

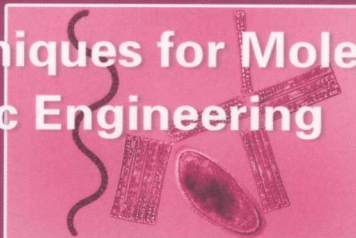


全国高等农林院校生物科学类  
专业“十二五”规划系列教材

# 分子生物学与 基因工程实验技术

杨清 余丽芸 主编

Experimental Techniques for Molecular  
Biology and Genetic Engineering



中国农业大学出版社

CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY PRESS



· 014032984

全国高等农林院校生物科学专业  
专业“十二五”规划系列教材

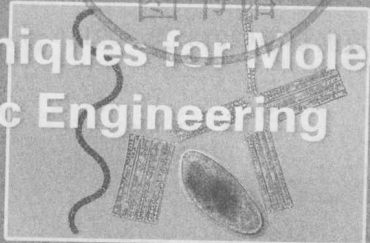
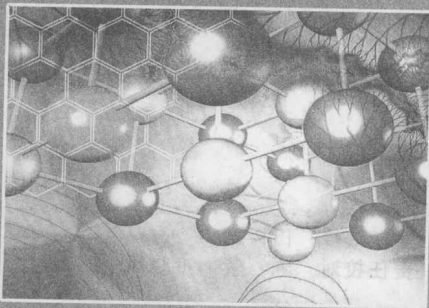
Q7-33  
46

# 分子生物学与 基因工程实验技术

杨清 余丽芸 主编



Experimental Techniques for Molecular  
Biology and Genetic Engineering



北航 C1721299

中国农业大学出版社  
CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY PRESS

Q7-33

46

10103288

类学研研五第农科农等高国中

书时版系内 二 业农

### 内 容 简 介

本书选编了 18 个实验:质粒 DNA 的提取、酶切与电泳鉴定,重组 DNA 分子的构建,大肠杆菌感受态细胞的制备与转化,植物细胞中 DNA 的提取,动物细胞中 DNA 的提取,基因的 PCR 扩增,PCR 扩增产物的纯化与回收,植物总 RNA 的提取,DNA 的分子杂交,RNA 的分子杂交,蛋白质的分子杂交,RT-PCR,基因表达的荧光定量 PCR 分析,外源基因在原核细胞中的诱导表达,外源基因在洋葱表皮细胞中的瞬时表达,利用 PCR 技术定点突变,农杆菌介导的烟草遗传转化以及转化烟草植株的 GUS 表达鉴定。前 8 个实验为基础实验,属于必做实验;后 10 个实验为选做实验,使用者根据自身情况进行安排。本书的附录部分包含分子生物学常用软件及数据库、常用数据及换算关系、常用试剂溶液及缓冲液的配制、常用培养基及抗生素的配制和生物样品的保存与实验室安全。本书可作为高等农林院校生物类专业开设分子生物学实验的教学用书,也可供有关研究人员和技术人员参考使用。

### 图书在版编目(CIP)数据

分子生物学与基因工程实验技术/杨清,余丽芸主编. —北京:中国农业大学出版社, 2014.2

ISBN 978-7-5655-0880-6

I. ①分… II. ①杨…②余… III. ①分子生物学-实验②基因工程-实验 IV. ①Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 309116 号

书 名 分子生物学与基因工程实验技术

作 者 杨 清 余丽芸 主编

策划编辑 孙 勇 潘晓丽

封面设计 郑 川

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路 2 号

电 话 发行部 010-62818525,8625

编辑部 010-62732617,2618

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

经 销 新华书店

印 刷 北京时代华都印刷有限公司

版 次 2014 年 2 月第 1 版 2014 年 2 月第 1 次印刷

规 格 787×1 092 16 开本 13.25 印张 326 千字

印 数 1~3 000

定 价 26.00 元

责任编辑 田树君

责任校对 陈 莹 王晓凤

邮政编码 100193

读者服务部 010-62732336

出版部 010-62733440

e-mail cbsszs @ cau.edu.cn

图书如有质量问题本社发行部负责调换

22381 YIN 75110 JIA 11232 CAU ANH

全国高等农林院校生物科学类专业“十二五”规划系列教材  
编审指导委员会  
(按姓氏拼音排序)

姓 名	所在院校	姓 名	所在院校
蔡庆生	南京农业大学	刘国琴	中国农业大学
蔡永萍	安徽农业大学	刘洪章	吉林农业大学
苍 晶	东北农业大学	彭立新	天津农学院
曹贵方	内蒙古农业大学	秦 利	沈阳农业大学
陈雯莉	华中农业大学	史国安	河南科技大学
董金皋	河北农业大学	宋 渊	中国农业大学
冯玉龙	沈阳农业大学	王金胜	山西农业大学
郭 蓓	北京农学院	吴建宇	河南农业大学
郭立忠	青岛农业大学	吴晓玉	江西农业大学
郭图强	塔里木大学	殷学贵	广东海洋大学
郭兴启	山东农业大学	余丽芸	黑龙江八一农垦大学
郭玉华	沈阳农业大学	张 炜	南京农业大学
李 唯	甘肃农业大学	赵 钢	仲恺农业工程学院
林家栋	中国农业大学出版社	赵国芬	内蒙古农业大学

