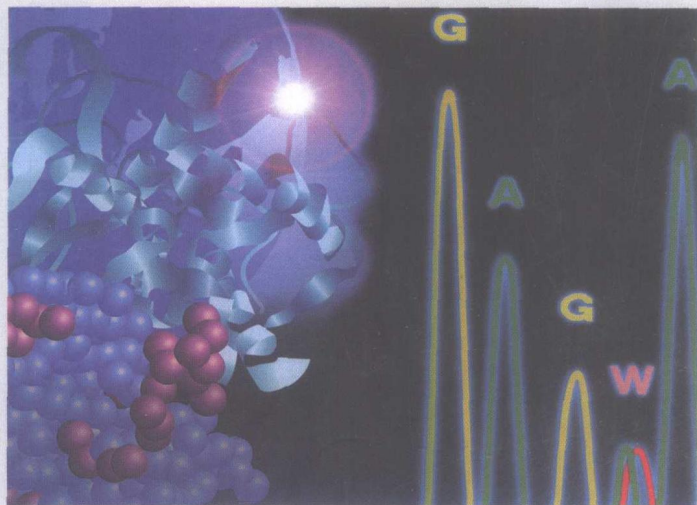




华夏英才基金学术文库

张维铭 主编

现代分子生物学 实验手册



科学出版社

www.sciencep.com



华夏英才基金学术文库

现代分子生物学实验手册

张维铭 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

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,越来越多的生命科学工作者,特别是医学工作者认识到,从基因水平上认识生命现象,解释、诊断和治疗疾病,可能会给人类认识自身的各种生命活动带来突破。要做到这一点就必须从实验室的点滴做起。

本书从基础的也是最重要的实验器具使用、操作及相关设备的主要原理开始,直到当前最为前沿的研究方法、手段,均有较为详细的介绍。它汇集了作者多年来从事基础医学研究的实践经验和在国外实验室工作的亲身体会,同时参阅了大量文献和有关论著,是一本系统的、理论与应用并重的实验参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

现代分子生物学实验手册/张维铭 主编. -北京:科学出版社,2003.6
ISBN 7-03-011341-1

I. 现… II. 张… III. 分子生物学-实验-手册 IV. Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 022151 号

责任编辑:王 晖 / 责任校对:朱光光

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄华斌

版权所有,违者必究

未经本社同意,数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2003年6月第一版 开本: B5 720×1000

2003年6月第一次印刷 印张: 37

印数: 1—3 000 字数: 719 000

定价:48.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

《现代分子生物学实验手册》编写人员

主 编 张维铭
编 者 (按姓氏笔画排序)
邢 军 刘 军
李艳芸 张维铭
徐 焱 耿 鑫

序

在中国华夏英才基金委员会的支持下,由张维铭教授等编写的《现代分子生物学实验手册》即将出版发行。从本书的命名就可以看出,这是一部以分子生物学实验技术为主要内容的参考书或工具书。贵在简明,重在实用。

随着生物技术(biological technology, BT)在医学基础研究、疾病诊断与临床治疗中的广泛应用,掌握分子生物学相关知识与某些实验技术,已经成为广大医学研究人员的迫切要求。本书正是为了适应这种要求而编写的。从编写指导思想与全书内容来看,有以下三个特点:

一是简明扼要,除用三章简述实验室设置、核酸的基本理论与生物信息学外,其余九章分别介绍了九类分子生物学实验技术,覆盖面广,实用性强。

二是文风朴实,不尚空谈,层次分明地介绍了操作步骤或实验流程,便于学习,易于掌握。

三是编著者在十年来科研与教学实践的基础上,又参阅了大量的相关论著和文献而写成本书,既有他人的成熟方法,也有自己积累的经验与改进,应有很高的可重复性。

本书对医药院校本科生、研究生、基础科室及临床医院的实验研究人员均有参考价值。

感谢编著者们为本书所付出的辛勤劳动,愿将此书推荐给广大读者。

吴咸中

中国工程院院士

天津医科大学教授

2003年2月

前 言

生命科学是 21 世纪学科发展的主流,其中医学分子生物学的研究使得人们从分子水平上逐渐认识到生命现象的本质。而相关的实验是所有研究过程中重要的途径和手段,为此对实验技术的了解和掌握是运用和发展学科的重要环节之一。

