



普通高等教育“十三五”规划教材
全国高等院校医学实验教学规划教材

编审委员会主任委员 文格波
编写委员会总主编 姜志胜

分子生物学实验

主编 刘录山 龙石银



科学出版社

普通高等教育“十三五”规划教材
全国高等院校医学实验教学规划教材

编审委员会主任委员 文格波

编写委员会总主编 姜志胜

分子生物学实验

主 审 姜志胜

主 编 刘录山 龙石银

副主编 马 云 王 佐 李家大

编 委 (按姓氏笔画排序)

马 云	王 双	王 佐	王五洲	韦 星
文红波	尹卫东	尹铁英	尹慧勇	甘 露
龙石银	田 英	乔新惠	任 重	危当恒
刘录山	刘贻尧	刘慧婷	严丽梅	苏泽红
李亚林	李俐娟	李家大	李斌元	吴颜晖
何芳丽	何淑雅	余美华	沈 阳	张 敏
张彩平	武 一	林国平	罗 应	胡小波
袁中华	莫中成	贾连群	唐 旻	唐朝克
唐雅玲	黄春林	曹运长	曹朝晖	

秘 书 张 敏

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书分为分子生物学实验技术及原理、分子生物学实验及分子生物学软件应用三篇。第二篇分子生物学实验内容包括 DNA 操作实验、RNA 操作实验、蛋白质研究相关实验、基因表达与调节实验、转基因实验、细胞研究实验。各个实验章节的编排尽量按实验目的、实验原理、实验器材/试剂、实验步骤、实验结果、注意事项和思考题统一格式。本书注重所述实验方法的常用性与先进性,同时注重语言的简洁性与条理性,以保证实验方法的可操作性。

本书适用于高等医药院校基础、临床、预防和口腔医学等专业本科生,以及生物技术、生物科学、药学、医学检验、卫生检验和护理等专业本科生。同时可以作为生物医学专业研究生和从事生物医学研究的科技工作者的分子生物学实验参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学实验 / 刘录山, 龙石银主编. —北京: 科学出版社, 2017.1

普通高等教育“十三五”规划教材·全国高等院校医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-050983-3

I. ①分… II. ①刘… ②龙… III. ①分子生物学—实验—高等学校—教材
IV. ①Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 296248 号

责任编辑: 李国红 周 园 / 责任校对: 赵桂芬

责任印制: 赵 博 / 封面设计: 陈 敬

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京市密东印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017 年 1 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2017 年 1 月第一次印刷 印张: 18 1/2

字数: 429 000

定价: 49.80 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

全国高等院校医学实验教学规划教材

编审委员会

主任委员 文格波

副主任委员 姜志胜 吴移谋 廖端芳

委员 (以姓氏笔画为序)

王 韵	王宗保	牛亦农	龙双涟
田 英	刘贻尧	刘艳平	宇 丽
严 杰	李 和	肖建华	肖献忠
何庆南	余 平	宋 健	张新华
陈 熙	罗学港	周国民	贺修胜
秦晓群	龚永生	傅松滨	管又飞

编写委员会

总 主 编 姜志胜

副 总 主 编 田 英 陈 熙 贺修胜

编 委 (以姓氏笔画为序)

万 炜	王汉群	尹 凯	甘润良
龙石银	乔新惠	向宇燕	刘 俊
刘录山	李严兵	李国庆	李忠玉
李美香	杨秋林	张 艳	易 岚
易光辉	屈丽华	赵飞骏	胡四海
桂庆军	凌 晖	唐志晗	梁 瑜
彭翠英	谭健苗		

秘 书 梁 瑜 唐志晗

序 一

近年来,教育部、卫生计生委等多部委紧密部署实施本科教学工程、专业综合改革试点、实践育人和卓越医生教育培养计划,把强化实践教学环节作为重要内容和重点要求,进一步凸显了医学实践性很强的属性,对切实加强医学实验教学提出了更高要求,指引着我国医学实验教学进入全面深化改革阶段。

高校牢固树立以学生为本、目标导向和持续改进的教育理念,积极创新和完善更加有利于培养学生实践能力和创新能力的实验教学体系,建设高素质实验教学队伍和高水平实验教学平台,以促进和保证实验教学水平全面提高。为此,南华大学医学院协同国内多所高校对第一版“全国高等院校医学实验教学规划教材”进行了修订和拓展。第二版教材涵盖了解剖学、显微形态学、医学免疫学、病原生物学、机能学、临床基本技能学、生物化学、分子生物学、医学细胞生物学、医学遗传学的实验教学内容,全书贯彻了先进的教育理念和教学指导思想,把握了各学科的总体框架和发展趋势,坚持了理论与实验结合、基础与临床结合、经典与现代结合、教学与科研结合,注重对学生探索精神、科学思维、实践能力、创新能力的全面培养,不失为一套高质量的精品教材。

