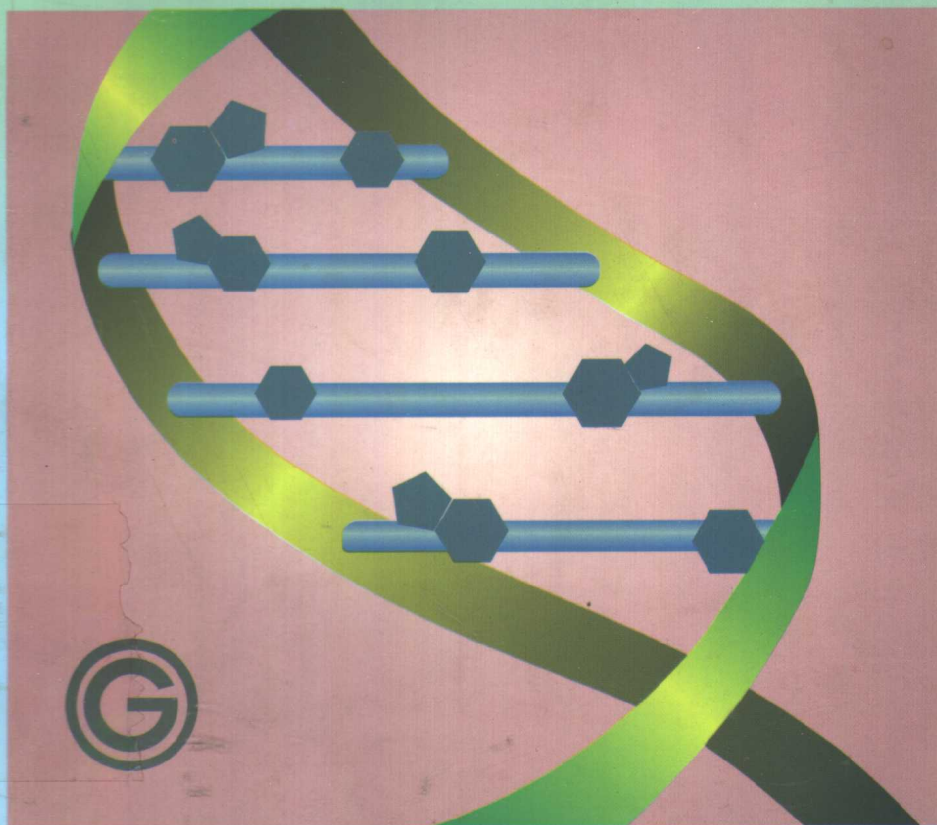


遗传学丛书

# 基因工程实验技术教程

● 盛小禹 编著



复旦大学出版社

---

遗传学丛书

---

# 基因工程实验技术教程

---

盛小禹 编著

---

复旦大学出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

基因工程实验技术教程/盛小禹编著. —上海:复旦大学出版社, 1999. 9

(遗传学丛书)

ISBN 7-309-02319-6

I. 基… II. 盛… III. 基因-遗传工程-实验-教材  
IV. 078-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 30252 号

---

出版发行 复旦大学出版社

上海市国权路 579 号 200433

86-21-65102941(发行部) 86-21-65642892(编辑部)

fupnet@fudanpress.com http://www.fudanpress.com

经销 新华书店上海发行所

印刷 上海第二教育学院印刷厂

开本 850×1168 1/32

印张 9.75

字数 268 千

版次 1999 年 9 月第一版 1999 年 9 月第一次印刷

印数 1—3 000

定价 14.00 元

---

如有印装质量问题, 请向复旦大学出版社发行部调换。

版权所有 侵权必究

## 内 容 提 要

本教程的实验是以 pUC118 质粒为载体克隆一卡那霉素抗性基因,转化子鉴定用快速抽提酶切法与非放射性标记探针的菌落原位杂交法。整个实验过程包括质粒抽提、电泳、酶切、片段回收、连接、转化、快速鉴定、探针标记、原位吸印、杂交与检测等基因工程的最基础的实验步骤。除上述系列实验外还有一独立的 PCR 实验——用头发进行人的性别鉴定。

