



DNA 粗提取与鉴定的比较和实验设计

周金成 江苏省无锡市玉祁高级中学(214183)

陈 维 南京师范大学惠山实验中学(214170)

“DNA 粗提取与鉴定”是人教版高中生物教材选修一中的一节内容,有些同仁对利用某一种植物材料进行实验的过程和结果进行描述,而笔者尝试利用几种不同植物材料进行实验和比较,并对几种增强实验效果的设想进行验证。

一、对细胞中染色体数目多的材料进行实验并比较实验现象

教材上列举的植物是菜花,笔者按照所述的步骤进行实验,鉴定现象并不明显。染色体是由蛋白质和 DNA 组成的,因此染色体数目多的材料细胞中 DNA 含量就高,是不是染色体含量高的材料实验现象更明显呢?笔者通过查找资料选择了菜花(体细胞 $2n=16$)、香蕉(体细胞 $3n=33$)、猕猴桃(体细胞 $2n=116$)分别进行实验和比较。

1. 实验步骤。

(1) 取材。称取 30 g 植物材料,切碎。

(2) 研磨。将碎菜花放入研钵中,倒入 10 mL 研磨液,充分研磨 10 min。

(3) 过滤。在漏斗中垫上尼龙纱布,将研磨液过滤到烧杯中(有条件的学校可将滤液倒入塑料离心管中进行离心,用 1 000 r/min 的转速离心 2~5 min,取上清液放入烧杯中)。在 4℃ 冰箱中放置几分钟后再取上清液。

(4) 沉淀。将一倍体积的上清液倒入两倍体积的体积分数为 95% 的预冷乙醇溶液中,并用玻璃棒缓缓、轻轻地搅拌溶液(注意玻璃棒不要直插到烧杯底

部)。沉淀 3~5 min 后,可见白色的 DNA 絮状物出现。用玻璃棒缓缓旋转,将絮状物缠绕在玻璃棒上。

(5) 鉴定。取两支试管,各加 2 mol/L 的 NaCl 溶液 5 mL,其中一支加 DNA 丝状物搅拌溶解,再各加入 4 mL 二苯胺,水浴煮沸 5 min,观察颜色变化。

2. 实验比较。

实验情况比较如表 1 所示。

3. 不同阶段差异分析。

(1) 滤液的比较。菜花和香蕉含水量相对较少,滤液体积和加入的研磨液体积相近,猕猴桃含水量较高,滤液体积增多。菜花的滤液颜色一直是白色的,香蕉滤液因为容易氧化而呈褐色,猕猴桃滤液因自身所带色素而呈浅黄绿色。

(2) 析出絮状物比较。相同重量的 3 种植物材料,经过研磨、过滤,析出的絮状物具体情况见图 1、图 2、图 3。



图 1 菜花析出物



图 2 香蕉析出物



图 3 猕猴桃析出物

图 1、图 2、图 3 分别对应菜花、香蕉、猕猴桃,从图中可以看出,3 种材料析出絮状物数量差异不大,

表 1 实验比较

材料	步 骤				
	研 磨	过 滤	离 心	沉 淀	鉴 定
菜花($2n=16$)	材料较硬,研磨困难,时间长	所得滤液与加入研磨液体积相近,10 mL 左右	离心管底部有少量沉淀	大量白色絮状沉淀	淡蓝色
香蕉($3n=33$)	容易研磨	所得滤液与加入研磨液体积相近,10 mL 左右	离心管底部有极少量沉淀	大量白色絮状沉淀	几乎无蓝色
猕猴桃($2n=116$)	容易研磨	所得滤液 15 mL 左右	离心管底部有较多沉淀	大量白色絮状沉淀	深蓝色



颜色略有差异。

(3) 鉴定结果的比较。具体现象如图 4 所示,从左到右依次是猕猴桃、香蕉、菜花、空白对照。从现象可以看出菜花细胞中染色体数目最少,但仍有淡蓝色出现;香蕉细胞中染色体数目较多,几乎无蓝色出现;猕猴桃细胞中染色体数目最多,有较深的蓝色出现。从以上 3 组实验结果分析来看,DNA 的提取数量与材料细胞中染色体数目没有必然的关系。在具体的操作过程中,香蕉的研磨需要快速进行,因为香蕉容易被氧化成褐色,对实验现象的观察有一定影响;猕猴桃的滤液呈黄绿色,因为鉴定蓝色比较明显,所以影响不是太大。

