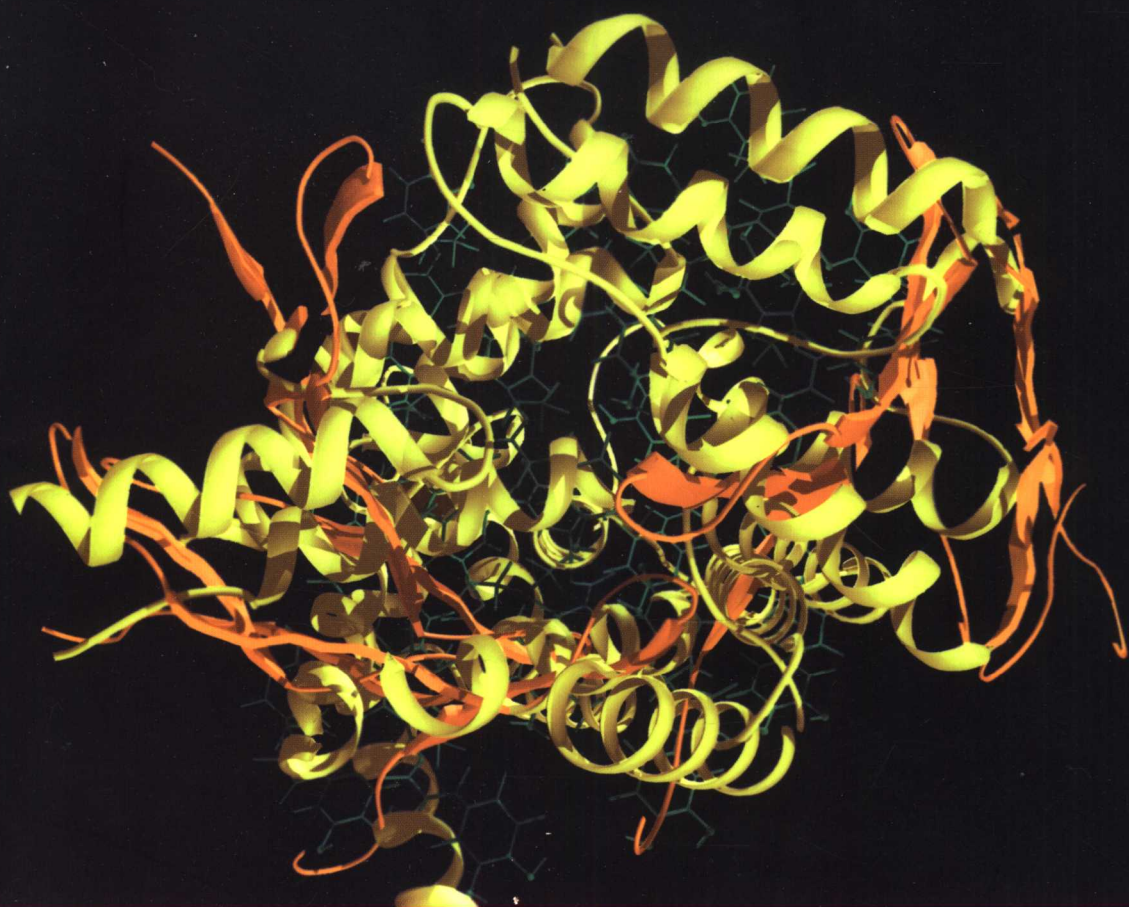


高等学校教材



SHENGWU HUAXUE YU FENZI SHENGWUXUE
ZONGHE DASHIYAN

生物化学与分子生物学 综合大实验

■ 魏 群 主编



化学工业出版社

生命科学的迅速发展,使生物化学和分子生物学越来越成为生命科学各领域的重要研究工具。本书是在多年来为北京师范大学生命科学学院开设生化大实验及分子生物学实验的基础上编写而成。

全书分为前后呼应的两篇,第一篇介绍了有关生物化学和分子生物学的基本实验技术理论,第二篇是学生实验,书后还摘编了对生物化学和分子生物学实验有用的附录。

本书的编写风格简明、实用。编写中突出实验的基础性、技能性和综合性。通过学习每一个基础实验和掌握每一个基本技能,使学生综合进行接近正规科研的实验训练。同时培养学生分析问题、解决问题的能力 and 研究的思维能力。

本书可作为高等院校生物和医药农林等专业研究生和本科生生物化学和分子生物学实验的指导用书,也可供生物化学和分子生物学有关研究人员、企业技术人员等参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学综合大实验/魏群主编. —北京:
化学工业出版社, 2007. 7
高等学校教材
ISBN 978-7-122-00767-4

I. 生… II. 魏… III. ①生物化学-实验-高等学校-
教材②分子生物学-实验-高等学校-教材 IV. Q5-33
Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 097778 号

责任编辑: 李 丽 郎红旗
责任校对: 王素芹

文字编辑: 周 侗
装帧设计: 张 辉

出版发行: 化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)
印 刷: 大厂聚鑫印刷有限责任公司
装 订: 三河市前程装订厂
787mm×1092mm 1/16 印张 13¼ 字数 326 千字 2007 年 8 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899
网 址: <http://www.cip.com.cn>
凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价: 24.00 元

版权所有 违者必究

前 言

生命科学的迅速发展,使生物化学和分子生物学越来越成为生命科学各领域的重要研究工具。本书是在多年来为北京师范大学生命科学学院开设生物化学大实验及分子生物学实验的基础上编写的。

为了更好地培养学生的综合科研素质和实践技能,我们将过去实验教学过程中的单一技能训练转化为综合实验技能训练,在实验课程体系和内容的设置方面以系统综合大实验为核心和以科学研究思路为线索,设计系列教学实验,改变了传统实验教学模式中条块分割的状况,让学生在实验课程中体验科研的过程,使学生从整体上初步了解进行生物化学及分子生物学科学研究的思路和方法,培养学生们正确的科研思维能力和综合素质。

全书分为前后呼应的两篇。第一篇介绍了有关生物化学和分子生物学的基本实验技术理论,内容包括载体,PCR 基因扩增,DNA 重组,基因分析与检测,基因表达,基因突变和蛋白质工程,层析技术,电泳技术,蛋白质的分离纯化,蛋白质的分析技术,酶工程与固定化酶,基因工程蛋白的发酵与制备技术。以供学生实验时查找和老师讲解。第二篇是学生实验,内容包括质粒 DNA 的提取及其定性定量分析,大肠杆菌基因组 DNA 的分离,PCR 法扩增大肠杆菌碱性磷酸酶基因,质粒 DNA 与目的 DNA 的双酶切和连接,感受态细胞的制备和重组质粒的转化,重组子的筛选与鉴定,重组碱性磷酸酶的发酵培养,发酵产物(碱性磷酸酶)的检测分析、分离纯化、参数的测定、纯度鉴定及其亚基分子量测定、酶学性质分析、变性及复性作用研究、固定化及固定化酶的特性研究、定点突变、结构与功能研究。书后还摘编了对生物化学和分子生物学实验有用的附录。

