

基

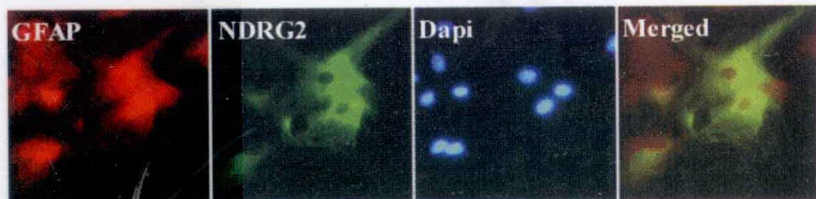
验 | 技 | 术 | 系 | 列 | 丛 | 书

分子生物学 实用实验技术

主 审 药立波

主 编 李 燕 张 健

副主编 李绍青 张 惠



分子生物学实用实验技术

(基础医学实验技术系列丛书)

主 审 药立波

主 编 李 燕 张 健

副主编 李绍青 张 惠

编 委 (以姓氏笔画排序)

卜 歆 于江天 马 骥 车红磊

申亮亮 史 曼 刘学武 朱 超

沈 岚 苏 金 杜锡林 李运明

李 霞 吴 琳 林 伟 杨国栋

杨建栋 张 瑞 张 璟 赵华栋

赵湘辉 侯武刚 茹 懿 唐 君

傅海燕 路 凡

第四军医大学出版社·西安

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学实用实验技术 / 李燕主编. - 西安: 第四军医大学出版社, 2011. 12

ISBN 978 - 7 - 5662 - 0070 - 9

I. ①分… II. ①李… III. ①分子生物学 - 实验技术 IV. ①Q7 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 251444 号

分子生物学实用实验技术

主 编 李 燕

责任编辑 相国庆

出版发行 第四军医大学出版社

地 址 西安市长乐西路 17 号(邮编:710032)

电 话 029 - 84776765

传 真 029 - 84776764

网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>

印 刷 西安永惠印务有限公司

版 次 2011 年 12 月第 2 版 2011 年 12 月第 1 次印刷

开 本 850 × 1168 1/32

印 张 9.5 彩 0.25

字 数 300 千字

书 号 ISBN 978 - 7 - 5662 - 0070 - 9/Q · 47

定 价 29.80 元

(版权所有 盗版必究)

序

分子生物学在分子水平探讨生命的本质，她既是生命科学的基础，又是目前自然科学中进展最迅速、最具活力的前沿领域，在生命科学和医学的发展过程中发挥着极其重要的作用。自从DNA双螺旋结构被阐明之后，人类真正进入了解码生命的时代，分子生物学的学科体系逐步形成和完善，相关的理论和技术推动了整个生命科学的发展。从1901年到2010年，109项诺贝尔生理学或医学奖中的67项颁发给了生物化学与分子生物学领域。如今，分子生物学将从古代医学脱胎而出的现代医学带入了分子医学时代。这是一个成就巨大的时代，也是一个充满争议的时代，更是一个充满了机遇和挑战的时代。今天，分子生物学的理论和技术在医学领域中的交叉渗透日益广泛，医学院校的研究生课题也因此进入了几乎离不开分子生物学实验技术的时期。

“工欲善其事，必先利其器”，熟悉和掌握分子生物学实验技术对于研究课题的设计和科学问题的解决无疑会有巨大的帮助。2009年，第四军医大学生物化学与分子生物学教研室里一批年轻的教师和博士生基于自身的学习历程，编写了《细胞与分子生物学常用实验技术》的实验操作小册子。作者们站在初学者的角度，从自己的实验过程中整理出每一项实验的具体操作、注意事项及个人的体会，成就了一本用于指导分子生物学实验操作的“掌中书”。有别于资深学者，年轻人的写作更加着眼于实用，风格简洁活泼。这本小书一经面世，就受到了年轻研究人员，尤其是研究生的广泛关注与好评，也使我们感受到强烈依赖于实验技术的生物学和医学学科研究生对实验操作手册的需求。基于这样的背景，四医大的生物化学与分子生物学、遗传与发育学、神经

生物学、免疫学、细胞生物学和生物制药学等教研室决定联合撰写一套涵盖生物学和基础医学研究常用实验技术的小手册，将陆续出版，成为《基础医学实验技术系列丛书》，为研究人员提供全面的实验操作指导。

《分子生物学实用实验技术》是该系列丛书的第一本，依然由一线年轻研究人员和在读博士生共同完成。为适应分子生物学研究领域日新月异的进步，我们对所有章节都进行了修订，同时新增了微小 RNA 分析、蛋白泛素化检测、基因表达谱分析、蛋白质双向电泳及质谱分析、小动物活体成像技术和分子生物学常用实验设计和统计方法等章节，期望对大家的实验有更多的帮助。

