

分子生物学实验



分子生物学实验教学组

复旦大学药学院

2022年11月29日



实验概述：重组DNA的原理与操作

一、总论

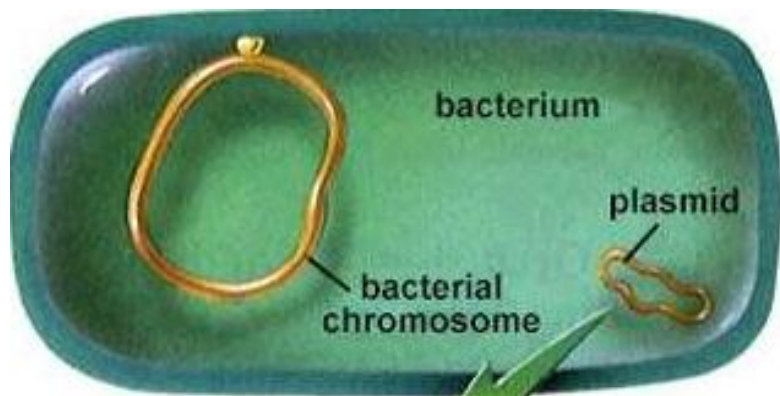
- 研究对象：DNA，RNA，基因，基因组
- 方法：利用分子生物学实验手段，在体外将不同生物基因经人工剪切、组合并与载体（质粒，噬菌体，病毒）DNA连接。引入宿主细胞内扩增或表达，合成相关DNA、RNA或蛋白质。

二、实验内容

- 实验一 总论；载体与目的基因的获取
- 实验二 载体与目的基因连接与转化
- 实验三 质粒的小提、PCR与酶切鉴定



质粒



定义：质粒多存在于**细菌**、放线菌、真菌以及一些动植物细胞（真核细胞）中，是细胞染色体外能够自主复制的很小的环状DNA分子。天然质粒的DNA长度从数千碱基对至数十万碱基对。在宿主细胞内可独立自主复制并赋予宿主细胞一定的遗传性状。

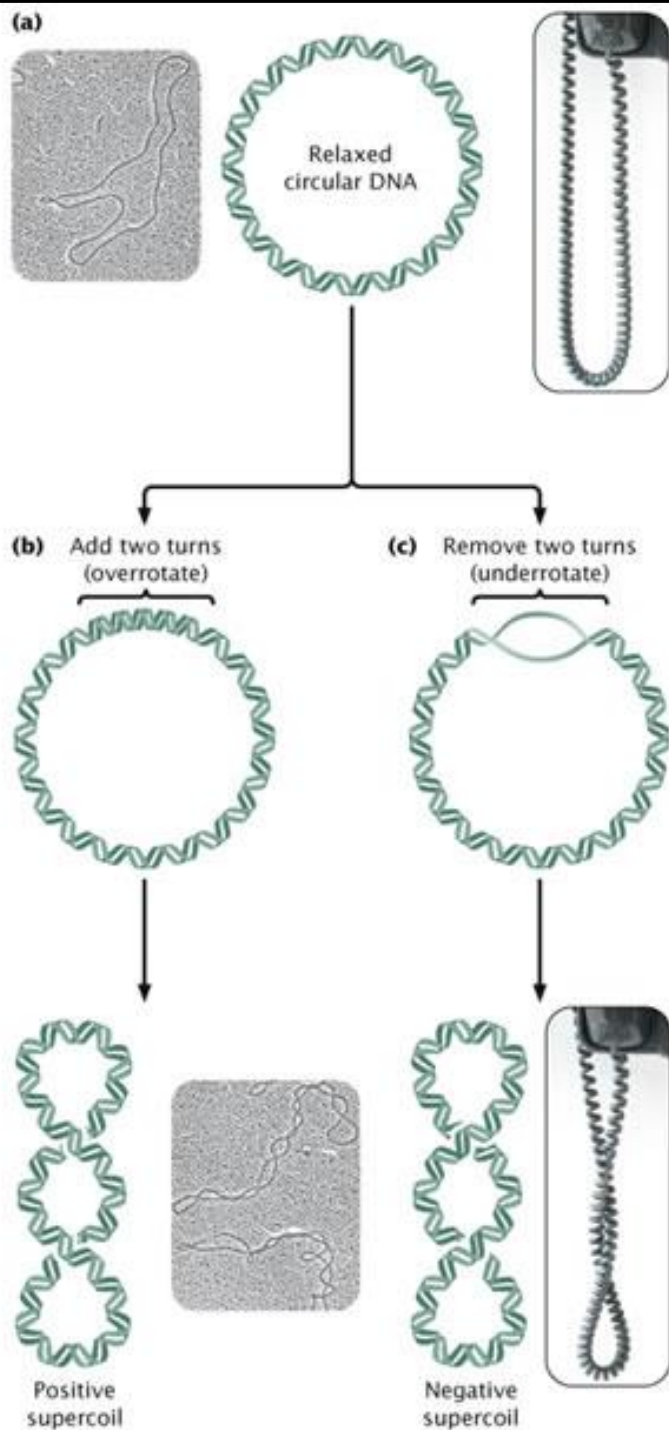
质粒的复制和转录要依赖于宿主细胞编码的某些酶和蛋白质，如离开宿主细胞则不能存活，而宿主即使没有它们也可以正常存活。



