

分子生物学实验指导

分子生物学实验指导编写组

淮阴师范学院
生物学实验教学中心
淮安 2004

目 录

分子生物学实验课程简介.....	(1)
实验守则及要求.....	(3)
注意事项.....	(4)

一 . 基础性实验

实验一 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化.....	(6)
实验二 质粒 DNA 的提取及酶切.....	(8)
实验三 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA.....	(11)
实验四 DNA 重组.....	(14)
实验五 哺乳动物基因组 DNA 的提取.....	(18)
实验六 植物基因组 DNA 的提取.....	(21)
实验七 植物总 RNA 的提取.....	(23)
实验八 DNA 序列测定-双脱氧链终止法.....	(26)
实验九 PCR 基因扩增.....	(31)
实验十 外源基因在大肠杆菌中的诱导表达.....	(34)
实验十一 蛋白质印迹.....	(39)
实验十二 Southern 杂交.....	(43)

二 . 研究性实验

实验十三 大肠杆菌 MAA 基因编码序列扩增的引物设计和扩增.....	(49)
实验十四 SBD 大肠杆菌表达质粒载体的构建、扩增、提取和电泳.....	(50)
实验十五 SBD 基因在大肠杆菌中的诱导表达.....	(51)
实验十六 Western 斑点杂交.....	(52)
实验十七 SBD 重组蛋白在马铃薯淀粉粒中的定位分析.....	(53)
实验十八 小麦雌性不育基因的标记定位.....	(54)

实验十九 小麦糯性基因的分子标记和辅助选择..... (55)

附录

附录一 分子生物学实验中的常用数据及换算关系..... (56)

附录二 分子生物学实验中的常用试剂及溶液、缓冲液..... (58)

附录三 与分子生物学实验相关的实验资料..... (66)

《分子生物学实验》课程简介

适用专业	生物技术、生物科学
学时	48
学分	2.5
课程性质	必修
预修课程	生物化学、遗传学、 微生物学、细胞生物学

一. 本课程的性质、地位和作用

分子生物学实验是生物科学和生物技术专业的一门专业基础课程，是一门独立的实验课程，同时也是为了配合分子生物学的教学而开设的。实验过程中，首先将有关的基本原理、基本技术和方法给学生做一介绍，然后将分子生物学实验中要用到的仪器以课件的形式展示给学生，在学生掌握了以上基本知识的基础上给定实验内容和目的，让学生自行设计实验方案并完成，得出一定的实验结论。希望通过本实验培养学生主动学习、学以致用、独立思考的能力。

二. 实验内容选编原则与要求

分子生物学实验教学内容选编原则与要求是，根据生物科学和生物技术专业人才的培养目标所需要的基本理论和基本技能的要求，根据本课程的教学性质、条件和教学实践而制定的。既要涵盖分子生物学的基本实验技术，也要体现现代分子生物学发展的新方法、新技术。全书所选实验项目分为两个部分，第一部分为基础性实验，包括感受态细胞的制备与转化、质粒 DNA 的提取及酶切、琼脂糖凝胶电泳检测 DNA、DNA 重组、基因组 DNA 的分离提取、DNA 序列测定、PCR 基因扩增、真核基因在原核细胞中的表达、蛋白质印迹、Southern 杂交等内容。要求学生能够掌握基本的实验操作技能。第二部分为研究性实验，采用了实验教学与科研课题相结合的新模式，选编了 7 个实验，包括大肠杆菌 MAA 基因扩增引物的设计与扩增、SBD 大肠杆菌表达质粒载体的构建、SBD 基因在大肠杆菌中的诱导表达、Western 斑点杂交、SBD 重组蛋白质在马铃薯淀粉粒中定位的分析、小麦糯性基因的分子标记和辅助选择、小麦雌性不育基因的标记定位等内容。要求学生根据所掌握的理论基础和实验技能，能够独立设计实验。

三. 教学安排与时数

本实验课程在三年级下学期和四年级上学期开设，学生可从基础性实验项目(每一实验为 3 学时)中任选 8 项(学时=24)，从研究性实验项目中任选 2 项(学时 \geq 24)，总计 \geq 48 学时，2.5 学分。

四. 考核方法与要求

(一) 基础性实验部分

1. 平时成绩：包括出勤、实验操作，实验效果、讨论情况等，占 30%
2. 报告成绩：实验报告等，占 30%
3. 考试成绩：占 40%
4. 综合考核成绩：平时成绩+设计成绩+报告成绩+考试成绩

(二) 研究性实验部分

1. 平时成绩：包括出勤、实验操作，实验效果、讨论情况等，占 30%
2. 设计成绩：提交实验设计报告等，占 30%
3. 报告成绩：实验报告和实验产物等，占 40%
4. 综合考核成绩：平时成绩+设计成绩+报告成绩+考试成绩

实验守则及要求

1. 穿着要整洁，必须穿实验服。
2. 实验室内禁止吃食物，勿高声谈话及随便走动。
3. 实验前必须认真预习，熟悉实验的内容，了解所用的仪器用具：实验中应严格按操作规程进行，认真操作、仔细观察，及时记录实验现象及结果：实验结束后，仔细地分析和总结实验结果，认真做好每一次的实验报告。
4. 实验器具应保持清洁，任何使用过的器具及玻璃器皿必须洗净后放回原处。使用贵重精密仪器时，应严格遵守操作规程，发现故障立即报告，不得擅自拆检。
5. 实验台面应随时保持整洁、仪器、药品摆放整齐。公用试剂用完后，应立即盖好放回原处。
6. 值日生制度：每天安排 3-4 人值日，其职责是负责实验器具的整理、操作台、水槽、地板等实验室卫生工作和一切服务性工作，并注意实验室的水、电、门、窗等方面情况。

注意事项

1. 实验前应做好试剂的配置、用品灭菌等准备工作。配置基因工程各种试剂，必须要使用重蒸水。
2. 使用后的器皿必须认真清洗干净，洗完后还要用重蒸水冲洗三次。
3. 凡是可以进行灭菌的试剂与用具都必须要经过高压蒸汽灭菌后进行使用，防止其他杂质或酶对 DNA、RNA 或蛋白质的降解。
4. 凡是基因工程操作所用的一切塑料器具(Eppendorf 管、吸嘴等)，在使用前都应装入盒子和瓶子中灭菌，且装盒或装瓶过程中都应采用镊子，或戴上一次性手套进行操作，不能直接用手去拿，严防手上杂酶污染。
5. 对于 Eppendorf 管、吸嘴与非玻璃离心管等只能湿热灭菌，然后放置在 50℃ 箱中烘干后使用。
6. 实验中加入任何试剂后应注意样品的混匀，保温等反应后的样品也应离心摔一下后再进行下步的实验。
7. 限制性内切酶等工具酶保存于 50%的甘油中，-20℃ 可以长期保存。应自始至终将酶保持在零度以下，取酶时不能用手指接触储存酶的部分。在需要加酶的时候将酶从冰箱中取出，放在冰盒里，用完后立即放回冰箱。
8. 微量移液器的使用：微量移液器是连续可调的、计量和转移液体的专用仪器。其装有直接读数容量计，读数由三位拨号数字组成，在移液器容量范围内能连续调节，从上(最大数)到下(最小数)读取。移液器的型号即是其最大容量值。按钮向下压以及放的动作、速度要缓慢平稳。

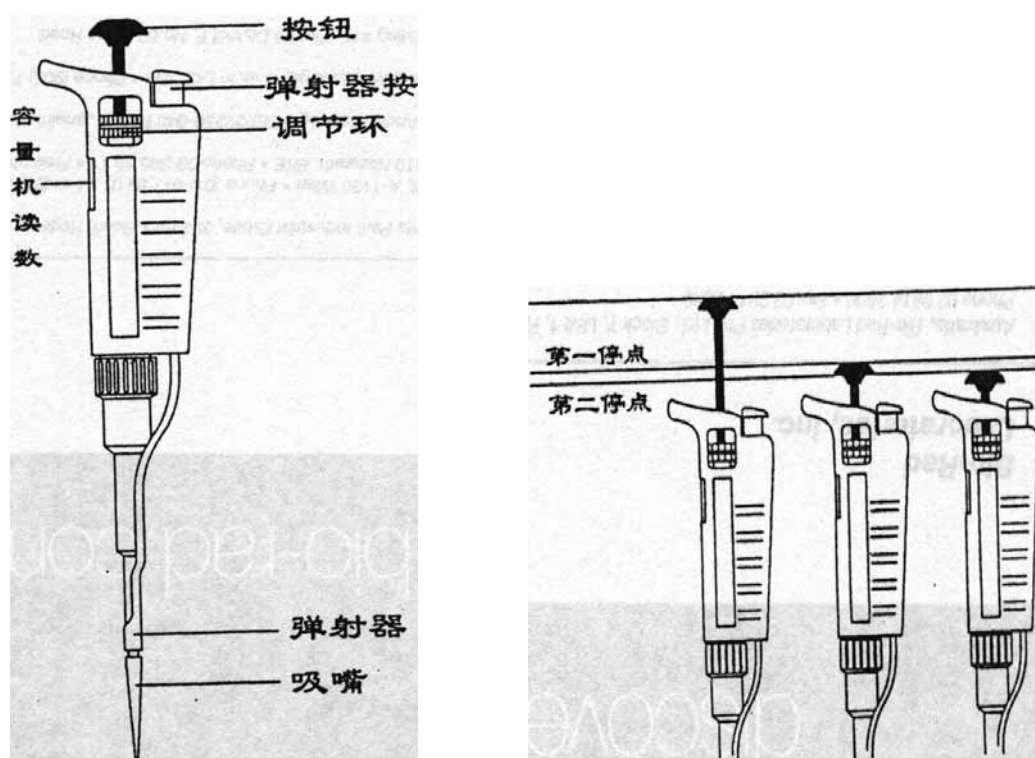


图 1 微量移液器的构造

操作:

- 1) 将微量移液器按钮轻轻压至**第一停点**;
- 2) 垂直握持微量移液器, 使吸嘴浸入液样面下几毫米, 千万别将吸嘴直接插到液体底部;
- 3) 缓慢、平稳地松开控制按钮, 吸上样液。否则液体进入吸嘴太快, 导致液体倒吸入移液器内部, 或吸入体积减少;
- 4) 等一秒钟后将吸嘴提离液面;
- 5) 平稳地把按钮压到第一停点, 再把按钮压至**第二停点**以排出剩余液体;
- 6) 提起微量移液器, 使吸嘴在容器壁擦过;
- 7) 然后按吸嘴弹射器除去吸嘴。

注意:

- 1) 未装吸嘴(tip)的微量移液器绝对不可用来吸取任何液体。
- 2) 一定要在允许范围内设定容量, 千万不要将读数的调节超出其适用的刻度范围, 否则会造成损坏。
- 3) 不要横放带有残余液体吸嘴的移液器。
- 4) 不要用大量程的移液器移取小体积样品。

9. 离心机的使用:

应注意保持离心管放置位置的对称以及离心管中样品的平衡, 并要拧紧盖好其中的离心机内部的盖子, 否则会损坏仪器。此外应注意离心管在离心机内的放置方向。

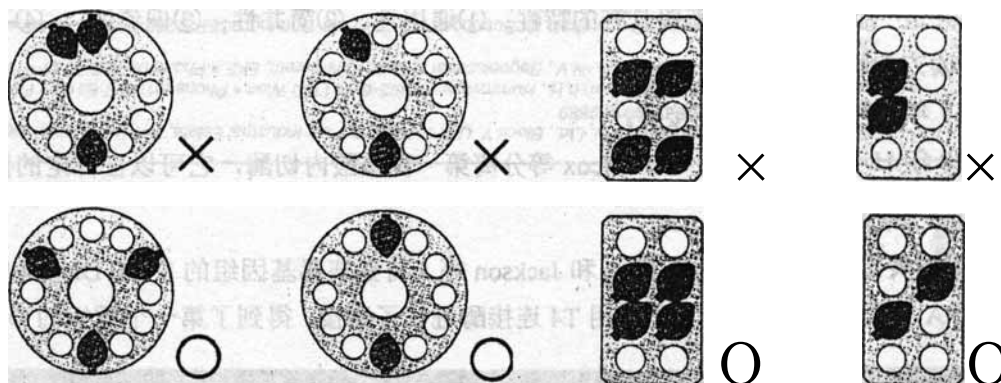


图2 离心机的平衡

10. 电子天平使用:

- 1) 注意在天平的最大称量范围内使用。
- 2) 天平应放在无振动、无空气对流处, 使用前须先调节水平泡至中央位置。
- 3) 使用后应保持仪器的洁净。

11. 微波炉内不可使用金属容器以及空载。

12. 配制药剂取试剂时, 所用的钥匙不能混用, 否则会造成药品污染。

13. 实验过程中应做好每个样品的标记工作, 如样品的名称、保存的时间。且一般在Eppendorf管上用记号笔作标记时, 应在两处重复做好标记。

一.基础性实验

实验一 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化

【实验目的】

通过本实验，掌握大肠杆菌感受态细胞的制备及转化的方法和技术。

【实验原理】

细菌处于容易吸收外源 DNA 的状态叫感受态。转化是指质粒 DNA 或以它为载体构建的重组子导入细菌的过程。其原理是细菌处于 0℃，CaCl₂低渗溶液中，菌细胞膨胀成球形。转化混合物中的DNA形成抗DNA酶的羟基-钙磷酸复合物粘附于细胞表面，经 42℃短时间热击处理，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Amp^r等)得到表达，然后将此细菌培养物涂在含有氨苄青霉素的选择性培养基上。

【仪器、材料与试剂】

(一)仪器

1. 超净工作台
2. 低温离心机
3. 恒温摇床
4. 恒温箱
5. -70℃冰箱
6. 恒温水浴器

(二)材料

1. 氯化钙 (CaCl₂)
2. 胰蛋白酶
3. 酵母提取物
4. 氯化钠 (NaCl)
5. 氨苄青霉素
6. 大肠杆菌 DH5α
7. pUC 19 质粒
8. 50mL 离心管
9. 吸嘴、小指管
10. 试管、培养皿、锥形瓶等

11. 琼脂

(三) 试剂

- 0.1 mol/L CaCl₂溶液
- LB 液体培养基
配制每升培养基，应在 950 mL 去离子水中加入：

胰蛋白胨(bacto-typtone)	10 g
酵母提取物(bacto-yeast extract)	5 g
NaCl	10 g

摇动容器直至溶质完全溶解，用 NaOH 调节 pH 至 7.0 (每升加 5 mol/L NaOH 200 μ L)，加入去离子水至总体积为 1 L，121 $^{\circ}$ C 湿热灭菌 20 min。
- 氨苄青霉素(Amp)，用无菌水配制成 100 mg/mL 溶液，置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。
- LB 固体培养基：每升 LB 培养基中加 15 g 琼脂。

【实验步骤】

- 从大肠杆菌 DH5 α 平板上挑取一个单菌落接于 2 mL LB 液体培养基的试管中，37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。
- 取 0.5 mL 菌液转接到一个含有 50 mL LB 液体培养基锥形瓶中，37 $^{\circ}$ C 振荡培养 2-3 h。(此时，OD₆₀₀ \leq 0.4-0.5，细胞数务必 $< 10^8$ / mL，此为实验成功的关键)。
- 将菌液转移到 50 mL 离心管中，冰上放置 10 min。
- 离心 10 min (4 000 r/min)，回收细胞。
- 倒出培养液，将管倒置 1 min 以便培养液流尽。
- 用冰冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 10 mL 悬浮沉淀，立即放在冰上保温 30 min。
- 0-4 $^{\circ}$ C 4 000 r/min，离心 10 min，回收细胞。
- 用冰冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 2 mL 悬浮细胞(务必放冰上)。
- 分装细胞，每 200 μ L 一份。此细胞为感受态细胞。
- 取 200 μ L 新鲜配制的感受态细胞，加入 DNA 2 μ L (50 ng) 混匀，冰上放置 30 min，本实验使用 pUC19。
同时做两个对照管。
 - 受体菌对照：200 μ L 感受态细胞+2 μ L 无菌水
 - 质粒对照：200 μ L 0.1 mol/L CaCl₂溶液+2 μ L 质粒DNA溶液
- 将管放到 42 $^{\circ}$ C 循环水浴 1-2 min。
- 冰浴 2 min。
- 每管加 800 μ L LB 液体培养基，37 $^{\circ}$ C 培养 1 h (慢摇)。
- 将适当体积(100 μ L) 已转化的感受态细胞，涂在含有氨苄青霉素(100 μ g/mL) 的培养皿中。
- 倒置平皿 37 $^{\circ}$ C 培养 12-16h，出现菌落。

