

生物技术制药实验

王天晓 主编

甘肃科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物技术制药实验 / 王天晓主编. —兰州: 甘肃
科学技术出版社, 2011.4
ISBN 978-7-5424-1460-1

I. ①生… II. ①王… III. ①生物制品: 药物—制造
—实验—教材 IV. ①TQ464.33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 051364 号

责任编辑 张 荣(0931-8773023)

封面设计 石 璞

出版发行 甘肃科学技术出版社(兰州市南滨河东路 520 号 0931-8773237)

印 刷 兰州大众彩印包装有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 11.25

字 数 290 千

插 页 1

版 次 2011 年 5 月第 1 版 2011 年 5 月第 1 次印刷

印 数 1~1000

书 号 ISBN 978-7-5424-1460-1

定 价 28.00 元

前 言

生物技术是一门具有悠久历史、又与现代科学和技术密切结合的学科。20 世纪 70 年代以来，DNA 重组技术等分子生物学技术的不断发展，赋予了生物技术崭新的内容，使之成为真正的高技术领域——现代生物技术。现代生物技术在医药领域的发展，使疾病的诊断、治疗以及药物的研发出现了崭新的局面。其中最成功的即是将生物技术用于新型药物的研制，目前已产生巨大的社会和经济效益。

生物技术制药是生物制药专业方向的专业必修课。生物技术制药是一门实验技术，重点培养学生的实际动手能力。生物技术制药是综合运用微生物学、生物化学、生物技术、药学等科学的原理和方法进行药物制造的技术。即以医药生物技术为基础，利用基因工程、细胞工程、微生物工程、酶工程、蛋白质工程等技术等来研究和开发药物，用于疾病的诊断、预防和治疗。要求学生通过理论学习和实验验证，能够系统地掌握生物技术药物研发和规模化生产过程，培养和提高学生从事生物技术药物研发和生产的能力。

基于上述认识和实践，我们编写了这本《生物技术制药实验》教材。该教材着重介绍生物技术制药的重要方法和技术，共设置 62 个实验，分为基础性实验、综合性实验和应用性实验三大教学模块。

基础性实验包含了生物技术制药实验的基本操作和技能训练、经典的生物技术实验技术和方法，是最能代表生物技术制药学科特点的实验方法和技术，为综合性实验奠定坚实的基础。

综合性实验是涉及本课程的综合知识的实验，是多种实验方法、技术和多层次实验内容的整合，以培养学生对所学生物技术制药理论知识和实验技术的综合运用能力。

应用性实验是将实验教学与理论教学相结合，旨在培养学生发现问题、解决问题的能力以及严谨的科学态度及创新能力。

该教材以基础性实验为主，以应用性实验作为拓展，力求内容完整、系统、科学，强调实用性和可操作性，注重能力培养。

各院校可根据时间和要求，选用部分实验。每个实验后面都附有相关的思考题，书后编有附录，可供读者查阅。

编者

2011 年 3 月

目 录

第一篇 基础实验	(1)
实验一 大肠杆菌感受态细胞的制备和质粒的转化	(1)
实验二 碱变性法提取质粒 DNA	(2)
实验三 质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测	(6)
实验四 DNA 的回收及纯化	(9)
实验五 PCR 扩增特异基因片段	(11)
实验六 PCR 产物的 TA 克隆	(16)
实验七 限制性内切酶酶切法鉴定重组质粒	(17)
实验八 真核细胞总 RNA 的提取	(20)
实验九 RNA 浓度、纯度的测定及浓度的调整	(22)
实验十 RNA 的琼脂糖凝胶检测	(23)
实验十一 RT-PCR 扩增目的基因	(27)
实验十二 外源基因在大肠杆菌中的表达及其检测	(30)
实验十三 外源基因在哺乳细胞中的表达及其检测	(35)
实验十四 蛋白质印迹分析 (Western blot)	(37)
实验十五 Southern 印迹杂交	(41)
实验十六 Northern 印迹杂交	(43)
实验十七 核苷酸的离子交换色谱	(45)
实验十八 植物组织培养培养基的配制与灭菌	(45)
实验十九 植物愈伤组织诱导和增殖	(48)
实验二十 植物细胞悬浮培养与同步化	(49)
实验二十一 植物原生质体融合	(49)
实验二十二 种子细胞筛选与细胞规模化培养	(53)
实验二十三 动物细胞培养器皿的清洗与灭菌	(54)
实验二十四 动物细胞培养用液的配制	(58)
实验二十五 细胞的原代培养	(61)
实验二十六 细胞的传代培养	(63)
实验二十七 细胞的冻存与复苏	(64)
实验二十八 细胞生长曲线的测定	(65)
实验二十九 组织块培养技术	(67)
实验三十 发酵实验用玻璃器皿的准备及灭菌技术	(68)
实验三十一 微生物接种技术	(70)
实验三十二 细菌增殖曲线的测定	(70)

