

环境分子生物学实验教程

HUANJINGFENZISHENGWUXUESHIYANJIAOCHENG

高等学校“十一五”规划教材



市政与环境工程系列丛书

主编 焦安英 李永峰 那冬晨 刘晓烨
主审 李建政



哈尔滨工业大学出版社

环境分子生物学实验教程

环境分子生物学实验教程

环境分子生物学实验教程

环境分子生物学实验教程

环境分子生物学实验教程

高等学校“十一五”规划教材
市政与环境工程系列研究生教材

环境分子生物学实验教程

主 编 焦安英 李永峰 那冬晨 刘晓烨
主 审 李建政

哈尔滨工业大学出版社

内容提要

编者根据多年的教学科研经验,结合分子生物学、环境微生物学及其他实验教材的资料,根据国内外该学科的研究进展,特别是环境微生物研究技术的发展编写此书。全书分为两篇,第一篇是基础分子生物学实验,包括质粒 DNA 的提取、酶切与鉴定,大肠杆菌感受态细胞的制备与转化,DNA 重组,植物基因转化,亚克隆的构建,PCR 扩增,单链 DNA 模板的制备,DNA 序列分析,DNA 重复序列与单一序列的分离,Southern 杂交,mRNA 分离纯化及鉴定,Northern 杂交,cDNA 文库构建,DNA 文库的筛选,DNA 减法克隆,差式显示法克隆,cDNA 代表群差别分析,真核基因在原核细胞中的表达,以杆状病毒为载体的真核基因表达,脉冲电场凝胶电泳,蛋白质转移,双向聚丙烯酰胺凝胶电泳,毛细管区带电泳等 23 个实验;第二篇是环境分子生物学综合性实验,包括环境压力条件下特异性表达基因的鉴定与分离,整体原位杂交检测环境干扰下组织特异性基因的表达,FRAP-PCR 检测环境污染物引起的基因表达的改变,双向电泳法评估海洋环境中过氧化物酶体增殖污染物,RLGS 检测基因突变,单细胞凝胶电泳,元基因组多样性检测,环境微生物菌群指纹图谱的建立等 8 个实验。

本书适合作为环境科学、环境工程、生态学、生物学等相关专业的本科、研究生教学用书。也可作为环境保护和环境监测等相关工作人员的参考材料。

图书在版编目(CIP)数据

环境分子生物学实验教程/焦安英等主编——哈
尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2010.10
(市政与环境工程系列丛书)
ISBN 978-7-5603-3100-3

I. ①环… II. ①焦… III. ①环境生物学:分子生物
学-实验 IV. ①X17-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 195610 号

策划编辑 贾学斌
责任编辑 张 瑞
封面设计 卞秉利
出版发行 哈尔滨工业大学出版社
社 址 哈尔滨市南岗区复华四道街 10 号 邮编 150006
传 真 0451-86414749
网 址 <http://hitpress.hit.edu.cn>
印 刷 哈尔滨工业大学印刷厂
开 本 787mm×1092mm 1/16 印张 11.5 字数 280 千字
版 次 2010 年 12 月第 1 版 2010 年 12 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 978-7-5603-3100-3
定 价 28.00 元

(如因印装质量问题影响阅读,我社负责调换)

前 言

环境分子生物学是一门新兴的学科,为了让学生及有关读者能循序渐进地了解环境微生物研究技术,我们综合了分子生物学、环境微生物学及相关教材和专著,结合编者的科学研究和教学实践,在广泛查阅国内外有关资料的基础上编写了此书。全书分为两篇,共31个实验。第1篇是基础分子生物学实验,包括质粒DNA的提取、酶切与鉴定,大肠杆菌感受态细胞的制备与转化,DNA重组,植物基因转化,亚克隆的构建,PCR扩增,单链DNA模板的制备,DNA序列分析,DNA重复序列与单一序列的分离,Southern杂交,mRNA分离纯化及鉴定,Northern杂交,cDNA文库构建,DNA文库的筛选,DNA减法克隆,差式显示法克隆,cDNA代表群差别分析,真核基因在原核细胞中的表达,以杆状病毒为载体的真核基因表达,脉冲电场凝胶电泳,蛋白质转移,双向聚丙烯酰胺凝胶电泳,毛细管区带电泳等23个实验;第2篇是环境分子生物学综合性实验,包括环境压力条件下特异性表达基因的鉴定与分离,整体原位杂交检测环境干扰下组织特异性基因的表达,FRAP-PCR检测环境污染物引起的基因表达的改变,双向电泳法评估海洋环境中过氧化物酶体增殖污染物,RLGS检测基因突变,单细胞凝胶电泳,元基因组多样性检测,环境微生物菌群指纹图谱的建立等8个实验。总之,本书是遵循由基础实验和研究技术到环境领域和问题的思路,希望能带领读者从理论到技术、从基础到应用,循序渐进地获取环境分子生物学实验的有关知识。

