

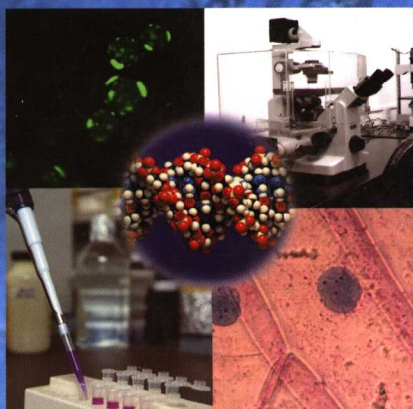
21世纪 高等院校教材

生物科学系列

细胞分子生物学 技术教程

第二版

印莉萍 祁小廷 主编



科学出版社

www.sciencep.com

21 世纪高等院校教材——生物科学系列

细胞分子生物学技术教程

(第二版)

印莉萍 祁小廷 主编

内 容 简 介

本书在第一版基础上编写而成。全书结合理论教学和实验技术,具有目的清晰、原理明确、步骤详尽、图文并茂等特点。各章均有技术理论、实验原理、结果分析、思考题等。

全书分为两篇。第一篇分子生物学技术,共六章 27 个实验。涵盖了 DNA 的制备和分析、DNA 的克隆、PCR 相关技术、RNA 的制备和分析、核酸分子杂交技术和蛋白质电泳技术等。第二篇细胞生物学技术,共五章 22 个实验。除显微镜技术、组织培养等经典细胞生物学实验外,还有 GFP 标记质膜蛋白的分选观察、细胞融合、细胞凋亡以及细胞培养与功能鉴定、细胞膜技术、细胞生理生化及植物转基因技术等。

本书适合普通高等院校生命科学领域教学用书,也可作为医学、农林、综合性大学本科和研究生有关课程的实验教材,也可供相关的科技人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

细胞分子生物学技术教程/印莉萍,祁小廷主编.—2版.—北京:科学出版社,2005.8

21 世纪高等院校教材——生物科学系列

ISBN 7-03-015463-0

I. 细… II. ①印…②祁… III. 细胞生物学:分子生物学-高等学校-教材 IV. Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 044013 号

责任编辑:单冉东 宋立明/责任校对:李奕莹

责任印制:安春生/封面设计:陈敬

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>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2001 年 1 月第 一 版 首都师范大学出版社

2005 年 8 月第 二 版 开本: B5 (720×1000)

2005 年 8 月第一次印刷 印张: 18 1/2

印数: 1—4 000 字数: 349 000

定价: 23.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈新欣〉)

编写人员名单

主 编 印莉萍 祁小廷

副 主 编 刘祥林 刘维仲 柴小清

参编人员（按姓氏笔画排序）

王 琦	王彩华	张艳萍
李 鹏	李昊文	李艳红
杨 坤	汪洪捷	洪剑明
晏月明	常正尧	黄勤妮
靳 飞	蔡明华	

前 言

国家经济建设的迅猛发展,对人才质量提出更高的要求。科技的日新月异、知识的快速更新,增加了高等院校提高教学质量、培养合格人才的紧迫感。本书正是在这样的背景环境中孕育而生的。2001年1月,印莉萍、刘祥林主编的《分子细胞生物学实验技术》由首都师范大学出版社出版,使用后反应良好,已成为许多学生或实验室常备的实验手册。本书是在前一版的基础上,经过近四年教学和科研的实践,结合三届本科生和四届研究生使用后的反馈信息,趋利弃弊,精心充实调整编写而成。