本教材的编写风格简明、实用。编写时一方面突出实验的基础性、技能性和综合性而设计系列综合大实验;另一方面突出实验操作的可行性,在实验方法中详细罗列所需的仪器和材料,在实验操作中详尽地叙述每一个实验步骤,特别是对实验中应注意的地方和学生在实验过程中易出现的问题等均给予了重要提示,学生通过本书即可独立地进行实验。通过学习本书,学生在获得较好实验结果的同时即可进行接近正规科学研究的综合实验技能训练,从而培养学生的科研能力、创新能力、分析问题与解决问题等的综合实践能力。

本书可作为高等院校生物和医药农林等专业研究生和本科生生物化学和分子生物学实验的指导用书,也可供生物化学和分子生物学有关研究人员、企业技术人员等参考。

编者

2007 年 2 月

于北京师范大学

目 录

第一篇 常用生物化学与分子生物学实验技术及原理

第一章 载体	1
第二章 PCR 基因扩增	8
第三章 DNA 重组	16
第四章 基因分析与检测	27
第五章 基因表达	53
第六章 基因突变和蛋白质工程	67
第七章 层析技术	78
第八章 电泳技术	90
第九章 蛋白质的分离纯化	101
第十章 蛋白质的分析技术	108
第十一章 酶工程与固定化酶	119
第十二章 基因工程蛋白的发酵与制备技术	126
参考文献	132

第二篇 学 生 实 验

实验一 质粒 DNA 的提取及其定性定量分析	133
实验二 大肠杆菌基因组 DNA 的分离	137
实验三 PCR 法扩增大肠杆菌碱性磷酸酶基因	139
实验四 质粒 DNA 与目的 DNA 的双酶切和连接	142
实验五 感受态细胞的制备和重组质粒的转化	144
实验六 重组子的筛选与鉴定	147
实验七 重组碱性磷酸酶的发酵培养	149
实验八 发酵产物（碱性磷酸酶）的检测分析	151
实验九 发酵产物（碱性磷酸酶）的分离纯化	155
实验十 碱性磷酸酶分离纯化参数的测定	157
实验十一 碱性磷酸酶的纯度鉴定及其亚基分子量测定	159
实验十二 碱性磷酸酶的酶学性质分析	162
实验十三 碱性磷酸酶的变性及复性作用研究	166
实验十四 碱性磷酸酶的固定化及固定化酶的特性研究	169
实验十五 碱性磷酸酶的定点突变（PCR 法）	172
实验十六 碱性磷酸酶及其突变体的结构与功能研究	175

附 录

一、常用单位及换算方法	179
二、常用核酸、蛋白质换算数据	179

三、氨基酸符号及相应密码子 180

四、常见市售酸碱的浓度及近似 pH 值 180

五、硫酸铵饱和度的常用表 181

六、离心机转速与相对离心力的换算 183

七、层析法常用数据 185

八、常用的电泳缓冲液及凝胶加样缓冲液 191

九、常用限制性内切酶酶切位点及缓冲液 192

十、分子生物学常用缓冲液和试剂的配制 193

十一、生化常用缓冲液的配制 196

十二、常用细菌培养基和抗生素溶液 199

十三、小鼠腹水多克隆抗体的制备和检测 202

第一篇 常用生物化学与分子生物学 实验技术及原理

第一章 载 体

基因工程是人工进行基因切割、重组、转移和表达的技术。基因工程诞生于 20 世纪 70 年代。基因工程中分离或改建的基因和核酸序列自身不能繁殖，需要载体携带它们到合适的细胞中复制和表现功能。这种携带目的基因进入宿主细胞进行扩增和表达的工具，称为载体。常用的载体有质粒 (plasmid)、噬菌体 (phage)、单链丝状噬菌体和黏性末端质粒 (黏粒)、病毒等。

基因工程中使用的载体必须具备以下条件：①复制子，是一段具有特殊结构的 DNA 序列，载体有复制点才能使与它结合的外源基因复制繁殖；②有一个或多个利于检测的遗传表型，使其进入宿主细胞或携带着外来的核酸序列进入宿主细胞都能容易被辨认和分离出来，如耐药性、显色表型反应等；③有一到几个限制性内切酶的单一识别位点，便于外源基因的插入，插入后不影响其进入宿主细胞和在细胞中的复制；④容易进入宿主细胞，而且进入效率越高越好；⑤适当的拷贝数，一般而言，较高的拷贝数不仅利于载体的制备，同时还会使细胞中克隆基因的数量增加。

一、质粒载体

质粒是基因工程中常用的载体之一。质粒是细菌或细胞染色体外的小型双链环状 DNA，大小在 1~200kb 之间。质粒能自主复制，在细菌中不断复制自身。质粒的特征如下。

① 质粒是染色质外的双链共价闭合环形 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA)，可自然形成超螺旋结构。不同质粒大小在 2~300kb 之间，<15kb 的小质粒比较容易分离纯化，>15kb 的大质粒则不易提取。

② 质粒能自主复制，是能独立复制的复制子 (autonomous replicon)。一般质粒 DNA 复制的质粒可随宿主细胞分裂而传给后代。按质粒复制的调控及其拷贝数可分为两类：严紧控制 (stringent control) 型质粒，其复制常与宿主的繁殖偶联，拷贝数较少，每个细胞中只有 1 个到十几个拷贝；另一类是松弛控制 (relaxed control) 型质粒，其复制与宿主的繁殖不偶联，每个细胞中有几十到几百个拷贝。

每个质粒 DNA 上都有复制起点 (ori)，只有 ori 能被宿主细胞复制蛋白质识别的质粒才能在该种细胞中复制，不同质粒的复制控制状况主要与复制起点的序列结构相关。有的质粒可以整合到宿主细胞染色质 DNA 中，随宿主 DNA 复制，称为附加体。例如细菌的性质粒就是一种附加体，它可以质粒形式存在，也能整合入细菌的 DNA，又能从细菌染色质 DNA 上切下来。F 因子携带基因编码的蛋白质能使两个细菌间形成纤毛状细管连接的接合 (conjugation)，通过此细管遗传物质可在两个细菌间传递。

③ 质粒对宿主生存并不是必需的，但也不妨碍宿主的生存。某些质粒携带的基因功能有利于宿主细胞在特定条件下生存。例如，细菌中许多天然的质粒带有耐药性基因，如编码合成能分解破坏四环素、氯霉素、青霉素、氨苄西林等的酶基因，这种质粒称为耐药性质粒，又称 R 质粒，带有 R 质粒的细菌就能在相应的抗生素存在的环境中生存繁殖。所以质粒对宿主不是寄生，而是共生。医学上遇到许多细菌的耐药性，常与 R 质粒在细菌间的传播有关，F 质粒就能促使这种传递。

现在分子生物学使用的质粒载体都已不是原来细菌或细胞中天然存在的质粒，而是经过了许多的人工改造。从不同的实验目的出发，人们设计了各种不同类型的质粒载体，近年来新的有特定用途的质粒不断被创建。

