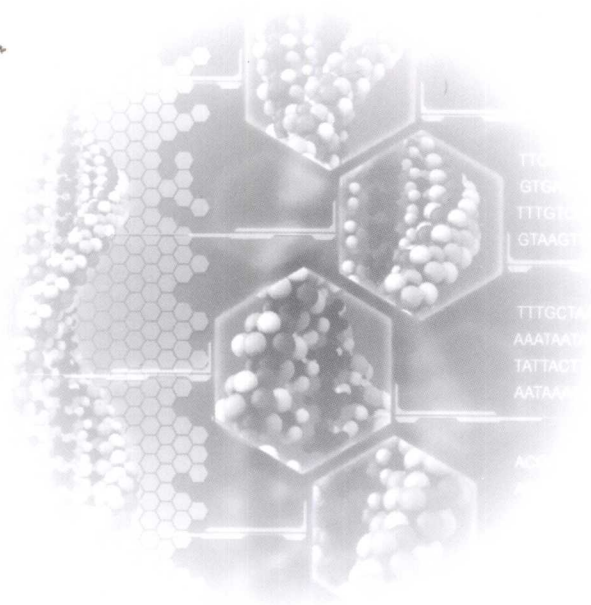




生命科学核心课程系列教材

生物技术综合实验

曹军卫 主编



科学出版社

014016260

Q81-33
24

生命科学核心课程系列教材

生物技术综合实验

主 编 曹军卫

副主编 涂 毅 金卫华

唐红枫 邓丽娟



科学出版社

北 京



北航

C1703453

Q81-33
24

000010410

内 容 简 介

本书包括基因工程、蛋白质工程、细胞工程、发酵工程、免疫学方面最新的、应用最广泛的实验技术,共 65 个相关实验。各实验的组织结构均包括实验目的、实验原理、器材、操作步骤、结果及思考题,并加强了各实验的安全提示。本书力求能够体现目前最新的技术方法,并且语言简洁、流畅,条理性 and 可操作性强。

本书适合作为微生物学、微生物工程、生物工程、生物技术、发酵工程、食品、生物医学工程等相关专业的生物技术综合实验教学用书,也可用于生物、医学和农学类应用性学科的相关专业实验课程教学。

图书在版编目(CIP)数据

生物技术综合实验/曹军卫主编. —北京:科学出版社,2013

生命科学核心课程系列教材

ISBN 978-7-03-038936-7

I. ①生… II. ①曹… III. ①生物工程-实验-高等学校-教材

IV. ①Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 249154 号

责任编辑:席 慧 高璐佳 / 责任校对:包志虹

责任印制:阎 磊 / 封面设计:迷底书装

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>

安泰印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013 年 12 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2013 年 12 月第一次印刷 印张:19 1/2

字数:512 000

定价:39.60 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

生物技术专业是在 1997 年根据国家教育部专业调整的要求新建立的本科专业,国内外均没有先例可供参考,尽管经历近 20 年的探索,有关该专业的人才培养方案,如专业培养目标、专业特色和培养要求、指导性专业方向、学制和学分要求、专业主干(核心)课程及专业主要实验和实践性教学要求等方面的建设,包括教材的建设,对于所有国内高等院校仍是一个亟待解决的重要课题。

目前全国高等院校微生物学、微生物工程、生物工程、生物技术、发酵工程、食品、生物医学工程等相关专业多数设置有生物技术综合实验课程,每年在校生有万余人,而适用的教材极少。在这类专业中,生物技术实验具有广阔的应用价值,不仅是实现生物技术专业培养目标最重要的专业课之一,也是许多生物、医学和农学类应用性学科最重要的专业课程。

生物技术专业以往使用的实验讲义不利于学生的学习与参考。因此,编者组织武汉大学知名教授与武汉东湖学院生物技术专业教师共同编写生物技术综合实验教材,希望借此为实现本专业人才培养目标做出贡献。这是国内第一部由 211、985 工程大学与民营大学合作出版的本科生专业课程教材,将会对全国各类大学的生物技术综合实验课程有一定的参考价值。

本书包括基因工程、蛋白质工程、细胞工程、发酵工程、免疫学方面的最新的、应用最广泛的实验技术,共有 65 个相关实验。编者希望借此实验教材的编写,带动该实验课程乃至整个专业的建设与改革。也希望本书得到全国各类高等院校广泛的认可和使用,并且欢迎广大教师在使用过程中提出宝贵意见,编者会在再版时加以改进。

