)。混匀后, 65°C 空气浴 15min。短暂低速离心后, 立即放置于冰上 5min。

5. 电泳:

1. 将 RNA 样品小心加到点样孔中。
2. 在 5V/cm 下跑胶 (5 x 14cm)。在电泳过程中, 每隔 30min 短暂停止电泳, 取出胶, 混匀两极的电泳液后继续电泳。当胶中的溴酚蓝 (500bp) 接近胶的边缘时终止电泳。
3. 紫外灯下, 检验电泳情况, 并用尺子测量 18S、28S、溴酚蓝到点样孔的距离。注意不要让胶在紫外灯下曝光太长时间。

6. 转膜

1. 用 3% 双氧水浸泡真空转移仪后, 用 DEPC 水冲洗。
2. 用 RNAzap 擦洗多孔渗水屏和塑胶屏, 用 DEPC 水冲洗二次。
3. 连接真空泵和真空转移仪, 剪取一块适当大小的膜 (膜的四边缘应大于塑胶屏孔口的 5mm), 膜在 Transfer buffer 浸湿 5 分钟后, 放置在多孔渗水屏的适当位置。
4. 盖上塑胶屏, 盖上外框, 扣上锁。
5. 将胶的多余部分切除, 切后的胶四边缘要能盖过塑胶屏孔, 并至少盖过边缘约 2mm, 以防止漏气。
6. 将胶小心放置在膜的上面, 膜与胶之间不能有气泡。
7. 打开真空泵, 使压强维持在 50~58mbar; 立即将 transfer buffer 加到胶面和四周。每隔 10min 在胶面加上 1ml transfer buffer, 真空转移 2 小时。
8. 转膜后, 用镊子夹住膜, 于 1x MOPS Gel Running buffer 中轻轻泡洗 10 秒, 去除残余的胶和盐。
9. 用吸水纸吸取膜上多余的液体后, 将膜置于 UV 交联仪中自动交联。
10. 将胶和紫外交联后的膜, 在紫外灯下检测转移效率。(避免太长的紫外曝光时间)
12. 将膜在 -20°C 保存。

7. 探针的制备

1. 在 1.5ml 离心管中配制以下反应液:

模板 DNA (25 ng) 1ul

Random Primer 2ul

灭菌水 11ul

总体积: 14ul

2. 95° C 加热 3 分钟后, 迅速放置于冰冷却 5min。

3. 在离心管中按下列顺序加入以下溶液:

10×Buffer 2.5ul

dNTP Mixture 2.5ul

111 TBq/mmol [α -³²P]dCTP 5 ul

Exo-free Klenow Fragment 1 ul

4. 混匀后 (25ul), 37° C 下反应 30 分钟。短暂离心, 收集溶液到管底。

5. 65° C 加热 5min 使酶失活。

8. 探针的纯化及比活性测定:

1. 准备凝胶: 将 1g 凝胶加入 30ml 的 DEPC 水中, 浸泡过夜。用 DEPC 水洗涤膨胀的凝胶数次, 以除去可溶解的葡聚糖。换用新配制的 TE (PH7.6)。

2. 取 1ml 一次性注射器, 去除内芯推杆, 将注射器底部用硅化的玻璃纤维塞住, 在注射器中装填 Sephadex G-50 凝胶。

3. 将注射器放入一支 15ml 离心管中, 注射器把手架在离心管口上。1600g 离心 4 分钟, 凝

胶压紧后，补加 Sephadex G-50 凝胶悬液，重复此步直至凝胶柱高度达注射器 0.9ml 刻度处

4. 100ul STE 缓冲液洗柱，1600g 离心 4min。重复 3 次。

5. 倒掉离心管中的溶液后，将一去盖的 1.5ml 离心管置于管中，再将装填了 Sephadex G-50 凝胶的注射器插入离心管中，注射器口对准 1.5ml 离心管。

6. 将标记的 DNA 样品加入 25 ul STE，取出 0.5ul 点样于 DE8 paper 上，其余上样于层析柱上。

7. 1600g 离心 4min，DNA 将流出被收集在去盖的离心管中，而未掺入 DNA 的 dNTP 则保留在层析柱中。取 0.5ul 已纯化的探针点样于 DE8-paper.

