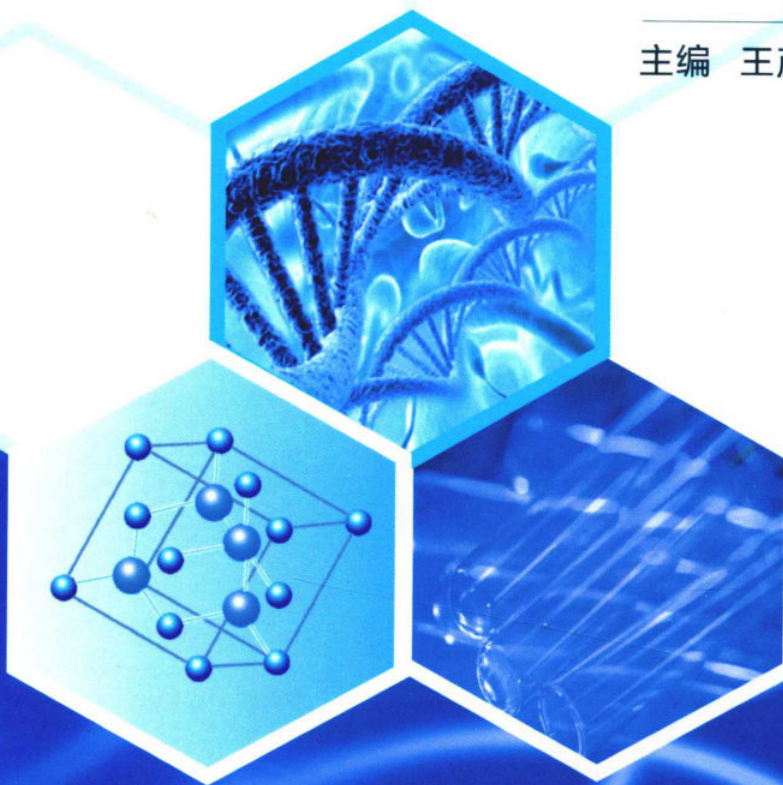


现代分子生物学 实验指导

主编 王彦芹 罗晓霞 张 锐

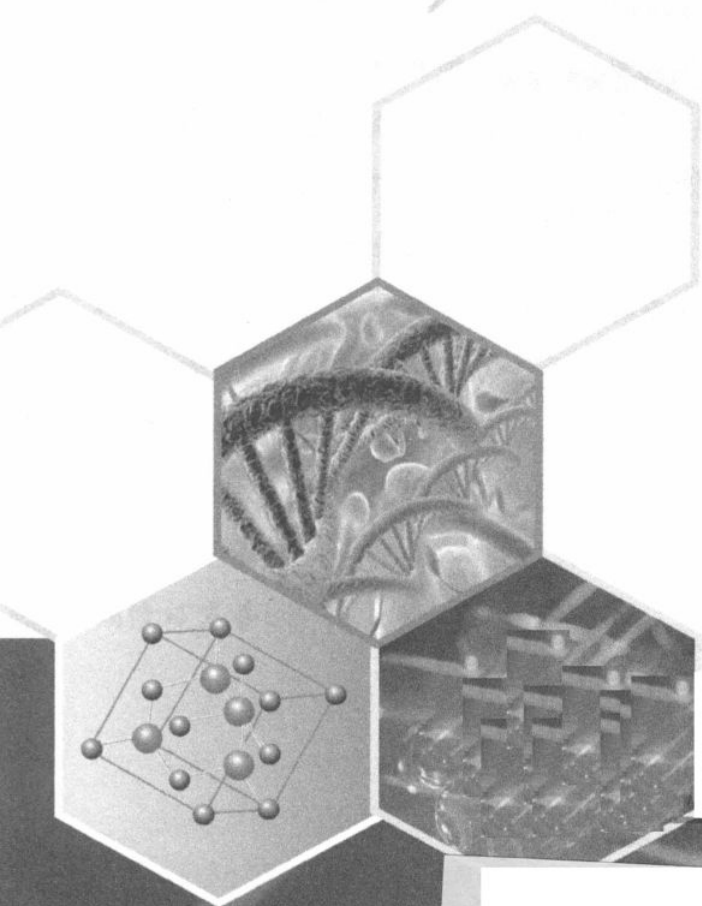


西安交通大学出版社
XI'AN JIAOTONG UNIVERSITY PRESS

现代分子生物学

实验指导

主 编 王彦芹 塔里木大学
罗晓霞 塔里木大学
张 锐 塔里木大学
副主编 应 璐 塔里木大学
邓 芳 塔里木大学
巩慧玲 兰州理工大学



西安交通大学出版社
XI'AN JIAOTONG UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

现代分子生物学实验指导/王彦芹,罗晓霞,张锐主编. —西安:西安交通大学出版社,2016.6

ISBN 978-7-5605-8738-7

I. ①现… II. ①王… ②罗… ③张… III. ①分子生物学-实验
IV. ①Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 157279 号

书 名 现代分子生物学实验指导
主 编 王彦芹 罗晓霞 张 锐
责任编辑 王 坤 杜玄静

出版发行 西安交通大学出版社
(西安市兴庆南路 10 号 邮政编码 710049)

网 址 <http://www.xjupress.com>
电 话 (029)82668357 82667874(发行中心)
(029)82668315(总编办)

传 真 (029)82668280
印 刷 虎彩印艺股份有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16 印张 11.25 字数 270 千字
版次印次 2017 年 3 月第 1 版 2017 年 3 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 978-7-5605-8738-7
定 价 35.00 元

读者购书、书店添货、如发现印装质量问题,请与本社发行中心联系、调换。

订购热线:(029)82665248 (029)82665249