本书由焦安英、李永峰、那冬晨、刘晓烨主编。编写分工如下:实验1~实验23等基础分子生物学实验由李永峰、焦安英编写;实验24~实验31章等环境分子生物学综合实验由那冬晨、刘晓烨编写。全书由焦安英、李永峰、那冬晨、刘晓烨统稿。

本书的出版得到了上海工程技术大学主持的上海市重点科技攻关项目(071605122)和东北林业大学主持的“溪水森林生态公园的生态规划与建设”项目的技术和成果的支持,特表谢意。

由于环境分子生物学是一门正在不断发展与完善的学科,加之编者水平和时间所限,书中难免有不妥及疏漏之处,恳请读者批评指正,以便进一步修订完善。

编 者
2010. 10

目 录

第 1 篇 基础分子生物学实验.....	1
实验 1 质粒 DNA 的提取、酶切与鉴定	3
实验 2 大肠杆菌感受态细胞的制备与转化	14
实验 3 DNA 重组	18
实验 4 植物基因转化	28
实验 5 亚克隆的构建	33
实验 6 PCR 扩增	38
实验 7 单链 DNA 模板的制备	42
实验 8 DNA 序列分析	45
实验 9 DNA 重复序列与单一序列的分离	51
实验 10 Southern 杂交	58
实验 11 mRNA 分离纯化及鉴定	64
实验 12 Northern 杂交	69
实验 13 cDNA 文库构建	74
实验 14 DNA 文库的筛选	80
实验 15 DNA 减法克隆	84
实验 16 差式显示法克隆	91
实验 17 cDNA 代表群差别分析	97
实验 18 真核基因在原核细胞中的表达	102
实验 19 以杆状病毒为载体的真核基因表达	105
实验 20 脉冲电场凝胶电泳	109
实验 21 蛋白质转移	112
实验 22 双向聚丙烯酰胺凝胶电泳	116
实验 23 毛细管区带电泳	120
第 2 篇 环境分子生物学综合性实验	125
实验 24 环境压力条件下特异性表达基因的鉴定与分离	127
实验 25 整体原位杂交检测环境干扰下组织特异性基因的表达	137
实验 26 FRAP-PCR 检测环境污染物引起的基因表达的改变	142
实验 27 双向电泳法评估海洋环境中过氧化物酶体增殖污染物	147
实验 28 RLGS 检测基因突变	151
实验 29 单细胞凝胶电泳	157
实验 30 元基因组多样性检测	161
实验 31 环境微生物菌群指纹图谱的建立	173
参考文献	177

基础分子生物学实验

第1篇

实验 1 质粒 DNA 的提取、酶切与鉴定

【内容提要】在 LB 培养基中培养大肠杆菌,用碱性 SDS 方法快速从大肠杆菌的细胞中分离、提取质粒 DNA,经过适当的限制性内切酶消化,琼脂糖凝胶电泳分离,溴化乙锭染色,在紫外分析仪上检测提取质粒样本的质量和浓度。

1.1 质粒 DNA 的提取

1.1.1 原理

在基因工程中,携带外源基因进入受体细胞的工具就叫载体(vector)。载体的设计和应用是 DNA 体外重组的重要条件。基因工程的载体必须具备以下条件:

- ① 载体是一个复制子,只有这样才能使它携带的外源基因得以复制繁殖;
- ② 在受体细胞中能大量增殖,只有高复制率才能使外源基因在受体细胞中大量扩增;
- ③ 含有一至几个限制性内切酶的单一识别与切割位点,便于外源基因的插入;
- ④ 具有选择性的遗传标记,如含有抗四环素基因(Tc^r)、抗新霉素基因(Ne^r)等,以此检测它是否进入受体细胞,也可以根据这个标记将受体细胞从其他细胞中分离筛选出来。