《基础医学实验技术系列丛书》的第二本读物——《遗传修饰小鼠常用实验技术》预计于 2012 年初与读者见面。

主审 药立波

2011 年 9 月

前 言

在基础医学研究中，很多情况下要涉及分子生物学实验技术。对于多数实验原理，即使刚接触实验的人，也会容易了解；然而在实验技术上，即使专业的技术人员，也有很多实验技巧需要注意，初学者更是难以下手。纵观整个图书市场，关于分子生物学的参考书很多，但往往侧重于实验原理与最新进展，对实验技术和技巧的讲解不够深入和透彻。为了改变这一现状，更利于初学者顺利地完成研究计划，我们组织了一群年富力强的博士研究生们站在初学者的角度编写了这本《分子生物学实用实验技术》。

全书共十七章：第一章到第十二章介绍分子生物学常用实验技术；第十三章到第十五章着重阐述分子生物学相关的细胞、组织和动物实验；第十六章为分子生物学常用数据库；第十七章阐述了分子生物学实验的设计和统计分析方法。本书有以下几个特点：一是编写人员大部分为刚毕业或在读的博士研究生，所写的实验技术均是其亲自做过、非常熟悉的，而且有自己独特的见解；二是所涉及内容均是常用而且成熟的实验方法；三是侧重于实验的具体操作、注意事项及个人的体会；四是从初学者的角度出发，符合初学者的需要，也可为从事基础医学研究的人员提供帮助；五是在本书中，每一个章节都附有作者的联系方式，若遇到相关问题，可以与作者进行交流。

本书是全体同仁共同努力的结晶，编写过程中我们力求正确、实用。但是，由于本书专业性强、内容覆盖面广，受知识和能力所限，难免有不足和错误之处，真诚希望读者提出宝贵意见和建议。

李燕

2011 年 11 月

目 录

第一章 PCR 技术	(1)
第一节 RT-PCR	(1)
第二节 实时定量 PCR	(13)
第二章 Western-blot 技术	(19)
第一节 蛋白样品制备	(19)
第二节 蛋白定量	(23)
第三节 蛋白电泳	(27)
第四节 转 膜	(31)
第五节 抗体杂交	(34)
第六节 发光检测或荧光扫描	(37)
第三章 质粒载体介导的重组 DNA 技术	(44)
第一节 感受态的制备	(44)
第二节 转 化	(46)
第三节 质粒提取	(48)
第四节 琼脂糖凝胶电泳	(49)
第五节 凝胶回收	(51)
第六节 重组 DNA 的构建	(53)
第四章 病毒载体介导的重组 DNA 技术	(57)
第一节 复制缺陷型腺病毒载体的包装	(57)
第二节 慢病毒载体的包装	(68)
第五章 蛋白原核表达与纯化	(73)
第六章 RNAi 技术	(83)
第七章 microRNA 研究方法	(89)

第八章 蛋白相互作用筛选及验证	(99)
第一节 酵母双杂交系统筛选	(99)
第二节 相互作用蛋白鉴定	(117)
第九章 蛋白泛素化检测	(126)
第十章 转录调控机制研究	(130)
第一节 转录因子与靶基因相关性分析	(131)
第二节 靶基因的启动子克隆	(132)
第三节 报告基因活性分析	(134)
第四节 转录因子结合位点的确定	(140)
第五节 DNA - 转录因子结合分析	(141)
第六节 ChIP on chip 技术	(148)
第十一章 DNA 制备和基因甲基化分析	(150)
第一节 基因组 DNA 提取	(150)
第二节 甲基化分析	(154)
第十二章 基因表达谱和蛋白质双向电泳及质谱分析	(165)
第一节 基因表达谱分析	(165)
第二节 全细胞蛋白质双向电泳及质谱分析	(171)
第十三章 相关细胞学技术	(180)
第一节 细胞冻存	(180)
第二节 细胞复苏	(182)
第三节 细胞计数法测定生长曲线	(184)
第四节 MTT 法测定生长曲线	(186)
第五节 平板克隆形成实验	(189)
第六节 软琼脂克隆形成实验	(191)
第七节 Transwell	(194)
第八节 划痕实验	(198)
第九节 细胞周期的测定	(200)
第十节 细胞凋亡检测	(203)
第十一节 脂质体介导的质粒转染	(210)
第十二节 病毒感染	(215)

