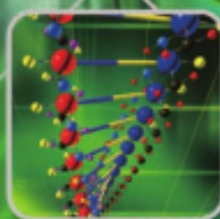


丁向真 王 盛 编著

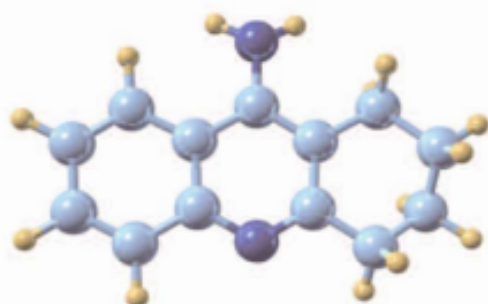
分子生物学基础实验 双语教程

Bilingual Guide For General Molecular
Biology Laboratory Manual



黄河出版传媒集团
阳光出版社

责任编辑／景 岚
封面设计／郭 俊



ISBN 978-7-5525-1209-0



定价：46.00元



分子生物学基础实验 双语教程

Bilingual Guide For General Molecular
Biology Laboratory Manual

丁向真 王 盛 编著 ●



黄河出版传媒集团
阳光出版社

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学基础实验双语教程 / 丁向真 王盛编著
-- 银川: 阳光出版社, 2014.3
ISBN 978-7-5525-1209-0

I. ①分… II. ①丁… ②王… III. ①分子生物学—
双语教学—高等学校—教材 IV. ①Q7
中国版本图书馆CIP 数据核字(2014)第 041024 号

分子生物学基础实验双语教程

丁向真 王 盛 编著

责任编辑 景 岚
封面设计 郭 俊
责任印制 郭迅生

黄河出版传媒集团 出版发行
阳 光 出 版 社

地 址 银川市北京东路139 号出版大厦(750001)
网 址 <http://www.yrpubm.com>
网上书店 <http://www.hh-book.com>
电子信箱 yangguang@yrpubm.com
邮购电话 0951-5044614
经 销 全国新华书店
印刷装订 宁夏凤鸣彩印广告有限公司
印刷委托书号 (宁)0014602

开 本 880mm×1230mm 1/16
印 张 3.125
字 数 900 千
版 次 2014 年3 月第1 版
印 次 2014 年3 月第1 次印刷
书 号 ISBN 978-7-5525-1209-0/G·1296

定 价 6.00 元

版权所有 翻印必究

前言

Preface

21 世纪是以生命科学为主导的时代。生命科学是一门以实验为基础的学科,而分子生物学是生命科学领域发展最为迅速的学科之一,随着该学科的发展和技术的不断革新,分子生物学的相关研究技术和方法已经渗入生物学的各个分支学科以及与其相关的各研究领域。分子生物学是一门在分子水平研究基因及其活性的学科;作为一门实验性很强的学科,它的每一个结论、每一个概念都源自于研究者对大量科学实验结果的总结与升华;因此实验教学作为这门学科的一个重要的组成部分,是培养学生实践能力和创新思维的重要环节。

2001 年教育部《关于加强高等学校本科教学工作提高教学质量的若干意见》(教高[2001]4 号)指出,按照“教育面向现代化、面向世界、面向未来”的要求,为适应经济全球化和科技革命的挑战,本科教育要创造条件使用英语等外语进行公共课和专业课教学,特别是高新技术领域的生物技术、信息技术等专业。尽管分子生物学作为一门自然科学、有其自身完整的研究认识规律,而语言只是知识的载体或工具,不能替代科学的思维,但由于社会历史原因,近百年来科学技术的成果大多是用英语来表达和交流的。因此,在该学科迅速发展的大背景下、在具体的教育教学实践中,运用双语进行教学是十分有益的教学模式。然而,到目前为止国内外虽然已出版了许多关于分子生物学实验技术的参考书,其中也不乏经典之作,但大多是针对专业研究工作者编写的,且文字叙述的内容较多,不大适合初学者;此外,这些书都是用英文或中文编写的,目前尚未有相应的中英文双语实验指导书,这对于需要掌握一定量中英文表达科技术语的本科生而言有诸多不便;因此,为了适应新时期高等教育教学改革的需要和人才培养的要求,我们编写了这本分子生物学基础实验双语教程。