质粒(plasmid)是独立于细菌染色体外的稳定遗传因子,大小在 1~200 kb 之间,具有双链闭环环状结构的 DNA 分子。质粒主要发现于细菌、放线菌和真菌细胞中。质粒具有自主复制和转录能力,能使子代细胞保持它们恒定的拷贝数,表达它携带的遗传信息。质粒可独立游离在细胞质内,也可以整合到细菌染色体中,质粒控制的许多生物学功能也是对宿主细胞的补偿。细菌质粒具备上述基因工程载体的必备条件,是基因工程中常用的载体之一。

质粒在细胞内的复制分为两种类型:严密控制型(stringent control)和松弛控制型(relaxed control)。严密控制型质粒只在细胞周期的一定阶段进行复制,它的复制受细菌染色体的严密控制,染色体停止复制时,它也不复制。严密控制型质粒在每个细胞内只含有一至几个拷贝。松弛控制型质粒在整个细胞周期中随时可以复制,每个细胞中含有许多个拷贝,一般在 20 个以上。一般大质粒如 F 因子等,拷贝数较少,复制受到严格控制。小质粒,如 Cole I 质粒(含有产生大肠杆菌素 E1 基因),拷贝数较多,复制不受严格控制。在使用蛋白质合成抑制剂——氯霉素时,染色体 DNA 复制受阻,而松弛型 Cole I 质粒可继续复制 12~16 h,在细胞中的拷贝数可迅速增加到 1 000~3 000 个拷贝,此时质粒 DNA 的比例(占总 DNA 的百分率)由原来的 2% 增加到 40%~50%。

质粒 DNA 的分离提取包括 3 个主要步骤:培养细菌使质粒扩增;收集和裂解细菌;分离和纯化质粒 DNA。采用溶菌酶可破坏菌体细胞壁,十二烷基硫酸钠(SDS)可使细胞壁

裂解,经溶菌酶和阴离子去污剂(SDS)处理后,细菌染色体 DNA 缠绕并附着在细胞壁碎片上,离心时被沉淀出来,而质粒 DNA 则留在上清液中。再用乙醇沉淀上清液,即可得到质粒 DNA。

质粒 DNA 的相对分子质量一般在 $10^6 \sim 10^7$ 范围内,如质粒 pBR322 的相对分子质量为 2.8×10^6 ,pUC19 的相对分子质量为 1.7×10^6 。细胞内的共价闭环 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) 常以超螺旋形式存在。如果 cccDNA 两条链中其中一条链发生一处或多处断裂,分子由于旋转而消除链的张力,这种松弛型的分子称为开环 DNA (open circular DNA, ocDNA)。电泳时,同一质粒的不同存在形式在凝胶中的泳动率不同。在相对分子质量相同的条件下,cccDNA 比 ocDNA 和线状 DNA 的泳动速度快。

1.1.2 主要仪器、材料和试剂

1.1.2.1 仪器和材料

1.5 mL 离心管,离心管架,微量移液器,常用玻璃仪器及滴管等,高速离心机 1 台,大肠杆菌 DH5 α 。

1.1.2.2 试剂

酚/氯仿(体积比为 1 : 1),氯仿/异戊醇(体积比为 24 : 1),7.5 mol/L 醋酸铵(pH 7.5 ~ 8.0),异丙醇,无水乙醇,70% 乙醇。

LB 培养基(pH 7.5):10 g / L 胰蛋白胨,5 g/L 酵母提取物,10 g / L NaCl,15 g / L 琼脂糖或琼脂(固体培养基时加入)。

GET 缓冲液(pH 8.0):50 mmol/L 葡萄糖,10 mmol/L EDTA- Na_2 ,25 mmol/L Tris-HCl;用前加溶菌酶 4 mg/mL。

乙酸钾溶液(pH 4.8):60 mL 5 mol/L KAc,11.5 mL 冰醋酸,28.5 mL H_2O 。钾离子浓度为 3 mol/L,醋酸根离子浓度为 5 mol/L。

TE 缓冲液(pH 8.0):10 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A。

1.1.3 操作步骤

1.1.3.1 培养细菌

将带有质粒 pUC19 或 pBR322 的大肠杆菌接种在 LB 琼脂培养基或液体培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 ~ 18 h。

1.1.3.2 从菌落中快速提取制备质粒 DNA

方法 1:

(1)用灭菌的牙签挑取平板培养基上的单菌落,放入 1.5 mL 离心管中,或取液体培养菌液 1.5 mL 置于离心管中,离心 1 min(10 000 r/min),收集菌体。加入 150 μL GET 缓冲液,充分混匀,室温放置 10 min。

(2)加入 200 μL 新配制的 0.2 mol/L NaOH(含 1% SDS),颠倒混匀,置于冰上 5 min。

(3)加入 150 μL 冰冷的乙酸钾溶液(pH 4.8),颠倒混匀,置于冰上 15 min。

(4)离心 5 min(10 000 r/min),取上清。

(5)向上清液中加入等体积酚/氯仿(体积比为 1 : 1),振荡混匀,离心 2 min

(10 000 r/min), 取上清液, 再用等体积的酚/氯仿抽提 1~2 次。

(6) 向上清液加入 2 倍体积无水乙醇, 混匀, 室温放置 2 min; 离心 5 min, 弃上清液。

(7) 加 0.5 mL 70% 乙醇洗涤沉淀, 振荡, 离心, 弃上清液, 室温自然干燥至乙醇挥发, 加入适量的灭菌去离子水或 TE 溶解。

方法 2:

步骤(1)~(4)同方法 1。

(5) 加入等体积异丙醇, 混匀, 室温放置 5 min, 离心 5 min(12 000 r/min), 弃上清液。

(6) 加入 200 μ L 灭菌的去离子水溶解沉淀, 加入 1/2 体积 7.5 mol/L NH_4Ac , 混匀, 冰浴 3~5 min, 离心 5 min(12 000 r/min)。

(7) 收集沉淀, 将上清移至另一新离心管中, 重复步骤(2)。

(8) 沉淀用 70% 乙醇洗涤, 弃乙醇, 室温干燥至乙醇挥发。

(9) 加入 18 μ L 含 RNase A (20 μ g/mL) 的灭菌去离子水溶解沉淀, 室温放置至少 30 min, 使 DNA 充分溶解, 4 $^{\circ}\text{C}$ 或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2 质粒 DNA 的酶切及琼脂糖凝胶电泳分离、鉴定

1.2.1 原理

限制性内切核酸酶(也可称限制性内切酶)是在细菌对噬菌体的限制和修饰现象中发现的。细菌细胞内同时存在一对酶, 分别为限制性内切酶(限制作用)和 DNA 甲基化酶(修饰作用)。它们对 DNA 底物有相同的识别顺序, 但生物功能却相反。由于细胞内存在 DNA 甲基化酶, 它能在限制性内切酶所识别的若干碱基上甲基化, 就避免限制性内切酶对细胞自身 DNA 的切割破坏, 而对感染的外来噬菌体 DNA, 因无甲基化而被切割破坏。所以限制性内切酶是该细菌细胞的卫士, 它与 DNA 甲基化酶一起构成了保护自己、抵抗外源入侵的 DNA 的防御机制。如果入侵的噬菌体 DNA 没有完全被限制性内切酶切割破坏, 残留的噬菌体 DNA 在复制时, 由于 DNA 甲基化酶的存在, 同样地也在识别部位进行修饰——甲基化, 限制性内切酶对这种复制后的噬菌体 DNA 就不起作用, 以致大量繁殖起来, 该受体细胞也因此遭到了灭顶之灾!

目前已发现的限制性内切酶有数百种。EcoR I 和 Hind III 都属于 II 型限制性内切酶, 这类酶的特点是具有能够识别双链 DNA 分子上的特异核苷酸顺序的能力, 能在这个特异性核苷酸序列内, 切断 DNA 的双链, 形成一定长度和顺序的 DNA 片段。EcoR I 和 Hind III 的识别序列和切口是:

EcoR I : G $\downarrow$ AATTC

Hind III : A $\downarrow$ AGCTT

G、A 等核苷酸表示酶的识别序列, 箭头表示酶切口。限制性内切酶对环状质粒 DNA 有多少切口, 就能产生多少个酶解片段, 因此鉴定酶切后的片段在电泳凝胶中的区带数, 就可以推断酶切口的数目, 从片段的迁移率可以大致判断酶切片段大小的差别。用已知相对分子质量的线状 DNA 为对照, 通过电泳迁移率的比较, 可以粗略地测出分子形状相

