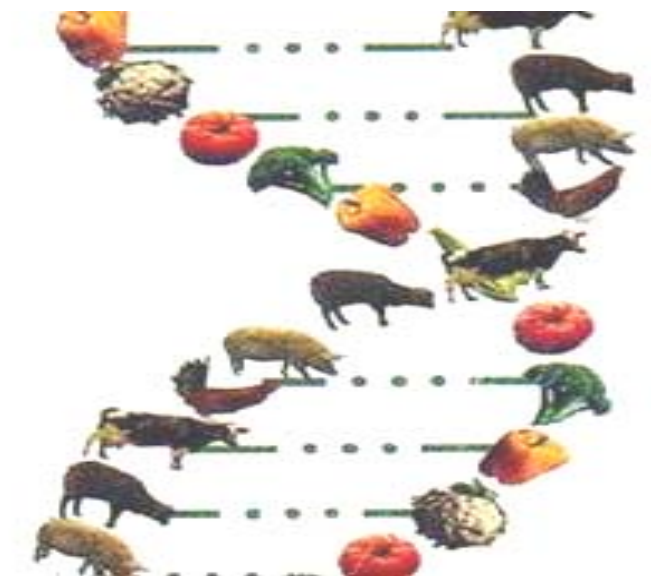


基因工程综合实验指导

(生物技术专业)



学 校: 北京林业大学
院 系: 生物学院生物技术系
教 师: 安新民

2012.2.15

Part I 目的基因克隆

实验目的

1. 通过 PCR 法分离克隆目的基因。
2. 熟悉掌握 PCR、凝胶电泳、DNA 回收纯化、PCR 产物与 T 载体链接、大肠杆菌感受态细胞制备、连接产物转化、重组子筛选等一系列克隆相关技术

实验原理

基于已知序列或已知同源基因序列，设计基因特异引物或简并引物，以 DNA 或 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，扩增产物电泳后回收纯化，与 T 载体连接，将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞，经抗性筛选和 PCR 检测、质粒酶切鉴定获得重组子。

试剂药品

PCR 反应试剂 (Taq DNA polymerase, 10×PCR Buffer (Mg^{2+}), 2.5mM dNTPs, Primers(合成))

1×TAE, $CaCl_2$, 无水乙醇、LB 培养基

DNA 回收试剂盒, 质粒 DNA 提取试剂盒, DNA marker

T-Vector, T4-DNA ligase,

质粒 DNA 提取试剂盒

常用限制性核酸内切酶

仪器设备

PCR 仪、电泳装置、离心机、恒温箱、摇床、凝胶成像仪、移液器等

耗材：PCR 管、离心管、吸头、培养皿等

实验程序

一. PCR

1. 原理:见《分子克隆》等有关手册

2a. 反应体系(使用 Taq 时):

DNA 模板	1 μ l
上游引物(10pmol/ μ l)	1 μ l
下游引物(10pmol/ μ l)	1 μ l
10×PCR Buffer	5 μ l
25mM $MgCl_2$	4 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
Taq(4,5units/ μ l)	0.5 μ l

ddH ₂ O	33.5μl
total	50μl

2b. 反应体系(使用 Pfu 时):

DNA 模板	1μl
上游引物(10pmol/μl)	3μl
下游引物(10pmol/μl)	3μl
10×PCR Buffer	5μl
10mM dNTP (each)	1μl
Pfu(2,3units/μl)	0.5μl
ddH ₂ O	36.5μl
total	50μl

3. 模板 DNA 可以是基因组 DNA、DNA 片段、cDNA、质粒 DNA 或含目标 DNA 的细菌及病毒等，浓度一般小于 100ng。

4. 引物设计应遵循下列原则:

- (1) 长度一般在 20-24 碱基;
- (2) 与模板 DNA 的配对同源性在 80%以上;
- (3) 上游引物与基因编码链序列一致, 下游引物则与之互补;
- (4) 3'末端与模板配对能力较好(最好末端 5 个碱基能配对);
- (5) 两引物 G+C 百分含量相近;
- (6) 3'末端不出现 3 个连续的 G/C;
- (7) 引物自身或两引物间不存在连续 5 个或 5 个以上碱基的互补能力;
- (8) 两引物 3'末端序列不应相近;
- (9) 目标 PCR 产物的长度应能预测;
- (10) 经 GenBank 同源性检索, 目标基因与引物的配对能力应远强于其它基因。