针对分子生物学、细胞生物学、基因工程、蛋白质工程、细胞工程等学科理工交融的特点,联系高等院校教学科研并重的实际,我们进行了多年“教学科研融合”的探索。将科学研究的思想方法带进课堂,提高学生发现问题的能力;把课题研究的成熟技术转化成实验,提高学生动手操作的水平。本书的重新编写就是这一教改思想的成果体现,把实践证明技术含量偏低、操作手段单一的内容舍弃,将应用范围广、现代化手段程度高的内容收编进来。让学生见识高档精密仪器的功能,使他们了解前沿技术领域的进展。例如,采用新试剂明显改进了诱导细胞凋亡的效果;增加了酵母细胞的异源互补筛选;带有GFP的质膜蛋白分选的荧光显微镜和激光共聚焦显微镜的观察;表位附加标签(epitope tag)用于蛋白亚细胞定位等实验内容。

本书的编写人员都是教学科研第一线的教师和具有相应技术专长的研究生,在编著的各项实验技术中融入了每个参编人员的经验、体会和实践技巧。本书插编了百余张实用图表,力求图文并茂;每章节还设有实验原理、技术理论、结果分析、思考题等,便于学生对实验内容的分析与理解。

本书的重新编写和出版是由印莉萍、李艳红申请并主持的首都师范大学“细胞生物学精品课”项目资助的。书中不少内容还应用了国家自然科学基金项目(30170552);北京市自然科学基金项目(5982008, 5042004)和北京市教委科技发展基金项目(KM200410028015)的研究成果。本书除了主编和副主编,参编人员还有:靳飞(实验23、24);晏月明(实验26);蔡明华(实验27);李鹏(实验33、38);黄勤妮(实验35、41);常正尧(实验40);洪剑明(实验37);王琦(实验43);杨坤,李昊文(实验44);张艳萍(实验49)。王彩华和汪洪捷编写了第七章,李艳红参编了多个细胞生物学实验。由于我们水平和经验所限,

书中难免存在缺点和错误, 恳请同行专家、使用教材的师生和热心读者批评指正。

印莉萍、祁小廷、刘祥林

2005年2月24日

目 录

前言

第一篇 分子生物学技术

第一章 DNA 的制备和分析	3
实验 1 细菌质粒的制备和分析	5
实验 2 植物基因组 DNA 的制备和分析	11
实验 3 酵母 DNA 的制备	15
实验 4 λ 噬菌体 DNA 的提取和分析	18
第二章 DNA 的克隆	22
实验 5 DNA 的限制酶剪切	25
实验 6 DNA 片段的回收纯化	28
实验 7 载体与目的基因的体外重组	30
实验 8 重组 DNA 的转化和蓝白筛选	32
实验 9 真核基因在原核细胞中的表达	36
第三章 PCR 相关技术	39
实验 10 PCR 法快速筛选阳性克隆	44
实验 11 转基因烟草的 PCR 检测	46
实验 12 逆转录 PCR	48
实验 13 PCR 产物的 T/A 克隆	54
实验 14 RACE 法获得全长 cDNA	57
第四章 RNA 的制备和分析	64
实验 15 植物组织总 RNA 的制备	66
实验 16 RNA 的定量和完整性分析	70
实验 17 mRNA 的分离和纯化	73
实验 18 表达型 cDNA 文库的构建	78
第五章 核酸分子杂交技术	86
实验 19 同位素标记探针的分子杂交	93
实验 20 DIG 标记探针的分子杂交	97
实验 21 噬菌斑的原位杂交	102
实验 22 Northern 印迹杂交	105

第六章 蛋白质电泳技术	108
实验 23 SDS-PAGE 和蛋白分子量的测定	108
实验 24 IEF-SDS 双向凝胶电泳	118
实验 25 肽质量指纹谱技术	125
实验 26 高效毛细管电泳分离蛋白质	130
实验 27 植物同工酶电泳分析	135

