



GAODENG XUEXIAO ZHUANYE JIAOCAI

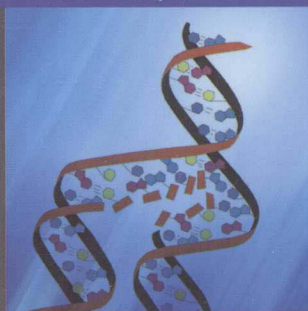
• 高等学校专业教材 •

[高校教材]

# 分子生物学与 基因工程实验教程

何华纲 朱姍颖 主编

AN EXPERIMENTAL COURSE FOR MOLECULAR  
BIOLOGY AND GENETIC ENGINEERING



高等学校专业教材

# 分子生物学与基因工程 实验教程

何华纲 朱姗颖 主编

 中国轻工业出版社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

分子生物学与基因工程实验教程/何华纲, 朱姗姗主编.  
—北京: 中国轻工业出版社, 2011. 8  
高等学校专业教材  
ISBN 978 - 7 - 5019 - 8293 - 6

I. ①分… II. ①何…②朱… 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 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 112141 号

责任编辑: 石悦  
策划编辑: 石悦 责任终审: 滕炎福 封面设计: 锋尚设计  
版式设计: 宋振全 责任校对: 杨琳 责任监印: 张可

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

印刷: 河北高碑店市德裕顺印刷有限责任公司

经销: 各地新华书店

版次: 2011 年 8 月第 1 版第 1 次印刷

开本: 787 × 1092 1/16 印张: 12.5

字数: 304 千字

书号: ISBN 978 - 7 - 5019 - 8293 - 6 定价: 23.00 元

邮购电话: 010 - 65241695 传真: 65128352

发行电话: 010 - 85119835 85119793 传真: 85113293

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: [club@chlip.com.cn](mailto:club@chlip.com.cn)

如发现图书残缺请直接与我社邮购联系调换

101094J1X101ZBW

# 《分子生物学与基因工程实验教程》编委会

**主 编** 何华纲 朱姍颖 (江苏大学)

**主 审** 王文兵 (江苏大学)

**编写人员** (按姓氏笔画为序)

陈全战 (南京晓庄学院)

别同德 (扬州农业科学研究院)

季更生 (江苏科技大学)

高安礼 (河南大学)

黄世全 (河南大学)

## 前 言

随着生命科学的发展，分子生物学与基因工程技术已在基础研究和生产实践上显示出重要的应用前景，尤其是在基因工程药物、转基因农作物等方面已创造了巨大的经济效益和社会效益。鉴于其重要性，“分子生物学”和“基因工程”被列为生物技术专业的主干课程，而掌握相关的实验技术则是运用和发展该学科的重要环节之一。为了落实高校培养专业技术人才和创新型人才的目标，编者结合多年教学和科研的经验，编写了这部实验教程。

本书共分为五篇 24 个实验：DNA 重组篇（实验一至实验七），主要涉及 DNA 重组技术；原核表达篇（实验八至实验十一），内容包括外源基因在大肠杆菌中的诱导表达与检测技术；植物转基因篇（实验十二至实验十九），介绍转基因植物的制作与检测技术；重组杆状病毒篇（实验二十至实验二十二），主要包括重组杆状病毒的构建与应用技术；开放性实验篇（实验二十三至实验二十四），介绍如何利用分子生物学技术鉴定微生物和利用分子标记技术分析人的遗传多样性。其中，DNA 重组篇侧重于基因操作基本技能的培养，其余各篇侧重于独立设计、综合运用能力的培养。书后还有四个附录，具有较强的参考价值和实用价值。

本书具有以下特色：

(1) 选材精当。围绕 DNA 重组技术及其在微生物、植物、动物（细胞）领域的应用，精心选择和设计了 24 个实验，基本囊括了常用的实验技术，可满足各院校的教学需求。

(2) 通俗易懂。注重背景知识的介绍和基本技术原理的阐述，力求清晰透彻，通俗易懂，并使用丰富的图片，辅助学生对各重点、难点的理解和掌握。

(3) 加强基本操作技能的培养。在实验步骤部分，以注意事项的形式，加强学生对实验原理、技术要点的掌握，并对实验安全予以高度重视。

(4) 加强设计能力和综合应用能力的培养。本教程所选的每个篇章都是一个小课题，带有较强的设计性，学生可根据自己设计的实验方案执行；每个篇章都包含若干实验，各实验相对独立，又前后关联，还原出科研的面貌，有利于培养学生的综合应用能力，激发学生的科研兴趣。

