

高等农林院校实验实训教材
国家园艺实验教学示范中心资助



YUANYI ZHIWU SHENGWU JISHU
SHIYAN ZHIDAO

园艺植物生物技术 实验指导

王晓峰 李 征 主编

西北农林科技大学出版社

高等农林院校实验实训教材
国家园艺实验教学示范中心资助

YUANYI ZHIWU SHENGWU JISHU
SHIYAN ZHIDAO

园艺植物生物技术 实验指导

王晓峰 李 征 主编

参 编 陈儒钢 徐 炎
张军科 王淑芬

西北农林科技大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

园艺植物生物技术实验指导 / 王晓峰, 李征主编. —杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2017. 8

ISBN 978-7-5683-0335-4

I. ①园… II. ①王… ②李… III. ①园林植物—生物技术—实验—高等学校—教学参考资料 IV. ①S680.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 203436 号

园艺植物生物技术实验指导

王晓峰 李 征 主编

出版发行	西北农林科技大学出版社	
地 址	陕西杨凌杨武路 3 号	邮 编: 712100
电 话	总编室: 029-87093105	发行部: 87093302
电子邮箱	press0809@163.com	
印 刷	北京京华虎彩印刷有限公司	
版 次	2017 年 9 月第 1 版	
印 次	2017 年 9 月第 1 次	
开 本	787 mm×1092 mm 1/16	
印 张	8	
字 数	182 千字	

ISBN 978-7-5683-0335-4

定价: 23.00 元

本书如有印装质量问题, 请与本社联系

前言

Preface

生命科学是 21 世纪的五大领军学科之一,生命科学的核心动力源于生物技术在上世纪末和 21 世纪初的突破性进展。园艺学植根于生命科学的基础之上,园艺生物技术也将成为园艺学新的突破点和发展前沿。

《园艺植物生物技术》是园艺专业的一门核心课程,该课程新知识多、学习难度大、实践性强,实验课对于理论课程的学习和知识的掌握至关重要。学生的生物技术知识和实验技能是学生学业水平和发展潜力的重要指标,也对其他课程的学习、实践及毕业论文的撰写具有基础性的作用。

近年来,本科毕业生的考研比例相对较大,更有部分的本科生和青年教师出国深造。但无论在国内还是在海外从事科学研究,生物技术实验技能已然成为绝大多数深造者的必备技能,基于这种考虑,我们组织相关专业课程教师编写了《园艺植物生物技术实验指导》一书。本书针对本科生和研究生在学习和科研中所遇到的问题给出了专业的指导,将前沿分子实验和园艺分子生物学基础知识紧密结合在一起,且更注重实验系统的完整性和实验过程的针对性。希望这本小册子能成为一本服务于园艺学、生物技术等相关专业的学生以及科研工作者的实用性实验工具书。

本书由多名从事园艺植物分子生物学教学并具有多年国内和国外实验室工作经验的教师共同编写。各个编写组成员以自己的科研和实验经验作为支撑,依据自己的实验特长并综合多种参考资料编写了相应章节。在本书 36 个章节中,为避免与细胞生物学和组织培养课程实验相重复,没有安排细胞生物学和组织培养有关的实验。

本教材的编写得到了园艺学院的大力支持,也离不开园艺实验中心的支持和帮助,在此表示十分的感谢。编写组教师克服困难,加班加点完成各自的编写任务,在此表示衷心的感谢!由于时间仓促,错误及不当之处在所难免,敬请读者批评指正。

