

高等学校规划教材

生物工程 实验指导

李霞 李海云 刘红艳 主编

SHENGWU
GONGCHENG
SHIYAN
ZHIDAO



化学工业出版社

高等学校规划教材

生物工程实验指导

李霞 李海云 刘红艳 主编



化学工业出版社

·北京·

《生物工程实验指导》共三章内容，第一章为生物工程基础实验，包括实验室常用生物化学实验技术（如分光光度法、色谱法、电泳、离心、透析等），以及基础生物化学和分子生物学的一些基础性实验；第二章为验证性实验，是在第一章的基础上，安排了一些大分子物质的提取分离及其测定等验证性实验；第三章为综合性实验，以前两章的实验操作为基础，在实验设计上，每个综合实验都以产品生产为主线，综合利用多种实验技术，力争使学生得到多方面的综合训练。内容上，涵盖发酵工程、酶工程、生物分离工程及生物信息学等；应用上，包括医药、能源、食品等，特别是生物多糖、果胶、蛋白酶的利用等目前生物工程领域的研究热点，这些实验的安排既结合了科研热点也贴近生活，提高了学生的生物工程实验操作技能。书末配有附录，介绍了生物化学实验基本常识与基本操作等。

《生物工程实验指导》实用性和可操作性较强，适合生物工程、生物技术、医药、食品、生物化工等专业师生使用，还可供应用技术开发领域、食品加工、医药工业、生物化工等领域科研工作者、生产技术人员参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

生物工程实验指导/李霞, 李海云, 刘红艳主编. —北京:
化学工业出版社, 2018.9
高等学校规划教材
ISBN 978-7-122-32583-9

I. ①生… II. ①李… ②李… ③刘… 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 (2018) 第 149098 号

责任编辑: 丁建华 徐雅妮
责任校对: 王 静

文字编辑: 焦欣渝
装帧设计: 关 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: 北京京华铭诚工贸有限公司

装 订: 北京瑞隆泰达装订有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张 9 $\frac{3}{4}$ 字数 235 千字 2018 年 9 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: 36.00 元

版权所有 违者必究

前言

近些年来,以基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程为代表的现代生物技术发展迅猛,并日益影响和改变着人们的生产和生活方式。生物工程是生物技术的统称,是指运用生物化学、分子生物学、微生物学、遗传学等原理与生化工程相结合,来改造或重新创造、设计细胞的遗传物质、培育出新品种,以工业规模利用现有生物体系,以生物化学过程来制造工业产品。简言之,就是将活的生物体、生命体系或生命过程产业化的过程。它是20世纪70年代初兴起的一门新兴综合性应用学科,随着生命科学在20世纪有了惊人的发展,生物工程技术也上升到一个新的高度。人类基因组计划的启动和进展,更显示出生物工程实验技术是生命科学研究领域和生物工程应用领域中一项非常重要的基本技术。因此,各高校相继开设了生物工程专业,生物工程实验是培养生物工程专业学生掌握专业实验技能的重要实践教学环节。

为提高实验教学环节的效率与质量,我们在已使用多年的实验讲义基础上,结合多年教学实践经验,参考国内外的生物工程相关实验教材,编写了这本《生物工程实验指导》。本教材在内容上做了精心选择,共安排了三章内容,第一章为生物工程基础实验,包括实验室常用生物化学实验技术(如分光光度法、色谱法、电泳、离心、透析等),以及基础生物化学和分子生物学的一些基础性实验;第二章为验证性实验,是在第一章的基础上,安排了一些大分子物质的提取分离及其测定等验证性实验;第三章为综合性实验,以前两章的实验操作为基础,在实验设计上,每个综合实验都以产品生产为主线,综合利用多种实验技术,力争使学生得到多方面的综合训练。内容上,涵盖发酵工程、酶工程、生物分离工程及生物信息学等;应用上,包括医药、能源、食品等,特别是生物多糖、果胶、蛋白酶的利用等目前生物工程领域的研究热点,这些实验的安排既结合了科研热点也贴近生活,提高了学生的生物工程实验操作技能。书末配有附录,介绍了生物化学实验基本常识与基本操作等。

本教材实用性和可操作性较强,适合生物工程、生物技术、医药、食品、生物化工等专业师生使用,还可供应用技术开发领域、食品加工、医药工业、生物化工等领域的科研工作者、生产技术人员参考。

本教材由长期从事生物工程专业实验教学的一线教师集体编写而成,是集体智慧的结

晶, 参加编写工作的主要有: 李霞 (实验 1~实验 5、实验 31~实验 38)、李静 (实验 6~实验 10)、李海云 (实验 11、实验 29、实验 30、实验 44~实验 52)、刘红艳 (实验 12~实验 21)、陈慧英 (实验 22、实验 23、实验 29、实验 30)、张会香 (实验 24~实验 28)、李培骏 (实验 39~实验 43)、李子院 (附录)。

