

高等学校实验教学改革教材

生物工程技术 与综合实验

Shengwu Gongcheng Jishu

Yu Zonghe Shiyan

杨洋 ©主编



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

013038745

Q81-43
23

高等学校实验教学改革教材

生物工程技术与综合实验

杨 洋 主编



Q81-43
23



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS



北航

C1646647

内 容 简 介

本书共两篇,上篇为生物工程技术,下篇为生物工程实验。主要内容包括绪论、基因工程、细胞工程、发酵工程、酶工程、生物反应器和实验等方面的基本操作技术。应用上,包括了医药、能源、食品等,特别是生物能源、纤维素的利用等是目前生物工程领域的研究热点。教材突出生物工程实验的综合性与创新性,适合作为生物技术和生物工程专业本科实验教学的教科书;同时可供从事相关专业的科研技术人员学习和参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物工程技术与综合实验/杨洋主编. —北京:北京大学出版社,2013.5
ISBN 978-7-301-22359-8

I. ①生… II. ①杨… III. ①生物工程-高等学校-教材 IV. ①Q81

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 070599 号

书 名: 生物工程技术与综合实验

著作责任者: 杨 洋 主编

责任编辑: 黄 炜

标准书号: ISBN 978-7-301-22359-8/Q · 0134

出版发行: 北京大学出版社

地 址: 北京市海淀区成府路 205 号 100871

网 址: <http://www.pup.cn> 新浪官方微博: @北京大学出版社

电子信箱: zpup@pup.cn

电 话: 邮购部 62752015 发行部 62750672 编辑部 62752038

出版部 62754962

印 刷 者: 北京飞达印刷有限责任公司

经 销 者: 新华书店

787 毫米×1092 毫米 16 开本 19.25 印张 460 千字

2013 年 5 月第 1 版 2013 年 5 月第 1 次印刷

定 价: 40.00 元

未经许可,不得以任何方式复制或抄袭本书之部分或全部内容

版权所有,侵权必究

举报电话: 010-62752024 电子信箱: fd@pup.pku.edu.cn

前 言

生物工程综合实验是实现生物工程专业培养目标的重要实践环节。在教学改革中,将零散的专业实验教学从理论教学中脱离出来,设立一门独立的生物工程综合实验课;将原来隶属于各门理论课的实验课剥离,重新整合、设计成“独立”的实验课程体系,进而与理论课程体系并驾齐驱,成为在人才培养目标上并重的既紧密联系又相对独立的两个支柱。经过修订后的生物工程本科教学计划中,独立开设了一门生物工程综合实验课,课程安排在专业理论教学结束后,分两个阶段进行:第一阶段在第六学期末,在学习完生物化学、微生物学、基因工程、微生物工程原理、生物工业下游技术、生物工程设备等必修课程后,是生物工程专业本科生集中进行的一次生物工程专业实验的系统操作。在这一阶段,要求学生掌握生物工程的基本实验操作和步骤,巩固所学的专业基础理论知识。第二阶段在第七学期中,根据学生自主选择的专业方向,结合专业方向开设的课程,设计相关实验。学生可以根据自己的兴趣爱好,结合后续教学环节,如毕业设计或论文和将来自己可能的工作方向,选修其中的任何一个方向或多个方向。实验课的课时安排则集中连续进行,使前一次实验为后一次实验做准备,实验内容环环相扣,保证实验的连续性,从而可得出比较准确的实验结果。实验内容覆盖了生物操作的上、中、下游的全过程,包括了好氧发酵、厌氧发酵等发酵类型,以及基因工程、细胞工程、酶工程和生物制药等操作技术。实验内容同时将过去简单的验证性实验转变为综合性、设计性实验。

