

分子生物学实验指导

魏 群 主编



CHEP
高等教育出版社



Springer
施普林格出版社

(京) 112 号

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学实验指导/魏群主编. - 北京: 高等教育出版社;
海德堡: 施普林格出版社, 1999. 12
ISBN 7-04-007962-3

I. 分… II. 魏… III. 分子生物学 - 实验 IV. Q7 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 76169 号

分子生物学实验指导

魏 群 主编

出版发行 高等教育出版社 施普林格出版社

社 址 北京市东城区沙滩后街 55 号

邮政编码 100009

电 话 010 - 64054588

传 真 010 - 64014048

网 址 <http://www.hep.edu.cn>

经 销 新华书店北京发行所

印 刷 北京民族印刷厂

开 本 787 × 1092 1/16

版 次 1999 年 12 月第 1 版

印 张 9

印 次 1999 年 12 月第 1 次印刷

字 数 240 000

定 价 15.00 元

©China Higher Education Press Beijing and Springer-Verlag Heidelberg 1999

版权所有 侵权必究

前 言

分子生物学技术已不再神秘,它已经渗入生物学的各个分支学科及医药农林的各个分支领域,并正在迅速改变着它们的面貌。对分子生物学实验技术的掌握已成为这些学科在新的高度和水平揭示生命奥秘的共同需求。

本书在我们多年用作北京师范大学生物化学及分子生物学专业本科生及生命科学学院研究生实验指导讲义的基础上,经修订和改编形成的,可以作为高等院校生物和医药农林等专业的分子生物学实验指导用书。

全书分为前后呼应的两大部分,前部分扼要介绍了有关分子生物学的实验方法和理论,内容包括载体;分子生物学中常用的工具酶;电泳;真核生物基因组文库的构建;cDNA 文库的构建;DNA 序列测定;PCR 基因扩增;基因表达;印迹法及分子检测;克隆化定点诱变等;以供学生实验时的查找和老师的讲解。后部分是学生实验,内容包括感受态细胞的制备和转化;质粒的提取和酶切;DNA 重组;PCR 基因扩增;哺乳动物和植物基因组 DNA 的分离和提取;凝胶电泳检测蛋白质和 DNA;Southern 杂交;蛋白质印迹和免疫检测;总 RNA 和 tRNA 的制备及分析;核酸序列测定;在原核细胞中表达真核基因;基因突变及检测等。书后还摘编了许多对分子生物学实验有用的附录。为适合不同领域对象的需要,对某些实验内容,安排有以动物为材料或以植物为材料的不同实验。为适合不同水平的对象,除最基础的实验外,还编排了较高层次的实验,供有条件的单位选用。

本书的编写宗旨是简明、实用。实验尽量避免购买昂贵的仪器和材料。为加强学生的动手能力,学生根据我们在实验器材中详细罗列的所需仪器和材料,即可独立地进行试剂的配置和实验。每个实验操作步骤叙述较为详细,特别是对实验中应注意的地方,学生在实验过程中易出现的问题,加入关键试剂应有的正常现象,某些仪器的正确操作等均给予了提示(书中用楷体标注)。对实验的时间安排,根据每一个实验的特点提出了我们的建议,希望本书能像一位无声的老师,指导初学者入门。

本书是我们北京师范大学生物化学和分子生物学系几代老师和学生从教学和科研中总结经验、不断完善、提取的精华。在编纂和修订中由魏群、崔丽华、杨淑杰、马晴、姜国华、向本琼、刘玉等老师执笔,魏群统稿。孙秀英老师在本书的实验、排印、校稿等方面作了大量工作。中科院生物物理所静国忠老师审阅了全书,为本书提出了许多宝贵的意见。另外北京师范大学京师公司的齐建国同志,鼎国公司的周卫东同志,生命科学学院的杨中海、颜卉君、李大海等老师对本书的实验工作提供了不少帮助,在此一并感谢。