8. 测比活性(试剂比活要求:106cpm/ml)。

9. 预杂交:

1. 将预杂交液在杂交炉中 68°C 预热，并漩涡使未溶解的物质溶解。

2. 加入适当的 ULRAhyb 到杂交管中(以 100cm² 膜面积加入 10mlULRAhyb 杂交液)，42°C 预杂交 4 hr。

10. 探针变性:

1. 用 10 mM EDTA 将探针稀释 10 倍。

2. 90°C 热处理稀释后探针 10min 后，立即放置于冰上 5min。

3. 短暂离心，将溶液收集到管底。

11. 杂交:

1. 加入 0.5ml ULTRAhyb 到变性的探针中，混匀后，将探针加到预杂交液中。

2. 42°C 杂交过夜 (14~24hr)。

杂交完后，将杂交液收集起来于一 20°C 保存。

12. 洗膜:

1. 低严谨性洗膜: 加入 Low Stringency Wash Solution#1 (100cm² 膜面积加入 20ml 洗膜溶液)，室温下，摇动洗膜 5min 两次。

2. 高严谨性洗膜: 加入 High Stringency Wash Solution#2 (100cm² 膜面积加入 20ml 洗膜溶液)，42°C 摇动洗膜 20min 两次。

13. 曝光:

1. 将膜从洗膜液中取出，用保鲜膜包住，以防止膜干燥。

2. 检查膜上放射性强度，估计曝光时间

3. 将 X 光底片覆盖与膜上，曝光

4. 冲洗 X 光底片，扫描记录结果。

14. 去除膜上的探针: 将 200ml 0.1%SDS (由 DEPC 水配制) 煮沸后，将膜放入，室温下让 SDS 冷却到室温，取出膜，去除多余的液体，干燥后，可以保存几个月。

15. 杂交结果

操作应该小心，但不必紧张。用于 RNA 电泳、转膜的所有器械、用具均须处理以除去 RNase 酶，以免样品的降解。转膜时，注意膜和多孔渗水屏之间不要有气泡

[注意事项]

1. RNA 极易被环境中的 RNA 酶降解，因此在 RNA 变性电泳过程中，创造一个无 RNA 酶的环境十分必要。所用试剂均用 DEPC 处理过的水配制，操作时应戴手套、口罩。

2. RNA 的上样量可为 30 μg，一般而言，只加入 10-20 μg 总 RNA，对于低浓度的 RNA 检测，每孔应加 0.5-3.0 μg poly (A) RNA。

3. 转膜过程最好在 4°C 冰箱里进行，温度低，RNA 不易降解，同时保持湿度，以利于转膜。

4. 一般采用 0.45 μm 硝酸纤维素膜，如被检测的 RNA 片段较小时 (小于 300bp)，可选用 0.22 μm 的硝酸纤维素膜。

随着国外大型生物技术公司不断加强对中国市场的重视,中国本土企业也开始加强对自己产品的研发。虽然目前很多国产品牌的核心技术——纯化介质还是依赖进口,一些有志者也开始建立起自己的研发机构,也许将来有我们自己技术专利的产品走向世界。

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

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

【注意事项】

1. 应先在实验前 2 天划线接种细菌,实验前 1 天晚上进行单菌落液体培养,并注意无菌操作。

2. 加入溶液 I 时可用力振荡,而加入溶液 II 5min 后,如溶液不变粘稠(用移液嘴沾吸没有丝状物出现),则应终止实验。检查使用的试剂是否正确,加量是否正确。

3. 溶液 I 中的溶菌酶宜临用前加入。溶液 II 也应临用前用母液配制。

4. 抽提产物经电泳分离、EB 染色后,在紫外线灯下可观察到三条带,自前往后分别为:超螺旋、线性及开环质粒 DNA。

四. DNA 的转染

根据转染的机制不同可将转染法分为化学转染法和物理转染法两大类。

(一) 化学转染法

化学转染法包括 DEAE-葡聚糖法、磷酸钙法和人工脂质体法等。目前应用最广泛的是人工脂质体法。

DEAE-葡聚糖转染法最早是用来促进病毒 DNA 导入细胞中,后来逐渐发展成为一种常用的哺乳动物细胞的基因转移方法,即 DEAE-右旋糖酐法。DEAE 是一种高分子多聚阳离子化合物,其作用机制尚不清楚,可能与带负电荷的 DNA 及细胞表面结合,促进靶细胞对 DNA 的摄取,或者保护 DNA 免受核酸酶降解。这种方法非常简单,即将外源 DNA 和 DEAE-右旋糖酐的混合物处理细胞。通常只用于克隆化基因的瞬时表达,不用于细胞的稳定转化,同时,它只对某些细胞如 BSC-1、CV-1 和 COS 等转染效果好。应用上有一定的限制。

