

李任强 主编

暨南大学生物工程学系教学指导委员会 编写

生物技术实验精选

BIOTECHNIQUE EXPERIMENT
CAREFULLY SELECTED



暨南大学出版社
Jinan University Press

暨南大学生物工程学系教学指导委员会 编写

生物技术实验精选

BIOTECHNIQUE EXPERIMENT
CAREFULLY SELECTED

李任强 主编



暨南大学出版社

中国·广州

图书在版编目 (CIP) 数据

生物技术实验精选/暨南大学生物工程学系教学指导委员会编写. —广州: 暨南大学出版社, 2006. 12

ISBN 7-81079-795-6

I. 生… II. 暨… III. 生物技术—实验 IV. Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 143970 号

出版发行: 暨南大学出版社

地 址: 中国广州暨南大学

电 话: 总编室 (8620) 85221601

营销部 (8620) 85227972 85220602 (邮购)

传 真: (8620) 85221583 (办公室) 85223774 (营销部)

邮 编: 510630

网 址: <http://www.jnupress.com> <http://press.jnu.edu.cn>

排 版: 暨南大学出版社照排中心

印 刷: 暨南大学印刷厂

开 本: 787mm × 1092mm 1/16

印 张: 15.625

字 数: 359 千

版 次: 2006 年 12 月第 1 版

印 次: 2006 年 12 月第 1 次

印 数: 1—3100 册

定 价: 25.00 元

(暨大版图书如有印装质量问题, 请与出版社总编室联系调换)

前 言

千里之行，始于足下。实验技术是生命科学的基础，随着生命科学的发展，实验技术日显重要。对于研究生命科学的生物技术、生物工程和生物科学等专业，实验教学成了不可缺少的主要内容。而且由于科技的迅猛发展、高新精仪器的发明以及计算机的运用等使生物科学的研究和实验方法越来越先进，实验内容更多的是设计性或综合性的实验。为了紧跟学科的发展，提高生命科学类专业的教学质量，我们组织了生物工程学系长期工作在教学与科研第一线、具有丰富专业知识又不断取得创新性成果的教师一起商讨和撰写，并根据本系实验教学的特点，编成了这本适用于生命科学类专业实验课教学的指导书。

本书是在结合基础实验和专业实验，并融合生命科学研究中常用的实验方法的基础上编写而成的。书中许多内容是编写教师长期进行教学与科研工作的经验总结，所有实验都经过实践验证。本书的宗旨是给学生提供一本反映当代生命科学技术实验方法的指导书，以生物技术主干课程基因工程、细胞工程、微生物工程、酶工程等为主要内容，并融合了各门生物学类课程的内容，其最大的特点就是突出了设计性和综合性实验，以及反映了先进的生物技术实验方法。本书是生物工程学系生物技术和生物科学专业本科生的指定教材，还可作为本科生毕业论文设计与实验、相关专业的本科生或研究生以及从事生命科学研究的教师和科研人员有用的参考书。

生物工程学系实验教学中心是开放性的实验教学单位，承担着生物科学中各个专业的实验教学及毕业论文设计与实验等教学任务。我们希望有更多具有先进性和实用性的教材出现，以推动生物科学实验教学的发展。本书的编写是一个很好的尝试。本教材的完成是生物工程学系许多教师辛勤劳动的结晶。此外，在编写和出版本书的过程中，得到了生命科学技术学院、暨南大学出版社以及我校相关单位的支持和帮助，在此表示感谢。

暨南大学生物工程学系主任、教授

李贵生

2006 年 8 月

目 录

前言	(1)
分子生物学·基因工程部分	(1)
实验一 DNA 的重组、克隆与鉴定	(1)
实验二 功能基因实验技术	(28)
实验三 海洋微藻特异基因的转录和表达分析	(62)
细胞工程部分	(69)
实验四 动物细胞培养	(69)
实验五 植物组织培养	(74)
实验六 植物多倍体诱发和鉴定	(81)
实验七 转基因斑马鱼实验	(85)
实验八 植物转基因技术	(99)
微生物工程部分	(119)
实验九 正交试验法在微生物培养条件优化选择中的应用	(119)
实验十 细菌 mRNA 的提取及其逆转录	(124)
实验十一 微生物生长动力学——细菌生长动力的测定	(131)
实验十二 食品、药品和水等的微生物检验技术	(134)
实验十三 一些产酶菌的培养特征与鉴别	(141)
实验十四 啤酒发酵的工艺	(143)
实验十五 固定化生长酵母发酵生产酒精	(146)
生物化学技术·酶工程部分	(150)
实验十六 蛋白质双向凝胶电泳	(150)
实验十七 人基因组 DNA 提取	(163)
实验十八 植物基因组 DNA 提取	(167)
实验十九 抗血清的制备与效价测定	(169)
实验二十 酶联免疫吸附技术	(173)

