



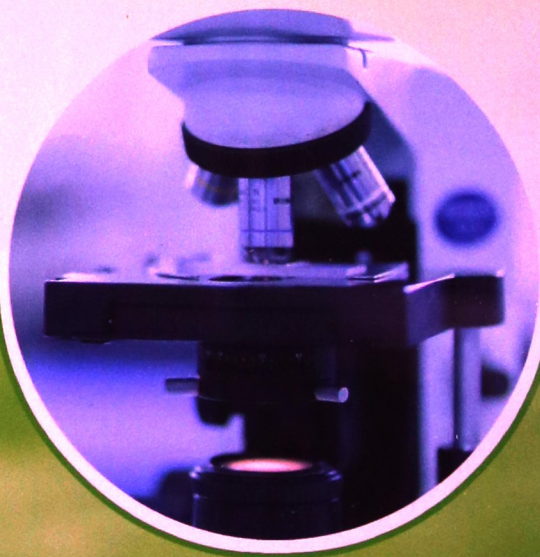
普通高等教育“十二五”规划教材  
能力培养型生物学基础课系列实验教材

# 分子生物学及基因工程 实验教程

（第三版）

**M**OLECULAR BIOLOGY  
& GENE ENGINEERING EXPERIMENT

刘箭 主编



科学出版社

能力培养型生物学基础课系列实验教材

# 分子生物学及基因 工程实验教程

(第三版)

刘 箭 主编

科学出版社

北 京

## 内 容 简 介

本书介绍了常用的分子生物学和基因工程实验技术。全书分为三部分,第一部分为基础性实验,介绍了一些简明且独立、可操作性强、实验结果明显、成功率高的实验方案,每个实验可在半日内完成,因此特别适用于相关专业的本科实验教学;第二部分为综合性实验,实验略微复杂,适用于有一定基础的高年级本科生实验教学;最后一部分为研究性实验,为培养学生独立科研的能力提供了更加贴近科研工作的实验方案。

本书不仅可以作为高等师范院校生命科学专业学生的实验教程,也可供非师范院校相关专业学生和生命科学工作者参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

---

分子生物学及基因工程实验教程 / 刘箭主编. —3  
版. —北京: 科学出版社, 2015. 1  
能力培养型生物学基础课系列实验教材  
ISBN 978 - 7 - 03 - 042861 - 5

I. ①分… II. ①刘… III. ①分子生物学—实验—高  
等学校—教材②基因工程—实验—高等学校—教材 IV.  
①Q7 - 33②Q78 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 304334 号

---

责任编辑: 陈 露  
责任印制: 谭宏宇 / 封面设计: 殷 靓

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

南京展望文化发展有限公司排版

江苏省句容市排印厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2008 年 4 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2015 年 1 月第 三 版 印张: 5

2015 年 1 月第六次印刷 字数: 107 000

定价: 20.00 元

# 能力培养型生物学基础课系列实验教材 第三版编委会

主任委员：安利国

副主任委员：郭善利 徐来祥 孙虎山 黄 勇

委 员：(按姓氏笔画为序)

王洪凯 朱道玉 刘林德 刘顺湖

刘淑娟 安利国 孙虎山 李师鹏

李荣贵 林光哲 姚志刚 徐来祥

郭善利 黄 勇 曹 慧 焦德杰

## 《分子生物学及基因工程实验教程》 第三版编写人员

主 编：刘 箭

副主编：吴春霞 曹雪松 王元秀 宿红艳

编 者：(按姓氏笔画为序)

马秀灵 王元秀 王宝琴 王建刚

王洪燕 叶春江 全先庆 刘立科

刘春香 刘 箭 杨东英 肖 波

吴春霞 孟小倩 秦宏伟 郭尚敬

曹雪松 宿红艳

## 第三版前言

《分子生物学及基因工程实验教程》第一、二版出版后,承蒙读者厚爱,被不少高等院校选为实验教材。根据读者反馈意见和学科发展趋势,编者对本书进行了全面的补充和修订。新版实验教程延续了前两版的简明风格,同时更加注重内容上的严谨性和科学性。第三版教程中,新添加科研工作中普遍使用的试剂盒方法。

