

ZHIWU FENZI
SHENGWUXUE JISHU
SHIYAN ZHIDAO



普通高等教育“十二五”规划教材

国家级实验教学示范中心植物学科系列实验教材

植物分子生物学技术实验指导

饶力群 主编



化学工业出版社

ZHIWU FENZI
SHENGWUXUE JISHU
SHIYAN ZHIDAO



普通高等教育“十二五”规划教材
国家级实验教学示范中心植物学科系列实验教材

植物分子生物学技术实验指导

饶力群 主编



化学工业出版社

· 北京 ·



本教材以植物分子生物学技术为主线,从植物分子生物学常用技术、植物 DNA 操作技术、植物 RNA 操作技术、植物蛋白质操作技术和生物信息学技术等 5 个方面介绍 32 个实验技术。植物分子生物学常用技术主要包括质粒 DNA 制备、DNA 电泳、PCR 扩增、Southern 杂交、Northern 杂交和 Western 杂交等技术;植物 DNA 操作技术主要包括植物 DNA 的提取、酶切片段分离、未知序列 TAIL-PCR 扩增、基因表达载体构建、转基因植物快速鉴定、PCR 点突变和农杆菌浸花法转化等实验技术;植物 RNA 操作技术主要包括植物总 RNA 提取、cDNA 合成、cDNA 芯片分析、实时定量 PCR、RNAi 载体构建、miRNA 克隆与表达、RACE 技术等实验技术;植物蛋白质操作技术主要包括植物蛋白质分离纯化、双向电泳技术、DNA 结合蛋白分离、ELISA 分析、酵母双杂交、蛋白质磷酸化修饰、蛋白质与核酸相互作用等实验技术;生物信息学技术主要介绍生物信息学网站基础知识、核酸序列分析和蛋白质序列分析等。

本教材可作为高等院校生命科学相关专业的植物分子生物学实验课程教学用书,同时也可供相关专业研究生、教师与科研工作者开展植物分子生物学科学研究作参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

植物分子生物学技术实验指导/饶力群主编. —北京:
化学工业出版社, 2013.7

普通高等教育“十二五”规划教材

国家级实验教学示范中心植物学科系列实验教材

ISBN 978-7-122-17583-0

I. ①植… II. ①饶… III. ①植物学-分子生物学-
实验-高等学校-教材 IV. ①Q946-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 124056 号

责任编辑:赵玉清

文字编辑:周 偶

责任校对:战河红

装帧设计:史利平

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:北京云浩印刷有限责任公司

装 订:三河市前程装订厂

710mm×1000mm 1/16 印张 10 字数 190 千字 2013 年 8 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:22.00 元

版权所有 违者必究

国家级实验教学示范中心植物学科系列实验教材 编写委员会

主 任：张宪省 （山东农业大学）
吴伯志 （云南农业大学）

副主任：李 滨 （山东农业大学）
崔大方 （华南农业大学）
赵玉清 （化学工业出版社）

委 员：（按姓名笔画排列）
杨学举 （河北农业大学）
陈建斌 （云南农业大学）
张金文 （甘肃农业大学）
李 滨 （山东农业大学）
李保同 （江西农业大学）
吴伯志 （云南农业大学）
肖建富 （浙江大学）
张宪省 （山东农业大学）
邹德堂 （东北农业大学）
周 琴 （南京农业大学）
项文化 （中南林业科技大学）
赵玉清 （化学工业出版社）
彭方仁 （南京林业大学）
崔大方 （华南农业大学）
蔺万煌 （湖南农业大学）
燕 玲 （内蒙古农业大学）

本书编写人员

主 编 饶力群(湖南农业大学)

副 主 编 胡颂平(江西农业大学)

刘 志(湖南农业大学)

吴 琦(四川农业大学)

汪启明(湖南农业大学)

参 编 (以姓名笔画为序)

王正加(浙江农林大学)

刘 志(湖南农业大学)

杨 华(湖南农业大学)

吴 琦(四川农业大学)

汪启明(湖南农业大学)

胡颂平(江西农业大学)

饶力群(湖南农业大学)

唐忠海(湖南农业大学)