实验二十一	α -地中海贫血症的快速基因诊断	(176)
实验二十二	从植物材料中提取制备过氧化物酶	(178)
实验二十三	海洋微藻的实验室培养与活性成分的分离	(180)
实验二十四	天然甲壳素的提取和分离	(184)
实验二十五	贝类水产品中 PSP、DSP 毒素的提取与检测	(186)
实验二十六	模拟过氧化物酶的制备、固定与应用	(192)
实验二十七	以枯草杆菌生产蛋白酶	(194)
实验二十八	包埋法、交联法对细胞和酶的固定化操作及其比较	(195)
遗传·发育·生理学部分		(198)
实验二十九	果蝇饲养及遗传学研究技术	(198)
实验三十	人类染色体基本实验技术	(209)
实验三十一	发育生物学实验	(219)
实验三十二	家兔动脉血压与呼吸运动的调节	(240)

分子生物学·基因工程部分

【实验一】

DNA 的重组、克隆与鉴定

前言

——重组质粒的构建设计

基因工程又称遗传工程、DNA 重组技术、分子克隆等。它是 20 世纪 70 年代在分子生物学发展的基础上形成的新学科。所谓基因工程，就是在分子水平上，用人工方法提取（或合成）某一生物的遗传物质，在体外切割、拼接和重新组合，然后通过载体把重组的 DNA 分子引入受体细胞，使外源 DNA 在受体细胞中进行复制和表达，按人们的意愿定向创造生物新性状，并使之稳定地遗传给下一代。基因工程具有广阔的应用前景，它既能为工农业生产和医药保健等开拓新途径，又能为生物的细胞分化、生长发育、肿瘤发生等基础研究提供有效的实验手段。

近十余年来，基因工程的发展和应用迅速地推动了生物科学的发展。目前，基因工程技术已成为生物学领域许多实验室的常用技术，它的先进性和普及性使人们感到有必要在大学的教学课程中得到反映。所以，我系已为十几届本科生、研究生开设了基因工程技术实验，选择一些最基本、最常用的技术，以使学生对基因工程有一个基本的了解，并能掌握一些基本技术。

但是基因工程的实验技术和实验系统正在不断地创新，新方法、新技术不断推出，而且在有限的学时内，所能触及的技术只是基因工程中极少的一部分，从教学角度来看，不可能面面俱到。我们只希望通过本实验，让学生通过基因工程中最基本的技术训练，为今后独立工作打下基础。

本实验设计主要参考了 T. Maniatis 的 *Molecular cloning*（第三版）、彭秀玲等编著的《基因工程实验技术》等。实验中所选择的方法和条件以适合于本实验室设备为首选，具体参考应用时，可作适当更改。见图 1-1。

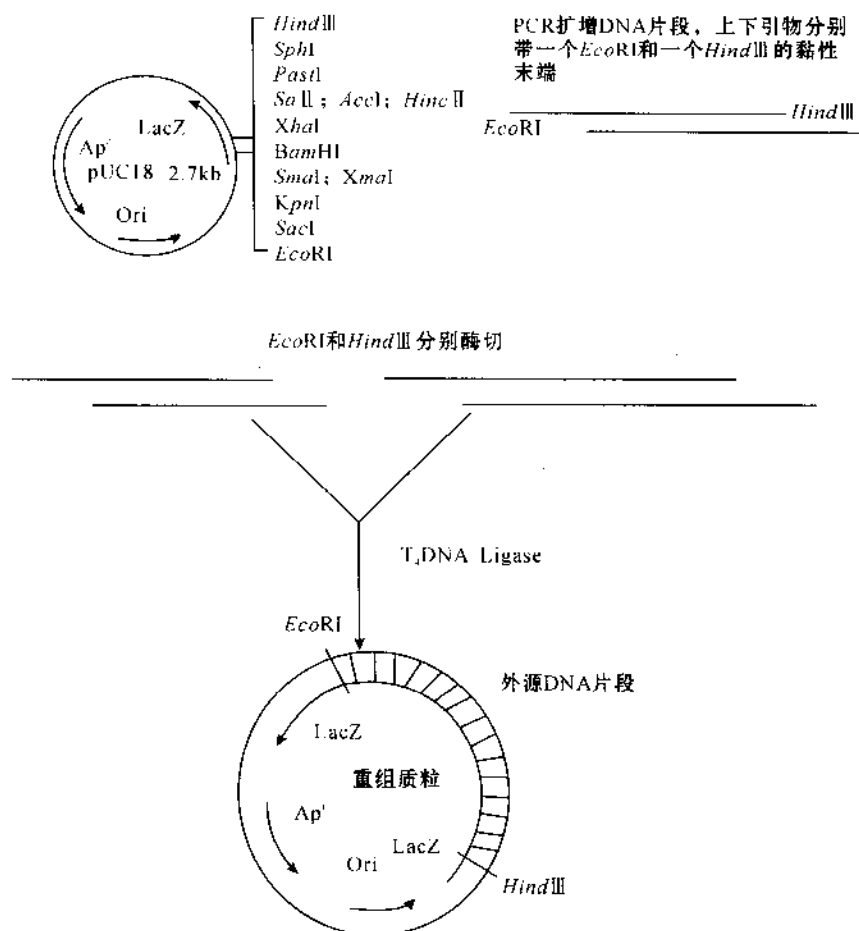


图 1-1 重组质粒构建图

本套实验设计过程如下：

- 染色体 DNA 的抽提
- PCR 扩增分离目的 DNA 片段
- 载体质粒的抽提、纯化及检测
- 载体及目的 DNA 片段的限制性核酸内切酶的酶切与连接
- 重组质粒转化为大肠杆菌
- 重组子的筛选、重组质粒的抽提与鉴定

