

第四部分 分子微生物学实验方法

基因重组可通过转化、转导、接合、溶原性转换等方式。本章所选的细菌耐药基因的重组实验属转化和接合的范畴。

分子诊断是一门新兴的生物科学技术，它已被广泛的应用于生命科学的各领域。其主要方法可分为检测核酸和检测蛋白质两大类。本章主要介绍几种最常用的分子诊断方法。分子诊断技术最大的优点在于灵敏度高、特异性强，并适于快速诊断。

实验二十 细菌耐药基因的重组

一、细菌质粒的提取与转化

细菌的后代具有与亲代相同的特征，这是由细菌的遗传物质染色体 DNA 所决定的。但有些遗传特性是由染色体外的遗传物质——质粒所编码的，如抗药基因即可在于质粒上。这种特性可以通过质粒的传递，在同种或种属关系相近的细菌间转移，使细菌产生耐药特性。

细菌质粒 DNA 的提取的二种方法——煮沸裂解法与碱裂解法，分别介绍如下：

以煮沸裂法提取耐氨苄青霉素供体菌 *E.coli* 1371(Amp^r)的质粒 DNA, 并以 CaCl₂ 处理对氨苄青霉素敏感的受体菌 *E.coli* YMC-15(Amp^S)制备感受细胞，在 42℃ 短暂作用下，可提高接受外源 DNA 的效率，从而使对氨苄青霉素敏感的受体菌 *E.coli* YMC-15 转化为耐对氨苄青霉素的耐药菌。

【材料】

(一) 菌种： 供体菌 *E.coli* 1371，含 Amp^r 质粒

受体菌 *E.coli* YMC-15

(二) LB 培养基：

1% 蛋白胨，0.5% 酵母浸出液，0.5% NaCl

(三) 悬浮液：25% 蔗糖，50 mmol/L Tris-HCl，pH8.0

(四) 裂解液：50 mmol Tris-HCl，pH8.0

5% 蔗糖，50 mmol/L EDTA，5% Triton-100

(五) 溶菌酶液：

5-10 mg/ml，用前配制

(六) 3 mol/L NaAc

(七) DNA 保存液

10 mol/L Tris-HCl，pH8.0，1 mmol/L EDTA

(八) 50 mmol/L CaCl₂

(九) 50 mmol/L CaCl₂, 15%甘油

(十) 氨苄青霉素(Amp) 5 mg/ml

【方法】

(一) 耐药质粒的提取

A、热裂法提取耐药质粒 DNA

1. 将供体菌接种入 5 ml 含 Amp 的 LB 培养基中, 37 °C 摇床过夜, 使细菌生长繁殖。
2. 将菌液离心, 4000 rpm 离心 5min, 沉淀菌体。
3. 弃上清, 菌体沉淀物加入悬液, 使菌体充分悬浮。
4. 加入裂解液及溶菌酶, 混匀。此时菌体细胞壁上应出现小孔。
5. 置沸水浴中加热 2 min, 然后迅速置冰浴中冷却 5 min。使细菌染色体 DNA 与残留细胞壁形成团块, 而质粒因分子量低, 可自细菌壁上小孔漏出于上清液中。
6. 取上清, 加入 1/10 体积 NaAc 及 2 倍体积冷无水乙醇, 以沉淀质粒 DNA。
7. 离心, 1000 r/min, 弃上清, 倒置吸干水份, 沉淀物置干燥缸内抽滤 8-10 min。加入 DNA 保存液使之溶解, 即得到质粒 DNA, 用琼脂糖电泳, 溴化乙啶染色, 可见残留的细菌染色体、RNA 及质粒条带(在紫外线下)。

B、碱裂解法提取耐药质粒 DNA

【材料】	(1) 含质粒的大肠杆菌	1.2ml/支×3
	(2) P1 (含 RNA 酶 100ug/ul)	0.5ml/支×1
	(3) P2	0.5ml/支×1
	(4) P3	0.5ml/支×1
	(5) 酚 (Tris 饱和)	1ml/支×1
	(6) 氯仿-异戊醇	1ml/支×3
	(7) 无水乙醇	1ml/支×3
	(8) 3MNaAc	0.2ml/支×1
	(9) 70%乙醇	1ml/支×3
	(10) TE	50μl/支×1
	(11) 1.5mlEp 管	5 只×3
	(12) 200ul 枪头	16 只×3
	(13) 20ul 加样器	1 把
	(14) 200ul 加样器	3 把
	(15) 冰盒	1 个