第二篇 细胞生物学技术

第七章 显微镜技术	141
实验 28 普通光学显微镜技术	142
实验 29 几种研究用显微镜技术	153
实验 30 电子显微镜技术	162
实验 31 电镜样品制备技术	167
第八章 细胞培养与功能鉴定	178
实验 32 酵母细胞的培养与观察	178
实验 33 酵母细胞的异源功能互补	181
实验 34 植物细胞的悬浮培养	189
实验 35 植物原生质体的分离与培养	190
第九章 细胞膜技术	194
实验 36 细胞膜的渗透性	194
实验 37 植物细胞质膜的分离和纯化技术	197
实验 38 带有 GFP 的质膜蛋白分选观察	203
实验 39 细胞的融合	207
第十章 细胞生理生化	211
实验 40 离心技术与叶绿体的分离	211
实验 41 植物细胞氧化还原活性的测定	217
实验 42 核酸 (DNA 和 RNA) 的细胞核定位观察.....	219
实验 43 细胞骨架的光学显微镜观察	224
实验 44 细胞凋亡小体和梯状 DNA 的诱导和观察.....	226
第十一章 植物转基因技术	232
实验 45 农杆菌介导的叶盘法转化烟草	237
实验 46 基因枪转化技术	243
实验 47 瞬时表达分析启动子活性	249
实验 48 顺式元件与反式因子间的凝胶阻滞分析	254

实验 49 c-myc 表位附加标签用于蛋白在亚细胞定位及 western blotting 检测	258
--	-----

附录

附录 1 有关核酸的常用数据	262
附录 2 与 DNA 凝胶电泳有关的数据	264
附录 3 缓冲液	265
附录 4 常用的生物酶类和抗生素类	268
附录 5 常用培养基	270
附录 6 用于噬菌体和酵母操作的溶液	274
附录 7 杂交实验中用于降低背景的封闭剂	276
附录 8 生物信息学常用数据库及其软件	278
附录 9 分子生物学有毒试剂的净化处理和安全使用	284

第一篇

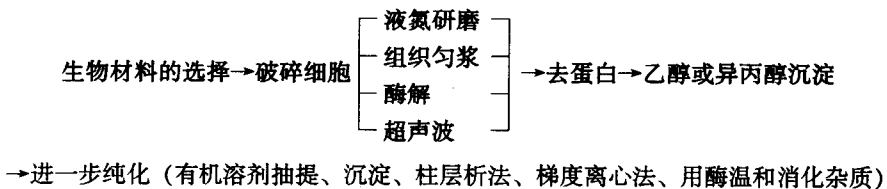
分子生物学技术

第一章 DNA 的制备和分析

DNA 是生物遗传信息的携带者，决定着蛋白质的生物合成，具有极为重要的生理功能。这些 DNA 分子包括病毒的 DNA、原核生物的基因组 DNA 及其胞内的质粒 DNA 和高等生物的 DNA 等。其中高等生物的 DNA 又包括核 DNA (染色体)、线粒体 DNA (mtDNA)、和/或叶绿体 DNA (cpDNA)。获得高纯度、完整性好的基因组 DNA 对分子生物学研究非常重要，如纯化的质粒载体 DNA 可用来进行基因克隆，提取的动植物基因组 DNA 可以用来构建基因组文库，进行 Southern 杂交等，因此研究 DNA 的提取方法极其有意义。

DNA 通常与蛋白质及部分 RNA 结合成染色质形式存在，因此分离核酸首先要破碎细胞，然后采用各种方法将蛋白质、糖类、脂类和盐类等物质除去以纯化 DNA。在提取过程中，要保证 DNA 不被内源或外界污染的 DNase 降解，以保持 DNA 的完整性，并要排除其他分子的污染，以获得高纯度的 DNA。

DNA 的一般提取程序可归纳如下：



1. 生物材料的选择

生物材料包括动植物器官或组织以及微生物等，选择提取 DNA 的生物材料主要考虑生物的生长状态或生长期、组织或器官类型、样品取材的难易及丰富程度等。

2. 细胞的破碎 (在缓冲液中)

机械法：组织捣碎机、玻璃匀浆器、研钵研磨。

物理法：反复冻融法 ($-15 \sim 20^{\circ}\text{C}$ ，主要用于动物细胞)、冷热交替法 ($90^{\circ}\text{C} \sim$ 冰冻，主要用于细菌病毒)、超声波处理法 (多用于微生物)。

