

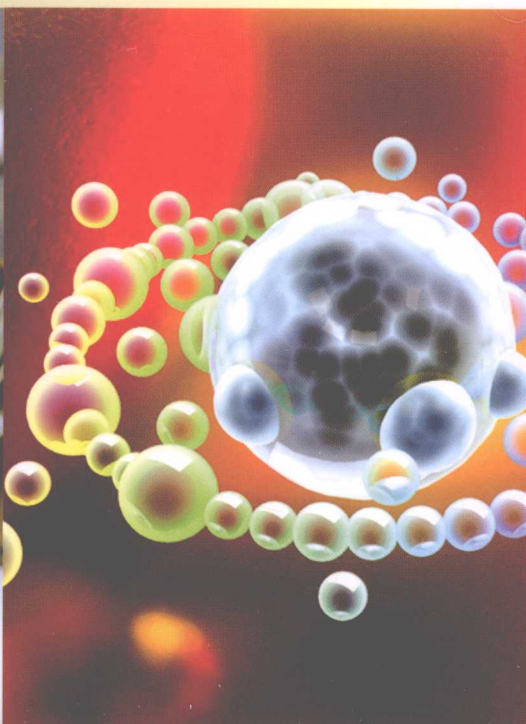
基因工程与分子生物学 实验教程

严海燕 主编



WUHAN UNIVERSITY PRESS

武汉大学出版社



基因工程与分子生物学 实验教程

主 编 严海燕
副主编 丁 益 吴元喜

参编人员 (按姓氏笔画排序)

丁 益 (南京大学)
刘新琼 (中南民族大学)
李晓华 (中南民族大学)
江雪源 (南京大学)
吴元喜 (华中科技大学)
肖 靓 (华中科技大学)
陈思礼 (中南民族大学)
陈江宁 (南京大学)
严海燕 (中南民族大学)
谢 青 (华中科技大学)
臧宇辉 (南京大学)



WUHAN UNIVERSITY PRESS

武汉大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

基因工程与分子生物学实验教程/严海燕主编. —武汉:武汉大学出版社, 2009. 8

ISBN 978-7-307-07246-6

I. 基… II. 严… III. ①基因—遗传工程—实验—高等学校—教材 ②分子生物学—实验—高等学校—教材 IV. Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 134789 号

责任编辑:黄汉平

责任校对:汪欣怡

版式设计:马 佳

出版发行:武汉大学出版社 (430072 武昌 珞珈山)

(电子邮件:cbs22@whu.edu.cn 网址:www.wdp.com.cn)

印刷:湖北恒泰印务有限公司

开本:880×1230 1/32 印张:4.625 字数:120千字 插页:1

版次:2009年8月第1版 2009年8月第1次印刷

ISBN 978-7-307-07246-6/Q·91 定价:16.00元

版权所有,不得翻印;凡购买我社的图书,如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请与当地图书销售部门联系调换。

前 言

分子生物学和基因工程实验技术的迅速发展,使生命科学在理论与应用上都取得了惊人的进展。在基因工程和分子生物学实验教学中,我们对实验材料、实验方法以及实验教学过程进行了大量的改革和研究,加强了基础技术的系统训练,从创新人才培养的角度增加了一系列综合性和设计性实验,引进一些现代的实验方法,如基因芯片技术及其应用,为学生开展创新研究提供了部分案例,在多年教学与科研的基础上,逐步形成了《基因工程与分子生物学实验教程》一书。该书由具有丰富实验教学及科研经验的人员编写,内容精练,通俗易懂,学时安排灵活,可操作性强,适合高等学校本科实验教学使用。

本书在原理部分详细叙述了相应实验技术的理论知识,使操作人员能理解操作过程,从而能灵活而准确地进行实验操作,有助于学生理解实验原理,并根据各实验室所具有的仪器设备、材料等因地制宜进行实验。

