



高职高专“十一五”规划教材

★ 生物技术系列

生物技术 综合实验

李玉林 任平国 主 编

SHENGWU JISHU
ZONGHE SHIYAN



化学工业出版社



高职高专“十一五”规划教材

★生物技术系列

生物技术 综合实验

李玉林 任平国 主 编

SHENGWU JISHU

ZONGHE SHIYAN



化学工业出版社

· 北 京 ·

本书是高职高专“十一五”规划教材★生物技术系列之一。本书共分为四部分。第一部分为基因工程技术,重点介绍外源基因在大肠杆菌中的克隆与表达,由9个实验组成。第二部分是生物大分子的分离纯化及活性检测,包括大肠杆菌中表达的外源蛋白的分离纯化与检测(7个实验)、动物血中超氧化物歧化酶提取、纯化与活性鉴定(5个实验)两章。第三部分是细胞工程及检测技术,分为鸡胚成纤维细胞培养技术(9个实验)、卵清蛋白多克隆抗体的制备与检测(6个实验)、原生质体的分离、融合与杂交细胞的筛选(7个实验)三章。第四部分是发酵工程与酶工程,分为谷氨酸发酵生产技术(9个实验)、实验室啤酒发酵技术(13个实验)、淀粉酶的发酵生产(9个实验)三章。各学校可根据条件和培养方向选用。

本书可供高职高专生物技术类各专业学生使用,也可作为相关领域技术人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

生物技术综合实验/李玉林,任平国主编. —北京:
化学工业出版社, 2009.3

高职高专“十一五”规划教材★生物技术系列
ISBN 978-7-122-04789-2

I. 生… II. ①李…②任… III. 生物技术-实验-
高等学校: 技术学院-教材 IV. Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 018179 号

责任编辑:李植峰 梁静丽
责任校对:郑捷

装帧设计:张辉

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印刷:北京云浩印刷有限责任公司

装订:三河市延风印装厂

787mm×1092mm 1/16 印张10 $\frac{3}{4}$ 字数264千字 2009年3月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:22.00 元

版权所有 违者必究

高职高专生物技术类“十一五”规划教材 建设委员会委员名单

主任委员 陈电容

副主任委员 王德芝

委 员 (按姓名笔画排列)

王云龙	王方林	王幸斌	王德芝	李崇高	李敏骞	吴高岭
员冬梅	辛秀兰	宋正富	张 胜	张 海	张文雯	张温典
张德新	陆 旋	陈 红	陈电容	陈忠辉	陈登文	周庆椿
郑 瑛	郑 强	赵凤英	赵书芳	胡红杰	姜金华	钱志强
黄根隆	崔士民	程云燕				

高职高专生物技术类“十一五”规划教材 编审委员会委员名单

主任委员 章静波

副主任委员 辛秀兰 刘振祥

委 员 (按姓名笔画排列)

王利明	王幸斌	王晓杰	卞 勇	叶水英	包雪英	兰 蓉
朱学文	任平国	刘振祥	关 力	江建军	孙德友	李 燕
李双石	李玉林	李永峰	李晓燕	李晨阳	杨贤强	杨国伟
杨洪元	杨福林	邱玉华	余少军	辛秀兰	宋京城	张文雯
张守润	张星海	张晓辉	张跃林	张温典	张德炎	陈 玮
陈可夫	陈红梅	罗合春	金小花	金学平	周双林	周济铭
赵俊杰	胡斌杰	贺立虎	夏 红	夏未铭	党占平	徐安书
徐启红	郭晓昭	陶令霞	黄贝贝	章玉平	章静波	董秀芹
程春杰	谢梅英	廖 威	廖旭辉			

高职高专生物技术类“十一五”规划教材 建设单位名单 (按汉语拼音排列)