由于我们的水平有限,希望读者在使用过程中,对书中的不当之处,提出批评指正。

编 者

1999.6

责任编辑 吴雪梅

封面设计 张楠

版式设计 李杰

责任印制 陈伟光

目 录

第一篇 常用分子生物学实验技术及原理

第一章 载 体	(1)
第二章 分子生物学中常用的工具酶	(6)
第三章 电 泳	(13)
第四章 真核生物基因组文库的构建	(19)
第五章 cDNA 文库的构建	(23)
第六章 DNA 序列测定	(27)
第七章 PCR 基因扩增	(33)
第八章 基因表达	(37)
第九章 印迹法及分子检测	(41)
第十章 克隆化 DNA 的定点突变	(47)

第二篇 学生实验

实验一 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化	(53)
实验二 质粒 DNA 的提取及酶切	(56)
实验三 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA	(59)
实验四 DNA 重组	(62)
实验五 哺乳动物基因组 DNA 的提取	(66)
实验六 植物基因组 DNA 的提取	(69)
实验七 植物总 RNA 的提取	(71)
实验八 酵母 tRNA 的制备(苯酚法)	(74)
实验九 鼠肝氨酰 tRNA 合成酶的制备及 tRNA 接受氨基酸活力的测定	(77)
实验十 DNA 序列测定——双脱氧链终止法	(81)
实验十一 DNA 序列测定——银染色法	(86)
实验十二 PCR 基因扩增	(90)
实验十三 外源基因在大肠杆菌中的诱导表达	(93)
实验十四 蛋白质印迹	(98)
实验十五 Southern 杂交	(104)
实验十六 利用聚合酶链式反应(PCR)定点突变	(110)
实验十七 寡核苷酸介导的定点突变	(114)

附 录

附录一	分子生物学实验中的常用数据及换算关系·····	(119)
附录二	分子生物学实验中的常用试剂及溶液、缓冲液·····	(122)
附录三	与分子生物学实验相关的实验资料·····	(130)

第一篇 常用分子生物学实验技术及原理

第一章 载体

基因工程中,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。目前除了大肠杆菌中的质粒、 λ 噬菌体、M13噬菌体、噬菌粒外,还有酵母人工染色体载体以及动、植物病毒载体等。

作为基因工程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,如抗药性、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;④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剂量增加。

一、质粒

质粒是基因工程中常用的载体之一。质粒是染色体外小型双链环状的 DNA,大小在 1~200 kb 之间。质粒能自主复制,在细菌中不断复制自身。在细胞内的复制分成两种类型:一种是低拷贝数的质粒,每个细胞仅含有一个或几个质粒分子,这种类型称为“严紧型”复制的质粒;另一类是高拷贝数的质粒,拷贝数一般在 20 个以上,这种类型称为“松弛型”复制的质粒。

质粒能编码一些遗传性状,如抗药性(如抗氨苄青霉素、抗四环素等),耐受重金属,产生细菌素等,被质粒转化的细菌也获得了这些额外的特性。

1. pBR322

pBR322 是由几个质粒 DNA 通过 DNA 重组技术构建而成的克隆载体。第一,具有较小的相对分子质量,DNA 分子的长度为 4 363 bp。第二,具有氨苄青霉素和四环素两种选择的抗药性标记。pBR322 共有 24 种限制性内切酶的单一的识别位点,其中 7 种酶(*EcoRV*, *NheI*, *BamHI*, *SphI*, *SalI*, *XmaIII*, *NruI*)的识别位点位于四环素抗性基因内部,2 种酶(*ClaI*, *HindIII*)的识别位点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基因(*tet'*)的失活。3 种酶(*ScaI*, *PvuI*, *PstI*)在氨苄青霉素抗性基因(*amp'*)内具单一的识别位点,在这个位点插入外源 DNA 则会导致 *amp'* 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 *BamHI* 位点,便产生 *amp'tet'* 的重组子,将经过这种重组子转化的受体菌涂布在含氨苄青霉素培养基上,存活下来的菌落有 *amp'tet'* 和 *amp'tet'* 两种表型,再将它们分别涂布在含四环素的培养基上,凡是在氨苄青霉素平板上生长,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。