编 者

2013 年 8 月 15 日

目 录

前言

第 1 篇 基因工程

第 1 章 基因工程常用技术	2
实验 1 染色体 DNA 的制备——植物总 DNA 的提取	3
实验 2 细菌总 DNA 的提取	5
实验 3 动物组织 DNA 的提取	7
实验 4 质粒 DNA 的提取	8
实验 5 琼脂糖凝胶电泳分离检测 DNA	12
实验 6 PCR 扩增目的基因	15
实验 7 琼脂糖凝胶中 DNA 片段的回收	19
实验 8 DNA 的酶切	22
实验 9 感受态细胞的制备	26
实验 10 在质粒载体中进行外源 DNA 的克隆	29
实验 11 质粒 DNA 的转化	31
实验 12 基因定位	34
实验 13 基因的定点突变	37
实验 14 DNA 的随机突变	40
第 2 章 原核表达体系的应用	43
实验 15 原核生物中外源基因的表达和纯化	43
实验 16 宏基因组文库构建	47
实验 17 cDNA 文库的构建	52
第 3 章 真核表达体系的应用	66
实验 18 小鼠 β -actin 基因的克隆与表达	66
实验 19 酵母表达体系及酵母双杂交技术	76
实验 20 植物表达体系	84

第 2 篇 蛋白质工程

第 4 章 蛋白质工程常用技术	95
实验 21 蛋白质末端分析	95
实验 22 SDS-PAGE 电泳分离检测蛋白质	100
实验 23 离子交换层析纯化牛奶中的酪蛋白	106
实验 24 凝胶过滤	115
实验 25 亲和层析	124
实验 26 高效液相色谱法测定牛乳中 α -乳白蛋白	127

实验 27 气相色谱法测定人白蛋白制品中辛酸钠含量	135
实验 28 蛋白质二维凝胶电泳技术	139
实验 29 免疫印迹	149

第3篇 细胞工程

第5章 细胞工程技术	156
实验 30 菊花的愈伤组织诱导培养	156
实验 31 菊花愈伤组织的分化培养	165
实验 32 菊花苗的生根培养	168
实验 33 植物原生质体分离与融合	169
实验 34 动物细胞的原代培养	176
实验 35 动物细胞的传代培养	182
实验 36 培养细胞的增殖及活力检测	183
实验 37 流式细胞仪检测技术	187

第4篇 发酵工程

第6章 固体培养技术	192
实验 38 平菇的固体培养技术	192
第7章 厌氧发酵技术	197
实验 39 啤酒发酵技术	197
实验 40 酸奶发酵	205
第8章 好氧分批发酵技术	213
实验 41 单细胞蛋白好氧分批发酵技术	213
第9章 连续发酵技术	222
实验 42 酵母的连续发酵技术	222
第10章 动植物细胞悬浮培养技术	229
实验 43 动物细胞悬浮培养	229
实验 44 植物细胞悬浮培养	237
实验 45 共聚焦显微技术	239

第5篇 免疫学

第11章 免疫学技术	246
实验 46 环状沉淀反应	246
实验 47 单向琼脂扩散实验	247
实验 48 双向琼脂扩散实验	249
实验 49 对流免疫电泳实验	250
实验 50 火箭电泳实验	252
实验 51 酶联免疫吸附测定(ELISA)	253
实验 52 BA-ELISA	255
实验 53 抗原和免疫血清的制备	257

实验 54	动物细胞免疫荧光技术	259
实验 55	淋巴细胞杂交瘤单克隆抗体技术	261
实验 56	盐析法纯化免疫球蛋白	265
实验 57	DEAE-Sephadex A-50 柱层析纯化免疫球蛋白	268
实验 58	Sephacrose CL-4B 亲和柱层析纯化 IgG 及 IgG 亚类	270
实验 59	高效液相色谱法纯化小鼠腹水中单克隆抗体	272
实验 60	单克隆抗体亲和层析柱纯化重组人 $\alpha 2a$ 干扰素	273
实验 61	免疫球蛋白酶标记抗体技术	274
实验 62	荧光素标记抗体技术	276
实验 63	免疫斑点实验	279
实验 64	免疫组化染色技术检测淋巴细胞表面标记	281
实验 65	免疫共沉淀实验	285
参考文献		289
附录 1	常用缓冲溶液的配制	291
附录 2	常用培养基的配制	297
附录 3	不同温度下硫酸铵饱和度计算表	305

第 1 篇 基因工程

20 世纪 70 年代以来,现代生物技术飞速发展。随着一系列新技术、新方法的不断出现,广大生物学家通过不懈的努力,开拓了许多新的研究领域,对生物科学的研究现状有了质的提升。其中,最引人注目并被公认的是以 DNA 重组为中心的基因工程技术。

