分子生物学实验技术

FENZI SHENGWUXUE SHIYAN JISHU

主　审　李旭牲　赵　锐

主　编　曲　萌　孙立伟　王艳双

第二军医大学出版社
Second Military Medical University Press

分子生物学实验技术

分子生物学实验技术

主　审　李旭姓　赵　锐

主　编　曲　萌　孙立伟　王艳双

副主编　初　秋　刘雁飞　董志恒

编　者　（按姓氏笔画排序）

丁福祥（北华大学附属医院）
王艳双（北华大学基础医学院）
曲　萌（北华大学基础医学院）
孙立伟（北华大学生命科学中心）
杨春枚（北华大学基础医学院）
初　秋（北华大学基础医学院）
范梅贞（北华大学附属医院）
胡林春（北华大学附属医院）
董志恒（北华大学基础医学院）
焦淑萍（北华大学基础医学院）
于　静（北华大学基础医学院）
白金明（吉林市中心医院）
刘雁飞（北华大学基础医学院）
李旭姓（北华大学基础医学院）
宋　宇（北华大学基础医学院）
张晓刚（北华大学基础医学院）
赵　锐（北华大学基础医学院）
崔继春（吉化职工总医院）
韩松涛（吉林市中心血站）

第二军医大学出版社
Second Military Medical University Press

内 容 简 介

本书深入浅出地介绍了分子生物学相关技术的理论基础，同时每个章节后编有与技术理论相关的实验方法，详细介绍了实验原理，试剂的配制，所需仪器、材料，操作步骤及注意事项。在满足基本教学需要的基础上，扩展了蛋白质组学、基因芯片及流式细胞等前沿技术。

本书具有较强的实用性和针对性，可以满足医学院校本科生及研究生的教学需要，同时也可作为广大实验人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学实验技术/曲萌，孙立伟，王艳双主编.
—上海：第二军医大学出版社，2012.5
ISBN 978-7-5481-0390-5

Ⅰ.①分… Ⅱ.①曲…②孙…③王… Ⅲ.①分子生物学—实验 Ⅳ.①Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 050072 号

出 版 人 陆小新
责任编辑 王 勇

分子生物学实验技术
主 编 曲 萌 孙立伟 王艳双
第二军医大学出版社出版发行
上海市翔殷路 800 号 邮政编码：200433
发行科电话/传真：021-65493093
全国各地新华书店经销
江苏江阴天源印刷厂印刷
开本：787×1 092 1/16 印张：11.5 字数：218 千字
2012 年 5 月第 1 版 2012 年 5 月第 1 次印刷
ISBN 978-7-5481-0390-5/Q·031
定价：26.00 元

前　言

进入21世纪后，随着人类前基因组计划的完成，分子生物学的发展十分迅速，目前已成为了生命科学中最重要的前沿学科。纵观分子生物学的发展过程，理论研究领域的种种突破都是以分子生物学实验技术的创建及发展为依托的，二者之间相辅相成、密不可分。因此，掌握分子生物学技术理论及实验方法对现代医学生来说尤为重要。

为适应学科建设、学科整合及培养方案的调整，我们特组织编写了《分子生物学实验技术》一书，以满足医学、预防、口腔、影像等本科医学生及研究生的教学需要，同时也可作为广大实验人员的参考书。

本书共由核酸的分离与纯化、蛋白质的分离与纯化、电泳技术、DNA重组技术、核酸分子杂交技术、PCR技术、蛋白质组学研究技术、生物芯片技术、细胞凋亡与检测技术以及附录十部分内容组成，以核酸的分离与纯化、DNA重组技术、PCR技术为核心，深入浅出地介绍了各相关技术的理论基础，同时每个章节后编有与技术理论相关的实验方法，详细介绍了实验原理，试剂的配制，所需仪器、材料，操作步骤及注意事项。在满足基本教学需要的基础上，扩展了蛋白质组学、基因芯片及流式细胞等前沿技术，从知识的深度和广度上来满足不同层次学生的需要。此外，在附录中详细介绍了PCR扩增仪、电泳仪、电子天平等分子生物学常用仪器的使用方法和注意事项，常用缓冲液的配制方法及与凝胶电泳相关的一系列数据，为初学者快速提高动手能力奠定了良好的基础。

