



普通高等教育“十三五”规划教材

分子生物学 实验指导

MOLECULAR BIOLOGY

EXPERIMENT

刘文 主编



科学出版社

分子生物学实验指导

刘 文 主编

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书是科研成果转化而来的、由递进式的实验项目组成的一个综合性课题,课题内容涵盖了重组DNA的基本流程,包含基础实验部分和拓展创新实验部分,共17个实验项目。

本书适合作为普通高等院校生物工程、生物技术、生物科学专业及农林、医药等专业的分子生物学或基因工程实验教材,也可供相关技术与研究人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学实验指导 / 刘文主编. —北京: 科学出版社, 2018.5
普通高等教育生命科学系列教材
ISBN 978-7-03-057123-6

I. ①分… II. ①刘… III. ①分子生物学—实验—高等学校—教学参考资料 IV. ①Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2018)第073207号

责任编辑: 陈 露
责任印制: 谭宏宇 / 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

江苏省句容市排版厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018年5月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2018年5月第一次印刷 印张: 6 1/4

字数: 150 000

定价: 28.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

《分子生物学实验指导》

编 委 会

主 编：刘 文

编 者：（按姓氏笔画排序）

王丽娟 刘 文

张建勇 孟春晓

胡 巍 盛桂华

前 言

分子生物学是21世纪的前沿学科,以重组DNA技术为基础的基因工程是生命科学发展前沿的一个代表。分子生物学实验或基因工程实验是生物学及医学、农林、食品科学等相关专业本科生的专业核心课程。实验教学不仅能帮助学生理解和掌握分子生物学的理论知识,也是提高学生现代生物学实验技能和科学素养、提升综合素质的必要环节。

本书的教学内容是科研成果转化而来的、由递进式的实验项目组成的一个综合性课题。用课题探究引导实验教学,让学生在探究的“实战”中发现问题、解决问题。在探究过程中,学生调动与运用知识储备分析问题,从而增长新的实验技能和科学素养,借助小组成员的沟通和合作获得积极的情感体验,推动认知的构建与技能的有效发展。

实验课题内容涵盖了重组DNA的基本流程,包含基础实验部分和拓展创新实验部分。基础实验部分“大肠杆菌Dps表达载体的构建、诱导表达及检测鉴定”包括基因扩增、质粒提取、DNA重组及转化、重组子筛选鉴定等分子生物学核心实验。拓展创新实验部分“Dps融合表达载体的构建、表达蛋白的分离纯化及功能鉴定”,通过融合表达载体的构建,教师可以将自己的科研成果(如某种真核生物目的基因)用于实验教学(如表达Dps-目的基因融合蛋白,进行蛋白纯化和功能鉴定等),对实验内容进行有特色的拓展和创新。

为了获得理想的教学效果,进行实验项目设计时,综合考虑了多方面的因素,包括实验流程完整性、操作技术经典性及系统性,宿主细胞容易获得,目的蛋白表达高效、蛋白质纯化鉴定方便,有较大的拓展和创新空间,实验成本较低等。不同学校进行实验教学时,可以根据教学目标、教学课时和实验条件等灵活选择教学方案。例如,从基础实验和拓展实验中选择部分模块,不同小组完成不同任务,选择不同的基因进行融合表达等。在教学组织方式上,建议集中几天时间完成所选方案的实验,保证探究的连续性,也有利于不同实验环节、不同小组在时间上的相互配合。



为便于学生将本书作为实验手册使用,基础实验部分加入了供学生思考的小问题(可要求学生针对拓展实验提出相关问题),同时在书中为学生提供了记录实验现象和结果的留白,提供了部分实验的结果图片作为参考,设计了基础实验的时间安排建议表和实验小贴士等。

在本书编写过程中,编者得到山东理工大学生命科学学院的大力支持。书中所用载体和部分技术方法,使用并参考了中国预防医学科学院病毒学研究所侯云德院士和中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所凌世淦教授、宋晓国老师的研究成果。山东理工大学生命科学学院宋新华、徐振彪、邓洪宽等老师为本书的编写提供过修改建议或部分资料;吕颖、方丽、贾义华等同学提供了许多宝贵的实验操作经验。在此,向提供过帮助的单位和个人一并表示最诚挚的感谢。

