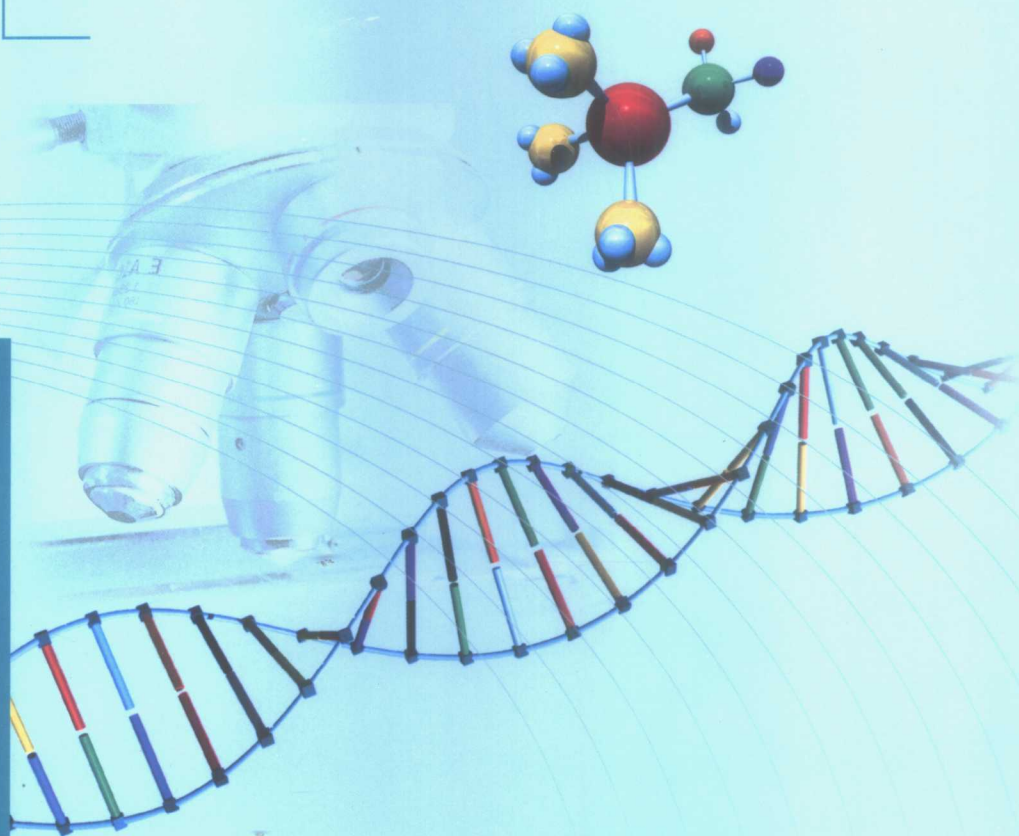


高等院校生命科学与技术实验教材

分子生物学 实验指导

FENZI SHENGWUXUE
SHIYAN ZHIDAO

刘进元 等 编著



清华大学出版社

高等院校生命科学与技术实验教材

分子生物学实验指导

刘进元 常智杰 赵广荣 等 编著
李 骥 武耀廷

清华大学出版社

(京)新登字 158 号

内 容 提 要

为了反映最新分子生物学技术,适应研究型创新人才的培养要求,本书是在近十年分子生物学实验教学的基础上,特为本科生的分子生物学实验编写的。书中选编了 15 个基础实验,内容包括核酸分离与定量、分子杂交、转化与基因表达、PCR 及其定量分析等。每个实验除了概述、实验步骤外,还有结果分析及问题讨论。在结果分析部分,编者将自己近年来研究的相关结果组合进去并加以说明,供读者在准确判断结果时参考。书末还附有附录,内容包括常用试剂及溶液的配制、实验室安全、常用数据、分子生物学常用软件及数据库介绍等。

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学实验指导/刘进元等编著. —北京:清华大学出版社,2002
ISBN 7-302-05774-5

I. 分… II. 刘… III. 分子生物学—实验—高等学校—教学参考资料 IV. Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 062482 号

出 版 者: 清华大学出版社(北京清华大学学研大厦,邮编 100084)

<http://www.tup.tsinghua.edu.cn>

责任编辑: 罗 健

版式设计: 韩爱君

印 刷 者: 北京市清华园胶印厂

发 行 者: 新华书店总店北京发行所

开 本: 787×1092 1/16 **印张:** 14.5 **字数:** 336 千字

版 次: 2002 年 11 月第 1 版 2002 年 11 月第 1 次印刷

书 号: ISBN 7-302-05774-5/Q·25

印 数: 0001~4000

定 价: 24.00 元

前 言

随着生命科学的发展,分子生物学技术已渗透到生命科学的各个研究领域,因而分子生物学实验技术已成为生命科学及其相关学科教学与科研不可缺少的部分。近年来,我国生命科学取得了长足的发展,但与世界先进水平相比还存在相当的差距,要在较短的时间内迎头赶上,高等学校肩负着培养研究型创新人才的重任。为了适应分子生物学技术的发展,落实培养研究型创新人才的目标,我们在原有分子生物学实验讲义的基础上,补充更新了原有实验内容,增加了一些反映最新进展的实验技术,编写成本分子生物学基础实验技术教材,供生命科学各专业的本科生和研究生选用。

本教材内容实用可行,每个实验除了概述、实验步骤外,还有结果分析及问题讨论。在结果分析部分,编者将自己近年来实验所获图片组合进去并加以说明,会对读者正确理解实验结果有所帮助。在问题讨论部分主要对实验原理或实验技巧作了进一步的阐述。书末的附录包括常用试剂及溶液的配制、实验室安全、常用数据、分子生物学常用软件及数据库介绍等,供需要这些知识的读者参考。

