

## 简述基因的克隆和表达的步骤

- 1) 获得目的基因和质粒载体；
- 2) 形成重组质粒；
- 3) 制备感受态细胞，用重组质粒转化大肠杆菌细胞；
- 4) 培养大肠杆菌，让重组质粒及外源目的基因形成大量拷贝；
- 5) 筛选含重组质粒的大肠杆菌细胞，进行检查或鉴定；
- 6) 表达目的蛋白。

## 实验一：质粒 DNA 的提取及鉴定

### 1. 分子生物学实验常用载体有哪些？它们的特点是什么？

常用载体：大肠杆菌中的质粒、噬菌体、M13 噬菌体、噬菌粒、酵母人工染色体载体、动植物病毒载体。

特点：具有复制子（一段具特殊结构的 DNA 序列，使与之结合的外源基因复制）、可检测的遗传表型、限制性内切酶单一识别位点（便于外源基因插入）、适合的拷贝数（有利于载体制备；使细胞中克隆基因的剂量增加）

### 2. 分离基因组 DNA 和质粒 DNA 有哪些异同点？

相同：提取的步骤基本上都属 DNA 的提取步骤，包括细胞裂解，DNA 释放，纯化，最后沉淀溶解。

不同：质粒提取过程中，有一个 DNA 变性、复性的过程，这个与基因组提取完全不同，这是利用质粒是以超螺旋结构存在于大肠杆菌中的特殊状态，分离纯化质粒时总是会利用这个特点来分离基因组 DNA 与质粒 DNA。

### 3. 核酸分离过程中，酚、氯仿、异戊醇的作用是什么？

#### 1) 酚、氯仿作用是变性蛋白质。

酚与氯仿是非极性分子，水是极性分子，当蛋白水溶液与酚或氯仿混合时，蛋白质分子之间的水分子就被酚或氯仿挤去，使蛋白失去水合状态而变性。经过离心，变性蛋白质的密度比水的密度为大，因而与水相分离，沉淀在水相下面，从而与溶解在水相中的 DNA 分开。而酚与氯仿有机溶剂比重更大，保留在最下层。作为表面变性的酚与氯仿，在去除蛋白质的作用中，各有利弊，酚的变性作用大，但酚与水相有一定程度的互溶，大约 10% ~ 15% 的水溶解在酚相中，因而损失了这部分水相中的 DNA，而氯仿的变性作用不如酚效果好，但氯仿与水不相混溶，不会带走 DNA。所以在抽提过程中，混合使用酚与氯仿效果最好。经酚第一次抽提后的水相中有残留的酚，由于酚与氯仿是互溶的，可用氯仿第二次变性蛋白质，此时一起将酚带走。也可以在第二次抽提时，将酚与氯仿混合（1:1）使用。

#### 2) 异戊醇是消泡剂。

在抽提 DNA 时，为了混合均匀，必须剧烈振荡容器数次，这时在混合液内易产生气泡，气泡会阻止相互间的充分作用。加入异戊醇能降低分子表面张力，所以能减少抽提过程中的泡沫产生。一般采用氯仿与异戊醇为 24：1之比。也可采用酚、氯仿与异戊醇之比为 25：24:1（不必先配制，可在临用前把一份酚加一份 24：1的氯仿与异戊醇即成），同时异戊醇有助于分相，使离心后的上层水相，中层变性蛋白相以及下层有机溶剂相维持稳定。

4.在 TE 缓冲液中为什么要加入 EDTA ？

EDTA 是为了螯合  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 等金属离子，抑制 Dnase

5.纯化的核酸如有酚和蛋白质的污染，对它的后期操作有何影响？

DNA 制品中的蛋白质、酚污染会降低内切酶的活性，影响酶切效果。（好像还有什么的，想不起来了）

6.有哪些因素影响核酸的沉淀？

7. 提质粒时，溶液 2为什么现配现用？

溶液 2中的主要成分是 NaOH 和 SDS 。NaOH 是裂解细胞膜的主要成分，长时间与空气接触会吸收二氧化碳，导致碱性下降，不利于破碎细胞，影响质粒的产量。

8. 加入溶液 3后产生的白色沉淀成分是什么？

钾离子置换了 SDS 中的钠离子形成了不溶性的 PDS。SDS 专门和蛋白质结合，平均两个氨基酸上结合一个 SDS 分子，钾钠离子置换所产生的大量沉淀自然就将绝大部分蛋白质沉淀了，大肠杆菌的基因组 DNA 也一起被共沉淀了。