由于编者水平有限, 书中难免存在不足和疏漏之处, 恳请读者批评指正, 以便再版时进一步完善。

编者

2018 年 4 月于桂林

目 录

第一章 生物工程基础实验	1
实验 1 牛肉膏蛋白胨培养基的制备及高压蒸汽灭菌	1
实验 2 微生物细胞的显微直接计数法	5
实验 3 质粒 DNA 分子转化	7
实验 4 碱裂解法小量提取质粒 DNA	9
实验 5 特异性 DNA 片段的 PCR 扩增	13
实验 6 小鼠脾细胞的体外分离培养	15
实验 7 动物细胞生长曲线的测定	17
实验 8 动物细胞的冻存和复苏	19
实验 9 酶联免疫吸附测定	20
实验 10 凝胶过滤色谱法检测蛋白质分子量	22
实验 11 离子交换树脂总交换容量的测定	26
实验 12 蛋白质含量的测定	28
实验 13 蛋白质的两性性质及等电点的测定	32
实验 14 氨基酸的分离鉴定——纸色谱法	34
实验 15 植物体内的转氨基作用	36
实验 16 血清蛋白的醋酸纤维薄膜电泳	39
第二章 验证性实验	41
实验 17 牛乳中酪蛋白的提取	41
实验 18 双水相体系中蛋白质分配系数的测定	43
实验 19 大蒜细胞 SOD 酶的提取与分离	45
实验 20 淀粉酶活性的测定	48
实验 21 影响酶活力的因素——正交试验法	51
实验 22 细胞色素 c 的制备和含量测定	54
实验 23 植物组织中 DNA 的提取	57
实验 24 实验室环境和人体表面微生物的检查	59
实验 25 细菌的简单染色法及革兰氏染色法	63
实验 26 细菌的芽孢染色法及活细菌运动性观察	66
实验 27 水中细菌总数的测定	68
实验 28 骨髓间充质干细胞体外培养和浓度计算	70
实验 29 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质的分子量	72

实验 30 抗生素生物效价测定	75
第三章 综合性实验	79
第一节 海藻多糖的分离和性质研究	79
实验 31 海藻粗多糖样品的制备	80
实验 32 海藻粗多糖中总糖含量的测定	81
实验 33 海藻粗多糖中还原糖含量的测定	84
实验 34 海藻粗多糖中蛋白质含量的测定	85
实验 35 海藻粗多糖中糖醛酸含量的测定	87
实验 36 海藻粗多糖中单糖组成分析	88
实验 37 海藻粗多糖的紫外光谱和红外光谱分析	90
实验 38 海藻粗多糖的灰分分析	92
第二节 柑橘果胶的分离和性质研究	94
实验 39 皮渣的预处理	95
实验 40 微波辅助提取橘皮果胶	96
实验 41 超声辅助提取橘皮果胶	97
实验 42 柑橘果胶中半乳糖醛酸含量的测定	99
实验 43 柑橘果胶中酯化度的测定	101
第三节 微生物发酵生产蛋白酶	102
实验 44 腐乳中产蛋白酶微生物的初筛及分离纯化	103
实验 45 产蛋白酶微生物的摇瓶复筛	105
实验 46 产蛋白酶微生物的鉴定	107
实验 47 小型发酵罐发酵生产蛋白酶	108
第四节 生姜蛋白酶的提取纯化	111
实验 48 生姜蛋白酶的提取及沉淀分离	111
实验 49 生姜蛋白酶的双水相萃取分离	114
实验 50 生姜蛋白酶的反胶束萃取分离	117
第五节 大米生料酿酒工艺	118
实验 51 大米生料酿酒工艺及其控制	119
实验 52 成品检测	121
附录	124
附录 1 实验须知	124
附录 2 生物试剂常识	125
附录 3 常用缓冲溶液的配制	125
附录 4 旋光光度法	128
附录 5 相对密度的测定方法 (2015 版《中华人民共和国药典》)	129
附录 6 熔点测定法 (2015 版《中华人民共和国药典》)	130
附录 7 黏度测定法	132
附录 8 常用的微生物培养基及配制方法	137
附录 9 实验室小型发酵罐灭菌及使用操作技术介绍	142
参考文献	146

第一章

生物工程基础实验

实验 1 牛肉膏蛋白胨培养基的制备及高压蒸汽灭菌

研究背景与意义

微生物培养基是供微生物生长繁殖或积累代谢产物用的人工配制的营养基质。由于各类微生物对营养基质的要求不同，应根据它们对营养的不同需求选择适宜的培养基。有时为了特殊目的要使用特定的培养基，因而培养基的种类很多，迄今为止，已有数千种不同的培养基。

