



国家级实验教学示范中心建设成果
浙江大学农业与生物技术学院组织编写
高等院校实验实训系列规划教材

分子生物学实验

Experiments of Molecular Biology

主编◎吴建祥 李桂新



浙江大学出版社

国家级实验教学示范中心建设成果
浙江大学农业与生物技术学院组织编写
高等院校实验实训系列规划教材

分子生物学实验

Experiments of Molecular Biology

主 编 吴建祥 李桂新
副主编 谢 艳 钱亚娟 刘小红



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学实验/吴建祥,李桂新主编. —杭州:
浙江大学出版社,2014.7

ISBN 978-7-308-12284-9

I. ①分… II. ①吴… ②李… III. ①分子生物学—
实验 IV. ①Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 228139 号

分子生物学实验

吴建祥 李桂新 主编

丛书策划 阮海潮(ruanhc@zju.edu.cn)

责任编辑 阮海潮

封面设计 续设计

出版发行 浙江大学出版社

(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310007)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 杭州金旭广告有限公司

印 刷 富阳市育才印刷有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 8.25

字 数 211 千

版 次 2014 年 7 月第 1 版 2014 年 7 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-12284-9

定 价 20.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部联系方式 (0571)88925591; <http://zjdxcbbs.tmall.com>

序

浙江大学农业与生物技术学院有着百年发展历史。无论是在院系调整前的浙江大学农学院时期,还是在院系调整后的浙江农学院、浙江农业大学时期,无数前辈为农科教材的编写呕心沥血、勤奋耕耘,出版了大量脍炙人口、影响力大的精品。仅 1956 年,浙江农学院就有 13 门讲义被教育部指定为全国交流讲义;到 1962 年底,浙江农业大学有 16 种教材被列为全国试用教材;1978 年主编的 15 门教材被指定为全国高等农业院校统一教材,全校 40% 的教师参加了教材的编写工作;1980—1998 年间,浙江农业大学共出版 61 部教材,其中 11 部教材为全国统编教材。这些教材的普及应用为浙江大学农科教学在全国农学领域树立声望奠定了坚实的基础。

1998 年,浙江农业大学回到浙江大学的大家庭,并由原来的农学系、园艺系、植物保护系、茶学系等合并组建了农业与生物技术学院,在新的浙江大学学科综合、人才会聚的背景下,农业学科的本科教学得到了进一步的发展。学院实施了“名师、名课、名书”工程,所有知名教授都走进了本科课程教学的讲堂;《遗传学》、《园艺产品储运学》、《植物保护学》、《环境生物学》、《生物入侵与生物安全》等 5 门课程被评为国家级精品课程,《生物统计学与试验设计》被评为国家级双语教学课程,《茶文化与茶健康》、《植物保护学》已被正式列入中国大学视频公开课;2000—2010 年间,学院共出版教材 39 部,《遗传学》等 9 部教材入选普通高等教育“十一五”国家级规划教材。学院非常重视本科实验教学,建院初期就将各系所的教学实验室进行整合,成立了实验教学中心,负责全院的实验教学工作。经过十多年建设,中心已于 2013 年正式被教育部命名为“农业生物学实验教学示范中心”。目前中心每年面向农学、园艺、植保、茶学、园林、应用生物科学等 10 多个专业开设 90 门实验课程,450 个实验项目。所有实

验指导教师也都是来自科研一线的教师,其中具有正高职称的教师的比例接近一半,成为中心实验教学的一大亮点。

为了鼓励教师及时更新实践教学内容,将最新的学科发展融入教材,2012年初学院组织各个学科的一线实验指导教师编写农业与生物技术实验指导丛书,并邀请了多位浙江大学的著名教授和浙江大学出版社的专家进行指导,力争出版的教材能很好地反映我院多年来的教学和科研成果,争取出精品、出名品。现在丛书的首批10部实验教材终于付梓出版了,在此我们感谢为该丛书编写和出版付出辛勤劳动的广大教师和出版社的工作人员,并恳请读者和教材使用单位对该丛书提出批评意见和建议,以便今后进一步改正和修订。

