

第7部分

基因工程实验

目的：通过基因工程实验部分的操作，使学生进一步了解基因工程的基本过程，进一步掌握从基因克隆到原核转化、重组子鉴定及纯化，重组蛋白表达的基本操作和实验方法。提高学生前期分子生物学及基因工程实验技能的综合运用能力。训练学生查阅资料，设计实验等科研能力，以及对分子生物学试剂药品的熟悉和选择应用能力。使学生掌握第二种分子杂交技术 -Western Blotting 技术。培养学生理论（分子生物学及基因工程理论）联系实验的能力。

实验 I 重组质粒 pcDNA3.0-ARRB 的提取, 质量检测及酶切分析

【实验目的】

1. 了解掌握细菌质粒 DNA 的分离制备方法。
2. 掌握质粒质控的检测方法和原理。
3. 了解质粒酶切原理, 掌握酶切分析方法。

【实验原理】

本实验采用的方法本质就是碱裂解法提取质粒。碱裂解法是一种应用最为广泛的制备质粒 DNA 的方法, 碱变性抽提质粒 DNA 是基于染色体 DNA 与质粒 DNA 的变性与复性的差异而达到分离目的。在 pH 值高达 12.6 的碱性条件下, 染色体 DNA 的氢键断裂、双螺旋结构解开而变性。质粒 DNA 的大部分氢键也断裂, 但超螺旋共价闭合环状的两条互补链不会完全分离, 当以 pH4.8 的 NaAc/KAc 高盐缓冲液去调节其 pH 值至中性时, 变性的质粒 DNA 又恢复原来的构型, 保存在溶液中, 但染色体 DNA 不能复性而形成缠连的网状结构, 通过离心, 染色体 DNA 与不稳定的大分子 RNA、蛋白质 -SDS 复合物等一起沉淀下来而被除去。

A_{260}/A_{280} 比值可进行核酸样品纯度评估: 纯 DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值为 1.8, 纯 RNA 为 2.0。如果比值低, 表示受到蛋白 (芳香族) 或酚类物质的污染, 需要纯化样品。

A_{230nm} 是碳水化合物最高吸收峰的吸收波长, 比值可进行核酸样品纯度评估。纯 DNA 和 RNA 的 A_{260}/A_{230} 比值为 2.5。高于 2.0 表示比较纯, 若比值小于 2.0 表明样品被糖类 (碳水化合物)、盐类或有机溶剂污染, 需要纯化样品。 A_{230} 产生负值主要是由于在很低 DNA 浓度的溶液中, 一些其他成分的干扰所致。

A_{320} 可用于检测溶液样品的浊度和其他干扰因子。该值应该接近 0.0。如果不是, 表明溶液中有悬浮物, 需要纯化样品。纯样品的 A_{320} 一般是 0。



限制性内切酶能特异地结合于一段被称为限制性酶识别序列的 DNA 序列之内或其附近的特异位点上,并切割双链 DNA。

【特别提示】

提前一天准备重组菌液 200ml, 4℃ 冰箱保存备用。

教师演示及逐个监督学生使用移液器进行大体积的移液操作和小体积的 Loading buffer 的混匀操作。

【实验步骤】

1.1 质粒提取

使用高纯度质粒小提试剂盒 (DP104)。

注意事项: 请务必在使用本试剂盒之前阅读注意事项,下同。

1. 溶液 P1 在使用前先加入 RNaseA (将试剂盒中提供的 RNaseA 全部加入),混匀,置于 2~8℃ 环境保存。

2. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在漂洗液 PW 中加入无水乙醇。

3. 使用前先检查平衡液 BL、溶液 P2 和 P3 是否出现浑浊,如有浑浊现象,可在 37℃ 水浴中加热几分钟,即可恢复澄清。

4. 注意不要直接接触溶液 P2 和 P3,使用后应立即盖紧盖子。

5. 所有离心步骤均使用台式离心机室温下进行离心,速度为 8000r/min ($\sim 13\,400\times g$)。

6. 提取的质粒量与细菌培养浓度、质粒拷贝数等因素有关。

7. 实验前使用平衡液处理吸附柱,可以最大限度激活硅基质膜,提高质粒得率。

8. 用平衡液处理过的柱子最好当天使用,放置时间过长会影响效果。

操作步骤:

1. 吸附柱平衡步骤:向吸附柱 CP3 中(吸附柱放入收集管中)加入 500 μ l 的平衡液 BL, 8000r/min 离心 1 分钟,倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中(请使用当天处理过的柱子)。

