

LINCHUANG KEYAN CHANGYONG FENZI SHENGWUXUE JISHU

临床科研常用分子生物学技术

武会娟 伦永志 主编

 北京科学技术出版社

临床科研常用分子生物学技术

武会娟 伦永志 主编

 北京科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

临床科研常用分子生物学技术/武会娟, 伦永志主编. —北京: 北京科学技术出版社, 2015. 7

ISBN 978 - 7 - 5304 - 7532 - 4

I. ①临… II. ①武… ②伦 III. ①医学 - 分子生物学
IV. ①Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 283243 号

临床科研常用分子生物学技术

主 编: 武会娟 * 伦永志 *

责任编辑: 王 薇 韩 晖 李 鹏

责任印制: 张 良

封面设计: 天露霖文化

出 版 人: 曾庆宇

出版发行: 北京科学技术出版社

社 址: 北京西直门南大街 16 号

邮政编码: 100035

电话传真: 0086-10-66161951 (总编室)

0086-10-66113227 (发行部)

0086-10-66161952 (发行部传真)

电子信箱: bjkj@bjkjpress.com

网 址: www.bkydw.cn

经 销: 新华书店

印 刷: 廊坊市海涛印刷有限公司

开 本: 787mm × 1092mm 1/16

字 数: 292 千

印 张: 15.25

版 次: 2015 年 7 月第 1 版

印 次: 2015 年 7 月第 1 次印刷

ISBN 978 - 7 - 5304 - 7532 - 4/Q · 102

定 价: 80.00 元



京科版图书, 版权所有, 侵权必究。
京科版图书, 印装差错, 负责退换。

编 委 会

主 编 武会娟 伦永志

编 委 (以姓氏笔画为序)

马 凯 (北京市理化分析测试中心)

王 琦 (首都医科大学附属北京地坛医院)

王雪蕾 (大连大学医学院)

田彦捷 (北京市理化分析测试中心)

伦永志 (大连大学医学院)

安云鹤 (北京市理化分析测试中心)

李 越 (北京市理化分析测试中心)

李宝明 (北京市理化分析测试中心)

张小莉 (北京市理化分析测试中心)

迟 庆 (大连大学医学院)

陈尔凝 (北京市理化分析测试中心)

武会娟 (北京市理化分析测试中心)

钱嘉林 (北京市理化分析测试中心)

高丽娟 (北京市理化分析测试中心)

程小艳 (北京市理化分析测试中心)

蒋中秀 (中国医科大学附属盛京医院)

魏 玲 (北京市理化分析测试中心)

秘 书 迟 庆 (大连大学医学院)

姚晓坤 (大连大学医学院)

前 言

毋庸置疑，分子生物学早已成为生物医学科研的主流，分子生物学的理论与技术也已渗透到当代生命科学的所有领域。回顾自然科学发展历程，任何一项重大成就无不与先进技术的发展息息相关。古人云“工欲善其事，必先利其器”，分子生物学技术就是挖掘生命现象本质并获取突破的利器。分子生物学技术是当前生物医学科研领域使用最广泛的先进而强有力的工具，对于生命科学的发展起着至关重要的作用。

分子生物学技术内容多，信息量大，知识更新快，而且理论过于抽象，学习难度较大。我们相信多数读者此前或多或少接触过分子生物学技术，但真正接受过严格、规范和系统培训的相对较少。4年来，北京市理化分析测试中心已举办12期“分子生物学常用技术与研究进展学习班”。截至目前，共招收来自全国各地的学员300余名，其中京外学员约占70%。大约40%的学员来自临床，一定程度上反映了分子生物学技术应用于临床科研的重要性和必要性。

从现实角度看，大多数医生除了临床治疗、教学工作外，还要承担相当重的科研任务，同时还受到科研手段和仪器设备的限制，这种现象在高校附属医院及省级以上医院中尤为突出。通过与临床学员的交流，我们了解到诸多同仁在科研实践中所承受的压力，并对此感同身受。这一点也是促成我们编写本书的主要动力。

