

班级：少年班 2308

姓名：王博想

日期：4 月 13 日

质粒 DNA 的提取及其定量分析与酶切

一、实验目的

- 从大肠杆菌中分离质粒 DNA，并对其浓度进行测定
 - 熟悉碱裂解法提取质粒 DNA 的原理与操作流程
 - 掌握紫外分光光度法测定核酸浓度及纯度的方法
 - 对实验五中获得的质粒 DNA 进行单一限制性酶切并通过电泳鉴定
 - 熟练掌握 DNA 酶切的原理及实验技术
-

二、实验原理

载体 (Vector) 及其类型

- **定义：**能将目标基因导入宿主细胞中进行复制和表达的工具
- **常见载体类型：**
 - 大肠杆菌质粒
 - 噬菌体
 - 酵母人工染色体
 - 动植物病毒
- **载体应具备的基本特性：**
 1. 在宿主细胞内稳定存在且具有一定拷贝数，对宿主无害
 2. 含有多克隆位点，便于不同限制性内切酶识别位点的插入
 3. 具有复制起始点，保证独立复制，避免重组 DNA 丢失
 4. 携带筛选标记基因（如氨苄青霉素抗性、四环素抗性 or LacZ）

5. (表达载体) 需含有启动子、核糖体结合位点和终止子等表达元件

质粒 DNA 提取方法

- 传统碱裂解法
- 碱裂解法结合硅胶/柱式离心纯化
- 酚-氯仿抽提法
- 硅胶柱法或磁珠法

紫外分光光度法测定核酸浓度与纯度

- 朗伯-比尔定律:

$$A = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \lg\left(\frac{1}{T}\right) = K \cdot C \cdot L$$

- A : 吸光度
- T : 透光率
- K : 摩尔吸收系数
- C : 吸光物质的浓度
- L : 溶液厚度

通过测定不同波长下的吸光度值, 来测定核酸的纯度。

- 纯度判断:
 - 230nm: 检测胍盐、苯氧基离子等杂质
 - 260/280nm: 蛋白质污染指标 (理想范围 1.7 ~ 2.0)
 - 260/230nm: 核酸纯度指标 (应 > 2.0)
 - 320nm: 检测溶液浑浊度

在各种 Universal Buffer 中的相对活性: *Bam*H I

| Universal Buffer | L | M | H | K | T (+BSA) |
|------------------|------|------|----|-----|----------|
| 相对活性(%) | (40) | (60) | 80 | 100 | 60 |

在各种 Universal Buffer 中的相对活性: *Hind* III

| Universal Buffer | L | M | H | K | T (+BSA) |
|------------------|------|-----|------|----|----------|
| 相对活性(%) | (60) | 100 | < 10 | 40 | (100) |

三、实验步骤

3.1 质粒提取（柱式离心法）

1. 柱平衡步骤：向吸附柱 CP3 中（吸附柱放入收集管中）加入 500 μ L 的平衡液 BL，12,000rpm (\sim 13,400xg) 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附重新放回收集管中。（请使用当天处理过的柱子）
2. 取 1 \sim 5mL 过夜培养的菌液加入离心管中，使用常规台式离心机，12,000rpm (\sim 13,400xg) 离心 1 分钟，尽量吸除上清（菌液较多时可以通过多次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中）。
3. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 250 μ L 溶液 P1（请先检查是否已加入 RNaseA），使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。

注意：如果有未彻底混匀的菌块，会影响裂解，导致提取量和纯度偏低。

4. 向离心管中加入 250 μ L 溶液 P2，温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解

注意：温和地混合，不要剧烈震荡，以免打断基因组 DNA，造成提取的质粒中混有基因组 DNA 片断。此时菌液应变得清亮粘稠，所用时间不应超过 5 分钟，以免质粒受到破坏。如果未变得清亮，可能由于菌体过多，裂解不彻底，应减少菌体量。

