

形成科学概念
巩固科学知识
获得实验技能

新课标

高中实验教程

• 报告册

江西省教育厅教学教材研究室组织编写

 江西科学技术出版社

生物

人教版 • 选修3

新课标

高中实验教程

• 报告册

江西省教育厅教学教材研究室组织编写

江西科学技术出版社

◎编者 (以姓氏笔画为序)

马丽	付晓华	刘兴全	陈小珺	何云
陈建生	余维	余琴	欧阳石龙	周国发
姜兵云	郭金花	姜建清	郭凯明	龚友生
黄芳	黄小勤	黄希亮	黄德明	雷园花
熊兆鹏				

生物

人教版·选修3

图书在版编目(CIP)数据

高中实验教程·报告册·生物(人教版·选修3)/江西省教育厅教学教材研究室组织编写. —南昌:江西科学技术出版社,2009. 8

ISBN 978 - 7 - 5390 - 3303 - 7

I. 高… II. 江… III. 生物课—高中—实验报告 IV. G634. 73

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 123773 号

国际互联网(Internet)地址:

<http://www.jxkjcs.com>

选题序号:ZK2009205

图书代码:J09098 - 101

高中实验教程·报告册·生物(人教版·选修3)

江西省教育厅教学教材
研究室组织编写

出版	江西科学技术出版社
发行	
社址	南昌市蓼洲街2号附1号
	邮编:330009 电话:(0791)6623491 6639342(传真)
印刷	南昌市红东印刷有限公司
经销	各地新华书店
开本	850mm×1168mm 1/16
字数	150千字
印张	8
版次	2009年8月第1版 2009年8月第1次印刷
书号	ISBN 978 - 7 - 5390 - 3303 - 7
定价	12.00元

(赣科版图书凡属印装错误,可向承印厂调换)

目 录

第一篇	实验理论	1
	一、基因工程的工具酶	1
	二、基因工程的载体	5
	三、PCR 技术	7
	四、目的基因导入受体细胞的方法	11
	五、分子杂交技术	15
	六、植物组织培养技术	16
	七、细胞融合技术	19
	八、人工种子的制备	23
	九、单倍体的诱导方法及应用价值	25
	十、克隆技术的伦理争论	26
	十一、试管婴儿技术与伦理	29
	十二、生态浮床技术	31
第二篇	演示实验	36
	一、重组 DNA 分子的模拟操作演示	36
	二、基因工程的基本操作程序图片演示	38
	三、转基因生物与食品安全辩论会演示	40
	四、《关于xxx村农村综合发展型生态工程的调查报告》的课题 报告会	41
第三篇	分组实验	47
	模拟制作 重组 DNA 分子的模拟操作	47
	实验 胡萝卜的组织培养	50

第四篇	经典实验	55
	一、基因敲除——分子生物学技术的又一次革命	55
	二、用纸层析法分析氨基酸实验	58
	三、认识假基因	60
	四、从人的头发中提取胱氨酸实验	61
	五、一些生物体细胞染色体数目汇总表	62
	六、植物体细胞杂交实验	63
	七、DNA 疫苗——人类免疫学发展史上的一次革命	65
	八、置换缺陷基因制造无先天疾病婴儿	67
	九、现代遗传学之父——托马斯·亨特·摩尔根	67
	十、外来入侵物种	69
	十一、流感病毒总动员	73
	十二、什么是“精确农业”	76
	十三、国际人类蛋白质组计划	78
	十四、酶工程	79
第五篇	实验教程测试卷	81
	测试卷一	81
	测试卷二	88
	测试卷三	95
	测试卷四	100
	测试卷五	106
第六篇	参考答案	114

第一篇 实验理论

一、基因工程的工具酶

基因工程又叫做基因拼接技术,或 DNA 重组技术。这种技术是在生物体外,通过对 DNA 分子进行人工“剪切”和“拼接”,对生物的基因进行改造和重新组合,然后导入受体细胞内进行无性繁殖,使重组基因在受体细胞内表达,产生出人类所需要的基因产物。通俗地说,就是按照人们的主观意愿,把一种生物的个别基因复制出来,加以修饰改造,然后放到另一种生物的细胞里,定向地改造生物的遗传性状。

基因工程是在 DNA 分子水平上进行设计施工的。DNA 分子的直径只有 2.0nm(粗细只有头发丝的十万分之一),其长度也是极其短小的。如流感嗜血杆菌的 DNA,长度只有 0.83 μ m,即使是较大的大肠杆菌,其长度也只有 1.36 μ m。要在如此微小的 DNA 分子上进行剪切和拼接,是一项非常精细的工作,必须要有专门的工具,即工具酶来实现。

(一) 限制性核酸内切酶(限制酶)

DNA 重组技术中对核酸的“精雕细刻”主要用酶作为工具。分子生物学研究过程中发现的酶,许多都用作工具,表 1-1 列出最常用的几种工具酶。限制性核酸内切酶在重组 DNA 技术中有重要地位。

表 1-1

DNA 重组技术中最常用的工具酶

酶	主要用途
限制性核酸内切酶	识别 DNA 特定序列,切断 DNA 链
DNA 聚合酶 I 或其大片段(Klenow)	①缺口平移制作标记 DNA 探针 ②合成 cDNA 的第二链 ③填补双链 DNA 3' 凹端 ④DNA 序列分析
耐热 DNA 聚合酶(Taq DNA 聚合酶等)	聚合酶链反应(PCR)
DNA 连接酶	连接两个 DNA 分子或片段
多核苷酸激酶	催化多核苷酸 5' - 羟基末端磷酸化,制备末端标记探针
末端转移酶	在 3' - 末端加入同质多聚物尾
SI 核酸酶,绿豆核酸酶	降解单链 DNA 或 RNA,使双链 DNA 突出端变为平端
DNA 端酶 I	降解 DNA,在双链 DNA 上产生随机切口
RNA 酶 A	降解 RNA
磷酸酶	切除核酸末端磷酸基

