

高等院校数字化融媒体特色教材  
动物科学类创新人才培养系列教材

# 动物分子生物学 实验指导

吴小锋 罗丽健 主编

Experiment Guidance of  
Animal Molecular Biology

附教学二维码  
17个实验操作指南  
12个实验录像  
3个实验动画  
8个实验技术资料



UNIVERSITY PRESS  
大学出版社

高等院校数字化融媒体特色教材  
动物科学类创新人才培养系列教材

# 动物分子生物学 实验指导

吴小锋 罗丽健 主编



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS  
浙江大学出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

动物分子生物学实验指导/吴小锋,罗丽健主编.  
—杭州:浙江大学出版社,2016.12  
ISBN 978-7-308-15878-7

I. ①动… II. ①吴… ②罗… III. ①动物学—分子生物学—实验—高等学校—教材 IV. ①Q95-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2016)第108674号

## 动物分子生物学实验指导

吴小锋 罗丽健 主编

---

丛书策划 阮海潮(ruanhc@zju.edu.cn)  
责任编辑 阮海潮  
责任校对 潘晶晶  
封面设计 续设计  
出版发行 浙江大学出版社  
(杭州市天目山路148号 邮政编码310007)  
(网址: <http://www.zjupress.com>)  
排 版 杭州中大图文设计有限公司  
印 刷 杭州杭新印务有限公司  
开 本 787mm×1092mm 1/16  
印 张 7.25  
字 数 154千  
版 次 2016年12月第1版 2016年12月第1次印刷  
书 号 ISBN 978-7-308-15878-7  
定 价 27.00元

---

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行中心联系方式:0571-88925591; <http://zjdxcs.tmall.com>

# 高等院校数字化融媒体特色教材 动物科学类创新人才培养系列教材 出版说明

调动学生学习的主动性、积极性、创造性,重视学生能力的培养是当今教学改革的主旋律。教材是实施教学的依据和手段。作为教材,不仅要传授最基本、最核心的理论知识,更重要的是应努力教给学生如何提高各种学习能力,包括自学能力(查阅文献资料能力)、科学思维能力(分析、综合、想象和创造能力)、动手能力(实验设计和基本操作能力)和表达能力(语言、文字、图表及整理统计能力)等。

为适应教学改革的需要和学科发展,《动物科学类创新人才培养系列教材》编委会组织一批学术水平高、实践经验丰富的专业教师,经过几年的教学实践和专题研究,编写了这套教材。

本系列教材紧跟动物科学、动物医学研究进展,围绕应用型专业培养目标,体现三基(基本方法、基本操作、基本技能)、五性(创新性、科学性、先进性、启发性、实用性)原则。编写时以整合创新、注重能力培养为导向,有所侧重、有所取舍地介绍了各门课程的最新发展成果。实验教材,结合科研实际详细叙述了有关实训项目的基本原理、操作方法、注意事项及思考题,高标准、严要求,为开展进展性、启发性个案教学服务,以培养学生的创新、探究能力。理论教材,以基本理论为基础,以问题为主线,力求将最新科研成果(如动物基因工程、胚胎移植、动物营养调控等)、教学经验编入其中,通过对问题的思索和讨论,启发学生的思维,激发学生的学习兴趣,加深对基本原理与知识点的理解,以拓展学生的视野,提高科研创新与实际应用的能力。注重建立以学生为主体、教师为主导的新型教学

关系,促进学生从记忆型、模仿型学习向思考型、创新型、探究型学习转变,为终身学习打下坚实的基础。

知识点呈现深入浅出,表达形式活泼。利用“互联网+”教育技术建设“立方书”教学平台,以嵌入二维码的纸质教材为载体,将教材、课堂、教学资源三者融合,实现线上线下结合的教学模式,读者只要用手机扫描“二维码”,就可以随时随地学习和查阅,做到边学习、边操作,给人以形象生动、易学易懂的直观感受。

首批 14 种教材,包括《动物遗传学》(英文版)、《动物病理学》、《蚕丝与蚕丝蛋白》、《茧丝加工学》、《生物材料学》、《水产动物养殖学》、《动物分子生物学实验指导》、《畜产品加工实验指导》、《动物解剖学实验指导》、《兽医寄生虫学实验指导》、《动物营养学实验指导》、《家畜组织学与胚胎学实验指导》、《兽医药理学实验指导》和《消化道微生物学实验指导》。

