



农科专业基础实验教学中心

《分子生物学大实验》

云南农业大学农科专业基础实验教学中心版权所有

实验一

大肠杆菌感受态细胞的制备

云南农业大学农科中心版权所有

一、实验目的

通过本实验，掌握大肠杆菌感受态细胞的制备方法。

二、实验原理

大肠杆菌经低温（零摄氏度）、及低渗溶液 CaCl_2 （氯化钙）的处理之后，菌体细胞膨胀成球形，细胞膜的通透性增加，处于极易吸收外源DNA的状态，此种生理状态的细胞称为感受态细胞（Competent Cells）。

三、实验材料

E. coli DH5 α 菌种



<http://baike.baidu.com/view/29729.htm>

四、器材及试剂

1. 器材 超净工作台、高压灭菌锅、低温离心机、恒温摇床、恒温培养箱、- 80 °C 冰箱、制冰机、微量移液器、50ml 离心管、吸头、试管、培养皿、锥形瓶等 。
2. 试剂 LB液体培养基（英文缩写LB）、10mM $MgCl_2$ 溶液、50 mM $CaCl_2$ 溶液、30%丙三醇

五、实验步骤

- 1) 从大肠杆菌DH5 α 平板上挑取一个单菌落接种于含2ml LB液体培养基的离心管中，37 $^{\circ}$ C以250rpm震荡培养过夜；
- 2) 取0.5ml过夜培养物转接到一个含有50ml LB液体培养基的锥形瓶中，37 $^{\circ}$ C以250rpm震荡培养2-3小时，直至OD₆₀₀值为0.5-0.6之间。
- 3) 将菌液转移置50ml离心管中，4 $^{\circ}$ C，4000rpm离心10min；
- 4) 丢弃上清液，用1/2体积冰冷的10mM的MgCl₂溶液悬浮沉淀，4 $^{\circ}$ C，4000rpm离心10min；
- 5) 丢弃上清液，用1/2体积冰冷的50 mM CaCl₂溶液悬浮沉淀，立即在冰上放置30min；
- 6) 4 $^{\circ}$ C，4000rpm离心10min，丢弃上清液，用0.04体积冰冷的50 mM CaCl₂溶液和30%丙三醇悬浮沉淀，立即在冰上放置60min；
- 7) 分装细胞悬液，每管100 μ l，然后用液氮快速冷冻，-80 $^{\circ}$ C保存备用。