本书采用中英文对照的形式(即前半部分为中文后半部分为英文),主要选取适合本科阶段教学的、涵盖分子生物学基本操作技能和方法的实验。考虑到分子生物学研究对象和研究手段的特殊性以及为便于初学者理解,我们尽量避免纯文字叙述,并提供大量图片将基本原理和实验技术流程清晰地反映出来,使抽象的内容具体化,从而使读者一目了然,又便于具体的实验操作。

本书主要包括以下内容:实验室基本知识、凝胶电泳、核酸的制备与质量控制、核酸的限制性酶

切分析、PCR 及其应用、从琼脂糖凝胶中回收 DNA、转化、DNA 重组、构建 DNA 文库、外源基因的表达和印迹技术。

本书的出版得到 2010 国家双语教学示范课程建设项目的资助,得到阳光出版社景岚编辑的大力帮助。刘晓明教授也在百忙之中欣然接受审阅全书,在此表示衷心感谢。

在本书的编写过程中,我们力求不出错或少出错,但作者的学识和经验有限,本书的疏漏和错误之处在所难免,恳请同行专家和读者批评指正。

丁向真 王 盛

2014 年 1 月

缩略语(Abbreviations)

英文缩写	英文名称	中文名称
Ac	acetate	乙酸盐
Acr	acrylamide	丙烯酰胺
AP	alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
APS	ammonium persulfate	过硫酸铵
BAC	bacterial artificial chromosome	细菌人工染色体
Bis	N, N'-methylene-bis-acrylamide	N, N'-亚甲基双丙烯酰胺
BME	β -mercaptoethanol	β -巯基乙醇
bp	base pair	碱基对
BPB	bromophenol blue	溴酚蓝
BSA	bovine serum albumin	牛血清清蛋白
CTAB	cetytriethylammonium bromide	十六烷基三甲基溴化铵
Da	Dalton	道尔顿
dH ₂ O	distilled H ₂ O	蒸馏水
ddH ₂ O	double distilled H ₂ O	双蒸水
DIG	digoxigenin	地高辛
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲(基)亚砜
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
DNase	deoxyribonuclease	脱氧核糖核酸酶, DNA 酶
DNase-free	deoxyribonuclease-free	不含 DNA 酶的
dNTPs	deoxynucleoside 5'-triphosphates	脱氧(核糖)核苷三磷酸
dsDNA	double-stranded DNA	双链 DNA
DTT	dithiotreitol	二硫苏糖醇
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
EtBr	ethidium bromide	溴化乙锭
EtOH	ethanol	乙醇
GLB	gel loading buffer	凝胶上样缓冲液
h	hour(s)	小时
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
Ig	immunoglobulin	免疫球蛋白
IPTG	isopropylthio- β -D-galactoside	异丙基硫代- β -D-半乳糖苷
KOAc	potassium acetate	乙酸钾, 醋酸钾
M	molarity	体积摩尔浓度
mg	milligram(s) = 10^{-3} gram	毫克
min	minute(s)	分钟
mL	milliliter(s)	毫升
mol	mole	摩尔
MOPS	morpholinopropane sulfonic acid	吗啉代丙烷磺酸
NaOAc	sodium acetate	醋酸钠, 醋酸钠
ng	nanogram(s) = 10^{-9} gram	纳克
nm	nanometer(s) = 10^{-9} meter	纳米
NP-40	Nonidet P-40 (detergent)	乙基苯基聚乙二醇(去污剂)
nt	nucleotide	核苷酸

