

- 全国高等医药院校药学类实验双语教材
- 教育部普通高等教育“十五”国家级规划教材

分子生物学 实验与指导

EXPERIMENT AND GUIDE
FOR MOLECULAR BIOLOGY

主编 谭树华

中国医药科技出版社

全国高等医药院校药学类实验双语教材
教育部普通高等教育“十五”国家级规划教材

分子生物学实验与指导

Experiment and Guide for Molecular Biology

(供药学类专业用)

主 编 谭树华

副 主 编 张玉彬

编 委 (按姓氏笔画排列)

李泰明 张玉彬 郑 珩

胡文军 谭树华

主 审

英文主审

中国医药科技出版社

本书配有光盘, 需要的读者请到多媒体阅览室(新馆 301 室)联系。

登记证号：(京) 075 号

内 容 提 要

本书是高等医药院校药学类实验双语教材。主要内容包括了最基本最常用的分子生物学实验技术。它不仅对实验步骤作了详尽的描述,而且对相关理论以及概念进行了简短阐述,这将有利于学生进一步理解掌握理论课上所接触到的概念;而且本教材还匹配了一张光盘,其中采用 CD 卡通的形式对其中 8 个基本实验的操作步骤进行了演示,这将对学生正确了解基本的实验方法有所帮助。

本书主要适用于生物技术专业以及药学类专业的高年级本科生和低年级研究生,同时还可供从事分子生物学研究及其相关专业人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学实验与指导/谭树华主编. —北京:中国医药科技出版社, 2003.7

全国高等医药院校药学类实验双语教材. 教育部普通高等教育“十五”国家级规划教材

ISBN 7-5067-2761-7

I. 分… II. 谭… III. 分子生物学-实验-医学院校-教材 IV. Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 057087 号

*

中国医药科技出版社 出版
(北京市海淀区文慧园北路甲 22 号)
(邮政编码 100088)

北京友谊印刷有限公司 印刷
全国各地新华书店 经销

*

开本 $787 \times 1092 \text{mm}^{1/16}$ 印张 $9\frac{3}{4}$

字数 212 千字 印数 1—5000

2003 年 8 月第 1 版 2003 年 8 月第 1 次印刷

定价: 22.00 元 (附 1 张光盘)

本社图书如存在印装质量问题, 请与本社联系调换 (电话: 62244206)

全国高等医药院校药学类教材编委会（第一届）

名誉主任委员	吴阶平	蒋正华	卢嘉锡
名誉副主任委员	郑筱萸	林蕙青	
主任委员	吴晓明	(中国药科大学校长)	
副主任委员	吴春福	(沈阳药科大学校长)	
	黄泰康	(中国医药科技出版社社长兼总编)	
	彭师奇	(北京大学药学院院长)	
	叶德泳	(复旦大学药学院副院长)	
	张志荣	(四川大学华西药学院院长)	
委	员	(按姓氏笔画排列)	
	丁 红	(山西医科大学药学院院长)	
	王广基	(中国药科大学副校长)	
	史录文	(北京大学医学部副主任)	
	朱景申	(华中科技大学同济药学院教授)	
	朱家勇	(广东药学院院长)	
	刘永琼	(武汉化工学院药学系副主任)	
	吴继洲	(华中科技大学同济药学院院长)	
	杨世民	(西安交通大学药学院院长)	
	罗向红	(沈阳药科大学教务处副处长)	
	梁 仁	(广东药学院教授)	
	娄红祥	(山东大学药学院院长)	
	姜远英	(第二军医大学药学院院长)	
	姚文兵	(中国药科大学教务处处长)	
	曾 苏	(浙江大学药学院院长)	

全国高等医药院校药学类教材编写办公室

主 副	主 任	任	姚文兵	(中国药科大学教务处处长)
		任	罗向红	(沈阳药科大学教务处副处长)
			程牛亮	(山西医科大学教务处处长)
			连建华	(广东药学院教务处副处长)