【实验安排】

本实验从制备感受态细胞到转化一天可做完，第二天早晨观察结果。

实验二 质粒 DNA 的提取及酶切

【实验目的】

通过本实验学习和掌握碱裂解法提取质粒。

【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。在 pH 值介于 12.0-12.5 这个狭窄的范围内，线性的 DNA 双螺旋结构解开而被变性，尽管在这样的条件下，共价闭环质粒 DNA 的氢键会被断裂，但两条互补链彼此相互盘绕，仍会紧密地结合在一起。当加入 pH4.8 的乙酸钾高盐缓冲液恢复 pH 至中性时，共价闭合环状的质粒 DNA 的两条互补链仍保持在一起，因此复性迅速而准确，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，通过离心，染色体 DNA 与不稳定的大分子 RNA，蛋白质-SDS 复合物等一起沉淀下来而被除去。

【仪器、材料与试剂】

(一) 仪器

1. 恒温培养箱
2. 恒温摇床
3. 台式离心机
4. 高压灭菌锅

(二) 材料

1. 葡萄糖
2. 三羟甲基氨基甲烷(Tris)
3. 乙二胺四乙酸(EDTA)
4. 氢氧化钠
5. 十二烷基硫酸钠(SDS)
6. 乙酸钾
7. 冰乙酸
8. 氯仿
9. 乙醇
10. 胰 RNA 酶
11. 氨苄青霉素
12. 蔗糖
13. 溴酚蓝
14. 酚
15. 8-羟基喹啉
16. β 巯基乙醇

17. 盐酸(HCl)
18. 含 pUC19 质粒的大肠杆菌
19. *Eco*RI 酶
20. 吸头、小指管

(三) 试剂

1. 溶液 I
 - 50 mmol/L 葡萄糖
 - 25 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)Tris.HCl(pH 8.0)
 - 10 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)(pH 8.0)
2. 溶液 II
 - 0.4 mol/L NaOH, 2% SDS, 用前等体积混合
3. 溶液 III
 - 5 mol/L 乙酸钾 60 mL
 - 冰乙酸 11.5 mL
 - 水 28.5 mL
4. TE 缓冲液
 - 10 mmol/L Tris.HCl(pH 8.0)
 - 1 mmol/L EDTA(pH 8.0)
5. 70% 乙醇(放-20℃冰箱中, 用后即放回)
6. 胰 RNA 酶
 - 将 RNA 酶溶于 10 mmol/L Tris.HCl(pH 7.5)、15 mmol/L NaCl 中, 配成 10 mg/mL 的浓度, 于 100℃ 加热 15 min, 缓慢冷却至室温, 保存于-20℃。
7. 凝胶加样缓冲液(6x): 40% 蔗糖、0.25% 溴酚兰
8. 酚(见附录二)

【实验步骤】

(一) 提取质粒

1. 将 2 mL 含相应抗生素(Amp: 50μg/mL)的 LB 液体培养基加入到试管中, 接入上述的含 pUC19 质粒的大肠杆菌, 37℃ 振荡培养过夜。
2. 取 1.5 mL 培养物倒入微量离心管中, 4 000 r/min 离心 2 min。
3. 吸去培养液, 使细胞沉淀尽可能干燥。
4. 将细菌沉淀悬浮于 100μL 溶液 I 中, 充分混匀, 室温放置 10 min。
5. 加 200μL 溶液 II(新鲜配制), 盖紧管皿, 混匀内容物, 将离心管放冰上 5 min。
6. 加入 150μL 溶液 III(冰上预冷), 盖紧管口, 颠倒数次使混匀。冰上放置 15 min。
7. 12 000 r/min, 离心 15 min, 将上清转至另一离心管中。
8. 向上清中加入等体积酚: 氯仿(1:1)(去蛋白), 反复混匀, 12 000 r/min, 离心 5 min, 将上清转移到另一离心管中。
9. 向上清加入 2 倍体积无水乙醇, 混匀后, 室温放置 5-10 min。12 000 r/min 离心 5 min。倒去上清液, 把离心管倒扣在吸水纸上, 吸干液体。
10. 用 1 mL 70% 乙醇洗涤质粒 DNA 沉淀, 振荡并离心, 倒去上清液, 真空抽干或空气中干燥。
11. 加 20μL TE 缓冲液, 其中含有 20μg/mL 的胰 RNA 酶, 使 DNA 完全溶解, -20℃

保存。

(二) 酶切

取 5 μ L DNA 溶液, 加 1 μ L 酶切缓冲液, *Eco*RI 酶 1 μ L (2U), 无菌水补至总体积 10 μ L, 37 $^{\circ}$ C 保温 3 h, 加凝胶上样缓冲液(6x) 2 μ L, 准备下个实验进行电泳, 分析质粒 DNA 的限制性酶切图谱。

【实验安排】

本实验一天内可做完。实验结果可结合下一个实验一起观察。

实验三 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA

【实验目的】

通过本实验学习琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的方法和技术。

【实验原理】

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，因此它们能以同样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。具有不同的相对分子质量的 DNA 片段泳动速度不一样，可进行分离。DNA 分子的迁移速度与相对分子质量的对数值成反比关系。凝胶电泳不仅可分离不同相对分子质量的 DNA，也可以分离相对分子质量相同，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, 简称 CCCDNA)，开环质粒 DNA，即共价闭合环状质粒 DNA 1 条链断裂，(open circular DNA, 简称 OCDNA)，线状质粒 DNA，即共价闭合环状质粒 DNA 2 条链发生断裂 (linear DNA, 简称 L DNA)。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，最慢的为开环质粒 DNA。

【仪器、材料与试剂】

(一) 仪器

1. 恒温培养箱
2. 琼脂糖凝胶电泳系统
3. 台式离心机
4. 高压灭菌锅
5. 紫外线透射仪

(二) 材料

1. 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)
2. 硼酸
3. 乙二胺四乙酸 (EDTA)
4. 溴酚蓝
5. 蔗糖
6. 琼脂糖
7. 溴化乙锭
8. DNA marker
9. pUC19 质粒

(三) 试剂

1. 5× TBE (5 倍体积的 TBE 贮存液)
 - 配 1 000 mL 5× TBE:
 - Tris 54g
 - 硼酸 27.5g
 - 0.5 mol/L EDTA 20 mL
 - pH 8.0
2. 凝胶加样缓冲液 (6×)
 - 溴酚蓝 0.25%
 - 蔗糖 40%
3. 琼脂糖
4. 溴化乙锭溶液 (EB) 0.5μg/mL

【实验步骤】**(一) 制备琼脂糖凝胶**

按照被分离 DNA 的大小, 决定凝胶中琼脂糖的百分含量。可参照下表:

琼脂糖凝胶浓度%	线性 DNA 的有效分离范围 / kb
0.3	5-60
0.6	1-20
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

称取 0.3 g 琼脂糖, 放入锥形瓶中, 加入 30 mL 0.5 ×TBE 缓冲液, 置微波炉或水浴加热至完全溶化, 取出摇匀, 则为 1% 琼脂糖凝胶液。

(二) 胶板的制备

1. 取有机玻璃内槽, 洗净, 晾干, 用橡皮膏将有机玻璃内槽的两端边缘封好 (一定封严, 不能留缝隙)。
2. 将有机玻璃内槽放置于水平位置, 并放好样品梳子。
3. 将冷到 60°C 左右的琼脂糖凝胶液, 缓缓倒入有机玻璃内槽, 直至有机玻璃板上形成一层均匀的胶面 (注意不要形成气泡)。
4. 待胶凝固后, 取出梳子, 取下橡皮膏, 放在电泳槽内。
5. 加入电泳缓冲液至电泳槽中。

(三) 加样

用移液枪将已加入上样缓冲液的 DNA 样品加入加样孔 (记录点样顺序及点样量)。

(四) 电泳

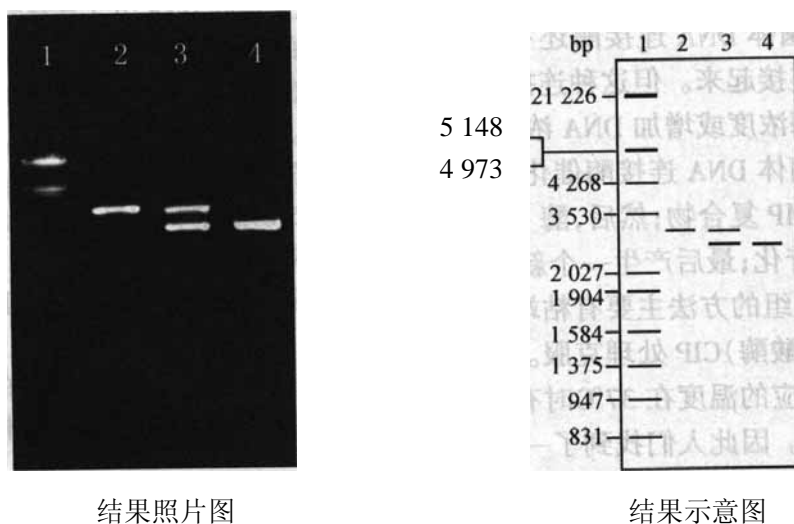
1. 接通电泳槽与电泳仪的电源 (注意正负极, DNA 片段从负极向正极移动)。DNA 的迁移速度与电压成正比, 最高电压不超过 5 V/cm。
2. 当溴酚蓝染料移动到距凝胶前沿 1-2 cm 处, 停止电泳。

(五) 染色

将电泳后的凝胶浸入溴化乙锭染色液中, 染色 (15 min) 以观察在琼脂糖凝胶中的带 (戴手套操作)。

【实验结果】

在紫外灯(360 nm, 312 nm 或 254 nm)下观察染色后的电泳凝胶(图实验 3-1)。DNA 存在处应显出桔红色荧光条带(在紫外灯下观察时应戴上防护眼镜, 紫外线对眼睛有伤害作用)。



图实验 3-1

1. DNA 相对分子质量标准物(marker);
2. pUC19 质粒 DNA 经 *Eco*RI 完全酶解;
3. pUC19 质粒 DNA 经 *Eco*RI 部分酶解;
4. 自提的 pUC19 质粒 DNA (此结果提得较好, 为 1 条带, 以超螺旋质粒 DNA 为主。有时结果是 3 条带, 分别为超螺旋质粒, 线状质粒和开环质粒。还有时结果为 2 条带)

【实验安排】

本实验从制胶到电泳一天内可做完。

实验四 DNA 重组

【实验目的】

通过本实验学会重组 DNA 连接以及鉴定重组子方法。

【实验原理】

外源DNA与载体分子的连接就是DNA重组，这样重新组合的DNA叫做重组体或重组子。重组的DNA分子是在DNA连接酶的作用下，有 Mg^{2+} 、ATP存在的连接缓冲系统中，将分别经酶切的载体分子与外源DNA分子进行连接。DNA连接酶有两种：T4噬菌体DNA连接酶和大肠杆菌DNA连接酶。两种DNA连接酶都有将两个带有相同粘性末端的DNA分子连在一起的功能，而且T4噬菌体DNA连接酶还有一种大肠杆菌连接酶没有的特性，即能使两个平末端的双链DNA分子连接起来。但这种连接的效率比粘性末端的连接效率低，一般可通过提高T4噬菌体DNA连接酶浓度或增加DNA浓度来提高平末端的连接效率。

T4噬菌体DNA连接酶催化DNA连接反应分为3步：首先，T4DNA连接酶与辅助因子ATP形成酶-AMP复合物；然后，酶-AMP复合物再结合到具有5'-磷酸基和3'-羟基切口的DNA上，使DNA腺苷化；最后产生一个新的磷酸二酯键，把切口封起来。

DNA重组的方法主要有粘端连接法和平端连接法，为了防止载体本身的自连，可以通过(牛小肠碱性磷酸酶)CIP处理克服。

连接反应的温度在37℃时有利于连接酶的活性。但是在这个温度下，粘性末端的氢键结合是不稳定的。因此人们找到了一个折中温度，即12-16℃，连接12-16h(过夜)，这样既可最大限度地发挥连接酶的活性，又兼顾到短暂配对结构的稳定。

重组质粒转化宿主细胞后，还需对转化菌落进行筛选鉴定。利用 α 互补现象进行筛选是最常用的一种鉴定方法。现在使用的许多载体都具有一段大肠杆菌 β 半乳糖苷酶的启动子及其编码的肽链的DNA序列，此结构称为*lacZ'*基因。*lacZ'*基因编码的 α 肽链是 β 半乳糖苷酶的氨基端的短片段(146个氨基酸)。宿主和质粒编码的片段各自都不具有酶活性，但它们可以通过片段互补的机制形成具有功能活性的 β 半乳糖苷酶分子。*lacZ'*基因编码的 α 肽链与失去了正常氨基端的 β 半乳糖苷酶突变体互补，这种现象称为 α 互补。由 α 互补而形成的有功能活性的 β 半乳糖苷酶，可以用X-gal(5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷)显色测定出来，它可将无色的化合物X-gal切割成半乳糖和深蓝色的底物5-溴-4-靛蓝。因此，任何携带着*lacZ'*基因的质粒载体转化了染色体基因组存在着此种 β 半乳糖苷酶突变的大肠杆菌细胞后，便会产生出有功能活性的 β 半乳糖苷酶，在IPTG(异丙基硫代 β -D-半乳糖苷)诱导后，在含有X-gal的培养基平板上形成蓝色菌落。而当有外源DNA片段插入到位于*lacZ'*中的多克隆位点后，就会破坏 α 肽链的阅读框，从而不能合成与受体菌内突变的 β 半乳糖苷酶相互补的活性 α 肽，而导致不能形成有功能活性的 β 半乳糖苷酶，因此含有重组质粒载体的克隆往往是白色菌落。

【仪器、材料与试剂】

(一) 仪器

1. 恒温摇床
2. 恒温水浴器
3. 恒温培养箱
4. 台式离心机
5. 低温离心机

(二)材料

1. 胰蛋白酶
2. 酵母提取物
3. 氯化钠 (NaCl)
4. 氨苄青霉素
5. 氯化钙 (CaCl₂)
6. 二甲基甲酰胺
7. *Eco*RI 酶
8. T4 DNA 连接酶
9. DH5 α
10. λ DNA
11. pUC19 质粒
12. 培养皿
13. 接种针
14. 玻璃涂棒
15. 试管
16. 酒精灯
17. 镊子、牙签等

(三)试剂

1. 3 mol/L KAc (pH 5.2)
2. X-gal: 将 X-gal 溶于二甲基甲酰胺, 配成 20 mg/mL, 不需过滤灭菌, 分装小包装, 避光贮存于-20°C。
3. IPTG: 取 2 g IPTG 溶于 8 mL 双蒸水中, 再用双蒸水补至 10 mL, 用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 每份 1 mL, 贮存于-20°C。
4. TE 缓冲液
10 mmol/L Tris.HCl (pH 8.0)
1 mmol/L EDTA (pH 8.0)

【实验步骤】

(一)质粒 DNA 的制备

按实验二的方法提取质粒。

(二)制备重组 DNA

1. 在灭菌的 Eppendorf 管中, 加入 pUC19 质粒 1 μ L (2 μ g/mL), 2 μ L 酶切缓冲液, 1 μ L (2U) *Eco*RI 酶, 无菌双蒸水 15 μ L, 至反应混合物总体积为 20 μ L, 离心混匀, 37°C 反应 3 h (酶及缓冲液应放在冰上)。
2. 在另一无菌 Eppendorf 管中, 加 λ DNA 1.5 μ g, 加入 1 μ L 酶切反应液, 1 μ L (2U) *Eco*RI

酶，无菌双蒸水补到 10 μ L，37 $^{\circ}$ C 反应 3 h。

- 反应完毕后各取 2 μ L 酶解液做电泳分析。
- 分别将余下的酶解液加入 1/10 体积的 3 mol/L KAc (pH 5.2) 溶液，再加 2 倍体积的无水乙醇，-20 $^{\circ}$ C 冰箱，2h (沉淀 DNA)。12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min，弃上清，加 70%乙醇洗沉淀物，再离心，去上清，真空干燥后，加 5 μ L TE 溶液。
- 将酶切后的 2 个 DNA 片段混合于一管中，加 T4 DNA 连接酶缓冲液 1 μ L，T4 DNA 连接酶 1 μ L，14 $^{\circ}$ C 保温 14 h，并做转化实验。

(三) 制备涂菌的琼脂板

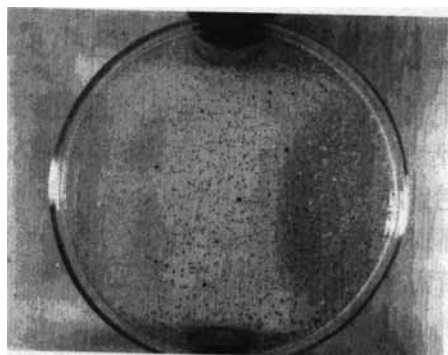
LB 培养基含 100 μ g/mL 氨苄青霉素，琼脂 15g/L，倒入培养皿，凝固后 4 $^{\circ}$ C 保存 (见附录二)。