投稿热线:(029)82668803 (029)82668804

读者信箱:med_xjup@163.com

版权所有 侵权必究

前言

FOREWORD

本书由长期从事分子生物学教学和科研工作的一线人员编写。编者在大量分析国内外研究方向及研究热点的基础上,整理了在长期教学与科研实践中的资料,设置了思路清晰、实用易懂、层次分明的实验内容。

本书具有三个显著特征:一是模块化。主要体现在实验内容包括基础实验、综合实验和拓展实验,这种架构既适合于本科生的实验指导,也适合于研究生和初学者的科研指导。二是具有地域特色。本书中所展现的实验方法不仅包括了模式物种的操作方法,还列举了基因组和复杂物种(如嗜盐真菌、荒漠植物、棉花等物种)核酸的分离、分子杂交等技术。三是紧跟学科发展。随着测序技术的广泛应用,生命科学已经进入后基因组时代。组学研究是基因功能及结构研究的基础和出发点,已经被广泛应用于生物学、医学、农学等许多领域。因此,本书也列举了原核生物基因组学、真核生物转录组、表达谱、蛋白质组学测序后的数据分析思路及方法,为科研人员学习和应用这些新技术提供指导和参考。

由于编者水平有限,希望广大读者在使用过程中提出宝贵意见,以便后期修订完善。

编 者

2016年1月

目 录

CONTENTS

第一部分 基础实验

实验一	DNA 的 PCR 扩增	(2)
实验二	PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳及 DNA 片段的回收	(9)
实验三	DNA 重组	(15)
实验四	大肠杆菌感受态细胞的制备及转化	(20)
实验五	质粒 DNA 的提取	(26)
实验六	质粒 DNA 的限制性核酸内切酶酶切鉴定	(31)

第二部分 综合实验

实验七	原核表达载体的构建及原核表达蛋白的 SDS-PAGE 分析 ...	(36)
实验八	植物基因转化	(43)
实验九	真核生物总 DNA 的提取	(48)
实验十	转基因植株的 Southern 杂交检测	(54)
实验十一	真核生物总 RNA 的提取及反转录	(60)
实验十二	转基因植株的 Northern blotting 检测	(66)

