

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、四环素抗性或 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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  $-20^{\circ}\text{C}$ ，以防 DNA 降解。为

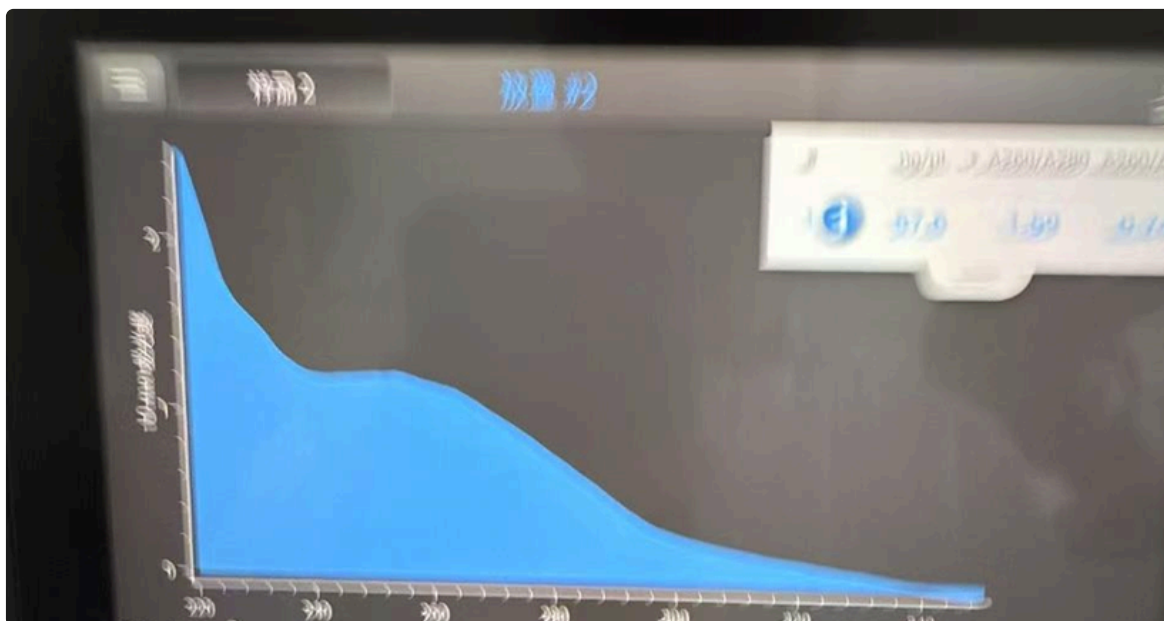
了增加质粒的回收率，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，室温放置 2 分钟，12,000rpm ( $\sim 13,400g$ ) 离心 2 分钟，将质粒溶液收集到离心管中。

➤ 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 $\mu$ l )	
<b><i>Hind</i> III 或 <i>Bam</i>HI</b>	1 $\mu$ l
<b>10<math>\times</math>K Buffer ( <i>Bam</i>HI ) 或 10<math>\times</math>M Buffer ( <i>Hind</i> III )</b>	2 $\mu$ l
<b>质粒DNA ( <math>\leq 1\mu</math>g )</b>	6 $\mu$ l (也可根据自己的质粒浓度计算体积)
<b>灭菌水</b>	11 $\mu$ l ( up to 20 $\mu$ l )
<b>PCR仪 , 37<math>^{\circ}</math>C , 1h</b>	



## 四、结果分析



- 浓度：67.6  $\mu$ g/ $\mu$ 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： $T_m - 5^{\circ}\text{C} \sim T_m$  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： $\beta$  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 ( $\lambda$ DNA 1 $\mu$ g/ml )	1 $\mu$ l	③
P1 ( 20 $\mu$ M )	1 $\mu$ l	④
P3 ( 20 $\mu$ M )	1 $\mu$ l	⑤
dNTP Mixture ( 2.5mM )	8 $\mu$ l	⑥
Taq 酶 ( 5U/ $\mu$ l )	0.5 $\mu$ l	⑦
5 $\times$ PCR Buffer ( Mg <sup>2+</sup> plus )	10 $\mu$ l	②
灭菌水	28.5 $\mu$ l	①
Total	50 $\mu$ l	

