

实验六 DNA指纹图谱分析

（综合性开放性实验）

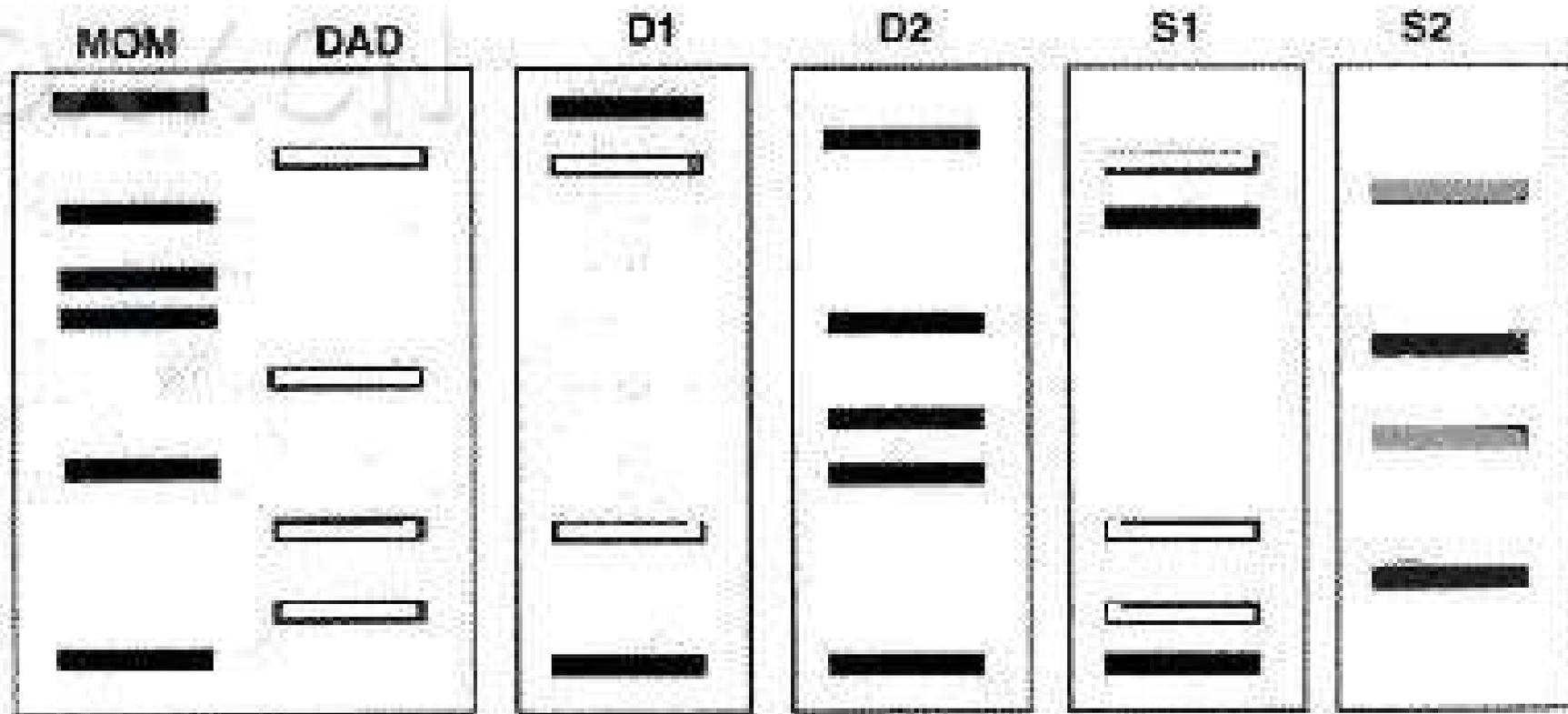
一、实验目的

1. 掌握**DNA**指纹图谱技术的概念、原理和基本操作过程
2. 学习**DNA**的限制性酶切的基本技术
3. 掌握琼脂糖凝胶电泳的基本操作技术，学习利用琼脂糖凝胶电泳测定**DNA**片段的长度，并能对实验结果进行分析。

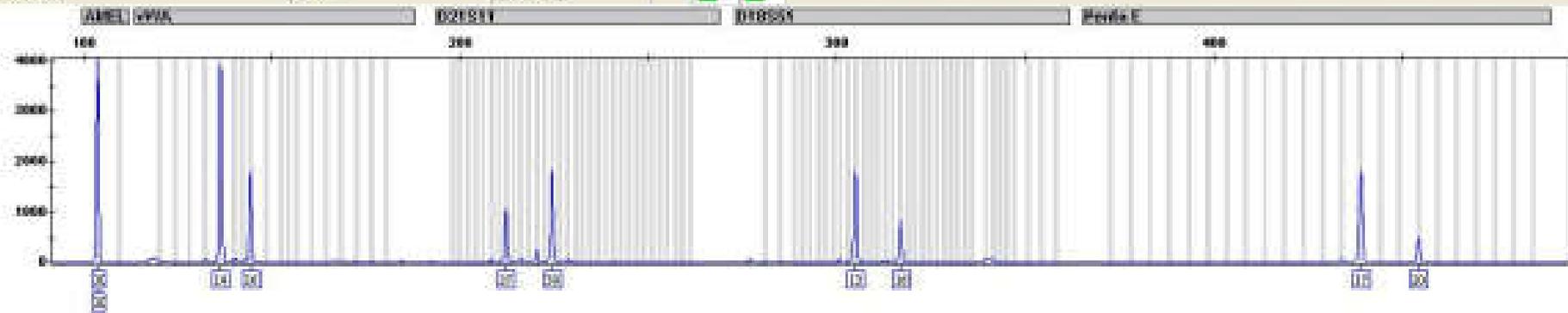
二、实验原理

- DNA指纹图谱是采用检测DNA多态性（生物的不同个体或不同种群在DNA结构上存在着差异）的多种多样的手段，如RFLP（限制性内切酶酶切片段长度多态性）分析、串联重复序列分析、RAPD（随机扩增多态性DNA）分析等，产生的具有完全个体特异的DNA多态性图谱。

