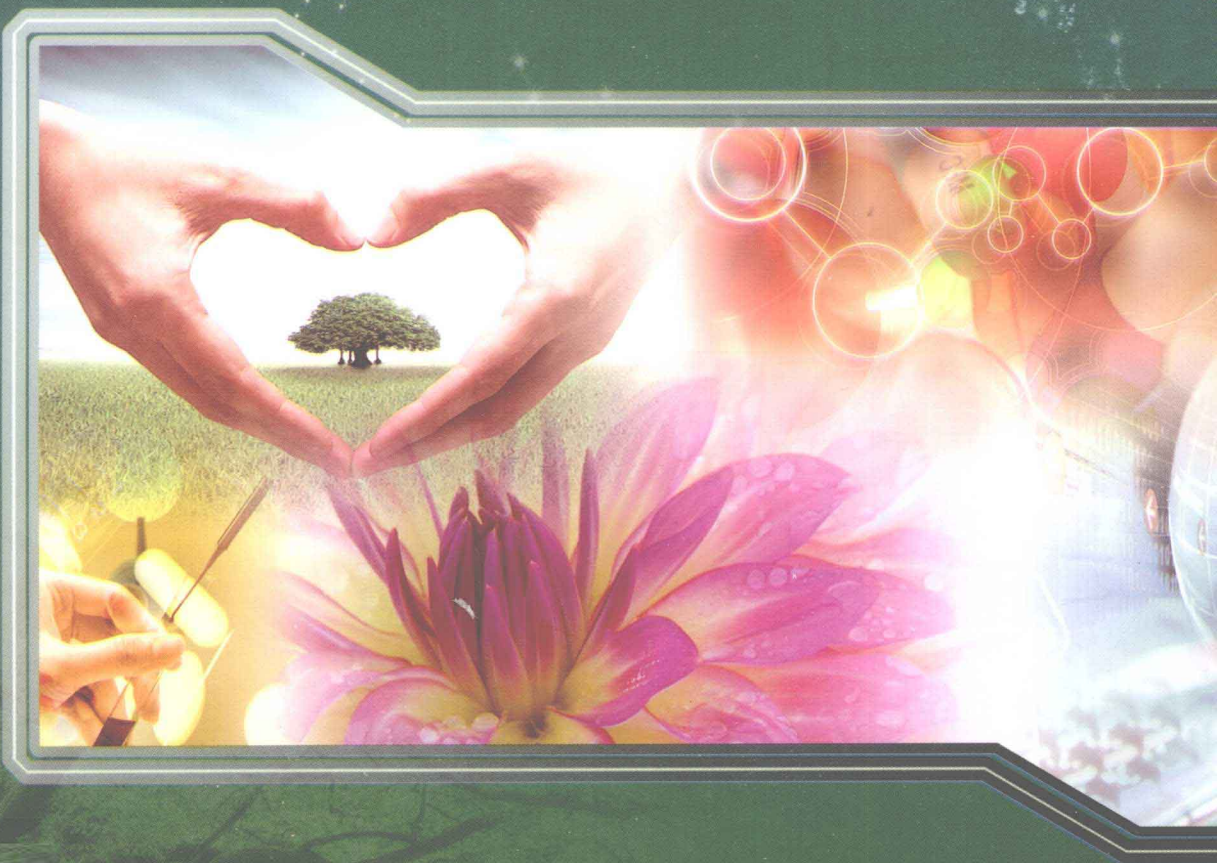


# 现代生物技术实验指南

—— 分子生物学与生物化学

主编 郑育声

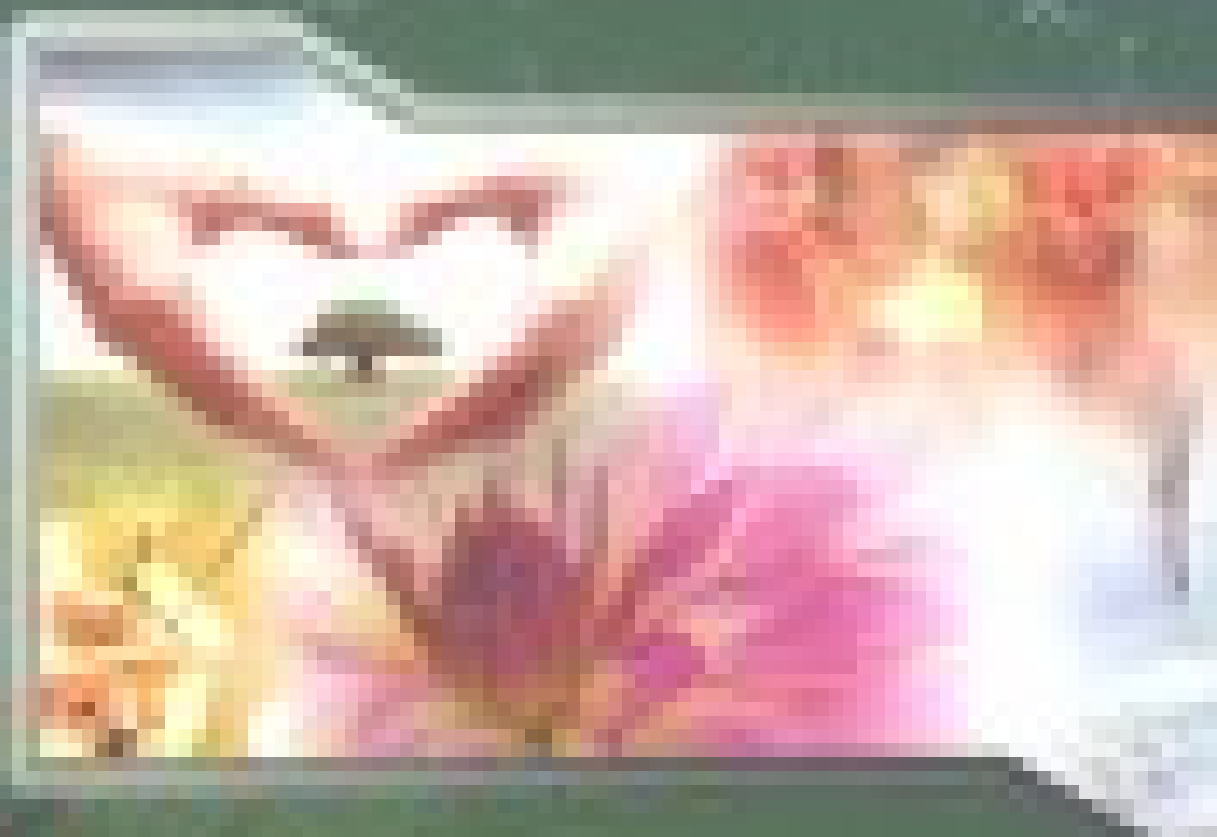


中国科学技术大学出版社

# 现代生物技术实验指南

—— 分子生物学与细胞生物学

主编 王明华



ISBN 7-309-05111-9

# 现代生物技术实验指南

—— 分子生物学与生物化学

XIANDAI SHENGWU JISHU SHIYAN ZHINAN

FENZI SHENGWUXUE YU SHENGWU HUAXUE

主编 郑育声

中国科学技术大学出版社

## 内 容 简 介

本书全面介绍了现代常用的分子生物学和生物化学技术的基本原理与操作规程。全书分为两大部分:第一部分是分子生物学实验,共 14 个实验,包括 DNA 重组、DNA 序列测定、cDNA 文库的构建、外源基因在毕赤酵母中的表达和检测等;第二部分是生物化学实验,共 20 个实验,包括糖的定量测定、氨基酸的分离鉴定、蛋白质浓度测定、免疫扩散和免疫电泳、卡那霉素的效价测定和正交法测定几种因素对酵母发酵作用的影响等。

本书在每一个实验开始之前,首先对相关实验原理与技术进行概括性的介绍。每个实验在详细介绍相关实验基本原理与技术的基础上,对基础性实验内容和原理进行一定程度的讨论,以训练和提升学生的分子生物学实验技能。

本书内容翔实,实用性强,部分实验后面附有实验结果,可供读者参照。本书可作为高等学校生物学科各专业本科生和研究生的分子生物学实验指导教材,同时对相关领域的教学、科研人员来说也是一本有益的参考书。