1. 限制性核酸内切酶的概念:

核酸酶可分为两类:①核酸外切酶是从核酸的一端开始,一个接一个把核苷酸水解下

来;②核酸内切酶则从核酸链中间水解 3',5' - 磷酸二酯键,将核酸链切断。很多细菌和细胞中②都能识别外来的核酸并将其分解,1962 年发现这是因为细菌中含有特异的核酸内切酶,能识别特定的核酸序列而将核酸切断;同时又伴随有特定的核酸修饰酶,最常见的是甲基化酶,能使细胞自身核酸特定的序列上碱基甲基化,从而避免受内切酶水解,外来核酸没有这种特异的甲基化修饰,就会被细胞的核酸酶所水解。这样细胞就构成了限制—修饰体系,其功能就是保护自身的 DNA,分解外来的 DNA,以保护和维持自身遗传信息的稳定,这对细菌的生存和繁衍具有重要意义。这就是限制性核酸内切酶名称中“限制”名称的由来。

2. 限制性核酸内切酶的命名:

①按酶的来源的属、种名而定,取生物属名的第 1 个字母与种名的头 2 个字母组成的 3 个斜体字母作略语,表示该酶的来源,如大肠杆菌 *Escherichia coli* 表示为 *Eco*,流感嗜血菌 *Haemophilus influenzae* 表示为 *Hin*;

②如有菌株名,则用一个正体字母表示菌株的类型,例如:从流感嗜血杆菌 d 株 (*Haemophilus influenzae* d) 中的限制酶表示为 *Hind*;

③如果一种特殊的菌株具有几个不同的限制酶,则在正体字母后按发现的先后用罗马数字标出,例如:从流感嗜血杆菌 d 株 (*Haemophilus influenzae* d) 中先后分离出 3 种限制酶,则分别命名为 *Hind* I、*Hind* II 和 *Hind* III。

3. 限制性核酸内切酶的分类:

按限制酶的组成、与修饰酶活性关系、切断核酸的情况等不同,分为三类:

① I 类限制性核酸内切酶:由 3 种不同亚基构成,兼具有修饰酶活性和依赖于 ATP 的限制性内切酶活性,它能识别和结合于特定的 DNA 序列位点,去随机切断在识别位点以外的 DNA 序列,通常在识别位点周围 400 ~ 700bp。这类酶的作用需要 Mg^{2+} , S 腺苷甲硫氨酸及 ATP。

② II 类限制性核酸内切酶:与 I 类酶相似,是多亚基蛋白质,既有内切酶活性,又有修饰酶活性,切断位点在识别序列周围 25 ~ 30bp 范围内,酶促反应除需 Mg^{2+} 外,也需要 ATP 供给能量。

③ III 类限制性核酸内切酶:只由一条肽链构成,仅需 Mg^{2+} ,切割 DNA 特异性最强,且就在识别位点范围内切断 DNA。是分子生物学中应用最广的限制性内切酶。通常在重组 DNA 技术提到的限制性核酸内切酶主要是指 II 类酶。

4. 限制性核酸内切酶的作用:大部分限制性核酸内切酶识别 DNA 序列具有回文结构特征,识别双链 DNA 分子中的某种特定核苷酸序列,并由此切开 DNA 双链结构中的 3',5' - 磷酸二酯键(图 1-1-1)。