实验三十三	机械搅拌发酵罐发酵培养枯草芽孢杆菌	(71)
实验三十四	活性干酵母的酒精发酵	(73)
实验三十五	纳豆的发酵生产及纳豆芽孢杆菌在发酵过程的生物学变化	(73)
实验三十六	酸奶发酵剂的制备及酸奶的酿制	(75)
实验三十七	酸奶中乳酸菌的测定	(76)
实验三十八	酶的固定化	(78)
实验三十九	酵母蔗糖酶的部分纯化与纯度测定	(81)
实验四十	酵母蔗糖酶活力测定及酶促动力学研究	(85)
实验四十一	酵母蔗糖酶的结晶	(87)
实验四十二	胰蛋白酶的亲和色谱	(88)
第二篇	综合实验	(91)
实验一	基因工程菌的发酵工艺	(91)
实验二	基因工程表达产物分离纯化	(93)
实验三	质粒的大规模制备	(96)
实验四	重组质粒转染人 PBMC 细胞	(97)
实验五	烟草叶片组织培养	(99)
实验六	HeLa 细胞与鸡红细胞的融合实验	(99)
实验七	红曲霉摇瓶发酵制备红曲霉色素	(101)
实验八	血清免疫球蛋白粗品的制备	(103)
实验九	限制性内切酶的制备	(104)
实验十	蛋白质类药物的分离、纯化	(106)
实验十一	蛋白质类药物的相对分子量及纯度测定	(108)
实验十二	二维双向凝胶电泳 (2-DE) 分析鉴定蛋白质	(110)
第三篇	应用实验	(112)
实验一	基因工程干扰素的制备	(112)
实验二	基因工程干扰素效价的测定	(114)
实验三	青霉素效价的测定	(115)
实验四	重组尿激酶的效价测定	(119)
实验五	SOD 的提取、分离机活性测定	(121)
实验六	动物药物卵磷脂的制备	(123)
实验七	菠萝蛋白酶的制备及酶活力测定	(124)
实验八	糖化酶的制备及酶活力测定	(125)
实验九	重组人促红细胞生成素 (rhEPO) 的体内活性测定	(127)
实验十	单克隆抗体的制备、纯化及鉴定	(130)
实验十一	基因芯片技术	(151)
实验十二	基因表达的系列分析 (SAGE) 技术	(155)
实验十三	蛋白质 - 核酸相互作用分析	(157)
附录	常用仪器设备简介	(161)

第一篇 基础实验

实验一 大肠杆菌感受态细胞的制备和质粒转化

1. 实验目的

掌握 CaCl_2 法制备大肠杆菌感受态细胞和质粒的化学转化法。

2. 实验原理

感受态是细菌能接受外源 DNA 能力的一种生理状态。用冰冷的 CaCl_2 溶液处理大肠杆菌，使细菌处于 0°C 的 CaCl_2 低渗溶液中，细菌细胞膨胀成球形，细胞膜的结构被改变，细菌处于短暂的“感受态”。此时，这些细菌可使每微克超螺旋质粒 DNA，如一些插入目的 DNA 片段的重组质粒，产生 $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 个转化的菌落。当质粒与这些大肠杆菌混合后，质粒黏附在大肠杆菌的表面，在 42°C 的温度时，大肠杆菌出现热休克，质粒可通过大肠杆菌细胞膜上形成的空隙进入菌体内。随后，加入 LB 培养液，于 37°C 振动培养可使细菌复苏，并且表达质粒编码的抗生素抗性基因，提高转化效率。转化成功的大肠杆菌可以在相应抗生素培养皿中传代，形成菌落。质粒 DNA 的转化是重组 DNA 技术中重要的一环。

3. 实验材料与试剂

- (1) 菌株 DH5 α 等
- (2) 质粒 pUC118 (ampicillin, Amp^r)
- (3) 100mmol/L CaCl_2

称取 1.1g 无水 CaCl_2 ，溶于 90ml 蒸馏水中，定容至 100ml，装于 250ml 三角瓶中，0.07MPa 高压灭菌 30 分钟， 4°C 保存。

- (4) 氨苄西林 (100mg/ml)

用无菌水配制并过滤 ($0.22 \mu\text{m}$) 除菌，滤液于 -20°C 冰箱中保存。

- (5) LB 培养基

细菌培养用胰蛋白胨	10g
细菌培养用酵母提取物	5g
NaCl	5g

加 800ml 水，放入磁力搅拌棒，在磁力搅拌器上搅拌至彻底溶解，用 5M NaOH (约 0.2 ml) 调节 pH 值至 7.0，加水定容至 1000 ml。高压 15 lbf/in² ($1.034 \times 10^6 \text{Pa}$) 消毒 30 分钟，冷却后可加入氨苄西林 (50mg/ml) 500ul，视载体特性而定，混匀，即为含抗生素的 LB 培养液。存放于避光处。

- (6) LB 平板 LB 培养液中加入 1.5% 琼脂粉，高压灭菌，稍冷却后铺平板。

(7) 含抗生素 LB 平板配方同上，高压灭菌后，待含有琼脂的培养基冷却至 65°C 左右，加入氨苄西林，使之成为终浓度为 $50 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ 培养液，倒入培养皿，用煤气灯火焰掠过培养基表面，以消除气泡。冷却后，标记，封于塑料袋中，倒置，于 4°C 冰箱内避光保存。

- (8) 培养皿及 1.5ml 离心管等。
- (9) 恒温培养摇床 (调至 37°C, 225rpm)
- (10) 42°C 恒温水浴
- (11) 玻璃涂棒 (普通玻璃吸管, 细头部在煤气灯上烧成“L”形)
- (12) 定时器、记号笔、一次性手套和筒纸

4. 实验步骤

- (1) 将冷冻保存的 DH5 α 菌种接种在 LB 平板上, 37°C 培养过夜 (约 16 小时)。
- (2) 从 LB 平板上挑取 DH5 α 单个菌落接种在 5ml LB 液体培养基中, 37°C 振荡培养过夜 (约 16 小时)。
- (3) 次日取 0.5~1.0ml 上述菌液, 接种于 50 ml 新鲜 LB 培养液中, 37°C 振荡培养 (2~3 小时), 待 OD₆₀₀=0.4~0.5, 立即置冰浴 10~15 分钟。
- (4) 将细菌转移到一个灭菌的 50ml 离心管中, 4°C 3000r/min 离心 10 分钟, 弃去上清液 (尽可能将所有的上清液去净), 收集菌体。
- (5) 将沉淀的菌体悬浮于 20ml 0.1mol/L 冷 CaCl₂ 内, 冰浴中放置 30 分钟, 4°C 3000r/min 离心 10 分钟, 弃去上清液 (尽可能将所有的上清液去净)。
- (6) 沉淀的菌体再悬浮于 2ml 0.1mol/L 冷 CaCl₂ 溶液 (操作要轻), 并置于冰浴中 (感受态细菌可以在 12.5% 的无菌甘油 -70°C 保存)。
- (7) 取大肠杆菌 DH-5 α 新鲜感受态细胞 100 μ l 于 1.5ml Eppendorf 管中, 加入 50~100ng 质粒 pUC118 DNA, 轻轻旋转以混合内容物, 在冰浴中放置 30 分钟。
- (8) 42°C 热激活 90 秒后, 立即放入冰浴, 放置 2~5 分钟。
- (9) 加入 LB 液体培养基 900 μ l, 37°C 剧烈振荡培养 60 分钟 (转速不低于 225rpm)。
- (10) 取 100 μ l 转化液涂布在含氨苄青霉素 (Amp) 100 μ g/ml 的 LB 固体平板上, 37°C 倒置培养 16~24 小时。
- (11) 观察平板, 长出的菌落可能就是转化子, 可进一步提取质粒鉴定。

