

分子生化实验操作

一、PCR 实验操作

(1) PCR 反应体系设置

PCR 体系	50ul X2 管	
Q5 2x Master Mix	25ul	
dd H2O	19ul/18ul	
Vector/cDNA	1ul (10ng) /2ul	
F/R	2.5ul	

(2) PCR 循环步骤

(具体温度设定需要根据不同模板和酶调整)

1. 变性: 将模板 DNA 加热至 94℃ 左右一定时间, 使双链 DNA 解离成单链。
2. 退火: 降低温度至 50-65℃, 使引物与单链 DNA 模板结合。
3. 延伸: 将温度升至 72℃ 左右, DNA 聚合酶开始合成新的 DNA 链。
4. 循环: 上述步骤进行 25-30 个循环。

(3) 结果分析

将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 通过紫外灯下观察扩增产物的条带。

二、琼脂糖凝胶 DNA 回收

(1) 配制琼脂糖凝胶并电泳分离:

配制合适浓度的琼脂糖凝胶, 电泳分离后, 在紫外灯下切下含目的 DNA 片段的凝胶。

(2) 称取凝胶块并加入 Buffer GDP

1. 称取凝胶块的重量, 按 100mg 凝胶块相当 100ul 体积计算, 加入 3 倍体积 Buffer GDP 转移至 2.0ml 离心管中。
2. 50~55℃ 水浴 10~15 分钟, 水浴期间, 颠倒混匀 3 次加速溶胶。

(3) 收集液滴并进行初步离心

1. 短暂离心收集管壁上的液滴。
2. 将 HiPure DNA Mini Column 套在 2ml 离心管中。
3. 把溶胶液 (≤750ul) 转移至柱子中。
4. 12,000xg 离心 30~60 秒。

(4) 加入 Buffer GDP 并离心

1. 倒弃滤液, 再加入 300ul Buffer GDP 至柱子中。
2. 静置 1 分钟。
3. 12,000xg 离心 30~60 秒。

(5) 加入稀释的 Buffer DW2 并离心

- 1.倒弃滤液，再加入 600ul Buffer DW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。
- 2.12,000xg 离心 30~60 秒。

(6) 进一步去除乙醇并干燥

- 1.倒弃滤液，把再加入 300ul Buffer DW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。
- 2.12,000xg 离心 2 分钟。
- 3.取出柱子时，不要让柱子底部接触到液体，若碰到了液体，倒弃液体后再离心 1 分钟。
- 4.打开柱子的盖子，空气干燥 5 分钟以彻底去除乙醇（也可用吹风机迅速吹干）。

(7) 洗脱 DNA 并保存

- 1.把柱子套在 1.5ml 离心管中，加入 10ul 65℃ ddH₂O 至柱子膜中央。
- 2.放置 2 分钟。
- 3.12,000xg 离心 1 分钟。
- 4.丢去柱子，把 DNA 保存于 -20℃。
- 5.若需要获得最高产量，建议重复第 7 步进行第二步洗脱。

