

《食品生物技术》

实验指导书

北京农学院食品科学系

张红星、徐文生编著

二〇〇六年九月

实验一 质粒 DNA 的小量制备

1. 目的

学会最常用的小量制备质粒 DNA 的碱裂解方法。

2. 原理

根据共价闭合环状质粒 DNA 与线性 DNA 在拓扑学上的差异来分离。在 pH12.0~12.5 这个狭窄的范围内，线性 DNA 双螺旋结构解开而被变性。尽管在这项的条件下共价闭合环状质粒 DNA 也会变性，但两条互补链彼此互相盘绕，仍会紧密结合在一起。当加入 pH4.8 的乙酸钾高盐缓冲液使 pH 恢复中性时，共价闭合环状质粒 DNA 复性快，而线性的染色体 DNA 复性缓慢，经过离心与蛋白质和大分子 RNA 一起沉淀下去。

3. 器材

超净工作台，接种环，酒精灯，台式离心机，旋涡混合器，微量移液取样器，1.5ml 微量离心管，恒温摇床，摇菌试管，双面微量离心管架，试管架，标签纸，磁力搅拌机。

4. 试剂

pET-his 质粒载体菌, pMD18-T-NK 载体菌, LB 培养基 1000ml (含 100ug/ml 氨苄青霉素), 葡萄糖/Tris/EDTA(GTE)溶液 (溶液 I), NaOH/SDS 溶液(溶液 II), KAc 溶液 (pH4.8) (溶液 III), RNase A, 95%乙醇, 70%乙醇, TE buffer (pH8.0)。

5. 实验准备

氨苄青霉素储存液(无菌水配制 5mg/ml, 分装后-20°C 保存), 配制 LB 培养基(胰化蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, NaCl 10g 加 200mL dd water 搅拌完全溶解, 用约 200 μ L 5N NaOH 调 pH 至 7.0, 加 dd water 至 1L, 121°C 20min 灭菌); 溶液 I (50mmol/L 葡萄糖, 25mmol/L Tris HCl pH8.0, 10mmol/L EDTA pH8.0); 溶液 II (0.2mol/L NaOH, 1% SDS); 溶液 III (60mL 5mol/L Kac, 加冰乙酸调 pH4.8, 补 dd water 至 100ml), 70%乙醇 (-20°C 保存), TE buffer (10mmol/L Tris HCl pH8.0, 1mmol/L EDTA pH8.0); 10mg /mL RNase A (RNA 酶 A 溶于 10mmol/L Tris HCl pH7.5, 15mmol/L NaCl 中); 摇菌试管洗净并盖上棉花塞、1.5ml 离心管装入铝制饭盒、移液器吸头装入相应的吸头盒, 一起高压灭菌 (121°C 30min)。

6. 操作步骤

- (1) 在超净工作台取 5ml LB (Amp⁺), 加入灭菌的摇菌管中。
- (2) 从超低温冰箱中取出保存 pET-his 载体的菌种和 pMD-18T-NK 的菌种 (操作完后迅速把菌种放回超低温冰柜中, 切不可将菌融化!), 在超净工作台上用烧红的接种环刮一下, 再把接种环于无菌 LB 培养液 (含 100ug/ml 氨苄青霉素) 中搅拌一下, 37°C 摇床中摇 20h。
pET-his 菌: 接种于 5ml LB (Amp⁺); pMD18-T 菌: 接种于 2ml LB (Amp⁺)
- (3) 取 1.5ml 的菌液于 1.5ml 离心管中, 15000rpm 离心 1min, 弃上清液 (尽量弃干净), 留沉淀备用。
pET-his 菌: 3 管 (3 \times 1.5ml); pMD18-T 菌: 1 管 (1.5ml)
- (4) 在沉淀中加入 100 μ l 溶液 I, 盖上盖后在涡旋混合器上混匀, 室温下静置 5min。(等待的同时, 取一个塑料盒, 装上适量的冰块备用。)
- (5) 加入 200 μ l 溶液 II, 盖上盖后上下颠倒几次混匀, 插入冰中, 放置 5min。
- (6) 加入 150 μ l 溶液 III, 盖上盖后上下颠倒几次混匀, 插入冰中, 放置 5min。
- (7) 15000rpm 离心 5min, 小心吸取 400 μ l 上清液于另一个干净的 1.5ml 离心管中, (不要将白色沉淀物带入!), 加入 800 μ l 95% 乙醇, 盖上盖后在涡旋混合器上混匀, 室温下静置 5min。
- (8) 15000rpm 离心 10 min, 小心弃掉上清液, 加入 500 μ l 70% 乙醇, 盖上盖后在涡旋混合器上混匀。15000rpm 离心 10 min, 小心弃掉上清液, 尽量倒置弃干净
- (9) 再加入 500 μ l 70% 乙醇, 盖上盖后在涡旋混合器上混匀。15000rpm 离心 10 min, 小心弃掉上清液, 尽量倒置弃干净
- (10) 离心管倒置于 37°C 培养箱中 (或室温) 空气干燥。(管底的沉淀质粒 DNA 用肉眼几乎看不见!)
- (11) pMD18-T 加入 30 μ l 无菌蒸馏水或 TE 缓冲液; 3 管 pET-his 质粒中每管加入 10 μ l 蒸馏