有关分子生物学技术的著作，乃至鸿篇巨制时有问世。尽管分子生物学新技术和新方法不断涌现，但实际上以稳定性和可操作性为特征的常用基本技术仍然为大多数实验室所信赖和推崇。所以本书的编写宗旨就是“实用常用，重在实践”。本书的相关章节曾作为实验讲义用于学习班教学，得到学员们的广泛认可。

我们在此基础上增加了部分内容，力求将理论与实践相结合，希望能为读者提供一本求真务实的分子生物学常用技术指南。

本书可供医药、卫生、生物、农林及相关专业的科研、教学、技术人员和在读研究生参考。

本书各章内容均几易其稿，虽经再三斟酌与审校，但限于编者的学识水平，难免有疏漏和不足之处，在此敬请广大读者不吝指正。

武金娟 徐志

2014 年 9 月

目 录

第一章 分子克隆	1
第一节 聚合酶链式反应 (PCR)	李宝明 武会娟 1
一、基本原理	1
二、材料、试剂与主要仪器	5
三、操作步骤	6
四、注意事项	6
第二节 琼脂糖凝胶电泳	田彦捷 高丽娟 7
一、基本原理	7
二、材料、试剂与主要仪器	10
三、操作步骤	11
四、结果分析	11
五、注意事项	14
第三节 琼脂糖凝胶中目的 DNA 片段的回收	田彦捷 武会娟 15
一、基本原理	15
二、材料、试剂与主要仪器	16
三、操作步骤	16
四、注意事项	17
第四节 体外连接 DNA	陈尔凝 18
一、基本原理	18
二、材料、试剂与主要仪器	20
三、操作步骤	20
四、结果分析	21
五、注意事项	21
第五节 感受态细胞的制备	田彦捷 高丽娟 22
一、基本原理	22
二、材料、试剂与主要仪器	24

三、操作步骤	24
四、注意事项	25
第六节 重组质粒的转化和阳性克隆的筛选	陈尔凝 26
一、基本原理	26
二、材料、试剂与主要仪器	27
三、操作步骤	28
四、结果分析	28
五、注意事项	28
第七节 质粒 DNA 的提取	陈尔凝 高丽娟 29
一、基本原理	29
二、材料、试剂与主要仪器	29
三、操作步骤	30
四、结果分析	31
五、注意事项	32
第八节 DNA 限制性内切酶酶切反应	马 凯 34
一、基本原理	34
二、材料、试剂与主要仪器	37
三、操作步骤	37
四、结果分析	38
五、注意事项	39
第九节 DNA 测序	李宝明 武会娟 40
一、基本原理	40
二、材料、试剂与主要仪器	42
三、操作步骤	42
四、结果分析	44
五、注意事项	49
 第二章 实时定量 PCR	51
第一节 组织总 RNA 的提取	李 越 王 琦 52
一、基本原理	52
二、材料、试剂与主要仪器	53

三、操作步骤	54
四、结果分析	55
第二节 实时定量荧光 PCR	李 越 王 琦 57
一、基本原理	58
二、材料、试剂与主要仪器	63
三、操作步骤	65
四、结果分析	67
 第三章 蛋白免疫印迹	70
第一节 组织总蛋白的提取	程小艳 武会娟 70
一、基本原理	70
二、材料、试剂与主要仪器	76
三、操作步骤	76
四、结果分析	77
五、注意事项	77
第二节 蛋白浓度测定	程小艳 武会娟 77
一、基本原理	77
二、材料、试剂与主要仪器	81
三、操作步骤	82
四、结果分析	83
五、注意事项	84
第三节 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE)	
.....	程小艳 武会娟 84
一、基本原理	84
二、材料、试剂与主要仪器	88
三、操作步骤	89
四、结果分析	91
五、注意事项	91
第四节 转膜与封膜	程小艳 武会娟 92
一、基本原理	92
二、材料、试剂与主要仪器	97

