

国家示范性高职院校建设项目成果系列教材

基因操作技术

张虎成

主编

JIYIN
CAOZUO JISHU



化学工业出版社

国家示范性高职院校建设项目成果系列教材

基因操作技术

张虎成 主编

JIYIN
CAOZUO JISHU



化学工业出版社

·北京·

本书为国家示范性高职院校一线教师和企业专家共同开发的教改成果教材。本书按照 DNA 重组技术的操作程序来安排实验,即从核酸的提取→目的基因的制备→体外 DNA 的重组(酶切与连接)→重组 DNA 分子引入受体细胞→转化子的筛选→重组 DNA 分子的鉴定等步骤编排成一个综合性大实验。在这个综合性实验中,每一步实验既相对独立又与下一步实验紧密相连。通过这些实验,学生可以熟练掌握分子生物学最基本的技术,并对 DNA 重组技术有一个比较全面而系统的概念。书中同时穿插了分子生物学其他必备的实验,以便培养学生比较全面的分子生物学实验技能。本书分为 6 个项目,每个项目由若干个任务组成,并且有“必备知识”作为任务的理论补充,“拓展知识”可以扩展学生的知识面,“项目思考”中设计的问题有助于培养学生独立思考能力和创新意识。

本书可作为高职高专生物技术相关专业的教材,也可供相关技术人员参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

基因操作技术/张虎成主编. —北京:化学工业出版社, 2010.9
(国家示范性高职院校建设项目成果系列教材)
ISBN 978-7-122-07860-5

I. 基… II. 张… III. 基因-遗传工程-高等学校: 技术学院-教材 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 148141 号

责任编辑:李植峰

文字编辑:李 瑾

责任校对:王素芹

装帧设计:张 辉

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装:化学工业出版社印刷厂

787mm×1092mm 1/16 印张 13 $\frac{3}{4}$ 字数 346 千字 2010 年 9 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:28.00 元

版权所有 违者必究

“国家示范性高职院校建设项目成果系列教材”

建设委员会成员名单

主任委员 安江英

副主任委员 么居标

委员 (按姓名汉语拼音排列)

安江英 陈洪华 陈淦漪 龚戈淬 马 越 苏东海

王利明 辛秀兰 么居标 张俊茹 钟桂英 周国烛

“国家示范性高职院校建设项目成果系列教材”

编审委员会成员名单

主任委员 辛秀兰

副主任委员 马 越

委员 (按姓名汉语拼音排列)

曹奇光 陈红梅 陈禹保 高春荣 兰 蓉 李 淳 李双石

李晓燕 刘俊英 刘 玮 刘亚红 鲁 绯 马长路 马 越

师艳秋 苏东海 王晓杰 王维彬 危 晴 吴清法 吴志明

谢国莉 辛秀兰 杨春花 杨国伟 苑 函 张虎成 张晓辉

《基因操作技术》编写人员

主 编 张虎成

副 主 编 劳文艳 舒 伟

参编人员 (按姓名汉语拼音排列)

劳文艳 (北京联合大学)

李建民 (军事医学科学院微生物流行病学研究所)

舒 伟 (广西医科大学)

魏 丽 (北京博奥生物有限公司)

许淑茹 (广西医科大学)

杨春花 (北京科技职业学院)

张虎成 (北京电子科技职业学院)

赵文军 (中国检验检疫科学研究院动植物检疫研究所)

前言

21 世纪是生物学的世纪，作为生物学最前沿的分子生物学是生物学相关专业的必修课程。随着人们在分子生物学水平研究的广泛展开和学习的不断深入，除了在分子水平上了解生物的本质特征外，在分子水平如何进行生物学操作是生物学界共同关心并十分重视的问题。“基因操作技术”就是利用分子生物学的一般原理阐述在分子生物学实验中所涉及的技术方法、原理和策略，是一门指导分子生物学实验操作的理论与实践相结合的课程。

随着生物科学和生物技术的日益发展，人们越来越重视对生物学研究手段的了解和掌握。新世纪的生物技术专业高职生有必要学习重组 DNA 技术的原理和方法，学会和掌握重组 DNA 技术。本书按照重组 DNA 技术的操作程序来安排实验，即从核酸的提取→目的基因的制备→体外 DNA 的重组（酶切与连接）→重组 DNA 分子引入受体细胞→转化子的筛选→重组 DNA 分子的鉴定等步骤编排成一个综合性大实验。在这个综合性实验中，每一步实验既相对独立又与下一步实验紧密相连，只有获得前一个步骤的正确实验结果才能开始下一个实验。旨在通过这些实验，向大家提供分子生物学最基本的技术训练，掌握最基本、最常用的技术，并对重组 DNA 技术有一个比较全面而系统的概念。同时穿插了分子生物学其他必备的实验技能，以便使学生掌握比较全面的分子生物学实验技能。

本书分为 6 个项目，每个项目由若干个任务组成。在内容编排上，有“必备知识”作为任务的理论补充，“项目思考”中的一些问题由学生独立思考解决，目的是培养学生的创新意识。项目一和项目二由张虎成、舒伟和许淑茹撰写；项目三由舒伟和赵文军撰写；项目四由张虎成和杨春花撰写；项目五和项目六由李建民和魏丽撰写。本书由张虎成统稿。劳文艳及舒伟在统稿过程中做了很多建设性的工作。