编写说明

为适应我国高等医药教育的改革和发展、满足市场竞争和医药管理体制对药学教育的要求,全国高等医药院校药学类教材编委会组织编写了“全国高等医药院校药学类教材”。

本系列教材是在充分向各医药院校调研、总结归纳当前药学教育迫切需要补充一些教学内容的基础上提出编写宗旨的。本系列教材的编写宗旨是:药学特色鲜明、具有前瞻性、能体现现代医药科技水平的高质量的药学教材。也希望通过教材的编写帮助各院校培养和推出一批优秀的中青年业务骨干,促进药学院校之间的校际间的业务交流。

参加本系列教材的编写单位有:中国药科大学、沈阳药科大学、北京大学药学院、广东药学院、华西医科大学药学院、山西医科大学、同济医科大学药学院、复旦大学药学院、西安交通大学药学院、山东大学药学院等数十所药学院校。

教材的编写尚存在一些不足,请各院校师生提出指正。

全国高等医药院校药学类
教材编写办公室

2001.9.3

序

实验教学是高等药学院校最基本的教学形式之一，对培养学生科学的思维与方法、创新意识与能力，全面推进素质教育有着重要的作用。飞速发展的科学技术，已成为主导社会进步的重要因素。高等药学院校必须不断更新教学内容，以学科发展的前沿知识充实实验课程内容。

近年来，中国药科大学坚持以研究促教改，通过承担教育部“世行贷款——21世纪初高等教育教学改革项目”及立项校内教改课题等多种方式，调动了广大教师投身教学改革的积极性，将转变教师的教育思想观念与教学内容、教学方法的改革紧密结合起来，取得了实效。此次推出的国家“十五”规划教材——药学专业双语实验教学系列，是广大教师长期钻研实验课程教学体系，改革教学内容，实现教育创新的重要成果。他们站在21世纪教育、科技和社会发展趋势的高度，对药学专业实验课程的教学内容进行了“精选”、“整合”和“创新”，强调对学生的动手能力、创新思维、科学素养等综合素质的全面培养。这套教材具有以下的特点：

1. 教材将各学科的实验内容进行了广泛的“精选”，既体现了高等药学教育“面向世界、面向未来、面向现代化”，也考虑到我国药学教育的现状与实际；既体现了各门实验课程自身的独立性、系统性和科学性，又充分考虑到各门实验课程之间的联系与衔接，有助于学生在教学大纲规定的实验教学学时内掌握基本操作技术，提高动手能力，养成严谨、求实、创新的科学态度。

2. 教材中新增的综合性、设计性实验有利于学生全面了解和综合掌握本门实验课程的教学内容。这一举措既满足了学生个性发展的需要，更注重培养学生分析问题、解决问题的能力 and 创新意识。

3. 教材中适当安排一些反映药学学科发展前沿的实验，有利于学生在掌握实验基本技术的同时，对药学学科的新进展、新技术有所了解，激发他们学习药学知识与相关学科的兴趣。

4. 教材以实践教学为突破口，采用双语体系编写，为实验课程改革构建数字化、信息化和外语教学的平台，有利于提高学生的科技英语水平。通过我校多年的药学系列实验课程双语教学实践，证明学生完全能够接受此套教材的教学。

国家十五规划教材——药学专业双语实验教学系列教材的陆续出版，必

将对推动我国高等药学教育的健康发展，产生积极而深远的影响。由于采用双语体系编写药学教学实验丛书尚属首次，缺乏经验，在内容选择及编写方法上的不妥之处，在所难免。欢迎从事药学教育的同行们批评赐教。

吴暖明

(中国药科大学校长、博士、教授、博士生导师)

2003年1月于南京

Preface

Experimental teaching is one of the most fundamental teaching means in pharmaceutical colleges, playing an important role in training scientific thoughts and methods, creative consciousness and ability of the students as well as in promoting quality – oriented education in all – round way. Fast – advancing science and technology has come to be an important factor in dominating social progress. Teaching materials must be updated continually in pharmaceutical colleges, especially enriching the materials of experimental courses with the most advanced knowledge in the subject.

In recent years, China Pharmaceutical University have been stressing the promotion of teaching reform on the basis of research, succeeding in stimulating teachers' enthusiasm for teaching reform by various means such as undertaking the project of teaching reform in higher education at the beginning of 21st century sponsored financially by World Bank and entrusted by the Ministry of Education as well as approving and ratifying internal programs on teaching reform. Meanwhile, it yields fruits to integrate the transforming of teachers' educational ideology into the reform of teaching materials and methods. This series of textbook of national "Tenth – five" planning – bilingual pharmaceutical experimental teaching series, is an important achievement made through studying teaching system of experimental courses for long, reforming teaching materials and carrying out educational innovation of all the teachers concerned.