---

### 图书在版编目(CIP)数据

现代生物技术实验指南:分子生物学与生物化学/郑育声主编. —合肥:中国科学技术大学出版社, 2011. 7

ISBN 978-7-312-02849-6

I. 现… II. 郑… III. ①分子生物学—实验—指南 ②生物化学—实验—指南  
IV. ①Q7-33 ②Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 108043 号

---

出版 中国科学技术大学出版社  
安徽省合肥市金寨路 96 号,邮编:230026  
网址:<http://press.ustc.edu.cn>  
印刷 安徽省瑞隆印务有限公司  
发行 中国科学技术大学出版社  
经销 全国新华书店  
开本 787 mm×1092 mm 1/16  
印张 9.25  
字数 243 千  
版次 2011 年 7 月第 1 版  
印次 2011 年 7 月第 1 次印刷  
定价 20.00 元

# 前 言

生物技术(Biotechnology),有时也称生物工程,是指人们以现代生命科学为基础,结合其他基础科学的科学原理,采用先进的科学技术手段,按照预先的设计改造生物体或加工生物原料,为人类生产出所需产品或达到某种目的的一门学科。生物技术是人们利用微生物、动植物体对物质原料进行加工,以提供产品来为社会服务的技术。它主要包括发酵技术和现代生物技术,是一门新兴的、综合性的学科。