由于时间仓促和作者水平有限，书中疏漏之处在所难免，敬请广大读者在使用过程中批评指正。

编者
2010 年 6 月

目 录

项目一 质粒 pMD18-T-EGFP 的分离、纯化

和鉴定 1

一、项目介绍 1

二、学习目标 1

三、项目实施 1

任务一 创建和谐包容性的工作环境 1

任务二 清洗、包扎常用玻璃器皿和耗材 2

任务三 配制并灭菌各种浓度单位的溶液 4

任务四 创建遗传信息流示意图 6

任务五 碱裂解法分离提取质粒 pMD18-

T-EGFP 及浓度测定 6

任务六 琼脂糖凝胶电泳鉴定质粒 pMD18-

T-EGFP 12

任务七 细菌基因组 DNA 提取及质量

检测 15

四、项目思考 16

五、必备知识 17

(一) 基因工程的发展简史 17

(二) 基因工程实验规范 23

(三) 溶液浓度的计算与换算 24

(四) 生物学遗传信息流 25

(五) DNA 的结构 27

(六) 核酸的理化性质 32

(七) 乳糖操纵元 33

(八) 载体 (一) 39

六、拓展知识 40

(一) 基因组大小与基因数量 40

(二) 基因操作对人类生存环境的影响 44

(三) 真核生物 DNA 的提取 45

(四) 真核基因组 DNA 的制备技术 47

项目二 绿色荧光蛋白基因 (*egfp*) 转录

产物 RNA 的提取 52

一、项目介绍 52

二、学习目标 52

三、项目实施 52

任务一 总 RNA 的提取及含量测定 52

任务二 mRNA 的提取与纯化 56

任务三 RNA 琼脂糖凝胶电泳 57

任务四 Northern blot 58

四、项目思考 60

五、必备知识 60

(一) RNA 操作注意事项 60

(二) RNA 的空间结构和功能 61

(三) mRNA 的合成与加工 63

六、拓展知识 70

(一) 植物病毒的 RNA 提取 70

(二) 动植物组织 mRNA 提取 71

(三) 兔肝 RNA 的制备 71

(四) 人体细胞总 RNA 和 mRNA 的

提取 73

项目三 体外扩增目的基因——绿色荧光

蛋白基因 (*egfp*) 74

一、项目介绍 74

二、学习目标 74

三、项目实施 74

任务一 以 DNA 为模板扩增绿色荧光蛋白

基因 (*egfp*)——PCR 74

任务二 以 mRNA 为模板反转录扩增绿色

荧光蛋白基因——RT-PCR 76

任务三 实时荧光系统通过反转录定量 (RT-

qPCR) 对基因表达进行分析 79

任务四 cDNA 文库构建技术 (一)——

磁珠法提纯 mRNA 82

任务五 cDNA 文库构建技术 (二)——

cDNA 链的反转合成 84

四、项目思考 86

五、必备知识 86

(一) DNA 的生物合成 86

(二) RNA 的生物合成 90

(三) DNA 聚合酶的类别和性质 92

(四) 其他工具酶 94

(五) PCR 技术及其在基因克隆中的

应用 97

(六) PCR 产物的克隆 103

六、拓展知识 105

(一) 巢式 PCR 105

(二) cDNA 文库构建技术 106

项目四 将绿色荧光蛋白基因 (*egfp*)

克隆到载体上 111

一、项目介绍 111

二、学习目标	111	四、项目思考	158
三、项目实施	111	五、必备知识	158
任务一 利用内切酶对载体和基因 (<i>egfp</i>) 进行酶切	111	(一) 感受态细胞	158
任务二 酶切片段的脱磷技术	113	(二) 外源基因导入真核细胞的方法	159
任务三 DNA 片段的回收技术	114	(三) 目的基因的筛选策略	161
任务四 基因的重组连接技术	116	六、拓展知识	163
任务五 cDNA 文库构建技术 (三) —— cDNA 的连接、包装及转染	119	(一) 基因打靶技术	163
任务六 RACE 技术扩增构建全长 cDNA 文库	120	(二) 从基因到基因组	164
四、项目思考	124	项目六 基因 (<i>egfp</i>) 及基因产物 (EGFP) 检测	166
五、必备知识	124	一、项目介绍	166
(一) 限制性内切酶分类和催化机制	124	二、学习目标	166
(二) DNA 甲基化酶	131	三、项目实施	166
(三) DNA 连接酶	133	任务一 酶切重组载体鉴定目的基因	166
(四) 其他工具酶的催化机制	136	任务二 Southern blot	167
(五) 载体 (二)	137	任务三 分子杂交	167
六、拓展知识	143	任务四 DNA 测序鉴定目的基因一 致性	170
(一) 分子标记	143	任务五 ELISA 检测表达产物	172
(二) RFLP 技术	148	任务六 SDS-PAGE 检测蛋白表达	173
(三) RAPD 技术	148	任务七 Western 杂交	176
(四) AFLP 技术	149	任务八 等电聚焦电泳	177
(五) SSR 技术	149	任务九 蛋白产物的定量测定	179
项目五 将含有 <i>egfp</i> 基因的质粒转化 到 <i>E. coli</i> 中	151	四、项目思考	182
一、项目介绍	151	五、必备知识	182
二、学习目标	151	(一) 基因表达系统	182
三、项目实施	151	(二) Southern blot	192
任务一 准备溶液及器皿	151	(三) 分子杂交技术	192
任务二 感受态细胞的制备及热激法将质 粒转化到 <i>E. coli</i> 中	152	(四) DNA 测序	194
任务三 感受态细胞的制备及电击法将 质粒转化到 <i>E. coli</i> 中	154	(五) 报告基因的应用	195
任务四 农杆菌转化植物细胞	155	(六) 重组体的筛选与检测	197
任务五 磷酸钙转染动物细胞	157	六、拓展知识	204
		(一) 基因芯片	204
		(二) 基因治疗的基本原理和应用 前景	208
		参考文献	211

