



普通高等教育“十二五”理工类课程规划教材

基因工程实验技术

JIYIN GONGCHENG SHIYAN JISHU

●周岩 赵俊杰 主编



河南科学技术出版社



中国工程实验技术

中国工程实验技术

中国工程实验技术

中国工程实验技术



普通高等教育“十二五”理工类课程规划教材

基因工程实验技术

周 岩 赵俊杰 主编

河南科学技术出版社

· 郑州 ·

内 容 提 要

本教材编写的出发点是突出基础性和实用性,以分子克隆技术操作流程及转基因技术作为主线,编入了常用的33个实验,包含核酸的提取和检测、外源基因和载体的重组、重组体的鉴定、基因文库的构建、PCR技术、凝胶电泳技术、基因转移技术等基因工程实验常用技术。书后附有基因工程操作常用的溶液和缓冲液配方、基因工程实验室的基本要求、常规仪器设备的使用方法及基因工程实验室安全规则等相关内容,供读者参考。

本实验教材可作为高等院校生物技术、生物工程、园艺、植保、农学、兽医、动物科学等专业本科生和研究生基因工程课程教材的配套实验教材,同时也适合作为从事基因工程、分子生物学及相关专业技术人员的参考书和工具书。

图书在版编目(CIP)数据

基因工程实验技术/周岩,赵俊杰主编. —郑州:河南科学技术出版社,2011.9
普通高等教育“十二五”理工类课程规划教材
ISBN 978-7-5349-5336-1

I. ①基… II. ①周…②赵… III. ①基因工程-实验-高等学校-教材
IV. ①Q78.33

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第190282号

出版发行:河南科学技术出版社

地址:郑州市经五路66号 邮编:450002

电话:(0371) 65737028

策划编辑:徐素军

责任编辑:樊 珊

责任校对:马晓灿

封面设计:张 伟

版式设计:栾亚平

责任印制:张艳芳

印 刷:郑州胜岗印刷有限公司

经 销:全国新华书店

幅面尺寸:185 mm×260 mm 印张:11.25 字数:271千字

版 次:2011年9月第1版 2011年9月第1次印刷

定 价:25.00元

如发现印、装质量问题,影响阅读,请与出版社联系。

前 言

基因工程技术是现代生物工程的核心技术，随着现代分子生物学的发展，已渗透到生物学的各个领域。转基因技术已在动植物品种的改良、珍贵药品的生产、基因治疗等各个方面显示了其独特的优越性，具有较广阔的发展前景。

本实验教材是在河南科技学院生物技术和生物工程专业本科生实验指导讲义的基础上编写的，该讲义已被使用多年，并在教学实践过程中不断修订和充实。本书作者从事基因工程教学实践及教学研究多年，其中周岩老师曾留学英国，具有在国外多年从事研究工作的经历。通过对国内外同类实验课程教学的调研及总结，结合作者多年的教学体会，确定了本实验教材基础性、实用性的基本指导思想。教材中所选实验大都为基因工程的基本实验技术，并注重吸收近年来发展起来的新技术和方法，尽量避免使用较昂贵的仪器、试剂和材料；在注意事项部分中，对实验过程中容易出现的问题、影响实验效果的重要因素等给予必要的提示，以帮助初学者更好地把握实验。

本书共有 33 个实验，内容包括动、植物细菌基因组 DNA 的提取，动物全血样品中 DNA 的分离提取，质粒 DNA 的提取，动、植物组织样品总 RNA 的提取，动、植物组织样品 mRNA 的分离提取，核酸浓度的分光光度计测定，琼脂糖凝胶电泳检测 DNA，重组质粒酶切鉴定，凝胶中 DNA 片段的回收与纯化，玻璃奶法快速纯化回收 DNA 片段，外源 DNA 和质粒载体的连接反应，大肠杆菌感受态细胞的制备和转化，重组子的蓝白斑筛选，核酸探针的制备，细菌菌落的原位杂交，Southern 杂交分析，Northern 杂交分析，Western 印迹分析，PCR 技术扩增 DNA 片段，RT-PCR 技术，核酸聚丙烯酰胺凝胶电泳，蛋白质电泳、基因组，cDNA 文库的构建，工程菌的培养，花序浸泡法转化拟南芥及转化子的筛选，根癌农杆菌介导的基因转化，基因枪法转基因技术及转基因植物的 *GUS* 基因检测等。书后还摘编了大量基因工程实验常用信息的有关附录。