本书可作为基因工程实验课程的教材,也可供生物学科有关各专业教师和科研人员参考。

# 序

1953年, J. D. Watson 和 F. H. C. Crick 提出了 DNA 双螺旋结构模型, 这是生命科学研究历程中的一个具有划时代意义的里程碑。这一模型对遗传学发展具有深远影响, 它不仅使遗传学研究从此深入到分子水平, 而且奠定了现代遗传学的基础, 进一步推动和影响着生命科学各个学科的飞速发展。目前, 遗传学科已成为生命科学领域中最活跃和最引人注目的一门带头学科。

三十余年来, 现代遗传学无论在理论研究还是在生产应用方面, 都取得了一系列重大突破, 尤其是 70 年代初重组 DNA 技术的建立和发展, 为遗传学发展走上产业化道路奠定了基础。遗传工程的兴起, 使人类有可能按照自己的意愿和需要, 来直接操纵遗传物质, 有目的地改造各种生物的遗传组成乃至建立新的遗传特性。遗传工程已经和将对人们的日常生活产生巨大的影响, 在当代人类社会中发挥重要作用。今天, 以遗传工程为主体的生物工程技术已同微电子技术、能源技术一起, 成为关系到人类生存和社会进步的世界高技术领域的重要支柱。

众所周知, 遗传学研究在我国曾几度波折, 历经沧桑, 有过一段坎坷曲折的历程。随着我国“四化”建设的步伐, 遗传学研究逐渐走上健康发展的道路, 改革开放政策的实施, 更推动着我国的遗传学研究走向世界。目前, 遗传学研究在我国已得到广泛的开展, 某些领域还

达到了国际先进水平。然而,面对世界新技术革命的潮流,我们必须清醒地认识到我国科学技术发展中还有薄弱环节;而要改变这一切,跻身于世界科技强国之行列,首要的战略措施就是必须抓紧人才的培养,这在任何国家都是一样的。造就和培养一大批具有高水平的科学家是我国科学技术实现现代化的体现和保证。因此,作为生命科学带头学科的遗传学,就更要求造就一大批一流的遗传学家,为现代遗传学的发展、为遗传工程和生物技术在我国广泛开展服务,这是一项有战略意义的重要措施。

就是在这种形势下,复旦大学出版社为了加速我国遗传学人才的培养,适应国内的遗传学教学的需要,特约请了复旦大学遗传学研究所和国内其他遗传学专家撰写《遗传学丛书》各分册。在这些论著中,作者不仅详细介绍了遗传学各个分支领域的基本理论和基础知识,还充分反映了最新的研究成果和进展,力求内容新颖、资料丰富、文笔流畅。这套丛书对遗传学专业的大学生、研究生和正在从事遗传学和相关领域的教学、科研工作者无疑是一套水平较高的专业参考书。我相信,这套丛书的出版必将对我国蓬勃发展的遗传学事业起积极的推动和促进作用,为我国科学技术现代化的早日实现作出应有的贡献。

谈家桢

1988年1月于上海复旦大学遗传学研究所

## 作者的话

本书的前身是基因工程实验技术讲义,已在多届学生,包括复旦大学生命科学院硕(博)士生、上海第二医科大学七年制临床医学专业的硕士生以及来自全国各地的大专院校与医学院校的进修教师中试用。由于实验安排上考虑到必须在有限的学时内学习到连贯性较强的系列实验,所以增加了实验背景知识的讲解,力求使学习者易于做到举一反三,融会贯通。讲义在试用过程中得到学生的首肯,并认为操作部分具有很强的实用性,适宜作为教材使用。实验中正文与附录部分的内容均经学生反复验证,一般都能得到理想的结果。现又根据最新资料(外文版书籍)对讲义中的部分内容进行了修订与增补,以期在原有的基础上有所提高。

本教程的特点之一是原理部分的内容比较详尽,目的是让学习者更全面了解前人在这一领域的实验设计中所做过的工作,掌握基因工程技术方面的原理与方法并开阔眼界,为今后独立设计与完善实验打下基础。文中这部分内容因技术性较强而未能在一般的基因工程原理教材中提及,实验操作手册中也缺少这方面的背景知识,所以学习这些内容有助于学生将来独立完成实验细节的设计。详尽的附录是本教程的又一特点,其中内容均为基因工程操作中常用仪器的使用、试剂的配制、菌种的保存等相关内容,编写时曾请教多位专家。附录的编写也基于同样的目的:从原理上理解每一项技术将有助