王晓峰

2017.9

目录

CONTENTS

实验一	植物基因组 DNA 的提取	(1)
实验二	大肠杆菌质粒 DNA 小量提取	(4)
实验三	DNA 纯度、浓度与相对分子质量测定	(7)
实验四	DNA 琼脂糖凝胶电泳	(10)
实验五	DNA 的体外酶切与连接	(13)
实验六	PCR 技术扩增 DNA 片段	(16)
实验七	DNA 片段的回收与纯化	(19)
实验八	PCR 产物的 TA 克隆	(21)
实验九	大肠杆菌感受态细胞的制备	(23)
实验十	重组 DNA 的转化	(25)
实验十一	PCR 法快速鉴定重组载体	(27)
实验十二	限制性内切酶酶切鉴定重组载体	(29)
实验十三	外源基因在大肠杆菌中的表达与检测	(31)
实验十四	植物分子标记技术	(34)
实验十五	变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染检测技术	(36)
实验十六	植物组织总 RNA 的提取	(39)
实验十七	植物总 RNA 的 cDNA 合成	(43)
实验十八	反转录 PCR(RT-PCR) 扩增基因特异片段	(46)
实验十九	RACE 技术扩增基因全长 cDNA	(49)
实验二十	植物基因表达水平定量检测	(55)
实验二十一	农杆菌感受态细胞的制备和重组 DNA 的转化	(61)
实验二十二	农杆菌侵染烟草的瞬时表达技术	(64)
实验二十三	农杆菌介导转化法——叶盘法	(66)
实验二十四	农杆菌介导转化法——拟南芥蘸花法	(68)
实验二十五	转化植株的 PCR 鉴定	(70)
实验二十六	Southern 印迹杂交	(72)
实验二十七	Northern 印迹杂交	(75)

实验二十八	Western 印记杂交	(79)
实验二十九	荧光原位杂交(FISH)技术	(82)
实验三十	植物组织或器官总蛋白质的提取	(86)
实验三十一	蛋白质的双向电泳技术	(89)
实验三十二	酵母单杂交技术分析 DNA-蛋白相互作用	(93)
实验三十三	酵母双杂交技术分析蛋白相互作用	(97)
实验三十四	生物信息学网站基础知识	(101)
实验三十五	核酸序列分析	(105)
实验三十六	蛋白质序列分析	(115)

实验一 植物基因组 DNA 的提取

——新鲜材料小量 CTAB 提取法

基因组 DNA 的提取通常用于 PCR 分离基因、构建基因组文库、Southern 杂交等。不同生物的基因组 DNA 的提取方法有所不同;同时后续不同的实验对 DNA 的质量(纯度、片段平均长度、完整性、细胞质 DNA 混杂程度等)也有不同要求。本节实验中采用 CTAB 法进行小量 DNA 的提取,主要针对后续的 PCR 反应要求。

本实验以蔬菜、果树、花卉等植物为材料,学习提取基因组 DNA 的一般方法。

一、实验目的和要求

(一)目的

1. 掌握植物提取基因组 DNA 的原理。
2. 学习植物提取基因组 DNA 的方法。

(二)要求

1. 材料准备分 4~6 组进行,每组 5~8 人,提取过程独立进行,每人提取 2 份(管)。
2. 在 3 h 内完成,提取产物进行编号,统一收集并保存。

二、实验原理

植物 DNA 被细胞膜和细胞核膜等多种生物膜结构包裹,在破碎细胞时加入去污剂十六烷基三甲基溴化铵(简称 CTAB)使核膜破裂、核蛋白与 DNA 链分离。再加入变性剂(氯仿/异戊醇)使蛋白质变性沉淀析出,DNA 被抽提。最后加入无水乙醇或异丙醇使 DNA 沉淀,与液相中多糖等杂质分离。

CTAB 是一种去污剂,可与核酸形成复合物,能溶于高盐溶液中,当盐浓度降低时沉淀。高速离心可以将 CTAB-核酸复合物同蛋白质、多糖类物质分离。用高盐溶液溶解 CTAB-核酸复合物,用无水乙醇沉淀核酸,CTAB 溶解于乙醇中。