5. 循环条件:

一般情况下 Taq 采用 94℃, 5min → (94℃, 40s → 退火温度, 40s → 72℃, 60-120s)₃₀ → 72℃, 10min。

Pfu 采用 95℃, 2min → (95℃, 40s → 退火温度, 30s → 73℃, 60-240s)₃₅ → 73℃, 5min。

退火温度是 PCR 成败的关键, 虽然根据引物的特性可估计退火温度, 但更多情况下是通过试验确定退火温度, 一般为 45-60℃。

退火温度大致可按下式推算: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T) - 5n$

n 代表错配的碱基数。

延伸时间 Taq 是每 kb 1min, Pfu 则每 kb 2min。

二. 琼脂糖凝胶电泳

1. 胶的浓度因 DNA 长度而异:

基因组 DNA, λDNA	0.4-0.5%
质粒(3-5kb)	0.7%
3-1kb	0.7-1.0%

1-0.5kb	1.0-1.5%
<0.5kb	2.0%

2. 电泳缓冲液可选用 $0.5\times$ TBE 或 $1\times$ TAE, 前者缓冲能力较后者强, 但不适用于从胶中回收 DNA, 建议只采用 $1\times$ TAE 用于琼脂糖凝胶电泳。琼脂糖用电泳缓冲液配制。
3. 电泳电压以 $5V/cm$ 为宜, 即电泳槽的长度 $\times$ 5。
4. 电泳胶中添加 $0.5\mu g/ml$ EB。
5. DNA 样品与 $6\times$ 上样缓冲液混合后点样, 为使 DNA 条带肉眼可见, 条带 DNA 必须达 $2ng$ 。
6. 采用合适的 DNA Marker。

三. PCR 产物与 T-载体连接

反应体系: $0.1\mu g$ 载体 DNA, $2-5\mu l$ PCR 纯化产物, $1\mu l$ 连接缓冲液, $1\mu l(3units/\mu l)$ T₄ DNA 连接酶, 加 ddH₂O 至 $10\mu l$, $12-16^{\circ}C$ 连接过夜。

四. 大肠杆菌感受态细胞制备及 DNA 转化感受态细胞

1. 挑取 TG1 单菌落在 LB 培养基中 $37^{\circ}C$ 过夜培养;
2. 过夜培养的 TG1 菌按 1: 50 或 1: 100 稀释培养 1.5-2hr;
3. 冰上冷却 10min;
4. $4000rpm \times 3min$, $4^{\circ}C$ 离心;
5. 沉淀用 $1ml$ $100mM$ CaCl₂ 悬浮, 冰上放置 10min;
6. $4000rpm \times 3min$, $4^{\circ}C$ 离心;
7. 沉淀用 $0.2ml$ $100mM$ CaCl₂ 悬浮, 冰上放置 30min-24hr 后使用;
8. 将连接产物与感受态细胞混合, 冰上放置 30min;
9. 于 $42^{\circ}C$ 热激 90s 后迅速放冰上 2min;
10. 加入 $1ml$ LB(不含氨苄青霉素), 混合后于 $37^{\circ}C$ 保温 1hr;
11. 在含 $100\mu g/ml$ 氨苄青霉素的 LB 固体培养基平板(直径 7cm)表面涂 $30\mu l$ x-gal ($20mg/ml$, 用二甲基甲酰胺配制)和 $3\mu l$ IPTG ($200mg/ml$), 然后涂布转化后的细菌;
12. $37^{\circ}C$ 倒置培养 10-14hr, 待菌落长成后将平板置于 $4^{\circ}C$ 中保存。

五. 大肠杆菌感受态细胞的快速制备及转化

1. 取 $1ml$ 过夜培养的细菌, 置冰上 10min, 离心收集细菌后加入 $100\mu l$ TSS 悬浮, 置冰上 10min 后可用;
 2. 加入要转化的 DNA, 置冰上 10min;
 3. 加入 $0.9ml$ 含 $20mM$ 葡萄糖的 TSS, $37^{\circ}C$ 培养 1 小时即可涂板。
- 注: 此感受态细胞可于 $-70^{\circ}C$ 保存 4 个月。

六. 农杆菌感受态细胞制备及冻融转化

1. 农杆菌稀释 100 倍过夜培养;
2. 吸取 $1.5ml$ 菌液于离心管中, 冰浴 10min;
3. $5000rpm$ 离心 5min, 弃去上清液;

