

烟曲霉脂肪酶编码基因的克隆与表达分析

接入载体: pET-28a(+), 外源基因: AFL-1, PCR 产物直接酶切 (**NdeI/BamHI**) 后纯化连接 pET-28a(+)

外源基因信息: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=3504452>

AFL1-1 (Gene ID=3504452) 序列信息统计如下:

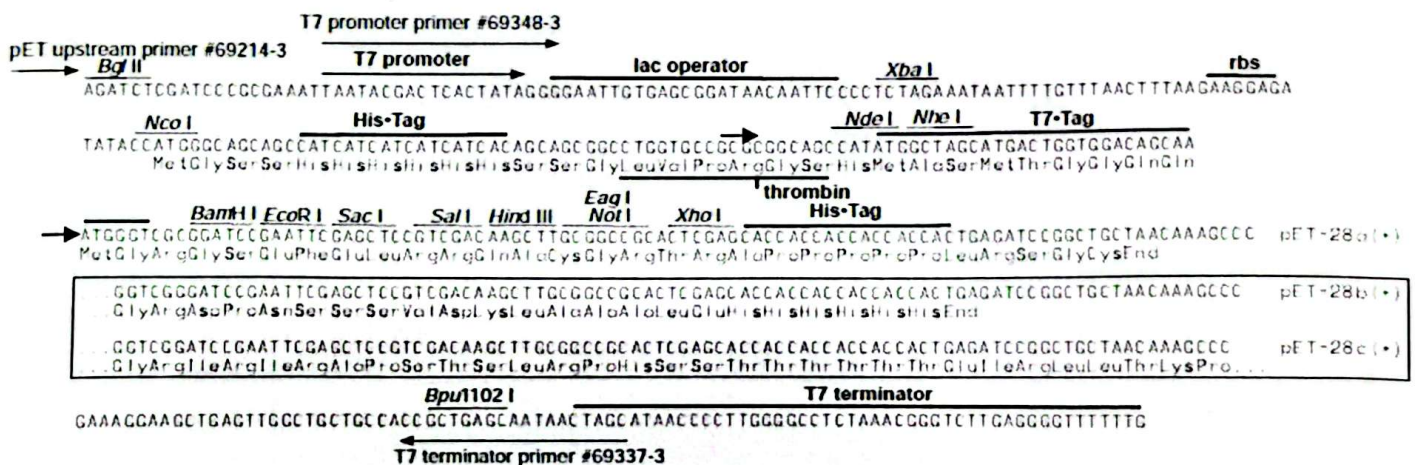
```
1 atggcttctc caattctgcg atcacggatt acttcggacc tcgccaacgt aacacccgat
61 ttggtggatg ttagcactcc cgaaaaattg aaatcctacc gcgaatcact tgaaccaatc
121 ttcacttttg agaatatcat ccgagggaaa gagaacatca tctcctacga ggaactggac
181 atcccaggcc ccgcaggacc gatgcggggc accatcttcc gcccgaagca ccaaaccac
241 cctatcgatg aaatccctgg tatcctacac atccacggcg ggggcctcgc cacgggaaac
301 cgcttctcgg gcttcaccat gtcgactgg gtcgagtcgc tcggtgccgt ctgcctgacg
361 gccgagtacc gtctcgcccc ggaacatcac cagcccgcgc agctggaaga cagctacgcc
421 gcgctgcagt ggatgagcga ccacgcgcgc gagctgggct tcaaccgcgc caagctgggt
481 gtctgcggta gtcgcggggg gggcaatctc acggcggggg tcaccttact cgcgcgggac
541 cgctcggggc cgcaaatecg cggccagggt ttgatctatc cgtgggttga cgatggcatg
601 gactacgtgt ccatgcggca gtatgcggat attgcgcctg tgagggacgt ggacgcgcgc
661 gtgttggtta attatgcgtt tggcgagagg cgcgagcacg cggatatgta tactgtgccg
721 atgcgcgcga cgaatttcgc gggttgccc ccgacgttta tcgatgtggg tgaggcggat
781 gtgtttcgtg atcaggatat cgcgtacgcg tcggctttgt ggaaggatgg tgtctcgact
841 gagttgcata tgtggccggg cagttggcat gggtttgatg tctttgttcc tgatgctccc
901 attagtcggc gggcgagggc tgctcggttg gaatggcttc ggaagttggt aagtgtgcct
```