1. pBR322

pBR322 (图 1-1) 是由几个质粒 DNA 通过 DNA 重组技术构建而成的克隆载体。具有

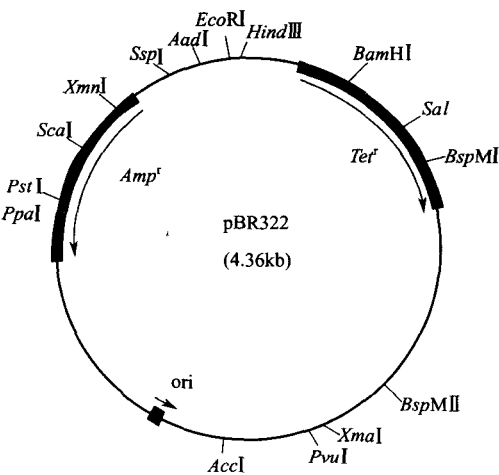


图 1-1 pBR322

较小的分子量，DNA 分子的长度为 4.36kb；具有氨苄西林抗性基因 (Amp^r) 和四环素抗性基因 (Tet^r) 两种选择的耐药性标记。pBR322 共有 24 种限制性内切酶的单一识别位点，其中 7 种酶 (从 12:00 位置按顺时针方向 $EcoR$ I、 Nhe I、 Bam H I、 Sph I、 Sal I、 Xma III、 Nru I) 的识别位点位于四环素抗性基因内部，另外 2 种酶 (Cla I、 $Hind$ III) 存在于这个基因的启动子内部。所以在这 9 个限制性位点上插入外源 DNA 通常都会导致四环素抗性基因 (Tet^r) 的失活。3 种限制酶 (Sca I、 Pvu I、 Pst I) 的单一识别位点在氨苄西林抗性基因 (Amp^r) 内部，在这个位点插入外源 DNA 则会导致氨苄西林抗性基

因的失活。利用这种插入失活来检测重组体质粒需经过两个步骤，如将外源基因插入到 Bam H I 位点，便产生 $Amp^r Tet^s$ 的重组子，将经过这种重组因子转化的受体菌涂布在含青霉素培养基上，存活下来的菌落有 $Amp^r Tet^r$ 和 $Amp^r Tet^s$ 两种表型，再将它们分别涂布在含四环素和青霉素的培养基上，凡是在青霉素平板上生长，而在四环素平板上不生长的菌落通常被认为有外源基因的插入。

综上所述，pBR322 质粒载体具有如下优点。①具有较小的分子量。经验表明，为了避免在 DNA 的纯化过程中发生链的断裂，克隆载体的分子大小最好不要超过 10kb。pBR322 质粒这种小分子量的特点，不仅易于自身 DNA 的纯化，而且可容纳较大的外源 DNA 片段。②具有两种抗生素抗性基因可供作转化子的选择记号，既能指示载体或重组 DNA 分子是否进入宿主细胞，又能指示外源 DNA 分子是否插入载体分子形成了重组子。③pBR322 质粒载体还具有较高的拷贝数，而且经过氯霉素扩增之后，每个细胞中可积累 1000~3000 个拷贝，这就为重组体 DNA 的制备提供方便。

2. pUC 载体

pUC 载体系列是由大肠杆菌 pBR322 质粒与 M13 噬菌体改建而成的双链 DNA 质粒载体，即是构建 M13mp 系列载体所用的 $lacZ$ 片段插入到 pBR322 的一种缺失变种之中。它

含有来自 pBR322 质粒的复制起点 (ori)，氨苄西林抗性基因 (*Amp^r*)，编码能水解 β -内酰胺环从而破坏氨苄西林的酶，大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因 (*lacZ*) 的启动子及其编码 α 肽链的 DNA 序列，并且在 *lacZ* 中有一段多克隆位点 (MCS) 区段。当外源 DNA 片段插入到这些克隆位点时，使 α 互补破坏，形成的是无活性的 β -半乳糖苷酶。于是，被转化的大肠杆菌细胞就在 Xgal-IPTG 培养基上形成白色菌落；相反没有外源 DNA 插入的质粒转化大肠杆菌细胞后，在 Xgal-IPTG 培养基上形成蓝色菌落。另外与 pBR322 相比，pUC 质粒载体具有更小的分子量，而且由于 *rop* 基因的缺失（其基因产物 ROP 蛋白，控制质粒复制），使得其拷贝数大增，每个细胞可达 500~700 个拷贝。因此由 pUC 质粒重组体转化的大肠杆菌细胞，可获得高产量的克隆 DNA 分子。

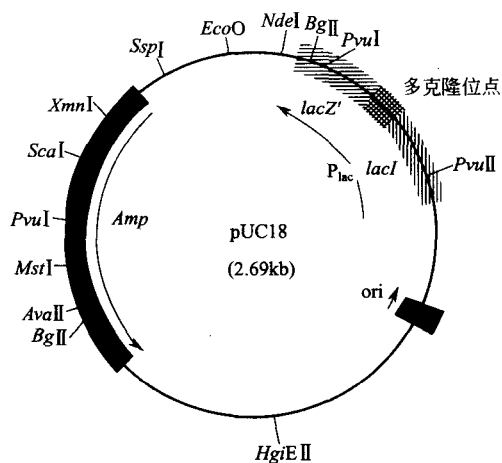


图 1-2 pUC18

在 pUC 载体系列中，用得最多的是 pUC18 (图 1-2) 和 pUC19。pUC18 和 pUC19 质粒载体除多克隆位点以互为相反的方向排列外，其他方面都相同。在 pUC18 中，*EcoR* I 位点紧接于 P_{lac} 下游；而在 pUC19 中，*Hind* III 位点紧接于 P_{lac} 下游。

3. pET 载体

pET 载体最初由 Studier 及其同事构建，由 pBR322 衍生而来含有一个编码 T7 基因 10 氨基端前 11 个氨基酸的区域，其后是外源片段的插入位点，起始 ATG 由 T7 基因 10 氨基端提供。当宿主菌中的 T7 RNA 聚合酶基因被诱导表达后，外源片段以 T7 基因 10 氨基端融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达。若外源片段在起始 ATG 处的 *Nde* I 位点插入，则可直接表达。

pET 系统是有史以来在大肠杆菌中克隆表达重组蛋白的功能最强大的系统。目的基因被克隆到 pET 质粒载体上，受噬菌体 T7 强转录和翻译（可选择）信号控制；表达由宿主细胞提供的 T7 RNA 聚合酶诱导。T7 RNA 聚合酶机制十分有效并具有选择性，充分诱导时，几乎所有的细胞资源都用于表达目的蛋白；诱导表达后仅几小时，目的蛋白通常可以占到细胞总蛋白的 50% 以上。在非诱导的条件下，可以使目的蛋白完全处于沉默状态而不转录。

pET 系统中 pET Blue™ 载体既具有 T7 *lac* 启动子表达靶基因，又具有传统的蓝白筛选标记。由于表达的 T7 *lac* 启动子和调控蓝白筛选的 *E. coli* 启动子的方向相反，而使得筛选和表达是相互独立的。pET Blue-2 (图 1-3) 具有一个较宽的多克隆位点 (MCS) 及 C 末端的融合标签 HSV·Tag® 和 His·Tag®。