林楚原系收赋 庄二 编审人员 主交制林交器高国全

会员委界议审编

(秋排音排入卦卦)

主 编 杨 清 余丽芸

副主编 胡汉桥 王有武 张继星 侯思宇

编 者 王有武 王桂华 王爱萍 尹淑琴 乌日娜 李 强 谷 毅

杨 清 余丽芸 陈 敏 张继星 胡汉桥 侯思宇

姜晓东 贾小云 黄 芳 谢彦杰

主 审 张 炜

俞学文 蔡天 潘立强 李大业 陈非 陈 晶 查

李大业 陈明 陈 豪 李大业 陈方 陈 斌 曹

李大业 陈林 陈 安 国 史 李大业 陈中 陈 燕 湖

李大业 陈国 陈 宋 李大业 陈非 陈 金 董

李大业 陈西 陈 金 王 李大业 陈明 陈 玉 洪

李大业 陈南 陈 雪 吴 湖学 陈京 陈 雷 博

李大业 陈西 陈 烈 吴 李大业 陈高 陈 立 群

李大业 陈本 陈 辉 李 李大业 陈里 陈 国 强

李大业 陈一 陈 斌 黑 芸 丽 余 李大业 陈志 陈 自 兴 群

李大业 陈京 陈 洪 李大业 陈明 陈 王 群

陈学群 工业 陈 群 李 李大业 陈南 陈 群 李

李大业 陈古 陈 园 强 陈 强 出 李大业 陈国 陈 家 林

## 出版说明



生物科学是近几十年来发展最为迅速的学科之一,它给人类的生产和生活带来巨大变化,尤其在农业和医学领域更是带来了革命性的变革。生物科学与各个学科之间、生物科学各个分支学科之间的广泛渗透,相互交叉,相互作用,极大地推动了生物科学技术进步。生物科学理论和方法的丰富和发展,在持续推动传统农业和医学创新的同时,其应用领域不断扩大,广泛应用的领域已包括食品、化工、环保、能源和冶金工业等各个方面。仿生学的应用还对电子技术和信息技术产生巨大影响。生物防治、生物固氮等生物技术的应用,极大地改变了农业过分依赖石化工业的局面,继而为自然生态平衡的恢复做出无可替代的贡献。以大量消耗资源为依赖的传统农业被以生物科学和技术为基础的生态农业所替代和转变。新的、大规模的近现代农业将由于生物科学的快速发展而迅速崛起。

生物科学在农业领域中越来越广泛地应用,以及不可替代作用的发挥,既促进了生物科学教育的发展,也为生物科学教育提出了新的更高的要求。农业领域高素质、应用型人才对生物科学的需求具有自身独特的使命和特征。作为培养高素质、应用型人才重要途径和方式的农业高等教育亟需探索出符合实际需求和发展的教育教学模式和内容。为此,中国农业大学生物学院和中国农业大学出版社与全国 30 余所高等农林院校合作,在充分汲取各校生物科学类专业教改实践经验和教改成果的基础上,经过进一步集成、融合、优化、提升,凝聚形成了比较符合农林院校教学实际、适应性更好、针对性更强、教学效果更佳的教学理念和教材编写思路,进而精心打造了“全国高等农林院校生物科学类专业‘十二五’规划系列教材”。系列教材覆盖了近 30 门生物科学类专业骨干课程。

本系列教材站在生物科学类专业教育教学整体目标的高度,以学科知识内容关联性为依据,审核确定教材品种和教材内容,通过相关课程教材小规模组合、专家交叉多重审定、编审指导委员会统一把关等措施,统筹解决相关教材内容衔接问题;以统一的编写指导思想因课制宜确定各门课程教材的编写体例和形式。因此,本系列教材主导思想整体归一、各种教材各具特色。

农业是生物科学最早也是应用范围最广的领域,其厚重的实践积累和丰硕成

果使得农业高等教育生物科学类专业教学独具特色和更高要求。本系列教材较好地体现了农业领域生物科学应用的重要成果和前沿研究成就,并考虑到农林院校生源特点、教学条件等,因而具有很强的适用性、针对性和前瞻性。

系列教材编审指导委员会在教材品种的确立、内容的筛选、编写指导思想以及质量把关等环节中发挥了巨大作用。其组成专家具有广泛的院校代表性、学科互补性和学术权威性,以及丰富的教学科研经验。专家们认真细致的工作为系列教材打造成为农林院校生物科学类专业精品教材奠定了扎实的基础,在此谨致深深谢意。

