

分子生物学实验课程

生物技术概念与特征

▶ 定义:

利用活体生物或它们的产物来生产或修饰一种产品以改良植物和动物、或发展具有特殊用途的微生物的技术。

▶ 特征:

21世纪最具潜力的高新技术
多学科、交叉、综合的技术
影响最为深远最广泛的技术

基因工程的概念

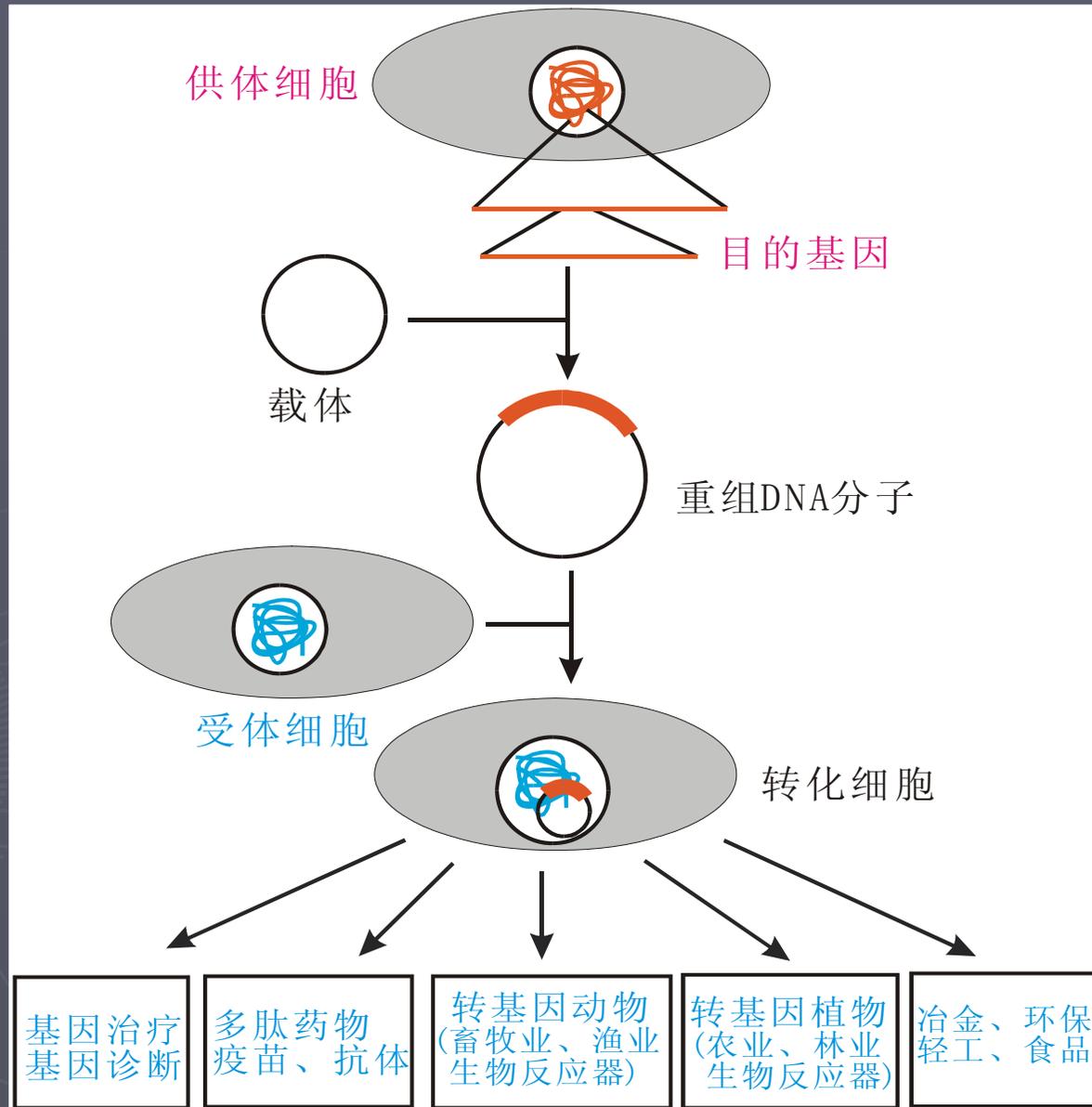
利用DNA体外重组或PCR扩增技术从某种生物基因组中分离感兴趣的基因，或是用人工合成的方法获取基因，然后经过一系列切割，加工修饰，连接反应形成重组DNA分子，再将其转入适当的受体细胞，以期获得基因表达的过程。

