

# 生物技术实验 精选

朱嘉明 程龙球 周天鸿 李月琴 梁旭方  
方 玲 梁宠荣 马三梅 徐明芳 王 莹 编著  
刘大岭 邓 宁 李任强 杨维东 姚冬生

2006年7月

# 生物技术实验精选

## 目录

### A 遗传·基因工程部分

实验一 果蝇饲养及遗传学研究技术

实验二 人类染色体基本实验技术

实验三 DNA 的重组、克隆与鉴定

实验四 功能基因实验技术

实验五 海洋微藻特异基因的转录和表达分析

### B 细胞工程部分

实验六 动物细胞培养

实验七 植物组织培养

实验八 植物多倍体诱发和鉴定

实验九 转基因斑马鱼实验

实验十 植物转基因技术

### C 微生物工程部分

实验十一 正交试验法在微生物培养条件优化选择中的应用

实验十二 细菌 mRNA 的提取及其逆转录

实验十三 微生物生长动力学——细菌生长动力的测定

实验十四 食品、药品和水等的微生物检验技术

### D 生物化学技术·酶工程部分

实验十五 蛋白质双向凝胶电泳

实验十六 人基因组 DNA 提取

实验十七 植物基因组 DNA 提取

实验十八 抗血清的制备与效价测定

实验十九 酶联免疫吸附技术

实验二十  $\alpha$ -地中海贫血的快速基因诊断

实验二十一 从植物材料中提取制备过氧化物酶

实验二十二 海洋微藻的实验室培养与活性成分的分离

实验二十三 天然甲壳素的提取和分离

实验二十四 家兔动脉血压与呼吸运动的调节

实验二十五 模拟过氧化物酶的制备、固定与应用

实验二十六 以枯草杆菌生产蛋白酶

实验二十七 包埋法、交联法对细胞、酶的固定化操作及其比较

备注：红字为精选出来的内容

# A 遗传·基因工程部分

## 实验三 DNA 的重组、克隆与鉴定

### 前 言

#### ——重组质粒的构建设计

基因工程又称遗传工程、DNA 重组技术、分子克隆等。它是七十年代在分子生物学发展的基础上形成的新学科。所谓基因工程，就是在分子水平上，用人工方法提取（或合成）某一生物的遗传物质，在体外切割，拼接和重新组合，然后通过载体把重组的 DNA 分子引入受体细胞，使外源 DNA 在受体细胞中进行复制和表达。按人们的意愿定向创造生物新性状，使之稳定地遗传给下一代。所以基因工程具有广阔的应用前景，即能为工农业生产和工医药保健等开拓新途径，又能为生物的细胞分化，生长发育，肿瘤发生等基础研究提供有效的实验手段。

近十余年来，基因工程的发展和应用，迅速地推动了生物科学的发展，目前，基因工程技术已成为生物学领域许多实验室的常用技术，它的先进性和普及性使人们感到有必要在大学的教学课程中得到反映。所以，我系已为十几届本科生、研究生开设了基因工程技术实验，选择一些最基本，最常用的技术，以使同学对基因工程有一个基本的了解，并能掌握一些基本技术。

但是基因工程的实际技术和实验系统正在不断的创新，新方法、新技术不断推出，而且在有限的学时内，所能触及的技术只是基因工程中极少的一部分，但从教学角度来看，是不可能面面俱到。我们只是希望通过本实验，让同学通过基因工程中最基本的技术训练，为今后独立工作打下基础。

本实验设计主要参考书为 T·Maniatis 的《Molecular cloning》第三版，彭秀玲等编著的《基因工程实验技术》等。实验中所选择的方法和条件以适合于本实验室设备为首选，具体参考应用时，可作适当更改。

本套实验设计过程如下：

1. 染色体 DNA 的抽提
2. PCR 扩增分离目的 DNA 片段
3. 载体质粒的抽提、纯化及检测
4. 载体及目的 DNA 片段的限制性核酸内切酶酶切与连接
5. 重组质粒转化大肠杆菌
6. 重组子的筛选、重组质粒的抽提与鉴定

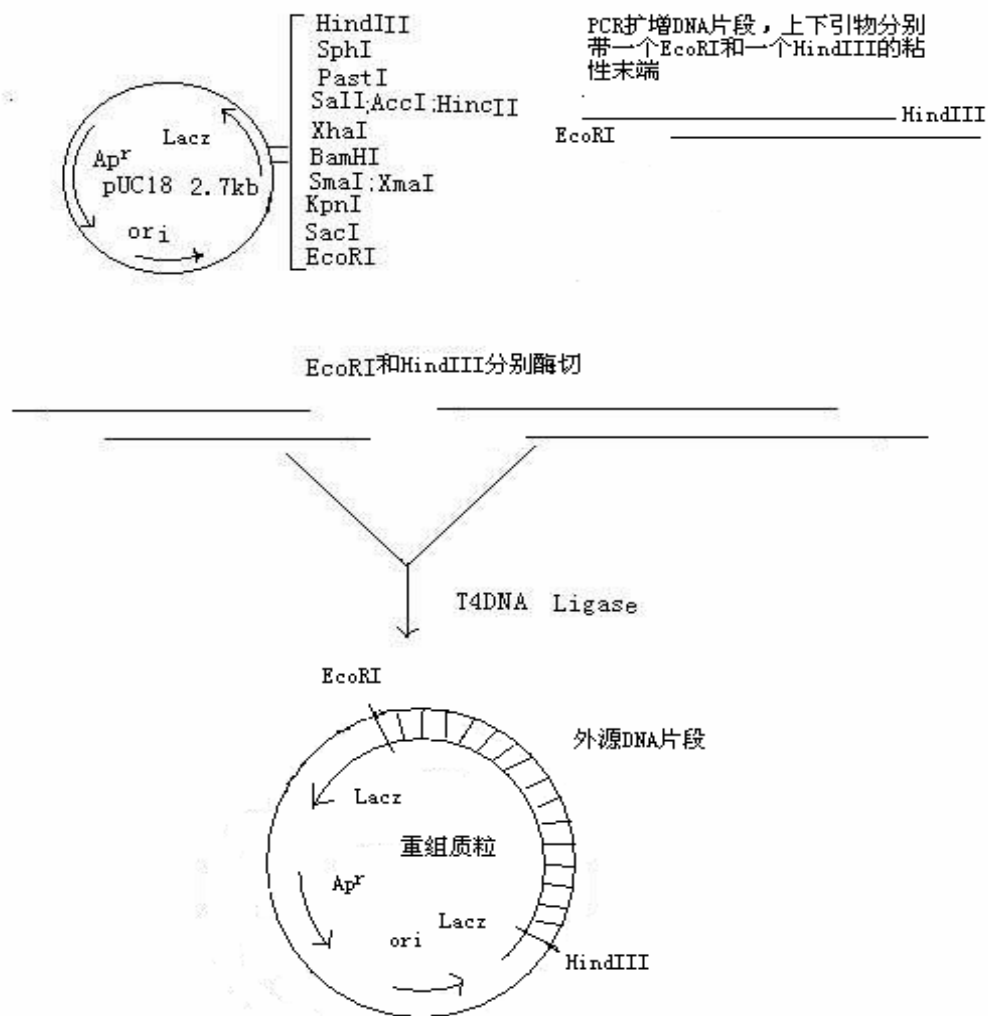


图 3—1 重组质粒构建图

## 1. DNA 的纯度和分子量的测定

### 一、目的

熟练掌握琼脂糖凝胶电泳法。

利用琼脂糖凝胶电泳测 DNA 分子量和质粒 DNA 分子纯度，并熟悉各种核酸分子在琼脂糖凝胶电泳中的位置分布和某些特性。

### 二、原理

琼脂糖是一种直链多糖。它是由 B—D 吡喃半乳糖和 3，6—脱水半乳糖以 1，3— $\beta$  糖苷键相连的双糖聚合物，链状琼脂糖分子之间相互以氢键交联。形成网络系统。琼脂糖带有

亲水性，不含有带电荷的基因，也不会引起核酸分子的变性，而且不吸附被分离的物质，因此成为基因工程上首选的凝胶剂。

当核酸分子在琼脂糖凝胶电场中时，分子上带电基团在 pH8.0 条件下带负电荷，在电场作用中移向正数，至使核酸分子在琼脂糖凝胶电泳中有其迁移率。迁移率与下列因素有关：

1. 核酸分子的大小：在相同的条件下，不同大小的核酸分子的迁移率不同，小分子的迁移率大，大分子的迁移率小。其中线状双链 DNA 分子在一定浓度琼脂糖上电泳的速度与线状双链 DNA 分子的分子量对数成反比(图 3—1)；所以根据迁移率大小可测定 DNA 分子的大小。不过实际应用时，通常将待测定的 DNA 和已知分子量大小的标准 DNA 片段进行电泳对照，观察其迁移距离，就可知该样品的分子量大小。

2、迁移率与核酸构象有关, 琼脂糖凝胶电泳可以鉴别分子量相同但构型不同的 DNA 分子。在依常规方法抽提的质粒 DNA 通常具有三种不同的构象: 超螺旋型 (SC)、线形 (L) 和开环型 (OC)。这三种构型分子有不同的迁移率。在一般情况下, 超螺旋型 (SC) 迁移速度最快, 其次为线状 (L) 分子, 最慢的为开环型 (OC) 分子。若提取到的质粒 DNA 样品中, 还有染色体 DNA 或 RNA, 在琼脂糖凝胶电泳上也可以分别观察到电泳区带, 由此可分析样品的纯度 (图 3—2)。

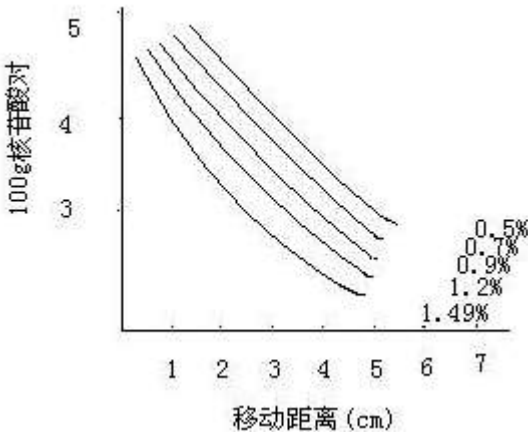


图 3—2 凝胶电泳，DNA 移动距离和分子量关系

(缓冲液 0.5×TBE, 0.5ug/ml 溴化乙锭

电泳条件 1v/cm 16 小时)

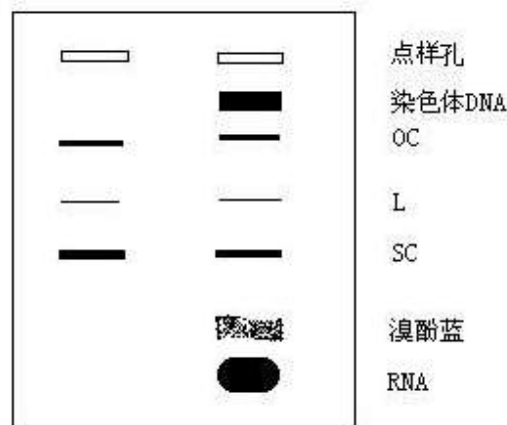


图 3-3 提纯和未提纯质粒 DNA 电泳图

3、迁移率与电泳条件有关，低电压时，线状 DNA 片段的迁移速度与电压成正比，当电压高时，大分子量 DNA 片段的迁移速度就不再与电压成正比，所以电压一般不超过每厘米 5 伏。电泳液采用缓冲液，以保证较稳定的 pH 值。pH 值的剧烈变化会影响 DNA 分子所带的电荷，因而影响正常的电泳速度。电泳温度一般不影响电泳，但若因电压过高，引起发热将会导致胶融解。所以可采用冷却循环系统。

4、迁移率与琼脂糖浓度有关。浓度越大，迁移率越低，当样品的分子量较大时，宜用较稀的琼脂糖浓度，分子量小时，浓度可选用大些，通常可选用 0.7%浓度的凝胶。此浓度下分离 DNA 分子的范围为 0.8—10 Kb。

当核酸样品在琼脂糖凝胶中电泳时，加入在紫外线照射下能发射荧光的溴化乙锭 (EB)，EB 就插入 DNA 分子中，形成荧光络合物，使其发射荧光增强几十倍，这样极其微量的 DNA 也可观察到。例如用肉眼观察，可检测到 0.05ug—0.1ug 的 DNA。

### 三、材料

#### 1、DNA 样品

样品 A:  $\lambda$  DNA (限制性核酸内切酶 EcoRI, HindIII 酶切后样品)

样品 B: 染色体 DNA+RNA

样品 C: 质粒 DNA (三种构型 DNA)

2、电泳缓冲液: Tris—乙酸 0.04mol/L pH8.0  
0.002mol/L EDTA

3、加样缓冲液: 0.25%溴酚兰 40% w/v 蔗糖

4、溴化乙锭溶液: 0.05mg/ml 溴化乙锭/水

5、琼脂糖

6、水平式微型电泳槽; 电泳仪; 微量取样器, 玻片等。

### 四、实验步骤

1、用胶纸带把电泳槽两端封好，以免凝胶溶液漏出，将电泳槽置于平面水平。

2、选择孔径适宜的点样板 (梳板)。将梳板置于距凝胶槽一端一厘米并与该端平行的

位置。梳板垂直架在槽上，使梳板底部不要触到槽底部，大约相距 1 毫米左右。

3、称取琼脂糖 0.3 克置三角瓶中，加入 40 毫升电泳缓冲液，于电炉上加热，至琼脂糖完全融化，取少量凝胶溶液沿胶带纸边缘封好，防止倒凝胶板时出现渗漏。

4、在凝胶溶液中加入 0.4 毫升溴化乙锭溶液（EB 最终浓度为 0.5ug/ml）摇匀，待凝胶溶液冷却至 55℃（手摸烧瓶不烫手）轻轻地倒入水平微型电泳槽内。除掉气泡，或用梳板将气泡排至凝胶边缘。

5、室温下，凝胶放置 30 分钟，待其凝固后，拔去梳板，保持电样孔完好。除掉防渗漏的胶带纸。把制备好的装凝胶块的微型电泳槽，放入水平大电泳槽，点样孔一端应在大电泳槽电极负极一端。然后在水平大电泳槽内加入电泳缓冲液，使其液面高于凝胶 1 毫米左右。

6、按以下混合好样品（以下为参考值，可视实际样品作调节）。

①：2 微升样品 A，2 微升加样缓冲液，10 微升电泳缓冲液。

②：2 微升样品 B，2 微升加样缓冲液，10 微升电泳缓冲液。

③：2 微升样品 C，2 微升加样缓冲液，10 微升电泳缓冲液。

7、在玻片上各把上述样品混合均匀，用微量取液器分别吸取样品，小心将样品注入点样孔内，记录样品的点样顺序。

8、点样孔那端的电泳槽负极连接电泳仪负极，另一端连接电泳仪正极，打开电泳仪电源开关（每次打开电源开关时，应检查电压旋钮是否置于零位），调电压至 5v/cm（以水平大电泳槽的两极算距离）。

9、待溴酚兰带走入凝胶 6 厘米后，小心取出微型电泳槽，勿使凝胶滑出，置于保鲜纸上，放在紫外检测仪上，打开紫外灯，观察电泳结果，绘好 DNA 区带电泳图。

## 五、结果分析

指出各核酸区带及构型和质粒 DNA 分子量。

## 六、问题

1、低 pH 值的缓冲液会降低核酸迁移率，甚至分子不能移动，为什么？

2、分离高分子量的 DNA 时，为何不用高浓度的琼脂糖凝胶。

附录：

$\lambda$  DNA 经核酸限制性内切酶 EcoRI 和 HindIII 双酶切割后，所产生的各片段的分子量（单位 Kb）。

21 • 26	5 • 15	4 • 97	4 • 3	3 • 53	2 • 03
1 • 90	1 • 58	1 • 38	0 • 95	0 • 83	0 • 56

## 2. 细菌染色体 DNA 的抽提

### 一、目的

熟练掌握抽提细菌 DNA 的一般方法

### 二、原理

要进行重组 DNA 实验，就离不开外源基因的纯化，而外源基因主要来源之一就要直接从生物的染色体 DNA 上制备，所以制备高质量的染色体 DNA 样品经常为基因工程实验所需要，抽提细菌染色体 DNA 的方法目前已有许多种，这里所介绍的两种方法：一适用于枯杆菌染色体的抽提；另一种方法则适用于大肠杆菌染色体的制备。

基因工程实验所需要的基因组 DNA 通常要求分子量尽可能大，以此增加外源基因获得率，但要获得大片段的 DNA 非易事，细菌基因组 DNA 通常是个很大的环状态 DNA，而在抽提过程中，不可避免的机械剪切力必将切断 DNA，如果要抽提到大的 DNA 分子，就要尽可能地温和操作，减少剪切力，减少切断 DNA 分子的可能性；分子热运动也会减少所抽提到的 DNA 分子量，所以提取过程也要尽可能在低温下进行。另外细胞内及抽提器皿中污染的核酸酶也会降解制备过程中的 DNA，所以制备过程要抑制其核酸酶的活性。

另外制备的细菌染色体 DNA 必须是高纯度的，以满足基因工程中各种酶反应的需要，制备的样品必须没有蛋白污染，没有 RNA，各种离子浓度应符合要求，这些在染色体制备时都应考虑到。

大肠杆菌染色体 DNA 抽提首先收集对数生长期的细胞，然后用离子型表面活性剂十二烷基硫酸钠（SDS）破裂细胞，SDS 具有的主要功能是：（1）溶解细胞膜上的脂类和蛋白质，因而溶解膜蛋白而破坏细胞膜；（2）解聚细胞膜上的脂类和蛋白质，有助于消除染色体 DNA 上的蛋白质；（3）SDS 能与蛋白质结合成为  $R_1-O-SO_3R_2$ —蛋白质的复合物，使蛋白质变性而沉淀下来。但是 SDS 能抑制核糖核酸酶的作用，所以在以后的提取过程中，必须把它除干净。以免影响下一步 RNase 的作用。破细胞后 RNA 经 RNase 消化除去，蛋白质经苯酚、氯仿：异戊醇抽提除去经酒精沉淀回收 DNA。

枯草杆菌染色体制备与上类似，但略加修改的方法要适合教学要求。枯草杆菌是格兰氏阳性菌，所以在 SDS 处理前需要使用溶菌酶裂解细胞壁。溶菌酶是一种糖苷水解酶，它能水解菌体细胞壁的主要化学成份肽聚糖中的  $\beta-1, 4$  糖苷键，有助于细胞壁破裂，破裂的细胞壁在 SDS 的作用下溶菌，同时用蛋白酶 K 消化蛋白质，能解离缠绕在染色体 DNA 上的蛋白质，然后加入一定量的醋酸钾，使蛋白质变性，通常离心除去，在这期间可加入核糖核酸酶消化 RNA，最后用乙醇回收 DNA。

此二种方法抽提的细菌染色体 DNA，无 RNA 和蛋白质污染，可用于限制性内切酶消化，分子再克隆等。但在下一步实验前，要测定其 DNA 的浓度，常用测定 DNA 浓度的方法，是溴化乙锭电泳法；当 DNA 样品在琼脂糖凝胶中电泳时，加入的 EB 会增强发射的荧光。而荧光的强度正比于 DNA 的含量，如将已知浓度的标准样品作电泳对照，就可估计出待样品的浓度。

### 三、材料

#### （一）菌株



大肠杆菌 C600、枯草杆菌 BR151。

(二) 仪器

电泳设备、恒温水浴锅、低速离心机、恒温振荡器、紫外检测仪。

(三) 器皿

玻璃离心管 (10 毫升)、移液管 (10 毫升、5 毫升)、微量取样器、烧杯、玻璃棒、试管、三角瓶

(四) 试剂

(1) LB 完全肉汤培养液: 1%蛋白胨 0.5%酵母粉 0.5%NaCl pH7.5。

(2) BY 培养液: 1%蛋白胨 0.5%牛肉膏 0.5%酵母粉 0.5%葡萄糖 0.5%NaCl pH7.5

(3) SET 溶液: 20%蔗糖; 50mmol/L Tris—HCl (pH7.6) 50mmol/L EDTA。

(4) 20%SDS

(5) 饱和酚

(6) 氯仿: 异戊醇 (24:1 V:V)

(7) 预冷无水酒精

(8) TE 溶液

(9) RNase 溶液

(10) 5mol/L 醋酸钾

(11) 蛋白酶 K 20mg/ml

## 四、实验步骤

1、取大肠杆菌 C600 单菌落于 5 毫升 LB 培养液中, 37℃振荡培养过夜。

2、将上述菌液 1%接种量接种于 20 毫升 LB 培养液中, 37℃摇床振荡培养过夜。

3、已培养好的菌液, 收集于 10 毫升的离心管中, 在低速离心机上 4000r/min 离心 10 分钟, 去上清, 留沉淀菌体。

4、用 5 毫升的 SET 溶液悬浮细胞, 加入 20% SDS 1 毫升, 37℃下轻摇过夜, 使细胞裂解。

5、加入等体积的饱和酚, 上下轻轻摇匀, 放置 5 分钟后, 在低速离心机上 3500r/min 离心 10 分钟。

6、取上相, 加入 1/2 体积的饱和酚, 1/2 体积的氯仿: 戊醇, 上下翻转均匀, 3500r/min 离心 10 分钟。

7、取上相, 加入等体积的氯仿: 异戊醇, 如第 6 步, 离心。

8、取上相于一干净离心管中, 另在一个 50 毫升的烧杯中加入 15 毫升预冷无水酒精, 把上述的上相液沿着玻棒慢慢倒入酒精中, 并温和地搅拌以使 DNA 附着于玻棒上。

9、挑起 DNA, 再放于干净的酒精中洗涤, 然后把 DNA 溶于 50 毫升 TE 中, 待测浓度。

(二) 枯草杆菌染色体 DNA 的抽提

1、在 BY 斜面上划线活化枯草杆菌 BR151。

2、挑一环已活化的 BR151 菌株于 20 毫升的 BY 培养液中, 37℃摇床振荡培养过夜。

3、过夜培养物, 收集 10 毫升于离心管内, 在低速离心机上 3500r/min 离心 10 分钟。

4、沉淀菌体加入 0.75 毫升溶菌酶液 (8 毫克溶菌酶/1 毫升 SET), 振荡器上悬浮细胞, 悬浮液移入 1.5 毫升离心管, 室温 30 分钟。

5、在反应液中加入 0.15 毫升 SDS 溶液, 蛋白酶 K 溶液 5 微升, 37℃水浴 10 分钟后转

入 75℃水浴 5 分钟。

6、加入 5mol/L 醋酸钾 0.3 毫升，上下翻转均匀，置于冰上 30 分钟，期间不时摇动。于台式高速离心机离 10000r/min 10 分钟。

7、上清液移入另一离心管，弃沉淀。重复第六步。

8、上清液移入 5 毫升的离心管内，缓慢加入 2 倍体积的无水酒精，DNA 呈絮状沉淀。用一灭菌牙签，挑起 DNA 沉淀，溶于 50 微升 TE 中。待检查浓度。

9、若无絮状沉，则把其置 -20℃冷冻 3 小时（或 -70℃冷冻 30 分钟），取出离心 10 分钟（10000r/min），去上清，晾干，加入 50ul TE 溶解（取 20ul 点样测定）。

（三）染色体 DNA 制备样品浓度测定

1、按实验一方法制备琼脂糖凝胶（0.6%）

2、分别取标准浓度的  $\lambda$  DNA 0.05ug、0.1ug、0.15ug、0.2ug，加相应的加样缓冲液混合好，点样。

3、取 2 微升染色体 DNA 样品点样（冷冻离心获取的 DNA 样品取 50 微升点样），打开电泳仪电泳，待溴酚兰进入凝胶 2 厘米后，停止电泳，紫外灯下观察，估计样品 DNA 浓度。

## 五、结果讨论与问题

紫外光下观察 DNA 样品纯度，计算出制备的 DNA 总量和浓度。

1、SDS 在抽提 DNA 过程有哪个作用？

2、在本实验中未加入 RNase，那么样品中应出现什么情况？

## 3. PCR 扩增分离目的 DNA 片段

### 一、目的

了解多聚合酶链反应 DNA 扩增技术的基本原理和实验应用，掌握 PCR 反应基本技术。

### 二、原理

PCR (Polymerase Chain Reaction) 即聚合酶链式反应是 1986 年由 Kallis Mullis 发现。这项技术已广泛地应用于分子生物学各个领域，它不仅可用于基因分离克隆和核酸序列分析，还可用于突变体和重组体的构建，基因表达调控的研究，基因多态性的分析，遗传病和传染病诊断，肿瘤机制探查，法医鉴定等方面。PCR 技术已成为方法学上的一次革命，它必将大大推动分子生物学各学科的研究发展。

PCR 是一种利用两种与相反链杂交并附着于靶 DNA 两侧的寡核苷酸引物经酶促合成特异的 DNA 片段的体外方法，由高温变性，低温退火和适温延伸等几步反应组成一个循环，然后反复进行，使目的 DNA 得以迅速扩增，主要过程如图 6。置待扩增 DNA 于高温下解链成为单链 DNA 模板；人工合成的两个寡核苷酸引物在低温条件下分别与目的片段两侧的两条链互补结合；DNA 聚合酶在 72℃将单核苷酸从引物 3' 端开始掺入，沿模板 5'—3' 方向延伸，合成 DNA 新链。由于每一循环所产生的 DNA 均能成为下一次循环的模板，所以 PCR 产物以指数方式增加，经 25—30 次周期之后，理论上可增加  $10^9$  倍，实际上可增加  $10^7$  倍。

PCR 技术具有操作简便、省时、灵敏度高特异性强和对原始材料质量要求低等优点，但由于所用的 TaqDNA 聚合酶缺乏 5'—3' 核酶外切酶活性，不能纠正反应中发生的错误核苷酸掺入，估计每 9000 个核苷酸会导致一个掺入错误，不过 Innis M•A 发现，错误掺入的碱基有终止链延伸的作用倾向，使得错误不会扩大。

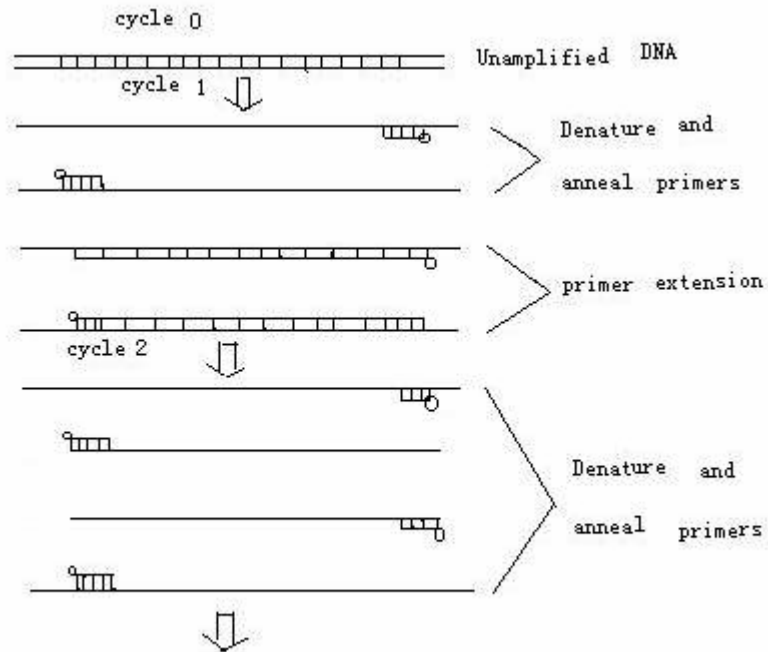


图 3-4 PCR 原理示意图

PCR 技术应用广泛，不可能有这样一套条件满足所有的实验，但本实验所介绍的方法可适应于大多数 DNA 扩增反应，即使有的不适应，至少也确定了一个共同的起点，在此基础上可以作多种变化。不过下列因素在实验应用时应予以特别注意，以求取得满意结果。

1、模板：单、双链 DNA 和 RNA 都可以作为 PCR 样品，若起始材料是 RNA，须先通过逆转录得取第一条 cDNA。虽然 PCR 可以仅用极微量的样品，但为了保证反应的特异性，一般宜用 ng 量级的克隆 DNA，ug 级的染色体 DNA，待扩增样品质量要求较低，但不能混合有任何蛋白酶、核酸酶，Taq DNA 聚合酶的抑制剂以及能结合 DNA 的蛋白质。

2、引物：引物是决定 PCR 结果的关键，下列原则有助于引物的合理设计。(1) 尽可能选择碱基随机分布，GC 含量类似于被扩增片段的引物，尽量避免具有多聚嘌呤、多聚嘧啶或其它异常序列的引物。(2) 避免具有明显二级结构（尤其是在引物 3'—末端）的序列。(3) 防止引物间的互补，特别要注意避免具有 3' 末端重叠的序列。(4) 引物的长度约为 20 个碱基，较长引物较好，但成本增加，短引物则特异性降低。(5) 引物浓度不宜偏高，过高易形成二聚体，而且扩增微量靶目标或起始材料是粗制品，容易产生非特异产物。

3、缓冲液：PCR 缓冲液的变化通常会影响到扩增结果，特别是  $MgCl_2$ ，其浓度对专一性和扩增量有重大影响，通常最适浓度为 1.5mM 左右（每种 dNTP 的浓度为 0.2mM 时），浓度过高，使反应特异性降低；浓度过低，使产物产量降低。四种 dNTP 浓度通常每种都是 0.05mM—0.2mM。过高的浓度会导致错误掺入，浓度过低，则影响反应产物的产量。四种 dNTP 浓度应大体相同，其中一种若偏高，会诱发错误掺入，降低合成速度，过早终止延伸反应。另外 dNTP 能与  $Mg^{2+}$  结合，使游离  $Mg^{2+}$  浓度降低，所以如果 dNTP 的浓度有很大改变， $MgCl_2$  浓度也要改变。Taq 聚合酶是一种耐高温聚合酶，用量通常是 1—4 单位/100ul，浓度过高，产生过多的非特异片段。

4、循环参数：PCR 循环是把起始材料加热到 90—95℃，保持短时间使双链 DNA 解链；然后冷却至 37—55℃，使引物与模板退火；再升温至 70—75℃，在 TaqDNA 聚合酶的作用下掺入单核苷酸，使引物沿模板延伸。解链不完全是导致 PCR 失败的最主要原因。用 DNA 扩增仪时，94℃ 保持 1 分钟可使模板的起始物完全变性。若用低于 94℃ 的条件，则应适当延长时间。引物与模板退火温度由引物的长度及 G+C 含量决定。适时间退火（1—2）分钟有利于产物的特异性。引物延伸在 70—75℃ 保温的时间可根据扩增 DNA 片段的长短来调节。正常情况下，每分钟可延伸 1Kb 的长度，常规 PCR 一般为 25—40 个循环，若循环加长，则由于酶活性降低，聚合时间延长，引物及单核苷酸减少等原因，反应后期容易产生错误掺入，所以在满足产物得率前提下，应尽量减少周期次数。

### 三、材料

#### （一）仪器与器皿

PCR 扩增仪（PE2400），琼脂糖凝胶电泳设备，微量取样器，一次性指形管，凝胶成像仪 玻片

#### （二）试剂与材料

##### 1. 琼脂糖凝胶电泳试剂

1) 电泳缓冲液：Tris—乙酸 0.04mol/L PH8.0

0.002mol/L EDTA

2) 加样缓冲液：0.25%溴酚兰 40% w/v 蔗糖

3) 溴化乙锭溶液：0.05mg/ml 溴化乙锭/水

4) 琼脂糖

##### 2. TaqDNA 多聚酶

##### 3. 5×反应缓冲液：

125mmol/L Tris-HCl pH8.2; 10mmol/L  $MgCl_2$ ; 0.5mg/ml gelatin;  
125mmol/L  $(NH_4)_2SO_4$ ; Formamide 25%

4. 混合 dNTP 液(dATP dGTP dTTP dCTP 各 2mmol/L)

5. DNA 模板（每 2×μl 中含有 10fg 待扩增 DNA）

6. 引物 1（25pmol/L），5' 加入 EcoRI 粘性末端碱基

7. 引物 2（25pmol/L），5' 加入 HindIII 粘性末端碱基

8. 无菌水

### 四. 实验步骤

1. 按顺序在 200 $\mu$ l 指形管中加入以下试剂与样品：（因购入的试剂批次不同，加样时有所差别，以预实验结果为准。）

- 1) ddH<sub>2</sub>O            74 $\mu$ l
- 2) 10 $\times$ Buffer        10 $\mu$ l
- 3) MgCl<sub>2</sub>            6 $\mu$ l（10 $\times$ Buffer 如已加入 MgCl<sub>2</sub>，则不必加）
- 4) dNTP            2 $\mu$ l
- 5) 引物 1            2 $\mu$ l
- 6) 引物 2            2 $\mu$ l
- 7) 模板            2 $\mu$ l
- 8) TaqDNA 聚合酶 2 $\mu$ l

总体积共 100 $\mu$ l（也可以配成 40 $\mu$ l 的反应体系）

2. 在 PCR 扩增仪上按以下反应条件编入程序：（以下为参考值，因扩增的 DNA 片段不同，各类 PCR 扩增仪程序设定各不相同，编程过程视扩增的 DNA 片段的要求及仪器而定参数，见示范。）

1. 预变性	94℃	2 分钟
2. 循环条件（30 次）		
变性	94℃	40 秒
复性	55℃	35 秒
延伸	72℃	2 分 10 秒
3. 延长延伸	72℃	7 分钟

编完反应程序，置反应管于 PCR 扩增仪的反应孔中，开动机器，扩增循环反应开始。

3. PCR 扩增完毕，配 2%琼脂糖凝胶，取 15 $\mu$ l 反应液及相适应的 PCR mark 分别点样，加样缓冲液应为 40%W/V 蔗糖，电泳观察结果。

4. 凝胶成像仪或紫外灯下观察实验结果，是否已扩增到实验设计的 DNA 片段。

## 五、结果分析

扩增片段是否存在非特异片段？

## 六、问题

1. PCR 扩增对引物有什么要求？为什么？
2. Taq 聚合酶存在掺入错误合成？
3. 改变 PCR 反应 dNTP 浓度相应改变哪一种试剂的浓度？

## 4. 载体质粒的抽提、纯化及检测

### 一、目的:

了解质粒抽提常用的方法和原理;掌握试剂盒制备质粒 DNA 的法。

### 二、原理:

(一) 质粒 DNA 制备三个步骤:

- 1、细菌培养与质粒扩增
- 2、菌体收集和溶菌
- 3、质粒 DNA 分离

(二) 方法介绍:

1、碱变性抽提法 (SDS 法): 主要是利用染色体 DNA 和质粒 DNA 碱性环境中变性和复性的差异来分离出质粒 DNA。

染色体 DNA 分子量比较大, 在碱性环境中 (高 pH) 变性, 双链解拆开, 抽提时由于机械剪切力的作用, 环状断裂成线状, 当 pH 恢复中性时, 无法恢复成环状, 就呈网状与蛋白质一起通过离心沉淀下来。

质粒 DNA 分子量小, 在碱性环境中 (高 pH), 双链解旋, 但不拆开, 当 pH 恢复中性时, 恢复成环状。由于分子量小, 所以离心沉淀时, 不下沉, 保留在上清溶液中。

缺点: SDS 破细胞很厉害, 小染色体片段和蛋白质比较多, 后处理较困难。

2、酚法: 主要是利用染色体 DNA 和质粒 DNA 在酸性环境中变性和复性的差异来分离出质粒 DNA。

染色体 DNA 分子量比较大, 在酸性环境中 (低 pH) 变性, 双链解拆开, 抽提时由于机械剪切力的作用, 环状断裂成线状, 当 pH 恢复中性时, 无法恢复成环状, 就呈网状与蛋白质一起通过离心沉淀下来。

质粒 DNA 分子量小, 在酸性环境中 (低 pH), 双链解旋, 但不拆开, 当 pH 恢复中性时, 恢复成环状。由于分子量小, 所以离心沉淀时, 不下沉, 保留在上清溶液中。

缺点: pH 值太低会降解 DNA, pH 的适度难以掌握, 稍一偏差, 全部 DNA 被降解, 什么也没抽到。现不常用。

3、溴化乙锭-氯化铯 (CsCl) 梯度离心法:

1) 不同的氯化铯浓度和不同的离心时间会成为不同的密度梯度。

2) 抽提破细胞后, 蛋白质, 染色体 DNA, 质粒 DNA, RNA 全部释放出来, 加入溴化乙锭 (EB), 通过 EB 对不同物质的插入多少而形成不同的密度梯度。EB 插入越多, 密度越小。离心后, 在离心管中从上到下 (密度由小到大) 形成的梯度区域带如下:

↓

蛋白质 (密度最小)

染色体 DNA (机械剪切力的作用断裂成线状, EB 插入较多, 密度较小)

质粒 DNA-线状 (EB 插入较多, 密度较小)

质粒 DNA-环状 (EB 插入较少, 密度较大)

质粒 DNA-超螺旋 (EB 插入少, 密度大)

RNA (单链, EB 插入最少, 密度最大)

↑

不同构象的核酸（线形、环形、超螺旋），密度和沉降速率不同，用 Cs-Cl 密度梯度离心可以将不同构象 DNA、RNA 与蛋白质区分开来

优点：此法抽提的质粒 DNA 高纯度。

缺点：1) 要求高档的超速离心机。

2) 成本高，氯化铯价格贵。

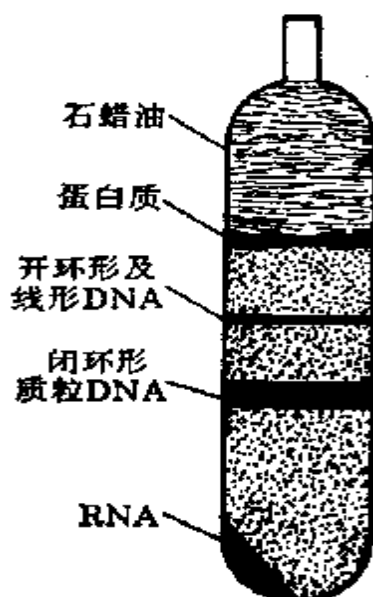


图 3-5 溴化乙锭-氯化铯 (CsCl) 梯度离心区域

#### 4. TritonX-100 抽提法：

TritonX-100 为非离子极性剂，在溶液中不形成离子，破细胞比较温和。使用该试剂是为了破细胞时不要太激烈，只形成孔状破裂，使质粒 DNA 释出（当然还有 RNA 和一些小片段的染色体 DNA 和蛋白质），而不释出大片段的染色体 DNA。当离心时染色体 DNA 的大片段与细胞膜的网状碎片附在一起，与蛋白质一起被离心沉淀，而质粒 DNA 则留在上清。所以细胞膜破裂的程度是实验的关键。

然后使用苯酚与氯仿来祛除蛋白质。用无水乙醇沉淀回收质 DNA。

优点：抽提的质粒比较纯，较好用，TritonX-100 不影响后续实验，可以大量抽提。

缺点：比试剂盒抽提时间要长。

### 三、试剂盒抽提法（本实验采用）：

#### （一）抽提原理：

人们使用碱与 SDS 裂解法从 *E. coli* 中分离制备质粒 DNA 已经有 20 多年的历史。将细菌悬浮液暴露在高 pH 值的强阴离子洗涤剂（如 NaOH 和 SDS）中，会使细胞壁破裂，染色体 DNA 和蛋白质变性，将质粒 DNA 释放到上清中。尽管碱性溶剂使碱基配对完全破坏，闭环的质粒 DNA 双链仍不会彼此分离，这因为他们在拓扑学上是相互缠绕的（超螺旋结构）。只要碱处理的强度和时间不要太过，当 pH 值恢复到中性时，DNA 双链就会再次形成。

在裂解过程中，细菌蛋白质、破裂的细胞壁和变性的染色体 DNA 会相互缠绕成大型复合物，后者被 SDS 包盖。当用钾离子取代钠离子时，这些复合物会从溶液中有效地沉淀下来。离心除去沉淀，就可以从上清中回收复性的质粒 DNA。

早在 20 世纪 50 年代，人们就已经知道，在较低 pH 值和高盐浓度环境下，DNA 能与硅胶 (Silica gel) 可逆结合。DNA 双链与硅化材料相互作用的原理普遍认为是 DNA 分子中磷酸二酯键在较低 pH 值和高盐浓度环境下脱水，使得暴露的磷酸基团吸附硅胶。双链的 DNA 分子一旦被硅胶吸附，则以天然状态或部分变性状态存在，不能用洗脱 RNA 或碳水化合物等生物大分子的溶剂（如 70% 乙醇）将其洗脱下来。但是，经过水溶性缓冲液（通常为 TE 或水）重新水化后，DNA 就能从层析柱上定量回收。

优点：快且纯。

（二）所用材料、试剂与器材：

1. 高速离心机、微量移液器、1.5ml EP 管
2. Rapid Plasmid DNA Daily Mini—prep Kit:
3. DNA—prep Tube (Silica 膜)
4. 2ml Microfuge Tube
5. Buffer S1 (葡萄糖维持渗透压、Tris—HCl 维持 pH 值、EDTA 抑制核酸酶、RNaseA1 降解 RNA)
6. Buffer S2 (NaOH 裂解细胞与核酸变性、SDS 裂解细胞与蛋白质变性)
7. Buffer S3 (乙酸钾置换钠离子、冰乙酸调节 pH 值)
8. BufferW1 (乙酸钠洗脱蛋白质、糖类等大分子杂质)
9. BufferW2 (70% 乙醇洗脱盐离子)
10. Eluent (TE pH8.5 洗脱质粒 DNA)
11. 大肠杆菌 C600 (内含 pUC18 质粒)
12. LB 完全培养基液 (1% 蛋白胨 0.5% 酵母粉 0.5% NaCl pH7.5。)

（三）操作步骤与注意事项：

1. 用接种棒取一环保存的大肠杆菌 C600 (内含 pUC18 质粒) 在 LB 完全培养基斜面上接种，活化菌株。

2. 在 5 毫升 LB 培养液中，用微量进样器加入 5 微升氨苄青霉素溶液。同时接入已活化的大肠杆菌 C600 一环，37℃ 摇床培养过夜。

3. 取 100 微升氨苄青霉素溶液于 100 毫升 LB 培养液中，然后取 1 毫升过夜培养物转接进去 (1% 接种量)，37℃ 摇床培养过夜。

4. 第二天分组用 1.5ml EP 管收集细胞：将菌液 10,000 rpm 离心 1m，弃尽上清，重复一次，将管口倒置在纸巾上，轻轻敲击，使上清流出，管壁上不应有残留上清。

5. 加入 250ul BufferS1，涡旋，充分悬浮细菌沉淀。悬浮需充分，对光观察，不应留有小的菌块，否则会影响菌体的裂解。

6. 加入 250ul BufferS2，温和但充分地上下翻转 4—6 次，此步骤不宜超过 5m。避免剧烈混合，否则将导致基因组 DNA 的污染。

7. 加入 400ul BufferS3，温和地上下翻转 10—20 次，直至沉淀由疏松状态变为相对紧密，体积明显缩小为止，室温静置 2m。12,000rpm 离心 10m。避免剧烈混合，否则将导致基因组 DNA 的污染。若离心后凝结块未沉淀到管底部，应再次翻转混合数次，12,000rpm 离心 3m。

8. 将 DNA—prep Tube 置于 2—ml Microfuge Tube 中，将步骤 4 中的上清加入 DNA—prep Tube 中，5,500rpm 离心 1m。

9. 弃滤液，将 DNA—prep Tube 置回到原 2—ml Microfuge Tube 中，加入 500ul BufferW1，



5,500rpm 离心 1m。

10. 弃滤液，将 DNA—prep Tube 置回到原 2—ml Microfuge Tube 中，加入 500ul BufferW2，5,500rpm 离心 1m。重复一次。

11. 弃滤液，将 DNA—prep Tube 置回到原 2—ml Microfuge Tube 中，12,000rpm 离心 2m，去除 Silica 膜上残余的试剂。

12. 将 DNA—prep Tube 置于一洁净的 1.5ml EP 管中，在 Silica 膜中央加 60ul Eluent，室温静置 2m，12,000rpm 离心 1m，洗脱质粒 DNA。

## 四、质粒 DNA 的琼脂糖凝胶检测

### （一）仪器

冰箱 高速离心机 琼脂糖凝胶电泳系统 凝胶成像仪或紫外检测仪

### （二）器皿

微量取样器 离心管 Eppendorf 管

### （三）试剂

（同实验一的琼脂糖凝胶电泳试剂）

### （四）实验步骤

配好琼脂糖凝胶（0.8%），取 5 微升含有质粒 DNA 的洗脱样品和 Mark 分别点样，检测质粒 DNA 的纯度和浓度。

## 五、结果分析

从电泳图谱上，观察所抽提到的质粒 DNA 的纯度和浓度。

## 六、问题

1、RNA 和染色体片段对 DNA 体外重组有何干扰？

## 5. 载体质粒 DNA 与 PCR 扩增产物的限制性核酸内切酶

### 酶切与连接

### 一、目的

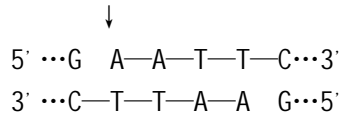
掌握 DNA 体外重组技术中限制性核酸内切酶的酶切与连接方法。了解酶解反应与连接

反应的条件及原理。

## 二、原理

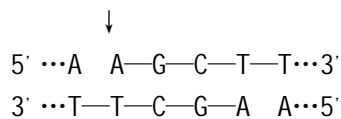
### (一) 酶切反应原理

1. 核酸限制性内切酶能够专一识别 DNA 双链上某碱基顺序，如 EcoRI 酶的识别顺序为：



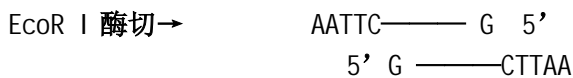
↑

Hi ndI I I 酶的识别顺序为：

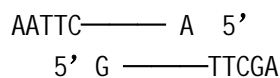


↑

若用 EcoRI 酶切只有一个切点的环状双链 DNA 分子，就能产生两个带有 AATT 碱基顺序的粘性末端的线状 DNA 分子：



若用 EcoRI 和 Hi ndI I I 同时酶切，质粒介于这两个位点之间的一个小片段就会被切除，而产生两个不同碱基顺序的粘性末端的线状 DNA 分子：



我们知道如果设计单位点酶切，质粒 DNA 与 PCR 扩增产物都会产生两个相同的粘性突出末端的线状分子，通过连接，就会产生不同方向性连接的重组质粒，也就产生了另一个问题，不同方向性的连接产生的结果一样吗？，为了避免这个问题，所以我们的实验设计了两个位点酶切，保证了连接的单向性。

2. 酶限制性内切酶作用于底物 DNA 时，受到许多要素的制约，主要有以下几个：

1) 底物 DNA 样品的纯度：在制备 DNA 样品中，由于各种条件的影响，存在着一些非 DNA 物质，这些物质有的对酶切反应影响较大，如抽提过程中，有机物质的残留成份：酚、氯仿、酒精，都会破坏酶的活性，另外未除去的蛋白质，也会干扰酶的反应，残留的染色体 DNA 则会相对降低酶对底物 DNA 的浓度。

2) 离子浓度：限制性核酸内切酶专一性需要镁离子，以作为辅基。并且要求一定的盐离子浓度，在使用上，通常把限制性核酸内切酶对盐离子的要求分为三类：高盐、中盐和低盐，它们所需的  $\text{Na}^+$  分别为 100mmol/L、50mmol/L 和 0。如果离子浓度使用不当，酶反应不完全或会使酶的识别位点发生改变，例如高盐类的 EcoRI 酶当  $\text{Na}^+$  离子浓度低于 50mmol/L 时，它的专一性就降低。只能识别中间的 4 个核苷酸序列（此活性记为 EcoRI<sup>+</sup>）

由于 EcoRI 酶切反应需要高盐缓冲液，在中盐缓冲液中反应比较慢，Hi ndI I I 酶切反应需要中盐缓冲液，实验要求 EcoRI 与 Hi ndI I I 酶同时消化 DNA 时，而酶切反应要完全，则选用了中盐缓冲液。中盐缓冲液虽然对 EcoRI 酶的效果有一些影响，但总体上还是可行的。

还有一种方法就是先用中盐缓冲液的 Hi ndI I I 酶酶切，再用高盐缓冲液的 EcoRI 酶酶

切，效果可以更好。但课堂实验受时间约束，所以选用了双酶切。

3) 底物 DNA 的量：商品限制性内切酶以酶单位计算，一个酶单位的定义是：在规定的温度和缓冲液内，于 20 微升反应液内 1 小时完全消化 1 微克 DNA 所需要的酶量。所以若是底物 DNA 的量超过酶的酶单位所规定的消化量，则反应不能完全。不过商品酶多是浓溶液，每微升含 10 单位以上，价格昂贵，所以使用时要尽量节省。

4) 酶反应温度与酶反应终止：大部分限制性核酸内切酶最适的反应温度在 37℃，极个别在 60℃，所以酶反应后要使酶的活性失活时，可把反应液置于 65℃ 内保温 10—15 分钟，以终止酶反应，但此法对个别酶（最适温度在 60℃ 的酶）不适合。

本实验因为采用双酶切，有小片段产生，为了不让小片段影响后续的连接实验，我们采用 PCR 清洁试剂盒来终止酶切反应，清除小片段。

PCR 清洁试剂盒 (V-GENE) 采用了 silica 膜选择性吸附 DNA 的原理，可从  $\leq 100 \mu\text{I}$  PCR、酶切反应、测序反应的反应液中纯化多至 8  $\mu\text{g}$  大于 100bp 的 DNA 片段，回收率为 70-90%。

原理是 Buffer PCR-A 中的高离液序列离子促使大于 100bp 的 DNA 片段选择性地吸附到 silica 膜上。经 Buffer W1、Buffer W2 洗涤去除残留在 silica 膜上的小于 50-mer 的引物、酶蛋白、单核苷酸、荧光染料或放射同位素标记的单核苷酸后，吸附到 silica 膜上的 DNA 片段经微量水或 Eluent 洗脱下来。纯化的 DNA 适用于测序、酶切、连接与转化、体外转录、微注射、基因芯片上的 DNA 分析等分子生物学实验。

5、酶反应时间：酶消化时间通常依酶的浓度，底物的浓度和纯度而定，通常是 30 分钟到 2 个小时，甚至更长些，但不能过长。因为商品酶极有可能含有杂酶，时间过久，微量的杂酶的酶反应也会积累到干扰整个酶反应的程度。

## (二) 连接反应的原理

在体外用 EcoRI 与 HindIII 两种酶切载体质粒 DNA 与 PCR 产物，均产生了两种不同的粘性末端，这些相同的粘性末端之间可以由氢键相连接，但在两个氢键相连的片段之间 5' 磷酸和 3' 羟基未能连上，仍有缺口，本实验通过 T<sub>4</sub>DNA 连接酶反应，把这些缺口以共价键连接起来，构成完整的嵌合质粒。

1. T<sub>4</sub>DNA 连接酶是由 T<sub>4</sub>噬菌体 DNA 编码的酶，可以连接双链分子中 3' 羟基和 5' 磷酸，补上其缺口。它的作用步骤如下：

1) T<sub>4</sub>DNA 连接酶与辅助因子 ATP 形成酶—AMP 复合物（腺苷酰酶）。

2) 酶—AMP 复合物再结合到具有 5' 一磷酸基和 3' 一羟基切口的 DNA 上，使 DNA 腺苷化。

3) 产生一个新的磷酸二酯键，把缺口封起来。

2. 影响 T<sub>4</sub>DNA 连接酶的主要因素有以下：

1) 连接酶的用量：

在一般情况下，酶的用量大，浓度高，反应速度快，反应连接物多，若所使的连接酶浓度太稀，要加进大量的连接酶。而商品连接酶是保存在 50% 甘油中，因此连接反应液中加入的酶量太大，则反应系统甘油含量过高，反而抑制酶的活性，影响连接效果，特别是含有杂酶的连接酶，加入量越大，影响就更大。

2) 作用时间和温度

T<sub>4</sub>DNA 连接酶的最适温度是 37℃。但是在这个温度下，粘性末端的氢键结合不稳定。EcoRI 与 HindIII 酶所产生的粘性末端，只通过四个碱基对相结合，这不足以抵抗该温度下的热运动，因此在实验操作时，DNA 分子粘性末端的连接反应，其最适温度是采取催化反应与末端粘合反应温度的折中，一般采用 12—15℃，反应时间为 1 昼夜。也可采取 4—5℃，反应时间为一个星期，同样也得到良好的效果。

3) 底物的浓度问题：

一般采用提高 DNA 的浓度来增加重组 DNA 分子的比例，DNA 浓度太稀，质粒自连比率将会上升。但是当底物浓度过高时，连接效果也很差，这可能是分子运动受到阻挠。另外载体 DNA 和外源基因的比例也要合适，否则将会降低重组分子的机率。

#### 4) 其它干扰因素：

反应液中残余微量物质也可能干扰酶反应。如 EDTA 的存在会抑制酶的活性。DNA 样品中如有蛋白质，RNA 存在，也会妨碍连接酶与 DNA 的直接作用。所以反应时，所用的器皿和试剂都应是干净的和高纯度。

### 三、材料

#### (一) 仪器

电热恒温水浴锅 琼脂糖凝胶电泳设备 凝胶成像仪或紫外检测仪 灭菌锅 分析天平 生化培养箱 冰箱

#### (二) 器皿

微量进样器 Eppendorf 管 保温瓶

#### (三) 试剂

EcoRI 与 HindIII 酶 中盐缓冲液 PCR 清洁试剂盒 T<sub>4</sub>DNA 连接酶 连接缓冲液 无菌水 pUC18 质粒样品 PCR 产物样品 琼脂糖凝胶电泳试剂（见实验一）

### 四、实验反应

#### (一) 酶切反应

##### 1. 实验步骤

1) 用微量进样器吸取下列试剂于一个已编好号码的 Eppendorf 小管内（按次序一一加样）：

- (1) 灭菌重蒸水 29 微升
- (2) 中盐微缓冲液 4 微升
- (3) pUC18 质粒 3 微升
- (4) EcoRI 与 HindIII 酶各 2 微升

总体积为 40 毫升（质粒 DNA 量为 0.4 微克左右）若浓度过高过低，可依此于无菌水一齐调整，但总体积仍保留至 40 微升）

2) 同样预备 PCR 产物酶切反应液，在编好号的塑料小管中依次加入：

- (1) 灭菌重蒸水 29 微升
- (2) 10 倍高盐缓冲液 4 微升
- (3) PCR 产物 3 微升
- (4) EcoRI 与 HindIII 酶各 2 微升

反应液总体积为 40 微升。

3) 两个塑料小管盖紧盖子，用于指轻轻弹底部溶液，混合均匀，置于高速离心机上离心 2 秒钟，使反应液甩入管底部。

4) 将上述含有反应液的两个小管，置于一塑料泡沫上，放入 37℃ 恒温水浴锅中，保温 1 小时。进行限制性核酸内切酶酶切反应。

5) 取装 pUC18 质粒的 Eppendorf 管内的反应液 15 微升，未酶切的质粒 DNA 2 微升，

依实验一方法，进行琼脂糖凝胶电泳，观察酶切反应结果。PCR 产物的酶切只是为了保证粘性末端的清洁，电泳图谱看不出变化，所以可以不用电泳。

6) 在琼脂糖凝胶电泳期间，仍将两个 Eppendorf 管置于 37℃ 水浴，直至电泳完。

7) 待琼脂糖凝胶电泳出带后，在紫外线分析仪上观察，若酶切已经完全。两管均用 PCR 清洁试剂盒终止酶反应，去掉小片段。

8) 在 PCR 和酶切反应液中，分别加入 3 体积的 Buffer PCR-A，若需加的 Buffer PCR-A 不足 100  $\mu$ l，则加入 100  $\mu$ l Buffer PCR-A。

9) 将 DNA-prep Tube 置于 2-ml Microfuge Tube 中，将步骤 1 中的混合液移入 DNA-prep Tube 中，2500 $\times$ g (或 5500rpm) 离心 1min (选择性吸附)。

10) 弃滤液，将 DNA-prep Tube 置回到原 2ml Microfuge Tube 中，加入 500  $\mu$ l Buffer W1，2500 $\times$ g (或 5500rpm) 离心 1min (去蛋白)。

11) 弃滤液，将 DNA-prep Tube 置回到原 2ml Microfuge Tube 中，加入 700  $\mu$ l Buffer W2，2500 $\times$ g (或 5500rpm) 离心 1min，以同样的方法再用 700  $\mu$ l Buffer W2 洗涤一次 (去离子)。

12) 将 DNA-prep Tube 置于 1.5ml 离心管中，12000 $\times$ g 离心 1 分钟。

13) 将 DNA-prep Tube 置于另一洁净的 1.5ml 离心管中，在 silica 膜中央加入 25-30  $\mu$ l Eluent 或去离子水，室温静置 1 分钟。12000 $\times$ g 离心 1 分钟洗脱 DNA。

## 2. 酶切结果分析

观察紫外分析仪上或凝胶成像仪上的酶切图谱，讨论酶反应结果。

## 3. 问题

1) 若只是为了分析 DNA 的酶切图谱，其样品是含有 RNA 的质粒 DNA 样品能否进行限制性内切酶反应？

2) 有一 DNA 样品难以酶消化，延长保温时间以利于消化，那么保温过夜是否有利？

3) 若是酶切紫外图谱如下，试分析酶切反应。

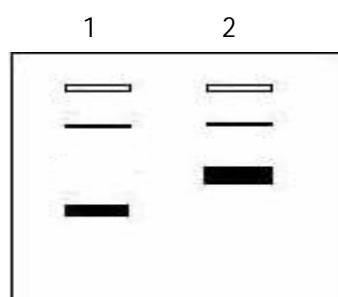


图 3—6 酶切图谱分析  
(1 号为未酶切的质粒 DNA，  
2 号为已酶切的质粒 DNA)

## (二) 连接反应

### 1. 实验步骤

1) 用微量进样器吸取用 PCR 清洁试剂盒终止酶反应的酶切反应液及试剂，混合于一个已编好号码的 Eppendorf 小管内，连接反应加样量及顺序：

(1) pUC18 质粒酶切反应液 15 微升

(2) PCR 产物酶切反应液 15 微升

(3) 10 倍 T4 连接缓冲液 4 微升

(4) 4 微升灭菌双蒸水

(5) T4DNA 连接酶 2 微升，反应液总体积为 40 毫升。

2) 将硅化小管置于台式离心机上离心 2 秒钟, 使管壁上的试剂全部甩向底部, 混合好。  
3) 在保温瓶内先装上自来水, 用冰调好 12℃, 然后将有反应液的硅化小管置于保温瓶内过夜, 也可将保温瓶置于普通冰箱冷藏室数天直至下一步反应所用。

4) 在保温反应期间, 应不时检查保温瓶内水温度, 不使它超出 15℃。

## 2. 问题

1) 若将连接反应后的反应液置于琼脂糖凝胶上进行电泳, 你能否预计它的 DNA 区带图谱将会怎样?

2) T<sub>4</sub>DNA 连接酶的最适温度和 T<sub>4</sub>连接反应的最适温度是否一样?

1) 在本实验中, 反应时多加载体 DNA 或多加目的基因, 对重组分子的生成有什么影响?

2)

## 五、附录：酶反应操作时注意事项：

1、基因工程操作是微量操作, 试剂昂贵, 要细心, 准确地配制所用的试剂。DNA 样品和酶用量体积都很少, 要注意吸样量的准确性, 酶用量不能过多, 因酶通常保存在一定浓度的甘油内, 酶用量取得过多, 甘油浓度加大反而抑制酶的反应, 通常不应超过 1/10 酶反应总体积。

2、当塑料小管在一定温度下水浴进行酶反应时, 盖子必须盖得严密, 防止水气出入, 影响总体积。

3、酶反应的一切器皿, 都要以重蒸水清洗, 消毒灭菌, 严防其它酶的污染。

4、要注意酶反应时, 加样顺序, 最后加酶液, 混匀, 操作过程中, 一旦吸取好酶溶液, 酶应立即放回-20℃冰箱中, 防止酶失活。

## 6. 大肠杆菌感受态细胞的制备与重组质粒转化

### 一、目的

1. 了解感受态细胞生理特性及制备条件, 掌握大肠杆菌感受态细胞制备方法。

2. 掌握质粒 DNA 转化大肠杆菌的方法, 了解转化的条件和利用半乳糖苷酶基因插入失活选择重组质粒 DNA 的原理。

### 二、原理

#### (一) 大肠杆菌感受态细胞制备的原理

所谓感受态, 是指细菌生长过程中的某一阶段的培养物, 只有某一生长阶段中的细菌才能作为转化的受体, 能接受外源 DNA 而不将其降解的生理状态。感受态形成后, 细胞生理状态会发生改变, 出现各种蛋白质和酶, 负责供体 DNA 的结合和加工等。细胞表面正电荷增加, 通透性增加, 形成能接受外来的 DNA 分子的受体位点等。

本实验为了把外源 DNA (重组质粒) 引入大肠杆菌, 就必须先制备能吸收外来 DNA 分子的感受态细胞。在细菌中, 能发生感受态细胞是占极少数。而且, 细菌的感受态是在短暂时间内发生。

目前对感受态细胞能接受外来 DNA 分子的本质看法不一。主要有两种假说:

1、局部原生质体化假说——细胞表面的细胞壁结构发生变化,即局部失去细胞壁或局部溶解细胞壁,使 DNA 分子能通过质膜进细胞。证据有:(1)发芽的芽孢杆菌容易转化;(2)大肠杆菌的原生质体不能被噬菌体感染,却能受噬菌体 DNA 转化;(3)适量的溶菌酶能提高转化率。

2、酶受体假说——感受态细胞的表面形成一种能接受 DNA 的酶位点,使 DNA 分子能进入细胞。证据是:(1)蛋白质合成的抑制剂如氯霉素,可以抑制转化作用;(2)细胞分裂过程中,一直有局部原生质化,但感受态只在生长对数期的中早期出现;(3)分离到感受态因子,能使非感受态细胞转变为感受细胞。

目前对感受态细胞的转化理论尚未有统一结论,但是许多实验室一直进行探索,试图从实验中获得明确回答。有人根据 pBR322 质粒 DNA 对 *E. coli* K—12X1776 菌株的转化结果,认为:(1)大肠杆菌受体菌培养时间为 OD<sub>550</sub>=0.2—0.3 ( $5-6 \times 10^7$  细胞/毫升)最好;(2)菌体用预冷的  $\text{CaCl}_2$  洗涤二次,效果较好;(3)100mmol/L  $\text{CaCl}_2$  处理可获得最高转化率;(4)菌体在 pH 为 6.0 的溶液悬浮时最为适宜。(5)经  $\text{CaCl}_2$  处理过的细胞对表面活性剂非常敏感,所用的玻璃离心管等用具必须严格清洗。

近来,在许多研究室都发现  $\text{CaCl}_2$  对受体菌处理,可提高转化效率几十倍,通常把细胞悬浮在 pH6.0 的 100mmol/L  $\text{CaCl}_2$  中,在冰浴条件下,放置过夜,转化率转高,但一过 24 小时,转化率测恢复为原来的水平。

## (二) 重组 DNA 的转化原理

我们已经制备好大肠杆菌感受态细胞,接下的实验是把重组的 DNA 引入受体细胞,使受体菌具有新的遗传特性,并从中选出转化子。

作为受体的大肠杆菌 C600 或 DH5 $\alpha$ ,必须不同外来 DNA 分子发生遗传重组,通常是 rec 基因缺陷型的突变体,同时它们必须是限制系统缺陷或限制与修饰系统均缺陷的菌株。这样外来的 DNA 分子不会受其限制酶的降解。保持外来 DNA 分子在受体细胞中的稳定性。制备的大肠杆菌细胞就具有这三种缺陷 ( $r_k^- m_k^- rec^-$ ) 同时此受体细胞还是氨苄青霉素敏感 (Ap)。在体外构建好的重组分子上具有分解氨苄青霉素 (Ap) 基因存在,当它导入受体细胞后,就赋予这些受体细胞新的特性,即 Ap 抗性。同时载体质粒上具有乳糖操纵的  $\beta$  一半乳糖苷酶基因 (lacZ),我们可以利用外源基因插入载体  $\beta$  一半乳糖苷酶基因 (lacZ),使其失去  $\beta$  一半乳糖苷酶活性的原理来选择新构建的重组子。

因 pUC18 带有 Amp<sup>r</sup> 基因而外源片段上不带该基因,故转化受体菌后只有带有 pUC18 DNA 的转化子才能在含有 Amp 的 LB 平板上存活下来;而只带有自身环化的外源片段的转化子则不能存活。此为初步的抗性筛选。

pUC18 上带有  $\beta$ -半乳糖苷酶基因 (lacZ) 的调控序列和  $\beta$ -半乳糖苷酶 N 端 146 个氨基酸的编码序列。这个编码区中插入了一个多克隆位点,但并没有破坏 lacZ 的阅读框架,不影响其正常功能。*E. coli* DH5 $\alpha$  菌株带有  $\beta$ -半乳糖苷酶 C 端部分序列的编码信息。在各自独立的情况下, pUC18 和 DH5 $\alpha$  编码的  $\beta$ -半乳糖苷酶的片段都没有酶活性。但在 pUC18 和 DH5 $\alpha$  融为一体时可形成具有酶活性的蛋白质。这种 lacZ 基因上缺失近操纵基因区段的突变体与带有完整的近操纵基因区段的  $\beta$ -半乳糖苷酶阴性突变体之间实现互补的现象叫  $\alpha$ -互补。由  $\alpha$ -互补产生的 Lac<sup>+</sup> 细菌较易识别,它在生色底物 X-gal (5-溴-4 氯-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷) 存在下被 IPTG (异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷) 诱导形成蓝色菌落。当外源片段 TGF  $\beta$  I 插入到 pUC18 质粒的多克隆位点上后会导致读码框架改变,表达蛋白失活,产生的氨基酸片段失去  $\alpha$ -互补能力,因此在同样条件下含重组质粒的转化子在生色诱导培养基上只能形成白色菌落。由此可将重组质粒与自身环化的载体 DNA 分开。此为  $\alpha$ -互补现象筛选。

本实验是把外来重组分子和感受态细胞在低温下混合,使其进入受体细胞。DNA 分子转

化的原理较复杂：1、吸附——完整的双链 DNA 分子吸附在受体菌表面。2、转入——双链 DNA 分子解链，单链 DNA 分子进入受体菌，另一链降解。3、自稳——外源质粒 DNA 分子在细胞内又复制成双链环状 DNA。4、表达——供体基因随同复制子同时复制，并被转录和翻译。

对 DNA 分子来说，能被转化进受体细胞的比率极低，通常只占 DNA 分子的 0.01%，改变条件，提高转化率是有可能的，一些研究表明下列因素可以提高转化率：（1）受体菌细胞与 DNA 分子两者比例在  $1.6 \times 10^8$  细胞：1 毫微克 DNA 分子（4.3Kb）左右转化率较好；（2）DNA 分子与细胞混合时间为 1 小时最佳；（3）铺平板条件会影响转化率；（4）对不同转化菌株热处理（效应不一致）。

除上述因素外，转化试验还注意如下问题：

1、连接 DNA 反应液与受体细胞混合时，一定保持在冰浴条件下操作，如果温度时高时低，转化效率将极差。

2、热处理 2 分钟后，要迅速加进 1 毫升 LB 以使表型表达，延迟加 LB，将使转化率迅速降低。

3、在平板上涂布细菌时。注意避免反复来回涂布，因为感受态细菌的细胞壁有了变化，过多的机械压涂布将会使细胞破裂。影响转化率。

### 三、材料

#### （一）仪器与器皿

恒温振荡器 分光光度计 电动沉淀离心机 旋涡混合器 恒温培养箱隔 电热恒温水浴锅 恒温摇床 普通冰箱 Eppendorf 管 转液管 平皿 涂布棒 微量取样器 微波炉 三角烧瓶 试管 刻度离心管 保温瓶 酒精灯等

#### （二）菌种

大肠杆菌 C600 或 DH5  $\alpha$  (rk<sup>-</sup> rec<sup>-</sup> mk<sup>-</sup>)