(四) 制备感受态细胞

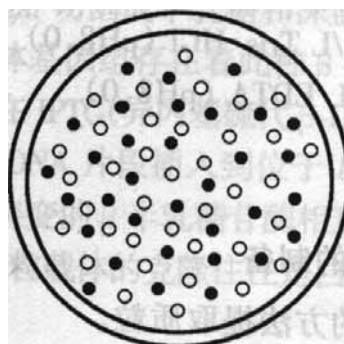
- 按实验一的方法制备感受态细胞。
- 在 200 μ L 新制备的感受态细胞中，加入 5 μ L 连接产物，混匀，冰上放置 30 min。同时做两个对照管。
受体菌对照：200 μ L 受态细胞+2 μ L 无菌双蒸水。
质粒对照：200 μ L 0.1 mol/L CaCl₂溶液+2 μ L pUC19 质粒DNA溶液。
- 将管放到 42 $^{\circ}$ C 水浴，1-2 min。
- 冰上放置 1-2 min。
- 每管加 800 μ L LB 液体培养基 (轻轻混匀)，37 $^{\circ}$ C 温育 45 min。慢摇。
- 在预制的 LB 琼脂平板上，加 40 μ L 20 mg/mL X-gal 和 4 μ L 200 mg/mL IPTG 溶液，并用灭菌玻璃推子 (酒精灯上烧后冷却)，均匀涂布于琼脂凝胶表面。
- 将这当体积 (200 μ L) 已转化的感受态细胞均匀涂在上面的培养皿上。将平皿放置 37 $^{\circ}$ C 温箱 30 min，至液体被吸收。
- 倒置平皿 37 $^{\circ}$ C 培养 12-16 h，出现菌落。其中白色菌落为重组 DNA 质粒。

【实验结果】

经 12-16h 培养后，培养皿上生长着很多白色菌落和蓝色菌落，白色菌落为 DNA 重组子 (图实验 4-1)。



结果照片图



结果示意图

图实验 4-1

【实验安排】

本实验约需要两天。

第一天：配试剂，制备质粒 DNA，做完 DNA 重组后，暂放冰箱保存。

第二天：制备感受态细胞，铺琼脂板，细胞转化，倒置平皿 37℃ 培养过夜(12-16 h)。

第三天：早晨观察结果。

实验五 哺乳动物基因组 DNA 的提取

【实验目的】

通过本实验了解并掌握提取基因组 DNA 的原理和步骤, 以及相对分子质量较大的 DNA 的琼脂糖凝胶电泳技术。

【实验原理】

在 EDTA 和 SDS 等去污剂存在下, 用蛋白酶 K 消化细胞, 随后用酚抽提, 可以得到哺乳动物基因组 DNA, 用此方法得到的 DNA 长度为 100-150kb, 适用于 λ 噬菌体建基因组文库和 Southern 分析。

【仪器、材料与试剂】

(一) 仪器

1. 台式离心机
2. 玻璃匀浆器
3. 高压灭菌锅
4. 恒温水浴锅

(二) 材料

1. 1.5 mL 微量离心管
2. 微量取样器和吸头
3. 无菌过滤器(一次性)
4. 10 mL 注射器
5. 鼠肝
6. 三羟甲基氨基甲烷(Tris)
7. 十二烷基硫酸钠(SDS)
8. 乙二胺四乙酸(EDTA)
9. 蛋白酶 K
10. RNA 酶
11. DNA 相对分子质量标准物, λ DNA / *EcoRI*+*Hind* III 相对分子质量标准物

(三) 试剂

1. 5 mol/L NaCl
 2. 0.5 mol/L Tris.HCl pH 8.0
 3. 0.5 mol/L EDTA pH 8.0
 4. mol/L NaAc pH5.2
- 以上均高压灭菌

5. 蛋白酶 K 10 mg/mL 配好后用一次性过滤器过滤, -20°C 保存(教师配制)
6. 组织匀浆液 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris.HCl (pH 8.0), 25 mmol/L EDTA (pH 8.0)
7. 酶解液 200 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris.HCl (pH 8.0), 50 mmol/L EDTA (pH 8.0), 200 μg /mL 蛋白酶 K, 1% SDS
8. 无 DNA 酶的 RNA 酶 将胰 RNA 酶溶于 10 mmol/L Tris.HCl (pH 7.5)、15 mmol/L NaCl 溶液中, 浓度 10 mg/mL, 于 100°C 水浴处理 15 min 以降解 DNA 酶, 缓慢冷却到室温, -20°C 保存
9. TE 缓冲液 10 mmol/L Tris.HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)
10. 平衡酚 (pH 8.0): 氯仿: 异戊醇 = 25:24:1 (体积比)
11. 氯仿: 异戊醇 = 24:1 (体积比)
12. $5\times$ TBE 5.4 g Tris, 2.75g 硼酸 2 mL 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0), 加水到 100 mL
13. $6\times$ 上样缓冲液 0.25% 溴酚蓝, 40% (W/V) 蔗糖水溶液
14. λ DNA / *Eco*RI+*Hind*III 相对分子质量标准物片段 (bp) 21 227, 5 148, 4 973, 4 268, 3 530, 2 027, 1 904, 1 584, 1 315, 947, 831, 564, 125

【实验步骤】

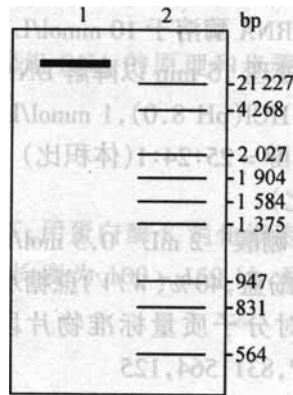
本实验在无液氮的条件下, 制备鼠肝 DNA, 与有液氮条件下相比, 产量和质量都有所下降。整个操作过程中, 应尽量避免 DNA 酶的污染, 特别注意动作温和, 减少对 DNA 的机械损伤。

1. 取 0.2 g 鼠肝, 用冰冷的生理盐水洗 3 次, 然后置于 2.0 mL 匀浆液中, 用玻璃匀浆器匀浆至无明显组织块存在(冰浴操作, 切勿将细胞破碎, 可镜检观察)。
2. 将组织细胞移至 1.5 mL 离心管中, 5 000 r/min 离心 30–60 s, (尽可能在低温下操作), 弃上清, 若沉淀中血细胞较多, 可再加入 5 倍于细胞体积的匀浆液洗一次。
3. 沉淀加 0.4 mL 无菌水迅速吹散, 再加 0.4 mL 酶解液, 翻转混匀(动作一定要轻) 55°C 水浴处理 12–18 h。
4. 加 RNase 至终浓度 200 μg /mL, 37°C 水浴 1 h。
5. 加入等体积酚 / 氯仿 / 异戊醇抽提一次, (慢慢旋转混匀, 倾斜使两相接触面增大)。 4°C 10min, 10 000 r/min 离心 10 min。
6. 有时如果 DNA 含量过高, 水相在下层, 实验时注意观察。用扩口吸头移出含 DNA 的水相(注意勿吸出界面中蛋白沉淀), 加等体积氯仿/异戊醇, 4°C 10 min, 10 000 r/min 离心 10 min (若界面或水相中蛋白含量多, 可重复 5, 6 操作)。
7. 用扩口吸头小心吸出上层含 DNA 的水相, 加 1/10 体积的 NaAc, 小心混匀(要充分), 再向每管中加入 2.5 倍体积的无水乙醇, -20°C 2 h。
8. 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 75% 冷乙醇洗涤一次, 12 000 r/min 离心 15 min, 室温干燥(不要太干, 否则 DNA 不易溶解), 加入 50 μL TE 缓冲液, 存放于 4°C , 轻摇溶解过夜(或 2 h), 即可得到实验动物基因组 DNA。
9. 电泳鉴定 DNA, 由于基因组 DNA 相对分子质量较大, 用 0.3% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定, 先在底部铺一层 1% 的支持胶, 凝固后再铺上一层 0.3% 琼脂糖凝胶, 插上梳子(梳子不能碰到支持胶)。取 1.5 止溶解的 DNA、1 μL 上样缓冲液和 3.5 μL 无菌水混匀后小心上样(可在另一孔加入 DNA 相对分子质量标准物)观察基因组

DNA 大小。用溴乙锭染色观察结果(小心, 胶很容易破碎)。

【实验结果】

提取得到的 DNA 应为一条带(图实验 5-1), 如 DNA 降解会出现弥散带型。



图实验 5-1

1. 提取的基因组 DNA;
2. DNA 相对分子质量标准物 (λ DNA / *Hind*III+*Eco*RI marker) (相对分子质量相差小的区带会重叠)

【实验安排】

- 第一天: 配试剂, 高压灭菌, 酶解细胞过夜。
第二天: 抽提 DNA, 乙醇沉淀 DNA。
第三天: 溶解 DNA, 电泳鉴定。

实验六 植物基因组 DNA 的提取

【实验目的】

通过本实验学习从植物组织中提取 DNA 的方法。

【实验原理】

利用液氮对植物组织进行研磨，从而破碎细胞。细胞提取液中含有的 SDS 溶解膜蛋白而破坏细胞膜，使蛋白质变性而沉淀下来。EDTA 抑制 DNA 酶的活性。再用酚、氯仿抽提的方法去除蛋白，得到的 DNA 溶液经乙醇沉淀。

【仪器、材料与试剂】

(一) 仪器

1. 低温离心机
2. 恒温水浴器
3. 台式离心机
4. 琼脂糖凝胶电泳系统

(二) 材料

1. 三羟甲基氨基甲烷(Tris)
2. 乙二胺四乙酸(EDTA)
3. 氯化钠(NaCl)
4. β 巯基乙醇
5. 氯化钾(KCl)
6. 异丙醇
7. 乙醇
8. 琼脂糖
9. 十二烷基硫酸钠(SDS)
10. 50 mL 离心管
11. 陶瓷研钵
12. 吸头、小指管

(三) 试剂

1. 细胞提取液

100 mmol/L	Tris.HCl (pH8.0)
5 mmol/L	EDTA (pH8.0)
500 mmol/L	NaCl
1.25 %	SDS
1 mol/L	β 巯基乙醇

2. 5 mol/L KCl
3. TE (见实验二质粒 DNA 的提取及酶切)

【实验步骤】

1. 取 4 g 新鲜叶片, 在液氮中研磨成粉末状(越细越好)。
2. 转移至 50 mL 离心管中, 加入 16 mL 细胞提取液, 充分混匀。65℃水浴保温 20 min。
3. 从水浴中取出离心管, 加入 5 mL 5 mol/L KCl 溶液, 混匀, 冰浴 20 min。
4. 4 000 r/min 离心 20 min。
5. 将上清液转移到另一 50 mL 离心管中。
6. 加等体积酚 / 氯仿混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清。
7. 加等体积氯仿, 混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清。
8. 加入 0.6-1 倍体积的异丙醇(沉淀 DNA), 混匀。
9. 离心获得沉淀, 70% 乙醇洗 3 次。风干沉淀。
10. 加入 500 μ L TE 缓冲液, 溶解 DNA。
11. 取 3 μ L 上清液, 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度、质量。

【实验结果】

实验结果可参见实验五。

【实验安排】

本实验一天内可完成: 上午提 DNA, 下午电泳检测。

实验七 植物总 RNA 的提取

【实验目的】

通过本实验学习从植物组织中提取 RNA 的方法。

【实验原理】

RNA 是一类极易降解的分子，要得到完整的 RNA 必须最大限度地抑制提取过程中内源性
及外源性核糖核酸酶对 RNA 的降解。高浓度强变性剂异硫氰酸胍，可溶解蛋白质，破坏细胞
结构，使核蛋白与核酸分离，失活 RNA 酶，所以 RNA 从细胞中释放出来时不被降解。细胞裂
解后，除了 RNA，还有 DNA、蛋白质和细胞碎片，通过酚、氯仿等有机溶剂处理得到纯化、
均一的总 RNA。

【仪器、材料与试剂】

(一) 仪器

1. 低温离心机
2. 台式离心机
3. 200℃ 以上烘箱
4. 琼脂糖凝胶电泳系统
5. 紫外线透射仪
6. 高压灭菌锅
7. 液氮

(二) 材料

1. 焦碳酸二乙酯 (DEPC)
2. 异硫氰酸胍
3. 醋酸钠 (NaAc)
4. 氯化锂 (LiCl)
5. 酚
6. 氯仿
7. 乙醇
8. 甲醛
9. 吗啉代丙烷磺酸 (MOPS)
10. 乙二胺四乙酸 (EDTA)
11. 琼脂糖
12. 50 mL 离心管
13. 陶瓷研钵
14. 剪刀，一次性手套等

(三) 试剂

1-4 试剂均用 0.1% 焦碳酸二乙酯(DEPC)配制, 然后高压灭菌。

1. 4 mol/L 异硫氰酸胍
2. 2 mol/L NaAc (pH 4.8)
3. 4 mol/L LiCl
4. 3 mol/L NaAc (pH 5.0)
5. 0.1% DEPC 水: 200 mL 双蒸去离子水加 0.2 mL DEPC 混匀, 室温放置过夜, 高压灭菌
6. 5× 电泳缓冲液

吗啉代丙烷磺酸(MOPS)	0.1 mol/L
NaAc	40 mmol/L
乙二胺四乙酸(EDTA)	5 mmol/L
7. 20 mL 变性琼脂糖凝胶(1%)

5× 电泳缓冲液	4 mL
琼脂糖	0.2 g
0.1% DEPC 水	12.6 mL

 加热溶解, 稍冷却, 加入 3.4 mL 37% 甲醛

【实验步骤】**(一) 总 RNA 提取**

(本实验对实验器皿要求非常严格。RNA 酶是一类生物活性非常稳定的酶类。除细胞内源 RNA 酶外: 外界环境中灰尘、器皿、试剂、汗液、唾液中均存在 RNA 酶。各种器皿试剂都很容易被污染。这类酶耐热、耐碱、耐酸, 煮沸 15 min 也不能使之完全失活。操作时应戴手套。

RNA 操作中的器皿应该用 DEPC 处理, 操作如下: 将器皿浸泡于 0.1% DEPC 溶液中 12 h, 121°C 高压灭菌 15 min, 再 70-80°C 烘干。

1. 实验前 10 d 左右播种小麦种子, 生长成约 10cm 黄化苗(避光)。
2. 称取 1.2 g 小麦叶片, 剪碎(冰浴)。
3. 移入研钵, 在液氮中研磨成粉末状, 移入 50 mL 离心管。
4. 加入 4 mol/L 异硫氰酸胍 4 mL
 苯酚 3 mL
 2 mol/L NaAc (pH4.8) 0.3 mL
 氯仿 0.6 mL
 混匀, 冰浴放置 30 min(破坏细胞结构, 抑制 RNA 酶活性)。
5. 4°C, 8 000 r/min, 离心 13 min。
6. 弃沉淀, 取上清至另一干净无菌离心管中。
7. 加入 2 倍体积无水乙醇, -20°C, 1 h。
8. 4°C, 8 000 r/min, 离心 13 min。
9. 弃上清, 在沉淀中加入 1 mL 4 mol/L LiCl, 使溶解。
10. 移入 1.5 mL Eppendorf 管中, 冰浴 2 h。
11. 13 000 r/min, 离心 15 min。
12. 弃上清, 在沉淀中加入 400 μL 水(经 DEPC 处理), 再加入 400 μL 氯仿, 混匀(去蛋白)。

13. 13 000 r/min, 离心 6 min。
14. 取上清, 并加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc (pH5.0), 2 倍体积无水乙醇, -20°C 放置 30 min。
15. 13 000 r/min, 离心 13 min。
16. 将沉淀 RNA 用 70% 乙醇洗涤 2 次 (70% 乙醇用 DEPC 水配制)。
17. 将沉淀 RNA 室温下稍干燥。
18. 加 100 μ L DEPC 水溶解, -20°C 保存。

(二) 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析总 RNA

1. 配制 1% 变性琼脂糖胶

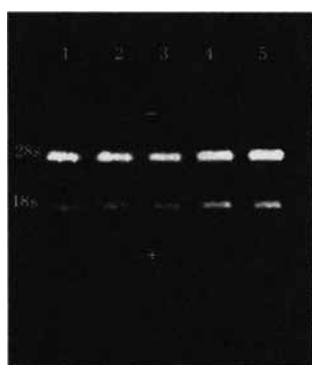
称取 0.2 g 琼脂糖, 加入 DEPC 水 12.6 mL, 5 \times 电泳缓冲液 4 mL, 加热使溶解。稍冷却加入 37% 甲醛 3.4 mL, 混匀, 室温凝固 0.5-1 h (通风橱操作)。