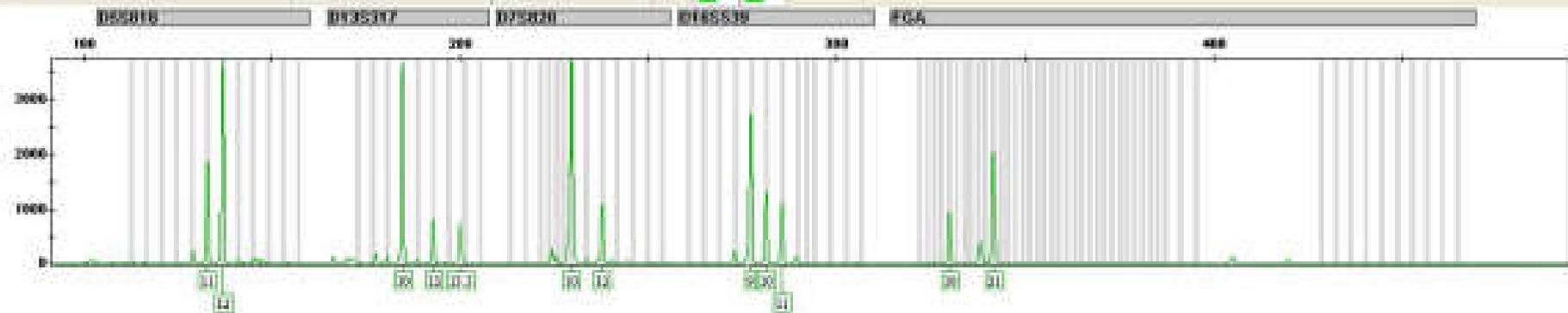
- **DNA**指纹具有下述特点：
- **1. 高度的特异性：**研究表明，两个随机个体具有相同**DNA**图形的概率仅 3×10^{-11} ；如果同时用两种探针进行比较，两个个体完全相同的概率小于 5×10^{-19} 。全世界人口约**50**亿，即 5×10^9 。因此，除非是同卵双生子女，否则几乎不可能有两个人的**DNA**指纹的图形完全相同。
- **2. 稳定的遗传性：****DNA**是人的遗传物质，其特征是由父母遗传的。分析发现，**DNA** 指纹图谱中几乎每一条带纹都能在其双亲之一的图谱中找到，这种带纹符合经典的孟德尔遗传规律，即双方的特征平均传递**50%**给子代。
- **3. 体细胞稳定性：**即同一个人的不同组织如血液、肌肉、毛发、精液等产生的**DNA**指纹图形完全一致。



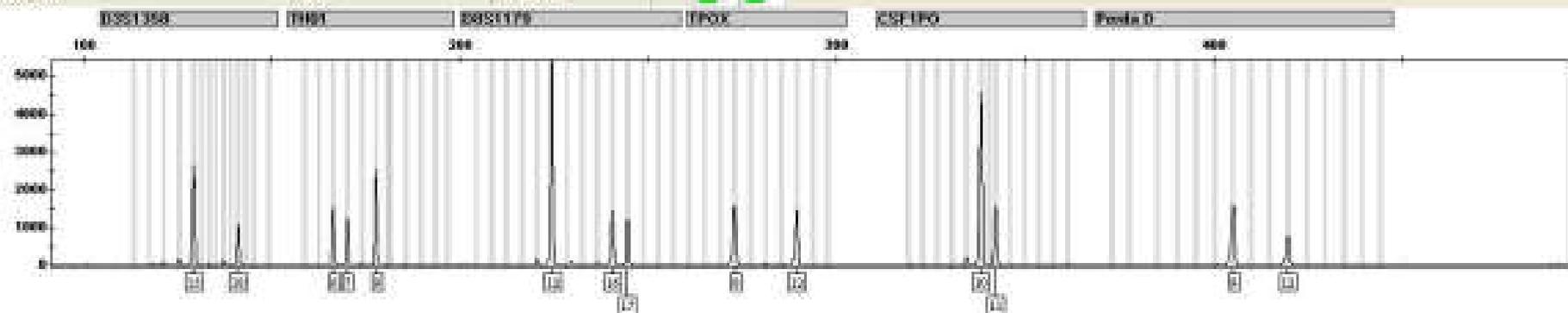
Sample File	Sample Name	Panel	QC1	QC2
000_0020.fw	H920	16A_v1.3	■	■



Sample File	Sample Name	Panel	QC1	QC2
000_0020.fw	H920	16A_v1.3	■	■



Sample File	Sample Name	Panel	QC1	QC2
000_0020.fw	H920	16A_v1.3	■	■



- **DNA**指纹图谱法的基本操作：
- 从生物样品中提取**DNA**（**DNA**一般都有部分的降解），可运用**PCR**技术扩增出高可变位点（如**VNTR**系统，串联重复的小卫星**DNA**等）或者完整的基因组**DNA**，然后将扩增出的**DNA**酶切成**DNA**片断，经琼脂糖凝胶电泳，按分子量大小分离后，转移至尼龙滤膜上，然后将已标记的小卫星**DNA**探针与膜上具有互补碱基序列的**DNA**片段杂交，用放射自显影便可获得**DNA**指纹图谱。

三、实验材料

- **1. DNA**样品来源:
- 枯草芽孢杆菌、
- 苏云金芽孢杆菌、
- 两种鸡（三栋鸡与白毛乌骨鸡）的血液

四、实验器具和药品

1.实验试剂

(1) **DNA样品反应缓冲液**: 100mM Tris, 200mM NaCl, 20mM MgCl₂, 2mM DTT, pH 8.0

2X CTAB提取缓冲液: 2%(W/v) CTAB, 100mM Tris-HCl(pH8.0), 20mM EDTA(pH8.0), 1.4M NaCl, 1%(W/v)PVP-400, 40mM β-巯基乙醇。

(2) **EcoR I 限制性内切酶**

(3) **EcoR V 限制性内切酶**

(4) **电泳缓冲液 (50× TAE)**

Tris 242g

冰醋酸 57.1ml

EDTA (0.5mol/L pH 8.0) 100ml

使用时用蒸馏水稀释**50倍**。

(5) 样品缓冲液 (DNA sample loading dye)

0.25% 溴酚蓝

0.25% 二甲苯青

40% (W/V) 蔗糖

(6) Gold View 10mg/ml

(7) 琼脂糖 agarose (电泳级)

(8) DNA 分子量标记物: Lambda HindIII DNA markers

2. 仪器设备和消耗品

电泳仪、电泳槽、样品梳、微波炉、水浴锅、移液器（**10 μ l**, **200 μ l**, **1000 μ l**）、离心管、一次性枪头（**200 μ l**, **1000 μ l**）。

五、实验过程

1.DNA样品的制备

(1) 细菌DNA提取

1 ml 菌液, 10000 转/分, 5 min, 弃上清

↓
加 800ul 2XCTAB 提取液

↓
90°C, 温育 10-60min

↓
冷却至室温, 加等体积(600ul)氯仿异戊醇

↓
10000 转/分, 10min

↓
取上清液 400ul, 加 2.5 体积冰冻无水乙醇(1000 ul)