质粒的应用

- 质粒广泛用作基因工程中目的基因的运载工具——载体。
- **载体 (Vector)** : 把一个有用的目的DNA片段通过重组DNA技术, 送进宿主细胞中进行扩增和表达的工具叫载体。细菌质粒是重组DNA技术中最常用的载体 (常用还有病毒、酵母人工染色体等)。质粒分子本身是含有复制功能的遗传结构。质粒带有的某些遗传信息会赋予宿主细胞一些遗传性状。其自我复制能力及所携带的遗传信息在重组DNA操作, 如扩增、筛选过程中极为有用。

从大肠杆菌中提取质粒DNA是分子生物学实验最基本的方法之一。



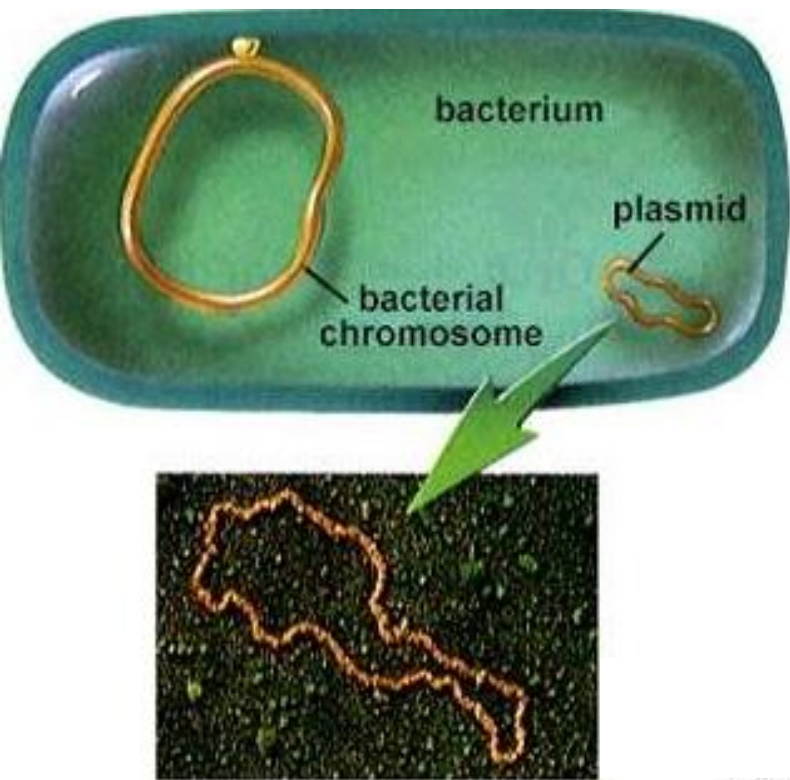
大多数来自细菌的质粒是双链、共价闭合环状 (3C) 的分子，以超螺旋形式存在。