本套教材适合作为动物科学、动物医学、食品科学与工程、动物养殖、水产养殖、动物检验检疫、食品加工和贸易等专业的教材,也可作为科研人员实验指导书以及从业人员的继续教育教材。

在教材陆续出版之际,感谢为该套教材编写和出版付出辛勤劳动的教师和出版社的工作人员,并恳请读者和教材使用单位多提批评意见和建议,以便今后进一步修订完善。

**《动物科学类创新人才培养系列教材》编委会**

# 前 言

动物分子生物学实验课程的设立目的在于培养学生掌握与分子生物学相关的基本实验技术和技能,通过实验设计和操作,培养学生的实际动手操作能力以及发现、分析和解决问题的能力。

本指导书主要内容包括实验前基本训练、动物组织 DNA 和 RNA 的提取与定性定量分析、PCR 基因克隆技术、体外重组 DNA 技术、基因片段的纯化、体外连接、细菌转化、转化子的筛选、限制性内切酶分析以及重组蛋白质的表达和分析技术等。另外,实验内容还增加了胚胎原位杂交、用于基因表达分析的 Southern 印迹杂交技术和 Northern 印迹杂交技术以及蛋白质 Western 印迹杂交技术等。

本书可作为本科生(动物科学、动物医学方向)必修课程动物分子生物学的实验指导书,也可供从事动物分子生物学的教学、科研人员参考。

由于时间仓促,水平有限,本书难免有不妥之处,敬请读者提出宝贵意见。

# 目 录

实验前基本训练	/1
实验一 动物细胞基因组 DNA 的分离、定量和限制性内切酶消化	/7
实验二 动物组织总 RNA 抽提与定量	/15
实验三 聚合酶链式反应(PCR)体外扩增(克隆)DNA 片段	/20
实验四 DNA 酶切、片段回收、DNA 连接和转化(DNA 重组)	/32
实验五 大肠杆菌感受态细胞的制备及质粒 DNA 的转化	/42
实验六 重组质粒 DNA 的提取及插入酶切鉴定	/47
实验七 外源基因在大肠杆菌中的表达(或诱导表达)和检测	/58
实验八 胚胎原位杂交	/66
实验九 Southern 印迹杂交	/74
实验十 Northern 印迹杂交	/84
实验十一 Western 印迹杂交	/92
附录	
附录一 分子生物学常用试剂的配制	/99
附录二 核酸、蛋白质的各种换算	/105

# 实验前基本训练

## 一、实验室守则及基本要求

1. 穿着整洁,进入实验室必须穿专用实验服。
2. 实验室内严禁吃食物,不高声谈话及随便走动。
3. 实验前必须认真预习,熟悉实验内容,了解实验过程中需使用仪器的性能,了解相应的操作技术。实验中应严格按操作规程进行,认真操作,仔细观察,及时记录实验现象及结果。实验结束后,认真分析和总结实验结果,认真做好每一次的实验报告。
4. 实验器具应保持清洁,任何使用过的器具及玻璃器皿必须洗净后放回原处。使用贵重精密仪器时,应严格遵守操作规程。发生故障立即报告指导教师,不得擅自拆检。
5. 实验台面应随时保持整洁,仪器、药品摆放整齐。公用试剂用完后,应立即盖好放回原处。
6. 值日生制度:每次实验安排 3~4 人值日。其职责是负责实验器具的整理,做好操作台、水槽、地板等实验室卫生工作和一切服务性工作,并注意实验室水、电、门、窗等方面的安全工作。

## 二、注意事项

1. 实验前应做好试剂的配制、用品灭菌等准备工作。配制分子生物学实验各种试剂,必须使用重蒸水( $\text{ddH}_2\text{O}$ )。
2. 使用后的器皿必须认真清洗干净,洗完后还要用重蒸水冲洗 3 次。
3. 凡是可以进行灭菌的试剂与用具都必须经过高压蒸汽灭菌后使用,防止其他杂质或酶对 DNA、RNA 或蛋白质的降解。
4. 凡是操作所用的一切塑料器具(Eppendorf 管、吸嘴等),在使用前都应装入盒子和瓶子中灭菌,且装盒或装瓶过程中都应采用镊子,或戴上一次性手套进行操作,不能直接用手去拿,严防手上杂酶的污染。



