

高等医学院校实验系列规划教材

生物工程技术实验指导

SHENGWU GONGCHENG JISHU SHIYAN ZHIDAO

主编 梁 猛



中国科学技术大学出版社

高等医学院校实验系列规划教材

生物工程技术实验指导

SHENGWU GONGCHENG JISHU SHIYAN ZHIDAO

主 编 梁 猛

副主编 王文锐

编 委 梁 猛 王文锐

席 琚 毛颖基

中国科学技术大学出版社

内 容 简 介

本书共分为四篇。第一篇为绪论,主要介绍了生物工程技术实验室的基本要求和实验报告要求。第二篇为分子生物学实验技术,主要以分子生物学技术为主线,包括琼脂糖凝胶电泳、聚合酶链式反应、DNA 提取和转基因检测,介绍了分子生物学实验的基本原理、技术路线、方法和具体操作,并对实验注意事项、应用和知识拓展给予了提示。第三篇为发酵工程技术,主要介绍了酸奶制作、甜酒制作、发酵罐的结构及灭菌、谷氨酸发酵和透明质酸合成。第四篇为生物工程下游技术,属于综合性实验,包括血清 γ 球蛋白的分离、纯化及鉴定,要求学生参与实验设计和结果讨论,并做工作汇报,锻炼学生的科研思维。附录部分列出了“发酵工程”课程的习题及参考答案,可以帮助学生更好地掌握发酵工程的基础知识。

本书可作为高等院校生物类、医药类及农林类开设生物工程技术实验的各专业的教学用书,也可供有关研究人员和技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物工程技术实验指导/梁猛主编. —合肥:中国科学技术大学出版社,2018. 2
ISBN 978-7-312-04392-5

I. 生… II. 梁… III. 生物工程—实验—高等学校—教材 IV. Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 020401 号

出版 中国科学技术大学出版社
安徽省合肥市金寨路 96 号,230026
<http://press.ustc.edu.cn>
<https://zgkxjsdxcbbs.tmall.com>
印刷 安徽省瑞隆印务有限公司
发行 中国科学技术大学出版社
经销 全国新华书店
开本 710 mm×1000 mm 1/16
印张 7
字数 149 千
版次 2018 年 2 月第 1 版
印次 2018 年 2 月第 1 次印刷
定价 28.00 元

前 言

生物工程是 20 世纪 70 年代初开始兴起的一门综合性应用学科,是以生物学的理论和技术为基础,结合化工、机械、计算机等现代工程知识和技术手段,充分运用分子生物学的前沿方法,人为地进行物种的遗传物质改造,使其具有特殊性能,再过通生物反应器进行大规模的培养,以生产大量有用代谢产物或发挥特殊生理功能的一门新兴技术。生物工程技术广泛应用于医学、药理学、生物学、能源、环保、化工原料等领域,为解决人类健康、资源和环境问题提供坚实的基础。

国内外“生物工程技术”实验指导基本均涉及经典的微生物发酵工程和大分子分离纯化技术,目前有些教材加入了综合性实验。本书以生物工程的上游、中游和下游技术为主线编排,实验目的明确,思路清晰,技术流程简明扼要,有利于加强科研思维训练;同时,考虑到“发酵工程技术”是生物工程领域的核心部分,本书加入了“发酵工程”课程的习题及参考答案。

本书主要是生物技术类专业“分子生物学技术”“发酵工程”和“生物工程下游技术”等专业课程的实验部分,以连续的综合实验进行编制,要求学生参与实验设计和准备工作以及实验结果的研讨分析。紧扣课程特点,重点在生物工程技术的基础理论、技术原理、实验操作、技术应用以及发展趋势等方面,并注重相关学科的交叉融合,包含发酵、血清 γ -球蛋白的分离纯化等。通过对本书的学习,使学生掌握生物工程技术的基本原理和实验设计原理,操作过程,结果分析方法,能独立处理和解决问题,提高科研能力。

