



# 東北大學

## 生物医学工程专业 实验报告

实验课程：\_\_\_\_\_ 分子生物学 \_\_\_\_\_

班级：\_\_\_\_\_ 生医 1502 班 \_\_\_\_\_ 姓名：\_\_\_\_\_ 尚麟静 \_\_\_\_\_

学号：\_\_\_\_\_ 20155467 \_\_\_\_\_ 同组人：\_\_\_\_\_ 柴一鑫、李东航、晏宝恩 \_\_\_\_\_

指导教师：\_\_\_\_\_ 张静淑 \_\_\_\_\_

实验成绩（教师签字）：\_\_\_\_\_

# 实验一 DNA 提取

1、样品的处理(本产品适用于处理新鲜的或已经添加抗凝剂的 0.1ml-1ml 血液样品):

a、在血液样品中加入 2-3 倍体积的红细胞裂解液,充分颠倒混匀,12000rpm 离心 1min,小心吸去上清,沉淀应为白色或淡红色,如果裂解不彻底,可重复以上步骤一次。向沉淀中加 200ul 溶液 A,振荡至彻底混匀。

红细胞裂解液是去除红细胞最简便易行的方法,即用裂解液裂解红细胞,它既不损伤有核细胞又能充分的去除红细胞。

b、如果处理的血样为禽类、鸟类、两栖类或更低级生物的血液,其红细胞为有核细胞,因此处理量为 5-20ul,不需要再用红细胞裂解液处理,直接加 200ul 溶液 A,振荡至彻底混匀。

2、向悬浮液中加入 20ul (10mg/ml) 的 RNase A,充分颠倒混匀,室温放置 10min。  
RNase A 即核糖核酸酶 A 是内切核糖核酸酶,可特异地攻击 RNA 上嘧啶残基的 3' 端,切割与相邻核苷酸形成的磷酸二酯键。反应终产物是嘧啶 3' 磷酸及末端带嘧啶 3' 磷酸的寡核苷酸。

3、加入 20ul (10mg /ml ) 的蛋白酶 K,充分颠倒混匀,65℃水浴消化 30-60min,消化期间可颠倒离心管混匀数次,直至样品消化完全为止。

蛋白酶 K 主要作用是酶解与核酸结合的组蛋白,使 DNA 游离在溶液中。

4、加入 2 倍体积溶液 B(使用前请先检查是否已加入无水乙醇),充分颠倒混匀,此时可能会出现絮状沉淀,不影响 DNA 的提取,可将溶液和絮状沉淀都加入吸附柱中,室温放置 2min。

**吸附柱用来吸附溶液中的 DNA**

5、12000rpm 离心 2min,弃废液,将吸附柱放入收集管中。

6、向吸附柱中加入 700ul 漂洗液(使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 12000rpm 离心 1min,弃废液,将吸附柱放入收集管中。

7、向吸附柱中加入 500ul 漂洗液,12000rpm 离心 1min,弃废液,将吸附柱放入收集管中。

8、12000rpm 离心 2min,将吸附柱敞口置于室温或 50℃温箱放置数分钟,目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除,否则漂洗液中的乙醇会影响后续的实验如酶切、PCR 等。

9、将吸附柱放入一个干净的离心管中,向吸附膜中央悬空滴加 50-200ul 经 65℃水浴预热的洗脱液,室温放置 5min,12000rpm 离心 1min。

10、离心所得洗脱液再加入吸附柱中,12000rpm 离心 2min,即可得到高质量的基因组

DNA。

## 实验二 琼脂糖凝胶电泳

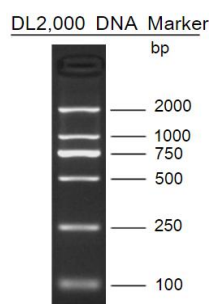
1. 1g 琼脂糖加入 100ml 1×TAE 电泳缓冲液中，摇匀。在微波炉中加热至琼脂糖完全溶解。（冷却到 60℃，加入 2 μl 的 GoldView，并摇匀。）

GoldView 是一种可代替溴化乙锭（EB）的新型核酸染料，采用琼脂糖电泳检测 DNA 时，GoldView 与核酸结合后能产生很强的荧光信号，其灵敏度与 EB 相当，使用方法与之完全相同。在紫外透射光下双链 DNA 呈现绿色荧光。

2. 制胶板两端封好，插入适当梳子，将溶解的琼脂糖（约 50℃）倒入，室温冷却凝固。
3. 充分凝固后，将凝胶置入电泳槽中，加 1×TAE 电泳缓冲液至液面覆盖凝胶 1-2mm，小心垂直向上拔出梳子
4. 用移液器吸取 DNA 样本 5ul 于封口膜上，再加入 2ul 的 6X loading buffer，混匀后，小心加入点样孔

loading buffer 的功能主要有两个。第一，里边的指示剂溴酚蓝和二甲苯氰 FF 起到指示的作用，显示电泳的进程，以便我们适时终止电泳；第二，里边的成分甘油可以加大样品密度，使样品密度大于 TAE，从而沉降到点样孔中，防止样品飘出点样孔。