七. 质粒提取——常规法

1. 取 1ml 细菌, 12000rpm, 15s;
2. 用 200 μ l Solution I 重悬浮细菌, 室温放置 5min;
3. 加入 200 μ l Solution II, 轻轻颠倒混匀, 冰上放置 5min;
4. 加入 200 μ l Solution III, 轻轻颠倒混匀, 冰上放置 5min;
5. 12000rpm, 10min;
6. 上清液移入新离心管, 加等体积异丙醇, 颠倒混匀, 室温放置 2min;
7. 12000rpm, 5min, 吸干残液;
8. 溶于 50 μ l 含 10 μ g/ml RNase 的 TE, 37 $^{\circ}$ C 保温 20min; (到此步骤的质粒可供电泳检查)
9. 补加 TE 至 100 μ l, 加等体积酚/氯仿, 剧烈颠倒混匀 1min;
10. 12000rpm, 5min;
11. 上清液(上层)移入新离心管, 加等体积氯仿, 剧烈颠倒混匀 30s;
12. 12000rpm, 2min;
13. 上清液(上层)移入新离心管, 加 1/10 体积 3M NaAc (pH5.2)和 2 倍体积乙醇, 室温放置 2min;
14. 12000rpm, 2min;
15. 用 1ml 70%乙醇洗涤沉淀后, 沉淀于室温或 37 $^{\circ}$ C 干燥;
16. 溶于 50 μ l TE, -20 $^{\circ}$ C 保存。

注: 提取少量质粒用于检查时, 也可直接取 200 μ l 细菌, 接着做步骤 3, 步骤 4 中在溶液 III 加入 5min 后加等体积氯仿/异戊醇, 混匀, 接着做下面步骤。

八. 低蛋白低 DNase 质粒的提取(该法无需酚/氯仿抽提)

1. 取 1ml 细菌, 12000rpm, 15s;
2. 用 150 μ l SET 重悬浮细菌, 室温放置 5min;
3. 加入 350 μ l Solution II, 轻轻颠倒混匀, 冰上放置 5min;
4. 加入 250 μ l Solution III, 轻轻颠倒混匀, 冰上放置 5min;
5. 12000rpm, 10min;
6. 上清液移入新离心管, 加等体积异丙醇, 颠倒混匀, 室温放置 2min;
7. 12000rpm, 5min, 吸干残液;
8. 溶于 50 μ l 含 10 μ g/ml RNase 的 TE, 37 $^{\circ}$ C 保温 20min, 然后-20 $^{\circ}$ C 保存。

Part II 植物表达载体构建与目的基因的转化 (以烟草为例)

实验目的

1. 进行分子设计构建植物表达载体。
2. 通过农杆菌介导等基因转化方法获得转基因烟草植株。

实验原理

根癌农杆菌介导的外源基因转移，整合型的根癌农杆菌 Ti 质粒是最常用的一种载体。研究最多的是章鱼碱型和胭脂碱型 Ti 质粒。在 Ti 质粒上有一段 T 区，T-DNA 能从该质粒转移到敏感植物的核基因组中。T-DNA 边界有 25bp 正向序列可能接受某种酶识别切割，进而形成环状中间体。此外，Ti 质粒上还有一个约 50bp 的 Virulence 区，简称 Vir 区，约有十几个基因，Vir 区不在 T-DNA 内，Vir 基因产物是一种跨膜蛋白。可以接受植物信号的诱导而发生构象的改变，成为活性蛋白。其中 VirA 基因可能是决定 Ti 宿主范围的基因。根据 Vir 质粒的基本构造，通常认为由根癌农杆菌介导的外源 DNA 转移和转化要具备三个因素：①位于农杆菌染色体上的 Chra 和 Chrb 基因，这两个基因细菌细胞对植物细胞的识别和吸附有关；②T-DNA 边界序列对于 T-DNA 整合到植物染色体的过程是必要的；③Vir 基因的活化可以启动 DNA 向植物细胞的转移。农杆菌介导的基因转移是双子叶植物中最为广泛而有效的遗传转化体系。

药品试剂

- MS 母液（大量元素，微量元素，铁盐，有机母液）
- 6-BA，IBA（0.1mg/ml）
- LB（蛋白胨，酵母提取物，氯化钠）
- 卡那霉素（50mg/ml）、头孢霉素（250mg/ml）、羧苄青霉素母液（50mg/ml）
- 琼脂（5g/L）
- 砂糖（20-30g/L）
- 定性滤纸
- 限制性内切酶
- T4 DNA 连接酶
- 凝胶 DNA 回收试剂盒