第三部分 拓展实验

实验十三	微生物基因组 DNA 提取	(70)
实验十四	微生物基因组文库的构建	(74)
实验十五	利用基因突变在微生物中验证基因功能	(81)
实验十六	微生物多样性分析	(85)
实验十七	真核生物 cDNA 文库的构建	(92)
实验十八	生物多样性的分子标记法分析	(96)

实验十九 蛋白质的双向电泳..... (108)

实验二十 酵母双杂交技术..... (119)

实验二十一 利用 CRISPR/Cas9 系统进行基因编辑 (124)

实验二十二 原核生物基因组测序及拼接..... (129)

实验二十三 基于高通量测序的组学数据分析..... (135)

实验二十四 蛋白质谱数据分析..... (144)

附 录

附录 1 常用缓冲液的配制 (155)

附录 2 常用抗生素的浓度及其配制 (160)

附录 3 常用培养基的配制 (161)

附录 4 简并密码子表 (165)

附录 5 蛋白质分子中的 20 种编码氨基酸 (166)

附录 6 分子生物学实验室操作规范 (167)

附录 7 分子生物学实验注意事项 (170)

第一部分 基础实验



实验一 DNA 的 PCR 扩增



【概述】

聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术是美国科学家 K. B. Mullis 于 1983 年发明的一种在体外快速扩增特定基因或 DNA 片段的方法。其特异性由两个人工合成的引物序列所决定。引物就是与待扩增 DNA 片段两侧互补的寡核苷酸片段。

PCR 扩增的原理:双链 DNA 分子在临近沸点的温度下加热时会解链成两条单链 DNA 分子(变性),两条引物分别与两条 DNA 的两侧序列特异复性,在适宜的条件下, DNA 聚合酶以单链 DNA 为模板,利用反应混合物中的 4 种脱氧核苷三磷酸(dNTP),在引物的引导下按 5'→3'方向复制互补 DNA 链(即引物的延伸)。这种热变性→复性→延伸的过程就是一个 PCR 循环(图 1-1)。

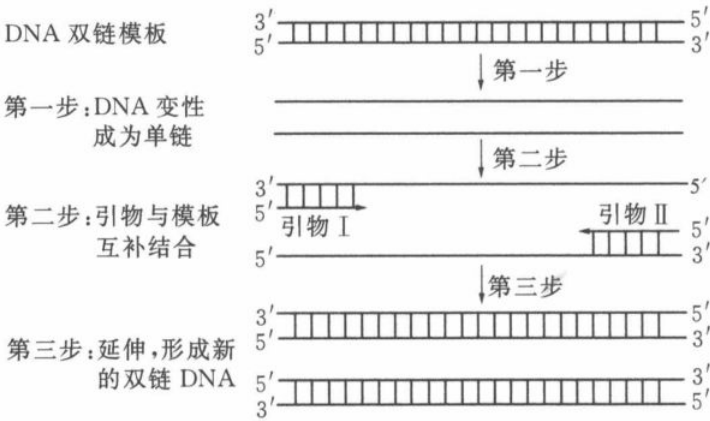


图 1-1 聚合酶链反应

在合适的条件下,这种循环不断地重复,前一个循环的产物可以作为后一个循环的模板参与 DNA 的合成,使产物 DNA 的量以 2^n 的方式扩增。从理论上讲,经过 30 次循环, DNA 的扩增倍数为 $10^6 \sim 10^9$,因此 PCR 技术可使用微量的样品获取足量的目的基因。PCR 技术除了用于克隆基因外,还可以用于检测真核生物中特定器官或组织中特异基因的表达量,如反转录 PCR(reverse transcription, RT-PCR)和荧光实时定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR),这两类 PCR 都是以 RNA 反转的 cDNA 为模板进行的 PCR,其目的是分析真核生物中某个特异基因的表达模式。RT-PCR 的结果通过琼脂糖凝胶电泳进行检测,而 qRT-PCR 则是通过荧光实时定量 PCR 仪检测 PCR 产物的荧光强度来分析某基因在模板中的初



