

分子生物学

实用方法

[美] R.F. 施莱夫 著
P.C. 温辛克

人民卫生出版社

Q 7
CJB

5225

分子生物学实用方法

〔美〕 R. F. 施莱夫 著
P. C. 温辛克

章静波 张世馥 译
李悦 康伟

章静波 校

人民卫生出版社

内 容 简 介

顾名思义,这是一本介绍分子生物学实用方法的书籍。全书共七章。第一、二章分别介绍以大肠杆菌和噬菌体为主要材料进行实验的基本操作方法;第三章介绍大肠杆菌的几种常用酶,以及偶联的转录与翻译体系的实验方法;第四章为蛋白质研究的方法;第五章为核酸的常用分子学方法;第六章介绍重组体 DNA 和分子克隆技术的基本方法;第七章为常用的实验室辅助技术介绍。

书中所叙述的技术方法适用范围颇广,操作步骤阐述比较详细,适用于初从事分子生物学工作者阅读和使用,对于大学生物系师生、各有关研究所的科研工作者也不失为一本“开卷有益”的工具书。

Practical Methods in Molecular Biology

Robert F. Schleif

Pieter C. Wensink

Springer-Verlag

New York Heidelberg Berlin

1981

分子生物学实用方法

〔美〕 R. F. 施莱夫 著
P. C. 温辛克

章静波 张世馥 译
李悦 康伟

人民卫生出版社出版

(北京市崇文区天坛西里10号)

北京通县印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

850×1168毫米32开本 7 $\frac{1}{4}$ 印张 2插页 210千字

1985年4月第1版 1985年4月第1版第1次印刷

印数:00,001—6,570

统一书号:14048·4896 定价:2.25元

〔科技新书目 87—65〕

译者的话

“分子生物学”是当前新兴的生物学科之一，其发展十分迅速。尤其是重组体 DNA 技术的建立使得分子生物学发生了革命性的改观。它在科学研究，工农业生产，以至在国防建设上愈来愈显示出它“指石成金”的无比威力。为此，学习和掌握分子生物学的最基本的知识与技术方法已成为科学工作者，尤其是生物科学工作者的迫切需要与愿望。

本书最早为十五年前美国勃朗第斯大学 (Brandeis University) 生物化学系编写的实验方法手册，1981 年经 R. F. 施莱夫 (Robert F. Schleif) 和 P. C. 温辛克 (Pieter C. Wensink) 修订和扩充撰写而成。全书共分七章，第一、二章分别介绍以大肠杆菌和 λ 噬菌体为主要实验材料进行生理学、生物化学、诱变、转导等实验的基本操作方法。第三章介绍大肠杆菌的几种常用酶的分析方法和使用大肠杆菌偶联的转录与翻译体系的实验方法。第四章为蛋白质研究的实验方法。第五章为 DNA 分离、提纯、分子大小分级、限制性内切酶切点图谱制定、以及核苷的层析与凝胶电泳分离等方法。第六章为重组体 DNA 和分子克隆技术常用的基本实验方法，包括用分子杂交法筛选含特定基因片段克隆系的技术，以及用麦胚或家兔网质红细胞制备的无细胞蛋白质合成体系、进行真核 mRNA 离体翻译实验等以研究真核基因活动的一系列技术。第七章为一般实验室常用辅助技术。

由上可见，本书一方面包括了经典的生物化学方法，一方面又包含最新的分子生物学技术。因此它既是初学者的“良师益友”，同时对于从事生物科学有关学科的科研工作者，尤其对于从事遗传工程为主要手段的技术人员也不失为一部有参考价值的最新工具书。

本书的译者多为从事有关研究的科技人员，对本领域的实验技术有一定的实践。然而，正如上面所提及的那样，分子生物学

FDT3/231 (1)

发展极为迅速。本书提到的某些方法国内还处于开始建立的阶段。我们还没有取得更多的经验。此外，限于我们的外语翻译水平及中文的表达能力。因此，译文中不当，甚至谬误之处在所难免。谨希同行专家以及本译本的使用者提出批评。

最后，要提及的是，本书在翻译过程中曾得到中国医学科学院基础医学研究所分子生物学与遗传工程研究室的同志，尤其是蔡良婉教授的多方指导，于此表示我们的衷心谢意。

章静波 1983年夏于北京

前 言

大约十五年前，作者之一首次编纂了一本实验方法手册。本书便是在此手册的基础上编写而著成的。自那时起，为了使之包括新的方法以及旧方法的及时更新，曾对本手册作了许多小的修订。其结果它显得愈加实用，也愈来愈广泛地流传开来。然而，荟集于《重组体 DNA 技术学》名目之下的最近一系列技术的急剧发展，成了这本以前未公开发行的书籍得以引伸的转折点，小小的修订再也不敷需要了。要使此书切实有用，我们必须作大的引伸与增补，结果是本书务须大大地扩充，并且必然使之适用于更多人的更广泛的用途。要使部头扩大，用处增加，也就使得此书的正式出版成为必须采取的合理性步骤。