愿“全国高等院校医学实验教学规划教材”的出版为推动我国医学实验教学的深化改革和持续发展发挥重要作用。

教育部高等学校基础医学类专业教学指导委员会主任委员

中国高等教育学会基础医学教育分会理事长

2015年12月



序 二

随着本科教学工程、专业综合改革试点、实践育人和卓越医生教育培养计划的实施,高等医学院校迎来了进一步加强医学实验教学、提高医学实验教学质量的大好时机,必须积极更新医学实验教学理念,创新实验教学体系、教学模式和教学方法,整合实验教学内容,应用实验教学新技术新手段,促进医学人才知识、技能和素质全面协调发展。

“全国高等院校医学实验教学规划教材”编审委员会和编写委员会与时俱进,积极推进实验教学改革的深化,组织相关学科专业的专家教授,在第一版的基础上,吸收了南华大学等多个高校近年来在医学实验教学方面的改革新成果,强调对学生基本理论、基础知识、基本技能以及创新能力的培养,打破现行课程框架,构建以综合能力培养为目标的新型医学实验教学体系,修订并拓展了这套实验教学规划教材。第二版教材共十四本,包括:《系统解剖学实验》《局部解剖学实验》《显微形态学实验(组织与胚胎学分册)》《显微形态学实验(病理学分册)》《病原生物学实验(医学微生物学分册)》《病原生物学实验(人体寄生虫学分册)》《医学免疫学实验》《机能实验学》《临床基本技能学(诊断技能分册)》《临床基本技能学(外科基本技能分册)》《生物化学实验和技术》《分子生物学实验》《医学细胞生物学实验》《医学遗传学实验》。

本套规划教材的编写,借鉴国内外同类实验教材的编写模式,内容上依据医学实验体系进行重组和有机融合,按照医学实验教学的逻辑和规律进行编写,并注重知识的更新,反映学科的前沿动态,体现教材的思想性、科学性、启发性、先进性和实用性。

本套规划教材适用对象以本科临床医学专业为主,兼顾麻醉学、口腔医学、医学影像、护理学、预防医学、医学检验、卫生检验、药学、药物制剂、生物科学、生物技术等专业实验教学需求,各层次各专业学生可按照其专业培养特点和要求,选用相应的实验项目进行教学与学习。

本套规划教材的编写出版,得到了科学出版社和南华大学以及有关兄弟院校的大力支持,凝聚了各位主编和全体编写、编审人员的心血和智慧,在此,一并表示衷心感谢。

由于医学实验教学模式尚存差异,加上我们的水平有限,本套规划教材难免存在缺点和不当之处,敬请读者批评指正。

总主编
2015年12月



前 言

1865 年孟德尔 (Mendel) 遗传因子假说的提出、1909 年约翰逊 (Johannsen) 基因概念的引入、1944 年艾弗里 (Avery) DNA 就是遗传物质的确定、1952 年富兰克林 (Franklin) DNA 晶体 X 线衍射图谱的获得, 加上沃森 (Watson) 与克里克 (Crick) 天才的想象力, 1953 年, DNA 双螺旋结构模型被提出, 从而开启了生命科学研究的又一里程碑, 揭开了分子生物学——一门从生物大分子结构和功能水平上阐述生命现象及其本质新学科的序幕。如果说 DNA 双螺旋结构的提出只是分子生物学的萌芽, 那么 1958 年遗传信息传递中心法则的提出、1972 年 DNA 重组技术的建立、1983 年 PCR 技术的发明、1998 年 RNA 干扰现象的发现及技术体系的应用、2006 年诱导多能干细胞的问世等一系列重大理论与技术发现, 则持续催生使其蓬勃生长成今天生命科学学科中的参天大树, 并还在以旺盛的生命力不断发展。

纵观分子生物学发展历程, 理论与技术相辅相成, 相互促进, 如羽之双翼、车之双轮。今日分子生物学技术已经渗透到生命科学领域的各个学科, 并且已经走进我们每一个平常人的日常生活, 如各种转基因食品已经摆上了我们的餐桌。就医学而言, 分子生物学技术已经贯穿于医学研究和临床疾病防治的各个环节。在医学研究领域, 传统的整体和细胞水平研究已全面深入到分子水平研究。这可以从诺贝尔获奖者名单中得到证实, 自 20 世纪 60 年代以来, 诺贝尔生理学或医学奖中约有 2/3 的获奖是因为在分子生物学理论与技术方面取得重要突破, 或是利用分子生物学技术在某些生物医学领域取得重要突破。这也可以从我国各类科学研究基金申请中得到证实, 历年来生物医学方面获得资助的项目已经很少不涉及应用分子生物学技术。在疾病诊断方面, 以 PCR 技术为主的基因诊断技术在遗传性疾病、感染性疾病和肿瘤性疾病等方面展示出广泛的应用前景。在疾病治疗方面, 目前主要以各种病毒为载体的基因治疗取得了积极进展, 并将有望从根本上根除某些疾病, 如糖尿病等; 利用基因工程技术生产的药用蛋白如人源性白蛋白将解决传统的血液提取来源不足的瓶颈。除此之外, 还有基于分子生物学技术的感染性疾病病原微生物的追踪溯源, 法医学人体标本的 DNA 检测、亲子鉴定。综上所述, 在掌握分子生物学理论的同时, 熟悉和掌握分子生物学技术对每一个医学生和医学工作者而言都是非常有必要的。但必须指出的是, 任何科学技术都有可能是一把双刃剑, 在我们合理应用分子生物学技术为人类健康带来福音的同时, 也必须看到和考虑到滥用分子生物学技术的安全性问题和可能带来的伦理问题。