本书适合作为生物技术及相关专业本科学生的实验教材，也适合作为研究生的参考书籍。

本书由何华纲、朱姝颖共同主编，季更生、陈全战、别同德、高安礼、黄世全参与编

写了部分内容，由王文兵教授审阅。本书的出版得到中国轻工业出版社和江苏大学的大力支持，王勇教授、赵伟睿博士提供了宝贵的建设性意见，李云亮博士设计制作了部分图片，在此一并致谢。

由于编者水平有限，书中难免有不足之处，敬请广大读者指正。

编者  
2011年2月

# 目 录

<b>第一篇 DNA 重组篇</b> .....	1
实验一 溶液的配制与器材的准备 .....	1
实验二 质粒 DNA 的提取与检测 .....	10
实验三 PCR 技术扩增目的基因 .....	20
实验四 目的基因的回收与纯化 .....	29
实验五 目的基因与质粒 DNA 的酶切分析 .....	34
实验六 目的基因与质粒载体的连接和转化 .....	40
实验七 重组质粒的鉴定 .....	48
<b>第二篇 原核表达篇</b> .....	55
实验八 大肠杆菌表达载体的设计与构建 .....	55
实验九 重组蛋白的诱导表达与 SDS - PAGE 检测 .....	67
实验十 重组蛋白的分离纯化 .....	76
实验十一 重组蛋白的活性分析 .....	83
<b>第三篇 植物转基因篇</b> .....	88
实验十二 农杆菌介导法制作转基因植物 .....	88
实验十三 植物基因组 DNA 的提取与检测 .....	99
实验十四 植物总 RNA 的提取与检测 .....	105
实验十五 Southern 杂交检测外源基因的整合 .....	109
实验十六 Northern 杂交检测外源基因的转录 .....	119
实验十七 RT-PCR 技术检测外源基因的转录 .....	122
实验十八 报告基因表达产物 GUS 的检测 .....	128
实验十九 Western 杂交检测外源基因的翻译 .....	134
<b>第四篇 杆状病毒篇</b> .....	139
实验二十 重组杆状病毒的构建与制备 .....	139
实验二十一 重组杆状病毒介导的蛋白质亚细胞定位 .....	145
实验二十二 重组杆状病毒感染家蚕幼虫 .....	150
<b>第五篇 开放性实验篇</b> .....	154
实验二十三 利用分子生物学技术鉴定纤维素降解微生物 .....	154
实验二十四 利用 DNA 分子标记技术分析学生群体的遗传多样性 .....	162

附录..... 171

附录一 常用培养基、试剂和缓冲液的配制..... 171

附录二 核酸和蛋白质数据..... 180

附录三 本书所用大肠杆菌菌株..... 182

附录四 常用分子生物学软件的使用..... 183

参考文献..... 187

01 ..... 187

02 ..... 187

03 ..... 187

04 ..... 187

05 ..... 187

06 ..... 187

07 ..... 187

08 ..... 187

09 ..... 187

10 ..... 187

11 ..... 187

12 ..... 187

13 ..... 187

14 ..... 187

15 ..... 187

16 ..... 187

17 ..... 187

18 ..... 187

19 ..... 187

20 ..... 187

21 ..... 187

22 ..... 187

23 ..... 187

24 ..... 187

25 ..... 187

26 ..... 187

27 ..... 187

28 ..... 187

29 ..... 187

30 ..... 187

31 ..... 187

32 ..... 187

33 ..... 187

34 ..... 187

35 ..... 187

36 ..... 187

37 ..... 187

38 ..... 187

39 ..... 187

40 ..... 187

41 ..... 187

42 ..... 187

43 ..... 187

44 ..... 187

45 ..... 187

46 ..... 187

47 ..... 187

48 ..... 187

49 ..... 187

50 ..... 187



# 第一篇 DNA 重组篇

## 实验一 溶液的配制与器材的准备

### 一、实验目的

1. 认识常用器械与耗材。
2. 掌握微量移液器的使用方法。
3. 掌握常用溶液和培养基的配制方法。
4. 掌握高压蒸汽灭菌的方法，了解其他灭菌方法，树立无菌观念。

### 二、实验原理

#### 1. 溶液的配制、灭菌与保存

(1) 溶液浓度的表示 溶液的浓度常用质量浓度、物质的量浓度和体积分数表示。

质量浓度，是指单位体积的溶液中所含溶质的质量，常用“g/L”、“mg/L”、“mg/mL”、“ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ”等单位表示。如抗生素母液常以“mg/mL”作为浓度单位，DNA 或 RNA 常以“ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ”作为浓度单位。

物质的量浓度，是指每升溶液中所含溶质的物质的量，其单位用“mol/L”表示。如 0.5mol/L 乙二胺四乙酸（EDTA），它表示每升溶液中含有 0.5mol EDTA。

