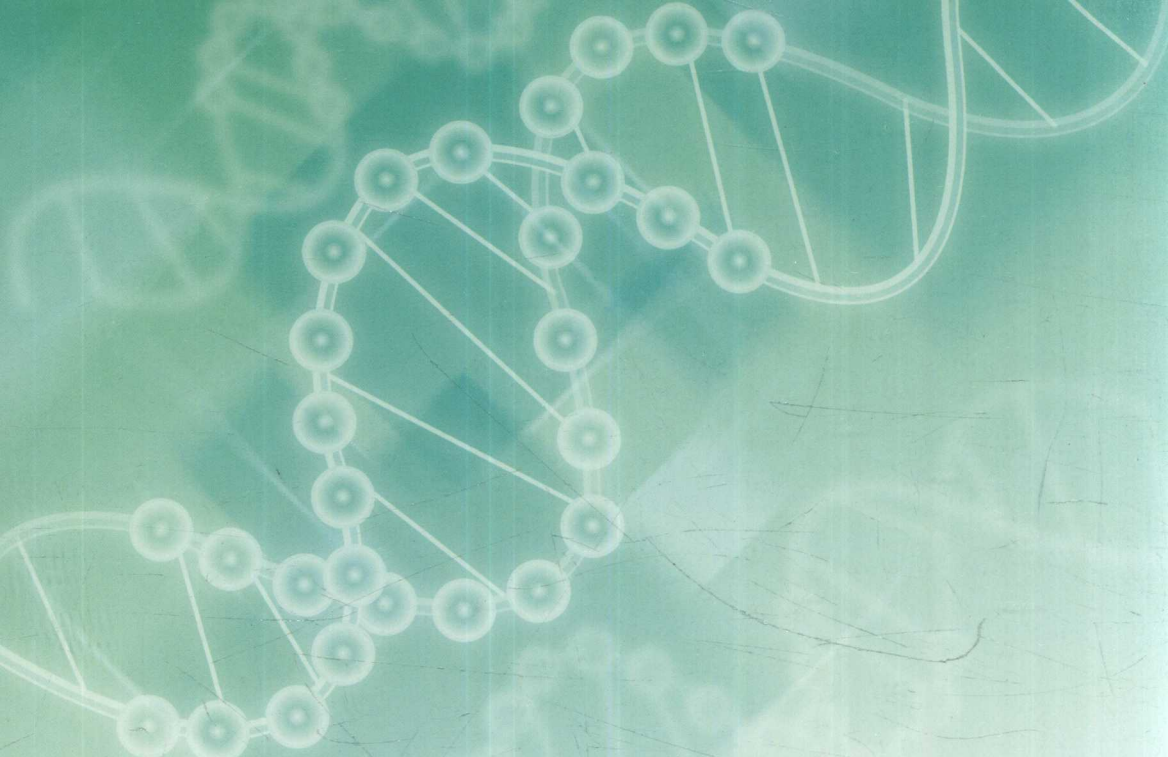




Experimental Technique in
Molecular Biology

分子生物学实验技术

刘长霞 罗施中 主编



化学工业出版社

Experimental Technique in
Molecular Biology

分子生物学实验技术

刘长霞 罗施中 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

《分子生物学实验技术》内容涵盖三个方面：一是基本实验技术；二是基因工程蛋白质药物工程化生产技术；三是现代分子生物学功能实验技术。本书包括基本分子生物学实验技术，并将常用分子生物学方法、科研成果和基因工程药物生产实践融入实验教学中，培养学生分子生物学实验技能、科研创新及工程产业化能力，实用性和指导性强。

本书可以用作生物技术、生物工程、制药工程、生物医学工程等相关专业本科教材，也可供上述领域研究人员参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

分子生物学实验技术/刘长霞，罗施中主编. —北京：
化学工业出版社，2017.12
ISBN 978-7-122-30836-8

I. ①分… II. ①刘… ②罗… III. ①分子生物学-
实验 IV. ①Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 257217 号

责任编辑：傅四周 张 亮
责任校对：王素芹

文字编辑：向 东
装帧设计：韩 飞

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：三河市航远印刷有限公司
装 订：三河市宇新装订厂
710mm×1000mm 1/16 印张 11 字数 213 千字 2018 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：39.00 元