在编写过程中,我们参考了已出版的国内外分子生物学实验技术方面的优秀书籍,直接引用在本实验室做出重要贡献的研究生们的实验结果图片。这里谨向世界上所有为本书积累了原始素材的学者们致以深深的谢意。参加本书编写的除了刘进元、常智杰、赵广荣、李骥、武耀廷外,还有杨晓东、冯海、李英姿等人。在编辑出版过程中,清华大学出版社的张秋玲、罗健做了大量的工作,在此一并致谢。本书的编者大多是活跃在科研第一线的年轻学者,由于经验不足,书中难免有不足之处,敬请广大读者指正,以便在再版时更正。

编 者

2002年1月于清华园

目 录

实验 1	质粒 DNA 的提取、酶切与电泳鉴定	1
实验 2	重组 DNA 分子的构建、筛选与鉴定	11
实验 3	大肠杆菌感受态细胞的制备及质粒 DNA 分子导入原核细胞	22
实验 4	聚合酶链式反应扩增 DNA 片段	30
实验 5	DNA 序列测定	39
实验 6	从哺乳动物细胞中提取核 DNA	49
实验 7	植物总 RNA 的提取及其电泳鉴定	57
实验 8	DNA 的分子杂交	67
实验 9	RNA 的分子杂交	79
实验 10	蛋白质的分子杂交	85
实验 11	同步 PCR 定量核酸分子	95
实验 12	外源基因转染哺乳动物细胞	102
实验 13	真核基因在原核细胞中的表达	112
实验 14	烟草叶盘与农杆菌共培养获得转基因烟草植株	128
实验 15	用 mRNA 的差异显示法分离特异表达的基因片段	142
附录 1	分子生物学常用软件及数据库介绍	155
附录 2	常用试剂、溶液及缓冲液的配制	203
附录 3	常用培养基和抗生素的配制	212
附录 4	生物样品的贮存、邮送与实验室安全	216
附录 5	常用生物学数据	223

实验 1

质粒 DNA 的提取、酶切与电泳鉴定

1. 概述

DNA 是由两条长链构成的生物大分子,其组成单位是核苷酸。核苷酸由碱基、戊糖和磷酸构成。DNA 分子十分巨大,如人基因组包含有 3×10^9 碱基对,最小的天然 DNA 分子也有数千碱基对。生物信息绝大部分都储存在 DNA 分子中,这些信息以碱基或者说核苷酸的不同排列顺序编码在 DNA 分子上,碱基排列顺序变了,它的生物学含义也就不同了。

DNA 的水溶液是很粘稠的,加热能使溶液粘度大大降低,这说明 DNA 分子具有一定结构。DNA 分子应该具有怎样的结构才能使它的溶液具有这种流体力学性质呢?同时 DNA 又是遗传信息的载体,那么 DNA 应该具有怎样的结构才能成为基因的载体呢?1953 年 Watson 和 Crick 提出了 DNA 双螺旋模型,这个模型不仅解释了当时所知道的 DNA 的一切理化性质,而且将结构与功能联系起来,从而奠定了分子生物学的基础。双螺旋的基本特征是脱氧核糖和磷酸基相互间隔连接构成 DNA 的主链。两条主链处于螺旋的外侧,碱基位于螺旋的内部(参见图 1.1)。维持双螺旋的力是由氢键和疏水键提供的,凡是破坏氢键和疏水键的因素都能导致双螺旋的破坏,如加热、极端的 pH、有机溶剂、尿素、酰胺试剂等。DNA 双螺旋的解链称为变性,DNA 分子变性之后就成为无规线团,表现为溶液的粘度大为降低,沉降速度增加,浮力密度上升,紫外吸收值升高。因此可以利用这些性质跟踪 DNA 的变性过程。

按照细胞的结构和遗传物质在细胞内的分布,可将生命有机体划分为原核生物和真核生物两大类。真核生物的遗传物质 DNA 集中在有核膜包围着的细胞核中,并与某些特殊的蛋白质相结合构成一种细密的染色体结构。而原核生物没有真正的细胞核,遗传物质 DNA 以裸露的分子存在于细胞中,有时虽然相对集中形成类核体,但无核膜包围,也不形成染色体结构,但习惯上还是把原核生物的核酸分子称为染色体。

在染色体外能自主复制且稳定遗传的遗传因子称为质粒,大小在 1 kb~200 kb 之间,是双链闭合环状结构的 DNA 分子。在细菌、放线菌、真菌以及一些动植物细胞中都

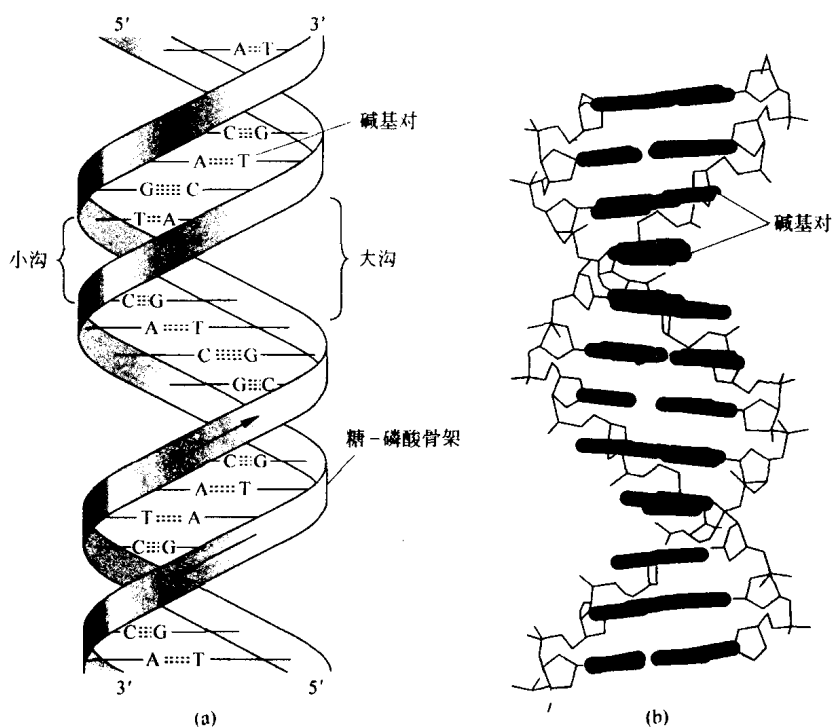
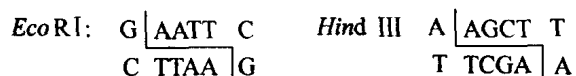


