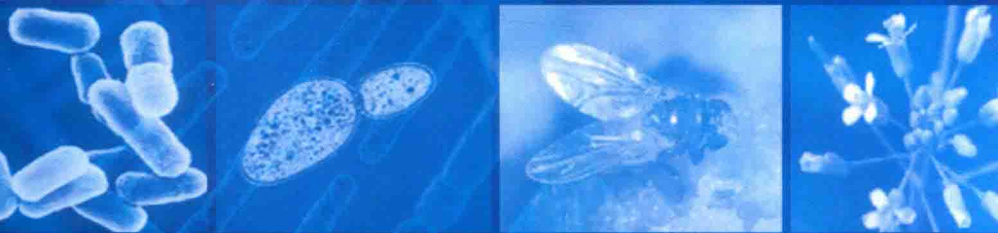


分子生物学与 基因工程技术和实验

徐小静◎编著

FENZI SHENGWUXUE YU JIYIN
GONGCHENG JISHU HE SHIYAN

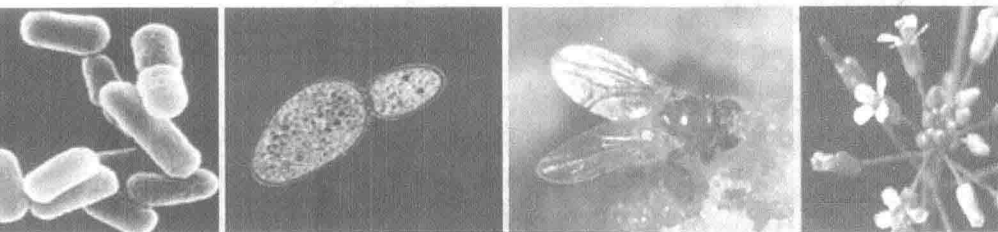


中央民族大学出版社
China Minzu University Press

分子生物学与 基因工程技术和实验

徐小静◎编著

FENZI SHENGWUXUE YU JIYIN
GONGCHENG JISHU HE SHIYAN



中央民族大学出版社
China Minzu University Press

图书在版编目 (CIP) 数据

分子生物学与基因工程技术和实验/徐小静编著. —北京:
中央民族大学出版社, 2018. 11 重印

ISBN 978 - 7 - 5660 - 0729 - 2

I. ①分… II. ①徐… III. ①分子生物学—实验—高
等学校—教材②基因工程—实验—高等学校—教材 IV.

①Q7 - 33②Q78 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 121465 号

分子生物学与基因工程技术和实验

编 著 徐小静

责任编辑 张林刚

封面设计 汤建军

出 版 者 中央民族大学出版社

北京市海淀区中关村南大街 27 号 邮编:100081

电话:68472815(发行部) 传真:68932751(发行部)

68932218(总编室) 68932447(办公室)

发 行 者 全国各地新华书店

印 刷 厂 北京建宏印刷有限公司

开 本 880 × 1230 (毫米) 1/32 印张: 14.5

字 数 364 千字

版 次 2018 年 11 月第 3 次印刷

书 号 ISBN 978 - 7 - 5660 - 0729 - 2

定 价 56.00 元

版权所有 翻印必究

前 言

生命科学是当代自然科学的热点和重点。数学、物理学等实证科学的进步不但给人类社会带来了物质文明，也带来了人口膨胀、环境污染、疾病猖獗、能源匮乏、生态平衡破坏等一系列问题，而生命科学有可能成为解决这些问题的突破口。分子生物学是在分子水平上研究生命现象的一门科学，基因工程是在分子生物学的基本理论、原理和技术的基础上发展起来的一门新兴学科，二者有着密切的关系，现均已成为生物专业本科生和研究生的重要专业课程。分子生物学和基因工程是实验科学，主要通过实验来研究问题，该领域的实验技术发展十分迅速，新知识、新概念、新技术不断涌现。为了帮助同学们更深刻的理解该领域的基本概念和原理，培养他们分析问题和解决问题的能力，并锻炼和提高他们的动手能力，特编写这本实验技术教材。本教材是编著者结合自己的教学和研究实践，并参考相关资料编写而成，可作为生物学相关专业本科生和研究生的实验教材，也可为其他专业教学和科研人员提供有益的参考。