安徽第一轻工业学校	湖北荆门职业技术学院
安徽万博科技职业学院	湖北荆州职业技术学院
安徽芜湖职业技术学院	湖北三峡职业技术学院
安徽医学高等专科学校	湖北生态工程职业技术学院
北京城市学院	湖北十堰职业技术学院
北京电子科技职业学院	湖北咸宁职业技术学院
北京吉利大学	湖北中医学院
北京协和医学院	湖南省药品检验所
北京医药器械学校	湖南永州职业技术学院
重庆工贸职业技术学院	华中农业大学
重庆三峡职业学院	江苏常州工程职业技术学院
甘肃农业职业技术学院	江西景德镇高等专科学校
广东科贸职业学院	江西应用技术职业学院
广西职业技术学院	开封大学
广州城市职业学院	山东滨州职业技术学院
贵州轻工职业技术学院	山东博士伦福瑞达制药有限公司
河北承德民族师范专科学校	山东东营职业学院
河北承德职业技术学院	陕西杨凌职业技术学院
河北旅游职业学院	上海工程技术大学
河南安阳工学院	四川工商职业技术学院
河南工业大学	苏州农业职业技术学院
河南科技学院	武汉软件工程职业学院
河南漯河职业技术学院	武汉马应龙药业有限公司
河南濮阳职业技术学院	武汉生物工程学院
河南三门峡职业技术学院	浙江大学
河南信阳农业高等专科学校	浙江金华职业技术学院
黑龙江农业职业技术学院	浙江经贸职业技术学院
呼和浩特职业学院	浙江医药高等专科学校
湖北大学知行学院	郑州牧业工程高等专科学校
湖北恩施职业技术学院	郑州职业技术学院
湖北黄冈职业技术学院	中国食品工业(集团)公司

《生物技术综合实验》编写人员

- 主 编 李玉林 （郑州职业技术学院）
 任平国 （漯河职业技术学院）
- 副 主 编 何 敏 （广东科贸职业学院）
 闵玉涛 （中州大学）
 邓黎黎 （河南省生物工程技术研究中心）
- 编写人员 （按姓名笔画排列）
 王亚平 （郑州职业技术学院）
 邓黎黎 （河南省生物工程技术研究中心）
 任平国 （漯河职业技术学院）
 李玉林 （郑州职业技术学院）
 何 敏 （广东科贸职业学院）
 闵玉涛 （中州大学）
 宋 娜 （郑州职业技术学院）
 张艳丽 （郑州职业技术学院）
 张新伟 （郑州职业技术学院）
 韩天龙 （黑龙江农业职业技术学院）

出版说明

“十五”期间，我国的高职高专教育经历了跨越式发展，高职高专教育的专业建设、改革和发展思路进一步明晰，教育研究和教学实践都取得了丰硕成果。但我们也清醒地认识到，高职高专教育的人才培养效果与市场需求之间还存在着一定的偏差，课程改革和教材建设的相对滞后是导致这一偏差的两大直接原因。虽然“十五”期间各级教育主管部门、高职高专院校以及各类出版社对高职高专教材建设给予了较大的支持和投入，出版了一些特色教材，但由于整个高职高专教育尚未进入成熟期，教育改革尚处于探索阶段，故而行的一些教材难免存在一定程度的不足。如某些教材仅仅注重内容上的增减变化，过分强调知识的系统性，没有真正反映出高职高专教育的特征与要求；编写人员缺少对生产实际的调查研究和深入了解，缺乏对职业岗位所需的专业知识和专项能力的科学分析，教材的内容脱离生产经营实际，针对性不强，新技术、新工艺、新案例、新材料不能及时反映到教材中来，与高职高专教育应紧密联系行业实际的要求不相适应；专业课程教材的编写缺少规划性，同一专业的各门课程所使用的教材缺乏内在的沟通衔接等。为适应高职高专教学的需要，在总结“十五”期间高职高专教学改革成果的基础上，组织编写一批突出高职高专教育特色，以培养适应行业需要的高级技能型人才为目标的高质量教材不仅十分必要，而且十分迫切。

“十一五”期间，教育部将深化教学内容和课程体系改革作为工作重点，大力推进教材向合理化、规范化方向发展。2006年，教育部不仅首次成立了高职高专40个专业类别的“教育部高等学校教学指导委员会”，加强了对高职高专教学改革和教材建设的直接指导，还组织了普通高等教育“十一五”国家级规划教材的申报工作。化学工业出版社申报的200余本教材经教育部专家评审，被列选为普通高等教育“十一五”国家级规划教材，为高等教育的发展做出了积极贡献。依照教育部的部署和要求，2006年化学工业出版社与生物技术应用专业教育部教改试点高职院校联合，邀请50余家高职高专院校和生物技术相关企业作为教材建设单位，共同研讨开发生物技术类高职高专“十一五”规划教材，成立了“高职高专生物技术类‘十一五’规划教材建设委员会”和“高职高专生物技术类‘十一五’规划教材编审委员会”，拟在“十一五”期间组织相关院校的一线教师和相关企业的技术人员，在深入调研、整体规划的基础上，编写出版一套生物技术相关专业基础课及专门课的教材——“高职高专‘十一五’规划教材★生物技术系列”。该批教材将涵盖各类高职高专院校的生物技术及应用专业、生物化工工艺专业、生物实验技术专业、微生物技术及应用专业、生物科学专业、生物制药技术专业、生化制药技术专业、发酵技术专业等专业的核心课程，从而形成优化配套的高职高专教材体系。该套教材将于2007~2008年陆续出版。目前，该套教材的首批编写计划已顺利实施。首批编写的教材中，《化学》、《细胞培养技术》和《药品质量管理》已列选为“普通高等教育‘十一五’国家级规划教材”。

