

21 世纪高等院校教材——生物科学系列

细胞分子生物学技术教程

(第二版)

印莉萍 祁小廷 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书在第一版基础上编写而成。全书结合理论教学和实验技术,具有目的清晰、原理明确、步骤详尽、图文并茂等特点。各章均有技术理论、实验原理、结果分析、思考题等。

全书分为两篇。第一篇分子生物学技术,共六章 27 个实验。涵盖了 DNA 的制备和分析、DNA 的克隆、PCR 相关技术、RNA 的制备和分析、核酸分子杂交技术和蛋白质电泳技术等。第二篇细胞生物学技术,共五章 22 个实验。除显微镜技术、组织培养等经典细胞生物学实验外,还有 GFP 标记质膜蛋白的分选观察、细胞融合、细胞凋亡以及细胞培养与功能鉴定、细胞膜技术、细胞生理生化及植物转基因技术等。

本书适合普通高等院校生命科学领域教学用书,也可作为医学、农林、综合性大学本科生和研究生有关课程的实验教材,也可供相关的科技人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

细胞分子生物学技术教程/印莉萍,祁小廷主编.—2版.—北京:科学出版社,2005.8

21 世纪高等院校教材——生物科学系列

ISBN 7-03-015463-0

I. 细… II. ①印…②祁… III. 细胞生物学:分子生物学-高等学校-教材 IV. Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 044013 号

责任编辑:单冉东 宋立明/责任校对:李奕萱

责任印制:安春生/封面设计:陈 敬

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

2001 年 1 月第 一 版 *

首都师范大学出版社

2005 年 8 月第 二 版 开本:B5(720×1000)

2005 年 8 月第一次印刷 印张:18 1/2

印数:1—4 000 字数:349 000

定价:25.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

编写人员名单

主 编 印莉萍 祁小廷

副 主 编 刘祥林 刘维仲 柴小清

参编人员（按姓氏笔画排序）

王 琦 王彩华 张艳萍

李 鹏 李昊文 李艳红

杨 坤 汪洪捷 洪剑明

晏月明 常正尧 黄勤妮

靳 飞 蔡明华

前 言

国家经济建设的迅猛发展，对人才质量提出更高的要求。科技的日新月异、知识的快速更新，增加了高等院校提高教学质量、培养合格人才的紧迫感。本书正是在这样的背景环境中孕育而生的。2001年1月，印莉萍、刘祥林主编的《分子细胞生物学实验技术》由首都师范大学出版社出版，使用后反应良好，已成为许多学生或实验室常备的实验手册。本书是在前一版的基础上，经过近四年教学和科研的实践，结合三届本科生和四届研究生使用后的反馈信息，趋利弃弊，精心充实调整编写而成。

针对分子生物学、细胞生物学、基因工程、蛋白质工程、细胞工程等学科理工交融的特点，联系高等院校教学科研并重的实际，我们进行了多年“教学科研融合”的探索。将科学研究的思想方法带进课堂，提高学生发现问题的能力；把课题研究的成熟技术转化成实验，提高学生动手操作的水平。本书的重新编写就是这一教改思想的成果体现，把实践证明技术含量偏低、操作手段单一的内容舍弃，将应用范围广、现代化手段程度高的内容收编进来。让学生见识高档精密仪器的功能，使他们了解前沿技术领域的进展。例如，采用新试剂明显改进了诱导细胞凋亡的效果；增加了酵母细胞的异源互补筛选；带有GFP的质膜蛋白分选的荧光显微镜和激光共聚焦显微镜的观察；表位附加标签（epitope tag）用于蛋白亚细胞定位等实验内容。

本书的编写人员都是教学科研第一线的教师和具有相应技术专长的研究生，在编著的各项实验技术中融入了每个参编人员的经验、体会和实践技巧。本书插编了百余张实用图表，力求图文并茂；每章节还设有实验原理、技术理论、结果分析、思考题等，便于学生对实验内容的分析与理解。

本书的重新编写和出版是由印莉萍、李艳红申请并主持的首都师范大学“细胞生物学精品课”项目资助的。书中不少内容还应用了国家自然科学基金项目（30170552）；北京市自然科学基金项目（5982008，5042004）和北京市教委科技发展基金项目（KM200410028015）的研究成果。本书除了主编和副主编，参编人员还有：靳飞（实验23、24）；晏月明（实验26）；蔡明华（实验27）；李鹏（实验33、38）；黄勤妮（实验35、41）；常正尧（实验40）；洪剑明（实验37）；王琦（实验43）；杨坤，李昊文（实验44）；张艳萍（实验49）。王彩华和汪洪捷编写了第七章，李艳红参编了多个细胞生物学实验。由于我们水平和经验所限，

书中难免存在缺点和错误，恳请同行专家、使用教材的师生和热心读者批评指正。

印莉萍、祁小廷、刘祥林

2005年2月24日

目 录

前言

第一篇 分子生物学技术

第一章 DNA 的制备和分析	3
实验 1 细菌质粒的制备和分析	5
实验 2 植物基因组 DNA 的制备和分析	11
实验 3 酵母 DNA 的制备	15
实验 4 λ 噬菌体 DNA 的提取和分析	18
第二章 DNA 的克隆	22
实验 5 DNA 的限制酶剪切	25
实验 6 DNA 片段的回收纯化	28
实验 7 载体与目的基因的体外重组	30
实验 8 重组 DNA 的转化和蓝白筛选	32
实验 9 真核基因在原核细胞中的表达	36
第三章 PCR 相关技术	39
实验 10 PCR 法快速筛选阳性克隆	44
实验 11 转基因烟草的 PCR 检测	46
实验 12 逆转录 PCR	48
实验 13 PCR 产物的 T/A 克隆	54
实验 14 RACE 法获得全长 cDNA	57
第四章 RNA 的制备和分析	64
实验 15 植物组织总 RNA 的制备	66
实验 16 RNA 的定量和完整性分析	70
实验 17 mRNA 的分离和纯化	73
实验 18 表达型 cDNA 文库的构建	78
第五章 核酸分子杂交技术	86
实验 19 同位素标记探针的分子杂交	93
实验 20 DIG 标记探针的分子杂交	97
实验 21 噬菌斑的原位杂交	102
实验 22 Northern 印迹杂交	105

第六章 蛋白质电泳技术	108
实验 23 SDS-PAGE 和蛋白分子量的测定	108
实验 24 IEF-SDS 双向凝胶电泳	118
实验 25 肽质量指纹谱技术	125
实验 26 高效毛细管电泳分离蛋白质	130
实验 27 植物同工酶电泳分析	135
 第二篇 细胞生物学技术 	
第七章 显微镜技术	141
实验 28 普通光学显微镜技术	142
实验 29 几种研究用显微镜技术	153
实验 30 电子显微镜技术	162
实验 31 电镜样品制备技术	167
第八章 细胞培养与功能鉴定	178
实验 32 酵母细胞的培养与观察	178
实验 33 酵母细胞的异源功能互补	181
实验 34 植物细胞的悬浮培养	189
实验 35 植物原生质体的分离与培养	190
第九章 细胞膜技术	194
实验 36 细胞膜的渗透性	194
实验 37 植物细胞质膜的分离和纯化技术	197
实验 38 带有 GFP 的质膜蛋白分选观察	203
实验 39 细胞的融合	207
第十章 细胞生理生化	211
实验 40 离心技术与叶绿体的分离	211
实验 41 植物细胞氧化还原活性的测定	217
实验 42 核酸 (DNA 和 RNA) 的细胞核定位观察.....	219
实验 43 细胞骨架的光学显微镜观察	224
实验 44 细胞凋亡小体和梯状 DNA 的诱导和观察	226
第十一章 植物转基因技术	232
实验 45 农杆菌介导的叶盘法转化烟草	237
实验 46 基因枪转化技术	243
实验 47 瞬时表达分析启动子活性	249
实验 48 顺式元件与反式因子间的凝胶阻滞分析	254