目前国内有关分子生物学理论的教材很多, 介绍分子生物学实验技术的也

有多种,但是尚缺乏可供医学院校本科生分子生物学实验技术教学的教材。我们在总结长期分子生物学实验教学经验的基础上,参考和借鉴已有的一些实验技术教学内容与方法,在既考虑本科生的水平与能力,侧重实用性和可操作性的同时,又考虑了分子生物学本身地发展,侧重先进性和科学性,选编了部分分子生物学实验技术,组织编写了这本教材。

本教材使用对象定位于高等医药院校基础、临床、预防和口腔医学等专业本科生,以及生物技术、生物科学、药学、医学检验、卫生检验和护理等专业本科生。同时可以作为生物医学专业研究生和从事生物医学研究的科技工作者分子生物学实验参考用书。

本教材的44位编委来自10所高等院校和科研院所,他们大部分来自医学院校,也有部分来自综合性大学的生命科学学院或生物工程学院。教材的整体设计过程得到了三位副主编的鼎力相助,各位编委结合自己的分子生物学实验教学经验尽心完成每一章的编写工作,同时也引用了部分国内外公开发表的文献和专著内容,以尽量提高编写质量,在此谨对原作者表示衷心感谢。南华大学生物化学与分子生物学教研室张敏博士担任本教材的编写秘书工作,为教材的最终完成做出了很大贡献。本教材的编写得到了科学出版社、南华大学医学部、南华大学医学院、南华大学心血管疾病研究所/动脉硬化化学湖南省重点实验室和南华大学生物化学与分子生物学教研室、南华大学生物化学与分子生物学实验中心的大力支持,在此谨表衷心的感谢。还有一批为本教材编写工作作出贡献的人士在此一并表示衷心的感谢。

本教材虽然在编写过程中由编委分头执笔完成初稿后,进行了互审,后又进行了主编再审和编委定稿会终审,但是由于编者水平有限,加之分子生物学技术发展迅速,难免存在不足之处,敬请使用本教材的师生和科技工作者批评指正。

刘录山 龙石银

2016年12月

目 录

第一篇 分子生物学实验技术及原理

第一章 常用工具与方法	1
第一节 载体	1
第二节 常用工具酶	9
第三节 电泳	14
第二章 核酸操作技术	21
第一节 DNA 的定性和定量分析	21
第二节 RNA 的定性和定量分析	30
第三节 DNA 重组技术	40
第四节 核酸文库构建	44
第三章 蛋白质研究技术	52
第一节 蛋白质分离与纯化	52
第二节 蛋白质定量	56
第三节 蛋白质免疫印迹	61
第四节 流式细胞分析技术	64
第五节 免疫共沉淀	67
第四章 基因功能研究相关技术	71
第一节 基因表达与调节	71
第二节 转基因技术	78
第三节 基因敲除	81
第四节 基因沉默	84
第五章 细胞研究技术	88
第一节 细胞培养	88
第二节 细胞凋亡的检测	91

第二篇 分子生物学实验

第六章 DNA 操作实验	95
实验一 质粒 DNA 的微量快速提取	95
实验二 外周血白细胞 DNA 的微量快速提取（离心柱法）	97
实验三 质粒 DNA 的酶切与鉴定	98
实验四 聚合酶链反应技术（PCR）	100
实验五 DNA 序列测定（双脱氧测序银染法）	101
实验六 DNA 印迹杂交技术（Southern 印迹法）	106
实验七 DNA 重组与鉴定	110