图 1.1 DNA 双螺旋结构

(a) 结构简图; (b) 用粗线条表示碱基对堆积的详细结构图 (Turner, 2000)

发现有质粒存在,其中细菌质粒存在最为普遍,研究得较为深入,在基因工程中常用作基因载体。

通过切割相邻的两个核苷酸残基之间的磷酸二酯键,从而导致核酸分子多核苷酸链发生水解断裂的蛋白酶称作核酸酶,是 DNA 重组技术得以创立的工具酶。其中能识别双链 DNA 分子中的某一特定核苷酸序列,并由此切割 DNA 双链结构的酶称为限制性内切核酸酶,也称为限制性内切酶。主要是从原核生物中分离纯化出来的,目前已发现的限制性内切酶有数百种。例如 *EcoR* I 和 *Hind* III 是常用的 2 种限制性内切酶,其识别序列和切口是:



如上所示,GAATTC 和 AAGCTT 核苷酸序列表示识别位点,线条表示切口。某种限制性内切酶对特定环状质粒 DNA 有多少酶切位点,就能产生多少个酶解片段,酶切后的片段可用琼脂糖凝胶电泳来分离鉴定,进而制作 DNA 分子的限制性酶切图谱。

电泳是分离和纯化 DNA 片段的常用技术。把 DNA 样品加入一块包含电解质的多孔支持介质的样品孔中,并置于静电场中, DNA 分子将向阳极移动,这是因为 DNA 分子的双螺旋骨架两侧带有含负电荷的磷酸根残基。当 DNA 长度增加时,来自电场的驱动力和来自凝胶的阻力之间的比率就会降低,不同长度的 DNA 片段就会表现出不同的迁移率,因而可依据 DNA 分子的大小来使其分离。该过程可以通过示踪染料或相对分子

质量标准参照物和样品一起进行电泳而得到检测。相对分子质量标准参照物可以提供—个用于确定 DNA 片段大小的标准。依据制备凝胶的材料,凝胶电泳可被分成琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳。相比之下琼脂糖凝胶在分离度上比聚丙烯酰胺差一些,而在分离范围上优于聚丙烯酰胺。一般琼脂糖凝胶适用于分离大小在 0.2 kb~50 kb 范围内的 DNA 片段。

本实验将介绍碱变性法提纯质粒 DNA 的操作技术,分光光度计定量 DNA,限制性内切酶解,琼脂糖凝胶的制备以及琼脂糖凝胶电泳在 DNA 片段分离中的应用等方法。这些均是分子生物学实验中的常用技术。

2. 内容提要

通过质粒 DNA 的提取、浓度测定、质粒 DNA 限制性内切酶酶解和琼脂糖凝胶电泳分离鉴定 DNA 片段的实验,掌握用碱变性法提取质粒 DNA、用分光光度计测定 DNA 含量、用限制性内切酶酶解的质粒 DNA 以及用琼脂糖凝胶电泳分离鉴定质粒 DNA 的方法。

3. 时间表

步 骤	所需时间
将含有质粒的大肠杆菌进行液体培养	8 h~16 h
碱变性法提取质粒 DNA	2 h
分光光度计法测定 DNA 浓度	30 min
质粒 DNA 限制性内切酶酶解	3 h~5 h
琼脂糖凝胶电泳分离鉴定 DNA 片段	2 h

4. 仪器、材料和试剂

1) 仪器及耗材

微量移液器、微量离心管(又称 Eppendorf 管)、常用玻璃器皿、台式高速离心机、分光光度计、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统等。

2) 材料

含有质粒 pBluescript 或 pGEM-3Zf 的大肠杆菌 DH5 α 、自提质粒 pBluescript 或市售标准质粒 pGEM-3Zf、 λ DNA/*Hind* III 标准 DNA 片段、*Eco*R I、*Hind* III 限制酶、琼脂糖等。

3) 试剂及溶液

(1) 用于碱法提取质粒 DNA 的溶液

溶液 1(GET 缓冲液): 50 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L EDTA, 25 mmol/L Tris · HCl pH 8.0, 用前加溶菌酶 4 mg/mL。

溶液 2(变性液): 0.2 mol/L NaOH, 1% SDS。

溶液 3(乙酸钾溶液): 60 mL 的 5 mol/L KAc, 11.5 mL 冰醋酸, 28.5 mL H₂O。

(2) 缓冲液

EcoR I 酶解缓冲液 (10×): 1 mol/L pH 7.5 Tris · HCl, 0.5 mol/L NaCl, 0.1 mol/L MgCl₂。

Hind III 酶解缓冲液 (10×): 0.1 mol/L pH 7.4 Tris · HCl, 1 mol/L NaCl, 0.07 mol/L MgCl₂。