三、材料、仪器和试剂

(一)材料

果树、蔬菜或花卉的幼嫩叶片或枝条每人 1~3 片或 1~3 枝。

(二)仪器

移液器(1 000 μ L、200 μ L、20 μ L);台式高速离心机,2~4 台;水浴锅,2~4 台;陶瓷研钵,4~6 套;1.5 mL 离心管,每人 6~10 个;不锈钢药勺,4~6 个;剪刀,4~6 把;架盘天平,2~4 台;塑料离心管架(适用于 1.5 mL 离心管),4~6 个;不锈钢离心管架(适用于 1.5 mL

离心管),1~2个;通风橱,1~2个;涡旋混合仪,2~4个;标签纸,4~6张;保温壶,4~6个;不锈钢汤勺,4~6个;液氮罐30 L,1个。

(三)试剂

1. 所需的化学试剂

Tris-HCl;EDTA;PVP;NaCl;95%乙醇:1 L;无菌水:10 L; β -巯基乙醇:100 mL;氯仿:500 mL;异戊醇:500 mL;RnaseA:1支;液氮:30 L。

2. 母液准备

(1)1 mol/L Tris-HCl pH 8.0 缓冲液:1 L;

(2)500 mmol/L EDTA pH 8.0:500 mL。配制方法(100 mL):EDTA 18.61 g,灭菌双蒸水 80 mL 进行溶解,NaOH 调 pH 至 8.0,无双蒸水定容至 100 mL;

(3)6 mol/L NaCl:1L;

(4)10% PVP:500 mL。

3. 提取试剂准备

提取缓冲液:提取缓冲液中含 100 mmol/L Tris-HCl,20 mmol/L EDTA,1.5 mol/L NaCl,2% PVP,2% CTAB。

75% 乙醇;TE;RnaseA; β -巯基乙醇(置通风橱中);氯仿:异戊醇(体积比 24:1)(置通风橱中)。

四、实验步骤

1. 水浴锅设定温度为 65℃,将提取缓冲液放入其中预热。

2. 每小组从液氮罐中取液氮放入保温壶备用,并准备好汤勺、研钵、药勺备用。

3. 称取提取材料(每人约 0.4~0.5 g),用剪刀迅速剪成碎片放入研钵中。

4. 迅速加入液氮研磨成白色粉末(注意:研磨期间必须加入液氮 2~3 次,保持材料的冻结状态)。

5. 每人取 2 个离心管,每管迅速加入研磨后的材料约 0.1 g。

6. 每管加入提取缓冲液 600 μ L。

7. 在通风橱中加入 β -巯基乙醇 12 μ L(蔬菜植物材料可以省略)。

8. 颠倒离心管摇匀后 65℃水浴 30 min,期间轻柔混匀 2~3 次。

9. 取出离心管自然冷却至室温后,加 24:1 的氯仿:异戊醇 600 μ L,在涡旋混合仪上混匀 1 min。

10. 12 000 r/min 离心 10 min,轻柔取出离心管,注意不要晃动。此时离心管中会分为上下两相,下层为有机相,上层为水相,DNA 存在于水相中(非蔬菜植物材料时,抽取上清,然后重复步骤 9 和 10)。

11. 用移液器小心而缓慢地吸取上层上清液约 500 μ L(注意不要吸取浑浊中间层),加入 1 000 μ L 无水乙醇(或 500 μ L 异丙醇),-20℃静置 10 min。

12. 12 000 r/min 离心 10 min,小心倒去上清液,并保留絮状沉淀,然后用 70%的乙醇小心冲洗 2 次(如沉淀分散可重复本次离心步骤)。

13. 倒立离心管 1 min,再水平放置离心管至管内完全干燥且沉淀透明。

14. 每管加入 50 μL TE 和 1 μL RNase(1U/ μL)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 溶解 DNA 并过夜。

15. -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

五、结果与分析

植物基因组 DNA 分子应为线状分子,溶解后为透明溶液,沉淀时为透明至白色。因此,在 DNA 沉淀后应能看到白色沉淀;如果看不到白色沉淀,则说明提取失败。失败的主要原因可能有:加入无水乙醇后沉淀时间不够或用 75%乙醇漂洗时 DNA 沉淀随乙醇被弃去。