2. 取 1~5ml 过夜培养的菌液加入离心管中, 8000r/min 离心 1 分钟,尽量吸除上清(菌液较多时可以通过几次离心将菌体沉淀收集到一个离心管中)。

3. 向留有菌体沉淀的离心管中加入 250 μ l 溶液 P1 (请先检查是否已加入 RNaseA),使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌细



胞沉淀。

注意: 如果有未彻底混匀的菌块, 会影响裂解, 导致提取量和纯度偏低。

4. 向离心管中加入 250 μ l 溶液 P2, 上下翻转 6~8 次使菌体充分裂解。观察是否混匀, 慢慢变透明, 如果很浑浊, 可以放置一会儿, 观察变清亮为止, 整个过程控制在 5 分钟内。

注意: 混合不要过于剧烈振荡, 以免污染基因组 DNA。此时菌液应变得清亮黏稠, 所用时间不应超过 5 分钟, 以免质粒受到破坏。

5. 向离心管中加入 350 μ l 溶液 P3, 立即上下翻转 6~8 次, 充分混匀, 此时会出现白色絮状沉淀。8000r/min 离心 10 分钟, 用移液器小心地将上清转移到过滤柱 CS (过滤柱放入收集管中), 注意尽量不要吸出沉淀。

注意: P3 加入后应立即混合, 避免产生局部沉淀。如果上清中还有微小白色沉淀, 可再次离心后取上清。

6. 8000r/min 离心 2 分钟, 小心地将离心后收集管中得到的溶液转移到吸附柱 CP3 中 (吸附柱放入收集管中)。(如果过滤柱中有残余的液体, 说明步骤 4 吸取的上清中杂质过多, 可以延长离心的时间; 如果离心后收集管底部有少量沉淀, 尽量地吸取上清)

7. 8000r/min 离心 30~60 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CP3 放入收集管中。

8. 向吸附柱 CP3 中加入 500 μ l 去蛋白液 PD, 8000r/min 离心 30~60 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CP3 放入收集管中。

9. 向吸附柱 CP3 中加入 600 μ l 漂洗液 PW (请先检查是否已加入无水乙醇), 8000r/min 离心 30~60 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CP3 放入收集管中。

10. 向吸附柱 CP3 中加入 600 μ l 漂洗液 PW, 8000r/min 离心 30~60 秒, 倒掉收集管中的废液。

注意: 加入漂洗液 PW 后, 可室温静置 2~5 分钟, 有助于更好地去除杂质。

11. 将吸附柱 CP3 放入收集管中, 8000r/min 离心 2 分钟, 目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除。

注意: 漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应 (酶切、PCR 等) 实验。为确保下游实验不受残留乙醇的影响, 建议将吸附柱 CP3 开盖, 室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的



漂洗液。

12. 将吸附柱 CP3 置于一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 50 μ l 洗脱缓冲液 TB，室温放置 2 分钟，8000r/min 离心 2 分钟，将质粒溶液收集到离心管中。

注意：为了增加质粒的回收效率，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，重复步骤 12。洗脱液的 pH 对于洗脱效率有很大影响。本次实验采用洗脱缓冲液洗脱，若用水做洗脱液，应保证其 pH 在 7.0~8.5 范围内（可以用 NaOH 将水的 pH 调到此范围），pH 低于 7.0 会降低洗脱效率。洗脱缓冲液体积不应少于 50 μ l，体积过小影响回收效率。且 DNA 产物应保存在 -20℃，以防 DNA 降解。

1.2 质粒质量检测

主要进行质粒 DNA 浓度及纯度检测。得到的质粒 DNA 用紫外分光光度计（Nanodrop，微量）检测浓度与纯度。主要测定 DNA 的浓度（ng/ μ l）以及观察 4 个指标， OD_{230} 、 OD_{260} 、 OD_{280} 和 OD_{320} ，纯化的质粒 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 通常在 1.8 左右， OD_{260}/OD_{230} 通常应该在 2.0 以上。可直接应用于细胞转染甚至动物体内实验等对 DNA 纯度要求很高的实验中。浓度测定时，质粒按照双链 DNA 来换算，即按照 OD_{260} 值为 1 相当于大约 50 μ g/ml 双链 DNA。借此来换算我们提取的质粒浓度，实验所用的仪器会直接给出本次测定的浓度。

