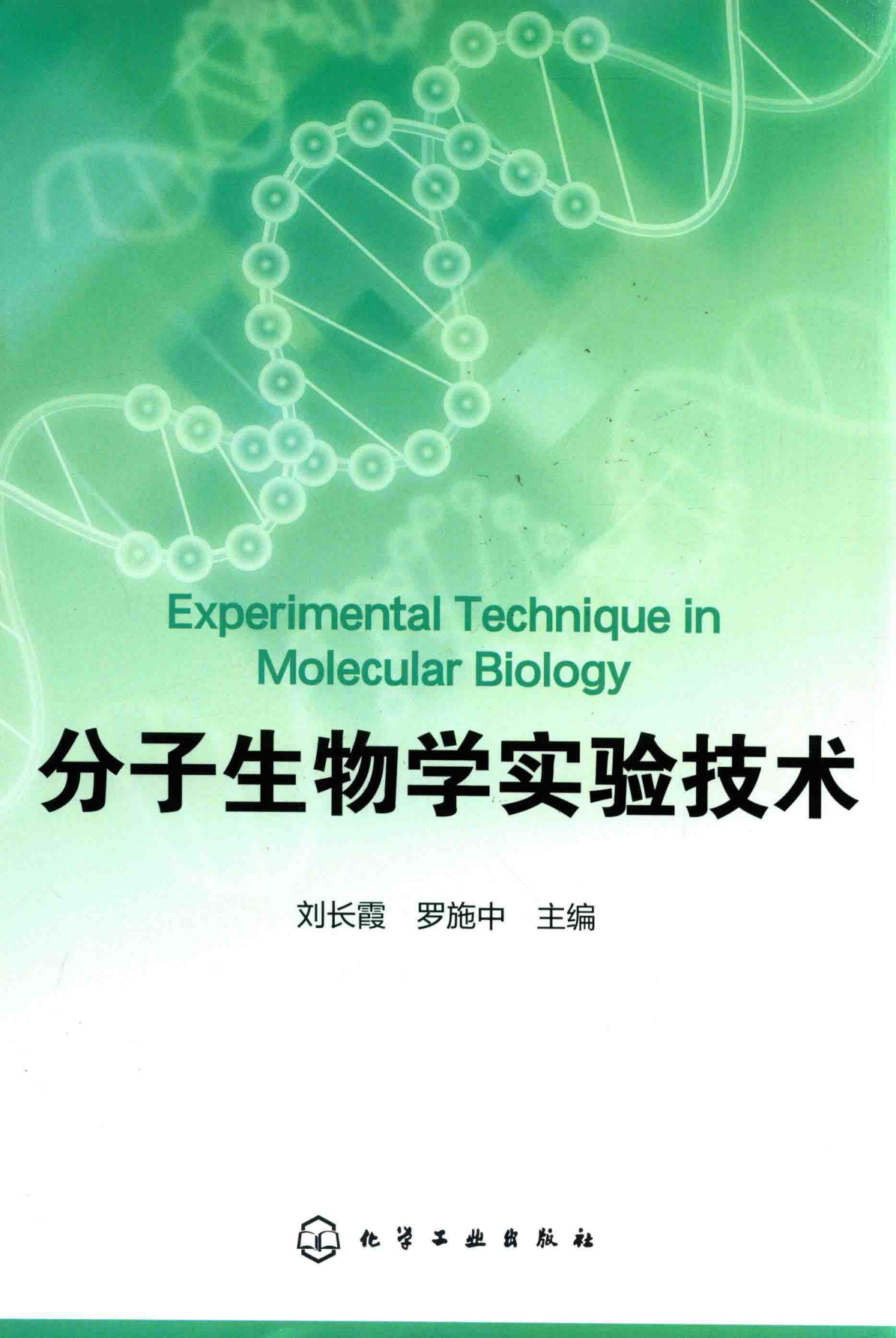




Experimental Technique in
Molecular Biology

分子生物学实验技术

刘长霞 罗施中 主编



化学工业出版社

本书为《分子生物学实验技术》一书的分卷之一，主要介绍分子生物学实验技术。本书共分五章，第一章介绍分子生物学实验技术的基本概念，第二章介绍分子生物学实验技术的基本原理，第三章介绍分子生物学实验技术的基本方法，第四章介绍分子生物学实验技术的基本应用，第五章介绍分子生物学实验技术的基本展望。本书可作为高等院校生物专业及相关专业的教材，也可供从事分子生物学研究的科研人员参考。