2. pUC18/pUC19

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,即将组建 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*),氨苄青霉素抗性基因(*amp^r*)以及大肠杆菌 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* 基因中有一段多克隆位点(MCS)区段。当外源的 DNA 片段插入到这些克隆位点时,使 α 互补链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,而相反没有外源 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相对分子质量,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。

pUC18 和 pUC19(图 1-1)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。

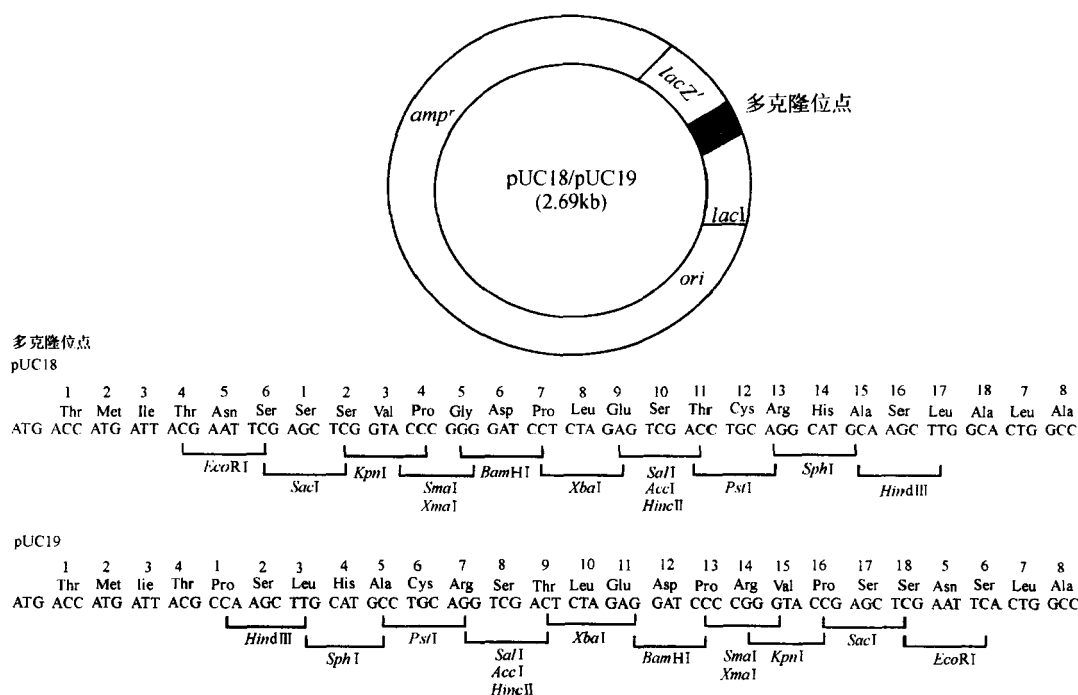


图 1-1 pUC18/pUC19

二、 λ 噬菌体

λ 噬菌体(图 1-2)是最早使用的克隆载体,其基因组是长度约为 50 kb 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,即粘性末端。当 λ 噬菌体 DNA 注入到寄主细胞后,线性 DNA 分子会通过粘性末端的碱基配对而结合,形成环状 DNA 分子。这种由粘性末端结合形成的双链区段为 *cos* 位点。 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。而在溶源生长周期,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,是进入溶原状态,还是进入溶菌状态,由 *cI* 基因控制,它编码一个阻遏蛋白质。 λ 噬菌体基因组的基因,按功能的相近性聚集成簇。① *A*、*W*、*B*、*C*、*D*、*E*、*F* 7 个基因组成头部基因,编码头部蛋白;② *Z*、*U*、*V*、*G*、*H*、*M*、*L*、*K*、*I*、*J* 等 10 余个基因编码 λ 噬菌体的尾部

