

深圳市农业地方标准

DB 440300/T 32.1—2007

农业转基因生物食用安全性检验 第 1 部分：样品制备

Edible safety determination of agriculture genetically modified organisms—
Part I: Method for sample preparation

2007-11-12 发布

2008-02-12 实施

深圳市质量技术监督局 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 DNA样品制备	1
5 RNA样品制备	2
6 蛋白质样品制备	3
7 外源基因表达产物制备	3
附录A（规范性附录） DNA样品制备	5
A.1 DNA样品制备常用试剂及仪器	5
A.2 DNA提取方法	6
附录B（规范性附录） RNA样品制备	8
B.1 RNA样品制备常用试剂及仪器	8
B.2 RNA提取方法	8
附录C（规范性附录） 蛋白质样品制备	10
C.1 蛋白质样品制备常用试剂及仪器	10
C.2 蛋白质提取制备方法	10
附录D（规范性附录） 外源基因表达产物制备	11
D.1 外源基因表达产物制备常用试剂及仪器	11
D.2 从转基因生物制备表达产物方法	12
D.3 工程菌的构建及培养方法	14
参考文献	16

前 言

DB 440300/T 32《农业转基因生物食用安全性检验》分成五个部分：

- 第1部分：样品制备；
- 第2部分：毒性检验；
- 第3部分：致敏性检验；
- 第4部分：抗营养作用检验；
- 第5部分：非期望效应检验。

本部分为DB 440300/T 32的第1部分。

附录A、B、C、D为规范性附录。

本部分由深圳市农林渔业局和深圳市卫生局提出。

本部分由深圳市农林渔业局和深圳市卫生局负责解释。

本部分主要起草单位：深圳市农作物良种引进中心、深圳市疾病预防控制中心。

本部分主要起草人：周向阳 邓平建 侯红利 杨冬燕 刘晋 杨永存 王学林 杨小柯 李永红 吴水清
周鹏 杜忠

农业转基因生物食用安全性检验

第1部分：样品制备

1 范围

本部分规定了农业转基因生物食用安全性检验样品的制备方法。

本部分适用于农业转基因生物非期望效应检验的DNA和RNA样品，以及毒性、致敏性、抗营养作用、非期望效应检验的蛋白质样品和外源基因表达产物的制备。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本部分，然而，鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本部分。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

SZJG 23 农业转基因生物食用安全性要求和评价

3 术语和定义

SZJG 23 确立的术语和定义适用于本部分。

4 DNA 样品制备

4.1 材料

转基因生物样品、受体生物样品、1.5 mL~5 mL 离心管、滤芯吸头（10 μ L，20 μ L，100 μ L，200 μ L，1 000 μ L）。

4.2 常用试剂与仪器

常用试剂与仪器见附录A.1。

4.3 样品前处理

4.3.1 植物样品

称取约50 g植物样品，置于经消毒灭菌处理的研钵或合适的粉碎装置中，将样品粉碎至约0.5 mm左右。

4.3.2 动物样品

动物组织样品：将新鲜的或-70 $^{\circ}$ C保存的动物组织1 g~3 g，置于经消毒灭菌处理的研钵中液氮碾成粉末状，然后，加入10 mL DNA提取液于50 mL的离心管中，混匀，37 $^{\circ}$ C保温1 h。

细胞培养样品：悬浮培养的细胞可以直接经低温4 $^{\circ}$ C，1 500 r/min离心10 min，收集细胞。对于贴壁培养细胞，用胰酶消化后再离心收集，细胞数应在 5×10^7 左右；将细胞重新悬浮在冰预冷的PBS液或生理盐水中，漂洗1次，再离心，弃上清收集细胞；重复漂洗步骤1次；用10 mL DNA提取液将细胞沉淀悬浮，移入50 mL离心管中，37 $^{\circ}$ C保温1 h。

血液样品：将20 mL新鲜血液与3.5 mL ACD抗凝液混匀，0 $^{\circ}$ C下可保存数天或-70 $^{\circ}$ C下长期冻贮，备用。用10 mL DNA提取缓冲液将细胞沉淀悬浮，移入50 mL离心管中，37 $^{\circ}$ C保温1 h。

4.3.3 微生物样品

细菌：培养5 mL的细菌培养物至饱和状态，取1.5 mL培养物于2.0 mL离心管中，1 200 r/min离心5 min，收集沉淀。

酵母：挑选酵母菌单菌落在YEPD完全培养基中30 °C培养过夜，取1.5 mL培养物于2.0 mL离心管中，1 200 r/min离心5 min，收集沉淀。

4.4 DNA 样品提取

DNA样品提取方法见附录A.2。

商品化试剂盒法：使用时按照相应的操作说明书进行操作。

4.5 DNA 提取质量的评估

4.5.1 凝胶电泳法

4.5.1.1 操作方法

将DNA样品点样于2%的琼脂糖凝胶上，采用1×TAE(或0.5×TAE)电泳缓冲液，在3 V/cm~5 V/cm条件下，电泳20 min~40 min，最后用溴化乙锭溶液染色观察结果。

4.5.1.2 结果判定

凝胶上呈现清晰的DNA条带，可判定DNA的提取符合要求。

凝胶上不出现DNA条带，或者凝胶上的条带不清晰，可判定DNA的提取不符合要求，必须重新提取样品DNA。

4.5.2 吸光度测定法

4.5.2.1 操作方法

用核酸蛋白分析仪分别测定样品DNA提取液的 $A_{260\text{nm}}$ 、 $A_{280\text{nm}}$ 。

4.5.2.2 结果判定

$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 在1.7~2.0之间时，可判定DNA的纯度符合后续检测的要求。

$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 小于1.7，或者大于2.0时，可判定DNA的纯度不符合后续检测的要求。必须对样品DNA作进一步的纯化，或者重新提取DNA，防止检测出现假阴性结果。

5 RNA 样品制备

5.1 材料

转基因生物新鲜组织或细胞、受体生物新鲜组织或细胞、DNA 分子量标记物、0.5 mL~5 mL 离心管、滤芯吸头(10 μL , 20 μL , 100 μL , 200 μL , 1 000 μL)及寡聚(dT)-纤维素。