一、实验目的

1. 明确培养基的配制原理。
2. 通过对牛肉膏蛋白胨培养基的配制，掌握配制培养基的一般方法和步骤。
3. 了解高压蒸汽灭菌的基本原理及应用范围。
4. 学习高压蒸汽灭菌锅的操作方法。

二、实验原理

微生物的营养物质种类包括水、碳源、氮源、无机盐、生长因子和能源。牛肉膏蛋白胨培养基是一种常用的细菌培养基，主要用于细菌的分离和培养，有时又称为普通培养基。它由牛肉膏、蛋白胨、NaCl 和水按一定的比例组成。其中牛肉膏为微生物提供碳源和能源，蛋白胨主要提供氮源，而 NaCl 提供无机盐。在配制固体培养基时还要加入一定量的琼脂作凝固剂。琼脂在常用浓度下 96℃ 时溶化，一般实际应用时在沸水浴中或下面垫石棉网煮沸溶化，以免琼脂烧焦。琼脂在 40℃ 时凝固，通常不被微生物分解利用。固体培养基中琼脂的含量根据琼脂的质量和气温的不同而有所不同。

由于这种培养基多用于培养细菌，因此，要用稀酸或稀碱将其 pH 调至中性或微碱性，以利于细菌的生长繁殖。

牛肉膏蛋白胨培养基的配方如下：

牛肉膏	3g	琼脂	15~20g
蛋白胨	10g	水	1000mL
NaCl	5g		

高压蒸汽灭菌主要是通过升温使蛋白质变性，从而达到杀死微生物的目的。将灭菌的物品放在一个密闭和加压的灭菌锅内，通过加热，使灭菌锅内的水沸腾而产生蒸汽。待蒸汽将锅内的冷空气从排气阀中排尽，关闭排气阀继续加热。此时蒸汽不溢出，压力增大，沸点升高，获得高于 100℃ 的温度，导致菌体蛋白凝固变性，从而达到灭菌的目的。蒸汽压力与温度的关系、灭菌锅中空气排除量与温度的关系见表 1-1、表 1-2。实验室中常用的高压蒸汽灭菌锅有立式、卧式和手提式等几种。

表 1-1 蒸汽压力与温度的关系

蒸汽压力 ^①	蒸汽温度/℃	蒸汽压力 ^①	蒸汽温度/℃	蒸汽压力 ^①	蒸汽温度/℃
0	100.0	11	116.4	22	127.8
1	101.9	12	117.6	23	128.7
2	103.6	13	118.8	24	129.6
3	105.3	14	119.9	25	130.4
4	106.9	15	121.0	26	131.3
5	108.4	16	122.0	27	132.1
6	109.8	17	123.0	28	132.9
7	111.3	18	124.1	29	133.7
8	112.6	19	125.0	30	134.5
9	113.9	20	126.0		
10	115.2	21	126.9		

① 蒸汽压力是指高压灭菌锅上压力表所指的值 [磅力/英寸² (即 psi)，1psi = 6894.7Pa，为阅读方便，在此不做换算]。

表 1-2 灭菌锅中空气排除量与温度的关系

高压灭菌锅压力表读数 /psi	温度/℃		
	空气完全排出	空气排出一半	空气未排出
5	109	94	72
10	115	105	90
15	121	112	100

三、实验材料与器材

- (1) 试剂 牛肉膏，蛋白胨，NaCl，琼脂，1mol/L NaOH，1mol/L HCl 等。
- (2) 仪器和耗材 试管，pH 试纸 (pH 5.5~9.0)，棉花，牛皮纸，称量纸，滤纸，记号笔，麻绳，纱布，锥形瓶，烧杯，量筒，玻璃棒，培养基分装器，天平，牛角匙，高压蒸汽灭菌锅。

四、实验步骤

1. 称量

按培养基配方比例依次准确地称取牛肉膏、蛋白胨、NaCl 放入烧杯中。牛肉膏常用玻璃棒挑取，放在小烧杯或表面皿中称量，用热水溶化后倒入烧杯；也可放在称量纸上，

称量后直接放入水中。这时如稍微加热，牛肉膏便会与称量纸分离，然后立即取出纸片。蛋白陈很容易吸潮，在称取时动作要迅速。另外，称量药品时严防药品混杂，一把牛角匙用于一种药品，或称取一种药品后，洗净、擦干，再称取另一种药品，瓶盖也不要盖错。

2. 溶化

在上述烧杯中可先加入少于所需要的水量，用玻璃棒搅匀，然后，在石棉网上加热使其溶解。待药品完全溶解后，补充水分到所需的总体积。如果配制固体培养基，将称好的琼脂放入已溶化的药品中，再加热溶化，在琼脂溶化的过程中，需不断搅拌，以防琼脂糊底使烧杯破裂，最后补足所失的水分。

