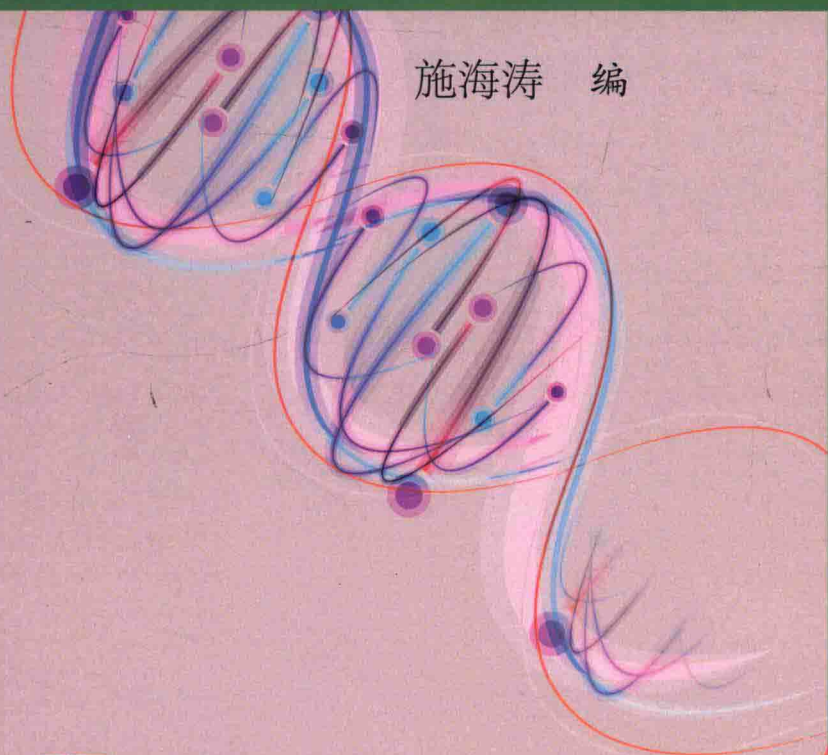




植物基因工程实验指导

施海涛 编



科学出版社

植物基因工程实验指导

施海涛 编



科学出版社

北京

内 容 简 介

本书包含植物基因克隆、植物的组织培养与遗传转化及分子检测和植物基因的分子遗传与生化研究三个部分,共27个实验,基本涵盖了植物基因工程的所有实验操作。本书简明扼要、由表及里、深入浅出地介绍了植物基因工程相关实验体系;既强调基础理论体系与实验技术的结合,也注重知识的系统性与先进性,语言的通俗性和科学性。

本书适用于农学与生命科学专业的本科生、从事植物基因工程、分子遗传学和作物遗传改良与良种等专业的研究生和青年科研人员,以便于他们快速了解相关实验原理,并掌握相关实验操作。

图书在版编目(CIP)数据

植物基因工程实验指导/施海涛编. —北京:科学出版社, 2016.1
ISBN 978-7-03-046315-9

I. ①植… II. ①施… III. ①植物基因工程-实验 IV. ①Q943.2-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第267763号

责任编辑:丛楠 杨晓庆 / 责任校对:何艳萍

责任印制:徐晓晨 / 封面设计:铭轩堂

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京京华虎彩印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016年1月第 一 版 开本:720×1000 B5

2016年1月第一次印刷 印张:6 3/4

字数:162 000

定价:19.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

丛 书 序

生命科学与技术是一门有较长历史的学科，即使在人类文明的初期，人们就已经注意到了生命与非生命的区别，并对各种生物进行了大量的观察、描述，收集整理了大量的相关材料。在21世纪的今天，生命科学与技术已经成为世界科学前沿最活跃的学科之一，并代表和引领着科学发展的最新方向。随着各种新理论、新概念、新技术和新方法的不断涌现，部分生命科学与技术专业课程的设置和内容明显落后于现代科学的发展，很多先进的技术方法和新理论不能及时地走进课堂，也使学生们缺乏对高新技术发展，社会进步情况和日常生活影响的认识，进而影响了他们科学价值观的形成。

植物生理与基因工程是研究植物生命规律及其调控的科学，理论性较强，与农业生产密切相关。在过去的几十年里，植物生理与基因工程在探索作物高产、超高产潜力，揭示作物抗逆、生长发育过程调控机制，在组培快繁、农产品储藏、保鲜研究方面取得了很多重大成果。同时，植物生理与基因工程的发展还带动了作物栽培学、作物育种学、植物病理学、医药卫生工业等学科的发展，内容涉及植物分子生物学、植物细胞生物学、植物发育生物学、植物代谢、植物分子病理学、植物资源学等领域。植物生理与基因工程是当代生物学发展最迅速、最具活力和生气的领域，特别是近年来随着新技术的出现和发展，植物生理与基因工程的研究更是如虎添翼。而且，它与其他学科互相渗透，互相推动，从而促进了生命科学的发展。