无论是质量浓度，还是物质的量浓度，在定义时都是以一定体积为基数的，因此在溶液的配制过程中，不能在称量好的溶质中直接加入足体积的溶剂，因为溶质溶解后也会占一定体积。比如，在配制 100mL 100g/L 十二烷基硫酸钠（SDS）溶液时，首先只加 80mL 纯净水，待 SDS 完全溶解后，再用水定容至 100mL。

体积分数，是用溶质体积占全部溶液体积的分数表示的浓度。当溶质本身为液体时，常用体积分数表示其浓度。如消毒用的 70% 乙醇，每 100mL 溶液中含有 70mL 无水乙醇。

配制一种溶液，究竟采用物质的量浓度、质量浓度，还是体积分数来表示，主要依据使用时的便利。

(2) 溶剂 总的来说，使用什么作为溶剂，以及随后如何调节 pH、如何灭菌处理等，必须在配制溶液前查阅相关实验手册。最权威、最全面、最常用的是美国冷泉港实验室所编著的《分子克隆实验指南》（Molecular Cloning: A Laboratory Manual），目前已有第三版的中译本。

溶液配制时，最常用的溶剂是各种级别的水。蒸馏水有两种。一种是一蒸水（单蒸水，也就是一般所说的蒸馏水），它的纯度与经过离子交换树脂处理得到的去离子水差不多。由于在实验室使用去离子水设备制备去离子水更方便，现在多用去离子水，主要用于器皿的冲洗、电泳缓冲液的配制和细菌培养基的配制等。另一种是双蒸水，由一蒸水再次

蒸馏得到，与超纯水的纯度差不多。超纯水是由结合有反渗透膜、离子交换、活性炭吸附等技术的纯水设备制备得到，几乎完全去除了水中的导电介质、不离解的胶体物质和有机物等，电阻率接近  $18.2\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 。由于在实验室使用纯水设备可以全自动地制备超纯水，现多用超纯水，主要应用于植物组织培养、动物细胞培养等对水质有更高要求的实验。

尽管各种级别的水是最常用的溶剂，但必须注意的是，对于某些有机成分，只能用相关的有机溶剂或酸、碱溶液来配制。例如，氯霉素母液需用无水乙醇配制，5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷 (X-Gal) 溶液需用 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 配制。因此，初次配制某种溶液时，最好先查阅溶质的溶解性数据和溶解方法。

(3) pH 的调节与定容 在分子生物学与基因工程的实验中，所用试剂（如电泳缓冲液、培养基等）往往应当具有一定的 pH，可以使用 pH 试纸测定，但需要更高精确度时，应使用 pH 计测定。在调节 pH 时，采用添加酸或碱的方法，但必须考虑溶液的成分，添加相应的酸或碱，尽量保证不引入杂离子，比如调节 Tris-HCl 缓冲液的 pH 时应使用浓盐酸，调节 EDTA 溶液的 pH 时应使用高浓度氢氧化钠 (NaOH) 溶液。

调节 pH 后，就可以对溶液进行定容。这里不是分析化学实验，没有必要用容量瓶来定容，只要用量筒就可以满足精度要求了。虽然三角瓶和烧杯也都带有刻度，但是往往很不精确，不可以用于定容。值得注意的是，定容是在最后完成，因此在前面的配制过程中，不能将溶剂直接添加到目的体积。

溶液经定容之后，应装于适当容量的试剂瓶中，贴上耐高温的标签纸，并用防水记号笔进行标记。在一张标签上，必须工整地书写以下内容：溶液名称、浓度、pH（必要时）、配制日期和配制人。

(4) 溶液的灭菌与保存 分子生物学与基因工程实验，一般都需要在无菌条件下进行，以避免杂菌的污染，或者避免 DNA 或 RNA 的降解，因此必须对配制的溶液进行无菌处理。溶液的无菌处理主要有两种：高压蒸汽灭菌和滤膜过滤。一般的溶液可以采用高压蒸汽灭菌，条件为  $121^\circ\text{C}$ （蒸汽压为  $0.1 \sim 0.15\text{MPa}$ ）保温 20min。但遇到以下情况时，必须采用滤膜过滤：①含有遇热易分解的成分；②含有易挥发的成分；③含有有机溶剂；④含有腐蚀性、刺激性强的成分。

例如，植物组织培养过程中的某些植物激素、细菌培养过程中各种抗生素，遇热很容易分解，配制后必须采用过滤除菌，而且必须在经灭菌的培养基冷却到  $50^\circ\text{C}$  以下，才能添加到培养基中。