3. 调 pH

在未调 pH 前，先用精密 pH 试纸测量培养基的原始 pH 值。如果 pH 偏酸，用滴管向培养基中逐滴加入 1mol/L NaOH，边加边搅拌，并随时用 pH 试纸测其 pH 值，直至 pH 达 7.4~7.6；反之，则用 1mol/L HCl 进行调节。注意 pH 值不要调过头，以避免回调，否则，将会影响培养基内各离子的浓度。

对于有些要求 pH 值较精确的微生物，其 pH 的调节可用酸度计。

4. 过滤

趁热用滤纸或多层纱布过滤，以利于结果的观察。一般无特殊要求的情况下，这一步可以省去（本实验无需过滤）。

5. 分装

按实验要求，可将配制的培养基分装入试管内或锥形瓶内。分装装置见图 1-1。分装过程中注意不要使培养基沾在管口或瓶口上，以免沾污棉塞而引起污染。

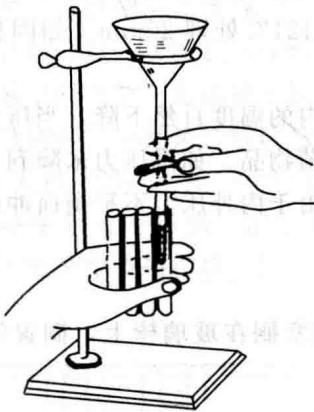


图 1-1 培养基分装装置

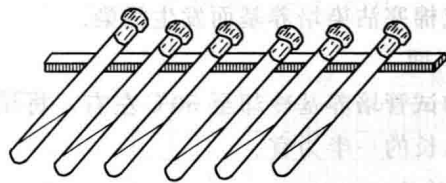


图 1-2 斜面摆法

(1) 液体分装高度以试管高度的 1/4 左右为宜。

(2) 固体分装试管，其装量不超过管高的 1/5，灭菌后制成斜面，如图 1-2 所示。分装锥形瓶的量以不超过锥形瓶容积的一半为宜。

(3) 半固体分装试管一般以试管高度的 1/3 为宜，灭菌后垂直待凝。

6. 加塞

培养基分装完毕后，在试管口或锥形瓶口塞上棉塞（棉塞的制作如图 1-3 所示），以阻止外界微生物进入培养基内而造成污染，并保证有良好的通气性。

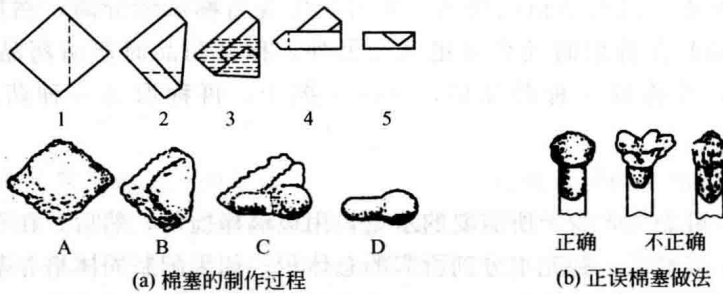


图 1-3 棉塞的做法

7. 包扎

加塞后，将全部试管用麻绳捆扎好，再在棉塞外包一层牛皮纸，以防止灭菌时冷凝水润湿棉塞，其外再用一道麻绳扎好。用记号笔注明培养基名称、组别、日期。锥形瓶加塞后，外包牛皮纸，用麻绳以活结形式扎好，使用时容易解开，同样用记号笔注明培养基名称、组别、日期。

8. 灭菌

(1) 首先将内层灭菌桶取出，再向外层锅内加入适量的水，使水面与三角搁架相平为宜。

(2) 放回灭菌桶，并装入待灭菌物品。注意不要装得太挤，以免妨碍蒸汽流通而影响灭菌效果。锥形瓶与试管口端均不要与桶壁接触，以免冷凝水淋湿包口的纸而透入棉塞。

(3) 加盖，并将盖上的排气软管插入内层灭菌桶的排气槽内。再以两两对称的方式同时旋紧相对的两个螺栓，使螺栓松紧一致，勿使漏气。

(4) 打开加热开关，并同时打开排气阀，使水沸腾以排除锅内的冷空气。待冷空气完全排尽后，关上排气阀，让锅内的温度随蒸汽压力的增加而逐渐上升。当锅内的压力升到所需压力时，控制热源，维持压力至所需时间。本实验用 121°C 处理 20min。如因特殊情况不能及时灭菌，则应放入冰箱内暂存。

(5) 到达灭菌所需时间后，切断电源，让灭菌锅内的温度自然下降，当压力表的压力降至 0 时，打开排气阀，旋松螺栓，打开盖子，取出灭菌物品。如果压力未降到 0 时，打开排气阀，就会因锅内压力突然下降，使容器内的培养基由于内外压力不平衡而冲出锥形瓶口或试管口，造成棉塞沾染培养基而发生污染。