仪器设备

——-20℃冰箱
——培养皿
——剪刀镊子
——三角瓶
——接种针
——枪头
——PCR 仪
——天平
——研钵和杵子
——37、65 水浴
——移液枪
——移液管
——离心机（转速至少可达 5000g）
——4℃冰箱
——水浴锅等

植物材料：

——室外烟草或烟草无菌苗

质粒与菌株

——pBI121, pBS, pUC19, 或外源目的基因质粒等。
——大肠杆菌 TG1、DH5α 等，农杆菌 LBA4404、GV3101 等。

实验程序：

1. 表达载体的构建：

- 将含外源目的基因的质粒与 pBS 或 pUC19 用相同的内切酶进行双酶切，
- 双酶切产物进行电泳，
- 用试剂盒回收目的条带
- 目的条带用 T4 DNA 连接酶，在 16℃下进行连接。连接体系如下：

目的基因片段	5μL
pBS 或 pUC19	3.5μL
T4 DNA ligase buffer(×10)	1μL
T4 DNA ligase	0.5μL

Total volume 10 μ L

- 连接产物转化大肠杆菌感受态细胞，通过 PCR 筛选出阳性重组质粒。
- 阳性重组质粒与 pBI121 用相同的内切酶进行双酶切；
- 电泳回收相应的目的片段；
- 目的条带用 T4 DNA 连接酶，在 16℃ 下进行连接。连接体系同上。
- 连接产物转化大肠杆菌感受态细胞，通过 PCR 筛选出阳性重组质粒。
- 提取重组质粒 DNA，转化农杆菌感受态细胞(液氮冻融直接转入法)，PCR 检测获得重组子。
- 重组子可直接用于基因转化研究，也可加入 30%~40% 无菌甘油于 -76℃ 保存备用。

2. 无菌材料的准备：叶片、茎段等均可作受体材料，有两种来源。

- 取自无菌试管苗(本实验采用无菌苗)
- 取自田间或温室栽培植株(需消毒处理，同组织培养)

3. 受体材料的预培养：

- **再生培养基的配制：**烟草叶片再生培养基的配制 MS+6-BA 1.0mg/l+IBA 0.1mg，铺板。准备灭过菌的培养皿、剪刀镊子等。
- **预培养：**取烟草无菌苗的幼嫩叶片用剪刀间隔 0.5 cm 结果叶片中脉(保持剪后叶片不断裂以便下一步侵染)，在再生培养基中预培养 1-2 天，待切口处刚刚开始膨大时即可进行农杆菌侵染。

4. 农杆菌培养：

- **农杆菌的活化：**从 -20 度冰箱里取出保存的农杆菌，在无菌操作台上吸取少量放入 LB 液体培养基中或者划线培养，挑取单菌落接种到液体 LB 培养基中，加入 50mg/l 的 Kan，200rpm，28℃ 摇菌过夜。需准备的物品及试剂：LB 液体培养基、灭菌的三角瓶 (50-100ml)、灭菌的枪头。
- **农杆菌的稀释及二次摇菌：**农杆菌培养物稀释到液体 MS 培养基中；二次摇菌需 6-10 小时，OD600 为 0.2~0.5 时可用于转化。需准备的物品及试剂：灭菌的三角瓶、枪头、2ml 的离心管。

5. 侵染：

于超净台上将经预培养的烟草叶片在农杆菌稀释液中浸 3 min，用灭菌的滤纸吸去多余菌液后，继续放置在原来的培养基中。

6. 共培养(暗培养)：

25℃条件下暗培养，共培养 2-4 天，待叶片周围有白色菌产生。

7. 选择培养:

将共培养的叶片转移至烟草再生培养基并附加 500 mg/L 羧苄青霉素或者 250mg/L 头孢霉素、50 mg/L 卡那霉素。转移至光下在 16 h 白天、8 h 黑夜的光周期和 25℃条件下选择培养。(观察拍照)

8. 继代培养:

选择培养 2~3 周后，将分化的抗性不定芽转入相应的选择培养基中进行继代扩繁培养。

9. 生根培养:

将生长至长 1 cm 以上的小苗转移到含 300 mg/L 羧苄青霉素、30 mg/L 卡那霉素的固体 MS 培养基上诱导生根。约 2-3 周后可见根的形成，从而得到再生完整植株。筛选。生根培养基为 1/2MS 无激素培养基附加 500mg/l 的头孢霉素+ 100mg/l 卡那霉素。(观察拍照)

10. 移栽:

待这些完整植株生长到大约 5 cm 时，并具有完整的根系后，移栽到花盆中，使之在温室中继续生长。

Part III 转基因植株的检测

一、 *gus* (β - 葡萄糖苷酸酶基因)的检测(组织化学定位染色法)

实验目的:

通过组织化学定位染色对转基因植株进行 GUS 活性检测。

实验原理:

gus 来源于大肠杆菌染色体的 *uidA* 位点。在一定条件下与 X-glucuronic acid (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-glucuronic acid)底物发生作用,发生蓝色沉淀反应,可以直接观察到植物组织由沉淀形成的蓝色斑点。

试剂:

■ X-Gluc 染色液的配制:

母液浓度	加入体积	终浓度
0.2M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (pH7.0)	50ml	100mM
0.5M EDTA(pH7.0)	0.2ml	1mM
铁氰化钾	0.0164g	0.05mM
亚铁氰化钾	0.0212g	0.05mM
Triton X-100	0.1ml	0.1%
无菌水	49.7ml	
总体积	100ml	

注: 121℃灭菌, 母液两周内使用有效, 最好现用现配

■ X-Gluc 反应液:

1mg X-Gluc 用 20 μ l DMSO (二甲基亚砷) 或 N, N-二甲酰氨 (DMF) 溶解后, 加 4ml 染色液母液, 所得 X-Gluc 的浓度为 2mM

■ 一般固定液:

1% 甲醛, 50mM 磷酸钠缓冲液, 0.05% Triton X-100(Tween-20)

■ 原生质体固定液

1% 甲醛, 0.3~0.6M 甘露醇, 10mM MES(甲基乙烷磺酸)pH5.6

■ FAA 固定液:

5% 甲醛, 5% 乙酸, 5% 乙醇

实验程序:

1. 材料的准备:

- 瞬时表达检测取侵染后 1~5 d 的材料, 稳定表达检测取转化后处理 6 周后的材料
- 叶片、幼根等制成徒手切片(小块、小片)
- 悬浮细胞、原生质体低速离心收集, 用无菌水等渗液洗涤
- 清洁的愈伤组织可直接使用

2. 染色:

■ 直接染色法

- ① 将准备好的试材浸泡在染液中, 于 25~37 °C 保温 1hr 至过夜;
- ② 叶片等绿色材料转入 70%乙醇中脱色 2~3 次, 至阴性对照材料呈白色;
- ③ 肉眼或显微镜下观察, 白色背景上的蓝色小点即为 GUS 表达位点。实验结果拍照记录。

■ 固定染色法

- ① 将材料浸入固定液, 必要时抽真空 1min, 室温下轻摇 30~60min;
- ② 取出材料, 用磷酸钠缓冲液漂洗 3~4 次;
- ③ 将试材放入 1.5ml 无菌离心管中, 加入染色液, 浸没材料, 盖上管盖, 于 37 °C 水浴中保温几分钟至过夜;
- ④ 取出材料, 用 75%的乙醇漂洗, 或放入 FAA 固定液中处理 20min;
- ⑤ 先后用 20%、50%乙醇各浸泡 20min 以上;
- ⑥ 显微镜下观察, 白色背景上的蓝色斑点即为 GUS 表达位点; 实验结果拍照记录。
- ⑦ 染色后的材料可浸入含 80%乙醇的 FAA 固定液中保存。

■ 注意事项:

- ① 实验要设阴性对照, 阴性对照应无蓝色出现, 如产生蓝色即为本底。其原因可能有: a. 试材或试剂的污染, 尤其是材料的内生菌; b 染色时间过长, 时间越长, 假阳性率增加。
- ② 在需要进行较长时间染色时染色液中应加入 0.02%NaN₃ 或 100 µg/ml 的氯霉素, 以便抑制细菌生长, 减少本底。
- ③ 叶绿素含量高的试材染色后一定要进行脱色
- ④ 含多酚、木质素多的试材染色过程中会发生褐化, 样品呈现褐色而掩盖 GUS 着色。可将染色后的材料放到 75%乳酸水溶液中, 在 1 磅压力下加热 15min, 此法对烟草、马铃薯有效。