实验八 克隆化 DNA 的定点突变实验	113
第七章 RNA 操作实验	116
实验一 肝总 RNA 的制备	116
实验二 Northern 印迹法	118
实验三 利用 RT-PCR 对大鼠肝组织 SOD 基因进行半定量分析	121
实验四 实时荧光定量 PCR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法) 检测大鼠不同组织中碱性成纤维细胞生长 因子 bFGF 基因表达水平的差异	123
实验五 cDNA 文库构建	128
第八章 蛋白质研究相关实验	134
实验一 血清 γ -球蛋白的分离纯化与鉴定	134
实验二 肝组织蛋白质定量	136
实验三 小鼠肝 β -actin 蛋白免疫印迹检测	140
实验四 免疫组织化学	144
实验五 免疫荧光染色方法	146
实验六 流式细胞仪对血小板活化的测定	148
实验七 免疫共沉淀	151
第九章 基因表达与调节实验	154
实验一 利用荧光素酶报告基因系统检测启动子的转录活性	154
实验二 染色质免疫沉淀技术	156
实验三 DNA 甲基化特异性 PCR	158
实验四 Red 同源重组技术对大肠埃希菌 ClpP 基因的敲除	162
实验五 siRNA 技术沉默基因	163
实验六 microRNA 技术沉默基因	165
第十章 转基因实验	168
实验一 绿色荧光蛋白基因真核表达载体的构建及其在酿酒酵母中的表达	168
实验二 原核表达载体构建	173
实验三 哺乳动物细胞的转染	178
实验四 用电穿孔方法将重组质粒转化细菌	179
实验五 克隆化基因在大肠埃希菌的诱导表达	180
实验六 转基因动物的建立	181
第十一章 细胞研究实验	185
实验一 小鼠原代细胞培养	185
实验二 细胞培养实验	186
实验三 细胞凋亡检测	187

第三篇 分子生物学软件应用

第十二章 PCR 引物设计及相关软件使用	190
第十三章 核酸序列分析与预测	203
第一节 核酸序列分析一般内容	203
第二节 miRNA 序列数据库及靶点预测	219

第十四章 蛋白质序列分析与结构预测	225
第一节 蛋白质序列分析	225
第二节 二级结构及三级结构预测	234
第十五章 科研论文中的图片处理	240
第一节 基本概念	240
第二节 图片的获取与保存	241
第三节 图片的修复、编排与标注	242
第四节 图片的制作规范	242
第五节 结语	242
第十六章 EndNote 软件的安装及其在医学文献管理和科研写作中的应用	243
第一节 EndNote X7 的安装	243
第二节 EndNote X7 的简介	245
第三节 EndNote X7 的使用	247
参考文献	259
附录	260
附录 1 分子生物学实验室常用设备介绍	260
附录 2 分子生物学及基因工程常用试剂	276

第一篇 分子生物学实验技术及原理

第一章 常用工具与方法

第一节 载 体

一、载体的定义及特征

(一) 载体的定义

载体(vector)是指携带外源 DNA 进入宿主细胞的工具,能够运载外源 DNA 片段(目的基因)进入受体细胞,具有自我复制能力,能使外源 DNA 片段在受体细胞中得到扩增和表达,而不被受体细胞的酶系统所破坏的一类 DNA 分子。

(二) 载体的必备条件

(1) 有复制起始位点,能在宿主细胞进行自我复制或整合到染色体 DNA 上与染色体 DNA 同步复制,进行基因扩增,否则可能会导致重组 DNA 丢失;对受体细胞无害,不影响受体细胞正常的生命活动。

(2) 具有多种单一的核酸内切酶识别切割位点,如大肠埃希菌 pBR322 存在多个限制内切酶的单一识别位点,用于插入目的 DNA。

(3) 具有选择性标记基因,使宿主细胞附加了新的性状,如抗生素敏感的宿主细胞转入含有抗生素抗性基因的载体,使其具备了抗生素抗性,并以此作为筛选标记。

(4) 具有较高的外源 DNA 的载装能力,因此要求载体本身除基本元件外,尽可能小。

(5) 必须安全,转入载体不能影响受体细胞正常的生命活动,且不会任意转入受体细胞以外的其他生物细胞中。

(三) 选择标记及筛选原理

选择标记基因是指编码的产物能够使转化或转染的细胞在有选择剂或营养缺乏的情况下很好的生长,或者表现出其他可视特征。构建载体时,目的基因与选择标记基因在载体上的空间关系有三种。第一种,选择标记基因是独立存在于载体中,可以用于区分转化细胞与未转化细胞;第二种,载体上的选择标记基因编码区或调控区内含有多克隆位点用于插入目的基因,以此区分空载体与重组载体转化细胞;第三种,选择标记基因与目的基因置于同一个基因调控序列之下,标记基因的表达产物容易被检测且能够指示外源导入受体细胞与否及表达水平的基因,从而筛选转化子,如绿色荧光蛋白 GFP 与目的基因置于同

一个启动子控制之下,报告基因与目的基因融合表达,可以监测目的蛋白的表达水平及组织细胞定位。

1. 抗生素抗性基因作为选择标记基因 最常用的报告基因是编码抗生素抗性蛋白的基因,大多数载体选择抗生素抗性基因作为选择性标记基因,包括氨苄西林抗性(Amp^r)、卡那霉素抗性(Kan^r)、四环素抗性(Tet^r)、链霉素抗性(Str^r)和氯霉素抗性(Cml^r)等。受体菌不具备抗生素抗性,不能在含有抗生素的培养基中生长;当带有抗生素抗性基因的载体进入受体菌后,受体菌带上抗生素抗性才能生长。

氨苄西林(ampicillin, Amp)干扰细菌细胞壁的合成,从而杀死细菌。细菌质粒 Amp^r 基因编码 β -内酰胺酶,特异地切割氨苄西林的 β -内酰胺环。