实验 49	c-myc 表位附加标签用于蛋白在亚细胞定位及 western blotting 检测	258
-------	---	-----

附录

附录 1	有关核酸的常用数据	262
附录 2	与 DNA 凝胶电泳有关的数据	264
附录 3	缓冲液	265
附录 4	常用的生物酶类和抗生素类	268
附录 5	常用培养基	270
附录 6	用于噬菌体和酵母操作的溶液	274
附录 7	杂交实验中用于降低背景的封闭剂	276
附录 8	生物信息学常用数据库及其软件	278
附录 9	分子生物学有毒试剂的净化处理和安全使用	284

第一篇

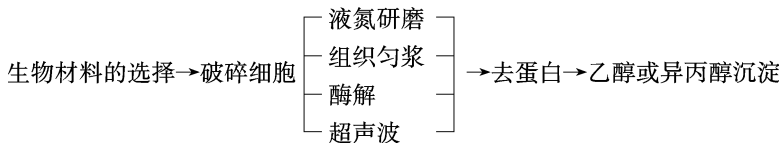
分子生物学技术

第一章 DNA 的制备和分析

DNA 是生物遗传信息的携带者，决定着蛋白质的生物合成，具有极为重要的生理功能。这些 DNA 分子包括病毒的 DNA、原核生物的基因组 DNA 及其胞内的质粒 DNA 和高等生物的 DNA 等。其中高等生物的 DNA 又包括核 DNA (染色体)、线粒体 DNA (mtDNA)、和/或叶绿体 DNA (cpDNA)。获得高纯度、完整性好的基因组 DNA 对分子生物学研究非常重要，如纯化的质粒载体 DNA 可用来进行基因克隆，提取的动植物基因组 DNA 可以用来构建基因组文库，进行 Southern 杂交等，因此研究 DNA 的提取方法极其有意义。

DNA 通常与蛋白质及部分 RNA 结合成染色质形式存在，因此分离核酸首先要破碎细胞，然后采用各种方法将蛋白质、糖类、脂类和盐类等物质除去以纯化 DNA。在提取过程中，要保证 DNA 不被内源或外界污染的 DNase 降解，以保持 DNA 的完整性，并要排除其他分子的污染，以获得高纯度的 DNA。

DNA 的一般提取程序可归纳如下：



→进一步纯化（有机溶剂抽提、沉淀、柱层析法、梯度离心法、用酶温和消化杂质）

1. 生物材料的选择

生物材料包括动植物器官或组织以及微生物等，选择提取 DNA 的生物材料主要考虑生物的生长状态或生长期、组织或器官类型、样品取材的难易及丰富程度等。

2. 细胞的破碎（在缓冲液中）

机械法：组织捣碎机、玻璃匀浆器、研钵研磨。

物理法：反复冻融法（ $-15 \sim 20^{\circ}\text{C}$ ，主要用于动物细胞）、冷热交替法（ $90^{\circ}\text{C} \sim$ 冰冻，主要用于细菌病毒）、超声波处理法（多用于微生物）。

化学及生化法：自溶法（在一定的条件下加防腐剂，靠自身酶系破坏细胞，因时间长不易控制，所以较少使用），使用溶菌酶（破坏细菌细胞壁）、纤维素酶（用于植物细胞）、表面活性剂（SDS 和 TritonX-100）等。

3. 细胞器的分离

要提取细胞的线粒体和叶绿体 DNA，首先应分离出线粒体和叶绿体，一般采取在适当介质中的差速离心法分离。

4. DNA 的提取

一般采用酚/氯仿除去蛋白质，用高盐除去糖类，用去污剂如 SDS（十二烷基磺酸钠）、CTAB（十六烷基三乙基溴化铵）等破坏细胞膜，使蛋白变性，抑制核酸酶活性。最后用乙醇或异丙醇沉淀 DNA。

5. DNA 的纯化

无论采用哪种方法提取 DNA，都有不同程度的蛋白质、多糖以及一些盐类污染，因此进一步纯化 DNA 是非常必要的。常用的方法有有机溶剂抽提、沉淀、柱层析、梯度离心法以及用酶温和消化杂质等。

本章主要介绍细菌质粒 DNA 的提取、植物基因组 DNA 提取以及噬菌体 λ DNA 的提取。

实验 1 细菌质粒的制备和分析

质粒是存在于染色体外的能独立复制的共价闭合环状双链 DNA 分子，它广泛存在于细菌等原核生物中，能够给宿主细胞提供一些表型如抗药性、分解复杂有机物的能力等。天然质粒经过改造后可以作为基因工程的载体，这种质粒载体在基因工程中具有极广泛的应用价值。因此质粒的分离与提取是分子生物学最常用、最基本的实验技术之一。

细菌质粒是最常用的基因工程载体，它的提取可以分为以下 3 步：细菌的培养、菌体的收集和裂解、质粒 DNA 的纯化。细菌的培养通常在选择性的液体培养基中（如含某种适当浓度的抗生素）接种一种含有质粒的宿主菌，37℃，150~250rpm 摇培过夜获得。对于某些松弛型复制的质粒，可以在细菌生长的对数后期加入适量氯霉素抑制宿主菌染色体 DNA 的复制和蛋白质合成来增加质粒拷贝数。但目前所用的质粒载体如 pUC 系列，采用强的改进型 *pMB1* 复制子，拷贝数能达到几百个，因此不用进行后期的氯霉素处理即可获得高产量的质粒。细菌的收集可以采用离心的方法，为了防止细菌的代谢产物影响质粒的纯度可以用液体培养基或生理盐水漂洗细菌沉淀 1~2 次。细胞裂解的方法很多，如去污剂法、煮沸法、碱变性法等。这些方法各有利弊，要根据质粒的性质，宿主菌的特性及后续的纯化方法等多种因素加以选择。为了满足一些实验的要求，粗提的质粒还需要进一步纯化，用氯化铯—溴化乙锭密度梯度超速离心纯化质粒 DNA 是经典的方法。

实验室提取细菌质粒常采用碱裂解法、煮沸法、一步提取法以及在碱裂解法基础上的试剂盒法等。碱裂解法利用宿主菌巨大线状染色体 DNA 与相对较小的闭环双链质粒 DNA 的结构差异来提取质粒 DNA。碱变性 DNA 时，线状基因组 DNA 变性充分而质粒 DNA 处于拓扑缠绕的自然状态而不能彼此分开。当去除变性条件时（酸中和），质粒 DNA 迅速而准确的配置重新形成完全天然超螺旋状分子，而难于复性的长链线状的基因组 DNA 则与破裂的细胞壁、细菌蛋白相互缠绕成大型复合物，被 SDS 包盖，当 K^+ 取代 Na^+ 时，这些复合物会从溶液中沉淀下来，附在细胞碎片上一起被离心除去。