续表

英文缩写	英文名称	中文名称
OD	optical density	光密度
Ω	ohm	欧姆
PAG	polyacrylamide gel	聚丙烯酰胺凝胶
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇
PIPES	piperazine-N,N'-bis (2-ethane sulfonic acid)	哌嗪-1,4-二乙磺酸
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
PVP	polyvinylpyrrolidone	聚乙烯吡咯烷酮
PVDF	polyvinylidene difluoride	聚偏(二)氟乙烯
RACE	rapid amplification of cDNA ends	快速扩增 cDNA 末端
RIPA	radio immuno precipitation assay	放射免疫沉淀测定
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
RT	room temperature	室温
RT	reverse transcriptase	反转录酶
RXN	reaction(s)	反应
RNase	ribonuclease	核糖核酸酶, RNA 酶
RNase-free	ribonuclease free	不含 RNA 酶的
RNasin	ribonuclease inhibitor	RNA 酶抑制剂
SDS	sodium dodecyl sulfate/sodium lauryl sulfate	十二烷基硫酸钠 / 月桂基硫酸钠
s	second(s)	秒
ssDNA	single-stranded DNA	单链 DNA
SSC	saline sodium citrate	柠檬酸钠盐溶液
STE	sodium Tris-EDTA (also TEN)	钠-Tris-EDTA 溶液
TAE	Tris-acetate EDTA (buffer)	Tris-醋酸电泳缓冲液
<i>Taq</i>	enzyme from <i>Thermus aquaticus</i>	来自于水生栖热菌的酶
TBE	Tris-borate EDTA (buffer)	Tris-硼酸电泳缓冲液
TBS	Tris-buffered saline	Tris 盐缓冲液
TE	Tris-EDTA (buffer)	Tris-EDTA 缓冲液
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
Tris	tris (hydroxymethyl) amino-methane	三羟甲基氨基甲烷
U	unit(s) of enzyme	酶的单位
UV	ultraviolet	紫外
V	volt	伏特
XC	xylene cyanole	二甲苯青
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside	5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-吡喃型半乳糖
YAC	yeast artificial chromosome	酵母人工染色体
[FINAL]	final concentration	终浓度
[Stock]	stock concentration	贮存浓度
$^{\circ}\text{C}$	degree Celsius	摄氏度
μg	microgram(s) = 10^{-6} gram	微克
μL	microliter(s) = 10^{-6} liter	微升

目 录

1 实验室基本知识	1
1.1 实验室安全	1
1.2 如何正确使用实验室设备	3
1.2.1 天平	3
1.2.2 移液器	4
1.2.3 离心(法)	6
1.2.4 pH 计	10
1.2.5 分光光度计	12
1.3 溶液的灭菌与贮存	15
1.3.1 溶液的灭菌	15
1.3.2 生物溶液的贮存	15
2 凝胶电泳	18
2.1 介绍	18
2.1.1 理论思考	18
2.1.2 两种常见的凝胶介质	19
2.1.3 灌制琼脂糖凝胶	21
2.1.4 灌制聚丙烯酰胺凝胶	23
2.2 核酸的凝胶电泳	25
2.2.1 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	25
2.2.2 DNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳	27
2.2.3 RNA 的琼脂糖凝胶电泳	28
2.2.4 方案:DNA 的琼脂糖凝胶电泳	31
2.2.5 方案:RNA 的甲醛凝胶电泳	32
2.2.6 方案:RNA 的乙二醛/DMSO 凝胶电泳	32
2.3 蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳	33
2.3.1 介绍	33

2.3.2 电泳缓冲液	34
2.3.3 蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶上的装载与电泳	34
2.3.4 最佳电压、电泳时间和电源设置	36
3 核酸的制备与质量控制	37
3.1 基本原理	37
3.1.1 裂解细胞	37
3.1.2 核酸的纯化	37
3.1.3 核酸的浓缩	38
3.2 DNA 的提取	39
3.2.1 CTAB 法小量制备植物基因组 DNA	39
3.2.2 盐析法分离高分子量 DNA	42
3.2.3 碱裂解法小量制备质粒 DNA	45
3.3 RNA 的提取	47
3.3.1 基本原理	47
3.3.2 控制 RNase 活性	48
3.3.3 胍—酸—酚抽提	49
3.3.4 原核 RNA 的分离	52
3.4 核酸的质量控制	54
3.4.1 质量控制技术 1:UV 分光光度(测定)法与吸收比	54
3.4.2 质量控制技术 2:凝胶电泳	56
4 核酸的限制性酶切分析	57
4.1 DNA 的单一限制性核酸内切酶消化	57
4.2 DNA 的多重酶切	60
5 PCR 及其应用	61
5.1 介绍	61
5.1.1 PCR 如何运作?	61
5.1.2 PCR 反应混合液	62
5.1.3 热稳定的 DNA 聚合酶	63
5.1.4 热盖	63
5.1.5 阳性与阴性对照	64
5.2 标准 PCR 方案	65
5.3 引物设计	67
5.4 PCR 反应程序优化	69
5.5 PCR 应用	71
5.5.1 LA PCR	71
5.5.2 热启动 PCR	71