磷酸钙法即磷酸钙共沉淀转染法,由于试剂易得、价格便宜而被广泛用于瞬时转染和稳定转染的研究。人们发现 DNA 与磷酸钙形成共沉淀物后,容易被细胞吸附而摄入细胞内,

由此建立了腺病毒和SV40DNA转染人KB细胞的方法，同时还摸索了形成DNA-磷酸钙共沉淀物的最佳参数。如钙离子浓度（125mmol/L），DNA浓度（5~30 μg/ml），最佳pH值（pH7.05）及沉淀反应的最佳时间（20~30分钟）等。利用这一方法，人们已有效地将多种外源DNA导入培养的贴壁型和悬浮型哺乳动物细胞中。至今本法仍是许多实验室常用的哺乳动物细胞基因转移的方法之一。方法是，先将DNA和氯化钙混合，然后加入到PBS中慢慢形成DNA磷酸钙沉淀，最后把含有沉淀的混悬液加到培养的细胞上，通过胞膜的内吞作用摄入DNA。

氯化钙转化法：CaCl₂转化法对于人DNA和超螺旋质粒转化大肠杆菌的效率可达10⁵~10⁶菌落/g DNA。目前常规的CaCl₂转化方法是离心收集对数生长期的细菌，用原培养液体积1/2的预冷的CaCl₂溶液（50~100mmol/L）悬浮细菌，离心后再用原培养液体积1/5的CaCl₂溶液重悬细菌。取一定量的细菌悬液加入一定量的待转化的质粒DNA或噬菌体DNA溶液中，0℃放置30分钟，42℃热休克90秒，快速冷却后加适量LB培养基，37℃培育使细菌复苏，涂布到含抗生素的选择培养基上筛选转化菌。有人对此常规方法提出不少改良方案，如使用不同比例组合的二价阳离子混合液（Ca²⁺，Mg²⁺），延长CaCl₂处理细菌的时间或加用二甲亚砜（DMSO），氯化六氨合高钴等试剂辅助处理细菌等，可以提高转化效率100~1000倍。本法适用于大多数大肠杆菌的转化，其转化效率足以满足以质粒为载体所进行的常规克隆的需要。

碱金属离子转移法：早在1983年，研究发现碱金属离子（Li⁺，Na⁺，K⁺，Rb⁺，Cs⁺）能较好地诱导酿酒酵母细胞产生感受态。特别是LiCl和醋酸锂（LiAc）对含有arsI复制起始区的质粒，其转化效率分别达到230转化子/μg DNA和400转化子/μg DNA，比原生质体（spheroplast）方法高了3~4倍。若转化反应的条件再经优化，如金属离子浓度为0.1~1.0mol/L，酵母细胞的最佳浓度为（5×10⁷）细胞/ml，金属离子与酵母细胞的培养时间为1小时，反应体系中加入PEG-4000及42℃热冲击，能再提高转化效率。

人工脂质体法具有较高的转染效率，不但可以转染其它化学方法不易转染的细胞系，而且能转染从寡核苷酸到人工酵母染色体不同长度的DNA，以及RNA和蛋白质。此外，脂质体体外转染还适用于瞬时表达和稳定表达。与其它方法不同的是，脂质体还可以介导DNA和RNA转入动物和人的体内，用于基因治疗。人工合成的阳离子脂质体与带负电荷的核酸结合后形成复合体，当复合体接近细胞膜时被内吞成为内体进入细胞质，随后DNA复合体被释放进入细胞核内。至于DNA是如何穿过核膜的目前还不十分清楚。脂质体转染法尽管效率不高，但仍具有许多优点，如方法简便，重复性好，对多种类型的细胞有效，同时包装容量大，安全性高，因此，广为实验室采用。

原生质体融合法是先将含目的基因的质粒转化到细菌或酵母细胞中，接着大量扩增，用溶菌酶或蜗牛酶除去胞壁部分，在高盐状态下，制成原生质体，然后铺到培养的单层哺乳动物细胞上，在融合剂如PEG的作用下，进行融合。融合过程中，染色体和质粒DNA都将转染至哺乳动物细胞中。