本书的参编人员均为一线的中青年教师，在具备扎实的理论基础同时，还具有高超的实验技巧和实验经验，在广泛查阅资料、认真编写的基础上总结并融入了大量简单、易行的实验流程，如第一章的“组织和细胞总RNA提取(TRIzol法)”、第六章的“RT-PCR检测基因的表达”、第七章的“大肠埃希菌双向凝胶电泳图谱的建立”及“真核酵母细胞双向图谱的建立”等，这些具有独到之处的成功实验方法是他们多年心血的凝聚。在此，谨向本书的编写者、主审者以及所选用的参考文献和相关资料的作者表示衷心的感谢！

试读结束，需要全本PDF请购买 www.ertongbook.com

由于我们的编写能力有限，书中难免会存在不妥和疏漏之处，恳请使用者及广大同仁给予批评指正。

曲　萌

2011年初冬

目　　录

第一章　核酸的分离与纯化 …… 1

第一节　核酸分离与纯化的技术路线与原则 …… 1
第二节　DNA 的分离制备 …… 4
第三节　质粒的分离与纯化 …… 5
第四节　RNA 的分离制备 …… 7
第五节　实验方法 …… 9
实验一　真核细胞染色体 DNA 的制备 …… 9
实验二　细菌的培养、保存和收集 …… 13
实验三　质粒 DNA 的提取 …… 16
实验四　组织和细胞总 RNA 提取(TRIzol 法) …… 19
实验五　核酸的定量 …… 21

第二章　蛋白质的分离与纯化 …… 25

第一节　生物材料的前处理 …… 25
第二节　蛋白质分离与纯化的方法 …… 26
第三节　蛋白质的鉴定 …… 29
第四节　实验方法 …… 30
实验一　SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的分子量 …… 30
实验二　Western 印迹法检测表达蛋白 …… 34
实验三　免疫荧光法检测重组蛋白 …… 39

第三章　电泳技术 …… 42

第一节　概述 …… 42

第二节　电泳基本原理 …… 43
第三节　影响电泳迁移率的因素 …… 44
第四节　核酸电泳的指示剂与染色剂 …… 46
第五节　不同波长紫外线对 EB－DNA 复合物的影响 …… 47
第六节　实验方法 …… 48
实验一　琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA …… 48
实验二　DNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳 …… 50

第四章　DNA 重组技术 …… 54

第一节　DNA 限制性内切酶酶切技术 …… 54
第二节　DNA 重组方法 …… 56
第三节　质粒的转化与细胞转染的方法 …… 58
第四节　DNA 重组体的筛选与鉴定 …… 59
第五节　克隆化基因的表达 …… 61
第六节　实验方法 …… 62
实验一　DNA 限制性内切酶消化法 …… 62
实验二　DNA 分子的体外连接 …… 65
实验三　感受态细胞的制备 …… 69
实验四　细菌的转化 …… 71
实验五　重组质粒的 α 互补筛选 …… 74

第五章　核酸分子杂交 …… 77

第一节　核酸分子杂交基本原理及分类 …… 77
第二节　核酸分子杂交的基本方法 …… 79
第三节　探针的种类及标记 …… 81
第四节　核酸分子杂交 …… 84
第五节　杂交信号的检测 …… 85
第六节　实验方法 …… 87
实验一　地高辛标记 DNA 探针 …… 87
实验二　放射性核素 ^{32}P 随机引物延伸标记法 …… 88
实验三　Southern 印迹杂交检测 HBV－DNA …… 91
实验四　Northern 印迹杂交检测 HCV－RNA …… 95

第六章 聚合酶链反应(PCR)技术 …… 101

第一节 PCR 的反应体系 …… 101
第二节 PCR 的基本步骤 …… 103
第三节 PCR 的衍生技术 …… 104
第四节 PCR 技术在医学上的应用 …… 106
第五节 实验方法 …… 109
实验一 PCR 检测病原体(试剂盒法) …… 109
实验二 PCR 检测遗传疾病的相关基因 …… 112
实验三 RT-PCR 检测基因的表达 …… 116