↓
10000 转/分, 5min

↓
沉淀为 DNA, 加 1ml 70%乙醇清洗

↓
倒去乙醇, 待干后加 100ul 无菌水, -20°C 保存

(2) 血液DNA提取

按照试剂盒说明书操作

2. PCR扩增目的片段

(1) 基于目的片段设计PCR扩增引物

细菌16s RNA通用引物:

27F: 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'

1429R: 5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3'

357F: 5' CTC CTA CGG GAG GCA GCA G 3'

1525R: 5' AAG GAG GTG WTC CAR CC 3'

鸟类DNA条形码引物

BirdF1 : TTCTCCAACCACAAAGACATT GGCAC

BirdR1 : ACGTGGGAGATAATTCCAAATCCTG

(2) 按照PCR试剂说明书加入各试剂

(3) PCR扩增程序, 总时间约3小时

①94 °C 预变性5min后进入循环

②94 °C 变性30S

③52 °C 复性45S

④72 °C 延伸1min

⑤Go to ②, 34 cycle

⑥72 °C 延伸8min

⑦12 °C Forever

⑧End

3. DNA样品的酶切反应

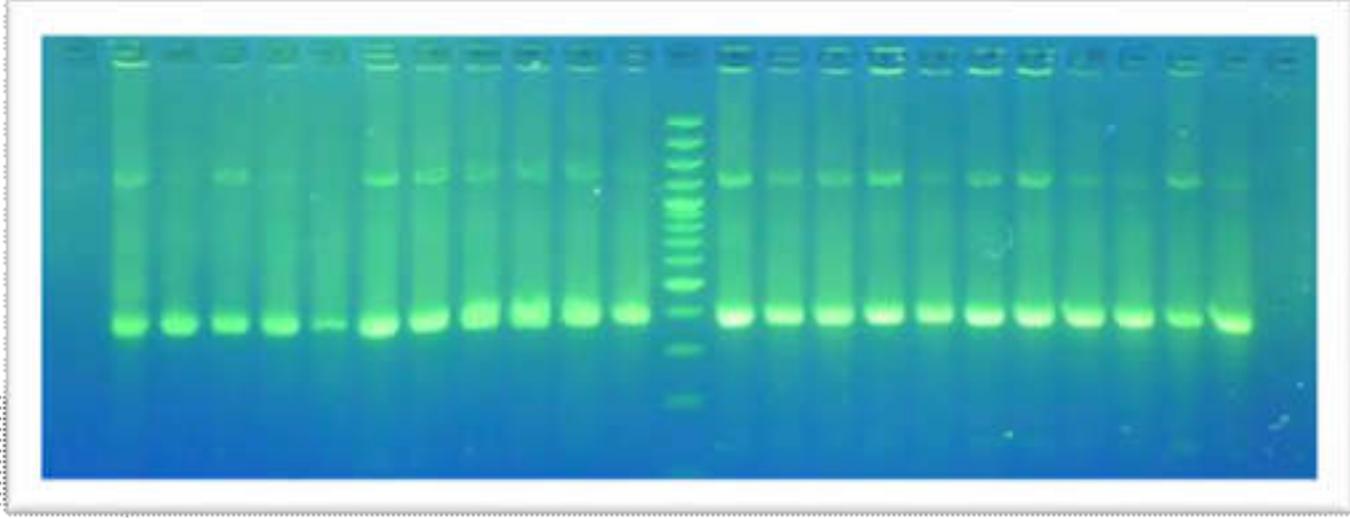
设置DNA样品的双酶切反应，按下列顺序加样

试剂	体积
水	20 μ l
基因组DNA	5 μ l
酶切Buffer	3 μ l
BamH I	1 μ l
EcoR V	1 μ l
共计	30 μ l

加完反应液，温和混匀，置于**37°C**水浴中反应**1**小时，取出备用或**-20°C**保存。

4. 酶切产物的琼脂糖电泳

- (1) 制agarose凝胶：称0.3g agarose，倒入250ml三角瓶中，加1X TBE溶液50ml，水浴加热溶解。冷却至60°C，用移液器加入2ul EB溶液，晃动使混匀。将制胶板两端密封，放上梳子，倒胶，30~60min胶凝固后，拔去梳子。
- (2) 上样：将胶板两端的挡板或胶布移去，把胶板置于电泳槽中，注入1X TBE缓冲液，使电泳缓冲液液面高出胶平面1cm左右。移取载样缓冲液15ul，DNA提取液2ul，混匀后将样品液加入梳孔中。在两端或中央梳孔上加入DNA ladder标记。
- (3) 电泳：接通电泳仪，上样品端接负极。调节电压电流，电压5-10V/cm，电流10~50mA。恒压电泳2小时左右。
- (4) 检测：关闭电泳仪，将电泳后的凝胶置于紫外分析仪上观测。DNA被溴化乙锭染色后在紫外光下呈现金黄色荧光，照相后关闭电源（紫外线对人眼有害，不要久看）。



例

犯罪

嫌犯
1

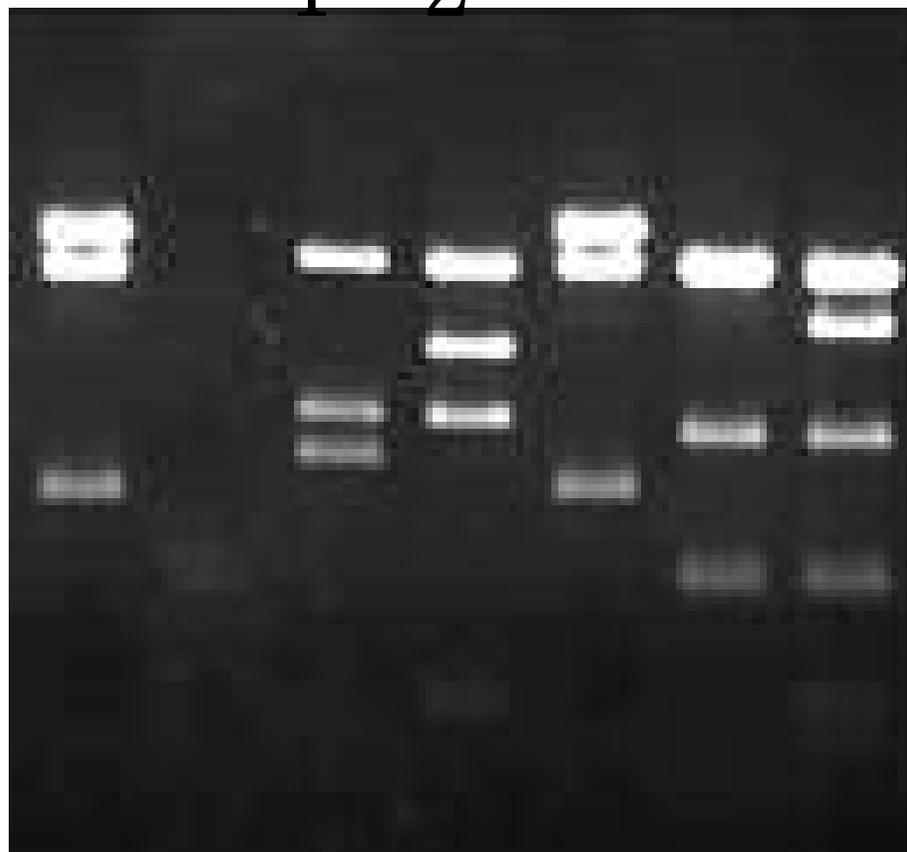
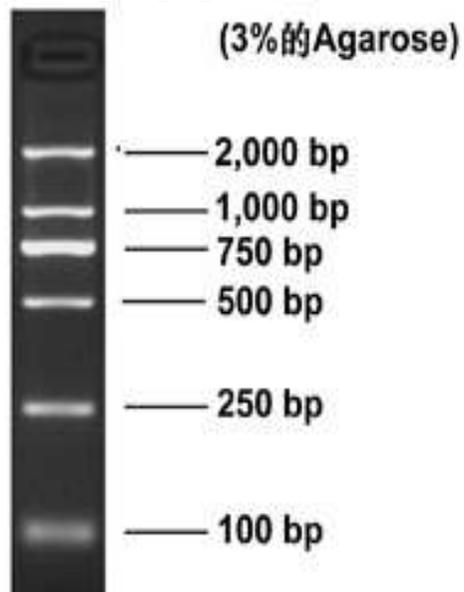
嫌犯
2