基因工程(gene engineering)常和以下名称混用:

- ▶ 遗传工程(genetic engineering);
- ▶ 基因克隆(gene cloning);
- ▶ 分子克隆(molecular cloning);
- ▶ 基因操作(gene manipulation);
- ▶ 重组DNA技术(recombination DNA technique)

- ▶ 包括基因的分离、重组、转移、基因在受体细胞内的保持、转录、翻译表达等全过程
- ▶ 基因工程四要素：目的基因、工具酶、载体、受体细胞

基因工程技术



基因工程的应用

- ▶ 1、生命科学基础理论研究
- ▶ 2、在医学中的应用
- ▶ 3、工业中的应用
- ▶ 4、农林牧渔业中的应用

基因工程技术路线

- ▶ 1、DNA片段的取得（目的基因的分离和制备）
- ▶ 2、DNA片段和载体的连接——重组体DNA
- ▶ 3、外源DNA片段引入受体细胞——基因克隆和基因文库
- ▶ 4、筛选——挑选含有目的基因的重组子
- ▶ 5、目的基因表达

- ▶ 本课程通过GSTZ基因克隆实验，使大家对分子生物学有一个感性的认识。
- ▶ 分离GSTZ基因（质粒DNA提取）
- ▶ PCR扩增
- ▶ 限制性内切酶切割载体和目的基因
- ▶ 载体和目的基因的连接
- ▶ 连接子转移入受体细胞
- ▶ 重组子筛选
- ▶ 目的基因表达及酶活性分析

实验一：细菌质粒DNA的碱法制备

通过本实验学习和掌握碱裂解法提取质粒。

DNA片段的获得

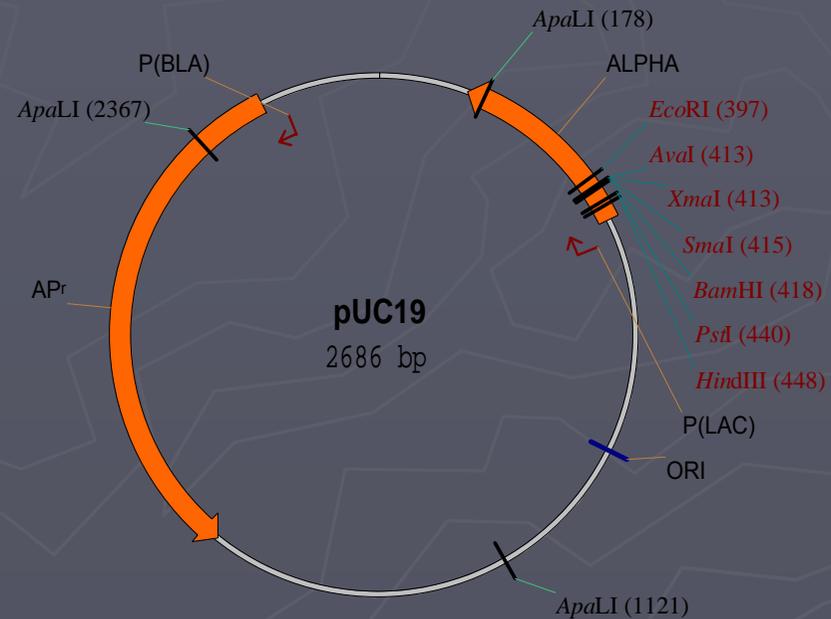
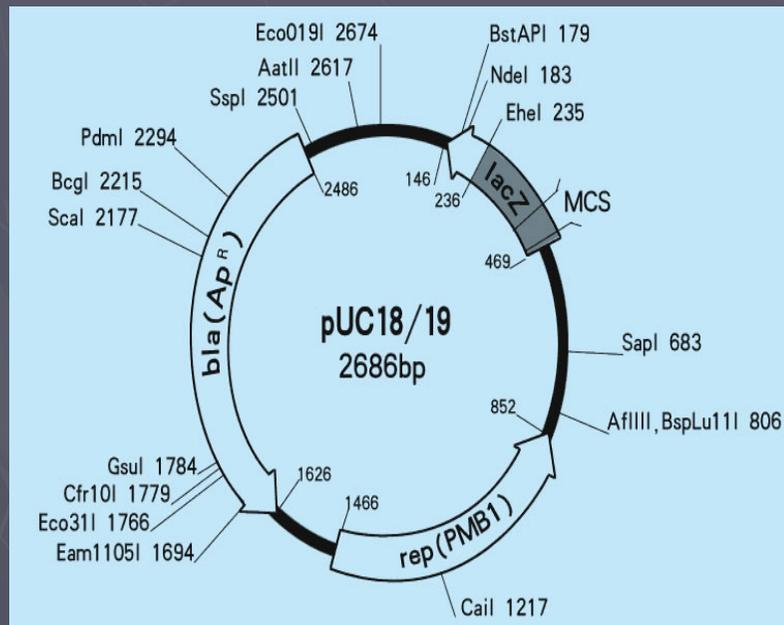
- ▶ 1、从基因所在的生物体直接取得
- ▶ 2、人工合成DNA片段（DNA合成仪）
- ▶ 3、PCR反应合成DNA
- ▶ 4、mRNA反转录成cDNA