氯霉素(chloramphenicol, Cml)通过与 50S 核糖体亚基结合,干扰细胞蛋白质的合成并阻止肽键的形成,杀死生长的细菌。细菌抗性原理是 Cml^r 编码乙酰转移酶,特异地使氯霉素乙酰化而失活。

卡那霉素(kanamycin, Kan)与 70S 核糖体亚基结合,导致翻译错误。而 Kan^r 编码的氨基苷磷酸转移酶,阻断其与核糖体结合,从而抑制了卡那霉素的作用。

链霉素(streptomycin, Str)与 30S 核糖体亚基结合,导致翻译错误。 Str^r 与 Kan^r 类似,编码一种氨基苷磷酸转移酶对链霉素进行修饰,阻断其与核糖体 30S 结合。

四环素(tetracycline, Tet)与 30S 核糖体亚基结合,阻止肽键的形成从而干扰细胞蛋白质的合成,杀死生长的细菌。 Tet^r 编码特异性蛋白质,对细菌的膜结构进行修饰,阻止四环素通过细胞膜进入细菌细胞内。

2. 营养基因作为选择标记性基因 载体分子上携带有某种营养组分的合成基因,而受体细胞本身不能合成这一营养组分,将转化细胞涂布在不含此营养组分的培养基上,长出的便是转化子。大肠埃希菌的营养标记常选用色氨酸生物合成基因 trp^+ ,哺乳动物细胞的营养标记则常选用胸腺嘧啶核苷酸基因 tk^+ 。

3. β -半乳糖苷酶作为选择标记性基因 β -半乳糖苷酶由大肠埃希菌 $lacZ$ 基因编码,可催化半乳糖苷水解,以 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷(X-gal)为底物,在培养基中形成蓝色菌落;以邻-硝基苯- β -D-半乳糖苷(ONPG)或者氯酚红- β -D-半乳糖苷(CPRG)为底物,可用标准的比色法检测酶活性,是最常用的检测转染效率的方法;以 4-甲基伞型基- β -D-吡喃半乳糖苷(MUG)和荧光素二半乳糖苷(FDG)为底物则可用荧光法检测其活性,灵敏度极高,可检测到单个细胞的酶活性,因此可用于流式细胞学分析。

4. 荧光蛋白作为选择标记性基因 荧光蛋白家族是从水螅纲和珊瑚类动物中发现的同源蛋白,包括绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白及它们的一些突变体。绿色荧光蛋白(GFP)是应用最多的发光蛋白。荧光蛋白作为选择标记基因的最大的优势是无需损伤细胞即可检测目的基因的表达水平。联合应用不同颜色的荧光蛋白,可以同时检测多个基因的表达。

5. 利用选择标记性基因进行重组子筛选 重组子为含有重组 DNA 分子(即插入目的基因)的转化细胞。利用选择标记性基因可以进行重组子的筛选。

(1) 带双抗生素抗性标记的筛选方法:菌株为某种抗生素缺陷型,载体携带两个抗生素抗性基因,这样只有重组子才能在含该抗生素的培养基上长出。若外源基因插入其中一个抗生素抗性基因内导致其失活,就可以用两种抗生素平板筛选重组子。首先进行正选择,在不进行插入失活抗性基因的相应抗生素平板上重组子可以生长,非重组子不能生长,可

将重组子直接从平板上挑出来；然后在插入失活抗性基因的相应抗生素平板上非重组子（未插入外源基因）可以生长，重组子（插入外源基因）不能生长，应与第一种抗生素板进行对照并在其上挑出重组子的菌落，即负选择。例如，pBR322 质粒含有 Tet^r 和 Amp^r 两种抗生素抗性基因，外源基因插入失活 Tet^r，转化细胞会有三种不同表现的细胞，Tet 和 Amp 抗生素敏感的细胞（未转化的受体菌）、抗 Tet 和 Amp 抗生素的细胞（含空载体的转化菌落）及 Tet 抗生素敏感和抗 Amp 抗生素的菌落（含重组体的阳性菌落）。

（2）蓝白斑筛选法：pUC 系列含有 β -半乳糖苷酶基因（lacZ）的调控序列，编码 N 端 146 个氨基酸区；受体菌编码 β -半乳糖苷酶 C 端氨基酸序列，两者互补形成有功能的 β -半乳糖苷酶全酶，在生色底物 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷（X-gal）培养基中形成蓝色菌落。而当有外源基因插入到载体 LacZ 的编码序列中的多克隆位点，插入失活导致 lacZ 基因不表达，形成白色菌斑，通过颜色不同而区分重组子和非重组子。结合载体上的抗生素的抗性基因，筛选区分重组子。例如，pUC19 质粒含有 Amp^r 抗生素抗性基因和 β -半乳糖苷酶 lacZ 基因，外源基因插入失活 lacZ 基因，转化细胞，在含 Amp 抗生素和 X-gal 底物的培养基中选择含有重组子的白色菌落；若不插入外源基因的空载体，lacZ 基因表达，为蓝色菌落；未转化的细胞不能生长。