该套教材的建设宗旨是从根本上体现以应用性职业岗位需求为中心，以素质教育、创新教育为基础，以学生能力培养为本位的教育理念，满足高职高专教学改革的需要和人才培养的需求。编写中主要遵循以下原则：①理论教材和实训教材中的理论知识遵循“必需”、“够用”、“管用”的原则；②依据企业对人才的知识、能力、素质的要求，贯彻职业需求导向的

原则；③坚持职业能力培养为主线的原则，多加入实际案例、技术路线、操作技能的论述，教材内容采用模块化形式组织，具有一定的可剪裁性和可拼接性，可根据不同的培养目标将内容模块剪裁、拼接成不同类型的知识体系；④考虑多岗位需求和学生继续学习的要求，在职业岗位现实需要的基础上，注重学生的全面发展，以常规技术为基础，关键技术为重点，先进技术为导向，体现与时俱进的原则；⑤围绕各种具体专业，制订统一、全面、规范性的教材建设标准，以协调同一专业相关课程教材间的衔接，形成有机整体，体现整套教材的系统性和规划性。同时，结合目前行业发展和教学模式的变化，吸纳并鼓励编写特色课程教材，以适应新的教学要求；并注重开发实验实训教材、电子教案、多媒体课件、网络教学资源等配套教学资源，方便教师教学和学生学习，满足现代化教学模式和课程改革的需要。

在该套教材的组织建设和使用过程中，欢迎高职高专院校的广大师生提出宝贵意见，也欢迎相关行业的管理人员、技术人员与社会各界关注高职高专教育和人才培养的有识之士提出中肯的建议，以便我们进一步做好该套教材的建设工作；更盼望有更多的高职高专院校教师和相关行业的管理人员、技术人员参加到教材的建设工作和编审工作中来，与我们共同努力，编写和出版更多高质量的教材。

化学工业出版社 教育分社

前 言

生物技术科学是一门实验科学。要培养高素质的专业人才，除了讲授专业课，让学生了解生物技术领域发展的全貌外，更主要的是开设一门具有先进性、科学性和系统性的实验课程。生物技术综合实验作为独立的课程内容，在专业基础课程教学中发挥着重要的作用，它涵盖的内容非常广泛，按照所研究的层次不同，可分为酶工程、发酵工程、细胞工程、基因工程、蛋白质工程等几大类。

近年来，生物技术呈现迅猛发展的局面，新理论、新技术层出不穷，世界上每年生物化学的研究成果呈几何级数增长，生物化学实验技术也有了很大的进步，其发展趋向呈现多方面的特点，体现在分析技术向着综合性和自动化发展、制备技术向高效性与微量化发展、结构研究向精确性与自然化发展；涉及的范围也更加宽广，技术水平也更加先进。随着生物技术各领域的广泛应用，高等学校对生物化学实验课的教学有了更高的要求。原有的一些陈旧的方法和技术手段已被新的方法与技术所取代，相应的教学内容已经过时，原采用的生物化学实验技术水平较低，设置不尽合理，简单验证实验过多，许多内容已不适合现今教学的需要，急需进行教学内容的改进，才能满足课程建设、人才培养的需要。

本书编写过程中力求简明扼要、内容新颖、图文并茂，既重视基础性和科学性，又适应高职高专发展方向，力争使实验内容具有先进性、系统性和综合性。实验内容包括动物、植物和微生物等多种样品中生物大分子的制备和分析，内容全面合理，反映了现代生物技术的成果和发展的特点，以期使学生系统掌握生物技术实验的基本理论和基本技能，通过实验掌握实验设计、实验条件优化和实验操作等基本科研技能，培养学生分析问题解决问题的能力。为学生学习后续的专业课及以后的工作和深造提供了良好的基础。