始转录本的含量。

1995 年,美国 PE 公司研制成功具有革命性意义的 qRT-PCR 技术,融合了 PCR 高灵敏性、DNA 杂交的高特异性和光谱技术的高精确定量等优点,直接探测 PCR 过程中荧光信号的变化,以获得特定区段扩增产物定量的结果,不需要 PCR 后处理或电泳检测,完全闭管操作(整个过程中仅有加入样品的一次开盖),一举克服了常规 PCR 技术的诸多难题。qRT-PCR 具有诸多优点:①它不仅操作简便、快速高效、高通量,而且具有很高的敏感性、重复性和特异性;②由于是在封闭的体系中完成扩增并进行实时测定,大大降低了污染的可能性,并且无须在扩增后进行操作;③有很大的动力学范围,可以在很大浓度范围内($>10^7$ 倍)进行定量;④既可以定量分析,又可以做定性分析;⑤它还可以通过不同的引物设计在同一反应体系中同时对多个靶基因分子进行扩增,即多重扩增。

qRT-PCR 在扩增反应中通过荧光信号对 PCR 进程进行实时检测,以荧光化学物质测定每次 PCR 循环后的产物总量,通过内参或者外参法对待测样品中的特定 DNA 序列进行定量分析。由于在 PCR 扩增的指数时期,模板的 Ct 值[Cycle threshold, 循环阈值,即每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数(图 1-2)]和该模板的起始拷贝数存在线性关

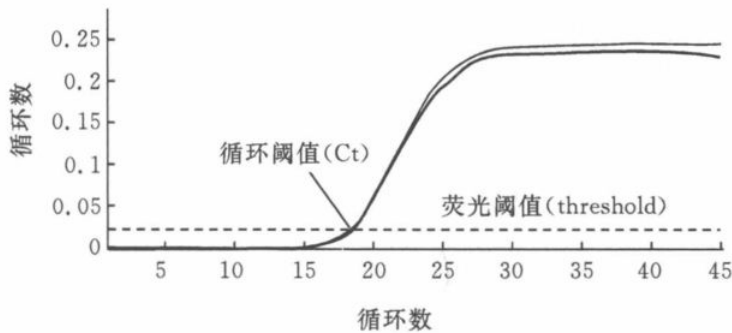


图 1-2 荧光阈值和循环阈值(Ct)

系,所以成为定量的依据。简单来说,qRT-PCR 的基本原理就是样本核酸扩增呈指数增长。在反应体系和条件完全一致的情况下,样本含量与扩增产物的对数成正比。由于反应体系中的荧光染料或荧光标记物(荧光探针)与扩增产物结合发光,其荧光量与扩增产物量成正比。因此,通过荧光量的检测就可以测定样本核酸量。实时荧光定量通常采用非特异性的 DNA 结合染料法(如 SYBR Green I 染料,图 1-3)和水解探针法(TaqMan 探针,图 1-4)。

