

UEXIAO ZHUANYE JIAOCAI

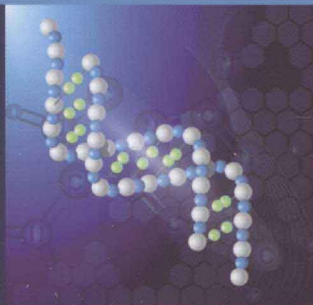
高等学校专业教材 •

[高校教材]

食品生物技术实验指导

王艳萍 主 编
王志伟 副主编

FOOD BIOTECHNOLOGY EXPERIMENT
METHODOLOGIES

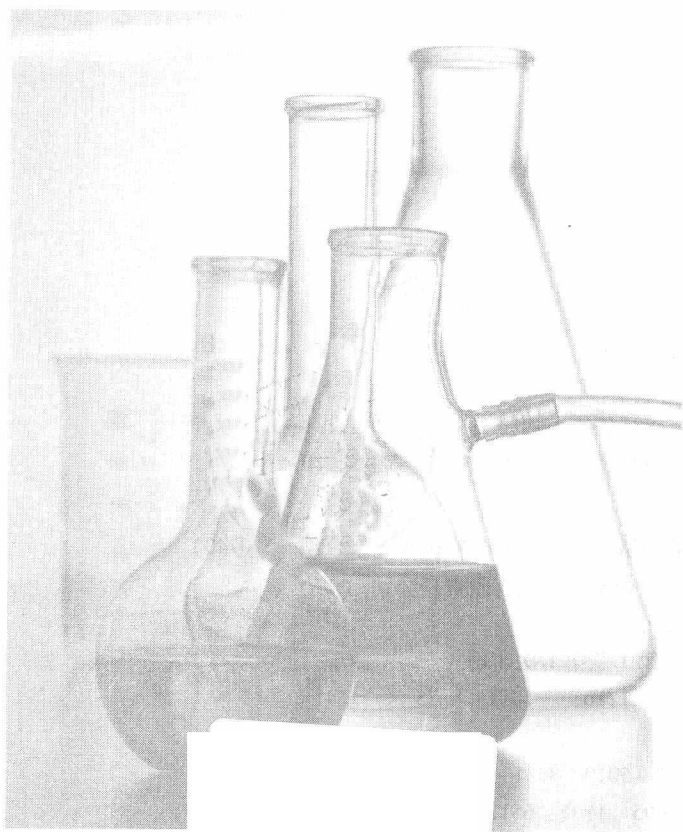


中国轻工业出版社

高等学校专业教材

食品生物技术实验指导

王艳萍 主 编
王志伟 副主编



 中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

食品生物技术实验指导/王艳萍主编. —北京:
中国轻工业出版社, 2012. 1

高等学校专业教材

ISBN 978 - 7 - 5019 - 8431 - 2

I. ①食… II. ①王… III. ①生物技术 - 应用 - 食品
工业 - 实验 - 高等学校 - 教材 IV. ①TS201. 2 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 178370 号

责任编辑: 马 妍 责任终审: 唐是雯 封面设计: 锋尚设计
版式设计: 宋振全 责任校对: 吴大鹏 责任监印: 张 可

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

印 刷: 河北高碑店市德裕顺印刷有限责任公司

经 销: 各地新华书店

版 次: 2012 年 1 月第 1 版第 1 次印刷

开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 8. 75

字 数: 202 千字

书 号: ISBN 978 - 7 - 5019 - 8431 - 2 定价: 18. 00 元

邮购电话: 010 - 65241695 传真: 65128352

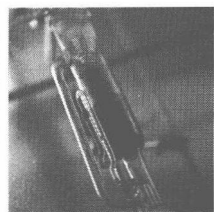
发行电话: 010 - 85119835 85119793 传真: 85113293

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社邮购联系调换

090496J1X101ZBW



前 言

食品生物技术是以基因工程为先导、以酶工程技术为核心、以生物大分子分离技术为目标的生物技术类专业的专业必修课,不仅具有较强的理论性,而且有一定的实践性。只有扎实地掌握系统的基因工程和酶工程基础知识、熟练的实验操作技能,才能在相应的专业技术领域真正地有所造诣和建树。为使学生充分掌握生物技术的基本原理和在食品制造过程中的应用技术与原理,培养学生的创新意识和实践能力,经过多年的教学实践、广泛的调查研究、深入的总结实践,我们编写了这本实验教材。

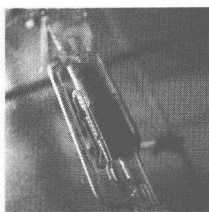
本书包括实验须知和安全措施、实验操作指导及附录,内容涉及食品生物技术实验的基本技能,包括基本实验理论、实验操作、具体实验内容以及常用的实验资料及数据处理方法等。本书力求内容系统全面、数据准确无误,同时脉络清晰、语言规范。在实验操作指导中,除了传统的基因工程、酶工程和生物分离工程实验外,更多的是结合食品制造中一些较为系统的食品加工实验,使学生通过实验不仅能够加深对食品生物技术理论的理解,还能体会出生物技术在食品加工中的应用,提高学生的实际操作能力。