外源基因 PCR 扩增引物序列:

P1: 5' GCGCGGCAGC CAT ATG GCT TCT CCA ATT CTG CGA 3'

P2: 5' GCTCGAATTC GGA TCC AGG CAC ACT TAA CAA CTT CCG AAG 3'

N 端保留了标签, 用于亲和层析



pET-28a-c(+) cloning/expression region

实验流程安排

实验准备

实验物品准备→移液器使用→实验总体克隆方案→整个实验周期内需要注意的问题（实验的连续性及空余时间的利用、实验的安全）→实验报告与总结报告

外源基因的制备和载体质粒的制备

涉及实验：PCR、电泳、质粒抽提

掌握实验原理：PCR 及基本要素和注意点、电泳、回收、质粒抽提

实验顺序：PCR 扩增→电泳→纯化→抽提质粒→电泳

进度限制点：PCR 为统一开机，需要所有同学完成后进行

上交样品：外源基因回收样品和载体质粒样品，标记好组号

外源基因的 PCR 制备体系

	1 [#]	2 [#]
总体积	50 μL	50 μL
ddH ₂ O	35 μL	34 μL
10 × buffer	5 μL	5 μL
dNTP (2.5 mM)	4 μL	4 μL
P1 (5 pmol/ μL)	2 μL	2 μL
P2 (5 pmol/ μL)	2 μL	2 μL
模板 DNA	1 μL	2 μL
Taq 酶 (5 U/ μL)	0.25 μL	0.5 μL

PCR 反应条件：退火温度 61 °C 30 s，延伸时间 1 min。

预变性：95 °C，5 min

变性 95 °C，30 s

退火 61 °C，30 s

延伸 72 °C，1 min

延伸 72 °C，10 min，

4 °C 保存；或取出实验；或取出后 -20 °C 保存。

} 30 循环

PCR 产物纯化：产品说明书

质粒提取：产品说明书

思考问题：

1. PCR 中的退火温度和延伸时间如何确定？产物浓度不高的原因？
2. PCR 实验中如果出现无产物，该如何分析原因？
3. PCR 扩增产物如果保证其准确性？如果出现扩增基因点突变时，有何解决方法？
4. 电泳中针对 300 bp 和 5.6 kb 的片段，胶浓度如何选择？
5. 质粒的拷贝数通常有哪些？对于低拷贝质粒的制备该如何进行？
6. 未酶切的质粒正常带型是如何分布的？如出现异常现象该如何处理？

外源片段与载体片段的酶切与回收

涉及实验：酶切、电泳、回收、连接

掌握实验原理：联合酶切与连接体系确定

实验顺序：预酶切→电泳→放大酶切→电泳回收→电泳→连接

进度限制点：均为各组独立实验，无限制点

上交样品：外源酶切片段（E）与载体酶切片段（F），连接（L）及对照（LC），需标记组号

载体质粒双酶切

总体积	40 μ L
ddH ₂ O	34-X μ L
10 \times buffer	4 μ L
质粒 DNA	X μ L
NdeI/BamHI	1+1 μ L

酶切反应条件：37 $^{\circ}$ C水浴保温 30 min。

连接体系

Σ	10 \times Buffer	载体片段	外源片段	T4 DNA 连接酶
15 μ L	1.5 μ L	X μ L	Y μ L	0.5 μ L

连接对照

Σ	10 \times Buffer	载体片段	外源片段	ddH ₂ O
15 μ L	1.5 μ L	X μ L	Y μ L	0.5 μ L

连接反应条件：4 $^{\circ}$ C水浴保温过夜。

DNA 片段回收：胶回收试剂盒说明书

思考问题：

- 1、胶回收过程中出现无产物带时，如何选择原因？
- 2、双酶切如发生酶切不完全时，产物带如何分析？在电泳中如果观察？
- 3、大体积酶切（如 1 mL 体积，DNA 量为毫克级）该如何设计酶切体系和酶切时间？
- 4、重组质粒构建中外源和载体的投入量如何确定？针对不同粘性末端的 DNA 片段连接该注意什么？