化学及生化法：自溶法 (在一定的条件下加防腐剂，靠自身酶系破坏细胞，因时间长不易控制，所以较少使用)，使用溶菌酶 (破坏细菌细胞壁)、纤维素酶 (用于植物细胞)、表面活性剂 (SDS 和 TritonX-100) 等。

3. 细胞器的分离

要提取细胞的线粒体和叶绿体 DNA，首先应分离出线粒体和叶绿体，一般采取在适当介质中的差速离心法分离。

4. DNA 的提取

一般采用酚/氯仿除去蛋白质，用高盐除去糖类，用去污剂如 SDS（十二烷基磺酸钠）、CTAB（十六烷基三乙基溴化铵）等破坏细胞膜，使蛋白变性，抑制核酸酶活性。最后用乙醇或异丙醇沉淀 DNA。

5. DNA 的纯化

无论采用哪种方法提取 DNA，都有不同程度的蛋白质、多糖以及一些盐类污染，因此进一步纯化 DNA 是非常必要的。常用的方法有有机溶剂抽提、沉淀、柱层析、梯度离心法以及用酶温和消化杂质等。

本章主要介绍细菌质粒 DNA 的提取、植物基因组 DNA 提取以及噬菌体 λ DNA 的提取。

实验 1 细菌质粒的制备和分析

质粒是存在于染色体外的能独立复制的共价闭环环状双链 DNA 分子, 它广泛存在于细菌等原核生物中, 能够给宿主细胞提供一些表型如抗药性、分解复杂有机物的能力等。天然质粒经过改造后可以作为基因工程的载体, 这种质粒载体在基因工程中具有极广泛的应用价值。因此质粒的分离与提取是分子生物学最常用、最基本的实验技术之一。

细菌质粒是最常用的基因工程载体, 它的提取可以分为以下 3 步: 细菌的培养、菌体的收集和裂解、质粒 DNA 的纯化。细菌的培养通常在选择性的液体培养基中 (如含某种适当浓度的抗生素) 接种一种含有质粒的宿主菌, 37℃, 150~250rpm 摇培过夜获得。对于某些松弛型复制的质粒, 可以在细菌生长的对数后期加入适量氯霉素抑制宿主菌染色体 DNA 的复制和蛋白质合成来增加质粒拷贝数。但目前所用的质粒载体如 pUC 系列, 采用强的改进型 *pMB1* 复制子, 拷贝数能达到几百个, 因此不用进行后期的氯霉素处理即可获得高产量的质粒。细菌的收集可以采用离心的方法, 为了防止细菌的代谢产物影响质粒的纯度可以用液体培养基或生理盐水漂洗细菌沉淀 1~2 次。细胞裂解的方法很多, 如去污剂法、煮沸法、碱变性法等。这些方法各有利弊, 要根据质粒的性质, 宿主菌的特性及后续的纯化方法等多种因素加以选择。为了满足一些实验的要求, 粗提的质粒还需要进一步纯化, 用氯化铯—溴化乙锭密度梯度超速离心纯化质粒 DNA 是经典的方法。

实验室提取细菌质粒常采用碱裂解法、煮沸法、一步提取法以及在碱裂解法基础上的试剂盒法等。碱裂解法利用宿主菌巨大线状染色体 DNA 与相对较小的闭环双链质粒 DNA 的结构差异来提取质粒 DNA。碱变性 DNA 时, 线状基因组 DNA 变性充分而质粒 DNA 处于拓扑缠绕的自然状态而不能彼此分开。当去除变性条件时 (酸中和), 质粒 DNA 迅速而准确的配置重新形成完全天然超螺旋状分子, 而难于复性的长链线状的基因组 DNA 则与破裂的细胞壁、细菌蛋白相互缠绕成大型复合物, 被 SDS 包盖, 当 K^+ 取代 Na^+ 时, 这些复合物会从溶液中沉淀下来, 附在细胞碎片上一起被离心除去。