### 三、微量移液枪基本操作要领

微量移液枪是分子生物学实验的必备工具,务必熟练操作。微量移液枪是连续可调的、计量和转移液体的专用仪器。其装有直接读数容量计,读数由三位拨号数字组成,在移液枪容量范围内能连续调节,从上(最大数)到下(最小数)读取(图 0-1)。微量移液枪的型号就是其最大容量值。按钮向下压以及放的动作、速度要缓慢平稳。

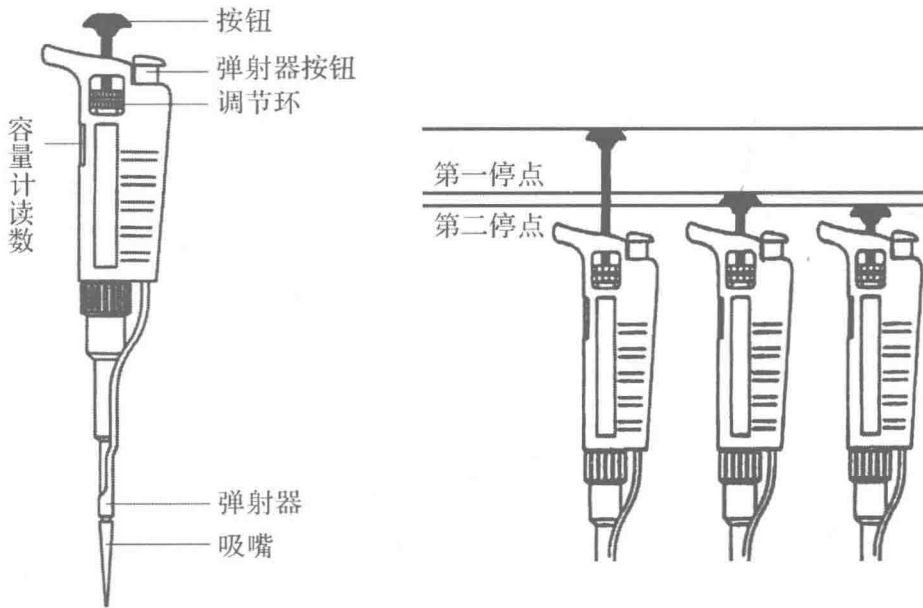


图 0-1 微量移液枪

微量移液枪基本操作要领如下：

1. 将微量移液枪按钮轻轻压至第一停点。
2. 垂直握持微量移液枪,使吸嘴浸入液面下几毫米。注意:千万别将吸嘴直接插到液体底部。
3. 缓慢、平稳地松开控制按钮,吸上样液;否则液体进入吸嘴太快,导致液体倒吸入移液枪内部,或吸入体积减小。
4. 等一秒钟后将吸嘴提离液面。
5. 平稳地把按钮压到第一停点,再把按钮压至第二停点以排出剩余液体。
6. 提起微量移液枪,使吸嘴在容器壁擦过。
7. 然后按吸嘴弹射器除去吸嘴。

注意事项：

1. 未装吸嘴(Tip 头)的微量移液枪绝对不可用来吸取任何液体。

2. 一定要在允许范围内设定容量,千万不要将读数的调节超出其适用的刻度范围,否则会造成损坏。

3. 不要横放吸嘴带有残余液体的移液枪。

4. 不要用大量程的移液枪移取小体积样品。

#### 四、离心机的使用

特别注意离心机使用中的平衡问题。应注意保持离心管放置位置的对称以及离心管中样品的平衡(图 0-2),并要拧紧盖好离心机内部的盖子,否则会损坏仪器。此外,应注意离心管在离心机内的放置方向。对于冷冻离心机,应注意及时将盖子盖上。