5. 注意事项

- (1) 制备感受态细胞的全部操作均须在冰浴低温条件下进行, 同时注意无菌操作, 防止感受态细胞受杂菌污染。
- (2) 42°C 热激活时间长短很关键, 转移速度要快, 且温度要准确, 同时注意热激活过程中离心管不要摇动。
- (3) 菌液涂皿操作时, 应避免反复来回涂布, 过多的机械挤压涂布会使细胞破裂, 影响转化率。
- (4) 实验用的玻璃器皿、微量吸管及 Eppendorf 管等, 应彻底洗净并进行高压消毒, 表面去污剂及其他化学试剂的污染往往大幅度地降低转化率。

6. 思考题

影响 CaCl₂ 法转化率的因素有哪些?

实验二 碱变性法提取质粒 DNA

1. 实验目的

掌握提取质粒 DNA 的常用方法。

2. 实验原理

质粒是染色体外的 DNA 分子，大小可为 1kb 到 200kb。大多数来自细菌的质粒是双链、共价闭合环状的分子，以超螺旋形式存在。它是细菌内的共生型遗传因子。从大肠杆菌中分离质粒 DNA 方法众多，目前常用的碱变性法；煮沸法；SDS 法；羟基磷灰石层析法等各方法分离是依据宿主菌株类型、质粒分子大小、碱基组成及结构等特点加以选择的，其中碱变性法既经济且收得率较高，提取的质粒 DNA 可用于酶切、连接与转化。

碱变性法是制备质粒 DNA 的最常用方法。碱变性提取质粒 DNA 是利用共价闭合环状质粒与线性染色质在拓扑学上的差异来分离它们，在碱性 pH，DNA 变性，恢复中性时，线性染色体 DNA 不能准确复性，与其他大分子共沉淀，而质粒 DNA 却可以准确复性，留在上清中。碱性下，变性蛋白是可溶的，酸性、中性下变性蛋白不溶而沉淀。几乎所有纯化质粒的方法都用到质粒 DNA 分子相对较小和共价闭合环状这两个特性。由于操作原因提取的质粒可有三种结构：超螺旋、开环和复制中间体（即没有复制完全的两个质粒连在了一起）

实验中在 pH 高达 12.6 的碱性条件下，染色体 DNA 的氢键断裂，双螺旋结构解开而变性。质粒 DNA 的大部分氢键也断裂，但超螺旋共价闭合环状的两条互补链不会完全分离，当以 pH4.8 的 NaAc 高盐缓冲液去调节其 pH 至中性时，变性的质粒 DNA 又恢复原来的构型，保存在溶液中，而染色体 DNA 不能复性而形成缠连的网状结构，通过离心，染色体 DNA 与不稳定的大分子 RNA、蛋白质 -SDS 复合物等一起沉淀下来而被除去。

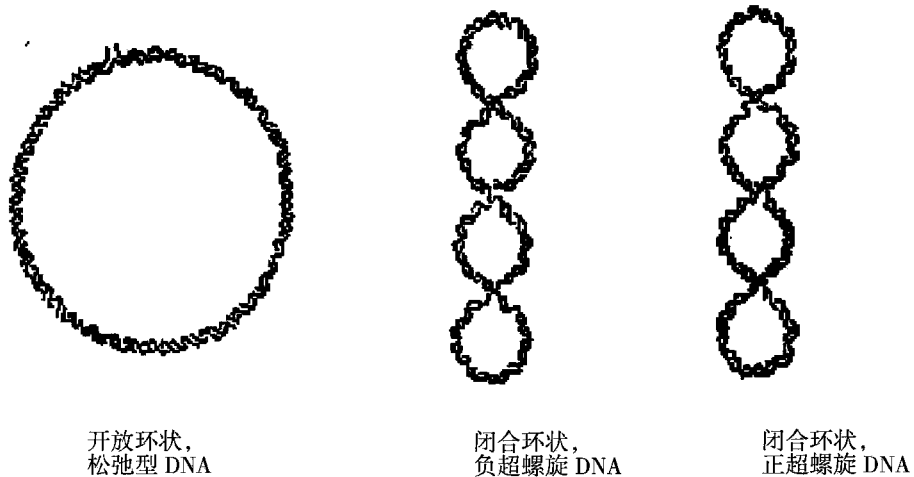


图 1-1 不同状态下的双链环状 DNA 分子示意图

3. 实验材料与试剂

(1) 大肠杆菌 DH-5 α (含 pUC118 质粒)

(2) LB 液体培养基

胰蛋白胨 (Tryptone) 10g/L

酵母浸出粉 (Yeast extract) 5g/L

NaCl 10g/L

用 2mol/L NaOH 调节 pH 至 7.2~7.4，高压蒸气灭菌 30 分钟，4 $^{\circ}$ C 贮存。

(3) 抗生素：氨苄青西林 (ampicillin, Amp)，配制成 100mg/ml 备用。

(4) 溶液 I (可成批配制, 灭菌后 4℃ 贮存)

50mmol/L 葡萄糖

25mmol/L Tris-HCl (pH8.0)

10mmol/L EDTA (pH8.0)

2mg/ml 溶菌酶

(5) 溶液 II (最好现用现配, 不需灭菌)

0.2mol/L NaOH

1% SDS

(6) 溶液 III

3mol/L NaAc (pH4.8) 溶液

(7) TE 缓冲液

10mmol/L Tris-HCl (pH8.0)