9. 搁置斜面

将灭菌的试管培养基冷却至 50°C 左右，将试管棉塞搁在玻璃棒上，搁置的斜面长度以不超过试管总长的一半为宜。

10. 无菌检查

将灭菌的培养基放入 37°C 的温室中培养 24~48h，以检查灭菌是否彻底。

五、注意事项

1. 要严格按培养基配方配制。
2. 调 pH 不要过头。
3. 使用前要检查高压灭菌锅中存水的量，加水到指定的标度。
4. 高压灭菌要注意物品不要过多，加热后排出冷空气，灭菌所需时间到后等压力表回零后方可取物。

六、思考题

1. 为什么要将培养基的 pH 值调到 7.4~7.6?
2. 为什么在高压灭菌锅加热过程中要打开排气阀?
3. 简述棉塞的制作方法和作用。

实验 2 微生物细胞的显微直接计数法

研究背景与意义

微生物细胞计数的方法有很多，主要包括显微直接计数法、稀释涂布平板法、滤膜法和比浊法，直接计数法适用于各种单细胞菌体的纯培养悬浮液，操作简单。

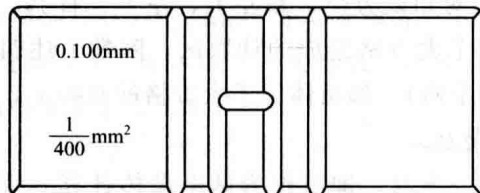
一、实验目的

了解血细胞计数板的构造、计数原理和计数方法，用显微镜直接测定微生物总细胞数。

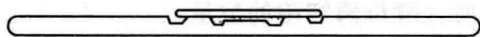
二、实验原理

菌体较大的酵母菌或霉菌孢子可采用血细胞计数板（又称血球计数板），一般细菌则采用彼得罗夫·霍泽（Petrof Hausser）细菌计数板。两种计数板的原理和部件相同，只是细菌计数板较薄，可以使用油镜观察；而血细胞计数板较厚，不能使用油镜观察。

血细胞计数板是一块特制的厚型载玻片，载玻片上有 4 条槽所构成的 3 个平台。中间的平台较宽，其中间又被一短横槽分隔成两半，每个半边上面各有一个计数区（图 1-4）。计数区的刻度有两种：一种是计数区分为 16 个大方格（大方格用三线隔开），而每个大方格又分成 25 个小方格；另一种是一个计数区分成 25 个大方格（大方格之间用双线分开），而每个大方格又分成 16 个小方格。但是不管计数区是哪一种构造，它们都有一个共同特点，即计数区都由 400 个小方格组成（图 1-5）。



(a) 平面图(中间平台分为两半, 各有一计数区)



(b) 侧面图

图 1-4 血细胞计数板的构造 (一)

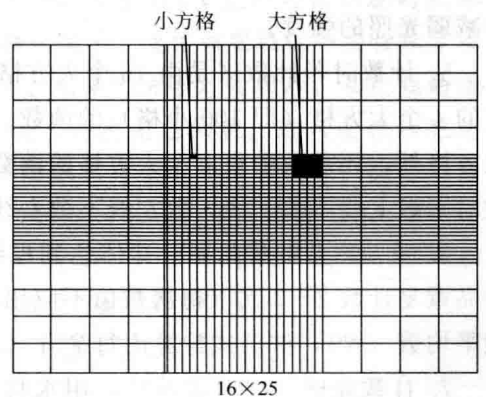


图 1-5 血细胞计数板的构造 (二)
放大后的方格网, 中间方格为计数区

计数区的边长为 1mm，则计数区的面积为 1mm^2 ，每个小方格的面积为 $1/400\text{mm}^2$ 。盖上盖玻片后，计数区的高度为 0.1mm，所以计数区的体积为 0.1mm^3 ，每个小方格的体积为 $1/4000\text{mm}^3$ 。

使用血细胞计数板计数时，先要测定每个小方格中微生物的数量，再换算成每毫升菌液（或每克样品）中微生物细胞的数量。

已知： 1mL 体积 = $10\text{mm} \times 10\text{mm} \times 10\text{mm} = 1000\text{mm}^3$

所以： 1mL 体积应含有小方格数为 $1000\text{mm}^3 / (1/4000\text{mm}^3) = 4 \times 10^6$ 个小方格，即系数 $K = 4 \times 10^6$ 。

因此：

每毫升菌悬液中含有细胞数 = 每个小格中细胞平均数 (N) \times 系数 (K) \times 菌液稀释倍数 (d)