9. 为什么用 TE 缓冲液悬浮和保存质粒更好？

TE 是 Tris-HCl 和 EDTA 的简称。在后续对质粒的操作中，不同的酶对辅助因子的种类及数量要求不同，有的要求高离子浓度，有的则要求低盐浓度，其他缓冲液系统（如磷酸盐缓冲系统（ $pK_a=7.2$ ）和硼酸系统（ $pK_a=9.24$ ）等）虽然也都符合细胞内环境的生理范围，可作 DNA 的保存液，但在转化实验时，磷酸根离子的种类及数量将与  $Ca^{2+}$ 产生  $Ca_3(PO_4)_2$ 沉淀。而 Tris-HCL( $pK_a=8.0$ ) 缓冲系统使用缓冲对是  $TrisH^+/Tris$ ，不存在金属离子的干扰作用，故在提取或保存 DNA 时，大都采用 Tris-HCL 系统，而 TE 缓冲液中的 EDTA 更能稳定 DNA 的活性。不存在金属离子，不产生干扰作用

10. 碱裂解法的原理和步骤（步骤见 ppt）

原理：根据共价闭合环状质粒 DNA 和线性染色体 DNA 在拓扑学上的差异来分离质粒 DNA。

在  $pH12.0-12.5$ ，线性的 DNA 双螺旋结构解开而被变性，尽管在这样的条件下，质粒 DNA

的氢键断裂，但两条互补链仍紧密结合。

当加入 pH4.8的 KAc 高盐缓冲液中和 pH 至中性时，共价闭合环状的质粒 DNA 复性迅速而准确，而线性的染色体 DNA 的两条互补链彼此已完全分开，复性慢，缠绕形成网状结构。通过离心，染色体 DNA 与 RNA、蛋白质 -SDS 复合物等一起絮状沉淀下来而被除去。

#### 11.酚抽提的酚的两个作用

使蛋白质变性沉降、抑制 DNase 活性

—

#### 实验二、质粒 DNA 的酶切鉴定及电泳检测

##### 1. 对核酸进行限制性酶切时应注意什么？

保证样品纯度（DNA 制品中的污染蛋白质、酚、氯仿、乙醇、EDTA、SDS 等会影响内切酶活性）对于酶切条件的控制（合适的酶反应体积、酶作用单位、反应时间）

##### 2. 如何提高核酸电泳的分辨率？

主要的是加大琼脂糖凝胶的密度，还可以降低跑电泳的电压，增大跑电泳的时间等。

#### 实验三、DNA 片段的回收及连接反应

##### 1. 单酶切重组 DNA 有哪些弊端，如何避免？

弊端：末端相同，可能发生自连，产生大量无效连接产物；插入片段没有方向性

避免方法：使用双酶切；若用单酶切，可以将载体 5' 末端去磷酸化，并提高插入片段与载体的浓度比。

##### 2. 在不计算 DNA 片段浓度的情况下，如何快速简便的估算连接片段的比例？

##### 3. DNA 连接反应的原理步骤、两种常用的筛选方法（见 ppt）

##### 4. 质粒重组的影响因素？

反应温度；连接酶的用量；DNA 末端的性质；DNA 浓度及两种 DNA 分子数的比例

##### 5. 连接时目的基因和载体的最佳摩尔比

最佳比例是由构造及末端的类型决定的，一般需要较高的插入片段与载体的摩尔比例，如 2：1 甚至 5：1。

##### 6. DNA 回收照胶紫外线使用短波还是长波？

应使用长波紫外灯。因为短波紫外线（254nm）会引起 DNA 链断裂，或是造成基因突变。

##### 7. DNA 连接反应的原理步骤

##### 8. 乙醇中为什么不加盐？

参考答案：洗的时候不加盐是为了除盐，做乙醇沉淀时加盐是因为单价阳离子有利于聚沉 DNA

9. DNA 连接酶两个主要特点是什么；

催化 DNA 5' 磷酸基与 3' 羟基之间（切口）形成磷酸二酯键； DNA 连接酶只能作用于双链 DNA 分子而不能将二个单链 DNA 分子连接（这个算不算？）。

10. 连接反应体系的加样顺序是什么

ddH<sub>2</sub>O, 10×缓冲液, DNA 片段, 最后加 T4DNA 连接酶

11. 在设计酶切和连接的时候，应该特别注意什么？

阅读框的保证

#### 实验四、感受态细胞的制备与重组 DNA 的转化

1. 如阴性对照中长出菌，可能原因是什么？

污染 .....