Meeting the new demands for education, science and technology and social growth, they select, integrate and innovate the teaching materials of pharmaceutical experimental courses, stressing the overall cultivation of comprehensive qualities, including experimental ability, creative thought and scientific attainments. This set of textbook possesses the following features:

1. These textbooks make an extensive "selection" of the experimental materials of each subject, reflecting the goal of facing the world, facing the future and facing the modernization in higher pharmaceutical education, and taking into account the status quota and reality of our pharmaceutical education; meanwhile embodying the individuality, systematicness and scientificness of each experimental courses, which helps the students to grasp basic techniques of operation within the class hours of experimental teaching prescribed by teaching syllabus and to improve their experimental ability and finally to cultivate a scientific approach of precision, practicality and creation.

2. The comprehensive designing experiments newly supplemented in the textbooks help the students to learn totally and grasp comprehensively the teaching materials of the experimental courses, which not only meets the students' needs for individual development but also trains their ability to analyze and solve problems and cultivates their creative consciousness.

3. Some experiments representing the latest development in pharmacy are properly included in the textbooks, which helps the students to learn about new advance and technology in pharmacy and to further arouse their interests in studying pharmacy and relevant subjects while grasping some basic techniques of experiment.

4. The textbooks take experimental teaching as starting point and are compiled in a system of bilingualism and aim to set up a platform of digitalization, information and foreign language teaching for the purpose of reforming experimental courses, which serves to enhance the students' level of technological English. It has been proved that the students have no difficulty being adapted to the teaching of this set of textbook through many years of bilingual teaching practice carried out in a series of pharmaceutical experimental courses of our university.

The successive publishing of the series of textbooks used for bilingual pharmaceutical experimental teaching – the national “Tenth—five” planning textbooks, will surely produce good and far – reaching influence in promoting the sound development of higher pharmaceutical education of our country. Since it is the first time that we have compiled this series of textbook of pharmaceutical teaching experiment in a bilingual system, we lack experience and thus some defects in choice of materials and way of compilation are inevitable. Experts engaged in pharmaceutical education are welcome to give any criticisms and advice.

Wu Xiaoming

Ph. D, prof. , and supervisor of doctoral candidates

President of China Pharmaceutical University

Nanjing

Jan, 2003

前 言

随着分子生物学的迅猛发展，它在现代药学研究中发挥着越来越重要的作用。同时，分子生物学也是一门实验性很强的学科，因此，越来越多的同学希望通过实验课程更好地掌握分子生物学实验技术。为此，我们编写了这本分子生物学实验与指导。

该书主要适用于生物技术专业以及药学专业的高年级本科生和低年级研究生，其内容主要包括了最基本最常用的分子生物学实验技术。

本书的一个主要特点是它不仅对实验步骤作了详尽的描述，而且对相关理论以及概念进行了简短阐述，这将有利于学生进一步理解掌握理论课上所接触到的概念；另一个特点就是本教材还匹配了一张光碟，其中采用 CD 卡通的形式对本书中的八个基本实验的操作步骤进行了演示，这将对学生正确了解基本的实验方法有所帮助。

在此谨向在本实验开设与教材编写过程中始终给予支持与鼓励的吴梧桐教授表示感谢，同时对我院参与文稿组织与校读的研究生们表示感谢，此外还特别感谢陈学亚先生以及王庆华同学，他们在 CD 卡通的制作过程中作了很大帮助。

Preface

With the rapid development of molecular biology, it plays a more and more important role in modern pharmaceuticals research. In addition, it is also an experimental science, an increasing number of students wish to enroll in a course that will guide them through up – to – date molecular biology techniques. To accomplish this objective we have compiled this starter protocol book in basic molecular biology.

This laboratory course manual is designed for advanced undergraduates or beginning graduate students majoring in biotechnology and pharmaceuticals. The contents of the book have been chosen to enable students to master the most common and valuable techniques in molecular biology.