前言

Preface

分子生物学主要是从分子水平上阐述生命现象和本质的科学，是现代生命科学的“共同语言”。分子生物学又是生命科学中进展迅速的前沿学科，它的理论已经渗透到其他生命学科各个领域，它的核心内容是通过生物的物质基础——核酸、蛋白质等生物大分子的结构、功能及其相互作用的规律的研究来阐明生命分子基础，从而探讨生命的奥秘。

分子生物学也是一门实验性学科，分子生物学技术已被广泛应用于基础生物学、医学、农业科学、林业科学和生物产业等领域，并且发挥着重要的作用。由于分子生物学特别是分子生物学技术的重要性，我国高等农林院校植物生产类、林学类以及生物科学类专业已广泛开设了“分子生物学”和“分子生物学技术”等课程。然而，由于高等农林院校专业的特殊性，“分子生物学技术”课程的开设主要以植物分子生物学实验技术为主。但是目前国内出版的植物分子生物学技术实验教材很少，且现已出版的分子生物学实验教材大多涉及实验面广，内容较多，作为高等农林院校植物生产类、林学类以及生物科学类专业本科生实验教材不太适合。

基于上述情况，在化学工业出版社的支持下，作为主编单位的湖南农业大学组织江西农业大学、四川农业大学和浙江农林大学等农林院校，邀请长期从事植物分子生物学教学和研究的教授、博士编写了《植物分子生物学技术实验指导》教材。本教材以植物分子生物学技术为主线，按植物分子生物学常用技术、植物 DNA 操作技术、植物 RNA 操作技术、植物蛋白质操作技术和生物信息学技术等五个方面编写 32 个实验教学内容。所选 32 个实验可操作性强，实验条件易满足，编写内容

实用，基本涵盖目前植物分子生物学通用技术，适合高等农林院校植物分子生物学实验教学的需要。本教材也可作为其他高等院校生命科学相关专业的植物分子生物学实验课程教学用书，同时也可供相关专业研究生、教师与科研工作者开展植物分子生物学科学研究作参考用书。

本教材由饶力群教授负责编写前言、实验十二~十四和统稿工作，刘志教授负责编写实验三十~三十二和附录二，胡颂平博士负责编写实验一、实验二、实验八和实验九，吴琦博士负责编写实验三、实验四、实验十、实验十一和实验十五，汪启明博士负责编写实验十六~二十一，杨华博士负责编写实验二十二~二十九，唐忠海博士和王正加博士负责编写实验五~七，唐忠海博士负责编写附录一。

鉴于时间及作者能力有限，书中不妥之处，敬请读者批评指正，作者不胜感谢。

编者
2013年4月

目录

Contents

第一篇 植物分子生物学常用技术

实验一	质粒 DNA 的制备	1
实验二	DNA 酶切	5
实验三	DNA 琼脂糖凝胶电泳	8
实验四	目的基因的 PCR 扩增	11
实验五	Southern 杂交	14
实验六	Northern 杂交	18
实验七	Western 杂交	24

第二篇 植物 DNA 操作技术

实验八	水稻基因组 DNA 的提取与检测	28
实验九	DNA 酶切片段的分离与回收	32
实验十	拟南芥未知序列的 TAIL-PCR 扩增	35
实验十一	植物基因表达载体的构建	39
实验十二	反向斑点杂交快速鉴定转基因植物	42
实验十三	DNA 的 PCR 定点突变	45
实验十四	农杆菌浸花法转化拟南芥	48

第三篇 植物 RNA 操作技术

实验十五	植物总 RNA 的提取及快速检测	52
实验十六	植物总 RNA 的 cDNA 合成	55
实验十七	cDNA 芯片技术分析拟南芥热激因子表达	58
实验十八	植物不同组织 mRNA 的实时定量 PCR 分析	62
实验十九	植物 RNAi 载体的构建及功能鉴定	67
实验二十	植物 miRNA 克隆与表达分析	71
实验二十一	RACE 技术扩增植物全长 cDNA	77

第四篇 植物蛋白质操作技术

实验二十二	植物蛋白质——超氧化物歧化酶的分离纯化	80
实验二十三	植物蛋白质双向电泳技术	85
实验二十四	DNA 固定化分离植物 DNA 结合蛋白	91
实验二十五	ELISA 技术分析植物蛋白质的表达	96
实验二十六	Western 杂交检测植物蛋白质的表达	100
实验二十七	酵母双杂交技术分析植物蛋白相互作用	104
实验二十八	植物蛋白质磷酸化修饰	116
实验二十九	植物蛋白质与核酸相互作用	119