5.2 常用试剂与仪器

常用试剂与仪器见附录B.1。

5.3 RNA 样品制备

5.3.1 总 RNA 制备

5.3.1.1 准备工作

用0.05% DEPC室温预处理50 mL 离心管1 h，然后高压灭菌30 min，去除残留的DEPC；从试剂盒中取出水饱和酚在室温下放置15 min，让各相分离。

5.3.1.2 样品制备

悬浮培养细胞：取悬浮培养细胞300 g，4 °C离心收集 1×10^8 个细胞，用25 mL 预冷的1×PBS漂洗细胞，离心收集，去上清，加15 mL 预冷的变性液，高速匀浆15 s~30 s。

贴壁培养细胞：计算好 1×10^8 个细胞所需培养瓶数后，用胰酶消化，离心收集细胞，细胞裂解方法同上。

植物组织或动物组织：将1 g 新鲜或液氮冻冰组织置于陶瓷研钵中，加入液氮研磨成细粉末，转移至含有12 mL 变性液的容器中匀浆。

5.3.2 RNA 提取

RNA提取方法见附录B.2。

5.3.3 mRNA 分离与纯化

寡聚(dT)—纤维素层析柱的制备及mRNA分离纯化试验方法见附录B的表B.2。

5.4 RNA 提取质量的评估

5.4.1 蛋白质或酚污染的检测

分别在230 nm、260 nm、280 nm处测定提取物溶液的吸光值，计算 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 及 $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ 的比值；纯净的RNA样品 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 的比值应在1.7~2.0之间。若小于1.7，则表明有蛋白质或酚试剂污染；应用等体积的酚/氯仿重新抽提去除蛋白质。

5.4.2 异硫氰酸胍污染的检测

$A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ 的比值应大于2.0。如小于2.0，则表明RNA被异硫氰酸胍污染。应通过乙醇或异丙醇重新沉淀（可反复多次），去除异硫氰酸胍。

5.4.3 RNA 含量的检测

纯净的RNA样品（无DNA及核苷酸杂质）260 nm的吸光度等于1.0时，RNA的含量为37 $\mu\text{g/mL}$ 。

$$\text{RNA含量} (\mu\text{g/mL}) = A_{260\text{ nm}} \times \text{稀释倍数} \times 37 \mu\text{g/mL}$$

6 蛋白质样品制备

6.1 材料

转基因生物样品、受体生物样品、1.5 mL~5 mL 离心管、滤芯吸头（10 μL ，20 μL ，100 μL ，200 μL ，1 000 μL ）。

6.2 常用试剂与仪器

常用试剂与仪器见附录C.1。

6.3 蛋白质提取

蛋白质提取见附录C.2。

6.4 蛋白质提取质量评估

6.4.1 操作方法

用核酸蛋白分析仪分别测定样品蛋白质提取液的 $A_{280\text{ nm}}$ 和 $A_{260\text{ nm}}$ 。

6.4.2 结果判定

$1.5A_{280\text{ nm}}/0.75A_{260\text{ nm}}$ 大于5时，蛋白质的纯度符合要求。

$1.5A_{280\text{ nm}}/0.75A_{260\text{ nm}}$ 小于5时，蛋白质的纯度不符合要求。必须对样品重新提取蛋白质。

7 外源基因表达产物制备

7.1 常用试剂与仪器

常用试剂与仪器见附录D.1。

7.2 材料

转基因生物样品、受体生物样品、含所需质粒载体的大肠杆菌、商品化的质粒载体、含外源结构基因的工程菌样品、受体菌样品、外源基因表达产物标准品、透析袋、色谱柱（离子交换色谱柱、凝胶过滤色谱柱、反相层析色谱柱、疏水层析色谱柱、亲和层析色谱柱）。

7.3 从转基因生物制备表达产物

7.3.1 蛋白质提取

按本部分6.3执行。

7.3.2 蛋白质提取质量评估

按本部分 6.4 执行。

7.3.3 表达产物的分离、复性、复性率检测、纯化及蛋白脱盐

按附录D.2进行实验。

7.3.4 表达产物的测定

7.3.4.1 表达产物等同性的鉴定

采用生物活性、分子量和氨基酸序列测定方法，鉴定上述蛋白纯品与外源基因表达产物标准品的等同性。

7.3.4.2 表达产物浓度的测定

测定方法：取适量蛋白溶液，置于比色杯中，用溶解蛋白的缓冲液为对照，在280 nm和260 nm处测量吸光度。

计算方法：蛋白质溶液的浓度按下式计算：

$$\text{蛋白质浓度 (mg/mL)} = 1.5A_{280\text{nm}} - 0.75A_{260\text{nm}}$$

7.4 从构建工程菌制备外源基因表达产物

7.4.1 工程菌的构建及培养

按附录D.3的方法进行试验。

7.4.2 工程菌鉴定

7.4.2.1 制备含相应抗生素（此抗生素为所用质粒载体的选择标记，抗生素浓度一般为 50 mg/L）的固体平板。

7.4.2.2 取 200 μL 菌液与 4 μL IPTG 及 40 μL X-gal（200 mg/mL）混匀。

7.4.2.3 用无菌吸头将混合液移至 LB 平板上，再用无菌三角头玻璃棒将菌液均匀涂满整个平板表面。

7.4.2.4 平板于 37 $^{\circ}\text{C}$ 正向放置至液体被吸收，然后倒置平皿，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h~16 h，挑选白色菌落用于工程菌的鉴定。鉴定可采用质粒 DNA 分子大小、质粒 DNA 限制性酶切和外源基因片段扩增等方法。

7.4.3 菌种保存

7.4.3.1 固体 LB 培养基高温灭菌后冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右，加入适量对应的抗生素，轻摇使混匀。

7.4.3.2 5 mL/支分装至 30 mL 试管中，塞上试管塞。

7.4.3.3 立即将试管倾斜放置在一支持物上，使培养基的前沿位于试管长度的 1/2 处，静置使培养基凝固。

7.4.3.4 用火焰灭菌的接种环取菌种在抗性 LB 平皿上划线分离单菌落。

7.4.3.5 平皿倒置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 或 37 $^{\circ}\text{C}$ （带温敏启动子的菌种应在 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养，其他菌种可用 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养）恒温培养箱中培养 24 h~28 h，至单菌落大小为 3 mm 左右。

