

# 酵母菌菌落 PCR 实验报告

人大附中翠微学校 高二五班 陈梓睿

## 一、引言

在微生物学和遗传学研究中，酵母菌作为一种重要的模式生物，被广泛用于探究细胞生物学、分子生物学和遗传学等领域的基本问题。随着基因工程技术的不断发展，PCR（聚合酶链式反应）作为一种敏感、高效的分子生物学技术，被广泛应用于酵母菌基因检测、表达分析以及遗传修饰等方面。

本次实验利用 PCR 技术，扩增酵母菌 26S rRNA D1/D2 区段。通过这一实验，可以建立一种简单、高效的菌落 PCR 方法，用于酵母菌菌落中目标片段的扩增与检测。

实验在人大附中翠微学校高中部生物实验室进行。所菌株使用由本实验室保存于 LB 培养基的发面酵母。菌液使用安琪酵母股份有限公司于 2023/10/9 生产的高活性干酵母粉与蒸馏水配制。菌液于 3/12 13:40 按 1:4 稀释比例配制，于 3/15 13:34 涂布接种于 LB 培养基。实验具体时间如下表：

| 过程    | 日期        | 体系配制  | PCR 结束 | 制胶    | 加样    | 电泳    | 成像    |
|-------|-----------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| 预实验   | 2024/3/28 | 10:55 | 13:12  | 3/28  | 16:43 | 17:05 | 18:26 |
| 模板量实验 | 2024/3/29 | 09:46 | 11:51  | 13:40 | 12:51 | 12:56 | 13:43 |

表 1 实验具体时间明细

## 二、材料与方法

### 1. 材料

- (1) 菌株：发面酵母（*Saccharomyces*）
- (2) 试剂：Taq mix、ddH<sub>2</sub>O、琼脂糖、DL2000 等均购自北京索莱宝科技有限公司。

### (3) 引物设计

扩增片段 NCBI 编号 DQ472019.1, 构造与 5'端前 24 个碱基相同的上游引物 NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAGGAA AAG- 3')、3'端后 19 个碱基相反的下游引物 NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G- 3')。引物由北京生工生物工程技术有限公司合成。

## 2. 方法

### (1) 预实验

- ① 实验目的: 测试引物、体系、PCR 设置等是否合理。
- ② PCR 模板的制备: 直接将单菌落加入至体系中并混匀。
- ③ 组别设置

重复实验三人同时完成: 由贾梦琦老师制作的组别标记为 A、B、C、D; 由杨未晞制作的组别标记为 1、2、3、4; 由陈梓睿制作的组别标记为 I、II、III、IV。设置完全相同的四组实验重复三次, 取前两组进行实验, 后两组于冰柜中封存。

- ④ PCR 扩增

50 $\mu$ L 反应体系由引物 NL1/NL4 各 2 $\mu$ L、Taq 酶 25 $\mu$ L 与 ddH<sub>2</sub>O 21 $\mu$ L 构成。

PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3min; 重复三十次 95 $^{\circ}$ C 变性 30s、50 $^{\circ}$ C 复性 30s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1min; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

### (2) 模板量实验

- ① 实验目的: 探究 50 $\mu$ L 体系中扩增效果最好的模板量。
- ② PCR 模板的制备: 在 10 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 中加入两个单菌落, 取菌液做模板。
- ③ 组别设置

本实验由陈梓睿完成: 设置三组模板量分别为 1 $\mu$ L、3 $\mu$ L、5 $\mu$ L 的组别标记为 1、3、5; 加入引物与 Taq mix 后用 ddH<sub>2</sub>O 定容至 50 $\mu$ L。

- ④ PCR 扩增

50 $\mu$ L 反应体系由引物 NL1/NL4 各 2 $\mu$ L、Taq mix 25 $\mu$ L、模板

1/3/5 $\mu$ L 与 ddH<sub>2</sub>O 20/18/16 $\mu$ L 构成;

PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 第一次 95 $^{\circ}$ C 变性 2min、54 $^{\circ}$ C 复性 50s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1min; 第二次 95 $^{\circ}$ C 变性 40s、54 $^{\circ}$ C 复性 50s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1min; 重复二十八次 95 $^{\circ}$ C 变性 30s、54 $^{\circ}$ C 复性 50s、72 $^{\circ}$ C 延伸; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。

