



高等院校生物类专业系列教材

基因工程

EXPERIMENTS IN GENETIC ENGINEERING

实验

主 编 陈蔚青

副主编 刘晓侠 柴 惠



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

高等院校生物类专业系列教材

基因工程

EXPERIMENTS IN GENETIC ENGINEERING

实验

主 编 陈蔚青

副主编 刘晓侠 柴 惠



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

基因工程实验 / 陈蔚青主编. —杭州: 浙江大学出版社, 2014. 9

ISBN 978-7-308-13806-2

I. ①基… II. ①陈… III. ①基因工程—实验—教材 IV. ①Q78-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 204235 号

基因工程实验

陈蔚青 主编

策划编辑 季 峥 (zzstellar@126.com)

责任编辑 季 峥 冯其华

出版发行 浙江大学出版社

(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310007)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 杭州林智广告有限公司

印 刷 德清县第二印刷厂

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 8.5

字 数 210 千

版 印 次 2014 年 9 月第 1 版 2014 年 9 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-13806-2

定 价 23.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部联系方式: (0571) 88925591; <http://zjdxcsb.tmall.com>

内 容 简 介

本教材介绍了基因工程的基本操作技术与实验手段。内容包括基因组 DNA 的提取,质粒 DNA 的提取,总 RNA 和 mRNA 的分离提取,核酸和蛋白质的凝胶电泳,DNA 扩增和 cDNA 文库的构建,限制性内切酶的酶切反应,重组质粒的连接、转化及鉴定,大肠杆菌感受态细胞的制备,Southern 印迹杂交,Western 印迹杂交,外源基因在大肠杆菌中的诱导表达,基因表达产物的检测分析和分离纯化等技术。书末附有基因工程操作中常用的溶液和缓冲液、基因工程实验室常规仪器设备等资料。

本教材本着实用、可行的原则进行内容设计,涵盖了基因工程的常用实验方法和技术,并吸收了近年来发展起来的新技术和新方法,内容具有普及性与连贯性,且通过综合性实验的设计以培养学生的科研能力。本教材主要面向生物工程、生物技术专业应用型本科学生,既可作为实验教材,也可作为基因工程实验教学的参考书。

前 言

基因工程作为现代生物技术和生命科学的基础与核心技术,已经渗透到与生命科学相关的各个领域,在基础研究和生产实践中发挥着重要作用。基因工程及其实验技术成为高等院校生物工程、生物技术及相关专业的基本教学内容。基因工程作为一门理论性与实践性并重的学科,基因工程实验是其必不可少的教学组成部分。

本教材由浙江树人大学、浙江中医药大学和嘉兴学院等高校的教师联合编写。教材本着实用、可行的原则进行内容设计,涵盖了基因工程的常用实验方法和技术,并吸收了近年发展起来的新技术和新方法,内容具有普及性与连贯性。教材主要面向生物工程、生物技术专业应用型本科专业学生,因此具有重点明确、简明扼要、基础与综合能力培养兼顾的特点。教材将基因工程的基本实验方法与最新研究方法有机结合,融入教师多年实验教学经验。通过本实验课程的学习,可使学生掌握基因工程的基本实验方法,并培养研究设计能力和综合应用能力。

本教材分为六章,第1~5章为基础性实验篇,第6章为综合性实验篇。基础性实验篇内容包括基因组DNA的提取,质粒DNA的提取,总RNA和mRNA的分离提取,核酸和蛋白质的凝胶电泳,DNA扩增和cDNA文库的构建,限制性内切酶的酶切反应,重组质粒的连接、转化及鉴定,大肠杆菌感受态细胞的制备,Southern印迹杂交,Western印迹杂交,外源基因在大肠杆菌中的诱导表达,基因表达产物的检测分析和分离纯化等实验技术和手段。第6章内容为工程菌的构建、培养与目的产物的分离纯化,是综合性应用基因工程实验技术的系列实验。通过该章实验教学,使学生能够将基因工程基本实验技术融会贯通,同时也培养了学生思考问题的系统性和全面性,锻炼学生实验设计的能力。