本实验技术教材的特点之一是全书着眼于分子生物学和基因工程的基本理论和基本技术，力求全面、深入浅出地反映该领域的研究与发展状况。特点之二是引入了一些反映最新进展的实验技术，如功能基因克隆及表达研究的新技术、蛋白质互作研究技术、二代核酸测序技术、Gateway 克隆技术以及组学研究技术等。特点

之三是编入了分子生物学和基因工程技术领域的基本实验，让学生在实验操作的同时加深对概念和原理的理解，培养学生利用所学的技术和方法解决实际问题的能力。精选的实验中绝大部分由中央民族大学生命与环境科学学院生物专业的几届本科生试行过，反响良好，并且具有较强的可操作性。特点之四是整理并编入了分子生物学和基因工程技术领域的一定数量的习题，进一步巩固学生的学习。总之本书将技术理论、学生实验及课后复习结合起来，能够满足学生多方面知识的需要，提高学生综合能力。

全书分为上、中、下三篇，上篇为原理部分，主要介绍分子生物学和基因工程的基本技术和原理，包括核酸研究技术、蛋白质研究技术、重组 DNA 和转基因技术以及组学研究技术；中篇为实验部分，包括分子生物学和基因工程领域中的基础实验，供学生根据实际情况选做；下篇为习题部分，包括分子生物学原理和基因工程技术方面的习题，供学生平时训练和复习时用。书末的附录包括常用网址、常用试剂及溶液的配制、常用数据和常用软件介绍，供需要这些知识的读者参考。需要特别说明的是，习题部分主要参阅了王金发、戴余军、向本谅等人的相关习题集，并引用了部分内容。

本书的编写得到了中央民族大学生命与环境科学学院领导的大力支持和帮助，中央民族大学生命与环境科学学院生物教研室的老师们给予了有益的指导和帮助。在编写过程中，参考了众多书籍和资料，由于篇幅关系，在参考文献中恕未能全部列出。本书的出版同时也得到了中央民族大学分子生物学双语教学项目的支持。在此，一并表示衷心的感谢。

由于编者水平有限，错漏不足之处在所难免，敬请批评指教。

编 者

2014 年 2 月

目 录

上篇 原理部分

第一章 核酸研究技术	(3)
第一节 分子标记技术	(3)
第二节 基因克隆技术	(11)
第三节 基因表达分析技术	(23)
第四节 基因敲除和减量表达技术	(31)
第五节 DNA 测序技术	(40)
第六节 基因的诱变	(49)
第二章 蛋白质研究技术	(57)
第一节 蛋白质的结构分析	(57)
第二节 蛋白质互作研究技术	(68)
第三节 蛋白质与核酸互作研究技术	(77)
第三章 重组 DNA 与转基因技术	(84)
第一节 克隆载体	(84)
第二节 重组 DNA 技术	(96)
第三节 基因在大肠杆菌和酵母中的高效表达	(110)
第四节 转基因技术	(119)

第四章 组学研究技术	(127)
第一节 基因组学和比较基因组学研究技术	(127)
第二节 转录组学研究技术	(136)
第三节 蛋白质组学研究技术	(147)
第四节 代谢组学研究技术	(155)

中篇 实验部分

实验一 大肠杆菌感受态细胞制备及质粒转化	(167)
实验二 质粒 DNA 的提取及浓度测定	(172)
实验三 DNA 酶切及琼脂糖凝胶电泳	(177)
实验四 PCR 扩增 DNA 特异性片段	(186)
实验五 植物组织总 RNA 的提取、变性电泳及 Northern 杂交	(191)
实验六 玉米 CuZn-SOD 基因 <i>ZmCSD</i> 的克隆	(203)
实验七 DNA 重组	(209)
实验八 真核生物基因组 DNA 的提取	(214)
实验九 大肠杆菌表达重组蛋白及目的蛋白的 免疫印迹鉴定	(219)
实验十 基因组文库的构建	(230)
实验十一 cDNA 文库的构建	(235)
实验十四 植物转基因技术 ——农杆菌介导的花芽浸泡法转化拟南芥植株	(250)
实验十五 植物转基因技术 ——农杆菌介导的双子叶植物叶盘法转化烟草	(256)
实验十六 植物转基因技术 ——农杆菌介导的番茄遗传转化	(263)
实验十七 基因枪法转化洋葱表皮细胞	(265)

实验十八	Real-time PCR 分析基因的表达	(269)
实验十九	酵母双杂交实验	(275)