本书编写过程中得到有关教师、研究生、专家、同仁以及河南科学技术出版社同志们的大力支持和帮助，在此表示诚挚的感谢！

由于作者水平有限，本书中如有疏漏和不足之处，诚请同行和使用者批评指正。

编 者

2011 年 8 月

目 录

实验一	植物基因组 DNA 的提取	(1)
实验二	动物基因组 DNA 的提取	(6)
实验三	细菌基因组 DNA 的制备	(9)
实验四	动物全血样品中 DNA 的分离提取	(12)
实验五	质粒 DNA 的提取	(16)
实验六	植物组织样品总 RNA 的分离提取	(24)
实验七	动物组织样品总 RNA 的分离提取	(27)
实验八	植物组织样品 mRNA 的分离提取	(32)
实验九	动物组织样品 mRNA 的分离提取	(35)
实验十	核酸浓度的分光光度计测定	(38)
实验十一	琼脂糖凝胶电泳检测 DNA	(41)
实验十二	重组质粒酶切鉴定	(45)
实验十三	凝胶中 DNA 片段的回收与纯化	(50)
实验十四	玻璃奶法快速纯化回收 DNA 片段	(54)
实验十五	外源 DNA 和质粒载体的连接反应	(58)
实验十六	大肠杆菌感受态细胞的制备及转化	(63)
实验十七	蓝白斑筛选法鉴定重组子	(67)
实验十八	核酸探针的制备	(71)
实验十九	细菌菌落的原位杂交	(75)
实验二十	Southern 杂交分析	(80)
实验二十一	Northern 杂交分析	(85)
实验二十二	Western 印迹分析	(88)
实验二十三	PCR 技术扩增 DNA 片段	(94)
实验二十四	RT-PCR 技术	(100)
实验二十五	核酸聚丙烯酰胺凝胶电泳	(104)
实验二十六	蛋白质电泳技术	(110)
实验二十七	基因组文库的构建	(115)
实验二十八	cDNA 文库的构建	(120)

实验二十九 工程菌的培养	(130)
实验三十 花序浸泡法转化拟南芥	(132)
实验三十一 根癌农杆菌介导的基因转移	(136)
实验三十二 基因枪法转基因技术	(141)
实验三十三 转基因植物的 <i>GUS</i> 基因检测	(145)
附 录	(148)
附录一 常用核酸、蛋白质换算数据	(148)
附录二 常用的抗生素	(149)
附录三 基因工程操作中常用的溶液和缓冲液	(149)
附录四 常用碱基、氨基酸符号	(160)
附录五 氨基酸与遗传密码子简表	(161)
附录六 菌种与 DNA 的保存	(162)
附录七 基因工程实验室的要求与仪器设备	(163)
附录八 基因工程相关试剂和仪器销售公司	(168)
附录九 基因工程实验室安全管理细则	(168)
参考文献	(171)

实验一 植物基因组 DNA 的提取

基因组是指细胞中所有的 DNA，包括所有的基因及基因间区域。植物除了细胞核基因组外，在细胞质中还存在着线粒体和叶绿体基因组。特定物种的基因组，包含了该生物生长、发育、繁殖等各项生理活动的几乎全部信息。研究基因组 DNA，首先要得到纯度和得率较高的 DNA。植物基因组 DNA 的成功提取无疑可以为其后续反应及相关工作如限制性片段多态性分析（RFLP）、微卫星分析（MSA）、DNA 克隆、聚合酶链反应（PCR）、DNA 测序、基因文库的构建、基因芯片的设计和应用的顺利完成奠定良好的基础。

提取植物基因组 DNA 有很多方法，如经典的 SDS（十二烷基硫酸钠）法、CTAB（十六烷基三甲基溴化铵）法，还有近些年出现的新的 DNA 提取方法，如利用螯合树脂、特异性 DNA 吸附膜、离子交换纯化柱及磁珠或玻璃粉吸附等方法。目前国内开发了商品化 DNA 提取纯化试剂盒，这些试剂盒根据不同的材料来源设计了不同的提取方法，操作简单而且有效，所提取 DNA 质量高，但价格昂贵，提取量较少。

