

分子生物学方法

[美] Leonard C. Davis
Mark D. Dixon
James F. Bailey 编者

周勇泉 江国健主译

科学出版社

分子生物学方法

田勇泉 江国健主译

责任编辑：沙一飞

*

湖南科学技术出版社出版发行

(长沙市展览馆路8号)

湖南省新华书店经销 湖南省新华印刷二厂印刷

*

1990年1月第1版第1次印刷

开本：850×1168毫米 1/32 印张：10.75 插页：4 字数：279,000

印数：1—6,800

ISBN 7—5357—0599—5

Q·17 定价：5.80元

地科89—32

前言

当今生物学演变的核心是遗传学技术的进展。它的成就不但改变了生物学家的的工作，更重要的是改变了他们的思维。以往从来没有这么多学科的科学家拥至一个如此狭小而又神秘的领域（如同分子遗传学家们过去所认为的那样）去学习和获取有关技术，其行动又是如此迅速，因为一旦掌握了这些有效的实验手段，便有那么多事情可做，有那么多知识和技术可以学习和钻研。Davis, Dibner和Battey三位博士给了我们很大帮助，为我们提供了最新而又易于掌握，并经过实验室工作检验的最有用的实验技术，并对如何利用它们进行工作予以详尽的介绍。他们是有经验的科学家，对基本原理和具体操作细节都作了阐述。剩下就靠我们努力了。

Philip Leder

波士顿

（田勇泉译 陶正德校）

译者的话

本世纪70年代以来,以重组DNA为主的分子生物学技术发展十分迅速。这些新技术在我国具有非常广阔的应用前景。毫无疑问,它们将使众多领域的生产和科研发生革命性的变化。及时学习和掌握这些新技术,已成为我国广大科学工作者的迫切需要。因此,当我们有幸得到这本于1986年4月在美国最新出版的《分子生物学方法》一书后,便产生了一个非常强烈的愿望——将这本深受国外读者欢迎的工具书尽快推荐给我国的读者。本书囊括了当今世界上先进实验室中最常用、最新的分子生物学实验技术。书中对每个实验方法的描述清晰、明了、精炼,对实验时间的预算、安排、所需仪器设备和试剂的准备都作了详细的介绍,使读者能参照此书有条不紊地完成每个实验。对于初学者来说,此书是难得的入门指南;对于从事分子生物学研究的专家,也不失为一本案头必备的工具书。

我们的愿望能够如此迅速地得以实现,要感谢湖南医科大学彭兴华副校长的大力支持;感谢陶正德、袁恬莹和姚开泰三位教授的热情鼓励;感谢湖南科学技术出版社的通力协作。

这里需作一点说明:本书完全依照原著翻译,因而没有列入国内仪器设备和各类试剂的供应厂商,而许多实验是可以国产的仪器及试剂完成的。相信读者可以从其它许多途径得到这方面

的信息资料。

参加本书翻译工作的，大都是三十岁左右的年轻人，都曾经或正在使用书中介绍的方法进行各自的研究，这是有利的条件；但由于我们水平有限，译文中不当乃至谬误之处在所难免，恳请读者批评指正。

田勇泉

江国健

1988年夏于长沙

目 录

前 言

- 1 分子生物学基础.....(1)
- 2 分子生物学家的实验方法.....(5)
- 3 使用本书的一般准备、步骤及注意事项.....(11)
 - § 3.1 如何使用本书 11
 - § 3.2 安全注意事项 15
 - § 3.3 分子生物学研究所需要的设备 16
- 4 克隆载体与细菌细胞.....(20)
 - § 4.1 pBR322 20
 - § 4.2 M13 22
 - § 4.3 pUC 25
 - § 4.4 λ gt10 27
 - § 4.5 λ gt11 27
 - § 4.6 EMBL3和EMBL4 29
 - § 4.7 Charon28 30
 - § 4.8 细菌菌株 32
- 5 真核细胞DNA的制备.....(33)
 - § 5.1 DNA的快速制备 33