TBE 缓冲液 (10×): 称取 Tris 108 g, 硼酸 55 g, 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 40 mL, 用 H₂O 定容到 1000 mL, 高压灭菌作为 10×贮液, 稀释 10 倍后作为工作液使用。

TE 缓冲液: 10 mmol/L Tris · HCl, 1 mmol/L EDTA pH 8.0, 其中含有 RNase 20 μg/mL。

(3) 上样液及其他试剂

上样液 (6×): 0.25% 溴酚蓝, 质量浓度为 40% 蔗糖水溶液。

溴化乙锭染色液 (10 mg/mL): 在 20 mL H₂O 中溶解 0.2 g 溴化乙锭, 混匀后于 4℃ 避光保存。

异丙醇, 70% 乙醇等。

5. 操作步骤

1) 质粒 DNA 的提取(碱法)

- ① 培养细菌: 将带有质粒 pBluescript(或 pGEM-3Zf) 的大肠杆菌单菌落, 接种到含有羧苄青霉素 (50 μg/mL) 的 LB 液体培养基 2 mL~5 mL 中, 37℃ 振荡培养 8 h~16 h。
- ② 取液体培养液 1.5 mL 于 Eppendorf 管中(剩余的可保存于 4℃ 备用), 转速 10000 r/min 离心 1 min, 去掉上清液, 加入 100 μL GET 溶液, 充分混匀后在室温下放置 5 min。
- ③ 加入 200 μL 新配制的变性液, 颠倒 2 次~3 次使之混匀, 冰上放置 5 min。
- ④ 加入 150 μL 冰冷的乙酸钾溶液 (pH 4.8), 颠倒数次混匀后, 冰上放置 5 min。
- ⑤ 用台式高速离心机, 转速为 10000 r/min 离心 5 min, 将上清液移入另一干净离心管, 并加等体积异丙醇混匀, 室温放置 5 min 后, 12000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。
- ⑥ 沉淀用 70% 乙醇清洗一次, 离心管倒置于吸水纸上, 除尽乙醇, 室温自然干燥。
- ⑦ 加入 20 μL 含有 RNase A 20 μg/mL 的 TE 缓冲液或灭菌蒸馏水溶解提取物, 室温放置 30 min 以上, 使 DNA 充分溶解。
- ⑧ -20℃ 保存备用。

2) 用试剂盒提取质粒

(采用 Promega 公司 Wizard™ Plus Minipreps DNA 纯化系统)

- ① 取 1.5 mL 细菌培养液于离心管中, 1000 r/min 离心 2 min, 弃上清液(尽可能完全)。
- ② 加入 200 μ L 细胞悬浮液(cell resuspension solution), 振荡使细胞完全重悬。
- ③ 加入 200 μ L 细胞裂解液(cell lysis solution), 颠倒 4 次混合, 此时溶液应变澄清。
- ④ 加入 200 μ L 中和液(neutralization solution), 颠倒 4 次混合。
- ⑤ 10000 r/min 离心 5 min。
- ⑥ 取出 2.5 mL 注射器的活塞, 将注射器套在柱子上, 取 1 mL 树脂(用前先混匀)加入到注射器中。
- ⑦ 取第 5 步离心后的上清液, 加入到已含有树脂的注射器中, 混匀。
- ⑧ 插上活塞, 缓慢推入底部, 将溶液挤出, 弃掉。
- ⑨ 将注射器与柱子分开, 从注射器中拔出活塞后, 重新将注射器套在柱子上, 加入 2 mL 洗柱液(column wash solution, 已加入乙醇), 插入活塞缓慢推至底部。
- ⑩ 将柱子从注射器上取下插入 1.5 mL 离心管中, 10000 r/min 离心 2 min, 以去掉残留液体。
- ⑪ 加入 50 μ L 灭菌水, 室温放置 1 min。
- ⑫ 10000 r/min 离心 20 s, 收集洗下的 DNA 溶液。
- ⑬ 弃去柱子, DNA 溶液 -20°C 保存备用。

3) 用分光光度计测定质粒 DNA 的浓度

- ① 用 TE 或蒸馏水将待测 DNA 样品做 1 : 20 或更高倍数的稀释。
- ② 用 TE 或蒸馏水作为空白, 在波长为 260 nm, 280 nm 及 310 nm 处调节分光光度计读数至零。
- ③ 加入 DNA 稀释液于 3 波长处读取 OD 值。
- ④ 记录 OD 值, 通过计算确定 DNA 浓度或纯度, 公式如下:
对于 ssDNA: $[\text{ssDNA}] = 33 \times (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{310}) \times \text{稀释倍数}$
对于 dsDNA: $[\text{dsDNA}] = 50 \times (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{310}) \times \text{稀释倍数}$
对于 ssRNA: $[\text{ssRNA}] = 40 \times (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{310}) \times \text{稀释倍数}$
以上浓度单位为 $\mu\text{g/mL}$ 。

