



iCourse 教材
生物技术与生物工程系列



基因工程 实验指导 (第3版)

.....
The Experimental Guide for
Gene Engineering (3rd Edition)

主编 朱旭芬

高等教育出版社



iCourse · 教材
生物技术与生物工程系列

基因工程 实验指导 (第3版)

.....
The Experimental Guide for
Gene Engineering (3rd Edition)

主 编 朱旭芬

副主编 严庆丰

编 者 (按姓氏拼音排序)

陈宏宇 (东北农业大学)

冯瑞丽 (上海大学)

王傲雪 (东北农业大学)

文铁桥 (上海大学)

向太和 (杭州师范大学)

严庆丰 (浙江大学)

赵小立 (浙江大学)

周 宏 (浙江大学)

朱旭芬 (浙江大学)



高等教育出版社·北京

内容提要

本书以基因克隆为主线,实验内容涉及核酸的提取与检测,靶基因的获取,基因定点突变、沉默与敲除,质粒的重组,原核及真核表达系统的构建与表达,蛋白质分析与目标产物分离等。每个实验板块由导言、知识导图以及5~9个不同的实验组成,系统介绍了实验的相关基本原理,为同一实验项目提供了多种可供选择的实验方法,强调注意事项,并对实验相关的内容进行评议。第3版还着重扩充了基因工程领域的新技术和新发展。

本书配套数字课程(<http://abook.hep.com.cn/43951>)提供了与教材相结合的教学课件、教学视频、彩图、拓展性阅读材料、实验仪器、操作要点图片、实验结果图片及实验报告范本等资源,便于教师教学和学生自主学习使用。

本书适用于高等学校生物技术、生物工程、生物科学等相关专业本科教学使用,也可供从事基因工程教学、科研、生产的工作人员和研究生参考。

图书在版编目(CIP)数据

基因工程实验指导 / 朱旭芬主编. --3版. --北京:高等教育出版社, 2016.4

iCourse 教材·生物技术与生物工程系列

ISBN 978-7-04-043951-9

I. ①基… II. ①朱… III. ①基因—实验—高等学校—教材 IV. ①Q78-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第318551号

Jiyin Gongcheng Shiyan Zhidao

项目策划 吴雪梅 王莉 单冉东

策划编辑 王莉 高新景

责任编辑 高新景

特约编辑 靳然

封面设计 王凌波

责任印制 耿轩

出版发行 高等教育出版社
社址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
印刷 中国农业出版社印刷厂
开本 889mm×1194mm 1/16
印张 16
字数 550千字(含数字课程)
购书热线 010-58581118
咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.hepmall.com.cn>
<http://www.hepmall.com>
<http://www.hepmall.cn>
版 次 2006年1月第1版
2016年4月第3版
印 次 2016年4月第1次印刷
定 价 29.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换
版权所有 侵权必究
物料号 43951-00

数字课程(基础版)

基因工程 实验指导 (第3版)

主编 朱旭芬

登录方法:

1. 访问<http://abook.hep.com.cn/43951>, 进行注册。已注册的用户输入用户名和密码登录, 进入“我的课程”。
2. 点击页面右上方“绑定课程”, 正确输入教材封底数字课程账号(20位密码, 刮开涂层可见), 进行课程绑定。
3. 在“我的课程”中选择本课程并点击“进入课程”即可进行学习。课程在首次使用时, 会出现在“申请学习”列表中。

课程绑定后一年为数字课程使用有效期。如有使用问题, 请发邮件至: lifescience@pub.hep.cn



iCourse·教材
生物技术与生物工程系列

基因工程实验指导(第3版)

主编 朱旭芬

用户名 密码 验证码 9873 进入课程

注册

内容介绍

纸质教材

版权信息

联系方式

基因工程实验指导(第3版)数字课程与纸质教材一体化设计, 紧密配合。立足全面展示实验设计的目的、方法与结果并反映学科快速发展的趋势和成果, 数字课程涵盖了教学课件、教学视频、彩图、拓展性阅读材料、实验仪器、操作要点图片、实验结果图片及实验报告范本等内容, 充分运用了多种形式的媒体资源, 丰富了知识的呈现形式, 更加贴合实验课程的实际需要。在提升课程教学效果的同时, 为学生学习提供了更多的思考和探索空间。