版权所有 违者必究

《分子生物学实验技术》

编写人员名单

主 编：刘长霞 罗施中

副主编：袁其朋

参编人员及单位(按姓名汉语拼音排序)：

陈 龙	北京化工大学
冯 越	北京化工大学
李正军	北京化工大学
刘长霞	北京化工大学
罗施中	北京化工大学
吕健龙	北京东方百泰生物科技有限公司
吕 杰	北京化工大学
任艳丽	伊犁师范学院
田平芳	北京化工大学
王文雅	北京化工大学
许立达	北京化工大学
袁其朋	北京化工大学

**第 1 章 核酸分离提取技术****1**

引言	1
第 1 节 碱裂解法提取质粒 DNA	1
第 2 节 磁珠法提取质粒 DNA	4
第 3 节 质粒 DNA 琼脂糖凝胶电泳及其胶回收	7
第 4 节 <i>E. coli</i> 基因组 DNA 的提取	10
第 5 节 RNA 的分离提取	14
参考文献	18

第 2 章 PCR 及实时荧光定量 PCR 技术**19**

引言	19
第 1 节 DNA 序列的 PCR 扩增	19
第 2 节 实时荧光定量 PCR 技术测定目标 DNA 含量	24
参考文献	40

第 3 章 基因工程菌的构建与表达产物鉴定技术**41**

引言	41
第 1 节 <i>E. coli</i> 感受态细胞的制备、质粒 DNA 重组与转化	41
第 2 节 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质	45
第 3 节 蛋白质的 Western 印迹分析	50
参考文献	56

第 4 章 基因工程蛋白的工程化生产技术**57**

引言	57
----------	----

第 1 节	基因工程蛋白的原核表达工程化技术	58
第 2 节	原核表达基因工程蛋白的分离纯化	68
第 3 节	基因工程蛋白的真核表达工程化技术	75
第 4 节	真核表达基因工程蛋白的分离纯化	82
参考文献		88

第 5 章 基因定点突变、基因敲除及微生物分子生物学鉴定技术 89

引言	89
第 1 节 基因定点突变技术	89
第 2 节 基于 RecA 同源重组的基因敲除技术	94
第 3 节 基于 16S rRNA 序列分析等相关技术 鉴定微生物	107
参考文献	119

第 6 章 蛋白质双向电泳、质谱鉴定及结晶技术 120

引言	120
第 1 节 蛋白质双向电泳	120
第 2 节 蛋白质的质谱鉴定	131
第 3 节 蛋白质表达、纯化与结晶	138
参考文献	151

第 7 章 生物信息学网络资源利用 152

引言	152
第 1 节 生物信息数据库	152
第 2 节 核酸与蛋白质序列分析	158
参考文献	163

附录 164

附录 I 实验报告撰写方法	164
附录 II 实验室安全守则	165
附录 III 培养基与试剂配制	166

第 1 章 核酸分离提取技术

引言

核酸提取与纯化技术是现代生物化学、分子生物学及相关科学研究与应用最基础的实验技术。目前应用于 DNA 分离纯化的方法有碱裂解法（酚氯仿法）、高盐沉淀法、离子交换法、硅介质色谱柱法及磁珠分离法等^[1,2]。几种核酸分离提取方法比较如表 1-1 所示。

表 1-1 核酸纯化方法比较

特点	碱裂解法	高盐沉淀法	硅介质色谱柱法	离子交换法	磁珠分离法
纯度	较高	低	高	高	高
方法稳定性	低	低	高	高	高
技术要求	高	高	低	高	低
有机试剂	需要	不需要	不需要	不需要	不需要
操作时间	较长	长	短	长	短
规模化	否	是	是	否	是
多步离心	需要	需要	需要	需要	不需要
自动化	否	否	是	否	是

碱裂解法是最传统的方法，硅介质色谱柱法是目前最常用的方法，磁珠分离法因易实现自动化操作与高通量提取，具有良好的发展前景^[3,4]。

第1节 碱裂解法提取质粒DNA

质粒是存在于染色体 DNA 外的、能够独立复制的小分子 DNA，其长度有数千个碱基对（kb）。细菌质粒是重组 DNA 技术中常用的基因运载工具。质粒的提取纯化技术是最常用、最基本的实验技术，碱裂解法是最常用的少量制备质粒 DNA 的方法。

一、实验目的

自大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株中分离纯化质粒。学习利用碱裂解法使菌体分解或破碎释放出质粒 DNA, 再以酚/氯仿萃取、乙醇将 DNA 沉淀, 获得质粒 DNA 分子。