Experimental Technique in Molecular Biology

分子生物学实验技术

参编人员及单位 (按姓名汉语拼音排序)

陈 龙 北京化工大学

刘长霞 罗施中 主编 (CIP) 目录编委会

罗施中 北京化工大学

刘长霞 北京化工大学

罗施中 北京化工大学

罗施中 北京化工大学

罗施中 北京化工大学

陈 龙	北京化工大学	罗施中	北京化工大学
刘长霞	北京化工大学	罗施中	北京化工大学
罗施中	北京化工大学	罗施中	北京化工大学
罗施中	北京化工大学	罗施中	北京化工大学
罗施中	北京化工大学	罗施中	北京化工大学
罗施中	北京化工大学	罗施中	北京化工大学
罗施中	北京化工大学	罗施中	北京化工大学
罗施中	北京化工大学	罗施中	北京化工大学
罗施中	北京化工大学	罗施中	北京化工大学
罗施中	北京化工大学	罗施中	北京化工大学

责任编辑：王 芳 封面设计：王 芳 印刷：北京化工大学印刷厂 装订：北京化工大学印刷厂 发行：北京化工大学书店 地址：北京化工大学 邮编：100029 电话：010-64412345 网址：http://www.cip.com.cn



化学工业出版社

北京 010029

元 00.00 份 8

· 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。

Experimental Technique in
Molecular Biology

分子生物学实验技术

图书在版编目 (CIP) 数据 中 数 字 编 目 收

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

文字编辑：向 东

责任校对：王素芹

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

近年来,随着分子生物学的发展及其与其他学科的交叉、融合,分子生物学实验技术已成为生命科学、工程(特别是生物工程、制药工程及环境工程)等学科领域的核心和必备的实验技术。

《分子生物学实验技术》内容主要包括:服务于教学的基本实验技术,含核酸提取分离技术、PCR技术、基因重组与工程菌构建技术、表达产物分析鉴定技术等;服务于生产实践的工程化生产技术,涉及通过最具代表性的原核生物(*E. coli*)表达系统、动物细胞(CHO)表达系统及其分离纯化技术生产基因工程蛋白药物,为基因工程产业化提供借鉴;广泛应用于现代科学研究的重要技术,如实时荧光定量PCR技术,基因定点突变、基因敲除及微生物分子生物学鉴定技术,基因工程蛋白的双向电泳、质谱鉴定及结晶技术,生物信息学网络资源利用等。

参编人员为从事相关教学与科研工作的教师以及基因工程蛋白质药物生产与研究的一线工程技术人员,他们将科研成果和工程实践融入实验教学工作,培养学生的基本素质、科研创新及工程产业化能力。本书是一本实用性较强的分子生物学实验教科书,适用于生物技术、生物工程、制药工程、生物医学工程等专业的本科教材,也可供上述领域科研及工程研究人员参考,旨在为创新人才培养、科学研究、产学研、科研成果产业化提供参考。

向各位参编人员及其他为本书撰写过程中提供帮助的人员表示衷心的感谢!

由于编者水平所限,书中不足之处在所难免,恳请读者和同行多提宝贵意见。

编者

2017年12月于北京

**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, 同时保证菌体在悬浮液中充分悬浮。
- (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 $20\mu\text{g}/\text{mL}$),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 $0.13\text{mmol}/\text{mL}$ 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 $100\text{mg}/\text{mL}$ 、 $25\text{mg}/\text{mL}$,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°C 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°C 真空干燥过夜。

(2) 称取 0.5g Fe_3O_4 多孔亚微球,加入 $1\text{mol}/\text{L}$ 的 NaOH 溶液 200mL,加热升温至 90°C , $400\text{r}/\text{min}$ 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°C 、 $800\text{r}/\text{min}$ 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°C 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, $12000\text{r}/\text{min}$ 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。

