

分子生物学实验基础知识

分子生物学是在生物化学基础上发展起来的，以研究核酸和蛋白质结构、功能等生命本质的学科，在核酸、蛋白质分子水平研究发病、诊断、治疗和预后的机制。其中基因工程（基因技术，基因重组）是目前分子生物学研究热点，这些技术可以改造或扩增基因和基因产物，使微量的研究对象达到分析水平，是研究基因调控和表达的方法，也是分子水平研究疾病发生机制、基因诊断和基因治疗的方法。转化（**transformation**）、转染、转导、转位等是自然界基因重组存在的方式，也是人工基因重组常采用的手段。基因重组的目的之一是基因克隆（**gene clone**），基因克隆可理解为以一分子基因为模板扩增得到的与模板分子结构完全相同的基因。使需要分析研究的微量、混杂的目的基因易于纯化，得以增量，便于分析。

外来基因引起细胞生物性状改变的过程叫转化（**transformation**），以噬菌体把外源基因导入细菌的过程叫转染（**transfection**）。利用载体（噬菌体或病毒）把遗传物质从一种宿主传给另一种宿主的过程叫转导（**transduction**）。一个或一组基因从一处转移到基因组另一处的过程叫转位（**transposition**），这些游动的基因叫转位子。

一、基因工程的常用工具

（一）载体

载体（**Vector**）是把外源 DNA（目的基因）导入宿主细胞，使之传代、扩增、表达的工具。载体有质粒（**plasmid**）、噬菌体、单链丝状噬菌体和粘性末端质粒（粘粒）、病毒等。载体具有能自我复制；有可选择的，便于筛选、鉴定的遗传标记；有供外源 DNA 插入的位点；本身体积小等特征。

质粒存在于多种细菌，是染色体（核）以外的独立遗传因子，由双链环状 DNA 组成，几乎完全裸露，很少有蛋白质结合。质粒有严紧型和松弛型之分。严紧型由 DNA 多聚酶 III 复制，一个细胞可复制 1-5 个质粒。而松弛型由 DNA 多聚酶 I 复制，一个细胞可复制 30-50 个质粒，如果用氯霉素可阻止蛋白质合成，使质粒有效利用原料，复制更多的质粒。质粒经过改造品种繁多，常用的有 pBR322、pUC 系列等。这些质粒都含有多个基本基因，如复制起动区（复制原点 Ori），便于复制扩增；抗抗生素标记（抗氨苄青霉素 Ap^r 、抗四环素 Tc^r 等）或大肠埃希菌部分乳糖操纵子（*E.coli* LacZ）等，便于基因重组体的筛选；基因发动子（乳糖操纵子 Lac、色氨酸操纵子 Trp 等）和转录终止序列，便于插入的

外源基因转录、翻译表达。质粒上还有许多限制性内切酶的切点，即基因插入位点，又叫基因重组位点，基因克隆位点。

常用噬菌体载体有单链噬菌体 M13 系统；双链噬菌体系统。噬菌体应和相应的宿主细胞配合使用。以上载体各有特点，便于选择，灵活应用。

(二) 工具酶

工具酶是基因重组技术不可缺少的工具。主要有限制性内切酶、连接酶、核酸聚合酶、逆转录酶、核酸酶等。

限制性内切酶有 I 型和 II 型限制性 DNA 内切酶之分，II 型能严格识别核酸序列，并在识别区内特定的核苷酸处切开 DNA 双链。故通常所指都是 II 型限制性 DNA 内切酶。识别分四核苷酸和六核苷酸，其序列旋转对称。切口分开端和粘端，产生 3'-OH 和 5'-P 末端。内切酶品种多，使用时应注意温度、缓冲液用量（一般 1 μ g DNA/2-5 单位酶）等反应条件。

酶	识别序列	切口	
Alu I	...AGCT...	...AG CT...	四核苷酸
	...TCGA...	...TC GA...	平端切口
Eco R1	...GAATTC...	...G AATTC...	六核苷酸
	...CTTAAG...	...CTTAA G...	粘端切口