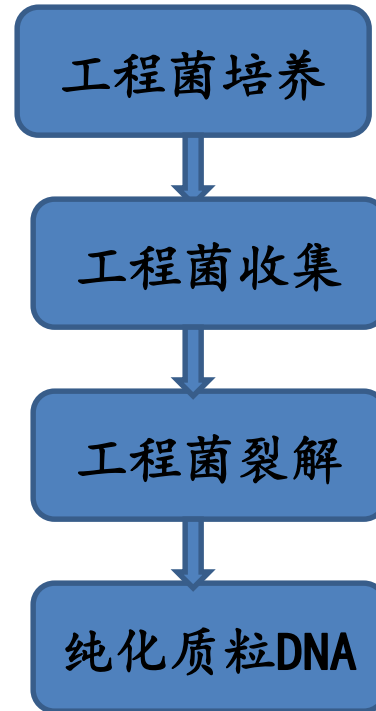
质粒的特性

- 质粒通常含有某些染色体没有的基因，负责编码某些功能蛋白，这些功能并非细菌生存所必需，但在一定环境下，可对宿主的生存有利。如产生抗生素的抗性（R因子）、生成抗生素、降解复杂有机化合物、产生大肠杆菌素、肠毒素及限制酶、修饰酶等。
- 基因工程质粒多已修饰改造，插入了特定的启动子、多克隆位点、抗性基因等。

质粒提取原理:



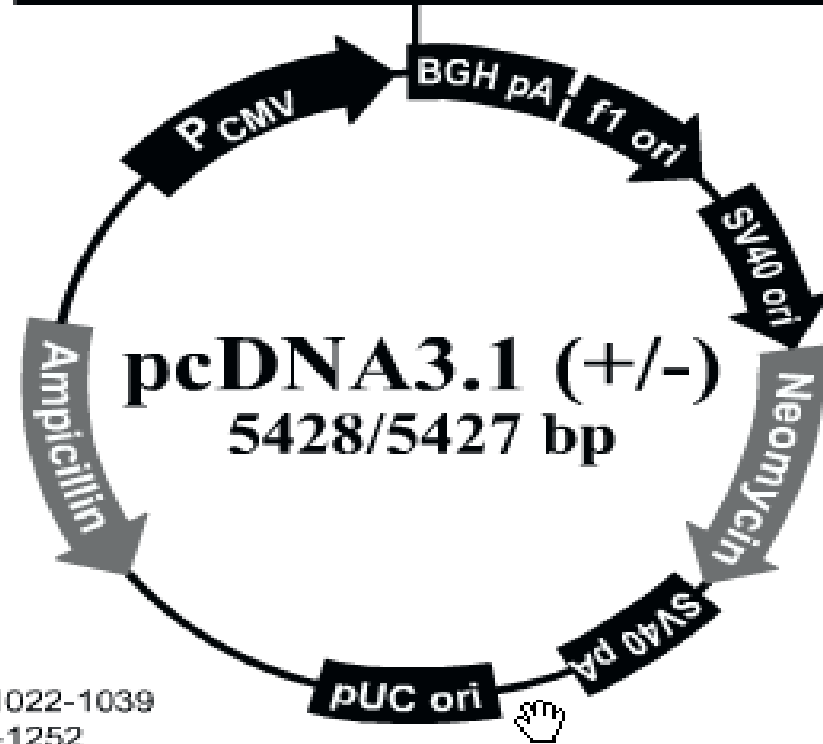
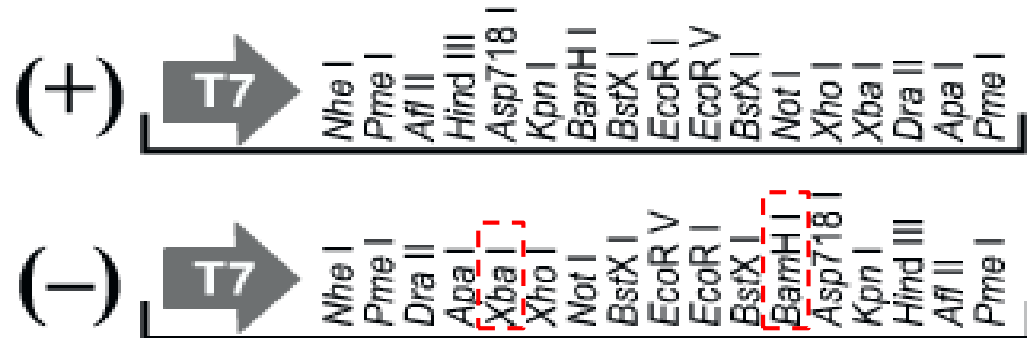
质粒提取有多种方法，但都包含有4个基本步骤：