于实验者对方法乃至器材加以改进,最终使实验进行得更快、更好。

基因工程实验课程初创时期所用教材为《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,1987年版),内容也为当年较先进的通用技术。但是,近年来基因工程实验技术的发展非常迅速,为此我们在教学中改革了旧的、并引进了新的实验,用意是跟上现代技术的要求。从现有实验内容来看,无论是材料还是方法均比以前有了很大的改进,例如:现在的实验中改革了原用的pBR322质粒载体,而代之以多功能的pUC系列质粒载体——pUC118,且与合适的宿主菌配套使用;克隆的目的基因用卡那霉素抗性基因取代了原用的链霉素抗性基因(因为细菌染色体DNA会以较高的频率发生核糖体小亚基(S12)突变,克隆链霉素抗性基因时易造成假阳性结果)。在实验技术方面:简化了碱法,取消了耗资较大的氯化铯密度梯度超离心法与操作较烦琐的Sephrose 2B柱层析法纯化质粒;增加了常用的琼脂糖凝胶中回收目的基因片段的实验,以及先进性与安全性俱佳的非放射性法标记DNA探针进行菌落原位杂交鉴定重组子的实验(共有探针标记、吸印、杂交、显色等四个实验)。在DNA水平检测重组子方面,也以一步法快速抽提后酶切鉴定取代了原用的快速细胞破碎法。除了以上的系列克隆实验外,还增加了PCR法鉴定人的性别(实验材料为头发),为学生初步掌握这门具有广泛应用前景的技术打下良好的基础。

作者长期从事基因工程实验教学,积累了较多的经验,可以说此书乃作者十数年之经验总结。本教材编写过程中曾得到复旦大学生命科学院及其他系诸多老师的无私帮助,在此一并致谢。由于作者水平所限,书中错误在所难免,衷心希望每位读者提出宝贵的意见与建议,以使今后的教材更加完善。

盛小禹

1999年6月于复旦大学

# 目 录

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 绪论                            | 1  |
| 本教程基因工程实验流程图                  | 3  |
| 实验一 碱法抽提质粒 DNA                | 5  |
| 一、实验目的                        | 5  |
| 二、实验原理                        | 5  |
| (一) 克隆载体 pUC118 质粒与宿主菌 MV1184 | 7  |
| 1. pUC118 质粒结构                | 7  |
| 2. MV1184 宿主菌 F' 因子基因型        | 8  |
| 3. MV1184 宿主菌染色体基因型           | 9  |
| (二) 质粒 DNA 的抽提                | 10 |
| 1. 裂解细胞                       | 11 |
| 2. 分离                         | 12 |
| 3. 纯化                         | 12 |
| (三) 碱法抽提的主要试剂                 | 19 |
| (四) 抽提产量与试剂用量的估算              | 19 |
| 1. 抽提产量估算                     | 19 |
| 2. 试剂用量估算                     | 20 |
| 三、试剂与器材                       | 21 |
| 四、实验步骤                        | 24 |

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| <b>实验二 电泳法测定 DNA 的浓度与纯度</b> | 27 |
| 一、实验目的                      | 27 |
| 二、实验原理                      | 27 |
| (一) 琼脂糖凝胶                   | 29 |
| (二) 电泳时 DNA 迁移的影响因素         | 31 |
| 1. DNA 分子质量的影响              | 31 |
| 2. DNA 构型的影响                | 31 |
| 3. 胶浓度的影响                   | 32 |
| 4. 电场强度的影响                  | 33 |
| 5. 溴乙锭的影响                   | 33 |
| 6. 电泳缓冲液的影响                 | 34 |
| 7. 碱基组成与电泳温度的影响             | 34 |
| (三) 电泳缓冲液                   | 35 |
| 1. TAE                      | 35 |
| 2. TBE                      | 35 |
| 3. TPE                      | 36 |
| (四) 上样液                     | 36 |
| (五) 上样量的控制                  | 37 |
| (六) DNA 电泳条带的检测             | 38 |
| (七) 电泳的分子质量梯度标志             | 40 |
| 1. 线状分子质量梯度标志               | 40 |
| 2. 超螺旋分子质量梯度标志              | 42 |
| 三、试剂与器材                     | 43 |
| 四、实验步骤                      | 44 |
| <b>实验三 载体与供体 DNA 的酶切</b>    | 46 |
| 一、实验目的                      | 46 |
| 二、实验原理                      | 46 |
| (一) 限制性内切酶的一般性质             | 48 |
| 1. 一般限制酶的识别位点               | 48 |