三、无内毒素质粒小提中量操作步骤

- 1.柱平衡步骤 向吸附柱 CP4 中（吸附柱放入收集管中）加入 500 μl 的平衡液 BL, 12,000rpm (~13,400 xg) 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。（请使用当天处理过的柱子）
- 2.取菌液：取 5-15 ml 过夜培养的菌液加入离心管中，12,000 rpm (~13,400xg) 离心 1 min，尽量吸除上清。
- 3.加入溶液 P1：向留有菌体沉淀的离心管中加入 500 ul 溶液 P1 （已加入 RNaseA），振荡彻底悬浮细菌细胞沉淀。
- 4.加入溶液 P2：向离心管中加入 500 μl 溶液 P2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解。
- 5.加入溶液 P4：向离心管中加入 500 μl 溶液 P4，立即温和地上下翻转 6-8 次充分混匀，室温放置 10 min 左右，12,000 rpm (~13,400xg) 离心 10 min，此时在离心管底部形成沉淀。
- 6.上清液过滤：将收集的上清液加入过滤柱 CS（液体量≤750ul），12,000 rpm (~13,400xg) 离心 2 min，滤液收集在另一 2 ml 离心管中。
- 7.加入异丙醇：向滤液中加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇，上下颠倒混匀后转移到吸附柱 CP4 中。
- 8.离心去蛋白：室温 12,000 rpm (~13,400xg) 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
- 9.去蛋白液 PD：向吸附柱 CP4 中加入 500 μl 去蛋白液 PD,12,000 rpm (~13,400xg) 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP4 放入收集管中。
- 10.漂洗液 PW：向吸附柱 CP4 中加入 600 μl 漂洗液 PW(已加入无水醇)静置 2-5min, 12000rpm (~13,400xg) 离心 1min，倒掉收集管中的废液。
- 11.再次漂洗：向吸附柱 CP4 中加入 600 μl 漂洗液 PW,12,000 rpm(~13,400xg) 离心 1 min，倒掉收集管中的废液。12,000 rpm(~13,400xg) 离心 2 min，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。可以静置 5min 或用吹风机加速残留乙醇挥发。

12.质粒 DNA 溶解：将吸附柱 CP4 置于另一个离心管中，65℃ 40μl ddH₂O，室温放置 2 min,12,000 rpm (~13,400xg) 离心 1 min 将质粒溶液收集到离心管中。

四、转化

- 1.已知质粒取 10ng (10ngDNA+50ul 感受态细胞)
- 2.提前打冰，将感受态细胞置于冰上融化，加入质粒轻弹混匀,冰上静置 30 分钟。
- 3.42℃水浴热激 30-45s (具体时间参照感受态说明书),迅速置于冰上冷却 2 分钟。
- 4.[在超净台中操作]加入 3-400ul 左右 LB 液体培养基,混匀后 37℃ 200rpm/min 培养 1 小时，
- 5.将上述菌液离心 4000rpm 3min，吸去培养基至只剩 200ul，混匀后吸取菌液均匀涂布于 LB 平板上,确保菌液涂干涂匀后倒置培养皿,37℃ 200rpm/min 培养 12-14h 左右。
- 6.挑取 LB 平板上生长的单菌落放入 2-3ml 液体培养基中 37℃ 200rpm/min 震荡培养。
- 7.当菌液 OD=600 左右可以进行保菌，按照菌液：甘油=1:1 混匀，放置-40 度长期保存。

五、提取 RNA-反转录

(1) ToPrepare:

- 1.低温离心机预冷至 4℃ (先设置温度，再按 Fasttemp)
- 2.75%乙醇擦拭移液器和 EP 管架、桌面，
- 3.准备-20℃预冷的无水乙醇 (用无水乙醇和无核酶水 (DNase/RNase-FreeWater) 配制 70%乙醇)
- 4.取冰、全部操作过程都使用 RNase-free 的 EP 管、枪头。

(2) 操作步骤:

- 1.打开通风橱，消化收集细胞至 1.5mlEP 管中，1000rpm 离心将细胞收至管底，吸取上清培养液并舍弃，每管加入 1mlTrizol，(或将六孔板中的培养基吸走，每孔加 1mlTrizol，吹打下细胞收集细胞至 1.5mlEP 管中)冰上静置 10min (不能震荡，防止 DNA 污染)。
- 2、加入 500μl 氯仿，盖紧 EP 管盖，用手上下摇晃混匀 (轻缓，防止 DNA 污染)，直至溶液呈粉红色，无分相现象。
- 3、冰上静置 10min，4℃12000rpm 离心 10min。离心过程中，将 1.5mlEP 管在冰上预冷。
- 4、从离心机中取出 EP 管，把上层溶液 (该溶液为溶解了核酸的氯仿) 小心转移至新 EP 管中，要求谨慎操作，切勿吸到中间层。
- 5、往上清液中 1:1 加入等体积异丙醇 (提 RNA 专用)，上下颠倒 EP 管 20 次，充分混匀可沉淀 RNA。
- 6、冰上静置 10min 后，4℃12000rpm 离心 10min。小心弃去上清，白色沉淀即为总 RNA。
- 7、向含有沉淀的 EP 管中加入-20℃预冷的 1ml70%乙醇，轻轻上下颠倒洗涤沉淀。
- 4℃12000rpm 离心 10min，再次弃掉上清，
- 8、用 500ul70%乙醇重复操作 7，用移液器除去上清，
- 9、再次 4℃12000rpm 离心 10min，弃上清，打开 EP 管盖，冰上放置晾干 (约 3-5min)。