One of its attractive features is that the text not only provides a detailed description of the steps in an experimental procedure but also presents the theoretical concepts on which the experiments are based. This serves to reinforce and complement concepts taught in a formal lecture course. The other major feature is that to this laboratory textbook a CD cartoon describing the detailed steps of eight basic experiments is attached, which will help the students learn about the correct methods and procedures for performing these exercises.

We would like to acknowledge the encouragement from professor Wutong Wu, a senior biochemical and biopharmaceutical scientist and the former dean of school of biopharmaceutics, and the invaluable assistance of two graduate student classes who helped improve and carefully proofread the text. We also acknowledge Mr. Xueya Chen and Miss Qinghua Wang for their assistance in preparation of CD cartoon.

目 录

实验一 大肠杆菌染色体 DNA 的分离与纯化	(1)
1 Isolation and Purification of <i>E. coli</i> Chromosomal DNA	(4)
实验二 利用紫外光谱测定 DNA 的浓度和纯度	(8)
2 Determination of the Concentration and Purity of DNA by UV Spectroscopy	(10)
实验三 碱去垢剂法分离质粒 DNA - 小量制备法	(12)
3 Isolation of Plasmid DNA by the Alkaline - Detergent Method - A Miniprep Procedure	(14)
实验四 琼脂糖凝胶电泳	(17)
4 Agarose Gel Electrophoresis	(20)
实验五 聚合酶链反应 (PCR)	(24)
5 Polymerase Chain Reaction (PCR)	(28)
实验六 限制性内切酶与 DNA 的消化	(32)
6 Restriction Endonuclease and Digestion of DNA	(34)
实验七 DNA 连接与 TA 克隆	(37)
7 Ligation of DNA and TA Cloning	(39)
实验八 感受态大肠杆菌的制备与转化 (氯化钙法)	(42)
8 Preparation and Transformation of Competent <i>E. coli</i> Using Calcium Chloride ...	(44)
实验九 利用 α 互补筛选细菌克隆	(47)
9 Screening Bacterial Colonies Using α - Complementation	(49)
实验十 Southern 印迹	(52)
10 Southern Blotting	(56)
实验十一 DNA 序列测定	(61)
11 DNA Sequencing	(71)
实验十二 RNA 分离与定量	(84)
12 RNA Isolation and Quantification	(87)
实验十三 Northern 印迹杂交	(91)
13 Northern Blotting	(96)
实验十四 反转录 - 聚合酶链反应 (RT - PCR)	(102)
14 RT - PCR	(105)
实验十五 克隆化基因在大肠杆菌中的表达	(108)
15 Expression of Cloned Genes in <i>E. coli</i>	(110)
实验十六 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(113)
16 SDS - polyacrylamide Gel Electrophoresis	(116)
实验十七 Western 印迹	(120)

17 Western Blotting	(122)
实验十八 计算机网络技术的在分子生物学中的应用.....	(125)
18 Molecular Biological Research on the Web	(131)
附录.....	(138)
主要参考文献.....	(143)

实验一 大肠杆菌染色体 DNA 的分离与纯化

【导言】

从细胞中分离染色体 DNA 的方法有多种，但其目的都是为了获得高分子量的 DNA 材料。染色体 DNA 一般都很长，比如，大肠杆菌的染色体有 4.7×10^3 kb，大约 1mm 长。由于 B 型双螺旋 DNA 的宽度只有 1nm，DNA 分子对剪切力十分敏感。因此，在分离过程中应尽量避免搅拌过度。为了进一步保护 DNA 样品的完整性，通常需要在缓冲液中添加乙二胺四乙酸 (EDTA) 以螯合 Mg^{2+} ，这样将会减少脱氧核糖核酸酶 (DNase) 的活性，因为该酶必须在有 Mg^{2+} 存在时才会起作用。

【目的】

掌握从大肠杆菌细胞中分离纯化染色体的正确实验方法。

【原理】

本实验中添加去垢剂 sarcosyl 和 SDS (十二烷基磺酸钠) 是为了使蛋白变性并溶解细胞膜中的脂质从而导致细胞裂解，而细胞裂解物又常用 RNA 酶和蛋白进行水解处理。随后用酚:氯仿进行抽提，以去除残留的蛋白质，这时蛋白质将进入有机相，或者假如已变性的话将呈现在有机相与水相之间。乙醚处理是为了去除苯酚，而乙醇沉淀处理则可以浓缩 DNA，同时去除核苷酸、氨基酸以及低分子量的寡核苷酸和肽。