三、操作步骤	98
四、结果分析	100
五、注意事项	100
第五节 抗体杂交	程小艳 武会娟 101
一、基本原理	101
二、材料、试剂与主要仪器	103
三、操作步骤	103
四、结果分析	104
五、注意事项	104
第六节 化学发光与显色	程小艳 武会娟 104
一、基本原理	104
二、材料、试剂与主要仪器	106
三、操作步骤	107
四、结果分析	107
五、注意事项	108
第四章 蛋白原核表达与纯化	109
第一节 重组蛋白小批量诱导表达	王雪蕾 伦永志 109
一、基本原理	109
二、材料、试剂与主要仪器	116
三、操作步骤	117
四、结果分析	118
五、注意事项	118
第二节 重组蛋白的提取	王雪蕾 伦永志 118
一、基本原理	118
二、材料、试剂与主要仪器	123
三、操作步骤	124
四、结果分析	124
五、注意事项	124
第三节 亲和层析仪纯化重组蛋白	魏 玲 武会娟 125
一、基本原理	125

二、材料、试剂与主要仪器	128
三、操作步骤	130
四、结果分析	132
五、注意事项	132
第四节 Ni^{2+} 柱纯化重组蛋白	魏 玲 武会娟 135
一、基本原理	135
二、材料、试剂与主要仪器	136
三、操作步骤	137
四、结果分析	142
五、注意事项	143
第五章 外源基因在真核细胞中的表达	144
第一节 细胞转染	钱嘉林 李明珍 144
一、基本原理	144
二、材料、试剂与主要仪器	148
三、操作步骤	149
四、注意事项	151
第二节 稳定转染细胞系的建立	伦永志 蒋中秀 152
一、基本原理	152
二、材料、试剂与主要仪器	152
三、操作步骤	153
四、结果分析	161
五、注意事项	163
第六章 小干扰 RNA (siRNA) 的应用	蒋中秀 伦永志 165
第一节 siRNA 的作用机制与应用	165
一、siRNA 的作用机制	165
二、RNAi 的潜能	166
三、siRNA 的应用	167
第二节 siRNA 的设计、制备和转染	170
一、siRNA 和 RNAi 作用的特点	170

二、siRNA 的设计	171
三、siRNA 的制备	172
四、siRNA 的转染	173
第三节 利用 siRNA 技术干扰目的基因	174
一、材料、试剂与主要仪器	174
二、操作步骤	175
三、结果分析	181
四、注意事项	183
 第七章 计算机辅助序列设计	184
第一节 PCR 引物设计	马 凯 184
第二节 Real Time PCR 引物设计	安云鹤 195
第三节 siRNA 的设计	安云鹤 202
 第八章 分子生物学实验常用资料	迟 庆 伦永志 207
第一节 常用数据及换算公式、图表	207
第二节 常用试剂与缓冲液的配制方法	216
 参考文献	230

第一章 分子克隆

第一节 聚合酶链式反应 (PCR)

一、基本原理

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是美国 Cetus 公司人类遗传研究室的科学家 Mullis 于 1983 年发明的一种在体外快速扩增特定基因或 DNA 序列的方法, 故又称为基因的体外扩增法。它可以在试管中建立扩增反应, 与细胞内的 DNA 复制过程十分类似, 经数小时后就能将极微量的目的基因或某一特定的 DNA 片段扩增数十万倍, 乃至千百万倍, 获得足够数量的精确的 DNA 拷贝。PCR 技术操作简单, 容易掌握, 结果也较为可靠, 为基因的分析与研究提供了一种强有力的手段, 是现代分子生物学研究中的一项富有革命性的创举, 对整个生命科学的研究与发展, 都有着深远的影响。现在, PCR 技术不仅可以用来扩增与分离目的基因, 而且在基因突变与检测、遗传疾病的诊断与治疗、分子进化研究以及法医学等诸多领域都有着重要的用途。因此, 该技术问世不久, 即被科技界享有盛誉的美国 *Science* 杂志评为 1989 年度十大科技新闻之一, 成为全世界引用频率最高的文献之一, Mullis 本人也因为发明了该技术在 1993 年获得了诺贝尔化学奖。