二、 λ 噬菌体载体

λ 噬菌体是最早使用的克隆载体，是基因组长度为 43kb 的线性双链 DNA 分子。在其两端，各有一条由 12 个核苷酸组成的互补的 5' 单链突出序列，即黏性末端。当 λ 噬菌体 DNA 注入到寄主细胞后，线性 DNA 分子会通过黏性末端的碱基配对而结合，形成环状 DNA 分子。这种由黏性末端结合形成的双链区段称为 COS 位点。

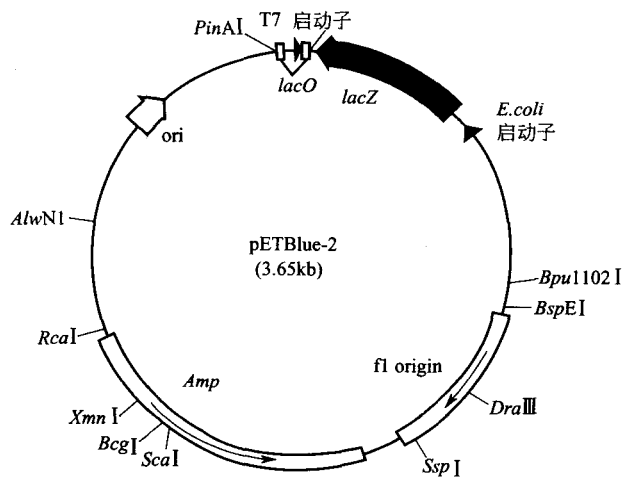


图 1-3 pET Blue-2

λ 噬菌体是一种中等大小的温和噬菌体，它既能进入溶菌生命周期又能进入溶源生命周期。在溶菌生命周期，噬菌体将其感染的宿主细胞裂解，并能产生出大量的子代噬菌体颗粒。而在溶源生命周期，在感染过程中没有产生出子代噬菌体颗粒，噬菌体 DNA 是整合到寄主细胞染色体 DNA 上，成为它的一个组成部分，并随寄主染色体的复制而复制。在溶源状态下，只有一个拷贝噬菌体基因组 DNA。 λ 噬菌体进入大肠杆菌寄主后，是进入溶源状态还是进入溶菌状态，由 *cI* 基因控制，它编码一个阻遏蛋白。 λ 噬菌体基因组的基因，按功能的相近性聚集成簇。①A、W、B、C、D、E、F 7 个基因组成头部基因，编码头部蛋白质。②Z、U、V、G、T、H、M、L、K、I、J 等基因编码 λ 噬菌体的尾部蛋白质。③介于基因 J 与基因 N 之间，这个区又称为非必要区，当它们被外源基因取代后，并不影响噬菌体的生命功能。本区包括了一些与重组有关的基因，*att* 基因是整合与切割的识别位点，*int* 基因编码的蛋白质能使 λ DNA 整合到细菌染色体上，*xis* 基因编码的蛋白质将原噬菌体从宿主细胞染色体上切割下来，*red* 基因负责促进重组。④N、Q 为调节基因，编码抗终止因子，分别控制早期功能和晚期功能的调节，*cI* 基因编码阻遏蛋白，*cro* 基因编码的蛋白质也是一种阻遏物，同操纵基因 O_L 、 O_R （左操纵子、右操纵子）结合而抑制转录。*cII* 基因编码一种调节蛋白，当缺乏这种蛋白时，*int* 和 *cI* 基因的启动子就无法利用 RNA 聚合酶，因而无法进行转录。S、R 基因为裂解基因。

现在实验室用的 λ 噬菌体载体都是在野生型基础上改造而成的，即从 λ 噬菌体的基因组 DNA 上消去一些多余的限制位点和切除掉非必要的区段。改建之后的常用载体有两类：①插入型载体，具有一个可供外源 DNA 插入的克隆位点，如 λ gt10、 λ gt11；②替换型载体，具有成对的克隆位点，在两个位点之间的 λ DNA 区段可被外源插入的 DNA 片段取代，如 Charon4、Charon10、Charon35。这两种载体在克隆中有不同的用途，插入型载体只能插入较小的外源 DNA 片段（<10kb），而替换型载体能插入较大的外源 DNA 片段（20~24kb）。

应用噬菌体载体构建重组体分子时，应注意包装限度。当重组体 DNA 分子长于 λ 噬菌体基因组 105% 或小于 75% 时，重组噬菌体的活力会大大下降，不能形成正常大小的噬菌斑，所以重组体 DNA 分子长度应控制在包装限度范围内。

λ 噬菌体重组体分子的筛选与质粒重组体分子不同，不具有抗生素抗性选择标记，主要

是依据噬菌斑的形态学特征和 Xgal-IPTG 显色反应来判断。

cI 基因编码阻遏蛋白，它的存在将使 λ 噬菌体进入溶源状态，因此在培养基上形成的是混浊型的噬菌斑。*cI* 基因失活或缺失的 λ 噬菌体，无法使其寄主细胞发生溶源化效应，这时在培养基上形成清亮型噬菌斑。所以如果在 λ 噬菌体的插入型载体的克隆位点或在替换型载体的可替换区段中有一个 *cI* 基因，那么插入了外源 DNA 片段的 λ 重组体分子将表现 *cI*⁻，形成清亮型噬菌斑；而非重组体分子 *cI*⁺，形成混浊型的噬菌斑。根据这个形态学特征可筛选 λ 重组体分子。

许多 λ 载体，如 Charon2、 λ gt11 含有编码 β -半乳糖苷酶基因 (*lacZ*) (其中引入多克隆位点)。由这种载体感染的大肠杆菌 *lac*⁻ 菌，涂布在含有 IPTG 和 Xgal 的培养基平板上，会形成蓝色噬菌斑。当外源 DNA 片段插入到这些克隆位点时，形成无活性的 β -半乳糖苷酶，被感染的大肠杆菌寄主细胞就会在 Xgal-IPTG 培养基上形成无色噬菌斑；没有插入外源 DNA 的载体形成蓝色噬菌斑。同样，如果在替换型载体的可替换区段含有 *lacZ* 基因序列，也会出现同样结果。

λ gt10 和 λ gt11 载体系列适用于克隆 6kb 左右的外源 DNA，适合构建 cDNA 基因文库。 λ gt10 的外源 DNA 插入位点 *EcoR* I 和 *Hind* III 都在 *cI* 基因内，外源 DNA 插入使 *cI* 失活。重组噬菌体在溶源性突变株 *hfl*⁻ 寄主细胞上能有效地形成噬菌斑，而 *cI* 完整的载体在 *hfl*⁻ 菌株上不能形成噬菌斑。 λ gt11 载体内含有 *lacZ* 基因，插入位点 *EcoR* I 在其编码的 C 端。当插入的 cDNA 的阅读框架与 *lacZ* 相一致时，就形成一个融合蛋白产物，可用免疫学方法检测。 λ 噬菌体侵染细胞的过程示意图见图 1-4。