注意:提取的 DNA 的浓度、质量将在实验三、四中通过电泳进行定性、定量分析。

六、实验报告与作业

本实验不要求提交独立的实验报告,其结果将于实验四“DNA 琼脂糖凝胶电泳”中进行考察。学生应结合实验“DNA 琼脂糖凝胶电泳”的结果完成本部分的实验报告。

本节实验报告应包括:植物 DNA 提取的基本原理与方法,主要试剂及配制方法。针对实验四“DNA 琼脂糖凝胶电泳”中的结果,分析 DNA 提取过程中可能出现的问题及其与实验结果的关系,尝试寻找可能的解决办法。

实验二 大肠杆菌质粒 DNA 小量提取

——碱变性小量法

细菌质粒 DNA 是基因工程中的最常用的载体,因此提取细菌质粒 DNA 是基因工程中构建克隆载体、重组子筛选的常规操作,学习提取质粒 DNA 的方法和原理是生物技术课程的基本要求之一。

一、实验目的和要求

(一)目的

1. 学习提取细菌质粒 DNA 的原理。
2. 掌握提取细菌质粒 DNA 的方法。

(二)要求

1. 细菌菌液准备分 4~6 组进行,每组 5~8 人(分组可与基因组 DNA 提取实验相同),提取过程独立进行,每人提取 2 份(管)。
2. 在 3 h 内完成,提取产物本人编号,统一收集并保存。

二、实验原理

大肠杆菌细胞中,质粒是游离于细胞质中“裸露”的 DNA 分子。因此将质粒 DNA 与大肠杆菌基因组 DNA 分离是提取质粒的关键。利用细菌基因组 DNA 附着大量蛋白质的特点,在变性条件下蛋白质会结合 SDS 而与基因组 DNA 分子一同溶于水中。上述溶液在 K^+ 存在条件下会转变成不溶于水的 PDS(十二烷基磺酸钾),并可以通过离心与液相分离,而大量附着蛋白质的基因组 DNA 也会随之得到分离。液相溶液中的质粒 DNA 随即可以用乙醇或异丙醇沉淀获得。

三、材料、仪器和试剂

(一)材料

含有质粒并经 37°C , $200\sim 300\text{ r/min}$ 振荡过夜、悬浮培养的大肠杆菌培养液,每人取用 5 mL。

(二)仪器

移液器($1\ 000\ \mu\text{L}$; $200\ \mu\text{L}$);台式高速离心机,2~4 台;冰浴或冰盒,2~4 个;2.0 mL 离心管,每人 2 个;1.5 mL 离心管,每人 6~10 个;托盘天平,2~4 台;塑料 1.5 mL 离心管架,4~6 个;通风橱,1~2 个;涡旋混合仪,2~4 个;标签纸,4~6 张。

(三)试剂

1. 所需的化学试剂

葡萄糖; Tris-HCl; EDTA; NaOH; SDS; 异丙醇; 冰醋酸; 醋酸钾; 无水乙醇; 氯仿: 500 mL; 异戊醇: 500 mL; RNase A: 1 支; 无菌水: 10 L。

2. 母液准备

(1) 1 mol/L Tris-HCl pH 8.0 缓冲液: 1 L。

(2) 500 mmol/L EDTA pH 8.0: 500 mL。

(3) 1 mol/L 葡萄糖 100 mL。

(4) 2 mol/L NaOH 100 mL。

(5) 10% SDS 100 mL。

3. 提取试剂准备

① 溶液 I: 50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 10 mmol/L EDTA (pH 8.0)。