对于本教材中的实验,使用者可以根据各自的实验条件和课时数进行选择。在实际教学时,针对不同层次、不同学时数的要求,既可以集中时间连续进行,也可以分成多次实验阶段性完成。本教材的部分实验提供了多种可供选择的实验方法,以便各高校根据自身情况

安排。本教材强调了实验中的注意事项,还对与实验相关的内容进行评述。为了便于读者进行基因工程实验操作及查阅相关资料,本教材将常规培养基与试剂的配制、常用抗生素、常用缩略语、常用实验仪器设备等资料在附录中列出。

本教材由浙江树人大学陈蔚青主编,参与本教材编写工作的有浙江中医药大学柴惠、金波、张林老师,嘉兴学院刘晓侠老师和浙江树人大学陈虹老师,最后由陈蔚青统稿。

本教材得到浙江省“十一五”重点教材建设项目资金资助;本教材的出版得到浙江大学出版社和浙江树人大学的大力支持;陈旭博士在教材的文字校对、图片拍摄等工作中作出了积极贡献。在此一并表示衷心的感谢。

由于我们水平有限,遗漏、缺点和错误在所难免,恳望批评指正。

编者

2014年3月

目 录

基础性实验篇

第 1 章 核酸的分离与纯化技术	3
实验 1.1 基因组 DNA 的提取	3
实验 1.2 质粒 DNA 的提取与纯化	10
实验 1.3 总 RNA 和 mRNA 的制备	14
第 2 章 电泳技术	19
实验 2.1 DNA 琼脂糖凝胶电泳	19
实验 2.2 RNA 琼脂糖凝胶电泳	23
实验 2.3 从低熔点胶琼脂糖凝胶中分离回收 DNA 片段	25
实验 2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	27
第 3 章 DNA 扩增和 cDNA 文库的构建	32
实验 3.1 聚合酶链反应扩增目的 DNA	32
实验 3.2 cDNA 文库的构建	50
实验 3.3 定量 PCR	57
第 4 章 重组质粒的连接与转化	62
实验 4.1 限制性内切酶的酶切反应	63
实验 4.2 外源 DNA 和质粒载体的连接反应	66
实验 4.3 大肠杆菌感受态细胞的制备	68
实验 4.4 重组质粒的转化与选择	71
第 5 章 重组子的筛选与鉴定	74
实验 5.1 Southern 印迹杂交	75
实验 5.2 Northern 印迹杂交	78
实验 5.3 菌落原位杂交	81

实验 5.4 斑点杂交	83
实验 5.5 Western 印迹杂交	84

综合性实验篇

第 6 章 工程菌的构建、培养与目的产物的分离纯化	89
实验 6.1 工程菌的构建	90
实验 6.2 高表达工程菌株的筛选与保藏	94
实验 6.3 工程菌生长曲线分析	97
实验 6.4 重组产物表达影响因素实验	99
实验 6.5 工程菌发酵工艺实验	101
实验 6.6 表达产物的分离纯化	103
附 录	108
附录 1 基因工程操作中常用的溶液和缓冲液	108
附录 2 培养基与试剂的配制	111
附录 3 常用抗生素	119
附录 4 常用缩略语	120
附录 5 常用仪器设备	123
附录 6 梯度 PCR 仪的介绍及使用说明	125

基础性实验篇

第 1 章

核酸的分离与纯化技术

核酸的分离与纯化技术是基因工程的一项基本技术。核酸的分离主要是指将核酸与细胞中的蛋白质、多糖、脂肪等生物大分子物质分开。在分离核酸时应遵循的基本原则是：保证核酸分子一级结构的完整性，去除其他分子的污染。

实验 1.1 基因组 DNA 的提取

【实验目的】

掌握基因组 DNA 的提取方法，制备高质量的植物、动物或微生物基因组 DNA，用于 PCR 扩增和构建基因组文库、Southern 印迹杂交等基因工程实验操作。

【实验原理】

生物体的大部分或几乎全部 DNA 都集中在细胞核或拟核区，主要与蛋白质共存。不同生物（植物、动物、微生物）的基因组 DNA 的提取方法有所不同；不同种类或同一种类的不同组织因其细胞结构及所含的成分不同，分离方法也有差异。在提取某种特殊组织的 DNA 时，必须参照文献和经验建立相应的提取方法，以获得可用的 DNA 大分子。尤其是组织中的多糖和酶类物质对随后的酶切、PCR 反应等有较强的抑制作用，因此用富含这类物质的材料提取基因组 DNA 时，应考虑除去多糖和酚类物质。