本实验所采用的方法已成功地应用于大肠杆菌和其他几种革兰阴性细菌 (包括 *Rhizobium*, *Seeratia* 和 *Vibrio* sp.) 的染色体 DNA 的抽提，而从其他类型的微生物 (比如 *Bacillus* sp. 和酵母) 中分离染色体 DNA 的方法则有所不同，其主要区别在于裂解步骤的不同。应用本实验所介绍的方法分离得到的染色体 DNA 样品易被限制酶切割，因此，较适用于 Southern 杂交的研究。如果所制备的染色体 DNA 是用于构建克隆文库，要求得到较大分子量的 DNA，则必须省略其中的振荡步骤。

【试剂与器材】

1. 大肠杆菌 LE932 lacY galK2 galT22 metB1 trpR55 supE44 supF58 hsdR514 (r_k^- , m_k^+), LB 培养基培养至对数生长期末期 (测定 OD_{600} , 以估算每毫升培养液所含的细胞菌体数)。
2. 盛冰的容器。
3. TNE 缓冲液 (10mM Tris - HCl, pH8.0, 10mM NaCl, 0.1mM EDTA)。
4. TE 缓冲液 (10mM Tris - HCl, pH8.0, 0.1mM EDTA)。
5. THE 缓冲液 (50mM Tris - HCl, pH8.0, 20mM EDTA)。
6. 灭菌的微量离心管。
7. 灭菌的移液器枪头。

8. 灭菌的移液器。
9. RNA 酶置于冰浴中（胰 RNA 酶 A，浓度为 10 mg/ml，溶于 TE 缓冲液中，80℃ 预热 10 分钟使其中的 DNA 酶失活）。
10. 链霉菌蛋白酶置于冰浴中（10mg/ml，溶于 TNE 缓冲液中，37℃ 预热 15 分钟，消化所有存在的 DNA 酶）。
11. 2% Sarcosyl (N-月桂醇肌氨酸) 溶于 HTE 缓冲液中。
12. 苯酚:氯仿 (1:1, 以 0.5 M Tris-HCl, pH8.0 平衡); 该氯仿为氯仿和异戊醇 (24:1 体积/体积) 的混合物。
13. 3.0M 醋酸钠。
14. 50℃ 水浴。
15. 37℃ 水浴。
16. 异丙醇 (储存于 -20℃)。
17. 70% 乙醇 (室温)。
18. 乙醚 (通风橱内)。
19. 聚乙二醇 (PEG) 400, 用水按照 1:1 的比例稀释——用于冲洗苯酚烧伤。

注意: 苯酚可以造成严重的皮肤烧伤。在使用苯酚时必须戴手套, 穿实验服, 带防护眼镜。如果有可能可带防护面罩。实验室必须备有 PEG 400 的水溶液 (与水 1:1 的稀释), 该溶液被推荐用来从体表除去苯酚。

20. 旋涡混合器。
21. 干冰—乙醇浴。
22. 真空干燥器。

【实验步骤】

1. 将 1.2ml 菌液置于微量离心管内, 8000 转/分钟离心 15 秒钟。
2. 将菌体悬浮于 0.31ml HTE 缓冲液中, 确保没有菌块。
3. 在 HTE 缓冲液中加入 0.35ml 2% Sarcosyl。将离心管颠倒数次, 充分混匀。
4. 加入 5 μ l RNA 酶, 37℃ 水浴保温 15 分钟。再加入 35 μ l 链霉菌蛋白酶并在 50℃ 水浴加热直至细胞裂解完全 (30~90 分钟)。
5. 旋涡振荡细胞裂解液 2 分钟以剪切 DNA。这一步骤将使 DNA 分子量下降为 20kb 左右, 同时, 还会降低裂解液的黏度, 使之更易于用苯酚:氯仿混合物及乙醚进行抽提。如果须保持大分子量质粒的环状结构, 就不要进行旋涡振荡。
6. 酚:氯仿抽提: 加入等体积的 (0.70ml) 苯酚:氯仿 (1:1) 的混合物, 短暂 (几秒钟) 旋涡振荡混合, 在微量离心机中最大速度离心 3 分钟使其分层, 用灭菌的移液器仔细将顶层转移至一新的微量离心管中。小心, 不要将白色絮状的中间层吸入。用苯酚:氯仿对含 DNA 的水层再进行两次抽提。将苯酚:氯仿倒入指定的废液回收容器内。