② 溶液 II: 溶液中含 0.2 mol/L NaOH, 1% SDS, 现配现用。

③ 溶液 III: 5 mol/L 乙酸钾 60 mL, 冰乙酸 11.5 mL, 水 28.5 mL, 定容至 100 mL。

75% 乙醇; TE; RNase A; 氯仿: 异戊醇 (体积比 24:1) (每班 1 份, 置通风橱中)。

四、实验步骤

1. 含有质粒的细菌接种于 LB 液体培养基中, 37℃, 200~300 r/min, 过夜, 悬浮振荡培养 (实验前 1 天开始)。

2. 将 2 mL 培养物倒入离心管中, 4℃, 5 000 r/min 离心 3~5 min, 弃培养液。

3. 加入 100 μ L 预冷的溶液 I (涡旋混合仪上剧烈振荡至完全悬浮无块状物), 室温下放置 5 min。

4. 加入 200 μ L 新配制的变性裂解溶液, 盖紧管口, 快速柔和颠倒离心管 6 次, 以混合内容物。应确保离心管的整个内表面均与溶液 II 接触, 时间不超过 5 min (长于 5 min 会引起质粒 DNA 碱变性, 使后续操作不能正常进行)。

5. 加入 150 μ L 用预冷的溶液 III, 盖紧管口, 柔和地颠倒混匀 6 次, 生成黏稠的细菌裂解物之后, 将管置于冰上 3~5 min。

6. 4℃, 12 000 r/min 离心 10 min, 小心吸取上清液转移到另一离心管中, 注意不要吸取沉淀。

7. 在通风橱中加入等体积的氯仿: 异戊醇溶液, 在涡旋混合仪上混匀 1 min。

8. 12 000 r/min 离心 5 min, 轻柔取出离心管, 不要晃动。此时离心管中会分为上下两相, 下层为有机相, 上层为水相, 质粒 DNA 存在于水相中。

9. 用移液器小心而缓慢地吸取上层上清液至一个新的离心管中, 注意不要吸取下层和浑浊中间层。

10. 加入 2 倍体积的无水乙醇 (或等体积的异丙醇), -20℃ 静置 10 min。

11. 4℃, 12 000 r/min 离心 10 min, 小心倒掉上清液, 保留沉淀。用 75% 的乙醇洗 2 次 (如沉淀分散可重复本次离心步骤)。

12. 倒立离心管 1 min, 使液体流尽, 再水平放置离心管至管内完全干燥且沉淀透明。
13. 每管加入 50 μL TE 和 1 μL RNase A (1 U/ μL), 4 $^{\circ}\text{C}$ 溶解 DNA 过夜。
14. -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

五、结果与分析

细菌质粒 DNA 分子应为环状分子, 沉淀时为透明至白色, 溶解后为透明溶液。因此, 本次实验中, 在 DNA 沉淀后应能看到白色沉淀; 如果看不到白色沉淀, 说明提取过程可能存在问题。造成问题的主要原因可能有: 加入无水乙醇后沉淀时间不够或用 75% 乙醇漂洗时 DNA 沉淀随乙醇被弃去。

六、实验报告与作业

本实验不要求提交独立的实验报告, 其结果于实验四“DNA 琼脂糖凝胶电泳”中进行考查。学生应结合实验四“DNA 琼脂糖凝胶电泳”的结果完成本部分的实验报告。

实验报告应包括: 质粒 DNA 提取的基本原理与方法, 主要试剂及配制方法。针对实验四“DNA 琼脂糖凝胶电泳”中的结果分析质粒 DNA 提取过程中可能出现的问题及其与实验结果的关系, 尝试寻找可能的解决办法。

实验三 DNA 纯度、浓度与相对分子质量测定

一、实验目的

通过测定提取到的染色体 DNA 及质粒 DNA 的纯度、浓度和分子量,为进一步选择酶切、连接及转化的条件提供依据。通过本实验掌握 DNA 纯度、浓度和相对分子质量的测定原理和方法。

