

现代分子生物学 实验技术 (第2版)

Experimental Techn
(Second Edition)

Molecular Biology

主编 魏春红 门淑珍 李毅



现代分子生物学 实验技术 (第2版)

XIANDAI FENZI SH

主编 魏春红 门淑珍 李 毅

编者 (按姓氏笔画排序)

门淑珍 王英典 任 波

李 毅 董 巍 魏春红

 高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

内容简介

本书介绍了现代分子生物学基本的、综合的实验方法和技术,并为训练学生的综合素质和独立从事实验的能力,设计了部分探索性实验。全书共分为三篇。基础篇介绍了基因克隆与分析方法,训练学生从事分子生物学实验的基本方法和操作技能。应用篇介绍了克隆基因在转基因植物及基因功能分析的具体应用,通过系统的综合性实验,不仅提高学生的实验操作技能,更使学生在掌握方法的基础上,增强综合运用、设计及观察分析能力。探索篇在前两部分基础上,要求学生针对科研中的实际问题,独立设计解决问题的具体方案,并通过实验操作激励学生进入科研状态,提高学生的科研兴趣及解决实际问题的综合素质和能力。

第2版中,作者对部分实验内容进行了改进,并以基因克隆及其在科研中的部分应用为线索,新增部分基础实验和一些新颖的实验内容。同时采用纸质教材与数字课程相结合的新型出版形式,使得内容更为丰富,主线更加突出。

本书可以作为生物技术、生物工程专业本科生教材和相关学科科研人员的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

现代分子生物学实验技术 / 魏春红, 门淑珍, 李毅

主编. — 2版. — 北京: 高等教育出版社, 2012.2

ISBN 978-7-04-033844-7

I. ①现… II. ①魏… ②门… ③李… III. ①分子生物学 - 实验 - 高等学校 - 教材 IV. ①Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第003758号

策划编辑 赵晓媛 责任编辑 赵晓媛 封面设计 张楠 责任印制 毛斯璐

出版发行	高等教育出版社	网 址	http://www.hep.edu.cn
社 址	北京市西城区德外大街4号		http://www.hep.com.cn
邮政编码	100120	网上订购	http://www.landracom.com
印 刷	北京市大天乐印刷有限责任公司印刷		http://www.landracom.com.cn
开 本	850 × 1168 1/16	版 次	2006年7月第1版
印 张	13.5		2012年2月第2版
字 数	360千字	印 次	2012年2月第1次印刷
购书热线	010-58581118	定 价	29.50元
咨询电话	400-810-0598		

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 33844-00

第2版前言

《现代分子生物学实验》第1版出版后,得到广大师生的使用和支持,并为本书的编写修订提出很多意见与建议。我们在本次修订中,根据这些建议新增和改进了部分实验内容。同时,我们以基因克隆及其在科研中的部分应用为线索,设计了部分基础实验和一些新颖的实验。使初学者在掌握分子生物学实验基本的操作技能的基础上,通过探索性实验内容进一步提高实验综合能力。

第2版中新加入的内容如下。植物原生质体遗传转化瞬间表达外源基因,通过这一方法也可获得转基因植株,使它成为基因功能研究中常用方法之一。To12转座子介导的转基因斑马鱼及筛选,转基因斑马鱼作为一种模式动物在科研中的应用越来越广,其实验简单操作技术性强。快速提取植物总DNA,操作简便实用性强,在拟南芥作为模式植物进行的多种研究中,这一实验经常需要进行。拟南芥微管蛋白折叠辅因子A的晶体生成这一实验,是从菌体中获得蛋白质后生成晶体,是在本书第一部分和第二部分一些实验的基础上进一步的提高延伸,目前它对蛋白质结构功能研究仍然是非常实用,这里要展示如何从克隆到的基因获得其编码蛋白质的晶体结构的一个系统的成功的实验操作方案;单碱基突变突变体的鉴定方法和已知侧翼序列的拟南芥T-DNA插入突变体的鉴定,这两个实验是PCR实验的扩展应用,前者配合酶切分析对单碱基突变的突变体进行基因型分析,后者可依其实验结果选择感兴趣的研究对象。

本次修订采用了纸质教材与数字课程相结合的出版模式。纸质教材中收录了最为基础和具代表性的实验内容,并通过篇首的技术路线图,帮助学生理清思路、掌握技术。在与教材配套的“数字课程”网站中,补充了更多的应用性实验,并在纸质教材相应位置以 e 标明。供师生在进一步地学习和研究中参考。