本教材编写分工:天津科技大学的王艳萍(实验四至六、二十六、三十)主编并主审了全书,天津科技大学的曹东旭(实验二十四、二十五和三十九)、刘清岱(实验一至三和十九)和大连工业大学的王际辉(实验八至十一)以及内蒙古农业大学的杨飞芸(实验七和四十一)等主要编写了基因工程实验,天津科技大学的胡爱军(实验十六至十八和二十八)和刘常金(实验十二至十五)主要编写了酶工程实验,天津科技大学的李昌模(实验二十至二十二)和天津商业大学的刘剑虹(实验二十七和四十二)等主要编写了生物大分子的分离纯化实验,河南工业大学的黄现青(实验二十三、三十五至三十八和四十)和天津科技大学的白小佳(实验二十九、三十一和附录一、六、七)、汪建明(实验三十二、三十三)和胡云峰(实验三十四)等主要编写了食品加工实验,天津科技大学的王志伟主要编写了附录部分,并参与了文字校对等工作。

本书的编写得到天津科技大学的大力支持,同时其它兄弟院校的同仁也给予了诸多帮助,在此特致谢意。

由于编者水平有限,书中错误在所难免,敬请读者批评指正。希望能得到各位读者在使用教材过程中的批评和建议,以使本书日臻完善。

编 者



目 录



绪论	1
实验须知	1
安全措施	2



第一章 基因工程实验	3
实验一 质粒 DNA 的分离、纯化	3
实验二 质粒 DNA 的酶切及凝胶电泳	6
实验三 基因组 DNA 的提取	9
实验四 聚合酶链式反应 (PCR) 扩增目的基因	11
实验五 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化	14
实验六 重组质粒的连接、转化及筛选	17
实验七 基因组 DNA 的 Southern 杂交分析	19
实验八 动物细胞 RNA 的提取和 cDNA 合成	22
实验九 外源基因在大肠杆菌中的诱导表达和检测	25
实验十 沙门菌的 PCR 方法鉴定	28
实验十一 枯草芽孢杆菌 G + C 含量的测定	30



第二章 酶工程实验	33
实验十二 溶菌酶的粗提取	33
实验十三 溶菌酶分离纯化及酶活力、蛋白质浓度测定	35
实验十四 溶菌酶纯度鉴定与分子质量测定	38
实验十五 溶菌酶在食品保藏中的应用	40
实验十六 原果胶酶的提取与活力测定	41
实验十七 果胶酶 (淀粉酶或凝乳酶) 酶制剂的制备	43
实验十八 固定化 α -淀粉酶与活力测定	46



第三章 生物大分子的分离纯化	49
实验十九 超速离心法分离质粒 DNA	49
实验二十 硅胶色谱法分离甘油三酯	51

实验二十一	HPLC 法测定单糖组分	53
实验二十二	气相色谱法分析脂肪酸	54
实验二十三	蛋白质的透析和浓缩	56
实验二十四	超滤技术浓缩和分离碱性蛋白酶	58
实验二十五	凝胶层析法纯化胰激肽原酶	61
实验二十六	亲和层析法 (His - Tag) 纯化目标蛋白质	67
实验二十七	乳源糖肽的小肽电泳和鉴定	70

第四章 食品加工实验

实验二十八	酶法澄清苹果汁的加工	73
实验二十九	生物活性肽——酪蛋白磷酸肽的制备及功能检测	74
实验三十	乳酸菌发酵剂的制备	77
实验三十一	微生物发酵法制备蛋白酶	79
实验三十二	酸奶的加工	82
实验三十三	农家干酪的制作	84
实验三十四	干红葡萄酒的制作	87
实验三十五	啤酒的酿造	89
实验三十六	醋的酿造	91
实验三十七	酱油的酿造	92
实验三十八	米酒的酿造	94
实验三十九	离子交换法制备纯水	95

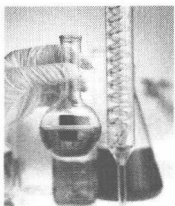
第五章 生物技术综合性实验

实验四十	蛋白酶产生菌的分离筛选、鉴定、发酵条件优化及酶学性质研究 ...	100
实验四十一	灵芝栽培及灵芝多糖的提取	103
实验四十二	酪蛋白糖巨肽的酶解制备、分离及组分分析	106

附录

附录一	分子生物学数据库	110
附录二	使用 Primer 5.0、DNASTar 设计引物	111
附录三	利用 GenBank 的 BLAST 进行基因的相似性比对	113
附录四	如何绘制聚类分析图	114
附录五	质粒图谱	117
附录六	常用核酸换算数据	119
附录七	微量移液器的使用说明	119
附录八	数据处理和生物统计相关知识	120

