

分子生物学 基本实验方法

[美] L·G·戴维斯

M·D·狄伯纳 J·F·巴蒂 著

张 钰 李凌衡 赵寿元 译

复旦大学出版社

分子生物学基本实验方法

〔美〕 L·G·戴维斯 M·D·狄伯纳 J·F·巴蒂

张钰 李凌衡 赵寿元 译

复旦大学出版社

内 容 提 要

本书介绍分子生物学和基因工程实验常用的操作,如从噬菌体、细菌和哺乳动物细胞抽提 DNA 或 RNA,基因的克隆和亚克隆, DNA 顺序分析和核酸分子杂交;还介绍了比较专门的实验,如哺乳动物细胞离体转染、蛋白质体外翻译和免疫沉淀、单克隆抗体制备及转基因小鼠的建立等。它反映了近年来发展的各项技术,包括分子、细胞和个体不同层次上的分子生物学实验技术,也包括了核酸和蛋白质两种最重要的生物大分子的研究技术;同时具有较大的实用性。本书可用作分子生物学和基因工程教学和科研的教材和参考书。

Leonard G. Davis, Mark D. Dibner, James F. Battey

Basic Methods in Molecular Biology

Elsevier Science Publishing Co., Inc. 1986

分子生物学基本实验方法

张钰 李凌衡 赵寿元 译

复旦大学出版社出版

(上海国权路 579 号)

新华书店上海发行所发行 复旦大学印刷厂印刷

开本 850×1168 1/32 印张 12.75 字数 378,000

1989年12月第1版 1989年12月第1次印刷

印数 1—5,000

ISBN7-309-00179-6/Q·08

定价: 3.25元

内 容 提 要

本书介绍分子生物学和基因工程实验常用的操作,如从噬菌体、细菌和哺乳动物细胞抽提 DNA 或 RNA,基因的克隆和亚克隆, DNA 顺序分析和核酸分子杂交;还介绍了比较专门的实验,如哺乳动物细胞离体转染、蛋白质体外翻译和免疫沉淀、单克隆抗体制备及转基因小鼠的建立等。它反映了近年来发展的各项技术,包括分子、细胞和个体不同层次上的分子生物学实验技术,也包括了核酸和蛋白质两种最重要的生物大分子的研究技术;同时具有较大的实用性。本书可用作分子生物学和基因工程教学和科研的教材和参考书。

Leonard G. Davis, Mark D. Dibner, James F. Battey

Basic Methods in Molecular Biology

Elsevier Science Publishing Co., Inc. 1986

分子生物学基本实验方法

张钰 李凌衡 赵寿元 译

复旦大学出版社出版

(上海国权路 579 号)

新华书店上海发行所发行 复旦大学印刷厂印刷

开本 850×1168 1/32 印张 12.75 字数 378,000

1989年12月第1版 1989年12月第1次印刷

印数 1—5,000

ISBN7-309-00179-6/Q·08

定价: 3.25元

译 者 的 话

近年来分子生物学和基因工程的实验技术不断创新,使分子生物学家掌握了洞幽察微的实验手段,得以在分子水平上研究生命活动的基本规律,从而对生物体的生长、分化、发育、衰老、病变等的分子机制取得进一步的认识。与此同时,操纵基因的技术给发展工农业生产和医疗保健事业带来巨大动力,前景是十分诱人的。正是在基础理论和实际应用两个方面取得了重大成就和效益,反过来又促进分子生物学实验技术更快地推陈出新。正因为如此,国际学术界和出版界有关这方面的书刊文献日益增多,使人目不暇接。在这种形势下,我国分子生物学和基因工程的科研和教学也不再局限于少数地区和单位,越来越多的高等院校和科研机构正从事或积极准备从事这方面的研究,或开设有关的课程。因此,我们翻译了这本《分子生物学基本实验方法》一书,以满足形势发展的要求。

