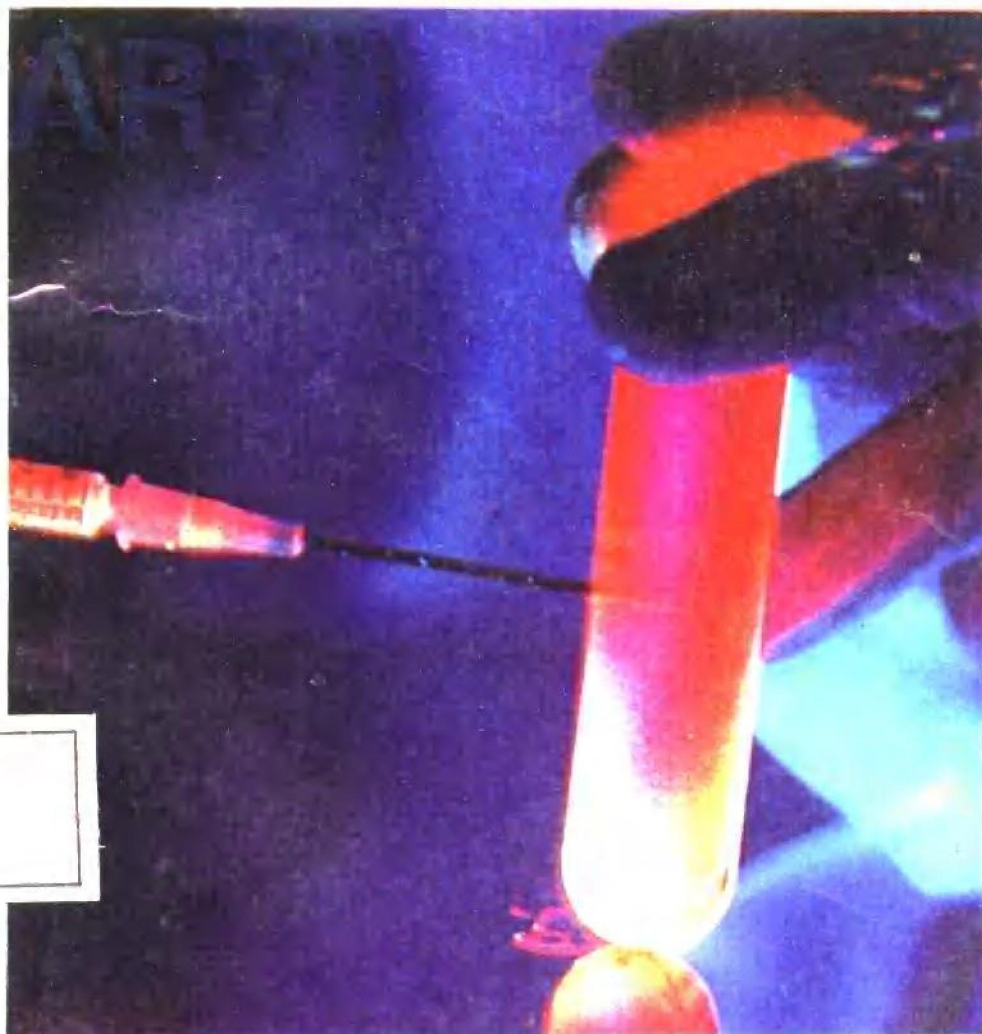


基因工程实验技术

彭秀玲 袁汉英编著 · 湖南科学技术出版社



3

基因工程实验技术

彭秀玲 袁汉英 编著
责任编辑：沙一飞

*

湖南科学技术出版社出版
(长沙市展览馆路8号)

湖南省新华书店发行 湖南省新华印刷二厂印刷

*

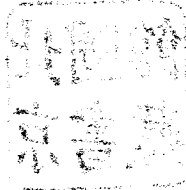
1987年8月第1版第1次印刷

开本：850×1168毫米 1/32 印张：6.75 插页：4 字数：176,000
印数：1—4,600

ISBN 7-5357-0104-0/Q·7

统一书号：13204·160 定价：2.70元

湘目87-33



前 言

近年来，国际上基因工程的研究，已从大学和研究所的实验室扩展到了工农医的研究部门，它的蓬勃发展，使人们感到有必要在大学的教学课程中得到反映。

五年来，我们多次对本系硕士研究生开设了《基因工程实验技术》一课，作为分子遗传学实验的一个组成部分。虽然实验中涉及的遗传学、生物化学、微生物学以及分子生物学等基础知识并未超越大学课程范围，但是进行本实验的研究生（将来还准备包括高年级大学生）缺乏分子生物学等方面的技术训练。在基因工程方面可以参阅的有关实验书籍又十分稀少，在国际上即使有一两本手册，也不适合于我国的教学需要。因此，我们在开设本课程的同时，编写了实验讲义。出乎我们意料，它不仅受到了同学们的欢迎，而且还经常为同行们索为参考资料，这就是鼓励我们编写本书的背景。

