



生物实验室系列
Biology Lab Manual Series



Lab Ref

A Handbook of Recipes, Reagents, and

Other Reference Tools for Use at the Bench

分子生物学实验参考手册

——基本数据、试剂配制及其相关方法

(第2卷)

[美] A. S. 梅利克 L. 罗杰斯 编

Albert S. Mellick Linda Rodgers

赵宗江 许波 张晓枚 等译



化学工业出版社
生物·医药出版分社



Lab Ref

A Handbook of Recipes, Reagents, and

Other Reference Tools for Use at the Bench

分子生物学实验参考手册

——基本数据、试剂配制及其相关方法

(第2卷)

[美] A. S. 梅利克 L. 罗杰斯 编
Albert S. Mellick Linda Rodgers

赵宗江 许波 张晓枚 等译



化学工业出版社
生物·医药出版分社

·北京·

图书在版编目 (CIP) 数据

分子生物学实验参考手册——基本数据、试剂配制及其
相关方法 (第 2 卷)/[美] 梅利克 (Mellick, A. S.), 罗
杰斯 (Rodgers, L.) 编; 赵宗江等译. —北京: 化学工
业出版社, 2008. 8

书名原文: Lab Ref, Volume 2, A Handbook of Recipes,
Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench
ISBN 978-7-122-03453-3

I. 分… II. ①梅…②罗…③赵… III. 分子生物学-实
验-手册 IV. Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 114532 号

Lab Ref, Volume 2, A Handbook of Recipes, Reagents, and Other
Reference Tools for Use at the Bench, by Albert S. Mellick & Linda Rodgers
ISBN 978-087969815-7

Copyright© 2007 by Cold Spring Harbor Laboratory Press. All rights re-
served.

Authorized translation from the English language edition published by Cold
Spring Harbor Laboratory Press.

本书中文简体字版由 Cold Spring Harbor Laboratory Press 授权化学工业出
版社独家出版发行。

未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分, 违者必究。

北京市版权局著作权合同登记号: 01-2007-5113

责任编辑: 傅四周 周 旭

装帧设计: 关 飞

责任校对: 宋 玮

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

印 装: 化学工业出版社印刷厂

720mm×1000mm 1/16 印张 11½ 字数 195 千字 2009 年 3 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: 32.00 元

版权所有 违者必究

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，生命科学无时无刻离不开实验，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，理论指导和发展的实验技术”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，约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
生物·医药出版分社

原著出版说明

近年来，冷泉港实验室出版社出版了许多受到高度评价的实验手册，其内容涵盖细胞生物学、分子生物学等诸多领域。这些书是为了满足实验人员的需要而精心设计的，因此，为了节省时间和减少麻烦，我们在 2002 年出版了一本实验手册合集——“Lab Ref”（2005 年化学工业出版社翻译出版该合集第 1 卷《分子生物学实验参考手册》），该实验手册合集收集了冷泉港实验室一系列的试剂配方和参考数据。

在同样的思想指导下，《实验手册》第 2 卷再次汇集了本实验室已出版书籍的多种参考资料，使之成为分子生物学实验室最实用、最简明和最具价值的分子生物学实验参考手册版本。

特此感谢为本书提供原始资料的作者和编者：Albert S. Mellick, Linda Rodgers, Maarten Hoek, Mary Cozza, Rena Steuer, Susan Schaefer, 感谢他们热忱和出色的工作。

前 言

正如本书第 1 卷那样,《实验手册》第 2 卷同样是为了便于查询实验室常用试剂配方以及便于应用网络时代信息的方法而编排的。本书包括了第 1 卷中没有收录的特殊试剂和配方,例如专门用于核酸定量分析、RNA 干扰和成像技术的试剂配方以及蛋白质组学的相关内容。

本书可作为实验室案头必备的试剂配方手册,内容精选自冷泉港实验室出版的各类实验手册。书中没有重复收录第 1 卷中的缓冲溶液和配方,手册中每一配方均可通过书名缩写参考其原书。试剂、信息以及配方是以专题的形式组织的,开始于核酸定量分析,而结束于更特殊的物种和特殊试剂。在每一章节中,试剂又经过分类,并且包括了一些常用的背景信息(如参考表格和图例)。