同的未知 DNA 的相对分子质量。我们采用 EcoR I 和 Hind III 分别酶切 λ DNA, 其酶切片段作为样品酶切片段大小的相对分子质量标准, 参见表 1.1 和 1.2。

表 1.1 λ DNA-EcoR I 酶解片段

片段	碱基对数目/kb	相对分子质量
1	21.226	13.7×10^6
2	7.421	4.74×10^6
3	5.804	3.73×10^6
4	5.643	3.48×10^6
5	4.878	3.02×10^6
6	3.530	2.13×10^6

表 1.2 λ DNA-Hind III 酶解片段

片段	碱基对数目/kb	相对分子质量
1	23.130	15.0×10^6
2	9.419	6.12×10^6
3	6.557	4.26×10^6
4	4.371	2.84×10^6
5	2.322	1.51×10^6
6	2.028	1.32×10^6
7	0.564	0.37×10^6
8	0.125	0.08×10^6

质粒的加工需要工具酶, 限制性内切酶是重要的工具酶之一。将质粒和外源基因用限制性内切酶酶切, 再经过退火和 DNA 连接酶封闭切口, 便可获得携带外源基因的重组质粒。

重组质粒可以转移到另一个生物细胞中去(细胞转化或转染), 进而复制、转录和表达外源基因产物, 这样通过基因工程可获得所需各种蛋白质产物。

本实验以商品 pUC19 或 pBR322 质粒 DNA 为标准, 以自己提取的 pUC19 或 pBR322 质粒 DNA 为样品, 用限制性内切酶酶切, 再经琼脂糖凝胶电泳分离二者酶切片段, 以鉴定自制 pUC19 或 pBR322 质粒 DNA。

1.2.2 主要仪器、材料和试剂

1.2.2.1 仪器和材料

电泳仪, 电泳槽, 样品槽模板(梳子), 有机玻璃内槽, 水平仪, 橡皮膏, 锥形瓶(100 mL 或 50 mL), 紫外灯, 照相机, 放大机, 白糖瓷盘(小号), 玻璃纸, 一次性塑料手套, 凝胶自动成像仪。

pUC19 或 pBR322, λ DNA, EcoR I 酶, Hind III 酶, 琼脂糖。

1.2.2.2 试剂

(1) EcoR I 酶解反应液($10 \times$): 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mol/L NaCl, 0.1 mol/L $MgCl_2$ 。

(2) Hind III 酶解反应液($10 \times$): 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.4), 1 mol/L NaCl,

0.07 mol/L MgCl_2 。

(3) 称取 Tris 2.18 g、硼酸 1.10 g 和 EDTA-Na_2 0.14 g 用蒸馏水溶解后,定容至 400 mL,称为 TBE 缓冲液($0.5 \times \text{TBE}$)。

(4) 酶反应终止液($10 \times$),两种反应终止液可供选择:① 0.1 mol/L EDTA-Na_2 ,20% Fi-CoLL,适量橙 G;② 0.25% 溴酚蓝,0.25% 二甲苯青 FF(或称二甲苯蓝),质量分数为 40% 蔗糖水溶液(或用 30% 甘油水溶液)。

(5) 菲啶溴红染色液:将菲啶溴红(溴乙啶)溶于蒸馏水或电泳缓冲液,使最终质量浓度达到 $0.5 \sim 1 \mu\text{g/mL}$,避光保存。临用前,用电泳缓冲液稀释 1 000 倍。

1.2.3 操作步骤

1.2.3.1 质粒 DNA 的酶解

将上一实验纯化的并经自然干燥的自制的 pUC19 质粒 DNA 加 18 μL TE 缓冲液或无菌水(内含 RNase A),使 DNA 完全溶解。

将清洁、干燥、灭菌的带塞的离心小管编号,用微量加样器按表 1.3 所示将各种试剂分别加入每个小管内。需要说明的是,所加的 $\lambda\text{DNA} + -\text{Hind III}$ 浓度为 0.1 μL ;市售质粒的质量浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$;内切酶的活性为 4.8 U/ μL 。所加酶缓冲液为 $10 \times$ 。加样时,要精神集中,严格操作,反复核对,做到准确无误。加样时不仅要防止错加或漏加的现象,而且还要保持公用试剂的纯净。应该指出,该项操作环节是整个实验成败的关键之一。

表 1.3 DNA 酶解加样表(两位同学所加样品)