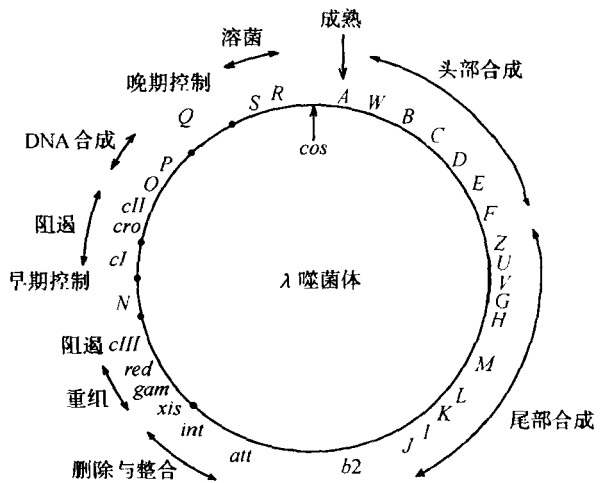


图 1-2 λ 噬菌体

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* 是整合与切割的识别位点,*int* 基因编码的蛋白能使 λ DNA 整合到细菌染色体上,*xis* 基因编码的蛋白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;④ *N*、*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、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,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(< 10 kb),而替换型载体能插入较大的外源 DNA 片段(20 ~ 24 kb 左右)。

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原化效应,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 的插入载体,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 6 kb 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 *Eco*RI 和 *Hind*III 都在 *cI* 基因内,外源 DNA 插入使 *cI* 失活。重组噬菌体在溶原性突变株 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 *Eco*RI 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。

三、其他载体

1. M13 噬菌体

M13 噬菌体颗粒的外形呈丝状,具有长约 6 400 bp 的闭合环状单链(+)DNA,它只感染带有 F 因子所编码的性纤毛的大肠杆菌,所以是雄性大肠杆菌特有的噬菌体。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 正链的特定位置,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,是由于感染的细菌在生长速度上比未感染的细菌明显下降所造成。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。

在 M13 系列中,用得最多的是 M13mp18、M13mp19 这一对载体。在这些载体中,含有大肠杆菌一段包括乳糖操纵子在内的 β 半乳糖苷酶基因 *lacZ* 序列,并可在该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,可利用蓝白斑噬菌斑的颜色反应来初步筛选重组的 DNA 分子。

M13mp18 和 M13mp19 与 pUC18 和 pUC19 一样,只是在多克隆位点的限制性内切酶的酶切位点顺序正好相反。

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

2. 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 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 476 bp 长的片段插入到 pUC18 和 pUC19 质粒的 *Nde*I 位点

上,长约为 3.2 kb。具有质粒和丝状噬菌体的双重特性。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 组织化学显色反应,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。

pUC118 和 pUC119 的区别只是多克隆位点方向相反。

第二章 分子生物学中常用的工具酶

分子生物学中基因的重组与分离,涉及到一系列相互关联的酶促反应。已知有许多种酶在基因克隆实验中有着广泛的用途。

一、限制性内切酶

限制性内切酶是一类能够识别双链 DNA 分子中的某种特定的核苷酸序列,并由此切割 DNA 双链结构的核酸内切酶,共有 I、II、III 3 类。I 类和 III 类限制性内切酶在同一蛋白质分子中兼有修饰(甲基化)作用及依赖于 ATP 的限制性切割活性。I 类限制性内切酶结合于识别位点,随机切割 DNA,III 类限制性内切酶在识别位点切割 DNA。在分子克隆中 I 和 III 类限制性内切酶都不常用。II 类限制性内切酶是由两种酶分子组成的复合体系,一种具有限制性内切酶功能,切割某一特异的核苷酸序列,另一种为独立的甲基化酶,它修饰同一识别序列。绝大多数 II 类限制性内切酶识别长度为 4~7 个核苷酸且呈二重对称的特异序列,但有少数酶识别更长的序列或简并序列。切割位点相对于二重对称轴的位置因酶而异:一些酶恰在对称轴处同时切割 DNA 的两条链,产生平端的 DNA 片段;而另一些酶则在对称轴两侧相类似的位置上分别切断两条链,产生带有单链突出端的 DNA 片段。在分子克隆中常使用 II 类限制性内切酶。