鉴于篇幅所限,本书并未包括每一本实验手册中的全部配方,而是精选每个专题最常用(以及向别的实验室借用的)技术所涉及的那些配方。

以下是本书内容编排的简要说明。

第 1 章 核酸定量分析 本章包括核酸定量分析所用到的试剂配方及储备溶液。其内容涵盖了用于从细菌、植物、哺乳动物组织中提取、纯化核酸以及进行相关实验的试剂。最近,基于芯片的生物技术的急剧增加引发了分子生物学的变革,因而本章专门着重介绍了用于芯片分析所需的实验资料。只有少部分是关于定量 PCR 分析的,这是因为 PCR 所用到的试剂通常首选商品化产品(如 SYBR Green I ABI 等产品)。

第 2 章 RNAi RNAi 是分子生物学中一个崭新的领域,是近 10 年来用于处理线虫所观察到的双链 dsRNA 特定程序性沉默的技术。从那时起,用特定调节酶对 RNA 细微调节就被认为是调节细胞生物学的常规内容了。本章特别详述了用于线虫、果蝇、拟南芥以及哺乳动物组织和胚胎等基因沉默处理的双链 RNA 准备过程中所用到的特殊试剂。还包括了提取、制备以及初步分析这些小的调节 RNA 所用的缓冲溶液。

第 3 章 成像 最近几年,随着绿色荧光蛋白的广泛应用,成像技术发展迅速。当然,其他荧光标记技术也在应用。本章提供了适用于成像技术的固定和制备组织的配方以及用于检查细胞或细胞内结构(如细胞骨架)的组织分型试剂。

第 4 章 蛋白质分析与蛋白质组学 本章包括了用于检测蛋白质以及蛋白质间相互作用的试剂,包括定量方法、纯化以及第 1 卷中所未收录的抗体研究

方法。

第5章 拟南芥 本章包括了前面章节未收录的用于植物（尤其是拟南芥）研究的缓冲溶液及试剂，涵盖了培养环境、用于组织化学的组织准备以及核酸的提取过程。

第6章 小鼠胚胎实验 本章收录了用于研究小鼠的试剂和缓冲溶液配方。其中包括体外培养胚胎干细胞和组织冷冻保存的方法。

第7章 生物样品的储存和运输 本章涉及细菌、哺乳动物以及酵母细胞最佳的长期或短期保存技术指南。

第8章 实用信息与表格 本章是本书最后一章，包括配方、信息表、术语命名法则以及有关网站和背景知识。可以从中查询常用实验信息。

译者序

《分子生物学实验参考手册——基本数据、试剂配制及其相关方法》第2卷是美国冷泉港实验室 (Cold Spring Harbor Laboratory) 的最新版分子生物学实验参考手册, 是《分子生物学实验参考手册——基本数据、试剂配制及其相关方法》第1卷 (化学工业出版社, 2005) 相媲美的姊妹篇, 也是一本更为便利的分子生物学顶级实验参考手册。

2001年人类基因组全序列完整草图的完成, 宣告人类基因组计划进入后基因组时代, 即蛋白质组计划——研究蛋白质的结构和功能。应用基因组学、蛋白质组学方法进行科学研究方兴未艾, 该手册正是提供了这方面研究的最新技术和方法。本书共分为8章, 主要内容包括核酸定量分析、RNAi、成像、蛋白质分析和蛋白质组学、拟南芥、小鼠胚胎实验、生物样品的贮存和运输以及实用信息与表格等。其原始资料主要基于冷泉港实验室出版社出版的10余种实验指南, 如《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 原著第三版)、《DNA芯片》(DNA Microarray: A Molecular Cloning Manual)、《蛋白质与蛋白质组学实验指南》(Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual) 等。作者将细胞和分子生物学实验中带有共性的实验试剂、数据和方法汇集成册, 极大地方便了广大科研、教学人员, 是不可多得的细胞与分子生物学实验手册。

本书原著刚刚出版, 就引起了国内多家出版社的极大关注。如同第1卷, 化学工业出版社及时组织策划了本书的翻译出版工作。在本书的翻译过程中, 我的研究生张学凯、李杨、于波、豆小妮、孙文和冯丽园等同学参加了部分章节的翻译和校稿工作。在本书的出版过程中, 化学工业出版社相关编辑给予了莫大的支持和帮助, 在此谨致谢忱。我们希望本书像《分子生物学实验参考手册——基本数据、试剂配制及其相关方法》第1卷一样, 会受到广大读者的欢迎。