植物基因组 DNA 提取要保持基因组相对完整，要尽量去除其他生物大分子，如蛋白质、多糖、RNA 等，保证提取样品中不含对酶有抑制作用的有机溶剂及高浓度的金属离子，并且具有较高的得率，以满足后续研究的需要。

基因组 DNA 的提取过程主要包括以下五个步骤。

一是植物材料的准备。植物组织材料的选择对提取 DNA 的产量和质量有很大影响。最好使用新鲜、幼嫩的植物组织作为 DNA 提取的材料，因为植物组织中含有的多糖和其他一些次生代谢产物，如酚、酯、萜等，会对 DNA 的提取造成很大困难，而且这些物质的含量随着植物器官的增长而增加。低温保存的样品材料注意不要反复冻融，组培细胞培养时间不能过长，否则会造成 DNA 降解。

二是植物细胞的裂解。植物细胞的 DNA 主要存在于细胞核中，细胞核具有核膜结构，细胞表面还有细胞膜和细胞壁的保护。要想得到 DNA 分子，首先需要通过一定手段裂解植物细胞，使细胞结构被破坏掉，这样 DNA 才能从细胞中释放出来。裂解细胞的方法有很多，例如：冻结—融化法（冻融法）、机械研磨法、超声波破碎法、去垢剂法等。针对不同材料，选择适当的裂解预处理方式。例如，植物材料常使用的方法是液氮研磨，通过液氮的处理可使植物组织冻裂，方便研磨时组织破碎；同时，液氮的温度很低，可以使破碎细胞处于低温环境中，从而抑制 DNase（脱氧核糖核酸酶）的活性。

三是核酸分离纯化。植物细胞中需要去除的大分子主要有蛋白质、多糖、RNA 等。去除蛋白质和多糖的基本原理是采用酚—氯仿（1:1, V/V）等蛋白质变性剂进行抽提，

蛋白质变性，经离心沉降后，去除蛋白质，同时促使核糖体释放核酸（核酸溶于缓冲液，即水相）。RNA 分子可通过 RNase（水解酶）去除。

四是沉淀并吸附核酸。加入等体积异丙醇或 2 倍体积冰无水乙醇，沉淀基因组，可看见白色纤维状絮团，即可用玻棒将其挑出，小分子 DNA 则只形成颗粒状沉淀附于壁上及底部。最后用缓冲液透析除去去垢剂和有机溶剂，从而达到分离提取基因组 DNA 的目的。

五是核酸溶解。用适量的缓冲液或水溶解核酸。目前，一般实验室所采用的方法大多是经典的 SDS 法、CTAB 法，这两种方法所提取的 DNA 能满足一般分子生物学研究的需要。下面，就以上两种方法为例，来介绍植物基因组 DNA 提取技术。

一、实验目的

了解植物 DNA 抽提的主要方法，掌握 CTAB 法快速抽提植物 DNA。

二、实验原理

植物细胞通过液氮研磨而被破碎，通过细胞提取液中的去垢剂溶解蛋白而破坏细胞膜，使 DNA 从细胞中释放出来。通过酚 - 氯仿抽提的方法去除蛋白，RNA 通过 RNase 去除，最后 DNA 经异丙醇或乙醇沉淀。CTAB 法和 SDS 法具体的实验原理如下：

（一）CTAB 法

十六烷基三甲基溴化铵（cetyltrimethyl ammonium bromide, CTAB）是一种非离子去污剂，植物材料在 CTAB 的处理下，结合 65℃ 水浴可溶解细胞膜，细胞裂解、蛋白质变性、DNA 从细胞中释放出来。释放出来的 CTAB 与核酸形成复合物，此复合物在高盐（> 0.7mM NaCl）浓度下可溶，并稳定存在，但在低盐浓度（0.1~0.5 mM NaCl）下 CTAB - 核酸复合物就因溶解度降低而沉淀，而大部分的蛋白质及多糖等仍溶解于溶液中，可通过离心弃上清液来去除。再经过氯仿 - 异戊醇（24:1, V/V）抽提去除蛋白质、多糖、色素等来纯化 DNA，CTAB - 核酸复合物再用 70%~75% 乙醇浸泡可洗脱掉 CTAB。最后经异丙醇或乙醇等 DNA 沉淀剂将 DNA 沉淀分离出来。