本书的特点之一是实验内容比较全面。它不仅介绍了实验室常用的操作,如从噬菌体、细菌和哺乳动物细胞抽提DNA或RNA,基因的克隆和亚克隆,DNA顺序分析和核酸分子杂交等,还收集了比较专门的实验技术,如启动子活性鉴定、哺乳动物细胞离体转染、蛋白质体外翻译和免疫沉淀、蛋白质分离纯化、单克隆抗体制备以及转基因小鼠的建立等。这样,就包括了分子、细胞和个体不同层次上的分子生物学实验技术,也包括了核酸和蛋白质两种最重要的生物大分子的研究技术。

本书的特点之二是较大的实用性。书中比较系统地介绍了同一类实验不同材料的操作。例如,克隆载体就分别介绍了pBR 322、M13、pUC、 λ gt10、 λ gt11、EMBL 3、EMBL 4和Charon系列等不同类型和相应的宿主菌种;哺乳动物细胞体外转染也有磷酸钙-DNA共沉淀、

DEAE-葡聚糖介导转染、电穿孔等不同方法。这样，可以适用于不同实验室的不同要求。

当然，本书虽说是分子生物学的基本实验手册，而且的确也收辑了许多个基本实验，但也不可能真正包容所有的基本实验，总还是会有遗漏的，更何况随着分子生物学的进展，许多实验操作会不断修改而日臻完善，一些原先是专门的技术也会得到普及而成为常用的方法。所以，这本书不能说是尽善臻美的。尽管如此，这本书在目前还是很有实用价值的。至于译文的准确和流畅程度，必定还有不尽人意之处，还祈读者鉴谅和指正。

1988年4月12日

前 言

遗传学技术的发展已是生物学最新一次革命的中心。它的成就已完全改变了生物学家的行动，也许更重要的是完全改变了生物学家的思想方法。此外，这么多学科的科学家涌进这么小而稍带神秘气氛的领域（分子遗传学家过去曾这么看待他们自己从事研究的领域）去学习、带走一些技术，并且干这一切都是急冲冲的，因为掌握了这些有力的工具后发现有待于人们去做和学的竟是这么多；这种情况是前所未有的。Davis、Dibner 和 Battey 三位博士奉献给大家各种最有力的工具，这些都是人们要搞好手头工作所必须了解的最新而可以做到的、经实验室检验的、内容齐全的实验方法。他们三位是经验丰富的科学家。他们阐明了原理并详述了细节。其余的是瞧我们自己的了。

Philip Leder

波士顿

致 谢

作者谨向在编写本书过程中给予帮助的人士和机构致谢。

许多科学家对本书作出了重大贡献，作者谨表谢忱。Shoshana Segal博士提供了有关哺乳动物细胞转染的章节。Marian Kelley 女士详述了单克隆抗体制备的细节。Hunt Potter 博士对我们撰写电穿孔 (electroporation) 这一节给予有益的帮助。Donna Reed 女士对准备各种蛋白质实验方法提供了很有价值的资料。Eric Sinn 博士撰写了转基因小鼠分析这一节的大部分内容，S. Carl Falco 博士则为我们对酵母菌使用所作的评论提供了资料。Edward Sausville 博士帮助准备了有关 cDNA 克隆化的章节。封面由 J. Blaney 博士所提供。

许多人士帮助审阅了我们的手稿。他们中有下列各位博士：Philip Leder, Marion Cohen, Edward Berger, Rick Woychik, Keith Lawrence, Eric Seifter, Anne-Marie Lebacqz 和 Michael Kuehl。本手册的一些章节由 I. Angulo, R. Arentzen, M. Lewis, F. Baldino, Jr., 和 L. Hennighausen 等博士审阅。A. Callahan, R. Manning 和 R. Lampe 也对审阅给予帮助。

