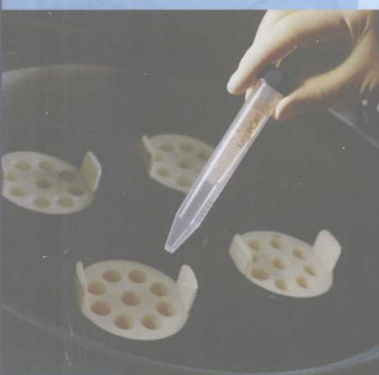
 21世纪高等院校教材

生物技术 综合实验

刘晓晴 等 编



科学出版社
www.sciencep.com

IT教育联盟

生物技术

综合实验

王德明 主编

清华大学出版社

21 世纪高等院校教材

生物技术综合实验

刘晓晴 等 编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书包括基因工程、蛋白工程、细胞工程(植物细胞工程、动物细胞工程)和微生物工程四大工程技术的基本方法。以分子生物学技术为主线,同时兼顾细菌、植物细胞、动物细胞的核酸及蛋白质的基本研究方法。每一部分内容既相对独立又相互联系,既有理论原理又有具体的实验方法和操作,同时还给出不同的结果进行分析和改进。

本书适合综合性大学、师范院校开设的生物技术、生物工程等综合性实验教学用书,亦可作为分子生物学和四大工程实验课的教材以及相应的实验操作参考书。

图书在版编目(CIP)数据

生物技术综合实验 / 刘晓晴等编. —北京: 科学出版社, 2009

(21 世纪高等院校教材)

ISBN 978-7-03-025423-8

I. 生… II. 刘… III. 生物技术-实验-高等学校-教材 IV. Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 152441 号

责任编辑: 单冉东 席 慧 / 责任校对: 陈玉凤

责任印制: 张克忠 / 封面设计: 耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

装 订 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009 年 9 月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2009 年 9 月第一次印刷 印张: 16

印数: 1—2 500 字数: 323 000

定价: 30.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

21 世纪是生命科学的世纪。近年来, 生物技术新的实验方法发展迅速, 其实际应用日益广泛, 已逐渐成为一个新的经济增长点, 对国民经济的发展发挥着显著作用。以培养具有创新精神和实践能力的高素质生物科学人才为根本任务的高等学校生物专业, 不仅要认真做好理论知识的传授, 而且应重视学生实践动手能力的培养。

《生物技术综合实验》是一本高校生物技术实验的教学指导用书, 内容包括基因工程、蛋白质工程、细胞工程和微生物工程几大领域的最主要生物技术方法。本书由多年来一直在一线从事教学、科研的老师根据生物技术的发展趋势和教学实践的要求编写的。全书分为五章, 每章均有基本原理介绍和具体实验内容, 每个实验完全按照学生实验的要求编写, 均分列了该实验的原理、目的和所用材料, 详细叙述了实验步骤, 并将实验的关键点和应注意的问题列入注意事项之中, 多数实验还给出了结果与分析, 对可能出现的不同结果和如何改进做了相应的分析和解释, 最后还列出了思考题。全书每章内容虽然相对独立, 但以实验所用绿色荧光蛋白 (GFP) 为线索, 将编码该蛋白基因的克隆、重组表达、纯化及鉴定以及 GFP 蛋白的应用贯穿起来, 便于学生理解和应用。全书 79 个实验都具有可操作性。本书最大的特点是不仅描述了实验过程, 还对实验结果进行了分析, 使学生不仅会做这些实验, 更有利于他们分析问题和解决问题能力的提高, 从而能让学生真正掌握现代的实验技能, 提高动手能力和科学素养。

本书由祁晓廷 (第 1 章)、刘晓晴 (第 2 章)、李艳红 (第 3 章)、廖蓊 (第 4 章)、侯成林、王颖 (第 5 章) 等共同执笔, 刘晓晴统稿。首都师范大学的李乐功教授审阅了全书并提出了宝贵意见, 在此深表感谢。