第五篇 生物信息学技术

实验三十	生物信息学网站基础知识	129
实验三十一	核酸序列分析	130
实验三十二	蛋白质序列分析	133

附 录

附录一	分子生物学常用试剂的配制	136
附录二	分子生物学实验技术和生物信息学综合网址	143

参考文献

第一篇 植物分子生物学常用技术

实验一 质粒 DNA 的制备

一、实验目的

学习和掌握质粒 DNA 提取的方法。

二、实验原理

从大肠杆菌细胞中分离质粒 DNA 的方法众多，其分离的依据可根据分子大小不同、碱基组成的差异以及质粒 DNA 的超螺旋共价闭环环状结构的特点进行。目前常用的有碱裂解法（又称碱变性抽提法）、羟基磷灰石柱色谱法、质粒 DNA 释放法、酚法、两相法以及溴化乙锭-氯化铯密度梯度离心法。以上方法各有利弊。但总结多数实验室的实践经验，认为碱裂解法效果良好，经济且收率较高，是一种使用最广泛的制备质粒 DNA 的方法，也是当今分子生物学研究中的常规方法。制备的质粒 DNA 可用于酶切、连接、转化以及 PCR 等。

碱裂解分离质粒 DNA 是基于染色体 DNA 与质粒 DNA 的变性与复性的差异而达到分离的目的。当细胞在 NaOH 和 SDS 溶液中裂解时，蛋白质与染色体 DNA 发生变性，加入醋酸钾中和液，进行离心后，它们随细胞碎片沉淀下来，而变性的质粒 DNA 又恢复到原来的构型留在上清液中，再经酚/氯仿抽提、乙醇沉淀等步骤获得质粒 DNA。

质粒 DNA 的存在形式有 3 种：①共价闭环 DNA，常以超螺旋形式存在；②开环 DNA，此种质粒 DNA 两条链中有一条发生一处或多处断裂；③线性 DNA，因质粒 DNA 的两条链在同一处断裂而造成。在电泳时同一质粒 DNA 的 3 种形式的泳动速度：超螺旋 > 线性 > 开环。

三、实验材料、试剂与仪器

（一）实验材料

1. 菌种：含 pBR322 或其他质粒 DNA 的大肠杆菌工程菌如 HB101、DH5 α 、JM109 等，如实验后需直接酶切制备的质粒 DNA，可选用科研工作中用 *EcoR* I 非定向克隆构建的重组质粒 DNA 转化的大肠杆菌。

2. LB 液体培养基：称取胰蛋白胨 3.0g，酵母提取物 1.5g，NaCl 3.0g，加双蒸水 200mL 溶解，用 5mol/L NaOH 调至 pH7.4，定容至 300mL，转移至三角烧瓶中，以 103.4kPa 高压灭菌 20min。

(二) 主要试剂

1. 10mg/mL 氨苄西林 (Amp) 溶液: 用无菌水配成 10mg/mL 水溶液, 过滤除菌, 分装成小份存于灭菌有盖离心管中, -20°C 保存备用, 不宜反复冻融。

2. 含 Amp 的 LB 固体培养基: 每 100mL LB 培养液在高压灭菌前加入 1.5g 琼脂, 以 103.4kPa 高压灭菌 20min, 溶液尚未完全冷却时, 取出培养基, 并轻轻摇动以使琼脂均匀分布于整个培养基中 (旋动培养基溶液时, 可能因液体过热会发生暴沸, 必须小心)。待培养基溶液温度降至 50°C (用手背碰瓶壁不致烫手), 按每 100mL 培养基加 10mg/mL Amp 溶液 1mL, 使其终浓度为 $100\mu\text{g/mL}$, 然后在超净台上铺平板, 90mm 直径的培养皿约需 25mL 培养基。