一般而言，提取基因组 DNA 可分两步：首先是裂解细胞，释放出基因组 DNA；然后是去除蛋白质、RNA 以及其他的生物大分子杂质。

基因组 DNA 在体内通常都与蛋白质相结合，蛋白质对基因组 DNA 的污染常常影响到后续的 DNA 操作过程，因此需要把蛋白质除去。一般采用苯酚/氯仿抽提和加蛋白酶的方法去除。苯酚、氯仿对蛋白质有极强的变性作用，而对 DNA 无影响。用苯酚/氯仿抽提这一方法对于去除核酸（无论是 DNA 或 RNA）中大量的蛋白质杂质是行之有效的。少量的或与 DNA 紧密结合的蛋白质杂质可用蛋白酶予以去除。基因组 DNA 中也会有 RNA 杂质，因 RNA 极易降解，少量的 RNA 对 DNA 的操作无大影响，一般无需处理，必要时可加入不含 DNA 酶的 RNA 酶以去除 RNA 的污染。

随着现代分子生物学的发展，DNA 分离技术也层出不穷，DNA 已经可以从化石、木乃

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

伊等极端材料中分离出来,也可以从痕量材料中获得。无论是什么材料,针对不同的材料来源和特点,调整、设计相应的提取缓冲液及不同的技术方案是十分重要的。提取缓冲液的成分应根据分离对象的不同而变化;缓冲液的 pH 值、保护剂和表面活性剂都要根据不同样品进行优化。目前许多公司有针对不同材料的试剂盒出售,使用方便,其中一些的使用效果好,如 Roche Applied Science 公司的 Plant DNA Isolation Kit 试剂盒。本节分别介绍实验室常用的植物、动物和细菌的总基因组 DNA 的提取方法。其中,用植物 DNA 的 CTAB (cetyl triethyl ammonium bromide,十六烷基三甲基溴化铵)改进提取法提取的 DNA 的质量与一些较好的试剂盒相当,不经 RNA 酶消化及后续步骤即可用于 PCR 反应和 Southern 印迹杂交。

1.1.1 植物基因组 DNA 的提取

植物组织材料的采集与保存对提取的 DNA 的产量和质量有很大影响。通常应尽可能采集新鲜、幼嫩的组织材料。采集过程中应尽可能保持组织材料所含的水分。通常的做法是取样时立即用浸湿的纱布包裹采集到的组织材料,放置在带有冷藏功能的采集箱中,这样通常可使组织材料在 3~5d 内仍然保持新鲜。野外远距离采集样本时,在可能的条件下应冷冻保存(如放置于液氮中);当不具备冷冻条件时,最好用盛有无水 CaSO_4 的瓶子分别保存,使其迅速干燥,利用这种方法可将材料保存数月,返回后应尽快进行 DNA 的提取工作。那些具有大量次生代谢产物(如单宁、酚类、醌类等)的植物材料,应尽可能采集幼嫩组织;此外,最好进行冷冻保存并在短时间内进行 DNA 提取。

从植物组织样品中分离 DNA 的方法,根据提取缓冲液(extraction buffer)中主要化学物质的不同,通常分为 CTAB 法和 SDS(sodium dodecyl-sulfate,十二烷基磺酸钠)法;根据 DNA 使用要求和研究目标的不同,分为 DNA 大量制备法和 DNA 微量制备法。DNA 大量制备法适用于 Southern 印迹杂交和基因组文库构建等对 DNA 质量和数量有较高要求的实验,但当需要对大群体或大样本进行快速的 PCR 检测或筛选时,DNA 微量制备法则成为首选。植物 DNA 的提取程序应包括以下几项:

(1) 破碎(或消化)细胞壁,释放出细胞内容物。

许多操作在破壁的同时也会剪切 DNA,因此采用任何方法均需在 DNA 的完整性和产量这两方面之间综合考虑。分离总基因组 DNA 常用的破壁方法是新鲜植物组织在干冰或液氮中快速冷冻后,用研钵将其磨成粉。分离细胞核 DNA 或细胞器 DNA 时则应采取更为温和的破壁方法,以免过早破坏内膜系统。这种情况下通常采用在含有渗透剂的缓冲液中(4°C)匀浆的方法来破壁。

(2) 破坏细胞膜,使 DNA 释放到提取缓冲液中。

这一步骤通常利用 SDS 或 CTAB 之类的去污剂来完成。SDS 是一种阳离子型表面活性剂,它的主要功能有:溶解细胞壁上的脂质与蛋白质,因而溶解膜蛋白而破坏细胞膜;解聚细胞中的核蛋白;与蛋白质结合形成 $\text{R}-\text{O}-\text{SO}_3-\cdots\text{R}^+-\text{蛋白质}$ 的复合物,使蛋白质变性而沉淀下来。但是,SDS 能抑制核糖核酸酶的作用,所以在以后的提取过程中,必须把它去除干净,防止下一步的操作(如用 RNA 酶去除 RNA)受干扰。CTAB 是一种在高盐浓度

下能与核酸结合形成可溶的稳定的络合物、低盐浓度下可形成沉淀的表面活性剂。在高盐浓度条件下,核酸以稳定形式与去污剂 CTAB 络合于溶液中;将盐(NaCl)浓度降至 0.4mol/L 以下可引起 CTAB-核酸络合物沉淀,从而将大部分多糖物质留在溶液中。因此,CTAB 缓冲液应当更适用于含有多糖或多酚类物质的植物材料的提取。去污剂还可以保护 DNA 免受胞内核酸酶的降解。通常提取液中还包含螯合剂(chelating agents),如乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA)。EDTA 可用于抑制金属离子依赖性的酶的活性,它可以螯合大多数核酸酶所需的辅助因子——镁离子。提取缓冲液的 pH 值,应以避开降解酶的最适 pH 值为原则。植物及微生物体内各种酶作用的最适 pH 值在 4.5~6.5。但也有例外的,如脂类物质降解酶及氧化酶的最适 pH 值为 5.0~6.0;而 DNase 的最适 pH 值为 7.0。因此大多提取缓冲液的 pH 值选为 8.0,有的甚至高达 9.0,但也有例外的。中药材大多为干品,而中药材加工和贮藏的整个过程,如日晒、高温烘干等都不利于 DNA 完整性的保持,一般选用高盐浓度、低 pH 值的提取缓冲液[100mmol/L 乙酸钠,50mmol/L EDTA,500mmol/L NaCl,2.5% PVP(聚乙烯吡咯烷酮),3% SDS,1% β -巯基乙醇,pH5.5]可以获得较好的提取效果。

(3) DNA 粗提液进一步纯化,操作过程中 DNA 剪切破坏的程度必须降到最低。

这是因为剧烈振荡或小孔快速抽吸都会打断溶液中高相对分子质量的 DNA。一般说来,如果操作得当,可以得到长度为 50~100kb 的 DNA。不过,分离高相对分子质量的 DNA 还只是工作的一部分,因为在 DNA 粗提取物中往往含有大量的 RNA、蛋白质、多糖等杂质,这些杂质有时很难从 DNA 中除去。因此,DNA 粗提液还需进一步纯化。大多数蛋白质可通过氯仿或苯酚处理后变性,沉淀除去;绝大部分 RNA 则可用 RNase A 经过热处理除去;但多数糖类杂质一般较难去除,这些杂质浓度高时,常使 DNA 提取物呈胶状。更为重要的是,即使在低浓度的情况下它们也会干扰后续操作,如抑制某些 DNA 修饰酶(如限制性内切酶)的活性,从而阻碍 Southern 印迹杂交或基因克隆;同时多糖杂质还会影响分光光度法对核酸的定量分析等。在氯仿/异戊醇(24:1)抽提后的水相中加入 1/2 体积的 5mol/L 的 NaCl,然后再加入 2 倍体积的乙醇使 DNA 沉淀,此时大部分多糖仍在上清液中。这种简单、迅速的方法可有效地去除植物 DNA 中的多糖。实验证明,在 DNA 的水溶液中,NaCl 终浓度为 0.5~3.0mol/L 时都能除去多糖杂质。也可以在常规提取步骤后再将提取物通过离子交换进行纯化,一些离子交换柱已商品化,对去除多糖有很好的效果。