5. 向离心管中加入 350 μ L 溶液 P3，立即温和地上下翻转 6-8 次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀。12,000rpm (\sim 13,400xg) 离心 10 分钟，此时在离心管底部形成沉淀。注意：P3 加入后应立即混合，避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀，可再次离心后取上清。
6. 将上一步收集的上清液用移液器转移到吸附柱 CP3 中（吸附柱放入收集管中），注意尽量不要吸出沉淀。12,000rpm (\sim 13,400xg) 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP3 放入收集管中。
7. 可选步骤：向吸附柱 CP3 中加入 500 μ L 去蛋白液 PD，12,000rpm (\sim 13,400xg) 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP3 重新放回收集管中。如果宿主菌是 endA 宿主菌（TG1, BL21, HB101, JM 系列, ET12567 等），这些宿主菌含有大量的核酸酶，易降解质粒 DNA，推荐采用此步如果宿主菌是 endA 宿主菌（DH5a, TOP10 等），这步可省略。
8. 向吸附柱 CP3 中加入 600 μ L 漂洗液 PW（请先检查是否已加入无水乙醇），12,000rpm (\sim 13,400xg) 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CP3 放入收集管中。
9. 重复操作步骤 8。
10. 将吸附柱 CP3 放入收集管中，12,000rpm (\sim 13,400xg) 离心 2 分钟，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。

注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR 等）实验。为确保下游实验不受残留乙醇的影响，建议将吸附柱 CP3 开盖，置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

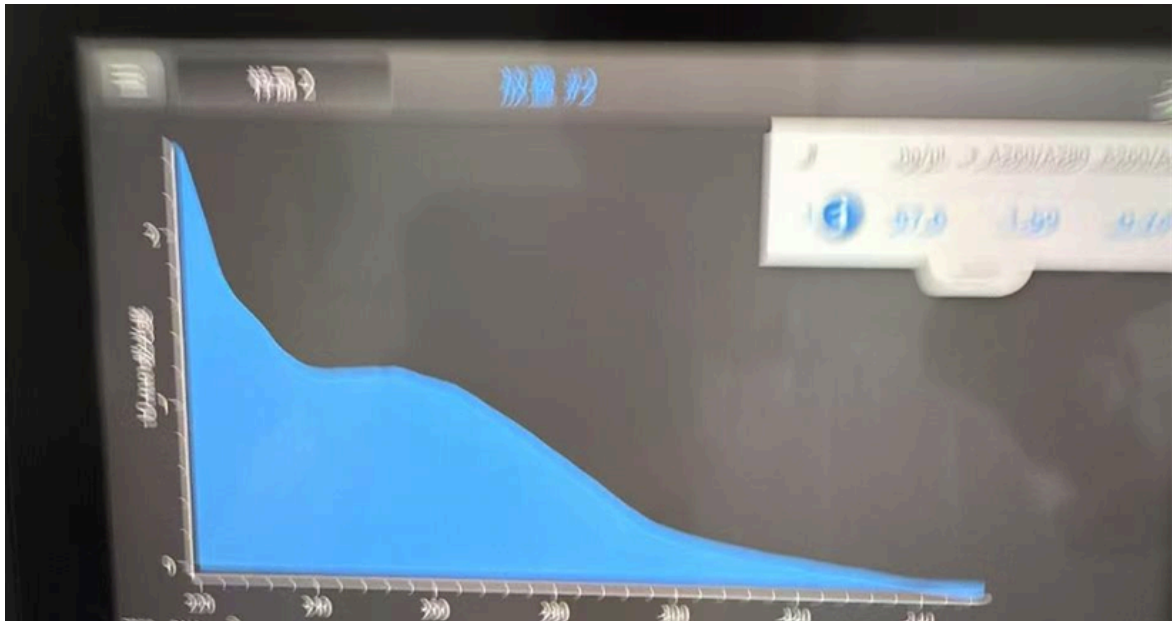
11. 将吸附柱 CP3 置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位滴加 50 \sim 100 μ L 洗脱缓冲液 EB，室温放置 2 分钟，12,000rpm 离心两分钟将质粒溶液收集到离心管中

注意：洗脱缓冲液体积不应少于 50 μ L，体积过小影响回收效率。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。若后续做测序，需使用去离子水做洗脱液，并保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内（可以用 NaOH 将水的 pH 值调到此范围），pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率。且 DNA 产物应保存在 -20 $^{\circ}$ C，以防 DNA 降解。为了增加质粒的回收率，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 分钟，12,000rpm (\sim 13,400xg) 离心 2 分钟，将质粒溶液收集到离心管中。

➤ 每组取1个200ul PCR管，管盖和管壁做好标记，按下表配制酶切体系：

| 单酶切体系（20 μ l） | |
|--|---------------------------------|
| <i>Hind</i> III 或 <i>Bam</i>H I | 1 μ l |
| 10\timesK Buffer (<i>Bam</i>H I) 或 10\timesM Buffer (<i>Hind</i> III) | 2 μ l |
| 质粒DNA (\leq1μg) | 6 μ l (也可根据自己的质粒浓度计算体积) |
| 灭菌水 | 11 μ l (up to 20 μ l) |
| PCR仪，37$^{\circ}$C，1h | |