六、思考题

- 1、基因克隆中为什么常采用*Ecoli*DH5 α 作为受体菌？
- 2、什么是感受态细胞，有哪些方法能使细胞处于感受态？

云南农业大学农科中心版权所有

实验二

质粒DNA的提取

云南农业大学农科中心版权所有

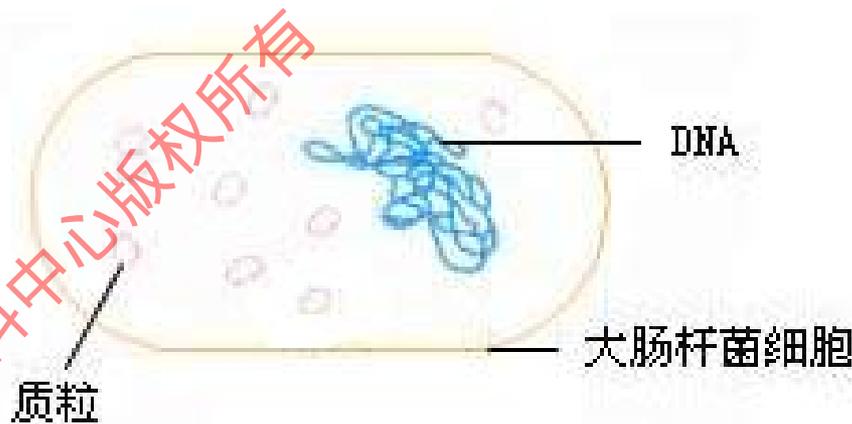
一、实验目的

学习和掌握碱裂解法提取质粒DNA的实验操作和方法。

二、实验原理

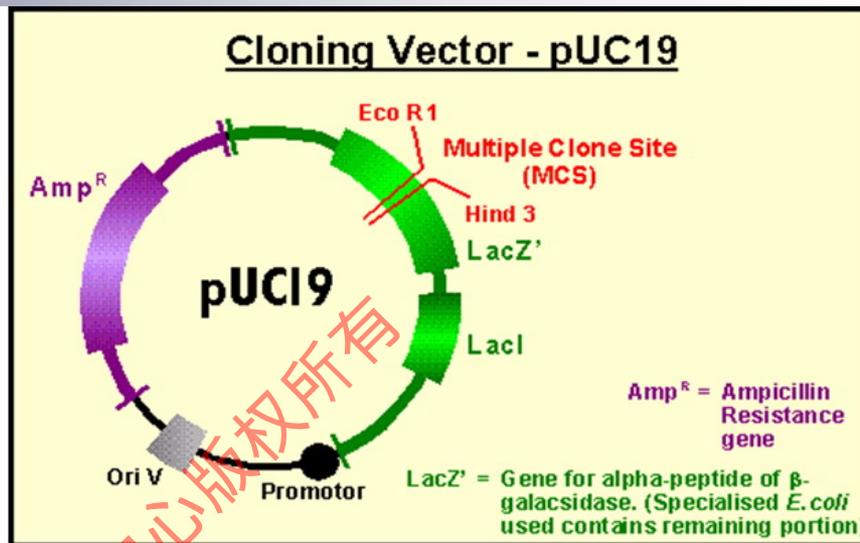
依据质粒DNA与染色体DNA在拓扑学上的不同，即质粒为共价闭合环状DNA、染色体为线状的DNA，使用碱裂解的方法

(pH为12.0~12.5)，使其变性，再经复性，利用它们在变性之后复性存在快慢、准确上的差异，达到分离提取质粒DNA的目的。

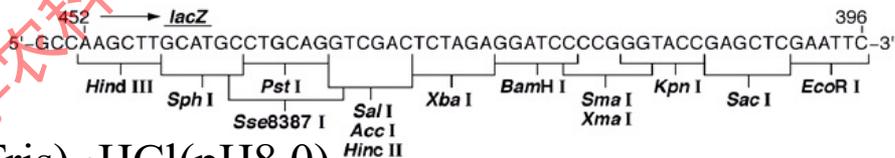


三、实验材料

含PUC19质粒的大肠杆菌



pUC19 多克隆位点 (Multiple Clone Site) 图谱



四、器材及试剂

1.器材 恒温培养箱、恒温摇床、高速台式离心机、制冰机、微量移液器等。

2.试剂 溶液I 组成:

- 50mmol / L 葡萄糖
- 25mmol / L 三羟甲基氨基甲烷(Tris) ·HCl(pH8.0)
- 10 mmol / L 乙二胺四乙酸(EDTA)(pH8.0)

溶液II 组成:

- 0.4mol / L NaOH
- 2% SDS

溶液III 组成:

- 5mol / L 醋酸钾 60 mL
- 冰乙酸 11.5mL
- 去离子水 28.5mL

含氨苄青霉素的LB液体培养基、氯仿/异戊醇(体积比为24:1)、无水乙醇、70%乙醇 TE缓冲液 组成:

- 10 mmol / L (Tris) ·HCl(pH8.0)
- 1 mmol / L EDTA (pH8.0)

五、实验步骤

- 1) 将含pUC19质粒的大肠杆菌接入2ml含氨苄青霉素的LB液体培养中，37°C、250rpm振荡培养过夜；
- 2) 取1.5ml培养物转移至Eppendorf管中，以12,000rpm离心1min；
- 3) 弃上清液，使细胞沉淀尽可能干燥，加入100μl溶液I，悬浮沉淀；
- 4) 加200μl溶液II（新配制），缓慢颠倒混匀，冰浴静置5 min；
- 5) 加150μl溶液III（冰冷），缓慢颠倒混匀，冰浴静置5 min；
- 6) 12,000rpm离心5min，转移上清液至另一离心管中；
- 7) 加入等体积的氯仿-异戊醇（24: 1），颠倒混匀，12,000rpm离5min；
- 8) 转移上清液至另一离心管中，加入2倍体积的无水乙醇，颠倒混匀，-20°C静置20 min；
- 9) 12,000rpm离心5min，尽可能弃去上清液，用70%乙醇洗涤沉淀，倒扣离心管并晾干沉淀；
- 10) 加50 ulTE缓冲液溶解沉淀后贮存于-20°C备用。

六、思考题

1. 提取质粒的方法有哪些？有何特点？
2. 碱裂解法提取质粒DNA的注意事项有哪些？
3. 经碱裂后提取的质粒DNA有哪些构型？

云南农业大学农科中心版权所有