由于时间有限,书中难免存在疏漏和不足之处,敬请使用本书的读者提出宝贵意见以帮助我们不断改进。

编 者

2018年3月20日

目 录

前言

实验室守则	1
实验内容概述	2
实验一 分子生物学实验常用仪器设备	4
实验二 培养基的配制与细菌的纯化培养	7
实验三 质粒的提取	10
实验四 目的基因PCR扩增及扩增产物回收	12
实验五 琼脂糖凝胶电泳检测DNA	16
实验六 PCR扩增产物与T载体的连接	20
实验七 大肠杆菌感受态细胞的制备	24
实验八 重组质粒的构建及转化	26
实验九 阳性克隆的筛选鉴定	31
实验十 目的蛋白的诱导表达及检测	36
实验十一 蛋白质印迹法鉴定目的蛋白	41
实验十二 细胞中总RNA的提取	44
实验十三 逆转录PCR获取目的基因	47
实验十四 Dps融合表达载体的构建	49
实验十五 目的基因与融合表达载体重组、Dps融合蛋白诱导表达及检测	55
实验十六 目的蛋白的分离纯化	58
实验十七 目的蛋白的功能鉴定	63
参考文献	68
附录1 常用试剂及其配制	69
附录2 常用实验材料保存方法	80
附录3 常用仪器设备使用说明及使用注意事项	81
附录4 实验时间安排建议	88
附录5 实验小贴士	90
附录6 实验报告格式	91

实验室守则

1. 穿着要整洁规范,进入实验室必须穿实验服。

2. 实验室内禁止带入食品,勿高声谈话。

3. 实验前应当认真预习,熟悉实验内容,了解所用仪器用具;实验应严格按操作规程进行,认真操作、仔细观察,及时记录实验现象及结果;实验结束后,仔细分析和总结实验结果,认真撰写实验报告。

4. 许多溶剂,如三氯甲烷(氯仿)、异戊醇、异丁醇、正丁醇、甲醛和乙醚,应在通风橱中使用或使用时注意通风,并注意保护呼吸道、皮肤和衣物。有些试剂可能是致癌物或诱变剂,如溴化乙锭、甲酰胺、丙烯酰胺等,在操作中应注意防护,并注意使用后的处理。注意防止紫外线对皮肤及眼睛的损伤,避免直接照射皮肤与眼睛。

5. 各种试剂在使用前都应认真阅读使用说明,特别是一些试剂盒,在掌握相关知识后方可使用。

6. 实验室中所有仪器都应向有使用经验的人请教后或阅读仪器使用说明书后方可使用。使用贵重精密仪器时,应严格遵守操作规程,发现故障立即报告,不得擅自拆检。仪器使用后使用人要如实填写使用登记表。

7. 实验台应当保持整洁,仪器、药品摆放整齐,使用过的器具及玻璃器皿应洗净后放回原处。试剂应规范、节约使用。公用试剂使用完毕后,应立即盖好放回原处。

8. 实验结束后整理好自己的实验用品,清理实验区域,做好卫生,并注意实验室水、电、门、窗等方面的安全。

实验内容概述

1. 课题名称

大肠杆菌 Dps 及其融合蛋白表达载体的构建、诱导表达、分离纯化和功能鉴定

2. 研究背景和目的意义

DNA 结合蛋白 (DNA-binding protein from starved cell, Dps) 是存在于古生菌及细菌中的一类抗压力蛋白, 属于铁蛋白超家族。每一个 Dps 单体的分子质量为 18.7kDa, Dps 单体能够通过自组装机制形成十二聚体, 发挥多种生理功能, 它既能通过亚铁氧化酶活性, 结合铁离子对氧化压力做出应答, 又能在氧化并储存铁的同时去除 H_2O_2 与 $Fe(II)$ 的毒性, 从而保护 DNA、蛋白质及膜脂免受自由基损伤。另外, 在铁、铜、辐射、高盐、酸、碱、饥饿或营养不足等环境胁迫下, 一些细菌的 Dps 还能非特异性结合 DNA, 形成一个高度有序且稳定的 Dps-DNA 复合体, 使染色体从松散易受损伤形态转变为凝集紧实状态, 起到保护 DNA 免受损伤的作用。