浙江大学农业与生物技术学院

2014年6月24日

前 言

21 世纪是生命科学的世纪,一方面,生命科学的发展促进了新的分子生物学实验技术的诞生和老技术的不断完善,另一方面,新的分子生物学实验技术的诞生和老技术的不断完善推动了生命科学的快速发展。鉴于分子生物学实验技术是生命科学领域的专业基础学科和技术支撑,目前国内外已出版了多本相关书籍,对我国生物技术的研究工作起到了重要的指导作用。

由于分子生物学实验技术的发展日新月异,老技术得到了不断完善,新技术、新方法层出不穷,并渗透到生命科学的各个领域,所以有必要将这些新的最常用的知识汇编成册。鉴于此,我们编写了这本《分子生物学实验》。

本书全面系统地介绍了分子生物学实验的基本技术。书中除其他同类书籍已涉及的内容外,增加了新的章节,如小 RNA 的分离和 Northern blot 杂交技术、原核表达蛋白纯化技术等;在结构上,各章节独立成篇,又互相联系成为一个有机整体;写作上,语言精炼,文字力求深入浅出,循序渐进,通俗易懂;在编写过程中,作者充分结合自己的科研经验,以期扩大本书的实用性,使该书不但适合初学者使用,而且对具有多年研究工作的学者也不失其参考价值。

本书共 14 章,内容涉及质粒 DNA 的分离、纯化和鉴定,DNA 的琼脂糖凝胶电泳和 RNA 甲醛琼脂糖凝胶变性电泳,质粒 DNA 的限制性酶切鉴定、割胶回收与纯化,特异 DNA 片段与载体的连接反应,大肠杆菌感受态细胞的制备及连接产物的转化、鉴定,PCR 扩增技术,基因组 DNA 的提取,动植物总 RNA 的提取,RT-PCR 技术,蛋白质的 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 分析,核酸杂交技术,RELP 和 RAPD 技术,基因的原核表达技术,酶联免疫吸附测定试验等。

本书可供生物技术、分子生物学、生物化学、生物物理学、微生物学、遗传学、医学及农业院校各专业的大学生、研究生、教师、科研人员及从事基因工程技术人员等作为分子生物学技术的教学用书和实验手册。

