



提取 DNA 流程的改进和鉴定方法的创新

王 岚¹ 孔 政^{1,2} 张保卫²

1. 安徽省合肥市第五中学(230001)

2. 安徽大学生命科学学院 安徽合肥(230601)

摘 要 通过改进操作流程、创新鉴定方法,对“DNA 的粗提取和鉴定实验”进行改进和创新,简化了实验方法、缩短了实验时间、提高了分组实验的成功率。

关键词 高中生物学;DNA 粗提取和鉴定;实验改进

文章编号 1005-2259(2019)10x-0038-03

“DNA 的粗提取和鉴定实验”在高中生物学教学中占据着重要的地位。《普通高中生物学课程标准(2017 年版)》中也指出,为了提高学生的生物学学科核心素养,应开展 DNA 的粗提取与鉴定实验。在必修 1 和必修 2 模块的学习中,学生已经学习了 DNA 分子的结构与功能,但仍有些“雾里看花、水中望月”的感觉。本实验就为学生提供了从生物组织中提取 DNA 分子的机会,能够让学生更为直观的认识 DNA。

1 DNA 粗提取操作流程的改进

笔者在教学实践中对该实验进行了一系列探索,并联合高校的分子生物学实验室,对原有方案进行改进和完善。以猪肝和菜花作为实验材料进行了 DNA 的粗提取,改进后的操作流程如下。

1.1 以猪肝为材料提取 DNA 的实验操作流程

1.1.1 实验仪器及试剂

仪器:250 mL 烧杯、100 mL 烧杯、50 mL 烧杯、100 mL 量筒、10 mL 量筒、玻璃棒、电子天平、食物破碎机、剪刀。

试剂:蒸馏水、生理盐水、嫩肉粉(内含木瓜蛋白酶)、洗洁精(内含 SDS)、95%酒精。

1.1.2 实验方法步骤

课前准备:(1)将体积分数为 95%的酒精溶液放入冰箱冷冻室 24 h;(2)称取 80 g 新鲜猪肝,剪碎,加入 0.5 g 嫩肉粉,再加入 200 mL 生理盐水并用食物破碎机破碎 1 min,获得新鲜猪肝匀浆。

步骤 1:每个实验小组(以全班共 20 组为例)量

取 10 mL 匀浆。向匀浆中加入 20 mL 蒸馏水,3 mL 洗洁精,慢速搅拌 5 min,注意动作应尽量轻缓以减少泡沫的产生。

步骤 2:用双层尼龙纱布(150 目)进行过滤,留取滤液备用。

步骤 3:向滤液中贴壁缓慢加入 95%酒精,至有絮状物产生。再加入体积为滤液 1.3 倍的酒精,待絮状物不再产生后收集上层絮状物。

1.2 以菜花为材料提取 DNA 的实验操作流程

1.2.1 实验仪器与试剂

仪器:250 mL 烧杯、100 mL 烧杯、50 mL 烧杯、100 mL 量筒、10 mL 量筒、玻璃棒、培养皿、电子天平、食物破碎机、剪刀。

试剂:蒸馏水、2 mol/L 浓盐水、洗洁精、95%酒精。

1.2.2 实验方法步骤

课前准备:(1)将体积分数为 95%的酒精溶液放入冰箱冷冻室 24 h;(2)剪取或刮取 150 g 新鲜的菜花表层花芽部分,剪碎,加入 100 mL 2mol/L NaCl 溶液,用食物破碎机破碎 1 min。再加入蒸馏水 100 mL,用食物破碎机破碎 1min,获得匀浆。

步骤 1:每个实验小组量取 10 mL 匀浆。向匀浆中加入 3 mL 洗洁精,慢速搅拌 5 min,注意动作应尽量轻缓以减少泡沫的产生。

步骤 2:用双层尼龙纱布(150 目)进行过滤,留取滤液备用。

通讯作者:张保卫(1977—),男,博士研究生学历,教授,E-mail:zhangbw@ahu.edu.cn



步骤3:向滤液中贴壁缓慢加入95%酒精,至有大量絮状物析出,再加入大约2倍体积的酒精,待絮状物不再产生后收集上层絮状物。

2 实验流程的创新之处和关键操作说明

2.1 使用电动食物破碎机代替手工研磨

在课前准备环节,使用食物破碎机将生物材料进行物理破碎,使之形成匀浆。笔者使用的食物破碎机为,品牌:朋客,型号:SG-350C,容量:550 mL,转速:29000 r/min。

