

分子生物学实验技术

主讲教师：徐志文

主要内容

- ◆ 一、碱裂解法制备质粒DNA
- ◆ 二、核酸杂交技术
- ◆ 三、PCR技术

实验一 碱裂解法制备质粒DNA

一、实验目的及背景

- ◆ 质粒是染色体外的DNA分子，大小可为1kb到200kb。
- ◆ 大多数来自细菌的质粒是双链、共价闭合环状的分子，以超螺旋形式存在。它是细菌内的共生型遗传因子。
- ◆ 其复制和遗传独立于细菌染色体，但复制和转录依赖于宿主编码的蛋白和酶。

质粒特点和类型

- ◆ 质粒能在细菌中垂直遗传并且赋予宿主细胞一些表型， 是比病毒更简单的原始生命。
- ◆ 质粒通过细菌的结合作用， 从雄性体转移到雌性体， 是细菌有性繁殖的性因子。
- ◆ 质粒按复制方式分为两种类型： 松弛型质粒和严紧型质粒。

质粒的应用

- ◆ 大多数基因工程使用松弛型质粒。
- ◆ 严紧型质粒用来表达一些可使宿主细胞受毒害致死的基因。
- ◆ 质粒的特点使质粒成为携带外源基因进入细菌中扩增或表达的重要媒介物，这种基因运载工具在基因工程中具有极广泛的应用价值。

二、本实验目的

- ◆ 本实验要求掌握最常用的质粒的提取方法。

分离质粒DNA方法

- ◆ 从大肠杆菌中分离质粒DNA方法众多，目前常用的
- ◆ 碱变性法；
- ◆ 煮沸法；
- ◆ SDS法；
- ◆ 羟基磷灰石层析法等
- ◆ 各方法分离是依据宿主菌株类型、质粒分子大小、碱基组成及结构等特点加以选择的，其中碱变性法既经济且收得率较高,提取的质粒DNA可用于酶切，连接与转化。

碱变性法基本原理

当菌体在NaOH和SDS溶液中裂解时，蛋白质与DNA发生变性，当加入中和液后，质粒DNA分子能够迅速复性，呈溶解状态，离心时留在上清中；蛋白质与染色体DNA不复性而呈絮状，离心时可沉淀下来。

三、实验方法

- ◆ L B培养基:

胰化蛋白胨 10g

酵母提取物 5g 定容 1000ml pH 7.5

NaCl 10g

- ◆ S T E:

0.1M NaCl

10mM Tris HCl(pH8.0)

1mM EDTA

- ◆ A m P 50mg/ml

- ◆ 溶菌酶 10mg/ml (用10mM Tris-HCl pH8.0新鲜配制)

三、实验方法

- ◆ 溶液 I :

50mM 葡萄糖

25mM Tris-HCl (pH8.0)

10mM EDTA

- ◆ 溶液 II: (新鲜配制)

0.2N NaOH

1% SDS

◆ 溶液III:

5M KAC 10ml

冰醋酸 11.5ml

水 28.5ml

◆ 酚, 氯仿, 乙醇

RNase 琼脂糖

◆ T E: 10mM

Tris-HCl(pH8.0)