#### （三）培养基与试剂

1. LB 液体培养基（1%蛋白胨 0.5%酵母粉 0.5%NaCl pH7.5。）

2. 100mmol / L  $\text{CaCl}_2$

3. 氨苄青霉素溶液（50 毫克/毫升）

4. DNA 连接反应液

5. X-gal 储液(20mg/ml)：用二甲基甲酰胺溶解 X-gal 配制成 20mg/ml 的储液，包以铝箔或黑纸以防止受光照被破坏，储存于-20℃。

6. IPTG 储液(200mg/ml)：在 800  $\mu$ l 蒸馏水中溶解 200mg IPTG 后，用蒸馏水定容至 1ml，用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌，分装于 eppendorf 管并储于-20℃。

7. 含 Amp 的 LB 固体培养基：将配好的 LB 固体培养基高压灭菌后冷却至 60℃左右，加入 Amp 储存液，使终浓度为 50ug/ml，摇匀后铺板。

8. 含 X-gal 和 IPTG 的筛选培养基：在事先制备好的含 50  $\mu$ g/ml Amp 的 LB 平板表面加 40ml X-gal 储液和 4  $\mu$ l IPTG 储液，用无菌玻棒将溶液涂匀，置于 37℃下放置 3-4 小时，使培养基表面的液体完全被吸收，备用。

### 四、实验步骤

#### （一）大肠杆菌感受态细胞制备



- 1、将受体大肠杆菌接种于 LB 斜面上活化，置于恒温培养箱中 37℃ 培养过夜。
- 2、取一环上述大肠杆菌培养物菌落接种于 3 毫升 LB 试管中，于恒温振荡器上，37℃ 振荡培养过夜（约 16 小时），必要时在显微镜下镜检菌细胞是否形态一致，有无杂菌污染。
- 3、用移液管无菌条件下，取过夜培养液 1 毫升，接种于新鲜的 LB 中（100 毫升 LB/250 毫升三角瓶，接种量按菌液浓度而定，一般在 1% 左右），于恒温振荡器上 37℃ 培养 2—3 小时。
- 4、取 1 毫升培养液以未接种的 LB 作空白对照，在 751 分光光度计上测 OD<sub>550</sub> 的光密度值，约为 0.2—0.5 左右。
- 5、无菌条件下将上述 1 毫升菌液倒入 1.5 毫升 EP 离心管中（离心管应带盖并高压灭菌过），每组 2 支。
- 6、带菌液的离心管置于冰上 10 分钟，冷却菌液，平衡好，置于台式低速离心机上，3500r/min 离心 5 分钟。
- 7、无菌条件下，倒去上清 LB，倒斜离心管，让 LB 流干，留下沉淀菌体，加入预冷的 100mmol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液 600 微升，用微量取样器轻轻吸冲底部沉淀菌体，使其悬浮后，把 2 支管转为 1 支，摇匀后于冰浴中放置 30 分钟。
- 8、重新将 CaCl<sub>2</sub> 菌悬浮液置于台式低速离心机上，3500r/min 离心 10 分钟，小心侧倒掉上清 CaCl<sub>2</sub>，留沉淀菌体。
- 9、再把菌体悬浮在 200 微升 100mmol/L CaCl<sub>2</sub> 的溶液中，置于冰上作为转化的受体菌液。此制备的感受态细胞应在此步后 1 小时至 24 小时内使用，效率比较高。
- 10、在事先制备好的含 50 μg/ml Amp 的 LB 平板表面加 40ml X-gal 储液和 4 μl IPTG 储液，用无菌玻棒将溶液涂匀，置于 37℃ 下放置 3-4 小时，使培养基表面的液体完全被吸收，备用。

## （二）重组 DNA 转化

1. 取 0.2ml 大肠杆菌感受态细胞，在无菌条件下，加入到连接液的 Eppendorf 管，混匀，置冰浴中 30 分钟。
  2. 冰浴后，将正在转化反应的细胞悬浮液加入已调好 42℃ 的恒温水浴槽内，保温 2 分钟。
  3. 热冲击处理后的细胞易死亡，应迅速倒入 LB 培养液 1 毫升，（无抗菌素 LB 液，有助于基因表达）马上置 37℃ 水浴 1 小时，每 10 分钟翻转 1 次。
  4. 用移液器取 0.1 毫升的转化菌液直接涂布含 50 μg/ml Amp、40ml X-gal 储液和 4 μl IPTG 储液 LB 固体平皿上，共涂布三个培养皿。
  5. 用移液器取未经转化的受体大肠杆菌感受态菌液 0.1 毫升直接涂布于含 50 μg/ml Amp、40ml X-gal 储液和 4 μl IPTG 储液 LB 固体平皿上，作为受体菌对照。
  6. 将第 14、15 步涂布培养皿先放室温 15 分钟左右，使涂布上的菌液干燥不会流动。然后倒置放于恒温箱中 37℃ 培养过夜。
  7. 第二天取出培养皿，观察对照平皿和转化平皿菌落情况。
- 对照平皿因受体菌对 Amp 敏感，故不能在含 Amp 的培养基上生长。
- 转化平皿是否有兰色和白色菌落生成？如果长出兰色菌落，说明自连的载体 pUC18 质粒已转入受体菌，但目的基因没有接入载体。如果长出白色菌落，说明目的基因已接入载体，重组质粒的转化子因此丧失了 β-半乳糖苷酶活性，在 x-gal 和 IPTG 存在的生色诱导培养基上只能形成白色菌落。

## 五、结果和讨论

比较对照平皿和转化平皿，讨论转化成败原因。

## 六、问题

1. 氯化钙处理后的细胞为何始终保持在低温下？
2. 制备感受态细胞的关键是什么？
3. 作为基因工程受体菌，要具有哪些特点？
4. 在含有 X-gal 和 IPTG 的筛选培养基上，为什么会长出蓝色菌落，和白色菌落？

## 7. 重组子的筛选、重组质粒的抽提、鉴定与凝胶成像技术

### 一、目的

鉴定载体与目的基因是否已经成功连接成新的重组质粒。

### 二、原理

载体 pUC18 具有一个 EcoRI 和 HindIII 的单酶切位点，含氨苄青霉素抗性基因。目的基因设计时分别在上、下游引物中加入了 EcoRI 和 HindIII 单酶切位点，两者双酶切后，经连接酶连接，连接成功就形成了新的重组质粒。

在含 50  $\mu$ g/ml Amp、40ml X-gal 储液和 4  $\mu$ l IPTG 储液 LB 固体平皿上，转化平皿长出白色菌落，说明目的基因已成功插入 pUC18 载体的 LacZ 基因中，重组质粒的转化子由于丧失了  $\beta$ -半乳糖苷酶活性，在 x-gal 和 IPTG 存在的生色诱导培养基上只能形成白色菌落。

所以在含 x-gal 和 IPTG 的选择性培养基上长出的白色菌落，初步可以认为是重组转化子。为了防止假阳性的出现，需要通过重组子质粒的抽提，经 EcoRI 和 HindIII 双酶切，凝胶电泳进一步鉴定，看是否酶切为原来的载体 pUC18 质粒和 PCR 产物的分子量图谱。如果是，则认为新构建的质粒已重组成功。当然最好的鉴定方法是通过测序来确认。

### 三、材料、试剂与器材

1. 高速离心机、微量移液器、1.5ml EP 管
2. Rapid Plasmid DNA Daily Mini-prep Kit:
3. DNA-prep Tube (Silica 膜)
4. 2ml Microfuge Tube
5. Buffer S1 (葡萄糖维持渗透压、Tris-HCl 维持 pH 值、EDTA 抑制核酸酶、RNaseA1 降解 RNA)
6. Buffer S2 (NaOH 裂解细胞与核酸变性、SDS 裂解细胞与蛋白质变性)
7. Buffer S3 (乙酸钾置换钠离子、冰乙酸调节 pH 值)
8. BufferW1 (乙酸钠洗脱蛋白质、糖类等大分子杂质)

9. BufferW2 (70%乙醇洗脱盐离子)
10. Eluent (TE pH8.5 洗脱质粒 DNA)
11. 在 Amp、x-gal 和 ITPG 生色诱导培养基上长出的白色菌落。
12. LB 完全培养基液 (1%蛋白胨 0.5%酵母粉 0.5%NaCl pH7.5。)

## 四、实验步骤

### (一) 重组质粒制备

1. 在 5 毫升 LB 培养液中, 用微量进样器加入 5 微升氨苄青霉素溶液。同时挑选一个在 x-gal 和 ITPG 存在的生色诱导培养基上长出的白色单菌落, 37℃ 摇床培养过夜。
2. 第二天分组用 1.5ml EP 管收集细胞: 将菌液 10,000 rpm 离心 1m, 弃尽上清, 重复一次, 将管口倒置在纸巾上, 轻轻敲击, 使上清流出, 管壁上不应有残留上清。
3. 加入 250ul BufferS1, 涡旋, 充分悬浮细菌沉淀。悬浮需充分, 对光观察, 不应留有小的菌块, 否则会影响菌体的裂解。
4. 加入 250ul BufferS2, 温和但充分地上下翻转 4—6 次, 此步骤不宜超过 5m。避免剧烈混合, 否则将导致基因组 DNA 的污染。
5. 加入 400ul BufferS3, 温和地上下翻转 10—20 次, 直至沉淀由疏松状态变为相对紧密, 体积明显缩小为止, 室温静置 2m。12,000rpm 离心 10m。避免剧烈混合, 否则将导致基因组 DNA 的污染。若离心后凝结块未沉淀到管底部, 应再次翻转混合数次, 12,000rpm 离心 3m。
6. 将 DNA—prep Tube 置于 2—ml Microfuge Tube 中, 将步骤 4 中的上清加入 DNA—prep Tube 中, 5,500rpm 离心 1m。
7. 弃滤液, 将 DNA—prep Tube 置回到原 2—ml Microfuge Tube 中, 加入 500ul BufferW1, 5,500rpm 离心 1m。
8. 弃滤液, 将 DNA—prep Tube 置回到原 2—ml Microfuge Tube 中, 加入 500ul BufferW2, 5,500rpm 离心 1m。重复一次。
9. 弃滤液, 将 DNA—prep Tube 置回到原 2—ml Microfuge Tube 中, 12,000rpm 离心 2m, 去除 Silica 膜上残余的试剂。
10. 将 DNA—prep Tube 置于一洁净的 1.5ml EP 管中, 在 Silica 膜中央加 60ul Eluent, 室温静置 2m, 12,000rpm 离心 1m, 洗脱质粒 DNA。

### (二) 重组质粒的酶切与检测

1. 用微量进样器吸取下列试剂于一个已编好号码的 Eppendorf 小管内 (按次序一一加样):
  - (1) 灭菌重蒸水 29 微升
  - (2) 中盐微缓冲液 4 微升
  - (3) 重组质粒 3 微升
  - (4) EcoRI 与 HindIII 酶各 2 微升反应液总体积为 40 微升。
2. 把塑料小管盖紧盖子, 用手指轻轻弹底部溶液, 混合均匀, 置于高速离心机上离心 2 秒钟, 使反应液甩入管底部。
3. 将上述含有反应液的小管, 置于一塑料泡沫上, 放入 37℃ 恒温水浴锅中, 保温 1 小时。进行限制性核酸内切酶酶切反应。
4. 取装重组质粒的 Eppendorf 管内的酶切反应液 15 微升, 未酶切的重组质粒 DNA 2 微升, 相应 Mark 2 微升, 分别进行点样, 依实验一方法, 进行琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成

像仪上拍下结果，观察酶切反应结果。

6. 讲解及示范凝胶成像仪的使用。

7.

## 五、酶切结果分析

观察凝胶成像仪上的酶切图谱，讨论重组质粒是否已酶切为原来的载体 pUC18 质粒和 PCR 产物的分子量图谱，新构建的质粒是否已重组成功。

## 六、问题

如果挑取含 Apm、x-gal 和 IPTG 存在的生色诱导培养基上长出的白色单菌落，抽提出的质粒，经过酶切鉴定后，没有出现重组成功的预期目标，请分析问题可能出现在哪几方面？

## 参考文献

[1]彭秀玲等，基因工程实验技术，湖南科学技术出版社，1987 年第一版，1997 年第二版

[2]邹福强等，基因工程操作技术，广东科技出版社，1987，7 年第一版

[3]分子克隆实验指南（第三版），科学出版社，2002，8 第一版，2003，1 第二次印刷，[美]J. 萨姆布鲁克等著，黄培堂等译

[4]精编分子生物学实验指南，科学出版社，1998，6 第一版，1999，10 第二次印刷，[美]F 奥斯伯等著，颜子颖，王海林译

（周天鸿、李月琴编写）

# A 遗传·基因工程部分

## 实验四 功能基因实验技术

### 前言

#### ——基因克隆策略与引物设计

### 1 功能基因克隆的基本策略

① 根据已知的脊椎动物某一特定基因的氨基酸序列的保守区域设计简并引物，利用 RT-PCR 技术获得该基因的核心片断，将该片断分离纯化后与 T 载体连接，转化大肠杆菌，挑取白色菌落，经 PCR 反应鉴定得到阳性克隆，送阳性克隆的 PCR 产物去测序，从而获得目的基因的 cDNA 核心片断的序列。

② 利用 3'-RACE 和 5'-RACE 技术扩增 cDNA 的 3'末端和 5'末端，将 cDNA 核心片断、3'末端和 5'末端进行序列拼接，从而获得全长 cDNA 序列。

③ 通过基因组 PCR 获得内含子 DNA 序列，通过基因组步移技术进一步克隆该基因的 5'侧翼序列（含启动子及其它顺式调控）和 3'侧翼序列，从而获得该基因的基因组 DNA 全序列。

### 2 引物设计基本原则

细心地进行引物设计是 PCR 中最重要的一步。理想的引物只跟目的序列两侧的单一序列而非其他序列退火。设计糟糕的引物可能会扩增出其他非目的序列。下面的指导描述了一个可以增加特异性引物所具有的令人满意的特点：

① 典型的引物长 18-24bp。引物足够长，保证序列特异性，并降低序列存在于非目的序列位点的可能性。但是长度大于 24bp 的引物并不意味着更高的特异性。较长的序列可能会与错误配对序列杂交，降低特异性，而且比短序列杂交慢，从而降低了产量。

② 选择 GC 含量为 40%-60%。高 GC 含量导致形成稳定的不正确的配对，而高 AT 含量降低正确配对的 T<sub>m</sub> 值。

③ 设计 5'端和中间区为 G 或 C 的引物。这会增加引物的稳定性和引物同目的序列杂交的稳定性。

④ 避免多碱基序列（如 poly dG）或者重复结构域的延伸——它们能够在模板上进行不正确的配对。

⑤ 避免在 PCR 反应中使用与其它引物互补的序列，以阻止引物之间的配对，形成引物二聚体，抑制扩增。

⑥ 在引物 5'末端加入限制性酶切位点序列时，一定要包含几个额外的碱基（2-6 碱基）作为固定，以防止 5'末端在消化时的移动。

### 第一部分 功能基因 cDNA 核心片断的克隆

# 1. 肝脏细胞 RNA 的提取

## 一. 原理

RNA提取技术不仅是分子生物学技术的重要组成部分，也是功能基因组学科研技术的重要基础。从RNA水平研究生物体内基因的调控机制，已成为分子生物学研究的一个重要手段。对某一生物或组织进行性状研究，首先要获得该性状基因，从组织细胞中分离完整的RNA对于分子克隆和基因表达分析等实验是至关重要的，如Northern印迹及杂交分析、cDNA合成等实验的成效在很大程度上取决于RNA的质量。利用提取的RNA人们可以对特定的基因表达进行定量的检测，从分子水平精确的了解细胞生命活动的规律。

通常一个典型的哺乳动物细胞约含有 $10^{-5}\mu\text{gRNA}$ ，其中80%~85%为rRNA（主要是28S、18S和5.8S、5S四种类型）；10%~15%为tRNA和核内小分子RNA。这些高峰度的RNA的大小和序列确定，可通过凝胶电泳、密度梯度离心、阴离子交换层析和高压液相层析（HPLC）分离。相反，占RNA总量1%~5%的为mRNA。mRNA虽然大小和核苷酸序列各不相同，从数百至数千碱基不等，但大多数真核细胞mRNA在其3'端均有一寡聚腺苷酸(polyA)组成的尾，其长度一般足以吸附于寡聚脱氧胸苷酸—纤维素[oligo(dT)]，使得mRNA可以利用亲和层析法分离。这个群体编码了所有由该细胞合成的多肽。

研究表明RNA极不稳定，易于降解，而RNA酶几乎无处不在，且特别稳定，故在提取RNA时关键因素是最大程度的避免外源RNA酶的污染和抑制内源RNA酶的活力，因此，创造一个无RNA酶的环境，严格防止RNA酶污染是成功提取RNA的关键。

对内源性RNA酶，主要运用RNA酶抑制剂，目前常用的RNA酶抑制剂有：①RNA酶的蛋白质抑制剂(RNasin)，它是从人胎盘分离的一种蛋白质，可以与多种RNA酶紧密结合形成非共价结合的复合物，使RNA酶失活。RNA酶的蛋白质抑制剂制品经数次冻融后或放在氧化条件下应弃之不用。RNA酶的蛋白质抑制剂不干扰反转录或mRNA在无细胞体系中的翻译；②氧钒核糖核苷复合物，它是由氧钒离子和4种核糖核苷之中的任意一种所形成的复合物，是一种过渡态似物，它能与多种RNA酶结合并高效抑制RNA酶活性。然而氧钒核糖核苷复合物能强烈抑制mRNA在无细胞体系中的翻译，因此必须用含0.1%羟基喹啉的苯酚多次抽提以除之；③硅藻土，硅藻土能吸附RNA酶，并且在后续的RNA纯化过程中经离心除去；④异硫氰酸胍，它是强力的蛋白质变性剂，在破坏细胞结构使核酸从细胞核中解离出来的同时也使RNA酶变性失活；⑤焦碳酸二乙酯(DEPC)，它是RNA酶强烈抑制剂，但其作用并不是绝对的。DEPC主要用于不能高压灭菌的材料和器皿的RNA酶处理；⑥其它化学试剂，如SDS、尿素等对RNA酶也有一定的抑制作用。

对外源性RNA酶主要通过以下几个途径污染RNA制品：①玻璃制品、塑料制品和电泳槽；②研究人员造成的污染；③污染的溶液。因此在实验中必须采取下列措施抑制外源性RNA酶：①实验室用的普通玻璃制品和塑料制品经常有RNA酶污染，使用前必须于180℃干烤3h以上(玻璃制品)或用氯仿冲洗(塑料制品)。另一种方法是用0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)的水溶液浸泡玻璃制品和其它用品2h，然后用灭菌水淋洗数次，并于100℃干烤15min。RNA电泳槽需用去污剂洗涤，用水冲洗，乙醇干燥，再浸泡于3% $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液10min，然后用0.1%DEPC水彻底冲洗电泳槽。灭菌的一次性使用的塑料制品基本上无RNA酶，可以不需要处理；②在RNA提取过程中，应戴一次性手套，对接触可能污染的器皿时，应勤换手套；③配制的溶液应尽可能用0.1%DEPC水在37℃处理12h以上，然后高压灭菌除去残留的DEPC。对不能高压灭菌的试剂，用经DEPC水配制处理过的无菌蒸馏水配制，然后用0.22 $\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌。

真核细胞总RNA制备方法有多种，包括异硫氰酸胍—氯化铯超速离心法、盐酸胍—有

机溶剂法、氯化锂—尿素法以及热酚法、异硫氰酸胍法—酚—氯仿一步法以及TRIzol试剂提取法等。目前实验室提取总RNA的常用方法为异硫氰酸胍法—酚—氯仿一步法和TRIzol试剂提取法。异硫氰酸胍法制备真核细胞总RNA，是将已知最强的RNase酶抑制剂异硫氰酸胍、 $\beta$ -巯基乙醇和去污剂N-十二烷基肌氨酸钠联合使用，抑制了RNA的降解，增强了核蛋白复合物的解离，使RNA和蛋白质分离并进入溶液，RNA选择性地进入无DNA和蛋白质的水相，容易被异丙醇沉淀浓缩。

## 二. 材料与amp;方法

### 1 材料

实验鱼，购于市场。

### 2 仪器、用具

台式离心机、恒温水浴锅（70℃）、分析天平、移液器、一次性注射器、方盘、镊子、手术剪、培养皿、1.5ml离心管

### 3 试剂

95%的RNase-free乙醇；0.1%DEPC处理水；SV RNA Lysis Buffer；SV RNA Dilution Buffer；SV RNA Wash Solution；Yellow core Buffer；MnCl<sub>2</sub>，0.09M；DNase I；SV DNase Stop Solution；Nuclease-Free Water

### 4 方法

#### 1) 材料的准备

- (1) 将培养皿、剪刀、眼科镊灭菌，-20℃预冷。
- (2) 用泡沫盒盛装碎冰，将培养皿置于冰上，将剪刀、镊子置于培养皿中。
- (3) 用桶盛装碎冰，加入少量的自来水，用纱布包裹鱼放入桶中。
- (4) 将已麻痹的鱼置于方盘中，用剪于肛门向前及斜向上将腹腔剪开，取出内脏，分离肝脏置于培养皿中。
- (5) 取1.5ml的离心管于分析天平上，调零。
- (6) 用镊子取20-30mg的肝脏组织于1.5ml的离心管中，称重。

#### 2) 实验操作

- (1) 取约30mg组织于1.5ml离心管中，加入175 $\mu$ l SV RNA Lysis Buffer，用一次性注射器将组织压碎、反复抽打混匀。
- (2) 加350 $\mu$ l SV RNA Dilution Buffer（蓝色），翻转管子3-4次混匀，置70℃水浴3min。
- (3) 冰上冷却1-2秒，14000rpm离心10min，上清液移入一新离心管。
- (4) 加入200 $\mu$ l 95%的乙醇，枪头混匀。
- (5) 将上述混合液移入Spin Basket Assembly，14000rpm离心1min，弃滤液。
- (6) 加入600 $\mu$ l SV RNA Wash Solution（with ethanol added），14000rpm离心1min，弃滤液。
- (7) 在一新离心管中配制DNase incubation mix：

Yellow core Buffer	40 $\mu$ l
MnCl <sub>2</sub> ，0.09M	5 $\mu$ l
DNase I	5 $\mu$ l

- (8) 将上述50 $\mu$ l混合液直接加在Spin Basket的膜上，室温（20-25℃）保育15min。
- (9) 加200 $\mu$ l SV DNase Stop Solution（with ethanol added）至Spin Basket 14000rpm，离心1min。
- (10)加600 $\mu$ l SV RNA Wash Solution，14000rpm离心1min，弃滤液。

- (11)加 250 $\mu$ l SV RNA Wash Solution, 14000rpm 离心 2min, 将 Spin Basket 转移到一新离心管中。
- (12)加 50 $\mu$ l Nuclease-Free Water 至膜上, 14000rpm 离心 1min, 溶解 RNA, -20℃ 保存。
- (13)取 5 $\mu$ l RNA 样品, 1 % 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。

## 2. 琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量

### 一. 原理

带电荷的物质在电场中的趋向运动称为电泳。其中, 凝胶电泳由于其操作简便、快速、灵敏等优点, 使它成为分离、鉴定和提纯核酸的首选标准方法。

与蛋白质分子类似, 核酸分子也是两性解离分子。在pH3.5时, 碱基上的氨基基团解离, 而三个磷酸基团中只有第一个磷酸解离, 整个分子带正电荷, 在电场中向负极泳动; 在pH值为8.0-8.3时, 碱基几乎不解离, 磷酸全部解离, 核酸分子带负电荷, 向正极移动。不同大小和构象的核酸分子的电荷密度大致相同, 在自由泳动时, 各核酸分子的迁移率区别很小, 难以分开。所以采用适应浓度的凝胶介质作为电泳支持物, 发挥分子筛的功能, 使不同分子大小和构象不同的核酸分子泳动率出现较大差异, 达到分离的目的。

#### 1) 影响泳动的四大因素:

① 影响泳动的首要因素是电泳样品的物理性质: 包括电荷多少、分子大小、颗粒形状和空间结构。一般来说颗粒带电荷的密度愈大, 泳动速率愈快; 颗粒物理形状愈大, 与支持物的摩擦力越大, 泳动速率越小。即泳动率与颗粒的分子大小、介质粘度成反比; 与颗粒所带电荷成正比。

② 支持物介质: DNA的凝胶电泳常使用两种支持材料: 琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶。通过这两种介质的浓度变化调整所形成凝胶的分子筛网孔大小, 分离不同分子量的核酸片断。琼脂糖的孔径大, 可以分离长度为100bp至60kb的核酸片断; 聚丙烯酰胺凝胶的孔径小, 可分离小片断(5-50bp)的核酸。

③ 电场强度: 电泳场两极间单位支持物长度的电压降即为电场强度或电压梯度。电场强度愈大, 带电颗粒的泳动率愈快, 但凝胶的有效分离范围随电压的增大而减小。在低电压时, 线性DNA分子的泳动率与电压成正比。一般凝胶电泳的电场强度不超过5V/cm。

④ 缓冲液离子强度: 缓冲液是电泳场中的导体, 它的种类、pH值、离子浓度直接影响电泳的效率。Tris·Cl缓冲体系中, 由于Cl<sup>-</sup>的泳动速度比样品分子快得多, 易引起带型不均一现象, 所以常用TAE、TBE、TPE三种缓冲体系。缓冲液的pH值直接影响DNA解离程度和电荷密度, 缓冲液pH值与核酸样品的等电点相距越远, 样品所携带电荷量越多, 泳动速度越快。核酸电泳缓冲液, 常采用偏碱性或中性条件, 使核酸分子带负电荷, 向正极泳动。缓冲液的离子强度与样品泳动速度呈反比, 电泳的最适离子强度一般在0.02-0.2之间。

#### 2) 指示剂

电泳过程中, 常使用一种由颜色的标记物以指示样品的迁移过程。核酸电泳常用的指示剂有两种: 溴酚兰——成蓝紫色; 二甲苯青——成蓝色。溴酚兰的分子量为670Da, 在不同浓度凝胶中, 迁移速度基本相同, 它的分子筛效应小, 近似于自由电泳, 故普遍用作指示剂。二甲苯青的分子量为554.6Da, 携带的电荷量比溴酚兰少, 在凝胶中迁移率比溴酚兰慢, 常用于聚丙烯酰胺凝胶电泳, 也有溴酚兰和二甲苯青混合应用。指示剂一般加在上样缓冲液中, 为了使样品能沉入胶孔, 还要加入适量的蔗糖、聚蔗糖400或甘油以增加比重。

#### 3) 染色剂



核酸经过染色才能显示带型，最常用的是溴化乙锭染色法。溴化乙锭(EB)是一种荧光染料，这种扁平分子可以嵌入核酸双链的配对的碱基之间，在紫外线激发下，发出红色荧光。激发荧光的能量来源于两个方面，一是核酸吸收波长为260nm的紫外线后能将能量传递给溴化乙锭，二是结合在DNA分子中的EB本身，主要吸收波长为300nm和360nm的紫外线的能量，来源于这两方面的能量，最终激发EB发射出波长为590nm的可见光谱红橙区的红色荧光。EB-DNA复合物中的EB发出的荧光，比游离的凝胶中的EB本身发出的荧光强大10倍，因此不需要洗净背景就能清楚地观察到核酸的电泳带型。通常，在凝胶中加入终浓度为0.5 $\mu$ g/ml的EB，可以在电泳过程中随时观察核酸的迁移情况，这种方法使用于一般性的核酸检测。由于EB见光易分解，故应存棕色瓶中于4℃条件下保存。单链DNA、RNA分子常存在自身配对的双链区，也可以嵌入EB分子，但嵌入量少，因而，荧光较低，其最低检测量为0.1 $\mu$ g。

## 二. 材料与方法

### 1 材料

RNA样品

### 2 仪器、用具

电泳仪、电泳槽、凝胶样品梳、微波炉、移液器等

### 3 试剂

(1) 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液

(2) 溴化乙锭溶液 (EB) [有毒，小心操作]

(3) 琼脂糖

(4) 6 $\times$ 加样缓冲液

### 4 方法

- (1) 选择孔径大小适合的点样梳，垂直架在胶版的一端，使点样梳底部离电泳槽水平面的距离为0.5-1mm。
- (2) 称取0.25g琼脂糖，加入25ml 1 $\times$ TAE电泳缓冲液中，微波炉加热使琼脂糖溶解均匀。
- (3) 于50ml的离心管中加入1.25 $\mu$ l EB (10mg/ml)。
- (4) 待凝胶冷却至50℃左右，将凝胶倒入50ml离心管中。
- (5) 将离心管中的凝胶溶液轻轻倒入电泳凝胶板上，除去气泡。
- (6) 待凝胶凝固后，小心取出点样梳。
- (7) 在电泳槽中加入1 $\times$ TAE电泳缓冲液，将胶板放入电泳槽中（点样孔一端靠近电泳槽的负极），使电泳缓冲液没过胶面。
- (8) 待测样品中加入1/6体积的6 $\times$ 上样缓冲液，混合后，移液枪点样，记录样品点样顺序及样量。
- (9) 连接电泳槽与电泳仪之间的电源线，正极为红色，负极为黑色。
- (10) 开启电源，开始电泳，最高电压不超过5V/cm。
- (11) 当指示剂跑过胶板的2/3，可终止电泳；切断电源后，将电泳凝胶块放在凝胶成像仪中观察，拍照。

## 3. cDNA的合成

### 一 原理

逆转录PCR (RT-PCR) 具有灵敏度高、专一性好、简便快捷等优点，其不仅是定量检测微量样品和表达水平低的基因的一种有效方法，同时也是从真核生物中获得目的基因的一条

重要途径。

cDNA的合成是RT-PCR的重要环节。以mRNA为模板，在逆转录酶的催化下，随机引物、oligo(dT)或基因特异性引物的引导下合成互补的DNA（complementary DNA，cDNA），再按照普通PCR的方法用两条引物以cDNA为模板，则可扩增出不含内含子的可编码完整基因的序列。

不同mRNA拷贝成cDNA的效率不同；因此，适合于一种mRNA拷贝的条件可能对另一种mRNA不适合。一般来说，从事不均一mRNA群体时，所使用的条件是导致cDNA合成的终产量达到最大，下述参数十分重要。

1. 逆转录酶 有两种不同的逆转录酶可以催化以mRNA为模板，oligo(dT)作为引物，合成与mRNA互补的cDNA链。一种来自纯化的禽成髓细胞瘤病毒（AMV），由两条肽链组成，具有聚合酶活性和很强的RNA酶H活性，它最适温度是42℃，最适pH8.3。在高反应温度时可消除mRNA的二级结构对逆转录的阻碍，然而高水平的RNA酶H的活性既抑制cDNA产生也限制其长度。另外，禽源逆转录酶制剂可被能切割DNA的核酸内切酶污染。另一种来源于鼠白血病病毒（Mo-MLV），是单肽链的，有RNA聚合酶活性和相对较弱的RNA酶H活性，最适温度37℃，最适pH7.6，较弱的RNA酶H活性对获得2-3kb的mRNA的全长cDNA有很大好处。在第一链反应前可用氢氧化甲基汞处理，破坏mRNA的二级结构，这一步对于最适反应温度较低（37）℃的鼠源逆转录酶催化的反应可能更为重要。临合成cDNA第一链之前加入过量的巯基试剂，可以使氢氧化甲基汞从RNA上解离。
2. 单价阳离子 离子条件基本上影响各种模板的转录效率。用钾比用钠离子可获得较长的转录产物。对于cDNA长度的最适钾离子浓度为140-150mM。
3. 二价阳离子 对于反转录酶活性来说，二价阳离子是必需的。低于4mM  $Mg^{2+}$ 未能观察到活性；产生全长转录产物的最适浓度是6-10mM。
4. 脱氧核苷三磷酸 使用四种脱氧核苷三磷酸（dNTP）中每一种的高浓度对于有效合成cDNA是特别重要的。如果其中只有一种的浓度下降到10-50微摩尔以下，全长转录物的产量将明显下降。常用的dNTP的浓度为200-250微摩尔。

## 二．材料与方法

### 1 材料

RNA样品

### 2 仪器、用具

PCR仪、电泳仪等、0.2mlPCR管（1个）、移液器、碎冰

### 3 试剂

RNase Free dH<sub>2</sub>O； 5×RT Buffer（含25mM  $Mg^{2+}$ ）； dNTP（10mM each）； RNase Inhibitor（10U/μl）； Oligo（dT）<sub>20</sub>（10μmol/L）； ReverTra Ace

### 4 方法

（1）以总 RNA 为模板，合成 cDNA 第一链，体系如下：

RNase Free dH <sub>2</sub> O	9.5μl
5×RT Buffer(含 25mM $Mg^{2+}$ )	4μl
dNTP(10mM each)	2μl
RNase Inhi bi tor (10U/μL )	0.5μl

Oligo (dT) <sub>20</sub> (10μmol/L)	1μl
总 RNA 模板	2μl
ReverTra Ace	1μl
Total	20μl

(2) 反转录反应条件为：30℃ 10min, 42℃ 30min, 99℃ 5min, 4℃ 5min。反应结束后冰浴 5min。

注意事项：

① cDNA 第一链合成的反应液冰上配制。

使用 ReverTra Ace、RNase Inhibitor 等酶类时，应轻轻混匀，避免起泡；由于酶保存液中含有 50%的甘油，粘度高，分取时应慢慢吸取。

## 4. PCR反应

### 1 材料

cDNA样品

### 2 仪器，用具

PCR仪、电泳仪、0.2mlPCR管、移液器、碎冰

### 3 试剂

ddH<sub>2</sub>O; 10×PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus); dNTP(2.5mM); TaKaRa rTaq酶

### 4 方法

(1) PCR 反应体系如下：

dd H <sub>2</sub> O	34.75μl
10×PCR Buffer(Mg <sup>2+</sup> plus)	5μl
dNTP(2.5mM)	4μl
上游引物 P <sub>1</sub>	1μl
下游引物 P <sub>2</sub>	1μl
cDNA 模板	4μl
TaKaRa rTaq 酶	0.25μl
Total	50μl

(2) PCR 扩增反应条件：94℃ 预变性 3min; 然后进行 30 个循环反应，其温度循环条件为：94℃ 变性 1min, 40-60℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1min; 循环结束后 72℃ 再延伸 5min。