影响限制性内切酶的因素很多。DNA 制品中的污染(如蛋白质、酚、氯仿、乙醇、EDTA、SDS、高浓度盐等)均能抑制酶切活性。这种抑制可通过增加酶作用单位数($10 \sim 20 \text{ U}/\mu\text{gDNA}$),增大反应体积以稀释可能的抑制剂或延长反应时间来加以克服。

应用:

- ①限制性内切酶切割位点提供了 DNA 物理图谱的特异性标记;
- ②酶切产生的特异性片段可用分子克隆的手段加以纯化;
- ③酶切产生的片段为各种各样的其他 DNA 酶学操作提供了基本底物。

二、连接酶

(一)DNA 连接酶

催化双链 DNA 分子中相邻碱基的 $5' - \text{P}$ 和 $3' - \text{OH}$ 间形成磷酸二酯键。

1. T4 DNA 连接酶

是从 T4 噬菌体感染过的大肠杆菌中分离出来的,既可催化粘性末端间的连接,也可催化平末端间的连接,需要 ATP 和 Mg^{2+} 。酶活性在高 NaCl 浓度($> 150 \text{ mmol/L}$)下受到抑制。它是唯一的在正常条件下有效连接平端的 DNA 连接酶。

2. 大肠杆菌 DNA 连接酶

修复双链 DNA 中的单链切口及互补粘性末端的连接。在正常反应条件下,它不能连接平端。PEG8000(聚乙二醇 8000)可增加粘端的连接效率。 NAD^+ 参与催化。在连接粘性末端时可代替 T4 DNA 连接酶,它产生的背景低,准确性高。

(二)RNA 连接酶

T4 RNA 连接酶在 ATP 存下,催化单链 DNA 或 RNA 的 $5' - \text{P}$ 与另一单链 DNA 或 RNA 的 $3'$

- OH 形成磷酸二酯键。

应用:

- ①RNA 末端的放射性标记;
- ②寡聚 DNA 和 RNA 分子的环化;
- ③在寡核苷酸合成中连接寡聚物产生在特异位点上带有内部标记的寡聚体。

三、聚合酶

(一)DNA 聚合酶

1. 依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶

把脱氧核苷酸连续地加到双链 DNA 分子链的 3' - OH 末端,催化核苷酸的聚合作用。它需要模板,含 3' - OH 的引物,4 种脱氧核苷三磷酸和二价阳离子。DNA 聚合酶的性质见表 2-1。

表 2-1 DNA 聚合酶的性质

DNA 聚合酶	3'→5'	5'→3'	聚合能力	持续合成能力
	外切酶活性	外切酶活性		
<i>E. coli</i> DNA 聚合酶	低	存在	中等	低
Klenow 酶	低	无	中等	低
反转录酶	无	无	慢	中等
T4 DNA 聚合酶	高	无	中等	低
天然 T7 DNA 聚合酶	高	无	快	高
化学修饰 T7 DNA 聚合酶	低	无	快	高
遗传修饰 T7 DNA 聚合酶	无	无	快	高
Taq DNA 聚合酶	无	存在	快	高

(1)大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 具有聚合酶活性,还具有 3'→5'或 5'→3'外切酶活性。对于双链 DNA,在 dNTP 存在时,外切酶活性则会被 5'→3'方向的聚合酶活性所抑制。通过 DNA 缺口转移,制备供核酸分子杂交用的带放射性标记的 DNA 探针。

应用:

- ①用切口平移方法标记 DNA;
- ②对 DNA 分子的 3'突出尾进行末端标记。

(2)Klenow 酶(大肠杆菌 DNA 聚合酶的大片段) 是由大肠杆菌 DNA 聚合酶全酶,经枯草杆菌蛋白酶处理后,产生出来的相对分子质量为 7.6×10^4 的 DNA 聚合酶 I 的 C 端大片段分子。此酶具有 5'→3'聚合酶活性和 3'→5'外切酶活性。

应用:

- ①修补经限制性内切酶酶解的 DNA 所形成的 3'隐蔽末端;
- ②DNA 片段的末端标记;
- ③cDNA 克隆中的第二链 cDNA 的合成;
- ④DNA 序列测定;
- ⑤在体外诱变中用于从单链模板合成双链 DNA;

⑥也可用于 PCR,在体外扩增基因重组 DNA 序列。

(3)T4 DNA 聚合酶 其活力与 Klenow 片段的相似,即具有 5'→3'聚合酶和 3'→5'外切酶活性而无 5'→3'外切酶活性,但 5'→3'聚合酶活性比大肠杆菌 DNA 聚合酶活性要高 200 倍。

应用:

- ①放射性标记 DNA 片段的 3'端;
- ②选择性及无选择性标记线性化双链 DNA 分子的 3'端;
- ③以双链 DNA 的粘性末端为平端,便于平端克隆。

用 T4 聚合酶标记 3'端时,反应温度保持在 11℃,在较高温度下,其外切酶活性易降解 DNA 模板。

(4)天然的 T7 DNA 聚合酶 是 T7 基因与蛋白、硫氧还蛋白复合物。硫氧还蛋白可充当辅助蛋白以增强 T7 基因与蛋白对引物模板的亲合,使 DNA 合成延伸上千个核苷酸。具有 5'→3'聚合酶活性及非常强的单链、双链 DNA 3'→5'外切酶活性。

应用:

①DNA 聚合能力很强,它可用于延伸很长的模板(可在同一引物模板上有效地合成数千个核苷酸且不受二级结构的影响);

- ②定点诱变中互补链的合成;
- ③变双链 DNA 的粘性末端为平端;
- ④3'端标记。

(5)经修饰的 T7 DNA 聚合酶(测序酶) 天然的 T7 DNA 的 3'→5'外切酶活性通过化学反应有选择地降低了或通过基因工程改造使之完全失活,它仅具有 5'→3'聚合酶活性。

应用:

- ①是理想的 DNA 测序酶,其合成效率较高,对 dNTP 的类似物无选择倾向性;
- ②在低 dNTP 浓度下($< 0.1\mu\text{mol/L}$)可有效地标记 DNA;
- ③标记 5'端突出的 DNA 3'端。

(6)Taq DNA 聚合酶 催化聚合反应的最适温度为 75~80℃,有 5'→3'外切酶活性。

应用:

- ①PCR 中得到充分的应用(在很广的温度范围内均有活性,在高温下活性最高);
- ②DNA 序列测定,尤其是当为减少模板的二级结构而需在高温下进行 DNA 合成时,更需要此酶。

2. 不依赖于模板的 DNA 聚合酶(末端转移酶)

催化 dNTP 掺入到 DNA 的 3'-OH 端,不需要模板,需二价阳离子。单链 DNA 的掺入率最高,对于双链 DNA 而言,带 3'突出端的掺入率为高。在钴离子存在下,该酶可在任意的 3'端催化有限个核苷酸聚合。

应用:

①克隆 DNA 片段在 DNA 片段和线性载体的末端分别加上互补的同聚尾,通过同聚尾互补将 DNA 片段克隆到该载体;

②用³²P 标记 DNA 的 3'端,在 DNA 序列测定中,可加入³²P 标记的 3'脱氧核苷三磷酸以终止反应;

- ③合成多聚核苷酸同聚体;

④在 DNA 片段的 3'端掺入非放射性的标记。

3. 依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶(反转录酶)

能以 RNA 为模板合成其互补的 DNA(cDNA),可以从 5'→3'或 3'→5'方向降解 DNA:RNA 杂合链中的 RNA 链。在 DNA 和 RNA 的杂交反应中尤为有用。

