

中央民族大学国家“十五”“~~工程~~工程”建设项目

# 生物技术原理与实验

徐小静 张少斌 王俊丽 主编

中央民族大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物技术原理与实验 徐小静等主编 北京: 中央民族大学出版社, 2004.12

豫13474·01

I ①生... II ②徐... III ③生物技术 IV ④Q91

中国版本图书馆CIP数据核字 (2004) 第12474号

生物技术原理与实验

---

主 编 徐小静 张少斌 王俊丽

责任编辑 杨 玉

封面设计 马钢工作室

出 版 者 中央民族大学出版社

北京市海淀区中关村南大街10号 邮编: 100081

电话: (010) 68911111(发行部) 传真: (010) 68911111(发行部)

(010) 68911111(总编室) (010) 68911111(办公室)

发 行 者 全国各地新华书店

印 刷 者 北京宏伟双华印刷有限公司

开 本 160mm×230mm(毫米) 1/16 印张: 16.5

字 数 300千字

印 数 1000册

版 次 2004年12月第1版 2004年12月第1次印刷

书 号 豫13474·01

定 价 16.00元

---

版权所有 翻印必究

## 前 言

生物技术的飞速发展，使生命科学成为当代自然科学的热点和重点，培养具有现代生物技术实验技能的人才也是高等学校的重要任务。

为了帮助学生更深刻地理解生物技术领域的基本概念和原理，培养他们分析问题和解决问题的实际能力，特编写这本实验技术教材。本教材是各位编者结合自己的教学和研究实践并参考资料编写而成，可作为生物学相关专业学生的实验教材，也可作为其他相关专业教学科研人员的参考书。

本实验技术教材的特点之一是全书着眼于生物技术的基本理论和基本技术，力求全面、深入浅出地反映当代生物技术领域的研究与发展状况；特点之二是引入了一些反映最新进展的实验技术，如功能基因克隆及表达研究的新技术、双向电泳、毛细管电泳技术和酵母双杂交技术；特点之三是编入了生物技术领域的基本实验，让学生在实验操作的同时加深对基本技术概念和基本原理的理解；特点之四是设计了综合实验，培养学生利用现代生物技术的原理和方法解决实际问题的综合能力。总之全书将技术理论和学生实验结合起来，力求满足学生多方面知识的需要，并有利于学生对该学科有一个全面的认识。

全书分为上、下两篇，上篇主要介绍现代生物技术主要领域的基本原理，包括基因工程、蛋白质及酶工程、细胞工程、发酵工程及其他常用技术；下篇为基本实验，包括生物技术领域中的基础实验。书末的附录包括实验室规则、实验室安全及防护、常用仪器的使用、常用因特网网址、常用缓冲溶液及试剂的配制和

常用实验数据，供需要这些知识的读者参考。

本书的第一章、第四章与第六章由中央民族大学的徐小静编写，第二章第一至六节、第七章与第十章由沈阳农业大学的张少斌编写，第三章与第八章由中央民族大学的王俊丽编写，第二章第七节与第九章由沈阳农业大学的阚国仕编写，附录部分主要由中央民族大学的郭志永完成，第五章由徐小静和张少斌共同完成，最后由徐小静完成了全书的统稿工作。

需要特别说明的是，在编写过程中，细胞工程技术部分主要参阅了《植物细胞工程》（朱至清编著，化学工业出版社，~~2002~~年）、《细胞工程》（李志勇编著，科学出版社，~~2002~~年）、《植物细胞工程原理与技术》（周维燕主编，中国农业大学出版社，~~2003~~年）等相关著作、教材和资料，并引用了部分相关内容。附录部分主要参阅了《生物工程技术实验指导》（魏群主编，高等教育出版社，~~2003~~）、《生化与分子生物学实验技术教程》（赵亚华等编，高等教育出版社，~~2003~~）和《基础生物化学实验指导》（吕淑霞主编，中国农业出版社，~~2003~~）等书的附录部分，并引用了部分相关内容。由于篇幅关系，在参考文献中未能将参考的众多书籍和资料全部列出，敬请谅解。

本书的编写与出版被列入中央民族大学“~~211~~工程”教材建设规划项目，得到了中央民族大学“~~211~~工程”办公室和生命与环境科学学院领导的大力支持和帮助。在编写过程中，中央民族大学生命与环境科学学院生物教研室的老师们给予了有益的指导，杨玉老师对本书进行了全面细致地审稿和编辑加工。在此，一并表示衷心地感谢。