### 三、结果与分析

PCR 扩增完成后, 用 2%的琼脂糖凝胶溶液与 120V 的电压进行琼脂糖凝胶电泳并成像分析结果。

#### 1. 预实验电泳结果

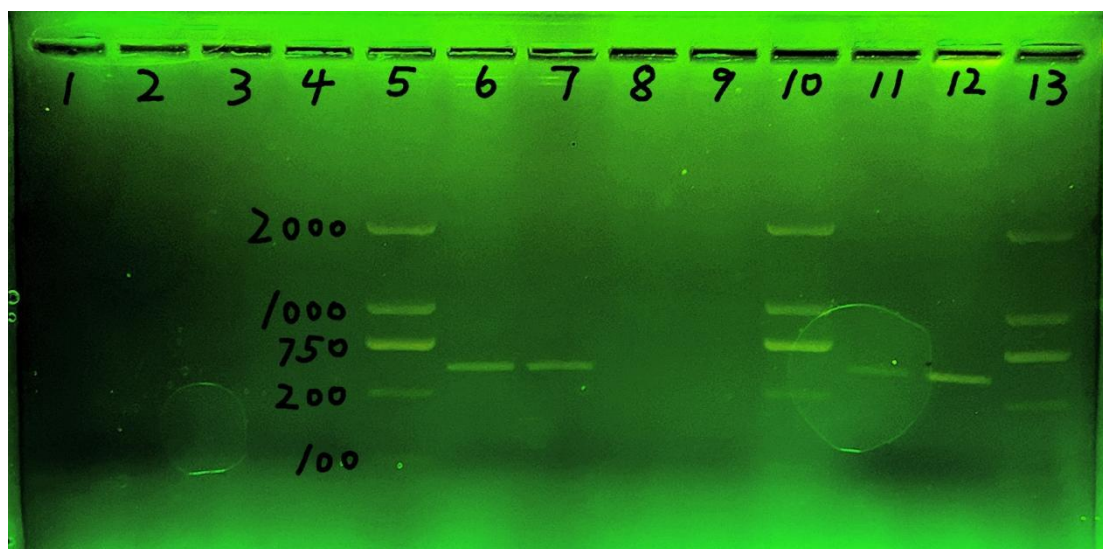


图 1 预实验扩增结果

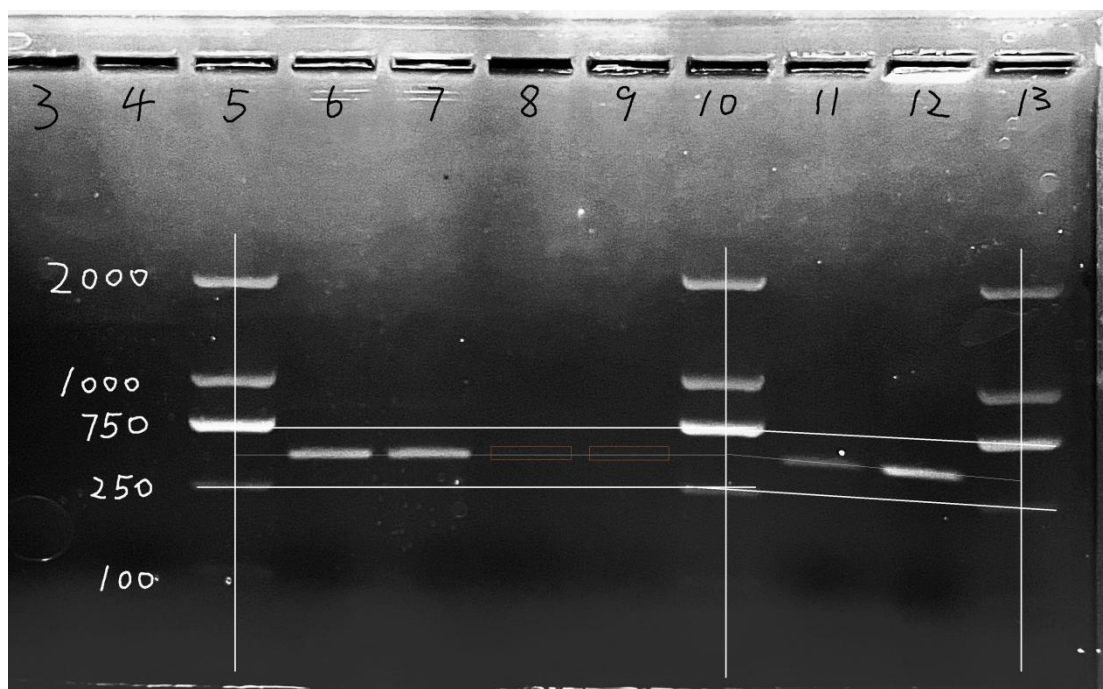


图 2 预实验扩增结果处理图

注：泳道 1~5 分别为 I、I、II、II、DL2000；泳道 6~10 分别为 1、1、2、2、DL2000；泳道 11~13 分别为 A、B、DL2000。