7.4.3.6 用火焰灭菌的接种环挑选单一菌落，在固体 LB 斜面上划线接种。

7.4.3.7 30 $^{\circ}\text{C}$ （或 37 $^{\circ}\text{C}$ ）培养箱培养 24 h~48 h。

7.4.3.8 用无菌橡皮塞代替试管塞，4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

7.4.4 发酵培养

7.4.4.1 根据工程菌生长和产物合成的需要，选择和配制相应的培养基。

7.4.4.2 在合适的培养条件下，对工程菌进行发酵培养，并诱导其中的外源基因进行表达。

7.4.5 蛋白质提取

按本部分6.3执行。

7.4.6 蛋白质提取质量评估

按本部分 6.4 执行。

7.4.7 表达产物的分离、复性、复性率的检测、纯化及蛋白脱盐

按本部分7.3.3执行。

7.4.8 表达产物的测定

按本部分7.3.4执行。

附 录 A
(规范性附录)
DNA 样品制备

A.1 DNA样品制备常用试剂及仪器

类型	样品制备及DNA提取试剂	仪器
植物	①1.5×CTAB提取液 [1.5% (w/v) CTAB, 75 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L NaCl, 15 mmol/L EDTA] ; ②10% CTAB溶液 [10% CTAB, 可以加入0.7 mol/L NaCl] ; ③沉淀液 [1% CTAB, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 10 mmol/L EDTA] ; ④高盐TE [1 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA] ; ⑤TE溶液 [0.01 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA] ; ⑥RNase A溶液 [10 mg/mL] 。	a) 电子天平 (感量为 0.001 g) ; b) 恒温孵育装置; c) 普通离心机; d) 低温冷冻高速离心机; e) 微型离心机; f) 研钵及粉碎装置; g) 低温冰箱; h) 普通冰箱; i) 旋涡振荡器; j) 高压灭菌器; k) 高温干燥箱; l) 核酸蛋白分析仪; m) 微量移液器; n) 超净工作台; o) 电泳仪; p) 凝胶成像系统; q) 酸度计; r) 实验用水制备装置。
动物	①磷酸盐缓冲液 (PBS) ; ②DNA 提取缓冲液 [0.01 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mmol/L EDTA (pH 8.0), 20 μg/mL 胰 RNA 酶, 0.5% SDS] ; ③蛋白酶 K; ④酚 [用 0.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 饱和] ; ⑤TE 溶液 [0.01 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA] ; ⑥无水乙醇; ⑦ACD 抗凝液 [柠檬酸 0.48 g, 柠檬酸钠 1.32 g, 右旋葡萄糖 1.47 g, 加水至 100 mL]。	
微生物	①TE溶液 [0.01 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA] ; ②CTAB提取液 [2% (w/v) CTAB, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA] ; ③20 mg/mL蛋白酶K; ④5 mol/L NaCl; ⑤氯仿/异戊醇 (24:1) ; ⑥酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) ; ⑦4 mol/L 乙酸铵; ⑧90% 乙醇; ⑨10% (w/v) SDS; ⑩YEPD完全培养基。	
凝胶电泳	①溴化乙锭 (EB) (10 mg/mL) 或其他的染色剂; ②琼脂糖: 电泳纯; ③50×TAE缓冲液 [242 g Tris碱, 57.1 mL冰乙酸, 100 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 加水至1 000 mL] ; ④上样缓冲液。	
注 1: 除另有规定外, 所使用的试剂为分析纯或生化试剂。 注 2: 实验用水按GB/T 6682的规定执行。		

A.2 DNA提取方法

A.2.1 植物（CTAB法）

- 1) 液氮研磨至粉末状，每份称取约 100 mg 样品，加入 1.5 mL 或 2.0 mL 离心管。
- 2) 加入 400 μ L CTAB 提取液（预热至 80 $^{\circ}$ C），摇匀，56 $^{\circ}$ C 水浴保温 15 min~20 min 或更久（常摇）。
- 3) 加入 300 μ L 氯仿/异戊醇（24:1），将离心管上下翻转，充分混匀约 5 min，12 000 r/min 离心 5 min~6 min。
- 4) 取上清，加 1/10 体积的 10% CTAB 液，摇匀。
- 5) 加入 300 μ L 氯仿/异戊醇（24:1），充分混匀约 5 min，12 000 r/min 离心 5 min。
- 6) 取上清，加等量 CTAB 沉淀液，轻轻摇匀，室温放置至少 10 min~15 min，12 000 r/min，离心 10 min。
- 7) 弃尽上清，加 100 μ L 高盐 TE 和 5 μ L 10 mg/mL RNase，55 $^{\circ}$ C 轻摇至完全溶解（约 10 min）。
- 8) 加入 2 倍体积冷无水乙醇，摇匀，12 000 r/min 离心 10 min。
- 9) 加入至少 200 μ L 的 70% 乙醇洗涤 1~2 次，12 000 r/min 离心沉淀。
- 10) 弃乙醇，风干，30 μ L~50 μ L TE 溶解。

A.2.2 动物（酚提取法）

- 1) 上述样品加入 20 mg/mL 的蛋白酶 K 至终浓度为 100 μ g/mL，边加边用玻棒轻轻搅拌，使溶液至粘稠状。
- 2) 50 $^{\circ}$ C 保温 3 h，裂解细胞，消化蛋白。保温过程中，应不时轻轻摇匀反应液。
- 3) 将反应液冷却至室温，加入等体积已饱和的酚溶液，温和地上下转动离心管混匀两相，反复该动作 10 min，直至水相与酚相混匀成乳状液，若没有达到这种效果，可用多角度摇荡混匀器温和地混匀 1 h。
- 4) 室温 5 000 r/min 离心 15 min，使用大口径（0.3 cm）吸管小心吸出上层粘稠水相，移至另一离心管中，重复③、④，用酚抽提 2 次。
- 5) 在第三次酚抽提后，将上层水相移入新离心管中，加入 0.2 倍体积的 10 mol/L 乙酸铵和 2 倍体积 95% 乙醇，室温下轻慢摇动混匀，当即可见到乳白色丝状 DNA 沉淀出现，用自制前端为钩状的玻璃棒捞出 DNA 纤维，立即放入 70% 乙醇中漂洗 2 次，室温 5 000 r/min 离心 5 min，弃上清，室温挥发迹量乙醇，不要使 DNA 沉淀完全干燥，按每 5×10^6 个细胞 DNA 提取物加入 1 mL TE 溶解 DNA，一般需要 12 h~24 h。