系列教材



基因工程原理与技术
王傲雪



基因工程
朱旭芬 吴敏 向太和

高等教育出版社

<http://abook.hep.com.cn/43951>

出版说明

“十二五”期间为高等教育继续深化改革、走以提高质量为核心的内涵式发展道路的关键时期。教育教学改革的核心是课程建设，课程建设水平对教学质量和人才培养质量具有重要影响。2011年10月12日教育部发布了《教育部关于国家精品开放课程建设的实施意见》（教高〔2011〕8号），开启了信息技术和网络技术条件下校、省、国家三级精品开放课程建设的序幕。作为国家精品开放课程展示、运行和管理平台的“爱课程（iCourse）”网站也逐渐为高校师生和社会公众认知和使用。截至目前，已有2600多门资源共享课和800多门视频公开课在“爱课程（iCourse）”网站上线。

高等教育出版社承担着“‘十二五’本科教学工程”中国国家精品开放课程建设的组织实施和平台建设运营的重要任务，在与广大高校的调研和协作中，我们了解到当前高校的教与学发生了深刻变化，也真切感受到课程和教材建设所面临的挑战和机遇。如何建设支撑学生自主学习和校际共建共享的课程和新形态教材成为现实课题，在教育部高等学校生物技术、生物工程类专业教学指导委员会的指导下，结合我社2009年以来在数字课程建设上的探索和实践，我们提出了“高等学校生物技术与生物工程专业精品资源共享课及系列教材”建设项目，项目建设得到了众多高校的积极响应和广泛参与。2013年5月以来，分别在上海、天津、沈阳、杭州、武汉、无锡、银川等地陆续召开了项目启动会议、主编会议和编写会议。2015年，项目成果“iCourse·教材：生物技术与生物工程系列”陆续出版。

本系列教材涵盖生物技术、生物工程专业15门基础课程及专业课程，在出版形式、编写理念、内容选取和体系编排上有不少独到之处，具体体现在以下几个方面：

1. 采用“纸质教材+数字课程”的出版形式。纸质教材与丰富的数字教学资源一体化设计，纸质教材内容精炼适当，并以新颖的版式设计和内容编排，方便学生学习和使用；数字课程对纸质教材内容起到巩固、补充和拓展作用，形成以纸质教材为核心，数字教学资源配合的综合知识体系。

2. 创新教学理念，引导自主学习。通过适当的教学设计，鼓励学生拓展知识面和针对某些重要问题进行深入探讨，增强其独立获取知识的意识和能力，为学生自主学习和教师创新教学方法提供支撑。

3. 强调基础与技术、工程应用之间的紧密联系，注重学生应用能力培养。在讲述理论的同时，通过数字课程对学科前沿进展和工程应用案例进行延伸，在概念引入和知识点讲授上也尽量从实际问题出发，这不仅有助于提高学生的学习兴趣，也有助于加强他们的创新意识和创新能力。

4. 教材建设与资源共享课建设紧密结合。本系列教材是对各校精品资源共享课和教学改革成果的集成和升华，通过参与院校共建共享课程资源，更可支持各级精品资源共享课的持续建设。

本系列教材以服务于生物技术、生物工程专业课程教学为核心,汇集了各高校学科专家与一线教师的智慧、经验和积累,实现了内容与形式、教学理念与教学设计、教学基本要求与个性化教学需求,以及资源共享课与教材建设的一体化设计,以期对我国生物技术与生物工程专业教学改革和人才培养产生积极影响。

建设切实满足高等教育教学需求、反映教改成果和学科发展、纸质出版与资源共享课紧密结合的新形态教材和优质教学资源,实现“校际联合共建,课程协同共享”是我们的宗旨和目标。将课程建设及教材出版紧密结合,采用“纸质教材+数字课程”的出版形式,是一种行之有效的方法和创新,得到了高校师生的高度认可。尽管我们在出版本系列教材的工作中力求尽善尽美,但难免存在不足和遗憾,恳请广大专家、教师和学生提出宝贵意见与建议。

高等教育出版社

2015年6月

前言

一晃已经是《基因工程实验指导》教材出版的第十个年头了,教材自出版以来,受到广大师生与读者的认可与欢迎,并被列为普通高等教育“十一五”国家级规划教材。2014年经全国范围遴选和教育部高等学校生物技术、生物工程类专业教学指导委员会审定,《基因工程实验指导》第3版被列入“高等学校生物技术与生物工程专业精品资源共享课及系列教材”建设项目。

第3版教材的编写力求简明精练、条理清晰、内容新颖,以保证其可读性,并注重激发学生的求知欲以及思考问题的能力,开拓读者的视野。教材的修订按照基础性、前沿性以及通用性的要求,紧跟分子生物学与基因工程学科进展,对第2版的实验进行了必要的修改和增减。既重视对基本操作的全面训练,又突出新进展、新重点,还注重对学生学习兴趣、综合能力和创新能力的培养。为了使读者对实验过程有更直观的认识与理解,我们还在配套数字课程中添加了大量实验过程与实验结果的照片。

