

# 微生物综合实验

本科生专业选修课程，共48学时

任课教师: 牛淑敏 李明春 潘皎 杨建华

教材《微生物学实验》

杨文博主编

# 微生物综合实验内容

- 实验1 酵母菌28S和18SRNA及2 $\mu$ mDNA的分离提取
- 实验2 琼脂糖凝胶电泳检测
- 实验3 限制性内切酶消化  $\lambda$  噬菌体DNA片断的分析
- 实验4 T4噬菌体基因组rII区域不同基因突变的互补
- 实验5 真菌形态及各类孢子的观察
- 实验6 丝状真菌生长的测定
- 实验7 丝状真菌  $\Delta 6$  -脂肪酸脱氢酶基因的分离

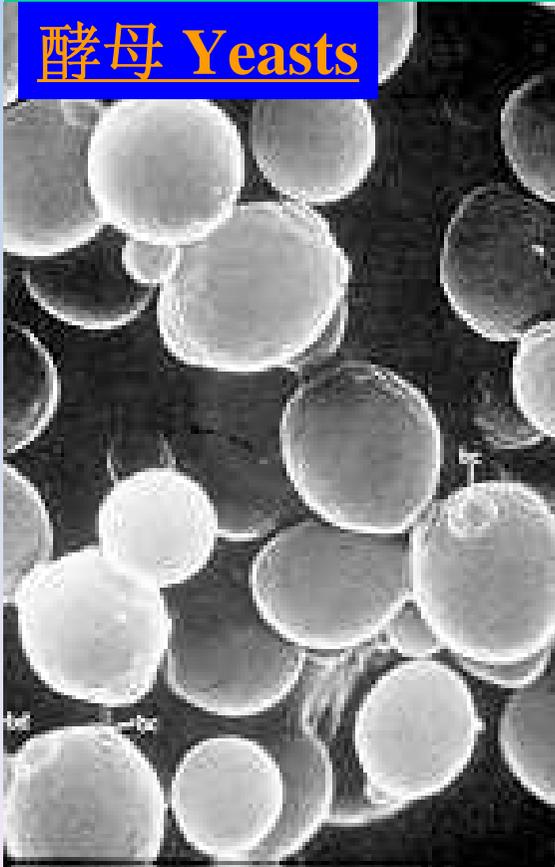
实验一 酵母菌28S和18SRNA及2 $\mu$ mDNA的  
分离提取

实验二 琼脂糖凝胶电泳检测RNA2 $\mu$ mDNA

实验三  $\lambda$  噬菌体DNA的限制性内切酶消  
化片段分析

# 实验一 酵母菌RNA和质粒DNA的分离提取

酵母 Yeasts



- 高纯度且完整的RNA制备是进行mRNA纯化和 Northern杂交以及cDNA合成等必要前提, 是研究基因表达的重要环节. 总RNA中, 大部分为rRNA, 约7% tRNA , 1-5% 为mRNA.

- 由于RNA酶具有高稳定性并且广泛存在, 而RNA的稳定性却很低, 在RNA操作的实验中具有很大难度. 为了消除内外源RNA酶的活性, 常采取强烈的处理条件, 如: DEPC, 碘乙酸, 氯仿等处理器皿, 高压灭菌烘干后使用.
- 提取RNA的方法有多种. 异硫氰酸胍法, 巯基乙醇-异硫氰酸胍联合变性法.

# RNA样品的定量分析

- 较纯的RNA样品 $OD_{260}/OD_{280}$ 通常在1.7-2.0之间. 比值偏低有蛋白质污染, 需进一步纯化.  $OD_{260}/OD_{230}$ 应大于2. 否则说明有异硫氰酸胍污染.
- RNA样品浓度推算: 通常 $OD_{260}=1$ , RNA样品浓度为 $40\mu\text{g/ml}$ .

# RNA样品的完整性检测

- 提取的RNA样品经非变性电泳后，28S和18SRNA与E·B的结合量比值为2:1(区带亮度), 表明RNA样品未发生明显降解, 完整性良好.

- $2\mu\text{mDNA}$ 是存在于酵母细胞中分子量比染色体DNA小得多的双链，共价、闭合环状DNA。即 $2\mu\text{m}$ 质粒DNA。它可作为基因操作中外源基因的载体，在基因重组中起重要作用。基因工程中所使用的载体均来自微生物细胞，所以从细胞中分离提取质粒是基因操作中最基本也是最重要的技术。

- 酵母菌RNA及DNA的分离提取首先是破坏微生物的细胞，使之从细胞内释放出来，由于不同的微生物细胞壁的结构和组分有差异，所以破壁方法不同，除常用的酶法外，还有化学法、物理法、超声波法、冷融法等。