连接酶有 T4 噬菌体 DNA 连接酶、T4 噬菌体 RNA 连接酶、大肠埃希菌 DNA 连接酶等。DNA 连接酶可连接平端，也连接粘端。反应需有 Mg²⁺和 ATP 存在，pH7.5-7.6。最适温度 37 $^{\circ}$ C，30 $^{\circ}$ C 以下活性明显下降，但考虑到被连接 DNA 的稳定性和粘性末端的退火温度，一般平端连接用 20-25 $^{\circ}$ C，粘端连接用 12 $^{\circ}$ C 左右。

聚合酶有 DNA 聚合酶（以 DNA 为模板合成 DNA 大肠埃希菌 DNA 聚合酶 I，大肠埃希菌 DNA 聚合酶 I 大片段（Klenow 大片段），T4 或 T7 噬菌体 DNA 聚合酶等）；RNA 聚合酶（以 DNA 为模板合成 RNA，T7 或 T3 噬菌体 RNA 聚合酶）；逆转录酶（以 RNA 为模板合成 DNA，除 RNA 病毒中发现外，发现大肠埃希菌 DNA 聚合酶 I 和 Taq DNA 聚合酶都有逆转录活性）。

大肠埃希菌 DNA 聚合酶 I 具有 5'→3'聚合酶活性和 5'→3', 3'→5'外切酶活性。Klenow 片段是 DNA 聚合酶 I 被枯草杆菌酶作用产生的一个大片段, 有 5'→3'聚合酶和 5'→3'外切酶活性, 无 3'→5'外切酶活性。可用于缺口翻译 (Nick translation) 法标记核酸, 也可用于 DNA 序列测定, 修补 DNA 链等。

核酸酶有 DNase、RNase、核酸酶 S1 等, 可水解相应的 DNA 和 RNA, 核酸酶 S1 可降解单链 DNA 和 RNA, 用量增大也可降解双链核酸。它可用于切去 ds-cDNA 合成中产生的发夹环。

末端转移酶在 Mg^{2+} 存在下, 选择 3'-OH 端单链 DNA 为引物加成核苷酸, 在 Co^{2+} 存在下, 选择 3'-OH 端双链 DNA 为引物加成核苷酸, 形成多聚核苷酸尾。常用于核酸末端标记和核酸连接的互补多聚尾 (连接器)。

碱性磷酸酶去除 5'-P, 可防止二分子 DNA 片段 5'端 P 基团自身空间障碍, 影响 DNA 分子之间的连接, 一般用碱性磷酸酶处理载体 DNA 除去 5'端 P 基团, 在连接酶作用下目的基因的 5'端 P 先与载体 3'端 OH 连接, 再通过复制修复另一条链, 使二条链完全连接。该方法大大提高了连接效率 (图 18-1)。