作为重点规划教材,为准确把握教学需求,突出特色和确保质量,教材的策划运行被赋予更为充分的时间,从选题调研、品种筛选、编写大纲的拟制与审定、组织教师编写书稿,直至第一种教材出版至少3年时间,按照拟订计划主要品种的面世需近4年。系列教材的运行经过了几个阶段。第一个阶段,对农林院校生物科学教学现状进行深入的调查研究。2010—2011年,出版社用了近1年的时间,先后多批次走访了近30所院校,与数百位生物科学教学一线的专家和教师进行座谈,深入了解我国高等农林院校生物科学教学的进展状况及存在的问题。第二个阶段,召开教学和教材建设研讨会。2011年12月份,中国农业大学生物学院和中国农业大学出版社组织召开了有30余所院校、100余位教师参加的生物教学研讨会,与会代表就农林院校生物科学类专业教学和教材建设问题进行了广泛和深入的研讨,会上还组织参观了中国农业大学生物学院教学中心、国家级生命科学实验教学示范中心以及两个国家重点实验室,给与会代表留下了深刻的印象和较大的启发。第三个阶段,教材立项编写。在广泛达成共识的基础上,有30多所高等农林院校、近500人次教师参加了系列教材的编写工作。从2013年4月起,系列教材将陆续出版,希望这套凝聚了广大教师智慧、具有较强的创新性、反映各校教改探索实践经验与成果的系列教材能够对农林院校生物科学类专业教育质量的提高发挥良好的作用。

良好的愿望和教学效果需要实践的检验和印证。我们热切地期待着您的意见反馈。

中国农业大学生物学院

中国农业大学出版社

2013年3月16日



## 前言

当今世界,生物学各学科都已进入分子水平。因此,分子生物学实验教学已经成为生物学科人才培养必不可少的内容。目前,供分子生物学实验教学的教材已经不少,但从内容的角度,每个教材都有其适用的对象。为了给农林类高等院校提供一本符合新时期要求的分子生物学实验教材,根据《国家中长期教育改革和发展规划纲要(2010—2020年)》精神,中国农业大学出版社组织编写“全国高等农林院校生物科学类专业‘十二五’规划系列教材”,《分子生物学与基因工程实验技术》属于该系列教材。

《分子生物学与基因工程实验技术》选编 18 个实验和 5 个附录,其中前 8 个实验,包括质粒 DNA 的提取、酶切与电泳鉴定,重组 DNA 分子的构建,大肠杆菌感受态细胞的制备与转化,植物细胞中 DNA 的提取,动物细胞中 DNA 的提取,基因的 PCR 扩增,PCR 扩增产物的纯化与回收和植物总 RNA 的提取,建议为必上内容,属于基础部分;后 10 个实验,包括 DNA 的分子杂交,RNA 的分子杂交,蛋白质的分子杂交,RT-PCR,基因表达的荧光定量 PCR 分析,外源基因在原核细胞中的诱导表达,外源基因在洋葱表皮细胞中的瞬时表达,利用 PCR 技术定点突变,农杆菌介导的烟草遗传转化和转化烟草植株的 GUS 表达鉴定,属于扩展性内容,各单位可根据自己的培养和教学方案进行选择教学;在附录中,选编分子生物学常用软件及数据库、常用数据及换算关系、常用试剂溶液及缓冲液的配制、常用培养基及抗生素的配制和生物样品的保存与实验室安全 5 个实用性资料,这些资料对实验的进行是非常有帮助的。

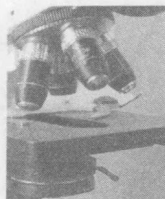
受中国农业大学出版社的委托,南京农业大学作为牵头单位负责组织编写《分子生物学与基因工程实验技术》,参加编写的单位有:黑龙江八一农垦大学、山西农业大学、广东海洋大学、内蒙古民族大学、塔里木大学、沈阳农业大学和东北农业大学。编写人员都是在教学第一线的教师,具有多年的分子生物学教学经验。在本教材的编写过程中,从实验内容的选择,到实验方法的确定,编写人员广泛研究了国内外现有同类教材,吸收新的研究成果,依据多年的教学实践经验,经过反复比较最终定案。在教材编写完成后,从内容到格式,经过仔细的审查,参加审稿的人员有:杨清、余丽芸、王有武、张继星、胡汉桥和陈敏。本教材具有以下特点:简单,实用,新颖,易学。本教材适宜用作农林院校生物类本科生和研究生分子生物学实验教材,也可作为理科院校学生分子生物学实验教材。

在本教材的编写过程中,得到了南京农业大学领导和生命科学学院领导的支持与帮助,在此,一并致以深深的谢意!