嫌犯

嫌犯

嫌犯

图



请注意电泳图片的方向！

六、作业

- 每组协作提交：**DNA**指纹图谱实验进展及总结报告一份，并PPT汇报3-5min（第10周）

注意观察（拍照）各实验过程：DNA提取、PCR扩增、酶切、电泳

课外查阅资料，也可以自己设计方案

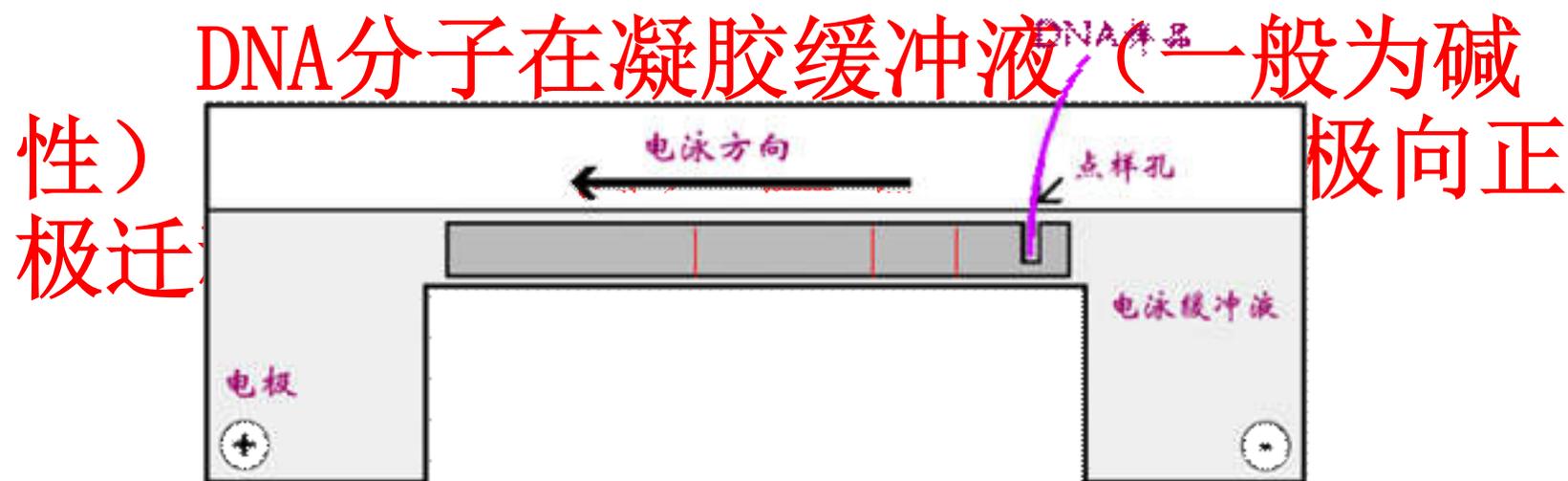
附件：DNA电泳课件

DNA凝胶电泳

DNA agarose gel electrophoresis

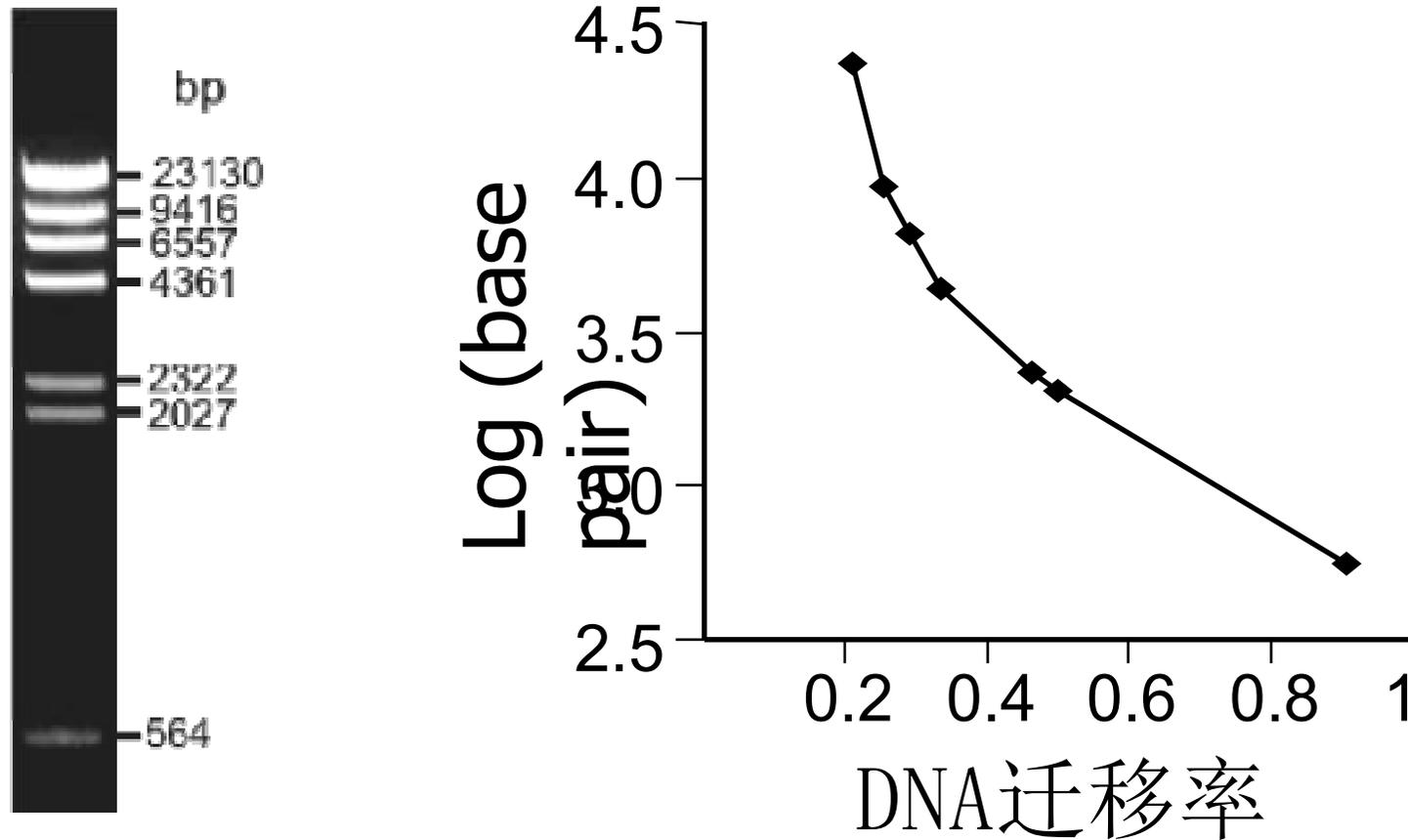
琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖凝胶电泳是分离，鉴定和纯化DNA片段的常规方法。在基因工程的常规操作中，应用最为广泛。它通常采用水平电泳装置，在强度和方向恒定的电场下进行电泳。