(3) 在 2%琼脂糖凝胶上对 PCR 产物进行电泳检测，方法与试验二相同。

注：PCR 反应液配制于冰上进行。

## 5. PCR 产物纯化

### (一) PCR 产物的直接纯化

#### 一. 原理

PCR产物一般都含有过量的引物、Taq DNA酶及dNTP，这些成分的存在将直接影响到后续的酶切、双脱氧PCR测序反应等过程，因此有必要除去。目前核酸纯化的方法有很多，商用化试剂盒的出现使得DNA的纯化过程变得更加简便快捷。本实验中，Buffer PCR-A促使大于100bp的DNA片断选择性地吸附到silica膜上。经Buffer W1、Buffer W2洗涤去除残留在silica膜上的小于50-mer的引物、酶蛋白、单核苷酸、荧光染料或放射性同位素标记的单核苷酸后，吸附到silica膜上的DNA片断经微量水或Eluent洗脱下来，即可用于各种分子生物学的操作。

#### 二. 材料与方法

##### 1 材料

PCR产物

##### 2 仪器、用具

恒温孵育器（65℃）、离心机、移液器、1.5ml 离心管

##### 3 试剂

Buffer PCR-A； Buffer W1； 已加无水乙醇的Buffer W2； Eluent或去离子水

##### 4 方法

- (1) 在 PCR 反应液中加入 3 倍体积的 Buffer PCR-A, 若需加入的 Buffer PCR-A 不足 100  $\mu$ l, 则加入 100  $\mu$ l。
- (2) 将DNA-prep Tube置于2-ml Microfuge Tube中, 将步骤(1)中的混合液移入DNA-prep Tube中, 5500rpm 离心 1min。
- (3) 弃滤液, 将DNA-prep Tube置回到原2-ml Microfuge Tube中, 加入500  $\mu$ l Buffer W1, 5500rpm 离心 1min。
- (4) 弃滤液, 将DNA-prep Tube置回到原2-ml Microfuge Tube中, 加入700  $\mu$ l 已加无水乙醇的Buffer W2, 5500rpm 离心 1min, 以同样的方法再用700  $\mu$ l 已加无水乙醇的Buffer W2 洗涤一次。
- (5) 弃滤液, 将DNA-prep Tube置回到原2-ml Microfuge Tube中, 14000rpm 离心 1min。
- (6) 连滤液一并弃掉收集管, 将DNA-prep Tube置于一新的1.5ml 离心管中, 在 silica 膜中央加入25-30  $\mu$ l Eluent 或去离子水（65℃预热）。
- (7) 室温静置 2min, 14000rpm 离心 1min 洗脱 DNA。
- (8) 取 5 $\mu$ l 样品, 1%琼脂糖凝胶电泳检测纯化结果。

### (二) 琼脂糖凝胶电泳回收PCR产物

#### 一. 原理

DNA片断的分离与回收是基因工程操作中的一项重要技术，例如可收集特定酶切片断

用于克隆或制备探针，回收PCR产物用于再次鉴定等。回收实验中两个最重要的技术指标是纯度和回收率：前者未达标时会严重影响以后的酶切、连接、标记等酶参与的反应；后者不理想时往往会大大增加前期的工作量。

本实验采用的是V-GENE公司的DNA凝胶回收试剂盒，其原理是：在凝胶融化液（Buffer DE-A）中凝胶块被迅速融化并释放出DNA。加入高离液序列溶液（Buffer DE-B）后DNA片段被选择性吸附到silica膜上。经Buffer W1、Buffer W2洗涤去除残留在silica膜上的杂质和高浓度盐离子后，吸附到silica膜上的DNA片段经微量水或Eluent洗脱下来，即可用于各种分子生物学实验。

## 二. 材料与方法

### 1 材料

PCR产物（未经纯化）

### 2 仪器、用具

电泳仪、电泳槽、凝胶样品梳、微波炉、台式离心机、移液器、恒温孵育器（55-65℃）、1.5ml 离心管

### 3 试剂

1×TAE电泳缓冲液；溴化乙锭溶液（EB）[有毒，小心操作]；琼脂糖；6×加样缓冲液；NJ 缓冲液；DNA洗脱缓冲液；SPW洗涤缓冲液

#### 2.4 方法

- (1) 按常规方法于2%琼脂糖凝胶进行电泳。
- (2) 在紫外灯下切下含有目的DNA的琼脂糖凝胶，用纸巾吸尽凝胶表面液体。
- (3) 称量凝胶重量，以1mg=1μl换算凝胶体积。
- (4) 加入3个凝胶体积的NJ缓冲液
- (5) 悬浮均匀后于55℃-65℃加热7min，期间每2—3min摇晃一次，直至凝胶块完全融化。
- (6) 把DNA—琼脂糖溶液加到一个Mu-Pu DNA回收纯化柱上，并把柱子装在一干净的2ml收集试管内，14000rpm离心1min，弃去流出液。  
\*对于体积大于700μl的样品，则分别加到不同的柱子上，每次700μl。
- (7) 用700μl无水乙醇稀释的SPW洗涤缓冲液洗涤柱子，加入柱子中后静置2-3min。室温下14000rpm离心1min。
- (8) 弃滤液，以同样的方法再洗涤一次。
- (9) 把柱子装在一个灭菌干净的1.5ml离心管上，加入30-50μl的DNA洗脱缓冲液或无菌去离子水到柱基质上，14000rpm离心1min以洗脱出DNA。
- (10) 取3μl样品，1%琼脂糖凝胶电泳检测回收结果。

注：PCR产物的纯化选用直接纯化法还是胶回收法主要取决于PCR产物。若PCR产物电泳时为单一条带，可采用直接纯化法，即将酶、dNTP等多余物质去掉便可；若PCR产物电泳时为多条带，则需要根据需要回收特定条带，此时须选用胶回收法。

## 6. PCR产物的T载体克隆

## （一）重组 T 质粒的构建

### 一. 原理

外源 DNA 与载体分子的连接就是 DNA 重组, 这样重新组合的 DNA 叫做重组体或重组子。重组的 DNA 分子是在 DNA 连接酶的作用下, 有  $Mg^{2+}$ 、ATP 存在的连接缓冲系统中, 将分别经酶切的载体分子与外源 DNA 分子进行连接。DNA 连接酶有两种:  $T_4$  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粘性末端的 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 DNA 连接酶没有的特性, 即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粘性末端的连接率低, 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 连接反应分为 3 步: 首先,  $T_4$  DNA 连接酶与辅因子 ATP 形成酶-ATP 复合物; 然后, 酶-ATP 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。

连接反应通常将两个不同大小的片断相连。因为 DNA 片断有两个端点, 所以切割时出现两种可能, 一种是单酶切, 另一种是双酶切, 这两种酶切方法在基因工程操作中都很常用到。对于单酶切来说, 载体与供体的末端都相同, 连接可以在任何末端之间进行, 这样就导致了大量的自连接产物。为了减少自环的高本底, 可对载体进行 5'除磷酸处理, 原理是连接酶只能连接 DNA 片断的 3'OH 末端与 5'端, 所以除磷后载体不会自环。一旦有外源片断插入时, 由外源片断提供 5'端就能与载体进行连接。通过这种方法可大大减少由载体的自环造成的高本底。对于双酶切来说, 无论载体与供体同一片段上都有不同的末端, 这样就避免了载体与供体的自环, 能使有效连接产物大大增加。双酶切的另一个特点是能将供体分子定向连接到载体上。

连接反应的温度在  $37^{\circ}C$  时有利于连接酶的活性。但是在这个温度下粘末端的氢键结合是不稳定的。因此采取折中的温度, 即  $12-16^{\circ}C$ , 连接 12-16h (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。

Taq DNA 酶扩增的 PCR 产物, 其 DNA 双链前后末端都有一个游离的 A 碱基, 可以与 pGEM-T Easy Vector 末端游离的 T 碱基互补形成环状重组 T 质粒。

### 二. 材料与方法

#### 1 材料

外源 DNA 片断

#### 2 仪器、用具

移液枪、碎冰

#### 3 试剂

pMD 18-T Vector; Ligation buffer;  $T_4$  ligase; rATP

#### 4 方法

连接体系如下:

ddH <sub>2</sub> O	2.5 $\mu$ l
pMD-18 Vector	0.5 $\mu$ l
Ligation buffer	1 $\mu$ l
rATP	0.5 $\mu$ l
PCR 纯化产物 (或胶回收产物)	5 $\mu$ l

T4 DNA ligase	0.5μl
Total	10μl

16℃连接过夜。

## (二) 重组质粒的转化及阳性克隆的鉴定

### 1 材料

E.coli JM109 菌株

### 2 仪器、用具

超净工作台、离心机、恒温摇床、恒温培养箱、培养皿、试管、1.5ml 离心管、电泳仪、电泳槽、凝胶样品梳、移液器

### 3 试剂

- (1) CaCl<sub>2</sub>、LB 平板（见附录）；SOC 培养基（见附录）；SOB 培养基
- (2) RNase A1；Buffer S1；Buffer S2；Buffer S3；Buffer W1；无水乙醇的 Buffer W2a
- (3) 1×电泳缓冲液（TAE）；溴化乙锭溶液（EB）[有毒，小心]；琼脂糖；6×加样缓冲液
- (4) 酚；氯仿；异戊醇
- (5) ddH<sub>2</sub>O；10×PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus)；dNTP；M13+；M13-；TaKaRa rTaq 酶

### 4 方法

#### 1. 大肠杆菌感受态细胞的制备

- (1) 取大肠杆菌 JM109 保存液 50 μl，接种于 4ml LB（或 SOB）液体培养基中，37℃，300rpm 振荡培养过夜，第二天取 50 μl 转接到新的 4ml LB（或 SOB）液体培养基中扩大培养 3h 至 OD<sub>600</sub>=0.35~0.4，在无菌操作台上取 1ml 菌液于 1.5ml 离心管中，冰浴 10min。
- (2) 4℃，5000rpm 离心 2min，去上清液。
- (3) 加入 750 μl 预冷的 0.1M CaCl<sub>2</sub>重悬菌体，冰浴 30min。
- (4) 4℃，5000rpm 离心 2min，弃上清液。
- (5) 加入 100 μl 冰冷的 0.1M CaCl<sub>2</sub>轻轻重悬菌体，冰浴 2h 后，4℃保存备用。

#### 2. 重组 DNA 的转化

- (1) 将含 Amp、X-Gal、IPTG 的 LB 平板 37℃预热。
- (2) 于 100μl 感受态细胞中加入 10 μl 连接产物，冰浴 30min。
- (3) 将离心管转入 42℃水浴，热冲击 90 秒，然后不要摇动离心管，迅速将其放在冰上 2min。
- (4) 在离心管中加入 SOC 培养基 300μl，枪头混匀，37℃、150rpm 温和摇振 60min。
- (5) 将 200μl 转化菌液均匀地涂布于含 50mg/ml Amp、20mg/ml X-gal、200mg/ml IPTG 的 LB 平板上，37℃倒置培养过夜，挑选白色菌落进行鉴定。

#### 注意事项：

- ① 制备感受态细胞的全部操作均须于冰浴操作，同时注意近火无菌操作，防止感受态细胞受杂菌污染。
- ② 42℃热处理时很关键，转移速度要快，且温度要准确。
- ③ 菌液涂皿操作时，应避免反复来回涂布，因为感受态细菌的细胞壁有了变化，过多的机械挤压涂布会使细胞破裂，影响转化率。

#### 3. 重组质粒的鉴定

##### 方案一 菌落 PCR

- (1) 制备 PCR 混合液：

dd H <sub>2</sub> O	37.25μl
---------------------	---------

10×PCR Buffer(Mg <sup>2+</sup> plus)	5μl
dNTP(2.5mM)	5μl
M13 正向引物	1μl
M13 反向引物	1μl
Total	49.75μl

- (2) 用经灭菌的 10μl 枪头（不用牙签）挑去白色菌落，迅速地使挑取物溶在上述混合液中。
- (3) 盖上离心管盖子，在沸水上温育 10 min。
- (4) 将步骤 (3) 的样品冷却至室温，离心数秒，然后于管中加入 TaKaRa rTaq 酶 0.25ul。
- (5) 按以下条件进行 PCR 反应：94℃预变性 3min；然后进行 30 个循环反应，其温度循环条件为：94℃变性 1min，57℃退火 1min，72℃延伸 1min；循环结束后 72℃再延伸 5min。
- (6) 取 5μl PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

## 方案二 质粒 PCR

### 1. 碱裂解法少量制备质粒 DNA

- (1) 用离心管收集 4ml 在 LB 培养基（含 Amp）中培养过夜的菌液，14000rpm 离心 30 秒，弃尽上清。
- (2) 用 250μl 已加入 RNase A1 的 Buffer S1 充分悬浮细菌沉淀。
- (3) 加入 250μl Buffer S2，温和但充分地上下翻转混合 4-6 次，此步骤不宜超过 5min。  
\*Buffer S2 使用后应立即盖紧瓶盖，以免空气中的 CO<sub>2</sub> 中和 Buffer S2 中的 NaOH，降低溶菌效率。
- (4) 加入 400μl Buffer S3，温和地上下翻转 8-10 次，室温静置 2min，14000rpm 离心 10min。  
\*若离心后凝结块未沉淀到离心管底部，应再上下翻转数次，12000g 离心 3min。
- (5) 将 DNA-prep Tube 置于 2-ml Microfuge Tube 中，将步(4)中的混合液移入 DNA-prep Tube 中，5500rpm 离心 1min。
- (6) 弃滤液，将 DNA-prep Tube 置回到原 2-ml Microfuge Tube 中，加入 500μl Buffer W1，5500rpm 离心 1min。
- (7) 弃滤液，将 DNA-prep Tube 置回到原 2-ml Microfuge Tube 中，加入 700μl 已加无水乙醇的 Buffer W2，5500rpm 离心 1min，以同样的方法再用 700μl 已加无水乙醇的 Buffer W2 洗涤一次。
- (8) 弃滤液，将 DNA-prep Tube 置回到原 2-ml Microfuge Tube 中，14000rpm 离心 1min。
- (9) 连滤液一并弃掉收集管，将 DNA-prep Tube 置于一新的 1.5ml 离心管中，在 silica 膜中央加入 25-30μl Eluent 或去离子水。
- (10) 室温静置 2 min，14000rpm 离心 1min 洗脱 DNA。
- (11) 取 5μl 样品，1%琼脂糖凝胶电泳初步筛选重组转化子。

### 2. 抽提纯化质粒 DNA

酚、氯仿抽提可以去除碱裂解法制备的质粒 DNA 中残留的蛋白质。

- (1) 加 TE 稀释质粒 DNA 溶液至 300μl。
- (2) 加等体积的酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1)，震荡混匀，静置 3min。
- (3) 14000rpm 离心 5min，吸上清液，加等体积的酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1)，混匀，静置 3min。
- (4) 14000rpm 离心 5min，吸上清液，加等体积的氯仿:异戊醇 (24:1)，混匀，静置 3min。
- (5) 14000rpm 离心 5min，吸上清液，加 2.5 倍体积预冷的无水乙醇，混匀后 -20℃放置 15min，沉淀质粒 DNA。
- (6) 14000rpm 离心 13min，弃上清液，沉淀加入 200μl 70%乙醇洗涤一次，室温干燥，用 20μl 去离子双蒸水溶解质粒 DNA 沉淀，-20℃保存待用。
- (7) 取 5μl 样品，1%琼脂糖凝胶电泳检测纯化结果。

### 3. 质粒 PCR

- (1) PCR 反应体系如下：



dd H <sub>2</sub> O	34.75μl
10×PCR Buffer II (Mg <sup>2+</sup> plus)	5μl
dNTP(2.5mM)	4μl
M13 正向引物	1μl
+ M13 反向引物	1μl
质粒	4μl
TaKaRa rTaq 酶	0.25μl
Total	50μl

- (2) PCR 扩增反应条件：94℃预变性 3min；然后进行 30 个循环反应，其温度循环条件为：94℃变性 1min，57℃退火 1min，72℃延伸 1min；循环结束后 72℃再延伸 5min。
- (3) 取 5μl PCR 产物于 1%琼脂糖凝胶进行电泳检测，方法与试验二相同。
- (4)

## 7. 功能基因 cDNA 序列的分析

### (一) cDNA 序列的测定

#### 一. 原理

DNA 序列测定技术，目前主要是根据 Sanger 等提出的酶法和 Maxam 和 Gilber 提出的化学降解法，这两种方法的原理大致相同。这里主要介绍 Sanger 的酶法——双脱氧链终止法。

双脱氧链终止法是 Sanger 等人于 1977 年建立起来的。它是利用了 2', 3'-双脱氧核苷三磷酸 (ddNTP) 可以特异地终止 DNA 链延长这一特点进行的。在 DNA 聚合酶的作用下，ddNTP 的 5'三磷酸基团可以与正在合成的 DNA 链中的 3'羟基形成磷酸二酯键，当 ddNTP 掺入到正在合成的 DNA 链以后，由于 3'端是脱氧，不能再进行链延长，由此即可进行 DNA 分析。

序列分析的原料包括：待测序的 DNA 模板（或 cDNA 模板）和一小段与模板互补的 DNA 引物。将模板与引物退火后分成 4 个试管进行反应。每个试管中一种 ddNTP(如 ddATP) 与其对应的 dNTP(如 dATP)按适当的比例混合，再加上其他三种 dNTP(如 dCTP,dGTP,dTTP)所用 4 种 dNTP 中有一种必需是同位素标记的，通常是  $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP 或  $\alpha^{32}\text{S}$ -dATP，如此分成 AGCT 4 个反应管，在聚合酶的作用下，正常的聚合作用即从引物处开始，若掺入的是 ddNTP（如 ddATP），链延长即停止，若掺入的是 dNTP（如 dATP），链继续延长，直至掺入另一个 ddATP。这样即可得一序列标记的 DNA 链，其长度依赖于特定的 ddNTP 相对于引物末端的位置。将 4 个反应管加到聚丙烯酰胺凝胶上电泳，标记片断按大小分离，放射自显影后即可按谱型读出 DNA 序列。

但双脱氧链终止法存在操作繁琐，效率低，速度慢等缺陷，特别是结果判读的读片过程一项既花时间又乏味的工作。随着科学技术的发展，操作简便、结果清晰，易于解读的自动测序技术于 80 年代末发展并成熟起来，并得到了广泛的应用。

DNA 自动测序的最基本原理与双脱氧链终止法一样，也是通过 4 个酶学反应利用 ddNTPs 产生一系列一端固定，另一端终止所有不同的 A, T, G, C 碱基位点的 DNA 片断，能够进行自动测序的关键是采用荧光素标记代替了放射性同位素标记显示高压电泳分离结果。根据所用的荧光素种类不同可将目前所用的自动测序方法可大致分为两类。

(1) 使用 4 种荧光素标记的自动测序方法 所用的 4 种荧光发色基团在激光的激发下可以产生不同波长的荧光。用 4 种荧光素分别标记 4 种双脱氧核苷三磷酸终止的 DNA 片断，这可形象比喻为赋予这 4 组 DNA 片断以不同的颜色。使用 4 种荧光素标记的 DNA 片断在电泳时将 4 组反应混合物加入同一样品孔中进行电泳。自动检测仪在胶的下端有一固定的检测窗口，一束激光与穿过这里的 DNA 片断相遇，DNA 上的荧光发色基团受激发发出特定波长的荧光，荧光又被高灵敏度的光电管或二极管光电检测器转换成电信号输入电子计算机加以贮存，4 种不同波长的荧光由安放在光电检测器前的旋转滤光片加以区分。这样根据 DNA 片断通过检测窗口的时间和颜色等原始信息经计算机处理后就可给出所测的 DNA 序列。

(2) 使用单荧光素标记的自动测序方法 这种自动测序方法更加类似双脱氧链终止法。它使用一种荧光素标记所有的 DNA 片断，电泳时与双脱氧链终止法一样将 4 种反应产物加在 4 个样品孔中进行电泳分离。在胶的底部有一个由激光光源和光电检测器组成的检测系统，每个样品道后都有一个检测器。当 DNA 片断迁移至检测区并与激光相遇时，荧光标记物即被激发发出荧光。荧光被光电检测器接受并转换成电信号送至计算机贮存。由于按特定的次序加样（如 A, C, G, T），所以第一个检测器检测到的信号代表 A，第二个检测器检测的信号代表 C，以此类推。电泳结束后计算机便收集到一套完整的信号，通过计算机处理后，就得到所测 DNA 的序列。

## 二. 序列测定的方法

- (1) 克隆的基因委托 TaKaRa 生物工程（大连）有限公司用 ABI PRISM™ 377 全自动荧光测序仪完成序列测定。
- (2) 计算目的基因片断的长度，推测其编码氨基酸数量。

### （二） cDNA序列的同源性比较

克隆的cDNA是否为新基因？它与其他已发现的基因序列有何异同？这一切可通过相应的软件（如Blast、FastA、PIMA、MAP等）对网上多个DNA序列数据库（Gene Bank、EMBL和DDBJ等）中已登陆的序列进行搜索、比较，了解序列间的相似程度，以判断该片断是新基因还是某基因家族的成员。有些基因的核苷酸顺序与其他基因并无十分高的同源性，仅通过核苷酸顺序的同源性比较无法得到十分有参考价值的信息，然而其编码的蛋白质的氨基酸顺序却可能与其他某些多肽高度同源，从而提示该蛋白的可能功能。因此，从某种程度上说，氨基酸序列的同源性比较有时比核苷酸序列的同源性比较更有意义。

方 法：

- ① 从 [www.google.com](http://www.google.com) 或 [www.yahoo.com](http://www.yahoo.com) 搜索 NCBI 网站。
- ② 登陆 NCBI 网站主页，在页面菜单上选择 BLAST 选项，进入 BLAST 页面。在 Nucleotide 选项中选择 Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn)，nucleotide-nucleotide BLAST 页面。在 search 选框中键入目的序列，在 Set subsequence 框中键入序列长度，如 from 1 To 526，点击 BLAST 进行核苷酸序列比较。根据所显示的结果找到与所克隆基因同源性

最高的基因，确定所克隆的基因是否为目的基因。

③ 确定了为目的基因后，再次登陆NCBI网站主页，在Search的复选框中选择Nucleotide，在for的选框中键入目的基因，如 $\beta$ -actine，然后按Go键搜索已发表的不同物种的 $\beta$ -actine基因。

④ 经搜索后，网页上会显示一系列物种编码。单击某物种编码查找该物种的基因。将其中若干种物种的 $\beta$ -actine基因的核苷酸序列及氨基酸序列下载下来。

⑤ 根据已知的核苷酸序列，应用计算机软件推出相应的氨基酸序列，并利用相关的软件对所下载的物种的基因的核苷酸序列及氨基酸序列进行多重比较，得出不同物种同一基因的同源性。

⑥ 另外，以便后续工作的进行，登陆NCBI网站查找目的基因已登陆的基因组DNA序列，将所获得的cDNA序列跟已登陆的基因组DNA序列进行比较，弄清目的基因内含子、外显子的位置。

## 第二部分 功能基因 cDNA 3'末端的克隆

### 1. 功能基因 cDNA 3'末端的克隆

#### 一. 原理

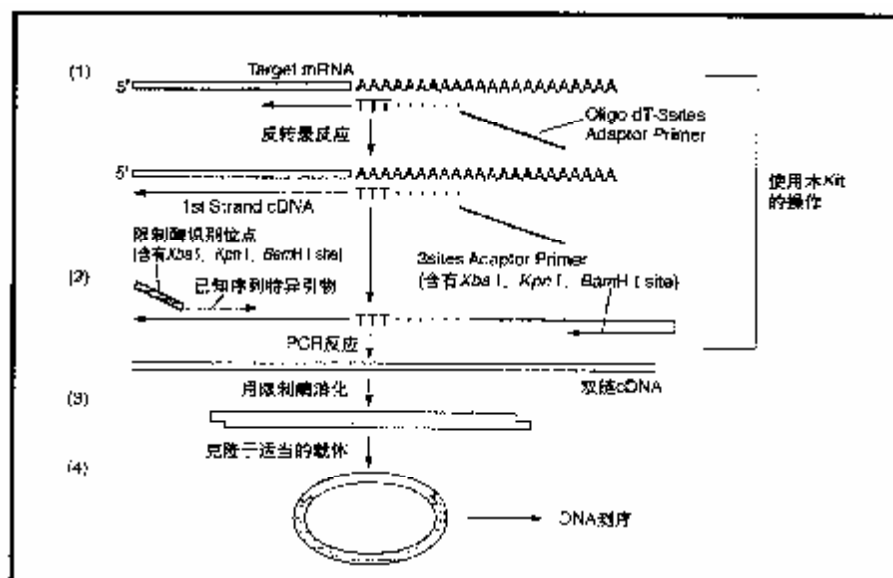


图 4-1 3'-RACE 法原理

(1) 以目的 mRNA 为模板，使用 Oligo dT-3sites Adaptor Primer 进行反转录反应，合成 1st Strand cDNA。

(2) 使用含有 KpnI、XbaI、BamH I 酶切位点的上游特异性引物和 3sites Adaptor Primer 进行 PCR 反应。

- (3) 使用限制性酶 (*KpnI*、*XbaI* 或 *BamH I*) 对 PCR 产物进行酶切反应。  
 (4) 选用适当载体克隆 PCR 产物并进行 DNA 测序。

## 二. 材料与amp;方法

### 1 材料

肝脏RNA

### 2 仪器、用具

PCR 仪、0.2mlPCR 管、移液器

### 3 试剂

- (1) RNase Free H<sub>2</sub>O; 10×RNA PCR Buffer; MgCl<sub>2</sub>(5mM); RNase Inhibitor(40 μ / μ l); Oligo dt-3sites Adaptor Primer(2.5 μ M); AMV Reverse Transcriptase XL(5 μ / μ l)  
 (2) ddH<sub>2</sub>O; 10×PCR Buffer; MgCl<sub>2</sub>(25mM); 3 sites Adaptor Primer(20 μ M); TaKaRa Taq 酶

### 4 方法

- (1) 1st strand cDNA 的合成

#### ① 逆转录体系:

RNase Free H <sub>2</sub> O	3.75μl
10×RNA PCR Buffer	1μl
MgCl <sub>2</sub> (5mM)	2μl
dNTP(各 10mM)	1μl
RNase Inhibitor (40U/μl)	0.25μl
Oligo dt-3sites Adaptor Primer (2.5μM)	0.5μl
RNA	1μl
AMV Reverse Transcriptase XL (5μ/μl)	0.5μl
Total	10μl

- ② 反应条件: 30℃ 10min; 55℃ 30min; 95℃ 5min; 5℃ 5min。

#### (2) PCR 反应

##### ① 1st PCR 反应

##### a. 反应体系:

ddH <sub>2</sub> O	34.75 μ l
10× PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	5 μ l
dNTP(各 2.5mM)	4 μ l
1st 上游 primer (20pmol / μ l)	1 μ l
3sites Adaptor Primer (20 μ M)	1 μ l
反转录液	4 μ l
TaKaRa Taq 酶	0.25 μ l
Total	50 μ l

b. 按以下条件进行反应: PCR 扩增反应条件: 94℃ 预变性 3 min; 然后进行 30 个循环反应,其温度循环条件为: 94℃ 变性 1 min ,55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min; 循环结束后 72℃ 再延伸 5 min。

##### ② 2nd PCR 反应

a. 反应体系:

ddH <sub>2</sub> O	34.75μl
10× PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	5μl
dNTP (2.5mM)	4μl
2nd 上游 primer (20μM)	1μl
3sites Adaptor Primer (20μM)	1μl
1st PCR Solution	1μl
TaKaRa Taq 酶 (5μ/μl)	0.25μl
Total	50μl

b. 按以下条件进行 PCR 反应: PCR 扩增反应条件: 94℃预变性 3min; 然后进行 30 个循环反应, 其温度循环条件为: 94℃变性 1 min, 60℃退火 1min, 72℃延伸 1 min; 循环结束后 72℃延伸 5 min。

c. 反应结束后, 取 PCR 反应液 (5-10μl) 进行琼脂糖凝胶电泳。

(3) 将 2nd PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳分离。回收纯化电泳片段克隆到 pMD-18T 载体, 进行鉴定和序列分析 (方法同实验六、实验七)。

(4) 获得 cDNA 3' 末端序列后, 将其与 cDNA 的核心片断进行序列拼接。

## 2. 功能基因 cDNA 5'末端的克隆

### 一. 原理

#### (1) 5'-RACE法

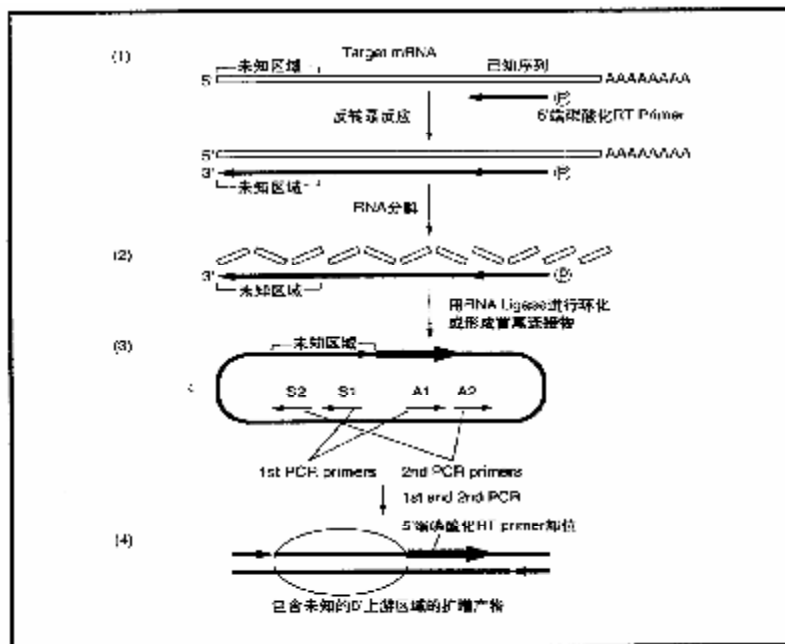


图 4-2 5'-RACE 法原理

- ① 以目的 mRNA 为模板，使用 5' 末端 P 标记的 RT 引物进行反转录反应，合成 1st strand cDNA。
- ② 使用 RNase H 分解 Hybrid DNA-RNA 中的 RNA 链。
- ③ 使用 T<sub>4</sub> RNA Ligase 使单链 cDNA 进行环化或形成首尾连接物。
- ④ 进行 PCR 扩增。

## (2) 引物设计

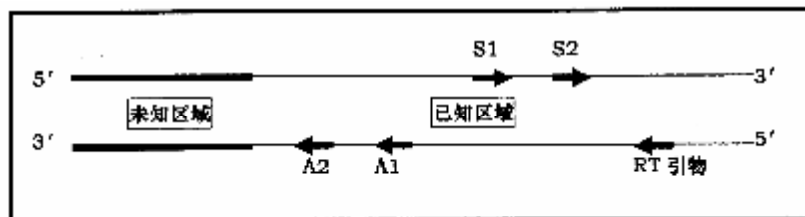


图4-3 各引物设计位置图

## 二. 材料与方法

### 1 材料

肝脏RNA

### 2 仪器、用具

PCR 仪、0.2ml PCR 管、移液器

### 3 试剂

- (1) RNase Free H<sub>2</sub>O; 10×RT PCR Buffer (含 dNTP Mixture); RNase Inhibitor (40U/μl); AMV Reverse Transcriptase XL (5U/μl); RNase H (60U/μl); 5×Hybrid RNA Degradation Buffer; 5×RNA (ssDNA) Ligation Buffer; T<sub>4</sub> RNA Ligase; 40% PEG#6000
- (2) ddH<sub>2</sub>O; 10×PCR Buffer; MgCl<sub>2</sub> (25mM); 3 sites Adaptor Primer (20 μM); TaKaRa Taq 酶
- (3) TE
- (4) 无水乙醇 (预冷)

### 4 方法

#### (1) 1st strand cDNA 的合成

##### ① 反应体系:

RNase Free dH <sub>2</sub> O	6 μl
10×RT Buffer	1.5 μl
RNase Inhibitor (40U/μl)	0.5 μl
RT-Primer	1 μl
RNA 模板	5 μl
AMV Reverse Transcriptase XL (5U/μl)	1 μl
Total	15 μl

- ② 反转录条件为: 30℃ 10min; 50℃ 30min; 80℃ 2min。

#### (2) Hybrid RNA 的分解

##### ① 按下列组成配制 RNA 分解反应液:

1st strand cDNA	15 μl
5×Hybrid RNA Degradation Buffer	15 μl
ddH <sub>2</sub> O	45 μl
Total	75 μl

- ② 上述反应液中加入 1  $\mu$ l 的 RNase H, 30℃ 反应 1h。
- ③ 上述反应液加入 100  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 500  $\mu$ l 冰冷的无水乙醇。
- ④ 混匀, -20℃ 放置 30min, 进行乙醇沉淀。
- ⑤ 14000rpm 离心 10min, 弃上清。
- ⑥ 加入 500  $\mu$ l 的 70%乙醇。
- ⑦ 14000rpm 离心 5min, 弃上清, 干燥沉淀。

(3) 单链 cDNA 环化 (连接反应)

- ① 按下列组分配制连接反应液:

5×RNA (ssDNA) Ligation Buffer	8 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	12 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

- ② 在上述沉淀中加入 20  $\mu$ l 连接反应液, 溶解 DNA。
- ③ 加入 20  $\mu$ l 40% PEG#6000, 均匀混合。
- ④ 加入 1  $\mu$ l T<sub>4</sub> RNA Li gase, 16℃ 过夜反应 (15-18h)。
- ⑤ 连接反应结束后, 将连接液用 TE Buffer 稀释 10 倍, -20℃ 保存备用。

(4) PCR 反应

- ① 1st PCR 反应

a. 反应体系:

ddH <sub>2</sub> O	34.75 $\mu$ l
10×PCRBuﬀer (Mg <sup>2+</sup> plus)	5 $\mu$ l
dNTP (各 2.5mM)	4 $\mu$ l
1st 上游 primer (20pmol / $\mu$ l)	1 $\mu$ l
1st 下游 primer (20pmol / $\mu$ l)	1 $\mu$ l
连接液	1 $\mu$ l
TaKaRa Taq 酶	0.25 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

b. 按以下条件进行反应: PCR 扩增反应条件: 94℃ 预变性 3 min; 然后进行 25 个循环反应, 其温度循环条件为: 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min; 循环结束后 72℃ 再延伸 5 min。

- ② 2nd PCR 反应

a. 反应体系:

ddH <sub>2</sub> O	34.75 $\mu$ l
10× PCRBuﬀer (Mg <sup>2+</sup> plus)	5 $\mu$ l
dNTP(2.5mM)	4 $\mu$ l
2nd 上游 primer	1 $\mu$ l
2nd 下游 primer	1 $\mu$ l
1st PCR Solution	1 $\mu$ l
TaKaRa Taq 酶(5 $\mu$ / $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

b. 按以下条件进行 PCR 反应: PCR 扩增反应条件: 94℃ 预变性 3min; 然后进行 30 个循环反应, 其温度循环条件为: 94℃ 变性 1 min, 60℃ 退火 1min,