（二）SDS 法

SDS 是一种去垢剂，通过破坏蛋白质的次级键，如氢键、盐键和疏水力，引起天然构象的解体。SDS 作用于膜蛋白，从而使细胞膜结构解体，核基因组释放，同时蛋白质因变性而沉淀下来。再通过氯仿 - 异戊醇（24:1, V/V）抽提去除蛋白质、多糖、色素等杂质，通过 RNase 去除 RNA，最后 DNA 通过异丙醇或 2 倍体积的冰无水乙醇而被沉淀。

三、实验材料

植物幼嫩组织。

四、仪器及试剂

（一）仪器

1. 高速冷冻离心机（2 mL）

2. 台式高速离心机
3. 水浴锅 (65 °C)
4. 微量移液器 (20 μ L、100 μ L、1 000 μ L)
5. 陶瓷研钵
6. 50 mL 离心管 (有盖)
7. 2 mL Eppendorf (EP) 管
8. 1.5 mL Eppendorf (EP) 管
9. 弯成钩状的小玻棒

(二) 试剂

1. 提取缓冲液 I

100 mmol/L Tris · HCl (pH8.0), 20 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl, 1.5% SDS。

2. 氯仿 - 戊醇 - 乙醇 (80:4:16, V/V)

200 mL 氯仿, 10 mL 戊醇, 40 mL 乙醇, 混匀。

3. 氯仿 - 异戊醇 (24:1, V/V)

240 mL 氯仿, 10 mL 异戊醇, 混匀。

4. 异丙醇 (isopropyl alcohol)

5. 70% 冰乙醇溶液

95% 乙醇 70 mL, dH₂O 25 mL, -20 °C 贮存。

6. CTAB 提取缓冲液

配制 1 L CTAB 提取缓冲液, 应在 800 mL 去离子水中加入 46.75 g 氯化钠, 20 g CTAB, 摇动容器使溶质完全溶解, 然后加入 1 mol/L Tris · HCl (pH 8.0) 50 mL, 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 20 mL, 用水定容至 1 L, 分装后高压灭菌。

7. 10 mg/mL RNase A

10 mg RNase A, 10 mmol/L Tris · HCl (pH 7.5), 15 mmol/L NaCl, 100 °C 保温 15 min, 室温下缓慢冷却, -20 °C 贮存 (配制时需要戴手套)。

8. 10 × 上样缓冲液 (pH 7.0)

50 mmol/L EDTA, 60% 甘油, 0.25% 二甲苯氰 FF (W/V), 0.25% 溴酚蓝 (W/V)。

9. TE (Tris + EDTA) 缓冲液

配制 1 L TE 缓冲液, 应在 800 mL 水中依次加入 1 mol/L Tris · HCl (pH 8.0) 10 mL, 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 2 mL, 加水定容至 1 L, 分装后高压灭菌。

10. 3 mol/L 乙酸钠 (NaAc, pH 6.8)

81.62 g NaAc · 3H₂O, dH₂O 溶解, 配制成 200 mL, 用 HAc 调 pH 至 6.5。

11. 其他试剂

液氮、异丙醇、无水乙醇、 β -巯基乙醇、DNA Marker。

五、实验方法

(一) CTAB 法提取植物基因组 DNA

(1) 将 CTAB 提取缓冲液放入水浴锅中, 65 °C 预热 (CTAB 需要在 65 °C 保温溶

解，充分混匀后使用)，用前每毫升提取液加入 40 μL β -巯基乙醇。

(2) 采集适量幼嫩叶片，称取 0.5 g 放入研钵用液氮研成粉末，转移粉末至 2 mL 离心管中（-20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷效果更好）。

(3) 向装有叶片粉末的离心管中加入 1 mL 预热到 65 $^{\circ}\text{C}$ 的 CTAB 缓冲液，混匀（防止冻融）。

(4) 立即置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中 30 ~ 60 min，其间不时轻缓颠倒混匀。到时间取出后 12 000 r/min 离心 5 min。