为了方便教学,提高教学质量,可浏览相关教学网站 <http://www.zwx.zju.edu.cn>,并提宝贵意见。

本教材的编写、出版得到浙江大学出版社高水平教材出版基金的资助。

限于编者的学术水平与编写经验,书中缺点和错误在所难免,恳求各位读者不吝指正,以期再版时予以修正和完善。

编者

2014 年 6 月于浙江大学

目 录

第一章 质粒 DNA 的分离、纯化和鉴定 1

第一节 概 述 / 1

第二节 碱法提纯质粒 DNA / 4

一、设备 / 4

二、材料 / 5

三、试剂 / 5

四、操作步骤 / 6

五、注意事项 / 6

第三节 Axygen 质粒提取试剂盒提纯质粒 DNA / 7

一、设备 / 7

二、材料 / 7

三、试剂 / 7

四、操作步骤 / 7

五、注意事项 / 8

第四节 离心机的使用及注意事项 / 8

一、离心机的使用步骤 / 8

二、离心机使用的注意事项 / 8

第二章 DNA 琼脂糖凝胶电泳和 RNA 甲醛琼脂糖凝胶变性电泳 9

第一节 概 述 / 9

第二节 DNA 的琼脂糖凝胶 / 11

一、设备 / 11

二、材料 / 11

三、试剂 / 11

四、操作步骤 / 11

五、注意事项 / 12

第三节 RNA 甲醛琼脂糖凝胶变性电泳 / 12

一、设备 / 13

二、材料 / 13

三、试剂 / 13

四、操作步骤 / 13

五、注意事项 / 13

第三章 质粒 DNA 的限制性酶切鉴定、割胶回收与纯化 14

第一节 概述 / 14

第二节 设备、材料及试剂 / 15

一、设备 / 15

二、材料 / 15

三、试剂 / 16

第三节 操作步骤 / 16

一、酶切反应 / 16

二、酶切产物的电泳分离和鉴定 / 16

三、酶切产物的割胶回收 / 16

四、注意事项 / 17

第四章 特异片段与载体的连接反应 19

第一节 概述 / 19

一、带有非互补粘性末端 DNA 片段的连接 / 20

二、带有相同粘性末端 DNA 片段的连接 / 20

三、带有平末端 DNA 片段的连接 / 20

四、适当改造的 DNA 片段的连接 / 20

五、PCR 介导的 DNA 片段的连接 / 20

第二节 设备、材料及试剂 / 22

一、设备 / 22

二、材料 / 22

三、试剂 / 22

第三节 操作步骤 / 22

一、外源片段和 pMD18-T 载体的连接反应(10 μ l 体系) / 22二、外源片段和质粒载体的连接反应(10 μ l 体系) / 22

三、注意事项 / 23

第五章 大肠杆菌感受态细胞的制备及连接产物的转化、鉴定 24

第一节 概述 / 24

一、大肠杆菌感受态细胞的制备 / 24

二、影响细菌转化效率的因素 / 25

三、转化子的鉴定 / 25

第二节 设备、材料及试剂 / 26

一、设备 / 26

二、材料 / 26

三、试剂 / 26

第三节 操作步骤 / 26

一、感受态细胞的制备 / 26

二、连接产物的转化 / 27

三、转化子的鉴定 / 28

第六章 PCR 扩增技术 30

第一节 概 述 / 30

一、PCR 技术的基本原理 / 30

二、参与 PCR 反应体系的因素及其作用 / 30

三、PCR 反应参数 / 32

第二节 设备、材料及试剂 / 34

一、设备 / 34

二、材料 / 34

三、试剂 / 34

第三节 操作步骤 / 34

一、常规 PCR 反应 / 34

二、菌落 PCR / 35

三、电泳 / 35

四、PCR 产物的纯化 / 35

五、注意事项 / 36

第七章 基因组 DNA 的提取 37

第一节 概 述 / 37

第二节 从植物组织提取基因组 DNA / 37

一、设备 / 37

二、材料 / 38

三、试剂 / 38

四、操作步骤 / 38

五、注意事项 / 39

第三节 从动物组织提取基因组 DNA / 40

一、设备 / 40

二、材料 / 40

三、试剂 / 40

四、操作步骤 / 40

第四节 细菌基因组 DNA 的制备 / 40

一、设备 / 40

二、材料 / 41

三、试剂	/ 41
四、操作步骤	/ 41
第五节 真菌基因组 DNA 提取	/ 41
一、设备	/ 41
二、材料	/ 41
三、试剂	/ 41
四、操作步骤	/ 42
第六节 基因组 DNA 的纯度鉴定	/ 42
第八章 动植物总 RNA 的提取	43
第一节 概述	/ 43
第二节 设备、材料及试剂	/ 44
一、设备	/ 44
二、材料	/ 44
三、试剂	/ 44
第三节 实验操作	/ 44
一、Trizol 法提取动植物总 RNA 的基本步骤	/ 44
二、注意事项	/ 44
三、如何处理 RNA 中的 DNA	/ 45
四、RNA 纯度鉴定	/ 45
第九章 RT-PCR 技术	46
第一节 概述	/ 46
第二节 两步法 RT-PCR	/ 47
一、设备	/ 47
二、材料	/ 47
三、试剂	/ 47
四、操作步骤	/ 47
五、注意事项	/ 48
第十章 蛋白质的 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 分析	49
第一节 概述	/ 49
第二节 设备、材料及试剂	/ 50
一、设备	/ 50
二、材料	/ 50
三、试剂	/ 50
第三节 操作步骤	/ 52
一、蛋白的 SDS-PAGE	/ 52