## 一、实验目的

掌握酵母菌RNA和质粒DNA的分离原理及方法。

## • 二、实验原理

酵母菌为真核微生物，细胞壁比较复杂，需用巯基乙醇和蜗牛酶作为溶解细胞壁的工具，使之形成原生质球。再用十二烷基硫酸钠进一步彻底裂解原生质体，然后用酚、氯仿等脱蛋白，可得到含有RNA和质粒DNA的粗提液。经乙醇沉淀，粗提液可得到浓缩和纯化。

## 三、实验材料和用具

1. 菌种：啤酒酵母2156 (*Saccharomyces cerevisiae* 2156)
- 2. 培养基： YEPD液体培养基
- 3. 试剂 (1) 0.5M EDTA (pH8.0)
- (2) 0.1M Tris-HCl (pH8.0)
- (3) 0.05M EDTA (pH8.0)
- (4) 山梨醇-EDTA缓冲液
- (5) 0.15M NaCl—0.1M EDTA (pH8.0)
- (6) 10% SDS, 巯基乙醇
- (7) 酚：氯仿 (1:1 V/V)
- (8) 氯仿—异戊醇 (24:1 V/V)
- (9) 5M NaClO<sub>4</sub> (10) 电泳缓冲液TBE

## 四、实验方法

- 1. 活化菌体：将活化后的菌体接一环于3ml YEPD液体培养基中，30℃培养12小时。之后将3ml培养液转接于含97ml YEPD液体培养基中，30℃培养12小时。
- 2. 每组取0.5ml菌体于10,000r/min离心2分钟，收集菌体，弃上清。
- 3. 用1ml 0.05mol/L EDTA洗两次，10,000r/min离心2分钟，弃上清。
- 4. 加入200μl 0.1mol/L Tris-HCl (pH8.0)，20μl 0.5mol/L EDTA (pH8.0) 和5μl 巯基乙醇，混匀。

- 5. 室温放置15分钟，于10,000r/min离心2分钟，收集菌体。
- 6. 将菌体悬于150 $\mu$ l山梨醇-EDTA缓冲液中。
- 7. 加入蜗牛酶150 $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C震荡保温40分钟，10,000r/min离心2分钟，收集原生质球。
- 8. 将原生质球悬于500 $\mu$ l含0.15mol/L NaCl—0.1mol/L EDTA（pH8.0）溶液中，加入50 $\mu$ l 10%SDS溶液，盖严试管帽，立即反复颠倒混匀，然后慢慢加入100 $\mu$ l 5mol/L NaClO<sub>4</sub>，使终浓度为1mol/L。

- 9. 12,000r/min离心5分钟，将上清转移至另一离心管。
- 10. 加入等体积（650 $\mu$ l）的酚，震荡混匀，12,000r/min离心2分钟，转移上清至另一离心管。再用650 $\mu$ l酚：氯仿（1：1）抽提一次，转移上清至另一离心管。
- 11. 在上清液中加入50 $\mu$ l 2mol/L NaCl，再缓缓加入2倍体积冷的无水乙醇（1ml），-20 $^{\circ}$ C放置2小时以上。
- 12. 12,000r/min离心10分钟，自然干燥，溶于40 $\mu$ l TE缓冲液中，得到RNA质粒DNA的提取液。
- 13. 提取液进行琼脂糖凝胶电泳检测及定量分析。

## 五、实验报告

- 1. 对不同取样时间，计算原生质球形成的百分率。
- 2. 图示电泳结果，并加以分析讨论。

## 六、思考题

- 1. 在破壁前为什么菌体悬于山梨醇—EDTA缓冲液中？
- 2. 还有哪些方法可用于酵母菌的RNA分离？
- 3. 真核酵母与原核细菌破壁有何不同？

## 实验二 琼脂糖凝胶电泳检测RNA 和质粒DNA

- 琼脂糖凝胶电泳已广泛应用于核酸研究中，琼脂糖是一种直链多糖，在水溶液中，琼脂糖分子间由于氢键而形成凝胶，具有亲水性和不含带电荷基团的性质，作为电泳支持介质，用来检测RNA和质粒DNA及分子量测定。

## 一、实验目的

了解琼脂糖凝胶电泳原理，掌握琼脂糖凝胶电泳技术。

## 二、实验原理

- 核酸分子具有可电离的基团，因此，在一定pH条件下的溶液中，能够形成带电荷的离子，由于物质本身带电性质不同，分子量大小及构型的区别，在一定电场强度下移动的速度不同。因此，借助于电场中的缓冲体系，RNA和DNA样品依据性质不同而进行分离。溴化乙锭（E·B）在紫外光照射下能发射荧光，当DNA与溴化乙锭结合时，使发射的荧光增强，荧光的强度与DNA含量成正比。

- 在电泳凝胶中，DNA分子的迁移速度与分子量的对数值成反比关系，质粒DNA样品用单一切点的内切酶切割后，与已知分子量大小的标准DNA片段同时进行电泳，计算迁移距离就可获知该样品的分子量。

