

普



面向 21 世纪 课 程 教 材  
Textbook Series for 21st Century

# 基因工程实验技术

陈 宏 主编

 中国农业出版社

面向 21 世纪课程教材

Textbook Series for 21st Century

# 基因工程实验技术

陈 宏 主编

中 国 农 业 出 版 社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

基因工程实验技术 / 陈宏主编. —北京: 中国农业出版社, 2005. 8

面向21 世纪课程教材

ISBN 7-109-09816-8

I. 基... II. 陈... III. 基因-遗传工程-实验-高等学校-教材 IV. Q78-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 084697 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

出版人: 傅玉祥

责任编辑 李国忠

---

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2005 年 8 月第 1 版 2005 年 8 月北京第 1 次印刷

---

开本: 787mm×960mm 1/16 印张: 15.25

字数: 269 千字

定价: 19.10 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

# 前 言

基因工程的发展是以生物化学和分子生物学为理论，以实验技术为基础的。本书是面向 21 世纪课程教材《基因工程原理与应用》的配套实验教材。本书涵盖了基因工程实验的一系列基本技术，实验内容本着实用、可行的原则设计。考虑到学员的基础知识和实验基本技能，每个实验方案尽可能详尽和有利于操作。

本教材吸收了近年来发展起来的新技术和新方法。第一章为核酸的分离纯化技术，包括从细菌、动物组织、植物组织、血液、病毒等组织中提取 DNA、mtDNA 和 RNA 及质粒、 $\lambda$  噬菌体的 DNA 分离提取等。第二章介绍 DNA 的纯化、浓度的测定及质量鉴定技术，包括梯度离心纯化、核酸酶处理纯化、凝胶回收与纯化等。第三章为电泳技术，包括琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、脉冲电场凝胶电泳及蛋白质电泳。第四章是 PCR 技术，包括 PCR 技术和分析技术。第五章为分子杂交技术，包括原位杂交、Southern 杂交分析、Northern 杂交分析。第六章为探针制备与标记技术，包括末端标记、随机标记和缺口翻译标记。第七章是基因操作的其他分析技术。第八章是 DNA 的重组与转化技术。第九章为重组体的鉴定与基因表达分析技术。本书的实验，使用者可以根据各自的实验条件和课时数进行选择。

本书由具有分子生物学和基因工程操作实践经验的教学第一线老师参与编写，书中也凝集了一些在国外做过多年研究工作编写者的研究工作经验。另外，除了前面列的编写人员以外，高建国、张润锋、蔡欣、蓝贤勇等也参加了部分编写工作。在本书编写过程中得到中国农业出版社同志们的大力协助和支持，特此表

示感谢！

本教材难免有疏漏与错误，敬请各位同行和使用者批评指正！

编 者

2005.6

# 目 录

## 前言

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| 第一章 核酸的分离纯化技术 .....               | 1  |
| 实验一 细菌 DNA 的分离提取 .....            | 1  |
| 实验二 质粒 DNA 的分离提取 .....            | 3  |
| 实验三 $\lambda$ 噬菌体 DNA 的分离提取 ..... | 9  |
| 实验四 动物组织样品 DNA 的分离提取 .....        | 13 |
| 实验五 动物全血样品中 DNA 的分离提取 .....       | 15 |
| 实验六 动物线粒体 DNA 的分离提取 .....         | 18 |
| 实验七 植物组织中 DNA 的分离提取 .....         | 20 |
| 实验八 植物线粒体 DNA 的分离提取 .....         | 24 |
| 实验九 植物叶绿体 DNA 的分离提取 .....         | 26 |
| 实验十 病毒核酸的分离提取 .....               | 30 |
| 实验十一 农杆菌 Ti 质粒 DNA 的分离提取 .....    | 37 |
| 实验十二 动物组织样品总 RNA 的分离提取 .....      | 40 |
| 实验十三 动物组织样品 mRNA 的分离提取 .....      | 45 |
| 实验十四 植物组织样品总 RNA 的分离提取 .....      | 47 |
| 实验十五 植物组织样品 mRNA 的分离提取 .....      | 55 |
| 第二章 DNA 的纯化、浓度的测定及质量鉴定 .....      | 61 |
| 实验一 质粒 DNA 的 CsCl 梯度离心纯化 .....    | 61 |
| 实验二 DNA (或 RNA) 的核酸酶处理纯化 .....    | 63 |
| 实验三 凝胶中的 DNA 片段的回收与纯化 .....       | 65 |
| 实验四 DNA 浓度的分光光度计测定 .....          | 68 |
| 实验五 DNA 质量与浓度的凝胶电泳法测定 .....       | 70 |
| 第三章 基因操作的基本技术 I ——电泳技术 .....      | 73 |
| 实验一 核酸 (DNA 或 RNA) 的琼脂糖凝胶电泳 ..... | 73 |