3. Tris-HCl 饱和酚 (pH8.0): 将市售的苯酚置于 65°C 水浴中溶解, 用空气冷凝管进行重蒸馏, 当温度升高至 183°C 时开始收集于数个棕色瓶中 (每瓶约 200mL), 贮存于 -20°C 可保存数年。使用前取一瓶重蒸酚于室温放置一段时间后, 移至 65°C 水浴融化 (冰箱取出后勿立即放入 65°C 水浴中, 以防玻璃炸裂)。融化后加 8-羟基喹啉至终浓度为 $0.1\text{g}/100\text{mL}$, 溶解混匀, 此时溶液呈黄色, 小心将酚倒入分液漏斗中。加入等体积的 1mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 立即加盖, 剧烈振荡并加入固体 Tris 摇匀 (一般加 1g 固体 Tris/100mL 酚)。静置分层后从分液漏斗中放出下层黄色酚相, 弃上层。将酚重新加至分液漏斗中, 加入等体积的含 0.2% β -巯基乙醇的 0.1mol/L Tris-HCl (pH8.0), 剧烈振荡, 直至酚相 $\text{pH} > 7.8$, 将酚装入棕色试剂瓶中, 加入 0.1 倍酚体积的含 0.2% β -巯基乙醇的 0.1mol/L Tris-HCl (pH8.0) 覆盖酚相, 置 4°C 贮存备用。

由于酚重蒸和平衡费时, 操作有一定危险, 因此也可直接从试剂公司购买 Tris-HCl 饱和重蒸酚。

4. 溶液 I: 含 50mmol/L 葡萄糖, 10mmol/L EDTA- Na_2 , 25mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 临用前加溶菌酶至 2mg/mL。

5. 溶液 II: 含 200mmol/L NaOH, 10g/L SDS, 临用前用两种溶液的贮存液配制。

6. 溶液 III: 5mol/L 醋酸钾溶液 60mL (称取 29.4g 醋酸钾定容至 60mL)、冰醋酸 11.5mL 和双蒸水 28.5mL 混合而成。

7. 10mg/mL RNase A: 称取 RNaseA 10mg 溶于 10mmol/L Tris-HCl (pH7.5)、15mmol/L NaCl 中, 于 100°C 加热煮沸 15min 灭活 DNase, 缓慢冷却至室温, 用 1.5mL Eppendorf 管分装成小份保存于 -20°C 。如为 Sigma 公司产品, 一般则不需加热煮沸。

8. TE 缓冲液 (pH8.0): 含 10mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 1mmol/L EDTA- Na_2 (pH8.0), 以 103.4kPa 高压蒸汽灭菌, 4°C 贮存。

9. 溶菌酶 (10mg/mL): 用 10mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 新鲜配制。

10. 酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1): 等体积加 “3” (饱和酚) 和 “11” (氯

仿：异戊醇)。

11. 氯仿：异戊醇 (24 : 1)：按氯仿：异戊醇 = 24 : 1 体积比加入异戊醇。氯仿可使蛋白质变性并有助于水相与有机相的分开，异戊醇则可消除抽提过程中出现的泡沫。

12. 其他试剂：无水乙醇、异丙醇、70%乙醇。

(三) 主要仪器

超净工作台，微量取液器 (20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L)，台式高速离心机，恒温振荡摇床，高压蒸汽消毒器 (灭菌锅)，涡旋振荡器，电泳仪，琼脂糖平板电泳装置和恒温水浴锅等。

四、实验方法

1. 用接种环挑取 1 环冷冻保存的含质粒 DNA 大肠杆菌工程菌，划线接种于含有 Amp 的 LB 固体培养基平板上，37 $^{\circ}$ C 倒置培养约 12h (过夜)。

2. 用接种针或消毒牙签挑取单菌落于盛有 2mL LB 液体培养基 (含 100 μ g/mL Amp) 的试管中，37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。

3. 将菌液收集在 1.5mL 的 EP 管中，10000r/min 离心 2min，弃上清液，将离心管倒置于纸巾上，以使所有液体流出。

4. 在沉淀中加入溶液 I 100 μ L，涡旋混匀，静置 5min。

5. 加入新鲜配制的溶液 II 200 μ L，颠倒数次，轻轻混匀，冰浴 5~10min (溶液变透明，黏稠)。

6. 加入溶液 III 150 μ L，颠倒混匀，冰浴 5~10min (溶液出现白色沉淀)。

7. 12000r/min 离心 2min，将上清液转移至另一 EP 管中。

8. 加等体积酚：氯仿：异戊醇 (25 : 24 : 1) 抽提 1 次，12000r/min 离心 2min，取上层水相转移至另一 EP 管。

9. 加等体积氯仿：异戊醇 (24 : 1) 抽提 1 次，12000r/min 离心 2min，取上层水相转移至另一 EP 管。

10. 加入 2 倍体积无水乙醇振荡混匀，于室温放置 2min 沉淀 DNA。12000r/min 离心 5min，弃乙醇。

11. 用 70%乙醇洗涤沉淀，12000r/min 离心 5min，弃乙醇，室温下静置使乙醇挥发或真空干燥。

12. 用 50 μ L 含 RNase A 的 TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀，振荡，室温放置 20min。-20 $^{\circ}$ C 保存。