操作步骤：

1. 仪器开机：取合适的 adaptor 并安装好后，打开 Nanodrop 电源，选择测定参数为 dsDNA，这个步骤由实验室指导教师协助完成。

2. 仪器探头清洗：取 2 μ l 水滴加至 Nanodrop 的探头上，用吸水纸轻柔擦洗，勿留灰尘和液滴，同时用纸擦净探头盖子。

3. 仪器平衡置零：取 2 μ l 洗脱缓冲液加入到 Nanodrop 的探头上，盖上盖子（注意盖子的方向性），按下 blank 键进行置零平衡。

4. 擦净探头和盖子后，取 2 μ l 质粒溶液加入到 Nanodrop 的探头上，盖上盖子（注意盖子的方向性），按下 sample 键进行样品的测定，记录测定结果，包括浓度、 OD_{230} 、 OD_{260} 、 OD_{280} 、 OD_{320} 、 OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230} 等参数，可以手机拍照记录结果（图 1）。



图1 Nanodrop 对质粒进行含量分析和测定质粒在不同波长下的吸光度

1.3 质粒酶切

酶切实验主要用来鉴定我们提取的质粒的正确性, 因为是一个重组质粒, 里面包含有我们克隆进去的基因, 而重组克隆时使用的酶切位点是已知的, 故这里需要用原来做重组克隆时的限制酶来酶切我们提取的重组质粒, 以期能够切出预期大小的重组克隆片段。本实验按照表1进行4组酶切组合, 注意双酶切为实验组(该组的酶切产物一半用于本次实验电泳检测, 另一半用于下次实验切胶回收, 故做两份的量 60 μ l), 其他均为对照组(做一份 30 μ l 即可)。

表1 酶切反应体系

试剂名称	双酶切组	单酶切组 1	单酶切组 2	不酶切组
灭菌水	x* μ l	x** μ l	x*** μ l	x**** μ l
10 $\times$ buffer M	6 μ l	3 μ l	3 μ l	3 μ l
内切酶 <i>Xho</i> I	2 μ l	1 μ l	0 μ l	0 μ l
内切酶 <i>Hind</i> III	2 μ l	0 μ l	1 μ l	0 μ l
质粒(需换算成体积)	2 μ g	1 μ g	1 μ g	1 μ g
总计	60 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l

● x* 的计算方法: 首先计算 2 μ g 质粒的体积 y* ($y^* = 2\mu\text{g} / \text{浓度}$, 浓度的单位换算成 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); 然后 $x^* = \text{总体积} (60\mu\text{l}) - 6 - 2 - y^*$ 。x** = 总体积 (30 μ l) - 3 - 1 - 1 - y**; x***; 和 x**** 计算方法以此类推。

● 用 100 μ l 的枪轻柔来回吸吹 3 次混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅或者空气培养箱中, 酶切反应 1~2 小时。

1.4 琼脂糖凝胶电泳检测

1. 配制 1% 琼脂糖凝胶。安装好制胶槽和梳子, 按照 100ml

的 $1\times$ 的 TAE 中加入 1g 琼脂糖粉末，轻柔摇匀后用微波炉加热使琼脂糖熔化，取出后摇匀，稍微放置使温度降低不要太烫，然后倒入准备好的制胶槽，观察梳子被淹没 3mm 以上即可。

注意：本实验所有琼脂糖凝胶电泳过程中不加 EB！会在电泳完成后用含有 EB 的水进行染色。

2. 向酶切产物中直接加入 DNA 电泳 loading buffer 混匀。

注意：加多少 loading buffer？具体体积需参照 loading buffer 的浓度，例如，如果是 $10\times$ 的 buffer， $30\mu\text{l}$ 的酶切产物，则加入 $30/9=3.5\mu\text{l}$ buffer。

注意：如何做到既要混匀又不能起气泡？用枪轻柔地吹吸 3 次，吹吸过程中始终要慢吹慢吸，保证枪头中始终有少量液体，这样可以保证既能混匀又不起气泡。

3. 待凝胶完全凝固后，向正上方小心拔掉梳子，将凝胶放入电泳槽，倒入电泳液（TAE）至能够完全淹没胶块。并观察点样孔被电泳液充满，不留任何气泡。

4. 点样，按照图 2 进行点样，点样时先挤出少量样品观察样品是否留在点样孔中，如果发现样品下沉后迅速消失掉，说明点样孔破裂，需重新制备胶块，或者挑选没有破裂的点样孔点样。