§ 5.2	真核细胞DNA的制备——一般方法	35
§ 5.3	培养细胞和组织的DNA制备	37
§ 5.4	限制性核酸内切酶(REs)及其应用	41
§ 5.5	琼脂糖凝胶电泳	48
§ 5.6	Southern印迹	51
6	用标记的合成探针探测核酸	(55)
§ 6.1	制备合成DNA探针——总论	55
§ 6.2	合成探针的末端标记	59
§ 6.3	用合成的 ^{32}P 末端标记探针进行杂交	61
7	用质粒源性探针探测核酸	(66)
§ 7.1	缺口转译	66
§ 7.2	DNA杂交(Southern印迹杂交)	69
8	质粒DNA的制备	(73)
§ 8.1	细菌的转化	73
§ 8.2	质粒DNA制备: 三硝基甲苯—溶菌酶 (Triton—Lysozyme) 法	76
§ 8.3	大规模碱裂解法: 质粒纯化	82
§ 8.4	质粒“微量制备”法	85
9	DNA内切酶片段的制备	(88)
§ 9.1	微型凝胶(Minigels)	88
§ 9.2	酶切后DNA片段的分析 ——琼脂糖凝胶电泳	90
§ 9.3	电洗脱	93
§ 9.4	DNA限制性片段的聚丙烯酰胺凝胶电泳	96
10	DNA的纯化	(100)
§ 10.1	DNA的精胺纯化法	100
§ 10.2	DNA的玻璃粉洗脱	102
§ 10.3	DNA的纯化: 其它方法	104

11	真核细胞RNA的制备和分析	(108)
§ 11.1	用喹尼丁异硫氰酸盐制备细胞总RNA	108
§ 11.2	微量RNA制备法	114
§ 11.3	用Oligo(dT)纤维素柱制备Poly(A ⁺)RNA	116
§ 11.4	福尔吗啉凝胶电泳分离RNA和Northern印迹分析	120
§ 11.5	用标记的探针“打点”杂交检测DNA或RNA	124
§ 11.6	RNA杂交时一般注意事项	127
§ 11.7	体外转录克隆到质粒中的DNA插入片段制备RNA探针	128
12	噬菌体克隆DNA的制备	(133)
§ 12.1	噬菌体的扩增与制备	133
§ 12.2	噬菌体DNA的大量制备与提纯	136
13	从真核细胞基因组中克隆 DNA	(142)
§ 13.1	概述	142
§ 13.2	DNA制备: MboI部分消化法	144
§ 13.3	基因克隆的噬菌体载体的制备	148
§ 13.4	连接基因组DNA 和噬菌体的臂、包装、构建基因文库	153
§ 13.5	基因文库的滴度测定和平皿试验	155
§ 13.6	用放射性标记的探针筛选基因文库	158
§ 13.7	基因文库扩增	163
14	用λgt10和λgt11 克隆 cDNA	(166)
§ 14.1	制备cDNA克隆载体——λgt10和λgt11	166
§ 14.2	从真核细胞mRNA制备cDNA插入片段	172
§ 14.3	λgt10或λgt11臂的连接、包装与cDNA文库的构建	181
§ 14.4	包装后的重组λgt10和λgt11的平皿接种	

与筛选 183

§ 14.5 λ gt10和 λ gt11cDNA克隆DNA的制备 188

15 用质粒载体进行亚克隆.....(192)

§ 15.1 用质粒载体进行亚克隆: 总则 192

§ 15.2 插入片断的亚克隆与连接中的pBR322

质粒的制备 193

§ 15.3 pBR322集落杂交 199

§ 15.4 用pUC质粒载体进行亚克隆 201

16 M13克隆与序列分析.....(204)

§ 16.1 M13克隆及序列分析: 概况 204

§ 16.2 用内切酶制备克隆插入片段 210

§ 16.3 用BAL31外切核酸酶连续删节法制备M13克

隆插入片段 214

§ 16.4 M13载体制备及载体与插入片段的连接 218

§ 16.5 用M13转化大肠杆菌JM103 222

§ 16.6 用放射性探针筛选M13克隆挑选插入片段作

序列分析 224

§ 16.7 制备M13单链DNA用于序列分析 226

§ 16.8 M13克隆的单道(Single-lane)筛选 228

§ 16.9 聚丙烯酰胺序列分析凝胶的制备 231

§ 16.10 M13克隆序列分析 235

17 克隆DNA的进一步定性.....(241)