5. 取 5ul DL2000 Marker 加入点样孔，电泳得到清晰条带作为序列长度的标记。其对应的序列长度如图：



6. 打开电源开关，调节电压至 10V，可见到溴酚蓝条带由负极向正极移动，电泳约 30min-60min

将凝胶置于紫外透射检测仪上，盖上防护观察罩，打开紫外灯，可见到发出荧光的 DNA 条带

## 实验三 PCR 引物设计

确定扩增的目的基因为 GAPDH 基因。

1. 登录 Ensembl 查找 GAPDH 基因片段序列：

GRCh37 BLAST/BLAT | VEP | Tools | BioMart | Downloads | Help & Docs | Blog

Human (GRCh37.p13) ▼

Location: 12:6,643,083-6,647,537 Gene: GAPDH

**Gene: GAPDH** ENSG00000111640

**Description** glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Source:HGNC Symbol;Acc:41414]

**Gene Synonyms** G3PD, GAPD

**Location** Chromosome 12: 6,643,083-6,647,537 forward strand.  
GRCh37:CM000674.1

**About this gene** This gene has 10 transcripts (splice variants), 87 orthologues, 1 paralogue and is a member of 1 Ensembl protein family.

**Transcripts** [Show transcript table](#)

**Marked-up sequence**

[Download sequence](#) [BLAST this sequence](#)

Exons GAPDH exons All exons in this region

Markup loaded

```
>chromosome:GRCh37:12:6642493:6648137:1
CTCCCATCCCACTCACAACCTGGCCCTCTGCGCTCTACCAAGAAGTGGATCCCT
GTGGAGGGGAGGGGACCTGTTCCACCTGTGCCCAAGACCTCTTTCCACTTTT
CCCTCTTTGACTACCTTGGCTCATATGCCCCGCGCGGAGGAGGAGAGCTCC
CTGGCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CTCTTGGCCAGGCTGGATGGAATGAAGGACACCTGCTCTCTCCCTAGGAGCAG
CCACAGGTTTCCAGGAGTCCCTTTGTGGAGGCTCTGGGCCCCACAGGCTCTGT
CCCTGCTGGGCTGGAGCCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
GGGCTAATATCAGGCTCAGGCTCAGGCTCAGGCTCAGGCTCAGGCTCAGGCTCAG
GCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
AGTCCCTAGTCCCTAGTCCCTAGTCCCTAGTCCCTAGTCCCTAGTCCCTAGTCCCT
GGGGAAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGT
TAGGCTTTGCTGAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
ACTTTCCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
GGGAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
TTTATGCAAGGCTGTAAGGCTGTAAGGCTGTAAGGCTGTAAGGCTGTAAGGCTGTA
CGGCTGCTGGAACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
TACGTGGGGGACAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
AAAGGGGAGAAAGTAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CTAAGGCTTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTG
TCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
```

2. 选取一个基因片段，要注意包含这一段全部的编码区序列：

TGTCGCAGAGGAGCCCCCTCCCCACGGCCTCCGGCACCGCAGGCCCCGGGATGCTAGTGC

GCAGCGGGTGTCATCCCTGTCCGGATGCTGCGCCTGCGGTAGAGCGGCCGCCATGT **TGCAA**

**CCGGGAAGGAAATGAATGGGCAGCCGTTAGGAAAGCCTGCCGGTGACTAACCCTGCGCTC**

**CTGCCTCGATGGGTGGAGTCGCGTGTGGCGGGGAAGTCAGGTGGAGCGAGGCTAGCTGGC**

**CCGATTTCTCTCCGGGTGATGCTTTTCCTAGATTATTCTCTG** GTAAATCAAAGAAGTGG

GTTTATGGAGGTCTCTTGTGTCCCCCTCCCCGCAGAGGTGTGGTGGCTGTGGCATGGTGC

CAAGCCGGGAGAAGCTGAGTCATGGGTAGTTGGAAAAGGACATTTCCACCGCAAAATGGC

这段序列长度为 420bp，其中编码区为 116-283bp。

3. 通过 NCBI 网站的 PCR 引物设计功能得到引物并进行选择：

NIH

U.S. National Library of Medicine

NCBI National Center for Biotechnology Information

Sign in to NCBI

Primer-BLAST >> JOB ID:MDrvs4Pljk2pdx5yExI6QGkJK3JEGjBvRQ

Primer-BLAST Results

Input PCR template  
Range  
Specificity of primers  
Other reports

1 - 420  
Primer pairs are specific to input template as no other targets were found in selected database: RefSeq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)  
[Search Summary](#)