基因工程的实验技术和实验系统正在不断创新，取得巨大进展。但从教学角度来说，重要的是要让同学通过实验掌握最基本、最常用的技术，并能得到一个比较全面而系统的概念。因此本书

选择一个内容扼要、方法简便、操作连续的实验系统，作为基因工程的基本技术训练。可以说，这是一本基因操作的入门书。根据实验课的学时，本书把十五个连续的实验分为A、B两组。A组包括实验一到实验八，是按基因工程操作的先后顺序安排的。它们之间紧密相依，只有获得第一个实验的结果，才能开始第二个实验。在完成A组实验后，我们已初步获得基因工程的基础训练。因此A组可作为本实验课的必修部份。它约需150个学时。B组着重进一步介绍重组DNA的检测手段。第九到第十二个实验是以核酸的分子杂交为内容，编写四个独立而衔接的实验方法。第十三到第十五个实验是介绍重组DNA分子量测定的两种方法，这也是基因工程所必须的和最常规的实验方法。在实验条件限制或超学时的情况下，B组可作为选修实验或示范实验。

本书各实验的产生是与复旦大学遗传学研究所的科学研究分不开的。对此，作者真诚地感谢郑兆鑫、汪训明、李育阳、李谐勋、陈炳元、严维耀、盛小禹、马玉良、孙晖等同志的支持与帮助。我们还感谢实验技术室的同志们的大力协助。同时也感谢所有修过本课的研究生，为本课程的完善所作的种种贡献。

由于实验条件和作者水平的限制，本书肯定有许多不足及错误之处，望读者能批评指正。

赵寿元教授审校了全书。

作者 于复旦大学生物工程系

一九八六年五月

目 录

总 论	(1)
A 基因工程主要步骤的基本操作	(5)
实验一 碱变性法抽提pBR322质粒DNA	(5)
实验二 氯化铯密度梯度超离心提取pXZ6 质粒DNA	(22)
实验三 DNA的纯度、浓度与分子量的测定	(36)
实验四 用Sepharose 2B柱层析法去除质粒 DNA中的RNA	(48)
实验五 DNA的酶切与连接	(59)
实验六 重组DNA的转化	(78)
实验七 转化子DNA的快速鉴定——快速细胞 破碎法	(91)
实验八 重组质粒DNA的快速制备与酶切	(98)
B 重组DNA的进一步检测	(107)
实验九 DNA片段的分离——从琼脂糖凝胶中分离 DNA片段	(107)

实验十	切口移位 (Nick Translation) 法制备 ^{32}P -DNA 探针	(119)
实验十一	Southern 印迹杂交法	(133)
实验十二	菌落原位杂交	(143)
实验十三	λ 噬菌体DNA (分子量标记)的制备	(151)
实验十四	用质粒DNA释放法提取pYPI并测定 其分子量	(165)
实验十五	电子显微镜法测定pYPI重组质粒DNA 分子量	(173)
附 录	(185)
一	各种试剂的母液配方	(185)
二	常用的抗菌素	(189)
三	玻璃和塑料器皿的硅化	(190)
四	核酸凝胶电泳图谱摄影	(191)
五	X-光底片的冲洗方法	(198)
六	常用仪器的操作方法	(200)
	高速冷冻离心机(日立)	(200)
	CENTRIKON T-2080型 (瑞士)超速离心机	(201)
	微波炉	(204)
	液体闪烁计数仪	(204)
	电子显微镜	(205)
参考文献	(209)

