

分子生物学实验的常见问题与解决方案-1

一、Southern 杂交

问题 1: 电泳后发现凝胶中 DNA 扩散, 导致结果难以确定, 如何解决这一问题?

解决方案: (1) 在操作上: 电泳时隔孔上样, 电泳后要对凝胶及时处理使凝胶干燥; (2) 琼脂糖的质量应该较好, 尤其是不应含有内切酶, 否则有时将使低拷贝数基因的杂交结果难以解释。

问题 2: 传统方法中转膜不完全的问题如何克服?

解决方案: 经典的向上转移法会使凝胶短时间内变薄, 此时即使延长转移时间至 24 小时以上, 也不能使大分子 DNA 良好地转移出去, 因此, 转膜不完全。向下转膜法由于不需在吸水纸上增加重量, 凝胶基本不变形; 加之吸水纸的吸力与水受到的重力方向一致, 故可以良好地完成 DNA 的转移, 它不需要特殊的仪器, 转移速度较快, 转移效率高。

利用地高辛标记探针进行 Southern 杂交时, 对于大于 15kb 的 DNA 片断, 转膜之前用盐酸进行脱嘌呤可以促进转膜效率, 但脱嘌呤过度可导致分子量相对较小的 DNA 被打断成过小的片段而难以和尼龙膜结合。如果实验转膜过程中同时含有大于 15kb 的 DNA (通常为基因组) 和小片段 DNA (通常是基因组酶切产物), 那么在转移的过程中倾斜容器, 仅使凝胶上半部分浸泡于盐酸, 这样既可以提高大片断 DNA 的转移效率, 又不会打碎小片段 DNA。

另外, 等采用琼脂糖凝胶直接杂交的方法, 来解决这一难题: 以转基因鼠的检测为例, 实验步骤如下: 1. 转基因鼠的建立: 以鼠乳清酸蛋白 (WAP) 基因 5' 调控区指导人 G-CSF 基因为构件, 建立转基因小鼠。转基因小鼠的检测采用剪取鼠尾 DNA 做 Southern 进行鉴定。2. 琼脂糖凝胶直接杂交: (1) 用 BanHI (150U) 对由假孕鼠产生的仔鼠剪尾提取基因组 DNA 10 μ g 酶切过液, 取少量电泳检查酶切完全后, 上样电泳 8 小时, (2) 将电泳槽板连同凝胶置 50℃ 放置 3 小时, 用镊子轻轻揭起凝胶, 放于变性液 (0.5MNaOH, 0.5MNaCl) 20 分钟, 转置中和液 (0.5MTrisHCl, 0.15MNaCl) 20 分钟, 将胶放于玻璃板上沥干液体, 室温放置 30 分钟。(3) 干胶应立即杂交。先将胶在水中泡一下, 以利于操作。(4) 将胶放入杂交液 (6×SSC、5×Denhardt' S、0.25% SDS、100 μ g/ml 鲑鱼精 DNA), 加入探针, 42℃ 杂交 16-20

小时。(5)杂交完成后,洗膜8轮,42℃每次15分钟。2×SSC、0.1%SDS、1×SSC、0.1%SDS、0.1×SSC、0.1%SDS、0.1×SSC、0.1%SDS、各洗两次,在冰水中浸泡2分钟,以利于盐的排出。(6)干燥后按检测试剂盒操作,室温压片0.5-2小时。冲片照相。使用的探针为G-CSF。DNA,探针标记采用Fluorescein-12-dUTP,检测试剂盒为杜邦公司产品,操作按试剂盒说明书进行。用琼脂糖凝胶直接杂交的方法,较好地解决了微量核酸或低拷贝数转基因的检测问题,结果不仅直观,而且特异性好。与常规的Southern杂交相比,它所具有的优势是,它省略了将DNA进行转膜的步骤,从而避免了因转膜不完全所造成的DNA量的损失,特别是低拷贝数基因的丢失。另一方面,也使复杂的Southern杂交操作程序大大简化。因此,在转基因鼠的鉴定中以及微量核酸检测、疾病诊断中是防止低拷贝数基因漏检的一种可行途径。

问题3: 在向下转膜法中,如何提高转膜效率?

解决方案: 1、转移液的水平面应略低于凝胶的水平面。如果转移液的水平面高于凝胶,短时间内会有大量液体聚集在凝胶上,直接从侧面流失;果转移液的水平面过分低于凝胶,影响纱布的吸水力,转移效率下降。2、吸水纸吸水后易变形,使吸水纸与滤纸间产生空隙,而降低吸水纸的吸水效率,应及时更换吸水纸。3、过夜转移时,及时添加转移液,防吸干。4、样本丰度高时,移时间可以缩短至1小时,此时凝胶上仍可见大分子量DNA的残留,当样本丰度低时,以延长转移时间。5、纱布上不要加盖重物,防凝胶受压变薄,响转移效率。

问题4 碱转移结束后的尼龙膜潮湿不利于保存,且防止长期保存过程中DNA结合不紧密影响杂交效果,应如何做?

解决方案: 将尼龙膜置于滤纸上干燥片刻,在紫外交联仪中将转有DNA的一面向上12000J交联4min,若尼龙膜暂不杂交,可在4℃下保存备用但存放时间不宜超过半年。

问题5 使用碱转移法,将导致杂交后探针的去除困难,几乎80%-90%的探针难以洗脱,如何解决这一问题?

解决方案: 将煮沸的 5g/LSDS 溶液倒在膜上, 待溶液自然冷却至室温, 可除去膜上已杂交的 DNA 探针。洗脱后的尼龙膜, 可反复用于其他探针的杂交(至少可耐 5 轮杂交与洗脱)。

问题 6: Southern 杂交中, 探针的背景高, 应如何解决?

解决方案: 用随机引物法标记的探针要想得到最低的背景, 在向尼龙膜上加 prob-DIG Easy Hybridization 混合物前, 要用 0.45 μm 醋酸纤维素膜过滤, 勿用硝酸纤维素滤膜过滤。对每一个探针和目的片段, 总是要根据经验确定最合适的杂交条件, 探针浓度很关键, 如果太高, 将会非特异性结合到膜上; 太低, 敏感性会降低。

利用地高辛标记探针进行 Southern 杂交时, 以下 2 种措施可降低背景: (1) 适当延长梯度洗膜的时间和提高洗膜温度; (2) 控制地高辛抗体的浓度。使用足够量的地高辛抗体可以获得较好的杂交信号, 但过量的地高辛抗体会在膜上产生非特异结合斑点。

问题 7: Southern 杂交没有检测出杂交信号的原因, 如何解决?

解决方案: (1) 目的 DNA 在总 DNA 中所占的比例, 一般需要 10 μg DNA 样品, 如果样品中目的基因含量较高, 可以按比例减少 DNA 用量。如果基因组中目的基因的拷贝数较低, 致使常规的基因组用量不能满足 Southern 杂交的需要, 此时可加大基因组的用量; (2) 探针的浓度和比活性: 在杂交袋中杂交需要 0.2ml/cm² 的杂交液; 使用圆筒状瓶子进行杂交可以使用较小的体积, 约 0.1ml/cm²。(3) 转移到滤膜上的 DNA 量以及探针与目的 DNA 间的配对: (见问题 2, 3)

二、蓝白斑筛选

问题 1: 做蓝白斑筛选只见白斑, 不见蓝斑, 该如何做?

解决方案: (1) 做空白对照, 将没有进行重组的宿主菌直接接入含有 IPTG 和 X-gal LB 琼脂糖平板在 37℃ 下培养 17 小时以上以便显色。显色后将平板置于 4℃ 两小时, 蓝色会加深。如果正常显色, 说明试剂, 培养基及菌没有问题, 如果不能正常显色, 更换试剂重新配置培养基或者接入新的菌种, 再次培养, 确保空白

对照结果正确。(2) 若空白试验结果正确, 用牙签挑取白色菌落, 进行 PCR 扩增, 同时设立阳性、阴性和空白对照。阳性对照为经测序确认含有相同大小插入片段的重组菌落, 阴性对照为经测序确认为不含插入片段的空载质粒菌落, 空白对照为不加模板的 PCR 体系。PCR 扩增产物通过非变性 PAGE 条带分析, 确定是否重组, 即 PCR 扩增后的反应液中加入 $2\ \mu\text{l}$ 的 $6\times$ 上样缓冲液, 混匀, 上样至已预电泳的 10% 非变性 PAGE 加样孔中, 200V 电压电泳后, 取胶至 EB 液中染色 30min, 最后在紫外灯下数码照相。比对结果, 判断白斑是否为重组子。

问题 2: 做蓝白斑筛选时, 只见蓝斑, 不见白斑该如何做?

解决方案: (1) 做空白对照, 将没有进行重组的宿主菌直接接入含有 IPTG 和 X-gal LB 琼脂糖平板在 37°C 下培养 17 小时以上以便显色。显色后将平板置于 4°C 两小时, 蓝色会加深。观察对照的蓝色是否和实验组的颜色一样, 如果实验组的蓝色较浅, 可能载体带有插入片段, 但没有阻断 *lacZ* 阅读框。(2) 用牙签挑取浅蓝色菌落, 进行 PCR 扩增, 同时设立阳性、阴性和空白对照。阳性对照为经测序确认含有相同大小插入片段的重组菌落, 阴性对照为经测序确认为不含插入片段的空载质粒菌落, 空白对照为不加模板的 PCR 体系。PCR 扩增产物通过非变性 PAGE 条带分析, 确定是否重组, 即 PCR 扩增后的反应液中加入 $2\ \mu\text{l}$ 的 $6\times$ 上样缓冲液, 混匀, 上样至已预电泳的 10% 非变性 PAGE 加样孔中, 200V 电压电泳后, 取胶至 EB 液中染色 30min, 最后在紫外灯下数码照相。比对结果, 判断浅蓝色菌落是否为重组子。

三、外源基因在大肠杆菌的表达

问题 1: 外源基因在大肠杆菌中高效表达易形成包含体, 包含体形成有利于表达产物的纯化, 但降低产生大量不具有生物活性的产物, 如何降低包涵体的形成?

解决方案: (1) 采用胰胨-磷酸盐培养基能够限制包含体的形成。(2) 培养液中加入甜菜碱和山梨醇来改变渗透压, 使表达产物由包含体形式转变为活性状态, 将温度从 37°C 降低到 25°C 时诱导表达, 可降低包含体的形成。(3) 选用 pMBI 衍生而来的载体质粒, 因为其可以协同表达 DnaK-DnaJ 或 GroEL-GroES, 增加凝结蛋白的溶解度。分子伴侣折叠作用效率与细胞 DnaK-DnaJ 和 GroEL-GroES 的浓度有关, 与表达蛋白的性质有关。

问题 2: 在 *lac*、*tac* 表达系统中 IPTG 用于诱导 *lac*、*tac* 启动子的转录，但由于 IPTG 本身具有一定的毒性。从安全角度，对表达和制备用于医疗目的的重组蛋白并不适合。一些国家规定在生产人用重组蛋白质的生产工艺中不能使用 IPTG，应如何做？

解决方案: (1) *lac* 和 *tac* 启动子的转录受温度严紧调控：把阻遏蛋白 LacI 的温度敏感突变体 *lacI*(ts)、*lacIq*(ts) 插入表达载体或整合到染色体后，均能使 *lac* 和 *tac* 启动子的转录受到温度严紧调控在较低温度 (30℃) 时抑制，在较高温度 (42℃) 时开放。(2) 用乳糖替代 IPTG 诱导 *lac* 和 *tac* 启动子的转录：乳糖在 B-半乳糖苷酶作用下生成异乳糖，异乳糖具有诱导剂的作用这一过程涉及乳糖的转运和转化，其效率受到多种因素的影响和制约因此乳糖诱导的有效剂量大大高于 IPTG。乳糖本身作为一种碳源可以被大肠杆菌代谢利用，较多的乳糖存在也会导致菌体生理及生长特性变化。乳糖替代 IPTG 作为诱导剂的研究要与发酵工艺结合起来，才能显示其良好的前景。

问题 3: T7 表达系统表达目的基因的水平是目前所有表达系统中最高的，但也不可避免出现在相对较高的本底转录，如果目的基因产物对大肠杆菌宿主有毒性，会影响细胞的生长。

解决方案: 在表达系统中低水平表达 T7 溶菌酶基因：因为 T7 溶菌酶除了作用于大肠杆菌细胞壁上肽聚糖外，还能与 T7 RNA 聚合酶结合抑制其转录的活性。目前 T7 溶菌酶基因都通过共转化质粒导入表达系统，它能明显降低本底转录，但对诱导后目的基因的表达水平无明显影响。

问题 4: 为了提高外源基因的表达水平，对表达载体如何进行改进？

解决方案: (1) 可诱导拷贝数的表达载体。质粒的拷贝数由培养条件控制，当需要增菌培养时，质粒的拷贝数很低，每个细胞仅 1-5 个拷贝，经适当条件诱导后，载体拷贝数可达每个细胞 100-500 个拷贝。这种表达载体的优点减小了载体质粒的丢失，保证质粒在大肠杆菌中的稳定性，对外源基因的表达调控更为严格，有利于基因的高效表达。这里主要有两类条件控制拷贝数的表达载体，一类是基于质粒 R1 基础上的单复制起始表达载体；另一类是双复制起始表达载体，一个复制起始来源于 *ColEI*，另一个来源于质粒 pSC101。(2) 多顺反子型表达载体。这种表达载体的设计在于将第二个顺反子的 SD 序列插入在第一个顺反子的终止密码子 TAA 之前，第一个顺反子要尽量短，后面接目的基因的起始密码子 ATG。由于第一个顺反子翻译地有效起始，使得大量的核糖体结合在多顺反子 mRNA 上，

促进了核糖体对第二个顺反子的 SD 序列的识别和翻译起始，从而提高了表达水平。(3)带翻译增强子的表达载体。atpE 基因 SD 序列上游的一段序列对其表达具有促进作用，它位于 SD 序列上游 2-7bp 处，这段序列在 atpE 基因的 mRNA 上核苷酸顺序为 UUUUAACUGAAACAAA，将其插入到其它表达载体内构建的新型表达载体，对 B-干扰素和 IL-2 的表达提高了 6-8 倍。T7 噬菌体基因 10 的 mRNA 中有一个翻译增强子，它是一段与 16sRNA 的互补序列，提高了核糖体与翻译起始区的亲和力，将其插入 SD 序列上游或起始密码子下游均可提高翻译起始效率。

问题 5：质粒的过度增殖以及其后目的基因的高效表达影响受体细胞的生长代谢，导致重组质粒的不稳定性以及目的基因宏观表达水平的下降。如何解决？

解决方案：将重组质粒的扩增纳入可控制的轨道：（1）采用条件控制拷贝数的表达载体，一类是基于质粒 R1 基础上的单复制起始表达载体；另一类是双复制起始表达载体，一个复制起始来源于 ColEI，另一个来源于质粒 pSC101；（2）将外源基因插入到大肠杆菌的染色体中 chopin 等报道，将分泌型 IGF-I 的基因，采用串连式的重复方式插入到大肠杆菌染色体的 att λ 位点，在不添加抗生素诱导的条件下，采用高密度发酵，IGF-I 基因十分稳定。

问题 6：在分泌型异源蛋白的表达中，附加的甲硫氨酸也可能改变蛋白质的免疫性质和药理性质，应如何去除？

解决方案：（1）在表达系统中共表达甲硫氨酸氨肽酶基因。（2）在分离纯化后在体外用外肽酶处理。但它们都对与甲硫氨酸相邻的氨基酸残基类型有一定要求，因此在使用上有一定的限制。

问题 7：把所表达的目标蛋白分泌到细胞外的培养基中可以进一步减少蛋白水解酶的降解，也有利于分离纯化。如何实现目标蛋白的外分泌表达？

解决方案：（1）与大肠杆菌本身的外泌蛋白基因融合表达；（2）与一些能提高细胞外膜通透性的因子融合或共表达；（3）改变培养基的成分。但方法仅对外泌分子量较小的蛋白有效，而且外泌效率一般都比较低。

问题 8：如何使外源基因高效表达？

解决方案：（1）表达质粒的优化和设计：构建表达质粒时首先要考虑使目标基因的翻译起始密码 ATG 与 SD 序列之间的距离和碱基组成处于一个适当的范围内。核糖体结合位点序列的变化对 mRNA 的翻译效率有显著影响，具体表现为：SD 序列 UAAGGAGG 的翻译效率要比 AAGGA 高 3-6 倍；翻译起始密码 ATG 与 UAAGGAGG 的最适距离是 6-8 个碱基长度，与 AAGAA 的最适距离是 5-7 个碱基长度；ATG 与 UAAGGAGG 至少相隔 3-4 个碱基，与 AAGAA 至少相隔 5 个碱基 mRNA 的翻译才能进行；ATG 与 SD 序列之间的碱基组成为 A, T 碱基丰富时，mRNA 翻译效率较高。其次，尽量提高核糖体结合位点本身和附近的序列中 A/T 碱基的含量，降低 mRNA 5' 端形成的“茎环”结构的可能性，也是构建表达质粒时需要注意的事项。在必要的情况下，还可通过定点突变，PCR 等技术改变个别关键的碱基来破坏 mRNA 5' 端的“茎环”结构。把目标基因设计成多顺反子结构，在大肠杆菌本身的高效翻译起始元件后加上第二个 SD 序列和目标基因，一起插入表达载体。这一方法通常适用于目标基因 5' 端序列容易形成二级结构，而又不宜改变其序列的情形下。再者，在构建表达质粒时，充分利用各个基因的结构特征和特点，注意引入翻译增强子序列。（2）共表达大肠杆菌稀有密码子 tRNA 基因：由于同义密码子的使用频率与细胞内对应的 tRNA 的丰度有正比关系稀有密码子对应的 tRNA 的丰度很低，有可能在翻译过程中发生中止和移码突变。可采用 1. 通过基因突变把稀有密码子改变为其他使用频率高的同义密码子；2. 在表达系统中共表达稀有密码子 tRNA 基因，以提高大肠杆菌细胞内稀有密码子 tRNA 的丰度。（3）提高目标基因 mRNA 和目标基因产物的稳定性：利用蛋白转运系统把目标蛋白最终累积在周质空间，或分泌到培养基中；采用缺乏某些蛋白水解酶基因的缺陷株作为宿主菌；对分子量较小的目标基因进行融合表达或串联聚合表达；共表达能提高特定目标蛋白稳定性的辅助因子，如分子伴侣基因；对蛋白质序列中的蛋白水解酶敏感区域和识别位点进行改造；在较低的温度下培养菌体和优化发酵条件。（4）高密度发酵和工程化宿主细胞：：大肠杆菌高密度发酵是大规模制备重组蛋白质过程中不可缺少的工艺步骤。其目的是在单个菌体对目标基因的表达水平基本不变的前提下，通过单位体积的菌体数量的成倍增加来实现总表达量的提高。目前常用的发酵方式有：恒定培养、流加补料培养、连续培养三种。工程化宿主细胞：1. 构建出产乙酸能力低的工程化宿主菌是解决高密度发酵后期由于菌体的生长密度较高，培养基中的溶氧饱和度往往比较低，氧气的不足导致菌体生长速率降低和乙酸的累积，乙酸的存在对目标基因的高效表达有明显的阻抑作用的根本途径。利用透明颤菌血红蛋白能提高大肠杆菌在贫氧条件下对氧的利用率的生物学性质，把透明颤菌血红蛋白基因 *vgb* 导入大肠杆菌细胞内以增加其对溶氧的宽容度。从而降低菌体产生乙酸所要求的溶氧饱和度阈值；用基因敲除技术缺失大肠杆菌的磷酸转乙酰酶基因 *pta1* 和乙酸激酶基因 *ackA*，使从丙酮酸到乙酸的合成途径被阻断；改变代谢流的方向，通过共转化把枯草杆菌、酿酒酵母的乙酰乳酸合成酶基因 *alsS*，单胞菌的丙酮酸脱羧酶基因 *pdc1* 和乙醇脱氢酶基因 *adh2* 导入大肠杆菌，使丙酮酸的代谢有选择地向生成

3-羟基丁酮或乙醇的方向进行。2. 构建蛋白水解酶活力低的工程化宿主菌：rpoH 基因编码大肠杆菌 RNA 聚合酶的 σ^{32} 亚基， σ^{32} 亚基对大肠杆菌中多种蛋白水解酶的活力有正调控作用。rpoH 基因缺陷的突变株已经被构建，研究结果表明它能明显提高目标基因的表达水平。

1 PCR 反应

1.1 假阴性，不出现扩增条带

可能原因：

(1) 模板：①模板中含有杂蛋白质；②模板中含有 Taq 酶抑制剂；③模板中蛋白质没有消化除净，特别是染色体中的组蛋白；④在提取制备模板时丢失过多，或吸入酚，模板本身拷贝数低；⑤模板核酸变性不彻底。

对策：纯化模板；配制有效而稳定的消化处理液，其程序亦应固定不宜随意更改；如果怀疑污染了抑制剂，可以使用乙醇沉淀 DNA。

(2) 酶失活

对策：需更换新酶，或新旧两种酶同时使用，以分析是否因酶的活性丧失或不够而导致假阴性。需要注意的是有时忘加 Taq 酶或溴乙锭。

(3) 引物：引物质量、引物的浓度、两条引物的浓度是否对称，是 PCR 失败或扩增条带不理想、容易弥散的常见原因。有些批号的引物合成质量有问题，两条引物一条浓度高，一条浓度低，造成低效率的不对称扩增，

对策：①选定一个好的引物合成单位；②引物的浓度不仅要看 OD 值，更要注重引物原液做琼脂糖凝胶电泳，一定要有引物条带出现，而且两引物带的亮度应大体一致，如一条引物有条带，一条引物无条带，此时做 PCR 有可能失败，应和引物合成单位协商解决。如一条引物亮度高，一条亮度低，在稀释引物时要平衡其浓度；③引物应高浓度小量分装保存，防止多次冻融或长期放冰箱冷藏部分，导致引物变质降解失效；④引物设计不合理，如引物长度不够引物之间形成二聚体等，需重新设计引物。

(4) Mg^{2+} 浓度： Mg^{2+} 离子浓度对 PCR 扩增效率影响很大，浓度过高可降低 PCR 扩增的特异性，浓度过低则影响 PCR 扩增产量甚至使 PCR 扩增失败而不出扩增条带。

对策：调整 Mg^{2+} 浓度，从 1mM 到 3mM，间隔 0.5mM 进行一系列反应，确定对于每个模板和引物对的最佳镁离子浓度。注意：对实时定量 PCR，使用 3mM 到 5mM 的镁离子浓度。

(5) 反应体积的改变：通常进行 PCR 扩增采用的体积为 20ul、30ul、50ul。或 100ul，应用多大体积进行 PCR 扩增，是根据科研和临床检测不同目的而设定，在做小体积如 20ul 后，再做大体积时，一定要摸索条件，否则容易失败。

(6) 物理原因：变性对 PCR 扩增来说相当重要，如变性温度低，变性时间短，极有可能出现假阴性；退火温度过低，可致非特异性扩增而降低特异性扩增效率；退火温度过高影响引物与模板的结合而降低 PCR 扩增效率。

对策：优化 PCR 温度，有时还有必要用标准的温度计，检测一下扩增仪或水浴锅内的变性、退火和延伸温度。

(7) 靶序列变异：如靶序列发生突变或缺失，影响引物与模板特异性结合，或因靶序列某段缺失使引物与模板失去互补序列，其 PCR 扩增是不会成功的。

1.2 假阳性：出现的 PCR 扩增条带与目的靶序列条带一致，有时其条带更整齐，亮度更高。

可能原因：

(1) 引物设计不合适：选择的扩增序列与非目的扩增序列有同源性，因而在进行 PCR 扩增时，扩增出的 PCR 产物为非目的性的序列。靶序列太短或引物太短，容易出现假阳性。

对策：需重新设计引物。

(2) 靶序列或扩增产物的交叉污染：这种污染有两种原因：

一是整个基因组或大片段的交叉污染，导致假阳性。

对策：①操作时应小心轻柔，防止将靶序列吸入加样枪内或溅出离心管外。②除酶及不能耐高温的物质外，所有试剂或器材均应高压消毒。所用离心管及样进枪头等均应一次性使用。③必要时，在加标本前，反应管和试剂用紫外线照射，以破坏存在的核酸。

二是空气中的小片段核酸污染，这些小片段比靶序列短，但有一定的同源性。可互相拼接，与引物互补后，可扩增出 PCR 产物，而导致假阳性的产生。

对策：可用巢式 PCR 方法来减轻或消除。

1.3 出现非特异性扩增带

PCR 扩增后出现的条带与预计的大小不一致，或大或小，或者同时出现特异性扩增带与非特异性扩增带。非特异性条带的出现，其原因：

(1) 引物与靶序列不完全互补、或引物聚合形成二聚体。(2) Mg^{2+} 离子浓度过高、退火温度过低，及 PCR 循环次数过多有关。(3) 酶的质和量，往往一些来源的酶易出现非特异条带而另一来源的酶则不出现，酶量过多有时也会出现非特异性扩增。

对策：①必要时重新设计引物。②减低酶量或调换另一来源的酶。③降低引物量，适当增加模板量，减少循环次数。④适当提高退火温度或采用二温度点法(93℃变性，65℃左右退火与延伸)。⑤降低 Mg^{2+} 浓度。

1.4 出现片状拖带或涂抹带

可能原因：酶量过多或酶的质量差，dNTP 浓度过高， Mg^{2+} 浓度过高，退火温度过低，循环次数过多。

对策：①减少酶量，或调换另一来源的酶。②减少 dNTP 的浓度。③适当降低 Mg^{2+} 浓度。④增加模板量，减少循环次数。

2 RT-PCR 反应

2.1 在琼脂糖凝胶分析中看到少量或没有 RT-PCR 产物

可能原因：

(1) RNA 被降解

对策：①在用来验证完整性之前先在变性胶上分析 RNA，使用良好的无污染技术分离 RNA；②在将组织从动物体取出后立刻处理在 100% 甲酰胺中储存 RNA；③如果使用胎盘 RNase 抑制剂，不要加热超过 45℃ 或 pH 超过 8.0，否则抑制剂或释放所有结合的 RNase。而且，在 ≥ 0.8 mM DTT 时加入 RNase 抑制剂，一定要存在 DTT。

(2) RNA 中包含逆转录抑制剂

对策：通过乙醇沉淀 RNA 除去抑制剂。用 70% (v/v) 乙醇对 RNA 沉淀进行清洗。可以加入糖元 (0.25 μ g 到 0.4 μ g/ μ l) 以帮助小量样品 RNA 的恢复。(逆转录

抑制剂包括：SDS，EDTA，甘油，焦磷酸钠，spermidine，甲酰胺和胍盐。) 将对照 RNA 同样品混合，同对照 RNA 反应比较产量以检验抑制剂。

(3) 多糖同 RNA 共沉淀

对策：使用氯化锂沉淀 RNA 以除去多糖。

(4) 用于合成 cDNA 第一链合成的引物没有很好退火

对策：①确定退火温度以适合引物。对于随机六聚体，建议在反应温度保温之前先在 25℃保温 10 分钟。②对于基因特异性引物 (GSP)，可以试一下其他 GSP，或换用 oligo(dT) 或随机六聚体。③确定 GSP 是反义序列。

(5) 起始 RNA 量不够

对策：增加 RNA 量。对于 <50ng 的 RNA 样品，可以在第一链 cDNA 合成中使用 0.1 μg 到 0.5 μg 乙酰 BSA。

(6) RNA 模板二级结构太多

对策：①将 RNA 和引物在不含盐及缓冲液条件下变性/退火。②提高逆转录反应温度，对 SuperScript II 可以到 50℃，对 ThermoScript 可以到 65℃。注意：不要在 >60℃时使用 oligo(dT) 引物，选择一个在反应温度可以退火的 GSP。对于 >1kb 的 RT-PCR 产物，保持反应温度 ≤65℃。不要在高于 37℃时使用 M-MLV。③如果不需要全长 cDNA，在第一链反应中使用随机引物。

(7) 引物或模板对残余的 RNA 模板敏感 对策：在 PCR 前用 RNaseH 处理。

(8) 靶序列在分析的组织中不表达 对策：尝试其他靶序列或组织

(9) PCR 没有起作用

对策：对两步法 RT-PCR，不要在 PCR 步骤中使用超过 1/5 的逆转录反应产物。

2.2 污染造成假阳性

可能原因：

(1) 样品间的交叉污染

对策：①收集样品的容器最好使用一次性的，如重复使用，应在使用前应于 180℃的高温下干烤 6 小时或更长时间；②样品存放时要密封严实，以防外溢造成相互间的交叉污染；③样品在提取过程中离心管及吸样枪头最好使用一次性的，以免

不同实验样品间相互污染；④由于吸样枪污染会导致样品间的污染，也是一个值得注意的问题，由于操作不慎将样品或提取物吸入枪内或粘上枪头是一个严重的污染源，因而加样或吸取时要十分小心，吸时要慢，吸取尽量一次性完成，忌多次抽吸，以免交叉污染或产生气溶胶污染；⑤同时要注意操作时不要剧烈地摇动反应管，开盖时也容易造成气溶胶污染。每次实验完毕都要及时清理实验台面，用 0.5%次氯酸钠消毒后再打开紫外灯照射半小时。

(2) RT-PCR 本身使用的试剂污染在试剂配制过程中，由于加样枪、容器及其它溶液被污染。

对策：所有试剂都应尽量小量分装，以减少重复加样次数，避免污染机会，另外 RT-PCR 试剂应尽可能密封好分类存放。每次操作完毕后同样要进行台面消毒和紫外线照射消毒。

(3) 扩增产物的污染，极微量的扩增产物污染就可造成假阳性。

对策：每次实验完后，扩增产物都要及时密封后处理。设阳性对照。

(4) 操作人员污染：只要存在少量的 RNA 酶就会引起 RNA 的降解，从而影响结果的准确性，RNA 酶可存在操作人员手汗、唾液中，也可灰尘中，一旦器械、玻璃制品、塑料制品受到污染，容易造成实验失败。

对策：操作人员应戴一次性口罩、帽子、手套，实验过程中手套要勤换。设置 PCR 操作专用实验室，所用实验用具应为专用，并合理分隔实验室，将样品的提取、配制 RT-PCR 反应液、PCR 循环扩增等步骤分室进行，实验前应将实验室及实验人员工作服用紫外线或臭氧消毒以破坏残留的 DNA 或 RNA。

2.3 在无反转录酶的情况下，对照 RNA 获得扩增结果

可能原因：

(1) 对照 RNA 中含有痕量 DNA。

对策：第一链 cDNA 稀释 1:10、1:100、1:1000 倍以消除 DNA 污染所造成的影响。

(2) 有可能是引物二聚体的条带。

2.4 扩增产物滞留在加样孔中

可能原因：由于模板量过高而导致 PCR 结果产生了高分子量的 DNA 胶状物。

对策：将第一链结果至少稀释 100 倍再进行二次扩增。另外，在二次 PCR 时使用的退火温度如果比引物的 T_m 值低 5°C ，可以将退火温度适当增高或进行热启动以提高特异性。

分子生物学实验中常见的问题与对策-3(2009-06-11 11:52:17)

3 定量 PCR

3.1 无 CT 值（信号）出现

可能原因：

（1）反应循环数不够

对策：35 个循环以上，可根据实验情况增加循环（如至 45cycles），但高于 45 个循环会增加过多的背景信号。

（2）测荧光信号的步骤有误

对策：一般 SG 法采用 72°C 延伸时采集，Taqman 法则一般在退火结束时或延伸结束采集信号。

（3）引物或探针降解 对策：可通过 PAGE 电泳检测其完整性。

（4）引物或探针的设计，如探针高于引物的温度不够，造成探针未杂交上而产物已延伸的情况。

对策：重新设计引物或探针

（5）模板量不足

对策：对未知浓度的样品应从系列稀释样本的最高浓度做起。

（6）模板降解 对策：避免样品制备中杂质的引入及反复冻融的情况。

3.2 CT 值出现过晚

可能原因：

（1）扩增效率低，反应条件不够优化

对策：设计更好的引物或探针；改用三步法进行反应；适当降低退火温度；增加镁离子浓度等。

(2) PCR 各种反应成分的降解或加样量的不足

(3) PCR 产物太长 对策：一般采用 80-150bp 的产物长度。

3.3 标准曲线的线性关系不佳

可能原因：

(1) 加样存在误差，使得标准品不呈梯度 对策：精确操作。

(2) 标准品出现降解 对策：避免标准品反复冻融，或重新制备并稀释标准品。

(3) 引物或探针不佳 对策：重新设计更好的引物和探针

(4) 模板中存在抑制物，或模板浓度过高 对策：降低模板浓度或重新制备。

3.4 阴性对照也出现明显的起飞

可能原因：

(1) 混合物或水被污染 对策：避免污染。

(2) 引物二聚体的出现

对策：用 SG 法在 35cycles 以后阴性出现起飞属正常情况，可配合熔解曲线进行分析。

(3) 反应过程中探针的降解 对策：用 PAGE 电泳对探针进行检测。

(4) 如果使用了 ROX 校正，则可能是 ROX 的降解所造成。

3.5 熔解曲线不止一个主峰

可能原因：

(1) 引物设计不够优化 对策：应避免引物二聚体和发夹结构的出现。

(2) 引物浓度不佳 对策：适当降低引物的浓度，并注意上下游引物的浓度配比。

(3) 镁离子浓度过高 对策：适当降低镁离子浓度，或选择更合适的 mix 试剂盒。

(4) 模板有基因组的污染

对策：RNA 提取过程中避免 DNA 的引入，或通过引物设计避免非特异扩增。

3.6 扩增效率低

可能原因：

(1) 反应试剂中部分成分特别是荧光染料降解。

(2) 反应条件不够优化 对策：可适当降低退火温度或改为三步扩增法。

(3) 反应体系中有 PCR 反应抑制物

对策：一般是加入模板时所引入，应先把模板适度稀释，再加入反应体系中，减少抑制物的影响。

3.7 实验重复性不好

可能原因：

(1) 加样不准确 对策：精确操作。

(2) 仪器在样品上温度条件有差异，即温度均一性不好。

(3) 模板浓度低。样品初始浓度越低，重复性越差 对策：应减少样品的稀释倍数。

3.8 变性温度是否合适

大部分的双链 DNA 在 95° C 就开始解链了，在有些情况下在 90 至 94° C 都不能很好地变性 DNA。由于部分变性，参加反应的探针和引物相应的减少了，因此反应效率会下降。

3.9 变性时间是否合适

15 到 20 秒对于变性扩增子是足够了，然而，长一点的产物，可能会需要 30 秒，60 秒的变性时间通常是不需要的。

3.10 退火温度和时间是否合适

检查引物和探针的 T_m 值, SYBRGreenI 的退火时间大约 20 到 35 秒, 双标记探针通常是两步法, 退火和延伸合并为一步, 时间大约是 45 到 60 秒, 温度通常在 60°C , 对于 FRET 探针退火步骤大约 20 到 30 秒。

3.11 在哪一步骤采集信号

SYBRGreenI 应当在 72°C , 此时绝大部分的 DNA 是双链状态, 如上所述, 双标记探针通常是两步检测, 因此信号采集应该在退火延伸的整合步骤。对于 FRET 检测, 数据应该在退火步骤检测。如果对于信号采集点不确定, 可以多点采集作对比。如果监控屏幕检测不到信号, 检查程序设定是否存在至少一个的信号采集点。

3.12 是否选定了合适的增益值

一些情况下会看到曲线超过了窗口范围, 在荧光强度 100 的地方成一直线。尽管大部分的数据可以用, 但是减少增益, 一些原始数据就不会超出范围。有时, 在第一个循环信号就跳出了窗口范围, 这是由于增益选得太高, 看起来像没有检测到数据。如果熔解曲线分析时, 开始荧光就达到了 100, 则应当用低的增益重新运行, 而不需要重新运行扩增反应, SYBRGreenI 和 FRET 的样品可以在一定程度上反复使用。

4 DNA 限制性内切酶酶切反应

4.1 DNA 完全没有被内切酶切割

可能原因:

(1) 内切酶失活 对策: 标准底物检测酶活性。

(2) DNA 不纯, 含 SDS、酚、EDTA 等内切酶抑制因子。

对策: 将 DNA 过柱纯化, 乙醇沉淀 DNA

(3) 条件不适 (试剂、温度) 对策: 检查反应系统是否最佳。

(4) DNA 酶切位点上的碱基被甲基化

对策: 换用对 DNA 甲基化不敏感的同裂酶, 重新将质粒 DNA 转化至 dcm^{-} , dam^{-} 基因型的细菌菌株。

(5) DNA 酶切位点上没有甲基化 (如 Dpn I)

对策：换用不同切割非甲基化位点的同裂酶消化 DNA（如 *San3A* I 代替 *Dpn* I），重新将质粒转至 *dcm*⁺ *dam*⁺ 菌株中扩增。

(6) DNA 位点上存在其它修饰 对策：将 DNA 底物与 λ DAN 混匀进行切割验证。

(7) DNA 不存在该酶识别顺序 对策：换用其它的酶切割 DNA 或过量酶消化进行验证。

4.2 DNA 切割不完全

可能原因：

(1) 内切酶活性下降 对策：用 5-10 倍过量消化。

(2) 内切酶稀释不正确 对策：用酶贮藏液或反应缓冲液稀释酶。

(3) DNA 不纯，反应条件不佳

对策：将 DNA 过柱纯化，乙醇沉淀 DNA；检查反应系统是否最佳。

(4) 内切酶识别的 DNA 位点上的碱基被甲基化或存在其它修饰

对策：换用对 DNA 甲基化不敏感的同裂酶，重新将质粒 DNA 转化至 *dcm*⁻, *dam*⁻ 基因型的细菌菌株；将 DNA 底物与 λ DAN 混匀进行切割验证。

(5) 部分 DNA 溶液粘在管壁上 对策：反应前离心数秒。

(6) 内切酶溶液粘度大，取样不准 对策：将内切酶稀释，增大取样体积。

(7) 酶切后 DNA 粘末端退火

对策：电泳前将样品置 65℃ 保温 5-10 分钟，取出后置冰浴骤冷。

(8) 由于反应溶液、温度、强烈振荡使内切酶变性

对策：使用标准反应缓冲液及温度，避免强烈振荡。

(9) 过度稀释使酶活性降低 对策：适当稀释酶液，反应液稀释的酶不能贮藏。

(10) 反应条件不适 对策：使用最佳反应体系。

(11) 识别位点两侧插入了可影响酶切效率的核酸顺序 对策：加大酶量 5-10 倍。

4.3 DNA 片段数目多于理论值

可能原因：

(1) 内切酶星状活性

对策：检查反应条件：甘油浓度大于 12%，盐度过低， Mn^{2+} 的存在及酶：DNA 值过大均可导致星状活性，降低酶的使用量。

(2) 其它内切酶污染 对策：用 λ DNA 作底物检查酶切结果。

(3) 底物中含其它 DNA 杂质

对策：电泳检查 DNA，换用其它酶切，纯化 DNA 片段。

4.4 酶切后没有观察到 DNA 片段的存在

可能原因：

(1) DNA 定量错误（如 RNA 含量较高）

对策：用 RNA 酶 A（无 DNA 酶）100ug/ml 消化 DNA 样，酚抽提后沉淀溶解，定量。

(2) 在酶切反应液中形成非特异性的沉淀

对策：在反应前透析 DNA 样品或用酒精沉淀二次。

4.5 内切酶保存期内快速失活

可能原因：

(1) 保存温度不合适

对策：内切酶贮藏在含 50%甘油的贮藏液中，应在-20℃低温保存。

(2) 以稀释形式保存 对策：稀释酶液不宜长期存放，应一次使用。

(3) 贮藏缓冲液不适当 对策：使用厂家推荐的贮藏缓冲液。

(4) 低蛋白浓度 对策：内切酶与 500ug/ml 的 BSA 一起保存。

4.6 电泳后 DNA 片段的带型弥散，不均一

可能原因：

(1) DNA 上结合有蛋白质

对策：电泳前上样液 65℃ 加热 5min，并加入 0.1% 的 SDS，酚/氯仿抽提纯化。

(2) 内切酶中含有 DNA 外切酶

对策：减少酶用量或消化时间，换用新包装的酶。

4.7 酶切后的 DNA 片段连接效率低

可能原因：

(1) 含磷酸盐的浓度高 对策：透析，乙醇沉淀去除磷酸盐

(2) 内切酶失活不全或含有 ATP 酶 对策：延长灭活时间或用酚抽提，乙醇沉淀回收 DNA。

(3) 平末端连接 对策：加大 T4 DNA 连接酶的用量。

(4) 外切酶污染 对策：减少酶用量，缩短保温时间，酚抽提回收 DNA。

(5) 连接缓冲液不合适 对策：重新配制连接缓冲液。

5 DNA 的连接反应

5.1 TA 克隆连接失败或效率低

可能原因：

(1) 连接缓冲液活性低，ATP 降解或缓冲液稀释不当

对策：使用一次性分装的缓冲液，避免反复冻融。提供的 T4 连接酶缓冲液为十倍浓度，正确稀释。

(2) 连接酶失活 对策：更换连接酶

(3) PCR 产物中含有抑制连接的成分，导致连接失败

对策：将 PCR 产物和连接反应对照混合，观察是否存在抑制效应。如怀疑有抑制成分存在，应重新纯化 PCR 产物。

(4) PCR 产物没有 3' A 突出端，不能连接

对策：使用能产生 3' A 突出端的 DNA 聚合酶或平端 PCR 产物先通过聚合酶及 dATP 进行加尾反应产生 3' A 突出端，再与 T 载体连接。

(5) 载体 T 突出端丢失，引起载体平端连接

对策：避免核酸外切酶的引入，降解 T 突出端。只使用无外源核酸酶的 T4 连接酶。

(6) 插入片段与载体比例不理想 对策：优化比例

5.2 粘端连接注意事项

(1) 连接反应的温度：DNA 连接酶的最适反应温度为 37℃，但在此温度下，粘性末端的氢键结合很不稳定，折衷方法是 12℃过夜。

(2) DNA 的平末端和粘性末端：由于内切酶产生的 DNA 末端有平末端和粘性末端，因而连接反应中就有平末端连接和粘性末端连接。二者连接效率不同。粘性末端效率高，因而在底物浓度，酶浓度选择上是有差异的。

(3) 碱性磷酸酶处理质粒载体：为了提高连接效率，一般采取提高 DNA 的浓度，增加重组子比例。这样就会出现 DNA 自生连接问题，为此通常选择对质粒载体用碱性磷酸酶处理，除去其 5' 末端的磷酸基，防止环化，通过接反应后形成的缺口可在转化细胞后得以修复。

(4) 连接反应的检测：连接反应成功与否，最后的检测要通过下一步实验，转化宿主菌，阳性克隆的筛选来确定。

(5) 如果要检验连接酶和连接酶专用的缓冲液是否有效，可重新连接酶切后的 λ DNA。若连接成功，则说明有效。

5.3 平端连接注意事项

(1) 插入片段和载体片断的比例要高。

(2) 连接酶要加的多点，最好用高浓度的酶。

(3) 载体片断要做去磷酸化处理。

- (4) 可以用 15% 的 PEG8000 来增加连接效率和减少载体自联。
- (5) 反应体系 10UL, 不要太大。
- (6) 去磷酸化的步骤要根据自己的酶的性质而定, 一般要反应一个小时, 在反应半小时后再补充酶再反应半小时。
- (7) 插入片断和载体片断要酶切良好。
- (8) 低温下长时间的连接效率比室温下短时间连接的好, 平端连接需要过夜反应。建议放在四度冰箱连接两天效率更高比 14 度好。

5.4 用 T4 DNA 连接酶连接后转化失败

可能原因:

- (1) 反应体系内无 ATP 或 Mg^{2+}

对策: 使用随酶提供的 buffer 或向其它兼容的 buffer 中加入 ATP。含 ATP 的 Buffer 保存超过 1 年, 其内 ATP 可能会降解, 导致连接失败。当补加 ATP 时, 确定补加的是核糖核酸 ATP, 而不是脱氧核糖核酸 ATP, 因为后者不起作用。

- (2) 反应体系中盐浓度过高或 EDTA 含量高 对策: 纯化 DNA

- (3) 去磷酸化步骤完成后, CIP、BAP 或 SAP 失活不彻底

对策: 根据厂家推荐的方法去除磷酸化酶。

- (4) DNA 浓度过高导致连接后产生的均是线性 DNA

对策: 保持总 DNA 浓度在 1-10 $\mu g/ml$ 之间。

- (5) 连接末端为单碱基突出末端

对策: 使用最高至 5 μl 高浓度连接酶 16° C 过夜连接。

(6) 插入片段和质粒没有磷酸化。注重: 假如载体已经去磷酸化了, 而引物又没有磷酸化会导致连接失败, 订购磷酸化的引物或对引物进行磷酸化。

- (7) 加入过多的连接混合物至感受态细胞

对策: 50 μl 感受态细胞应加入 1-5 μl 连接混合物。

(8) 插入片段太大，不能进行环化

对策：降低插入片段的浓度，并使用高浓度连接酶 16° C 过夜连接。

(9) 连接酶失活 对策：用 lambda HindIII 或其它可行的底物进行检测。

5.5 内切酶酶切反应后，有什么因素可以导致 T4 DNA 连接酶连接和后续转化失败

可能原因：

(1) 内切酶酶切不充分

对策：假如酶切位点位于 PCR 产物的末端，识别位点末端侧需要加至少 6 个保护碱基。用对照底物检测内切酶的活性。

(2) 内切酶没有完全失活

对策：假如内切酶不能热失活，用酚/氯仿抽提纯化 DNA。

(3) 内切酶的星号活性消化了载体或插入片段

对策：跑胶检测 DNA，假如存在多余的条带，减少内切酶使用量或缩短反应时间。

(4) DNA 或内切酶有外切酶或磷酸酶的污染，破坏了 DNA 末端

对策：酚/氯仿抽提纯化 DNA。检查内切酶的质量检测资料和注重事项，假如连接 QC 不佳或外切酶活性高，减少内切酶量或缩短反应时间。

5.6 在应用快速连接试剂盒时，什么原因可以造成不完全连接或转化？

可能原因：

(1) 快速连接反应被热失活了，快速连接缓冲液中含有 PEG，热失活后会抑制转化。

(2) 快速连接混合液在电击之前没有纯化，快速连接缓冲液中含有的 PEG 会阻止电击反应。 对策：应用商业化的 DNA 纯化柱纯化连接产物。

(3) 过夜孵育进行连接反应。连接时间过长，快速连接缓冲液中存在的 PEG 就会降低转化效率。连接反应时间超过 30min，也不会获得更好的效果。

(4) 反应体系中盐浓度过高，抑制了连接或转化反应 对策：纯化 DNA。

(5) 脱磷之后，所用的磷酸酶（CIP，BAP 或 SAP）没有完全失活或去除

对策：可以按照推荐的操作来进行以去除磷酸酶或者选用热敏磷酸酶（NEB#M0289）。因为热敏磷酸酶在 65℃ 5min 即可完全失活而无需纯化 DNA。

6 细菌的培养

6.1 用氨苄抗性的选择培养基筛选转化细胞时，平板上没有克隆，有一层白色的浆状物，不均匀，像一层菌膜。

可能原因：氨苄无效或浓度过低，操作中引入杂菌；质粒没有转进去。

对策：重新转化质粒，更换氨苄。

6.2 工程菌的不稳定性及其对策

工程菌稳定与否，与重组质粒本身的分子组成、宿主细胞生理和遗传性及环境条件等因素有关。

就质粒本身的分子结构而言，引起工程菌不稳定常常是由于稳定区受到影响。另外可能由于重组质粒上有重复序列，或与宿主染色体有部分同源等都会造成质粒的不稳定。

就宿主而言，除了上述质粒中有同源序列外，还与宿主的比生长速率、宿主中重组基因（rec 系统）的完整性、重组时有关基因的具体变异等都有关系。

在培养环境中高温、去垢剂（如 SDS 等）、某些药物（如利福平）、染料及胸腺嘧啶饥饿、紫外线辐射等都会引起质粒的丢失，因而常采取下列措施以防止或降低工程菌的不稳定性。

(1) 组建合适载体 在质粒构建时，插入一段特殊的 DNA 片段或基因以使宿主细胞分裂时，质粒能够较稳定地遗传到子代细胞中。

(2) 选择适当宿主 重组质粒的稳定性在很大程度上受宿主细胞遗传特性的影响，在选择宿主时，必须确定其遗传特点。相对而言重组质粒在大肠杆菌中比较稳定，而在枯草杆菌和酵母中较不稳定。

(3) 施加选择压力 从遗传学来说, 选择即利用某些生长条件使得只有那些具有一定遗传特性的细胞才能生长。在重组 DNA 技术中, 有好几方面利用选择压力, 如转化后用选择压力确定含有重组质粒的克隆株, 而在利用克隆菌进行发酵生产时, 经常采取施加选择压力的方法消除重组质粒的不稳定, 以提高菌体纯度和发酵生产率。①抗生素添加法②抗生素依赖变异法③营养缺陷法。

(4) 控制基因过量表达 提高质粒稳定性的目的是为了提提高克隆菌的发酵生产率, 但许多研究发现, 外源基因表达水平越高, 重组质粒往往越不稳定, 因此可采取分段培养法, 即前期控制基因过量表达, 使重组质粒稳定遗传, 到后期通过提高质粒的拷贝、转录、翻译效率使外源基因高效表达。①利用阻遏—去阻遏启动子原理控制基因过量表达, ②选择温度敏感型质粒控制基因过量表达。

(5) 控制培养条件 重组菌所处的培养环境条件对其质粒的稳定性和表达效率等均具有很大的影响, 当重组菌构建成功后, 能否进入工业化生产阶段, 其关键的步骤就是筛选最适的培养条件, 包括培养基配方、培养温度、pH 值范围, 溶氧水平(好氧菌), 添加选择压力和控制基因表达, 实质也是通过培养条件的控制实现的。影响培养条件的因素很多, 能影响菌体生长的所有培养工艺、工程参数都会影响质粒的稳定性, 在这些工艺工程参数中, 培养基成分、培养温度、菌体的比生长速率三个方面最为重要。

1. southern 杂交时如何提高消化效果?

答: 一般在消化结束时可取 5 μ l 电泳检测消化结果。如果消化不好, 可以延长消化时间, 但不可超过 6 小时; 或放大反应体积; 或补充酶再消化。如仍不能奏效, 可能是 DNA 样品中含有太多杂质, 需要先进行提纯; 或是酶的活力下降需要更换。

2. Southern 杂交的探针一般用什么标记? 有哪些标记方法?

答: 进行 Southern 杂交的探针一般用放射性物质标记或用地高辛标记。放射性标记灵敏度高, 效果好; 地高辛标记没有半衰期, 安全性好。

探针的标记方法有随机引物法、切口平移法和末端标记法。

3. 对照实验结果好, 却没有回收到目的片段, 实验出了什么问题?

答：A) 连接用室温保温 1 小时，能满足大多数克隆，为提高效率，需 4℃ 过夜。
B) 插入片段带有污染，使 3' -T 缺失，或抑制连接，抑制转化。插入片段需纯化，或重新制备。

C) 插入片段不适于连接。用凝胶纯化的插入片段，因受 UV 过度照射，时有发生。UV 过度照射会产生嘧啶二聚体，不利于连接，DNA 必需重新纯化。

D) 高度重复序列可能会不稳定，在扩增中产生缺失和重排，如发现插入片段高频率地产生缺失和重排，需用重组缺陷大肠杆菌菌株。

4. 进行一次成功的连接实验需要优化哪些实验指标？

答：进行一次成功的连接实验需要优化一系列实验指标：

A) 载体和插入片段的摩尔浓度比特别重要，载体：插入片段的摩尔数的变化范围可为 8: 1 到 1: 16，但通常的变化范围是 3: 1 到 1: 3。插入片段的长度和序列的变化会影响和同一载体的连接效果。每一个连接反应都需要作实验，来选择最佳的载体和插入片段的摩尔数比。在最小的反应体积中，通常一个连接反应用 10-50ng 的载体 DNA。

B) 进行连接反应时的保温的时间和温度也需优化。一般而言，平末端连接在 22℃ 保温 4-16 小时，粘性末端在 22℃ 保温 3 小时，或 4℃ 保温 16 小时。大多数连接反应用 T₄DNA 连接酶，但大肠杆菌的 DNA 连接酶可用于粘性末端的连接，平末端连接时用此酶，活力较低。当用 pGEM 载体克隆大片段时 (>7-8kbp)，经转化的菌株在 30℃ 而不是在 37℃ 生长，更有利于连接。为提高获得目的克隆的机会，应用尽可能高转化效率的感受态细胞。

D) 为降低背景，提高插入片段的连接效率，载体用单一限制性内切酶切割后，需去磷酸化。这可提高插入片段的连接效率，抑制载体自身连接。为使连接成功，载体和插入片段应纯化无杂质。残留的杂质会干扰连接酶的效果，抑制连接反应。

5. 蓝白斑筛选为什么没有白斑？

答：说明重组质粒连接效率低或是自连严重；也有可能是插入的目的片段太短，并且刚好和 lacZ 使用的是同一个阅读框。解决方法有：控制好连接时间和温度，防止载体自连；适当加长目的片段的长度；加大目的片段和载体的比例；重新选

择连接酶，可以使用双酶切，但要注意连接酶不要是同尾酶；尝试更换反应缓冲液。

6. 在蓝白斑筛选中如何使显色更加明显？

答：做蓝白斑筛选时，转化，涂板 37 度培养 12 到 16 小时后，一般在 4 度放几个小时，蓝斑显色更明显。

7. 蓝白斑筛选中出现浅蓝色斑是怎么回事？

答：实际操作中发现当插入小片段时，重组子也有形成浅蓝斑的情况。即蓝色菌斑也有可能含外源基因。据最新报道，大概有 30% 的假阴性。

8. 对照组未导入含 Amp 抗性的质粒，涂布该大肠杆菌菌液，普遍都有大量菌落产生，这是怎么解释？

答：对照组被污染了；或是大肠杆菌发生了突变；或是氨苄有问题；或是配制培养基时在培养基还没冷却时就加了氨苄，氨苄失效。

9. 影响感受态细胞转化效率的因素及实际操作过程中应注意的事项有哪些？

答：A) 细菌的生长状态：实验中应密切注视细菌的生长状态和密度，尽量使用对数生长期的细胞（一般通过检测 OD_{600} 来控制。DH5 α 菌株 OD_{600} 为 0.5 时细胞密度是 $5 \times 10^7/\text{ml}$ ）；

B) 所有操作均应在无菌条件和冰上进行；

C) 经 CaCl_2 处理的细胞，在低温条件下，一定的时间内转化率随时间的推移而增加，24 小时达到最高，之后转化率再下降（这是由于总的活菌数随时间延长而减少造成的）；

D) 化合物及无机离子的影响：在 Ca^{2+} 的基础上联合其他二价金属离子（如 Mn^{2+} 或 Co^{2+} ）、DMSO 或还原剂等物质处理细菌，可使转化效率大大提高（100-1000 倍）；

E) 所使用的器皿必须干净。少量的去污剂或其它化学物质的存在可能大大降低细菌的转化效率;

F) 质粒的大小及构型的影响: 用于转化的应主要是超螺旋的 DNA;

G) 一定范围内, 转化效率与外源 DNA 的浓度呈正比。

10. IPTG 用于诱导 lac、tac 启动子的转录, 但其本身具有一定的毒性, 若用于医疗目的的重组蛋白并不适合。该如何解决这一问题?

答: 有两种解决方法: (1) 把阻遏蛋白 lac I 的温度敏感突变株 lac I (ts) 插入表达载体或整合到染色体后, 均能使 lac、tac 启动子的转录受到温度严谨调控, 在较低温度 (30℃) 时抑制, 在较高温度 (42℃) 时开放; (2) 用乳糖替代 IPTG, 但其效率受到多种因素的影响和制约, 因此乳糖诱导的有效剂量大大高于 IPTG。乳糖本身作为一种碳源可以被大肠杆菌代谢利用, 较多的乳糖存在也会导致菌体生理及生长特性变化。乳糖代替 IPTG 作为诱导剂的研究要与发酵工艺结合起来, 才能显示其良好的前景。

11. PL 和 PR 表达载体由于菌体中没有 cI 基因产物, PL 或 PR 启动子的高强度直接转录使其在普通大肠杆菌中相当不稳定。如何解决这一问题?

答: 办法之一是用溶源化 λ 噬菌体的大肠杆菌作为 PL 和 PR 启动子表达载体的宿主菌; 或是把 cI857ts 基因组装在表达载体上, 这样就可以有更大的宿主菌选择范围。

12. T7 表达系统中本底转录水平过高的问题如何解决?

答: 解决这一问题的办法之一就是在表达系统中低水平表达 T7 溶菌酶基因。因为 T7 溶菌酶除了作用于大肠杆菌细胞壁上的肽聚糖外, 还与 T7 RNA 聚合酶结合抑制其转录活性。目前 T7 溶菌酶基因都通过共转化质粒导入表达系统, 它能明显降低本底转录, 但对诱导后目标基因的表达水平没有明显影响。

13. 去除附加的甲硫氨酸有什么方法?

