

“DNA 的粗提取与鉴定”实验改进

江苏省苏州工业园区星海实验中学(215021) 梁 玮

摘 要 介绍了 DNA 粗提取与鉴定实验材料的选择,实验用具的改进,实验原理及实验反思。

关键词 DNA 粗提;实验;材料;用具

文章编号 1005-2259(2018)10-0039-02

1 实验背景介绍

人教版《生物·选修1·生物技术实践》“DNA 和蛋白质技术”专题中的“DNA 的粗提取与鉴定”实验,是分子生物学领域的基础实验课题之一。该课题的目标是通过尝试对植物或动物组织中的 DNA 进行粗提取,了解 DNA 的物理化学性质,理解 DNA 粗提取以及 DNA 鉴定的原理。该实验在操作过程中存在以下问题:操作步骤多、复杂、材料难取,所用时间长,在一节课内无法完成,成功率低等。从该实验教学的现状出发,笔者在材料选择、处理方法上做了不同于教材实验方案的改进,为“DNA 的粗提取与鉴定”提供了适于演示、简便易行的探索途径。

2 实验材料选择

不同的实验材料提取 DNA 的方法也不尽相同,教材中重点介绍的材料是鸡血,但该材料存在不易获取等弊端。近年来,关于该实验材料选取的探索和研究有很多,如动物材料:猪的肝脏、鲤鱼的精巢(鱼白);植物材料:菜花、洋葱、香蕉和猕猴桃等。在实验材料选择时要因地制宜,推荐方便购买,并且 DNA 含量相对较高、蛋白质等杂质含量较少、颜色较浅的生物材料^[1]。因此,笔者选择了小麦胚芽粉作为本实验的优选材料。该实验材料是 100% 纯天然小麦胚芽,蛋白质、脂肪等含量较少,含水量少,含 DNA 相对较多,材料颜色浅,取材容易,价格低廉,且实验效果明显。因此,小麦胚芽粉可为实验教学提供数量充足、性价比高的实验材料。

3 实验用具改进

DNA 由于磷酸基团的存在而带大量负电荷,而

玻璃易带正电,所以该实验应尽量避免使用玻璃烧杯和试管等玻璃仪器,最好使用塑料烧杯和试管,以避免 DNA 吸附在玻璃表面,造成提取量降低。为了在短时间内用简便的方法提取 DNA,笔者选择 10 mL 螺口尖底塑料离心管(图 1)进行 DNA 的粗提取。

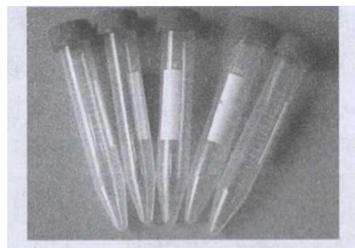


图 1 螺口尖底塑料离心管

4 实验原理解析

4.1 DNA 的溶解性

目前,提取 DNA 已经有了较为成熟的方法,常用的有 CTAB 法、SDS 法、盐析法等^[2]。人教教材利用“渗透吸水”和“盐析”的原理,引导学生理解 DNA 提取的实验原理^[3]。DNA 在不同浓度的 NaCl 溶液中溶解度不同。高浓度的 NaCl(2 mol/L)溶液能溶解较多的 DNA,而使杂质沉淀,达到分离的目的。核酸微溶于水而不溶于乙醇、乙醚和氯仿等一般有机溶剂,所以常用乙醇从溶液中沉淀核酸。DNA 由于含有磷酸基而可与阳离子 Na⁺ 结合,消除静电斥力,对 DNA 的结构有重要的稳定作用,所以 DNA 在浓盐溶液中的稳定性会高于在水中的稳定性。如果本实验提取的 DNA 无须长时间保存,那么可以选择使用更加方便易得的蒸馏水或自来水来溶解 DNA。DNA 不溶于酒精,而细胞中的某些蛋白质则溶于酒精。利用这一原理,可进一步去除杂质,分离并提取 DNA。



4.2 破坏细胞膜

DNA 主要存在于细胞核的双层膜结构中,细胞又由细胞膜包被。要获得游离的足量的 DNA,需要破坏细胞膜,使 DNA 释放出来。生物膜的主要成分是磷脂和蛋白质,若破坏磷脂的结构,膜的基本骨架就会瓦解。常用的洗涤剂等一些去污剂中存在离子表面活性剂,如十二烷基磺酸钠(SDS),可以有效破坏细胞膜的磷脂和膜蛋白,使植物细胞膜和核膜破碎,并可以使蛋白质变性,与 DNA 分离。