本书分为生物工程技术(上篇)和生物工程实验(下篇)两部分,并对生物工程实验中涉及的实验技术、反应原理、流程安排等问题进行了较为详细的阐述。全书内容丰富,绪论部分对生物工程学主要进展进行了鸟瞰式的叙述;其他章节的内容涉及基因工程、细胞工程、发酵工程、酶工程、生物反应器的技术理论及实验,还包括生物制药技术及生物工程综合大实验等内容。本书在介绍不同的实验技术时,选取了各学科中有代表性的实验方法 and 研究技术,并结合科研、教学实践进行了比较和分析;附录还列出了一些常用试剂、缓冲溶液等的配制方法及一些常用数据和缩略语等。全书层次清晰,内容安排合理,针对性和应用性强。本书可供生物技术、生物工程及相关领域本科生及研究人员进行学习和参考。

本教材由广西大学生命科学与技术学院生物工程系杨洋主编。各部分编写工作分工如下:生物工程技术(上篇)第一、第二单元由栗桂娇编写,第三单元由阎欲晓、莫柏立编

写,第四单元由莫柏立编写,第五单元由杨洋编写;生物工程实验(下篇)中基因工程实验(第一单元)由陆坚、卢春花编写,细胞工程实验(第二单元)由栗桂娇编写,发酵工程实验(第三、四单元)由栗桂娇、阎欲晓、朱萍编写,酶工程实验(第五单元)由莫柏立、杜丽琴、蒋承建编写,生物制药技术(第六单元)由卢洁、蒙健宗编写,生物工程综合大实验(第七单元)由栗桂娇、阎欲晓、杜丽琴编写。本教材在编写过程中,得到了学校、出版社的大力支持和帮助,谨在此一并表示衷心感谢。

由于编者水平有限,书中定会存在错误,敬请读者批评指正。

编者
2012年7月

目 录

上篇 生物工程技术

绪论	(3)
第一单元 基因工程	(4)
第一节 基因工程概述	(4)
第二节 基因工程实施的四大要素	(6)
第三节 基因工程实验操作技术及操作要点	(20)
第二单元 细胞工程	(38)
第一节 细胞工程概述	(38)
第二节 细胞培养的基本原理与技术	(39)
第三节 植物细胞培养技术	(48)
第四节 动物细胞培养技术	(51)
第五节 组织细胞的培养方法	(54)
第三单元 发酵工程	(57)
第一节 发酵工程概述	(57)
第二节 菌种与种子扩大培养	(59)
第三节 培养基及其制备	(64)
第四节 培养基与设备灭菌	(66)
第五节 发酵工艺控制	(69)
第六节 下游加工过程	(73)
第四单元 酶工程	(92)
第一节 酶的性质和活力测定	(92)
第二节 酶的生产 and 制备	(96)
第三节 酶细胞和原生质体的固定化	(101)
第四节 酶工程研究进展	(107)
第五单元 生物反应器	(113)
第一节 酶反应器	(113)
第二节 细胞培养反应器	(116)
第三节 发酵设备	(123)
第四节 生物反应器的检测及控制	(126)

下篇 生物工程实验

第一单元 基因工程	(133)
实验 1 黄单胞菌基因组 DNA 的提取	(133)
实验 2 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA	(134)
实验 3 质粒 DNA 的提取	(136)
实验 4 聚合酶链式反应(PCR)扩增 DNA 片段	(139)
实验 5 DNA 的限制性内切酶酶切	(142)
实验 6 重组 DNA 分子的构建	(145)
实验 7 化学转化法感受态大肠杆菌的制备与转化	(147)
实验 8 重组质粒 DNA 的 PCR 验证	(150)
实验 9 核酸分子的转移: Southern 印迹和电泳转移	(151)
第二单元 细胞工程	(155)
实验 10 细胞工程实验基础	(155)
实验 11 植物组织和细胞培养	(162)
实验 12 家蚕细胞传代培养	(165)
实验 13 家蚕细胞融合	(166)
实验 14 PEG 诱导动物细胞融合	(167)
第三单元 发酵工程	(169)
实验 15 液体发酵法生产链霉素	(169)
实验 16 盐酸庆大霉素生产全流程实验	(173)
实验 17 离子交换法提取谷氨酸实验	(180)
实验 18 摇瓶溶氧系数的测定	(184)
实验 19 发酵罐溶氧速率测定实验	(186)
实验 20 面包酵母分批与流加培养实验	(188)
第四单元 发酵产品制作	(191)
实验 21 淡色啤酒酿制	(191)
实验 22 白酒酿制	(192)
实验 23 柑橘渣微生物发酵生产饲料蛋白	(193)
实验 24 发酵法酿制食醋	(195)
实验 25 小曲酒饼的制作	(196)
实验 26 小曲白酒的制作	(197)
实验 27 酱油种曲的制作	(199)
实验 28 酱油的制作	(200)
实验 29 葡萄酒的制作	(202)
实验 30 糯米甜酒的酿制	(203)

