

3.12.3 实验内容

目录

1. 哺乳动物细胞总 RNA 的提取
2. 哺乳动物细胞 cDNA 的合成
3. PCR 检测奢侈基因 *VEGF* 的可变剪接
4. 原核表达系统中 His-EGFP 融合蛋白的亲纯化
5. 蛋白质电泳与考马斯亮蓝染色
6. 定量 PCR 检测真核表达系统中 *EGFP* 的 mRNA 表达水平
7. Western blot 检测原核表达系统中 EGFP 的蛋白表达水平

内容 1. 哺乳动物细胞总 RNA 的提取

【实验原理】RNA 提取是分子生物学实验中的基本操作技术，cDNA 文库构建，蛋白质体外翻译，RNA 序列分析以及 Northern blot 等实验都需要先提取较好纯度和完整性的 RNA。由于 RNA 的核糖残基上 2' 和 3' 位具有羟基，RNA 的化学性质较 DNA 活跃，易于被 RNase 降解。RNA 抽提的质量取决于能否最大限度地避免纯化过程中内、外源 RNA 酶对 RNA 的降解。

【实验方法】利用 TRIzol 试剂裂解细胞（并通过抑制 RNA 酶的活性保护细胞内 RNA），利用氯仿变性蛋白，进一步利用异丙醇沉淀 RNA。RNA 抽提后的质检可以用吸光度测量方法或电泳检测方法。

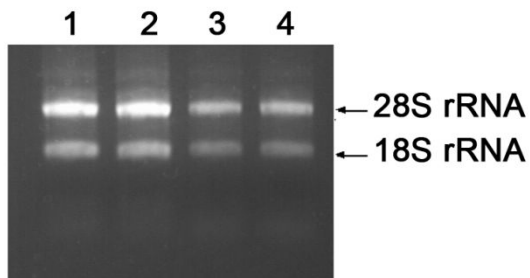
【实验材料】哺乳动物细胞

【关键实验试剂说明书】

Trizol <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15596026>

【实验课时】6 学时

【代表性实验结果】



左图：琼脂糖电泳检测 RNA 抽提效率。电泳可见细胞内丰度最高的 28S rRNA 和 18S rRNA，且 28S rRNA 的亮度约是 18S rRNA 亮度的两倍，说明 RNA 抽提效果较好。

内容 2. 哺乳动物细胞 cDNA 的合成

【实验原理】互补 DNA (cDNA, complementary DNA) 的合成是以真核细胞 mRNA 为模板, 通过酶促反应反转录合成 cDNA 的过程。cDNA 可以用于构建表达文库、基因表达的定性与定量分析等。cDNA 合成依赖于反转录酶(依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶)的三种催化活性: 依赖 RNA 的 DNA 聚合酶活性: 以 mRNA 为模板合成 cDNA 第一条链; RNase 水解活性: 水解 RNA-DNA 杂合链中的 RNA; 依赖 DNA 的 DNA 聚合酶活性: 以 cDNA 第一条链为模板合成互补的双链 cDNA。

【实验方法】利用北京全式金生物公司的反转录酶试剂盒进行 cDNA 合成。内含反转录酶及其缓冲液、随机引物、oligo d(T)、dNTP 等。

【实验材料】哺乳动物细胞全 RNA

【关键实验试剂说明书】

反转录试剂盒 http://www.transgen.com.cn/attached/download/1441004651_993842.pdf

【实验课时】3 学时

内容 3. PCR 检测奢侈基因 *VEGF* 的可变剪接

【实验原理】 真核基因序列包括外显子和内含子两部分，其中，内含子的转录产物会在 RNA 加工过程中被剪切。大多数真核基因可以利用不同的外显子、内含子的组合方式生产不同的成熟 mRNA，这一过程叫做可变剪接 (alternative splicing)。可变剪接是真核生物增加遗传信息多样性的重要途径之一。通过合理设计 PCR 引物，可以利用 RT-PCR 的方法直接观察基因的可变剪接现象。本实验观察的是 *VEGFA* 基因的可变剪接，引物分别位于 3 号、8 号外显子上。

PCR (Polymerase Chain Reaction)，即聚合酶链式反应，现在是最常见的分子生物学技术之一。PCR 反应由①高温变性②退火结合③引物延伸三步反应构成，通过多次循环使模板中的目的 DNA 迅速并特异性地扩增出来。PCR 反应的基本组分包括 DNA 模板、引物、DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、dNTPs 和 KCl 等。

