

◆ 国 家 规 划 教 材 ◆

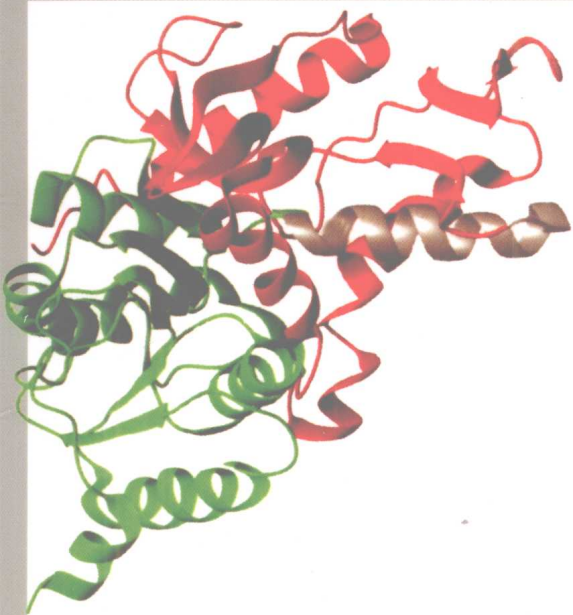
精编

JINGBIAN
FENZI SHENGWUXUE
SHIYAN ZHIDAO



分子生物学

实验指导



刘维全 高士争 王吉贵 主编



化学工业出版社
生物·医药出版分社

◆ 国 家 规 划 教 材 ◆

JINGBIAN
FENZI SHENGWUXUE
SHIYAN ZHIDAO



精编 分子生物学 实验指导

刘维全 高士争 王吉贵 主编



化学工业出版社
生物·医药出版分社

· 北 京 ·

本书介绍了分子生物学技术的发展简史,详细介绍了分子生物学实验中的各项基本操作,常用的酶、载体和实验仪器的应用方法及注意事项,详细讲解了14种分子生物学实验中常用的实验操作方法,并说明了实验记录、数据处理、结果分析及实验报告的撰写方法。

本书对初涉分子生物学相关专业的本科生、研究生在实验操作上有极大的帮助,并可供相关实验人员、研究人员使用,是一本实用性很强的实验参考书。

图书在版编目(CIP)数据

精编分子生物学实验指导/刘维全,高士争,王吉贵
主编. —北京:化学工业出版社,2009.3

(国家规划教材)

ISBN 978-7-122-04648-2

I. 精… II. ①刘…②高…③王… III. 分子生物学-
实验 IV. Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2009)第007990号

责任编辑:邵桂林
责任校对:洪雅姝

文字编辑:史 懿
装帧设计:韩 飞

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:北京云浩印刷有限责任公司
850mm×1168mm 1/32 印张5½ 字数125千字
2009年4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:15.00元

版权所有 违者必究

《精编分子生物学实验指导》

编写人员

主 编 刘维全 高士争 王吉贵
编写人员 (以姓氏笔画为序)
 于福先 王吉贵 刘维全
 孙绍光 杨淑艳 张 鹏
 洪 燕 高士争 韩海棠

前 言

分子生物学技术种类繁多，数量巨大，是一个庞大的技术体系。其核心内容是基因工程技术，即基因克隆、序列测定、表达与调控、表达产物的获得等过程中所用到的技术。同时，还包括该过程中所有用到的检测、鉴定技术。总之，所有直接或间接与生物大分子操作有关的技术，统称为分子生物学技术。

在分子生物学领域中，作为实验指导或指南方面的专著，国外有美国冷泉港实验室 J. Sambrook 等编著的《Molecular Cloning——A Laboratory Manual》，迄今已发行至第 3 版，每个版次均有中译本。另外一本就是《Short Protocols in Molecular Biology》，也有中译本。国内这方面的专著有卢圣栋的《现代分子生物学实验技术》。这些专著对分子生物学实验的理论、具体操作步骤以及注意事项等都给出了详尽的介绍，是分子生物学实验室必不可少的，也是每一位分子生物学科研工作者必备的经典参考书。但是，这些实验专著由于内容庞大、价格较贵，在实用性和经济上不适合作为学生的实验教材。基于此，我们试图编写一本简明、实用的实验指导书，以满足分子生物学实验教学的需要。这就是我们编写《精编分子生物学实验指导》的目的。