参考文献



绪 论

实验须知

1. 学生应本着认真、积极的态度，在教师的指导下完成每次实验。不仅要明白实验的原理、步骤和关键，还要能发现问题，积累经验，并对实验结果进行分析讨论。

2. 实验课前应当认真预习，并书写简单的预习报告。实验过程中，严格遵守操作规范，实验结果和数据应如实记录，并当堂写出原始实验结果记录，经教师检查同意并签字后，方可离开。实验报告应在实验后一天内完成并交到指定地点。

3. 遵守课堂纪律，不得迟到早退，实验室内不得吸烟、饮食、大声喧哗，学生之间应互助友爱。

4. 爱护实验器材。在了解仪器性能和操作规程之前，不得贸然使用，更不得擅自拆卸或将其带出室外。实验过程中，如发现仪器损坏或运转异常，应立即告知指导教师。公用试剂用毕应立即盖好，放回原处，实验中应注意节约。

5. 注意安全。对腐蚀性试剂或易燃有机溶剂的操作应格外小心；水、电、煤气在停用时应及时关闭。

6. 学生应分组轮流值日，负责实验室的卫生和安全。



安全措施

1. 进入实验室必须穿实验工作服。

2. 实验室内严禁吸烟，易燃易爆物品应远离火源。低沸点的有机溶剂不得在火焰上直接加热；必须加热时，可在水浴中进行。

3. 使用电器设备要严防触电，切忌用湿手触摸电器。发现仪器漏电时，立即报告并停止使用。万一发生触电事故，应立即关闭电源，并用干木棍将导线挑离被电者身体；对呼吸停止者，应立即进行人工呼吸，并及时送医院抢救。

4. 强酸、强碱液体或剧毒液体不得用口经吸量管吸取，必须使用橡皮球，万一不慎吸入口内或沾及皮肤，应立即用清水多次漱口或局部冲洗。若为强碱灼伤，清洗后可再用5%硼酸溶液清洗；若为强酸灼伤，水洗后可用5%碳酸氢钠溶液清洗。严重灼伤者，应立即将残留在身体上的液体轻轻冲洗后，送医务部门处理。

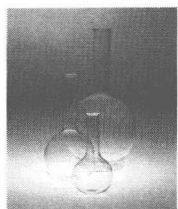
5. 用后的浓酸、浓碱残液，应倒入指定的容器。不要直接倒入水池内，以免蚀损水管。若少量残液已倒入池内，应立即放水冲稀流走。

6. 万一着火，不要惊慌失措，要立即切断火源和电源，搬走易燃物品，同时立即报告指导老师进行紧急处理，严防火势蔓延；若火势蔓延，应立即报警。

7. 分子生物学实验废弃物的处理

溴化乙锭(EB)：溴化乙锭是强诱变物，并有中度毒性。使用时应戴一次性手套，实验操作宜固定在一定的区间、使用相对固定的容器。实验结束后，在教师的指导下统一进行回收处理。

细菌培养物：细菌培养物及所接触的平皿在121℃、30min消毒后方可丢弃。



第一章 基因工程实验

实验一 质粒 DNA 的分离、纯化

实验目的

本实验采用碱裂解法提取细菌细胞中的质粒 DNA，经酚、氯仿、异戊醇抽提和乙醇沉淀等步骤，从而得到适用于基因操作的质粒 DNA 分子。通过本实验掌握碱裂解法提取质粒 DNA 的原理和分子生物学实验技巧，初步了解几种 DNA 分离、纯化的方法。

实验原理

质粒 (Plasmid) 作为携带外源基因进入细菌中扩增或表达的主要载体，广泛应用于基因操作的各个方面。质粒是一种染色体外的 DNA 分子，其大小范围在 1 ~ 200kb 不等。大多数来自细菌细胞的质粒，为双链、共价闭合环状的 DNA 分子，并以超螺旋状态存在于宿主细胞中。

质粒载体是在天然质粒的基础上为适应实验室操作而进行人工构建的。与天然质粒相比，质粒载体通常带有一个或一个以上的选择性标记基因（如抗生素抗性基因）和一个人工合成的含有多个限制性内切酶识别位点的多克隆位点序列，并去掉了大部分非必需序列，使分子质量尽可能减小，以便于基因工程操作。通常所用的质粒载体有 pBR322、pUC18、pUC19 等，本次实验要提取的质粒是具有氨卞青霉素抗性基因 (Amp^r) 的 pUC19，大小约为 2.69kb。

从细菌中分离质粒 DNA 的方法都包括三个基本步骤：培养细菌使质粒扩增，收集和裂解细胞，分离和纯化质粒 DNA。分离制备质粒 DNA 的方法很多，常用的方法有碱裂解法、煮沸法、SDS 法等。本实验以碱裂解法为例，介绍质粒的抽提过程。碱裂解法的原理是：碱性条件下 (NaOH)，用十二烷基磺酸钠 (SDS) 破坏菌体细胞壁，从而使质粒 DNA 以及基因组 DNA 同时从细胞中释放出来。释放出来的 DNA 遇到强碱性环境，就会发生变性。因为细菌染色体 DNA 比质粒大得多，且染色体 DNA 分子为线性分子，难以复性，与变性的蛋白质和细胞碎片缠绕在一起，可以离心除去。而质粒 DNA 具超螺旋闭合环状结构，虽变性但两条互补链不会完全分离。当 pH 被调至中性后，质粒 DNA 可以恢复构型，并以溶解状态存在于液相，离心除去沉淀后，就可以从上清液中回收质粒 DNA 分子（见图 1-1）。