A.2.3 微生物

A.2.3.1 细菌样品的CTAB法

- 1) 在含有沉淀物的离心管中加入 567 μ L TE 缓冲液，用吸管反复吹打使之重悬，加入 30 μ L 10% SDS 和 3 μ L 20 mg/mL 蛋白酶 K，混匀，于 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h。
- 2) 加入 100 μ L 5 mol/L NaCl，充分混匀，再加入 80 μ L CTAB/NaCl 溶液，混匀，于 65 $^{\circ}$ C 温育 10 min。
- 3) 加入等体积的氯仿/异戊醇，混匀，高速离心 5 min，将上清液移入另一离心管中，如果难以移出上清，先用牙签除去界面物质。
- 4) 加入等体积酚/氯仿/异戊醇溶液，混匀，高速离心 5 min，将上清液移入另一离心管中。
- 5) 加入 0.6 倍体积异丙醇，轻轻混合直到 DNA 沉淀下来。
- 6) 高速离心 5 min，弃上清，用 1 mL 70% 乙醇洗涤沉淀，离心，弃上清，用冻干机稍加干燥，重溶于 100 μ L TE 缓冲液。

A.2.3.2 酵母样品的CTAB法

- 1) 在含有沉淀物的离心管中加入 200 μ L 酚/氯仿/异戊醇溶液重悬。
- 2) 加 0.3 g 玻璃珠及 200 μ L 酚/氯仿/异戊醇溶液，在旋涡混合器上高速振荡 3 min。

- 3) 加入 200 μL TE 缓冲液, 快速振荡, 高速离心 5 min, 室温下将水相转移至一个干净的离心管中, 加 1mL 无水乙醇, 颠倒混匀。
- 4) 室温下高速离心 3 min, 去上清, 沉淀用 400 μL TE 缓冲液重悬。
- 5) 加 30 μL RNase A 酶溶液, 混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 min。
- 6) 加 10 μL 4 mol/L 乙酸铵和 1 mL 无水乙醇, 颠倒混匀, 室温下高速离心 3 min, 弃上清, 干燥沉淀, DNA 用 100 μL TE 缓冲液重悬。

附录 B
(规范性附录)
RNA 样品制备

B.1 RNA样品制备常用试剂及仪器

类型	样品制备及RNA提取试剂	仪器
总RNA提取试剂	①RNA 提取试剂盒 [50 g 异硫氰酸胍 (2×25 g)、75 mL CBS (柠檬酸/十二烷基肌氨酸钠/β-巯基乙醇) 缓冲液、10 mL 2 mol/L NaAc (pH4.0)、酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)、100 mL 异丙醇、25 mL 无 RNase 水] ; ②75% 冰冷乙醇; ③10×PBS溶液 [11.5 g NaHPO ₄ , 2 g KH ₂ PO ₄ , 80 g NaCl, 2 g KCl溶于 1 L灭菌去离子水中。1×PBS溶液的pH为 7.4] ; ④变性液 [加 33 mL CSB 缓冲液于 25 g 异硫氰酸胍中, 充分混匀直至所有成分完全溶解, 65 °C加热有助于溶解, 配好后可贮存于 4 °C] 。 ⑤0.05% DEPC(二乙基焦碳酸盐)。	同附录 A.1 仪器的规定
mRNA分离与纯化试剂	①0.1 mol/L NaOH; ②1×上样缓冲液 [2.0 mmol/L Tris-HCl (pH7.6), 0.5 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA (pH8.0), 0.1% 十二烷基肌氨酸钠 (SLS)]; ③洗脱缓冲液 [10 mmol/L Tris-HCl (pH7.6), 1 mmol/L EDTA (pH8.0), 0.05% SDS]; ④3 mol/L NaAc (pH5.2); ⑤无水乙醇。	
注 1: 除另有规定外, 所使用的试剂为分析纯或生化试剂。 注 2: 实验用水按GB/T 6682的规定执行。		

B.2 RNA提取方法**B.2.1 RNA提取**

1) 匀浆后的组织细胞移至 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 1.2 mL 2 mol/L NaAc (pH 4.0), 加盖并反复颠倒离心管。

2) 加入 12 mL 酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 混匀, 强力振荡 10 s, 冰浴 15 min。

3) 4 °C, 12 000 r/min 离心 20 min 沉淀 RNA。

4) 小心吸取上层水相 (含 RNA) 至一个新的 50 mL 离心管 (经 DEPC 处理) 中, 注意不要吸出中间层, 该层富含蛋白质和 DNA。

5) 加等体积异丙醇与样品混匀置 -20 °C 沉淀 RNA 30 min。对于 RNA 含量极少的样品可沉淀过夜提高回收率。

6) 4 °C, 12 000 r/min 离心 15 min 沉淀 RNA。

7) 弃上清, 将 RNA 沉淀重新悬浮于 5 mL 变性溶液中, 置旋转摇床上多角度摇晃直至 RNA 溶解, 也可加热至 65 °C 促进溶解 (时间尽可能短)。

8) 加入等体积酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)重新抽提 1 次, 即重复 2) ~4) 步骤。

9) 重复 5)、6) 步骤。

10) 离心后, 弃上清, 加 75% 预冷乙醇 10 mL, 漂洗沉淀, 离心, 弃上清。

11) 真空干燥去除样品中的乙醇, 不宜完全干燥, 否则沉淀难以溶解。

12) 将 RNA 溶于 1 mL ~ 3 mL 无 RNase 的去离子双蒸水中, -20 °C 保存备用。

B.2.2 mRNA分离与纯化**B.2.2.1 寡聚(dT)—纤维素层析柱的制备**

1) 将 0.5g ~ 1.0 g 寡聚(dT)—纤维素悬浮于 0.1 mol/L NaOH 溶液中。

2) 用 DEPC 处理的 1 mL 注射器或适当的吸管, 再高压消毒, 将寡聚(dT)—纤维素装柱 0.5 mL~1 mL, 用 3 倍柱床容积的消毒水洗柱。

3) 用 1×上样缓冲液洗柱, 直到洗出液 pH 值小于 8.0。

B. 2. 2. 2 分离与纯化

1) 将总 RNA 溶于消毒水中, 65 °C 加热 5 min, 用水将其冷却至室温, 加入等体积 2×上样缓冲液, 混匀后直接上柱, 马上收集流出液, 当总 RNA 上样液全部进入柱床后, 再用 1 柱床容积的 1×上样缓冲液洗柱, 继续收集流出液。