4) 质粒 DNA 的酶解

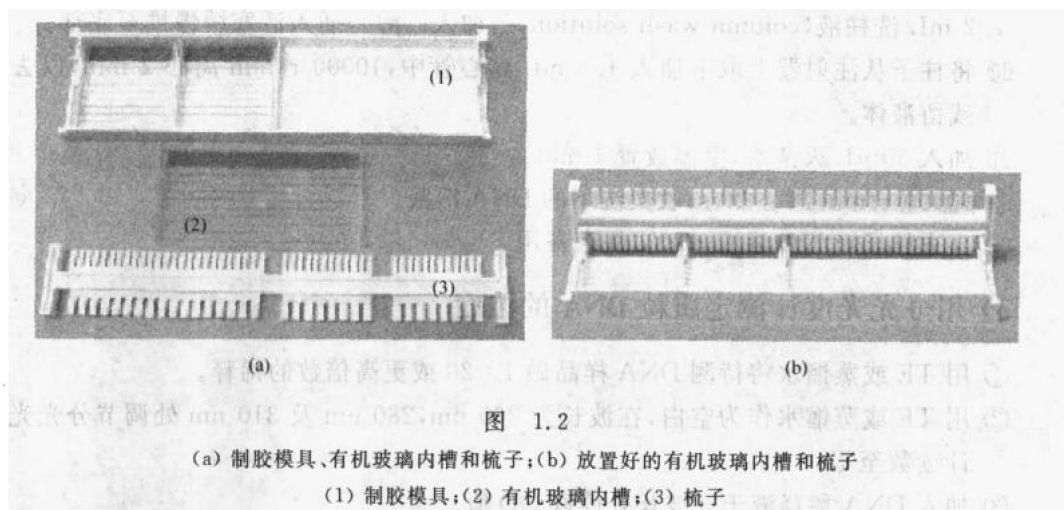
将上一实验提纯并溶于 20 μ L TE 的质粒 DNA 以及标准 DNA 用于酶切, 按下表分别加入所需试剂。

μL			
质粒	样品	酶解缓冲液	酶液
自提质粒	16	2	2
标准质粒	16	2	2

加样后小心混匀,置于 37℃ 水浴中酶解半小时(有时可以长一点,数小时或过夜),然后向管中加入上样液 4 μL 后进行电泳分析。

5) 琼脂糖凝胶的制备

- ① 琼脂糖凝胶液的制备:称取 0.8 g 琼脂糖,置于三角瓶中,加入 100 mL TBE 工作液,瓶口倒扣一个小烧杯或小平皿,将该三角瓶置于微波炉加热直至琼脂溶解。此外也可用沸水浴或高压锅加热溶解琼脂糖。
- ② 胶板的制备:将有机玻璃内槽洗净、晾干,放入制胶模具中(图 1.2(a)),并在固定位置插上梳子(图 1.2(b))。将冷却至 65℃ 左右的琼脂糖凝胶液轻轻摇匀,小心地倒在有机玻璃内槽上,使胶液缓慢展开,直到在整个有机玻璃板表面形成均匀的胶层。室温下静置 30 min 左右,凝固完全后,轻轻拔出梳子,这时在胶板上即形成相互隔开的上样孔。将铺好胶的有机玻璃内槽放入含有电泳缓冲液 TBE 或 TAE 的电泳槽中备用。



6) 加样

用微量加样器将上述样品分别加入胶板的样品孔内(图 1.3)。每加完一个样品,换一个加样头。加样时应防止碰坏样品孔周围的凝胶面,本实验样品孔容量约 10 μL 左右。

7) 电泳

加完样后的凝胶板可以通电进行电泳。建议在 80 V~100 V 的电压或 20 mA 下电泳。当溴酚蓝移动到距离胶板下沿约 1 cm 处时,停止电泳。在低电压条件下,线形 DNA 片段的迁移速度与电压成比例关系。但在电场强度增加时,不同相对分子质量的 DNA 片段泳动度的增加是有差别的。随着电压的增加,琼脂糖凝胶的有效分离范围会随之减小。为了获得

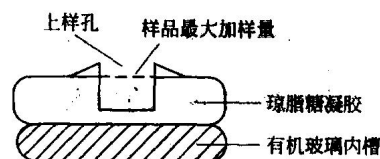


图 1.3 凝胶的上样小孔

电泳分离 DNA 片段的最大分辨率, 电场强度不应高于 5 V/cm。电泳温度视需要而定, 对大分子 DNA 的分离以低温为好, 也可在室温下进行。在琼脂糖凝胶浓度低于 0.5% 时, 由于胶太稀, 最好在 4℃ 进行电泳。

8) 染色、观察和拍照

将电泳完成后的凝胶浸在含有溴化乙啶(终浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$)的电泳缓冲液中, 染色约 20 min, 在紫外灯 (254 nm 或 302 nm 波长) 下观察染色后的凝胶。DNA 存在处显示出红色的荧光条带。一般紫外光激发 30 s 左右, 肉眼可观察到清晰的条带。在紫外灯下观察时, 应戴上防护眼镜或有机玻璃防护面罩, 避免眼睛遭受强紫外光损伤。采用凝胶成像系统拍摄电泳带谱。

6. 结果分析

图 1.4 和图 1.5 分别显示了自提质粒和质粒酶切后的电泳带谱。

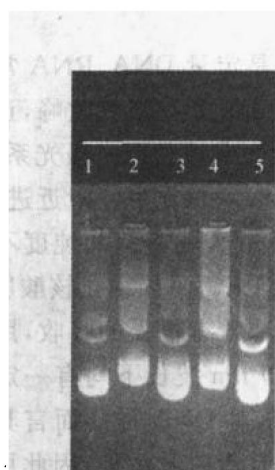


图 1.4 质粒电泳图

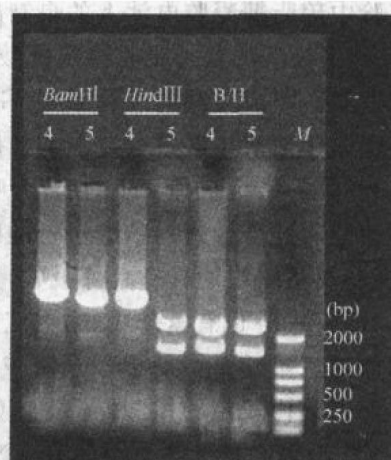


图 1.5 质粒酶切鉴定结果

图 1.4 所示是用碱裂解法提取质粒(1 号~5 号), 通过琼脂糖(1%)凝胶电泳可以初步检查质粒的大小及浓度。一般情况下, 提取的质粒为三条带。但在优化条件下, 如冰浴或试剂盒提取时可以只出现一条带或主要出现一条带, 即超螺旋带。如图 1.4 所示超螺旋带最亮, 说明质粒提取质量较好。同时也可根据移动距离来初步判断质粒的大小。图中 2 号和 4 号质粒大小相近, 而 1 号、3 号和 5 号大小相似。可进一步利用酶切法来较准确地鉴定质粒大小(电泳图由冯海提供)。