项目一

质粒 pMD18-T-EGFP 的分离、纯化和鉴定

一、项目介绍

项目相关背景	基因操作人员首要的工作是熟练地分离、提取质粒 DNA 并能够进行鉴定。这就需要基因操作人员维护一个良好的工作环境,准备各种常用的器皿和耗材,正确地计算和配制各种浓度的溶液,利用各种方法提取和分离质粒 DNA,能够测定质粒的含量和纯度并对 DNA 进行鉴定;也需要掌握一些必备的理论知识,如分子生物学中心法则、DNA 的复制机理;对一些必要的 DNA 软件也需要掌握
项目任务描述	任务一 创建和谐包容性的工作环境 任务二 清洗、包扎常用玻璃器皿、耗材 任务三 配制并灭菌各种浓度单位的溶液 任务四 创建遗传信息流示意图 任务五 碱裂解法分离提取质粒 pMD18-T-EGFP 及浓度测定 任务六 琼脂糖凝胶电泳鉴定质粒 pMD18-T-EGFP 任务七 细菌基因组 DNA 提取及质量检测

二、学习目标

1. 熟悉基因工程实验室工作环境。
2. 熟练掌握与基因操作有关的各种浓度溶液的配制。
3. 掌握中心法则及乳糖操纵子的概念。
4. 掌握碱裂解法提取质粒和 DNA 浓度的测定过程及原理。
5. 掌握琼脂糖凝胶电泳的原理及方法。
6. 掌握核酸结构和 DNA 复制机理。
7. 了解动植物细胞 DNA 抽提的主要方法。

三、项目实施

任务一 创建和谐包容性的工作环境

基因操作 (gene manipulation) 的核心部分为分子克隆 (molecular cloning)。由于政府对基因操作有一定的法律约束,大多数国家对此都有一个精确的法律定义。比如在英国将基因操作定义为将在细胞外产生的核酸(物质)分子插入到病毒、质粒或其他载体系统中,再整合到那些本来不含该类物质的宿主中,从而形成一种新的可连续繁殖的有机体。强调外源核酸分子(一般情况下都是 DNA)在不同宿主中的繁殖,打破自然界种的界限,将来自不

相关物种的基因放入一个宿主中是基因操作的重要特征。另一个特征是繁殖。这里所说的基因操作并不是一个法律概念,除了包括基因克隆外,还包括基因的表达、调控、检测和改造等与基因研究相关的内容。实验人员在从事基因操作工作时必须在一个和谐、安全和有秩序的环境中工作。

1. 分组打扫基因工程实验室。
2. 分组查找基因工程实验室的安全隐患。
3. 分组查找资料并讨论国家对基因操作和基因工程方面制定的法律。
4. 分组制定基因工程实验室规章制度。

任务二 清洗、包扎常用玻璃器皿和耗材

1. 仪器器皿的清洗

(1) 准备材料 试管、吸管、培养皿、三角烧瓶、烧杯、量筒、量杯、漏斗、乳钵、普通棉花、脱脂棉、纱布、牛皮纸、旧报纸、新洁尔灭、来苏儿、石炭酸、肥皂粉、重铬酸钾、粗硫酸、盐酸、橡胶手套、橡胶围裙等。电热恒温培养箱、电热干燥箱、高压蒸汽灭菌器、电冰箱、电动离心机、电热恒温水浴箱。

(2) 玻璃仪器的清洗

① 初用玻璃仪器的清洗。新购买的玻璃仪器表面常附着有游离的碱性物质,可先用0.5%的去污剂洗刷,再用自来水洗净,然后浸泡在1%~2%盐酸溶液中过夜(不可少于4h),再用自来水冲洗,最后用去离子水冲洗两次,在100~120℃烘箱内烘干备用。

② 使用过的玻璃仪器的清洗。先用自来水洗刷至无污物,再用合适的毛刷沾去污剂(粉)洗刷,或浸泡在0.5%的清洗剂中超声清洗(比色皿绝不可超声),然后用自来水彻底洗净去污剂,用去离子水洗两次,烘干备用(计量仪器不可烘干)。清洗后器皿内外不可挂有水珠,否则重洗,若重洗后仍挂有水珠,则需用洗液浸泡数小时后(或用去污粉擦洗),重新清洗。

③ 石英和玻璃比色皿的清洗。绝不可用强碱清洗,因为强碱会侵蚀抛光的比色皿。只能用洗液或1%~2%的去污剂浸泡,然后用自来水冲洗,这时使用一支绸布包裹的小棒或棉花球棒刷洗,效果会更好,清洗干净的比色皿也应内外壁不挂水珠。

④ 细菌培养用过的试管、平皿等,须高压蒸汽灭菌后趁热倒去内容物,立即用热肥皂水刷去污物,然后用清水冲洗,最后用蒸馏水冲洗2~3次,晾干或烘干。

对污染有病原微生物的吸管,用后投入盛有消毒液(2%~3%来苏儿或5%石炭酸)的玻璃筒内(筒底必须垫有棉花,消毒液要淹没吸管),经1~2d后取出,浸入2%肥皂粉液中1~2h(或煮沸)取出,再用一根橡皮管,使一端接于自来水龙头,另一端与吸管口相接,用自来水反复冲洗,最后用蒸馏水冲洗。

(3) 塑料器皿的清洗 聚乙烯、聚丙烯等制成的塑料器皿,在生物化学实验中已用得越来越多。第一次使用塑料器皿时,可先用8mol/L尿素(用浓盐酸调pH=1)清洗,接着依次用去离子水、1mol/L KOH和去离子水清洗,然后用3~10mol/L EDTA除去金属离子的污染,最后用去离子水彻底清洗。以后每次使用时,可只用0.5%的去污剂清洗,然后用自来水和去离子水洗净即可。