煮沸法利用高温破坏细菌细胞, 同时利用溶菌酶酶解细菌细胞。把细菌悬浮于含有 Triton X-100、溶菌酶 (消化细胞壁) 的缓冲液中, 然后加热到 100℃, 使其裂解。加热破坏了细胞壁, 还有助于解开 DNA 链的碱基对, 并使蛋白质和染色体 DNA 变性。闭环质粒 DNA 配对虽被破坏, 但是链彼此不会分离, 当温度下降时则恢复成超螺旋。离心除去变性的染色体 DNA 和蛋白质, 从上清液中回收质粒 DNA。

小量一步提取法是直接将细菌培养物和酚/氯仿混合, 同时完成细胞裂解、蛋白变性两个过程, 然后离心除去大部分基因组 DNA 与蛋白质, 用异丙醇沉淀含质粒 DNA 的上清。其优点是操作简单、方便、经济, 特别适合多样本质粒的快速分析。

多数公司生产质粒提取试剂盒时多采用在碱裂解法的基础上通过特殊的吸附柱来纯化质粒 DNA 的方法。经碱裂解获得的含质粒的上清液与高盐结合缓冲液混合, 加到能高效、专一吸附 DNA 的特殊硅基质填充的离心式吸附柱子中, 再用洗涤缓冲液通过离心法洗去蛋白、盐等杂质, 最后用洗脱缓冲液将质粒 DNA 洗脱下来。在提取液中含有 RNase A, 可以在提取纯化过程中除去 RNA, 而不用另外单独加 RNase A 除去 RNA。该方法由于不用苯酚、氯仿抽提, 减少了对质粒 DNA 破坏, 而且纯度很高, 超螺旋状质粒占 80%~90%。

方法一 碱裂解法

一、材料、试剂和仪器

1. 材料 含有质粒的菌种

2. 试剂 溶液 I:

50mmol/l 葡萄糖

25mmol/l Tris-HCl (pH8.0)

10mmol/l EDTA (pH8.0)

高压灭菌 15min, 4℃ 贮存。

注: 若提取质粒较小, 可以直接用 pH8.0 的 TE 代替。

溶液 II: 新鲜配制

0.2mol/l NaOH (用 5mol/l NaOH 母液配)

1% SDS (用 10% SDS 母液配)

注: 此处可以用 0.4mol/l NaOH 和 2% SDS 的母液等体积混合即可。

溶液 III:

5mol/l KAc 60ml

冰乙酸 11.5ml

ddH₂O 28.5ml

高压灭菌 15min, 4℃ 贮存。

注: 也可以用 3mol/l KAc 代替, 但效果不好。

3. 仪器 恒温摇床、台式离心机、制冰机、电泳装置、紫外透射观测仪

二、实验程序

1. 小量提取法

- (1) 在含有抗生素的 LB 培养基中接种一单菌落, 37℃、150rpm 摇培过夜。
- (2) 取 1.5ml 菌液于小离心管中, 室温 12 000rpm 离心 30sec 收集菌体, 尽可能弃去上清。加入 100 μ l 冰预冷的溶液 I, 剧烈振荡直至悬液发稠。
- (3) 加入 200 μ l 新配制的溶液 II, 温和颠倒 5 次, 置冰上 1~2min。
- (4) 加入 150 μ l 冰预冷的溶液 III, 温和振荡 10sec, 置冰上 5min。
- (5) 12 000rpm, 离心 10min, 转上清于另一管中, 用等体积的酚/氯仿抽提一次, 10 000rpm 离心 2min, 吸上清于另一管中。加入 2 倍体积 100% 乙醇, -20℃ 沉淀 1hr。
- (6) 12 000rpm, 离心 10min 回收质粒 DNA, 用 75% 乙醇洗一次, 超净台中吹干后, 溶于适量灭菌 ddH₂O 中。琼脂糖凝胶电泳检测质粒的质量。
- (7) 若需要可以进一步纯化质粒 DNA 以达到转化、重组的要求。