（3）插入表达筛选法：载体的选择标记基因前连接一段负调控序列，插入失活负调控序列后，使其下游的筛选标记基因表达。例如，pTR262 质粒，含有 Tet^r 抗生素抗性基因，其受含有 λ 噬菌体启动子 PR 及阻遏蛋白 cI 调控。阻遏蛋白 cI 结合到启动子 PR 上，抑制 Tet^r 表达，对四环素 Tet 不表现抗性。cI 基因插入失活，Tet^r 基因表达，受体细胞在含 Tet 抗生素的培养基上生长；未转化细胞及空载体转化细胞对 Tet 抗生素敏感，Tet 培养基中不能生长。

（四）载体的类型

1. 以载体应用范围分类 可分为克隆载体和表达载体。克隆载体主要用于在受体细胞中进行目的基因扩增的载体，一般为松弛型复制子，即载体的复制不受宿主细胞复制系统的影响，可存在多个拷贝。表达载体是使所载目的基因能够复制、转录和翻译的载体，一般是在克隆载体的基础上增加表达元件使目的基因在宿主细胞中得以表达的载体，如在克隆载体 pBR322 的基础上加入强启动子、终止子及 RBS 位点，多克隆位点一般位于 RBS 位点之后 5~13bp 处。

2. 以载体应用对象分类 可分为原核载体、真核载体（酵母、植物和动物）和穿梭载体。原核和真核表达系统所需的表达元件不同。例如，启动子，终止子在两种表达系统中是不一样的。如果同时拥有真核和原核两个表达系统的为穿梭载体。因此穿梭载体又称双功能载体，具有细菌质粒的复制原点和真核生物可识别的复制原点（如病毒复制原点或酵母菌自主复制序列 ARS），能在原核和真核两种生物中进行自主复制的载体。它主要用于真核生物 DNA 片段在原核生物中的扩增和真核生物中的蛋白质表达。

3. 以载体构建来源分类 可分为质粒载体、病毒或噬菌体载体、质粒 DNA 与病毒或噬菌体 DNA 组成的载体和质粒 DNA 与染色体 DNA 片段组成的载体。

（1）质粒载体：为独立于染色体 DNA 之外的可以自主复制的小型环状 DNA，经限制性核酸内切酶（restriction endonuclease, RE）切割质粒插入的外源目的基因，可以以质粒为载体转化进入宿主细胞，进行重组、筛选、扩增及表达，其装载量只有几 kb。

(2) 噬菌体载体: 利用噬菌体 DNA 作载体, 将外来目的 DNA 替代或插入中段序列, 其装载能力远远大于质粒, 具有 25kb 的装载量; 插入目的片段随噬菌体 DNA 一起包装成噬菌体, 感染大肠埃希菌。根据 λ 噬菌体 DNA 或宿主细胞的性质, 宿主细胞裂解 (即溶菌状态), 或直接整合到宿主细胞的染色体 DNA 上, 不产生子代噬菌体颗粒, 即溶原状态。DNA 重组技术一般需要 λ 噬菌体进入溶菌状态; λ -DNA 可在体外包装成噬菌体颗粒, 高效转染大肠埃希菌。

(3) 病毒载体: 为了满足在真核细胞 DNA 重组的需要, 利用病毒感染真核细胞传送基因组的特点, 对病毒进行改造构建病毒载体, 在病毒 DNA 的基础上加入质粒复制起始位点, 保证载体在细胞中克隆和扩增, 然后引入真核细胞。可利用的病毒分为逆转录病毒、慢病毒和腺病毒等。

(4) 考斯质粒: λ 噬菌体 DNA 载体装载量为 25kb, 但在很多情况下需要克隆更大的外源 DNA 片段。为了进一步提高噬菌体 DNA 的装载量, 1978 年 Collins 和 Hohn 发明构建了考斯质粒载体, 将含有 λ 噬菌体 DNA 的 cos 序列和质粒复制子组装在一起。考斯质粒具备质粒的自主复制性和噬菌体的高效感染能力的双重特点。由于不再携带包装蛋白基因, 最大限度地提高了载体的装载能力 (转载量为 31~45kb), 但是重组 DNA 分子在细胞内不再能形成噬菌体颗粒。

(5) 人造染色体载体: 全基因组序列分析需要对大片段 DNA 进行克隆, 即使是考斯质粒的装载量也无法达到需求, 因此需要装载量更大的载体。人造染色体载体借用了细菌或酵母菌染色体上的复制区与质粒组装在一起, 扩大了载体的装载量。外源 DNA 插入到人造染色体载体后, 转入受体细胞, 像天然染色体一样进行复制遗传给子代细胞。目前常用的人造染色体载体包括细菌人造染色体 (BAC) 和酵母人造染色体 (YAC), 它们的装载量分别为 50~300kb 和 350~400kb。