二、Western blot 技术 / 53	
三、快速银染检测 SDS-PAGE 胶中蛋白 / 57	
第十一章 核酸分子杂交技术	58
第一节 核酸探针标记的方法 / 58	
一、双链 DNA 探针及其标记方法 / 58	
二、单链 DNA 探针 / 60	
三、末端标记 DNA 探针 / 63	
四、寡核苷酸探针 / 64	
五、RNA 探针 / 64	
第二节 几种常见的核酸杂交 / 66	
一、Southern blot / 66	
二、Northern blot / 70	
三、Small RNA(小 RNA)Northern blot 杂交 / 72	
四、地高辛标记的 Southern blot 杂交 / 74	
第三节 杂交反应的条件及参数的优化 / 76	
第十二章 RFLP 和 RAPD 技术	77
第一节 概 述 / 77	
第二节 RFLP 技术 / 78	
一、设备 / 78	
二、材料 / 78	
三、试剂 / 78	
四、操作步骤 / 78	
第三节 RAPD 技术 / 79	
一、设备 / 79	
二、材料 / 79	
三、试剂 / 79	
四、操作步骤 / 80	
五、注意事项 / 80	
第十三章 蛋白的原核表达技术	81
第一节 概 述 / 81	
第二节 基因的诱导表达及表达产物的分析 / 86	
一、设备 / 86	
二、材料 / 86	
三、试剂 / 86	
四、操作步骤 / 86	

五、注意事项 / 87

第三节 $6\times\text{His}$ 融合蛋白的大量表达及 8M 尿素变性条件下用镍离子纯化蛋白 / 87

一、设备 / 87

二、材料 / 87

三、试剂 / 87

四、操作步骤 / 88

五、注意事项 / 88

第四节 镍离子在自然条件下纯化 $6\times\text{His}$ 融合蛋白 / 89

一、设备 / 89

二、材料 / 89

三、试剂 / 89

四、操作步骤 / 89

五、注意事项 / 90

第五节 GST 融合蛋白的表达及其亲和层析纯化 / 90

一、设备 / 90

二、材料 / 90

三、试剂 / 90

四、操作步骤 / 90

第六节 MBP 融合蛋白的表达及其亲和层析纯化 / 91

一、设备 / 91

二、材料 / 91

三、试剂 / 91

四、操作步骤 / 91

第十四章 酶联免疫吸附试验 93

第一节 概述 / 93

第二节 设备、材料及试剂 / 97

一、设备 / 97

二、材料 / 97

三、试剂 / 97

第三节 操作步骤 / 98

一、直接 ELISA 步骤 / 98

二、间接 ELISA 检测抗青霉素抗体效价或青霉素抗体 / 99

三、抗原包被 ELISA (ACP-ELISA) 检测南方水稻黑条矮缩病毒 (SRBSDV) 的步骤 / 99

四、DAS-ELISA 测乙肝病毒步骤 / 100

五、TAS-ELISA 的步骤 / 100

六、酶标记抗原竞争 ELISA 测三聚氰胺的步骤 / 100

七、酶标记抗体竞争 ELISA 测青霉素 / 101

八、酶标记二抗竞争 ELISA 测氯霉素 / 101	
九、dot-ELISA 检测水稻中南方水稻黑条矮缩病毒(SRBSDV)的步骤 / 101	
十、dot-ELISA 检测灰飞虱中水稻黑条矮缩病毒(RBSDV)的步骤 / 102	
附 录	104
附录 1 细菌、酵母及核酸的贮存	104
一、细菌保存 / 104	
二、酵母贮存 / 104	
三、DNA 贮存 / 105	
四、RNA 贮存 / 105	
附录 2 常用试剂、溶液及缓冲液的配制	105
一、基本要求 / 105	
二、浓酸和浓碱的浓度 / 106	
三、常用贮液与溶液 / 106	
四、电泳缓冲液、染料和凝胶加样液 / 112	
附录 3 常用培养基和抗生素的配制	115
一、一般要求 / 115	
二、常用培养基 / 116	
三、常用抗生素 / 117	
参考文献	118