1mmol/L EDTA

(8) 预冷的无水乙醇

4. 实验器材

低温高速离心机, 涡流混合器, 微量移液器, 接种环, 1ml 移液管, 1.5ml Eppendorf 管, 200 μ l 吸头, 冰块, 牛皮纸, 纱布盖, 线绳。

5. 实验步骤

(1) 挑取琼脂培养板上的含有 pUC118 质粒的单菌落, 接种至 3ml LB 培养液 (含 100 μ g/ml 氨苄青西林), 37℃ 振荡培养过夜 (约 16h)。

自下一步骤起不需无菌操作

(2) 取 1ml 菌液于 1.5ml Eppendorf 管中, 3000r/min 离心 5 分钟, 弃去上清液。

(3) 将细菌沉淀重悬于 100 μ l 预冷的溶液 I 中, 强烈震荡混匀。

(4) 加入 200 μ l 溶液 II, 温和振荡, 溶液变黏稠, 而且清亮透明, 冰浴 10 分钟。

(5) 加入 150 μ l 预冷的溶液 III, 温和振荡, 出现白色沉淀, 冰浴 10 分钟。

(6) 4℃ 10,000r/min 离心 10 分钟, 将上清液小心倒入另一个新 Eppendorf 管中, 加入 800 μ l 预冷的无水乙醇。-20℃ 冰箱中放置 1 小时, 沉淀 DNA。

(7) 4℃ 10,000r/min 离心 10 分钟, 弃去上清液, 将 Eppendorf 管中所有液体挥发干净。

(8) 加入 20 μ l TE 缓冲液溶解 DNA。

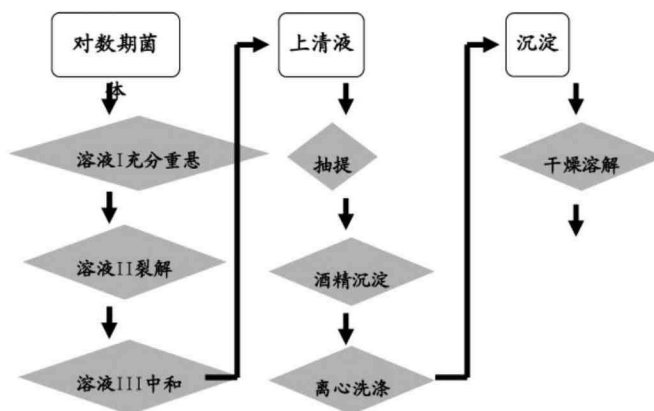


图 1-2 减裂解法流程图

6. 注意事项

(1) 去除染色体 DNA 是该实验成功的标志, 其关键步骤是加入溶液 II 和溶液 III 时, 控制变性与复性操作时机, 既要使试剂与染色体 DNA 充分作用使之变性, 又要使染色体 DNA 不断裂成小片段, 从而能与质粒 DNA 相分离。这就要求试剂与溶菌液充分摇匀, 摇动时用力要适当。加入溶液 I 时可用力振荡几次, 因为此时细菌还没有与溶菌酶完全作用, 染色体 DNA 尚未释放出来, 不必担心其分子断裂。加入 SDS 以后, 注意振荡不能过分用力, 但还要保证溶液混合充分, 因此可上下颠倒 Eppendorf 管数次, 直至其混匀。

(2) 加乙醇沉淀 DNA 时, 要把离心管加盖上下颠倒摇动几次, 观察水相与乙醇之间没有分层现象之后, 才可以放在冰箱中去沉淀 DNA, 以获得更多的 DNA。

(3) 乙醇沉淀 DNA 离心后, 要把离心管四周的上清液抽干或将离心管倒置于滤纸上以尽量让管内液体流出。否则, 影响 TE 缓冲液溶解 DNA。

(4) 在材料准备方面: 尽可能使用处于对数期的新鲜菌体, 由于老化菌体将导致开环质粒增加; 同时在培养时应加入筛选压力, 否则菌体易污染, 质粒易丢失; 尽量选择高拷贝的质粒, 如为低拷贝或大质粒, 则应加大菌体用量; 菌株不要频繁转接, 否则将引起质粒丢失。

(5) 在细胞裂解时要注意: 使用的菌体量适当, 菌体量过大将导致细胞裂解不完全, 另外, 离心菌体时要将培养基去除干净, 加入重悬液时要保证菌体在悬浮液中充分悬浮, 还要注意变性的时间不要过长 (通常不超过 5 分钟), 否则质粒易被打断, 同时复性时间也不宜过长, 否则会有基因组 DNA 的污染。

7. 思考题

(1) 未提出质粒或质粒得率较低, 如何解决?

(2) 质粒纯度不高, 如何解决?

(3) 简要叙述溶液 I、溶液 II 和溶液 III 的作用, 以及实验中分别加入上述溶液后, 反应体系出现的现象及其成因?

(4) 简要叙述酚氯仿抽提 DNA 体系后出现的现象及其成因?

(5) 沉淀 DNA 时为什么要用无水乙醇及在高盐、低温条件下进行?

(6) 染色体 DNA 与质粒 DNA 分离的主要依据是什么?