5.5.3 降落和上升 PCR	72
5.5.4 多重 PCR	72
5.5.5 反转录 PCR	72
5.5.6 定量和实时 PCR	73
6 从琼脂糖凝胶中回收 DNA	75
6.1 增加从琼脂糖凝胶中回收 DNA 效率的建议	75
6.2 从低熔点琼脂糖凝胶中回收 DNA:有机抽提	76
6.3 从琼脂糖凝胶中电洗脱 DNA	79
6.4 用硅基膜离心柱从琼脂糖凝胶中回收 DNA	81
7 转化	84
7.1 介绍	84
7.2 大肠杆菌的 CaCl_2 转化	85
7.2.1 方法 1:传统方案	85
7.2.2 方法 2:革新方案	88
7.3 大肠杆菌的电穿孔转化	90
8 DNA 重组	95
8.1 介绍	95
8.2 载体与插入片段的准备	96
8.3 连接	97
8.3.1 介绍	97
8.3.2. 标准应用——DNA 的连接	98
8.4 转化	99
8.5 重组子的筛选	99
8.5.1 插入失活	99
8.5.2 菌液 PCR	102
8.5.3 限制(性酶切)图	103
9 构建 DNA 文库	105
9.1 基因组文库	106
9.1.1 构建一个基因组文库	106
9.1.2 载体的选择	106
9.1.3 基因组文库的评估	107
9.1.4 文库的生长与贮存	108
9.2 cDNA 文库	108
9.2.1 mRNA 的分离	109
9.2.2 cDNA 的合成	109
9.2.3 方案:使用试剂盒构建 cDNA 文库	113

10 外源基因的表达	119
10.1 介绍	119
10.2 无细胞蛋白质表达系统/体外蛋白质表达系统	119
10.3 体内的蛋白质表达系统	121
10.3.1 大肠杆菌表达系统	121
10.3.2 方案:克隆基因在大肠杆菌中的诱导表达与 SDS-PAGE 分析	125
11 印迹技术	128
11.1 技术指导	128
11.1.1 印迹膜的选择	128
11.1.2 转移方法	130
11.2 核酸印迹	132
11.2.1 核酸印迹概况	132
11.2.2 固定	132
11.2.3 核酸的标记与检测	133
11.2.4 DNA 印迹方案	135
11.2.5 RNA 印迹方案	139
11.3 蛋白质印迹	142
11.3.1 蛋白质印迹概况	142
11.3.2 蛋白质印迹方案	146
附录 A:常用的贮存溶液	150
附录 B:培养基与抗生素	153
附录 C:大分子制备与纯化试剂	155
附录 D:核酸电泳与印迹的试剂和溶液	158
附录 E:蛋白质电泳与印迹的试剂和溶液	160

Contents

1 General Laboratory Information	163
1.1 Safety in the Laboratory/Laboratory Safety	163
1.2 How to Properly Use Laboratory Equipment	166
1.2.1 Balances	166
1.2.2 Pipettors	167
1.2.3 Centrifugation	170
1.2.4 pH Meters	175
1.2.5 Spectrophotometers	178
1.3 Sterilization and Storage of Solutions	181
1.3.1 Sterilization of Solutions	181
1.3.2 Storage of Biological Solutions	181
2 Gel Electrophoresis	186
2.1 Introduction	186
2.1.1 Theoretical Considerations	186
2.1.2 Two Common Types of Gel Matrix	188
2.1.3 Casting Agarose Gel	190
2.1.4 Casting Polyacrylamide Gel	192
2.2 Nucleic Acid Gel Electrophoresis	194
2.2.1 Agarose Gel Electrophoresis of DNA	195
2.2.2 Polyacrylamide Gel Electrophoresis of DNA	197
2.2.3 Agarose Gel Electrophoresis of RNA	199
2.2.4 Protocol: Agarose Gel Electrophoresis of DNA	202
2.2.5 Protocol: Formaldehyde Electrophoresis of RNA	203
2.2.6 Protocol: Glyoxal/DMSO Electrophoresis of RNA	204
2.3 Protein Polyacrylamide Gel Electrophoresis	204
2.3.1 Introduction	204