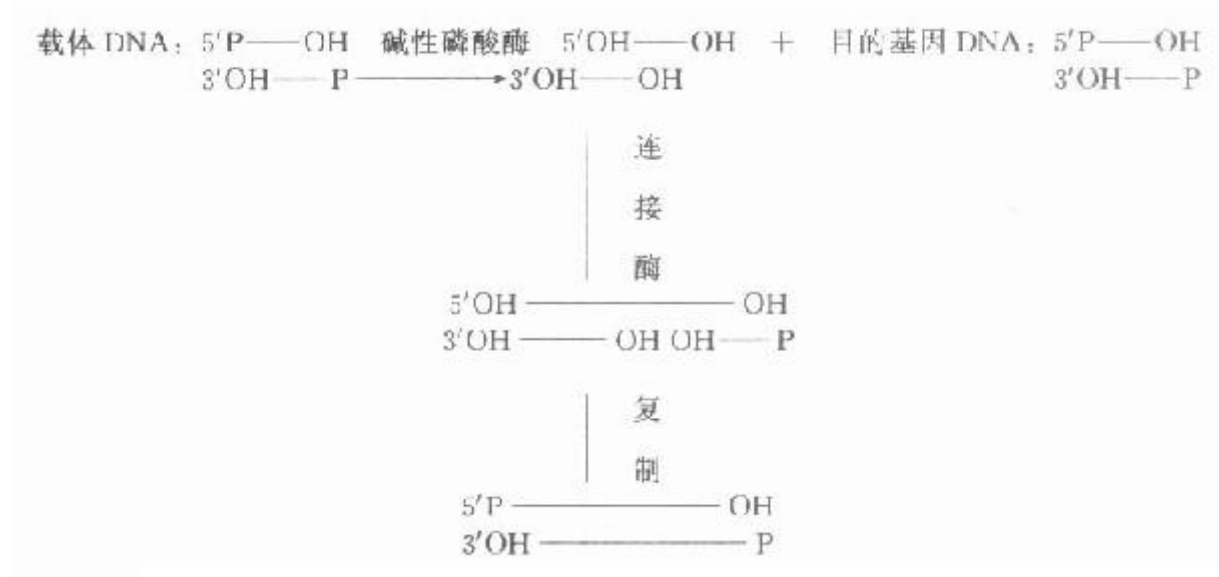


图 18-1 经碱性磷酸酶处理后载体 DNA 与目的基因 DNA 的连接

二、目的基因

常把需研究的基因称为目的基因, 需分析的基因称靶基因, 在基因克隆过程中有时两者均称为插入基因, 有时三者含义相近。简单的原核生物目的基因可从细胞核中直接分离得到, 但人类的基因分布在 23 对染色体上, 较难从直接法得

到。简短的目的基因可在了解一级结构或通过了解多肽链一级结构氨基酸编码的核苷酸序列基础上人工合成。但多数的目的基因由 mRNA 合成 cDNA (complementary DNA, 反转录 DNA) 得到。cDNA 通过各种方式与载体连接, 克隆可得到全长 cDNA 或片段, 用于探针制备、序列分析、基因表达等研究。因此以 cDNA 为研究材料反映了 mRNA 的转录及对以后翻译的影响情况, 即反映某一基因 (DNA) 外显子的情况。(图 18-2)

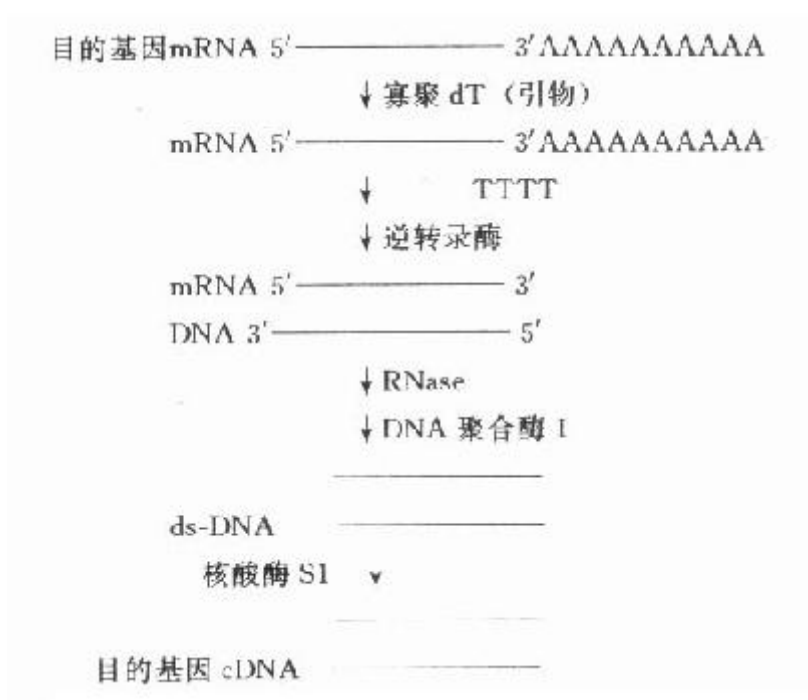


图 18-2 目的基因 cDNA 的合成

三、基因库的建立

建立基因库的目的是为了便于目的基因的保存、扩增和纯化。基因库是利用工具酶, 通过基因重组技术和转化、筛选而建立, 也是基因克隆的过程。实际上是利用低等生物如细菌、病毒、噬菌体等生长快, 繁殖力强的特点, 而作为一种核酸扩增筛选的载体, 把人类等高等生物的基因或其片段用工具酶插入, 重组于其中, 经筛选, 克隆得到目的基因与载体重组的重组基因, 成为便于保存, 取用方便的基因库。基因库交流是研究室之间交流目的基因的常用方式。