本书分三个部分,第一部分为基础实验,共十四个独立的实验技术,前十个实验在动物 DNA、植物 DNA 和质粒 DNA 提取的基础上,进行酶切,将酶切后的基因组 DNA 与从琼脂糖凝胶中纯化后的载体片段进行连接,同时 PCR 扩增目的片段,将目的片段从琼脂糖凝胶中纯化后与 T 载体进行连接。后面四个实验分别提供了从 RNA 水平和蛋白质水平检测基因表达的方法。基本包括了从基因组 DNA 和转录的 RNA 中克隆基因片段到连接转化构建再到载体的基因工

程和分子生物学最基本的实验技术。第二部分为综合实验，共七个综合实验，分别从不同的角度将不同的实验技术有机地整合，形成了具有一定生物学意义的大实验，不仅训练了学生的基础实验技术，也合理安排和节省了时间，同时提供了进行完整科学研究和应用操作的训练方法，可以根据使用者实验室的需要选择合适的研究性课题进行实验。第三部分是与基因芯片有关的两个创新性实验，不仅提供了前沿技术，还可以根据使用者实验室的需要结合科学研究进行创新性实验。

由于我们的水平有限，书中可能存在不妥之处，敬请读者批评指正。

编 者

目 录

一、基础实验部分

实验一	植物基因组 DNA 的提取和酶切	3
实验二	动物组织总 DNA 的提取	10
实验三	大肠杆菌染色体 DNA 的提取	15
实验四	质粒 DNA 的提取、琼脂糖凝胶电泳鉴定和酶切	18
实验五	从琼脂糖中回收 DNA 片段	25
实验六	目的 DNA 与载体质粒的连接	28
实验七	大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞的制备	30
实验八	重组质粒的转化和重组菌的筛选	33
实验九	多聚酶链式反应(PCR)扩增目的基因	37
实验十	Southern Blotting 鉴定目的 DNA 片段	42
实验十一	植物中 RNA 的提取	47
实验十二	反转录及反向 PCR 检测特异基因的表达	53
实验十三	植物叶片总蛋白的提取	56
实验十四	蛋白质印迹	59

二、综合实验部分

实验十五	小片段基因组文库的构建	67
实验十六	目的 DNA 片段在基因组中存在和拷贝数的分析	69

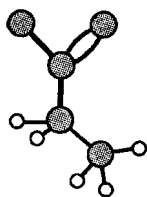
实验十七	PCR 克隆特异基因序列	71
实验十八	特异基因转录表达分析	72
实验十九	特异蛋白质表达分析	73
实验二十	GFP 和 HSF4 的融合蛋白在 HeLa 细胞中的 定位观察	75
实验二十一	利用分子生物学技术鉴定细菌	85

三、基因芯片技术

实验二十二	利用基因芯片鉴定细菌	91
实验二十三	应用基因芯片研究酵母菌热激反应基因 表达谱的变化	108

四、附 录

附录 1	琼脂糖凝胶电泳分离技术	123
附录 2	SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳	127
附录 3	抗原抗体反应	129
附录 4	纯化方法	130
附录 5	储存液的配制	132
附录 6	DNA 和 RNA 的定量检测	136
附录 7	本书中采用的英文缩写	137
附录 8	微量移液器的使用	139
附录 9	RedPrime DNA 探针标记试剂盒操作方法	142
参考文献		144



一、基础实验部分

实验一 植物基因组 DNA 的提取和酶切

一、实验目的

了解植物总 DNA 的抽提方法,掌握抽提植物总 DNA 的基本原理;学习根据不同的植物和实验要求设计和改良植物总 DNA 抽提方法,制备高质量的基因组 DNA,用作 PCR 扩增的模板,还可用于构建基因组文库以及进行 Southern 印记杂交。

二、实验原理

植物细胞外有纤维素细胞壁包围,因此常采用机械研磨的方法破碎植物的组织和细胞。由于植物细胞匀浆含有多种酶类(尤其是氧化酶类),对 DNA 的抽提产生不利的影响,在抽提缓冲液中需加入抗氧化剂或强还原剂(如巯基乙醇)以降低这些酶类的活性。在液氮中研磨,材料易于破碎,并减少研磨过程中各种酶类的作用。也可以加入提取缓冲液后在冰上研磨。