本书共分 20 章，以分子克隆的一般过程为主线，选择取材方便、重复性好的基础实验技术。第 1 章至第 4 章简要介绍了分子生物学技术的发展史，分子克隆的一般过程，常用的仪器设备，安全注意事项以及常用工具酶和载体。第 5 章至第 18 章，是本书的主要内容，分别简单介绍了核酸定量测定技术，核酸标记技术，琼脂糖凝胶电泳技术，聚丙烯酰胺凝胶电泳技术，动物组织中 DNA 的提取与纯化，动物组织中总 RNA 的提取及定量，大肠杆菌感受态细胞的制备及质粒的转化，质粒 DNA 的提取、纯化与电泳鉴定，重组子的构建与筛选鉴定，目的基因在大肠杆菌中的表达与检测，聚合酶链式反应（PCR），Southern 杂交

技术, Northern 杂交技术和免疫印迹技术——Western blot 等技术的用途和原理, 详细阐明了每个技术的操作步骤和注意事项。在有些实验技术中还包含了多个不同但相关的技术, 如质粒的提取包括小提和大提, 基因组 DNA 的提取包括组织和血液 DNA 的提取等, 可根据实际条件选择使用。每章的最后附有少量的思考题, 供学生思考。第 19、20 两章是实验记录和实验报告。

这些技术方法都是目前分子生物学实验室正在使用的方法。在实验材料的选择上, 除通用的实验技术外, 全部选择使用动物材料。从安全角度考虑, 避免采用具有危害性的技术方法, 如同位素标记技术等。

目前, 由于很多分子生物学实验技术已有现成的试剂盒可供使用, 极大地简化了操作步骤, 提高了实验的效率和成功率。但考虑到本书的使用者大多是初学者, 为了使他们更好地掌握这些技术的原理, 弄清楚实验中每个步骤的道理, 以便灵活使用、改进提高已有的技术, 创造新的技术, 所以本书以基本操作技术为主, 很少选择试剂盒进行实验。

在实验技术种类的选择上, 一方面, 由于分子生物学技术种类繁多, 数量巨大, 从中选择出大家都能够接受并开展的实验非常困难。另一方面, 由于实验条件各不相同, 实验材料多种多样, 更是增加了选择合适实验的难度。因此, 本书在实验选择上可能存在不完善之处, 各学校可根据实验室的具体条件选用不同的实验, 对具体的实验步骤进行适当的修改完善, 还可以增加新的实验内容。

除作为本科生教材使用外, 本书还可供相关专业研究生和实验室工作人员参考。

由于上述种种原因, 加上作者水平有限, 书中不妥或错误之处在所难免, 希望读者批评指正。

编 者

2008 年 12 月于北京

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 分子生物学技术发展简史	1
1.2 DNA 重组的一般过程	5
1.3 分子生物学技术的应用	12
第 2 章 分子生物学实验室常用仪器设备及安全	
注意事项	13
2.1 分子生物学实验室常用仪器设备	13
2.2 分子生物学实验室安全注意事项	19
第 3 章 分子生物学实验基本操作技术	23
3.1 除（灭）菌技术	23
3.2 无菌操作技术	28
3.3 微量操作技术	30
第 4 章 分子克隆常用工具酶和载体	32
4.1 分子克隆常用工具酶	32
4.2 常用载体	37
4.3 宿主细胞	39
第 5 章 核酸定量测定技术——紫外分光光度法	41
5.1 主要内容	41
5.2 目的要求	41

5.3	实验原理·····	42
5.4	材料、试剂及器材·····	42
5.5	方法与操作步骤·····	43
第6章	核酸标记技术 ·····	46
6.1	主要内容·····	47
6.2	目的要求·····	47
6.3	实验原理·····	47
6.4	材料、试剂与器材·····	48
6.5	方法与操作步骤·····	49
第7章	琼脂糖凝胶电泳技术 ·····	52
7.1	主要内容·····	53
7.2	目的要求·····	53
7.3	实验原理·····	53
7.4	材料、试剂及器材·····	55
7.5	方法与操作步骤·····	56
第8章	聚丙烯酰胺凝胶电泳技术 ·····	60
8.1	主要内容·····	62
8.2	目的要求·····	62
8.3	实验原理·····	62
8.4	材料、试剂与器材·····	64
8.5	方法与操作步骤·····	65
第9章	动物组织中DNA的提取与纯化 ·····	70
9.1	主要内容·····	70
9.2	目的要求·····	70
9.3	实验原理·····	71