(一) PCR 技术基本原理

PCR 技术的基本原理类似于细胞内的 DNA 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 由高温变性、低温退火和中温延伸三个基本反应步骤构成, 经过多次循环重复完成 PCR 过程。

1. 模板 DNA 的变性

将含有模板 DNA 的反应混合物加热至高温 (92 ~ 96℃) 一定时间后, 使模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离, 分离出单链, 以便它与引物结合, 为下一步反应做准备。

2. 模板 DNA 与引物的退火

在温度降低后 (40 ~ 60℃), 寡核苷酸引物与变性后的单链模板 DNA 发生复性作用, 结合在靶 DNA 区段两端的互补序列位置上。

3. 引物的延伸

将反应混合物升温至中温 (70 ~ 72℃), DNA 模板引物结合物在 *Taq* DNA 聚合酶的作用下, 从引物的 3' 端开始, 按 5' 端至 3' 端方向, 以 dNTP 为反应原料, 靶序列为模板, 按碱基配对原则合成一条与模板 DNA 链互补的新链。

重复循环变性、退火、延伸三过程, 就可获得更多的“半保留复制链”, 而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需 2 ~ 4 min, 2 ~ 3 h 就能将待扩增目的基因扩增放大几百万倍。

(二) PCR 反应体系

1. 模板 DNA

单、双链 DNA 或 RNA 都可作为 PCR 的模板, 若起始材料是 RNA, 需先通过逆转录反应得到一条 cDNA。模板可以是粗制品, 但不能混有蛋白酶、核酸酶、*Taq* DNA 聚合酶抑制剂以及任何能结合 DNA 的蛋白。在一定范围内 PCR 产量随模板物质的量升高而显著升高, 但模板物质的量过高会导致反应的非特异性增加。为保证反应特异性, 一般采用微克水平的基因组 DNA 或 $10^2 \sim 10^5$ 拷贝的待扩增片段作为模板。

2. PCR 扩增引物

引物是指与模板 DNA 中目标区段两端序列互补的人工合成的寡核苷酸短片段, 其长度通常在 15 ~ 30 个核苷酸。引物设计的合理与否是直接关系到 PCR 扩增成败的关键因素。引物合成的质量要高, 且需纯化。冻干引物于 -20℃ 可保存 12 ~ 24 个月, 液体状态于 -20℃ 可保存 6 个月。引物不用时应于 -20℃ 保存。在 PCR 反应体系中, 引物物质的量一般为 0.1 ~ 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 浓度过高会引起模板与引物的错配, PCR 反应特异性下降, 同时形成引物二聚体的概率增大。

3. DNA 聚合酶

DNA 聚合酶在 PCR 反应中起着关键作用, 因此, DNA 聚合酶的选择是至关重要的。早期进行的 PCR 中使用的是大肠埃希菌 DNA 聚合酶 I Klenow 大片段, 但由于这种酶是热敏感的, 在实际操作中十分烦琐, 且特异性差。直到 1988 年, Saiki 等人成功地将热稳定的 *Taq* DNA 聚合酶应用于 PCR 扩增, 提高了反应的特异性和敏感性, 是 PCR 技术的一次突破性的进展。目前常用的 *Taq* DNA 聚合酶主要有两种来源: 从嗜热水生菌中提

取的天然 *Taq* DNA 聚合酶和大肠埃希菌表达的重组 *Taq* DNA 聚合酶。两种酶都有 5'→3'外切酶活性,但均缺乏 3'→5'外切酶活性。在 50 μ L PCR 反应体系中 *Taq* DNA 聚合酶的用量为 0.5 ~ 2.5 U。酶用量过少则 PCR 产物相应减少,酶用量过高则可引起非特异性扩增。