十二烷基肌酸钠(sarkosyl)、十六烷基三甲基溴化铵(hexadyltrimethyl ammonium bromide, 简称为 CTAB)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, 简称 SDS)等离子型表面活性剂,能溶解细胞膜和核膜蛋白,使核蛋白解聚,从而使 DNA 得以游离出来。再加入苯酚和氯仿等有机溶剂,能使蛋白质变性,并使抽提液分相,因核酸(DNA、RNA)水溶性很强,经离心后即可从抽提液中除去细胞碎片

和大部分蛋白质。一般 DNA 或 RNA 的提取要经过饱和酚、饱和酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)、氯仿-异戊醇三步提取,或者直接用后两步提取。酚与氯仿的水溶性不同,对蛋白质的变性作用也不同,对其他杂质的溶解性也不同。同时酚是环状结构,能够插入核酸分子之中,影响后续的酶反应,而酚与氯仿互溶,用氯仿可以清除酚的污染。所以,酚与氯仿的三步处理法可以较充分地使蛋白质变性,并使含有 DNA 的水溶液与含有膜组成、疏水性蛋白、脂溶性色素、多酚类等其他成分的有机溶剂分开。由于 DNA 在 0.3mol/L 的高盐浓度和酸性 pH 值的一定浓度的醇类溶液中溶解性降低而沉淀,上清液中加入 2.5 ~ 3 倍无水乙醇或等体积异丙醇使 DNA 沉淀。离心后弃去上清液,用 75% 乙醇洗一次,将沉淀中的离子、脂溶性物质和有机溶剂洗去,最后用无水乙醇洗,带走剩余的水分,使沉淀容易干燥。Tris-HCl 是缓冲剂,保持缓冲液中 pH 值为 8.0,碱性状态,维持 DNA 双螺旋的稳定。因此沉淀 DNA 溶于 TE 溶液中,即得植物总 DNA 溶液。

由于基因组 DNA 是长链分子,提取过程中容易被各种物理力量切断,提取过程中要采取降低切断率的措施,如用剪口的 1mL 枪头吸取,混合时不要剧烈振荡等。

用于 Southern 杂交的原始 DNA 分子应达到 100 ~ 150kb 大小。提取出来的 DNA 用酶切处理后能形成较小片段,可以连接到相同酶切处理的载体质粒上。

三、实验仪器、材料和试剂

1. 仪器:离心管(1.5mL、7mL),台式高速离心机,微量移液器,枪头(1mL、200 μ L),枪头盒,水浴锅,研钵。

2. 材料:花生或水稻叶片。

3. 试剂:2% CTAB 抽提缓冲溶液:CTAB 4g NaCl 16.364g, 1mol/L Tris-HCl 20mL (pH8.0), 0.5mol/L EDTA 8mL, 先用

70mL ddH₂O 溶解, 再定容至 200mL 灭菌, 冷却后加 β -巯基乙醇到 0.2% ~ 1% (400 μ L)。

Tris-饱和酚, 冰冷的 75% 乙醇, 冰冷的无水乙醇。

3mol/L NaAC, pH5.2。

氯仿-异戊醇(24:1): 先加 96mL 氯仿, 再加 4mL 异戊醇, 摇匀即可。

四、实验步骤

(一) DNA 提取详细步骤和说明

1. 含有 0.2% ~ 1% β -巯基乙醇的 2% CTAB 抽提缓冲液在 65℃ 水浴中预热。

2. 取少量叶片(用 7mL 离心管提取约 1g, 用 1.5mL 离心管提取约 0.25g) 置于研钵中, 加入 3mL (7mL 离心管抽提) 或 700 μ L (1.5mL 离心管抽提) 的 2% CTAB 抽提缓冲液在冰上研磨。

3. 将磨碎液倒入 7mL 或 1.5mL 的灭菌离心管中, 磨碎液的高度约占管的二分之一。

4. 将离心管置于 65℃ 的水浴槽中, 每隔 10min 轻轻摇动, 40min 后取出。

5. 冷却 2min 后, 加入等体积 Tris-饱和酚-氯仿-异戊醇(25:24:1) 至满管(平衡), 轻轻振荡约 10min, 使两者混合均匀。

6. 放入离心机中 6 000rpm 离心 15min。

7. 将上清液用剪口枪头转到新离心管中。

8. 加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1), 轻轻振荡混匀, 于 6 000rpm 的离心机中离心 5min。