|                                        |            |
|----------------------------------------|------------|
| 实验二 核酸聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....                  | 75         |
| 实验三 核酸的脉冲电场凝胶电泳 .....                  | 78         |
| 实验四 蛋白质电泳 .....                        | 86         |
| <b>第四章 基因操作的基本技术Ⅱ——PCR 技术 .....</b>    | <b>91</b>  |
| 实验一 PCR 技术与分析 .....                    | 91         |
| 实验二 RAPD 技术 .....                      | 94         |
| 实验三 PCR-SSCP 技术 .....                  | 97         |
| 实验四 PCR-SSR 技术 .....                   | 101        |
| 实验五 PCR-ISSR 技术 .....                  | 104        |
| 实验六 RT-PCR 技术 .....                    | 107        |
| <b>第五章 基因操作的基本技术Ⅲ——分子杂交技术 .....</b>    | <b>110</b> |
| 实验一 组织切片原位杂交 .....                     | 110        |
| 实验二 细菌菌落的原位杂交 .....                    | 113        |
| 实验三 基因定位的荧光原位杂交 .....                  | 117        |
| 实验四 Southern 杂交分析 .....                | 120        |
| 实验五 Northern 杂交分析 .....                | 123        |
| <b>第六章 基因操作的基本技术Ⅳ——探针制备与标记技术 .....</b> | <b>127</b> |
| 实验一 核酸探针的制备 .....                      | 127        |
| 实验二 DNA 探针的末端标记 .....                  | 129        |
| 实验三 DNA 探针的随机标记 .....                  | 131        |
| 实验四 DNA 探针的切口平移标记 .....                | 133        |
| <b>第七章 基因操作的基本技术Ⅴ——其他分析技术 .....</b>    | <b>136</b> |
| 实验一 M13 克隆和 DNA 序列分析 .....             | 136        |
| 实验二 Western 印迹分析Ⅰ .....                | 143        |
| 实验三 Western 印迹分析Ⅱ .....                | 148        |
| 实验四 mRNA 的体外翻译 .....                   | 150        |
| 实验五 克隆化 DNA 的定点诱变 .....                | 157        |
| <b>第八章 DNA 的重组与转化技术 .....</b>          | <b>163</b> |
| 实验一 外源 DNA 和质粒载体的连接反应 .....            | 163        |

|                                        |            |
|----------------------------------------|------------|
| 实验二 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化 .....              | 165        |
| 实验三 噬菌体 DNA 的体外包装 .....                | 168        |
| 实验四 根癌农杆菌介导的基因转移 .....                 | 171        |
| 实验五 基因枪法的基因转移 .....                    | 174        |
| 实验六 磷酸钙介导的基因转移 .....                   | 177        |
| 实验七 显微注射法的基因转移 .....                   | 179        |
| 实验八 脂质体介导的基因转移 .....                   | 181        |
| <b>第九章 重组体的鉴定与基因表达分析技术 .....</b>       | <b>184</b> |
| 实验一 重组质粒细胞菌落的快速鉴定 .....                | 184        |
| 实验二 重组质粒酶切鉴定 .....                     | 186        |
| 实验三 $\lambda$ 噬菌体重组体的鉴定分析 .....        | 189        |
| 实验四 基因组文库的构建与检测 .....                  | 192        |
| 实验五 基因表达产物的检测分析 I —— 细胞的裂解 .....       | 196        |
| 实验六 基因表达产物的检测分析 II —— 包涵体的分离 .....     | 199        |
| 实验七 基因表达产物的检测分析 III —— 包涵体的溶解和复性 ..... | 201        |
| 实验八 外源基因在大肠杆菌中的表达 .....                | 202        |
| <b>附录一 基因工程操作中常用的溶液和缓冲液 .....</b>      | <b>207</b> |
| <b>附录二 基因工程实验室的要求与仪器设备 .....</b>       | <b>225</b> |
| <b>主要参考文献 .....</b>                    | <b>232</b> |