新版实验教程虽经全体编者悉心勘校,疏漏和不妥之处仍在所难免,恳请读者继续给予关注和支持,并提出宝贵意见。

编者

2015年1月

# 目 录

第三版前言

## 第一部分 基础性实验

实验 1	质粒的分离——碱裂解法 .....	( 2 )
实验 2	Silica 硅石粉法纯化质粒 .....	( 4 )
实验 3	吸附膜方法提取质粒 DNA .....	( 6 )
实验 4	核酸琼脂糖凝胶电泳及“玻璃奶”法纯化回收 DNA 片段 .....	( 7 )
实验 5	吸附膜方法回收琼脂糖凝胶中 DNA 片段 .....	( 9 )
实验 6	DNA 片段的连接(向质粒载体中插入外源 DNA) .....	( 11 )
实验 7	大肠杆菌感受态细胞的制备、转化及转化子的鉴定 (蓝白斑筛选法) .....	( 12 )
实验 8	聚合酶链式反应(PCR)技术 .....	( 15 )
实验 9	PCR 产物连入 T 载体 .....	( 16 )
实验 10	菌落 PCR 方法快速筛选细菌重组子 .....	( 18 )
实验 11	重组子的插入方向鉴定(酶切法) .....	( 20 )
实验 12	噬菌体铺板 .....	( 21 )
实验 13	M13 噬菌体 DNA 的提取 .....	( 24 )
实验 14	SDS 法小量提取植物基因组 DNA .....	( 26 )
实验 15	CTAB 法小量提取植物基因组 DNA .....	( 27 )
实验 16	动物组织细胞基因组 DNA 提取 .....	( 29 )
实验 17	血液基因组 DNA 的纯化分离 .....	( 30 )
实验 18	Trizol 试剂快速提取(动)植物总 RNA .....	( 32 )
实验 19	离心柱型方法纯化植物组织总 RNA .....	( 33 )
实验 20	植物启动子表达分析—— $\beta$ -葡萄糖醛酸糖苷酶(GUS) 组织化学染色 .....	( 35 )



## 第二部分 综合性实验

实验 21	反转录 PCR .....	( 38 )
实验 22	谷胱甘肽 S-转移酶融合蛋白质的表达及纯化 .....	( 40 )
实验 23	(His) <sub>6</sub> 标记蛋白质的原核表达和纯化 .....	( 44 )
实验 24	Western-blotting 分析 .....	( 46 )
实验 25	化学发光 Western-blotting 分析 .....	( 50 )

## 第三部分 研究性实验

实验 26	地高辛标记探针的 Southern 杂交 .....	( 54 )
实验 27	菌落原位杂交 .....	( 58 )
实验 28	转基因植物的 PCR 检测 .....	( 59 )
实验 29	花序浸泡法转化拟南芥及转化子的筛选 .....	( 62 )
实验 30	叶盘法转化烟草 .....	( 64 )
实验 31	PCR 引物的电子设计 .....	( 66 )
主要参考文献	.....	( 72 )

# 第一部分

## 基础性实验



# 实验 1 质粒的分离——碱裂解法

## 【实验目的】

1. 学习碱法分离质粒的基本原理。
2. 掌握碱法分离质粒的操作方法。

## 【实验原理】

质粒是染色体之外裸露的、具有自主复制能力的、以超螺旋状态存在于细胞内的双链 DNA 分子。质粒的分离是分子生物学研究中最基本的技术,目前提取质粒的方法很多,比如 CsCl 梯度离心法、煮沸法、硅石粉法、碱裂解法等。本实验所用的碱裂解法是一种经典的分离质粒 DNA 的方法,其基本原理是利用染色体 DNA 与质粒 DNA 在变性程度和复性速度的差异,即在  $\text{pH} > 12$  的碱性条件下,大肠杆菌的基因组 DNA 氢键断裂,双螺旋结构解开而变性,但在该条件下,质粒因其具有共价闭合环状超螺旋结构的特点,两条互补链间的氢键没有完全被破坏,两条链仍然部分地结合在一起;当溶液的 pH 回复至中性时,质粒 DNA 快速复性,但是染色体 DNA 由于分子很大,难以复性;在高盐溶液中,变性的染色体 DNA 相互缠绕,形成不溶性 DNA-蛋白质-SDS 大分子复合物,与细胞碎片一起被离心除去,而质粒 DNA 则留在上清液中,可用异丙醇或乙醇沉淀上清液中的质粒 DNA,获得纯度较高的质粒。