注: 以上材料是按学生 2 人一组, 每桌 3 组计, 每一桌的材料量

【步骤】

含质粒的大肠杆菌 1.2 ml (Ep 管)
↓离心 10000 转, 1 分钟
沉淀 (上清用枪头完全吸干)
↓
加 P1 150 μ l (含 RNA 酶), 充分混匀 (可用枪头吹打)
↓0 $^{\circ}$ C, 5 分钟
加 P2 150 μ l, 颠倒混匀 5 次
↓室温, 5 分钟
加 P3 150 μ l, 颠倒混匀 5 次
↓0 $^{\circ}$ C, 10 分钟
离心, 10000 转 5 分钟
↓
取上清+半量酚, 颠倒混匀; 再加半量氯仿-异戊醇, 颠倒混匀,
↓离心 10000 转, 5 分钟
取上层液相+等量氯仿-异戊醇, 颠倒混匀 20 次
↓离心 10000 转, 5 分钟
取上层液相+2 倍体积冷无水乙醇+1/10 体积 3M NaAc
↓-80 $^{\circ}$ C, 15 分钟, 4 $^{\circ}$ C 离心, 12000 转 15 分钟
沉淀+1 ml 70%乙醇吹打
↓离心, 10000 转 5 分钟
沉淀 (37 $^{\circ}$ C 烘干 5 分钟)
↓
溶于 20 μ l TE

(二)感受态细胞的制备: 无菌操作。

1. 取受体菌 *E.coli* YMC 接种入 5ml LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇床过夜。
2. 取菌液 1ml 接种至 50 ml 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 2h。
3. 取 3ml 菌液测 OD_{650nm} 读数在 0.75 左右即可。
4. 置冰浴中冷却, 离心沉淀菌体。弃上清, 加入 1/2 体积冷 CaCl₂ (冰浴中预冷), 置冰浴中 20min, 再离心, 收集菌体。
5. 加入 CaCl₂, 甘油悬浮, 即为感受态细菌。

(三)质粒 DNA 的转化: (图 19-1)

1. 取受体菌 100 μ l 加供体菌质粒 DNA 20 μ l, 混匀后置冰浴中 45 min, 再 42 $^{\circ}$ C 热冲击 2 min (或 37 $^{\circ}$ C 水浴 5min), 先经液体培养基 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 1 h, 再取转化物 100 μ l, 于含 Amp 的琼脂平板上, 用 L 形玻璃棒涂布均匀, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 如有转化成功的受体菌, 即可以生长。以下为耐药基因的细菌转化学生操作流程简图:

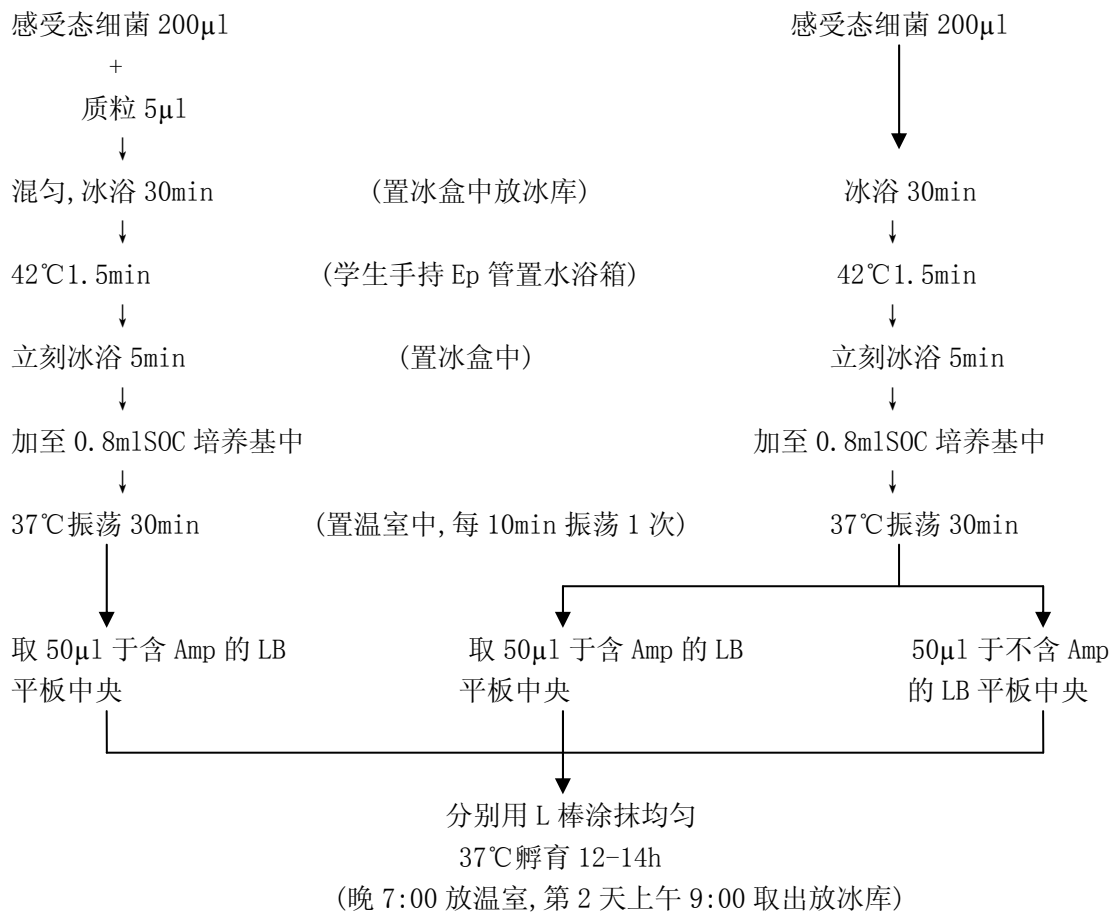


图 20-1 耐药基因的细菌转化实验流程简图

2. 同时设对照:

未经质粒 DNA 转化的受体菌 100μl, 接种于含 Amp 的琼脂平板上 37°C 培养过夜不应生长, 但接种于不含 Amp 的琼脂平板上, 37°C 培养过夜, 可以生长。

3. 结果判断:

因本质粒携带 Amp 的耐药基因, 故通过转化进入受体菌后, 可使原来对 Amp 敏感的受体菌成为耐药菌, 故可在含有 Amp 的琼脂平板上生长。

二、细菌间耐药基因的转移——接合

细菌的耐药基因既可通过质粒转化的方式, 在亲缘相近的细菌间转移。也可通过亲缘相近的细菌活菌间通过性菌毛的接触, 将耐药菌(供体菌)的耐药质粒基因转移至不耐药的细菌(受体菌)内, 使受体菌同样获得与供体菌相似的耐药遗传性状。以这种方式传递遗传基因, 通常称为接合。

【材料】

菌种: 本教研这所保贮的菌种

1. 供体菌: 对氯霉素耐药的鼠伤寒沙门菌株

2. 受体菌：对氯霉素敏感的大肠埃希菌株

培养基：

1. 肉汤培养基

2. 普通麦康凯平板

3. 含 100 $\mu\text{g/ml}$ 氯霉素的麦康凯平板；将制备好的普通麦康凯培养基在烧瓶内煮沸，待冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ 以下时，加入氯霉素注射液，使成相应浓度，即刻摇匀后倾注平板。

【方法】

1. 将上述两株细菌分别接种于普通麦康凯平板上，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h，以证明该平板适宜于上述两株细菌的生长。鼠伤寒沙门菌不分解乳糖，菌落为无色透明；大肠埃希菌分解乳糖，菌落呈粉红色。

2. 将上述两株细菌分别移种于肉汤培养基内，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h。

3. 分别取供体菌和受体菌各 0.1 ml，混合于 1ml 肉汤培养基中。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后，分区划线接种于含 100 $\mu\text{g/ml}$ 氯霉素的麦康凯平板上，同时设阴性和阳性对照。将平板置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h 后观察结果。