第七章 蛋白质组学研究技术 …… 120

第一节 蛋白质组学概论 …… 120
第二节 细胞及亚细胞样品制备方法 …… 120
第三节 双向电泳技术 …… 123
第四节 蛋白质鉴定技术 …… 127
第五节 实验方法 …… 127
实验一 大肠埃希菌双向凝胶电泳图谱的建立 …… 127
实验二 真核酵母细胞双向图谱的建立 …… 132

第八章 生物芯片技术与应用 …… 137

第一节 生物芯片技术原理 …… 137
第二节 芯片的构建及操作流程 …… 138
第三节 芯片技术的应用 …… 140

第九章 细胞凋亡与检测技术 …… 142

第一节 细胞凋亡概述 …… 142
第二节 凋亡细胞的形态和生化特征及检测方法 …… 142
第三节 流式细胞术在细胞凋亡研究中的应用 …… 148

附录一 分子生物学实验室常用仪器的使用方法与保养 …… 154

附录二　实验用玻璃器皿的准备 …… 161

附录三　常用缓冲液的配制 …… 162

附录四　常用单位的换算 …… 163

附录五　常用 DNA 分子量标准参照物 …… 164

附录六　与 DNA 凝胶电泳有关的数据 …… 165

第一章　核酸的分离与纯化

核酸是遗传信息的携带者，是基因表达的物质基础，在生物的生命活动中起到十分重要的作用。因此，核酸是现代生物学及医学研究的重要内容。然而，无论是对核酸进行结构与功能的研究，还是进行基因工程和蛋白质工程的研究，都需要首先对核酸进行分离、纯化。核酸的分离与纯化已成为分子生物学中的基本技术，核酸样品的质量将直接影响到后继实验的结果。

第一节　核酸分离与纯化的技术路线与原则

核酸包括 DNA、RNA 两类分子，在细胞内均与蛋白质结合成核蛋白。真核生物基因组中，95%DNA 为双链线性分子，存在于细胞核中，5%为双链环状分子，存在于细胞器中；原核生物 DNA 及质粒 DNA 为双链或单链环状分子；RNA 为单链线性分子，主要存在于细胞质中。DNA 与 RNA 性质的不同导致对其分离与纯化的条件也不相同。

一、核酸分离与纯化的原则

(1) 保证核酸一级结构的完整性。生物的遗传信息全部贮存在核酸一级结构中，而且核酸的一级结构还决定其高级结构的形式及和其他大分子结合的方式。所以，所提取的核酸一级结构的完整性直接影响着后续实验中对其结构与功能研究的质量。因此，在制备核酸的过程中，要做到：尽量简化操作程序，缩短提取过程；避免过酸、过碱等化学因素对核酸链中磷酸二酯键的破坏，在 pH 值 4～10 条件下进行操作；操作时动作要轻缓，提取的样品小包装保存，以免诸多的物理因素对核酸的降解；避免细胞内及环境中核酶对核酸的生物性降解。

试读结束，需要全本PDF请购买 www.ertongbook.com

(2) 排除其他生物大分子的污染，如蛋白质、多糖和脂类分子的污染应尽可能降低到最低程度，特别是提取 DNA 分子时应除去 RNA 分子，反之亦然。

(3) 排除核酸样品中有机溶剂和过高浓度的金属离子。

二、分离与纯化的技术路线

(一) 核酸的释放

通常情况下 DNA 及 RNA 均位于细胞内，因此核酸分离与纯化的第一步就是制备单个细胞，再破碎细胞，从而释放核酸。破碎细胞的方法包括机械法与非机械法两大类。机械法又可分为液体剪切法与固体剪切法；非机械法可分为干燥法与溶胞法。由于溶胞法采用适宜的化学试剂与酶，能有效地裂解细胞，方法温和，能保证较高的核酸获得率，并能较好地保持核酸的完整性，从而得到广泛的应用。

(二) 核酸的分离与纯化

利用核酸与其他物质性质上的差异，可以分离与纯化核酸。这种差异包括细胞定位与组织分布上的差异，物理、化学性质上的不同，以及各自独特的生物学特性。操作过程中，既可以从复杂样品中抽提出核酸分子，也可以将样品中的非核酸成分(非核酸的生物大分子、非需要的核酸分子及在操作过程中加入的溶液与试剂)逐步清除。在分离与纯化过程中步骤越多，核酸的纯度也越高，但获得率会逐渐下降，完整性也越难以保证。