下篇 习题部分

第一章	分子生物学原理	(289)
第一节	核 酸	(289)
第二节	染色体和基因组	(298)
第三节	DNA 复制	(306)
第四节	DNA 修复及转座	(312)
第五节	DNA 转录	(318)
第六节	蛋白质翻译	(327)
第七节	原核基因表达调控	(336)
第八节	真核基因表达调控	(343)
第二章	基因工程技术	(352)
第三章	分子生物学与基因工程综合技术	(372)
第一节	分子生物学与基因工程技术综合题(一)	(372)
第二节	分子生物学与基因工程技术综合题(二)	(380)
第三节	分子生物学与基因工程技术综合题(三)	(387)
第四节	分子生物学与基因工程技术综合题(四)	(394)
第四章	分子生物学及基因工程实验原理及操作	(407)
第一节	基本原理类	(407)
第二节	实验操作类	(408)

附 录

附录一	常用因特网网址	(413)
附录二	常用缓冲溶液及试剂的配制	(417)

附录三	细菌培养基	(428)
附录四	常用实验数据	(431)
附录五	分光光度计定量分析法	(437)
附录六	常用缩略词	(441)
附录七	常用软件及介绍	(445)

上篇 原理部分

第一章 核酸研究技术

第一节 分子标记技术

一、分子标记技术概述

遗传标记指可追踪染色体、染色体某一节段、某个基因座在家系中传递的任何一种遗传特性。它具有两个基本特征，即可遗传性和可识别性。遗传标记包括形态标记、细胞学标记、生化标记和分子标记四种类型。广义的分子标记是指可遗传并可检测的 DNA 序列或蛋白质，狭义分子标记是指能反映生物个体或种群间基因组中某种差异的特异性 DNA 片段。分子标记与其他遗传标记相比，具有以下特点：（1）准确性高。直接以 DNA 的形式表现，植物体的各个组织、各生长发育时期均可检测，不受季节及环境因素限制，与基因表达与否无关。（2）数量多。由于基因组 DNA 的变异极其丰富，分子标记数量几乎是无限的。（3）多态性高。自然界存在许多等位变异，不需专门创造特殊的遗传材料。（4）共显性好。许多分子标记都表现为共显性，能更好地鉴别纯合基因与杂合基因类

型。(5) 对表型无影响, 不影响目标性状的表达。

分子标记技术发展到现在已有十多种, 可分为以下类型: (1) 基于分子杂交技术的分子标记, 如限制性片段长度多态性 (RFLP) 和数目可变串联重复多态性 (VNTR)。(2) 基于 PCR 的分子标记, 主要有两大类, 其中随机引物的 PCR 标记主要包括随机扩增多态性 DNA (RAPD)、任意引物 PCR (AP-PCR) 和 DNA 扩增指纹印迹 (DAF), 特异性引物的 PCR 标记主要包括序列标记位点 (STS)、简单重复序列 (SSR)、内部简单重复序列 (ISSR)、序列特异性扩增区 (SCAR)、单引物扩增反应 (SPAR)、DNA 单链构象多态性 (SSCP) 和双脱氧指纹法 (ddF)。(3) 基于限制性酶切和 PCR 技术的分子标记, 包括扩增片段长度多态性 (AFLP) 和酶切扩增多态性序列 (CAPS)。(4) 近年来在 DNA 测序、大量 DNA 序列数据和 DNA 芯片技术的基础上发展起来的分子标记技术, 如核苷酸多态性 (SNP)、表达序列标签 (EST)、表达序列标签-简单重复序列 (EST-SSR)、相关序列扩增多态性 (SRAP)、条形码 (DNA barcodes) 等技术。下面对应用较广泛的 RFLP、RAPD、SSR、EST、DNA barcodes 等技术进行介绍。

二、常用分子标记技术

1. RFLP

RFLP (restriction fragment length polymorphism) 即限制性片段长度多态性, 指由于碱基突变造成 DNA 序列上限制性内切酶位点的丢失或者产生, 而产生的酶切片段的多态性。RFLP 是较早产生的基于 DNA 多态的分子标记技术, 其基本原理是因 DNA 的碱基发生变异后, 引起限制性内切酶识别位点的增减, 用限制性内切酶酶切改变后的 DNA, 产生长短、种类、数目不同的限制性片段, 经电泳分离后, 在凝胶上呈现不同的带型分布, 通过与 DNA 探针进行