10、加入 RNase-freewater 约 10ul(60mm 皿细胞), 溶解 RNA 并测浓度(测浓度也需用 RNAase 的枪头)。

(三) 反转录:

1.去除 DNA:

收集刚刚提取的 RNA 溶液, 按照如下体系配置反应液:

gDNAEraser	1ul
5xgDNAEraserBuffer	2ul
TotalRNA	1 或 2ug/浓度
RNaseFreedH ₂ O	up to10ul

反应温度: 42 度 2min/室温 5min→4 度保存

2.反转录:

上述反应液	10ul
MIX (PrimeScriptRTEnzymeMixI+ RTPrimeMix+5xPrimeScriptBuffer2)	10ul

反应温度: 37 度 15min→85 度 5s→4 度保存

六、 SDS-PAGE 蛋白质凝胶电泳

(1) 样品制备

1.将培养皿中的培养基吸走, PBS 洗两遍, 加入 RIPA 裂解液 (10mlRIPA+磷酸酶抑制剂 (一片罗氏药片) +100ul 蛋白酶抑制剂 cocktail+100ul-1mMPMSF)

2.四度冰箱旋转摇床旋转 0.5-1h, 把裂解后的细胞吹打混匀后加入标记好的 EP 管中, 4 度离心机预冷, 12000rpm 离心 30min, 将上清吸到新的 EP 管中, 进行 BCA 蛋白浓度测定 (按 protocol 进行操作);

3.按样品浓度分别加入 ripa 和 loading, (样品中加入含有 SDS 和β-巯基乙醇的上样缓冲液), 通过 100 度水浴或金属浴 10min, 使蛋白质完全变性和解聚, 加热过程中及时开盖防止 EP 管炸开损失样品。(如果是已经煮过的样本, 从冰箱取出后重新 100 度加热 2min) (煮样之前要混匀离心, 加样尽量吸取上清加样)

(2) 凝胶制备

制备两种不同浓度的凝胶, 即浓缩胶和分离胶。浓缩胶用于浓缩样品, 分离胶用于根据分子量进行分离。(下层胶浓度越高, 跑分子量越小的蛋白; 下层胶浓度越低, 跑分子量越大的蛋白)

(3) 配制 Tris - 甘氨酸 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 5% 积层胶所用溶液

溶液成分	体积 ml
水	3.4
30% 丙烯酰胺溶液	0.83
1.0 mol/L Tris (pH6.8)	0.63
10% SDS	0.05
10% 过硫酸铵 AP	0.05
TEMED	0.005

(4) PS:

1.5M Tris-HCl pH 8.8

1. Tris base : 18.65 g
2. 加入 80ml 左右, 用 HCl 调节 pH 至 8.8
3. ddH₂O: 定容至 100mL

1M Tris-HCl PH 6.8

1. Tris base: 12.114g
2. 加入 80ml 左右, 用 HCl 调节 pH 至 6.8
3. ddH₂O: 定容至 100mL

(5) 电泳过程

样品加载到浓缩胶上 (枪头垂直在孔中央, 缓慢加样, 样本尽量居中放置), marker 一般加 2-3 μ l 一前一后, 样本 6-8 μ l。然后在电场作用下进行电泳, 一般设置 70v 30min 再 120v 60min 跑胶。由于 SDS 的存在, 蛋白质在电泳过程中只根据其分子量迁移, 从而实现分离。