(5) 吸取上清液约 600 μL 至一新的 2 mL 离心管中，加入等体积（600 μL ）氯仿-异戊醇（24:1），轻缓颠倒混匀溶液。12 000 r/min 离心 5 min（该步骤重复 2 ~ 3 次）。

(6) 取约 450 μL 上清液于一新 1.5 mL 离心管，加入 1 mL 异丙醇或冰无水乙醇，颠倒混匀，室温放置 10 min。

(7) 12 000 r/min 离心 10 min，弃去上清液，用 70% 冰乙醇洗涤沉淀 2 ~ 3 次。

(8) 除去残留的乙醇，待沉淀干燥后，加入适量的 TE 或无菌水（含 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A），置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜，待 DNA 溶解后，检测 DNA 浓度及质量，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

(9) DNA 溶液纯度的测定：将 DNA 适当稀释，测定并记录其在 260 ~ 280 nm 的紫外光吸收率，以一个 OD_{260} 值相当于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNA 浓度来计算纯化的 DNA 浓度。要求 DNA 溶液 OD_{260}/OD_{280} 的比值为 1.7 ~ 2.0。

(二) SDS 法提取植物基因组 DNA

(1) 取 20 mL 提取缓冲液 I 加入到 50 mL 离心管中，60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热。

(2) 取植物幼嫩叶片 5 ~ 10 g，用蒸馏水冲洗干净、滤纸吸干、剪碎，大小为 2 ~ 6 mm（越短越好）。

(3) 将剪碎的植物幼嫩叶片全部转移至经液氮预冷的瓷研钵内，加少量液氮磨成粉状，中途不断添加液氮以保持样品不解冻，迅速用灭菌的不锈钢勺转移粉末到预热的离心管中，剧烈摇动混匀，60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 30 ~ 60 min（时间长，利于提高 DNA 产量），中间要不时摇动离心管。

(4) 加入 20 mL 氯仿-戊醇-乙醇（80:4:16）溶液，颠倒混匀，室温下静置 5 ~ 10 min，使水相和有机相分层。颠倒混匀过程中可见有机相颜色逐渐加深，由无色渐渐转变成墨绿色。

(5) 室温下 5 000 r/min 离心 5 min。

(6) 将上清液转移至另一支 50 mL 离心管 [若上清液仍为绿色，应重复步骤 (4) 和 (5) 直至上清液变为透明色]，加入等体积异丙醇，颠倒混匀，室温下放置片刻即出现絮状 DNA 沉淀。

(7) 在 1.5 mL EP 管中加入 1 mL TE 溶液，备用。

(8) 用钩状玻璃棒挑出 DNA 絮团，干净吸水纸吸干，转入含 TE 的 EP 管中，DNA 很快溶解于 TE 溶液中。

(9) 如步骤 (6) 中 DNA 不形成絮状沉淀，可用 5 000 r/min 离心 5 min，去上清

液，再将沉淀移入 TE 溶液中。这样收集的 DNA 沉淀，往往难溶解，可在 60 °C 水浴放置 15 min 以上，帮助溶解。

(10) 将 DNA 溶液以 3 000 r/min 离心 5 min，上清液倒入一个干净的 5 mL 离心管中。

(11) 加入 5 μ L RNase A (10 mg/mL)，37 °C 保温 20 min，除去 RNA (RNA 对 DNA 的操作、分析一般无影响，可省略该步骤)。

(12) 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 及 2 \times 体积的冰乙醇 (无水乙醇提前放于 -20 °C 冰箱中预冷)，颠倒混匀，-20 °C 放置 30 min 以上 (时间长可增加得率)，DNA 形成絮状沉淀。

(13) 用钩状玻棒挑出 DNA 沉淀，用 70% 冰乙醇漂洗，除去乙醇并在室温下干燥。

(14) 将 DNA 溶解于 1 mL TE 中，-20 °C 贮存。

(15) 取 2 ~ 5 μ L DNA 样品在 0.7% 琼脂糖胶上进行电泳，检测 DNA 的分子大小。同时取 15 μ L 稀释 20 倍，测定 OD_{260}/OD_{280} ，检测 DNA 含量及质量。