✓ 去除蛋白质

✓ 去除RNA

✓ 去除基因组DNA



Comments for pcDNA3.1 (+)
5428 nucleotides

CMV promoter: bases 232-819

T7 promoter/priming site: bases 863-882

Multiple cloning site: bases 895-1010

pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 1022-1039

BGH polyadenylation sequence: bases 1028-1252

f1 origin: bases 1298-1726

SV40 early promoter and origin: bases 1731-2074

Neomycin resistance gene (ORF): bases 2136-2930

SV40 early polyadenylation signal: bases 3104-3234

pUC origin: bases 3617-4287 (complementary strand)

Ampicillin resistance gene (*bla*): bases 4432-5428 (complementary strand)

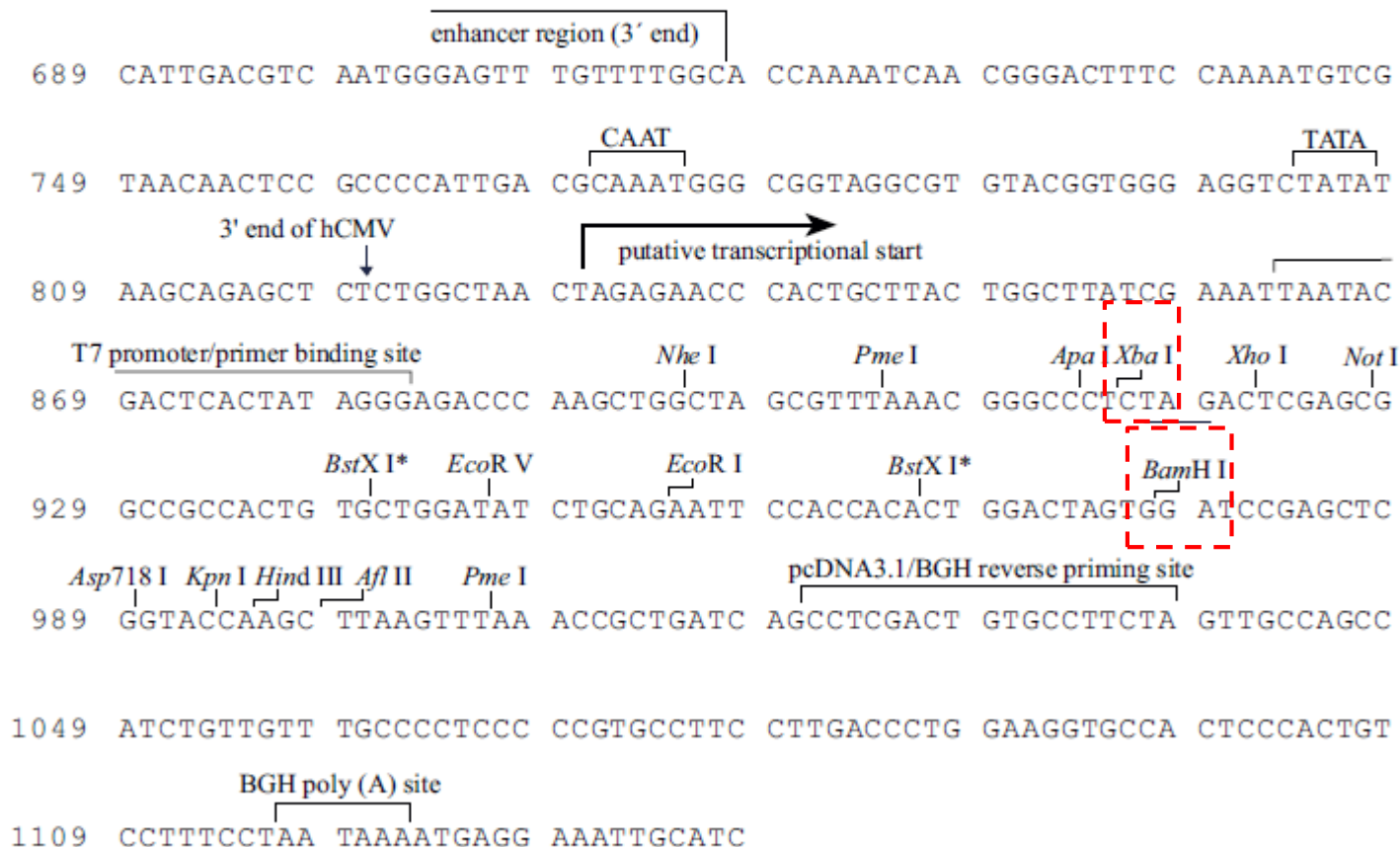
ORF: bases 4432-5292 (complementary strand)