二、实验原理

通常采用下面两种方法:紫外分光光度计法和琼脂糖凝胶电泳法。

紫外分光光度计法的基本原理是:DNA 或 RNA 链上碱基的嘌呤环和嘧啶环结构具有吸收紫外光的性质,其 260 nm 处有最大吸收峰。单链核酸由于碱基暴露,所以其吸光度较双链高。在一定浓度范围内,DNA 或 RNA 的光密度 OD_{260} 与其含量成正比。

根据计算可知在 260 nm 波长下,每毫升 1 μg DNA 钠盐溶液的 OD 值为 0.02,即在 $OD_{260}=1$ 时,双链 DNA 含量为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$;单链 DNA 与 RNA 含量为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。根据以下公式计算 DNA 的浓度:

$$\text{DNA 浓度}(\text{ng}/\mu\text{L}) = \text{稀释倍数} \times OD_{260} \times 50$$

式中“50”为 DNA 在 $OD_{260}=1$ 时的浓度。

注: OD_{260} 值应在 0~1 之间,以在 0.5 左右为好。

当 DNA 样品中含有蛋白质、酚或其他小分子污染物时,会影响 DNA 吸光度的准确测定。一般情况下,同时检测同一样品的 OD_{260} 、 OD_{280} (280 nm 是蛋白质的吸收峰值)和 OD_{230} (230 nm 是酚类等杂质的吸收峰值),可通过计算其比值来衡量样品的纯度。

经验值:纯 DNA 的 $OD_{260}/OD_{280} \approx 1.8$,若大于 1.9,表明有 RNA 污染或 DNA 降解;小于 1.6,表明 DNA 纯度低,有蛋白质或酚类杂质污染。

纯 RNA: $1.8 < OD_{260}/OD_{280} < 2.0$ 。

第二种方法是琼脂糖凝胶电泳法,这也是实验室中最常规的检测方法。它简便易行,只需要少量 DNA。电泳后的琼脂糖凝胶直接在紫外灯下拍照,只需 5~10 ng DNA 就可以从照片上比较鉴别。若用肉眼观察,则可检测 0.05~0.1 μg 的 DNA。

在凝胶电泳中,DNA 分子的迁移速度与分子量的对数值成反比关系。质粒 DNA 样品用单一切点的酶酶切后,与已知分子量大小的标准 DNA 片段进行电泳对照,观察其迁移距离,就可以获知该样品分子量大小。凝胶电泳不仅可以分离不同分子量的 DNA,也可以鉴别分子量相同但构型不同的 DNA 分子。在抽提质粒 DNA 的过程中,由于各种因素的影响,使超螺旋的共价闭合环状结构的质粒 DNA(SC)的一条链断裂,变成开环状(OC)分子,如果两条链发生断裂,就变成线状(L)分子。这三种构型的分子有不同的迁移率。在一般情

况下,超螺旋(SC)迁移速度最快,其次为线状(L)分子,最慢的为开环状(OC)分子。

提取到的质粒 DNA 样品中,若还有染色体 DNA 或 RNA,也可以分别观察到电泳条带,由此可以分析样品的纯度。

DNA 分子在琼脂糖凝胶中泳动时,有电荷效应与分子筛效应。前者由分子所带净电荷量的多少而定,后者主要与分子大小及其构型有关。DNA 分子在高于其等电点的溶液中带负电荷,在电场中向正极移动。在用电泳法测定 DNA 分子大小时,应当尽量减少电荷效应。其中增加凝胶的浓度可以在一定程度上降低电荷效应,使分子的迁移速度主要由分子受凝胶阻滞差异的程度所决定,以此提高分辨率。同时适当减低电泳时的电压,也可以使分子筛效应相对增强从而提高分辨率。

