



生命科学实验指南系列

分子生物学实验技术 基础与拓展

Molecular Biology Techniques:
Foundation and Enhancement

黄立华 王亚琴 梁 山 著
邓惠敏 赖建彬 谷 峻 张晓娟



科学出版社

生命科学实验指南系列

分子生物学实验技术

基础与拓展

Molecular Biology Techniques:
Foundation and Enhancement

黄立华 王亚琴 梁 山 著
邓惠敏 赖建彬 谷 峻 张晓娟



科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书由两部分组成。第一部分“基础篇”精选了 10 个最基础的分子生物学实验和一个综合实验,包括 PCR、DNA 提取、酶切、连接、转化、蛋白质电泳等。在每一个实验的最后,都增加了相关的拓展环节,用于拓宽学生对该知识点的理解。第二部分“拓展篇”主要适用于具有一定基础的科研工作者(研究生或研发人员)进一步深入开展研究,内容包括总 RNA 提取、实时定量 PCR、基因定点突变、热不对称交错 PCR、蛋白质原核表达、蛋白质印迹、凝胶迁移实验、多克隆抗体制备、植物转基因操作和昆虫转基因操作等。

本书可供普通高等学校、医学院校、生物类研究所本科生和研究生,以及从事生物化学与分子生物学工作的科研人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学实验技术:基础与拓展/黄立华等著. —北京:科学出版社, 2017. 11

ISBN 978-7-03-055058-3

I. ①分… II. ①黄… III. ①分子生物学-实验-高等学校-教材
IV. ①Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 266822 号

责任编辑:马 俊 / 责任校对:邹慧卿

责任印制:张 伟 / 封面设计:北京铭轩堂广告设计有限公司

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>

北京京华虎彩印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017 年 11 月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2017 年 11 月第一次印刷 印张: 8

字数: 160 000

定价: 48.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

作者简介

黄立华 男，出生于1975年10月。2007年毕业于中国科学院动物研究所，获博士学位。2007~2009年在美国康奈尔大学昆虫学系从事博士后研究，2016~2017年在美国加利福尼亚大学（尔湾分校）分子生物学与生物化学系访学。现任华南师范大学生命科学学院教授。专业方向为生物化学与分子生物学，研究领域为昆虫发育调控及转基因昆虫。E-mail: HuangLH@scnu.edu.cn。

王亚琴 女，出生于1972年9月。2003年毕业于中国科学院华南植物园，获博士学位。2003~2010年在华南理工大学生物科学与工程学院任副教授。2008~2009年在美国康奈尔大学BTI（Boyce Thompson Institute）访学。2010年调入华南师范大学生命科学学院。2014~2015年在美国康奈尔大学农业与生命科学院园艺系访学。现任华南师范大学生命科学学院教授。专业方向为遗传学，研究领域为植物分子发育与遗传。E-mail: yqwang@scut.edu.cn。

梁山 女，出生于1968年12月。2007年毕业于中山大学，获博士学位。现任华南师范大学生命科学学院副教授。专业方向为遗传学，研究领域为兰科植物开花控制。E-mail: liangsh@scnu.edu.cn。

邓惠敏 女，出生于1984年12月。2012年毕业于华南师范大学，获博士学位。现任华南师范大学生命科学学院副教授。专业方向为生物化学与分子生物学，研究领域为昆虫发育调控。E-mail: denghuiminmin@163.com。

赖建彬 男，出生于1980年12月。2009年毕业于中山大学，获博士学位。2009~2013年在美国康奈尔大学分子医药系从事博士后研究。现任华南师范大学生命科学学院副教授。专业方向为遗传学，研究领域为植物蛋白质修饰。E-mail: laijianbin@hotmail.com。

谷峻 女，出生于1976年12月。2005年毕业于中国农业大学微生物学系，获博士学位。2007~2009年在美国康奈尔大学植物病理学与微生物学系从事博士后研究，2016~2017年在美国加利福尼亚大学（河滨分校）微生物学系访问。现任华南师范大学生命科学学院副教授。专业方向为分子微生物学，研究领域为微生物资源及应用。E-mail: gujun@scnu.edu.cn。

张晓娟 女，出生于 1988 年 12 月。2015 年毕业于华南师范大学生物化学与分子生物学专业，获硕士学位。现任华南师范大学生命科学学院助理实验师。
E-mail: zhangxiaojuan0035@163.com。

前 言

1941 年美国科学家 Beadle 和 Tatum 提出“一个基因，一种酶”，这被称为分子生物学发展史上的第一个重要发现。2000 年 6 月 26 日，人类全基因组测序计划顺利完成。前后不到 60 年的时间，分子生物学发展突飞猛进。近年来，各种新型分子生物学技术不断涌现，如第三代基因组测序、以 CRISPR/Cas9 为代表的基因组编辑技术、转基因技术等，正迅速推动着一场新的生物技术变革。DNA 条形码、转基因植物、基因治疗等正深刻地影响着我们的日常生活。身处这个时代的我们，如何去理解、适应乃至引领这场生物技术变革，确实需要我们每一个人去认真思考。