本书由李玉林、任平国担任主编，何敏、闵玉涛、邓黎黎担任副主编，参编人员还有王亚平、宋娜、张艳丽、韩天龙、张新伟。在本书编写过程中，曾受到有关院校领导和专家的大力支持和帮助，郑州职业技术学院的程春杰老师在编写团队的组织方面做了大量工作，并提出许多宝贵的建议，在此一并表示衷心的感谢。同时，对本书参考文献的所有作者表示衷心的感谢。

由于编者水平有限，不当之处在所难免，恳请广大读者和专家批评指正。

编者

2009年1月

目 录

第一篇 基因工程技术

第一章 外源基因在大肠杆菌中的克隆与表达	2	实验五 质粒 DNA 和目的基因的酶切和连接	10
实验一 大肠杆菌的对照培养、单菌落的分离及菌种保存	2	实验六 琼脂糖凝胶电泳检测、回收目的基因	13
实验二 大肠杆菌基因组 DNA 的提取	3	实验七 感受态细胞的制备和重组子转化	14
实验三 PCR 扩增制备目的基因	5	实验八 转化克隆的筛选和鉴定	16
实验四 质粒 DNA 提取	8	实验九 外源基因的诱导表达	18

第二篇 生物大分子的分离纯化及活性检测

第二章 大肠杆菌中表达的外源蛋白的分离纯化与检测	21	实验七 碱性磷酸酶 (AP) 米氏常数 (K_m) 的测定	34
实验一 小量表达及细胞破碎	21	第三章 动物血中超氧化物歧化酶的提取、纯化与活性鉴定	38
实验二 表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析	23	实验一 原材料的预处理	38
实验三 包涵体的洗涤、溶解、复性	25	实验二 超氧化物歧化酶的活性测定	39
实验四 从包涵体中纯化表达蛋白	28	实验三 粗酶液的制备	41
实验五 固化 Ni^{2+} 吸收光谱纯化 his-tag 表达蛋白	30	实验四 金属螯合色谱分离纯化超氧化物歧化酶	42
实验六 Western blotting 免疫印迹检测表达蛋白	32	实验五 离子交换色谱纯化超氧化物歧化酶	43

第三篇 细胞工程及检测技术

第四章 鸡胚成纤维细胞培养技术	48	实验二 实验动物的处死与取血方法	68
实验一 实验器材的清洗	48	实验三 实验动物的免疫方法	70
实验二 实验器材的包装和消毒	50	实验四 抗血清的制备	72
实验三 培养用液的配制和无菌处理	51	实验五 双向琼脂扩散实验检测抗体效价	73
实验四 鸡胚成纤维细胞的原代细胞培养	54	实验六 间接 ELISA 法检测抗体	75
实验五 细胞克隆和纯化	57	第六章 植物原生质体的分离、融合与杂交细胞的筛选	78
实验六 细胞的传代培养	59	实验一 培养基母液的配制	78
实验七 细胞生长曲线的测定	60	实验二 培养基的配制与灭菌	80
实验八 细胞的冻存和复苏	61	实验三 愈伤组织的诱导与培养	83
实验九 动物细胞融合	63	实验四 原生质体的制备	84
第五章 卵清蛋白多克隆抗体的制备与检测	65	实验五 原生质体的活力测定	87
实验一 实验动物的抓取、固定和注射方法	65	实验六 原生质体的融合	88
		实验七 杂交细胞的筛选	90

第四篇 发酵工程与酶工程

第七章 谷氨酸发酵生产技术	94	实验八 总还原糖含量的测定	125
实验一 谷氨酸菌种的制备	94	实验九 α -氨基氮含量的测定	127
实验二 噬菌体的检测	95	实验十 酸度和 pH 的测定	129
实验三 大肠杆菌谷氨酸脱羧酶酶粉的 制备	96	实验十一 酒精度的测定及原麦芽汁浓度 的计算	131
实验四 发酵过程中还原糖的测定	97	实验十二 色度和苦味物质含量的测定	135
实验五 发酵过程中谷氨酸含量的测定	99	实验十三 二氧化碳含量的测定	137
实验六 谷氨酸发酵液的除菌体	101	第九章 淀粉酶的发酵生产	139
实验七 谷氨酸的离子交换回收	102	实验一 淀粉酶产生菌的分离、筛选与 鉴定	139
实验八 谷氨酸的等电回收及精制	103	实验二 发酵条件优化及酶学性质研究	143
实验九 谷氨酸钠质量控制及分析	106	实验三 淀粉酶产生菌的改良	146
第八章 实验室啤酒发酵技术	108	实验四 淀粉酶的发酵生产	148
实验一 啤酒酵母的纯种分离	108	实验五 淀粉酶活力的测定	150
实验二 啤酒酵母的计数	110	实验六 盐析处理和透析	152
实验三 啤酒酵母的质量检查	111	实验七 离子交换剂的色谱处理	154
实验四 啤酒酵母的扩大培养	115	实验八 浓缩和冷冻干燥	155
实验五 麦芽汁的制备	116	实验九 淀粉酶的包埋处理及热稳定性 测定	157
实验六 麦芽汁糖度的测定	120		
实验七 啤酒主发酵	123		
参考文献	160		