§ 17.1 S_1 核酸酶保护试验 241

18 哺乳动物体外培养细胞的转染试验.....(251)

§ 18.1 用纯化质粒进行悬浮细胞和贴壁细胞转染的

磷酸钙沉淀法 251

§ 18.2 DEAE葡聚糖介导的哺乳动物悬浮细胞和贴

壁细胞的转染试验 255

§ 18.3 电导入(Electroporation) 257

§ 18.4 转染后哺乳动物细胞的选择——G418选择方法 260

§ 18.5 氯霉素乙酰转移酶试验(CAT试验) 262

19 蛋白质的分析方法.....(266)

§ 19.1 体外翻译和免疫沉淀 266

§ 19.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质 270

§ 19.3 Western印迹分析法 275

§ 19.4 蛋白质和RNA凝胶的银染色 278

20 一般的方法.....(282)

§ 20.1 DNA和RNA的抽提和沉淀 282

§ 20.2 塑料袋封口 285

§ 20.3 光密度分析测量 287

§ 20.4 凝胶或放射自显影的照相 288

§ 20.5 放射自显影术 289

§ 20.6 细菌生长平板的制作 291

§ 20.7 噬菌体的滴度测定与铺板 294

21 特殊的方法.....(296)

§ 21.1 转基因小鼠制备 296

§ 21.2 单克隆抗体生产：杂交瘤融合 304

§ 21.3 标记探针与组织切片的原位杂交 311

§ 21.4 克隆至酵母菌 316

附录1. 母液.....(319)

2. 酶类.....(326)

3. 提供试剂和仪器的主要厂商.....(327)

1

分子生物学基础

近十五年内一系列新技术的产生，使得现代生物科学发生了重大变革。利用这些新技术，可以揭示与细胞生长、分裂、代谢、分化和发育等复杂过程有关的分子结构及其作用机制。更有意义的是，它们提供了在这些过程中起关键作用的一些分子的操作方法，而且能够观察活体系统在结合了这些经过改变的分子后所发生的变化。

核酸和蛋白质为大分子物质，是由亚单位组成的线性多聚体。核酸含有生物体所有蛋白质特异结构的基因信息密码。它们同脂质和细胞间质一起，增加细胞的活性与生理功能。通过对这些关键成分相互关系的测定，能部分地了解其生物效应。细胞的基因物质——脱氧核糖核苷酸（DNA）是由四种核苷酸组合的多聚体。每种核苷酸由一个核酸碱基（A——腺嘌呤、G——鸟嘌呤、T——胸腺嘧啶、C——胞嘧啶）、一个脱氧核糖和一个磷酸分子组成。每条单链通过前一个脱氧核糖的3'碳与后一个脱氧核糖的5'碳共价相连，形成3'5'磷酸二酯键。DNA分子就是以磷酸糖作骨架，两条极性相反，互为平行的多核苷酸链相互环绕形成的双螺旋体结构。两条链之间，遵循碱基配对法则，以氢键紧紧相连。所谓碱基配对法则，即为：A总是配T，G必定配C。此法则不难从核酸合成机理的研究中得到证实，亦即当一条核苷酸链上的碱

基顺序固定下来作模板后，必须加入相配对的碱基才有延长新链的可能。正是这种碱基互补法则的恒定和专一，构成了作为遗传信息物质（DNA）的功能基础。DNA核苷酸的顺序，决定着蛋白质的氨基酸顺序。因此，DNA编码合成蛋白质——代表一个mRNA密码的三个相邻核苷酸组成一个三联体，以指导一种特异氨基酸的合成。因此，DNA分子的线性核苷酸序列决定了细胞的结构性、功能性以及酶活性蛋白质的氨基酸序列。DNA分子上非直接编码蛋白质的区域含有指导调节基因产物合成的信息。