总 论

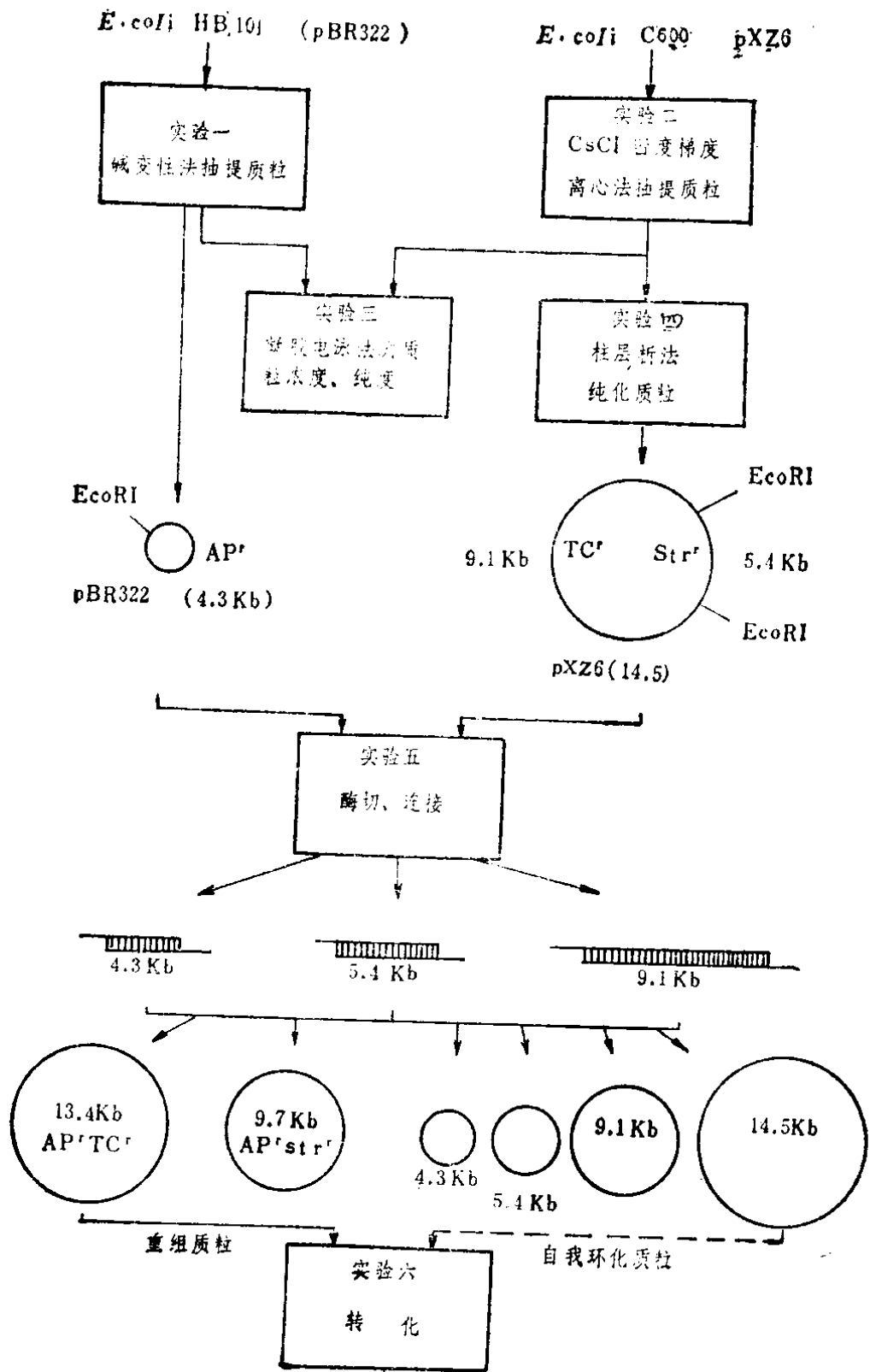
基因是遗传的基本单位，基因是DNA分子，所以基因工程有时称遗传工程，(Genetic Engineering) 也就是DNA重组技术(Recombinant DNA Technigues)。有人还称它为基因的无性繁殖(Gene Cloning) 或分子克隆(Molecular Cloning)。