第一篇 基因工程技术

第一章 外源基因在大肠杆菌中的克隆与表达

实验一 大肠杆菌的对照培养、单菌落的分离及菌种保存

实验二 大肠杆菌基因组 DNA 的提取

实验三 PCR 扩增制备目的基因

实验四 质粒 DNA 提取

实验五 质粒 DNA 和目的基因的酶切和连接

实验六 琼脂糖凝胶电泳检测、回收目的基因

实验七 感受态细胞的制备和重组子转化

实验八 转化克隆的筛选和鉴定

实验九 外源基因的诱导表达

第一章 外源基因在大肠杆菌中的克隆与表达

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 是一种杆状细菌，其染色体呈环状，约 4.6×10^6 个碱基对，含有 4288 个基因。大肠杆菌对生长条件要求不高，在仅含葡萄糖等碳水化合物（提供碳源和能量）的培养基中就能生长，是分子遗传学实验、基因工程操作中广泛采用的一种受体菌，它的遗传背景研究得比较详细，常用做寄主进行基因扩增及外源基因的表达。基因工程操作的基本过程包括限制性内切酶酶切、目的基因与载体连接、重组质粒的转化和扩增及重组子的筛选等。

实验一 大肠杆菌的对照培养、单菌落的分离及菌种保存

一、实验目的

掌握大肠杆菌的对照培养、单菌落的分离及菌种保存方法。

二、实验原理

大肠杆菌是一种杆状细菌，其染色体呈环状，约 4.6×10^6 个碱基对。除本身的核染色体外，往往还含有质粒 (plasmid) DNA，这是一种双链闭合环状的 DNA 分子，大小在 1~200kb 左右。通常质粒 DNA 带有利于细菌在某一特定环境下生存的酶的基因，而使寄主菌具有以下一些表现型：①对抗生素的抗性；②产生抗生素；③降解有机复合物；④产生大肠杆菌素；⑤产生内毒素；⑥产生限制修饰酶。

pUC19 质粒上带有一个与大肠杆菌抗氨苄青霉素 (ampicillin) 有关的基因 (*amp^r*)，它能编码一种 β -内酰胺酶，这种酶降解氨苄青霉素，从而消除了氨苄青霉素对细胞壁形成的抑制作用，含这种质粒的细菌能在含氨苄青霉素的培养基上存活，不含该质粒的细菌则不能存活。

三、实验材料、试剂及器材

1. 材料与试剂：*E. coli* InvaF'、*E. coli* InvaF' (pUC19)、琼脂、酵母抽提物、胰蛋白胨、NaCl、氨苄青霉素 (Amp)、NaOH 等。

2. 器材：超净工作台、恒温培养箱、高压灭菌锅、恒温水浴锅、微波炉及各种培养器皿等。

四、实验步骤

1. 配制培养基

① LB 培养基：胰蛋白胨 10g/L、酵母抽提物 5g/L、NaCl 10g/L、1mol/L NaOH 1mL，加蒸馏水定容至 1000mL，调节 pH 值至 7.0。

② 固体培养基 (750mL)：在上述 LB 液体培养基中，按 15g/L 加入琼脂，加热至充分熔化，即成固体培养基。

③ 50%的丙三醇：取 50mL 丙三醇，加入 50mL 去离子水 (dd H₂O) 至 100mL。

将上述培养基和丙三醇溶液高温蒸汽消毒处理。

2. 倒平板：将固体培养基加热至充分熔化，待温度降至 50℃ 以下凝固前，加入 Amp 至

100 μ g/mL 摇动混匀，每平皿倒入 25mL 左右，此过程应进行无菌操作。另倒一不含 Amp 的 LB 平板。

3. 待培养基凝固以后，用接种环（灼烧消毒后）分别接种各一环贮存菌种 *E. coli* InvaF' 和 *E. coli* InvaF' (pUC19) 于不含 Amp 的 LB 平板上和含 Amp 的 LB 平板上，划线方法如图 1-1 所示。