一、DNA 的纯度和分子量的测定

(一) 目的

熟练掌握琼脂糖凝胶电泳法。

利用琼脂糖凝胶电泳测 DNA 分子量和质粒 DNA 分子纯度，并熟悉各种核酸分子在琼脂糖凝胶电泳中的位置分布和某些特性。

(二) 原理

琼脂糖是一种直链多糖。它是由 B-D 吡喃半乳糖和 3, 6-脱水半乳糖以 1, 3- β 糖苷键相连的双糖聚合物, 链状琼脂糖分子之间相互以氢键交联, 形成网络系统。琼脂糖具有亲水性, 不含有带电荷的基因, 也不会引起核酸分子的变性, 而且不吸附被分离的物质, 因此成为基因工程上首选的凝胶剂。

当核酸分子在琼脂糖凝胶电场中时, 分子上带电基团在 pH 8.0 条件下带负电荷, 在电场作用下移向正极, 致使核酸分子在琼脂糖凝胶电泳中有其迁移率。迁移率与下列因素有关:

1. 迁移率与核酸分子的大小有关。在相同的条件下, 不同大小的核酸分子的迁移率不同, 小分子的迁移率大, 大分子的迁移率小。其中线状双链 DNA 分子在一定浓度琼脂糖上电泳的速度与线状双链 DNA 分子的分子量对数成反比 (见图 1-2), 所以根据迁移率大小可测定 DNA 分子的大小。不过实际应用时, 通常将待测定的 DNA 和已知分子量大小的标准 DNA 片段进行电泳对照, 观察其迁移距离, 就可知该样品的分子量大小。

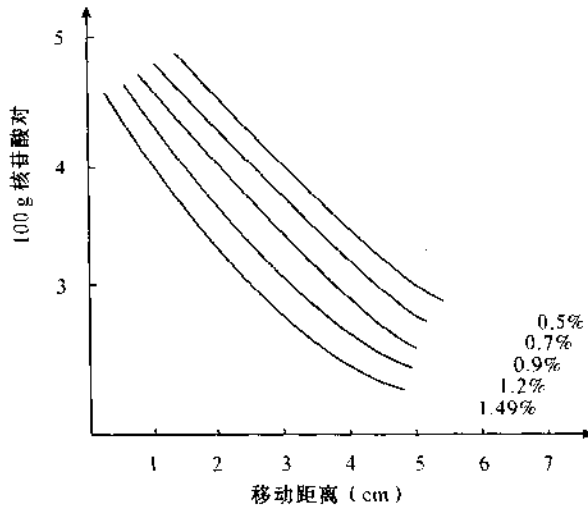


图 1-2 凝胶电泳中 DNA 移动距离和分子量的关系
(缓冲液 $0.5 \times$ TBE, $0.5 \mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭, 电泳条件 1 V/cm , 16 h)

2. 迁移率与核酸构象有关。琼脂糖凝胶电泳可以鉴别分子量相同但构型不同的 DNA 分子。以常规方法抽提的质粒 DNA 通常具有三种不同的构象: 超螺旋形 (SC)、线形 (L) 和开环形 (OC)。这三种构型分子有不同的迁移率。在一般情况下, 超螺旋形 (SC) 迁移速度最快, 其次为线形 (L) 分子, 最慢的为开环形 (OC) 分子。若提取到的质粒 DNA 样品中, 含有染色体 DNA 或 RNA, 在琼脂糖凝胶电泳上也可以分别观察到电泳区带, 由此可分析样品的纯度 (见图 1-3)。

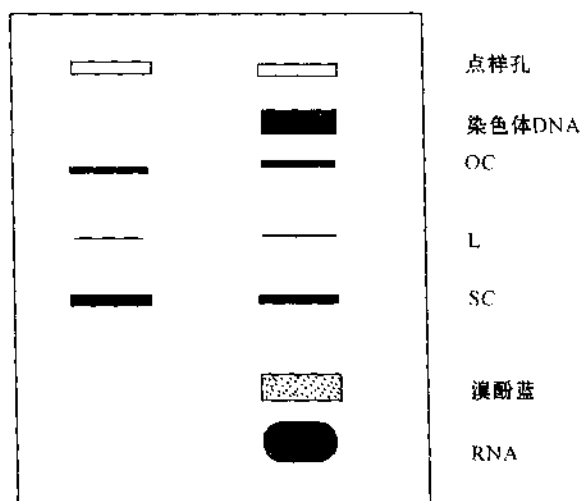


图 1-3 提纯和未提纯质粒 DNA 电泳图

3. 迁移率与电泳条件有关。低电压时，线状 DNA 片段的迁移速度与电压成正比；当电压高时，大分子量的 DNA 片段的迁移速度就不再与电压成正比，所以电压一般不超过 5 V/cm。电泳液采用缓冲液，以保证较稳定的 pH 值。pH 值的剧烈变化会影响 DNA 分子所带的电荷，因而影响正常的电泳速度。电泳温度一般不影响电泳，但若因电压过高，引起发热将会导致胶熔解，所以可采用冷却循环系统。