9.4	材料、试剂及器材	71
9.5	方法与操作步骤	72
第 10 章	动物组织总 RNA 的提取及定量	75
10.1	主要内容	75
10.2	目的要求	75
10.3	实验原理	76
10.4	材料、试剂及器材	76
10.5	方法与操作步骤	76
第 11 章	大肠杆菌感受态细胞的制备和转化	79
11.1	主要内容	79
11.2	目的要求	79
11.3	实验原理	80
11.4	材料、试剂及器材	81
11.5	方法与操作步骤	82
第 12 章	质粒 DNA 的提取、纯化与电泳鉴定	85
12.1	主要内容	85
12.2	目的要求	86
12.3	实验原理	86
12.4	材料、试剂及器材	87
12.5	方法与操作步骤	88
第 13 章	重组子的构建与筛选鉴定	93
13.1	主要内容	93
13.2	目的要求	93
13.3	实验原理	94
13.4	材料、试剂与器材	94

13.5	方法与操作步骤	96
第 14 章	目的基因在大肠杆菌中的表达与检测	99
14.1	主要内容	100
14.2	目的要求	100
14.3	实验原理	100
14.4	材料、试剂与器材	101
14.5	方法与操作步骤	101
第 15 章	聚合酶链式反应	104
15.1	主要内容	104
15.2	目的要求	104
15.3	实验原理	104
15.4	材料、试剂与器材	106
15.5	方法与操作步骤	106
第 16 章	Southern 杂交技术	112
16.1	主要内容	113
16.2	目的要求	113
16.3	实验原理	113
16.4	材料、试剂及器材	115
16.5	方法与操作步骤	116
第 17 章	Northern 杂交技术	120
17.1	主要内容	120
17.2	目的要求	120
17.3	实验原理	120
17.4	材料、试剂及器材	121
17.5	方法与操作步骤	123

第 18 章 免疫印迹技术——Western Blot	128
18.1 主要内容	128
18.2 目的要求	129
18.3 实验原理	129
18.4 材料、试剂及器材	130
18.5 方法与操作步骤	131
第 19 章 实验记录、数据处理与结果分析	138
19.1 实验记录	138
19.2 数据处理	140
19.3 结果分析与结论	143
第 20 章 实验报告	146
附录	149
一、常用缓冲溶液的配制方法	149
二、常用电泳上样缓冲液	151
三、常用限制性核酸内切酶的识别序列及切点	152
四、常用宿主细胞及特点	152
五、常用蛋白酶与核酸酶的配制及使用浓度	154
六、常用培养基	154
七、常用抗生素的配制及使用浓度	155
八、琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶的浓度及其有效 分离范围	155
九、不同浓度聚丙烯酰胺凝胶的配制方法	156
十、蛋白质和核酸常用分子质量标准	157
参考文献	160

第 1 章

绪 论

目前，分子生物学技术主要是指 DNA 的体外操作技术，同时它还包括与之相关的生物化学、遗传学、细胞生物学、微生物学与免疫学等众多学科技术。化学、物理学以及计算机等学科技术的发展和在生命科学领域中的广泛应用，使它们也成为分子生物学技术体系的重要组成部分。分子生物学技术诞生于 20 世纪 70 年代初期，并随着分子生物学理论的快速发展而不断发展和完善，反过来又极大地促进了分子生物学及其他生命科学的飞速发展。

1.1 分子生物学技术发展简史

早在 19 世纪中叶，G. Mendel 就提出了遗传学定律——分离定律和自由组合定律，并指出，遗传是由一些独立的单位从一个世代传递给下一个世代。这些独立的能够遗传的单位就是我们今天所说的基因（gene）。大量的实验证据表明，基因就是核酸分子中的最小遗传单位。核酸包括脱氧核糖核酸（DNA）和核糖核酸（RNA）两种，除部分病毒的遗传物质为 RNA 外（这部分病毒被称为 RNA 病毒），绝大多数生物的遗传物质为 DNA。1953 年 J. Watson 和 F. Crick 首先提出了

DNA 的双螺旋结构模型。这是一个在生命科学发展史上具有里程碑意义的重大事件，它标志着生命科学的发展从此进入了分子生物学时代。

随着对 DNA 的化学组成、结构和理化学性质的深入研究，以及细胞内 DNA 的复制、转录和翻译过程的分子机理的阐明，使人们在体外研究基因的结构与其功能之间的相互关系，或者获得某一基因的表达产物成为可能。于是，从核酸的提取、纯化与鉴定，DNA 的酶切、连接，重组 DNA 导入受体细胞以及基因在细胞或个体中的表达，到表达产物的鉴定等环节，先后建立了一系列技术和方法，其中许多技术和方法被授予了诺贝尔奖。