分子生物学技术种类繁多，发展迅速，要一一掌握几乎是不可能的，也没有必要。所有高深的分子生物学技术，都是从最基础的实验一步一步发展起来的。因此，只有掌握好基本的分子生物学实验技能，才能够在此基础上，通过努力，不断提高，从而开展更加精细的分子生物学研究。根据教育部教学大纲的要求，并在总结了我们多年的分子生物学教学和科研经验的基础上，撰写了这本教材，其中包括 10 个最常用的基础分子生物学实验、一个综合实验（基础篇）和 10 个高级实验（拓展篇）。通过对这些实验的操作和掌握，读者将能够循序渐进地掌握基本的分子生物学实验技能，从而具备独立开展相关分子生物学课题研究的能力。

本教材适用于大学阶段生物学各专业分子生物学实验技术的教学，也可作为生物学专业研究生或相关领域研发人员的参考书。鉴于我们知识和能力所限，书中可能会出现不足之处，敬请各位读者批评指正，我们将竭力在将来的再版中加以完善。

黄立华

华南师范大学生命科学学院

2017 年 3 月

目 录

第一部分 基 础 篇

实验 1 移液器的使用	3
实验 2 聚合酶链反应	8
实验 3 PCR 产物的回收与纯化	12
实验 4 基因组 DNA 的提取	15
实验 5 琼脂糖凝胶电泳	19
实验 6 质粒 DNA 的提取	24
实验 7 DNA 酶切与连接反应	31
实验 8 大肠杆菌感受态细胞的制备与转化	36
实验 9 SDS-PAGE	41
实验 10 表达蛋白的分离与纯化	47
实验 11 综合实验——基因克隆	52
案例分析	58

第二部分 拓 展 篇

实验 1 总 RNA 提取	63
实验 2 实时定量 PCR	68
实验 3 基因定点突变——overlap PCR	77
实验 4 热不对称交错 PCR	80
实验 5 蛋白质原核表达	85
实验 6 蛋白质印迹	89
实验 7 凝胶迁移实验	94
实验 8 多克隆抗体制备	99
实验 9 植物转基因操作	102
实验 10 昆虫转基因操作	106

附 录

附录 1 常用培养基和抗生素	111
----------------------	-----

附录 2 常用试剂的配制	113
附录 3 引物设计	115
附录 4 推荐阅读书目	117

第一部分

基 础 篇

实验 1 移液器的使用

(王亚琴)

一、实验目的

- ①学会如何正确使用不同量程的移液器。
- ②掌握不同量程移液器的精度范围。

二、实验原理

1. 原理

移液器的工作原理是活塞通过弹簧的伸缩运动来实现吸液和放液。在活塞推动下，排出部分空气，利用大气压吸入液体，再由活塞推动空气排出液体。使用移液器时，配合弹簧的伸缩性特点来操作，可以很好地控制移液的速度和力度。

2. 移液器介绍

移液器各部分的名称如图 1-1 所示。移液器通常有 4 种不同的量程，在移液器量程范围内能连续调节读数。不同量程的移液器，其精度范围也不同。量程越小，精度越高。因此，当 2 种移液器都能完成移液操作时，优先选用量程小的移液器会得到更加精确的结果。不同量程移液器的精度范围如表 1-1 所示。

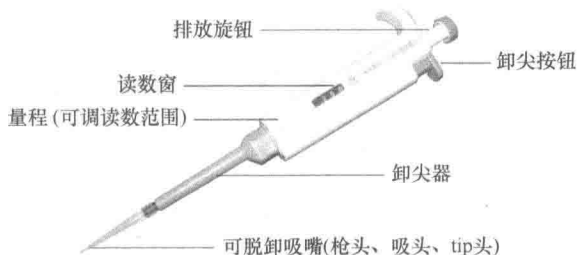


图 1-1 移液器各部分的名称

表 1-1 不同量程移液器的精度范围

不同量程的移液器	精度范围
0.5~10μl	0.1μl
5~50μl	0.5μl
20~200μl	1μl
100~1000μl	5μl

三、实验内容

1. 练习单支移液器的操作

吸取 800μl、150μl、5μl 液体。

2. 练习两支移液器组合操作

吸取 1100μl、225μl 液体。

3. 练习吸取微量液体操作

吸取 2.5μl、1.5μl、0.5μl 液体。

四、实验材料、试剂及所用仪器

1. 材料与试剂

纯净水。

2. 实验仪器

不同量程的移液器。

五、操作步骤

一个完整的移液循环，包括容量设定、吸头安装、预洗吸头、吸液、放液、卸掉吸头 6 个步骤。每一个步骤都有需要遵循的操作规范。

1. 吸头安装

正确的安装方法称为旋转安装法。具体的做法是将白套筒顶端插入吸头（无论是散装吸头还是盒装吸头都一样），在轻轻用力下压的同时把手中的移液器按逆时针方向旋转 90°。切记用力不能过猛，更不能采取剥吸头的方法进行安装，否则会对手中的移液器造成不必要的损伤。