全书共分为四篇。第一篇为导论,主要介绍了生物工程技术实验室的基本要求和实验报告要求。第二篇为分子生物学实验技术,主要以分子生物学技术为主线,包括琼脂糖凝胶电泳、聚合酶链式反应、DNA 提取和转基因检测,介绍了分子生物学实验的基本原理、技术路线、方法和具体操作,并对实验注意事项、应用和知识拓展给予了提示。第三篇为发酵工程技术,主要介绍了酸奶制作、甜酒制作、发酵罐的结构及灭菌、谷氨酸发酵和透明质酸合成。第四篇为生物工程下游技术,属于综合性实验,包括血清 γ -球蛋白的分离、纯化及鉴定,要求学生参与实验设计和结果讨论,并做工作汇报,培养学生的科研素养。附录部分列出了由宋存江、方柏山等人主编的《发酵工程原理与技术》一书的课后习题及参考答案,可以帮助学生更好地掌握发酵工程的基础知识。

在本书编写过程中,得到了蚌埠医学院生物科学系陈昌杰教授、吴守伟副教授

的大力支持和指导,在此深表谢意!同时,非常感谢中国科学技术大学出版社为本书顺利出版给予的帮助和支持。

由于编写者水平有限,经验不足,书中难免有疏漏或不当之处,恳请广大读者给予批评指正。

编 者
2018 年 1 月

目 录

前言	(i)
第一篇 导论	(1)
第二篇 分子生物学实验技术	(9)
实验一 琼脂糖凝胶电泳	(9)
实验二 聚合酶链式反应(PCR)	(12)
实验三 全血基因组 DNA 的提取及鉴定	(16)
实验四 Bt-176 转基因玉米的实时荧光定量 PCR 检测	(19)
实验五 玉米油脂中 Bt-176 转基因的实时荧光定量 PCR 检测	(22)
第三篇 发酵工程技术	(26)
实验六 酸奶制作	(26)
实验七 甜酒制作	(28)
实验八 小型发酵罐的安装、拆卸和使用	(32)
实验九 发酵罐中培养基的灭菌及接种	(37)
实验十 谷氨酸发酵	(41)
实验十一 透明质酸合成	(47)
第四篇 生物工程下游技术	(53)
实验十二 盐析:球蛋白与清蛋白分离	(55)
实验十三 凝胶层析:去除球蛋白中无机盐	(58)
实验十四 离子交换层析:纯化 γ -球蛋白	(63)
实验十五 电泳: γ -球蛋白纯度鉴定	(66)
附录 《发酵工程原理与技术》课后习题及参考答案	(71)
第一章 绪论	(71)
第二章 微生物反应的质能平衡与代谢产物的过量生产	(74)
第三章 生物发酵的基本过程	(77)
第四章 微生物发酵动力学	(79)
第五章 分批发酵、补料分批发酵和高密度发酵	(82)
第六章 连续发酵	(84)
第七章 微生物的现代固态发酵	(86)

第八章	基因工程菌株发酵	(88)
第九章	发酵过程中氧的溶解、传递、测定及其影响因素	(91)
第十章	发酵控制工程	(93)
第十一章	发酵工程中的灭菌与空气除菌	(96)
第十二章	发酵工程设备	(99)
第十三章	动植物细胞的发酵工程	(102)
参考文献		(105)

第一篇 导 论

一、生物工程技术实验课简介

生物工程技术实验是以生物学(主要包括微生物学、遗传学、生物化学和细胞学)的理论和技術为基础,结合化工、机械、计算机等现代工程知识和技术手段,进行基因改造(生物工程上游技术)、产品生产(生物工程中游技术)和提纯(生物工程下游技术)的过程。本教材的编写与设计,分别以生物工程的上游、中游和下游技术为主线编排,上游以分子生物学实验技术为主体,中游介绍了发酵工程,下游是血清 γ -球蛋白的分离、纯化及鉴定的综合性实验,下面简要介绍如下。

(一) 分子生物学实验技术

20 世纪 90 年代初期,随着分子生物学的快速发展,分子生物学实验技术迅速成为生命科学相关学科重要的研究工具。高等学校生命科学相关专业的学生要适应时代的发展,除了需要学习分子生物学基础理论知识以外,还必须系统地培养学生在分子生物学方面的技术素养与动手能力,主要通过学生参与设计、完成实验和实验讨论,把学到的分子生物学理论、技术融会贯通地用到实际科学研究中去,使理论与实践更好地结合,提高学生创新性思维和独立分析、解决问题的综合能力。本教材以经典的分子生物学技术为主线,包括琼脂糖凝胶电泳、聚合酶链式反应、DNA 提取和转基因检测,介绍了分子生物学实验的基本原理、技术路线、方法和具体操作,并对实验注意事项、应用和知识拓展给予了提示,扩展了与生命科学相关学科的学生们的知识结构,推动了实验教学内容现代化的进程。