Ribosome binding site: bases 5300-5304 (complementary strand)

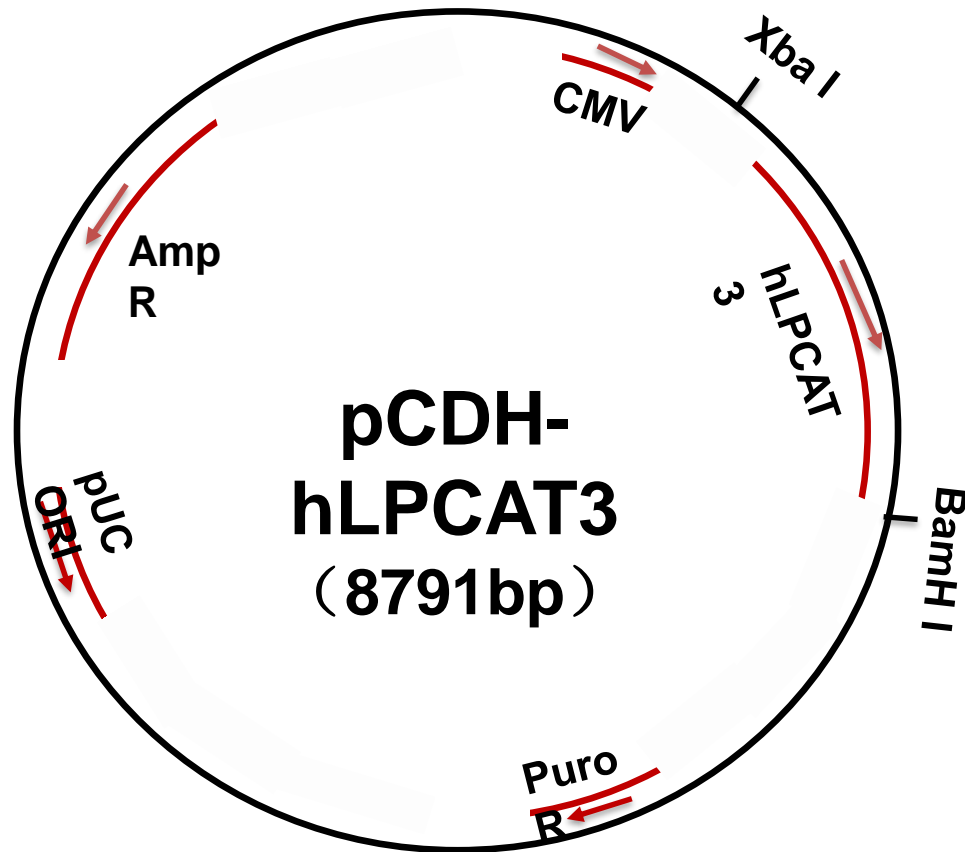
bla promoter (P3): bases 5327-5333 (complementary strand)

Multiple Cloning Site of pcDNA3.1(-)

Below is the multiple cloning site for pcDNA3.1(-). Restriction sites are labeled to indicate the cleavage site. The *Xba* I site contains an internal stop codon (TCTAGA). The multiple cloning site has been confirmed by sequencing and functional testing. The complete sequence of pcDNA3.1(-) is available for downloading from our web site (www.invitrogen.com) or from Technical Service (see page 13). For a map and a description of the features of pcDNA3.1(-), please see the Appendix, pages 10-11.