教材具有较好的广度与深度,共分为7个实验板块,由45个实验组成,涵盖了核酸的提取与检测,靶基因的获取,基因定点突变、沉默与敲除,质粒的重组,原核及真核表达系统的构建与表达,蛋白质的分析与目标产物分离等内容。每个板块由导言、知识导图以及5~9个不同的实验组成,并对实验的设计、操作、改进等方面提出指导性意见,对实验中常见的问题进行解析。教材中的实验可以单独开设,也可根据需要前后串联成综合性的大实验。实验计划表在原先基础上,又增添了与目前科研接近、可个人独立完成基因克隆与表达的第二套方案,供有实验经费保障的学校参考。

教材的编写由长期活跃在教学、科研第一线的老师完成,参加编写的人员有浙江大学的朱旭芬、严庆丰、赵小立与周宏老师;杭州师范大学的向太和老师;上海大学的文铁桥与冯瑞丽老师以及东北农业大学的王傲雪与陈宏宇老师。数字课程提供了与纸质教材相结合的教学课件、教学视频、知识拓展、实验仪器、电子表格、操作要点图片以及实验结果照片等内容,教学视频的拍摄与剪辑由周宏老师与研究生孙聪、苏悦完成。

教材的出版得到了高等教育出版社生命科学分社王莉、高新景等编辑的大力帮助,他们为教材的出版付出了大量辛勤的劳动。在此,表示诚挚的谢意!

限于编者的学识与水平,书中难免有不妥与错漏之处,恳请广大同行与读者随时赐教,使教材得以不断改进。

朱旭芬

2015年冬于启真湖畔

目 录

实验计划表.....	1	3-2 基因沉默技术	89
导 论.....	5	3-3 酵母基因的敲除	95
第一节 基因工程的四大要素.....	7	3-4 哺乳动物基因的敲除	97
第二节 基因克隆的策略.....	11	3-5 植物基因的敲除	102
1 核酸的提取与检测	14	4 质粒的重组	108
1-1 基因组 DNA 的提取	15	4-1 T-A 克隆	109
1-2 总 RNA 和 mRNA 的提取	20	4-2 感受态细胞的制备	111
1-3 噬菌体 DNA 的提取	24	4-3 重组质粒的转化	114
1-4 质粒 DNA 的提取	28	4-4 阳性克隆的筛选	117
1-5 核酸的检测	32	4-5 DNA 序列测定与序列同源性分析	119
1-6 脉冲场凝胶电泳	38	5 原核表达系统的构建与诱导表达	126
1-7 宏基因组文库的构建	40	5-1 DNA 的酶切反应	127
2 靶基因的获取	46	5-2 靶 DNA 片段的分离纯化	130
2-1 PCR 扩增	47	5-3 DNA 片段的连接	132
2-2 目的基因片段的获取	52	5-4 表达质粒的构建	136
2-3 探针的标记及检测	55	5-5 Southern 印迹	140
2-4 核酸探针筛选基因文库	62	5-6 靶基因的诱导表达	147
2-5 反转录 PCR	66	5-7 SDS-PAGE	152
2-6 RACE 方法	71	6 真核表达系统的构建与表达	158
2-7 反向 PCR	76	6-1 外源基因在酵母中的表达	159
2-8 SiteFinding-PCR	79	6-2 外源基因在哺乳动物细胞中的 表达	166
2-9 功能基因的活性筛选	83	6-3 外源基因在植物细胞中的表达	171
3 基因定点突变、沉默与敲除	85	6-4 qRT-PCR 分析	175
3-1 基因定点突变	86	6-5 Northern 印迹	180
		6-6 Western 印迹	186