线性双链DNA分子的电泳规律

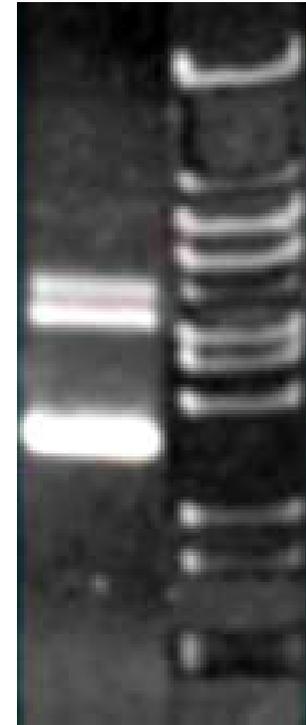
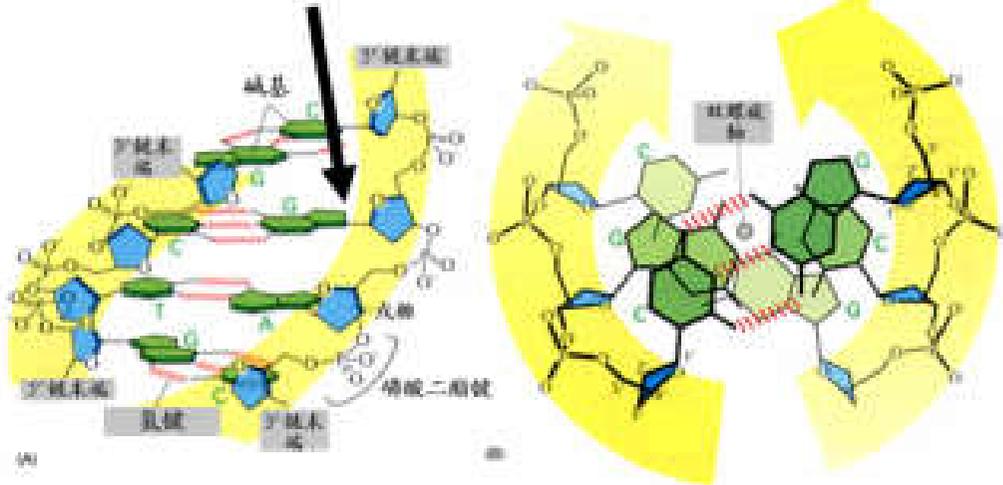
琼脂糖凝胶可以分离长度为200bp至近50kbp的DNA，DNA分子迁移的速率与分子大小成反比。



DNA分子的观察

Goldview核酸染料能够嵌入DNA双螺旋分子中，紫外灯下发出绿色荧光，使DNA可见。

Goldview



* 实验原理

- 琼脂糖凝胶电泳是常用的用于分离、鉴定DNA、RNA分子混合物的方法，这种电泳方法以琼脂凝胶作为支持物，利用DNA分子在泳动时的电荷效应和分子筛效应，达到分离混合物的目的。DNA分子在高于其等电点的溶液中带负电，在电场中向阳极移动。
- 在一定的电场强度下，DNA分子的迁移速度取决于分子筛效应，即分子本身的大小和构型是主要的影响因素。DNA分子的迁移速度与其相对分子量成反比。
- 不同构型的DNA分子的迁移速度不同。如环形DNA分子样品，其中有三种构型的分子：共价闭合环状的超螺旋分子（cccDNA）、开环分子（ocDNA）、和线形DNA分子（lDNA）。这三种不同构型分子进行电泳时的迁移速度大小顺序为： $cccDNA > lDNA > ocDNA$ 。

* 实验原理

- 当用低浓度的荧光嵌入染料溴化乙锭 (Ethidium bromide, EB) 染色，在紫外光下至少可以检出1-10ng的DNA条带，从而可以确定DNA片段在凝胶中的位置。此外，还可以从电泳后的凝胶中回收特定的DNA条带，用于以后的克隆操作。
- GoldView II是一种可代替溴化乙锭 (EB) 的新型花青类核酸染料，采用琼脂糖电泳检测DNA时，GoldView II与核酸结合后能产生很强的荧光信号，其灵敏度比EB强5-10倍，使用方法与之完全相同。

* 实验原理



➤ GoldView II与核酸结合后，最大吸收峰为497nm，另外，其在254nm处也有一强吸收峰，发射波长为520nm，在紫外透射光下双链DNA呈现绿色荧光，而且也可用于染RNA。

➤ 通过Ames试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验、小鼠睾丸精母细胞染色体畸变试验，致突变性结果均为阴性；而溴化乙锭（EB）是一种强致癌剂。因此用Goldview II代替EB不失为一种明智的选择。

GoldView II 核酸染料说明书

货号：G8142

规格：0.5ml (5000×)

