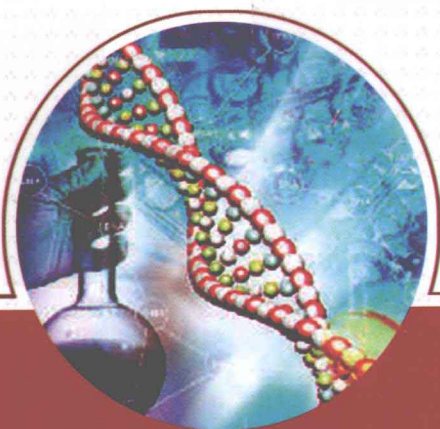


刘箭 主编

分子生物学及基因工程 实验教程

(第二版)

Molecular Biology & Gene engineering
Experiment



科学出版社

周群 主编

分子生物学及基因工程 实验教程

(第二版)

Molecular Biology & Gene engineering
Experiment



清华大学出版社

能力培养型生物学基础课系列实验教材

分子生物学及基因 工程实验教程

(第二版)

刘 箭 主编

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书介绍了常用的分子生物学和基因工程实验技术。全书分为三部分,第一部分为基础性实验,介绍了一些简明且独立的实验方案,每个实验可在半日内完成,且成功率高,因此特别适用于相关专业的本科实验教学;第二部分为综合性实验,实验略微复杂,适用于有一定基础的高年级本科生实验教学;最后一部分为研究性实验,为培养学生独立科研的能力提供了更加贴近科研工作的实验方案。

本书介绍的实验方法严谨可靠,可操作性强,实验结果明显。不仅可以作为高等师范院校生命科学专业的本、专科学生的实验教程,也可供非师范院校相关专业的学生和生命科学工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学及基因工程实验教程/刘箭主编. —第二版. —北京: 科学出版社, 2012. 5
能力培养型生物学基础课系列实验教材
ISBN 978-7-03-034039-9

I. ① 分… II. ① 刘… III. ① 分子生物学—实验—高等学校—教材② 基因工程—实验—高等学校—教材 IV.
① Q7-33② Q78-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 067192 号

责任编辑: 陈 露 封 婷 / 责任校对: 刘珊珊
责任印制: 刘 学 / 封面设计: 殷 靓

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>

南京展望文化发展有限公司排版

江苏省句容市排印厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2008 年 4 月第 一 版 开本: B5(720×1000)

2012 年 5 月第 二 版 印张: 6 1/4

2012 年 5 月第四次印刷 字数: 109 000

定价: 17.00 元

能力培养型生物学基础课系列实验教材

第二版编委会

主任委员：安利国

副主任委员：郭善利 徐来祥 刘林德 黄 勇

委 员：（按姓氏笔画为序）

王元秀	王洪凯	朱道玉	刘林德
刘淑娟	安利国	李志香	李荣贵
林光哲	赵光强	姚志刚	徐来祥
郭承华	郭善利	黄 勇	焦传珍

《分子生物学及基因工程实验教程》

第二版编写人员

主 编：刘 箭

副主编：吴春霞 曹雪松 王元秀 宿红艳

编 者：（按姓氏笔画为序）

马秀灵	王宝琴	王建刚	王洪燕
叶春江	全先庆	刘立科	杨东英
孟小倩	郭尚敬	刘 箭	吴春霞
曹雪松	王元秀	宿红艳	

再 版 说 明

生物学是一门实验性学科,实验教学在其专业课学习中占有十分重要的地位,动手能力、综合分析能力和创新能力的培养主要依靠实验教学来完成。

受传统教育思想的影响,几十年来我国高等师范院校生物科学专业的实验教学以学科知识为体系,从属于理论教学,以验证理论知识和学习实验技术为主要目的,忽视了能力的培养,扼杀了学生的创新欲望。实验内容繁琐,存在着大量的低水平的重复,远远不能适应创新型人才培养的要求。

随着我国高等教育的快速发展,能力培养越来越引起国家和学校的重视。高教部下发的《关于加强高等学校本科教学工作,提高教学质量的若干意见》中特别强调“进一步加强实践教学,注重学生创新精神和实践能力的培养”,指出:“实践教学对于提高学生的综合素质、培养学生的创新精神与实践能力具有特殊作用。高等学校要重视本科教学的实验环节,保证实验课的开出率达到本科教学合格评估标准,并开出一批综合性、设计性实验。”本套能力培养型实验教材就是适应我国高等教育创新性人才培养的需要而编写的。