2) 所有液体流出后, 将收集液 65 °C 加热 5 min, 冷至室温后重新上柱, 再收集流出液。

3) 用 5~10 倍柱床容积的 1×上样缓冲液洗柱, 除去 rRNA 和 tRNA, 每管 1 mL 分部收集, A_{260} 测定 RNA 含量。前部分收集管的 A_{260} 较高, 其内容物为 poly(A) 尾的 RNA, 后部分收集管中洗脱液的 A_{260} 较低或无吸收。

4) 用 2~3 柱床容积的洗脱缓冲液洗脱 poly(A⁺) RNA, 分部收集, 每部分为 1/3~1/2 柱容积。

5) 用 A_{260} 测定 poly(A⁺) RNA 的分布, 合并含 poly(A⁺) RNA 的收集管, 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH 5.2) 混匀后, 加 2.5 倍体积的预冷无水乙醇, 混匀, -20 °C 沉淀 RNA 30 min。

6) 4 °C, 10 000 r/min 离心 15 min, 小心吸弃上清, poly(A⁺) RNA 沉淀此时往往看不见, 用 70% 乙醇漂洗沉淀, 室温, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 室温蒸发乙醇。

7) 用适量无 RNase 的去离子双蒸水溶解 RNA, 加入 3 倍体积的乙醇混匀后, -70 °C 长期保存。使用前, 加入 0.1 倍体积的 3 mol/L NaAc (pH 5.2) 混匀, 4 °C, 12 000 r/min 离心 5 min, 收集 poly(A⁺) RNA。

附 录 C
(规范性附录)
蛋白质样品制备

C.1 蛋白质样品制备常用试剂及仪器

类型	样品制备及DNA提取试剂	仪器
植物细胞裂解缓冲液	60 mmol/L Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 1.44 mmol/L β -巯基乙醇, 25% 甘油, 0.1% 溴酚蓝, 用去离子水配制, 避光贮存于棕色瓶中, 4 °C 保存。	同附录A.1 仪器的规定
动物细胞裂解缓冲液	50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 150 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 1 μ g/mL 抑蛋白酶肽 (Aprotinin), 1% 非离子去污剂 (Nonidet P-40, NP-40) 或 1% Triton X-100, 1% 去氧胆酸钠, 用去离子水配制, 避光贮存于棕色瓶中, 4 °C 保存。	
酵母细胞裂解缓冲液	50 mmol/L Tris-HCl (pH7.5), 150 mmol/L NaCl, 1% 非离子去污剂 (Nonidet P-40, NP-40) 或 1% Triton X-100, 0.5% 去氧胆酸钠, 0.1% SDS, 用去离子水配制, 避光贮存于棕色瓶中, 4 °C 保存。	
细菌裂解缓冲液	100 mmol/L Tris-HCl (pH6.8), 200 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT) (用前现加), 4% SDS, 0.2% 溴酚蓝, 20% 甘油, 用去离子水配制, 避光贮存于棕色瓶中, 4 °C 保存。	
注 1: 除另有规定外, 所使用的试剂为分析纯或生化试剂。		
注 2: 实验用水按 GB/T 6682 的规定执行。		

C.2 蛋白质提取制备方法**C.2.1 植物细胞**

取约 1 g 的新鲜样品, 液氮研磨, 移至 15 mL 离心管中, 在冰浴条件下加入 1 mL 植物细胞裂解缓冲液 (预冷至 0 °C), 充分混匀。冰浴 20 min; 4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min。收集上清液, 冷冻干燥或 4 °C 保存。

C.2.2 动物细胞

悬浮培养的细胞可以直接经低温 4 °C, 1 500 r/min 离心 10 min, 收集细胞。对于贴壁培养细胞, 用胰酶消化后再离心收集, 细胞数应在 5×10^7 左右。在冰浴条件下加入 1 mL 动物细胞裂解缓冲液 (预冷至 0 °C), 充分混匀。冰浴 20 min; 4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min。收集上清液, 冷冻干燥或 4 °C 保存。

C.2.3 酵母

挑选酵母菌落在 YEPD 完全培养基中 30 °C 培养至 A_{600} 达 5~10, 1.5 mL 的培养物, 在 2.0 mL 离心管中 1 500 r/min 离心 2 min, 去除上清。在冰浴条件下加入 1 mL 酵母细胞裂解缓冲液 (预冷至 0 °C), 充分混匀。冰浴 20 min; 4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min。收集上清液, 冷冻干燥或 4 °C 保存。

C.2.4 细菌

培养 5 mL 的细菌培养物至饱和状态, 取 1.5 mL 的培养物, 在 2.0 mL 离心管中 1 500 r/min 离心 2 min, 去除上清。在冰浴条件下加入 1 mL 细菌裂解缓冲液 (预冷至 0 °C), 充分混匀。冰浴 20 min; 4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min。收集上清液, 冷冻干燥或 4 °C 保存。