煮沸法利用高温破坏细菌细胞，同时利用溶菌酶酶解细菌细胞。把细菌悬浮于含有 Triton X-100、溶菌酶（消化细胞壁）的缓冲液中，然后加热到 100℃，使其裂解。加热破坏了细胞壁，还有助于解开 DNA 链的碱基对，并使蛋白质和染色体 DNA 变性。闭环质粒 DNA 配对虽被破坏，但是链彼此不会分离，当温度下降时则恢复成超螺旋。离心除去变性的染色体 DNA 和蛋白质，从上清液中回收质粒 DNA。

小量一步提取法是直接将细菌培养物和酚/氯仿混合，同时完成细胞裂解、蛋白变性两个过程，然后离心除去大部分基因组 DNA 与蛋白质，用异丙醇沉淀含质粒 DNA 的上清。其优点是操作简单、方便、经济，特别适合多样本质粒的快速分析。

多数公司生产质粒提取试剂盒时多采用在碱裂解法的基础上通过特殊的吸附柱来纯化质粒 DNA 的方法。经碱裂解获得的含质粒的上清液与高盐结合缓冲液混合，加到能高效、专一吸附 DNA 的特殊硅基质填充的离心式吸附柱子中，再用洗涤缓冲液通过离心法洗去蛋白、盐等杂质，最后用洗脱缓冲液将质粒 DNA 洗脱下来。在提取液中含有 RNase A，可以在提取纯化过程中除去 RNA，而不用另外单独加 RNase A 除去 RNA。该方法由于不用苯酚、氯仿抽提，减少了对质粒 DNA 破坏，而且纯度很高，超螺旋状质粒占 80%~90%。

方法一 碱裂解法

一、材料、试剂和仪器

1. 材料 含有质粒的菌种

2. 试剂 溶液 I：

50mmol/l 葡萄糖

25mmol/l Tris-HCl (pH8.0)

10mmol/l EDTA (pH8.0)

高压灭菌 15min，4℃贮存。

注：若提取质粒较小，可以直接用 pH8.0 的 TE 代替。

溶液 II：新鲜配制

0.2mol/l NaOH (用 5mol/l NaOH 母液配)

1% SDS (用 10% SDS 母液配)

注：此处可以用 0.4mol/l NaOH 和 2% SDS 的母液等体积混合即可。

溶液 III：

5mol/l KAc 60ml

冰乙酸 11.5ml

ddH₂O 28.5ml

高压灭菌 15min，4℃贮存。

注：也可以用 3mol/l KAc 代替，但效果不好。

3. 仪器 恒温摇床、台式离心机、制冰机、电泳装置、紫外透射观测仪

二、实验程序

1. 小量提取法

- (1) 在含有抗生素的 LB 培养基中接种一单菌落, 37℃、150rpm 摇培过夜。
- (2) 取 1.5ml 菌液于小离心管中, 室温 12 000rpm 离心 30sec 收集菌体, 尽可能弃去上清。加入 100 μ l 冰预冷的溶液 I, 剧烈振荡直至悬液发稠。
- (3) 加入 200 μ l 新配制的溶液 II, 温和颠倒 5 次, 置冰上 1~2min。
- (4) 加入 150 μ l 冰预冷的溶液 III, 温和振荡 10sec, 置冰上 5min。
- (5) 12 000rpm, 离心 10min, 转上清于另一管中, 用等体积的酚/氯仿抽提一次, 10 000rpm 离心 2min, 吸上清于另一管中。加入 2 倍体积 100% 乙醇, -20℃ 沉淀 1hr。
- (6) 12 000rpm, 离心 10min 回收质粒 DNA, 用 75% 乙醇洗一次, 超净台中吹干后, 溶于适量灭菌 ddH₂O 中。琼脂糖凝胶电泳检测质粒的质量。
- (7) 若需要可以进一步纯化质粒 DNA 以达到转化、重组的要求。

2. 大量提取法

- (1) 在含有抗生素的 30ml LB 培养基中接种一单菌落, 37℃, 150rpm 摇培至对数晚期, 然后转到 500ml 的 LB 培养基中剧烈摇培过夜, 此时也可以加入氯霉素以增加质粒的拷贝数。
- (2) 取 500ml 菌液于离心管中, 4 000rpm 离心 15min 收集菌体, 弃去上清, 重悬于 10ml 冰预冷的溶液 I 中。
- (3) 加 1ml 新配制的溶菌酶溶液 (10mg/ml, 溶于 10mmol/l Tris-HCl pH 8.0)。
- (4) 加入 20ml 新配制的溶液 II, 盖紧盖子, 缓缓颠倒离心管数次, 以充分混匀内容物。于室温放置 5~10min, 此时溶液已发稠。
- (5) 加入 15ml 冰预冷的溶液 III, 温和振荡数次, 置冰上 10min。此时溶液出现白色沉淀。
- (6) 4 000rpm, 离心 10min, 转上清于另一管中, 用等体积的酚/氯仿抽提一次, 1 000rpm 离心 2min, 吸上清于另一管中。加入 0.6 倍体积异丙醇混匀, 室温沉淀 10min。
- (7) 5 000rpm 离心 15min 回收质粒 DNA。70% 乙醇洗一次后, 空气中干燥。加适量的无菌水或 TE 溶解。
- (8) 用琼脂糖凝胶电泳检测质粒的完整性。若需要可以进一步纯化质粒 DNA, 以达到转化、重组的要求。

注: 小量提取往往不能满足大量分析需要, 这时可以用“中量提取法”即 50ml 菌液用 2ml 溶液 I, 4ml 溶液 II 和 3ml 溶液 III 处理后直接用等体积的氯仿抽提, 然后分装到小离心管

中供沉淀分析用。这样即节省时间又便于分析。

方法二 煮沸法

一、材料、试剂和仪器

1. 材料 适合煮沸法提取质粒的细菌（如含有 endA^+ 的菌株不适宜用此法）

2. 试剂

(1) STET: 0.1mmol/l NaCl, 10mmol/l Tris-HCl (pH8.0),

1mmol/l EDTA (pH8.0), 5% Triton X-100

(2) 溶菌酶 10mg/ml (溶于 10mmol/l Tris-HCl pH8.0, 新鲜配制)

(3) RNase A 10mg/ml

(4) 异丙醇

(5) 70%乙醇

(6) TE: 10mmol/l Tris-HCl, 1mmol/l EDTA (pH8.0) (参考附录 3)

3. 仪器 离心机、制冰机、水浴锅、电泳装置、紫外透射观测仪

二、实验程序

1. 离心收集的细菌用 350 μ l STET 悬浮。

2. 加入 25 μ l 新鲜配制的溶菌酶液，混匀，煮沸 40sec。

3. 室温下，12 000rpm 离心 10min。

4. 转上清于另一管中或用灭菌牙签挑出沉淀物，上清中加入 40 μ l 2.5mol/l NaCl (pH5.2) 和 420 μ l 的异丙醇，振荡混匀，室温下放置 5min。