本套教材将实验分为基础性实验、综合性实验和研究性实验三种类型。

基础性实验是经过精选的最基本的、最代表学科特点的实验方法和技术,通过学习使学生掌握相应学科的基本知识与基本技能,为综合性实验奠定基础。

综合性实验由多种实验手段与技术和多层次的实验内容所组成,要求学生独立完成预习报告、试剂配制、仪器安装与调试、实验记录、数据处理和总结报告。综合性实验主要训练学生对所学知识和实验技术的综合运用能力、对实验的独立工作能力、对实验结果的综合分析能力,为研究性实验的顺利开展做好准备。

研究性实验是在完成基础性实验和综合性实验的基础上,以相应学科的研究为主结合其他学科的知识与技术,由学生自己设计实验方案,开展科学研究,撰写课程研究论文,使学生得到科学研究的初步训练,为毕业论文研究工作的开展打下基础。部分优秀课程研究论文可进一步深化、充实,作为毕业论文参加答辩。

本套教材试图从下述几个方面有所突破和创新:

1. 以能力培养为核心,通过综合性实验和研究性实验的开设,启发学生思维,引导学生创新。
2. 本套教材是我国高校第一套生物科学基础实验课系列性教材,在编委会的

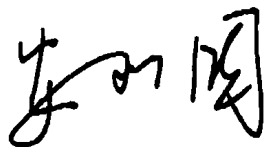
统一领导下完成,避免了低层次重复,体现了实验内容的系统性。

3. 本套教材特别强调实用性和可操作性,实验内容已在编者所在学校开设了多年,得到了教学实践的检验。

4. 本套教材充分体现先进性,尽可能反映生命科学的最新进展。

5. 每本教材都附有实验报告和研究论文范文,为学生提供了实验报告的规范性样板,对培养学生严谨、仔细的学风具有一定的指导作用。

本套教材自 2004 年出版以来,受到全国各地高校的普遍欢迎,迄今为止,已被近百所院校选用,累计重印量达到 20 万册。教材的创新性和实用性也得到了大家的认可,先后获得山东省实验教学成果奖和高等学校优秀教材奖。这几年来生物学又有了很大的发展,教材的内容需要随之更新,各校在使用过程中也发现了一些问题。在广泛征求意见的基础上,本次再版对编者进行了调整和充实,对内容进行了修订和更新,力求使教材的水平不断得到提高。尽管各位主编和编委已经尽了最大努力,但是,由于编者水平所限,肯定还有不少的错误,恳请各位同仁不吝赐教,继续对本套教材给予关心和支持。



2012 年 2 月

第二版前言

《分子生物学及基因工程实验教程》第一版出版后,承蒙读者厚爱,被不少高等院校选用为实验教材。根据读者反馈意见和学科发展趋势,编者对本书进行了全面的补充和修订。新版实验教程延续了第一版的简明风格,同时更加注重内容上的严谨性和科学性。修改后的实验方案操作起来更加流畅,其实验结果也更加明显。