(4) 载玻片和盖玻片的清洗 用毕立即浸泡于消毒液(2%~3%来苏儿或0.1%新洁尔灭)中,经1~2d取出,用洗衣粉液煮沸5min,再用毛刷刷去油脂及污垢,然后用清水冲洗,晾干或将洗净的玻片用蒸馏水煮沸,趁热把玻片摊放在干毛巾或干纱布上,稍等片刻,

玻片即干, 保存备用或浸泡于 95% 酒精中备用。

(5) 玻璃和塑料器皿的干燥 实验中用到的玻璃和塑料器皿经常需要干燥, 通常都是用烘箱或烘干机在 110~120℃ 进行干燥, 而不要用丙酮荡洗再吹干的方法来干燥, 因为那样会有残留的有机物覆盖在器皿的内表面。硝酸纤维素的塑料离心管加热时会发生爆炸, 所以绝不能放在烘箱中干燥, 只能用冷风吹干。

2. 洗液的配制

(1) 常用洗液的配制 如遇玻璃器皿用上述方法不能洗净者, 可用下列清洗液浸泡后洗刷。因已确定铬有致癌作用, 因此配制和使用洗液时要极为小心, 常用的两种配制方法如下。

① 取 100mL 工业浓硫酸置于烧杯内, 小心加热, 然后慢慢加入 5g 重铬酸钾粉末, 边加边搅拌, 待全部溶解并缓慢冷却后, 储存在磨口玻璃塞的细口瓶内。

② 称取 5g 重铬酸钾粉末, 置于 250mL 烧杯中, 加 5mL 水使其溶解, 然后慢慢加入 100mL 浓硫酸, 溶液温度将达 80℃, 待其冷却后储存于磨口玻璃瓶内。

(2) 其他洗液

① 工业浓盐酸: 可洗去水垢或某些无机盐沉淀。

② 5% 草酸溶液: 用数滴硫酸酸化, 可洗去高锰酸钾的痕迹。

③ 5%~10% 磷酸三钠 ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 溶液: 可洗涤油污。

④ 30% 硝酸溶液: 洗涤二氧化碳测定仪及微量滴管。

⑤ 5%~10% 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-Na_2) 溶液: 加热煮沸可洗脱玻璃仪器内壁的白色沉淀物。

⑥ 尿素洗涤液: 为蛋白质的良好溶剂, 适用于洗涤盛过蛋白质制剂及血样的容器。

⑦ 有机溶剂: 如丙酮、乙醚、乙醇等可用于洗脱油脂、脂溶性染料污痕等, 二甲苯可洗脱油漆的污垢。

⑧ 氢氧化钾的乙醇溶液和含有高锰酸钾的氢氧化钠溶液: 这是两种强碱性的洗涤液, 对玻璃仪器的侵蚀性很强, 可清除容器内壁污垢, 洗涤时间不宜过长, 使用时应小心慎重。

⑨ 重铬酸钾 (工业用) 80g、粗硫酸 100mL、水 1000mL 配成的洗液: 将玻璃器皿浸泡 24h 后取出用水冲刷干净。清洁液经反复使用变黑, 重换新液。此液腐蚀性强, 用时切勿触及皮肤或衣服等, 可戴上橡胶手套和穿上橡胶围裙操作。

3. 玻璃器皿的包装

(1) 培养皿 将合适的底、盖配对, 装入金属盒内或用报纸 5~8 个一摞包成一包。

(2) 试管、三角烧瓶等 于开口处塞上大小适合的棉塞或纱布塞 (也可用各种型号的软木塞、胶塞等), 并在棉塞、瓶口之外, 包以牛皮纸, 用细绳扎紧即可。制作棉塞时, 要求棉花紧贴玻璃壁, 没有皱纹和缝隙, 松紧适宜。过紧易挤破管口和不易塞入; 过松易掉落和污染。棉塞长度不小于管口直径的 2 倍, 约 2/3 塞进管口 (见图 1-1)。

另一种比较简单的棉塞制作方法: 取一适当大小纱布, 将其中心铺于管口任其自然下垂至管外壁, 将试管上端与纱布一并握住, 用一小木棒将纱布中心向管内推进, 至该棉塞所需长度后握紧试管上端, 用木棒将适量棉花向管内填塞并压紧充实后将纱布尾部敛紧, 抽出约 1/3 长度, 散开纱布将棉塞尾部加适量棉花并压紧使之略大于试管, 再敛紧尾部纱布并用棉线扎紧, 剪去多余线头纱布, 一大一小和松紧适宜的棉塞制作完毕 (见图 1-2)。

如采用塑料试管塞, 可根据所用的试管的规格和试验要求来选取合适的塑料试管塞。若干支试管用绳扎在一起, 在棉花部分外包裹油纸或牛皮纸, 再用绳扎紧。三角瓶加棉塞后单