细胞实验操作

一、细胞实验—复苏细胞

(1) 准备工作

1. 将完全培养液置于 37℃ 水浴锅中预热 30 分钟。
2. 将冻存的细胞从液氮中取出, 冻存管中如有液氮残留较多, 可在超净台中拧松盖子挥发液氮。

(2) 快速解冻

1. 在超净台内用吸管吸取 3-4mL 培养液至 60mm 培养皿中。
2. 将细胞放入浮漂在 37℃ 水浴中晃动 (注意: 水不能没过盖子), 使其在 3 分钟左右完全融化。
3. 将融化好的细胞 800 rpm 室温离心 3 分钟, 弃冻存液留下细胞沉淀。

（3）重悬与培养

将离心后的细胞沉淀用培养液重悬后转移至培养器皿，轻摇混匀（十字或八字划线法），观察细胞状态后置于 5%CO₂ 培养箱 37℃培养。（放入培养箱中再轻混匀一次）

二、细胞的传代培养

（1）准备工作：

- 1.将长成单层的细胞从 CO₂ 培养箱中取出，在倒置显微镜下观察细胞形态。
- 2.对于贴壁细胞，当细胞覆盖率达到 80%汇合或刚达到汇合时，是较理想的传代阶段（不同细胞情况可能不同）。
- 3.对于贴壁细胞，通常使用的培养基是 DMEM、MCMM。通常需要添加 10%的胎牛血清（FBS）以提供必要的营养物质和生长因子。
- 4.在传代过程中，贴壁细胞需要使用 2.5%浓度胰蛋白酶来打断细胞之间的连接，然后将细胞稀释到适当的密度并转移到新的培养皿中继续生长（大皿 8ml、中皿 4ml、小皿 1ml）。（各个皿面积 10cm 60mm 35mm）

（2）操作步骤（贴壁细胞）：

- 1.弃去培养瓶中的旧培养基。加入 1 mL PBS 轻轻晃动培养瓶润洗细胞，吸出 PBS 丢弃。重复两次。
- 2.中皿（60mm）加入约 750ul 胰蛋白酶，大皿（100mm）加入 1ml 胰蛋白酶。轻轻晃动培养瓶使之浸润所有细胞，放入培养箱消化后有以下两步，通常采用步骤 1。

步骤 1：吸去胰酶，加入培养基终止消化。（U2OS 细胞消化约 2min，HELA 细胞消化约 3min）

步骤 2：直接加入培养基，离心去上清并重悬细胞，将消化后的细胞悬液转移到离心管中，离心去除上清。再加入 1ml 培养基，将沉淀的细胞用新鲜培养基重悬混匀，加入培养皿中。

（要保证大部分细胞消化后变圆；U2OS 细胞可以一传三，即一皿吸取 333.3ul）

三、细胞转染实验操作

（1）pre：

- 1.首先确认细胞状态是否适合转染（细胞密度（U2OS=100% COS7=70%）、细胞生长状态等）。
- 2.37 度提前预热培养基、转染试剂
- 3.转染前细胞需要换液

（2）步骤：（以 35mm 皿为例）

- 1.制备溶液 A：125ml optiMEM 无血清培养基 + 5ul lipo2000 脂质体
- 2.制备溶液 B：125ml optiMEM 无血清培养基 +2-3ug 质粒（多个质粒的总质量）
- 3.轻轻震荡混合溶液 AB，静置 5min
- 4.将静置好的转染液“drop”（一滴一滴，靠近液面加入）进处理好的细胞培养皿中
- 5.轻转混匀（此时开始算转染时间），培养 4-6h 后换液