4. 迁移率与琼脂糖浓度有关。浓度越大，迁移率越低，当样品的分子量较大时，宜用较稀的琼脂糖浓度；当分子量小时，浓度可选用大些，通常可选用浓度为 0.7% 的凝胶。在此浓度下分离 DNA 分子的范围为 0.8 ~ 10 kb。

当核酸样品在琼脂糖凝胶中电泳时，加入在紫外线照射下能发射荧光的溴化乙锭 (EB)，EB 就插入 DNA 分子中，形成荧光络合物，使其发射荧光增强几十倍，这样即使是极其微量的 DNA 也可观察到。例如用肉眼观察，可检测到 0.05 ~ 0.1 μg 的 DNA。

(三) 材料

1. DNA 样品。

样品 A: λ DNA (限制性核酸内切酶 *EcoRI*, *HindIII* 酶切后样品)。

样品 B: 染色体 DNA + RNA。

样品 C: 质粒 DNA (三种构型 DNA)。

2. 电泳缓冲液: 0.04 mol/L、pH 8.0 的 Tris - 乙酸, 0.002 mol/L EDTA。

3. 加样缓冲液: 0.25% 溴酚蓝, 40% (w/v) 蔗糖。

4. 溴化乙锭溶液: 0.05 mg/mL (溴化乙锭/水)。

5. 琼脂糖。

6. 仪器与器皿: 水平式微型电泳槽, 电泳仪, 微量取样器, 玻片等。

(四) 实验步骤

1. 用胶纸带把电泳槽两端封好，以免凝胶溶液漏出，将电泳槽置于平面

水平。

2. 选择孔径适宜的点样板（梳板）。将梳板置于距凝胶槽一端 1 cm 并与该端平行的位置。梳板垂直架在槽上，使梳板底部不要触到槽底部，大约相距 1 mm 左右。

3. 称取琼脂糖 0.3 g 置三角瓶中，加入 40 mL 电泳缓冲液，于电炉上加热，至琼脂糖完全溶化，取少量凝胶溶液沿胶带纸边缘封好，防止倒凝胶板时出现渗漏。

4. 在凝胶溶液中加入 0.4 mL 溴化乙锭溶液（EB 最终浓度为 $0.5 \mu\text{g/mL}$ ），摇匀，待凝胶溶液冷却至 55°C （手摸烧瓶不烫手）时轻轻地倒入水平式微型电泳槽内。除掉气泡，或用梳板将气泡排至凝胶边缘。

5. 室温下，凝胶放置 30 min，待其凝固后，拔去梳板，保持电样孔完好。除掉防渗漏的胶带纸。把制备好的装凝胶块的微型电泳槽放入水平大电泳槽，点样孔一端应在大电泳槽电极负极一端。然后在水平大电泳槽内加入电泳缓冲液，使其液面高于凝胶 1 mm 左右。

6. 按以下比例混合好样品（以下为参考值，可视实际样品作调节）。

(1) 2 μL 样品 A, 2 μL 加样缓冲液, 10 μL 电泳缓冲液。

(2) 2 μL 样品 B, 2 μL 加样缓冲液, 10 μL 电泳缓冲液。

(3) 2 μL 样品 C, 2 μL 加样缓冲液, 10 μL 电泳缓冲液。

7. 在玻片上分别把上述样品混合均匀，用微量取液器分别吸取样品，小心将样品注入点样孔内，记录样品的点样顺序。

8. 点样孔一端的电泳槽负极连接电泳仪负极，另一端连接电泳仪正极，打开电泳仪电源开关（每次打开电源开关时，应检查电压旋钮是否置于零位），调电压至 5 V/cm （以水平大电泳槽的两极算距离）。

9. 待溴酚蓝带进入凝胶 6 cm 后，小心取出微型电泳槽，勿使凝胶滑出，置于保鲜纸上，放在紫外检测仪上，打开紫外灯，观察电泳结果，绘制 DNA 区带电泳图。

（五）结果分析

指出各核酸区带和构型以及质粒 DNA 分子量。

（六）问题

1. 低 pH 值的缓冲液会降低核酸迁移率，甚至分子不能移动，为什么？

2. 分离高分子量的 DNA 时，为何不用高浓度的琼脂糖凝胶？

附录：

λ DNA 经核酸限制性内切酶 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切割后，所产生的各片段的分子量如下（单位 kb）。