|                           |    |
|---------------------------|----|
| 2. 识别超长碱基序列的酶 .....       | 49 |
| 3. 各类粘性末端的特点 .....        | 49 |
| 4. 同识别序列的酶 .....          | 50 |
| 5. 酶切反应中的位点优先现象 .....     | 50 |
| 6. DNA 构型对酶切的影响 .....     | 51 |
| 7. 近末端切割 .....            | 51 |
| 8. 酶的星号反应 .....           | 51 |
| 9. 大肠杆菌中甲基化现象对酶切的影响 ..... | 52 |
| 10. 能切割单链的限制酶 .....       | 53 |
| (二) 限制性内切酶的使用 .....       | 54 |
| 1. 制作基因图谱 .....           | 54 |
| 2. 克隆基因 .....             | 54 |
| 3. 制备探针 .....             | 55 |
| (三) 酶切方式 .....            | 55 |
| 1. 部分酶切 .....             | 55 |
| 2. 完全酶切 .....             | 56 |
| (四) 酶的质量鉴定 .....          | 56 |
| (五) 酶的保存 .....            | 57 |
| (六) 酶单位的定义 .....          | 58 |
| (七) 限制酶的作用条件 .....        | 58 |
| 1. 作用温度 .....             | 58 |
| 2. 缓冲体系 .....             | 59 |
| 3. 反应时间 .....             | 60 |
| 4. DNA 的纯度与浓度 .....       | 60 |
| (八) 终止酶反应的方法 .....        | 61 |
| (九) 酶切失败的原因及处理的方法 .....   | 61 |
| 三、试剂与器材 .....             | 63 |
| 四、实验步骤 .....              | 63 |
| 实验四 目的基因片段的回收 .....       | 65 |

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 一、实验目的 .....                   | 65 |
| 二、实验原理 .....                   | 65 |
| (一) 各类回收方法 .....               | 66 |
| 1. 电泳回收法 .....                 | 66 |
| 2. 收集孔电泳回收法 .....              | 68 |
| 3. 机械破碎凝胶回收法 .....             | 68 |
| 4. 溶(熔)胶回收法 .....              | 70 |
| 5. 琼脂糖酶降解凝胶回收法 .....           | 71 |
| (二) 回收方法的选择与操作注意事项 .....       | 72 |
| 三、试剂与器材 .....                  | 73 |
| 四、实验步骤 .....                   | 74 |
| <b>实验五 载体与供体 DNA 的连接</b> ..... | 77 |
| 一、实验目的 .....                   | 77 |
| 二、实验原理 .....                   | 77 |
| (一) 早期的连接理论 .....              | 78 |
| (二) 近期的计算机模拟反应进程 .....         | 79 |
| (三) 连接酶 .....                  | 88 |
| (四) 连接反应的影响因素 .....            | 89 |
| 1. 连接缓冲液的影响 .....              | 89 |
| 2. pH 值的影响 .....               | 89 |
| 3. ATP 浓度的影响 .....             | 90 |
| 4. 连接温度与时间的影响 .....            | 90 |
| 5. 酶浓度的影响 .....                | 90 |
| 6. DNA 浓度的影响 .....             | 91 |
| 7. DNA 序列的影响 .....             | 91 |
| 8. 其他抑制因素的影响 .....             | 92 |
| (五) 三种连接酶单位定义 .....            | 92 |
| 1. Weiss 单位 .....              | 92 |
| 2. d(A—T)环化单位 .....            | 92 |