试 剂 \ 编 号		1	2	3	4	5	6	7
样 品	$\lambda\text{DNA} + -\text{Hind III}/\mu\text{L}$			3				
	市售 pUC19 或 pBR322/ μL				3	3		
	自提质粒/ μL	8	8				8	8
内 切 酶	EcoR I 或 Hind III/ μL	1			1		1	
酶解 缓冲 液	EcoR I 或 Hind III 缓冲液/ μL	1	1	1	1	1	1	1
水	$\text{H}_2\text{O}/\mu\text{L}$	0	1	6	5	6	0	1
	总体积/ μL	10	10	10	10	10	10	10

加样后,小心混匀,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中,酶解 2~3 h(有时可以过夜),然后向每个小管中分别加入 1/10 体积的酶反应终止液,混匀以停止酶解反应。各酶解样品于冰箱中贮存

备用。

1.2.3.2 琼脂糖凝胶板的制备

(1) 琼脂糖凝胶的制备:称取 0.3 g 琼脂糖,置于锥形瓶中,加入 30 mL TBE 稀释液,瓶口倒扣一个小烧杯(或小漏斗),将该锥形瓶置于手提式高压锅内加热,待排气口冒出大量蒸汽时,将限压阀扣在排气口上,继续加热至 121 kPa 时维持 5 min,琼脂糖即可全部融化在缓冲液中,取出摇匀,则为 1.0% 琼脂糖凝胶液。

除此之外,也可用沸水浴或微波炉加热直至琼脂糖溶解。

(2) 胶板的制备:取有机玻璃内槽,洗净,晾干。

取橡皮膏(宽约 1 cm),将有机玻璃内槽的两端边缘封好(注意:将橡皮膏紧贴在有机玻璃内槽两端边上,不要留空隙)形成一个边脚模子。

将有机玻璃内槽置于一水平位置,放好样品槽模板(梳子)(图 1.1)。

将冷却至 65 °C 左右的琼脂糖凝胶液,小心地倒在有机玻璃内槽上,控制灌胶速度,使胶液缓慢地展开,直到在整个有机玻璃板表面形成均匀的胶层(图 1.2)。室温下静置 1 h 左右,待凝固完全后,轻轻拔出样品槽模板,在胶板上即形成相互隔开的样品槽。

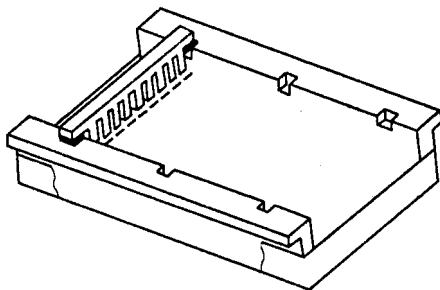


图 1.1 有机玻璃内槽和放置好的模板(梳子)

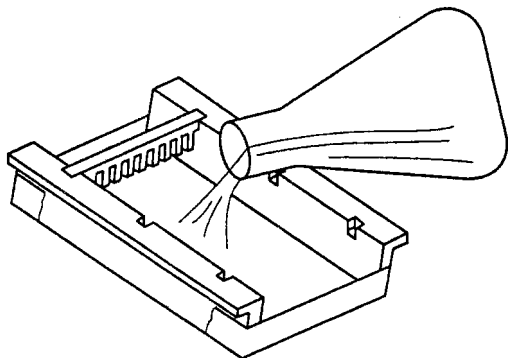


图 1.2 灌胶过程示意图

用滴管将样品槽内注满 TBE 稀释液以防止干裂,制备好胶板后应立即取下橡皮膏,将铺胶的有机玻璃内槽放在电泳槽中使用。

1.2.3.3 加样

用微量加样器将上述样品分别加入胶板的样品小槽内,如图 1.3 所示。

每次加完一个样品,要用蒸馏水反复洗净微量加样器,以防止相互污染。加样时,应防止碰坏样品槽周围的凝胶面,每个样品槽的加样量不宜过多,本实验室样品槽容量约 15 ~ 20 μL 左右。

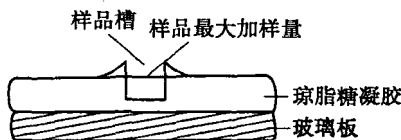


图 1.3 胶板内的样品小槽

1.2.3.4 电泳

在低电压条件下,线形 DNA 片段的迁移速度与电压成比例关系,但是,在电场强度增加时,不同相对分子质量的 DNA 片段泳动度的增加是有差别的。因此,随着电压的增加,琼脂糖凝胶的有效分离范围随之减小。为了获得电泳分离 DNA 片段的最大分辨率,电场强度不应高于 5 V/cm。