第五单元 酶工程	(205)
实验 31 蛋清溶菌酶的制备	(205)
实验 32 β -半乳糖苷酶的诱导合成	(208)
实验 33 β -半乳糖苷酶的固定化	(209)
实验 34 谷氨酸棒杆菌原生质体固定化及应用	(211)
实验 35 α -环糊精酶基因的表达和酶活力的测定	(213)
实验 36 糖化酶的反应动力学性质的测定	(216)
实验 37 碱性蛋白酶基因的表达和活性的测定	(218)
第六单元 生物制药技术	(222)
实验 38 芦丁的精制、鉴定与含量测定	(222)
实验 39 芦丁胶囊的制备与崩解时限测定	(225)
实验 40 不同助悬剂对芦丁混悬剂稳定作用的比较	(228)
实验 41 芦丁片的薄膜包衣及质量评价	(229)
实验 42 薄荷油及其 β -环糊精包合物的制备与质量评价	(231)
实验 43 薄荷油微囊的制备与镜检	(234)
实验 44 鱼油高不饱和脂肪酸 EPA 和 DHA 制备与含量测定	(236)
实验 45 微生物发酵法制备辅酶 Q ₁₀	(238)
第七单元 生物工程综合大实验	(241)
实验 46 细胞生物学大实验——动物细胞培养及外源基因的导入	(241)
实验 47 生物燃料酒精发酵大实验	(243)
实验 47(1) 固定化酵母细胞的制备和增殖培养	(243)
实验 47(2) 甘蔗糖蜜预处理实验	(246)
实验 47(3) 双酶法制备淀粉水解糖	(247)
实验 47(4) 淀粉水解糖含量定量分析	(249)
实验 47(5) 游离酵母细胞和固定化酵母细胞发酵生产酒精	(251)
实验 47(6) 酒精蒸馏与酒精发酵液产物分析	(252)
实验 48 米曲霉固态培养生产中性蛋白酶及产物分离纯化初步研究	(254)
实验 49 淀粉酶基因工程菌的构建及上罐流加发酵	(259)
实验 49(1) 地衣芽孢杆菌染色体 DNA 的提取	(260)
实验 49(2) DNA 琼脂糖凝胶电泳	(262)
实验 49(3) 聚合酶链式反应(PCR)	(264)
实验 49(4) 碱裂解法小量制备质粒 DNA	(265)
实验 49(5) 质粒载体与外源 DNA 片段的连接	(267)
实验 49(6) 连接产物的化学转化	(268)
实验 49(7) 淀粉选择平板筛选重组转化子	(270)
实验 49(8) 小型发酵罐的结构与使用	(271)

实验 49(9) 小型发酵罐上罐操作及流加发酵实验	(274)
实验 49(10) OxiTop IS6 BOD 测试仪的使用	(278)
附 录	(283)
附录 A 实验室须知	(285)
附录 B 常用参数	(291)
附录 C 酒精度与温度校正表	(292)
参考文献	(295)