以下为细菌耐药基因接合转移学生操作流程简图：

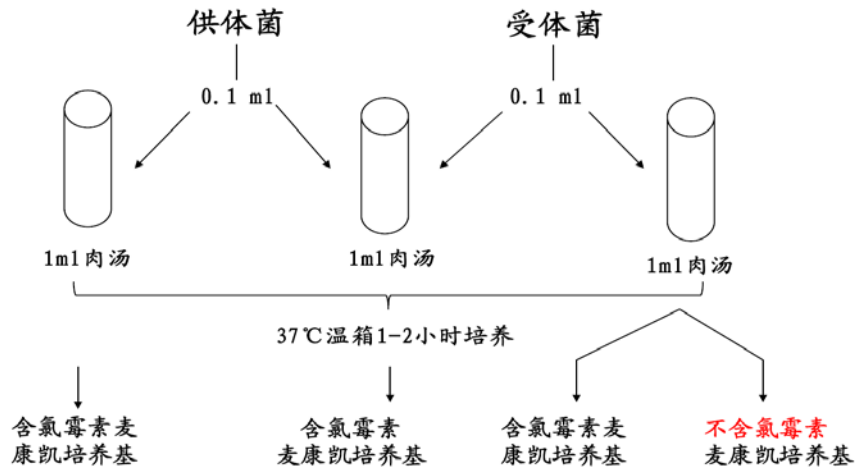


图 20-2 细菌耐药氯霉素基因接合转移流程

实验二十一 细菌 DNA 限制性核酸内切酶分析

一、原理

限制性核酸内切酶能识别和切割双链 DNA 的特异部位，产生系列 DNA 片段，这些片段经琼脂糖电泳凝胶电泳后可显示不同的带谱，这些带谱构成了各不同双链 DNA 的特征性“指纹(Finger print)”。

二、方法

1. 材料

(1) 限制性核酸内切酶 目前常用的有 *Bam*H I、*Hind* II、*Hind* III、*Eco*R I、*Hinf* I、*Xho* I、*Pvu* II 等，各种酶通常各有其最佳的工作条件，在商品说明书上均有详细介绍，包括酶的识别序列、最适反应条件、温度及贮存条件等参数，故使用前应仔细阅读说明书。

(2) 细菌 DNA 按常规方法提取、纯化细菌 DNA。

(3) 琼脂糖

(4) 电泳缓冲液常用配方（表 20-1）

表 21-1 常用电泳缓冲液

缓冲液名称	组成(终浓度)	配制方法
TAE	0.04 mol/L Tris-HAC 0.002 mol/L EDTA	50×: 242g Tris, 冰醋酸 57.1ml, 0.5mol/L EDTA 100ml, pH8.0
TBE	0.089 mol/L Tris-硼酸 0.002 mol/L EDTA	5×: 54g Tris, 硼酸 27.5g, 0.5mol/L EDTA 20ml, pH8.0
TPE	0.08 mol/L Tris-H ₃ PO ₄ 0.008 mol/L EDTA	10×: 108g Tris, 85%磷酸(1679 mg/ml) 15.5ml, 0.5mol/L EDTA 40ml, pH8.0

(5)电泳仪、水平电泳槽、252 nm 紫外灯。

2. 步骤

用电泳缓冲液将琼脂糖配制成所需浓度，加于水平玻璃板上制成凝胶，待凝固后在加样孔中加入经内切酶切割消化过的 DNA 样品，电泳时电压 1.5-2V / cm，电泳时间 8-12 h，电完后将凝胶浸于含 0.5 μg/ml 溴乙锭的电泳缓冲液中染色 30 min，紫外灯照射下拍照。

三、在细菌分类鉴定中的意义

各种属细菌的酶切图谱有明显不同，同种不同型、甚至同型不同株的细菌也可能在图上显示其差异。限制性内切酶分析法重复性、稳定性、敏感性均较好，且操作简便，可快速到结果，因此在细菌的鉴定、分型及进行分子流行病学研究等方面应用较广。

实验二十二 核酸探针和分子杂交技术

一、分子杂交技术的基本原理

分子杂交技术是根据两条单链 DNA 中互补碱基序列能专一配对的原理进行的。由于双链 DNA 之间依靠非共价的氢键连接, 所以可采用高温、低盐或化学物质将双螺旋分离, 这种由双螺旋产生两个单链 DNA 分子的过程称为变性。重新降低温度、去除化学变性物质或提高盐浓度(离子强度)会使两个单链再结合成双螺旋, 这个过程称退火或复性。若两个退火的单链来源不同(如一个同位素标记的探针 DNA 加入源于临床标本的 DNA 中), 这一反应通常称为杂交。所谓探针是指用某种方法标记以便检测的 DNA 或 RNA 片段, 它能用于测定标本中是否存在可与之互补的 DNA 或 RNA 序列。目前实验室常用的核酸杂交方法包括: Southern 印迹法、Northern 印迹法、斑点杂交法、原位杂交法等。

1. **Southern 印迹法(Southern blot)** 将待测 DNA 用限制性内切酶切割后, 其片段在琼脂糖凝胶电泳中按分子量大小分离, 随后使 DNA 在原位发生变性, 并从凝胶转移到一固相支持物(硝酸纤维素滤膜或尼龙膜)上, 再用标记的探针与固着于滤膜上的 DNA 杂交, 最后根据探针的标记方法不同而采用不同的检测方法, 以确定与探针互补的电泳条带的位置。由于 DNA 经限制性内切酶在特定位点进行切割, 故不仅可检出杂交片段的数量和大小, 而且可在一定程度上反映待测 DNA 的基因组成。