第十四章	相关组织学技术	(217)
第一节	动物组织取材和固定	(217)
第二节	临床标本收集方法	(220)
第三节	免疫组织(细胞)化学	(225)
第四节	间接免疫荧光	(231)
第五节	组织原位杂交	(234)
第十五章	相关常用动物实验	(241)
第一节	裸鼠移植瘤动物模型	(241)
第二节	小动物活体成像技术	(243)
第十六章	分子生物学常用数据库	(247)
第一节	基因基本信息的获取	(247)
第二节	基因表达调控分析	(251)
第三节	基因功能分析	(258)
第十七章	常用实验设计和统计方法	(269)
第一节	完全随机设计分组	(269)
第二节	样本量估计软件实现	(272)
第三节	实验原始数据记录及预处理	(278)
第四节	统计分析方法的选择	(282)
第五节	Box-Cox 正态性转换 SPSS 软件实现	(287)
第六节	论文统计学方法描述	(289)

第一章 PCR 技术

> >

PCR (Polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应) 是利用针对目的基因所设计的一对特异寡核苷酸引物, 以目的基因为模板进行的 DNA 体外扩增反应, 类似于 DNA 的天然复制过程。反应产物随循环数的增加成指数扩增, 可高效获取大量目的基因。这里仅介绍检测编码蛋白 mRNA 含量最常用的 RT-PCR 技术和荧光实时定量 PCR 技术。

第一节 RT-PCR

扩增模板为 RNA 时, 需先通过反转录酶将其反转录为 cDNA 才能进行扩增。RT-PCR 应用非常广泛, 常用于分子生物学实验及临床检验。

一、PCR 引物的设计合成

1. 实验目的

PCR 引物设计的目的是为了找到一对合适的核苷酸片段, 使其能有效地扩增模板 DNA 序列。因此, 引物的优劣直接关系到 PCR 的特异性与成功与否。

2. 设计原则

- (1) 引物长度一般为 15 ~ 30 个碱基 (一般为 18 ~ 24 个)。
- (2) 引物 5' 端可以修饰, 引物 3' 端不可修饰, 避免 3' 端为连续的 GC。
- (3) G + C 含量为 40% ~ 60%。

(4) 引物位置应在核酸序列保守区内并具有特异性。

(5) 引物自身碱基要随机分布, 不要有聚嘌呤或聚嘧啶, 不能形成二级结构。

(6) 引物之间不能有连续 4 个碱基的互补。

(7) 退火温度在 53℃ ~ 62℃ 范围内。

3. 操作步骤

(1) 查找基因 mRNA 序列。登陆 NCBI 主页 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 在“Search”下拉菜单中选择“Nucleotide”, 输入目的基因的 Genbank 号, 如 NM_001469。如果不知道 Genbank 号, 可以输入基因名称、种属、mRNA, 这样可能得到很多条结果, 可以点击进入“Limit”界面, 限制字段名为 accession, 还可以在 limit 界面进行其他限制。即使进行了限制, 也可能得到不止一条结果, 出现这种情况的原因是, 有些序列相似的 mRNA 被不同研究人员发现而同时上传到 NCBI 数据库, 故最好选择完整的序列。以人 *NDRG2* 基因为例, 输入查询条件后, 得到 3 条结果, 如图 1-1 所示, 但是打开链接可以看到 3 个的 Gene ID 都是 57447, 所以都可以用。

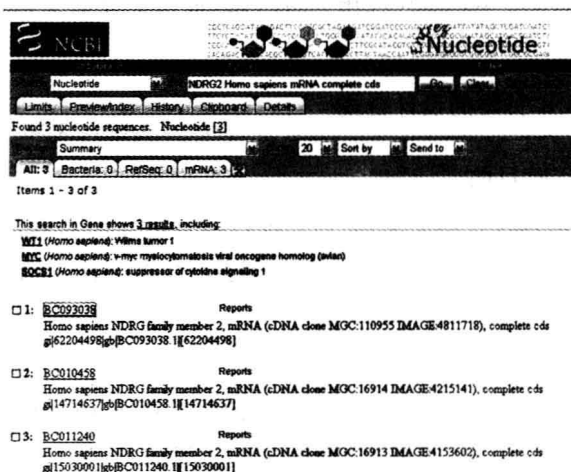


图 1-1 查找人 *NDRG2* 基因 mRNA 序列

(2)用引物设计软件设计引物。以最常用的 Primer premier 5.0 为例,打开软件工具栏的“File”按钮,选择“New”菜单下的“DNA Sequence”,将序列拷贝粘贴到引物设计软件中,如图 1-2 所示。