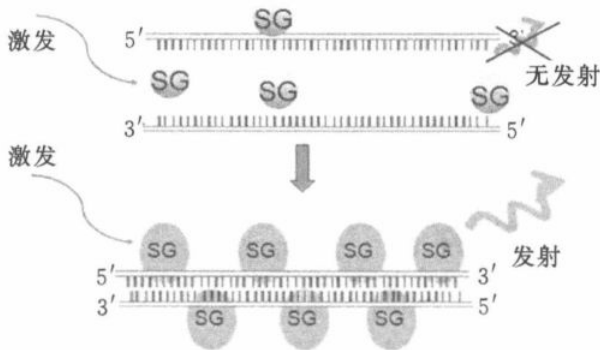


图 1-3 SYBR Green I 工作原理图

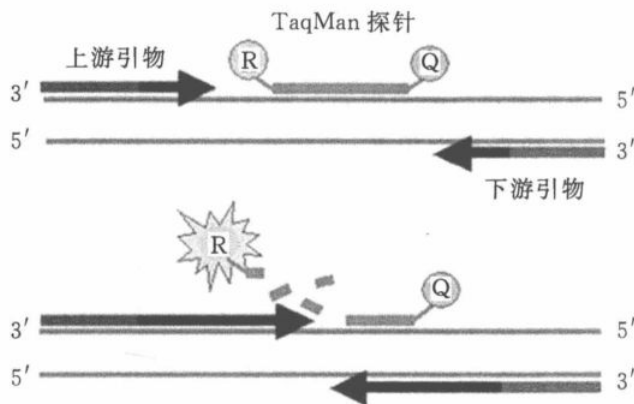


图 1-4 TaqMan 探针工作原理图

基因表达差异最终呈现出蛋白质合成量的差异,并在一定程度上决定了细胞的激活、增殖、分化、病变和凋亡。生物的生长、发育、衰老和病变通常由基因在不同阶段或不同组织的差异表达来决定。qRT-PCR 是一种利用荧光信号实时监测体外 DNA 分子 PCR 复制过程中每个循环的扩增产物,从而实现对 DNA 模板进行定量分析的技术,具有准确、快速、灵敏、特异等优点,在动植物基因工程、动植物检疫、微生物鉴定与分类、食品安全检测和医学等领域中得到广泛应用。



【实验目的】

用含有已知基因的质粒载体为模板对已知基因进行 PCR 扩增。通过本实验学习 PCR 仪的使用、循环程序及参数的设计,掌握不同 PCR 的原理;熟记 PCR、qRT-PCR 反应的程序,理解并掌握 qRT-PCR 的原理。了解 qRT-PCR 所使用的荧光化学方法及梯度 PCR、RT-PCR、qRT-PCR 设计与应用。



【时间表】

PCR 反应时间见表 1-1。

表 1-1 PCR 反应时间表

实验内容	所需时间(h)
PCR 反应体系	0.5
PCR 反应循环	2.5
总时间	3.0



【实验仪器、材料和试剂】

1. 实验仪器

Cycler PCR 仪,实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad iQTM5),小型离心机,qRT-PCR 板,微量



离心管,移液器等。

2. 实验材料

含目的基因(如绿色荧光蛋白基因 GFP)的载体质粒,组织 cDNA。

3. 实验试剂

10×PCR buffer、特异引物,MgCl₂,ddH₂O,dNTPs,Taq 酶,反转录试剂盒[PrimeScript RTreagent Kit with DNA Eraser(Perfect Real Time)],qRT-PCR 试剂盒[SYBR © Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)]。



【实验步骤】

1. PCR 反应

1)建立反应体系(表 1-2)。

表 1-2 PCR 反应体系

试剂	体积(μL)	终浓度
10×PCR buffer	2.0	1×
25mmol/L MgCl ₂	1.0	1~5mmol/L
dNTP 混合液	1.0	0.5~1mmol/L
P1+P2(引物)	0.5+0.5	各 0.5μmol/L
Taq 酶	0.3	≥20U
模板 DNA	0.2	<50ng
ddH ₂ O	14.5	
总体积	20	

2)PCR 反应循环参数(表 1-3)。

表 1-3 PCR 循环参数

预变性	PCR 循环			延伸	复性
94℃	94℃	55℃	72℃	72℃	4~15℃
5~8min	55℃	30s	1min	8min	10min
1 循环	20~30 循环			1 循环	