由于作者水平有限, 书中难免存在不当之处, 欢迎广大读者批评指正。

编 者

2009 年 7 月

目 录

前言

第 1 章 基因工程技术	1
1.1 基因工程技术基本原理与实践	1
1.1.1 基因工程简述	1
1.1.2 基因工程技术实践	2
1.2 原核生物基因工程技术	6
1.2.1 目的 DNA 的获得	6
实验 1 细菌基因组 DNA 的制备	7
实验 2 植物基因组 DNA 的制备和分析	8
实验 3 动物细胞基因组 DNA 的制备	10
实验 4 PCR 扩增目的 DNA	11
1.2.2 大肠杆菌质粒载体的制备	16
实验 5 碱裂解法	17
实验 6 小量一步提取法	19
实验 7 试剂盒法	19
1.2.3 载体和目的 DNA 的限制酶消化	20
实验 8 基因组 DNA 的限制酶消化	21
实验 9 质粒载体的限制酶消化	21
实验 10 DNA 片段的回收纯化	23
1.2.4 载体与目的基因的体外重组	25
实验 11 载体和目的基因的体外重组	26
实验 12 PCR 产物的 TA 重组	26
1.2.5 重组质粒导入大肠杆菌	29
实验 13 CaCl_2 介导转化法	30
1.2.6 转化菌落的筛选	32
实验 14 PCR 法快速筛选阳性克隆	33
实验 15 菌落原位杂交	34
1.3 真核生物(酵母)的基因工程	37
实验 16 酵母基因组 DNA 的提取	38
实验 17 酵母细胞质粒 DNA 的分离	39

实验 18 酵母细胞的转化	40
实验 19 酵母单杂交	42
主要参考文献	44
第 2 章 蛋白质工程技术	46
2.1 蛋白质工程技术原理	46
2.2 蛋白质工程技术	47
2.2.1 重组蛋白质的表达	47
实验 1 重组蛋白在大肠杆菌中的诱导表达	49
实验 2 重组蛋白在酵母中的诱导表达	51
2.2.2 重组表达蛋白的分离纯化	53
实验 3 金属螯合层析法纯化带组氨酸标签的蛋白质	54
实验 4 谷胱甘肽-琼脂糖亲和层析纯化融合蛋白	57
实验 5 从包含体中纯化表达蛋白	59
实验 6 利用凝胶过滤层析更换缓冲液	62
2.2.3 蛋白质溶液的浓缩	64
实验 7 超滤法浓缩蛋白质溶液	65
实验 8 透析法浓缩蛋白溶液	67
2.2.4 蛋白质浓度测定	68
实验 9 Bradford 检测法	68
实验 10 Lowry 检测法	70
2.2.5 蛋白质鉴定方法	71
实验 11 蛋白质的 SDS-PAGE	71
实验 12 双向聚丙烯酰胺凝胶电泳	74
实验 13 蛋白质印迹	82
2.2.6 蛋白质的定点突变	85
实验 14 重叠延伸产生特异位点突变	85
主要参考文献	88
第 3 章 植物细胞工程技术	89
3.1 植物细胞工程原理	89
3.2 植物细胞工程技术	90
3.2.1 植物组织培养技术	90
实验 1 植物组织培养常用培养基的配制及灭菌	91
实验 2 烟草组织快繁技术	95
实验 3 植物细胞悬浮培养技术	96
3.2.2 植物原生质体分离与细胞融合技术	99

实验 4 烟草叶片原生质体的分离与培养	100
3.2.3 植物体细胞杂交	105
实验 5 电激法诱导植物原生质体融合	106
实验 6 聚乙二醇诱导植物原生质体融合	107
3.2.4 植物转基因技术	109
实验 7 叶盘法转化烟草	111
实验 8 真空渗入法转化拟南芥	114
实验 9 基因枪转化水稻愈伤组织	117
3.2.5 转基因植物的鉴定	120
实验 10 外源基因整合的鉴定——斑点杂交	121
实验 11 利用 Southern 杂交检测外源基因的整合	124
实验 12 植物组织总 RNA 的提取	128
实验 13 利用 RT-PCR 初步检测外源基因在植物体内的表达	129
实验 14 利用实时荧光定量 RT-PCR 定量检测外源基因在植物体内的表达	132
实验 15 <i>gus</i> 基因检测	136
主要参考文献	138
第 4 章 动物细胞工程技术	139
4.1 动物细胞工程技术原理	139
4.2 动物细胞工程技术	140
4.2.1 细胞培养的准备工作及基本操作	140
实验 1 细胞培养的前期工作	140
实验 2 细胞培养基的配制	143
实验 3 细胞计数及活力测定	148
实验 4 细胞传代培养 (胰蛋白酶消化法)	151
实验 5 细胞的冻存和复苏	154
4.2.2 原代细胞的培养	158
实验 6 从小鼠胚胎中分离鼠胚胎成纤维细胞	158
实验 7 从鸡胚胎中分离背根神经节细胞	160
4.2.3 细胞系的建立和培养	162
实验 8 原代鼠胚胎成纤维细胞的永生化	162
实验 9 细胞系的培养	164
4.2.4 DNA 导入哺乳动物细胞	166
实验 10 与磷酸钙形成共沉淀的 DNA 转染技术	167
实验 11 脂质体介导的 DNA 转染技术	169
实验 12 用电穿孔法导入 DNA	172