## 三、实验材料和用具

- 1. RNA. 质粒DNA（自制）
- 2. 试剂
  - 1mg/ml E·B液
  - TAE电泳缓冲液：
- 3. 用具
  - 微波炉、水浴锅、稳压电泳仪、水平电泳槽、紫外检测仪、Epp管、薄层扫描仪。
  - 乳胶手套 微量进样器

## 四、实验方法

- 1. 选择合适的水平式电泳槽、稳压电泳仪、调节电泳槽平面至水平，检查稳压电源与正负极的线路。
- 2. 选择孔径大小、厚薄适宜的点样梳，放于水平电泳槽的制胶盘上，制胶盘两端用胶带封好。

- 3. 配制0.8%琼脂糖凝胶100ml，需称取0.8克琼脂糖。放入三角瓶中，加入100ml TAE缓冲液，放入微波炉内加热。待胶化好后取出，冷至60℃时加EB一滴，摇匀，轻轻倒入凝胶托盘中，放入点样梳（在电泳槽负极一端）。
- 4. 凝胶冷却凝固后，放进电泳槽，加入TAE电泳缓冲液，使液面高出凝胶1.5mm，取出点样梳，必须小心，以保点样孔完好。
- 5. 电泳（见实验三）

- **五、实验结果**

1. 记录电泳结果。
2. 以1号管电泳结果为分子量标准，鉴定RNA和质粒DNA区带。

- **六、思考题**

如何判断 RNA的完整性？

# 实验三 $\lambda$ 噬菌体DNA限制性内切酶消化片段分析

- **一、实验目的**
- 通过实验了解限制性核酸内切酶的特性及作用原理。分析DNA被内切酶消化后的限制性内切酶图谱。

## 二、实验原理

- 已知的限制性内切酶在双股DNA分子上识别特定的核苷酸顺序并在双股上进行切割。虽然限制内切酶都识别特定的核苷酸序列。但并非所有的内切酶都在特定的位点切割DNA。根据它们的功能和特性。限制性内切酶可分为三类。第一类酶和第三类酶在切割上没有特性。第二类酶，即识别特定核苷酸顺序又能在唯一的位点切割DNA，用第二类限制酶切割的DNA产生唯一特性的DNA片段。

- **三、实验材料和用具**

- 1. 材料

- DNA液:  $\lambda$  DNA

- 内切酶: EcoRI

- 2. 试剂

- 10 $\times$  内切酶缓冲液

- 灭菌的蒸馏水

- 溴酚兰指示剂

- 琼脂糖溶液: (0.8% 琼脂糖)

## 四、实验方法

### 1. 酶切反应

(1) 把反应试管标上号，然后按下表的顺序加入各试剂，表中的量以 $\mu\text{l}$ 为单位, (20  $\mu\text{l}$ )

试剂	1号	2号
蒸馏水	13	6
Buffer(10 $\times$ )	2	2
$\lambda$ DNA	5	10
EcoRI	0	2

- (2) 将反应管盖上塞，轻轻混匀（不要用旋涡混合器），注意不要使液体粘在管壁上。在37℃保温1小时。
- (3) 在反应过程中，准备琼脂糖凝胶。
- (4) 保温结束后，把反应管放在65℃水浴中5分钟，终止反应。
- (5) 在每一个反应管中加入2μl指示剂，轻轻混匀，样品制备好后，准备点入凝胶的样品孔中。

- **2. 琼脂糖凝胶的制备：**

- 注意：E.B是一种诱变剂和致癌因子在操作时要戴手套。
- (1) 琼脂糖浓度**0.8%**，用三角瓶加热溶解至清亮为至。
- (2) 在实验台上，放上制胶平板。
- (3) 在制胶板上放上梳子（梳子和底之间离开**1mm**）。
- (4) 把熔化好的胶液倒在板上，排除空气泡。
- (5) 在胶凝固之前，决不能动板和梳子。
- (6) 胶凝固后，即成为不透明的凝固状态。
- 小心取出梳子，就制成样品孔。

### 3. 点样和电泳:

- (1) 将胶板放入电泳槽中，样品孔的一端放在阴极。
- (2) 在电泳槽中放入电泳缓冲液，使缓冲液盖住胶面。
- (3) 在样品孔中央点样，点样量根据需要而定（一般 5-20 $\mu$ l）。
- (4) 电泳开始60-90V电压，在电泳过程中不断检查电泳是否正常，如有异常现象，立即停止电泳。
- (5) 电泳时间大约2-3小时，当溴酚兰距离胶边约1/2cm处，即可停止电泳。在暗室中，将胶板放在紫外分析仪下观察并照相。

## 五、实验报告

- 1. 图示电泳后凝胶板上的结果，标出点样孔、DNA、指示剂的位置，指明每一个DNA带的迁移距离。
- 2. 指出凝胶上各酶切片段的大小。

## 六、思考题

- 1. 在DNA片段的分离中，根据什么因素确定琼脂糖凝胶浓度？
- 2. 使DNA带整齐应控制好哪些条件？