本书所以对许多人有用的理由之一，在于它仅仅包括我们反复使用的，以及经我们本人与我们实验室其他人使用证明有高度可靠性的那些操作程序。我们决定本书仅仅收集高度可靠的，我们自己应用过的那些具体方法，因为我们希期本书对于其他人也是一种可靠的资料。要想使可靠性成为本书的一个主要优点，因此也就迫使我们有所割爱，我们必须取消某些重要的操作方法。此外，正如在实验工作中经常所遇到地，大多数最可靠的程序往往缺乏精细的，当前工艺水平的那种复杂性或功效性。

本书涉及的技术方法颇为广泛。其中有从如何繁殖细菌到通过杂交选择克隆和信使 RNAs 的体外翻译等。此外，比起在当前科学出版物中通常所能找到的资料来，我们的描述要详尽得多。因此，本书中的方法对于以往不具备这方面技术经验的人也必当有用。

值得一提的是，本书包含大量与遗传工程有关的具体方法。因此，所描述的技术有诸如 DNA 纯化，浓集，定量这样一些常规操作，以及较高等有机体基因无性繁殖所必须的某些程序。然而，本书并不是 DNA 顺序测定技术的广泛蒐集。这些在 1980

年Grossman 和 Moldave 编辑的酶学方法 (65 卷) 第一部分中已有叙述。本书也不是详尽的遗传学技术的广泛蒐集, 这些包括在 J. Miller 所著的分子遗传学实验一书中。读者当可利用这些资料进行 DNA 顺序测定或是广泛的遗传学分析。

本书书型设计也旨在使它能在实验室内使用起来很方便。每页皆留有许多空白处; 纸虽硬而不光滑, 因此使用者可用铅笔涂涂写写, 也可把配方作自己的改良; 字体不但清晰, 而且较大, 这也会使烦困的实验者阅读起来更加容易。

若是没有本研究领域中众多的人们提供资料、此书的写作也只是一枕黄粱。值得庆幸的是, 我们所从事的这一研究领域有自由交换甚至最完善而详尽的当代实验方法的传统。我们对于那些在建立这些方法方面给予帮助的所有人们表示谢忱。

R. F. 施莱夫

P. C. 温辛克

章静波译

内 容 简 介

顾名思义,这是一本介绍分子生物学实用方法的书籍。全书共七章。第一、二章分别介绍以大肠杆菌和噬菌体为主要材料进行实验的基本操作方法;第三章介绍大肠杆菌的几种常用酶,以及偶联的转录与翻译体系的实验方法;第四章为蛋白质研究的方法;第五章为核酸的常用分子学方法;第六章介绍重组体 DNA 和分子克隆技术的基本方法;第七章为常用的实验室辅助技术介绍。

书中所叙述的技术方法适用范围颇广,操作步骤阐述比较详细,适用于初从事分子生物学工作者阅读和使用,对于大学生物系师生、各有关研究所的科研工作者也不失为一本“开卷有益”的工具书。

Practical Methods in Molecular Biology

Robert F. Schleif

Pieter C. Wensink

Springer-Verlag

New York Heidelberg Berlin

1981

分子生物学实用方法

〔美〕 R. F. 施莱夫 著
P. C. 温辛克

章静波 张世馥 译
李悦 康伟

人民卫生出版社出版

(北京市崇文区天坛西里10号)