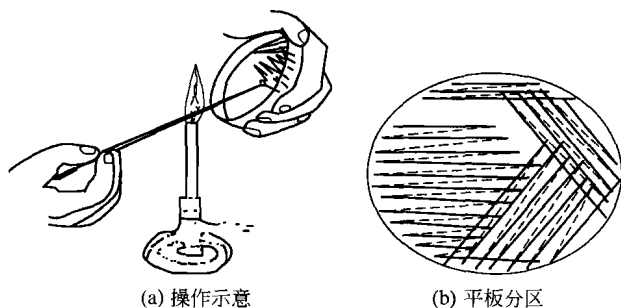


图 1-1 平板划线接种法

用接种环以无菌操作取菌种悬液一环，在平板培养基的一边做第一次平行划线，划 2~3 条。转动培养皿 70°，用烧过冷却的接种环，通过第一次划线部分，做第二次平行划线。用同样的方法通过第二次划线，做第三次划线。

划线接种要注意防止划破培养基，接种环要与平板表面约成 20~30°角。

4. 接种完成后将培养皿倒置入培养箱 37℃ 培养过夜，运用这种划线方法接种，可以较好地保证单菌落的形成。

5. 比较两菌系在培养基上的不同反应。挑取 *E. coli* InvaF' 和 *E. coli* InvaF' (pUC19) 的单菌落分别接种至含 Amp 和不含 Amp 的 5mL LB 液体培养基中，37℃ 振荡培养过夜。

6. 分别吸取 0.5mL 菌液在无菌条件下，加入 0.5mL 50% 丙三醇，置一灭菌的冻干管中，混匀至 -20℃ 保存。

五、实验结果

本实验可以得到理想的大肠杆菌单菌落（图 1-2），因而常用于生物技术实验中。

六、注意事项

1. 实验中所配制的培养基和丙三醇溶液一定要做高温蒸汽消毒处理。
2. 倒平板过程应进行无菌操作
3. 平板培养细菌一定要倒置培养。

七、思考题

1. 平板培养细菌为什么要倒置培养？
2. 细菌的继代繁殖为何要强调单菌落分离？
3. 在固体培养基中怎样加入抗生素？
4. 简述单菌落分离的接种过程。

实验二 大肠杆菌基因组 DNA 的提取

一、实验目的

1. 了解 DNA 提取的基本原理。

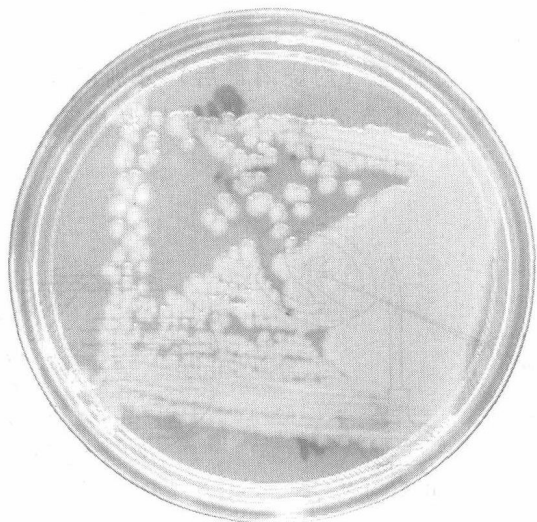


图 1-2 平板划线接种结果

2. 掌握大肠杆菌基因组 DNA 提取的基本方法。

二、实验原理

核酸是遗传信息的载体，是最重要的生物信息分子，在生物体内主要以核蛋白（脱氧核糖核蛋白和核糖核蛋白，即 DNP 和 RNP）的形式存在。

基因组 DNA 的提取通常用于构建基因组文库、Southern 杂交 [包括限制性核酸内切酶片段长度多态性 (RFLP)] 及 PCR 分离基因等。利用基因组 DNA 较长的特性，可以将其与细胞器 DNA 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。在提取过程中，染色体会发生机械断裂，产生大小不同的片段，因此分离基因组 DNA 时应尽量在温和的条件下操作，如尽量减少酚-氯仿抽提，混匀过程要轻缓，以保证得到较长的 DNA。一般来说，构建基因组文库，初始 DNA 长度必须在 100kb 以上，否则酶切后两边都带合适末端的有效片段很少。而进行 RFLP 和 PCR 分析，DNA 长度可短至 50kb，在该长度以上可保证酶切后产生 RFLP 片段 (20kb 以下)，并可保证包含 PCR 所扩增的片段（一般 2kb 以下）。