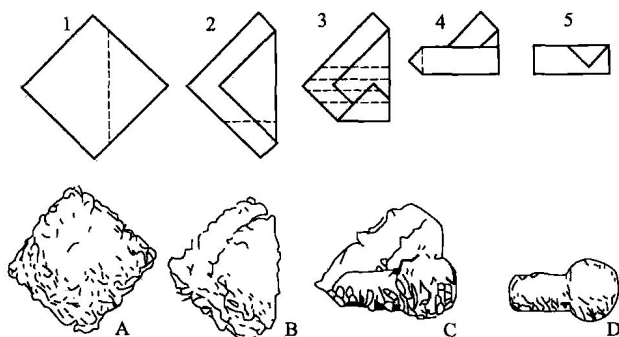


图 1-1 棉塞的制作过程
1~5, A~D—制作步骤

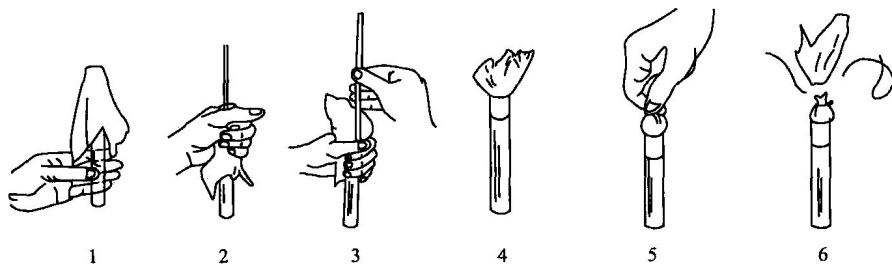


图 1-2 棉塞的简易制作
1~6—制作步骤

个用油纸包扎。

(3) 吸管 在用口吸的一端，加塞棉花少许，松紧要适宜，然后用 3~5cm 宽的长纸条(旧报纸)，由尖端缠卷包裹，直至包没吸管将纸条合拢。

(4) 乳钵、漏斗、烧杯等 可用纸张直接包扎或用厚纸包严开口处，再以牛皮纸包扎。

任务三 配制并灭菌各种浓度单位的溶液

1. 配制培养基及抗生素溶液

(1) LB 液体培养基 (Luria-Bertani) 称取蛋白胨 (Tryptone) 10g，酵母提取物 (Yeast extract) 5g，NaCl 10g，溶于 800mL 去离子水中，用 NaOH 调 pH 至 7.5，加去离子水至总体积 1L，高压下蒸汽灭菌 121℃ 20min。

(2) LB 固体培养基 液体培养基中每升加 15g 琼脂粉 (1.5%~2.0%)，高压下蒸汽灭菌 121℃ 20min。

(3) 氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp) 母液 配成 100mg/mL 水溶液，过滤除菌 (切忌勿高压灭菌)，可在 -20℃ 保存一年。使用时，氨苄青霉素终浓度为 0.1mg/mL (例如：向 100mL 培养基中加入 0.1mL 100mg/mL 的青霉素母液)。

2. 提取质粒溶液的配制

(1) 溶菌酶溶液 用 10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液配制成 10mg/mL，并分装成小份 (如 1.5mL/份) 保存于 -20℃，每一小份一经使用后便予丢弃。

(2) 3mol/L NaAc (pH 5.2) 50mL 水中溶解 40.81g NaAc · 3H₂O，用冰醋酸调 pH 至 5.2，加水定容至 100mL，分装后高压灭菌，储存于 4℃ 冰箱。

(3) 溶液 I 50mmol/L 葡萄糖, 25mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 10mmol/L EDTA (pH 8.0)。溶液 I 可成批配制, 每瓶 100mL, 高压灭菌 15min, 储存于 4℃ 冰箱。

(4) 溶液 II 0.2mol/L NaOH(临用前用 10mol/L NaOH 母液稀释), 1% SDS。

(5) 溶液 III 5mol/L KAc 60mL, 冰醋酸 11.5mL, H₂O 28.5mL, 定容至 100mL, 并高压灭菌。溶液终浓度为: K⁺ 3mol/L, Ac⁻ 5mol/L。

(6) RNA 酶 A 母液 将 100mg RNA 酶 A 溶于 10mL 缓冲液 [10mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 15mmol/L NaCl] 中, 配成 10mg/mL 的溶液, 于 100℃ 加热 15min, 使混有的 DNA 酶失活。冷却后用 1.5mL Eppendorf 管分装成小份保存于 -20℃。

(7) 饱和酚 市售酚中含有醌等氧化物, 这些产物可引起磷酸二酯键的断裂及导致 RNA 和 DNA 的交联, 应在 160℃ 用冷凝管进行重蒸。重蒸酚加入 0.1% 的 8-羟基喹啉 (作为抗氧化剂), 并用等体积的 0.5mol/L Tris-HCl(pH 8.0) 和 0.1mol/L Tris-HCl(pH 8.0) 缓冲液反复抽提使之饱和并使其 pH 值达到 7.6 以上, 因为酸性条件下 DNA 会分配于有机相。

(8) 氯仿 按氯仿: 异戊醇 = 24:1 体积比加入异戊醇。氯仿可使蛋白变性并有助于液相与有机相的分开, 异戊醇则可起消除抽提过程中出现的泡沫。按体积比 1:1 混合上述饱和酚与氯仿即得酚/氯仿 (1:1)。酚和氯仿均有很强的腐蚀性, 操作时应戴手套。

(9) TE 缓冲液 10mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 1mmol/L EDTA(pH 8.0)。高压灭菌后储存于 4℃ 冰箱中。

(10) STET 0.1mol/L NaCl, 10mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 10mmol/L EDTA(pH 8.0), 5% Triton X-100。

(11) STE 0.1mol/L NaCl, 10mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 1mmol/L EDTA(pH 8.0)。

3. 电泳溶液的配制

(1) TBE 缓冲液 (5×) 称取 Tris 54g, 硼酸 27.5g, 一并加入 0.5mol/L EDTA(pH 8.0) 20mL 中, 定容至 1000mL。

