

高等院校生物类专业系列教材



基因工程实验技术

GENETIC ENGINEERING EXPERIMENT TECHNOLOGY
AND IMPLEMENTATION TUTORIAL

与实施教程



主 编 斯越秀

副主编 王忠华 俞超 谭志文



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大学出版社

THE HISTORY OF THE CHINESE PEOPLE

THE HISTORY OF THE CHINESE PEOPLE

THE HISTORY OF THE CHINESE PEOPLE

THE HISTORY OF THE CHINESE PEOPLE

高等院校生物类专业系列教材

基因工程实验技术

GENETIC ENGINEERING EXPERIMENT TECHNOLOGY
AND IMPLEMENTATION TUTORIAL

与实施教程



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

基因工程实验技术与实施教程 / 斯越秀主编. — 杭州: 浙江大学出版社, 2011. 11

ISBN 978-7-308-08842-8

I. ①基… II. ①斯… III. ①基因工程—实验—高等教育—教材 IV. ①Q78-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 134476 号

基因工程实验技术与实施教程

斯越秀 主编

责任编辑 周卫群

封面设计 刘依群

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 浙江时代出版服务有限公司

印 刷 杭州日报报业集团盛元印务有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 13.75

字 数 335 千

版 印 次 2011 年 11 月第 1 版 2011 年 11 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-08842-8

定 价 28.00 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邮购电话(0571)88925591

前言

基因工程是一门实验性很强的学科,近年来发展相当迅速,其任何进展都是以实验为基础的。基因工程方法与技术随着分子生物学的迅猛发展,已渗透到现代生命科学的各个分支领域,成为生物工程的核心技术。基因工程实验课程具有综合设计性和实践性强等特点,并且与农业、医药、环境、能源和食品等行业紧密结合,发展空间广阔。

近年来,我国高等教育改革步伐加快。21 世纪的教育是开发人的创造力、想象力,培养创造能力、创新型人才的教育。根据新时代发展的需要,高等院校必须进行全面的教育改革,实现单一的验证理论向探索未知的转变;实现学科专业素质培养向综合素质教育的转变;实现侧重获取知识的教育向增强创造性教育的转变;实现学生被动接受知识向主动合作学习知识的观念转变。随着生物科学的迅猛发展和教育改革的不断深入,实验教学改革也在不断深化,构建相关实验的课程项目体系、改革实验教学模式及建立科学合理的实验考评考核方式是应用型人才培养的必要措施。本教材结合浙江省新世纪高等教育教学改革项目《以创新能力培养为导向的基因工程实验教学改革与探索》,浙江万里学院生物技术、生物工程专业实验教学体系建设,以及近十年的实践教学经验而编写,作为《分子生物学与基因工程》省级精品课程建设配套实验教材,是一本实用性较强的具有明显特色的基因工程实验教材。

《基因工程实验技术与实施教程》是新的教学形势催生的产物,不同于传统的基因工程实验指导书,本教材由基因工程实验技术教学组织实施形式、基因工程实验技术与原理、基础实验、综合设计实验和附录五部分组成,并全程体现实验教学方法的实施和运用。

教程中所选实验项目融入了教师多年的实验教学经验,收集了部分现代基因工程实验指导教材的精华,内容涵盖基因克隆、表达、表达产物检测与分析等基因工程基本实验领域,涉及基因组 DNA 提取、质粒提取、PCR 扩增目的基因、酶切、酶切产物纯化、连接、转化、重组子筛选鉴定、目的蛋白的诱导表达等常用的基因工程基本技术以及电泳技术、层析技术、分光光度法等分离鉴定和分析手段。

特别是教材的第一部分介绍教学实施方案,第四部分综合设计实验融教学组织实施方式于教学内容中,有利于教师实验的组织实施、学生预习和复习实验,对基因工程实验课程进行设计性、开放式实验教学改革有很大帮助。整个实验内容的编写思路是以专业的实践技能和行业应用为导向,循序递进设置实验项目,突出实验教学内容的技能综合性、设计性、应用性与自主探索性,构建基础性实验——综合性设计性实验的教学内容体系。本教材是高校生物专业学生自主学习的良好基因工程实验教材。