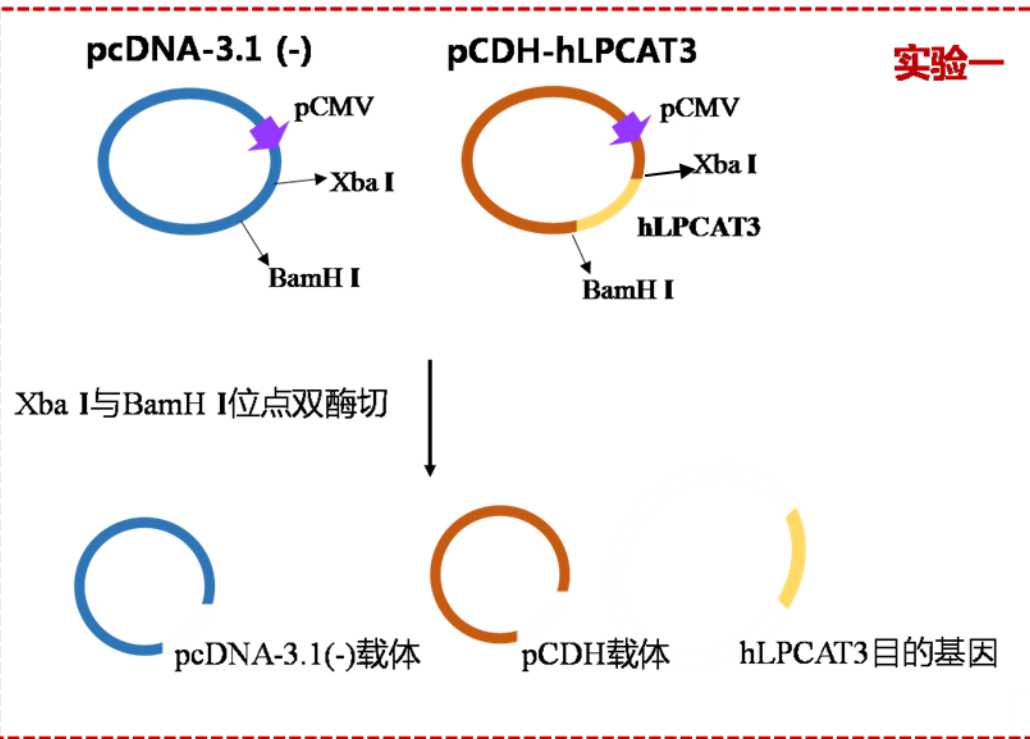
*Please note that there are two *BstX* I sites in the polylinker.