编者

2013年8月于南京



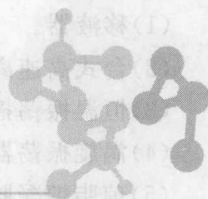


# 目 录

实验一	质粒 DNA 的提取、酶切与电泳鉴定 .....	1
实验二	重组 DNA 分子的构建 .....	6
实验三	大肠杆菌感受态细胞的制备与转化 .....	10
实验四	植物细胞中 DNA 的提取 .....	16
实验五	动物细胞中 DNA 的提取 .....	25
实验六	基因的 PCR 扩增 .....	28
实验七	PCR 扩增产物的纯化与回收 .....	32
实验八	植物总 RNA 的提取 .....	37
实验九	DNA 的分子杂交 .....	44
实验十	RNA 的分子杂交 .....	58
实验十一	蛋白质的分子杂交 .....	65
实验十二	RT-PCR .....	71
实验十三	基因表达的荧光定量 PCR 分析 .....	78
实验十四	外源基因在原核细胞中的诱导表达 .....	84
实验十五	外源基因在洋葱表皮细胞中的瞬时表达 .....	89
实验十六	利用 PCR 技术定点突变 .....	94
实验十七	农杆菌介导的烟草遗传转化 .....	101
实验十八	转化烟草植株的 GUS 表达鉴定 .....	107
参考文献	.....	111
附录 1	分子生物学常用软件及数据库介绍 .....	114
附录 2	分子生物学实验中的常用数据及换算关系 .....	159
附录 3	常用试剂溶液及缓冲液的配制 .....	161
附录 4	常用培养基及抗生素的配制 .....	186
附录 5	生物样品的保存与实验室安全 .....	197

【实验名称】

实验(一)



## 实验一

# 质粒DNA的提取、酶切与电泳鉴定

### 【概述】

质粒是存在于细菌染色体外的一个或多个能独立复制并稳定遗传的小型环状双链 DNA 分子。由于质粒分子小,便于分离和提取,可以携带目的基因进入细菌、动物细胞或植物体内进行扩增与表达,基因克隆实验中常将经改造后的质粒作为运送基因的载体。目前从细菌中提取质粒 DNA 多采用碱裂解法,该法操作简便。

碱裂解法的原理: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 达到 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 的大部分氢键也断裂,但超螺旋共价闭合环状的两条互补链不会完全分离。当以 pH 4.8 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。

这种方法既可用于从小量培养物或同时从许多细胞克隆中进行质粒 DNA 抽提,也可用来进行质粒 DNA 的大量提取。该方法对于目前使用的所有大肠杆菌菌株都卓有成效,并可与随后的纯化步骤(聚乙二醇沉淀或氯化铯—溴化乙锭梯度平衡离心等)一并联合使用。

酶切鉴定的原理:用两种能将外源 DNA 片段从重组质粒上切割下来的限制性核酸内切酶酶解质粒 DNA,凝胶电泳后重组质粒分子较单一载体质粒多出一条泳带,据此将重组子和非重组子分离开。

电泳检测的原理:利用荧光染料溴化乙锭(EB)进行染色,EB 具有扁平结构,可嵌入核酸双链的配对碱基之间,在紫外线激发下,发出橘红色荧光。EB-DNA 复合物中的 EB 发出的荧光,比游离的凝胶中的 EB 发出的荧光强度大 10 倍,因此无需洗净背景即可清楚观察核酸带型。在凝胶电泳中,加入溴化乙锭对核酸分子进行染色以后,将电泳标本放置在紫外光下观察,可通过同已知分子质量和含量的标准 DNA 片段之间的比较,测定出共迁移的 DNA 片段的分子质量和含量。在紫外光下至少可以检出 1~10 ng 的 DNA 条带。

### 【实验安排】

时间	内容
第 1 天下午 或者晚上	培养重组菌(从琼脂平板上挑取一个单菌落,接种到含有适当抗生素的液体培养基中,待生长到对数晚期即可,这个过程一般需要过夜培养)
第 2 天上午	细菌的收获和裂解,质粒 DNA 的纯化
第 2 天下午	内切酶酶切此质粒 DNA
第 2 天晚上	电泳鉴定



## 【仪器、材料与试剂】

### (一) 仪器

- (1) 移液器。
- (2) 台式高速离心机。
- (3) 恒温振荡摇床。
- (4) 涡旋振荡器。
- (5) 琼脂糖凝胶电泳装置。
- (6) 恒温水浴锅。
- (7) 凝胶成像系统。
- (8) 灭菌锅。
- (9) 电子天平。
- (10) 微波炉。