本实验以大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 基因组为模板, 对其 *dps* 基因进行扩增, 并在其下游引入 His-Tag, 重组到 pBV220 载体上构建 pBV-dps-6his 原核表达载体, 利用亲和层析分离纯化目的蛋白并通过蛋白质印迹实验进行鉴定; 根据蛋白质是否能自组装成十二聚体并与 DNA 结合、保护 DNA 免受自由基氧化损伤等特点检测表达蛋白的功能。

在 pBV-dps-6his 原核表达载体基础上构建 pBV-dps-2x-6his 原核表达载体, 其中 2x 为引入的 *Xho I* 和 *Xba I* 酶切位点, 可将其他目的基因, 如抗原表位序列或通过 RT-PCR 获得的真核生物基因等插入此位点, 诱导表达 Dps 融合蛋白。

通过基因工程表达的 Dps 及其融合蛋白, 可进行蛋白质抗氧化保护作用、抗原表位的免疫原性等生物学功能方面的研究。本课题内容综合性强, 包含了基因工程 (重组 DNA 技术) 的关键设计思路和基因操作的常用方法。

(5) 载体 pBV-dps-2x-6his 与目的基因的重组、Dps 融合蛋白的诱导表达、蛋白分离纯化、Dps 蛋白功能鉴定。

实验一

分子生物学实验常用仪器设备

【实验目的】

介绍实验的原理和流程;学习常用仪器设备的使用。

【实验器材】

1. 灭菌设备

电热鼓风干燥箱主要用于干热灭菌;高压灭菌锅主要用于高压湿热灭菌。

2. 离心机

低温分离技术是分子生物学研究中必不可少的手段,基因片段的分离、酶蛋白的沉淀和回收及其他生物样品的分离制备实验中都离不开低温离心技术。

离心机的分类和功能:低速离心机,每分钟几千转(r/min),用于分离细胞;高速离心机,每分钟1万~3万转,用于分离DNA、蛋白质等生物大分子;超速离心机,每分钟3万转以上,用于分离病毒、蛋白质等,根据用途又可分为分析超速离心机和制备超速离心机。

本课题需要实验室配有低温台式高速离心机,分别配有1.5ml和40ml角式转头,极限转速在20 000r/min以上。

3. 冷冻设备

普通冰箱(4℃, -20℃), -40℃冰箱, -80℃冰箱。许多动物、植物、微生物的样本以及试剂需要在低温或者超低温下贮存。

需配置制冰机,许多反应和实验过程需要在冰浴内进行。

4. 凝胶电泳装置

电泳法可以对不同带电物质进行定性或定量分析,或将一定混合物进行组分分析或单个组分提取制备。水平电泳槽常用于对核酸进行琼脂糖凝胶电泳实验,垂直电泳槽多用于蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳实验。电泳仪为电泳提供稳压或稳流的电源。

5. 凝胶成像仪

观察凝胶板、进行成像和分析存储成像结果。

6. PCR 仪

PCR仪也称DNA热循环仪、基因扩增仪。主要应用在基础研究

离心机使用的主要步骤包括几个方面?

最关键的注意步骤是什么?

你所在的实验室有几种离心机?分别在什么情况下使用?



和应用研究的许多领域,如基因合成、基因分析、序列分析、进化分析、临床诊断、法医学鉴定等。

7. 0.1~1 000 μ l 的微量移液器

一般都为量程可调移液器,可调范围分别为0.1~2.5 μ l、0.5~10 μ l、10~100 μ l、20~200 μ l、200~1 000 μ l,用于微量溶液的移取。有不同型号的移液器枪头(tip)适用于不同量程的移液器。

8. 超净工作台

超净工作台为分子生物学无菌操作提供了可能,分为垂直送风和水平送风两种。

超净工作台由三相电机作鼓风动力,功率为145~260W,将空气通过由特制的微孔泡沫塑料片层叠合组成的“超级滤清器”后吹送出来,形成连续不断的无尘无菌的超净空气层流,即所谓的“高效的特殊空气”,它除去了大于0.3 μ m的尘埃、真菌和细菌孢子等。超净空气的流速为24~30m/min,这已足够防止附近空气可能的袭扰而引起的污染,该范围流速也不会妨碍采用酒精灯对器械等进行的灼烧消毒。工作人员在这样的无菌条件下操作,保持无菌材料在转移接种过程中不被污染。