21世纪分子生物学技术的发展对于每个从事研究或者正在学习的生物专业人来说都是机遇也是挑战。随着分子生物学技术的发展,传统的生物技术和相关专业也发生了翻天覆地的变化。想要跟上学科发展的潮流,了解并掌握最新的分子生物学实验手段及其原理是每个学生必须通过的训练过程。

一本合适的实验课教材或实验指导书是开好专业实验课的基本条件之一。虽然目前国内有关分子生物学的实验教材版本众多,但我们在为学生选择实验教材的过程中却发现,目前的教材有的内容过多过细,不适合学生使用;有的具有明显的专业倾向,如更适合于医学、微生物和农学专业,而针对生物工程或生物技术专业本科生的简明扼要的生物技术综合实验教材并不多见。为了加强海南大学生物工程学科的教材建设,编者参考了国内外最新的有关分子生物学实验技术的专著和文献以及部分网络上刊载的实验心得,并增加了部分作者在研究工作中得到的体会,同时立足于海南大学本科学生的特点及现有的实验室基础和条件,选择了部分实验内容,汇编成了生物技术实验指导书,以供学生在开课时参考。

“现代生物技术实验”是为生物工程和生物技术专业本科学生开设的综合实验课程。本实验课程所涉及的内容偏重于分子生物学实验,目的是通过系统性、综合性和科学性的实验课程学习,使学生掌握常见现代生物技术的基本原理和基本实验技能,培养基本的动手能力、创新能力和综合分析能力。该课程的教学要求学生具备一定生物化学实验、生化技术实验的基础理论知识和动手能力。

由于分子生物学技术和生物技术的快速发展,许多工作还处于不断探索的过程中,加之编者所涉及领域有限,在本书的编撰过程中难免有不妥和疏漏之处,恳请读者提出宝贵意见,以利于不断修改和完善。

在本书的编撰和出版工作中得到了海南大学李东栋教授、曹献英研究员和中国科学技术大学出版社的大力支持和无私帮助,在此作者表示由衷的感谢。

作 者  
2011年3月

# 目 录

前言 .....	( i )
----------	-------

## 分子生物学实验

实验 1 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化 .....	( 3 )
实验 2 质粒 DNA 的提取和检测 .....	( 7 )
实验 3 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA .....	( 11 )
实验 4 DNA 重组 .....	( 14 )
实验 5 哺乳动物基因组 DNA 的提取 .....	( 18 )
实验 6 植物基因组 DNA 的提取 .....	( 21 )
实验 7 植物总 RNA 的提取 .....	( 25 )
实验 8 DNA 序列测定 .....	( 29 )
实验 9 PCR 基因扩增 .....	( 37 )
实验 10 聚丙烯酰胺电泳检测蛋白质 .....	( 42 )
实验 11 蛋白质印迹 .....	( 48 )
实验 12 cDNA 文库的构建 .....	( 53 )
实验 13 外源基因在大肠杆菌中的表达和检测 .....	( 59 )
实验 14 外源基因在毕赤酵母中的表达和检测 .....	( 63 )

## 生物化学实验

生物化学实验要求 .....	( 73 )
实验 15 大肠杆菌细胞的超声波破碎 .....	( 80 )
实验 16 糖的呈色反应和还原糖的检验 .....	( 81 )
实验 17 糖的定量测定 .....	( 85 )
实验 18 脂肪碘值的测定 .....	( 87 )
实验 19 氨基酸的分离鉴定——纸层析法 .....	( 90 )
实验 20 茚三酮显色法测定氨基酸含量 .....	( 93 )
实验 21 蛋白质的制备——牛奶中提取酪蛋白 .....	( 95 )
实验 22 蛋白质溶液的凝胶层析脱盐 .....	( 97 )
实验 23 蛋白质浓度测定(1)——微量凯式定氮法测定总氮量 .....	( 98 )
实验 24 蛋白质浓度测定(2)——双缩脲法 .....	( 103 )
实验 25 蛋白质浓度测定(3)——Folin-酚测定法 .....	( 106 )

实验 26	定磷法显色测定 RNA 含量 .....	(108)
实验 27	二苯胺显色法测定 DNA 含量 .....	(110)
实验 28	免疫扩散和免疫电泳 .....	(111)
	双向免疫扩散法 .....	(112)
	单向定量免疫电泳(火箭电泳) .....	(116)
实验 29	双向免疫扩散法测定抗血清效价 .....	(119)
实验 30	维生素 B <sub>2</sub> (核黄素)的荧光测定法 .....	(121)
实验 31	维生素 C 的定量测定(2,6-二氯酚靛酚滴定法) .....	(123)
实验 32	卡那霉素的效价测定 .....	(126)
实验 33	二环素的杀菌能力测定 .....	(128)
实验 34	用正交法测定几种因素对酵母发酵作用的影响 .....	(130)
附录	.....	(134)
	缓冲液的配制 .....	(134)
	凝胶电泳部分试剂的配制 .....	(139)
	核酸杂交用试剂的配制 .....	(139)
参考文献	.....	(141)