20 世纪 70 年代，基因工程技术取得了突破性的进展。70 年代初期，W. Arber、H. O. Smith 和 D. Nathans 3 个小组发现并纯化了限制性内切酶；几乎同时，H. Temin 和 Baltimore 分别独立发现了 RNA 病毒中的反转录酶，为广泛开展 RNA 的研究奠定了基础；1972 年，美国斯坦福大学的 P. Berg 等首次用限制性内切酶切割了 DNA 分子，并实现了 DNA 分子的重组。1973 年，美国斯坦福大学的 S. Cohen 等第一次完成了 DNA 重组体的转化，这一年被定为基因工程的诞生年，Cohen 成为基因工程的创始人。同时，各种仪器及分析手段进一步发展，先后研制成功了 DNA 序列测定仪、DNA 合成仪等。

除上述具有划时代意义的技术性成果外，还有许多技术在分子生物学的发展过程中发挥了重要的作用。例如，产生于 20 世纪 30 年代中期的“放射性同位素示踪技术”在 50 年代有了较大的发展，不仅为各种生物化学代谢过程的阐明发挥了决定性的作用，而且为以后核酸和蛋白质标记技术的诞生奠定了基础；60 年代以后，各种仪器分析方法，如高效液相色谱技术（high pressure liquid chromatography, HPLC）、光谱技

术、X-光衍射技术 (X-ray diffraction) 及核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 技术等不断完善, 在核酸和蛋白质分析、含量测定以及空间结构解析等领域得到广泛应用。同期, 氨基酸自动分析仪、多肽序列测定仪的应用极大地加快了蛋白质的氨基酸组成和序列分析工作。此外, 层析和电泳技术也有了迅速发展。在 1968~1972 年, C. B. Anfinsen 创建了亲和层析技术, 开辟了层析技术的新领域。1969 年 K. Weber 应用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术 (SDS-PAGE) 测定了蛋白质的分子量, 使电泳技术得到了进一步发展。

20 世纪 80~90 年代, 基因工程技术进入快速发展的时期。1980 年, 英国剑桥大学的生物化学家 F. Sanger 和美国哈佛大学的 W. Gilbert 分别设计出酶法和化学法两种测定 DNA 分子核苷酸序列的方法, 因此与 Berg 共同获得了诺贝尔化学奖。从此, DNA 序列分析法成为分子生物学最重要的研究手段之一。

1980 年, J. W. Gordon 等首次报道, 用显微注射的方法将外源基因直接注入受精卵的雄原核中, 可以获得整合有目的基因的转基因小鼠。此后, 转基因与转基因动物的研究迅猛发展, 成为生命科学中的重要研究领域之一。

1981 年, 由 J. W. Jorgenson 和 K. D. Lukacs 首先提出的高效毛细管电泳技术 (high performance capillary electrophoresis, HPCE), 由于其高效、快速、经济, 尤其适用于生物大分子的分析, 因此受到广大科学工作者的极大重视, 发展极为迅速。HPCE 技术是分子生物学实验技术和仪器分析领域的重大突破, 因此导致原用于分析之用的 HPLC 技术逐渐向制备方向发展。

1984 年, 德国科学家 G. J. F. Kohler、英国科学家 C. Milstein 和丹麦科学家 N. K. Jerne 由于发展了单克隆抗体技术, 完善了极微量蛋白质的检测技术而共享了诺贝尔生理或

医学奖。

1985 年, 美国 Cetus 公司的 K. B. Mullis 等发明了 PCR 技术 (polymerase chain reaction, PCR), 即聚合酶链式反应技术。这是一种高效 DNA 体外扩增技术, 对于分子生物学的发展具有划时代的意义, Mullis 因此与第一个设计基因定点突变的美国科学家 M. Smith 共同获得了 1993 年的诺贝尔化学奖。

另外, 用于 DNA 检测的各种技术, 如核酸标记技术, 核酸杂交技术, 如 Dot blot、Southern blot 及 Northern blot 等, DNA 或基因克隆技术 (基因组文库和 cDNA 文库), 基因表达技术等相继产生并不断发展和完善。

进入 20 世纪 90 年代以后, 人们逐渐认识到, 对单一基因的结构与功能的研究远不能阐明生命的全部奥秘, 必须从基因组水平上对生物的 DNA 结构进行破译, 才有可能彻底揭开生命的奥秘或为此奠定坚实的基础。人类基因组计划 (human genomic project, HGP) 的实施与完成, 标志着分子生物学研究进入了后基因组时代, 基因组学、比较基因组学、转录组、蛋白质组学以及表观遗传学研究的迅速展开, 以 DNA 测序自动化、基因芯片 (gene chip) 技术、二维电泳技术 (two dimensional electrophoresis) 为代表的大规模、高通量核酸和蛋白质研究技术应运而生。这些技术都是以计算机技术为核心的众多学科交叉融合的结果。1997 年, Dolly 羊的诞生标志着体细胞核移植技术——动物克隆技术的建立和成功应用。它打破了动物体细胞全能性不可恢复的传统观念, 具有重大的理论和实际应用价值。

