

# 实验五

## 细菌总DNA提取及电泳检测

p174

# 细菌鉴定的实验室常用流程（非标准）

---

## 已完成

- 1、样品采集；
- 2、细菌的分离（稀释涂平板）、纯化（划线）；
- 3、细菌的扩大培养（逐级：单菌落—试管—三角瓶）；

## 第五、六次课

- 4、细菌DNA提取及16S rRNA基因的PCR扩增；

## 理论课讲解及《生物信息学》

- 5、测序（序列文件.seq和质控文件.abi；序列文件应该有一个或多个，以16S为例应该包括前向序列、后向序列、拼接后序列）；
- 6、比对（NCBI（最好注册，需要提交16S序列）或者EzBioCloud（需要注册，主要包含Type strains及未可培养菌株））；
- 7、构建进化树（ARB, Mega等）；
- 8、其它：生理生化实验、抗生素实验、脂肪酸、磷脂、呼吸醌、DNA杂交等。

# 目的要求

---

- ✓ 学习并掌握常用的细菌总DNA制备方法的原理和  
操作技术；
- ✓ 学习并掌握琼脂糖凝胶电泳检测DNA的方法。

# 5.1 细菌总DNA提取—基本原理

---

细菌基因组一般为1-5 Mb。细菌总DNA制备方法很多，但都包括两个主要步骤：裂解细胞和去除蛋白质、RNA、多糖等大分子；

## 1、细胞裂解：

革兰氏阴性菌，SDS(十二烷基硫酸钠)；

革兰氏阳性菌，溶菌酶+SDS

## 2、DNA纯化：

饱和酚、酚/氯仿/异戊醇和蛋白酶除去DNA样品中的蛋白质；

酚抽提时，可以除去部分RNA，用RNAase除去参与的RNA；

CTAB/NaCl溶液除去多糖和其它大分子物质。

## 3、DNA浓度和纯度检测：

粗测：琼脂糖凝胶电泳；

精测：Nanodrop

# 5.1 细菌总DNA提取—基本原理

精测：Nanodrop

核酸，包括DNA和RNA，均由核糖、磷酸基以及碱基构成。其中，由于碱基含有芳香环结构，因此具有紫外吸收的特性。核酸的特征吸收波长为260 nm。根据朗伯比尔定律，已知物质的消光系数（几十年前早已测量），液层的厚度（固定的样品室），就能利用其吸光度来计算出物质的浓度。与此同时，还能通过计算A260/A280和A260/A230的数值，估计核酸的纯度。（280 nm吸光通常来自蛋白质，而230 nm则通常来自糖类和苯酚等。）

基本参数	A260/A280	纯净的样品 A260/A280 大于 1.8 (DNA)或者 2.0 (RNA)。如果比值低于 1.8 或者 2.0。表示存在蛋白质或者酚类物质的影响。
	A260/A230	A230 示样品中存在污染物，如碳水化合物、盐(胍盐)等，较纯净的核酸 A260/A230 的比值大于 2.0。

## 5.1 细菌基因组总DNA提取试剂盒使用**注意事项**

---

- 漂洗液PE第一次使用前请按瓶上标签加入3倍体积的无水乙醇，即15 ml漂洗液PE加入45 ml无水乙醇，30 ml漂洗液PE加入90 ml无水乙醇，使用后应立即盖紧盖子。
- 消化缓冲液DS和裂解液MS室温保存可能会有沉淀产生，在55°C加热溶解，待恢复至室温后混匀即可使用。不会影响基因组DNA纯化效率。
- 应尽量使用新鲜的菌体，确保提取的基因组DNA不被降解。
- 所有离心步骤均为室温下进行。
- 请严格按照操作步骤操作。

# 实验步骤

---

1. 取0.5-2 ml处于对数生长期菌液，置于1.5 ml离心管中。12,000 rpm离心1min，弃上清。
2. 向收集到的菌体沉淀中加入200  $\mu$ l 缓冲液DS，用涡旋振荡器剧烈振荡直至菌体彻底悬浮。

（对于较难破壁的革兰氏阳性菌，需加入溶菌酶消化细胞壁后，再进行基因组DNA的提取。具体方法为：向步骤1收集到的菌体中，加入108  $\mu$ l消化缓冲液DS和72  $\mu$ l的50 mg/ml的溶菌酶振荡混匀。37°C处理30min以上。）