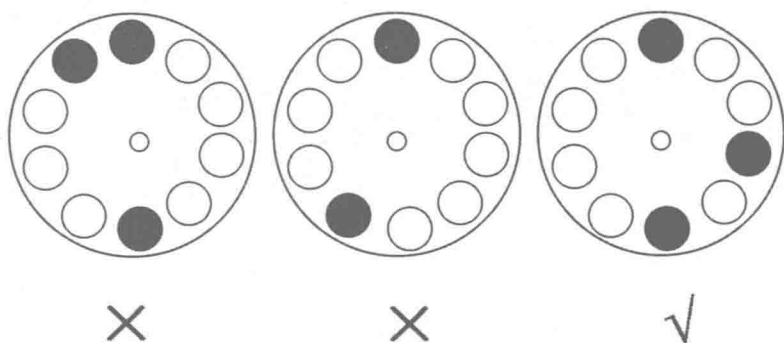


图 0-2 离心管放置位置的对称以及离心管中样品的平衡

#### 五、分子生物学实验需要特别注意的事项

1. DNA 染色剂[溴化乙锭(EB)染色剂]是剧毒有害物质。进行 DNA 染色时应戴上乳胶手套,避免用手直接接触。经过 EB 染色的琼脂糖凝胶不能随便丢弃,应放置在指定的垃圾回收箱中。

2. DNA 需要在紫外线下才能观察,应带特制的眼镜或隔开玻璃观察,避免紫外线灼伤皮肤。

3. 涉及 DNA 重组(如将目的基因克隆入质粒载体等)的实验,所有实验样品不能随便丢弃。学生带回观察的培养皿(如实验四,转化后蓝白斑观察)应及时交回,并放置在特定的垃圾箱内,经过高压灭菌才能作为垃圾丢弃。