21.26	5.15	4.97	4.3	3.53	2.03
1.90	1.58	1.38	0.95	0.83	0.56

二、细菌染色体 DNA 的抽提

(一) 目的

熟练掌握抽提细菌 DNA 的一般方法。

(二) 原理

要进行重组 DNA 实验，就离不开外源基因的纯化，而外源基因的主要来源之一就是要直接从生物的染色体 DNA 上制备，所以制备高质量的染色体 DNA 样品经常为基因工程实验所需要。目前抽提细菌染色体 DNA 的方法有许多种，这里只介绍两种：一种适用于枯草杆菌染色体的抽提；另一种则适用于大肠杆菌染色体的制备。

基因工程实验所需要的基因组 DNA 通常要求分子量尽可能大，以此增加外源基因获得率，但要获得大片段的 DNA 并非易事。细菌基因组 DNA 通常是一个很大的环状 DNA，而在抽提过程中，不可避免的机械剪切力必将切断 DNA，如果要抽提到大的 DNA 分子，就要尽可能地温和操作，减少剪切力，减少切断 DNA 分子的可能性。分子热运动也会减少所抽提到的 DNA 分子量，所以提取过程要尽可能在低温下进行。另外，细胞内及抽提器皿中污染的核酸酶也会降解制备过程中的 DNA，所以制备过程要抑制核酸酶的活性。

另外，制备的细菌染色体 DNA 必须是高纯度的，以满足基因工程中各种酶反应的需要，制备的样品必须没有蛋白污染，没有 RNA，各种离子浓度应符合要求，这些在染色体制备时都应考虑到。

大肠杆菌染色体 DNA 的抽提首先收集对数生长期的细胞，然后用离子型表面活性剂十二烷基磺酸钠 (SDS) 破裂细胞。SDS 具有的主要功能是：①溶解细胞膜上的脂类和蛋白质，因而溶解膜蛋白而破坏细胞膜；②解聚细胞膜上的脂类和蛋白质，有助于消除染色体 DNA 上的蛋白质；③与蛋白质结合成为 $R_1-O-SO_3R_2$ -蛋白质的复合物，使蛋白质变性而沉淀下来。因为 SDS 能抑制核糖核酸酶的作用，所以在以后的提取过程中，必须把它除干净，以免影响下一步 RNase 的作用。破裂细胞后 RNA 经 RNase 消化除去，蛋白质经苯酚、氯仿、异戊醇抽提除去，经酒精沉淀回收 DNA。

枯草杆菌染色体制备与上述方法类似，但略加修改的方法要适合教学要求。枯草杆菌是革兰氏阳性菌，所以在 SDS 处理前需要使用溶菌酶裂解细胞壁。溶菌酶是一种糖苷水解酶，它能水解菌体细胞壁的主要化学成分肽聚糖中的 $\beta-1, 4$ -糖苷键，有助于细胞壁破裂，破裂的细胞壁在 SDS 作用下溶菌，同时用蛋白酶 K 消化蛋白质，能解离缠绕在染色体 DNA 上的蛋白质，然后加入一定量的醋酸钾，使蛋白质变性，通常离心除去，在这期间可加入核糖核酸酶消化 RNA，最后用乙醇回收 DNA。

上述两种方法抽提的细菌染色体 DNA，无 RNA 和蛋白质污染，可用于限制性内切酶消化、分子再克隆等。但在下一步实验前，要测定其 DNA 的浓度。常

用测定 DNA 浓度的方法是溴化乙锭电泳法。当 DNA 样品在琼脂糖凝胶中电泳时, 加入的 EB 会增强发射的荧光, 而荧光的强度与 DNA 的含量成正比, 如将已知浓度的标准样品作电泳对照, 就可估计出待测样品的浓度。

(三) 材料

1. 菌株: 大肠杆菌 C600、枯草杆菌 BR151。
2. 仪器: 电泳设备, 恒温水浴锅, 低速离心机, 恒温振荡器, 紫外检测仪。
3. 器皿: 玻璃离心管 (10 mL), 移液管 (10 mL、5 mL), 微量取样器, 烧杯, 玻璃棒, 试管, 三角瓶。
4. 试剂:
 - (1) LB 完全肉汤培养液: 1% 蛋白胨, 0.5% 酵母粉, 0.5% NaCl, pH 为 7.5。
 - (2) BY 培养液: 1% 蛋白胨, 0.5% 牛肉膏, 0.5% 酵母粉, 0.5% 葡萄糖, 0.5% NaCl, pH 为 7.5。
 - (3) SET 溶液: 20% 蔗糖, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6), 50 mmol/L EDTA。
 - (4) 20% SDS。
 - (5) 饱和酚。
 - (6) 氯仿: 异戊醇 (体积比为 24:1)。
 - (7) 预冷无水酒精。
 - (8) TE 溶液。
 - (9) RNase 溶液。
 - (10) 5 mol/L 醋酸钾。
 - (11) 20 mg/mL 蛋白酶 K。