四、结果分析



- 浓度：67.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- $A_{260}/A_{280} = 1.89$ （蛋白质污染较少）
- $A_{260}/A_{230} = 0.74$ （核酸纯度偏低）

原因分析：

- 移液枪未及时更换枪头，可能导致试剂交叉污染
- 菌体未完全裂解，影响提取效率与纯度
- 酶切情况：单酶切基本完全，条带与预期一致

聚合酶链式反应及琼脂糖凝胶电泳

一、实验目的

- 应用 PCR 技术扩增目标基因
- 掌握 PCR 原理与操作流程
- 熟悉琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 的方法

二、实验原理

PCR 反应组成

- **模板 DNA**：基因组或质粒 DNA
- **引物**：互补于模板序列的寡核苷酸，能与模板互补的单链寡核苷酸序列，包含上下游 2 条
- **dNTPs**：四种脱氧核苷三磷酸，合成目的 DNA 片段的原料
- **DNA 聚合酶**：催化目的 DNA 片段合成
- **反应缓冲液**：提供适宜反应条件，如 Mg^{2+} 保证酶的活性和反应特异性，Tris-HCl 提供合适的 pH

PCR 三步循环

1. **变性**：94°C，双链 DNA 解链
2. **退火**： $T_m - 5^{\circ}C \sim T_m$ 温度，根据引物 T_m 以 2°C 梯度优化

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$$

3. **延伸**：72°C，DNA 聚合酶合成新链

电泳技术

1. 电泳 (electrophoresis)：带电颗粒在电场作用下，向着与其电性相反的电极移动
2. 电泳技术：利用带电粒子在电场中移动速度不同而达到分离的技术
3. 电泳泳动率：电泳泳动率与样品分子电荷密度、电泳电压成正比，与样品分子量成反比
4. 核酸电泳：核酸为两性分子，中性环境下磷酸基团解离，核酸带负电；DNA 分子电荷密度相似，泳动率只与分子量成反比，可近似估算分子量大小

琼脂糖凝胶电泳

1. 琼脂糖是线性的多聚物，基本结构： β D-半乳糖和 3,6-内醚-L-半乳糖交替连接成长链
2. 溶解之后再形成的琼脂糖凝胶，形成多孔的网状结构，凝胶孔径的大小决定于琼脂糖的浓度
3. DNA 分子带负电，由负极向正极移动

4. DNA 分子的泳动速度与其分子量的对数成反比

琼脂糖凝胶浓度：

1. 不同浓度的琼脂糖凝胶适合分离不同大小的 DNA 片段
2. 琼脂糖凝胶浓度越高，适合分离的 DNA 片段越小

三、实验步骤

1. 取PCR管1个，做好标记，按顺序加入表中PCR反应体系各组分，混匀。将管壁液滴甩至管底，放入PCR仪。

| 名 称 | 反应体系 | 加样顺序 |
|---|--------------------|------|
| 模板 (λ DNA 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) | 1 μl | ③ |
| P1 (20 μM) | 1 μl | ④ |
| P3 (20 μM) | 1 μl | ⑤ |
| dNTP Mixture (2.5mM) | 8 μl | ⑥ |
| Taq 酶 (5U/ μl) | 0.5 μl | ⑦ |
| 5 \times PCR Buffer (Mg^{2+} plus) | 10 μl | ② |
| 灭菌水 | 28.5 μl | ① |
| Total | 50 μl | |