(一) 基因重组

基因重组方案很多, 简单的可用同一种限制性内切酶分别在载体和目的基因切出相对应的切口, 便于连接。也可用末端连接酶合成连接器(图 18-3)。近年, Okayama 方案为实验室普遍采用, 该方法可得到全长的 cDNA。

(二) 转化

转化目的是把有复制能力，但在细胞外无复制活性的目的基因-载体重组体装入细胞（大肠埃希菌），使目的基因随载体在细胞内复制、扩增。实验步骤介绍如下：

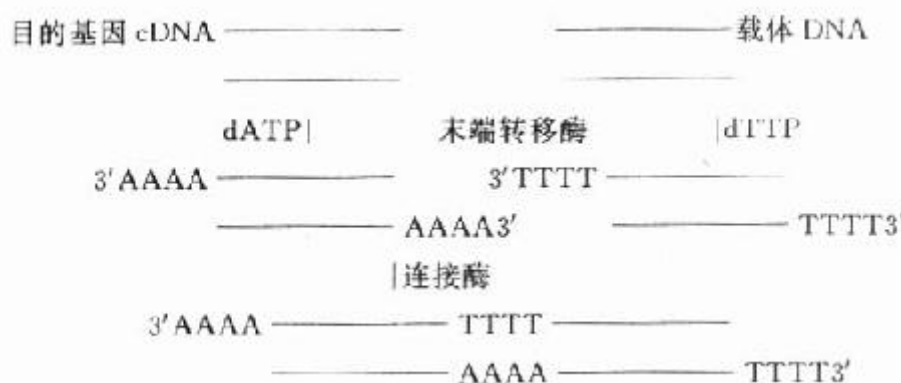


图 18-3 基因重组方案之一

1. 大肠埃希菌的处理（增加细胞膜通透性，便于基因进入细胞）大肠埃希菌（*E. Coli* cells）接种于 Lb agar 培养基，37℃ 培养一晚。挑选 3~5 个大菌落，接种于 50ml LB 培养基，37℃，振荡培养一晚后，在 A_{550} 测定，要求细菌繁殖一定量（一般为细菌对数生长期），野生型（*rec+*， 5×10^7 cells/ml）为 0.2-0.3，缺陷型（*rec-*， 5×10^7 cells/ml）为 0.5-0.6。离心弃去上清液，用 20ml，50mmol/L， CaCl_2 悬浮菌体。冰浴 20 分钟，低温离心。弃上清液，用 2.5ml 冰 50mmol/L CaCl_2 悬浮。4℃ 可保存 48 小时，用于转化，称 competent cells。

2. 质粒（如经基因重组建立的重组质粒，基因库等）的转化 将 competent cells（以美国 BRL 公司 DH10B 菌株为例）置冰水浴。同时将 Falcon2059（传热系数稳定）塑料试管置冰水浴。取 100 μ l 菌液（DH10B）于 2059 试管中，加 10 倍稀释的巯基乙醇 1 μ l，冰浴轻摇 2 分钟，放置 10 分钟。取 0.1-50ng 质粒加入试管，轻轻摇匀，冰浴 30 分钟。此间备好 42℃ 水浴。并将 SOC 培养基置 42℃ 备用。将试管置于 42℃，轻摇 45 秒钟，马上置冰浴 2 分钟。使 competent cells 热胀冷缩，把质粒导入菌体。加 42℃ SOC 培养基 0.9ml 于试管，37℃ 培养 1 小时。1000rpm 离心 10 分钟，弃上清液，用 200 μ l SOC 培养基悬浮菌体。接种于 LB-氨苄青霉素（100U/ml）培养皿，37℃ 培养一晚。已转化的菌体可形成菌落（因质粒上有抗氨苄青霉素基因）。在了解目的基因或其产物的基础上对菌落进行鉴定。并在 LB 培养液中扩大培养。基因库的建立、转化、筛选、扩增、纯化的过程就是基因克隆的过程。