实验 13 运用显微注射法导入 DNA	175
4.2.5 检测基因产物的表达	177
实验 14 利用绿色荧光蛋白观察特定融合蛋白在细胞内的动态分布	177
实验 15 用免疫荧光技术检测特定蛋白质在细胞中的定位	180
实验 16 用免疫共沉淀法和免疫印记法检测蛋白质之间的相互作用	183
实验 17 用流式细胞仪分析细胞周期的变化	186
实验 18 利用双荧光素酶作为报告基因来检测启动子的活性和调控	190
主要参考文献	196
第 5 章 微生物工程技术	197
5.1 微生物工程技术原理	197
5.1.1 微生物工程的定义	197
5.1.2 微生物工程的研究内容	198
5.1.3 微生物工程的发展历史	198
5.1.4 发酵工业的特点	200
5.1.5 微生物工程的应用	200
5.1.6 我国发酵工业发展概况	201
5.2 微生物工程技术	202
实验 1 菌种的自然选育	202
实验 2 土壤中放线菌的选择性分离	205
实验 3 发酵菌株的初筛	208
实验 4 微生物菌种的保藏	210
实验 5 发酵菌种的诱变选育	216
实验 6 四环素的定向发酵及效价测定	219
实验 7 竹黄菌液体发酵及其活性物质的提取	226
实验 8 淀粉质原料的酒精发酵	229
实验 9 生长曲线和产物形成曲线的测定	236
实验 10 发酵过程中糖的利用	238
实验 11 抗生素的分离纯化	240
实验 12 发酵污染的检测和判断	242
实验 13 酸乳的发酵	244
主要参考文献	248

第 1 章 基因工程技术

1.1 基因工程技术基本原理与实践

基因工程技术是在 1973 年发展起来的, 由 S. N. Cohen 和 H. W. Boyer 把大肠杆菌的两种质粒 pSC 101 和 R6-5DNA 的片数在体外建成重组分子后, 引入到大肠杆菌并进行无性繁殖。此后, 基因工程取得了飞速进展, 并成为现代生物技术体系的核心。因此了解基因工程基本原理并掌握其基本的实验技术是每个学习现代生物学的学生必备的知识。

1.1.1 基因工程简述

基因工程技术是在 DNA 水平操纵基因的一门技术: 将基因插入病毒、质粒或其他能自我复制的 DNA 载体分子, 构成遗传物质的新组合, 导入大肠杆菌、酿酒酵母、动物细胞、植物细胞中, 最终实现基因的复制乃至表达。不同于其他理论课程, 基因工程更偏重于技术设计理念, 因此本章在兼顾基因工程基本原理的基础上更侧重技术设计实践。

一般来说, 基因工程的流程可以概括为“分”、“切”、“连”、“转”、“筛”和“表”6 个阶段, 以上过程涉及一系列的分子生物学技术, 如载体 DNA 制备、各种工具酶的使用、体外重组、重组 DNA 分子导入宿主细胞和重组子筛选等技术(图 1-1)。简述如下。

(1) “分”: 首先分离生物有机体基因组 DNA, 或逆转录获得 cDNA, 或通过 PCR 或 RT-PCR 技术直接获得目的基因 DNA, 同时从含有载体 DNA 分子的宿主菌种中分离载体 DNA 分子, 如质粒、YAC、噬菌体 DNA 等。