二、实验原理

碱裂解法提取分离 *E. coli* 质粒 DNA 的原理是利用碱裂解菌体, 并使质粒 DNA 及染色体 DNA 变性, 打开双螺旋链呈单股状态再加酸中和, 染色体 DNA 因分子过大无法恢复配对并与其他分子如蛋白等沉淀下来。质粒 DNA 分子小很快恢复 DNA 原碱基配对而溶于水中, 通过离心作用, 即可将染色体 DNA 与质粒 DNA 分离。加入溶液 I 的目的主要是将细菌团块重新悬浮于缓冲溶液中并兼有破壁作用, 溶液 II 含有 SDS 及 NaOH, 前者可将细菌溶解, 后者可使 DNA 变性, 溶液 III 是由醋酸及钾盐组成的, 前者在于中和碱, 后者则与 DNA 形成复合物而有利于 DNA 的沉淀。加入溶液 III 后离心, 大部分的蛋白质与染色体 DNA 会留在下面的有机层, 而上层的水层所含的质粒 DNA 可用乙醇沉淀, 或酚/氯仿/异戊醇萃取去除残留蛋白质, 氯仿可使蛋白质变性并有助于液相与有机相的分开, 异戊醇则可以消除抽提过程中出现的泡沫, 70%乙醇洗涤除盐。

三、材料、试剂与仪器

1. 实验材料

实验前一天, 将含 pET-28a 质粒的 *E. coli* DH5 α 菌株接种至 3mL 含卡那霉素 50 μ g/mL 的 LB 培养液中, 并在 37 $^{\circ}$ C 下振荡培养过夜。

2. 实验试剂

溶液 I (GTE 溶液): 25mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、10mmol/L EDTA (pH 8.0)、50mmol/L 葡萄糖, 121 $^{\circ}$ C、高压灭菌 15min, 贮存于 4 $^{\circ}$ C。

溶液 II: 0.2mol/L NaOH, 1% SDS (使用前以 10mol/L NaOH 与 10% SDS 稀释配制)。

溶液 III: 3mol/L 醋酸-醋酸钾溶液 (pH 5.2), 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

其他: LB 培养液、1mg/mL RNase A 溶液、TE 缓冲溶液、苯酚/氯仿/异戊醇 (三者体积比为 25 : 24 : 1)、无水乙醇或异丙醇、70%乙醇、100mg/mL 卡那霉素母液。

3. 实验仪器

高压灭菌锅、微量移液器 (20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L)、涡旋振荡器、恒温水浴锅、超净工作台、台式离心机、微量离心管、真空干燥机及 NanoDrop 2000C 超微量分光光度计。

四、实验步骤

- (1) 将过夜培养菌液分别倒入 1.5mL 微量离心管中, 以 6000r/min 离心 2min 后, 弃上清液。
- (2) 沉淀菌体加入 100 μ L 预冷的溶液 I, 涡旋振荡器剧烈振荡, 使菌体完全悬浮, 室温放置 5min。
- (3) 加入 200 μ L 溶液 II, 盖上管盖后将离心管反复上下颠倒数次 (不可振荡), 室温放置 5min。
- (4) 加入 150 μ L 溶液 III, 亦温和摇匀, 室温放置 5min。
- (5) 以 12000r/min (13400g) 离心 10min, 小心吸取上清液至另一离心管中。
- (6) 加入等量的苯酚/氯仿/异戊醇 (约 350 μ L), 振荡混合有机相和水相, 然后 12000r/min 离心 10min, 将上清转移至一新离心管中。
- (7) 加入 2 倍体积无水乙醇, 混合均匀, -20°C 放置 30min。
- (8) 12000r/min 离心 10min, 小心弃上清液, 加入 1mL 70% 乙醇洗涤沉淀, 12000r/min 离心 2min, 弃上清液。
- (9) 将开口的离心管置于超净工作台, 吹干乙醇。
- (10) 加入 2 μ L 的 RNase A 溶液, 加入 20 μ L 的 TE 缓冲液溶解, 37°C 放置 20min, -20°C 保存。

五、结果与分析

pH 7~8.5 和低离子浓度的条件下 (如 10mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0) 测定 A_{260}/A_{280} 比值在 1.6~1.9, 低于 1.6 说明有蛋白质、酚等污染, 高于 1.9 有 RNA 污染, 大于 2.0 可能被异硫氰酸胍污染, 公认纯 DNA 为 1.8。 A_{260}/A_{230} 比值在 2.0~2.5, 小于 2.0 表明样品被糖类、盐类或有机溶剂污染。也可用琼脂糖凝胶电泳方法检测所提取 DNA 的情况。