随着分子生物学科的发展,原有的研究方法、技术不断改进,新的技术、仪器设备不断出现。在总结自己近年来工作和实验教学的基础上,又受到国内外高水平分子生物学实验室工作的启迪,通过编写小组的努力完成了此书。编写中我们力求理论与实践结合、重点突出及各部分之间的系统性,同时也尽量吸纳相关实验技术的最新进展,祈望能给读者一个分子生物学实验的完整概念。

参加本书编写的以青年学者为主,他们中有已毕业的博士、硕士研究生,也有正在攻读学业的博士、硕士研究生。各自编写的章节是徐垚第二、三、七、十章,李艳芸第八、九章,刘文天第十一章第一节,邢军第十二章,耿鑫附录的整理和编写,张维铭第一、四、五、六章,第十一章第二、三节,以及全书的统一编审。

此外,崔建峰、耿鑫、郑洁等同志承担了本书的打字、制图、计算机编排及其他的组织、联络等工作,在此表示深深的谢意。

更应该感谢的是中共中央统战部和中华英才基金委员会对本书的编写和出版给予的鼎力支持和亲切关怀,中共天津市委教育卫生工作委员会、统战部及中共天津医科大学委员会、统战部的各级领导自始至终对本书的编写给予了具体的帮助和热情的支持。编写小组在此表示诚挚的感激之情。

盼望本书的出版能予同行学者及研究生的学习小有裨益。

本书的错误及不足在所难免,欢迎批评指正。

张维铭

于天津医科大学

2003 年 2 月

目 录

序

前言

第一章 基础篇	(1)
第一节 分子生物学实验室常用基本器具	(1)
一、常用基本器具	(1)
二、常用器具的材料	(6)
第二节 通用实验设备及其使用方法	(9)
一、天平	(9)
二、pH 计	(11)
三、分光光度计	(11)
四、微量移液器	(12)
五、离心机	(15)
六、恒温箱	(17)
七、振荡器	(19)
八、超净工作台	(20)
第三节 实验室基础准备工作	(21)
一、实验用水的制备	(21)
二、消毒灭菌	(23)
三、液氮的使用	(26)
四、实验器具的硅化	(27)
五、实验用醇及酚类的准备	(28)
第四节 实验用试剂	(31)
一、分子生物学实验室常用试剂浓度表示法	(31)
二、试剂的保存	(32)
三、实验室中试剂的管理	(32)
第五节 安全防护	(32)
一、放射性核素的防护	(32)
二、危险化学试剂及防护	(33)
三、生物安全防护	(34)

第二章 核酸的基础理论	(36)
第一节 核酸	(36)
一、核酸的组成与结构	(36)
二、核酸的理化特性	(42)
三、核酸的光谱学	(44)
四、核酸的降解与合成	(45)
第二节 基因与染色体	(47)
一、基因	(47)
二、染色体	(53)
第三节 细胞分裂周期	(59)
一、有丝分裂	(59)
二、减数分裂	(62)
第四节 遗传信息的传递	(66)
一、复制	(66)
二、转录	(70)
三、翻译	(75)
第三章 核酸的制备	(80)
第一节 真核细胞 DNA 的制备	(80)
一、概论	(80)
二、从培养的动物细胞或组织中提取高分子质量 DNA	(84)
三、血液样品中 DNA 的制备	(87)
四、残存蛋白质和 RNA 的检测	(88)
五、真核细胞基因组 DNA 制备中的注意事项	(89)
第二节 细菌细胞 DNA 的提取	(89)
一、试剂	(89)
二、实验流程	(90)
三、制备大分子质量细菌 DNA 的几个关键步骤	(91)
第三节 质粒 DNA 的分离纯化	(91)
一、概论	(91)
二、氯化铯密度梯度离心法	(93)
三、碱裂解法	(94)
四、煮沸法	(97)
五、试剂盒提取及纯化质粒	(97)
第四节 RNA 的制备	(98)
一、RNA 的结构和分布	(99)