电泳温度视需要而定,对大分子的分离,以低温较好,也可在室温下进行。在琼脂糖凝胶质量分数低于 0.5% 时,由于胶太稀,最好在 4 $^{\circ}\text{C}$ 进行电泳以增加凝胶硬度。

加完样品后的凝胶板立即通电,进行电泳。但要注意控制一定的条件,样品进胶前,应使电流控制在 10 mA,样品进胶后电流为 20 mA 左右。当橙 G 或溴酚蓝染料移动到距离胶板下沿约 1 ~ 2 cm 处,停止电泳。

1.2.3.5 染色

将电泳后的凝胶浸入菲啉溴红(又叫溴乙啶,EB)染色液中,进行染色以观察在琼脂糖凝胶中的 DNA 带。

1.2.3.6 观察和拍照

在波长为 254 nm 的紫外灯下,观察染色后的电泳凝胶。DNA 存在处显示出红色的荧光条带。紫外光激发 30 s 左右,肉眼可观察到清晰的条带。在紫外灯下观察时,应戴上防护眼镜或有机玻璃防护面罩,避免眼睛遭受强紫外光损伤。

拍照电泳图谱时,采用透射紫外光,照相机镜头加上近摄接圈和红色滤光片(580 ~ 600 nm),距离 50 ~ 60 cm。采用全色胶卷,5.6 光圈,10 ~ 20 s。曝光时间,根据荧光条带的深浅进行选择。将电泳图谱放大为 0.9 cm $\times$ 1.5 cm 左右的照片,用于相对分子质量的测定。

以上步骤可以用凝胶自动成像仪(Gel Doc 1 000 Fluorescent Gel Documentation System)处理代替,结果如图 1.4 所示。

1.2.3.7 测定 DNA 相对分子质量的标准曲线的制作

标准曲线的制作是在放大的电泳照片上,用卡尺量 λDNA 的 EcoR I 或 Hind III 酶解各片段的迁移距离,以 cm 为单位。根据表 1.1 和 1.2 将 DNA 酶解各片段相对分子质量的对数为纵坐标,它们的迁移距离为横坐标,在坐标纸上绘制出联结各点的曲线,即为测定 DNA 相对分子质量的标准曲线,如图 1.5 所示。

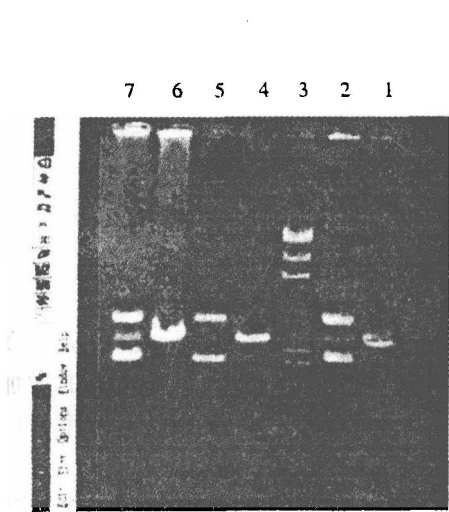


图 1.4 DNA 酶解后的电泳图谱

1—自提质粒 DNA 经酶解;2—自提质粒 DNA 未酶解;
3—λDNA + HindⅢ 酶解;4—市售质粒 DNA 经酶解;
5—市售质粒 DNA 未酶解;6—自提质粒 DNA 经酶解;
7—自提质粒 DNA 未酶解