在全球气候变化条件下，温度的升高和降水格局的变化，各种环境因子胁迫的单独或联合作用导致的作物大幅度减产，并引发的自然生态系统退化，已经成为制约现代农业发展的一个重要问题。然而，植物由于自身不能移动，当遭受逆境时只能应答外界胁迫，从而进化出一系列复杂而精密的调控机制，来感受外部胁迫并传递信号，最终在分子、细胞和整个植株水平形成应激性反应。各种逆境胁迫首先被植物细胞膜上的感应器所感受，然后信号通过第二信使被传导到下游激发转录因子，从而启动基因的表达，最后通过基因产物的作用在生理生化等方面作出合适的调节反应，以应答相应的胁迫并存活下来。

植物的抗性既受系统发生的遗传基因控制，又受个体发育中生理生态因素制约。在逆境下植物形态结构和生理特性发生明显变化。多种胁迫都会使自由水含

量降低,光合作用减缓,呼吸变化异常,蛋白质、碳水化合物等物质分解大于合成。脯氨酸、甜菜碱、可溶性糖等可通过调节细胞的渗透势从而提高植物的抗渗透胁迫能力。在逆境下植物激素的相对比例发生改变,以不同方式使植物的抗性得以提高,特别是脱落酸在其中起了重要的作用。生物膜往往是胁迫的原初作用部位,逆境下活性氧的产生和消除失去平衡,而抗氧化酶系统对膜系统起保护作用。植物应答各种胁迫反应时,最直观的表现是在生理水平上,如促进渗透调节物,诱导一些功能蛋白,离子调节和区域化,清除活性氧毒害等,因此研究植物逆境胁迫下生理反应具有十分重要的现实意义。

另外,植物表现在生理生化水平上的变化只是在应答非生物胁迫时的下游调整,针对激发这些下游生理生化变化的上游调控的分子机制则需要通过分子生物学的方法进行探讨,特别是分子遗传学的应用。反向遗传学的策略是从已知的基因序列入手鉴定其功能,研究手段包括基因的互补实验、超表达、反义抑制、基因敲除、基因激活等。研究植物体内基因的功能有两大方法,一是基因功能丧失,即筛选目的基因功能部分丧失或全部丧失的突变体,比较其与野生型的差异来确定该基因的功能;二是基因功能增加,即筛选目的基因高水平表达的植株即功能增加植株,比较其与相应对照植株(野生型植株,功能丧失突变体)的差异,来分析基因功能。因此植物分子生物学的研究方法在当前研究中越来越重要,是不可或缺的。

作者从事植物逆境胁迫生理与基因工程研究和教学工作十余年,根据作者多年相关研究经验,选择应用较多的植物逆境生理学实验36个和植物基因工程实验27个,共63个实验汇编成本系列丛书。其中植物逆境生理学实验包含5章,即植物的胁迫表征与渗透调节物,植物的第二信使与部分元素,植物的活性氧与抗氧化酶系统,植物代谢的部分关键酶和植物对病原细菌的抗性;植物基因工程实验包含植物基因克隆,植物的组织培养与遗传转化及分子检测和植物基因的分子遗传与生化研究三部分。这些专题包括了相关专业的研究背景,原理和研究方法。本书既可应用于植物逆境生理学相关专业课程,也可应用于植物分子生物学专业课程,还可应用于相关专业交叉学科。本书将植物逆境生理学和植物基因工程的理论原理与实际操作实验完美结合,学生能自主立项、独立完成实验,初步运用所学的基本实验技能,解决有关植物生理学的问题,在科学态度、实验技能、独立工作能力方面获得初步的锻炼。希望能够让相关领域的本科生、研究生和青年科研人员快速了解相关实验原理,并掌握相关实验操作。

本书序

植物基因工程是研究植物生命规律及其调控的科学，理论性较强，与农业生产密切相关，因而也是一门实验性科学。本书包含植物基因克隆，植物的组织培养与遗传转化及分子检测和植物基因的分子遗传与生化研究三个部分，共27个实验，基本涵盖了植物基因工程的所有实验操作。本书是在作者十多年来科研和教学基础上逐步补充和完善而成，简明扼要、由表及里、深入浅出地介绍了植物基因工程相关实验体系；既强调基础理论体系与实验技术的结合，也注重知识的系统性与先进性，语言的通俗性和科学性。