# 分子生物学实验

- ☞ 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化
- ☞ 质粒 DNA 的提取和检测
- ☞ 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA
- ☞ DNA 重组
- ☞ 哺乳动物基因组 DNA 的提取
- ☞ 植物基因组 DNA 的提取
- ☞ 植物总 RNA 的提取
- ☞ DNA 序列测定
- ☞ PCR 基因扩增
- ☞ 聚丙烯酰胺电泳检测蛋白质
- ☞ 蛋白质印迹
- ☞ cDNA 文库的构建
- ☞ 外源基因在大肠杆菌中的表达和检测
- ☞ 外源基因在毕赤酵母中的表达和检测





# 实验 1 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化

## 【实验目的】

通过本实验,掌握大肠杆菌感受态细胞的制备及转化的方法和技术。

## 【实验原理】

### 1. 感受态细胞的概念

重组 DNA 分子体外构建完成后,必须导入特定的宿主(受体)细胞,使之无性繁殖并高效表达外源基因或直接改变其遗传性状,这个导入过程及操作统称为重组 DNA 分子的转化。在原核生物中,转化是一个较普遍的现象,在细胞间转化是否发生,一方面取决于供体菌与受体菌两者在进化过程中的亲缘关系,另一方面还与受体菌是否处于一种感受状态有着很大的关系。所谓的感受态,即指受体(或者宿主)最易接受外源 DNA 片段并实现其转化的一种生理状态,它是由受体菌的遗传性状所决定的,同时也受菌龄、外界环境因子的影响。cAMP 可以使感受态水平提高一万倍,而  $\text{Ca}^{2+}$  也可大大促进转化的作用。细胞的感受态一般出现在对数生长期,新鲜幼嫩的细胞是制备感受态细胞和进行成功转化的关键。如果制备出的感受态细胞暂时不用,可加入占总体积 15% 的无菌甘油或  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存(有效期 6 个月)。

### 2. 转化的概念及原理

在基因克隆技术中,转化特指将质粒 DNA 或以其为载体构建的重组 DNA 导入细菌体内,使之获得新的遗传特性的一种方法。它是微生物遗传、分子遗传、基因工程等研究领域的基本实验技术之一。受体细胞经过一些特殊方法(如:电击法, $\text{CaCl}_2$  等化学试剂法)处理后,使细胞膜的通透性发生变化,成为能容许外源 DNA 分子通过的感受态细胞。进入细胞的 DNA 分子通过复制、表达实现遗传信息的转移,使受体细胞出现新的遗传性状。大肠杆菌的转化常用化学法( $\text{CaCl}_2$  法),该法最先是由 Cohen 于 1972 年发现的。其原理是细菌处于  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{CaCl}_2$  的低渗溶液中,菌细胞膨胀成球形,转化混合物中的 DNA 形成抗 DNase 的羟基-钙磷酸复合物黏附于细胞表面,经  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  短时间热冲击处理,促使细胞吸收 DNA 复合物,在丰富培养基上生长数小时后,球状细胞复原并分裂增殖,被转化的细菌中,重组子中基因得到表达,在选择性培养基平板上,可选出所需的转化子。 $\text{Ca}^{2+}$  处理感受态细胞,其转化率一般能达到  $(5 \times 10^6) \sim (2 \times 10^7)$  转化子/ $\mu\text{g}$  质粒 DNA,可以满足一般的基因克隆试验。如在  $\text{Ca}^{2+}$  的基础上,联合其他的二价金属离子(如  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ )、DMSO 或还原剂等物质处理细菌,则可使转化率提高 100~1 000 倍。化学法简单、快速、稳定、重复性好,菌株适用范围广,感受态细菌可以在  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存,因此被广泛用于外源基因的转化。除化学法转化细菌外,还有电击转化法,电击法不需要预先诱导细菌的感受态,依靠短暂的电击促使 DNA 进入细菌,转化率最高能达到  $10^9 \sim 10^{10}$  转化子/ $\mu\text{g}$  闭环 DNA。因操作简便,愈来愈为人们所接受。

### 3. 感受态细胞制备及转化中的影响因素

#### (1) 细胞的生长状态和密度

最好从 $-70\sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 甘油保存的菌种中直接转接用于制备感受态细胞的菌液,不要用已经多次转接及贮存在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的培养菌液。细胞生长密度以每毫升培养液中的细胞数在 $5\times 10^7$ 个左右为佳。即应用对数期或对数生长前期的细菌,可通过测定培养液的 $\text{OD}_{600}$ 控制。对TG1菌株, $\text{OD}_{600}$ 为0.5时,细胞密度在 $5\times 10^7$ 个/ml左右(应注意 $\text{OD}_{600}$ 值与细胞数之间的关系随菌株的不同而不同)。密度过高或不足均会使转化率下降。此外,受体细胞一般应是限制-修饰系统缺陷的突变株,即不含限制性内切酶和甲基化酶的突变株。并且受体细胞还应与所转化的载体性质相匹配。