## 【实验器材、材料与试剂】

### 1. 器材

恒温摇床、超净工作台、高压灭菌锅、高速台式离心机、微量移液枪、枪头、1.5 mL Eppendorf 管。

### 2. 材料

含 pUC18 质粒的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  或 JM109 菌株。

### 3. 试剂

(1) LB 液体培养基:称取胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、NaCl 10 g,溶于 950 mL 水中,用 0.4 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.0,定容至 1 L,高温高压灭菌。

(2) LB 固体培养基:称取琼脂粉 15 g,加入 1 L LB 液体培养基中,高温高压灭菌。

(3) 溶液 I:含 50 mmol/L 葡萄糖、25 mmol/L Tris - Cl (pH 8.0)、10 mmol/L EDTA (pH 8.0),高温高压灭菌后,4 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

(4) 溶液 II (新鲜配制):含 0.2 mol/L NaOH、1% (m/V) SDS。

由新配制的 0.4 mol/L 的 NaOH 和 2% 的 SDS 等体积混合而成。溶液 II 中如有絮状沉淀,可置于温水浴中助溶,如果溶液不变澄清,说明试剂失效。

(5) 溶液 III:取 5 mol/L 醋酸钾 60 mL、冰醋酸 11.5 mL 和无菌水 28.5 mL,混合既成。

(6) 氨苄青霉素 (Amp):用无菌蒸馏水配制 100 mg/mL 氨苄青霉素贮存液,置 -20 $^{\circ}\text{C}$



冰箱保存备用。

(7) RNaseA 溶液: 用含 10 mmol/L Tris - Cl (pH 7.5) 和 15 mmol/L NaCl 溶液或无菌水配制 10 mg/mL 的 RNaseA 溶液。配成的 RNaseA 溶液在沸水浴中加热 15 min, 自然冷却至室温, 分装成小份,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

(8) TE - RNaseA 缓冲液: 含 10 mmol/L Tris - Cl (pH 8.0) 和 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)。TE 缓冲液配好后灭菌 15 min, 冷却至室温后加入 RNaseA 溶液, 至终浓度为  $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$  即为 TE - RNaseA 缓冲液。

(9) 氯仿/异戊醇:  $V(\text{氯仿}):V(\text{异戊醇})$  为 24:1, 混匀使用。

(10) 酚/氯仿: Tris - Cl 饱和酚加入等体积氯仿/异戊醇, 混匀使用。

(11) 70%(V/V) 乙醇

(12)  $-20^{\circ}\text{C}$  预冷的异丙醇或无水乙醇

### 【操作步骤】

1. 在超净工作台上, 用灭菌的牙签挑取单菌落放入 50 mL LB 液体培养基中(含  $50\sim 100\ \mu\text{g}/\text{mL}$  的 Amp),  $37^{\circ}\text{C}$  振荡培养过夜。

2. 将菌液倒入 1.5 mL Eppendorf 管中, 10 000 r/min, 离心 1 min, 弃上清液, 将 Eppendorf 管倒置于吸水纸上数分钟, 使液体流尽。

3. 沉淀悬于  $100\ \mu\text{L}$  溶液 I 中, 涡旋或剧烈振荡使菌体充分悬浮。

4. 加入  $200\ \mu\text{L}$  溶液 II, 轻轻翻转 Eppendorf 管混匀溶液(不要振荡涡旋), 置冰浴 5 min。

5. 加入  $150\ \mu\text{L}$  溶液 III, 温和振荡混匀, 冰浴 3~5 min。

6. 12 000 r/min, 离心 10 min, 将上清液移至新的 Eppendorf 管中。

7. 加入等体积酚/氯仿, 涡旋 2 min, 12 000 r/min, 离心 10 min。

8. 将水相移至新 Eppendorf 管中, 加入预冷的等体积异丙醇或 2~2.5 倍体积的无水乙醇,  $-20^{\circ}\text{C}$  下静置 30 min, 12 000 r/min,  $4^{\circ}\text{C}$ , 离心 10~15 min。

9. 弃上清液, 将 Eppendorf 管倒置于吸水纸上, 使液体流尽, 然后加入 70%(V/V) 乙醇  $500\ \mu\text{L}$ , 洗涤 2 次, 12 000 r/min, 离心 1 min。

10. 弃上清液, 将 Eppendorf 管倒置于吸水纸上, 使液体流尽, 然后在  $50^{\circ}\text{C}$  下, 干燥或自然风干。

11. 每管中加入  $30\ \mu\text{L}$  TE - RNaseA 缓冲液, 溶解质粒 DNA,  $-20^{\circ}\text{C}$  储存。

### 【要点提示】

1. 加入溶液 II 后混匀时动作一定要轻, 冰浴时间不要超过 5 min。

2. 实验中所用的酚必须是 Tris - Cl 饱和酚 (pH 8.0) (有市售), 如果饱和酚呈粉红色, 则说明试剂失效, 不能继续使用。

3. 溶液 II 中的 NaOH 要现配现用。

### 【思考题】

1. NaOH 在质粒分离中的主要作用是什么?

2. 加入溶液 II 后混匀时为什么动作一定要轻, 同时冰浴时间不要过长?

