

2019 年生物工程学院“MINI 工程师”实践训练计划日程安排

日 期	时 间	地 点	活 动
7 月 15 日	9:00-11:00	生物工程学院 109 会议室	1.夏令营开营仪式; 2.实验室安全、注意事项及安全测试; 3.实验小课堂: 绿色荧光蛋白的前世今生。
	12:00-13:30	109 会议室	午休
	13:30-17:00	基因工程实验室 218/220	1.实验小课堂: 微生物编程设计, 获得属于自己的荧光细菌; 2.实验 (组 1): 绿色荧光蛋白基因表达载体质粒提取、转化及筛选; 3.实验 (组 2): 绿色荧光蛋白表达菌株发酵培养基配置、灭菌、接种; 4. 实验准备 (组 1&组 2): 平板绘画材料灭菌。
7 月 16 日	9:00-12:00	基因工程实验室 218/220	1. 实验小课堂: 如何获得目的基因以及克隆载体的构建及验证 (基因剪刀和胶水); 2. 实验 (组 1): 绿色荧光蛋白阳性转化子挑选和液体培养; 3. 实验 (组 2): 绿色荧光蛋白表达菌株诱导表达; 4. 活动 (组 1&组 2): 平板绘画。
	12:00-13:30	109 会议室	午休
	13:30-18:00	基因工程实验室 218/220	1. 实验小课堂: 目的基因表达载体构建、转化及筛选验证 (基因元件和功能) 2. 实验 (组 1&组 2): 绿色荧光蛋白基因体外扩增-聚合酶链式反应 (PCR); 3. 实验 (组 1&组 2): 绿色荧光蛋白基因酶切—限制性内切酶实验; 4. 实验 (组 2): 绿色荧光蛋白表达菌株发酵过程取样、检测。
7 月 17 日	9:00-12:00	基因工程实验室 218/220	1. 实验小课堂: 基因工程菌株发酵条件优化及目的蛋白诱导表达 (细胞工厂) 2. 实验 (组 1): 绿色荧光蛋白阳性转化菌的诱导表达; 3. 实验 (组 1): 质粒、目的基因及酶切验证结果琼脂糖凝胶电泳实验; 4. 实验 (组 2): 发酵生产过程菌体样品收集、破碎、离心。
	12:00-13:30	109 会议室	午休
	13:30-18:00	基因工程实验室 218/220	1. 实验 (组 1): 阳性转化菌的绿色荧光观察及拍照; 2. 实验 (组 2): 发酵菌的绿色荧光观察、拍照, 及绿色荧光蛋白强度检测; 3. 实验 (组 1&组 2): 平板绘画结果拍照; 4. 实验小课堂: 实验结果讨论 (组 1&组 2)。

课件讲义 (The courseware)

一. DNA 提取

一、实验目的与要求

掌握 DNA 提取的方法

二、实验原理

1. DNA 主要存在于细胞核

2. DNA 在 NaCl 溶液中的溶解度, 是随着 NaCl 的浓度的变化而改变的。当 NaCl 的物质的量浓度为 0.14 mol / L 时, DNA 的溶解度最低。利用这一原理, 可以使溶解在 NaCl 溶液中的 DNA 析出。

3. DNA 不溶于酒精溶液, 但是细胞中的某些蛋白质可以溶于酒精溶液。利用这一原理, 可以进一步提取出含杂质较少的 DNA。

三、DNA 提取实验步骤:

1. 获取口腔上皮细胞: 取白开水并用其漱口, 使其尽可能与口腔内壁上皮细胞接触, 集漱口水于小烧杯中。
2. 在小烧杯的漱口水中加入 NaCl 使其浓度达到 2 mol/L , SDS 溶液 $200 \mu\text{l}$, 充分振荡。
3. 沿烧杯内壁, 缓缓加入约两倍体积的冷无水乙醇, 静置后观察白色丝状析出物。