(二) 发酵工程技术

发酵工程是指采用现代工程技术手段,利用生物(主要是微生物)的某些功能,为人类生产有用的生物产品,或直接用微生物参与控制某些工业生产过程的一种技术,利用酵母菌发酵制造啤酒和果酒,乳酸菌发酵制造奶酪和酸奶,真菌生产青霉素等都是发酵工程的应用。随着科学技术的飞速发展,发酵相关技术也有了很

大的进步,目前人类能够控制和改造微生物,使这些微生物为人类生产更优质的产品。现代发酵工程作为现代生物工程技术的重要组成部分,具有广阔的应用前景。发酵工程的内容主要包括菌种选育、培养基配制、灭菌、培养和接种的扩大、发酵过程和产品的分离。本教材主要介绍了酸奶制作、甜酒制作、发酵罐的结构及灭菌、谷氨酸发酵和透明质酸合成,使学生掌握发酵工程的基本知识和基本技能,了解现代发酵工程技术的发展与应用情况,具备一定的微生物生产工程技能,并通过实验操作的锻炼,能够做到理论联系实际,能够基本完成从斜面到各种规模放大的一整套微生物培养操作及成分的处理和检测。

(三) 生物工程下游技术

生物工程下游技术是在酶工程、基因工程、细胞工程等基础上建立起来的,主要包括细胞破碎与分离,膜分离技术,层析、色谱技术,电泳技术等,在社会生活中已经发挥了巨大的作用,生物产品的种类及应用也得到了前所未有的发展。如何进一步使这些生物制品更好地服务于社会,主要取决于生产的规模和提取技术的深化。生物工程下游技术的任务是将目标产物从反应液中提取出来并加以精制以达到规定的质量要求,它泛指从工程菌或工程细胞中获得目的产物的分离纯化、质量监测所需要的一系列单元操作技术,由此可见下游技术是结合分离、纯化和产品检测的综合技术。本教材使用血清 γ -球蛋白分离、纯化及鉴定的综合性实验,学生参与实验设计、结果讨论,并做工作汇报,使学生掌握生物工程产品下游制造技术的科学本质,理解、掌握传统技术基础,接受新概念、新知识、新技术,为今后的科学研究、技术开发和工程应用做好理论准备。本教材紧扣课程特点,重点在生物工程技术的基础理论、技术原理、实验操作、技术应用以及发展趋势等方面,并注重相关学科的交叉融合。为了达到最佳的教学效果,学生在本实验课程学习过程中务必做到实验前预习,实验中积极参与并做好实验记录,实验后及时提交实验报告。同时,考虑到“发酵工程技术”是生物工程技术领域的核心内容,本教材附录部分加入了“发酵工程”课程的习题及参考答案。

生物工程技术的应用领域非常广泛,包括医学、生物、食品、农业、药理学、能源、环保、冶金、化工等方面,它必将为人们提供巨大的经济效益和社会效益,对人类社会的现代化生活产生巨大影响,为世界面临的资源、环境和人类健康等问题的解决提供了基础。通过本教材的学习,使学生掌握生物工程技术的基本原理、实验设计原理、操作过程、结果分析方法,让学生独立处理问题和解决问题,提高科研能力。

二、生物工程技术实验室的基本要求

(一) 人员准入要求

(1) 进入实验室的教师和学生必须具备相应的专业技能,受过相关的实验室生物安全培训,了解实验室潜在的生物危害和特殊要求,能严格执行安全操作规程,经负责人审批后方可进入生物工程技术实验室工作。

(2) 实验室人员必须在身体状况良好、穿好工作服的情况下,方能进入实验室;当身体出现较大的开放性损伤、处于较重的疾病感染状态或呈重度疲劳状态时不得进入实验室。

(3) 外来参观人员需经实验室负责人同意,并在相关人员陪同下进入实验室;未经许可,不得随意带他人进入实验室。

(4) 进入实验室前要摘除首饰,修剪指甲,以免刺破手套;长发应束在脑后,禁止在实验室内穿露脚趾的鞋。

(5) 在实验室里工作时,要始终穿着工作服,工作服应定期清洗、更换,清洗时应使用具有杀菌消毒的洗液或其他相应方法;室内设备仪器不得擅自拆卸、挪动,与本人实验无关的设备不可随意开启。