答：在表达系统中共表达甲硫氨酸氨肽酶基因；分离纯化后在体外用外肽酶处理。

14. 转化的大肠杆菌为什么不长？

答：A) 检查感受态细胞是否有问题，不管公司的也好自己做的也好，转化连接产物时同时转化一只质粒，作为对照。

B) 连接 T 的时候，保证连接比例没有问题。连接时间可以适当延长，但是试剂盒的连接往往效率很高，连接时间不是大问题。

C) 转化的细节处理：加培养基复苏：摇 1h 的话，可以多加入一些培养基，此时培养基一定不要加入抗性！摇 1h 复苏，摇速在 150rpm 先摇 30min。

D) 涂板时来回轻轻涂布，感觉大多数地方都涂到即可，不要反复用力涂布，不要把涂布环或者涂布棒烧的过热，或者不待冷却就涂。切记感受态细胞比较娇嫩。

E) 检查一下琼脂板是否有问题。

F) 检查一下抗生素在配置过程中是否出错，有没有加错。

15. 如何增加蛋白在大肠杆菌中的表达？

答：有以下几种方法：（1）摸索不同温度进行表达（2）提高诱导时间（3）改变基因上游构建，对目的基因进行密码子优化（4）提高质粒稳定性（5）插入信号肽

16. 提高目标蛋白的稳定性的措施有哪些？

答：主要有：（1）利用蛋白转运系统把目标蛋白最终积累在周质空间或分泌到培养基中；（2）采用缺乏某些蛋白水解酶基因的缺陷株作为宿主菌；（3）对分子量较小的目标基因进行融合表达或串联聚合表达；（4）共表达能提高特定目标蛋白稳定性的辅助因子，如分子伴侣基因；（5）对蛋白质序列中的蛋白水解酶敏感区域和识别位点进行改造；（6）在较低温度下培养菌体和优化发酵条件。

1、Southern 杂交

(1) 做 Southern 用杂交袋还是杂交管（瓶）好？

答：杂交管好用，首先杂交管不用担心气泡问题，而且膜可以均匀杂交，其次杂交管其实也用不了多少杂交液，只需要几毫升，在杂交炉里旋转就可以保证膜均匀杂交。

(2) 细菌基因组酶切后的条带可不可以用非变性聚丙烯酰胺凝胶来分离？然后再通过湿转印到尼龙膜上，一般要转印多久？

文献上一般都是通过 0.8% 左右的琼脂糖凝胶来分离的，但是通过传统的毛细管法转印到膜上比较麻烦，琼脂糖凝胶上的 DNA 能通过半干转印仪来转印吗？

答：首先不一定要用非变性聚丙烯酰胺凝胶来分离：Southern 杂交目的就是要知道基因组中是否有想要的基因片段，并且可能还要知道此基因片段的位置是否与预期的一样，所以酶切基因组并杂交，其杂交条带的大小是很重要的指标，如果采用非变性聚丙烯酰胺凝胶，虽然大多数 DNA 的迁移率与其大小的对数值成反比，但迁移率也受碱基组成序列的影响，以致大小完全相同的 DNA 迁移率相差达 10%，所以非变性聚丙烯酰胺凝胶不能用来确定 DNA 的大小。一般采用琼脂糖凝胶电泳。但是，如果不在意片段的大小，可以聚丙烯酰胺凝胶后采用电转的方法。电转的时间取决于片段的大小，凝胶空隙和外加电场的强度，可参阅电转移的说明书。其次是转移方法：基本上有三种：毛细管转移最常用也很稳定。电转移效果不好，必须使用带电的尼龙膜，温度可能会过热等等问题，经常是时而转不出来。真空转移效率高，但需要仪器。毛细管转移虽然麻烦，但没有条件的情况下最好用，而且非常稳定，大小片段都能转得很好。

(3) Southern 杂交的时候用什么来做标记比较好呢？除了放射性元素以外。

答：非放射性标记系统主要包括三大类：半抗原类、荧光色素类、酶类。其中半抗原类使用最为广泛，商品化选择最多。①半抗原类：主要有生物素(biotin)、地高辛、荧光素、二硝基苯(dinitrophenyl)、雌二醇、香豆素等，前三者使用最为广泛，且均有商品化试剂盒选用。②荧光色素类：主要包括荧光素、异硫氰酸荧光素、香豆素、德州红等。③酶标法：以 Amersham Pharmacia 公司开发的 ECL 系统为代表。它是在戊二醛的作用下将辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酶(AP)与寡核苷酸探针片段直接共价相连，此法简化了检测步骤，减少了非特异污染的可能。在这些系统中以新的荧光色素类标记物最具潜力。

非放射性系统的优势为：(1)安全、无污染、使用及后处理方便；(2)稳定性好，标记好的探针可保存一年甚至更久，降低工作强度、批次检测之间重复性好，为多样本或长期检测带来极大方便；(3)利用几种不同的探针标记方法，可一次对同一样本进行多探针杂交。

非放射性标记物发展方向为灵敏度高、稳定性好、实验周期短、检测方法简单、安全。

2、细菌的蓝白斑筛选法筛选转化子

(1) 蓝白斑筛选怎么都是白斑？

目的基因 900bp，T 载体是 takara 的 PMD18-T，加 A 后与 T 载体连接。琼脂平板表面涂 40 微升 2% 的 X-gal 和 28 微升 5% 的 IPTG，16h 后平板上都是白色菌落，一个蓝色的也没有。选了 5 个菌落，摇过夜，抽提质粒，电泳发现其中四个在 2200bp 左右有明亮的条带。但载体就有 2800bp 左右，连上就应该有 3700bp，那条带是什么？

答：如果平板上长了几百个菌，全是白的就可能有问题，16h 对常用的克隆用的大肠杆菌来说，因该已经显色了，不过如果菌长得慢，比较小的话，可以在室温或 4 度（3-7 度放久了容易长卫星小菌落），继续放一段时间，看看会不会有部分变蓝。如果就几个或几十个菌，白斑居多的可能性会有很大，但基本没有连一个蓝斑都没有的情况，因为即使 T 载体不连接片断，也有的会长出来（仅用 T 载体加连接酶后转化，涂板，能长几百个菌，也只是有几个或是几个是白的，说明不插入片断并不一定都是蓝的），这可能是由于 T 载体的质量也不是绝对的好，可能有部分发生了末端的降解，或者加 T 的时候不完美。另外，形成白斑的可能有两种：①插入片断破坏了半乳糖苷酶基因的读码框；②插入片断虽然不破坏读码框，但插入片断基因编码氨基酸阻碍了半乳糖苷酶正确构象的形成。

质粒在 2.2kb 处有很亮的条带，而空载体是 2.8kb 的，插入 900bp 后的是 3.7kb 的。若是带了 marker，才进行比较的，2.2kb 因该是质粒的超螺旋带，新提的质粒中一般占主要，亮度较大，在最前面。接着会有第二条带，是线性的，第三条带，是有缺口的。质粒直接比大小，与 marker 比，不好反应出其真实的大小。可以这样比较：①比较提的质粒的超螺旋带或线性的或缺口的。先从中找出较大的，大的可能性比较大；②质粒单酶切后，与 marker 比大小，或用质粒三条带中的线性的与 marker 比大小；③直接用酶切，看是否放出与你目的基因片断大小一致的片断。

takara 的 PMD18-T 载体假阳性也就是白斑往往比较多，所以蓝白斑只是参考作用，可以直接挑克隆筛选。一次挑 20-40 个克隆，用 1.5ml EPENDORF 管加 200ul LB 培养 2 个小时，然后直接取上清 1-2ul 作为模板进行 PCR 鉴定（注意要用载体上的通用引物进行鉴定），这样就不用扩大培养抽质粒，节约时间和试剂。其实 18T 本来作蓝白斑筛选效果就不太好，可以改用 19T 或者 20T，效果可能好点。

(2) 为什么蓝白斑筛选会出现假阴性？

答：此类载体携带 lacZ' 基因，它编码 β -半乳糖苷酶的 N-末端 (α -肽)，并且处于可被安慰诱导物 IPTG (异丙基硫代半乳糖苷，与乳糖结构类似但不能被 β -半乳糖苷酶降解) 诱导的启动子调控之下。质粒转化的宿主菌为 LacZ Δ M15 基因型 (含有编码 N-末端缺陷型的 β -半乳糖苷酶多肽的基因)。未重组的质粒转化宿主菌后，在 IPTG 的诱导下，质粒与基因组分别表达缺陷但可以相互补偿的两个肽 (即 α -互补)，形成了有功能的 β -半乳糖苷酶，该酶能把培养基中无色的 X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷) 底物分解成半乳糖和深蓝色的 5-溴-4-氯-靛蓝。然而当外源 DNA 插入质粒位于 α -肽编码序列中的多克隆位点时，由于破坏了 α -肽的阅读框架，因而不能表达出与宿主菌基因组表达的缺陷型 β -半乳糖苷酶多肽发生 α -互补。由于没有 β -半乳糖苷酶的酶解作用，致使重组菌形成白色菌落。由此，可以借助蓝白斑很容易筛选出重组子。不过实际操作中发现当插入小片段时，重组子也有形成浅蓝斑的情况。即蓝色菌斑也有可能含外源基因。据最新报道，大概有 30% 的假阴性。

(3) 做蓝白斑筛选重组子的时候，平板在 37℃ 培养了 16 个小时，放入 4℃ 下充分显色 3 个小时，仍然只有白斑而没有蓝斑。在挑了菌落之后放入 4℃ 冰箱内 12 个小时仍然没有蓝斑。但是再将其置入 37℃ 条件下 12 个小时就出现了蓝白斑？

答：原因有可能以下几个：首先可能是连接效率很高，片段全插进去了，还有可能是在 AT 克隆时插入了很多非特意性的片段，尤其是小的非特意性片段；这两个情况几乎看不到蓝菌。另外底物有问题，用 IPTG/X-gal 或其他的，要注意加入的量，过大和过小都不行，另外这两个配制的方法也不能错。还有插入的片段很大，因为大片段插入后细菌生长的速度很慢，而且又是单拷贝的，所以就培养 24 小时才能明显看出颜色。

(4) 蓝白筛选在实验操作过程中会发现浅蓝色重组子的出现，怎么解释这种现象？

答：如果培养时间过长，白斑也有可能变蓝的。所以一般 48 小时就可以了。建议挑白斑摇菌后，再做一次筛选。

3、外源基因在大肠杆菌中的表达

(1) 大肠杆菌构建基因工程菌，怎样突破专利中的代谢途径？要构建大肠杆菌构建基因工程菌，但国外已经几乎把通向目标产物的所有途径和相应的酶基因申请专利。能够利用已有途径，对其中的酶进行突变，这样能突破专利吗？

答：一些基因是可以的，但是突变后的性质要发生很大改变，或者在序列上发生很大的差异，同源性一般要低于 80%。国外的专利有些很霸道的，连可能的突变位置都申请了专利保护，这类基因很难突破专利的。

(2) 邻近基因的表达相互是否有联系啊？比如几个基因排列都处于相同的染色体区域，那这几个基因的表达调控有否影响？

答：不一定。在原核生物中，一个调控单位称操纵子（如乳糖操纵子），[乳糖操纵子](#)包括调节基因、启动基因、操纵基因和结构基因，这四个相邻基因间的表达就相互影响，其中结构基因又包括表达三种蛋白的 lacZ Y A 三种基因，他们虽相邻，但相互之间没影响，共同受调节基因的表达影响。在相同染色体区域，不同操纵子之间一般不会相互影响。在真核生物中即使是染色体在同一区域的基因之间表达也可能不会相互影响。真核生物基因由外显子和内含子构成，比方说用 ABCDEF 表示一段 DNA，一个基因表达出来可能是 ACD 序列蛋白，另一个基因表达出来可能是 BCE，在这段染色体中这两个基因不仅是相邻，还有部分重叠，他们之间的表达也大多不会影响，只不过是他们的表达受控于不同的调控序列或不同的启动子。

(3) 什么类型的真核基因不适宜在大肠杆菌中表达？目前知道一些跨膜蛋白因结构太复杂，不能在大肠杆菌中表达，不知道一些糖蛋白基因能否在大肠杆菌中表达？

答：在大肠杆菌中表达的蛋白不能够被糖基化，所以如果糖基对于该糖基化蛋白的活性很重要的化，就不能够用大肠杆菌表达。

1、PCR 问题

PCR 产物是否需要用凝胶纯化？

如凝胶分析扩增产物只有一条带，不需要用凝胶纯化。如可见其他杂带，可能是积累了大量引物的二聚体。少量的引物二聚体的摩尔数也很高，这会产生高比例的带有引物二聚体的克隆，而非目的插入片段。为此需在克隆前做凝胶纯化。

2、限制性内切酶反应

底物 DNA 没有被限制酶切开或者切割不完全

1、缺少识别序列

检查底物 DNA 中是否存在可被限制酶识别的 DNA 序列。

2、甘油浓度过高

某些限制性内切酶（Nco I，Hpa I）对反应混合物中的甘油浓度特别敏感。如果限制酶含 50%甘油，酶的体积不能超过反应总体积的 1/10。

3、限制性内切酶已部分或全部失活

如果反应条件和底物 DNA 都跟产品说明中的一致，但酶仍然切割不完全或者酶活性仍然很低，这可能是由于不正确的操作使酶失活。

3、DNA 连接反应

连接效率不高

1、连接缓冲液已变质

连接缓冲液中的 ATP 和 DTT 很容易降解。用新鲜的连接缓冲液重新进行连接反应。

2、限制性内切酶在连接混合物中仍具活性

如果限制性内切酶在 65℃温育下热稳定，酶切后应该用酚来去除蛋白并用乙醇沉淀 DNA。

3、非特异性的核酸酶污染

由于试验过程中不正确的操作，限制性内切酶、连接酶或者底物 DNA 中都可能含有非特异性核酸酶污染。判断连接反应混合物中哪种组分被污染，然后逐一将其替换。

4、细菌培养

本身干燥的菌种转接时如何保证均匀？

所用的菌种在斜面生长时有一个显著特征——干燥，甚至会形成一些突起的褶皱，导致在转接下一批斜面时，接种环刮下来的常常是一块粘连在一起的菌苔，转接的新斜面生长也就十分不均匀了

1. 组织挖块，在斜面上尽量放得均匀些；
2. 液体接种，取液体摇瓶或是斜面的打碎物，每个斜面接种 0.1~0.2ml，可能长得稍微慢些，但均匀。

I 各种 PCR 技术常见问题与解决方案

1 假阴性，不出现扩增条带或带很弱。

(1) 可能是因为模板有问题，如 DNA 不纯，含有杂蛋白，含有 Taq 酶抑制剂；或 DNA 量太少，超出实验的灵敏范围；或在提取模板时吸入酚；或 DNA 已严重降解，需要扩增的特定位点已丢失；或模板核酸变性不彻底。**解决方案：**采用纯化方法除去抑制物，提取 DNA 的过程中避免交叉污染，尽可能保持大分子量 DNA，配制有效而稳定的消化处理液，程序应固定不宜随便更改。

(2) 可能是因为酶有问题，如酶活性低或失活。**解决方案：**检查所用 Taq 酶是否过期，更换新酶，按照推荐的量加入 Taq 酶，确保从酶加入到反应开始时间尽可能量短。

(3) 可能是引物有问题，引物浓度太低或引物降解。**解决方案：**选择正确的引物浓度，引物合成后的稀释需用无核酸酶的无离子水，否则引物会降解，在从储存液中吸取引物前一定小心混匀，按照推荐的量加入引物。

(3) 可能是扩增程序错误。**解决方案：**选用每个位点的正确程序。

(4) 可能是 DNA 样品中盐浓度过高或者体系的 PH 值发生改变, 反应缓冲液中的 K^+ , Na^+ , 或 Mg^{2+} 过高, 均不利于反应。**解决方案:** 所加入模板 DNA 的体积不应超过整个反应体系的 1/5。

(5) 反应管与扩增仪加热模板块间结合不紧密, 或者扩增仪温度控制系统存在问题。**解决方案:** 调校扩增仪, 选用标准反应管。反应管必须是经过硅化处理的。

(6) 可能是水的质量不好。**解决方案:** 在扩增反应中须使用超纯水。

2 假阳性, 实验中设立的阴性对照出现阳性结果, 则实验检测结果可能有假阳性。

(1) 可能是引物设计不合适, 靶序列太短或引物太短容易出现假阳性。**解决方案:** 重新设计引物。

(2) 可能是靶序列或扩增产物被交叉污染了。这种污染有两种原因, 一是整个基因组或大片段的交叉污染, 导致假阳性。**这种污染的解决方案:** 操作时小心轻柔, 防止把靶序列吸入加样枪内或溅出离心管外。除酶及不能耐高温的物质外, 所有试剂或器材都应高压消毒。所用离心管及加样枪头等均应一次性使用。必要时, 在加标本前, 反应管和试剂用紫外线照射, 以破坏存在的核酸。二是空气中的小片段核酸污染, 这些小片段比靶序列短, 但有一定的同源性。可互相拼接, 与引物互补后, 可扩增出 PCR 产物, 而导致假阳性的产生。**解决方案:** 使用巢式 PCR 方法来减轻或消除。

3 出现非特异性扩增带。 PCR 扩增后出现的条带与预计的大小不一致, 或大或小, 或者同时出现特异性扩增带与非特异性扩增带。

非特异性条带的出现, 其原因可能是引物与靶序列不完全互补、或引物聚合形成二聚体。也可能是与 Mg^{2+} 离子浓度过高、退火温度过低, 及 PCR 循环次数过多有关。其次是酶的质和量, 往往一些来源的酶易出现非特异条带而另一来源的酶则不出现, 酶量过多有时也会出现非特异性扩增。**解决方案有:** 必要时重新设计引物。减低酶量或调换另一来源的酶。降低引物量, 适当增加模板量, 减少循环次数。适当提高退火温度或采用二温度点法 ($93^{\circ}C$ 变性, $65^{\circ}C$ 左右退火与延伸)。

4 PCR 扩增出现涂抹带或片状带或地毯样带。

出现片状拖带或涂抹带, 其原因往往由于酶量过多或酶的质量差, dNTP 浓度过高, Mg^{2+} 浓度过高, 退火温度过低, 循环次数过多引起。**解决方案有:** 减少酶量, 或调换另一来源的酶。减少 dNTP 的浓度。适当降低 Mg^{2+} 浓度。增加模板量, 减少循环次数。

5 PCR 操作过程中受到污染。

(1)标本间交叉污染；(2) PCR 试剂的污染；(3) PCR 扩增产物污染；(4) 实验室中克隆质粒的污染。

解决方案：(1) 合理分隔实验室，将样品的处理、配制 PCR 反应液、PCR 循环扩增及 PCR 产物的鉴定等步骤分区或分室进行；(2) 严格容器及器械的处理，玻璃器皿、枪头、离心管

等物品应经破坏 RNA 酶的药品处理。使用前必须于 180℃干烤 2 个小时以上（玻璃器皿），或用氯仿冲洗（塑料制品）；另一种方法是用 0.1%的 DEPC 水溶液浸泡制备 RNA 的容器；吸样枪应防止将样品或模板核酸吸入枪内或粘上枪头，加样或吸取模板核酸时要小心，吸样时尽量一次性完成，忌多次抽吸，以免交叉污染或产生气溶胶污染。(3) 预混合分装 PCR 试剂，PCR 反应液应预先配制好，然后小量分装，-20℃保存，减少重复加样次数，避免污染机会。另外，PCR 试剂、PCR 反应液应与样品及 PCR 产物分开保存，不应放于同一冰盒或同一冰箱。(4) 防止操作人员污染，使用一次性手套、吸头、小离心管应一次性使用。(5) 设立适当的阳性对照与阴性对照。(6) 设置合适的 PCR 循环次数，只要 PCR 产物达到检测水平就适可而止。(7) 选择质量好的微量离心管。避免样本外溢及外来核酸的进入，打开离心管前应先离心，将管壁及管盖上的液体甩至管底部，开管动作要轻，以防管内液体溅出。

荧光定量 PCR 专属问题：

1 无 CT 值（信号）出现

(1) 可能是因为反应循环数不够。**解决方案：**一般都要在 35 个循环以上，可根据实验情况增加循环（如至 45cycles），但高于 45 个循环会增加过多的背景信号；

(2) 可能是因为检测荧光信号的步骤有误。**解决方案：**一般 SG 法采用 72℃延伸时采集，Taqman 法则一般在退火结束时或延伸结束采集信号；

(3) 可能是因为引物或探针降解，**解决方案：**可通过 PAGE 电泳检测其完整性；

(4) 可能是模板量不足，**解决方案：**对未知浓度的样品应从系列稀释样本的最高浓度做起。(5) 可能是因为模板降解了，**解决方案：**避免样品制备中杂质的引入及反复冻融的情况。

2 CT 值出现过晚

(1) 可能是因为扩增效率低，反应条件不够优化，**解决方案**：设计更好的引物或探针；改用三步法进行反应；适当降低退火温度；增加镁离子浓度等；

(2) 可能是因为 PCR 产物太长。**解决方案**：一般采用 80-150bp 的产物长度。

3 标准曲线的线性关系不佳

(1) 可能是因为加样存在误差，使得标准品不呈梯度，**解决方案**：规范操作；

(2) 可能标准品出现降解，**解决方案**：避免标准品反复冻融，或重新制备并稀释标准品；

(3) 可能是因为引物或探针不佳。**解决方案**：重新设计更好的引物和探针；

4 熔解曲线不止一个主峰

(1) 可能是因为引物设计不够优化，**解决方案**：应避免引物二聚体和发夹结构的出现；

(2) 可能是因为引物浓度不佳，**解决方案**：适当降低引物的浓度，并注意上下游引物的浓度配比；

(3) 可能是因为镁离子浓度过高，**解决方案**：适当降低镁离子浓度，或选择更合适的mix试剂盒。

(4) 可能是因为模板有基因组的污染，**解决方案**：RNA提取过程中避免基因组DNA的引入，或通过引物设计避免非特异扩增。

II DNA 限制性内切酶酶切反应常见问题及解决方案

1 DNA 完全没有被内切酶切割

(1) 可能是内切酶失活，**解决方案**：用标准底物检测酶活性；

(2) 可能是 DNA 不纯，含有 SDS，酚，EDTA 等内切酶抑制因子，**解决方案**：将 DNA 过柱纯化，乙醇沉淀 DNA ；

(3) 可能是条件不适（试剂、温度），**解决方案**：检查反应系统是否最佳；

(4) 可能是 DNA 酶切位点上的碱基被甲基化，**解决方案**：换用对 DNA 甲基化不敏感的同裂酶酶解，重新将质粒 DNA 转化至 dcm⁻，dam⁻基因型的细菌菌株

(5) 可能是 DNA 酶切位点上没有甲基化（如 Dpn I），**解决方案**：换用不同切割非甲基化位点的同裂酶消化 DNA(如 San3A I 代替 Dpn I)，重新将质粒转至 dcm⁺，

dam⁺菌株中扩增(6) 可能是 DNA 位点上存在其它修饰, **解决方案**: 将 DNA 底物与 λ DAN 混匀进行切割验证 ;

(7) 可能是 DNA 不存在该酶识别顺序, **解决方案**: 换用其它的酶切割 DNA 或过量酶消化进行验证。

2 DNA 切割不完全

(1) 可能是内切酶活性下降, **解决方案**: 用 5-10 倍量过量消化;

(2) 可能是内切酶稀释不正确, **解决方案**: 用酶贮藏液或反应缓冲液稀释酶;

(3) 可能是 DNA 不纯, 含有 SDS, 酚, EDTA 等内切酶抑制因子, **解决方案**: 将 DNA 过柱纯化, 乙醇沉淀 DNA ;

(4) 可能是内切酶识别的 DNA 位点上的碱基被甲基化或存在其它修饰, **解决方案**: 换用对 DNA 甲基化不敏感的同裂酶酶解, 重新将质粒 DNA 转化至 dcm⁻, dam⁻基因型的细菌菌株; (5) 可能是部分 DNA 溶液粘在管壁上, **解决方案**: 反应前离心数秒;

(6) 可能是内切酶溶液粘度大, 取样不准, **解决方案**: 将内切酶稀释, 增大取样体积;

(7) 可能是酶切后 DNA 粘末端退火, **解决方案**: 电泳前将样品置 65℃ 保温 5-10 分钟, 取出后置冰浴骤冷;

(8) 可能是由于反应溶液、温度、强烈振荡使内切酶变性, **解决方案**: 使用标准反应缓冲液及温度, 避免强烈振荡;

(9) 可能过度稀释使酶活性降低, **解决方案**: 适当稀释酶液, 反应液稀释的酶不能贮藏;

(10) 可能是反应条件不适, **解决方案**: 使用最佳反应体系;

(11) 可能是识别位点两侧插入了可影响酶切效率的核酸顺序, **解决方案**: 加大酶量 5-10 倍。

3 DNA 片段数目多于理论值

(1) 可能是因为内切酶的星状活性, 检查反应条件: 甘油浓度大于 12%, 盐度过低, 酶/DNA 值过大, 高 PH 值, 存在有机溶剂 (如 DMSO、乙醇、乙烯乙二醇、二

甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、sulphalane 等) 及用其他二价离子替代镁离子(如 Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} 等) 均可导致星状活性, **解决方案**: 降低酶的用量, 这样可以避免过度消化以及过高的甘油浓度; 尽量避免有机溶剂(如制备 DNA 时引入的乙醇) 的污染; 将离子浓度提高到 100-150mM (若酶活性不受离子强度影响);

(2) 可能有其它内切酶的污染, **解决方案**: 用 λ DNA 作底物检查酶切结果;

(3) 可能是因为底物中含其它 DNA 杂质, **解决方案**: 电泳检查 DNA, 换用其它酶切, 纯化 DNA 片段。

4 酶切后没有观察到 DNA 片段的存在

(1) 可能是因为 DNA 定量错误(如 RNA 含量较高), **解决方案**: 用 RNA 酶 A (无 DNA 酶) 100ug/ml 消化 DNA 样, 酚抽提后沉淀溶解, 定量;

(2) 可能是因为酶切反应液中形成了非特异的沉淀, **解决方案**: 在反应前透析 DNA 样品或用酒精沉淀二次。

5 内切酶保存期内快速失活

(1) 可能是保存温度不合适, **解决方案**: 内切酶贮藏在含 50%甘油的贮藏液中, 在-20℃低温保存;

(2) 可能是因为以稀释形式保存, **解决方案**: 稀释酶液不宜长期存放, 应一次使用;

(3) 可能是因为贮藏缓冲液不适当, **解决方案**: 使用厂家推荐的贮藏缓冲液;

(4) 可能是因为低蛋白浓度, **解决方案**: 内切酶与 500ug/ml 的 BSA 一起保存。

6 电泳后 DNA 片段的带型弥散, 不均一

(1) 可能是 DNA 上结合有蛋白质, **解决方案**: 电泳前上样液 65℃加热 5min, 并加入 0.1%的 SDS, 酚/氯仿抽提纯化;

(2) 可能内切酶中含有 DNA 外切酶, **解决方案**: 减少酶用量或消化时间, 换用新包装的酶。

7 酶切后的 DNA 片段连接效率低

(1) 可能含磷酸盐的浓度高, **解决方案**: 透析, 乙醇沉淀去除磷酸盐;

(2) 可能是因为内切酶失活不全或含 ATP 酶, **解决方案**: 延长灭活时间或用酚抽提, 乙醇沉淀回收 DNA;

- (3) 可能是因为平末端连接, **解决方案**: 加大 T4 DNA Ligase 用量;
- (4) 可能是因为外切酶污染, **解决方案**: 减少酶用量, 缩短保温时间, 酚抽提回收 DNA;
- (5) 可能是因为连接缓冲液不合适, **解决方案**: 重新配制连接缓冲液

III DNA 连接反应常见问题与解决方案

1 DNA 连接失败 (以 T4 DNA 连接酶为例)

- (1) 可能是因为反应体系内无 ATP 或 Mg^{2+} 导致连接失败, **解决方案**: 使用随酶提供的 buffer 或向其它兼容的 buffer 中加入 ATP。含 ATP 的 Buffer 保存超过 1 年, 其内 ATP 可能会降解, 导致连接失败。当补加 ATP 时, 确定补加的是核糖核酸 ATP, 而不是脱氧核糖核酸 ATP, 因为后者不起作用;
- (2) 可能是因为反应体系中盐浓度过高或 EDTA 含量高导致连接失败, **解决方案**: 纯化 DNA; (3) 可能是因为去磷酸化步骤完成后, CIP、BAP 或 SAP 失活不彻底, **解决方案**: 根据厂家推荐的方法去除去磷酸化酶;
- (4) 可能使因为连接末端为单碱基突出末端, **解决方案**: 使用最高至 $5 \mu l$ 高浓度连接酶 $16^{\circ} C$ 过夜连接;
- (5) 可能是因为插入片段和质粒没有磷酸化, 假如载体已经去磷酸化了, 而引物又没有磷酸化会导致连接失败, **解决方案**: 订购磷酸化的引物或对引物进行磷酸化;
- (6) 可能是因为插入片段太大, 不能进行环化, **解决方案**: 降低插入片段的浓度, 并使用高浓度连接酶 $16^{\circ} C$ 过夜连接;
- (7) 可能是因为连接酶失活, **解决方案**: 用 lambda HindIII 或其它可行的底物进行检测。

2 DNA 平端连接效率低

解决方案:

- (1) 低温下长时间的连接效率比室温下短时间连接的好, 平端连接需要过夜反应;
- (2) 在体系中加一点切载体的酶, 只要连接后原来的酶切位点消失。这样可避免载体自连, 应该可以大大提高平端连接的效率。足够多的载体和插入片段是最重

要的。要看片段具体情况而言，有时载体和片段浓度过高，容易产生线性化产物，不利于环化的。插入的 DNA 片段的摩尔数是载体摩尔数的 5-10 倍，这个很关键。载体通常 50ng 就够了，若载体在 10k 左右，可用 50—100ng；

(3) 平端的连接对于离子浓度很敏感，回收的时候多洗洗，加 PEG 和扩大酶量，22 度 2 小时后 4C 过夜；

(4) 尽可能缩小连接反应的体积，最好不超过 10 微升，在 5、6 微升左右最佳；

(5) 建议放在四度冰箱连接两天效率更高比 14 度好。

IV 细菌培养中常见的问题与解决方案

1 细菌不生长

(1) 可能是因为培养条件不合适，培养基成分不对，解决方案：使用适合细菌生长的优化条件，选择适合细菌生长的培养基；

(2) 可能培养基中混入了不对应的抑菌抗生素，解决方案：去除或加入正确的抗生素。

2 有杂菌生长

(1) 可能是操作过程中混入了杂菌，**解决方案**：注意操作与培养条件，保证无菌，做平行试验检验；

(2) 可能是样品中混入了霉菌，**解决方案**：空气中有大量的霉菌，注意样品的除菌处理；

(3) 可能是忘记加抗生素，**解决方案**：加入相应的抗生素。

一、质粒提取常见问题分析与策略

1. 用试剂盒未提质粒或质粒得率低有哪些原因？

1) 细菌老化

请涂布平板培养后，重新挑选新菌落进行液体培养。

2) 细菌培养物生长过度或不新鲜

不要于 37℃ 培养超过 16 小时，分离质粒前长时间存放培养物是不利的。

3) 质粒拷贝数低

由于使用低拷贝数载体引起的质粒 DNA 提取量低,可更换具有相同功能的高拷贝数载体。

4) 菌体中无质粒

有些菌体本身不能在某些菌种中稳定存在,经多次转接后有可能造成质粒丢失。例如柯斯质粒在大肠杆菌中长期保存不稳定,因此不要频繁转接,每次接种时应该接种单菌落。另外检查筛选用抗生素使用浓度是否正确。

5) 菌体过量,碱裂解不充分

取样时菌液过多,导致菌体裂解不充分,可减少菌体用量或增加溶液悬浮液、裂解液、中和液的用量。对低拷贝数质粒,提取时可加大菌体用量并加倍增加溶液悬浮液、裂解液、中和液的用量(应保持 1: 1: 1.4 比例)。

6) 溶液使用不当

溶液裂解液、中和液在温度较低时容易出现盐析,如出现,应将其放入 37℃ 水浴至完全溶解、澄清,方可使用。

7) 质粒未全部溶解(尤其质粒较大时)

洗脱溶解质粒时,可适当加温或延长溶解时间。

8) 乙醇残留

洗涤液 II 洗涤后应离心并静置数分钟尽量去除残留乙醇后,再加入洗脱液洗脱回收。

9) 洗脱液加入位置不正确

洗脱液应加入吸附柱中膜的中央以确保洗脱液完全覆盖吸附膜的表面达到最大洗脱效率。

10) 洗脱效率:

洗脱效率与洗脱液 PH 值、洗脱液用量、洗脱次数、加入洗脱液后的静置时间和是否预热等因素有关。PH7.0—8.5 之间,洗脱液用量不得小于 50 μ l,重复洗脱 2—3 次,增加室温静置时间及 65℃ 水浴预热可以有效提高得率 30%。

2. 试剂盒提取质粒纯度不高，如何解决？

1) 有蛋白质污染

应在加入去蛋白液后，以足够高的转速离心，使沉淀紧密，并小心地吸取上清液，避免吸入沉淀。另外，不要使用过多菌体。经悬浮液、裂解液、中和液处理，离心后溶液应为澄清的，如果还混有微小蛋白悬浮物可再次离心去除后再进行下一步骤。

2) 有 RNA 污染

说明 RNaseA 处理不彻底，请减少菌体用量或加入悬浮液之后，振荡充分混匀室温放置一段时间。如果悬浮液已保存 6 个月以上，请在悬浮液中添加 RNaseA 至终浓度 100 $\mu\text{g/ml}$ 。

3) 混有基因组 DNA

加入裂解液、中和液后应温和混匀，如果剧烈振荡，可能会导致基因组 DNA 断裂成小碎片从而混杂在质粒中。如果加入裂解液后过于黏稠，无法温和混匀，请减少菌体用量。另细菌培养时间过长会导致细胞和 DNA 的降解，培养时间不要超过 16 小时。

4) 裂解液加入时间过长

裂解液加入溶液后，放置时间不宜太长，否则有可能会产生小片段 DNA 污染。

5) 含大量核酸酶的宿主菌

宿主菌含大量核酸酶，在质粒提取过程中降解质粒 DNA，影响提取质粒 DNA 的完整性，最好选用不含核酸酶的大肠杆菌宿主菌，如 DH5 a 和 Top10。

6) 质粒的二聚体和多聚体形式

质粒复制过程中形成的，与宿主菌相关，电泳可检测出多条条带，单酶切处理后可变成单一条带。

3. 在琼脂糖凝胶上点样时，为什么质粒漂出点样孔？

乙醇没有完全从柱子上去除。洗涤液 2 洗涤后应离心并静置数分钟尽量去除残留乙醇后，再加入洗脱液洗脱回收。

4. 为什么用无水乙醇沉淀 DNA?

用无水乙醇沉淀 DNA，这是实验中最常用的沉淀 DNA 的方法。乙醇的优点是可以任意比和水相混溶，乙醇与核酸不会起任何化学反应，对 DNA 很安全，因此是理想的沉淀剂。DNA 溶液是 DNA 以水合状态稳定存在，当加入乙醇时，乙醇会夺去 DNA 周围的水分子，使 DNA 失水而易于聚合。一般实验中，是加 2 倍体积的无水乙醇与 DNA 相混合，其乙醇的最终含量占 67% 左右。因而也可改用 95% 乙醇来替代无水乙醇（因为无水乙醇的价格远远比 95% 乙醇昂贵）。但是加 95% 的乙醇使总体积增大，而 DNA 在溶液中有一定程度的溶解，因而 DNA 损失也增大，尤其用多次乙醇沉淀时，就会影响收得率。折中的做法是初次沉淀 DNA 时可用 95% 乙醇代替无水乙醇，最后的沉淀步骤要使用无水乙醇。也可以用 0.6 倍体积的异丙醇选择性沉淀 DNA。一般在室温下放置 15—30 分钟即可。

5. 在用乙醇沉淀 DNA 时，为什么一定要加 NaAc 或 NaCl 至最终浓度达 0.1~0.25mol/L?

在 pH 为 8 左右的溶液中，DNA 分子是带负电荷的，加一定浓度的 NaAc 或 NaCl，使 Na^+ 中和 DNA 分子上的负电荷，减少 DNA 分子之间的同性电荷相斥力，易于互相聚合而形成 DNA 钠盐沉淀，当加入的盐溶液浓度太低时，只有部分 DNA 形成 DNA 钠盐而聚合，这样就造成 DNA 沉淀不完全，当加入的盐溶液浓度太高时，其效果也不好。在沉淀的 DNA 中，由于过多的盐杂质存在，影响 DNA 的酶切等反应，必须要进行洗涤或重沉淀。

6. 为什么在保存或抽提 DNA 过程中，一般采用 TE 缓冲液?

在基因操作实验中，选择缓冲液的主要原则是考虑 DNA 的稳定性及缓冲液成分不产生干扰作用。磷酸盐缓冲系统 ($\text{pK}_a=7.2$) 和硼酸系统 ($\text{pK}_a=9.24$) 等虽然也都符合细胞内环境的生理范围 (pH)，可作 DNA 的保存液，但在转化实验时，磷酸根离子的种类及数量将与 Ca^{2+} 产生 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 沉淀；在 DNA 反应时，不同的酶对辅助因子的种类及数量要求不同，有的要求高离子浓度，有的则要求低盐浓度，采用 Tris-HCl ($\text{pK}_a=8.0$) 的缓冲系统，由于缓冲液是 $\text{TrisH}^+/\text{Tris}$ ，不存在金属离子的干扰作用，故在提取或保存 DNA 时，大都采用 Tris-HCl 系统，而 TE 缓冲液中的 EDTA 更能稳定 DNA 的活性。

7. 抽提 DNA 去除蛋白质时，怎样使用酚与氯仿较好?

酚与氯仿是非极性分子，水是极性分子，当蛋白水溶液与酚或氯仿混合时，蛋白质分子之间的水分子就被酚或氯仿挤去，使蛋白失去水合状态而变性。经过离心，变性蛋白质的密度比水的密度为大，因而与水相分离，沉淀在水相下面，从而与溶解在水相中的 DNA 分开。而酚与氯仿有机溶剂比重更大，保留在最下层。

作为表面变性的酚与氯仿，在去除蛋白质的作用中，各有利弊，酚的变性作用大，但酚与水相有一定程度的互溶，大约 10%~15% 的水溶解在酚相中，因而损失了这部分水相中的 DNA，而氯仿的变性作用不如酚效果好，但氯仿与水不相混溶，不会带走 DNA。所以在抽提过程中，混合使用酚与氯仿效果最好。经酚第一次抽提后的水相中有残留的酚，由于酚与氯仿是互溶的，可用氯仿第二次变性蛋白质，此时一起将酚带走。也可以在第二次抽提时，将酚与氯仿混合（1:1）使用。

7. 为什么用酚与氯仿抽提 DNA 时，还要加少量的异戊醇？

在抽提 DNA 时，为了混合均匀，必须剧烈振荡容器数次，这时在混合液内易产生气泡，气泡会阻止相互间的充分作用。加入异戊醇能降低分子表面张力，所以能减少抽提过程中的泡沫产生。一般采用氯仿与异戊醇为 24:1 之比。也可采用酚、氯仿与异戊醇之比为 25:24:1（不必先配制，可在临用前把一份酚加一份 24:1 的氯仿与异戊醇即成），同时异戊醇有助于分相，使离心后的上层水相，中层变性蛋白相以及下层有机溶剂相维持稳定。

9. 为什么要用 pH8 的 Tris 水溶液饱和酚？呈粉红色的酚可否使用？如何保存酚不被空气氧化？

因为酚与水有一定的互溶，苯酚用水饱和的目的是使其抽提 DNA 过程中，不致吸收样品中含有 DNA 的水分，减少 DNA 的损失。用 Tris 调节至 pH 为 8 是因为 DNA 在此条件下比较稳定。在中性或碱性条件下（pH5~7），RNA 比 DNA 更容易游离到水相，所以可获得 RNA 含量较少的 DNA 样品。

保存在冰箱中的酚，容易被空气氧化而变成粉红色的，这样的酚容易降解 DNA，一般不可以使用。为了防止酚的氧化，可加入巯基乙醇和 8-羟基喹啉至终浓度为 0.1%。8-羟基喹啉是带有淡黄色的固体粉末，不仅能抗氧化，并在一定程度上能抑制 DNase 的活性，它是金属离子的弱螯合剂。用 Tris pH8.0 水溶液饱和后的酚，最好分装在棕色小试剂瓶里，上面盖一层 Tris 水溶液或 TE 缓冲液，隔绝空气，以装满盖紧盖子为宜，如有可能，可充氮气，防止与空气接触而被氧化。平时保存在 4℃ 或 -20℃ 冰箱中，使用时，打开盖子吸取后迅速加盖，这样可使酚不变质，可用数月。

10. 细菌离心加入溶液 I 涡旋振荡后，发现菌体呈絮状不均匀或呈细砂状？

1) 很可能是细菌发生溶菌，可减少培养时间或者试试平板培养，质粒提取前用 PBS 将菌落洗下，相对来说固体培养基上细菌生长的要好一些。

2) 质粒抽提过程很大程度上是受细菌生长情况决定的，刚活化的菌比负 80℃ 保存菌种所培养出来的菌液状态好，保存久的菌株可能会造成质粒浓度低，质粒丢

失等不明原因。

3) 判断生长的菌液是否正常，可以用肉眼观察，在光线明亮处摇荡新鲜培养液，如果发现菌液呈漂絮状，情况很好。如果发现呈泥水状，即看不到絮状，只是感觉很浑浊，则可能提不出好的质粒，或者没有质粒。

4) 菌液不宜生长太浓，摇床速度不宜过高。达到 OD600 1.5 就可以了，（尤其是对于试剂盒提取要注意）另外如果只是简单的酶切验证根本无需酚氯仿抽提（安全考虑，慎重），只要溶液 I/ II /III 比例恰当，转管过程仔细吸取不会有太多杂质。

11. 为什么加了溶液 II 后，菌体没有逐渐由混浊变澄清？提出来的条带几乎没有，但是 RNA 很亮（没加 RNA 酶）？

1) 可能是因为溶液储存不当，或屡次操作没有及时盖好溶液瓶盖，导致其吸收空气中的 CO₂ 失效。RNA 在菌体中量较多，相对少量的菌体裂解，可有较 DNA 明显的条带。

2) 可能是菌量大，加溶液 II 后，菌体并不能完全裂解，所以没有变清，这也会导致质粒产率低下。

3) 可能是质粒的拷贝数不高，质粒产率不高。如果是使用自己配的试剂，建议做中提或大提；或者买试剂盒提。用自己配的试剂，不加 RNA 酶，最后 RNA 是很亮的，要去除干净就要用比较好的 RNA 酶。

4) 如果不是试剂的原因，可能是质粒表达的过程中使膜蛋白变化（数量变多），很难使用碱裂解法，可以尝试用其他比较剧烈的方法（比如高温或者低温研磨等），然后使用一般的发放。

5) 可能质粒随乙醇一起倒掉了。

12. 加入溶液 II 后，菌液仍然呈浑浊状态，或者混浊度没有明显的改变？

1) 问题可能是发生在溶液 II 上。首先看看 10% SDS 是否是澄清的？NaOH 是否有效的？如果使用的是试剂盒，也要首先确认溶液 II 是否澄清没有沉淀？

2) 可能是细菌浓度很高，适当调整增加溶液 I/II/III 的体积。

3) 可能是“杂菌”污染，如果菌液生长异常快，就有可能被杂菌污染。这种情况一般表现为和目的菌有相同的抗性，生长速度异常，能够提出质粒，跑胶的条带也异常的亮，但产物不是自己想要的质粒，要特别注意一下。

13. 加入酚/仿抽提，离心后在水相和有机相间没有出现变性蛋白相层，在随后的乙醇沉淀步骤中却出现大量的半透明沉淀，溶解后发现蛋白浓度很高？

乙醇沉淀时，较纯的质粒沉淀是白色的（PEG 纯化的沉淀是透明的肉眼不易发现），如沉淀是半透明的凝胶状，则应是蛋白含量高。首先看看平衡酚是否已被氧化？pH 是否是 8.0？其次检测溶液 III 反应完成后的离心上清 pH

是否在 8.0 左右？有时由于溶液 III 配置的问题，会出现溶液 III 反应后离心的上清 pH 与 8.0 偏差较大的现象，这会降低平衡酚抽提蛋白抽的有效性，pH 偏差过大也会导致水相和平衡酚互溶。

14. 使用酚仿抽提方法，质粒的纯度很好，但酶切不能完全切开？

- 1) 确认酶的有效性。
- 2) 平衡酚是否被氧化（正常是黄色，而氧化后是棕色的）。
- 3) 是否不小心吸入了痕量的酚。
- 4) 乙醇沉淀后，70%乙醇漂洗的是否充分（残留的盐类会影响酶切）。
- 5) 乙醇漂洗后是否完全干燥（残留的乙醇会影响酶切）。

15. 提取质粒中 RNA 没有去除？

可能是 RNase 失效或效率不高。

- 1) 更换 RNase A，并保证其储存条件是正确的
- 2) 手工提取质粒的，可单独增加一步去除 RNA 的步骤，溶液 III 反应后，在离心的上清中加 RNase，室温下去除 RNA 10min~30min（需要保证 RNase A 是经过失活 DNase 的），同时较高温度（如 50℃）会更加快速完全的去除 RNA，经验所得经过高温处理的质粒质量不是很高。

16. 提取的质粒电泳后，为连续的一片火箭状？

- 1) 质粒如果盐离子多，会有走胶变形的现象，如果提到的质粒不够纯，会有电泳条带不平齐的现象。
- 2) 当电压太大时，容易出现火箭状，而降解应该是弥散状。
- 3) 可能是宿主菌影响的，质粒抽提好后，用酚-氯仿处理一下再酶切，若有改善，则为宿主菌影响。转化到其它宿主菌再切。
- 4) NaOH 的浓度过高，会出现火箭状的结果。

17. 用碱裂解法提取质粒，裂解 5 分钟，没有用酚 / 氯仿抽提，最后用灭菌水溶解质粒 DNA 15min。双酶切后跑胶一条带都没有，原因是什么？

- 1) 溶解时间稍微短了点，但是根据各个实验室 RNase 不同，这个条件是不同的。在溶解的过程要涡旋处理促进溶解。
- 2) 确认一下酶切过程中是不是有 DNA 酶的污染，比如酶切体系的 Buffer 或者是水，特别是水中；其次是酶切体系的问题；建议再把提取的产物用 70%酒精重新洗涤一遍，也可以用酚/氯仿重新抽提一下。

- 3) 也可能在用乙醇洗时把质粒倒掉了。
- 4) 没有用 RNase 消化, 不要用放久的 RNase 否则会有 DNA 酶的污染;
- 5) 在没有进行酶切时, 把所提的质粒跑一下核酸电泳看看, 如果是提核酸的问题那这一步电泳结果应该没有大于三千的条带, 这样可以先排除核酸提取的问题。若是没有酶切时间过长等其他问题的话可以那可以检查一下所用的溶解 DNA 的溶液是否有 DNase 污染的问题, 建议将超纯水换成 TE。

18. 培养基、抗生素、质粒提取都没有问题, 而细菌菌液提取不到质粒?

如果是氨苄抗性的, 有可能是质粒丢失造成的。主要是培养时间较长, 导致培养基中的 beta-内酰胺酶过多, 作用时间过长, 同时培养基 pH 值降低, 氨苄青霉素失活, 从而使无质粒的菌株大量增殖。解决的办法: 可以添加葡萄糖, 缩短培养时间, 改用羧苄青霉素。

二、DNA 电泳常见问题与对策

1. DNA 带模糊

- 1) DNA 降解: 避免核酸酶污染;
- 2) 电泳缓冲液陈旧: 电泳缓冲液多次使用后, 离子强度降低, pH 值上升, 缓冲能力减弱, 从而影响电泳效果。建议经常更换电泳缓冲液;
- 3) 所用电泳条件不合适: 电泳时电压不应超过 20V/cm, 温度 < 30℃; 巨大 DNA 链电泳, 温度应 < 15℃; 核查所用电泳缓冲液是否有足够的缓冲能力;
- 4) DNA 上样量过多: 减少凝胶中 DNA 上样量;
- 5) DNA 样含盐过高: 电泳前通过乙醇沉淀去除过多的盐;
- 6) 有蛋白污染: 电泳前酚抽提去除蛋白;
- 7) DNA 变性: 电泳前勿加热, 用 20mM NaCl 缓冲液稀释 DNA。

2. 不规则 DNA 带迁移

- 1) 对于 λ /Hind III 片段 cos 位点复性 电泳前于 65℃ 加热 DNA 5 分钟, 然后在冰上冷却 5 分钟;
- 2) 电泳条件不合适: 电泳电压不超过 20V/cm; 温度 < 30℃; 经常更换电泳缓冲液;

3) DNA 变性：以 20mM NaCl Buffer 稀释 DNA，电泳前勿加热。

3. 带弱或无 DNA 带

1) DNA 的上样量不够：增加 DNA 的上样量；聚丙烯酰胺凝胶电泳比琼脂糖电泳灵敏度稍高，上样量可适当降低；

2) DNA 降解：避免 DNA 的核酸酶污染；

3) DNA 走出凝胶：缩短电泳时间，降低电压，增强凝胶浓度；

4) 对于 EB 染色的 DNA，所用光源不合适：应用短波长（254nm）的紫外光源。

4. DNA 带缺失

1) 小 DNA 带走出凝胶：缩短电泳时间，降低电压，增强凝胶浓度；

2) 分子大小相近的 DNA 带不易分辨：增加电泳时间，核准正确的凝胶浓度；

3) DNA 变性：电泳前请勿高温加热 DNA 链，以 20mM NaCl Buffer 稀释 DNA；

4) DNA 链巨大，常规凝胶电泳不合适：在脉冲凝胶电泳上分析。

5. DNA 电泳的 MARKER 怎么是扭曲的？

1) 配制胶时的缓冲液需要和电泳缓冲液不是同时配制的。最好是同时配制。电泳时缓冲液高过液面 1—2mm 即可。

2) 电泳时电压过高，可以在电泳前 15 分钟用较低电压 (3V/cm)，等条带出孔后比较漂亮了。然后再调电压。

3) 上样时尽量慢慢加样，等样品自然沉降后再加电压。

6. 做 PCR 电泳后跑电泳，目的基因是 489BP 的，结果每次切胶回收后再跑电泳就变成 500 多了，快到 600 了？为什么？

有时只靠电泳结果判断是不准确的，同样的片段每次跑的远近会有不同。有经验显示目的片段是 1300 多，结果就跑到 1000 的 marker 下面去了，后来证实片段没有问题。也有做的一个片段也是这样，是 490BP。理论上两个条带一样，可是 PCR 结果显示就是大小不一致。然后回收以后的检测结果又全部都一样了，后来又拿去做了下一个测序，才知道根本没有问题。

三、DNA 回收常见问题分析与策略

1. 没有回收得到 DNA 片段

一点都不能得到产物的回收情况很少见，有些情况是判定回收效率的方式不对。如对，请检查一下 Wash 中有没有加入酒精；检查加入的 DNA 结合剂（Solution S 或 Solution SN）的量对不对；洗脱前有没有将残留得酒精去彻底；洗脱液有没有使吸附材料充分接触（洗脱），接触的时间是否充分。

2. 提取率低

- 1) 融胶液为酸性缓冲液，如融胶后，其 pH 值升高将影响提取得率。请加入 0.1 倍体积的 3M 乙酸钾 (pH5.0)。
- 2) 长时间使用后没有更换的电泳缓冲液，其 pH 值较高，将影响 DNA 的吸附。请更换新的电泳缓冲液后，再进行电泳，然后切胶。
- 3) 在洗脱前，将洗脱液于 30~60℃温浴，可提高提取效率。

3. 如何计算提取率

- 1) 由于回收前样品中，往往含有非目的 DNA 片段，引物，dNTP 等，所以不能用测回收前后吸光度的方法计算回收率。
- 2) 可将回收前后 DNA 片段一起电泳，使用凝胶成像系统拍照后，用配套的软件进行电泳条带灰度对比。
- 3) 注意，电泳条件及拍摄条件将对灰度对比结果造成很大影响，请仔细操作，以减小误差。

4. 如何提高胶回收的得率？

Agarose 抑制 DNA 与吸附材料的结合，将不含 DNA 片段多余的 Agarose 切除，能显著提高回收效率。DNA 结合到吸附材料，需要一定浓度的结合剂，Agarose 多了，结合剂（Solution SN）的相对浓度就会下降，得率就受到影响。大多数情况下，是由于电泳时琼脂糖的浓度不同，切下的胶块有大有小，得率自然不同。回收的得率还与回收片段的大小有关。提高结合剂（Solution SN）的相对浓度，增加 DNA 与吸附材料作用时间（放置时间），控制好离心速度都一定程度上可以提高得率。改善洗脱条件，如提高洗脱溶液的 pH 值，温度，增加洗脱液的体积等也可以提高得率，但是对于 pH 过高，可能会影响下游反应，通常情况下采用 pH8-8.5 为宜。

5. 回收得片段为什么电泳上样会漂起来？

主要问题是纯化过程中的乙醇没有除干净。

6. 纯化过程中乙醇或核酸结合剂（Solution S, SN, B 等）不能去除干净，对下游实验有影响吗？

影响非常大。操作过程中有专门除残留乙醇的步骤，不可以省略，否则下游的酶切和连接都可能遇到问题。可以使核酸结合到吸附材料上的吸附剂很多，这些吸附剂的残留对克隆影响较大。

7. 胶很难融如何处理？

将融胶问题提高到 60 度；可能是胶的浓度太高，需要提高融胶液的体积；融胶过程中每隔一段时间就震荡几下帮助融胶。

8. 如何鉴定回收的效果？

电泳比较回收前后的条带强弱。比较时需要将回收的产物全部加到胶中去，具有可比性。如果您的样品难得，可以选无关的片段验证一下。

9. 如果胶在后续过程发生胶没有彻底融化，如何补救？

补加融胶液，将胶悬起来，50-60 度继续保温至彻底融化。

10. 洗脱 DNA 用什么洗脱好？

需要根据您回收片段下游用途确定。一般情况下，采用 TE 或 Tris 缓冲液可以。测序反应，请用无菌水洗脱。如果你洗脱的 DNA 需要长期保存，请用 TE 洗脱。

11. 用 Ez-Resin 如果凉干过头，如何处理？

加 TE，50-60 度处理 10 分钟，间或振荡，离心收集上清。

12. 什么情况下需要在 50-60 度的情况洗脱？

如果您十分关心效率，回收的片段为大片段（10kb 左右），单链片段等需要预保温洗脱液。

13. UV 方式定量回收的量合适吗？

对于 Miniprep, 回收的量很少，用 UV 方式定量不合适，用琼脂糖电泳方式确定。

14. 跑完 PCR，暂时不方便胶回收，条带已经切下来放到 ep 管里了，这个能保存么？会不会有不良影响？

割下来的胶放在-20 保存两个星期完全没有问题。切下来的胶放在 4 度冰箱中 4、5 小时没有问题回收的效果也很好。

15. 凝胶回收 DNA 实验的关键在哪里？

最关键的是切胶之后，溶胶的那一步。切胶的时候要尽量把多余的琼脂糖凝胶切干净，按照实验步骤，第一步应该是将胶充分的溶化。这以后步一定要做充分，保证凝胶已经完全溶解了。加乙醇这步也很关键，当凝胶溶解后最好多过几次柱子。还有就是洗脱的那一步。洗脱的时候最好用加热到 60 度的洗脱液洗脱，如果实在效果不好可以分两次洗脱。

16. 切胶的时候如何能切的准呢？条带的位置肉眼很难判断出来，如何判断条带的位置呢？

可以将产物与 Marker 一起电泳，染色后，在紫外灯下观察结果，跟 Marker 进行相比，就知道要的是哪条带。注意，紫外灯下切胶速度要快，否则 DNA 会降解，另外，紫外线对身体伤害很大，特别是眼睛，请注意采取保护措施（比如在专门的箱子里切，带眼镜等）。RNA 用具要用 10% 的 NaOH 浸泡过液，再用 DEPC 水冲洗干净。70% 的乙醇用过国产分析乙醇有杂质，RNA 酶还会有，并带入其它污染。

17. 回收率为什么与点样量和片段大小有关？

DNA 片断越大，和固相基质的结合力越强，就越难洗脱，回收率就低；DNA 的量越少，相对损失越大，回收率越低。

18. 用胶回收试剂盒从凝胶中回收 DNA 得率低是什么原因？

- 1) 胶块溶解不完全，可适当延长水浴时间和上下颠倒的次数以及增加溶胶液的比例；
- 2) 胶块体积太大，应使用枪头捣碎，还不能充分溶解则先将其切为小块，分多次回收；
- 3) 紫外灯下切胶时间过长，导致 DNA 部分降解，应尽量把切胶时间控制在 30s 以内；
- 4) 洗涤液使用后未及时盖严瓶盖，乙醇挥发，影响回收效率；
- 5) TAE 或 TBE 电泳缓冲液不新鲜，失去了缓冲能力，导致 PH 值升高，降低 DNA 和膜的吸附力，应及时更换电泳缓冲液，最好使用新鲜配制的电泳缓冲液，效果更好；
- 6) 回收前的样品量太少，加大点样量；
- 7) 洗脱前，预先 65℃ 预热洗脱液、延长室温静置时间、增加洗脱次数可以有效提高回收率 30% 以上。

19. 加入溶胶液温浴后，液体仍很粘稠或后续步骤有堵柱子现象？

- 1) 胶块溶解不充分，可再补加一些溶胶液或延长水浴时间并增加上下颠倒次数帮助溶胶；
- 2) 胶块体积过大，应尽量切除多余部分，并将其切为小碎块，分几次回收；
- 3) 水浴温度是否达到规定温度 65℃，用温度计检测。

20. 琼脂糖凝胶块不溶？

- 1) 琼脂糖质量不好；
- 2) 含目的片断的凝胶在空气中放置过久，使胶块失水干燥，建议切胶后立即进行回收或将胶块保存于 4℃ 或 -20℃；
- 3) 制胶的电泳缓冲液浓度过高或陈旧。

21. 能否使用去离子水洗脱回收？

可以，但是实验室所用去离子水一般 PH 值偏低，可用 NaOH 适当调高 PH 值 > 7.0，以增加回收得率。

22. 能否使用 TE (PH8.0) 洗脱？

可以

23. 可否使用小于 30 μl 的洗脱液进行洗脱？

不可以。因为说明书提供的最少洗脱体积是能完全覆盖吸附膜的最小体积。

24. 为什么溶胶不彻底会影响回收结果的纯度？

在电泳过程中，DNA 会与大分子的多糖紧密的结合在一起，凝胶的种类和质量不同，DNA 与之结合力也不同，只有凝胶充分溶解，DNA 才能充分释放，否则，凝胶将与 DNA 一起沉淀下来，洗脱后将影响回收结果的纯度。

四、外源质粒对大肠杆菌的转化常见问题分析与对策

1. TA 克隆常见问题与解决方案

a. 没有或极少量菌落

- 1) 感受态细胞效率低: 使用转化效率高于 10^7 cfu/mg 的感受态
- 2) 连接酶失效: 2x 快速连接反应体系应于 -20°C 保存; 用时于冰上融解, 使用前需充分混匀; 每次用量少应适量分装
- 3) PCR 产物加 A 比例过低: 使用高保真 DNA 聚合酶扩增的产物需进行加 A 处理; PCR 产物如不能及时连接, 应于 -20°C 保存 ≤ 2 周
- 4) PCR 产物量不足: 电泳定量, 浓缩 PCR 产物
- 5) PCR 产物中含有阻碍 TA 连接反应的杂质: 脱盐纯化 (电转化必须做!)
- 6) UV 照射过久导致 PCR 产物变性: 切胶动作要快, 尽量缩短 UV 照射时间
- 7) 载体 3' 末端 T 降解: EZ-T 载体应于 -20°C 保存; 每次用量少应适量分装
- 8) 抗生素用错或浓度过高: 使用 Amp 终浓度为 100 mg/ml 的琼脂糖平板

b. 蓝色菌落过多

- 1) 过度连接: 使用 2x 快速连接反应体系时, 16°C 反应不应超过 2 小时; 当天不能立即转化时, 可于 -20°C 保存连接反应液
- 2) 插入片段较小, 未破坏读码框: 挑选几个蓝斑, 看是否有插入片段

c. 白色菌落不含目标长度的插入片段: PCR 产物含非特异片段或引物二聚体, 可胶纯化回收目标产物

d. 菌落过多: 可能过度连接, 可使用 Amp 终浓度为 100 mg/ml 的琼脂糖平板; 37°C 培养不超过 16 小时

2. 连接反应后转化效率很低或阳性克隆非常少。

- 1) 可能感受态细菌转化效率太低, 用质粒作为阳性对照同时检测感受态的转化效率。
- 2) 可以尝试提高载体或插入片段的纯度。对于平端连接需注意适当延长连接时间。
- 3) 可能载体酶切不够充分, 用未经连接的载体转化作为阴性对照。

4) 用存放 DNA 的溶液进行转化, 作为阴性对照, 检测感受态细菌是否存在问题。

3. 超级感受态得到的转化效率低的问题出在哪里的呢?