三、材料、仪器和试剂

(一)材料

前述实验一提取的植物基因组 DNA 和实验二获得的细菌质粒 DNA 样品;PVP 手套。

(二)仪器

紫外分光光度计;低压水平电泳仪;水平电泳槽及附件;移液器(1 000 μL ;20 μL);微波炉或电炉;天平;紫外透射分析仪(或核酸凝胶成像系统)。

(三)试剂

1. 所需的化学试剂

溴化乙啶;琼脂糖;Tris-HCl;冰醋酸;EDTA;溴酚蓝;蔗糖;蒸馏水;标准 DNA 分子 Marker。

2. 母液准备

(1)溴化乙啶(10 mg/mL):称取 1 g 的溴化乙啶,溶于 100 mL 蒸馏水中,置于磁力搅拌器上搅拌数小时,或称取 10 mg 的溴化乙啶,置于 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL 蒸馏水涡旋混匀,并注意使溴化乙啶充分溶解。(注意:溴化乙啶有致癌风险,本操作由教师或实验员指导完成。)

(2)50 $\times$ TAE:羟基甲基氨基甲烷(Tris)242.0 g,冰乙酸 57.1 mL,0.5 mol/L EDTA- Na_2 (pH 8.0)100 mL,无双蒸水定容至 1 000 mL。

(3)6 $\times$ 上样缓冲液:含 0.25%溴酚蓝,40%(W/V)蔗糖水溶液。

四、操作步骤

(一)紫外分光光度计法

1. 取 10 μL 自提的 DNA 溶液,用 ddH₂O 稀释 10 倍(终体积:100 μL)。
 2. 以蒸馏水作参比,对仪器进行调零等调整后,测定 DNA 样品的 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 数值。
 3. 计算 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值,判定其纯度。
- 计算 DNA 样品的浓度:

$$\text{DNA 浓度}(\text{ng}/\mu\text{L}) = \text{稀释倍数} \times \text{OD}_{260} \times 50$$

(二) 琼脂糖凝胶电泳法

实验步骤见实验四。

五、结果与分析

对于提取的植物基因组 DNA 或者质粒 DNA, 使用分光光度计法获得相应吸光值和比值, 并分析 DNA 纯度。结合实验四“琼脂糖凝胶电泳”的实验结果, 分析两种方法的检测结果是否一致。

六、实验报告与作业

本实验不要求提交独立的实验报告, 其结果可与实验四“DNA 琼脂糖凝胶电泳”的结果一并考查。学生应结合实验四“DNA 琼脂糖凝胶电泳”的结果完成本部分的实验报告。

实验四 DNA 琼脂糖凝胶电泳

电泳是对核酸、蛋白质等大分子物质进行分离、鉴定、纯化的一种技术。核酸电泳是分子生物学的基本技术之一。用于核酸分离鉴定的电泳主要有琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、脉冲电场凝胶电泳等。一般常用琼脂糖凝胶电泳检验 DNA 质量。

一、实验目的和要求

(一)目的

1. 学习 DNA 琼脂糖凝胶电泳的原理。
2. 掌握 DNA 琼脂糖凝胶电泳的操作技术和结果的方法。

(二)要求

1. 电泳凝胶制备过程为演示实验, DNA 样品上样与结果观察为单人操作。
2. 本实验在 3 h 内完成。
3. 结合植物 DNA 提取、质粒 DNA 提取完成实验报告 1 份。

二、实验原理

在电场中,带电生物大分子会定向运动。带电分子的迁移速率与电场电压成正比,与电泳介质阻力成反比。需要分离、纯化、检测的对象不同,所用的电泳介质、电压也往往不同。用于核酸电泳的电泳介质有聚丙烯酰胺(PAGE)、琼脂糖,分别称为聚丙烯酰胺凝胶电泳和琼脂糖凝胶电泳。电泳介质的阻力主要取决于电泳介质的胶联孔径,主要受胶联时介质浓度的影响。