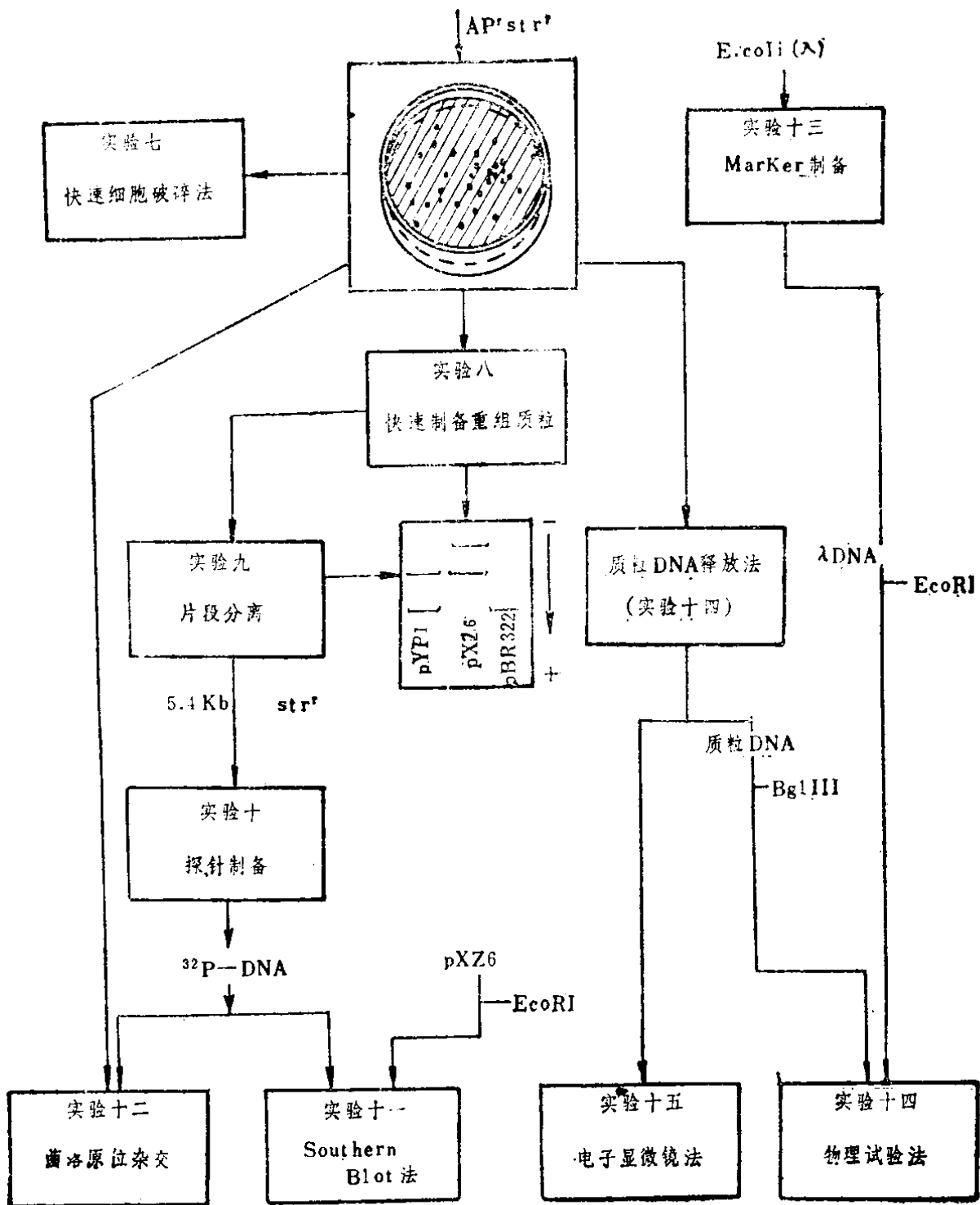
基因工程是70年代在分子生物学发展的基础上形成的新学科。基因工程就是在分子水平上，用人工方法提取(或合成)不同生物的遗传物质，在体外切割、拼接和重新组合。然后通过载体把重组的DNA分子引入受体细胞，使外源DNA在受体细胞中进行复制与表达。按人们的需要生产不同的产物或定向地创造生物的新性状，并使之稳定地遗传给下代。基因工程具有广泛的应用价值，能为工农业生产和医药保健等开拓新途径，又能为高等生物的细胞分化、生长发育、肿瘤发生等基础研究提供有效的实验手段。

几年来，我国在基因工程的研究方面取得了一定成绩。利用DNA重组技术表达了乙型肝炎表面抗原蛋白、胰岛素、干扰素和青霉素酰化酶。实验技术有了很大提高，但是目前尚未在生产上