- 1) 菌液 OD 值 偏大或偏小
- 2) 原始菌株不好
- 3) 试剂超纯程度不够
- 4) 操作时, 对菌体伤害过大

影响感受态效率的其实就一条: 状态。生长时控制 OD 就是为了达到对数期, 此时菌活力最高而处理时要使这种好的状态保持, 但 CaCl₂ 处理又要使之处理充分, 使膜局部变化达到最佳的感受状态, 从这个意义上说, 任何可能影响菌状态的步骤或试剂均有可能最终影响到感受效率, 比如离心力是否太大导致菌破碎, CaCl₂ 的纯度浓度处理时间……。

4. 我们所做的普通氯化钙法制备的感受态细胞所能吸收的最大基因是多少?

多大都可以吸收, 主要是你的载体可以容纳多大的片段, 不同的载体容纳外援片段是不同的

5. 用碱裂解法提取的质粒, 取 3ul 转化感受态大肠杆菌涂 amp 抗性平板, 却出现阳性克隆较少 (含绿色荧光蛋白, 阳性克隆应该显绿色, 在紫外灯下非常明显, 就几十个菌落) 大部分菌落不发绿, 这些菌落比发绿的菌落小一些的现象, 为什么?

- 1) 做一次阴性对照, 拿空白菌涂布在含 amp 的平板上, 如生长, 说明 amp 过期, 一般这种情况不多见。一般粉末状的 amp 不容易失效, 如果 amp 有效的话, 可以配制远高于标准的浓度, 如果细菌耐药的话, 也能生长良好, 如不耐药, 则放置数天仍不见细菌生长。
- 2) 拿阴性和阳性的细菌各取数个放于高浓度的 amp 液体培养基中, 如能生长, 说明空白菌中带有耐药菌, 建议换菌。
- 3) 提质粒的菌受污染了, 重新划线挑单克隆。

分子生物学实验中常见的问题与对策-12

一、PCR

a) 无扩增产物

现象: 正对照有条带, 而样品则无。

原因: 模板: 含有抑制物, 含量低; Buffer 对样品不合适; 引物设计不当或者发生降解; 反应条件: 退火温度太高, 延伸时间太短。

对策: 纯化模板或者使用试剂盒提取模板 DNA 或加大模板的用量; 更换 Buffer

或调整浓度；重新设计引物（避免链间二聚体和链内二级结构）或者换一管新引物；降低退火温度、延长延伸时间。

b) 非特异性扩增

现象：PCR 扩增后出现的条带与预计的大小不一致，或大或小，或者同时出现特异性扩增带与非特异性扩增带。

原因：引物特异性差；模板或引物浓度过高；酶量过多；Mg²⁺浓度偏高；退火温度偏低；循环次数过多。

对策：重新设计引物或者使用巢式 PCR；适当降低模板或引物浓度；适当减少酶量；降低镁离子浓度；适当提高退火温度或使用二阶段温度法；减少循环次数。

c) 拖尾

现象：产物在凝胶上呈 Smear 状态。

原因：模板不纯；Buffer 不合适；退火温度偏低；酶量过多；dNTP、Mg²⁺浓度偏高；循环次数过多。

对策：纯化模板；更换 Buffer；适当提高退火温度；适量用酶；适当降低 dNTP 和镁离子的浓度；减少循环次数。

d) 假阳性

现象：空白对照出现目的扩增产物

原因：靶序列或扩增产物的交叉污染

对策：操作时应小心轻柔，防止将靶序列吸入加样枪内或溅出离心管外；除酶及不能耐高温的物质外，所有试剂或器材均应高压消毒；所用离心管及加样枪头等均应一次性使用；各种试剂最好先进行分装，然后低温贮存。

二、RT-PCR

a) 少量或没有 RT-PCR 产物

可能原因：RNA 被降解。

对策：分离无污染，高质量的 RNA；提取 RNA 的材料要尽量新鲜，防止 RNA 降解；RT 反应前，在变性胶上分析 RNA 的完整性；RNA 提取后，应储存在 100% 甲酰胺中，如果使用 RNase 抑制剂，加热时小于 45℃；pH 小于 8.0，否则抑制剂会释放所有结合的 RNase。而且，在 ≥0.8mM DTT 时加入 RNase 抑制剂，一定要存在 DTT。

可能原因：RNA 中包含逆转录反应的抑制剂。

对策：逆转录抑制剂包括：SDS，EDTA，甘油，焦磷酸钠，亚精胺，甲酰胺和胍盐等；将对照 RNA 和样品混合，与对照 RNA 反应比较产量，以检验是否有抑制剂；通过 70% 乙醇对 RNA 沉淀进行清洗，除去抑制剂。

可能原因：用于合成 cDNA 第一链的引物退火不充分。

对策：确定退火温度适合实验中所用的引物，对于随机六聚体，建议在反应温度保温之前先在 25℃ 保温 10 分钟；对于基因特异性引物（GSP），可以试一下其他 GSP，或换用 oligo(dT) 或随机六聚体确定 GSP 是反义序列。

可能原因：起始 RNA 量较少。

对策：增加 RNA 的量。对于小于 50ng 的 RNA 样品，可以在第一链 cDNA 合成中使用 0.1 μ g—0.5 μ g 乙酰 BSA。

可能原因：目的序列在分析的组织中不表达。

对策：尝试其他组织。

可能原因：PCR 反应失败。

对策：两步法 RT-PCR，在 PCR 步骤中的 cDNA 模板不能超过反应体积的 1/5。

b) 产物有非特异性条带

可能原因：引物和模板的非特异性退火。

对策：避免引物 3' 端含有 2—3 个 dG 或 dC；在第一链合成中使用基因特异性引物，而不是随机引物或 oligo(dT)；在开始几个循环使用较高的退火温度，然后使用较低的退火温度；使用热启动 Taq DNA 酶进行 PCR，提高反应的特异性。

可能原因：基因特异性引物设计较差。

对策：遵循用于扩增引物设计的同样原则。

可能原因：RNA 中有基因组 DNA 的污染。

对策：使用扩增级 DNase I 处理 RNA；设置没有逆转录的对照反应检测 DNA 污染。

可能原因：形成引物二聚体。

对策：设计在 3' 端没有互补序列的引物。

可能原因：镁离子浓度太高。

对策：对于每一个模板和引物组合优化镁离子浓度。

可能原因：沾染外源 DNA。

对策：使用抗气雾剂的吸头和 UDG 酶

c) 产生弥散 (smear) 条带

可能原因：第一链产物的含量过高。

对策：常规 PCR 反应步骤中减少第一链产物的量。

可能原因：PCR 反应中引物过多。

对策：减少引物的用量。

可能原因：循环数过多。

对策：优化 PCR 反应条件，减少 PCR 的循环次数。

可能原因：退火温度过低。

对策：提高退火温度，防止非特异性的起始及延伸。

可能原因：Dnase 降解 DNA 是产生的寡核苷酸片段产生的非特异性扩增。

对策：提取高质量 RNA，防止被 DNA 污染。

三、DNA 限制性内切酶酶切反应

a) DNA 完全没有被内切酶切割

可能原因：内切酶失活。

对策：标准底物检测酶活性。

可能原因：DNA 不纯，含有 SDS，酚，EDTA 等内切酶抑制因子。

对策：将 DNA 过柱纯化，乙醇沉淀 DNA。

可能原因：条件不适（试剂、温度）。

对策：检查反应系统是否最佳。

可能原因：DNA 酶切位点上的碱基被甲基化。

对策：换用对 DNA 甲基化不敏感的同裂酶酶解，重新将质粒 DNA 转化至 dcm⁻, dam⁻基因型的细菌菌株。

可能原因：DNA 酶切位点上没有甲基化（如 Dpn I）。

对策：换用不同切割非甲基化位点的同裂酶消化 DNA（如 San3A I 代替 Dpn I），重新将质粒转至 dcm⁺ dam⁺菌株中扩增。

可能原因：DNA 位点上存在其它修饰。

对策：将 DNA 底物与 λ DAN 混匀进行切割验证。

可能原因：DNA 不存在该酶识别顺序。

对策：换用其它的酶切割 DNA 或过量酶消化进行验证。

b)DNA 切割不完全

可能原因：内切酶活性下降。

对策：用 5-10 倍量过量消化。

可能原因：内切酶稀释不正确。

对策：用酶贮藏液或反应缓冲液稀释酶。

可能原因：DNA 不纯，反应条件不佳。

对策：用酶贮藏液或反应缓冲液稀释酶。

可能原因：内切酶识别的 DNA 位点上的碱基被甲基化或存在其它修饰。

对策：用酶贮藏液或反应缓冲液稀释酶。

可能原因：部分 DNA 溶液粘在管壁上。

对策：反应前离心数秒。

可能原因：内切酶溶液粘度大，取样不准。

对策：将内切酶稀释，增大取样体积。

可能原因：酶切后 DNA 粘末端退火。

对策：电泳前将样品置 65℃ 保温 5-10 分钟，取出后置冰浴骤冷。

可能原因：由于反应溶液、温度、强烈振荡使内切酶变性。

对策：使用标准反应缓冲液及温度，避免强烈振荡。

可能原因：过度稀释使酶活性降低。

对策：适当稀释酶液，反应液稀释的酶不能贮藏。

可能原因：反应条件不适。

对策：使用最佳反应体系。

可能原因：识别位点两侧插入了可影响酶切效率的核酸顺序。

对策：加大酶量 5-10 倍。

c)DNA 片段数目多于理论值

可能原因：内切酶星状活性。

对策：检查反应条件：甘油浓度大于 12%，盐度过低，Mn²⁺的存在及酶：DNA 值

过大均均可导致星状活性，降低酶的用量。

可能原因：其它内切酶污染。

对策：用 λ DNA 作底物检查酶切结果。

可能原因：底物中含其它 DNA 杂质。

对策：电泳检查 DNA，换用其它酶切，纯化 DNA 片段。

d) 酶切后没有观察到 DNA 片段的存在

可能原因：DNA 定量错误（如 RNA 含量较高）。

对策：用 RNA 酶 A（无 DNA 酶）100ug/ml 消化 DNA 样，酚抽提后沉淀溶解，定量。

可能原因：在酶切反应液中形成非特异的沉淀。

对策：在反应前透析 DNA 样品或用酒精沉淀二次。

e) 电泳后 DNA 片段的带型弥散，不均一

可能原因：DNA 上结合有蛋白质。

对策：电泳前上样液 65℃ 加热 5min，并加入 0.1% 的 SDS，酚/氯仿抽提纯化。

可能原因：内切酶中含有 DNA 外切酶。

对策：减少酶用量或消化时间，换用新包装的酶。

四、DNA 的连接反应

a) 影响因素：

1、连接缓冲液的影响：大体上缓冲液含有以下组分：20-100mmol/L 的 Tris-HCl，较多用 50mmol/L，pH 的范围在 7.4-7.8，较多用 7.8，目的是提供合适酸碱度的连接体系；10mmol/L 的 MgCl₂，作用是激活酶反应；1-20mmol/L 的 DTT，较多用 10mmol/L，作用是维持还原性环境，稳定酶活性；25-50ug/ml 的 BSA，作用是增加蛋白质的浓度，防止因蛋白浓度过稀而造成酶的失活。与限制酶缓冲液不同的是连接酶缓冲液还含有 0.5-4mmol/L 的 ATP，现多用 1mmol/L，是酶反应所必需的。

2、pH 的影响：一般将缓冲液的 pH 调节到 7.4-7.8，较多用 7.8。

3、ATP 浓度的影响：连接缓冲液中 ATP 的浓度在 0.5-4mmol/L 之间，较多用 1mmol/L。研究发现，ATP 的最适浓度为 0.5-1mmol/L，过浓会抑制反应。由于 ATP 极易分解，所以当连接反应失败时，除了 DNA 与酶的问题外，还应考虑 ATP 的因素。含有 ATP 的缓冲液应于 -20℃ 保存，溶化取用后立即放回。连接缓冲液体积较大时最好分小管贮存，防止反复冻融引起 ATP 分解。

4、连接温度与时间的影响：因为黏性末端的 DNA 双链间有氢键的作用，所以温度过高会使氢键不稳定，但连接酶的最适温度又恰为 37℃。为了解决这一矛盾，在经过综合考虑后，传统上将连接温度定为 16℃，时间为 4-16h。现经实验发现，对于一般的黏性末端来说，20℃ 30min 就足以取得相当好的连接效果，当然如果时间充裕的话，20℃ 60min 能使连接反应进行得更完全一些。对于平末端是不用考虑氢键问题的，可使用较高的温度，使酶活力得到更好的发挥。

5、酶浓度的影响：日常使用的 DNA 浓度比酶单位定义状态低 10-20 倍，连接平末端时酶用量要比连接黏端大 10-100 倍。

6、DNA 浓度的影响：要求得到环化的有效连接产物，DNA 浓度不可过高，一般不超过 20nmol/L。要求线性化的连接产物，DNA 的浓度可以高些，至少是接近推荐的浓度。在用大质粒载体进行大片段克隆时，以及在双酶切片段的连接反应中，DNA 浓度还应降低，甚至是 DNA 的总浓度低至几个 nmol/L。另据研究，T4 DNA 连接酶对 DNA 末端的表观 K_m 值为 1.5nmol/L，所以，连接时 DNA 浓度不应低于 1nmol/L。即应具有 2nmol/L 的末端浓度。

b) 提高平端连接效率的方法：

- 1、低温下长时间的连接效率比室温下短时间连接的好，平端连接需要过夜反应。
- 2、在体系中加入一点切载体的酶，只要连接后原来的酶切位点消失。这样可避免载体自连，可以大大提高平端连接的效率。足够多的载体和插入片段是最重要的。要看片段具体情况而言，有时载体和片段浓度过高，容易产生线性化产物，不利于环化的。插入的 DNA 片段的摩尔数是载体摩尔数的 5-10 倍，这个很关键。载体通常 50ng 就够了，若载体在 10k 左右，可用 50—100ng。
- 3、平端的连接对于离子浓度很敏感，回收的时候多洗洗，加 PEG 和扩大酶量，22 度 2 小时后 4℃ 过夜。
- 4、尽可能缩小连接反应的体积，最好不超过 10ul，在 5、6ul 左右最佳。
- 5、建议放在四度冰箱连接两天效率更高比 14 度好。
- 6、在反应混合物中加入一些可促进大分子群聚作用并可导致 DNA 分子凝聚成集体的物质，如聚乙二醇或氯化六氨合高钴。它们可使平端 DNA 的连接速率加大 1—3 个数量级，因此可使连接反应在酶 DNA 浓度不高的条件下进行；它们可以改变连接产物的分布，分子内连接受到抑制，所形成的连接产物一律是分子间连接的产物。这样，即使在有利于自身环化 ($j:i=10$) 的 DNA 浓度下，所有的 DNA 产物也将是线状多聚体。

五、细菌的培养

a) 培养基

培养基是供细菌生长用的，由人工方法将多种营养物质根据各种细菌的需要而组合成的混合营养基质。

培养基的基本成分有营养物质、凝固物质、抑制剂和指示剂。常用的营养物质有：蛋白胨、肉浸液、牛肉膏、各种糖类、血液、无机盐、鸡蛋和动物血清、生长因子等。最常用凝固物质为琼脂 100ml 培养基中加入 2~2.5g 琼脂可制成固体培养基；100ml 培养基中加入 0.3~0.5g 琼脂可制成半固体培养基。有时也使用明胶、卵白蛋白、血清等作为赋形剂。常用的抑制剂有胆盐、煌绿、玫瑰红酸、亚硫酸钠、亚硒酸钠、一些染料和某些抗生素。培养基中加入的指示剂有酚红、中性红、甲基红、酸性复红、溴甲酚紫、溴麝香草酚蓝等酸碱指示剂和美蓝作为氧气指示剂。

b) 细菌的培养方法

普通培养法：普通培养法是指需氧菌或兼性厌氧菌等在普通大气条件下的培养方法，又称需氧培养法。若用明胶培养基培养细菌，应 22℃ 培养。

二氧化碳培养法 某些细菌，如脑膜炎奈瑟菌、布鲁菌等在初分离时，需在 5~10% 二氧化碳环境中才能良好生长。二氧化碳培养方法有以下几种：二氧化碳培养箱、烛缸法、化学法。

厌氧培养法：常用方法有厌氧罐法、气袋法和厌氧手套箱等。大多数厌氧菌的初代培养生长较慢，故厌氧培养在 37℃ 至少应培养 48h。如疑为放线菌则应延长 72~96h。

1 PCR 反应的常见问题分析与对策

1.1 PCR 反应出现假阴性，不出现扩增条带

模版：模版中含有杂蛋白质，模版中含有 Taq 酶抑制剂，模版中蛋白质没有消化除净，特别是染色体中的组蛋白，在提取制备模版时丢失过多，或吸入酚。模版核酸变性不彻底。在酶和引物质量好时，不出现扩增带，极有可能是标本的消化处理，模版核酸提取过程出了毛病，因而要配制有效而稳定的消化处理液，其程序亦应固定不宜随意更改。

酶失活：需更换新酶，或新旧两种酶同时使用，以分析是否因酶的活性丧失或不够而导致假阴性。需注意的是有时忘加 Taq 酶或溴乙锭。

引物：引物质量、引物的浓度、两条引物的浓度是否对称，是 PCR 失败或扩增条带不理想、容易弥散的常见原因。有些批号的引物合成质量有问题，两条引物一条浓度高，一条浓度低，造成低效率的不对称扩增，对策为：选定一个好的引物合成单位。引物的浓度不仅要看 OD 值，更要注重引物原液做琼脂糖凝胶电泳，一定要有引物条带出现，而且两引物带的亮度应大体一致，如一条引物有条带，一条引物无条带，此时做 PCR 有可能失败，应和引物合成单位协商解决。如一条引物亮度高，一条亮度低，在稀释引物时要平衡其浓度。引物应高浓度小量分装保存，防止多次冻融或长期放冰箱冷藏部分，导致引物变质降解失效。引物设计不合理，如引物长度不够，引物之间形成二聚体等。

Mg²⁺浓度：Mg²⁺离子浓度对 PCR 扩增效率影响很大，浓度过高可降低 PCR 扩增的特异性，浓度过低则影响 PCR 扩增产量甚至使 PCR 扩增失败而不出扩增条带。

反应体积的改变：通常进行 PCR 扩增采用的体积为 20ul、30ul、50ul 或 100ul，应用多大体积进行 PCR 扩增，是根据科研和临床检测不同目的而设定，在做小体积如 20ul 后，再做大体积时，一定要摸索条件，否则容易失败。

物理原因：变性对 PCR 扩增来说相当重要，如变性温度低，变性时间短，极有可能出现假阴性；退火温度过低，可致非特异性扩增而降低特异性扩增效率；退火温度过高影响引物与模板的结合而降低 PCR 扩增效率。有时还有必要用标准的温度计，检测一下扩增仪或水浴锅内的变性、退火和延伸温度，这也是 PCR 失败的原因之一。

1.2 出现假阳性

出现的 PCR 扩增条带与目的靶序列条带一致，有时其条带更整齐，亮度更高。

引物设计不合适：选择的扩增序列与非目的扩增序列有同源性，因而在进行 PCR 扩增时，扩增出的 PCR 产物为非目的性的序列。靶序列太短或引物太短，容易出现假阳性。需重新设计引物。

靶序列或扩增产物的交叉污染：这种污染有两种原因：一是整个基因组或大片段的交叉污染，导致假阳性。这种假阳性可用以下方法解决：操作时应小心轻柔，防止将靶序列吸入加样枪内或溅出离心管外。除酶及不能耐高温的物质外，所有试剂或器材均应高压消毒。所用离心管及样进枪头等均应一次性使用。必要时，在加标本前，反应管和试剂用紫外线照射，以破坏存在的核酸。二是空气中的小片段核酸污染，这些小片段比靶序列短，但有一定的同源性。可互相拼接，与引物互补后，可扩增出 PCR 产物，而导致假阳性的产生，可用巢式 PCR 方法来减轻或消除。

1.3 出现非特异性扩增带

PCR 扩增后出现的条带与预计的大小不一致，或大或小，或者同时出现特异性扩增带与非特异性扩增带。非特异性条带的出现，其原因：一是引物与靶序列不完全互补、或引物聚合形成二聚体。二是 Mg^{2+} 离子浓度过高、退火温度过低，及 PCR 循环次数过多有关。其次是酶的质和量，往往一些来源的酶易出现非特异条带而另一来源的酶则不出现，酶量过多有时也会出现非特异性扩增。其对策有：必要时重新设计引物。减低酶量或调换另一来源的酶。③降低引物量，适当增加模板量，减少循环次数。适当提高退火温度或采用二温度点法 ($93^{\circ}C$ 变性， $65^{\circ}C$ 左右退火与延伸)。

1.4 出现片状拖带或涂抹带

PCR 扩增有时出现涂抹带或片状带或地毯样带。其原因往往由于酶量过多或酶的质量差，dNTP 浓度过高， Mg^{2+} 浓度过高，退火温度过低，循环次数过多引起。其对策有：减少酶量，或调换另一来源的酶。减 dNTP 的浓度。适当降低 Mg^{2+} 浓度。增加模板量，减少循环次数。

1.5 克隆 PCR 产物的最优条件是什么？

最佳插入片段：载体比需实验确定。1: 1 (插入片段: 载体) 常为最佳比，摩尔数比 1: 8 或 8: 1 也行。应测定比值范围。连接用 5ul 2X 连接液，50ng 质粒 DNA, 1 Weiss 单位的 T4 连接酶，插入片段共 10ul。室温保温 1 小时，或 $40^{\circ}C$ 过夜。在这 2 种温度下，缺 T-凸出端的载体会自连，产生蓝斑。室温保温 1 小时能满足大多数克隆要求，为提高连接效率，需 $40^{\circ}C$ 过夜。

1.6 PCR 产物是否需要用凝胶纯化？

如凝胶分析扩增产物只有一条带，不需要用凝胶纯化。如可见其他杂带，可能是积累了大量引物的二聚体。少量的引物二聚体的摩尔数也很高，这会产生高比例的带有引物二聚体的克隆，而非目的插入片段。为此需在克隆前做凝胶纯化。

2 DNA 限制性内切酶酶切常见问题分析与对策

2.1 DNA 完全没有被内切酶切割

原因 解决办法

- 1) 内切酶失活 标准底物检测酶活性
- 2) DNA 不纯，含有 SDS，酚，EDTA 等内切酶抑制因子 将 DNA 过柱纯化，乙醇沉淀 DNA
- 3) 条件不适（试剂、温度） 检查反应系统是否最佳
- 4) DNA 酶切位点上的碱基被甲基化 换用对 DNA 甲基化不敏感的同裂酶酶解，重新将质粒 DNA 转化至 dcm⁻，dam⁻基因型的细菌菌株
- 5) DNA 酶切位点上没有甲基化（如 Dpn I） 换用不同切割非甲基化位点的同裂酶消化 DNA（如 San3A I 代替 Dpn I），重新将质粒转至 dcm⁺ dam⁺菌株中扩增
- 6) DNA 位点上存在其它修饰 将 DNA 底物与 λ DAN 混匀进行切割验证
- 7) DNA 不存在该酶识别顺序 换用其它的酶切割 DNA 或过量酶消化进行验证

2.2 DNA 切割不完全

原因 解决办法

- 1) 内切酶活性下降 用 5-10 倍量过量消化
- 2) 内切酶稀释不正确 用酶贮藏液或反应缓冲液稀释酶
- 3) DNA 不纯，反应条件不佳 同上
- 4) 内切酶识别的 DNA 位点上的碱基被甲基化或存在其它修饰 同上
- 5) 部分 DNA 溶液粘在管壁上 反应前离心数秒
- 6) 内切酶溶液粘度大，取样不准 将内切酶稀释，增大取样体积
- 7) 酶切后 DNA 粘末端退火 电泳前将样品置 65℃ 保温 5-10 分钟，取出后置冰浴骤冷
- 8) 由于反应溶液、温度、强烈振荡使内切酶变性 使用标准反应缓冲液及温度，避免强烈振荡
- 9) 过度稀释使酶活性降低 适当稀释酶液，反应液稀释的酶不能贮藏
- 10) 反应条件不适 使用最佳反应体系
- 11) 识别位点两侧插入了可影响酶切效率的核酸顺序 加大酶量 5-10 倍

2.3 DNA 片段数目多于理论值

原因 解决办法

- 1) 内切酶星状活性 检查反应条件：甘油浓度大于 12%，盐度过低，Mn²⁺的存在及酶：DNA 值过大均均可导致星状活性，降低酶的用量
- 2) 其它内切酶污染 用 λ DNA 作底物检查酶切结果
- 3) 底物中含其它 DNA 杂质 电泳检查 DNA，换用其它酶切，纯化 DNA 片段

2.4 酶切后没有观察到 DNA 片段的存在

原因 解决办法

1) DNA 定量错误 (如 RNA 含量较高) 用 RNA 酶 A (无 DNA 酶) 100ug/ml 消化 DNA 样, 酚抽提后沉淀溶解, 定量

2) 在酶切反应液中形成非特异的沉淀 在反应前透析 DNA 样品或用酒精沉淀二次

2.5 内切酶保存期内快速失活

原因 解决办法

1) 保存温度不合适 内切酶贮藏在含 50%甘油的贮藏液中, 应在-20℃低温保存

2) 以稀释形式保存 稀释酶液不宜长期存放, 应一次使用

3) 贮藏缓冲液不适当 使用厂家推荐的贮藏缓冲液

4) 低蛋白浓度 内切酶与 500ug/ml 的 BSA 一起保存

2.6 电泳后 DNA 片段的带型弥散, 不均一

原因 解决办法

1) DNA 上结合有蛋白质 电泳前上样液 65℃加热 5min, 并加入 0.1%的 SDS, 酚/氯仿抽提纯化

2) 内切酶中含有 DNA 外切酶 减少酶用量或消化时间, 换用新包装的酶

2.7 酶切后的 DNA 片段连接效率低

原因 解决办法

1) 含磷酸盐的浓度高 透析, 乙醇沉淀去除磷酸盐

2) 内切酶失活不全或含有 ATP 酶 延长灭活时间或用酚抽提, 乙醇沉淀回收 DNA

3) 平末端连接 加大 T4 DNA Ligase 用量

4) 外切酶污染 减少酶用量, 缩短保温时间, 酚抽提回收 DNA

5) 连接缓冲液不合适 重新配制连接缓冲液

3 T4 DNA 酶连接常见问题分析与对策

3.1 有哪些潜在原因可导致用 T4 DNA 连接酶连接后转化失败?

反应体系内无 ATP 或 Mg^{2+} 可导致连接失败: 使用随酶提供的 buffer 或向其它兼容的 buffer 中加入 ATP。含 ATP 的 Buffer 保存超过 1 年, 其内 ATP 可能会降解, 导致连接失败。当补加 ATP 时, 确定补加的是核糖核酸 ATP, 而不是脱氧核糖核酸 ATP, 因为后者不起作用。

反应体系中盐浓度过高或 EDTA 含量高都可导致连接失败: 纯化 DNA。

去磷酸化步骤完成后, CIP、BAP 或 SAP 失活不彻底: 根据厂家推荐的方法去除

去磷酸化酶。

DNA 浓度过高导致连接后产生的均是线性 DNA：保持总 DNA 浓度在 1-10 $\mu\text{g/ml}$ 之间。连接末端为单碱基突出末端：使用最高至 5 μl 高浓度连接酶 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接。

插入片段和质粒没有磷酸化。注重：假如载体已经去磷酸化了，而引物又没有磷酸化会导致连接失败，订购磷酸化的引物或对引物进行磷酸化。

加入过多的连接混合物至感受态细胞：50 μl 感受态细胞应加入 1-5 μl 连接混合物。

插入片段太大，不能进行环化：降低插入片段的浓度，并使用高浓度连接酶 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接。

3.2 内切酶酶切反应后，有什么因素可以导致 T4 DNA 连接酶连接和后续的转化失败？

内切酶酶切不充分：假如酶切位点位于 PCR 产物的末端，识别位点末端侧需要加至少 6 个保护碱基。用对照底物检测内切酶的活性。

内切酶没有完全失活：假如内切酶不能热失活，用酚/氯仿抽提纯化 DNA。

内切酶的星号活性消化了载体或插入片段：跑胶检测 DNA，假如存在多余的条带，减少内切酶使用量或减短反应时间。

DNA 或内切酶有外切酶或磷酸酶的污染，破坏了 DNA 末端：酚/氯仿抽提纯化 DNA。检查内切酶的质量检测资料和注重事项，假如连接 QC 不佳或外切酶活性高，减少内切酶量或缩短反应时间

各种常见 PCR、DNA 限制性内切酶酶切反应、DNA 的连接反应、细菌的培养常见的问题与对策

一、各种常见 PCR

1. 假阳性

可能原因：

(1) 靶序列或扩增产物的交叉污染 解决方案：操作时应小心轻柔，防止将靶序列吸入加样枪内或溅出离心管外；除酶及不能耐高温的物质外，所有试剂或器材均应高压消毒；所用离心管及加样枪头等均应一次性使用；各种试剂最好先进行分装，然后低温贮存。

(2) 引物设计不合适：选择的扩增序列与非目的扩增序列有同源性，因而在进行 PCR 扩增时，扩增出的 PCR 产物为非目的性的序列。靶序列太短或引物太短，容易出现假阳性。 解决方案：重新设计引物。

2. 假阴性

可能原因：模板：含有抑制物，含量低；Buffer 对样品不合适；引物设计不当或者发生降解；反应条件：退火温度太高，延伸时间太短。解决方案：纯化模板或

者使用试剂盒提取模板 DNA 或加大模板的用量；更换 Buffer 或调整浓度；重新设计引物（避免链间二聚体和链内二级结构）或者换一管新引物；降低退火温度、延长延伸时间。

3. 非特异性扩增

可能原因：引物特异性差；模板或引物浓度过高；酶量过多；Mg²⁺浓度偏高；退火温度偏低；循环次数过多。解决方案：重新设计引物或者使用巢式 PCR；适当降低模板或引物浓度；适当减少酶量；降低镁离子浓度；适当提高退火温度或使用二阶段温度法；减少循环次数。

4. 拖尾

可能原因：模板不纯；Buffer 不合适；退火温度偏低；酶量过多；dNTP、Mg²⁺浓度偏高；循环次数过多。解决方案：纯化模板；更换 Buffer；适当提高退火温度；适量用酶；适当降低 dNTP 和镁离子的浓度；减少循环次数。

二、DNA 限制性内切酶酶切反应

1. DNA 完全没有被内切酶切割

可能原因：（1）内切酶失活 对策：标准底物检测酶活性。（2）DNA 不纯，含 SDS、酚、EDTA 等内切酶抑制因子。对策：将 DNA 过柱纯化，乙醇沉淀 DNA。

（3）条件不适（试剂、温度）对策：检查反应系统是否最佳。（4）DNA 酶切位点上的碱基被甲基化。对策：换用对 DNA 甲基化不敏感的同裂酶，重新将质粒 DNA 转化至 dcm⁻，dam⁻基因型的细菌菌株。（5）DNA 酶切位点上没有甲基化（如 Dpn I）。对策：换用不同切割非甲基化位点的同裂酶消化 DNA（如 San3A I 代替 Dpn I），重新将质粒转至 dcm⁺ dam⁺菌株中扩增。（6）DNA 位点上存在其它修饰 对策：将 DNA 底物与 λ DAN 混匀进行切割验证。（7）DNA 不存在该酶识别顺序 对策：换用其它的酶切割 DNA 或过量酶消化进行验证。

2. DNA 切割不完全

可能原因：（1）内切酶活性下降 对策：用 5-10 倍过量消化。（2）内切酶稀释不正确 对策：用酶贮藏液或反应缓冲液稀释酶。（3）DNA 不纯，反应条件不佳对策：将 DNA 过柱纯化，乙醇沉淀 DNA；检查反应系统是否最佳。（4）内切酶识别的 DNA 位点上的碱基被甲基化或存在其它修饰。对策：换用对 DNA 甲基化不敏感的同裂酶，重新将质粒 DNA 转化至 dcm⁻，dam⁻基因型的细菌菌株；将 DNA 底物与 λ DAN 混匀进行切割验证。（5）部分 DNA 溶液粘在管壁上 对策：反应前离心数秒。（6）内切酶溶液粘度大，取样不准 对策：将内切酶稀释，增大取样体积。（7）酶切后 DNA 粘末端退火。对策：电泳前将样品置 65℃保温 5-10 分钟，取出后置冰浴骤冷。（8）由于反应溶液、温度、强烈振荡使内切酶变性对策：使用标准反应缓冲液及温度，避免强烈振荡。（9）过度稀释使酶活性降低 对策：适当稀释酶液，反应液稀释的酶不能贮藏。（10）反应条件不适 对策：使用最佳反应体系。（11）识别位点两侧插入了可影响酶切效率的核酸顺序 对策：加大酶量 5-10 倍。

3. DNA 片段数目多于理论值

可能原因：（1）内切酶星状活性。对策：检查反应条件：甘油浓度大于 12%，盐度过低，Mn²⁺的存在及酶：DNA 值过大均可导致星状活性，降低酶的使用量。

（2）其它内切酶污染 对策：用 λ DNA 作底物检查酶切结果。（3）底物中含其它 DNA 杂质对策：电泳检查 DNA，换用其它酶切，纯化 DNA 片段。

4. 酶切后没有观察到 DNA 片段的存在

可能原因：（1）DNA 定量错误（如 RNA 含量较高）对策：用 RNA 酶 A（无 DNA 酶）100ug/ml 消化 DNA 样，酚抽提后沉淀溶解，定量。（2）在酶切反应液中形成非特异性的沉淀对策：在反应前透析 DNA 样品或用酒精沉淀二次。

5. 内切酶保存期内快速失活

可能原因：

（1）保存温度不合适。对策：内切酶贮藏在含 50%甘油的贮藏液中，应在-20℃低温保存。（2）以稀释形式保存 对策：稀释酶液不宜长期存放，应一次使用。

（3）贮藏缓冲液不适当 对策：使用厂家推荐的贮藏缓冲液。

（4）低蛋白浓度 对策：内切酶与 500ug/ml 的 BSA 一起保存。

6. 电泳后 DNA 片段的带型弥散，不均一

可能原因：

（1）DNA 上结合有蛋白质。对策：电泳前上样液 65℃加热 5min，并加入 0.1% 的 SDS，酚/氯仿抽提纯化。

（2）内切酶中含有 DNA 外切酶。对策：减少酶用量或消化时间，换用新包装的酶。

7. 酶切后的 DNA 片段连接效率低

可能原因：

（1）含磷酸盐的浓度高 对策：透析，乙醇沉淀去除磷酸盐

（2）内切酶失活不全或含有 ATP 酶 对策：延长灭活时间或用酚抽提，乙醇沉淀回收 DNA。

（3）平末端连接 对策：加大 T4 DNA 连接酶的用量。

（4）外切酶污染 对策：减少酶用量，缩短保温时间，酚抽提回收 DNA。

（5）连接缓冲液不合适 对策：重新配制连接缓冲液。

三、DNA 的连接反应

1. DNA 连接失败（以 T4 DNA 连接酶为例）

（1）可能是因为反应体系内无 ATP 或 Mg²⁺导致连接失败，解决方案：使用随酶提供的 buffer 或向其它兼容的 buffer 中加入 ATP。含 ATP 的 Buffer 保存超过 1 年，其内 ATP 可能会降解，导致连接失败。当补加 ATP 时，确定补加的是核糖核酸 ATP，而不是脱氧核糖核酸 ATP，因为后者不起作用；

（2）可能是因为反应体系中盐浓度过高或 EDTA 含量高导致连接失败，解决方案：纯化 DNA；（3）可能是因为去磷酸化步骤完成后，CIP、BAP 或 SAP 失活不彻底，解决方案：根据厂家推荐的方法去除去磷酸化酶；

（4）可能使因为连接末端为单碱基突出末端，解决方案：使用最高至 5 μ l 高浓度

连接酶 16° C 过夜连接；

(5) 可能是因为插入片段和质粒没有磷酸化，假如载体已经去磷酸化了，而引物又没有磷酸化会导致连接失败，解决方案：订购磷酸化的引物或对引物进行磷酸化；

(6) 可能是因为插入片段太大，不能进行环化，解决方案：降低插入片段的浓度，并使用高浓度连接酶 16° C 过夜连接；

(7) 可能是因为连接酶失活，解决方案：用 lambda HindIII 或其它可行的底物进行检测。

2. DNA 平端连接效率低

解决方案：

(1) 低温下长时间的连接效率比室温下短时间连接的好，平端连接需要过夜反应；

(2) 在体系中加入一点切载体的酶，只要连接后原来的酶切位点消失。这样可避免载体自连，应该可以大大提高平端连接的效率。足够多的载体和插入片段是最重要的。要看片段具体情况而言，有时载体和片段浓度过高，容易产生线性化产物，不利于环化的。插入的 DNA 片段的摩尔数是载体摩尔数的 5-10 倍，这个很关键。载体通常 50ng 就够了，若载体在 10k 左右，可用 50-100ng；

(3) 平端的连接对于离子浓度很敏感，回收的时候多洗洗，加 PEG 和扩大酶量，22 度 2 小时后 4 度过夜；

(4) 尽可能缩小连接反应的体积，最好不超过 10 微升，在 5、6 微升左右最佳；

(5) 建议放在四度冰箱连接两天效率更高比 14 度好。

四、细菌的培养

1. 细菌不生长

(1) 可能是因为培养条件不合适，培养基成分不对，解决方案：使用适合细菌生长的优化条件，选择适合细菌生长的培养基；

(2) 可能培养基中混入了不对应的抑菌抗生素，解决方案：去除或加入正确的抗生素。

2. 有杂菌生长

(1) 可能是操作过程中混入了杂菌，解决方案：注意操作与培养条件，保证无菌，做平行试验检验；

(2) 可能是样品中混入了霉菌，解决方案：空气中有大量的霉菌，注意样品的除菌处理；

(3) 可能是忘记加抗生素，解决方案：加入相应的抗生素

1、Southern 杂交技术成败主要取决于哪两个因素？

答：Southern 杂交技术的成败主要取决于两个因素：首先，用于探针的 DNA 纯度要高，否则影响特异性。其次是探针 DNA 的放射性比强度要高，因为增加放射性强，可提高检测水平。

2、Southern 杂交技术中的 DNA 的消化和电泳有哪些注意点？

答：①选择的限制性内切酶应提供某种信息，通常消化前 DNA 中间长度至少应该三倍于消化产生的 DNA 中间长度；

②高分子的 DNA 容易造成消化不均匀，所以要用大体系酶切；而若酶切体系太大，消化后不方便上样，则可以对 DNA 进行浓缩，用乙醇沉淀 DNA；

③电泳电泳前，除乙醇，并且 70℃ 水浴，这样也可以破坏限制性片段黏性末端之间的碱基配对；

④消化后的 DNA 可以在 4℃ 保存，但是电泳加样前需加热至 56℃ 2~3 分钟，破坏黏性末端碱基对；

⑤酶切后，电泳上样前最好通过荧光测量法测 DNA 消化产物的浓度；

⑥电泳前要保证 DNA 分散均匀，并且若是大分子量的 DNA，要用大口径吸头吸取；

⑦过夜电泳，低电压慢迁移率；

⑧电泳后将凝胶用溴化乙锭染色，读胶，用透明荧光尺读取迁移距离；

⑨电泳后的凝胶可以再 4℃ 保存，但是不可超过一天。

3、Southern 杂交技术中的膜转移有哪些注意点？

答：①凝胶、膜、吸水纸大小要适中，差不多大，不能太大，防止造成短路。并且各层之间不能有气泡；

②凝胶、膜都要做好标记，不能搞混；

③转膜前要对凝胶中 DNA 片段进行变性、洗涤等工作，若目的 DNA 片段大于 15kb，则变形前还要进行短暂脱嘌呤处理，使 DNA 产生缺口，提高转移效率；

④不带电膜需用中性缓冲液，同时凝胶经变性后需用中性缓冲液洗涤；若是带点膜需用碱性缓冲液，则凝胶可直接进行转移，不需要变性。

4、Southern 杂交技术中杂交部分的主要因素有哪些，分别有什么关系？

答：杂交步骤中主要因素有膜上的 DNA 量、探针量以及结合效率等；杂交的灵敏度可达到 0.1pg，杂交信号强度与探针特异性活性呈正比，与探针长度呈反比。

5、Southern 杂交技术中的探针有几种？实验室常用什么？

答：Southern 杂交种使用的标记探针有同位素与非同位素标记两种。放射性同位素标记的探针灵敏度较高，但存在半衰期限制，并且实验过程中操作者及环境都会受到放射性辐射的危害。所以实验室常用地高辛标记探针，目前市场已有相应的商品试剂盒，具体操作可以根据产品说明书进行。

6、Southern 杂交技术中使用地高辛探针方法时除按照商品说明书流程进行操作外，还需要注意哪些技术要点？

答：（1）探针的标记与使用：

①地高辛方法最好用 PCR 方法制备探针，同时若是模板 DNA 量足够多，则可用随机标记法。PCR 法制备探针有时会出现非特异条带，特异性降低，所以之前要对 PCR 条件进行优化以保证特异性；

②要摸索探针的最适工作浓度。

（2）DNA 样品的准备：

①DNA 量要足够，一般不少于 10 μ g，若产物中目的 DNA 浓度很大，则可适当按比例减少样品量；

②电泳判断样品是否完全消化。

（3）膜转移

①当目的基因的含量较低或转移基因组时，采用向下转移法能够提高转移效率和检测信号的强度；

②实验室一般采用紫外交联的方法对膜上 DNA 进行固定，此法快速、方便，但是操作中要避免膜被过量照射，并且将膜上带有 DNA 的一面朝向紫外光源。此步是为了使 DNA 的一小部分胸腺嘧啶残基与膜表面带正电荷的氨基基团形成交联。

（4）分子杂交：

根据所选择的预杂交液确定杂交温度，在满足温度条件的情况下，杂交的成败取决于杂交时间，时间果断则杂交不充分；时间过长则可能导致非特异性结合增多。杂交时间一般控制在 20 小时左右。

（5）祛除背景的方法：

①适当延长梯度洗膜的时间和提高洗膜温度；

②控制地高辛抗体的浓度。足够量的地高辛抗体可以获得较好的杂交信号，但过量的地高辛抗体会在膜上产生非特异结合斑点。

7、Southern 杂交结果条带不清楚，可能是哪些方面的原因？

答：（1）膜上 DNA 量少。A、酶切消化时，要使样品完全消化，通过定时做电泳检测；B、电泳上样量一般不能少于 10 μ g；C、转膜后，若是不带电膜，则要进行固定 DNA 步骤，通过烘干、紫外照射等方法。

（2）探针的灵敏度及浓度问题。A、探针选用不合适；B、探针的浓度不合适，可能偏低。

（3）分子杂交步骤处理不当。A、分子杂交的时间不合适，可能偏短；B、杂交液量不合适，可能偏多；C、杂交环境温度不合适。

8、Southern 杂交结果底色颜色太重，怎么办？

答：（1）减少杂交时间；

（2）减少探针的浓度；

(3) 增加凝胶及膜漂洗的次数及时间;

(4) 选用灵敏度更高的探针。

9、蓝白斑筛选结果中只有白斑没有蓝斑，为什么？

答：(1) 可能是显色时间不够，平板培养一段时间后，要放置 4℃ 冰箱 8~12 小时，蓝色才会慢慢显现；

(2) 连接部分出错，可能连接子大量自连，或是插入了其他小片段；

(3) IPTG 和 X-Gal 分布不均匀。可以在培养基灭菌后液态时加入 IPTG 和 X-Gal，混匀后再铺板。

10、蓝白斑筛选结果中出现了浅蓝色斑点，是什么原因？

答：实验中发现当载体中插入了小片段后，可能会出现浅蓝色斑点，也就是说浅蓝色可能也插入了我们的外源基因，还需进一步用其他方法验证。

11、蓝白斑筛选结果中，白斑不规则分布，密密麻麻，菌落较小，可能是什么原因？

答：(1) 感受态细胞状态不好；

(2) 抗生素失效，污染杂菌。此原因可通过观察阴性对照板确定；

12、外源基因表达的基本条件有哪些？

答：(1) 外源基因插入序列必须保持正确的方向和阅读框架。其遗传密码不得缺失、遗漏、或错位及错码。否则会导致编码错误的蛋白质分子，特别是目的基因序列内部应不含两端酶切位点的识别序列。

(2) 插入的外源基因必须放在原核的启动子控制之下，也就是使原核的 RNA 聚合酶能够识别插入的基因。

(3) 外源基因必须能在大肠杆菌中进行有效转录（如无内含子），转录后的 mRNA 在菌体必须相当稳定，并且能有效地进行翻译，转译的蛋白分子在菌体内不致于受菌体蛋白酶的降解。

13、大肠杆菌中表达载体的构建要求？

答：完整的表达载体（质粒）应有强启动子、终止子、多个酶切位点、抗性标记、复制子和 RBS 的 SD 序列。还应结合考虑：质粒的拷贝能力和稳定性，转译蛋白的表达形式和存放地点（分泌型、包涵体、融合蛋白），蛋白质的分子量、性质和稳定性等。

14、常用的启动子有哪些，分别是用哪种物质进行诱导表达？

答：常用的启动子有 5 中，分别为乳糖启动子（Lac）、Trp 启动子、Tac 启动子、噬菌体的 PL 和 PR 启动子以及脂蛋白启动子（LPP），分别介绍如下：

(1) 乳糖启动子（Lac）：无乳糖时，调节基因（I）产生阻遏蛋白与操纵基因

结合，阻止 RNA 聚合酶结合进而阻止转录；有乳糖时，乳糖能与阻遏蛋白结合，使其变构解离而行使转录功能。而 LacZ 基因可由 IPTG（异丙基硫代- β -D-半乳糖）诱导转录。

（2）Trp 启动子：色氨酸启动子（Trp）的阻遏蛋白在有色氨酸时，二者结合，阻遏蛋白变构激活而与启动子结合，阻止 RNA 聚合酶的转录。无色氨酸时，阻遏解除，因 β -吲哚丙烯酸是色氨酸的竞争性抑制剂，常用作诱导剂，诱发色氨酸启动子转录。

（3）Tac 启动子：Tac 启动子是由 Trp 启动子和 Lac 启动子构建而成的杂合启动子，-35 区为 Trp 启动子顺序，-10 为 LacUV5 启动子顺序，二者之间距离为 16bp 者为 pTrc，17bp 者为 pTac。该启动子只需用 IPTG 诱导转录即可。

（4）噬菌体的 PL 和 PR 启动子：PL 为 λ ϕ 左向启动区，PR 为右向转录启动区，与 CI 阻遏蛋白结合，可抑制 OL 或 OR 转录，但 CI 在 42℃ 诱导转录

（5）脂蛋白启动子（LPP）：脂蛋白为细胞外膜蛋白，细菌中含量高，该启动子表达效率高，由信号肽可将基因表达产物分泌到胞外，常用来构造分泌型表达载体。

15、大肠杆菌作为表达外源基因受体菌的特征有哪些？

答：（1）大肠杆菌表达外源基因的优势：A、全基因组测序，共有 4405 个开放型阅读框架；B、基因克隆表达系统成熟完善；C、繁殖迅速、培养简单、操作方便、遗传稳定；D、被美国 FDA 批准为安全的基因工程受体生物。

（2）大肠杆菌表达外源基因的劣势：A、缺乏对真核生物蛋白质的复性功能；B、缺乏对真核生物蛋白质的修饰加工系统；C、内源性蛋白酶降解空间构象不正确的异源蛋白；D、细胞周质含有很多种类繁多的内毒素。

16、当用 IPTG 诱导 Lac、Tac 启动子的转录时，IPTG 本身也具有一定的毒性，所以对表达和制备用于医疗目的的重组蛋白并不合适，一些国家规定在生产人用重组蛋白质的生产工艺中不能使用 IPTG 怎么解决？

答：（1）lac 和 tac 启动子的转录受温度严紧调控：把阻遏蛋白 LacI 的温度敏感突变体 lacI(ts)、lacIq(ts) 插入表达载体或整合到染色体后，均能使 lac 和 tac 启动子的转录受到温度严紧调控在较低温度（30℃）时抑制，在较高温度（42℃）时开放。

（2）乳糖替代 IPTG 诱导 lac 和 tac 启动子的转录：乳糖在 β -半乳糖苷酶作用下生成异乳糖，异乳糖具有诱导剂的作用这一过程涉及乳糖的转运和转化，其效率受到多种因素的影响和制约因此乳糖诱导的有效剂量大大高于 IPTG。乳糖本身作为一种碳源可以被大肠杆菌代谢利用，较多的乳糖存在也会导致菌体生理及生长特性变化。乳糖替代 IPTG 作为诱导剂的研究要与发酵工艺结合起来，才能显示其良好的前景。

17、外源基因在大肠杆菌的表达中强化转录终止，为什么？常用的终止子有哪些

答：外源基因在强启动子的控制下表达，容易发生转录过头现象，即 RNA 聚合酶滑过终止子结构继续转录质粒上邻近的 DNA 序列，形成长短不一的 mRNA 混合物。过长转录物的产生在很大程度上会影响外源基因的表达，其原因如下：

（1）转录产物越长，RNA 聚合酶转录一分子 mRNA 所需的时间就相应增加，外源基因本身的转录效率下降；

（2）如果外源基因下游紧接有载体上的其它重要基因或 DNA 功能区域，如选择性标记基因和复制子结构等，则 RNA 聚合酶在此处的转录可能干扰质粒的复制及其它生物功能，甚至导致重组质粒的不稳定性；

（3）过长的 mRNA 往往会产生大量无用的蛋白质，增加工程菌无谓的能量消耗；

（4）更为严重的是，过长的转录物往往不能形成理想的二级结构，从而大大降低外源基因编码产物的翻译效率。

目前外源基因表达质粒中常用的终止子是来自大肠杆菌 rRNA 操纵子上的 rrnT1T2 以及 T7 噬菌体 DNA 上的 Tf；对于一些终止作用较弱的终止子，通常可以采用二聚体终止子串联的特殊结构，以增强其转录终止作用

18、外源基因在大肠杆菌中的高效表达，在基因构建方面有哪些要素？

答：启动子、终止子负责转录；核糖体结合位点、密码子、质粒拷贝数负责翻译。这些要素都能影响到外源基因的表达，对提高表达效率有很大作用。

19、外源基因所表达的蛋白有几种形式？大肠杆菌基因工程菌的构建策略有哪些？

答：目的蛋白在大肠杆菌系统表达的形式有两种：（1）在细胞内表现为不溶性的包涵体颗粒，在大肠杆菌细胞质中；（2）在细胞内表现为可溶性的蛋白质，可存在于细胞质中，有的也可分泌到细胞质之外。

大肠杆菌基因工程菌的构建策略有：包涵体型异源蛋白的表达、分泌型异源蛋白的表达、融合型异源蛋白的表达、寡聚型异源蛋白的表达、整合型异源蛋白的表达、蛋白酶抗性或缺陷型表达系统的构建。

分子生物学实验中常见的问题和对策-15

一、Southern 杂交中可能出现的问题以及解决的可能方法？

答：

问题 1：Southern 杂交膜的背景比较高

解决方法：

1) 电泳液和凝胶都用新的，处理凝胶和膜的时候始终保持干净，电泳后凝胶要用去离子

水洗干净。

2) 转膜时要小心，不要用手触摸，保持膜的干净，转膜后要用洗膜液漂洗杂交膜。

3) 预杂交时间可再延长一些，理论上是 1-4h，一般是用 4h 左右的，同时洗膜时要测一下

它的值。

4) 探针的量要适中，浓度是书上的 2 倍，不可过多，而且不能直接加到膜上。采用地高辛标记的探针，需控制地高辛抗体的浓度，足够量的地高辛抗体可以获得较好的杂交信号，但过量的地高辛抗体会在膜上产生非特异结合斑点。

5) 杂交的温度：如果是酶直接标记的那就用 42 度，如果是随机引物标记则用 60 度就可以。

这是同源探针的工作参数，非同源探针杂交温度则要低一些，用 50 度左右就可以。

6) 杂交过程中，要调整好杂交瓶位置，要将瓶转一圈，保证膜的各个角落都能浇到，随便

放有时如果有个角落一直浇不到，特别是用液体量较少时，这时肯定会产生背景高问题。

7) 洗膜时：洗膜的时间不是固定的，要通过计数来定，等同位素的量降下来才行，然后根

据计数来压膜，如果计数很高就不要压太久，否则背景就挺高的。洗膜第一步是非严谨

洗脱，室温就行，第二步严谨洗脱，要预热。可适当延长梯度洗膜的时间和提高洗膜温

度；洗膜时应让膜动起来，别粘在盒壁上。

8) 显色前膜上不要有太多的液体，应稍微控一下。显色时，先把膜用不加显色剂的 buffer

洗两次，平衡后在加显色剂。

问题 2：杂交膜的背景非常不均一，某些部分显示出高背景，某些部分却完全未能着色。

解决方法：

1) 洗膜之前要把洗膜液先预热，其他步骤洗膜时一般是在室温条件下洗，但一定要在摇床

上洗膜，这样洗膜就会均匀一些了。

2) 杂交膜在使用之前要用甲醛处理，处理的不完全容易出现背景不均一的问题。

3) 在检测液中加入 BCIP/NBP 的时候，要先和检测液混匀，混匀以后再滴加在膜上面显色，

这样的背景基本上是均匀的。

4) 显色的时间不要过长，一般 3-5 个小时就可以了，时间太长反而会引起脱色高背景的问题。

题。

5) 更换杂交使用的探针。

6) 增加 DNA 的量。

问题 3: Souther 杂交，杂交信号总是很弱。

解决方法:

1) 可能是所用的基因的 mRNA 不稳定或翻译效率低。

2) 增加探针的浓度，一般探针浓度在 15-25 纳克每毫升杂交液。

3) 上样量可能偏少，尽管文献上一般都是 15-20 微克左右，但增加上样量还是必须的，

一般 40-50 微克较好，若还是信号弱，就有可能说明所用的基因在组织中表达量弱。

4) 加的发光底物的量一定要足够，将整个膜湿润后在 37 度温育 10 分钟再放到曝光匣，之

后可将曝光时间延长，一般可以延长到 30 分钟左右。

问题 4: 探针标记后，发现比标准浓度要低很多。

解决方法:

1) 试剂盒每次反应可以标记 10ng-3ug DNA，所以如果待标记的 DNA 不是很难获取的话，一般建议量多一些。25ul 的标记体系一般至少标记 2ug DNA；大于 2ug 时，实际被标记的 DNA 增加量就比较少，所以 2ug 足够了。

2) 待标记的 DNA 一定要纯，如果是试剂盒回收的话，建议重新沉淀一次，探针如果杂质

多，一方面影响标记，一方面杂的膜会很脏。

3) 可以适当延长标记时间，1000ng template DNA: 1hour 标记 260ng, 20hours 标记 780ng;

但是如果是 3000ng, 20hours, 890ng。

4) 如果是基因组 DNA 的话，建议用量多一些，转膜后要看是否完全，杂交时间可以延长过夜。如果是质粒 DNA，电泳清晰可见浓度时，可将杂交时间减至 1hour (探针浓度高)。

5) 适当提高杂交温度，温度高特异性更高。

6) 同源性低的探针，显色可过夜；同源性高的探针，立等可显 (探针浓度高)。

问题 5: Southern 杂交过程中，转膜不理想，要么转不上，要么只转上一小部分。

解决方法:

1) 改用电转，比如 Bio-rad 的电转系统，速度快。

2) 检查膜上的 DNA 探针是否固定牢固。

3) 采用向下转膜法, 向下转膜法由于不需在吸水纸上增加重量, 凝胶基本不变形; 加之吸

水纸的吸力与水受到的重力方向一致, 故可以良好地完成 DNA 的转移, 它不需要特殊

的仪器, 转移速度较快, 转移效率高。

问题 6: Southern 预杂交液中有大量沉淀, 怎样除去?