2. 容量设定

正确的容量设定分为 2 个步骤。一是粗调，即通过排放按钮将容量值迅速调整至接近自己的预想值；二是细调，当容量值接近自己的预想值以后，应将移液器横置水平放至自己的眼前，通过调节轮慢慢地将容量值调至预想值，从而避免视觉误差所造成的影响。

在容量设定时，还有一个需要特别注意的地方。当我们从大值调整到小值时，刚好就行；但从小值调整到大值时，就需要调超三分之一圈后再返回。这是因为计数器里面有一定的空隙，需要弥补。

3. 预洗吸头

在安装了新的吸头或增大了容量值以后，首先应该把需要转移的液体吸取、排放 2~3 次。这样做是为了让吸头内壁形成一道同质液膜，确保移液工作的精度和准度，使整个移液过程具有极高的重现性。其次在吸取有机溶剂或高挥发液体时，挥发性气体会在白套筒室内形成负压，从而产生漏液的情况，这时就需要我们预洗 4~6 次，让白套筒室内的气体达到饱和，负压就会自动消失。

4. 吸液

先将移液器按钮轻轻压至第一停点；垂直握持移液器，使 tip 头浸入液面下几毫米，千万不要将 tip 头直接插到液体底部；然后缓慢、平稳地松开控制按钮，吸上液体，稍等片刻后将 tip 头提离液面。

5. 放液

放液时，吸头紧贴容器壁，先将排放按钮按至第一停点。略作停顿后再按至第二停点，这样做可以确保吸头内无残留液体。如果这样操作还有残留液体存在，应该考虑更换吸头。

6. 卸掉吸头

卸掉的吸头一定不能和新吸头混放，以免产生交叉污染。

六、注意事项

①严禁吸液后将移液器平放。

②吸液时一定要缓慢松开排放旋钮使液体进入吸头，否则，液体会迅速进入 tip 头，导致液体（尤其是一些腐蚀性液体，如氯仿）倒冲入移液器内部，对移液器造成损伤，同时也可能造成溶液的污染。

③对于黏稠液体可首先吸放几次，然后极缓慢地松开按钮，使溶液慢慢进入吸头内；否则，会使吸入体积减小。

④移液器用完后将刻度调至最大量程，让弹簧恢复原形，延长移液器的使用寿命。

⑤注意正确的握持方法，如图 1-2 所示。



图 1-2 移液器的握持方法

⑥注意正确的 tip 安装法，如图 1-3 所示 (<http://zxsys.med.stu.edu.cn/upload/file/artdir/2.pdf>)。

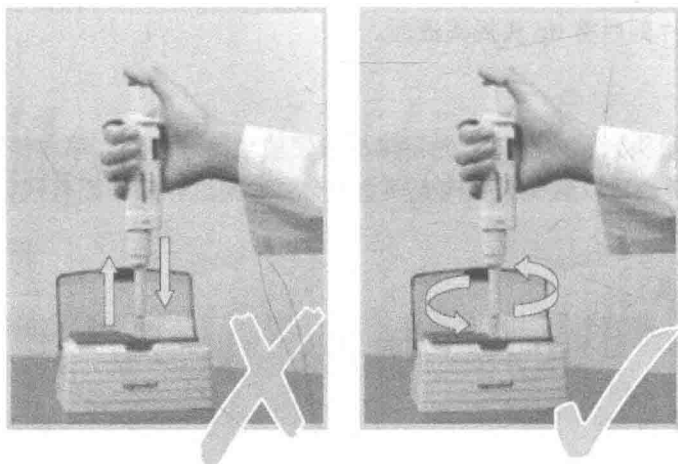


图 1-3 移液器 tip 头的安装方法

七、实验报告

①简述移液器操作的整个流程。

②移液过程中，遇到哪些问题？是如何克服的？

八、思考题

当两种不同量程的移液器都可以完成移液操作时，该选取小量程的还是大量程的移液器？为什么？

九、拓展环节

为满足不同实验的需要，移液器发展出了各种用途：①电动移液器（图 1-4A），不需要按压排放按钮，轻轻一触，自动吸液和放液。②多通道移液器（图 1-4B），按压一次排放按钮，可完成 8 个样品的移液操作。③可编程的移液器（图 1-4C），它具有可调固定体积移液功能、独立编程功能和历史记忆功能。④连续分液器（图 1-4D），它适用于冗长连续分液，只需一次吸液，就可以完成最高 100 次的分液操作。