感受态细胞制备与转化

涉及实验：感受态细胞制备、电泳、转化

掌握实验原理：细菌细胞感受状态、连接效果分析、转化

实验顺序：翻瓶（7:30）→感受态细胞制备→连接样品电泳→转化→涂板

进度限制点：冷冻离心和超净台公用

上交样品：涂布平板 5 块/组，统一放置 37 °C 培养箱

大肠杆菌感受态细胞的制备

1. 用牙签挑取少许宿主菌保藏液稀释划线于 LB 固体培养基上，37 °C 下隔夜培养。
2. 挑取单菌落接种于 30 mL LB 液体培养基中，37 °C 下隔夜培养。
3. 按 1% 的接种量将大肠杆菌菌液接种于 30 mL LB 培养基中。
4. 在 37 °C 的水浴摇床中培养 1.5 h，OD₆₀₀ 接近 0.5。（以上步骤教师完成）
5. 4 °C，6 000 rpm 离心 10 分钟收获菌体。 1.0mL/管，4 管/组
6. 上述菌体沉淀用 100 μL/管的 100 mmol/L CaCl₂（冰冻）悬浮，并合并于一管，4 °C，6 000 rpm 离心 10 min。
7. 弃上清，将沉淀用 100 μL 的 100 mmol/L CaCl₂（冰冻）重新悬浮。
8. 冰水浴中放置 3-5 h 放可使用。

连接效果分析：连接样品和对照各取 5 μL 电泳

大肠杆菌的转化

1. 取一管已制备好的大肠杆菌感受态细胞置于冰水浴中。
2. 在 90 μL 感受态细胞悬浮液，加入 10 μL DNA 连接溶液，轻轻混匀，在冰水浴中放置 30 min。
3. 混匀，42 °C 水浴中脉冲 2 min，快速转移至冰水浴中，加入 900 μL LB 培养基，37 °C 摇床培养 1~1.5 h。
（42 °C 热脉冲前混匀菌体）
4. 吸取适量已转化的感受态细胞涂布于 100 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板上。
（涂布量确定？本次实验离心后弃上清 850 μL，离心条件 4 °C，6000 rpm，5 min）
5. 37 °C 下倒置培养 12~16 h 后计数。

思考问题：

1. 大肠杆菌转化除了感受态细胞转化方法外，还有哪些方法？
2. DNA 连接过程中如何分析连接效果？
3. 转化子筛选原理？一般筛选中还有哪些方法？
4. 转化完成最后筛选平板上几乎没有转化子，转化失败可能的原因有哪些？

重组子的鉴定

涉及实验：转化计数、菌落 PCR、快抽质粒

掌握实验原理：转化子与重组子、质粒快抽、表达宿主中基因表达的调控方式

实验顺序：菌落 PCR→电泳→快抽质粒→酶切→电泳

进度限制点：PCR 为统一开机，需要所有同学完成后进行

上交样品：扩增平板 1 块/组，统一放置 37 °C 培养箱，快抽质粒若干

菌落 PCR

总体积	25 μ L	
ddH ₂ O	10 μ L	
2×MIX	12.5 μ L	
P1 (5 pmol/ μ L)	1 μ L	
P2 (5 pmol/ μ L)	1 μ L	
模板 DNA (菌液)	0.5 μ L	每组完成 4 个菌落的 PCR 鉴定；

PCR 反应条件：退火温度 61 °C 30 s，延伸时间 1 min。

预变性：95 °C，5 min，

变性 95 °C，30 s，

退火 61 °C，30 s，

延伸 72 °C，1 min，

延伸 72 °C，10 min，

4 °C 保存。

} 30 循环

沸水浴法快抽大肠杆菌质粒 DNA

1. 在 Eppendorf 管中加入 110 μ L 的 STET (8%蔗糖、5% TritonX-100、50 mM Tris-HCl、50 mM EDTA, pH 8.0, 使用前加入溶菌酶至终浓度为 5 μ g/mL) 溶液，挑入小米粒大小的菌团，充分悬浮并混匀。
2. 上述菌体悬浮液沸水煮 20 s。
3. 迅速放置于常温下 15 000 rpm 离心 15 min。
4. 用牙签挑去菌体碎片 (白色沉淀)，在上清液中加入 100 μ L 的异丙醇 (注意不同样品管中的溶液平衡)，充分混匀后 15 000 rpm 离心 15 min。
5. 弃上清液，沿管壁四周加入 70%冰乙醇 400 μ L 洗涤上述所得 DNA 样品，完毕后弃上清，管子倒扣 10 s 左右，然后将 DNA 沉淀凉干。
6. 沉淀凉干后用 50 μ L 无菌重蒸水溶解，样品可取 5 μ L 酶切电泳分析或待用。