4. dNTP

dNTP 物质的量取决于扩增片段的长度。物质的量一般为 50 ~ 200 μ mol/L。由于 dNTP 溶液有较强酸性,可用 1 mol/L NaOH 溶液将其贮存液 (50 mmol/L) 的 pH 调至 7.0 ~ 7.5,分装小管于 -20℃ 保存。过多冻融会使其降解。dNTP 可与 Mg^{2+} 结合,使游离的 Mg^{2+} 浓度下降,从而影响 DNA 聚合酶的活性。因此,要注意 dNTP 和 Mg^{2+} 两者之间的浓度关系。

5. 缓冲液

常用的缓冲液体系为 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris - HCl (pH 8.3), 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 100 ng/mL 明胶。缓冲液中 KCl 有利于引物的退火,但过高浓度的 KCl 会抑制 *Taq* DNA 聚合酶的活性。 Mg^{2+} 是 *Taq* DNA 聚合酶活性所必需的。 Mg^{2+} 浓度过低则酶活性显著降低;过高时则酶催化非特异性产物的扩增。PCR 混合物中的 DNA 模板、引物和 dNTP 的磷酸基团均可与 Mg^{2+} 结合,降低 Mg^{2+} 实际浓度。*Taq* DNA 聚合酶需要的是游离的 Mg^{2+} ,因此 PCR 中 Mg^{2+} 的加入量要比 dNTP 浓度高 0.2 ~ 2.5 mmol/L。最好对每种模板、每种引物均进行 Mg^{2+} 浓度的优化。PCR 反应中 Mg^{2+} 浓度一般为 1.5 ~ 2.0 μ mol/L。另外,还需注意引物和模板 DNA 原液中如含有 EDTA 等金属离子螯合剂也会影响游离 Mg^{2+} 浓度,使 Mg^{2+} 浓度降低。当高浓度 dNTP 或 DNA 样品中有 EDTA 的条件下进行反应时,PCR 反应体系须相应提高 Mg^{2+} 浓度。

(三) PCR 反应参数

鉴于目前 PCR 技术已经获得了极其广泛的应用,模板 DNA 的来源多种多样,所用的寡核苷酸引物序列、长度不一等诸多因素,因此要给出一个“标准”的反应参数十分困难。

PCR 涉及变性、退火、延伸三个阶段的不同温度和时间。通常双链模板 DNA 在 95℃ 于 45 s 至 1 min 即可使一般的 DNA 分子完全变性,变性温度过高或变性时间过长都会导致 *Taq* DNA 聚合酶活性下降,影响 PCR 的产量。变性温度过低会导致 DNA 模板变性不完全,引物与模板无法结合,最终致使 PCR 反应失败。对于富含 G、C 的模板应适当提高变性温度。

退火温度由引物的长度及其 G + C 含量决定,其退火温度可由 T_m 值确定,退火温度比 T_m 低 5 ~ 10℃。当引物长度为 15 ~ 25 bp 时, T_m 可按 T_m

$= 4(G + C) + 2(A + T)$ 计算。提高退火温度可减少引物与模板之间的非特异结合, 提高 PCR 反应的特异性。

在 T_m 值允许的范围内, 较高的退火温度有利于提高 PCR 特异性, 退火时间一般为 0.5 ~ 1 min。延伸温度为 72℃, 时间与待扩增片段长度有关, 一般 1 kb 以内的片段延伸时间为 1 min, 如扩增片段较长可适当增加时间。

PCR 的循环次数主要取决于模板 DNA 的浓度。一般情况下, 随着 PCR 的循环次数的增加, PCR 产物的浓度会不断增加, 但当循环次数增加到一定程度以后, PCR 产物的积累会进入“平台期”, 主要是因为产物浓度过高导致自身结合而不与引物结合, 或产物链缠结在一起, 致使扩增效率降低; 另外, 随着循环次数的增加, *Taq* DNA 聚合酶活性降低, 引物及 dNTP 浓度下降, 易发生错误掺入, 非特异性产物增加。因此, 在得到足够产物的前提下应尽量减少循环的次数, 一般为 25 ~ 35 次。