四、细胞冻存实验操作

（1）配制冻存液

冻存液最好于实验当天新鲜配制，常用的细胞冻存液配方为 培养基：FBS：DMSO= 7:2:1。

（2）细胞消化与离心

详见“细胞实验-传代培养”，细胞消化完成后，加入适量配制好的冻存液终止消化，吹打下细胞并装入冻存管中（每管 1ml）。

（3）细胞冷冻

将冻存盒置于-80℃冰箱中储存。

免疫分析实验操作

一、 Western Blot 实验操作

（1）转膜（接着“分子生化实验 SDS-PAGE”继续操作）

1.将分离后的蛋白质从凝胶转移到 PVDF 膜上，按照“白色板—海绵片—滤纸 x4—PVDF 膜—蛋白凝胶—滤纸 x4—海绵片—黑色板”的顺序叠放在一起，扣紧卡扣。（注意胶的正反和前后位置，一般默认将胶倒扣在水中，不改变方向直接拿起敷在膜上）

（全程保持湿润；如果叠放过程中有气泡需要轻轻刮掉，但 PVDF 膜和凝胶不能刮；与胶和膜接触的滤纸要用新滤纸；0.2um 滤纸跑分子量<100KD 的蛋白 0.45um 跑 分子量≥100KD 的蛋白；滤纸和 PVDF 膜都用 6x9cm）

2.将组装好的转膜板放入转膜仪，300mA 90min 电转。转膜时放入冰块降温。

（2）封闭

1.将膜置于含有 5%牛血清白蛋白（BSA）或 5%脱脂奶粉中 1h 摇晃封闭。

(5%BSA=2.5gBSA+50mlPBST)

2.封闭结束后，将 PVDF 膜放在 PBST 中。(PBST=1%Tween-20+1000PBS)

（3）一抗孵育

1.找好目的条带的位置（按照分子量大小）将之裁下，宽度不超过 3cm

2.加入一抗稀释液（一抗：一抗稀释液=1:1000/500；具体比例按照厂家说明）5ml，在4℃摇床上摇晃孵育过夜。

（4）二抗孵育

回收一抗液，PBST洗3次，每次10min；加入二抗（二抗：BSA=1:4000）室温摇床孵育1-2h。

（一抗原液在-40℃可长期保存；一抗稀释液保存在4度方便使用，但需要一个月补1ul一抗原液；试用前需要检查是否有抗体沉淀）

（5）显影

1.用TBST洗三次（每次摇晃洗10min），将条带剪成合适大小，在目的条带位置滴入显影液200ul（白瓶：棕瓶=1：1）显影。（内参容易显影，一般只需要用显影液孵5s，目的条带一般孵10s，可根据显影情况调整孵育时间）

2.依次开启电脑、显影仪，打开软件，设置显影格式。

3.用塑料薄膜把条带上的液体擦干，打开薄膜，在目的条带位置滴入显影液。（acting只需曝光10s，其他条带按情况曝光）

1.将得到的数据保存到光盘里，关闭仪器、电脑。

（6）ps

如果需要在相同条带孵育磷酸化的抗体，可以按以下步骤洗去抗体重新封闭：

1. 用TBST/PBST摇晃洗10min。

2. 用stripping buffer在室温下孵育15-30min。

3. 倒掉孵育盒里的液体，再用TBST/PBS摇晃洗10min。

4. 重新开始封闭步骤，再次进行实验。

二、IF 免疫荧光实验操作

1. 固定：用PBS洗两遍细胞，再用4%多聚甲醛固定（9PBS+1（37%）PFA）10-15min。

2. 通透：用0.2%的Triton X-100洗2-3遍，再用0.5% Triton X-100进行膜打孔10min。（Triton X-100这是一种常用的通透剂，能够有效地使细胞膜通透，使抗体能够进入细胞内部与抗原结合。

需及时放入4℃保存）

3. 封闭：5%驴血清封闭1h（封闭完后血清尽量回收）

4. 洗涤：0.2% Triton X-100洗2遍。

5. 孵育：用1抗孵育，4℃过夜。

6. 洗涤：用0.2% Triton X-100洗两遍

7. 孵育：用二抗（抗体：驴血清=1:1000）孵育（1-2h）

8. 洗涤：0.2% Triton X-100洗2遍

9. 保存：培养皿用PBS浸泡，4℃保存。

10.注意事项：孵育时全程避光，最后保存时也要避光保存。