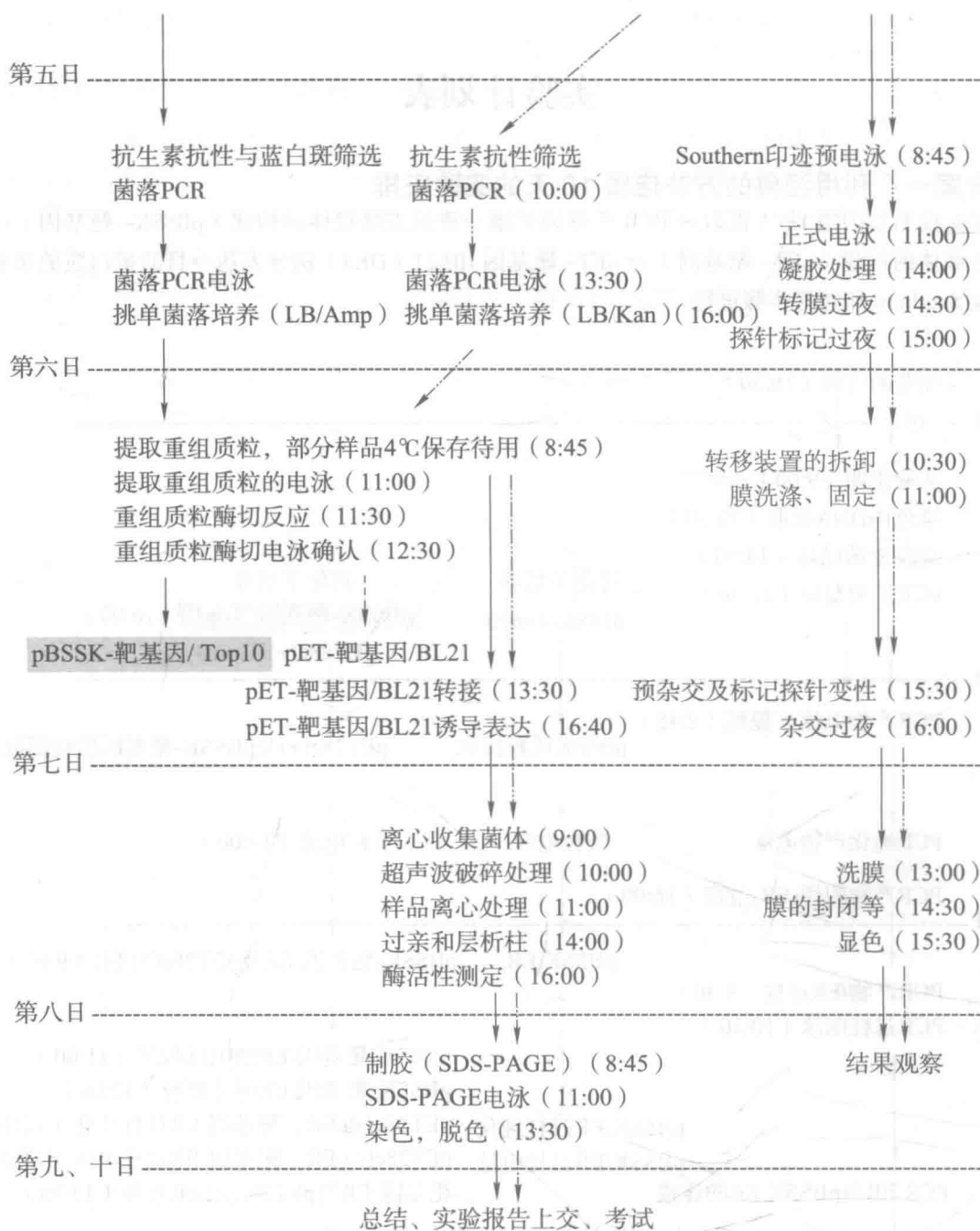
6-7 荧光原位杂交	192	附录 1 名词缩写	226
7 蛋白质的分析与目标产物分离	196	附录 2 实验操作及仪器使用注意 事项	230
7-1 免疫荧光与激光共聚焦	197	附录 3 如何撰写实验报告	234
7-2 双向电泳	200	附录 4 常用碱基、氨基酸符号及 缓冲液	236
7-3 酵母双杂交	206	附录 5 大肠杆菌基因型	240
7-4 蛋白质浓度的测定	209	附录 6 实验仪器	242
7-5 亲和层析	213		
参考文献	223		

实验计划表

方案一：利用经典的方法连续 10 天的实验安排

实验按照基因组 DNA 提取→PCR 靶基因扩增→重组克隆载体的构建 (pBSSK-靶基因)→重组表达载体的构建 (pET-靶基因)→pET-靶基因/BL21 (DE3) 诱导表达→目的蛋白质的亲和纯化以及 Southern 印迹等步骤进行。