水混匀后收集到一个管中，涡旋混合器上混匀，在离心机中瞬时转一下，使溶液集中在管底。待电泳确认（见实验二）后再在 pET-his 质粒中加入 1 μ l RNase A。用记号笔标记后放入冰箱中备用。

(12) 在剩余的菌液中倒入少许 84 消毒液，待溶液变清亮后随废液和剩余的冰块一起倒入下水池。清理桌面，清洗仪器，撰写实验报告

7. 思考

- ◆ 1. 简要叙述溶液 I、溶液 II 和溶液 III 的作用，以及实验中 分别加入上述溶液后，反应体系出现的现象及其成因。
- ◆ 2. 简要叙述酚氯仿抽提 DNA 体系后出现的现象及其成因。
- ◆ 3. 沉淀 DNA 时为什么要用无水乙醇及在高盐、低温条件下进行？

实验二 质粒 DNA 电泳鉴定

1. 目的

学会常用的 DNA 琼脂糖凝胶电泳。

2. 原理

DNA 双螺旋分子骨架两侧带有含负电荷的磷酸根，在电场中会向正极方向移动。不同长度的 DNA 由于受到凝胶介质的阻力不同，表现为不同的迁移率而被分开。

3. 器材

电泳仪，水平凝胶电泳槽和梳子及其制胶模块，250ml 三角瓶，微波炉，台式离心机，旋涡混合器，凝胶成像系统，分光光度计，微量移液取样器，1.5ml 离心管，双面微量离心管架，试管架等。

4. 试剂

5. 实验准备

配制 TAE 电泳缓冲液 (50× 储存液, pH 约 8.5: Tris 碱 242g, 57.1ml 冰乙酸, 37.2g Na₂EDTA·2H₂O, dd water 定容至 1L), 1000× 溴化乙锭储存液 (0.5mg/ml: 50mg 溴化乙锭溶于 100mL dd water, 4°C 避光储存), 10× 加样缓冲液 (20% Ficoll 400, 0.1mol/L Na₂EDTA pH8.0, 1.0% SDS, 0.25% 溴酚蓝); 6× 加样缓冲液 (0.25% 溴酚蓝, 40% 蔗糖水溶液); 1.5ml 离心管装入铝制饭盒 (灭菌)、移液器吸头装入相应的吸头盒 (灭菌)。

6. 操作步骤

- (1) 称取 0.5g 琼脂糖粉，放入三角瓶，加入 50ml TAE 电泳缓冲液(1×)，放入微波炉中烧开 (1min)。50ml 正好倒两块小胶。
- (2) 注意观察烧瓶中的琼脂糖粉末，待完全熔化后停止微波炉 (切不可让胶溶液溢出到微波炉中!)。
- (3) 戴上线手套，从微波炉中取出三角瓶，置桌面上冷却致不烫手 (约 50-60°C)。
- (4) 把梳子插到凝胶灌制模具的正确位置后缓缓倒入胶溶液。胶溶液倒至与模具的矮边缘相平即可，不要把胶溶液溢到外面。在桌面上静置 10-20 分钟待胶完全凝固。(剩下的胶溶液封口后留待以后再熔化使用)。
- (5) 在水平电泳槽中加满 1×TAE 电泳缓冲液。根据电泳槽的长度把电泳仪的电压调至 170V(10V/cm)，注意正负电极的位置连接正确。
- (6) 待胶完全凝固后 (15-20 分钟)，小心拔出梳子。用手指捏住模具两侧的高边缘取出模具和凝胶放入电泳槽中间的平台，凝胶要没入电泳液中。凝胶上有样品孔的一侧要朝向电泳槽的负极。
- (7) 剪 1 片光面纸 (或封口膜)，点 6μl 蒸馏水、1μl 10× 加样缓冲液，再加入 3μl 质粒 DNA 溶液制成 10μl DNA 样品。
- (8) 在凝胶上选择相邻的加样孔。用 10μl 的吸液头分别将管中的样品加入凝胶的加样孔中 (如果需要时，在相邻的加样孔中加入 1.5-3μl DNA 分子量标准物)。加样时持移液器的手以肘部固定在桌上，用另一只手扶住这只手的手腕，以减少移液器的抖动。看到蓝色的样品吸管尖头伸进加样孔后 (不能伸得太深，以免穿破凝胶的底部) 缓缓将蓝色的样品压入加样孔中。切不可使蓝色样品流到孔外。
- (9) 打开电源开关，样品将形成一条蓝色的横带向前移动 (如果发现蓝色向后移动，立即关闭电源，调换电极)。电泳将进行约 30min。
- (10) 当蓝色的溴酚蓝迁移到距凝胶边缘 1cm 时，关闭电源。取出模具和凝胶。
- (11) 把凝胶小心反扣放入盛有 EB 的搪瓷盒中。放置约 10 分钟后，取出用自来水冲洗两次。放入凝胶成像系统中拍照。
- (12) 清理垃圾。染有 EB 的凝胶要放到专用的垃圾袋中作专门处理，以免污染环境。
- (13) 撰写实验报告。