三、实验材料与器材

(1) 材料 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 斜面菌种或培养液。

(2) 仪器和耗材 显微镜，血细胞计数板，盖玻片 ($22\text{mm} \times 22\text{mm}$)，吸水纸，计数器，滴管，擦镜纸。

四、实验步骤

1. 视待测菌悬液浓度，加无菌水适量稀释（斜面一般稀释到 10^{-2} ），以每小格的菌数可数为度。

2. 取洁净的血细胞计数板一块，在计数区上盖上一块盖玻片。

3. 将酵母菌悬液摇匀，用滴管吸取少许，从计数板中间平台两侧的沟槽内沿盖玻片的下边缘滴入一小滴（不宜过多），让菌悬液利用液体的表面张力充满计数区，勿使气泡产生，并用吸水纸吸去沟槽中流出的多余菌悬液。也可以将菌悬液直接滴加在计数区上，注意不要使计数区两边平台沾上菌悬液，以免加盖盖玻片后，造成计数区深度的升高。然后加盖盖玻片（勿使产生气泡）。

4. 静置片刻，将血细胞计数板置载物台上夹稳，先在低倍镜下观察到计数区后，再转换高倍镜观察并计数。由于活细胞的折射率和水的折射率相近，观察时应适当关小孔径光阑并减弱光照的强度。

5. 计数时若计数区是由 16 个大方格组成的，按对角线方位，数左上、左下、右上、右下的 4 个大方格（即 100 小格）的菌数。如果是 25 个大方格组成的计数区，除数上述四个大方格外，还需数中央 1 个大方格的菌数（即 80 个小格）。如菌体位于大方格的双线上，计数时则数上线不数下线，数左线不数右线，以减少误差。

6. 对于出芽的酵母菌，芽体达到母细胞大小的一半时，即可作为两个菌体计算。每个样品重复计数 2~3 次（每次数值不应相差过大，否则应重新操作），求出每一个小格中的细胞平均数 (N)，按公式计算出每毫升（克）菌悬液所含酵母菌细胞的数量。

7. 计数完毕，取下盖玻片，用水将血细胞计数板冲洗干净，切勿用硬物洗刷或抹擦，以免损坏网格刻度。洗净后自行晾干或用吹风机吹干，放入盒内保存。

8. 将实验结果填入表 1-3 中。

表 1-3 观察结果记录表

计数次数	每个大方格菌数					平均数	稀释倍数	试管斜面中的总菌数
	1	2	3	4	5			
第一次								
第二次								

五、注意事项

1. 菌悬液的稀释倍数不宜过高也不宜过低，以每小格的菌数可数为度。
2. 在计数时，对沉降在格线上的细胞的统计应有统一的规定。如菌体位于大方格的双线上，计数时则数上线不数下线，数左线不数右线，以减少误差。
3. 加样量以不溢出盖玻片为宜，也不要过少或者带气泡。

六、思考题

根据你实验的体会，用血细胞计数板计数的误差主要来自哪些方面？应如何尽量减少误差、力求准确？

实验 3 质粒 DNA 分子转化

研究背景与意义

质粒 (plasmid) 是细菌、酵母菌和放线菌等生物中染色体 (或拟核) 以外的 DNA (脱氧核糖核酸) 分子，大小通常在 1~500kb 范围内，常存在于细胞质中，具有自主复制能力。质粒载体是基于细菌质粒的各种元件组建而成的基因工程载体，其用途广泛，借助于插入各种特殊序列而适用于不同的目的。

质粒 DNA 或以其为载体构建的重组 DNA 分子，需要导入细胞中才能进行增殖和表达，接受它们的细胞称为受体细胞或宿主细胞。将外源 DNA 分子导入受体细胞，从而使受体细胞遗传性改变的过程称为转化 (transformation)。由于 DNA 直接转化细胞的效率很低，通常需要采取一些方法处理受体细胞以提高转化效率。受体细胞经过一些特殊方法 (Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 等二价阳离子化学试剂诱导法、电穿孔法等) 处理后，细胞膜的通透性发生暂时性改变，成为能允许外源 DNA 分子进入的感受态细胞。进入受体细胞的 DNA 分子通过复制和表达实现信息的转移，使受体细胞具有了新的遗传性状。将经过转化的细胞在筛选培养基上培养，即可筛选出转化子 (transformant, 带有异源 DNA 分子的细胞)。钙处理的感受态细胞，一般每微克 DNA 能获得 $10^5 \sim 10^6$ 个转化子，而电穿孔法处理的感受态细胞，其转化率可高达 $10^9 \sim 10^{10}$ 个转化子/ μg 质粒 DNA。