## 六、熟悉用于分子生物学实验的常规仪器

用于分子生物学实验的常规仪器如图 0-3 至图 0-7 所示。



图 0-3 移液枪、金属恒温浴



图 0-4 台式离心机

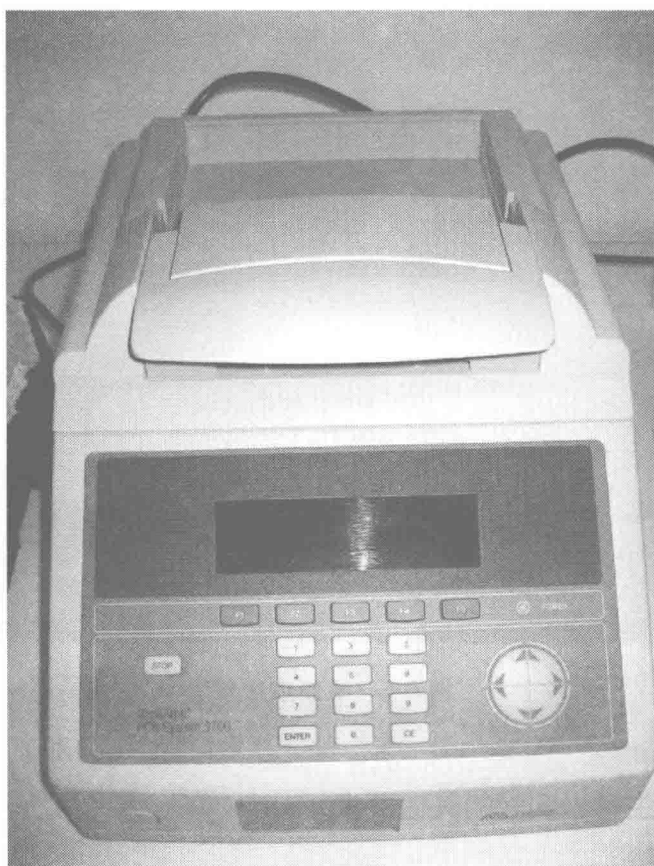


图 0-5 PCR 仪



图 0-6 电泳仪

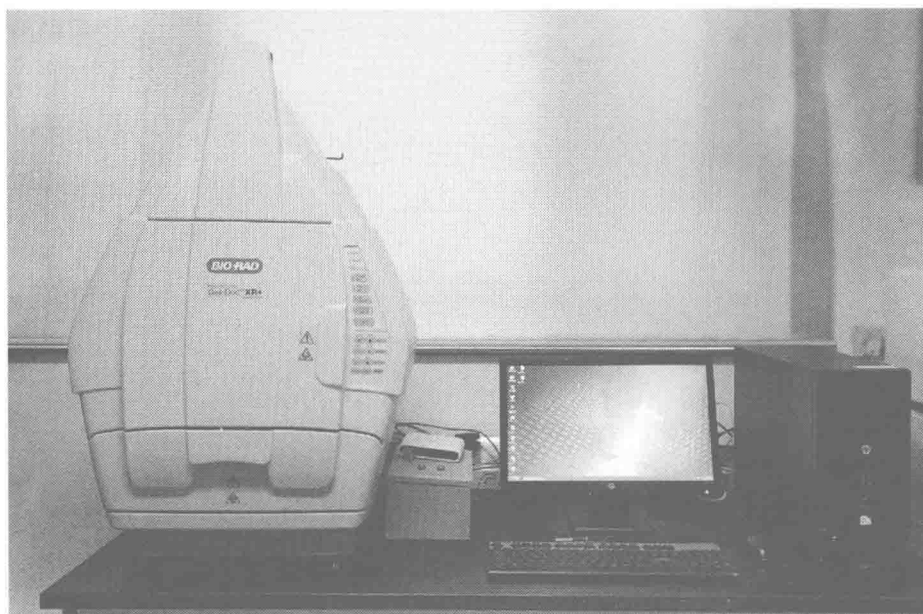


图 0-7 凝胶成像仪

## 七、动物分子生物学实验的其他要求

1. 每次实验务必参加, 缺席者扣除相应实验成绩。
2. 每位同学都必须亲自动手做实验, 全程参与, 不能委托他人或中途从其他同学那里取得样品。
3. 实验报告务必手写, 不能打印。“实验结果分析”、“实验心得体会”是重点, 每次实验报告必须附上结果图片。
4. 实验报告左上角注明“选课序号”(方便教师快速查到学生名单、记录成绩)。待完成全部实验后装订成册、上交。

# 实验一 动物细胞基因组 DNA 的分离、定量和限制性内切酶消化

实验前特别注意事项:酚、EB(溴化乙锭)等对人体有毒。在操作有毒试剂时必须戴上 PE 手套,小心操作,防止其进入人体。

## 一、实验目的

通过本实验学习和掌握:

- (1)动物基因组提取的原理和方法;
- (2)DNA 的琼脂糖凝胶电泳技术;
- (3)DNA 检测技术(定量、定性);
- (4)DNA 酶解(消化)技术。

## 二、实验原理

真核生物的一切有核细胞(包括培养细胞)都能用来制备基因组 DNA。真核生物的 DNA 是以染色体的形式存在于细胞核内的,如图 1-1 所示。因此,制备 DNA 的原则是既要 DNA 与蛋白质、脂类和糖类等分离,又要保持 DNA 分子的完整性。提取 DNA 的一般过程是,将分散好的组织细胞在含 SDS(十二烷基硫酸钠)和蛋白酶 K 的溶液中消化分解蛋白质,再用酚-氯仿-异戊醇抽提,分离、去除蛋白质,经乙醇沉淀使 DNA 从溶液中析出。

蛋白酶 K 的重要特性是能在 SDS 和 EDTA- $\text{Na}_2$ (乙二胺四乙酸二钠)存在下保持很高的活性。在匀浆后提取 DNA 的反应体系中,SDS 可破坏细胞膜、核膜,并使组织蛋白与 DNA 分离,EDTA 则抑制细胞中 DNase 的活性;而蛋白酶 K 可将蛋白质降解成小肽或氨基酸,使 DNA 分子完整地分离出来。

制备基因组 DNA 是研究基因结构和功能的重要步骤,如大相对分子质量 DNA 可用于构建基因文库或基因组 Southern 分析,通常要求片段的相对分子质量达到 100~200 kb。有效制备大分子 DNA 的方法都要考虑两个原则:①防止和抑制内源 DNase 对 DNA