基础实验部分介绍 10 个基因工程基础实验技术,侧重于实验原理的学习、方法的掌握和分析讨论,着重训练学生的基本基因操作实验技能,并通过实验技术加深对理论知识的理

解。综合设计实验部分以目的基因的克隆和原核表达为训练项目,包含4个研究性、行业相关性的实验项目。每个实验项目包括实验目的、实验背景、实验设计要求、实验设计示例、结果展示、合作研讨题、实验设计及学习参考资料7个内容。教材内容的编排与具体的教学实施过程配套。教师在教学过程可针对每个实验项目提出实验目标,并将实验方法和重要参数告诉学生,然后要求学生查阅相关文献和资料,每组学生根据实验总要求,自行确定实验材料、自主设计实验技术路线并提交,指导教师审核后参考实验指导书中的相关步骤与方法进行实验,形成总结性材料,从而进一步培养学生综合运用各种分子生物学实验技术能力、分析与设计能力、逻辑思维能力。同时为适应自主式学习需要,每个实验项目提供了课后研讨题及学习参考资料,便于学生开展实验设计及实验讨论。

在附录中,收集了基因工程实验常用的一些数据、分子生物学常用试剂的配制方法、实验注意事项等,为从事综合性基因工程实验的师生们提供方便。

本书特色:(1)教材内容围绕基因的克隆与表达,循序递进设置实验项目,构建基础性实验——综合性设计性实验的教学内容体系,明确基因的克隆与原核表达的实验教学技能体系。(2)教材中穿插了实验教学组织形式,便于教师实验教学的开展。综合性设计性实验项目的编写以专业的实践技能和行业应用为导向,以鼓励和培养学生自己动手、开发创新的精神为主导,在编写实验项目和内容的同时,更体现教学方法的改革和创新。(3)提供了实验的参考资料,有利于学生开展自主学习和自主设计实验。(4)提供实验研讨要求和题目,引导学生之间互相分析讨论实验全过程。

本教材主要针对地方本科院校、应用型人才培养目标而设计编写,也可供其他理工科高等院校的生命科学、生物技术、生物工程等专业学生及相关领域的科技人员使用。

本教材由斯越秀、王忠华、俞超、谭志文、毛芝娟、包永波、张捷等老师参与编写,借鉴兄弟院校基因工程实验教材经验,供我院开设的各专业选用。借此出版机会,表示由衷的感谢!

本书作为生物技术、生物工程专业课程实验教材,我们力求使之具备实验性、可操作性。但是由于主客观条件,限于我们的学识和水平,而且编写时间仓促,肯定有不少缺点和错误,敬请各位老师与同学提出宝贵意见,帮助我们不断改进教学,谢谢!

编 者

2011年6月

目 录

第一部分 基因工程实验技术教学组织实施形式	(1)
一、实验学习目标	(1)
二、实验学习要求	(1)
三、实验教学组织实施流程	(2)
四、实验报告要求	(4)
五、文档格式	(5)
第二部分 基因工程实验技术与原理	(15)
第一章 基因组 DNA 的提取	(15)
第二章 质粒载体	(18)
第三章 PCR 基因扩增与引物设计	(22)
第四章 DNA 重组技术	(38)
第五章 重组体分析与检测	(41)
第六章 基因表达	(47)
第七章 蛋白质分析技术	(56)
第八章 重组蛋白质的分离纯化与制备	(71)
第三部分 基础实验	(80)
实验一 细菌基因组 DNA 的提取及电泳鉴定	(80)
实验二 PCR 法扩增目的基因及 PCR 产物的纯化	(85)
实验三 碱裂解法提取质粒载体及电泳鉴定	(89)
实验四 载体质粒、PCR 产物的双酶切及酶切产物纯化	(94)
实验五 载体片段与 PCR 产物的连接	(99)
实验六 感受态细胞的制备和重组质粒的转化	(102)
实验七 重组子的鉴定	(105)
实验八 阳性重组质粒转化表达菌株	(111)
实验九 目的基因的诱导表达和鉴定	(113)
实验十 表达产物的分离纯化	(117)