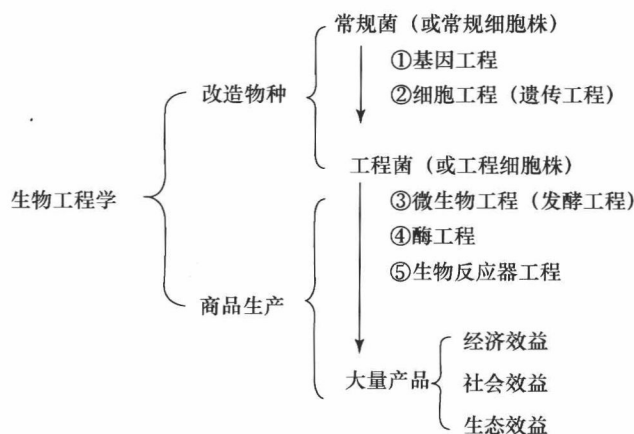
上 篇

生 物 工 程 技 术

绪 论

生物工程,又称生物工程技术,这些技术通过基因重组、细胞培养、细胞融合和酶反应等人为主的控制,对生命有机体在分子水平、细胞水平、组织水平、个体水平进行不同层次的创造性的设计和改造,改变生物(动物、植物、微生物等)遗传性状,按照人类的需要创造出新产品或定向组建具有特定性状的新生物,最终造福于人类。

一般认为,生物工程技术主要包括:基因工程、细胞工程(遗传工程)、酶工程、微生物工程(发酵工程)、生物反应器工程(生化工程)等。



生物工程的产生发展涉及了许多学科,它既具有基础科学,如分子生物学、量子生物学、细胞生物学、遗传学、微生物学、化学、数学、物理学等,同时又涵盖了工程学的现代技术科学,所以它是一门新型的现代应用技术学科,是生命科学与工程科学相结合的交叉科学。

由于生物工程的发展,特别是基因重组技术的研究成功,使人类进入了按照自己的需要人工创造新生物的伟大时代,其意义不亚于原子裂变和半导体的发现。生物工程是世界新技术革命的三大支柱之一,也将是下一代新兴产业的基础技术。在一些发达国家,以生物工程为基础的工业部门,已成为国民经济的重要支柱。现代生物工程技术极大地改善了人类生活的质量,主要包括:更加准确地诊断、开发疫苗、预防或治疗遗传性疾病和传染病;开发可以生产化学药物、生物多聚体、氨基酸、酶类、各种食品添加剂的微生物;有效地提高作物的产量,获得具有抗病虫害、抗逆境、品质形状优良的农作物,培育品种优良的家畜及其他动物;简化从环境中清除污染物和废弃物的程序,并将这些污染物和废弃物再生转化为可利用的物质等。由此可见,生物工程为解决世界面临的能源、粮食、人口、资源以及污染等严重问题开辟了新途径,它的发展直接关系到医药卫生、轻工食品、农牧渔业以及能源、化工、冶金等传统产业的改造和新兴产业的形成。

第一单元 基因工程

第一节 基因工程概述

一、基因工程定义

基因工程是在分子生物学等学科综合发展的基础上,于 20 世纪 70 年代诞生的一门崭新的生物技术科学。基因工程,是在人工的预先设计下,在体外(细胞外)重新组合 DNA 的片段,再应用载体将重组的基因导入细胞体内,从而使细胞获得以前自身所没有的、新的遗传特性,即具有人工所控制的遗传特性,故有时又把基因工程称为基因的人工操作。

二、基因工程的基本操作过程

生物的遗传性状是由基因编码的遗传信息所决定的。基因工程操作首先通过分离或合成方法获得目的基因,才能在体外用酶进行“剪切”和“拼接”,插入由病毒、质粒或染色体 DNA 片段构建成的载体,然后将重组体 DNA 导入微生物或动、植物细胞,使其复制,由此获得基因克隆,通过分子杂交等方法筛选获得所需的重组体克隆。基因还可通过 DNA 聚合酶链式反应(PCR)在体外进行扩增,借助合成的寡核苷酸在体外对基因进行定位诱变和改造。克隆的基因需要进行鉴定或测序。控制适当的条件,使转入的基因在细胞内得到表达,即能产生出人们所需要的产品或使生物体获得新的性状。这种获得新功能的微生物称为“工程菌”,新类型的动、植物分别称为“工程动物”和“工程植物”,或“转基因动物”和“转基因植物”。