9. 培养箱

包括恒温培养箱和数控恒温振荡培养箱。数控恒温振荡培养箱广泛用于对温度和振荡频率有较高要求的细菌培养、发酵、杂交、生物化学反应及酶和组织研究等。

10. 天平

包括分析天平和制备天平,天平的精度可达到千分之一或者万分之一。

11. 光学测量仪器

紫外-可见分光光度计主要用来检测DNA或RNA的浓度和纯度,有条件的实验室用DNA或RNA计算器来代替分光光度计,使用起来更方便。

12. 微波炉及电磁炉

用于熔化琼脂和琼脂糖。

13. pH计(酸度计)

用于试剂配制。

14. 磁力搅拌器

用于试剂配制。

15. 旋涡混合器

混合微量试剂。

16. 水浴装置

常用的水浴温度分别为16 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、42 $^{\circ}$ C和60 $^{\circ}$ C等,用于重组、酶切、转化、溶胶等分子实验操作。

PCR的原理是什么?
谈谈PCR仪还能做些什么工作?

微量移液器如何使用?
使用时有哪些注意事项?

超净工作台的使用步骤是什么?



17. 玻璃器皿及塑料制品

大小烧杯、锥形瓶、培养皿(直径9mm)、试剂瓶、量筒、吸管、搅拌棒、研磨器、离心管(1.5ml、0.5ml、0.2ml)、PCR管、不同型号的移液器枪头等。

18. 部分常用仪器

19. 含质粒的大肠杆菌菌株

20. 胰蛋白胨、酵母提取物、氨苄西林(氨苄青霉素)

【实验步骤】

1. 了解实验主要流程、时间安排、实验要求等。
2. 学习实验室安全注意事项。
3. 学习微量移液器的使用(见附录3)。使用各种量程的移液器练习移取1 μ l、10 μ l、55 μ l、150 μ l和1ml的蒸馏水。
4. 学习高压蒸汽灭菌锅、超净工作台、恒温振荡培养箱等的使用(见附录3)。
5. 实验器皿的洗涤、灭菌。
6. 含质粒大肠杆菌的接种培养。

【注意事项】

1. 取液体试剂之前应混匀一下,以免因放置时间过长而浓度不均。
2. 移液器用完之后要将刻度调回到接近最大量程的位置,防止弹簧失去弹性。

【问题讨论】

1. 分子生物学实验中哪些试剂在使用过程中应特别注意安全防护?
2. 简述微量移液器的正确使用方法。

实验二

培养基的配制与细菌的纯化培养

【实验目的】

1. 掌握LB培养基的配制方法。
2. 掌握菌种的纯化培养方法。

【实验原理】

LB (Luria-Bertani) 培养基是微生物学实验中最常用的培养基, 用于大肠杆菌等细菌的培养, 分为液体培养基和加入琼脂的固体培养基。加入抗生素的LB培养基可用于筛选含有质粒(质粒上有抗性基因)的细菌克隆。

菌种纯化就是将菌体进行单菌落培养, 常采用平板划线法或稀释涂布法。

【实验器材】

1. 仪器
超净工作台, 灭菌锅, 恒温培养箱。
2. 材料与试剂
 - (1) 菌种: 含质粒的大肠杆菌 DH5 α 。
 - (2) 胰蛋白胨。
 - (3) 酵母提取物。
 - (4) 氯化钠。
 - (5) 琼脂。
 - (6) 50mg/ml 氨苄青霉素 (Amp)。
 - (7) 5mol/L 氢氧化钠。
 - (8) 30% 甘油。

【实验步骤】

1. LB 液体培养基的配制

配制每升培养基, 应在 950ml 去离子水中加入:

胰蛋白胨	10g
酵母提取物	5g



氯化钠 10g

用玻璃棒搅拌溶液直至溶质完全溶解,加入200 μ l 5mol/L NaOH调节pH至7.0,加入去离子水至总体积为1L。配制LB固体培养基需在液体培养基中加入1.5%~2%的琼脂并煮沸溶化,补足失水。121 $^{\circ}$ C高压灭菌20min。

2. 培养皿、移液管等的包装与灭菌

实验需灭菌的器械包括培养皿,试管,10ml移液管,40ml离心管,牙签,各种规格枪头,1.5ml离心管,0.1mol/L CaCl₂溶液等。

3. 含抗生素培养基的配制及倒平板

用灭菌后的去离子水将氨苄青霉素配制成50mg/ml储备液,放置-20 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