（如需要去除RNA，加完消化缓冲液DS或溶菌酶后，加入4  $\mu$ l RNase A（100 mg/ml溶液，振荡混匀，室温放置5min。）

3. 加入20 $\mu$ l蛋白酶K溶液，55°C水浴或金属浴30min。
4. 加入220 $\mu$ l裂解液MS，涡旋振荡混匀，直至形成均一的悬浮液，65°C温浴10min，溶液应变清亮，简短离心以去除管盖内壁的水珠，室温放置5min使溶液冷却。

# 实验步骤

---

5. 加入220  $\mu\text{l}$ 无水乙醇，上下颠倒混匀，此时可能出现絮状沉淀，简短离心以去除管盖内壁的水珠。将溶液及絮状沉淀转移到纯化柱中。12,000 rpm离心1min，弃滤液。（此时基因组DNA被吸附于DNA纯化柱中的硅胶膜上。）
6. 加入500  $\mu\text{l}$ 去蛋白液PS，12,000 rpm离心1min，弃滤液。
7. 加入500 $\mu\text{l}$ 漂洗液PE，12,000 rpm离心1min，弃滤液。
8. 加入500  $\mu\text{l}$ 漂洗液PE，12,000 rpm离心1min，弃滤液，12,000 rpm离心3min，以彻底去除纯化柱中残留的液体。
9. 将纯化柱置于新的1.5 ml离心管中。向纯化柱中央处，悬空滴加30-100  $\mu\text{l}$ 洗脱液TE。室温放置2min。
10. 12,000 rpm离心2min，管底即为高纯度基因组DNA。-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。（洗脱液TE可用去离子水代替，但其pH需为8.0-8.5。）（对洗脱液TE 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热，会提高基因组DNA的产量。）

# 实验步骤

---

## 11、浓度检测

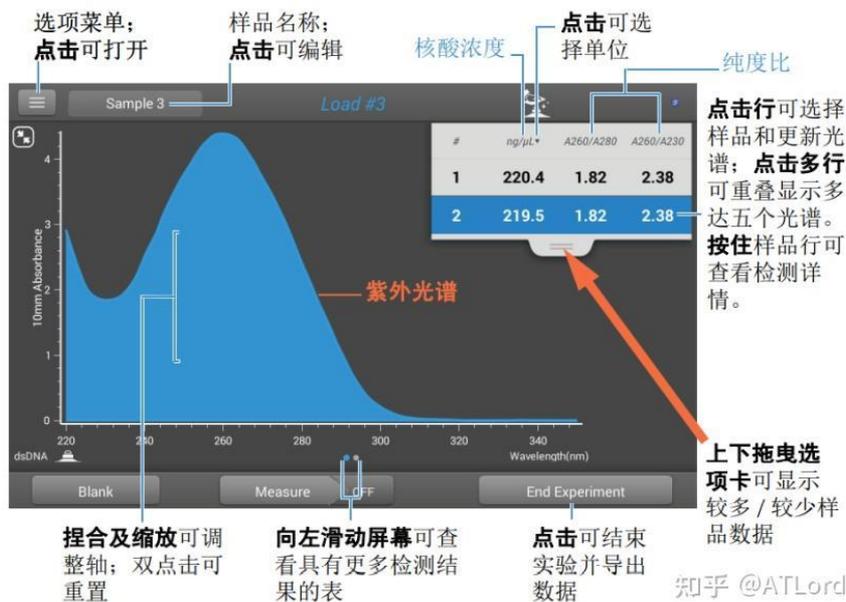
- a、在“主页”屏幕上，选择核酸选项卡并点击双链DNA、单链DNA或RNA，根据要检测的样品而定；
- b、用ddH<sub>2</sub>O清洗上下基座三次，再用低尘擦拭纸擦拭干净；
- c、将1-2 uL空白检测溶液移取到下基座，然后降下检测臂，或将空白检测比色皿插入比色皿架；
- d、点击空白检测并等待检测完成；（提示：如果自动空白检测设为“开启”，空白检测将会在您降下检测臂时自动开始,此选项不适用于比色皿检测。）
- e、抬起检测臂，用新的低尘擦拭纸擦拭上下基座，或取下空白检测比色皿；