二、RNA 制备中的关键因素	(101)
三、组织细胞总 RNA 分离制备	(103)
第四章 电泳技术	(107)
第一节 电泳技术的基本原理	(107)
第二节 影响泳动率的因素	(108)
一、样品	(108)
二、支持介质	(108)
三、电场强度	(110)
四、缓冲液的离子强度	(110)
第三节 凝胶电泳的基本技术和条件	(111)
一、核酸凝胶电泳的分类	(111)
二、缓冲液系统	(112)
三、样品的配制	(112)
四、电泳条件的考虑	(113)
五、染色	(113)
六、电泳结果的记录	(115)
第四节 琼脂糖凝胶电泳	(116)
一、仪器设备及材料	(117)
二、电泳操作步骤	(118)
第五节 碱性琼脂糖凝胶电泳	(120)
第六节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(122)
一、仪器设备及试剂	(123)
二、制胶准备	(124)
三、制胶	(125)
四、电泳	(126)
五、染色及结果观察	(126)
第七节 双向电泳	(127)
一、等电聚焦电泳	(128)
二、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	(138)
三、双向电泳结果的分析鉴定	(144)
第八节 凝胶扫描、成像系统	(148)
第五章 工具酶	(151)
第一节 限制性内切酶	(151)
一、概述	(151)
二、常用的三种内切酶	(153)

三、其他类型内切酶	(157)
四、甲基化酶	(158)
五、与内切酶相关的几个概念	(160)
六、限制性内切酶酶切反应	(161)
七、DNA 分子的限制性内切酶酶谱	(163)
第二节 DNA 重组常用的其他酶类	(165)
一、DNA 聚合酶	(165)
二、RNA 聚合酶	(167)
三、DNA 连接酶	(168)
四、反转录酶	(168)
五、核糖核酸酶 A	(169)
六、核糖核酸酶 T ₁	(169)
七、核糖核酸酶 H	(169)
八、核糖核酸酶 U ₂ 、核糖核酸酶 CL ₃	(169)
九、脱氧核糖核酸酶 I	(169)
十、核酸酶 S ₁	(170)
十一、核酸酶 Ba131	(170)
十二、核酸外切酶	(170)
十三、末端转移酶	(170)
十四、多核苷酸激酶	(171)
十五、碱性磷酸酯酶	(171)
第六章 基因克隆技术	(172)
第一节 目的基因 DNA 的制备	(172)
一、从染色体中获得	(172)
二、人工合成	(174)
三、聚合酶链式反应扩增特定的基因片段	(174)
第二节 基因克隆载体	(175)
一、质粒	(176)
二、噬菌体	(185)
三、真核细胞为宿主的克隆载体	(194)
四、反转录病毒载体	(202)
第三节 DNA 分子的体外重组	(204)
一、DNA 连接酶	(204)
二、外源性基因 DNA 片段与载体 DNA 的连接	(207)
三、影响 DNA 连接的因素	(212)

四、DNA 在凝胶内的连接	(213)
第四节 重组 DNA 导入宿主细胞	(213)
一、转化的方法	(214)
二、氯化钙法转化大肠杆菌(全部过程需无菌操作)	(215)
三、重组 DNA 克隆的筛选与鉴定	(218)
第五节 基因组文库的构建	(222)
一、构建基因文库的准备条件	(223)
二、基因文库的构建	(226)
第六节 cDNA 文库的构建	(235)
一、总 RNA 的提取及 mRNA 的制备	(236)
二、cDNA 文库的构建	(238)
第七章 聚合酶链式反应	(244)
第一节 PCR 基本原理	(244)
一、基本原理	(244)
二、“长产物片段”与“短产物片段”	(246)
三、平台效应	(248)
第二节 PCR 反应条件的优化	(249)
一、标准 PCR 反应流程	(249)
二、PCR 反应条件的优化	(249)
第三节 引物的设计	(254)
一、设计原则	(254)
二、引物长度	(255)
三、引物的 5' 端修饰法	(256)
四、简并引物	(257)
五、嵌套引物	(258)
第四节 PCR 反应模板的制备	(259)
第五节 耐热 DNA 聚合酶	(260)
一、 <i>Taq</i> DNA 聚合酶	(260)
二、其他耐热 DNA 聚合酶	(263)
第六节 热启动 PCR	(265)
一、热启动 PCR 的原理	(265)
二、热启动 PCR 的几种技术	(265)
第七节 降落 PCR	(268)
第八节 PCR 相关技术的发展	(269)
一、不对称 PCR	(269)