实验准备

1. 仪器设备

微量移液器 (20 μ L、200 μ L、1000 μ L)、台式高速离心机、恒温振荡摇床、高压蒸汽

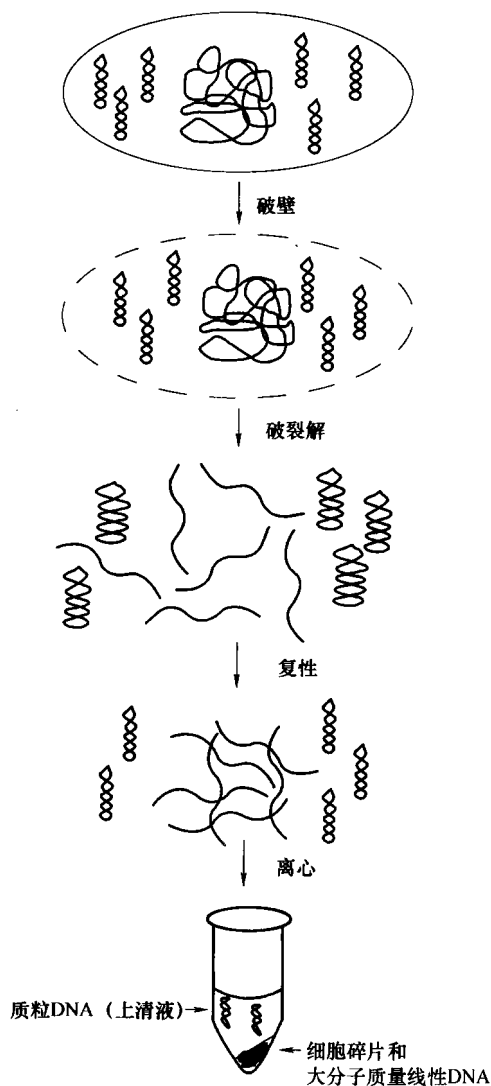


图 1-1 质粒 DNA 提取的原理

消毒器（灭菌锅）、涡旋振荡器、恒温水浴锅等。

2. 材料

含 pUC19 的大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 。

3. 主要试剂

(1) LB 液体培养基

蛋白胨 (Tryptone) 10g

酵母提取物 (Yeast extract) 5g

NaCl 10g

溶于 800mL 去离子水中，用 NaOH 调 pH 至 7.5，加去离子水定容至 1L，高温高压灭菌 20min。

LB 固体培养基：液体培养基中每升加 15g 琼脂粉，高温高压灭菌 (0.1MPa, 121℃)。

(2) 氨苄青霉素 (Ampicillin, 100mg/mL) 称取 1g 氨苄青霉素置于 10mL 离心管中, 加入去离子水定容至 10mL, 用 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤除菌后, 分装后储存于 -20℃ 冰箱中。

- (3) 溶液 I 50mmol/L 葡萄糖
25mmol/L Tris - HCl (pH8.0)
10mmol/L EDTA (pH8.0)

高温高压灭菌 15min, 储存于 4℃ 冰箱。

- (4) 溶液 II 0.2mol/L NaOH
1% SDS, 使用前现用现配

- (5) 溶液 III 5mol/L 醋酸钾 60mL
冰醋酸 11.5mL
H₂O 28.5mL

高温高压灭菌后, 储存于 4℃ 冰箱。

(6) 苯酚 - 氯仿 - 异戊醇 (25:24:1) pH8.0, 棕色玻璃瓶中 4℃ 保存, 购自上海生物工程技术有限公司。

(7) RNA 酶 A (RNase A) 母液 称取 RNase A 溶于 10mmol/L Tris - HCl (pH7.5)、15mmol/L NaCl 中, 配制终浓度为 10mg/mL 的 RNase A 溶液, 于 100℃ 加热 15min。冷却后用 1.5mL 离心管分装成小份保存于 -20℃ 条件下。

(8) TE 缓冲液 10mmol/L Tris - HCl (pH8.0)、1mmol/L EDTA (pH8.0)。高温高压灭菌后储存于 4℃ 冰箱中 (0.1MPa, 121℃, 20min)。

实验方法

(1) 培养细菌使质粒扩增 采用灭菌的牙签挑取生长在 LB 固体培养基上的单菌落, 并将其接种于 5.0mL LB 液体培养基中, 同时加入氨苄青霉素 2.5 μ L, 使氨苄青霉素的终浓度为 50 μ g/mL。37℃ 振荡培养过夜 (12 ~ 14h)。