附录

一、某些试剂的生化作用原理

1. 溶液 I—溶菌液

① 溶菌酶: 它是糖苷水解酶, 能水解菌体细胞壁的主要化学成分肽聚糖中的 β -1,4 糖苷键, 因而具有溶菌作用。其最适 pH 为 8.0。

② 葡萄糖: 增加溶液的黏度, 维持渗透压, 防止 DNA 受机械力作用而降解。

③ EDTA: 螯合 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等金属离子, 抑制 DNase 对 DNA 的降解作用。另外, EDTA 的存在, 有利于溶菌酶的作用, 因为溶菌酶的反应要求有较低的离子强度的环境。

2. 溶液 II—NaOH-SDS 液

① NaOH: DNA 在 $pH > 5$ 、 < 9 的溶液中是稳定的。但当 $pH > 12$ 或 $pH < 3$ 时, 就会引起双链之间的氢键解离而变性。溶液 II 中的 NaOH 浓度为 200mmol/L, 加到提取液中时, 该系统的 pH 就高达 12.6, 因而促使染色体 DNA 与质粒 DNA 的变性。

② SDS: SDS 是离子型表面活性剂。它主要功能是溶解细胞膜上的脂质和蛋白, 因而溶解膜蛋白破坏细胞膜; 解聚细胞中的核蛋白; SDS 能与蛋白质结合成为 $R-O-SO_3^- \cdots R^+$ —蛋白质

复合物，使蛋白质变性而沉淀下来。

3. 溶液 III—3mol/L NaAc (pH4.8) 溶液

NaAc 的水溶液呈碱性，为了调节 pH 至 4.8，必须加入大量的冰醋酸，所以该溶液实际上是 NaAc-Hac 的缓冲液。用 pH4.8 的 NaAc 是为了把 pH12.6 的提取液调回至 pH 中性，使变性的质粒 DNA 能够复性，并稳定存在。而高盐的 3mol/L NaAc 可以中和核酸上的电荷，减少相斥力，有利于变性的大分子染色体 DNA、RNA 互相聚合而沉淀下来，同时钠盐与 SDS-蛋白复合物作用后，能形成较小的钠盐形式复合物，使沉淀更完全。

4. 沉淀 DNA

乙醇可以任意比例和水相混溶，乙醇与核酸不会起任何化学反应，对 DNA 很安全，因此是理想的 DNA 沉淀剂。DNA 溶液中 DNA 是以水合状态稳定存在的，当加入乙醇时，乙醇会夺去 DNA 周围的水分子，使 DNA 失去水而易于聚合。

二、某些试剂的配制方法

1. 溶液 I 配制方法

葡萄糖	0.991g
双蒸馏水	80ml
250mmol/L EDTA	4ml
1.0mol/L Tris-HCl (pH8.0)	2.5ml

用双蒸馏水定容至 100ml，0.07M Pa 高压灭菌 20 分钟，4℃保存，临用时加入 200mg 溶菌酶。

2. 溶液 II 配制方法

2mol/L	NaOH	10ml
10%	SDS	10ml
	双蒸馏水	80ml

最好现用现配，不需灭菌。

实验三 质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测

1. 实验目的

了解琼脂糖凝胶电泳的原理，掌握琼脂糖凝胶的制作及进行电泳的方法。

2. 实验原理

带电物质在电场中的定向运动称为电泳。核酸分子是两性解离分子，在 pH 3.5 时，碱基上的氨基基团解离，而三个磷酸基团中只有第一个磷酸解离，整个分子带正电荷，在电场中向负极泳动；在 pH 8.0~8.3 时，碱基几乎不解离，磷酸全部解离，核酸分子带负电荷，在电场中向正极移动。

DNA 电泳速率与电荷效应无关，这是由于随着碱基数的增加，DNA 分子量增加，电荷数也增加，这样荷质比基本维持一个常数。当不同大小和构象的核酸分子的电荷密度大致相同，在自由泳动时，各核酸分子的迁移率区别很小，难以分开。所以采用适应浓度的凝胶介质作为电泳支持物，发挥分子筛的功能，使得分子大小和构象不同的核酸分子泳动率出现较大差异，达到分离的目的。通常 DNA 分子迁移速率与其相对分子量成反比。值得注意的是，等长度的单链 DNA 和双链 DNA 在中性或碱性凝胶中的迁移率大致相等。