本书使用和引用了大量国外、国内同行的结果，在此一并表示感谢。由于编写时间仓促，以及编者水平有限和研究方向的局限性，书中难免存在一些不足和纰漏，敬请专家和读者给予批评指正和谅解。

本书能够成稿，要感谢海南大学农学院何朝族研究员和陈银华教授的大力帮助和支持，感谢海南省高等学校教育教学改革研究项目（基因工程海南省精品课程体系与教学内容整体优化研究，批准号：Hnjg2016-10）、海南大学教育教学改革研究课题重点项目立项项目（基因工程海南省精品课程体系与教学内容整体优化研究，批准号：hdjy1601）和海南大学高层次人才引进的科研基金资助项目（项目编号：kyqd1531）的资助，还要感谢科学出版社编辑在文字、图表和格式上认真细致地修改、校正及热情耐心地关心与帮助。

施海涛

haitaoshi@hainu.edu.cn

2016年1月于海南大学

目 录

丛书序

本书序

第一部分 植物基因克隆	(1)
实验一 植物叶片基因组的提取方法	(2)
实验二 植物叶片总RNA的提取与cDNA的合成方法	(3)
实验三 聚合酶链反应	(6)
实验四 CaCl_2 法制备大肠杆菌感受态细胞DH5 α 的方法	(11)
实验五 Inoue法制备大肠杆菌超级感受态的方法	(13)
实验六 大肠杆菌DH5 α 的转化方法	(15)
实验七 植物基因的扩增与基于T载体连接的克隆方法	(17)
实验八 大肠杆菌质粒的提取方法	(22)
实验九 农杆菌感受态细胞GV3101和EHA105的制备方法	(25)
实验十 农杆菌GV3101和EHA105转化方法	(27)
第二部分 植物的组织培养与遗传转化及分子检测	(30)
实验十一 拟南芥的栽培方法	(31)
实验十二 拟南芥的无菌组织培养方法	(34)
实验十三 农杆菌GV3101介导的拟南芥遗传转化方法	(37)
实验十四 拟南芥转基因植株的筛选与PCR鉴定方法	(38)
实验十五 水稻愈伤组织的培养与农杆菌EHA105介导的水稻遗传 转化方法	(42)
实验十六 水稻转基因植株的筛选与PCR鉴定方法	(46)
实验十七 实时荧光定量PCR	(49)
第三部分 植物基因的分子遗传与生化研究	(54)
实验十八 报告基因的融合表达方法	(54)

实验十九 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳	(60)
实验二十 植物总蛋白的双向电泳方法	(64)
实验二十一 原核表达系统中蛋白质的诱导表达与纯化方法	(70)
实验二十二 甲醇酵母表达系统中蛋白质的诱导表达与纯化方法	(76)
实验二十三 酵母双杂交	(81)
实验二十四 Western blot方法	(86)
实验二十五 免疫沉淀方法	(90)
实验二十六 植物叶肉原生质体的提取与质粒的瞬时转化方法	(92)
实验二十七 基因枪介导的洋葱表皮细胞的瞬时转化方法	(94)
主要参考文献	(97)
名词索引 (中英文对照)	(98)

第一部分 植物基因克隆

基因 (gene) 是遗传物质的最基本单位, 也是生物体所有生命活动的基础。不论是要揭示某个基因的功能, 还是要改变某个基因的功能, 都必须首先将所要研究的基因克隆出来, 所以, 特定基因的克隆是整个基因工程或分子生物学的起点。

随着各种植物全基因组测序工作的完成, 植物基因组研究目前已进入后基因组时代, 出现了大量的基因序列数据, 这势必要求人们对这些基因进行功能鉴定。通常植物基因功能的研究有两种方法: 正向遗传学策略和反向遗传学策略。正向遗传学策略, 是采用传统的方法, 通过筛选天然或人工产生的突变体克隆相关目标基因, 即从功能 (表型) 到突变体到基因, 最后得到具有相关功能 (如对于旱敏感或耐旱) 的基因。反向遗传学策略, 是从已知的基因序列入手鉴定其功能, 研究手段包括基因的互补实验、超表达、反义抑制、基因敲除、基因激活等。通常情况下, 研究者们会将这两种策略结合应用。而在所有的这些研究中, 植物基因的克隆是最关键的, 也是必不可少的。