(2) 收集菌体 取 1.5mL 细菌培养液移入离心管中, 室温 8 000r/min 离心, 弃上清液, 将离心管倒置, 使液体尽可能流尽。

(3) 裂解细菌细胞 将细菌沉淀重悬于 100 μ L 预冷的溶液 I 中, 剧烈振荡, 使菌体分散混匀。

(4) 加入 200 μ L 新鲜配制的溶液 II, 温和翻转数次混匀, 并将离心管放置于冰上 3 ~ 5min, 使细胞膜裂解 (溶液 II 为裂解液, 故离心管中菌液逐渐变清)。

(5) 加入 150 μ L 预冷的溶液 III, 将离心管温和颠倒数次混匀, 此时可见白色絮状沉淀, 可在冰上放置 5 ~ 10min。

(6) 4℃ 下, 12 000r/min 离心 5min, 用移液器小心吸取含有质粒 DNA 的上清液至新的离心管中, 同时估算上清液的体积。

(7) 加入与上清液等体积的苯酚 - 氯仿 - 异戊醇 (25:24:1), 注意苯酚 - 氯仿 - 异戊醇位于下层, 不要吸取上层的水。振荡混匀, 静置 10min 后, 4℃ 下, 12000r/min 离心 5 ~ 10min。

(8) 用移液器小心移出上清液, 置于一新的离心管中, 加入 2 倍体积预冷的无水乙

醇，充分混匀。冰上放置半个小时以上，4℃下，12000r/min 离心 5~10min，去除上面的乙醇液后，在离心管的底部可发现白色的沉淀。

(9) 吸取 400μL 预冷的 70% 乙醇洗涤沉淀 1~2 次，并于 4℃ 下，8000r/min 离心 5~10min，收集沉淀，弃上清液，将质粒 DNA 沉淀在室温下晾干。

(10) 用 20~50μL TE (含 RNase A 20μg/mL) 溶解质粒 DNA 沉淀，37℃ 水浴半小时，以降解除 RNA 分子，-20℃ 下保存备用。

注意事项与建议

(1) 提取过程应尽量保持低温条件。

(2) 溶液 II 使用前现用现配。由于空气中的 CO₂ 可与溶液 II 中的 NaOH 作用，减弱了其碱性，达不到裂解细胞的目的。

(3) 严格控制裂解步骤在 5min 内完成，同时混匀动作要轻柔。如果加溶液 II 时操作时间过长，提取的质粒中会出现断裂的基因组 DNA 片段。

(4) 苯酚有毒，它的浓溶液对皮肤有强烈的腐蚀性，操作时一定要小心，如不慎滴落到皮肤上，应马上用酒精清洗。

(5) 提取和纯化后的质粒 DNA 应该保存在 TE 缓冲液中，而用纯水只能短期保存，因为实验室制备的纯水呈现弱酸性，质粒在酸性条件下会发生酸解。

思考题

1. 本实验所提取的 pUC19 质粒的基本性质有哪些？
2. 使用碱裂解法提取质粒 DNA 操作过程中应注意哪些问题？
3. 质粒 DNA 的纯化需要哪些试剂？它们发挥怎样的作用？
4. 为什么要用 pH8.0 的 Tris 水溶液饱和酚？呈粉红色的酚可否使用？如何保存酚，使其不被空气氧化？

实验二 质粒 DNA 的酶切及凝胶电泳

实验目的

本实验使用限制性内切酶对质粒 DNA 进行酶切反应，通过琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物片段的大小。熟悉酶切位点查找的分子生物学软件，了解基因工程中常用的限制性内切酶性质，能够对常见质粒 DNA 进行双酶切实验分析。

实验原理

40 年前，当人们研究细菌对抗噬菌体宿主特异性的限制-修饰现象时发现了限制性内切酶 (restriction enzyme)。限制性核酸内切酶可分为三类，重组 DNA 技术中常用的限制性核酸内切酶为 II 类酶。绝大多数 II 类限制酶识别长度为 4~6 个核苷酸的回文对称特异核苷酸序列 (如 EcoR I 识别 6 个核苷酸序列：5'-G↓AATTC-3')，有少数酶识别更

长的序列或简并序列。内切酶切割位点在识别序列中，有的在对称轴处切割，产生平末端的 DNA 片段（如 Sma I：5' - CCC ↓ GGG - 3'）；有的切割位点在对称轴一侧，产生带有单链突出末端的 DNA 片段称黏性末端，如 EcoR I 切割识别序列后产生两个互补的黏性末端。

本实验是对提取的质粒 pUC19 进行酶切分析。首先需要应用分子生物学软件分析质粒的酶切位点，推荐使用的软件有：Primer Premier 5.0、Vector NTI、DNAMAN 和 NEB - cutter 等。DNA 限制性内切酶酶切图谱又称 DNA 的物理图谱，它由一系列位置确定的多种限制性内切酶酶切位点组成，以直线或环状图式表示。在 DNA 序列分析、基因组的功能图谱绘制、DNA 的无性繁殖、基因文库的构建等工作中，建立限制性内切酶图谱都是不可缺少的环节。

琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳是分离鉴定和纯化 DNA 片段的标准方法。在电场中，在中性 pH 下带负电荷的 DNA 向阳极迁移，其迁移速率由 DNA 的分子大小、构象等因素决定。该技术操作简便、快速，可以分辨用其它方法（如密度梯度离心法）无法分离的 DNA 片段。当用低浓度的荧光嵌入染料溴化乙锭（Ethidium Bromide, EB）染色，在紫外光下至少可以检出 1 ~ 10ng 的 DNA 条带，从而可以确定 DNA 片段在凝胶中的位置。此外，还可以从电泳后的凝胶中回收特定的 DNA 条带，用于以后的克隆操作。

实验准备

1. 仪器设备

水平式电泳装置、电泳仪、台式高速离心机、恒温水浴锅、微量移液器、电炉、紫外透射仪、凝胶成像系统。

2. 主要试剂

(1) 限制性内切酶 EcoR I、Hind III，购自 NEB 公司。

(2) 50 × TAE 电泳缓冲液 242g Tris

57.1mL 冰乙酸 (17.4mol/L)

200mL 0.5mol/L EDTA (pH 8.0) 加入去离子水定容至 1L。

(3) 6 × 电泳载样缓冲液 0.25% 溴酚蓝，0.4g/mL 蔗糖水溶液，储存于 4℃。

(4) 溴化乙锭 (EB) 溶液母液 将溴化乙锭配制成 10mg/mL，用铝箔包裹容器，储于室温。

(5) DNA 分子质量标准 2kb DNA Marker (北京全式金生物技术有限公司)，条带组成为 100bp, 250bp, 500bp, 750bp, 1000bp, 2000bp。

实验方法

1. DNA 酶切反应

(1) 利用分子生物学软件 Primer Premier 5.0、Vector NTI 等，或者利用在线的分析软件，如 NEB - cutter (New England Biolabs 公司) 查找质粒 DNA 的酶切位点，选择相应的限制性内切酶，预测酶切产物的电泳结果。

(2) 取 1.5mL 离心管，用微量移液器分别加入 DNA 5μg 和 10 倍的反应缓冲液 2μL，再加入重蒸水使总体积为 19μL，将管内溶液混匀后加入 1μL 酶液，充分混匀。使用限制

性内切酶时应尽量缩短其离开冰箱的时间，以免活力降低。

(3) 混匀反应体系后，将离心管置于浮子（或插在泡沫塑料板）上，37℃水浴保温2~3h，使酶切反应完全。

(4) 每管加入10倍的上样缓冲液，充分混匀以停止反应，置于冰箱中保存备用。

2. 琼脂糖凝胶的制备

(1) 缓冲液 取50×TAE缓冲液20mL，加水至1000mL，配制成稀释缓冲液，待用。

(2) 胶液的制备 称取0.4g琼脂糖，置于200mL锥形瓶中，加入50mL TAE稀释缓冲液，放入微波炉（电炉上）加热至琼脂糖全部融化，取出摇匀，此为0.8%琼脂糖凝胶液。加热过程中要不时摇动，使附于瓶壁上的琼脂糖颗粒进入溶液。

(3) 胶板的制备 将有机玻璃胶槽两端分别用橡皮膏（宽约1cm）紧密封住。将封好的胶槽置于水平支持物上，插上样品梳子，注意观察梳子齿下缘应与胶槽底面保持1mm左右的间隙。向冷却至50~60℃的琼脂糖胶液中加入溴化乙锭溶液使其终浓度为0.5μg/mL（也可不把溴化乙锭加入凝胶中，而是电泳后再用0.5μg/mL的溴化乙锭溶液浸泡染色）。用移液器吸取少量融化的琼脂糖凝胶，密封橡皮膏内侧，待琼脂糖溶液凝固后将剩余的琼脂糖小心地倒入胶槽内，使胶液形成均匀的胶层。倒胶时的温度不可太低，否则凝固不均匀，速度也不可太快，否则容易出现气泡。待胶完全凝固后拔出梳子，注意不要损伤梳子底部的凝胶，然后向槽内加入TAE稀释缓冲液至液面，要恰好没过胶板上表面。

(4) 加样 取10μL酶解液与2μL 6×载样液混匀，用微量移液器小心加入样品槽中。若DNA含量偏低，则可依上述比例增加上样量，但总体积不可超过样品槽容量。每加完一个样品要更换吸头，以防止互相污染，注意上样时要小心操作。

(5) 电泳 加完样后，合上电泳槽盖，立即接通电源。控制电压保持在60~80V，电流在40mA以上。当溴酚蓝条带移动到距凝胶前沿约2cm时，停止电泳。

(6) 染色 未加溴化乙锭的胶板在电泳完毕后移入0.5μg/mL的溴化乙锭溶液或Gelred染液中，室温下染色20~25min。

(7) 观察和拍照 采用凝胶成像系统进行，并且保存凝胶照片。

注意事项与建议

(1) 限制性内切酶从冰箱取出后须一直置于冰上或者低温的冰盒中。

(2) 加入内切酶之前将反应混合物混匀，可以用移液器上下吹打或轻弹管壁，然后在离心机中快速离心，切忌振荡混匀。

(3) 为避免星号活性，甘油浓度应低于5%，即加入内切酶（贮存于50%甘油中）的量应不超过总体积的10%。

(4) 进行两种限制性内切酶的同步双酶切时，请参看相关生物技术公司的《双酶切反应时通用缓冲液使用表》，选择双酶切反应时的通用缓冲液。如果两个酶切位点相邻或没有共同的缓冲液，通常单酶切，即先做一种酶切，乙醇沉淀纯化后，再做另一种酶切。