2. 菌的密度过高或培养时间过长时，会在阳性菌的周围长出一些小的卫星菌落，它们是非 Kan 抗性的，试分析原因。

阳性菌能编码一种周质酶（内酰胺酶）可特异地切割 Amp 的内酰胺环，从而使其失去杀菌能力。培养时间过长，内酰胺酶使周围抗生素的降解，使得不带抗性的菌也能生长，形成卫星菌落。

3. 制作感受态细胞中最关键的操作？

4. 重组子两种常用的筛选方法

抗生素筛选法：

菌株为某种抗性缺陷型，而质粒上带有该抗性基因（如氨苄青霉素（Amp<sup>r</sup>）抗性基因编码一种周质酶（内酰胺酶）可特异地切割 Amp 的内酰胺环，从而使其失去杀菌能力。）这样只有转化子才能在含该抗生素的培养基上长出。

互补法：

又称蓝白斑筛选法，质粒上 LacZ 基因编码的肽链与受体菌中编码的半乳糖苷酶 C 端突变体互补，形成有功能的半乳糖苷酶，在特定培养基上显蓝斑，这种现象称为互补。如果有外源 DNA 片段插入质粒上的 LacZ 基因中，则半乳糖苷酶失活，显白斑。

6. 影响转化效率的因素

细菌的生长状态：大肠杆菌在对数中期易产生感受态（OD 值：0.3 - 0.5 (5×10<sup>7</sup> 个/ml)）；试剂的质量；化合物及无机离子（Rb<sup>+</sup>、Mn<sup>+</sup>、二甲亚砜等）；质粒：大小、构型；外源 DNA（质粒）与细胞的比例；器皿的洁净度；污染（尽量所有打开器皿盖的操作都在超净台中进行）

## 7.转化效率计算

转化效率 (每微克质粒 DNA 的转化子数) = 转化子总数 (个转化子) / 加入质粒 DNA 的量 (μg)

转化子总数 = 菌落数 × (转化反应原液总体积 / 涂板菌液体积)

## 8.简述蓝白斑检测原理

质粒上 LacZ 基因编码的 肽链与受体菌中编码的 半乳糖苷酶 C 端突变体互补，形成有功能的 半乳糖苷酶，在特定培养基上显蓝斑，这种现象称为 互补。如果有外源 DNA 片段插入质粒上的 LacZ 基因中，则 半乳糖苷酶失活，显白斑。

## 实验五、重组克隆的鉴定（菌落 PCR 检测），接种培养

### 1.PCR 变性，退火，延伸温度

( 95 预变性 5 min )

94 变性 45 sec

50 退火 45 sec

72 延伸 45 sec

### 2 . 怎么计算 PCR 退火温度 Tm-5

### 3. PCR 中如果出现非特异的条带，可能是哪些方面出现问题，应该如何调整？

### 4. 减少错掺的对策：

加入 Taq 酶后迅速反应，避免低温下进行的链延伸；酶浓度不可过大；dNTP 不可过浓；Mg<sup>2+</sup> 浓度适中

## 实验六、重组克隆子的酶切鉴定

### 1. 比较 菌落 PCR 和 提质粒酶切 这两种方法的优缺点，为什么需要两次鉴定？

菌落 PCR 快，灵敏，但是易出现假阳性，一般做初筛；提质粒酶切结果可靠，但是耗时比较长，一般做最终确定。

## 实验七、大肠杆菌 BL21 感受态细胞制备及重组 DNA 的转化

### 1. 简述 BL21 感受态制备和转化的步骤

## 实验八、蛋白质的诱导表达

### 1.BL21 和 DH5a 的比较

#### 1) DH5a 菌株

DH5a 是一种常用于质粒克隆的菌株。 E.coli DH5a 在使用 pUC 系列质粒载体转化时，可与载体编码的  $\alpha$ -半乳糖苷酶氨基端实现  $\alpha$ -互补。可用于蓝白斑筛选鉴别重组菌株。 DH5 质粒拷贝数高，用于质粒克隆、重组筛选、适合保存菌种，也可以表达某些蛋白

## 2) BL21(DE3) 菌株

该菌株用于高效表达克隆于含有噬菌体 T7 启动子的表达载体（如 pET 系列）的基因。 T7 噬菌体 RNA 聚合酶位于噬菌体 DE3 区，该区整合于 BL21 的染色体上。该菌适合表达非毒性蛋白。