溴化乙啶染料的化学结构及其对 DNA 分子的插入作用。由于插入了溴化乙啶分子，在紫外光照射下，琼脂糖凝胶电泳中 DNA 的条带便呈现出橘黄色荧光，易于鉴定。

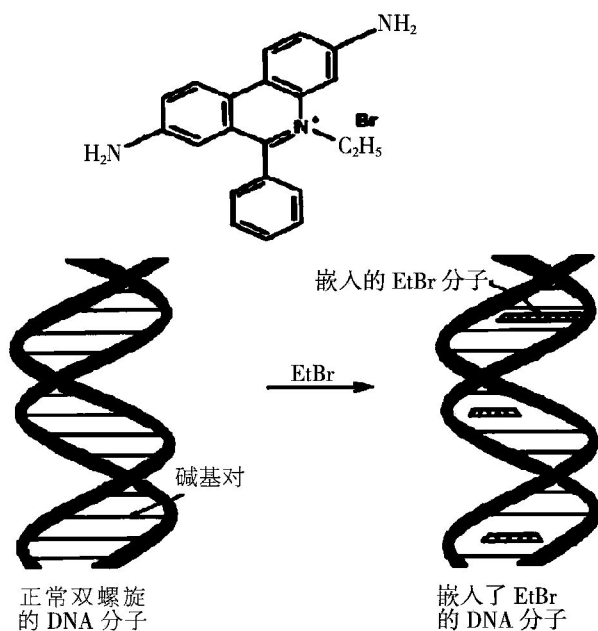


图 1-3 溴化乙啶染料的化学结构及其对 DNA 分子的插入作用

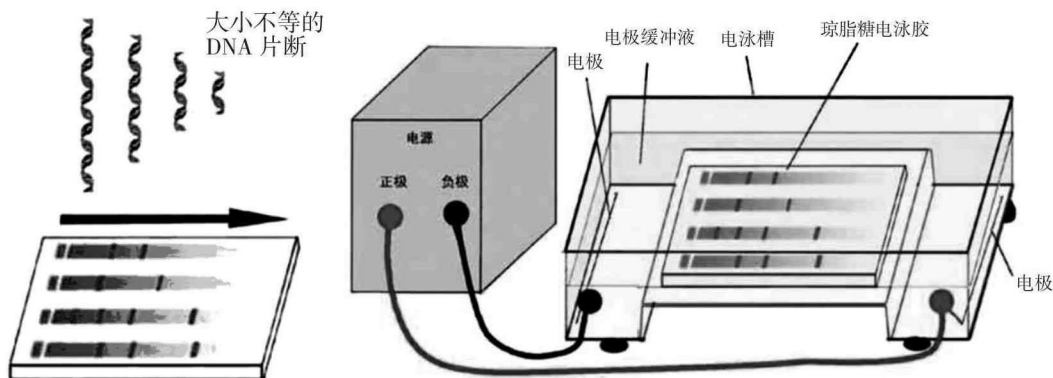


图 1-4 琼脂糖凝胶电泳分离大小不等的 DNA 片段示意图

3. 实验材料与试剂

- (1) 质粒 pUC118
- (2) 琼脂糖
- (3) 10mg/ml 溴化乙啶 (EB)溶液

小心称取 1g 溴化乙啶，转移到广口瓶中，加 100ml 水，用磁力搅拌器搅拌至完全溶解。用铝箔包裹装液管，4℃贮存。

- (4) DNA 分子量标准 (Marker)
- (5) 50×TAE 电泳缓冲液

Tris 碱 242g, 57.1 ml 的冰乙酸 (17.4mol/L), 200ml 的 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0), 用水定

容至 1000ml。

(6) 6× 溴酚蓝上样缓冲液 (100ml)

溴酚蓝 0.25g, 蔗糖 40g, 10mM EDTA (pH8.0) 0.2ml, 4℃保存。

4. 实验器材

- (1) 恒温水浴
- (2) 电泳槽
- (3) 电泳仪
- (4) 微波炉
- (5) 微量移液器: 100 ~ 1000 μ l, 10 ~ 100 μ l, 0.5 ~ 10 μ l
- (6) 透射紫外观察仪

5. 实验步骤

- (1) 称取 1.0 g 琼脂糖, 加入 100ml 1×TAE 电泳缓冲液中, 加热使琼脂糖溶解。
- (2) 凝胶冷却至 60℃左右, 加入溴化乙啶至终浓度为 0.5 μ g/ml。
- (3) 选择孔径大小合适的点样梳子, 垂直架在电泳胶模的一端, 使点样梳子底部距离电泳胶模底部 1.0mm。
- (4) 将琼脂糖溶液倒入模具, 凝胶厚度一般为 0.3 ~ 0.5cm, 注意避免产生气泡。室温下 15 ~ 30 分钟后, 琼脂糖溶液完全凝固。
- (5) 小心拔掉点样梳子和电泳胶模两端的挡板, 将电泳胶模放入电泳槽, 加样孔在负极端。
- (6) 加入 1×TAE 电泳缓冲液至电泳槽中, 液面高于胶面 1 ~ 2mm, 如点样孔内有气泡, 用吸管小心吸出, 以免影响加样。
- (7) 取 15 μ l DNA 样品, 加入 1/10 体积的上样缓冲液并混匀。(注: 注意点样品要放阴极端! 每加完一个样品要更换 tip 头, 以防止互相污染; 注意上样时要小心操作, 避免损坏凝胶或将样品槽底部凝胶刺穿。)
- (8) 用微量移液器将 DNA 样品加入梳孔中, 记录样品点样顺序。
- (9) 接通电源, 电压选择为 3 ~ 5V/cm, 使 DNA 样品向正极移动。注意: 长度以两个电极之间的距离计算。
- (10) 当指示剂迁移距离超过凝胶长度的 2/3 时, 即可终止电泳; 切断电源后, 凝胶可以直接在紫外线灯下观察或拍照。注意要在透射仪的样品台上铺一张保鲜膜 (全班共用一张保鲜膜), 赶走气泡, 然后将胶槽内的胶块小心滑出至样品台上面。

6. 注意事项

- (1) 加热溶解琼脂糖时应不断地摇动容器, 使附于壁上的颗粒也完全溶解。
- (2) EB 有潜在的致癌危险, 操作时必须戴乳胶手套或一次性手套。
- (3) 紫外光对眼睛有害, 观察时应戴上眼镜或防护面罩。
- (4) 相同分子量但不同构型的 DNA 分子迁移速率不同。质粒在正常情况下以 cccDNA 构型存在, 在提取过程中由于机械力、酸碱度、试剂等的原因, 可能会使 DNA 链发生断裂。所以, 多数质粒粗提物中含有三种构型的质粒: 共价闭合环状 DNA (cccDNA); 开环 DNA (ocDNA); 线形 DNA (LDNA)

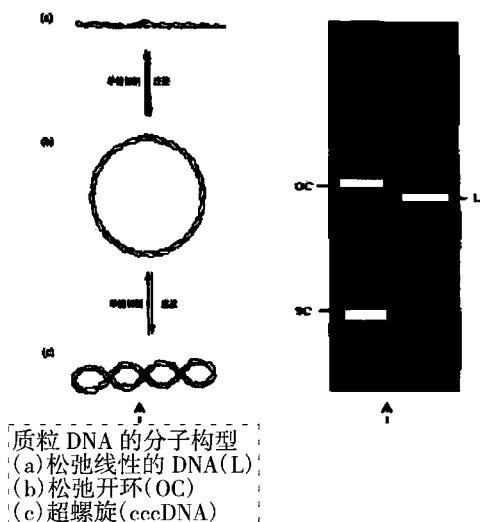


图 1-5 三种构型的质粒的电泳模式图谱

7. 思考题

哪些因素影响带电粒子在电场中泳动?