图 1.5 是用酶切法对 4 号和 5 号质粒进行的鉴定结果。*Bam*H I 和 *Hind*III 单酶切和双酶切结果如图 1.5 所示, *Bam*H I 酶切结果相近, 但 *Hind*III 酶切结果不同, 所以二者为不同质粒。双酶切的结果虽然均为两条带, 但大小略有不同。*M* 表示标准 DNA 片段带谱, 所示数字的单位为 bp(电泳图由冯海提供)。

7. 问题讨论

1) 提取质粒 DNA 有多种方法,所有这些方法都包括 3 个基本步骤:培养细菌使质粒扩增;收集和裂解细菌;分离和纯化质粒 DNA。可采用溶菌酶破坏菌体细胞壁,十二烷基硫酸钠(SDS)可使细胞壁裂解。经溶菌酶和 SDS 处理后,在碱性条件下细菌染色体 DNA 和质粒 DNA 都变性,而当加入乙酸钾在中性条件下,巨大的染色体 DNA 分子难以复性,而质粒 DNA 很快得以复性,离心时染色体 DNA 与细胞碎片一起被沉淀出来,而质粒 DNA 则留在上清液中,用异丙醇或乙醇沉淀后洗涤,可得到质粒 DNA。

2) 在细胞内质粒 DNA 是共价闭环 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA),常以超螺旋形式存在。如果两条链中有一条链发生一处或多处缺刻,分子就能旋转而消除链的张力,这种松弛型的分子叫作开环 DNA (open circular DNA, ocDNA);若两条链在同一处或其附近断裂,则变成性状 DNA 分子。在电泳时,同一质粒的电泳速度因 DNA 的构型不同而异,其次序为:cccDNA>直线 DNA>ocDNA,因此在本次实验中琼脂糖凝胶电泳上的自制质粒呈现 3 条带。

3) 利用核酸的紫外吸收测定核酸浓度的光学定量法,是定量 DNA、RNA 常用的且快速的方法。组成核酸的 5 种碱基(G, A, T, C, U)均在 260 nm 处有强吸收峰,正是利用这一强吸收峰而对核酸进行定量的。碱基的种类不同,最大吸收波长以及吸光系数不同,即使是相同碱基,也会随 pH 的变化,吸光系数也会产生变化,一般在中性附近进行测定。采用本法能对纯度较好的核酸进行准确定量,而对来自动物或大肠杆菌的纯度不高的样品,因为糖及蛋白质均具有紫外吸收,常会产生定量不准的结果。另外纯化核酸所用试剂如苯酚、EDTA 等也有紫外吸收,在定量时需注意。特别是苯酚有很强的吸收,用苯酚处理过的样品定量时要特别小心。核酸样品在 260 nm 和 280 nm 波长下均有一定的光吸收值。如果是比较纯的核酸样品,其 OD_{260}/OD_{280} 是固定的,对 DNA 样品而言其值大约为 1.8~2.2,而高于 2.2 则可能有 RNA 污染,低于 1.8 则有蛋白质污染,因此可以用测定样品 OD_{260}/OD_{280} 的方法来分析核酸样品的纯度。核酸样品 OD_{260} 值的大小也反映着核酸浓度的大小。对于较纯的样品, $OD_{260}=1$,相当于 50 $\mu\text{g/mL}$ 双链 DNA,40 $\mu\text{g/mL}$ 单链 DNA 或 RNA,33 $\mu\text{g/mL}$ 单链寡核苷酸,因此常用测 OD_{260} 值的方法来测定核酸的浓度。

4) 琼脂糖是一种从海藻中提取出来的线状高聚物,当熔化再凝固后就会形成固体基质,其密度取决于溶液中所含琼脂糖的量。带负电荷的核酸就可以在这种基质中,于电场的作用下向阳极移动。核酸在琼脂糖基质中的迁移率取决于下列参数:①DNA 的分子大小;②琼脂糖的浓度;③DNA 的构象;④所加电压;⑤电场方向;⑥碱基组成与温度;⑦嵌入的染料;⑧电泳缓冲液的组成等。琼脂糖浓度对核酸迁移率的影响是:一定大小的 DNA 片段,在不同浓度的琼脂糖凝胶中的迁移率不同;在一定浓度的琼脂糖凝胶能够分辨的核酸片段大小范围内,核酸片段的迁移率与其相对分子质量大小相反。

5) 溴化乙啶的化学名称是 3,8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶溴盐 (3,8-diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridinium bromide,简称 Ethidium Bromide 或 EB 或 EtBr),其结

构式如图 1.6(a)所示。由于溴化乙锭分子插入,在紫外光的照射下,琼脂糖凝胶电泳中 DNA 的条带呈现出桔黄色的荧光,便于检测。EB 能插入 DNA 分子中的碱基对之间(图 1.6(b)),完成与 DNA 结合(超螺旋 DNA 与 EB 结合能力小于双链闭环,而双链闭环 DNA 与 EB 结合能力小于线状双链 DNA),DNA 所吸收的 260 nm 的紫外光(UV)传递给 EB,或者结合的 EB 本身在 300 nm 和 360 nm 吸收的射线均在可见光谱的红橙区,以 590 nm 波长发射出来。EB 染色具有以下特点:①操作简便快速,室温下染色 15 min~20 min;②不会使核酸断裂;③灵敏度高,10 ng 或更少的 DNA 即可检出;④可以加到样品中,随时用紫外吸收追踪检查。但应该特别注意的是,溴化乙锭是诱变剂,配制和使用时应戴乳胶(或一次性塑料)手套,并且不要将该染色液洒在桌面或地面上。凡是沾污溴化乙锭的器皿或物品,必须经特殊处理后,再进行清洗或弃去。