应用:

- ①合成 cDNA,并克隆到载体;
- ②补平和标记 5'端突出的 DNA 片段的 3'端;
- ③代替 Klenow 酶用于 DNA 序列测定。

(二)RNA 聚合酶

1. 依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶

催化合成与 DNA 模板互补的 RNA,高效、特异地转录置于相应的启动子下游的 DNA 序列。

应用:

- ①产生均匀标记的高比活度单链 RNA 探针,用于 DNA 或 RNA 序列的同源性分析;
- ②均匀标记的 RNA 转录物可用于分析 RNA 或 DNA 末端,用于基因组 DNA 的序列测定和研究前体 RNA 的剪接;
- ③RNA 转录物可用于体外翻译,在放射性标记的氨基酸存在下,合成放射性标记的蛋白质。

2. 不依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶[poly(A)聚合酶]

利用 ATP 为前体分子,催化 AMP 残基掺入到 RNA 的 3'OH 端。

应用:

- ①[α - ^{32}P]ATP 标记 RNA 的 3'端;
- ②克隆缺少 poly(A)的 RNA,用 poly(A)聚合酶加尾,oligo(dT)作为引物合成 cDNA。

四、激酶、磷酸酶

(一)碱性磷酸酶

催化水解 DNA、RNA、dNTP、NTP 上的 5'-P,产生无 5'-P 的产物。最常用的有细菌碱性磷酸酶 BAP 和小牛肠碱性磷酸酶 CIP。大多数情况下,CIP 更常用,活性更高。

应用:

- ①载体 DNA 末端去磷酸化可防止载体的自身环化;
- ②用碱性磷酸酶脱去 5'端的磷酸基团,再用(γ - ^{32}P)ATP 标记 5'端,可用于化学测序,RNA 测序和特异性 DNA 或 RNA 片段的图谱构建。

(二)T4 多核苷酸激酶

具有两种活性,正向反应活性较高,催化 ATP 的 γ -p 转移到 DNA 或 RNA 的 5'-OH。此酶催化的反应是标记或磷酸化 5'端的首选方法。交换反应活性很低,催化 5'-P 的交换,在过剩 ADP 存在下,5'端的 P 可移换到 ADP 上,5'端被 γ - ^{32}P 重新磷酸化。

应用:

- ①用于化学法测 DNA 序列;
- ②对准备用于连接但缺乏 5'-P 的 DNA 或合成接头进行磷酸化;
- ③标记 DNA 的 5'端(正向反应,交换反应标记 5'端)。

五、核酸酶

(一)核酸外切酶

1. 单链 5'→3'和 3'→5'核酸外切酶(exo VII)

来源于大肠杆菌。水解单链核酸产生寡核苷酸片段。

应用:

- ①基因组 DNA 中内含子的位置作图;
- ②切除通过 poly(dT-dA)加尾插入到质粒载体的 DNA 片段。

2. 双链 5'→3'端外切酶

(1) λ 噬菌体核酸外切酶 λ_{exo} 。催化双链 DNA 5' - P 端的持续水解,释放 5'核苷单磷酸,但不降解 5' - OH 端。

应用:

- ①双脱氧法测序时,将双链 DNA 转变为单链 DNA;
- ②去掉双链 DNA 5'突出端,便于末端转移酶加尾。

(2)T7 基因 6 核酸外切酶 催化双链 DNA 的 5'端,依次水解,生成 5'核苷单磷酸,对含 5' - P 或 5' - OH 的 DNA 链都能起作用,5'端的降解均匀且可控制。

应用:

- ①双脱氧法测序时,变双链 DNA 为单链 DNA;
- ②去掉双链 DNA 5'突出端,便于末端转移酶加尾。

3. 双链 3'→5'核酸外切酶(exo III)