LB 培养基（1L）：10g 蛋白胨，5g 酵母膏，10g NaCl，高压灭菌，pH7.5。

SOB 培养基（1L）：20g 蛋白胨，5g 酵母膏，0.5g NaCl，高压灭菌。另外准备 2mol/L 镁溶液（1mol/L 氯化镁与 1mol/L 硫酸镁等量混匀，过滤灭菌），临用前加 1ml 于 100ml 培养基。

SOC 培养基（100ml）：临用前加入 1ml 过滤灭菌的 2mol/L 葡萄糖。

四、核酸的分离与纯化

核酸存在于多种细胞，如病毒、细菌、寄生虫、动植物细胞；多种标本中，如血液、组织、唾液、尿液等其它来源的标本。因此分离方法复杂而多样。又因各种 DNA、RNA 的丰度差异，各种分析方法对核酸的纯度与量的要求有差异，因此在实验前应对采用的方法有所了解 and 选择。总的说来核酸的分离与纯化是在溶解细胞的基础上，利用苯酚等有机溶剂抽提（核酸溶于缓冲液，即水相），分离，纯化；乙醇、丙酮等有机溶剂沉淀，收获。溶解细胞的方法因标本不同而不同，有用 SDS 加 NaOH，有用蛋白酶，有的用超声波破碎等方法，苯酚提取主要使蛋白质变性沉淀于有机相，而核酸保留在水相，达到分离核酸的目的。实验上生物标本中含量最多的就是蛋白质。为了除去分离过程中残留的有机溶剂，常用的方法是加冷乙醇和盐沉淀核酸，通过离心回收核酸，然后用 70%-80% 乙醇洗涤沉淀，除去多余的盐，以免影响核酸溶解和抑制后续步骤的酶促反应。为了得到纯的核酸可用蛋白酶除去蛋白，用 RNA 酶除去 RNA，得到纯的 DNA，用 DNA 酶除去 DNA 而获得 RNA。目前开发了许多商品化的核酸分离柱，可简单、快速地分离得到纯度很高的 DNA 或 RNA。其分离原理有的利用核酸的分子量差异，有的利用需分离核酸的特点与其特异性结合达到分离、回收的目的。

（一）质粒的分离与纯化

含质粒的 E. Coli cells 经 LB 培养液 250ml 扩大培养，倒入 50ml 离心管，4℃，3000rpm，离心 15 分钟。弃去上清液。（弃去液丢弃前应作消毒处理，以免污染环境）。加 lysis buffer(50mmol/L Glucose, 10mmol/L EDTA, 25mmol/L Tris-HCl, pH8.0)1-2ml 使之悬浮。放置室温 5 分钟，加 3.5-7ml 新配制 SDS/NaOH 溶液（1mol/L NaOH 8ml, 20%SDs 2ml, 蒸馏水 30ml）上下摇匀，置冰水浴 5 分钟。禁用混匀器，以免 DNA 分子断裂），加 2.5mol/L 醋酸钾缓冲液（pH4.8）2.6-5.2ml，上下摇匀，冰浴 5 分钟。4℃，3000rpm，离心 15 分钟。沉淀蛋白质。取上清液，加无水乙醇 12-24ml（上清液的二倍）放室温 15 分钟后，10000rpm 离心，弃上清液。加约为沉淀物体积的 0.4 倍 TE（10mmol/L Tr