由于相同大小的生物大分子在电场中的迁移速率相同,不同的生物大分子迁移速率不同,从而可以区分不同的分子。

为了能够观察核酸分子,通常使用核酸染色剂。溴化乙啶(EB)是一种常用的核酸染色剂,这种染料嵌入到核酸分子的碱基之间后,会靠碱基堆集力稳定,而未嵌入的 EB 则可以通过漂洗除去。EB 在紫外激发光下可以发出荧光,因此可以看到核酸的位置。

三、材料、仪器和试剂

(一)材料

电泳 DNA 样品为实验一提取的植物基因组的 DNA 和实验二提取的质粒 DNA(每人每次的提取产物随机取 1 份,根据电泳结果进行评分)。

(二)仪器

低压水平电泳仪;水平电泳槽及附件;移液器(1 000 μ L、20 μ L);微波炉或电炉;天平;

紫外反射透射分析仪(或核酸凝胶成像系统),PVP 手套。

(三)试剂

1. 所需的化学试剂

溴化乙啶;琼脂糖;Tris-HCl;冰醋酸;EDTA;溴酚蓝;蔗糖;蒸馏水;标准 DNA 分子 Marker。

2. 母液准备

(1)溴化乙啶(10 mg/mL):称取 1 g 的溴化乙啶,溶于 100 mL 蒸馏水中,磁力搅拌器上搅拌数小时,或称取 10 mg 的溴化乙啶,置于 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL 蒸馏水涡旋混匀,并注意使溴化乙啶充分溶解。(注意:本操作由指导教师或实验员完成。)

(2)50×TAE:羟基甲基氨基甲烷(Tris)242.0 g,冰乙酸 57.1 mL,0.5 mol/L EDTA- Na_2 (pH 8.0)100 mL,用无菌双蒸水定容至 1 000 mL。

(3)6×上样缓冲液:含 0.25%溴酚蓝,40%(W/V)蔗糖水溶液。

四、操作步骤

1. 样品准备:取提取的植物基因组 DNA 或细菌质粒 DNA 3 μL ,加上样缓冲液 1.5 μL ,加水 4.5 μL ,混合均匀,并短时离心收集到离心管底部。上样缓冲液不仅能够提高样品的密度,使样品均匀沉到点样孔底,而且使样品带色,既便于上样,同时便于判断电泳时样品的位置。

2. 称取适量琼脂糖加入 1×TAE 电泳缓冲液,将琼脂糖悬浮液在微波炉中加热融化,配制所需浓度(植物基因组 DNA 为 0.8%的琼脂糖凝胶电泳,细菌质粒 DNA 为 1%的琼脂糖凝胶),冷却到 60℃,加入溴化乙啶(终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)充分混匀。

3. 用胶带将洗净干燥的制胶器两端封好,形成一个胶模。

4. 根据上样量的多少选择适当的梳子,在胶模中放置好梳子,使梳齿高于底板 1~2 mmol/L。

5. 倒入温热的琼脂糖溶液,使厚度大概为 3~5 mmol/L;若有气泡,则用吸管吸出气泡。

6. 放置 30 min 让胶完全凝固,除去制胶器两端的胶布,放进电泳槽中。

7. 加入电泳缓冲液,使液面高出胶表面 2~3 mmol/L(不要超过 1 cm)小心地拔出梳子,并用吸管吸出样品孔中的气泡,以免影响上样。

8. 向样品中加入上样缓冲液(按 10 μL 样品加 2 μL 上样缓冲液的比例加入),轻微振荡心混匀。

9. 用微量可调的移液器上样。注意:样品不一致时要更换枪头,或在阳极缓冲液中冲洗几次。

10. 盖上电泳槽盖,接通电源,按每 1 cm 电极间距加 3~5 V 电压进行恒压电泳,当溴酚蓝指示剂走到距离胶前缘约 1/4 处,切断电源,电泳过程完毕。

11. 电泳结果观察:将电泳完的凝胶放置到紫外光下观察,有条件的情况下进行拍照,分析 DNA 样品的浓度、纯度、提取质量。