六、注意事项

- (1) 收集菌体提取质粒 DNA 前, 培养基要去除干净, 同时保证菌体在悬液中充分悬浮。
- (2) 在添加溶液 II 和溶液 III 后采用上下颠倒的柔和混合方法, 不要在振荡器上剧烈振荡, 以免污染基因组 DNA。其中加入溶液 II 后, 溶液变澄清, 并有黏性, 加入溶液 III 后, 出现絮状沉淀。
- (3) 配制酚/氯仿溶液过程中, 吸取酚溶液时, 注意吸取下层, 上层为酚饱和的水溶液, 下层为水饱和的酚溶液。酚和氯仿均有很强的腐蚀性, 操作时应戴手套。苯酚能造成皮肤的严重烧伤及衣物损坏, 使用时应注意小心操作。如果不

小心皮肤上碰到苯酚则应用碱性溶液、肥皂及大量的清水冲洗。

(4) 苯酚/氯仿/异戊醇溶液分上下两层，上层是隔绝空气作用的 Tris-HCl 液，所以应取下层溶液。

(5) 采用有机溶剂（苯酚/氯仿/异戊醇）抽提时，应充分混合。经苯酚/氯仿抽提后，吸取上清液时注意不要把中间的白色层吸入，其中含蛋白质等杂质。

(6) 如果用异丙醇沉淀 DNA 时，盐等杂质易下沉，所以沉淀要在室温下进行，并且时间不宜过长，限于 20min 以内。沉淀离心后，还要用 70% 乙醇洗涤，以除去盐类及挥发性小的异丙醇。

(7) 有些质粒本身可能在某些菌种中稳定存在，但经过多次转接有可能造成质粒丢失。因此，不要频繁转接，每次接种时应挑单菌落。

七、思考题

质粒 DNA 提取过程中是如何与染色体 DNA 实现分离的？

(刘长霞)

第2节 磁珠法提取质粒DNA

磁珠分离技术已在生物分子分离纯化领域有较为广泛的应用。单分散磁珠粒子，内核是具有超顺磁性的磁芯，外层包被二氧化硅，有非常好的化学稳定性和机械稳定性，其粒径有纳米级、亚微米级和微米级，比表面积大。磁珠法纯化核酸操作简便、快捷，不需要苯酚、氯仿等有毒有机溶剂抽提，无需离心、沉淀等耗时步骤，可配合自动化仪器进行自动化操作，实现高通量提取。纯化的核酸可以直接应用于 PCR、酶切、杂交等后续实验。

一、实验目的

掌握使用磁珠法提取质粒 DNA，了解提取原理及各种试剂的作用。

二、实验原理

磁性 SiO_2 复合微球与 DNA 的吸附机理类似于硅类吸附介质：DNA 在低 pH 值高盐条件下可以吸附沉积到磁性 SiO_2 复合微球表面，当溶液环境转变为高 pH 值溶液时，DNA 又可以被成功地从磁性 SiO_2 复合微球表面解吸附。DNA/RNA 结合到磁珠上主要靠静电作用、疏水作用和氢键作用。细胞或组织在一定的裂解液（胍盐、去污剂、蛋白酶 K 等）作用下，核酸从生物样本中释放出来，随后核酸在结合液（聚乙二醇、碘盐、高氯酸盐和醇等）存在的条件下，特异性地与二氧化硅磁珠结合，形成核酸-磁珠复合物，该复合体经过磁场作用，从生物裂解液中分离出来，其后复合体经过盐溶液洗涤后去除非特异性吸

附的杂质，醇洗涤去除盐分后，可以用 TE 缓冲液进行洗脱，将核酸纯化。

三、材料、试剂与仪器

1. 实验材料

含 pET-28a 的 *E. coli*。

2. 实验试剂

卡那霉素、LB 培养液（配制方法见附录Ⅲ）。

磁珠吸附法试剂盒组分：溶液Ⅰ、溶液Ⅱ及溶液Ⅲ配制见本章第1节，其中溶液Ⅰ使用前加入 RNase A（工作浓度为 $20\mu\text{g/mL}$ ），TE 缓冲液配制见附录Ⅲ，70%乙醇。

DNA 结合液配制：20g PEG8000 溶解于 100mL 2mol/L 的 NaCl 溶液中。

100mg/mL $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 亚微球：100mg $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 亚微球分散到 1mL 的 TE 缓冲液中。