六、注意事项

(1) 实验中的提取液及实验用具要在 121 °C、高温高压下灭菌 20 min。

(2) 所用实验材料要尽量选择新鲜、幼嫩的材料，低温保存的材料不要反复冻融，材料多少应适量，过多会导致裂解不充分，过少会导致 DNA 得率和纯度低。

(3) 在提取 DNA 的整个操作过程中要避免剧烈振荡，避免机械剪切力对 DNA 的机械切割；同时尽量简化操作步骤，缩短提取过程，避免物理、化学和生物的因素 (例如：机械剪切力、高温和 DNase 等) 对核酸的降解。

(4) 在吸取上清液的过程中，枪头一定要避免伸入下层的溶液中或吸入沉淀，以免为 DNA 的提纯造成困难。

(5) 采用有机抽提 (氯仿 - 异戊醇抽提) 去除蛋白质时，由于有机相和水相互不相溶，因此一定要充分混匀，以便水相中的蛋白质能和有机相中的氯仿充分接触而变性，但动作要轻柔。离心分离两相时，应保证一定的转速和时间。

(6) 有些材料多糖类物质含量较高，表现为 DNA 沉淀呈白色透明状而且溶解后呈黏稠状可在取材前将植物放暗处 24 h，达到去除淀粉的目的。

(7) 如果提取的 DNA 沉淀呈棕色，说明植物材料中含有大量酚类化合物，酚类化合物与 DNA 共价结合，使 DNA 呈棕色，并会抑制 DNA 的酶解反应。为防止此情况出现，可在加入 2 \times CTAB 的同时加入 2% ~ 5% 的巯基乙醇，或者加入亚精胺 (100 μ L DNA 加 5 μ L 0.1 mol/L 的亚精胺)。

七、作业与思考题

(1) CTAB 法和 SDS 法提取植物 DNA 主要有哪些差别?

(2) CTAB 在植物 DNA 提取中起到了哪些作用?

(3) 植物 DNA 提取中如何去除蛋白质的污染?

实验二 动物基因组 DNA 的提取

一、实验目的

了解动物 DNA 基因组 DNA 提取的原理，掌握动物基因组 DNA 提取的实验技术。

二、实验原理

DNA 是生物遗传信息的携带者。要对一个生物体进行分子生物学研究，首先需要获得它的基因组 DNA。分离得到 DNA 样品质量的好坏直接关系到下一步实验的成败，而基因组 DNA 提取和纯化方法的灵敏度、特异性直接影响 DNA 的质量。目前，国内外已有多种提取 DNA 的方法，如水煮法、酚抽提法、甲酰胺解聚法、盐酸胍裂解法、盐洗法等。动物基因组提取实验中用的较多的方法是酚抽提法。

酚抽提法的原理是在 SDS 等去污剂存在下，用蛋白酶 K 消化细胞，然后用酚 - 氯仿抽提去除蛋白质，用异丙醇或乙醇沉淀即可得到动物的基因组 DNA。用此方法得到的 DNA 长度为 100 ~ 150 kb，适用于噬菌体构建基因组文库和 Southern 杂交分析。

三、实验材料

新鲜动物组织，如脾脏、肝脏、心脏等。

四、仪器与试剂

(一) 仪器

1. 低温冷冻离心机
2. 恒温水浴锅
3. 组织匀浆器
4. 高压灭菌锅
5. 微量取液器及吸头 (20 μ L、200 μ L、1 000 μ L)
6. 一次性过滤器
7. 1.5 mL 离心管

(二) 试剂

1. 匀浆缓冲液
10 mmol/L Tris · HCl (pH 7.4), 100 mmol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA。
2. 酶解液

含 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris · HCl (pH8.0), 25 mmol/LEDTA (pH 8.0), 0.5% SDS, 临用前加 0.1 mg/mL 蛋白酶 K。

3. 无 DNA 酶的 RNA 酶 (10 mg/L)