二、质 粒

(一) 质粒的基本特征

质粒是存在于细胞中, 非染色体或核区 DNA 原有的能够自主复制并被稳定遗传的 DNA 分子。质粒常见于细菌和真菌中, 分子质量范围为 1~200kb。天然 DNA 质粒具有 3 种构型: 共价闭合环状 (cccDNA)、开环 (ocDNA) 和线形 (lDNA) 构型。绝大多数的天然 DNA 质粒具有共价、封闭和环状的分子结构, 即 cccDNA, 它存在于许多细菌以及酵母菌等生物中, 乃至植物的线粒体等细胞器中。*Streptomyces coelicolor* (天蓝色链霉菌) 等放线菌及 *Borrelia hermsii* (赫氏螺旋体) 等原核生物中存在线形质粒。

1. 质粒的自主复制性 质粒能利用寄主细胞的 DNA 复制系统进行自主复制。按照复制性质, 质粒可分为两大复制类型, 严紧型质粒和松弛型质粒。细胞染色体复制一次时, 质粒也复制一次, 每个细胞内只有 1~2 个拷贝, 为严紧型质粒; 松弛型质粒一般相对分子质量较小, 不受宿主细胞的复制系统控制, 当染色体复制停止后仍然能继续复制, 每一个细胞内可存在多拷贝。克隆载体一般为松弛型质粒。

2. 质粒的不相容性 含有相似复制子结构的不同质粒会互相干扰, 不能同时存在于一个细胞中 (其中一种质粒经过多次复制周期以后丢失), 即质粒的不相容性。例如, ColEI

和 pMB1 拥有相似的复制子结构,彼此不相容。只有当复制子结构不同时,复制各自受自己的拷贝数控制系统调节,才能保证不丢失质粒,我们把能共存于一个细胞内的质粒称为亲和性质粒。

3. 质粒的可转移性 革兰阴性菌的质粒可分成两大类:接合型质粒和非接合型质粒。接合型质粒是指能在天然条件下自发地从一个细胞转移到另一个细胞发生接合作用的质粒,如 F、Col 和 R 质粒等。反之,非接合型质粒是指不能在天然条件下独立的发生接合作用的质粒,但可以在接合型质粒的存在和协助下发生 DNA 的转移。

4. 质粒的重组性 由 *rec* 基因控制质粒 DNA 可以整合到染色体基因组上。通常基因工程应用的是重组缺陷型(*rec⁻*)的质粒和菌株。

5. 携带特殊的遗传标记 质粒 DNA 上必须携带一个或多个遗传标记基因,让宿主细胞添加了一些新的性状,如抗性基因,方便对重组子进行筛选。

(二) 理想质粒载体应具备的条件

天然存在的野生型质粒由于相对分子质量大、拷贝数低、单一酶切位点少、遗传标记缺乏等缺陷,因而不适合用作基因工程的载体,必须对之进行改造构建理想的质粒载体。

(1) 缩短 DNA 分子长度,尽可能地切去非必需片段,提高导入效率,增加载体装载量。

(2) 改严紧型复制子为松弛型复制子,保证受体细胞中的高拷贝数。

(3) 具有一个以上的选择标记基因,形成重组质粒后,至少还要有一个强的选择标记。

(4) 具有允许外源 DNA 片段克隆的位点,插入外源片段不影响质粒的复制功能。

(5) 能够导入寄主细胞,具备转化的功能。

(6) 操作简单方便,可根据需要加装其他元件,构建不同用途的质粒载体。

三、常见载体的介绍

(一) 克隆载体

1. pBR322 质粒 pBR322 是最早且应用最广泛的大肠埃希菌克隆载体之一,相对分子质量较小,大小为 4361bp,方便插入目的基因;复制子为松弛型复制子,保证了该质粒在宿主细胞中的高拷贝数,在加入蛋白质抑制剂条件下可达到 1000~3000 个;具有两种抗生素抗性基因——氨苄西林抗性基因 *Amp^r* 和四环素抗性基因 *Ter^r*,可供重组子的抗性筛选。2 个抗性基因都含有单一的酶切位点可以插入 DNA, *Amp^r* 基因内可被 *Pst* I、*Pvu* I、*Sac* I 切开, *Ter^r* 基因可被 *Bam* H I、*Hind* III 切开,通过插入失活筛选重组子。此载体不能在自然界的宿主细胞中转移,具有很好的安全性。pBR322 质粒含有 *Ter^r* 和 *Amp^r* 两个抗生素抗性基因,外源基因可插入其中一个基因内导致其失活,用两种抗生素平板进行正负选择筛选重组子。在不进行插入失活抗性基因的相应抗生素平板上重组子可以生长,非重组子不能生长,可将重组子直接从平板上挑出来,即正选择。在插入失活抗性基因的相应抗生素平板上转化子中的非重组子(未插入外源基因)可以生长,重组子(插入外源基因)不能生长,应与第一种抗生素板进行对照并在其上挑出重组子的菌落,即负选择。