植物细胞具有加厚的次生壁和硕大的液泡,因此植物细胞中贮存了大量种类繁多的次生物质,例如多酚、乳汁、树脂等。酚氧化酶存在于细胞质基质中,当细胞受到轻微破坏或组织衰老时,细胞结构(如液泡)解体,释放其中的酚类物质,酚氧化酶则和底物起反应,将酚类氧化成棕褐色的醌类物质。这些次生物质在提取 DNA 的过程中可与 DNA 共沉淀,形成黏稠的胶状物,难以溶解或产生褐变,如此质量的 DNA 既不能用于酶切位点分析,又不能用于 PCR 扩增。因为上述次生物质的存在严重抑制限制性内切酶和 Taq DNA 聚合酶的活性,所以去除多酚等次生物质成为提取与纯化植物 DNA 的关键步骤。为了去除多酚类次生物质,在提取介质中必须加入抗氧化剂(antioxidants),最常用的有 β -巯基乙醇、抗坏血酸钠、半胱氨酸和二硫苏糖醇(dithiothreitol,DTT)等。它们共同的作用是提供—SH(巯基),使其与多酚类物质竞争氧,因而有效地防止了酚类氧化成醌类,避免了褐变。所用抗氧化剂的种类

与用量依植物的类群而定,最常用的是 β -巯基乙醇,其最终含量范围是0.1%~2%(体积分数)。PVP是一种聚合物,其加入也可减少酚类、醌类及单宁类物质的影响。常用的是PVP 40,可以去除色素,它与多酚类物质结合形成一种不溶的络合物,因此也能有效去除酚类,常与抗氧化剂一起使用,终浓度为20~60g/L。而对于棉花、荔枝等含有大量酚类、醌类及其他次生代谢物的植物,提取缓冲液中常会添加一些诸如葡萄糖和DIECA(diethyl dithiocarbamic acid)钠盐的物质或在提取过程中增加苯酚/氯仿抽提的次数。还有其他一些非通用添加物,如抗坏血酸(维生素C)可用于降低醌类物质的影响,精胺及其他多胺可用于降低核酶的影响,氰化物可用于降低重金属氧化酶的影响。

【实验材料】

水稻或其他禾本科植物幼苗,李子或苹果幼嫩叶子等。

【实验器材】

研钵,高速冷冻离心机,水浴锅,100~1000 μ l、20~200 μ l、0.5~10 μ l 移液枪,核酸电泳仪,烧杯,三角瓶,容量瓶,1.5ml 无菌离心管等。

【实验试剂】

1. 2%(V/V)2-巯基乙醇。
2. CTAB 抽提液: 2%(m/V)CTAB,100mmol/L Tris·Cl(pH8.0),20mmol/L EDTA(pH8.0),1.4mol/L NaCl。室温保存,使用前加入2%(V/V)2-巯基乙醇。
3. CTAB 沉淀液: 1%(m/V)CTAB,50mmol/L Tris·Cl(pH8.0),20mmol/L EDTA(pH8.0),室温保存。
4. 高盐 TE 缓冲液: 10mmol/L Tris·Cl(pH8.0),20mmol/L EDTA(pH8.0),1mol/L NaCl,室温保存。
5. 异丙醇。
6. 70%(V/V)乙醇。
7. CTAB/NaCl 溶液: 在80ml H₂O 中溶解4.1g NaCl,缓慢加入10g CTAB 并搅拌,如果需要,可加热至65℃溶解,定容终体积至100ml。
8. 氯仿/异戊醇(24:1)。