(四) 实验步骤

一) 大肠杆菌染色体 DNA 的抽提

1. 取大肠杆菌 C600 单菌落于 5 mL LB 培养液中, 37℃ 振荡培养过夜。
2. 将上述菌液 1% 接种量接种于 20 mL LB 培养液中, 37℃ 摇床振荡培养过夜。
3. 已培养好的菌液, 收集于 10 mL 的离心管中, 在低速离心机上 4 000 r/min 离心 10 min, 去上清液, 留沉淀菌体。
4. 用 5 mL 的 SET 溶液悬浮细胞, 加入 20% SDS 1 mL, 37℃ 下轻摇过夜, 使细胞裂解。
5. 加入等体积的饱和酚, 上下轻轻摇匀, 放置 5 min 后, 在低速离心机上 3 500 r/min 离心 10 min。
6. 取上相, 加入 1/2 体积的饱和酚, 1/2 体积的氯仿与异戊醇混合液, 上下翻转均匀, 3 500 r/min 离心 10 min。
7. 取上相, 加入等体积的氯仿与异戊醇, 如第 6 步, 离心。
8. 取上相于一干净离心管中, 另在一个 50 mL 的烧杯中加入 15 mL 预冷无水酒精, 把上述的上相液沿着玻棒慢慢倒入酒精中, 并温和地搅拌以使 DNA 附着于玻棒上。

9. 挑起 DNA, 再放入干净的酒精中洗涤, 然后把 DNA 溶于 50 mL TE 中。待测浓度。

二) 枯草杆菌染色体 DNA 的抽提

1. 在 BY 斜面上圈出活化枯草杆菌 BR151。

2. 挑一环已活化的 BR151 菌株于 20 mL 的 BY 培养液中, 37℃ 摇床振荡培养过夜。

3. 收集过夜培养物 10 mL 于离心管内, 在低速离心机上 3 500 r/min 离心 10 min。

4. 沉淀菌体加入 0.75 mL 溶菌酶液 (8mg 溶菌酶/1 mL SET), 振荡器上悬浮细胞, 悬浮液移入 1.5 mL 离心管, 室温 30 min。

5. 在反应液中加入 0.15 mL SDS 溶液, 蛋白酶 K 溶液 5 μ L, 37℃ 水浴 10 min 后转入 75℃ 水浴 5 min。

6. 加入 5 mol/L 醋酸钾 0.3 mL, 上下翻转均匀, 置于冰上 30 min, 其间不时摇动。于台式高速离心机 10 000 r/min 离心 10 min。

7. 上清液移入另一离心管, 弃沉淀。重复第 6 步。

8. 上清液移入 5 mL 的离心管内, 缓慢加入 2 倍体积的无水酒精, DNA 呈絮状沉淀。用一灭菌牙签, 挑起 DNA 沉淀, 溶于 50 μ L TE 中。待测浓度。

9. 若无絮状沉淀, 则把其置于 -20℃ 冷冻 3 h (或 -70℃ 冷冻 30 min), 取出离心 10 min (10 000 r/min), 去上清液, 晾干, 加入 50 μ L TE 溶解 (取 20 μ L 点样测定)。

三) 染色体 DNA 制备样品浓度测定

1. 按实验一的方法制备琼脂糖凝胶 (0.6%)。

2. 分别取标准浓度的 λ DNA 0.05 μ g、0.1 μ g、0.15 μ g、0.2 μ g, 加相应的加样缓冲液混合好, 点样。

3. 取 2 μ L 染色体 DNA 样品点样 (冷冻离心获取的 DNA 样品取 50 μ L 点样), 打开电泳仪电泳, 待溴酚蓝带进入凝胶 2 cm 后, 停止电泳, 紫外灯下观察, 估计样品 DNA 浓度。

(五) 实验结果讨论与问题

紫外光下观察 DNA 样品纯度, 计算出制备的 DNA 总量和浓度。

1. SDS 在抽提 DNA 过程中有哪几个作用?

2. 如在本实验中未加入 RNase, 那么样品中会出现什么情况?

三、PCR 扩增分离目的 DNA 片段

(一) 目的

了解多聚合酶链式反应 DNA 扩增技术的基本原理和实验应用, 掌握 PCR 反应基本技术。

(二) 原理

PCR (Polymerase Chain Reaction) 即聚合酶链式反应是 1986 年由 Kallis Mullis 发现的。这项技术已广泛地应用于分子生物学各个领域,它不仅可用于基因分离克隆和核酸序列分析,还可用于突变体和重组体的构建、基因表达调控的研究、基因多态性的分析、遗传病和传染病诊断、肿瘤机制探查、法医鉴定等方面。PCR 技术已成为方法学上的一次革命,它必将大大推动分子生物学各学科的研究发展。