【实验方法】 利用北京全式金生物公司的 Taq 酶等进行 PCR 反应。

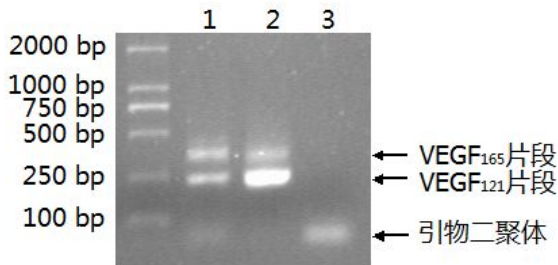
【实验材料】 哺乳动物细胞 cDNA

【关键实验试剂说明书】

Taq 酶 http://www.transgen.com.cn/attached/down/1436856954_504584.pdf

【实验课时】 6 学时

【代表性实验结果】



左图：琼脂糖电泳检测 *VEGFA* 的可变剪接现象。1、2 号泳道是两个实验组，3 号泳道是阴性对照组。实验组中可见两条大小不同的主带，分别对应的是 *VEGF*₁₆₅，*VEGF*₁₂₁ 这两种主要剪接本。对照组中仅隐约可见引物二聚体。

内容 4. 原核表达系统中 His-EGFP 融合蛋白的亲纯化

【实验原理】 基因工程中常用原核表达系统生产外源目的蛋白，本实验使用的 BL21 (DE3) 菌株携带 *pET28a-EGFP* 重组质粒，可以在合适浓度的 IPTG 诱导下表达目的蛋白 EGFP。*pET28a* 质粒属于一种常用的原核表达载体，它含有原核生物蛋白表达所需要的启动子，终止子以及核糖体结合位点等 DNA 元件以及 His Tag, T7 Tag 等序列标签。被插入到 MCS 内的外源基因的编码序列受到噬菌体来源的 T7 启动子的转录及翻译调控；在特定的诱导条件下，宿主细胞提供 T7 RNA 聚合酶诱导 T7 启动子表达下游的标签序列和外源基因，得到融合蛋白。

一些特殊氨基酸，如组氨酸，能与多种金属离子如 Cu^{2+} , Ni^{2+} 等发生相互作用。利用这一特点可以设计分离纯化表面富含组氨酸的蛋白质的有效方法。镍 NTA (Ni-NTA) 亲和层析介质是把螯合剂 NTA 与 Ni^{2+} 牢固结合，再共价偶联到琼脂糖介质上。这种介质可以用于纯化多种表达系统（如原核，酵母，昆虫细胞和哺乳动物细胞等）表达的天然或变性的 His 标签融合蛋白。

【实验方法】 利用 IPTG 诱导的方法进行 His-EGFP 蛋白的诱导表达，利用超声方法破菌，释放可溶性蛋白，利用 Ni-NTA 亲和层析柱进行 His-EGFP 亲和纯化。

【实验材料】 携带 *pET28a-EGFP* 重组质粒的 BL21 (DE3) 菌株

【关键实验试剂说明书】

Ni-NTA 珠子

<https://www.qiagen.com/cn/shop/sample-technologies/protein/protein-preparation/ni-nta-agarose/>

【实验课时】 12 学时

内容 5. 蛋白质电泳与考马斯亮蓝染色

【实验原理】 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE) 是以丙烯酰胺为介质的一种区带电泳, 是常用的蛋白质电泳方法, 也可以用于分离核酸。单体丙烯酰胺 (acrylamide) 和交联剂 N,N-甲叉双丙烯酰胺 (N,N-methylene-bisacrylamide) 在引发剂过硫酸铵 (Ammonium Persulfate, APS) 和催化剂 N,N,N',N'-四甲基乙二胺 (N, N, N, N'-tetramethylethylenediamine, TEMED) 的作用下产生自由基, 聚合交联成三维网状结构的凝胶。SDS-PAGE 是指在聚丙烯酰胺凝胶系统中引进 SDS (十二烷基磺酸钠)。SDS 属于阴离子去垢剂, 与蛋白质结合形成 SDS-蛋白质复合物。由于 SDS 带有大量负电荷, 蛋白质本身带有的电荷则被掩盖, 消除了蛋白质分子之间的电荷差异。因此, 蛋白质分子的迁移速度主要取决于蛋白质分子量的大小。

考马斯亮蓝 (Coomassie brilliant blue) 是一种三苯甲烷分子, 常用于蛋白定量和蛋白电泳中蛋白染色。考马斯亮蓝通过与蛋白质内的氨基和羧基基团间的静电结合作用以及范德华力, 与蛋白质形成强但非共价键连接的复合物。蛋白-染料复合物的形成可以稳定染料分子内携带的负电荷阴离子 (如磺酸基), 从而产生肉眼可见的蓝色。

【实验方法】 按照 SDS-PAGE 配方配置凝胶, 利用垂直电泳槽进行电泳, 电泳结束后利用考马斯亮蓝染色。

【实验材料】 诱导表达和亲和纯化过程中收集到的各个组分。

【关键实验试剂说明书】

SDS-PAGE

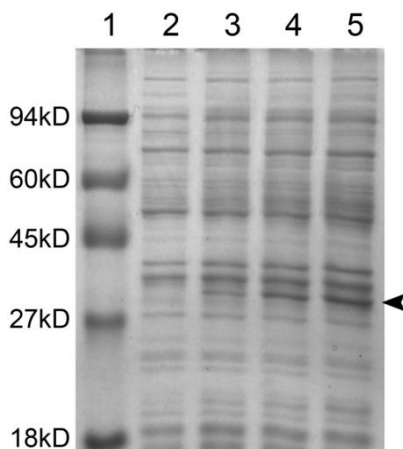
<http://www.bio-rad.com/zh-cn/product/electrophoresis-chambers/mini-protean-tetra-handcast-systems?tab=Combs>