以上循环参数中,退火温度由引物决定,延长时间由待扩增片段的长度决定。经过 30 个循环后,可在 4℃保存 1~2h,或者在-20℃长期保存备用。



2. 巢式 PCR

巢式 PCR 也称为嵌套 PCR,是利用第一对引物 P1 和 P2 扩增的产物作为第二对引物 P3 和 P4 扩增的模板,P3 及 P4 引物在第一次 PCR 扩增片段的内部,其 PCR 体系、PCR 循环参数和普通 PCR 一致。

3. 反转录 PCR

反转录 PCR(RT-PCR)是以 RNA 为模板反转录而成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增的方法,主要用于从真核生物中克隆目的基因,对真核生物的基因进行表达模式分析等。这种 PCR 除了模板和普通 PCR 的来源不同外,其 PCR 体系和循环参数都基本一致。

4. 实时荧光定量 PCR

1)qRT-PCR 体系(表 1-4)

表 1-4 qRT-PCR 体系

试剂	使用量(μ L)	终浓度
实时荧光定量试剂盒[SYBR $\text{\textcircled{C}}$ Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)](2 $\times$)	12.5	1 $\times$
前引物(PCR Forward Primer)(10 μ mol/L)	1.0	0.4 μ mol/L ^{*1}
后引物(PCR Reverse Primer)(10 μ mol/L)	1.0	0.4 μ mol/L ^{*1}
cDNA 模板	2 ^{*2}	
灭菌蒸馏水(dH ₂ O)	8.5	
总体积	25	

注:* 1. 通常引物终浓度为 0.4 μ mol/L 可以得到较好结果。反应性能较差时,可以在 0.2~1.0 μ mol/L 范围内调整引物浓度。

* 2. 建议在 25 μ L 反应液中使用相当于 10pg~100ng 总 RNA 量的 cDNA 为模板。反转录反应液的加入量不能超过 PCR 反应液总体积的 10%。

2)反应程序(表 1-5)

表 1-5 反应程序

程序($^{\circ}$ C)	时间(s)	重复(次)
95	30	1
95	5	40
60	30~60	

3) 融解曲线(表 1-6)

表 1-6 溶解曲线反应程序

温度(℃)	时间(s)	变温速度(℃/s)
95	0	20
55	15	20
95	0	0.1



【结果分析】

普通 PCR、巢式 PCR 和 RT-PCR,需经过琼脂糖凝胶电泳检测其条带所处的位置及亮度,进而分析 PCR 实验是否成功,或分析基因表达模式;对 qRT-PCR,通常在反应结束后确认 PCR 的扩增曲线和融解曲线等,来分析所检测组织样品的基因表达模式。



【注意事项】

1. 普通 PCR、巢式 PCR、RT-PCR 注意事项

(1)反应开始之前,在每支 PCR 管中加一滴矿物油或启动 PCR 仪的热盖程序,以防止液体蒸发。

(2) $MgCl_2$ 、引物、dNTPs、Taq 酶如果浓度过大,会产生引物二聚体,从而影响 PCR 结果。

(3)PCR 循环数一般在 28~35 个循环数为宜,超过 45 个循环会影响 PCR 结果。

(4)退火和延伸时间由扩增片段的长度来定,片段过长时可适当延长延伸时间,但不能超过 2min,也不能低于 30s。

(5)PCR 反应中注意设置对照。本实验用含目的基因的载体质粒为模板,无须设阳性对照,但必须设阴性对照。所谓阴性对照,就是不加模板,用以检测模板以外的试剂是否被模板污染。

2. qPCR、巢式 PCR、RT-PCR 注意事项

(1)用于 RNA 实验的试剂需使用干热灭菌($180^{\circ}C$, 60min)或用上述方法进行 DEPC 水处理灭菌后的玻璃容器盛装(也可使用 RNA 实验用的一次性塑料容器),使用的无菌水需用 0.1%的 DEPC 水处理后进行高温高压灭菌。