一、实验目的

掌握热激法转化大肠埃希菌的原理和方法。

二、实验原理

本实验采用 CaCl_2 法制备感受态细胞。其原理是细胞处于 $0\sim 4^\circ\text{C}$ 时，在含 CaCl_2 的低渗溶液中，大肠埃希菌细胞膨胀成球状。转化混合物中的 DNA 形成抗 DNA 酶的羟基-钙磷酸复合物黏附于细胞表面，经 42°C 热激处理 90s，促进细胞吸收 DNA 复合物。将细菌放置于非选择性培养基中保温一段时间，促使在转化过程中获得的新的表型，如氨苄西林耐药 (Amp^r) 得到表达，然后将此细菌培养物涂在含 Amp 的选择性培养基上，倒置培养过夜，即可获得细菌菌落。

转化过程所用的受体细胞一般是限制修饰系统缺陷的变异株，即不含限制性内切酶和甲基化酶的突变体 (R^- , M^-)，它可以容忍外源 DNA 分子进入体内并稳定地遗传给后代。为了提高转化效率，要考虑以下几个重要因素。

(1) 细胞生长状态和密度 细胞生长密度以刚进入对数生长期时为好，可通过监测培养液的 OD_{600} 来控制。DH5 α 菌株的 OD_{600} 为 0.5 时，细胞密度在 5×10^7 个/mL 左右（不同的菌株情况有所不同），浓度比较合适。密度过高或不足均会影响转化效率。

(2) 质粒的质量和浓度 1ng 的 cccDNA 即可使 $50\mu\text{L}$ 的感受态细胞达到饱和。一般情况下，DNA 溶液的体积不应超过感受态细胞体积的 5%。

(3) 试剂的质量 所用的试剂，如 CaCl_2 等均需是最高纯度的 (G. R. 或 A. R.)，并用超纯水配制，最好分装保存于干燥的冷暗处。

(4) 防止杂菌和杂 DNA 的污染 整个操作过程均应在无菌条件下进行，所用器皿，如离心管、tip 头等最好是新的，并经高压灭菌处理，所有的试剂都要灭菌，且注意防止被其他试剂、DNA 酶或杂 DNA 所污染，否则均会影响转化效率或杂 DNA 的转入，为以后的筛选、鉴定带来不必要的麻烦。

三、实验材料与器材

(1) 材料 质粒 PUC19，大肠埃希菌感受态菌株。

(2) 试剂 胰蛋白胨 (tryptone)，酵母提取物 (yeast extract)，氯化钠 (NaCl)，氨苄西林 (Amp)，琼脂粉。

LB 培养基：胰蛋白胨 10g/L，酵母提取物 5g/L，氯化钠 10g/L，固体培养基加琼脂粉 15g/L。

氨苄西林的配制：用无菌水配制成 100mg/mL 溶液，抽滤灭菌置 -20°C 冰箱中保存。

(3) 仪器和耗材 恒温摇床，恒温水浴锅，恒温培养箱，高压灭菌锅，制冰机，超净工作台，移液枪，培养皿，金属涂棒，酒精灯，镊子，灭菌牙签，离心管，一次性手套等。

四、实验步骤

1. 配制 LB 培养基 (约 100mL 固体 LB 培养基和 100mL 液体培养基)，高压下蒸汽灭菌 20min，高压灭菌后，待熔化的 LB 固体培养基温度降到约 50°C ，加入 Amp，充分摇匀，使终浓度为 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ ，100mL LB 固体培养基倒 4 个平板。

2. 取感受态细胞置于冰上。

3. 在 $100\mu\text{L}$ 的感受态菌中加入 $5\mu\text{L}$ 质粒，轻轻混匀，冰上放置 30min。
4. 42°C 热激 60~90s，快速将离心管转移到冰浴中，使细胞冷却 2~3min，该过程不要摇动离心管。
5. 于超净工作台中，每管加 $900\mu\text{L}$ LB 液体培养基（不含 Amp），于 37°C 摇床振荡培养 45min ($150\text{r}/\text{min}$)，使细菌复苏。
6. 在超净台中取 $100\mu\text{L}$ 菌液转移到含有 Amp $50\text{mg}/\text{L}$ 的 LB 平板上，均匀涂板，待液体吸收后，倒置平皿， 37°C 培养 12~16h。

五、注意事项

本实验方法也适用于其他 *E. coli* 受体菌株的不同质粒 DNA 的转化。但它们的转化效率并不一定一样。有的转化效率高，需将转化液进行多梯度稀释涂板才能得到单菌落平板，而有的转化效率低，涂板时必须将菌液浓缩（如离心），才能较准确地计算转化率。

六、思考题

实验中热激进行完之后，向管中加入 0.9mL LB 液体培养基（不含 Amp），混匀后 37°C 振荡培养 45min 的目的是什么？

实验 4 碱裂解法小量提取质粒 DNA

研究背景与意义

质粒已成为目前最常用的基因克隆的载体分子，可获得大量纯化的质粒 DNA 分子。目前已有许多方法可用于质粒 DNA 的提取，本实验采用碱裂解法提取质粒 DNA。

一、实验目的

通过本实验学习和掌握碱裂解法提取质粒 DNA 及琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的方法和技术。