2.3.2 Buffers for Electrophoresis	205
2.3.3 Loading and Running Proteins on Polyacrylamide Gels	205
2.3.4 Optimal Voltage, Running Times and Power Settings	207
3 Preparation and Quality Control of Nucleic Acid	209
3.1 Rationale	209
3.1.1 Lysing Cells	209
3.1.2 Purification of Nucleic Acid	209
3.1.3 Concentration of Nucleic Acid	211
3.2 Extraction of DNA	211
3.2.1 Small-scale Preparation of Plant Genomic DNA Using CTAB	211
3.2.2 Isolation of High-molecular-weight DNA by Salting-Out	215
3.2.3 Preparation of Plasmid DNA—Alkaline Lysis Minprep	218
3.3 Extraction of RNA	221
3.3.1 Rationale	221
3.3.2 Controlling RNase Activity	222
3.3.3 Guanidinium–Acid–Phenol Extraction	224
3.3.4 Isolation of Prokaryotic RNA	227
3.4 Quality Control of Nucleic Acid	230
3.4.1 Quality Control Technique 1: UV Spectrophotometry and Absorption Ratios	230
3.4.2 Quality Control Technique 2: Gel Electrophoresis	232
4 Restriction Analysis of Nucleic acid	233
4.1 Digesting DNA with a Single Restriction Endonuclease	233
4.2 Digesting DNA with Multiple Restriction Endonuclease	236
5 PCR and Its Application	237
5.1 Introduction	237
5.1.1 How does PCR work?	237
5.1.2 The PCR Reaction Mix	238
5.1.3 Thermostable DNA Polymerases	239
5.1.4 Heated Lid	240
5.1.5 Positive and Negative Controls	240
5.2 Protocol of Standard PCR	242
5.3 Primers Design	244
5.4 Optimization of the PCR Reaction Procedures	246
5.5 PCR Applications	250
5.5.1 LA PCR	250
5.5.2 Hot Start PCR	251

5.5.3 Touchdown and Touch-up PCR	251
5.5.4 Multiplex PCR	252
5.5.5 Reverse-transcriptase PCR	252
5.5.6 Quantitative and Real-time PCR	253
6 Recovery of DNA from Agarose Gel	256
6.1 Tips for Increasing DNA Recovery Efficiency from Agarose Gels	256
6.2 Recovery of DNA from Low-melting-temperature Agarose Gels: Organic Extraction	257
6.3 Electroelution of DNA from Agarose Gels	260
6.4 Recovery of DNA from Agarose Gel Using Silica Membrane Spin Columns	262
7 Transformation	266
7.1 Introduction	266
7.2 Transformation of <i>Escherichia coli</i> Using CaCl ₂	267
7.2.1 Protocol 1: Conventional Scheme	267
7.2.2 Protocol 2: Innovation Scheme	270
7.3 Transformation of <i>E. coli</i> by Electroporation	272
8 DNA Recombination	277
8.1 Introduction	277
8.2 Preparation of Vector and Insert	278
8.3 Ligation	279
8.3.1 Introduction	279
8.3.2. Standard Application—Ligation of DNA	281
8.4 Transformation	282
8.5 Screening for Recombinants	282
8.5.1 Insertional Inactivation	282
8.5.2 PCR Amplification of Inserts from Bacterial Cultures	285
8.5.3 Restriction Mapping	287
9 Constructing DNA Libraries	289
9.1 Genomic Library	290
9.1.1 Construction of a Genomic Library	290
9.1.2 Choice of Vectors	290
9.1.3 Evaluation of A Genomic Library	292
9.1.4 Growing and Storing Libraries	292
9.2 cDNA Library	293
9.2.1 Isolation of mRNA	294
9.2.2 cDNA Synthesis	294
9.2.3 Protocol: Construction of A cDNA Library Using Kits	299