hLPCAT3: Lysophosphatidylcholine acyltransferase3

pCDH-hLPCAT3质粒中含有hLPCAT3基因，约1.46Kb，位于pCDH载体的Xba I和BamH I之间。

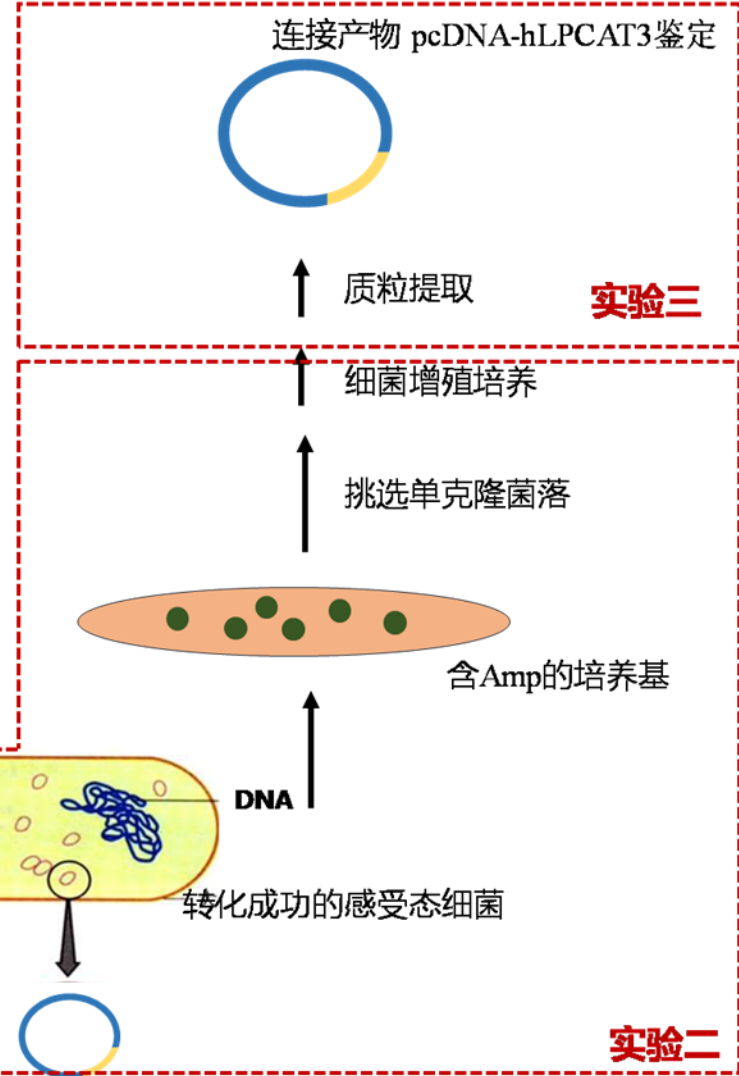
实验一



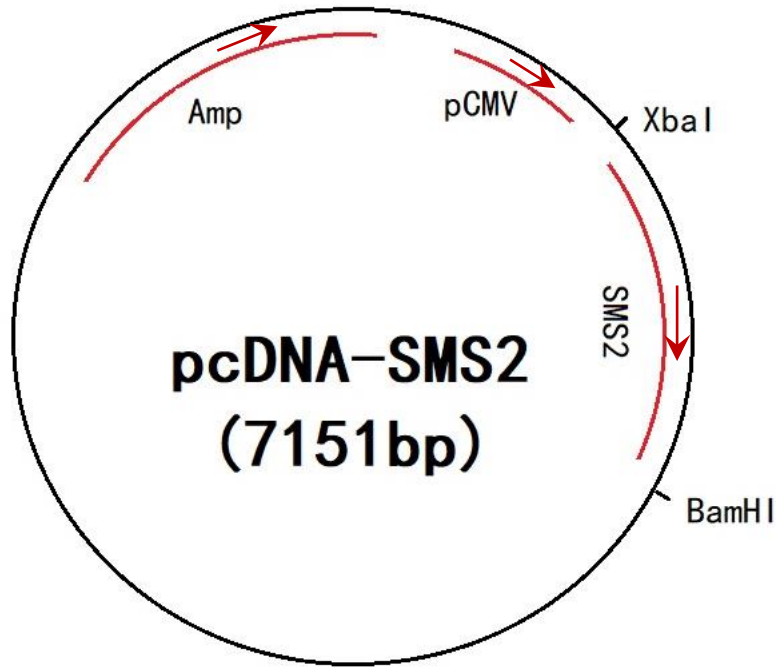
pcDNA-3.1 (-)载体与目的基因连接



实验三



用pcDNA-SMS2替代pcDNA 3.1(-)



用pcDNA-SMS2替代pcDNA 3.1(-)的优势：通过一段约2.0kb DNA的存在，帮助判断目标质粒是发生了单酶切还是双酶切。



分子生物学实验一

- 载体和目的基因的准备



实验目的

1. 双酶切获得pcDNA3.1(-)载体大片段,
2. 双酶切从pCDH-hLPCAT3质粒中获取含有hLPCAT3
目的基因DNA片段。
3. 电泳分离并纯化回收DNA片段。
4. 测定所回收DNA的浓度。



实验原理

II类限制性核酸内切酶可识别特定核苷酸序列并在序列内部特定位点切断3', 5'-磷酸二酯键。*Xba* I的识别和切割序列是5' T[↓]CTAGA3' , *Bam*H I的识别和切割序列是5' G[↓]GATCC3' 。用*Xba* I和*Bam*H I双酶切pcDNA-SMS2载体可得到约5.4kb的载体大片段, 含有2个5'端突出的粘性末端。用*Xba* I和*Bam*H I双酶切pCDH-hLPCAT3质粒可获得长约1.46kb的hLPCAT3基因小片段, 也含有2个5'端突出的粘性末端, 有利于后续实验将hLPCAT3基因装入pcDNA3.1(-)载体中。

酶切产物经琼脂糖凝胶电泳将DNA分离, 从凝胶切出hLPCAT3基因及pcDNA3.1(-)载体片段条带后, 用试剂盒从琼脂糖凝胶中回收DNA。



实验方法

1. *Xba* I和*Bam*H I双酶切获取载体大片段。
2. *Xba* I和*Bam*H I双酶切含目的基因的质粒。
3. 电泳分离载体大片段和目的基因。
4. 回收载体大片段和目的基因。