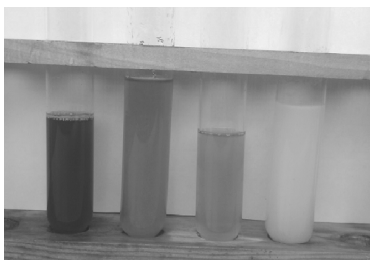


图 4 实验结果比较

二、絮状物成分分析和纯化 DNA 的尝试

在教学中,许多学生在实验中析出了大量絮状物,但鉴定的现象并不一定明显,这说明絮状物含有大量杂质,那么杂质的主要成分是什么呢?笔者取少量絮状物溶解于蒸馏水中,加入双缩脲试剂,摇匀后观察可见紫色现象,这说明絮状物中含有蛋白质。如何能减少蛋白质对实验的影响呢?与 DNA 相比,蛋白质对温度、盐浓度、pH 等条件要敏感得多,笔者进行如下操作验证。

1. 利用 DNA 与蛋白质对温度的耐受性不同原理。将滤液放在 60~75 °C 恒温水浴锅中处理 10~15 min,用尼龙板过滤,从而达到与 DNA 纯化的目的,或者将植物材料用 70 °C 的热水处理 5 min 后再研磨,这样处理后植物材料变得松软,容易研磨,加入冷酒精后析出的絮状物比没处理的材料数量要少,鉴定现象相近,具体现象见图 5,左边试管为热水处理过的菜花鉴定现象。

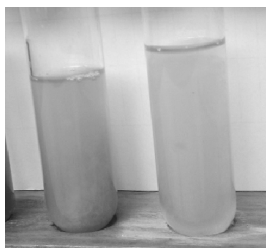


图 5 实验现象

2. 利用酶的专一性原理。蛋白酶可以分解蛋白

质,不会损伤 DNA,在滤液中加入嫩肉粉,反应 10~15 min,嫩肉粉中的木瓜蛋白酶会分解蛋白质。

3. 利用 DNA 和蛋白质等在不同浓度的 NaCl 溶液中溶解度不同的原理,其中 DNA 在 0.14 mol/L 的 NaCl 溶液中溶解度最低,降低或升高其浓度,DNA 溶解度提高,利用这一特点,使 DNA 在不同浓度盐溶液中反复溶解和析出,达到去除杂质的目的。具体做法是:在过滤得到的含 DNA 的滤液中加入 NaCl,使其浓度为 2 mol/L,过滤除去不溶的杂质,再加蒸馏水调节 NaCl 溶液浓度为 0.14 mol/L,析出 DNA,过滤去除溶液中的杂质,再用 2 mol/L 的 NaCl 溶液溶解 DNA,过滤去除杂质。

4. 参考教参,由于氯仿可使蛋白质变性沉淀,而 DNA 易溶解于其中,对 DNA 结构无影响,因此可将滤液与等量氯仿混合,静置一段时间,大多数蛋白质变性沉淀,而 DNA 溶解于上清液中,从而可吸取上清液,从上清液中提取 DNA。

在上述 4 种方法中,可以将大多数的蛋白质除去,教师可以根据学校的条件让学生自己设计实验方案,比较实验结果。然而,大多数糖类杂质较难除去,在糖类浓度比较高时常常使提取物呈胶状,因而影响鉴定效果。实验前应将材料于低温、暗处保存,这样就可以降低多糖的含量,使实验效果更加明显。

三、关注细节,让鉴定现象更明显

1. 粗提取阶段。实验前选择新鲜的材料放在冰箱中保存,以降低多糖的含量。加入的研磨液应包含弱碱性的缓冲体系,因为在酸性溶液中,DNA 易水解,在中性或弱碱性溶液中较稳定。研磨要充分,时间至少 10 min,让洗涤剂充分与细胞接触,瓦解细胞膜,把细胞中的 DNA 释放出来,溶解在研磨液中。在加入冷酒精后,尽可能缓慢搅拌,让析出的 DNA 尽可能缠绕在玻璃棒上。

2. 鉴定阶段。将上述白色絮状物尽可能取出,溶于尽可能少体积的 2 mol/L 的 NaCl 溶液中,提高溶液中 DNA 的浓度。在进行沸水浴时,等烧杯中的水沸腾后再放入试管,时间要不少于 15 min。在高温条件下试管中的现象可能会不明显,若等冷却到室温后再观察,现象则会更明显。具体现象见图 6,其中 a 为冷却前,b 为冷却后。

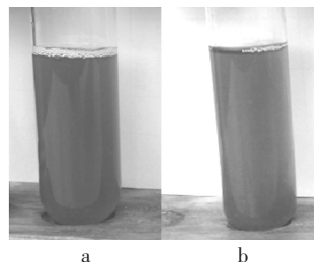


图 6 实验现象