PCR 是一种利用两种与相反链杂交并附着于靶 DNA 两侧的寡核苷酸引物经酶促合成特异的 DNA 片段的体外方法,由高温变性、低温退火和适温延伸等几步反应组成一个循环,然后反复进行,使目的 DNA 得以迅速扩增,主要过程如图 1-4 所示。置待扩增 DNA 于高温下解链成为单链 DNA 模板;人工合成的两个寡核苷酸引物在低温条件下分别与目的片段两侧的两条链互补结合;DNA 聚合酶在 72℃ 将单核苷酸从引物 3' 端开始掺入,沿模板 5' → 3' 方向延伸,合成 DNA 新链。由于每一循环所产生的 DNA 均能成为下一次循环的模板,所以 PCR 产物以指数方式增加,经 25 ~ 30 个周期之后,理论上可增加 10^9 倍,实际上可增加 10^7 倍。

PCR 技术具有操作简便、省时、灵敏度高、特异性强和对原始材料质量要求低等优点,但由于所用的 TaqDNA 聚合酶缺乏 5' - 3' 核酸外切酶活性,不能纠正反应中发生的错误核苷酸掺入,估计每 9 000 个核苷酸会导致一个掺入错误,不过 Innis M. A. 发现,错误掺入的碱基有终止链延伸的作用,使错误不会扩大。

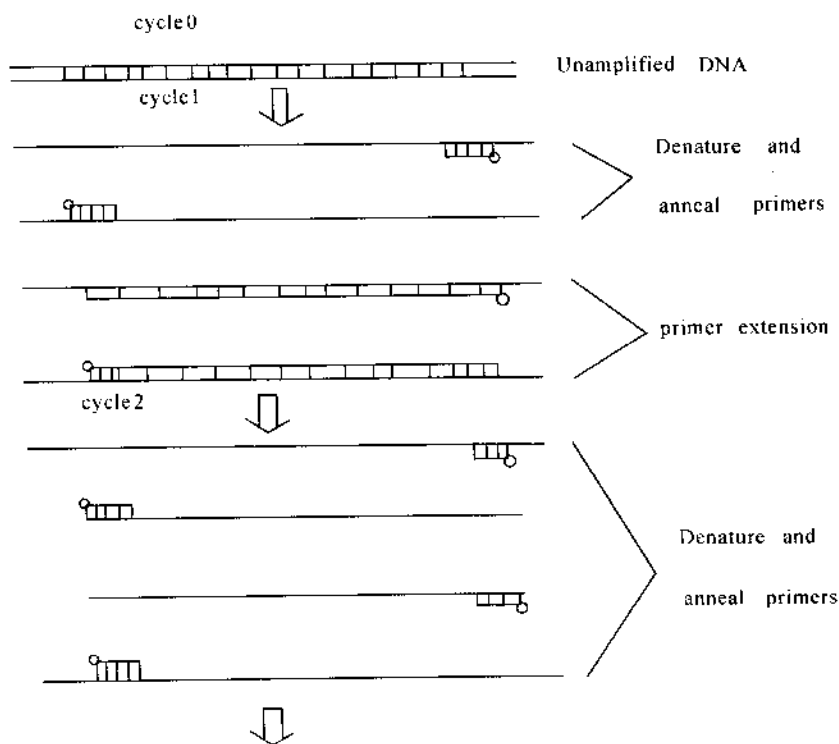


图 1-4 PCR 原理示意图

PCR 技术应用广泛,不可能有这样一组条件满足所有的实验,但本实验所介绍的方法可适用于大多数 DNA 扩增反应,即使有的不适应,至少也确定了一个共同的起点,在此基础上可以作多种变化。不过,下列因素在实验应用时应予以特别注意,以求取得满意结果。

1. 模板:单、双链 DNA 和 RNA 都可以作为 PCR 样品,若起始材料是 RNA,须先通过逆转录取得第一条 cDNA。虽然 PCR 可以仅用极微量的样品,但为了保证反应的特异性,一般宜用 ng 量级的克隆 DNA、 μg 量级的染色体 DNA,待扩增样品质量要求较低,但不能混合有任何蛋白酶、核酸酶、TaqDNA 聚合酶的抑制剂以及能结合 DNA 的蛋白质。

2. 引物:引物是决定 PCR 结果的关键,下列原则有助于引物的合理设计。
①尽可能选择碱基随机分布,GC 含量类似于被扩增片段的引物,尽量避免具有多聚嘌呤、多聚嘧啶或其他异常序列的引物。
②避免具有明显二级结构(尤其是在引物 3' 末端)的序列。
③防止引物间的互补,特别要注意避免具有 3' 末端重叠的序列。
④引物的长度约为 20 个碱基,长引物较好,但会增加成本,短引物则特异性降低。
⑤引物浓度不宜偏高,过高易形成二聚体,而且扩增微量靶目标或起始材料是粗制品,容易产生非特异产物。