(四) PCR 引物的设计原则

PCR 扩增引物, 是指与待扩增的靶 DNA 区段两段序列互补的人工合成的寡核苷酸短片段, 其长度通常为 15 ~ 30 个核苷酸。引物的设计在整个 PCR 扩增中占有十分重要的地位, 引物与模板结合的特异性是决定 PCR 反应结果的关键, 若引物设计不合理, PCR 反应的特异性及扩增效率均会降低。下列原则有助于合理地设计引物。

(1) 引物序列应位于基因组 DNA 的高度保守区, 最好与非扩增区无同源序列。

(2) 引物长度以 15 ~ 30 bp 为宜, 通常 20 bp 左右。

(3) 引物碱基最好随机分布, 避免出现数个嘌呤或嘧啶的连续排列, G + C 碱基的含量在 40% ~ 75%。

(4) 引物内部避免形成二级结构, 特别是引物的末端应无“回文”结构。

(5) 上下游引物间不应有互补序列, 尤其是 3' 端应避免互补, 以免形成“引物二聚体”。

(6) 引物的 5' 端可以修饰。如附加限制酶位点, 引入突变位点, 用生物素、荧光物质、地高辛标记, 加入其他短序列, 包括起始密码子、终止密码子等。最多不超过 10 个碱基。

(7) 引物 3' 端的碱基, 特别是最末及倒数第二个碱基, 会影响 *Taq* DNA 聚合酶的延伸效率, 从而影响 PCR 的扩增效率及特异性, 因此严格要求配对, 最好选择 G 和 C, 不选 A。

目前, 网络上已经有很多开发好的引物设计、评估软件供下载和使

用，并且这些软件集成了引物设计的一些常用原则，因此使用起来非常方便、快捷。

二、材料、试剂与主要仪器

(一) 材料

1. PCR 模板

PCR 的模板可以是 DNA，也可以是 RNA，模板质量的高低对 PCR 实验的成功与否至关重要。本实验以构建 M2 型丙酮酸激酶基因 3'—非翻译区 (PKM 2 3'—UTR) 克隆质粒为例说明。

在日常科研实践中，模板的取材主要依据 PCR 的扩增对象，可以是病原体标本，如病毒、细菌、真菌等；也可以是病理生理标本，如细胞、血液、羊水等；法医学标本有血斑、精斑、毛发等。对于标本处理的基本要求是除去杂质，并部分纯化标本中的核酸。多数样品需要经过 SDS 和蛋白酶 K 处理。难以破碎的细菌，可用溶菌酶加 EDTA 处理。所得到的粗制 DNA，经酚、氯仿抽提纯化，再用乙醇沉淀后用作 PCR 模板，具体方法可以参考相关技术资料。模板的制备也可采用商品化的 DNA (RNA) 提取、纯化试剂盒进行。

2. 引物

PCR 扩增实验中使用的引物要根据实验中所用模板及要获得的目的基因来共同确定。本实验根据目的基因 (PKM 2 3'—UTR) 确定引物序列，如表 1-1 所示。

表 1-1 PCR 实验引物序列信息

PKM2 3'—UTR	引物序列	产物长度
F	GAGCTCGTGTTCCTCTGCCGT	676 bp
R	TCTAGACCCAGCAGAAAAGAGAGG	

3. 去离子超纯水

(二) 试剂

PCR 反应体系需要的试剂包括 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液。对于各试剂的使用量可以根据实验目的单项添加，也可以使用商品化集成试剂。

本实验采用 2 × PCR Master Mix，其中含有 *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、MgCl₂、反应缓冲液、反应增强剂、优化剂和稳定剂，具有方便快捷的优