

分子生物学实验设计基础

ECUST

Light harvester iGEM 2017 present

For team SUIS_Alpha_Shanghai

摘要

基因工程（genetic engineering）又称基因拼接技术和 DNA 重组技术，是以分子遗传学为理论基础，以分子生物学和微生物学的现代方法为手段，将不同来源的基因按预先设计的蓝图，在体外构建杂种 DNA 分子，然后导入活细胞，以改变生物原有的遗传特性、获得新品种、生产新产品。基因工程技术为基因的结构和功能的研究提供了有力的手段

目录

第 1 章 前言.....	4
1.1 实验目的和背景.....	4
第 2 章 实验流程和原理.....	5
2.1 实验流程.....	5
2.2 实验原理.....	5
2.2.1 外源 DNA 和载体的获取.....	6
2.2.2 外源 DNA 和载体的酶切和连接.....	6
2.2.3 感受态细胞的制备和转化.....	7
2.2.4 转化子的培养和扩增.....	7

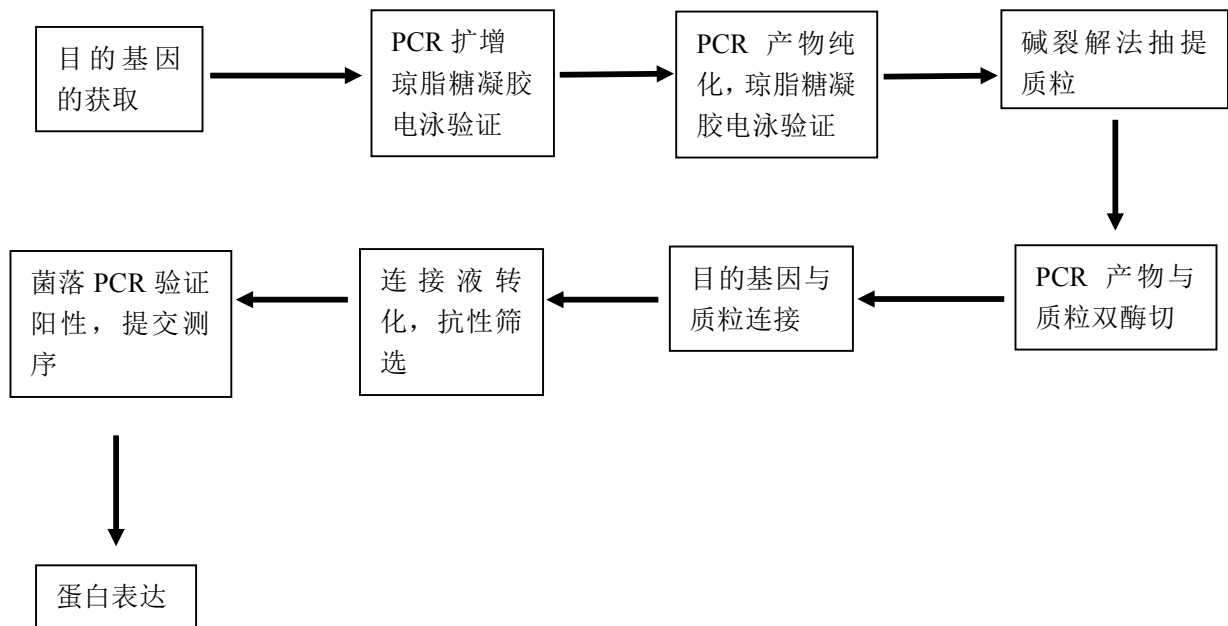
第一章 前言

1.1 实验目的和背景

基因工程是指将一种或多种生物体（供体）的基因与载体在体外进行剪切重组，然后转入另一种生物体（受体）内，使之按照人们的意愿遗传并表达出新的性状。因此，供体、受体、载体称为基因工程的三大要素，其中相对于受体而言，来自供体的基因属于外源基因重组剪接的载体也都是 DNA 分子，因此基因工程亦称为重组 DNA 技术。另外，DNA 重组分子大都需在受体细胞中复制扩增，故还可将基因工程表征为分子克隆技术。