# 第一章 核酸的分离纯化技术

## 实验一 细菌 DNA 的分离提取

### 一、原理和用途

用 EDTA 络合二价离子, SDS 结合膜蛋白, 溶菌酶破坏膜结构, 使 DNA 溢出到膜外, 经氯仿异戊醇沉淀蛋白, 可获得较纯的 DNA。用于克隆细菌染色体上的目的基因、检测细菌污染、绘制基因图谱等。

### 二、实验材料

大肠杆菌或沙门氏菌等。

### 三、溶液与缓冲液

1. LB 液体培养基: 按表 1-1-1 称取各种试剂。用蒸馏水溶解并定容至 300 mL。用 10 mol/L NaOH 调 pH 至 7.2~7.4。分装于 150 mL 三角烧瓶中, 每瓶 30 mL。然后置高压蒸汽消毒锅, 以  $10.78 \times 10^4$  Pa ( $1.1 \text{ kgf/cm}^2$ ) 灭菌 20 min。

表 1-1-1 LB 液体培养基配方

| 试 剂   | 用量 (g) |
|-------|--------|
| 精解蛋白胨 | 3.0    |
| 酵母浸出粉 | 1.5    |
| 氯化钠   | 3.0    |
| 葡萄糖   | 0.6    |

2. SE 溶液: 含 0.15 mol/L NaCl 和 0.1 mol/L EDTA (pH 8.0)。

3. 20% SDS。

4. 溶菌酶。

5. 5 mol/L 过氯酸钠。
6. 氯仿-异戊醇：氯仿：异戊醇=24：1。
7. 20 倍 SSC 溶液：含 0.3 mol/L 柠檬酸钠和 3 mol/L NaCl。
- 0.1 倍 SSC 溶液：取 1 mL 20 倍 SSC 溶液加到 199 mL 超纯水中。
8. 10 mg/mL RNA 酶：称取 10 mg 核糖核酸酶 A 于灭菌的 EP 管内，加 1 mL 100 mmol/L pH 5.0 的 NaAc 溶液，即为 10 mg/mL RNA 酶。为了消除脱氧核糖核酸酶的影响，置 80 °C 水浴中 10 min 或 100 °C 水浴 2 min，然后于 -20 °C 保存。
9. 无水乙醇，70%乙醇。
10. TE 溶液：含 10 mmol/L Tris · HCl (pH 8.0) 和 1 mmol/L EDTA。
11. 10 mg/mL 溴化乙锭染色液。
12. 溴酚蓝电泳加样缓冲液：含 0.2%溴酚蓝和 50%蔗糖。

#### 四、仪器设备及耗材

超净工作台、电热恒温培养箱、台式高速冷冻离心机、高速离心机、稳压电泳仪、紫外检测仪、水平式电泳槽、水浴锅、水平仪、摄影设备、高压蒸汽消毒锅、微量移液器 (20  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L)、玻璃棒、三角烧瓶 (500 mL)、烧杯 (100 mL、250 mL)、量筒 (50 mL、10 mL)、塑料离心管 (50 mL)、EP 管 (1.5 mL)、吸头 (20  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L)。

#### 五、实验方法

##### (一) 实验步骤

1. 将 200 mL LB 液体培养基中生长的菌液以 4 000 r/min 离心 10 min，收集菌体。
2. 用 SE 溶液洗涤菌体，重悬于 20 mL SE 溶液中。
3. 加入 2.0 mL 20% SDS、10 mg 溶菌酶，混匀，37 °C 保温，不时振荡，菌体溶解 (30~60 min) 后，置 60 °C 水浴中 10 min。
4. 加入 5 mol/L 过氯酸钠至终浓度为 1 mol/L，再加入 1 倍体积的氯仿-异戊醇，缓振 20 min，以 12 000 r/min 离心 5 min。
5. 转移水相到另一离心管中，加入 2 倍体积 -20 °C 预冷无水乙醇，混匀，用玻璃棒轻轻缠出 DNA 细丝，加 70% 冷乙醇 300  $\mu$ L 清洗。
6. 将玻璃棒置离心管中，用 0.1 倍 SSC 溶液冲洗，使 DNA 溶解，然后用 20 倍 SSC 溶液调整浓度为 1 倍 SSC。
7. 加入 2 倍体积冷无水乙醇，室温混匀 -20 °C 放置 30 min。