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，DNA 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。

本实验以大肠杆菌培养物为材料，用蛋白酶 K 消化溶解于饱和溶液中的细菌，以除去蛋白质。通过用溴化十六烷三甲基铵选择性沉淀以去除细胞壁碎片、多糖和残余蛋白。产生的上清液经异丙醇沉淀，获取相对分子质量高的 DNA。

三、实验材料、试剂及器材

1. 材料与试剂：大肠杆菌培养物、溴化十六烷三甲基铵-氯化钠溶液 (CTAB/NaCl 溶液：10% CTAB, 0.7mol/L NaCl)、氯仿-异戊醇 (24 : 1)、异丙醇、70% 乙醇、酚-氯仿-

异戊醇 (25 : 24 : 1)、TE 缓冲液 [10mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 1mmol/L EDTA]、10% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、蛋白酶 K (20mg/mL 或粉剂)、5mol/L NaCl。

2. 器材: 移液管、高速冷冻离心机、台式离心机、水浴锅。

四、实验步骤

1. 将 5mL 培养液和所需要的细菌一起孵育。在与该株细菌相应的条件下 (即相应的培养液、药物选择、温度) 培养, 直到达到饱和。

2. 离心 2min, 直至形成结实的小团球, 弃去上清液。

3. 加 567 μ L TE 缓冲液, 用吸量管反复吹打以重新混悬离心团球。加入 30 μ L 10% 的 SDS 和 3 μ L 20mg/mL 蛋白酶 K, 使其终浓度分别为 0.5% 和 100 μ g/mL。

4. 加入 100 μ L 5mol/L NaCl, 充分混匀。然后加入 80 μ L 的 CTAB-NaCl 溶液, 充分混匀, 65℃ 下孵育 10min。

5. 加入等体积的氯仿-异戊醇 (0.7~0.8mL), 充分混匀, 离心 4~5min。将黏稠的上清液移入新的离心管, 留下交界面。上清液中加入等体积的酚-氯仿-异戊醇, 充分抽提, 离心 5min。

6. 将上清液转入新的试管, 加入等体积的异丙醇以沉淀核酸。将试管来回振摇直至可出现明显的白色纤维状 DNA 沉淀。将一根细的吸量管的末端加热封口, 然后在煤气灯火焰上弯成钩状, 用末端的钩将 DNA 沉淀转移到新的装有 70% 乙醇的试管里。也可以在室温下简短离心, 以收集沉淀物。

7. 用 70% 乙醇洗涤 DNA, 以去除残余的 CTAB, 然后在室温下再离心沉淀 DNA。小心去除上清液, 在冻干机中短暂干燥离心物。

8. 将离心物质重新溶解在 100 μ L 的 TE 缓冲液中。

五、实验结果

100mL 的原始培养液 ($10^8 \sim 10^9$ 个细胞/mL) 可产生 0.5~2mg 的 DNA。

六、注意事项

1. 上述步骤 1 中的培养时间可能需要几小时到几天, 这要取决于细菌生长速度。

2. 在上述步骤 6 中没有必要加盐, 因为 NaCl 的浓度已经很高。

3. 步骤中的 4~8 可以适用于细菌染色体 DNA 制备物中多糖和其他大分子污染物的去除。将 DNA 溶液中的 NaCl 浓度调到 0.7mol/L; 加入 0.1 体积的 CTAB/NaCl 溶液; CTAB 抽提步骤 5 可以重复几次, 直至交界面消失为止。这些措施将更有利于基因组 DNA 制备物中多糖的去除。

4. 由于蛋白酶 K 不稳定, 每次使用时必须新鲜加入。

七、思考题

1. 结合自身实验操作的体会, 谈谈在提取的过程中如何避免 DNA 分子的降解和断裂?
2. 试查阅相关文献, DNA 的提取还有没有其他的方法? 其原理是什么?