### (二) 药品、材料

- (1) 三羟甲基氨基甲烷·盐酸(Tris · HCl)。
- (2) 乙二胺四乙酸(EDTA)。
- (3) 氢氧化钠(NaOH)。
- (4) 乙酸钠(NaAc)。
- (5) 十二烷基硫酸钠(SDS)。
- (6) *Bam* H I 内切酶。
- (7) *Hind* III 内切酶。
- (8) *Sal* I 内切酶。
- (9) 胰蛋白酶。
- (10) 酵母粉。
- (11) 氨苄青霉素。
- (12) 琼脂糖。
- (13) 标准分子质量(Marker)。
- (14) 溴化乙锭(EB)。
- (15) 无水乙醇。
- (16) 滤纸若干。
- (17) 吸头: 1 mL、200  $\mu$ L、10  $\mu$ L。
- (18) 质粒载体(自构)。
- (19) 塑料离心管: 0.5 mL、1.5 mL、2 mL。

### (三) 试剂

#### 1. 溶液 I

50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L Tris · Cl (pH 8.0), 10 mmol/L EDTA (pH 为 8.0)。

溶液 I 可成批配制, 每瓶 100 mL, 高压灭菌 15 min, 储存于 4℃ 冰箱。

#### 2. 溶液 II

10 mol/L NaOH 4 mL, 20% SDS 10 mL, 加双蒸水至 100 mL(现用现配制)。

### 3. 溶液Ⅲ

无水 NaAc 49.2 g, 先加 140 mL 超纯水(ddH<sub>2</sub>O), 加热溶解, 再加冰醋酸约 40 mL, 调 pH 至 4.8, 加 ddH<sub>2</sub>O 定容至 200 mL。

### 4. RNase

10 mg/mL, TE 配制, 100℃ 煮沸 10 min, -20℃ 保存。

### 5. TE 缓冲液

10 mmol/L Tris · Cl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)。高压灭菌后储存于 4℃ 冰箱中保存备用。

### 6. 电泳所用试剂

5×TAE 缓冲液, 10×上样缓冲液 (loading buffer)。

### 7. LB 液体培养基

10 g 胰蛋白胨 + 5 g 酵母粉 + 5 g NaCl, 加双蒸水定容至 1 000 mL, 用 NaOH 调 pH 至 7.0, 121℃ 高压湿热灭菌 20 min。

### 8. LB 固体培养基

10 g 胰蛋白胨 + 5 g 酵母粉 + 5 g NaCl + 15 g Agar, 加 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 000 mL, 用 NaOH 调 pH 至 7.0, 121℃ 高压湿热灭菌 20 min。

## 【操作步骤】

### (一) 质粒 DNA 提取

#### 1. 细菌的培养和收集

将实验中得到的含有目的片段对应的单菌落, 放入 40 mL LB 液体培养基中, 先在液体中加入 0.1% (体积分数) 的氨苄青霉素 (100 mg/mL), 37℃ 过夜摇菌培养, 用于质粒提取。

#### 2. 质粒 DNA 少量快速提取

(1) 取 1.5 mL 培养液置于 1.5 mL 离心管中, 4℃ 下 12 000g 离心 30 s。

(2) 弃上清液, 将管倒置于卫生纸上数分钟, 使液体流尽。

(3) 菌体沉淀重悬浮于 100 μL 溶液 I 中 (需剧烈振荡), 室温下放置 5~10 min。

(4) 加入 200 μL 新配制的溶液 II, 盖紧管口, 快速温和颠倒离心管数次, 以混匀内容物 (千万不要振荡), 冰浴 5 min (溶液呈现清亮状态)。

(5) 加入 150 μL 预冷的溶液 III, 盖紧管口, 并倒置离心管, 温和振荡 10 s, 使沉淀混匀, 冰浴中 5~10 min, 4℃ 下 12 000g 离心 5~10 min (溶液出现沉淀)。

(6) 将水相移入干净离心管中, 加入 2 倍体积的无水乙醇, 振荡混匀后, 室温放置 2 min, 4℃ 下 12 000g 离心 5 min。

(7) 弃上清液, 将管口敞开倒置于卫生纸上, 使所有液体流出, 加入 1 mL 70% 乙醇洗沉淀一次, 4℃ 下 12 000g 离心 5 min。

(8) 弃上清液, 将管倒置于卫生纸上使液体流尽, 室温干燥。

(9) 将沉淀溶于 20 μL TE 缓冲液 (含 RNase 20 μg/mL), 37℃ 水浴 30 min, 以降解 RNA 分子, 储存于 -20℃ 冰箱中备用。

### (二) 质粒 DNA 酶切

(1) 根据载体图谱, 选择合适的内切酶, 保证目的片段中无这种酶的酶切位点。也可以根

据实验初期的克隆策略,选择目的片段两端的内切酶进行酶切。

(2)组成如下酶切反应体系:

<i>Bam</i> H I	1 $\mu$ L
<i>Hind</i> III (或者 <i>Sal</i> I)	1 $\mu$ L
10 $\times$ K buffer	2 $\mu$ L
质粒 DNA	5 $\mu$ L