【实验步骤】

1. 将10g 新鲜的植物组织洗净、吸干,放入研钵,添加液氮,研成细粉。
2. 取0.2g 细粉置1.5ml 离心管中,加入0.8ml 预热的CTAB 抽提缓冲液和2%(V/V)巯基乙醇,混合,于65℃温育10~60min,其间不断搅拌混匀。
3. 加入等体积的氯仿/异戊醇,颠倒使充分混合,于4℃,7500r/min 离心5min,回收上层相。
4. 在回收的上层相中加入1/10 体积的65℃的CTAB/NaCl 溶液,颠倒混匀,加入等体积的氯仿/异戊醇,颠倒使充分混合,于4℃,7500r/min 离心5min。

5. 回收上层相,重复步骤4。
6. 将上清液转入新的经硅烷化处理的离心管中,加入1倍体积的1×CTAB沉淀液,颠倒混匀。于65℃温育30min,观察沉淀生成,若无明显的沉淀生成,延长放置时间,使沉淀量增加。
7. 于4℃,5000r/min离心5min,用0.2ml高盐TE缓冲液重悬沉淀,若沉淀难以重悬,于65℃温育30min,重复直至所有或大部分的沉淀溶解。
8. 加入0.6倍体积的异丙醇,充分混匀,于4℃,7500r/min离心15min,用70%冰乙醇洗涤沉淀,自然干燥,用TE缓冲液溶解,于4℃保存备用。
9. 沉淀进一步经琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果如图1-1所示。



图1-1 植物基因组DNA电泳图谱

M-DNA相对分子质量标准;1,2,3-核桃叶片提取物

1.1.2 动物基因组DNA的提取

从动物组织或细胞中分离总基因组DNA一般是在EDTA及SDS这类去污剂存在的条件下,用蛋白酶K消化细胞,再用苯酚抽提实现的。若对DNA质量要求较高,通常除了通过增加氯仿/异戊醇(24:1)抽提次数、彻底去除蛋白质使DNA纯化外,还可采用CsCl密度梯度离心法进行纯化。较纯的DNA溶液可通过测定其紫外吸收光谱来进行定量。若DNA不够纯,由于RNA或非核酸类杂质的干扰,通过紫外吸收光谱测算的数据可能会有误差。这种情况下,可通过琼脂糖凝胶电泳的方法来定量测定。在低浓度琼脂糖凝胶(6.5g/L)中加入约50~100ng样品DNA,并依次加入25~200ng未经酶解的λDNA作标准。高相对分子质量DNA(长度大于50kb)应为一条靠近λDNA的清晰条带。该条带以下的片状模糊是机械或化学降解产物,更为靠近胶底部的模糊条带则是样品DNA中混杂的RNA。比较样品DNA条带与λDNA标准条带的亮度即可对样品DNA进行定量。通过肉眼比较条带的强

度可对 DNA 含量进行粗略估计($\pm 10\text{ng}$),但若用图像处理设备和凝胶分析软件,例如 UVP (Cambridge)软件包 SW2000 可进行更高精度的分析。这种设备对条带的强度均赋予数值,利用 λ DNA 标准条带绘制出 DNA 量与条带亮度的标准曲线,这样就可以更精确地估算出未知样品中的 DNA 含量。

【实验材料】

哺乳动物新鲜组织。

【实验器材】

组织匀浆器,100~1000 μl 、20~200 μl 、0.5~10 μl 移液枪,高速冷冻离心机,振荡水浴锅,核酸电泳仪,烧杯,三角瓶,容量瓶,1.5ml 无菌离心管等。

【实验试剂】

1. 消化缓冲液: 100mmol/L NaCl, 10mmol/L Tris $\cdot$ Cl(pH8.0), 25mmol/L EDTA (pH8.0)。
2. 0.5%(m/V)SDS: 室温保存。
3. 100mg/ml 蛋白酶 K: 临用前加入。
4. 磷酸缓冲液(PBS) 10 $\times$ PBS: 80g NaCl(1.37mol/L), 2g KCl(27mmol/L), 11.5g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (43mmol/L), 2g KH_2PO_4 (14mmol/L), 加水至 1L, 室温可长期保存。
5. 3mol/L NaAc(pH5.2): 80ml 水溶解 40.81g 的 NaAc $\cdot$ 3 H_2O , 用冰醋酸调 pH 至 5.2, 加 dd H_2O 定容至 100ml。
6. 7.5mol/L 乙酸铵。
7. 100%(V/V)乙醇及 70%乙醇。
8. TE 缓冲液: 10mmol/L Tris $\cdot$ Cl(pH8.0), 1mmol/L EDTA。
9. 苯酚/氯仿/异戊醇(PCI): 按苯酚: 氯仿/异戊醇=1:1 的比例混合饱和苯酚与氯仿, 即得苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)。
10. 氯仿/异戊醇(24:1)。