基因工程(gene engineering),又称基因操作(gene manipulation)或重组 DNA(recombinant DNA),是一门以分子遗传学和分子生物学理论为基础,以生物化学和微生物学的现代方法为手段,将来源不同的遗传物质(基因)即 DNA 分子,按照预先设计的蓝图,在体外构建所需的 DNA 片段,然后通过载体导入受体细胞,以改变生物原有的遗传特性,获得新物种(品种),或研究基因结构与功能的现代生物技术。

从定义可以看出,基因工程的一个重要特征,就是强调了外源 DNA 分子的新组合被引入一种新的寄主生物中进行繁殖。这种 DNA 分子的新组合是按照工程学的方法进行设计和操作的。这就赋予了基因工程跨越天然物种屏障的能力,克服了固有的生物物种间的限制,带来和扩大了定向创造新生物的可能性。这是基因工程的最大特点。

而基因工程最大的优点是打破了常规育种难以突破的物种之间的界限,可以使原核生物与真核生物之间、动物与植物之间,甚至人与其他生物之间的遗传信息进行重组和转移。

自 DNA 重组技术于 1972 年诞生以来,作为现代生物技术核心的基因工程技术得到了飞速的发展,并广泛应用于医学、农业、工业、水产、环保等行业。本篇实验在方法上,力求具有可行性、实用性,内容涵盖基因工程操作的基本过程,整个实验基本上是一个连续的过程,通过学习,要求学生能在原有的相关理论知识基础上,较全面和深入理解基因工程原理,掌握基本的基因工程常用实验方法。

第 1 章 基因工程常用技术

基因工程技术的可行性基于以下方面的原理。

1. 不同基因具有相同的遗传物质基础

地球上的一切生物,从细菌到高等动物和植物,直至人类,其基因都是一个具有遗传功能的含特定核苷酸序列的 DNA 片段。而所有生物的 DNA 的组成和基本结构都是一样的。因此,不同生物的基因(DNA 片段)原则上是可以重组互换的。虽然某些病毒的基因定位在 RNA 上,但是这些病毒的 RNA 仍可以通过反转录产生 DNA,并不影响不同基因的重组或互换。

2. 基因是可以切割的

基因是以直线排列在 DNA 分子上。除少数基因重叠排列外,大多数基因彼此之间存在着间隔序列。因此,作为 DNA 分子上一个特定核苷酸序列的基因,可以从 DNA 分子上一个完整地切割下来。即使是重叠序列的基因,也可以把其中需要的基因切割下来,但是破坏了其他的基因。

3. 基因是可以转移的

基因不仅是切割下来的,而且发现携带基因的 DNA 分子可以在不同生物体之间转移,或者在生物体内的染色体 DNA 上移动,甚至可以在不同染色体之间进行跳跃,插入靶 DNA 分子之中。由此表明基因是可以转移的。

4. 多肽与基因之间存在着对应关系

普遍认为,一种多肽就有一种相对应的基因。因此,基因的转移或重组最终可以根据其表达产物——多肽的性质来考察。

5. 遗传密码是通用的

一系列三联密码子(除极少数几个外)同氨基酸之间的对应关系,在所有生物中都是相同的。也就是说遗传密码是通用的,重组的 DNA 分子不管导入什么样的生物细胞中,只要具备转录翻译的条件,均能转录翻译出同样的氨基酸。即使人工合成的 DNA 分子(基因)同样可以转录翻译出相应的氨基酸。

6. 基因可以通过复制把遗传信息传递给下一代

经重组的基因一般来说是能传代的,可以获得相对稳定的转基因生物。

基因工程部分的实验内容总体分为基因工程常用技术、目的基因的原核表达体系及目的基因的真核表达体系三个方面,基本流程如图 1 所示。

主要包括以下实验内容。

(1) 从生物有机体复杂的基因组中,分离出带有目的基因的 DNA 片段或 RNA 片段,同时对提取的目的基因进行琼脂糖凝胶电泳分离检测。

(2) 载体的获得:提取质粒等载体;通过 PCR 技术获得大量的目的基因;在体外将带有目的基因的 DNA 片段连接到具有选择标记的质粒载体上,形成重组 DNA 分子。将目的基因与