3. 有人认为菌体细胞的裂解主要是 SDS 的作用, 你同意此看法吗, 为什么?

4. 试分析一下碱法能不能用来提取染色体 DNA, 为什么?



## 实验 2 Silica 硅石粉法纯化质粒

### 【实验目的】

1. 了解硅石粉法提取质粒的原理。
2. 掌握硅石粉法提取质粒的步骤。

### 【实验原理】

silica 硅石粉在一定的条件下可以选择性的吸附 DNA。在水溶液中 DNA 分子带负电荷,而 silica 表面的硅氧键水化后带负电荷,DNA 分子和硅胶之间产生静电排斥,silica 硅石粉不能结合 DNA,当溶液中含有高浓度的阳离子时,阳离子在 DNA 与 silica 硅石粉表面形成阳离子桥,DNA 吸附在 silica 硅石粉表面(但 silica 不结合蛋白质、寡聚核苷酸、有机溶剂、去污剂及其他可能抑制酶活性的有机或无机物),当溶液离子浓度再次降低时,水分子破坏了阳离子桥,silica 硅石粉表面再次水化带负电荷,DNA 从 silica 硅石粉表面解吸,释放到溶液中(图 1-1)。

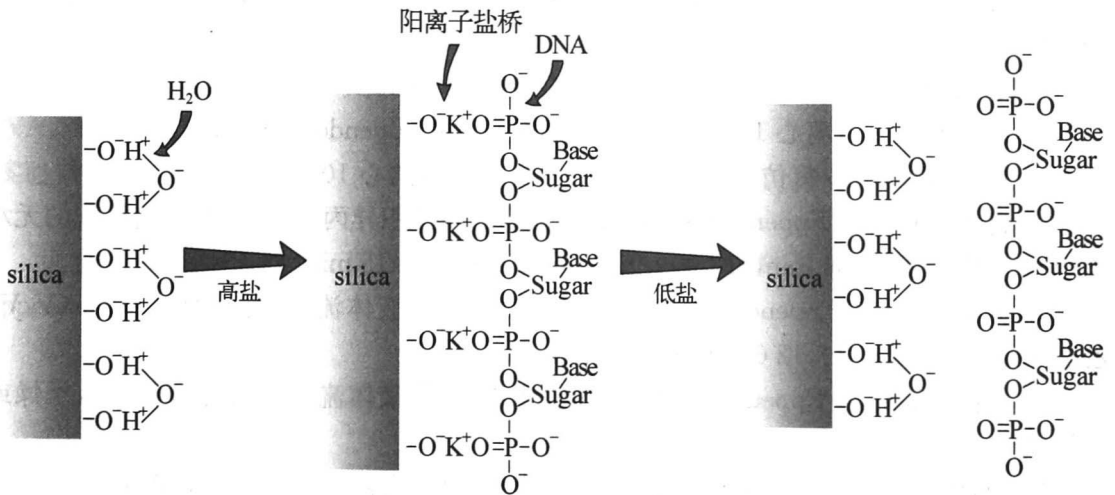


图 1-1 Silica 硅石粉吸附和解吸 DNA

利用 silica 硅石粉纯化质粒 DNA 时,首先是利用了碱法提取质粒 DNA,再在高盐条件下利用 silica 硅石粉特异性地吸附质粒 DNA,并用 70%乙醇溶液洗去不被 silica 硅石粉吸附的杂质(包括蛋白质和多糖等物质),最后利用纯水处理 silica 硅石粉,解吸 silica 硅石粉上吸附的质粒 DNA,获得高纯度的质粒。用 silica 方法纯化 DNA,无须酚抽提,DNA 回收率高,纯度满足 DNA 酶切、测序、连接、转化和体外转录等分子操作。