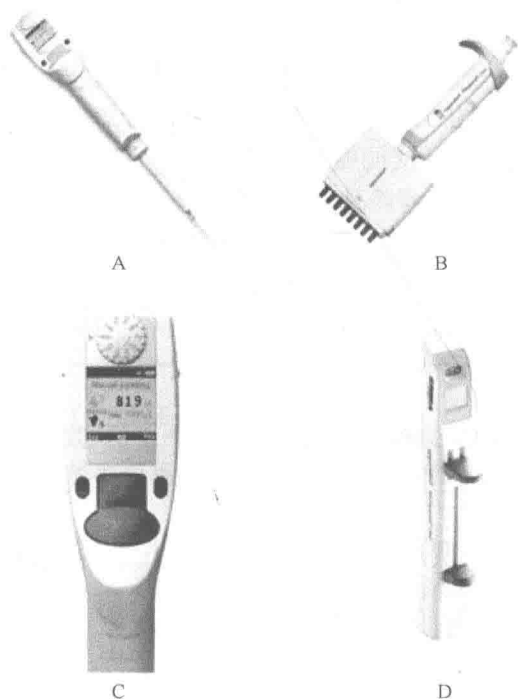


图 1-4 各种用途的移液器

A. 电动移液器；B. 多通道移液器；C. 可编程的移液器；D. 连续分液器

实验 2 聚合酶链反应

(王亚琴)

一、实验目的

- ①掌握聚合酶链反应 (PCR) 技术的原理和一般方法。
- ②了解 PCR 的应用。

二、实验原理

PCR 类似于细胞体内的 DNA 复制过程。首先将待扩增的 DNA 模板加热, 双链 DNA 变成单链 DNA, 这一步称为变性。随后, 当反应混合物冷却至某一温度时, 引物与它的靶序列配对结合, 这一步称为退火。最后, 温度升高至 DNA 聚合酶适宜的温度 (通常为 72°C)。这时, DNA 聚合酶就会在引物的 3'端按照与模板碱基互补的方式添加相应的碱基, DNA 链得以延长, 这一步称为延伸。这种热变性—退火—延伸的过程就是一个 PCR 循环。每经过一个循环, 理论上讲, DNA 模板分子数就会增加一倍。因此, 经过 n 次循环扩增后, DNA 分子数就会变为原来的 2^n 倍, 从而有利于进一步的分子操作。

三、实验内容

以 λ 噬菌体质粒 DNA 为模板, 用提供的上下游引物进行 PCR 扩增。PCR 产物大小为 500bp。

四、实验材料、试剂及所用仪器

1. 材料与试剂

- ① λ 噬菌体质粒 DNA (反应模板)。
- ② $10\times$ PCR 缓冲液。
- ③dNTP (每种 dNTP 单一组分的浓度为 2.5mmol/L)。
- ④r*Taq* DNA 聚合酶 $5\text{U}/\mu\text{l}$ 。

⑤上游引物 (5'-GATGAGTTCGTGTCCGTACAACT-3') 和下游引物 (5'-GGTTATCGAAATCAGCCACAGCGCC-3') (引物浓度均为 10μmol/L)。

⑥0.2ml PCR 管。

⑦去离子水。

2. 实验仪器

①DNA 扩增仪。

②台式高速离心机。

③移液器。

五、操作步骤

1. PCR 体系的建立

取 0.2ml 的薄壁离心管，按表 2-1 顺序加入试剂，稍混匀后短暂离心从而将溶液甩至管底。

表 2-1 PCR 体系

试剂标记	成分	体积/μl
H	去离子水	17.2
D	dNTP (每种 dNTP 单一组分的浓度为 2.5mmol/L)	2.0
P1	上游引物 (10μmol/L)	1.0
P2	下游引物 (10μmol/L)	1.0
M	模板 DNA	1.0
B	10×PCR 缓冲液	2.5
T	rTaq DNA 聚合酶	0.3
总体积		25.0

2. PCR 的变温程序 (热循环反应)

按表 2-2 设置 PCR 的变温程序，把离心管放进 PCR 仪进行扩增，反应结束后低温保存或检测。

表 2-2 PCR 的变温程序

反应阶段	循环数	温度	持续时间
1	1	94℃ (预变性)	3min
		94℃ (变性)	30s
2	35	52℃ (退火)	30s
		72℃ (延伸)	30s
3	1	72℃ (补充延伸)	10min
4	1	12℃	短时间保存; 若需长期保存, 可取出后放置于-20℃