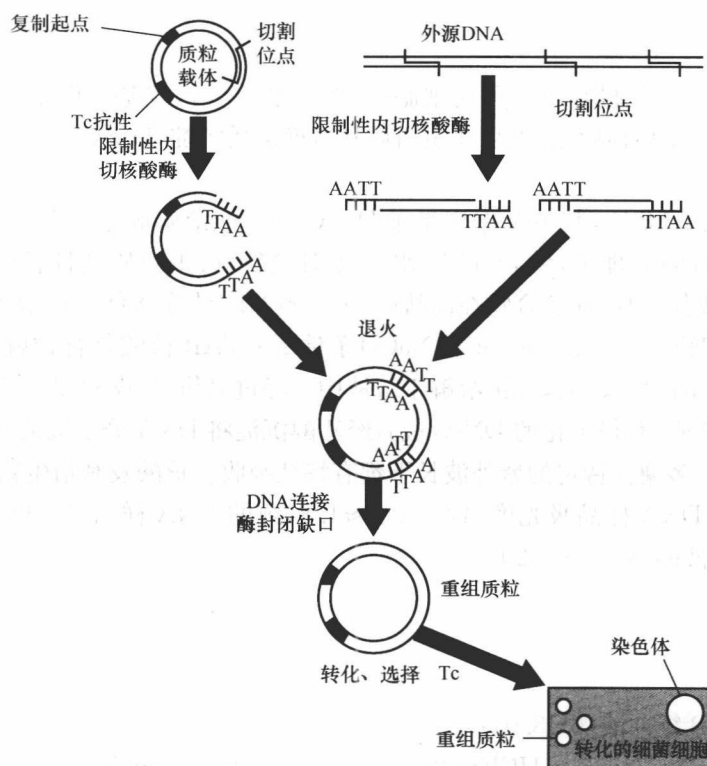


图1 基因工程的基本过程

载体结合的过程,实际上是不同来源的 DNA 重新组合的过程。

(3) 将目的基因导入受体细胞:用人工的方法使体外重组的 DNA 分子转移到受体细胞,主要是借鉴细菌(转化)或病毒(转导)侵染细胞的途径。

(4) 扩增带有重组体的细胞,获得大量的细胞繁殖群体(菌落)。

(5) 从大量的细胞繁殖菌落中,筛选出具有重组 DNA 分子的阳性克隆。

(6) 进一步研究分析筛选出的细胞克隆的目的基因。

(7) 将目的基因克隆到表达载体上,导入寄主细胞,使之在新的遗传背景下实现功能表达,产生出人类所需要的各种物质。

实验1 染色体 DNA 的制备——植物总 DNA 的提取

【实验目的】

(1) 学习和掌握 CTAB 法提取植物总 DNA 的基本原理和实验技术。

(2) 学习和掌握紫外吸收法测定 DNA 的纯度和浓度。

【实验原理】

在液氮冷冻下研磨植物叶片,可使细胞壁破裂,加入十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)和 β -巯基乙醇,可使核蛋白体解聚,然后使蛋白质和多糖杂质沉淀,DNA进入水相,再用酚、氯仿抽提纯化。

本实验采用CTAB法,其主要作用是破膜。CTAB能溶解膜蛋白与脂肪,解聚核蛋白。植物材料在CTAB的处理下,结合65℃水浴使细胞裂解、蛋白质变性、DNA被释放出来。CTAB与核酸形成复合物,此复合物在高盐($>0.7\text{ mol/L}$)浓度条件下可溶于溶液中,并稳定存在,但在低盐浓度($0.1\sim 0.5\text{ mmol/L NaCl}$)条件下CTAB-核酸复合物就因溶解度降低而沉淀,而大部分的蛋白质及多糖等仍溶解于溶液中。经过氯仿/异戊醇(24:1)抽提,去除蛋白质、多糖、色素等杂质,获得纯化的DNA,最后经乙醇沉淀将DNA分子沉淀分离出来。

核酸、蛋白质、多糖在特定的紫外波长下都有特征吸收。核酸及其衍生物的紫外吸收高峰在260 nm。纯的DNA样品吸光度 $A_{260}/A_{280}\approx 1.8$,纯的RNA样品吸光度 $A_{260}/A_{280}\approx 2.0$, $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ DNA溶液的 $A_{260}=0.020$ 。

【器材】

1. 试剂

(1) 3×CTAB缓冲液(pH8.0):

Tris·HCl(pH8.0)	100 mmol/L
EDTA(pH8.0)	25 mmol/L
NaCl	1.5 mol/L
CTAB	3%

使用前加入2%(V/V) β -巯基乙醇。

(2) TE缓冲液(pH8.0):