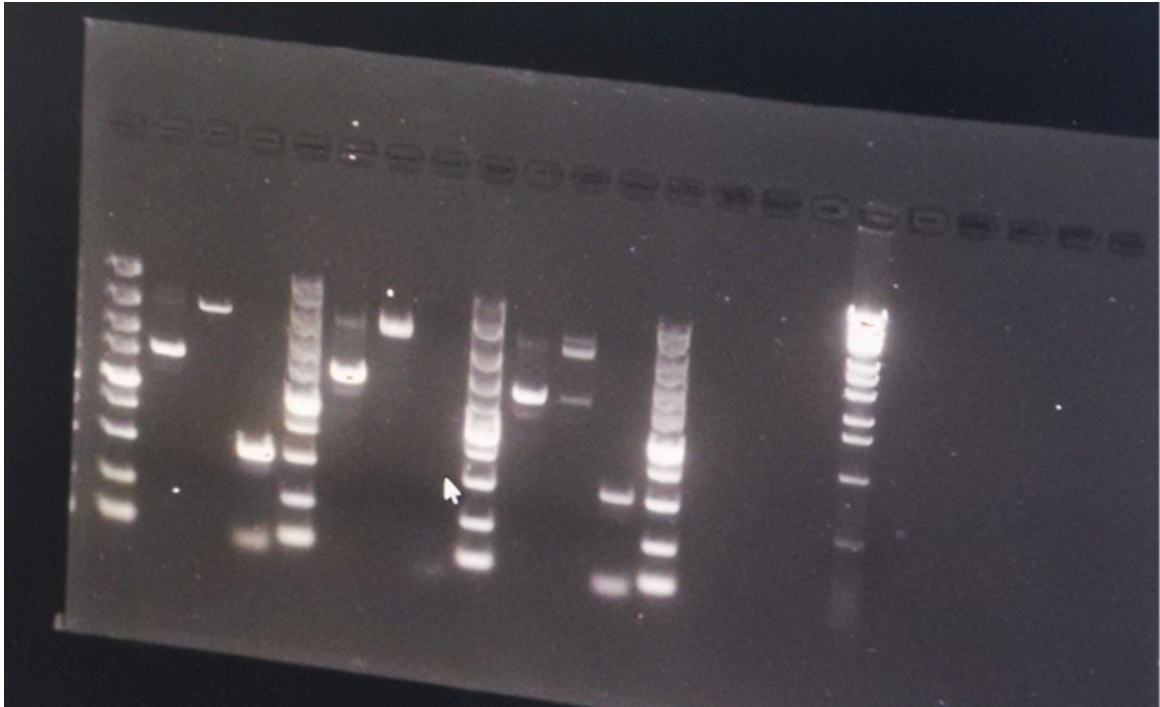
2. 按下表设置PCR反应程序，进行DNA的扩增。

| | | | |
|-----|-----------------------|----------|-------|
| 预变性 | 94 $^{\circ}\text{C}$ | 3分钟 | |
| 变性 | 94 $^{\circ}\text{C}$ | 30秒 | 25个循环 |
| 退火 | 55 $^{\circ}\text{C}$ | 30秒 | |
| 延伸 | 72 $^{\circ}\text{C}$ | 30秒 | |
| 延伸 | 72 $^{\circ}\text{C}$ | 2分钟 | |
| 保温 | 4 $^{\circ}\text{C}$ | ∞ | |

琼脂糖凝胶制备：

1. 相邻 4 个小组的 8 位同学共同配制 1 块凝胶，使用一套电泳设备。
 2. 胶槽安装：胶板放入胶槽中，插入 18 孔的梳子。
 3. 凝胶液的制备（1%）：称取 0.8g 琼脂糖，置于 200mL 三角烧瓶中，加入 80mL 1×TAE。
 4. 铝箔封口扎小洞防止蒸发，放入微波炉加热至琼脂糖全部熔化。冷却至 50 ~ 60°C 时加入 8 μ L Gel Red 混匀（全程戴好手套）。
 5. 制胶：将胶液倒入胶槽中（80mL/胶槽），待完全凝固后拔出梳子。
 6. 上样准备：电泳观察与拍照取几个 EP 管，做好标记质粒 DNA、酶切产物：各取 15 μ L，加 3 μ L 6×loading buffer 混匀，各 18 μ L PCR 产物取 10 μ L，加 2 μ L 10×loading buffer 混匀，共 12 μ L。
 7. 上样：Marker：5 μ L；每组3个样品：1 个质粒 DNA，1 个酶切产物，1 个 PCR 产物。
 8. 电泳：160V, 30 ~ 40min。
 9. 观察：在凝胶成像仪中观察 DNA 电泳条带并拍照，将照片拷走分析。
-

四、结果分析



- 扩增片段: 850 bp
- 25 次循环之后理论值为 2^{25} 个
- 电泳结果:
 1. Marker 对照清晰可见。左侧和右侧的通道中可见典型的 DL5000 Marker 条带。可用于估算其他条带的大小。
 2. 样品条带表现（中间多个通道）：大多数通道都显示出多个清晰条带，尤其是靠左的几条，呈现出典型的“酶切图谱”。每个通道中多条带说明模板 DNA 可能被一个或多个限制酶切割成多个片段。这些条带在 500bp 到 5000bp 之间分布，符合 λ DNA 被限制性酶（如 EcoRI, HindIII, BamHI 等）切割后的电泳图谱。