(5) 溴化乙锭具有强致癌性，注意使用一次性的PE手套。

思考题

1. 使用分子生物学软件分析pUC19的多克隆位点有哪些内切酶切点？

2. 采用两种内切酶来分析质粒如何提高酶切效率?
3. 琼脂糖凝胶电泳中 DNA 分子迁移率受哪些因素影响?

实验三 基因组 DNA 的提取

实验目的

本实验以枯草芽孢杆菌为材料, 采用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的基因组 DNA 作为后续实验——基因扩增的模板, 并测定其含量和纯度。

实验原理

高纯度、高分子质量的基因组 DNA 是构建基因组文库、Southern 杂交 (包括 RFLP) 及 PCR 等后续分子生物学操作的基础。利用基因组 DNA 较长的特性, 可以将其与细胞器或质粒等小分子 DNA 分离。加入一定量的异丙醇或乙醇, 基因组的大分子 DNA 即沉淀形成纤维状絮团飘浮其中, 可用玻棒将其取出, 而小分子 DNA 则只形成颗粒状沉淀附于壁上及底部, 从而达到提取的目的。

本实验介绍的方法是 CTAB 法。十六烷基三甲基溴化铵是一种去污剂, 它与 DNA 能形成复合物, 这些复合物在高盐溶液 (0.7mol/L NaCl) 中可溶并且稳定存在。此时的高盐溶液中除含有 CTAB-DNA 复合物外, 还含有大量的多糖和蛋白。可用氯仿先对此高盐溶液进行抽提, 大量蛋白和多糖等被从溶液中抽提沉淀出来, 而 DNA 仍留在溶液中。接着可用乙醇或异丙醇将 DNA 从溶液中沉淀出来, 然后用水或 TE 缓冲液等将 DNA 溶解。所得基因组 DNA 大小为 $20\sim 50\text{kb}$ 。DNA 的含量与纯度在研究工作中十分重要, 常常需要测定。目前使用较多和较简便的是紫外吸收法。DNA 在 260nm 波长处有一特征吸收峰, 根据其光密度值可计算 DNA 浓度。蛋白质在 260nm 波长处有一特征吸收峰, 在 260nm 波长处的吸收值仅为 DNA 的 $1/10$ 或更低, 因此当 DNA 样品中蛋白质含量较低时, 对 DNA 的紫外测定影响不大。DNA 的 260nm 与 280nm 波长处吸收比值在 1.8 左右, 当制品中蛋白质含量较高时此比值下降, 比值大于 2 时表明 RNA 及 DNA 碎片多, 比值在 $1.8\sim 1.99$ 时表明纯度较好。

实验准备

1. 仪器设备

移液器、冷冻高速离心机、台式高速离心机、水浴锅、陶瓷研钵、 50mL 离心管 (有盖) 及 5mL 和 1.5mL 离心管、弯成钩状的小玻棒、紫外分光光度计。

2. 材料

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

3. 主要试剂

(1) CTAB-NaCl 溶液 将 4.1g NaCl 溶解于 $80\text{mL H}_2\text{O}$, 缓慢加入 10g CTAB , 加水定容至 100mL 。

(2) 氯仿 - 异戊醇 (24:1), 酚 - 氯仿 - 异戊醇 (25:24:1), 异丙醇, 70% 乙醇, TE 缓冲液 (10mmol/L Tris - HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0), 10% SDS, 蛋白酶 K (20mg/mL 或粉剂), 5mol/L NaCl 溶液。

(3) Lambda DNA - HindIII 条带相对分子质量分别为 125bp, 564bp, 2027bp, 2322bp, 4361bp, 6557bp, 9416bp, 23130bp。

实验方法

(1) 培养细菌和收集菌体 挑取 LB 固体培养基上生长的单菌落, 接种于 100mL 的 LB 液体培养基中, 37℃ 培养过夜。次日, 将 100mL 过夜培养的菌液, 5000r/min 离心 10min, 弃去上清液, 收集菌体沉淀。