灭菌后的培养基降温至60 $^{\circ}$ C左右(触摸不烫手),定量加入氨苄青霉素溶液至终浓度50 μ g/ml,混匀。

固体LB培养基需在加入抗生素后立即倒平板。左手拇指和食指打开培养皿上盖,右手托锥形瓶瓶底,倒入约20ml(高度小于1/2)培养基,水平放置,使培养基平铺。

4. 菌种的分离纯化(需进行无菌操作)

划线培养:右手拿接种环,挑取保存菌种,左手拿培养皿,微开上盖,接种环与平板成45 $^{\circ}$ 角,用手腕力轻巧地在平面上滑动,避免划破培养基。划线完后,把培养皿倒置放在37 $^{\circ}$ C条件下培养24~48h。

挑单菌落:从上述成功划线培养的平板上挑取一个单菌落于3ml LB液体培养基试管中,37 $^{\circ}$ C振荡培养过夜。

5. 菌种的保存

接种在平板上的细菌置于4 $^{\circ}$ C冰箱只能保存数天,将过夜培养的菌液加入等量的30%灭菌的甘油,分装于无菌1.5ml离心管中-20 $^{\circ}$ C或-48 $^{\circ}$ C长久保存。

【注意事项】

1. 灭菌后的培养基待冷却至60 $^{\circ}$ C左右再加入抗生素,防止抗生素在高温下失活。

2. 倒平板时手法要快,防止培养基冷凝,所倾倒在培养皿中的培养基厚度应不高于1/2培养皿高度。

3. 菌株可在含15%甘油的培养液中-20 $^{\circ}$ C保存。也可在半固体LB琼脂培养基中穿刺保存。

4. 基础实验部分,15人左右的实验组一般需配制液体LB培养基500ml,分装后(30ml/瓶)灭菌;固体LB培养基800ml,灭菌后冷却至50~60 $^{\circ}$ C倒平板(其中2个不加Amp,其余加Amp至终浓度50 μ g/ml且混合均匀),备用;若长期保存需封口,4 $^{\circ}$ C条件下倒置。

为什么要在培养基中加入氨苄青霉素? 100ml培养基中应加入多少氨苄青霉素的储备液?

菌种有哪些保存方法? 各有什么优缺点?



【问题讨论】

1. 什么是大肠杆菌的单克隆？为什么要进行菌种的单克隆培养？
2. 在培养基中加入何种抗生素的依据是什么？

实验三

质粒的提取

【实验目的】

掌握碱裂解法提取质粒的原理与方法。

【实验原理】

碱裂解法提取质粒根据共价闭合环状质粒DNA与线性染色体DNA之间在拓扑学上存在差异而达到使其分离的目的。

在pH12.0~12.5这个狭窄的范围内, DNA分子中的氢键被破坏, 基因组DNA双螺旋结构被解开而变性, 而共价闭合环状的小分子质粒DNA的氢键虽断裂, 但两条互补链仍彼此相互盘绕, 紧密地结合在一起。当加入pH4.8的乙酸钾高盐缓冲液恢复pH至中性时, 两条互补链仍保持在一起的质粒DNA能够迅速而准确地复性; 染色体DNA两条互补链往往彼此已完全分开、缠绕成线团或网状结构而很难复性。通过离心, 线团状的染色体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。

DNA变性和复性的方法有哪些?
变性DNA的哪些性质发生了改变?

【实验器材】

1. 仪器

恒温摇床, 台式离心机, 旋涡混合器。

2. 材料与试剂

(1) 含pBV220质粒的大肠杆菌菌种。

(2) 溶液 I : 50mmol/L 葡萄糖, 25mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 10mmol/L EDTA (pH8.0)。

(3) 溶液 II : 0.4mol/L NaOH, 2% SDS, 新鲜配制。

(4) 溶液 III : 3mol/L KAc溶液, pH4.8。

(5) 氯仿 : 异戊醇 (V : V = 24 : 1)。

(6) Tris饱和酚。

(7) 异丙醇或无水乙醇。

(8) 70%乙醇。

(9) TE缓冲液 : 10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0。