在DNA控制蛋白质合成途径中，中介物是核糖核酸（RNA）。编码蛋白信息的DNA单链转录出一条RNA互补链，这种RNA含有同DNA一样的碱基，只是尿嘧啶（U）替代了胸腺嘧啶（T），核糖代替了脱氧核糖。称作信使核糖核酸（mRNA）的RNA，在转移核糖核酸（tRNA）和核糖体〔核糖体核糖核酸（rRNA）与蛋白质〕协同下，有序地组合氨基酸，翻译形成初级蛋白质。

许多分子生物学实验方法利用相对简单的原核细胞系统（例如细菌）来进行研究。原核细胞，其连续线性DNA序列直接与线性RNA和蛋白质序列相一致。然而，在真核细胞，编码蛋白质的核苷酸并不能被连续解读，因为它在可翻译的序列中含有阻断因子（内含子），因此，真核DNA最初被翻译为原始副本（异种核RNA），后者在核内被编码蛋白质序列的外显子所切割。而外显子本身呈线性结合在成熟的mRNA上。mRNA在核内进一步被处理并移至胞浆内翻译蛋白质。某些更先进的方法能够在真核细胞系统内进行基因的研究。

了解基因的结构、功能、调节和其产物，对生物系统的评价是必要的，这也涉及到对生物体核酸结构的认识。最初，这种认识被那在五万个基因中含有大约 10^9 核酸的真核细胞基因组的复杂性所困惑不解。为了在复杂条件下分析基因结构和功能，人们需要有在纯化形式下分离和研究单一基因的能力。DNA的分子克隆，为从基因群中分离、纯化并扩增DNA的单一断续片段到产生足够纯的片段以进行化学的、遗传的和生物学的分析，提供了理

论依据和可能。这一克隆过程完全依赖于实验室所进行的酶学反应，使用专一的细菌DNA切割酶（限制性内切酶REs）和修饰酶进行复制、切割与拼接不同种的DNA分子。当DNA分子拼接到有自主复制能力的环状DNA（质粒）或细菌病毒（噬菌体）后，便传染至细菌细胞，大量复制后，杂交分子再度分离、纯化，以获得数量可观的克隆片段。

由于能分离、纯化DNA片段，核苷酸碱基序列便能快速测定，由此也能正确地推测编码蛋白质的氨基酸序列。通过对纯化DNA的放射性标记，使科学家能在无以数计且十分复杂的细胞基因组内特异地探测到有关的DNA序列或细胞内相关的mRNA序列的拷贝数。由纯化DNA转录合成的mRNA能被检测和定量，甚至每个细胞低至1到10拷贝也能检测出来。在细菌或酵母内所进行的DNA克隆重组技术，使它的蛋白质编码顺序得到表达。这为生物学或医学提供了价廉、丰富的来源，而这些是其他方法办不到的，DNA克隆的选择性翻译能在实验室通过由改变序列或结构的方法而获得，然后再将这些DNA引入细胞或整个动物，以研究这些人为改变或突变造成的结果，并借此更全面地了解基因的调节和功能。

在这本书里，我们从分子遗传学的角度介绍了这些实验方法，如同烹饪手册那样，对每种情况下的实验方法我们都给予了十分详细的描述，而且这些方法早已为人们采纳和使用，倍受推荐。

本书所使用的方法从非常简单的到特别复杂的都作了合理编排。首先是对质粒、载体系统和细菌宿主细胞的介绍。接下来的几章是在假定特异合成或DNA克隆获得的探针可以应用的基础上，介绍了对目的基因进行选择，扩增和检测的方法。第五章讨论的是从组织抽提，切割DNA到理想的大小和分离所需的DNA片段的方法。第六、七两章则叙述了从挑选出来的目的DNA中如何制备探针，或通过合成或来自质粒繁衍。第八章所述及的方法是质粒的制备和扩增。接下来的第九、十两章便是克隆的DNA如何进行切割和纯化。