保存：-20℃，短期4℃保存。

注意：本产品属于微量核酸检测试剂，使

* 实验材料和试剂

实验材料：PCR产物,基因组DNA,质粒DNA等，购买
或自行提取纯化。

实验试剂：

- ① 6×电泳载样缓冲液：0.25% 溴粉蓝，40% (w/v) 蔗糖水溶液，贮存于4℃。
- ② 琼脂糖
- ③ 1×TAE(40mM Tris, 20mM NaAc, 1mM EDTA pH8.0)
- ④ GoldView溶液母液(5000×)。

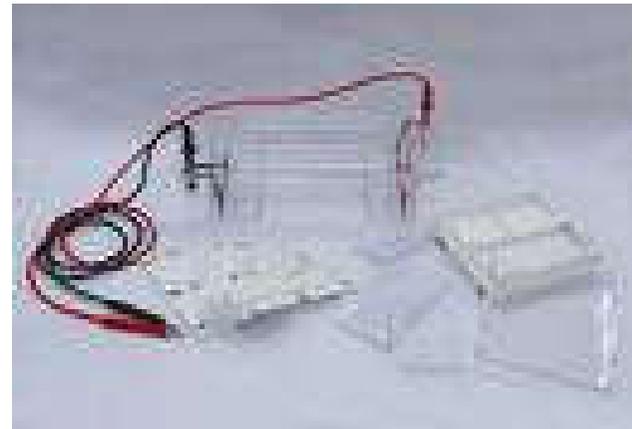
实验仪器



微波炉



凝胶电泳槽





凝胶成像 系统



三、实验步骤

- (一) DNA样品的提取和酶切
- (二) 制胶
- (三) 点样
- (四) 电泳
- (五) 观察

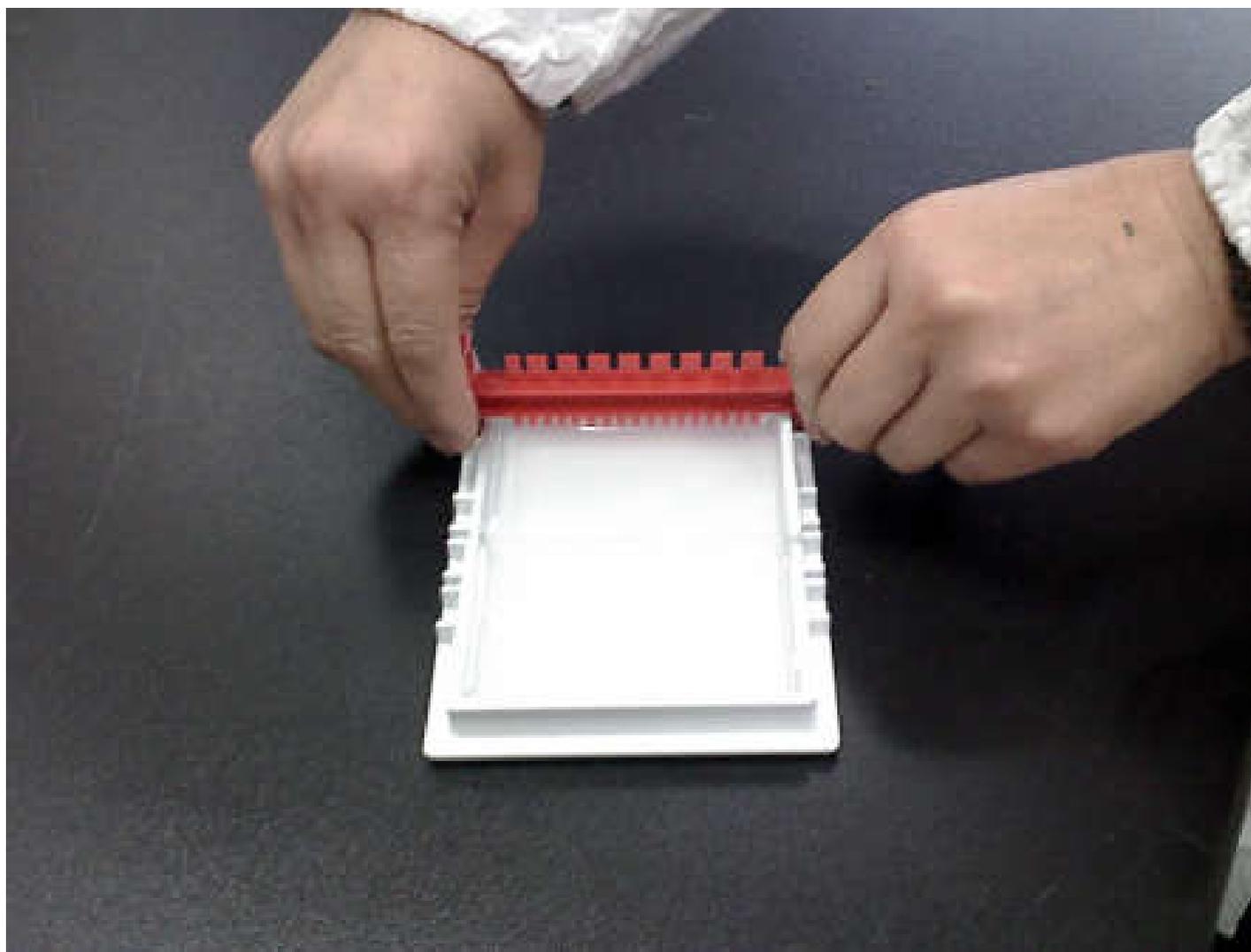
* 实验步骤

1. 胶液的制备：称取0.4g琼脂糖，置于200mL锥形瓶中，加入50mL 1×TAE稀释缓冲液，放入微波炉里加热至琼脂糖全部融化，取出摇匀，此为0.8%琼脂糖凝胶液。加热过程中要不时摇动，使附于瓶壁上的琼脂糖颗粒进入溶液。
2. 胶板的制备：将封好的胶槽置于水平支持物上，插上样品梳子，注意观察梳子齿下缘应与胶槽底面保持1mm左右的间隙。