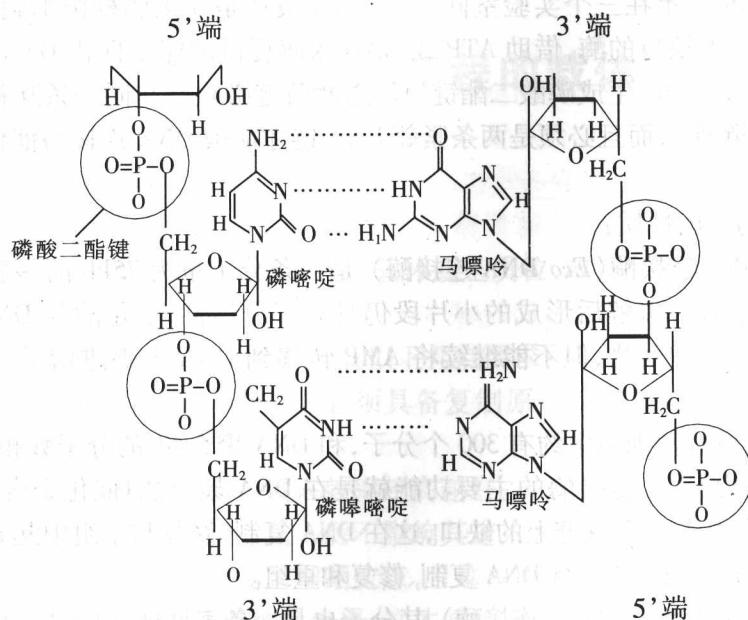


图 1-1-1 DNA 结构和 3', 5' - 磷酸二酯键的位置

DNA 分子经限制酶切割后产生的 DNA 片段末端通常有两种形式,即黏性末端和平末端(如图 1-1-2)。

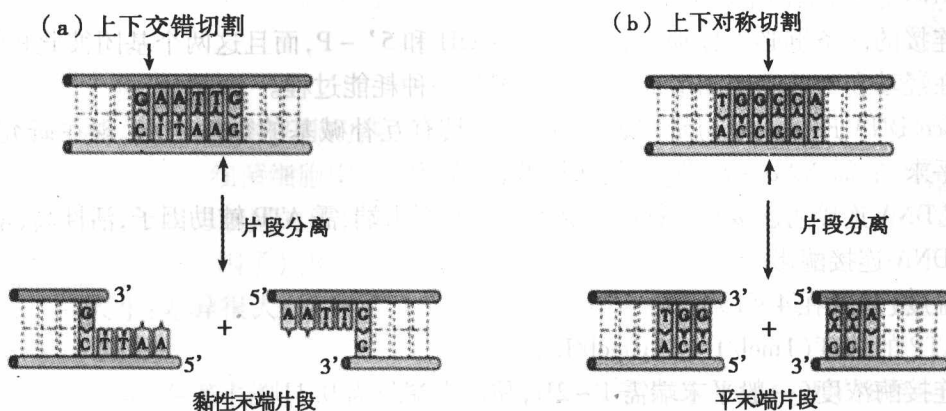


图 1-1-2 黏性末端和平末端

(二) DNA 连接酶

1. DNA 连接酶:

被限制酶切开的 DNA 形成了黏性末端。可以设想,如果把两种来源不同的 DNA 用同一种限制酶来切割,然后让两者的黏性末端黏合起来,似乎就可以合成重组的 DNA 分子了。但是,实际上仅仅这样做是不够的,互补的碱基处虽然连接起来,但是这种连接只是相当于把断成两截的梯子中间的踏板连接起来,两边的扶手的断口处还没有连接起来。要把扶手的断口处连接起来,也就是把两条 DNA 末端之间的缝隙“缝合”起来,还要靠另一种极其重要的工具,即基因的针线、分子缝合针——DNA 连接酶。

DNA 连接酶是 1967 年在三个实验室同时发现的,最初是在大肠杆菌细胞中发现的。它是一种封闭 DNA 链上缺口的酶,借助 ATP 或 NAD 水解提供的能量催化 DNA 链的 $5' - PO_4$ 与另一 DNA 链的 $3' - OH$ 生成磷酸二酯键。但这两条链必须是与同一条互补链配对结合的(T_4 DNA 连接酶除外),而且必须是两条紧邻 DNA 链才能被 DNA 连接酶催化成磷酸二酯键。

2. DNA 连接酶的一般性质:

①大肠杆菌的 DNA 连接酶(*Eco* DNA 连接酶)是一条分子量为 75kb 的多肽链。对胰蛋白酶敏感,可被其水解。水解后形成的小片段仍具有部分活性,催化酶与 DNA(而不是 ATP)反应形成酶-AMP 中间物,但不能继续将 AMP 转移到 DNA 上促进磷酸二酯键的形成。

DNA 连接酶在大肠杆菌细胞中约有 300 个分子,和 DNA 聚合酶 I 的分子数相近,这也是比较合理现象。因为 DNA 连接酶的主要功能就是在 DNA 聚合酶 I 催化聚合、填满双链 DNA 上的单链间隙后封闭 DNA 双链上的缺口,这在 DNA 复制、修复和重组中起着重要的作用。连接酶有缺陷的突变株不能进行 DNA 复制、修复和重组。

② T_4 噬菌体 DNA 连接酶(T_4 DNA 连接酶)其分子也是一条多肽链,分子量为 60kd,其活性很容易被 0.2mol/L 的 KCl 和精胺所抑制。此酶的催化过程需要 ATP 辅助。 T_4 DNA 连接酶可连接 DNA-DNA、DNA-RNA、RNA-RNA 和双链 DNA 黏性末端或平末端。另外, NH_4Cl 可以提高在 *Eco* DNA 连接酶的催化速率,而对 T_4 DNA 连接酶则无效。无论是 T_4 DNA 连接酶,还是 *Eco* DNA 连接酶都不能催化两条游离的 DNA 链相连接。

3. DNA 连接酶作用特点:

①连接的两条链必须分别具有自由 $3' - OH$ 和 $5' - P$,而且这两个基团彼此相邻。

②在羟基和磷酸基团间形成磷酸二酯键是一种耗能过程。

③*Eco* DNA 连接酶最初研究表明,可连接具有互补碱基的黏性末端,现在研究发现还可连接平末端;需 NAD⁺ 辅助因子,活性低,不常用。

④ T_4 DNA 连接酶连接具互补碱基黏性末端和平末端,需 ATP 辅助因子,活性高,常用。

4. DNA 连接酶影响连接效率的因素有:

①温度(通常在 $4 \sim 15^\circ C$)。

②ATP 的浓度($1mol/L \sim 10\mu mol/L$)。

③连接酶浓度(一般平末端需 $1 \sim 2U$,黏性末端仅需 $0.1U$)。

④反应时间(通常连接过夜)。

⑤插入片段和载体片段的摩尔比($1:1 \sim 5:1$)。

二、基因工程的载体

(一) 载体具备的特性

DNA 片段的克隆需要合适的载体。载体或是质粒,或是噬菌体,或是病毒,通常大多需经过人工改造。

对理想的基因工程载体一般至少有以下几点要求:

①在细胞内必须能自主复制,即必须具备复制原点,而且最好要有较高的自主复制能力,保证载体的繁殖。

②容易进入宿主细胞,而且进入效率越高越好。

③容易插入外来核酸片段,插入后不影响其进入宿主细胞和在细胞中的复制。这就要求载体 DNA 上要有合适的限制酶切割位点,且这些酶切位点不在复制原点区域内。

④容易从宿主细胞中分离纯化出来,这才便于重组操作。

⑤有容易被识别筛选的标志,如对抗生素的抗性,某些基因产物的显色反应等。当其进入宿主细胞,或携带着外来的核酸序列进入宿主细胞都能容易被辨认和分离出来,利于克隆操作。

常用的载体有质粒、噬菌体和病毒等。

(二) 质粒载体

1. 质粒的生物学特性:

①质粒是独立于染色体以外的能自主复制的裸露的双链环状(少数为线形和 RNA) DNA 分子。广泛存在于细菌细胞中,比病毒更简单。在霉菌、蓝藻、酵母和一些动植物细胞中也发现了质粒,目前对细菌的质粒研究得比较深入,特别是大肠杆菌的质粒。大肠杆菌的质粒主要有 F 质粒(F 因子)、R 质粒(抗药性因子)和 Col 质粒(大肠杆菌素因子)三种。

②质粒的大小:差异很大,最小的只有 1kb,只能编码中等大小的 2~3 种蛋白质分子,最大的可达到 200kb。

③质粒的生存:在寄主细胞中“友好”地“借居”,离开了寄主它本身无法复制;同时质粒往往有宿主专一性,如大肠杆菌质粒的复制起点不一定能在其他生物细胞中启动复制。

④质粒的复制类型:一种质粒在宿主细胞中存在的数目称为该质粒的拷贝数。据拷贝数将质粒分为两种复制型:“严紧型”质粒,拷贝数为 1~3;“松弛型”质粒,拷贝数为 10~60。不过即使是同一质粒,其拷贝数在不同的寄主细胞间和不同的生长环境下也可能有很大的变化。

⑤质粒的不亲和性:两种亲缘关系密切的不同质粒不能在同一宿主细胞中稳定共存。载体质粒与受体的质粒应是不同的不亲和群。

⑥质粒的转移:转移性质粒,含有 tra 基因,能通过结合作用从一个细胞转移到另一个细胞。非转移性质粒,不含 tra 基因,可以为转移性质粒所带动转移。

⑦质粒的存在形式:有超螺旋、开环双螺旋和线状双螺旋三种。

2. 碱变性法提取质粒:

有多种分离质粒的方法,如碱变性(裂解)法,煮沸裂解法,层析柱过滤法等。

目前一般使用碱变性法制备质粒 DNA。这个方法主要包括培养收集细菌菌体、裂解细胞、将质粒 DNA 与染色体 DNA 分开及除去蛋白质和 RNA 等过程。

①取 1.5mL 含质粒的大肠杆菌培养物过夜,加在微量离心管中,离心收集细胞沉淀。

②加入 100 μ L 冰冷的溶液 I(葡萄糖 50mmol、Tris - HC 25mmol PH = 8.0 EDTA 10mmol)涡旋震荡悬浮菌液。

③加入 200 μ L 新配制的溶液 II(0.2mol NaOH 1.0% SDS),缓缓混匀置室温 5min。

④加入 150mL 冰冷的溶液 III(醋酸钾 29.4g、冰乙酸 11.5mL、加蒸馏水至 100mL),颠倒离心管 10 次后,冰浴 5min。

⑤离心管的上清液用苯酚抽取数次,用乙醇沉淀收集质粒 DNA。

3. 质粒载体的改造:

①去掉不必要的 DNA 区段。

②减少限制酶的识别位点,一种酶只保留一个(单一的限制性酶切位点)。

③加入易于检出的选择性标记基因。

④对质粒进行安全性改造,要求质粒不能随便转移。

⑤改造或增加基因表达的调控序列。

4. 常用质粒:

(1) pBR322 质粒:

① pBR322 质粒的结构特点:有氨苄青霉素(氨苄西林)抗性基因,内部有 3 种限制酶单一识别位点;有四环素抗性基因(tetr 或 Tcr):内部有 7 种(其中启动区内有 2 种)限制酶单一识别位点;DNA 复制起点(ori)。

② pBR322 质粒的优点:具有较小的分子量 4363bp, 2.6×10^6 Da;具有两种抗生素抗性基因可供作转化子的选择记号;具较高的拷贝数,而且经过氯霉素扩增之后,每个细胞中可累积 1000 ~ 3000 个拷贝;对多种常见的限制酶只含有一个能切割的位点。

(2) pUC 质粒:

① pUC 质粒的结构特点:有来自于 pBR322 的 Ori;有氨苄青霉素抗性基因(ampr),但核苷酸序列发生了变化;有 LacZ' 基因:编码 β -半乳糖酶的 α -肽链即氨基末端;MCS 区段(多克隆位点区段)是一段用于插入外源 DNA 片段的特定区域,由一系列的紧密相连的限制酶位点组成,而且每个限制酶位点在整个载体中是唯一的。

② pUC 质粒载体的优点:与 pBR322 相比,pUC 质粒载体的优点表现具有更小的分子量和更高的拷贝数,如 pUC8 为 2 750bp,pUC18 为 2 686bp,控制质粒复制 rop 基因的缺失,平均每个细胞即可达 500 ~ 700 个拷贝;适用于组织化学法检测重组体,通过互补作用,利用菌落颜色筛选重组;具有多克隆位点区段(MCS)可以定向克隆,防止载体自我连接。

(三) 噬菌体载体

1. 噬菌体:

噬菌体是感染细菌的一类病毒,有的噬菌体基因组较大,如 λ 噬菌体和 T 噬菌体等;有的则较小,如 M₁₃、f₁、f_d 噬菌体等。用感染大肠杆菌的 λ 噬菌体改造成的载体应用最为广泛。

烈性噬菌体,只具有溶菌生长周期;温和噬菌体,具有溶源生长周期和溶菌生长周期。

溶菌周期是指噬菌体将 DNA 注入寄主细胞后很快环化,然后进行自我复制、蛋白衣壳合成和新噬菌体颗粒的组装,最后使寄主细胞破裂而释放出大量的子代噬菌体。

溶源周期中,注入寄主细胞的噬菌体 DNA 是整合到寄主细胞染色体上并可以随着寄主细胞的分裂而进行复制。

整合了一套完整的噬菌体基因组的细菌称为溶源性细菌。在溶源性细菌内存在的整合或非整合的噬菌体 DNA 称为原噬菌体。

2. 噬菌体的生物学特性:

(1) 组成:由蛋白质外壳和线状双链 DNA 分子组成(DNA 长度为 48 502bp,在分子两端各有 12 个碱基的单链互补黏性末端。当其注入寄主细胞中后,可以迅速通过这两个黏性末端的互补作用形成双链的环形 DNA 分子。上述通过黏性末端互补形成的双链区被称为 cos 位点。

(2) 温和噬菌体:一般以溶源生长进行增殖,胁迫条件下也会进入溶菌生长周期。

(3) 复制:溶源周期随溶源细菌染色体一起复制,溶菌周期的早期是“ θ ”复制,晚期进行滚环复制。

(4) 基因组成:DNA 至少包括 61 个基因,大多基因按功能相似性成簇排列,其中一部分为噬菌体生命活动的必须基因,另一部分约 1/3 为非必须区段。

3. 噬菌体载体的类型:

(1) 插入型:这种载体仅仅有一个可供外源 DNA 插入的克隆位点,如 λ gt10、 λ gt11。克隆能力小,不到 10kb。

(2) 置换型:这种载体具有两个对应的酶切克隆位点,在两个位点之间的 λ DNA 区段是 λ 噬菌体的非必须序列,可以被外源插入的 DNA 取代,如 Charon 4 载体。克隆能力大,20 ~ 25kb。

(四) 动物病毒载体

质粒和噬菌体载体只能在细菌中繁殖,不能满足真核 DNA 重组需要。感染动物的病毒可改造用作动物细胞的载体。由于动物细胞的培养和操作较复杂、花费也较多,因而病毒载体构建时一般都把细菌质粒复制起始序列放置其中。使载体及其携带的外来序列能方便地在细菌中繁殖和克隆,然后再引入真核细胞。目前常用病毒载体有改造来自猴肾病毒 SV40、逆转录病毒和昆虫杆状病毒等,使用这些病毒载体的目的多是将目的基因或序列放入动物细胞中表达或试验其功能,或作基因治疗等。

三、PCR 技术

聚合酶链反应(PCR)是一项体外基因扩增技术,1985 年美国 PE 公司人类遗传研究室发明了该项技术,Saiki 等首先应用于镰状红细胞贫血的产前诊断,但由于操作方法繁琐未能全面推广应用。直到 1988 年耐热 DNA 聚合酶(Taq 酶)的发现和运用,使 PCR 技术变得极为简单,才被迅速应用于分子生物学、生物工程、医学、法医学和农学等领域,PCR 技术已经作为分子生物学发展道路上一个里程碑,永载史册。

(一) PCR 技术的基本原理

PCR 类似于 DNA 的天然复制过程,其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。PCR 由“变性—退火—延伸”三个基本反应步骤构成:

(1) 模板 DNA 的变性:模板 DNA 经加热至 93°C 左右一定时间后,模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离,使之成为单链,以便它与引物结合,为下轮反应作准备。

(2) 模板 DNA 与引物的退火(复性):模板 DNA 经加热变性成单链后,温度降至 55°C 左右,引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合,形成 DNA 模板—引物结合物。

(3) 引物的延伸:DNA 模板—引物结合物在 Taq DNA 聚合酶的作用下,以 4 种 dNTP(脱氧核苷酸,包括 dATP——腺嘌呤脱氧核苷酸、dGTP——鸟嘌呤脱氧核苷酸、dCTP——胞嘧啶脱氧核苷酸、dTTP——胸腺嘧啶脱氧核苷酸)为反应原料,靶序列为模板,按碱基配对与半保留复制原理,合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链。重复循环“变性—退火—延伸”三个过程,就可获得更多的“半保留复制链”,而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需 2~4 分钟,2~3 小时就能将目的基因扩增几百万倍(2^n , n 为循环次数)。到达平台期所需循环次数取决于样品中模板的拷贝(如图 1-3-1)。

(二) PCR 扩增产物

可分为长产物片段和短产物片段两部分。短产物片段的长度严格地限定在两个引物链 5'—端之间,是需要扩增的特定片段。短产物片段和长产物片段是由于引物所结合的模板不一样而形成的,以一个原始模板为例,在第一个反应周期中,以两条互补的 DNA 为模板,引物是从 3'—端开始延伸,其 5'—端是固定的,3'—端则没有固定的止点,长短不一,这就是“长产物片段”。进入第二周期后,引物除与原始模板结合外,还要同新合成的链(即“长产物片段”)结合。引物在与新链结合时,由于新链模板的 5'—端序列是固定的,这就等于这次延伸的片段 3'—端被固定了止点,保证了新片段的起点和止点都限定于引物扩增