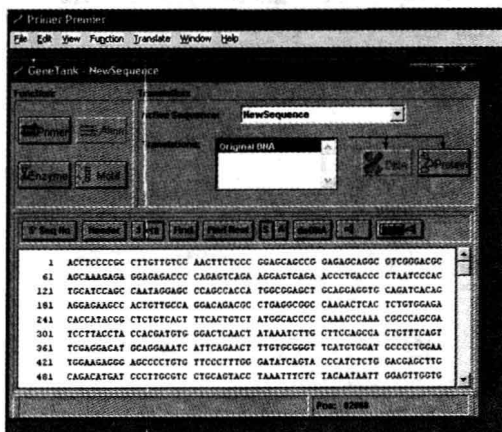


图 1-2 将人 *NDRG2* 基因 mRNA 序列输入引物设计软件 Primer premier 5.0

点“Function”中的“Primer”按钮,出现新的界面,如图 1-3 所示。

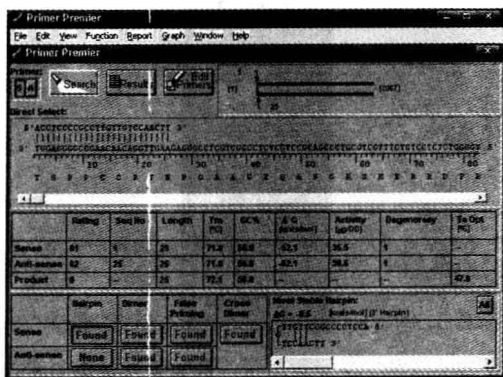


图 1-3 Primer premier 5.0 引物功能菜单

点击“Search”,并且选择需要的 PCR 引物的长度、PCR 产物的

大小以及引物在整个序列中的范围等信息,如图 1-4 所示。

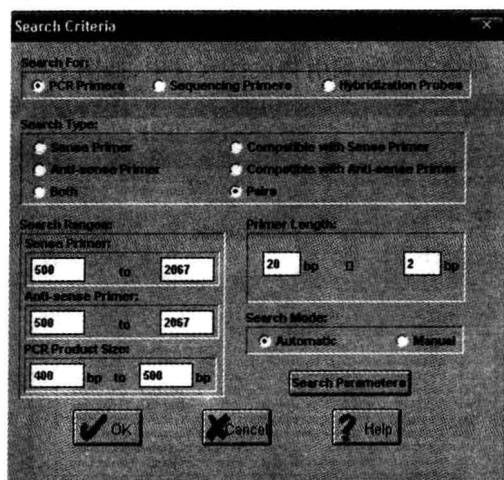


图 1-4 Primer premier 5.0 引物设定功能菜单

选好点击“OK”按钮,结果显示评分从高到低的 100 对引物,如图 1-5 所示。

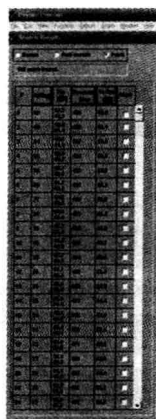


图 1-5 Primer premier 5.0 根据设定信息自动生成 100 对引物

直接点击任何一对引物,都可以看到引物长度、产物大小、 T_m (退火温度)值、GC%、单条引物是否形成发夹结构、二聚体、错配以及两条引物之间形成二聚体的可能性等信息。可以从这些设计

BLAST 检测将导出数个序列的基本信息,如图 1-8 所示,以及与其对应的 Score、E value,一般以其所对应的分数值就可以判断此引物与所检测的某种物质是否对应。比如:若第一条就是所需要的,直接点击进入可以看到这些序列的第一发表者,以及被引用情况,而且相对应的需要序列就会给出。一般 E value 值越小,特异性越高。再用同样的方法 BLAST 另一条引物。

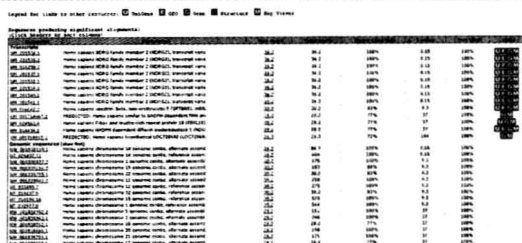


图 1-8 BLAST 结果

4. 送公司合成

将设计好的引物以电子邮件的方式送生物公司合成,比如北京奥科和上海生工等。各公司都提供电子订单,可以标注客户的具体要求。一般可以要求合成3个OD(其实1个OD就够用了,但1个OD和3个OD价格相同),每个OD分装一管,便于以后稀释。一般情况下,1周左右可以到货。