(2) “切”: 采用适当的限制性内切核酸酶(以下简称限制酶)同时对载体和目的 DNA 进行消化, 以获得相匹配末端。

(3) “连”: 将上述获得带有匹配末端的目的基因 DNA 片段和载体分子通过 DNA 连接酶催化形成重组 DNA 分子。

(4) “转”: 将重组 DNA 分子采用物理、化学或生物媒体介导等方法导入适当的受体细胞。

(5) “筛”: 从大量的细胞繁殖群体中, 采用抗性筛选、核酸分子杂交、PCR 扩增和免疫学筛选等方法获得含有重组 DNA 分子的细胞克隆, 最终测序确认。

(6) “表”: 将测序正确的目的基因 DNA 亚克隆至适当的表达载体中, 导入

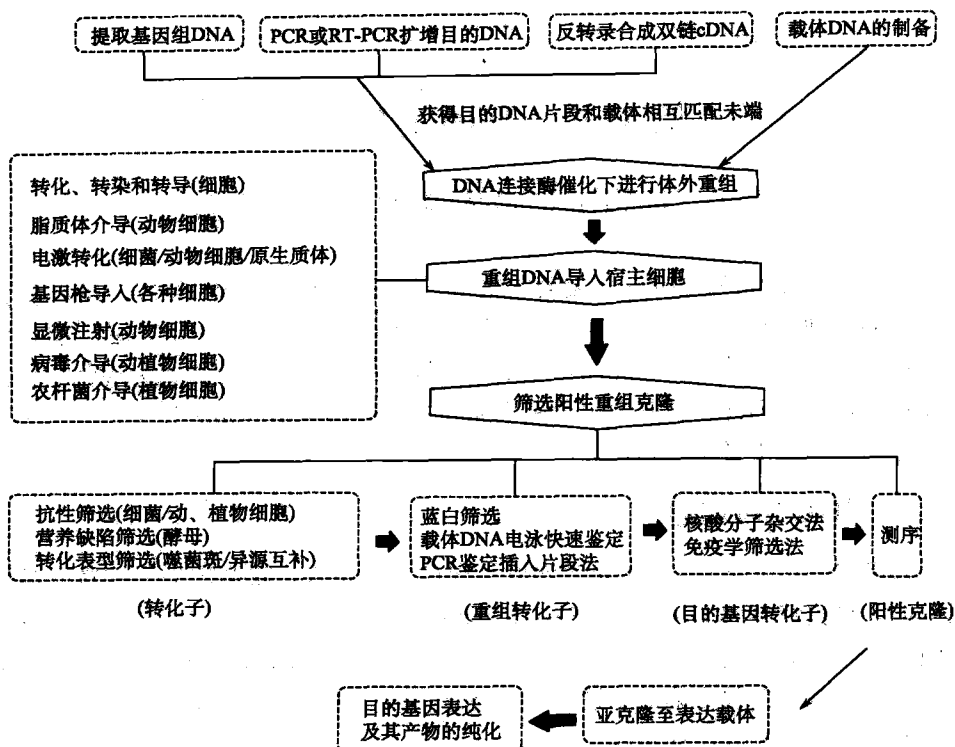


图 1-1 基因工程技术流程示意图

寄主细胞进行表达。根据目的蛋白的表达目的可以选用适当的表达载体，如目的蛋白亚细胞定位分析可以选择 GFP 融合表达载体，在大肠杆菌中表达目的蛋白多采用 IPTG 诱导型表达载体。

常用的克隆体系有质粒/噬菌体载体-大肠杆菌、质粒/YAC-酿酒酵母、质粒(病毒)-动物细胞、质粒/病毒-植物原生质体和农杆菌-植物细胞等。

1.1.2 基因工程技术实践

1. 目的 DNA 片段的分离

DNA 克隆的第一步是获得包含目的基因在内的一群 DNA 分子，这些 DNA 分子或来自于目的生物基因组 DNA 或来自目的细胞 mRNA 逆转录合成的双链 cDNA 分子。由于基因组 DNA 太大，不能够完整克隆，因此必须将其处理成适合克隆的 DNA 小片段，常采用机械物理切割（注射器快速抽提或超声波）和限制酶消化等方法。若基因序列已知而且比较小，就可以用化学法直接合成，但成本较高，尤其在 DNA 很长的情况下。如果基因的两端部分序列