(三) 核酸的浓缩、沉淀与洗涤

在核酸的提取过程中，逐步加入的各种试剂及操作等因素可导致样品中核酸浓度逐渐下降。为满足后继研究与应用的需要，应对核酸进行浓缩处理。沉淀是核酸浓缩最常用及有效的方法，除可以调整核酸溶液至所需浓度外，还能进一步去除部分杂质及某些盐离子。其原理：核酸为多聚阴阳离子水溶性化合物，可与钾、钠、镁、锂及铵根等阳离子形成盐，不溶于许多有机溶剂。

常用的盐类有醋酸钠、醋酸钾、醋酸铵、氯化钠、氯化钾及氯化镁等，常用的有机溶剂有乙醇(2 倍样本体积的 95%乙醇可有效沉淀 DNA；2.5 倍样本体积的 95%乙醇可有效沉淀 RNA，样本中的痕量乙醇易蒸发去除，不影响以后的实验)、异丙醇(0.54～1.0 倍样本体积的异丙醇可选择地沉淀 DNA 和大分子 rRNA、mRNA，但对 5sRNA 和 tRNA 及多糖不产生沉淀，样品中的异丙醇用 70%的乙醇漂洗去除)和聚

乙二醇(不同浓度的 PEG 选择沉淀不同相对分子质量(也称分子量)的 DNA 片段，PEG 沉淀一般需要加入 0.5 mol/L NaCl 或 10 mmol/L $MgCl_2$。DNA 沉淀中 PEG 去除的最有效方法是用 70%的乙醇漂洗 2 次)。

三、鉴定与保存

(一) 核酸的鉴定

分离与纯化后的核酸需要对其浓度、纯度及完整性进行鉴定，以确保其质量满足后续实验。

1. 浓度的鉴定

根据核酸的最大吸收波长为 260 nm 这一性质，将样品于波长 260 nm 的紫外线下测其吸光度 A 值，A=1 时相当于 50 μg/ml 的双链 DNA、38 μg/ml 的单链 DNA 或 RNA、33 μg/ml 的单链寡核苷酸。如果 DNA 样品中含有盐，则会使测得的 A_{260} 偏高，需扣除 A_{310}，以二者的差值作为定量计算的依据。

DNA 浓度计算公式：DNA 浓度(μg/μl)=A_{260}×50×稀释倍数/1 000。

RNA 浓度计算公式：RNA 浓度(μg/μl)=A_{260}×38×稀释倍数/1 000。

此外，可在核酸样品中加入荧光染料溴化乙锭(ethidiumbromide，EB)。嵌入到碱基平面的 EB 可在紫外线激发下发出橙红色的荧光，其荧光强度积分与核酸含量呈正比。由于其灵敏度高，故适合于低浓度核酸溶液的定量分析。

2. 纯度鉴定

纯 DNA A_{260}/A_{280} 比值为 1.8，纯 RNA 为 2.0。蛋白质及酚的污染可使比值降低，RNA 的污染可致 DNA 样品比值增高，故比值为 1.8 的 DNA 溶液不一定为纯的 DNA 溶液。由于 RNA 二级结构的不同，导致样品的读数可能会在 1.8 和 2.1 之间波动。

3. 完整性鉴定

根据不同分子量的核酸片段在凝胶电泳的迁移率的差异来判定核酸的完整性。DNA 的分子量较 RNA 大，在电场中泳动得慢，如 DNA 发生降解，电泳图呈拖尾状；总 RNA 电泳图为特征性的三条带(23S、16S、5S；28S、18S、5S 或 5.8S)，一般 28S(或 23S)RNA 的荧光强度约为 18S(或 16S)RNA 的 2 倍，否则提示有 RNA 的降解。如果在加样槽附近有着色条带，则说明有 DNA 的污染。