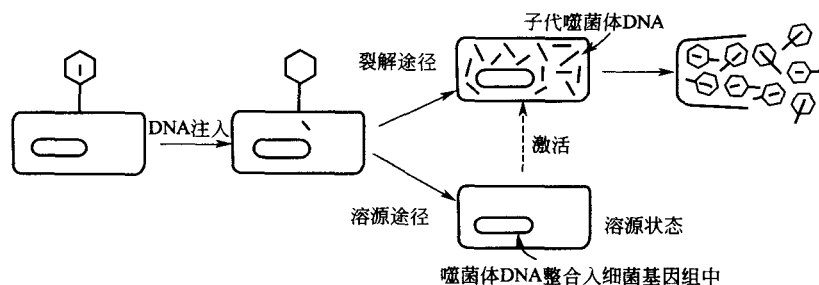


图 1-4 λ 噬菌体侵染细胞的过程示意

三、单链丝状噬菌体

M13 噬菌体是最常用的单链丝状噬菌体载体，M13 噬菌体颗粒的外形呈丝状，具有长约 6400bp 的闭合环状单链 (+) DNA，它只感染带有 F 性纤毛的大肠杆菌，所以是雄性大肠杆菌特有的噬菌体。

侵染过程：它先吸附到性纤毛上，其主要外壳蛋白脱落，M13 (+) 链 DNA 进入大肠杆菌寄主细胞；在细胞内酶的作用下，以 (+) 链 DNA 为模板，合成互补的 (-) 链 DNA，从而形成双链复制型 DNA (RF DNA)；(-) 链转录成 M13 的 mRNA。M13 基因 II 编码的蛋白质作用于 RF DNA 正链的特定位点，切割形成切口，以环形的 M13 (-) 链为模板，合成 M13 (+) 链 DNA，当 DNA 复制叉环绕负链模板整整一周时，在基因 II 产物的作用下，新合成的 (+) 链 DNA 被切去，并环化形成 M13 基因组。

M13 是一种非溶菌的噬菌体，在实验中所观察到的混浊型的“噬菌斑”，是由于感染的

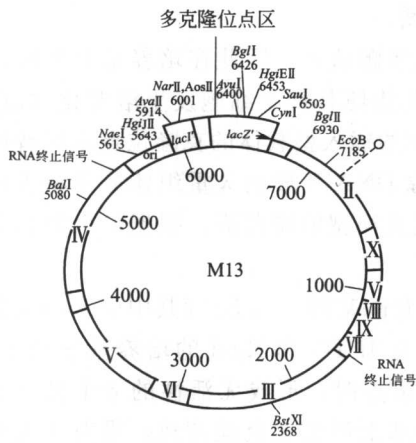


图 1-5 M13mp10 和 M13mp11

细菌在生长速度上比未感染的细菌明显下降所造成的。RF DNA 复制大量单链 (+)DNA，此单链 (+)DNA 在从其感染的寄主细胞膜上溢出的过程中被外壳蛋白包裹成病毒颗粒。由于 M13 能以双链 DNA 形式存在于细胞中，并以单链 DNA 形式分泌到大肠杆菌以外，所以被发展成为一种载体，在 Sanger 设计的双脱氧 DNA 序列分析中有特殊的用途。

M13mp10 和 M13mp11 是一对常用的 M13 载体 (图 1-5)，它们都带有一段限制性位点相同而取向相反的多克隆位点序列。图 1-5 中的罗马数字代表 M13 噬菌体的基因。在这些载体中，含有大肠杆菌一段包括糖操纵子在内的 β -半乳糖苷酶基因 *lacZ* 序列，并在此序列中导入多克隆位点。此多克隆位点含有多个单一的限制性内切酶位点，当有外源 DNA 片段插入时，可利用蓝白噬菌斑的颜色反应来初步筛选重组的 DNA 分子。

M13mp 载体存在着插入片段不稳定问题，当克隆片段超过 1kb 时，在 M13 噬菌体的增殖过程中会发生缺失。

四、噬菌粒

由于 M13 系列载体存在着外源插入片段不稳定以及特定的外源 DNA 片段总是按一种主要的取向插入等不足，又发展出了一类由质粒载体和单链噬菌体相结合而成的载体系列，称为噬菌粒。

pUC118 和 pUC119 (图 1-6) 是分别由 pUC18 和 pUC19 质粒与 M13 噬菌体重组而成的噬菌粒载体，即将含有 M13 噬菌体的复制起点的 476bp 长的片段插入到 pUC18 和 pUC19 质粒的 *Nde*I 位点上，长约为 3.2kb，具有质粒和丝状噬菌体的双重特性。

pUC118 和 pUC119 的区别只是多克隆位点方向相反。它们都含有 *Amp^r* 基因作为选择记号，便于重组子的选择；具有 *lacZ* 基因，并在其上引入多克隆位点，所以当有外源 DNA 片段插入时，可按照 Xgal-IPTG 化学显色反应来筛选重组子；含有一个质粒的复制起点，在没有辅助噬菌体的情况下，克隆的外源基因像质粒一样，复制形成大量的双链 DNA 分子；另外还含有一个 M13 噬菌体的复制起点，所以在有辅助噬菌体感染的寄主细胞中，可以合成质粒 DNA 的其中一条链，并包装成噬菌体颗粒分泌到培养基中。

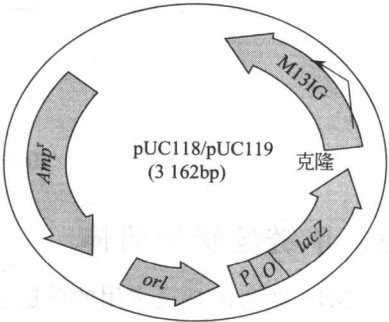


图 1-6 pUC118 和 pUC119

五、腺病毒载体

(一) 腺病毒的一般特性

腺病毒 (adenovirus) 形态是特征性的二十面体病毒壳体，病毒壳体含有三种主要的蛋白：六邻体 (II)、五邻体基底 (III) 和纤突 (IV) (图 1-7)，还有多种其他的辅助蛋白 VI、

Ⅷ、Ⅸ、Ⅲa 和Ⅳa2。腺病毒基因组是一个线性的双链 DNA，基因组内有 14 个基因。腺病毒含有一种病毒自身编码的蛋白酶，这种蛋白酶对于加工某些结构蛋白从而产生成熟的具有感染性的病毒是必需的。

腺病毒家族 (adenoviridae) 的成员可感染多种有丝分裂后的细胞，甚至包括来自高度分化的组织中的细胞，例如骨骼肌细胞、肺细胞、脑细胞和心脏细胞。因为腺病毒可将自身的基因组递送到细胞核中，并且高效率地复制，所以腺病毒成为表达和传递治疗基因的主要候选者。