特异地催化双链 DNA 从 3' - OH 末端开始水解,释放 5'核苷单磷酸。它的外切酶活性是非特异的,是用于在双链 DNA 中产生均匀的单链区的理想工具酶。水解速率受核苷酸组成的影响 ($C > A \sim T > G$)。

应用:

- ①与 Klenow 酶联用,制备链特异的放射性探针;
- ②制备单链模板,用于双脱氧测序;
- ③从克隆化 DNA 片段的特定位置进行非定向缺失,构建亚克隆可不经限制性内切酶定位直接用于 DNA 序列测定。

(二)核酸内切酶

1. Bal 31 核酸酶

特异地降解双链 DNA 的缺口或 DNA 超螺旋上产生的瞬时单链区域。此酶可在 SDS、尿素中保持活性,需要 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ,也可作为核酸酶水解 rRNA 和 tRNA。

应用:

- ①在可控条件下产生并克隆不同大小的缺失体;
- ②DNA 片段的限制性位点作图;
- ③研究经诱变剂处理的超螺旋 DNA 的螺旋区的变化和超螺旋 DNA 的二级结构。

2. 核酸酶 S1

催化单链 DNA 或 RNA 的降解,产生带 5' - P 的核苷酸或寡核苷酸。是高度特异的单链内切酶,且在 SDS、尿素、甲酰胺中稳定。

应用:

- ①分析抗核酸酶 S1 降解的 RNA:DNA 杂合体以定位 RNA 转录物的 5'和 3'端;
- ②通过酶解成熟的 RNA 分子与³²P 标记的基因组 DNA 杂交形成的杂合体,确定内含子的位置;
- ③酶解在用反转录酶合成 cDNA 时所形成的发夹;
- ④去掉 DNA 片段的单链突出端,产生用于连接的平端;
- ⑤在限制性内切酶位点处产生小的缺失。

3. 绿豆核酸酶

来源于绿豆芽,是高度特异的单链内切酶。

应用:

- ①准确切除经限制性内切酶酶解的不配对突出端;
- ②在转录物定位作图实验中,在紧邻最后一个杂交配对碱基处作用,而不移去任何配对的核苷酸。

4. 微球菌核酸酶

来源于金黄色葡萄球菌。是非特异的核酸酶,它能切割单链和双链 DNA 和 RNA,生成带 3' - P 的寡核苷酸和单核苷酸,优先在 AT 或 AU 丰富区域切割,此酶能被 EGTA 灭活。

应用:

- ①研究染色质的结构;
- ②从未破坏酶活性的无细胞粗提物中去除核酸。

(三) 脱氧核糖核酸酶 (DNase I)

需二价阳离子的内切酶,优先从嘧啶核苷酸处水解双链或单 DNA 产生带 5' - P 的单核苷酸或寡核苷酸。在 Mg^{2+} 存在下,在双链 DNA 上产生缺口,在 Mn^{2+} 存在下断裂双链 DNA。

应用:

- ①切口平移法进行放射性标记;
- ②在 Mn^{2+} 存在下裂解双链 DNA,用于随机克隆,以便在 M13 噬菌体载体上进行测序;
- ③分析蛋白:DNA 复合物(DNA 酶足迹法)。

(四) 核糖核酸酶 (RNase)

1. 核糖核酸酶 A

在 C 和 U 残基后特异水解 RNA 的内切酶,切割发生在嘧啶核苷酸的 3' - P 和相邻核苷酸的 5' - OH 之间。

应用:

- ①在 RNase 保护实验中,对 RNA 进行定量和作图,与 RNaseT₁ 联合使用;
- ②降解 DNA 制备物中的 RNA 分子;
- ③RNA 测序;
- ④将双 cDNA 的末端修平,与 RNaseH 联合使用。

2. 核糖核酸酶 H

特异地水解 RNA:DNA 杂合体中的 RNA 的磷酸二酯键,产生末端为 3' - OH 和 5' - P 的产物,它不能降解单链或双链 DNA 或 RNA。RNaseH 水解可通过用较短的寡核苷酸与 RNA 杂交而限定于特定的位点。