Southern 杂交和放射自显影后，即可揭示出 DNA 的多态性。它所检测的 DNA 分子多态来源于：（1）突变形成的、决定酶切片段数量的限制性内切酶酶切位点的存在与否；（2）两个酶切位点间因 DNA 插入、重排或缺失造成的长度变异。

RFLP 标记具有很高的分辨力，又以共显性的方式遗传，结果的重复性和准确度高，在高密度遗传连锁图谱和指纹图谱的构建、群体遗传与系统演化等研究领域具有重要的应用价值。但 RFLP 技术整个的处理过程比较冗长，步骤繁琐，有一定的技术难度，且检测中需要的放射性同位素对人体有害，因此在应用中尤其是需要大量分子标记的研究中受到限制。虽然已经出现了一些非放射性同位素标记方法，但它们的高价格和繁琐的实验操作步骤影响了在实际使用中的推广。

PCR 技术使得人们很容易获得目的基因，在此基础上诞生了 PCR - RFLP 技术。该技术与传统的 RFLP 技术相比，成本低廉，耗时少，实验流程简单，很快得到了广泛应用。PCR - RFLP 所得到的信息有时并不比单个基因序列所获得的信息量少，因为用少量的内切酶酶切就可以产生和获得能够反映分类群遗传差异的大量多态性，为研究植物类群特别是属间、种间甚至品种间的亲缘关系、系统发育与演化提供了有力的依据。曹东伟等（2007）采用 PCR - RFLP 技术对中国野生樱桃的 13 个自然居群进行了亲缘地理研究，为探讨中国樱桃植物的起源、冰期后的迁移路线以及现有分布格局的成因奠定了基础。吴国盛等（2008）用 PCR - RFLP 方法对部分菊属和亚菊属植物进行亲缘关系分析，发现该方法可为菊属植物亲缘关系的研究提供一定的分子证据。

2. RAPD

RAPD (random amplified polymorphic DNA) 即随机扩增片段长度多态性 DNA，指用一个（有时用两个）随机引物（一般 8 ~ 10 nt）非定点地扩增基因组 DNA，如果发生 DNA 片段插入、缺失或

碱基突变，就有可能导致引物结合位点的分布发生相应的变化，导致 PCR 产物增加、减少或发生分子量变化，从而产生 RAPD 标记。RAPD 所用的一系列引物各不相同，但对于任一特定的引物来说，它同基因组 DNA 序列有其特定的结合位点。这些特定的结合位点在基因组某些区域内的分布如符合 PCR 扩增条件，即引物在模板的两条链上有互补位置，且与引物的 3' 端相距在一定长度范围之内，就可扩增出片段。每个引物检测基因组 DNA 多态性的区域是有限的，当分析所用的随机引物数足够大时，RAPD 标记所检测的标记信息几乎覆盖整个基因组。因此，RAPD 可以对整个基因组进行多态性检测。

RAPD 标记是植物品种鉴定领域用得最多的分子标记技术之一。谷巍等（2009）运用 RAPD 分子标记分析了福建、江西、四川产泽泻的遗传多样性，证明不同产地泽泻具有较高的遗传多样性。华树妹等（2009）利用 RAPD 技术对山药资源进行遗传多样性分析，聚类分析结果与经典的园艺学分类相符，在分子水平上支持了按园艺学薯块类型对山药资源进行分类的观点。杜勤等建立及优化青天葵样品总 DNA 的提取方法及 RAPD 反应体系，探讨不同品种的青天葵及其替代品、伪品在 DNA 分子水平上的遗传多样性，证明 RAPD 技术可以很好的鉴别青天葵。

RAPD 技术操作简便，适合大量样本的快速分析，尤其在种质资源鉴定方面及作物品种纯度和真实性鉴定方面受到广泛的重视（匡猛，2009）。RAPD 技术无需知道基因组序列信息，可直接对基因组进行随机扩增。RAPD 方法的缺点主要是多数位点的标记带表现为显性，不能区别杂合子，其次是 RAPD 标记由于使用了较短的引物，PCR 容易受实验条件的影响，重复性和稳定性差，有时甚至出现假阳性标记，一定程度上降低了实验结果的可靠性，因此在品种指纹鉴定中的应用受到一定限制。