基因克隆的诞生主要得益于 20 世纪生命科学的发展。基因概念的提出和基因与脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 关系的建立为基因重组打下了物质基础。对 DNA 结构的阐明和 DNA 在生命活动中的作用的认知, 为基因操作打下了理论基础。基因操作技术的发展则直接导致基因工程的诞生和发展。此外, 理论上的三大发现 (DNA 是遗传物质被证实; DNA 双螺旋结构模型的提出; 中心法则的提出) 和技术上的三大发明 (工具酶的发现和应用; 反转录酶的发现和应用; 载体的发现和应用) 这些基础的建立, 最终导致了基因克隆和基因工程的发展。通常, 基因克隆技术包括把来自不同生物基因同有自主复制能力的载体 DNA 在体外人工连接, 构建成新的重组 DNA, 然后送入受体生物中去表达, 从而产生遗传物质和状态的转移和重新组合。因此, 基因克隆技术又称为基因操作、基因工程和分子克隆等。

结合目前植物基因克隆的常规操作, 本专题共包括 10 个实验, 即实验一 植物叶片基因组的提取方法; 实验二 植物叶片总 RNA 的提取与 cDNA 的合成方法; 实验三 聚合酶链反应; 实验四 CaCl_2 法制备大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 的方法; 实验五 Inoue 法制备大肠杆菌超级感受态的方法; 实验六 大肠杆菌 DH5 α 的转化

方法；实验七 植物基因的扩增与基于 T 载体连接的克隆方法；实验八 大肠杆菌质粒的提取方法；实验九 农杆菌感受态细胞 GV3101 和 EHA105 的制备方法；实验十 农杆菌 GV3101 和 EHA105 转化方法。

实验一 植物叶片基因组的提取方法

一、实验原理

基因组是指一个细胞中的全部 DNA，包括所有的基因 (gene) 和基因间隔区 (intergenic region)。植物基因组由重复序列和低 (单) 拷贝的 DNA 组成。重复序列分为两类：串联重复 (tandem repeat) 和散布重复 (dispersed repeat)。基因组较大的植物，DNA 序列重复的程度高，单拷贝序列较短 (小于 2 kb)；基因组较小的植物，低拷贝序列则较长，如在拟南芥中可长达 120 kb。

十六烷基三甲基溴化铵 (hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB)，是一种阳离子去污剂，具有从低离子强度溶液中沉淀核酸与酸性多聚糖的特性。在高离子强度的溶液中 (大于 0.7 mol/L NaCl)，CTAB 与蛋白质和多聚糖形成复合物，只是不能沉淀核酸。通过有机溶剂抽提，去除蛋白质、多糖、酚类等杂质后加入乙醇沉淀即可使核酸分离出来。

二、实验仪器

常用玻璃容器与 EP 管，水浴锅，天平，研磨器，冷冻离心机，DNA 干燥仪，移液枪 (配套枪头)，紫外分光光度计等。

三、实验试剂和配制

2% (W/V) CTAB 抽提缓冲液：2% CTAB (W/V)，100 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)-HCl (pH 8.5)，20 mmol/L 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)，1.4 mol/L NaCl，1% (V/V) 聚乙烯吡咯烷酮 (insoluble polyvinylpyrrolidone, PVP)，使用之前加入 β -巯基乙醇使其终浓度为 15% (V/V)。

液氮，氯仿-异戊醇 (体积比为 24 : 1)，异丙醇，70% (V/V) 乙醇。

四、实验步骤

(1) 将 2% CTAB 抽提缓冲液在 65℃ 水浴中预热处理。

(2) 称取 200 mg 植物叶片组织置于研钵中，用液氮磨至干粉状后加入至 1.5 ml 的灭菌 EP 管中，然后加入 700 μ l 的 2% CTAB 抽提缓冲液后轻轻摇动，将提取液置于 65℃ 的水浴锅或恒温箱中，每隔 10 min 轻轻摇动，30 ~ 60 min 后取出。

(3) 将装有提取液的 EP 管冷却至室温后，加入 700 μ l 的氯仿：异戊醇（体积比为 24 : 1）溶液，充分混匀后，室温下 12 000 r/min 离心 10 min。