2. **Northern 印迹法(Northern blot)** 与 Southern 印迹法相似, 只不过待测核酸为 RNA, 由于 RNA 只有被有效转录后, 才能在 Northern 杂交中显示出来, 所以此法可作为研究特定基因表达的手段。

3. **斑点杂交法(Dot blot)** 将待测的 DNA 标本直接点在硝酸纤维素滤膜上, 经变性处理后用探针进行杂交。由于在常规临床微生物检验中, 关注的重点往往是标本中是否存在某种微生物, 而不是其基因构成及表达, 因此, 这种省去内切酶消化、电泳、转移等步骤的点杂交法显示出了快速、方便的优点。

4. **原位杂交法(In situ hybridization)** 为核酸杂交技术与细胞学技术相结合的一种特殊检测方法。它在不破坏细胞形态结构的情况下, 用标记的探针直接检测切片标本中的核酸。此法不需从细胞中提取核酸, 可直接了解细胞内基因的定位及分布情况, 最适宜外科活检标本、病理切片标本等, 不但能确定有无微生物序列的存在, 还可清楚地了解到哪些细胞受到影响。

二、核酸探针的类型及标记方法

1. **探针的类型** 任何形式的核酸(DNA、RNA)经适当标记后均可作为探针用于杂交, 根据核酸的性质可将探针分为以下几类:

(1) 全染色体探针这类探针制备简便, 主要用于细菌的检测, 但特异性不如克隆片段探针。

(2)克隆片段 DNA 这是目前使用最多的探针类型, 由于克隆片段的特异性可以选择, 因而它最有更大的灵活性, 而且便于进一步分析 DNA 结构及发展新的检测技术, 如 PCR 技术。

(3)RNA 及其 cDNA 探针, RNA 探针具有与 DNA 杂交亲和力强、不会发生自身杂交、未杂交探针易于去除等优点, 但探针制备较为费时, 产量较低, 且易被 RNase 降解。其 cDNA 探针则稳定性较好, 可用多种方法标记, 并且产量较高。

(4)rDNA(rRNA 基因)探针 rDNA 即 rRNA 基因。rRNA 是核蛋白体的主要成分, 胞内含量丰富。不同菌种其 rDNA 的核苷酸序列不同, 且在进化上十分保守, 故可用特异的 rDNA 探针检测相应 rRNA 靶序列来确定细菌的种类。

(5)寡核苷酸探针 为人工合成的短链核苷酸, 特异性高, 可检出点突变。因其短小、易穿入组织, 可用于原位杂交, 但同时也由于核苷酸序列短, 样品中与之相似的序列较多, 造成杂交背景提高或出现假阳性。

2. 探针的标记方法 分放射性标记与非放射性标记两大类。放射性同位素标记的探针为杂交分析法提供了高度的敏感性和较强的分辨力, 但以下诸多因素限制了其在常规临床检测中的应用: 成本高, 操作烦琐、费时。对操作人员危险性大, 废弃物难以处理, 而且很多同位素半衰期很短, 也限制了其标记的探针的寿命。非放射性标记是在核酸链上共价连接半抗原、生物素或荧光素等化学基团, 杂交后通过酶底物显色或荧光计检测。非放射性标记探针具有使用周期长。检测程序简单。节省费用, 对操作人员健康无威胁等优点, 有些探针的灵敏度已达到或接近放射性同位素标记的探针。目前生物素或地高辛标记的探针越来越受到普遍的欢迎。

三、操作过程

(一)血清标本点样

【材料及试剂】

1. 0.45um 孔径硝酸纤维素膜(国产可用混合纤维素酯微孔滤膜)
2. 加样器、抽滤板。
3. 试剂: 溶液 I 1mol/L NaOH; 溶液 II: pH7.4, 0.6 mol/L Tris-HCl; 溶液 III: pH7.4, 3.0 mol/L NaCl-0.5 mol/L Tris-HCl; 溶液 IV: 2 × SSC (0.3 mol/L NaCl-0.3 mol/L 枸橼酸钠)。

【方法】

1. 取上述滤膜用溶液 IV 浸透, 置抽滤板上, 按水泵减压法缓慢抽滤。
2. 将膜置溶液 I 上变性, 30min 后, 用溶液 II、III 分别中和, 80 °C 干烤 2 h 以固定核酸(此时为单链)。