8. 4℃下以 12 000 r/min 离心 5 min, 小心除去上清, 除尽壁液。
9. 加 70% 冷乙醇 300  $\mu$ L, 清洗沉淀。4℃下以 12 000 r/min 离心 5 min, 去上清。
10. 加 28  $\mu$ L TE 溶液、2  $\mu$ L RNA 酶。
11. 制取 0.7% 的琼脂糖凝胶板 (当凝胶冷却到 60℃, 加入 10 mg/mL 溴化乙锭染色液使溴化乙锭的终浓度为 0.5  $\mu$ g/mL), 插好点样梳。
12. 凝胶冷却, 加缓冲液至淹没平板, 抽出点样梳。
13. 取 1  $\mu$ L 溴酚蓝, 与 9 mL DNA 样混合, 点样, 电压 50 V/cm, 电泳 1~2 h, 将点样胶在紫外灯下观察 DNA 谱带。

## (二) 注意事项

1. 第 5 步加入 2 倍体积 100% 的乙醇后, 可以接第 8 步, 结果纯度稍差。
2. DNA 谱带在点样孔 0.5 cm 左右。
3. 可以在第 1 步后, 菌体重悬于 10 mL SE 溶液中, 每人取 1 mL 菌液, 以后按 1/10 量操作。

## 六、作业与思考题

1. 用玻璃棒轻轻缠出的 DNA 细丝是什么样的?
2. 为什么加 70% 冷乙醇 300  $\mu$ L 清洗?

## 实验二 质粒 DNA 的分离提取

### 方法一 碱变性法提取质粒 DNA

#### 一、原理和用途

碱变性法提取质粒 DNA 是基于染色体 DNA 和质粒 DNA 变性与复性的差异而达到分离目的。在 pH 高达 12.6 的碱性条件下, 染色体 DNA 的氢键断裂, 双螺旋结构解开而变性。质粒 DNA 的大部分氢键也断裂, 但是共价闭合环状结构的两条互补链不会完全分离, 当以 pH 4.8 的 NaAc 高盐缓冲液调节其 pH 到中性时, 变性的质粒 DNA 又恢复到原来的构象, 保存在溶液中, 染色体 DNA 不能复性而形成单链的网状结构。通过离心, 染色体 DNA 与不定的大分子 RNA、蛋白质-SDS 复合物等一起沉淀下来而被除去。碱变性法提取质粒的 DNA 可以用于酶切、连接、重组鉴定、PCR 扩增、建基因文库等。

## 二、实验材料

大肠杆菌 JM109 (或 DH5a) 含有 pUC18 (或 pGEM)。

## 三、溶液与缓冲液

1. LB 液体培养基: 按表 1-2-1 称取各种试剂, 用蒸馏水溶解并定容至 300 mL。用 10 mol/L NaOH 调 pH 至 7.2~7.4。分装于 150 mL 三角烧瓶中, 每瓶 30 mL, 每组一瓶。然后置高压蒸汽消毒锅,  $10.78 \times 10^4$  Pa ( $1.1 \text{ kgf/cm}^2$ ) 灭菌 20 min。

表 1-2-1 LB 液体培养基配方

| 试 剂   | 用量 (g) |
|-------|--------|
| 精解蛋白胨 | 3.0    |
| 酵母浸出粉 | 1.5    |
| 氯化钠   | 3.0    |
| 葡萄糖   | 0.6    |

### 2. 抗生素:

(1) 氨苄青霉素 (Amp): 用无菌水配制在灭菌有盖试管中, 母液浓度为 100 mg/mL。

(2) 氯霉素 (Cm): 配制在无菌有盖试管中, 先用少量乙醇助溶, 再加无菌水至母液浓度为 150 mg/mL。

3. 溶液 I: 含 50 mmol/L 葡萄糖、10 mmol/L EDTA、25 mmol/L Tris · HCl (pH 8.0) 和 2 mg/mL 溶菌酶。