(6) 禁止在实验室内吸烟、进餐、会客、喧哗,实验室内不得带入私人物品,离开实验室前认真检查水、电、暖气、门窗,对于有毒、有害、易燃、污染、腐蚀的物品和废弃物品应按有关要求执行,不准随意丢弃杂物等。

(7) 每位实验室成员都应以主人翁精神参与实验室的建设与管理,爱护仪器设备,节约用水、用电及实验材料等,注意公共卫生。实验室负责人督促相关制度严格执行,根据情况给予奖惩,出现问题应立即报告管理单位。

(二) 仪器、玻璃器皿和试剂使用要求

1. 仪器使用要求

(1) 实验仪器按指定位置摆放,不得擅自改变仪器设备及其附属设备的存放位置;确需移动位置时,必须经实验室负责人同意,使用后应及时整理复原。

(2) 精密仪器须专人负责管理,使用者经过培训合格后方能使用,对于没有按规定操作导致设备故障者,要追究其责任。

(3) 严格遵守各种仪器的操作规程和登记制度,凡对拟使用的仪器的操作无把握者,务必请教仪器负责人;发现仪器故障者,有义务立即通知仪器负责人,以便及时维修;凡违反操作规程而损坏仪器者,视其损失轻重给予一定处罚。

(4) 各通电设备在使用完毕后,应切断电源,旋钮复原归位,待仔细检查后,方可离去,以保证安全。

(5) 必须严格执行仪器设备运行记录制度,记录仪器运行状况,开、关机时间。

(6) 仪器设备应保持清洁,应有仪器套罩;下次使用者,首先检查仪器清洁卫生,仪器是否有损坏,接通电源后,检查是否运转正常;发现问题及时通知仪器负责人,并找上一次使用者问明情况,知情不报者追查当次使用者的责任。

(7) 微生物发酵实验后,实验室须立即收拾整洁、干净。如有菌液污染须用3%来苏尔液覆盖污染区30 min后擦去;带菌工具(如吸管、玻璃棒等)在洗涤前须用3%来苏尔液浸泡消毒。

2. 玻璃器皿使用要求

(1) 大型器皿建立账目,每年清查一次;易耗器皿损坏后随时填写损耗登记清单,及时订购。

(2) 玻璃器皿使用前应除去污垢,并用2%稀盐酸溶液浸泡24 h后,用清水冲洗干净备用。

(3) 玻璃器皿应轻拿轻放,严格按照其使用条件来使用。

(4) 玻璃器皿使用后随时清洗,染菌后应严格高压灭菌,不得乱弃乱扔。

3. 试剂使用要求

(1) 实验室内易燃、易爆、腐蚀性和剧毒性试剂应分类管理并有相应的目录,使用时应做好领用记录。

(2) 所有试剂必须有明显的标志,对字迹不清的标签要及时更换,对过期失效和没有标签的药品不准使用,并要进行妥善处理。

(3) 使用强酸、强碱等化学试剂时,按照规定要求操作和贮存;使用有机溶剂和挥发性强的试剂,必须在通风橱内进行。

(4) 实验室中试剂如长期不用,应放到储藏室统一管理;同种试剂使用完后再开启新瓶,使用完后放回原处;购买试剂前,先检查试剂柜内的库存,然后按需购买。

(5) 配制的公用溶液存放于指定位置,溶液瓶上都要有标签,标签上要注明溶液名称、浓度、配制者姓名、配制日期等信息;无标签或标签无法辨认的溶液都要当成危险物品重新鉴别后谨慎处理,不可随意扔弃,以免引起严重事故。

(三) 安全卫生要求

(1) 涉及挥发性、刺激性及有毒试剂的操作必须在通风橱内进行;进行有毒、有害、有刺激性的物质或有腐蚀性的物质操作时,应戴好防护手套,在特定实验台上操作,不要污染其他工作台;切勿使乙醇、乙醚、丙酮等易燃药品接近火焰,实验室内严禁吸烟。