### 2. IPTG 的作用原理（ppt）

3. 如何通过调节 IPTG 的浓度和温度来控制蛋白表达速度，从而提高蛋白的可溶性？

4. 在诱导表达时，对蛋白质表达的影响因素？

### 5. 原核表达系统的特点

其遗传图谱明确，容易培养且费用低，生产成本低廉。

?细菌 RNA 聚合酶不能识别真核基因启动子

?真核基因 mRNA 无 SD 序列，不能启动翻译

?缺乏转录后加工系统，不能切除内含子，cDNA,

?表达的蛋白不稳定，容易被细菌蛋白酶破坏

?缺乏翻译后加工体系

?可能形成不溶性的包涵体

6. 诱导表达蛋白为什么要使用 T4 噬菌体的启动子而不用大肠杆菌自己的启动子？

## 实验九、蛋白质的纯化

1. 在蛋白纯化过程中， lysis buffer，wash buffer 和 Elution buffer 中所含有的咪唑的作用是什么？

lysis buffer，wash buffer 中低浓度咪唑封闭多于结合位点，防止杂蛋白与镍离子结合。

Elution buffer 中高浓度咪唑与目的蛋白竞争镍离子，将目的蛋白洗脱下来。

## 实验十、诱导表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳检测

### 1. 蛋白电泳上样缓冲液的作用及煮沸的作用

蛋白电泳上样缓冲液包括 2%SDS，0.1%溴酚蓝 10%甘油，SDS 是保证样品中的所有蛋白带电荷一致，减少电荷对电泳结果的影响。还原剂是让二硫键处于断开状态，保证蛋白分子的线性。溴酚蓝作用是指示上样蛋白的跑胶时标记的，甘油是增加上样重量的，以免漂浮，煮沸

是使蛋白变性的永久保存。

2. SDS-PAGE 的应用有哪些？

- 1) 蛋白质纯度分析；
- 2) 蛋白质分析量的测定，根据迁移率大小测定蛋白质亚基的分子量；
- 3) 蛋白质浓度的测定；
- 4) 蛋白质水解的分析；
- 5) 免疫沉淀蛋白的鉴定；
- 6) 免疫印迹的第一步；
- 7) 蛋白质修饰的鉴定；
- 8) 分离和浓缩用于产生抗体的抗原；
- 9) 分离放射性标记的蛋白质；
- 10) 显示小分子多肽。

3. SDS-PAGE 电泳的原理和步骤（详见 ppt）

（我就考到了这一题，原理我才提到三个效应还没解释老师就让我过了）

4. 不连续的 SDS-PAGE 电泳过程中利用了哪些效应？

电荷效应、分子筛效应、浓缩效应

5. 过硫酸铵的作用是什么 引发剂

点样孔为什么是亮的？

主要是蛋白质污染，蛋白质无法跑出胶孔，所以点样孔周围会很亮。也可能是基因组 DNA 污染。（拔梳子搓了据说也会照出反光效果）

离心机的使用：

离心管的对称平衡；关好内盖及外盖； 设置离心速度和时间；转头完全停止后开盖； “ Short ” 键的使用。

培养皿为什么要倒置？

1) 由于重力的作用使培养基表面及次层能富集微生物生长所需的营养物质，利于微生物生长；

2) 防止空气中微生物的污染培养基及培养物：倒置时平板内的空气是不流动的，杂菌不会沉降到培养基表面，如果不倒置，很快平板周边会长起杂菌。

3) 倒置培养使琼脂里水分不易蒸发出去，而充分的保持琼脂的弹性与细菌容易繁殖和生存的环境。 如果不倒置， 大概 3天左右培养基就会出现龟裂等水分散失的情况。 而一些落菌等试验， 需验证培养基无菌， 就要先倒置培养 48小时才可作为模板做落菌， 水分散失是很重要的。

其他：

1) 由于现在一般拿平板的操作均为：小盖子朝向手心，五指张开抓住平板，大拇指推动平板的大盖子进行操作，所以倒置平板有利于操作。

2) 其他人打开培养箱的时候一不小心就把皿盖给打开了，倒置培养的时候不容易打开。

3) 倒置培养方便拿起来观察。

4) 培养过程中产生的水分在盖上聚成小水滴，可能滴到正在生长的菌落上而将其冲散，不容易辨别菌落特征，也不好计数。

怎么鉴定包涵体

参考：破菌、离心，然后分别取上清和沉淀 SDS-PAGE, 如果目的蛋白在沉淀，说明是包涵体

pcr 体系 short 的作用（ 2个）

混匀、把壁上的液体集中到管底