由图 2 可知，扩增结果中 DL2000、1、B 组出现明显条带，A 组出现浅条带，2 组条带不明显，I、II 组未出现条带。1、2、A、B 组均扩增出酵母 26S rDNA D1/D2 区域片段，其中 A、B 处理结果显示无其他非特异干扰带，1 组约 800bp 处出现不明显条带，表现出良好特异性。四组条带对比 DL2000 标准样估计条带长度均在 600~650bp 左右，符合实验预期（615bp）。

对于异常组结果的分析如下：

(1) I、II 组

- ① 泳道加载量不足
- ② 加样时间过长导致样本逸散：I、II 组位于泳道 1~4，加样时间最早且均无明显条带。推测可能原因之一是总加样时间过长导致加样孔中样本扩散至溶液中，使条带不明显。
- ③ 配制体系时错加或漏加试剂

(2) 2 组与 A 组

- ① 样本逸散：对于 1、A 组条带明显浅于 2、B 组，可能是在将扩增后

体系加入凝胶时枪头带出样本导致样本扩散至溶液中，使条带不明显。

- ② 样本溶液分布不均或沉淀：样本在放置一段时间后沉淀，吸取的样本溶液所含扩增后 DNA 浓度不同，导致条带亮度差异。

## 2. 模板量实验电泳结果

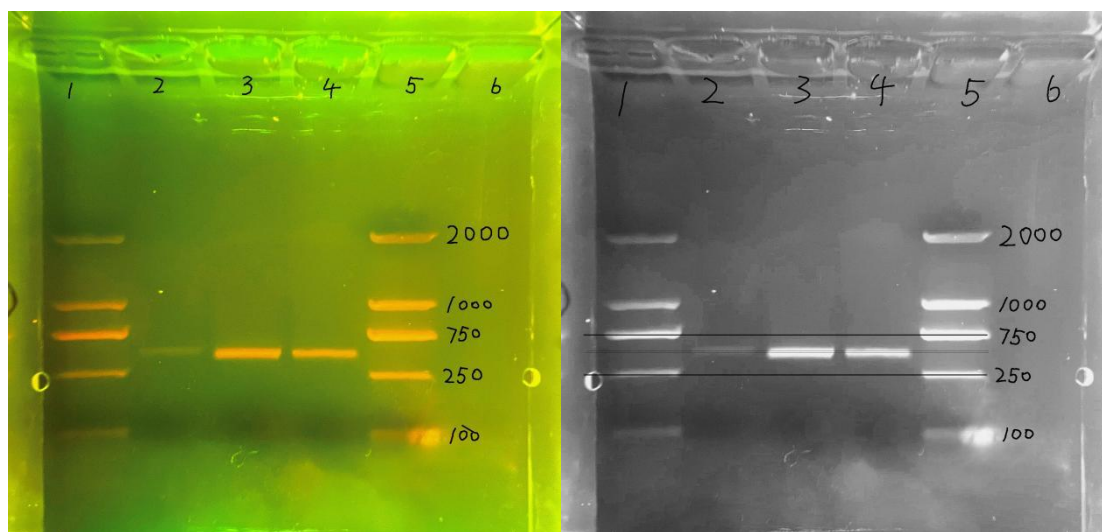


图 3 模板量实验扩增结果

图 4 模板量实验扩增结果处理图

注：泳道 1~5 为 DL2000、1 $\mu$ L 模板、3 $\mu$ L 模板、5 $\mu$ L 模板、DL2000。

由图 4 可知，扩增结果中 DL2000 与实验组均出现条带。采用 1 $\mu$ L、3 $\mu$ L、5 $\mu$ L 的模板量均扩增出酵母 26S rDNA D1/D2 区域片段，处理结果显示无其他非特异干扰带，表现出良好特异性。对比 DL2000 标准样估计条带长度均在 600~650bp 左右，符合实验预期（615bp）。

对比三组扩增情况，发现 3 $\mu$ L 组条带最亮、1 $\mu$ L 组条带最暗，初步得出在 50 $\mu$ L 体系中最佳扩增模板量为 3 $\mu$ L。为确认结果准确还应做重复实验排除偶然因素干扰。

## 四、结语

本实验通过菌落 PCR 成功扩增了目标区域的 DNA 序列。结果显示，引物在酵母菌扩增区段中表现出良好的特异性和高效性，PCR 产物的大小与预期相符，证明了扩增的目标序列的存在。尽管本实验取得了成功，但未来仍然需要进

一步改进扩增的可重复性,对于模板量实验的结论也应当继续进行重复实验验证结论。

——2024年3月30日