发挥作用，获得经济效益。在实验技术开发方面，我们还缺乏具有生产意义的基因工程元件(如目的基因)。发展基因合成技术，开发基因源，是基因工程的先决条件。我们还缺乏高效的转录启动子和宿主细胞系统。因此构建适用于不同宿主系统的高效表达的载体系统是基因工程的关键。基因工程的重要环节之一是表达后产物的分离、纯化，即基因工程的后处理工艺。因此研究表达产物的分泌机制；建立分泌型的载体受体系统等工作都有待我们去研究。从教学来说，不可能深入每一个方面。我们只是希望通过本实验，让同学掌握基因工程最基本的技术训练，为今后独立工作打下扎实的基础。因此，《基因工程实验技术》一书，就是根据基因工程的基本过程进行编写的。即从载体的选择——目的基因的提取——体外DNA的重组——引入受体细胞——无性繁殖的转化子筛选——重组DNA的检测等。在1984年美国明尼苏达大学开设这门课程时，作为教学实验，就是选用已克隆到 λ 噬菌体的大肠杆菌的核糖核酸还原酶中的nrdA与nrdB两个基因作为目的基因，与大肠杆菌pBR325质粒载体相连接。而我们则选用大肠杆菌pXZ6质粒中带有一段链霉素抗性基因的DNA片段作为目的基因，与大肠杆菌pBR322质粒载体相连接。从目的基因的提取、转化与表达来看，这途径是较为简便易行的。我们采用EcoRI限制性内切酶对上述两者进行酶切。用T₄DNA连接酶将其粘性末端相连接。然后把这体外重组的DNA分子引入大肠杆菌K802的受体细胞中，用氨苄青霉素和链霉素的双重抗性标记的遗传性状来筛选转化子。从转化子来说，K802已获得了抗链霉素的新遗传性状。而在重组的DNA分子中，由于供体pXZ6质粒中只供给了链霉素抗性基因片段，这切割下来的基因片段已失去了原有的复制能力，只有与pBR322连接后，借助pBR322的复制结构与功能才能复制。因为pBR322是松弛型的复制子，而pXZ6质粒是严紧型的。所以对这一链霉素抗性基因来说，它已从原来的少拷贝复制转变为多拷贝复制，已大大提高了产量，也可以说是基因元件生产的一种手段，是基因元件的基因工程。

为了一目了然，特将本书设计的实验过程用图解方法总结如下：





—— 转化子与重组 DNA 检定 ——

—— 重组质粒分子量测定 ——

A

基因工程主要步骤的基本操作

实验一 碱变性法抽提pBR322质粒DNA

一、目的

提取基因工程中的运载基因的载体，掌握最常用的提取质粒DNA的方法。

二、原理

从大肠杆菌细胞中分离质粒DNA的方法众多。其分离可依据分子大小不同，碱基组成的差异以及质粒DNA的超螺旋共价闭环状结构的特点来进行。目前常用的有碱变性抽提法；羟基磷灰石柱层析法；质粒DNA释放法；酸酚法；两相法以及溴化乙锭-氯化铯密度梯度离心法。以上各种方法均有利弊。有的难以控制；有的收得率不高；有的手续繁琐；还有的纯度不高。总结实验室的多年实践经验，认为碱变性法抽提效果良好，既经济且收得率较高。提取到的质粒DNA可用于酶切、连接与转化。但该法如操

作不慎，会影响纯度；且步骤复杂，费时较多。

碱变性抽提质粒DNA是基于染色体DNA与质粒DNA的变性与复性的差异而达到分离目的。在pH高达12.6的碱性条件下，染色体DNA的氢键断裂，双螺旋结构解开而变性。质粒DNA的大部份氢键也断裂，但超螺旋共价闭合环状结构的两条互补链不会完全分离，当以pH4.8的NaAc高盐缓冲液调节其pH至中性时，变性的质粒DNA又恢复到原来的构型，保存在溶液中。而染色体DNA不能复性而形成缠连的网状结构。通过离心，染色体DNA与不稳定的大分子RNA，蛋白质-SDS复合物等一起沉淀下来而被除去。

三、材料*

(一) 仪器

超净工作台(或接种室)；隔水式电热恒温培养箱；THZ-82型恒温振荡器；721型分光光度计；高速冷冻离心机(20K)；TGL-16B型台式高速离心机；80-1型电动沉淀离心机；XW-80型漩涡混合器；电热恒温水浴锅。