第四部分 综合设计实验	(121)
项目一 枯草芽孢杆菌碱性磷酸酶基因的克隆与表达	(121)
项目二 大肠杆菌甘露醇-1-磷酸脱氢酶基因的克隆与表达	(144)
项目三 弧菌外膜蛋白的基因克隆、蛋白表达与纯化	(166)
项目四 泥蚶谷氨酰胺合成酶基因的克隆和表达分析	(189)
第五部分 附 录	(207)
一、氨基酸符号及相应的密码子	(207)
二、常用限制性内切酶酶切位点及缓冲液	(208)
三、常用市售酸的浓度	(208)
四、常用蛋白质分子量标准参照物	(209)
五、常用缓冲液的配制	(209)
六、分子生物学常用试剂的配制	(211)
七、琼脂糖凝胶浓度与线形 DNA 的最佳分辨范围	(213)
八、核酸、蛋白质的常用数据	(213)
九、菌种与 DNA 的保存	(214)
十、基因工程实验注意事项	(215)

第一部分 基因工程实验技术教学组织实施形式

一、实验学习目标

《基因工程实验技术与实施教程》是以渐进式训练学生基因工程基础实验技能、学科研究综合设计技能为目标的实验教材。实验教学过程采用自主设计、全程参与、研讨合作的实验教学模式。通过实验前查阅资料和自主设计实验的要求,提高学生的创新意识,培养学生的创新能力和实验设计能力;通过学生准备实验和全程参与实验过程,培养学生掌握分子生物学实验的基本技术,规范操作技能,强化动手能力;通过学生之间相互合作、讨论和分析实验全过程的要求,培养学生分析研究问题的逻辑思维能力和团队合作精神。

基因工程实验技术课程开设的实验项目,包括基础性实验和综合设计性实验,通过这些实验项目的开设,以强化学生的分子生物学基本操作技能和综合应用能力,并达到以下目标:

1. 巩固和深化对分子生物学基本理论的理解,训练并掌握基因工程相关实验技术的基本操作技能,为今后专业学习和科研工作打下实验技能基础。

2. 通过基础实验的学习和操作,要求学生掌握基因组 DNA 的提取、PCR、质粒提取、酶切、连接、感受态细胞的制备、重组质粒的转化、重组子的鉴定、重组蛋白的诱导表达、目的蛋白的分离纯化、检测等基因工程基本实验技术。

3. 综合设计性实验以目的基因的克隆和原核表达为训练项目,培养学生综合运用各种分子生物学实验技术的能力,提高实验设计与分析能力,培养分析问题、解决问题和实践创新的能力。

二、实验学习要求

1. 课前预习:基础实验学习前明确实验目的、原理、方法及操作中的注意事项。综合设计实验部分学习前,务必对基因工程实验技术与原理部分做好学习,明确实验目标,了解实验背景,查阅资料,按照要求分组写好实验设计方案。

2. 实验过程:基础实验按照实验指导书所列步骤和要求实施实验操作,综合设计实验项目,鼓励学生综合所学知识开拓创新,可运用多种实验方法完成实验目标,也可根据指导书示例进行操作学习。