(2) 上样缓冲液 (6×) 0.25% 溴酚蓝, 40% (w/v) 蔗糖水溶液。

4. 一些试剂的生化作用原理

(1) 溶液 I ——溶菌液

① 溶菌酶。它是糖苷水解酶, 能水解菌体细胞壁的主要化学成分肽聚糖中的 1,4-糖苷键, 因而具有溶菌作用。其最适 pH 为 8.0。

② 葡萄糖。增加溶液的黏度, 维持渗透压, 防止 DNA 受机械力作用而降解。

③ EDTA。整合 Mg²⁺、Ca²⁺ 等金属离子, 抑制 DNase 对 DNA 的降解作用。另外, EDTA 的存在, 有利于溶菌酶的作用, 因为溶菌酶的反应要求有较低的离子强度的环境。

(2) 溶液 II ——NaOH-SDS 液

① NaOH。DNA 在 5<pH<9 的溶液中是稳定的。但当 pH>12 或 pH<3 时, 就会引起双链之间的氢键解离而变性。溶液 II 中的 NaOH 浓度为 200mmol/L, 加到提取液中时, 该系统的 pH 就高达 12.6, 因而促使染色体 DNA 与质粒 DNA 的变性。

② SDS。SDS 是离子型表面活性剂。它的主要功能是溶解细胞膜上的脂质和蛋白, 因而溶解膜蛋白破坏细胞膜; 解聚细胞中的核蛋白; SDS 能与蛋白质结合成为 R-O-SO₃⁻... R⁺-蛋白质复合物, 使蛋白质变性而沉淀下来。

(3) 溶液 III ——3mol/L NaAc(pH 4.8) 溶液 NaAc 的水溶液呈碱性, 为了调节 pH

至 4.8, 必须加入大量的冰醋酸, 所以该溶液实际上是 NaAc-HAc 的缓冲液。用 pH 4.8 的 NaAc 是为了把 pH 12.6 的提取液调回至 pH 中性, 使变性的质粒 DNA 能够复性, 并稳定存在。而高盐的 3mol/L NaAc 可以中和核酸上的电荷, 减少相斥力, 有利于变性的大分子染色体 DNA、RNA 互相聚合而沉淀下来, 同时钠盐与 SDS-蛋白复合物作用后, 能形成较小的钠盐形式复合物, 使沉淀更完全。

(4) 沉淀 DNA 乙醇可以任意比例和水相混溶, 乙醇与核酸不会起任何化学反应, 对 DNA 很安全, 因此是理想的 DNA 沉淀剂。DNA 溶液中 DNA 是以水合状态稳定存在的, 当加入乙醇时, 乙醇会夺去 DNA 周围的水分子, 使 DNA 失去水而易于聚合。

任务四 创建遗传信息流示意图

1. 讨论分子生物学中心法则并用图示表示。
2. 讨论复制、转录和翻译的意义和联系。
3. 讨论中心法则在生物界的意义及在基因工程实验中的指导意义。

任务五 碱裂解法分离提取质粒 pMD18-T-EGFP 及浓度测定

质粒是携带外源基因进入细菌中扩增或表达的主要载体, 它在基因操作中具有重要作用。质粒的分离与提取是最常用、最基本的实验技术。质粒的提取方法很多, 大多包括 3 个主要步骤: 细菌的培养、细菌的收集和裂解、质粒 DNA 的分离和纯化。

可以利用分光光度计在波长 260nm 测定分离的质粒 DNA 含量。纯的双链标准 DNA 溶液的浓度为 $50\mu\text{g/mL}$, 其分光光度计吸收值 A_{260} 为 1.0。而且根据在波长 260nm 处测的吸收值可以判断分离的 DNA 的纯度, 用 A_{260}/A_{280} 表示, 如果是纯的 DNA, 这个比值是 1.8。

在 pH=12.0~12.6 碱性环境中, 细菌的线性大分子量染色体 DNA 变性分开, 而共价闭环的质粒 DNA 虽然变性但仍处于拓扑缠绕状态。将 pH 调至中性并有高盐存在及低温的条件下, 大部分染色体 DNA、大分子量的 RNA 和蛋白质在去污剂 SDS 的作用下形成沉淀, 而质粒 DNA 仍然为可溶状态。通过离心, 可除去大部分细胞碎片、染色体 DNA、RNA 及蛋白质, 质粒 DNA 尚在上清中, 然后用酚、氯仿抽提进一步纯化质粒 DNA。提取质粒的溶液 I、II、III 的作用如下。

溶液 I (solution I): 悬浮细胞。该溶液中含有 50mmol/L 的葡萄糖。

溶液 II (solution II): 用量为 2 倍溶液 I 体积。该溶液含有 0.2mol/L NaOH 和 1% SDS。在这种情况下, 细胞会很快破裂, 使混浊的细胞悬液变成完全澄清的黏稠液体。此时, 由于在 pH=12.0~12.5 这样狭小的范围内, 线性染色体 DNA 发生变性, 而质粒 DNA (cccDNA) 不会变性。

溶液 III (solution III): 用量为 1.5 倍溶液 I 体积。该溶液为高浓度的醋酸钾缓冲液 (3mol/L, pH4.6)。在中和过程中, 高分子量的染色体 DNA 复性并聚积成不溶的沉淀, 同时高浓度的盐引起蛋白质与 SDS 复合物以及大分子的 RNA 形成沉淀。而质粒 DNA 是环状的, 在变性之后经过中和仍保持环状, 处于可溶解状态。经高速离心, 上清液即为质粒 DNA 粗制品。

提取质粒时应当注意以下几点。

- ① 细菌细胞的裂解是分离质粒 DNA 的关键步骤。通常可以加入溶菌酶或 SDS 促使大

肠杆菌细胞裂解。如果细菌细胞没有完全裂解,会明显降低质粒 DNA 的回收率。理想的状态是每一个细菌细胞都能够被充分破裂使质粒 DNA 顺利溢出,而并没有污染过多的染色体分子。