家用电冰箱(0℃~4℃)

低温冰箱(-20℃, -70℃)

真空泵与恒温真空箱

稳压电泳仪(0~500V, 0~300mA)

手提式紫外检测仪(254nm)

微型电泳槽(15.5×6.5×6.5厘米)

(二) 器皿(一组学生实验用)。

三角烧瓶	150毫升、500毫升	各1只
烧杯	100毫升、250毫升	各1只
量筒	50毫升	1只
移液管	1毫升	4支
	5毫升	4支
	10毫升	10支

* 以下为本室所用培养基，试剂及仪器的型号和来源，供读者参考。

滴管		10支
注射器(连7号针头)	2毫升	1支
Eppendorf管*		2只
刻度离心管	10毫升	2支
磨口刻度离心管	10毫升	4支
TS 7.5塑料离心管	250毫升	2支
TA 20塑料离心管	40毫升	4支
硅化玻璃离心管	15毫升	1支
微量进样器	0~20微升	1支
标本缸或保温瓶		1只
标记笔		1支

(三) 菌种:

大肠杆菌K-12HB101(pBR322)。

(四) 培养基(按10组学生实验用量配制, 下同)

1. LB液体培养基:

精解蛋白胨(上海禽蛋二厂, 生化试剂或日本, polypepton, 下同)。3克

酵母浸出粉(上海酵母厂, 生化试剂或oxoid英国或diCa美国, 下同)。1.5克

氯化钠(上海南汇彭镇营房化工厂, 分子量58.44, 分析纯, 下同)。3克

葡萄糖(上海化学试剂采购供应站, 分子量198.17, 分析纯, 下同)。0.6克

按上述配方用重蒸水(以ddH₂O或dH₂O表示, 下同)溶解至300毫升。用10M NaOH调pH至7.2~7.4。分装于150毫升三角烧瓶中, 每瓶30毫升, 每组1瓶。然后置高压蒸汽消毒锅以1.1公斤/平方厘米灭菌20分钟。

2. M9液体培养基:

* Eppendorf管也叫微量离心管或1.5ml离心管。

A液:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (上海化学试剂二厂, 分子量178.05, 分析纯)。12克

KH_2PO_4 (上海化学试剂二厂, 分子量136.08, 分析纯)。6克

NH_4Cl (上海无机化工研究所, 分子量53.49, 分析纯, 下同)。2克

NaCl 1克

蛋白胨 10克

重蒸水 定容至1800毫升

按上述配方配制A液1800毫升, 分装于500毫升三角烧瓶中, 每瓶180毫升, 每组一瓶。

B液:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (上海金山尖塔化工厂, 分子量203.30, 分析纯, 下同)。0.26克

葡萄糖 8克

重蒸水 定容至200毫升

按上述配方配制B液, 分装于100毫升/250毫升三角烧瓶中, 共2只, 将A液与B液置高压蒸汽消毒锅中, 以0.6公斤/平方厘米灭菌30分钟。

接种前, 在无菌室内用灭菌移液管吸20毫升B液加入180毫升/500毫升三角烧瓶的A液中, 即成200毫升的M9液体培养基。

3. 抗菌素:

氨苄青霉素(Amp)临用时用无菌水配制在灭菌有盖试管中, 母液浓度为100毫克/毫升。

氯霉素(Cm)临用时配制在灭菌有盖试管中, 先用少量乙醇助溶, 再加无菌水至母液浓度为150毫克/毫升。

(五) 试剂

1. 溶液(I), 50mM葡萄糖

10mM EDTA

25mM Tris-HCl(pH8.0)

2毫克/毫升溶菌酶

配制方法, 吸取母液(见附录一)。

200mM葡萄糖25毫升

250mM EDTA4毫升

1M Tris-HCl (pH8.0) 2.5毫升

加ddH₂O至100毫升。

临用时再加200毫克溶菌酶(上海禽蛋二厂)。

2. 溶液(II), 200mM NaOH

1% SDS

配制方法: 吸取母液(见附录一)。

10M NaOH 4毫升

20% SDS 10毫升

加ddH₂O至200毫升

3. 溶液(III), 0.1M NaAc (pH4.8) 溶液:

称取无水乙酸钠(上海化学试剂采购供应站, 分子量82.03, 分析纯, 下同) 49.2克, 先加140毫升重蒸水, 加热使溶解, 再用冰乙酸(上海化学试剂总厂, 分子量60.05, 分析纯, 下同)约40毫升调pH至4.8, 加重蒸水定容至200毫升。

4. 50mM Tris-HCl (pH8.0)、100mM NaAc溶液:

配制方法: 吸取母液(见附录一)

1M Tris-HCl (pH8.0) 6毫升

3M NaAc 4毫升

加ddH₂O至120毫升, 1.1公斤/平方厘米灭菌20分钟。

5. 25mM Tris-HCl (pH7.5)、30mM EDTA缓冲液,

配制方法: 吸取母液(见附录一):

1M Tris-HCl (pH7.5) 5毫升

250mM EDTA24毫升

加ddH₂O至200毫升1.1公斤/平方厘米灭菌20分钟。

6. 10毫克/毫升 RNaseA:

称取10毫克核糖核酸酶A(美国 SIGMA 或中科院上海生物化学研究所东风试剂厂,下同)。于灭菌的Eppendorf管内,加1毫升100mM pH5的NaAc溶液(完全溶解),即为10毫克/毫升RNase,为了破坏脱氧核糖核酸酶,置80℃水浴中10分钟或100℃水浴2分钟,然后存-20℃(或家用冰箱的冰格子内)保存。

7. 20%SDS溶液(见附录一)。

8. 5M KAc溶液

称取乙酸钾(上海化学试剂一厂,分子量98.14,分析纯,下同)24.5克,加40毫升重蒸水,加热溶解,再加重蒸水至50毫升,1.1公斤/平方厘米灭菌20分钟。

9. 30%PEG-1.8M NaCl 溶液

称取30克聚乙二醇6000(进口分装,分子量6000左右)再称取氯化钠10.52克。先加入70毫升重蒸水,再加热充分搅拌溶解,溶解时间较长,由粘乳状逐步完全溶解至透明。加重蒸水定容至100毫升,1.1公斤/平方厘米灭菌20分钟。

10. TE缓冲液: 10mM Tris-HCl(pH8.0)、1mM EDTA。

配制时吸取100倍母液(见附录一)用重蒸水稀释100倍,1.1公斤/平方厘米灭菌20分钟。

11. Tris-HCl (pH8.0) 溶液的饱和酚(见附录一)。

12. 氯仿-异戊醇(24:1):

量取240毫升氯仿(三氯甲烷,上海化学试剂一厂,分子量119.38,分析纯,下同),加入10毫升异戊醇(上海化学试剂一厂,分子量88.15,分析纯,下同)充分混匀。

13. 5MNaCl (见附录一)。

14. 预冷无水乙醇:

无水乙醇(上海振兴化工一厂,分析纯)保存在4℃冰箱中备用。

15. 电泳缓冲液:

40mM Tris-HCl (pH8.0)。

20mM NaAc。

2mM EDTA。

配制方法：吸取母液(见附录一)。

100倍的电泳缓冲液50毫升

加ddH₂O至5000毫升。

16. 溴酚蓝指示剂溶液：0.2%溴酚蓝、50%蔗糖，(见附录一)。

17. 1毫克/毫升溴化乙锭溶液(见附录一)。

18. 琼脂糖(上海东海制药厂，生化试剂，或中科院生物物理所，下同)。

四、方法

大肠杆菌K-12HB101 (pBR322) 冷冻保存的菌种

↓

挑取一环，接在含有100微克/毫升氨苄青霉素 (Amp)的LB固体培养基斜面上，(活化菌种)。

↓ 37℃培养过夜 (约16小时)

挑取一环，转接在含有100微克/毫升Amp的LB液体培养基 (30毫升/150毫升三角烧瓶)中(种子培养)。

↓ 37℃振荡培养过夜 (约16小时)

吸取4毫升种子液于含有100微克/毫升Amp的M9液体培养基 (200毫升/500毫升三角烧瓶) 中

↓ 37℃振荡培养至OD₆₀₀ = 1.0(约3—4小时)

加入氯霉素 (Cm)30毫克 (最终浓度为150微克/毫升)

↓ 37℃振荡培养过夜 (扩增质粒)

收集菌体于离心管中。

↓ 冰浴15分钟

在5,000r/min (5Krpm)4℃离心5分钟

↓

弃去上清液，湿菌体在旋涡混合器上，振荡均匀

↓