或获得纯化蛋白 N 端氨基酸序列, 就可以根据已知序列设计兼并引物, 从基因组 DNA 或总 RNA 中通过 PCR 或 RT-PCR 技术获得全长或部分目的基因片段。

2. 载体的选择

基因工程的载体应具有以下基本性质: ①在宿主细胞中有独立复制和表达的能力, 这样才能使外源重组的 DNA 片段得以扩增; ②分子质量尽可能小, 以利于在宿主细胞中有较多的拷贝, 便于结合更大的外源 DNA 片段, 同时在实验操作中也不易被机械剪切而破坏; ③载体分子中最好具有两个以上的容易检测的遗传标记 (如抗药性标记基因、报告基因), 以赋予宿主细胞不同的表型特征 (如对抗生素的抗性或产生颜色); ④载体本身最好具有尽可能多的限制酶单一切点, 为避开外源 DNA 序列中限制酶位点的干扰提供更大的选择范围, 若载体上的单一酶切位点位于检测表型的标记基因之内可造成插入失活效应。DNA 克隆常用的载体有: 质粒 (plasmid) 载体、噬菌体 (phage) 载体、柯斯质粒 (cosmid) 载体、单链 DNA 噬菌体 (ssDNA phage) 载体、噬粒 (phagemid) 载体、酵母质粒载体及酵母人工染色体 (YAC) 等。从总体上讲, 根据载体的使用目的, 载体可以分为克隆载体、表达载体、测序载体、穿梭载体等。常用的基因工程载体列于表 1-1 中。

表 1-1 常见基因工程载体比较

载体种类	导入方式	筛选标记	宿主细胞
质粒载体	转化	抗生素	大肠杆菌
噬菌体载体	转染、转导	蓝白筛选, CI 基因	大肠杆菌
柯斯质粒载体	转导	抗生素	大肠杆菌
YAC 载体 (穿梭载体)	电击转化	营养缺陷	酵母细胞
植物质粒表达载体 (穿梭载体)	农杆菌介导、基因枪、电激或 PEG 介导转原生质体	抗生素, 报告基因 (GUS/GFP/LUC)	大肠杆菌/植物细胞
动物质粒表达载体 (穿梭载体)	基因枪、脂质体、显微注射、电激转化	抗生素, 报告基因 (LacZ/GFP/LUC)	大肠杆菌/动物细胞

3. 体外重组

体外重组即体外将目的片段和载体分子连接的过程。许多限制酶能够切割 DNA 分子形成黏末端。用同一种产生黏末端的酶或同尾酶切割适当载体的多克隆位点便可获得相同的黏末端。黏末端彼此退火, 通过 T4 DNA 连接酶的作用便可形成重组体, 此为黏末端连接。当目的 DNA 片段为平末端时, 可以直接与带有平末端载体相连, 此为平末端连接, 但连接效率比末端连接低。有时

为了不同的克隆目的,如将平末端 DNA 分子插入到带有黏末端的表达载体时,则要将平末端 DNA 分子通过一些修饰,如同聚物加尾,加衔接物或人工接头,PCR 法引入酶切位点等,可以获得相应的黏末端,然后进行连接,此为修饰黏末端连接。其中同聚物加尾法获得的载体和 DNA 的“尾巴”虽然长短不同,但能形成环化 DNA 分子,因此并不需要 T4 DNA 连接酶,转化后在宿主菌体内完成连接。当 DNA 末端性质不明时,可以采用 *E. coli* DNA 聚合酶的 5'→3' DNA 聚合酶活性补平 5' 凸出端序列或 3' 凹末端序列,或用 3'→5' DNA 外切酶活性切除 3' 凸出端序列,最终获得具有平末端的 DNA 分子。体外重组的策略如图 1-2 所示。