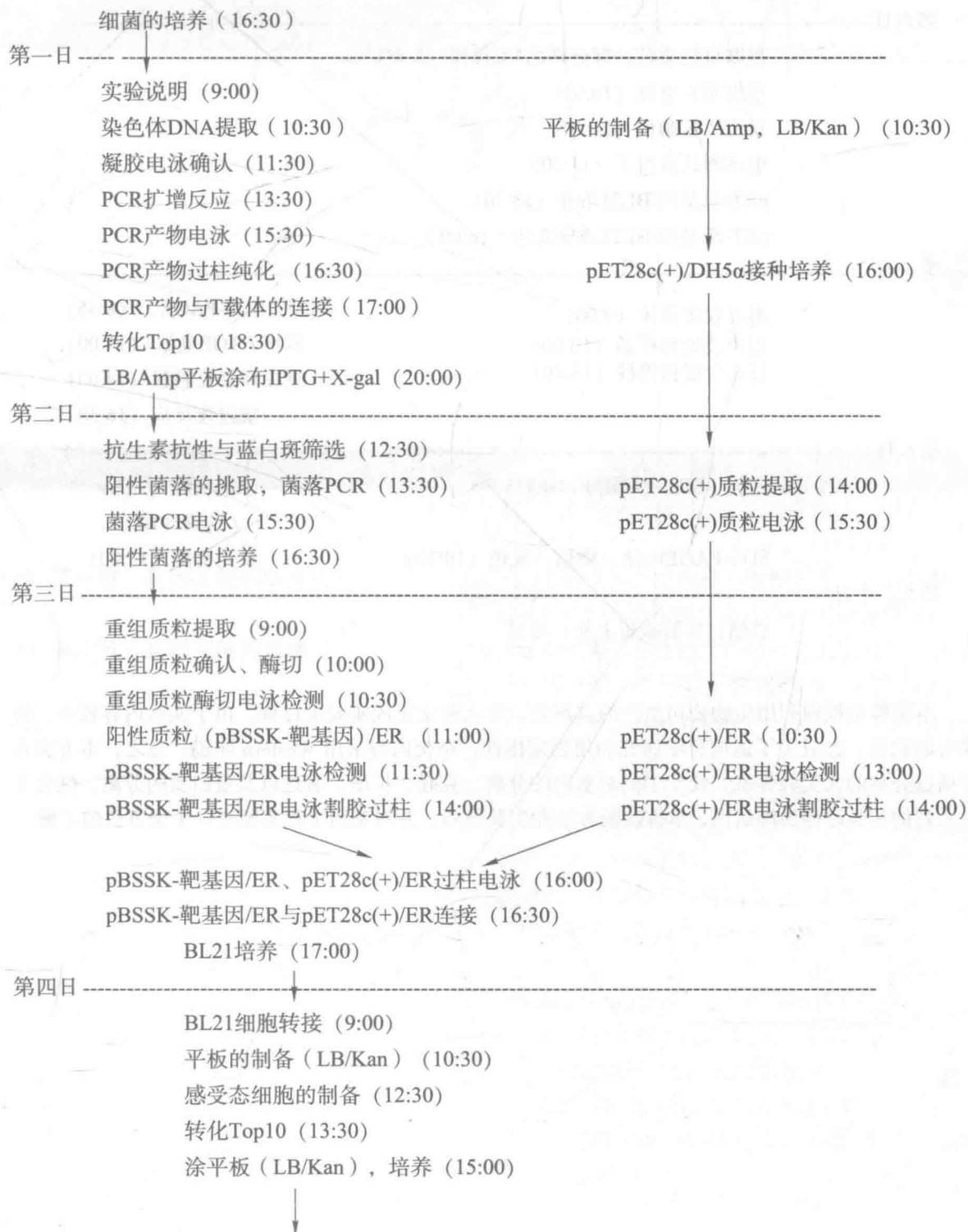




在有限的时间内 (10 天为一周期), 为了保证实验的完整性, 须两人一组 (甲、乙) 进行操作, 其中甲构建扩增质粒 (↓), 乙构建表达质粒 (↓)。最后甲、乙两同学共同完成包括 Southern 印迹、诱导表达、SDS-PAGE 分析以及酶的分离、过柱纯化等实验。要求每个同学在实验过程中, 认真做好自己分内实验的同时, 还应了解对方的实验内容。在实验完成后, 能充分了解整个实验的设计方案。总之, 通过完整的大实验体系, 可使学生对基因的分离、克隆、扩增、表达以及蛋白质的分离、纯化等一系列的实验过程加深认识, 掌握实验方法和实验技巧, 并对基因工程实验有一个全方位的了解。

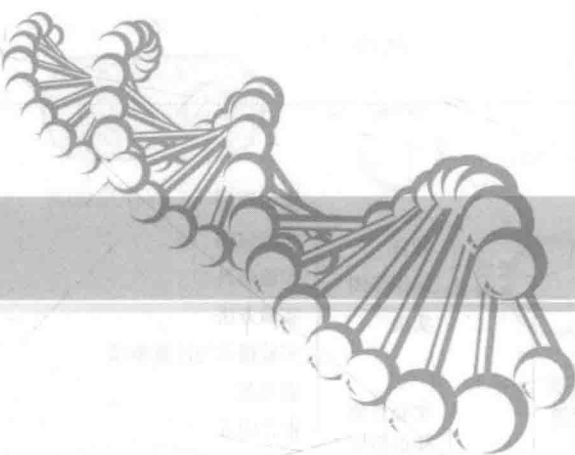
方案二：利用厂家生产的试剂盒连续 10 天的实验安排

有充分实验经费的院校，可按照目前科研程序安排学生的技能训练，即进行基因组 DNA 提取→PCR 扩增靶基因→T-A 克隆→重组表达载体的构建→诱导表达→目的蛋白质的亲和纯化→Western 印迹以及酶活测定等实验。