北京中医药大学细胞与生化实验室

赵宗江

2009年1月

于日本新潟大学肾病研究所蛋白质组学研究室

目 录

《实验指南》书名缩写一览	1
缩略语	3
第 1 章 核酸定量分析	5
1.1 提取总 DNA	6
1.2 提取总 RNA	10
1.3 总 RNA 提取 poly (A) RNA	12
1.4 细胞或组织分离和扩增 RNA	14
1.5 核酸杂交分析	15
1.6 基因芯片分析目的核酸	19
1.7 基因芯片分析核酸探针	21
1.8 其他核酸定量方法	23
第 2 章 RNAi	27
2.1 线虫 RNAi	28
2.2 果蝇 RNAi	28
2.3 植物 RNAi	29
2.4 哺乳动物 RNAi	29
2.5 小鼠卵母细胞及早期胚胎 RNAi	30
第 3 章 成像	33
3.1 胚胎学活细胞成像	34
3.2 固定组织成像	37
3.3 小鼠成像	38
3.4 细胞内成像	38
3.5 成像的一般知识	45
第 4 章 蛋白质分析与蛋白质组学	47
4.1 蛋白质组学中蛋白质分析的基本方法	48
4.2 植物、动物及细菌蛋白质的提取	54
4.3 鉴定蛋白质间相互作用的高级实验设计	57
第 5 章 拟南芥	77

5.1	显微镜技术	78
5.2	基因实验	78
5.3	蛋白质提取	79
5.4	核酸提取	80
5.5	GUS融合组织化学	80
第6章	小鼠胚胎实验	81
6.1	体外培养胚胎干细胞	82
6.2	基因分型	85
6.3	全胚免疫组织化学	85
6.4	其他缓冲溶液和溶液	86
第7章	生物样品的储存和运输	91
第8章	实用信息与表格	97
8.1	实用信息	98
8.2	命名指南	133
8.3	实用网站	141
附录	注意事项	149
	一般注意事项	150
	常用化学药品的一般性质	152
	危险物品使用注意事项	154
索引		165

《实验指南》书名缩写一览

本书内容节选自冷泉港实验室出版社出版的《实验指南》，《实验指南》书名缩写说明如下：

- ARA 《拟南芥实验手册》(Arabidopsis: A Laboratory Manual)
- IND 《神经系统科学成像及其发展实验手册》(Imaging in Neuroscience and Development)
- LCI 《活细胞成像技术实验指南》(Live Cell Imaging: A Laboratory Manual)
- MC3 《分子克隆实验指南》原著第三版 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition)
- MICRO 《DNA 芯片》(DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual)
- MME3 《小鼠胚胎操作实验指南》原著第三版 (Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 3rd Edition)
- PCR2 《PCR 实验技术指南》原著第二版 (PCR Primer: A Laboratory Manual, 2nd Edition)
- PPI2 《蛋白质-蛋白质相互作用》原著第二版 (Protein-Protein Interactions, 2nd Edition)
- PROT 《蛋白质与蛋白质组学实验指南》(Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual)
- PUR 《蛋白质纯化实验指南——用于蛋白质组学研究》(Purifying Proteins for Proteomics: A Laboratory Manual)
- RNAi 《RNAi——基因沉默指南》(RNAi: A Guide to Gene Silencing)