二. 固体平板的制备

一、实验目的与要求

1. 掌握固体平板制备的基本操作步骤;
2. 掌握无菌操作的一般方法。

二、实验材料与用品

LB 固体培养基(胰蛋白胨 10g , 酵母浸粉 5g , NaCl 10g , 加入蒸馏水, 调 pH 至 7.0 , 定容至 1L), 平皿, 酒精灯, 酒精喷壶, 打火机, 超净工作台

三、实验步骤与方法

1.按照下列配方配制 LB 固体培养基: (每升)

酵母浸粉 5g

蛋白胨 10g

NaCl10g

琼脂粉 10-20g

2. 调节 pH 到 7, 放到高压灭菌锅中灭菌。

3. 倒平板: 待培养基冷却至 50℃左右, 加入卡那霉素, 按无菌操作法倒平板(每皿约 15ml), 平置, 待凝固。

倒平板的方法: 右手持盛培养基的锥形瓶置酒精灯火焰旁边, 用左手将瓶塞轻轻地拨出, 瓶口保持对着火焰; 然后用右手手掌边缘或小指与无名指夹住瓶塞(也可将瓶塞放在左手边缘或小指与无名指之间夹住。如果三角瓶内的培养基一次用完, 瓶塞可倒置放于操作台面上)。左手拿培养皿并将皿盖在火焰附近打开一缝, 迅速例入培养基约 15 ml, 盖上皿盖后轻轻摇动培养皿, 使培养基均匀分布在培养皿底部, 然后平置于桌面上, 待凝后即成为固体平板。

三. 神奇的荧光颜料——平板绘画比赛

一、实验目的与要求

掌握平板划线的基本操作步骤。

二、实验材料与用品

固体平板, 大肠杆菌, 接种环, 酒精灯, 酒精喷壶, 打火机, 记号笔超净工作台

三、实验步骤与方法

1.标记: 在培养皿底面或侧面用记号笔标注接种菌名、接种者姓名、日期等。

2. 灭菌接种环: 点燃酒精灯, 右手以持笔式握持接种环, 并放置火焰中烧灼灭菌, 先将接种环的接种丝部分置于火焰中, 待金属丝烧红并蔓延至金属端, 再直接烧灼金属环直至烧红, 然后由金属环至金属杆方向快速通过火焰, 随后再反方向通过火焰, 如此 2~3 次。然后将接种环移开火焰, 待其冷却。
3. 取菌: 左手持装有大肠杆菌菌液的锥形瓶, 用持有接种环的右手手掌及小指拔取瓶塞, 将瓶口迅速通过火焰 2~3 次进行灭菌。将已灭菌且已冷却的接种环伸入瓶中, 取一接种环的菌液, 将菌种瓶口再次通过火焰 2~3 次灭菌, 塞好瓶塞, 放至原来的位置。
4. 划线: 左手持琼脂平板培养基(将皿盖反放在桌上酒精灯附近), 尽量使之直立以免空气中的细菌落入其中, 并靠近火焰。右手持接种环在琼脂平板上划线, 绘制自己喜欢的图案。划线时使接种环与接种平板面成 30~40 度角, 以腕力在平板表面行轻而快地来回滑动动作。划线完成后盖上培养皿盖。
5. 恒温培养: 将划线平板倒置, 于 37℃恒温培养箱中培养, 24 小时后观察。

四. 限制性核酸内切酶实验

一、实验目的

- 1.掌握限制性核酸内切酶的特点
- 2.学习如何用限制性核酸内切酶切割质粒 DNA

二、实验原理

限制性核酸内切酶是可以识别并附着特定的脱氧核苷酸序列, 并在每条链中特定部位的两个脱氧核糖核苷酸之间的磷酸二酯键进行切割的一类酶, 简称限制酶。根据限制酶的结构, 辅因子的需求切位与作用方式, 可将限制酶分为三种类型, 分别是第一型 (Type I)、第二型 (Type II) 及第三型 (Type III)。I 型限制性内切酶既能催化宿主 DNA 的甲基化, 又催化非甲基化的 DNA 的水解; 而 II 型限制性内切酶只催化非甲基化的 DNA 的水解。III 型限制性内切酶同时具有修饰及认知切割的作用。