(4) 用移液枪取上清液，加入 700 μ l 异丙醇，上下轻轻摇动混匀后，4℃ 12 000 r/min 离心 10 min。

(5) 弃上清后向离心后的 EP 管中加入 500 μ l 70% 乙醇。

(6) 4℃ 12 000 r/min 离心 1 min，弃 70% 乙醇溶液后，在 DNA 干燥仪中将 EP 管干燥。

(7) 向干燥后的 EP 管中加 50 μ l 无菌水溶解沉淀，紫外分光光度计测定或电泳估测 DNA 浓度。

五、思考题

(1) 目前已经完成基因组测序的植物物种有哪些？

(2) CTAB 法提取植物基因组应该注意些什么？

(3) 植物基因组的提取方法除 CTAB 法外，还有哪些？

(4) 植物基因组的沉淀方法有哪几种？

实验二 植物叶片总RNA的提取与cDNA的合成方法

一、实验原理

从植物组织中提取信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA)，通过酶促反应反转录合成互补脱氧核糖核酸 (complementary DNA, cDNA) 的第一链和第二链，将双链 cDNA 和载体连接，然后转化扩增，即可获得 cDNA 文库，构建的 cDNA 文库可用于植物基因的结构、表达和调控的分析；比较 cDNA 和相应基因组 DNA 序列差异可确定内含子存在和了解转录后加工等一系列问题。总

之, cDNA 的合成和克隆已成为当今植物分子生物学研究的基本手段。cDNA 合成及克隆的基本步骤包括用反转录酶合成 cDNA 第一链, 聚合酶合成 cDNA 第二链, 加入合成接头, 以及将双链 DNA 克隆到适当载体。

1. 核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 制备

模板 mRNA 的质量直接影响到 cDNA 合成的效率。由于 mRNA 分子的结构特点, 它容易受 RNA 酶的攻击反应而降解, 加上 RNA 酶极为稳定且广泛存在, 因此在提取过程中要严格防止 RNA 酶的污染, 并设法抑制其活性, 这是本实验成败的关键。所有的组织中均存在 RNA 酶, 人的皮肤、手指、试剂、容器等均可能被污染, 因此全部实验过程中均需戴手套操作并经常更换 (使用一次性手套)。所用的玻璃器皿需置于干燥烘箱中 200℃ 烘烤 2 h 以上。凡是不能用高温烘烤的材料如塑料容器等皆可用 0.1% (W/V) 的焦碳酸二乙酯 (diethylpyrocarbonate, DEPC) 水溶液处理, 再用双蒸水冲净。焦碳酸二乙酯是 RNA 酶的化学修饰剂, 它和 RNA 酶的活性基团组氨酸的咪唑环反应而抑制酶活性。焦碳酸二乙酯与氨水溶液混合会产生致癌物, 因而使用时需小心。实验所用试剂也可用焦碳酸二乙酯处理, 加入焦碳酸二乙酯至 0.1% (W/V) 浓度, 然后剧烈振荡 10 min, 再煮沸 15 min 或高压灭菌以消除残存的焦碳酸二乙酯, 否则焦碳酸二乙酯也能和腺嘌呤作用而破坏 mRNA 活性。但焦碳酸二乙酯能与胺和巯基反应, 因而含三羟甲基氨基甲烷 [tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris] 和二硫苏糖醇 (DL-dithiothreitol, DTT) 的试剂不能用焦碳酸二乙酯处理。三羟甲基氨基甲烷溶液可用焦碳酸二乙酯处理的水配制然后高压灭菌。配制的溶液如不能高压灭菌, 可用焦碳酸二乙酯处理水配制, 并尽可能用未曾开封的试剂。除焦碳酸二乙酯外, 也可用异硫氰酸胍、钒氧核苷酸复合物、RNA 酶抑制蛋白等。此外, 为了避免 mRNA 或 cDNA 吸附在玻璃或塑料器皿壁上, 所有器皿一律需经硅烷化处理。

2. cDNA 第一链的合成

所有合成 cDNA 第一链的方法都要用依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶 (反转录酶) 来催化反应。cDNA 合成最常用的引物是与真核细胞 mRNA 分子 3' 端 poly (A) 结合的 12 ~ 18 核苷酸长的多聚胸腺嘧啶 [oligo (dT)]。

3. cDNA 第二链的合成

(1) 自身引导法: 合成的单链 cDNA 3' 端能够形成一短的发夹结构, 这就为第二链的合成提供了现成的引物, 当第一链合成反应产物的 DNA 与 RNA 杂交链变性后利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段或反转录酶合成 cDNA 第二链,

最后用对单链特异性的 S1 核酸酶消化该环,即可进一步克隆。但自身引导合成法较难控制反应,而且用 S1 核酸酶切割发夹结构时无一例外地将导致对应于 mRNA 5' 端序列出现缺失和重排,因而该方法目前很少使用。