Tris·HCl	10 mmol/L
EDTA	1 mmol/L

(3) 其他试剂:氯仿/异戊醇混合液(24:1,V/V)、95%乙醇、液氮、新鲜的植物叶片(根据实验目的自行选择,如小白菜叶)。

2. 仪器

高压灭菌锅,恒温水浴锅,高速冷冻离心机,紫外分光光度计等。

【操作步骤】

(1) 称取2 g新鲜的植物叶片,用蒸馏水冲洗叶面,滤纸吸干水分。

(2) 将叶片剪成约1 cm长,置预冷的研钵中,倒入液氮,尽快研磨成粉末。

(3) 待液氮蒸发完后,加入15 mL预热(60℃)的CTAB提取缓冲液,转入一磨口锥形瓶中,置于65℃水浴保温1 h,不时地轻轻摇动混匀。

注:CTAB缓冲液放在65℃水浴中预热90 min,加入2%(V/V) β -巯基乙醇。如果量少,可以在1.5 mL的离心管中进行。注意液氮研磨时,小心操作,最好戴上棉布手套,以免冻伤。

(4) 加等体积的氯仿/异戊醇,盖上瓶塞,温和摇动,使成乳状液。

(5) 将锥形瓶中的液体倒入50 mL离心管中,4℃,8000 r/min离心10 min。

(6) 离心管中会出现3层,用滴管小心地将上层清液吸入另一干净的离心管中,弃去中间层的细胞碎片和变性蛋白及下层的氯仿(根据需要,上清可用氯仿/异戊醇反复提取多次)。

(7) 收集上层清液,并将其倒入小烧杯。沿烧杯壁慢慢加入2倍体积预冷的95%乙醇。边加边用细玻璃棒沿同一方向搅动,可看到纤维状的沉淀(主要为DNA)迅速缠绕在玻璃棒上。

注:玻璃棒要缓慢沿着同一方向搅动,避免将DNA链打断。

(8) 小心取下这些纤维状沉淀,加1~2 mL 70%乙醇冲洗沉淀,冲洗2次,轻摇几分钟,除去乙醇,即为DNA粗制品。

(9) 将粗制品溶于70%乙醇,缓和颠倒数次,4℃,8000 r/min离心10 min。弃上清。

(10) 将DNA沉淀风干,并用双蒸水溶解。

(11) 在紫外分光光度计上分别测定该溶液在260 nm和280 nm波长下的吸光度。

(12) PCR操作时,吸取样品溶液1 μ L,剩余样品放入-20℃保存。

【结果】

根据测得的260 nm和280 nm波长下的吸光度判断提取DNA的纯度,并估算DNA的浓度及含量。

【思考题】

(1) β -巯基乙醇和CTAB的作用分别是什么?

(2) 液氮研磨的原理是什么?

(3) 分析实验结果,并讨论实验材料中的哪些物质对结果有影响。

(唐红枫)

实验2 细菌总DNA的提取

【实验目的】

(1) 学习细菌总DNA提取的基本原理。

(2) 学习革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌总DNA的提取方法。

【实验原理】

在碱性条件下,用表面活性剂十二烷基磺酸钠(SDS)将细菌细胞壁破裂,然后用高浓度的NaCl沉淀蛋白质等杂质,经过氯仿抽提进一步去掉蛋白质等杂质后,经乙醇沉淀,得到纯度较高的总DNA。

【器材】

1. 菌种

分离纯化后的细菌菌株,革兰氏阳性菌如苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)、革兰氏

阴性菌如大肠杆菌等。

2. 试剂

TE 缓冲液(pH8.0)、溶菌酶溶液(20 mg/mL)、10% SDS、蛋白酶 K(20 mg/mL)、5 mol/L NaCl、酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、乙醇。

3. 仪器

高速台式离心机,紫外检测仪,微量移液器等。

【操作步骤】

1. 革兰氏阳性菌 DNA 提取方法(提取基因组 DNA)

- (1) 取 3~6 mL 细菌过夜培养液,5000 r/min 离心 10 min,弃上清。
- (2) 加入 0.5 mL TE 缓冲液悬浮沉淀,并加入 75 μ L 溶菌酶(20 mg/mL)溶液,40 $^{\circ}$ C 保温 30 min。
- (3) 加入 10% SDS 50 μ L,蛋白酶 K(20 mg/mL)5 μ L,混匀,37 $^{\circ}$ C 保温 30 min。
- (4) 加入 5 mol/L NaCl 0.75 mL,混匀。
- (5) 用等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提后,5000 r/min 离心 10 min,将上清移至干净的离心管中。
- (6) 加 2 倍体积的乙醇沉淀 DNA,颠倒混合,室温下静止 10 min,离心沉淀 DNA。
- (7) 70%乙醇漂洗 DNA 后,吸干,用 TE 缓冲液 30~50 μ L 溶解 DNA,-20 $^{\circ}$ C 保存。