经过必要的无菌处理后，常常将溶液放置在  $4^\circ\text{C}$  冰箱保存，这样就可以较长时间地保存溶液，而不受杂菌的污染。对于易失活的抗生素母液等，可分装后保存于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱。而高浓度的母液，如  $0.5\text{mol/L}$  EDTA (pH 8.0)、 $0.5\text{mol/L}$  Tris-HCl (pH 8.0)、 $50 \times$  TAE 电泳缓冲液等，可在室温下保存。在较低的温度条件下，含有 SDS 成分的溶液易发生絮凝，一般也在室温下保存。

## 2. 工作液与储存液

实验中使用的溶液可以分为工作液和储存液（母液）。工作液浓度较低，可以直接使用，但往往容易受到污染，不利于溶液的长期保存；而储存液的浓度往往比较高，不易受污染，可以长期保存。如实验室常用的 Tris-HCl (pH 8.0) 溶液和 EDTA (pH 8.0) 溶液就多以高浓度的储存液形式配制，比如可以配制成  $0.5\text{mol/L}$  或  $1\text{mol/L}$  这样的高浓度。

工作液浓度往往可以默认为“1×”，如果储存液是该工作浓度的10倍，那么储存液的浓度就可以表述为“10×”。如琼脂糖凝胶电泳时，常采用的工作液为1×TAE电泳缓冲液，而在配制其储存液时，往往配成50×TAE电泳缓冲液。

这样的储存液不但可以在常温下长期保存，而且也极大地节约实验室空间，另外在实际使用中显得相当方便，只要根据计算直接移取一定体积的储存液进行稀释，就可以转变为工作液浓度。例如，将50×TAE电泳缓冲液稀释50倍就可以直接用于琼脂糖凝胶电泳。因此，有了高浓度的储存液，也就没有必要在每次使用前都从头配制这种溶液，要知道，有些溶液的配制比较烦琐，情况往往是溶质难以溶解，或者不易调节到所需pH。

### 3. 常用器材及其灭菌

在实验中，常用器械或耗材的灭菌方法的确定，主要是要根据材料的特性，例如，有些是玻璃器皿，有些是金属制品，还有些是塑料制品，这里对它们做简单介绍。

常用的玻璃器皿包括烧杯、量筒、试剂瓶、三角瓶、培养皿、涂布玻棒等。

①烧杯与量筒：烧杯可用于溶液的配制，量筒可用于溶液的定容；

②试剂瓶：包括无色试剂瓶和棕色试剂瓶，后者常用于特殊试剂的避光保存；

③三角瓶：可用于液体或固体培养基的配制，也可用于细菌的液体培养，以增殖遗传背景一致的纯种，但由于三角瓶的刻度很不精确，不可用于溶液最后的定容；

④培养皿：用于分装固体培养基和细菌的固体培养，以获得遗传背景一致或插入单一片段的单克隆（菌落）；

⑤涂布玻棒：可将细菌均匀涂布于培养皿中的固体培养基上，以培养和获得单克隆。

常用的金属制品包括接种环、镊子、剪刀等，其中接种环用于细菌的划线接种，以获得单克隆。

常用的塑料制品主要包括离心管和移液枪头。离心管有0.2mL、1.5mL、10mL、50mL等多种型号，其中0.2mL离心管主要用于需要在热循环仪上运行的反应，如聚合酶链式反应（PCR）、连接反应、酶切反应等；1.5mL离心管还可以用于质粒DNA的提取、DNA片段的回收等；另外，1.5mL离心管和10mL、50mL离心管既可以用于一定体积溶液的配制，也可以用于细菌不同规模的液体培养。至于装于微量移液器上的移液枪头，将在“微量移液器的使用”中进一步介绍。

器材的灭菌方法主要有：高压蒸汽灭菌、高温干燥灭菌、过滤除菌、火焰灼烧、紫外线照射和70%乙醇消毒等。针对不同材料的特性，应选择不同的灭菌方法。

①对于塑料制品（离心管、枪头等）、玻璃器皿（如培养皿），常采用高压蒸汽灭菌。

②对于金属制品和玻璃器皿（如培养皿、量筒等），常采用高温干燥灭菌，120℃烘烤2h以上，甚至采用更高温度、更长时间进行烘烤，如对RNA进行操作时，所使用的器械需经过180℃烘烤6h以上。

③对于金属制品和涂布玻棒等玻璃制品，还可以蘸取工业酒精后，通过火焰灼烧的方法进行灭菌。

④对于微量移液器等不宜采用以上方法灭菌的器械，以及操作人员的手部，可以采用70%乙醇进行表面擦洗，做简单的消毒处理。

### 4. 微量移液器的使用

(1) 微量移液器与枪头 在分子生物学实验中，实际操作往往涉及一定体积液体的

移取，这时需要借助移液管（及洗耳球）与移液器。移液管的量程较大，有 5mL、10mL、20mL 等级别，常用于较大体积液体的移取。

分子生物学实验的许多反应体系，如聚合酶链式反应（PCR）体系、限制性内切酶酶切反应体系等，其配制往往涉及微量溶液或酶制剂，这时必须使用另一种移取液体的工具——微量移液器（micropipettor），简称移液器，另外，在实验者进行交流时，还有一个通俗的叫法是“移液枪”。