2. 50 V 恒压电泳, 至溴酚蓝移至前沿 1 cm 处停止电泳。

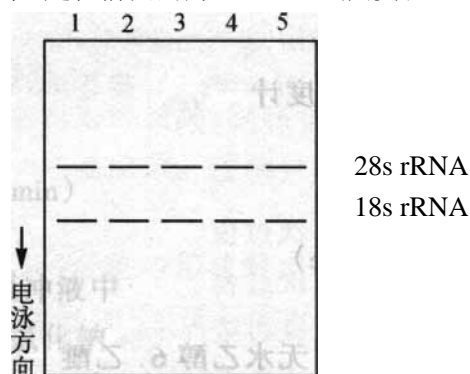
3. 在 EB 中染色 15-20 min, 紫外灯下观察结果。

【实验结果】

紫外灯下观察可见 18s rRNA 和 28s rRNA 两条带, 走在前面的为 18 s rRNA (图实验 7-1)。



结果照片图



结果示意图

图实验 7-1

1. 加样量为 0.5 μ L
2. 加样量为 0.8 μ L
3. 加样量为 1.0 μ L
4. 加样量为 1.5 μ L
5. 加样量为 2.0 μ L

【实验安排】

本实验从提取总 RNA 到电泳检测一天内完成, 但需提前做准备工作, 如器皿的处理等等。

实验八 DNA 序列测定—双脱氧链终止法

【实验目的】

通过本实验了解双脱氧链终止法的基本原理，掌握 DNA 测序的基本方法。

【实验原理】

DNA 聚合酶可以在体外以单链 DNA 为模板合成互补链。DNA 聚合酶不能起始 DNA 链的合成，在反应体系中引物与模板退火形成双链 DNA 后，DNA 聚合酶便结合到 DNA 双链区上，在引物的 3' 端上进行链延伸。通过与模板碱基的特异性配对，脱氧核糖核苷酸被掺入到引物的生长链上。链的延伸是引物生长端的 3'-羟基与被掺入脱氧核糖核苷三磷酸的 5'-磷酸基团反应形成磷酸二酯键，在总体上看链是沿 5'-3' 方向延伸。

DNA 聚合酶不仅可以脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP) 为底物催化其掺入正在延伸的 DNA 链而且还可以 2, 3-双脱氧核糖核苷三磷酸 (ddNTP) 为底物，将其掺入正在延伸的 DNA 链的 3' 端。与普通的 dNTP 不同，ddNTP 在其脱氧核糖的 3' 位置上无羟基。当它们被掺入到正在延伸的引物 3' 端时，由于其上没有了 3'-羟基，因此无法与后续的 dNTP 5'-磷酸基团形成磷酸二酯键，链的延伸就此终止。这样，在 DNA 合成反应混合物的 4 种普通的 dNTP 中加入少量的一种 ddNTP，链的延伸与偶然发生但却非常特异的链终止展开竞争，反应产物是一系列寡核苷酸链，其长度取决于 ddNTP 掺入的位置和引物 5' 端的距离。在 4 个测序反应中，每个反应只需加入 4 种可能的 ddNTP 中的一种，调整每个测序反应中 ddNTP 与 dNTP 的比例，使引物延伸在对应于模板 DNA 上每个可能掺入 ddNTP 的位置上都有可能发生终止。将 4 个反应的产物上样于测序胶的相邻泳道上，进行高压电泳。含有变性剂 (尿素) 的聚丙烯酰胺凝胶高压电泳能在长达 500 bp 的单链寡核苷酸中分辨出一个脱氧核糖核苷酸的差异。利用放射自显影技术将分离结果显示在 X 光片上。由于 4 个泳道中再现了所有可能的寡核苷酸，DNA 的序列便能在 X 光片上所形成的寡核苷酸阶梯中直接读出。

【仪器、材料与试剂】

(一) 仪器

1. 高压电泳仪
2. 测序用电泳槽
3. X 光片
4. 微量离心管
5. 离心机
6. 曝光盒
7. 水浴箱
8. 干胶机
9. 保鲜膜
10. 微量加样器 (0-10 μ L, 40-200 μ L)
11. 吸头

(二) 材料

1. 引物
2. 含有待测 DNA 的质粒
3. ^{32}P 或 ^{35}S 标记的脱氧腺苷三磷酸(dATP)
4. 丙烯酰胺
5. N,N'-亚甲基双丙烯酰胺
6. 三羟甲基氨基甲烷(Tris)
7. 硼酸
8. 乙二胺四乙酸钠(EDTA)
9. 尿素
10. 四甲基乙二胺(TEMED)
11. 过硫酸胺
12. 硅烷化试剂
13. 氢氧化钠
14. 乙酸钠
15. 异丙醇
16. 乙醇
17. DNA 测序试剂盒(含测序酶; 5×测序酶缓冲液; 0.1 mol/L 硫苏糖醇(DTT); 5×标记混合液; ddGTP 溶液; ddCTP 溶液; ddATP 溶液; ddTTP 溶液; 链延伸溶液; 反应停止液; 稀释酶缓冲液)

(三) 试剂

1. 40% 丙烯酰胺贮液: 38 g 丙烯酰胺+2 gN,N'-亚甲双丙烯酰胺, 蒸馏水定容 100 mL。
2. 10×TBE: Tris 108 g, 硼酸 55 g, 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)0.4 mL, 去离子水定容至 1 L。
3. 3 mol/L(pH5.2)乙酸钠
4. 70% 乙醇
5. TE 缓冲液
6. 碱变性溶液
2 mol/L NaOH. 2 mmol/L EDTA

【实验步骤】

1. 大量制备含有待测 DNA 的质粒(略)

(注意: ①所提的质粒应有足够的浓度; ②质粒要有较好的纯度, 要避免作为模板的质粒被寡聚 DNA 小分子和小分子 RNA 及 DNA 酶抑制剂所污染, 其中前两种污染物可作为随机引物, 造成序列胶上出现鬼带和假带)

2. 制备引物

将所需的引物配成 10 pmol/ μL 的溶液备用。

3. 碱变性制备单链模板

- ① 在 1.5 mL 离心管加入含有待测 DNA 的质粒 20 μL , 10×碱变性溶液 2 μL 混匀后 37℃ 保温 30 min。
- ② 取出保温好的离心管, 用台式离心机稍离一下(离下盖上的水), 然后加 2 μL (0.1

体积) 3 mol/L 乙酸钠, 混匀后加入 6 μL 蒸馏水, 70 μL 无水乙醇, 使乙醇的终浓度达到 70%, 将该溶液置于 -70°C 冰箱中 1 h (在 -70°C 冰箱可置于液氮中 5 min 或丙酮+干冰中 15 min)。

- ③ 取出该管, 4°C 15 000 r/min, 离心 15 min, 弃上清, 用 -20°C 冷却的 70% 乙醇洗沉淀, 将其晾干。

4. 测序反应

① 模板与引物退火: 向含有干燥好的单链模板的微量离心管中加入 5 μL 双蒸水使模板溶解, 然后加入 2 μL $5\times$ 反应缓冲液, 3 μL 引物, 37°C 保温 15–30 min (保温完毕用台式离心机离一下, 离下盖上的水)。

② 链延伸—标记反应: 标记前稀释所需的溶液 (A) 将 $5\times$ 标记混合液用重蒸水稀释成 $1\times$ 标记混合液; (B) 在冰浴中按 1:8 比例用试剂盒中的稀释酶缓冲液稀释测序酶; (C) 准备链终止反应管, 取 4 只微量离心管, 分别标明 A、G、T、C, A 管中加入 2.5 μL ddATP, G 管中加入 2.5 μL ddGTP, T 管中加入 2.5 μL ddTTP, C 管中加入 2.5 μL ddCTP。

向含有引物——模板退火混合液的微量离心管中加入下列溶液:

$1\times$ 标记混合液	2 μL
0.1 mol/L DTT	1 μL
^{32}P 或 ^{35}S 标记的dATP	0.5 μL
稀释好的测序酶 (1.6 U/ μL)	2 μL

混匀后室温反应 2–5 min。

- ③ 延伸—终止反应: 吸取反应到时的标记反应混合液 3.5 μL 加入到装有 2.5 μL ddATP 的离心管 A 管中, 同样的量也加入到 G、C、T 管中, 37°C 反应 3–5 min, 反应到时时向每管加入 4 μL 反应停止液, 样品置于冰浴中待用。

5. 电泳

① 制胶

(A) 装配胶模 用去污剂将制胶用的玻璃清洗干净, 再用乙醇将玻璃擦干净。在玻璃的制胶面倒少量硅烷化液, 用脱脂棉吸附硅烷化液并在玻璃板上涂布均匀。将擦好的玻璃装配成胶模。

(B) 制备 6% 的含变性剂 (尿素) 的聚丙烯酰胺凝胶 称取 25.2 g 尿素置于 100 mL 的烧杯中, 并加入 9 mL 40% 丙烯酰胺贮液, 3 mL $10\times$ TBE, 加适量的蒸馏水搅拌溶解, 最后定容 60 mL。向胶液中加入 200 μL 25% 过硫酸铵, 40 μL TEMED 迅速将其混匀。

(C) 灌胶 将配好的胶液从胶模上端凹形槽内均匀地灌入胶模 (注意灌胶过程中避免出现气泡) 如果胶液在胶板内流动不均匀可以用弹性物体如大号吸耳球在胶液流动慢处轻敲胶板, 待胶液充满板时插入梳子 (用于测序的梳子有两种: 一种是常规梳子, 另一种是鲨鱼齿梳子)。常规梳子在丙烯酰胺聚合后, 从凝胶中小心拔出梳子, 这样形成常规加样孔。这种加样孔样品可被孔间的凝胶分离, 不易发生样品间的渗透。缺点是相邻的加样孔可能不平齐, 易影响结果。鲨鱼齿形梳子在丙烯酰胺聚合前将该梳子的平端置入溶液顶部 (深约 0–5 cm), 待凝胶成形。取出梳子, 以电泳缓冲液冲洗凝胶顶部, 然后将鲨鱼齿形梳子带齿的一边插入凝胶顶部, 让梳子齿进入凝胶适当的深度, 这样便形成了鲨鱼齿形加样孔。梳子齿上的各点可以作为防止邻近样品间相混的屏障, 这样减少了加样孔破损的危险, 并可产生一个更为平整一致的表面。此外, 鲨鱼齿形梳子实际上在相邻泳道间不留空隙, 更有利于准确读序。缺点是有时发生相邻泳道间样品渗漏。

②上样电泳

(A) 将胶模固定在电泳装置上, 上、下液槽中加入 $0.5 \times \text{TBE}$ 。上样前先将凝胶加 1 000–2 000 V 电压(电压因凝胶板而异)预热 0.5–1 h。链延伸终止反应液上样前 80°C 水浴 5 min, 然后放冰上。

(B) 吸取 A、G、T、C 反应液各 $3\mu\text{L}$, 加在相邻的泳道上(记清加样顺序)。所有样品加样完毕将电极与电泳仪连好, 1 000–2 000 V 电泳约 2 h(时间因实验而异, 也可通过监测染料位置确定电泳时间)。电泳结束后关掉电源, 弃去电泳缓冲液, 从电泳装置上取出胶模。把胶板平放在铺有保护性吸水纸的台面上, 小心撬开胶板。

(C) 将凝胶连同玻璃平板一起放入浅托盘中, 轻轻覆盖一层约 2 cm 的固定液(5% 乙酸、5% 甲醇等比例混和), 浸泡 10–15 min(^{32}P 标记的 dATP 可省此步, 但由于尿素可淬灭 ^{35}S 的信号, 因此 ^{35}S 标记的 dATP 必须此步)。

如用乙酸固定, 固定后要用水浸洗一下。

(D) 将玻璃板和凝胶一同取出, 用滤纸粘下凝胶(注意不要把凝胶弄破)。

6. 放射自显影

① 将滤纸和凝胶放置于胶机上, 其上覆盖一张保鲜膜, 80°C 处理 1–2 h 使凝胶彻底干燥。

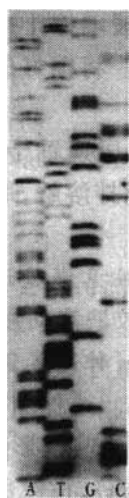
② 揭去干胶上的保鲜膜, 将干胶放在曝光盒中, 将 X 光片直接与凝胶接触, -20°C 曝光过夜。

③ 取出曝光好的 X 光片, 经显影定影, 干燥后便可直接读出 DNA 序列。

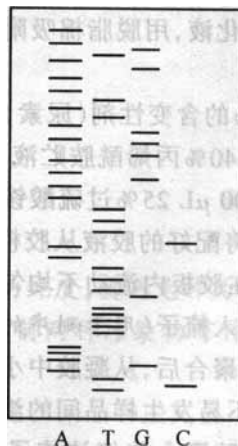
【实验结果】

从照片中所显示的 DNA 阶梯可以读出 DNA 的序列(图实验 8-1)(电泳方向自上而下, 读序自下而上读), 这个测序结果部分序列是:

TCTAGAAATTTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAAGATGAA.



结果照片图



结果示意图

图实验 8-1

【实验安排】

本实验要 2–3 d 时间, 建议如下安排:

第一天: 准备引物;

碱变性制备单链模板；

完成模板与引物的退火(产物可在冰浴中存放数小时)；

准备含 2.5 μ L ddGTP 的 G 管和含 2.5 μ L ddCTP 的 C 管，含 2.5 μ L ddATP 的 A 管，含 2.5 μ L ddTTP 的 T 管(A, T, G, C 管可在冰浴中存放数小时)；

进行测序反应(使用³²p-dATP 标记的反应产物可在-20 $^{\circ}$ C 条件下存放 1-2 d。

使用³⁵S-dATP 标记的反应产物可在-20 $^{\circ}$ C 条件下存放 2 周)；

制备测序胶(凝胶可以过夜)。

第二天：预电泳；

上样电泳；

制干胶；

曝光过夜。

第三天：曝光好的 X 光片经显影，定影显示结果，读出所测 DNA 的序列。

实验九 PCR 基因扩增

【实验目的】

通过本实验学习 PCR 反应的基本原理与实验技术。

【实验原理】

多聚酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)的原理类似于DNA的天然复制过程。在待扩增的DNA片段两侧和与其两侧互补的两个寡核苷酸引物,经变性、退火和延伸若干个循环后, DNA扩增 2^n 倍。

1. 变性: 加热使模板 DNA 在高温下(94°C)变性, 双链间的氢键断裂而形成两条单链, 即变性阶段。
2. 退火: 使溶液温度降至 $50\text{--}60^{\circ}\text{C}$, 模板 DNA 与引物按碱基配对原则互补结合, 即退火阶段。
3. 延伸: 溶液反应温度升至 72°C , 耐热 DNA 聚合酶以单链 DNA 为模板, 在引物的引导下。利用反应混合物中的 4 种脱氧核苷三磷酸(dNTP), 按 $5'\text{--}3'$ 方向复制出互补 DNA, 即引物的延伸阶段。

上述 3 步为一个循环, 即高温变性、低温退火、中温延伸 3 个阶段。从理论上讲, 每经过一个循环, 样本中的DNA量应该增加一倍, 新形成的链又可成为新一轮循环的模板, 经过 25-30 个循环后DNA可扩增 $10^6\text{--}10^9$ 倍。

典型的PCR反应体系由如下组分组成: DNA模板、反应缓冲液、dNTP、 MgCl_2 、两个合成的DNA引物、耐热Taq聚合酶。

【仪器、材料与试剂】

(一) 仪器

1. PCR 热循环仪
2. 琼脂糖凝胶电泳系统

(二) 材料

1. DNA 模板
2. 4 种 dNTP
3. 引物 1、引物 2
4. Taq 酶
5. 琼脂糖
6. DNA 相对分子质量标准物
7. 吸头、小指管

(三) 试剂

1. $10\times$ 缓冲液

- 500 mmol/L KCl
 100 mmol/L Tris.HCl (pH8.3, 室温)
 15 mmol/L MgCl₂
 0.1% 明胶
2. 4x dNTP
 1 mmol/L dATP
 1 mmol/L dCTP
 1 mmol/L dGTP
 1 mmol/L dTTP
3. Tag 酶 1 U/μL
4. DNA 模板 1 ng/μL
5. 引物 1 5' GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA 3'
6. 引物 2 5' CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC 3'
7. 引物溶液浓度 10 pmol/μL

【实验步骤】

1. 在 0.5 mL Eppendorf 管内配制 25 μL 反应体系:

反应物	体积 / μL
ddH ₂ O	11
10xPCR 缓冲液	2.5
2.5 mmol/L dNTP	2.0
25 mmol/L MgCl ₂	1.5
引物 1	1.0
引物 2	1.0
模板 DNA	5
Tag 酶	1 (1U)