2. 革兰氏阴性菌总 DNA 提取方法

方法 1:

- (1) 将菌液悬于 1.5 mL 溶菌酶溶液[0.15 mol/L NaCl,0.1 mol/L Na₂EDTA,15 mg/mL溶菌酶(pH8.0)]中,37 $^{\circ}$ C 温浴 2 h。
- (2) 加入 10% SDS 1.5 mL[0.1 mol/L NaCl,0.5 mol/L Tris,10% SDS(pH8.0)],反复颠倒混匀 10 min,10 000 r/min 离心 10 min,取上清。
- (3) 用等体积酚:氯仿:异戊醇混合液抽提 1 次,水相中加入 3 mol/L 乙酸铵 40 μ L 和 3 mL无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C 沉淀 DNA 1 h,12 000 r/min 离心 10 min。
- (4) 收集 DNA 沉淀,用 100 μ L TE 溶解。

方法 2:

- (1) 菌液中加入 DNA 提取液[100 mmol/L Tris,100 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl,1% PVP,2% SDS(pH8.0)],涡旋混匀。
- (2) 在摇床上 250 r/min 振荡 2 h,4 $^{\circ}$ C 沉淀 DNA 1 h,13 000 r/min 离心 10 min,收集 DNA 沉淀。

- (3) 用 TE 缓冲液 100 μ L 溶解 DNA。

方法 3:

- (1) 菌液中加入 DNA 提取液[100 mmol/L Tris,100 mmol/L EDTA,100 mmol/L 磷酸钠,1.5 mol/L NaCl,1% CTAB(pH8.0)],20 μ L 蛋白酶 K(20 mg/mL)和 500 μ L 溶菌酶[0.15 mol/L NaCl,0.1 mol/L Na₂EDTA,15 mg/mL 溶菌酶(pH8.0)],37 $^{\circ}$ C 温浴 2 h。
- (2) 加入 1 mL 20% SDS,65 $^{\circ}$ C 水浴过夜。
- (3) 加入 1/3 倍体积饱和 NaCl,剧烈振荡,12 000 r/min 离心 10 min。

(4) 取上清,用等体积酚:氯仿:异戊醇抽提1次,水相中加入等体积 TE 缓冲液,再加入 0.6 倍体积的异丙醇,室温沉淀 DNA 2 h。

(5) 12 000 r/min 离心 10 min,收集 DNA 沉淀,用 TE 缓冲液 200 μL 溶解。

方法 4:

(1) 取 TE 缓冲液 20 μL 、饱和酚 20 μL 加入无菌小离心管中。

(2) 取已经培养好的菌液一环加入上述离心管中。

(3) 振荡离心管 30 s。

(4) 8000 r/min 离心 10 min。

(5) 取上清 3~5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测。

注:在总 DNA 提取过程中,离心管不可剧烈振动,防止过多的 DNA 断裂。

【结果】

取少量 DNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳检测(见实验 5)。

【思考题】

(1) 为什么 DNA 提取时,革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的方法有所不同?

(2) 本实验中,SDS 和蛋白酶 K 的作用分别是什么?

(唐红枫)

实验 3 动物组织 DNA 的提取

【实验目的】

(1) 学习并掌握动物组织总 DNA 的提取方法及其原理。

(2) 从肝脏组织中提取到一定量的纯净的 DNA 样品。

【实验原理】

DNA 是一切生物细胞的重要组成成分,主要存在于细胞核中。通过研磨和 SDS 作用,破碎细胞;苯酚和氯仿可使蛋白质变性,用其混合液(酚:氯仿:异戊醇)重复抽提,使蛋白质变性,然后离心除去变性蛋白质;RNase 降解 RNA,从而得到纯净的 DNA 分子。

【器材】

1. 仪器

高速离心机,烘箱,冰箱,水浴锅,微量移液器,高压灭菌锅。

2. 试剂

(1) 1 mol/L Tris-HCl(pH8.0),生理盐水,0.5 mol/L EDTA(pH8.0),10% SDS,RNA 酶,氯仿:异戊醇=24:1,TE 缓冲液(pH8.0)。

(2) TES 缓冲液(释放 DNA):将 0.5844 g NaCl 溶解于 80 mL 双蒸水,分别加入 0.5 mol/L EDTA 1 mL、Tris-HCl (pH8.0) 0.2 mL,并定容至 100 mL,摇匀后,转到准备好的输液瓶中,贴上标签,高压灭菌后,降至室温,4 °C 保存备用。