北京通县印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

850×1168毫米32开本 7 $\frac{3}{4}$ 印张 2插页 210千字

1985年4月第1版 1985年4月第1版第1次印刷

印数: 00,001—6,570

统一书号: 14048·4896 定价: 2.25元

〔科技新书目 87—65〕

目 录

第一章 大肠杆菌的应用	1
一、菌株	1
(一) 菌株的纯化	1
(二) 菌株的来源	1
(三) 常用的菌株	2
(四) 谱系和遗传图	2
(五) 菌株的生理测量	2
(六) 菌株的保存	3
二、细菌的培养	3
(一) 细菌的特性	3
(二) 噬菌体的污染	5
(三) 用作生理测量的菌株	6
(四) 用作遗传学研究的菌株	7
(五) 培养用于提纯某些分子的细菌	9
三、细胞密度的测量	9
四、细菌的大量培养	11
五、细胞的破碎	15
(一) 超声波法	16
(二) 氧化铝磨碎法	16
(三) 玻璃珠磨碎法	16
(四) 用溶菌酶破碎细胞	17
六、细菌的放射性标记	18
七、亚硝基胍的诱变作用	18
八、青霉素的选择作用	19
九、消除菌体中的 F-因子	20
(一) 用吡啶橙消除 F-因子	21
(二) 选择自发地消除 F-因子的菌株	21
(三) 用十二烷基磺酸钠去除 F-因子	21
(四) 用高温消除 F-因子	21
十、培育抗链霉素的菌株	22

十一、recA 和细菌的杂交·····	22
十二、P1 噬菌体转导的遗传标记·····	23
十三、大量的遗传杂交·····	26
十四、利用转位子建立新的菌株·····	28
第二章 λ 噬菌体·····	29
一、两株有用的突变株·····	29
(一) CI ₈₅₇ ·····	29
(二) S ₇ ·····	30
二、测定效价·····	30
三、平板原液的制备·····	31
四、大规模液体培养·····	34
五、提纯·····	36
六、遗传杂交·····	38
七、噬菌斑记数·····	39
八、筛选 λ 抗性突变株·····	40
九、测试菌落生长 λ 噬菌体的能力·····	41
十、构建溶原性细菌·····	42
十一、测试可能的溶原性细菌·····	44
十二、划线分离单噬菌斑·····	44
十三、选择缺失·····	45
第三章 酶的测定·····	47
一、 β -半乳糖苷酶·····	47
二、RNA 聚合酶·····	49
三、阿拉伯糖异构酶·····	51
四、溶菌酶·····	55
五、核酮糖激酶·····	57
六、大肠杆菌-偶联转录-翻译系统·····	62
第四章 蛋白质的实验·····	68
一、蛋白质的硫酸铵沉淀·····	69
二、利用相分配法去除核酸·····	71
(一)从核酸中分离大量蛋白质·····	72
(二)结合DNA 或 RNA的蛋白质的纯化·····	74
三、柱、分部收集器及其管道·····	75
四、离子交换层析和凝胶过滤·····	76

(一) 离子交换树脂的制备	76
(二) 装柱	77
(三) 加样和洗脱	78
五、蛋白质浓度的测定	81
(一) 光密度法	81
(二) 双缩脲法	82
(三) Lowry 法	82
(四) Lowry 法测定稀释的样品	83
六、浓缩蛋白质溶液	84
七、稳定蛋白质	85
八、蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳	86
(一) 制备夹层凝胶	87
(二) 带有浓缩胶的 SDS-10% 丙烯酰胺凝胶	83
(三) 尿素-SDS-丙烯酰胺梯度凝胶	93
(四) 凝胶的染色	95
(五) [^3H] 或 [^{35}S]-标记的蛋白质在丙烯酰胺凝胶 中的荧光图谱	96
(六) 从 DMSO 溶液中回收 PPO	97
第五章 核酸的实验	98
一、核酸的浓度和纯度测定	98
(一) 光学方法	98
(二) 荧光方法	99
二、DNA 的储备	101
三、DNA 的提纯	102
(一) 用 DEAE 纯化 DNA	103
(二) 用羟基磷灰石柱纯化 DNA	104
四、用乙醇沉淀 DNA	105
五、TCA 沉淀测定	106
六、DNA 的聚乙二醇沉淀和大小分段	107
七、大肠杆菌 DNA 的分离	108
八、 λ DNA 的分离	109
(一) 苯酚抽提	110
(二) SDS 抽提	111
九、质粒 DNA 的分离	111