(二)探针制备

【材料及试剂】

1. 缺口翻译(Nick Translation)试剂: 缓冲液, dNTP 混合物(如同位素标记者为 ³²P-dATP, 则加入 dCTP, dGTP 及 dTTP)、同位素标记 dNTP(加 dATP)。DNA 酶 I, DNA 多聚酶 I。

2. Sephadex G50 柱
3. 闪烁计数器
4. 待标记病毒 DNA

【方法】

1. 取 1 μ g 待标记病毒 DNA, 加入同位素标记的 dNTP, 补充未标记的其他 dNTP, 加入 DNA 酶 I(打开 DNA 链上缺口)及 DNA 多聚酶 I(同时将各 dNTP 进行聚合, 以一条链为模板, 聚合另一条相应互补链), 从而使病毒 DNA 标上同位素。14 $^{\circ}$ C 水浴 2h 使反应完成。

2. 加入终止反应液后, 上 Sephadex G₅₀(葡聚糖柱), 以分离聚合的 DNA 链与游离的小分子 dNTP。第一峰为标记探针, 后峰为游离 dNTP。

3. 用闪烁计数器计算标记的 cpm 数。

(三)预杂交及杂交

【材料及试剂】

1. 厚塑料纸, 封口机
2. 预杂交液: 甲酰胺 SSC, Denhardt 液、低分子量 DNA、缓冲液。
3. 杂交液: 预杂交液; 硫酸葡聚糖及煮沸后迅速冷却的探针 DNA(使成单链)。

【方法】

1. 在三面封口的塑料袋中加入已准备好的有样品的滤膜。加入预杂交液, 赶走气泡, 封口后, 42 $^{\circ}$ C 水浴振摇以预杂交 6-24 h。

2. 弃去预杂交液, 加入杂交液, 封口后, 42 $^{\circ}$ C 振摇杂交 24-36 h。
3. 倒去杂交液, 用高盐、低盐洗液涤滤膜。
4. 包 X 光片, 置-70 $^{\circ}$ C 曝光。经一段时间后, 取出 X 光片定影、显影。

实验二十三 核酸扩增技术

核酸探针作为常规诊断方法用于临床还受其技术复杂、灵敏度不够的限制。最敏感的核酸探针仅能检出 10^3 - 10^4 拷贝的靶分子，而多数临床标本中靶分子量远低于此限，因此用扩增靶序列的量使之与已有探针进行杂交，也能极大地提高反应的敏感性。最常用的核酸扩增方法是聚合酶链反应(Polymerase chain reaction, PCR)。

一、原理

聚合酶链反应是一种选择性体外扩增 DNA 片段的方法，其特异性由两个人工合成的寡核苷酸引物的序列而定，这两段引物分别与待扩增片段两端的 DNA 序列互补，经过反复的热变性—复性—延伸的循环过程，原 DNA 序列呈指数方式增加(数小时内可增加百万倍)。

二、基本过程

将模板 DNA、引物、 Mg^{2+} 、4 种 dNTP 和 Taq DNA 聚合酶混合，在高温下使 DNA 变性，双链解链为两条单链，再在低温下退火，使引物与模板链 3' 端形成部分双链 DNA，然后在中温条件下通过 Taq DNA 聚合酶使引物从 5' 端向 3' 端延伸，随着 4 种 dNTP 掺入合成新的 DNA 互补链，完成一轮循环，所扩增的 DNA 可作为下一轮扩增反应的模板。重复上述循环过程，可产生大量 DNA。由于引物限定范围内的 DNA 序列以指数形式扩增，其他区域的 DNA 只能以线性形式扩增，故实际的最终产物中以引物限定长度 DNA 片段为主。

三、反应成分

1. 引物(primer) 是 DNA 聚合酶启动 DNA 合成时所必需的一段寡核苷酸。PCR 扩增产物的大小与性质是由引物特异性所决定的，故引物的设计对 PCR 的成功与否具有决定性作用。PCR 引物设计应遵循如下原则：

(1)引物中的碱基随机分布，不应有单一碱基重复序列或存在二级结构的区域。G+C 碱基含量与待扩增序列类似。一般为 45-55%。引物的 T_m 值按下列公式计算： $T_m(^{\circ}C)=(G+C)\times 4+(A+T)\times 2$ ， T_m 值最好接近 $72^{\circ}C$ ，以使复性条件最佳。

(2)引物至少具有 16 个核苷酸，最多为 20~24 个核苷酸。引物的有效长度 ($L_n=2(G+c)+(A+T)$)。 L_n 不能大于 38，因为大于 38 时最适延伸温度会超过 Taq DNA 聚合酶的最适温度($74^{\circ}C$)，不能保证产物的特异性。