我们感谢 Elsevier 科学出版社的有关人士，特别是 Yale Altman 先生和 Jonathan Wiener 先生对编写出版我们的第一部著作所给予的帮助和支持。书中插图是 Brain Trench 先生的大作。对于 New England Bio Labs, Bethesda Research Labs, Bio-Rad, Boehringer Mannheim 和 Pharmacia 等公司慨允复制许多图片表示谢意。我们还感谢 Sherry M. Vari 女士卓越的辞句修饰和花了很多时间使本手册得以成书。

作者特别要向哈佛医学院遗传学系主任 Philip Leder 致谢，本书中绝大部分方法的创建和改进都是由他提供资料 and 在他领导下取得

的。我们还要感谢 Leder 博士实验室里以前和现在的工作人员，我们是分享了他们的知识才使本书得以写成的。

最后，我们愿把本书奉献给我们的妻子，她们是 Penny, Elaine 和 Fran。她们对本书写作的计划和时间给了极好的支持。

Leonard G. Davis

Mark D. Dibner

James F. Battey

1986 年 4 月

目 录

译者的话	1
前言	3
致谢	4
1. 分子生物学基础	1
2. 分子生物学家的工具	5
3. 使用本手册的准备工作、步骤和注意事项	10
3-1 本手册的使用	10
3-2 应注意的安全问题	14
3-3 分子生物学研究所需的仪器设备	16
4. 克隆载体与细菌细胞	19
4-1 pBR322	19
4-2 M13	21
4-3 pUC	24
4-4 λ gt10	26
4-5 λ gt11	28
4-6 EMBL 3 和 EMBL 4	30
4-7 Charon 28	31
4-8 细菌菌株	33
5. 从真核细胞中制备 DNA	34
5-1 快速制备 DNA	34
5-2 从真核细胞中制备 DNA 的常用方法	37
5-3 从培养细胞和组织中制备 DNA	40
5-4 限制性内切酶及其使用	44
5-5 琼脂糖凝胶电泳	51
5-6 Southern 印迹	55

6. 用标记的合成探针检测核酸	59
6-1 制作 DNA 合成探针: 一般描述	59
6-2 合成探针的末端标记	63
6-3 用 ^{32}P 末端标记的合成探针作杂交	66
7. 用来源于质粒的探针探测核酸	70
7-1 切口平移	70
7-2 DNA 杂交(Southern 印迹杂交)	74
8 质粒 DNA 制备	78
8-1 细菌转化	78
8-2 质粒 DNA 制备: Triton-溶菌酶法	81
8-3 大量提取的碱裂解法: 质粒纯化	88
8-4 质粒的“小量制备”法	92
9. DNA 限制酶切片段的制备	95
9-1 小凝胶	95
9-2 酶切后分析 DNA 限制酶切片段: 琼脂糖凝胶电泳	98
9-3 电泳洗脱	101
9-4 DNA 限制酶切片段的聚丙烯酰胺凝胶电泳	104
10. 纯化 DNA	108
10-1 精胺纯化 DNA	108
10-2 玻璃粉末洗脱 DNA	111
10-3 DNA 纯化的其他方法	114
11. 真核细胞 RNA 的制备和分析	117
11-1 异硫氰酸胍制备总 RNA	117
11-2 RNA 的制备: 微量法	124
11-3 用寡聚脱氧胸苷纤维素选择 Poly(A ⁺)RNA	127
11-4 甲醛凝胶电泳分离 RNA 和 Northern 印迹	131
11-5 标记探针和 DNA 或 RNA 样品的点渍印迹杂交	135
11-6 RNA 凝胶印迹探测: 概述	138
11-7 从克隆在质粒中的 DNA 制备 RNA 探针	140
12. 制备噬菌体克隆 DNA	145
12-1 噬菌体的生长和制备	145
12-2 噬菌体 DNA 的大量制备和纯化	149