Graphical view of primer pairs

Detailed primer reports

Primer pair 1		Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer		CAGGCCCGGGATGCTA	Plus	17	40	56	60.86	70.59	6.00	2.00
Reverse primer		CCAACATCCCATGACTCAGCTT	Minus	22	393	372	60.03	50.00	5.00	2.00
Product length		354								

Primer pair 2		Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer		ATCCCTGTCCGGATGCT	Plus	17	72	88	57.07	58.82	6.00	0.00
Reverse primer		GGACCTCCATAAACCCTTC	Minus	21	314	294	58.00	52.38	4.00	0.00
Product length		243								

通过比较引物的 Tm 和 GC%，选择引物 2 作为 PCR 的引物。

Primer pair 2

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop
Forward primer	ATCCCTGTCCGGATGCT	Plus	17	72	88
Reverse primer	GGACCTCCATAAACCCTTC	Minus	21	314	294
Product length	243				

4. 进行引物的特异性检测，将引物在全基因组中进行查询。
- 查看引物对于全基因组中是否会对其他片段起作用，是否会干扰所选片段的剪切

NIH

U.S. National Library of Medicine

NCBI National Center for Biotechnology Information

Sign in to NCBI

Primer-BLAST >> JOB ID:YGq\_wRGpHAETPwY6CIoiCHFBMzpcUignXQ

Primer-BLAST Results

Input PCR template  
Specificity of primers  
Other reports

none  
Target templates were found in selected database: Genome database (reference assembly only) for selected species (Organism limited to Homo sapiens)  
[Search Summary](#)

Detailed primer reports

Primer pair 1		Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer		ATCCCTGTCCGGATGCT	17	57.07	58.82	6.00	0.00
Reverse primer		GGACCTCCATAAACCCTTC	21	58.00	52.38	4.00	0.00

Products on target templates

>NC\_000012.12 Homo sapiens chromosome 12, GRCh38 p12 Primary Assembly

product length = 246

Features associated with this product:

elcvsoraldehyde3-phosphate dehydrogenase isoform 1

elcvsoraldehyde3-phosphate dehydrogenase isoform 1

Forward primer 1 ATCCCTGTCCGGATGCT 17

Template 6535258 ..... 6535274

Reverse primer 1 GGACCTCCATAAACCCTTC 21

Template 6535500 ..... 6535480

>NC\_000016.10 Homo sapiens chromosome 16, GRCh38 p12 Primary Assembly

product length = 3393

Features flanking this product:

1432 bp at 5' side: adhesion G protein-coupled receptor G3 isoform 2

4768 bp at 3' side: rhodopsin regulatory complex subunit 7 isoform 1

Forward primer 1 ATCCCTGTCCGGATGCT 17

Template 5769599 C...G..... 5769595

Reverse primer 1 GGACCTCCATAAACCCTTC 21

Template 5769361 TAA.....C... 5769361

**Primer-BLAST** >> JOB ID:YGq\_wRGpHAE7PwY6C1oiCHFBMzpcUignXQ

Primer-B

Input PCR template  
Specificity of primers  
Other reports

none  
Target templates were found in selected database: Genome database (reference)  
[▶ Search Summary](#)

## Detailed primer reports

### Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length
Forward primer	ATCCCTGTCCGGATGCT	17
Reverse primer	GGACCTCCATAAACCCACTTC	21

#### Products on target templates

>[NC\\_000012.12](#) Homo sapiens chromosome 12, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 243

Features associated with this product:

[glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform 1](#)

[glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform 1](#)

Forward primer 1 ATCCCTGTCCGGATGCT 17  
Template 6535258 ..... 6535274

Reverse primer 1 GGACCTCCATAAACCCACTTC 21  
Template 6535500 ..... 6535480

>[NC\\_000016.10](#) Homo sapiens chromosome 16, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 3283

Features flanking this product:

[1439 bp at 5' side: adhesion G protein-coupled receptor G3 isoform 2](#)

[4768 bp at 3' side: dynein regulatory complex subunit 7 isoform a](#)

Forward primer 1 ATCCCTGTCCGGATGCT 17  
Template 57689899 C...C..... 57689915

Reverse primer 1 GGACCTCCATAAACCCACTTC 21  
Template 57693181 TA.A.....C.. 57693161

有两个扩增产物，其中一个为要扩增的产物 243bp 的 GAPDH 基因，另一个长度 3283bp，相差较大，不会对产物造成影响，该引物符合要求。

## 实验四 PCR 扩增

### 1. 配置 50ul PCR 反应体系：

提取的 DNA 5ul、引物 1 2ul、引物 2 2ul、2xMasterMix 25ul、ddH2O 16ul



## 2. 设置 PCR 反应循环

94℃	3min	}	30 cycles
94℃	30sec		
55℃	30sec		
72℃	500-2000bp/1min		
72℃	5min		
4℃	30min (低温保存)		

## 3. 结果检测：反应结束后，取 5ul 反应产物，琼脂糖凝胶电泳检测。