（二）核酸的保存

1. DNA 的保存

溶于 TE 缓冲液中 4℃下保存。TE 的 pH 值为 8.0 时 DNA 不易变性。EDTA 作为二价金属离子的螯合剂，可抑制 DNA 酶的活性。低温条件下可减少 DNA 分子的各种反应。如需长期保存，可加入少量氯仿，在－70℃下保存。

2. RNA 的保存

溶于 0.3 mol/L 的醋酸钠溶液、双蒸水、焦碳酸二乙酯（diethylpyrocarbonate，DEPC）、水、90％乙醇中，在－80～－70℃下保存。

第二节　DNA 的分离制备

不同来源的 DNA 分子，由于分子量、形状及细胞定位的不同，提取的方法也不尽相同。

一、酚抽提法

以含有 EDTA、SDS 及 RNA 酶的裂解缓冲液裂解细胞，经蛋白酶 K 处理后，酚抽提 DNA。EDTA 可以抑制 DNA 酶的活性，还可降低细胞膜的稳定性；SDS 为阴离子去污剂，可降解细胞膜和乳化脂质及蛋白质；蛋白酶 K 可水解蛋白质，消化 DNA 酶和细胞中的蛋白质；RNA 酶降解 RNA；酚使蛋白质变性或变成不溶性物质，经离心后沉淀，但由于酚不使核酸变性，所以核酸溶解在水相溶液中，加入氯仿后，能加速有机相与液相的分层，从而达到抽提 DNA 的目的。

二、甲酰胺解聚法

甲酰胺是一种离子化溶剂，既可以裂解蛋白质与 DNA 的复合物，还可使释放的蛋白质变性。裂解细胞及水解蛋白质（方法同酚抽提法）后，使用高浓度的甲酰胺裂解 DNA 与蛋白质的复合物，再通过火棉胶袋的充分透析以除去蛋白酶和有机溶剂。此方法操作步骤少，适用于大于 200 kb 的大分子量 DNA 片段的提取。

三、玻棒缠绕法

以盐酸胍裂解细胞，基因组 DNA 沉淀于细胞裂解液与乙醇液的交界面，将沉淀的 DNA 缠绕于带钩玻棒上，并转移到 pH 值 8.0 的 TE 溶液重溶。适用于大约 80 kb 的 DNA 片段的制备。

第三节　质粒的分离与纯化

一、质粒的分离方法

质粒是存在于细菌染色外，可自主复制的双链的小型共价闭合环状的 DNA，是基因工程中的重要载体。对质粒的提取与纯化是分子生物学的基本技术，由细菌的培养（质粒 DNA 的扩增）、细菌的裂解（质粒 DNA 的释放）及质粒 DNA 的分离、纯化等 3 个步骤组成。根据所制备的质粒量的不同，可分为小量（1～2 ml）、中量（20～50 ml）及大量（500 ml）制备，但制备的方法与原理基本相同。经典的方法包括碱裂解法、煮沸裂解法和 SDS 裂解法等。

（一）碱裂解法

在 NaOH 存在的强碱性（pH 值 12.0～12.6）条件下，SDS 破坏细胞壁并裂解细胞，同时使宿主细胞的蛋白质及染色体 DNA 发生变性，而质粒 DNA 由于其分子量小且缠结紧密不易变性，只要不在碱性条件下存在太久，可在 pH 值调至中性时，恢复其天然构象。在高钾盐条件下，细胞壁碎片、变性的蛋白质及染色体 DNA 发生沉淀，离心后可除去，而上清液中的质粒 DNA 通过无水乙醇浓缩、沉淀。此方法适用范围广，是最简单和最常用的质粒制备方法。

（二）煮沸裂解法

先用 TritonX－100 和溶菌酶破坏细胞壁，再用沸水浴裂解细胞，使宿主细胞的蛋白质与染色体 DNA 变性，而质粒 DNA 不变性，通过离心于上清液中收集质粒 DNA。由于此法条件较剧烈，一般只用于小质粒 DNA（<15 kb）的制备。

（三）SDS 裂解法

溶菌酶和 EDTA 破坏细胞壁，再用 SDS 裂解去壁细菌，温和释放质粒 DNA 后用酚/氯仿抽提。此法虽条件温和，但产率不高，可用于制备大于 15 kb 的质粒 DNA。