三、实验用品

PCR 管、限制酶切试剂盒, 恒温水浴锅, 微型移液器和枪头,

四、实验步骤

按照下列加样配制反应体系

10x 限制酶缓冲液 2ul

限制酶 1ul

DNA 样品 1ul

双蒸水补齐至 20ul

注：若做多组反应体系，可以先一起配制 DNA 样品和双蒸水，分装后再加入缓冲液和限制酶。

不同限制酶的缓冲液如下：

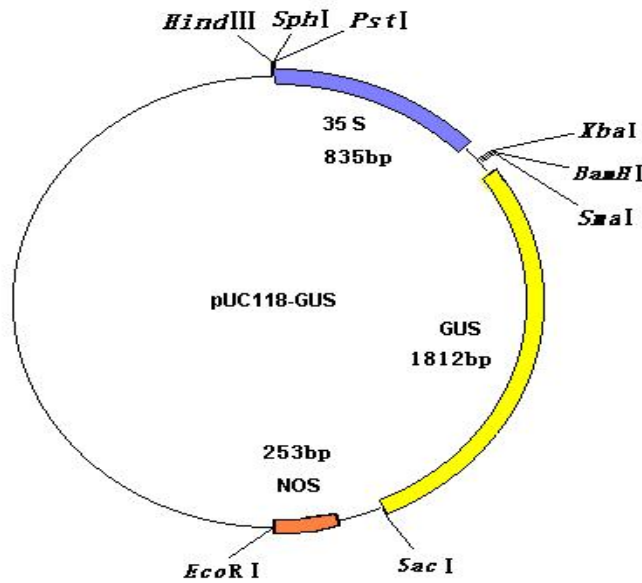
表 3.5.2 限制性内切酶进行双酶切时建议使用的缓冲液

酶	<i>EcoR</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Bam</i> H I	<i>Sac</i> I
<i>EcoR</i> I	1 × H	1 × M	1 × K	1 × M
<i>Hind</i> III	1 × M	1 × M	1 × K	1 × M
<i>Bam</i> H I	1 × K	1 × K	1 × K	0.5 × K
<i>Sac</i> I	1 × M	1 × M	0.5 × K	1 × L

表 3.5.3 限制性内切酶在各种不同缓冲液中的相对活性(%)

	L	M	H	K
<i>EcoR</i> I	(20)	(100)	100	(120)
<i>Hind</i> III	(60)	100	<20	200
<i>Bam</i> H I	(<20)	<20	40	100
<i>Sac</i> I	100	60	<20	<20

注:有()标记的是易受 Star 活性影响的缓冲液；*Bam*H I 最适反应温度为 30℃，其余均为 37℃。



pUC18-GUS 质粒图谱

五. 聚合酶链反应 PCR

一、实验目的

1. 掌握 PCR 的原理及操作方法。
2. 学习设计对照实验。

二、实验原理

聚合酶链式反应 (PCR) 是利用合成的两段已知序列的寡核苷酸作为引物，将位于两引物之间的特定 DNA 片段进行复制，经过多次循环，使模板上特定 DNA 拷贝数呈指数级增长。PCR 反应体系由缓冲液 (10X Buffer)、底物 (4XdNTP)、引物、耐热性 DNA 聚合酶 (Taq 酶) 和模板 DNA 组成。每个循环包括变性、退火和延伸三个步骤，模拟生物体内 DNA 复制扩增过程。每次循环扩增的产物可作为下一个循环的模板，因此理论上每经过一轮变性，退火和延伸，特定 DNA 片段的分子数增加一倍。