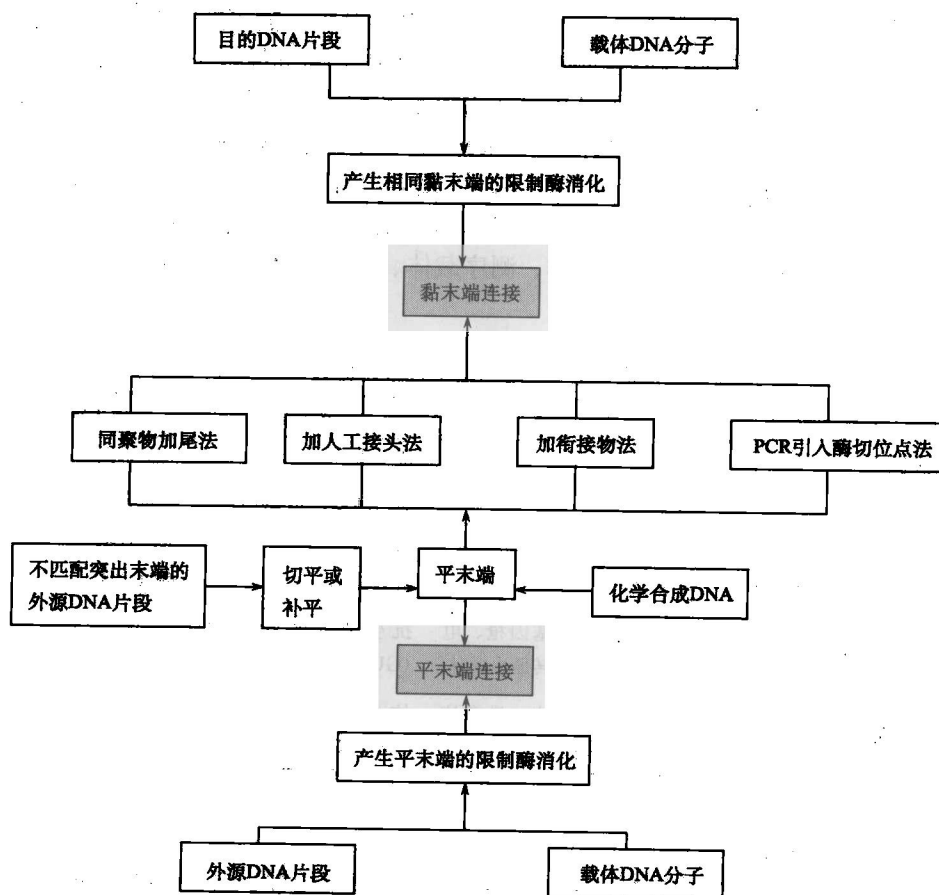


图 1-2 DNA 连接策略

4. 导入受体细胞

载体 DNA 分子上具有能被原核宿主细胞识别的复制起始位点,因此可以在

原核细胞如大肠杆菌中复制,重组载体中的目的基因随载体一起被扩增,最终获得大量同一的重组 DNA 分子。

将外源重组 DNA 分子导入原核宿主细胞的方法有转化 (transformation)、转染 (transfection) 和转导 (transduction)。质粒导入 *E. coli* 为转化,而重组噬菌体 DNA 导入 *E. coli* 称之为转染。为了提高导入效率,将重组噬菌体 DNA 或柯斯质粒体外包装成有侵染性的噬菌体颗粒,借助这些噬菌体颗粒将重组 DNA 分子导入宿主细胞,这种导入技术称之为转导。对于真核生物宿主细胞,可采用基因枪、电激 (电穿孔)、显微注射、磷酸钙沉淀转染法、脂质体介导和聚乙二醇 (PEG) 介导等物理化学手段,也可采用改造天然能侵染真核细胞的细菌、病毒等生物媒介,如农杆菌和 SV40 病毒等。当然随着现代生物技术和多学科交叉渗透,会出现更多高效的导入方法。

5. 重组子的筛选

从不同的重组 DNA 分子获得的转化子中鉴定出含有目的基因的转化子,即阳性克隆的过程就是筛选。目前发展起来的成熟的筛选方法有以下几种。

1) 插入失活法

外源 DNA 片段插入到位于筛选标记基因 (抗生素基因或 β -半乳糖苷酶等报告基因) 的多克隆位点后,会造成标记基因失活,表现出转化子相应的抗生素抗性消失或转化子颜色改变,通过这些现象可以初步鉴定出转化子是重组子或非重组子。目前常用的是 β -半乳糖苷酶显色法,即蓝白筛选法。