由于编者水平有限，错漏不足之处在所难免，敬请批评指教。

编 者

~~2003~~年 1月

# 目 录

## 上篇 生物技术原理

### 第一章 基因工程技术

- 第一节 克隆载体 ..... (猿)
- 第二节 重组 阅粤技术 ..... (员)
- 第三节 基因文库的构建 ..... (圆)
- 第四节 孕砸技术 ..... (源)
- 第五节 核酸分子杂交技术 ..... (缘)
- 第六节 阅粤测序技术 ..... (缘)
- 第七节 转基因技术 ..... (远)

### 第二章 蛋白质及酶工程技术

- 第一节 蛋白质的提取与粗分级 ..... (苑)
- 第二节 蛋白质的细分级 ..... (怨)
- 第三节 蛋白质的鉴定 ..... (员)
- 第四节 蛋白质结构测定 ..... (员)
- 第五节 定点突变技术 ..... (员)
- 第六节 蛋白质的原核和真核表达技术 ..... (员)
- 第七节 酶工程(酶蛋白工程)概述 ..... (员)

### 第三章 细胞工程技术

- 第一节 植物细胞工程技术 ..... (员)
- 第二节 动物细胞工程技术 ..... (圆)

### 第四章 发酵工程技术

## 目 录

第一节	微生物发酵方式 .....	(四九)
第二节	发酵过程 .....	(五〇)
第五章	其他常用技术	
第一节	功能基因的克隆技术 .....	(五二)
第二节	基因表达分析技术 .....	(五三)
第三节	RNA干扰 (RNAi) 技术 .....	(五四)
第四节	双向电泳技术 .....	(五五)
第五节	毛细管电泳技术 .....	(五六)
第六节	酵母双杂交技术 .....	(五七)

## 下篇 基本实验

### 第六章 基因工程实验

实验一	碱裂解法提取质粒 DNA .....	(五九)
实验二	DNA酶切及琼脂糖凝胶电泳 .....	(六〇)
实验三	大肠杆菌感受态细胞的制备和质粒 DNA的转化 .....	(六一)
实验四	PCR扩增 DNA特异性片段 .....	(六二)
实验五	真核生物基因组 DNA的提取 .....	(六三)
实验六	植物组织总 DNA的提取及变性电泳 .....	(六四)
实验七	Southern杂交 .....	(六五)
实验八	基因组文库的构建 .....	(六六)
实验九	cDNA文库的构建 .....	(六七)
实验十	动物转基因技术——动物细胞的磷酸钙沉淀 转化法 .....	(六八)
实验十一	植物转基因技术——农杆菌介导的花芽 浸泡法转化拟南芥植株 .....	(六九)
实验十二	植物转基因技术——农杆菌介导的双子 叶植物叶盘转化法 .....	(七〇)

## 第七章 蛋白质及酶工程实验

- 实验一 生物组织总蛋白质的提取 ..... (猿园)
- 实验二 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量 ..... (猿怨)
- 实验三 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (猿园)
- 测定蛋白质亚基分子量 ..... (猿园)
- 实验四 大肠杆菌中重组蛋白质的诱导表达与亲和层析  
纯化 ..... (猿愿)
- 实验五 蛋白质的免疫印迹分析 ..... (猿缘)
- 实验六 羧基降解法测定小肽的氨基酸序列 ..... (猿怨)
- 实验七 蛋白质结晶 ..... (猿猿)
- 实验八 酶的基本特性 ..... (猿缘)
- 实验九 绿色荧光蛋白 (猿云) 定点突变 ..... (猿园)

## 第八章 细胞工程实验

- 实验一 培养基母液的配制 ..... (猿园)
- 实验二 培养基的配制与灭菌 ..... (猿怨)
- 实验三 植物培养材料的灭菌与接种 ..... (猿园)
- 实验四 种胚的离体培养 ..... (猿猿)
- 实验五 愈伤组织的诱导 ..... (猿缘)
- 实验六 悬浮细胞系的建立 ..... (猿园)
- 实验七 植物原生质体的游离和融合 ..... (猿愿)
- 实验八 草莓遗传转化实验 (农杆菌介导法) ..... (猿园)
- 实验九 水稻悬浮细胞的遗传转化实验  
(基因枪法) ..... (猿猿)
- 实验十 动物组织的消化培养及单细胞的获得 ..... (猿缘)

## 第九章 发酵工程实验

- 实验一 凝固型酸奶的制作 ..... (猿园)
- 实验二 纤维素酶生产 (一) —— 固体发酵法生产  
纤维素酶 ..... (猿园)