解决方法:

1) 杂交液里离子浓度比较高, 一般在冰箱储存过程中, 由于温度比较低, 大量离子析出。

可以考虑在 37 度水浴, 预温。如果是常温下出现该现象, 或预温后还有此现象, 可考

虑重新配制。

2) 配制杂交液时, 一般是将所有溶液 (室温保存) 都先加好 (一定要混匀, 因为加了 SDS

后会很难吹打均匀), 37 度预热 10min, 最后再缓慢加入 SDS, 加了 SDS 会有白色沉淀,

不过不要紧, 稍微吹打再放到杂交炉 37 度再孵 10min, 到时候就没有沉淀了。

3) 可将显色底物放在 4 度冰箱, 且避光保存, 用的时候直接吸取就可以了。

问题 7: Southern 杂交过程中, 如果没有杂交袋, 可否用其他的保鲜袋?

解决方法: 试剂公司有杂交袋卖, 它的好处是对探针的吸附比较少, 不容易渗漏。如果没有,

普通的带封口的塑料袋也是可以的, 要在用之前试试, 以防渗漏了。

二、细菌的蓝白斑筛选转化子过程中可能出现的问题和解决方法

答:

问题 1: 蓝白斑筛选中, 白斑多但是没有阳性克隆 (假阳性)。

解决方法:

1) 检查质粒载体和目的片段的连接情况, 避免载体自连的发生。

2) 检查载体的酶切位点, 排除酶切插入位点等没有出现设计问题。

3) 控制好转化的时间和温度。

问题 2: 蓝白斑筛选, 出现很多浅蓝色菌斑 (假阴性)。

解决方法: 当实际操作中发现当插入小片段时, 重组子也有形成浅蓝斑的情况。即蓝色菌斑

也有可能含外源基因。据最新报道, 大概有 30% 的假阴性。用牙签挑取浅蓝色菌

落，进行 PCR 扩增，同时设立阳性、阴性和空白对照。阳性对照为经测序确认含有相同大小插入片段的重组菌落，阴性对照为经测序确认为不含插入片段的空载质粒菌落，空白对照为不加模板的 PCR 体系。PCR 扩增产物通过非变性 PAGE 条带分析，判断浅蓝色菌落是否为重组子。

问题 3：蓝白斑筛选，全是白斑，没有蓝斑。

解决方法：

1) 可能是 Ampicillin 失效，让非抗性的菌种也生长出来。应该确定 Ampicillin 平板没有问题，2 个周之内使用，再用一个加抗生素和一个不加抗生素的平板做对照，用抗生素敏感菌种划平板对照。

2) 做个空载背景对照，检查平板是否适合做蓝白斑筛选，而且筛选平板要新鲜。

3) 做转化之前，用 PCR 检测一下连接产物，看是否连接成功，或者是否载体自连，这样就

可以提前减少假阳性的可能性。

4) 用牙签挑取白色菌落，进行 PCR 扩增，同时设立阳性、阴性和空白对照。

阳性对照为经

测序确认含有相同大小插入片段的重组菌落，阴性对照为经测序确认为不含插入片段的

空载质粒菌落，空白对照为不加模板的 PCR 体系。PCR 扩增产物通过非变性 PAGE 条带

分析，确定是否重组。

问题 4：蓝白斑筛选，只有蓝斑，没有白斑。

解决方法：

1) 先用 PCR 检测一下连接产物，引物可以用载体上的相应序列，比如 M13，检测一下连

接是否成功，如果有大片段（自己估计长度）产生，那么连接就是成功的。

2) 可能是片段浓度太低，连接时注意浓度比，片段和质粒载体浓度比 1: 5-1: 9。

3) 用牙签挑取蓝色菌落，进行 PCR 扩增，同时设立阳性、阴性和空白对照。阳性对照为经

测序确认含有相同大小插入片段的重组菌落，阴性对照为经测序确认为不含插入片段的

空载质粒菌落，空白对照为不加模板的 PCR 体系。PCR 扩增产物通过非变性 PAGE 条带

分析，判断蓝色菌落是否为重组子。

问题 5：蓝斑较大，白斑很小附在周围，还有蓝白镶嵌的斑（卫星菌落）。

解决办法：

1) 连接体系还需要优化，即载体和需连接的片段的相对比例必须适中，才会产

生一定数量

的转化子，比例过大过小都不行。

2) 可能是氨苄失效，更换其他抗性载体。

3) 中间菌落的生长可能消耗了培养基周围的 Amp，导致了卫星菌落的出现，可以小心挑取

中间的那个菌落，它一般是阳性克隆。

4) 往培养基中加抗生素的时候，温度不能高了，不烫手为宜，防止抗生素失效。

5) 培养时间不宜过长，出现阳性菌落就及时处理，以 12-16 小时为宜。

问题 6: 蓝白斑筛选时平板置于 4 度冰箱可以消除假阳性或假阴性吗，根据什么原理？

解决方法: IPTG 是 β -半乳糖苷酶的活性诱导物质，X-Gal 是 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 的显色底物，在 β -半乳糖苷酶的催化下会产生蓝色产物。做蓝白斑筛选是主要是依靠 IPTG 与 X-gal 的作用使假阳性菌呈蓝色，而将其置于 4 度是为了使其显色充分，不是一开始就 4 度，是等菌长出来之后。一般菌长出来就会有蓝色的了，4 度之后会进一步显色。

问题 7: 蓝白斑筛选，过了很多天才显色，出现蓝色菌落。

解决方法:

1) IPTG 和 X-gal 用 pUC18 空质粒检测时用的板是否与外源 DNA 片段连在 pUC18 后转化用

的板是同一批的，即使是同一批次的板，由于倒板时培养基温度过高，导致 IPTG 和 X-gal

部分失效，且有可能混匀不均，使得倒的板蓝白斑筛选效果不同。

2) 理由与上基本相似，抗生素失效，更换其他抗性载体。

3) 检查外源片段以及载体酶切是否完全，连接时间可稍微加长一下。

4) 检查感受态是否被污染，白斑是否为透明白斑，而不应该是白色的菌落。

三、外源基因在大肠杆菌中的表达过程中可能出现的问题和解决方法

问题 1: 将转化后的细菌涂板，结果细菌长成了一块一块的秃斑样，且大小不一，是什么原因？

解决方法:

1) 加的菌液太多，单菌落长到一块儿去了，减少加入的菌液量。

2) 培养的时间太长，单菌落长到一块儿去了，减少培养的时间。

3) 涂的菌太多，太浓，应适当稀释菌液。

4) 平板太干了，注意板的条件优化。

问题 2: 大肠杆菌转化实验，在 pulsing 的时候，可能会造成啪的一声产生电弧，为什么？解决方法: 可能原因是电击转化过程中没有除盐，电击杯没擦干，有气

泡！要保证电击杯的

干燥，排除气泡。

问题 3：在大肠杆菌中表达的蛋白产量比较低，怎样提高蛋白的表达？

解决方法：

1) 在保留编码蛋白质序列的同时重新构建基因的 5' 端，使其 A+T 含量增加到最大限度。

2) 确定是否存在转录终止子，如果没有，应该插入一个终止子。

3) 检查克隆基因序列的密码子是否为大肠杆菌不常用者，稀有密码子会使核糖体停滞。跟

据现有对大肠杆菌高表达的基因研究发现的有限的稀有密码子，已经观察到由于其对应

的 tRNAs 水平很低，直接导致了翻译延伸的困难，序列中的意外的终止密码子可能造成

突变，这在 PCR 克隆产物的情况下较为突出。可以通过测序发现此类问题，也可以用体

外翻译的方法确认重组子的表达能力，可以选用 Novagen 的 Red Nova 溶菌液进行测试。

如果含有大肠杆菌稀有密码子可以换含有大肠杆菌稀有密码子的 rosseta(de3) 宿主菌。

4) 重组质粒的不稳定因素，可能是重组表达的质粒对大肠杆菌产生了细胞毒性，表达有细

胞毒性蛋白的大肠杆菌不具有生长优势，而且随细菌培养时间的增加 β -内酰胺酶将逐渐

释放到溶液中去，破坏溶液中的 AMP。这样本不具有生长优势的表达菌又失去了选择压

力，造成大部分新生细菌无质粒，表现为表达困难。可将融合蛋白得表达分成两个阶段，

前一个阶段为质粒生长阶段，主要保证质粒的稳定性和提高质粒的拷贝数；后一个阶段

为融合蛋白表达阶段，待细菌生长达饱和以后，诱导融合蛋白的表达。如果表达的蛋白

对大肠杆菌有毒性可以在诱导前的培养基中加葡萄糖，能防止本底表达。

5) AMP 浓度是影响融合蛋白表达量的另一个重要因素。当其他条件不变，AMP 浓度在 50

ug/ml 以下时，融合蛋白的表达量在 20% 以下；AMP 浓度在 200-500 ug/ml 条件下，呈

高表达，表达量接近 50%。但 AMP 浓度加到 500 ug/ml AMP 时则会使细菌

的生长速度下

降,说明一定的选择压力可以提高质粒的稳定性从而提高融合蛋白表达量。

6) mRNA 转录子中的二级结构会干扰 AUG 翻译起始密码子和/或核糖体结合位点,所有

pET 载体的转录产物都是下列两种之一:

5' ... AAGAAGGAGAUUAUCAUAUG ... 3'

5' ... AAGAAGGAGAUUAACCAUGG ... 3' , 如果发现表达很差,你可以通过检查编码插

入序列的链上的与上述序列互补的序列,以确定是否是因为存在潜在的二级结构造成麻

烦。

7) 改变诱导条件,能提高表达量(诱导温度、时间、OD 值和 IPTG 浓度等)。

问题 4: 大肠杆菌中表达的蛋白产物当中,除了有全长目的蛋白以外,还能看到截短的产物,

这是怎么回事? 怎么去除?

解决方法: 一个最直接原因就是蛋白水解了。然而第二点翻译起始也非常有可能。起始密码

子 AUG (Met) 的上游在 RNA 编码区有类似于核糖体结合位点序列(AAGGAGG)

的间隔序列(通常是 5 - 13 个核苷酸)时,容易出现这种问题。截短蛋白在纯化

全长蛋白的操作时往往造成麻烦。解决途径之一即是选用两端都带有融合标签的

pET 载体,例如 pET-28 和 pET-30 系列载体在 N-端和 C-端都有 His 和 Tag。这样,

全长蛋白就可以通过提高咪唑浓度,在洗脱时将截短蛋白与全长蛋白区分开。

问题 5: 怎样去除成熟蛋白 N-端的附加的甲硫氨酸?

解决方法:

N-端 fMet 是否被去除受倒数第二个氨基酸影响。这个加工过程由甲硫氨酸氨肽酶催化,并受以下关系支配: 去除的困难程度随倒数第二位氨基酸的支链大小的增加而降低。可采用去除的方法有:

- 1) 在表达系统中共表达甲硫氨酸氨肽酶基因。
- 2) 在分离纯化后在体外用外肽酶处理。

问题 6: 当需要表达可溶、有活性的蛋白时,产量虽足但不溶。

解决方法:

- 1) 改变生长温度；很多蛋白在低温下易溶，大肠杆菌一般在 10-43 度。
- 2) 改变发酵条件。
- 3) 使用低拷贝数质粒，改变表达效率，可采用 pACYC 族载体或将克隆基因以单拷贝插入染色体的形式插入到靶基因中。

问题 7：如果 IPTG 诱导后细胞停止了生长，是不是表示细胞死了？

解决方法：T7 RNA 聚合酶非常活跃，T7 转录和翻译信号极强，因此，一旦诱导，细胞的主要生理活动都向着目的蛋白表达的方面转化。在通常情况下，细胞将停止生长，形成克隆的能力大大降低，但并未死亡。菌落形成试验可以用来检测表达系统的性能。也有一些例外情况，例如特别的目的基因以及一些极为严紧的载体/宿主菌组合（比如含有 pLysE 的宿主菌）等，这时在诱导后菌落还是会继续生长。

问题 8：IPTG 用于诱导 lac、tac 启动子的转录，但 IPTG 具有一定的毒性，不适合用于医疗的重组蛋白，怎么解决？

解决方法：

- 1) 把阻遏蛋白 lac I 的温度敏感突变株 lac I (ts) 插入表达载体或整合到染色体后均能使 lac、

tac 启动子的转录受到温度严谨调控，在较低温度（30℃）时抑制，在较高温度（42℃）

时开放。

- 2) 用乳糖替代 IPTG，但其效率受到多种因素的影响和制约，因此乳糖诱导的有效剂量大大

高于 IPTG。乳糖本身作为一种碳源可以被大肠杆菌代谢利用，较多的乳糖存在也会导致

菌体生理及生长特性变化。乳糖代替 IPTG 作为诱导剂的研究要与发酵工艺结合起来，

才能显示其良好的前景。

问题 9：怎样减少目的产物以包涵体的形式出现，增大表达产物的可溶性？

解决方法：多数包涵体是因为蛋白质部分折叠或错误折叠的多肽发生不适当聚集，可采取：

- 1) 使用的载体可能会严重影响表达产物的溶解性，可以尝试用不同的载体系统，选择最适

载体。

- 2) 利用融合系统表达可减少包涵体的形成。

- 3) 用含有原核信号肽的载体进行表达，新合成的蛋白质由于被转运至周质间分泌，而呈现

可溶的形式。

4) 摸索表达条件, 可以采用降低培养温度, 降低诱导剂浓度, 增加通气量, 或者把 IPTG

的浓度降到原来的 1/5 等方法。

5) 与 chaperone 共同表达也可能增加目的蛋白的可溶性, 比如 Gro/ES 体系, DnaK-DanJ-

GrpE 体系, 或者折叠催化剂蛋白质二硫键异构酶 (有商业化产品)。

6) 改变条件还是得不到可溶性表达, 可以换载体, 用 GST 融合表达载体比 his 融合表达载

体更容易得到可溶性表达的融合蛋白。

1. PCR 中常见问题及解决方法

1.1 RT-PCR

1.1.1 特异性差, 在琼脂糖凝胶分析中观察到非预期条带

(1) 引物和模板非特异性退火。

在第一链合成中使用基因特异性引物 GSP, 而不是随机引物或 oligo(dT)。GSP 对于逆转录步骤是特异性最好的引物。GSP 是反义寡聚核苷, 可以特异性地同 RNA 目的序列杂交, 而不象随机引物或 oligo(dT)那样同所有 RNA 退火。GSP 可以同与 mRNA 3'最末端退火的扩增引物序列相同, 或 GSP 可以设计为与反向扩增引物的下游退火。试用允许高温 cDNA 合成的 GSP。

避免在引物 3'端含有 2 到 3 个 dG 或 dC。

提高逆转录保真温度。为了充分利用 GSP 特异性的全部优点, 应该使用有较高热稳定性的逆转录酶。热稳定逆转录酶可以在较高温度保温以增加反应严谨性。以 2°C 到 5°C 间隔增加退火温度, 减少退火时间。在开始几个循环使用较高的退火温度, 然后使用较低的退火温度。

使用 Platinum Taq DNA 进行自动热启动 PCR。

(2) GSP 设计较差。遵循用于扩增引物设计的同样原则

(3) RNA 中沾染了基因组 DNA。使用较好的 RNA 分离方法, 如 Trizol Reagent, 会减少 RNA 制备物中沾染的基因组 DNA。为了避免产生于基因组 DNA 的产物, 可以在逆转录之前使用扩增级的 DNase I 对 RNA 进行处理以除去沾染的 DNA。将样品在 2.0mM EDTA 中 65°C 保温 10 分钟以终止 DNase I 消化。对每个 RNA 模板进行一个无逆转录的对照实验, 以确定一个给定片段是来自基因组 DNA 还是 cDNA。在无逆转录时所得到的 PCR 产物来源于基因组。

(4) 形成引物二聚体。设计在 3'端没有互补序列的引物。

(5) 镁离子浓度太高。对于每一个模板和引物组合优化镁离子浓度。

(6) 因为扩增复杂模板导致引物错误起始。使用巢式 PCR 或递减 PCR。

(7) 沾染外源 DNA。可以在 PCR 过程中使用良好的实验步骤减少残余污染。使用抗气雾剂移液管阻止气雾剂进入 eppendorf 管内。为 PCR 样品配制和扩增后分析设计隔离的区域, 在准备新反应前更换手套。总是使用不含有模板的阴性对照检测污染。使用预先混合的反应成分, 而不是每个反应的每个试剂单独加入。还有一种防止残余污染的方法是使用尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (UDG)。这种酶 (也称为尿嘧啶-N-糖基化酶或 UNG) 移除 DNA 中的尿嘧啶。在扩增过程中将脱氧尿嘧啶替换为胸腺嘧啶使得可以把前面的扩增产物

同模板 DNA 区分开来。因为前面的扩增产物对 UDG 敏感，所有可以在 PCR 前对新配制的反应用 UDG 处理以破坏残余产物。

(8) 因为二级结构导致引物结合位点无法接近。对于 GC 含量 > 50% 的模板，使用 (1×-3×) PCRx Enhancer Solution。

1.1.2 灵敏度低，在琼脂糖凝胶分析中看到少量或没有 RT-PCR 产物

(1) PCR 引物设计较差。避免在引物 3'端含有互补序列。避免可以形成内部发卡结构的序列。设计 Tm 类似的引物。

(2) DNA 含有抑制剂。诸如 DMSO, SDS 和甲酰胺之类的试剂会抑制 Taq DNA 聚合酶。如果怀疑污染了抑制剂，可以使用乙醇沉淀 DNA

(3) 富含 GC 的模板。对于 GC 含量 > 50% 的模板，使用 PCRx Enhancer Solution。

(4) 模板浓度太低。使用 10⁴ 拷贝的靶序列，以在 25 到 30 个循环中获得信号。

(5) 镁离子浓度太低。从 1mM 到 3mM，间隔 0.5mM 进行一系列反应，确定对于每个模板和引物对的最佳镁离子浓度。注意：对实时定量 PCR，使用 3mM 到 5mM 的镁离子浓度。

(6) 退火温度太高。把退火温度设定为低于 Tm 5℃。因为 Tm 值通常是通过公式估算，所有真正的退火温度实际会高些或低些。

(7) 另外，在 PCR 之前使用 RNaseH 处理 cDNA 合成反应可以提高灵敏度。对于某些模板，据认为 cDNA 合成反应中的 RNA 会阻止扩增产物的结合，在这种情况下，RNaseH 处理可以增加灵敏度。一般当扩增较长的全长 cDNA 目标模板时，RNaseH 处理是必需的，比如低拷贝的 tuberous sclerosis II。对于多数 RT-PCR 反应，RNaseH 处理是可选的，因为 95℃ 保温的 PCR 变性步骤一般会将 RNA: DNA 复合物中的 RNA 水解掉。

1.2 定量 RT-PCR

1.2.1 无扩增产量，相对荧光信号小于等于背景

(1) cDNA 合成温度太高。降低保温温度。

(2) 反转录 cDNA 产物被二级结构封闭。提高保温温度，重新设计引物。

(3) RNA 被损害或降解，必要的话更换 RNA。

(4) RNase 污染。维持无菌条件；加入 RNase 抑制剂。或使用无 RNaseH 活性 (RNaseH-) 的逆转录酶，如 SuperScript II 逆转录酶，RNaseH- 的 M-MLV 逆转录酶及 ThermoScript 逆转录酶，RNaseH- 的 AMV。

(5) 荧光探针无功能。确保探针设计的有效性和 fluorophore 和 quencher 的存在。用 DNase 处理 TaqMan 探针，校验荧光是否增强。必要的话重新设计和合成探针。

1.2.2 灵敏度低，须在比预期更高的循环中检出产物

(1) 初始模板 RNA 不充分。增加模板 RNA 的浓度；使用 10ng-1μg 的总 RNA。

(2) RNA 被损害和降解。必要的话更换 RNA。

(3) RNase 污染。维持无菌条件；加入 RNase 抑制剂。或使用无 RNaseH 活性 (RNaseH-) 的逆转录酶。

(4) 无效的 cDNA。通过增加 70% 乙醇清洗的次数来去除制备 RNA 过程中的抑制剂。

(5) 无效的 PCR 扩增。可能是引入了反转录的抑制剂包括 SDS、EDTA、

胍盐、甲酰胺、磷酸钠和亚精胺导致。也能是 cDNA 合成温度或引物设计不合理。

1.2.3 信号高于预期，在低于预期的循环中即可检出产物

(1) 反应中加的样品太多。降低模板的浓度。

(2) 模板或 PCR 残余污染。隔离污染来源，更换试剂。使用专用的精致移液器。在无 DNA 区域准备反应，使用抗气溶胶的吸头。

(3) 电泳后出现意外的条带，RNA 被基因组 DNA 污染。用 DNase I 预处理 RNA。

(4) PCR 的低特异性。优化 PCR 条件。

(5) 第一链合成使用了寡聚 dT 或随机引物引起。使用基因特异性引物。

2. 限制性内切酶酶切反应常见问题及解决方法

2.1 如何做酶切反应

(1) 成功酶切的关键是准备好模板 DNA。DNA 样品中不能含有有机溶剂(会使酶变性或产生星号活性)，不能含有干扰酶活性的污染物质，不能含有高浓度的 EDTA (TE 中的 EDTA 浓度较低，对 Mg 的浓度影响较小)；同时要对 DNA 甲基化程度及其对酶切效率的影响要做到心中有数。

(2) 选用合适的酶。根据酶切序列选用，特别注意选用甲基化对酶活性的干扰。

(3) 正确使用和保存酶。酶需要保存在-20 度的低温环境中，只是在需要用酶时才从冰箱中取出来。运输和临时存放时需要将酶至于冰上。手拿酶管时不要接触酶管下部含酶的部分，移酶时尽可能用长 TIP，避免污染。用完后需要及时送回原处。注意：酶通常是最后加。

(4) 反应体积需要根据实验目的定，常规的酶切一般要维持在 10-50ul，酶切鉴定 10-20ul 就可以了。

(5) 模板浓度问题：浓度过高，溶液黏度过大，酶不能有效扩散，酶切效果不会好。浓度过低，也会影响酶活性。

(6) 注意模板用量和反应体积的关系。对酶用量，模板用量，反应体积等要素的确定需要的是时间和经验的积累。

(7) 酶切反应的各个组分加完后，需要用 TIP 小心混匀几次，short spin 一下就可以保温了。一般不能使用振荡器混匀。

(8) 反应温度的选择。一般反应都用 37 度，但是 Sma I 的最适合温度是 25 度，37 度时酶仍表现出活性，但是效率下降 50%。部分从耐热菌制备的酶需要在 37 度以上的温度反应，如 Taq I 的最适温度为 65 度，37 度保温，效率仅为前者的 1/10。

(9) 反应时间的选择。一般酶切鉴定 30 分钟就可以了。要完全酶切可以采用少量的酶长时间反应，或较高的酶量短时间处理都可以达到。在使用高酶量的时候需要注意甘油的最终浓度不要超过 5%，也就是说 10ul 的体系，酶的用量不要超过 1ul。

(10) 是否和如何终止反应？酶切鉴定之类的实验不需要特殊处理。灭活的手段：加入高浓度的 EDTA；65 度或 80 度热处理 20-30 分钟；部分从高温菌纯化出来的内切酶由于最适的反应温度比较高，热处理灭活不一定完全，需要用苯酚/氯仿/乙醇方法纯化；电泳回收也是实验室常用除酶的手段。

2.2 酶切不动或切不完全

可从下面几个因素去考虑：

(1) 酶是否有活性：酶的活性单位通常是在 60 分钟酶切 1ug lambda DNA 或特定线状 DNA 所需要的酶量。鉴定酶的活性高低不是用我们待切的 DNA 模板，也不是别的公司的酶来判定。因为不同公司酶可能是从不同系统中纯化的，虽然识别位点相同，但是酶的特性可能是有差异的。鉴定酶必须使用使用说明书上认定的酶活确定的方式，通常需要用 lambda DAN 做模板来判定。同时如果酶对甲基化敏感，还需要用 Dcm-。

(2) 模板性质是否清楚：如果 DNA 的类型变了所需要的酶量也不同。酶切效果与 DNA 的性质（线状，超螺旋状）、位点数目、位点左右的序列、甲基化程度、纯度等有很大的关系。对超螺旋状 DNA 完全酶切所需要的酶量要比线状的高好几倍，同时需要提高酶的用量（10U/ug）和延长反应时间等措施。还有一个问题是有些时候 DNA 是从别人那里得到的，背景不清楚也造成困惑。

(3) 模板纯度是否够：模板制备方式影响 DNA 的质量，制备过程中使用到乙醇，氯仿，苯酚，SDS, EDTA 等如果残留在最终的 DNA 模板中，都会不同程度影响酶的活性。Miniprep 时如果用试剂盒抽提，需要处理的污染是变性剂和乙醇；如果是手工制备的，氯仿，乙醇，苯酚及细胞内其他杂质都会不同程度的干扰酶活性。

(4) 甲基化程度对酶的活性是否有影响：细菌中主要有 Dcm 和 Dam 两种甲基化方式，在植物和动物细胞中主要是 CG 位被甲基化。仔细看看使用的酶对甲基化的敏感情况，或许能找到酶切效率低或根本不能酶切的根源。

(5) 反应条件是否合适：对照说明书，检查使用的温度是否正确，是否需要添加 BSA，是否使用正确的缓冲溶液。由于缓冲液中基本都含有 DTT，反复冻融会使模板使 DTT 降解。注意有些研究人员将 buffer 长时间放在 4 度或室温，这是很不规范的行为。

(6) 酶稀释和添加方式是否正确：一般要求在最后加酶，但是对同时做多个相同反应的时候，最后加酶有可能不很方便。通常是将缓冲、酶和适量的水配制成一个混合物，然后分装，最后加模板。需要提醒的是混合物（Master Mix）中由于没有底物的存在，离子强度也不对，酶可能要受到损伤。这种提前混合的做法没有问题，只是动作要快一些，没有分装前的 Mix，要求放在冰里，尽快使用。

2.3 如何设定 PCR 引物的保护碱基

如果想直接对 PCR 产物酶切，同时获得理想的酶切效果，一般情况下需要在酶切位点序列 5' 端方向增加额外的保护碱基。保护碱基的数目随酶的种类不同而不同，根据文献资料汇总，一般保护碱基有 3-4 个就可以了。不提倡提供过多的保护碱基，因为太多的额外碱基会增加 PCR 扩增的难度，同时增加合成费用。

2.4. 如何对 PCR 扩增的产物进行酶切

Fermentas 公司的研究表明，限制性内切酶在 PCR 扩增体系中仍然有部分活性，可以通过稀释（3 倍以上）扩增混合液，适当提高酶量和反应时间，进行酶切。

需要对 PCR 产物进行酶切分析通常是为了克隆或基因表型分析，由于 Taq, Pfu 等高温聚合酶在酶切温度（37 度或更高）下，仍然保持一定的活性，高温聚合酶所具有的聚合或无模板添 A 或外切修正的功能仍在一定的程度上表现出来，可能会影响到酶切产物末端的正确性。结果是要么装不上去，要么

装上去切不下来，测序发现末端引物碱基少了。正确安全的做法是先通过琼脂糖电泳回收产物，然后酶切，酶切可以适当提高酶的用量。一般的做法是从 50ulPCR 反应中回收的产物，溶解于 45ul 水中，加入酶，酶切后的产物通过从溶液中回收 DNA 的方式直接回收，不需要跑琼脂糖电泳。

3. DNA 连接反应常见问题及解决方法

3.1 互补性粘性末端的连接

单一限制性内切酶或两种限制性内切酶（为同尾酶，如 BamHI 和 BglII）分别处理载体和外源 DNA，得到的粘性末端为互补性突出末端，在连接反应中外源片段和质粒载体 DNA 均可能发生自身环化或几个分子串连形成寡聚物，且正反两种连接方向都可能。为了降低载体的自身环化，使正确的连接产物数量达到最高水平，一般载体 DNA 和外源 DNA 的分子数比（浓度比）为 1: 3~1: 10 之间。同时，为了最大限度地抑制质粒 DNA 的自身环化，还可将载体 DNA 的 5' 磷酸基团用碱性磷酸酯酶去掉，防止其自身环化。而带 5' 端磷酸的外源 DNA 片段可有效地与去磷酸化的载体相连，产生一个带有两个缺口的开环分子，在转入 E.coli 受体菌后该种缺口可在 DNA 复制过程中自动修复。

3.2 非互补粘性末端的连接

用两种不同的限制性内切酶进行消化可以产生带有非互补的粘性末端，是 DNA 重组中最容易克隆的 DNA 片段。一般情况下，常用质粒载体均带有多个不同限制酶的识别序列组成的多克隆位点，因而几乎总能找到与外源 DNA 片段末端匹配的限制酶切位点的载体，从而将外源片段定向地克隆到载体上。也可在 PCR 扩增时，在 DNA 片段两端人为加上不同酶切位点以便与载体相连。该种粘性末端的连接载体 DNA 和外源 DNA 的分子数比（浓度比）通常为 1: 1。

3.3 平头末端的连接

是由产生平末端的限制酶或核酸外切酶消化产生，或由 DNA 聚合酶补平所致。由于平端的连接效率比粘性末端要低得多，故在其连接反应中，T4 DNA 连接酶的浓度和外源 DNA 及载体 DNA 浓度均要高得多。通常还需加入低浓度的聚乙二醇（PEG 8000）以促进 DNA 分子凝聚成聚集体的物质以提高转化效率。特殊情况下，外源 DNA 分子的末端与所用的载体末端无法相互匹配，则可以在线状质粒载体末端或外源 DNA 片段末端接上合适的接头（linker）或衍接头（adapter）使其匹配，也可以有控制的使用 E. coli DNA 聚合酶 I 的 klenow 大片段部分填平 3' 凹端，使不相匹配的末端转变为互补末端或转为平末端后再进行连接。

3.4 DNA 连接的影响因素

（1）温度与时间

连接反应的一项重要参数是温度，理论上连接反应的最佳温度是 37℃，此时连接酶的活性最高。但 37℃ 时粘性末端分子形成的氢键配对结构极不稳定，因此人们找到了一个既可最大限度地发挥连接酶的活性，又有助于短暂配对结构稳定的最适温度即 12~16℃。一般粘性末端的连接在此温度下，反应 30min 即可取得较好的效果，如时间充裕的话连接 60min 则更完全些，为了实验方便有时也在 4℃ 条件下连接过夜。而对于平头末端的连接，建议在 37℃ 条件下连接，并且时间适当延长。

（2）酶量

酶单位的定义在宝生物工程公司提供的 T4-DNA 连接酶中是指在 20ml 的连接反应体系中，6mg 的 1 DNA-HindIII 的分解物在 16℃ 下反应 30min 时，有 90% 以上的 DNA 片段进行连接的酶量为 1U。由以上的定义可知，日常连接实验中的 DNA 的浓度比酶量定义的状态下低很多 10~20 倍，所以实际酶量是过量的。平头末端的连接酶的用量要比粘性末端连接所需酶量大 10~100 倍，因此厂商提供的连接酶浓度往往是高浓度的（宝生物的 T4-DNA 连接酶浓度 350U/ml）。故从这个意义上分析，常规的粘性末端的连接反应体系中酶量的加入往往是过量的。

（3）缓冲体系

不同公司的连接酶缓冲液大部分含有 Tris-HCl (pH 7.5) 提供连接所需的合适 pH 值。另外在缓冲液中还有两种主要成份非常重要：DTT 和 ATP。前者提供一定的还原能力，而后者能促进连接反应的有效进行。但是在实验中缓冲液使用时的反复冻融会引起 ATP 的分解，从而影响连接效率。为了保证实验的顺利进行，一般大剂量的缓冲液可以分装成小管保存并使用，另外可考虑使用一段时间的缓冲液定期更新一下。

（4）DNA 浓度

DNA 连接反应中建议的 DNA 连接浓度为 0.1~1pmol/ml，而为了降低载体分子间的环化，载体 DNA 的浓度不宜过高，外源 DNA 的投入量则依据连接类型不同投入 1~10 倍。

4. 细菌培养

在其他条件如温度、培养基、pH 等为改变的条件下，在固体 LB 上能正常生长的菌接到液体 LB 上却不生长。

（1）转接时出现问题，比如：没有将菌体转种进液体培养基或者是接种针在过火后没有很好冷却把菌烫死等。

（2）培养基的抗性缺失，比如时间过长或倒板子时过热导致抗生素失活。而长起的菌本身并无抗性。

（3）如果以上情况排除，可以在培养条件上改变，比如转速是不是可以加大，而温度可以作些改变。

（4）菌体在板子上不要长得太大，否则一是有杂菌生长的可能，第二菌活性下降导致摇菌而无菌生长。

4.2 杂菌污染

（1）注意环境的消毒和灭菌工作，如果空间没有紫外灯可以定期用臭氧等进行空间的消毒杀菌。

（2）及时清洗和消毒空气过滤网。

（3）操作中要加强手部的消毒

• 质粒提取常见问题及解决办法

1. 使用酚仿抽提方法，质粒的纯度很好，但酶切不能完全切开

1) 确认酶的有效性。

2) 平衡酚是否被氧化（正常是黄色，而氧化后是棕色的）。

3) 是否不小心吸入了痕量的酚。

4) 乙醇沉淀后，70%乙醇漂洗的是否充分（残留的盐类会影响酶切）。

5) 乙醇漂洗后是否完全干燥（残留的乙醇会影响酶切）。

2. 提取的质粒电泳，为连续的一片火箭状

1) 如果盐离子多，会有走胶变形的现象，如果提到的质粒不够纯，会有电泳条带不平齐的现象。

2) 当电压太大时，容易出现火箭状，而降解应该是弥散状。

3) 可能是宿主菌影响的，质粒抽提好后，用酚-氯仿处理一下再酶切。若有改善，则为宿主菌影响。转化到其它宿主菌再切。

4) NaOH 的浓度过高，会出现火箭状的结果。

3. 未提出质粒或质粒得率较低

1) 大肠杆菌老化。涂布平板培养后，重新挑选新菌落进行液体培养。

2) 质粒拷贝数低。由于使用低拷贝数载体而引起的质粒 DNA 提取量低，可更换具有相同功能的高拷贝数载体。

3) 菌体中无质粒。有些质粒本身不能在某些菌种中稳定存在，经多次转接后有可能造成质粒丢失。不要频繁转接，每次接种时应接种单菌落。另外，检查筛选用抗生素使用浓度是否正确。

4) 碱裂解不充分。过多使用菌体培养液，会导致菌体裂解不充分，可减少菌体用量或增加溶液的用量。对低拷贝数质粒，提取时可加大菌体用量并加倍使用溶液，这样有助于增加质粒提取量和提高质粒质量。

5) 溶液使用不当。溶液 II 和 III 在温度较低时可能出现浑浊，应置于 37℃ 保温片刻直至溶解为清亮的溶液，才能使用。

6) 吸附柱过载。不同产品中吸附柱吸附能力不同，如果需要提取的质粒量很大，可分多次提取。若用富集培养基，菌液体积必须减少；若质粒是非常高的拷贝数或宿主菌具有很高的生长率，则需减少 LB 培养液体积。

7) 质粒未全部溶解（尤其质粒较大时）。洗脱溶解质粒时，可适当加温或延长溶解时间。

8) 乙醇残留。漂洗液洗涤后应离心尽量去除残留液体，再加入洗脱缓冲液。

9) 洗脱液加入位置不正确。洗脱液应加在硅胶膜中心部位，以确保洗脱液完全覆盖硅胶膜的表面达到最大洗脱效率。

10) 洗脱液不合适。DNA 只在低盐溶液中才能被洗脱，如洗脱缓冲液 EB (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.5) 或水。洗脱效率还取决于 pH 值，最大洗脱效率在 pH7.0~8.5 间。当用水洗脱时确保其 pH 值在此范围内，如果 pH 过低可能导致洗脱量低。洗脱时将灭菌蒸馏水或洗脱缓冲液加热至 60℃ 后使用，有利于提高洗脱效率。

11) 洗脱体积太小：洗脱体积对回收率有一定影响。随着洗脱体积的增大回收率增高，但产品浓度降低。为了得到较高的回收率可以增大洗脱体积。

12) 洗脱时间过短：洗脱时间对回收率也会有一定影响。洗脱时放置 1min 可达到较好的效果。

4. 测序鉴定时没有问题的细菌，37℃ 摇菌后发现质粒大小或序列出现异常
这种情况常出现在较大质粒或比较特殊的序列中。解决办法：

- 1) 降低培养温度，在 20~25℃ 下培养，或室温培养可明显减少发生概率。
- 2) 使用一些特殊菌株，如 Sure 菌株，它缺失了一些重组酶，如 rec 类等，使得质粒复制更加稳定。
- 3) 质粒抽提酶切不完全的可能原因是溶液 II 中的 NaOH 浓度过高造成的。

•DNA 电泳中常出现的问题及解决办法

1. 出现 DNA 不迁移的原因

在确定电源已打开且线路正确连接的情况下，仍然出现 DNA 不迁移，这可能是由于缓冲液使用不当造成的。当缓冲液中没有离子存在时，电导率最小，这会导致 DNA 不迁移或者迁移极慢。要选择适当离子浓度的缓冲液。

2. 出现拖尾和弥散的现象

在电泳中，并不是加样量越多电泳条带就越清晰。相反，过多的量会造成加样孔超载，从而导致拖尾和弥散，对于较大的 DNA 此现象更明显。一般情况下，0.5cm 宽的梳子可加 0.5ug 的 DNA 量，加样量的多少依据加样孔的大小及 DNA 中片断的数量和大小而定。

3. 电泳过程中出现不规则 DNA 带迁移

出现不规则 DNA 带迁移可能是由于 DNA 变性引起的。当缓冲液电导很高并产热时，可能会导致 DNA 变性。选择合适的缓冲液可以解决这个问题，此外，以 20mM 的氯化钠缓冲液稀释 DNA，且在电泳前不加热，也可以缓解这一问题。

4. DNA 电泳条带缺失

对于一些小分子 DNA，如果电泳条件不合适，可能会出现小 DNA 带走出凝胶的现象。缩短电泳时间、降低电压、以及增强凝胶浓度可以改变这一情况。此外，巨大的 DNA 链不适合用凝胶电泳，可以在脉冲电声凝胶电泳上分析。

5. DNA 带模糊的原因

可以导致 DNA 带模糊的原因有很多，如：1) 如果有核酸酶存在，则会因为 DNA 降解，使得 DNA 带模糊，因此在电泳前要清除核酸酶，防止污染。2) DNA 样品中含盐量过高，可以在电泳前通过乙醇沉淀去除过多的盐。3) 有蛋白污染，可以在电泳前用酚抽提除去蛋白。

6. DNA 带相近不易分辨

当 DNA 的分子大小比较相近时，会在电泳结果中出现 DNA 带不易分辨的情况。这时可以通过增加电泳时间，核准正确的凝胶浓度来提高分辨率。

•DNA 回收常见问题及解决办法

1. DNA 未回收或回收率较低

1) 胶块未全部溶解。溶解凝胶时应该置于 55℃ 水浴，不断上下颠倒，确定胶块完全溶解后再进行下一步操作。如果凝胶容量较大，可增加溶胶液的使用量。

2) 胶块太大（超过 400 毫克）。如需处理的胶块太大，应该先将其切成小块，做两次回收。

3) 电泳缓冲液 pH 过高。硅胶在高盐及低 pH 值（小于或等于 7.5）时可结合 DNA。在低盐及高 pH 值（大于或等于 8）时洗脱。如果电泳缓冲液 pH 值太高，会导致

DNA 无法结合或降低结合率，可在溶胶后将 pH 值调至 7.5 以下。

4) 洗脱缓冲液不合适。DNA 只在低盐溶液中才能被洗脱，如洗脱缓冲液 EB (10mM Tris.Cl pH8.5) 或水。洗脱效率取决于 pH 值。最大洗脱效率在 pH7.0~8.5 之间。

2. 琼脂糖凝胶块不溶

1) 琼脂糖质量不好

2) 含目的片断的凝胶在空气中放置过久，使胶块失水干燥，建议切胶后立即进行回收或将胶块保存于 4℃ 或 -20℃；

3) 制胶的电泳缓冲液浓度过高或陈旧。

3. 如何鉴定回收的效果

电泳比较回收前后的条带强弱。比较时需要将回收的产物全部加到胶中去，具有可比性。如果您的样品难得，可以选无关的片段验证一下。

4. 如果胶在后续过程发生胶没有彻底融化，如何补救

补加融胶液，将胶悬起来，50-60 度继续保温至彻底融化。

5. 可以用什么洗脱 DNA

根据回收片段下游用途确定。一般情况下，采用 TE 或 Tris 缓冲液可以。测序反应，可用无菌水洗脱。如果洗脱的 DNA 需要长期保存，应用 TE 洗脱。

• 外源质粒对大肠杆菌的转化常见问题及解决办法

1. 连接反应后转化效率很低或阳性克隆非常少

1) 可能感受态细菌转化效率太低，用质粒作为阳性对照同时检测感受态的转化效率。

2) 可以尝试提高载体或插入片段的纯度。对于平端连接需注意适当延长连接时间。

3) 可能载体酶切不够充分，用未经连接的载体转化作为阴性对照。

4) 用存放 DNA 的溶液进行转化，作为阴性对照，检测感受态细菌是否存在问题。

2. 超级感受态得到的转化效率低

1) 菌液 OD 值偏大或偏小，生长时控制 OD 就是为了达到对数期，此时菌活力最高而处理时要使这种好的状态保持。

2) 原始菌株不好

3) CaCl₂ 处理的不够充分。用 CaCl₂ 使膜局部变化达到最佳的感受状态

4) 操作时，对菌体伤害过大。比如离心力是否太大导致菌破碎。

分子生物学实验常见问题分析及对策-18

一、质粒提取常见问题分析

1. 未提质粒或质粒得率较低

可能存在的原因和解决方法：

- 1) 质粒拷贝数低：由于使用低拷贝数载体引起的质粒 DNA 提取量低，可更换具有相同功能的高拷贝数载体。
- 2) 菌体中无质粒：有些质粒本身不能在某些菌种中稳定存在，经多次转接后有可能造成质粒丢失。例如，柯斯质粒在大肠杆菌中长期保存不稳定，因此不要频繁转接，每次接种时应接种单菌落。另外，检查筛选用抗生素使用浓度是否正确。
- 3) 碱裂解不充分：使用过多菌体培养液，会导致菌体裂解不充分，可减少菌体用量或增加溶液 P1、P2 和 P3 的用量。一般低拷贝的质粒 5ml 的菌液，高拷贝的质粒 2-3ml 小剂量提取。对低拷贝数质粒，提取时，可加倍使用溶液 P1、P2 和 P3，可能有助于增加质粒提取量和质粒质量。
- 4) 溶液使用不当：溶液 P2、P3 在温度较低时可能出现浑浊，应置于 37℃ 保温片刻直至溶解为清亮的溶液，才能使用。
- 5) 吸附柱过载：不同产品中吸附柱吸附能力不同，如果需要提取的质粒量很大，请分多次提取。若用富集培养基，例如 TB 或 2×YT，菌液体积必须减少；若质粒或宿主菌是非常高的拷贝数或生长率，则需调整 LB 培养液体积。
- 6) 质粒未全部溶解（尤其质粒较大时）：洗脱溶解质粒时，可适当加温或延长溶解时间。
- 7) 乙醇残留：漂洗液洗涤后应离心尽量去除残留液体，树脂型试剂盒漂洗后应晾干树脂，再加入洗脱缓冲液。
- 8) 洗脱液加入位置不正确：洗脱液应加在硅胶膜中心部位以确保洗脱液会完全覆盖硅胶膜的表面达到最大洗脱效率。
- 9) 洗脱液不合适：DNA 只在低盐溶液中才能被洗脱，如洗脱缓冲液 EB (10 mM Tris •Cl, pH 8.5) 或水。洗脱效率取决于 pH 值。最大洗脱效率在 pH7.0-8.5 间。当用水洗脱时确保其 pH 值在此范围内，如果 pH 过低可能导致洗脱量低。洗脱时将灭菌蒸馏水缓冲液加热至 60℃ 后使用有利于提高洗脱效率。
- 10) 洗脱体积太小：洗脱体积对回收率有一定影响。随着洗脱体积的增大，回收率增高，但产品浓度降低。为了得到较高的回收率可以增大洗脱体积。
- 11) 洗脱时间过短：洗脱时间对回收率也会有一定影响。洗脱时放置一分钟可达到较好的效果。
- 12) 碱裂解时间过长：加入裂解液 P2 如 SDS-NaOH 后，时间不宜超过 5min，因为此步骤的目的是使细胞内物质释放，蛋白质、染色体 DNA 和质粒 DNA 变性，时间过长，会导致加入中和裂解液 P3 如酸性醋酸钾后，仍无法使质粒 DNA 复性。导致提取失败。
- 13) 大肠杆菌老化：请涂布平板培养后，重新挑选新菌落进行液体培养。

2. 质粒纯度不高：

可能存在的原因和解决方法：

- 1) 混有蛋白：不要使用过多菌体。溶液 P1、P2、P3 处理并离心后溶液应为澄清的，如果还混有微小蛋白悬浮物，可再次离心去除后再进行下一步骤。
- 2) 混有 RNA：RNase A 处理不彻底，请减少菌体用量或加入溶液 P3 之后室温放

置一段时间。如果溶液 P1 已保存 6 个月以上，请在溶液 P1 中添加 RNase A。

3) 混有基因组 DNA：加入溶液 P2 和 P3 后应温和混匀，如果剧烈振荡，可能把基因组 DNA 剪切成碎片从而混杂在质粒中。如果加入溶液 P2 后过于粘稠，无法温和混匀，请减少菌体用量。细菌培养时间过长会导致细胞和 DNA 的降解，不要超过 16 小时。

4) P3 溶液加入时间过长：P3 溶液加入后，放置时间不要过长，否则有可能会产生小片段 DNA 污染。

5) 含大量核酸酶的宿主菌：宿主菌含大量核酸酶，在质粒提取过程中降解质粒 DNA，影响提取质粒 DNA 的完整性，最好选用不含核酸酶的大肠杆菌宿主菌，如 DH5 α 和 Top10。

6) 裂解时间过长：加入溶液 P2 后裂解时间不应超过 5 分钟。

7) 质粒的二聚体和多聚体形式：质粒复制过程中形成的，与宿主菌相关，电泳可检测出。

3. 提取的质粒在跑胶时出现了条带 做了酶切后却看不到任何物质

可能存在的原因和解决方法：

1) 质粒浓度太低，纯度不高（纯度对酶切很重要）。

2) 出现星号活性。

3) 酶切时间过长，可能质粒降解过多：注意酶切体系及加酶量。

4. 提质粒大都提的有三条带，是不是一条带就是好的呢

这两种情况都可能出现，多数情况下你能看到三条带，但不是超螺旋、线性和开环这三条带。碱法抽提得到质粒样品中不含线性 DNA。其实这三条带以电泳速度的快慢而排序，分别是超螺旋、开环和复制中间体（即没有复制完全的两个质粒连在了一起）。如果不小心在溶液 P2 加入后过度振荡，会有第四条带，这条带泳动得较慢，远离这三条带，是 20-100 kb 的大肠杆菌基因组 DNA 的片断。

5. 加完裂解液 P2，P3 之后动作太大有什么影响

一般需要掌握好手法，不要给予瞬间的冲量（用手指轻轻弹几下，以松解难溶的团块也还是允许的），但是也要保证溶液混匀，至于上下颠倒的次数，依混匀为准。因为动作大小会影响 DNA 的断裂，不是需要太大的片断，有些断裂无所谓，不影响后边的操作。另外加入溶液 P3 动作过于剧烈，容易导致离心蛋白的效果不佳，也容易导致质粒终产物中的菌体基因组 DNA 污染的增大。

二、DNA 电泳常见问题分析

1. DNA 带模糊

可能存在的原因和解决方法：

1) 电泳缓冲液陈旧：电泳缓冲液多次使用后，离子强度降低，pH 值上升，缓冲能力减弱，从而影响电泳效果，故需经常更换电泳缓冲液。

2) 所用电泳条件不合适：电泳时电压不应超过 20V/cm，温度 $< 30^{\circ}\text{C}$ ；巨大 DNA

链电泳，温度应 $<15^{\circ}\text{C}$ ，同时核查所用电泳缓冲液是否有足够的缓冲能力。

3) DNA 上样量过多：减少凝胶中 DNA 上样量。

4) DNA 样含盐过高：电泳前通过乙醇沉淀去除过多的盐。

5) 有蛋白污染：电泳前酚抽提去除蛋白。

6) DNA 变性：电泳前勿加热，用 20mM NaCl 缓冲液稀释 DNA。

7) DNA 降解：应避免核酸酶污染。

2. 不规则 DNA 带迁移

可能存在的原因和解决方法：

1) 对于 λ /Hind III 片段 cos 位点复性：电泳前于 65°C 加热 DNA 5 分钟，然后在冰上冷却 5 分钟。

2) 电泳条件不合适：电泳电压不超过 20V/cm；温度 $<30^{\circ}\text{C}$ ；经常更换电泳缓冲液。

3) DNA 变性：用 20mM NaCl 缓冲液稀释 DNA，电泳前勿加热。

3. 带弱或无 DNA 带

可能存在的原因和解决方法：

1) DNA 的上样量不够：增加 DNA 的上样量，但聚丙烯酰胺凝胶电泳比琼脂糖电泳灵敏度稍高，上样量可适当降低。

2) DNA 降解：应避免 DNA 的核酸酶污染。

3) DNA 走出凝胶：缩短电泳时间，降低电压，增强凝胶浓度。

4) 对于 EB 染色的 DNA，所用光源不合适：应用短波长（254nm）的紫外光源。

4. DNA 带缺失

可能存在的原因和解决方法：

1) 小 DNA 带走出凝胶：缩短电泳时间，降低电压，增强凝胶浓度。

2) 分子大小相近的 DNA 带不易分辨：增加电泳时间，核准正确的凝胶浓度。

3) DNA 变性：用 20mM NaCl 缓冲液稀释 DNA，电泳前勿加热。

4) DNA 链巨大，常规凝胶电泳不合适：改在脉冲凝胶电泳上分析。

5. 重复性不好

可能存在的原因和解决方法：

1) 凝胶制备的不规范：按要求严格操作。

2) 凝胶放置过久：聚合时间不能太长或太短，分离胶不过一周，间隔胶当日用。

6. DNA 电泳的 MARKER 带扭曲

可能存在的原因和解决方法：

1) 配制胶时的缓冲液和电泳缓冲液不是同时配制的：最好是同时配制。电泳时缓冲液高过液面 1—2mm 即可。

2) 电泳时电压过高：可以在电泳前 15 分钟用较低电压 (3V/cm)，等条带出孔后再调电压。

3) 上样时尽量慢慢加样，等样品自然沉降后再加电压。

三、DNA 回收常见问题分析

1. 切胶的时候如何能切的准？条带的位置肉眼很难判断出来，如何判断条带的位置？

可以将产物与 Marker 一起电泳，染色后，在紫外灯下观察结果，跟 Marker 进行相比，就知道要的是哪条带。注意，紫外灯下切胶速度要快，否则 DNA 会降解，另外，紫外线对身体伤害很大，特别是眼睛，请注意采取保护措施（比如在专门的箱子里切，带眼镜等）。

2. 凝胶回收 DNA 实验的关键在哪里？

最关键的是切胶之后，溶胶的那一步。切胶的时候要尽量把多余的琼脂糖凝胶切干净，按照实验步骤，第一步应该是将胶充分的溶化。这以后步一定要做充分，保证凝胶已经完全溶解了。加乙醇这步也很关键，当凝胶溶解后最好多过几次柱子。还有就是洗脱的那一步。洗脱的时候最好用加热到 60 度的洗脱液洗脱，如果实在效果不好可以分两次洗脱。

3. 跑完 PCR，暂时不方便胶回收，条带已经切下来放到 ep 管里了，能保存么？

割下来的胶放在 -20℃ 保存两个星期完全没有问题。切下来的胶放在 4 度冰箱中 4、5 小时没有问题，回收的效果也很好。

4. 做 PCR 电泳后跑电泳，目的基因是 489BP 的，结果每次切胶回收后再跑电泳就变成 500 多了，快到 600 了？为什么？

有时只靠电泳结果判断是不准确的，同样的片段每次跑的远近会有不同。有经验显示目的片段是 1300 多，结果就跑到 1000 的 marker 下面去了，后来证实片段没有问题。理论上两个条带一样，可是 PCR 结果显示就是大小不一致。然后回收以后的检测结果又全部都一样了，后来又拿去做了下一个测序，才知道根本没有问题。

5. 利用凝胶回收试剂盒 DNA 回收效率较低或者未回收到目的片段

可能存在的原因和解决方法：

1) 胶块未完全溶解：可适当延长水浴时间，并增加上下颠倒次数辅助溶解。

2) 胶块体积太大：应先将其切为小块，分多次回收。

3) 电泳缓冲液 pH 太高：硅基质膜在高盐低 pH 结合 DNA，如 pH 太高，应作适当调整。

4) 漂洗液中未加入无水乙醇。

5) 外缘 DNA 污染：在紫外灯下切下含待回收的 DNA 的凝胶时，要衬以干净的塑料薄膜，使用无 DNA 污染的新刀片。

6) 改用去离子水洗脱，但是实验室所用纯水一般 pH 偏低，可利用 NaOH 适当提高其 pH 值，以增加洗脱得率。

7) 不可以使用更小的洗脱体积（小于说明书提供的最小洗脱体积）进行洗脱以提高浓度，因为说明书上提供的最小洗脱体积是能完全覆盖吸附膜的最小体积，若减少体积则不能将 DNA 完全洗脱下来。

6. DNA 回收时，琼脂糖凝胶胶块不溶

可能存在的原因和解决方法:

- 1) 琼脂糖质量不好。
- 2) 含目的片断的凝胶在空气中放置过久, 使胶块失水、干燥: 切胶后应立即进行回收或保存在 4 或 -20℃。
- 3) 制胶的电泳缓冲液浓度过高或陈旧。

四、外源质粒对大肠杆菌的转化常见问题分析

1. 转化效率低

可能存在的原因和解决方法:

- 1) 供试 DNA 样品不纯: 应从 DNA 样品中进一步除去苯酚、蛋白、去污剂及乙醇。
- 2) 供试 DNA 过量: 每 100 μ l 的感受态细胞悬液加 1-10ngDNA 的溶液。DNA 样品体积超过总体积的 10%。
- 3) 不完全的连接反应混合物: 应该用最佳的连接反应物。在转化反应中, 人工重组的质粒载体的转化效率要比超螺旋的质粒 DNA 的效率约低 10 倍。
- 4) 连接反应混合物抑制转化: 在与感受态细胞混合之前, 用 10mM Tris-HCl (PH7.5) 和 1mM EDTA 稀释连接反应混合液 5 倍。
- 5) 抗生素抗性的表达不足: ①用 S. O. C 平板代替 LB 平板: 实验表明, 用 S. O. C 平板比用 LB 平板的转化效率高 2—3 倍; ②若选用四环素抗性基因及启动子为选择标记, 那么质粒转化的细胞至少应在非选择培养基中生长 30 分钟, 以表达足够的抗性蛋白, 使细胞在含四环素的平板上以最高效率形成菌落。③如用氨苄青霉素筛选, 转化细胞必须稀释后再涂布。否则抗性菌落周围的一些菌落也会生长。用 50—100ug/ml 羧苄青霉素可减轻这一问题。
- 6) 感受态细胞贮存的不适当: ①不论是商品细胞还是实验室制备的, 都应贮于 -70℃ 处, 但不要贮于液氮中; ②减少解冻的次数。通常细胞样品以小体积包装, 解冻后立即一次性使用, 剩余的不再冷冻备用; ③在干冰/乙醇浴中快速冷冻感受态细胞。
- 7) 热冲击过程不适当: 不同的商品细胞及实验室制备的感受态细胞对热冲击时间的要求略有不同, 可根据具体情况进行摸索, 转化反应所用的容器及细胞体积不同, 最佳的热冲击条件也不同。根据预备实验, 固定菌株小管型号、反应体积及热激的最适温度和时间。如改变了管子型号和反应体积, 就应重新调整温度和时间。

2. 重组质粒转化于大肠杆菌, 接种到含有抗生素的平板培养基中, 能生长, 但接种到含同样抗生素的液体培养基中, 无细菌生长

可能存在的原因和解决方法:

- 1) 接到平板培养基上成功生长的菌种太少, 长出的菌未必是转化进载体的大肠杆菌, 可以做牙签法质粒抽提, 跑电泳看是否成功转化。
- 2) 往液体培养基接种时量太少没接上: 重新接种。
3. 采用冻融转化法进行质粒转化试验, 阳性对照长有单菌落, 对照用质粒是别人的质粒, 大小和我的质粒差不多, 说明感受态是没问题, 质粒是新提的, 电泳检

测有两条带，都很亮，质粒已经 PCR，酶切检测过了，均出带，做了 3 次，结果都是不长，平板也换过，是卡纳抗性，用别人的板也不长。

可能存在的原因和解决方法：

1) 加大转化质粒的量。

2) 质粒本身的问题，该质粒有可能编码产生对该细菌有致命损害的物质，因此有必要再查阅相关文献看看别人是怎么做的，以及用的什么菌种。

分子生物学实验常见问题分析及对策-19

质粒的提取中常出现的问题

1、 质粒提取不成功的原因

(1) 裂解时间太长。加入溶液 P2 后裂解时间不应超过 5 分钟。

(2) 吸附时间不够

(3) 溶解时间不够

(4) 大肠杆菌老化。建议涂布平板培养后，重新挑选新菌落进行液体培养。

(5) 质粒拷贝数低。由于使用低拷贝数载体引起的质粒 DNA 提取量低，可更换具体相同功能的高拷贝数载体。

(6) 菌体中无质粒。有些质粒本身不能在某些菌种中稳定存在，经多次转接后有可能造成质粒丢失。例如，柯斯质粒在大肠杆菌中长期保存不稳定，因此不要频繁转接，每次接种时应接种单菌落。另外，检查筛选用抗生素使用浓度是否正确。碱裂解不充分。使用过多菌体培养液，会导致菌体裂解不充分，可减少菌体用量或增加溶液 P1、P2 和 P3 的用量。对低拷贝数质粒，提取时，可加倍使用溶液 P1、P2 和 P3，可能有助于增加质粒提取量和质料质量。

(7) 溶液使用不当。溶液 P2、P3 在温度较低时可能出现浑浊，应置于 37℃ 保温片刻直至溶解为清亮的溶液，才能使用。

(8) 吸附柱过载。不同产品中吸附柱吸附能力不同，如果需要提取的质粒量很大，请分多次提取。若用富集培养基，例如 TB 或者 ×YT，菌液体积必须减少；若质粒或宿主菌是非常高的拷贝数或生长率，则需调整 LB 培养液体积。

(9) 质粒未全部溶解。洗脱溶解质粒时，可适当加温或延长溶解时间。

(10) 乙醇残留。漂洗液洗涤后应离心尽量去除残留液体，树脂型试剂盒漂洗后应晾干树脂，再加入洗脱缓冲液。

(11) 洗脱液加入位置不正确。洗脱液应加在硅胶膜中心部位以确保洗脱液会完全覆盖硅胶膜的表面达到最大洗脱效率。

(12) 洗脱液不合适。DNA 只在低盐溶液中才能被洗脱，如洗脱缓冲液 EB (10 mM Tris·Cl, pH8.5) 或水。洗脱效率取决于 pH 值。最大洗脱效率在 pH7.0~8.5 间。当用水洗脱时确保其 pH 值在此范围内，如果 pH 过低可能性导致洗脱量低。洗脱时将灭菌蒸馏水或洗脱缓冲液加热至 60℃ 后使用有利于提高洗脱效率。

(13) 洗脱体积太小。洗脱体积对回收率有一定影响。随着洗脱体积的增大回收率增高, 但产品浓度降低。为了得到较高的回收率可以增大洗脱体积。

(14) 混有蛋白。不要使用过多菌体。溶液 P1、P2、P3 处理并离心后溶液应为澄清的, 如果还混有微小蛋白悬浮物, 可再次离心去除后再进行下一步骤。

DNA 电泳中常出现的问题

1、 提大肠杆菌质粒后跑琼脂糖凝胶电泳无条带出现

在确定琼脂糖凝胶电泳无问题的前提下, 那应该就是质粒提取有问题。首先看质粒是高拷贝还是低拷贝的质粒, 一般低拷贝的质粒 5ml 的, 高拷贝的质粒 2-3ml 小剂量提取。量不能过大, 否则影响提取。第二点, 加入裂解液如 SDS-NaOH 后, 时间不宜超过 5min, 因为此步骤的目的是使细胞内物质释放, 蛋白质, 染色体 DNA 和质粒 DNA 变性, 时间过长, 会导致加入中和裂解液如酸性醋酸钾后, 仍无法使质粒 DNA 复性。导致提取失败。

2、 电泳无条带的原因

(1) 上样量太小。解决方案是增加上样量。

(2) 样品分子量不在胶允许范围内。建议另外配置合适的胶。

(3) 提取不干净或缓冲液有问题。

(4) 菌的问题, 菌种是否正确, 有没有确信加了抗生素, 质粒拷贝数高不高, 菌量够不够然后提取的时候, 试剂盒牌子质量过不过硬, 有没有过期, 裂解是不是完全, 会不会 SDS 或者高盐都结晶沉淀了, 所有溶液有没有加错, 比如说柱分离, 漂洗液里面有没有确信加了酒精, 洗脱时候洗脱液假如用的是纯水, 有没有调过 pH 值, 加的量够不够, 有没有完全浸润硅胶膜。

(5) 最后跑电泳的时候, 有没有确信加了 EB, 加的样品量有多少, 有没有增加样品量看看。

3、 marker 条带非常模糊, 无法辨别具体条带的原因

(1) marker 条带出现了降解。请确保在使用过程中避免核酸酶污染;

(2) 电泳缓冲液陈旧。电泳缓冲液多次使用后, 离子浓度降低, pH 值上升, 缓冲能力减弱, 从而影响电泳效果, 建议经常更换电泳缓冲液;

(3) 电泳条件不合适。电泳时电压应不超过 20V/cm, 温度应低于 30℃;

(4) marker 上样量过多。请根据说明书选用合适上样量;

(5) 凝胶质量不好。建议使用质量较好的琼脂糖; 此外, 凝胶凝固不均匀也会导致条带模糊。

DNA 回收中常出现的问题

1、 没有回收 DNA 片段

如在洗脱后, 发现洗脱液中没有 DNA 片段, 请检查是否按瓶身标签, 在洗涤液中加入

入了无水乙醇。

2、 提取率低

(1) 融胶液为酸性缓冲液, 如融胶后, 其 pH 值升高将影响提取得率. 请加入 0.1 倍体积

的 3M 乙酸钾 (pH5.0).