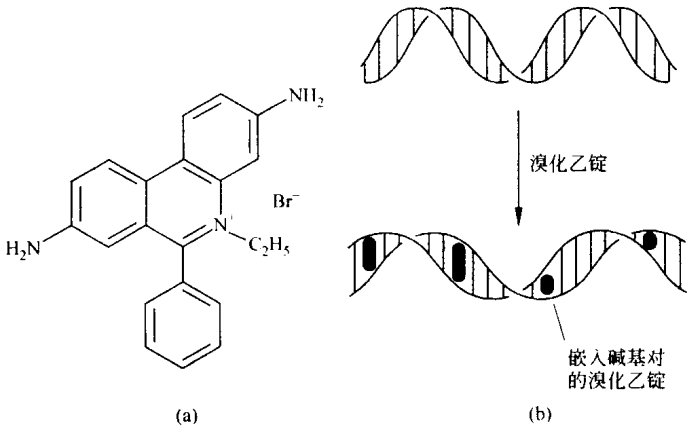


图 1.6 溴化乙锭染料分子的化学结构及其对 DNA 分子的插入作用(Turner,2000)

6) 限制性内切酶是在细菌对噬菌体的限制和修饰现象中发现的。细菌细胞内同时

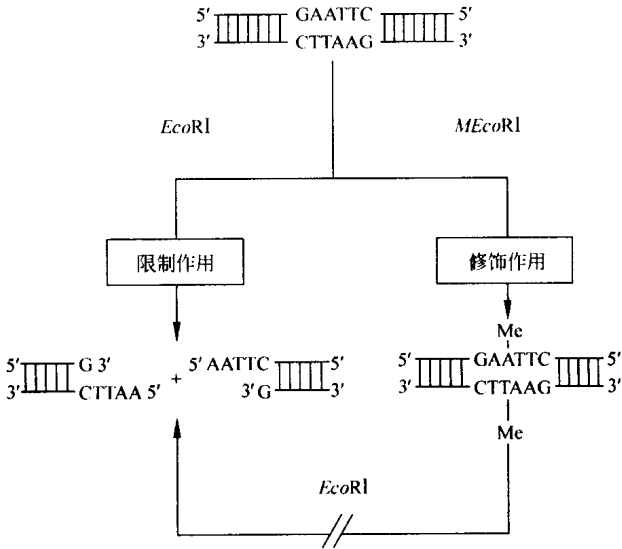


图 1.7 核酸内切限制酶 *EcoRI* 及其修饰的甲基化酶 *MEcoRI* 的限制与修饰作用

存在一对酶即限制性内切酶和 DNA 甲基化酶。它们对 DNA 底物有相同的识别顺序,但生物功能却相反,前者是限制作用,后者是修饰作用。由于细胞内存在 DNA 甲基化酶,它能在限制性内切酶所识别的若干碱基上甲基化,这就避免了限制性内切酶对细胞自身 DNA 的切割破坏。对感染的外来噬菌体 DNA,因无甲基化就会被切割破坏。图 1.7 表示 *EcoR* I 及其甲基化酶 *MEcoR* I 的限制与修饰作用。*EcoR* I 识别序列经 *MEcoR* I 甲基化之后,就再不能被 *EcoR* I 所切割。可见限制性内切酶是细菌细胞的卫士,它与 DNA 甲基化酶一起构成了保护自己,抵抗外源入侵的 DNA 的防御机制。

参考文献

- Burton Z F, Kaguni J M. 1997. Experiments in molecular biology; biochemical applications. San Diego: Academic Press
- Jeanne Perry. 2001. Techniques in molecular and cell biology. UCLA: Academic Publishing Service
- Li Yongming, Zhao Yuqi. 1995. Practical protocols in molecular biology. Beijing: Science Press
- Robert F Weaver. 2002. Molecular Biology. Second Edition. New York: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Turner P C, McLennan A G, Bates A D, White M R H. 2000. Instant notes in molecular biology. Second Edition. UK: BIOS Scientific Publishers limited
- 郝福英,朱玉贤等编. 1998. 分子生物学实验技术. 北京: 北京大学出版社
- 刘进元,李文君,王薛林等译. 2001. 分子生物学. 第二版. 北京: 科学出版社
- 刘进元,吴庆余等译. 2000. 植物分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社
- 吴乃虎. 1998. 基因工程原理. 第二版(上册). 北京: 科学出版社

(刘进元 李英姿)



重组 DNA 分子的构建、筛选与鉴定

1. 概述

DNA 重组技术是 20 世纪 70 年代发展起来的,是 DNA 克隆技术中的一项关键技术。所谓 DNA 重组,就是指把外源目的基因“装进”载体这一过程,即 DNA 的重新组合。这种重新组合的 DNA 是由两种不同来源的 DNA 组合而成,所以称作重组体或嵌合 DNA。