(2) 操作感染性、腐蚀性或毒性物质时须在通风橱中进行,并穿戴相关的安全防护用品,如安全镜、面罩或护目镜;高温、高压等易燃、易爆实验,需要特别注意安

全防范。

(3) 消防器材要定时检测,放置在便于使用的地方,保证随时可用,且其周围不可堆放其他物品、杂物。

(4) 实验人员都必须熟悉实验室内水、电、气开关的分布情况,在遇到紧急情况的时候应立刻关闭相应的开关;还应该熟悉实验室的各种应急措施,包括灭火器和火情警铃按钮。

(5) 实验完毕后和下班离开实验室时,应切断电源(必须通电的除外)和水源、清理实验场所、关好门窗后方能离开。所有实验需过夜的,应安排人员值守。

(6) 钥匙为实验室工作人员进入实验室的通行证,不得转借;钥匙的持有者应对本实验室的安全负责。

(7) 实验室内要保持清洁卫生,每天上、下班应进行清扫整理,桌柜等表面应每天用消毒液擦拭,保持无尘,杜绝污染;实验室仪器要摆放合理,并有固定位置。

(8) 实验室内不得乱扔纸屑等杂物,测试用过的废弃物要倒在固定的箱筒内并及时处理;实验室工作台面应保持水平 and 无渗漏,墙壁和地面应当光滑和容易清洗。

(9) 实验室应有良好的通风条件,如安装空调设备及过滤设备,并具有优良的采光条件和照明设备,严禁利用实验室作会议室、学习场所或进行其他文娱活动。

(四) 培养基制备要求

制备的培养基质量直接影响微生物发酵状况,由于不同微生物对营养要求不完全相同以及培养目的不同,不同培养基制备要求不同。

(1) 根据培养基配方的化学成分定量称取,然后溶于超纯水中。

(2) 在室温条件下测定溶液 pH,若与目的 pH 有差异,加入适量酸或碱混匀后再测试,直到达到目的 pH 为止。培养基 pH 务必准确,否则会影响微生物的生长发酵。

(3) 培养基需充分溶解,保持清澈,盛装于玻璃容器中,便于观察杂菌的生长情况。

(4) 培养基的灭菌既要达到完全灭菌的目的,又要注意防止加热而破坏营养物质,一般 121 °C 灭菌 20 min 即可。同时注意高压灭菌可能影响培养基的 pH,故灭菌压力不宜过高或次数太多,以免影响培养基的质量。

(5) 培养基制备好后,必须进行质量控制试验。实验室配制的培养基的常规监控项目是无菌生长试验、pH、适用性检查试验和定期的稳定性检查以确定有效期,有效期的长短将取决于在一定存放条件下(包括容器特性及密封性)的培养基组成成分的稳定性。

(6) 染菌培养基及菌悬液在丢弃前应在实验室内完成销毁工作,合适的方法

是 121 ℃ 灭菌 30 min 处理;未长菌的培养基或过期的培养基在丢弃前应进行去营养处理,可以选用 121 ℃ 处理 30 min。

(7) 每批制备的培养基所用化学试剂、灭菌情况及质量控制检测结果,培养基配置人员要做好记录,以备查询。

(五) 实验室操作要求

(1) 实验过程中所有样本、培养物均可能有传染性,操作时均应戴手套,当手套已被污染时应及时更换新手套;不得用戴手套的手触摸自己的眼、鼻子或其他暴露的黏膜或皮肤,不得戴手套离开实验室和开、关门。

(2) 严格禁止用嘴操作实验器材,包括吸液、吹酒精灯等,禁止实验材料直接接触皮肤;尽量用塑料制品代替玻璃制品,不使用破裂或有缺口的玻璃器具,破裂的玻璃器具和碎片应丢弃在有专门标记的、单独的、不易刺破的容器里。

(3) 任何使形成气溶胶的危险性上升的操作都必须在生物安全柜里进行,有害气溶胶不得直接排放;应尽可能减少使用利器,尽量使用替代品,包括针头、玻璃、一次性手术刀在内的利器应在使用后立即放在耐扎容器中。