此外,分子生物学在飞速发展,学习者还应认真分析所用到的实验方法,收集更多资料信息,充分利用已具备的实验条件,才能设计出合理高效的实验方案,多出有效的实验结果。

由于编者水平有限,书中难免有疏漏之处,还请广大读者批评指正。

编者
2011. 10. 26

第 1 版前言

本科教学中的分子生物学大实验是学生从课堂理论学习到从事科学研究的一个非常重要的学习环节。具有坚实的基础理论与实验技能,学生才能够完成从理论学习到科研实践的质的飞跃。为了更好地帮助学生理解分子生物学的基础理论,培养科研活动中的实际操作能力,我们挑选出最具代表性的实验内容,并结合多年的分子生物学大实验教学经验,编写了这本《现代分子生物学实验技术》教材。该书的特点是将分子生物学最基本的实验方法与最新的研究方法有机结合,使本科生在掌握基本分子生物实验技术的基础上,有机会学习和了解最新的分子生物的研究方法,所编排的实验内容在操作难度上循序渐进,以逐步提高学生科研实验的综合能力,为进一步的研究生学习和科研工作打下坚实的基础。

本书共分三篇。

基础篇 主要内容为基因的克隆和分析,如从植物材料中通过反转录、PCR 等操作获得目的基因,并重组在适宜的载体上,再经过酶切分析、DNA 序列分析进行克隆基因的鉴定。此外,还安排了 cDNA 末端序列的快速扩增实验(RACE)及高通量基因克隆技术(GATEWAY cloning technology)实验,这些新技术的应用使基因克隆变得更加简单高效。

应用篇 主要包括三方面的综合性实验。其一是基因表达分析,除了介绍在原核细胞中表达外源基因外,还介绍了在真核细胞中表达外源基因以及 Western 印迹分析检测目的蛋白。在昆虫细胞中表达真核生物的目的蛋白是近年来研究蛋白质功能和结构中的一种重要方法,该方法容易得到可溶性蛋白质,有利于蛋白质结构和功能的研究。其二是转基因植物的创制及检测,除介绍了土壤农杆菌介导的植物基因转化方法外,还介绍了微弹轰击法进行植物基因的转化技术,这些都是科研中常用的技术与方法。然后通过 DNA 的 Southern 印迹分析和 mRNA 的 Northern 印迹分析,证明目的基因是否存在于转化材料中。除了介绍应用同位素标记核苷酸探针的实验方法外,还介绍了以地高辛(digoxin 或 digacin, Dig)标记核苷酸探针的实验方法。以 Dig 代替同位素,克服了实验中的不安全性和同位素潜在的污染问题,简化了实验操作,使 Southern 印迹和 Northern 印迹实验在一般实验室就可进行。其三是蛋白质与基因功能的分析。如蛋白质相互作用的分析,由于对蛋白质功能的研究越来越广泛,所以在此把酵母双杂技术系统引入本科生实验教学。包括用

于细胞核内和细胞质中(CytoTrap 系统)研究蛋白质相互作用的方法。另外,所介绍的 DNA-蛋白质的相互作用,也是首次为本科生设计的蛋白质与 DNA 相互作用的研究方法,该方法是蛋白质和 DNA 功能研究中最重要实验方法之一。在基因功能分析的内容中,一部分内容是以烟草脆裂病毒为载体,通过基因沉默分析植物基因功能,另一部分是通过构建水稻突变体,以研究水稻基因功能。

探索篇 主要设计思路是给学生一个相对独立模拟科研的探索机会,激发学生的科研兴趣,充分发挥学生的科研潜能,让学生相互学习、尝试用不同的方法解决同一问题,同时也是对课程设计、课堂训练情况及学生学习情况的一种检验。

本书编者近十几年来一直从事分子生物学教学和研究,承担分子生物学部分实验教学,主持或参与着多项科学研究项目,发表了高水平的学术论文,希望本书也是我们进行科研实验技术交流的一种途径,并能在培养现代分子生物学人才中发挥很好的作用。

该教材在编写过程中得到了北京大学生命科学学院和蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室朱玉贤教授、顾红雅教授、瞿礼嘉教授、许崇任教授、丁明孝教授、安成才教授、赵进东教授和孟玉萍老师等的支持和帮助。另外,俞立、安利忻、门淑珍、李艳、李恩虎、周北雁、李胜、汪敏、程明非、李春波、钟永旺、刘慧君、曹雪松、朱士锋、段明瑞、杜云龙、周朋、钱丹、周锋、张晓明等同学为本书提供了许多宝贵的实验技术和操作经验。

教育部高等学校生物科学与工程教学指导委员会和高等教育出版社在本书内容选择和风格设计等多个方面给予了很大的指导和帮助。高等教育出版社吴雪梅女士和林金安先生给予很多的指导和帮助。书中涉及的部分技术和方法参考了 GIBCO BRL, Life Technologies, Invitrogene Life Technologies, Roche, CLONTECH 和 Stratagene 等公司相关产品的操作手册。本书还参考了许多研究论文的结果。高等教育出版社王莉、赵晓媛女士在整个书的编写过程以及后期排版、校对、印刷等过程中给予了许多的帮助,郭力恒先生在图片绘制方面做了大量的工作。在此,对所有指导、帮助、参与和关心本书的人员和单位表示最诚挚的感谢。