将胰 RNA 酶溶于含 10 mmol/L Tris · HCl (pH 7.5) 和 15 mmol/L NaCl 的溶液中, 使浓度为 10 mg/L, 于 100 °C 水浴处理 15 min, 以降解 DNA 酶。缓慢冷却到室温, 在 -20 °C 保存。

4. 酚 - 氯仿 - 异戊醇 (25:24:1, 体积比)

5. 5 mol/L NaCl

称取 29.2 g NaCl, 溶解于足量的 dH₂O 中, 定容至 100 mL。

6. 3 mol/L NaAc

81.62 g NaAc · 3H₂O, 加 dH₂O 溶解, 定容至 200 mL, 用 HAc 调 pH 至 6.5。

7. 70% 冰乙醇

95% 乙醇 70 mL, dH₂O 25 mL, -20 °C 贮存。

8. TE 缓冲液

含 10 mmol/L Tris · HCl (pH 8.0), 1 mmol/LEDTA (pH 8.0)。

9. 生理盐水

10. 无水乙醇

五、实验方法

(1) 取 0.2 g 动物组织, 用冰冷的生理盐水洗 3 次, 吸水纸吸干, 剪碎, 越细小越好。

(2) 将剪碎的组织中加入 2.0 mL 匀浆缓冲液, 用组织匀浆器匀浆至无明显组织块存在 (冰浴操作)。

(3) 将组织细胞的匀浆液转移至 1.5 mL 离心管中, 5 000 r/min, 4 °C 下离心 30 ~ 60 s。弃上清液, 在沉淀物中再加 2 倍体积的匀浆缓冲液, 以相同转速和时间再次离心, 收集沉淀。

(4) 沉淀中加入 0.4 mL 酶解液, 轻轻颠倒混匀, 于 50 ~ 55 °C 水浴保温 12 ~ 18 h。

(5) 加入 RNA 酶至终浓度 200 μg/mL, 37 °C 水浴 1 h。

(6) 加入等体积平衡酚 - 氯仿 - 异戊醇, 慢慢颠倒离心管使两相充分接触, 4 °C 下, 3 500 r/min 离心 10 min。

(7) 用剪掉吸头前端的扩口吸头小心吸出离心管中的含 DNA 的水相, 注意不要吸到中间界面上一层白色物质 (该物质为蛋白质沉淀)。然后加入等体积氯仿 - 异戊醇, 以 3 500 r/min 在 4 °C 下离心 10 min。如果界面或水相中含蛋白质沉淀较多, 可重复 (6) ~ (7) 操作。

(8) 用扩口吸头小心吸出上层含 DNA 的水相, 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc, 充分混匀, 再加入 2 倍体积的无水乙醇, 充分混匀, 在 -20 °C 放置 2 h。

(9) 以 12 000 r/min 4 °C 下离心 15 min, 弃上清液, 向沉淀中加入 1 mL 70% 冷乙醇洗涤, 在 4 °C 下以 12 000 r/min 离心 15 min, 获得沉淀, 室温下干燥。加入 50 μL TE 缓

冲液溶解，即可得到动物基因组 DNA。-20 ℃ 冰箱保存。

如果要对提取的 DNA 进行完整性鉴定，可通过琼脂糖凝胶电泳。方法是取 1 μL 溶解的 DNA 样品、1 μL 上样缓冲液和 4 μL 无菌水混匀，在 0.8% 的琼脂糖凝胶中进行电泳，用溴化乙锭染色观察结果。

六、注意事项

- (1) 动物肝脏一定要尽量剪碎，匀浆一定要充分且在冰浴中进行。
- (2) 有机相和水相颠倒混匀时动作要轻，但一定要充分混匀。
- (3) 为防止对 DNA 的机械切割作用，吸取含 DNA 的水相时最好用剪掉吸头前端的扩口吸头。

七、作业与思考题

- (1) SDS 在动物基因组提取 DNA 中起到了什么作用？
- (2) SDS 法提取 DNA 的原理是什么？
- (3) 动物基因组 DNA 提取需要注意哪些问题，才能得到浓度和纯度较高的 DNA？