72 °C 延伸 1 min; 循环结束后 72 °C 再延伸 5 min。

c. 反应结束后, 取 PCR 反应液 (5-10  $\mu$ l) 进行琼脂糖凝胶电泳。

(5) 将 2nd PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳分离。回收纯化电泳片段克隆到 pMD-18T 载体, 进行鉴定和序列分析 (方法同实验六、实验七)。

(6) 获得 cDNA 5' 末端序列后, 将其与 cDNA 的核心片断及 3' 末端序进行拼接。这就获得了 cDNA 的全序列。

### 3. 基因组步行法扩增3' 及5' 侧翼序列

#### 一. 原理

基因组步行技术是一种新发展的利用已知序列(cDNA或基因组DNA)从基因组中获得基因的上游(如启动子) 或下游序列的方法。其原理如下: 首先利用不同的具有平末端的 DNA 限制性内切酶消化基因组 DNA, 然后将预先设计好的 DNA 接头连接在 DNA 的两端, 这样的一组两端带有接头的 DNA 片段就称为所谓的无载体的 DNA 文库; 根据接头和目的基因的序列设计两组引物, 以上述的DNA为模板, 先以外侧的一组引物进行第一轮 TD-PCR ( touchdown PCR ) 扩增, 然后以内侧的一组引物进行巢式 TD-PCR 扩增, 扩增产物即为所需的DNA片段。在接头中, 由于2条链中较短的一链的3' 末端被 2NH<sub>2</sub> 封闭, 使得引物 AP1 在第一次 PCR 之前没有结合位点, 在 PCR 的第一循环过程中只能从 GSP1 延伸, 没有 AP1 的延伸产物。而 GSP1 的延伸产物产生了 AP1 的结合位点, 在第二循环就开始从两端进行延伸反应。这样, 就减少了非特异性扩增, 从而提高了 PCR 的特异性。基因组步行由 2 轮 TD-PCR 反应组成。在 TD-PCR 的初始循环中, 所采用的退火和延伸温度比引物的 T<sub>m</sub> 值略高, 在这种情况下引物退火的效率会下降, 但是特异性将增加; 另外, 在极少数情况下接头的 2NH<sub>2</sub> 也会延伸, 补平接头, 这样也产生了 AP1 的结合位点, 从而增加了非特异性扩增, 但在高温下, 接头的自我退火比引物与接头退火的效率高, 就提高了针对于 AP1 的 PCR 抑制效应, 减少非特异性扩增。在随后的循环中, 退火和延伸温度比 T<sub>m</sub> 值略低, 有利于特异性产物的指数增长。

基因组步行技术主要应用于一些只知部分 cDNA 序列的基因的启动子或其他上游调控序列的快速克隆, 该技术也可用于确定内元/外元的连接以及从任何序列标签位点 (Sequence2tagged site, STS) 或 EST 两端进行扩增获得相应的序列。尽管一次步行获得的片段长度短于 6 kb, 但可通过多次反应获得更长的片段。该方法对于填补基因组中的一些间隙, 特别是当这些缺失的克隆通过常规的筛选文库很难得到时非常有用。

#### 一、高质量基因组 DNA 的提取

##### 1 材料

实验鱼, 尾静脉取血 100  $\mu$ l (含抗凝剂)

##### 2 试剂

QIAGEN Genomic 20/G; Tip Holders; Buffer C1; Buffer QBT; Buffer QF

抗凝剂: 0.48% 柠檬酸, 1.32% 柠檬酸钠, 1.47% 葡萄糖

##### 3. 方法

###### 1) 样品的处理和裂解

(1) 将 100  $\mu$ l 鱼血用 PBS 稀释至 1ml

(2) 加入 1 倍体积冰冷的 Buffer C1, 3 倍体积 (3ml) 的 ddH<sub>2</sub>O。

(3) 翻转数次至悬液成半透明。



- (4) 冰浴 10min。
- (5) 4℃, 1300g 离心 15min, 弃上清液。
- (6) 加入 250 μl 冰冷的 Buffer C1, 750 μl 冰冷的 ddH<sub>2</sub>O。
- (7) 轻弹, 溶解沉淀。
- (8) 4℃, 1300g 离心 15min, 弃上清液 (如沉淀不是白色, 重复洗涤步骤)。
- (9) 加入 1ml Buffer G<sub>2</sub>, 最大速漩涡 10-30s, 充分重悬核酸沉淀物 (时间要控制得很严格)。
- (10) 加入 25ul QIAGEN Protease, 50℃ 保育 30-60min (如有必要可延长保育时间)。

## 2) DNA 的提取

- (1) 用 2ml Buffer QBT 平衡 QIAGEN Genomic-tip, 让 Buffer QBT 自然流下。
- (2) 最大速漩涡 10s, 重悬样品。
- (3) 样品迅速移至 QIAGEN Genomic-tip 中, 样品在重力作用下进入树脂。
- (4) 加入 1ml Buffer Q<sub>c</sub>, 洗脱样品。
- (5) 加入 1ml Buffer Q<sub>c</sub>, 再洗一次。
- (6) 将 QIAGEN Genomic-tip 置于一干净的 7ml tube 中。
- (7) 加入 1ml Buffer Q<sub>r</sub>, 洗脱基因组 DNA。
- (8) 再次加入 1ml Buffer Q<sub>r</sub>, 洗脱基因组 DNA。
- (9) 加入 1.4ml 室温保存的异丙醇至 DNA 洗脱液中。
- (10) 翻转离心管 10-20 次, 用玻棒将 DNA 卷起。
- (11) 迅速将缠绕着 DNA 的玻棒转至一含有 0.1-0.2ml TB Buffer 的微量离心管中。
- (12) 55℃ 放置 1-2h 溶解 DNA。

## 二、基因组步行法扩增5'及3'侧翼序列

### 1 材料

基因组DNA

### 2. 仪器、用具

离心机、PCR仪

### 3. 试剂

- (1) 30μl Dra I (10units/μl)
- (2) 10ul T4 DNA Ligase (6units/μl)
- (3) 10×Ligation Buffer
- (4) BD Genome walker Adaptor (25 UM)
- (5) Adaptor Primer1 (AP1, 10uM)
- (6) Nested Adaptor Primer2 (AP2, 10μM)
- (7) 酚
- (8) 氯仿
- (9) 3M 醋酸钠
- (10) 95% 乙醇
- (11) 80% 乙醇
- (12) TE: 10 mM Tris, 0.1mM EDTA (10/0.1, pH7.5)
- (13) TE: 10 mM Tris, 1mM EDTA (10/1, pH7.5)

### 4. 方法

#### 1) 电泳检测基因组 DNA 质量

取 1μl Genomic DNA (0.1μg/μl) 和 1 μl Control genomic DNA (0.1 μg/μl), 0.8%凝胶电泳检测基因组 DNA 质量。

#### 2) Dra I 酶切检测 Genomic DNA 质量

- (1) 于 0.5ml 离心管中加入

ddH <sub>2</sub> O	5μl
Genomic DNA	1.4μl
10×Dra I Restriction Buffer	2μl
Dra I	1.6μl
Total	20μl

(2) 轻轻翻转离心管混匀(不要旋涡)。

(3) 37°C 过夜。

(4) 取 5 μl 反应液于 0.8%凝胶进行检测, 1 μl genomic DNA 作对照。

### 3) 基因 DNA Dra I 酶切

(1) 于 1.5ml 离心管中加入以下试剂:

ddH <sub>2</sub> O	75μl
Genomic DNA	7μl
10× Dra I Restriction Buffer	10μl
Dra I	8μl
Total	100μl

(2) 轻轻摇匀。

(3) 37°C 保育 2hr。

(4) 低速旋涡 5-10s。

(5) 37°C 温育过夜(16hr -18hr)。

(6) 取 5 μl 酶切产物于 0.8%凝胶上进行电泳检测。

### 4) Dra I 酶切 DNA 的纯化

(1)于 1.5ml 离心管中加入等体积的 (95 μl) 酚。

(2)低速旋涡 5-10s。

(3)短暂离心分离水相和有机物。

(4)将上层水相吸至另一新 1.5ml 离心管中, 弃下层有机物。

(5)加入等体积 (95 μl) 氯仿。

(6)低速旋涡 5-10s。

(7)短暂离心分离水相有机物。

(8)转移上层水相至另一新 1.5ml 离心管中, 弃下层有机物。

(9)加入 2 倍体积 (190 μl) 冰冷的 95%乙醇。

(10) 加入 1/10 体积 (9.5 μl) 3M NaAc (pH4.5)。

(11) 低速旋涡 5-10s (轻弹)。

(12) 14000rpm, 离心 10min。

(13) 倒掉上清, 空气干燥沉淀。

(14) 加入 20 μl TE (10/0.1 pH7.5)溶解沉淀

(15) 低速旋涡 5-10s (轻弹)。

(16) 1 μl 纯化产物于 0.8%凝胶进行电泳检测。

### 5) Genomic DNA 与 Genomewalker Adaptor 连接

(1)于 0.5ml 离心管中加入

酶切 DNA	4μl
Genome walkeA daptor	1.9μl
10×Ligation Buffer	1.6μl
T <sub>4</sub> Ligase (6u/ul)	0.5μl
Total	8μl

(2)16°C 过夜

(3) 70°C 保育 5min

(4) 加入 TE 72  $\mu\text{l}$  (TE 10/1 pH7.5)

(5) 轻弹 5-10s

6) PCR

(1) 1st PCR

① 配制 PCR 反应液

ddH <sub>2</sub> O	33.5 $\mu\text{l}$
10 $\times$ LA Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	5 $\mu\text{l}$
dNTPMix	8 $\mu\text{l}$
Ap1	1 $\mu\text{l}$
Gsp1	1 $\mu\text{l}$
连接产物	1 $\mu\text{l}$
LA Taq (TaKaRa)	0.5 $\mu\text{l}$
Total	50 $\mu\text{l}$

② 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$  25s, 72 $^{\circ}\text{C}$  3min  $\times$ 7; 94 $^{\circ}\text{C}$  25s, 67 $^{\circ}\text{C}$  3min  $\times$ 32; 67 $^{\circ}\text{C}$  7min。

(2) 2nd PCR

1) 取 1  $\mu\text{l}$  1st PCR 产物 49  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O 中, 稀释 50 倍

① 配制 PCR 反应液

ddH <sub>2</sub> O	33.5 $\mu\text{l}$
10 $\times$ LA Buffer(Mg <sup>2+</sup> plus)	5 $\mu\text{l}$
dNTPMix	8 $\mu\text{l}$
Ap1	1 $\mu\text{l}$
Gsp2	1 $\mu\text{l}$
1st PCR 产物稀释液	1 $\mu\text{l}$
LA Taq(TaKaRa)	0.5 $\mu\text{l}$
Total	50 $\mu\text{l}$

② 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$  25s, 72 $^{\circ}\text{C}$  3min  $\times$ 5; 94 $^{\circ}\text{C}$  25s, 67 $^{\circ}\text{C}$  3min  $\times$ 20; 67 $^{\circ}\text{C}$  7min。

(3) 取 5  $\mu\text{l}$  第二轮 PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上进行电泳分离。回收纯化电泳片段克隆到 pMD-18T 载体, 进行鉴定和测序。

(4) 获得基因组 DNA 5' 及 3' 侧翼序列后, 将其与基因组 DNA 的核心片断进行拼接。这就获得了基因组 DNA 的全序列。

注: 基因组步行法扩增 5' 侧翼序列和 3' 侧翼序列的方法相一致, 只是 PCR 反应所用的接头引物和基因特异引物不同。

## 第三部分 定量 PCR

### 一. 原理

应用定量 PCR 技术,用一种标准作对照能够估计出一种特异性靶 DNA 或 RNA 分子的相对含量。

参照物:

在定量 PCR 中必须加入参照物,用来作为扩增系统的阳性对照,并作为未知样本定量的标准,且通过竞争性作用校正扩增系统内管间的扩增效率,使其具有可比性。参照物按其性质不同可分为内参照和外参照。

内参照和外参照均是在定量 PCR 过程中一种含量已知的标准品模板。根据参照物的不同,定量 PCR 分为竞争性定量 PCR 和非竞争性定量 PCR。内参照是与待检样本加于同一反应管中,与样本共用或不共用同一对引物的标准模板。共用同一对引物者,两个模板的扩增存在竞争性,称竞争性内参照,这种条件下进行的定量 PCR 属竞争性定量 PCR;相反,不共用同一对引物时则不存在竞争性,为非竞争性内参照,属非竞争性定量 PCR。

外参照则是参照物与待检样本的扩增分别在不同的管间进行。采用外参照进行的定量 PCR 属非竞争性定量 PCR。

非竞争性对照基因定量法:

即是靶基因与参照基因的同步扩增。是在同样的反应条件下,在一个试管内同步扩增来自同一 DNA 的一段靶序列和另一段内标序列(通常是管家基因或它们的 mRNA)。此内标序列可控制 DNA 的量、可扩增性和管间扩增效率的变化。通过比较两种序列的扩增产物电泳带的颜色强度对靶基因定量。此法只有在靶序列和作为对照的内标序列的含量及扩增效率相似时才能得到准确的定量结果。这种扩增效率的差异常发生在 PCR 的终末期,所以最好定量处于扩增指数期的 PCR 产物。扩增后可通过测量电泳带的相对强度而定量。只有当靶序列和内标序列以相同的量存在时,才能对两者进行相对定量。

竞争性 PCR:

竞争 PCR 与前述方法相似,即靶基因与参考标准在同一反应管中共同扩增,但参照标准通常是一段人工合成的模板而不是内源性基因。竞争 PCR 必须构建一个内部标准,此标准能与靶基因竞争聚合酶、核苷酸和引物分子,具有相同的引物结合位点,其扩增产物能通过电泳或高效液相色谱(HPLC)等方法区分开来。对竞争性模板作系列稀释后加入到恒量的样品 DNA 中进行 PCR,靶基因的量取决于所添加的竞争性 DNA 片段的量,使两者的 PCR 终产物有相等摩尔数。竞争 PCR 有效地控制了不同反应管间扩增效率的差异。若反应条件达到要求,可不必使反应限制于指数扩增期,靶序列可在较大范围内获得定量并能检测到其 2 倍的差别。因此,竞争性 PCR 是应用最广的定量 PCR 方法。通过竞争性 PCR 进行绝对定量的条件是靶序列和竞争序列的扩增效率相同、引物相同,靶基因和竞争基因的初始比值在整个反应过程中保持不变。

## 二. 材料与方法

### 1. 使用外参照的半定量 PCR

#### 1) 肝脏总 RNA 的提取与定量

(1) 肝脏总 RNA 的提取按第二部分实验一进行。

(2) 肝脏总 RNA 的定量

将提取的总 RNA 稀释一定的倍数后,用紫外分光光度计测定 260nm 和 280nm 两个波长处的光吸收值,然后按以下公式来计算提取得到的总 RNA 的浓度:

$$[\text{RNA 浓度}] = A_{260} \times 40 \times \text{稀释倍数} \quad \mu\text{g/ml}$$

260nm 和 280nm 两处读数的比值 ( $A_{260}/A_{280}$ ),可反映核酸的纯度。DNA 和 RNA 纯品的  $A_{260}/A_{280}$  的值分别为 1.8 和 2.0 如果样品中有蛋白质或酚的污染,则  $A_{260}/A_{280}$

将明显低于此值，此时就无法对样品中的核酸进行精确定量。

获得总 RNA 浓度后，用 RNase-Free Water 将总 RNA 浓度调整为 1μg/μl。

## 2) cDNA 样品的制备

### (1) 材料

RNA样品

### (2) 仪器、用具

PCR仪、电泳仪等、0.2mlPCR管（1个）、移液器、碎冰

### (3) 试剂

RNase Free dH<sub>2</sub>O; 5×RT Buffer(含25mM Mg<sup>2+</sup>); dNTP(10mM each); RNase Inhibitor (10U/μl); Oligo (dT)<sub>20</sub>(10μmol/L); ReverTra Ace

## 3) 方法

(1) 以总 RNA 为模板，合成 cDNA 第一链，体系如下：

RNase Free dH <sub>2</sub> O	10μl
5×RT Buffer(含 25mM Mg <sup>2+</sup> )	4μl
dNTP(10mM each)	2μl
RNase Inhibitor (10U/μL)	1μl
Oligo (dT) <sub>20</sub> (10μmol/L)	1μl
总 RNA 模板 (1μg/μl)	1μl
ReverTra Ace	1μl
Total	20μl

(2) 反转录反应条件为：30℃ 10min, 42℃ 30min, 99℃ 5min, 4℃ 5min。

注：必须将所有样品的总 RNA 的加样量均为 1

## 4) PCR

### (1) 待测基因 cDNA 片断的获得

① 根据待测基因的已知序列设计一对特异引物，利用该引物进行 PCR 反应。PCR 反应体系为：

dd H <sub>2</sub> O	36.5μl
10×PCR Buffer(Mg <sup>2+</sup> plus)	5μl
dNTP(2.5mM)	4μl
上游引物 P <sub>1</sub>	1μl
下游引物 P <sub>2</sub>	1μl
cDNA 模板	1μl
rTaq 酶(TaKaRa)	0.5μl
Total	50μl

② PCR 扩增反应条件：94℃预变性 3min; 然后进行 30 个循环反应，其温度循环条件为：94℃变性 1min, 55℃退火 1min, 72℃延伸 1min; 循环结束后 72℃再延伸 5min。

### (2) 外参照 β-肌动蛋白 cDNA 片断的获得

① 根据 β-肌动蛋白基因序列设计一对特异引物，利用该引物进行 PCR 反应。PCR 反应体系为：

dd H <sub>2</sub> O	36.5μl
10×PCR Buffer(Mg <sup>2+</sup> plus)	5μl

dNTP (2.5mM)	4μl
ACT01F	1μl
ACT02R	1μl
cDNA 模板	1μl
rTaq 酶 (TaKaRa)	0.5μl
Total	50μl

- ② PCR 扩增反应条件：94℃预变性 3min；然后进行 30 个循环反应，其温度循环条件为：94℃变性 1min，55℃退火 1min，72℃延伸 1min；循环结束后 72℃再延伸 5min。
- (3) PCR 产物经在 2%琼脂糖凝胶上电泳后用凝胶成像系统及相关软件进行分析，结果以待测基因与 β-肌动蛋白 mRNA 的 RT-PCR 产物亮度之比（%）表示。

2. 使用竞争性内参照的定量 PCR

- 1) 肝脏总 RNA 的提取与定量、组织 cDNA 样品的制备  
方法见 1。
- 2) 竞争标准 cDNA 的制备

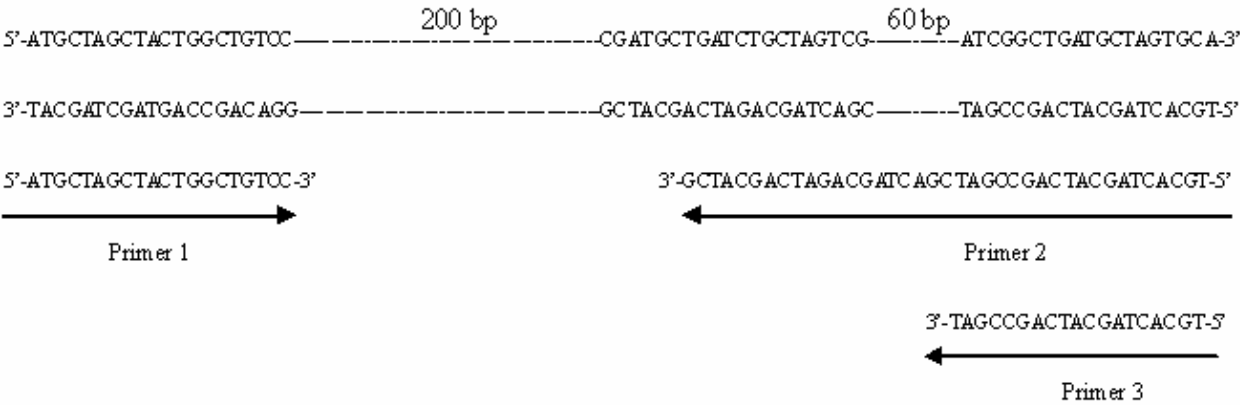


图 4—4。 竞争 PCR 引物设计示意图

- (1) 根据待测基因序列设计一对引物（图 1），用正向特异引物 Primer1 和特别设计的反向引物 Primer2 进行 PCR 扩增：
- (2) PCR 反应体系为：

dd H <sub>2</sub> O	36.5μl
10×PCR Buffer(Mg <sup>2+</sup> plus)	5μl
dNTP (2.5mM)	4μl
Primer 1	1μl
Primer 2	1μl
组织 cDNA	1μl
rTaq 酶 (TaKaRa)	0.5μl
Total	50μl

- (3) PCR 扩增反应条件：94℃预变性 3min；然后进行 30 个循环反应，其温度循环条件为：94℃变性 1min，55℃退火 1min，72℃延伸 1min；循环结束后 72℃再延伸 5min。
- (4) 在 1%琼脂糖凝胶上对 PCR 产物进行电泳检测，方法与试验二相同。

(5) PCR 产物经在 2%琼脂糖凝胶上电泳分离后, 将 PCR 产物进行胶回收, 方法与实验六(一)相同。结果就得到一竞争标准 cDNA 片断, 该片断相当于待测片断内部产生 1 个 60bp 的缺失。

3) 竞争 PCR

(1) 通过连续 2 倍稀释配制系列浓度的 cDNA 竞争标准, 这些竞争标准 cDNA 梯度溶液分别加入到一定量的组织 cDNA 样品中(预实验确定), 再用正向引物 Primer 1 和 Primer 3(图 1) 同时扩增组织中的待测基因 cDNA 和竞争标准 cDNA, PCR 扩增体系如下:

dd H2O	35.5μl
10×PCR Buffer(Mg2+ plus)	5μl
dNTP(2.5mM)	4μl
Primer 1	1μl
Primer 3	1μl
组织 cDNA	1μl
序列稀释的竞争标准 cDNA	1μl
rTaq 酶(TaKaRa)	0.5μl
Total	50μl

(2) PCR 扩增反应条件: 94℃预变性 3min; 然后进行 30 个循环反应, 其温度循环条件为: 94℃变性 1min, 55℃退火 1min, 72℃延伸 1min; 循环结束后 72℃再延伸 5min。

(3) PCR 产物经在 2%琼脂糖凝胶上电泳(方法与试验二相同)后用凝胶成像系统及相关软件进行分析, 样品待测基因 cDNA 条带与竞争标准 cDNA 条带可据片断大小而区分并定量。根据样品待测基因 cDNA 条带与竞争标准 cDNA 条带亮度之比, 则可利用竞争标准 cDNA 确定组织样品待测基因 cDNA 含量, 再通过样品待测基因 cDNA 的 PCR 产物分子量将其含量换算成待测基因 mRNA 数量。

第四部分 Northern 杂交

一. 原理

Northern 杂交是用来测量真核生物 RNA 的量和大小估计其丰度的实验方法, 可以从大量的 RNA 样本同时获得这些信息。其基本步骤包括:

- 1. 完整 mRNA 的分离
- 2. 根据 RNA 的大小通过琼脂糖凝胶电泳对 RNA 进行分离
- 3. 将 RNA 转移到固相支持物上, 在转移的过程中, 要保持 RNA 在凝胶中的相对分布
- 4. 将 RNA 固定到支持物上
- 5. 固相 RNA 与探针分子杂交
- 6. 除去非特异结合到固相支持物上的探针分子
- 7. 对特异结合的探针分子的图像进行检测、捕获和分析

二. DNA 探针的制备与标记

1. 材料

纯化的 PCR 产物

## 2. 仪器

电泳仪, 紫外分析仪, 离心管, 移液枪, 碎冰

## 3. 试剂

10× transcription buffer; 10× nucleotide mix (10mm each ATP GTP CTP); 20U RNase inhibitor; 40U T7, T3 or SP6 RNA Polymerase; DMPC 处理水; DNase I (40U) RNase free; EDTA (0.2M PH 8.0); RNA-free water (含 40 U RNase inhibitor)

## 4. 方法

(1) 将 10ng-3μg 纯化模板 DNA, RNase-free 水加到灭菌 RNase free 1.5ml 离心管中, 终体积为 15 μl。

(2) 沸水浴 10min 后快速置于冰上。

(3) 依次加入下列试剂

10× Hexanucleotide MIX	2 μl
10× NTP Labeling mix	2 μl
Klenow enzyme labeling grade	1 μl

(4) 短暂离心, 温和混合, 37℃ 保育 1-20h。

\*注意: 过长时间保育不能增加标记 RNA 产量

\*注意: 仅在 RNase 保护试验中被要求。

(5) 加 65℃ 温育 10min 或加入 2μl 0.2M EDTA (PH 8.0) 终止反应。

(6) 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 探针长度。

(7) 探针分装保存在 -20℃ 备用

\*注意: 避免探针反复冻融。

# 三. Northern 杂交

## 1. RNA 分离与转膜

### 1) 材料

注: 实验中所有的试剂的配置都要使用无 RNase 的水。

(1) 10 × BPTE 电泳缓冲液

100mmol/L PIPES (piperazine-1, 4-bis (2-ethanesulfonic acid), 哌嗪-, N' -双(2-乙磺酸)); 300mmol/L Bis-Tris (bis [2-hydroxyethyl] iminotris [hydroxymethyl] methane); 10mmol/EDTA (pH8.0); 10 × 缓冲液的最终 pH 值约为 6.5。10 × 缓冲液的配置: 将 3g PIPES (游离酸), 6g Bis-Tris (游离碱), 2ml 0.5 mol/L 的 EDTA (pH8.0) 加到 90ml 双蒸馏水中, 在 37℃ 用终浓度为 0.1% 的 DEPC 处理 1h, 然后高压灭菌

(2) 乙二醛

商业储存的乙二醛溶液(40% 或 6mol/L) 含有各种水合形式的乙二醛, 一些氧化产物, 如乙二醛酸、蚁酸及一些能降解 RNA 的化合物, 因此必须去除这些杂质。

(3) 乙二醛反应混合物

6 ml DMSO, 2 ml 去离子乙二醛, 1.2 ml 10 × BPTE 电泳缓冲液, 0.2 ml 溴乙锭 (10 mg/ml 水溶液), 分装成小份, 贮存于 -70℃。

### 2) 方法

电泳分离 RNA:

(1) 配置乙二醛变性反应液。在无菌离心管中混合:

RNA (总共 10 μg)	1 ~ 2 μl
乙二醛反应混合液	10 μl

每个电泳泳道中可分析 10μg RNA。用 Northern 法可分析 10μg 总细胞 RNA 即可检测



到其中的大量 mRNA。要检测到稀有 RNA 则需要至少 1.0 $\mu$ g poly (A)<sup>+</sup> RNA。RNA 相对分子质量标准参照物应当像待测样品一样的乙二醛反应液中制备。

- (2) 盖上离心管的盖子。将 RNA 溶液在 55℃ 放置 60 min, 在冰水中冰浴 10 min, 然后离心 5s, 使所有液体沉到离心管底部。
- (3) 在样品加热过程中, 将琼脂糖凝胶装到水平电泳仪的盒子中。加入足够的 1×BTE 电泳缓冲液, 使其没过凝胶约 1 mmol/L。
- (4) 将 1 ~ 2  $\mu$ l RNA 上样缓冲液加到乙二醛化的 RNA 样品中, 然后马上把 RNA 样品加到凝胶加样孔中, 留着两边最外面的两个孔不要加样。将 RNA 相对分子质量标准参照物加到最外面的孔中。
- (5) 以 5V/cm 的电压进行电泳, 直到溴酚蓝迁移大约 8 cm。
- (6) 将凝胶放在保鲜膜上, 在紫外灯下观察 RNA。把透明尺和凝胶对齐, 在紫外灯下拍照。
- (7) 在照片上量出从加样孔到各 RNA 条带的距离。以 RNA 片断大小的对数 (log<sub>10</sub>) 值对迁移的距离作用。用得到的曲线计算点杂交检测到的 RNA 的大小。
- (8) 利用半干转印系统把 RNA 固定在固体支持物上。

变性 RNA 的转移和固定:

- (1) 将凝胶转移至培养皿中, 用锋利的刀片修去凝胶的无用部分, 在凝胶的左上角切取一角作为标记。
- (2) 将凝胶置于 0.5×TBE 中平衡 30min。
- (3) 用切纸刀裁一张长宽均大于胶 1mm 的尼龙膜, 切去膜一角, 使其与凝胶的切角对应。
- (4) 将尼龙膜和 6 张与胶大小一致的滤纸置于 0.5×TBE 中平衡 10min。
- (5) 将 3 张滤纸平铺于电转移装置的金属箔片上 (阳极), 用玻棒赶走所有气泡。
- (6) 将已平衡的尼龙膜平铺于滤纸上, 用玻棒赶走所有气泡。
- (7) 小心将凝胶置于尼龙膜上, 并使两者的切角相重叠, 确保胶与膜之间没有气泡。
- (8) 将另外 3 张滤纸置于胶上, 用玻棒赶走所有气泡。
- (9) 于最上层加入约 15ml 转移缓冲液 (0.5×TBE) 以湿润滤纸。
- (10) 将支持框至于胶/膜/滤纸四周, 接上阴极电极, 盖上安全盖, 接上电源供给装置 (确保电极插头连接正确), 给予 3mA/cm<sup>2</sup> 的恒流, 转移时间一般为 30-35min (电转过程中, 电压保持在 20V 左右, 若超过 25V, 则须终止转移)。
- (11) 电转结束后, 用 2×SSC 漂洗尼龙膜。
- (12) 将尼龙膜置于一张干的滤纸上, 在波长 254nm 处按照 0.120J/cm<sup>2</sup> 的剂量照射 3min。

## 2. 杂交

### 1) 试剂

DIG Easy Hyb

### 2) 方法

- (1) 45℃ 预热 DIG Easy Hyb (20ml/100cm<sup>2</sup>) (不能煮沸)。
- (2) 杂交仪温度调至 45℃。
- (3) 向杂交膜加入 2ml 的 45℃ 预热杂交液, 开泵测试流速, 然后关泵;
- (4) 再加入 2ml 的预热杂交液作预杂交 (最少 5min);
- (5) 将 DIG 标记的 DNA 探针沸水浴 5min 进行变性后快速转置冰上。
- (6) 将变性的 DIG 标记的 DNA 探针加入预热的 DIG Easy Hyb (3.5ml/100cm<sup>2</sup> 膜)。小心混匀, 避免产生泡沫。
- (7) 开泵排走预杂交液。
- (8) 关泵, 等到负压消失, 加入上述探针/杂交液, 温育至少 6h。

开泵排走 DNA 样品溶液 (注意: 每次开泵应完全抽走薄膜上的试剂)。注: 杂交温度因不同探针而异。

## 3. 洗脱

- (1) 用 2×SSC, 0.1% SDS 于 15-25℃ 洗脱 2 次, 每次 5min。
- (2) 用 0.5×SSC, 0.1% SDS 于 65-68℃ 洗脱 2 次, 每次 15min。

#### 4. 显色

##### 1) 材料

DIG-labeled 核苷酸

##### 2) 试剂

- (1) Washing buffer: 0.1M Maleic acid, 0.15M NaCl; pH7.5 (20℃); 0.3% (v/v) Tween20
- (2) Maleic acid buffer: 0.1 M Maleic acid, 0.15M NaCl; 用 NaOH (固体) 调节 pH 到 7.5 (20℃)
- (3) Detection buffer: 0.1M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH9.5 (20℃)
- (4) TE buffer: 10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH 8.0
- (5) Blocking stock solution: 用 Maleic acid buffer 将 Blocking reagent 稀释为 10% (w/v)
- (6) Blocking solution: 用 Maleic acid buffer 将 10× Blocking reagent 稀释为 1×working solution
- (7) Antibody solution: 每次使用前将 Anti-Digoxigenin-Ap, 10000rpm 离心 5min, 用 Blocking solution 将 Anti-Digoxigenin-AP 稀释 5000 倍
- (8) Color substrate solution: 于 10ml Detection buffer 贮藏液中加入 200μl NBT/BCIP(避光保存)

##### 3) 方法:

- (1) 把杂交仪温度调至 25℃。
- (2) 杂交后按严格的步骤洗脱后, 用 Washing buffer 简单的清洗。
- (3) 于 100ml Blocking buffer 中保育 30min。
- (4) 在 20ml Antibody solution 中保育 30 min。
- (5) 用 100ml washing buffer 洗 2\*15min。
- (6) 在 20ml Detection buffer 中平衡 2-5min。
- (7) 在黑暗的合适的容器中, 将膜于 10ml 新鲜配制的 Color substrate solution 中保育 0.5h-16h (该过程不要摇动, 可一段时间的暴露灯光下观察染色情况)。
- (8) 当所需的颜色呈现时, 用 50ml 灭菌的双蒸水或 TE-buffer 冲洗膜。

(梁旭方 方玲编写)

## B 细胞工程部分

### 实验九 转基因斑马鱼实验

转基因动物 (transgenic animal) 是指基因组中整合有外源基因的一类动物, 整入动物基因的外源基因被称为转基因 (transgene)。嵌合体动物 (chimera mosaic animal) 是只有部分组织细胞的基因组中整合有外源基因的动物, 称为嵌合体动物 (chimera mosaic animal)。这类动物只有当外源基因整合入的“部分组织细胞”恰为生殖细胞时, 才能将其携带的外源基因遗传给子代, 一般用胚胎干细胞法或逆转录病毒载体法制备的第一代转基因动物均为嵌合体动物, 而显微注射法得到的第一代转基因动物中, 也有 20% 为嵌合体动物。转基因动物是指动物所有细胞均整合有外源基因, 则具有将外源基因遗传给子代的能力, 通常被称为转基因动物。转基因动物技术是常规分子生物学技术的延伸和拓展, 它不仅为人们研究生命科学提供了一个更有效的工具, 而且随着转基因动物技术的发展, 转基因产品将会广泛渗透到医疗、卫生、农产品和食品中。