由于编著者水平有限,书中难免会有这样或那样的疏漏和不当之处,敬请读者提出宝贵意见和批评指正。

编 者

2006. 5. 26

目 录

基 础 篇

1 碱法提取质粒	3
2 煮沸法提取质粒	12
3 质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	16
4 质粒的限制性内切酶反应分析	22
5 用玻璃奶回收琼脂糖凝胶中的 DNA	28
6 DNA 的连接	31
7 <i>E. coli</i> DH5 α 感受态细胞的制备及转化	36
8 植物总 RNA 的提取	41
9 聚合酶链反应——PCR	45
10 cDNA 末端快速扩增——RACE	51
11 高通量基因克隆技术	63
12 银染法 DNA 序列测定	e

应 用 篇

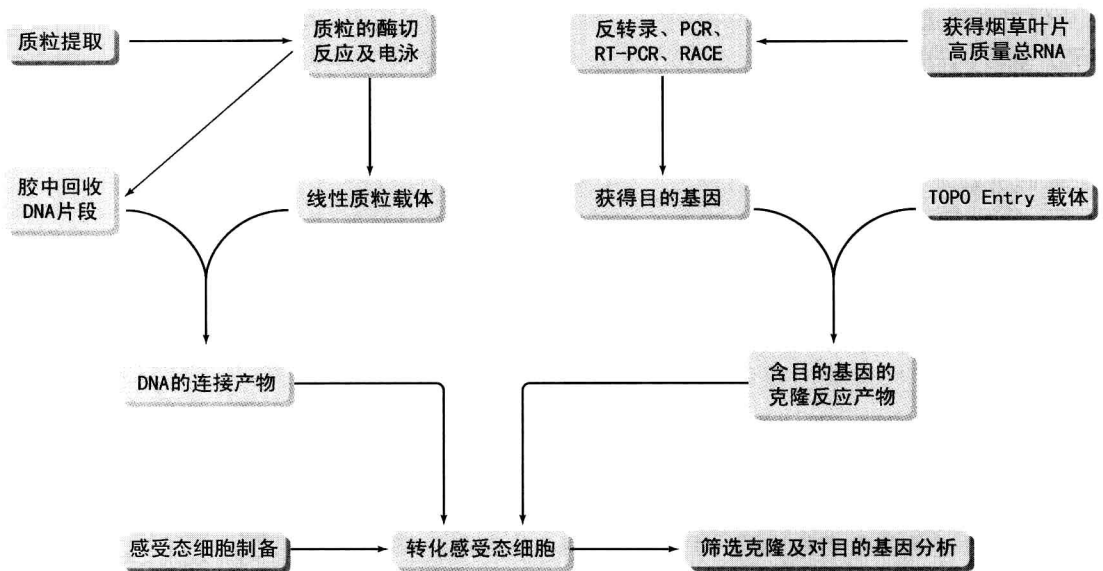
13 原核细胞中外源基因的表达和初步纯化	75
14 蛋白质的 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳	81
15 蛋白质的 Western 印迹分析	87
16 拟南芥微管蛋白折叠辅因子 A 的晶体生成	e
17 昆虫细胞中外源基因的表达	95
18 Tol2 转座子介导的转基因斑马鱼及筛选	100
19 拟南芥原生质体遗传转化	107
20 土壤农杆菌介导的烟草基因转化	111
21 应用微弹轰击法进行兰花基因转化	119
22 植物总 DNA 的提取	127
23 快速提取植物总 DNA	e
24 DNA 探针的制备	e

25	DNA 的 Southern 印迹分析(用同位素标记探针)	132
26	DNA 的 Southern 印迹分析(用 Dig 标记探针)	138
27	mRNA 的 Northern 印迹分析(用 Dig 标记探针)	142
28	酵母双杂系统研究蛋白质的相互作用	149
29	CytoTrap 酵母双杂系统研究蛋白质的相互作用	149
30	DNA - 蛋白质的相互作用	156
31	蛋白质核酸结合活性的分析	163
32	以烟草脆裂病毒为载体通过基因沉默分析植物基因功能	167
33	水稻突变体库的创建	173
34	转基因水稻突变体 T - DNA 侧翼序列的扩增与分析	173
35	单碱基突变体的鉴定方法	173
36	已知侧翼序列的拟南芥 T - DNA 插入突变体的鉴定	173

探 索 篇

37	亚克隆及检测的独立设计与操作	185
38	土壤农杆菌感受态细胞的制备和转化	187
39	不同植物材料组织的再生培养	189
40	在酵母细胞中表达外源基因	191
41	应用 Bac - to - Bac 杆状病毒表达系统在昆虫细胞中表达蛋白	193
42	检测蛋白质的相互作用——Protein Overlay	196
43	沉默转 <i>GUS</i> 基因烟草中的 <i>GUS</i> 基因	198
44	拟南芥 T - DNA 突变库的构建	200
45	用 RNAi 的方法研究拟南芥基因功能	202
主要参考资料		204