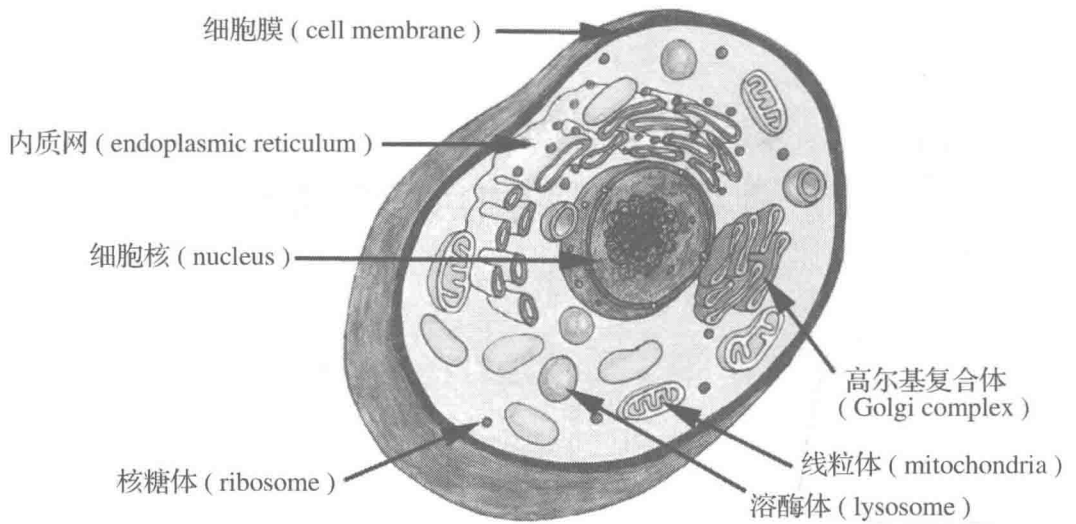


图 1-1 真核生物细胞示意图, DNA 位于细胞核内

的降解;②尽量减少对溶液中 DNA 的机械剪切破坏。要实现原则①,只需加入一定浓度的螯合剂,如 EDTA,因为几乎所有 DNase 都需要  $Mg^{2+}$  或  $Mn^{2+}$  为辅助因子。要实现原则②,则应在操作过程中尽量减弱溶液的涡旋,动作要轻柔,进行 DNA 溶液转移时使用大口吸管。

DNA 提取方法很多,本实验采用酚抽提法。其基本原理是超低温下粉碎组织和细胞,通过蛋白酶 K 和 SDS 消化,破碎细胞,再用酚-氯仿去除蛋白质。

### 三、实验器材

恒温水浴锅	台式离心机	紫外分光光度计	移液枪
玻璃匀浆器	离心管(灭菌)	吸头(灭菌)	

### 四、实验试剂

#### 1. 细胞裂解缓冲液:

- 100 mmol/L Tris (pH 8.0)
- 500 mmol/L EDTA (pH 8.0)
- 20 mmol/L NaCl
- 10% SDS
- 20  $\mu$ g/ml 胰 RNA 酶

2. 蛋白酶 K: 称取 20 mg 蛋白酶 K 溶于 1 ml 灭菌的双蒸水中,  $-20^{\circ}\text{C}$  储藏备用。

3. 酚-氯仿-异戊醇(25 : 24 : 1)。
4. 异丙醇、冷无水乙醇、70%乙醇、灭菌水。
5. TE 缓冲液(pH 8.0)配制方法如下(250 ml)：

成分	称取质量	终浓度
Tris( $M_r = 121.1$ )	0.30275 g	10 mmol/L
EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ( $M_r = 372.24$ )	0.093 g	1 mmol/L

用盐酸溶液调整 pH 值至 8.0。高压灭菌,室温储存。

6. 7.5 mol/L 乙酸铵溶液。

## 五、实验操作步骤

1. 取新鲜动物组织块 0.1 g(本次实验采用新鲜猪肝,由助教统一剪取、称量,放置称量纸上),放入 1.5 ml Eppendorf 管中,尽量剪碎,加入 50  $\mu\text{l}$  细胞裂解缓冲液,用匀浆棒匀浆至不见组织块,再加入 0.45 ml 细胞裂解缓冲液,混匀。(本步骤至为关键)

2. 样品管中加入蛋白酶 K(500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )20  $\mu\text{l}$ ,混匀。在 65  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴锅中水浴 30 min,于台式离心机中以 12000 r/min 离心 5 min。取上清液(大家统一用量为 400  $\mu\text{l}$ ),加入另一离心管中。