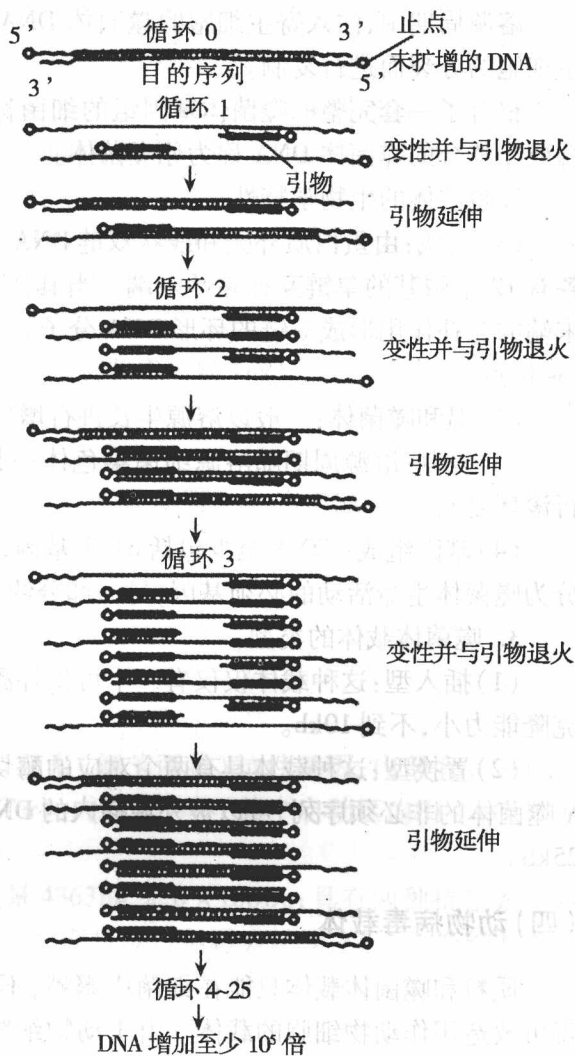


图 1-3-1 PCR 反应原理

序列以内,形成长短一致的“短产物片段”。不难看出“短产物片段”是按指数倍数增加,而“长产物片段”则以算术倍数增加,几乎可以忽略不计,这使得 PCR 的反应产物不需要再纯化,就能保证足够纯 DNA 片段供分析与检测用。

(三)PCR 反应体系

1. 标准的 PCR 反应体系(表 1-2)。

表 1-2 标准的 PCR 反应体系

10 × 扩增缓冲液	10 μ L
4 种 dNTP 混合物	各 200 μ mol/L 等量混合
引物	各 10 ~ 100 pmol
模板 DNA	0.1 ~ 2 μ g
Taq DNA 聚合酶	2.5 U
Mg ²⁺	1.5 mmol/L
双或三蒸水加至	100 μ L

注:①1L = 10³ mL = 10⁶ μ L;②1 摩尔(mol) = 10³ 毫摩尔(mmol) = 10⁶ 微摩尔(μ mol) = 10⁹ 纳摩尔(nmol) = 10¹² 皮摩尔(pmol);③U:酶活力单位。1961 年国际酶学会议规定:1 个酶活力单位是指在特定条件(25℃,其他为最适条件)下,在 1min 内能转化 1 μ mol 底物的酶量,或是转化底物中 1 μ mol 的有关基团的酶量。

2. 参加 PCR 反应的物质主要有五种,即引物、酶、dNTP、模板和 Mg²⁺。

(1)引物:引物是 PCR 特异性反应的关键,PCR 产物的特异性取决于引物与模板 DNA 互补的程度。理论上,只要知道任何一段模板 DNA 序列,就能按其设计互补的寡核苷酸链做引物,利用 PCR 就可将模板 DNA 在体外大量扩增。

设计引物应遵循以下原则:

- ①引物长度:15 ~ 30bp,常用为 20bp 左右。
- ②引物扩增跨度:以 200 ~ 500bp 为宜,特定条件下可扩增长至 10kb 的片段。
- ③引物碱基 G + C 含量以 40% ~ 60% 为宜,G + C 太少扩增效果不佳,G + C 过多易出现非特异条带。ATGC 最好随机分布,避免 5 个以上的嘌呤或嘧啶核苷酸的成串排列。
- ④避免引物内部出现二级结构,避免两条引物间互补,特别是 3' - 端的互补,否则会形成引物二聚体,产生非特异的扩增条带。
- ⑤引物 3' - 端的碱基,特别是最末及倒数第二个碱基,应严格要求配对,以避免因末端碱基不配对而导致 PCR 失败。
- ⑥若引物中有或能加上合适的酶切位点,被扩增的靶序列最好有适宜的酶切位点,这对酶切分析或分子克隆很有好处。
- ⑦引物的特异性:引物应与核酸序列数据库的其他序列无明显同源性。
- ⑧引物量:每条引物的浓度 0.1 ~ 1 μ mol 或 10 ~ 100 pmol,以最低引物量产生所需要的结果为好,引物浓度偏高会引起错配和非特异性扩增,且可增加引物之间形成二聚体的机会。

(2)酶及其浓度:目前有两种 Taq DNA 聚合酶供应,一种是从栖热水生杆菌中提纯的

天然酶,另一种为大肠菌合成的基因工程酶。催化典型的 PCR 反应约需酶量 2.5U(指总反应体积为 100 μ l 时),浓度过高可引起非特异性扩增,浓度过低则合成产物量减少。