3. SSR

SSR (simple sequence repeat) 即简单序列重复, 又称为微卫星 DNA (microsatellite DNA), 指在真核生物基因组中散在分布的由简单的重复单位 (2 ~ 6 bp) 组成的小序列 (几百个 bp)。SSR 的结构为核心区 [(重复单元) n] + 侧翼区, 其中 n 在不同个体中高度变异, 因此 SSR 显示出较强的多态性, 侧翼区为保守的单拷贝序列, 可通过 PCR 扩增, 产生 SSR 标记, 或称 SSLP。微卫星 DNA 具有丰富的多态性, 主要表现在核苷酸重复单位数目的多态性和重复序列中核苷酸的替换多态性。一般认为, 一个微卫星 DNA 核心序列重复数目越高, 其等位基因数目也就越多, 即多态性越丰富, 提供的信息量越高。微卫星 DNA 遵循孟德尔遗传规律, 能够稳定地从上一代传给下一代, 并且等位基因间呈现共显性遗传的特点。微卫星 DNA 分布广, 含量丰富, 几乎存在于所有真核生物中, 人类基因组 DNA 中平均每 6 ~ 10 kb 就有一个 SSR 位点。微卫星 DNA 具有含量丰富、多态性高、共显性和检测方法简单等优点, 使得微卫星 DNA 标记技术在遗传多样性研究中具备明显优势, 特别是在居群遗传学中的广泛使用, 已经形成了较为完整的体系。

SSR 标记也有一定的局限性, 必须事先知道微卫星 DNA 两翼序列信息才能设计引物, 对于许多物种需构建文库, 但对于主要农作物和经济作物的基因组而言, 可从互联网上共享引物序列的宝贵资源。微卫星序列可以通过检索 Genbank (美国基因和蛋白数据库)、EMBL (欧洲分子生物学实验室数据库) 和 DDBJ (日本国家遗传研究所基因数据库) 等 DNA 序列数据库, 从互联网上获得含有微卫星 DNA 的序列。随着基因组计划的进行, 数据库中涌现了很多新的序列, 通过检索能很容易获得更多标记, 将成为获取微卫星 DNA 标记的一个主要途径。

4. SNP

SNP (single nucleotide polymorphism) 即单核苷酸多态性, 主

要是指由基因组核苷酸水平上的变异引起的 DNA 序列多态性，包括单碱基的转换、颠换，以及单碱基的插入或缺失等。SNP 在基因组内可以划分为两种形式，一是遍布于基因组的大量单碱基变异，二是基因编码区的功能性突变，由于分布在基因编码区 (coding region)，故又称其为 cSNP。cSNP 经常引起表达蛋白的多态性变异，有时会影响他们的功能特性。与其他分子标记相比，SNP 分辨率最高也最为丰富，覆盖基因组范围大，遗传上比较稳定。在人类基因组中，估计平均每 1000 对碱基就有 1 个 SNP，估计其总数可达 300 万个甚至更多，是继微卫星之后的第三代遗传标记。SNP 的分布不均匀，非转录序列要多于转录序列，绝大多数位于蛋白的非编码区。通常情况下是一种二等位基因的变异，多为转换，即一种嘧啶碱基换为另一种嘧啶碱基，或一种嘌呤碱基换为另一种嘌呤碱基，而颠换，即嘌呤与嘧啶之间的替代发生较少，转换与颠换之比为 2 : 1。SNP 在 CG 序列上出现最为频繁，而且多是 C→T，因为 CG 中 C 常为甲基化的，自发脱氨后即变为胸腺嘧啶。

SNP 作为一类广泛应用的遗传标记，具有以下特点：(1) 密度高：SNP 在基因组中数量多、分布密度高，在人类基因组分布达 3×10^6 个，遗传距离为 2~3 cM，密度比微卫星标记更高，可以在任何一个待研究基因的内部或附近提供一系列标记。(2) 富有代表性：某些位于基因内部的 SNP 有可能直接影响蛋白质结构或表达水平，因此它们可能代表疾病遗传机理中的某些作用因素。(3) 遗传稳定性：与微卫星等重复序列多态性标记相比，SNP 具有更高的遗传稳定性。(4) 易实现分析的自动化：SNP 标记在人群中只有两种等位型 (allele) 故也称为双等位标记 (biallelic marker)。这样在检测时只需一个“+/-”或“全/无”的方式，而无须像检测限制性片段长度多态性或微卫星那样对片段的长度作出测量，这使得基于 SNP 的检测分析方法易实现自动化。用目前的方法每年可以检测出上千个基因中的 SNP，而其成本会随着技术和手段的不断成熟而