PCR 反应的变性条件一般为 94-98℃、10-30s；延伸温度除两步 PCR 外（退火和延伸温度均为 68℃），一般为 72℃，时间通常以扩增 1Kb 长度的片段需 1min 来计算；而退火条件变化较大，一般为 50-68℃，0.5-1min。在进行 PCR 反应时应设置严格的对照体系，其中包括阳性对照、空白对照和阴性对照。

三、实验材料

1.试剂：10XBuffer、4XdNTP、引物 F、引物 R、Ex Taq 酶、ddH₂O、模板 Puc118-GUS 质粒、1XTAE 缓冲液、10Xloading buffer、DNA marker(DL2000)、琼脂糖

2.仪器：1.5mL 离心管、0.2mL 离心管、PCR 仪器、电泳槽、电泳仪、离心机

四、实验步骤

1. 在 2mL 离心管中配置 200μL 反应体系（10xbuffer 20μL、4XdNTP 20μL、引物 F 10μL、引物 R 10μL、Taq 酶 2μL、ddH₂O 128μL），混合均匀后每管 20μL 分装至 9 个 0.2mL 离心管内（为什么不是 10 个？），每管加入 Puc118-GUS 质粒 DNA 溶液 1μL，混匀，冰上操作，避免产生气泡。（空白对照只加 1μL ddH₂O 作为模板）
2. 将离心管放入 PCR 仪器中，设置反应条件如下：94℃ 5min—35 cycles(94℃ 30s—55℃ 45s—72℃ 1min)—72℃ 7min—16℃ ∞。
3. PCR 结束后每管加入 2.5μL 10Xloading buffer，混匀，用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果，PCR 产物上样量为 2μL，空白对照上样量为 10μL，DNA marker 选择 DL2000，上样量为 6μL（利用 marker 估算含量），预期扩增片段大小为 1Kb。

六. 大肠杆菌感受态细胞质粒转化和检测

一、实验概述

受体细胞需要经过一些特殊的方法处理后处理后，便具有摄取外源 DNA 的能力，称为感受态细胞。而导入的质粒 DNA 可在宿主中表达，是宿主产生相应的抗性并能够在含有相应抗生素的培养基平板上生长，从而使含有质粒 DNA 的阳性克隆菌落被筛选出来。

感受态细胞的质量可以通过转化转化率来衡量，转化率定义为每微克质粒 DNA 在选择平板上锁形成的菌落（转化体）数，通常为 $10^5 \sim 10^8$ 个菌落 / μg 。如果用抗生素筛选转化体，作为对照的受体菌应该在此培养基上不生长。因此，在转化实验室中应设立受体菌对照组和 DNA 对照组以检测是否有污染情况发生。

二、实验目的

掌握大肠杆菌感受态细胞质粒转化和检测的方法。

三、实验试剂和材料

pUC118-GUS 质粒、固体 LB 培养基（含有 1.5%的琼脂）、氨苄青霉素（Amp,100mg/mL）、SOC 培养基

四、主要仪器设备

9cm 培养皿，500ml 三角瓶，1.5ml 离心管，微量移液管，无菌玻璃涂布器、水浴锅、冰盒（冰）、培养箱、摇床。

五、实验步骤

1.平板准备：LB 培养基添加 Amp 达到 100mg/L。在超净台中准备好三个（直径 9cm）LB 平板，每个平板 18~20ml LB 培养基（含 Amp），等待凝固后。

转化

2.准备 3 组材料，加入受体菌和 DNA 进行转化作为实验组，感受态细胞（只加受体菌）和质粒（只加入 DNA）作为对照，对照组其它步骤不变。

3. E.coli DH5 α Competent Cells 使用前在冰上融化。

4. 轻微混匀，取 100 μl 感受态细胞装入 1.5ml 离心管中（注意：不能剧烈振荡混合细胞。）

5. 加入 DNA（pUC118-GUS）样品（建议 $\leq 10\text{ ng}$ ）。

6. 冰中放置 30 min。

7. 42 $^{\circ}\text{C}$ 放置 45s。

8. 冰中放置 1-2min。

9. 添加 LB 培养基（预先在 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温）至终体积 1 ml。