(2) 破碎细胞壁 菌体沉淀用 10mL TE 缓冲液悬浮, 同时加入 0.5mL 10% SDS 和 50μL 蛋白酶 K, 充分混匀, 37℃ 保温 1h。

(3) 加 1.5mL 5mol/L NaCl 溶液, 充分混匀。然后再加 1.5mL CTAB - NaCl 溶液, 充分混匀, 65℃ 保温 20min。

(4) 用等体积酚 - 氯仿 - 异戊醇 (25:24:1) 抽提, 5000r/min 离心 10min, 移取上清液至干净离心管中。

(5) 用等体积氯仿 - 异戊醇 (24:1) 抽提, 5000r/min 离心 10min, 取上清液移至干净离心管中。

(6) 加 1 倍体积异丙醇, 颠倒混合, 室温下静置 10min, 10000r/min 离心 15min 得到 DNA 沉淀。

(7) 加入 700μL 70% 乙醇, 70μL 3mol/L NaAc 漂洗 DNA 沉淀, 10000r/min 离心 15min, 收集 DNA 沉淀。溶解于 1mL TE, -20℃ 保存。

(8) 去除 RNA 污染 加 5μL RNase A (终浓度为 20μg/mL), 37℃ 温育 30min; 加 1/10 体积 3mol/L NaAc, 同时加入 2 倍体积无水乙醇 10min 后, 充分混匀, 10000r/min 离心 5min, 收集 DNA 沉淀。将 DNA 沉淀溶于 1mL TE, -20℃ 保存。

(9) 用 0.6% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性, 琼脂糖凝胶电泳的具体方法参照实验二, 分子质量标记可以使用 Lambda DNA - HindIII。

(10) 用分光计测定浓度及纯度 基因组 DNA 溶液用 TE 缓冲液适当稀释后以 TE 调零, 在 260nm 和 280nm 波长处分别测光密度 OD 值, 计算 DNA 浓度 (经验公式 $\mu\text{g/mL} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{稀释倍数}$) 以及含量、产率计算 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值, 计算其纯度。

注意事项与建议

(1) 革兰阳性菌, 由于细胞壁的结构与阴性菌有差别, 可在收集完菌体后加入终浓度 2mg/mL 的溶菌酶, 37℃ 温育 1h。

(2) 十六烷基三甲基溴化铵溶液在低于 15℃ 时会形成沉淀析出, 因此在将其加入冰冷的实验材料之前必须预热且离心时温度不要低于 15℃。

(3) 苯酚、溴化乙锭等化学试剂有毒, 操作时应注意安全。

(4) DNA 中含有蛋白多糖多酚类杂质, 可以重新沉淀 DNA, 让酒精充分挥发, 并且增加 70% 乙醇洗涤的次数 (2~3 次)。

思考题

1. 如何利用分子生物学数据库找到某一物种的基因与基因组信息?
2. 为什么构建 DNA 文库时,一定要用高分子质量的 DNA?
3. 用无水乙醇沉淀 DNA 时,为什么加入单价的阳离子?

实验四 聚合酶链式反应 (PCR) 扩增目的基因

利用 PCR 技术扩增目的基因是一个设计性实验。首先对数据库进行基因检索,并以此为模板,利用分子生物学软件设计引物;然后使用 PCR 仪进行基因扩增,并对产物进行电泳检测,凝胶成像系统分析实验结果。此外,还可以用纳米材料来优化反应条件,提高基因扩增效率。

实验目的

掌握 PCR 的原理和技术,了解影响 PCR 反应的主要因素;能够使用 Primer Premier 5.0 等分子生物学软件设计和分析引物。初步学习利用美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 等生物信息学数据库。

实验原理

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是一种体外模拟自然 DNA 复制过程的核酸扩增技术,又称体外酶促基因扩增。PCR 与分子克隆和核酸序列分析方法几乎构成了整个现代分子生物学的实验工作的基础。近年来,伴随着 PCR 技术的发展,PCR 不但可以对目的基因进行定性,而且可以定量 (即原始模板的确切数目),因此广泛应用于遗传学、微生物学、医学乃至整个生命科学的研究中。

PCR 的原理类似于 DNA 的天然复制过程。利用耐热的 DNA 聚合酶,在待扩增的基因片段两侧和与其互补的两个引物,经过变性、退火和延伸三步的一个循环,实现模板 DNA 拷贝数增加一倍,在以后进行的循环过程中,每一循环的产物作为下一轮循环的模板。 n 次循环后,拷贝数增加 2^n 倍 (见图 1-2)。因此,进行 25~30 个循环后,拷贝数即可达到上百万倍 (10^6)。

PCR 的基本反应体系包括:需要扩增的模板 (template)、一对寡核苷酸引物 (primers)、4 种脱氧核苷三磷酸 (dNTP)、耐热 DNA 聚合酶 (DNA polymerase)、缓冲液 (reaction buffer system)、二价阳离子 (Mg^{2+}) 等。上述因子均可以影响 PCR 反应的结果。此外,纳米材料作为新型的 PCR 增效剂不仅可以增加 PCR 特异性和效率,而且可以提高 PCR 反应的灵敏度。实验中常用纳米金 (10nm) 作为 PCR 的增效剂来提高扩增效率,使扩增的特异性增强,有利于下一步的基因操作。

本实验由每组学生分别查找枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的相关基因,在教师的指导下设计引物,利用前面实验提取的基因组 DNA 作为模板,独立进行 PCR、电泳检测和凝胶成像等操作,并利用学过的知识对 PCR 反应条件进行优化,提高扩增的效率。