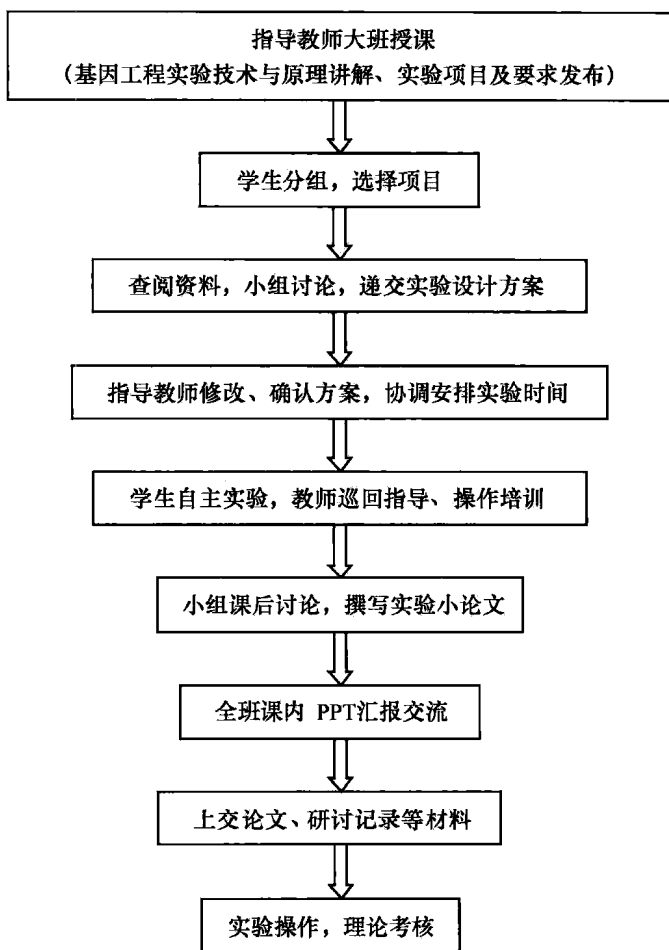
3. 实验结果与分析:真实记录实验结果数据,对结果要认真分析,得出结论;异常的结果要进行理论分析并找出原因。坚持实验的严肃性、严格性、严密性。

4. 讨论与报告:对实验结果进行分析研讨,写出实验报告或小论文,并汇报交流实验收获和知识拓展情况。

5. 注意事项:严格遵守大型精密仪器操作管理及实验室规则,防止各种事故发生;综合设计实验每个项目都是连续的实验,每次实验结束应注意妥善保管各自的实验产物,以便为下次实验提供材料保证。

三、实验教学组织实施流程

基因工程实验教学过程可把基础性实验融入综合设计性实验项目中,采取自主、开放、探索式实验教学方式,以“项目驱动”为主线,根据实际条件,开设几个综合设计性实验项目,让学生自主选择一个自己感兴趣的实验项目(每个项目 64 学时),自主设计实验方案,自主实施实验过程,教师仅起引导、辅助解疑的作用。综合设计性实验教学组织实施流程如下:



(一)理论讲解与任务布置

第一次课,教师先发布实验项目,下达实验要求及项目完成的目标。教师把开展综合设计实验的总体思路、要求、方法和步骤告诉学生,让学生明确思想,做好准备。其次,教师简要讲解基因工程实验技术的基本原理,进行针对实验项目的理论辅导,使学生在设计和开展实验前具备分子克隆相关的理论基础,便于自主学习和设计。

(二)分组与项目选择

学生自由组合分组或教师按学号安排,一般 4 人为一组,学生根据自己的兴趣在教师发

布的实验项目中选择一个开展实验。根据选定的实验项目指定相应的实验指导教师。

(三) 实验方案设计与审核

学生在学习理论知识、查阅资料的基础上,写出实验设计方案。小组讨论每个组员的实验设计方案,最终形成小组的实验设计方案。老师审核实验设计可行性及修改后,进行实施训练。

(四) 实验实施

各小组先填写预约,申请提交实验中心,审核通过后,学生可根据自己设计的实验方案,利用课余时间到实验室进行实验;实验后,清理实验室、检查水电、登记离开。这段时间实验室全天对学生开放,并为学生配备所需的实验材料、试剂和仪器等,以满足实验需要。在项目的实施过程中,小组成员可进行合理分工。

指导教师负责实验实施全过程的指导。在实训过程中老师全程指导并及时与学生交流,互动式探讨实验遇到的问题,并分析解决,将传统的“学生”和“教师”的角色转换为实验探索合作者,教师成为解决仪器应用培训、疑难问题提供协助者。

(五) 实验总结

实验完成后,在教师指导下完成实验小论文的写作。重点强调4个方面的内容:实验意义;材料和方法;实验结果;分析讨论。论文完成后各小组制作演示汇报文稿(PPT),课堂上进行全班集中交流汇报演示。教师对学生每个汇报项目在给予肯定和积极鼓励的前提下,从设计内容、知识原理、演示文稿制作水平、发言水平以及对教师、学生所提出的质疑解答等方面进行点评,纠正及引导学生解决问题。通过讨论,鼓励学生学习的积极性及创新精神,引发同学深入思考,进一步提高学生掌握知识和技能能力。