实验三 PCR 扩增制备目的基因

一、实验目的

1. 了解多聚合酶链反应 DNA 扩增技术的基本原理和实验应用。
2. 掌握 PCR 反应基本技术。

二、实验原理

聚合酶链反应 (polymerase chain reactron, PCR) 为体外基因扩增方法, 是 20 世纪 80 年代中期由 Mullis 发明的一种新的分子生物学技术。它能在实验室的试管内, 将所要研究的一个目的基因或某一 DNA 片段, 在数小时内扩增百万倍乃至千万倍, 使研究人员能够观察和判断该基因或 DNA 片段的存在。若配合适当的限制性内切酶, 可以直接分析该基因的结构。只要一根毛发、一个精子、一滴血的 DNA, 即使经甲醛固定或石蜡包埋的组织, 甚至被冷冻数万年的组织, 都可用于基因结构的分析。这项技术已广泛地应用于分子生物学各个领域, 它不仅可用于基因分离克隆和核酸序列分析, 还可用于突变体和重组体的构建、基因表达调控的研究、基因多态性的分析、遗传病和传染病诊断、肿瘤机制探查、法医鉴定等方面。

PCR 技术具有操作简便、省时、灵敏度高、特异性强和对原始材料质量要求低等优点, 但由于所用的 *Taq* DNA 聚合酶缺乏 5'-3' 核酶外切酶活性, 不能纠正反应中发生的错误核苷酸掺入, 估计每 9000 个核苷酸会导致一个掺入错误, 不过错误掺入的碱基有终止链延伸的作用倾向, 使得错误不会扩大。

本实验是将待扩增的 DNA 模板加热变性, 与其两侧互补的寡聚核苷酸引物复性, 然后经过耐热的 DNA 聚合酶延伸。再进入下一轮变性-复性(退火)-延伸的循环, n 次循环后 DNA 可被扩增 $(1+X)^n$ 倍。如图 1-3 所示。

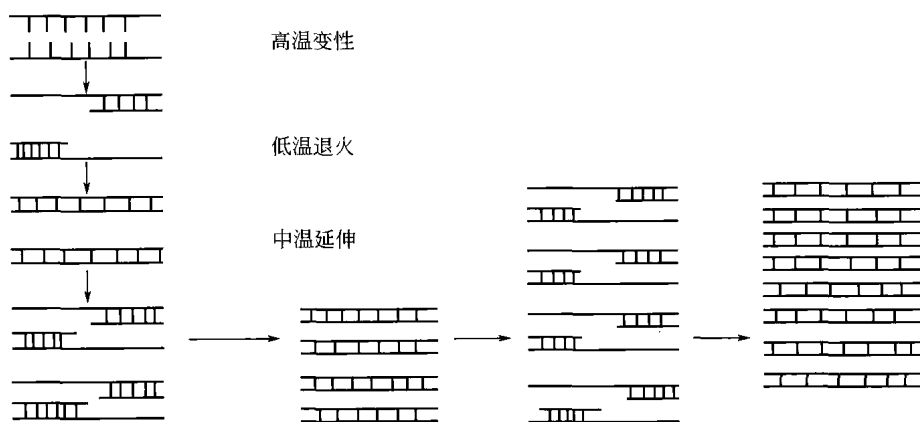


图 1-3 基因扩增示意图

三、实验材料、试剂及器材

1. 材料与试剂: DNA 模板 (哺乳动物基因组 DNA 为 $0.1\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 质粒 DNA 为 $0.1\text{ng}/\mu\text{L}$)、 $5\text{U}/\mu\text{L}$ *Taq* DNA 聚合酶、 $10\times$ PCR 缓冲液 (不含 MgCl_2)、 25mmol/L MgCl_2 、4 种 dNTP 混合液 (每种均为 2.5mmol/L)、矿物油、去离子水 ($\text{dd H}_2\text{O}$)。

2. 器材: 旋涡混合器、微量移液取样器、移液器吸头、 0.2mL PCR 微量离心管、双面微量离心管架、PCR 仪、台式离心机、琼脂糖凝胶电泳系统、水漂、恒温水浴。

四、实验步骤

1. 在 0.2mL PCR 微量离心管中配制反应体系。

dd H_2O	$30\mu\text{L}$
$10\times$ PCR 缓冲液 (不含 MgCl_2)	$10\mu\text{L}$
25mmol/L MgCl_2	$6\mu\text{L}$
4 种 dNTP 混合物	$8\mu\text{L}$ (每种均为 2.5mmol/L)