新版实验教程虽经全体编者悉心勘校,疏漏和不妥之处仍在所难免,恳请读者继续给予关注和支持,并提出宝贵意见。

编 者

2012年2月

目 录

再版说明

第二版前言

第一部分 基础性实验

实验 1	质粒的分离——碱性 SDS 法	(1)
实验 2	Silica 硅石粉法纯化质粒	(4)
实验 3	吸附膜方法提取质粒 DNA	(7)
实验 4	核酸琼脂糖凝胶电泳及“玻璃奶”法纯化回收 DNA 片段	(9)
实验 5	吸附膜方法回收琼脂糖凝胶中 DNA 片段	(12)
实验 6	DNA 片段的连接(向质粒载体中插入外源 DNA)	(14)
实验 7	大肠杆菌感受态细胞的制备、转化及转化子的鉴定 (蓝白斑筛选法)	(16)
实验 8	聚合酶链式反应(PCR)技术	(19)
实验 9	PCR 产物连入 T 载体	(21)
实验 10	菌落 PCR 方法快速筛选细菌重组子	(23)
实验 11	重组子的插入方向鉴定(酶切法)	(26)
实验 12	噬菌体铺板	(28)
实验 13	M13 噬菌体 DNA 的提取	(31)
实验 14	SDS 法小量提取植物基因组 DNA	(34)
实验 15	CTAB 法小量提取植物基因组 DNA	(36)
实验 16	动物组织细胞基因组 DNA 提取	(38)
实验 17	血液基因组 DNA 的纯化分离	(40)
实验 18	Trizol 试剂快速提取(动)植物总 RNA	(42)
实验 19	总 RNA 的变性琼脂糖凝胶电泳检测	(44)
实验 20	植物启动子表达分析—— β -葡萄糖醛酸糖苷酶(GUS) 组织化学染色	(46)

第二部分 综合性实验

实验 21	反转录 PCR	(48)
实验 22	谷胱甘肽 S-转移酶融合蛋白质的表达及纯化	(51)
实验 23	(His)6 标记蛋白质的原核表达和纯化	(56)
实验 24	Western-blotting 分析	(59)
实验 25	化学发光 Western-blotting 分析	(65)

第三部分 研究性实验

实验 26	地高辛标记探针的 Southern 杂交	(68)
实验 27	菌落原位杂交	(74)
实验 28	转基因植物的 PCR 检测	(76)
实验 29	花序浸泡法转化拟南芥及转化子的筛选	(79)
实验 30	叶盘法转化烟草	(82)
实验 31	PCR 引物的电子设计	(85)

参考文献	(90)
------------	--------

第一部分

基础性实验

实验 1 质粒的分离—— 碱性 SDS 法

【实验目的】

1. 学习碱法分离质粒的基本原理。
2. 掌握碱法分离质粒的操作方法。

【实验原理】

质粒是染色体之外裸露的、具有自主复制能力的、以超螺旋状态存在于细胞内的双链 DNA 分子。质粒的分离是分子生物学研究中最基本的技术,目前提取质粒的方法很多,比如 CsCl 梯度离心法、煮沸法、硅石粉法、碱性 SDS 法等。本实验所用的碱性 SDS 法(简称碱法)是一种经典的分离质粒 DNA 的方法,其基本原理是利用染色体 DNA 与质粒 DNA 在变性程度和复性速度的差异,即在 $\text{pH} > 12$ 的碱性条件下,大肠杆菌的线性染色体由于氢键断裂,双螺旋结构解开而变性,但在该条件下,质粒由于其共价闭合环状超螺旋结构的特点,两条互补链间的氢键没有完全被破坏,两条链仍然部分地结合在一起,当将溶液的 pH 调至中性时,质粒 DNA 会快速复性,但是染色体 DNA 由于分子很大,难以复性,在高盐溶液中,变性的染色体 DNA 相互缠绕,形成不溶性 DNA-蛋白质-SDS 大分子复合体,与细胞碎片一起被离心除去,而质粒 DNA 存留在上清液中,可用异丙醇或乙醇沉淀上清溶液中的质粒 DNA,获得纯度较高的质粒。

【实验器材、材料与试剂】

1. 器材

恒温摇床、超净工作台、高压灭菌锅、高速台式离心机、微量移液枪、枪头、1.5 ml Eppendorf 管。

2. 材料

含 pUC18 质粒的大肠杆菌 DH5 α 或 JM109 菌株。

3. 试剂

(1) LB 液体培养基

称取胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、NaCl 10 g 溶于 950 ml 水中,用 0.4 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.0,定容至 1 L,高温高压灭菌。

(2) LB 固体培养基

称取琼脂粉 15 g, 加入 1 L LB 液体培养基中, 高温高压灭菌。

(3) 溶液 I

含 50 mmol/L 葡萄糖、25 mmol/L Tris - Cl (pH 8.0)、10 mmol/L EDTA (pH 8.0), 高温高压灭菌后, 4℃ 保存备用。

(4) 溶液 II (新鲜配制)

含 0.2 mol/L NaOH、1% (m/V) SDS。

由新配制的 0.4 mol/L 的 NaOH 和 2% 的 SDS 等体积混合而成。溶液 II 中如有絮状沉淀, 可置于温水浴中助溶, 如果溶液不变澄清, 说明试剂失效。