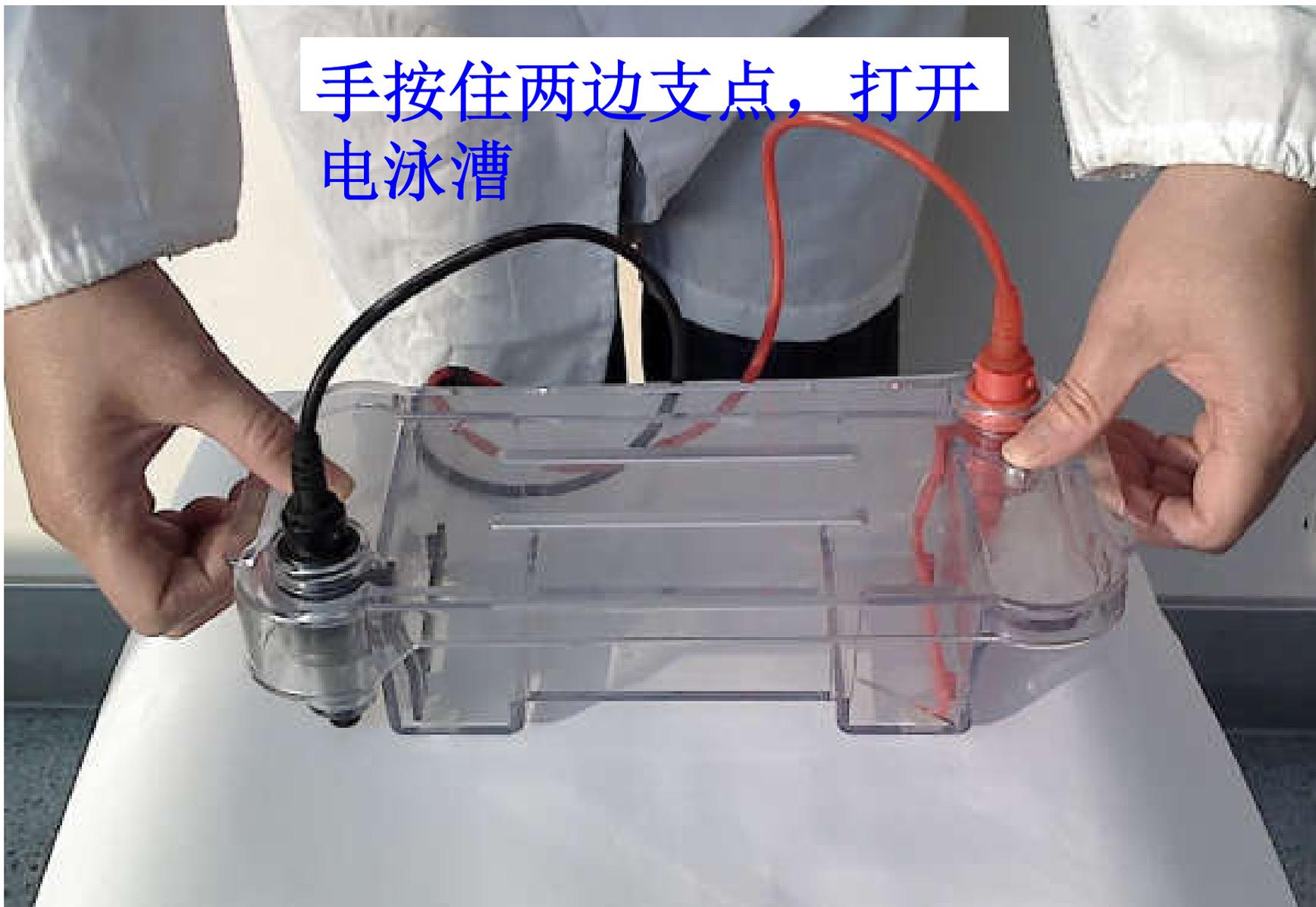
* 实验步骤

5. 加样：取 $10\ \mu\text{L}$ DNA样品与 $2\ \mu\text{L}$ $6\times$ 上样液混匀，用微量移液枪小心加入样品槽中。若DNA含量偏低，则可依上述比例增加上样量，但总体积不可超过样品槽容量。每加完一个样品要更换tip头，以防止互相污染，注意上样时要小心操作，避免损坏凝胶或将样品槽底部凝胶刺穿。
6. 电泳：加完样后，合上电泳槽盖，立即接通电源。控制电压保持在60-80V，电流在40mA以上。当溴酚蓝条带移动到距凝胶前沿约2cm时，停止电泳。
7. 观察和拍照：在波长为254nm的长波长紫外灯下观察染色后的或已加有EB的电泳胶板。