思考问题：

1. 菌落 PCR 的模板 DNA 来源何处？为何能直接以菌液模板进行 PCR？血液样品可否直接 PCR？
2. PCR 预混液主要包括哪些组份？如进行批量转化子的菌落 PCR 鉴定，如何实验可以大大节约时间？如果没有购买预混液，可否自行配制？如果进行？
3. 快抽质粒过程中，得到质粒浓度极低，可能的原因有哪些？
4. 比较本次实验中快抽质粒和连接样品转化后的转化效率的差异，分析产生这种差异的原因有哪些？

重组菌的表达

涉及实验：细菌 RNA 抽提、RT、电泳、蛋白电泳样品处理

掌握实验原理：RNA 抽提、RNA 电泳、RT、蛋白电泳样品处理

实验顺序：重组菌诱导表达→RNA 抽提→RNA 样品电泳→RT→电泳→蛋白电泳样品处理

进度限制点：RT 为统一开机，需要所有同学完成后进行

上交样品：cDNA、预处理蛋白样品

RNA 抽提：产品说明书

逆转录体系（电子产品说明书 RR037A）

Σ	5 × Buffer (含 dNTP)	Enzyme Mix	Oligo dT	Random 6mers	RNA	RNA Free dH ₂ O
10 μL	2 μL	0.5 μL	0.5 μL	0.5 μL	1 μL	5.5 μL
对照						
Σ	5 × Buffer	Enzyme Mix	Oligo dT	Random 6mers	RNA	RNA Free dH ₂ O
10 μL	2 μL	0 μL	0.5 μL	0.5 μL	1 μL	6 μL

逆转录反应条件：37 °C 15 min, 85 °C 5 s

思考问题：

1. 细菌 RNA 的半衰期特点？如何判断 RNA 的抽提质量？
2. 逆转录过程中需要注意 RNA 酶污染情况否？为什么？
3. 抽提 RNA 过程中为何要带手套和口罩？常规 DNA 电泳可以分析 RNA 抽提质量否？
4. RT-PCR 是定性分析外源基因表达情况？如果要进行定量分析外源基因表达情况，如何设定内参？

重组菌的转录和蛋白表达分析

涉及实验：RT-PCR、电泳、SDS-PAGE 灌胶、蛋白电泳

掌握实验原理：SDS-PAGE 电泳

实验顺序：制分离胶→RT-PCR→制浓缩胶→核酸电泳→蛋白电泳→染色→脱色

进度限制点：蛋白胶制备，RT-PCR 为统一开机，需要所有同学完成后进行

上交样品：无

SDS-PAGE 分离胶和浓缩胶配制

组 分	分离胶 (μL)	浓缩胶 (μL)
双蒸水	1650	2700
30%丙烯酰胺 (甲叉双丙烯酰胺)	2000	670
分离胶缓冲液 (pH 8.8)	1250	—
浓缩胶缓冲液 (pH 6.8)	—	500
10%SDS	50	40
10%过硫酸铵	50	40
TEMED	2.5	2.5
总体积	5000	4000

菌体电泳样的制备：将菌体均匀悬浮，测 OD₆₀₀，若>1，则稀释，离心，弃上清，按照 1 OD/mL 沉淀中加入 100 μL 1 × loading buffer (50 水 + 50 μL 2 × loading buffer)，悬浮，沸水浴 5 min，离心后，3 μL 上样。例如：若 OD₆₀₀ 为 0.6，体积为 0.5，则所得沉淀中相应加入，0.6 × 0.5=30 μL 1 × loading buffer (15 μL 水+15 μL 2 × loading buffer)。

RT-PCR

总体积	20 μL
ddH ₂ O	7 μL
2 × MIX	10 μL
P1 (5 pmol/μL)	1 μL
P2 (5 pmol/μL)	1 μL
模板 DNA (逆转录液)	1 μL

PCR 反应条件：退火温度 61 °C 30 s，延伸时间 1 min。

预变性：95 °C，5 min，	
变性 95 °C，30 s，	} 35 循环
退火 61 °C，30 s，	
延伸 72 °C，1 min，	
延伸 72 °C，10 min，	
4 °C 保存。	

思考问题：

- 1. 蛋白电泳中胶浓度如何选择？分离胶和浓缩胶各自的作用是什么？
- 2. 蛋白电泳中如何判断基因是否表达出蛋白产物？