二、多重 PCR	(271)
三、着色互补 PCR	(272)
四、巢式 PCR	(272)
五、锚定 PCR	(273)
六、反向 PCR	(273)
七、柄 PCR	(275)
八、增敏 PCR	(275)
九、重组 PCR	(276)
十、表达 PCR	(277)
十一、原位 PCR	(278)
十二、RNA 的聚合酶链反应	(279)
十三、cDNA 末端快速扩增	(280)
十四、差异显示 PCR	(286)
十五、定量 PCR	(286)
第九节 PCR 产物的检测	(295)
一、琼脂糖凝胶电泳	(296)
二、聚丙烯酰胺凝胶电泳	(296)
三、层析技术	(297)
四、分子杂交	(297)
五、微孔板夹心杂交法	(297)
六、限制性内切酶酶切分析	(298)
七、酶免疫法检测 PCR	(298)
八、PCR 扩增产物的直接测序	(299)
第十节 PCR 的污染及对策	(299)
一、PCR 污染	(299)
二、污染的预防	(300)
三、对照实验	(300)
四、污染源的处理	(301)
第十一节 PCR 技术的应用	(302)
一、基因分析	(302)
二、定序克隆	(308)
三、序列分析	(309)
第八章 核酸分子探针的标记	(311)
第一节 概述	(311)
一、探针的种类及其选择	(311)

二、各种标记物及其选择	(312)
三、各种标记方法及其选择	(317)
第二节 非放射性 DIG 标记方法	(317)
一、非放射性 DIG 标记方法的比较	(317)
二、PCR 标记法	(319)
三、随机引物标记法	(322)
四、体外转录标记 RNA 探针	(325)
五、三种标记方法重要参数的比较简表	(329)
第三节 探针标记效率的评估	(330)
一、直接检测过程	(330)
二、琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 标记探针	(331)
第九章 核酸分子杂交	(332)
第一节 Southern 杂交	(332)
一、琼脂糖凝胶分离 DNA 样品	(332)
二、DNA 的转膜(Southern 印迹,虹吸印迹法)	(333)
三、预杂交	(336)
四、DIG 标记的 DNA 探针与靶 DNA 的杂交	(337)
第二节 RNA 探针的 Northern 杂交	(342)
一、琼脂糖凝胶分离 RNA 样品	(342)
二、RNA 的转膜(Northern 印迹,虹吸印迹法)	(343)
三、预杂交	(344)
四、DIG 标记的 RNA 探针与 RNA 的杂交	(345)
五、做核酸杂交时,如何取得良好结果	(345)
第三节 非放射性核素探针的检测	(347)
一、光学检测	(347)
二、化学发光检测	(349)
第四节 使用 DIG 标记的探针进行菌落和噬菌斑的杂交	(351)
一、菌落/噬菌斑滤膜的准备步骤	(351)
二、DIG 标记的 DNA 探针与菌落/噬菌斑滤膜的杂交	(353)
三、化学发光法检测探针-靶基因杂交信号	(353)
四、显色法检测探针-靶基因杂交信号	(354)
五、菌落/噬菌斑杂交的影响因素	(355)
第五节 核酸原位杂交	(355)
一、核酸原位杂交的基本要点	(355)
二、结果的评定	(358)

附:Western 印迹检测表达蛋白质	(359)
一、哺乳细胞的裂解	(359)
二、蛋白质的电转移	(359)
三、封闭	(360)
四、靶蛋白与第一抗体反应	(360)
五、与第二抗体反应	(361)
六、显色	(361)
第十章 测序	(362)
第一节 概论.....	(362)
第二节 Sanger 双脱氧法	(363)
一、基本原理	(363)
二、经典测序反应——M13 单链测序系统	(366)
三、双链 DNA 测序反应系统	(375)
四、循环测序法	(378)
五、PCR 产物直接测序	(380)
第三节 Maxmam-Gilbert 化学法	(383)
一、化学法基本原理	(383)
二、化学法测序的一般流程	(385)
三、化学法的优缺点	(387)
第四节 杂交测序.....	(388)
第五节 自动化测序.....	(392)
一、自动化测序仪	(392)
二、全自动化测序流程	(399)
第六节 DNA 大片段序列测定的战略	(405)
一、随机测序	(405)
二、定向测序法	(409)
三、全基因组测序策略	(411)
第七节 DNA 测序技术新进展	(414)
第十一章 新技术	(419)
第一节 mRNA 差异显示技术	(419)
一、概述	(419)
二、基本原理	(423)
三、实验设计和优化	(424)
四、实验操作	(431)
五、差异显示技术衍生的方法	(440)