上述步骤如图 1-1 所示。

三、基因工程技术的应用领域

基因工程有两方面用途:一是用于分子生物学研究,比如用于分离和纯化待定的基因,用于研究基因的表达和调控,从而阐明生物基因的组织 and 结构,以及抗体形成、细胞分化和肿瘤发生等重大生物学问题;二是用于改造生物,创造对人类有用的新品种或新物种。由于体外重组 DNA 的最终目的是要改变生物的遗传性,所以分子水平的操作和细胞水平的表达是基因工程的两个最基本的特点。

基因工程为生物学、医药学、遗传学、农业科学、环境科学和某些工业研究开拓了广阔的、革命性的发展前景。基因工程技术已经完全突破了经典的研究方法和研究内容,它形成了一个内容广泛而崭新的新领域。基因工程使人类从单纯地认识生物和利用生物的传统模式跳跃到能动地改造生物和创造生物的新时代,即,使人们从简单地利用现存的生物资源进行诸如发酵、酿酒、制醋和酱油等传统的生物技术时代,走向按人们需要而定向地

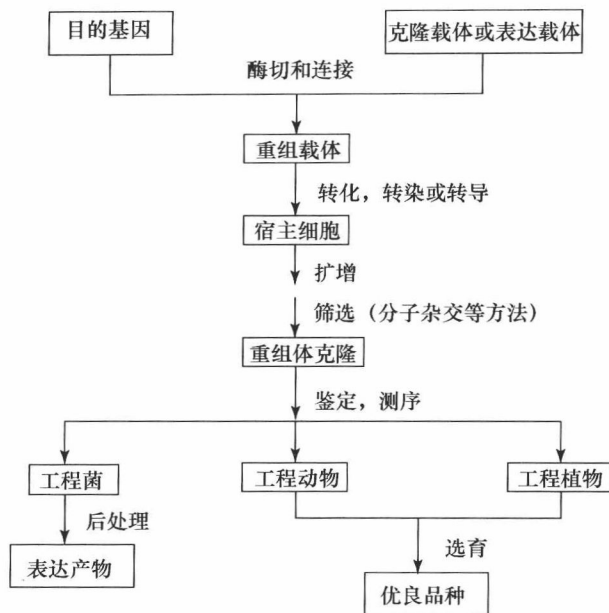


图 1-1 基因工程基本操作过程示意图

改造和创造具有新的遗传性品种的时代。

基因工程的潜力几乎是不可估量的。基因工程技术能把珍贵的人类激素基因插入到可以进行工业规模生产的微生物中,以生产大量的人类激素,如生长激素、胰岛素、促红细胞生成素等。农业科学已能利用基因工程技术来改良甚至创造新的作物新品种,例如,用适当的基因转移来增加玉米的赖氨酸含量,或使某些作物增加维生素含量、提高产量,把生长快的动物基因转移到家畜使其快速生长等。医学上除了用基因工程制药外,还在研究用简单的 DNA 转染来治疗某些癌症或某些遗传疾病。基因工程技术使得很多从自然界很难或不能获得的蛋白质得以大规模合成。20 世纪 80 年代以来,以大肠杆菌作为宿主,表达真核 cDNA、细菌毒素和病毒抗原基因等,为人类获得大量有价值的多肽类蛋白质开辟了一条新的途径。1981 年,美国拉温首先把血清蛋白基因转移到细菌中克隆成功。1983 年,美国、日本、荷兰的生物学家,用酵母菌作受体,用基因工程技术制成了乙型肝炎疫苗。此外,基因工程为疾病的诊断提供了分子检测手段——DNA 探针。DNA 探针是一小段能识别特定基因的 DNA 片段,它可以用来鉴定和分离有机体的遗传信息,已成功应用于寻找病毒、诊断遗传病、探测遗传损伤、诊断癌症等。