# 实验步骤

f、将 1-2  $\mu\text{L}$  样品溶液移取到基座上，然后降下检测臂，或将样品比色皿插入比色皿架。

g、开始样品检测：基座：如果自动检测设为“开启”，降下检测臂；如果“自动检测”设为“关闭”，降下检测臂并点击检测。比色皿：点击检测

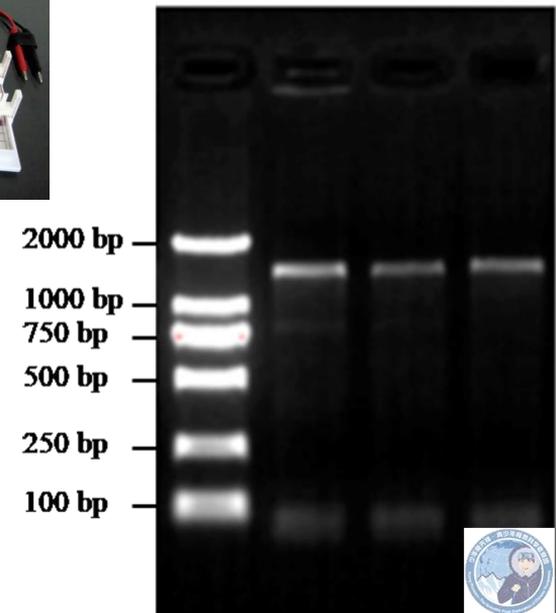
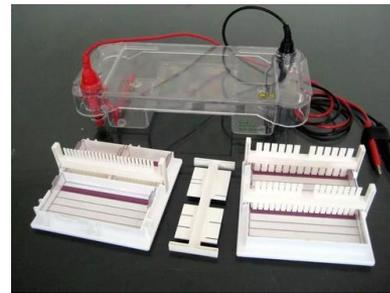
h、完成检测样品后，点击结束实验。抬起检测臂，用新的抹布擦拭上下基座，或取下样品比色皿。



## 5.2 琼脂糖凝胶电泳检测DNA

### 基本原理：

- 琼脂糖凝胶具有网络结构，物质分子通过时会受到阻力，**大分子物质在涌动时受到的阻力大**，因此在凝胶电泳中，带电颗粒的分离不仅取决于**净电荷的性质和数量**，而且还取决于**分子大小**，这就大大提高了分辨能力。
- 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。
- 常用1%的琼脂糖作为电泳支持物。琼脂糖凝胶约可区分相差100bp的DNA片段。



# 实验准备

---

**样品：提取到的DNA样品、DNA分子量标准品**

**试剂：琼脂糖**

**1x电泳缓冲液（TBE）**

**6x上样缓冲液（溴酚蓝指示剂）**

**10mg/ml溴化乙锭（EB）**

# 实验步骤

---

- 1.准备。用蒸馏水将电泳槽和梳子冲洗干净，放在水平桌上，并架好梳子。
- 2.配制1%琼脂糖凝胶。在三角瓶中加入0.6g琼脂糖和60ml (0.5xTBE)，微波炉加热至溶解，待凝胶冷却到60°C（不烫手）后加入微量EB。
- 3.倒胶。将刚刚配置好的凝胶平稳不间断地倒入胶床，避免产生气泡，室温下充分凝固，垂直向上拔出梳子。
- 4.将胶板放入电泳槽，向电泳槽中加入0.5xTBE缓冲液至刚没过凝胶表面1-2mm。

# 实验步骤

---

5.加样。取样品溶液 $5\mu\text{l}$ ，将溶液加到样品孔中，同时在另一样品孔中加入标准分子量DNA。（注意:枪头不可插入过深，以免刺穿凝胶，导致样品外溢，每加完一个样品要更换枪头，以防EB污染。）

6.电泳。接通电源，电压为  $5\text{V}/\text{cm}$ ，当染料前沿移至底边1-2mm时，电泳结束。

7.电泳结束后，将凝胶板取出，在紫外仪上观察电泳带及其位置，记录实验结果。