10 Foreign Gene Expressions/Recombinant Gene Expressions	305
10.1 Introduction	305
10.2 Cell-Free Protein Expression Systems/ <i>In vitro</i> Protein Expression Systems	305
10.3 <i>In vivo</i> Protein Expression Systems	306
10.3.1 <i>E. coli</i> Expression System	306
10.3.2 Protocol: Expression of Cloned Genes in <i>E. coli</i> Using IPTG as Inducer and SDS-PAGE Analysis	312
11 Blotting Technology	316
11.1 Technology Guide	317
11.1.1 Choice of Blotting Membrane	317
11.1.2 Transfer Methods	319
11.2 Nucleic Acid Blotting	321
11.2.1 Overview of Nucleic Acid Blotting	321
11.2.2 Immobilization/Fixation	322
11.2.3 Nucleic Acid Labeling and Detection	323
11.2.4 Southern Blotting Protocol	326
11.2.5 Northern Blotting Protocol	331
11.3 Western Blotting	333
11.3.1 Overview of Western Blotting	334
11.3.2 Western Blotting Protocol	340
Appendix A: General Stock Solutions	344
Appendix B: Media and Antibiotics	347
Appendix C: Reagents and Solutions for Preparation and Purification of Macromolecular	349
Appendix D: Reagents and Solutions for Nucleic Acid Electrophoresis and Blotting	352
Appendix E: Reagents and Solutions for Protein Electrophoresis and Blotting	354
参考文献(References)	357



1 实验室基本知识

1.1 实验室安全

“我认为良好的实验室训练、顾及他人和安全是密不可分的。”

——冷泉港实验室医学博士 David H. Beach

安全工作是头等大事。实验室中存在危险物质,因此你需要保护自己免受伤害。同时,你也应该以同样的方式保护你的同伴和实验室外的环境。

提前预习实验指导。

提前阅读实验指导、熟悉原理和方法。这将减少事故发生的机会,同时也有助于在实验室中有效的工作。

养成良好的实验室规程。

禁止在实验室里吃、喝或抽烟。更不要在实验室里储存食物。这将避免你在不经意间吞进有害物质。实验结束后,清洗双手方可离开。

实验室中的个人防护。

无论何时进入实验室都应正确着装。尽管一件实验服可以保护你和你的衣服免受某些危险物侵害,但是你在实验服下的穿戴同样重要(图 1-1)。衣服应该易于清洗而且不是太宽松。重要的是衣服应该覆盖全身,包括腿。因此,穿裤子或长裙是恰当的。应当穿不露脚趾的鞋,因为破损或泄漏可能会发生。避免悬挂的首饰或领带,此外长而松散的头发可能掉入你的试样或是被正在运动的设备捕获。最好不要在实验室戴戒指、手镯或者手表,因为化学品易渗入其中。在实验室中穿着的衣服最好是防火的,而且在万一被化学药品或生物污染时易于脱除。也应正确地对用于实验室的、各种类型的化学试剂采取防护措施。

在恰当的时候戴一次性手套和安全眼镜(图 1-1)。在实验室中正确使用手套是防护多种类型危害的一种有效措施。最显而易见的好处是可在皮肤与化学药品或生物污染物之间增加了一道屏障。图 1-2 显示了清除已佩戴的一次性手套的技术,从而保证污染物不会从手套散布至皮肤。在操作化学药品、打开火焰或者使用工具时,戴上护目镜。当操作化学药品时,护目镜必须是抗飞溅的。

保持工作区域畅通且有序。

只将与实验工作有关材料带到实验室的工作区。所有其他物品(衣服、书包等)应当置于工作区外,最好是在走廊外。这种“物品”创造了流动的危险物而且会因意外的泄露而被污染。