3. 实验仪器

磁铁或磁力架，其他同碱裂解法提取质粒 DNA。

四、实验步骤

1. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 制备^[5]

（1）配制物质的量浓度为 0.13mmol/mL 的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的无水乙二醇溶液，将一定质量的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 加入到无水乙二醇中，室温搅拌，直至成为澄清溶液。接着加入 CH_3COONa 、PEG4000，二者的终质量浓度分别为 100mg/mL、25mg/mL，反应液的体积不超过反应釜体积的 3/5，剧烈搅拌 30min，转移至密封高压反应釜中，200℃反应 8h。冷却至室温后，将磁性产物用 95%乙醇、纯水交替洗涤 3 次，无水乙醇洗涤 2 次，磁性分离，磁性粉末即为 Fe_3O_4 亚微米磁球，贮存在无水乙醇中，使用前 60℃真空干燥过夜。

（2）称取 0.5g Fe_3O_4 多孔亚微球，加入 1mol/L 的 NaOH 溶液 200mL，加热升温至 90℃，400r/min 搅拌 10min，再加入 6mL 油酸，反应 30min，磁性分离，无水乙醇洗涤 5 次，得到油基 Fe_3O_4 亚微球。

（3）上述油基 Fe_3O_4 亚微球用丙酮、乙醇交替洗涤 2 次，加入 15mL 正硅酸乙酯（TEOS）、1.5g 表面活性剂 Triton X-100，超声 5min，加入 100mL 去离子水，超声混匀 20min。将上述分散混合液转移到 1000mL 圆底烧瓶中，加入 80mL 氨水、200mL 无水乙醇，90℃、800r/min 搅拌 4h，磁性分离，用乙醇和去离子水交替清洗 3 次，产物即为 SiO_2 包覆的 Fe_3O_4 亚微球，即 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ ，无水乙醇封存。使用前 60℃真空干燥。

2. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 提取质粒 DNA

（1）取 3mL 过夜培养的菌液，加入离心管中，12000r/min 离心 1min，尽

量除净上清液（菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中）。

（2）向留有菌体沉淀的离心管中加入 250 μ L 溶液 I（确保已加入 RNase A），使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。

（3）向离心管中加入 250 μ L 溶液 II，温和地上下翻转 6~8 次，使菌体充分裂解。此时菌液应变得清亮黏稠，否则应减少菌体量，菌体过多裂解不彻底。

（4）向离心管中加入 300 μ L 溶液 III，立即快速地上下颠倒混合 10~15 次，充分混匀，此时将出现絮状沉淀，12000r/min 离心 2min。

（5）将离心管中的上清液用移液器转移到另一新的离心管中，加入 50 μ L 的 100mg/mL 磁球、400 μ L 的 DNA 结合液，颠倒混匀，室温放置 5min，其间颠倒混匀数次，防止磁珠沉淀。

（6）磁分离，弃上清液，70%乙醇洗涤 2 次，开盖挥发残留的乙醇。

（7）加入 50~100 μ L 的 TE 缓冲液，用移液器吸打混匀，室温放置 10min，注意防止磁珠沉降。

（8）磁分离，上清液即为收集到的质粒 DNA，将其转移到新的离心管中，-20 $^{\circ}$ C 保存。

五、结果与分析

（1）溶剂热法制备 Fe_3O_4 亚微米粒子及 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 亚微米粒子，扫描电子显微镜（SEM）及透射电子显微镜（TEM）观察粒径均为 200nm 左右（图 1-1），均一性良好。 Fe_3O_4 亚微米单个粒子的磁响应性远远强于纳米尺寸的单个粒子，非常适合生物大分子的分离。

（2）获得的质粒 DNA 分子进一步做琼脂糖凝胶电泳确定，纯度检测同碱裂解法。

六、注意事项

（1）收集菌体提取质粒前，培养基要去除干净，同时保证菌体在悬浮液中充分悬浮。

（2）在添加溶液 II 后，混合一定要柔和，采用上下颠倒的方法，不要在振荡器上剧烈振荡。加溶液 II 后溶液会变澄清，并有黏性；加入溶液 III 后则出现絮状沉淀。