综上所述，腺病毒载体的主要特点是：①宿主范围较广，不仅可感染能进行分裂的细胞，也能感染不再分裂的细胞，如神经细胞；②腺病毒载体不整合进宿主细胞基因组，而是以附加体形式游离在宿主细胞基因组外，这样就避免了病毒载体插入宿主细胞基因组可能引起基因突变等后果，因而使用时更安全。但是，这同时也造成一些麻烦，由于腺病毒载体未整合进宿主细胞基因组，因而在细胞分裂过程中，不能均等地分配给子细胞，会使得有些细胞丢失腺病毒载体。

按生活周期不同，大体上可将重组腺病毒载体分为复制缺陷型 (replication-defective) 和增殖型 (replication-competent) 两大类。

(二) 腺病毒载体的应用

腺病毒载体可高效地传递和表达基因的能力 (尤其是在体外)，然而，体内的免疫反应限制了腺病毒载体的实际应用和发展。

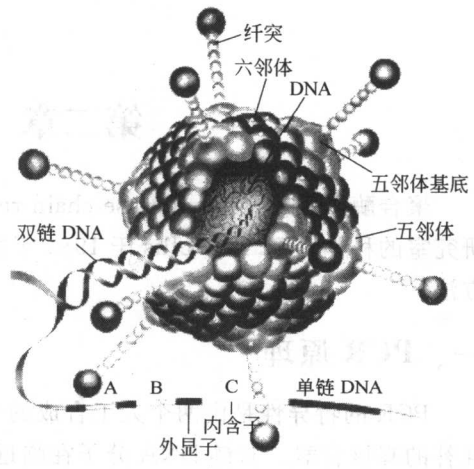


图 1-7 腺病毒结构示意图

第二章 PCR 基因扩增

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction), 即 PCR 技术, 是美国 Cetus 公司人类遗传研究室的科学家 K. B. Mullis 于 1983 年发明的一种在体外快速扩增特定基因或 DNA 序列的方法。

一、PCR 原理

PCR 的特异性是由两个人工合成的引物序列决定的。引物就是与待扩增 DNA 片段两侧互补的寡核苷酸。双链 DNA 分子在临近沸点的温度下加热时便会分离成两条单链 DNA 分子 (变性), 两引物分别与两条 DNA 的两侧序列特异复性, 在适宜条件下, DNA 聚合酶以单链 DNA 为模板, 利用反应混合物中的 4 种脱氧核苷三磷酸 (dNTP), 在引物的引导下, 按 5'→3' 方向复制互补 DNA, 即引物的延伸。这种热变性→复性→延伸的过程就是一个 PCR 循环。如图 2-1 所示。

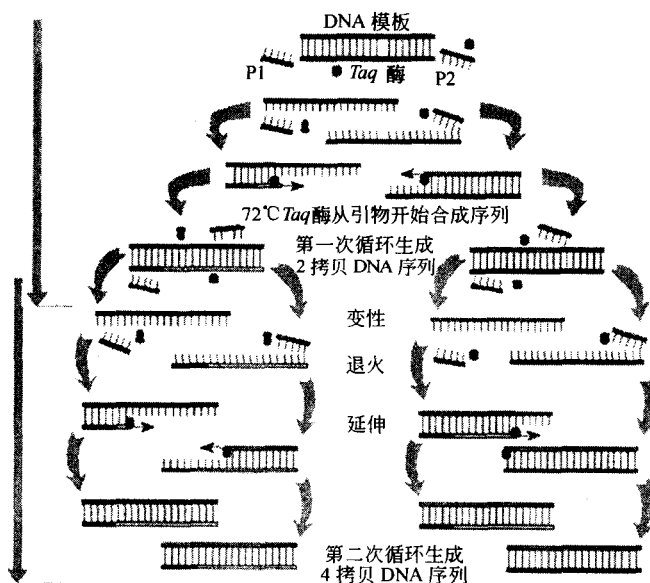


图 2-1 PCR 原理

在合适条件下, 这种循环不断重复, 前一个循环的产物 DNA 可作为后一循环的模板 DNA 参与 DNA 的合成, 使产物 DNA 的量按 2^n 方式扩增。理论上讲经过 30 次的循环反应, DNA 扩增倍数为 $10^6 \sim 10^9$ 。因此能用微量样品获取目的基因。PCR 已成为分子生物学及基因工程中非常有用的研究手段。另外在医疗诊断上也具有特殊的应用价值。

典型的 PCR 操作: 在微量离心管中加入适量缓冲液, 加微量模板 DNA, 4 种脱氧核苷三磷酸 (dNTP), 两个合成 DNA 引物, 耐热 Taq DNA 聚合酶, 并有 Mg^{2+} 存在。

向一支微量离心管中依次加入:

ddH ₂ O (双蒸水)	补至终体积 (终体积 50~100 μ L)
10 $\times$ PCR 缓冲液	1/10 体积
4 种 dNTP	各 200 μ mol/L
一对引物	各 1 μ mol/L
DNA 模板	10 ² ~10 ⁵ 拷贝
Taq DNA 聚合酶	1~5U

混匀后, 离心 15s 使反应成分集中在管底。将此微量离心管放入已设置好程序的 PCR 自动热循环仪, 也可以设定 3 个恒温水浴锅进行手工操作。

加热使模板 DNA 在高温下 (94 $^{\circ}$ C) 变性, 双链解开, 这就是变性阶段; 降低溶液温度, 使合成引物在低温 (50~60 $^{\circ}$ C) 与模板 DNA 杂交形成部分双链, 这是退火阶段; 溶液反应温度升至中温 72 $^{\circ}$ C, Taq DNA 聚合酶以 4 种 dNTP 为原料, 引物为复制起点, 按 5'→3'方向, 复制模板的互补链, 这是延伸阶段。按此循环 (变性→复性→延伸), 一般重复 25~30 次。

温度循环参数: 在 90~95 $^{\circ}$ C 条件下, 双链 DNA 分子会变性解离为单链。变性 DNA 所需的时间决定于 DNA 的复杂性。一般情况下, 选 94 $^{\circ}$ C 30s 对模板 DNA 进行变性, 过高的温度及过长的时间会降低 Taq DNA 聚合酶的活性。退火的温度取决于引物的长度、碱基组成和浓度。引物的退火温度通过经验公式 $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ 计算得到, 一般 50~60 $^{\circ}$ C 30s。延伸温度选在 70~75 $^{\circ}$ C 之间, 因为此时 Taq DNA 聚合酶活性最高。延伸反应的时间根据扩增片段的长度而定, 一般 1kb 以内延伸 1min, 更长的片段需相应延长时间。PCR 的循环次数取决于模板 DNA 的浓度, 一般控制在 20~30 次。循环次数越多, 非特异性产物也越多。