五、结果与分析

抽提产物经电泳分离、EB 染色后，在紫外线灯下可观察到 3 条带，自正极端往负极端分别为：超螺旋、线性及开环质粒 DNA。

六、注意事项

1. 应先在实验前 2d 划线接种细菌，实验前 1d 晚上进行单菌落液体培养，并注意无菌操作。

2. 加入溶液 I 时可用力振荡，而加入溶液 II 5min 后，如溶液不变黏稠（用移液枪沾吸没有丝状物出现），则应终止实验。检查使用的试剂是否正确，加量是否正确。

3. 溶液 I 中的溶菌酶宜临用前加入。溶液 II 也应临用前用母液配制。

4. 要选择干净、灭过菌的离心管进行最后一次沉淀 DNA。

附：一种快速可靠的小量制备质粒 DNA 的方法

小规模快速制备质粒 DNA 是筛选大批重组质粒的阳性克隆一个不可缺少的步骤，常规经典的方法是碱裂解法。通过该方法制备出来的质粒 DNA 既可进行琼脂糖凝胶电泳，也可进行限制性酶切分析。但该方法在一次筛选数十个克隆时就显得操作步骤烦琐，费时较多。

下面介绍一种做了一些改动的快速可靠的小规模制备质粒 DNA 方法，此方法称为改良一步法。改动后的整个质粒提取操作步骤如下。

1. 收获 1.5mL 过夜培养菌液于 1.5mL 微量离心管中，12000r/min 离心 10s。

2. 弃去培养液并尽量吸干（使用微量台式真空泵较方便），加入 50 μ L TE (pH8.0) 缓冲液，用旋涡混合器振荡以悬浮细胞。

3. 用玻璃移液管加入 50 μ L 酚/氯仿（1：1）混合液，在旋涡混合器上振荡 10s 后，以 12000r/min 离心 5min。

4. 小心取出 40 μ L 上清液，加入 RNase A 至终浓度 50 μ g/mL，室温放置 5min。

5. 取 5 μ L 质粒溶液进行 0.6%~1% 琼脂糖凝胶电泳，并以未重组载体 DNA 作对照，根据电泳结果即可判断有无外源 DNA 插入。

取适当量可能含重组载体的质粒溶液进行限制性酶切分析。

实验二 DNA 酶切

一、实验目的

学习和掌握 DNA 的限制性核酸内切酶的酶切方法。

二、实验原理

限制性内切酶 (restriction endonuclease, RE) 是由细菌自己产生的能识别双链 DNA 分子中的特定碱基顺序, 并以内切方式水解核酸中的磷酸二酯键的核酸水解酶。它可分为三种类型: I、II 和 III 型, 其中 II 型酶就是通常所指的 RE, 能识别双链 DNA 的特异顺序, 并在这个顺序内进行切割。限制性内切酶是基因工程中剪切 DNA 分子的常用工具酶, 被誉为分子生物学家的手术刀。

实验可选用价格低廉、酶切效果好的 *Eco* RI (识别位点 $G \downarrow AATTC$) 对实验一制备的质粒 pBR322 的 DNA 进行酶切, 观察 RE 的特定切割作用及其限制性图谱。

三、实验材料、试剂与仪器

(一) 实验材料

DNA 底物为实验一制备的大肠杆菌 HB101 的质粒 pBR322 DNA。

(二) 主要试剂

1. 限制性内切酶 *Eco* RI 及其缓冲液: 国内试剂公司购置, 每种 RE 均配有 2 种缓冲液, 在配套的缓冲液中该 RE 均可获得 100% 酶切活性。

2. 50×TAE 缓冲液: 取 Tris 24.2g, 冰醋酸 5.7mL, 0.25mol/L EDTA (pH8.0) 20mL, 加蒸馏水至 100mL。