10. 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 1 小时（160-225 rpm）。

11. 取适量 (100 μ l) 涂布于选择培养基*。

12. 37℃过夜培养。

七. 琼脂糖凝胶电泳

一、实验方法原理

琼脂糖凝胶电泳是用琼脂糖作支持介质的一种电泳方法。其分析原理与其他支持物电泳的最主要区别是：它兼有“分子筛”和“电泳”的双重作用。DNA 分子在琼脂糖凝胶中泳动时有电荷效应和分子筛效应。DNA 分子在高于等电点的 pH 溶液中带负电荷，在电场中向正极移动。由于糖-磷酸骨架在结构上的重复性质，相同数量的双链 DNA 几乎具有等量的净电荷，因此它们能以同样的速率向正极方向移动。普通琼脂糖凝胶分离 DNA 的范围为 0.2-20 kb，利用脉冲电泳，可分离高达 107 bp 的 DNA 片段。

1.DNA 分子量与在琼脂糖凝胶中的迁移速度成反比

2.不同构型的 DNA 分子的迁移速度不同，共价闭合环状的超螺旋分子 (cccDNA)、开环分子(ocDNA)、和线形 DNA 分子(IDNA)。这三种不同构型分子进行电泳时的迁移速度大小顺序为:cccDNA > IDNA > ocDNA

二、实验材料与仪器

1. 材料：不同大小的基因组片段

2.试剂：DNA Marker 1000or2000；琼脂糖；上样缓冲液 (6x)；电泳缓冲液 (1×TAE)；电泳缓冲液 (0.5×TAE)；Goldenview

3.仪器及器具：

(1) 移液器、吸头、锥形瓶

(2) 电泳系统：电泳仪、托盘、胶托、梳子

(3) 紫外透射仪、微波炉(或加热装置)、电子天平

ps: 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, 而且也可用于染 RNA。虽然未发现 GoldView 有致癌作用, 但对皮肤、眼睛会有一定的刺激, 操作时应戴上手套。(这句话来源于百度百科, 但是既然能结合 DNA, 感觉还是有风险, 注意安全操作。)

三、操作步骤

1.1%琼脂糖凝胶的制备: 用 $1 \times \text{TAE}$ 稀释缓冲液和琼脂糖配置 1%琼脂糖凝胶, 根据所需量配置 (一般配置 50ml 即可倒满一个大胶托和一个小胶托), 可加入锥形瓶中用微波炉加热 2-3min 即可充分溶解。煮好的凝胶需无气泡、色泽均匀。

2.做胶片: 待凝胶冷却至 65°C 时 (不烫手), 加入 2ul Goldenviue /50ml。然后将凝胶倒入胶托中, 插入梳子 (回收用的是宽梳子), 等待至其凝固。

3.取酶切产物与上样缓冲液混合 (可在石蜡纸上进行, 注意用移液枪时不要把石蜡纸戳破了)。在 DNA 含量较低时可考虑增加上样量, 但是上样量不能溢出上样孔。DNA 浓度可用 OD260 进行测定, $1\text{OD}=\text{双链 DNA}50\text{ng}/\text{ul}$ 。

4.向电泳槽中加入电泳缓冲液 ($0.5 \times \text{TAE}$), 将胶片放入电泳槽中使有胶孔的一边靠近负极, 若缓冲液不能末过胶片, 加至末过。加入 Marker 及混合后的样品。

5.打开电泳槽, 设置电压和时间。一般设 120V, 时间 20min。可根据需要调整。

6.观察和拍照: 紫外灯下观察, 与 Marker 进行对比, 判断所跑条带的片段长度。

7.回收目的片段的胶条: 在日光下将带有目的基因的胶块切下 (为了提高回收的浓度应尽量能够全切下来, 且不带空白部分)。在日光下 (含紫外线) DNA 会呈淡绿色。

8.按照回收试剂盒的操作对 DNA 进行回收。