二、质粒 DNA 的纯化

为满足实验需求，需除去质粒 DNA 提取物中的 RNA、染色体 DNA 及杂质等非质粒 DNA 物质，同时还要去除开环的和带有切口的环状质粒 DNA，即对样品作进一步纯化。

（一）氯化铯-溴化乙锭等密度梯度超速离心法（CsCl－EB 法）

离心介质 CsCl 经超速离心后形成一连续的密度梯度，可将不同密度的物质经离心平衡后得以分开。蛋白质密度小（1.3～1.4 g/cm^3），浮于液面；RNA 密度大（2.0 g/cm^3），沉于管底；DNA 位于二者之间。染色体 DNA 与不同分子构型的质粒 DNA 的密度均为 1.7 g/cm^{3}左右，难以区分，因此加入过量 EB，由于 EB 与不同分子构型的 DNA 的结合能力不一样，使密度出现差异。闭环质粒 DNA 约为 1.59 g/cm^3，染色体 DNA、开环质粒 DNA 以及带切口的环状质粒 DNA 约为 1.54 g/cm^3，从而得以分离。此法容量大、分辨率高、纯化效果好，但费时，并需要昂贵的设备与试剂。

（二）聚乙二醇（polyethylene glycol，PEG）沉淀法

这是一种分级沉淀法，先用 LiCl 沉淀大分子 RNA，去除小分子 RNA 后，再用 PEG 选择性地沉淀大的质粒 DNA，所得沉淀还需进一步用酚/氯仿抽提及乙醇沉淀。此法简单、经济、适用广泛，但不能有效分离带切口的环状质粒 DNA 与闭环质粒 DNA。

（三）柱层析法

使用树脂填充层析柱，所用树脂可分为二类：一类是利用疏水的相互作用纯化质粒 DNA 样品；另一类是通过离子交换与吸附的相互作用进行纯化。常用硅基质作为填充材料，于多盐条件下磷酸二酯骨架脱水，暴露的磷酸盐残基使 DNA 吸附到硅基质上，以 50%的乙醇为洗脱液，除去 RNA 和糖类等生物大分子。由于 DNA 与硅

基质的结合是可逆性的，因此加入 TE 或水溶液可使 DNA 分子重新水合，并通过离心洗脱出来。此法方便快捷、应用广泛，但纯化效果并不优于其他方法，且成本较高，不能用于小分子 DNA 片段的纯化。

第四节　RNA 的分离制备

许多分子生物学的实验是以 RNA 为起始材料的，这就需要对 RNA 进行提取。RNase 是 RNA 的水解酶，除存在于细胞内外，还广泛存在于人的皮肤、唾液、汗液及环境中。由于 RNase 的生物学活性稳定，加热煮沸及一般的变性剂均不能使其失活，易导致样品中 RNA 的降解，故在 RNA 的制备过程中应尽量创造一个无 RNase 的环境。

一、RNA 制备的条件与环境

要创造一个无 RNase 的环境，需做到：避免外源性 RNase 的污染，抑制内源性 RNase 的污染。

（一）避免外源性 RNase 污染的措施

（1）在整个操作中操作者应戴口罩和手套。

（2）操作过程应在洁净的环境中进行。因为空气中灰尘携带的细菌、霉菌等微生物也是外源性 RNase 污染的一条途径。

（3）玻璃器皿常规洗净后，应用 0.1%DEPC（二乙基焦碳酸盐）浸泡处理，再用双蒸灭菌水漂洗几次，然后高压灭菌去除 DEPC，最后在 250℃下烘烤 4 h 以上或 200℃下干烤过夜。

（4）塑料器材最好使用灭菌的一次性塑料用品。Eppendorf 管、Tip 头最好用新的，临用前要进行高压灭菌。

（5）所有溶液应加 DEPC 至 0.05%～0.1%，室温下处理过夜，然后高压处理以去除残留的 DEPC。

（6）所有化学试剂应为新鲜包装，称量时使用干烤处理的称量勺。所有操作应在冰浴中进行，因为低温条件可降低 RNase 的活性。

试读结束，需要全本PDF请购买 www.ertongbook.com