(2) 长时间使用后没有更换的电泳缓冲液, 其 pH 值较高, 将影响 DNA 的吸附. 请更换新

的电泳缓冲液后, 再进行电泳, 然后切胶.

(3) 在洗脱前, 将洗脱液于 30~60℃ 温浴, 可提高提取效率.

3、回收得片段为什么电泳上样会漂起来?

主要问题是纯化过程中的乙醇没有除干净。

4、胶很难融如何处理?

将融胶问题提高到 60 度; 可能是胶的浓度太高, 需要提高融胶液的体积; 融胶过程中每隔一段时间就震荡几下帮助融胶。

5、如果胶在后续过程发生胶没有彻底融化, 如何补救?

补加融胶液, 将胶悬起来, 50-60 度继续保温至彻底融化。

6、如果 DNA 纯化的得率非常低或根本没有, 估计是什么问题?

一点都不能得到产物的回收情况很少见, 有些情况是判定回收效率的方式不对。如: 对, 请检查一下 Wash 中有没有加入酒精; 检查加入的 DNA 结合剂 (Solution S 或 Solution SN) 的量对不对; 洗脱前有没有将残留得酒精去彻底; 洗脱液有没有使吸附材料充分接触 (洗脱), 接触的时间是否充分。

7、用 Ez-Resin 如果凉干过头, 如何处理?

答: 加 TE, 50-60 度处理 10 分钟, 间或振荡, 离心收集上清。

外源质粒对大肠杆菌的转化中常出现的问题

1、大肠杆菌经质粒转化后铺板生长菌落大小不一

转入空载质粒、含有插入的 DNA 片段、以及少量具有抗性的菌落在选择培养基上受到的选择压不同, 生长速率不一。

2、没有或极少量菌落

(1) 感受态细胞效率低: 使用转化效率高于 10^7 cfu/mg 的感受态

(2) PCR 产物量不足: 电泳定量, 浓缩 PCR 产物

(3) 抗生素用错或浓度过高

分子生物学实验常见问题分析及对策-20

质粒的提取常见问题与对策

Q1: 提质粒没有明显的沉淀, 能说明是没有提出来吗? 跑完电泳还是没有条带能证明质粒没提出来吗?

A: 提质粒的时候没有明显的沉淀, 也有可能是由于你加的乙醇量少或异丙醇量不足或质量有问题。或者质粒太少了难以用肉眼看出。跑完电泳还是没有条带也有可能是跑胶时配置胶出问题, 或染色剂不够, 或者你加的质粒量少。要具体情况再分析

Q2: 质粒条带很暗而且通常只有一条带是什么问题?

A: 没有用试剂盒提取的话可能考虑技术问题。如果常做质粒的提取, 且用的是试剂盒, 还出现这种情况, 就要从质粒本身着手考虑了: 首先做个 PCR 鉴定一下, 确保有质粒的情况下, 很可能质粒是低拷贝的, 如此就要用大量的细菌来提取质粒。

一般的用可以用水煮法提 (1ml 菌液离心, 沉淀加 50 μ l DEPC 水, 100 度水煮 3-4 分钟, 离心取上清液, 含有大量的质粒) 用 1-2 μ l 作为模板跑 PCR 效果很好。

Q3: 用分光光度计测得的质粒浓度很高, 但是跑出来的电泳却看不到条带, 这是什么原因?

A: 三种可能:

- 1) 可能 EB 有问题, 应同时检查同一块胶上其它样品是否有条带。
- 2) 计算 OD260/280 比例, 有可能为蛋白污染所致。
- 3) 稀释后上样的浓度过低。

Q4: 提质粒电泳显示应该几条带? 哪种情况较好?

A: 质粒在电泳时会出现三种情况的图谱:

- 1) 三条带, 按照电泳泳动速度 (快到慢) 排列为: 超螺旋、缺口闭环、开环。经常会出现。
- 2) 两条带, 超螺旋/闭环/开环 任意两种。
- 3) 一条带, 超螺旋。

至于那种情况好, 要看我们进一步实验的目的了。

- 1) 进行分子克隆的操作, 构建载体。这随便那种情况都可以, 不会影响你的后续实验。所以在这种情况下, 没必要评比谁好谁不好。
- 2) 进行细胞转染。因为转染必须要超螺旋, 所以它们的质量好坏顺序是: 3)、2)、1)。

Q5: 如何降低质粒变性超螺旋的含量?

A: 理论上, 用碱裂解法抽提质粒, 变性超螺旋的出现是不可避免的。之所以大家没有非常在意, 一是因为它的存在似乎对酶反应没有任何影响, 二是因为它的含量并不一定高到被用电泳观察到。抽提使用相对过剩的溶液, 在加入溶液 II 后, 体系能在 1 分钟内变澄清, 再快速加入溶液 III, 这样基本上能将变性超螺旋的出现控制在电泳看不见的水平。(变性超螺旋电泳时比正常超螺旋跑得快一点点。)

Q6: 质粒大小如何在电泳中的鉴定?

A: 1. 从细菌中大量提取的质粒电泳时, 不一定均出现三条带, 有时会出现两条, 甚至一条(一般是超螺旋的质粒), 这跟上样量也有些关系。出现不同的结果都是由抽提质粒时的操作手法造成的。如果严格按照操作步骤, 超螺旋的质粒会较多。
2. 酶切将质粒线性化以后, 才可以用 marker 判断大小。如果有三种构像, 可以用中间那条带与 marker 比较判断大小。
3. 商品化的质粒估计应该大部分是超螺旋构像。
4. 酶切后线性化条带电泳时所处的位置就指示质粒的大小。

Q7: 首次进行小量制备质粒时, 有时会发现质粒 DNA 不能被限制酶所切割是为什么?

A: 这几乎总是由于从细菌沉淀或从核酸沉淀中去除所有上清液时注意得不够。大多数情况下, 用酚: 氯仿对溶液进行抽提可以去除小量备物中的杂质。如果总是依然存在, 可用离心柱层析纯化 DNA。

Q8: 大提质粒产量低的原因是什么?

A: 大体积摇菌时, 注意培养基最多只能占摇瓶体积的 1/4, 单纯地增加摇速是没有用的。另外, 加溶液 I 裂解时, 要注意充分裂解。你的溶液 II 加入后, 溶液没有澄清, 说明一是菌体没有裂解好, 二是溶液 II 的酸碱度有问题或者其他原因。在溶液 II 没有完全澄清的情况下, 加入溶液 III, plasmid 就会包裹在基因组的粘团之中, 随沉渣一起被沉淀下来。不信你把沉渣再加入溶液 II 和 III, 会再提出一部分质粒出来。建议可使用 Kit 以提高质粒产量。

Q9: 小提质粒的产量很高, 但大提的产量不高, 如何注意大提质粒的手法和细节?

A: 1. 溶液 1, 5ml; 溶液 2, 10ml; 溶液 3, 7.5ml

2. 加溶液 2 后，缓慢颠倒数次，见到蛋清样液体挂在离心管壁上，开离心管盖后，有拉丝现象。
3. 异丙醇后，烤沉淀的时间不宜太长，质粒烤得太干，一是有损失，二是难溶。
4. 加 TE 溶解质粒时，如果 30 分钟后还不溶，可能是 TE 中，质粒达到过饱和，补加适量的 TE 即可

Q10: 超过 10K 的质粒转化要注意什么问题？

A: 选择高效转化效率的感受态细胞，DH5a 可以做为较大质粒的宿主菌。

Q11: 沉淀质粒 DNA 的方法有哪些？可以用什么代替无水乙醇？

A: 用无水乙醇沉淀 DNA，这是实验中最常用的沉淀 DNA 的方法。乙醇的优点是可以任意比和水相混溶，乙醇与核酸不会起任何化学反应，对 DNA 很安全，因此是理想的沉淀剂。一般实验中，是加 2 倍体积的无水乙醇与 DNA 相混合，其乙醇的最终含量占 67% 左右。因而也可改用 95% 乙醇来替代无水乙醇（因为无水乙醇的价格远远比 95% 乙醇昂贵）。但是加 95% 的乙醇使总体积增大，而 DNA 在溶液中有一定程度的溶解，因而 DNA 损失也增大，尤其用多次乙醇沉淀时，就会影响收得率。折中的做法是初次沉淀 DNA 时可用 95% 乙醇代替无水乙醇，最后的沉淀步骤要使用无水乙醇。也可以用 0.6 倍体积的异丙醇选择性沉淀 DNA。一般在室温下放置 15—30 分钟即可。

Q12: 加核糖核酸酶降解核糖核酸后，需不需要再用 SDS 与 KAc 来处理？为什么？

A: 需要。加进去的 RNase 本身是一种蛋白质，为了纯化 DNA，又必须去除之，加 SDS 可使它们成为 SDS-蛋白复合物沉淀，再加 KAc 使这些复合物转变为溶解度更小的钾盐形式的 SDS-蛋白质复合物，使沉淀更加完全。也可用饱和酚、氯仿抽提再沉淀，去除 RNase。在溶液中，有人以 KAc 代替 NaAc，也可以收到较好效果。

Q13: 在保存或抽提 DNA 过程中，一般采用什么缓冲液？为什么？

A: 采用 TE 缓冲液。在基因操作实验中，选择缓冲液的主要原则是考虑 DNA 的稳定性及缓冲液成分不产生干扰作用。磷酸盐缓冲系统 ($pK_a=7.2$) 和硼酸系统 ($pK_a=9.24$) 等虽然也都符合细胞内环境的生理范围 (pH)，可作 DNA 的保存液，但在转化实验时，磷酸根离子的种类及数量将与 Ca^{2+} 产生 $Ca_3(PO_4)_2$ 沉淀；在 DNA 反应时，不同的酶对辅助因子的种类及数量要求不同，有的要求高离子浓度，

有的则要求低盐浓度，采用 Tris-HCl (pKa=8.0) 的缓冲系统，由于缓冲液是 TrisH⁺/Tris，不存在金属离子的干扰作用，故在提取或保存 DNA 时，大都采用 Tris-HCl 系统，而 TE 缓冲液中的 EDTA 更能稳定 DNA 的活性。如下游有特殊需要也可用水保存 DNA。

Q14: 如何选择聚乙二醇 (6000) 的浓度来沉淀 DNA?

A: 采用 PEG (6000) 沉淀 DNA，大小不同的 DNA 分子所用的 PEG 的浓度也不同，PEG 的浓度低，选择性沉淀 DNA 分子量大，大分子所需 PEG 的浓度只需 1% 左右，小分子所需 PEG 浓度高达 20%。本实验选择性沉淀 4.3kb 的 pBR322 质粒 DNA，每毫升加入 0.4 毫升的 30% PEG，其最终 PEG 浓度为 12%。PEG 选择性沉淀 DNA 的分辨率大约 100bp。

Q15: 用酚与氯仿抽提质粒 DNA 时，还要加多少量的异戊醇?

A: 在抽提质粒时，为了混合均匀，必须剧烈振荡容器数次，这时在混合液内易产生气泡，气泡会阻止相互间的充分作用。加入异戊醇能降低分子表面张力，所以能减少抽提过程中的泡沫产生。一般采用氯仿与异戊醇为 24:1 之比。也可采用酚、氯仿与异戊醇之比为 25:24:1 (不必先配制，可在临用前把一份酚加一份 24:1 的氯仿与异戊醇即成)，同时异戊醇有助于分相，使离心后的上层水相，中层变性蛋白相以及下层有机溶剂相维持稳定。

Q16: 为了提高质粒的转化效率，实验中要考虑几个重要因素?

A: 1. 细胞生长状态和密度: 不要用经过多次转接或储于 4℃ 的培养菌，最好从 -70℃ 或 -20℃ 甘油保存的菌种中直接转接用于制备感受态细胞的菌液。细胞生长密度以刚进入对数生长期时为好，可通过监测培养液的 OD₆₀₀ 来控制。DH5α 菌株的 OD₆₀₀ 为 0.5 时，细胞密度在 5×10⁷ 个/ml 左右 (不同的菌株情况有所不同)，这时比较合适。密度过高或不足均会影响转化效率。

2. 质粒的质量和浓度: 用于转化的质粒 DNA 应主要是超螺旋态 DNA (cccDNA)。转化效率与外源 DNA 的浓度在一定范围内成正比，但当加入的外源 DNA 的量过多或体积过大时，转化效率就会降低。1ng 的 cccDNA 即可使 50 μl 的感受态细胞达到饱和。一般情况下，DNA 溶液的体积不应超过感受态细胞体积的 5%。

3. 试剂的质量: 所用的试剂，如 CaCl₂ 等均需是最高纯度的 (GR. 或 AR.)，并用超纯水配制，最好分装保存于干燥的冷暗处。

4. 防止杂菌和杂 DNA 的污染: 整个操作过程均应在无菌条件下进行，所用器皿，如离心管，tip 头等最好是新的，并经高压灭菌处理，所有的试剂都要灭菌，且注

意防止被其它试剂、DNA 酶或杂 DNA 所污染，否则均会影响转化效率或杂 DNA 的转入，为以后的筛选、鉴定带来不必要的麻烦。

Q17: 质粒抽提的关键性控制因素有哪些？

A: (1) 摇菌时间——过夜培养是一个普遍接受的概念，而且适合大部分情况。如果出现了问题，调整培养时间会有帮助：Nick 多，则增加培养时间；酶切出现问题，则减少培养时间。

(2) 起始菌体量——不仅只是“从多少 ml 菌液中抽提质粒”，一定要养成每次都观察菌体量的习惯，因为质粒毕竟是在菌体中，而且，抽提质粒所用的试剂量，都只与菌体量有关。

(3) 菌体的彻底悬浮——如果没有彻底悬浮菌体，则残留的菌体团块在溶液 II 加入后，变成一个外围几乎彻底裂解，往里不完全裂解，中间没有裂解的团块。这个团块在溶液 III 加入后，会有一部分蛋白质继续存在于溶液中，成为蛋白质残留的最大根源。

(4) 使用相对过量的试剂——这是适合所有核酸抽提的建议。试剂相对过量的好处是：稳定性好，纯度高，操作更简单。如果认为这样不经济，就少用一点菌体。

(5) 裂解时间——加入溶液 II 后，混匀，体系最好能立即变得清澈。体系如果变得清澈了，马上加入溶液 III 中和。如果体系不马上变清澈，下次少用一点菌液，或者多用一点溶液。如今的质粒设计得越来越复杂了，奇怪的现象也越来越多，而所有的奇怪现象，多与裂解时间有关。

(6) 中和的操作——在 1.5ml 离心管中加入溶液 III 后，先颠倒两次，使管底朝上，用指头弹击管底数次，再颠倒混匀。效果非常好。

(7) 中和后的离心去蛋白——一定要将蛋白质彻底离心下去。如果发现离心后仍然有蛋白质漂浮在液面，继续离心的效果并不好；而将上清倒入另外一个离心管中，再离心，效果要好许多。

Q18: 用碱法大提质粒最后误用的 10 倍 TE 溶解沉淀，对质粒有影响吗？如何补救？

A: 离子浓度可以影响 DNA 的稳定性，时间长了会导致 DNA 断裂等。离子浓度过大可能会影响下游的操作，当然这只是可能；简易将质粒重新沉淀一下：加 1/10 体积 3M pH5.2 的醋酸钠、2 倍体积的无水乙醇沉淀即可，这一步还有纯化作用，当然也可以重新离心，再换水溶解或 1 倍 TE 溶解。

Q19: 如何降低 RNA 残留？

A: RNA 的去除，首先是使用 RNase 消化。在溶液 I 中加入高浓度的 RNase A

(100ug/ml), 或者用含 25ug RNase A/ml TE 溶解抽提好的质粒, 都可以降低 RNA 残留, 但都不能彻底去除。幸运的是, RNA 的残留并不影响酶切等最常用的用途。如果想彻底去除 RNA 残留, 可以用试剂盒, 或者使用对 4 个碱基都作用的 RNase。

Q20: 如何降低 gDNA 残留?

A: gDNA 的残留问题, 必须在抽提过程中解决, 否则, 就只能用胶回收方法处理了。gDNA 越大, 越难于复性, 也就越容易被去除; 所以, 一定要尽可能不打断 gDNA。裂解体系越粘稠, gDNA 越容易被扯断; 操作手法越重, gDNA 也越容易被打断。温和操作, 使用相对过剩的试剂, 是降低 gDNA 残留的最好方法。

Q21: 如何降低蛋白质残留?

A: 蛋白质的去除, 主要是靠不溶解的 K-SDS-蛋白质复合物的形成。虽然将中和后的体系置于 4℃ 一段时间, 可以形成更多的该不溶复合物, 从而使蛋白质残留更少, 但实践证明这样做并不是必须的, 除非是大量抽提。只要加入溶液 I 后的悬浮, 加入溶液 II 后的裂解及加入溶液 III 后的中和是均匀彻底的, 蛋白质的残留就应该在可以满足实验要求的水平; 而只有溶液的用量足够, 甚至过剩, 才能确保裂解和中和是彻底的。当然, 试剂盒及苯酚的使用, 是可以更进一步降低蛋白质的残留的。

Q22: 如何降低质粒 Nick ?

A: 细菌收获时间, 菌株的选择, 抽提操作的剧烈程度是影响 Nick 的三个主要因素。细菌收获过早, 质粒还在复制过程中, Nick 的比例较高; 过晚, 细菌开始死亡, 杂质会比较多。如果使用胞内酶含量很高的宿主菌, 会出现较高比例的 Nick。加入溶液 II 及加入溶液 III 的混匀操作, 也可以导致一些 Nick, 但影响不会比前两者大。

DNA 电泳及回收常见问题及对策

Q1: 为什么 DNA 及 marker 条带非常模糊, 无法辨别具体条带?

A: 出现上述情况, 可能有以下几个原因:

1. DNA 条带出现了降解。请确保在使用过程中避免核酸酶污染;

2. 电泳缓冲液陈旧。电泳缓冲液多次使用后，离子浓度降低，pH 值上升，缓冲能力减弱，从而影响电泳效果，建议经常更换电泳缓冲液；
3. 电泳条件不合适。电泳时电压应不超过 20V/cm，温度应低于 30℃；
4. DNA 上样量过多。请根据说明书选用合适上样量；
5. 凝胶质量不好。建议使用质量较好的琼脂糖；此外，凝胶凝固不均匀也会导致条带模糊。

Q2: 为什么 DNA 及 marker 条带出现不规则的条带（如哑铃状等）？

A: 出现上述情况，多与以下几个原因有关：

1. 电泳缓冲液陈旧。老化的电泳缓冲液离子浓度降低，pH 值上升，缓冲能力减弱，从而影响电泳效果，建议经常更换电泳缓冲液；
2. 电泳条件不合适。电泳时电压应不超过 20V/cm，电压太高可能也会导致条带出现不规则现象。此外，凝胶质量差以及凝胶冷却时凝固不均匀也会导致该现象出现。

Q3: 为什么 DNA 及 marker 条带非常弱或者根本没有条带？

A: 出现上述情况可能是：

1. 上样量较低，可适当增加上样量；
2. 凝胶质量较差或凝胶凝固不均匀也会导致电泳条带弱或根本没有条带；
3. 电泳时间过长导致条带跑出凝胶，可缩短电泳时间，降低电压，增加凝胶浓度。

Q4: 为什么 DNA 及 marker 缺带？

A: 对于含有较小片段的 marker，如果出现缺带现象，可能是因为：

1. 小条带跑出凝胶或分子量大小非常相近的条带不易辨认所致，可适当缩短电泳时间，降低电压，同时增加凝胶浓度；
2. 凝胶中 EB 含量过低，导致大片段结合 EB 量太少或没有，在紫外光下亮度太低，可适当增加 EB 用量。

Q5: DNA 电泳切胶回收需要注意什么问题？

A: 1. 电泳的 buffer 和 gel 都是新制的，切胶的台子清理干净，刀片最好洗净灭菌，总之一句话就是保证切下的带没有外源 dna 污染。

2. 切胶是要把整个目的片段所在位置的胶全部回收。为了减少胶的体积，可以用相对比较薄的胶来做，只要够点样即可，也可采用薄而宽的梳子来跑胶。

3. 关于防护，在一般有机玻璃后就足够了，戴上防护面具以保护眼睛，如果你戴树脂眼镜就可以了。要是非常害怕紫外照射，或者对于胶有特殊要求，例如要求不含 EB，你可以采用点 marker 和带刻度的尺子一起照相的方法来确定目的条带在胶上的位置进行切胶。

按照正常程序点 marker 跑胶，然后切下有 marker 的胶，EB 染色，紫外灯下与带刻度的尺子一起照相。由于要回收的带与 marker 间的相对位置已知，根据尺子来衡量未染色胶上目的带的位置即可。如果觉得很难判断，可以直接在 marker 边点少量的样，这样位置就容易确定了。

外源质粒对大肠杆菌的转化常见问题及对策

Q1: 连接反应后转化效率很低或阳性克隆非常少是什么原因？

A: 1) 可能感受态细菌转化效率太低，用质粒作为阳性对照同时检测感受态的转化效率。

2) 可以尝试提高载体或插入片段的纯度。对于平端连接需注意适当延长连接时间。

3) 可能载体酶切不够充分，用未经连接的载体转化作为阴性对照。

4) 用存放 DNA 的溶液进行转化，作为阴性对照，检测感受态细菌是否存在问题。

Q2: 转化后没有或极少量菌落是什么原因？

A: (1) 感受态细胞效率低：使用转化效率高于 10^7 cfu/mg 的感受态。

(2) 连接酶失效：2x 快速连接反应体系应于 -20°C 保存；用时于冰上融解，使用前需充分混匀；每次用量少应适量分装。

(3) PCR 产物加 A 比例过低：使用高保真 DNA 聚合酶扩增的产物需进行加 A 处理；PCR 产物如不能及时连接，应于 -20°C 保存 ≤ 2 周。

(4) PCR 产物量不足：电泳定量，浓缩 PCR 产物。

(5) PCR 产物中含有阻碍 TA 连接反应的杂质：脱盐纯化（电转化必须做！）

(6) UV 照射过久导致 PCR 产物变性：切胶动作要快，尽量缩短 UV 照射时间。

(7) 载体 3' 末端 T 降解：EZ-T 载体应于 -20°C 保存；每次用量少应适量分装。

(8) 抗生素用错或浓度过高：使用 Amp 终浓度为 100 mg/ml 的琼脂糖平板。

Q3: 重组质粒转化于大肠杆菌，接种到含有抗生素的平板培养基中，能生长，但接种到含同样抗生素的液体培养基中，无细菌生长可能存在的原因和解决方法？

A: 1) 接到平板培养基上成功生长的菌种太少, 长出的菌未必是转化进载体的大肠杆菌, 可以做做牙签法质粒抽提, 跑电泳看是否成功转化。

2) 往液体培养基接种时量太少没接上: 重新接种。

分子生物学实验常见问题分析及对策-21

一, 蓝白斑筛选

此类载体携带 lacZ' 基因, 它编码 β -半乳糖苷酶的 N-末端 (α -肽), 并且处于可被安慰诱导物 IPTG (异丙基硫代半乳糖苷, 与乳糖结构类似但不能被 β -半乳糖苷酶降解) 诱导的启动子调控之下。质粒转化的宿主菌为 LacZ Δ M15 基因型 (含有编码 N-末端缺陷型的 β -半乳糖苷酶多肽的基因)。未重组的质粒转化宿主菌后, 在 IPTG 的诱导下, 质粒与基因组分别表达缺陷但可以相互补偿的两个肽 (即 α -互补), 形成了有功能的 β -半乳糖苷酶, 该酶能把培养基中无色的 X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷) 底物分解成半乳糖和深蓝色的 5-溴-4-氯-靛蓝。然而当外源 DNA 插入质粒位于 α -肽编码序列中的多克隆位点时, 由于破坏了 α -肽的阅读框架, 因而不能表达出与宿主菌基因组表达的缺陷型 β -半乳糖苷酶多肽发生 α -互补。由于没有 β -半乳糖苷酶的酶解作用, 致使重组菌形成白色菌落。由此, 可以借助蓝白斑很容易筛选出重组子。

不过实际操作中发现当插入小片段时, 重组子也有形成浅蓝斑的情况。即蓝色菌斑也有可能含外源基因。据最新报道, 大概有 30% 的假阴性。若形成的白斑很多, 但仍不是阳性克隆, 需仔细检查你的质粒载体和目的片段连接转化时间温度控制好 避免载体自连并且排除你的酶切插入位点等没有出现设计问题

还有, 进行蓝白斑筛选时, 平板上没有菌生长, 可能由于操作和试剂用量有关如不同的公司试剂用量要求并不一样。有以下建议:

(1) 先将 IPTG 和 X-gal (两者可混合) 涂于 Amp 板上, 将平皿正置放于 37 度约 30min, 待 IPTG 和 X-gal 完全吸收后, 再将 (连接体系转化大肠杆菌感受态细胞, 加入 LB 培养 1 小时所得的) 菌体涂板。

(2) 可以先涂 IPTG 和 X-gal, 也可以和菌液一起涂, 但要主意一点 IPTG 浓度不能太高, 因为他对菌体是有毒性的。实验结果是没有长菌, 应该不是筛选的问题, 而是其他的问题, 如果有相应的对照, 比如检验感受态活力等就比较好分析了。

(3) 另一做法一般是把 Amp、X-gal、IPTG 在倒平板时就加入固体 LB 培养基中, 如果是涂板时现加, 如果浓度合适应该也没问题的。不长菌有很多原因的, 或者 Amp 浓度过高, 或者细胞全死了..... 建议下次做个连接 PCR 检测后确定连接没问题, 然后转化 (化转 90 秒热激) 时加上阴性、阳性对照。按上面的方法试试, 严格按操作步骤进行, 肯定没问题。

若用 T 载体连接, 有时会出现蓝白斑, 但有时出现全是白斑。

原因:

1) X-gal 涂得不够或 IPTG 加得不够, 因为大肠杆菌的有些菌株如 JM109, 其 LacI (B-半乳糖苷酶的调节基因) 是突变型的, 即为 lacI_q, 相对野生型 (如 DH5a) 的 LacI 来说, 其对乳糖操纵子的抑制要强 10 倍。

2) 显色的时间可能不够, 延长时间或放入低温冰箱可加强显色。

3) 连接产物里面空载的载体本来就极少, 这可能是主要原因。

T 载体的制备实际上通过酶切和加 T 的酶反应得来的, 由于酶反应不可能 100% 向单方向彻底进行, 所以在 T 载体试剂中总是有未切开的环状载体分子和线性未加 T 的载体分子存在的, 在连接反应进行时, 这些线性载体分子又会环化, 转入细菌, 产生蓝色菌落。所以在连接转化的细胞中肯定是有蓝色菌落的。

但有时涂板培养后, 却看不见有蓝色菌落, 实际上是一种假象, 以为 100% 有插入子。为什么说是一种假象呢?

这与 T 载体质量有关, 某批次的 T 载体或某些公司的载体制备纯化好, 空载的分子本来就少, 况且我们进行实验时目的片段往往过量, 所以连接产物中重组分子占绝大多数, 转化细胞当然蓝色的所占比例极少极少, 一般只涂一个或两个平板, 蓝色的菌落被涂的可能性极低, 故好像全是白色菌落了。如果将所有细胞都涂的话, 且不能涂得过密, 肯定会有蓝色菌落的出现。

二, southern 杂交

Southern 印迹杂交是进行基因组 DNA 特定序列定位的通用方法。一般利用琼脂糖凝胶电泳分离经限制性内切酶消化的 DNA 片段, 将胶上的 DNA 变性并在原位将单链 DNA 片段转移至尼龙膜或其他固相支持物上, 经干烤或者紫外线照射固定, 再与相对应结构的标记探针进行杂交, 用放射自显影或酶反应显色, 从而检测特定 DNA 分子的含量

Southern 杂交可用来检测经限制性内切酶切割后的 DNA 片段中是否存在与探针同源的序列, 它包括下列步骤:

- (1) 酶切 DNA, 凝胶电泳分离各酶切片段, 然后使 DNA 原位变性。
- (2) 将 DNA 片段转移到固体支持物 (硝酸纤维素滤膜或尼龙膜) 上。
- (3) 预杂交滤膜, 掩盖滤膜上非特异性位点。
- (4) 让探针与同源 DNA 片段杂交, 然后漂洗除去非特异性结合的探针。
- (5) 通过显影检查目的 DNA 所在的位置。

Southern 杂交能否检出杂交信号取决于很多因素, 包括目的 DNA 在总 DNA 中所占的比例、探针的大小和比活性、转移到滤膜上的 DNA 量以及探针与目的 DNA 间的配对情况等。在最佳条件下, 放射自显影曝光数天后, Southern 杂交能很灵敏地检测出低于 0.1pg 与 32 P 标记的高比活性探针的 (>10⁹ cpm/μg) 互补 DNA。如果将 10 μg 基因组 DNA 转移到滤膜上, 并与长度为几百个核苷酸的探针杂交, 曝光过夜, 则可检测出哺乳动物基因组中 1kb 大小的单拷贝序列。

将 DNA 从凝胶中转移到固体支持物上的方法主要有 3 种: (1) 毛细管转移。本方法由 Southern 发明, 故又称为 Southern 转移 (或印迹)。毛细管转移方法的优点是简单, 不需要用其他仪器。缺点是转移时间较长, 转移后杂交信号较弱。(2) 电泳

转移。将 DNA 变性后,可电泳转移至带电荷的尼龙膜上。该法的优点是不需要脱嘌呤/水解作用,可直接转移较大的 DNA 片段。缺点是转移中电流较大,温度难以控制。通常只有当毛细管转移和真空转移无效时,才采用电泳转移。(3) 真空转移。有多种真空转移的商品化仪器,它们一般是将硝酸纤维素膜或尼龙膜放在真空室上面的多孔屏上,再将凝胶置于滤膜上,缓冲液从上面的一个贮液槽中流下,洗脱出凝胶中的 DNA,使其沉积在滤膜上。该法的优点是快速,在 30 分钟内就能从正常厚度(4-5mm)和正常琼脂糖浓度(<1%)的凝胶中定量地转移出来。转移后得到的杂交信号比 Southern 转移强 2-3 倍。缺点是如不小心,会使凝胶碎裂,并且在洗膜不严格时,其背景比毛细转移要高

主要操作步骤:

1. 琼脂糖电泳

(1) 取一定量的待测 DNA 样品,用适当的限制性内切酶酶切。DNA 的量根据样品的种类及实验目的的不同而异,对于克隆片段的限制性内切酶图谱分析,取 0.1-0.5 μg 即可;而对于鉴定基因组 DNA 中的单拷贝基因序列,则需要 10~20 μg ;当采用寡核苷酸探针或探针的比放射性活性较低时,则需要 30~50 μg 。

(2) 酶切完毕,在琼脂糖凝胶中电泳。

(3) 电泳结束后,EB 染色,长波紫外线下观察电泳结果及照相。

2. 印迹转移

(1) 切胶并作标记(左下角切除),以便于定位,然后将凝胶置于一容器中。

Southern 印迹杂交转膜示意图

(2) 将凝胶浸泡于适量的变性液中,室温下放置 1h 使之变性,不间断地轻轻摇动。

(3) 将凝胶用去离子水漂洗 1 次,然后浸泡于适量的中和液中 30 min,不间断地轻轻摇动。更换中和液,继续浸泡 15 min。

(4) 将滤纸,硝酸纤维素膜 NC 膜(以下简称 NC 膜)剪成与胶同样大小,NC 膜浸入转移 buffer 中平衡 30 min。

(5) 按右图操作:逐层铺平,各层之间勿留有气泡和皱折。

(6) 虹吸转移 12-16h。

3. 固定 DNA

(1) 取出转移后的 NC 膜,用滤纸吸干 NC 膜,NC 膜光面朝上平铺于变性液中变性 5min。

(2) 用相同的方法将 NC 膜平铺在中性液上,中和两遍,每遍 5min。

(3) 将膜夹在两张干燥滤纸间,80℃烘烤 1-2h。

4. 预杂交

(1) 将膜浸入 5×SSC 中 2min,将膜放入干净的塑料袋中。

(2) 将预杂交液事先在 65℃ 预热, 然后将 10 ml 预杂交液加入袋中, 封口。

(3) 65℃ 预杂交 1h 以上, 不时摇动。

5. 杂交

(1) 取出杂交袋, 剪去一角去除杂交液后, 加入 5ml 杂交液及 5 μ l 变性探针, 排除气泡后封口。

(2) 将杂交袋放入 65℃ 水中杂交过夜。

6. 按下列条件洗膜

2×SSC, 0.1%SDS 50ml 室温 5min /2 次

0.1×SSC, 0.1%SDS 50ml 65℃ 15min /2 次

7. 免疫酶联检测

(1) 偶联反应

①用中和液 洗膜 2min, 室温。

②用封闭液 50ml 洗膜 30min, 室温, 轻摇。

③用中和液将稀释抗体-Dig -Ap 至 750 mU/ml , 将膜封入杂交袋, 加入 5 ml 稀释抗体轻摇 50min。

④用中和液 50 ml 洗膜, 10min ×2 次, 室温, 轻摇, 除去未结合的抗体。

(2) 显色反应

①用平衡液 20 ml 平衡膜 2min。

②将膜装入杂交袋中, 加入 5ml 显色液, 避光 30min 左右, 当出现颜色时不要晃动。

③用 TE 洗膜终止反应。

④80℃烤干。

注意事项

1 要取得好的转移和杂交效果, 应根据 DNA 分子的大小, 适当调整变性时间。对于分子量较大的 DNA 片段 (大于 15kb), 可在变性前用 0.2M HCl 预处理 10min 使其脱嘌呤。

2 转移用的 NC 膜要预先在双蒸水中浸泡使其湿透, 否则会影响转膜效果; 不可用手触摸 NC 膜, 否则影响 DNA 的转移及与膜的结合。

3 转移时, 凝胶的四周用 Parafilm 蜡膜封严, 防止在转移过程中产生短路, 影响转移效率, 同时注意 NC 膜与凝胶及滤纸间不能留有气泡, 以免影响转移。

4 注意同位素的安全使用。

改进的 southern 方法

对 Harley 等创建的经典 Southern blotting 方法进行改进, 采用无放射污染的生物素标记的探针进行分子杂交, 建立了一种低背景显示端粒谱带的方法, 建立生物素标记探针杂交检测端粒 DNA 的方法, 关键是要得到低背景而高清晰度的杂交条带, 从而准确分析端粒 DNA 的长度。笔者通过多次试验发现, 有以下 3 方面值得注意。第一, 要保证大分子量基因组 DNA, 在 DNA 的抽提过程中, 操作要

缓慢轻柔，以防止大分子 DNA 断裂。其次，DNA 酶切要完全，消化时间要足够（37 °C 过夜），酶切产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离，在紫外灯下呈均匀瀑布样分布。第二，杂交条件也是影响实验结果的主要因素。但杂交条件包括许多方面，其中以凝胶处理、杂交液成分和杂交温度等为重要影响因素：（1）凝胶处理：由于制备和电泳过程中始终保持双链结构。为了有效实现 Southern 印迹转移，对凝胶做预处理十分必要。为了使 DNA 片段在合理的时间内从凝胶中移动出来，必须将最长的 DNA 片段控制在大约 2 Kb 以下，DNA 的大片段必须被打成缺口以缩短其长度。因此，通常是将凝胶用 0.25 mol/L 的 HCL 溶液短暂的脱嘌呤处理之后，移至于碱性溶液浸泡，使 DNA 变形并断裂形成较短的单链 DNA，这样产生的 DNA 片段可高效率地从凝胶上迅速转移。然而需特别注意的是防止脱嘌呤反应过甚，否则 DNA 断裂成过小的片段而不能有效地结合到固相支持物上，以 10~15 min 为宜（凝胶上的溴酚蓝变为黄色）。（2）Southern 印迹转移的固相支持物建议使用带正电荷尼龙膜，结合 DNA 能力更强。（3）杂交温度的确定：一般情况下是按照探针、靶基因和杂交液的特性确定合适的杂交温度，本研究杂交温度 55 °C 左右时效果较好，温度过低，杂交背景过深，温度高则探针与端粒 DNA 结合效率下降。

三、外源基因在大肠杆菌中的表达

大肠杆菌具有生长快速、生长周期短、安全性好、可以进行高密度培养和适合表达不同基因产物等特点，是许多外源基因表达系统中最好的一种，大量的有价值基因产物在大肠杆菌中获得了表达。

1 质粒拷贝数和质粒稳定性

质粒在细胞分裂过程中一般自由分布，没有选择压力时丢失率很低，一般为 10^{-5} ~ 10^{-6} 代。但是如果细胞含有的质粒拷贝数过高，或带有对宿主细胞有毒副作用的基因，以及以高密度或连续培养的方式培养工程菌时，质粒的丢失率可能会大大增加。克隆有外源基因的质粒载体转化到大肠杆菌受体细胞后，会产生一系列的生理效应，影响到重组质粒的稳定性。如带有重组质粒的大肠杆菌在培养过程中，由于的缺失、插入和重排导致重组质粒的结构不稳定，以及质粒的 par 功能区的破坏，重组质粒的不稳定是影响外源基因表达的主要问题之一，尽管人们采用以 rec⁻突变体细胞作宿主菌、降低生长速度、选用含有 par 功能区的质粒作为克隆载体质粒等方法来提高重组质粒的稳定性，但是利用带有编码抗药性标记的质粒和提供添加抗生素的培养基，抑制不含有质粒的菌体生长是常用的方法。然而这种方法也有其局限性，一方面菌体细胞周质中的抗生素分解酶会渗漏到培养基中，分解抗生素，培养基的选择压力消失另一方面含有抗生素的产品使用时受到限制。

解决重组质粒不稳定性的另外一个根本性办法就是将外源基因插入到大肠杆菌的染色体中。

2 启动子

启动子是链上聚合酶的识别位点和结合位点，外源基因表达的理想启动子是可

以指

导高效转录，保证目的基因高效表达的启动子。

3 上游调控元件

位于中心启动子两侧的区域对转录效率起着重要的作用。在一些细菌的上，位于‘端的上游一区域富含十系列，可以增加聚合酶亲和能力，提高转录效益。

4 mRNA 的稳定性

大肠杆菌的 mRNA 相当不稳定，半存活时间在 30 秒到 20 分钟之间。与 mRNA 降解有关的酶是 3'，5' 外切和内切 RnaseE, Npase, EDAD 盒、RNA 蜗牛酶 Rh1B 和糖分解烯醇化酶等。5' 端的不翻译结构的 RNA 二级结构 (UTR) 的稳定性与 3' 端 rho 非依赖性的末端结构终止结构都可以提高 mRNA 的稳定性，但是稳定性大小有所差别。

5 翻译体系

由于在原核生物中，转录和翻译相互偶联，转录和翻译之间最适距离是个碱基，如果少于个或大于个碱基就会显著影响基因的翻译效率。翻译起始区的能量对于基因的翻译有很大影响。

6 外源蛋白在宿主细胞中的折叠

外源蛋白在大肠杆菌体内的表达常常会导致蛋白的错误折叠，形成不溶性的包涵体。虽然包涵体的形成可以使蛋白质分离简单化，但也会产生大量不具有生物活性的产物。传统的方法是采用降低发酵温度来减少蛋白质的聚集作用。

7 外源蛋白在宿主大肠杆菌细胞中的降解

外源蛋白在细胞中的降解可分为细胞质降解和周质中降解。大肠杆菌细胞可以将细胞内错误折叠和有害的蛋白质分解为氨基酸，成为细胞内可用的氨基酸资源库而重新利用。因此将目的蛋白进行修饰，转变为细胞内不溶的蛋白质，如包涵体，或选用带有温度敏感型突变的菌体作为宿主菌是普遍用来防止降解的办法。

8 融合蛋白

开始构建融合蛋白是为了便于蛋白的纯化和固定化，以及在同一代谢途径中耦联不同酶的活性。后来发现，融合蛋白伴随体配体可以大大提高转运蛋白的溶解性和融合蛋白在包涵体内的表达量，融合蛋白之所以能够提高中间蛋白的折叠性，减少被降解的机会，是因为融合蛋白的伴随结构，在脱离核糖体后，可以很快形成自身的结构，促进异构酶催化的下游折叠单元的异构化反应

不过融合蛋白的主要不足在于（1）让中间蛋白复性需要昂贵的蛋白酶（例如 Xa 因子和肠激酶），（2）裂解不完全，会导致产物减少，（3）要获得有活性的蛋白，需要很多步骤才能完成，（4）融合蛋白的可溶性难以保证。

9 宿主菌的培养控制

为了提高工程菌培养过程中质粒的稳定性，工程菌的培养常分为两个阶段第一阶段，先使菌体生长到一定密度第二阶段，诱导外源基因的表达。

重组大肠杆菌培养方式是影响外源基因在大肠杆菌中高效表达的另外一个外部

因子。为了获得基因的高效率表达，通常采用以下几种培养形式。（1）补料分批培养（2）连续培养（3）透析培养。

分子生物学实验常见问题分析及对策-22

PCR 常见问题及解决方法汇总

PCR 反应的关键环节有①模板核酸的制备，②引物的质量与特异性，③酶的质量及活性 ④PCR 循环条件。寻找原因亦应针对上述环节进行分析研究。

模板：①模板中含有杂蛋白质，②模板中含有 Taq 酶抑制剂，③模板中蛋白质没有消化除净，特别是染色体中的组蛋白，④在提取制备模板时丢失过多，或吸入酚。⑤模板核酸变性不彻底。在酶和引物质量好时，不出现扩增带，极有可能是标本的消化处理，模板核酸提取过程出了毛病，因而要配制有效而稳定的消化处理液，其程序亦应固定不宜随意更改。

酶失活：需更换新酶，或新旧两种酶同时使用，以分析是否因酶的活性丧失或不够而导致假阴性。需注意的是有时忘加 Taq 酶或溴乙锭。

引物：引物质量、引物的浓度、两条引物的浓度是否对称，是 PCR 失败或扩增条带不理想、容易弥散的常见原因。有些批号的引物合成质量有问题，两条引物一条浓度高，一条浓度低，造成低效率的不对称扩增，对策为：①选定一个好的引物合成单位。②引物的浓度不仅要看 OD 值，更要注重引物原液做琼脂糖凝胶电泳，一定要有引物条带出现，而且两引物带的亮度应大体一致，如一条引物有条带，一条引物无条带，此时做 PCR 有可能失败，应和引物合成单位协商解决。如一条引物亮度高，一条亮度低，在稀释引物时要平衡其浓度。③引物应高浓度小量分装保存，防止多次冻融或长期放冰箱冷藏部分，导致引物变质降解失效。④引物设计不合理，如引物长度不够，引物之间形成二聚体等。

Mg²⁺浓度：Mg²⁺离子浓度对 PCR 扩增效率影响很大，浓度过高可降低 PCR 扩增的特异性，浓度过低则影响 PCR 扩增产量甚至使 PCR 扩增失败而不出扩增条带。

反应体积的改变：通常进行 PCR 扩增采用的体积为 20 μ l、30 μ l、50 μ l。或 100 μ l，应用多大体积进行 PCR 扩增，是根据科研和临床检测不同目的而设定，在做小体积如 20 μ l 后，再做大体积时，一定要摸索条件，否则容易失败。

物理原因：变性对 PCR 扩增来说相当重要，如变性温度低，变性时间短，极可能出现假阴性；退火温度过低，可致非特异性扩增而降低特异性扩增效率退火温度过高影响引物与模板的结合而降低 PCR 扩增效率。有时还有必要用标准的温度计，检测一下扩增仪或水浴锅内的变性、退火和延伸温度，这也是 PCR 失败的原因之一。

靶序列变异：如靶序列发生突变或缺失，影响引物与模板特异性结合，或因靶序列某段缺失使引物与模板失去互补序列，其 PCR 扩增是不会成功的。

扩增失败的其中一个非常重要的问题就是污染，特别是当 PCR 检测微量感染因子时，一定要注意产物残留污染的问题。

一. 污染的预防；进行 PCR 操作时，操作人员应该严格遵守一些操作规程，最大程度地降低可能出现的 PCR 污染或杜绝污染的出现。

（一）划分操作区：目前，普通 PCR 尚不能做到单人单管，实现完全闭管操作，但无论是否能够达到单人单管，均要求实验操作在三个不同的区域内进行，PCR 的前处理和后处理要在不同的隔离区内进行：

1. 标本处理区，包括扩增模板的制备；
2. PCR 扩增区，包括反应液的配制和 PCR 扩增；
3. 产物分析区，凝胶电泳分析，产物拍照及重组克隆的制备。

各工作区要有一定的隔离，操作器材专用，要有一定的方向性。如：标本制备→PCR 扩增→产物分析→产物处理。切记产物分析区的产物及器材不要拿到其他两个工作区。

（二）分装试剂：PCR 扩增所需要的试剂均应在装有紫外灯的超净工作台或负压工作台配制和分装。所有的加样器和吸头需固定放于其中，不能用来吸取扩增后的 DNA 和其他来源的 DNA：

1. PCR 用水应为高压的双蒸水；
2. 引物和 dNTP 用高压的双蒸水在无 PCR 扩增产物区配制；
3. 引物和 dNTP 应分装储存，分装时应标明时间，以备发生污染时查找原因。

（三）实验操作注意事项：尽管扩增序列的残留污染大部分是假阳性反应的原因，样品间的交叉污染也是原因之一。因此，不仅要在进行扩增反应是谨慎认真，在样品的收集、抽提和扩增的所有环节都应该注意。

1. 戴一次性手套，若不小心溅上反应液，立即更换手套；
2. 使用一次性吸头，严禁与 PCR 产物分析室的吸头混用，吸头不要长时间暴露于空气中，避免气溶胶的污染；
3. 避免反应液飞溅，打开反应管时为避免此种情况，开盖前稍离心收集液体于管底。若不小心溅到手套或桌面上，应立刻更换手套并用稀酸擦拭桌面；
4. 操作多份样品时，制备反应混合液，先将 dNTP、缓冲液、引物和酶混合好，然后分装，这样即可以减少操作，避免污染，又可以增加反应的精确度；
5. 最后加入反应模板，加入后盖紧反应管；
6. 操作时设立阴阳性对照和空白对照，即可验证 PCR 反应的可靠性，又可以协助判断扩增系统的可信性；
7. 尽可能用可替换或可高压处理的加样器，由于加样器最容易受产物气溶胶或标本 DNA 的污染，最好使用可替换或高压处理的加样器。如没有这种特殊的加样器，至少 PCR 操作过程中加样器应该专用，不能交叉使用，尤其是 PCR 产物分析所用加样器不能拿到其它两个区；
8. 重复实验，验证结果，慎下结论。

二. 追踪污染源

如果不慎发生污染情况，应从下面几条出发，逐一分析，排除污染。

（一）设立阴阳性对照：有利于监测反应体系各成分的污染情况。选择阳性对照时，应选择扩增弱，且重复性好的样品，因强阳性对照可产生大量不必要的扩增序列，反而可能成为潜在的污染源。如果以含靶序列的重组质粒为对照，100 个拷贝之内的靶序列就足以产生阳性扩增。阴性对照的选择亦要慎重，因为 PCR 敏感性极高，可以从其它方法（Southern 印迹或点杂交等）检测阴性的标本中检测出极微量的靶分子。此外，每次扩增均应包括 PCR 体系中各试剂的时机对照，即包括 PCR 反应所需的全部成分，而不加模板 DNA，这对监测试剂中 PCR 产物残留污染是非常有益的。如果扩增结果中试剂对照为阳性结果，就是某一种或数种试剂被污染了。此时，要全部更换一批新的试剂进行扩增，扩增时设立不同的反应管，每一管含有一种被检测试剂，在检出污染试剂后，应马上处理。

（二）环境污染：在排除试剂污染的可能性外，更换试剂后，若不久又发现试剂被污染了，如果预防措施比较严密，则考虑可能为环境污染。

环境污染中常见的污染源主要有：

1. 模板提取时真空抽干装置；
2. 凝胶电泳加样器；
3. 电泳装置；
4. 紫外分析仪；
5. 切胶用刀或手术刀片；
6. 离心机；
7. 冰箱门把手，冷冻架，门把手或实验台面等；

此时可用擦拭实验来查找可疑污染源。1) 用无菌水浸泡过的灭菌棉签擦拭可疑污染源；2) 0.1ml 去离子水浸泡；3) 取 5ml 做 PCR 实验；4) 电泳检测结果。

8. 气溶胶。如果经过上述追踪实验，仍不能查找到确切污染源，则污染可能是由空气中 PCR 产物的气溶胶造成的，此时就应该更换实验场所，若条件不允许，则重新设计新的引物（与原引物无相关性）。

三. 污染处理

（一）环境污染

1. 稀酸处理法：对可疑器具用 1mol/L 盐酸擦拭或浸泡，使残余 DNA 脱嘌呤；
2. 紫外照射（UV）法：紫外波长（nm）一般选择 254/300nm，照射 30min 即可。需要注意的是，选择 UV 作为消除残留 PCR 产物污染时，要考虑 PCR 产物的长度与产物序列中碱基的分布，UV 照射仅对 500bp 以上长片段有效，对短片段效果不大。UV 照射时，PCR 产物中嘧啶碱基会形成二聚体，这些二聚体可使延伸终止，但并不是 DNA 链中所有嘧啶均能形成二聚体，且 UV 照射还可使二聚体断裂。形成二聚体的程度取决于 UV 波长，嘧啶二聚体的类型及与二聚体位点相邻核苷酸的序列。在受照射的长 DNA 链上，形成二聚体缺陷的数量少于 0.065/碱基，其他非二聚体的光照损伤（如环丁烷型嘧啶复合体，胸腺嘧啶乙二醇，DNA 链间与链内的交联和 DNA 断裂等）均可终止 Taq DNA 聚合酶的延伸。这些位点的数量与

二聚体位点相当。如果这些位点(0.13/碱基)在 DNA 分子上随机分布,一个 500bp 片段的 DNA 分子链上将有 32 处损伤位点,那么,105 个这样的分子中每个分子中会至少有一处损伤。相反,如果 100bp 的片段,每条链上仅有 6 处损伤,105 个拷贝分子中将有许多分子没有任何损伤。这就是 UV 照射有一定的片段长度限制的原因。

(二) 反应液污染

可采用下列方法之一处理:

1. DNase I 法: PCR 混合液(未加模板和 Taq 聚合酶)加入 0.5U DNase I,室温反应 30 min 后加热灭活,然后加入模板和 Taq 聚合酶进行正常 PCR 扩增。该方法的优点是不需要知道污染 DNA 的序列;
2. 内切酶法: 选择识别 4 个碱基的内切酶(如 Msp I 和 Taq I 等),可同时选择几种,以克服用一种酶只能识别特定序列的缺陷,室温作用 1h 后加热灭活进行 PCR;
3. 紫外照射法: 未加模板和 Taq 聚合酶的 PCR 混合液进行紫外照射,注意事项与方法同上述 UV 照射法;
4. g 射线辐射法: 1.5kGy 的辐射可完全破坏 0.1ng 基因组 DNA,2.0 kGy 可破坏 104 拷贝的质粒分子,4.0 kGy 仍不影响 PCR,但高于此限度会使 PCR 扩增效率下降。引物可受照射而不影响 PCR,g 射线是通过水的离子化产生自由基来破坏 DNA 的。