② 质粒提取过程中,除规定的实验条件外,应尽量保持低温,避免过酸过碱,操作过程中手法要温和,尽可能避免脱氧核糖核酸酶(DNase)对质粒 DNA 的降解和破坏。

③ 电泳时上样孔中如果有白色物质,是由于蛋白质没有去除干净。

④ 质粒共有三种构型。

共价闭合环形 DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA): 质粒的两条多核苷酸链均保持着完整的环形结构,这样的 DNA 通常呈现超螺旋的 SC 构型;

开环 DNA(open circular DNA, ocDNA): 质粒的两条多核苷酸链中一条保持着完整的环形结构,另一条链出现有一个或数个缺口,即 OC 构型;

线性分子(linear DNA, lDNA): 质粒 DNA 经过适当的核酸限制内切酶切割之后,发生双链断裂而形成线性 DNA 分子,通称 L 构型。

相同分子质量质粒的三种构型在正常情况下电泳时,迁移速率分别是:超螺旋 DNA 比线性的 DNA 迁移率大,线性 DNA 比开环 DNA 迁移率大。

(一) 准备材料和设备

实验必备的设备或溶液有:小型离心机;旋涡机;小型离心管;小型离心机转子;P1000、P200、P20 微量取样器;微量取样器 tips;固体(装 tip 头)废物缸;液体废液缸;计时表;记号笔;冰盒和碎冰;10%漂白溶液;消毒液;5mL 过夜培养的 *E. coli* 菌体;TE 缓冲液;GTE 溶液;溶液 I;溶液 II;溶液 III;RNAase (10mg/mL);紫外分光光度计;石英比色皿。

(二) 操作步骤

1. 细菌的培养和收集

将含有质粒 pMD18-T-EGFP 的 *E. coli* DH5 α 菌种接种在 LB 固体培养基(含 50 μ g/mL Amp)中,37 $^{\circ}$ C 培养 12~24h。用无菌牙签挑取单菌落接种到 5mL LB 液体培养基(含 50 μ g/mL Amp)中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养约 12h 至对数生长期。

2. 质粒 DNA 少量快速提取

质粒 DNA 少量提取法对于从大量转化子中制备少量部分纯化的质粒 DNA 十分有用。这些方法的共同特点是简便、快速,能同时处理大量试样,所得 DNA 有一定纯度,可满足限制酶切割、电泳分析的需要。

(1) 煮沸法

- ① 将 15mL 培养液倒入 Eppendorf 管中,4 $^{\circ}$ C 下 12000g 离心 30s。
- ② 弃上清,将管倒置于卫生纸上几分钟,使液体流尽。
- ③ 将菌体沉淀悬浮于 12mL STET 溶液中,涡旋混匀。
- ④ 加入 1.0mL 新配制的溶菌酶溶液(10mg/mL),涡旋振荡 3s,室温静置 5min。
- ⑤ 将 Eppendorf 管放入沸水浴中,50s 后立即取出。
- ⑥ 用微量离心机 4 $^{\circ}$ C 下 12000g 离心 10min。
- ⑦ 用无菌牙签从 Eppendorf 管中去除细菌碎片。
- ⑧ 取 20 μ L 进行电泳检查。
- ⑨ 备注
 - a. 对大肠杆菌可从固体培养基上挑取单个菌落直接进行煮沸法提取质粒 DNA。

b. 煮沸法中添加溶菌酶有一定限度, 浓度高时, 细菌裂解效果反而不好。有时不同溶菌酶也能溶菌。

c. 提取的质粒 DNA 中会含有 RNA, 但 RNA 并不干扰进一步实验, 如限制性内切酶消化、亚克隆及连接反应等。

(2) 碱裂解法

① 取 1.5mL 培养液倒入 1.5mL Eppendorf 管中, 4℃ 下 12000g 离心 30s。弃上清, 将管倒置于卫生纸上数分钟, 使液体流尽。

② 菌体沉淀重悬浮于 100 μ L 溶液 I (加入溶菌酶) 中 (需剧烈振荡), 室温下放置 5~10min。

③ 加入新配制的溶液 II 200 μ L, 盖紧管口, 快速温和颠倒 Eppendorf 管数次, 以混匀内容物 (千万不要振荡), 冰浴 5min。

④ 加入 150 μ L 预冷的溶液 III, 盖紧管口, 并倒置离心管, 温和振荡 10s, 使沉淀混匀, 冰浴中 5~10min, 4℃ 下 12000g 离心 5~10min。

⑤ 上清液移入干净 Eppendorf 管中, 加入等体积的酚/氯仿 (1:1), 振荡混匀, 4℃ 下 12000g 离心 5min。

⑥ 将水相移入干净 Eppendorf 管中, 加入 2 倍体积的无水乙醇, 振荡混匀后置于 -20℃ 冰箱中 20min, 然后 4℃ 下 12000g 离心 10min。