附 录 D
(规范性附录)
外源基因表达产物制备

D.1 外源基因表达产物制备常用试剂及仪器

试剂名称	组 分	仪 器
植物细胞裂解缓冲液	同附录 C 表 C.1 相应规定。	a) 中压液相色谱仪; b) 自动部分收集器; c) 中压液相色谱系统; d) 抽滤装置: 配0.45 μm滤膜, 抽滤瓶体积为5L; e) 其他仪器同附录A表A.1仪器的规定。
动物细胞裂解缓冲液	同附录 C 表 C.1 相应规定。	
酵母细胞裂解缓冲液	同附录 C 表 C.1 相应规定。	
细菌裂解缓冲液	同附录 C 表 C.1 相应规定。	
大肠杆菌质粒载体DNA提取和纯化	①STE [STE: 0.1 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0), 高压蒸汽灭菌后于4 °C贮存]; ②溶液 I [50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 10 mmol/L EDTA (pH 8.0), 高压蒸汽灭菌, 于4 °C贮存]; ③溶液 II [0.2 mol/L NaOH, 1% SDS (新鲜配制)]; ④溶液 III [5 mol/L KAc 60 mL, 冰乙酸11.5 mL, dH ₂ O 28.5 mL (pH 4.8)。也可以按KAc 29.4 g, 冰乙酸11.5 mL, 加蒸馏水至100 mL配制]; ⑤RNase A溶液 (10 mg/mL); ⑥Tris平衡酚, 酚/氯仿溶液。	
外源基因与载体限制酶酶切与连接反应	①限制酶及相应的缓冲液; ②T ₄ DNA连接酶及缓冲液; ③碱性磷酸酶 (CIP) 及缓冲液; ④DNA聚合酶 I 大片段及缓冲液; ⑤T ₄ DNA聚合酶及缓冲液; ⑥1 mol/L Tris-HCl (pH 7.6), 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3); ⑦100 mmol/L MgCl ₂ . ⑧200 mmol/L DTT; ⑨10 mmol/L ATP; ⑩10 mmol/L ZnCl ₂ 。	
重组质粒转化大肠杆菌	①0.1 mol/L CaCl ₂ 溶液; ②20 mg/mL X-gal: 溶于二甲基甲酰胺, 分装, 避光保存; ③200 mg/mL IPTG: 溶于水, 0.22 μm滤膜过滤, 分装, -20 °C贮存。	

(续表 D.1)

外源基因表达 产物分离	①流动相 [8 mol/L 尿素, 1 mmol/L DTT, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)] ; ②稀释用变性液 [0.6 mol/L 盐酸胍, 0.1 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 0.9 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 20 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)] ; ③TE缓冲液 [20 mmol/L Tris-HCl (pH7.0), 使用前抽滤脱气] 。
外源基因表达 产物复性检测	①流动相A [0.1%TFA + 超纯水] ; ②流动相B [0.1%TFA + 乙腈] ; ③流动相C [20 mmol/L BP, pH7.0, 0.6 mol/L 盐酸胍] 。
外源基因表达 产物纯化	①TE缓冲液 [20 mmol/L Tris-HCl (pH7.0), 使用前抽滤脱气] ; ②B溶液 [NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl (pH7.0), 使用前抽滤脱气] ; ③C溶液 [1 mol/L Na ₂ SO ₄ , 20 mmol/L Tris-HCl (pH7.0), 使用前抽滤脱气] ; ④1 mol/L HCl。
注 1: 除另有规定外, 所使用的试剂为分析纯或生化试剂。 注 2: 实验用水按GB/T 6682的规定执行。	

D.2 从转基因生物制备表达产物方法

D.2.1 表达产物的分离

1) 根据需要制备的表达产物的数量, 收集蛋白质提取物, 用流动相配制含蛋白(5~10)mg/mL 的样品溶液。

2) 根据待分离表达产物的性质, 选用适当的离子交换色谱柱。

3) 液相色谱仪装上交换柱, 按液相色谱仪操作说明开启仪器, 平衡色谱柱。

4) 用注射器将 25 mL 样品溶液注入进样环。

5) 用流动相以流速 9 mL/min 洗脱。

6) 进样后 1.5 h 开始, 用分步收集仪, 20 μ L /管收集洗脱液。

7) 取各洗脱峰对应的收集管样品 20 μ L / 管, 作 SDS-PAGE 分析。

8) 将含表达产物的收集管的收集液合并, 用作蛋白复性的样品。

D.2.2 表达产物的复性

1) 将 5 mL 蛋白复性样品溶液加入到 245 mL 稀释用变性液中, 搅拌均匀。

2) 稀释后的蛋白复性样品溶液装入预先处理过的 3 只透析袋中两端用透析袋夹夹紧。

3) 将透析袋放入一只装有 5 L 复性液的烧杯中, 4 $^{\circ}$ C, 搅拌透析 5 h。

4) 将透析袋取出, 放入另一装有 5 L 复性液的烧杯中, 4 $^{\circ}$ C, 搅拌透析 10 h~15 h。

5) 将透析袋取出, 放入另一装有 5 L TE 缓冲液的烧杯中, 4 $^{\circ}$ C, 搅拌透析 10 h~15 h。

6) 将透析袋溶液合并。用低温高速离心机, 4 $^{\circ}$ C, 15 000 r/min 离心 30 min。

7) 上清用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤, 滤液即可用于蛋白复性的检测。

D.2.3 蛋白复性率的检测

D.2.3.1 反相高压液相色谱法

1) 液相色谱仪装上反相色谱柱或者 C18 柱, 按液相色谱仪操作说明开启仪器。在色谱仪的 A、B 通道, 分别放流动相 A 和流动相 B, 冲洗 A、B 通道。

2) 开紫外检测器, 设定检测波长为 280 nm。

3) 以 100% A, 0.5 mL/min 的流速平衡柱, 至基线平稳。

4) 设定洗脱程序: 0 min, 100% A, 0%B; 5 min, 100% A, 0% B; 65 min, 10% A, 90% B。

5) 分别进 20 μL 0.1 mg/mL、0.06 mg/mL、0.03 mg/mL、0.01 mg/mL 目标蛋白标准溶液, 启动洗脱程序, 测定目标蛋白标准样品的峰面积。以目标蛋白浓度对峰面积作标准曲线。

6) 取蛋白复性检测样品 20 μL 进样, 启动洗脱程序。测定与目标蛋白标准同一保留时间的峰面积, 代入标准曲线计算复性蛋白含量。并根据蛋白复性样品中目标蛋白的含量, 计算目标蛋白的复性率。需要时, 对样品作进一步复性处理, 或者改用其他方法对样品作复性处理。

D. 2. 3. 2 凝胶高压液相色谱法

1) 液相色谱仪装上凝胶层析柱, 按液相色谱仪操作说明开启仪器。在色谱仪的 A 通道, 放流动相 C, 冲洗 A 通道。

2) 开紫外检测器, 设定检测波长为 280 nm。

3) 以 100% C, 0.5 mL/min 的流速平衡柱, 至基线平稳。

4) 设定洗脱程序: 100% A, 45 min。

5) 分别进 20 μL 0.1 mg/mL、0.06 mg/mL、0.03 mg/mL、0.01 mg/mL 目标蛋白标准溶液, 启动洗脱程序, 测定目标蛋白标准样品的峰面积。以目标蛋白浓度对峰面积作标准曲线。