加 ddH<sub>2</sub>O 至 10  $\mu$ L

(3)37 $^{\circ}$ C 反应 3 h。

(4)琼脂糖凝胶电泳检测。

### (三)琼脂糖凝胶电泳检测

(1)制备琼脂糖凝胶:称取 1 g 琼脂糖,溶解在 100 mL 电泳缓冲液中,置微波炉中至琼脂糖熔化均匀。

(2)灌胶:在凝胶溶液中加入 3  $\mu$ L EB,摇匀。插好点样梳子,轻轻倒入电泳槽载胶板中,除掉气泡。

(3)待凝胶冷却凝固后,轻轻取出点样梳。

(4)点样:将酶切产物 10  $\mu$ L+3  $\mu$ L 10 $\times$  loading buffer,混匀、点样,同时一孔点 5  $\mu$ L 标准分子质量 Marker,记录点样次序。

(5)在电泳槽中加入电泳缓冲液,将点好样的载胶板轻轻放在电泳槽内。

(6)电泳:接上电极线,点样侧接电泳仪负极,另一侧接电泳仪正极,50 V 电泳 45~60 min。

(7)将电泳槽载胶板拿到暗室,在紫外灯下直接观察结果,或者凝胶电泳成像仪照相保存。

### 【实验结果】

质粒样品及酶切产物经琼脂糖凝胶电泳,结果如图 1-1 和图 1-2 所示。

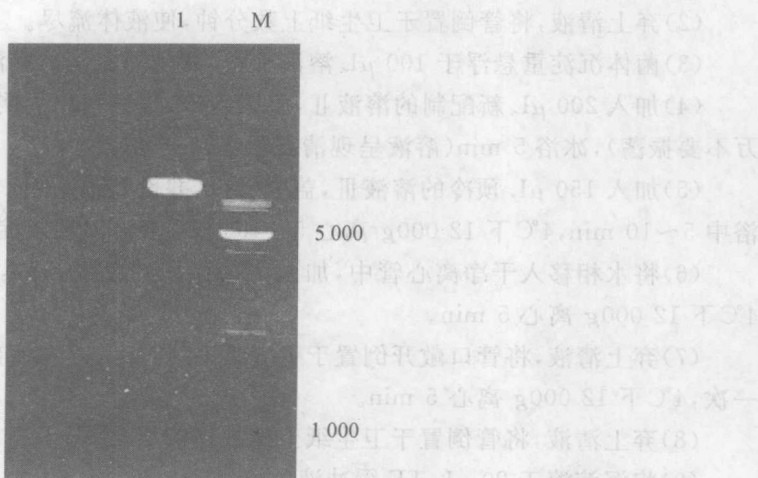


图 1-1 质粒琼脂糖凝胶电泳

M:DL 10 000 DNA;1:空载质粒(载体片段 12 361 bp)

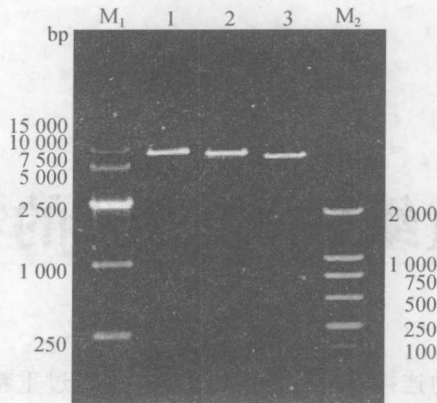


图 1-2 质粒酶切图谱

M<sub>1</sub>: DL 15 000 DNA Marker; M<sub>2</sub>: DL 2 000 DNA Marker;

- 1: 重组质粒 4 *Bam* H I/*Sal* I 双酶切产物(载体片段 7 171 bp; 目的基因 498 bp);
- 2: 重组质粒 4 *Sal* I/*Hind* III 双酶切产物(载体载体片段 6 844 bp; 目的基因 825 bp);
- 3: 重组质粒 4 *Bam* H I/*Hind* III 双酶切产物(载体片段 6 346 bp; 目的基因 1 323 bp)

### 【问题与讨论】

(1) 在电泳检测时,有时会发现没有任何条带出现,可能是在操作过程中,加溶液 II 之后溶液未见清亮状态;或者加溶液 III 之后溶液未出现沉淀;此时实验不需要继续下去,否则在电泳检测时,可能会没有任何结果。

(2) 在电泳检测时,重组质粒会出现两条带(一条长片段是载体带,另一条短些的是目的条带),非重组质粒可能是一条载体带,也可能是一条载体带加一条短的非目的条带,由于片段长度不同,可根据电泳过程中迁移速率不同而区别重组质粒与非重组质粒。

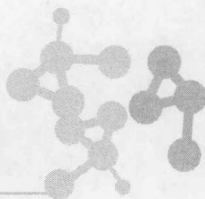
(3) 电泳检测时发现双酶切的结果只有一条片段长度长于载体片段,可能是内切酶失活而导致重组质粒未被切开。