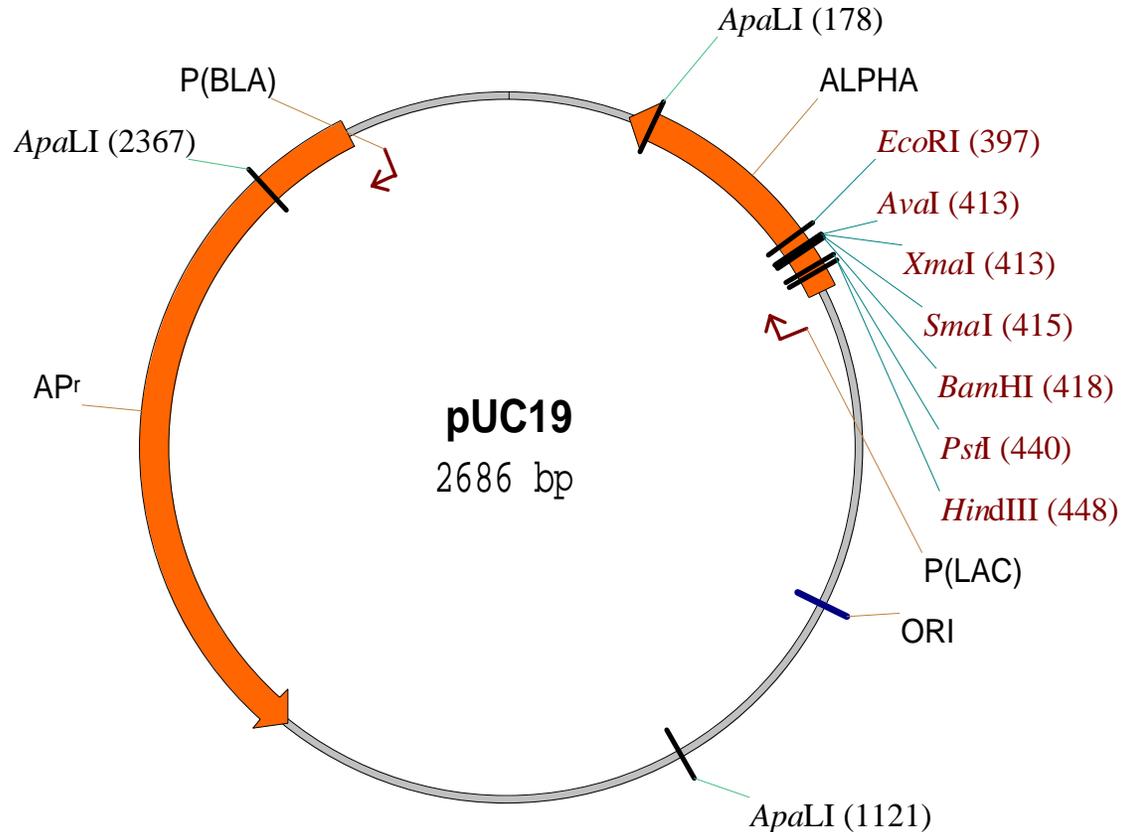
1mM EDTA

pUC18/19

■ 链长2,686 bp

pUC18/19是适合于双脱氧法DNA测序的载体，在*lacZ*领域中含有多克隆位点，因此在含有IPTG, X-Gal的平板培养基上，很容易判断有无外源基因的插入。此外，也可以利用*lac promoter*表达外源基因。进行DNA测序时，可以很方便地使用M13系列Primers。

- ◆ 多克隆位点: *EcoR* I, *Sac* I, *Kpn* I, *Sma* I, *Bam*HI, *Xba* I, *Sal* I, *Pst* I, *Sph* I 和 *Hind* III 只有一个酶切位点。
- ◆ **■ 用途**
- ◆ 克隆外源基因。
- ◆ 利用*lac promoter*进行基因表达。
- ◆ 使用M13 primers进行DNA测序。
- ◆ pUC18/pUC19 cloning site图
- ◆



三、实验方法

质粒DNA的提取

接含PUC18 (或pET21a) 质粒的单菌落于3ml LB Amp⁺液体培养基中



37°C, 190rpm振荡培养过夜



6000rpm、离心2min, 收集菌体



100uL溶液I悬浮菌体 (充分振荡), 室温10min



加入200uL溶液II (振荡混匀), 冰上静置5min裂解菌体



加入150uL溶液III (振荡混匀), 冰上静置
15min质粒DNA复性



12000rpm, 离心15min



上清加等体积的酚: 氯仿: 异戊醇 (振荡混匀)



12000rpm, 离心15min



上清加等体积的氯仿: 异戊醇 (振荡混匀)