第二章 实验流程和原理

2.1 实验流程图



2.2 实验原理

2.2.1 外源 DNA 和载体的获取

首先通过模板基因组获取目的基因，主要通过 PCR 的方法：

PCR 技术的基本原理类似于 DNA 的天然复制过程，其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。PCR 由变性--退火--延伸三个基本反应步骤构成：

①模板 DNA 的变性：模板 DNA 经加热至 93℃ 左右一定时间后，使模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离，使之成为单链，以便它与引物结合，为下轮反应作准备；

②模板 DNA 与引物的退火(复性)：模板 DNA 经加热变性成单链后，温度降至 55℃ 左右，引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合；

③引物的延伸：DNA 模板--引物结合物在 TaqDNA 聚合酶的作用下，以 dNTP 为反应原料，靶序列为模板，按碱基互补配对与半保留复制原理，合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链，重复循环变性--退火--延伸三过程就可获得更多的“半保留复制链”，而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需 2~4 分钟，2~3 小时就能将待扩目的基因扩增放大几百万倍。

其次通过碱裂解法获取质粒：

质粒是一种染色体外的稳定遗传因子，为双链、闭环的 DNA 分子，并以超螺旋状

态存在于宿主细胞中，具有自主复制和转录能力，能在子代细胞中保持恒定的拷贝数，并表达所携带的遗传信息。质粒的复制和转录依赖于宿主细胞编码的某些酶和蛋白质，其还有一些重要的性质如自主复制性、不相容性、携带遗传标记、可转移性、具有多克隆位点等。

质粒 DNA 的抽提主要有碱裂解法和沸水浴法。碱裂解法主要采用了 3 种试剂：solution I 由葡萄糖、EDTA、Tris-Cl 组成，葡萄糖的作用是增加溶液的粘度，减少抽提过程中的机械剪切作用，防止破坏质粒 DNA；EDTA 的作用是络合掉 Mg^{2+} 等二价金属离子，防止核酸酶对质粒 DNA 的降解作用；Tris-Cl 能使溶菌液维持溶菌作用的最适 PH；使用前需加 RNase I,降解细胞破碎物中 RNA。Solution II 由 SDS 和 NaOH 组成，SDS 作用是溶解细胞膜并与蛋白质结合使之变性；NaOH 可以破坏氢键，使 DNA 分子变性，染色体 DNA 被组蛋白包裹着沉淀下来，同时有降解 RNA 和破壁的作用。Solution III 由 KAc 与 HAc 组成，高盐溶液能使蛋白质盐析，其 PH5.5 能中和 solution II 的碱性并使质粒 DNA 复性， K^+ 与 SDS 形成溶解度很小的盐并与蛋白质形成沉淀而除去。溶液中的染色体 DNA 也会与蛋白质-SDS 复合物形成相互缠绕的大分子物质，很容易与小分子的质粒 DNA 分离。然后再用乙醇沉淀 DNA 并以水或 Elution buffer 溶解即可得到质粒 DNA 溶液。

DNA 凝胶电泳分析：

琼脂糖凝胶电泳是用琼脂糖作支持介质的一种电泳方法。其分析原理与其他支持物电泳最主要区别是：它兼有“分子筛”和“电泳”的双重作用。

琼脂糖凝胶具有网络结构，物质分子通过时会受到阻力，大分子物质在涌动时受到的阻力大，因此在凝胶电泳中，带电颗粒的分离不仅取决于净电荷的性质和数量，而且还取决于分子大小，这就大大提高了分辨能力。但由于其孔径相当大，对大多数蛋白质来说其分子筛效应微不足道，现广泛应用于核酸的研究中。

核酸会根据 pH 不同带有不同电荷，在电场中受力大小不同，因此跑的速度不同，根据这个原理可将其分开。电泳缓冲液的 pH 在 6~9 之间，离子强度 0.02~0.05 为最适。常用 1%的琼脂糖作为电泳支持物。琼脂糖凝胶约可区分相差 100bp 的 DNA 片段，其分辨率虽比聚丙烯酰胺凝胶低，但它制备容易，分离范围广。普通琼脂糖凝胶分离 DNA 的范围为 0.2-20kb，利用脉冲电泳，可分离高达 10^7 bp 的 DNA 片段。