十、大量分离质粒·····	117
十一、果蝇 DNA 的分离·····	120
十二、三磷酸核苷溶液的制备·····	123
十三、核苷的层析分析·····	124
十四、DNA 的凝胶电泳·····	125
(一)琼脂糖凝胶电泳·····	127
(二)聚丙烯酰胺凝胶电泳·····	132
(三)凝胶的染色和照相·····	134
(四)从丙烯酰胺和琼脂糖凝胶中提取 DNA·····	135
十五、限制性核酸内切酶酶切 DNA 的位点图谱·····	138
第六章 重组体DNA的构成与分析·····	142
一、DNA 分子末端的连接·····	142
(一)以 S1 酶消化制作钝性末端·····	143
(二)用 T ₄ DNA 连接酶连接·····	143
(三)λ 核酸外切酶消化产生游离 3'末端·····	145
(四)加入同聚物末尾·····	146
二、用质粒 DNA 使大肠杆菌转化·····	147
三、贮存含有质粒的菌株·····	149
四、重组体质粒的环丝氨酸选择·····	150
五、DNA 和 RNA 的体外放射性同位素标记·····	151
(一)用缺口翻译放射标记 DNA·····	151
(二)合成与 DNA 互补的放射标记的 RNA·····	153
(三)合成与 RNA 互补的放射标记的 DNA·····	155
(四)放射标记 RNA 或 DNA 的 5'末端·····	157
六、核酸杂交反应的一般性质·····	159
七、以核酸杂交筛选重组体 DNA 克隆·····	160
(一)筛选噬菌体空斑·····	161
(二)筛选菌落·····	164
八、从单个菌落中分离 DNA·····	165
九、Southern 转移·····	166
十、选择与 DNA 互补的 RNA·····	171
(一)制备 DNA·····	172
(二)制备 NBM 纸·····	172
(三)使 NBM 纸转变成 DBM 纸以及结合 DNA·····	172

(四)RNA 与结合 DBM 的 DNA 杂交·····	173
(五)回收 RNA·····	173
(六)NBPC (nitrobenzylpyridinium chloride) 的合成·····	174
十一、某些高级生物的体外翻译系统·····	176
(一)制备麦胚提取液·····	176
(二)麦胚翻译反应·····	178
(三)制备兔网织细胞溶解物·····	179
(四)细胞溶解物的微球菌核酸酶消化·····	180
(五)网织细胞翻译反应·····	180
十二、纯化总的和多核糖体 RNA·····	181
(一)从果蝇成虫中提纯 RNA·····	182
(二)从果蝇胚胎中提纯多核糖体 RNA·····	183
十三、POLY-A ⁺ (富含 mRNA ⁺ 的) RNA 的纯化·····	184
十四、用蔗糖梯度离心对 RNA 大小进行分级·····	187
(一)制作蔗糖梯度·····	187
(二)制备 RNA·····	188
(三)沉淀和收集 RNA·····	188
第七章 辅助性实验室技术·····	189
一、玻璃和塑料容器·····	189
二、玻璃器皿的硅化·····	190
三、吸管的洗涤·····	190
四、pH 计·····	191
五、缓冲液·····	193
(一)Tris·····	193
(二)磷酸·····	193
(三)Good 氏缓冲液·····	194
(四)二甲砷酸盐·····	194
六、Beckman 超速离心机·····	194
(一)离心管的充盈和平衡·····	194
(二)装转头·····	195
七、绘图·····	196
八、幻灯片和负片·····	197
(一)Polaroid 幻灯片·····	197
(二)常规幻灯片和负片·····	198

九、胶片感光性·····	199
十、放射自显影和荧光照相·····	200
十一、透析袋·····	202
十二、酚的蒸馏·····	204
十三、回收用过的 CsCl·····	205
十四、化学试剂的来源·····	206
十五、危害和警告·····	207
(一)干燥器、制备性离心机和真空泵·····	207
(二)化学试剂·····	207
(三)电的危害和防护·····	209
附录 I 常用试剂制备·····	212
附录 II 常用数据·····	222
参考文献·····	224

第一章 大肠杆菌的应用

重组体 DNA 研究工作兴起之前,在分子生物学大量的研究工作中,大肠杆菌 (*E. coli*) 不仅作为实验研究的对象,而且是实验材料的来源。近来人们对不同的生物体的研究及所研究的问题大量增加,用 *E. coli* 作为研究对象的工作正在减少。但是, *E. coli* 的应用仍是可观的; *E. coli* 对于研究生物体的基本问题往往是最合适的; 它也是研究重组体 DNA 所必需的 DNA 和蛋白质最好的来源。下面几节将描述运用 *E. coli* 作为实验研究对象以及作为某些其他实验的载体情况。

一般情况下,培养这类细菌的理由有以下三点: (1)制备某种纯的生物分子; (2)研究基因操作; (3)测定培养的细胞。在这些情况下,最使人关心的问题是菌株、溶有气体的培养基及培养温度。

一、菌 株

(一) 菌株的纯化

菌株常常不是人们所想象和所说的那样,它们的生长条件尚不为人们所知,而且还有一些出乎意料的性质。菌株偶尔会被回复突变体 (revertants) 或完全不同的微生物所污染。因此,对于所使用的任何菌株都应该测定其已知的某些性质,而且,如有可能,还应该测定特殊实验所需要了解的某些性质。这种测定通常应用单一菌落进行,单一菌落是用划线法在盛有 YT* 的培养皿中培养获得的。用这种方法可分离出数个菌落,以测定菌株的几种特性。通常只需要对菌株进行营养需求的试验。但是,如所需要的特殊突变能迅速回复,则也应对菌株进行测定。