12000rpm, 离心15min



上清加2倍体积的无水乙醇 (充分混匀), -20°C
30min



12000rpm, 离心15min



沉淀用75%乙醇1mL洗涤两次（振荡混匀、
离心）



12000rpm, 离心10min



沉淀超净台中风干



沉淀用20uL TE溶解, -20°C保存

四、结果分析

- ◆ 1. 质粒DNA OD₂₆₀, OD₂₈₀的值, 由此计算质粒DNA得率和DNA纯度。按 $1A_{260}=50\mu\text{g}$ 质粒DNA/ml确定量。
- ◆ 2. 电泳检测鉴定。

电泳原理：溴化乙锭是一种荧光染料
(3, 8-二氨基-5-乙基-6苯基菲啶溴盐)，
其分子可以嵌入到核酸的碱基对之间，在
紫外线的激发下，发出橙色荧光。

质粒DNA的电泳鉴定

1%琼脂糖凝胶 20mL (用buffer配)

0.5xTBE 100mL

2uL质粒DNA + 1uL 10xloading + 1uL

SYBR + 3 uL无菌水

80伏恒压电泳

结果用凝胶成像仪分析照相

注意

- ◆ EB是诱变剂，配制和使用EB染色液时，应带乳胶手套或一次性手套，并且不要将该染色液洒在桌面或地面上，凡是沾污EB的器皿或物品，必须进行清洗或弃去。

实验二 核酸分子杂交技术

- ◆ 一、原理

- ◆ 依据**DNA**双链碱基互补、变性和复性原理，用已知碱基序列的单链核苷酸片段为探针检测样本中是否存在与其互补的同源核酸序列的方法。

二、探针的特征

- ◆ **1、概念：Probe**是核酸分子杂交的技术基础，它是一段与被检测的核苷酸序列（靶基因序列）互补的带标记的核苷酸片段。
- ◆ **2、特征（条件）：**
 - ◆ **（1）**要加以标记、带有示踪物，便于杂交后检测，鉴定杂交分子。
 - ◆ **（2）**单链
 - ◆ **（3）**高度特异性
 - ◆ **（4）**长度十多个碱基到几千个碱基。小杂交反应快、特异性强，但灵敏度低。
 - ◆ **（5）**应为基因编码序列
 - ◆ **（6）**高灵敏度、稳定，标记简便、安全。