is-HCl pH8.0, 10mmol/l EDTA) 溶解沉淀后, 加 0.2 倍的 7.5mol/L 醋酸铵。可用混匀器混匀, 置冰浴 10 分钟。4℃, 10000rpm 离心 5min, 弃上清液。加沉淀物 0.4 倍的 10mmol/l Tris-HCl pH7.5, 10mmol/l EDTA 缓冲液, 1/10 体积的 5mg/ml RNase, 37℃, 30 分钟保温。加等量的 phenol (酚) /CIAA(480 ml 氯仿, 20ml 异戊醇), 混匀。4℃, 10000rpm, 离心 5 分钟。取上层液加酚/CIAA 重复一次。取上层液加 1/10 体积 5mol/l NaCl 和 2 倍无水乙醇, -20℃过夜或-70℃2 小时以上。4℃, 10000rpm, 离心 10 分钟, 弃上清液。加 80%乙醇不摇动, 直接 10000rpm 离心, 弃上清液, 真空干燥。加适量 (约 200μl) TE 溶解。测定含量后备用。

(二) 重组质粒中目的基因的分离与纯化

先取少量纯化的重组质粒, 用限制性内切酶切出目的基因, 经电泳分离, 确认。以 200μl 含 2mg DNA (重组质粒) 为例: 取 10μl 含 100μg DNA, 加 90μl TE。按 1μg DNA 加 2-5U 限制性内切酶, 1/10 体积缓冲液, 1-2 小时保温。缓冲液种类和酶反应温度因内切酶种类而异。1/10 体积 3mol/l NaAc, 2 倍无水乙醇, -70℃, 2 小时 (-20℃过夜), 10000rpm, 10 分钟离心, 弃上清液 (乙醇沉淀)。适量 TE 溶解沉淀 (切断的 DNA 质粒与目的基因混合物), 电泳分离 (用相应分子量 DNA 标准同时电泳), 在紫外光下观察结果, 与标准 DNA 分子量比较, 确认目的基因和内切酶的切割效果。

1. 电泳条件:

凝胶制备:	1%琼脂糖凝胶	agarose(mg)	X50TAE(ml)	EB(溴化乙锭 μl)			
	(agarose)	1000	2.0	4.0			
	总体积 (ml)						
	100						
胶浓度 (%):	0.3	0.6	0.7	0.9	1.2	1.5	2.0
DNA 长度 (kb):	60-5	20-1	10-0.8	7-0.5	6-0.4	4-0.2	3-0.1
电泳缓冲液:	X50TAE(ml)	EB(μl)	总体积(ml)				
)						

	20	30	1000				
--	----	----	------	--	--	--	--

X50TAE: Trisma base 54g; 乙酸 57.1ml; 0.5m EDTA pH8.0 20ml; 蒸馏水至 1000ml。

EB: 10mg/ml ethidium bromide。(EB 有致癌性, 操作应小心)。

经电泳确认后, 取适量 DNA (重组质粒) 同上条件切开, 用 1.5% 低熔点 (< 65°C 溶解) 琼脂糖凝胶, 电泳分离。在紫外光下, 切出含目的基因区带 (凝胶), 放入离心管中, 提取纯化。

2. 从低熔点凝胶提取, 纯化 DNA 片段 加与凝胶体积相等的 TE (10mmol/l Tris-HCl pH8.0, 0.1mmol/l EDTA), 置 65°C 水浴 5 分钟保温, 使凝胶完全溶解。待放至室温, 加等量酚 (TE 饱和, TE 封在上层, 取下层酚), 轻轻混匀 (不用混匀), 12000rpm, 3 分钟离心。反复 1-2 次。取上层液, 加 0.1 体积 3mol/L 醋酸钠 (pH5.2) 和 2.5 倍体积无水乙醇, 进行乙醇沉淀。将纯化的 DNA 加适量 TE 溶解, 测定含量, 备用 (可用于目的基因结构分析, 探针制备等)。除低熔点凝胶回收法外, 如用一般凝胶可用透析带短暂电泳, 离心管底部加玻璃棉, 高速离心等方法回收 DNA 片段。

