




生物实验室系列
Biology Lab Manual Series



Current Molecular Biology Techniques
and Tips

现代分子生物学技术 及实验技巧

叶棋浓 主编



化学工业出版社



Current Molecular Biology Techniques

and Tips

现代分子生物学技术 及实验技巧

叶棋浓 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

现代分子生物学技术及实验技巧/叶棋浓主编.
北京: 化学工业出版社, 2015. 8
(生物实验室系列)
ISBN 978-7-122-24502-1

I. ①现… II. ①叶… III. ①分子生物学-实验
IV. ①Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 149839 号

责任编辑: 傅四周
责任校对: 王素芹

装帧设计: 关 飞

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市胜利装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张 31 彩插 7 字数 768 千字 2015 年 10 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888(传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 149.00 元

版权所有 违者必究

编写人员名单

主 编 叶棋浓

编 者 (以姓氏笔画为序)

丁丽华	王 江	王 健	王友亮	王玉飞
王栋澍	王恒樑	叶华虎	叶棋浓	付 洁
冯尔玲	朱 力	朱 恒	刘 威	刘 婕
刘雨潇	刘珊珊	苏永锋	苏国富	李 环
李文龙	李伍举	李丽莉	李宗成	杨昭鹏
邹大阳	应晓敏	张 浩	张 毅	张广州
陆启轩	陈立涵	陈垚文	周建光	郑晓飞
胡娟峰	柯跃华	查 磊	袁 静	袁菊芳
徐 淞	徐小洁	程 龙	蔺 静	

出版者的话

21 世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20 世纪后叶，现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为 21 世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如 17 世纪 Leeuwenhoek 等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973 年 Cohn 和 Boyer 完成了 DNA 体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988 年 Kary Mullis 发明的 PCR 技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学每时每刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展了实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化学工业出版社组织出版了《生物实验室系列》图书。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介

绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，邀请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

《生物实验室系列》图书的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望《生物实验室系列》图书的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的科学工作者致以崇高的敬意！

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社

序

受作者之邀为本书作序，初看书名有点兴趣索然，因为关系生物技术方法的文章和著作比比皆是，不胜枚举。但在我浏览了全书以后，丰富的内容和写作技巧令我欣然命笔。

分子生物学技术开创于 20 世纪 70 年代，在这短短的时间里得到了飞速发展，大大推动了生物科学技术的发展，也已出版了不少关系这方面的文章和专著，但总觉得还有些不够解渴之处。例如很多文章在介绍具体方法之后，也列出实验结果，但没有对结果作详细分析，使初学者不得理解。

由军事医学科学院一批天天与分子生物学技术打交道的中青年科技工作者撰写的《现代分子生物学技术及实验技巧》一书，不仅内容全面、方法具体，而且所得结果尽可能用图或照片表示，对照图或照片对结果作详尽分析，使读者一目了然。书中还列举了每种方法的难点和解决办法。

本书的出版为研究生命科学的科技工作者的案头上又添加了一本实用的工具书，相信它能有益于提高科研工作的质量和效率，推动生物科技事业的发展。



中国科学院 院士

军事医学科学院 研究员

张学敏

2015 年 5 月 于北京

前 言

分子生物学是从分子水平对生物学进行研究的科学，自从现代分子生物学技术诞生以来，生命科学的发展得以大力推进，分子生物学技术在生物学、医学、农林业、制药学等多个领域得到了广泛的应用。该技术是目前从事生命科学研究的重要手段，是每个从事这个领域的科技工作者都必须熟练掌握的基本技能。

编写本书的目的在于弥补以往的书籍中对实验结果分析的缺乏，本书强调对实验结果作具体的分析，如需附结果的图或照片，图中要有阴阳性对照等。结合照片分析研究结果，列举实验中经常遇到的问题及可能的解决方法是本书的特色。读者阅后在实验结果解读和改进实验方法等方面都能豁然开朗。此外，本书在编写的内容上也力求全面，第一~六章包括分子克隆所需的技术，从基因的提取、克隆到目的基因的表达；第七~十三章分别介绍了包括双向电泳、蛋白质与核酸/蛋白质的相互作用、细菌体内 DNA 同源重组、基因打靶和转基因动物等；最后三章则对小 RNA、干细胞的分离培养与诱导分化技术以及非编码 RNA 数据库及在线分析工具进行了介绍。本书适用于所有从事生命科学研究的科技工作者、教师和研究生。