蛋白质 Marker

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26620?ICID=search-product>

【实验课时】 6 学时

【代表性实验结果】



左图: GFP 小量诱导表达的分析。泳道 1, 蛋白质 marker, 泳道 2-4, IPTG 诱导后 0, 1, 2, 3 h 的菌体样品。

内容 6. 定量 PCR 检测真核表达系统中 EGFP 的 mRNA 表达水平

【实验原理】 定量 PCR，也叫 Real time PCR（实时监测 PCR），它具有特异性强、自动化程度高等特点。定量 PCR 是在 PCR 反应体系中加入荧光物质，并通过对 PCR 反应进程中的荧光信号强度进行实时监测，最终对实验数据进行分析处理，不需要对 PCR 产物进行分离，已被广泛地应用于分子生物学研究的各个领域，如 DNA 或 RNA 的绝对定量分析，基因差异表达分析和基因分型等等。定量 PCR 常用的两种方法分别为 SYBR Green 荧光染料掺入法和 Taqman 探针法。本实验采用 SYBR Green 法，在 PCR 反应体系中，SYBR Green 荧光染料可以特异性地掺入双链 DNA 产物中并发射荧光信号，而不掺入链中的 SYBR Green 染料分子不会发射任何荧光信号，荧光信号的强弱变化可以反映 PCR 产物量的变化。

【实验方法】 SYBR green 荧光染料掺入法。

【实验材料】 哺乳动物细胞 cDNA

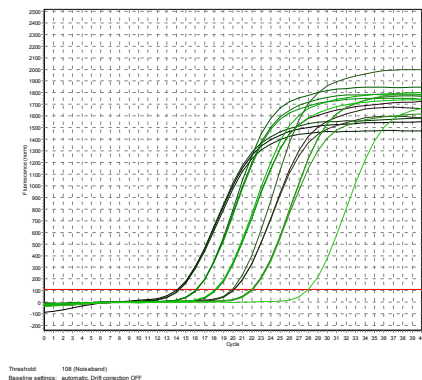
【关键实验试剂说明书】

SYBR Green

http://www.clontech.com/US/Products/Real-Time_qPCR_and_Reverse_Transcription/Real-Time_qPCR_SYBR_Detection/SYBR_Premix_Ex_Taq_II_Tli_Rnase_H_Plus

【实验课时】 6 学时

【代表性实验结果】



左图：EGFP 标准品和细胞 cDNA 中 EGFP 的扩增曲线。
横坐标：循环数；纵坐标：荧光信号强度。

内容 7. Western blot 检测原核表达系统中 EGFP 的蛋白表达水平

【实验原理】印迹法 (blot) 是指将样品转移到固相载体上, 而后利用相应的检测反应来检测样品的一种方法, 是一种将凝胶电泳技术、固定化技术及分子亲和技术融合一体的综合性技术。Western blot 技术, 首先将经 PAGE 电泳分离的蛋白质样品转移到固相载体, 例如硝酸纤维素膜 (nitrocellulose filter membrane, 简称 NC 膜)、聚偏二氟乙烯膜 (poly vinylidene fluoride membrane, 简称 PVDF 膜) 等, 转移后的固相载体表面保持电泳分离的蛋白质类型, 分布及活性不变。然后将固相载体上的蛋白质抗原与相应的抗体孵育, 再与酶/同位素/荧光标记的第二抗体进行免疫反应, 最后经过底物显色/放射自显影/自发荧光检测目的基因的蛋白表达产物。Western blot 技术被广泛应用于蛋白水平的表达检测, 可以定性, 也可以半定量。

【实验方法】 利用 anti-His 抗体和 anti-EGFP 抗体检测目的蛋白 His-EGFP。

【实验材料】 哺乳动物细胞裂解液。

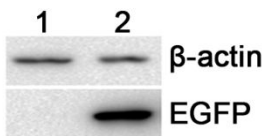
【关键实验试剂说明书】

Anti- β -actin 抗体 http://www.transgen.com.cn/attached/download/1437698514_547797.pdf

Anti-EGFP 抗体 <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g6539?lang=zh®ion=CN>

【实验课时】 12 学时

【代表性实验结果】



左图: 哺乳动物细胞中 β -actin 和 EGFP 的表达检测。泳道 1, 不表达 EGFP 蛋白的 SK-Hep1 细胞裂解液, 泳道 2, 表达 EGFP 蛋白的 SK-Hep1 细胞裂解液。