(2)设计的引物要防止形成引物二聚体以及非特异性扩增(引物设计软件 Primer Express 或 Oligo 等)。

(3)引物浓度太低会导致反应不完全。但若引物太多,则发生错配以及产生非特异产物的可能性会大大增加。对于大多数 PCR 反应, $0.5\mu mol/L$ 是合适的浓度。若初次选用这个浓度不理想,可在 $0.3\sim 1.0\mu mol/L$ 之间进行选择,直至达到满意的结果。



(4)首次实验设置的退火温度应比计算得出的 T_m 值小 5°C , 然后增加或减少 $1\sim 2^{\circ}\text{C}$ 进行选择。一般退火温度要根据经验来确定, 这个经验值往往同计算得到的 T_m 值有较大的差距。

(5)在反转录的 cDNA 中要消除 DNA 污染、引物非特异性扩增。



【问题与讨论】

- (1)是否有特异性的扩增带? 如果有, 大小如何? 亮度如何? 如果没有, 试分析原因。
- (2)阴性对照是否有特异性的扩增带? 如果有, 分析其原因。
- (3)是否有引物二聚体? 如果有, 分析原因。
- (4)为什么循环次数过多(多于 45 个循环)时特异性扩增带的量很少甚至没有?
- (5)溶解曲线的目的是什么?



【参考文献】

- [1] 萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯. 分子克隆试验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [3] 吴乃虎. 基因工程原理[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2000.
- [4] 陈旭, 齐凤坤, 康立功, 等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J]. 东北农业大学学报, 41(8): 148 - 155.
- [5] 张惟材, 朱力, 王玉飞. 实时荧光定量 PCR[M]. 北京: 化学工业出版社, 2013.
- [6] 黄留玉. PCR 最新技术原理、方法及应用[M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2011.

实验二 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳及 DNA 片段的回收

【概述】

带电荷的物质在电场作用下向与其自身所带电荷电性相反的电极移动的现象称为电泳。1937 年瑞典化学家 Tiselius 首先开发了蛋白质的电泳技术,并成功地将血清蛋白分成几个组分。此后,电泳的种类及其应用的深度和广度均得到了迅速发展,成为分子生物学中分离、鉴定生物大分子的重要手段。其中,凝胶电泳由于操作简单、快速、灵敏等优点,已成为蛋白质、核酸研究最常用的方法。

DNA 分子在琼脂糖凝胶中泳动时有电荷效应和分子筛效应。DNA 分子在高于等电点的溶液中带负电荷,在电场中向正极移动。由于糖-磷酸骨架在结构上的重复性,相同数量的双链 DNA 分子几乎具有等量的净电荷,因此,它们能以相同的速度向正极方向移动。在一定的电场强度下,DNA 分子的迁移速度决定于分子筛效应,即 DNA 分子本身的大小和结构。相对分子质量不同的 DNA 片段其泳动速度不同,DNA 分子的迁移速度与相对分子质量的对数值成反比关系,即分子量大的迁移速度快,分子量小的迁移速度慢;分子质量相同结构不同的 DNA 也可通过电泳分离,如质粒 DNA 中共价闭合环状的 DNA(CCC-DNA)迁移速度最快,线型的 DNA(L-DNA)次之,开环的 DNA(OC-DNA)最慢。

依据凝胶的不同,琼脂糖凝胶电泳的分离范围比聚丙烯酰胺凝胶电泳广,但分辨率低于后者。

一般琼脂糖凝胶适用于分离大小在 0.2~50kb 范围内的 DNA 片段。本实验主要介绍琼脂糖凝胶电泳。

DNA 片段的分离与回收是基因工程操作中一项重要的技术,如可收集特定酶切片段用于基因克隆或是制备探针,回收 PCR 产物用于 T-A 克隆等。

DNA 的回收一般采用 DNA 凝胶回收试剂盒。这种试剂盒采用了融胶液,可以使琼脂糖凝胶完全融化。同时采用了一种新型的离子交换柱,在特定条件下使 DNA 能在离心过柱的瞬间结合到 DNA 纯化柱上,在一定条件下又能将 DNA 充分洗脱,从而实现 DNA 的快速纯化。在回收过程中,无需酚:氯仿抽提,无需酒精沉淀。试剂盒回收 DNA 只需 30min 左右,样品回收率可达 50%以上。