(4) 如果是双酶切,重组质粒泳道应该出现两条电泳带,非重组质粒泳道可能出现一条带、两条带或者三条带。

(王桂华 编写)

## 实验二

# 重组DNA分子的构建



### 【概述】

外源 DNA 与载体分子的连接过程称为 DNA 重组, 经过重新组合获得的 DNA 叫作重组体或重组子。DNA 重组技术是在 DNA 连接酶和限制性内切酶被发现以后, 于 1972—1973 年由 H. Boyer, P. Berg 等发明的, 通过该技术他们获得第一个重组 DNA 分子。

DNA 重组是在有  $Mg^{2+}$ 、ATP 存在的连接缓冲系统中, DNA 连接酶的作用下, 将分别酶切过的载体分子与外源 DNA 分子进行连接。

DNA 重组中载体分子是具有特殊结构的 DNA 分子, 应具备下列基本特性: ①具有能够在特定宿主细胞中独立自我复制的复制起始点, 该起始点保证外源基因随着载体的复制得到繁殖; ②具有易于检测的遗传标记(如抗药性基因、酶基因、营养缺陷型及形成噬菌斑的能力等), 用以区分阳性与阴性重组分子; ③具有多个限制性内切酶的单一切点, 即多克隆位点, 这些位点最好位于检测表型的遗传标记基因之内, 这样当外源基因插入载体时将导致其表型改变从而便于筛选重组分子; ④载体分子不宜过大, 以便于 DNA 体外操作。

DNA 连接酶是 DNA 重组中的关键酶。20 世纪 60 年代后期, 从大肠杆菌和用  $T_4$  噬菌体感染的大肠杆菌中发现两种连接酶:  $T_4$  噬菌体 DNA 连接酶和大肠杆菌 DNA 连接酶。两种 DNA 连接酶都有将两个带有相同黏性末端的 DNA 分子连在一起的功能, 而且  $T_4$  噬菌体 DNA 连接酶还有一种大肠杆菌连接酶没有的特性, 即能使两个平末端的双链 DNA 分子连接起来。但这种连接的效率比黏性末端的连接效率低, 一般可通过提高  $T_4$  噬菌体 DNA 连接酶浓度或增加 DNA 浓度来提高平末端的连接效率。 $T_4$  噬菌体 DNA 连接酶催化 DNA 连接反应方法分为 3 步: 首先,  $T_4$  DNA 连接酶与辅助因子 ATP 形成酶-AMP 复合物; 然后, 酶-AMP 复合物再结合到具有 5' 磷酸基和 3' 羟基切口的 DNA 上, 使 DNA 腺苷化; 最后产生一个新的磷酸二酯键, 把切口封起来。我们选用的是 Fermentas 的连接酶, 短时间内即可达到很好的连接效果。所用的内切酶也是 Fermentas 的 Fastdigest 系列的, 酶切时间短, 酶切效果好。

DNA 重组的方法主要有黏端连接法和平端连接法, 按照连接分子末端的异同, 黏端连接法又可进一步分为两端相同和两端不同的连接方法。由这三种连接方法得到的重组 DNA 分子具有不同的特点: 平末端连接法的连接产物, 非重组体克隆的背景可能很高, 质粒和外源 DNA 结合处的限制性酶切位点消失, 重组质粒会带有外源 DNA 的串联拷贝; 两端不同黏性末端连接法的产物, 质粒和外源 DNA 结合处的限制性酶切位点常可保留, 非重组体克隆的背景低, 外源 DNA 只以一个方向插入载体; 两端相同黏性末端连接法的产物, 质粒和外源 DNA 结合处的限制性酶切位点常可保留, 外源 DNA 会以两个方向插入载体中, 重组质粒会带有外源 DNA 的串联拷贝。



影响 DNA 重组效率的因素:①连接缓冲液:大体上缓冲液含有以下组分:20~100 mmol/L 的 Tris-HCl,较多用 50 mmol/L, pH 的范围在 7.4~7.8,较多用 7.8,目的是提供合适酸碱度的连接体系;10 mmol/L 的  $MgCl_2$ ,作用是激活酶反应;1~20 mmol/L 的 DTT,较多用 10 mmol/L,作用是维持还原性环境,稳定酶活性,25~50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 BSA,作用是增加蛋白质的浓度,防止因蛋白浓度过稀而造成酶的失活。②pH:一般将缓冲液的 pH 调节到 7.4~7.8,较多用 7.8。③ATP 浓度:ATP 是酶反应所需要的,连接缓冲液中 ATP 的浓度在 0.5~4 mmol/L,较多用 1 mmol/L。研究发现,ATP 的最适浓度为 0.5~1 mmol/L,过浓会抑制反应。④连接温度与时间:因为黏性末端的 DNA 双链间有氢键的作用,所以温度过高会使氢键不稳定,但连接酶的最适温度又恰为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。因此,人们找到了一个折中温度,即 12~16 $^{\circ}\text{C}$ ,连接 12~16 h(过夜),这样既可最大限度地发挥连接酶的活性,又兼顾到短暂配对结构的稳定。⑤酶浓度:用量一般为 0.1~2 U,平端连接酶用量要高一些。⑥插入片段和载体之间的摩尔比经验值,一般为 3:10,即插入片段要多于载体数,这样有利于提高重组率。