食物破碎机在短时间内(1~2 min)即可破坏实验材料组织结构,与手工研磨相比大大缩短了实验时间,并且粉碎的效果显著优化,得到的匀浆更加细致均匀,为后面DNA的提取奠定了良好的基础。

2.2 研磨液配方和使用方法的改进

教材中提供的研磨液配方复杂,且在配制中需要调节pH值,过程烦琐^[1]。本方案使用盐水和洗洁精代替研磨液^[2],简化了实验步骤。洗洁精含有表面活性剂SDS(十二烷基磺酸钠),能起到破坏细胞膜的作用,同时可使蛋白质变性而无法与DNA结合,从而释放DNA。

对操作方法进行探索时发现,如果在破碎环节加入洗洁精,由于食物破碎机的作用会产生大量泡沫,显著增加过滤难度。因此,在破碎生物材料时只加入盐水,而不使用洗洁精。破碎生物材料获得匀浆后,再加入洗洁精进行缓慢搅拌,可有效避免泡沫的产生,同时达到破坏细胞和释放DNA的效果。

2.3 破碎猪肝时使用生理盐水,破碎后加入蒸馏水

在破碎猪肝时,需根据猪肝新鲜程度调整生理盐水的用量;破碎猪肝后,加入蒸馏水可促进细胞破裂。探索发现,在破碎猪肝时加入生理盐水所得到的匀浆会较为均匀。不新鲜的猪肝会出现失水现象,应适量多加生理盐水,否则在猪肝的匀浆内易出现含有固体残留物的现象。破碎猪肝后,需在匀浆中加入体积约为匀浆体积两倍的蒸馏水,慢速搅拌5 min。蒸馏水的加入会稀释匀浆,有利于细胞破裂及DNA释放。

2.4 破碎菜花时先后加入NaCl溶液和蒸馏水

在破碎菜花的过程中需先加入2 mol/L NaCl溶液,并用食物破碎机破碎1 min。2 mol/L NaCl溶液的作用在于析出植物细胞中的水分,有利于细胞的破碎,同时可促进DNA的溶解。之后再加入蒸馏水的目的在于控制匀浆黏稠度,使之易于过滤。

3 改进效果

改进后的DNA粗提取实验操作简便、用时短、成功率高。不管是以猪肝,还是以菜花为材料,均可在20 min以内完成,并看到大量絮状物析出(图1,2),分组实验成功率达到100%。

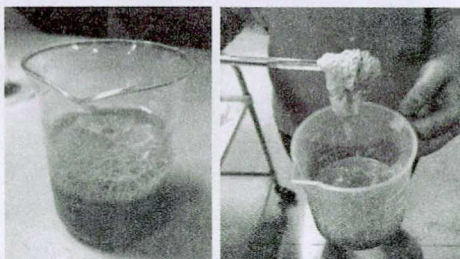


图1 以猪肝为材料进行DNA粗提取效果

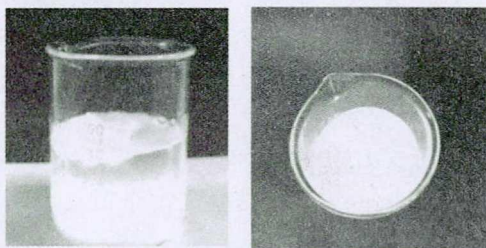


图2 以菜花为材料进行DNA粗提取效果

4 鉴定方法的创新——运用荧光染色剂

研究发现,使用SYBR Green I荧光染色剂对提取物进行染色,若在紫外灯照射下发出绿色荧光,即证明含有DNA分子。

原理:游离状态下SYBR Green I可发出极微弱的荧光,但当SYBR Green I与双链DNA结合后,荧光会大大增强。将一定浓度的SYBR Green I与DNA混合后,在紫外灯照射下会出现荧光反应,且荧光的强度会随着DNA浓度的提高而增强,可根据荧光强弱判断提取物中DNA分子的含量^[3]。SYBR Green I安全性高,无致癌性,适合在高中实验中推广使用。