缩 略 语

ADA	<i>N</i> -(2-乙酰胺基)-2-亚氨基二乙酸, <i>N</i> -(2-acetamido)-2-iminodiacetic acid
BES	<i>N,N</i> -双(2-羟乙基)-2-氨基乙烷磺酸, 2-[<i>N,N</i> -bis(2-hydroxyethyl)amino] ethanesulfonic acid
BSA	牛血清白蛋白, bovine serum albumin
CHAPS	3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐, 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio] propanesulfonate
DEPC	焦碳酸二乙酯, diethylpyrocarbonate
DMEM	DMEM 培养基, Dulbecco modified Eagle medium
DMSO	二甲基亚砷, dimethyl sulphoxide
DTT	二硫苏糖醇, dithiothreitol
EDTA	乙二胺四乙酸, ethylene diamine tetraacetate
EGTA	乙二醇双四乙酸, ethylene glycol-bistetraacetate
ES	胚胎干细胞, embryonic stem cells
EST	表达序列标签克隆, expressed sequence tag clones
FRET	荧光共振能量转移, fluorescence resonance energy transfer
GFP	绿色荧光蛋白, greenfluorescentprotein
HEPES	<i>N</i> -(2-羟乙基)哌嗪- <i>N'</i> -2-乙烷磺酸, <i>N</i> -(2-hydroxyethyl) piperazine- <i>N'</i> -2-ethanesulfonic acid
HPLC	高效液相色谱, high-performance liquid chromatography
HPMC	羟丙基甲基纤维素, (hydroxypropyl) methyl cellulose
IPG-IEF	固相 pH 梯度等电聚焦, immobilized pH gradient isoelectric focusing
MES	2-(<i>N</i> -吗啉)乙磺酸, 2-(<i>N</i> -morpholino) ethanesulfonic acid
MOPS	3-(<i>N</i> -吗啉)丙磺酸, 3-(<i>N</i> -morpholino) propanesulfonic acid
NP-40	乙基苯基聚乙二醇, Nonidet P-40
PIPES	哌嗪- <i>N,N'</i> -二-(2-乙磺酸), piperazine- <i>N,N'</i> -bis(2-ethanesul-

	fonic acid)
PMSF	苯甲磺酰氟, phenylmethylsulfonyl fluoride
PBS	磷酸盐缓冲溶液, phosphate-buffered saline
SDS	十二烷基硫酸钠, sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TCA	三氯乙酸, trichloroacetic acid
TCEP	三(2-甲酰乙基)膦盐酸盐, tris(2-carboxyethyl)-phosphine hydrochloride
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -四甲基乙二胺, <i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine
TFA	三氯乙酸, trichloroacetic acid
Tris	三羟甲基氨基甲烷, tris(hydroxymethyl) aminomethane
Tris-Cl	三羟甲基氨基甲烷盐酸盐, tris(hydroxymethyl) aminomethane-Cl

第 1 章 核酸定量分析

本章包括了核酸定量分析的常用缓冲溶液，并着重介绍了通用芯片分析的相关资料，但更为详细的资料可以查询相应的冷泉港实验室出版社出版的各实验手册（用“参照试剂”后标明的书名缩写及“《实验指南》书名缩写一览”查询）。

本章重点是芯片分析和核酸分析，大部分用于 PCR 和核酸分析的试剂均已商品化（如 QIAGEN、ABI 等公司的产品），因而收录了特定用途的缓冲溶液（如分离多聚核糖体等）。优先选择提取 RNA 和 DNA 的实验设计。

注意：标明 * 的材料的处理方法参见附录。

1.1 提取总 DNA

(1) 提取血液总 DNA

柠檬酸葡萄糖酸, B 液 VI (保存液) MC3

4.8g/L 柠檬酸

1.32g/L 柠檬酸钠

1.47g/L 葡萄糖

用于新提取血样或冰冻血样。

红细胞稀释缓冲溶液 MC3

20mmol/L Tris-Cl (pH7.6) MC3

室温保存。

细胞稀释缓冲溶液 MC3

10mmol/L Tris-Cl (pH8.0)

1mmol/L EDTA (pH8.0)

0.1g/L SDS *

室温保存, 备用部分 0℃ 保存。

醋酸钾溶液 MC3

5mol/L 醋酸钾 60mL

冰醋酸 11.5mL *

H₂O 28.5mL

终溶液中钾离子浓度为 3mol/L、醋酸浓度为 5mol/L, 室温保存。

(2) 纯化大分子量 DNA

分离缓冲溶液 1 MC3

20mmol/L Tris-Cl (pH8.0)

0.1mol/L NaCl

10mmol/L EDTA (pH8.0)

制备 6L, 4℃ 保存。

分离缓冲溶液 2 MC3

10mmol/L Tris-Cl (pH8.0)

10mmol/L NaCl

0.5mmol/L EDTA (pH8.0)

制备 6L, 4℃ 保存。