### 【器材与试剂】

1. 实验器材  
参见实验 1。



## 2. 材料与试剂

(1) silica 硅石粉悬液: 称取 5 g silica 硅石粉(Sigma 产品, 货号 S-5631), 加 20 mL  $H_2O$ , 使 silica 硅石粉完全悬浮, 然后静置 2 h, 轻轻地倾去混浊的悬液(保留沉淀), 重复清洗沉淀 3 次, 用 20 mL  $H_2O$  使 silica 硅石粉悬浮,  $4^{\circ}C$  保存备用。

(2) 溶液 I: 含 50 mmol/L Tris-Cl, 10 mmol/L EDTA(pH 7.5~8.0) 和 10 mg/mL RNaseA。

(3) 溶液 II: 含 0.2 mol/L NaOH, 1% (m/V) SDS。

(4) 溶液 III: 4 mol/L KAc(pH 4.8)。

(5) 6 mol/L 盐酸胍

(6) 70% (V/V) 乙醇

### 【操作步骤】

1. 取 1.5 mL 过夜培养的菌液于 1.5 mL Eppendorf 管中, 5 000 r/min, 离心 1 min, 弃上清液。

2. 加入 200  $\mu$ L 溶液 I, 涡旋, 使细胞沉淀充分悬起。

3. 加入 200  $\mu$ L 溶液 II, 轻轻颠倒混匀, 放置 5 min。

4. 加入 200  $\mu$ L 溶液 III, 轻轻混匀, 以 12 000 r/min 的转速离心 10 min。

5. 取上清液至新的 1.5 mL Eppendorf 管中, 加入 6 mol/L 盐酸胍 600  $\mu$ L, 混匀后, 再加入 50  $\mu$ L silica 硅石粉混匀。

6. 12 000 r/min, 离心 3 min, 弃上清液。

7. 加入 70% (V/V) 乙醇 1 mL, 充分悬起 silica 硅石粉, 12 000 r/min, 离心 3 min, 弃上清液。

8. 重复操作步骤 7。

9. 干燥沉淀 10 min。

10. 加入 50  $\mu$ L 无菌水,  $65^{\circ}C$  水浴 5 min。

11. 室温下, 12 000 r/min, 离心 5 min。

12. 取上清液至新的 Eppendorf 管中,  $-20^{\circ}C$  储存。

### 【要点提示】

1. 加入溶液 II、III 后, 轻轻颠倒混匀, 防止基因组 DNA 断裂, 此过程与碱法提取质粒 DNA 一致。

2. 在步骤 9 中, 尽量吹干酒精, 酒精会影响下游操作。

3.  $65^{\circ}C$  水浴有利于质粒充分从 silica 硅石粉上解吸, 提高质粒 DNA 的回收率。

### 【思考题】

1. 实验中, 盐酸胍的作用是什么?

2. 水浴的作用是什么? 可否用沸水溶解吸质粒?

3. 本实验中, 样品中的 RNA 是如何除去的?



## 实验3 吸附膜方法提取质粒 DNA

### 【实验目的】

1. 学习吸附膜方法提取质粒的基本原理。
2. 掌握试剂盒提取质粒的操作技术。

### 【实验原理】

质粒提取试剂盒中的塑料离心柱的下部有一白色的 silica 基质膜片,该膜片是以 silica 为材料压制而成,在高离子强度下,silica 基质膜可以专一性的吸附 DNA,而当离子强度很低时,DNA 又可从膜片上解吸(详细原理参见实验 2)。根据此原理,常规碱法提取质粒 DNA 再经过 silica 基质膜片的特异性的吸附纯化,可以除去杂质,收获高纯度的质粒。由于 silica 膜片兼有滤膜的特点,吸附膜方法省去一些离心沉淀 silica 的步骤,操作更加方便快捷。

### 【器材与试剂】

1. 实验器材

参见实验 1。

2. 试剂

本实验方案采用宝生物工程有限公司生产的质粒纯化试剂盒。宝生物工程质粒纯化试剂盒包括以下成分。

名 称	数 量	保 存 条 件	名 称	数 量	保 存 条 件
Buffer P1(重悬液)	20 mL	RT	Buffer PW(洗涤液)**	20 mL	RT
Buffer P2(裂解液)	20 mL	RT	Elution Buffer(洗脱液)	10 mL	RT
Buffer P3(结合液)	30 mL	RT	离心柱及套管	100 套	RT
Buffer PWT(洗涤液 T)*	30 mL	RT	RNaseA 20 mg/mL	0.1 mL	-20℃