第十一章转而介绍了RNA的制备、选择、分离和鉴定方法。

第十二章就另一大类克隆载体——噬菌体进行了讨论。提请注意的是，到这章为止，所述及的方法包括了已被克隆的DNA序列的选择和扩增。第十三、十四两章的主要内容是在噬菌体载体内构建DNA文库和cDNA（互补DNA）文库。从已构建的基因文库中挑选所需的克隆，进而大规模地扩增DNA，再亚克隆引进质粒中增殖是第十五章的内容。从高产的这种DNA克隆中，人们对它的序列和其他特性进行研究，随后克隆到合适的M13载体，这便是第十六章和第十七章所讨论的问题。至此，很方便地利用简单的原核生物系统来进行DNA的研究已经作了较全面的讨论。然而，为了更确切更具体地探索DNA的调节和功能，将克隆的基因片段再插回到真核细胞基因组中才是真正目的。故第十八章介绍的方法便是在体外哺乳动物细胞内进行的DNA重组。

如上所述，蛋白质是基因产物。无疑，了解基因的调控，对蛋白质的研究具有重要作用，同样，在体外也能将RNA翻译成蛋白质。这些涉及到蛋白质的研究安排在第十九章里。

第二十章为一般方法。介绍了本书所讨论的许多种方法中都要使用的基本技术。例如DNA的抽提、放射自显影、噬菌斑滴定。若是初学者一开始便参照此书进行实验的话，可以相信，要不了多久，他将变成一个老手而胜任此方面的研究。

最后的一章也就是第二十一章，讨论的是几种较特殊的分子生物学方法。首先是转基因小鼠的分析，包括新的DNA片段整合到鼠的胚胎内再于生产后进行研究。我们也介绍了制备免疫探针来检测特异基因产物的单克隆抗体的生产技术，使用核苷酸探针对组织切片中特异性遗传信息进行定位和研究的原位杂交方法。最后对使用酵母宿主和载体系统进行分子生物学技术方面的某些注意事项给予了说明。

后面几页介绍的是分子生物学研究中专有技术的使用。在您阅读本章和使用这些方法时，请特别注意书中所强调的那些问题。

（江国健译 田勇泉校）

2

分子生物学家的实验方法

为了说明分子生物学方法的用途,本章围绕一个典型基因x进行研究,从所能采用的一套实验为基础,介绍各种不同的实验方法。

如果对令人感兴趣的x基因的分子结构或其在某些生物中的相对表达进行研究,首先就需要得到一个与x基因序列相同的放射性标记DNA探针。例如从另一物种所得的与x基因同源的基因。此探针可加以纯化并进行缺口转译形成一个放射性标记的探针,以便在DNA印迹转移(Southern blot)分析中检测x基因的存在。另外还有一种方法,即在实验室合成与x基因部分序列互补的寡核苷酸探针。然后此标记探针可以用于DNA印迹检测以分析选用的组织或细胞株DNA,确定其基因组中与x基因相关序列的存在。

为了进行DNA(Southern)印迹分析,要将来源于组织或细胞株的DNA分离提纯,由特异性限制性核酸内切酶(REs)切割成限定片段,然后通过琼脂糖凝胶电泳,将不同大小的DNA片段分开,将凝胶上的DNA转移到硝酸纤维滤纸上(Southern blot, DNA印迹转移),将DNA印迹膜与特异于x基因的探针杂交(Southern杂交)。探针只与含有同源序列的限制性片段形成互补。将非

特异性放射活性物质洗去，如果待测 DNA 中存在有x基因，则此印迹膜的放射自显影图谱可显示一条或多条区带，如无区带出现，则说明未能在待测DNA中发现x基因。

在用Southern印迹技术检测一种特异组织样本DNA时，可能出现异型的DNA限制性片段杂交区带，反映x基因结构序列有改变。例如，如果在特异组织或肿瘤中发生DNA重排 (rearrangement)，这种体细胞 (somatic) 内的重排可以用上述方法检出，即提纯不同组织来源的DNA并用探针检测。不同细胞类型或组织的基因组DNA，由于分子重排而引起的改变，可以导致在Southern印迹上显示出不同大小的杂交片段。