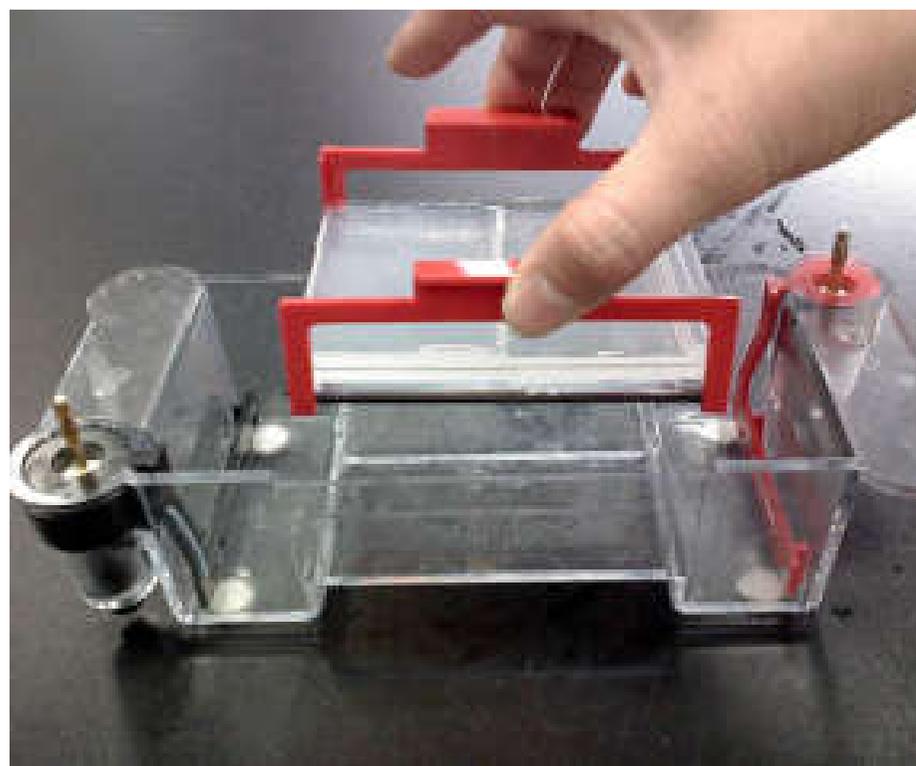
移去梳子



手按住两边支点，打开
电泳槽



把支架放入电泳槽中，注意正负极方向





转动移液器推杆调节量程3ul,
用力上好枪头, 禁止不加枪头使用

下压推杆至设定量程，将枪头伸到液面下



缓慢松开推杆，液体吸入枪头



下压推杆至底，挤出所有液体



去枪头的方法



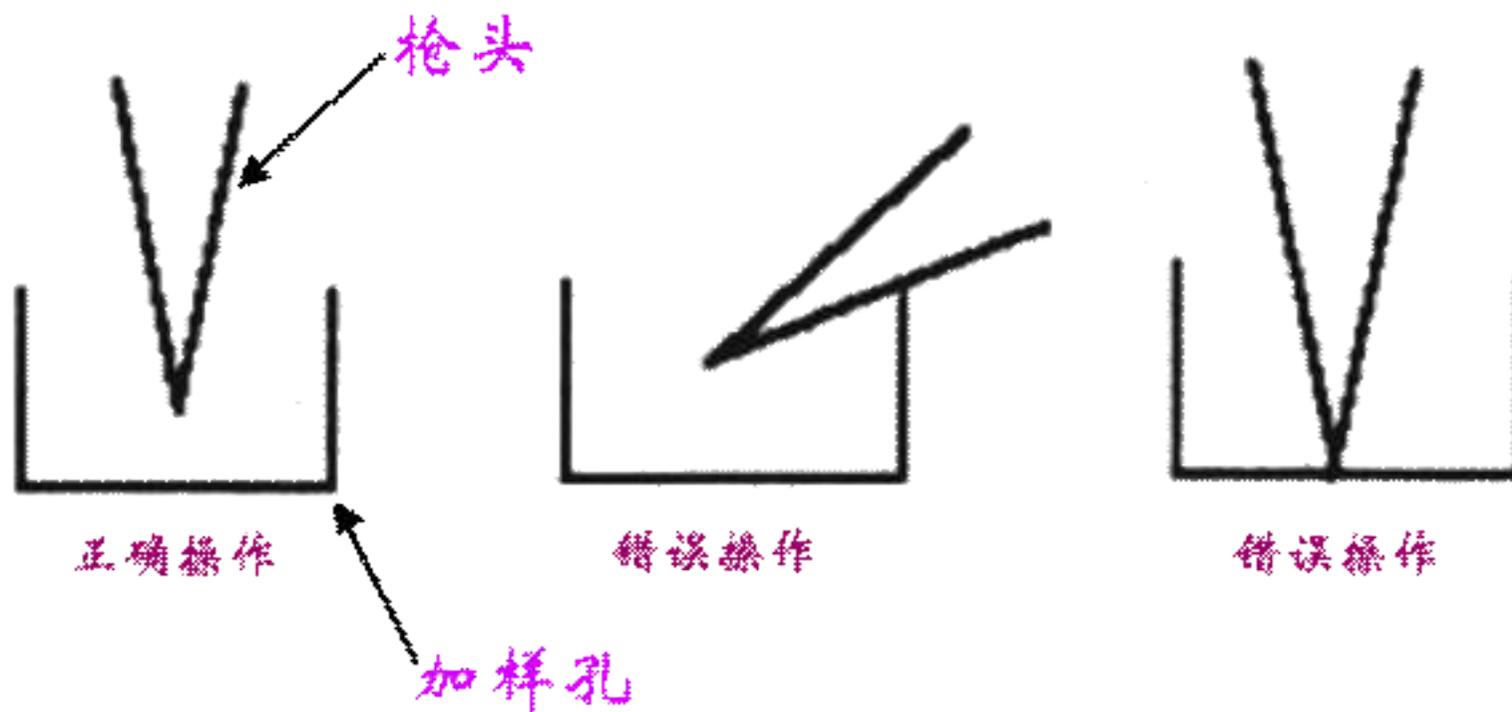
使用过的枪头和EP管请弃去
不同的样品要使用不同的枪头



请在桌面滴一滴水，把水滴从一处移到另一处，枪头尖端不能有空气，练习枪的使用



加样的正确操作



四 注意事项

- 1、电泳结束后，不要倒掉电泳液。
- 2、实验设备及用品清理，归位后，教师检查合格方可离开实验室。
- 3、实验报告请标注报告人点样的DNA条带。

例
图

犯罪

嫌犯
1

嫌犯
2

嫌犯
3

嫌犯
4

嫌犯
5



(3%的Agarose)

2,000 bp

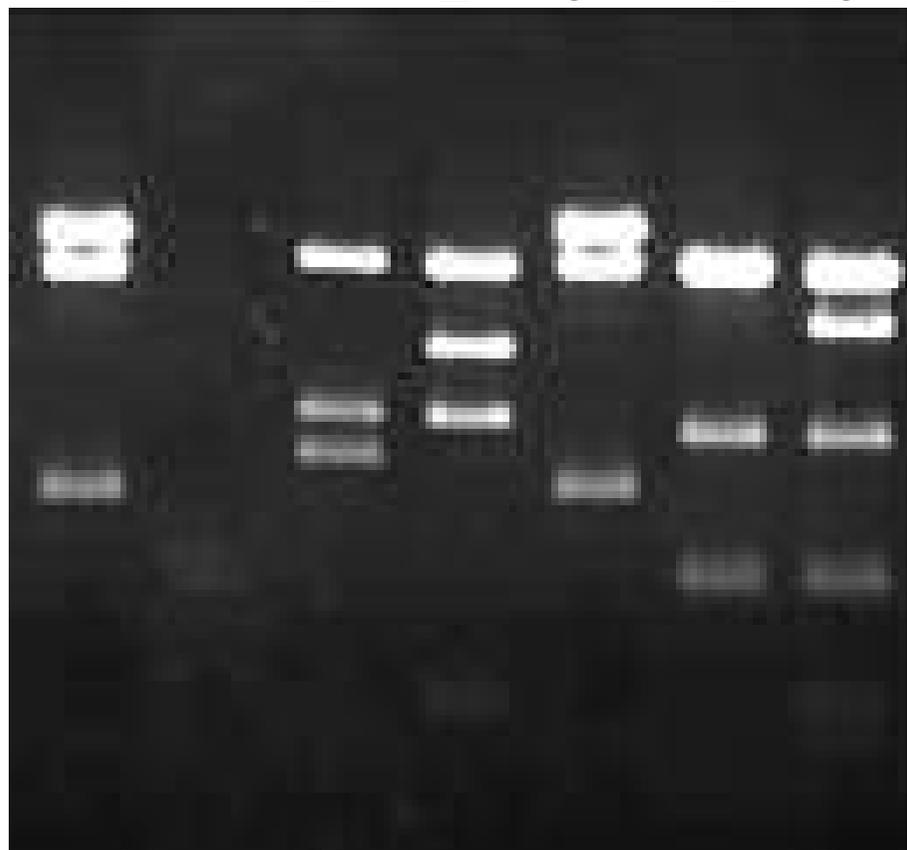
1,000 bp

750 bp

500 bp

250 bp

100 bp



请注意电泳图片的方向！