六、差异显示技术的应用	(441)
七、存在的问题和解决的策略	(450)
八、展望	(451)
第二节 生物芯片	(452)
一、生物芯片技术的基本原理	(453)
二、生物芯片技术的特点	(453)
三、生物芯片的应用	(454)
四、生物芯片技术存在的问题及发展前景	(457)
第三节 激光捕获纤维切割技术	(459)
一、LCM 技术的主要原理及简单操作	(459)
二、LCM 技术的特点、存在问题及相应对策	(460)
三、LCM 技术在生命科学研究中的应用状况	(461)
四、LCM 技术的发展前景	(462)
第十二章 生物信息学及其在分子生物技术中的应用	(465)
第一节 概述	(465)
一、生物信息学的概念	(465)
二、生物信息学的发展	(466)
三、生物信息学的研究现状	(469)
第二节 生物信息学的研究方法和内容	(471)
一、研究方法	(471)
二、研究内容	(489)
第三节 生物信息数据库	(494)
一、生物信息数据库及其分类	(494)
二、生物信息数据库介绍	(495)
三、数据库的查询	(497)
四、全球生物信息数据库	(499)
第四节 序列比对和数据库搜索	(511)
一、序列比对	(511)
二、数据库搜索	(513)
第五节 生物信息学的应用	(516)
一、序列分析	(516)
二、核酸序列装配和拼接	(524)
三、电子基因定位	(525)
四、基因表达的电子组织分布	(528)
五、功能预测	(529)

六、蛋白质结构预测	(531)
七、向数据库提交序列	(532)
八、SNP 分析	(533)
第六节 研究实例	(534)
一、实例一	(534)
二、实例二	(539)
三、其他研究路线	(540)
附录	(543)
一、遗传密码子表	(543)
二、常用的缓冲液和试剂	(543)
三、铬酸洗液及配制方法	(551)
四、放射性核素资料	(552)
五、核酸及蛋白质数据	(553)
六、常用分子质量标准参照物	(554)
七、细胞培养中出现的常见问题、原因及解决方法	(556)
八、分子生物学研究中的网上资源	(557)
缩略语	(559)
索引	(564)

第一章 基础篇

当今,科学研究进展日新月异,新理论、新技术、新仪器设备在不断地诞生和出现。特别是分子生物学近年来发展迅速,已渗透到了多个学科领域,大大地推动了医学、药学的发展进程。事实证明,无论在哪个学术领域,要想有新的突破,除了正确的理论指导和科学的实验设计之外,先进的技术方法、良好的仪器设备、正确的操作技能是最重要的保证。

第一节 分子生物学实验室常用基本器具

一、常用基本器具

分子生物学实验室中有一些最基本的常用器具,在实验过程中每天都要使用,但实验者特别是初学者往往对这些极为简单器具的性质和特点不够了解,从而给全实验带来一些影响。

(一) 溶液瓶

溶液瓶(bottle)(图 1-1-1)是最常用的实验室容器之一,其材质多为玻璃和树脂(聚乙烯、聚丙烯),主要是用来贮存各种液体试剂,应该根据试剂的理化性质和其他具体要求来选择溶液瓶。

下面几点应在使用前给以考虑:

- (1) 是否能耐受高压蒸汽灭菌或干热灭菌。
- (2) 瓶体、瓶盖及其内衬对酸、碱的耐受性。
- (3) 特别是选用树脂瓶时,应考虑在贮存过程中瓶体是否可能有某种物质被溶出。

一般来说,需要高压蒸汽灭菌或干热灭菌应尽量不选用树脂制溶液瓶。尽管聚丙烯树脂能耐受高压,但其在高压时若相邻有其他消毒物品,则极易被挤压变形。此外,含有机溶剂的试剂一般也不宜选用树脂制瓶盛装。

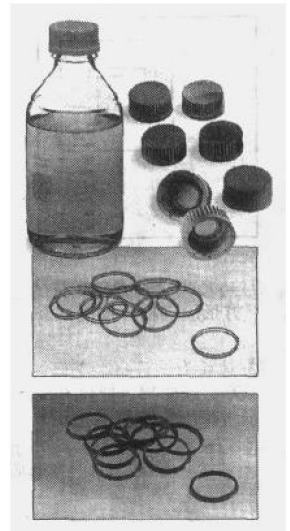


图 1-1-1 溶液瓶