当然, 纵观分子生物学发展史, 它的每一个进步无不与其他学科, 如物理学、化学等的发展紧密联系, 先进的技术和研究手段, 如电子显微镜 (electron microscopy)、超速离心 (ultracentrifugation)、色谱 (chromatography)、同位素示踪 (isotopic tracing)、X-光衍射、质谱 (mass spectrometry) 以

及核磁共振等技术为分子生物学的发展提供了强有力的工具。

1.2 DNA 重组的一般过程

DNA 重组的一般过程包括目的基因的获得、DNA 重组与转化、重组质粒 (recombinant plasmid) 的筛选和鉴定、外源基因的导入、整合及表达产物的检测等步骤, 如图 1-1。

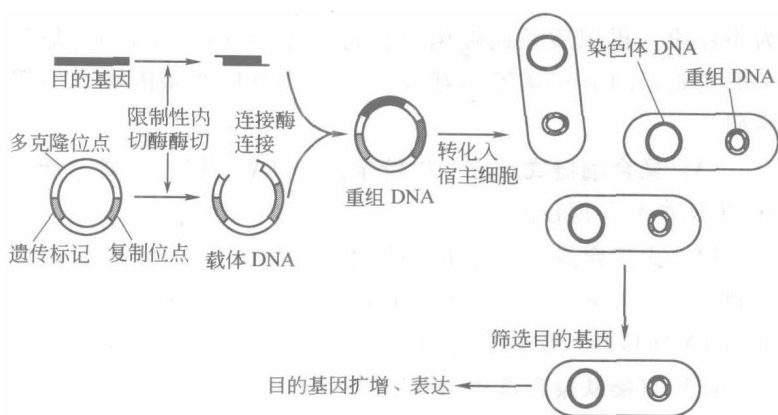


图 1-1 DNA 重组的一般过程

1.2.1 目的基因的获得

这里所说的目的基因是泛指要研究的 DNA 片段, 可以是具有编码功能的 DNA 片段, 即通常所说的目的基因, 也可以是非编码序列, 如启动子、增强子等。获得目的基因的方法主要有以下几种。

(1) 从 cDNA 文库中克隆 对已知序列或未知序列的基因均可先通过反转录方法建立 cDNA 文库 (cDNA library), 再筛选目的基因。对于已知序列的 cDNA 基因还可以利用反转录 PCR (RT-PCR) 方法直接扩增获得。

cDNA 文库分为克隆文库和表达文库,也可分为质粒cDNA 文库和噬菌体 cDNA 文库。在 DNA 重组中,cDNA 文库比基因文库更有用。

建立 cDNA 文库的方法和详细操作步骤在很多基因工程操作方面的实验参考书中都有介绍,这里不再赘述。

(2) 构建基因组文库 基因组文库 (genomic library) 是含有某种生物体全部基因随机片段的重组 DNA 克隆群体。一般先建立大片段的基因文库,然后将已克隆的一个大片段酶切为小片段,再用质粒或噬菌粒进行亚克隆 (subclone),最后根据实验目的分别从不同基因文库中钓取目的基因或非编码序列。

(3) 聚合酶链式反应 以特定的 DNA 为模板,通过特异性 PCR 扩增获得目的基因。

(4) 人工合成 小分子多肽或蛋白质基因通过化学合成即可制备,大分子蛋白质基因一般先合成特定的序列片段,再通过 DNA 连接酶依次连接合成。

(5) 直接从染色体中分离 先分离细胞基因组 DNA,然后用特异的限制酶酶切或非特异的限制酶随机断裂。随机断裂包括机械的、化学的以及非特异性酶降解。

1.2.2 DNA 重组与转化

(1) DNA 重组 外源 DNA 片段与载体 DNA 连接在一起,构建成重组质粒 (又称重组子) 的过程,就是 DNA 的重组,这一过程是以 DNA 连接酶为中心的生物化学过程。连接的原则是:实验步骤简单易行;连接点能被限制酶重新切割而便于回收插入片段;有利于重组,避免载体自身环化;对复制、表达过程不产生干扰。连接的方式主要有黏性末端连接、平末端连接、定向克隆、人工接头连接和多聚核苷酸连接等。

(2) 转化 在 DNA 重组过程中,将质粒或重组质粒导入