(5) 溶液 III

取 5 mol/L 醋酸钾 60 ml、冰醋酸 11.5 ml 和无菌水 28.5 ml, 混合既成。

(6) 氨苄青霉素 (Amp)

用无菌蒸馏水配制 100 mg/ml 氨苄青霉素贮存液, 置 -20℃ 冰箱保存备用。

(7) RNaseA 溶液

用含 10 mmol/L Tris - Cl (pH 7.5) 和 15 mmol/L NaCl 溶液或无菌水配制 10 mg/ml 的 RNaseA 溶液。配成的 RNaseA 溶液在沸水浴中加热 15 min, 自然冷却至室温, 分装成小份, -20℃ 保存。

(8) TE - RNaseA 缓冲液

含 10 mmol/L Tris - Cl (pH 8.0) 和 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)。TE 缓冲液配好后灭菌 15 min, 冷却至室温后加入 RNaseA 溶液, 至终浓度为 20 μg/ml 即为 TE - RNaseA 缓冲液。

(9) 氯仿/异戊醇

含 V(氯仿) : V(异戊醇) 为 24 : 1, 混匀使用。

(10) 酚/氯仿

Tris - Cl 饱和酚加入等体积氯仿/异戊醇, 混匀使用。

(11) 70% (V/V) 乙醇

(12) -20℃ 预冷的异丙醇或无水乙醇

【操作步骤】

1. 在超净工作台上, 用灭菌的牙签挑取单菌落放入 50 ml LB 液体培养基中 (含 50~100 μg/ml 的 Amp), 37℃ 振荡培养过夜。

2. 将 1.5 ml 菌液倒入 1.5 ml Eppendorf 管中, 以 10 000 r/min 的转速离心 1 min, 弃去上清液, 将 Eppendorf 管倒置于吸水纸上数分钟, 使液体流尽。

3. 沉淀悬于 100 μl 溶液 I 中, 涡旋或剧烈振荡使菌体充分悬浮。

4. 加入 200 μl 溶液 II, 轻轻翻转 Eppendorf 管 5~7 次混匀溶液 (不要振荡涡旋), 置冰浴 5 min。

5. 加入 150 μl 溶液Ⅲ,温和振荡混匀,冰浴 3~5 min。
6. 以 12 000 r/min 的转速离心 10 min,将上清液移至新的 Eppendorf 管中。
7. 加入等体积酚/氯仿,涡旋 2 min,以 12 000 r/min 的转速离心 10 min。
8. 将水相移至新 Eppendorf 管中,加入预冷的等体积异丙醇或 2~2.5 倍体积的无水乙醇, -20°C 下静置 30 min,以 12 000 r/min 的转速,在 4°C 下,离心 10~15 min。
9. 弃去上清液,将 Eppendorf 管倒置于吸水纸上,使液体流尽,然后加入 70% (V/V) 乙醇 500 μl ,洗涤 2 次,以 12 000 r/min 的转速离心 1 min。
10. 弃去上清液,将 Eppendorf 管倒置于吸水纸上,使液体流尽,然后在 50°C 下,干燥 15 min 或自然风干。
11. 每管中加入 30 μl TE - RNaseA 缓冲液,溶解质粒 DNA, -20°C 储存。

【要点提示】

1. 加入溶液Ⅱ后混匀时动作一定要轻,冰浴时间不要超过 5 min。
2. 实验中所用的酚必须是 Tris - Cl 饱和酚(pH 8.0)(有市售),如果饱和酚呈粉红色,则说明试剂失效,不能继续使用。
3. 溶液Ⅱ中的 NaOH 要现配现用。

【思考题】

1. NaOH 在质粒分离中的主要作用是什么?
2. 加入溶液Ⅱ后混匀时为什么动作一定要轻,同时冰浴时间不要过长?
3. 有人认为菌体细胞的裂解主要是 SDS 的作用,你同意此看法吗,为什么?
4. 试分析一下碱法能不能用来提取染色体 DNA,为什么?