【实验步骤】

1. 切下组织, 剔除结缔组织, 立即剪成小块, 置于液氮中冻结。取 0.2g 组织用 2ml 消化缓冲液悬浮, 用组织匀浆器匀浆至无明显组织块存在(冰浴操作)。
2. 将组织细胞的匀浆液转移至 1.5ml 离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5000r/min 离心 5min, 弃上清。
3. 取细胞沉淀添加 1~10ml 冰 PBS 悬浮洗涤, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5000r/min 离心 5min, 如此洗涤 2 次。
4. 用细胞沉淀的 10~40 倍体积的消化缓冲液(约 0.4ml)悬浮细胞, 50~55 $^{\circ}\text{C}$ 振荡温育 12~18h。
5. 用等体积的苯酚/氯仿/异戊醇抽提(轻柔混匀), 室温下, 7500r/min 离心 10min。
6. 用剪掉吸头前端的扩口的吸头, 小心吸出上清液, 移至新的离心管中, 然后加入等体积

氯仿/异戊醇,以 7000r/min 离心 10min,如果界面或水相中含蛋白质沉淀较多,可重复步骤5、6。

7. 将上层(水溶液)转移至一个新管中,加入 1/2 体积 7.5mol/L 乙酸铵和 2 体积 100%乙醇,10000r/min 离心 2min。

8. 沉淀用 70%的乙醇清洗、空气干燥,再用 TE 缓冲液溶解,于 4℃保存备用。

9. 沉淀进一步经琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果如图 1-2 所示。

1.1.3 细菌基因组 DNA 的提取

【实验材料】

细菌培养物。

【实验器材】

恒温培养箱,100 ~ 1000 μ l,20 ~ 200 μ l,0.5 ~ 10 μ l 移液枪,高速冷冻离心机,漩涡混合器,恒温水浴锅,核酸电泳仪,烧杯,三角瓶,容量瓶等。

【实验试剂】

1. LB(Luria Broth)培养基: 1%蛋白胨(typtone),0.5%酵母提取物(yeast extract),1% NaCl,pH7.0,121℃灭菌 20min 备用。若用固体培养基,则在 LB 培养基中添加1.5%~2%琼脂,灭菌备用。

2. 溶液 I (GTE 溶液): 50mmol/L 葡萄糖,25mmol/L Tris · Cl(pH8.0),10mmol/L EDTA(pH8.0)。

3. 100mg/ml 溶菌酶。

4. 10mg/ml 蛋白酶 K: 用灭菌的去离子水配制,在 -20℃条件下保存。

5. 氯仿/异戊醇: 按氯仿:异戊醇=24:1 的比例加入异戊醇。

6. 饱和苯酚: 分析纯的苯酚溶化后经 160℃重蒸,加入 0.1%的抗氧化剂 8-羟基喹啉,再加等体积的 0.1mol/L Tris · Cl(pH8.0)、1mmol/L EDTA。

7. 苯酚/氯仿/异戊醇: 按苯酚:氯仿/异戊醇=1:1 的比例混合饱和苯酚与氯仿,即得苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)。

8. TE 缓冲液: 10mmol/L Tris · Cl(pH8.0),1mmol/L EDTA。

9. 2mg/ml RNase A: 10mmol/L Tris · Cl(pH8.0),15mmol/L NaCl,在 100℃保温 15min,然后室温条件下缓慢冷却。

10. 无水乙醇,预冷的 70%乙醇,80%甘油。

【实验步骤】

1. 挑取单菌落接种至 5ml 的液体 LB 培养基中,适当温度条件下,振荡培养过夜。

2. 取菌液 0.5~1ml,7500r/min 离心 1min,弃上清液。



图 1-2 动物基因组 DNA 电泳图谱
M- DNA 相对分子质量标准;
1,2,3-绵羊耳组织 DNA