克隆真核生物基因组 DNA	154
13-1 克隆真核生物基因组 DNA: 导论	154
13-2 基因组 DNA 的制备: <i>Mbo</i> I 部分酶解法	156
13-3 制备基因组克隆化用的噬菌体载体	160
13-4 基因组 DNA 与噬菌体臂连接和包装以构建文库	165
13-5 包装的文库效价测定及涂平板培养	167
13-6 用放射性标记探针筛选已倒平板的文库	170
13-7 文库扩增	176
14. cDNA 克隆进 λgt10 和 λgt11	178
14-1 cDNA 克隆载体 λ gt10 和 λ gt11 的制备	178
14-2 从真核生物 mRNA 生成 cDNA 插入片段	184
14-3 cDNA 文库用 λ gt10 或 λ gt11 的臂连接并加以包装	194
14-4 已包装的含插入片段的 λ gt10 和 λ gt11 倒平板和筛选	197
14-5 从 λ gt10 和 λ gt11 cDNA 克隆制备 DNA	203
15. 用质粒作亚克隆	207
15-1 用质粒作亚克隆: 总则	207
15-2 制备 pBR322 质粒以供亚克隆和与插入片段连接	209
15-3 pBR322 菌落杂交	215
15-4 亚克隆在 pUC 质粒上	218
16. M13 克隆和顺序测定	221
16-1 M13 克隆和顺序测定: 总则	221
16-2 制备供克隆化的专一限制酶切片段	227
16-3 BAL31 核酸外切酶连续缺失法制备供 M13 克隆化的插入片段	231
16-4 M13 载体的制备和插入片段与载体的连接	236
16-5 M13 对 JM103 大肠杆菌宿主的转化	240
16-6 用放射性标记探针筛选 M13 克隆选出待测顺序的插入片段	243
16-7 制备作顺序分析用的单链 M13 DNA	245
16-8 M13 克隆的单行筛选分析	248
16-9 聚丙烯酰胺顺序分析凝胶的制备	252
16-10 M13 克隆的顺序分析	256
17. 克隆 DNA 的进一步鉴定	263
17-1 S_1 核酸酶保护测定	263

18. 转染离体培养的哺乳动物细胞	273
18-1 用纯化的质粒进行粘着细胞和非粘着细胞的磷酸钙转染	273
18-2 非粘着和粘着哺乳动物细胞的 DEAE 葡聚糖介导的转染	277
18-3 电穿孔	280
18-4 选择转染的哺乳动物细胞: G418 法	283
18-5 氯霉素乙酰转移酶(CAT)分析	285
19. 蛋白质方法	288
19-1 体外翻译和免疫沉淀	288
19-2 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质	292
19-3 Western 印迹分析	297
19-4 用于蛋白质或 RNA 的银染凝胶	301
20. 常用方法	305
20-1 DNA/RNA 的抽提和沉淀	305
20-2 塑料袋的封口	309
20-3 光密度的分析测定	312
20-4 凝胶拍照或放射自显影	314
20-5 放射自显影	316
20-6 制作细菌生长的平板	318
20-7 噬菌体的效价测定和涂布	321
21. 专用方法	323
21-1 转基因小鼠的制备	323
21-2 单克隆抗体的产生: 杂交瘤融合	332
21-3 用标记探针对组织切片作原位杂交	340
21-4 酵母菌为受体的克隆化	345
附录 I 贮存溶液	348
附录 II 酶	356
附录 III 试剂和仪器供应商	358
索引	363

1. 分子生物学基础

最近 15 年内发展起来的一系列新的研究技术,使当代生物科学发生了一场革命。这些技术可确定细胞生长和分裂、代谢、分化和发育等复杂过程的分子机制和分子结构。更重要的是这些技术开辟了一条途径,可操纵对于上述过程至关重要的分子,以及观察已改变的分子所参与的生命系统中发生的变化。