配制方法: 按表 1-2-2 制备母液, 临用时再加 200 mg 溶菌酶。

表 1-2-2 溶液 I 母液的配制

| 试 剂                         | 用 量        |
|-----------------------------|------------|
| 200 mmol/L 葡萄糖              | 25 mL      |
| 250 mmol/L EDTA             | 4 mL       |
| 1 mol/L Tris · HCl (pH 8.0) | 2.5 mL     |
| 加 ddH <sub>2</sub> O        | 定容至 100 mL |

4. 溶液 II: 含 200 mmol/L NaOH 和 1% SDS。

配制方法: 按表 1-2-3 配制。

表 1-2-3 溶液Ⅱ的配制

| 试 剂                  | 用 量        |
|----------------------|------------|
| 10 mol/L NaOH        | 4 mL       |
| 20% SDS              | 10 mL      |
| 加 ddH <sub>2</sub> O | 定容至 200 mL |

5. 溶液Ⅲ：含 3 mol/L NaAc (pH 4.8) 溶液。其配制方法是：称取无水乙酸钠 52.2 g，先加 140 mL 重蒸水，加热使溶解，再加冰乙酸约 40 mL 调至 pH 4.8，加重蒸水定容至 200 mL。

6. 50 mmol/L Tris · HCl (pH 8.0)、100 mmol/L NaAc 溶液：按表 1-2-4 配方配制，然后以  $10.78 \times 10^4$  Pa (1.1 kgf/cm<sup>2</sup>) 灭菌 20 min。

表 1-2-4 50 mmol/L Tris · HCl (pH 8.0)、100 mmol/L NaAc 溶液的配方

| 试 剂                         | 用 量        |
|-----------------------------|------------|
| 1 mol/L Tris · HCl (pH 8.0) | 6 mL       |
| 3 mol/L NaAc                | 4 mL       |
| 加 ddH <sub>2</sub> O        | 定容至 120 mL |

7. 25 mmol/L Tris · HCl (pH 7.5)、30 mmol/L EDTA 缓冲液：按表 1-2-5 配方配制，然后以  $10.78 \times 10^4$  Pa (1.1 kgf/cm<sup>2</sup>) 灭菌 20 min。

表 1-2-5 25 mmol/L Tris · HCl、30 mmol/L EDTA 缓冲液配方

| 试 剂                         | 用 量        |
|-----------------------------|------------|
| 1 mol/L Tris · HCl (pH 7.5) | 5 mL       |
| 250 mmol/L EDTA             | 24 mL      |
| 加 ddH <sub>2</sub> O        | 定容至 200 mL |

8. 10 mg/mL RNA 酶：称取 10 mg 核糖核酸酶 A，于灭菌的 EP 管内，加 1 mL 100 mmol/L pH 5.0 的 NaAc 溶液，即为 10 mg/mL RNA 酶。为了消除脱氧核糖核酸酶的影响，置 80 °C 水浴中 10 min 或 100 °C 水浴 2 min，然后存于 -20 °C 保存。

9. 20% SDS 溶液

10. 3 mol/L NaAc 溶液 (pH 5.2)。

11. TE 缓冲液：含 10 mmol/L Tris · HCl (pH 8.0)、1 mmol/L EDTA。

12. Tris · HCl (pH 8.0) 溶液的饱和酚。

13. 氯仿-异戊醇 (24 : 1): 量取 240 mL 氯仿, 加入 10 mL 异戊醇, 充分混匀。

14. 5 mol/L NaCl。

15. 预冷 70% 乙醇和无水乙醇, 保存在 4 °C 冰箱中备用。

16. 电泳缓冲液: 含 40 mmol/L Tris · HCl (pH 8.0)、20 mmol/L NaAc 和 2 mmol/L EDTA。

配制方法: 取 100 倍电泳缓冲液 5 mL, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 500 mL。

17. 溴酚蓝指示剂溶液: 含 0.2% 溴酚盐和 50% 蔗糖。

18. 1 mg/mL 的溴化乙锭溶液。

19. 琼脂糖。

#### 四、仪器设备及耗材

超净工作台、电热恒温培养箱、恒温振荡器、可见光分光光度计、高速冷冻离心机、TGL-16 离心机、旋涡混合器、电热恒温水浴锅、普通冰箱、低温冰箱 (-40 °C)、真空泵、稳压电泳仪 (500 V; 300 mA)、紫外检测仪 (254 nm)、微型水平电泳槽、微量移液器 (20 μL、200 μL、1 000 μL)、三角烧瓶 (150 mL)、烧杯 (100 mL、250 mL)、量筒 (50 mL)、EP 管 (1.5 mL)、试管 (10 mL)、吸头 (20 μL、200 μL、1 000 μL)。