DNA 重组技术已被广泛地应用于不同研究领域,比如基因克隆、DNA 文库构建、分子标记、基因遗传转化等。

## 【实验安排】

由于本实验只进行重组操作,连接产物的检测将在下一次实验中完成,本实验能在半天内完成。

## 【仪器、材料与试剂】

### (一)仪器

- (1)超净工作台。
- (2)恒温培养振荡器。
- (3)低温冷冻离心机。
- (4)恒温水浴锅。
- (5)琼脂糖凝胶电泳装置。
- (6)紫外分光光度仪。
- (7)移液器。
- (8)灭菌锅。
- (9)电子天平。
- (10)凝胶成像系统。

### (二)药品、材料

- (1)外源片段: $\lambda$ DNA。
- (2)质粒:pUC19。
- (3) $EcoR$  I 酶。
- (4)10 $\times$  $EcoR$  I 酶 buffer。
- (5) $T_4$  DNA 连接酶。
- (6) $T_4$  DNA 连接酶 buffer。





(7)吸头:1 mL、200  $\mu$ L、10  $\mu$ L。

(8)塑料离心管:0.5 mL、1.5 mL、2 mL。

### 【试剂】

(1)3 mol/L KAc(pH 5.2)(灭菌)。

(2)70%乙醇:700 mL 无水乙醇和 300 mL ddH<sub>2</sub>O 配制。

### 【操作步骤】

#### 【(一)酶切处理】

(1)在灭菌的 0.5 mL 离心管中,加入 1  $\mu$ g pUC19 质粒, 2  $\mu$ L 酶切缓冲液, 1  $\mu$ L *Eco*R I 酶,加无菌双蒸水补充至总体积为 20  $\mu$ L,离心混匀,37 $^{\circ}$ C 反应 30 min。

(2)在另一灭菌的 0.5 mL 离心管中加入 1.5  $\mu$ g  $\lambda$ DNA,加入 1  $\mu$ L 酶切反应液,1  $\mu$ L 的 *Eco*R I 酶,加 ddH<sub>2</sub>O 补充到 10  $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C 下反应 30 min。

#### 【(二)酶切检测】

(1)反应完毕后各取 2  $\mu$ L 酶解液做电泳分析。

(2)分别将余下的酶解液加入 1/10 体积的 3 mol/L KAc (pH 5.2)溶液,再加 2 倍体积的无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C 沉淀 DNA 1 h。

(3)4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,加 70%乙醇洗涤沉淀再离心,去上清液,真空干燥后。

(4)加 5  $\mu$ L TE,溶解酶切产物。

#### 【(三)连接反应】

将酶切后的 2 个 DNA 片段混合于一管中,加 1  $\mu$ L T<sub>4</sub> DNA 连接酶缓冲液,1  $\mu$ L T<sub>4</sub> DNA 连接酶,22 $^{\circ}$ C 下保温 1 h。将连接产物置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

### 【实验结果】

本实验获得的连接产物可能包含真重组子和由质粒自身环化形成的假重组子,重组子的鉴定将在下一次实验中进行。

### 【问题与讨论】

影响 DNA 重组成败的因素很多,其中载体分子的自身环化是实验中值得重视的问题。为了提高连接效率,必须阻止在限制酶切割后线性载体分子的自身环化作用。具体可采用以下方法:

(1)用碱性磷酸酶处理限制酶酶解产生的线性载体分子。碱性磷酸酶可除去线性载体 DNA 分子的 5'-磷酸,而留下 3'-羟基基团。经过碱性磷酸酶处理的线性载体分子,除非插入外源 DNA 片段,否则就不能重新环化为有功能的载体分子。

(2)采用同聚物加尾连接技术,可自动防止线性载体 DNA 分子的自身环化作用,这是因为切割后形成的线性 DNA 分子的两个 3'-OH 末端,此时都已被加上具有同样碱基结构的同聚物尾巴。

(3)应用柯斯质粒,也可防止质粒 DNA 分子发生自身环化作用。需要指出的是,在连接反应中,正确配加载体 DNA 与外源 DNA 间的比例,是高效获得重组体的一个重要因素。在应用  $\lambda$  噬菌体或柯斯质粒作载体时,如果配置高比值的载体 DNA/外源 DNA 的连接反应体