(三) 尿嘧啶糖苷酶(UNG)法

由于 UV 照射的去污染作用对 500bp 以下的片段效果不好,而临床用于检测的 PCR 扩增片段通常为 300bp 左右,因此 UNG 的预防作用日益受到重视和肯定。

1. 原理: 在 PCR 产物或引物中用 dU 代替 dT。这种 dU 化的 PCR 产物与 UNG 一起孵育,因 UNG 可裂解尿嘧啶碱基和糖磷酸骨架间的 N-糖基键,可除去 dU 而阻止 TaqDNA 聚合酶的延伸,从而失去被再扩增的能力。UNG 对不含 dU 的模板无任何影响。UNG 可从单或双链 DNA 中消除尿嘧啶,而对 RNA 中的尿嘧啶和单一尿嘧啶分子则无任何作用。
2. dUTP 法: 用 dUTP 代替 dTTP,使产物中掺入大量 dU。在再次进行 PCR 扩增前,用 UNG 处理 PCR 混合液即可消除 PCR 产物的残留污染。由于 UNG 在 PCR 循环中的变性一步便可被灭活,因此不会影响含 dU 的新的 PCR 产物。
3. dU 引物法: 合成引物时以 dU 代 dT,这样 PCR 产物中仅 5' 端带 dU。UNG 处理后,引物失去了结合位点而不能扩增。对长片段(1-2kb 以上)的扩增用 dUTP 法效率较用 dTTP 低,而用 dU 法就可克服这一缺点。dU 引物最好将 dU 设计在 3' 端或近 3' 端。该法仅能用于引物以外试剂的处理。
4. 优点: 可以去除任何来源的污染; UNG 处理可以和 PCR 扩增在同一个反应管内进行; 由于扩增产物中有大量 dU 存在,可彻底消除污染源。
5. 需注意的是掺入 dUTP 的 DNA 不对产物的任何操作有影响,在进行 PCR 产物克隆时,应该转化 UNG⁻(UNG 缺陷)大肠杆菌受体菌,否则转化产物会被受体菌

UNG 消化掉。

（四）固相捕获法

用于去除标本中污染的核酸和杂质，原理如下：1) 用一生物素标记的单链 RNA 探针与待扩核酸杂交，杂交区域是非扩增区；2) 用包被链霉亲和素的固相载体来捕获带有生物素探针的杂交核酸，通过漂洗可去除污染的扩增产物和杂质；3) 洗脱靶分子后用特异引物扩增非 RNA 探针杂交区域。第 2) 步的漂洗后可用 PCR 检测以确定标本是否被扩增产物或重组质粒污染。

（五）RS-PCR 法 (RNA-specific PCR)

也称为链特异性 PCR，主要指用于 RNA 模板的特异性 PCR 法，该法可明显降低假阳性而不影响 PCR 的敏感性。其关键在于设计引物，逆转录引物的 3' 端 (A 区) 有 20 个核苷酸左右为模板的特异性互不序列，5' 端 20 个核苷酸 (C 区) 为附加修饰碱基。与 mRNA 逆转录后，经超速离心使 cDNA 与多余引物分开，再用和第二引物 (C) 以第一链 cDNA 为模板合成第二链 cDNA，以后的 PCR 循环中用逆转录引物的 B 区和引物 C 进行扩增加尾 cDNA，而污染的 DNA 或质粒 DNA 才不会被扩增。

（六）抗污染引物法

该对引物扩增时通过病毒 DNA 克隆如入质粒的位点。这一区域只存在完整的原病毒中，在重组质粒中，这一区域分成两个区域与克隆位点被。如果重组质粒污染了标本，也不能扩增出任何条带，即使出现了扩增带，其大小也与预期的不同。只有原病毒 DNA 才能被引物扩增，因此只要出现预期大小的扩增带就可以证明标本是阳性的，该法试用于环状靶分子系列。

四. 其它 PCR 检测方法:

（一）两步法：是指在用套式 PCR 方法扩增某些含量低微的标本时，两对引物在同一个管中以简化步骤，减少污染。通常第一步进行 20-25 个循环，扩增外引物片段；第二步再进行 10 个循环，扩增内引物片段。两步法对内外引物的 T_m 值有特殊要求，即内外引物的退火温度高（如 68℃），在此温度下内引物不与模板退火，然后降低退火温度（至 55℃）再扩增内引物片段，这样，在操作过程中，仅打开 PCR 反应管一次，大大减少了污染的可能性。

（二）荧光法：亦称荧光 PCR 技术 (fluorescence PCR, F-PCR)，是 1995 年由美国 PE 公司首先研制成功的，它融汇了 PCR 的灵敏性、DNA 杂交的特异性和光谱技术精确定量的优点，电脑同步跟踪，数据自动化处理，直接探测 PCR 过程中的变化以获得定量的结果，不需要做 PCR 后处理或检测，完全闭管操作。探针标记除用 TET 和 FAM 外，还可用 HEX、JOE 作为报告荧光，3' 端的淬灭基团常用 TAMRA。在探针保持完整时，荧光报告基团的荧光被荧光抑制基团淬灭，而在探针被切断后，荧光报告基团才发出报告荧光，且荧光的强度与 PCR 产物的数量呈正比。荧光检测仪器透过 PCR 管壁能直接检测到荧光信号的波长和长度变化。

主要有以下优点：

1. 探针特异性强，假阳性率低；

2. 操作快速，不需要 PCR 后处理；

3. 定量范围宽，HBV 0.4fg-4000fg/ml (102-106 Dane' s particle/ml)；

4. 闭管操作，PCR 产物污染少；

5. 灵敏度高。

主要方法有：

1. 荧光探针法：进行荧光 PCR 检测时，要求荧光探针必须完全与靶基因互补，长度以 20-30 个碱基为宜，必要时 3' 端磷酸化封闭，以防在扩增时作为引物延伸。该方法利用 Taq 酶的 3' → 5' 聚合酶活性及 5' → 3' 外切酶活性，可以在链延伸过程中实现链替换，并将被替换的探针切断，故可进行定性与定量检测。荧光探针 5' 端标记的 TAMRA，在 480nm 激发下产生 530nm 的红色荧光；3' 端标记的 FAM，激发后产生绿色荧光。PE 公司推出的 TaqMan 系统，即采用双荧光探针，如配合使用 PCR 扩增与荧光检测合二为一的仪器，可进行实时 (real-time) 定量检测。

2. 分子信标法：分子信标 (molecular beacon) 是一个发夹样结构的特异探针，其环状部分与靶序列互补。在室温时，分子信标的发夹紧闭，荧光淬灭。PCR 扩增时，随着温度升高，发夹松开，与单链模板特异结合，发出荧光。荧光强度与模板呈正比，故可用于 PCR 产物的定性及定量。

另外实验结果的验证需要注意以下几点：

1. 假阴性，即不出现扩增条带。

PCR 反应的关键环节有①模板核酸的制备，②引物的质量与特异性，③酶的质量及，④PCR 循环条件。寻找原因亦应针对上述环节进行分析研究。

模板：①模板中含有杂蛋白质，②模板中含有 Taq 酶抑制剂，③模板中蛋白质没有消化除净，特别是染色体中的组蛋白，④在提取制备模板时丢失过多，或吸入酚。⑤模板核酸变性不彻底。在酶和引物质量好时，不出现扩增带，极有可能是标本的消化处理，模板核酸提取过程出了毛病，因而要配制有效而稳定的消化处理液，其程序亦应固定不宜随意更改。

酶失活：需更换新酶，或新旧两种酶同时使用，以分析是否因酶的活性丧失或不够而导致假阴性。需注意的是有时忘加 Taq 酶或溴乙锭。

引物：引物质量、引物的浓度、两条引物的浓度是否对称，是 PCR 失败或扩增条带不理想、容易弥散的常见原因。有些批号的引物合成质量有问题，两条引物一条浓度高，一条浓度低，造成低效率的不对称扩增，对策为：①选定一个好的引物合成单位。②引物的浓度不仅要看 OD 值，更要注重引物原液做琼脂糖凝胶电泳，一定要有引物条带出现，而且两引物带的亮度应大体一致，如一条引物有条带，一条引物无条带，此时做 PCR 有可能失败，应和引物合成单位协商解决。如一条引物亮度高，一条亮度低，在稀释引物时要平衡其浓度。③引物应高浓度小量分装保存，防止多次冻融或长期放冰箱冷藏部分，导致引物变质降解失效。④引物设计不合理，如引物长度不够，引物之间形成二聚体等。

Mg²⁺浓度：Mg²⁺离子浓度对 PCR 扩增效率影响很大，浓度过高可降低 PCR 扩增的

特异性，浓度过低则影响 PCR 扩增产量甚至使 PCR 扩增失败而不出扩增条带。

反应体积的改变：通常进行 PCR 扩增采用的体积为 20ul、30ul、50ul 或 100ul，应用多大体积进行 PCR 扩增，是根据科研和临床检测不同目的而设定，在做小体积如 20ul 后，再做大体积时，一定要摸索条件，否则容易失败。

物理原因：变性对 PCR 扩增来说相当重要，如变性温度低，变性时间短，极有可能出现假阴性；退火温度过低，可致非特异性扩增而降低特异性扩增效率退火温度过高影响引物与模板的结合而降低 PCR 扩增效率。有时还有必要用标准的温度计，检测一下扩增仪或水浴锅内的变性、退火和延伸温度，这也是 PCR 失败的原因之一。

靶序列变异：如靶序列发生突变或缺失，影响引物与模板特异性结合，或因靶序列某段缺失使引物与模板失去互补序列，其 PCR 扩增是不会成功的。

仪器因素：PCR 实验对仪器的依赖性是很高的，离心机、扩增仪都是造成 PCR 假阴性的因素。扩增仪的主要问题是孔间差，引起扩增失败可扩增效率降低。而离心机的影响则更容易被忽视。国内使用离心机很少使用离心加速度（XXXg）作为参数指标，而常使用转数作为参数指标，这里就存在着一个问题，由于离心机的大小不同，有效跳心半径也不相同，因此同样的转速所产生的离心力相差很大（有的在数倍以上），所以在相同的离心时间下，有可能模板并没有离心下来，造成 PCR 假阴性。这个问题在其他实验也有，但因其他实验都是测定大分子蛋白沉淀，对离心的速度要求较低所以不太明显。建议使用小型台式离心机的实验要注意一下这个问题。

操作人员素质：PCR 实验的环节很多，而且对每一环节的质量要求都很高，例如少加、漏加试剂、离心不充分、循环参数设计错误、对于 RNA 抽提降解、逆转录失败等等都能造成结果的假阴性。因此要求 PCR 的实验操作人员有很好的素质，能够严格遵守操作规程，并能敏锐的发现问题和解决问题。

另外 PCR 实验中从样品的采集、运输、保存开始就可以引起结果的假阴性，而对于病原体检测（如 HBV）在人体血液系统出现有周期性变化也是值得注意的因素。

2. 假阳性：出现的 PCR 扩增条带与目的靶序列条带一致，有时其条带更整齐，亮度更高。

引物设计不合适：选择的扩增序列与非目的扩增序列有同源性，因而在进行 PCR 扩增时，扩增出的 PCR 产物为非目的性的序列。靶序列太短或引物太短，容易出现假阳性。需重新设计引物。

靶序列或扩增产物的交叉污染：这种污染有两种原因：一是整个基因组或大片段的交叉污染，导致假阳性。这种假阳性可用以下方法解决：①操作时应小心轻柔，防止将靶序列吸入加样枪内或溅出离心管外。②除酶及不能耐高温的物质外，所有试剂或器材均应高压消毒。所用离心管及样进枪头等均应一次性使用。③必要时，在加标本前，反应管和试剂用紫外线照射，以破坏存在的核酸。二是空气中的小片段核酸污染，这些小片段比靶序列短，但有一定的同源性。可互相拼接，与引物互补后，可扩增出 PCR 产物，而导致假阳性的产生，可用巢式 PCR 方法来

减轻或消除。

3. 出现非特异性扩增带

PCR 扩增后出现的条带与预计的大小不一致，或大或小，或者同时出现特异性扩增带与非特异性扩增带。非特异性条带的出现，其原因：一是引物与靶序列不完全互补、或引物聚合形成二聚体。二是 Mg^{2+} 离子浓度过高、退火温度过低，及 PCR 循环次数过多有关。其次是酶的质和量，往往一些来源的酶易出现非特异条带而另一来源的酶则不出现，酶量过多有时也会出现非特异性扩增。其对策有：①必要时重新设计引物。②减低酶量或调换另一来源的酶。③降低引物量，适当增加模板量，减少循环次数。④适当提高退火温度或采用二温度点法 ($93^{\circ}C$ 变性， $65^{\circ}C$ 左右退火与延伸)。

4. 出现片状拖带或涂抹带

PCR 扩增有时出现涂抹带或片状带或地毯样带。其原因往往由于酶量过多或酶的质量差，dNTP 浓度过高， Mg^{2+} 浓度过高，退火温度过低，循环次数过多引起。其对策有：①减少酶量，或调换另一来源的酶。②减少 dNTP 的浓度。③适当降低 Mg^{2+} 浓度。④增加模板量，减少循环次数。

5. PCR 产物的电泳检测时间

一般为 48h 以内，有些最好于当日电泳检测，大于 48h 后带型不规则甚至消失。

分子生物学实验常见问题分析及对策-23

一. 各种 PCR 技术常见问题与对策

1. 假阴性（不出现扩增条带）

（1）模板出现异常：

- ①模板中含有杂蛋白质
- ②模板中含有 Taq 酶抑制剂
- ③模板中蛋白质没有消化除净，特别是染色体中的组蛋白
- ④在提取制备模板时丢失过多，或吸入酚
- ⑤模板核酸变性不彻底。

（2）酶失活

需更换新酶，或新旧两种酶同时使用，以分析是否因酶的活性丧失或不够而导致假阴性。需要注意的是有时忘加 Taq 酶或溴乙锭。

（3）引物引起的假阴性：

- ①选定一个好的引物合成单位，保证合成的引物质量。
- ②引物的浓度不仅要看 OD 值，更要注重引物原液做琼脂糖凝胶电泳，一定要有引物条带出现，而且两引物带的亮度应大体一致。
- ③引物应高浓度小量分装保存，防止多次冻融或长期放冰箱冷藏部分，导致引物变质降解失效

④引物设计不合理，如引物长度不够，引物之间形成二聚体等。

(4) Mg^{2+} 浓度的影响：

Mg^{2+} 浓度过高可降低 PCR 扩增的特异性，浓度过低则影响 PCR 扩增产量甚至使 PCR 扩增失败。

(5) 反应体积的改变

通常进行 PCR 扩增采用的体积为 20 μ l、30 μ l、50 μ l。或 100 μ l，PCR 应用的扩增体积发生改变时，一定要摸索条件，否则容易失败。

(6) 物理原因造成的假阴性：

变性温度低，变性时间短，极有可能出现假阴性。而退火温度过低，可致非特异性扩增而降低特异性扩增效率；退火温度过高影响引物与模板的结合而降低 PCR 扩增效率。

2. 假阳性（出现的 PCR 扩增条带与目的靶序列条带一致，有时其条带更整齐，亮度更高）

(1) 引物设计不合适

选择的扩增序列与非目的扩增序列有同源性，因而在进行 PCR 扩增时，扩增出的 PCR 产物为非目的性的序列。靶序列太短或引物太短，容易出现假阳性。需重新设计引物。

(2) 靶序列或扩增产物的交叉污染

这种污染有两种原因：一是整个基因组或大片段的交叉污染，导致假阳性。这种假阳性可用以下方法解决：

①在加标本前，反应管和试剂要用紫外线照射，以破坏存在的核酸。

②除酶及不能耐高温的物质外，所有试剂或 器材均应高压消毒。离心管及枪头等应一次性使用

③是空气中的小片段核酸污染，它们与引物互补后，可扩增出 PCR 产物，而导致假阳性的产生，可用巢式 PCR 方法来减轻或消除。

二. DNA 限制性内切酶酶切反应常见问题及对策

1. 底物 DNA 没有被限制酶切开或者切割不完全

(1) DNA 中混有抑制酶活性的物质

在 DNA 的制备过程中可能会混入酚、氯仿、乙醇、去污剂、EDTA、盐类等物质。可用单位标准底物 DNA 和混有单位标准底物 DNA 的待测 DNA 来检验酶活性。如果只有标准底物 DNA 酶切完全，此时须将底物 DNA 重新纯化。

(2) 限制性内切酶对 DNA 甲基化敏感

常用来制备 DNA 的质粒都含有两个特异的 DNA 甲基化位点：Dam 和 Dcm。发生这种情况的时候，应当换用不同切割非甲基化位点的同裂酶消化 DNA，重新将质粒转至 dcm⁺ dam⁺菌株中扩增。

2. 酶切后发现除了目的 DNA 条带外，还有其它条带

(1) 酶存在“星号”活性

当加大酶量或延长温育时间会提高酶的“星号活性”。为避免星号活性酶量不能过量太多，反应最好在推荐的缓冲液中进行。

(2) 底物 DNA 中可能存在其它 DNA 污染

将底物 DNA 电泳检测其纯度；或用其它限制性内切酶对底物 DNA 进行酶切，必要时对 DNA 进行再纯化。

三. DNA 连接酶反应常见问题及对策

1. DNA 连接失败

(1) 反应体系内无 ATP 或 Mg^{2+} ：

使用随酶提供的 buffer 或向其它兼容的 buffer 中加入 ATP。含 ATP 的 Buffer 保存超过 1 年，其内 ATP 可能会降解，导致连接失败。当补加 ATP 时，确定补加的是核糖核酸 ATP，

(2) 反应体系中盐浓度过高或 EDTA 含量高

(3) 去磷酸化后，CIP、BAP 或 SAP 失活不彻底

(4) 连接末端为单碱基突出末端：

使用最高至 $5 \mu l$ 高浓度连接酶 $16^{\circ}C$ 过夜连接，以提高连接效率。

(5) 插入片段和质粒没有磷酸化：

如果载体已经去磷酸化了，而引物又没有磷酸化会导致连接失败，需要使用磷酸化的引物或对引物进行磷酸化。

(6) 插入片段太大不利于进行环化

降低插入片段的浓度，并使用高浓度连接酶 $16^{\circ}C$ 过夜连接。

2. 粘端连接注意事项

(1) 连接反应的温度：DNA 连接酶的最适反应温度为 $37^{\circ}C$ ，但在此温度下，粘性末端的氢键结合很不稳定，折衷方法是 $12^{\circ}C$ 过夜。

(2) 碱性磷酸酶处理质粒载体：质粒载体用碱性磷酸酶处理，除去其 $5'$ 末端的磷酸基，防止环化，通过接反应后形成的缺口可在转化细胞后得以修复。

(3) 连接反应的检测：连接反应成功与否，最后的检测要通过下一步实验，转化宿主菌，阳性克隆的筛选来确定。

(4) 如果要检验连接酶和连接酶专用的缓冲液是否有效，可重新连接酶切后的 λ DNA。若连接成功，则说明有效。

四 细菌培养常见问题及对策

1. 培养液 PH 变化过快

(1) CO_2 张力不对

①按培养液中 $NaHCO_3$ 浓度增加或减少培养箱内 CO_2 浓度， $2.0g/L$ 到 $3.7g/L$ 浓度 $NaHCO_3$ 对应 CO_2 浓度为 5%到 10%。

②采用不依赖 CO_2 的培养液

(2) 培养液中盐浓度不正确

在 CO_2 培养环境中改用基于 Earle's 盐配制的培养液，在大气培养环境中培养

改用 Hanks 盐配制的培养液。

(3) 细菌、酵母或真菌污染

用抗生素除菌，若杂菌难以清除只能丢弃培养物。

2. 培养细胞生长减慢

(1) 由于更换不同培养液或血清造成的：

比较新培养液与原培养液成分，比较新血清与旧血清支持细胞生长实验。或增加起始培养的细胞浓度，让细胞逐渐适应新培养液。

(2) 培养液中的成分下降造成：

培养液中一些细胞生长必需成分如谷氨酰胺或生长因子耗尽或缺乏或已被破坏，所以需要换入新鲜配制培养液或补加谷氨酰胺以及必须的生长因子。

3. 悬浮细胞成簇出现

(1) 培养液中含钙、镁离子：

用无钙镁平衡盐溶液洗涤细胞，轻轻吹吸细胞获得单细胞悬液。

(2) 支原体污染：

分离培养物，检测支原体。如发现支原体污染，丢弃培养物。

(3) 蛋白酶过度消化：

蛋白酶过度消化会使得细胞裂解释放 DNA，可以使用 DNaseI 处理细胞，除去释放的 DNA。

分子生物学实验常见问题分析及对策-24

Part1. PCR 实验常见问题及对策

无扩增产物

◇现象：正对照有条带，而样品则无（如图）

◇可能原因：

1. 模板：①模板中含有杂蛋白质 ②模板中含有 Taq 酶抑制剂，③模板中蛋白质没有消化除净，特别是染色体中的组蛋白④在提取制备模板时丢失过多，或吸入酚⑤模板核酸变性不彻底。

2. 引物设计不当或者发生降解

3. Buffer 对样品不合适，Mg²⁺浓度过低

4. 反应条件：退火温度太高，延伸时间太短

5. 酶失活

6. 其他：变性对 PCR 扩增来说相当重要，如变性温度低，变性时间短，极有可能出现假阴性；退火温度过高影响引物与模板的结合而降低 PCR 扩增效率。

◇ 对策：

1. 检查模板和引物的用量。纯化模板或者使用试剂盒提取模板 DNA 或加大模板的用量。载酶和引物质量好时，不出现扩增带，极有可能是标本的消化处理，模板核酸提取过程出了毛病，因而要配制有效而稳定的消化处理液，其程序亦应固定不宜随意更改。

2. 重新设计引物（避免链间二聚体和链内二级结构）或者换一管新引物；引物应高浓度小量分装保存，防止多次冻融或长期放冰箱冷藏部分，导致引物变质降解失效；引物的浓度不仅要看 OD 值，更要注重引物原液做琼脂糖凝胶电泳，一定要有引物条带出现，而且两引物带的亮度应大体一致，如一条引物有条带，一条引物无条带，此时做 PCR 有可能失败，应和引物合成单位协商解决。如一条引物亮度高，一条亮度低，在稀释引物时要平衡其浓度。

3. 更换 Buffer 或调整浓度

4. 检查退火温度和变性条件，如果有需要的话，可降低退火温度，延长延伸时间，增加循环次数。

5. 需更换新酶，或新旧两种酶同时使用，以分析是否因酶的活性丧失或不够而导致假阴性。需注意的是有时忘加 Taq 酶或溴乙锭。

6. 控制温度，有时还有必要用标准的温度计，检测一下扩增仪或水浴锅内的变性、退火和延伸温度，这也是 PCR 失败的原因之一。不要随意减少 dNTP 的用量，它是一个系统的因素，必须与其它成份保持平衡。

非特异性扩增：

◇现象： PCR 扩增后出现的条带与预计的大小不一致，或大或小，或者同时出现特异性扩增带与非特异性扩增带（如图）

◇可能原因：

1. 引物特异性差（引物与靶序列不完全互补、或引物聚合形成二聚体）

2. Mg^{2+} 浓度偏高模板或引物浓度过高
3. 退火温度偏低
4. 循环次数过多
5. 酶的质（来源）和量

6. 模板或引物浓度过高

◇对策:

1. 重新设计引物或者使用巢式PCR
2. 适当降低镁离子浓度
3. 适当提高退火温度或使用二阶段温度法
4. 减少循环次数
5. 适当减少酶量或调换另一来源的酶
6. 适当降低模板或引物浓度

假阳性

◇现象：空白对照出现目的扩增产物

◇可能原因：靶序列或扩增产物的交叉污染

◇对策:

1. 操作时应小心轻柔，防止将靶序列吸入加样枪内或溅出离心管外；
2. 除酶及不能耐高温的物质外，所有试剂或器材均应高压消毒。所用离心管及加样枪头等均应一次性使用；
3. 各种试剂最好先进行分装，然后低温贮存。

拖尾

◇现象：泳道中出现模糊条带（如图）

◇可能原因:

1. 酶量过多或酶的质量差
2. dNTP 浓度过高， Mg^{2+} 浓度过高

3. 退火温度过低，循环次数过多

◇对策：

1. 减少酶量，或调换另一来源的酶
2. 适当降低 dNTP 的浓度或 Mg^{2+} 浓度
3. 提高退火温度，但不要超过 $68^{\circ}C$ ，减少循环次数。

其他要点

建议使用 0.2-ml 薄壁管。厚壁管在 $92^{\circ}C$ 时不能有效地使模板变性；

最佳反应体积为 50ml，推荐用 30ml 矿物油覆盖（对盖子加热的 PCR 仪可以不加）；

大多数反应中，0.75ml ($0.5 \sim 1ml$) 的酶量在大多数情况下可以得到满意的结果；

建议使用 1.75mmol/L $MgCl_2$:350mmol/L dNTP 或 2.25mmol/L $MgCl_2$:500mmol/L dNTP 组合的混合物。然而要得到最佳结果，优化 Mg^{2+} 的浓度是必需的；

降低二级结构和引物二聚物形成的可能性。

RT-PCR 中的问题及对策

在琼脂糖凝胶分析中看到少量或没有 RT-PCR 产物

① RNA 被降解：在用来验证完整性之前先在变性胶上分析 RNA；使用良好的无污染技术分离 RNA；在将组织从动物体取出后立刻处理；在 100% 甲酰胺中储存 RNA 如果使用胎盘 RNase 抑制剂，不要加热超过 $45^{\circ}C$ 或 pH 超过 8.0，否则抑制剂或释放所有结合的 RNase。而且，在 $\geq 0.8mM$ DTT 时加入 RNase 抑制剂，一定要存在 DTT；

② RNA 中包含逆转录抑制剂：过乙醇沉淀 RNA 除去抑制剂。用 70% (v/v) 乙醇对 RNA 沉淀进行清洗。可以加入糖元 ($0.25 \mu g$ 到 $0.4 \mu g/\mu l$) 以帮助少量样品 RNA 的恢复；逆转录抑制剂包括：SDS，EDTA，甘油，焦磷酸钠，亚精胺，甲酰胺和胍盐；将对照 RNA 同样品混合，同对照 RNA 反应比较产量以检验抑制剂；

- ③ 多糖同 RNA 共沉淀：使用氯化锂沉淀 RNA 以除去多糖；
- ④ 用于合成 cDNA 第一链合成的引物没有很好退火：确定退火温度适合您的引物。对于随机六聚体，建议在反应温度保温之前先在 25℃ 保温 10 分钟；对于基因特异性引物 (GSP)，可以试一下其他 GSP，或换用 oligo(dT) 或随机六聚体确定 GSP 是反义序列；
- ⑤ 起始 RNA 量不够：增加 RNA 量；对于 <50ng 的 RNA 样品，可以在第一链 cDNA 合成中使用 0.1 μg 到 0.5 μg 乙酰 BSA；
- ⑥ RNA 模板二级结构太多：将 RNA 和引物在不含盐及缓冲液条件下变性/退火；提高逆转录反应温度，不要在 >60℃ 时使用 oligo(dT) 引物，选择一个在反应温度可以退火的 GSP；对于 >1kb 的 RT-PCR 产物，保持反应温度 ≤65℃；
- ⑦ 引物或模板对残余的 RNA 模板敏感：在 PCR 前用 RNaseH 处理；
- ⑧ 靶序列在分析的组织中不表达：尝试其他靶序列或组织；
- ⑨ PCR 没有起作用：对两步法 RT-PCR，不要在 PCR 步骤中使用超过 1/5 的逆转录反应产物。

Part2. DNA 限制性内切酶酶切反应

酶切出现问题，看内切酶说明书，相应试剂公司目录。不同公司出产的内切酶，菌株来源、制备工艺、纯度活力、酶切活性优化可能不同。可在上面找到酶单位定义、保存条件、酶切体系(buffer 及与其它酶双切的 buffer 等)、酶切反应温度(有些酶是在 50、55 或 30 等温度下反应的)、酶是否受甲基化影响、是否有星号活性及出现星号活可能因素、保护性碱基、同尾酶、同裂酶。限制性酶切割 DNA 底物的操作过程中，会出现一些问题，产生的原因主要为酶解体系中各要素处于非最佳状态，包括 DNA 的纯度和特性、反应缓冲液、反应体积、反应时间及温度等。

酶切不开或不完全

▼ 质粒问题：纯度差或残留酶切抑制物最为常见。杂蛋白存在会影响酶切，表现为 A260/A280 低于 1.8；抑制物常见酚、盐、乙醇等；重新提 DNA，使用可靠试剂盒或可靠手工提取试剂。

▼ 酶的问题：确认内切酶有效（很多内切酶虽然有过期时间，但过期后只要能够有效酶切，可用。确认酶切效果不好，做标记，更换）。

▼ 条件不适：检查反应系统是否最佳。

▼ buffer问题: 有些酶切的buffer中, 添加了一些较为容易析出或溶解的成分(连接酶的buffer更是这样), 有时酶切的buffer没有完全融化时, buffer的浓度是不均一的。新的buffer先融化的部分, 盐离子浓度要高, 使用一段时间后, 融化部分的离子浓度会变低。通常, 这种影响不大, 但如果是使用一些对离子浓度敏感的内切酶时就会出现问题。

▼ 酶切位点的甲基化影响: 有时甲基化会影响酶切, 常见的有Xba I、Bcl I 等。甲基化主要分为Dam、Dcm和CpG甲基化等。如果是提取的质粒, 质粒就会因大肠杆菌的Dam, Dcm被甲基化; 如果是直接从哺乳动物细胞中提取的DNA, 则部分DNA就会因CG methylase的影响而被甲基化。一些酶切位点被甲基化后, 酶切会受影响。因此, 出现酶切不开或不全时需要考虑甲基化的问题。

▼ 酶切体系问题: 通常较大的反应体系 ($\geq 50\mu\text{l}$), 较少量的质粒 ($\leq 1\mu\text{g}$, 或更少), 酶切的会更加完全一些。

▼ 酶切或双酶切时, 保护性碱基及近末端位点碱基个数的问题: 在酶切PCR产物时, 酶切位点旁的碱基个数可能会影响酶切效率。同样, 在双酶切载体时, 如果两个载体相邻过近, 也有可能影响酶切效果。

▼ 部分DNA溶液粘在管壁上: 反应前离心数秒

▼ 内切酶溶液粘度大, 取样不准: 将内切酶稀释, 增大取样体积

质粒酶切时出现 smear

▼ 体系中的内切酶含量过高: 通常酶切体系中的内切酶含量不宜超过酶切体系的10%, 不管是单一酶切还是双酶切, 酶的含量在5%一下是比较合适的。由于酶是保存在50%甘油缓冲液中, 过高的酶用量会导致甘油含量提高, 从而引起酶的星活性。

▼ 酶切反应过程中有导致星活性的因素: 有些内切酶除了对甘油浓度外, 对离子浓度、反应温度、酶含量、反应时间等都可能产生星活性。所以在使用内切酶时, 一定要留意说明书中的描述, 避免可能出现星活性情况的发生。减少酶用量、合适的反应温度、不进行长时间的酶切反应, 可减少星号活性的出现(在非理想的条件下, 内切酶切割与识别位点相似但不完全相同的序列, 这一现象称星号活性)。

▼ 酶切体系可能污染了其它物质: 如其它的DNA、其它的内切酶或DNA酶等。电泳检查DNA, 换用其它酶切, 纯化DNA片段。

内切酶保存期内快速失活

- ▼ 保存温度不合适: 内切酶贮藏在含 50%甘油的贮藏液中, 应在-20℃低温保存
- ▼ 以稀释形式保存: 稀释酶液不宜长期存放, 应一次使用
- ▼ 贮藏缓冲液不适当: 使用厂家推荐的贮藏缓冲液
- ▼ 低蛋白浓度: 内切酶与 500ug/ml的BSA一起保存

酶切后的DNA片段连接效率低

- ▼ 含磷酸盐的浓度高: 透析, 乙醇沉淀去除磷酸盐
- ▼ 内切酶失活不全或含有ATP酶: 延长灭活时间或用酚抽提, 乙醇沉淀回收DNA
- ▼ 平末端连接: 加大T4 DNA ligase用量
- ▼ 外切酶污染: 减少酶用量, 缩短保温时间, 酚抽提回收DNA
- ▼ 连接缓冲液不合适: 重新配制

Part3. 细胞培养常见问题与对策

培养液 pH 值变化太快

可能原因:

- (1) CO₂ 张力不对。
- (2) 培养瓶盖拧得太紧。
- (3) NaHCO₃ 缓冲系统缓冲力不足。
- (4) 培养液中盐浓度不正确
- (5) 细菌、酵母或真菌污染

解决方法:

- (1) 按培养液中 NaHCO₃ 浓度增加或减少培养箱内 CO₂ 浓度, 2.0g/L 到 3.7g/L 浓度 NaHCO₃ 对应 CO₂ 浓度为 5%到 10%。
- (2) 改用不依赖 CO₂ 培养液。松开瓶盖 1/4 圈。加 HEPES 缓冲液至 10 到 25mM 终浓度。

(3) 在 CO₂ 培养环境中改用基于 Earle's 盐配制的培养液，在大气培养环境中培养改用 Hanks 盐配制的培养液。

(4) 丢弃培养物或用抗生素除菌。

培养液出现沉淀，但 pH 值不变

可能原因:

(1) 用洗涤剂清洗后残留磷酸盐将培养基成分沉淀下来

(2) 冰冻保存培养液

解决方法:

(1) 用去离子水反复冲洗玻璃器皿，然后除菌。

(2) 将培养液加热到 37℃，摇动使其溶解如沉淀仍然存在，丢弃培养液。

培养液出现沉淀，同时 pH 发生变化

可能原因:

细菌或真菌污染

解决方法:

丢弃培养物或用抗生素除菌。

培养细胞不贴壁

可能原因:

(1) 胰蛋白酶消化过度

(2) 支原体污染

(3) 培养液中无贴壁因子

解决方法:

- (1) 缩短胰蛋白酶消化时间或降低胰蛋白酶浓度。
- (2) 分离培养物，检测支原体。清洁支架和培养箱。如发现支原体污染，丢弃培养物。

悬浮细胞成簇

可能原因:

- (1) 培养液中含钙、镁离子
- (2) 支原体污染
- (3) 蛋白酶过度消化使得细胞裂解释放 DNA

解决方法:

- (1) 用无钙镁平衡盐溶液洗涤细胞，轻轻吹吸细胞获得单细胞悬液。
- (2) 分离培养物，检测支原体。如发现支原体污染，丢弃培养物。
- (3) 用 DNase I 处理细胞。

培养细胞生长减慢

可能原因:

- (1) 由于更换不同培养液或血清培养液中一些细胞生长必需成分如谷氨酰胺或生长因子耗尽或缺乏或已被破坏。
- (2) 培养物中有少量细菌或真菌污染试剂保存不当。
- (3) 接种细胞起始浓度太低
- (4) 细胞已老化

(5) 支原体污染

解决方法:

(1) 比较新培养液与原培养液成分，比较新血清与旧血清支持细胞生长实验。

(2) 增加起始培养细胞浓度。让细胞逐渐适应新培养液。

换入新鲜配制培养液。补加谷氨酰胺或生长因子。

(3) 用无抗生素培养液培养，如发现污染，丢弃培养物。或用抗生素除菌。

(4) 血清需保存在 -5°C 到 -20°C 。培养液需在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 避光保存。含血清完全培养液在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存，并在2周内用完。

(5) 增加接种细胞起始浓度。换用新的保种细胞。分离培养物，检测支原体。清洁支架和培养箱。如发现支原体污染，丢弃培养物。

培养细胞死亡

可能原因:

(1) 培养箱内无 CO_2

(2) 培养箱内温度波动太大

(3) 细胞冻存或复苏过程中损伤

(4) 培养液渗透压不正确

(5) 培养液种有毒代谢产物堆积

解决方法:

(1) 检测培养箱内 CO_2

(2) 检查培养箱内温度

(3) 取新的保存细胞种

(4) 检测培养液渗透压。

分子生物学实验常见问题分析及对策-25

一 质粒的提取常见问题分析及其解决方案

1. 用试剂盒未提出质粒或质粒得率较低:

(1) 大肠杆菌老化 请涂布平板培养后, 重新挑选新菌落进行液体培养。

(2) 质粒拷贝数低 由于低使用低拷贝数载体引起的质粒 DNA 提取量低, 可更换具有相同功能的高拷贝数载体。

(3) 菌体中无质粒 有些质粒本身不能在某些菌种中稳定存在, 经多次转接后有可能造成质粒丢失。例如, 柯斯质粒在大肠杆菌中长期保存不稳定, 因此不要频繁转接, 每次接种时应接种单菌落。另外, 检查筛选用抗生素使用浓度是否正确。

(4) 碱裂解不充分 使用过多菌体培养液, 会导致菌体裂解不充分, 可减少菌体用量或增加裂解液。对低拷贝数质粒, 提取时, 可加倍使用裂解液, 可能有助于增加质粒提取量和质粒质量。

(5) 溶液使用不当 裂解液在温度较低时可能出现浑浊, 应置于 37℃ 保温片刻直至溶解为清亮的溶液, 才能使用。

(6) 吸附柱过载 不同产品中吸附柱吸附能力不同, 如果需要提取的质粒量很大, 请分多次提取。若用富集培养基, 例如 TB 或 2×YT, 菌液体积必须减少; 若质粒或宿主菌是非常高的拷贝数或生长率, 则需调整 LB 培养液体积。

(7) 质粒未全部溶解 (尤其质粒较大时) 洗脱溶解质粒时, 可适当加温或延长溶解时间。

(8) 乙醇残留 漂洗液洗涤后应离心尽量去除残留液体, 树脂型试剂盒漂洗后应晾干树脂, 再加入洗脱缓冲液。

(9) 洗脱液加入位置不正确 洗脱液应加在硅胶膜中心部位以确保洗脱液会完全覆盖硅胶膜的表面达到最大洗脱效率。

(10) 洗脱液不合适 DNA 只在低盐溶液中才能被洗脱, 如洗脱缓冲液 EB (10 mM Tris•Cl, pH 8.5) 或水。洗脱效率取决于 pH 值。最大洗脱效率在 pH7.0-8.5 间。当用水洗脱时确保其 pH 值在此范围内, 如果 pH 过低可能导致洗脱量低。洗脱时将灭菌蒸馏水或洗脱缓冲液加热至 60℃ 后使用有利于提高洗脱效率。

(11) 洗脱体积太小 洗脱体积对回收率有一定影响。随着洗脱体积的增大回收率增高, 但产品浓度降低。为了得到较高的回收率可以增大洗脱体积。

(12) 洗脱时间过短 洗脱时间对回收率也会有一定影响。洗脱时放置一分钟可达到较好的效果。

2. 质粒纯度不高:

(1) 混有蛋白 不要使用过多菌体。裂解液 1, 2, 3 处理并离心后溶液应为澄清的, 如果还混有微小蛋白悬浮物, 可再次离心去除后再进行下一步骤。

(2) 混有 RNA RNase A 处理不彻底, 请减少菌体用量或加入裂解液 3 之后室温放置一段时间。如

果裂解液 1 已保存 6 个月以上, 请在裂解液 1 中添加 RNase A。

(3) 混有基因组 DNA 加入裂解液 2, 3 后应温和混匀, 如果剧烈振荡, 可能把基因组 DNA 剪切成碎片从而混杂在质粒中。如果加入裂解液 2 后过于粘稠, 无法温和混匀, 请减少菌体用量。细菌培养时间过长会导致细胞和 DNA 的降解, 不要超过 16 小时。

(4) 裂解液 3 溶液加入时间过长 裂解液 P3 溶液加入后, 放置时间不要过长, 否则有可能会产生小片段 DNA 污染。

(5) 含大量核酸酶的宿主菌 宿主菌含大量核酸酶, 在质粒提取过程中降解质粒 DNA, 影响提取质粒 DNA 的完整性, 最好选用不含核酸酶的大肠杆菌宿主菌, 如 DH5 α 和 Top10。

(6) 裂解时间过长 加入裂解液 2 后裂解时间不应超过 5 分钟。

(7) 质粒的二聚体和多聚体形式 质粒复制过程中形成的, 与宿主菌相关, 电泳可检测出。

(8) 质粒提出后跑电泳有多条条带 可能原因是菌液污染了杂菌, 解决方法: 将原菌液分区划线后挑出单菌落重新培养提质粒。

二 DNA 回收常见问题分析及解决方案

1. 回收率低可能原因

(1) 膜结合液 (MB) 使用量不当 解决方法按每 1 mg 凝胶或每 1 μ l DNA 溶液加入 1 μ l 膜结合液的比例 (1:1) 加入膜结合液。

(2) 溶胶不完全 解决方法尽量将胶切成小块, 加入膜结合溶液后于 55~65 $^{\circ}$ C 加热助溶, 确保溶胶彻底。

(3) 离心转速不够, 溶液中的 DNA 没有与硅胶膜充分结合 解决方法使用离心力 $\geq 12,000 \times g$ 的离心机, 如达不到该转速, 可通过适当延长离心时间确保胶溶液完全通过硅胶膜。

(4) 膜漂洗液 (MW) 未添加乙醇 第一次使用时按比例添加乙醇, 并在试剂瓶上做标记。

(5) 洗脱溶液 pH 值不合适 使用试剂盒提供的洗脱缓冲液 (EB); 如用去离子水洗脱, 需将 pH 值调至 7.5~8.5 范围。

(6) 洗脱溶液体积过小 使用 30 μ l 洗脱溶液, 加至硅胶膜的中央, 静置 1 分钟, 使膜完全浸润后再离心。

2. 回收产物测序结果不佳

(1) 用量太低 提高测序反应使用的 DNA 量; 如果回收产物浓度过低, 可通过乙醇沉淀浓缩产物。

(2) 用量过高, 干扰测序结果 降低 DNA 用量, 必要时用 EB 或灭菌双蒸水进行稀释。

(3) TE 缓冲液干扰测序结果 使用无 DNA 酶污染的洗脱缓冲液 (EB) 或灭菌双蒸水溶解 DNA 作为测序模板。

(4) 紫外线下暴露时间过长 切胶动作要快, 尽量减少紫外线照射的时间

3. 酶切效果不佳

(1) 酶的质量低劣或使用方法不当 按照厂家说明书正确使用酶; 设立阳性对照检测内切酶活性。

(2) 膜漂洗液 (MW) 去除不彻底, 胶回收产物中残留有乙醇或盐 再次乙醇沉淀回收, 并确保 DNA 溶液体积不高于酶切反应总体积的 10%。

4. 电泳上样时漂出上样孔

(1) 未添加上样缓冲液 与适量上样缓冲液混合后上样。

(2) 膜漂洗液 (MW) 去除不彻底, 胶回收产物中残留有乙醇 确保洗涤步骤中洗涤缓冲液去除彻底, 可增加离心时间或打开盖一段时间使残留乙醇挥发。

5. 回收产物电泳条带不锐利

(1) DNA 分子断裂 切胶、混合等操作尽量小心, 特别是大片段, 应避免 DNA 因机械损伤而断裂。

(2) 其他 DNA 分子污染 DNA 切胶回收时应使用新配制的琼脂糖胶和电泳缓冲液以避免 DNA 污染。

(3) DNA 分子降解 切下来的胶块如不能及时回收, 应于 4℃ 保存, 避免 DNA 降解。

6. 克隆效率低

(1) 离心吸附柱漂洗不彻底 再次乙醇沉淀回收。

(2) 回收过程中有外切酶污染, 导致 DNA 片段末端序列缺失 用新鲜配制的胶和电泳缓冲液进行电泳; 胶回收保证无菌操作。

(3) 感受态细胞的效率差 确保感受态制备和保存方法正确。

三 DNA 电泳常见问题分析及其解决方案

1. DNA 带模糊

(1) DNA 降解 避免核酸酶污染。

(2) 电泳缓冲液陈旧 电泳缓冲液多次使用后, 离子强度降低, pH 值上升, 缓冲能力减弱, 从而影响电泳效果。建议经常更换电泳缓冲液。

(3) 所用电泳条件不合适 电泳时电压不应超过 20V/cm, 温度 < 30℃; 巨大 DNA 链电泳, 温度应 < 15℃; 核查所用电泳缓冲液是否有足够的缓冲能力。

(4) DNA 上样量过多 DNA 上样量过多。

(5) DNA 样含盐过高 电泳前通过乙醇沉淀去除过多的盐。

(6) 有蛋白污染 电泳前酚抽提去除蛋白。

(7) DNA 变性 电泳前勿加热, 用 20mM NaCl 缓冲液稀释 DNA。

2. 不规则 DNA 带迁移

(1) 对于 λ /Hind III 片段 cos 位点复性 电泳前于 65℃ 加热 DNA 5 分钟，然后在冰上冷却 5 分钟。

(2) 电泳条件不合适 电泳电压不超过 20V/cm；温度 < 30℃；经常更换电泳缓冲液。

(3) DNA 变性 以 20mM NaCl Buffer 稀释 DNA，电泳前勿加热。

3. 带弱或无 DNA 带

(1) DNA 的上样量不够 增加 DNA 的上样量；聚丙烯酰胺凝胶电泳比琼脂糖电泳灵敏度稍高，上样量可适当降低。

(2) DNA 降解 避免 DNA 的核酸酶污染。

(3) DNA 走出凝胶 缩短电泳时间，降低电压，增强凝胶浓度。

(4) 对于 EB 染色的 DNA，所用光源不合适 应用短波长 (254nm) 的紫外光源。

4. DNA 带缺失

(1) 小 DNA 带走出凝胶 缩短电泳时间，降低电压，增强凝胶浓度。

(2) 分子大小相近的 DNA 带不易分辨 增加电泳时间，核准正确的凝胶浓度。

(3) DNA 变性 电泳前请勿高温加热 DNA 链 以 20mM NaCl Buffer 稀释 DNA。

(4) DNA 链巨大 常规凝胶电泳不合适 在脉冲凝胶电泳上分析。

四 外源质粒对大肠杆菌的转化

1. 转化率的影响因素

转化率的高低对于一般重组克隆实验关系不大，但在构建基因文库时，保持较高的转化率至关重要。影响转化率的因素很多，其中包括：

(1) 载体 DNA 及重组 DNA：

载体本身性质决定了转化率的高低，不同载体 DNA 转化同一受体细胞，其转化率明显不同。载体分子的空间构象对转化率也有明显影响，超螺旋结构的载体质粒往往具有较高的转化率，经体外酶切连接操作后的载体 DNA 或重组 DNA 由于空间构象改变，其转化率一般要比具有超螺旋结构的质粒低。

(2) 受体细胞：

受体细胞一般要求具有限制重组缺陷性，而且应与所转化的载体 DNA 性质相匹配，如 pBR322 转化大肠杆菌 JM83 株，其转化率不高于 103/mg DNA，但若转化 ED8767 株，则可获得 106/mg DNA 的转化率。

(3) 转化操作：

受体细胞的预处理或感受态细胞的制备对转化率影响最大。对于 Ca^{2+} 诱导的完整细胞转化而言，菌龄、 CaCl_2 处理时间、感受态细胞的保存期以及热脉冲时间均是很重要的因素，其中感受态细胞通常在 12-24 小时内转化率最高，之后转化率急剧下降。

(4) 试剂纯度与器皿的洁净度：

转化过程中，所用的试剂 (CaCl_2 ，甘油，水) 必须是高纯度的。所用器皿尽量酸洗后乙醇洗涤，超声后用超纯水淋洗。

2. 重组质粒转化于大肠杆菌，接种到含有抗生素的平板培养基中能生长，但接种

到含同样抗生素的液体培养基中，无细菌生长可能存在的原因和解决方法：

(1) 接到平板培养基上成功生长的菌种太少，长出的菌未必是转化进载体的大肠杆菌，可以做牙签法质粒抽提，跑电泳看是否成功转化。

(2) 往液体培养基接种时量太少没接上：重新接种。

分子生物学实验常见问题分析及对策-26

一、质粒的提取常见问题与对策

1. 未提出质粒或质粒得率较低，如何解决？

1) 大肠杆菌老化：涂布平板培养后，重新挑选新菌落进行液体培养。

2) 质粒拷贝数低：由于使用低拷贝数载体引起的质粒 DNA 提取量低，可更换具有相同功能的高拷贝数载体。

3) 菌体中无质粒：有些质粒本身不能在某些菌种中稳定存在，经多次转接后有可能造成质粒丢失。例如，柯斯质粒在大肠杆菌中长期保存不稳定，因此不要频繁转接，每次接种时应接种单菌落。另外，检查筛选用抗生素使用浓度是否正确。

4) 碱裂解不充分：使用过多菌体培养液，会导致菌体裂解不充分，可减少菌体用量或增加溶液的用量。对低拷贝数质粒，提取时可加大菌体用量并加倍使用溶液，有助于增加质粒提取量 and 提高质粒质量。

5) 溶液使用不当：溶液 2 和 3 在温度较低时可能出现浑浊，应置于 37℃ 保温片刻直至溶解为清亮的溶液，才能使用。

6) 吸附柱过载：不同产品中吸附柱吸附能力不同，如果需要提取的质粒量很大，请分多次提取。若用富集培养基，例如 TB 或 2×YT，菌液体积必须减少；若质粒是非常高的拷贝数或宿主菌具有很高的生长率，则需减少 LB 培养液体积。

7) 质粒未全部溶解(尤其质粒较大时)：洗脱溶解质粒时，可适当加温或延长溶解时间。

8) 乙醇残留：漂洗液洗涤后应离心尽量去除残留液体，再加入洗脱缓冲液。

9) 洗脱液加入位置不正确：洗脱液应加在硅胶膜中心部位以确保洗脱液会完全覆盖硅胶膜的表面达到最大洗脱效率。

10) 洗脱液不合适：DNA 只在低盐溶液中才能被洗脱，如洗脱缓冲液 EB(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.5) 或水。洗脱效率还取决于 pH 值，最大洗脱效率在 pH7.0-8.5 间。当用水洗脱时确保其 pH 值在此范围内，如果 pH 过低可能导致洗脱量低。洗脱时将灭菌蒸馏水或洗脱缓冲液加热至 60℃ 后使用，有利于提高洗脱效率。

11) 洗脱体积太小：洗脱体积对回收率有一定影响。随着洗脱体积的增大回收率增高，但产品浓度降低。为了得到较高的回收率可以增大洗脱体积。

12) 洗脱时间过短：洗脱时间对回收率也会有一定影响。洗脱时放置 1min 可达到较好的效果。

2. 为什么在保存或抽提 DNA 过程中，一般采用 TE 缓冲液？

在基因操作实验中，选择缓冲液的主要原则是考虑 DNA 的稳定性及缓冲液成分不产生干扰作用。磷酸盐缓冲系统 ($pK_a=7.2$) 和硼酸系统 ($pK_a=9.24$) 等虽然也都符合细胞内环境的生理范围 (pH)，可作 DNA 的保存液，但在转化实验时，磷酸根离子的种类及数量将与 Ca^{2+} 产生 $Ca_3(PO_4)_2$ 沉淀；在 DNA 反应时，不同的酶对辅助因子的种类及数量要求不同，有的要求高离子浓度，有的则要求低盐浓度，采用 Tris-HCl ($pK_a=8.0$) 的缓冲系统，由于缓冲液是 $TrisH^+/Tris$ ，不存在金属离子的干扰作用，故在提取或保存 DNA 时，大都采用 Tris-HCl 系统，而 TE 缓冲液中的 EDTA 更能稳定 DNA 的活性。

3. 为什么用酚与氯仿抽提 DNA 时，还要加少量的异戊醇？

在抽提 DNA 时，为了混合均匀，必须剧烈振荡容器数次，这时在混合液内易产生气泡，气泡会阻止相互间的充分作用。加入异戊醇能降低分子表面张力，所以能减少抽提过程中的泡沫产生。一般采用氯仿与异戊醇为 24:1 之比。也可采用酚、氯仿与异戊醇之比为 25:24:1 (不必先配制，可在临用前把一份酚加一份 24:1 的氯仿与异戊醇即成)，同时异戊醇有助于分相，使离心后的上层水相，中层变性蛋白相以及下层有机溶剂相维持稳定。

4. 细菌离心加入溶液 I 涡旋振荡后，发现菌体呈絮状不均匀或呈细砂状？

1) 细菌发生溶菌，可减少培养时间或者试试平板培养，质粒提取前用 PBS 将菌落洗下，相较来说固体培养基上细菌生长的要好一些。

2) 质粒抽提过程很大程度上是受细菌生长情况决定的，刚活化的菌比负 80°C 保存菌种所培养出来的菌液状态好，保存久的菌株可能会造成质粒浓度低，质粒丢失等不明原因。

3) 判断生长的菌液是否正常，可以用肉眼观察，在光线明亮处摇荡新鲜培养液，如果发现菌液呈漂絮状，情况很好。如果发现呈泥水状，即看不到絮状，只是感觉很浑浊，则可能提不出好的质粒，或者没有质粒。

4) 菌液不宜生长太浓，摇床速度不宜过高。达到 OD600 1.5 就可以了，（尤其是对于试剂盒提取要注意）另外如果只是简单的酶切验证根本无需酚氯仿抽提（安全考虑，慎重），只要溶液 I/ II /III 比例恰当，转管过程仔细吸取不会有太多杂志。

5. 为什么加了溶液 II 后，菌体没有逐渐由混浊变澄清？提出来的条带几乎没有，但是 RNA 很亮（没加 RNA 酶）？

溶液 II 主要就是 NaOH，如果菌液没有由混浊变澄清，

1) 可能是因为溶液储存不当，或屡次操作没有及时盖好溶液瓶盖，导致其吸收空气中的 CO_2 失效。RNA 在菌体中量较多，相对少量的菌体裂解，可有较 DNA 明显的条带。

2) 可能是菌量大，加溶液 II 后，菌体并不能完全裂解，所以没有变清，这也会导致质粒产率低下。

3) 可能是质粒的拷贝数不高，质粒产率不高。如果是使用自己配的试剂，建议

做中提或大提；或者买试剂盒提。用自己配的试剂，不加 RNA 酶，最后 RNA 是很亮的，要去除干净就要用比较好的 RNA 酶。

4) 如果不是试剂的原因，可能是质粒表达的过程中使膜蛋白变化（数量变多），很难使用碱裂解法，可以尝试用其他比较剧烈的方法（比如高温或者低温研磨等），然后使用一般的质粒提取。

5) 可能质粒随乙醇一起倒掉了。

6. 加入溶液 II 后，菌液仍然呈浑浊状态，或者混浊度没有明显的改变？

裂解不完全

1) 问题可能是发生在溶液 II 上。首先看看 10% SDS 是否是澄清的？NaOH 是否有效的？如果使用的是试剂盒，也要首先确认溶液 II 是否澄清没有沉淀？

2) 可能是细菌浓度很高，适当调整增加溶液 I/II/III 的体积。

3) 可能是“杂菌”污染，如果菌液生长异常快，就有可能被杂菌污染。这种情况一般表现为和目的菌有相同的抗性，生长速度异常，能够提出质粒，跑胶的条带也异常的亮，但产物不是自己想要的质粒，要特别注意一下。

7. 提取的质粒电泳后，为连续的一片火箭状？

1) 质粒如果盐离子多，会有走胶变形的现象，如果提到的质粒不够纯，会有电泳条带不平齐的现象。

2) 当电压太大时，容易出现火箭状，而降解应该是弥散状。

3) 可能是宿主菌影响的，质粒抽提好后，用酚-氯仿处理一下再酶切，若有改善，则为宿主菌影响。转化到其它宿主菌再切。

4) NaOH 的浓度过高，会出现火箭状的结果。

8. 用碱裂解法提取质粒，裂解 5 分钟，没有用酚 / 氯仿抽提，最后用灭菌水溶解质粒 DNA 15min。双酶切后跑胶一条带都没有，原因是什么？

1) 溶解时间稍微短了点，但是根据各个实验室 RNase 不同，这个条件是不同的。在溶解的过程要涡旋处理促进溶解。

2) 确认一下酶切过程中是不是有 DNA 酶的污染，比如酶切体系的 Buffer 或者是水，特别是水中；其次是酶切体系的问题；建议再把提取的产物用 70% 酒精重新洗涤一遍，也可以用酚 / 氯仿重新抽提一下。

3) 也可能在用乙醇洗时把质粒倒掉了。

4) 没有用 RNase 消化，不要用放久的 RNase 否则会有 DNA 酶的污染；

5) 在没有进行酶切时，把所提的质粒跑一下核酸电泳看看，如果是提核酸的问题那这一步电泳结果应该没有大于三千的条带，这样可以先排除核酸提取的问题。若是没有酶切时间过长等其他问题的话可以检查一下所用的溶解 DNA 的溶液是否有 DNase 污染的问题，建议将超纯水换成 TE。

二、DNA 电泳常见问题与对策

1. DNA 带模糊

1) DNA 降解：避免核酸酶污染

2) 电泳缓冲液陈旧：电泳缓冲液多次使用后，离子强度降低，pH 值上升，缓冲

能力减弱，从而影响电泳效果。建议经常更换电泳缓冲液

3) 所用电泳条件不合适：电泳时电压不应超过 20V/cm，温度 < 30℃；巨大 DNA 链电泳，温度应 < 15℃；核查所用电泳缓冲液是否有足够的缓冲能力

4) DNA 上样量过多：减少凝胶中 DNA 上样量

5) DNA 样含盐过高：电泳前通过乙醇沉淀去除过多的盐

6) 有蛋白污染：电泳前酚抽提去除蛋白

7) DNA 变性：电泳前勿加热，用 20mM NaCl 缓冲液稀释 DNA

2. 不规则 DNA 带迁移

1) 对于 λ /Hind III 片段 cos 位点复性：电泳前于 65℃ 加热 DNA 5 分钟，然后在冰上冷却 5 分钟

2) 电泳条件不合适：电泳电压不超过 20V/cm；温度 < 30℃；经常更换电泳缓冲液

3) DNA 变性：以 20mM NaCl Buffer 稀释 DNA，电泳前勿加热

3. 带弱或无 DNA 带

1) DNA 的上样量不够：增加 DNA 的上样量；聚丙烯酰胺凝胶电泳比琼脂糖电泳灵敏度稍高，上样量可适当降低

2) DNA 降解：避免 DNA 的核酸酶污染

3) DNA 走出凝胶：缩短电泳时间，降低电压，增强凝胶浓度

4) 对于 EB 染色的 DNA：所用光源不合适 应用短波长（254nm）的紫外光源

4. DNA 带缺失

1) 小 DNA 带走出凝胶：缩短电泳时间，降低电压，增强凝胶浓度

2) 分子大小相近的 DNA 带不易分辨：增加电泳时间，核准正确的凝胶浓度

3) DNA 变性：电泳前请勿高温加热 DNA 链，以 20mM NaCl Buffer 稀释 DNA

4) DNA 链巨大：常规凝胶电泳不合适，在脉冲凝胶电泳上分析

三、DNA 回收常见问题与对策

1. 没有回收到 DNA 片段

如在洗脱后，发现洗脱液中没有 DNA 片段，请检查是否按瓶身标签在洗涤液中加入了无水乙醇。

2. 提取率低

(1) 融胶液为酸性缓冲液，如融胶后，其 pH 值升高将影响提取率。请加入 0.1 倍体积的 3M 乙酸钾 (pH5.0)。

(2) 长时间使用后没有更换的电泳缓冲液，其 pH 值较高，将影响 DNA 的吸附。请更换新的电泳缓冲液后，再进行电泳，然后切胶。

(3) 在洗脱前，将洗脱液于 30~60℃ 温浴，可提高提取效率。

3. 吸光度测量结果问题

吸光度测量的是未知样品与调零标准之间的相对吸光度，所以请用与洗脱液体相同的液体，对测量样品进行稀释和调零。

4. 如何计算提取率

(1) 由于回收前样品中，往往含有非目的 DNA 片段、引物、dNTP 等，所以不能用测回收前后吸光度的方法计算回收率。

(2) 可将回收前后 DNA 片段一起电泳，使用凝胶成像系统拍照后，用配套的软件进行电泳条带灰度对比。

(3) 注意：电泳条件及拍摄条件将对灰度对比结果造成很大影响，请仔细操作，以减小误差。

5. 核酸纯化的基本流程是什么？

胶回收的过程非常简单，电泳分离目的条带后，加入融胶液，50-60 度处理几分钟，使胶彻底融化，加入 EZ-resin 和结合剂，核酸将结合到树脂上，用试剂盒提供的 Wash 溶液洗去非特异的产物，然后用 TE 或水洗脱即可使用。

6. 核酸纯化的基本流程是什么？

胶回收的过程非常简单，电泳分离目的条带后，加入融胶液，50-60 度处理几分钟，使胶彻底融化，然后转移到 3S 离心柱中，核酸将吸附到柱底部的吸附层上，用试剂盒提供的 Wash 溶液洗去非特异杂质，然后用 TE 或水洗脱即可使用。

7. Ez-Resin 和 3S column 核酸纯化的主要差别是什么？

这两者的原理和吸附材料是不同的。EZ-resin 吸附材料是硅胶基质，规模可以根据需要调整，但是批量操作相对麻烦一些，干燥需要凉干，干燥程度影响洗脱效果，当然也可以真空干燥，需要实验经验作为支撑。3S column 吸附材料是玻璃基质，柱离心式，操作比较方便，可以自动化和批量处理。在实验过程中，我们发现，用不同方式纯化的 DNA，下游使用的效果有一定的差异。我们注意到用 EZ-resin 纯化 PCR 产物，做全自动测序和 TA 克隆的成功率要高一些。所以我们仍然保留了 Ez-Resin 纯化试剂盒。两种纯化得到的 DNA，纯度和使用效果差别不大。

8. 如何提高胶回收的得率？

Agarose 抑制 DNA 与吸附材料的结合，将不含 DNA 片段多余的 Agarose 切除，能显著提高回收效率。DNA 结合到吸附材料，需要一定浓度的结合剂，Agarose 多了，结合剂 (Solution SN) 的相对浓度就会下降，得率就受到影响。大多数情况下，是由于电泳时琼脂糖的浓度不同，切下的胶块有大有小，得率自然不同。回收的得率还与回收片段的大小有关。提高结合剂 (Solution SN) 的相对浓度，增加 DNA 与吸附材料作用时间 (放置时间)，控制好离心速度都一定程度上可以提高得率。改善洗脱条件，如提高洗脱溶液的 pH 值，温度，增加洗脱液的体积等也可以提高得率，但是对于 pH 过高，可能会影响下游反应，通常情况下采用 pH8-8.5 为宜。

9. 胶回收的实验次数是如何确定的？

通常情况下，试剂盒所提供的试剂量是规定次数试剂需要量的 110%。以 3S column 胶回收为例，一次实验所提供的溶液是指离心小柱子内所能容纳的最大体积，应该按照说明书建议用量使用。

10. 采用 Ez-resin 和 3S column 所能回收片段的上/下限是多少？

有些试剂盒可以回收片段的 70bp 以上的片段。回收小片段时需要适当提高结合剂使用量，如将 Solution SN: Agarose 的比例提高到 6-7。从使用情况看，回收 10kb 左右的片段是没有什么问题，但是片段越大，回收的效率相对较低，DNA 受损伤的可能性就大一些。

11. 回收的片段为什么电泳上样会漂起来？

主要问题是纯化过程中的乙醇没有除干净。

12. 纯化过程中乙醇或核酸结合剂（Solution S, SN, B 等）不能去除干净，对下游实验有影响吗？

影响非常大。操作过程中有专门除残留乙醇的步骤，不可以省略，否则下游的酶切和连接都可能遇到问题。可以使核酸结合到吸附材料上的吸附剂很多，这些吸附助剂的残留对克隆影响较大。

13. 胶很难融如何处理？

1) 将融胶温度提高到 60 度

2) 可能是胶的浓度太高，需要提高融胶液的体积

3) 融胶过程中每隔一段时间就震荡几下帮助融胶。

14. 如何鉴定回收的效果？

电泳比较回收前后的条带强弱。比较时需要将回收的产物全部加到胶中去，具有可比性。如果样品难得，可以选无关的片段验证一下。

15. 如果胶在后续过程发生胶没有彻底融化，如何补救？

补加融胶液，将胶悬起来，50-60 度继续保温至彻底融化。

16. 回收的产物都需要电泳鉴定吗？

不需要，通常情况回收的量和纯度能满足下游实验要求。公司提供的产品，一直都有严格的生产和质量控制过程。每批产品都同时在公司内部大量使用。如果有问题，公司肯定会在第一时间发现。

17. 洗脱 DNA 用什么洗脱好？

需要根据回收片段下游用途确定。一般情况下，采用 TE 或 Tris 缓冲液可以。测序反应，请用无菌水洗脱。如果洗脱的 DNA 需要长期保存，请用 TE 洗脱。

18. 如果 DNA 纯化的得率非常低或根本没有，估计是什么问题？

一点都不能得到产物的回收情况很少见，有些情况是判定回收效率的方式不对。如对，请检查一下 Wash 中有没有加入酒精；检查加入的 DNA 结合剂（Solution S 或 Solution SN）的量对不对；洗脱前有没有将残留的酒精去彻底；洗脱液有没有使吸附材料充分接触（洗脱），接触的时间是否充分。

19. 用 Ez-Resin 如果凉干过头，如何处理？

加 TE，50-60 度处理 10 分钟，间或振荡，离心收集上清。

20. 什么情况下需要在 50-60 度的情况洗脱？

如果十分关心效率，回收的片段为大片段（10kb 左右），单链片段等需要预保温洗脱液。

21. UV 方式定量回收的量合适吗？

对于 Miniprep, 回收的量很少, 用 UV 方式定量不合适, 用琼脂糖电泳方式确定。

22. 从溶液中回收时, 加入结合剂 (如 Solution S 或 Solution B) 发生沉淀如何处理?