质粒 (plasmid)

- ▶ 是染色体外小型 (1-200kb) 的共价、闭合、环状的双链DNA分子 (cccDNA)，能自主复制并能稳定遗传的遗传因子。
- ▶ 常常编码一些对宿主有利的酶的基因，这些基因的表型包括抗生素抗性、产生抗生素、限制酶、修饰酶等

常用的质粒载体

► 是通过DNA重组技术构建而成的。



▶ pMID-GSTZ

- 3.5Kb
- 共价、闭合、环状的**DNA**分子

▶ 要去除的物质:

- 蛋白
- 基因组**DNA**
- **RNA**
- 脂类及小分子杂质

一、提纯的思路

▶ 质粒的特性：共价、闭合、环状的小分子量DNA

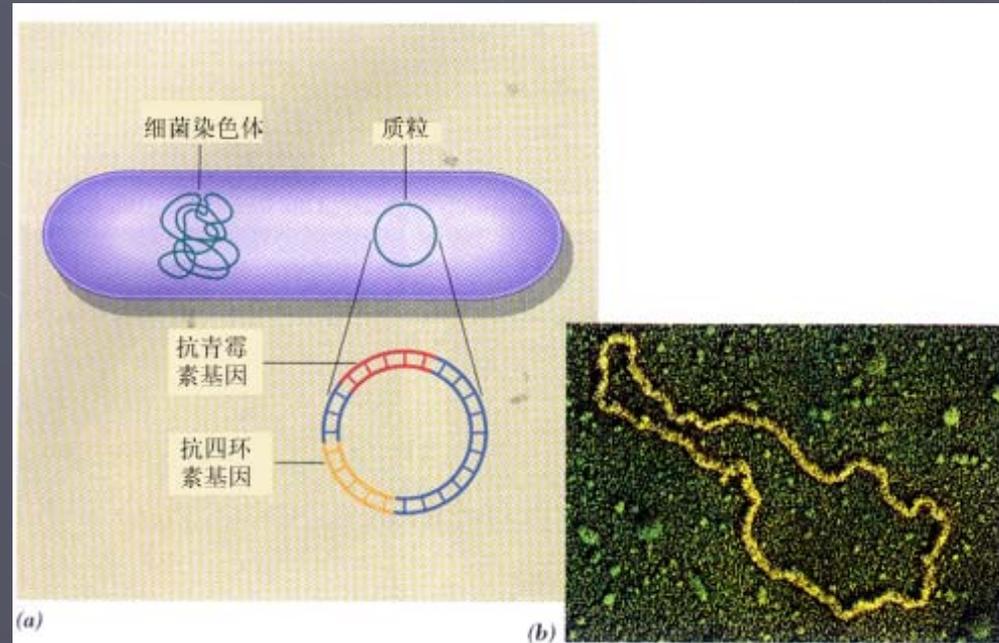
▶ 要去除的物质：

蛋白

基因组DNA

脂类及小分子杂质

RNA



DNA 是具有一定结构的物质，一些特殊的环境会导致DNA的变性，如加热、极端pH值、有机溶剂、尿素、酰胺试剂等，而适宜的环境又可以使DNA复性。

细菌裂解的方法：

碱裂解法：0.2molNaOH+1%SDS

煮沸裂解法：沸水煮沸40秒

二、碱裂解法提取质粒DNA的实验原理

碱裂解法提取质粒DNA的原理是根据共价闭环环状质粒DNA与线性染色体DNA的结构差异来实现分离的。

在pH12-12.5时，线性DNA被彻底变性，但共价闭环质粒DNA虽然H键也发生断裂，但两条互补链仍会紧密缠绕结合在一起。

当在溶液体系中加入pH4.8的KAC时，溶液恢复中性，质粒DNA迅速复性，染色体DNA则由于变性而相互混乱缠绕，不能复性，从而离心即可以把变性的染色体DNA沉淀和蛋白-SDS复合物沉淀分离出来。