【知识链接】

琼脂糖是一种从海藻中提取出来的线状高聚物,当熔化凝固后就会形成固体基质,其密度取决于琼脂糖的浓度。带负电荷的核酸就可以在电场的作用下在这种基质中向阳极移动。核酸在琼脂糖基质中的迁移率取决于下列参数:①DNA 的分子大小;②琼脂糖的浓度;③DNA 的构象;④所加电压;⑤电场方向;⑥碱基组成与温度;⑦嵌入的染料;⑧电泳缓冲液的组成等。琼脂糖的浓度对核酸迁移率的影响是:一定大小的 DNA 片段在不同浓度的琼脂糖凝胶中的迁移率不同;在一定浓度的琼脂糖凝胶能够分辨的核酸大小范围内,核酸片段的迁移率与其相对分子质量大小负相关。



【实验目的】

熟练掌握琼脂糖凝胶电泳及凝胶成像系统的操作过程、琼脂糖凝胶的制备方法及 DNA 片段回收的方法。



【时间表】

本实验所需时间见表 2-1。

表 2-1 琼脂糖凝胶电泳及 DNA 片段回收时间表

实验内容	所需时间
配制电泳缓冲液	0.5h
制胶	1h
电泳	0.5h
凝胶成像系统检测	10min
DNA 片段回收	0.5h
总时间	2.5h



【实验仪器、材料和试剂】

1. 实验仪器

微量移液器,电泳仪,电泳槽,凝胶成像系统,小型台式离心机,水浴锅,DNA 凝胶回收试剂盒,离心管,微波炉等。

2. 实验材料

PCR 产物或酶切产物。

3. 实验试剂

(1)上样缓冲液(6×):0.25%的溴酚蓝,质量浓度 40%的蔗糖(表 2-2)。

表 2-2 凝胶加样缓冲液

试剂	用量
二甲苯青(FF)	0.25g
溴酚蓝	0.25g
40%(W/V)蔗糖	100mL
总体积	100mL

(2)溴化乙锭染色液(10mg/mL):在 20mL dH₂O 中溶解 0.2g 溴化乙锭(溴化乙锭有致癌作用,需戴手套操作),混匀后于 4℃ 避光保存。

(3)TAE 缓冲液(50×):称取 242g Tris 溶于蒸馏水,加入 57.1mL 冰乙酸、100mL 0.5mol/L 的 EDTA(pH8.0),用 dH₂O 定容到 1L(表 2-3)。电泳时稀释为 1×TAE 工作液。

表 2-3 50×TAE 的配制

试剂	用量
Tris	242g
冰乙酸	57.1mL
0.5mol/L EDTA-Na ₂ (pH8.0)	100mL
H ₂ O	894.9mL
总体积	1L

溴化乙锭(ethidium bromide, EB)的化学名称是 3,8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶溴盐。EB 能插入 DNA 分子的碱基对之间与 DNA 结合,在 260nm 紫外光激发下,会产生红色的荧光。

EB 染色液具有以下很多优点:①染色操作简便、快速,室温下染色 15~20min;②不会使核酸断裂;③灵敏度很高,10ng 或更少的 DNA 即可检出;④可以加到样品中,可随时用紫外吸收法追踪检查。

【实验步骤】

1. PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

(1)琼脂糖凝胶的制备:称取 0.2g 琼脂糖置于三角瓶中,加入 20mL 1×TAE 工作液,封住瓶口,放入微波炉中加热至琼脂糖完全融解。

(2)胶板的制备:将有机玻璃内槽洗净、晾干,放入制胶模具中并在固定位置插上梳子。于