PCR 扩增要具有特异性、有效性和忠实性三大特性。其高度特异性体现在: PCR 只产生一个扩增产物, 即希望得到的目的序列, 电泳时只有一条带; 其高有效性体现在: 经过较少的循环可得到更多的扩增产物; 其忠实性体现在: 由 DNA 聚合酶诱导的错配非常低, 不会对结果产生影响。要达到这些目的, 必须清楚 PCR 的每一个成分是如何影响 PCR 反应的。

二、PCR 反应体系的基本构成

(一) 耐热 DNA 聚合酶

早期 PCR 扩增是由大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段完成的, 但这种酶不耐热, 所以每一轮循环在变性和退火后必须加入新酶。后来引入耐热的 DNA 聚合酶。耐热 DNA 聚合酶包括: Taq DNA 聚合酶, Tth DNA 聚合酶, VENT DNA 聚合酶, Sac DNA 聚合酶。其中以 Taq DNA 聚合酶应用最广泛。Taq DNA 聚合酶最高可在 97.5 $^{\circ}$ C 的高温下保持其活力 5~6min。通常所用的条件为 95 $^{\circ}$ C, 其活力可保持 35min, 故 PCR 过程中变性温度不宜高过 95 $^{\circ}$ C。Taq DNA 聚合酶最适的活性温度是 72 $^{\circ}$ C, 连续保温 30min 仍具有相当的活性, 而且在比较宽的温度范围内保持着催化 DNA 合成的能力。因此只需一次加酶即可满足 PCR 全过程的需要, 避免了以前繁琐的操作, 使 PCR 走向自动化。

纯化的 Taq DNA 聚合酶有 5'→3'外切酶活性, 而无 3'→5'外切酶活性, 它不具有 Klenow 酶的 3'→5'校对活性。因此在 PCR 中有错误掺入率, 这种错误掺入的概率大约是每 2×10^4 个核苷酸中有一个。这对于大批量的 PCR 产物分析而言, 不会造成什么严重的后果。因为具同样错误掺入核苷酸的 DNA 分子, 仅占全部合成的 DNA 分子群体的极小部分。如果 PCR 扩增的 DNA 是用于分子克隆, 这一问题就必须得到足够的重视。

Taq DNA 聚合酶具有类似脱氧核糖核酸末端转移酶的功能, 可在新合成双链产物的 3' 端加上 poly(dA)。这是一个非模板依赖的碱基。利用这种特性可以构建 dT-载体, 来克隆带 dA 尾的产物。

在 100 μ L 反应体系中, 一般所需 *Taq* DNA 聚合酶的用量为 0.5~5U。使用 *Taq* DNA 聚合酶浓度过高, 可引起非特异性产物的扩增; 浓度过低, 则扩增产物量减少。*Taq* DNA 聚合酶性质稳定, 可在 -20 $^{\circ}$ C 贮存至少 6 个月。

为了降低 PCR 过程中的错误率, 使 PCR 更精确, 人们设计使用了适用于 PCR 条件下的具有较高保真性的 DNA 聚合酶, 如 *Pfu* DNA 聚合酶、Ex-*Taq* DNA 聚合酶等。它们有的能够在较高的反应温度下仍然保证极低的碱基掺入错误率, 有的则适用于对长片段 DNA 的合成。这些酶可以根据具体的反应条件和不同的实验要求进行选用。

下面仅举一例: *Tth* DNA 聚合酶。

Tth DNA 聚合酶是一种热稳定性酶, 分子质量为 92kDa, 从 *Thermus thermophilus* HB-8 中分离。该酶在 74 $^{\circ}$ C 时可进行 DNA 复制, 在 95 $^{\circ}$ C 的半衰期为 20min。*Tth* DNA 聚合酶在镁离子存在的条件下可催化核苷酸沿 5'→3' 方向发生聚合反应, 形成双链 DNA; 也可在镁离子存在的条件下, 以 RNA 为模板沿 5'→3' 方向发生核苷酸聚合反应; 也具有 5'→3' 外切酶活力。*Tth* DNA 聚合酶可用于 PCR、RT-PCR、逆转录和较高温度条件下的引物延伸反应。

其特性是: ①RT-PCR 的特异性增加, 在较高的温度下进行逆转录, 增加了引物杂交和延伸的特异性; ②二级结构减少, 在较高的温度下进行逆转录, 减少了由于 RNA 二级结构引起的问题。

(二) PCR 反应的缓冲液

各公司生产的 DNA 聚合酶配备有各自的 PCR 缓冲液, 其成分略有不同, 但基本成分大致相同。PCR 的缓冲液一般制成 10 $\times$, 但用时要稀释到 1 $\times$ 。

10 $\times$ PCR 缓冲液:

KCl	500mmol/L
Tris-HCl (pH8.3, 室温)	100mmol/L
MgCl ₂	15mmol/L
明胶	0.1%

PCR 缓冲液是一个影响 PCR 产率的重要因素。10 $\times$ 缓冲液中用的 100mmol/L Tris-HCl 是一种双极性离子缓冲液, 其主要作用是调节缓冲液的 pH, 使 *Taq* DNA 聚合酶的作用环境维持在偏碱性。10 $\times$ 缓冲液中 500mmol/L KCl 有利于引物的退火, 但浓度过高会抑制 *Taq* DNA 聚合酶的活性。溶液中明胶的作用是保护酶不变性失活。Mg²⁺ 非常重要, 能影响 *Taq* DNA 聚合酶的活性, 直接影响反应的特异性和扩增 DNA 的产率。dNTP 的磷酸根以及引物、模板中带来的 EDTA 等螯合剂都要结合 Mg²⁺。*Taq* DNA 聚合酶需要的是游离的 Mg²⁺, 因此要综合考虑各种因素, 将 Mg²⁺ 浓度调至最佳。在正式实验前, 可设置在一定浓度的模板、引物、4 种 dNTP 和循环参数下, PCR 的反应缓冲液中不加 Mg²⁺, Mg²⁺ 是从贮存液中单一加入, 并按 0.5mmol/L 的浓度梯度逐级递增进行 (0.5mmol/L、1.0mmol/L、1.5mmol/L、2.0mmol/L、2.5mmol/L、...、5.0mmol/L), 在确定大概浓度后, 以 0.2mmol/L 的浓度梯度递增或递减来精确确定 Mg²⁺ 的最佳浓度。

(三) 引物

PCR 成功扩增的一个关键条件在于寡核苷酸引物的正确设计。引物设计一般遵循以下原则，最好在引物设计时有计算机软件辅助分析。

1. 引物长度

寡核苷酸引物长度为 15~30 个碱基，一般为 20~27 个碱基。包括上游引物和下游引物，共两条。引物的有效长度： $L_n = 2(G+C) + (A+T)$ ， L_n 值不能大于 38，因为大于 38 时，最适延伸温度会超过 *Taq* DNA 聚合酶的最适温度 (74℃)，不能保证产物的特异性。