|                                                                         |            |
|-------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3. 粘性末端单位 .....                                                         | 92         |
| 三、试剂与器材 .....                                                           | 93         |
| 四、实验步骤 .....                                                            | 93         |
| <b>实验六 CaCl<sub>2</sub> 法转化大肠杆菌 .....</b>                               | <b>95</b>  |
| 一、实验目的 .....                                                            | 95         |
| 二、实验原理 .....                                                            | 95         |
| (一) 各种转化方法与转化率的衡量指标 .....                                               | 96         |
| (二) 转化率的影响因素 .....                                                      | 98         |
| 1. 试剂(包括水)纯度与器皿清洁程度的影响 .....                                            | 98         |
| 2. 接种前菌种保存方式的影响 .....                                                   | 98         |
| 3. 宿主菌生长时期的影响 .....                                                     | 98         |
| 4. CaCl <sub>2</sub> 法 0℃ 放置时间的影响 .....                                 | 99         |
| 5. 化合物与无机离子的影响 .....                                                    | 99         |
| 6. 质粒大小、构型与复制起点的影响 .....                                                | 100        |
| 7. 竞争 DNA 的影响 .....                                                     | 101        |
| 8. 共转化质粒的影响 .....                                                       | 102        |
| 9. 质粒 DNA 与转化细胞比例的影响 .....                                              | 103        |
| 10. 菌株基因型 <i>recA</i> <sup>+</sup> 与 <i>recA</i> <sup>-</sup> 的影响 ..... | 103        |
| 11. 连接缓冲液的影响 .....                                                      | 104        |
| (三) 大肠杆菌中的限制系统与限制-修饰系统 .....                                            | 104        |
| 1. <i>Mcr</i> 限制系统 .....                                                | 104        |
| 2. <i>Mrr</i> 限制系统 .....                                                | 105        |
| 3. <i>hsd</i> 限制-修饰系统 .....                                             | 105        |
| (四) 宿主菌的选择 .....                                                        | 106        |
| 三、试剂与器材 .....                                                           | 107        |
| 四、实验步骤 .....                                                            | 108        |
| <b>实验七 酚/氯仿法快速鉴定转化子 .....</b>                                           | <b>111</b> |
| 一、实验目的 .....                                                            | 111        |
| 二、实验原理 .....                                                            | 111        |

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| (一) DNA 水平检测 .....              | 112        |
| 1. 快速抽提电泳分析 .....               | 112        |
| 2. 快速抽提酶切分析 .....               | 112        |
| 3. 原位杂交法 .....                  | 112        |
| 4. 斑点杂交法 .....                  | 113        |
| 5. Southern 杂交法 .....           | 113        |
| 6. DNA 序列分析 .....               | 113        |
| (二) mRNA 水平检测 .....             | 113        |
| 1. R-环电子显微镜法检测 .....            | 114        |
| 2. 杂交抑制翻译 .....                 | 114        |
| 3. 杂交选择翻译 .....                 | 114        |
| (三) 蛋白质水平检测 .....               | 115        |
| 1. 沉淀免疫检测法 .....                | 115        |
| 2. 其他免疫检测法 .....                | 115        |
| (四) 功能水平检测 .....                | 115        |
| 三、试剂与器材 .....                   | 116        |
| 四、实验步骤 .....                    | 117        |
| <b>实验八 随机引物法标记 DNA 探针 .....</b> | <b>120</b> |
| 一、实验目的 .....                    | 120        |
| 二、实验原理 .....                    | 120        |
| (一) 酶法标记于链上 .....               | 122        |
| 1. 缺口转移法 .....                  | 122        |
| 2. 随机引物法 .....                  | 123        |
| 3. PCR 法 .....                  | 123        |
| (二) 酶法标记于末端 .....               | 124        |
| 1. 3'末端标记法 .....                | 124        |
| 2. 5'末端标记法 .....                | 124        |
| (三) 化学法标记于链上 .....              | 128        |
| 1. 直接标记法 .....                  | 128        |

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| 2. 介导标记法 .....                                                     | 129 |
| (四) 化学法标记于末端 .....                                                 | 137 |
| 1. 合成时引入氨基或巯基 .....                                                | 137 |
| 2. 合成后引入氨基或巯基 .....                                                | 140 |
| (五) 光化学法标记于链上 .....                                                | 140 |
| 1. 芳香叠氮化合物 .....                                                   | 140 |
| 2. 呋喃香豆素衍生物 .....                                                  | 141 |
| (六) 人工合成于链上 .....                                                  | 142 |
| 1. 掺入碱基类似物 .....                                                   | 142 |
| 2. 掺入核糖类似物 .....                                                   | 143 |
| (七) 检测酶直接标记法 .....                                                 | 144 |
| 1. 检测酶直接标记于链上 .....                                                | 144 |
| 2. 检测酶直接标记于末端 .....                                                | 145 |
| 三、试剂与器材 .....                                                      | 151 |
| 四、实验步骤 .....                                                       | 151 |
| <b>实验九 菌落原位吸印</b> .....                                            | 153 |
| 一、实验目的 .....                                                       | 153 |
| 二、实验原理 .....                                                       | 153 |
| (一) 各类吸印膜 .....                                                    | 153 |
| 1. 硝酸纤维素膜(NC膜) .....                                               | 153 |
| 2. 叠氮苄基甲基纤维素纸(DBM纸), 重氮苯硫醚<br>纤维素纸(DPT纸)和氨基苯硫醚纤维素纸(APT<br>纸) ..... | 154 |
| 3. 二乙氨基乙基纤维素纸(DEAE纸) .....                                         | 154 |
| 4. ECTELA纸 .....                                                   | 155 |
| 5. 尼龙膜 .....                                                       | 155 |
| 6. 聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜) .....                                            | 156 |
| 7. 其他膜 .....                                                       | 156 |
| (二) 各种转移方法 .....                                                   | 156 |