#### 五、实验方法

##### (一) 实验步骤

1. 取含质粒的单一菌落一环, 接在 2 mL LB 液体培养基 (加入 100 mg/mL Amp) 的 10 mL 试管中, 37 °C 振荡过夜。

2. 取上述培养液 200 μL, 加入到 30 mL 含 30 μL 含 50 mg/mL Amp 的 LB 液体培养基, 37 °C 振荡培养, 12 h 后加入 30 μL 150 U/μL 氯霉素 (Cm), 37 °C 振荡过夜。

3. 取 1.5 mL 培养物吸入 EP 管, 4 °C 下以 12 000 r/min 离心 30 s, 去上清。

4. 再向管内加入 1.5 mL 培养物, 重复步骤 3。

5. 取沉淀, 重悬于 100 μL 预冷的溶液 I, 完全分散。

6. 加入新配的溶液 II 200 μL, 立即反复倒置 5 次。倒置操作要温和, 否则有染色体 DNA 污染。

7. 加入冰冷的溶液 III 150 μL, 温和倒置混匀。

8. 4 °C 下以 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 计算体积, 不计算沉淀。

9. 加入等体积的酚和氯仿-异戊醇 (24 : 1), 4 °C 下以 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清加入另一支 EP 管。
10. 加入 2 倍体积 100% 冷乙醇, 室温混匀, -20 °C 放置 30 min。
11. 4 °C 下以 12 000 r/min 离心 5 min, 小心除去上清, 除尽壁液。
12. 加 70% 冷乙醇 300  $\mu$ L, 清洗沉淀。4 °C 下以 12 000 r/min 离心 5 min。
13. 取沉淀, 充分干燥, 除尽壁液。
14. 加 19  $\mu$ L TE 和 1  $\mu$ L RNA 酶。冰箱保存备用。如果要进行检测可继续以下的第 15~17 步操作。
15. 制取 1% 的琼脂糖凝胶板 (含 0.5  $\mu$ g/mL 溴化乙锭), 插好点样梳。
16. 凝胶冷却, 加缓冲液至微没过平板, 抽出点样梳。
17. 加 1  $\mu$ L 溴酚蓝指示剂溶液, 与 9 mL DNA 溶液混合点样 50 V/cm 电泳 1~2 h, 将点样胶在紫外灯下观察 DNA 谱带。

## (二) 注意事项

1. 抗菌素必须保存在 -20 °C 冰箱中, 青霉素一次性使用。
2. 溶液 II 现用现配。
3. 管壁残液必须除尽。
4. 注意防止紫外光烧伤眼睛。
5. 注意不要沾染上 EB, 因它有致癌性。

## 六、作业与思考题

1. 加上溶液 II 后出现什么现象? 为什么?
2. 提取的质粒 DNA 溶液中还可能有什么物质?

## 方法二 煮沸法提取质粒 DNA

### 一、原理和用途

细菌悬浮于含有 Triton X-100 和能消化细胞壁的溶菌酶的缓冲液中, 加热到 100 °C 使其裂解。加热除了破坏细菌外壁, 还有助于解开 DNA 链的碱基配对, 并使蛋白质和染色体 DNA 变性。但是, 闭环质粒 DNA 双链彼此不会彻底分离, 因为它们的磷酸二酯骨架具有互相缠绕的拓扑结构。当温度下降后, 闭环 DNA 的碱基又相互配对复位, 形成超螺旋分子。离心除去变性的染色体 DNA 和蛋白质, 就可从上清液中回收质粒 DNA。

煮沸裂解提取细菌质粒 DNA 与碱变性法提取质粒 DNA 质量基本相同,

均可用于酶切、连接、重组鉴定、PCR 扩增、建基因文库等。

## 二、实验材料

大肠杆菌 JM109 (或 DH5a) 含有 pUC18 (或 pBR322)。

## 三、溶液与缓冲液

1. 主要溶液同碱裂解法。
2. STET 溶液: 含 8% 蔗糖、10 mmol/L Tris · HCl (pH 8.0)、50 mmol/L EDTA 和 0.5% Triton X-100。
3. 溶菌酶溶液。
4. 异丙醇。
5. 5 mol/L NaAc (pH 5.2)。
6. 70% 乙醇。
7. RNA 酶 (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。
8. TE 缓冲液 (pH 8.0)。