7. 思考

- (1) 泳道中的质粒 DNA 有几条带? 为什么?
- (2) 溴酚蓝的迁移率相当于多少 bp 的 DNA?
- (3) 影响本实验结果的因素有哪些?

实验三 PCR 扩增制备目的基因

1. 目的

学会 PCR 操作的基本技术。

2. 原理

是将待扩增的DNA模板加热变性，与其两侧互补的寡聚核苷酸引物复性，然后经过耐热的DNA聚合酶延伸。再进入下一轮变性—复性—延伸的循环，n次循环后DNA可被扩增 $(1+X)^n$ 倍。其中 $<25\text{nt}$ 的引物退火温度 $T_m=2(A+T)+4(G+C)$ 。

3. 器材

旋涡混合器，微量移液取样器，移液器吸头，0.2ml PCR 微量管，双面微量离心管架，PCR 仪，台式离心机，琼脂糖凝胶电泳系统，水漂，恒温水浴。

4. 试剂

3U/ μl Taq DNA聚合酶，PCR缓冲液（10 \times ，MgCl₂ free），25mM MgCl₂，dNTP，引物，模板质粒pMD18-T-NK，无菌dd water。

5. 实验准备

dNTP 混合液（每种 25mM），TAE 电泳缓冲液，1000 \times 溴化乙锭储存液（0.5mg/ml），10 \times 加样缓冲液，1.5ml 离心管装入铝制饭盒（灭菌）、移液器吸头装入相应的吸头盒（灭菌）。

合成的引物：Sense primer 5'-GGATCCGCGCAATCTGTTCCCTTATGGC-3'
BamHI
Antisense primer 5'-GAATTCCTTGTGCAGCTGCTTGTACGTTG-3'
EcoRI

目的基因模板质粒（遗传研究室惠赠）：已经克隆在 pMD18-T 载体上的基因。

6. 操作步骤

(1) 在 0.2ml PCR 微量离心管中配制 50 μl 反应体系。（以下加样量供参考，括号内是最终需要量，实验时需参照 Taq 酶说明书计算）

dd water	32 μl
10 \times PCR buffer（不含MgCl ₂ ）	5 μl
25mM MgCl ₂	3 μl
2.5mmol/L dNTP	4 μl （每种 dNTP 终浓度 0.2mM）
10 $\mu\text{mol/L}$ Primer1	2 μl （12.5—25pmoles）
10 $\mu\text{mol/L}$ primer2	2 μl （12.5—25pmoles）
模板质粒	1 μl （1 $\times 10^{-3}$ pmoles）
3U/ μl Taq 酶	1 μl （3u）
总体积	50 μl

(2) 根据厂商的操作手册设置 PCR 仪的循环程序：

- ① 94 $^{\circ}\text{C}$ 5min
- ② 94 $^{\circ}\text{C}$ 1min
- ③ 60 $^{\circ}\text{C}$ 1min
- ④ 72 $^{\circ}\text{C}$ 1min50s
- ⑤ goto② 29 times
- ⑥ 72 $^{\circ}\text{C}$ 10min

(3) PCR 结束后，取 10 μl 产物进行琼脂糖凝胶电泳。观察胶上是否有预计的主要产物带。

(4) 清理桌面，撰写实验报告。

(5) PCR 产物可以直接与 T 载体连接（见实验五），然后转化感受态细胞（见实验八）。

7. 思考

- (1) 复性温度如何确定？
- (2) 为什么要在最后延伸 10min？
- (3) 是否有非特异性扩增产物（或引物二聚体），如何才能消除？