二、转基因植株的 PCR 检测

实验目的:

1. 快速提取转基因植株的基因组 DNA。
2. 通过 PCR 反应对基因转化植株进行快速检测。

实验原理:

依据 PCR 原理, 通过基因特异引物对转基因植株中外源目的基因进行特异扩增, 从而判断是否为转基因植株。

实验试剂、药品:

——液氮

——1 × CTAB 缓冲液: 50mmol/L Tris-HCl pH8, 0.7mol/L NaCl, 10mmol/L EDTA pH8, 1% CTAB, 20mmol/L 2-巯基乙醇 (用前加入)

——氯仿/异戊醇 (24: 1)

——RNase A: 2000 U/ml, 用 0.15mol/L NaCl, 0.015mol/L 柠檬酸三钠配成 10mg/ml; 使用前 100℃ 热处理 15min 除去残留的 DNase 活性

——异丙醇

——无水乙醇, 3mol/L 乙酸钠

——70%乙醇

——TE 缓冲液: 10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA pH8

——PCR 引物及反应试剂等。

仪器设备:

——PCR 仪

——电泳设备

——离心机

——凝胶摄影仪

——水浴锅

——天平

——研钵和杵子

——37、65 水浴

——移液枪

——离心管、枪头等各种耗材

植物材料:

——转基因植株、对照植株

实验程序:

1. 转化植株的 DNA 的分离(CTAB 法)

- ① 取 0.5g 材料于液氮中研成粉末,移至预热的 500 μ l 2 $\times$ CTAB 缓冲液中(2%CTAB, 100 mmol/L Tris-Cl, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mmol/L NaCl, pH=8.0), 轻轻转动离心管, 混匀, 然后置于 65 $^{\circ}$ C 水浴放置 60min。
- ② 混合物冷至室温后加入等体积的氯仿/异戊醇。轻轻颠倒离心管几次使管内混合物成乳浊液。室温下 10000rpm 离心 10min 分相。
- ③ 将上清液(水相)移至一干净离心管中, 加入 1/100 体积的 RNaseA 贮液, 颠倒混匀, 37 $^{\circ}$ C 保温 30min。
- ④ 2/3 体积异丙醇沉淀, 混匀, 室温下 10000rpm 离心 10min, 沉淀 DNA。
- ⑤ 70%乙醇清洗沉淀。
- ⑥ 将 DNA 空气干燥 15min, 溶于 TE 缓冲液中。4 $^{\circ}$ C 保存备用。

2. PCR 反应

■ 引物序列

GUS 基因:

GUSF:5-AGTCGAC ATGTTACGTCCTGTAGAAACCCCA **-3(Sall)**

GUSR:5-ACTGCAG TCATTGTTTGCCTCCCTGCT **-3(PstI)**

GFP 基因:

GFPF: 5-AGAGCTC ATGGTAGATCTGACTAGTAAA **-3(SacI)**

GFPR: 5-AGGTACC TCACACGTGGTGGTGGTG **-3(KpnI)**

■ 反应体系

成分	体积
DNA 模板	1 μ L
上游引物 (10 pmol/ μ L)	0.4 μ L
下游引物 (10 pmol/ μ L)	0.4 μ L
10 $\times$ PCR buffer	2 μ L
25 mM MgCl ₂	1.6 μ L
2.5 mM dNTP	1.6 μ L
Taq 酶(4,5units/ μ L)	0.3 μ L
ddH ₂ O	12.7 μ L
Total volume	20 μ L

■ 反应条件

用转化植株的总 DNA 为模板，未转化植株作阴性对照，重组质粒作阳性对照，进行 PCR 扩增反应，

反应条件为：94℃预变性 5 min 后，94℃变性 30 sec，46~60℃退火 40 sec，72℃延伸 1 min，进行 30 个循环，最后 72℃延伸 10 min，4℃保存。

■ 电泳检测

PCR 产物在 1%~1.5% 的 agarose 胶上电泳，拍照。

总体要求

1. 通过此次实验，要求掌握基因工程的基本操作技术，熟悉植物基因工程的基本流程，进一步加深理解基因工程的基本原理。
2. 严格按照学报(参照北京林业大学学报)格式要求(题目、作者姓名、专业班级、中英文摘要、材料、方法、结果分析、讨论、参考文献)，写一篇研究报告，要求图表清楚规范。