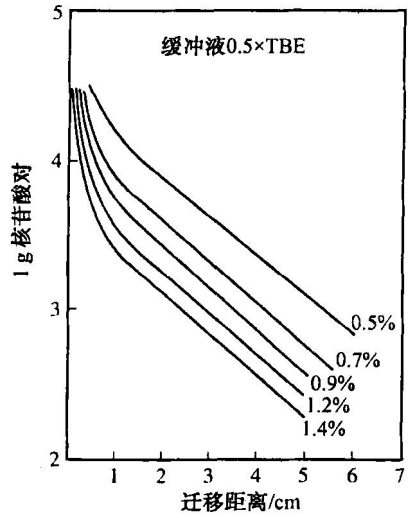


图 1.5 迁移距离对核苷酸对的半对数图

1.2.4 结果讨论和注意事项

1.2.4.1 核酸分子迁移率与琼脂糖浓度的关系

(1) DNA 的分子大小:DNA 分子通过琼脂糖凝胶的速度(电泳迁移率)与其相对分子质量的常用对数成反比。

(2) 琼脂糖的浓度:一定大小的 DNA 片段在不同浓度的琼脂糖凝胶中,电泳迁移率不相同。DNA 的电泳迁移率(M)对数和凝胶浓度(T)之间的线性关系可按下述方程式表示

$$\lg M = \lg M_0 - K_r T$$

式中, M_0 为自由电泳迁移率; K_r 为滞留系数,这是与凝胶性质、迁移分子大小和形状有关的常数。

因此,要有效地分离不同大小的 DNA 片段,选用适当的琼脂糖凝胶浓度是非常重要的,参见表 1.4。

表 1.4 琼脂糖凝胶质量分数与分辨 DNA 大小范围的关系

琼脂糖凝胶质量分数/%	可分辨的线性 DNA 大小范围/kb
0.3	5 ~ 60
0.6	1 ~ 21
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

(3) 琼脂糖浓度与电压关系:研究了琼脂糖凝胶电泳分离大分子DNA的条件,发现以低浓度、低电压分离效果较好。胶的浓度越低,适用于分离的DNA越大,这是一个总的规律。不过浓度太低,制胶有困难,电泳结束后将胶取出来也有困难。在低电压情况下,线性DNA分子的电泳迁移率与所用电压成正比。但是如果电压增高,电泳分辨率反而下降。因为电压升高了,样品流动速度增快,大分子在高速流动时,分子伸展开了,摩擦力也增加,相对分子质量与移动速度就不一定呈线性关系。

1.2.4.2 核酸构型与琼脂糖凝胶电泳分离的关系

根据 Aaij 和 Borst 用琼脂糖凝胶电泳研究的结果,发现在相对分子质量相当的情况下,DNA 的电泳速度次序为:共价闭环DNA > 直线DNA > 开环的双链环状DNA(本实验结果也应如此),参见图1.4。但琼脂糖浓度太高时,环状DNA(一般为球形)不能进入胶中,相对迁移率为0($R_m = 0$),而同样大小的直线双链DNA(刚性棒状)可以按长轴方向前进($R_m > 0$)。由此可见,构型不同,在凝胶中的电泳速度差别较大。用琼脂糖凝胶电泳相差一个超螺旋的DNA也可以分开。除DNA外,RNA同样也如此。

1.2.4.3 聚丙烯酰胺凝胶的应用范围

除了上述的用琼脂糖凝胶外,也可用聚丙烯酰胺凝胶电泳,两种方法的比较见表1.5和1.6。

表1.5 两种不同凝胶电泳的使用范围

类 型	琼脂糖凝胶	聚丙烯酰胺凝胶
操 作	简 便	需要聚合
分辨率/bp	150 ~ 880 000	10 ~ 1 000
胶的浓度/%	0.1 ~ 2.5	3 ~ 20
设 备	水平式电泳槽	垂直型电泳槽

表1.6 聚丙烯酰胺凝胶质量分数与分离DNA片段大小的关系

聚丙烯酰胺凝胶质量分数/%	有效分离范围(核苷酸)
3.5	100 ~ 1 000
5.0	80 ~ 500
8.0	60 ~ 400
12.0	40 ~ 200
20.0	10 ~ 100

1.2.4.4 脉冲电泳

分离大分子DNA的琼脂糖凝胶电泳法中,DNA的大小一般不超过20 kb,更大的DNA分子彼此很难分开。这是由于DNA分子在琼脂糖凝胶介质中,呈无规卷曲的构象。当DNA分子的有效直径超过凝胶孔径时,在电场作用下可变形挤过筛孔,此时其电泳迁移率不再依赖于分子大小,因而无法进行分离。此时可采用交变脉冲电泳法,它可以分离分析大分子DNA(10 ~ 1 000 kb)。

1.2.4.5 pUC19 或 pBR322 的电泳行为

(1) 标准质粒pUC19或pBR322与自己提取的pUC19或pBR322未经酶解,在电泳图谱上应观察到3条带。