【操作步骤】

(1) 组织块解冻,用生理盐水洗去血污,剪取约 0.5 g 组织,放入 1.5 mL 离心管中,剪碎。

(2) 加入 TES 缓冲液 0.45 mL 混匀,再加入 SDS(10%) 50 μ L, 5.0 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL),充分混匀后,于 56 °C 保温 4~6 h,每 2 h 摇动 1 次。

(3) 放置到室温,加入等体积饱和酚(500 μ L),颠倒混匀,10 000 r/min 离心 10 min,分离水相和有机相,小心吸取上层含核酸的水相,转入一个新的 1.5 mL 离心管。

注:离心后,请勿晃动离心管;取上层清液时,注意不要吸起中间的蛋白质层。

(4) 加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),颠倒混匀,10 000 r/min 离心 10 min,取上层转移到新的 1.5 mL 离心管中。

注:抽提每一步用力要柔和,防止机械剪切力对 DNA 的损伤。

(5) 加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),颠倒混匀,10 000 r/min 离心 10 min,取上层清液转入一个新的 1.5 mL 离心管。

(6) 加入 2.5 倍体积的-20 °C 预冷的无水乙醇沉淀 DNA,观察现象。

(7) 12 000 r/min 离心 10 min,弃去乙醇。

(8) 用-20 °C 的 75%乙醇洗涤,10 000 r/min 离心 5 min,弃去乙醇,55 °C 干燥 DNA。

注:弃去乙醇时,注意不要荡起 DNA。

(9) 加入适量 TE 缓冲液溶解 DNA(具体依 DNA 的多少而定),-20 °C 保存备用。

【结果】

测定样品 DNA 在 260 nm 和 280 nm 波长下的吸光度,判断提取 DNA 的纯度,并估算 DNA 的浓度及含量。

【思考题】

(1) 为了获得高质量的肝脏 DNA,在实验过程中应注意什么?

(2) 为什么不能加 SDS、蛋白酶 K 后再进行研磨处理,而植物 DNA 提取时加入 CTAB 抽提液后必须进行研磨?

(3) 比较分析植物 DNA 抽提和动物 DNA 抽提的不同之处。

(唐红枫)

实验 4 质粒 DNA 的提取

【实验目的】

掌握用碱裂解法和试剂盒法处理小量细菌培养物、分离质粒 DNA 的操作方法。

【实验原理】

根据实验目的不同,质粒 DNA 的提取可以有不同的方法,但基本步骤多为三步:第一步,细菌培养和质粒的扩增;第二步,细菌菌体的裂解;第三步,质粒 DNA 的纯化。菌体裂解方法不同,决定了质粒 DNA 提取方法的差异,目前菌体裂解方法主要有煮沸法、SDS 法、碱裂解法、Triton-溶菌酶法等。质粒 DNA 的纯化方法主要有梯度离心法、柱层析法等,但由于目前所用质粒的复制量极大,小量常规制备的质粒即可以满足内切核酸酶图的绘制、细菌转化、特定 DNA 片段的分离、常规亚克隆及探针标记等方面的工作需要。在质粒 DNA 提取中,质粒 DNA 的质量和产量在很大程度上受培养条件的影响,通过一些实验发现,下列培养方式能获得较好的结果。

(1) 培养应用菌龄不超过 4 天的平板单菌落作为起始菌。

(2) 培养菌应在 37 °C, 220 r/min 下生长 16~18 h。

(3) 不能用经储藏的培养菌直接进行质粒提取制备。

碱裂解法是较常用的提取质粒 DNA 的方法。其优点是收获率高,适于多数的菌株,所得产物经纯化后可满足多数的 DNA 重组操作。十二烷基磺酸钠(SDS)是一种阴离子表面活性剂,它既能使细菌细胞裂解,又能使一些蛋白质变性。用 SDS 处理细菌后,会导致细菌细胞破裂,释放出质粒 DNA 和染色体 DNA,两种 DNA 在强碱环境中都会变性。由于质粒和主染色体的拓扑结构不同,变性时前者虽然两条链分离,但仍然缠绕在一起不分开;但后者完全变性分离甚至出现断裂。因此,当加入 pH4.8 的酸性乙酸钾降低溶液 pH,使溶液 pH 恢复较低的近中性水平时,质粒的两条小分子单链可迅速复性,恢复双链结构,但是主染色体 DNA 则难以复性。在离心时,大部分主染色体与细胞碎片、杂质等缠绕在一起被沉淀,而可溶性的质粒 DNA 则留在上清液中。再用异丙醇沉淀、乙醇洗涤后,可得到纯化的质粒 DNA。碱裂解法提取的质粒 DNA 可直接用于酶切、PCR 扩增、银染序列分析等。