本实验全程须利用生物公司生产的试剂盒, 每人独立完成实验全过程。由于实验内容较多、持续时间较长, 并且为了适应科学研究和增强实用性, 杂交内容采用 Western 印迹。总之, 本方案希望通过完整的大实验体系, 使学生们对基因的分离、克隆、扩增、表达以及蛋白质的分离、纯化等一系列的实验过程加深认识, 掌握实验方法和实验技巧, 并对基因工程实验有一个全方位的了解。



导 论

● 第一节 基因工程的四大要素

● 第二节 基因克隆的策略

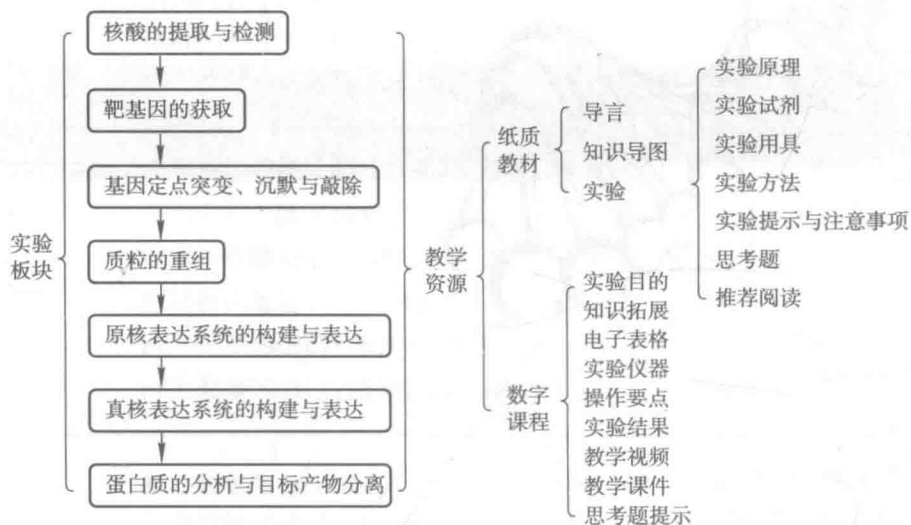
生物世界形态多样、物种各异、纷繁复杂，这一切都是由遗传的基础——基因所决定的。基因可以进行复制、转录以及翻译，产生蛋白质等有生物活性的物质。基因工程就是在体外 (*in vitro*) 进行基因重组，然后将重组 DNA 导入特定的宿主细胞进行转录和翻译，以操控基因的表达，最后达到基因改良、使生物获得新遗传性状的目的。

本教材共分为 7 个实验板块，包括核酸的提取与检测，靶基因的获取，基因定点突变、沉默与敲除，质粒的重组，原核与真核表达系统的构建与表达，蛋白质的分析与目标产物分离等内容。每个板块由一系列的实验串联组成。读者通过本教材的学习，将对基因工程有一个全方位的了解。

通过导论的学习，可以掌握以下内容：

1. 基因工程的概念和基本流程。
2. 载体的构成、种类以及应用。
3. 靶基因的获取方法以及宿主的选择。
4. 基因文库、基因组文库与 cDNA 文库的概念。
5. 各实验的安排。

知识导图



我们生活的地球大约有 45 亿年的历史,而原始生物体(厌氧的异养生物)最早诞生在 36 亿年前。从那以后,生物体便以其顽强的活力世代繁衍、生生不息,发展成如今种类繁多、千姿百态的生命大千世界。尽管如此,生命活动的本质在不同生物体中却是高度一致的,如构成 DNA 的 4 种脱氧核苷酸、组成蛋白质的 20 种氨基酸、核酸结构与蛋白质结构的对应关系,以及遗传密码等在整个生命世界中都是基本一致的,从而使不同生物体的基因之间的转移和表达成为可能。

基因工程 (gene engineering) 或称基因操作 (gene manipulation)、重组 DNA 技术 (recombinant DNA technology) 是 20 世纪 70 年代在分子遗传学基础上发展起来的一门新技术,它综合采用了生物化学、遗传学和微生物学等现代学科技术,在体外 (*in vitro*) 对大分子 DNA 进行剪切加工,再使其与不同亲本来源的 DNA 分子重新组合 (recombination),并将重组 DNA 导入受体细胞中,通过复制 (replication)、转录 (transcription)、翻译 (translation) 以及表达 (expression),使生物体获得新的遗传性状。可以说基因工程实质上是人类对生物功能的模拟,是人们获取、整理、破译、编辑和表达遗传信息 (基因) 的一种操作技术与平台。基因工程的两个基本特点是分子水平的操作和细胞水平的表达。