基因工程产品的生产是一项十分复杂的系统工程,可分为上游和下游两个阶段。上游阶段是研究开发必不可少的基础,主要是在实验室内进行分离目的基因、构建工程菌(细胞)。下游阶段是从工程菌(细胞)的大规模培养一直到产品的分离纯化、质量控制等,是将实验室成果产业化、商品化,它主要包括工程菌大规模发酵最佳参数的确立、新型反应器的研制、高效分离介质及装置的开发、分离纯化的优化控制、高纯度产品的制备技术等。工程菌的发酵工艺不同于传统的抗生素和氨基酸发酵,需要对影响目的基因的因素进行分析,对各种因素进行优化,建立适于目的基因高效表达的发酵工艺,以便获得较高产量的目的基因表达产物。

基因工程既是现实的生产力,更是巨大的潜在生产力,它已占据生物技术的核心技术地位。基因工程无疑是下一代新产业的基础技术,它将成为世界各国,特别是发达国家国民经济的重要支柱。在能源短缺、食品不足和环境污染这三大危机已开始构成全球社会问题的今天,基因工程及其伴随的细胞工程、酶工程、发酵工程和生化工程将是帮助人类克服这些难关的有力武器,是关系到各国经济乃至影响人类社会发展的关键因素之一。总之,基因工程好像一个神通广大的、奇异的“魔术师”,可以把不可能变成可能,可以把无用的生物变成有用的生物,它可帮助人类把许多奇妙的幻想变成现实。

第二节 基因工程实施的四大要素

一、工具酶

基因的重组与分离,涉及一系列相关联的酶促反应。我们把基因工程所要用的酶统称为工具酶。

(一) DNA 限制性内切酶和甲基化酶

DNA 限制性内切酶是一类能够识别双链 DNA 分子中的某种特定核苷酸序列,并由此切割 DNA 双链结构的核酸内切酶。限制性内切酶在基因工程中的主要作用是通过切割 DNA 分子,对含有特定基因的片段进行分离、分析。现在几乎在基因工程中所用的所有限制性内切酶都已商品化,注意查阅各公司的样本,就可以找到各种酶反应条件。

1. DNA 限制性内切酶的命名

由于发现了大量的限制酶,所以需要有一个统一的命名原则。现在通用的命名原则(按 Smith 及 Nathans 提出的原则)是:

(1) 用细菌属名的头一个字母和种名的头两个字母,组成三个斜体字母的缩略语表示寄主菌的物种名称。例如,大肠杆菌(*Escherichia coli*)用 *Eco* 表示;流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)用 *Hin* 表示;

(2) 同一种细菌若有不同菌株,则在属名、种名后加上菌株的第一个字母或型;

(3) 如同一菌株先后发现有几种不同的内切酶,则分别用罗马数字 I、II、III……表示。

如 *EcoRI*: *E* 表示大肠杆菌属名 *Escherichia* 的第一个字母;*co* 表示种名 *coli* 头两个字母;*R* 表示菌株 RY13 的第一个字母;*I* 表示该菌株中第一个被分离出来的内切酶。

2. 限制酶的分类

根据限制酶结构和功能特性,主要可分为三类,即 I 型酶、II 型酶、III 型酶。I 和 III 型酶由于无切割特异性或特异性不强,不能产生可以利用的 DNA 片段,故不用于基因工程。II 型酶具有可以控制和预测的位点特异性切割的性质,并且产生固定的 DNA 片段,故用处很大,目前基因工程中所用的限制酶都是 II 型限制酶。