混匀, 加 25 μL 石蜡油。

2. 按下述程序进行扩增

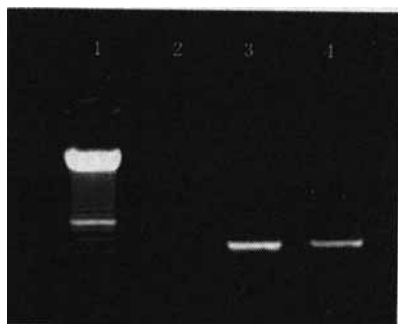
- ① 94°C 预变性 5 min;
- ② 94°C 变性 1 min
- ③ 52°C 退火 1 min
- ④ 72°C 延伸 1 min
- ⑤ 重复步骤②-④35次;
- ⑥ 72°C 延伸 10 min。

3. 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 结果

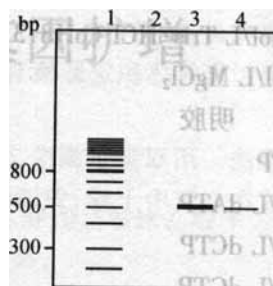
配制 2% 琼脂糖凝胶, 取 10 μL 扩增产物电泳。保持电流 40 mA。电泳结束后, 用 EB 染色 15 min, 紫外灯下观察结果。

【实验结果】

本实验扩增片段长 548 bp (图实验 9-1)。



结果照片图



结果示意图

图实验 9-1

1. DNA 相对分子质量标准;
2. 对照(没有模板 DNA);
3. 10 μ L 样品;
4. 5 μ L 样品

【实验安排】

本实验 1 d 内可完成，上午做 PCR 反应，下午做电泳检测。

实验十 外源基因在大肠杆菌中的诱导表达和检测

I. 外源基因在大肠杆菌中的诱导表达

【实验目的】

通过本实验了解外源基因在原核细胞中表达的特点和方法。

【实验原理】

将外源基因克隆在含有 *lac* 启动子的表达载体中, 让其在 *E. coli* 中表达。先让宿主菌生长, *lacI* 产生的阻遏蛋白与 *lac* 操纵基因结合, 从而不能进行外源基因的转录及表达, 此时宿主菌正常生长。然后向培养基中加入 *lac* 操纵子的诱导物 IPTG(异丙基硫代- β -D-半乳糖), 阻遏蛋白不能与操纵基因结合, 则 DNA 外源基因大量转录并高效表达。表达蛋白可经 SDS-PAGE 检测(本实验 II)或做 Western-blotting, 用抗体识别之(实验十一)。

【仪器、材料与试剂】

(一) 仪器

1. 恒温摇床
2. 培养用锥形瓶
3. 超静工作台
4. 低温离心机
5. 干热灭菌箱

(二) 材料

1. 克隆在 *E. coli* 表达载体中的外源基因
2. 酵母提取物(yeast extract)
3. 胰化蛋白胨(tryptone)
4. 氯化钠(NaCl)
5. 甘油
6. 氨苄青霉素(ampicillin, Amp)
7. 异丙基硫代- β -D-半乳糖(IPTG)
8. 滤菌膜, 滤器
9. 移液管
10. 吸头, 小指管

(三) 试剂

1. LB 培养基
2. TM 表达用培养基

细菌培养用胰化蛋白胨	12g/L
细菌培养用酵母提取物	24g/L
氯化钠	10g/L
甘油	6mL/L

用 Tris 调 pH 至 7.4, 再用自来水补至 1 L, 15 磅高压蒸气灭菌 20 min。

3. 50 mg/mL Amp 过滤菌膜于灭菌小指管中, -20°C 贮存。
4. 1 mol/L IPTG 过滤菌膜于灭菌小指管中, -20°C 贮存备用。

【实验步骤】

1. 含外源基因的表达菌株在 LB(含 50 μ g/mL Amp) 培养基中预培养过夜(注意取菌株要在超静工作台上操作, 一定注意无菌)。
2. 100 mL TM 培养基加入 100 μ L 50mg/mL Amp, 使终浓度达 50 μ g/mL
按 1/50-1/100 比例加入过夜培养的上述 LB 培养液。
于 37°C 恒温摇床, 250r/min, 培养 3 h 左右, 使其 OD₆₀₀ 值达 0.7-0.8(注意 OD₆₀₀ 的值要视不同菌株中不同外源蛋白的表达情况而定, 此 0.7-0.8 为本实验摸索出的经验值)。
3. 加入 50 μ L 1 mol/L IPTG, 终浓度达 0.5 mmol/L, 进行外源基因的诱导表达。
于 37°C 恒温摇床, 250r/min, 继续培养 4-5 h(继续培养时间也需视蛋白表达情况而定)。
4. 4°C 低温离心, 4 000 r/min, 20 min, 收获菌体, 弃上清。菌体放 -20°C 存放备用。

II. SDS-PAGE 检测表达蛋白

【实验目的】

学习 SDS-PAGE 的基本操作, 学会用 SDS-PAGE 检测蛋白。

【实验原理】

蛋白质与 SDS 结合后, 均带有负电荷, 在电场下, 按相对分子质量大小在板状胶上排列。

【仪器、材料和试剂】

(一) 仪器

1. 平板电泳槽及配套的玻璃板, 胶条, 梳子
2. 普通恒压恒流电泳仪

(二) 材料

1. 十二烷基硫酸钠(SDS)
2. 丙烯酰胺(Acr)
3. N, N' - 亚甲基双丙烯酰胺(Bis)
4. 三羟甲基氨基甲烷(Tris)
5. 甘氨酸(Gly)

6. 盐酸(HCl)
7. 过硫酸胺(Aps)
8. 四甲基乙二胺(TEMED)
9. 低相对分子质量标准蛋白
10. 预染标准蛋白(购自 Bio-lab 公司)
11. 溴酚蓝
12. 甘油
13. 冰醋酸
14. 乙醇
15. 巯基乙醇
16. 琼脂
17. 考马斯亮蓝 R250

(三) 试剂

1. 1.5 mol/L Tris.HCl pH 8.8 (4°C 存放)
2. 0.5 mol/L Tris.HCl pH 6.8 (4°C 存放)
3. 10% SDS(室温存放)
4. 30% Acr/Bis 29.2 g Acr + 0.8g Bis, 用双蒸水定容至 100 mL, 过滤备用, 4°C 存放
5. 10% Aps(-20°C 存放)
6. 2×上样缓冲液(室温存放)

0.5 mol/L Tris.HCl pH 6.8	2 mL
甘油	2 mL
20% (W / V) SDS	2 mL
0.1% 溴酚蓝	0.5 mL
2-β-巯基乙醇	1.0 mL
双蒸水	2.5 mL

室温存放备用
7. 5× 电泳缓冲液(室温存放)

Tris	7.5 g
Gly	36 g
SDS	2.5 g

双蒸水溶解, 定容至 500 mL, 使用时稀释 5 倍使用
8. 染色液: 0.2g 考马斯亮蓝 R250 + 84 mL 95% 乙醇 + 20 mL 冰醋酸, 定容至 200 mL, 过滤
9. 脱色液: 医用酒精:冰醋酸:水=4.5:0.5:5(V:V:V)
10. 保存液: 7% 冰醋酸
11. 封底胶: 1% 琼脂(用蒸馏水配制)

【实验步骤】

1. 配制分离胶

- ①架好胶板, 用 1.5 mm 胶条在两边隔开, 用夹子固定, 并用封底胶封底约 1cm。

②配制分离胶:

凝胶浓度/%	7.5	10	12	15	18	20
双蒸水/mL	9.6	8.1	6.7	4.7	2.7	1.5
1.5 mol/L Tris.HCl (pH 8.8)/mL	5	5	5	5	5	5
10% (W/V) SDS/ μ L	200	200	200	200	200	200
Acr/Bis (30%) mL	5	6.65	8	10	12	13.2
TEMED/ μ L	10	10	10	10	10	10
10% Aps/ μ L	100	100	100	100	100	100
总体积/mL	20	20	20	20	20	20

混匀后加入两玻璃夹缝中, 并小心在胶面上加入 1cm 蒸馏水, 约 40 min, 等胶自然凝聚后倾斜倒, 出蒸馏水, 并在两玻璃板夹缝中水平插入 1.5 mm 的梳子(在胶面上加入蒸馏水称水封, 其目的是保持胶面平整和防止空气进入, 影响凝胶)。

2. 4% 浓缩胶的配制

双蒸水	6.1 mL
0.5 mol/L Tris.HCl pH 6.8	2.5 mL
10% (W / V) SDS	100 μ L
Acr/Bis (30%)	1.3 mL
TEMED	10 μ L
10% Ap	50 μ L
总体积	10 mL

混匀后加入到夹缝中, 并没过梳子, 待凝固后小心拨出梳子, 用 100 μ L 微量注射器抽取电极缓冲液冲洗梳子拔出后的加样凹槽底部, 清除未凝的丙烯酰胺。

3. 样品制备

菌体样品与 2 \times 上样缓冲液 1:1 混匀, 并在 100 $^{\circ}$ C 沸水浴中保温 3-5 min, 取出待用。

4. 电泳

一孔加 10 μ L 标准蛋白, 一孔加样品(若做印迹, 需加预染蛋白)。将玻璃板凝胶放入电泳槽中, 并在槽中加入电极液, 接通电源, 电流调至 1mA/孔, 当样品进入分离胶时, 调节电压使恒定在 120 V。当溴酚蓝移动到离底部约 0.5 cm 时, 切断电源, 停止电泳。

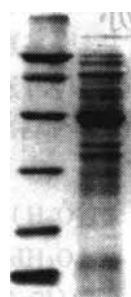
将胶板从电泳槽中取出, 小心从玻璃板上取下胶。移去浓缩胶, 将分离胶用考马斯亮蓝染色液染色, 也可将此分离胶作印迹用。

5. 染色

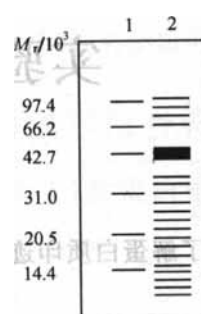
凝胶用染色液染色 2 h, 脱色过夜, 换保存液保存胶。

【实验结果】

SDS-PAGE 检测表达蛋白结果如图实验 10-1:



结果照片图



结果示意图

图实验 10-1

1. 标准蛋白；2. 表达蛋白样品；
此结果为采用 12% 分离胶和 4% 浓缩胶所得

【实验安排】

第一天：1. 配制试剂和培养基，高压灭菌；

2. 预培养。

第二天：诱导表达。

第三天：SDS-PAGE 电泳。

实验十一 蛋白质印迹

【实验目的】

通过本实验了解蛋白质印迹的方法和操作要点。

【实验原理】

印迹法一般由凝胶电泳；样品的印迹和固定化；各种灵敏的检测手段如抗体、抗原反应等三大实验部分组成。

1. 生物大分子凝胶电泳分离蛋白质印迹法的第一步一般是将蛋白质进行 SDS 聚丙烯酰胺平板凝胶电泳，使待测蛋白质在电泳中按相对分子质量大小在板状胶上排列。

2. 分子区带的转移和固定第二步就是把凝胶电泳已分离的分子区带转移并固定到一种特殊的载体上，使之形成稳定的、经得起各种处理并容易检出的，即容易和各自的特异性配体结合的固定化生物大分子。现用得最多的载体材料为硝酸纤维素膜(NC 膜)和一种尼龙衬底的膜(ZB 膜)，它们和生物大分子都是非共价结合。

3. 特异性谱带的检出 印迹在载体上的特异抗原的检出依赖于抗体、抗原的亲合反应。即将酶、荧光素或同位素标记的特异蛋白分别偶联在此特异抗体的二抗上，再分别用底物直接显色，测荧光，放射自显影等方法检测出我们感兴趣的抗原来，考虑到如果无合适抗体用来检测抗原时，可用一般的蛋白染料，如丽春红，检测转移到膜上的蛋白，验证转移是否成功。

I. SDS-PAGE(此部分见实验十)

II. 电转移

【仪器、材料与试剂】

(一)仪器

1. 高电流电泳仪(500mA 上)
2. 电泳转移槽及转移夹
3. 海棉块
4. 滤纸
5. 水平摇床

(二)材料

1. 硝酸纤维素膜(NC 膜)
2. 甘氨酸(Gly)
3. 甲醇
4. 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)
5. 磷酸氢二钾(K_2HPO_4)

6. 三羟甲基氨基甲烷(Tris)
7. 牛血清白蛋白(BSA)
8. 吐温 20(Tween-20)
9. 4-氯萘酚
10. 过氧化氢(H_2O_2)
11. 双蒸水(ddH₂O)
12. 氯化钠(NaCl)
13. 小塑料盒若干
14. 乳胶手套
15. 镊子
16. 普通玻璃器皿

(三) 试剂

1. 印迹缓冲液
25 mmol/L Tris
192 mmol/L 甘氨酸
20% 甲醇
pH 8.3
(现用现配)
6.05g Tris + 28.83g Gly + 400mL甲醇, 用ddH₂O 溶解并定容至 2 L
2. PBS 贮存液(10×PBS)
0.2 mol/L K₂HPO₄, KH₂PO₄, 5mol/L NaCl, pH7.45, 用时稀释 10 倍使用
18.49g K₂HPO₄
2.59g KH₂PO₄
以上分开配, 用其中一种调 pH=7.45, 再加入 43.83g NaCl 定容至 500 mL
3. PBS 缓冲液取 10×PBS 贮存液若干, 临用前用重蒸水 10 倍体积稀释
4. 封闭液 PBS+3% 牛血清白蛋白
5. 漂洗液 PBS+1% Tween-20

【实验步骤】

1. 戴乳胶手套将硝酸纤维素纸裁成和需印迹凝胶相似而略大的小块。
2. 将 SDS-PAGE 后准备印迹的凝胶块和硝酸纤维素纸分别放入装有印迹缓冲液的小塑料盒里漂洗 10 min(印迹缓冲液中加入甲醇的作用是使 SDS 游离出来, 并增加 NC 纸结合蛋白的容量, 提高 NC 纸与蛋白的亲合力, 便于 NC 纸上蛋白的复性, 防止凝胶肿胀等, 但甲醇能改变凝胶中大分子的电荷, 过多的甲醇还能使凝胶孔径缩小, 甚至引起大分子在凝胶中的沉淀而影响印迹效率)。
3. 将滤纸裁成比凝胶和硝酸纤维素纸略大的小块, 并做成“三明治”状, 放入转移夹中。
4. 印迹槽中倒入印迹液, 将印迹夹放入, 胶朝负极, NC 膜朝正极, 印迹时电流从负极到正极, 即将胶上的蛋白质印迹到 NC 膜上。
5. 电印迹: 接通电源, 使电流达 300mA, 同时通冷凝水, 印迹 2h 后, 切断电源。

III. 特异性谱带的检出

一、非特异性蛋白染色(当无特异抗体时可用此方法)

【试剂】

1. 丽春红: 用 4% 乙酸配制 1% 丽春红。
2. 染色液: 90mL 乙醇, 90mL 水, 10mL 乙酸, 0.25g 考马斯亮蓝 R250。
3. 脱色液: 70mL 乙酸, 50mL 乙醇, 定容至 1 000mL。

【实验步骤】

NC 膜的染色和脱色:

印迹完毕, 用镊子小心取出 NC 纸, 放置于塑料盒中。

方法 1: 用丽春红染色 5 min, 用水轻轻漂洗数次至背景红色消失。

方法 2: 用染色液染色 5 min, 用脱色液脱色 1-2 h。

二、特异性抗体检测

【仪器】

水平摇床

【试剂】

1. 稀释液: 1×PBS
2. 显色液: 称取 4-氯萘酚 30mg, 溶解在 12mL 甲醇中, 然后加 PBS 到 50mL, 最后加入 100 μ L 30% H₂O₂
3. 酶标二抗: 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (HRP-IgG)

【实验步骤】

1. 印迹完毕, 用镊子小心取出 NC 纸, 放置小塑料盒中, 封闭液加入后, 在室温中不断振摇, 封闭 3 h 以上。
2. 倒出封闭液(置冰箱 4°C, 可反复使用), 加入特异性抗体(某一抗原的小鼠腹水多克隆抗体制备见附)。用 PBS 稀释(如已测效价, 可按效价比例稀释, 一般情况可先试 1:500), 在室温下振摇过夜, 或至少 3h。
3. 用漂洗液洗 3 次, 每次 5 min(摇)。
4. 加入用 PBS 按商品要求稀释的酶标二抗, 在室温中不断振摇, 孵育 30 min。
5. 同 3. 用漂洗液洗涤。
6. 用显色液(临用前加 H₂O₂)显色, 到显色清晰时, 用蒸馏水终止反应。