(二) 探针的种类

- ◆ **1、基因组DNA**

可以是基因的全序列，也可是部分。

- ◆ **2、cDNA探针**

不存在内含子和重复序列。

- ◆ **3、寡聚核苷酸探针**

人工合成，长度**20-50**个碱基，灵敏度差。

- ◆ **4、RNA探针**

杂交时不存在竞争，杂交效率高，特异性强（不含重复序列），本底低。

二、标记物

◆ 1、标记物的特征：

(1) 高度灵敏性

(2) 标记物与核酸探针分子的结合，不影响其碱基配对的特异性

(3) 不影响探针分子的主要理化特性（如：杂交体的解链温度）

(4) 不影响酶促标记用酶的活性。

(5) 检测方法要求：高灵敏度、高特异性

(6) 化学稳定性。要求保存时间长、对环境无污染，安全，价格低。

二、标记物

◆ 2、标记物的种类

(1) 放射性核素标记物

^{32}P 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{131}I

(2) 非放射性标记物

生物素、地高辛、荧光素、酶（辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等）。

光敏生物素：通过一个连接臂一端连接生物素一端连接光敏基团。

三、探针标记方法

- ◆ 根据标记方法的基本原理，可将其分为两大类型。

- ◆ 1、酶促标记法

将标记物预先标记在核苷酸分子上，利用酶促聚合反应将其引入到待标记的核酸中，或将核苷酸分子上的标记基团交换到核酸分子上。

优点：对DNA的修饰更好、敏感性高。

缺点：操作较复杂、产量低、成本高。

三、探针标记方法

◆ 2、化学法

利用标记分子上的化学活性基团与待标记核酸分子上的基团发生化学反应，将标记物直接结合到核酸分子上。

优点： 标记简便、快速、标记均匀。

缺点： 敏感性相对较低。

四、核酸分子杂交方法

- ◆ 根据反应环境条件可以分为液相杂交和固相杂交

- ◆ 1、液相杂交

将待检测的杂交样本与核酸探针同时溶于杂交液中进行反应，然后分离杂交体和未参加反应游离的核酸探针，分析结果。

优点：反应快。

缺点：不易分离杂交体和未参加反应游离的核酸探针，不适合常规应用。

四、核酸分子杂交方法

◆ 2、固相杂交

- ◆ 把欲检测核酸样本先结合到某种固相载体上，再与溶解于液体的核酸探针进行杂交反应，漂洗去除未参与反应游离的核酸探针，经检测显示杂交信号，分析杂交结果。
- ◆ 常用固相载体：硝酸纤维素膜、尼龙膜。

固相杂交杂交的基本程序

- ◆ 1、待检测核酸的制备
- ◆ 2、探针制备及标记
- ◆ 3、固相载体的处理
- ◆ 4、预杂交、杂交、漂洗
- ◆ 5、检测显示杂交信号
- ◆ 6、结果的判断及分析