核酸和蛋白质是大分子,都是由亚基组成的线状多聚物。核酸编码的遗传信息决定生物体所特有的各种蛋白质的一级结构。它们与脂类和细胞外的支持基质一起创造出细胞活性和生理功能。因此,考察这些重要组成成分之间的相互关系,就可部分地了解生物学功能。细胞的遗传物质脱氧核糖核酸(DNA)是由四种核苷酸为单位构成的多聚物。每种核苷酸都含一种核酸碱基(A,腺嘌呤;G,鸟嘌呤;T,胸腺嘧啶;C,胞嘧啶),一个脱氧核糖半分子和一个磷酸酯。每条链就是一串核苷酸,核苷酸通过脱氧核糖半分子的 5' 碳同相邻核苷酸中糖分子 3' 碳之间的磷酸酯键共价连接。这些 DNA 亚基构成的链是与磷酸-糖骨架取相反极性的反向平行的两条链,彼此缠绕呈双螺旋结构。两条链相互紧密连结,因为一条链上的碱基与相对的(或互补的)那条链上的碱基之间可形成氢键。腺嘌呤总是与胸腺嘧啶配对,鸟嘌呤则同胞嘧啶配对。核酸合成机构保证了碱基配对的保真性,这种机构是一条新链延伸时,只把模板链规定的“正确的”碱基加上去。正是这种互补碱基配对的稳定性和专一性,构成了 DNA 作为遗传信息贮存库功能的基础。DNA 中核苷酸的次序对应于蛋白质中氨基酸的次序。三个相邻核苷酸组成的三联体代表一个 mRNA 密码子,规定一种特定的氨基酸,DNA 就能由此来编码蛋白质。因此,DNA 中线性的核苷酸顺序规定了细胞结构蛋白质、功能蛋白质和酶蛋白中

的氨基酸顺序。DNA 中不直接编码蛋白质的其他区域，包含调控基因产物合成的指令信息。

在生物合成路线中，核糖核酸(RNA)介于 DNA 和蛋白质之间。双链 DNA 中包含编码蛋白质顺序信息的那条链，拷贝或转录为互补的 RNA 链。这种 RNA 含有与 DNA 相同的碱基，只是以尿嘧啶(U)代替胸腺嘧啶，以核糖代替了脱氧核糖。基因的 RNA 拷贝称为信使 RNA (mRNA)，它在运转 RNA (tRNA) 和核糖体 (rRNA) 同蛋白质相连接的复合物帮助下转译，按次序地把氨基酸装配成蛋白质的一级结构。

很多分子生物学实验都用细菌这类比较简单的原核细胞系统。在原核生物中，连续的 DNA 线性顺序直接对应于 RNA 和蛋白质的线性顺序。可是在真核细胞中，编码蛋白质的 DNA 不能连续地解读，因为它的转译顺序中有间断（内含子）。于是真核生物 DNA 先拷贝为初级转录物（异质核 RNA），再在核内加工切下蛋白质的编码顺序（外显子）。外显子线状连接为成熟的 mRNA，在核内进一步加工后进入细胞质转译出蛋白质。有些新方法可在真核细胞里研究基因。

了解基因及其产物的结构、功能和调控，对评价一个生物系统是很重要的。这也就涉及了解生物体的核酸的组织结构。过去由于真核细胞基因组的复杂性，很难弄清楚这方面的情况，因为基因组 5 万个基因的核苷酸多达 10^9 。要在这种复杂情况下分析遗传的结构和事件，必需有能力去分离和研究纯化状态的单个基因。DNA 的分子克隆化提供了一种机制，可从基因群体中分离出一个 DNA 片段，将此片段纯化为均质的并进行扩增以获得足够纯的物质，供化学、遗传学和生物学的分析。克隆化的过程完全依赖于实验室里完成的酶反应，即用已鉴定其特性的细菌的 DNA 裂解酶（限制酶）和修饰酶去拷贝、切割 DNA，以及把单独的 DNA 分子拼接在一起。DNA 分子在拼接进自主复制的环状 DNA（质粒）或细菌病毒（噬菌体）后，就被引入了细菌细胞。在经过许多轮复制后，把杂合分子再分离出来并加以纯化，产生出足够数量的克隆的 DNA 片段。