|                                     |     |
|-------------------------------------|-----|
| 1. 毛细管转移法 .....                     | 156 |
| 2. 真空转移法 .....                      | 157 |
| 3. 电转移法 .....                       | 158 |
| 三、试剂与器材 .....                       | 158 |
| 四、实验步骤 .....                        | 159 |
| <b>实验十 DNA 分子杂交</b> .....           | 161 |
| 一、实验目的 .....                        | 161 |
| 二、实验原理 .....                        | 161 |
| (一) DNA 的复性与杂交反应动力学方程式 .....        | 162 |
| 1. 双链 DNA 的复性过程 .....               | 162 |
| 2. 单链探针的杂交过程 .....                  | 164 |
| 3. 双链探针的杂交过程 .....                  | 166 |
| (二) 杂交速率的影响因素 .....                 | 169 |
| 1. 探针分子复杂性的影响 .....                 | 169 |
| 2. 探针分子浓度的影响 .....                  | 169 |
| 3. 杂交温度的影响 .....                    | 170 |
| 4. 杂交液 pH 值的影响 .....                | 171 |
| 5. 杂交液中离子强度的影响 .....                | 171 |
| 6. 杂交液中甲酰胺浓度的影响 .....               | 171 |
| 7. 杂交促进剂的影响 .....                   | 171 |
| (三) 杂交反应的两种模式 .....                 | 172 |
| (四) 杂交分子稳定性的影响 .....                | 173 |
| 1. 杂交液中 $\text{Na}^+$ 离子浓度的影响 ..... | 173 |
| 2. 探针分子中 GC% 的影响 .....              | 173 |
| 3. 杂交液中甲酰胺浓度的影响 .....               | 173 |
| 4. 探针分子长度的影响 .....                  | 174 |
| 5. 与目标 DNA 错配的影响 .....              | 174 |
| 6. 杂交液 pH 值的影响 .....                | 174 |
| (五) 杂交的步骤 .....                     | 175 |

|                               |     |
|-------------------------------|-----|
| 三、试剂与器材 .....                 | 176 |
| 四、实验步骤 .....                  | 177 |
| <b>实验十一 显色法检测杂交结果</b> .....   | 179 |
| 一、实验目的 .....                  | 179 |
| 二、实验原理 .....                  | 179 |
| (一) 酶法显色原理 .....              | 181 |
| 1. 辣根过氧化物酶 .....              | 182 |
| 2. 碱性磷酸酯酶 .....               | 185 |
| (二) 免疫法检测原理 .....             | 189 |
| (三) 生物素-亲和素法检测原理 .....        | 189 |
| (四) 其他检测法 .....               | 190 |
| 1. 胶体金标记——银加强检测法 .....        | 190 |
| 2. 时间分辨荧光检测法 .....            | 191 |
| 三、试剂与器材 .....                 | 193 |
| 四、实验步骤 .....                  | 195 |
| <b>实验十二 PCR 法鉴定人的性别</b> ..... | 197 |
| 一、实验目的 .....                  | 197 |
| 二、实验原理 .....                  | 197 |
| (一) PCR 的引物设计 .....           | 199 |
| 1. 引物的长度 .....                | 199 |
| 2. 引物的 GC% 含量 .....           | 199 |
| 3. 引物的 3' 端起始碱基 .....         | 200 |
| 4. 引物无回文对称结构 .....            | 200 |
| 5. 引物自身不能配对 .....             | 200 |
| 6. 两个引物的 $T_m$ 值 .....        | 200 |
| 7. 两个引物之间不能配对 .....           | 200 |
| (二) PCR 的反应体系 .....           | 202 |
| 1. 模板 DNA .....               | 202 |
| 2. 引物 .....                   | 202 |