(二) 菌株的来源

在分子生物学实验中,经常自由地交换菌株和突变株。然而,近几年来许多研究人员由于进行不同方面的工作,因而不保持

* 见附录 1, 常用的配方

他们在文献中所描述的菌株了。幸运的是, *E. coli* 遗传供应中心 (Dept. of Human Genetics, 310 Cedar Street, New Haven, Connecticut 06510) B. Bachmann 博士已承担了 *E. coli* 突变株的收集者和分配者的任务。她本人也收集了大量的已知的 *E. coli* 突变菌株, 并一直为研究者提供菌种。

(三) 常用的菌株

遗传研究中常用的 K-12 菌株是从斯坦福医学院分离培养出来的。B 品系被认为是从伯克莱 (Berkeley) 分离出来的, 而 B/r 则是根据抗紫外线 (UV) 辐射这种特性从 B 品系中选择出来的。B 菌株对 UV 非常敏感。C 菌株生长有 ϕ X-174 噬菌体, 但缺乏一种限制-修饰系统。

(四) 谱系和遗传图

为某一实验所需要的一些常见的突变株早就分离出来了。一般情况下, 从其他研究者那里得到一种菌株并测定所需要的性质要比分离、鉴定和测定新的突变株更容易。在许多情况下, 没有恰恰合乎需要的菌株, 而有的是具有大多数性质的菌株。用几种简单的遗传操纵即可以建立所需要的菌株。有关现存菌株方面许多有用的资料集中在为数不多的几篇论文中。其中最有价值的是 “Linkage map of *Escherichia coli* K-12 第六版” (Bachmann and Low, 1980); “Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12” (Bachmann, 1972); 和 “*Escherichia coli* K-12 F-prime factors, old and new” (Low, 1972)。这些文章中所用的, 以及目前文献中尽量袭用的遗传学术语均在《细菌遗传学统一命名法的建议 (A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics)》(Demerec 等, 1966) 一书中描述过。

(五) 菌株的生理测量

由于大多数菌株已在实验室中保持了数十年, 这就难以确定某一菌株现在的性质与早期测得的, 或者与不同的实验室中测得的性质究竟有多少相同之处。随着新研究问题的复杂性不断增加, 遗传稳定性的问题也变得越来越重要。因此, 当我们测定某种极

为简单的特性例如蛋白质的顺序时，便不必过多地关心它的进化漂变 (evolutionary drift)。然而，如果研究某种复杂的细胞控制系统，诸如核蛋白体的合成速率、DNA 合成的调节、核苷酸库的组成，那么，所应用的菌株的起源及其可能的趋异 (possible divergence) 则是十分重要的。

人们可采用几种合理的步骤来解决遗传不稳定性问题。原则上，一种办法是选择在遗传上尽可能地接近原始的 B、B/r 和 K-12 菌株；若有可能的话，则应使用原始菌株的直系后代。如需要特殊的突变株，最好从这一菌株中移出所期望的标志并将它转移到某种特性已知的标准菌株中去。P1 的转导作用是引入这种标志的最安全的方法，因为它除了引导需要的标记之外，不会同时引导其他的标记。若需进行诱变以分离某种特殊的突变株，则光诱变作用，如 UV 照射，是最安全的。如用亚硝基胍诱变（这种物质常诱发多重突变）会产生很多问题。

(六) 菌株的保存

菌株的生存期差别很大，有些菌株在液体培养基中（贮于冰箱）能存活数月；另外有些菌株在这些条件下仅能生存数天。用于遗传研究的多种菌株，在密闭的，一半装有穿刺琼脂 (stab agar) 的小瓶中，于室温避光条件下可保存数年。保存用于一系列生理测定的菌株，应该更加仔细。为确保存放数年的菌株其生理性质恒定，最好的方法是冰冻标本。将单一的菌落稀释倒入含有 10~50% 的甘油培养基中，等份分装于许多小瓶后，存放在 -20~-70℃，这类标本瓶经 30 次左右冰冻和融化后仍能提供活的菌种。

二、细菌的培养

(一) 细菌的特性

1966 年 Maaloe 和 Kjeldgaard 发表的《大分子合成的控制》(Control of Macromolecular Synthesis) 一书中叙述了很多关于 E. coli 的培养及其它颇为丰富的资料。书中对影响细菌生长的许多因素进行了格外仔细的分析，可能十分类似