（3）使用前请先检查溶液 II 和溶液 III 是否出现浑浊，如有浑浊现象，可在 37 $^{\circ}$ C 水浴中加热几分钟，即可恢复澄清。

（4）在漂洗和洗脱的过程中，为防止磁珠沉降可反复上下颠倒离心管。

七、思考题

简述 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 亚微球分离 DNA 的原理。

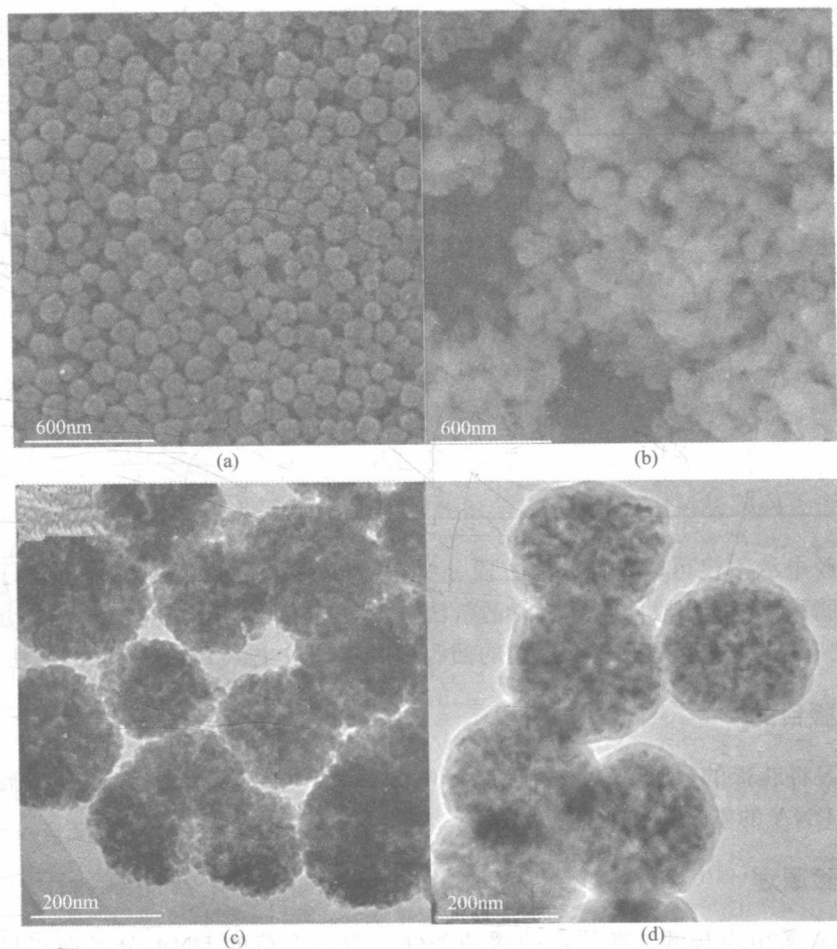


图 1-1 (a) Fe_3O_4 SEM; (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ SEM;
(c) Fe_3O_4 TEM; (d) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ TEM

(刘长霞)

第3节

质粒DNA琼脂糖凝胶电泳及其胶回收

琼脂糖是由半乳糖及其衍生物构成的中性物质，不带电荷，在高温溶液状态下是无规卷曲状态，当冷却时，通过氢键形成螺旋纤维，继续保持较低的温度，螺旋纤维之间在“节点”靠氢键连接形成三维结构即为凝胶^[6]。胶结构均匀，含水量大（占98%~99%），对样品吸附极微，电泳图谱清晰，分辨率高，重复性好，需样量少，是核酸平板凝胶电泳的常用方法，也可用于大分子蛋白的分离

和鉴定^[7]。凝胶中琼脂糖的浓度愈大，形成的空隙愈小。不同浓度的琼脂糖凝胶分离 DNA 分子大小如表 1-2 所示。

表 1-2 琼脂糖浓度和 DNA 分子大小的关系^[7]

琼脂糖浓度/%	分离线状 DNA 大小/kb
0.3	5~60
0.5	1~30
0.6	1~20
0.7	0.8~10
0.9	0.5~7
1.2	0.4~6
1.5	0.2~4
2.0	0.1~3

凝胶电泳不仅可以进行核酸片段分析，还可以作为分离纯化 DNA 分子的手段。琼脂糖 DNA 片段回收方法有透析法、反复冻融法、低熔点法及试剂盒回收法等^[8,9]，磁珠法也是近几年兴起的回收琼脂糖凝胶电泳 DNA 片段的方法。