4.3 DNA 的鉴定

DNA 遇二苯胺试剂沸水浴加热显示蓝色,沸水浴加热是显色反应的必要条件,加热过程中就能观察到浅蓝色,冷却后蓝色更明显。蓝色的深浅与提取的 DNA 含量有关。如果鉴定溶液显浅蓝色,就证明提取出了 DNA。

5 实验过程简化

教师可根据实际情况,采取课堂演示或分组合作完成该实验,粗提取 DNA 的具体操作步骤(表 1):

表 1 粗提取 DNA 的实验操作步骤

步骤	方法
提取 DNA	取 1 mL 小麦胚芽粉于塑料离心管中,加入 3 mL 水,剧烈震荡 2 min
	↓
	加入洗涤剂(蓝月亮洗手液与水按 1:1 混匀)3 mL,上下颠倒离心管 1 min
	↓
	快速加入 3 mL 冷酒精
	↓
	析出白色絮状物,用玻璃棒卷起
	↓
	粗提取 DNA

将玻璃棒上的白色絮状物转移到加入了 5 mL NaCl (2 mol/L) 溶液的试管中,充分溶解后加入 4 mL 二苯胺试剂,沸水浴加热 5 min,取另一支试管作为空白对照。DNA 鉴定的结果:实验组变为浅蓝色,对照组不变蓝。

6 实验中关键问题的反思

6.1 实验材料和用具的选取

原则上含有 DNA 的细胞均可作为提取 DNA 的材料,如果以含有 DNA 的动物细胞作为实验材料,能方便地破碎细胞,但哪种材料 DNA 的含量更高,材料内蛋白质或脂肪等的含量较少,是关乎 DNA 提取分

离的关键因素。实验结果表明小麦胚芽粉是经济实惠的实验材料。

使用带盖的塑料离心管,一方面在提取 DNA 时可以方便操作者剧烈震荡或上下颠倒离心管,便于细胞破碎,另一方面离心管上标有刻度,方便操作者滴加试剂,适用于教师课堂演示和学生实验操作。

6.2 充分震荡

为了更好地获取细胞中的 DNA,选择植物材料时只有打开细胞壁、细胞膜才能让细胞的内容物充分流出,所以实验操作中往往要充分研磨。在塑料离心管中进行 DNA 的粗提取时,代替快速充分研磨的方法是充分震荡。在加入水之后剧烈震荡,目的是使植物细胞快速吸水,细胞结构破碎。加入洗涤剂的混合液后,不再剧烈震荡,以免产生大量泡沫影响实验效果,而要采用较为缓和的上下颠倒离心管的方法,目的是使植物细胞与洗涤剂充分接触,有效地破坏细胞膜,释放 DNA。

6.3 冷却后颜色反应更明显

使用二苯胺试剂鉴定 DNA 时,若沸水浴显蓝色,说明实验基本成功。蓝色较深,说明提取的 DNA 量较多。沸水浴加热显色需要一定的时间,有些学生在沸水浴加热的过程中发现溶液未显蓝色或蓝色较浅,于是草草得出实验失败的结论。教师应引导学生耐心等待,虽然加热的过程中就能观察到加入二苯胺试剂的提取液显蓝色,但冷却后蓝色会更加明显,笔者甚至发现在实验后 24 h 和沸水浴结束后 5 min 的蓝色深浅存在明显差异。因本实验为定性实验,所以如果实验显示浅蓝色,就证明提取出了 DNA。

总之,改进后的实验不同于教材上的实验方案,该实验操作简便,实验条件要求低,取材方便易得,成本低廉,显著缩短了操作时间,既适用于教师课堂演示,充分调动了学生学习的兴趣,又增强了学生实验的可操作性,一堂课即可完成教学任务,实验现象明显,成功率高。

参考文献

- [1] 陈国梁,张向前,刘勇,等.“DNA 的粗提取与鉴定”实验材料的选择及实验步骤的改进[J]. 生物学通报,2005,40(3):50-51.
- [2] 韩玉杰,贾玮珑,王自霞,等.几种提取植物 DNA 方法的比较[J]. 山西农业科学,2008,36(7):17-19. ▲