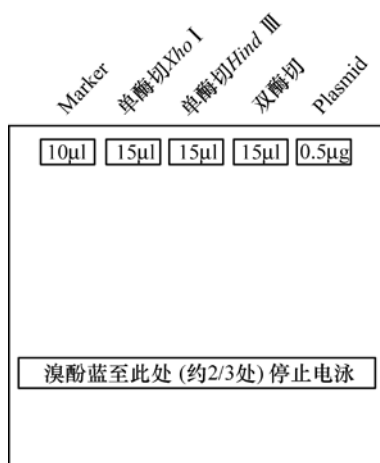


图 2 电泳点样顺序示意图

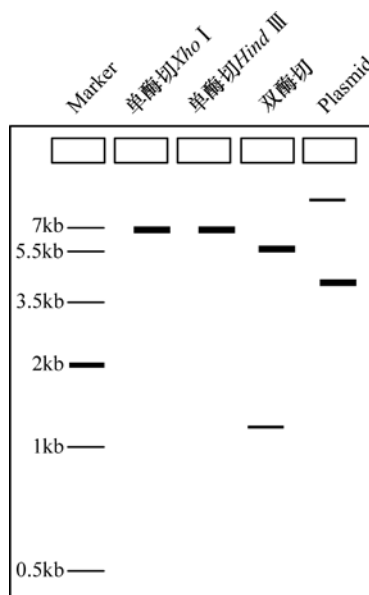


图 3 电泳标准结果示意图



注意：如何检验点样孔是否破裂？点样前，可以向点样孔中点入少量的 $1\times$ 的 loading buffer，稍等片刻，观察 loading buffer 如果一直留在点样孔中，说明点样孔完好，如果点入的 buffer 迅速消失不见，则说明点样孔破裂。一般来说，点样孔破裂极少发生，主要在配置低浓度胶 ($<0.6\%$) 时，或者凝胶没有完全凝固就拔掉梳子的情况下会发生。

5. 电泳，120V 恒压，观察指示染料溴酚蓝电泳至整个胶块的 $2/3$ 处停止电泳。

6. 染色：电泳完成后，将凝胶放入含有 EB 的水溶液中浸泡 5 分钟，然后用水漂洗 2 分钟，重复漂洗一次。

7. 拍照：通过凝胶成像仪来检测电泳结果，预期的结果：双酶切预期会切出两条带，分别是 5.4kb 和 1.3kb；单酶切只有一条单一的条带 6.7kb；未酶切的有一条暗的大带（开环状态的质粒）和一条稍小的亮带（超螺旋状态的质粒），拍照记录实验结果。预期的模拟实验结果如图 3 所示。实验结果出来后需要在原始图片的基础上进行适当的标注，部分真实实验结果如图 4 所示。

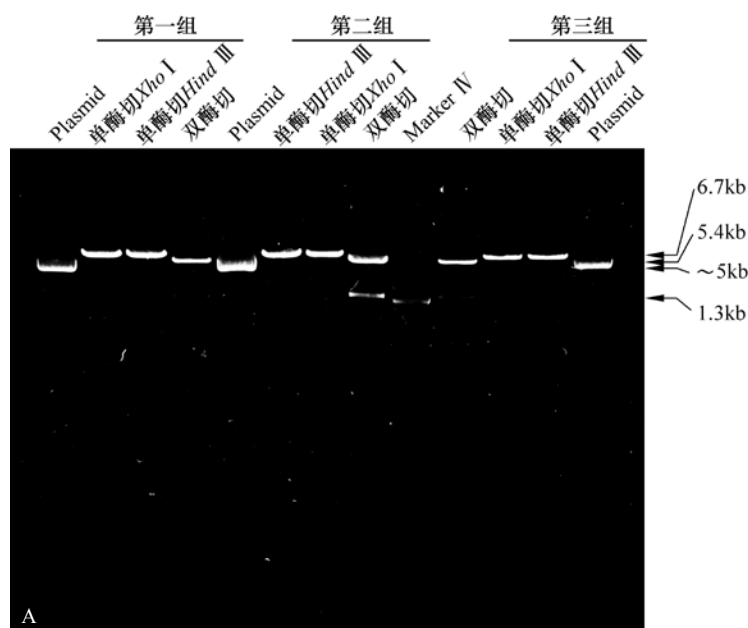


图4 A、B、C 组电泳实验结果

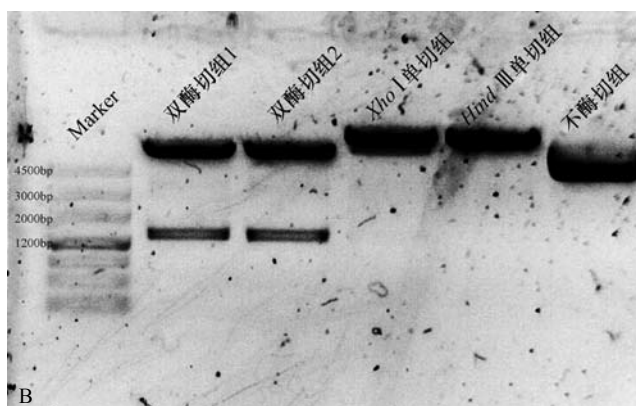


图 4 (续)