二、实验原理

碱裂解法提取质粒是根据共价闭合环状质粒 DNA 与线性染色体 DNA 在拓扑学上的差异来分离它们的，*E. coli* 染色体约 4700kb ，SDS（十二烷基硫酸钠）是一种阴离子表面活性剂，它和 NaOH 共同作用既能使细菌细胞裂解，又能使一些蛋白质变性，SDS 处理细菌细胞后，会导致细菌细胞壁的破裂，从而使质粒 DNA 以及基因组 DNA 从细胞中同时释放出来，基因组 DNA 断裂为线性双链片段，而质粒 DNA 仍为超螺旋，释放出来的 DNA 遇到强碱性（NaOH）环境就会变性，基因组 DNA 全部完全变性，而质粒 DNA 只有部分变性，然后，用酸性乙酸钾来中和溶液，使溶液处于中性，质粒 DNA 为小分子，两条互补链

复性迅速而准确，而线性的染色体 DNA 的两条互补链彼此已完全分开，复性就不会那么迅速而准确，它们缠绕形成网状结构，与不稳定的大分子 RNA（核糖核酸）、蛋白质-SDS 复合物等通过离心一起沉淀下来而被除去。然后通过苯酚、氯仿等抽提蛋白，2 倍体积无水乙醇或 0.6 倍体积异丙醇沉淀 DNA，70% 酒精洗后，干燥，用无菌的双蒸水或 TE 溶解，-20℃ 保存。

DNA 分子在琼脂糖凝胶中泳动时有电荷效应和分子筛效应。DNA 分子在高于等电点的 pH 溶液中带负电荷，在电场中向正极移动。由于糖-磷酸骨架在结构上的重复性质，相同数量的双链 DNA 几乎具有等量的净电荷，因此，它们能以相同的速度向正极方向移动。在一定的电场强度下，DNA 分子的迁移速度取决于分子筛效应，即 DNA 分子本身的大小和构型。具有不同分子量的 DNA 片段的泳动速度不一样，可进行分离。DNA 分子的迁移速度与分子量的对数值成反比关系。凝胶电泳不仅可以分离不同分子量的 DNA，也可以分离分子量相同但构型不同的 DNA 分子。如上次实验提取的 pUC19 质粒有 3 种构型：超螺旋的共价闭合环状质粒 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA)；开环质粒 DNA (open circular DNA, ocDNA)，即共价闭合环状质粒 DNA 1 条链断裂；线状质粒 DNA (linear DNA, L DNA)，即共价闭合环状质粒 DNA 2 条链发生断裂。这 3 种构型的质粒 DNA 分子在凝胶电泳中的迁移率不同。因此，电泳后呈 3 条带，超螺旋质粒 DNA 泳动最快，其次为线状 DNA、开环质粒 DNA。但是由于琼脂糖浓度、电场强度、离子强度和溴化乙锭等的影响，会出现相反的情况。

影响核酸分子泳动率的因素主要有以下几种：

(1) 样品的物理性状 即分子的大小、电荷数、颗粒形状和空间构型。一般而言，电荷密度越大，泳动率越大。但是不同核酸分子的电荷密度大致相同，所以对泳动率的影响不明显。

(2) 支持物介质 核酸电泳通常使用琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶两种介质，琼脂糖是一种聚合链线性分子。含有不同浓度琼脂糖的凝胶构成的分子筛的网孔大小不同，适于分离不同浓度范围的核酸分子。

(3) 电场强度 电场强度越大，带电颗粒的泳动越快。

(4) 缓冲液离子强度 核酸电泳常采用 TAE、TBE、TPE 三种缓冲系统，但它们各有利弊。TAE 价格低廉，但缓冲能力低，必须进行两极缓冲液的循环。TPE 在进行 DNA 回收时，会使 DNA 污染磷酸盐，影响后续反应。所以多采用 TBE 缓冲液。

三、实验材料与器材

(1) 材料 含 pUC19 质粒的大肠埃希菌。

(2) 试剂 10×TBE (10 倍体积的 TBE 贮存液，pH 8.3，含 0.89mol/L Tris-硼酸，20mmol/L EDTA)，凝胶加样缓冲液 (6×，含 0.25% 溴酚蓝和 40% 蔗糖)，溴化乙锭溶液 (EB, 10mg/mL，避光保存，工作浓度 0.5mg/L)，琼脂糖，天根快速质粒提取试剂盒。

(3) 仪器和耗材 恒温培养箱，恒温摇床，台式离心机，高压灭菌锅，琼脂糖凝胶电泳系统，电泳仪，电泳槽，凝胶成像系统，1.5mL 离心管，吸头，移液枪，一次性手套等。