样品中的组分与试剂盒的试剂发生反应, 遇到此类情况, 请直接和厂家联系, 厂家将根据样品的组分订制出合适的结合剂。

四、外源质粒对大肠杆菌的转化常见问题与对策

1. 转化率的原因及解决方法

1) DNA 不纯: 除去 DNA 溶液中的酚、蛋白质、去污剂和乙醇

2) DNA 量过多: 每 100ul 感受态细胞中加入 DNA 的量为 1—10ng。DNA 样品体积超过总体积的 10%

3) 抗性表达差: 改用 SOC 作为表达培养基; 在转化细胞涂布前, 应至少培养 30 分钟, 使抗性基因表达; 如用氨苄青霉素筛选, 转化细胞必须稀释后再涂布。否则抗性菌落周围的一些菌落也会生长。用 50—100ug/ml 羧苄青霉素可减轻这一问题

4) 热激不当: 根据预备实验, 固定菌株小管型号、反应体积及热激的最适温度和时间。如改变了管子型号和反应体积, 就应重新调整温度和时间

2. 对 DNA 分子来说, 能被转化进受体细胞的比率极低, 通常只占 DNA 分子的 0.01%, 改变条件, 提高转化率是很有可能, 怎样提高转化率?

1) 受体菌细胞与 DNA 分子两者比例在 1.6×10^8 细胞:1 毫微克 DNA 分子 (4.3Kb) 左右转化率较好;

2) DNA 分子与细胞混合时间为 1 小时最佳;

3) 铺平板条件会影响转化率;

4) 对不同转化菌株热处理 (效应不一致)。

3. 为了提高感受态细胞的转化率, 实验中需要考虑哪些因素?

1) 细菌的生长状态: 实验中应密切注视细菌的生长状态和密度, 尽量使用对数生长期的细胞 (一般通过检测 OD600 来控制。DH5 α 菌株 OD600 为 0.5 时细胞密度是 5×10^7 /ml);

2) 所有操作均应在无菌条件和冰上进行;

3) 经 CaCl₂ 处理的细胞, 在低温条件下, 一定的时间内转化率随时间的推移而增加, 24 小时达到最高, 之后转化率再下降 (这是由于总的活菌数随时间延长而减少造成的);

4) 化合物及无机离子的影响: 在 Ca²⁺ 的基础上联合其他二价金属离子 (如 Mn²⁺ 或 Co²⁺)、DMSO 或还原剂等物质处理细菌, 可使转化效率大大提高 (100—1000 倍);

5) 所使用的器皿必须干净。迹量的去污剂或其它化学物质的存在可能大大降低细菌的转化效率;

6) 质粒的大小及构型的影响: 用于转化的应主要是超螺旋的 DNA;

7) 一定范围内, 转化效率与外源 DNA 的浓度呈正比

4. TA 克隆常见问题分析及解决方案

(1) 转化后无克隆菌产生

转化过程有问题或感受态细胞失活: 可通过转化 pUC18/19 等未切割的可用于抗性筛选的质粒, 检测感受态细胞的转化效率和转化操作是否正确

(2) PCR 产物连接时白色菌落数很少或根本没有

1) 10× 快速连接缓冲液稀释不当: 提供的 T4 连接酶缓冲液为十倍浓度, 10 μl 反应体积加 1 μl T4 连接酶缓冲液;

2) 连接反应存在问题: 连接缓冲液只有低的活性。10× 快速连接缓冲液含有 ATP, 温度波动 ATP 易降解。使用一次性分装的缓冲液, 避免其反复冻化;

3) T 突出端丢失, 引起载体平端连接, 因而蓝色菌落数高于白色菌落数: 避免核酸外切酶的引入, 降解 T 突出端;

4) 连接孵育时间不够长: 连接过夜可得到理想结果;

5) PCR 产物中含有抑制连接的成分, 导致连接的失败: 将 PCR 产物和连接反应对照混合, 观察是否存在抑制效应。如怀疑有抑制成分存在, 应重新纯化 PCR 产物;

6) PCR 产物没有 3' '''''''' -A 突出端, 不能连接。并非所有 DNA 聚合酶都产生 3' '''''''' -A 突出端, 如 Pfu 酶的 PCR 产物为平端。平端 PCR 产物可先通过聚合酶及 dATP 进行加尾反应产生 3' '''''''' -A 突出端, 再与 T 载体连接 由于紫外灯过度照射形成嘧啶二聚体, PCR 产物不能连接;

7) PCR 产物已经插入, 但未破坏 lacZ 基因的翻译框;

8) 插入片段: 载体连接比例不理想;

9) 连接的 PCR 片段中可能有引物二聚体;

10) PCR 产物质量太差。

(3) PCR 连接反应只产生白色克隆 (没有蓝色克隆)

1) 氨苄失活, 因而氨苄敏感菌可生长。检查氨苄平板是正常制备并在一个月使用菌株 (如 TOP10) 丧失 F' '''''''' 因子检测背景对照, 如果菌落不是蓝色的, 则可能是宿主菌细胞丢失 F' '''''''' 因子 (假设 acIqZ.M15 位于宿主菌的 F' '''''''' 因子上, 并使用正常平板)。用于 T- 载体系统的感受态细胞一定要正确制备;

2) 检查平板是否含有氨苄 /IPTG/X-Gal 以及是否新鲜。如平板有问题, 重新制备新鲜平板

分子生物学实验常见问题分析及对策-27

一、普通 PCR 常见问题及解决对策

PCR 产物的电泳检测时间一般为 48h 以内, 有些最好于当日电泳检测, 大于 48h

后带型不规则甚至消失。

1. 假阴性，不出现扩增条带

PCR 反应的关键环节有①模板核酸的制备，②引物的质量与特异性，③酶的质量及活性④PCR 循环条件。寻找原因亦应针对上述环节进行分析研究。

1.1 模板

①模板中含有杂蛋白质，②模板中含有 Taq 酶抑制剂，③模板中蛋白质没有消化除净，特别是染色体中的组蛋白，④在提取制备模板时丢失过多，或吸入酚。⑤模板核酸变性不彻底。在酶和引物质量好时，不出现扩增带，极有可能是标本的消化处理，模板核酸提取过程出了毛病，因而要配制有效而稳定的消化处理液，其程序亦应固定不宜随意更改。

1.2 酶失活

需更换新酶，或新旧两种酶同时使用，以分析是否因酶的活性丧失或不够而导致假阴性。需要注意的是有时忘加 Taq 酶或溴乙锭。

1.3 引物

引物质量、引物的浓度、两条引物的浓度是否对称，是 PCR 失败或扩增条带不理想、容易弥散的常见原因。有些批号的引物合成质量有问题，两条引物一条浓度高，一条浓度低，造成低效率的不对称扩增，对策为：①选定一个好的引物合成单位。②引物的浓度不仅要看 OD 值，更要注重引物原液做琼脂糖凝胶电泳，一定要有引物条带出现，而且两引物带的亮度应大体一致，如一条引物有条带，一条引物无条带，此时做 PCR 有可能失败，应和引物合成单位协商解决。如一条引物亮度高，一条亮度低，在稀释引物时要平衡其浓度。③引物应高浓度小量分装保存，防止多次冻融或长期放冰箱冷藏部分，导致引物变质降解失效。④引物设计不合理，如引物长度不够，引物之间形成二聚体等。

1.4 Mg^{2+} 浓度

Mg^{2+} 离子浓度对 PCR 扩增效率影响很大，浓度过高可降低 PCR 扩增的特异性，浓度过低则影响 PCR 扩增产量甚至使 PCR 扩增失败而不出扩增条带。

1.5 反应体积的改变

通常进行 PCR 扩增采用的体积为 20 μ l、30 μ l、50 μ l。或 100 μ l，应用多大体积进行 PCR 扩增，是根据科研和临床检测不同目的而设定，在做小体积如 20 μ l 后，再做大体积时，一定要摸索条件，否则容易失败。

1.6 物理原因

变性对 PCR 扩增来说相当重要，如变性温度低，变性时间短，极有可能出现假阴性；退火温度过低，可致非特异性扩增而降低特异性扩增效率退火温度过高影响引物与模板的结合而降低 PCR 扩增效率。有时还有必要用标准的温度计，检测一下扩增仪或水浴锅内的变性、退火和延伸温度，这也是 PCR 失败的原因之一。

1.7 靶序列变异：如靶序列发生突变或缺失，影响引物与模板特异性结合，或因靶序列某段缺失使引物与模板失去互补序列，其 PCR 扩增是不会成功的。

2. 假阳性

出现的 PCR 扩增条带与目的靶序列条带一致，有时其条带更整齐，亮度更高。

2.1 引物设计不合适

选择的扩增序列与非目的扩增序列有同源性，因而在进行 PCR 扩增时，扩增出的 PCR 产物为非目的性的序列。靶序列太短或引物太短，容易出现假阳性。需重新设计引物。

2.2 靶序列或扩增产物的交叉污染

这种污染有两种原因：一是整个或大片段的交叉污染，导致假阳性。这种假阳性可用以下方法解决：①操作时应小心轻柔，防止将靶序列吸入加样枪内或溅出离心管外。②除酶及不能耐高温的物质外，所有试剂或器材均应高压消毒。所用离心管及样进枪头等均应一次性使用。③必要时，在加标本前，反应管和试剂用紫外线照射，以破坏存在的核酸。二是空气中的小片段核酸污染，这些小片段比靶序列短，但有一定的同源性。可互相拼接，与引物互补后，可扩增出 PCR 产物，而导致假阳性的产生，可用巢式 PCR 方法来减轻或消除。

3. 基因组出现非特异性扩增带

PCR 扩增后出现的条带与预计的大小不一致，或大或小，或者同时出现特异性扩增带与非特异性扩增带。

3.1 原因

一是引物与靶序列不完全互补、或引物聚合形成二聚体。二是 Mg^{2+} 离子浓度过高、退火温度过低，及 PCR 循环次数过多有关。其次是酶的质和量，往往一些来源的酶易出现非特异条带而另一来源的酶则不出现，酶量过多有时也会出现非特异性扩增。

3.2 对策

①必要时重新设计引物。②减低酶量或调换另一来源的酶。③降低引物量，适当增加模板量，减少循环次数。④适当提高退火温度或采用二温度点法 ($93^{\circ}C$ 变性， $65^{\circ}C$ 左右退火与延伸)。

4. 出现片状拖带或涂抹带或地毯样带

4.1 原因

往往由于酶量过多或酶的质量差，dNTP 浓度过高， Mg^{2+} 浓度过高，退火温度过低，循环次数过多引起。

4.2 对策

①减少酶量，或调换另一来源的酶。②减少 dNTP 的浓度。③适当降低 Mg^{2+} 浓度。④增加模板量，减少循环次数。

二、荧光定量 PCR 常见问题及解决对策

1. 无 C_t 值（信号）出现

1.1 反应循环数不够：一般都要在 35 个循环以上，可根据实验情况增加循环，但高于 45 个循环会增加过多的背景信号。

1.2 检测荧光信号的步骤有误：一般采用 $72^{\circ}C$ 延伸时采集荧光，Taqman 方法

则一般在退火结束或延伸结束采集信号。

- 1.3 引物或探针降解：可通过 PAGE 电泳检测其完整性。
- 1.4 探针设计不佳：设计探针温度低于引物，造成探针未杂交上而产物已延伸。
- 1.5 模板量少：对未知浓度的样品应从系列稀释样品的最高浓度做起。
- 1.6 模板降解：避免样品制备中杂质的引入以及模板反复冻融的情况发生。

2. 如何确认模板中是否含有 PCR 反应阻害物质

有时 RNA 或 cDNA 模板中存在对反转录和荧光 PCR 反应的阻害物质。为了确认这样的阻害物质的有无，我们可以使用高浓度的模板按 3—4 个梯度稀释，并使用其进行荧光定量 PCR 反应。如果无阻害物质存在，得到的 Ct 值就会依模板浓度的变化而变化；而如果模板中有阻害物质的存在，实验过程中我们就会发现高浓度的模板有反应性能下降的现象。

3. Ct 值出现过晚

- 3.1 反应条件不佳：未最佳反应条件，可重新设计引物或探针，适当降低退火温度，增加镁离子浓度等。
- 3.2 PCR 各种反应成分的降解或加样量不够。
- 3.3 扩增产物片段过长：一般采用 100—200bp 的扩增长度。

4. 标准曲线的线性关系不佳

- 4.1 加样存在误差，标准品稀释不呈梯度。
- 4.2 标准品降解：标准品尽量避免反复冻融。
- 4.3 引物或探针不佳：重新设计。
- 4.4 模板中存在抑制物，或模板浓度过高。

5. 阴性对照液出现明显的扩增

- 5.1 荧光 PCR mix 或水被污染；
- 5.2 引物二聚体的出现：在 35 循环后阴性对照出现扩增属正常情况，可配合溶解曲线进行分析。

5.3 反应过程中探针降解：用 PAGE 电泳对探针进行检测。

6. 溶解曲线不止一个主峰

- 6.1 引物设计不佳：避免二聚体和发夹结构的出现；
- 6.2 引物浓度不佳：适当调整引物浓度；
- 6.3 退火温度低：提高退火温度；
- 6.4 镁离子浓度过高：适当降低镁离子浓度；
- 6.5 模板中有基因组的污染：RNA 提取过程中避免基因组 DNA 的污染，或通过引物设计避免非特异扩增。

7. 如何避免荧光定量 PCR 中基因组 DNA 扩增？

- 7.1 引物设计时避免基因组 DNA 扩增；
- 7.2 在 RNA 提取过程中使用 DNase I 处理去除 RNA 中混有的基因组 DNA。

8. 扩增效率低

- 8.1 反应试剂中部分成分特别是荧光染料降解；

- 8.2 反应条件不佳：适当降低退火温度或改为三步扩增法；
- 8.3 反应体系中有抑制物：一般为模板中引入，应先把模板适当稀释，再加入到体系中，减少抑制物的影响。
9. 重复性不好
 - 9.1 加样不准确；
 - 9.2 仪器在样品上温度条件有差异，温度均一性不好；
 - 9.3 模板浓度低：样品初始浓度越低，重复性越差，应减少样品的稀释倍数。
10. 扩增曲线不正常，刚进入指数期就很快进入平台期并向右下弯曲
 - 10.1 基线等设置不当：按仪器说明书重新操作；
 - 10.2 模板量过多：当扩增曲线在 10 个循环内起峰时，应将模板稀释 100—1000 倍后使用。
11. 各孔间的荧光信号如何进行校正
由于加样操作的误差、离心管透光性能的差异、荧光激发效率的差异等偶然误差不可避免，因此仪器收集到的原始信号必须进行归一化校正，以消除这些因素对定量结果的影响。这种校正可以通过在反应体系中添加额外的荧光染料来实现，一般采用红色 ROX 荧光，称为阳性参比信号。ROX 在反应缓冲液中的浓度是固定的，因此其信号的强度与反应体系的总体积和总的荧光激发效率正相关。ROX 校正可以提高定量数据的精度和重现性，减少孔间差异。
12. 荧光定量 PCR CT 值一般在多少后认为模板没扩增？
当进入对数期的循环数大于 35 时，Real Time RT-PCR 检测无效，基因没有表达；当进入对数的循环数在 32-35 个循环时，需要有至少 3 个重复才能判断是否能检测到基因的表达。

三、DNA限制性内切酶酶切反应

1. 底物DNA没有被所用限制酶切断，为什么？
 - 1.1 底物DNA上没有该限制酶的识别、切断位点。特别是一些经过重组等处理的DNA，碱基易发生缺失、变化等。
 - 1.2 限制酶识别位点上的A或C被甲基化。
部分限制酶对识别位点中的碱基是否被甲基化比较敏感，从而无法切断该位点。被甲基化的部位，根据底物DNA及宿主种类的不同而不同。
大多数大肠杆菌都带有 2 种具有特异性识别位点的甲基化酶，即dam methylase (G6mATC) 和dcm methylase (C5mCWGG)。在进行转化时，通常使用的菌株为C600、HB101、JM109 等，因为都带有dam、dcm甲基化酶，所以使用这些菌株制备的DNA时，必须注意。另外，动物由来的DNA，CG序列多为 5mCG；植物由来的DNA，CG及CNG序列多为 5mCG和 5mCNG。
 - 1.3 底物不纯。
如果底物DNA中含有限制酶阻害物质，会影响限制酶的酶切作用。在此种情况下，底物DNA须重新进行纯化。

1.4 底物DNA种类不同，它们的大小，切点数也不同，达到完全分解时，所需要的酶量也不同，从这些数据中计算出的[完全分解 1 mg DNA所需要的限制酶预计量]与[实际量]，也因限制酶的种类不同而有差别，这些差别被认为是酶同其识别位点周围的高级结构亲和程度而产生的。例如，限制酶Nae I 在切断 pBR322 DNA时，就有着非常难以切断的部位。

1.5 Star活性（星号活性）

限制酶在一些特定条件下使用时，对于底物DNA的特异性可能降低。即可以把与原来识别的特定的DNA序列不同的碱基序列切断，这个现象叫Star活性。Star活性出现的频率，根据酶、底物DNA、反应条件的不同而不同，可以说几乎所有的限制酶都具有Star活性。并且，它们除了识别序列的范围增大之外，还发现了在DNA的一条链上加入切口的单链切口活性，所以为了极力抑制Star活性，一般情况下，即使会降低反应性能，也提倡在低甘油浓度、中性pH、高盐浓度条件下进行反应。

2. 怎样确认酶切位点是否被甲基化？

一般情况下，从大多数的大肠杆菌中提取的DNA，几乎都存在被甲基化的现象，其相对应识别序列的受甲基化影响的限制酶即切不开该酶切位点。而只有在转化时选用了甲基化酶欠损的大肠杆菌作为宿主，提取的DNA才不会被甲基化。在实际操作中，如果使用受甲基化酶影响的限制酶对从一般的大肠杆菌中提取的DNA进行酶切反应，而没切开，或者对测序结果有酶切位点的片段，切不开，其酶切位点被甲基化的可能性就比较大，这时就要选用不受甲基化影响的限制酶进行酶切。

3. 酶切位点被dam或dcm甲基化，要想切开怎么办？

一种方法是，选用不受dam、dcm甲基化影响的限制酶进行酶切反应。例如Sau3A I、Mbo I 具有相同的酶切位点，但Mbo I受dam methylase的影响，而Sau3A I不受dam methylase的影响。

另外一种方法是，使用dam、dcm甲基化酶欠损的宿主菌（例如GM33）进行DNA的转化和制备。还可以使用PCR方法对该DNA进行扩增，然后再进行酶切。

4. 限制酶活性定义的 1 U是在 37℃条件下，经 1 小时，将 1·μg □DNA完全切断的酶量，对所有的底物DNA都可以完全切开吗？

由于底物DNA的不同，其含有的酶切位点的摩尔浓度不同，空间结构也不相同，这些，都会对酶切反应的速度产生影响，所以，相同的酶量，不一定能将不同的底物切开。

5. 设计引物做PCR产物时，酶切位点的保护碱基如何设计比较合适？

各种限制酶，所需要的酶切位点的保护碱基的数量不同。一般情况下，在酶切位点以外多出 3 个碱基，即可以满足几乎所有限制酶的酶切要求。详细情况，请参照NEB公司的网页

(http://www.neb-china.com/cn/tech/re/cleavage_olig.htm)。

6. 导致或抑制星号活性的因素

6.1 导致星号活性的因素:

- 1) 较高的甘油浓度 ($>5\%$ v/v) ;
- 2) 酶与底物DNA比例过高 (不同的酶情况不同, 通常为 >100 U/ μ g) ;
- 3) 低盐浓度 (<25 mM) ;
- 4) 高pH值 ($>\text{pH } 8.0$) ;
- 5) 存在有机溶剂 (如DMSO、乙醇、乙烯乙二醇、二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、sulphalane等) ;
- 6) 用其他二价离子替代镁离子 (如 Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} 等) ;

以上因素的影响程度因酶的不同而有所不同。例如EcoR I比 Pst I对甘油浓度更敏感, 而后者则对高pH值更敏感一些。

6.2 抑制星号活性的方法:

- 1) 尽量用较少的酶进行完全消化反应。这样可以避免过度消化以及过高的甘油浓度。
- 2) 尽量避免有机溶剂 (如制备DNA时引入的乙醇) 的污染。
- 3) 将离子浓度提高到 $100\text{--}150$ mM (若酶活性不受离子强度影响) 。
- 4) 将反应缓冲液的pH值降到 7.0 。
- 5) 二价离子用 Mg^{2+} 。

四、DNA 的连接反应

1. 外源 DNA 片段和质粒载体的连接反应策略

1.1 带有非互补突出端的片段

用两种不同的限制性内切酶进行消化可以产生带有非互补的粘性末端, 这也是最容易克隆的 DNA 片段, 一般情况下, 常用质粒载体均带有多个不同限制酶的识别序列组成的多克隆位点, 因而几乎总能找到与外源 DNA 片段末端匹配的限制酶切位点的载体, 从而将外源片段定向地克隆到载体上。也可在 PCR 扩增时, 在 DNA 片段两端人为加上不同酶切位点以便与载体相连。

1.2 带有相同的粘性末端

用相同的酶或同尾酶处理可得到这样的末端。由于质粒载体也必须用同一种酶消化, 亦得到同样的两个相同粘性末端, 因此在连接反应中外源片段和质粒载体 DNA 均可能发生自身环化或几个分子串连形成寡聚物, 而且正反两种连接方向都可能。所以, 必须仔细调整连接反应中两种 DNA 的浓度, 以便使正确的连接产物的数量达到最高水平。还可将载体 DNA 的 $5'$ 磷酸基团用碱性磷酸酯酶去掉, 最大限度地抑制质粒 DNA 的自身环化。带 $5'$ 端磷酸的外源 DNA 片段可以有效地与去磷酸化的载体相连, 产生一个带有两个缺口的开环分子, 在转入 *E. coli* 受体菌后的扩增过程中缺口可自动修复。

1.3 带有平末端

由产生平末端的限制酶或核酸外切酶消化产生, 或由 DNA 聚合酶补平所致。由于平端的连接效率比粘性末端要低得多, 故在其连接反应中, T4 DNA 连接酶的浓

度和外源 DNA 及载体 DNA 浓度均要高得多。通常还需加入低浓度的聚乙二醇 (PEG 8000) 以促进 DNA 分子凝聚成聚集体的物质以提高转化效率。

1.4 特殊情况

外源 DNA 分子的末端与所用的载体末端无法相互匹配, 则可以在线状质粒载体末端或外源 DNA 片段末端接上合适的接头(linker)或衔接头(adapter)使其匹配, 也可以有控制的使用 E. coli DNA 聚合酶 I 的 klenow 大片段部分填平 3' 凹端, 使不相匹配的末端转变为互补末端或转为平末端后再进行连接。

在 PCR 产物尾部加 dT 或 ddT: Taq DNA 聚合酶会在 3' 端加上多余的非模板依赖碱基, 而且对 A 优先聚合, 所以 PCR 产物末端的多余碱基大部分都是 A。利用这一特点, 可以经限制酶切割产生的平末端用酶加上 dT 或 ddT, 使载体与 PCR 产物末端互补并进行连接. 载体末端加 dT 尾可直接用 Taq DNA 聚合酶和 dTTP 或 ddTTP, ddTTP 因缺少 3-OH 而不能再形成磷酸二酯键, 保证在载体 3' 端只加上一个 ddTTP, 而其 5' 端所含的磷酸基团可与 PCR 产物的 3' 端 OH 连接, 连接产物在载体和 PCR 产物之间的双链上带两个切口, 这种重组 DNA 仍可转化合适的受体菌, 并在细菌体内修复. 目前一些公司已开发出可直接用于克隆 PCR 产物的带 3'-T 的 T-Vector。

2. 注意事项

2.1 DNA 连接酶用量与 DNA 片段的性质有关, 连接平齐末端, 必须加大酶量, 一般使用连接粘性末端酶量的 10-100 倍。

2.2 接带有粘性末端的 DNA 片段时, DNA 浓度一般为 2-10mg/ml, 在连接平齐末端时, 需加入 DNA 浓度至 100-200mg/ml。

2.3 连接反应后, 反应液在 0℃ 储存数天, -80℃ 储存 2 个月, 但是在 -20℃ 冰冻保存将会降低转化效率。

2.4 粘性末端形成的氢键在低温下更加稳定, 所以尽管 T4 DNA 连接酶的最适反应温度为 37℃, 在连接粘性末端时, 反应温度以 10-16℃ 为好, 平齐末端则以 15-20℃ 为好。

2.5 在连接反应中, 如不对载体分子进行去 5' 磷酸基处理, 使用过量的外源 DNA 片段 (2-5 倍), 这将有助于减少载体的自身环化, 增加外源 DNA 和载体连接的机会。

2.6 麦康凯选择性琼脂组成的平板, 在含有适当抗生素时, 携有载体 DNA 的转化子为淡红色菌落, 而携有带插入片段的重组质粒转化子为白色菌落。该产品筛选效果同蓝白斑筛选, 且价格低廉。但需及时挑取白色菌落, 当培养时间延长, 白色菌落会逐渐变成微红色, 影响挑选。

2.7 在含有 X-gal 和 IPTG 的筛选培养基上, 携带载体 DNA 的转化子为蓝色菌落, 而携带插入片段的重组质粒转化子为白色菌落, 平板如在 37℃ 培养后放于冰箱 3-4 小时可使显色反应充分, 蓝色菌落明显。

五、细菌的培养

一般的细菌都可以用人工的方法进行培养，以研究它们的各种生物学特征或制备菌苗。培养细菌时，除采用合适的培养基外，还要供给一些必要的培养条件，如温度、气体等。

1. 进行活化的话是用斜面好还是放液体培养基摇瓶好呢？保藏的话用多少浓度的甘油？

1.1 斜面和平板活化与液体活化都可以，斜面较好，但液体活化如果时间控制得好，不会造成传代多的现象。

1.2 基因工程酵母的保存方法：与野生菌一样，要用甘油保藏的话，最好是在对数期，一般摇床培养 20 小时左右，过夜培养后保藏就可以。可将酵母菌在液体培养基培养 3~5 天，然后与 100%甘油 1:1 混合冻存即可。即甘油浓度 50%。

2. 菌体不生长

2.1 先查培养条件。温度很关键，校正一下温度计是否正常指示；还要其他条件（湿度，摇床转速等）。

2.2 查原材料。尤其是原材料的保存问题，最好在 4 度冷藏。

2.3 查菌种

2.4 如果长得慢，加大接种量看一下。

2.5 消毒有没有问题

3. 为什么会发生菌体自溶？发生菌体自溶会让发酵参数发生什么变化

自溶和培养条件有关系，比如 PH 突然变化会引起菌体渗透压的变化导致自溶，还有温度的影响等；一般来说菌体也有自己的生存时限（依培养物变化而变化），也会产生自溶。

3.1 控制条件不好，PH 和温度不适合溶氧太低使菌体生长异常，产生溶菌酶自溶；

3.2 营养条件不好，营养跟不上，碳源不足自溶；

3.3 菌体衰老自溶，菌种培养时间过长，造成老化。改换酵母粉，增加一些生物素及微量元素可以消除自溶的问题；

3.4 过早的表达产物往往会对细胞产生毒害作用，使宿主菌的比生长速率下降甚至使细胞死亡、自溶；

3.5 感染噬菌体

发生菌体自溶现象：pH 升高，溶氧升高，氨氮回升，镜检时菌体空、碎

4. 培养基组分对芽孢杆菌产生芽孢的影响

一般加入 Mn 离子有助芽孢形成，另外培养基中注意磷酸盐含量不要太高了，高了不利于形成芽孢的。Mn 的浓度大概在 5-50ppm 之间。

5. 质粒小量提取之细菌的培养及收集

将含有质粒菌种接种在 LB 固体培养基(含 50 μ g/ml Amp)中，37℃培养 12-24h。

用无菌牙签挑取单菌落接种到 5ml LB 液体培养基(含 50 μ g/ml Amp)中，37℃振荡培养约 12 小时至对数生长期。

6. 质粒的大量提取之细菌的培养及收集

许多年来,一直认为在氯霉素存在下扩增质粒只对生长在基本培养基上的细菌有效,然而在带有 pMB1 或 ColE1 复制子的高拷贝数质粒的大肠杆菌菌株中,采用以下步骤可提高产量至每 500ml 培养物 2-5mg 质粒 DNA,而且重复性也很好。

6.1 将 30ml 含有目的质粒的细菌培养物培养到对数晚期 (OD600 约 0.6)。培养基中应含有相应抗生素,用单菌落或从单菌落中生长起来的小量液体闭关物进行接种。

6.2 将含相应抗生素的 500ml LB 或 Terrific 肉汤培养基 (预加温至 37℃) 加入 25ml 对数晚期的培养物,于 37℃ 剧烈振摇培养 2.5h (摇床转速 300 转/分),所得培养物的 OD600 值约为 0.4。

6.3 可做可不做:加 2.5ml 氯霉素溶液 (34mg/ml 溶于乙醇),使终浓度为 170 μ g/ml。有些质粒只要生长达到,新一代的质粒 (如 pUC 质粒) 可复制到很高的拷贝数,因此无需扩增。但像 pBR322 一类在宿主菌内只以中等拷贝复制质粒,有必要扩增。用氯霉素进行处理,具有抑制细菌复制的优点,可减少细菌裂解物的体积和粘稠度,极大地简化质粒纯化的过程。所以一般说来,尽管要在生长中的细菌培养物里加入氯霉素略显不便,但用氯霉素处理还是利大于弊。

6.4 于 37℃ 剧烈振摇 (300 转/分),继续培养 12-16 小时。

6.5 用 Sorvall GS3 转头 (或相当的转头) 于 4℃ 以 4000rpm 离心 15min,弃上清,敞开离心管口并倒置离心管使上清全部流尽。将细菌沉淀重悬于 100ml 用冰预冷的 STE 中。【STE: 0.1mol/L NaCl 10mmol/L Tris.Cl (pH8.0) 1mmol/L EDTA (pH8.0) 5% Triton X-100】按照前面所述收集细菌细胞。

7. 大肠杆菌的基因工程菌质粒丢失的几率有多大? 丢失后的性状表现是什么?

一般质粒带有抗性,传代过程中不会丢失。但在发酵过程中,不加抗生素,可能造成质粒丢失,减少目的产物量 (发生的比例不高)。工程菌的抗性可以携带与菌体复制相关的基因 (如载体为 pAYC32),可以降低质粒丢失比例至。细菌培养不要超过 16 个小时,否则细菌会崩溃,引起细菌大量死亡,导致质粒丢失。有些质粒本身就不能在某些菌种中稳定存在,经过多次转接后有可能造成质粒的丢失。因此不能频繁转接,每次接种应接种菌落比较好。

8. 提高质粒稳定性的策略

8.1 质粒的选择: 最好利用小的质粒

8.2 选择合适的插入片段或重新构建表达载体: 插入 DNA 片段的大小,在质粒分离不稳定性中有关系; parDE 基因的插入,可提高重组质粒稳定性。

8.3 选择适当的宿主细胞: 同一宿主菌株对不同质粒的稳定性不同,而同一质粒在不同宿主菌株中的稳定性也有差别。

8.4 添加选择压力

在重组菌培养过程中通常采用增加“选择压力”来提高重组菌的稳定性。

“选择压力”通常包括: 1) 在质粒构建时,加入抗生素抗性基因,在生物反应器

的培养基中加入抗 生素；2) 利用营养缺陷型细胞作为宿主细胞，构建营养缺陷型互补质粒，设计营养缺陷型培养基；3) 噬菌体抑制及转化子中自杀蛋白的表达。这种方法对于质粒或宿主细胞本身发生了突变，虽保留了选择性标记、但不能表达目的产物的细胞无效。

8.5 控制培养条件

8.5.1 培养基组成：葡萄糖、磷酸盐 and 无机盐是限制性基质 (pBR325 例外)；

8.5.2 氧传递和搅拌：温和的搅拌速率

8.5.3 温度和 pH

温度敏感型质粒，常采用二阶段温度培养系统。重组工程菌的生长和产物合成时的 pH 值常不同。

8.5.4 选择合适的培养操作方式

1) 适当采用周期性分批流加操作方式。另外，选择合适的流加方式可提高质粒在非选择性培养基中的稳定性和工程菌的产量。

2) 连续培养的稀释速率周期变化时，周期的振幅和频率是质粒稳定性的重要参数。

3) 固定化培养

一、 DNA 电泳

DNA 电泳的时候，设定的电压是 100V，开始的电流是 95mA 左右，功率是 13W。等到二十分钟左右时电流就会升到 115mA 左右，而功率则升到 15、6W，这个对电泳的结果有没有影响？

在电泳的过程中，电泳液也发生变化的，电泳液是在电解，也就是 H₂O 被分解成 H₂ 和 O₂，可想而知了，电泳液中的离子浓度就增加了，所以，电流肯定会增加的。

DNA 电泳常见问题分析和解决办法

DNA 带模糊

1) DNA 降解 避免核酸酶污染

2) 电泳缓冲液陈旧 电泳缓冲液多次使用后，离子强度降低，pH 值上升，缓冲能力减弱，从而影响电泳效果。建议经常更换电泳缓冲液

3) 所用电泳条件不合适 电泳时电压不应超过 20V/cm，温度 < 30℃；巨大 DNA 链电泳，温度应 < 15℃；核查所用电泳缓冲液是否有足够的缓冲能力

4) DNA 上样量过多 减少凝胶中 DNA 上样量

5) DNA 样含盐过高 电泳前通过乙醇沉淀去除过多的盐

6) 有蛋白污染 电泳前酚抽提去除蛋白

7) DNA 变性 电泳前勿加热, 用 20mM NaCl 缓冲液稀释 DNA

不规则 DNA 带迁移

1) 对于 λ /Hind III 片段 cos 位点复性 电泳前于 65℃加热 DNA 5 分钟, 然后在冰上冷却 5 分钟

2) 电泳条件不合适 电泳电压不超过 20V/cm; 温度 < 30℃; 经常更换电泳缓冲液

3) DNA 变性 以 20mM NaCl Buffer 稀释 DNA, 电泳前勿加热
带弱或无 DNA 带

1) DNA 的上样量不够 增加 DNA 的上样量; 聚丙烯酰胺凝胶电泳比琼脂糖电泳灵敏度稍高, 上样量可适当降低

2) DNA 降解 避免 DNA 的核酸酶污染

3) DNA 走出凝胶 缩短电泳时间, 降低电压, 增强凝胶浓度

4) 对于 EB 染色的 DNA, 所用光源不合适 应用短波长 (254nm) 的紫外光源
DNA 带缺失

1) 小 DNA 带走出凝胶 缩短电泳时间, 降低电压, 增强凝胶浓度

2) 分子大小相近的 DNA 带不易分辨 增加电泳时间, 核准正确的凝胶浓度

3) DNA 变性 电泳前请勿高温加热 DNA 链, 以 20mM NaCl Buffer 稀释 DNA

4) DNA 链巨大, 常规凝胶电泳不合适 在脉冲凝胶电泳上分析

二、DNA 回收

Q: 利用凝胶回收盒 DNA 回收效率较低或者未回收到目的片段?

A:

可能有以下几个原因:

1. 胶块未完全溶解, 可适当延长水浴时间, 并增加上下颠倒次数辅助溶解;
2. 胶块体积太大, 应先将其切为小块, 分多次回收;
3. 电泳缓冲液 pH 太高, 硅基质膜在高盐低 pH 结合 DNA, 如 pH 太高, 应作适当调整;
4. 漂洗液中未加入无水乙醇。

Q: 能否改用去离子水洗脱?

A: 可以。但是实验室所用纯水一般 pH 偏低, 可利用 NaOH 适当调高其 pH 值, 以增加洗脱得率。

Q: 回收 DNA 进行后续酶切实验?

A: 洗脱产物含有残留的乙醇会影响酶切, 请确保彻底去除漂洗缓冲液, 具体方法参见回收效率低的解决方案。

Q: 可否使用更小洗脱体积(小于说明书提供的最小洗脱体积)进行洗脱以提高浓度?

A: 不可以。因为说明书提供的最少洗脱体积是能完全覆盖吸附膜的最小体积, 若减少体积则不能将 DNA 完全洗脱下来。

Q: 电泳检测只有一条目的带, 可否选用凝胶回收盒?

A: 可以。如果后续实验对片段纯度要求较高, 建议即使只有一条带, 也可以切胶纯化, 其回收得到片段的纯度可能要比直接回收高一些。

Q: 琼脂糖凝胶胶块不溶?

A: 1. 琼脂糖质量不好。2. 含目的片段的凝胶再空气中放置过久, 使胶块失水、干燥, 建议切胶后立即进行回收或将胶块保存在 4℃ 或 -20℃。3. 制胶的电泳缓冲液浓度过高或陈旧。

三、 外源质粒对大肠杆菌的转化

Q: 对于大分子的外源质粒的转化需要注意什么问题?

A: 外源质粒比较大的情况下需要高效率的感受态的细胞

Q: 质粒转化后没有菌落长出

A: 做转化时设置对照很容易分析出你问题的所在:

平板 1: 正对照一, 即没有转质粒的感受态细胞(不加抗生素); 不能长出说明感受态有问题;

平板 2: 负对照, 即没有转质粒的感受态细胞(加抗生素); 肯定不能长出, 如果长出说明已经染菌, 本次所有操作无效;

平板 3: 正对照二, 用原来已经成功转化的质粒转化你的感受态; 如果不能长出, 说明感受态出了问题, 重新制作感受态;

平板 4: 转化你的目的质粒。如果平板 3 能长出而平板 4 不能长出, 说明你的质粒有问题, 或浓度不够, 或根本没有你要的质粒

Q: 连接反应后转化效率很低或阳性克隆非常少。

A: 1) 可能感受态细菌转化效率太低, 用质粒作为阳性对照同时检测感受态的转化效率。

2) 可以尝试提高载体或插入片段的纯度。对于平端连接需注意适当延长连接时间。

3) 可能载体酶切不够充分, 用未经连接的载体转化作为阴性对照。

4) 用存放 DNA 的溶液进行转化, 作为阴性对照, 检测感受态细菌是否存在问题。

1 质粒提取常见问题分析

1.1 影响质粒提取的因素有哪些?

质粒提取的得率和质量与很多因素有关, 如宿主菌的种类和培养条件、细菌细胞的裂解、质粒拷贝数、质粒的稳定性、抗生素、吸附膜的吸附能力、提取操作的熟练程度等等。

1.2 为什么从革兰氏阳性菌中提取质粒要在悬浮液中加入溶菌酶?

革兰氏阳性菌有一层细胞壁, 必须加入溶菌酶才能使之溶解。

1.3 如何根据实验需要选择不同级别的产品?

从纯度上: 各种常规操作, 包括酶切、PCR、测序、文库筛选、连接和转化, 普通纯度的质粒可以满足要求; 对于转染实验, 则要求使用无内毒素质粒提取试剂盒方能满足要求。

从提取的量上: 1-20 μg , 应选择小量提取试剂盒; 20-40 μg , 应选择中量提取试剂盒; 大于 40 μg , 应选择大量提取试剂盒。

从宿主菌上: 分为普通细菌质粒提取试剂盒、真菌质粒提取试剂盒和酵母菌质粒提取试剂盒, 根据情况进行选择。

1.4 未提出质粒或质粒得率低有哪些原因?

1) 细菌老化: 请涂布平板培养后, 重新挑选新菌落进行液体培养;

- 2) 细菌培养物生长过度或不新鲜：不要于 37℃ 培养超过 16 小时，分离质粒前长时间存放培养物是不利的。
- 3) 质粒拷贝数低：由于使用低拷贝数载体引起的质粒 DNA 提取量低，可更换具有相同功能的高拷贝数载体；
- 4) 菌体中无质粒：有些菌体本身不能在某些菌种中稳定存在，经多次转接后有可能造成质粒丢失。例如柯斯质粒在大肠杆菌中长期保存不稳定，因此不要频繁转接，每次接种时应该接种单菌落。另外检查筛选用抗生素使用浓度是否正确；
- 5) 菌体过量，碱裂解不充分：取样时菌液过多，导致菌体裂解不充分，可减少菌体用量或增加溶液悬浮液、裂解液、中和液的用量。对低拷贝数质粒，提取时可加大菌体用量并加倍增加溶液悬浮液、裂解液、中和液的用量（应保持 1: 1: 1.4 比例）。
- 6) 溶液使用不当：溶液裂解液、中和液在温度较低时容易出现盐析，如出现，应将其放入 37℃ 水浴至完全溶解、澄清，方可使用；
- 7) 质粒未全部溶解（尤其质粒较大时）：洗脱溶解质粒时，可适当加温活延长溶解时间；
- 8) 乙醇残留：洗涤液 II 洗涤后应离心并静置数分钟尽量去除残留乙醇后，再加入洗脱液洗脱回收；
- 9) 洗脱液加入位置不正确：洗脱液应加入吸附柱中膜的中央以确保洗脱液完全覆盖吸附膜的表面达到最大洗脱效率；
- 10) 洗脱效率：洗脱效率与洗脱液 PH 值、洗脱液用量、洗脱次数、加入洗脱液后的静置时间和是否预热等因素有关。PH7.0—8.5 之间，洗脱液用量不得小于 50 μ l，重复洗脱 2-3 次，增加室温静置时间及 65℃ 水浴预热可以有效提高得率 30%。

1.5 在琼脂糖凝胶上点样时，质粒漂出点样孔？

乙醇没有完全从柱子上去除。洗涤液 2 洗涤后应离心并静置数分钟尽量去除残留乙醇后，再加入洗脱液洗脱回收。

1.6 用自动荧光测序没有结果，如何解决？

测序反应体系中 DNA 的量加得不够，提取的质粒要经过琼脂糖凝胶电泳定量。要使用新鲜的 LB 培养基和新活化的菌株摇菌。

1.7 质粒纯度不高，如何解决？

1) 有蛋白质污染：

应在加入去蛋白液后，以足够高的转速离心，使沉淀紧密，并小心地吸取上清液，避免吸入沉淀。另外，不要使用过多菌体。经悬浮液、裂解液、中和液处理，离心后溶液应为澄清的，如果还混有微小蛋白悬浮物可再次离心去除后再进行下一步骤。

2) 有 RNA 污染:

说明 RNaseA 处理不彻底, 请减少菌体用量或加入悬浮液之后, 振荡充分混匀室温放置一段时间。如果悬浮液已保存 6 个月以上, 请在悬浮液中添加 RNaseA 至终浓度 100 $\mu\text{g/ml}$ 。

3) 混有基因组 DNA

加入裂解液、中和液后应温和混匀, 如果剧烈振荡, 可能会导致基因组 DNA 断裂成小碎片从而混杂在质粒中。如果加入裂解液后过于黏稠, 无法温和混匀, 请减少菌体用量。另细菌培养时间过长会导致细胞和 DNA 的降解, 培养时间不要超过 16 小时。

4) 裂解液加入时间过长

裂解液加入溶液后, 放置时间不宜太长, 否则有可能会产生小片段 DNA 污染。

5) 含大量核酸酶的宿主菌

宿主菌含大量核酸酶, 在质粒提取过程中降解质粒 DNA, 影响提取质粒 DNA 的完整性, 最好选用不含核酸酶的大肠杆菌宿主菌, 如 DH5 a 和 Top10。

6) 质粒的二聚体和多聚体形式

质粒复制过程中形成的, 与宿主菌相关, 电泳可检测出多条条带, 单酶切处理后可变成单一条带。

1.8 加入 solution. III, 经 10 分钟离心后细菌沉淀怎么不结实, 有的漂浮在液面, 有的贴在离心管壁上, 一摇晃即破碎脱落下来?

细菌的用量太少, 导致产生的沉淀主要是盐分的沉淀, 因为缺少变性的细菌蛋白和细菌基因组 DNA 的缠绕, 沉淀就显得不结实。

解决方法: 将细菌的用量增加。

1.9 加入 soln. III, 经 10 分钟离心后细菌沉淀怎么不结实, 呈大块的水泡状, 上清较少?

1) 使用了过多的细菌, 导致菌体未被有效裂解。解决方法: 将细菌用量减半。

2) 细菌悬浮不充分, 存留小菌块, 导致菌体未被有效裂解。解决方法: 注意将细菌悬浮充分。

3) 加 Solution III 后中和不充分。解决方法: 如果细菌用量较多, 请注意多翻转几次直至中和后的沉淀呈松散的豆腐花状(也可以稍用力混合直至沉淀呈松散的豆腐花状)。

4) Solution II 出现沉淀。解决方法: 如果实验室内温度低于 15°C, 使用试剂盒前请注意观察 Solution II 中是否出现沉淀。如果出现沉淀, 请于 37°C 水浴溶解沉淀后再使用。

5) Solution II 长时间暴露于空气中被 CO₂ 中和, 导致菌体未能被有效裂解。解决方法: 可用经典碱裂解法抽提质粒 DNA 方法中的 II 液替代 Solution II 使用。

1.10 出现严重的 RNA 污染?

1) 未在 Solution I 中事先加入 RNase A1。解决方法: 补加 RNase A1。

2) 加入 RNase A1 的 Solution I 长期保存于室温, 导致 RNase A1 活性下降。

3) 细菌过量, RNase A1 不能有效降解 RNA。解决方法: 将细菌用量减半或增加 RNase A1 在 Solution I 中的浓度。

1.11 抽提的质粒 DNA 电泳时怎么出现切口、断裂或降解现象?

1) 使用的是收集后冷冻保藏的细菌。解决方法: 使用新鲜培养的细菌。

2) 宿主菌富含核酸内切酶。解决方法: 增加一步 Rinse A 洗涤步骤以彻底去除残留的核酸内切酶。或者将质粒 DNA 进行乙醇沉淀。

3) 质粒 DNA 在 Solution II 中暴露过久, 易造成质粒 DNA 的切口断裂。裂解步骤控制在 5 分钟内完成。

4) 培养的细菌被杂菌污染。解决方法: 重新挑取单菌落培养细菌。

1.12 抽提的质粒 DNA 电泳时怎么出现基因组 DNA 的污染?

1) 菌体裂解和中和过程中, 剧烈混合造成基因组 DNA 断裂所致。解决方法: 温和地进行菌体的裂解和中和。

2) 加 Solution II 时操作时间过长, 造成基因组 DNA 断裂所致。解决方法: 将裂解步骤控制在 5 分钟内完成。

3) 细菌的质量差(反复冻融的细菌, 陈旧的细菌, 培养条件不合适的细菌等)中有许多断裂或降解而游离的基因组 DNA, 使用生长良好的新鲜细菌。

1.13 加样时 DNA 飘出加样孔外?

忽略或省略了高速离心以甩干残留的 Rinse B 的操作步骤。解决方法: 按说明书的操作步骤操作以确保残留的 Rinse B 被甩干。

1.14 为什么提出的质粒的多是二聚体和多聚体形式?

是在质粒复制过程中形成的, 与宿主菌相关, 电泳可检测出。

2 DNA 胶回收中常见问题分析

2.1 没有回收到 DNA 片段

如在洗脱后, 发现洗脱液中没有 DNA 片段, 请检查是否按瓶身标签, 在洗涤液中加入无水乙醇。

2.2 提取率低

1) 融胶液为酸性缓冲液, 如融胶后, 其 pH 值升高将影响提取率。请加入 0.1 倍体积的 3M 乙酸钾(pH5.0)。

2) 长时间使用后没有更换的电泳缓冲液, 其 pH 值较高, 将影响 DNA 的吸附. 请更换新的电泳缓冲液后, 再进行电泳, 然后切胶。

3) 在洗脱前, 将洗脱液于 30~60℃温浴, 可提高提取效率。

2.3 吸光度测量结果问题

吸光度测量的是未知样品与调零标准之间的相对吸光度, 所以请用与洗脱液体相同的液体, 对测量样品进行稀释和调零。

2.4 如何计算提取率

1) 由于回收前样品中, 往往含有非目的 DNA 片段, 引物, dNTP 等, 所以不能用测回收前后吸光度的方法计算回收率。

2) 可将回收前后 DNA 片段一起电泳, 使用凝胶成像系统拍照后, 用配套的软件进行电泳条带灰度对比。

3) 注意, 电泳条件及拍摄条件将对灰度对比结果造成很大影响, 请仔细操作, 以减小误差。

2.5 核酸纯化的基本流程是什么?

胶回收的过程非常简单, 电泳分离目的条带后, 加入融胶液, 50-60 度处理几分钟, 使胶彻底融化, 加入 EZ-resin 和结合剂, 核酸将结合到树脂上, 用试剂盒提供的 Wash 溶液洗去非特异的产物, 然后用 TE 或水洗脱即可使用。

2.6 核酸纯化的基本流程是什么?