注意: 苯酚和氯仿可以抽提脂类并且使蛋白质变性, 而异戊醇则可降低抽提

时泡沫的产生并促进水相和有机相的分层。重蒸酚必须储存于 -20°C ，以防这些污染物的积累造成 RNA 和 DNA 的断裂与交连。如果苯酚带有任何颜色，那么在用于核酸纯化前，必须对其进行重新蒸馏。苯酚或苯酚:氯仿溶液用于抽提操作前，必须与缓冲溶液进行混合，以使其下层（有机相）是水饱和的，这样，使用时对含有所要提纯的核酸的水相就不会产生任何吸收。

7. 乙醚抽提（通风橱内操作）：等体积（0.70ml）乙醚抽提——加入乙醚，短暂旋涡振荡，然后将顶层溶液弃至废液缸内。

注意：乙醚用于抽提水层中残留的痕量苯酚和氯仿。乙醚极易挥发和燃烧；应在化学通风橱内进行操作。

8. 沉淀 DNA：加入醋酸钠溶液，使其终浓度达到 0.3M（70 μl ），混合均匀，加入等体积的异丙醇（0.7ml）。加入异丙醇后，将离心管来回颠倒 5 到 6 次。在乙醇—干冰浴中冷冻 10 分钟。离心 5 分钟或更长时间（见注释）并倾去上清。

注意：如果回收 DNA 时存在问题，可以尝试延长离心时间。

9. 漂洗 DNA 沉淀：加入 70%乙醇约 1.0ml，稍加混匀，然后离心 5 分钟，倾去上清。重复两次。这样可以除去残存的盐分以及残留的苯酚和氯仿。用封口膜将离心管口封好，并用针在上面扎几个眼，真空干燥以除去乙醇。

10. 将 DNA 沉淀溶解于 50 μl 的 TE 缓冲液中。在管子上做好标记， -20°C 保存。

1 Isolation and Purification of *E. coli* Chromosomal DNA

Introduction

There are several methods for isolating chromosomal DNA from cells. All have the common goal of obtaining high – molecular – weight material. Chromosomal DNA is quite long. For example, the chromosome of *E. coli* is 4.7×10^3 kb, which is about 1mm long. Because the double helix of DNA in the B form is only 1nm wide, DNA is extremely susceptible to shearing forces. In any isolation procedure then, excessively agitation should be avoided. As a further precaution, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) is included in the buffers to chelate Mg^{2+} . This will reduce deoxyribonuclease (DNase) activity because of the Mg^{2+} requirement of these enzymes.

Purpose

Master the correct method for isolating and purifying chromosomal DNA from *E. coli* cell.

Principle

In the procedure described here, the detergents sarcosyl and SDS (sodium dodecyl sulfate) are added to denature proteins and solubilize lipids in membranes leading to cell lysis. The cell lysate is often treated with enzymes that hydrolyze RNA and proteins. This is generally followed by phenol or phenol: chloroform extraction to remove the remaining proteins, which will either enter the organic phase or, if denatured, appear at the interphase. Ether treatment is used to remove the phenol, and alcohol precipitation concentrates the DNA while removing nucleotides, amino acids, and low – molecular – weight oligonucleotides and peptides.

This procedure has been used successfully with *E. coli* and with several other types of Gram – negative bacteria, including *Rhizobia*, *Seeratia*, and *Vibrio* sp.. Chromosomal DNA isolation procedures for other microorganisms differs mainly in the lysis step, such as for *Bacillus* sp. and for yeast. The protocol described here result in DNA that is easily cut with restriction enzymes and, therefore, is useful for Southern Hybridization studies. If the DNA is to be used to construct a clone bank, higher molecular weight DNA is desirable, so