⑦ 弃上清, 将管口敞开倒置于卫生纸上使所有液体流出, 加入 1mL 70% 乙醇洗沉淀一次, 4℃ 下 12000g 离心 5~10min。

⑧ 吸除上清液, 将管倒置于卫生纸上使液体流尽, 真空干燥 10min 或室温干燥。

⑨ 将沉淀溶于 20 μ L TE 缓冲液 (pH 8.0, 含 20 μ g/mL RNaseA) 中, 储于 -20℃ 冰箱中。

⑩ 备注

a. 提取过程应尽量保持低温。

b. 提取质粒 DNA 过程中除去蛋白很重要, 采用酚/氯仿去除蛋白效果较单独用酚或氯仿好, 要将蛋白尽量除干净需多次抽提。

c. 沉淀 DNA 通常使用冰乙醇, 在低温条件下放置时间稍长可使 DNA 沉淀完全。沉淀 DNA 也可用异丙醇 (一般使用等体积), 且沉淀完全, 速度快, 但常把盐沉淀下来, 所以多数还是用乙醇。加入乙醇沉淀 DNA 时, 要把离心管盖上盖子倒翻摇动几次, 注意观察水相和乙醇之间没有分层现象之后, 才可以放到冰箱中去沉淀 DNA。

d. 该实验最重要的是去掉染色体 DNA, 在全部提取过程中, 只有一次机会去除染色体 DNA, 其关键步骤是加入溶液 II 和溶液 III 时, 控制变性与复性操作时机, 既要使试剂与染色体 DNA 充分作用使之变性, 又要使染色体 DNA 不断裂成小片段, 从而能与质粒 DNA 相分离。这就要求试剂与溶菌液充分摇匀, 摇动时用力要适当。一般加入溶液 I 时可用力振荡几次, 因为此时细菌还没有与溶菌酶完全作用, 染色体 DNA 尚未释放出来, 不必担心其分子断裂。加入 SDS 以后, 必须注意不能过分用力振荡, 但又必须保证溶液混合充分, 可上下颠倒 Eppendorf 管数次, 直至混匀。

e. 加入溶液 II 5min 后, 如果溶液不变黏稠, 实验不能继续做下去, 要检查所用的试剂是否正确, 数量是否符合, 待找出原因改正后才可继续进行下去, 否则, 提取到最后, 将得不到质粒 DNA 或收率极低。

(3) Wizard 少量 DNA 纯化系统 Promega 公司的 Wizard 少量 DNA 纯化系统可快速

有效地抽提质粒 DNA, 整个过程只需 15min。提取的质粒可直接用于 DNA 测序、酶切分析和体外转录等。该系统中所含试剂和柱子可以用于 50 次 1~3mL 质粒培养液的分离和纯化, 试剂包括 10mL 细胞悬浮液、10mL 细胞裂解液、10mL 中和液、50mL Wizard 少量 DNA 纯化树脂、50mL 柱洗液(使用前加 95%乙醇至 120mL)和 50 支 Wizard 微型柱。

① 1~3mL 过夜培养细胞液 4℃下 12000g 离心 1~2min。

② 去除上清液, 菌体细胞悬浮于 200 μ L 细胞悬浮液中, 充分混合, 并移入 Eppendorf 管中。

③ 加 200 μ L 细胞裂解液, 颠倒离心管数次, 直到溶液变清亮。加 200 μ L 中和液, 颠倒离心管数次。

④ 4℃下 12000g 离心 5min, 取上清液于新的 Eppendorf 管中。

⑤ 加 1mL Wizard 少量 DNA 纯化树脂, 颠倒离心管数次以充分混匀。

⑥ 取一次性注射器, 取出注塞, 并使注射筒与 Wizard 微型柱连接, 用移液枪将上述混合液加入注射筒中, 并用注塞轻推, 使混合物进入微型柱。

⑦ 将注射器与微型柱分开, 取出注塞, 再将注射筒与微型柱相连, 加入 2mL 柱洗液, 并用注塞轻推, 使柱洗液进入微型柱。

⑧ 取出微型柱置于 Eppendorf 管中, 离心 2min 以除去微型柱中的柱洗液。

⑨ 将微型柱放在一个新 Eppendorf 管中, 加 50 μ L TE(或水)于微型柱中, 静止 1min 后, 4℃下 12000g 离心 20s。丢弃微型柱, 将 Eppendorf 管中的质粒 DNA 储于 4℃或 -20℃冰箱。

⑩ 备注。树脂使用前应充分混匀, 如有结晶, 可将树脂用 25~37℃水浴处理 10min。

3. 质粒 DNA 的大量提取和纯化

在制作酶谱、测定序列、制备探针等实验中需要高纯度、高浓度的质粒 DNA, 为此需要大量提取质粒 DNA。大量提取的质粒 DNA 一般需进一步纯化, 常用柱层析法和氯化铯梯度离心法。

(1) 碱裂解法大量提取质粒

① 取培养至对数生长后期的含 pMD18-T-EGFP 质粒的细菌培养液 250mL, 4℃下 5000g 离心 15min, 弃上清, 将离心管倒置使上清液全部流尽。

② 将细菌沉淀重新悬浮于 50mL 用冰预冷的 STE 中(此步可省略)。

③ 同步骤①方法离心以收集细菌细胞。将细菌沉淀物重新悬浮于 5mL 溶液 I 中, 充分悬浮菌体细胞。

④ 加入 12mL 新配制的溶液 II, 盖紧瓶盖, 缓缓地颠倒离心管数次, 以充分混匀内容物, 冰浴 10min。

⑤ 加 9mL 用冰预冷的溶液 III, 摇动离心管数次以混匀内容物, 冰上放置 15min, 此时应形成白色絮状沉淀。

⑥ 4℃下 5000g 离心 15min。取上清液, 加入 50mL RNA 酶 A(10mg/mL), 37℃水浴 20min。

⑦ 加入等体积的饱和酚/氯仿, 振荡混匀, 4℃下 12000g 离心 10min。取上层水相, 加入等体积氯仿, 振荡混匀, 4℃下 12000g 离心 10min。

⑧ 取上层水相, 加入 1/5 体积的 4mol/L NaCl 和 10% PEG(相对分子质量 6000), 冰上放置 60min。

⑨ 4℃下 12000g 离心 15min, 沉淀用数毫升 70%冰冷乙醇洗涤, 4℃下 12000g 离心