## 源 目 录

---

实验三	纤维素酶生产(二)——分级盐析法纯化 纤维素酶.....	(猿猿)
实验四	纤维素酶生产(三)——凝胶过滤层析法纯化 纤维素酶.....	(猿猿)
实验五	四环素发酵代谢曲线的绘制.....	(猿猿)
第十章	综合设计实验	
实验一	溶菌酶的纯化、结晶与酶活测定.....	(猿猿)
实验二	种子蛋白质含量及组成分析.....	(猿猿)
实验三	植物蛋白酶的分离纯化与鉴定.....	(猿猿)
实验四	绿色荧光蛋白的原核表达、纯化及鉴定.....	(猿猿)
实验五	转绿色荧光蛋白基因烟草的获得及鉴定.....	(猿猿)
实验六	大肠杆菌碱性磷酸酶定点诱变与酶活 分析.....	(猿猿)
附 录		
附录一	实验室规则.....	(猿猿)
附录二	实验室安全及防护.....	(猿猿)
附录三	常用仪器的使用.....	(猿猿)
附录四	常用因特网网址.....	(猿猿)
附录五	常用缓冲溶液及试剂的配制.....	(猿猿)
附录六	常用实验数据.....	(猿猿)

上篇  
生物技术原理



# 第一章 基因工程技术

## 第一节 克隆载体

### 一、质粒载体

#### 质粒

质粒 (plasmid) 是一种染色体外的稳定遗传因子, 主要发现于细菌之中。质粒能够自主复制, 为闭合环状的双链 DNA 分子, 并以超螺旋状态存在于宿主细胞之中。质粒大小不定, 一般为 1~10 kb, 其基本生物学特性体现在以下四个方面:

#### (一) 自主复制性

质粒能够独立于染色体 DNA 外自主复制。质粒具有一段 DNA 复制起始位点的序列, 它帮助质粒 DNA 在宿主细胞中复制。质粒独立于细菌染色体之外, 又必须依赖于宿主编码的酶来进行复制和转录。质粒在宿主细胞中的复制一般有两种形式, 即严紧型复制和松弛型复制。前者指质粒的复制受宿主细胞复制的严格控制, 复制要求同时表达一个由质粒编码的蛋白质, 每个细胞中只含一个或几个拷贝; 后者指质粒的复制受宿主细胞的控制不严, 不需要质粒编码的功能蛋白, 其复制完全依赖于宿主提供的酶 (如 DNA 聚合酶 I、III, 依赖于宿主的 DNA 聚合酶以及宿主基因表达的产物等) 来进行, 它们在每个细胞中的数目可达 1 至 100 个拷贝。控制质粒拷贝数的基因, 位于包括 DNA 复制起点在内的一个质粒的 DNA 区域内 (即复制子)。融合产生的质粒如含有一个以上的复制子, 也只会有一个复制子具有

活性。

#### (圆) 不相容性

同一复制系统的不同质粒不能稳定地和平共处，称之为不相容性，也称之为不亲和性。确切地说，两个密切相关的质粒通常不能在同一宿主菌的子代细胞中共存。

#### (猿) 转移性

在自然条件下，很多质粒可以通过细菌接合的方式转移至新宿主内，这需要 **性因子** 基因的产物（**性因子转移蛋白**）来参与。**性因子转移蛋白** 可在质粒的 **oriT**（**转移起始位点**）产生切口来转移，由于开发的质粒载体上缺少 **oriT** 位点，因此不会自然转移。

#### (源) 具抗药性标记

质粒往往带有一些抗药性标记，将质粒 **转化** 到细菌中时，细菌会表现出质粒基因所具有的新的生物表现型。例如将带某种抗生素标记的质粒转化到细菌中后，细菌就表现出抵抗该抗生素的表型，借助这种新的表型特征，可以证实质粒已经转化到宿主菌中，因此可作为基因工程中的筛选标记。

质粒作为一种自我复制的遗传因子，具有携带外源 **基因** 成为克隆载体的潜在可能性。但是没有经过修饰的自然状态的质粒，通常缺乏高质量的克隆载体所必需的一些特性，因此质粒要变成克隆载体，就必须对它进行遗传改造。

#### 圆质粒载体

把一个有用的目的 **基因** 片段通过重组 **DNA** 技术，送进受体细胞中去进行繁殖和表达的工具称作载体（**克隆载体**）。质粒载体是重组 **DNA** 技术中常用的载体，是在天然质粒的基础上为适应实验室操作而通过人工构建形成的载体。与天然质粒相比，质粒载体通常带有一个或一个以上的选择性标记基因（如抗生素抗性基因）和一个人工合成的、含有多个常用限制性内切酶的单切点，即多克隆位点（**多克隆位点**），并去掉了大部分非必