\* Buffer PWT(洗涤液 T)在首次使用时加入异丙醇 30 mL 混匀。

\*\* Buffer PW(洗涤液)在首次使用时加入无水乙醇 80 mL 混匀。

注:首次使用时将 RNaseA 加入 Buffer P1 中混匀,置于 4℃ 保存。

### 【操作步骤】

1. 取过夜培养菌液 1~3 mL,装入 1.5 mL 中,5 000 r/min,在室温下离心 2 min,完全弃上清液,收集菌体。

2. 加入 200  $\mu$ L Buffer P1,充分涡旋,使其菌体沉淀完全分散开。

3. 加入 200  $\mu$ L Buffer P2,轻轻颠倒离心管 3~5 次,室温放置 2~3 min(裂解时间不要超过 5 min)。

4. 加入 300  $\mu$ L Buffer P3,轻轻颠倒离心管 4~6 次,充分混匀(可见白色絮状物产生),室温放置 1 min。室温下,12 000 r/min,离心 8 min,小心吸出上清液,转移至插入套管的离心小柱内(离心小柱的白色滤膜是由 silica 压制而成),8 000 r/min,离心 30 s,弃套



管内废液,再将离心小柱插回套管。

5. 向离心小柱内加入 Buffer PWT(洗涤液 T)500  $\mu\text{L}$ , 8 000 r/min, 高速离心 30 s, 弃套管内废液, 将离心柱插回套管。

6. 向离心小柱内加入 Buffer PW(洗涤液)700  $\mu\text{L}$ , 8 000 r/min, 高速离心 30 s, 弃套管内废液, 将离心柱插回套管, 再次高速离心 1~2 min。

7. 小心取出离心小柱, 不要沾上套管内的废液。

8. 将离心小柱插入一个新的 1.5 mL 离心管, 在离心柱内硅胶膜中心位置加入 100  $\mu\text{L}$  洗脱液(Elution Buffer), 放置 1 min, 8 000 r/min, 高速离心 1 min, 离心管中洗脱即为纯化的质粒 DNA 溶液。

#### 【要点提示】

如需获得高浓度质粒 DNA 溶液时, 可减少洗脱液体积至 50  $\mu\text{L}$ , 但质粒 DNA 回收总量可能降低。

#### 【思考题】

试从质粒 DNA 的产量、纯度和提取过程所花费的时间等方面比较吸附膜方法与传统的碱裂解-乙醇沉淀纯化质粒的优缺点。

## 实验 4 核酸琼脂糖凝胶电泳及“玻璃奶”法 纯化回收 DNA 片段

#### 【实验目的】

1. 了解核酸琼脂糖凝胶电泳的基本原理。
2. 掌握“玻璃奶”法快速纯化回收 DNA 片段的操作技术。

#### 【实验原理】

1. 核酸琼脂糖凝胶电泳基本原理

琼脂糖电泳是分离、鉴定和纯化 DNA 片段的快速简便方法, 琼脂糖凝胶可用低浓度的荧光染料溴化乙锭(ethidium bromide, EB)染色, 在紫外光照射下可以灵敏地检出发橙色荧光的 DNA 样品, 根据标准 DNA marker 和检测 DNA 片段在凝胶中的相对位置, 可以判断 DNA 片段的大小。

EB 具有毒性, 因此很多实验室使用毒性很低(但比较昂贵)的荧光染料 SYBR Green I 替代 EB 进行 DNA 染色。SYBR Green I 能高强度地结合双链核酸, 呈现绿色荧光, 其灵敏度高于 EB 25~100 倍, 需要注意的是 DNA 结合 SYBR Green I 后, DNA 在电泳时的迁移速度明显低于裸露的 DNA, 因此用先被 SYBR Green I 染色的琼脂糖进行电泳时耗时要明显长于后用 SYBR Green I 染色的 DNA 琼脂糖, 因此, 也可以在完成 DNA 琼脂糖电泳后, 再用 SYBR Green I 染色。



琼脂糖是 DNA 电泳中的固体支持介质,其密度和形成的孔径大小取决于琼脂糖的浓度,不同浓度的琼脂糖凝胶仅适合于分离不同大小的 DNA 片段,因此选用不同浓度的琼脂糖凝胶,可分离长度从 200 bp 至近 50 kb 的 DNA 片段。琼脂糖凝胶电泳通常用水平电泳装置,由于电泳缓冲液的 pH 高于 DNA 分子的等电点,所以在强度和方向恒定的电场下,带负电荷的 DNA 向阳极迁移。