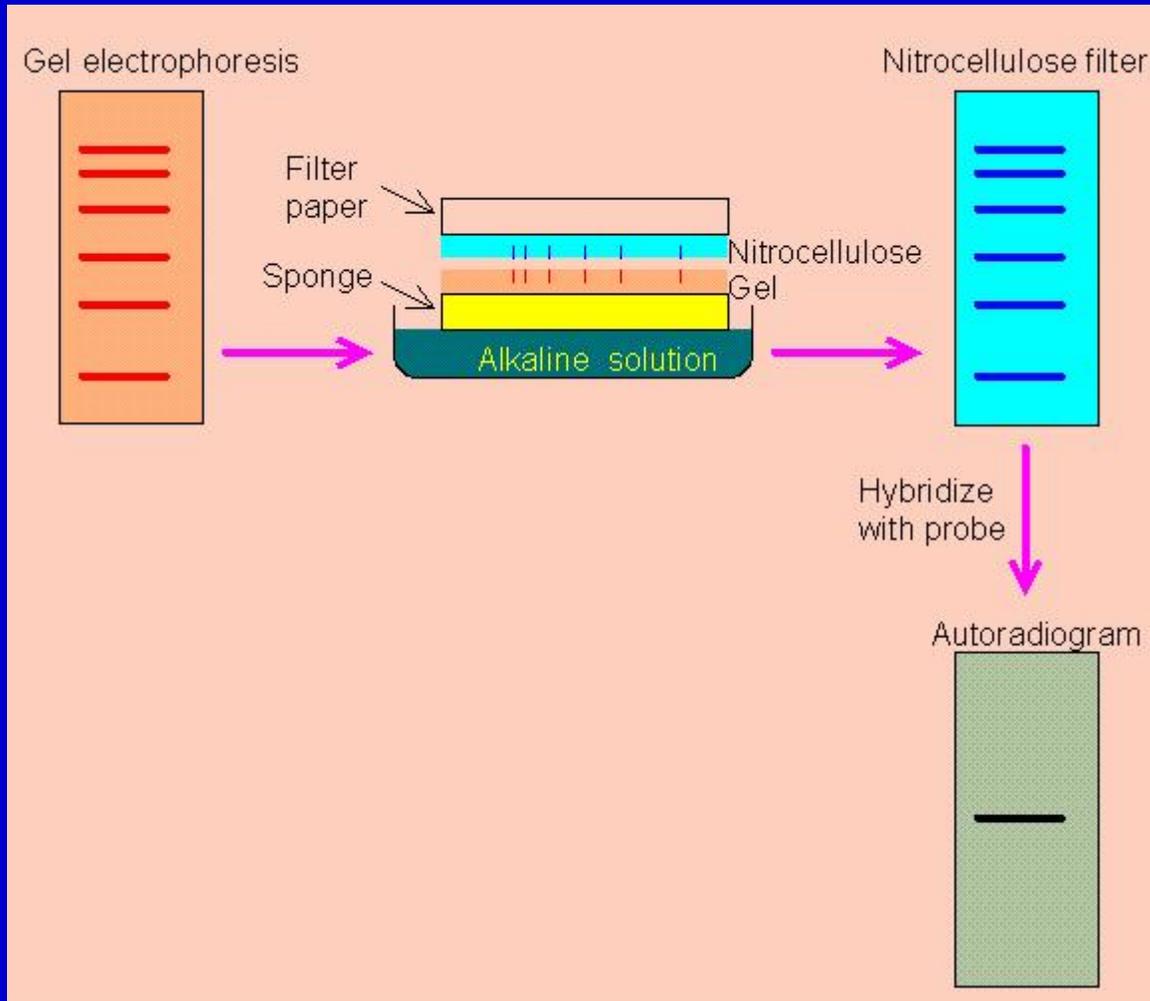
固相杂交杂交的基本程序

- ◆ **预杂交**: 用非特异性**DNA**分子（如：鲑鱼精**DNA**、小牛胸腺**DNA**）及其它高分子化合物（如：**Denhardt**液）将滤膜上非**DNA**结合位点封闭，减少膜对探针的非特异性吸附。
- ◆ **杂交**: 探针与被检测核酸结合，随后采用不同漂洗条件，洗去未参与杂交的游离探针。

几种常见的固相核酸杂交

- ◆ 1、Southern印迹
- ◆ 2、Northern印迹
- ◆ 3、斑点杂交
- ◆ 4、菌落杂交

Southern Blotting



实验三 聚合酶链反应技术 (PCR)

- ◆ **概念:** PCR技术是一种在体外利用引物介导DNA序列酶促合成反应，又称基因扩子增技术。
- ◆ **特点:** 特异性强、灵敏度高、操作简便、省时、对待检原始材料质量要求低等特点。

PCR反应的原理

- ◆ 原理：
- ◆ 类似于体内DNA的复制过程。主要利用DNA聚合酶依赖于DNA模板的特性，模仿体内的复制过程，在附加的一对引物之间诱发聚合反应。
- ◆ 主要步骤：
- ◆ DNA模板变性——模板与引物结合——引物延伸。

PCR 仪



PCR 扩增、保温实验等

PCR的主要步骤:

- ◆ **1、DNA变性:** 将待扩增DNA于高温下变性, 双链解开变成单链成为模板。
- ◆ **2、模板与引物的结合:** 降温退火的过程中, 引物分别同被扩增的特异性靶序列DNA片段两侧对应两条链互补结合配对。
- ◆ **3、引物延伸:** 在DNA聚合酶的最适作用温度下, 以dNTP为底物, 沿引物5-3方向合成新股DNA。
- ◆ 以上三个步骤称为一个周期或一个循环。

引物设计一般原则

- ◆ 1、引物长度
 - ◆ **15-30bp**，有效长度不能大于**38**，否则最适延伸温度会超过**TaqDNA**聚合酶的最适（**74度**），不能保证产物特异性。
- ◆ 2、**G+C**含量
 - ◆ **40-60%**，保证**T_m**值为**55-80度**。
- ◆ 3、碱基分布的随机性
 - ◆ 不要有数个嘌呤或嘧啶的连续排列。尽量避免**4**个以上的单一碱基，尤其**3'**端不应超过**3**个连续**G**或**C**，否则会使引物在**G+C**富集区错误引发。

引物设计一般原则

- ◆ 4、引物自身
 - ◆ 不能自身折叠形成发夹结构（即不应存在互补序列，连续互补碱基不能多于**3bp**）
- ◆ 5、引物之间
 - ◆ 避免引物二聚体形成。之间不能有多于**4**个的互补或同源序列，尤其是**3'**端的互补。
- ◆ 6、引物**3'**端
 - ◆ 无修饰、不形成二级结构、不错配、不含**T**尤其**2**个以上连续**T**，不存在与密码子**3**位。