分离并纯化的 DNA 片段的核苷酸顺序很快就可测定，这样就能预测它编码的蛋白质的氨基酸顺序。科学家可用放射性标记的这种纯

化的 DNA，在上百万个无关顺序的背景中专一地检出复杂基因组中有关 DNA 顺序的拷贝，或细胞内有关的 mRNA。由纯化 DNA 合成的 mRNA，那怕少到每个细胞里只有 1~10 份拷贝，也能加以检出和定量测定。克隆的 DNA 在细菌或酵母中再次工程化，可使编码蛋白质的顺序得以表达，为非此就无从获得生物学和医学上重要的蛋白质提供廉价而丰富的来源。在实验室里还可以改变克隆 DNA 的结构或顺序。这样构建成的 DNA 可重新引入细胞或动物体内，借以研究这些人为的改变或突变会产生什么后果，可更全面地了解基因的功能和调节。

本书描述了完成这些实验的分子遗传学方法。每一实验中的方法都像“烹饪书”那样地一步一步介绍，而且照这样做都已取得很好的结果。

本手册梗概

本书介绍的方法有很简单的，也有极复杂的。最先介绍的是实验方法所用质粒等载体系统和细菌宿主。前面几节是假设已经有了专一的合成探针或克隆的 DNA 探针，可用来选出、扩增和考察所要研究的基因。第 5 节是从组织中分离 DNA，把 DNA 切成便于使用的长度，再把 DNA 片段按其长短加以分开的方法。第 6、7 节的方法是制备用来选出所要 DNA 的合成探针，或质粒所带的探针。第 8 节介绍质粒制备和扩增的方法。从扩增的质粒切下并纯化克隆的 DNA（第 9、10 节）。

第 11 节转向 RNA 的制备、选择、分离和分析。第 12 节描述另一类克隆载体，即噬菌体。请注意到这一节为止，描述的方法都是涉及选择和扩增已克隆的 DNA 顺序。下面两节即第 13、14 节介绍的方法是用噬菌体为载体构建基因组 DNA 文库和 cDNA 文库。

从构建的文库中选出所要的克隆。下一个步骤是大量增殖这个克隆的 DNA，即第 15 节中把 DNA 次级克隆进质粒供制备之用。有了比较多的这种克隆的 DNA 后，再把它克隆在合适的 M13 载体上，就可研究其顺序和其他性质了（第 16、17 节）。到这里为止，是利用

了较简单的原核生物系统的有利条件来研究 DNA。可是，令人感兴趣的也许是将克隆的 DNA 作出改变后再放回真核细胞基因组，以便在生物学上关系更近的系统中间估测其调控及功能。第 18 节描述的是 DNA 参入体外培养生长的哺乳动物细胞的一些方法。

如上所述，蛋白质是遗传物质的产物，研究蛋白质对于了解基因的调控作用也许是重要的。现在可在体外把 RNA 转译成蛋白质。与蛋白质有关的方法见第 19 节。

一些常用的方法见第 20 节。这里介绍了一些基本技术，如 DNA 抽提，放射自显影，噬菌斑效价测定，预料初学者在开始时要查阅这些方法，以后则将是得心应手了。

最后，第 21 节描述了几个比较专门的分子生物学方法。第一个是转基因小鼠分析，包括先把一段 DNA 参入小鼠胚胎，再分析以后娩下的动物。我们还介绍了用来制备检测特定基因产物的免疫学探针的单克隆抗体生产技术，以及原位杂交技术，即用核苷酸探针在组织切片上研究并定位特定的遗传信息。最后是有关使用酵母宿主和载体系统所作分子生物学技术的一般注意事项。

后面几页写的是分子生物学研究中一些专门技术的应用，以及用这些方法时要注意的问题。