9. 用剪口移液器轻轻地吸取上清液到新管中, 加 1/10 体积的 3mol/L NaAC, pH5.2, 加入等体积异丙醇, 轻轻混匀, 可见白色絮状 DNA。

10.6 000rpm 离心 10min 后,立即倒掉液体,注意勿将白色 DNA 沉淀倒出,同时勿翻转离心管,直接倒立于铺开的纸巾上,直到管内无可见液体。

11.加入 1mL 75% 乙醇轻轻转动,用手指弹管尖,使沉淀与管底的 DNA 块状物悬浮于液体中(也可直接加入 75% 乙醇后不搅动沉淀,直接离心)。

12.10 000rpm 离心 1min 后,倒掉液体,加入无水乙醇 1mL 后 10 000rpm 离心 1min。

13.离心后,倒掉液体,同时勿翻转离心管,直接倒立于铺开的纸巾上,等管内无可见液体后,直立离心管,干燥 DNA(自然风干或真空离心机干燥 10min)。

14.加入 50 μ L 0.5 $\times$ TE(含 RNase)缓冲液(如果产量高可加 100 μ L),使 DNA 溶解。

(二) DNA 提取流程图

(三) 对 DNA 的处理

①一管的 DNA 产物同时加入 *EcoR* I 和 *Hind* III 置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱约 12h,对 DNA 进行酶切,用于基因组文库构建(选择性)。②一管只加 *EcoR* I,同时使 RNA 降解,用于 Southern 杂交。③一管只含 RNA 酶,用做 PCR 模板。

以上三管置于 -20 $^{\circ}$ C 保存、备用。

说明:制备的基因组 DNA 用于下面的 3 个实验:

1. PCR 的模板(不用酶切)。
2. 基因组 DNA 文库的插入片段(*EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切)。
3. Southern 杂交的材料(*EcoR* I 酶切)。

(四) DNA 质量检测

琼脂糖凝胶电泳检测,实验原理和实验步骤见附录 1。

整个实验大约需要 4~5h。

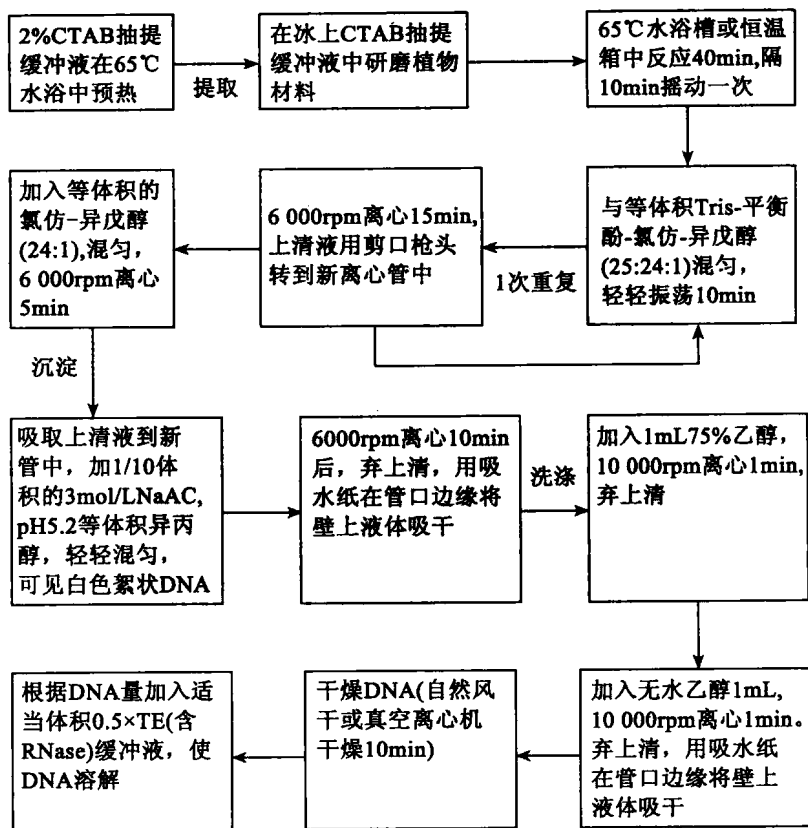


图 1-1 CTAB 法提取植物基因组 DNA 流程图

五、结果与分析

植物基因组 DNA 结果如图 1-2 所示。基因组分子量很大，能够在琼脂糖凝胶中分离的最大片段 DNA 分子量根据凝胶浓度而定（见附录 1），一般检测性的凝胶浓度在 0.7% ~ 1.2%，分子量很大