(2) 置换合成法:该方法利用第一链在反转录酶作用下产生的 cDNA 与 mRNA 杂交链不用碱变性,而是在 dNTP 存在下,利用 RNA 酶 H 在杂交链的 mRNA 链上造成切口和缺口。从而产生一系列 RNA 引物,使之成为合成第二链的引物,在大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的作用下合成第二链。该反应有以下三个主要优点:①非常有效;②直接利用第一链反应产物,无需进一步处理和纯化;③不必使用 S1 核酸酶来切割双链 cDNA 中的单链发夹环。目前合成 cDNA 常采用该方法。

二、实验仪器

常用玻璃容器与 EP 管,水浴锅,天平,研磨器,冷冻离心机,移液枪(配套枪头),PCR 仪,紫外分光光度计等。

三、实验试剂

液氮,总 RNA 抽提试剂——TRIZOL 试剂,焦碳酸二乙酯- H_2O ,70%乙醇,氯仿,异丙醇,多聚胸腺嘧啶,5× 反转录(reverse transcription, RT)缓冲液,RNA 酶抑制剂,反转录酶。

10 mmol/L 脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP)混合物:是包括 dATP、dGTP、dTTP、dCTP 等在内的统称,N 是指含氮碱基,代表变量,指代腺嘌呤(adenine, A)、鸟嘌呤(guanine, G)、尿嘧啶(uracil, U)、胞嘧啶(cytosine, C)、胸腺嘧啶(thymine, T)等中的一种。

四、实验步骤

(1) 称取植物叶片组织约 100 mg,加入液氮充分研磨后移入氯仿处理并灭菌的 EP 管中,加入 1 ml TRIZOL 试剂,上下左右轻轻振荡混匀,室温下放置 5 min 后移入冰上放置。

(2) 向用氯仿处理过的 EP 管中加入 0.2 ml 氯仿,上下左右充分振荡 30 s,室温放置 5 ~ 10 min 后,12 000 r/min 4℃ 离心 15 min。

(3) 将离心后得到的上清转移到另一氯仿处理并灭菌的 EP 管中,加入等体积异丙醇,放入 -20℃ 冰箱沉淀 30 ~ 60 min,12 000 r/min 4℃ 离心 15 min。

(4) 弃上清后用 70% 乙醇洗涤沉淀, 12 000 r/min 4℃ 离心 1 min, 然后吸去上清, 室温放置以使 RNA 完全干燥。

(5) 将干燥后的沉淀 RNA 溶于 20 μ l DEPC-H₂O, 电泳检测或 -20℃ 保存。

(6) 在氯仿处理并灭菌的 PCR 管中配置反应体系, 在反应体系中依次加入: 6 μ l RNA, DEPC-H₂O 6 μ l, 1 μ l oligo dT, 1 μ l 10 mmol/L dNTP 混合物 (dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP 各 2.5 mmol/L), 65℃ 反应 5 min。

(7) 将反应后的 PCR 管移至冰上, 再向反应体系中依次加入: 4 μ l 5×RT 缓冲液, 1 μ l RNA 酶抑制剂, 42℃ 反应 2 min。

(8) 将反应后的 PCR 管转移至冰上, 向反应体系加入 1 μ l 反转录酶, 42℃ 反应 50 min。

(9) 70℃, 反应 15 min, 反应后的产物即为 cDNA, -20℃ 冰箱中保存备用。

五、思考题

- (1) RNA 提取过程中应注意些什么?
- (2) RNA 的提取及反转录包括哪些步骤?
- (3) RNA 的提取及反转录过程中需用到哪些工具酶? 它们各有何作用?
- (4) 如何防止 RNA 提取过程中的降解?

实验三 聚合酶链反应

一、实验原理

DNA 的半保留复制是生物进化和传代的重要途径。双链 DNA 在多种酶的作用下可以变性解旋成单链, 在 DNA 聚合酶的参与下, 根据碱基互补配对原则复制成同样的两分子拷贝。在实验中发现, DNA 在高温时也可以发生变性解链, 当温度降低后又可以复性成为双链。因此, 通过温度变化控制 DNA 的变性和复性, 加入设计引物、DNA 聚合酶、脱氧核糖核苷三磷酸就可以完成特定基因的体外复制。但是, DNA 聚合酶在高温时会失活, 因此, 每次循环都得加入新的 DNA 聚合酶, 不仅操作烦琐, 而且价格昂贵, 制约了聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术的应用和发展。耐热 DNA 聚合酶——*Taq* 酶的发现对于 PCR 的应用具有里程碑的意义, 该酶可以耐受 90℃ 以上的高温而不失活, 不需要每个循环加酶, 使 PCR 技术变得非常简捷, 同时也大大降低了成本。