本书大多由工作在第一线的青年科技工作者和博士研究生撰写，由于时间仓促，加上编者水平有限，书中难免有疏漏和不妥之处，恳请读者指正。

叶棋浓

军事医学科学院生物工程研究所

2015 年 5 月 于北京

目 录

第一章 分子生物学技术概述	1
一、引言	1
二、目的基因的获取	1
三、克隆载体的构建和选择	2
四、载体的转化	2
五、重组子的筛选	3
六、基因表达	4
七、生物工程技术的应用	5
参考文献	6
第二章 核酸提取技术	7
第一节 质粒 DNA 的提取	7
一、引言	7
二、碱裂解法小量质粒提取所需的仪器、材料及基本步骤	8
三、Promega 质粒 DNA 小量提取试剂盒操作程序	9
四、注意事项	10
五、实验结果说明	10
六、疑难解析	10
第二节 基因组 DNA 的提取	12
一、引言	12
二、从植物组织提取基因组 DNA	13
三、从动物组织提取基因组 DNA	14
四、细菌基因组 DNA 的制备	15
五、用 DNA 提取试剂盒从全血和组织中提取基因组 DNA	15
六、注意事项	17
七、实验结果说明	18
八、疑难解析	18
第三节 RNA 的提取	19
一、引言	19
二、实验设计思路和基本步骤	20
三、实验结果说明	24
四、疑难解析	24
参考文献	25
第三章 目的基因的获取及鉴定技术	27
第一节 普通 PCR	27
一、普通 PCR 的基本概念和原理	27

二、普通 PCR 技术的实验方法	28
三、疑难解析	33
第二节 实时荧光定量 PCR	34
一、实时荧光定量 PCR 的基本概念和原理	34
二、实时荧光定量 PCR 的定量方法	38
三、荧光定量 PCR 的实验方法	43
四、荧光定量 PCR 技术的应用	48
五、疑难解析	54
第三节 环介导恒温扩增法快速检测病原菌	57
一、引言	57
二、环介导恒温核酸扩增的原理	58
三、实验设计思路和基本步骤	60
四、实验结果	68
五、疑难解析	69
六、小结	72
参考文献	74
第四章 载体的构建和鉴定	78
第一节 克隆载体	78
一、pBR322 载体	78
二、pUC8——一种 Lac 选择型质粒	80
三、pGEM3Z——克隆 DNA 的体外转录	80
四、柯斯质粒载体	81
第二节 表达载体	82
一、原核表达载体	82
二、真核表达载体	84
第三节 载体构建中的关键工具和步骤	90
一、关键工具	90
二、关键步骤	91
第四节 载体构建的应用举例	93
一、实验材料	93
二、实验方法	94
参考文献	98
第五章 细菌转化与细胞转染技术	100
第一节 细菌转化	100
一、基本原理	100
二、实验设计思路和基本步骤	101
三、实验结果及分析	102
四、疑难解析	102
第二节 细胞转染	104
一、基本原理	104