2) PCR 筛选和限制酶酶切法

提取转化子中的重组 DNA 分子作模板,根据目的基因已知的两端序列设计特异引物,通过 PCR 技术筛选阳性克隆。PCR 法筛选出的阳性克隆,用限制酶酶切法进一步鉴定插入片段的大小。

3) 核酸分子杂交法

制备目的基因特异的核酸探针,通过核酸分子杂交法从众多的转化子中筛选目的克隆。目的基因特异的核酸探针可以是已获得的部分目的基因片段,或目的基因表达蛋白的部分序列反推得到的一群寡聚核苷酸,或其他物种的同源基因。

4) 免疫学筛选法

如果目的基因的表达产物能纯化,就可以利用该蛋白质的特异抗体,采用免疫学筛选法从表达型 cDNA 文库获得目的基因克隆。

上述方法获得的阳性克隆最后要进行测序分析,以最终确认目的基因。

6. 表达

将测序正确的基因的编码序列克隆至表达载体,根据表达蛋白的目的可以选用诱导或组织细胞特异启动子,或与 GFP 报告基因融合以研究目的蛋白细胞定位,或加标签蛋白 (6×His 标签等) 便于后续检测、分离和纯化。

在后续的内容中分原核生物基因工程和酵母细胞基因工程两部分介绍相关的实验技术,而植物基因工程和动物基因工程请参照第3、4章部分。

1.2 原核生物基因工程技术

本部分主要以质粒-大肠杆菌经典克隆体系为核心,按照原核基因克隆程序对基本实验技术展开叙述,而基因表达部分在第2章有专门的叙述,这里就不再重复。

1.2.1 目的DNA的获得

DNA是生物遗传信息的携带者,在生物体内决定着蛋白质的生物合成,具有极为重要的生理功能。这些分子DNA包括病毒的DNA、原核生物的基因组DNA及其细胞内的质粒DNA和高等生物的DNA等。其中高等生物的DNA又包括染色体DNA(核基因组)、线粒体DNA(mtDNA)和叶绿体DNA(cpDNA)。纯度高完整性好的DNA对分子生物学研究非常重要,如纯化的质粒载体DNA可用来进行基因克隆;提取的动植物基因组DNA可以用来构建基因组文库,进行Southern杂交等,因此研究DNA的提取方法很有意义。

DNA通常与蛋白质及部分RNA结合以染色质形式存在,因此分离核酸首先要破碎细胞,然后采用各种方法将蛋白质、糖类、脂类和盐类等物质除去以纯化DNA。在提取过程中要保证DNA不被内源或外源DNase所降解,以保持DNA的完整性。

DNA的一般提取程序可归纳如下:

生物材料的选择→破碎细胞(液氮研磨/组织匀浆/酶解/超声波)→去除蛋白质→DNA沉淀→纯化(有机溶剂抽提/沉淀/柱层析法/梯度离心法/用酶温和消化杂质)。

1. 生物材料的选择

生物材料包括动、植物器官或组织以及微生物等,选择提取DNA的生物材料主要考虑生物的生长状态或生长期、组织或器官类型、样品取材的难易及丰富程度等。

2. 细胞的破碎(在缓冲液中)

机械法:组织捣碎机,玻璃匀浆器,研钵研磨。

物理法:反复冻融法($-15\sim 0^{\circ}\text{C}$,主要用于动物细胞)、冷热交替法(90°C 至冰冻,主要用于细菌病毒)、超声波处理法(多用于微生物)。

化学及生化法:自溶法(在一定的条件下加防腐剂,自身酶系破坏细胞,因时间长不易控制较少使用)、溶菌酶(破坏细菌细胞壁)、纤维素酶(用在植物细胞上)、表面活性剂[十二烷基硫酸钠(SDS)和Triton X-100等]。

3. DNA 的提取

一般采用酚/氯仿去除蛋白质，用高盐除去糖类，用去污剂如 SDS、CTAB（十六烷基三甲基溴化铵）等破坏细胞膜，使蛋白质变性，同时抑制 DNase 活性，最后用乙醇或异丙醇沉淀 DNA。