需序列，使分子量尽可能减小，以便于基因工程操作。大多数质粒载体带有一些多用途的辅助序列，这些用途包括通过组织化学方法肉眼鉴定重组克隆、产生用于序列测定的单链 DNA 体外转录外源 DNA 序列、鉴定片段的插入方向、外源基因的大量表达等等。

一个理想的克隆载体应具有以下一些特性：分子量小、多拷贝、松弛控制型；具多克隆位点（MCS）；能插入较大的外源 DNA 片段；具有容易操作的检测表型。常用的质粒载体大小一般在 1-10 kb 之间。

20 世纪 70 年代初，许多天然质粒通过一系列复杂的消化和连接反应被人工修饰和构建成为克隆载体。其中 pBR322 质粒是至今仍广泛应用的克隆载体（图 1-1），它的大小为 4.36 kb，比天然质粒更小，更能抵挡物理剪切力所致的损害并且增大了被细

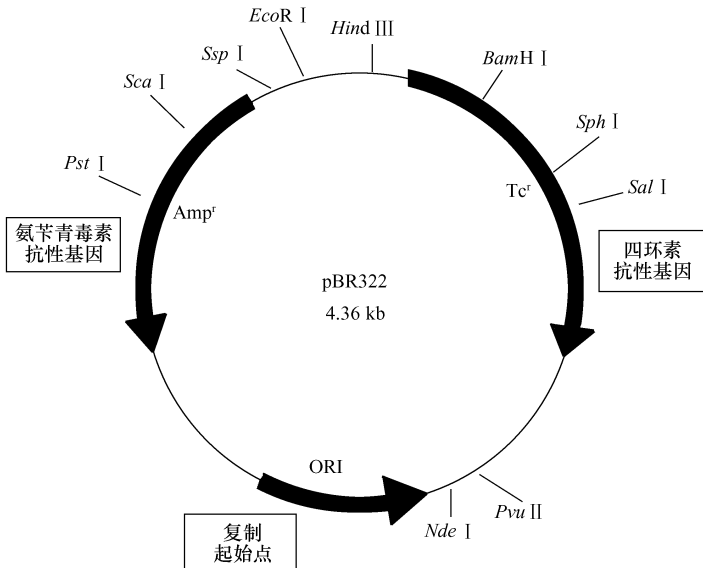


图 1-1 质粒 pBR322 图谱

菌摄入的效率；它具有细菌的 **ori** 复制起始点（**ori**），保证质粒能被宿主细胞所复制，并且复制起始点属于松弛型，保证其在细菌中具有较高的拷贝数；具有两种编码抗生素抗性的基因，即氨苄青霉素抗性（**amp<sup>r</sup>**）和四环素抗性（**tet<sup>r</sup>**），一种抗生素能够选择含有质粒的细胞，如果细胞被涂布在含有特定抗生素的平板上，只有那些含有质粒的细胞才能够生长并且形成菌落；另一个抗生素基因可以用来检测那些含有插入 **ori** 的质粒。此外，在 **ori** 质粒的不同的位点上有大量的限制性内切酶位点，方便用来插入外源 **ori**，其中一些位点位于抗生素的抗性基因之内，可以通过该抗生素抗性的失活来检测插入片段的存在。

**ori** 质粒也是常用的克隆载体，大小为 **ori**。它有来自大肠杆菌乳糖操纵子的 **ori** 区段，编码  $\beta$  原半乳糖苷酶氨基端的一个片段（**lacZ'**）和一个调节 **lacI** 基因表达的阻遏蛋白（**lacI**）的基因 **lacI**，可对重组体进行蓝白斑筛选。它还含一个氨苄青霉素抗性基因和包含多种常用限制性内切酶位点的多克隆位点（**MCS**），见图 **ori**。