## 四、仪器设备及耗材

恒温培养箱、恒温振荡器、TGL-16 离心机、旋涡混合器、普通冰箱、低温冰箱 ( $-20^{\circ}\text{C}$ )、真空泵、沸水浴锅、稳压电泳仪 (500 V, 300 mA)、紫外检测仪 (254 nm)、微型水平电泳槽、微量移液器 (20  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、1 000  $\mu\text{L}$ )、三角烧瓶 (50 mL)、烧杯 (100 mL)、量筒 (50 mL)、EP 管 (1.5 mL)、吸头 (20  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、1 000  $\mu\text{L}$ )、牙签。

## 五、实验方法

### (一) 实验步骤

1. 执行碱变性法提取质粒 DNA 的步骤 1~4 的操作。
2. 将细菌沉淀重悬于 350  $\mu\text{L}$  STET 溶液中。加 25  $\mu\text{L}$  新配制的溶菌酶溶液, 振荡 3 s, 混匀。
3. 将离心管放入煮沸的水浴锅中, 持续时间为准确的 40 s。
4. 室温下以 12 000  $g$  离心 10 min。
5. 用无菌牙签从离心管中去除细菌碎片。
6. 在上清中加入 40  $\mu\text{L}$  5 mol/L NaAc (pH 5.2) 和 420  $\mu\text{L}$  异丙醇, 振荡混匀, 室温下放置 5 min。
7.  $4^{\circ}\text{C}$  下以 12 000  $g$  离心 5 min, 回收核酸沉淀。

8. 小心吸去上清液, 将离心管倒置于一张纸巾上, 以使所有液体流出。再将附于管壁的液滴除尽。

9. 加 0.5 mL 70% 乙醇, 4 °C 下以 12 000 g 离心 2 min, 去上清液。

10. 去除管壁上所有乙醇液滴, 打开管口, 放于室温下使乙醇挥发殆尽, 直至管内无可见的液体为止或用真空泵干燥。

11. 用 20  $\mu$ L 含 RNA 酶 (20  $\mu$ g/mL) TE (pH 8.0) 溶解核酸, 稍加振荡, 储存于 -20 °C。

12. 电泳, 观察结果。

## (二) 注意事项

1. 煮沸的时间应准确掌握 40 s, 用镊子夹住, 以免烫手。

2. 异丙醇沉淀核酸放置冰箱中 0.5 h 效果更好。

## 六、作业与思考题

1. 异丙醇和乙醇沉淀核酸有什么异同?
2. 为什么要将附于管壁的液滴除尽?
3. 残留的乙醇对质粒有什么影响?

## 实验三 $\lambda$ 噬菌体 DNA 的分离提取

### 一、原理和用途

自从  $\lambda$  噬菌体于 20 世纪 50 年代初被首次发现以及在 70 年代初被用做克隆工具以来, 它几乎是迄今为止研究得最为详尽的一种大肠杆菌双链 DNA 噬菌体。并已构建了 400 多个与其相关的不同载体, 用于从最初较大容量的基因组 DNA 亚克隆到构建复杂的 cDNA 文库或基因组 DNA 文库。 $\lambda$  噬菌体载体的主要类型包括插入型载体、置换型载体和表达型载体。

本文以  $\lambda$ gt11 为例阐述  $\lambda$  噬菌体 DNA 的提取过程。 $\lambda$ gt11 是插入型载体的一种, 同时又是表达载体的原型。它的基因组中含有一个大肠杆菌的 *lac5* 区段, 编码  $\beta$ -半乳糖苷酶 *lacZ* 基因, 同时这种载体的基因组所携带的 *lacZ* 基因序列中, 有一个 *EcoR* I 的识别位点, 可容纳 8.3 kb 大小的外源 DNA 片段。当外源基因插入到 *lac5* 区段的时候, 阻断了  $\beta$ -半乳糖苷酶基因 *lacZ* 的编码序列, 会导致  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的失活, 就会形成无色的噬菌斑。

$\lambda$ gt11 载体适用于 cDNA 克隆, 是专门设计用来按抗体筛选技术分离特定