一、实验目的

学习将获得的核酸片段进行琼脂糖电泳分离、鉴定及用酚/氯仿从凝胶中回收质粒 DNA 的基本方法。

二、实验原理

DNA 等电点较低，在特定的缓冲条件下带负电荷的 DNA 分子向正极方向移动。其移动速率依赖于分子片段的大小，分子愈大，移动速率愈慢。特定大小的 DNA 片段在不同浓度的胶中移动速率均不同，可用 DNA marker (DNA 标记) 来比较它们的大小。核酸经荧光染料染色嵌入核酸碱基中，以紫外线激发产生荧光，通过核酸的位置判断核酸分子的大小及分离效果。

三、材料、试剂与仪器

1. 实验材料

商品化试剂盒及磁珠法提取获得的 *E. coli* 质粒 pET-28a。

2. 实验试剂

50×TAE 电泳缓冲液、1.5% 琼脂糖、上样缓冲液 (含溴酚蓝指示剂)、核酸染料 GoldView (10000×)、10kb 的 DNA marker、酚/氯仿 (1 : 1)、10% CH₃COONa、无水乙醇、70% 乙醇。

3. 实验仪器

电泳仪、电泳槽、凝胶自动成像仪、微波炉、离心管、冰箱、台式离心机、电子天平、微量移液器 (20 μ L、1000 μ L)。

四、实验步骤

(1) 将 1.5% 琼脂糖凝胶置于微波炉中加热至琼脂糖完全熔化 (注意! 防止突沸及胶液外溢)。让琼脂糖在室温下冷却 30min 以上, 待手持胶液不烫手时, 加入 3.0 μ L 荧光染料 (GoldView) 混匀, 随即倒入电泳槽内, 插上梳子后使之凝结。未使用的电泳胶片可以用保鲜膜封存, 或浸入 1 $\times$ TAE 缓冲液内, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中, 留待下次再使用。

(2) 取 5 μ L 的 *E. coli* pET-28a 质粒 DNA 溶液与 2 μ L 上样缓冲液混合, 加入到齿孔, 并在其他齿孔中加入 5 μ L 的 DNA marker 进行比较, 连接电源插头 (黑色为负极-, 红色为正极+), 带负电荷的 DNA 分子会由负极移向正极, 80~100V 电泳 1h, 或直至上样缓冲液染料前端距胶底 1.5cm (注意! 勿碰触高压电的电泳仪器)。

(3) 将胶取出, 置于凝胶自动成像仪, 紫外灯下观察、拍照。

(4) 切胶称重, -20 $^{\circ}$ C 冻融捣碎 2 次。

(5) 等体积酚/氯仿, 振荡 5min (如果胶的量少, 可将酚/氯仿的比例提高), 12000r/min, 5min。

(6) 取上清液, 加入 10% CH₃COONa 混匀, 再加入 2 倍体积无水乙醇混匀, 12000r/min, 10min。

(7) 弃上清液, 离心管中加入 70% 乙醇 500 μ L, 12000r/min, 5min。

(8) 弃上清液, 干燥即得。

五、结果与分析

通过电泳图谱可以检测所提 DNA 片段的大小和相对纯度, 也可以进行特定片段纯化。在细菌细胞内共价闭环 DNA 质粒以超螺旋形式存在, 若在提取过程中质粒 DNA 其中一条链有断裂或多处断裂但不在同一位置, 则解螺旋成环状 DNA 分子, 若在 2 条链的同一处断裂, 则成线状 DNA 分子。若出现后两种情况, 电泳迁移速率为: 共价闭环 DNA > 直线 DNA > 开环的双链环状 DNA。图 1-2 为商品化试剂盒与磁珠法提取质粒 DNA 电泳图, 可通过条带判断 DNA 分子的纯度及分子大小。

六、注意事项

(1) 戴手套把琼脂糖放在强 UV (紫外线) 透射光源板上, 300nm 紫外线激发即可对结果拍照存档, 尽量减少身体 (脸或手) 和胶体暴露于 UV 下过久, 有

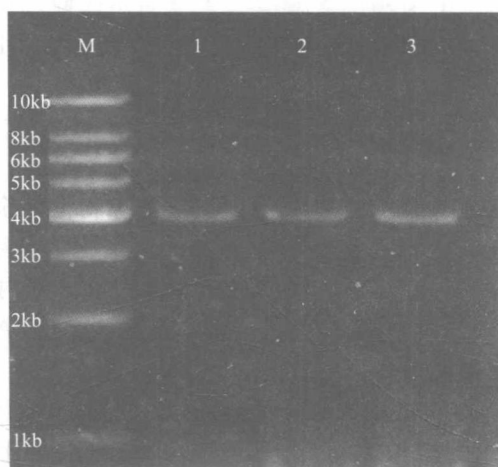


图 1-2 纯化的质粒 DNA pET28a 电泳图^[5]