一个典型的 DNA 重组过程通常包含 (图 0-1): ①通过 PCR 扩增等方法获取供体 (donor) 生物的靶基因 (target gene),用限制性内切核酸酶 (restriction endonuclease) 分别对外源 DNA 和载体 (vector) 分子进行切割;②利用 DNA 连接酶 (ligase) 将含有靶基因的 DNA 片段连接到载体的 DNA 分子上,构成新的重组 DNA 分子;③借助细胞转化 (transformation) 等手段,将重组 DNA 分子导入受体 (宿主, host) 细胞,并在其中复制保存;④对转入重组 DNA 的受体细胞进行筛选和鉴定;⑤大量培养含有重组 DNA 的细胞,检测外源靶基因是否表达。重组 DNA 技术的关键是外源靶基因的分离、克隆、扩增和表达,其中最关键的是基因克隆。

重组 DNA 技术具有以下特点: ①可以打破生物界种的界限,突破亲缘关系的限制,加快变异的程度和速度;②可以进行定向变异和育种,定性改造生物;③可以创造出自然界中原本没有的生物。

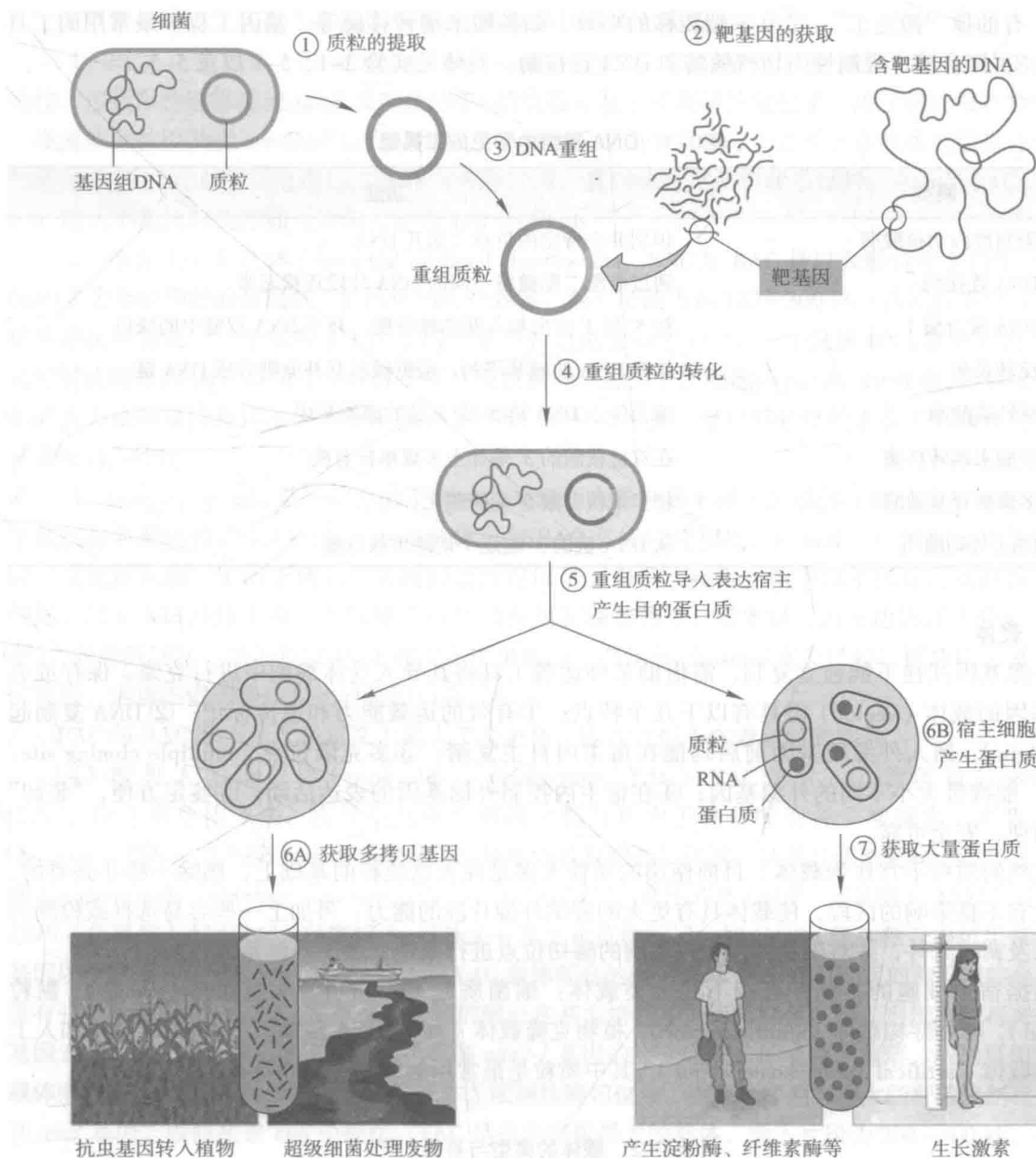


图 0-1 基因工程基本流程示意图

第一节 基因工程的四大要素

基因工程的四大要素为工具酶、载体、受体以及供体（外源靶基因）。

1. 工具酶

工具酶包括限制性内切核酸酶、外切核酸酶（exonuclease）、甲基化酶（methylase）、DNA 和 RNA 聚合酶（polymerase）、核酸末端转移酶（terminal transferase）、DNA 连接酶、碱性磷酸酶（alkaline phosphatase）以及其他反转录酶（reverse transcriptase）等（表 0-1）。工具酶的种类不同、功能各异，有的是“手术刀”，专司切割之职，如限制性内切核酸酶和外切核酸酶；有的是“缝纫线”，具有连接的功能，如 DNA 连接酶；有的像“复印机”，行使复制的任务，如 DNA 和 RNA 聚

知识拓展 0-2

工具酶的发现

合酶；有的像“搬运工”，带有末端转移的功效，如核酸末端转移酶等。基因工程中最常用的工具酶是 DNA 聚合酶、限制性内切核酸酶和 DNA 连接酶，具体见实验 2-1、5-1 以及 5-3。

表 0-1 DNA 重组中常见的工具酶

酶类	功能
限制性内切核酸酶	识别并在特定的位点上切开 DNA
DNA 连接酶	通过磷酸二酯键将不同的 DNA 片段连接起来