微量移液器主要是由手柄（handle）、操作按钮（operating button）、刻度显示（digital display）、枪头锥（tip cone）、挂钩（grip cover）、枪头推杆（tip ejector）组成（图 1-1）。

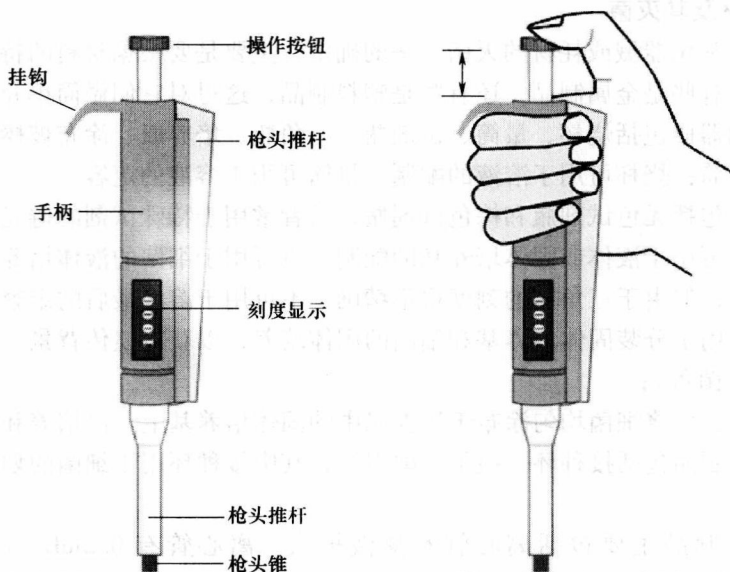


图 1-1 微量移液器的结构与握法

实验室使用的微量移液器，按照量程的不同，主要分为五种规格，每种规格的移液器在具体操作时还需配以相应型号的枪头（tip）：

- ① 100 ~ 1000 $\mu$ L：装配 1mL 枪头；
- ② 20 ~ 200 $\mu$ L：装配 200 $\mu$ L 枪头；
- ③ 5 ~ 50 $\mu$ L：装配 200 $\mu$ L 枪头；
- ④ 0.5 ~ 10 $\mu$ L：装配 200 $\mu$ L 枪头；
- ⑤ 0.1 ~ 2.5 $\mu$ L：装配 10 $\mu$ L 枪头。

## (2) 微量移液器的使用方法

① 选型号设体积：选择适当量程的微量移液器，旋转移液器最上方的操作按钮，使刻度显示为所需体积；

② 装配枪头：将微量移液器垂直，使移液器最下方的枪头锥插入枪头，稍稍旋转微量移液器使枪头上紧（图 1-2A）；

③ 吸取液体：保持微量移液器垂直，按操作按钮至第一挡（图 1-2B），使枪头尖端进入液面，缓慢释放按钮，所需体积的溶液进入枪头（图 1-2C、D），可转移至离心管

或其他容器；

④打出液体：使枪头以一定角度贴壁，将操作按钮缓慢按至第一挡，使绝大部分溶液打出（图1-2E），如果此时的枪头中还有少量溶液，进而将操作按钮按至第二挡，即可将枪头内的剩余液体全部打出（图1-2F），释放操作按钮使其弹回；

⑤卸枪头归位：按下枪头推杆，将不用的枪头卸下（图1-2G），在整个实验结束时，调节操作按钮使刻度显示为最大量程。

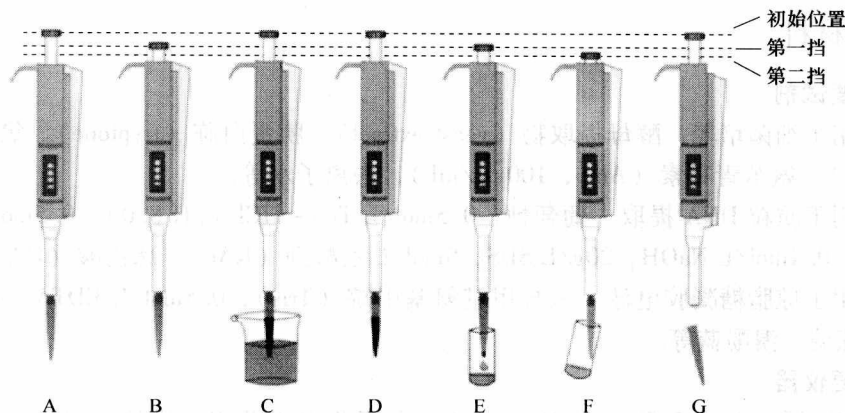


图1-2 微量移液器的使用过程

微量移液器适用于移取微量体积的水、各类盐溶液、缓冲液和酸碱溶液，有时也会用于移取高黏稠度的液体（如甘油等）和易挥发的液体（如氯仿等），移取这些液体时很容易导致体积出现较大的误差。为了提高移液的精确性，可采用以下几个措施：