#### (2) 质粒DNA的质量和浓度

用于转化的质粒DNA应主要是超螺旋态的,转化率与外源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,则会使转化率下降。一般地,DNA溶液的体积不应超过感受态细胞体积的5%,1 ng的cccDNA即可使 $50\ \mu\text{l}$ 的感受态细胞达到饱和。对于以质粒为载体的重组分子而言,分子量大的转化效率低。实验证明,大于30 kb的重组质粒将很难进行转化。此外,重组DNA分子的构型与转化效率也密切相关,环状重组质粒的转化率较分子量相同的线性重组质粒高10~100倍,因此重组DNA大都构成环状双螺旋分子。

#### (3) 试剂的质量

所用的 $\text{CaCl}_2$ 等试剂均需是最高纯度的,并用最纯净的水配制,最好分装保存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

#### (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、移液枪头等最好是新的,并经高压灭菌处理。所有的试剂都要灭菌,且注意防止被其他试剂、DNA酶或杂DNA所污染,否则均会影响转化效率或杂DNA的转入。

#### (5) 注意事项

整个操作均需在冰上进行,不能离开冰浴,否则细胞转化率将会降低。

## 【仪器、材料与试剂】

### 1. 仪器

- ① 超净工作台;
- ② 低温离心机;
- ③ 恒温摇床;
- ④ 培养箱;
- ⑤  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱;
- ⑥ 恒温水浴器。

### 2. 材料

- ① 氯化钙( $\text{CaCl}_2$ );
- ② 胰蛋白胨;
- ③ 酵母提取物;
- ④ 氯化钠( $\text{NaCl}$ );
- ⑤ 氨苄青霉素;

- ⑥ 大肠杆菌 DH5a;
- ⑦ pUC19 质粒;
- ⑧ 50 ml 离心管;
- ⑨ 吸尖、小指管;
- ⑩ 吸管、培养基、锥形瓶等;
- ⑪ 琼脂。

### 3. 试剂

① 0.1 mol/l  $\text{CaCl}_2$  溶液;

② LB 液体培养基

配制 1 l LB 液体培养基,应在 950 ml 去离子水中加入:

胰蛋白胨(bacto-typtone) 10 g

酵母提取物(bacto-yeast extract) 5 g

NaCl 10 g

摇动容器至溶解,用 NaOH 调节 pH 至 7.0;121 °C 湿热灭菌 20 min;

③ 氨苄青霉素(Amp),用无菌水配制成 100 mg/ml 溶液,置于 -20 °C 冰箱保存;

④ LB 固体培养基:每升 LB 培养基中加 15 g 琼脂。

## 【实验步骤】

① 从大肠杆菌 DH5a 平板上挑取一个单菌落接于 2 ml LB 液体培养基的试管中,37 °C 剧烈振荡培养过夜。

② 取 0.5 ml 菌液转接到一个含有 50 ml LB 液体培养基的锥形瓶中,37 °C 振荡培养 2~3 h。此时, $\text{OD}_{600} \leq (0.4 \sim 0.5)$ ,细胞数  $< 10^8$  /ml。

③ 将菌液转移到 50 ml 离心管中,冰上放置 10 min。

④ 4 000 rpm 离心 10 min,回收细胞。

⑤ 倒出培养液,将管倒置 1 min 以便培养液流尽。

⑥ 用冰冷的 0.1 mol/l  $\text{CaCl}_2$  10 ml 悬浮沉淀,立即放在冰上 30 min。

⑦ 0~4 °C 离心 10 min(4 000 rpm),回收细胞。

⑧ 用冰冷的 0.1 mol/l  $\text{CaCl}_2$  10 ml 悬浮细胞(务必放冰上)。

⑨ 每 200  $\mu\text{l}$  /份分装细胞,此细胞即为感受态细胞。

⑩ 取 200  $\mu\text{l}$  新鲜配制的感受态细胞,加入 DNA 2  $\mu\text{l}$  (约等于 50 ng),混匀,冰上放置 30 s。

⑪ 同时做两个对照管:受体菌对照:200  $\mu\text{l}$  感受态细胞 + 2  $\mu\text{l}$  无菌水;质粒对照:200  $\mu\text{l}$  0.01 mol/l  $\text{CaCl}_2$  溶液 + 2  $\mu\text{l}$  质粒 DNA 溶液。