引起DNA杂交区带变化的另一个例子是限制性片段长度多态性 (RFLPs) 或不同的基因型 (等位基因)。如果将从100个不同个体控制的基因组DNA分别用限制性内切酶 EcoRI 切割，用x基因探针作Southern印迹检测，则可能出现2种或更多种不同亚型。因此，某些个体的基因组DNA可能含10—kb杂交限制性片段，而另一些个体也许含6—kb杂交片段，杂合个体则含有6—和10—kb两种片段，代表所研究的人群中，x基因位点存在有两个不同的等位基因。这种限制性片段长度多态性 (RFLPs) 有些可能与发生遗传性疾病的基因连锁或与某种恶变倾向相关联。由此可以肯定，在检出基因x的特殊等位基因与发生遗传性疾病或恶性肿瘤之间存在着相关。因此可以通过Southern印迹研究估计发生疾病的可能性。最近已经证实，在遗传测定上存在着与Huntington氏病、Duchenne氏肌营养不良以及囊性纤维变性相关的RFLPs。因此凡可能发生这些疾病的个体，在他们达到生育年龄以前，甚至在他们出生以前，即可检出。

要进一步了解x基因的详细结构或它在不同生物学条件下的变异结构，则需要较大量地制备均质的基因DNA。这就先要制备一个基因文库，其步骤是制备一套能代表全部基因组DNA的随机片段，其中基因组DNA各区段至少出现一次。将这些片段分别插入到一种能自主复制的原核生物DNA，如某种 λ 噬菌体DNA衍生物

之中，后者又被称为载体（vector）。将这种DNA重组文库用于感染细菌细胞，这些细胞分裂多次，而每个细胞又含多个载有插入片段的噬菌体。多数情况下，至少其中有几个克隆片段将含有x基因。可以用与上述同样的放射性标记探针从基因组文库中分离x基因克隆。

这样，一个克隆基因组片段的噬菌体文库便已建成，文库中千千万万个噬菌体，每一个都产生出自己所特有的插入DNA片段的多个拷贝。为从文库中找出复制x基因的噬菌体，必须筛选整个文库。将整个文库铺在多个培养皿上，将每个噬菌斑产生的DNA转移一小部分到硝酸纤维滤膜上，将x基因特异性探针与之杂交，用放射自显影鉴定杂交DNA，有杂交的DNA在x光胶片上呈现黑斑。任何在放射自显影胶片上检出的黑斑均鉴定为x基因噬菌体克隆，或x基因相关序列噬菌体克隆，可用于分离及进一步提纯。经过几个轮回的筛选，便可挑出x基因的均一克隆。现在样本中只含一种类型的噬菌体，即插入x基因的噬菌体。载x基因的片段可以用一种限制性内切酶（RE）从噬菌体基因组中切下来，而这条片段又可重新插入到一个更紧凑的载体（例如质粒）中去。所感兴趣的DNA片段插入质粒后，就能扩增这种克隆DNA，得到数以毫克计的x基因，以便进一步研究。

利用基因组DNA克隆可以观察x基因的结构标志和测定其核苷酸序列。例如，可用不同的限制性内切酶切割x基因标本，描绘出x基因内部及其周围的限制性内切酶位点（在给定的较短片段的DNA序列上，限制性内切酶切割位点是高度特异性的）。为了进行这一步，用数种限制性内切酶以不同方式组合，去消化x基因DNA，消化后的样本在琼脂糖凝胶上电泳，比较由多种限制性内切酶同时消化或单独消化所产生的片段的大小，即可绘出该基因组DNA克隆的限制性内切酶位点图。

利用x基因限制性内切酶位点图，可以从x基因中制备小的DNA片段，克隆到噬菌体MB载体中去。可用双脱氧链末端中止法或化学降解法对这些片段进行序列测定。从测得的序列可得到有