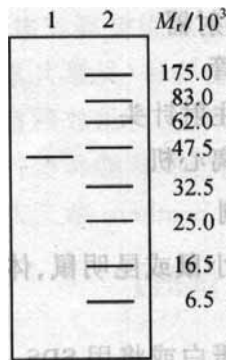
【实验结果】

1. 蛋白印迹后用丽春红染色所得的结果如结果示意图 11-1。



结果示意图 11-1

1. 为牛血清白蛋白； 2. 为卵清蛋白
2. 蛋白印迹后抗体检测结果如结果示意图 11-2。



结果示意图 11-2

1. 为外源基因在 *E. coli* 中表达后所得粗匀浆液，经抗体识别出的蛋白带；
2. 为预染标准蛋白

【实验安排】

- 第一天：上午 SDS-PAGE；
 中午 电转移；
 下午 封闭或直接蛋白染色。
- 第二天：加一抗、二抗和显色。

实验十二 Southern 杂交

【实验目的】

通过本实验学习和掌握 Southern 转膜, 随机引物法标记探针, 用放射自显影方法取得分子杂交结果的方法。

【实验原理】

Southern 杂交是一项在复杂的背景基因中识别特异性 DNA 序列的重要技术之一。它是 Southern 于 1975 年首创的杂交方法。其基本原理是具有一定同源性的两条核酸单链 DNA (或 DNA 与 RNA) 在一定的条件下可按碱基互补原则退火形成双链。杂交的双方是待测核酸序列及标记的探针。此杂交过程是高度特异性的。

首先将经限制性内切酶酶解的 DNA 片段, 经过琼脂糖凝胶电泳分离的 DNA 片段在凝胶上经 NaOH 处理使之变性, 然后用硝酸纤维素滤膜 (nitrocellulose filter membrane, NC 膜) 放在凝胶上, 使之按原有顺序将条带转移至 NC 膜上并固定起来, 这是 Southern 转膜过程。

Southern 膜杂交是将吸附并固定在硝酸纤维素滤膜上的 DNA 片段与一个 ^{32}P 标记的 DNA 或 RNA 探针杂交, 最后经过放射自显影从 X 光片上显现出杂交分子的区带。

本实验中, 经琼脂糖凝胶电泳分离的 pUC19 质粒 DNA, 通过 Southern 转移, 将其吸印在 NC 膜上, 通过随机引物法, 以同位素 ^{32}P 标记的 pUC19 质粒 DNA 为探针, 与 NC 膜上的质粒 DNA 进行杂交, 再用放射自显影方法取得分子杂交的结果。

本实验所用待测核酸和探针都是 pUC19 质粒 DNA, 之间必然有同源性, 可得到杂交带。这样可对初学者对 Southern 杂交方法进行训练。

【仪器、材料与试剂】

(一) 仪器

1. 恒温水浴器
2. 烤箱
3. 台式高速离心机
4. 放射性污染监测器
5. 琼脂糖凝胶电泳系统
6. 高压灭菌锅
7. -70°C 或 -20°C 冰箱

(二) 材料

1. 4 种 dNTP (其中一种为 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$)
2. DNA 聚合酶 I 大片段 (Klenow 酶)
3. 随机引物
4. 氯化钠 (NaCl)
5. 柠檬酸钠
6. 盐酸 (HCl)

7. 氢氧化钠 (NaOH)
8. 蔗糖
9. 硼酸
10. 溴酚蓝
11. 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)
12. 十二烷基硫酸钠 (SDS)
13. 磷酸二氢钠 (NaH_2PO_4)
14. 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)
15. 显影粉
16. 定影粉
17. 溴化乙锭 (EB)
18. 20 μL , 100 μL , 1 000 μL 微量加样器及吸头, 小指管
19. Whatman No. 1 滤纸及普通滤纸
20. 10cm \times 5cm 玻璃板
21. 硝酸纤维素滤膜 (NC 膜)
22. 卫生纸 (或吸水纸)
23. 裁纸刀
24. 杂交盒
25. 500g 重物
26. X 光片夹及 X 光片
27. 剪子、镊子、刀片、胶带
28. 保鲜膜
29. 直径 20cm 的玻璃平皿
30. 一次性手套
31. 生化常用玻璃器皿
32. pUC19 质粒 DNA

(三) 试剂

1. 20 \times SSC (1 000 mL)
 - 3 mol/L NaCl (175.32g)
 - 0.3 mol/L 柠檬酸钠 (88.26g)
 - 用 1 mol/L HCl 调至 pH7.0
2. 变性溶液 (500 mL)
 - 1.5 mol/L NaCl (43.83g)
 - 0.5 mol/L NaOH (10g)
3. 中和溶液 (500 mL)
 - 0.5 mol/L Tris (30.27g)
 - 3 mol/L NaCl (87.66g)
 - 用 1 mol/L HCl 调至 pH7.0
4. 5 \times TBE (250 mL)

Tris	13.5g
硼酸	6.9g
EDTA- Na_2	0.9g

用蒸馏水定容至 250 mL

5. TE (10 mL)
10 mmol/L Tris. HCl
1 mmol/L EDTA
pH 8.0
6. 0.2 mol/L HCl (500mL)
7. 6×溴酚蓝载样液 (1mL)
0.25% 溴酚蓝
40% 蔗糖
8. 4 mol/L EDTA 1 mL
9. 6×SSC 杂交液贮液
20% SDS (50mL)
1 mol/L NaH₂PO₄ (10mL)
1 mol/L Na₂HPO₄ (50mL)
0.5 mol/L EDTA (100mL)
10. EB 染色液
0.5μg / mL 溴化乙锭

【实验步骤】

(一) pUC19 质粒按实验二的方法进行提取

(二) 质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

1. 将 5×TBE 稀释 10 倍, 即为 0.5×TBE。
2. 用 0.5×TBE 配制 50 mL 1% 琼脂糖凝胶。称取 0.5 g 琼脂糖于锥形瓶中, 加入 50mL 0.5×TBE, 加热至琼脂糖溶化, 摇匀, 待胶冷至 60% 左右, 制胶。
3. 电泳。一般电压控制在 50 V 左右, 电流在 40 mA 以下, 恒压电泳。当溴酚蓝染料移动距凝胶前沿 1cm 时, 停止电泳。
4. 用 EB 染色 15 min, 放在紫外灯上观察电泳结果。如果电泳条带清晰(看到桔黄色荧光带), 将凝胶照相, 并继续进行下一步。

(三) Southern 转移(以下操作要戴上一次性手套)

1. 用刀片切掉未用过的凝胶区域, 并将凝胶切掉一个角(对点样顺序做个标记), 然后转玻璃平皿中。
2. 将胶置于 0.2 mol/L HCl 中 10min (加 HCl 的目的是将 DNA 部分脱嘌呤)。
DNA < 1 kb 可省。缓缓摇动。当溴酚蓝由蓝色转变成桔黄色停止, 用蒸馏水漂洗 2 次。
3. 在室温下将凝胶浸泡在变性溶液中(目的是使 DNA 双链变性成单链), 放置 40 min, 使 DNA 充分变性并不断摇动。
4. 用蒸馏水漂洗 2 次。
5. 在室温下将凝胶转到另一玻璃平皿中, 用中和溶液浸泡 40 min(目的是中和), 不断摇动。
6. 用蒸馏水漂洗 2 次。
7. 将 2 个直径 20cm 的玻璃平皿并排放置, 里面倒上 20×SSC, 两个平皿上面放一块干净玻璃板 10×15 cm², 玻璃板上铺两张 Whatman No. 1 滤纸, 滤纸的宽与玻璃板同宽, 滤纸的两个边垂入 20×SSC 溶液中, 使溶液不断地吸到滤纸上(注意: 可用玻璃棒在滤纸上滚动以赶尽气泡, 滤纸不能用手直接接触)。
8. 将 NC 膜裁成与凝胶大小一致, 并在相应位置上剪掉一个角, 然后用重蒸水浸湿, 再

- 转入 $20\times$ SSC 溶液浸泡约半小时(注意:不要用手直接触摸 NC 膜)。
9. 将中和处理好的凝胶滑到已用 Whatman No. 1 滤纸铺好的玻璃板中央(用玻璃棒赶掉凝胶与滤纸间的气泡)。
 10. 小心用镊子将 NC 膜准确放在凝胶上(此时 DNA 开始转移,不能再移动 NC 膜)。
 11. 用玻璃棒仔细赶掉一切存在于 NC 膜与凝胶间的气泡。
 12. NC 膜上盖一张同样大小的普通滤纸,再次赶尽气泡。
 13. 预先裁一叠同样大小的卫生纸,纸大小略比 NC 膜小 2 mm。压在滤纸上,约 10 cm 厚。
 14. 在卫生纸上放置一块玻璃板,玻璃板上放一个 500g 的砝码或其他重物。
 15. 让凝胶上的 DNA 转移 12 h 或过夜。
 16. 将 NC 膜与凝胶剥离。弃去胶,把 NC 膜浸在 $6\times$ SSC 溶液中,约 5 min 后取出。
 17. 把 NC 膜夹在 4 层普通滤纸中,置 65°C 烘箱中烘烤 4 h。

(四) 探针标记

1. 取 20–100 μg DNA 加水至 45 μL , 100% 变性 10 min, 迅速插入冰中。
 2. 以下操作均在同位素防护下进行:
准备一个微量离心管置于冰上,依次加入下列试剂(以下均为 Promega 公司提供,除 DNA 模板):
- | | |
|---|-------------------|
| 标记 $5\times$ buffer | 10 μL |
| dATP. dGTP. dTTP 混合物 | 2 μL |
| 变性的 DNA 模板 | 1.5 μL |
| 不含核酸酶的 BSA | 2 μL |
| $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (10 U/ μL) | 5 μL |
| Klenow 酶 (5 U/ μL) | 1 μL |
| 引物 | 2 μL |
| 加无菌水至 | 50 μL |
3. 用离心机轻轻混匀,然后在室温下标记 3h(放置同位素室)。
 4. 终止:将完成标记后的反应物煮沸 2 min,立即放入冰浴中。加入 5 μL 4 mol/L EDTA 后,冷藏 (-20°C) 或直接用于杂交。

(五) Southern 杂交

1. $6\times$ SSC 杂交液配制 (1 000 mL)

NaCl	43.8g
柠檬酸钠	36.9g
以上用 500 mL 水溶解	
20% SDS	30 mL
1 mol/L NaH_2P_4	8 mL
1 mol/L Na_2HPO_4	42 mL
Ficoll	1 g
PVP	1 g
BSA	1 g
0.5 mol/L EDTA	5 mL

定容至 1 000 mL, 试一下 pH 值, 如为 7.5 左右则正确。

(SDS 的作用使蛋白质变性, 减少蛋白质对 DNA 杂交的影响; NaH_2P_4 与 Na_2HPO_4 提供 pH7.5 缓冲条件; Ficoll、PVP 以及 BSA 的作用是防止单链 DNA 与硝酸纤维素膜的非特异性结合)。

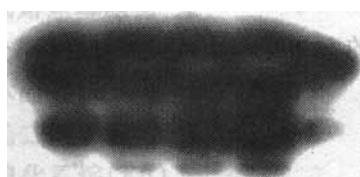
2. 鱼精 DNA 的变性: 100℃水浴煮沸 10 min, 迅速插入冰中。
3. 将已烘烤过的 NC 膜放入杂交盒中, 加入预热的杂交液 10 mL, 使杂交液刚好没过 NC 膜, 同时加入变性鱼精 DNA(减少杂交时的背景干扰), 使杂交液中的鱼精 DNA 的浓度为 0.5 mL/100 mL 杂交液, 65℃恒温水浴, 预杂交 4-5 h(同位素室进行, 预杂交的目的是将非特异性序列封闭, 从而使背景更清晰)。
4. 探针变性: 完成标记后, 加等体积 0.4 mol/L NaOH 混匀 10 min。
5. 将变性探针加入杂交液中, 混匀(变性探针与膜上的特异性序列杂交)。
6. 65℃恒温水浴杂交 12 h 或过夜(同位素室进行)。
7. 洗膜(同位素室进行)
 - 一洗: 2×SSC, 0.1% SDS. 10 min×2
 - 二洗: 1×SSC, 0.1% SDS 10 min×2
 - 三洗: 0.5×SSC, 0.1% SDS 10 min×2
 (注意: 洗膜的温度和时间、盐离子浓度可灵活掌握)
 (洗膜目的是将滤膜上未与 DNA 杂交的及非特异性杂交的探针分子从滤膜上洗去)

(六)放射自显影

1. 将滤膜用保鲜膜包好, 置 X 光片夹中, 并用同位素监测仪探测一下同位素强度, 从而确定曝光时间。
2. 在暗室中将 NC 膜放在增感屏上(光面与 NC 膜接触), 在滤膜上压上 X 光片, 再压上增感屏后屏(光面与 X 光片接触)。为了防止滤膜和 X 光片移位, 可在适当位置粘上胶带条。
3. 置-70℃(或-20℃)曝光, 曝光时间由第 1 步决定。
4. 在暗室中冲片, 显影一水洗一定影, 用水洗净后吹干或晾干。

【实验结果】

图实验 12-1 为提取的 pUC19 质粒经 Southern 转移和分子杂交后, 放射自显影而得到的结果。3 条带依次为超螺旋 DNA(A)、线状 DNA(B)和开环 DNA(C)。



结果照片图



结果示意图

图实验 12-1

- | | |
|------------------------|------------------------|
| 1. 加样量为 2 μL (0.10μg); | 2. 加样量为 3 μL (0.15μg); |
| 3. 加样量为 4 μL (0.20μg); | 4. 加样量为 6 μL (0.30μg); |
| 5. 加样量为 7 μL (0.35μg) | |

【实验安排】

整个实验在 7-10 d 之间完成。

第一天：配试剂、提质粒。

第二天：电泳，Southern 转膜过夜。

第三天：取出 Southern 膜进行预杂交与杂交，并杂交过夜。

第四天：洗膜，放射自显影。在放射自显影过程中，可穿插安排别的实验。

二. 研究性实验

实验十三 大肠杆菌 MAA 基因编码序列扩增 的引物设计和扩增

【计划时数】6 学时

【实验目标与基本要求】

使学生掌握 PCR 扩增引物设计的基本原理和原则，熟练应用引物设计软件(Oligo 5.0)。熟练使用基因扩增仪。

【实验材料、仪器和软件】

大肠杆菌基因组 DNA，引物，4 种 dNTP，*Pfu* DNA 聚合酶。PCR 基因扩增仪，琼脂糖凝胶电泳系统，凝胶成像系统。Oligo 5.0 引物设计软件。

【实验内容和提示】

登录<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>网站，学习检索大肠杆菌MAA基因序列的方法，根据MAA基因序列，应用Oligo 5.0 软件设计引物，MAA基因片段扩增，回收，凝胶电泳检测。

【据体要求】

参阅下列参考文献，制定详细的实验步骤，并和实验指导老师讨论。实验完成后提交实验报告和纯化的 MAA-DNA 片段。

【参考文献】

1. 魏群 (2004) 分子生物学实验指导: PCR 基因扩增, pp90-92, 高等教育出版社.
2. 用淀粉结合结构域作为“锚”对甘薯淀粉分子结构修饰的研究/国家自然科学基金申请书 2005.
3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 网站

【实验来源】

季勤副教授的研究项目。

实验十四 SBD 大肠杆菌表达质粒载体的构建、 扩增、提取和电泳

【计划时数】: 18 小时

【实验目标与基本要求】

使学生掌握大肠杆菌表达质粒载体构建、扩增、提取、酶切及电泳检测的原理和方法。

【实验材料、试剂和仪器】

质粒 pTrcHis B, 环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans* strain 251)的环状糊精糖基转移酶(cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase)基因中淀粉粒结合结构域(starch-binding domain, SBD)的编码序列, *E.coli* Top10 感受态细胞, DNA 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶。基因导入仪, 琼脂糖凝胶电泳系统, 凝胶成像系统。

【实验内容和提示】

将环状糊精糖基转移酶(CGTase)基因中淀粉粒结合结构域(SBD)的编码序列插入大肠杆菌表达质粒 pTrcHisB 中, 转化大肠杆菌 Top10, 挑选单菌落培养, 提取质粒 DNA, 限制性内切酶酶切, 凝胶电泳检测。

【据体要求】

根据所掌握的分子生物学实验的基本知识和查阅相关的参考文献, 制定完整的实验操作步骤, 交实验指导老师审阅。实验完成后提交实验报告和纯化的 pTrcHisB/SBD 质粒 DNA。