基础篇



在科研中常需要从动植物材料中获得某一目的基因或 DNA 片段,本篇以烟草 *SGTI* 基因(抗病信号转导途径基因)为例设计实验。在实际工作中是先对可得到的目的基因或 DNA 片段资料信息进行分析;然后设计引物,在合成引物的同时,进行烟草总 RNA 的提取和质量检测;RNA 质量合格后进行反转录,用合成的引物进行 PCR 扩增目的基因,PCR 结果的电泳检测,PCR 产物的末端处理。目的基因或 DNA 片段与载体的连接,感受态细胞的制备、转化以及筛选目的基因克隆(包括提取质粒、质粒的琼脂糖凝胶电泳、质粒的酶切分析及目的基因或 DNA 片段克隆的序列分析)。作为本科生实验,为了让学生掌握分子生物学实验中常用仪器的使用、微量试剂的取用等,首先使学生进入分子生物学实验的状态,然后在操作技能上循序渐进得以提高。实验安排先进行操作简单的提取质粒 pBS - *SGTI* 和 pYL156,对得到的质粒进行琼脂糖凝胶电泳及其酶切分析,再通过 DNA 片段的回收、DNA 重组及连接产物转化大肠杆菌感受态细胞的实验操作,使学生掌握最基本的分子生物学的操作技术,在此基础上再进行高难度的实验,如烟草总 RNA 的提取。RNA 的提取操作简单,但稍不细心就得不到高质量的 RNA,这不但直接影响整个实验进度,而且对于有限的材料会造成很大的损失。随后对烟草总 RNA 进行反转录,采用 RACE 方法获得 *SGTI* 基因的两端序列,在此基础上设计 *SGTI* 基因两端引物,应用 RT - PCR 进一步得到 *SGTI* 基因的全长序列或经 TOPO 克隆把 *SGTI* 基因克隆在 TOPO 初始载体中,经序列分析选择正确的 *SGTI* 基因克隆。高通量基因克隆技术(GATEWAY cloning technology)是简单高效的克隆技术,通过对 *SGTI* 基因克隆学生将体会到这一技术方法的显著优势。DNA 序列测定早已商业化,大多数科研组不自行测序,但学生有必要了解 DNA 序列测定原理及对 DNA 序列如何进行分析,所以这里也编写了银染测定 DNA 序列的方法。

实验

1

碱法提取质粒

1 目的

- 了解掌握碱法提取质粒的原理和方法。
- 掌握微量移液器、高速离心机等的正确使用。
- 提取质粒 pYL156、pBS - SGT1。

2 原理

对培养的含有大量质粒的菌液,离心收集菌体。用含一定浓度葡萄糖的缓冲液(溶液 I)悬浮菌体,采用碱性 SDS(十二烷基硫酸钠)溶液裂解菌体的细胞壁,使质粒缓慢释放出来,同时整个液体的 pH 为 12 ~ 12.5,双链 DNA 变成单链,当 pH 调至中性并有高盐浓度存在下,绝大多数变性质粒恢复自然状态溶在液体中,而变性染色体不能复性,断裂成线性的单链细菌染色体 DNA 相互交联缠绕附着在细胞壁碎片上与蛋白质形成沉淀,离心获得含有大量质粒的上清液,再利用适当浓度的亲水性有机溶剂(乙醇、异丙醇、PEG8000)使质粒 DNA 脱水,离心得到质粒沉淀(图 1-1)。

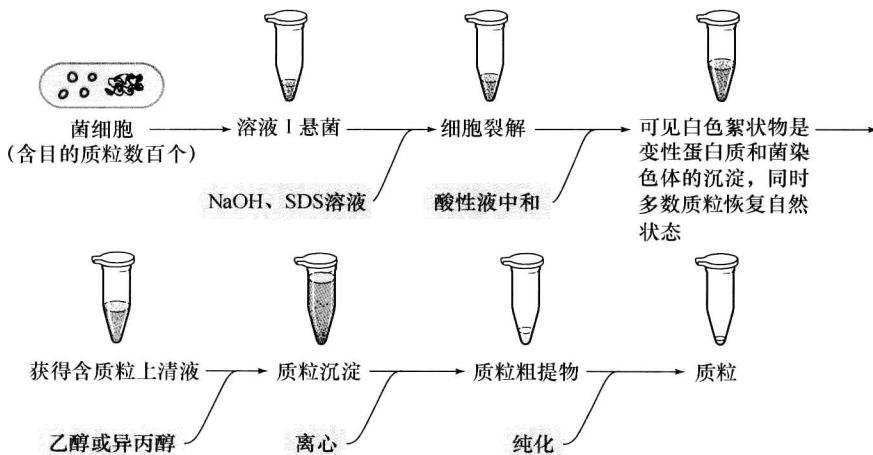


图 1-1 碱法提取质粒流程示意

思考:
基因工程中作为载体质粒的特点是什么?