- ①在吸取高黏稠度的液体前，可将枪头尖端剪掉，以使液体容易进入枪头；
- ②在吸取挥发性的液体前，使枪头尖端进入液面，轻缓地反复吸打数次，以湿润枪头内部，然后再吸取所需液体；
- ③在吸取或打出高黏稠度的液体和易挥发的液体时，多停留一段时间，以充分吸取或打出液体；
- ④在打出高黏稠度的液体后，可在所配制的溶液或反应体系中，轻缓地反复吸打数次，以清洗出枪头内的残留液体；
- ⑤采用反相移液法：直接将操作按钮按至第二挡时吸取液体，轻缓地释放操作按钮，而打出液体时按至第一挡，此时会有少部分液体残留在枪头内，不用把它打出来，可直接按下枪头推杆卸下枪头。

在使用微量移液器时，常见以下错误操作：

- ①超量程使用微量移液器，导致移取的体积不准确，且容易损坏微量移液器；
- ②装配枪头时用力撞击，导致使用结束后枪头难以卸下，长期撞击使用还会增加移液器的磨损程度，致使移液器与枪头匹配松动；
- ③吸取液体时移液器倾斜，导致移取的体积不准确；
- ④直接将操作按钮按至第二挡后吸取液体，使移取体积过大，导致试剂的用量存在严重偏差，甚至可使液体漫过枪头进入移液器，导致移液器受污染或腐蚀；

⑤吸取液体时过快地释放操作按钮，可能会使液体冲入移液器内部，导致移液器受污染或腐蚀，或使空气窜入枪头，导致移取溶液的体积减少；

⑥将吸有液体或带有残余液体的移液器平放或倒放，使枪头中的液体进入移液器内部，导致移液器内部受污染，甚至受腐蚀和损坏；

⑦完成移液操作后，不将刻度归位到最大值量程，使移液器内部的弹簧长期处于压缩状态，导致移液器的刻度不精确，甚至损坏。

### 三、实验材料

#### 1. 主要试剂

(1) 用于细菌培养 酵母提取物 (yeast extract)，胰蛋白胨 (tryptone)，氯化钠，琼脂粉 (agar)，氨苄青霉素 (Amp, 100mg/mL)，去离子水等。

(2) 用于质粒 DNA 提取 葡萄糖，0.5mol/L Tris - HCl (pH 8.0)，0.5mol/L EDTA (pH 8.0)，0.4mol/L NaOH，20g/L SDS，5mol/L 乙酸钾 (KAc)，冰乙酸 (HAc) 等。

(3) 用于琼脂糖凝胶电泳 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)，0.5mol/L EDTA (pH 8.0)，冰乙酸，蔗糖，溴酚蓝等。

#### 2. 主要仪器

微量移液器，电子天平，pH 计，全自动高压蒸汽灭菌锅，烘箱，超净工作台，冰箱等。

### 四、实验内容

#### 1. 常用溶液的配制

注意：在移取小体积的液体时，应使用微量移液器，请正确使用微量移液器。

(1) 配制溶液前的准备 请先计算所配溶液中各成分的用量，完成表 1-1。

表 1-1 常用溶液的配方

溶液	试剂	储存形式	终浓度	所需质量或体积
LB 培养基 50mL	酵母提取物	固体粉末	5g/L	___ g
	胰蛋白胨	固体粉末	10g/L	___ g
	氯化钠	固体粉末	10g/L	___ g
		去离子水		直接加水 50mL
溶液 I 50mL	葡萄糖	固体粉末	50mmol/L	___ g
	Tris - HCl, pH 8.0	0.5mol/L 储存液	25mmol/L	___ mL
	EDTA, pH 8.0	0.5mol/L 储存液	10mmol/L	___ mL
		去离子水		定容至 50mL
溶液 II 4mL	NaOH	0.4mol/L 储存液	0.2mol/L	___ mL
	SDS	2% 储存液	10g/L	___ mL
溶液 III 50mL	乙酸钾	5mol/L 储存液	3mol/L	___ mL
	冰乙酸	液体 (100%)	11.5% (体积分数)	___ mL
		去离子水		定容至 50mL