⑫ 将管循环水浴 90 s。

⑬ 冰浴 2 min。

⑭ 每管加 800  $\mu\text{l}$  LB 液体培养基,37 °C 培养 45 min(慢摇 120 rpm)。

⑮ 将适当体积(100  $\mu\text{l}$ )已转化的感受态细胞,涂抹到含有氨苄青霉素(100  $\mu\text{l}$ /ml)的培养皿中。

⑯ 倒置培养皿,37 °C 培养 12~16 h,出现菌落并进行统计。

## 【实验结果】

实验结果如图 1.1 所示。

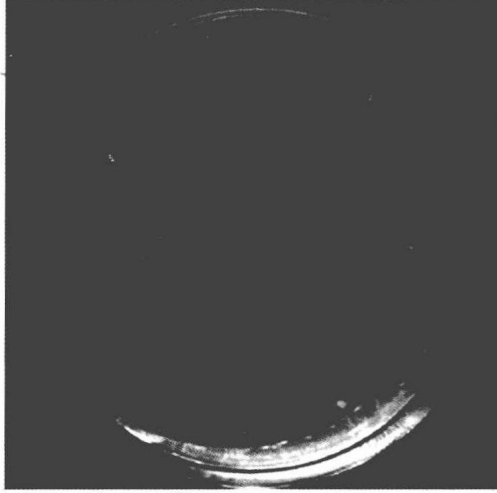


图 1.1

## 实验 2 质粒 DNA 的提取和检测

### 【实验目的】

通过本实验学习和掌握碱裂解法提取质粒。

### 【实验原理】

碱裂解法提取质粒是根据共价闭合环状质粒 DNA 与线性染色体 DNA 在拓扑学上的差异来分离它们。在 pH 12.0~12.5 这个狭窄的范围内,线性的 DNA 双螺旋结构解开而被变性,尽管在这样的条件下,共价闭环质粒 DNA 的氢键会断裂,但两条互补链彼此相互盘绕,仍会紧密地结合在一起。当加入 pH 为 4.8 的乙酸钾高盐缓冲液恢复 pH 至中性时,共价闭合环状的质粒 DNA 的两条互补链仍保持在一起,因此复性迅速而准确,而线性的染色体 DNA 的两条互补链彼此已完全分开,复性就不会那么迅速而准确,它们缠绕形成网状结构。通过离心,染色体 DNA 与不稳定的大分子 RNA、蛋白质-SDS 复合物等一起沉淀下来而被除去。但对相关原理仍有不同类型的解释,下面是来自网络上对原理的另类描述为,仅供参考:

碱法质粒抽提用到三种溶液:溶液 I,50 mmol/l 葡萄糖,25 mmol/l Tris-HCl,10 mmol/l EDTA,pH 8.0。溶液 II,0.4 M NaOH,2% SDS。溶液 III,3 mol/l 醋酸钾,2 mol/l 醋酸。

溶液 I 的作用:任何生物化学反应,首先要控制好溶液的 pH,因此用适当浓度和 pH 的 Tris-HCl 溶液,是再自然不过的了。那么 50 mmol/l 葡萄糖是干什么的呢?事实上加了葡萄糖后最大的好处只是悬浮后的大肠杆菌不会快速沉积到管子的底部。因此,如果溶液 I 中缺了葡萄糖其实对质粒的抽提本身而言,几乎没有影响。所以说溶液 I 中葡萄糖是可缺的。那么 EDTA 呢?大家知道 EDTA 是  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  等二价金属离子的螯合剂,配在分子生物学试剂中的主要作用是:抑制 DNase 的活性和抑制微生物生长。在溶液 I 中加入高达 10 mmol/l 的 EDTA,无非就是要把大肠杆菌细胞中的所有二价金属离子都螯合掉。如果不加 EDTA,其实也没什么大不了的,只要是在不太长的时间里完成质粒抽提,就不用怕 DNA 会被迅速降解,因为最终溶解质粒的 TE 缓冲液中有 EDTA。如果哪天你手上正好缺了溶液 I,可不可以抽提质粒呢?可以说只要用等体积的水,或 LB 培养基来悬浮菌体就可以了。有一点不能忘的是,菌体一定要悬浮均匀,不能有结块。

关于溶液 II,是用新鲜的 0.4 M 的 NaOH 和 2% 的 SDS 等体积混合后使用的。要新从浓 NaOH 稀释制备 0.4 M 的 NaOH,无非是为了保证 NaOH 没有因吸收空气中的  $\text{CO}_2$  而减弱了碱性。很多人不知道其实破细胞依靠的主要是碱,而不是 SDS,所以才叫碱法抽提。事实上 NaOH 是最佳的溶解细胞的试剂,不管是大肠杆菌还是哺乳动物细胞,碰到了碱,几乎都会在瞬间就溶解,这是由于细胞膜发生了从双层膜结构向微囊结构的相变化所导致的。用了不新鲜的 0.4 M NaOH,即便是有 SDS 也无法有效溶解大肠杆菌(可以自己试一下),自然就难高效率抽提得到质粒。如果只用 SDS 当然也能抽提得到少量质粒,因为 SDS 也是碱性的,只是弱了点