3 材料、试剂和仪器

3.1 材料

- 菌种 *E. coli* DH5 α 含质粒 pYL156。
- 菌种 *E. coli* DH5 α 含质粒 pBS - *SGT1*。

3.2 试剂

- LB 培养基: 固体 LB 培养基 60 mL, 准备实验培养菌种用。
液体 LB 培养基, 配制 200 mL 分装在 6 个 100 mL 体积的三角瓶内, 灭菌。

液体 LB (pH 7.0) 成分:

蛋白胨	10 g/L
酵母提取物	5 g/L
NaCl	10 g/L
NaOH (1 mol/L)	1 mL/L

(固体 LB 培养基是在液体 LB 中加琼脂粉至 1%, 本次实验课学生只用到液体 LB。)

- 溶液 I 50 mL (保存在 0 ~ 4 $^{\circ}$ C):

葡萄糖	50 mmol/L
Tris · Cl (pH 8.0)	25 mmol/L
EDTA (pH 8.0)	10 mmol/L
 - 溶液 II 100 mL:

NaOH	0.2 mol/L
SDS	1% (W/V)

 用时由母液 2 mol/L NaOH、10% (W/V) SDS 稀释现配。
 - 溶液 III 100 mL (保存在 0 ~ 4 $^{\circ}$ C):

KOAc (5 mol/L)	60 mL
冰醋酸	11.5 mL
H ₂ O	28.5 mL

 有时需改变冰醋酸与水的体积使溶液的 pH 为 4.8。
 - 无离子灭菌水。
 - 7.5 mol/L NH₄OAc: 100 mL。
- 以上溶液配制完后, 除溶液 II 外, 其他试剂需在 121 $^{\circ}$ C、15 磅, 灭菌 15 ~ 20 min。
- 70% 乙醇, 用新开装的乙醇和灭菌无离子水配成, 放在 0 ~ 4 $^{\circ}$ C。
 - 无水乙醇, 放在 0 ~ 4 $^{\circ}$ C。
 - RNase 母液:

将 RNase 溶于 10 mmol/L Tris · Cl (pH 7.5)、15 mmol/L NaCl 配成的

思考:

试了解一般科研组如何保存菌种。

pH 计使用提示:

pH 计的探头不能放入过酸、过碱的环境中。当加入酸和碱时需取出探头, 搅匀后再测, 用完要洗净探头。

思考:

成分复杂的溶液如何配制?

思考:

本实验的哪些试剂常放在 0 ~ 4 $^{\circ}$ C 环境中?

试剂中,配成 10 mg/mL 的溶液,在 100℃ 加热 15 min,使可能混有的 DNase 失活,然后缓慢冷却至室温,分装成小份保存于 -20℃。

- 氨苄青霉素 (Amp): 100 mg/mL。
- 卡那霉素 (Kan): 50 mg/mL。
- Tris 饱和酚 (pH 7.0): 氯仿: 异戊醇 = 25:24:1 (V/V/V)

为下个实验准备下列试剂:

- 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0): 100 mL。
- 50 × TAE 电泳缓冲母液 50 mL:

Tris 碱	12.1 g
冰醋酸	2.85 mL
0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)	5 mL

- 6 × DNA 电泳上样液:

溴酚蓝	0.25%
蔗糖水溶液	40% (W/V)

3.3 仪器用品

超净台、高速台式离心机、37℃ 摇床、高压灭菌锅、制冰机、电子天平、pH 计、量筒 (10 mL, 100 mL, 500 mL, 1 000 mL)、烧杯 (50 mL, 100 mL, 500 mL, 1 000 mL)、玻璃棒、镊子、微量移液器 (1 000 μL, 200 μL, 20 μL)、酒精灯、灭菌的 1.5 mL 离心管 (ependorf 管)、灭菌吸头 (1 000 μL, 200 μL) 和吸水纸。

4 操作步骤

4.1 离心获得菌体

操作步骤如图 1-2 所示。

注意: (1) 实验用菌不能污染周围环境,不用的含菌液体应作灭菌处理。

(2) 使用离心机放入的离心管重力平衡,管外不能有液体。

(3) 操作中弃上清液时要彻底,可用小离心机把管壁上的少量液体离心到管底,再用微量移液器吸出。

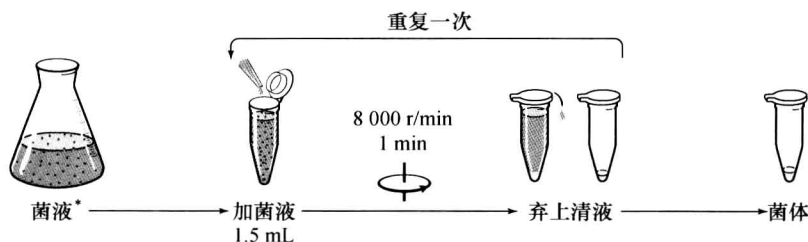


图 1-2 离心获得菌体

其中*: 菌液的准备——在超净台内分别从保存的平板上挑取单菌落,或用以其他方式保存的菌种接种于分装在 6 个三角瓶中的 200 mL LB (分别含 Amp, Kan) 培养液,在 37℃ 培养 15 ~ 18 h

思考:

如何配制和保存抗生素液体?