引物设计一般原则

- ◆ 7、引物5'端
 - ◆ 影响产物长度，不影响其特异性。可被修饰：酶切位点、标记、突变等。
- ◆ 8、引物的特异性
 - ◆ 引物与非特异性扩增序列的同源性不大于**90%**或存在**8**个以上互补碱基。

四、耐热DNA聚合酶

- ◆ 耐热的DNA聚合酶是影响PCR反应的最关键因素之一。

- ◆ 种类：

- 1、Taq DNA聚合酶 应用最广。

来源：嗜热水生生物。

最适温度：70-75度

- 2、VENT DNA聚合酶

来源：嗜热球菌。

优点：可耐受100度高温，具有3-5'外切活性。

- 3、Tth DNA聚合酶

来源：嗜热菌，具有逆转录功能。

五、PCR条件的优化

- ◆ 1、模板

- ◆ 2、引物：最终浓度：**0.2-1.0 μ mol/L。**

- ◆ 3、缓冲液

作用维持偏碱环境。**Mg⁺⁺浓度：1.5-2.0mmol/L**，
过高引入非特异性，过低影响产量。

- ◆ 4、dNTP浓度

50-200 μ mol/L，不能低于**10-15 μ mol/L**。

过高引入非特异性，过低影响产量

- ◆ 5、Taq DNA酶用量

100 μ l体系中加入**0.5-5U**，通常加入**2.5U**。

PCR条件的优化

- ◆ 6、循环参数

97度7-10分钟，使模板充分变性。

93-94度变性30s。

- ◆ 7、退火温度

低于引物 T_m 值**5度**，较高退火温度可以提高特异性。

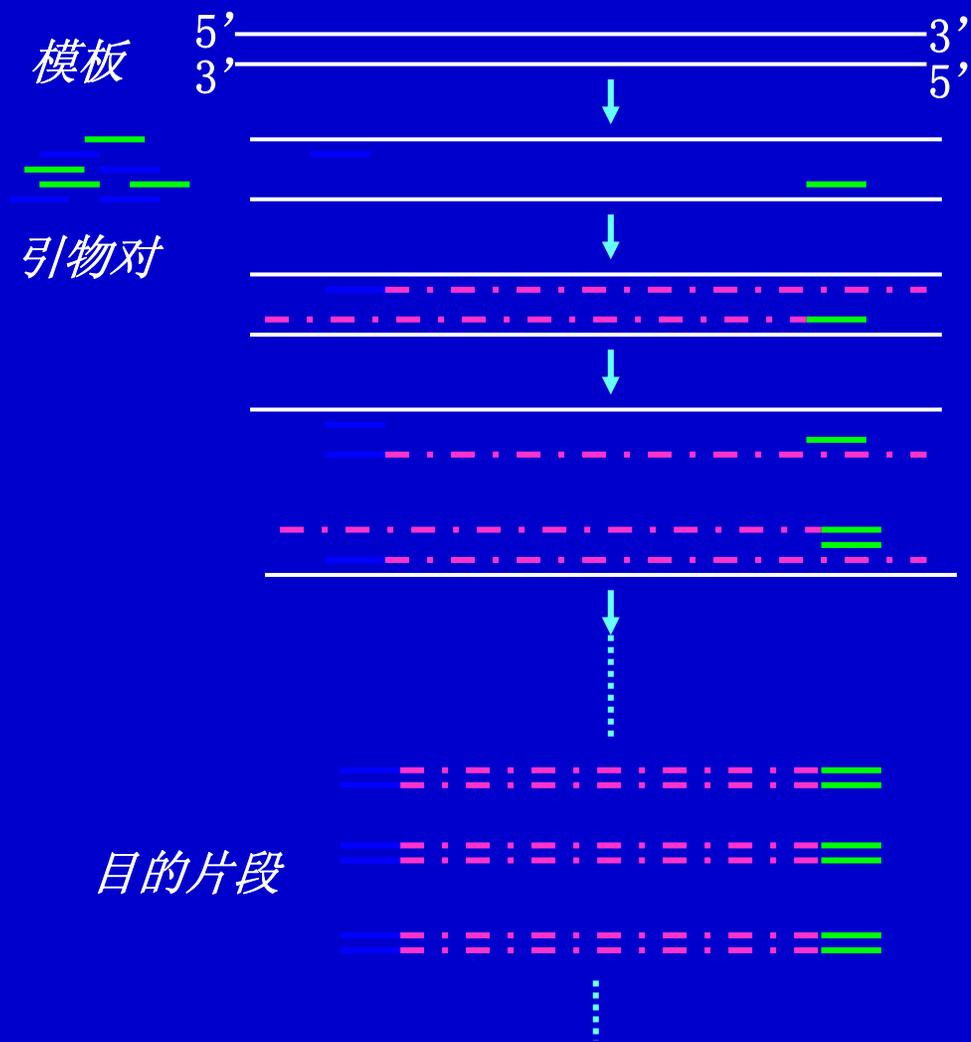
时间：**30s。**

- ◆ 8、延伸温度

70-75度

时间：**30s**

- ◆ 9、循环次数 **20-25次。**



高温变性
↓
低温退火
↓
中温延伸
↓
不断循环

聚合酶链式反应示意图

反应体系

- ◆ 模板：DNA或RNA
- ◆ 引物：sense 和 antisense
- ◆ Taq酶：耐热DNA聚合酶
- ◆ dNTP Mixture 底物
- ◆ PCR buffer: 10mmol/L Tris-HCl pH8.4 (20°C)