5. 4℃, 12 000rpm, 离心 5min。

6. 弃上清，加入 1ml 70%乙醇洗一次。吹干，加入 50 μ l TE 溶解。

方法三 小量一步提取法

一、材料、试剂和仪器

1. 材料 含质粒的细菌

2. 试剂

(1) PCI: 酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1), 其中酚用 TE (10mmol/l Tris-HCl pH7.5, 1mmol/l EDTA) 饱和。

(2) TER: TE (pH7.5), 含 RNase A 20 μ g/ml

3. 仪器 离心机、电泳装置、紫外透射观测仪

二、实验程序

1. 取 0.5ml 细菌过夜培养物，置 1.5ml 离心管中。
2. 加入 0.5ml PCI，用振荡器最大速度振荡 1min，充分混匀。
3. 4℃，12 000g 离心 5min，取上清 0.45ml 左右，移至离心管中，加 0.5ml 异丙醇（不加盐也无需冷冻）混匀，立即于 12 000g 离心 5min。弃上清，用 70% 乙醇洗一次，空气中干燥，加 100 μ l TER 溶解质粒 DNA。取 5~10 μ l 电泳分析。

方法四 试剂盒法

一、材料、试剂和仪器

1. 材料 含质粒的细菌
2. 试剂 质粒快速提取试剂盒（北京博大泰克生物基因技术公司）
3. 仪器 离心机、电泳装置、紫外透射观测仪

二、实验程序

1. 将 3~5ml 细菌培养液 10 000rpm 离心 1min，去上清，沉淀加 100 μ l 溶液 I（含 RNase A），彻底振荡悬浮。
2. 加入 150 μ l 溶液 II 温和振荡混匀（不要涡旋），置冰上 1~2min。
3. 加入 150 μ l 溶液 III，温和颠倒试管数次使之混合（不要涡旋），置冰上 5~10min。12 000rpm 离心 10min，转上清与另一已加好 420 μ l 结合缓冲液的管中，混匀，加到离心吸附柱中，然后以 12 000rpm 离心 30sec。
4. 倒掉废液，向柱子中加 750 μ l 洗涤缓冲液，12 000rpm 离心 30sec，弃去废液。
5. 再重复一次步骤 4。
6. 再次以 12 000rpm 离心 1min，彻底除去柱中残留的乙醇。
7. 将柱子置于一个灭过菌的 1.5ml 试管上，加 50 μ l 洗脱缓冲液到柱中央，室温放置 5min，然后 12 000rpm 离心 1min 收集到的液体即为质粒。

注：此处只以一个公司产品为例来说明原理，具体以试剂盒操作说明为准。

三、结果与分析

通过琼脂糖凝胶电泳检测所提质粒的质量。电泳后经 E.B 染色可在紫外光下常常看到三条质粒带型，根据质粒泳动的快慢由（-）到（+）分别为开环（OC），线状（L）和超螺旋（SC）三种形式。根据其中线状条带的位置与已知分子量的标准线状 DNA 分子（Marker）比较，可以估算质粒的分子量（见图 1-1）。样品中可能会污染了细菌基因组 DNA（这表现在电泳点样孔中有亮带），

这多由碱裂解中振荡过于剧烈造成细菌基因组剪切或加溶液Ⅱ后放置时间过长等引起。因此在操作中加溶液Ⅱ后应温和混匀，决不要涡旋振荡，并且冰上放置的时间要不宜超过 2min。用试剂盒提取的质粒 DNA 分子超螺旋形式占的比例较大，电泳结果往往只有一条带或两条带。

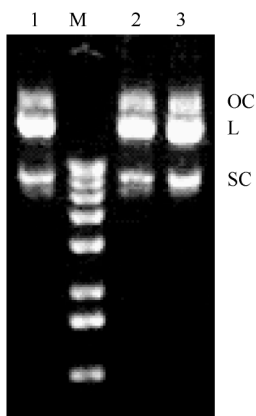


图 1-1 质粒 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱
M: 1kb marker; 1, 2, 3: plasmid。从上而下
分别为同种质粒的三种不同构象。OC: 开环状
DNA; L: 线状 DNA; SC: 超螺旋状 DNA

四、思考题

1. 提取质粒的一般原理是什么?
2. 比较不同的质粒提取方法的优缺点?

实验2 植物基因组 DNA 的制备和分析

由于植物细胞有细胞壁，细胞内多糖类物质的含量高，因此提取真核细胞基因组 DNA 的一般方法用在植物细胞上并不十分有效。这里介绍两种常用的提取植物细胞基因组 DNA 的方法：CTAB 法和 SDS 法。

方法一 CTAB 法提取植物基因组 DNA

这种方法是由 Murray 和 Thompson (1980) 的方法修改而成的简便方法。CTAB 是一种去污剂，可溶解细胞膜，它能与核酸形成复合物，在高盐溶液中 (0.7mol/l NaCl) 是可溶的，当溶液盐浓度降低到一定程度 (0.3mol/l NaCl) 时，它可从溶液中沉淀出来，通过离心就可将 CTAB-核酸的复合物与蛋白、多糖类物质分开。最后通过乙醇或异丙醇沉淀 DNA，CTAB 因为溶于乙醇或异丙醇而被除去。

一、材料、试剂和仪器

1. 材料 新鲜的植物组织材料或 -80°C 冻存的材料

2. 试剂

(1) $2\times\text{CTAB}$ 溶液

CTAB (w/v)	2%
Tris-HCl	100mmol/l (pH8.0)
EDTA	20mmol/l (pH8.0)
NaCl	1.4mol/l
PVP	1%

灭菌备用。没灭菌前呈黏稠状，CTAB 灭菌后变成清亮的溶液。

(2) 氯仿/异戊醇 (24:1 CI)

(3) RNase A 10mg/ml

(4) 乙醇或异丙醇

(5) β -巯基乙醇

(6) 70%乙醇

3. 仪器 离心机、恒温水浴、台式高速离心机、电泳装置

二、实验程序

1. 在 2ml 离心管中，加入 $500\mu\text{l}$ 的 $2\times\text{CTAB}$ ， 65°C 预热，使用前加入 $20\mu\text{l}$ β -巯基乙醇。

2. 取幼嫩的组织材料 1~2g, 用蒸馏水冲洗干净, 再用灭菌 ddH₂O 冲洗两次, 放入经液氮预冷的研钵中, 加入液氮研磨至粉末状, 用干净的灭菌不锈钢勺转移粉末到预热的离心管中, 总体积达到 1ml, 混匀后置 65℃ 水浴中保温 45~60min, 并不时轻轻转动试管。

注: 冻存材料要直接研磨, 绝对不能化冻。而且粉末应在化冻前转移, 否则内源性 DNase 有可能降解基因组 DNA。

3. 加等体积的氯仿/异戊醇, 轻轻地颠倒混匀, 室温下 10 000rpm 离心 10min, 移上清至一新管中。

4. 向管中加入 1/100 体积的 RNase A 溶液, 37℃ 下保温 20~30min。

5. 加入两倍体积的 100% 乙醇或 0.7 倍体积异丙醇, 会出现絮状沉淀, -20℃ 放置 30min 或 -80℃ 放置 10min, 12 000rpm 离心 10~15min 回收 DNA 沉淀。