方法步骤:将提取的DNA溶解于2 mol/L的浓盐水中,过滤去除不可溶的杂质,然后将滤出液与SYBR Green I染色剂按照19:1的比例混合置于暗处,使用紫外灯照射,即可看到绿色的荧光。

优点:对DNA具有专一性,灵敏度高,操作简单,用时少,安全无毒。

实验结果:图3为SYBR Green I荧光染色效果,可见猪肝提取物和菜花提取物与染色剂混合后,在紫外灯照射下均显现明显绿色荧光;而不加提取物的染色剂和不加染色剂的提取物都荧光微弱或不出现荧光。



基于生物学学科核心素养的实验教学

——以“探究影响酶活性的条件”为例

广东省中山市实验中学(528404) 刘付香

摘要 以“探究影响酶活性的条件”实验为例,利用微课精心设计探究活动,通过自主、合作、探究的学习方式,培养学生的科学思维和科学探究能力,落实学科核心素养。

关键词 核心素养;探究实验;微课

文章编号 1005-2259(2019)10x-0040-02

科学探究是课程标准倡导的学习方式和中学生物学学科核心素养之一^[1]。实验是生物学科的重要组成部分,也是生物学科的特点之一。新课标要求教师要精心设计探究活动,为学生提供可探究的内容,鼓励学生积极参与实验设计,培养并提高学生的科学思维和探究能力^[2]。微课具有时间短、可反复观看、效果逼真等优点。在生物学实验教学中引入微课,即可节省实验等待时间,有效填补课堂中的空白,又可调动学生学习的兴趣与积极性,有助于达到更好的实验探究效果。

“探究影响酶活性的条件”是人教版《生物·必修1·分子与细胞》第5章第1节“降低化学反应活化能的酶”中的一个重要内容,属于开放性探究实验。笔者在教学中尝试借助微课,将探究实验的基本理论和教材基本实验置于课前,将创新实验设计和具体实践过程置于课中,让学生通过自主、合作、探究的方式

完成对本节内容的学习。

1 设计微课学习流程

笔者将该实验设计成了3个微课。微课1复习科学探究的流程及实验设计的基本原则,让学生根据导学案中的问题和教师提供的材料、用具设计实验,并预测实验结果;微课2为实验过程,让学生在观看后审查自己设计的实验方案,找出需要改进的步骤,完善实验设计,从而更深入地掌握和理解实验的原理、方法步骤、结果和结论;微课3为课外小组利用身边的材料、用具所做的改进实验,学生可在观看后根据改进的实验方案继续深入探究。

1.1 利用微课引导学生完成实验设计

学生在观看微课1前完成教师布置的前测问题:(1)科学研究的一般流程是什么?(2)科学实验设计的基本原则是什么?(3)人在发烧时常常会感觉食欲不振,你认为这是是什么原因造成的?如何验证呢?

的可操作性。同时,该实验方案的实验现象明显,分组实验成功率达到100%,能够充分发挥育人功能,让学生在实验中体验成功的喜悦,同时提高学生的科学精神和探究能力。

参考文献

- [1] 陆奇,吴红漫.“DNA的粗提取与鉴定”的教学设计及实施[J].生物学通报,2015,50(3):48-51.
- [2] 张爱芳.DNA粗提取与鉴定实验中材料的选取和比较[J].内蒙古教育,2015(20):74.
- [3] 何敏,杨文敏,农清清,等.新型核酸染料SYBR-Green在检测基因扩增产物中的应用[J].广西医科大学学报,2003,20(1):7-10. △

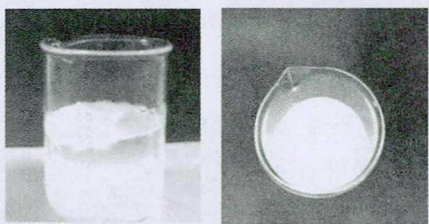


图3 SYBR Green I 荧光染色效果

5 讨论

本创新实验方案采用新方法,引入新设备,与实验教学高度融合,真正做到了创新为教学服务。改进后的实验方案取材方便,操作步骤简便、用时短,一节课就可以完成对动物、植物材料的实验,增强了实验