PCR 技术的基本原理类似于 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℃ 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,成为单链,这样便于它与引物结合,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℃ 左右,引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合;③引物的延伸, DNA 模板-引物结合物在 72℃ 和 DNA 聚合酶(如 *Taq* DNA 聚合酶)的作用下,以 dNTP 为反应原料,靶序列为模板,按碱基互补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 min, 2 ~ 3 h 就能将待扩目的基因扩增放大几百万倍。

PCR 反应 5 要素,即参加 PCR 反应的物质主要有以下 5 种:引物(PCR 引物为 DNA 片段,细胞内 DNA 复制的引物为一段 RNA 链)、酶、dNTP、模板和缓冲液(其中需要 Mg^{2+})。因此,对于一个 PCR 反应,其反应体系主要包括:①扩增缓冲液;② 4 种 dNTP 混合物(终浓度均为 100 ~ 250 $\mu\text{mol/L}$);③左右两端引物(终浓度均为 5 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$);④模板 DNA 为 0.1 ~ 2 μg ;⑤ *Taq* DNA 聚合酶 5 ~ 10 U;⑥ Mg^{2+} (终浓度约为 2 mmol/L)。其中 dNTP、引物、模板 DNA、*Taq* DNA 聚合酶及 Mg^{2+} 的加量(或浓度)可根据实验进行调整。

PCR 反应中有两条引物,即 5' 端引物和 3' 端引物。设计引物时以一条 DNA 单链为基准(常以信息链为基准),5' 端引物与位于待扩增片段 5' 端上的一小段 DNA 序列相同;3' 端引物与位于待扩增片段 3' 端的一小段 DNA 序列互补。引物有多种设计方法,由 PCR 在实验中的目的决定,但基本原则相同,即:①引物长度,15 ~ 30 bp,常用为 20 bp 左右。②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参照。③引物内部不应出现互补序列。④两个引物之间不应存在互补序列,尤其是避免 3' 端的互补重叠。⑤引物与非特异扩增区的序列的同源性不要超过 70%,引物 3' 端连续 8 个碱基在待扩增区以外不能有完全互补序列,否则易导致非特异性扩增。⑥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,最佳选择是 G 和 C。⑦引物的 5' 端可以修饰。例如,附加限制酶位点,引入突变位点,用生物素、荧光物质、地高辛标记,加入其他短序列,包括起始密码子、终止密码子等。

PCR 所用的酶主要有两种来源:*Taq* 和 *Pfu*,分别来自两种不同的嗜热菌。其中 *Taq* 扩增效率高但易发生错配。*Pfu* 扩增效率弱但有纠错功能。所以实际使用时必须根据需要做不同的选择。

模板即扩增用的 DNA, 也可以是 RNA, 可以是任何来源, 但有两个原则, 第一, 纯度必须较高; 第二, 浓度不能太高以免抑制反应。标本处理的基本要求是除去杂质, 并部分纯化标本中的核酸。多数样品需要经过十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS) 和蛋白酶 K 处理。难以破碎的细菌, 可用溶菌酶加乙二醇四乙酸处理。所得到的粗制 DNA, 经酚、氯仿抽提纯化, 再用乙醇沉淀后用作 PCR 反应模板。

缓冲液的成分最为复杂, 除水外一般包括 4 个有效成分: ①缓冲体系, 一般使用 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 {2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethane sulfonic acid, HEPES} 或 3-吗啉丙磺酸 (3-morpholinopropanesulfonic acid, MOPS) 缓冲体系; ②一价阳离子, 一般采用钾离子, 但在特殊情况下也可使用铵根离子; ③二价阳离子, 即镁离子, 根据反应体系确定, 除特殊情况外不需调整; ④辅助成分, 常见的有二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、甘油等, 主要用来保持酶的活性和帮助 DNA 解除缠绕结构。

PCR 反应的控制条件如下: ① PCR 反应的缓冲液。提供合适的酸碱度与某些离子。②镁离子浓度。总量应比 dNTP 的浓度高, 常用 2 mmol/L。③底物浓度。dNTP 以等物质的量浓度配制, 20 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$ 。④ *Taq* DNA 聚合酶。2.5 U/100 μl 。⑤引物。浓度一般为 0.1 ~ 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 。⑥反应温度、时间和循环次数。变性温度和时间一般为 95℃ 和 30s; 退火温度低于引物 DNA 熔解温度—— T_m 值 5℃ 左右, 一般在 45 ~ 55℃; 延伸温度和时间一般为 72℃ 和 1 min/kb (10 kb 内); 循环次数一般为 25 ~ 35 次。循环次数决定 PCR 扩增的产量。模板初始浓度低, 可增加循环次数以便达到有效的扩增量。但循环次数并不是可以无限增加的。一般循环次数为 30 次左右, 循环次数超过 30 次以后, DNA 聚合酶活性逐渐达到饱和, 产物的量不再随循环次数的增加而增加, 出现了所谓的“平台期”。