2. pUC18 质粒 pUC18 来自于 pBR322, 只保留了 pBR322 载体的复制起点和 Amp^r 抗性基因, 大小为 2686bp。与 pBR322 相比, 目的基因不插入 Amp^r 基因序列, 而插入 lacZ 基因内的多克隆位点上, 通常应用于重组 DNA 分子克隆和 DNA 测序。由于 pUC18 载体带有氨苄西林抗性基因 Amp^r, 因此可在氨苄西林平板上存活, 即抗性筛选。pUC18 上带有 β -半乳糖苷酶基因 (lacZ) 的调控序列和 β -半乳糖苷酶 N 端 146 个氨基酸的编码序列, 宿主细胞 DH5 α 带有 β -半乳糖苷酶 C 端部分序列的编码信息, 当 pUC18 空载体在正常情况下同感受态菌株融合后, 互补表达有活性的 β -半乳糖苷酶, 称为 α -互补现象, 在呈色底物 X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚- β -半乳糖苷酶) 和诱导物 IPTG (异丙基- β -D-硫代半乳糖苷) 的存在下, 互补产物菌落呈现蓝色。当有外源片段插入载体 lacZ 基因内的多克隆位点后, β -半乳糖苷酶 N 端序列的编码被破坏, 细菌不能产生 β -半乳糖苷酶活性, 不互补产物菌落呈白色, 很容易鉴别, 这种筛选方法称为 α -互补现象筛选, 又称蓝白斑筛选。

3. λ 噬菌体载体 λ 噬菌体是感染大肠埃希菌的溶原性噬菌体, 在感染宿主后可进入溶原状态, 也可进入裂解循环。 λ 噬菌体为双链 DNA 线形性分子, 其两端的 5'端为 12 个碱基的黏性末端 (又叫 cos), 序列为 5'-GGGCGGCGACCT-3', 是感染大肠埃希菌所必需的。当 λ 噬菌体 DNA 进入宿主细胞后, 黏性末端互补配对形成环状 DNA 分子, 在宿主细胞的 DNA 连接酶和促旋酶作用下, 形成封闭的环状 DNA 分子, 再进行转录。此时, λ 噬菌体可选择进入溶菌状态, 大量复制并组装成子代 λ 噬菌体颗粒, 经过 40~45min 的生长循环, 宿主细胞裂解, 每个细胞约释放出 100 个感染性噬菌体颗粒, 或进入溶原状态, 将 λ 噬菌体基因组 DNA 通过位点专一性重组整合到宿主的染色体 DNA 中, 并随宿主的繁殖传给子代细胞。因此说 λ 噬菌体具有高效的感染性。

λ 噬菌体载体属于克隆载体, 主要用于构建 cDNA 文库和基因组文库并从中筛选目标基因, 也可用于亚克隆大容量载体 (如考斯质粒) 中增殖的外源 DNA 片段。 λ 噬菌体载体克隆外源 DNA 片段的原理与质粒载体的工作原理相类似, 载体和外源 DNA 片段经过酶切以后, 外源 DNA 片段插入到载体的适当位置, 或置换载体的填充片段。这种连接后的重组 DNA 保留增殖性能, 但由于相对分子质量太大, 不能像重组质粒 DNA 那样可通过转化方法进入大肠埃希菌。通过提取 λ 噬菌体的蛋白质外壳, 可在体外对重组噬菌体 DNA 进行包装, 形成噬菌体颗粒。这样的噬菌体颗粒保留对大肠埃希菌的感染能力, 可将被包装的重组噬菌体 DNA 注射到宿主菌中。通过裂解生长, 可增殖重组噬菌体。在构建基因文库时, 不同的重组噬菌体 DNA 经过裂解生长过程最终形成大量的噬菌斑。这些噬菌斑的集合, 就构成了基因文库。因此, 用 λ 噬菌体载体构建基因文库时, 文库是以噬菌斑的形式存在的, 而质粒载体构建的文库是以菌落的形式存在的。

(二) 原核表达载体

表达载体是指携带目的基因, 并使所载目的基因能够复制、转录和翻译的载体, 即目的基因在宿主细胞中得以表达的载体。

1. pBAD 载体 也来自于 pBR322, 只保留了 pBR322 载体的复制起点和 Amp^r 位点, 大小为 4.1kb。该表达质粒含有阿拉伯糖诱导型操纵子 (arabinose, araBAD) 的启动子 pBAD, 受正负调控子基因 araC 和 cAMP-CRP 协同调控, 是具有紧密调控功能和高水平表达外源蛋白质的原核表达载体。在缺乏葡萄糖时, 阿拉伯糖正向调控基因的表达, 阿拉伯糖和 araC 结合, araC 以同源二聚体的形式分别结合到 araO1 和 araI 区, cAMP-CRP 结合到 CRP 位