而已。很多人对 NaOH 的作用误以为是为了让基因组 DNA 变性,以便沉淀,这是由于没有正确理解一些书上的有关 DNA 变性复性的描述所导致的。有人不禁要问,既然是 NaOH 溶解的细胞,那为什么要加 SDS 呢?那是为下一步操作做的铺垫。这一步要记住两点:第一,时间不能过长,因为在这样的碱性条件下基因组 DNA 片断会慢慢断裂;第二,必须温柔混合,不然基因组 DNA 也会断裂。基因组 DNA 的断裂会带来麻烦。

溶液Ⅲ加入后就会有大量的沉淀,但大部分人却不明白这沉淀的本质。最容易产生的误解是,这是当 SDS 碰到酸后发生的沉淀。如果你这样怀疑,往 1% 的 SDS 溶液中加入 2 mol/l 的醋酸溶液看看就知道不是这么回事了。大量沉淀的出现,显然与 SDS 的加入有关系。如果在溶液Ⅱ中不加 SDS 会怎样呢,也会有少量的沉淀,但量要少得多,显然是盐析和酸变性沉淀出来的蛋白质。既然 SDS 不是遇酸发生的沉淀,那会不会是遇盐发生的沉淀呢?在 1% 的 SDS 溶液中慢慢加入 5 N 的 NaCl,你会发现 SDS 在高盐浓度下是会产生沉淀。因此高浓度的盐导致了 SDS 的沉淀。但如果你加入的不是 NaCl 而是 KCl,你会发现沉淀的量要多得多。这其实是十二烷基硫酸钠遇到钾离子后变成了十二烷基硫酸钾(PDS),而 PDS 是水不溶的,因此发生了沉淀。如此看来,溶液Ⅲ加入后的沉淀实际上是钾离子置换了 SDS 中的钠离子形成了不溶性的 PDS,而高浓度的盐使沉淀更完全。

大家知道 SDS 专门喜欢和蛋白质结合,平均两个氨基酸上结合一个 SDS 分子,钾钠离子置换所产生的大量沉淀自然就将绝大部分蛋白质沉淀了,让人高兴的是大肠杆菌的基因组 DNA 也一起被共沉淀了。这个过程不难想像,因为基因组 DNA 太长了,长长的 DNA 自然容易被 PDS 给共沉淀了,尽管 SDS 并不与 DNA 分子结合。那么 2 mol/l 的醋酸又是为什么而加的呢?是为了中和 NaOH,因为长时间的碱性条件会打断 DNA,所以要中和之。基因组 DNA 一旦发生断裂,只要是 50~100 kb 大小的片断,就没有办法再被 PDS 共沉淀了。所以碱处理的时间要短,而且不得激烈振荡,不然最后得到的质粒上总会有大量的基因组 DNA 混入,琼脂糖电泳可以观察到一条浓浓的总 DNA 条带。

很多人误认为是溶液Ⅲ加入后基因组 DNA 无法快速复性就被沉淀了,这是天大的误会,因为变性的也好,复性的也好,DNA 分子在中性溶液中都是溶解的。NaOH 本来是为了溶解细胞而用的,DNA 分子的变性其实是个副产物,与它是不是沉淀下来其实没有关系。溶液Ⅲ加入并混合均匀后在冰上放置,目的是为了 PDS 沉淀更充分一点。不要以为 PDS 沉淀的形成就能将所有的蛋白质沉淀了,其实还有很多蛋白质不能被沉淀,因此要用酚/氯仿/异戊醇进行抽提,然后进行酒精沉淀才能得到质量稳定的质粒 DNA,不然时间一长就会因为混入的 DNase 而发生降解。这里用 25/24/1 的酚/氯仿/异戊醇是有很多道理的,这里做个全面的介绍。酚(Phenol)对蛋白质的变性作用远大于氯仿,按道理应该用酚来最大限度地蛋白质抽提掉,但是水饱和酚的比重略比水重,碰到高浓度的盐溶液(比如 4 mol/l 的异硫氰酸胍),离心后酚相会跑到上层,不利于含质粒的水相的回收;但加入氯仿后可以增加比重,使得酚/氯仿始终在下层,方便水相的回收。还有一点,酚与水有很大的互溶性,如果单独用酚抽提后会有大量的酚溶解到水相中,而酚会抑制很多酶反应(比如限制性酶切反应),因此如果单独用酚抽提后一定要用氯仿抽提一次将水相中的酚去除,而用酚/氯仿的混合液进行抽提,跑到水相中的酚则少得多,微量的酚在乙醇沉淀时就会被除干净而不必担心酶切等反应不能正常进行。至于异戊醇的添加,其作用主要是为了让离心后上下层的界面更加清晰,也方便了水相的回收。回收后的水相含有足够多的盐,因此只要加入 2 倍体积的乙醇,在室温放置几分钟后离心就可以将质粒 DNA 沉淀出来。这时候如果放到 -20 °C,时间一长反而会导致大量盐的沉淀,这点不同于普通的