DNA 分子在琼脂糖凝胶中泳动时有电荷效应和分子筛效应。DNA 分子在高于等电点的 pH 溶液中带负电荷，在电场中向正极移动。由于糖-磷酸骨架在结构上的重复性质，相同数量的双链 DNA 几乎具有等量的净电荷，因此它们能以同样的速率向正极方向移动。

2.22 外源 DNA 和载体双酶切与连接

基因工程的第一步就是将目的 DNA 片段从不同来源的 DNA 上切下，并在载体分子上打开与之相对应的缺口，然后两者能连接成重组 DNA 分子，而完成切割操作的就

是限制性核酸内切酶。

限制性内切酶一般是以微生物属名的第一个字母和种名的前两个字母组成，第四个字母表示菌株（品系）。例如，从 *Bacillus amylolique faciens* H 中提取的限制性内切酶称为 Bam H，在同一品系细菌中得到的识别不同碱基顺序的几种不同特异性的酶，可以编成不同的号，如 Hind II、Hind III，Hpa I、Hpa II，Mbo I、Mbo II 等。

根据限制酶的结构，辅因子的需求切位与作用方式，可将限制酶分为三种类型，分别是第一型（Type I）、第二型（Type II）及第三型（Type III）。II 类限制性核酸内切酶是一种分子量较小的单体蛋白，其 dsDNA 的识别和切割活性仅需要 Mg²⁺且一般识别 4-8 个碱基的回文序列，切割后产生 3 种末端：3'粘性末端、5'粘性末端或平头末端。那么若用能产生相同粘性末端的同种限制酶或同尾酶分别切割外源 DNA 和质粒分子，两者的酶切片段便可在连接酶的催化下连接。

T4DNA 连接酶是 ATP 依赖的 DNA 连接酶，催化两条 DNA 双链上相邻的 5'磷酸基和 3'羟基之间形成磷酸二酯键。可接双链 DNA 的平末端、相容粘末端及其中的单链切口，在分子生物学中有广泛的应用。

一般情况下，互补性粘性末端连接其载体 DNA 和外源 DNA 的分子数之比为 1: 3-1: 10 之间，这样可以有效防止载体片段自连接。同时，为了最大限度抑制质粒的自身环化，还可将载体 DNA 的 5'磷酸基团用碱性磷酸酯酶去掉，而带 5'磷酸的外源 DNA 片段可有效地与去磷酸化的载体相连接，产生一个带两个缺口的开环分子，在转入受体菌后该种缺口可在 DNA 复制过程中自动修复。

2.23 感受态细胞的制备与转化

受体细胞经过一些特殊方法（如：电击法，CaCl₂ 等化学试剂法）处理后，使细胞膜的通透性发生变化，成为能容许外源 DNA 分子通过的感受态细胞。进入细胞的 DNA 分子通过复制、表达实现遗传信息的转移，使受体细胞出现新的遗传性状。

大肠杆菌的转化常用化学法（CaCl₂ 法），该法最先是由 Cohen 于 1972 年发现的。其原理是细菌处于 0℃，CaCl₂ 的低渗溶液中，菌细胞膨胀成球形，转化混合物中的 DNA 形成抗 DNase 的羟基-钙磷酸复合物粘附于细胞表面，经 42℃ 短时间热冲击处理，促使细胞吸收 DNA 复合物，在丰富培养基上生长数小时后，球状细胞复原并分裂增值，被转化的细菌中，重组子中基因得到表达，在选择性培养基平板上，可选出所需的转化子。

2.24 转化子的培养与扩增

转化子在一定的选择培养基上培养扩增，随后挑取单克隆继续培养扩增，此即为转化子的培养和扩增。此步骤的主要目的包括：达到初步筛选的目的，即只有含载体的转化子能够在此选择培养基上生长；扩增到一定的菌数以满足后续的筛选和鉴定操作需要；挑取转化子的单克隆，以便重组子的鉴定和外源基因表达分析。