## 2. “玻璃奶”法快速纯化回收 DNA 片段的基本原理

“玻璃奶”试剂是一种超细的 silica 粉,在特定的 pH 和高离子强度下,“玻璃奶”专一性地吸附小至 200 bp 的 DNA 片段(详细原理参见实验 2)。“玻璃奶”DNA 回收试剂盒中的另一重要试剂是碘化钠溶液,碘化钠溶液可以溶解固体琼脂糖,释放其中的 DNA,使 DNA 能充分吸附在“玻璃奶”上,从而更高效地回收 DNA 片段。

### 【器材与试剂】

#### 1. 实验器材

电泳仪、电泳槽、凝胶紫外透射仪、解剖刀、台式高速离心机、Eppendorf 管、移液枪、恒温水浴锅、一次性手套。

#### 2. 试剂

##### (1) 琼脂糖

##### (2) 核酸样品和 DNA marker

##### (3) 玻璃奶 DNA 快速纯化回收试剂盒(TaKaRa)

(4) 50×TAE 电泳缓冲液:取 Tris 24.2 g, EDTA·2H<sub>2</sub>O 3.7 g,加入冰醋酸 5.7 mL,定容至 100 mL。

(5) 6×电泳加样缓冲液:含 0.25%(m/V)溴酚蓝和 40%(m/V)蔗糖。

(6) 10 mg/mL 溴化乙锭(EB)母液

(7) 10 000×的电泳级 SYBR Green I 母液

### 【操作步骤】

#### 1. 核酸琼脂糖凝胶电泳

(1) 凝胶的制备:称取一定量的琼脂糖,按照比例加入稀释后电泳缓冲液(1×TAE),用沸水浴或微波炉融化凝胶,待其自然冷却到 55℃左右(在此温度下,触摸三角瓶,没有强烈的烫手感觉),加入 DNA 荧光染料,灌入水平胶框,插入梳子,自然冷却。(注意:刚刚熔化的胶,温度很高,不能直接灌入胶框。)如果要制备含有 EB 的琼脂糖凝胶,则在此时加入 EB 母液至终浓度为 0.5 μg/mL,摇匀,此时溶液呈微红色;或加入琼脂糖凝胶 1/10 000 体积的 SYBR Green I 母液,摇匀。凝胶在室温下放置 30~45 min,使其自然凝结,小心拔出梳子。将凝胶放入电泳槽中,向电泳槽中加入电泳缓冲液,刚好浸没过凝胶约 1 mm。

(2) 样品配制与加样:取适量 DNA 样品溶液,加入约 1/6 样品体积的加样缓冲液,混匀,将 DNA 样品点入琼脂糖的样品孔内,开始电泳。

(3) 染色和拍照:当溴酚蓝迁移到距凝胶下缘 2 cm 左右时,停止电泳。利用紫外透射仪观察 DNA 条带。

#### 2. “玻璃奶”法快速纯化回收 DNA 片段

注:本实验采用宝生物工程有限公司生产的 Agarose Gel DNA Fragment Recovery 试剂盒。



- (1) 紫外透射仪下,将电泳分离的 DNA 条带从胶上切割下来(不含 DNA 的胶越少越好,即胶块大小尽量与 DNA 条带相接近),放入已称重的 1.5 mL Eppendorf 管中。
- (2) 称量切割出的凝胶,加入三倍量( $V/m$ )的碘化钠溶液。
- (3) 将 Eppendorf 管置于 55°C 水浴中 5~10 min,直至凝胶完全溶化。
- (4) 加入 20  $\mu\text{L}$  充分悬浮的“玻璃奶”(使用前用漩涡振荡器振荡 3 min),室温放置 5 min(期间不时将离心管颠倒几次以混匀,使 DNA 片段充分吸附于“玻璃奶”表面)。
- (5) 10 000 r/min,离心 20 s,移去上清液。
- (6) 加入 4°C 预冷的洗涤液 0.8 mL,充分悬浮“玻璃奶”,10 000 r/min,离心 20 s,弃上清液。
- (7) 重复步骤(6)两次。
- (8) 用吸水纸仔细将 Eppendorf 管壁上及管底残留的液体吸干。
- (9) 加入 20  $\mu\text{L}$  超纯水,混匀后将 Eppendorf 管置于 55°C 水浴 5 min。
- (10) 离心 3 min,将上清液小心地吸至另一个离心管,即为纯化的 DNA。
- (11) 电泳检查回收的结果。