3. II 型酶的基本特征

II 型酶只有一种多肽,并通常以同源二聚体形式存在。II 型酶具有如下基本特征:

(1) 识别序列和切割位点都是专一的。

识别序列又称识别位点或靶序列,即特定的核苷酸顺序。限制酶的识别序列同 DNA 的来源无关,是对各种 DNA 普遍适用的。II 型酶识别序列最常见的是 4 或 6 个核苷酸。

II 型酶是一种位点特异性酶,能够识别双链 DNA 分子中的特定序列,并在特定部位上水解双链 DNA 中每一条链上的磷酸二酯键,从而造成双链缺口,切断 DNA 分子。正由于该酶的这一特性,使 DNA 在体外切割时总能得到同样的核苷酸顺序的 DNA 片段,并能构建来自不同基因组的 DNA 片段,形成杂合 DNA 分子。

(2) 识别序列大多呈回文结构,也就是说,正读和反读都是一样的。

(3) 具有特定的酶切位点,由此产生出特定的酶切末端。

所有限制酶切割 DNA 后,均产生含 5'-磷酸基(5'-P)和 3'-羟基(3'-OH)的末端。交错切割,则形成具有黏性末端的 DNA 片段;沿对称轴切割,则形成平末端。

(4) II 型酶限制-修饰系统是由两种酶分子组成的二元系统。

限制性内切酶和甲基化酶互为独立,但甲基化酶修饰与限制性内切酶识别位点相重叠的序列。

4. 同裂酶、不完全同裂酶和同尾酶

同裂酶和同尾酶是两种特殊的 II 型酶。同裂酶指来源不同,但识别和切割相同的 DNA 序列的限制性内切酶。同裂酶能产生同样的切割,形成同样的末端,酶切后所得到的 DNA 片段连接后所形成的重组序列,仍可能被原来的限制酶所切割。如, *Eco47 I* 与 *Ava II*。不完全同裂酶指识别相同的 DNA 序列,但切割位点不完全相同。这类酶中有的对于切割位点上的甲基化碱基的敏感性有所差别,故可用来研究 DNA 甲基化作用。如,限制酶 *Hpa II* 和 *Msp I*。

同尾酶指来源各异,识别的序列也不尽相同,但切割 DNA 后产生黏性末端相同的一类限制酶。由同尾酶所产生的 DNA 片段,是能够通过其黏性末端之间的互补作用而彼此连接起来的,因此在基因克隆实验中很有用处。由一对同尾酶分别产生的黏性末端共价结合形成的位点,称为杂种位点。这类杂种位点的结构,一般是不能再被原来的任何一种同尾酶所识别的。但也有例外。

5. 影响 DNA 限制性内切酶活性的因素

限制酶的活性单位定义为,某种限制酶在最适反应条件下,1 μg DNA 在 1 h 内完全酶切所需的酶量。一般以在 20 μL 反应体积中,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下水解 1 μg DNA 的酶量定为 1 个酶活性单位。

与其他酶学反应一样,应用各种限制酶切割 DNA 时需要适宜的反应条件,比如温度、pH、离子强度等。研究表明,影响限制酶活性的主要因素有:

(1) DNA 的纯度。DNA 制剂中的某些污染物质,如,蛋白质、酚、氯仿、酒精、EDTA、SDS 以及高浓度的盐类,都有可能抑制酶的活性。为提高酶对低浓度 DNA 制剂的反应效率,可采用如下方法:① 提高酶的用量,平均每毫克底物 DNA 可高达 10 单位甚至更多;② 扩大酶催化反应的体积,以使潜在的抑制因素被相应地稀释;③ 延长酶催化反应的保温时间。另外,含有少量的 DNase 污染的 DNA 制剂会使 DNA 降解。避免的办法则是使用高纯度的 DNA,操作中注意防止 DNase 污染。