二、实验设计和基本步骤	107
三、实验结果及分析	108
四、疑难解析	109
参考文献	110

第六章 外源基因表达的鉴定

第一节 Northern Blot

一、引言	112
二、实验设计思路和基本步骤	112
三、实验结果说明	115
四、疑难解析	116

第二节 RT-PCR

一、引言	116
二、实验设计思路和基本步骤	117
三、实验结果说明	119
四、疑难解析	119

第三节 Western Blot

一、引言	120
二、实验设计思路和基本步骤	120
三、实验结果说明	125
四、疑难解析	125

第四节 ELISA

一、引言	126
二、实验设计思路和基本步骤	128
三、实验结果说明	130
四、疑难解析	131

参考文献

第七章 报告基因分析

第一节 报告基因的定义和种类

一、报告基因的定义	134
二、常用的报告基因	134

第二节 应用报告基因分析基因的转录活性

一、实验原理	135
二、实验设计和基本步骤	136
三、实验结果分析	137
四、疑难解析	139

第三节 报告基因在动物活体成像中的应用

一、实验原理	140
二、实验设计和基本步骤	142
三、实验结果分析	143
四、疑难解析	144

参考文献	145
第八章 差异基因表达谱分析	147
第一节 基于双向电泳技术的蛋白质组学分析	147
一、引言	147
二、实验基本步骤和注意事项	147
三、双向电泳实验结果说明及疑难解析	154
四、质谱数据分析说明及疑难解析	154
五、结语	160
第二节 基因芯片	160
一、引言	160
二、工作原理	161
第三节 基因芯片的制备	163
一、概述	163
二、探针的选择和制备	164
三、基因芯片基片的选择和准备	165
四、基因芯片的制作	166
第四节 基因芯片的检测	168
一、基因芯片的杂交和数据获取	168
二、基因芯片分析常用的软件和数据库	170
第五节 基因芯片的应用	171
一、基因芯片与病原微生物检测	171
二、基因芯片与肿瘤	172
三、基因芯片与药物研发	174
四、结束语	176
参考文献	177
第九章 蛋白质-核酸相互作用技术	178
第一节 凝胶迁移实验	178
一、引言	178
二、实验设计与基本步骤	179
三、实验举例与结果说明	184
四、需要注意的问题	186
第二节 染色质免疫共沉淀技术	187
一、引言	187
二、实验基本步骤	188
三、实验举例	190
四、实验注意事项	191
第三节 RNA 沉降	192
一、实验基本原理	192
二、实验基本思路	193
三、实验举例说明	198

参考文献	199
第十章 蛋白质-蛋白质相互作用技术	200
第一节 运用酵母双杂交技术筛选与靶蛋白相互作用的蛋白质	200
一、引言	200
二、实验设备及材料	201
三、实验设计流程	202
四、实验方法	202
五、实验结果说明	208
六、疑难解析	212
第二节 GST 沉降	213
一、实验基本原理	213
二、实验基本步骤	213
三、实验举例	216
四、实验注意事项	220
第三节 免疫共沉淀	221
一、引言	221
二、实验设计和基本步骤	222
三、实验结果举例	223
四、需要注意的问题	226
第四节 细胞共定位	226
一、引言	226
二、实验设计和基本步骤	227
三、实验结果举例说明	227
四、实验注意事项	229
参考文献	229
第十一章 微生物体内同源重组技术	231
第一节 传统的大肠杆菌体内同源重组方法 (RecA 重组系统)	231
一、引言	231
二、利用 RecA 重组系统构建痢疾杆菌 <i>hns</i> 基因插入突变体	231
三、RecA 重组系统构建突变体的其他方法	234
四、存在的问题和解决方法	235
五、小结	235
第二节 Red/ET 重组系统	236
一、引言	236
二、痢疾杆菌酸 <i>hns</i> 基因缺失突变体的构建	237
三、Red 同源重组技术应用策略	239
四、应用 Gap-Repair 克隆技术构建 pBR322-Red 载体	241
五、Red/ET 重组系统的其他应用	244
六、小结	244
参考文献	244

第十二章 转基因动物技术	246
第一节 转基因动物概述	246
一、转基因动物的概念	246
二、转基因动物的分类	246
三、转基因动物的命名	247
四、转基因动物的基本原理	248
五、转基因动物的安全性和伦理学问题	249
六、转基因动物技术的发展概况	250
第二节 显微注射法制备转基因动物	251
一、仪器设备及材料	251
二、实验动物准备	252
三、转基因动物制备方法	253
四、影响转基因动物效率的因素	256
第三节 利用 ES 细胞制备转基因动物	257
一、ES 细胞的研究历史	257
二、ES 细胞的生物学特性	257
三、ES 细胞分离培养的基本方法	258
四、ES 细胞的遗传修饰	262
五、转基因制备	269
参考文献	270
第十三章 基因打靶技术	271
一、基因打靶技术的原理	271
二、利用同源重组构建基因打靶动物模型的基本步骤	272
三、基因打靶的策略	274
四、基因打靶的生物学意义和应用前景	286
参考文献	287
第十四章 流式细胞术实验方法	291
一、引言	291
二、实验方法	294
三、实验结果分析	299
四、流式细胞分析的质量控制	309
参考文献	311
第十五章 干细胞的分离培养与诱导分化	313
第一节 人胎盘来源间充质干细胞的分离培养与纯化	313
一、引言	313
二、材料、试剂与主要仪器设备	314
三、实验方法	315
四、实验结果	318
五、注意事项	321

第二节 小鼠间充质干细胞的分离培养与纯化	324
一、引言	324
二、骨髓法	325
三、密质骨法	325
第三节 人胚胎干细胞的培养	334
一、引言	334
二、实验材料	335
三、实验方法	335
四、注意事项	339
第四节 CD34 ⁺ 造血干细胞与 CD14 ⁺ 单核细胞向树突状细胞的诱导分化	339
一、引言	339
二、实验材料与amp;方法	340
三、实验结果	343
四、注意事项	345
参考文献	346
第十六章 小 RNA 的构造及实验技术	351
第一节 miRNA 克隆	351
一、材料与设备	352
二、实验方法	352
三、疑难解析	355
第二节 miRNA Northern Blot	355
一、材料与设备	355
二、实验方法	356
三、疑难解析	357
第三节 miRNA 原位杂交	357
一、材料与设备	357
二、实验方法	358
三、疑难解析	359
第四节 基于 poly(A)加尾的 miRNA RT-PCR	359
一、材料与设备	359
二、实验方法	360
三、疑难解析	361
第五节 miRNA 功能研究	362
一、miRNA 表达检测	362
二、miRNA 功能筛选鉴定	362
三、miRNA 靶基因鉴定	364
第六节 siRNA 的构造及实验研究	365
一、引言	365
二、如何进行 siRNA 实验	368
三、常用 siRNA 实验的基本步骤	371