2. 大量提取法

- (1) 在含有抗生素的 30ml LB 培养基中接种一单菌落, 37℃, 150rpm 摇培至对数晚期, 然后转到 500ml 的 LB 培养基中剧烈摇培过夜, 此时也可以加入氯霉素以增加质粒的拷贝数。
- (2) 取 500ml 菌液于离心管中, 4 000rpm 离心 15min 收集菌体, 弃去上清, 重悬于 10ml 冰预冷的溶液 I 中。
- (3) 加 1ml 新配制的溶菌酶溶液 (10mg/ml, 溶于 10mmol/l Tris-HCl pH 8.0)。
- (4) 加入 20ml 新配制的溶液 II, 盖紧盖子, 缓缓颠倒离心管数次, 以充分混匀内容物。于室温放置 5~10min, 此时溶液已发稠。
- (5) 加入 15ml 冰预冷的溶液 III, 温和振荡数次, 置冰上 10min。此时溶液出现白色沉淀。
- (6) 4 000rpm, 离心 10min, 转上清于另一管中, 用等体积的酚/氯仿抽提一次, 1 000rpm 离心 2min, 吸上清于另一管中。加入 0.6 倍体积异丙醇混匀, 室温沉淀 10min。
- (7) 5 000rpm 离心 15min 回收质粒 DNA。70% 乙醇洗一次后, 空气中干燥。加适量的无菌水或 TE 溶解。
- (8) 用琼脂糖凝胶电泳检测质粒的完整性。若需要可以进一步纯化质粒 DNA, 以达到转化、重组的要求。

注: 小量提取往往不能满足大量分析需要, 这时可以用“中量提取法”即 50ml 菌液用 2ml 溶液 I, 4ml 溶液 II 和 3ml 溶液 III 处理后直接用等体积的氯仿抽提, 然后分装到小离心管

中供沉淀分析用。这样即节省时间又便于分析。

方法二 煮沸法

一、材料、试剂和仪器

1. 材料 适合煮沸法提取质粒的细菌（如含有 endA^+ 的菌株不适宜用此法）
2. 试剂
 - (1) STET: 0.1mmol/l NaCl, 10mmol/l Tris-HCl (pH8.0), 1mmol/l EDTA (pH8.0), 5% Triton X-100
 - (2) 溶菌酶 10mg/ml (溶于 10mmol/l Tris-HCl pH8.0, 新鲜配制)
 - (3) RNase A 10mg/ml
 - (4) 异丙醇
 - (5) 70% 乙醇
 - (6) TE: 10mmol/l Tris-HCl, 1mmol/l EDTA (pH8.0) (参考附录 3)
3. 仪器 离心机、制冰机、水浴锅、电泳装置、紫外透射观测仪

二、实验程序

1. 离心收集的细菌用 350 μ l STET 悬浮。
2. 加入 25 μ l 新鲜配制的溶菌酶液, 混匀, 煮沸 40sec。
3. 室温下, 12 000rpm 离心 10min。
4. 转上清于另一管中或用灭菌牙签挑出沉淀物, 上清中加入 40 μ l 2.5mol/l NaCl (pH5.2) 和 420 μ l 的异丙醇, 振荡混匀, 室温下放置 5min。
5. 4℃, 12 000rpm, 离心 5min。
6. 弃上清, 加入 1ml 70% 乙醇洗一次。吹干, 加入 50 μ l TE 溶解。

方法三 小量一步提取法

一、材料、试剂和仪器

1. 材料 含质粒的细菌
2. 试剂
 - (1) PCI: 酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1), 其中酚用 TE (10mmol/l Tris-HCl pH7.5, 1mmol/l EDTA) 饱和。
 - (2) TER: TE (pH7.5), 含 RNase A 20 μ g/ml
3. 仪器 离心机、电泳装置、紫外透射观测仪