(3)引物自身不应存在互补序列，否则会自身折叠成发夹结构或引物本身复性。两种或多种引物间不应有互补性，尤其应避免 3' 端的重叠，以防止引物形成二聚体或多聚体。

(4)引物 3' 端对 Taq DNA 聚合酶的延伸效率有很大影响，不能进行任何修饰。一般在 3' 端选用 T，不用 A、G 和 C。设计简并性引物时，3' 端的简并性应尽量小。

(5)引物的 5' 端限定着 PCR 产物的长度，它对扩增物特异性影响不大，因此可被适当修饰，包括加酶切位点，标记生物素、荧光素、地高辛等，引入蛋白质结合 DNA 序列、突变位点、启动子序列等。

(6)引物浓度一般为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ ，该浓度足以进行 30 轮以上的扩增。过高浓度的引物会在异位引导合成，引物浓度不足则使 PCR 效率明显下降。

2. Taq DNA 聚合酶 最初的 PCR 中使用 *E.coli* DNA 聚合酶 Klenow I 片段，但该片段在高温下迅速失活，故每一轮反应都需补充酶。Taq DNA 聚合酶是从嗜热细菌分离的耐热 DNA 聚合酶，可在较高温度时进行引物复性延伸，减少了错配引物的延伸和非靶产物对酶和引物的竞争，提高了产物的数量和质量。

3. 反应缓冲液 PCR 反应的缓冲液常用含 10-50 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L MgCl_2 的溶液，聚合反应温度下 pH 为 7.2，但各实验室该缓冲液配方可能不同。KCl 浓度过高会抑制酶的活性， Mg^{2+} 可影响引物退火的程度、模板与产物链的解离温度、产物的特异性、引物二聚体形成和酶的活性及其精确性等，故需在缓冲液配制中加以注意。EDTA 或磷酸根能影响 Mg^{2+} 浓度，故模板 DNA 溶液中 EDTA 浓度和 PCR 反应中能提供磷酸根的 dNTP 浓度应适当。

4. dNTP 原液浓度通常为 1 mmol/L ，并用 NaOH 调 pH 至 7.0，以确保反应 pH 值的不低于 7.1。各种 dNTP 的摩尔数基本相等，终浓度为 20-200 mmol/L ，否则易于诱发聚合酶的错误掺入，或降低合成速度，或过早中止延伸反应。

四、反应参数

1. 变性 第一轮扩增前使 DNA 完全变性极为重要，常用变性温度及时间为 94 $^{\circ}\text{C}$ 60s 或 97 $^{\circ}\text{C}$ 15s。

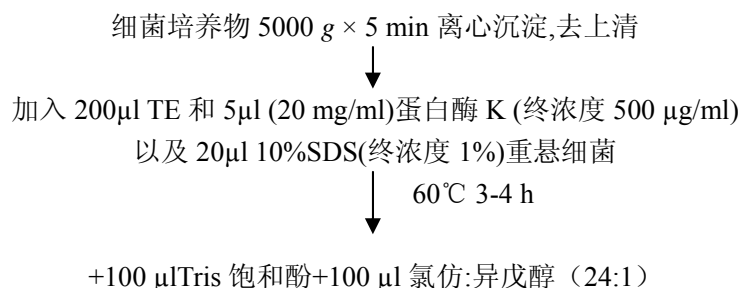
2. 退火 退火温度较引物的 T_m 值低 5 $^{\circ}\text{C}$ 左右。典型的退火温度和时间为 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min。

3. 延伸 延伸反应的温度一般为 72 $^{\circ}\text{C}$ ，与 Taq DNA 聚合酶最适温度相近。延伸反应的时间取决于目的序列的长度和浓度，典型的时间为 1-3 min。

4. 循环次数其他参数确定后，循环次数取决于模板 DNA 的浓度。一般以 20-30 个循环为宜，循环次数过多可使非特异性产物明显增加。

由于 PCR 技术能快速特异地扩增任何希望的目的基因或 DNA 片段，并很容易使 ng 级水平的起始物达到 mg 级水平，因此可使用 PCR 技术制备大量纯化的 DNA，将其标记后制成探针，用 DNA 杂交技术检测各种标本中的靶 DNA。