6) 取蛋白复性检测样品 20 μL 进样, 启动洗脱程序。测定与目标蛋白标准同一保留时间的峰面积, 代入标准曲线计算复性蛋白含量。并根据蛋白复性样品中目标蛋白的含量, 计算目标蛋白的复性率。需要时, 对样品作进一步复性处理, 或者改用其他方法对样品作复性处理。

D. 2. 3. 3 表达产物的初步纯化

1) 以上述经复性的表达产物溶液为样品, 可根据需要制备的表达产物的数量, 将同一样品多个复性表达产物溶液合并为一个样品。

2) 1.5 L 蛋白提取物中边搅拌边滴加 1 mol/L HCl, 并用酸度计测定溶液的 pH 值, 至 pH 7.0, 继续搅拌 30 min。

3) 蛋白提取溶液用 0.45 μm 滤膜的抽滤装置抽滤。

4) 液相色谱仪装上阴离子交换柱, 按液相色谱仪操作说明开启仪器, 平衡色谱柱。

5) 以流速 6 mL/min 上样。上样后将通道进液口溶液换回 TE 缓冲液, 流速 2 mL/min 冲洗 30 min。

6) 梯度洗脱, 流速 2 mL/min, 4 mL/管收集洗脱液。

7) 每个收集管取 20 μL 样品, 作 SDS-PAGE 分析。将含有表达产物, 且纯度较高的收集管溶液合并, 用于进一步纯化。

D. 2. 4 表达产物的进一步纯化

1) 样品准备: 上一步蛋白样品中加入硫酸钠至浓度为 1 mol/L。

2) 溶液用 0.45 μm 滤膜的抽滤装置抽滤。

3) 液相色谱仪装上疏水层析柱, 按液相色谱仪操作说明开启仪器, 平衡色谱柱。

4) 用注射器将样品溶液注入进样环。

5) 流速 4 mL/min 冲洗柱 30 min。

6) 梯度洗脱, 流速 4 mL/min, 4 mL/管收集洗脱液。

7) 每个收集管取 20 μL 样品, 作 SDS-PAGE 分析。将含有目标蛋白, 且纯度 $\geq 95\%$ 样品收集管溶液合并。

D. 2. 5 蛋白脱盐

1) 液相色谱仪装上凝胶层析柱, 按液相色谱仪操作说明开启仪器, 平衡色谱柱。

2) 以流速 15 mL/min 上样。上样后将通道进液口溶液换回 B 溶液, 流速 15 mL/min 洗脱。

3) 收集第一峰即为蛋白纯品。

注: 反相高压液相色谱法和凝胶高压液相色谱法常用于目标蛋白复性过程中复性速度和复性终点的检测。反相高压液相色谱法利用不同构型蛋白的疏水性不同, 在反相色谱柱上会有不同的保留时间, 从而分析蛋白不同复性状态的含量; 凝胶高压液相色谱法利用不同构型蛋白的水化半径不同, 在凝胶色谱柱上会有不同的保留时间, 从而分析蛋白不同复性状态的含量。根据目标蛋白的性质, 可选择下述反相高压液相色谱法或凝胶高压

液相色谱法检测目标蛋白的复性率。

D.3 工程菌的构建及培养方法

D.3.1 外源基因DNA片断的制备

1) 方法一：采用PCR扩增方法，从转基因生物细胞的DNA提取物中扩增所需的外源基因DNA片段，经凝胶电泳分离后，回收外源基因DNA片段。

2) 方法二：采用PCR扩增方法，从含有所需外源基因的质粒中扩增所需的外源基因DNA片段，经凝胶电泳分离后，回收外源基因DNA片段。

3) 方法三：根据所需的外源基因的核酸序列，合成相应的DNA片段。

D.3.2 质粒载体DNA的制备

1) 从LB平板上挑选含所需质粒的大肠杆菌单菌落，接种于5 mL附加相应抗生素的LB液体培养基中，37 °C条件下250 r/min振荡培养过夜（至对数生长期后期）。

2) 取1.2 mL~1.5 mL菌液移至1.5 mL无菌Eppendorf管中，12 000 r/min离心30 s，弃上清。

3) 加入1 mL STE溶液，涡旋振荡重悬菌体，12 000 r/min离心30 s，弃上清，用无菌吸水纸条吸去管壁上的液滴。

4) 重复3)操作1次。

5) 向离心管内加入100 μL冰冷的溶液I，涡旋振荡悬浮菌体。

6) 加入200 μL新配制的溶液II，迅速盖严离心管盖，快速颠倒（千万不要振荡）离心管5次，室温放置5 min。

7) 向离心管内加入150 μL溶液III，颠倒离心管10次，冰浴5 min~10 min，12 000 r/min离心10 min。

8) 将上清液转入1.5 mL无菌Eppendorf管中，加入1/10体积RNase A溶液，37 °C保温1 h至过夜。

9) 分别用1倍体积的Tris平衡酚、酚/氯仿、氯仿各抽提1次，每次抽提后均于12 000 r/min离心5 min，仔细吸取上层水相。

10) 将氯仿抽提后的上层水相转入无菌Eppendorf管中，加入1倍体积的水饱和乙醚，颠倒混匀，12 000 r/min离心5 min，取下层水相，转入无菌Eppendorf管中，打开离心管盖，68 °C水浴5 min，以除去残留的乙醚。

11) 冷至室温，加入2倍体积无水乙醇，-20 °C放置30 min（或加入2/3体积异丙醇，混匀，立即离心）。

12) 4 °C、12 000 r/min离心10 min，弃去上清液，用无菌吸水纸条吸去管壁上的液滴。

13) 用500 μL 70%乙醇洗沉淀1~3次，空气中干燥。

14) 加入适量（10 μL~20 μL）TE溶解质粒DNA。

15) 按本标准7.4的DNA提取质量评估方法，检测提取DNA的纯度和含量。

D.3.3 外源基因与载体的限制酶酶切及连接

D.3.3.1 不对称相容末端的酶切及连接

1) 在A、B两个Eppendorf管中分别加入以下试剂：A管：ddH₂O 11 μL、10×buffer 2 μL、外源基因片段（1 μg/μL）5 μL、限制酶I 1 μL、限制酶II 1 μL； B管：ddH₂O 15 μL、10×buffer 2 μL、载体DNA（1 μg/μL）1 μL、限制酶I 1 μL、限制酶II 1 μL。