四、实验结果说明	374
五、疑难解析	376
参考文献	376
第十七章 非编码 RNA 数据库及在线分析工具介绍	379
一、综合性非编码 RNA 数据库	379
二、miRNA 相关数据库及预测	403
三、rRNA 相关数据库及预测	424
四、sRNA 相关数据库及预测	432
五、siRNA 相关数据库及预测	448
六、tRNA 相关数据库及预测	456
七、snoRNA 相关数据库及预测	471
参考文献	478

第一章

分子生物学技术概述

一、引言

基因的克隆是将目的基因用体外重组方法将它们插入克隆载体，形成重组克隆载体，通过转化与转染的方式，引入细胞，筛选重组子，经测序验证后，转染至合适的表达细胞，进行稳定表达或瞬时表达，再进行表达的分析 and 鉴定。下面从基因克隆方法、克隆载体的构建、细胞的转染、瞬时表达与稳定表达细胞克隆的建立、基因表达量分析的方法五个方面对分子生物学技术作概述，下续各章分别进行详细介绍。

二、目的基因的获取

目的基因的获取有下面几种方式。①鸟枪法^[1]。用限制性内切酶将供体细胞中的 DNA 切成许多片段，将这些片段分别载入运载体，然后通过运载体分别转入不同的受体细胞，让供体细胞所提供的 DNA（外源 DNA）的所有片段分别在受体细胞中大量复制，从中找出含有目的基因的细胞，再用一定的方法把带有目的基因的 DNA 片段分离出来。用“鸟枪法”获取目的基因的优点是操作简便，缺点是工作量大，具有一定的盲目性。②染色体 DNA 的限制性内切酶酶解^[2]。II 型限制性内切酶可专一性地识别并切割特定的 DNA 顺序，产生不同类型的 DNA 末端。若载体 DNA 与插入的 DNA 片段用同一种内切酶消化，或靶 DNA 与载体 DNA 末端具有互补的黏性末端，可以直接进行连接。③人工体外合成。简短的目的基因可在了解 DNA 一级结构或多肽链氨基酸的一级结构编码的核苷酸序列的基础上人工合成。④用逆转录酶制备 cDNA。大多数目的基因是由 mRNA 合成 cDNA 得到的。从 RNA 入手，先从细胞提取总 RNA，然后根据大多数真核 mRNA 含有多聚腺嘌呤（polyadenylic acid, polyA）尾的特点，用寡聚 dT 纤维素柱将 mRNA 分离出来，以 mRNA 为模板，在多聚 A 尾上结合 12~18 个 dT 的寡聚 dT 片段，作为合适的起始引物，在逆转录酶的作用下合成第一条目的 DNA 链。用碱或 RNA 酶水解除去 mRNA，再用 DNA 聚合酶，最好是 Klenow 片段合成第二条 DNA 链。双链合成后，用 S1 核酸酶切去去夹结构，即可获得双链 cDNA。cDNA 用于探针制备、序列分析、基因表达等研究。⑤PCR 技术^[3]。PCR 扩增类似于 DNA 的天然复制过程，其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。PCR（多聚酶链式反应）用于扩增位于两段已知序列之间的 DNA 区段，在由 DNA 聚合酶催化的一系列合成反应中，使用了两段寡核苷酸作为反应的引物，一般情况下，这两段寡核苷酸引物的序列是互不相同的，并分别与模板 DNA 进行加热变性。随之，将反应混合冷却至某一温度，这一温度可使引物与它的靶序列发生退火。此后，退火引物在 DNA 聚合酶的作用下得到延伸，如此反复进行高温变性、低温退火、中温 DNA 合成这一循环。由于一轮扩增的产物又充当下一轮扩增的模板。所以，每完成一个循环，就可使目的 DNA 产物增加 1 倍。多轮扩增的结果是使目的 DNA 片段以指数方式迅速积累。一般 PCR 扩增经过 30~35 个循