三、实验仪器、材料与试剂

(一) 仪器: 恒温培养箱、恒温摇床、台式离心机、高压灭菌锅

(二) 材料: 含pMID-GSTZ质粒的大肠杆菌、LB液体培养基

(三) 试剂:

- 溶液I 基本成分: 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH8.0)

作用: 分散细胞, 螯合金属离子使金属酶失活

- 其它可能添加成分:

- 50mM Glucose, 增加溶液密度
- 溶菌酶, 降解细胞壁
- RNase A, 降解释放的RNA

溶液II 0.2M NaOH, 1%SDS

作用: 裂解细胞壁和细胞膜, 核酸和蛋白质变性。

- 溶液III 3M KAc (pH5)

作用: 性下质粒DNA复性, 变性蛋白 - SDS⁺线性DNA沉淀, K⁺可中和DNA分子所带电荷

- 平衡酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）

作用：氯仿可使蛋白质变性并有助于液相与有机相的分离。平衡酚pH7.8（酸性下DNA分配于有机相，酚的密度大），可使DNA在上清中。异戊醇有助于消除抽提过程中出现的泡沫）

注：用时取下层液，酚腐蚀性强，可引起灼伤。

- 无水乙醇：除去DNA水化层，使DNA沉淀
- TE缓冲液：溶解DNA

四、实验步骤

接种含pMID-GSTZ质粒的大肠杆菌到含有60 μ g/ml Amp抗生素的LB 液体培养基



37°C, 190rpm振荡培养过夜



取1.5菌液入1.5ml的dorf管中



6000~10000rpm、离心2min, 弃上清, 收集菌体 (重复一次)



150uL溶液I悬浮菌体 (充分振荡或吹打)



加入250uL溶液II (轻轻混匀), 冰上静置5min裂解菌体

1.集菌

2.悬浮

3.裂解

4.中和

加入200uL溶液III（**柔和混匀**），冰上静置5~15min质粒DNA复性

5.去除蛋白及染色质

12000rpm，离心10min，取上清到一新管中

6.异丙醇沉淀

加入0.6倍体积异丙醇（**充分混匀**），室温放置20min

12000rpm，离心10min，弃上清，沉淀室温干燥

7.消化RNA

加入400ul 溶液I 溶解，37℃消化30min 以上

8.去除蛋白

加等体积的酚：氯仿：异戊醇（**充分混匀**），室温放置5min

12000rpm，离心10min，取上清到一新管

9.乙醇沉淀

上清加2倍体积的无水乙醇（**充分混匀**），-20℃ 30min以上

12000rpm, 4°C 离心15min



10. 洗涤

沉淀用75%乙醇1mL洗涤1~2次 (振荡混匀、离心)



12000rpm, 4°C 离心10min



室温风干



11. 溶解

沉淀用20~100uL RTE溶解, -20°C保存

取1.5菌液离心集菌，重复一次



6000~10000rpm、离心2min，弃上清，收集菌体(重复收集一次)



150uL溶液I悬浮菌体(充分振荡)，室温(或冰浴)10min



加入250uL溶液II(轻轻混匀)，冰上静置5min裂解菌体



加入200uL溶液III(轻轻混匀)，冰上静置5~15min质粒DNA复性



12000rpm，离心10min，取上清到一新管中



加入0.6ml异丙醇(充分混匀)，室温放置20min



12000rpm，离心10min，弃上清，沉淀室温干燥



加入50uL TE溶解后，取10uL放入新管中；剩余40uL中加入460uL 溶液I混匀，37℃消化30min以上



加等体积的酚：氯仿：异戊醇(充分混匀)，室温放置5min



12000rpm 10min，取上清到一新管



上清加1/10体积溶液III和2倍体积的无水乙醇(充分混匀)，-20℃ 30min以上



12000rpm，4℃离心15min



沉淀用75%乙醇1mL洗涤1~2次(振荡混匀)



12000rpm，4℃离心10min



室温风干



沉淀用20~100uL TE溶解，-20℃保存

注意：

- 用移液器操作时，每一步都要格外小心，特别是在加入溶液II 和III后，一定不要剧烈振荡，以免切碎DNA（包括质粒DNA和基因组DNA）！！！！