3. 加 2 倍体积异丙醇(800  $\mu\text{l}$ ),倒转混匀后,可以看见丝状物,用 100  $\mu\text{l}$  吸头挑出,晾干。也可离心沉淀下来,用 300  $\mu\text{l}$  TE 缓冲液重新溶解。

4. 加等量的酚-氯仿-异戊醇(300  $\mu\text{l}$ )振荡混匀,12000 r/min 离心 5 min。

5. 取上层溶液至另一管(图 1-2,注意不要吸取中间层),加入等体积的酚-氯仿-异戊醇(300  $\mu\text{l}$ ),振荡混匀,12000 r/min 离心 5 min。

6. 取上层溶液至另一管,加入 1/2 体积的 7.5 mol/L 乙酸铵(100  $\mu\text{l}$ ),加入 2 倍体积的无水乙醇(600  $\mu\text{l}$ ),混匀后室温沉淀 2 min(学生可用手机拍照),12000 r/min 离心 5 min。

7. 小心倒掉上清液,将离心管倒置于吸水纸上,将附于管壁的残余液滴除掉。

8. 用 1 ml 70%乙醇洗涤沉淀物 1 次,12000 r/min 离心 2 min。

9. 小心倒掉上清液,将离心管倒置于吸水纸上,将附于管壁的残余液滴除掉,室温干燥。

10. 加 50~200  $\mu\text{l}$  (大家统一用量为 60  $\mu\text{l}$ )TE 缓冲液重新溶解沉淀物,然后置于 4  $^{\circ}\text{C}$  或 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

11. 吸取适量样品,于紫外分光光度计上检测浓度和纯度。

12. 基因组限制性内切酶部分消化,酶切反应体系如表 1-1 所示。



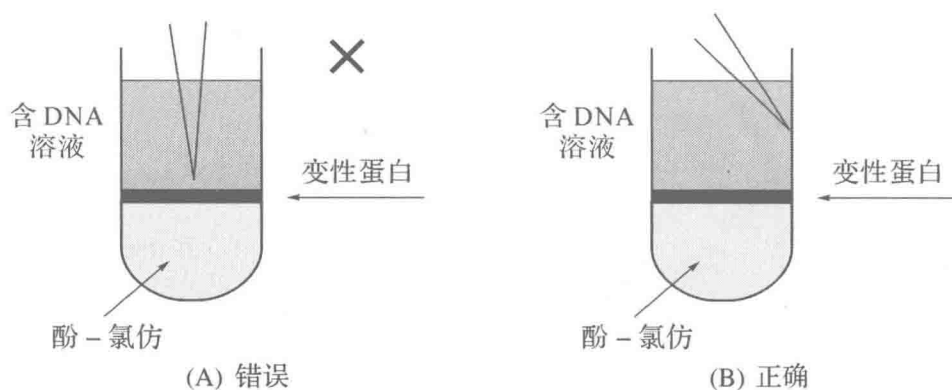


图 1-2 吸取 DNA 溶液的正确方法(B),不能竖直吸取 DNA 溶液,否则很容易吸到变性蛋白层(A)

表 1-1 酶切反应体系

成分	用量
Buffer(10×)	2.0 $\mu\text{l}$
<i>EcoR</i> I (10 U/ $\mu\text{l}$ )	1.0 $\mu\text{l}$
<i>Hind</i> III (10 U/ $\mu\text{l}$ )	1.0 $\mu\text{l}$
基因组	10.0 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	6.0 $\mu\text{l}$
总计	20.0 $\mu\text{l}$

上述反应液稍离心混匀,37℃酶切过夜(本次实验需2h)。之后凝胶电泳,紫外灯下观察消化情况。

水浴最好采用公司赠送的泡沫板,这样样品中反应体系的温度更接近水浴的温度,且温度更均匀。

### 13. 电泳检测:

DNA 电泳 1×TAE 缓冲液的配制方法如表 1-2 所示。(先配制 50×高浓度保存液)

表 1-2 50×保存液(50×Stock Solution)

成分	用量
Tris	121 g
醋酸	37 ml
EDTA	18.6 g
H <sub>2</sub> O	1.0 L

使用时 50 倍稀释。