6. 用 70% 乙醇清洗沉淀两次, 吹干后溶于适量的无菌 ddH₂O 或 TE 缓冲液中。

7. 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性。

方法二 SDS 法提取植物基因组 DNA

本方法由 Dellaporta, Wood 和 Hicks (1983) 的方法修改而成。其基本原理是研磨的组织细胞用热的 SDS 裂解后, 加入高浓度的 KAc, 0℃ 放置以除去蛋白和多糖类杂质, 最后用乙醇或异丙醇沉淀。

一、材料、试剂和仪器

1. 材料 新鲜的组织材料或 -80℃ 冻存的材料

2. 试剂

(1) 提取缓冲液

Tris-HCl 100mmol/l (pH8.0)

EDTA 50mmol/l (pH8.0)

NaCl 500mmol/l

灭菌后加 β -巯基乙醇至 10mmol/l

(2) 裂解液 20% SDS

(3) 高盐溶液 5mol/l KAc

(4) RNase A 10mg/ml

(5) 异丙醇

(6) 灭菌 ddH₂O 或 TE 缓冲液

3. 仪器 离心机、恒温水浴、台式高速离心机、电泳装置

二、实验程序

1. 取幼嫩的组织材料 1~2g, 用蒸馏水冲洗干净, 再用灭菌 ddH₂O 冲洗两次,

放入经液氮预冷的研钵中，加入液氮研磨至粉末状，用灭菌不锈钢勺转移粉末至加有 500 μ l 提取液的离心管中，轻轻混匀。

2. 向管中加入 50 μ l 20% SDS 溶液，混匀，不可过于强烈振荡以防基因组 DNA 断裂，65℃保温 10min，并不时摇动。

3. 加入 150 μ l 5mol/l KAc，混匀，置冰上 20~30min。

4. 4℃，15 000rpm 离心 15min，转移上清到另一离心管中，加入 0.7 倍体积的异丙醇，混匀，-20℃沉淀 30min。

5. 12 000rpm 离心 10min 回收基因组 DNA 沉淀，吹干后加入适量的灭菌 ddH₂O 或 TE 缓冲液溶解 DNA。

6. 加入 1/10 体积的 RNase A，37℃保温 20min，除去 RNA。

7. CI（氯仿/异戊醇）抽提后，加 2 倍体积乙醇，-20℃沉淀 30min。12 000rpm 离心 10min，回收基因组 DNA 沉淀。

8. 用 400 μ l 70%乙醇洗一次后，吹干，加入适量的灭菌 ddH₂O 或 TE 缓冲液溶解 DNA。

9. 电泳检测完整性。

三、结果与分析

1. 用紫外分光光度计在 230nm、260nm、280nm 和 310nm 波长分别读数。其中 260nm 读数用来估计样品中 DNA 的浓度， OD_{260}/OD_{280} 与 OD_{260}/OD_{230} 的值用于估计 DNA 的纯度，310nm 为背景吸收值。1 个 OD_{260} 值相当于 50 μ g/ml 双链 DNA。计算样品浓度：

样品浓度 (μ g/ml) = ($OD_{260} - OD_{310}$) $\times$ 稀释倍数 $\times$ 50

对于 DNA 纯制品，其 $OD_{260}/OD_{280} \approx 1.8$ ， OD_{260}/OD_{230} 应大于 2.0。如果 $OD_{260}/OD_{280} > 1.8$ 表明可能有 RNA 污染； $OD_{260}/OD_{280} < 1.8$ 表明可能有蛋白污染。

用琼脂糖凝胶电泳 (0.8%) 检测核 DNA 的完整性 (见图 1-2)。

2. 如果 DNA 沉淀呈白色透明状而且溶解后成黏稠状，说明 DNA 含有较多的多糖类物质，可以在取材前将植物放暗处 24hr，以达到去除淀粉的目的。

3. 如果 DNA 沉淀呈棕色，难以用限制性内切核

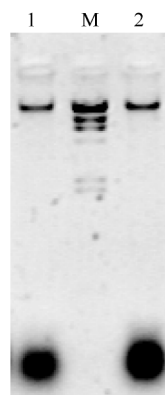


图 1-2 烟草基因组 DNA 电泳图谱
M: Marker (λ DNA/ *Hind*III; 1, 2: 基因组 DNA

完整性好的基因组 DNA 应是一条比 23kb 滞后的电泳带，若降解则成为弥散状。电泳前缘为未除干净的 RNA

酸酶完全消化。植物材料含有大量酚类化合物，与 DNA 共价结合，使 DNA 呈棕色，并抑制 DNA 的酶解反应。为防止此情况出现，可在加入 $2\times$ CTAB 的同时加入 2%~5% 的巯基乙醇，或者加入亚精胺（ $100\mu\text{l}$ DNA 加 $5\mu\text{l}$ 0.1mol/l 的亚精胺）。

4. DNA 中含有多糖或盐类。可将 DNA 用 100% 乙醇或异丙醇沉淀出来，离心，沉淀用 70% 乙醇清洗两次或更多次，吹干后重溶于 TE 中。（注意乙醇一定要吹干，否则电泳点样时，样品上漂）

5. DNA 已降解，电泳条带呈弥散状。样品降解可能有两种情况：一是机械振动过于剧烈，二是操作过程中 DNase 污染。在提取 DNA 的各个操作过程中要避免剧烈振荡，提取液及用品要高温高压灭菌。另外，使用吸头吸取过程中应避免产生气泡，吸头应剪去尖，避免反复冻融 DNA。

四、思考题

1. 如何评价基因组 DNA 的纯度和完整性？
2. 如何减少基因组 DNA 的降解？

实验 3 酵母 DNA 的制备

酵母是一种易于培养的典型单细胞真核生物，一直作为遗传学和分子生物学研究的有力工具，有真核生物中的“大肠杆菌”的美称。单倍体酵母细胞基因组为 15Mb，含 16 条大小约为 200~2200kb 的线性染色体。它的单倍体核酸 DNA 容量仅为大肠杆菌基因组的 3.5 倍。相比较而言，最大的酵母染色体仍然比哺乳动物的染色体的平均大小小 100 倍左右。尽管酵母菌基因组很小，但它的许多生物学特性与真核生物相似。它不仅含有高等真核生物细胞中有膜的亚细胞器，而且还有细胞骨架。酵母 DNA 只在核内存在，尽管无组蛋白 H1，但染色体 DNA 的核小体结构与高等真核生物仍十分相似。酵母菌 DNA 的转录由三种不同的 RNA 聚合酶完成，只有很少的基因出现内含子，mRNA（由 RNA 聚合酶 II 转录）具有真核生物 mRNA 典型的转录后修饰 [如 5' 端加甲基化的嘌呤帽 (methyl-G) 和 3' 端加 poly (A) 尾] 等特点。它的良好遗传背景，为进行真核生物的基因操作提供了大量的研究工具和可借鉴的经验。