实验 2 Silica 硅石粉法纯化质粒

【实验目的】

- 1. 了解硅石粉法提取质粒的原理。
- 2. 掌握硅石粉法提取质粒的步骤。

【实验原理】

silica 硅石粉在一定的条件下可以选择性的吸附 DNA。在水溶液中 DNA 分子带负电荷,而 silica 表面的硅氧键水化后带负电荷,DNA 分子和硅胶之间产生静电排斥,silica 硅石粉不能结合 DNA,当溶液中含有高浓度的阳离子时,阳离子在 DNA 与 silica 硅石粉表面形成阳离子桥,DNA 吸附在 silica 硅石粉表面(但 silica 不结合蛋白质、寡聚核苷酸、有机溶剂、去污剂及其他可能抑制酶活性的有机或无机物),当溶液离子浓度再次降低时,水分子破坏了阳离子桥,silica 硅石粉表面再次水化带负电荷,DNA 从 silica 硅石粉表面解吸,释放到溶液中(图 1-1)。

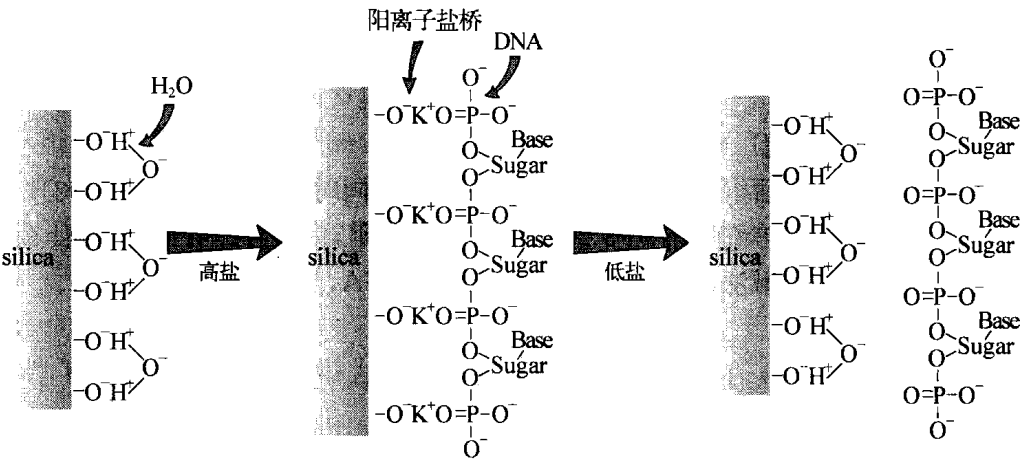


图 1-1 Silica 硅石粉吸附和解吸 DNA

利用 silica 硅石粉纯化质粒 DNA 时,首先是利用了碱法提取质粒 DNA,再在高盐条件下利用 silica 硅石粉特异性地吸附质粒 DNA,并用 70%乙醇溶液洗去不被 silica 硅石粉吸附的杂质(包括蛋白质和多糖等物质),最后利用纯水处理 silica 硅石粉,解吸 silica 硅石粉上吸附的质粒 DNA,获得高纯度的质粒。用 silica 方法纯化 DNA,无需酚抽提,DNA 回收率高,纯度满足 DNA 酶切、测序、连接、转化和体外转录等分子操作。

【器材与试剂】

- 1. 实验器材
参见实验 1。

2. 材料与试剂

(1) silica 硅石粉悬液

称取 5 g silica 硅石粉(Sigma 产品,货号 S-5631),加 20 ml H_2O ,使 silica 硅石粉完全悬浮,然后静置 2 h,轻轻地倾去混浊的悬液(保留沉淀),重复清洗沉淀 3 次,用 20 ml H_2O 使 silica 硅石粉悬浮,4℃保存备用。