(3)dNTP 的质量与浓度:dNTP 的质量与浓度和 PCR 扩增效率有密切关系,dNTP 粉呈颗粒状,如保存不当易变性失去生物学活性。dNTP 溶液呈酸性,使用时应配成高浓度后,以 1mol NaOH 或 1mol Tris. HCL 的缓冲液将其 pH 调节到 7.0~7.5,小量分装,-20 $^{\circ}$ C 冰冻保存。多次冻融会使 dNTP 降解。在 PCR 反应中,dNTP 应为 50~200 μ mol/L,尤其是注意 4 种 dNTP 的浓度要相等(等摩尔浓度配制),如其中任何一种浓度不同于其他几种时(偏高或偏低),就会引起错配。浓度过低又会降低 PCR 产物的产量。dNTP 能与 Mg^{2+} 结合,使游离的 Mg^{2+} 浓度降低。

(4)模板(靶基因)核酸:模板核酸的量与纯化程度是 PCR 成败与否的关键环节之一,传统的 DNA 纯化方法通常采用 SDS 和蛋白酶 K 来消化处理标本。SDS 的主要功能是溶解细胞膜上的脂类与蛋白质,因而溶解膜蛋白而破坏细胞膜,并解离细胞中的核蛋白,SDS 还能与蛋白质结合而沉淀;蛋白酶 K 能水解消化蛋白质,特别是与 DNA 结合的组蛋白,再用有机溶剂酚与氯仿抽提掉蛋白质和其他细胞组分,用乙醇或异丙醇沉淀核酸。提取的核酸即可作为模板用于 PCR 反应。一般临床检测标本,可采用快速简便的方法溶解细胞,裂解病原体,消化除去染色体的蛋白质使靶基因游离,直接用于 PCR 扩增。RNA 模板提取一般采用异硫氰酸胍或蛋白酶 K 法,要防止 RNase 降解 RNA。

(5) Mg^{2+} 浓度: Mg^{2+} 对 PCR 扩增的特异性和产量有显著的影响。在一般的 PCR 反应中,各种 dNTP 浓度为 200 μ mol/L 时, Mg^{2+} 浓度为 1.5~2.0mmol/L 为宜。 Mg^{2+} 浓度过高,反应特异性降低,出现非特异扩增;浓度过低会降低 Taq DNA 聚合酶的活性,使反应产物减少。

(四)PCR 反应条件的选择

PCR 反应条件为温度、时间和循环次数。

(1)温度与时间的设置:基于 PCR 原理三步骤而设置“变性—退火—延伸”的三个温度点。在标准反应中采用三温度点法:双链 DNA 在 90~95 $^{\circ}$ C 变性,再迅速冷却至 40~60 $^{\circ}$ C,引物退火并结合到靶序列上,然后快速升温至 70~75 $^{\circ}$ C,在 Taq DNA 聚合酶的作用下,使引物链沿模板延伸。对于较短靶基因(长度为 100~300bp 时)可采用二温度点法:除变性温度外、退火与延伸温度可合二为一,一般采用 94 $^{\circ}$ C 变性,65 $^{\circ}$ C 左右退火与延伸(此温度 Taq DNA 酶仍有较高的催化活性)。

①变性温度与时间:变性温度低,解链不完全是导致 PCR 失败的最主要原因。一般情况下,93~94 $^{\circ}$ C 时 1min 足以使模板 DNA 变性;若低于 93 $^{\circ}$ C 则需延长延长时间,但温度不能过高,因为高温环境对酶的活性有影响。此步若不能使靶基因模板或 PCR 产物完全变性,就会导致 PCR 失败。

②退火(复性)温度与时间:退火温度是影响 PCR 特异性的较重要因素。变性后温度快速冷却至 40~60 $^{\circ}$ C,可使引物和模板发生结合。由于模板 DNA 比引物复杂得多,引物和模板之间的碰撞结合机会远远高于模板互补链之间的碰撞。退火温度与时间,取决于引物的长度、碱基组成及其浓度,还有靶基序列的长度。对于 20 个核苷酸,G+C 含量约 50% 的引物,55 $^{\circ}$ C 为选择最适退火温度的起点较为理想。引物的复性温度可通过以下公式帮助选择:

T_m 值(解链温度) = $4(G + C) + 2(A + T)$

复性温度 = T_m 值 - $(5 \sim 10^\circ\text{C})$

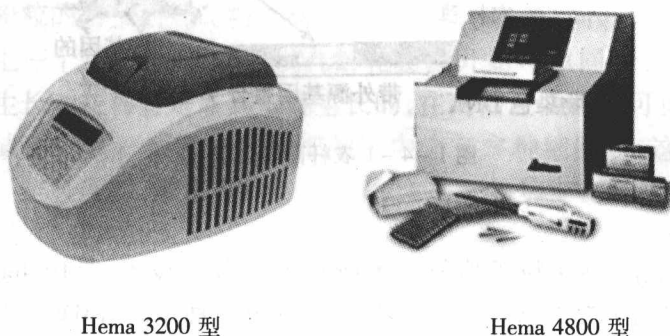
在 T_m 值允许范围内, 选择较高的复性温度可大大减少引物和模板间的非特异性结合, 提高 PCR 反应的特异性。复性时间一般为 $30 \sim 60\text{s}$, 足以使引物与模板之间完全结合。

③延伸温度与时间: Taq DNA 聚合酶的生物学活性: $70 \sim 80^\circ\text{C}$ 能组合 150 核苷酸/秒/酶分子; 70°C 能组合 60 核苷酸/秒/酶分子; 55°C 能组合 24 核苷酸/秒/酶分子; 高于 90°C 时, DNA 合成几乎不能进行。