培养酵母菌即简单、经济，又十分快捷，在营养丰富的培养基中，大约 90min 的时间即可增殖一代。

支持酵母菌染色体功能的 3 种基本结构元件已经被确认和克隆，它们分别是：复制起点 (ARS 元件)、着丝粒 (CEN 元件) 和端粒 (telomeres, TEL)。已经利用这些克隆化的元件构建了酵母人工染色体，并应用于各种染色体行为的研究。利用这些结构元件，再加上克隆化的酵母菌选择标记与大肠杆菌载体融合构建穿梭载体，能分别在大肠杆菌和酵母菌中自主复制并稳定存在。

大多数酵母载体都是能穿梭于酵母和细菌之间的穿梭载体。根据不同用途，可分为克隆载体、表达载体、转导载体和用于诱变的载体。根据复制方式，酵母载体也可分为两类：一类是整合载体，这种载体在酵母中不能自我复制，只能通过同源重组整合到染色体中而得以保存。这类载体的优点是某个基因一旦被克隆和整合之后，将随染色体 DNA 而分离。因此该基因在细胞分裂时会更稳定。另一类载体（它包括酵母着丝点序列），一般在克隆时作为一个 CEN/ARS 盒。这类载体同时具有自我复制能力并且在细胞分裂时较稳定。

酵母分子生物学研究中常常要分离质粒和酵母染色体 DNA，质粒 DNA 用来转化大肠杆菌，而染色体 DNA 则用于 Southern 杂交分析、PCR 扩增和整合性质的质粒的克隆等。下面分别介绍酵母细胞质粒 DNA 和染色体 DNA 的分离方法。

一、材料、试剂和仪器

1. 材料 酵母细胞

2. 试剂

- (1) YPD 或选择培养基
- (2) 含目的质粒的酵母菌落
- (3) 溶菌缓冲液: 100mmol/l Tris
30mmol/l EDTA
0.5% SDS
- (4) 酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1)
- (5) 0.45~0.52mmol/l 酸洗玻璃珠 (Thomas Scientific)
- (6) TE 缓冲液
- (7) 1mg/ml RNaseA
- (8) 4mol/l 乙酸铵溶液或 3mol/l 乙酸钾 (KAc)
- (9) 无水乙醇、70%乙醇

3. 仪器 离心机、电泳仪、恒温摇床

二、实验程序

1. 酵母细胞质粒 DNA 的分离

(1) 在玻璃试管中加入 2ml 带有抗生素的培养基, 接种含有目的质粒的单菌落, 30℃摇培过夜。

(2) 将菌液倒入微量离心管中, 室温 5200rpm 离心 5min, 弃上清, 快速振荡分散沉淀物。

(3) 酵母细胞用 200μl 溶菌缓冲液重悬, 加入 0.3g 玻璃珠 (约 200μl 体积) 及 200μl 酚/氯仿/异戊醇, 在涡旋混合器上高速振荡 2min, 室温 10 000rpm 离心 5min。

(4) 水相即含质粒, 一方面可按常规用乙醇沉淀质粒; 另一方面也可直接取 1~2μl 水相转化大肠杆菌。

2. 酵母染色体 DNA 的提取

(1) 在三角瓶中加入 10ml 培养液, 接种 30℃过夜培养。

(2) 室温下 5 000rpm 离心 5min, 弃上清。

(3) 细胞用 100μl 溶菌缓冲液重悬, 快速涡旋振荡分散菌体沉淀, 沸水浴 15min。

(4) 加 100μl 2.5mol/l KAc, 冰上放置 1hr。

(5) 13 000rpm, 4℃下离心 5min, 上清液转移至一个新试管中, 加 100μl

酚/氯仿/异戊醇，在涡旋混合器上高速振荡 3min。

(6) 室温下高速离心 3min，取上清，加 30 μ l 的 1mg/ml RNaseA，混合 37℃ 温育 5min。

(7) 加 100 μ l 氯仿/异戊醇，混匀。13 000rpm 离心 3min。将上清液移至另一个新试管中。

(8) 加 1ml 冷的异丙醇，-20℃放置 10min。

(9) 15 000 rpm 离心 15min，弃上清。

(10) 加 1ml 70% 乙醇，13 000rpm 离心 10min。

(11) 弃上清，干燥沉淀，DNA 用 100 μ l TE 缓冲液重悬。

10ml 菌液大约可以得到 20 μ g 的染色体 DNA，可用于限制酶切，体外 PCR 扩增或 Southern 分析，对于 Southern 杂交，当用 5 μ l DNA (约 1 μ g) 在 20 μ l 总体积下消化时可以得到最佳效果。PCR 扩增时，则在 50 μ l 反应体系中用 2 μ l DNA。

三、思考题

1. 比较细菌质粒提取与酵母质粒提取方法的差异。
2. 酵母染色体 DNA 与质粒 DNA 提取时是如何分开的？

实验 4 λ 噬菌体 DNA 的提取和分析

λ 噬菌体 DNA 是常用的基因克隆的载体, 常用此构建 cDNA 文库和基因组文库, 因此从烈性噬菌体的裂解菌液中提取 λ 噬菌体载体或重组的 λ 噬菌体 DNA 意义重大。采用 λ 噬菌体载体构建 cDNA 文库是常用的建库方法。mRNA 逆转录成双链 cDNA 后, 重组到 λ 载体 (如 λ ZAP) 中, 经体外包装和转导宿主菌 (如 XL1-blue) 获得初级 cDNA 文库。初级 cDNA 文库不稳定, 经过扩增获得浓度较高的终库, 以噬菌体粒子原液的形式存放于 -80°C 中。cDNA 文库构建好后, 插入的 cDNA 片段长度如何? 是否含有所需的目的基因? 这都需要提取 cDNA 文库的重组 λ DNA 进行 Southern 杂交或进行 PCR 检测, 以期鉴定文库的质量以及是否含有目的基因。烈性重组噬菌体通过与宿主菌共培养得到 λ 噬菌体裂解液, 里面含有大量的子代 λ 噬菌体粒子, 可以用来提取 λ DNA。首先用 DNase I 和 RNase A 除去宿主菌的 DNA 和 RNA, 而 λ 噬菌体 DNA 因有外壳蛋白保护而免遭裂解。然后用 PEG 沉淀噬菌体。最后用酚/氯仿和 SDS 裂解噬菌体蛋白外壳释放 λ DNA, 用异丙醇沉淀 DNA。小量提取 λ DNA 可以用来进行酶切分析, 此法简单快速。

方法一 大量制备 λ DNA

一、材料、试剂和仪器

1. 材料 宿主菌 XL1-Blue、cDNA 文库

2. 试剂

- (1) 20% PEG
- (2) DNase I (5mg/ml)
- (3) RNase A (10mg/ml)
- (4) 10% SDS
- (5) 0.5mol/l EDTA
- (6) 酚/氯仿
- (7) Tet (5mg/ml)
- (8) LB 固体培养基 (参考附录 5)
- (9) LB broth (参考附录 5)
- (10) SM 缓冲液 (参考附录 6)