DNA 聚合酶 I	按 5' 到 3' 方向加入新的核苷酸，补平 DNA 双链中的缺口
反转录酶	按照 RNA 的碱基序列，根据碱基互补原则合成 DNA 链
碱性磷酸酶	除去位于 DNA 链 5' 或 3' 端的磷酸基团
核酸末端转移酶	在双链核酸的 3' 端加上多聚单核苷酸
多聚核苷酸激酶	使多聚核苷酸 5' 端磷酸化
DNA 外切酶 III	从 DNA 链的 3' 端逐个切除单核苷酸

2. 载体

外源基因往往不能独立复制，需借助某种运载工具将其导入受体细胞中进行克隆、保存或表达。基因的载体 (vector) 需具有以下几个特点：①有效的运载能力和遗传标记；②DNA 复制起点 (origin)，插入外源靶基因前后均能在宿主内自主复制；③多克隆位点 (multiple cloning site, MCS)，能携带大小不同的外源基因；④在宿主内控制外源基因的表达活动；⑤鉴定方便，“装卸”手续简便，安全可靠。

天然的质粒不宜作为载体。目前使用的质粒大多是在天然质粒的基础上，删除一些非必要的、对宿主有不良影响的区段，使载体具有更大的容纳外源片段的能力；再加上一些容易选择或检测的标记以及调控元件；并对限制性内切核酸酶的酶切位点进行改造，便于外源基因插入。

根据宿主细胞的不同，有以下几大类载体：细菌质粒 (plasmid)、λ 噬菌体 (phage)、黏粒 (cosmid)、酵母穿梭载体 (shuttle vector)、植物克隆载体 (如 T-DNA 载体)、动物克隆载体和人工染色体载体 (artificial chromosome vector)，其中质粒是最常用的载体 (表 0-2)。

表 0-2 载体的类型与容量

载体	复制子	容量 / kb	结构	举例
细菌质粒	ColE1 等	0.1 ~ 10	环形质粒	pUC、pET
λ 噬菌体		10 ~ 23	线形载体	λgt11、λDASH II
fosmid	F 因子	35 ~ 45	环形质粒	pCC2FOS TM
黏粒	ColE1	30 ~ 45	环形质粒	pJB8
P1	P1	70 ~ 100	环形质粒	pAd10 sacB II
P1 人工染色体 (PAC)	P1	130 ~ 150	环形质粒	pCYPAC2
细菌人工染色体 (BAC)	F 因子	120 ~ 300	线形染色体	pBeLoBAC11
酵母人工染色体 (YAC)	ARS	200 ~ 400	线形染色体	pYAC2
哺乳动物人工染色体 (MAC)	F 因子	约 10 000	线形染色体	