因此,这一项目化训练从文献资料检索、阅读、思维能力、组织能力、计算机软件应用能力、口头表达能力、演讲能力、论文撰写能力、团结协作等多方面培养了学生综合能力,体现了合作式、自主探索式实验教学在培养综合素质应用型人才中的作用。

(六) 上交材料

整个实验过程需上交的材料包括:文档一、基因工程实验设计方案(小组);文档二、基因工程实验报告(个人);文档三、基因工程实验任务分工(小组);文档四、实验研讨记录(小组);汇报PPT(小组,电子版)。

(七) 实验考核

为充分发挥评价的激励作用,提高实验教学效果,适合以能力培养为核心的实验教学模式,应建立既注重过程又注重结果的课程考核方法,以促进学生的全面发展。本教程是以实验实施的参与过程、技能提高、设计与研究能力、实验结果与分析能力等为观察点,作为考核评价的主要依据。具体指标如下:

1. 实验设计:考核实验设计方案格式,可行性、创新性,参考文献资料等。
2. 实验研讨:以小组为单位对本实验进行小组研讨,形成研讨成果,并定期在全班大组

中进行讨论汇报。讨论评价以小组为单位。

3. 实验小论文:每个综合设计实验项目形成一篇研究性小论文。评价实验论文格式、实验论文数据及图谱结果、实验讨论分析,引用文献,观点阐述等。

4. 实验操作测评:确定每个基础实验知识点与技能点,明确测评内容和要求,考试时由学生抽取 1 个考题,当场操作完成,当场评定打分。

5. 实验理论测试:针对实验原理和内容进行理论考试。

6. 平时表现与出勤:出勤情况、实验前的准备、实验过程、实验后的清理等给予相应的成绩。

基因工程实验技术课程成绩构成表

构 成	分 值
实验设计	10
实验研讨	10
实验小论文	30
实验操作测评	15
实验理论测试	25
平时表现与出勤	10

四、实验报告要求

实验报告是做完每个实验后的总结,完全是根据自己的实验历程所撰写的,除小部分引用他人的文献之外,都必须是实际实验过程和结果的记录。每个人要写一份自己的实验报告,照片等结果可以打印附上。

实验报告或实验小论文的格式可参考科学期刊里的论文格式,要求写得合理、准确。

(一)封面

第一页为封面,依次写入实验课程、实验题目、组别、姓名、完成日期等信息。

(二)摘要与关键词

摘要包括研究的对象和主要目的;研究的主要内容;主要成果及意义。从摘要的内容可以知道:你利用什么材料与方法,做了什么研究,得到了怎样的结果,得出了什么结论。

关键词:3~5 个不等。

(三)前言

简要说明实验的目的与目标。需要引用他人文献时要注明出处。注意引用的文献要尽可能可能是最新的文献,当然常规方法的引用文献除外。

(四)材料与方法

描述要简洁,写出实验的实际操作步骤,记录自己所操作的流程与条件,不要完全照抄实验讲义或论文上的内容,但要写清楚,以便他人能够重复。若使用已有的报告或论文中的方法,要加注出处(参考文献)。

(五)结果与讨论

结果是论文的核心之一,基本要求是表达清楚,前后连贯。应记录、陈述实际观察到的实验现象,简明点出获得的实验结果,而不是重复实验方法,也不是照抄实验书所列的应得到的实验结果。要详细记录实验现象的所有细节。切忌拼凑实验数据与结果。报告在实验中的真实发现是非常重要的,在科研中仔细观察,应特别注意未预期的实验现象。此外,实验数据要经过整理后,做成图表以便阅读,不要将原始资料完全抄录。请写出有意义的实验结果,但切勿遗漏重要结果。

图表一定要精确制作,正确而易懂的图表最有助于研究结果的阅读。图表都要加说明文字,好的图表只要阅读图表即可了解其实验结果。使用计算机软件作图,多参考别人如何安排图表内容,是最佳的学习方式。