PCR 反应的延伸温度一般选择在 $70 \sim 75^\circ\text{C}$ 之间, 常用温度为 72°C , 过高的延伸温度不利于引物和模板的结合。PCR 延伸反应的时间, 可根据待扩增片段的长度而定, 一般 1kb 以内的 DNA 片段, 延伸时间 1min 是足够的。3 ~ 4kb 的靶序列需 3 ~ 4min; 扩增 10kb 需延伸至 15min。延伸时间过长会导致非特异性扩增带的出现。对低浓度模板的扩增, 延伸时间要稍长些。

(2)循环次数: 循环次数决定 PCR 扩增程度。PCR 循环次数主要取决于模板 DNA 的浓度。一般的循环次数选在 30 ~ 40 次之间, 循环次数越多, 非特异性产物的量亦随之增多。

基因的扩增过程可以在 PCR 扩增仪上自动快速完成(如图 1-3-2)。



Hema 3200 型

Hema 4800 型

图 1-3-2 PCR 扩增仪

四、目的基因导入受体细胞的方法

将目的基因导入受体细胞的方法很多, 如将目的基因导入植物细胞的常用方法有农杆菌转化法、基因枪法、花粉管通道法等; 将目的基因导入动物细胞的常用方法是显微注射技术; 将目的基因导入微生物的常用方法为大肠杆菌转化法。

(一) 农杆菌转化法

农杆菌是普遍存在于土壤中的一种革兰氏阴性细菌, 它能在自然条件下趋化性地感染大多数双子叶植物的受伤部位, 并诱导产生冠瘿瘤或发状根。根癌农杆菌和发根农杆菌的细胞中分别含有 Ti 质粒和 Ri 质粒, 其上有一段 T-DNA, 农杆菌通过侵染植物伤口进入细胞后, 可将 T-DNA 插入到植物基因组中。因此, 农杆菌是一种天然的植物遗传转化体系。人们将目的基因插入到经过改造的 T-DNA 区, 借助农杆菌的感染实现外源基因向植物细胞的转移与整合, 然后通过细胞和组织培养技术, 再生出转基因植株(如图 1-4-1)。农

杆菌介导法起初只被用于双子叶植物中,近年来,农杆菌介导转化在一些单子叶植物(尤其是水稻)中也得到了广泛应用。

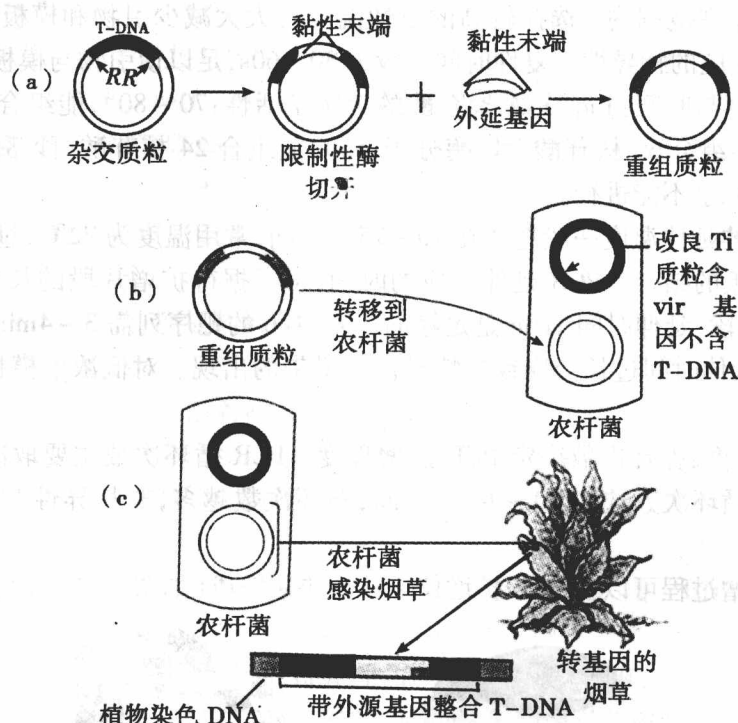


图 1-4-1 农杆菌转化法

(二) 基因枪法

该法又称粒子轰击、高速粒子喷射技术或基因枪轰击技术,是由 John. C. Santord 等于 1983 年研究成功的。1987 年, Vlein 首先报道了应用此技术将 TMV (烟草花叶病毒) RNA 吸附到钨粒表面,轰击洋葱表皮细胞,经检测发现病毒 RNA 能进行复制,并以同样技术将 CAT (氯霉素乙酰转移酶基因) 基因导入洋葱表皮细胞。现在,该技术已在烟草、水稻、小麦、黑麦草、甘蔗、棉花、大豆、菜豆、洋葱、番木瓜、甜橙、葡萄等多种作物上转基因成功。

这一方法是依靠一种基因枪(如图 1-4-2)来帮助导入外源基因。基因枪根据动力系统可分为火药引爆、高压放电和压缩气体驱动三类。其基本原理是通过动力系统将带有基因的金属颗粒(金粒或钨粒,直径 $0.6 \sim 4 \mu\text{m}$),将 DNA 吸附在表面,以一定的速度射进植物细胞,由于小颗粒穿透力强,故不需除去细胞壁和细胞膜而进入基因组,从而实现稳定转化的目的(如图 1-4-3)。该法具有应用面广,方法简单,转化时间短等优点,是单子叶植物中常用的一种转化方法,但成本较高。对于农杆菌不能感染的植物,采用该方法可打破载体法的局限。基因枪的转化频率与受体种类、微弹大小、轰击压力、制止盘与金颗粒的距离、受体预处理、受体轰击后的培养有直接关系。