2. (G+C) 含量

(G+C) 含量一般为 40%~60%。一对引物的 (G+C) 含量和引物 T_m 值应该协调。 T_m 值是寡核苷酸的解链温度，即在一定盐浓度条件下，50%寡核苷酸双链解开的温度。有效启动温度一般高于 T_m 值 5~10℃。按公式 $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ 估计引物的 T_m 值。有效引物的 T_m 值为 55~62℃，其 T_m 值最好接近 72℃以使复性条件最佳。

3. 碱基的随机分布

引物中 4 种碱基的分布最好是随机的，不会多个嘌呤或多个嘧啶连续出现。引物自身不应存在互补序列，否则引物自身会折叠成发夹结构，这种二级结构会影响引物与模板的退火结合。两引物之间也不应有互补性，尤其是避免 3' 端的互补而形成引物二聚体，同时 3' 端不应超过 3 个连续的 G 或 C，因这样会使引物在 (G+C) 富集序列区错误引发。引物二聚体也是 PCR 的底物，与靶序列竞争 DNA 聚合酶、dNTP，从而使靶序列的扩增量下降。

4. 引物的端部

引物的 3' 端：引物的延伸是从 3' 端开始的，故 3' 端不能进行任何修饰，也不能有形成任何二级结构的可能。且引物的 3' 端决定引物的特异性，3' 端与模板 DNA 一定要配对。除在特殊的 PCR (AS-PCR) 中，引物 3' 端不能发生错配。

引物的 5' 端：引物的 5' 端限定着 PCR 产物的长度，它对扩增特异性影响不大。因此，只要与模板 DNA 结合的引物长度足够长，5' 端碱基可以不与模板 DNA 配对而呈游离状态，即可以被修饰而不影响扩增的特异性。引物 5' 端修饰包括：加酶切位点；标记生物素、荧光、地高辛、 Eu^{3+} 等；引入蛋白质结合 DNA 序列；引入突变位点、插入与缺失突变序列和引入启动子序列等。加酶切位点时要注意方向，且应在其 5' 端加上 2~4 个保护碱基。

(四) dNTP

dNTP 常用的浓度为 20~200 $\mu\text{mol/L}$ ，而且 4 种 dNTP 的终浓度相等。dNTP 浓度过高虽可加快反应速度，但会增加碱基的错误掺入率，适当的低浓度会提高反应的精确度。另外，dNTP 是磷酸根的来源，会与 Mg^{2+} 结合，也应注意协调 Mg^{2+} 浓度和 dNTP 浓度之间的关系。

(五) 模板 DNA

模板可以是基因组 DNA、质粒 DNA、噬菌体 DNA、扩增后的 DNA、cDNA 等，RNA 的扩增需要首先反转录成 cDNA 后才能进行正常 PCR 循环。含有靶序列的 DNA 可以单链或双链形式加入 PCR 混合液中。通常情况下，小片段模板 DNA 的 PCR 效率要高于大分子（未消化的真核基因组）DNA，因此，在 PCR 前用机械剪切或用稀有限制酶消化基因组 DNA，以提高产量。

PCR 中模板加入量一般为 $10^2 \sim 10^5$ 拷贝的靶序列。

三、特殊条件下的 PCR 及应用

除了这种典型的 PCR 外,人们还根据各种用途设计了各种不同的特殊 PCR。①反转录 PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR),即在 mRNA 反转录之后可作为 PCR 的模板进行的 PCR 扩增,常用于基因表达研究(定量 PCR)和逆病毒检测。②反向 PCR (reverse PCR),常规 PCR 允许扩增两引物之间的 DNA 区段,而反向 PCR 则可以对靶 DNA 区段之外的两侧未知的 DNA 序列进行扩增。③非对称 PCR (asymmetric PCR),常规 PCR 使用的引物浓度相同,而非对称 PCR 使用引物浓度不同,在 PCR 反应体系中,限制引物之一的浓度 [(50~100):1] 进行扩增。在最初 20 个循环中,主要产物是双链 DNA。当低浓度引物被耗尽后,高浓度引物引导的 PCR 就会产生大量单链 DNA,单链 DNA 可用于制备单链测序模板或单链 DNA 杂交探针。④多重 PCR (multiple PCR),在同一 PCR 反应体系中用多对引物(覆盖不同长度的靶序列)同时扩增。例如,用多重 PCR 进行 DNA 缺失筛选。⑤套式 PCR (nested PCR),用第一次 PCR 扩增区域内部的第二对(套式)引物对第一次 PCR 产物再次扩增,可以增加特异性和灵敏度。

(一) 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)

1. RT-PCR 的原理

RT-PCR 是将 RNA 的反转录 (RT) 和 cDNA 的聚合酶链反应 (PCR) 相结合的技术。首先提取组织或细胞中的总 RNA,以其中的 mRNA 作为模板,采用 oligo (dT)、随机引物或特异引物利用逆转录酶反转录成 cDNA;再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,而获得目的基因或检测基因表达。RT-PCR 使 RNA 检测的灵敏性提高了几个数量级,使一些极为微量 RNA 样品分析成为可能。它用途广泛,可用于检测细胞中基因表达水平、细胞中 RNA 病毒的含量和直接克隆特定基因的 cDNA 序列。RT-PCR 实验有三部:抽提 RNA、RT、PCR。在所有 RNA 实验中,最关键的因素是分离得到全长的 RNA。而实验失败的主要原因是核糖核酸酶 (RNA 酶) 的污染。RNA 酶广泛存在而且性质稳定,一般反应不需要辅助因子。因而在 RNA 制剂中,只要存在少量的 RNA 酶就会引起 RNA 在制备与分析过程中的降解,而所制备的 RNA 的纯度和完整性又可直接影响 RNA 分析的结果,所以 RNA 的制备与分析操作难度极大。在实验中,一方面,要严格控制外源性 RNA 酶的污染;另一方面,要最大限度地抑制内源性 RNA 酶。可采用的逆转录酶主要有以下几种:①莫洛尼鼠白血病毒 (MMLV) 逆转录酶,聚合酶活性强, RNA 酶 H 活性相对较弱,最适作用温度为 37°C ;②禽成髓细胞瘤病毒 (AMV) 逆转录酶,聚合酶活性强, RNA 酶 H 活性较强,最适作用温度为 42°C ;③ *Thermus thermophilus*、*Thermus flavus* 等嗜热微生物的热稳定性逆转录酶,在 Mn^{2+} 存在下,允许高温反转录 RNA,以消除 RNA 模板的二级结构;④ MMLV 逆转录酶的 RNase H⁻ 突变体,此酶与其他酶相比的优势在于,能将更大部分的 RNA 转换成 cDNA,这一特性使其允许从含二级结构的、低温反转录很困难的 mRNA 模板合成较长 cDNA。RT-PCR 技术主要用于:分析基因的转录产物、获取目的基因、合成 cDNA 探针、构建 RNA 高效转录系统。

2. 合成 cDNA 引物介导的 RT-PCR (如图 2-2)

(1) 随机六聚体引物介导 适用于长的或具有发夹结构的 RNA;适用于 rRNA、mRNA、