(2) DNA 的甲基化程度。限制性内切酶是原核生物限制-修饰体系的组成部分,因此识别序列中特定核苷酸的甲基化作用,便会强烈地影响酶的活性。

通常从大肠杆菌寄主细胞分离而来的质粒 DNA,混有两种甲基化酶:① dam 甲基化酶,催化 GATC 序列中腺嘌呤残基(即腺嘌呤的 N⁶ 位置上)甲基化;② dcm 甲基化酶,催化 CCA/TGG(即 CCAGG 或 CCTGG)序列内部的胞嘧啶残基(即胞嘧啶的 C⁵ 位置上)甲基化。因此,此类质粒 DNA,只能被限制性内切酶局部消化,甚至完全不被消化。为了避免产生这样的问题,在基因克隆中使用失去了甲基化酶的大肠杆菌菌株制备质粒 DNA。真核生物中目前只发现 5-甲基胞嘧啶。

(3) 酶切的反应温度。不同的 DNA 限制性内切酶,具有不同的最适反应温度,而且彼此之间有相当大的变动范围,大多数是 37℃,但也有例外。反应温度低于或高于最适温度,都会影响限制性内切酶的活性,甚至最终导致完全失活。所以当需要终止酶切反应时,常用的方法为:65℃,处理 10 min(或 10~15 min)。

(4) 酶解时间。注意酶在保温过程中活性的变化,从而确定合适的酶解时间。一般控制在 1 h 内。因为随着酶解时间的延长,限制酶的活性会部分失活,甚至完全丧失。

(5) DNA 的分子结构。DNA 分子的不同构型对酶的活性也有很大的影响,例如,切割超螺旋结构的质粒或病毒 DNA 所需的酶量,要比线性 DNA 高出许多倍,最高可达 20 倍。

(6) 缓冲液。酶的缓冲液组分包括: MgCl₂、NaCl 或 KCl、Tris-HCl、β-巯基乙醇或二硫苏糖醇(DTT)以及牛血清白蛋白(BSA)等。各种成分均应无酶(特别是核酸酶)活性、无重金属污染。所有母液应过滤或高压除菌,然后冰冻保存并定期更换。几种试剂可混合配制成 10×浓缩母液,使用时用无菌水适当稀释即可。

(7) 酶专一性(识别序列)的“松动”。在“非最适的”条件下(包括高浓度的限制性内切酶、甘油、有机溶剂;低离子强度;用 Mn²⁺ 取代 Mg²⁺ 以及高 pH 等等),有些限制性内切酶的识别序列的特异性便会发生松动,从其“正确”识别序列以外的其他位点切割 DNA 分子。限制酶的这种特殊的识别能力,通常称为星号活性。为了防止星号活性的出现,所有限制性内切酶的酶切反应均应在标准条件下进行。

(二) DNA 连接酶

同 DNA 限制性内切酶一样,DNA 连接酶也是体外构建重组 DNA 分子必不可少的基本工具酶。

用于将两段乃至数段 DNA 片段拼接起来的酶称为 DNA 连接酶。DNA 连接酶能催化一条 DNA 链的 3'-OH 和另一条 DNA 链的 5'-磷酸之间形成磷酸二酯键,从而具有 DNA 的合成、损伤 DNA 的修复以及 DNA 链中平头末端、黏性末端的连接等功能。

DNA 连接酶连接作用的分子机理为:① 与辅助因子形成酶-AMP 复合物;② 激活的 AMP 随后从 DNA 连接酶的赖氨酸残基转移到 DNA 一条链的 5'-磷酸基团上,形成 DNA-AMP 复合物;③ 3'-OH 对活跃的磷原子作亲核攻击,结果形成磷酸二酯键,同时释放出 AMP。

DNA 连接酶有大肠杆菌 DNA 连接酶和 T₄ DNA 连接酶。大肠杆菌 DNA 连接酶由大肠杆菌染色体编码。连接反应中,用 NAD⁺ 作能源辅助因子,分解产生 AMP。此酶可