续表

溶液	试剂	储存形式	终浓度	所需质量或体积
TE (pH 8.0) 50mL	Tris - HCl, pH 8.0	0.5mol/L 储存液	10mmol/L	___ mL
	EDTA, pH 8.0	0.5mol/L 储存液	1mmol/L	___ mL
		去离子水		定容至 50mL
10 × TAE 电泳缓冲液 1000mL	Tris	固体粉末	0.4mol/L	___ g
	EDTA, pH 8.0	0.5mol/L 储存液	10mmol/L	___ mL
	冰乙酸	液体 (100%)	1.15% (体积分数)	___ mL
		去离子水		定容至 1000mL
6 × DNA 上样缓冲液 10mL	蔗糖	固体粉末	400g/L	___ g
	溴酚蓝	固体粉末	2.5g/L	___ g
		去离子水		定容至 10mL

注意：为节约实验时间，请在预习时完成此表，实验时核对计算结果。

(2) 配制 LB 液体培养基 (50mL) 清洗 150mL 三角瓶，称取适量的酵母提取物、胰蛋白胨、氯化钠，加入 50mL 去离子水，铝箔纸封口后，待高压蒸汽灭菌。

注意：①LB (Luria - Bertani) 液体培养基常用于大肠杆菌增殖培养；

②在 LB 培养基中，酵母提取物可提供细菌生长所需的碳源和能量，包括氨基酸、核苷酸、维生素和矿物质等；胰蛋白胨可提供氮源和氨基酸等；NaCl 提供无机盐，并维持适当的渗透压；

③使用 OXOID 公司的酵母提取物和胰蛋白胨配制的 LB，pH 接近中性，故不必调 pH，另外也不必定容，可直接加入 50mL 去离子水；

④加蒸馏水后不必使之溶解，相关溶质在高压蒸汽灭菌过程中能自动溶解；

⑤氨苄青霉素等抗生素受热易分解，必须在培养基经高压蒸汽灭菌、且温度降至 50℃ 以下时加入。

(3) 配制 LB 固体培养基 (50mL) 清洗 150mL 三角瓶，称取适量的酵母提取物、胰蛋白胨、氯化钠，并称取 0.75g 琼脂粉，加入 50mL 去离子水，铝箔纸封口后，待高压蒸汽灭菌。

注意：①LB 固体培养基常用于大肠杆菌的纯化培养；

②琼脂粉起固化的作用。

(4) 配制溶液 I (50mL) 清洗适当容积的试剂瓶，称取适量的葡萄糖，加适量去离子水使之溶解，选择适当量程的微量移液器，移取所需体积的储存液，用 100mL 量筒定容，待高压蒸汽灭菌。

注意：①溶液 I、II、III 用于质粒的制备；

②配制分子生物学实验中的溶液时，用量筒定容即可满足精度要求，不必使用容量瓶定容。

(5) 配制溶液 II (4mL) 清洗适当容积的试剂瓶，选择适当量程的微量移液器，移取所需体积的储存液，混匀，无需高压蒸汽灭菌。

注意：溶液 II 必须现用现配，室温下放置，此处可暂时不配制。

(6) 配制溶液Ⅲ (50mL) 清洗适当容积的试剂瓶, 选择适当量程的微量移液器或量筒量取所需体积的储存液, 最后用 100mL 量筒定容, 待高压蒸汽灭菌。

(7) 配制 TE (pH 8.0, 50mL) 清洗适当容积的试剂瓶, 选择适当量程的微量移液器, 移取所需体积的储存液, 并用去离子水定容至 50mL, 待高压蒸汽灭菌。

注意: ①TE 溶液用于溶解各类 DNA;

②由于 Tris - HCl 和 EDTA 溶液为常用试剂, 故常先配制高浓度的储存液, 于 4℃ 冰箱或室温下保存备用;

③由于 0.5mol/L Tris - HCl (pH 8.0) 和 0.5mol/L EDTA (pH 8.0) 均已调好 pH, 配制 pH 8.0 的 TE 溶液时不必再调节 pH。

(8) 配制 10 × TAE 电泳缓冲液 (1000mL) 清洗适当容积的试剂瓶, 称取适量的 Tris, 加适量去离子水使之溶解, 移取所需体积的储存液, 用去离子水定容至 1000mL, 待高压蒸汽灭菌。

注意: ①10 × TAE 电泳缓冲液为高浓度的储存液, 使用时将其稀释 10 倍作为 1 × TAE 工作液;

②在电泳槽中添加的电泳缓冲液和配制琼脂糖凝胶所用的电泳缓冲液成分及浓度均应一致, 在本书中的琼脂糖凝胶电泳都使用 1 × TAE 工作液。

(9) 配制 6 × DNA 上样缓冲液 (loading buffer) (10mL) 清洗适当容积的试剂瓶, 称取适量的蔗糖和溴酚蓝, 用去离子水溶解后, 定容至 10mL, 无需高压蒸汽灭菌。