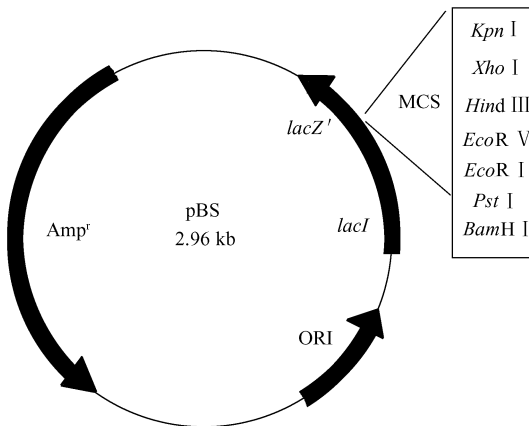


图 **ori** 质粒 **ori** 图谱

## 质粒筛选系统

### (一) 抗性筛选

利用质粒上的抗性标记来进行筛选是常见的筛选方法，含有质粒的菌体具有质粒所编码的抗性，即具备在含该抗生素的培养基上生长的能力。质粒载体中常用的抗性标记有：

**四环素（Tet<sup>r</sup>）** 四环素与核糖体 30S 亚基的一种蛋白质结合，从而抑制核糖体的转位而使蛋白质合成终止。质粒带有组成型表达的四环素抗性基因，编码 16 个氨基酸的膜结合蛋白，可阻止四环素进入细胞内。

**氨苄青霉素（Amp<sup>r</sup>）** 氨苄青霉素可与细胞膜上的一些与细胞壁合成有关的酶结合，并抑制其活性。氨苄青霉素抗性基因编码  $\beta$  原内酰胺酶，可分泌进入细菌外周质腔中，催化  $\beta$  原内酰胺环水解，从而解除毒性。

**氯霉素（Cm<sup>r</sup>）** 氯霉素与核糖体 50S 亚基结合并抑制蛋白质合成。氯霉素抗性基因编码一个四聚体蛋白，在乙酰辅酶 A 存在下，催氯霉素乙酰化，形成的产物不能与核糖体结合。

**卡那霉素（Kan<sup>r</sup>）** 和新霉素（Neom<sup>r</sup>） 它们都能与核糖体成分结合并导致与 mRNA 发生错读。两种抗生素均可被抗性基因编码的蛋白质（氨基糖苷磷酸转移酶）修饰，阻止它们与核糖体结合。

### (二) 插入失活筛选

插入失活是一种鉴定带有插入片段重组载体的非常有用的筛选方法。质粒的四环素抗性编码基因的内部具有单一的限制性酶切酶  $\text{Pst} \text{I}$  位点。用  $\text{Pst} \text{I}$  同时消化质粒和染色体 DNA 片段，在 DNA 连接酶的催化下可以得到质粒和消化后 DNA 片段的连接物，将连接产物转化大肠杆菌。大肠杆菌经短暂的温育而使抗生素基因表达之后，将菌体涂布在含有氨苄青霉素的培养基上。在这些平板上能够生长的菌落一定来源于含有质粒的菌体，因为它携带有氨苄青霉素的抗性基因，但这时



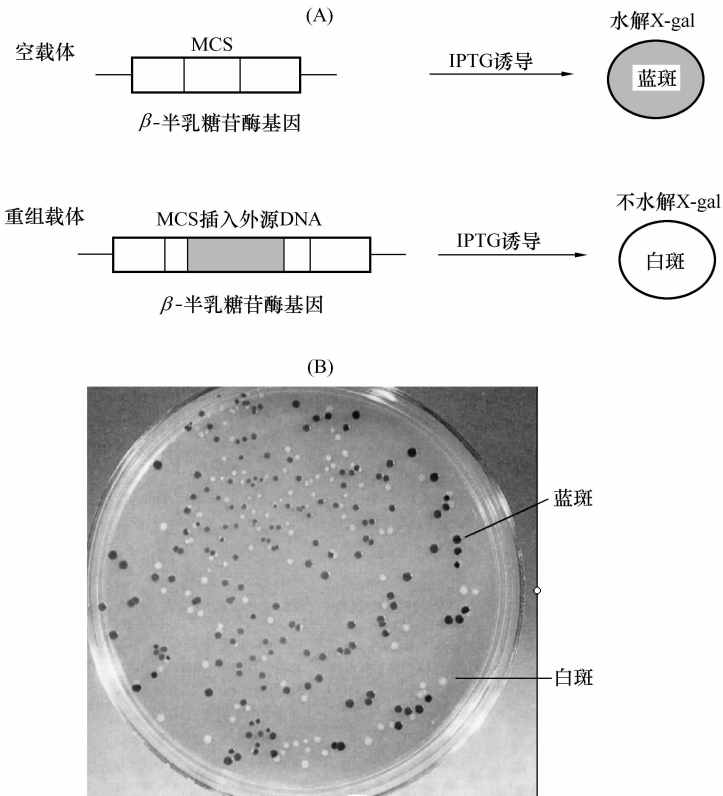


图 1-1-1 检测重组载体的蓝白斑筛选  
(A) 原理示意图, (B) 平板上蓝白斑筛选

### (二) 细菌培养物的生长

从琼脂平板上挑取一个单菌落, 接种到培养基 (含有一定浓度的抗生素) 中, 培养至对数生长末期, 就可以大量提纯质粒。对于早期开发的载体, 如 **质粒载体**, 由于不能高拷贝数的自由复制, 所以需要在得到部分生长的细菌培养物中加入氯霉素继续培养若干小时, 以便对质粒进行选择性地扩增。氯霉素可抑制宿主的