2. 按下表设置PCR反应程序，进行DNA的扩增。

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

琼脂糖凝胶制备：

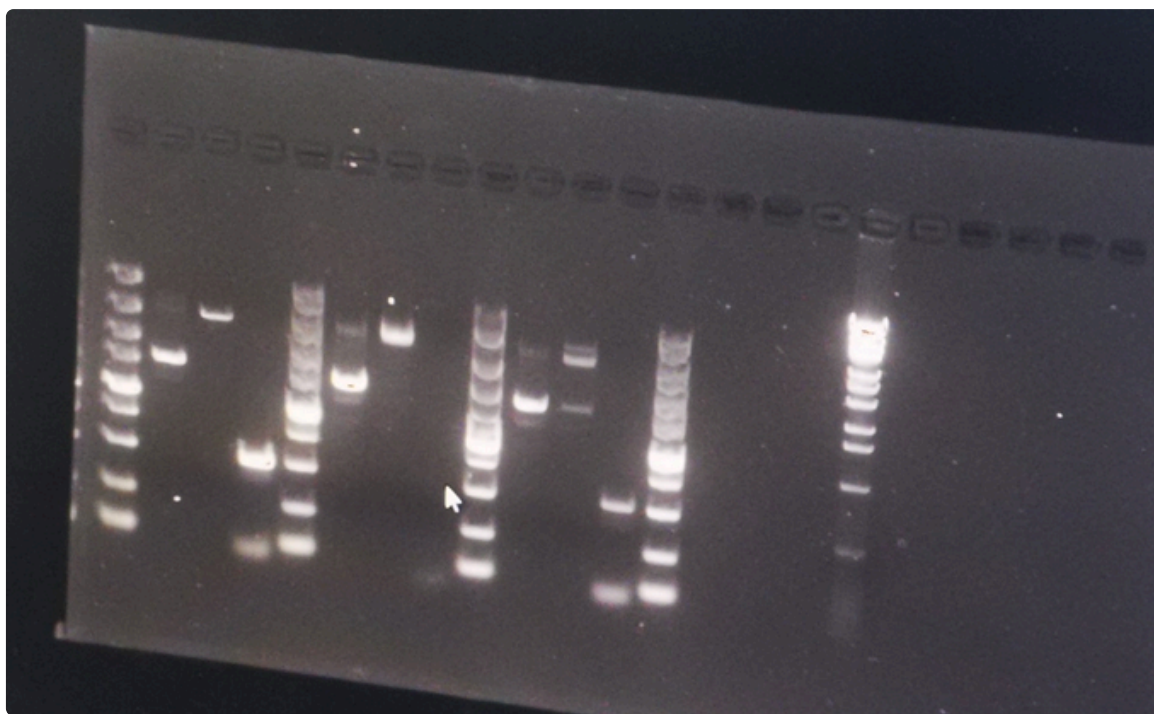
1. 相邻 4 个小组的 8 位同学共同配制 1 块凝胶，使用一套电泳设备。
2. 胶槽安装：胶板放入胶槽中，插入 18 孔的梳子。
3. 凝胶液的制备（1%）：称取 0.8g 琼脂糖，置于 200mL 三角烧瓶中，加入 80mL 1 $\times$  TAE。
4. 铝箔封口扎小洞防止蒸发，放入微波炉加热至琼脂糖全部熔化。冷却至 50 ~ 60 $^{\circ}$ C 时加入 8 $\mu$ L Gel Red 混匀（全程戴好手套）。
5. 制胶：将胶液倒入胶槽中（80mL/胶槽），待完全凝固后拔出梳子。



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  $15\mu\text{L}$ ，加  $3\mu\text{L}$   $6\times$ loading buffer 混匀，各  $18\mu\text{L}$  PCR 产物取  $10\mu\text{L}$ ，加  $2\mu\text{L}$   $10\times$  loading buffer 混匀，共  $12\mu\text{L}$ 。
7. 上样：Marker： $5\mu\text{L}$ ；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：850bp
- 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  $\lambda$ DNA 被限制性酶（如 EcoRI, HindIII, BamHI 等）切割后的电泳图谱。