(三) 标本 DNA 的分离与纯化

用 5-10ml 1xNTE (NaCl 100mmol/L, Tris-HCl 10mmol/l pH7.4, EDTa 1mmol/L pH8.0) 调整细胞为 2×10^7 个 (组织应切碎置液氮冰冻, 高速搅切成粉末后, 加入缓冲液)。加 1/10-1/20 体积 (V) 10mg/ml 蛋白酶 (Sigma VIII 型), 1/20v 10% SDS, 37°C 2 小时。加等量酚/3xNTE (3xNTE 上封) 混匀 (至少 7 分钟)。4°C, 3000rpm, 10 分钟。取上清液, 加 2ml TE (Tris-HCl 10mmol/L pH7.5, EDTa 1mmol/L pH8.0), 充分混匀。乙醇沉淀。2ml TE 溶解沉淀。加 1/30xNTE, 蛋白酶 K (10mg/ml) 代替蛋白酶重复 2-4 步骤。测定含量。

(四) 样品 RNA 的分离, 纯化

含 10^6 个细胞液加等量纯化溶液 [4mol/L 胍基硫氰酸盐, 25mmol/L 柠檬酸 pH7.0, 0.5% 肌氨酸 (sarcosyl), 0.1mol/l 2-巯基乙醇]。总体积为细胞沉淀 4-5 倍, 混匀。加 0.1 体积 2ml/L 乙酸钠 (pH4.1), 1 体积酚 (重蒸水上封), 0.2 体积 CIAA, 混匀器剧烈混合 10 秒钟。冰水浴 15 分钟。10000xg 4°C, 20 分钟。离心 (不用刹车)。小心取出上清液。加等量丙酮 (或 2 倍乙醇), -20°C, 60 分钟以上。10000xg, 4°C, 20 分钟离心。弃上清液。用 1.5ml 离心管约

加 0.3ml 纯化溶液，重复 3) 步骤，离心 10 分钟，弃上清液。加 75% 乙醇，10000xg，4℃，10 分钟离心。弃上清液。真空干燥 15 分钟，备用。

五、探针制备

探针制备就是目的基因的标记，核酸标记方法常用的有缺口平移法、随机引物法、末端标记法等。标记物质有放射性元素（如 ^{32}P 等）和非放射性物质（如生物素、地高辛等）。 ^{32}P 是最常用的核苷酸标记同位素，被标记的 dNTP 本身就带有磷酸基团，便于标记，特点是比活性高，可达 9000Ci/mmol；发射的 β 射线能量高，可达 1.70MeV，用它标记的探针自显影时间短，灵敏度高。 ^{32}P 的半寿期为 14 天，应随标随用，一般标记后，在一周内使用，它虽带来不便，但给使用后废弃物处理减轻了压力。使用 ^{32}P 标记物应注意防护，操作时应有 1-1.5 cm 厚聚甲基丙烯酸甲酯有机玻璃隔离保护，避免直接照射。操作人员胸前应佩带个人计量器，定期检测。结束实验后，应用专用探测器（盖革-米勒检测器），检查工作区域、手、衣服等，以免污染发生。其它同位素标记物，同样应注意放射线防护。

非放射性标记有酶标和化学物标记法。酶标方法与免疫测定 ELISA 方法相似，只是被标记的核酸代替了被标记的抗体，事实上被标记的抗体也称为探针，阅读文献时应加以注意。现有许多商品是生物素（biotin）、地高辛标记的，如生物素-dUTP、生物素-dATP、地高辛-dUTP 等。血凝素（avidin）与生物素有非常高的亲和性，当血凝素标记上过氧化物酶或碱性磷酸酶（血凝素-酶），经杂交反应最终形成：探针-生物素-血凝素-酶复合物（ABC 法）。酶催化底物显色，观察结果。与一般的酶反应底物不同，ABC 法底物显色后为不溶物，以便观测结果。酶标记法复杂、重复性差、成本高，但便于运输保存，灵敏度与放射物标记相当。化学物标记有的也是利用相应酶标抗体形成特异复合物，与上述方法相当，有的则可自发光。化学标记法简单、成本低，但灵敏度相对较低。

地址：杭州市西湖科技园西园八路 11 号

邮编：310030

售后服务专线：400-672-1817

销售电话：0571-86056609 86059660

86054117 86055117

传真：0571-86059660 86823529

网址：www.top17.net