胶回收的过程非常简单, 电泳分离目的条带后, 加入融胶液, 50-60 度处理几分钟, 使胶彻底融化, 然后转移到 3S 离心柱中, 核酸将吸附到柱底部的吸附层上, 用试剂盒提供的 Wash 溶液洗去非特异杂质, 然后用 TE 或水洗脱即可使用。

2.7 Ez-Resin 和 3S column 核酸纯化的主要差别是什么?

这两者的原理和吸附材料是不同的。EZ-resin 吸附材料是硅胶基质, 规模可以根据需要调整, 但是批量操作相对麻烦一些, 干燥需要凉干, 干燥程度影响洗脱效果, 当然也可以真空干燥, 需要实验经验作为支撑。3S column 吸附材料是玻璃基质, 柱离心式, 操作比较方便, 可以自动化和批量处理。在实验过程中, 我们发现, 用不同方式纯化的 DNA, 下游使用的效果有一定的差异。我们注意到用 EZ-resin 纯化 PCR 产物, 做全自动测序和 TA 克隆的成功率要高一些。所以我们仍然保留了 Ez-Resin 纯化试剂盒。两种纯化得到的 DNA, 纯度和使用效果差别不大。

2.8 如何提高胶回收的得率?

Agarose 抑制 DNA 与吸附材料的结合, 将不含 DNA 片段多余的 Agarose 切除, 能显著提高回收效率。DNA 结合到吸附材料, 需要一定浓度的结合剂, Agarose 多了, 结合剂 (Solution SN) 的相对浓度就会下降, 得率就受到影响。有些用户

抱怨产品得率不稳定。大多数情况下，是由于电泳时琼脂糖的浓度不同，切下的胶块有大有小，得率自然不同。回收的得率还与回收片段的大小有关。提高结合剂（Solution SN）的相对浓度，增加 DNA 与吸附材料作用时间（放置时间），控制好离心速度都一定程度上可以提高得率。改善洗脱条件，如提高洗脱溶液的 pH 值，温度，增加洗脱液的体积等也可以提高得率，但是对于 pH 过高，可能会影响下游反应，通常情况下采用 pH8-8.5 为宜。

2.9 胶回收的实验次数是如何确定的？

通常情况下，试剂盒所提供的试剂量是规定次数试剂需要量的 110%。以 3S column 胶回收为例，一次实验所提供的溶液是指离心小柱子内所能容纳的最大体积，若切的胶块非常大，为了融胶，不得不提高 Solution SN 的用量，到最后溶液会不够，柱子会有得多。

2.10 采用 Ez-resin 和 3S column 所能回收片段的上/下限是多少？

回收小片段时需要适当提高结合剂使用量，如将 Solution SN: Agarose 的比例提高到 6-7。可以回收的最大片段是多少没有做过系统的分析，但是从一般情况看，回收 10kb 左右的片段是没有什么问题，但是片段越大，回收的效率相对较低，DNA 受损伤的可能性就大一些。

2.11 回收得片段为什么电泳上样会漂起来？

主要问题是纯化过程中的乙醇没有除干净。

2.12 纯化过程中乙醇或核酸结合剂（Solution S, SN, B 等）不能去除干净，对下游实验有影响吗？

影响非常大。操作过程中有专门除残留乙醇的步骤，不可以省略，否则下游的酶切和连接都可能遇到问题。可以使核酸结合到吸附材料上的吸附剂很多，这些吸附剂的残留对克隆影响较大。

2.13 胶很难融如何处理？

将融胶问题提高到 60 度；可能是胶的浓度太高，需要提高融胶液的体积；融胶过程中每隔一段时间就震荡几下帮助融胶。

2.14 如何鉴定回收的效果？

电泳比较回收前后的条带强弱。比较时需要将回收的产物全部加到胶中去，具有可比性。如果您的样品难得，可以选无关的片段验证一下。

2.15 如果胶在后续过程发生胶没有彻底融化，如何补救？

补加融胶液，将胶悬起来，50-60 度继续保温至彻底融化。

2.16 回收的产物都需要电泳鉴定吗？

不需要，通常情况回收的量和纯度满足您下游实验要求。一般好的 DNA 回收试剂盒已经经过严格验证，就省去了电泳验证的步骤了。

2.17 洗脱 DNA 用什么洗脱好？

需要根据回收片段下游用途确定。一般情况下，采用 TE 或 Tris 缓冲液可以。测序反应，请用无菌水洗脱。如果你洗脱的 DNA 需要长期保存，请用 TE 洗脱。

2.18 如果 DNA 纯化的得率非常低或根本没有，估计是什么问题？

一点都不能得到产物的回收情况很少见，有些情况是判定回收效率的方式不对。如：对，请检查一下 Wash 中有没有加入酒精；检查加入的 DNA 结合剂（Solution S 或 Solution SN）的量对不对；洗脱前有没有将残留得酒精去彻底；洗脱液有没有使吸附材料充分接触（洗脱），接触的时间是否充分。

2.19 用 Ez-Resin 如果凉干过头，如何处理？

加 TE, 50-60 度处理 10 分钟，间或振荡，离心收集上清。

2.20 什么情况下需要在 50-60 度的情况洗脱？

如果十分关心效率，回收的片段为大片段（10kb 左右），单链片段等需要预保温洗脱液。

2.21 UV 方式定量回收的量合适吗？

对于 Miniprep, 回收的量很少，用 UV 方式定量不合适，用琼脂糖电泳方式确定。

3 DNA 电泳常见问题分析

3.1 DNA 带模糊

原因：DNA 降解

解决方法：避免核酸酶污染

原因：电泳缓冲液陈旧

解决方法：电泳缓冲液多次使用后，离子强度降低，pH 值上升，缓冲能力减弱，从而影响电泳效果。建议经常更换电泳缓冲液

原因：所用电泳条件不合适

解决方法电泳时电压不应超过 20V/cm，温度 < 30℃；巨大 DNA 链电泳，温度应 < 15℃；核查所用电泳缓冲液是否有足够的缓冲能力

原因：DNA 上样量过多

解决方法：减少凝胶中 DNA 上样量

原因：DNA 样含盐过高

解决方法：电泳前通过乙醇沉淀去除过多的盐

原因：有蛋白污染

解决方法：电泳前酚抽提去除蛋白

原因：DNA 变性

解决方法：电泳前勿加热，用 20mM NaCl 缓冲液稀释 DNA

3.2 不规则 DNA 带迁移

原因：对于 λ /Hind III 片段 cos 位点复性

解决方法：电泳前于 65℃加热 DNA 5 分钟，然后在冰上冷却 5 分钟

原因：电泳条件不合适

解决方法：电泳电压不超过 20V/cm；温度 < 30℃；经常更换电泳缓冲液

原因：DNA 变性

解决方法：以 20mM NaCl Buffer 稀释 DNA，电泳前勿加热

3.3 带弱或无 DNA 带

原因：DNA 的上样量不够

解决方法：增加 DNA 的上样量；聚丙烯酰胺凝胶电泳比琼脂糖电泳灵敏度稍高，上样量可适当降低

原因：DNA 降解

解决方法：避免 DNA 的核酸酶污染

原因：DNA 走出凝胶

解决方法：缩短电泳时间，降低电压，增强凝胶浓度对于 EB 染色的 DNA，所用光源不合适 应用短波长（254nm）的紫外光源

3.4 DNA 带缺失

原因：小 DNA 带走出凝胶

解决方法：缩短电泳时间，降低电压，增强凝胶浓度

原因：分子大小相近的 DNA 带不易分辨

解决方法：增加电泳时间，核准正确的凝胶浓度

原因：DNA 变性

解决方法：电泳前请勿高温加热 DNA 链，以 20mM NaCl Buffer 稀释 DNA

原因：DNA 链巨大

解决方法：常规凝胶电泳不合适 在脉冲凝胶电泳上分析

4 外源质粒对大肠杆菌转化过程中常见问题分析

4.1 连接反应后转化效率很低或阳性克隆非常少。

- 1) 可能感受态细菌转化效率太低，用质粒作为阳性对照同时检测感受态的转化效率。
- 2) 可以尝试提高载体或插入片段的纯度。对于平端连接需注意适当延长连接时间。
- 3) 可能载体酶切不够充分，用未经连接的载体转化作为阴性对照。
- 4) 用存放 DNA 的溶液进行转化，作为阴性对照，检测感受态细菌是否存在问题。

4.2 超级感受态得到的转化效率低的问题出在其中的呢？

- 1) 菌液 OD 值 偏大或偏小
 - 2) 原始菌株不好
 - 3) 试剂超纯程度不够
 - 4) 操作时，对菌体伤害过大

影响感受态效率的其实就一条：状态。生长时控制 OD 就是为了达到对数期，此时菌活力最高而处理时要使这种好的状态保持，但 CaCl₂ 处理又要使之处理充分，使膜局部变化达到最佳的感受状态，从这个意义上说，任何可能影响菌状态的步骤或试剂均有可能最终影响到感受效率，比如离心力是否太大导致菌破碎，CaCl₂ 的纯度浓度处理时间等。

4.3 我们所做的普通氯化钙法制备的感受态细胞所能吸收的最大基因是多少？

多大都可以吸收，主要是你的载体可以容纳多大的片段，不同的载体容纳外源片段是不同的，如果载体质粒较大则可选择合适的宿主菌进行转化如可用 DH5 α 作为宿主以提高转化效率。我曾做过一个质粒较大的克隆，其表达宿主菌应是 TAF，但 TAF 转化效率较低，为了提高克隆的成功率，就选择用 DH5 α 作为过渡的宿主进行实验。

4.4 制备感受态的菌液收集时间：

1 准确测定 OD 值：OD 在 1.2~1.5 之间。

- 1) 为了准确测定 OD 值，建议将菌液稀释不同浓度测定（1、2、4、8、16 倍稀释，看其 OD 值是否呈线性关系）。每个倍数做 3—5 个重复，应该可以大致推断 OD 值是否准确！菌液看上去浑浊，但 OD 值不高，很可能 OD 稀释倍数不够！
- 2) OD 值是否测准也可以这样估算：OD₆₀₀ 为 40 左右时，菌体湿重（6000rpm

离心 5min) 约 0.95g/10ml。高密度发酵时菌体湿重将相应下降。

275ml 的菌, 经 18h 左右的培养, 最后 sorbital 洗涤完毕后, 50ml 离心管里所剩菌体特别浓, 需要 1ml sorbitol 才可溶解为糊状。正常培养的 OD 在 1.2~1.5 之间的 500ml 菌液, 收集的感受态也用 1ml 稀释的, 没那么粘稠。可以看看降低培养温度 (27 摄氏度) 或缩短培养时间 (12h)。

3 甚至不用转接, 直接挑单克隆在 50-100ml YPD 中摇过夜, 效果也很好

4.5 制备感受态的菌液量

如果只转一个样品, 50ml 就够了, 一般 50ml 的培养液如果 OD 值正常的话够做 10 管感受态的, 其他的按比例缩小。用大试管摇 5ml 菌液, 然后取 1ml 毫升在 1.5ml EP 管中制感受态, 每一步的离心时间 30 秒就行。整个流程时间短, 制备好的感受态用来做转化的效率很高。

山梨醇离心, 洗涤的过程之后的重悬的时候注意浓度, 不要过于粘稠和稀释。

4.6 感受态的保存

感受态细胞做好后由于电转化杯还没有处理好等原因, 在冰上放几个小时再做可能有一定的影响, 尽量马上制备马上转化。如果感受态细胞要保存, 不需要加甘油, 一般 80ul EP 管分装, -70 或 -80 摄氏度保存。

4.7 电转化注意点:

1. 感受态做好后, 最后一次吸出 sorbital 时, 不是直接倒调的, 而是用毛细管轻吸出来的, 这样可能使剩下的感受态纯净些。
2. 最后用毛细管取出 100ul 出来, 加入质粒, 混匀! (怕量不够, 吸得很多, 电转时效果反而不好。)
3. 电转杯清洁处理: 一般先冲洗, 洗净; 然后浸泡在 75% 的乙醇中; 使用前我们都是放在超净台上, 开启紫外, 边吹风晾干, 边进行紫外照射。电转杯的新包装或重复使用可能对转化率有一定的影响。
4. 电击的时候, 电压数以及电击时间可以摸索一下, 适当增加电压或者延长电击时间都可以。电击条件比如 1.5kv, 放电 4.8~5.5ms。电击所有过程都要尽量在冰上进行, 电击时间可以减少一点, 设置为 5ms 左右, 电击之后马上加入预冷的山梨醇溶液, 转移至 EP 管, 30 度静止培养 1h。如果菌体悬液浓度比较大的时候, 在制备感受态的时候要留心一下操作中的问题了。
5. 电击之后, 加入 1ml 的山梨醇, 吸入 1.5ml 的 ep 管中, 置于 30 度摇床低速培养 1h, 再涂板。
6. 注意的是处理液中的 DTT 是在使用前加入, 其它配好后于 4 度保存, DTT 单独于 -20 度保存, 可配成 100 倍的贮备液。
7. 转化后 1ml 用 sorbitol 重悬的细胞悬液不能全部涂在一块板子上, 按标准程序制作的感受态一般 3 块左右可能比较合适, 以干燥后看见一薄层淡淡的白色为宜。转化子会在白色的薄层上长出圆韵、饱满的大菌落的。

4.8 转化试剂和培养基的正确准备方法

1. MD 板子提前几天做好，放在冰箱里，涂板的时候吸收效果会好些。如果是新板子，可能吸收不是太好，板子上有些积层，反而不利于生长。
2. YNB42℃水浴一会，然后过滤除菌，YNB 是加到培养基里面的，去离子水 pH 偏低，建议直接用蒸馏水就可以（关系不是太大）。
3. 山梨醇，以及无菌去离子水均是冰冻，存放在 4 度冰箱中
4. 一般用 10ug 以上质粒用 SalI 酶切，然后直接加乙醇沉淀，70%乙醇洗一遍，约 20ul ddH₂O 重溶。转化效率一般大于 100 个克隆每 ugDNA。有人用 LiCl 和 DTT 处理细胞，转化效率很高，可以试试。建议你不要用胶回收 kit，回收的 DNA 可能还有盐，导致电击时放电时间很短。

1 Southern 杂交最适温度和时间

根据所选择的预杂交液确定杂交温度，选用 Standard buffer 时，杂交温度控制在 65 ~68℃；Standard buffer 中加入 50%formamide 或选用 High SDS buffer 时，杂交温度控制在 37~42℃。在满足温度条件的情况下，杂交的成败取决于杂交时间，时间过短则杂交不充分；时间过长则可能导致非特异结合增多。杂交时间一般控制在 20h 左右。

2 经典 Southern 杂交方法缺点

经典 Southern 杂交的凝胶转膜方式为向上转移法，它操作简便，可以方便地更换吸水纸，但由于它是靠毛细管虹吸现象来完成的，故必须在吸水纸上增加重量，以提高毛细管的虹吸力，然而这样却会使凝胶受压并脱水而变薄，变薄后的凝胶其孔径会更小，此时。即使延长转移时间也不能使大分子量的 DNA 转移出去，再者，由于向上的虹吸力与重力的方向相反，故尚需克服重力的影响，因此，向上转移法不能良好的完成 DNA 的转移。解决方法：当用向下转移法时，不需在吸水纸上增加重量，故凝胶基本不变形，加之吸水纸的吸力与水受到的重力方向一致，故可以很好的完成 DNA 的转移。

3 如何提高外源基因在大肠杆菌中的表达水平

(1)可诱导拷贝数的表达载体。质粒的拷贝数由培养条件控制，当需要增菌培养时，质粒的拷贝数很低，每个细胞仅 1-5 个拷贝，经适当条件诱导后，载体拷贝数可达每个细胞 100-500 个拷贝，这种表达载体的优点减小了载体质粒的丢失，保证质粒在大肠杆菌中的稳定性。(2)多顺反子型表达载体。这种表达载体的设计在于将第二个顺反子的 SD 序列插入第一个顺反子的终止密码子 TAA 之前，第一个顺反子要尽量短，后面接目的基因的起始密码子 ATG。(3)带翻译增强子的表达载体。

4 大肠杆菌表达体系的一些缺点及对策

(1)高效表达易形成包含体，可采用胰脲-磷酸盐培养基可限制包含体的形成。(2)

不能进行翻译后的加工修饰，如糖基化、磷酸化及酰基化等，可通过对菌株的修饰加以改进，如将酵母酰基转移酶引入到细菌中。

Southern 杂交

1. 问：做 Southern 杂交时，每次都是 marker 能杂出来，除了 marker 之外什么都杂不出来，阳性对照也杂不出来 DNA 酶切的也挺好的，转膜转的也可以，就是杂交不上。原因是什么？该如何做？

答：SOUTHERN 杂交时，Marker 有时候能杂交出来条带，这是因为探针的序列有可能部分与 Marker 互补，而 Marker 的成分单一，浓度远比酶切后的单拷贝目标基因高。关键是目标条带没有。主要还是探针种类、标记效率和使用量的问题。最好还是换探针，可改用 PCR 法或随机引物法标记探针。摸索 DNA 酶切条件，还得加大 DNA 的量。

2. 问：细菌基因组酶切后的条带可不可以用非变性聚丙烯酰胺凝胶来分离？然后再通过湿转印到尼龙膜上？琼脂糖凝胶上的 DNA 能通过半干转印仪来转印吗？

答：Southern 杂交目的就是要知道基因组中是否有想要的基因片段，并且可能还要知道此基因片段的位置是否与预期的一样，所以酶切基因组并杂交，其杂交条带的大小是很重要的指标，如果采用非变性聚丙烯酰胺凝胶，虽然大多数 DNA 的迁移率与其大小的对数值成反比，但迁移率也受碱基组成序列的影响，以致大小完全相同的 DNA 迁移率相差达 10%，所以非变性聚丙烯酰胺凝胶不能用来确定 DNA 的大小。一般采用琼脂糖凝胶电泳。但是，如果不在意片段的大小，可以聚丙烯酰胺凝胶后采用电转的方法。电转的时间取决于片段的大小，凝胶空隙和外加电场的强度。其次是转移方法：基本上有三种：毛细管转移最常用也很稳定。电转移效果不好，必须使用带电的尼龙膜，温度可能会过热等等问题，经常是时而转不出来。真空转移效率高，但需要仪器。总之，毛细管转移虽然麻烦，但没有条件的情况下最好用。做习惯后，毛细管转移并不麻烦，而且非常稳定，大小片段都能转得很好。

3. 问：southern 杂交后膜上只有两个阳性对照出现了条带，而基因组 DNA 和酶切后 DNA 都未出现条带。这是什么原因呢？该如何解决？

答：1 基因组中本来就没有插入目的序列 2 基因组 DNA 用量少了。重新插入目的序列，增加 DNA 的用量。

4. 问：Southern 杂交背景高的解决方案有哪些？

答：增加 DNA 的量；预杂交时间延长一个小时；杂交的温度，如果是酶直接标记的那就用 42 度，如果是随机引物标记，则用 60 度就可以。这是同源探针的工作参数，非同源探针杂交温度则要低一些，用 50 度左右就可以。；探针的量要适中，浓度是书上的 2 倍，不可过多，而且不能直接加到膜上。；洗膜可以增加一次，每次都在杂交炉里面做；显色前片子上不要有太多的液体，应稍微控一下。；电泳后凝胶要用去离子水洗干净，；转膜时小心，不要用手触摸，保持膜的干净；转膜后用洗膜液漂洗杂交膜。洗膜的时间不是固定的，要通过计数来定，等同位

素的量降下来才行，然后根据计数来压膜，如果计数很高就不要压太久，否则背景增高。

细菌的蓝白斑筛选法筛选转化子

5 问：蓝白斑筛选，长的斑都少，十个左右。蓝斑较大，白斑很小附在周围，还有些斑是外圈白色，中间蓝色，为什么？该如何做？

答：很多小的白斑，那应该是卫星菌落，如果载体的抗性是氨苄的，是经常出现这种情况的，极有可能是氨苄失效或者是其它杂菌有分解氨苄的能力，相比而言卡那霉素是比较好用的，从没发现卡那抗性载体出现这种问题的，卡那绝对是不会有卫星菌落的，因为他的作用原理是杀菌不是抑菌。连接体系还需要优化，即载体和需连接的片段的相对比例必须适中，才会产生一定数量的转化子，比例过大过小都不行，可以做个实验，配几个不同比例的体系来分别转化试试，以后做连接也可以有参照。

6 问：做连接大肠杆菌转化后我涂平板，而且四板涂得浓度不同，分别为 100 、50 、10 、5 微升，每次都不能长出单菌落，都是一片一片的 根本不能进行蓝白斑筛选，这是怎么回事？该怎么办？

答：5ul 都不行，很可能是 amp 失效了。拿空菌加点 AMP 和 LB 的液体培养基，看长不长，如果长就是抗生素失效了，可以选用新的抗生素，重新做蓝白斑筛选就可长出单菌落。

外源基因在大肠杆菌中的表达

7. 问：设计“某种真核生物基因在大肠杆菌中的表达”的实验，如果设计的可行？

答：找个合适的基因，设计扩增引物，并加入合适的酶切位点；挑选表达该基因的细胞系，提取总 RNA；以 oligo dT 为引物反转录 RT-PCR 获得 cDNA；用设计的引物 PCR 扩增该基因；将 PCR 结果连接到 T 载体上，转化 E. coli 的 TG1，蓝白斑筛选获得阳性菌株；提质粒酶切鉴定，测序鉴定；提质粒，用设计好的酶切位点切下片断，连接表达载体（比如 pET 系列）；转化 BL21，筛选转化子；小量发酵，SDS-PAGE 检测看蛋白在那部分表达，如果上清就有最好，稍稍优化；若上清没有，全是包涵体，复性。

8. 问：在做重组蛋白在大肠杆菌中的表达时，从 PCR 扩增目的片段，切胶回收，酶切，连接都在正确位置有条带，转化后挑菌落 PCR 也有正确条带，可是诱导表达之后也能在胶上看到相应目的蛋白条带，为什么做 Western-blot 就是出不来呢，一抗二抗也都没有问题。原因和解决办法？ 答：

1) 表达的蛋白不是需要的。用的酶时间久了，导致了非特异性切割，切割位点没有相差太远，所以琼脂糖电泳条带看不出差别，但是这样导致表达出的蛋白不是目的蛋白。把蛋白测序，看看是不是读框发生改变。2) 原核表达蛋白未修饰导致抗原抗体结合改变，而无法检测到蛋白表达。对其进行修饰。3) 最大的可能就是在 western-blot 这一步。检查做 western 的方法。4) 电泳改变了目的蛋白的构象使得抗体对目的蛋白的亲水性降低，从而不能检测出来。做免疫 荧光

试试, 构象形可查出。5) 更换新的试剂和材料。

9 在大肠中作表达, 蛋白就是不表达, 究竟需要注意什么, 该怎么做?

答: 启动子; SD 序列; RNA 二级结构; 密码子偏好; . 蛋白毒性; 碳源 (葡萄糖抑制 LAC 启动子) 等等。解决方法: 1), 选择好的表达系统。也就是选择适当的表达菌株和表达载体。在自己现有条件下, 如果一种系统几次试验后还不表达, 那就应该考虑换一个系统。2), 选择适当的表达条件。主要有, OD 值、温度、IPTG 浓度。3), 确定蛋白是包含体表达还是可溶表达还是分泌表达。温度可以在 25–37 之间, OD 值在 0.6–1.2 之间, IPTG 浓度在 0.1–1.0 之间。4), 融合表达, 用此种表达也有利于蛋白的纯化。

10 问: 用的是 LB 培养基在 28 摄氏度下用 IPTG 诱导, 但表达出来的蛋白都以包涵体形式存在, 如何提高破碎后上清中的表达量?

答: 目的基因质粒和分子伴侣质粒一起转入菌中表达会提高可溶蛋白表达量。如果真是包涵体很严重, 就搞包涵体变复性。或改改条件看能不能表达出可溶的蛋白。降低表达温度 (16 度) 和 IPTG 浓度 (0.1mM)。

1 化学发光技术在 Southern 印迹杂交中应用有哪些优势及注意事项?

答: 在分子生物学的部分技术中, 放射性试剂已逐步被非同位素试剂所取代, 化学发光是目前采用的最主要的非同位素技术, 当这种技术与酶标技术结合使用时效果尤其好, 这样, 酶标技术的放大特性与化学发光检测的高灵敏度相结合可产生出超高灵敏度的分析效果。化学发光分析及操作独特的优势主要体现在其改进的灵敏度已超过了传统的放射检测、比色检测以及荧光检测系统。

注意事项:

1. 随机引物法地高辛标记时, 模板量通常需要 300ng~1 μ gDNA, 才能检测单拷贝基因, 检测范围 0.03~0.1pgDNA。
2. 模板纯度要高, 否则非常易受模板中杂质的影响, 如果标记失败, 最可能是模板不纯。
3. 模板最好是线状的, 没有载体序列的插入片段宜作为模板, 这样消除了载体序列被标记的可能性和消除载体序列导致的不想要的交叉杂交。
4. 模板宜溶解在 H₂O、Tris buffer 中, 不宜用 TE, 因为 EDTA 会抑制标记反应。
5. 在杂交前, 通常没必要去除探针中未结合的 DIG 单核苷酸。
6. 通常的硝酸纤维素膜不能用于化学发光分析, 荷正电的尼龙膜比硝酸膜更耐用、更敏感, 比未荷正电的尼龙膜更易结合目标片段, 电荷被控制确保低背景、高信噪比。
7. 为了得到干净的 X 光片, 处理尼龙膜时要戴无滑石粉的手套, 用干净的塑料钝头镊子夹住膜边缘。
8. 预杂交和杂交间隙勿使膜干燥, 预杂交和杂交过程中防止 DIG Easy Hyb 中氨水漏出, 防止 pH 变化。
9. 用随机引物法标记的探针要想得到最低的背景, 在向尼龙膜上加 prob-DIG

Easy Hyb 混合物前,用醋酸纤维素膜过滤,勿用硝酸纤维素滤膜过滤。

10. 化学发光免疫检测全过程中摇动尼龙膜,可以延长封闭和漂洗过程,但勿延长抗体孵育过程,若有非特异性背景,可增加封闭剂浓度,使用刚洗净的托盘,接触化学发光底物时,应无菌操作,避免磷酸酶污染。

2 如何消除蓝白斑筛选中的假阳性和假阴性问题?

答:蓝白斑筛选法是筛选重组子的常用方法。但这种方法大概有 30% 的假阴性,即蓝色菌斑也有可能含外源基因,同时还可能会出现一定程度的假阳性,即载体不含重组子但由于 LacZ 基因被破坏而显示白色。蓝、白斑筛选的载体,通常是将插入位点放在 LacZ 基因的起始密码子 ATG 到第 7 个氨基酸密码子之间。但如果将外源基因插入位置改变到 LacZ 基因的第 11—36 个氨基酸密码子之间,那么就可以完全消除假阳性和假阴性。

3 外源基因在大肠杆菌中的表达的优化方法有哪些?

答:在利用大肠杆菌表达外源基因的过程中会遇到很多困难,致使表达效率难以得到最大限度的提高。因此需对外源基因在大肠杆菌中表达的条件进行优化。其主要方法有:

一 表达质粒的优化设计

1 转录水平上的优化 ○1 在大肠杆菌中表达外源基因最有用的启动子是强的可调控的启动子,如 lac, trp, λ pL, trp—lacUV5 杂和的 tac 启动子等。○2 大肠杆菌启动子都有 2 种保守的序列,即 -35 区和 -10 区,提高载体上启动子序列与保守序列间相似程度可增强外源基因的表达能力。○3 2 种保守序列间的距离也是影响克隆基因表达效率的重要因素,此段距离越是接近 17 个碱基,启动子的活性强度就越高。○4 已知大肠杆菌格外偏爱终止密码子 UAA,尤其是当在其下连上 1 个 U 而形成 UAAU 三联核苷酸的情况下,转译终止的效率会进一步加强。

2 翻译水平上的优化 ○1 要获得较高的 mRNA 翻译效率,SD 序列与翻译起始密码子 AUG 的最适距离是 9 ± 3 个碱基长度。○2 SD 序列与起始密码子之间富含 A/T 碱基时,转译作用最为有效。○3 尽可能提高 RBS 序列本身和附近序列 A/T 碱基含量,降低 mRNA 5' 形成“茎环”结构。

3 提高质粒的拷贝数和稳定性

二 提高目的基因 mRNA 和目的蛋白的稳定性

由于大肠杆菌细胞中的核酸酶和蛋白水解酶能够降解目的基因 mRNA 和目的基因产物,因此,对 mRNA 和基因产物采取一定的保护措施,可以使一些原先不能在原核生物中稳定表达的目的基因获得高效表达。

- 1 利用蛋白转运系统将蛋白分泌到周质或培养基中;
- 2 利用缺乏某种蛋白水解酶基因的缺陷株作为宿主菌;
- 3 共表达提高蛋白稳定性的辅助因子, 如信号肽;
- 4 对蛋白质序列中的蛋白水解酶敏感区域和识别位点进行改造;
- 5 降低菌体的培养温度.

三 培养条件的优化

- 1 宿主菌的选择 表达载体对表达宿主有一定的选择性, 合适的宿主有利于外源基因的表达。
- 2 菌体的培养温度 37 °C 是细菌生长的最佳温度, 但在这个温度下诱导表达的目的蛋白往往以包涵体的形式积累, 在一些非温度诱导的表达系统中, 降低培养温度可能提高可溶性、高活性蛋白的产量.
- 3 诱导时菌体的生长密度 构建的表达载体上的可调控型启动子, 需要大肠杆菌生长到一定时期时用理化方法进行诱导表达。菌体密度以 OD600 表示, 一般当 OD600 在 0.6~0.8 时进行诱导, 即菌体对数生长期的中后期诱导, 过早或过迟都不利于蛋白的表达.
- 4 诱导剂的种类、浓度和诱导时间 不同表达系统所需诱导剂的种类、浓度和诱导时间是不同的, 需要通过实验寻找最优的诱导条件.

质粒的提取

涂布棒在酒精蘸一下, 然后烧一下, 能不能保证把所用的菌烧死?

参考见解: 涂布棒可以在酒精中保藏, 但是酒精不能即时杀菌。蘸了酒精后再烧一小会, 烧的是酒精而不是涂布棒。建议涂布棒还是干烧较长时间后, 冷却了再涂。同时作多个转化时, 应用几个涂布棒免得交叉污染。

原先测序鉴定没有问题的细菌, 37°C 摇菌后发现质粒大小或序列出现异常?

参考见解: 这种情况出现的几率较小, 常出现在较大质粒或比较特殊的序列中。

解决办法:

- 1、降低培养温度, 在 20~25°C 下培养, 或室温培养可明显减少发生概率。
- 2、使用一些特殊菌株, 如 Sure 菌株, 它缺失了一些重组酶, 如 rec 类等, 使得质粒复制更加稳定。
- 3、质粒抽提有一个酶切不完全的原因就是溶液 II 中的 NaOH 浓度过高造成的, 请大家注意一下!

【有两种方法可以在提质粒前判断菌生长是否正常:

- 1、利用你的嗅觉。只要平时做实验仔细点就能闻出大肠杆菌的气味, 新鲜的大肠杆菌是略带一点刺鼻的气味, 但不至于反感。而在泥水状的菌液中你只要一凑过去就感觉到其臭无比或者没有气味, 可以和正常菌液对照。
- 2、肉眼观察活化菌株。对于生长不正常的菌液进行划线验证或者稀释到浓度足够低涂板, 第二天观察单克隆生长情况, LB 平板生长的 DH5A 正常形态在 37°C 16h 后直径在 1mm 左右, 颜色偏白, 半透明状, 湿润的圆形菌斑, 如果观察到生长过快, 颜色又是泛黄的话基本上不正常了。

未提出质粒或质粒得率较低, 如何解决?

参考见解:

- 1、大肠杆菌老化: 涂布平板培养后, 重新挑选新菌落进行液体培养。
- 2、质粒拷贝数低: 由于使用低拷贝数载体引起的质粒 DNA 提取量低, 可更换

具有相同功能的高拷贝数载体。

3、菌体中无质粒：有些质粒本身不能在某些菌种中稳定存在，经多次转接后有可能造成质粒丢失。例如，柯斯质粒在大肠杆菌中长期保存不稳定，因此不要频繁转接，每次接种时应接种单菌落。另外，检查筛选用抗生素使用浓度是否正确。

4、碱裂解不充分：使用过多菌体培养液，会导致菌体裂解不充分，可减少菌体用量或增加溶液的用量。对低拷贝数质粒，提取时可加大菌体用量并加倍使用溶液，可以有助于增加质粒提取量和提高质粒质量。

5、溶液使用不当：溶液 2 和 3 在温度较低时可能出现浑浊，应置于 37℃ 保温片刻直至溶解为清亮的溶液，才能使用。"

6、吸附柱过载：不同产品中吸附柱吸附能力不同，如果需要提取的质粒量很大，请分多次提取。若用富集培养基，例如 TB 或 2×YT，菌液体积必须减少；若质粒是非常高的拷贝数或宿主菌具有很高的生长率，则需减少 LB 培养液体积。

7、质粒未全部溶解(尤其质粒较大时)：洗脱溶解质粒时，可适当加温或延长溶解时间。

8、乙醇残留：漂洗液洗涤后应离心尽量去除残留液体，再加入洗脱缓冲液。

9、洗脱液加入位置不正确：洗脱液应加在硅胶膜中心部位以确保洗脱液会完全覆盖硅胶膜的表面达到最大洗脱效率。

10、洗脱液不合适：DNA 只在低盐溶液中才能被洗脱，如洗脱缓冲液 EB(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.5)或水。洗脱效率还取决于 pH 值，最大洗脱效率在 pH7.0-8.5 间。当用水洗脱时确保其 pH 值在此范围内，如果 pH 过低可能导致洗脱量低。洗脱时将灭菌蒸馏水或洗脱缓冲液加热至 60℃ 后使用，有利于提高洗脱效率。

11、洗脱体积太小：洗脱体积对回收率有一定影响。随着洗脱体积的增大回收率增高，但产品浓度降低。为了得到较高的回收率可以增大洗脱体积。

12、洗脱时间过短：洗脱时间对回收率也会有一定影响。洗脱时放置 1min 可达到较好的效果。

细菌离心加入溶液 I 涡旋振荡后，发现菌体呈絮状不均匀或呈细砂状？

参考见解：

1、很可能是细菌发生溶菌，可减少培养时间或者试试平板培养，质粒提取前用 PBS 将菌落洗下，相对来说固体培养基上细菌生长的要好一些。

2、质粒抽提过程很大程度上是受细菌生长情况决定的，刚活化的菌比负 80℃ 保存菌种所培养出来的菌液状态好，保存久的菌株可能会造成质粒浓度低，质粒丢失等不明原因。

3、判断生长的菌液是否正常，可以用肉眼观察，在光线明亮处摇荡新鲜培养液，如果发现菌液呈漂絮状，情况很好。如果发现呈泥水状，即看不到絮状，只是感觉很浑浊，则可能提不出好的质粒，或者没有质粒。

4、菌液不宜生长太浓，摇床速度不宜过高。达到 OD600 1.5 就可以了，（尤其是对于试剂盒提取要注意）另外如果只是简单的酶切验证根本无需酚氯仿抽提（安全考虑，慎重），只要溶液 I / II / III 比例恰当，转管过程仔细吸取不会有太多杂质。

为什么加了溶液 II 后，菌体没有逐渐由混浊变澄清？提出来的条带几乎没有，但是 RNA 很亮（没加 RNA 酶）？

溶液 II 主要就是 NaOH，如果菌液没有由混浊变澄清，参考见解：

1、可能是因为溶液储存不当，或屡次操作没有及时盖好溶液瓶盖，导致其吸收

空气中的 CO₂ 失效。RNA 在菌体中量较多，相对少量的菌体裂解，可有较 DNA 明显的条带。

2、可能是菌量大，加溶液 II 后，菌体并不能完全裂解，所以没有变清，这也会导致质粒产率低下。

3、可能是质粒的拷贝数不高，质粒产率不高。如果是使用自己配的试剂，建议做中提或大提；或者买试剂盒提。用自己配的试剂，不加 RNA 酶，最后 RNA 是很亮的，要去除干净就要用比较好的 RNA 酶。

4、如果不是试剂的原因，可能是质粒表达的过程中使膜蛋白变化（数量变多），很难使用碱裂解法，可以尝试用其他比较剧烈的方法（比如高温或者低温研磨等），然后使用一般的发放。

5、可能质粒随乙醇一起倒掉了。

加入溶液 II 后，菌液仍然呈浑浊状态，或者混浊度没有明显的改变？

裂解不完全，参考见解

1、问题可能是发生在溶液 II 上。首先看看 10% SDS 是否是澄清的？NaOH 是否是有效的？如果使用的是试剂盒，也要首先确认溶液 II 是否澄清没有沉淀？

2、可能是细菌浓度很高，适当调整增加溶液 I/II/III 的体积。

3、可能是“杂菌”污染，如果菌液生长异常快，就有可能被杂菌污染。这种情况一般表现为和目的菌有相同的抗性，生长速度异常，能够提出质粒，跑胶的条带也异常的亮，但产物不是自己想要的质粒，要特别注意一下。

抽提 DNA 去除蛋白质时，为什么要酚/氯仿混合使用？怎样使用酚与氯仿较好？

参考见解：酚与氯仿都是非极性分子，水是极性分子，当蛋白水溶液与酚或氯仿混合时，蛋白质分子之间的水分子就被酚或氯仿挤去，使蛋白失去水合状态而变性。经过离心，变性蛋白质的密度比水的密度大，因而与水相分离，沉淀在水相下面，从而与溶解在水相中的 DNA 分开。而酚与氯仿有机溶剂比重更大，保留在最下层。

作为表面变性的酚与氯仿，在去除蛋白质的作用中，各有利弊，酚的变性作用大，但酚与水相有一定程度的互溶，大约 10%~15% 的水溶解在酚相中，因而损失了这部分水相中的 DNA，而氯仿的变性作用不如酚效果好，但氯仿与水不相混溶，不会带走 DNA。所以在抽提过程中，混合使用酚与氯仿效果最好。经酚第一次抽提后的水相中有残留的酚，由于酚与氯仿是互溶的，可用氯仿第二次变性蛋白质，此时一起将酚带走。也可以在第二次抽提时，将酚与氯仿混合（1:1）使用。

呈粉红色的酚可否使用？如何保存酚不被空气氧化？

参考见解：保存在冰箱中的酚，容易被空气氧化而变成粉红色的，这样的酚容易降解 DNA，一般不可以使用。为了防止酚的氧化，可加入巯基乙醇和 8-羟基喹啉至终浓度为 0.1%。8-羟基喹啉是带有淡黄色的固体粉末，不仅能抗氧化，并在一定程度上能抑制 DNase 的活性，它是金属离子的弱螯合剂。用 Tris pH8.0 水溶液饱和后的酚，最好分装在棕色小试剂瓶里，上面盖一层 Tris 水溶液或 TE 缓冲液，隔绝空气，以装满盖紧盖子为宜，如有可能，可充氮气防止与空气接触而被氧化。平时保存在 4℃ 或 -20℃ 冰箱中，使用时，打开盖子吸取后迅速加盖，这样可使酚不变质，可用数月。

为什么用酚与氯仿抽提 DNA 时，还要加少量的异戊醇？

参考见解：在抽提 DNA 时，为了混合均匀，必须剧烈振荡容器数次，这时在混

合液内易产生气泡，气泡会阻止相互间的充分作用。加入异戊醇能降低分子表面张力，可以降低抽提过程中的泡沫产生。一般采用氯仿与异戊醇为 24: 1 之比。也可采用酚、氯仿与异戊醇之比为 25: 24:1（不必先配制，可在临用前把一份酚加一份 24: 1 的氯仿与异戊醇即成），同时异戊醇有助于分相，使离心后的上层水相，中层变性蛋白相以及下层有机溶剂相维持稳定。

加入酚/仿抽提，离心后在水相和有机相间没有出现变性蛋白相层，在随后的乙醇沉淀步骤中却出现大量的半透明沉淀，溶解后发现蛋白浓度很高？

乙醇沉淀时，较纯的质粒沉淀是白色的（PEG 纯化的沉淀是透明的肉眼不易发现），如沉淀是半透明的凝胶状，则应是蛋白含量高。参考见解：首先看看平衡酚是否已被氧化？pH 是否是 8.0？其次检测溶液 III 反应完成后的离心上清 pH 是否在 8.0 左右？有时由于溶液 III 配置的问题，会出现溶液 III 反应后离心的上清 pH 与 8.0 偏差较大的现象，这会降低平衡酚抽提蛋白抽的有效性，pH 偏差过大也会导致水相和平衡酚互溶。

碱裂解法提取的质粒 DNA 进行琼脂糖电泳进行鉴定时，看到的三条带分别是什么？

参考见解：碱法抽提得到质粒样品中不含线性 DNA，得到的三条带是以电泳速度的快慢排序的，分别是超螺旋、开环和复制中间体（即没有复制完全的两个质粒连在了一起）。如果你不小心在溶液 II 加入后过度振荡，会有第四条带，这条带泳动得较慢，远离这三条带，是 20-100kb 的大肠杆菌基因组 DNA 的片断。

提取质粒中 RNA 没有去除？

可能是 RNase 失效或效率不高。参考见解：

- 1、 更换 RNase A，并保证其储存条件是正确的
- 2、 手工提取质粒的，可单独增加一步去除 RNA 的步骤，溶液 III 反应后，在离心的上清中加 RNase，室温下去除 RNA 10min~30min（需要保证 RNase A 是经过失活 DNase 的），同时较高温度（如 50℃）会更加快速完全的去除 RNA，经验所得经过高温处理的质粒质量不是很高。

分子生物学实验中常见的问题与对策 34

1. 关于 Southern 杂交

1.1 影响 Southern 杂交实验的因素有哪些？

影响因素主要有：DNA 纯度、目的 DNA 在总 DNA 中所占的比例、酶切效率、电泳分离效果、转移效率、探针比活性、探针与目的 DNA 间的同源性、杂交效率以及洗膜终止点等。

1.2 在 Southern 杂交实验各步操作中会有哪些问题以及应对措施？

DNA 制备：在提取 DNA 的过程中，尽可能多的除去如蛋白质、脂质等杂质，纯度越高越好。如：如果 DNA 样品中有太多的杂质，会降低下一步的酶切效率。

酶切：为保证消化完全，一般用 2-4U 的酶消化 1 μg 的 DNA（消化的 DNA 浓度不宜太高，以 0.5 μg / μl 为好），且加入不能超过 1/10 反应体系体积的酶液（内切酶是保存在 50%甘油内的，而酶只有在甘油浓度<5%的条件下才能发挥正常作

用），在最适温度下消化 1-3hr。消化结束时可取 5 μ l 电泳检测消化效果。如果消化效果不好，可以延长消化时间，或者放大反应体积，或者补充酶再消化。如果需要两种酶消化 DNA，而两种酶的反应条件可以一致，则两种酶可同时进行消化；如果反应条件不一致，则先用需要低离子强度的酶消化，然后补加盐类等物质调高反应体系的离子强度，再加第二种酶进行消化。

电泳分离：一般用于 Southern 杂交的电泳胶是 0.8%琼脂糖凝胶。根据实验目的决定酶切 DNA 的量。一般 Southern 杂交每一个电泳通道需要 10-30 μ g 的 DNA。如果量过少的话，条带会很暗，不利于观察，且影响转移效率；如果量过多的话，条带脱尾严重，分离效果达不到。

DNA 转移：要取得好的转移效果，应根据 DNA 分子的大小，适当调整变性时间。对于分子量较大的 DNA 片段（大于 15kb），可在变性前用 0.2M HCl 预处理 10min 使其脱嘌呤。转移用的 NC 膜要预先在双蒸水中浸泡使其湿透，否则会影响转膜效果；注意不可用手触摸 NC 膜，否则影响 DNA 的转移及与膜的结合。转移时，凝胶的四周用 Parafilm 蜡膜封严，防止在转移过程中产生短路，影响转移效率，同时注意 NC 膜与凝胶及滤纸间不能留有气泡，以免影响转移。转移过程一般需要 8-24hr，每隔数 hr 换掉已经湿掉的纸巾。

探针：进行 Southern 杂交的探针一般用放射性物质标记或用地高辛标记。放射性标记灵敏度高，效果好；地高辛标记没有半衰期，安全性好。当用放射性物质标记时，标记后的探针可以直接使用或过柱纯化后使用。由于 α - 32 P 的半衰期只有 14 天，所以标记好的探针应尽快使用。探针的比活性最好大于 10⁹ 计数/分/ μ l。

杂交：杂交前要进行预杂交，以封闭 NC 膜上没有 DNA 转移的位点，降低杂交背景、提高杂交特异性。

洗膜与检测：在洗膜的过程中，不断振摇，不断用放射性检测仪探测膜上的放射强度。实践证明，当放射强度指示数值较环境背景高 1-2 倍时，是洗膜的终止点。洗完的膜浸入 2 $\times$ SSC 中 2min，取出膜，用滤纸吸干膜表面的水份，并用保鲜膜包裹，注意保鲜膜与 NC 膜之间不能有气泡。将膜正面向上，放入暗盒中（加双侧增感屏），在暗室的红光下，贴覆两张 X 光片，每一片都用透明胶带固定，合上暗盒，置 -70 $^{\circ}$ C 低温冰箱中曝光。根据信号强弱决定曝光时间，一般在 1-3 天时间。洗片时，先洗一张 X 光片，若感光偏弱，则再多加两天曝光时间，再洗第二张片子。

2. 关于细菌的蓝白斑筛选法筛选转化子

2.1 蓝白筛选平板上只出现蓝斑或白斑极少的原因及解决方法？

可能的原因分析：一、质粒转化的宿主菌不符合要求，即其编码完整的 β -半乳糖苷酶基因而非 N-末端缺陷型的 β -半乳糖苷酶多肽的基因；二、重组质粒连接效率低或者自连严重；三、插入片段太短，并且刚好和 lacZ 使用同一个读码框，

造成半乳糖苷酶具有部分活性从而表现假阴性结果；四、内切酶产生星号活力，外源基因插入到 MSC 以外的部分，未破坏半乳糖苷酶活性从而表现假阴性结果。可能的解决方法：一、用不含抗生素的 X-gal 来检测宿主菌，出现蓝斑，则说明宿主菌不符合实验要求，更换宿主菌重新实验；二、重做连接和转化，注意使用的双酶切，并且内切酶不要是同尾酶，严格按照使用说明操作；三、如果目的基因本身片段太短，则可在 PCR 扩增时适当目的基因两侧添加一些碱基对；四、严格按照内切酶的使用说明操作，此外，在挑白斑菌落提质粒做酶切检测的同时也要挑一些蓝斑菌落进行检测，防止因假阴性造成遗漏。

2.2 蓝白筛选平板上只出现白斑，且白斑经检测后发现多为非阳性克隆的原因及解决方法？

可能的原因分析：一、所用抗生素失效或质粒转化的宿主菌产生了与载体质粒相同的抗药性造成加阳性结果；二、载体质粒问题，比如酶切插入位点设计问题造成载体质粒不能编码有效的 α -互补片断从而表现出假阳性结果；三、X-gal 保存不当，失效；四、培养时间及温度等影响因素。

可能的解决方法：一、更换有效的抗生素重新实验，若非抗生素失效则用含抗生素的平板培养宿主菌，能够生长则表明宿主菌已产生抗药性，更换宿主菌重新实验；二、将空质粒转化后的菌在含抗生素的 X-gal 平板上培养，出现白斑，则说明质粒有问题，选取合适质粒重新实验；三、X-gal 不稳定，实验前可以用一点试试看其是否已经失效；四、经验表明做蓝白筛选时，转化，涂板 37 摄氏度培养 12 到 16 小时后，要放在 4 摄氏度进一步显色，一般在放几个小时后可使显色反应充分。

2.3 蓝白筛选平板上同时出现白斑蓝斑，但经检测后发现白斑为阴性克隆，蓝斑为阳性克隆的原因及解决方法？

原因分析：所用抗生素失效或宿主菌产生了抗性从而出现假阳性现象，又因为插入的目的基因片段太短，并且刚好和 lacZ 使用同一个读码框，造成半乳糖苷酶具有部分活性从而表现假阴性现象。

解决方法：更换有效的抗生素重新实验，若非抗生素失效则用含抗生素的平板培养宿主菌，能够生长则表明宿主菌已产生抗药性，更换宿主菌重新实验；PCR 扩增时适当延长目的基因；在挑白斑菌落提质粒做酶切检测的同时也要挑一些蓝斑菌落进行检测，防止因假阴性造成遗漏。

3. 关于外源基因在大肠杆菌中的表达

3.1 影响外源基因在大肠杆菌中表达的因素有哪些？

启动子的结构：启动子-35 区和-10 区序列与通用转录序列一致，间距为 17 bp，大于 17bp 效果差，不同产物选用不同启动子，如尿激酶用 ptac，IL2/2FU-V 用 PRPL 启动子效果好。

表达载体的选择：载体分子量不宜过大，以 2.5-5.6kb 为佳，高拷贝，不同产物

选用不同类型表达载体。

外源基因的结构：细菌中基因表达对密码子有偏爱性，不偏爱的稀有密码子(AGA、AGG)表达效果差，特别当有 AGA-AGG 连续序列存在时表达效率低。

mRNA 的结构与稳定性：起始密码子：表达效率 AUG>GUG>UUG；SD 序列：较长的效率高，如 UAAGGAGG 比 AAGAA 高三倍；SD 序列与 AUG 间距一般 6-12bp，4-10bp 较佳，9bp 最佳；SD 序列的 5' 非翻译区，若有 5' -UGAUCU，则有增强作用；mRNA 形成二级结构时，可产生茎环，若 SD 序列、AUG 位于茎环内或发夹内，转译受抑制；在茎环外则有利于转译。REP 序列可阻止 mRNA 降解，偏爱密码子也起保护作用。

除上述影响因素外还有蛋白质折叠的难易程度、宿主细胞蛋白酶对蛋白质的降解、以及蛋白质对宿主的潜在毒性等等。

3.2 目的蛋白以包涵体的形式表达，如何使其正确折叠？

一、共表达分子伴侣、折叠酶、硫氧还蛋白

二、二硫键异构酶(PDI)、DsbA、DsbB 处理

三、降低合成速度：弱启动子、低温

3.3 如何进行对宿主有毒性的蛋白的表达，如：在大肠杆菌中表达抗菌肽？

由于其杀菌活性，抗菌肽不能在大肠杆菌中直接表达。可采用与人胰岛素原(mhP1)、麦芽糖结合蛋白(MBP)等大分子蛋白融合表达抗菌肽形成非活性表达体的方式可避免直接表达时宿主菌的“自杀”，也可保护抗菌肽免受蛋白酶的降解，同时容易分离。提出的包涵体用一定的酶切后表现抗菌活性。

3.4 如何进行在大肠杆菌中不稳定的外源蛋白？

一、融合表达，形成包涵体

二、改造改造信号肽序列和结构，使蛋白实现周质表达或分泌表达

三、使用缺乏蛋白水解酶基因或蛋白水解酶敏感和识别位点改造过的工程菌

一、Southern 杂交中出现的问题及解决方法。

1 斑点

原因：1) 存在不溶颗粒。2) 膜上存有未稀释的探针。3) 手套上的粉末。4) 气泡。

解决方法：1) 加热至合适的温度，离心或过滤除去颗粒。2) 不要把探针直接加到膜上。3) 戴无粉末的手套。4) 一直用均匀的溶液和底物覆盖膜。

2 高背景

原因：1) 探针浓度过高。2) 封闭不充分。3) 严谨度洗脱无效。4) 滤纸被污染。

解决方法：1) 降低探针浓度。2) 延长封闭时间。3) 提高洗膜温度，增加表面活性剂，降低盐浓度。4) 用高质量的滤纸接触膜。

3 无信号

原因：1) 曝光时间太短。2) 转膜不完全。3) HRP 失活。4) 探针浓度太低。5) 目标基因浓度太低。6) 目标基因变性不完全。7) 目标基因没有恰当固定。8)

探针损失于塑料袋中。9) 洗膜条件严谨度太高。10) 寡聚核苷酸太短且膜标记过。

解决方法：1) 曝光时间延长。2) 通过 EB 染色确定转膜效果。3) 点试验检测探针活性。4) 增加探针浓度。5) 增加目标基因浓度，或延长曝光时间。6) 转膜前充分变性。7) 固定之前，将膜浸入 TE 或水中。8) 用低吸收度塑料袋。9) 洗膜时，增加盐浓度，降低表面活性剂浓度或温度。10) 寡聚核苷酸必须大于 50bp。

4 非特异带

原因：1) 探针太多。2) 洗膜不充分。3) 温度不正确。4) 目标基因太多。5) EB 或胶中污染物阻碍杂交。

解决方法：1) 降低探针浓度。2) 降低 SSC 浓度。3) 检查温度。4) 减少目的基因浓度。5) 用 1*TE 或 0.1%SDS 充分洗膜。

二、细菌的蓝白斑筛选法筛选转化子。

1 蓝白斑筛选时只有蓝斑，没有白斑。

原因：1) 实际操作中发现当插入小片段时，重组子也有形成浅蓝斑的情况。据最新报道，大概有 30% 的假阴性，即蓝色菌斑也有可能含外源基因，同时还会出现一定程度的假阳性。可以用于蓝白斑筛选的菌株有 DH5a, JM109。2) 重组质粒连接效率低或者自连严重。3) 插入片段太短，并且刚好和 lacZ 使用同一个读码框，造成半乳糖苷酶具有部分活性。4) 目的片段没连接进去。5) 插入片段有可能并没有阻断操纵子，片段虽然插进去了，但也有可能出现蓝斑。

解决方法：1) 重做一次连接和转化，注意使用的双酶切，并且内切酶不要是同尾酶。2) 从新选择合适的质粒。3) 加大目的片段跟载体的比例。

2 蓝白斑筛选时只有白斑，没有蓝斑。

可能原因及解决方法：1) PCR 产物切胶回收纯化后 -20 度保存是可以的，不会出现“A”脱落的现象。但是 PCR 产物经过反复冻融之后，或者引入外切酶的污染就不好说了。2) 连接的时候，摩尔比例的要求还是必须的。可能对于容易连接的目的片段影响不会很大，但是遇到难连接的片段，就会体现出来。3) 摩尔比例的计算方法，就是摩尔数 = 质量 / 摩尔质量，摩尔质量 = 660 * 片段长度。

注意单位要统一，即 mol 对应 g，umol 对应 ug。4) 片段结构特殊的时候，可以采用 65 度加入 5~10 分钟预变性，冰上急冷后连接的方法。此方法证明的确行之有效。5) 连接效率低，还可以通过适当延长连接时间改善；另外，Solution I 必须 -20 度保存，多半会冻上，而且在冰上融解，轻轻上下颠倒混匀之后使用。酶都会随着反复冻融活性下降的，但是在包装范围内使用绝对是没有问题的。

6) 可以再换一支 Solution I 试一试。

三、外源基因在大肠杆菌中的表达

1 大肠杆菌不能形成成熟的 mRNA，且缺乏糖基化修饰，如何获得符合要求的真核基因？

答：1) 从真核细胞中分离 mRNA，逆转录成 cDNA，再进行表达。2) 体外 DNA 合成法，适用于相对分子量较小的蛋白质或多肽基因的克隆表达。3) PCR 扩增法，设计合成合适的引物，经 PCR 扩增技术获得所需基因。

2 如何提高表达水平？

答：1) 改用融合表达载体，提高表达的稳定性和产量。2) 改用更强的启动子提高 mRNA 产量，并在基因下游加入稳定的 mRNA 的强终止子。3) 调整 SD-ATG 距离。4) 改用蛋白酶陷性宿主菌，或在宿主体内表达蛋白酶抑制剂，减少目的蛋白的降解。5) 改用分泌性表达模式，减少反馈抑制或蛋白酶降解。6) 适时加入诱导物，以防过早大量表达目的基因而影响宿主细胞繁殖。7) 根据密码子简并性，减少目的基因中稀有密码子的比例。8) 消除核糖体附近可能的二级结构，加大 A、T 含量，提高翻译效率。

3 包涵体复活困难，如何使宿主菌分泌表达？

答：为了使目的蛋白在细胞质中形成天然有活性结构，一些表达方法被开发，包括联合表达分子伴侣、使用硫氧还蛋白缺陷菌株以形成有利的氧化还原电位、低温培养以及使用高可溶性多肽作为融合配偶体。

使目标蛋白分泌表达，需要设计合适的信号序列。通常，分泌表达的蛋白在细胞质合成过程中会形成一段短的信号序列（15-30 个氨基酸），这段短的信号序列对于分泌蛋白是至关重要的。目前已有一系列信号序列用于大肠杆菌分泌表达，包括 Omp A, Omp F, Pho A, Sp A 和 Pel B。

四、关于 RT-PCR 中可能存在的问题。

1 RT-PCR 电泳中未见或微弱可见 RT-PCR 产物。

原因：①RNA 被降解。②RNA 中含有逆转录抑制剂。③多糖与 RNA 共沉淀。④合成 cDNA 第 1 链的印务配对性差。⑤起始 RNA 量不够。⑥RNA 模版二级结构过多。⑦引物或模版对残余 RNA 敏感。⑧靶序列在被分析组织中不表达。⑨PCR 灵敏度问题。

解决方法：①变性胶上检测 RNA 完整性。使用好的 RNA 提取技术或试剂盒。②用乙醇重新沉淀 RNA 以除去抑制剂（SDS、EDTA、甘油、焦磷酸钠、亚精胺、甲酰胺、胍盐等）③使用 LiCl 法沉淀 RNA 以除去多糖。④重新合成或设计引物。⑤增加 RNA 量，对于小于 50ngRNA 样品，在合成第一条链时加 0.1-0.5 μg 乙酰 BSA。⑥将 RNA 和引物在不含盐及缓冲液条件下变性/退火。⑦PCR 前用 RNase 处理。⑧尝试其他靶序列或组织⑨PCR 条件优化。