DNA 克隆中不可缺少的基本元件之一是载体,目的基因片段只有与载体片段共价结合形成重组体后,进入适合的宿主细胞内才能进行复制。作为载体 DNA 分子,应具备下列基本特性:①必须具有能够在特定宿主细胞中独立自我复制的复制起始点,只有这样,外源基因装入该载体后,才能在载体复制起始点的驱动下一起复制,达到无性繁殖的目的;②应具有容易检测的遗传标记(选择标记包括抗药性基因、酶基因、营养缺陷型及形成噬菌斑的能力等),用以区分阳性与阴性重组分子;③应具有多个限制性内切酶的单一识别点即多克隆位点,限制性内切酶的切点最好是位于检测表型的遗传标记基因之内,这样目的基因是否连进载体就可以通过其表型的改变与否而得知,便于筛选重组分子;④为了便于 DNA 体外操作,载体分子不宜过大,而且载体 DNA 应与宿主细胞核 DNA 容易分开以便于提纯。

DNA 重组本质上是将不同来源的 DNA 片段连接在一起的过程,是一个酶促生化反应。在体外将不同来源的 DNA 片段连接组成新的杂种 DNA 分子虽有粘性末端和平末端 DNA 片段的连接之分,但其共同点都是利用 DNA 连接酶所具有的连接和封闭单链 DNA 的功能。在体外 DNA 重组中用于 DNA 连接过程的 DNA 连接酶主要有两种,即 T4 噬菌体 DNA 连接酶和大肠杆菌 DNA 连接酶。T4 噬菌体 DNA 连接酶催化 DNA 连接反应可分为三步(图 2.1)。首先,ATP 与 T4 噬菌体 DNA 连接酶通过 ATP 的磷酸与连接酶的赖氨酸的 ϵ 氨基形成磷酸-氨基键而产生酶-AMP 复合物。其次,被激活的 AMP 随后从赖氨酸残基转移到 DNA 一条链的 5' 端的磷酸基团上,形成磷酸-磷酸键。最后 DNA 链 3' 端的羟基对活跃的磷原子作亲核攻击,结果形成磷酸二酯键,并释放出

AMP,完成 DNA 之间的连接。大肠杆菌 DNA 连接酶催化 DNA 分子连接的机理与 T4 噬菌体 DNA 连接酶基本相同,只是辅助因子不是 ATP 而是 NAD^+ 。

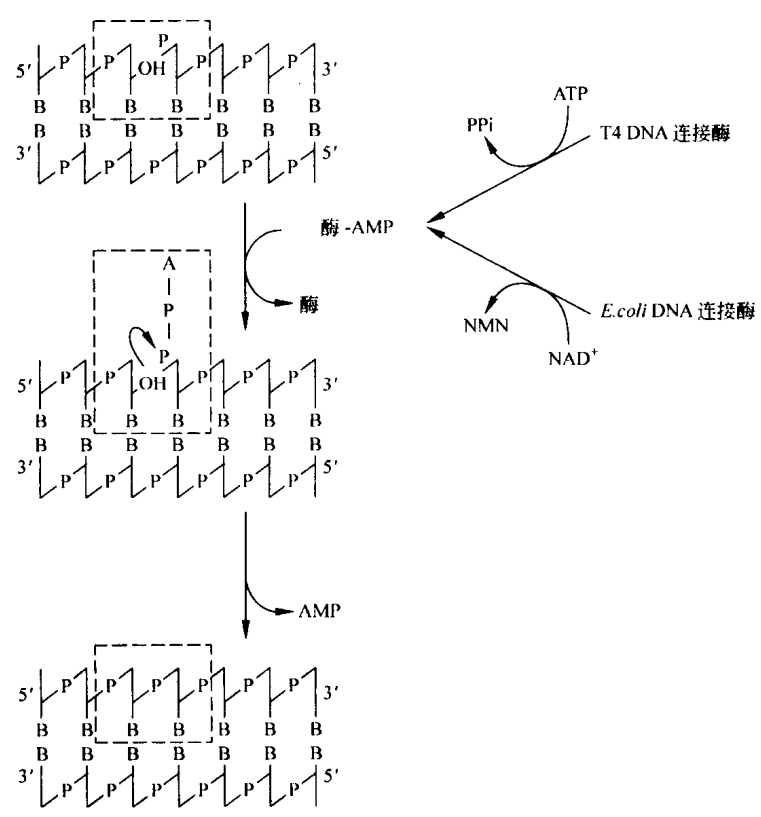


图 2.1 DNA 连接酶连接作用的分子机理

具有相同粘性末端的 DNA 分子容易通过碱基配对形成一个相对稳定的结构。连接酶利用这个相对稳定的结构,行使间断修复的功能,就可以使两个 DNA 分子比较容易连在一起。大肠杆菌 DNA 连接酶和 T4 噬菌体 DNA 连接酶均具有将两个带有相同粘性末端的 DNA 分子连在一起的功能,但 T4 噬菌体 DNA 连接酶还有一种大肠杆菌 DNA 连接酶没有的特性,即可使两个平末端的双链 DNA 分子连接起来的功能。但总的来说,这种连接的效率比粘性末端的连接效率要低得多,可能是因为平末端 DNA 分子无法形成类似粘性末端分子那样相对稳定的结构。一般通过增加 DNA 的浓度或提高 T4 噬菌体 DNA 连接酶浓度的办法来提高平末端的连接效率。

表 2.1 总结了带有各种末端类型的外源 DNA 的连接特点。进行 DNA 连接主要有粘性末端连接法和平末端连接法,而后者还可分为平接法、接头法以及粘-平端连接法。这些方法的选择主要依据外源 DNA 片段的末端性质、质粒载体性质以及与外源 DNA 上限制性酶切位点来做决定。

在重组 DNA 实验中,若 DNA 插入片段与特定载体为相同粘性末端,这将是最简单的连接反应。相同粘性末端可以是同一种内切酶切成的粘性末端,也可以是不同的内切酶切成的相同或互补的粘性末端。如表 2.1 所指出的那样,粘性末端连接法所得到的重