（二）物理转染法

包括电穿孔、显微注射及基因枪等方法。

电穿孔法其作用原理是，利用高压电脉冲对细胞膜的干扰，使其形成利于核酸进入的微孔。电穿孔技术可用于瞬时转染和稳定转染，可方便地用于悬浮细胞，重现性好，但需要较多的细胞。影响转染效率的主要因素是脉冲强度和持续时间。必须找到能够使核酸有效释放而又不杀死细胞的最佳平衡点。在高压电场的短暂作用下，细胞膜上出现可逆的微小孔洞，外源DNA可通过此孔洞进入胞内。该法广泛应用于不同类型细胞的基因转移，如细菌、酵母、植物及动物细胞，本法需要电穿孔仪。细胞悬浮在石英池内，将外源DNA加入池内的介质中，池的两边有两个电极，外接高压电源，给予一个极其短暂的高压脉冲电场，在细胞膜两边产生一个高于其阈电位的膜电压势能，使细胞膜被打碎，形成许多瞬间小孔，允许外

源DNA分子进入。应用这一技术，可将大至150kb的DNA分子转入灵长类动物细胞中。电穿孔法操作简单方便，重复性好，基因的转移效率也较高，尤其是对酵母细胞和细菌，远高于化学方法。常用来转染如植物原生质体等常规方法不容易转染的细胞。本法的另一优点是转染DNA的突变率比DNA-磷酸钙共沉淀法、DEAE-葡聚糖法为低。它主要适用于克隆基因的短暂或持续表达。电穿孔法的缺点是对细胞的损害较大，有时细胞不易存活。

显微注射虽然费力，但却是非常有效的将核酸导入细胞或细胞核的方法。这种方法常用来制备转基因动物，但不适用于需大量转染细胞的研究。它是应用玻璃显微注射仪器，在外科手术显微镜下将外源DNA直接注入靶细胞的核内。显微注射法的受体细胞主要是体积较大的受精卵细胞，是制备转基因动物的常用技术之一，现在也用贴壁培养的体细胞作为受体细胞。注射入受体细胞核内的外源基因大约有25%整合到受体细胞的染色体中并稳定表达。显微注射法转移基因成功与否与操作者本身的熟练程度密切相关。但目前已有电脑控制的显微注射装置出售，其效率可达每小时注射1500个细胞。

基因枪依靠携带了核酸的高速粒子而将核酸导入细胞内，这种方法适用于培养的细胞和在体的细胞。

需要注意的是，没有一种方法是万能的，应根据具体情况进行选择。但无论选用何种转染方法，DNA的质量和数量对转染成功与否至关重要。用于转染的质粒DNA必须没有蛋白质、RNA和其它化学物质污染。可用CsCl梯度离心、柱层析法或质粒DNA提取试剂盒制备DNA。吸光度A_{260nm}与A_{280nm}的比值应在1.8-1.9之间。转染前用乙醇沉淀DNA，再加入适量灭菌水或TE缓冲液溶解DNA，至终浓度为1mg/ml左右。对于不同的细胞，质粒DNA转染所需的量不同，因此在实验开始以前需要优化实验条件。需要优化的参数主要有：脂质体与DNA的比例，转染DNA的总量，细胞接触脂质体的时间及是否存在血清等。细胞状态、密度、传代次数及污染也会影响转染效率。

5. DNA 的检测 (Southern 杂交分析法)

1. 实验步骤

1) 取 10 μ l 待测 DNA, 于一定浓度的琼脂糖凝胶上进行电泳。(20mL, 1.0%凝胶,)

2) 凝胶用溴化乙锭染色, 切掉凝胶四周多余部分, 并在凝胶的一角作一记号, 拍照记录电泳结果(拍照时, 凝胶旁放一尺子)。

3) 杂交用胶的制备 (做以下步骤两组合一)