1. *Xba* I和*Bam*H I双酶切获取载体大片段

pcDNA3.1-SMS2 ($\approx 0.4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$)	16 μL
10 \times Quickcut Buffer	2 μL
<i>Xba</i> I	1 μL
<i>Bam</i> H I	1 μL

总体积 20 μL

30 $^{\circ}\text{C}$ 保温20分钟，然后37 $^{\circ}\text{C}$ 保温20分钟。

2. *Xba* I和*Bam*H I双酶切含目的基因的质粒

pCDH-hLPCAT3 plasmid ($\approx 0.8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$)	16 μL
10×Quickcut Buffer	2 μL
<i>Xba</i> I	1 μL
<i>Bam</i> H I	1 μL

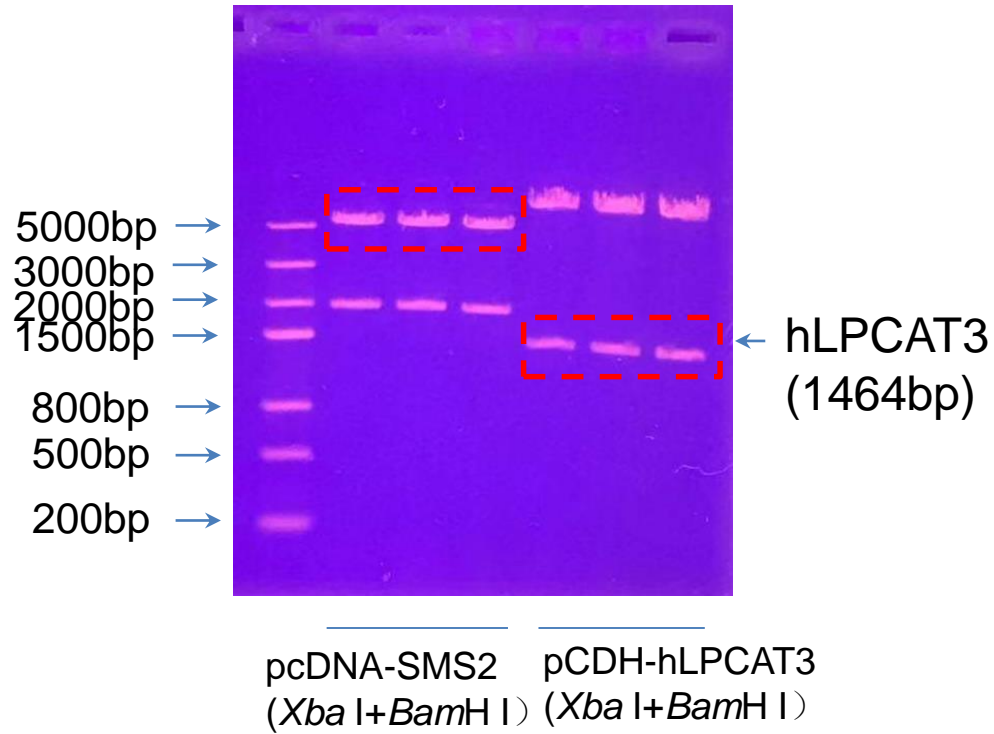
总体积	20 μL

30 °C保温20分钟，然后37°C保温20分钟。

3. 电泳分离载体大片段和目的基因

- 1) 样品全部加入至1%琼脂糖凝胶样品槽中。pcDNA3.1-SMS2和pCDH-hLPCAT3分别点样在两块凝胶中，150V，300mA，电泳40min。
- 2) 分别切下含载体大片段(约5.4kb)和目的基因(约1.5kb)的琼脂糖凝胶（每2孔样品一起切割回收）。
- 3) 将含有单一DNA条带的琼脂糖凝胶（尽量切除多余部分）放入干净的离心管中，称取凝胶质量。（一般 $\leq 0.3\text{g}$ ）
- 4) 将试管做好标记，交给老师统一保管，保存于 -20°C ，用于后续实验。

实验结果示例



思考题

1. 简要说明基因工程上游步骤有哪些？
2. 本实验中为何使用pcDNA-SMS2替代pcDNA 3.1(-)？
3. 使用*Xba* I和*Bam*H I双酶切时为何先于30 °C保温20分钟再于37°C保温20分钟？两种保温温度顺序能否互换？为什么？