3. 缓冲液:PCR 缓冲液的变化通常会影响到扩增结果,特别是 MgCl_2 ,其浓度对专一性和扩增量有重大影响,通常最适浓度为 1.5 mmol/L 左右(每种 dNTP 的浓度为 0.2 mmol/L 时),浓度过高,使反应特异性降低;浓度过低,使产物产量降低。四种 dNTP 浓度通常都是 $0.05 \sim 0.2 \text{ mmol/L}$ 。过高的浓度会导致错误掺入,浓度过低,则影响反应产物的产量。四种 dNTP 浓度应大体相同,若其中一种偏高,会诱发错误掺入,降低合成速度,过早终止延伸反应。另外 dNTP 能与 Mg^{2+} 结合,使游离 Mg^{2+} 浓度降低,所以如果 dNTP 的浓度有很大改变, MgCl_2 浓度也要改变。Taq 聚合酶是一种耐高温聚合酶,用量通常是 $1 \sim 4$ 单位/ $100 \mu\text{L}$,浓度过高,会产生过多的非特异片段。

4. 循环参数:PCR 循环是把起始材料加热到 $90^\circ\text{C} \sim 95^\circ\text{C}$,保持短时间使双链 DNA 解链;然后冷却至 $37^\circ\text{C} \sim 55^\circ\text{C}$,使引物与模板退火;再升温至 $70^\circ\text{C} \sim 75^\circ\text{C}$,在 TaqDNA 聚合酶的作用下掺入单核苷酸,使引物沿模板延伸。解链不是导致 PCR 失败的最主要原因。用 DNA 扩增仪时, 94°C 保持 1 min 可使模板的起始物完全变性。若用低于 94°C 的条件,则应适当延长时间。引物与模板退火温度由引物的长度及 G + C 含量决定。在适当时间内退火($1 \sim 2 \text{ min}$)有利于产物的特异性。引物延伸在 $70^\circ\text{C} \sim 75^\circ\text{C}$ 保温的时间可根据扩增 DNA 片段的长短来调节。正常情况下,每分钟可延伸 1 kb 的长度,常规 PCR 一般为 $25 \sim 40$ 个循环,若循环加长,则由于酶活性降低,聚合时间延长,引物及单核苷酸减少等原因,反应后期容易产生错误掺入,所以在满足产物得率前提下,应尽量减少周期次数。

(三) 材料

1. 仪器与器皿

PCR 扩增仪 (PE2400),琼脂糖凝胶电泳设备,微量取样器,一次性指形管,凝胶成像仪,玻片。

二) 试剂与材料

1. 琼脂糖凝胶电泳试剂。

(1) 电泳缓冲液: 0.04 mol/L、pH 8.0 的 Tris - 乙酸, 0.002 mol/L EDTA。

(2) 加样缓冲液: 0.25% 溴酚蓝, 40% (w/v) 蔗糖。

(3) 溴化乙锭溶液: 0.05 mg/mL (溴化乙锭/水)。

(4) 琼脂糖。

2. TaqDNA 聚合酶。

3. 5 × 反应缓冲液。

125 mmol/L Tris - HCl, pH8.2; 10 mmol/L MgCl₂; 0.5 mg/mL gelatin;

125 mmol/L (NH₄)₂SO₄; 25% Formamide。

4. 混合 dNTP 液 (dATP、dGTP、dTTP、dCTP 各 2 mmol/L)。

5. DNA 模板 (每 2 × μL 中含有 10fg 待扩增 DNA)。

6. 引物 1 (25p mol/L), 5' 端加入 *Eco*RI 黏性末端碱基。

7. 引物 2 (25p mol/L), 5' 端加入 *Hind*III 黏性末端碱基。

8. 无菌水。

(四) 实验步骤

1. 按顺序在 20 μL 指形管中加入以下试剂与样品 (因购入的试剂批次不同, 加样时有所差别, 以预实验结果为准):

(1) ddH ₂ O	74 μL
(2) 10 × Buffer	10 μL
(3) MgCl ₂	6 μL (5 × Buffer 如已加入 MgCl ₂ , 则不必加)
(4) dNTP	2 μL
(5) 引物 1	2 μL
(6) 引物 2	2 μL
(7) 模板	2 μL
(8) TaqDNA 聚合酶	2 μL

总体积为 100 μL (也可以配成 40 μL 的反应体系)。

2. 在 PCR 扩增仪上按以下反应条件编入程序 (以下为参考值, 因扩增的 DNA 片段不同, 各类 PCR 扩增仪程序设定各不相同, 编程过程视扩增的 DNA 片段的要求及仪器而定参数, 见示范):

(1) 预变性	94℃	2 min
(2) 循环条件 (30 次)		
变性	94℃	40 s
退火	55℃	35 s
延伸	72℃	2 min 10 s
(3) 延长延伸	72℃	7 min

编完反应程序, 置反应管于 PCR 扩增仪的反应孔中, 开动机器, 扩增循环反应开始。

3. PCR 扩增完毕, 配 2% 琼脂糖凝胶, 取 15 μL 反应液及相适应的 PCR mark 分别点样, 加样缓冲液应为 40% (w/v) 蔗糖, 电泳观察结果。