附录

表 1-1 琼脂糖凝胶浓度与线性 DNA 的最适分辨范围

琼脂糖凝胶浓度线性	DNA 的最适分辨范围 (bp)
0.5%	1,000 ~ 30,000
0.7%	800 ~ 12,000
1.0%	500 ~ 1,000
1.2%	400 ~ 7,000
1.5%	200 ~ 3,000
2.0%	500 ~ 2,000

实验四 DNA 的回收及纯化

1. 实验目的

了解琼脂糖凝胶电泳中回收 DNA 片段的常用方法,掌握应用试剂盒回收 DNA 的技术方法。

2. 实验原理

DNA 片段的分离与回收是基因工程操作中一项重要的技术。产物纯度与回收率是该实验中两个重要的技术指标:纯度不纯将严重影响后面的酶切、连接、标记等反应;回收率低将会大大增加前期工作量。

PCR 产物回收试剂盒的基本原理是,在高盐状态下,纯化树脂专一性地吸附 DNA;而在低盐或水溶液状态下, DNA 被洗脱下来。此法简便快捷,可在几分钟内从 PCR 反应液,或十几分钟内从普通琼脂糖凝胶中回收高纯度的 PCR 产物,用于 DNA 测序及其他酶促反应。其回收率分别为 85%和 70%左右。该系统不仅用于纯化 PCR 产物,还可以从反应液或普通琼脂糖凝胶中回收各种类型的 DNA 片段,适用范围从 150bp 到十几 kb。

3. 实验试剂

- (1) PCR 产物
- (2) TAE 电泳缓冲液
- (3) 10×DNA 电泳样品缓冲液
- (4) 琼脂糖
- (5) 无菌水
- (6) 溴化乙啶 (EB)
- (7) PCR 产物回收试剂盒 (纯化树脂, 离心纯化柱)
- (8) 80%异丙醇或 80%乙醇
- (9) 超纯水或 TE 缓冲液

4. 实验仪器

- (1) 台式高速离心机
- (2) 水浴锅
- (3) 电泳仪、电泳槽

5. 实验步骤

(1) 将 50~100 μl PCR 反应液 (或酶切反应液) 在 1%的琼脂糖凝胶上电泳后, 切下所需的 DNA 条带, 装入 2ml 离心管中, 尽量切掉多余的琼脂糖凝胶。

(2) 200~400mg 琼脂糖凝胶中加入 0.4ml 纯化树脂 (使用前充分混匀), 70°C保温 5~10 分钟, 每两分钟颠倒混匀 1 次, 使琼脂糖凝胶完全融化。对于高浓度的琼脂糖凝胶 (>2%), 每 200mg 的琼脂糖凝胶中加入 0.5ml 纯化树脂, 加热融胶的时间延长到 15 分钟。

(3) 将混合液移入离心纯化柱, 13,000rpm 离心 30 秒, 弃去收集管中的废液。

(4) 加入 500 μl 80%异丙醇 (或乙醇), 13,000rpm 离心 30 秒, 弃去收集管中的废液。

(5) 13,000rpm 离心 2 分钟, 如果离心纯化柱上还残留有异丙醇 (或乙醇), 13,000rpm 再离心 1 分钟, 务必将异丙醇 (或乙醇) 除尽。

(6) 将离心纯化柱套入干净的 1.5ml 或 2ml 离心管中, 开盖放置 2~3 分钟, 务必使乙醇充分挥发, 加入 40 μl TE 缓冲液 (若用于测序, 则加 40 μl 纯水) 于纯化树脂上, 注意不能粘在管壁上。放置 2 分钟充分反应后, 13,000rpm 离心 30 秒。

(7) 离心管中的液体即是纯化的 DNA 片段, 取 4 μl 电泳 (0.8%琼脂糖, 120V, 10 分钟) 检测并目测定量。-20°C保存备用。

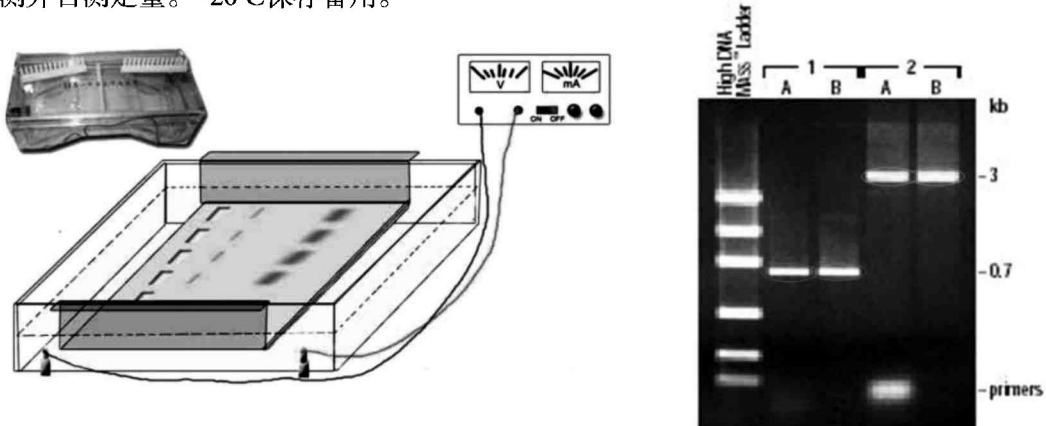


图 1-6 实验示意图

6. 注意事项

(1) 纯化树脂 (于 GS 结合液中) 为灰褐色粉状物质, 静置时沉淀于瓶底, 使用时要充分混匀。

(2) 室温低于 25℃ 时, 纯化树脂 (于 GS 结合液中) 可能出现结晶或盐析, 此时请务必预热, 使其完全溶解后使用。

(3) TE 缓冲液或超纯水的用量视对浓度的要求而定。离心纯化柱放入离心管中, 若盖不上盖子, 亦没有关系, 可开盖离心。

附录——常用的 DNA 回收方法

1. 低熔点胶法 低熔点胶是向普通琼脂糖的多糖链上引入羟乙基形成的, 这一变化会使凝胶的熔化点与凝固点均降低。低熔点胶在 30℃ 时凝结、65℃ 时熔化, 这一温度尚不足以使 DNA 分子变性。操作时可先灌一块普通的胶, 然后用低熔点胶取代其中的回收部分。割下的胶加入 TE 后于 65℃ 保温促使凝胶熔化, 再加入等体积的酚抽提去除凝胶。低熔点胶的另一个特点是电泳回收后可以立即进行酶切连接、标记等酶反应, 因为这类胶中不含有普通琼脂糖中抑制酶活性的硫酸盐等杂质, 并且收集的胶条能在酶反应的合适温度 (37℃) 始终保持液体状态。