3. 仪器 培养箱、恒温摇床、分光光度计、水浴锅、低温冷冻离心机

二、实验程序

1. 在 LB-Tet 的培养基上划线宿主菌 XL1-Blue, 37℃培养过夜。(两次划线培养细菌较好)
2. 挑取单菌落接种在 LB+10mmol/l MgSO_4 +0.2% (w/v) 麦芽糖培养液中, 37℃150rpm 摇菌 4~6hr, 用紫外分光光度计测量菌液的 OD_{600} 值, 确保 $\text{OD}_{600}=1.0$ 。
3. 室温下, 500g 离心 5min 收集细菌培养物, 以 10mmol/l MgSO_4 悬浮菌体。
4. 从 cDNA 文库中取出噬菌体原液, 按 $10^6:10^8$ 混合噬菌体与宿主菌, 37℃保温 20min (间歇摇动), 让噬菌体充分吸附在宿主菌上。
5. 加入 10~12ml LB 液体培养基, 37℃培养 9~12hr (若细菌裂解量较少, 可先以小体积宿主菌裂解, 然后转到新的宿主菌液中继续裂解), 待宿主菌裂解后, 加入 100 μ l 氯仿, 继续于 37℃保温 20min。
6. 4℃, 8 000g 离心 10min, 收集含噬菌体的上清, 加入 10 μ l DNase I (5mg/ml) 和 15 μ l RNase A (10mg/ml) 至终浓度 1 μ g/ml, 混匀, 37℃保温 2.5~3hr。
7. 加等体积 20% (w/v) PEG₆₀₀₀ (若为 PEG₄₀₀₀ 浓度则加到 40%) 和终浓度 2mol/l NaCl (可以加固体 NaCl), 混匀, 冰浴 1~2hr。
8. 4℃, 10 000g 离心 20min, 去上清 (中间白色层不弃去因其中含有噬菌体和 PEG), 用 0.5mol/l SM 缓冲液悬浮沉淀, 4℃, 8 000g 离心 3min。
9. 取上清, 加入 5 μ l 10% (w/v) SDS 和 5 μ l 0.5mol/l EDTA (pH8.0), 68℃保温 20~30min。
10. 酚/氯仿抽提 (去 PEG 和蛋白) 3 次, 最后一次在水相中加入等体积异丙醇, -20℃沉淀 2hr 以上。
11. 4℃, 12 000g 离心 20min, 弃上清, 用 70%乙醇洗涤沉淀 3 次, 真空抽干后, 溶于 50 μ l TE 缓冲液 (pH8.0)。
12. 用 0.7%琼脂糖凝胶电泳检测。

方法二 小量制备 λ DNA

一、材料、试剂和仪器

1. 材料 筛选的阳性噬菌体
2. 试剂
 - (1) 50mol/l Tris-HCl, pH8.0
 - (2) DNase I (5mg/ml)
 - (3) RNase A (10mg/ml)

- (4) 3mol/l NaAc pH4.8
 - (5) 100%和 70%乙醇
3. 仪器 恒温摇床、水浴锅、低温冷冻离心机

二、实验程序

1. 在大约 50ml 的液体噬菌体裂解液中加入 10 μ l DNase I 和 25 μ l RNase A，在 37 $^{\circ}$ C 保温 1hr。
2. 10 000rpm 4 $^{\circ}$ C 下离心 1.5hr，弃上清，用 200 μ l 50mol/l Tris-HCl (pH8.0) 重新悬浮噬菌体，并转到离心管中。
3. 加 200 μ l Tris 饱和酚，振荡 20min。在台式离心机中离心 5min，保留上层水相，用酚重复抽提 1 次。
4. 加 200 μ l 氯仿，振荡，然后离心，保留上层水相，并用氯仿重新抽提 1 次。
5. 加 20 μ l 3mol/l NaAc 和 2 倍体积的 100%乙醇，在室温下沉淀 DNA。离心 10min 并弃去上清液。
6. 用 70%乙醇洗涤沉淀，离心 5min 后弃去上清液。真空干燥后用 100 μ l TE 缓冲液重新悬浮。
7. 用电泳检测和进行酶切分析。

三、结果与分析

从图 1-3A 中可以看出所提取的 λ DNA 载体与野生型 λ DNA 大小相一致，说

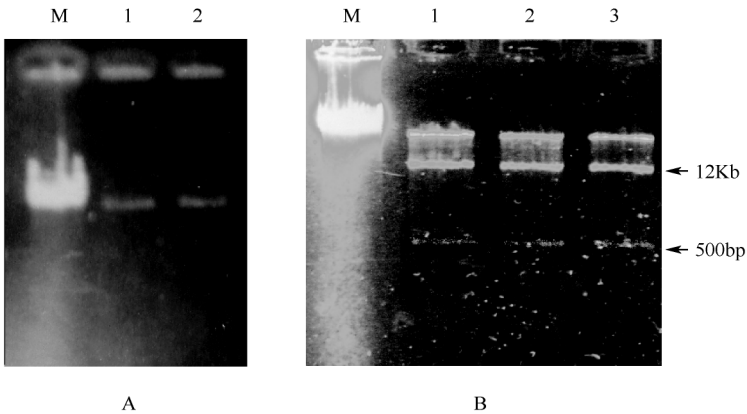


图 1-3 λ 噬菌体 DNA 的电泳图谱

A: λ DNA 载体的电泳图; B: 重组噬菌体 DNA 的酶切电泳图。M: 野生型 λ DNA; 1~2: λ DNA 载体; M: 野生型 λ DNA; 1~3: 重组噬菌体 DNA 的 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切

明已经提取出来,但点样空白处有大分子量的 DNA 分子滞留,表明有细菌染色体 DNA 分子污染。

从图 1-3B 中可以看出阳性重组噬菌体 DNA 经过 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切释放出插入片段后的空载体与野生型 λ DNA 分子量相一致,而释放的插入 DNA 大小从 12Kb 到 500bp,带形呈现弥散状,但主要集中在 12Kb 与 500bp 之间。

提取重组 λ DNA 最重要的是防止宿主菌 DNA 的污染,这就需要注意酶解宿主菌 DNA 和 RNA 的时间及所加的酶量。可以设计一系列不同酶量的实验加以检验,以获得最佳酶解条件。DNA 分子量较大,因此操作要十分小心。此外,由于低丰度的重组 cDNA 数目代表较少,而克隆的基因往往是单拷贝的基因,因此要求取噬菌体原液要均匀而且裂解宿主菌要充分,以保证所需重组 cDNA 也得到扩增而不是大量扩增高丰度的重组 cDNA 甚至载体本身。重组 λ DNA 提取后经过 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测,可以用 λ 载体 DNA 为 Marker。所提重组 λ DNA 应该比载体 λ DNA 长,因此呈现一条弥散的 DNA 条带,且最短处在载体 DNA 平行处。进一步用相应的限制性内切核酸酶消化重组 λ DNA,将重组的 cDNA 释放出来,电泳结果是空载体下边有一条 DNA 条带。若不是此结果,则可能 λ DNA 没有被提取出来或在提取过程中被降解了,需找出原因解决。