第一章 质粒 DNA 的分离、纯化和鉴定

6

第一节 概 述

大多数 DNA 片段不具备自我复制和表达的能力,所以为了能够在寄主细胞中进行繁殖和表达,就必须将这种 DNA 片段连接到一种特定的具备自我复制和表达能力的 DNA 分子上,这种 DNA 分子称作载体(vector),即把一个有用的目的 DNA 片段通过重组 DNA 技术,送进受体细胞中进行繁殖和表达的工具。目前,经常使用的载体主要有质粒载体、 λ 噬菌体载体、粘粒载体和 M13 噬菌体载体等。以功能来分,载体可以分为克隆载体、表达载体、测序载体及在两个不同物种中均能存在的穿梭载体。目前常用载体有以下几种:

质粒(plasmid)是重组 DNA 技术中最常见的载体。质粒广泛存在于细菌中,是细菌染色体外具有自我复制能力的一种小分子环形双链 DNA 分子,大小从 1~200kb 不等,呈超螺旋状态存在于宿主细胞中,它能自由进出细菌细胞,当插入一段外来的 DNA 片段后,它依然能自我复制,因此,质粒是一种理想的载体。质粒主要发现于细菌、放线菌和真菌细胞中,它具有自主复制和转录的能力,能在子代细胞中保持恒定的拷贝数,并表达所携带的遗传信息。质粒的复制和转录主要依赖于宿主细胞编码的某些酶和蛋白质,如离开宿主细胞则不能存活,而宿主即使没有它们也可以正常存活。质粒的存在使宿主具有一些额外的特性,如对抗生素的抗性等。F 质粒(又称 F 因子或性质粒)、R 质粒(抗药性因子)和 Col 质粒(产大肠杆菌素因子)等都是常见的天然质粒。

根据质粒的复制方式不同分为两种类型:紧密控制型和松弛控制型。前者只在细胞周期的一定阶段进行复制,当染色体不复制时,它也不能复制,通常每个细胞内只含有 1 个或几个质粒分子,如 F 因子。后者在整个细胞周期中随时可以复制,在每个细胞中有许多拷贝,一般在 20 个以上,如 Col E1 质粒。在使用蛋白质合成抑制剂——氯霉素时,细胞内蛋白质合成、染色体 DNA 复制和细胞分裂均受到抑制,紧密型质粒复制停止,而松弛型质粒继续复制,质粒拷贝数可由原来的 20 多个扩增至 1000~3000 个,此时质粒 DNA 占总 DNA 的含量可由原来的 2% 增加至 40%~50%。

质粒具有不相容性,即利用同一复制系统的不同质粒不能在同一宿主细胞中共同存在。当两种质粒同时导入同一细胞时,它们在复制及随后分配到子细胞的过程中彼此竞争,在一些细胞中,一种质粒占优势,而在另一些细胞中另一种质粒却占上风。当细胞生长几代后,占少数的质粒将会丢失,因而在细胞后代中只有两种质粒中的一种,这种现象称质粒的不相容性。而利用不同复制系统的质粒则可以稳定地共存于同一宿主细胞中。

质粒通常含有编码某些酶的基因,其表型包括对抗生素的抗性,产生某些抗生素,降解复杂有机物,产生大肠杆菌素和肠毒素及某些限制性内切酶与修饰酶等。应用的细菌质粒往往

携带一些抗药性基因,如抗氨苄青霉素基因、抗四环素基因等,这些基因通常称为标记基因,标记基因的存在给 DNA 克隆带来了很大的方便。通过在细菌培养基中加入一些抗生素,可以将含有重组质粒的细菌与其他细菌区分开来。