2. 玻璃粉 (乳) 法 将胶条割下加入 NaI 溶液浸泡, 剧烈振荡数分钟促使溶胶。向胶液中加入经酸净化处理的极细玻璃粉 (乳), 室温反复倒转离心管使 DNA 吸附于其上。离心收集玻璃粉后加入 TE 并于 37℃ 保温, 洗脱吸附于玻璃粉上 DNA, 再次离心收集含 DNA 的上清液即可。玻璃粉法适用于回收 0.4~1kb 的小分子片段, 均有 80% 的回收率。

3. QIAgen 胶回收试剂盒 由于凝胶溶于含 NaI 的溶胶液, DNA 能专一地与离心柱中纤维素结合。结合后的 DNA 经洗涤除去杂质, 最后在低盐缓冲液中经离心从纤维素上洗脱下来。

实验五 PCR 扩增特异基因片段

1. 实验目的

学习 PCR 体外扩增的基本原理; 掌握 PCR 的基本操作; 了解引物设计的一般原则。

2. 实验原理

PCR(Polymerase chain reaction)是一种特定核酸序列扩增技术, 是分子生物学中一项极为常用的技术。

PCR 的原理是在模板 DNA、引物和 4 种脱氧核糖核苷酸(dNTP)存在的条件下, 依赖于 DNA 聚合酶的体外酶促合成反应。两个引物分别位于靶序列的两端, 同两条模板的 3' 端互补, 由此限定扩增片段。PCR 反应由变性—退火—延伸循环构成, 即在高温下模板双链 DNA 变性, 在较低温度下与过量的引物退火, 再在适中温度下经 DNA 聚合酶催化进行延伸。每一循环的产物可作为下一循环的模板, 因此扩增产物的量以指数级方式增加。理论上, 经过 n 次循环可使靶基因扩增到 2^n-1 , 由于扩增效率很难达到 100%, 实际量会少些, 通常经 25~30 次循环可扩增 10^6 倍, 这个量可满足分子生物学研究的一般要求。

PCR 反应中的引物设计极为重要。要保证 PCR 反应能准确、特异、有效地对模板 DNA 进行扩增, 通常引物设计要遵守以下原则: ①引物长度: 15~25 个核苷酸; ②GC 含量为 40%~60%; ③ T_m 值高于 55℃ [$T_m=4(C+G)+2(A+T)$ 计算]; ④引物与模板非特异性配对位点的碱基配对率小于 70%; ⑤两条引物间配对碱基数小于 5 个; ⑥引物自身配对 (特别是在引物的 3'

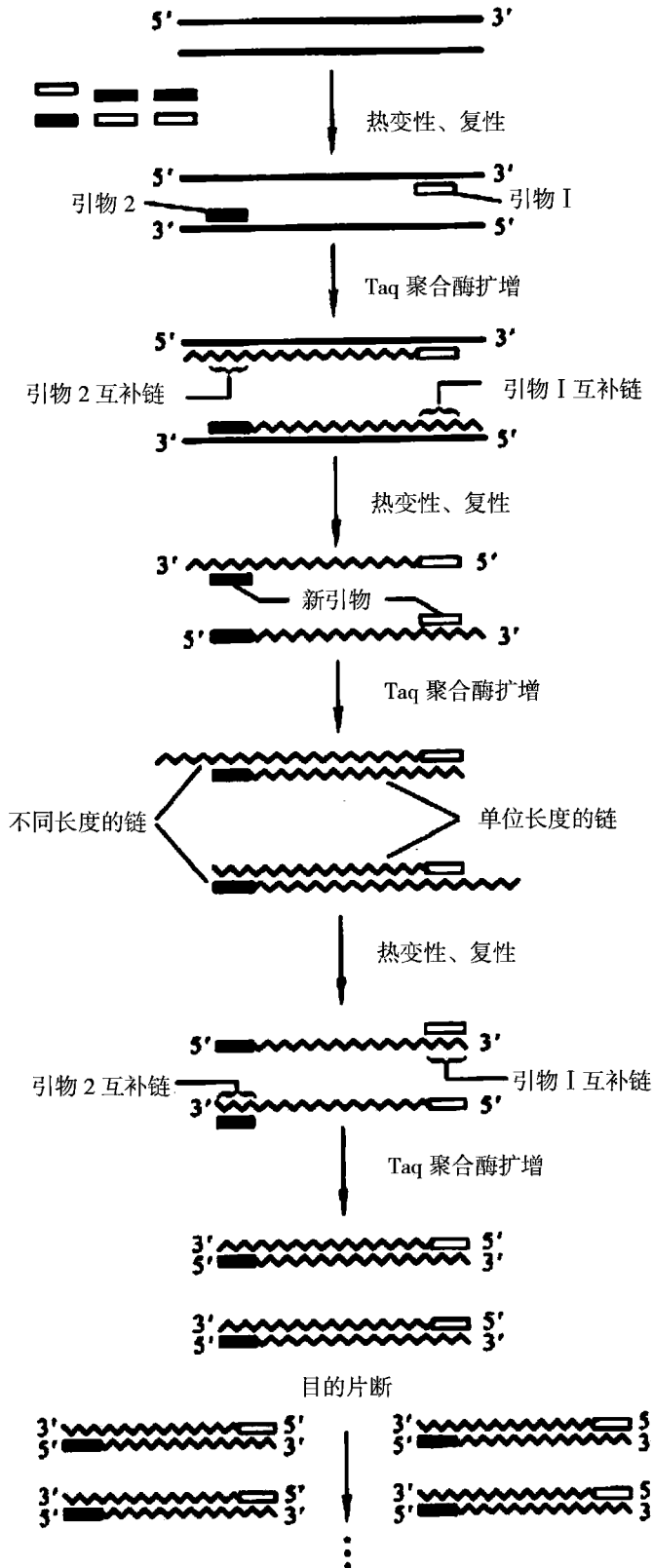


图 1-7 PCR 扩增 DNA 的原理示意图