提取的质粒 DNA 可用琼脂糖凝胶电泳检测,电泳前在样品中加入 RNA 酶可防止 RNA 污染。质粒通常有三种构象,即超螺旋、线性和开环。三种构象的质粒在琼脂糖凝胶电泳中的泳动速度不同,由快到慢依次为超螺旋、线性、开环(开环质粒是指双链环状的质粒, DNA 有部分解链,因此电泳速度最慢)。由标准分子质量 Marker 可推断质粒的分子质量大小。

判断提取质粒好坏的一个指标就是超螺旋质粒的含量。因为用质粒转染细胞时,超螺旋质粒的效率最高,所以要求质粒中超螺旋质粒的含量要在 90% 以上。

本实验介绍常用的碱裂解法和试剂盒法提取质粒 DNA。

【器材】

1. 试剂

(1) 碱裂解液 I: GET 缓冲液[50 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L EDTA, 25 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)]。

(2) 碱裂解液 II: 0.2 mol/L NaOH(内含 1% 的 SDS, 现配现用)。

(3) 碱裂解液 III: 乙酸钾溶液[60 mL 5 mol/L KAc, 11.5 mL 冰醋酸, 28.5 mL H₂O (pH4.8)]。

(4) 异丙醇, 75% 乙醇, 酚: 氯仿(1:1, V/V), TE 缓冲液, 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 1 mmol/L EDTA, 氨苄西林, 电泳缓冲液, RNA 酶, 蒸馏水。

2. 培养基

LB 培养基。

3. 菌种

大肠杆菌 DH5 α (含 pUC18 质粒及带有氨苄西林抗性标记的重组质粒)。

4. 仪器

移液器,离心机,1.5 mL 离心管,试管,三角瓶,培养皿,牙签,移液枪,无菌操作台等。

【操作步骤】

1. 培养基配制、灭菌和接种

1) 抗生素溶液的配制 抗生素(氨苄西林 100 mg/mL)溶液:1 g 氨苄西林溶于 10 mL 双蒸水中,用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌。使用时按浓度 100 mg/mL 的量加入 LB 培养基,即得氨苄西林抗性的 LB 培养基。

2) LB 培养基的制备

(1) 称取 1 g 蛋白胨、1 g 氯化钠、0.5 g 酵母提取物放于烧杯中(固体培养基中加入 1 g 琼脂粉)。

(2) 加适量蒸馏水、搅拌溶化(在定容后加入适量琼脂粉,然后直接灭菌)。

(3) 用 pH 试纸调节 pH 约 7.0。

(4) 定容至 100 mL 后倒入 500 mL 的三角瓶中,塞上棉塞或硅胶塞,并用报纸和棉线扎紧瓶口。

(5) 向灭菌锅中加入自来水,将装有培养基的三角瓶及试管(已包扎好)放入灭菌锅中。

(6) 盖好灭菌锅,开始加热,约 10 min 后开始排放灭菌锅中的冷气,约 5 min 后关上阀门。

(7) 温度升到 121 $^{\circ}$ C 开始计时,20 min 后灭菌完成。

(8) 取出固体培养基,待其温度降至 50~60 $^{\circ}$ C(不烫手),加入 100 μ L 氨苄西林溶液(100 mg/mL)并混匀。

(9) 每 100 mL 固体培养基倒 6~7 个平板(在超净台上操作)。

3. 接种

(1) 培养基凝固后,用无菌接种环蘸取菌液,将菌种划线接种于 LB 固体培养基表面。

(2) 平板在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中倒置培养过夜。

(3) 用灭菌过的牙签挑取平板上的单菌落,放在装有无菌液体培养基(约 5 mL)的试管中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。

2. 碱裂解法提取质粒

1) 质粒提取

(1) 用划线接种的方法将菌种转接于含氨苄西林的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。

(2) 挑取单菌落,接种到 5 mL 含抗生素(氨苄西林终浓度 50 μ g/mL)的 LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养 16~24 h。

(3) 取 1.5 mL 培养物加入 2 mL 离心管,6000 r/min 离心 3 min。

注:为保证产量,可以做两管,然后混合为一管。

(4) 离心结束后,去掉上层培养液(尽量吸干)。

(5) 将细菌沉淀重悬于 100 μ L 冰预冷的碱裂解液 I 中,剧烈振荡。

注:可用移液枪吹打混匀或在漩涡振荡器上混匀,目的是确保细胞被完全悬浮,使最大数量的细胞接触