附录： PCR 操作的流程简图（图 23-1-1，图 23-1-2）



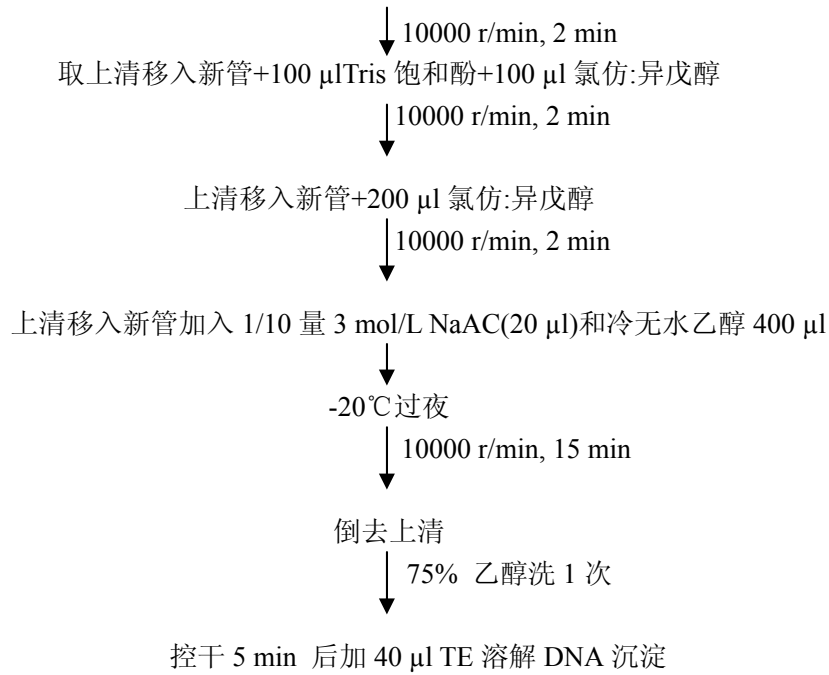


图 23-1-1 细菌 DNA 的提取

在微量离心管中混合以下 PCR 反应成分：

10×缓冲液	3 μl	
Primer 1	1 μl	1 μmol/L
Primer 2	1 μl	1 μmol/L
dNTP	3 μl	200 μmol/L
MgCl ₂	3 μl	1.5 μmol/L
H ₂ O	18 μl	
DNA 模版	1 μl	

总体积 30μl,混匀后加 1 滴矿物油

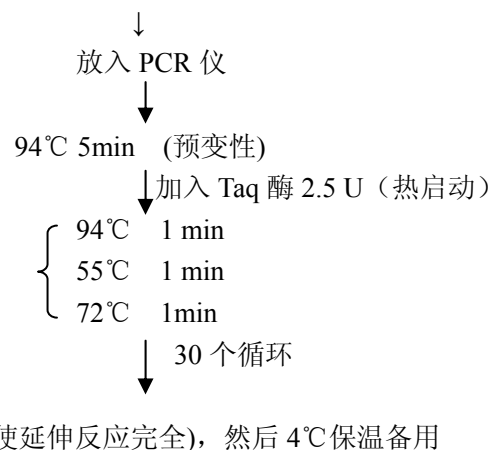


图 23-1-2 PCR 操作流程示例

实验二十四 蛋白质的分子检测方法

每个菌细胞大约含有 2000 种蛋白分子, 这些蛋白质参与了细菌的各种生命活动, 也构成细菌的各种特征信息, 因此在分类学中已发展了许多技术, 用来分离和研究蛋白质的特征, 以作为系统研究的依据. 常用的蛋白质的分子技术有 SDS-PAGE 凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)、Western 印迹法(Western blot)等。

1.SDS-PAGE 将待测蛋白质样品溶解于含有强阴离子去污剂(SDS)和还原剂的溶液中, 加热使蛋白质解离, 变性的多肽与 SDS 结合, 结合的量与多肽的分子量成正比, 该 SDS 多肽复合物在聚丙烯酰胺凝胶电泳中的迁移率也只与多肽的大小相关. 在室温饱和的状态下, 每克多肽约可结合 1.4g 去污剂, 借助已知分子量的标准参照物便可测算出多肽链的分子量. 用考马斯亮蓝或银盐液对聚丙烯酰胺凝胶进行染色, 可清晰地显示电泳后的蛋白质图谱.

2.Western 印迹法 与 Southern 印迹法类似, 将 SDS-PAGE 分离的蛋白组分从凝胶转移到硝酸纤维素滤膜上, 再用探针加以检测. 不同于 Southern 印迹法的是, 所有探针是标记的针对特定氨基酸序列的特异性抗体, 它能与附着于滤膜上的靶蛋白所呈现的抗原表位发生特异性反应, 可测出标中特定蛋白质(抗原)的大小和含量。