PCR 反应程序一般包括: ①预变性。模板 DNA 完全变性与 PCR 酶的完全激活对 PCR 能否成功至关重要, 建议加热时间参考试剂说明书, 一般未修饰的 *Taq* 酶激活时间为 2 min。②变性步骤。循环中一般 95℃、30 s 足以使各种靶 DNA 序列完全变性, 可能的情况下可缩短该步骤时间, 变性时间过长损害酶活性, 过短靶序列变性不彻底, 易造成扩增失败。③引物退火。退火温度需要从多方面去决定, 一般以引物的 T_m 值为参考, 根据扩增的长度适当下调退火温度。然后在此次实验基础上作出预估。退火温度对 PCR 的特异性有较大影响。④引物延伸。引物延伸一般在 72℃ 进行 (*Taq* 酶最适温度)。但在扩增长度较短且退火温度较高时, 本步骤可省略; 延伸时间随扩增片段长短而定, 一般推荐在 1000 bp 以上, 含 *Pfu* 及其衍生物的时间设定为 1 min/kb。⑤循环数。大多数 PCR 含 25 ~ 35 个循环, 过多易产生非特异扩增。⑥最后延伸。在最后一个循环后, 反应在 72℃ 维持

10 ~ 30 min, 使引物延伸完全, 并使单链产物退火成双链。

标准的 PCR 过程分为三步: ① DNA 变性 (90 ~ 96℃), 双链 DNA 模板在热作用下, 氢键断裂, 形成单链 DNA。②退火 (60 ~ 65℃), 系统温度降低, 引物与 DNA 模板结合, 形成局部双链。③延伸 (70 ~ 75℃), 在 *Taq* 酶 (在 72℃ 左右, 活性最佳梯度 PCR 仪) 的作用下, 以 dNTP 为原料, 从引物的 3' 端开始沿 5' → 3' 的方向延伸, 合成与模板互补的 DNA 链。每一循环经过变性、退火和延伸, DNA 含量即增加一倍。现在有些 PCR 因为扩增区很短, 即使 *Taq* 酶活性不是最佳也能在很短的时间内复制完成, 因此可以改为两步法, 即退火和延伸同时在 60 ~ 65℃ 进行, 以减少一次升降温过程, 提高反应速度。

PCR 反应扩增出了高的拷贝数, 下一步检测就成了关键。溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 染色凝胶电泳是最常用的检测手段。电泳法检测特异性是不太高的, 因此引物二聚体等非特异性的杂交体很容易引起误判。但因为其简捷易行, 成为了主流检测方法。近年来以荧光探针为代表的检测方法, 有逐渐取代电泳法的趋势。

PCR 反应特点为编辑特异性强, 其反应的特异性决定因素为: ①引物与模板 DNA 特异正确地结合; ②碱基配对原则; ③ *Taq* DNA 聚合酶合成反应的忠实性; ④靶基因的特异性与保守性。其中引物与模板的正确结合是关键。引物与模板的结合及引物链的延伸是遵循碱基配对原则的。聚合酶合成反应的忠实性及 *Taq* DNA 聚合酶耐高温性, 使反应中模板与引物的结合 (复性) 可以在较高的温度下进行, 结合的特异性大大增加, 被扩增的靶基因片段也就能保持很高的正确度。再通过选择特异性和保守性高的靶基因区, 其特异性程度就更高了。PCR 反应的灵敏度高, PCR 产物的生成量是以指数方式增加的, 能将皮克 ($1 \text{ pg} = 10^{-12} \text{ g}$) 量级的起始待测模板扩增到微克 ($1 \text{ } \mu\text{g} = 10^{-6} \text{ g}$) 水平。PCR 反应简便、快速, PCR 反应用耐高温的 *Taq* DNA 聚合酶, 一次性地将反应液加好后, 即在 DNA 扩增液和水浴锅上进行变性—退火—延伸反应, 一般在 2 ~ 4 h 完成扩增反应。扩增产物一般用电泳分析, 不一定要用同位素, 无放射性污染, 易推广。

二、实验仪器

常用玻璃容器与 EP 管, 天平, 冷冻离心机, 移液枪 (配套枪头), PCR 仪, DNA 电泳仪等。

三、实验试剂和配制

模板 cDNA, 正、反向引物, 10 mmol/L dNTP 混合物 (dATP、dGTP、dCTP 和