(4) 所有弃置的样本、培养物和废弃物应被假定有传染性,在从实验室中取走之前,应以安全方式处理和处置,使其达到生物学安全。

(5) 接种环在接种细菌前应经酒精灯火焰烧灼全部金属丝,必要时还要烧到环和针与杆的连接处,接种、吸管吸取菌液或样品必须在酒精灯前操作,吸管从包装中取出后及打开试管塞都要通过火焰消毒。

(6) 超净工作台采用紫外灯灭菌时,照射时间不少于 30 min,不得直接在打开的紫外线下操作,以免引起损伤;紫外灯管每隔 2 周需用酒精棉球轻轻擦拭,除去上面的灰尘和油垢,以减少紫外线穿透的影响;为了获得较好的灭菌效果,紫外灯管要定期更换。

(7) 实验室应保持整洁、干净,当潜在的危险物溅出或一天的工作结束后,所有操作台面、离心机、加样枪、试管架必须擦拭、消毒。

三、实验报告要求

(一) 实验预习

实验前,学生应认真、自主地学习实验内容及相关的参考文献资料,进行实验预习,未预习者不得进行实验。预习主要完成以下工作:

(1) 认真阅读实验指导书,明确所做实验的目的、原理、方法、步骤和注意事项等,充分理解所做实验的意义,使用学校统一的实验报告纸写出实验的目的、原理、仪器材料、方法和步骤。

(2) 根据实验的具体目标,研究实验的理论依据和实验的具体步骤,分析应该测取哪些数据,并预测这些数据的变化规律,准备好实验记录表格及计算用具。

(3) 提前到实验室现场并结合实验指导书仔细观察实验流程、实验材料和主要仪器的构造及使用方法,熟悉实验环境。

(二) 实验记录

(1) 根据实验内容的要求,将实验过程中获得的实验结果记录下来,注明实验日期和时间。用字规范,条理清楚,字体端正,须用蓝色或黑色字迹的钢笔或签字笔书写,不得使用铅笔或其他易褪色的工具书写。

(2) 必须真实、准确、完整地记录实验中所观察到的现象和测量的数据,实验记录必须公正客观,防止漏记和随意涂改,禁止伪造和编造数据。

(3) 详细记录实验条件,如使用的试剂和仪器的生产厂家、型号和编号,实验原材料的来源、形态特征及重量等;详细记录实验过程中关键步骤的具体操作以及观察到的现象,同时辅助以拍照记录。

(4) 使用规范的专业术语,计量单位应采用国际标准计量单位,有效数字的取舍应符合实验要求。

(5) 原始实验数据一般不得修改,若要修改数据,可以画线去除,同时需注明原因并确保原记录可见。实验记录应妥善保存,避免破损,保持整洁。

(6) 实验完毕后必须将记录结果交给实验指导教师检查,经签字认可方为有效实验结果,实验报告中无指导教师签字的实验结果视为无效。

(三) 实验报告格式

(1) 实验目的:根据实验教学要求阐明实验主要目的。

(2) 实验原理:应在理解的基础上简明扼要地书写实验原理,不能简单地照抄实验指导书。

(3) 实验仪器和材料:包括仪器名称及型号规格,材料来源及属性。

(4) 实验方法:运用何种生物学方法研究该实验。

(5) 实验步骤:简明扼要书写实验每一阶段的具体步骤。

(6) 实验结果:该项为实验报告的重点项,应认真、客观、如实、完整地记录实验数据、实验现象等,绘制相关图表,并认真分析,得出实验结论。

(7) 实验总结:根据具体的实验现象和实验中存在的问题进行整理、解释、分析总结,写出实验后自己的收获,遇到的困难及解决的方法等心得体会,对本次实验进一步的想法以及意见和建议等。