四、思考题

1. λ DNA 的提取过程中如何避免污染细菌基因组 DNA?
2. 简述提取重组 λ DNA 的目的和意义。

参考文献

1. 北京博大泰克质粒快速提取试剂盒说明书 2002
2. 顾红雅等. 1995. 植物基因与分子操作. 北京大学出版社
3. 李永明, 赵玉琪. 1998. 实用分子生物学方法手册. 科学出版社
4. 卢圣栋. 1993. 现代分子生物学实验技术. 高等教育出版社
5. 奥斯伯等. 1998. 精编分子生物学实验指南. 科学出版社
6. Dellaporta SL, Wood J, Hicks J. B. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. Plant Mol Biol Rep 1 (4): 19~21
7. J. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis. 1993. 分子克隆实验指南 (第二版). 科学出版社
8. Murray MG, Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res 8: 4321~4325

第二章 DNA 的克隆

DNA 的克隆是指在体外将含有目的基因或其他有意义的 DNA 片段与能够自我复制的载体 DNA 连接，然后将其转入宿主细胞或受体生物使其增殖或进行表达的分子操作过程，因此 DNA 克隆又称分子克隆、基因操作或重组 DNA 技术。DNA 克隆涉及一系列的分子生物学技术，如目的 DNA 片段的获得、载体的选择、各种工具酶的使用、体外重组、导入宿主细胞技术和重组子筛选技术等。

1. 目的 DNA 片段的获得

DNA 克隆的第一步是获得包含目的基因在内的一群 DNA 分子，这些 DNA 分子或来自目的生物基因组 DNA 或来自目的细胞 mRNA 逆转录合成的双链 cDNA 分子。由于基因组 DNA 太大，不能够完整克隆，因此必须将其处理成适合克隆的 DNA 小片段，常用的方法有机械物理切割和限制性内切核酸酶消化。若基因序列已知而且比较小就可用人工直接化学合成。如果基因的两端部分序列已知，根据已知序列设计引物，从基因组 DNA 或 cDNA 中通过 PCR 或 RT-PCR 技术就可以获得目的基因。

2. 载体的选择

基因工程的载体应具有一些基本的性质：①在宿主细胞中有独立的复制和表达能力，这样才能使外源重组的 DNA 片段得以扩增。②分子量尽可能小，以利于在宿主细胞中有较多的拷贝，便于结合更大的外源 DNA 片段。同时在实验操作中也不易被机械剪切而破坏。③载体分子中最好具有两个以上的容易检测的遗传标记（如抗药性标记基因），以赋予宿主细胞不同的表型特征（如对抗生素的抗性）。④载体本身最好具有尽可能多的限制性内切核酸酶单一切点，为避开外源 DNA 序列中限制性内切核酸酶位点的干扰提供更大的选择范围。若载体上的单一酶切位点位于检测表型的标记基因之内可造成插入失活效应，则更有利于重组子的筛选。

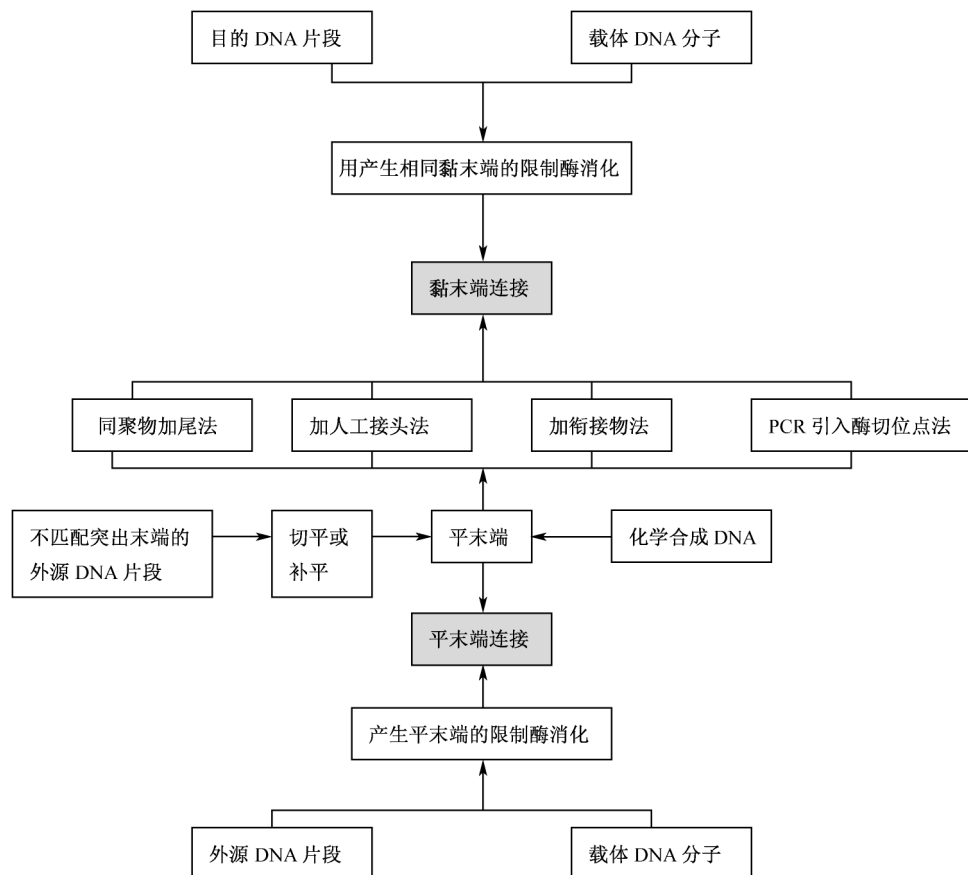
DNA 克隆常用的载体有：质粒载体（plasmid）、噬菌体载体（phage）、柯斯质粒载体（cosmid）、单链 DNA 噬菌体载体（ssDNA phage）、噬粒载体（phagemid）及酵母人工染色体（YAC）等。从总体上讲，根据载体的使用目的，载体可以分为克隆载体、表达载体、测序载体、穿梭载体等。

3. 体外重组

体外重组即在体外将目的片段和载体分子连接的过程。许多限制性内切核酸酶能够切割 DNA 分子而形成黏性末端，用同一种能产生黏末端的酶或同尾酶切割适当载体的多克隆位点便可获得相同的黏性末端，黏性末端彼此退火，通过

T4 DNA 连接酶的作用便可形成重组体，此为黏末端连接。当目的 DNA 片段为平端时，可以直接与平端载体相连，此为平末端连接，但连接效率比黏末端相连差些。有时为了不同的克隆目的，如将平端 DNA 分子插入到带有黏末端的表达载体实现表达时，平端 DNA 分子则要经过一些修饰，如同聚物加尾、加衔接物或人工接头、PCR 法引入酶切位点等，可以获得相应的黏末端，然后进行连接，此为修饰黏末端连接。

各种连接策略间的关系总结如下：



4. 导入受体细胞

载体 DNA 分子上具有能被原核宿主细胞识别的复制起始位点，因此可以在原核细胞如大肠杆菌中复制，重组载体中的目的基因随同载体一起被扩增，最终获得大量同一的重组 DNA 分子。

将外源重组 DNA 分子导入原核宿主细胞的方法有转化 (transformation)、