DNA 酒精沉淀回收,所以不必过分小心了。高浓度的盐会水合大量的水分子,因此 DNA 分子之间就容易形成氢键而发生沉淀。如果发生了盐的沉淀,就用 70% 的乙醇多洗几次,每次在室温放置 1 h 以上,并用 tip 将沉淀打碎,就能得到好的样品。

得到的质粒样品一般用含 RNase(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 的 TE 缓冲液进行溶解,不然大量未降解的 RNA 会干扰电泳结果。琼脂糖电泳进行鉴定质粒 DNA 时,多数情况下你能看到三条带,但千万不要认为你看到的是超螺旋、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,可以用 EcoR I 线性化质粒后再进行琼脂糖电泳来验证,就会看到线性质粒 DNA 的位置与这三条带的位置不一样。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 20~100 kb 的大肠杆菌基因组 DNA 的片断。非常偶然的是,有时候抽提到的质粒会有 7~10 条带,这是由于特殊的 DNA 序列导致了不同程度的超螺旋(超螺旋的圈数不同)所致。

## 【仪器、材料与试剂】

### 1. 仪器

- ① 恒温培养箱;
- ② 恒温摇床;
- ③ 台式离心机;
- ④ 高压灭菌锅。

### 2. 材料

- ① 葡萄糖;
- ② 三羟甲基氨基甲烷(Tris);
- ③ 乙二胺四乙酸(EDTA);
- ④ 氢氧化钠;
- ⑤ 十二烷基硫酸钠(SDS);
- ⑥ 乙酸钾;
- ⑦ 冰乙酸;
- ⑧ 氯仿;
- ⑨ 乙醇;
- ⑩ 胰 RNA 酶;
- ⑪ 氨苄青霉素;
- ⑫ 蔗糖;
- ⑬ 溴酚蓝;
- ⑭ 苯酚;
- ⑮ 8-羟基喹啉;
- ⑯ 巯基己醇;
- ⑰ 盐酸(HCl);
- ⑱ 含 pUC19 质粒的大肠杆菌;
- ⑲ EcoR I ;



⑩ 吸头。

### 3. 试剂

#### ① 溶液 I:

50 mmol/l 葡萄糖

25 mmol/l Tris-HCl(pH 8.0)

10 mmol/l 乙二胺四乙酸(EDTA) (pH 8.0)

#### ② 溶液 II:

使用前新鲜配制的 0.4 mol/l NaOH, 2% SDS

#### ③ 溶液 III:

5 mol/l 乙酸钾 60 ml

冰乙酸 115 ml

水 285 ml

#### ④ TE 缓冲液:

10 mmol/l Tris-HCl(pH 8.0)

1 mmol/l EDTA(pH 8.0)

⑤ 70%乙醇(放置于 20 °C 冰箱中,用后即放回);

⑥ RNA 酶;

⑦ 上样缓冲液。

## 【实验步骤】

① 从平板上挑取含 pUC19 质粒的大肠杆菌单菌落接入 50 ml 含相应抗生素(Amp: 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )的 LB 液体培养基中,37 °C 剧烈振荡培养过夜。

② 取 1.5 ml 培养物至微量离心管中,12 000 rpm 离心 30 s。

③ 倒去培养液,将细菌沉淀悬浮于 100  $\mu\text{l}$  溶液 I 中,在振荡器上剧烈震荡使沉淀重新悬浮。

④ 加 200  $\mu\text{l}$  溶液 II,上下颠倒 5~7 次以混匀内容物,将离心管放冰上。

⑤ 加入 150  $\mu\text{l}$  溶液 III(4 °C 预冷),颠倒数次使混匀,冰上放置 5 min。

⑥ 12 000 rpm 离心 5 min,将上清转至另一离心管中。

⑦ 向上清加入 2 倍体积无水乙醇,混匀后,室温放置 5~10 min,12 000 rpm 离心 5 min。

⑧ 去上清,加入 1 ml 70%乙醇,颠倒数次后再次离心(12 000 rpm, 5 min)。

⑨ 去清液,将离心管放在 50 °C 左右的恒温箱中干燥 3~5 min。

⑩ 加 20  $\mu\text{l}$  TE 缓冲液,其中含有 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 RNA 酶,使 DNA 完全溶解。

⑪ 取 3~5  $\mu\text{l}$  在 0.8%的琼脂糖凝胶上电泳 40 min,并进行观察。