(四) 实验报告要求

(1) 实验报告必须填写实验人信息:学号、姓名、课程、班级、日期。若为两人

以上共同完成的实验,需要填写同组人员姓名。

(2) 实验报告的内容一般包括实验名称、目的、原理、方法、仪器和材料、步骤、结果、总结等,同时要根据指导教师的具体要求,确定实验报告的内容。

(3) 实验报告是在实验预习完成的内容的基础上再加写剩余内容,两者合二为一构成一份完整的实验报告。

(4) 严禁抄袭报告。对抄袭报告的学生,除责成该同学写出深刻检查外,必须重新书写实验报告。

(5) 每次的实验报告在实验完成后一周内上交,实验报告的电子文档和需要上交的结果文件发到指导教师的电子邮箱。

第二篇 分子生物学实验技术

实验一 琼脂糖凝胶电泳

一、实验目的

- (1) 学习和掌握琼脂糖凝胶电泳法鉴定 DNA 的原理和方法。
- (2) 掌握琼脂糖电泳各种试剂的组分和作用。

二、实验原理

带电颗粒在电场作用下,向着与其相反的电极移动,称为电泳。DNA 分子是两性电解质,在高于其等电点的溶液(pH 8.0~8.3)中,碱基几乎不解离,磷酸基团全部解离,DNA 分子带负电荷,在电场中向正极移动。核酸分子在琼脂糖凝胶中泳动时,具有电荷效应和分子筛效应,但主要为分子筛效应。因此,核酸分子的迁移率由下列几种因素决定:

(1) DNA 的分子大小。线状双链 DNA 分子在一定浓度琼脂糖凝胶中的迁移速率与 DNA 分子量的对数成反比,分子越大则所受阻力越大,也越难于在凝胶孔隙中移动,因而迁移得越慢。

(2) DNA 分子的构象。当 DNA 分子处于不同构象时,它在电场中的移动距离不仅和分子量,还和它本身构象有关。相同分子量的线状、开环和超螺旋质粒 DNA 在琼脂糖凝胶中移动的速度是不一样的,超螺旋 DNA 移动得最快,而开环状 DNA 移动得最慢。如在电泳鉴定质粒纯度时,若发现凝胶上有数条 DNA 带难以确定是由质粒 DNA 不同构象引起还是因为含有其他 DNA 引起的,可从琼脂糖凝胶上将 DNA 带逐个回收,用同一种限制性内切酶分别水解,然后电泳,如在凝胶上出现相同的 DNA 图谱,则为同一种 DNA。

(3) 电源电压。在低电压时,线状 DNA 片段的迁移速率与所加电压成正比。但是随着电场强度的增加,不同分子量的 DNA 片段的迁移率将以不同的幅度增加,片段越大,因场强升高引起的迁移率增加幅度也越大,因此电压增加,琼脂糖凝

胶的有效分离范围将缩小。要使大于 2 kb 的 DNA 片段的分辨率达到最大,所加电压不得超过 5 V/cm。

三、实验仪器、材料与试剂

1. 仪器

恒温培养箱,琼脂糖凝胶电泳系统,台式离心机,高压灭菌锅,紫外线透射仪。

2. 材料与试剂

三羟甲基氨基甲烷(Tris),硼酸,乙二胺四乙酸(EDTA),溴酚蓝,琼脂糖,溴化乙啶(EB),DNA marker。

四、实验流程

琼脂糖凝胶电泳的实验流程如图 1.1 所示。



图 1.1 琼脂糖凝胶电泳实验流程图

五、实验步骤

1. 制备琼脂糖凝胶

准确称取琼脂糖,加适量电泳缓冲液,置微波炉中,将琼脂糖融化均匀。在加热过程中要不时摇动,使附于瓶壁上的琼脂糖颗粒进入溶液;加热时应盖上封口膜,以减少水分蒸发。按照被分离的 DNA 大小决定琼脂糖的百分含量。

2. 胶板的制备

将胶槽置于制胶板上,插上样品梳子,注意观察梳子齿下缘应与胶槽底面保持 1 mm 左右的间隙,待胶溶液冷却至 55 °C 左右时,加入最终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 EB (也可不把 EB 加入凝胶中,而是电泳后再用 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 EB 溶液浸泡染色 15 min),摇匀,轻轻倒在电泳制胶板上,除掉气泡;待凝胶冷却凝固后,垂直轻拔梳子;将凝胶放入电泳槽内,加入 1 $\times$ 电泳缓冲液,使电泳缓冲液液面刚高出琼脂糖凝胶面。

3. 加样

点样板或薄膜上混合 DNA 样品和上样缓冲液,上样缓冲液的最终稀释倍数应不小于 1 $\times$ 。用 10 μL 微量移液器分别将样品加入胶板的样品小槽内,每加完一个样品,应更换一个加样头,以防污染,加样时勿碰坏样品孔周围的凝胶面(注意:加样前要先记下加样的顺序和点样量)。能加样的最大体积取决于加样孔的容积。