转基因技术是生物学领域最新重大进展之一, 已能渗透到生物学、医学、畜牧学等学科的广泛领域。转基因动物已成为探讨基因调控机理、致癌基因作用和免疫系统反应的有力工具。同时人类遗传病的转基因动物模型的建立, 为遗传病的基因治疗打下坚实的理论和实验基础。转基因技术涉及外源基因的组建、载体、受体、基因导入技术、供转基因胚胎发育的体外培养系统和宿主动物等方面的内容。

鱼类是脊椎动物中最丰富多样性的类群, 估计达 30000 种。这种多样性反映在诸如形态、行为、生殖、发育、世代时间和对环境的耐受等各种特征的广泛差异, 从而使各种转基因鱼模型的常规制作既是挑战, 又是机遇。有的鱼类的卵是透明的, 能直接对发育进行监察, 有的情况下对活体内报告基因的表达进行判断。有些鱼种类还可能进行其他的遗传操作来诱导单倍体、三倍体和纯合子产雌品系。

尽管鱼种类很多, 但作研究用的却要少的多。因为野生种群的持续减少, 为帮助满足高质量蛋白质需要, 水产养殖较常用鱼是鳊鱼、虹鳟鱼、罗非鱼、大西洋鲑和鲤鱼。有些种类如虹鳟鱼和鲤鱼的体积大, 有助于器官或组织的操作、样品采集和简易外科程序的进行。有些种类如青鳉、剑尾鱼、斑马鱼和底鳉等, 因体积小、世代时间短和实验室培养成本低, 也作为人类疾病、脊椎动物发育、毒理学和遗传研究的动物模型, 且被广泛应用。

研究转基因动物的制备, 首先要考虑用何种转基因受体细胞。选择合适的受体细胞和可行的基因导入途径, 是该技术成功的前提。基因转移的受体细胞必须是全能细胞, 全能细胞随着细胞分化、胚胎发育, 可以把其中的基因组贮存的全部遗传信息扩大到生物体所有的细胞中。除此以外至少是多能细胞。满足转基因动物需要的受体细胞有以下几种。

(一) 原生生殖细胞: 禽类的原生生殖细胞容易分离、培养和冷冻, 所以, 这种受体细胞在禽类动物较易实现。(二) 配子: 配子能把自身携带的基因组全部信息和外源插入基因序列, 完整地贡献给合子。由于精子可用作有效的转移载体, 所以, 可以精子作为目的基因的受体。较多的是用重组病毒直接感染精子, 精子即可把外源基因传到合子。

(三) 受精卵或胚胎内细胞团: 精卵结合形成的单细胞受精卵, 是最常用的外源基因转移的受体; 受精后的早期胚胎及囊胚期稍后的胚胎含有的内细胞团, 该细胞团内含有未分化的胚胎干细胞, 也可认为是全能的, 或至少是多能性的, 所以, 用该时期的内细胞团或囊胚期的细胞作为外源基因的受体细胞, 也可望达到基因转移的目的。但这种情况下制备的转基因动物

多为嵌合体。

## 一. 斑马鱼实验室繁殖与操控技术

斑马鱼原产于印度、孟加拉等国,属鲤科。是一种亚热带淡水观赏经济鱼类,成鱼体长大约 5cm,呈黄褐色,体表从头到尾覆盖着水平方向的蓝紫色条纹,故又称蓝条鱼。雄性皮肤偏柠檬色,雌性皮肤偏银灰色,鳍条宽大,发达,外观十分美丽。

繁殖特性:4月龄性成熟,5月龄体成熟,繁殖周期短,一般7天左右,一年四季都可产卵,产卵可达300~1000粒,成活率高。40日龄即可上市,市场价每条1元左右,成本低,养殖效益较显著,是一种短、平、快的淡水观赏经济鱼类。

斑马鱼除了具有经济、观赏价值外,由于体小、卵大、卵径1~1.5mm,繁殖周转快,目前已成为研究脊椎动物(包括灵长类)胚胎发育及对外界环境变化,如紫外线、重金属盐类、农药、工业污水、放射性物质等对人类影响的良好研究材料;是一种极好的实验模式鱼;是取代青蛙、果蝇、小白鼠等作为研究对象的优良试验材料;其发展前景十分广阔。

性别鉴定:首先看皮肤,偏银灰色的为雌性,偏柠檬色的为雄性。其次性成熟的雌鱼体形丰满,腹部膨大、松软,仰腹可见有明显的卵巢轮廓,手摸富有弹性。雄性斑马鱼腹部扁平,身材显得修长。

### 1. 斑马鱼受精卵实验室获取

受精将亲鱼公、母分开饲喂2~3天(相互之间能够看到,可在饲养箱中加一玻璃隔板,将公、母分开)繁殖时将公、母按1~2:1比例放入产卵池中进行产卵受精。斑马鱼一般凌晨产卵,为防止亲鱼吞噬鱼卵,可用网孔2~3mm的网将亲鱼限制在产卵池的上半部活动,以防止亲鱼吞吃鱼卵。每条雌鱼可产卵300~1000粒。

### 2. 斑马鱼的卵的孵育

人工孵化受精结束后获得的受精卵要及时捞出,剔除异物,将眼观有白色小斑点、畸形异常卵去除。然后将受精卵移入培养箱中进行孵化,温度为25~28℃,温差不能够超过0.5℃。这期间可在解剖镜下观察胚胎的发育状况。大约经过2天孵化,小鱼就可出膜,刚出膜的鱼苗游泳能力低,静卧于水底。

### 3. 斑马鱼孵化后的喂养

孵化时应注意:①虹吸出产卵池底的受精卵时要用直径1cm左右的皮软管,如果用硬质的吸管,有可对受精卵造成损伤。②孵化用水、清洗用水,水质要好,水温相差不宜过大,要保持相对恒定,对受精卵来说,剧烈的温度变化会引起胚胎死亡。③孵化期间每天要及时清除败育卵,勤换水。

刚孵出的仔鱼呈淡黄色,在解剖镜下可见到跳动的心脏,流动的血液,腹部有一很大的、未吸收的卵黄囊。头2~3天仔鱼静卧于水底,此时不需要饲喂。注意及时将卵膜和白色的死卵捞出,每天更换新水,将鱼苗置于温室内,温度为25℃(可放在空调房间内)。3~4日龄时仔鱼可自由游泳(平游)并开始觅食,此时可用绢网取少许蛋黄在水中轻轻地搅动,至水微呈淡黄色。适当加喂钙素母片、复方VB液、土霉素等,以提高鱼苗的成活率。喂要少量多餐,日喂3~4次。7~10日龄时加喂草履虫,啤酒酵母等,3周龄投喂卤虫的无节幼体,并逐渐添喂配合饲料。在饲喂过程中要注意水质的变化,勤换水,少喂勤添,以确保鱼苗健康成长。

### 4. 转基因技术

将成功开发转基因小鼠的各种程序按照鱼类的特点进行应用,在加速转基因鱼的研究上已经得到明显的成果。但是,小鼠与鱼类之间的若干重要差别对哲学方法在鱼类上的应有程度有所限制。首当其冲的是小鼠与鱼类卵的差别。与小鼠卵相反,鱼卵是大的,由一层硬卵

壳所包围，前核位置难以确定。为此尝试过各种方法进行研究，成功程度都不相同。基因移植的方法包括细胞质的显微注射，发生泡的显微注射，胚胎或精子的电转移，逆转录病毒感染及颗粒枪攻击等。最近，用胚胎细胞进行细胞核移植和细胞介导的基因转移也已被证明是成功的。

显微注射法：

在显微镜下，可借助显微操作仪，将毛细玻璃管直接插入受精卵的雄原核中(较大的原核)，注入特定的外源基因，即为基因显微注射法。此法的优点是，在一定设备和经验条件下，实验过程大为简化；任何 DNA 顺序都可直接导入原核内，导入的外源 DNA 在卵裂前与受体基因组整合，其缺点在于导入的外源 DNA 通常以多拷贝串联的形式随机地整合于受体基因组中，妨碍其表达的正常调节。

用拉制的毛细血管针往刚受精的乱的细胞质注射 DNA 是制作转基因鱼的最可靠方法，其生殖系遗传和转基因表达的效率皆令人满意。因此，这种程序仍然是将 DNA 导入与基因组的最常用方法。往细胞质进行 DNA 显微注射产生转基因鱼的一般的步骤是：①准备育种种群；②收集受精卵；③向 1-细胞胚胎细胞质注射 DNA；④鉴定携带转基因的鱼；⑤将首代动物与野生型鱼交配确证通过生殖系遗传。下面的方法是水生生物技术与环境实验室在制作转基因青鳞时所用的方法，或许可代表制作其他转基因鱼类可采取的程序。青鳞是小型的水生鱼类，是在包括毒理学、遗传学和发育生物学在内的各种领域中广泛采用的模式物种。该物种具有许多有益的特征，包括世代时间较短、管理上具有成本效益、生殖上的多产能力以及透明的卵壳很适合于作转基因研究。

鱼类和哺乳类显微注射用的 DNA 的制备和操作的基本步骤基本相同。为提高胚胎的存活率和获得转基因首代动物的总效率，需要用保证 DNA 最佳纯度的标准方法制备 DNA 构件。

转基因整合的效率取决于注射的 DNA 浓度，而卵的存活能力与 DNA 浓度则呈相反的关系。因此，需在胚胎存活与整合效率之间寻求一种这种折衷办法。控制注射到细胞的 DNA 量是通过 DNA 浓度而不是注射 DNA 溶液的体积来调节。为代偿注射到大体积的细胞质导致 DNA 的稀释，为使注射的 DNA 进入细胞核达到适当的概率，而同时也使注射后的胚胎维持令人满意存活率(50%)，注射时所用 DNA 的浓度应配成 50~200ng/ml (约大于  $10^4 \sim 10^6$  转基因靠拷贝)。DNA (5 $\mu$ l) 通过微量装液移液管反填装入注射针。当心不要引入气泡，以免可能干扰 DNA 的流速。此外，还有一些其它的方法，都有不同的优缺点。

理论上，一个完整的拷贝即足够。但是表达水平可能与基因数量相关；拷贝数较高可能导致表达的提高。一般地说，真正的结果并非对所有基因都如此；事实上，异乎寻常的高拷贝数可导致表达水平低。高拷贝数不仅影响表达水平，也影响转基因位点的遗传稳庄性。大量的串列重复元件可能造成染色体内的重组，导致重排、缺失、断裂和置换。我们的经验是 2~5 拷贝大多是理想的。

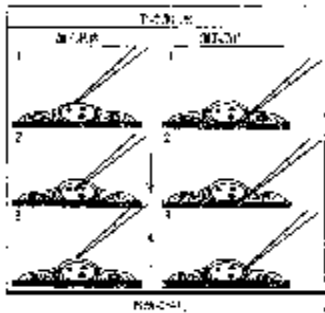


图 9-1. 手动注射示意图

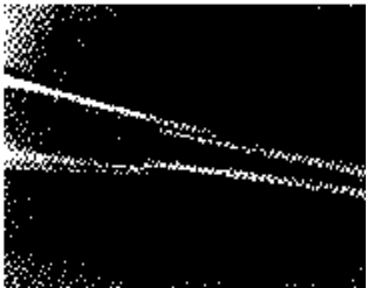


图 9-2. 针头中的液面



图 9-3. 注射过程

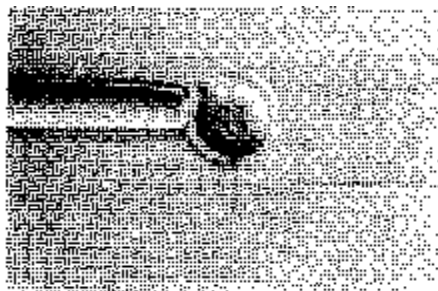


图 9-4. 注射针与持定针

## 二. 实验步骤

### 1. 转基因鱼制备

#### (1) 材料

斑马鱼1细胞期受精卵

#### (2) 仪器、用具

手动显微注射器、体式显微镜、倒置显微镜、眼科镊、摄像系统（JVC）、注射针、发圈、小酒精灯、数码相机、硼硅酸玻璃毛细管

#### (3) 试剂

准备好的重组目的片段的质粒

#### (4) 方法

(1) 注射外源 DNA 的处理，注射时所用的 DNA 浓度应配成  $0.15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

(2) DNA ( $5 \mu\text{l}$ ) 填装入注射针，不要引入气泡，以免干扰注射。

(3) 将成批分选和洗净的卵移到有琼脂糖的表面皿中。

(4) 一边轻轻地用眼科镊将卵固定，将卵定位在视野中心，使动物极方向向上。

(5) 注射前小心将显微注射针定位，将针垂直定位到卵表面是穿透坚硬的卵壳注射成功的关键。

(6) 然后推动注射针，使其刺入受精卵的动物极一细胞中，将 DNA 注入 (约  $2\text{nl}$ )。

(7) 注射完毕，慢慢抽出注射针，将受精卵放入装有水的培养皿中，使其恢复。一般  $50\sim 80\%$  的受精卵在显微注射后仍保持健康。(抽针是一种不间断的运动)。

### 2. 转基因鱼的孵化

斑马鱼在干净的水中孵化注射后的卵，及时清除死去的卵，并记录正常发育和死亡的卵数。

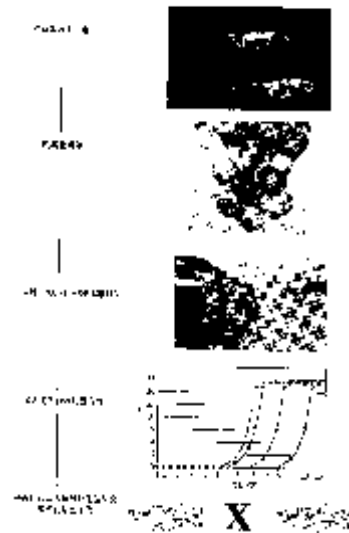


图 9-5。通过 1-细胞胚胎细胞质进行转基因鱼制备流程

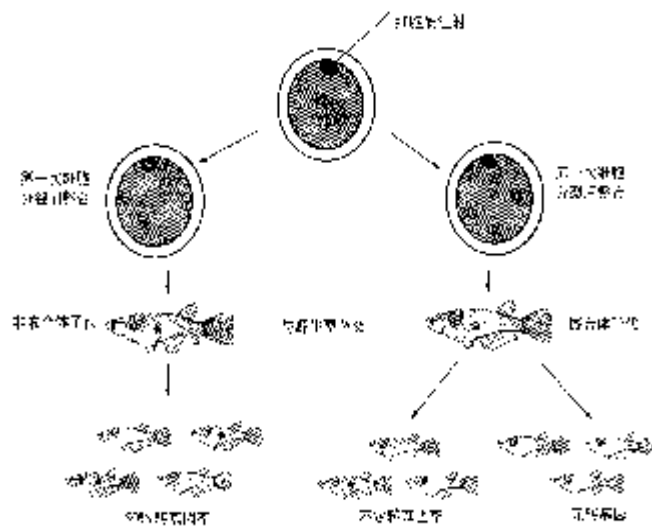


图 9-6。第一次细胞分裂前后转基因整合的图解

(梁旭方 方玲编写)

## B 细胞工程部分

### 实验十 植物转基因技术

#### 一. 实验目的

通过本实验的学习, 了解和掌握植物转基因技术的原理和方法, 以及转基因植物的筛选和鉴定的基本过程。

#### 二. 实验原理

植物转基因技术(plant trasgenetic technology)是指把从动物、植物或微生物中分离到的目的基因, 通过各种方法转移到植物基因组中, 使之稳定遗传并赋予植物新的性状, 如抗虫、抗病、抗逆、高产、优质等。

##### 1. 植物基因转化的方法

目前已发展了许多用于植物基因转化的方法, 这些方法可分为 3 大类: 一类是载体介导的转化方法, 即将目的基因插入到农杆菌的质粒或病毒的 DNA 等载体分子上, 随着载体 DNA 的转移而将目的基因导入到植物基因组中。农杆菌介导和病毒介导法就属于这种方法。第二类为基因直接导入法, 是指通过物理或化学的方法直接将外源目的基因导入植物的基因组中。物理方法包括基因枪转化法、电激转化法、超声波法、显微注射法和激光微束法等; 化学方法有 PEG 介导转化方法和脂质体法等。第三类为种质系统法, 这包括花粉管通道法、生殖细胞浸染法、胚囊和子房注射法等。

##### (一) 载体介导的转化方法

###### 1 根癌农杆菌介导转化法

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)是普遍存在于土壤中的一种革兰氏阴性细菌。它能在自然条件下感染大多数双子叶植物的受伤部位, 并诱导产生冠瘿瘤(crown gall tumor)。根癌农杆菌细胞中含有 Ti 质粒(tumor-inducing plasmid, 瘤诱导质粒)。在 Ti 质粒上有一段 T-DNA(T-DNA region), 即转移-DNA(transfer-DNA), 又称为 T 区(T region)。根癌农杆菌通过侵染植物伤口进入细胞后, 可将 T-DNA 插入到植物基因组中。因此, 根癌农杆菌是一种天然的植物遗传转化体系。人们将目的基因插入到经过改造的 T-DNA 区, 借助根癌农杆菌的感染实现外源基因向植物细胞的转移与整合, 然后通过细胞和组织培养技术, 再生出转基因植株。

##### (1) Ti 质粒的结构与功能

Ti 质粒是根癌农杆菌染色体外的遗传物质, 为双链共价闭合的环状 DNA 分子。Ti 质粒大约在 160~240kb 之间。其中 T-DNA 大约在 15kb-30kb。根据其诱导的植物冠瘿瘤中所合成的冠瘿碱种类, Ti 质粒可分为 4 类: 章鱼碱型(octopine)、胭脂碱型(nopaline)、农杆菌型(agropine)和农杆菌素碱型(agrocinopine)。

Ti 质粒可分为 4 个功能区域: ①T-DNA 区(transferred-DNA region): T-DNA 是根癌农杆菌侵染植物细胞时从 Ti 质粒上切割下来转移到植物细胞的一段 DNA; ②Vir 区(virulence region): Vir 区上的基因能激活 T-DNA 转移, 使根癌农杆菌表现出毒性; ③Con 区(regions encoding conjugations, 接合转移编码区): 该区段上存在与细菌间接合转移的有关基因, 调控 Ti 质粒在农杆菌之间的转移; ④Ori 区(origin of replication, 复制起始区): Ori 区上的基因调控 Ti 质粒的自我复制。



T-DNA 上共含有 *tms*、*tmr* 和 *tmt* 3 套基因。其中 *tms* 和 *tmr* 2 套基因分别控制合成植物生长素与分裂素，促使植物创伤组织无限制地生长与分裂，形成冠瘿瘤。*tms* 基因组由 *iaaH* 和 *iaaM* 2 个基因组成，控制由色氨酸产生生长素吲哚乙酸的生物合成途径；*tmr* 基因组中的 *iptZ* 负责由异戊烯焦磷酸和 AMP 合成分裂素的反应；*tmt* 基因组的编码产物可催化合成冠瘿碱(Opines)。冠瘿碱的代谢产物为氨基酸和糖类，是根癌农杆菌生长必需的物质，供根癌农杆菌作为营养使用。

此外，在 T-DNA 的两端还含有左右 2 个边界，左边界(left border, LB)和右边界(right border, RB)是长为 25bp 的末端重复顺序，在切除及整合过程具有重要意义。

## (2) Ti 质粒的转化机理

根癌农杆菌之所以会感染植物根部是因为植物根部损伤部位会分泌出酚类物质乙酰丁香酮和羟基乙酰丁香酮，这些酚类物质能诱导 Ti 质粒上的 *vir* 基因以及根癌农杆菌染色体上的一个操纵子表达。*vir* 基因产物将 Ti 质粒上的 T-DNA 单链切下，而根癌农杆菌染色体上的操纵子表达产物则与单链 T-DNA 结合形成复合物，转化植物根部细胞。整个过程大致可分为以下几个步骤：①根癌农杆菌对植物细胞的识别和附着；②根癌农杆菌对植物信号物质的感受；③根癌农杆菌 Ti 质粒上的 *vir* 基因以及染色体上操纵子的活化；④T-DNA 复合体的产生；⑤T-DNA 复合体的转运；⑥T-DNA 整合到植物基因组中。

## (3) 野生型 Ti 质粒的改造和中间载体的构建

Ti 质粒是植物基因工程的一种天然载体。但野生型 Ti 质粒不能直接用作克隆外源基因的载体。这主要表现在：①野生型 Ti 质粒分子过大，因而在基因工程中操作起来十分麻烦；②野生型 Ti 质粒上分布着各种限制型核酸内切酶的多个酶切位点，不论用何种限制型核酸内切酶切割，都会切成很大片段。而且即使在 T-DNA 上也很难找到可利用的单一的酶切位点；③T-DNA 上的 *tms* 和 *tmr* 基因产物将干扰受体植物内源激素的平衡，导致冠瘿瘤的产生，阻碍转基因植物细胞的分化和植株的再生；④冠瘿碱的合成过程消耗大量的精氨酸和谷氨酸，直接影响转基因植物细胞的生长代谢；⑤野生型 Ti 质粒没有大肠杆菌(*Escherichia coli*)的复制起点和作为转化载体的选择标记基因。因此，必须对野生型的 Ti 质粒进行改造后才能作为转基因植物的载体。

对野生型 Ti 质粒的改造，主要包括以下几个方面：①删除 T-DNA 上的 *tms*、*tmr* 和 *tmt* 基因；②加入大肠杆菌复制起点和选择标记基因，构建根癌农杆菌-大肠杆菌穿梭质粒，便于重组分子的克隆与扩增；③引入植物细胞的筛选标记基因，如细菌来源的新霉素磷酸转移酶 II 基因(neomycin phosphotransferase II, *NPT II*)等，便于转基因植物细胞的筛选；④引入植物基因的启动子和 polyA 化信号序列；⑤插入人工多克隆位点，以利于外源基因的克隆。⑥除去 Ti 质粒上的其它非必需序列，最大限度地缩短载体的长度。

由于大肠杆菌具有能与根癌农杆菌高效接合转移的特征。因此，为了使 Ti 质粒成为有效的外源基因导入载体，科学家们将 T-DNA 片段克隆进大肠杆菌的质粒，并插入目的基因，而后通过接合转移将目的基因引入到根癌农杆菌的 Ti 质粒。带有重组 T-DNA 的大肠杆菌衍生载体称为中间载体(intermediate vector)，而接受中间载体的 Ti 质粒则称为受体 Ti 质粒(acceptor Ti plasmid)。构建中间载体是解决 Ti 质粒不能直接导入目的基因的有效方法之一。中间载体是一种在一个普通大肠杆菌的克隆载体(如 pBR322 质粒)中插入了一段合适的 T-DNA 片段而构成的小型质粒。

## (4) 中间载体的表达构建

在中间载体中加上能在植物细胞中表达的各种启动子，可使外源基因在植物细胞中表达；当启动子与显性选择标记基因及报告基因连接，构成嵌合基因(chimeric gene)时，这些标记基因同样能表达，从而可提供用于筛选和鉴定的表型。这类含植物启动子的中间载体称为中间表达载体(intermediate expression vector)。

目前已从动物、植物、病毒及微生物中分离到许多适用于植物的启动子。根据作用方式及功能可将启动子分为 3 类：组成型启动子、诱导型启动子和组织特异型启动子。

①组成型启动子(constitutive promoter)是指在该类启动子控制下，结构基因的表达大体恒定在一定水平上，在不同组织、部位表达水平没有明显差异。目前使用最广泛的组成型启动子是花椰菜花叶病毒(CaMV)35S 启动子、来自根癌农杆菌 Ti 质粒 T-DNA 区域的胭脂碱合成酶基因 Ocs 启动子，后者虽来自细菌，但具有植物启动子的特性。

②组织特异启动子(tissue-specific promoter)又称器官特异性启动子。在这类启动子调控下，基因往往只在某些特定的器官或组织部位表达，并表现出发育调节的特性。例如烟草的花粉绒毡层细胞中特异表达基因启动子 TA29，豌豆的豆清蛋白(legumin)基因启动子可在转化植物种子中特异性表达，马铃薯块茎储藏蛋白(patatin)基因启动子在块茎中优势表达。

③诱导型启动子(inducible promoter)是指在某些特定的物理或化学信号的刺激下，该种类型的启动子可以大幅度地提高基因的转录水平。目前已经分离了光诱导表达基因启动子、热诱导表达基因启动子、创伤诱导表达基因启动子、真菌诱导表达基因启动子和共生细菌诱导表达基因启动子等。

目前植物基因工程中常采用的终止子是胭脂碱合成酶的 *nos* 终止子和 Rubisco 小亚基基因的 3' 端区域。

#### (5) 植物表达载体的构建

中间表达载体是不能将外源基因转化进植物细胞。因此，必须将中间表达载体引入到上述已改造的受体 Ti 质粒中，并构建成能侵染植物细胞的基因转化载体(它是由两种以上质粒构成的复合型载体，故称之为载体系统)，才能在植物基因转化中应用。

为利用根癌农杆菌的 Ti 质粒，发展了一元载体系统和二元载体系统。一元载体系统是指首先将目的基因插入到中间表达载体上，筛选出含有目的基因的重组分子，然后将重组质粒转化到根癌农杆菌中，重组质粒与 Ti 质粒上的同源序列发生同源重组，将外源基因整合到 Ti 质粒上，用于侵染植物细胞。T-DNA 重组分子就可整合到植物细胞染色体 DNA 上。最后利用植物选择标记基因筛选转化细胞。简单而言，一元载体系统就是指含有目的基因的中间表达载体与改造后的受体 Ti 质粒通过同源重组所产生的一种复合型载体，通常又称为共整合载体(co-integrated vector)；由于该载体的 T-DNA 区与 Ti 质粒 Vir 区连锁，因而又称为顺式载体(cis-vector)。

二元载体(binary vector)系统是指由两个分别含 T-DNA 和 Vir 区的相容性突变 Ti 质粒构成的系统。其中之一是含有 T-DNA 转移所必需的 Vir 区段质粒，它缺失或部分缺失 T-DNA 序列。它的主要作用是表达毒蛋白，激活 T-DNA 的转移，故称为辅助 Ti 质粒(helper Ti plasmid)；另一个则是含有 T-DNA 的质粒。一般作为目的基因的载体，由于其分子量较小，故称为微型质粒(mini-Ti plasmid)。它是一种寄主范围广泛的 DNA 转移载体质粒。它既含有大肠杆菌复制起始位点，又含有根癌农杆菌复制起始位点，实际上是一种大肠杆菌-农杆菌穿梭质粒。这两种质粒在单独存在的情况下，均不能诱导植物产生冠瘿瘤。若根癌农杆菌细胞内同时存在这两种质粒时，便可获得正常诱导肿瘤的能力。因此，含有二元载体的根癌农杆菌细胞浸染植物时，就可以将含有目的基因的 T-DNA 整合进植物基因组中。

目前以 T-DNA 转化植物细胞的标准方法大多采用 Ti 质粒介导的二元载体系统。首先将目的基因插入到微型质粒，含有目的基因的重组微型质粒转化大肠杆菌后，再导入携带辅助 Ti 质粒的根癌农杆菌中，经筛选后直接感染植物细胞。根癌农杆菌侵染植物细胞后，植物的创伤信号启动 Ti 质粒上的 *vir* 基因，随后将微型质粒上的 T-DNA 切割下来，转移到植物细胞中。由于二元载体系统的 T-DNA 和 Vir 区在两个独立的质粒上，通过反式激活 T-DNA 转移，故又称为反式载体(trans-vector)。

#### (6) Ti 质粒介导的转移转化方法

目前已建立了多种根癌农杆菌 Ti 质粒介导的植物基因转化方法，其基本程序包括：含重组 Ti 质粒的根癌农杆菌的培养，选择合适的外植体，根癌农杆菌与外植体共培养，外植体脱毒及筛选培养，转化植株再生等步骤。

叶盘转化法：

叶盘转化法(leaf dish transformation)是 Monsanto 公司 Morsch 等人(1985)建立起来的一种转化方法。其操作步骤为：首先用打孔器从消毒叶片上取下直径为 2~5mm 圆形叶片，即叶盘。再将叶盘放入培养至对数生长期的根癌农杆菌液浸泡几秒钟，使根癌农杆菌浸染叶盘。然后用滤纸吸干叶盘上多余的菌液，将这种经浸染处理过的叶盘置于培养基上共培养 2~3d，再转移到含有头孢霉素或羧苄青霉素抑菌剂的培养基中，除去根癌农杆菌。与此同时在该培养基中加入抗生素进行转化体的筛选，使转化细胞再生为植株。对这些再生植物进行分子检测就可确定它们是否整合有目的基因及其表达情况。

叶盘转化法已在多种双子叶植物上得到成功的应用。实际上，其他的多种外植体，例如茎段、叶柄、胚轴、子叶愈伤组织、萌发的种子均可采用类似的方法进行转化。该方法的优点是适用性广且操作简单，是目前应用最多的方法之一。

原生质体共培养转化法：

原生质体共培养转化法是以原生质体作为受体细胞，通过将根癌农杆菌与原生质体作短暂的共培养，然后洗涤除去残留的根癌农杆菌后，置于含抗生素的选择培养基上筛选出转化细胞，进而再生成植株。与叶盘转化法相比，此法得到的转化体不含嵌合体，一次可以处理多个细胞，得到相对较多的转化体。应用此法进行基因转化时，其先决条件就是要建立起良好的原生质培养和再生植物技术体系。

整株感染法：

此法是模仿根癌农杆菌天然的感染过程，用根癌农杆菌直接感染植物而进行遗传转化的一种简单易行的方法。其做法是：人为地在植株上造成创伤，然后把含有重组质粒的根癌农杆菌接种在创伤面上，或把含有重组质粒的根癌农杆菌注射到植物体内。使根癌农杆菌在植物体内进行浸染实现转化。为了获得较高的转化频率，一般多采用无菌种子的实生苗或试管苗。用去除了致瘤基因的根癌农杆菌进行整株感染后，受伤部位一般不会出现肿瘤。在筛选转化体时，可将感染部位的薄壁组织切下放入选择培养基上及诱发愈伤组织的培养基上进行筛选和愈伤组织诱导。最后将转化的愈伤组织转移至含合适植物激素的培养基上诱导再生植株。

在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)上，将根癌农杆菌涂于植株腋芽处或顶芽，可长出转化的新枝条，新的转化枝条开花结实后，也可以获得转基因种子；或者通过真空渗透或农杆菌浸泡拟南芥开花植株，等结实之后，利用筛选萌芽种子的方法，也可以得到转基因植株及种子。

## 2 发根农杆菌介导转化法

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)是与根癌农杆菌同属的一种病原土壤杆菌。但与根癌农杆菌不同的是，发根农杆菌从植物伤口入侵后，不能诱发植物产生冠瘿瘤，而是诱发植物产生许多不定根。这些不定根生长迅速，不断分枝成毛状，故称之为毛状根或发状根(hairy root)。发状根的形成是由存在于发根农杆菌中的 Ri 质粒(root inducing plasmid,根诱导质粒)所决定的。

Ri 质粒是发根农杆菌染色体外的遗传物质。属于巨大质粒，其大小为 200~800kb。Ri 质粒和 Ti 质粒不仅结构、特点相似，而且具有相同的寄主范围和相似的转化机理。与 Ri 质粒转化相关的也主要为 Vir 区和 T-DNA 区 2 部分。Ri 质粒的 T-DNA 也存在冠瘿碱合成基因，且这些合成基因只能在被侵染的真核细胞中表达。根据其诱导的冠瘿碱的不同，Ri 质粒可分为 3 种类型：农杆菌型(agropine)、甘露碱型(mannopine)和黄瓜碱型(cucumopine)。与 Ti

质粒的 T-DNA 不同的是, Ri 质粒的 T-DNA 上的基因不影响植株再生。因此, 野生型 Ri 质粒可以直接作转化载体。

与 Ti 质粒相同, Ri 质粒基因转化载体的构建也主要采用有共整合载体和双元载体系统。由 Ri 质粒诱发生成的不定根组织, 经离体培养后, 一般都可再生完整的植株。因此, 利用 Ri 质粒作为转基因植物的载体, 同样具有诱人的前景。

### 3 病毒介导转化法

病毒侵染细胞后把其 DNA 导入寄主细胞, 并且这些病毒 DNA 能在寄主细胞中进行复制和表达。其本身就是一种潜在的基因转化系统。因此, 病毒可以作为植物转基因的一种载体。随着植物病毒分子生物学及遗传学研究的不断深入, 用病毒基因组作为载体转化植物细胞日益受到人们的重视。因为病毒载体能将外源基因导入植物的所有组织和细胞中, 而且不受单子叶或双子叶的限制。

在已知的 300 多种植物病毒中, 单链 RNA 病毒约占 91% 左右, 双链 DNA 病毒、单链 DNA 病毒各占 3% 左右。RNA 不太适合于作为克隆载体, 因为 RNA 的操作非常困难。目前较为成熟的植物病毒载体是花椰菜花斑病毒(cauliflower mosaic virus, CaMV)和番茄金花叶病毒(tomato golden mosaic virus, TGMV)。

#### (1) CaMV DNA 载体转化法

CaMV 含有双链 DNA 基因组, 将外源目的基因插入到 CaMV DNA 上, 重组分子在体外包装成有感染力的病毒颗粒, 就可高效转染植物原生质体, 进而通过原生质体培养再生为整株植物。但 CaMV 作为基因转化的载体也存在如下缺点, 从而限制了其应用: ①CaMV 容纳外源 DNA 的能力非常有限, 即使是切除了非必须序列, 也只能插入很小的片段; ②CaMV 的寄主范围非常窄, 主要是芸苔属(*Brassica*)植物如甘蓝和花椰菜等; ③CaMV 是一种病原体, 它的感染后会使寄主植物患病, 降低产量和品质; ④目前还没有发现有一种植物病毒 DNA 是可以整合到寄主染色体上的。这就不可能通过有性过程将插入的外源基因稳定地传递给感染植株的后代。⑤尽管 CaMV DNA 可以感染植物, 而带有外源基因的 CaMV DNA 重组体则不能感染植物, 这就必须通过原生质体予以克服。但通过原生质体再生植株对有些作物是非常困难的。并且植物病毒在植物组织中的传播也是受到限制的; ⑥目前判断 CaMV DNA 感染的唯一的办法就是靠“症状”的表现, 因此, 对 CaMV DNA 载体来说, 还需要一个更好的选择标记。