【参考文献】

1. 魏群 (2004) 分子生物学实验指导, 高等教育出版社。
2. Lawson, C.L., van Montfort, R., Strokopytow, B., Rozeboom, H.J., Kalk, K. H., de Vries, G.E., Penninga, D., Dijkhuizen, L. and Dijkstra, B. W. (1994) Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form. *J. Mol. Biol.* **236**, 590-600.
3. Ji, Q., Vincken, J.-P., Suurs, L.C.J.M. and Visser, R.G.F. (2003) Microbial starch-binding domains as a tool for targeting proteins to granules during starch biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* **51**, 789-801.
4. 登录<http://www.invitrogen.com.cn> Invitrogen 公司的中文网站, 查阅有关 pTrcHis B 大肠杆菌表达质粒结构资料。

【实验来源】 季勤副教授的研究项目。

实验十五 SBD 基因在大肠杆菌中的诱导表达

【计划时数】 18 小时

【实验目标与基本要求】

使学生掌握外源基因诱导表达的原理和方法。培养学生利用基因重组技术从事科研工作的能力。

【实验仪器、材料和试剂】

水平摇床, 全自动多功能水平电泳仪 (PhastSystem), 蛋白质分离纯化柱(ProBond Resin 柱), 标准蛋白质 (RainBow), NAP-25 柱(蛋白质样品脱盐柱), 12.5%SDS-PAGE, IPTG (异丙基硫代- β -D-半乳糖)等实验必需试剂。

【实验内容和提示】

将上一实验中获得的转化大肠杆菌培养液扩大培养, 诱导表达, 收集菌体, SBD 蛋白质的分离、纯化和 SDS-PAGE 检测。

【据体要求】

参阅下列参考文献, 制定详细的实验步骤, 并和实验指导老师讨论。实验完成后提交实验报告和纯化的 SBD 蛋白质样品。

【参考文献】

1. 魏群 (2004) 分子生物学实验指导: 外源基因在大肠杆菌中的诱导表达, pp93-97, 高等教育出版社。
2. Qin Ji, Jean-Paul Vincken, Luc C.J.M. Suurs, and Richard G.F.Visser (2003) Microbial starch-binding domains as a tool for targeting proteins to granules during starch biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* **51**, 789-801.
3. 登录<http://www.invitrogen.com.cn> Invitrogen 公司的中文网站, 查阅有关 pTrcHis B大肠杆菌表达质粒的结构及其表态特性的资料, 并查阅有关ProBond Resin 柱的分离纯化原理以及使用说明书。

【实验来源】

季勤副教授的研究项目。

实验十六 Western 斑点杂交

【计划时数】 6 小时

【实验目标与基本要求】

使学生掌握 Western 斑点杂交分析的原理、方法和操作要点。

【实验仪器、材料和试剂】

全自动多功能水平电泳仪 (PhastSystem), 水平摇床, 水浴锅, 12.5% SDS-PAGE 胶 (50mm×50mm×3mm), 马铃薯淀粉 (对照), SBD 转基因马铃薯淀粉, Hybond ECL 醋酸纤维素滤膜, SBD 多克隆抗体(一抗), 羊抗兔 IgG 抗体(酶标二抗), 显色液等必要的试剂。

【实验内容和提示】

将 SBD 转基因马铃薯淀粉加含有 SDS 的样品缓冲液煮沸变性, 蛋白质的印迹转移, 醋酸纤维素滤膜的封闭, 一抗杂交, 二抗杂交, 显色。

【据体要求】

参阅下列参考文献, 制定详细的实验步骤, 并和实验指导老师讨论。实验完成后提交实验报告。

【参考文献】

1. 魏群 (2004) 分子生物学实验指导: 蛋白质印迹, pp98-101, 高等教育出版社.
4. Qin Ji, Jean-Paul Vincken, Luc C.J.M. Suurs, and Richard G.F. Visser (2003) Microbial starch-binding domains as a tool for targeting proteins to granules during starch biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* **51**, 789-801.

【实验来源】

季勤副教授的研究项目。

实验十七 SBD 重组蛋白在马铃薯淀粉粒中的定位分析

【计划时数】6 小时

【实验目标与基本要求】

使学生掌握用胰蛋白酶分析 SBD 重组蛋白在马铃薯淀粉粒中定位的原理和方法, 掌握 Western 斑点杂交分析的原理、方法和操作要点。

【实验仪器、材料和试剂】

全自动多功能水平电泳仪 (PhastSystem), 水平摇床, 12.5% SDS-PAGE 胶 (50mm×50mm×3mm), 马铃薯淀粉 (对照), SBD 转基因马铃薯淀粉, 大肠杆菌 SBD 蛋白质, 胰蛋白酶 (Trypsin), Hybond ECL 醋酸纤维滤膜, SBD 多克隆抗体(一抗), 羊抗兔 IgG 抗体(酶标二抗), 显色液等必要的试剂。

【实验内容和提示】

将 SBD 转基因马铃薯淀粉用胰蛋白酶进行水解处理, 处理的淀粉样品加含有 SDS 的样品缓冲液煮沸变性, 蛋白质的印迹转移, 醋酸纤维滤膜的封闭, 一抗杂交, 二抗杂交, 显色。

【据体要求】

参阅下列参考文献, 制定详细的实验步骤, 并和实验指导老师讨论。实验完成后提交实验报告。

【参考文献】

1. 魏群 (2004) 分子生物学实验指导: 蛋白质印迹, pp98-101, 高等教育出版社.
5. Qin Ji, Jean-Paul Vincken, Luc C.J.M. Suurs, and Richard G.F.Visser (2003) Microbial starch-binding domains as a tool for targeting proteins to granules during starch biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* **51**, 789-801.

【实验来源】

季勤副教授的研究项目。

实验十八 小麦糯性基因的分子标记和辅助选择

【计划时数】 8 小时

【实验目标与基本要求】

为学生提供一个了解小麦品种多样性及功能多样化的体会，让学生体会优良品种的育种目标及杂交培育原理和过程，给学生提供淀粉特性的组织化学鉴定及基因鉴定的机会。

【实验材料、用具和仪器】

1. 小麦品比试验区材料，亲本圃及选种圃材料；
2. 杂交授粉工具：镊子、剪刀、授粉袋；
3. 淀粉组织化学鉴定仪器：体视显微镜、普通显微镜；
4. PCR 仪、电泳系统

【实验内容和提示】

1. 了解几类特用小麦代表性品种，包括面包小麦、饼干小麦的特征；
2. 面条小麦配粉原理及糯性小麦组织化学鉴定；
3. 糯性小麦的基因鉴定。

【据体要求】

参阅参考文献，制定详细的实验步骤，并和实验指导老师讨论，实验完成后提交实验报告。

【参考文献】

1. J. 萨姆布鲁克等著[美] (黄培堂译) 分子克隆实验指南(第三版) 科学出版社
2. 方宣钧 (2001) 作物 DNA 标记辅助育种. 科学出版社
3. <http://wheat.pw.usda.gov/NSF/> 关于小麦分子图谱与标记引物的资料
4. T Nakamura; P Vrinten; M Saito; M Konda / Rapid classification of partial waxy wheats using PCR-based markers//Genome; Dec 2002; 45, 6; ProQuest Biology Journals, pg. 1150

【实验来源】

窦秉德副教授的研究项目。

实验十九 小麦雌性不育基因的标记定位

【计划时数】 18 学时

【实验目标与基本要求】

使学生了解植物育性性状的鉴定方法及其多态性在植物界的意义,通过性状分析群体的构建理解性状的遗传分析方法,通过已知标记位点连锁群的引物的查询、筛选以及有义标记在分析群体中与性状的重组分析,理解有义标记和已知标记及目标性状之间的连锁距离,从而认识分子遗传图谱在育种群体的标记辅助选择中的重要性。

【实验仪器、试剂和软件】

主要的所需条件为 DNA 提取、纯化、定量所需仪器设备试剂, PCR 所需试剂仪器,聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染所需仪器设备。标记分析的软件。

【实验内容和提示】

从技术角度讲学生通过实验课以了解植物 DNA 提取等操作,精通 PCR 技术和凝胶电泳技术,软件应用技术,从理论角度讲,学生可以深刻体会分子标记的精妙之处及其在分子遗传分析中的作用。

【据体要求】

参阅下列参考文献,制定详细的实验步骤,并和实验指导老师讨论。实验完成后提交实验报告或撰写实验论文。

【参考文献】

1. J.萨姆布鲁克等著[美](黄培堂译) 分子克隆实验指南(第三版) 科学出版社
2. 方宣钧(2001) 作物 DNA 标记辅助育种. 科学出版社
3. <http://wheat.pw.usda.gov/NSF/> 关于小麦分子图谱与标记引物的资料
4. 小麦雌性不育的遗传分析/ 国家自然科学基金申请书 2005

【实验来源】

窦秉德副教授的研究项目。

附录一 分子生物学实验中的常用数据及换算关系

(一) 常用单位及换算方法

1. 长度单位

1米(m)=10分米(dm)=100厘米(cm)= 10^3 毫米(mm)= 10^6 微米(μm)= 10^9 纳米(nm): 10^{10} 埃(Å)

2. 体积单位

1升(L)=10分升(dL)=100厘升(cL)= 10^3 毫升(mL)= 10^6 微升(μL)

3. 重量单位

1公斤(kg)= 10^3 克(g)= 10^4 分克(dg)= 10^5 厘克(cg)= 10^6 毫克(mg)= 10^9 微克(μg)

1磅=453.59237克(g)

4. 摩尔浓度单位

1 mol/L= 10^3 mmol/L= 10^6 μmol/L= 10^9 nmol/L= 10^{12} pmol/L

(二) 常用核酸、蛋换算数据

1. 重量换算

1μg= 10^{-6} g

1ng= 10^{-9} g

1pg= 10^{-12} g

1fg= 10^{-15} g

2. 分光光度换算

1个OD₂₆₀双链DNA=50μg/mL

1个OD₂₆₀单链DNA=33μg/mL

1个OD₂₆₀单链RNA=40μg/mL

3. DNA摩尔换算

1 μg 1 000 bp DNA=1.52 pmol=3.03 pmol末端

1 μg pBR322 DNA=0.36 pmol

1 pmol 1 000 bp DNA=0.66μg

1 pmol pBR322=2.8μg

1 kb双链DNA(钠盐)= 6.6×10^5

1 kb单链DNA(钠盐)= 3.3×10^5

1 kb单链RNA(钠盐)= 3.4×10^5

脱氧核糖核苷的平均 $M_r = 324.5$

4. 蛋白摩尔换算

100 pmol M_r 为 100 000蛋白质=10μg

100 pmol M_r 为 50 000蛋白质=5μg

100 pmol M_r 为 10 000蛋白质=1μg

氨基酸的平均 $M_r=126.7$

5. 蛋白质 / DNA换算

1 kb DNA=333个氨基酸编码容量= 3.7×10^4 蛋白质(M_r)

10 000蛋白质(M_r)=270 bp DNA

30 000蛋白质(M_r)=810 bp DNA

50 000蛋白质(M_r)=1.35 kb DNA

100 000蛋白质(M_r)=2.7 kb DNA

附录二 分子生物学实验中的常用试剂及溶液、缓冲液

(一) 有机试剂的配制

1. 酚

大多数市售液化酚是清亮、无色的，无须重蒸馏便可用于分子克隆实验。偶有些批号的液化酚呈粉红色或黄色，应拒收或退回生产厂家。最好能够避免使用结晶酚，因为必须在 160°C 对之进行重蒸馏以去除诸如醌等氧化产物，这些产物可引起磷酸二酯键的断裂及导致 RNA 和 DNA 的交联。(国内出售的酚多为结晶酚，应在 160°C 用空气冷凝管进行重蒸)。

(小心：酚腐蚀性很强，并可引起严重灼伤，操作时应戴手套及防护镜，穿防护服。所有操作均应在化学通风橱中进行。与酚接触过的皮肤部位应用大量的水清洗，并用肥皂和水洗涤，忌用乙醇)

酚的平衡：

因为在酸性 pH 条件下 DNA 分配于有机相，因此使用前必须对酚进行平衡，使其 pH 值在 7.8 以上。

- 1) 经过液化的酚液应贮存于 -20°C，用前将之从冰冻室中取出，使其温度升至室温。然后在 68°C 使酚溶解，加入 8-羟基喹啉至终浓度为 0.1%。该化合物是一种抗氧化剂、RNA 酶的不完全抑制剂及金属离子的弱螯合剂(Kirby, 1956)。此外，其黄颜色有助于方便地识别出有机相。
- 2) 为融化酚，可加入等体积的缓冲液[常于室温加入 0.5 mol/L Tris.HCl (pH8.0)]，用磁力搅拌器将混合物搅拌 15 min，关上搅拌器待两相分开后，用与带有接液瓶的真空装置相连接的玻璃吸管，尽可能彻底地移出上相(水相)液。
- 3) 加入等体积的 0.1 mol/L Tris.HCl (pH8.0) 到酚中，搅拌 15 min 后关上磁力搅拌器。按步骤 2) 所述移出上层水相。重复抽提过程，直到酚相的 pH 值大于 7.8 (用 pH 试纸测量)。
- 4) 酚达到平衡并最后一次移出液相后，加入 0.1 体积含有 0.2% B 巯基乙醇的 0.1 mol/L Tris.HCl (pH8.0)。这种形式的酚溶液可装在不透光的瓶中并处于 10 mmol/L Tris.HCl (pH8.0) 缓冲液层之下，于 4°C 保存一个月。

2. 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)

从核酸样品中去除蛋白质时常常使用等体积混合的平衡酚和氯仿:异戊醇(24:1)。其中的氯仿可使蛋白质变性并有助于液相与有机相的分离。异戊醇则有助于消除抽提过程中出现的泡沫。

氯仿和异戊醇在使用前均无需处理，放在不透光的瓶中并处于 100 mmol/L Tris.HCl (pH8.0) 缓冲液之下的酚:氯仿:异戊醇混合液可在 4°C 保存 1 个月。

(二) 细菌培养基和抗生素

1. 液体培养基

(1) LB 培养基 (Luria-Bertani 培养基)

配制每升培养基，应在 950 mL 去离子水中加入：

细菌培养用胰化蛋白胨 (bacto-tryptone) 10 g

细菌培养用酵母提取物(bacto-yeast extract) 5 g
氯化钠 10 g

摇动容器直至溶质完全溶解,用 5 mol/L 氢氧化钠(约 0.2 mL)调节 pH 值至 7.0,加入去离子水至总体积为 1 L,在 1.034×10^5 Pa 高压蒸汽灭菌 20 min。

(2) 高浓度肉汤(Tartof, Hobbs, 1987)

配制每升高浓度肉汤,应在 900 mL 去离子水中加入:

细菌培养用胰化蛋白胨 12 g
细菌培养用酵母提取物 24 g
甘油 4 mL

摇动容器使溶质完全溶解,在 1.034×10^5 Pa 高压下蒸汽灭菌 20 min,然后使该溶液降温至 60°C 或 60°C 以下,再加入 100 mL 经灭菌的磷酸盐缓冲液(该磷酸盐缓冲液的配制方法如下:在 90 mL 的去离子水中溶解 12.54 g 磷酸氢二钾,然后加入去离子水至总体积为 100 mL,在 1.034×10^5 Pa 高压下蒸汽灭菌 20 min)。

(3) SOS 培养基

配制每升培养基,应在 950 mL 去离子水中加入:

细菌培养用胰化蛋白胨 20 g
细菌培养用酵母提取物 5 g
氯化钠 0.5 g

摇动容器使溶质完全溶解,然后加入 10 mL 250 mmol/L 氯化钾溶液(在 100 mL 去离子水中溶解 1.86 g 氯化钾,配制成 250 mmol/L 氯化钾溶液),用 5 mol/L 氢氧化钠(约 0.2 mL)调节溶液的 pH 值至 7.0,然后加入去离子水至总体积为 1 L,在 1.034×10^5 Pa 高压下蒸汽灭菌 20 min。

该溶液在使用前加入 5 mL 经灭菌的 2 mol/L 氯化镁溶液(2 mol/L 氯化镁溶液的配制方法如下:在 90 mL 去离子水中溶解 19 g 氯化镁,然后加入去离子水至总体积为 100 mL,在 1.034×10^5 Pa 高压下蒸汽灭菌 20 min)。

(4) 2× YT 培养基

配制每升培养基,应在 900 mL 去离子水中加入:

细菌培养用胰化蛋白胨 16 g
细菌培养用酵母提取物 10 g
氯化钠 5 g

摇动容器直至溶质完全溶解,用 5 mol/L 氢氧化钠调节 pH 值至 7.0,加入去离子水至总体积为 1 L,在 1.034×10^5 Pa 高压下蒸汽灭菌 20 min。

(5) M9 培养基

配制每升培养基,应在 750 mL 无菌的去离子水(冷却至 50°C 以下)中加入:

5× M9 盐溶液 200 mL

灭菌的去离子水至 1 L

适当碳源的 20% 溶液(如 20% 葡萄糖) 20 mL

如有必要,可在 M9 培养基中补加含有适当种类的氨基酸的贮存液。

5× M9 盐溶液的配制:在去离子水中溶解下列盐类,终体积为 1 L:

磷酸氢二钠·7H₂O 64 g

磷酸二氢钾	15 g
氯化钠	2.5 g
氯化铵	5.0 g

把上述盐溶液分成 200 mL 一份，在 1.034×10^5 Pa 高压下蒸汽灭菌 15 min。

2. 含有琼脂或琼脂糖的培养基

先按上述配方制成液体培养基，临高压灭菌前加入下列试剂中的一份：

细菌培养用琼脂	15 g/L (铺制平板用)
细菌培养用琼脂	7 g/L (配制顶层琼脂用)
琼脂糖	15 g/L (铺制平板用)
琼脂糖	7 g/L (配制顶层琼脂糖用)

在 1.034×10^5 Pa 高压下蒸汽灭菌 20 min。从高压灭菌器中取出培养基时应轻轻旋动以使溶解的琼脂或琼脂糖能均匀分布于整个培养基溶液中。必须小心，此时培养基溶液可能过热，旋动液体会发生暴沸。应使培养基降温至 50°C，方可加入不耐热的物质(如抗生素)。为避免产生气泡，混匀培养基时应采取旋动的方式，然后可直接从烧瓶中倾出培养基铺制平板。90 mm 直径的培养皿约需 30–50 mL 培养基。如果平板上的培养基有气泡形成，可在琼脂或琼脂糖凝结前用本生灯灼烧培养基表面以除去之。按设定的颜色记号在相应平板的边缘作记号以区别不同的培养平板(例如两条红杠表示 LB-氨苄青霉素平板，一条黑杠表示 LB 平板等等)。

培养基完全凝结后，应倒置平皿并贮存于 4°C 备用。使用前 1–2 h 应取出贮存的平皿。如果平板是新鲜制备的，在 37°C 温育时会“发汗”，便会致细菌克隆或噬菌体噬斑在平板表面交互扩散而增加交叉污染的机会。为了避免这一问题，可以拭去平皿内部的冷凝水。并把平皿倒置于 37°C 温育数小时方予使用，也可快速甩一下平皿盖以除去冷凝水。为尽可能减少污染的机会，除去盖上的水滴时应把开盖的平皿倒置握在手上。

3. 抗生素

抗生素溶液

抗生素	贮存液*		工作浓度	
	浓度	保存条件	严紧型质粒	松弛型质粒
氨苄青霉素	50mg/mL (溶于水)	-20°C	20μg/mL	60μg/mL
羧苄青霉素	50mg/mL (溶于水)	-20°C	20μg/mL	60μg/mL
氯霉素	34mg/mL (溶于乙醇)	-20°C	25μg/mL	170μg/mL
卡那霉素	10mg/mL (溶于水)	-20°C	10μg/mL	50μg/mL
链霉素	10mg/mL (溶于水)	-20°C	10μg/mL	50μg/mL
四环素**	5mg/mL (溶于乙醇)	-20°C	10μg/mL	50μg/mL

* 以水为溶剂的抗生素贮存液应通过 0.22μm 滤器过滤除菌。以乙醇为溶剂的抗生素溶液无须除菌处理，所有抗生素溶液均应放于不透光的容器中保存。

** 镁离子是四环素的拮抗剂，四环素抗性菌的筛选应使用不含镁盐的培养基(如

LB 培养基)。

(三) 常用缓冲液的配制

1. 常用缓冲液的 pKa 值

缓冲液	相对分子质量	pKa 值	缓冲范围
Tris (三羟甲基氨基甲烷)	121.1	8.08	7.1-8.9
HEPES (<i>N</i> -2-羟乙基哌嗪- <i>N'</i> -2-乙磺酸)	238.3	7.47	7.2-8.2
MOPS (3-(<i>N</i> -吗啉代)丙磺酸)	209.3	7.15	6.6-7.8
PIPES (<i>N,N'</i> -双(2-乙磺酸)哌嗪)	304.3	6.76	6.2-7.3
MES (2-(<i>N</i> -吗啉代)乙磺酸)	195.2	6.09	5.4-6.8

2. 各种 pH 值 Tris 缓冲液的配制

各种 pH 值 Tris 缓冲液的配制

所需 pH 值(25°C)	0.1 mol/L HCl 的体积/mL
7.10	45.7
7.20	44.7
7.30	43.4
7.40	42.0
7.50	40.3
7.60	38.5
7.70	36.6
7.80	34.5
7.90	32.0
8.00	29.2
8.10	26.2
8.20	22.9
8.30	19.9
8.40	17.2
8.50	14.7
8.60	12.4
8.70	10.3
8.80	8.5
8.90	7.0

某一特定 pH 的 0.05 mol/L Tris 缓冲液的配制: 将 50mL 0.1 mol/L Tris 碱溶液与上表所示相应体积(单位: mL)的 0.1 mol/L HCl 混合, 加水将体积调至 100mL。

3. 分子生物学中的常用缓冲液

(1) TE

pH7.4

10 mmol/L Tris.HCl (pH7.4)

1 mmol/L EDTA (pH8.0)

pH7.6

10 mmol/L Tris.HCl (pH7.6)

1 mmol/L EDTA (pH8.0)

pH8.0

10 mmol/L Tris.HCl (pH8.0)

1 mmol/L EDTA (pH8.0)

(2) STE (亦称 TEN)

0.1 mol/L 氯化钠

10 mmol/L Tris.HCl (pH8.0)

1 mmol/L EDTA (pH8.0)

(3) STET

0.1 mol/L 氯化钠

10 mmol/L Tris.HCl (pH8.0)

1 mmol/L EDTA (pH8.0)

5% Triton X-100

(4) TNT

10 mmol/L Tris.HCl (pH8.0)

150 mmol/L 氯化钠

0.05% Tween 20

4. 常用电泳缓冲液

常用电泳缓冲液

缓冲液	使用液	浓贮存液 (100mL)
Tris-乙酸(TAE)	1×: 0.04 mol/L Tris-乙酸 0.001 mol/L EDTA	50×: 242 g Tris 碱 57.1 mL 冰乙酸 100 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)
Tris-磷酸(TPE)	1×: 0.09 mol/L Tris-磷酸 0.02 mol/L EDTA	10×: 108 g Tris 碱 15.5 mL 85%磷酸 (1.679g/mL) 40 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)
Tris-硼酸(TBE)*	0.5×: 0.045 mol/L Tris-硼酸 0.001 mol/L EDTA	5×: 54 g Tris 碱 27.5 g 硼酸 20 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)
碱性缓冲液**	1×: 50 mmol/L 氢氧化钠 1 mmol/L EDTA	1×: 5 mL 10 mol/L 氢氧化钠 2 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)
Tris-甘氨酸***	1×: 25 mmol/L Tris 250 mmol/L 甘氨酸 0.1 % SDS	5×: 15.1 g Tris 碱 94 g 甘氨酸 (电泳级) (pH8.3) 50 mL 10% SDS (电泳级)

* TBE 浓溶液长时间存放后会形成沉淀物, 为避免这一问题, 可在室温下用玻璃瓶保存 5×溶液, 出现沉淀后则予以废弃。

以往都以 1×TBE 作为使用液(即 1:5 稀释浓贮存液)进行琼脂糖电泳。但 0.5×的使用液已具备足够的缓冲容量。目前几乎所有的琼脂糖凝胶电泳都以 1:10 稀释的贮存液作为使用液。

进行聚丙烯酰胺凝胶电泳使用 1×TBE, 是琼脂糖凝胶电泳时使用液浓度的 2 倍。聚丙烯酰胺凝胶垂直槽的缓冲液槽较小, 故通过缓冲液的电流量通常较大, 需要使用 1×TBE 以提供足够的缓冲容量。

** 碱性电泳缓冲液应现用现配。

*** Tris-甘氨酸缓冲液用于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

5. 常用的凝胶加样缓冲液

缓冲液类型	6×缓冲液	贮存温度/°C
(1)	0.25% 溴酚蓝 0.25% 二甲苯青 FF 40% (W/V) 蔗糖水溶液	4
(2)	0.25% 溴酚蓝 0.25% 二甲苯青 FF 15% 聚蔗糖 (Ficoll) (400 型) 水溶液	室温
(3)	0.25% 溴酚蓝 0.25% 二甲苯青 FF 30% 甘油水溶液	4
(4)	0.25% 溴酚蓝 40% (W/V) 蔗糖水溶液	4
	碱性加样缓冲液 300 mmol/L 氢氧化钠	
(5)	6 mmol/L EDTA 18% 聚蔗糖 (Ficoll) (400 型) 水溶液 0.15% 溴甲酚绿 0.25% 二甲苯青 FF	4

使用以上凝胶加样缓冲液的目的有三：增大样品密度，以确保 DNA 均匀进入样品孔内；使样品呈现颜色，从而使加样操作更为便利；含有在电场中预知速率向阳极泳动的染料。溴酚蓝在琼脂糖凝胶中移动的速率约为二甲苯青 FF 的 2.2 倍，而与琼脂糖浓度无关。以 0.5×TBE 作电泳液时，溴酚蓝在琼脂糖中的泳动速率约与长 300 bp 的双链线状 DNA 相同，而二甲苯青 FF 的泳动则与长 4 kb 的双链线状 DNA 相同。在琼脂糖浓度为 0.5%–1.4% 的范围内，这些对应关系受凝胶浓度变化的影响并不显著。

对于碱性凝胶应当使用溴甲酚绿作为示踪染料，因为在碱性 pH 条件下其显色较溴酚蓝更为鲜明。

6. 2×SDS 凝胶加样缓冲液

- 100 mmol/L Tris.HCl (pH6.8)
- 200 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT)
- 4% SDS (电泳级)
- 0.2% 溴酚蓝

20%甘油

不含二硫苏糖醇(DTT)的 $2\times$ SDS凝胶加样缓冲液可保存于室温,应在临用前取 1 mol/L 二硫苏糖醇贮存液现加于上述缓冲液中。

7. 测序凝胶加样缓冲液

98%去离子甲酰胺 0.025%二甲苯青 FF

10 mmol/L EDTA(pH8.0) 0.025%溴酚蓝

甲酰胺:许多批号的试剂甲酰胺,其纯度符合使用要求,无须再进行处理。不过,一旦略呈黄色,则应在磁力搅拌器上将甲酰胺与Dowex XG8混合床树脂共同搅拌1 h进行去离子处理;并用Whatman 1号滤纸过滤2次。去离子甲酰胺分装成小份,充氮存于 -70°C 。有的公司出售经过蒸馏并充氮包装的甲酰胺,用前不必纯化。

(六) 常见限制性内切酶酶切缓冲液

各种限制性内切酶缓冲液常配制成10倍浓缩液。

根据各酶所需的盐浓度,常配制高盐、中盐和低盐贮存液:

10 \times 低盐缓冲液:

100 mmol/L Tris.HCl(pH7.5)

100 mmol/L 氯化镁

10 mmol/L DTT

10 \times 中盐缓冲液:

0.5 mol/L 氯化钠

100 mmol/L Tris.HCl(pH7.5)

100 mmol/L 氯化镁

10 mmol/L DTT

10 \times 高盐缓冲液:

1 mol/L 氯化钠

500 mmol/L Tris.HCl(pH7.5)

100 mmol/L 氯化镁

10 mmol/L DTT

附录三 与分子生物学实验相关的实验资料

(一) 溴化乙锭溶液的净化处理

注意：溴化乙锭是强诱变剂，并有中度毒性，取用含有这一染料时务必戴手套，这些溶液经使用后应按下面介绍的方法之一进行净化处理。

1. 溴化乙锭浓溶液(即浓度 >0.5 mg/mL 的溴化乙锭溶液)的净化处理

方法 I:

用沙门氏菌-微粒体测定法表明，本法可使溴化乙锭的诱变活性降低至原来的 1/200 左右。

- (1) 加入足量的水使溴化乙锭的浓度降至 0.5 mg/mL 以下。
- (2) 在所得溶液中加入 0.2 倍体积新配制的 5% 次磷酸和 0.12 倍体积新配制的 0.5 mol/L 亚硝酸钠，小心混匀。

切记：检测该溶液的 pH 值，应 <3.0 。

市售次磷酸一般为 50% 溶液，具有腐蚀性，应小心操作，必须现用现稀释。亚硝酸钠溶液(0.5 mol/L)应用水溶解 34.5 g 亚硝酸钠，并定容至终体积 500 mL，现用现配。

- (3) 于室温温育 24 h 后，加入大大过量的 1 mol/L 碳酸氢钠。至此，该溶液可予丢弃。

方法 II:

用沙门氏菌-微粒体测定法检查，经用本方法处理后，可使溴化乙锭的诱变活性降至原来的 1/3 000 左右。但也有报道，在用净化溶液处理的“空白”样品中，偶尔有一些具有诱变活性。

- (1) 加入足量的水使溴化乙锭的浓度降至 0.5 mg/mL 以下。
- (2) 加入 1 倍体积的 0.5 mol/L 高锰酸钾，小心混匀后再加 1 倍体积的 2.5 mol/L 盐酸。小心混匀，于室温放置数小时。
- (3) 加入 1 倍体积的 2.5 mol/L 氢氧化钠，小心混匀后可丢弃该溶液。

2. 溴化乙锭稀溶液(如含有 0.5 μ g/mL 溴化乙锭的电泳缓冲液)的净化处理

方法 I:

- (1) 每 100 mL 溶液中加入 29 g Amberlite XAD-16，这是一种非离子型多聚吸附剂。
- (2) 于室温放置 12 h，不时摇动。
- (3) 用 Whatman 1 号滤纸过滤溶液，丢弃滤液。
- (4) 用塑料袋封装滤纸和 Amberlite 树脂，作为有害废物予以丢弃。

方法 II:

- (1) 每 100 mL 溶液中加入 100 mg 粉状活性炭。
- (2) 于室温放置 1 h，不时摇动。
- (3) 用 Whatman 1 号滤纸过滤溶液，丢弃滤液。
- (4) 用塑料袋封装滤纸和活性炭，作为有害废物予以丢弃。

注：

- (1) 用次氯酸(漂白剂)处理溴化乙锭溶液并不可取。用沙氏门菌-微粒体测定法检查，这样处理可使溴化乙锭的诱变活性降低至原来的 1/1 000 左右，

但溴化乙锭却转化成一种在微粒体存在的条件下具有诱变活性的化合物。

(2) 溴化乙锭在 262°C 分解，在标准条件进行焚化后不可能再有危害性。

(3) Amberlite XAD-16 或活性炭可用于净化被溴化乙锭污染的物体表面。

(二) 细菌保存

细菌可用穿刺保存法存放 2 年之久，或用冷冻保存法无限期存放。

(1) 穿刺保存 使用容量为 2-3 mL 并带有螺口旋盖和橡皮垫圈的玻璃小瓶，加入相当于约 2/3 容量的熔化 LB 琼脂，旋上盖子，但并不拧紧，在 1.034×10^5 Pa 高压下蒸汽灭菌 20 min。从高压蒸汽灭菌器中取出玻璃试管，冷却至室温后拧紧盖子。放室温保存备用。

保存细菌时，用一灭菌的接种针挑取良好的单菌落，把针穿过琼脂直达瓶底数次，盖上瓶盖并拧紧，在瓶身和瓶盖上均作好标记，室温下存放于暗处。(更加广为接受的做法是将瓶盖放松，在适当温度下培养过夜，然后拧紧瓶盖并加封 Parafilm 膜，最好于 4°C 或于室温避光保存)。

(2) 冷冻保存

1) 在液体培养基中生长的细菌培养物的保存

取 0.85 mL 细菌培养物，加入 0.15 mL 灭菌甘油(甘油应在 1.034×10^5 Pa 高压下蒸汽灭菌 20min) 振荡培养物使甘油分布均匀，然后转移至标记好的、带有螺口和空气密封圈的保存管内，在乙醇干冰或液氮中冻结后转至 -70°C 长期保存。

复苏菌种时，用灭菌的接种针刮拭冻结的培养物表面，然后立即把粘附在接种针上的细菌划于含适当抗生素的 LB 琼脂平板表面，冻干保存的菌种管重置于 -70°C，而琼脂平板于 37°C 培养过夜。

2) 在琼脂平板上生长的细菌培养物的保存

从琼脂平板表面刮下细菌放入装有 2 mL LB 的无菌试管内，再加入等量的含有 30% 灭菌甘油的 LB 培养基，振荡混合物使甘油完全分布均匀后，分装于带有螺口盖和空气密封圈的无菌试管中，按上述方法冰冻保存。