实验三 细菌基因组 DNA 的制备

一、实验目的

了解提取细菌基因组 DNA 的原理，掌握细菌基因组 DNA 的制备操作方法。

二、实验原理

细菌细胞最外层有一层厚厚的细胞壁，通过溶菌酶结合革兰阳性菌细胞壁上的溶菌酶结合位点，使细胞壁合成及稳定性受到破坏，导致细菌失去细胞壁的支撑和保护而溶解破裂。同时，SDS 能够破坏细胞的膜结构，从而使细胞结构解体，DNA 释放到细胞外。蛋白质经氯仿 - 异戊醇沉淀，RNA 可通过 RAase 而去除，即可获得较纯的 DNA。可用于克隆细菌染色体上的目的基因、绘制基因图谱、检测细菌污染等。

三、实验材料

大肠杆菌或其他细菌培养物。

四、仪器与试剂

(一) 仪器

1. 微量移液器
2. 高速冷冻离心机
3. 台式高速离心机
4. 水浴锅
5. 旋涡混合器
6. 50 mL 离心管（有盖）
7. 5 mL EP 管
8. 1.5 mL EP 管

(二) 试剂

1. LB (Luria - Bertani) 液体培养基

胰化蛋白胨 10 g，酵母提取物 5 g，NaCl 10 g，加 ddH₂O 至 1 000 mL，待完全溶解后，分装小瓶，0.1 MPa (15 lbf/in²) 高压灭菌 20 min。

2. 裂解液

40 mmol/L Tris - 乙酸，20 mmol/L 乙酸钠，1 mmol/L EDTA，1% SDS，pH 8.0。

3. 1% SDS

在 90 mL dH₂O 中溶解 1g 电泳级 SDS，用 dH₂O 定容至 100 mL。

4. Tris · HCl 饱和苯酚

5. 其他试剂

5 mol/L NaCl、氯仿、无水乙醇、70% 冰乙醇、TE。

五、实验方法

(1) 细菌接种于含 5 mL LB 液体培养基的离心管中，37 ℃，200 r/min，振荡培养过夜。

(2) 取 1.5 mL 培养物于 1.5 mL EP 管中，12 000 r/min 离心 30 s，弃上清液，将 EP 管倒置于吸水纸上吸干。

(3) 加入 400 μL 裂解液，用移液枪反复吹打使之重新悬浮，置于 37 ℃ 温浴 30 min。

(4) 加入 132 μL 的 5 mol/L NaCl 溶液，颠倒试管使之混匀，13 000 r/min 离心 15 min。

(5) 用扩口吸头（用消毒后的剪刀剪去 1 000 μL 枪头的尖端）小心吸取上清液转入一个新的离心管中。

(6) 加入等体积的饱和苯酚，充分混匀，12 000 r/min 离心 3 min，若水相经离心后仍然混浊则说明还有蛋白质未去除干净，则需要重复上述步骤直到水相变得澄清，水相和有机相之间不再有白色沉淀物时停止（约 2 次）。

(7) 吸取上清液，转入一新的 EP 管中，加入等体积的氯仿，颠倒混匀，13 000 r/min 离心 3 min，以便除去苯酚。

(8) 将上清液小心吸出，转入一新的 EP 管中，加入预冷的 2 倍体积的无水乙醇，放于 -20 ℃ 冰箱中静置 30 min。

(9) 13 000 r/min 离心 15 min，可见白色丝状沉淀物。

(10) 小心吸除上清液，将沉淀物用 400 μL 预冷 70% 乙醇洗涤 2 次。

(11) 室温干燥后，加入 50 μL TE（含 20 μg/mL 的 RNase）溶解 DNA，-20 ℃ 冰箱保存备用。

六、注意事项

(1) 细菌培养物经离心沉淀后，一定要用移液枪反复吹打使之重新悬浮，否则会导致细菌细胞裂解不充分。

(2) 裂解步骤中，如果不澄清说明菌体没有裂解，可能的原因有：菌量太大或该菌为厚壁的非革兰阴性菌。

(3) 步骤（5）中吸取上清液需用扩口枪头吸取，以减小机械剪切力对基因组 DNA 的损伤。

(4) 加入苯酚时需要戴手套，苯酚具有腐蚀性，小心操作。

(5) 苯酚 - 氯仿抽提时，注意 PEC、蛋白质等杂质污染，它们会影响限制性内切