细菌内的天然质粒往往不能满足作为 DNA 克隆载体的要求,因此需要对其进行改造。例如某些细菌质粒太大,使拷贝数相应减少,不利于提高基因克隆的产量和纯度,也不便于对重组质粒进行酶切分析,因此需要去除一些复制非必需区段和不含选择性标记的区段,使它变小;某些质粒含有同一种限制性内切酶的许多酶切位点,这样,在用这种限制性内切酶进行酶切时,往往形成好几个片段,这就失去了作为克隆载体的价值,因此对于这类具有多切点的载体,需要加以人工改造,使其只保留一个切点等等。大多数质粒载体带有一些多用途的辅助序列,这些用途包括通过组织化学方法肉眼鉴定重组克隆、产生用于序列测定的单链 DNA、体外转录外源 DNA 序列、鉴定片段的插入方向、外源基因的大量表达等。常用的质粒载体大小一般在 1kb 至 10kb 之间,DNA 克隆常用的质粒载体主要有 pBR322、pUC、pEGM 系列和 pBluescript(简称 pBS)等,它们都是以天然质粒为材料人工构建而成的。

λ 噬菌体载体(λ phage):用于基因文库和基因表达文库的构建,可容纳 20kb 的外源 DNA。质粒作为 DNA 克隆的载体具有快速、方便的特点,但是质粒能容纳外源 DNA 片段的长度一般不能长于 10kb,而 DNA 克隆实验中,克隆的目的基因片段长度常常超过 10kb,这样我们就要用到 λ 噬菌体载体。 λ 噬菌体是一种感染大肠杆菌的双链 DNA 病毒,由头部和尾部两部分组成,很像一只小蝌蚪。 λ 噬菌体中的 DNA 常称 λ DNA, λ DNA 大小约为 50kb,在 λ 噬菌体颗粒中它是以线状形式存在,线状分子两头的 5' 端均为长 12 核苷酸的单链,这两段单链序列互补,成为天然的粘性末端(cohesive site,cos),当 λ 噬菌体侵入大肠杆菌后,线状 DNA 分子借助粘性末端连接成环状分子。 λ 噬菌体感染大肠杆菌后呈现两种类型的生长状态,即溶菌性生长状态和溶原性生长状态。溶菌性生长状态时, λ DNA 在大肠杆菌内能进行独立的自我复制,并装配成大量成熟的 λ 噬菌体颗粒,结果导致大肠杆菌裂解;溶原性反应状态时, λ 噬菌体的生长周期中断, λ DNA 整合至大肠杆菌的基因组 DNA 中, λ DNA 不能独立进行复制,也不能形成新的 λ 噬菌体,被感染的大肠杆菌不会发生裂解。用 λ 噬菌体作基因克隆载体就是利用它的溶菌性生长特性。

天然的 λ 噬菌体并不符合作克隆载体的要求,因而需要对 λ 噬菌体进行改造。改造时将 λ DNA 中间的核苷酸区段删掉,另外,需将 λ DNA 中一些限制性核酸内切酶的多酶切位点改造为单酶切或双酶切位点。 λ 噬菌体载体有两类,一类是替换型载体,另一类是插入型载体。

1. 替换型载体:这类载体的 DNA 具有一个限制性核酸内切酶的两个切点,两点间为非必需基因区,可以插入目的基因。由于 λ 噬菌体具有一个特殊性质,即只有 λ DNA 的长度介于天然 λ 噬菌体 DNA 长度的 75%~105% 时,才能被包装形成噬菌体颗粒,当用特定的限制性核酸内切酶切开 λ DNA 后,目的基因可以连接于左右两臂之间,形成足够长度的 DNA 片段而被包装。相反,如果没有外源 DNA 的插入,由左右两臂直接融合起来的缺损基因,由于长度不足,不能被包装,从而提供了一个筛选重组 λ DNA 的标记。 λ 噬菌体载体的非必需 DNA 区段中,常插入一些标记基因,当此区段被外源 DNA 置换时,噬菌体的表型便发生改变,因此,根据噬菌体的表型也可以筛选重组体。替换型载体可以插入长度为 20kb 的外源 DNA。