#### (2) TGMV DNA 载体转化法

植物双生病毒(geminiviruses)为单链 DNA 病毒, 成熟的双生病毒呈双颗粒状, 每一个颗粒中含有一条不同的 DNA 单链。其中 A 链能单独在植物细胞中复制, 并含有一部分病毒包衣蛋白基因; B 链编码另一部分包衣蛋白基因及感染性基因。A、B 两条链必须同处于一个植物细胞中, 方能形成有感染力的病毒。双生病毒具有广泛的宿主范围, 因此是一种很有潜力的植物病毒载体。

目前常用双生病毒家族成员中的 TGMV。利用 TGMV 病毒将外源基因克隆到植物体内的程序是: 从成熟的病毒颗粒中分离其 A 链 DNA, 并在体外复制成双链形式; 以外源基因和标记基因(例如 *NPTII*)取代 A 链 DNA 上的病毒包装蛋白基因; 将重组分子克隆在含有 T-DNA 和农杆菌根瘤菌复制子的载体质粒上, 并转化含有 Ti 辅助质粒的农杆菌根瘤菌; 将农杆菌根瘤菌注射到已含有 TGMV 的 B 链植物的茎组织中, 此时重组 DNA 分子在植物体内被包装成具有活力的病毒颗粒, 后者分泌后再感染其它细胞和组织, 使外源基因迅速遍布整株植物。在上述工作的基础上, 随后又发展出了同时含有 A 链 DNA 和 B 链 DNA 两种组分的另外一种双元载体系统。使用这样的载体就不必事先用 B 链 DNA 转化植物。这样简单便捷。

此外, 由于病毒可引起破坏性的侵染, 需要严格的防护, 防止载体从寄主中逃逸侵染自然中的植物。所以 CaMV 和 TGMV 作为克隆载体还需要进一步的改造。

## (二) 基因直接导入法

农杆菌侵染双子叶植物获得转基因植株是非常成功的。但自然界中的农杆菌只侵染双子叶植物,对单子叶植物不敏感。虽然通过添加乙酰丁香酮类物质可使农杆菌侵染单子叶植物,但单子叶植物的再生比较困难,因而农杆菌转化单子叶植物仍然是比较困难的。1984 年科学家发现,超螺旋结构的细菌质粒,虽然不能在植物细胞中复制,但可以重组整合到植物染色体内。重组机制并不清楚。因为细菌质粒与植物 DNA 之间没有同源性。事实上整合是随机发生在植物染色体的任何位点。受这一现象的启发产生了基因直接转化技术。

### 1 基因枪转化法

基因枪(**particle gun**)介导转化法又称微弹轰击法(**microprojectile bombardment, particle bombardment, biolistic**),是指利用火药爆炸、高压气体和高压放电作为驱动力(这一加速设备称为基因枪),将载有目的基因的金属颗粒加速,高速射入植物组织和细胞中,然后通过细胞和组织培养技术,再生出新的植株。

美国 Cornell 大学最早研制了火药基因枪。1990 年,美国杜邦公司推出了商品基因枪 PDS-1000 系统。此后,高压放电、压缩气体驱动等各种类型的基因枪相继出现,并在实际应用中得到不断改进和发展,使基因枪转化法成为继农杆菌介导转化法之后又一广泛应用的转化技术。根据动力系统,可将基因枪分为 3 种类型。第一类是利用火药爆炸力作为加速动力;第二类是以高压气体作为动力;第三类是以高压放电作为驱动力。

尽管基因枪有各种不同的类型,但基因枪转化的基本步骤如下:①受体细胞或组织的准备和预处理;②DNA 微弹的制备;③受体材料的轰击;④轰击后外植体的培养和筛选。

基因枪转化率差异很大,一般在  $10^{-3} \sim 10^{-2}$  之间。但有的报道其转化率高达 2.0%,而有的报道仅有  $10^{-4}$ 。相对于农杆菌介导的转化率要低得多。而且基因枪转化成本高;嵌合体比率大;遗传稳定性差。此外,通过基因枪法整合进植物细胞基因组中的外源基因通常是多拷贝的,可导致植物自身的某些基因非正常表达,还可能发生共抑制现象(**co-suppression**)。即使这样,该方法得到了广泛应用,因其具有如下优点:①无宿主限制,无论是单子叶植物和双子叶植物都可以应用;②可控度高,操作简便迅速,商品化的基因枪都可以根据实验需要调控微弹的速度和射入浓度,命中特定层次的细胞;③受体类型广泛,原生质体、叶圆片、悬浮培养细胞、茎、根、以及种子的胚、分生组织、愈伤组织、花粉细胞、子房等几乎所有具有分生潜力的组织或细胞都可以用基因枪进行轰击;④可将外源基因导入植物细胞的细胞器,并可得到稳定表达。正因为基因枪这些优点,使基因枪成功的应用于植物基因转化,特别是单子叶植物的转化;外源基因导入植物细胞器等。

### 2 聚乙二醇法

聚乙二醇(**polyethylene glycol, PEG**)是一种水溶性的化学渗透剂,分子质量 1500~6000,  $\text{pH} 4.6 \sim 6.5$ , 因多聚程度不同而异。PEG 法的原理是它可使细胞膜之间或使 DNA 与膜形成分子桥,促使相互间的接触和粘连,并可通过改变细胞膜表面的电荷,引起细胞膜透性的改变,从而诱导原生质体摄取外源基因 DNA。

在 PEG 转化过程中,常需加入磷酸钙,这是因为磷酸钙可与 DNA 结合形成 DNA-磷酸钙复合物而使 DNA 沉积在原生质体的膜表面,并促进细胞发生内吞作用。此外,高 pH 可诱导外源 DNA 分子的摄取。因此,PEG 转化时常将溶液的 pH 调到 8.0 左右。

PEG 转化的基本步骤包括:①外源目的基因的制备;②原生质体制备;③目的基因和原生质体的转化培养;④转化体的鉴定及再生植物培养。

PEG 转化法操作简单、成本低、无需昂贵的基因转化仪器;所得到的转化体中,嵌合体很少;受体植物不受种类的限制,对已建立了原生质体再生体系的植物都可采用;并且结果比较稳定,重复性好。但由于建立作物原生质体再生系统较为困难,加之 PEG 转化法对原生质体活力的有害作用,使转化率低,一般在  $10^{-5} \sim 10^{-3}$  之间。将 PEG 转化法与电击法、

脂质体法和激光微束法等技术结合使用，可使转化率大大提高。

### 3 脂质体法

脂质体(liposome)法是根据生物膜的结构和功能特征，用磷脂等脂类化学物质合成的双层膜囊将 DNA 或 RNA 包裹成球状，导入原生质体或细胞，以实现遗传转化的目的。脂质体法有两种具体方法：其一是脂质体融合法(liposome fusion)，先将脂质体与原生质体共培养，使脂质体与原生质体膜融合，而后通过原生质体的吞噬作用把脂质体内的外源 DNA 或 RNA 分子高效地转入到植物的原生质体内。最后通过原生质体培养技术，再生出新的植株。其二是脂质体注射法(liposome injection)，通过显微注射把含有外源遗传完整的脂质体注射到植物细胞以获得转化。

脂质体法有多方面的优点，例如脂质体可以保护 DNA 在导入细胞之前免受核酸酶的降解作用，降低对细胞的毒害效应，包裹在脂质体内的 DNA 可以稳定贮藏，适应的植物种类广泛，重复性好等。最近美国 BRL 公司研制了一种新型脂质体，只要将该脂质体与 DNA 简单地混合，即可将 DNA 包裹在脂质体内，并可有效地转化植物细胞。脂质体的商业化生产无疑为脂质体介导植物遗传转化法的广泛应用奠定了基础。

### 4 电击法

电击法(electroporation)也称电穿孔法，其原理是利用高压电脉冲作用在原生质体上“电激穿孔”，形成可逆的瞬间通道，从而促进外源基因的摄入。随着技术的改进，并与化学法结合，目前该法的转化率可高达 1.2%。

电击法的一般操作程序如下：将高浓度的质粒 DNA 加入到植物细胞的原生质体悬浮液中，混合物在 200 - 600 V/cm 的电场中处理若干秒钟，然后将原生质体在组织培养基中培养 1~2 周之后，选择已转化的细胞，作进一步的分化培养，最后获得转化的再生植物。

电击法的优点是操作简便，特别适合于瞬间表达研究。缺点是必须经过原生质体培养，加上电穿孔易造成原生质体损伤，使其再生率降低。将电击法与 PEG 转化法、脂质体法和激光微束法等技术结合使用及不断改进技术，都可有效提高转化率。

### 5 超声波法

超声波是指频率高于 20kHz，人耳一般听不见的声波。它在介质中主要产生 2 种形式的机械振荡，即横向振荡(横波)和纵向振荡(纵波)，前者只能于固体中产生，而后者则可在固、液、气体中产生。由于超声波频率高，波长短，因而在传播过程中具有定向性好，能量大，穿透力强等特征。

一般认为超声波的生物学效应主要是机械作用、热化作用和空化作用。超声波的机械效应是指超声波在介质中传播时，引起介质的振动，其位移、速度、加速度、压强等力学量所引起的效应。超声波的热化效应是指由于介质吸收超声波以及内摩擦消耗，分子产生剧烈振动，超声波的机械能转化为介质的内能，引起介质温度升高。超声波的强度愈大，产生的热效应愈强。超声波空化作用是指存在于液体中的微气核(空化泡)在声波的作用下振动，当声压达到一定值时发生的生长和崩溃的动力学过程。空化作用一般包括 3 个阶段：空化泡的形成、长大和剧烈的崩溃。空化泡崩溃的极短时间内在空化泡周围产生高温高压，并伴有强烈的冲击波和速度极快的微射流产生。

超声波法转化(ultrasonic transformation)法就是利用低声强脉冲超声波的生物学效应击穿细胞膜造成通道，从而使外源 DNA 进入细胞。此转化途径可以避免脉冲高压对细胞的损伤作用，有利于原生质体的存活。此外，该法具有操作简便、设备便宜、不受宿主范围限制等优点。但该转化方法尚待进行更深入的研究使之完善。

### 6 激光微束法(laser microbeam)

将激光聚焦成微米级的微束照射细胞后，利用其热损伤效应使细胞壁上产生可恢复的小孔，使加入到细胞培养基里的外源基因进入植物细胞，从而实现基因的转移。

该法具有操作简便、适用性广、无作宿主范围制、能转化细胞器等优点。但该方法因仪器昂贵，转化率较低，故有待于进一步研究和完善。

## 7 显微注射法(microinjection)

利用显微注射仪将外源基因直接注入到已固定的植物细胞的细胞核或细胞质中，从而实现基因转移。受体细胞最初仅用原生质体，现在已发展成为适用于带壁的悬浮细胞、花粉粒、卵细胞、子房等。

显微注射中一个重要环节是固定受体细胞。动物细胞培养时因为有独特的贴壁生长特征，因而无需进行人工固定。但是，植物细胞在使用显微注射时，必须首先将受体细胞进行人工固定。目前人工固定的方法主要有 3 种：①琼脂糖包埋法，即把低熔点的琼脂糖熔化，冷却到一定温度后将制备的细胞悬浮液混合于琼脂糖中，并使细胞体的一半埋在琼脂糖中而固定，一半暴露在琼脂糖的表面以便于进行显微注射；②多聚-L-赖氨酸粘连法，即先用多聚-L-赖氨酸处理玻片表面，由于多聚-L-赖氨酸对细胞有粘连作用。因此当分离的细胞或原生质体与玻片接触时，就可被固定在玻片上；③吸管支持法，即用一固定的毛细管将原生质体或细胞吸附在管口，起到固定作用。并且吸管可以旋转或移动位置，使操作者选择最佳位置进行注射。显微注射用的微针通常用拉针机制备，针尖直径以  $0.5\ \mu\text{m}$  左右为宜。一次注入的 DNA 量约为  $10^{-9}\text{mol}$ 。

显微注射法突出的优点是转化率高，整个操作过程对受体细胞无药物毒害，有利于转化细胞的生长发育。其缺点是操作繁琐耗时，工作效率低，并需精细的操作技术和精密的仪器设备。

## 8 碳化硅纤维介导转化法

碳化硅纤维介导转化(silicon carbide fiber mediated transformation)法是将细胞或组织的培养物与质粒 DNA 及直径为  $0.6\ \mu\text{m}$ ，长度为  $10\sim 80\ \mu\text{m}$  的针状的碳化硅纤维混合，借助于在涡旋振荡引起的相互碰撞过程中纤维对细胞的穿刺作用，而将附着于纤维上的 DNA 导入细胞，实现植物细胞的转化。碳化硅纤维介导转化法是一种简单、快速和经济的导入 DNA 进入植物完整细胞的方法。该方法操作简便，成本低，而且能较好的控制转化的 DNA 数量。但也有不足之处：一是转化后细胞的生活率下降；二是这种方法现在只限于以悬浮细胞为受体的转化。

### (三) 种质系统法

以植物自身的种质细胞为媒介，特别使植物的生殖系统的细胞(花粉、卵细胞、子房和幼胚等)以及细胞的结构，将外源 DNA 导入完整植物细胞，实现遗传转化的技术称为种质转化系统(germ line transformation)，该技术也称为生物媒体转化系统或整株活体转化(in planta transformation)。该技术具有下述特点：①目的 DNA 可以是裸露的 DNA，也可以是总 DNA 或重组质粒 DNA，还可以是某些 DNA 片断；②转化过程依靠植物自身的种质系统或细胞结构来实现，不需要细胞分离、组织培养和再生植株等复杂技术；③方法简便易行，并与常规育种紧密结合。它已发展成一种颇具潜力的转化体系。目前常用的种质系统转化法有以下几种：

#### 1 花粉管通道法

花粉管通道法(pollen-tube pathway)是由中国科学院周光宇等(1983)建立，并在长期科学研究中发展起来的。该法的主要原理是：在授粉后向子房注射含目的基因的 DNA 溶液，利用植物在开花、受精过程中形成的花粉管通道，将外源 DNA 导入受精卵细胞，并进一步地被整合到受体细胞的基因组中，随着受精卵的发育而成为带转基因的新个体。

花粉管通道法的基本程序包括：①外源 DNA(基因)的制备；②根据受体植物的受精过程及时间，确定导入外源 DNA(基因)的时间及方法；③将外源 DNA(基因)导入受体植物；④转基因植株目标性状鉴定及分子检测。

花粉管通道法最大优点是不依赖组织培养人工再生植株，技术简单，不需要装备精良的实验室，常规育种工作者易于掌握。它的受体材料为植株整体，省略了细胞组织培养的诱导和传代过程，避免了原生质体再生以及组织培养过程中可能导致的染色体变异或优良农艺性状丧失等问题，排除了植株再生的障碍，特别适合于难以建立有效再生系统的植物。由于转化的是完整植株的卵细胞、受精卵或早期胚胎细胞，导入的 DNA 分子整合效率较高。但该方法的使用在时间上受到开花季节的限制。

花粉管通道法的成株转化率一般在  $10^{-2} \sim 10^{-1}$  之间，其影响因素主要有：①花粉管导入的关键因素在于精确掌握受体植物的受精过程及时间规律，恰当地应用花粉管途径，达到外源 DNA 导入的目的；②DNA 导入液的浓度、PH 值等均影响转化率；③DNA 的分子结构及其片段大小对转化率也有重要的影响。环状分子难以转化，片段太小或太大转化率低，因此要使用合适的 DNA 片段。

目前花粉管通道法已应用于水稻、小麦、棉花、大豆、花生、蔬菜等作物的转基因研究。利用这一技术我国已选育出棉花、水稻、小麦等新品种，如棉花 3118、湘棉 12 号、水稻 GER-1 等。我国目前推广面积最大的转基因抗虫棉就是用花粉管通道法培育出来的。

## 2 浸泡转化法

所谓浸泡转化(imbibition transformation)法就是指将种子、胚、胚珠、子房、幼穗甚至幼苗等直接浸泡在外源 DNA 溶液中，利用渗透作用可将外源基因导入受体细胞并得到整合与表达的一种转化方法。

浸泡转化法的原理是利用植物细胞自身的物质运转系统将外源 DNA 直接导入受体细胞。关于植物运输系统的结构与功能已有很多研究。现已证明植物细胞至少可以通过以下途径将外源 DNA 吸入细胞内：①外源 DNA 可以通过细胞间隙与胞间连丝组成的网络化运输系统而被运输到每个细胞；②植物细胞也可以通过内吞作用将外源 DNA 摄入细胞内；③植物组织中传递细胞的膜透性改变也为大分子物质透过细胞膜提供了机会。尤其是在生殖细胞、胚胎细胞及分生细胞中，外源 DNA 进入细胞的机会更大。

浸泡转化法是植物转基因技术中最简单、快速、便宜的一种转化方法。它不需要昂贵的仪器设备和复杂的组织培养技术，可以进行大批量的受体转化工作，并且此法容易推广普及。但该法的转化率较低，重复性较差，而且筛选和检测也比较困难。

## 3 胚囊、子房注射法

胚囊、子房注射法是指使用显微注射仪将外源 DNA 溶液注入到子房或胚囊中，由于子房或胚囊中产生高的压力及卵细胞的吸收使外源 DNA 进入受精的卵细胞中，从而获得转基因植株。其主要原理依据有以下几点：植物的胚囊是一个拥有较大空隙的空腔，能够注入一定的外源 DNA 溶液；卵细胞有一侧没有细胞壁，只有一层质膜，能够吸入外源 DNA；正常的花粉管进入胚囊后也是在胚囊中破裂，释放出的雄配子 DNA 也在胚囊中；外源 DNA 溶液注入胚囊后对卵细胞造成一个较大的渗透压，迫使外源 DNA 进入卵细胞；如外源 DNA 注入到子房中，通过花粉管进入胚珠通道，能够使外源 DNA 从子房进入胚囊；注入的外源 DNA 可以是已重组构建的带目的基因及启动子的 DNA，因此，导入卵细胞后可以整合到核基因组中并得到表达。因此，胚囊、子房注射法是一种简单可行的转化途径，特别对那些子房大、多胚珠的植物更加适合。

总则，随着研究的不断深入和发展，外源 DNA 导入的方法会日益增加，转化的程序也将日趋简化。在已建立的各种转化方法中，它们所使用的载体、转化原理及受体细胞均有明显的差异，宿主范围、转化频率及操作复杂性方面也均不相同。因此，在应用这些转化方法时，应了解各种转化方法的特点，根据不同的研究对象和研究目标，选择合适的方法。

植物基因转化的方法

## 2. 基因转植物的筛选和鉴定方法



在植物遗传转化中，外源基因导入植物细胞的频率是相当低的。在数量庞大的受体细胞群体中，通常只有为数不多的一小部分细胞获得了外源 DNA，而目的整合到基因组并实现表达的转化细胞则更少。因此，必须采用一定的方法，才能筛选和鉴定出含有目的基因的重组体。

目前已发展出一系列的基因转植物的筛选和鉴定方法。在这些鉴定和筛选方法，根据检测的基因功能来划分调控基因(包括启动子终止子等检测、选择标记基因检测和目的基因直接检测法。根据检测的不同阶段区分，有整合水平检测法和表达水平的检测法，表达水平的检测法包括转录水平检测法和翻译水平检测法。外源基因整合检测方法主要有 Southern 杂交、PCR、PCR-Southern 杂交、原位杂交和 DNA 分子标记技术等。转录水平的检测法有 Northern 杂交和反转录 PCR(reverse transcribed PCR, RT-PCR)检测等。翻译水平的检测法有酶联免疫吸附法(enzyme linked immuno sorbent assay, ELISA)和 Western 杂交。表达水平的检测法中最简便和使用广泛的为利用报告基因检测法。由于这些方法的具体操作已在其他章节(课程)介绍过，这里只侧重介绍基于选择标记基因和报告基因的筛选和鉴定方法。

(一) 选择标记基因检测法

在构建植物表达载体时，除含有目的基因和各种表达调控元件外，一般情况下还插入了供选择用的选择标记基因(selectable marker gene)。经过遗传转化，所有这些表达载体上的插入序列一同整合到受体植物染色体基因组中。

选择标记基因简称为标记基因(marker gene)，是指其编码产物能够使转化的细胞、组织具有对抗生素或除草剂的抗性，或者使转化细胞、组织具有代谢的优越性。其主要功能是该基因的产物赋予转化的植物细胞产生一种选择压力，致使未转化的细胞在施用选择剂条件下不能生长、发育和分化。而转化细胞对该选择剂具有抗性，可以继续存活，因而有利于从大量的细胞或组织中筛选出转化细胞及植株。该方法已成为植物遗传转化一种较为方便、快捷的转基因植物鉴定方法。

植物基因工程所应用的选择性标记基因都具有以下 4 个特征：①编码一种不存在于正常植物细胞中的产物例如酶和蛋白质等；②基因较小，易构成嵌合基因；③能在转化体中得到充分表达；④容易检测，并能定量分析。目前，常用的选择标记基因主要有两大类。一类是编码抗生素的抗性基因，例如：新霉素磷酸转移酶(Neomycin phosphotransferase)基因 *npt II*、潮霉素磷酸转移酶(Hygromycin phosphotransferase)基因 *hpt* 和二氢叶酸还原酶(Dihydrofolate reductase)基因 *dhfr*；另一类是编码除草剂抗性基因，例如，草丁膦乙酰转移酶(Phosphinothricin acetyltransferase)基因 *bar*、5-烯醇丙酮酰草酸-3-磷酸合成酶(5-Enolpyruvate shikimatr-3-phosphate)基因 *epsps*。现将目前在转基因植物所使用的抗性选择标记基因来源及其编码的基因产物和使用的选择试剂列表如下(见表 10-1)。

表 10—1. 目前在转基因植物中使用的主要选择标记基因

基因	基因编码的产物	选择试剂	基因来源
Gene	Gene products	Selection agents	Gene resource
<i>npt II</i> / <i>aph II</i> / <i>neo</i>	新霉素磷酸转移酶 II Neomycin phosphotransferase II, 或称为氨基葡 萄糖苷磷酸转移酶 II Aminnoglycoside phosphotransferase II	卡那霉素 Kanamycin, 新霉素 Neomycin, Geneticin(G418), 巴 龙霉素 Paromomycin, 氨基 羟丁基卡那霉素	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> , 转 座子 Tn5 Transposon Tn5

		A( 即 BBK8)	
		Amikacin, 氨基葡萄糖苷 Aminnoglycoside	
<i>bar/pat</i>	草丁膦乙酰转移酶 Phosphinothricin acetyltransferase	草甘膦 Glufosinate, 草丁膦 Phosphinothricin., 双丙氨膦 Bialaphos	链霉菌 <i>Streptomyces hygroscopicus</i> , <i>Stroptomyces viridochromogenes</i>
<i>bla</i>	B-内酰胺酶 $\beta$ -Lactamase	青霉素 Penicillin, 苄青霉素 Ampicillin	大肠杆菌 <i>E. coli</i>
<i>aadA</i>	氨基葡萄糖苷腺苷转移酶 Aminoglycoside-3'-adenyltransferase	链霉素 Streptomycin, 壮观霉素 Spectinomycin	<i>Shigella flexneri</i>
<i>hpt</i>	潮霉素磷酸转移酶 Hygromycin phosphotransferase	潮霉素 B Hygromycin B	大肠杆菌 <i>E. coli</i>
<i>nptIII</i>	新霉素磷酸转移酶 III Neomycin phosphotransferase III	氨基羟丁基卡那霉素 A( 即 BBK8) Amikacin, 卡那霉素 Kanamycin, 新霉素 Neomycin, Geneticin (G418), 巴龙霉素 Paromomycin	<i>Streptococcus faecalis</i> 的 R 质粒 R plasmid
<i>epsps/aroA</i>	5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸 5-Enoylpyruvate shikimatr-3-phosphate	草甘膦 Glyphosate	农杆菌 CP4 <i>Agrobacterium</i> CP4, 玉米 <i>Zea mays</i> , 矮牵牛 <i>Petunis hybrida</i>
<i>gox</i>	草甘膦氧化还原酶 Glyphosate oxidoreductase	草甘膦 Glyphosate	<b>Achrombacter LBAA</b>
<i>bxn</i>	溴苯腈水解酶 Bromoxynil nitrilase	溴苯腈 Bromoxynil	肺炎克雷伯氏菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i> var. <i>iozaenae</i>
<i>als</i>	乙酰乳糖合成酶 Acetolactate synthase	磺酰脲类除草剂 Sulfonylureas, Imidazolinones, 咪唑啉酮 Thiazolopyrimidines	拟南芥 <i>Arabididopsis thaliana</i> , 烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> , 甘蓝型油菜 <i>Brassica napus</i>
<i>cat</i>	氯霉素乙酰转移酶 Chloramphenicol acetyltransferase	氯霉素 Chloramphenicol	转座子 Tn9 Transposon Tn9, 噬菌体 P1 Bacteriophage P1
<i>tdc</i>	色氨酸脱羧酶 Tryptophan decarboxylase	4-甲基色氨酸 4-Methyltryptophan	
<b>Catharaanthus roseus</b>			
<i>uidA/gus</i>	$\beta$ -葡萄糖苷酸酶 $\beta$ -Glucuronidase	葡萄糖苷酸 Cytokinin	大肠杆菌 <i>E. coli</i>

			glucuronides		
<i>nptI</i>	新霉素磷酸转移酶 I phosphotransferase I	Neomycin	卡那霉素转座子 Kanamycin, 新霉素 Neomycin, Geneticin (G418), 氨基葡萄糖 苷 Aminnoglycoside	Tn601 Transposon	Tn601, 大肠杆菌 <i>E. coli</i>
<i>gent</i>	庆大霉素乙酰转移酶 Acetyltransferase	Aminoglycoside	庆大霉素 Gentamycin	细菌	Bacterium
<i>strI/spc/spt</i>	链霉素磷酸转移酶 phosphotransferase	Streptomycin	链霉素 Streptomycin	转座子 Tn5	Transposon Tn5
<i>dhfr</i>	二氢叶酸还原酶 reductase	Dihydrofolate	氨甲喋呤 Methotrexate	细菌质粒 pR67	Bacterium plasmid pR67

根据吴乃虎编<sup>[1]</sup>、闫新甫<sup>[2]</sup>、王关林和方宏筠<sup>[3]</sup>、Daniell 等<sup>[4]</sup>、Lamthan 等<sup>[5]</sup>、Kuiper 等<sup>[6]</sup>和 Goddijn 等<sup>[7]</sup>、林忠平<sup>[8]</sup>的资料整理编辑而成。

## (二) 报告基因检测法

报告基因(reporter gene)是指其编码产物能够被快速地测定,常用来判断外源基因是否已经成功地导入受体细胞、组织或器官,并检测其表达活性的一类特殊用途的基因。可见报告基因实质是起到了判断目的基因是否已经成功的导入到受体细胞并且表达的标记基因的作用。

作为理想的植物报告基因应具备以下特征: ①编码的产物是惟一的,并且对受体细胞无毒;②表达产物及产物的类似功能在未转化的细胞内不存在,即无背景;③产物表达水平稳定,便于检测等。转基因植物常用的报告基因主要有  $\beta$ -葡萄糖醛酸乙酰转移酶( $\beta$ -glucuronidase, *gus*)基因(*gus*)、胭脂碱合成酶(nopaline synthase, *nos*)基因(*nos*)、章鱼碱合成酶(octopine synthase, *ocs*)基因(*ocs*)、荧光素酶(luciferase, *luc*)基因(*luc*)和绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因(*gfp*)等。

### 1 *gus* 基因的检测

应用较为广泛的报告基因是基因,它来自于大肠杆菌,编码  $\beta$ -葡萄糖醛酸乙酰转移酶。该酶与 5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D-葡萄糖苷酸酯(5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-glucuronic acid, X-Gluc)底物发生作用,产生蓝色沉淀反应,既可以用分光光度法测定,又可以直接观察到植物组织由沉淀形成的蓝色斑点。检测容易、迅速并能当量。只需少量的植物组织即可在短时间内测定完成。

### 2 *nos* 和 *ocs* 基因的检测

胭脂碱合成酶催化冠瘿碱的前体物质精氨酸与  $\alpha$ -酮戊二酸进行缩合反应,生成胭脂碱。章鱼碱合成酶催化精氨酸与丙酮酸缩合生成章鱼碱。目前主要采用纸电泳法检测 *nos* 和 *ocs* 基因。纸电泳分离被检植物组织抽提物,精氨酸的电泳迁移率最大,章鱼碱的迁移率略大于胭脂碱。电泳后用菲醌染色。菲醌与精氨酸、胭脂碱、章鱼碱作用后在紫外光下显示黄色荧光,放置两天后变为蓝色。

用作报告基因的荧光素酶基因主要来自细菌和萤火虫。细菌荧光素酶以脂肪醛为底物,在还原型黄素单核苷酸参与下,使脂肪醛氧化为脂肪酸,同时放出光子。萤火虫荧光酶在镁离子、三磷酸腺苷和氧的作用下,催化 6-羟基喹啉类物质生成氧化荧光素,同时放出光子。依据上述原理建立的荧光素酶基因的检测方法简便、灵敏。

### 3 绿色荧光蛋白基因

绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)是维多利亚水母(*Aequorea Victoria*)中分离纯化出一种可以发出绿色荧光的物质。与其他选择标记相比, GFP 的检测具有不需要添

加任何底物或辅助因子，不使用同位素，也不需要测定酶的活性等优点。同时 GFP 生色基团的形成无种属特异性，在原核和真核细胞中都能表达，其表达产物对细胞没有毒害作用，并且不影响细胞的正常生长和功能。所以利用 *gfp* 作为选择标记基因，可以很方便的从大量的细胞或组织中筛选出转化细胞及植株，并且可用来追踪外源基因的分离情况。

总则，为了获得真正的转基因植株，进行基因转化后的筛选和鉴定工作包括以下步骤：第一步工作是筛选转化细胞。在含有选择压的培养基上诱导转化细胞分化，形成转化芽，再诱导芽生长、生根，形成转基因植株；第二步是对转化植株进行分子生物学鉴定，通过 Southern 杂交证明外源基因在植物染色体的整合，通过原位杂交可缺点外源基因在染色体上整合的位点及其整入的外源基因的拷贝数。通过 Northern 杂交可以证明外源基因在植物细胞内是否正常转录，生成特异的 mRNA。通过 Western 杂交可证明外源基因在植物细胞内转录及翻译成功，生成特异的蛋白质。第三步则是进行性状鉴定及外源基因的表达调控研究。转基因植物应具有由外源基因编码的特异蛋白质影响代谢而产生该植物不具备的目标经济性状，这样才达到转基因的目的；第四步则是遗传学分析，分析外源目的基因及其控制的目标性状能否稳定遗传？以及遵守什么遗传规律。最后是获得转基因植物品种，应用于生产。

### 三. 实验方法

由于根癌农杆菌介导转化法操作简便、成本低、转化率高，是目前应用最广泛的转基因方法。因此本实验主要以根癌农杆菌介导转化法为主学习植物转基因技术的原理和方法，以及转基因植物的筛选和鉴定的基本过程。至于其他方法如有机会，可到其他单位进行参观学习。

#### 1. 仪器

- (1) 超净工作台
- (2) 高压灭菌锅
- (3) 恒温摇床
- (4) 台式离心机
- (5) 冷冻台式离心机
- (6) 超速冷冻离心机
- (7) 紫外/可见分光光度计
- (8) PCR 扩增仪
- (9) 电泳仪及水平电泳槽
- (10) 紫外投射仪
- (11) 自动双蒸纯水蒸馏器
- (12) 光照培养箱

#### 2. 实验材料

- (1) 植物材料：甘蓝型油菜(*Brassica napus* L) “四月慢” 种子
- (2) 菌株及质粒：根瘤农杆菌菌株为 EHA105。质粒为携带 *SsV HX1* 基因的 PROK2。由于 PROK2 质粒本身带有 *NPTII* 基因，因此表现为卡那霉素抗性。

#### 3. 试剂

- (1) MS 培养基：见植物组织培养实验。
- (2) LB 培养基：

Tryptone	10g/L
Yeast Extract	5g/L
NaCl	10g/L

用 5M 调 PH=7.0-7.2, 定容, 高压灭菌 15-20min。固体培养基加入 1.5% 的琼脂。

(3) 分化培养基: MS + 0.05mg/L NAA + 1.0mg/L 6-BA。

(4) 生根培养基: MS + 0.1mg/L NAA 或 IBA

(5) 植物 DNA 提取液: Tris-HCl(pH8.0)100 mM/L, EDTA(pH8.0) 5 mM/L, NaCl 500mM/L, SDS 1.25 %。

(6) TE 缓冲液: 10Mm/L Tris-HCl(pH7.4), 5 mM/L EDTA。

(7) 质粒提取液:

Solution I:	50mM	葡萄糖
	25mM	Tris-HCL(pH=8.0)
	10mM	EDTA (pH=8.0)
Solution II:	0.4M	NaOH
	2%	SDS
Solution III:	60ml	KAc
	11.5ml	冰乙酸
	28.5ml	水

Solution I 15 磅高压灭菌 15min。Solution I 和 solution III 均储存于 4℃ 冰箱内, Solution II 现用现配。

(8) 异硫氰酸胍裂解液: 4M/L 异硫氰酸胍, 25mM/L 柠檬酸钠(pH8.0), 0.5%SDS, 0.1M/L 巯基乙醇。

#### 4. 实验步骤

##### (一) 无菌苗的获得

选取饱满的油菜种子, 在超净工作台上用 70% 的乙醇溶液消毒 1min, 然后用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 处理 10min, 用无菌水冲洗 5~6 次。将消毒的油菜种子播种于固体 MS 培养基上, 25~28℃, 12~16h 光照, 光强 1500Lx 条件下进行组织培养, 苗龄期 10~12d, 获得无菌苗, 取下胚轴作为转化受体。

##### (二) 农杆菌的活化

在超净工作台上挑取携带 *SsNHX 1* 基因的 EHA105 菌株的单菌落, 放入含有 50mg/L 的卡那霉素和 100mg/L 的利福平的液体 LB 培养基中, 在 28℃ 条件下振荡培养 20~22h(200r/min), 使农杆菌生长至对数期, OD 值达 0.3(600nm)。

##### (三) 侵染转化和选择

将活化的 EHA105 菌液在 4℃ 条件下离心 10min (4000r/min), 弃去上清液, 收集菌体, 用液体 MS 培养基稀释菌体, 将下胚轴放入菌液侵染 1min, 迅速用滤纸吸干菌液, 将下胚轴平放在分化培养基上, 在黑暗条件下共培养 2d。筛选下胚轴, 用无菌水冲洗, 除去多余菌体, 用含有 500mg/l 头孢霉素的液体 MS 培养基浸泡下胚轴 30min, 以抑制农杆菌的生长。再将下胚轴平放于含有 500mg/l 头孢霉素和 30mg/l 卡那霉素的分化培养基上, 于 25~28℃、光照 16h/d 条件下进行筛选培养。2~4 周后出现芽的分化。