50mmol/L KCl
Mg²⁺
0.1mg/mL乙酰BSA

PCR引物设计

AKP

CDS

554.....2038

引物1 5'GTCG**CGGATCC**ATGTCACGGCCGAGAC 3' BamH1

CDS 5'AGCTGTCATAAAG**ATG**TTCACGGCCGAGACTTATAGTCGCT...

.....
.....
.....
.....

CDSCATGAAAGCCGCTCTGGGGCTGAAAT**AAA**ACCGCGCCCGG3'

引物2 HindIII 3'GAGACCCCGACTTT**ATTTCGA**ACAGCG 5'



PCR扩增产物的分析

琼脂糖凝胶电泳分析

PCR扩增产物的回收

- ◆ 回收的方法很多，主要目的是去除Taq酶等，取出目的DNA片段进行后续操作
- ◆ 低熔点琼脂糖法
- ◆ 离心柱过滤
- ◆ 离心柱吸附
- ◆ 玻璃奶吸附

PCR的应用

- ◆ 目的基因的获得
- ◆ 基因组克隆
- ◆ DNA序列分析
- ◆ RNA分析
- ◆ 基因突变
- ◆ 基因组的比较研究
- ◆ 医学疾病诊断等

实验流程

PCR扩增

2.5mmol/L dNTP Mixture	2.0uL
10xbuffer Mg ²⁺ Free	2.5uL
Ex-Taq E	1uL (1U)
10pmol/uL sense	1uL
10pmol/uL antisense	1uL
模板DNA	1uL
MgCl ₂ (25mmol/L)	1uL
ddH ₂ O	16.5uL
94°C, 2' → 94°C, 1' → 42°C, 1' → 72°C, 2'	
→ 72°C, 10'	

|-----30 cycles-----|

PCR产物的电泳

- ◆ 1xTAE 150mL
- ◆ 0.8%琼脂糖凝胶 20mL (用1xTAE配)
- ◆ 25uL PCR产物 + 3uL 10xloading (含SYBR荧光染料)
- ◆ 80伏恒压电泳

常用PCR技术

- ◆ 1、通用引物PCR
- ◆ 2、多重PCR
- ◆ 3、套式PCR
- ◆ 4、其它