高压灭菌锅使用提示:

每次使用前检查锅底水位及外接水瓶的水位,确保水位是处于要求的范围内;当温度显示超过 80℃ 时不能打开锅盖,以防烫伤;当压力降为零时才可以打开锅。

移液器使用提示:

不能超出它的量取范围;吸入和推出液体时要缓慢;吸入液体后不能平放;需按时保修。

4.2 菌体破裂获得含质粒的上清液

操作步骤如图 1-3 所示。

- 注意: (1) 菌体破裂后的液体保持在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$, 一般将管放在冰盘上。
 (2) 加入各种试剂后盖好管, 水平转动离心管或上下缓和颠倒数次以混合各种成分。
 (3) 加入溶液 II 后在冰上放置不要超过 5 min。
 (4) 本实验所用到的溶液 I 和溶液 III 须一直保存在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 。

思考:

如何减少化学和物理因素对超螺旋质粒的破坏?

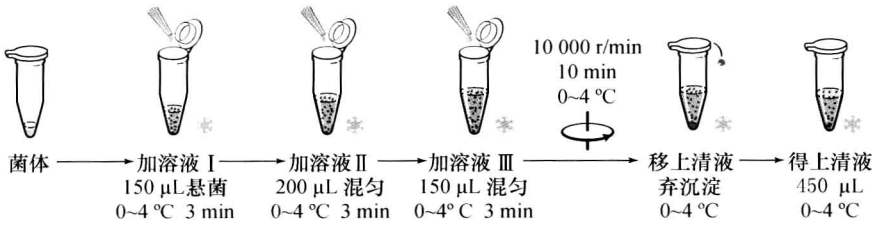


图 1-3 菌体破裂获得含质粒的上清液

4.3 获得较纯的质粒

注意: 对质粒的纯度要求不是很高的情况下用 NH_4OAc 纯化法, 酚氯仿抽提蛋白质得到的质粒纯度高, 但容易造成实验室空气的污染, 所以尽量少用。

4.3.1 NH_4OAc 纯化法

用 NH_4OAc 纯化法(图 1-4)提到的质粒可以用来进行酶切反应或作为一般鉴定性 PCR 的模板。

思考:

什么情况下需对提取的质粒进行纯化?