3. 1×TAE 缓冲液: 用 50×TAE 缓冲液临时配制。

4. 溴酚蓝指示剂溶液: 称取溴酚蓝 100mg, 加双蒸水 5mL, 在室温下过夜, 待溶解后再称取蔗糖 25g, 加双蒸水溶解后移入溴酚蓝溶液中, 摇匀后定容至 50mL, 加入 NaOH 1 滴, 调至蓝色。

5. 溴化乙锭 (EB, 1mg/mL): 戴手套小心称取 EB 20mg 于棕色试剂瓶中, 加 20mL 双蒸水, 溶解后贮于 4℃ 备用, 配制琼脂糖凝胶时每 100mL 凝胶加 50μL EB。

6. DNA 分子量标准: 根据需要购买, 一般浓度为 0.5μg/μL。

(三) 主要仪器

水平式电泳装置, 电泳仪, 台式高速离心机, 恒温水浴锅, 微量移液枪, 微波炉, 凝胶成像仪。

四、实验方法

1. 将下列试剂: RE 缓冲液 $2\mu\text{L}$ 、质粒 DNA 样品 ($1\mu\text{g}$)、*Eco* RI $5\sim 10\text{U}$ 加至 0.5mL EP 管中, 加双蒸水至 $20\mu\text{L}$, 加盖, 混匀后稍离心, 37°C 水浴反应 1h 。

2. 制备琼脂糖凝胶: 称取 0.8g 琼脂糖倒入三角瓶中, 加入 $1\times\text{TAE}$ 缓冲液 100mL , 置微波炉或水浴加热至完全溶化, 取出摇匀, 稍冷却后加 $50\mu\text{L}$ EB 染色液, 摇匀。

3. 灌胶

(1) 取洁净的电泳内槽, 用橡皮膏或透明胶带将内槽的两端边缘封好 (一定要封严, 不能留缝隙)。

(2) 将内槽放置于一水平台面, 并插好所需齿数和厚度的样品梳子。

(3) 将冷却至 60°C 左右的琼脂糖凝胶液缓慢倒入内槽, 直至所需厚度, 注意不要形成气泡, 特别是梳子下, 如有气泡可用小玻棒挑破。

(4) 待胶凝固后, 小心取出梳子, 撕去橡皮膏或透明胶带, 将带凝胶的内槽放入电泳槽中, 注意凝胶点样端要靠近负极。

(5) 加入 $1\times\text{TAE}$ 缓冲液至电泳槽, 缓冲液刚没过凝胶表面即可。

4. 加样: 剪取适当大小的蜡膜 (Parafilm 膜), 取 $6\times$ 上样缓冲液 $1\mu\text{L}$ 点于膜上数点。取 $5\mu\text{L}$ 酶切后的样品、 $0.5\sim 1\mu\text{g}$ 未酶切质粒 DNA、DNA 分子量标准分别与上样缓冲液混匀。将其分别加入凝胶的点样孔 (记录点样顺序及点样量)。

5. 电泳: 接通电源槽与电泳仪的电源 (检查正负极, DNA 片段是从负极向正极移动)。DNA 的迁移率与电压成正比, 电压不超过 $5\text{V}/\text{cm}$ 凝胶长度。当溴酚蓝染料移动至凝胶前沿 $1\sim 2\text{cm}$ 处, 切断电源, 停止电泳。

五、结果与分析

取出内槽, 在紫外凝胶成像仪的玻璃平板上小心推出凝胶, 仔细观察电泳结果, DNA 存在处应显出蓝紫色荧光条带。可观察到酶切与未酶切的 DNA 带的泳动位置: 酶切的 pBR322 只产生 1 个 4.3kb 的条带; 未酶切的 pBR322 有 3 种构型, 从而有 3 个条带, 分别为 5.4kb 、 4.3kb 、 2.5kb 。注意及时保存电泳图像结果。

六、注意事项

1. 本实验可先进行酶切反应, 酶切过程等时间的间隙灌好琼脂糖凝胶。

2. 进行 DNA 酶切时, 要在其最适温度下 (大多数为 37°C) 进行。最好是用每一种酶的专用缓冲液, 以达到最佳酶切效率。如遇 2 种酶酶切应先用低盐缓冲液后用高盐缓冲液, 或 1 种酶切结束后加 TE 至 $400\mu\text{L}$, 再进行酚/氯仿抽提、乙醇沉淀, 重新建立第 2 个酶切反应体系。