A. 将凝胶浸入 30mL 0.25mol/L HCl 溶液中 15min, 使 DNA 脱嘌呤。

B. 用蒸馏水短暂洗凝胶 2 次。

C. 将凝胶浸入 30mL 变性液中 30min, 使凝胶变性。

D. 将凝胶浸入 30mL 中和液中 15min 使它被中和。

重复 D 一次。在制备杂交用胶时准备转移的平台、膜、滤纸等(4、5)。

4) 准备 DNA 从凝胶向膜转移的平台

5) 将 1 张待用尼龙膜和 3 张厚滤纸切成与待转移胶相同大小, 并在尼龙膜一角做一标记。

另 1 张厚滤纸切成与凝胶相同宽度, 长度(约 18cm)足以达到转移液盒子的底部。

准备 10 X SSC 转移液。

将待用尼龙膜用蒸馏水浸湿后, 再浸入 10 X SSC 转移液中。

6) 安装毛细管转移装置

A. 将长的滤纸放在转移平台的顶部, 滤纸两端达到转移盒的底部, 做成虹吸桥。

B. 将 80mL 转移液倒入转移盒内, 并湿润滤纸。

C. 将凝胶背面朝上置于滤纸搭成的桥上, 凝胶与滤纸间避免有气泡。

D. 用保鲜纸封住凝胶四边。

E. 将浸湿的转移膜置于凝胶的上部, 凝胶与膜间避免有气泡。

F. 将剩下的 3 张滤纸小心的放在转移膜的上面, 并放一叠吸水纸搭在滤纸上, 再放一玻璃板, 其上压一重物。

G. 转移几小时或过夜(至少 4 小时)

注意: 勿使转移液干枯。

7) 已转移的 DNA 与膜交联

A. 将膜放在浸有 10 X SSC 的厚滤纸上, 有 DNA 的一面朝上。

B. 将膜置于 UV crosslinker 中, 在紫外光下自动交联。

C. 用蒸馏水短暂的漂洗已交联的膜, 空气中干燥。

此膜可在 4 $^{\circ}$ C 长期保存。

8) DNA 探针的制备(略过)

参照生产商提供的实验方法合成地高辛标记的探针。

9) 印迹的预杂交

将适量的预杂交液 DIG Easy Hyb 在 42 $^{\circ}$ C 预热。

放入印迹膜, 在 42 $^{\circ}$ C 预杂交 30min。

10) 准备探针

水煮地高辛标记的探针 5min 使变性, 并立即放在冰上 2min。

11) 加适量的探针到已预热的杂交液中,混合均匀(避免形成泡沫,影响杂交效果)。

42 °C 杂交至少 4 小时或过夜。

注意: 不要将探针直接加在印迹膜上, 而应加在容器一角的预杂交液中

12) 印迹膜的冲洗:

A. 将杂交液倒出, 储存起来可再次使用。

B. 用 25mL 的 2 X SSC, 0.1% SDS 在室温摇动洗膜 2 次, 每次 5min .

C. 用已预热的 30mL 0.5XSSC, 0.1%SDS 在 65 °C 摇动洗膜 2 次, 每次 15min (用杂交炉)。

13) 免疫检测:

A. 用 10mL 冲洗液洗膜 1-5min.

B. 膜在 15mL 阻断液中孵育 30min

C. 膜和 8mL 抗体孵育 30min

D. 在 15mL 冲洗液中洗膜 2 次, 每次 15min.

E. 在 15mL 检测液中平衡 2-5min.

14) 将膜的有 DNA 的面朝上, 放在保鲜纸上, 滴数滴 CSPD ready-to-use 覆盖膜; 然后, 立即用保鲜纸包裹, 挤掉多余的 CSPD ready-to-use, 使其均匀平铺在膜上, 没有气泡, 但避免使膜干掉. 室温孵育 5min.

15) 在 37 °C 孵育潮湿的膜 10min, 增强发光.

16) 用 X-光底片将杂交膜进行曝光 10-25min.

(发光性能至少可持续 48 小时)

17) X-光底片的冲洗

Agfa 30 显影液显影(1-5min)---冲水(1min)---F5 定影液定影(10min)---用水冲洗---晾干底片

2. 注意事项

1. 一定要在凝胶和硝酸纤维素膜上作好方向标记, 滤膜操作须带手套。

2. 在转移时玻璃板与滤纸、凝胶与滤膜之间不要有气泡存在。前者可用玻棒赶气泡; 后者可在放滤膜时, 从其一端开始, 逐渐将滤膜放下。

3. 为避免发生转移液虹吸短路, 凝胶下面四周用封口膜隔离, 并且硝酸纤维素膜及上面的滤纸与吸水纸不要大于凝胶块。

4. 托盘里的转移液不要没过玻璃板, 但要足够过夜转移用, 吸水纸湿透后应更换。

5. 尼龙膜用于转移吸印更具优点, 表现在 DNA 转移到尼龙膜上不需要高盐条件, 可以直接用 0.5mol/L NaOH 作转移缓冲液; 碱转移另一优点是 DNA 结合力强, 不易扩散, DNA 转移条带清晰, 分辨率高; 而且尼龙膜结合 DNA 后不需烘烤。