注意: 在电泳上样前, 取适量 6 × 上样缓冲液与 DNA 样品 (如质粒溶液、PCR 产物、酶切产物等) 混合, 使上样缓冲液在混合物中的终浓度约为 “1 ×”。

## 2. 器材的准备

(1) 戴一次性塑料手套, 将各种型号的移液枪头装入相应的枪头盒: 1mL、200μL、10μL 枪头, 待高压蒸汽灭菌。

注意: 必须戴一次性塑料手套装枪头, 以免手上的残质污染。

(2) 戴一次性塑料手套, 将各种型号的离心管装入铝制饭盒: 50mL、10mL、1.5mL、0.2mL 离心管。待高压蒸汽灭菌。

注意: 必须打开离心管盖子, 使离心管内部充分灭菌。

(3) 清洗玻璃培养皿, 用牛皮纸或报纸包扎, 待高压蒸汽灭菌。

注意: ①用于 LB 固体培养基的配制;

②玻璃培养皿也可以利用烘箱进行高温干燥灭菌 (120℃, 2h)。

## 3. 器材与试剂的灭菌

(1) 采用全自动高压蒸汽灭菌锅对各试剂 [LB 液体培养基、LB 固体培养基、溶液 I、溶液Ⅲ、TE (pH 8.0)、10 × TAE 电泳缓冲液] 和器械 (枪头、离心管、玻璃培养皿) 进行灭菌, 121℃ 保温 20min。

(2) 高压蒸汽灭菌后, 将塑料制品 (枪头、离心管) 转放于 50℃ 烘箱, 烘干, 备用。

(3) LB 液体培养基、溶液 I、溶液Ⅲ、TE、10 × TAE 电泳缓冲液, 取出后冷却至室温, 保存于 4℃ 冰箱, 备用。

(4) 配制 LB 平板 (含 100μg/mL Amp): 在超净工作台内喷洒 70% 乙醇, 并打开紫



紫外灯消毒 10 ~ 20min。将灭菌后的 LB 固体培养基冷却至 50℃ 以下后，每 50mL 培养基中加入 50 $\mu$ L 氨苄青霉素 (100mg/mL)，轻轻混匀，倒入培养皿，铺制 LB 平板。培养皿中的培养基凝固后，打开盖子，用鼓风机吹干水汽后，将平板倒扣，放置于 4℃ 冰箱保存，备用 (图 1-3)。

注意：①配制 LB 平板时必须严格按照无菌操作的要求，以免污染；

②提前对超净工作台进行消毒，倒培养基前关闭紫外灯，以免对皮肤和眼睛造成伤害；

③氨苄青霉素等抗生素在高温下容易失活，必须在培养基温度较低时加入，一般为裸手可承受时 (50℃ 以下)；

④倒入的培养基厚度应适宜，约占平皿厚度的 1/3。

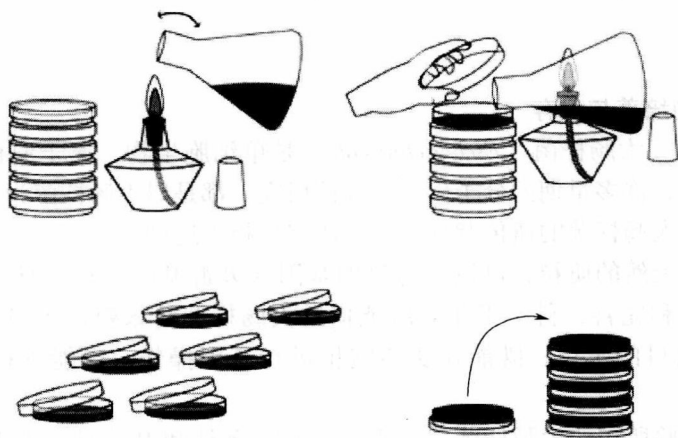


图 1-3 LB 平板的铺制

## 五、思考题

1. 在配制一定 pH 的溶液时，应当先定容后调 pH，还是先调 pH 后定容？为什么？
2. Tris - HCl、EDTA 是分子生物学实验中的常用试剂，它们在相关溶液中主要起什么作用？
3. 在分子生物学实验中，常将一些试剂配制成高浓度的储存液（母液），这样做有什么好处？
4. 在分子生物学实验中，微量试剂和酶液的移取离不开微量移液器，在使用微量移液器时，应当注意哪些问题？
5. 常用的灭菌方法有哪些？各用于哪类试剂、器皿或耗材的灭菌？
6. 作为一种选择压，抗生素为筛选含有某种质粒的菌株提供了极大的便利，在使用抗生素时，应当注意哪些问题？