3. RE 一定要在低温 (-20°C) 下贮存, 因含 50% 甘油, 在此温度下一般不会结冰, 如结冰则表明冰箱温度低于 -20°C , 应避免结冰。新购的大包装酶,

应先分装。每次吸取后均应将 RE 管放在冰盒内，用完后立即放在 -20°C 。每次取酶尽可能使用新的灭菌 tip（吸嘴），避免污染。

4. 进行大量酶切时，先要确定 RE 的浓度。一般 1U RE 于 37°C 条件下作用底物 DNA 1h 以上可切割 $1\mu\text{g}$ DNA。一般来说，要用 2~3 倍才能保证完全消化，对基因组 DNA 尤其如此。

5. 为便于电泳后直接观察结果，EB 可在琼脂糖加热熔化至灌胶前加入。EB 是 DNA 的诱变剂，亦是极强的致癌物，配制和使用过程中要小心，操作时一定要戴手套，用过的手套要及时把手套顺手翻过来，让污染有 EB 的面朝里，有 EB 的废液和器皿要分别处理好。

6. 由于 DNA 样品与限制性内切酶的用量都少，所以需注意吸样量的准确性及全部放入反应体系中。

7. 凡在酶切反应中所用的一切塑料器皿，都要新的，最后用重蒸水清洗，湿热灭菌，置 50°C 温箱中烘干，用前打开包装，用镊子夹取，不直接用手拿，严防手上杂酶污染。

8. 因温差常使盖上有水汽，故样品酶切完毕或中间取样电泳要离心 2s，以集中体积内溶液，否则常发现酶切后体积变少了。

实验三 DNA 琼脂糖凝胶电泳

一、实验目的

学习和掌握水平式琼脂糖凝胶电泳技术，DNA 分子量和纯度的检测。

二、实验原理

电泳是用于分离和纯化 DNA 的最常用技术。DNA 具有两性解离性质，在 pH8.0 左右带负电荷，电泳时 DNA 分子将从负极往正极移动，可根据其分子量大小来分离 DNA。当提取到 DNA 样品中还有 RNA 残留时，因二者在凝胶上电泳区带的不同，可以鉴定 DNA 样品的纯度。此外，电泳还可以鉴别分子量相同，但构型不同的 DNA 分子。在抽提质粒 DNA 过程中，由于各种因素的影响，使超螺旋的共价闭合环状结构的质粒 DNA (SC) 的一条链断裂，变成开环状 (OC) 分子，如果两条链发生断裂，就转变为线状 (L) 分子。这 3 种构型的分子有不同的迁移率。在一般情况下，超螺旋型 (SC) 迁移速度最快，其次为线状 (L) 分子，最慢的为开环状 (OC) 分子。

DNA 电泳所使用的凝胶主要是琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶 2 种。琼脂糖凝胶在分离范围上优于聚丙烯酰胺凝胶，而分离度上比聚丙烯酰胺凝胶差一些。琼脂糖是一种由 D-半乳糖和 3, 6-脱水-L-半乳糖的残基交替排列组成的天然直链多糖。琼脂糖的原料是琼脂，它由不带电荷的琼脂糖和带电荷的琼胶所组成。琼胶中含有硫酸根和羟基，具有离子交换性质，电泳时产生电渗作用，影响电泳结果。因此，已去除琼胶的琼脂糖，不带有电荷，电泳时不会产生电渗作用。

以上过程需要通过添加了示踪染料的 DNA 分子量标准和样品一起电泳而得以检测。溴化乙锭 (EB) 是常用的 DNA 染料，它在紫外光照射下能发射荧光。当 DNA 样品在琼脂糖凝胶中电泳时，琼脂糖凝胶中的 EB 就插入 DNA 分子中形成荧光络合物，使 DNA 发射的荧光增强几十倍，而荧光的强度正比于 DNA 的含量，如将已知浓度的标准样品作对照，就可比较出待测样品的浓度。由于 EB 有强致癌性，现在已有多种低毒和更为安全的 EB 替代品用于 DNA 染色，例如 GoldView、GreenView 和花菁类染料等。

三、实验材料、试剂与仪器

(一) 实验材料

pUC19 质粒 DNA。

(二) 主要试剂

1. 琼脂糖。
2. GoldView 染料。