的 DNA 在胶孔中跑不下来。一般的基因组 DNA 提取操作过程都会造成大分子 DNA 链的断裂, 因此凝胶中呈现弥散状带型。双酶切以后, 由于基因组 DNA 序列的多样化, 带型也呈弥散型。只有非常小心提取的基因组 DNA 不呈弥散状, 但其大片段留在加样孔中, 除非采用 0.3% 浓度的琼脂糖凝胶在低温下分离。

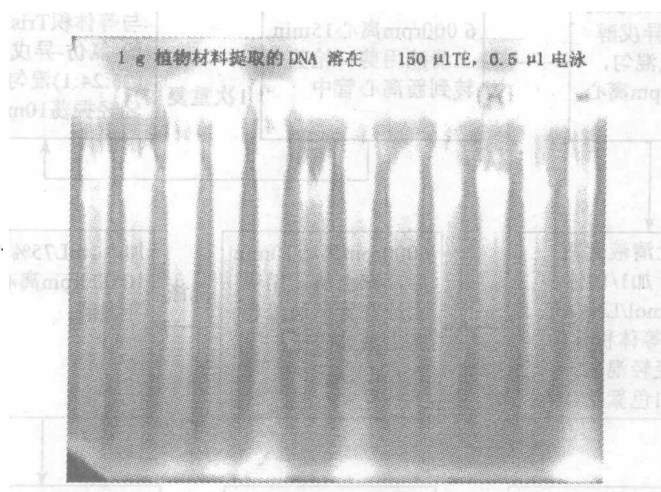


图 1-2 植物基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

六、注意事项

1. 叶片磨得越细越好, 由于植物细胞中含有大量的 DNA 酶, 因此, 除在抽提液中加入 EDTA 抑制酶的活性外, 第一步的操作应迅速, 以免组织解冻, 导致细胞裂解, 释放出 DNA 酶, 使 DNA 降解。
2. 注意移液器的使用。
3. 操作过程中应避免高速旋转和剧烈振摇造成的 DNA 线状分子的断裂。

七、思考题

1. 实验中所用到的各试剂的作用是什么？如：CTAB，氯仿，异丙醇，75% 乙醇，EDTA。
2. 提取基因组 DNA 时应注意哪些问题？

实验二 动物组织总 DNA 的提取

一、实验目的

学习动物组织总 DNA 的抽提方法，掌握抽提动物组织总 DNA 的基本原理。

二、实验原理

由于动物细胞没有纤维素外壁，细胞外被含有大量蛋白质，用蛋白酶 K 进行消化可以裂解细胞。还可采用机械破碎动物的组织和细胞。

等离子型表面活性剂十二烷基肌酸钠(sarkosyl)、十六烷基三甲基溴化铵(hexadyltrimethyl ammonium bromide, 简称为 CTAB)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, 简称 SDS)能溶解细胞膜和核膜蛋白，使核蛋白解聚，从而使 DNA 从核中和结合状态释放出来到抽提液中。苯酚和氯仿等能使蛋白质变性的有机溶剂加入后，使抽提液分相。水溶性很强的核酸(DNA、RNA)分布于水相，各种脂溶性物质和大部分蛋白质在有机相，经离心后即可从抽提液中除去细胞碎片沉淀和有机相中的各种其他成分。上清液中加入异丙醇或无水乙醇使 DNA 沉淀，沉淀 DNA 溶于双蒸水或 TE 溶液中，即得动物总 DNA 溶液。之后可加入 RNA 酶降解其中的 RNA，再用氯仿除去 RNA 酶，得到较纯的 DNA 制剂。