##### (四) 生根

待芽长至 1cm 高左右, 切下芽转至含有 50mg/l 卡那霉素的生根培养基中, 2~3 周即可生根。

#### 5. 转基因植物的鉴定

##### (一) 转基因植株的 PCR 检测

###### 1 植物基因组 DNA 的提取

- 1) 取 4 g 植株，在液氮中研磨成粉末(越细越好)。
- 2) 转移至 50 ml 离心管中，加入 16 ml 提取液，充分混匀。65℃水浴保温 20 min。
- 3) 加入 5ml 5M KAc 溶液，冰浴放置 30min 以上。
- 4) 加入 5ml 氯仿：苯酚(1 : 1)，混匀。6000rpm 离心 10min。
- 5) 上清液转移到一个干净的 5mL 离心管中，加入 5ml 氯仿，6000rpm 离心 10min
- 6) 上清液转移到一个干净的 5mL 离心管中，加入等体积冰冻的异丙醇。 -20℃放置 2h 以上，沉淀 DNA。4℃，6000rpm 离心 10min。弃上清液。
- 7) 用 70% 乙醇洗涤沉淀 2~3 次，吹干。
- 8) 沉淀用 TE 缓冲液溶，用分光光度法测 A<sub>260</sub> 及 A<sub>280</sub> 以确定浓度，于 -20℃贮存备用。

## 2 根癌农杆菌质粒提取

- 1) 将 3ml 农杆菌菌液倒入离心管中，7,000rpm 离心 1min。去掉上清液，沉淀悬于 200μL Solution I 中。
- 2) 加入 300μL Solution II，混匀，冰浴 5min。
- 3) 加入 300μL Solution III，混匀，冰浴 5min。
- 4) 加 800μL 氯仿，混匀，13,000rpm 离心 15min，取上清液。
- 5) 上清液中加入预冷的等体积异丙醇， -20℃沉淀 30min。
- 6) 13,000rpm 离心 15min。去上清，沉淀加入 500μL 70% 乙醇洗涤 2 次。
- 7) 13,000rpm 离心 3 分钟，去乙醇。
- 8) 每管中加入 38μL 无菌水 2μLRNase, 37℃消化。
- 9) 电泳检测质粒，用分光光度法测 A<sub>260</sub> 及 A<sub>280</sub> 以确定浓度，于 -20℃贮存备用。

## 3 PCR 扩增

### 1) PCR 反应液

取转基因植物、对照植物和根癌农杆菌质粒 DNA(0.01~0.5μg)作 PCR 反应模板，每个离心管中加入 50μL 反应混合液。反应混合液包含：

DNA 模板	1μL
10×PCR 缓冲液	5.0μL
10×dNTP(2mM)	5.0μL
<i>SsNHX1</i> 基因上游引物	1μL
<i>SsNHX1</i> 基因下游引物	1μL
Taq 酶	0.5μL
双蒸水	36.5μL

并设两个空白对照，即分别没有 DNA 和没有引物。

### 2) PCR 扩增

先 95℃预变性 5min，然后进行下列循环： 95℃变性 30 sec，55℃退火 30 sec，72℃延伸 30 sec，40 个循环。最后，72℃延伸 10min。

### 3) PCR 扩增产物的检测

PCR 完毕后，取 5μL 扩增产物在 1.5%的琼脂糖凝胶上电泳，电压为 5 伏/cm，电解缓冲液为 1×TAE(40mmol/L Tris-乙酸，1mmol/L EDTA)，凝胶中含有 0.05%的溴化乙锭，以 PCR Markers 作为分子量标记，在紫外透射仪上观察并照像记录。

## (二) 转基因植株的 Southern 检测

转基因植株 DNA 提取同上，选用在 *SsNHX1* 基因序列中没有酶切位点的限制性内切酶 *BamH I* 进行酶切。杂交膜的制备、探针的制备和杂交过程等具体操作方法见《分子克隆实验》。

### (三) 转基因植株的 Northern 检测

#### 1 异硫氰酸胍法提取转基因植物总 RNA

- 1) 称取 2g 新鲜植株，液氮研磨成粉末移入 50ml 离心管中。
- 2) 加入异硫氰酸胍裂解液 6mL 涡旋 90sec，加入 2M/LNaAc(pH4.8)2mL，涡旋 90 sec，再加入 6mL 苯酚，2 mL 氯仿，混匀。4℃，8000 rpm，离心 15min。
- 3) 弃沉淀，取上清至另一干净 DEPC 水处理过的离心管中加入 2 倍体积无水乙醇，-20℃放置 1h。
- 4) 4℃，8000 rpm，离心 10 min。弃上清，在沉淀中加入 1mL 2 M/L LiCl。
- 5) 移入 1.5 mL 离心管中，冰浴 2 h。
- 6) 3 000 rpm，离心 15 min。弃上清，在沉淀中加入 400 uL 水(经 DEPC 处理)，再加入 400 μL 氯仿，混匀(去蛋白)。
- 7) 13 000 rpm，离心 6 min。上清加入 1/10 体积 3M NaAc(pH5.2)和；两倍体积的无水乙醇。 -20℃放置过夜。
- 8) 13 000 rpm，离心 13 min。将沉淀 RNA 用 70%乙醇洗涤 2 次(70%乙醇用 DEPC 水配制)。
- 9) RNA 沉淀室温下稍干燥。加 100 μL DEPC 水溶解，-20℃保存。

#### 2 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析总 RNA。

- 1) 配制 1%变性琼脂糖胶 称取 0.2 g 琼脂糖，加入 DEPC 水 12.6 mL，5 X 电泳缓冲液 4 mL，加热使溶解。稍冷却加入 37%甲醛 3.4 mL，混匀，室温凝固 0.5~1h(通风橱操作)。
- 2) 50 V 恒压电泳，至溴酚蓝移至前沿 1 cm 处停止电泳。
- 3) 在 EB 中染色 15~20 min，紫外灯下观察结果。
- 4) 在含有甲醛的凝胶上进行 RNA 电泳

RNA 杂交膜的制备、探针的制备和杂交过程等具体操作方法见《分子克隆实验》。

## 四. 实验结果分析

1. 观察转基因植物愈伤组织生长特征。
2. 进行 PCR 扩增产物电泳。
3. 观察转基因植株的 Southern 检测结果。
4. 观察转基因植株的 Northern 检测结果。

## 参考文献

- [1] 吴乃虎编著. 基因工程原理(下册)(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 183-189
- [2] 闫新甫主编. 转基因植物[M]. 北京: 科学出版社, 2003. 214-238
- [3] 王关林, 方宏筠主编. 植物基因工程(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 112-226
- [4] Daniell H, Khan M S, Allison L. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology[J]. Trends Plant Sci, 2001, 7: 84-91
- [5] Lamthan S, Day A. Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 1172-1176
- [6] Kuiper H A, Kleter G A, Noteborn H P *et al.* Assessment of food safety issues related to genetically modified foods. *Plant J*, 2001, **27**: 503-528
- [7] Goddijn O J M, Schouten P M V, Schilperoort R A *et al.* A chimeric tryptophan decarboxylase gene as a novel selectable marker in plant cells. *Plant Mol Biol*, 1993, **22**: 907-913

- [8] 林忠平. 走向 21 世纪的植物分子生物学[C].北京: 2000, 科学出版社, 66-71
- [9] Allison G, Gough K, Rogers L. A suicide vector for allelic recombination involving in the *Cyanobacterium Synechococcus* PCC6301[J]. Mol Gen Genet, 1997, 255 : 392-399
- [10] 张海燕, 田颖川. 将商陆抗病毒蛋白(PAP)cDNA 导入油菜获得抗病毒转基因植株[J]. 科学通报, 1998, 43(23): 2534-2537
- [11] 林良斌, 官春云. 油菜高效转化系统的研究[J]. 作物学报, 1999, 25(4): 447-450
- [12] 程振东, 卫志明. 根癌农杆菌对甘蓝型油菜的转化及转基因植的再生. 植物学报, 1994, 36 (9): 657-663
- [13] 钟蓉, 朱峰. 油菜的遗传转化及抗溴苯腈转基因油菜的获得[J]. 植物学报, 1997, 39(1): 22-27
- [14] 卢爱兰, 方荣祥. 抗芜菁花叶病毒转基因甘蓝型油菜的研究. 遗传学报, 1996, 23(1): 77-83
- [15] 王苏燕, 叶寅, 赵淑珍, 等. 转基因油菜中核酶介导的对花椰菜花叶病毒的高度抗病性. 中国科学(C 辑): 1997, 27(5 ): 426-431
- [16] 陈锦清, 郎春秀. 反义 PEP 基因调控油菜籽粒蛋白质/油脂含量比率的研究. 农业生物技术学报, 1999, 7(4 ): 316-320

(王永飞编写)



## C 微生物工程部分

### 实验十一 正交试验法在微生物培养条件优化选择中的应用

#### 一. 目的要求

对于一个生物作用过程，其结果或产物的得到受到多种因素的影响。如发酵中，菌种的生物活性、酶的浓度、底物浓度、温度、pH 值、菌种生长环境中的氧气、二氧化碳浓度、各种营养成分的比例等。对于这种多因素的实验，如何合理地设计实验，提高效率，以达到所预期的目的是需要进行认真考虑和周密准备的。

本实验运用正交实验法测定酵母用量、葡萄糖浓度、温度、磷酸盐用量这四个因素在不同水平对发酵过程和结果的影响，并应用生物统计学的计算方法分析处理实验数据，求得什么样的酵母用量、葡萄糖浓度、温度、磷酸盐用量对发酵效果最好，并确定影响实验的关键因素及最适条件。

#### 二. 基本原理

正交实验法是安排多因素、多水平的一种实验方法，即借助正交表的表格来计划安排实验，并正确地分析结果，找到实验的最佳条件，分清因素和水平的主次，这就能通过比较少的实验次数达到好的实验效果。实践证明，正交法是一种行之有效的好方法，被广泛地运用于工农业生产和科学研究实验。

#### 三. 正交实验法的基本步骤

##### 1). 明确试验目的，确定评价指标

评价指标有时只有一个，有时可能有多个。当评价指标多于两个，为多指标试验。

##### 2). 挑选因素

影响试验指标的因素很多，由于试验条件的限制，不可能逐一或全面地加以研究，因此要根据已有的专业知识及有关文献资料和实际情况，固定一些因素于最佳水平，排除一些次要的因素，而挑选一些主要因素。正交试验设计法正是安排多因素试验的有利工具。当因素较多时，除非事先根据专业知识或经验等，能肯定某因素作用很小而不选取外，对于凡是可能起作用或情况不明或看法不一的因素，都应当选入进行考察。

##### 3). 确定各因素的水平

因素的水平分为定性与定量两种，水平的确定包含两个含义，即水平个数的确定和各个水平数量的确定。对定性因素，要根据试验具体内容，赋予该因素每个水平以具体含义。

定量因素的量大多是连续变化的，这就要求试验者根据相关知识或经验、或者文献资料首先确定该因素的数量变化范围，而后根据试验的目的及性质，并结合正交表的选用来确定因素的水平数和各水平的取值。每个因素的水平数可以相等，也可以不等，重要因素或特别希望详细了解的因素，其水平可多一些，其他因素的水平可以少一些。

如果没有特别重要的因素需要详细考察的话，要尽可能使因素的水平数相等，以便减小试验数据处理工作量。

#### 4). 制定因素水平表

根据上面选取的因素及因素的水平的取值,制定一张反映试验所要考察研究的因素及各因素的水平的“因素水平综合表”。该表在制定过程中,对于每个因素用哪个水平号码,对应于哪个量可以随机地任意确定。一般讲最好是打乱次序安排,但一经选定之后,试验过程中就不能再变了。

#### 5). 选择合适的正交表

常用的正交表较多,有几十个,可以灵活选择。应注意的是,选择正交表与选择因素及其水平是相互影响的,必须综合考虑,而不能将任何一个问题孤立出来。选择正交表时一般需考虑以下两个方面的情况:

①所考察因素及其水平的多少。选用的正交表,要能容纳所研究的因素数和因素的水平数,在这一前提下,应选择试验次数最小的正交表。

②考虑各因素之间的交互作用。一般说来,两因素的交互作用通常都有可能存在,而三因素的交互作用在通常情况下可以忽略不计。

#### 6). 确定试验方案

根据制定的因素水平表和选定的正交表来安排试验时,一般原则如下:

①如果各因素之间无交互作用,按照因素水平表中固定下来的因素次序,顺序地放到正交表的纵列上,每一列放一种因素。

②如果不能排除因素之间的交互作用,则应避免将因素的主效应安排在正交表的交互效应列内,以妨碍对因素主效应的判断。

③把各因素的水平按照因素水平表中所确定的关系,对号入座后,试验方案随即确定。

#### 7). 正交试验结果的分析

正交试验结果的直观分析与正交试验结果的方差分析相比,具有计算量小、计算简单、分析速度快、一目了然等特点,但分析结果的精确性与严密性相对于方差分析来说稍差。

直观分析主要可以解决以下两个问题:

①求最佳水平组合。该问题归结为找到各因素分别取何水平时,所得到的试验结果会最好。极差的大小直接反映各个因素对试验指标影响的变化幅度,极差大表明该因素的影响越大,是主要因素;反之,极差小,表明该因素的作用不大,

属于次级因素。因此,可以通过比较各个因素的极差大小决定因素的主次顺序。

但因素影响的显著性需通过方差分析确定。

## 四. 实验装置

图 10-1 为 5L 容积的发酵罐培养装置示意图。发酵罐为不锈钢制的圆柱形,外有夹套以便加热或冷却。搅拌可采用电机带动或磁力搅拌器。

空气过滤可采用介质层过滤或聚乙烯醇 PVA 滤芯空气过滤气。

采用可蒸汽杀菌的 pH 复合电极及 pH 控制装置,溶解氧分析仪使用的是可反复蒸汽灭菌、原电极型覆膜电极。

采用 2 台泵,一台用于流加酸碱,一台用于流加消泡剂。所使用的辅料管应是可蒸汽灭菌,使用的管材有长期耐用的硅胶管(一般用)、氟化橡胶管(碳氢化合物用)和耐酸、碱用管等。

采用氧分析仪测定尾气中的氧分压,用红外分析仪测定尾气中二氧化碳分压。

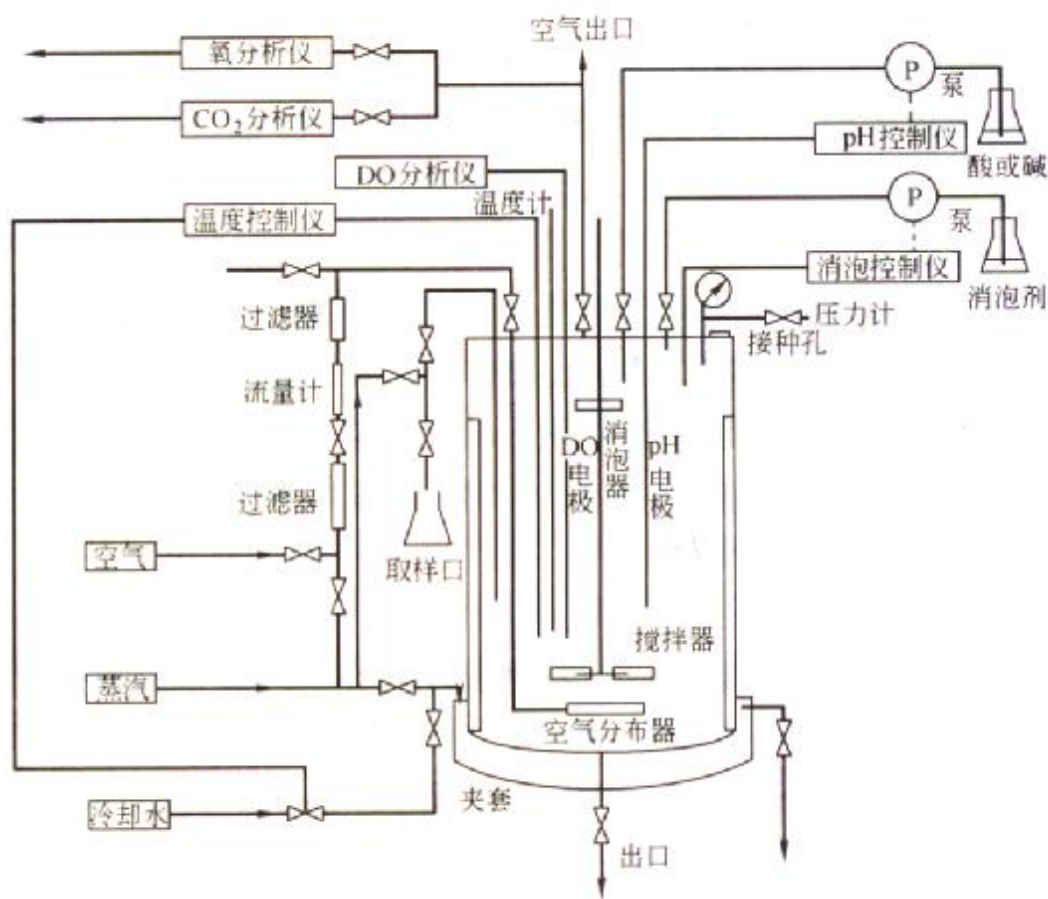


图 11—1。培养装置示意图

## 五. 实验方法

### 1). 菌种:

啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

### 2). 培养基制备

培养基的加入量一般为罐容积的 70%。将称量好的培养基组分，经溶解后加入到发酵罐中。此时培养液的体积为实际所需培养基容积的 80%。由于蒸汽杀菌过程中有大量的蒸汽转变为水，使发酵液体积增大。对于合成培养基的灭菌操作，葡萄糖与磷酸盐应分别灭菌后，在开始培养前加入以避免在杀菌过程中，葡萄糖与氮化合物之间发生美拉德(Mal ad)反应，以及磷盐与其他金属离子形成沉淀。溶液 pH5. 0。

培养基的成分(g / L.) (酵母用量、葡萄糖浓度、温度、磷酸盐用量可变)

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4. 0	CaCl <sub>2</sub>	0. 1	维生素 B1	0. 2mg/L
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4. 0	NH <sub>4</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 12H <sub>2</sub> O	0. 02	烟 酸	5. 0 mg/L
Na <sub>2</sub> HP0 <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	2. 0	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0. 01	对氨基苯甲酸	0. 3 mg/L
MgSO <sub>4</sub>	0. 5	葡萄糖	0. 5	泛酸(盐)	0. 5 mg/L

生物素 0.006 mg/L 消旋肌醇 50 mg/L 维生素 B6 1.0 mg/L

除排气口加棉塞，并包牛皮纸或铝箔外，其他可用橡胶塞或截水夹封住。

### 3). 安装控制装置

连接好各种传感器的管线及通风、水管等,安装调试好 pH 电极、温度计、氧电极、消泡电极等。

### 4). 杀菌

夹套内通入加热蒸汽,使培养液温度达到 80℃ 以上。随后将蒸汽直接通入发酵罐,在 121℃ 下杀菌 15min。杀菌过程中,间断打开各阀门,排出内部空气,以保证各出管内杀菌完全。杀菌完成后,夹套内通入冷却水,进行培养基的冷却。为保证罐内正压,应通入适量无菌空气。

### 5). 接菌、培养

检查温度、通风和 pH 等条件正常后接菌,将浸有酒精的脱脂棉围绕在接种口周围,点火后打开接种口,加入无菌水,调节好罐内培养液量,进而将种子培养液注入。接种量一般为 1%~10%,盖好接种口后,调节搅拌转速至所需数值,培养开始。为了解培养过程中的变化,需定时取样进行样品分析。取样后应通入加热蒸汽,以防取样管路污染杂菌。

### 6). 制定因素水平表和选定正交表进行正交试验

正交实验设计  $L_9(3^4)$  (四因素三水平)

	酵母用量	葡萄糖浓度	温度	磷酸盐用量	菌体量(X)
1	1	1	1	1	
2	1	2	2	2	
3	1	3	3	3	
4	2	1	2	3	
5	2	2	3	1	
6	2	3	1	2	
7	3	1	3	2	
8	3	2	2	3	
9	3	3	1	1	

### 7). 培养结束

将电极与培养液全部取出,培养液在 121℃ 下杀菌 15min 后,排放到指定地点。罐内应冲洗干净。

### 8) 菌体量(X)分析方法

用去离子水适当稀释培养液,在 660nm 下测浊度。测干燥重量时,用事先干燥至恒重的定量滤纸(孔径 1.2μm)过滤培养液,用去离子水洗两次,然后将其干燥至恒重(105℃, 10h),用电子天平称重。

### 9) 数据处理

画出培养液中葡萄糖(g/L)、酵母菌体量(g/L)随培养时间的变化曲线。计算酵母产率(质量分数,葡萄糖)。

## 作业

1. 影响酵母发酵的关键因素是什麼？
2. 采用那些方法可以提高酵母的产率？

## 参考文献

- [1] 杨阳,“生化工程实验”课程研究探讨,高等理科教育 2003, 47 (1): 62-66
- [2] 贾士儒,生物工艺与工程实验技术,北京,中国轻工出版社,2002.9
- [3] 徐吉民, 正交法在医药科研中的应用,北京:中国医药科技出版社,1987.10
- [4] 孙荣恒,应用数理统计,北京:科学出版社,2003

(徐明芳编写)

# D 生物化学技术·酶工程部分

## 实验十九 酶联免疫吸附技术

### 一. 实验目的

- 1、学习掌握 ELISA 的原理和操作方法。
- 2、绘制 IgG 水平曲线，找出反应最佳浓度。
- 3、了解探索 ELISA 反应的最佳条件的方法。

### 二、实验原理

酶联免疫吸附测定(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)技术自 20 世纪 70 年代初问世以来,发展非常迅速,目前被广泛应用于免疫学、医学、生物学等许多领域。

ELISA 是以免疫学反应为基础,将抗原、抗体的特异性反应与酶对底物的高效催化作用相结合起来的一种敏感性很高的试验技术。其基本原理是根据抗原或抗体能在一定条件下结合到固相载体的表面仍保持其免疫活性,抗原或抗体与酶结合形成的结合物仍能保持免疫学和酶的活性。结合物与相应的抗原、抗体结合后,可根据加入相应的酶底物的颜色反应来判断有无相应的免疫反应,而且颜色的深浅与相应的抗原或抗体的量在一定的范围内成正比。由于抗原、抗体的反应在 1 种固相载体——聚苯乙烯微量滴定板的孔中进行,每加入一种试剂孵育后,可通过洗涤除去多余的游离反应物,从而保证实验结果的特异性与稳定性。在实际应用中,通过不同的设计,具体的实验步骤可有多种,如用于检测抗体的间接法、用于检测抗原的双抗夹心法、用于检测小分子抗原或半抗原的抗原竞争法等等。常用的是间接 ELISA 法(见图 19-1)和双抗夹心 ELISA 法。

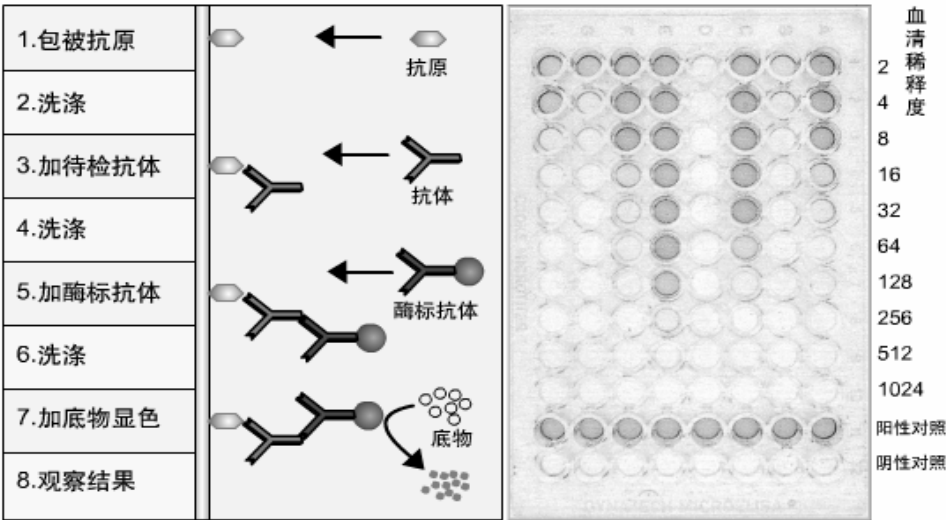


图 19-1 间接 ELISA 法原理

### 三. 实验仪器和试剂

## 1、仪器

酶标仪 (ELISA Reader), 微量可调加样器 1 套 (10、20、100、200、1000  $\mu\text{L}$ ), 恒温培养箱, pH 计, 冲洗器 (或洗板机), 洗涤瓶, 康氏管, 50 mL 烧杯, 吸管。96 孔酶标板或 64 孔酶标板。

## 2、试剂

- 1) 包被液: 0.05 M pH9.6 碳酸盐缓冲液 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59 g,  $\text{NaHCO}_3$  2.93 g, 加水至 1000 mL, 4℃可保存 1 周)。
- 2) 封闭液: 5% 脱脂奶粉或 0.3% BSA
- 3) 洗涤液: 0.15 M pH7.4 PBS-T (0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 8 g NaCl, 0.2 g NCl, 0.5 mL Tween-20, 加水至 1000 mL, 4℃保存)
- 4) 底物液: pH5.0 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液 (0.1 M 柠檬酸 24.3 mL, 0.2 M 磷酸盐 25.7 mL, 加水 50 mL, 混匀), 临用前, 在上述缓冲液中溶解 40 毫克邻苯二胺 (Ortho-Phenglendiaruine, OPD), 然后加入 30% 双氧水 0.15 毫升, 底物对光敏感, 需要避光并立即使用。
- 5) 阳性对照液: 1: 100 用 HAT 培养基稀释的小鼠血清。阴性对照液为 HAT 培养基
- 6) 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 酶标结合物。
- 7) 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- 8) 抗原溶液

## 四. 实验步骤

### 1. 抗原包被

取洁净的聚苯乙烯微量酶标板, 于每孔内加抗原 0.1 毫升 (用包被缓冲液稀释, 蛋白含量 10  $\mu\text{g/mL}$ ), 置 4℃过夜, 用洗涤液洗 3 次, 每次 3 min。

### 2. 封闭

每孔加封闭液 100  $\mu\text{L}$ , 37℃放置 30 min。洗涤 3 次。

### 3. 加待测血清

于每孔内分别加不同稀释度 (如 1: 5, 1: 10, 1: 20...1: 80) 的待测血清, PBS 空白对照, 阴性对照血清, 阳性对照血清各 100  $\mu\text{L}$ 。置 37℃ 60 min, 洗涤 3 次。

### 4. 加酶标抗体 (二抗)

于每孔加酶标抗体各 100  $\mu\text{L}$ , 置 37℃ 60min, 洗涤 3 次。

### 5. 加临时配制的底物液各 100 $\mu\text{L}$ , 置暗处 15 分钟。加 2M 硫酸 50 $\mu\text{L}$ 终止反应。

### 5. 结果判断: (肉眼判断)

若颜色于阴性对照相同则为阴性, 若较阴性对照深则为阳性, 根据颜色深浅以 (+) 表示。

## 注意事项

- 1、实验时, 应分别以阳性与阴性对照控制实验条件, 待检样品应一式两份, 以保证实验结果的准确性, 有时本底高, 说明有非特异性反应, 可采用羊血清、兔血清或 BSA 等封闭。
- 2、在 ELISA 中, 进行各项实验条件的选择非常重要, 如: 固相载体的选择: 很多物质可作固相载体, 如聚氯乙稀、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、纤维素等, 可以是凹平板、试管、珠粒等。目前常用的 96 孔板为聚苯乙烯凹孔板。不管何种载体, 使用前均进行筛选,

用等量的抗原包被，同样条件下比较不同载体的均一性和吸附性能。

包被抗体（或抗原）的选择：将抗体（或抗原）吸附在固相载体表面时，要求纯度好，pH 值适当，吸附时间和蛋白量也有一定的影响。最好通过滴定确定蛋白包被的最佳浓度。

酶的底物和共氢体的选择：共氢体要求廉价、安全、有明显的显色反应，而本身无色。如 OPD 有潜在的致癌性，应注意防护。TMB 和 ASTS 是目前较满意的共氢体。底物作用一段时间后，应加入强酸或强碱以终止反应。通常地位作用时间为 10~30 min 为宜。底物使用液应该新鲜配制。

（邓宁编写）



## D 生物化学技术·酶工程部分

### 实验二十五 模拟过氧化物酶的制备、固定与应用

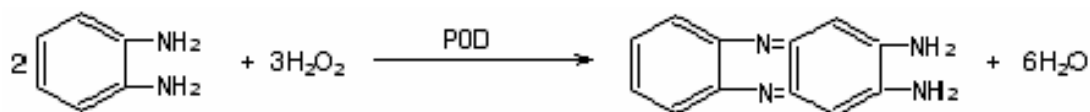
#### 一. 实验目的

学习一种人工合成模拟过氧化物酶的方法,了解柱子型固定酶的原理以及感性认识酶分析法的一些应用。

#### 二. 实验原理

过氧化物酶的辅基是血红素。在体外将血红素与牛血清白蛋白结合制备成含血红素的蛋白质分子作为模拟过氧化物酶。在确定血红素与牛血清白蛋白结合后,检测其的过氧化物酶活性。然后将此人工模拟酶固定在载体琼脂糖凝胶(Sephrose 4B)上并装柱,应用于检测样品中痕量过氧化氢的含量,因为过氧化氢的测定不论是在临床生物化学还是在环境化学和食品工业中都具有重要意义。

血红素是一活性分子,而血清白蛋白具有极强吸附能力,所以两者能结合。由于含有血红素,该结合物就具有过氧化物酶的特性。琼脂糖凝胶在激活后能很好的吸附蛋白质分子从而把蛋白质分子(模拟过氧化物酶)固定。过氧化物酶能极敏感的催化过氧化氢分解从而使邻苯二胺变成有色物质 2,3-二氨基吩嗪,反应如下:



产物 2,3-二氨基吩嗪在 428nm 处有光吸收峰,所以能以此反应来测定过氧化物酶的活性和检测过氧化氢的含量。

#### 三. 主要仪器与试剂

仪器: 紫外-可见分光光度计,摇床,水浴锅,天平,布氏漏斗,恒流泵等。

试剂: 氯化血红素、牛血清白蛋白,过氧化氢,邻苯二胺,氨水,环氧氯丙烷, Sepharose 4B, 1,4-二氧六环等。

#### 四. 操作步骤

##### 1. 以等摩尔数将牛血清白蛋白与氯化血红素结合

称取 3.216g 牛血清白蛋白于少量水中溶解,后加水至约 30ml。先用几滴氨水使 0.0312g 氯化血红素溶解,加少量水搅匀,然后在搅拌中缓慢滴至 30℃ 的牛血清白蛋白溶液中,最后使混合液最终总体积为 80ml。其中所含氯化血红素和牛血清白蛋白的最终浓度均为 0.6mmol/L。在 30℃ 水浴中 20 分钟(以上全班只做两份)。该混合液经吸收光谱测定确认牛血清白蛋白与血红素结合后,稀释 4 倍,以稀 NaOH 或稀 HCl 调 pH 约为 9.5。每组取 16ml 备用。

## 2. 载体 Sepharose 4B 的活化

将适量的 Sepharose 4B 于烧结漏斗中(抽气过滤)抽干,称取 8g(湿重),以 100ml 1mol/L NaCl 和 100ml 蒸馏水先后在漏斗上洗涤,抽干后移至小三角瓶内,加入 6.5ml 2mol/L NaOH、1.5ml 环氧氯丙烷、15ml 56% 1,4-二氧六环,于 40℃ 的恒温摇床中振摇活化 2h 后取出,在烧结漏斗中以蒸馏水和 0.2mol/L, pH9.5  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液洗涤、抽干。

## 3. 模拟过氧化物酶与载体的连接

将 10ml 牛血清白蛋白-氯化血红素复合物(其余 6ml 用作酶活力和偶联率的测定)与活化的载体 Sepharose 4B 混合,在 40℃ 摇床上振荡偶联 24h 左右,在烧结漏斗中收集滤液,并用少许蒸馏水淋洗一并收集,量体积,用作未结合模拟酶的量的测定,算出偶联率。将偶联复合物用 0.2mol/L, pH9.5  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液浸泡后装柱。用相同缓冲液平衡。

## 4. 模拟酶固定前活力的测定及固定后的应用

固定前酶活力的测定:将 2ml 20mmol/L 邻苯二胺与定量模拟酶(如可以是 5、10、15  $\mu\text{l}$  等)混合后,再与 1ml 20%过氧化氢混合,即用时间扫描测定反应 0.5 或 1 分钟时 428nm 处的吸光度,以 O.D 值/分mg 酶来表达酶的活力。

固定装柱后对过氧化氢检出值的测定:将柱子柱面上平衡液放至界面,把 3ml 20mmol/L 邻苯二胺与含微量过氧化氢(如 2  $\mu\text{l}$ )的水样品 1ml 混合,用恒流泵以 0.5ml/min 的流速使样品经过柱子(洗脱液用 0.2mol/L, pH9.5  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液),收集有色过柱液 3ml 并测 428nm 的吸光值,以水代替过氧化氢与邻苯二胺混合过柱作为对照。改变过氧化氢含量重复以上操作,测定出过氧化氢的最低检出值。以过氧化氢含量与 OD 值的关系作出标准曲线,也可测定污水或雨水中过氧化氢的含量(注意相同条件才能比较)。

## 5. 载体与模拟酶偶联率的测定

以 1 克 Sepharose 4B 偶联模拟酶的毫克数表示。测定模拟酶与载体混合前还原态(加少许连二亚硫酸钠使模拟酶还原)模拟酶在 577nm 的吸光值(已知模拟酶的量),再测定偶联后未结合的还原态模拟酶在 577nm 处的吸光值,通过比例法算出未结合模拟酶的数量,从而算出偶联率。

附:主要物质的分子量

牛血清白蛋白: 66, 411

氯化血红素: 652

模拟过氧化物酶: 67, 063

(李任强编写)