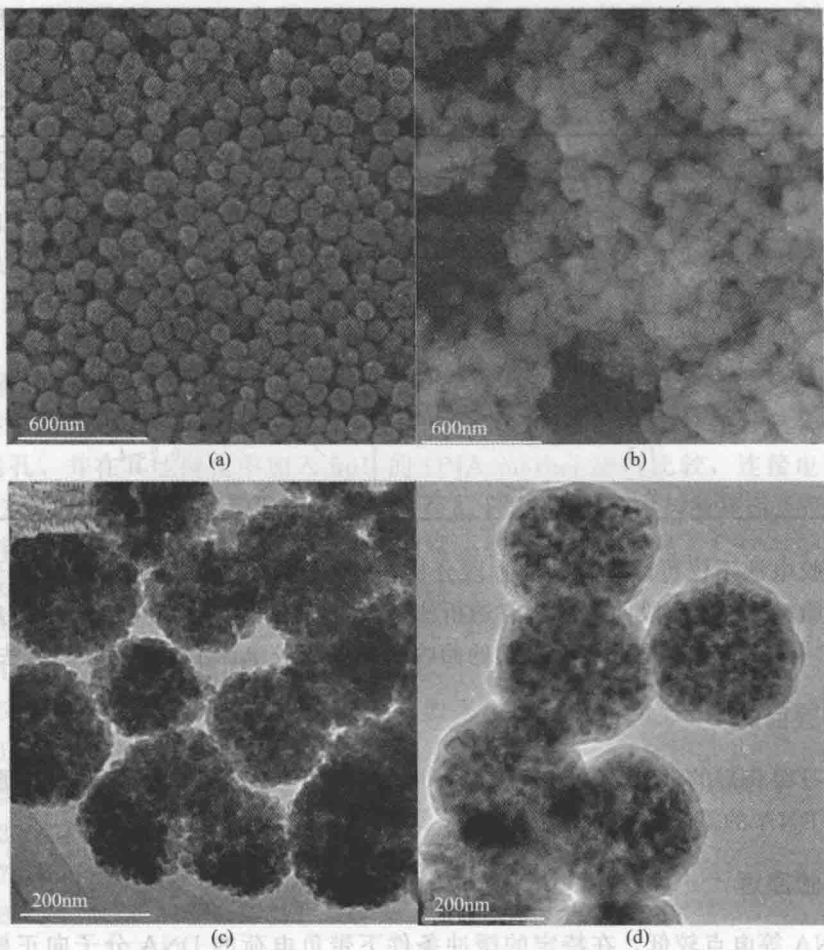


图 1-1 (a) Fe_3O_4 SEM; (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ SEM;
(c) Fe_3O_4 TEM; (d) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ TEM

(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

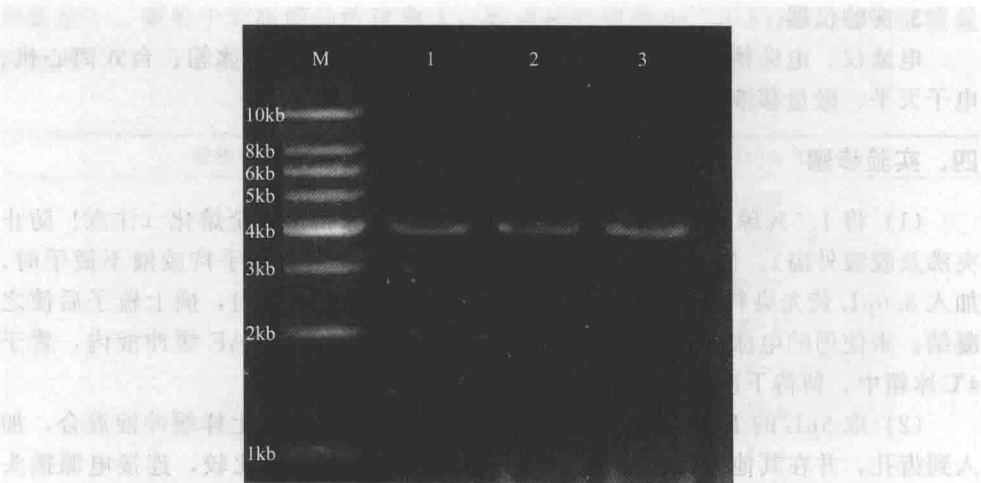


图 1-2 纯化的质粒 DNA pET28a 电泳图^[5]
M—DNA marker；1—商品试剂盒（硅胶柱）提取质粒；
2、3—Fe₃O₄@SiO₂ 提取质粒

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 等的重要环节^[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