#### 【要点提示】

1. 紫外光对视网膜有害,观察时加盖玻璃罩,观察时间不宜太长。溴化乙锭染色后的 DNA 易受紫外光破坏,切胶时间要尽量短。
2. DNA 洗涤液应保持在低温,否则可能使 DNA 从“玻璃奶”试剂上脱落而导致回收率降低。
3. 步骤(8)是关键操作,管壁和管底残留的含有盐和乙醇的洗涤液若不完全除去,可能导致“玻璃奶”试剂上结合的 DNA 不能充分被水洗脱。

#### 【思考题】

“玻璃奶”纯化回收 DNA 试剂盒除能够从凝胶中纯化和回收 DNA 片段外,还有哪些用途?

## 实验 5 吸附膜方法回收琼脂糖凝胶中 DNA 片段

#### 【实验目的】

掌握吸附膜回收琼脂糖凝胶中 DNA 片段的方法。

#### 【实验原理】

参见实验 2 和实验 3。

#### 【器材与试剂】

1. 器材

参见实验 1。





## 2. 试剂

宝生物工程有限公司生产的 Agarose Gel DNA Purification 试剂盒。

### 【操作步骤】

1. 使用  $1\times$ TAE 缓冲液或  $0.5\times$ TBE 缓冲液制作琼脂糖凝胶, 然后对目的 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳。

2. 在紫外灯下切下含有目的 DNA 的琼脂糖凝胶, 用纸巾吸尽凝胶表面的液体。

3. 切碎胶块。胶块切碎后可加快胶块融化时间, 提高 DNA 回收率。

4. 称量胶块重量, 计算胶块体积。计算胶块体积时, 以  $1\text{ mg}=1\ \mu\text{L}$  计算。

5. 依照下表向胶块中加入胶块融化液 DR-I Buffer:

凝 胶 浓 度/(m/V)	DR-I Buffer 使用量
1.0%	3 个凝胶体积量
1.0%~1.5%	4 个凝胶体积量
1.5%~2.0%	5 个凝胶体积量

6. 混合均匀后,  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$  加热融化胶块(低熔点琼脂糖凝胶可在  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  加热)。其间应间断振荡混合, 使胶块充分融化(6~10 min)。

7. 向上述胶块融化液中加入 DR-I Buffer 量的  $1/2$  体积的 DR-II Buffer, 均匀混合。分离小于 400 bp 的 DNA 片段时, 应在此溶液中加入终浓度为  $20\%$ (V/V) 的异丙醇。

8. 将试剂盒中的 Spin Column 安置在 Collection Tube 上。

9. 将步骤 7 的溶液转移至 Spin Column 中,  $3\ 600\ \text{r}/\text{min}$ , 离心 1 min(如 Spin Column 中有液体残留, 可适当提高离心速度, 再离心 1 min), 弃滤液。将滤液再加入 Spin Column 中离心一次, 可提高 DNA 回收率。

10. 将  $500\ \mu\text{L}$  的 Rinse A 加入 Spin Column 中,  $3\ 600\ \text{r}/\text{min}$ , 离心 30 s, 弃滤液。

11. 将  $700\ \mu\text{L}$  的 Rinse B 加入 Spin Column 中,  $3\ 600\ \text{r}/\text{min}$ , 离心 30 s, 弃滤液。

12. 重复步骤 11, 然后以  $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$  再离心 1 min。

13. 将 Spin Column 安置于新的  $1.5\ \text{mL}$  的离心管上, 在 Spin Column 膜的中央处加入  $25\ \mu\text{L}$  的水或洗脱液, 室温静置 1 min。把水或洗脱液加热至  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  时使用有利于提高洗脱效率。

14.  $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$ , 离心 1 min, 洗脱 DNA。

### 【要点提示】

1. 切胶时应尽量切除不含目的 DNA 的凝胶, 并注意不要使 DNA 长时间暴露于紫外灯下。

2. 胶块一定要充分融化, 否则会严重影响 DNA 的回收率。

3. 纯化的 DNA 用于 DNA 序列分析时, 最好用水洗脱 DNA。

4. DNA 需长期保存时, 建议在洗脱液中保存。

### 【思考题】

1. 纯化回收 DNA 的目的是什么?

2. 若纯化回收后的 DNA 电泳条带为两条, 可能的原因是什么? 应如何解决?