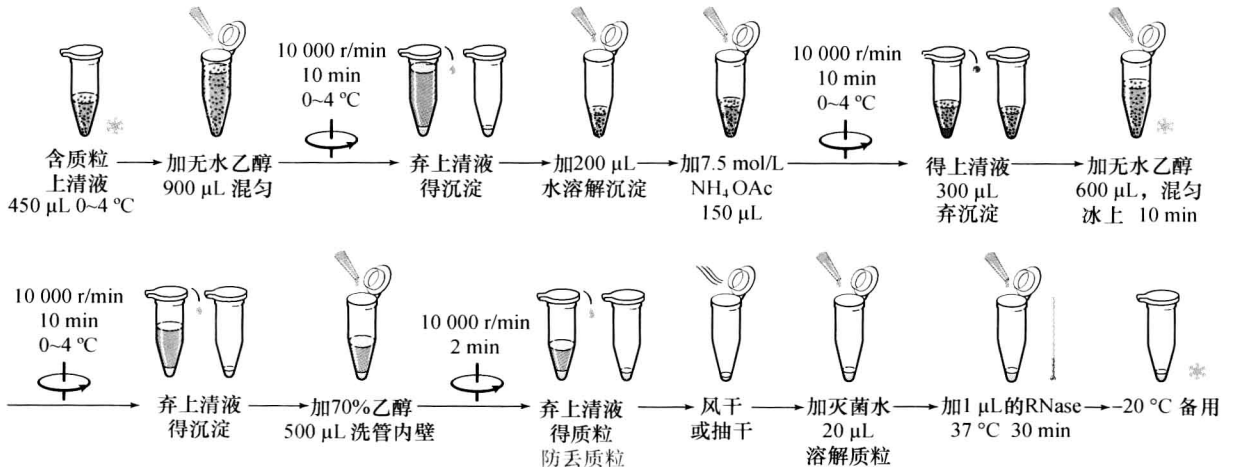


图 1-4 NH_4OAc 纯化质粒法

4.3.2 酚氯仿纯化法

操作步骤如图1-5所示。

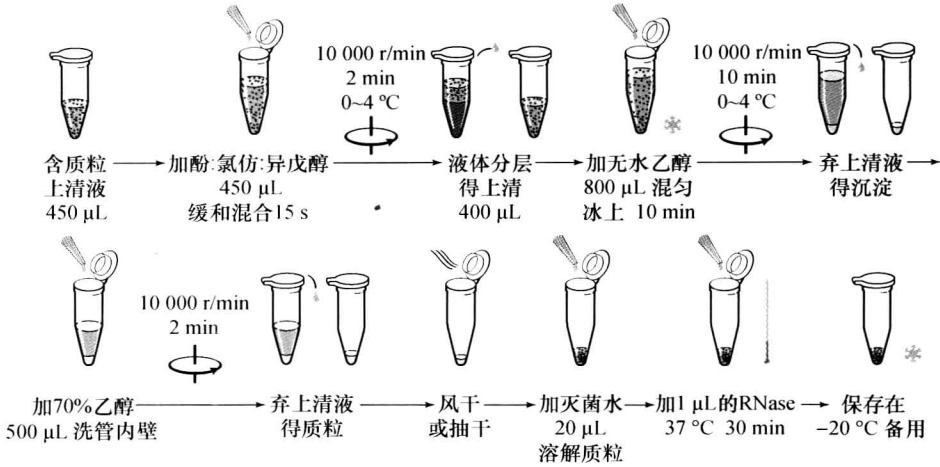


图1-5 酚氯仿纯化质粒

提取的质粒多数以超螺旋型存在,超螺旋的质粒DNA中一个螺旋由10个碱基组成,若一个螺旋大于或小于10个碱基时,分子内就产生一种力量,处于不稳定状态,当分子上有一个缺刻时,分子会立即松弛,形成开环分子,如果质粒的双链配对处都断裂则形成线性质粒。质粒的3种形式如图1-6所示,一般提取的超螺旋型质粒应占到总量70%以上,否则反思你的每步操作是否正确。

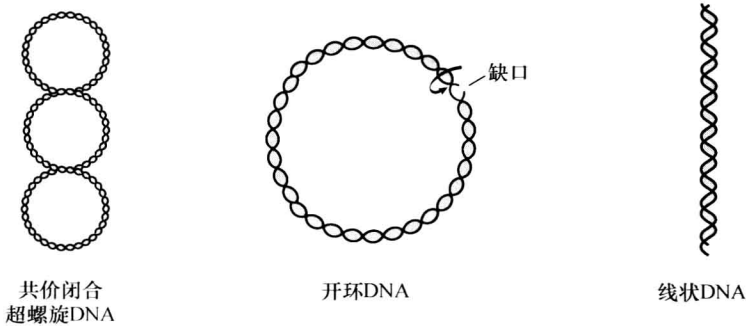


图1-6 同一种质粒的3种基本的存在形式示意图

碱法提取的质粒如图1-7,菌中的质粒如图1-8。

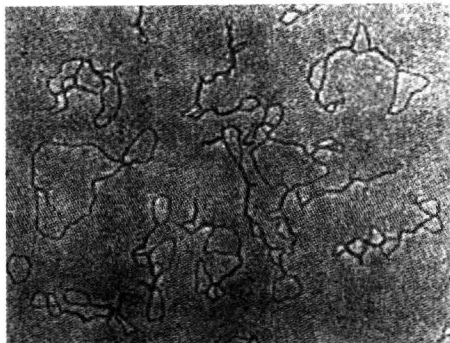


图 1-7 碱法提取的质粒 pCMVLuc DNA 的电镜照片

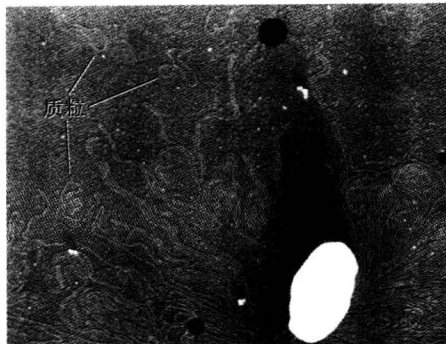


图 1-8 电镜下细菌的染色体和细菌的质粒

当细菌细胞被缓慢破碎后 DNA 保留其完整性, 图中示几个质粒的环状结构

5 提示

(1) 提取核酸时应尽量保护绝大多数核酸的一级结构完整性。采取简化操作步骤, 缩短提取过程等方法, 以减少各种有害因素对核酸的破坏。为避免过酸、过碱对核酸链中磷酸二酯键的破坏, 操作多在 pH 4 ~ 10 条件下进行以减少化学因素对核酸的降解; 避免多次离心、吸取、转移、机械剪切力、高温和反复冻贮等, 以减少物理因素对核酸的降解; DNA 裸露后很容易被核酸酶降解, 要防止细胞内外各种核酸酶消化核酸链中的磷酸二酯键, 直接破坏核酸的一级结构。