(2) 溶液 I

含 50 mmol/L Tris - Cl, 10 mmol/L EDTA(pH 7.5~8.0)和 10 mg/ml RNaseA。

(3) 溶液 II

含 0.2 mol/L NaOH, 1%(m/V)SDS。

(4) 溶液 III

4 mol/L KAc(pH 4.8)。

(5) 6 mol/L 盐酸胍

(6) 70%(V/V) 乙醇

【操作步骤】

1. 取 1.5 ml 过夜培养的菌液于 1.5 ml Eppendorf 管中,以 5 000 r/min 的转速离心 1 min,弃去上清液。
2. 加入 200 μ l 溶液 I,涡旋,使细胞沉淀充分悬起。
3. 加入 200 μ l 溶液 II,轻轻颠倒混匀,放置 5 min。
4. 加入 200 μ l 溶液 III,轻轻混匀,以 12 000 r/min 的转速离心 10 min。
5. 取上清液至新的 1.5 ml Eppendorf 管中,加入 6 mol/L 盐酸胍 600 μ l,混匀后,再加入 50 μ l silica 硅石粉混匀。
6. 以 12 000 r/min 的转速离心 3 min,弃去上清液。
7. 加入 70%(V/V) 乙醇 1 ml,充分悬起 silica 硅石粉,以 12 000 r/min 的转速离心 3 min,弃去上清液。
8. 重复操作步骤 7。
9. 干燥沉淀 10 min。
10. 加入 50 μ l 无菌水,65℃水浴 5 min。
11. 室温下,以 12 000 r/min 的转速离心 5 min。
12. 取上清液至新的 Eppendorf 管中,-20℃储存。

【要点提示】

1. 加入溶液 II、III 后,轻轻颠倒混匀,防止基因组 DNA 断裂,此过程与碱法提取质粒 DNA 一致。
2. 在步骤 9 中,尽量吹干酒精,酒精会影响下游操作。
3. 65℃水浴有利于质粒充分从 silica 硅石粉上解吸,提高质粒 DNA 的回

收率。

【思考题】

1. 实验中,盐酸胍的作用是什么?
2. 水浴的作用是什么? 可否用沸水溶解吸质粒?
3. 本实验中,样品中的 RNA 是如何除去的?

实验3 吸附膜方法提取质粒 DNA

【实验目的】

- 1. 学习吸附膜方法提取质粒的基本原理。
- 2. 掌握试剂盒提取质粒的操作技术。

【实验原理】

质粒提取试剂盒中的塑料离心柱的下部有一白色的 silica 基质膜片,该膜片是以 silica 为材料压制而成,在高离子强度下,silica 基质膜可以专一性的吸附 DNA,而当离子强度很低时,DNA 又可从膜片上解吸(详细原理参见实验 2)。根据此原理,常规碱法提取质粒 DNA 再经过 silica 基质膜片的特异性的吸附纯化,可以除去杂质,收获高纯度的质粒。由于 silica 膜片兼有滤膜的特点,吸附膜方法省去一些离心沉淀 silica 的步骤,操作更加方便快捷。

【器材与试剂】

- 1. 实验器材
参见实验 1。
- 2. 试剂

本实验方案采用宝生物工程有限公司生产的质粒纯化试剂盒。宝生物工程质粒纯化试剂盒包括以下成分。

名 称	数 量	保存条件	名 称	数 量	保存条件
Buffer P1(重悬液)	20 ml	RT	Buffer PW(洗涤液)**	20 ml	RT
Buffer P2(裂解液)	20 ml	RT	Elution Buffer(洗脱液)	10 ml	RT
Buffer P3(结合液)	30 ml	RT	离心柱及套管	100 套	RT
Buffer PWT(洗涤液 T)*	30 ml	RT	RNaseA 20 mg/ml	0.1 ml	-20℃

* Buffer PWT(洗涤液 T)在首次使用时加入异丙醇 30 ml 混匀。
** Buffer PW(洗涤液)在首次使用时加入无水乙醇 80 ml 混匀。
注:首次使用时将 RNaseA 加入 Buffer P1 中混匀,置于 4℃ 保存。

【操作步骤】

- 1. 取过夜培养菌液 1~3 ml,装入 1.5 ml 中,以 5 000 r/min 的转速,在室温下离心 2 min,完全弃去上清液,收集菌体。
- 2. 加入 200 μ l Buffer P1,充分涡旋,使其菌体沉淀完全分散开。
- 3. 加入 200 μ l Buffer P2,轻轻颠倒离心管 3~5 次,室温放置 2~3 min(裂解时间不要超过 5 min)。
- 4. 加入 300 μ l Buffer P3,轻轻颠倒离心管 4~6 次,充分混匀(可见白色絮状