5. 注意事项

(1) 常用的引物设计软件如 Primer premier 5.0、Oligo 6.0 和 DNASTar 都不错,网上基本上都可以下载到。用软件辅助设计的引物并不一定分数越高越好,还需结合实验的具体情况,通过进一步实验才能证明。

(2)合成好的引物是干粉,可以置4℃或-20℃保存。

6. 个人心得

为了防止提取 RNA 时因 DNA(基因组)污染干扰实验,可以在引物设计上下工夫。上下游引物设计于跨内含子的前一个外显子的 3'端和下一个外显子的 5'端,这样不会在基因组上扩出来。还可以

设计在两个离得远的外显子上,这样从基因组和 cDNA 上得到的产物大小不一样。但是对于单外显子基因,最好选择 DNase I 处理。

表达水平检测和开放读框没有关系,PCR 的位置不需要在读框里,实际上 3' 非翻译区更加保守,同源性低。

很多在 PCR 方面有经验的专业人员实际上并不需软件帮助,按照引物设计的原则直接在序列上寻找合适的引物,同样可以得到满意的结果(附常用内参照引物,表 1-1)。

表 1-1 常用内参照引物

内参基因名称	引物序列	退火温度 (℃)	PCR 产物大小(碱 基对, base pair, bp)
Human beta actin [●]	上游 agcgagcatcccccaggt	54	285
	下游 gggcacgaaggctcatct		
Rat beta actin	上游 gagagggaatcgtgcgtgac	57	452
	下游 catctgctggaaggaggaca		
Mouse beta actin	上游 gtcctcaccctcccaaaag	56	266
	下游 gctgcctcaacacctcaaccc		
Human GAPDH [*]	上游 aggtccaccactgacacgtt	55	310
	下游 gcctcaagatcatcagcaat		
Rat GAPDH	上游 acagcaacagggtggtggac	57	252
	下游 ttgagggtgcagcgaactt		
Mouse GAPDH	上游 ggtgaaggtcggtgtgaacg	56	233
	下游 ctcgctcctggaagatggtg		

注: [●] beta actin, β - 肌动蛋白

^{*} GAPDH, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, 磷酸甘油醛脱氢酶

二、RNA 提取及定量

1. 原则

避免 RNA 酶污染。

2. 主要仪器及试剂

(1) 紫外分光光度计(以下以 Bio - Rad 公司的 SmartSpec™ 3000 分光光度计为例)。

(2) 无菌乳胶手套(无滑石粉)、口罩、离心管(EP 管)、移液器及枪头、匀浆器等。

(3) Trizol、氯仿(三氯甲烷)、异丙醇、乙醇、DEPC 处理水等。

3. 操作步骤(全程戴手套和口罩)

(1) Trizol 处理。将细胞培养液细胞吸出后,用 PBS 洗 2 次,加入 1ml Trizol,室温裂解 1 ~ 2min,用移液器均匀吹下细胞并置于 EP 管中,上下轻柔颠倒 10 次,室温静置 5min。组织样品可以加入 Trizol 后匀浆,后续的步骤和细胞样品相同。Trizol 的用量一般 1ml 至少可以处理一个长满的 25cm² 细胞培养皿的细胞或 200mg 的组织。

(2) 加 1/5 体积的氯仿(如 1ml Trizol 加 0.2ml 氯仿),颠倒混匀 10 次,室温静置 5min, 4℃, 12 000r/min, 离心 20min。

(3) 转上层水相于另一 EP 管中,加等体积异丙醇,颠倒混匀 10 次,室温静置 10min, 4℃, 12 000r/min, 离心 15min。

(4) 真空泵或移液器小心吸弃上清液,加冰预冷的 75% 乙醇($\omega_{乙醇} = 0.75$)(用 DEPC 处理水配), 4℃, 12 000r/min, 离心 10min。

(5) 弃上清液,EP 管倒扣,空气干燥 5 ~ 10min。

(6) 溶于 20 μ l DEPC 处理水中。

(7) 定量时将溶于 DEPC 处理水的 RNA 进行适量稀释,如 50 倍或 100 倍稀释(98 μ l 去离子水加 2 μ l RNA 或 99 μ l 去离子水加 1 μ l RNA,总体积 100 μ l),用紫外分光光度计的微量石英杯定量,开机后选择 RNA 定量,先用 100 μ l 去离子水做空白读数去除背景,再检测样品。读取 OD260 值及 OD260/OD280 比值。

4. 结果判读

OD260/OD280 如果在 1.8 ~ 2.0 之间,基本上可以进行下一步反转录,越接近 2.0 越好,若比值明显低于 1.8,可能存在蛋白污