2. 插入型载体:这类 λ 噬菌体 DNA 已经失去了非必需区,仅保留了 *EcoR* I 的单一酶切位点,而且这个酶切位点又位于标记基因内,故在切开 λ DNA 并插入外源基因后,标记基因失活,以此可以进行重组体的筛选。插入型载体可插入长度为 10kb 的外源 DNA。

M13 噬菌体载体:一种细丝状的大肠杆菌噬菌体,含单链环状 DNA 分子,长约 6.4kb。选择 M13 噬菌体作 DNA 克隆载体,是因为 M13 能直接克隆出单链 DNA 分子,这对目的基因的测序、诱变和制备探针非常有用。M13 噬菌体作克隆载体无需作大的改造,只需在其 DNA 分子中插入一个选择性标记基因,以后拟克隆的目的基因就插入在此标记基因内。用 M13 噬菌体进行基因克隆时,先需将其单链 DNA 复制成双链 DNA 分子,然后再将目的基因插入到双链 DNA 分子中,重组 DNA 分子进入大肠杆菌后,进入复制循环,产生只含一条 DNA 链的子代噬菌体颗粒。

粘粒载体(cosmid)是将 λ 噬菌体 DNA 中的粘性末端位点(cos 位点)引入质粒中形成的一种特殊的质粒载体。粘粒载体主要由 cos 位点、*E. coli* 复制起始位点和抗生素抗性基因三部分组成,兼有质粒和噬菌体的特性。 λ 噬菌体颗粒能容纳 DNA 的最大范围是 38~52kb,由于 λ 噬菌体载体 DNA 本身长度为 28~30kb,故 λ DNA 载体可克隆的最大外源 DNA 片段长度为 22kb。不过,后来人们发现, λ DNA 被包装时的识别序列只是 cos 位点及其附近很小的一段区域,若将 λ DNA 的这段区域(简称 cos 位点)插入到质粒载体中,则克隆的外源 DNA 片段可以加大。正是基于这种构想,1978 年柯林斯(Collins)和何恩(Hohn)等构建了粘粒载体。目前所用的粘粒载体一般为 6kb,故在粘粒中克隆的外源 DNA 的长度可达 32~45kb,约为 λ 噬菌体载体克隆长度(20kb)的两倍。

人工染色体(artificial chromosome):天然染色体基本功能单位包括复制起始点、着丝粒和端粒。复制起始点保证了染色体复制,着丝粒保证了染色体分离,端粒封闭了染色体末端,防止黏附到其他断裂端,保证了染色体的稳定存在。人们为了克隆大片段 DNA,利用 DNA 体外重组技术分离了天然染色体的基本功能元件并将它们连接起来构建成克隆载体即人工染色体,其可容纳较大的外源基因。如细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)可容纳 300~350kb 的插入序列。酵母人工染色体(yeast artificial chromosome, YAC)可容纳大于 1Mb 的 DNA 片段。哺乳动物人工染色体(mammal artificial chromosome)是指从哺乳动物细胞中分离出染色体的复制起始区、端粒以及着丝粒构建而成的克隆载体。它可以克隆大于 1000kb 的外源 DNA 片段。

穿梭载体:具有真核细胞和细菌质粒序列,既能在真核细胞中复制繁殖、表达,也能在原核细胞中复制繁殖、表达。

酵母附加型质粒:可像质粒一样复制,还可整合进酵母染色体 DNA 中。

农杆菌 Ti 质粒:通过农杆菌介导将其左右边界间的基因整合入植物细胞的染色体中,其用于植物转基因。

动植物 DNA 病毒:如猪圆环病毒及植物双生病毒载体,分别用于基因在动植物细胞中的表达。

昆虫杆状病毒载体:用于基因在昆虫细胞表达。

哺乳动物病毒载体:如 SV40 及反转录病毒等用于动物细胞中的表达。

这些载体虽然在相对分子质量大小、结构、特性和用途上存在着较大的差异,但是作为载体,它们应该具有一些共同的特性:

1. 能在宿主细胞内进行独立和稳定的 DNA 自我复制。在其 DNA 中插入外源基因后,仍然保持着稳定的复制状态和遗传特性。

2. 为小的松弛型质粒,相对分子质量小,多拷贝,而且便于提取和纯化。

3. 质粒 DNA 的序列、结构和功能清楚,便于进行基因操作。

4. DNA 序列中含有多个单一的限制性核酸内切酶位点,这些内切酶位点集中在一个很小的区段,此区段称为多克隆位点(multiple cloning site, MCS),在 MCS 插入外源基因后,不影响质粒自身的复制。

5. 插入了外源基因的重组质粒,易导入宿主菌内进行复制和表达。

6. 具有一个或几个标记基因,而且限制性内切酶的单一识别点恰好在此标记基因内,由于插入外源基因,这个标记基因失活,从而便于筛选重组体,即具有容易操作的检测表型。

质粒 DNA 提纯的原理:从细菌中分离质粒 DNA 的方法一般包括 3 个基本步骤:培养细菌使质粒扩增,收集和裂解细胞,分离和纯化质粒 DNA。采用溶菌酶可以破坏菌体细胞壁,而十二烷基硫酸钠(SDS)和 Triton X-100 可使细胞膜裂解。经溶菌酶和 SDS 或 Triton X-100 处理后,细菌染色体 DNA 会缠绕附着在细胞碎片上,同时由于细菌染色体 DNA 比质粒大得多,易受机械力和核酸酶等的作用而被切断成不同大小的线性片段。当用强热或酸、碱处理时,细菌的线性染色体 DNA 变性,而共价闭合环状质粒 DNA(covalently closed circular DNA,简称 cccDNA)的两条链不会相互分开,当外界条件恢复正常时,线状染色体 DNA 片段难以复性,而是与变性的蛋白质和细胞碎片缠绕在一起,经离心而沉淀,而质粒 DNA 双链又恢复原状,重新形成天然的超螺旋分子,并以溶解状态存在于液相中。

碱法提质粒的原理:用含 SDS 的碱性溶液即溶液 II 裂解大肠杆菌细胞,变性蛋白质和染色体 DNA,然后用溶液 III 中和提取液的 pH 以使质粒 DNA 双链又恢复原状,重新形成天然的超螺旋分子,并以溶解状态存在于液相中,而线状染色体 DNA 片段难以复性,并与变性的蛋白质和细胞碎片缠绕在一起而沉淀,在溶液中只剩下质粒 DNA 和 RNA。溶液中的 RNA 可用 RNA 酶 A 降解,从而使溶液中仅仅留下质粒 DNA。

在细菌细胞内,共价闭环质粒以超螺旋形式存在。在提取质粒过程中,除了超螺旋 DNA 外,还会产生其他形式的质粒 DNA。如果质粒 DNA 两条链中有一条链发生一处或多处断裂,分子就能解螺旋而消除链的张力,形成松弛型的环状分子,称开环 DNA(open circular DNA,简称 ocDNA);如果质粒 DNA 的两条链在同一处断裂,则形成线状 DNA(linear DNA)。当提取的质粒 DNA 电泳时,同一质粒 DNA 其超螺旋形式的泳动速度要比开环和线状分子的泳动速度快。

试剂盒提质粒 DNA 的原理:目前市面上质粒提取试剂盒大多数都是采用传统的碱裂解法质粒提取原理,不同之处在于纯化方式,菌体加入溶液 I、II、III 后离心,把上清加入到吸附柱子中,上清中的质粒 DNA 在高盐、低 pH 值状态下被柱子中的硅胶膜选择性吸附,而蛋白质不被吸附。再过去蛋白液和漂洗液将杂质和其他细菌成分去除,最后用低盐、高 pH 值的洗脱缓冲液将纯净质粒 DNA 从硅胶膜上洗脱下来。

第二节 碱法提纯质粒 DNA

一、设备

移液器一套,台式高速离心机,恒温振荡摇床,高压蒸汽灭菌锅,涡旋振荡器,电泳仪,琼脂