一篇报告的分量主要反映在讨论这部分内容,讨论不是实验结果的重述,而是由结果所得到的观察,进一步综合分析,说明由结果所透露出来的信息。若有与事实或已知不符的现象,请仔细讨论或解释分析。讨论部分也可以包括对于实验设计的认识、体会和建议,以及对实验课改进的意见、对自己的实验质量作出的评价等。总之,这一部分最需要发挥专业实力与写作水平。

(六)参考文献

报告中若有引用他人方法与结果,一定要列出参考文献。编辑参考文献要多花时间,不可因为文献不好查或不易输入而随便应付。参考文献的写法相当复杂,不同期刊有不同的格式,但应注意在同一篇文章中统一用一种格式。

五、文档格式

文档格式详见格式一至格式四。

格式一

基因工程实验设计方案

项目名称					
专业班级		组别		组长	
小组其他成员					
一、项目研究意义(结合国内外研究、生产或市场现状)					
二、研究的预期目标					
三、实验总体流程					

四、实验具体步骤(每个分步骤包括以下部分,尽可能详细)

1. 原理
2. 实验用品
 - (1)材料
 - (2)试剂
 - (3)仪器
3. 实验步骤

五、结果预测(查阅文献报告可能出现的结果)

六、参考文献

指导教师评阅意见

指导教师签名: _____

年 月 日

格式二

基因工程实验报告

实验名称: _____

班级组别: _____

学 号: _____

姓 名: _____

指导教师: _____

完成日期: _____

报告内容应包括:摘要、关键词、前言、材料与方法、结果与分析、参考资料。具体格式如下:

1. 论文标题

一、二、三、四级标题分别采用 1、1.1、1.1.1、1.1.1.1 依次标出。如“1 前言、1.1 研究现状、1.1.1 国内研究现状”。标题文字为宋体小四加粗,数字为新罗马小四加粗,行距 1.5 倍,段前、段后间距设定为 0。与正文内容之间不空行。

2. 正文内容

宋体小四,不加粗。行距 1.5 倍,两端对齐,每段首行缩进 2 字符。段与段之间不空行,段前、段后间距设定为 0。标点符号在中文状态下输入。

3. 图表

图序及图名居中置于图的下方,图中的术语、符号、单位等应与正文表述所用一致;三线表,表序及表名置于表的上方,表中参数应标明量和单位的符号;图名、表名采用宋体五号,图序、表序为新罗马五号,加粗;表格中字体五号,左对齐,图表整体均要居中。若图或表中有附注,采用英文小写字母顺序编号,附注写在图或表的下方。如示例“表 1”。

表 1 海洋化能异养细菌类型

	革兰氏阳性菌	革兰氏阴性菌
1	产芽孢的棒状菌和球状菌	棒状菌和球状菌,好氧菌(假单胞菌科)
2	不产芽孢的棒状菌	兼性菌(弧菌科)
3	不产芽孢的球状菌	厌氧菌(还原硫酸盐细菌)

4. 参考资料

列出在正文中被引用过的文献资料。按顺序,在引用句句末以上标的形式标注[1]、[2]……按文中引用的顺序,将参考文献附于文末。作者姓名写到第三位,余者写“等”或“, et al”。文献正文采用 5 号宋体及新罗马字体,行距 1.5 倍,标点符号在英文状态下输入。几种主要参考文献著录表的格式为:

(1) 书籍格式

[序号] 作者著编. 书名[M]. 出版地:出版社,出版年:起止页码. 与后面文字间空一格。一行不够到下一行,不缩进。如:

[1] 池振明著. 现代微生物生态学[M]. 北京:科学出版社,2005,8:52.

(2) 期刊格式

[序号] 作者. 文章题目[J]. 期刊名,年份,卷号(期号):起止页码. 如:

[2] 韦蔓新,童万平. 北海湾无机氮的分布及其与环境因子的关系[J]. 海洋环境科学,2007,19(2): 25—29.

(3) 报纸文章格式

[序号] 作者. 文章题目[N]. 报纸名,出版日期(版次). 如:

[3] 谢习德. 创造学习的新思路[N]. 人民日报,1998—12—25(10).