4. DNA 的纯化

无论采用哪种方法提取 DNA，都有不同程度的蛋白质、多糖以及一些盐类污染，因此进一步纯化 DNA 是非常必要的。常用的方法有有机溶剂抽提、沉淀、柱层析法、梯度离心法以及用酶温和消化杂质等。

下面分别介绍细菌、植物和动物的基因组 DNA 提取技术。

实验 1 细菌基因组 DNA 的制备

首先用 SDS 和蛋白酶 K 破坏细菌细胞膜，同时抑制内源 DNase 活性。然后用高浓度 NaCl 除去糖类物质，CTAB 结合 DNA，通过氯仿抽提可将蛋白质除去。最后通过异丙醇沉淀 DNA，而 CTAB 溶于异丙醇而被除去。

【实验目的】

掌握细菌 DNA 提取的原理及试剂的作用。

【实验材料】

1. 材料

过夜培养的大肠杆菌

2. 试剂

TE 缓冲液：

Tris-HCl 100 mmol/L (pH8.0)
EDTA 20 mmol/L (pH 8.0)
10% (m/V) SDS

CTAB/NaCl 溶液：

CTAB (m/V) 10%
NaCl 0.7 mol/L
20 mg/mL 蛋白酶 K
5 mol/L NaCl
异丙醇
70%乙醇
酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1)

3. 仪器

恒温水浴锅，台式高速离心机，电泳装置

【实验步骤】

(1) 取 1.5 mL 菌液于小离心管中，室温 10 000 r/min 离心 30 s 收集菌体，

倾倒入去上清，尽可能移去残余液，否则会影响后续反应。

- (2) 加入 567 μL TE 缓冲液，涡旋充分混匀，然后加入 30 μL 10% SDS 和 3 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K，上下颠倒混匀，37℃ 水浴中保温 1 h。（裂解细菌细胞同时抑制内源 DNase）
- (3) 加入 100 μL 5 mol/L NaCl 和 80 μL CTAB/NaCl 溶液，充分混匀，于 65℃ 水浴中保温 10 min。（高盐去糖，CTAB 结合 DNA）
- (4) 加入等体积酚/氯仿/异戊醇，颠倒混匀，置冰上 2 min，10 000 r/min 离心 5 min。转移上清至另一新管中。（抽提去蛋白）
- (5) 在上清液中加入等体积酚/氯仿/异戊醇再次抽提一次，操作同第 (4) 步。
- (6) 加入 0.6 倍体积异丙醇，混匀后于 -20℃ 存放至少 1 h，沉淀 DNA。（沉淀 DNA）
- (7) 12 000 r/min 离心 10 min，仔细移去上清，不要搅动沉淀。然后加入 500 μL 70% 乙醇，旋转离心管，然后 10 000 r/min 离心 5 min。移出乙醇，吹干后溶于适量的灭菌 ddH₂O 或 TE 缓冲液中。（去盐）
- (8) 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性。

实验 2 植物基因组 DNA 的制备和分析

由于植物细胞具有细胞壁，而且细胞内多糖类物质含量高，因此一般的提取真核细胞基因组 DNA 的方法用在植物细胞提取上并不十分有效。这里介绍一种常用的提取植物细胞基因组 DNA 的方法，即 CTAB 法。CTAB 是一种去污剂，可溶解细胞膜，它能与核酸形成复合物，在高盐溶液中（0.7 mol/L NaCl）是可溶的，通过氯仿抽提可将蛋白质除去。最后通过乙醇或异丙醇沉淀 DNA，而 CTAB 可溶于乙醇或异丙醇而被除去。

【实验目的】

掌握植物 DNA 提取的原理及试剂的作用。

【实验材料】

1. 材料

新鲜的植物组织材料或 -80℃ 冻存的材料

2. 试剂

2×CTAB 溶液：

CTAB (m/V)	2%
Tris-HCl	100 mmol/L (pH8.0)
EDTA	20 mmol/L (pH8.0)
NaCl	1.4 mol/L
PVP (聚乙烯吡咯烷酮)	1%