(2) 排除其他分子的污染。核酸样品中不应存在对酶有抑制作用的有机溶剂和过高浓度的金属离子; 蛋白质、多糖和脂质分子应降低到最低程度; 提取 DNA 时应除去 RNA 分子, 反之亦然。

(3) 提取核酸时常用的 SDS 能溶解膜蛋白、核小体及脂肪, 从而释放出核酸; 它对 RNase 和 DNase 有抑制作用; 还能与蛋白质形成复合物使蛋白质变性沉淀。

(4) 纯化核酸时用到的苯酚, 常会氧化产生自由基, 这种自由基能够引起磷酸二酯键的断裂, 所以用前需要重蒸除去氧化物, 还必须用 Tris · Cl 或水制成饱和酚, 同时调 pH 为中性或酸性, 另外饱和酚可以降低核酸的损失。饱和酚中要加入 0.1% 的 8-羟基喹啉和 β -巯基乙醇, 一方面用于抗氧化, 同时使饱和酚呈淡黄色, 淡黄色消失则表明饱和酚不可再用。

(5) 用乙醇沉淀 TE 或水中的核酸时需要加入 NaOAc 使其浓度到 0.25 ~ 0.3 mol/L, 它可以中和核酸中的一 OH, 增强核酸的聚集力, 利于核酸沉淀。

(6) 使用的 TE 缓冲液中的 EDTA, 可螯合 Mg^{2+} , 使核酸酶失去辅助因子而不能发挥其作用, 从而保护核酸。

6 质粒

6.1 质粒简介

(1) 质粒(plasmid)是细胞染色体外一种双链 DNA 分子,它随寄主细胞稳定遗传。至今发现的质粒多数是环状的,也有少数是线性的,如一些能够产生抗生素的链霉菌属质粒。对于质粒的研究始于 1946 年,美国科学家 Lederberg J 首先研究了细菌的性因子(F 因子),随后科学家们又相继发现了细菌的抗药性因子(R 因子)、大肠杆菌素因子(CoE)等,并对这些染色体外遗传单位的性质、功能及与宿主的关系进行了深入的研究,为建立第一批重组 DNA 载体提供了科学的依据。

(2) 质粒 DNA 在细菌中的复制分为严紧型(stringent control)和松弛型(relaxed control)。严紧型质粒的复制要在蛋白质合成时和 DNA 聚合酶Ⅲ的存在,只随染色体的复制而复制,其拷贝数少,每个细胞中只有 1~10 个;松弛型质粒的复制需要使用的是 DNA 聚合酶 I,它在细胞生长周期中随时可以复制,每个细胞中有 10~200 以上个拷贝。现在基因工程中应用的质粒,部分在细菌细胞中的拷贝数可达上千个。

(3) 质粒具有相容性,即复制机制不同的质粒可以共存于同一个细胞。

6.2 载体质粒的特点

(1) 载体质粒是一个复制子,由复制起点、复制区和复制终点组成。它能自我复制而不受染色体制约,使它携带的目的基因得到大量扩增。

(2) 可被转化但不能扩散利于安全,另外相对分子质量小,拷贝数要高,便于应用(如便于提取、基因克隆、酶切鉴定、细胞转化及原位杂交等)。

(3) 至少要有两个便于选择的遗传标记,如 pBluescript SK(+/-),见图 1-9。载体中引入的 *LacZ* 基因用于检查外源 DNA 是否插入到质粒中。它编码 β -半乳糖苷酶氨基端的一个 146 个氨基酸的 α -肽,可以被 IPTG(异丙基- β -D-硫代半乳糖苷)、TAM(硫甲基半乳糖苷)和 DNPG(邻硝基苯基半乳糖苷)诱导合成,新合成的肽能与宿主细胞所编码的缺陷型 β -半乳糖苷酶实现互补,产生有活性的 β -半乳糖苷酶,图 1-10 所示。该酶能够水解 X-gal(5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷),生成蓝色的溴氯吡啶,使含 X-gal 的培养基中生长的菌落为蓝色。若有外源 DNA 插入 *LacZ* 中,因不能合成正确的 α -肽,转化或转染的 Lac 缺陷菌株,用 X-gal 筛选,白色菌落可能是含阳性克隆载体,含空载体的菌落为蓝色。第二个遗传标记用于选择已把载体转化到细菌中的菌落,如氨苄青霉素抗性基因(*Amp^r*),只有经转化含有质粒的重组菌在含氨苄青霉素的培养基中才能生长。

(4) 有多个单一的酶切位点,起点在某个遗传标记上,便于基因克隆,鉴定。如图 1-9 插在 *LacZ* 中的 MCS。

目前科研中使用的载体有质粒 DNA、病毒 DNA、质粒 DNA 与病毒 DNA