M—DNA marker; 1—商品试剂盒（硅胶柱）提取质粒；
2, 3— $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 提取质粒

时会使 DNA 产生缺口或突变。

(2) 以刀片将 *E. coli* pET-28a 质粒载体 DNA 切下，做 DNA 纯化及浓缩，若分离的 DNA 条带过细，可适当增加酚/氯仿的比例。

七、思考题

- (1) 琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 分子量的范围是多少？
- (2) 为何琼脂糖凝胶电泳适合作为核酸分离介质？

(刘长霞)

第4节 *E. coli* 基因组DNA的提取

一、实验目的

- (1) 了解原核生物 *E. coli* 基因组 DNA 的制备原理及各种试剂的作用。
- (2) 掌握原核生物 *E. coli* 基因组 DNA 的提取和检测方法。

二、实验原理

基因组 DNA 的提取是构建基因组文库、Southern 杂交（包括 RFLP）及 PCR 等重要环节^[6~8]。提取基因组 DNA 通常要求分子量尽可能大，以增加外源基因的获得率，所以要温和操作，减少剪切力，尽量低温操作^[9,10]。细胞内

及抽提器皿中污染的核酸酶也会降解制备过程中的 DNA，所以制备过程中要抑制其核酸酶的活性。DNA、RNA 和核苷酸都是极性化合物，一般都溶于水，不溶于乙醇、氯仿等有机溶剂，它们的钠盐比游离酸易溶于水，RNA 钠盐在水中的溶解度可达 40g/L，DNA 在水中的溶解度为 10g/L，呈黏性胶体溶液。

在酸性溶液中，天然状态的 DNA 是以脱氧核糖核蛋白 (DNP) 的形式存在于细胞核中。要从细胞中提取 DNA 时，先把 DNP 抽提出来，再把蛋白质除去，再除去细胞中的糖、RNA 及无机离子等，从中分离 DNA。DNP 和核糖核蛋白 (RNP) 在盐溶液中的溶解度受盐浓度的影响而不同。DNP 在低浓度盐溶液中几乎不溶解，如在 0.14mol/L 的氯化钠中溶解度最低，仅为在水中溶解度的 1%，随着盐浓度的增加溶解度也增加，1mol/L 氯化钠中的溶解度很大，比纯水高 2 倍。RNP 在盐溶液中的溶解度受盐浓度的影响较小，在 0.14mol/L 氯化钠中的溶解度较大。因此，在提取时，常用此法分离这两种核蛋白。

Bandyopadhyay 等比较了苯酚-氯仿法、试剂盒法和磁性分离法提取细菌基因组 DNA^[10]，如表 1-3 所示。

表 1-3 不同方法对细菌基因组 DNA 的提取

参数	磁性分离法	苯酚-氯仿法	试剂盒法
A_{260}/A_{280}	1.8	1.5	1.83
DNA 产量/ μg	18~20	18~20	20~22
耗费时间	25min	6h	2h
成本/样品(in INR)	10	20	100
不加 RNA 酶时 RNA 存在与否	无	大量存在	—

磁性分离法的成本虽然不高，但市场售价仍然是比较昂贵的。苯酚/氯仿法是目前耗时但较为廉价的方法。*E. coli* 基因组 DNA 提取过程中，使用苯酚作为蛋白变性剂，同时抑制了 DNase 的降解作用。用苯酚处理匀浆液时，由于蛋白质与 DNA 的连接键已断，蛋白质分子表面又含有很多极性基团与苯酚相似相溶。蛋白质分子溶于酚相，而 DNA 溶于水相。离心分层后取出水层，多次重复操作，再合并含 DNA 的水相，利用核酸不溶于醇的性质，用乙醇沉淀 DNA。此法的特点是使提取的 DNA 保持天然状态，真核细胞 DNA 的分离通常是在 EDTA 及 SDS 一类去污剂的存在下，用蛋白酶 K 消化细胞获得的。

三、材料、试剂与仪器

1. 实验材料

E. coli 发酵液。

2. 实验试剂

苯酚/氯仿/异戊醇混合液 (苯酚:氯仿:异戊醇=25:24:1, 体积比)、氯