2) 各管分别混匀，瞬时离心。

3) 37 °C保温3 h。

4) 65 °C保温10 min，灭活限制酶。

5) 加入适量的加样缓冲液，混匀，离心5 s，分别上样于已制备好的1%琼脂糖凝胶两个样品槽中，同时于最外侧的样品槽中加入1 μg分子质量标准DNA样品。

6) 3 V/cm电泳1 h~2 h。

7) 回收：按DNA回收试剂盒说明进行。

- 8) 在1.5 mL Eppendorf管中加入以下试剂: ddH₂O 12 μL、酶切后回收的外源基因片段 (0.1 μg/μL) 4 μL、酶切后回收的载体DNA (0.1 μg/μL) 1 μL、10×连接酶缓冲液2 μL、T₄ DNA连接酶 (1U/μL) 1 μL。
- 9) 混匀, 瞬时离心。
- 10) 14 °C连接4 h~16 h。
- 11) 检测连接产物或直接用于转化。

D.3.3.2 对称性粘性相容末端及平末端的酶切及连接

- 1) 限制酶切: 外源基因片段和载体 DNA 的酶切操作步骤与本附录 D.3.3.1 相同。
- 2) 对质粒载体酶切产物进行脱磷酸处理: A. 于Eppendorf管中分别加入以下试剂: 质粒载体酶切产物20 μL、ddH₂O 24 μL、10×buffer 5 μL、CIP 1 μL。B. 混匀, 于37 °C保温30 min。C. 用1倍体积的酚/氯仿抽提2~3次。D. 上清液中加入1/10倍体积的3 mol/L NaAc (pH 7.0), 2倍体积的冷无水乙醇, -20 °C放置1 h, 12 000 r/min 离心10 min, 回收沉淀。E. 将沉淀溶于适量TE缓冲液, 测定浓度, 分装, 贮于-20 °C, 供连接用。

3) 在1.5 mL Eppendorf管中依次加入以下试剂: ddH₂O 14 μL、酶切后回收的外源基因片段 (0.15 μg/μL) 2 μL、酶切后回收并经脱磷酸处理的载体DNA (0.1 μg/μL) 1 μL、10×连接酶缓冲液2 μL、T₄ DNA连接酶 (1 U/μL) 1 μL。

- 4) 混匀, 14 °C连接4 h至过夜。
- 5) 检测连接产物或直接用于转化。

D.3.3.3 不相容粘性末端的酶切及连接

1) 限制酶切: 外源基因片段和载体 DNA 的酶切操作步骤与本部分 D.3.3.1 相同, 但酶切样品需加大。

2) 5' 突出平端补平: A. 于Eppendorf管中分别加入以下试剂: DNA酶切片段 (0.1 μg/μL~0.2 μg/μL) 20 μL、10×buffer 3 μL、10mmol/L DTT 3 μL、dNTP (各 0.5 mmol/L) 3 μL、DNA聚合酶 I 大片段 1 μL。B. 37 °C保温 15 min。C. 70 °C保温 10 min。D. 酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀离心, 沉淀吹干, 溶于TE供连接用。

3) 3' 突出平端删除: A. 于Eppendorf管中分别加入以下试剂: DNA酶切片段 (0.1 μg/μL~0.2 μg/μL) 20 μL、10×buffer 3 μL、10 mmol/L DTT 3 μL、dNTP (各 0.5 mmol/L) 3 μL、T₄DNA聚合酶 1 μL。B. 37 °C保温 15 min。C. 70 °C保温 10 min。D. 酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀离心, 沉淀吹干, 溶于TE供连接用。

4) 连接: 经5' 突出平端补平或3' 突出平端删除修饰的外源基因片段和载体DNA的连接操作步骤与本附录D.3.3.2相同。

D.3.4 连接产物导入大肠杆菌细胞

1) 将单菌落接入 5 mL 不含抗生素的LB液体培养基中, 37 °C振荡培养过夜。次日按 1% (v/v) 转入新鲜LB液体培养基中, 37 °C振荡培养至A₆₀₀为 0.3。

2) 将 50 mL~100 mL 的培养液转入两个预冷的无菌离心管中, 4 °C下 500 r/min 离心 10 min, 去上清液。

3) 离心管中各加入 10 mL冰冷的 0.1 mol/L CaCl₂溶液重悬菌体, 冰浴 30 min。

4) 4 °C, 3 500 r/min 离心 10 min。

5) 去上清液, 将菌体悬于 2 mL冰冷的 0.1 mol/L CaCl₂溶液中, 即为感受态细胞。

6) 于 4 °C冰箱保存, 1 周内使用。也可加入 300 μL 无菌甘油或 7% DMSO, 混匀, 分装于无菌 Eppendorf 管中, 用液氮速冻后置 -70 °C 保存。使用时取出置冰中融化。

7) 用无菌吸头取 100 μL 感受态细胞置于 1.5 mL 预冷的 Eppendorf 管中, 加入 10 ng~1 000 ng 连接产物 DNA, 轻轻混匀 (用手弹管壁几下), 立即置冰上 30 min。

8) 将管置42 °C恒温水浴中热激90 s, 立即放回冰上15 min。放入800 μL无抗生素的LB液体培养基, 混匀, 37 °C预表达培养45 min~60 min。

参考文献

- [1] 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术(第二版). 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999, 101-126、136-154、372-374、404-429
- [2] GB/T19495.3-2004 转基因产品检测核酸提取纯化方法
- [3] [美]F.奥斯伯, R.E.金斯顿, J.G.塞德曼等著. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南, 北京: 科学出版社, 1998, 22-24、35-40、120-130、329-394、522-523
- [4] [美]J. 萨姆布鲁克, E.F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著. 金冬燕, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南(第二版), 北京: 科学出版社, 1999, 34-68、822-848、870-877
- [5] 王关林, 方宏筠主编. 植物基因工程. 北京: 科学出版社, 733-767,
-