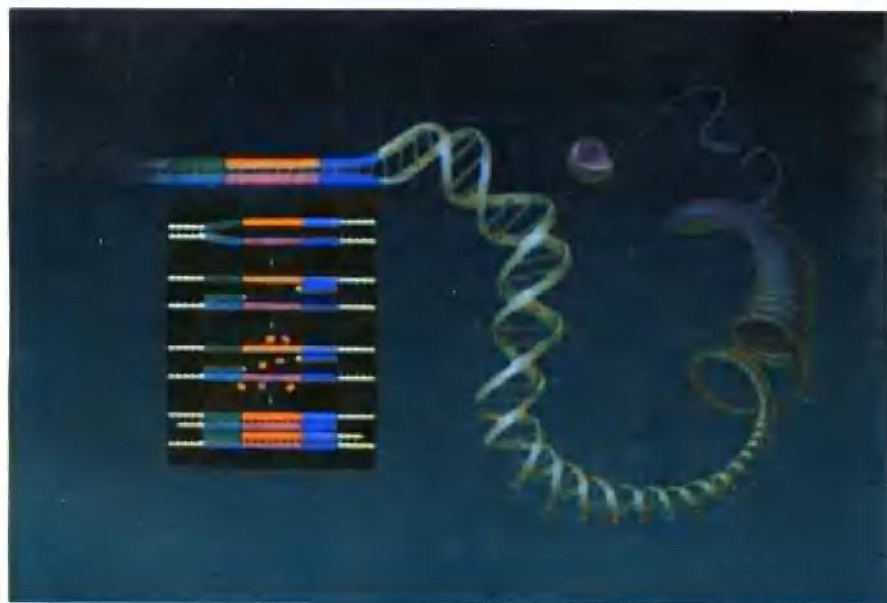




实用分子生物学方法手册

李永明 赵玉琪 等著

科学出版社

G7-3
LYM

Y411/26

实用分子生物学方法手册

李永明 赵玉琪 等著

李电东 陈 巍 等译

王以光 皮国华 谷淑燕 审校



科学出版社

1998



A0289822

内 容 简 介

本书是根据 34 位海外中国留学生、学者联合编写的《实用分子生物学方法手册》英文版译出。全书从 DNA、RNA、蛋白质三个层次全面介绍了当前分子生物学及其相关领域常用技术的基本原理与操作方案。另外,还详细介绍了计算机技术在现代分子生物学领域的应用。书中的大部分方法都是作者常规使用或验证过的,证明切实可行,并适合国内的条件。本书不仅适合于分子生物学领域有经验的科研、教学人员,对刚接触该领域的初学者也是一本不可多得的参考书。

图书在版编目 (CIP) 数据

实用分子生物学方法手册/李永明,赵玉琪等著;李电东等译.-北京:科学出版社,1998. 6

书名原文: Practical Protocols in Molecular Biology

ISBN 7-03-006417-8

I. 实… II. ①李… ②赵… ③李… III. 分子生物学-实验方法 IV. Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (97) 第 26650 号

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

北京科地亚印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1998 年 6 月第 一 版 开本: 850×1168 1/32

1998 年 6 月第一次印刷 印张: 14 1/4

印数: 1 3 000 字数: 366000

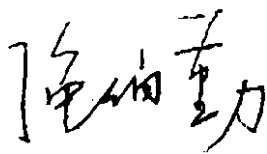
定价: 27.00 元

序 1

这是一本由中国海外学者、留学生编写的分子生物学方法的专著。全书将主要的技术、方法按 DNA、RNA、蛋白质以及计算机应用四个部分叙述，有序地介绍了当前分子生物学研究中很实用的一系列基本技术，其内容还涉及医学诊断、疾病发病机理研究、药物开发、农业、植物和微生物等方法的应用。34 位作者大都拥有博士学位，有 5 年以上分子生物学的实践经验。本著作凝聚了作者的多年学习、研究的心得和发明、创造，是一本简明实用，适合中国国内应用的好书。相信本书的出版发行必将会推动我国生物学、医学研究的发展。

这本书是作者们在做实验、写论文，开学术会议的百忙中，利用 E-mail 联合写成的。真实的体现了海外学子的拳拳爱国心，悠悠报国情。国家自然科学基金委员会赞赏和重视海外学者的爱国热情，支持和帮助他们以各种不同的方式报效祖国人民。

国家自然科学基金委员会
生命学部主任



序 2

科学研究的成功大多取决于最适方法的选择。分子生物学中的最佳方法是经过反复地改进和试验而完善起来的。

《实用分子生物学方法手册》收编了经过详尽检验的，在分子生物学实验室中通常使用的最新技术。该书的独特之处在于所有的方法均是科学家们自己发展的最新方法或对原有方法的改进。这本手册既对初学者有益，也有助于有经验的实验室工作者。我希望本书将被证明对于从事生命科学研究领域里的研究生、博士后以及其他科研工作者来说是非常有用的。

吴 瑞

纽约伊萨卡，康纳尔大学生物化学和分子生物学教授

译者的话

《实用分子生物学方法手册》英文版，是由旅美学者李永明博士倡议，由李永明、赵玉琪博士主编，历经3年，并联合34位旅美学人集体编著的。本书介绍了当前分子生物学常用的140多种基本技术，涉及医学诊断、疾病病理研究、药物开发、微生物学等方面的应用。这些技术方法都是经过精心选择，反复实验和优选的，其中还有作者独创的新方法。它是34位学者集体智慧的结晶。

1985年2月至1987年12月我在美国伊利诺伊州立大学任访问教授时，认识了李永明，那时他在生物系读生理学硕士。1992年我再次访美时，他已是伊利诺伊大学分子免疫学博士，谈起海外学子共著《实用分子生物学方法手册》，我对他的设想给予了热情的支持，从他身上我看到当今海外年轻一代学者，孜孜不倦，胸怀抱负，心系祖国的缩影。他们留学期间，奋发钻研，学有所成。虽然旅居大洋彼岸，但谁也没有忘记培养他们的祖国。一旦有机会为祖国做些事情，个个都是那么心甘情愿，那么积极热情，丝毫不计较个人得失。

李永明博士曾多次回国进行学术交流，每次我都请他来所介绍学术动态。1996年10月，他应邀出席国家科委生命科学技术发展中心举办的“新医药博士论坛会”，为了将《实用分子生物学方法手册》普及到基层，我们酝酿将手册译成中文。11月底与李永明共任主编的美国西北大学赵玉琪博士回国开会，共同商讨了本书的翻译工作。正像美国康奈尔大学著名华裔分子生物学家吴瑞先生所指出的：“分子生物学的研究依赖于先进的实验方法，而最好的方法又来源于反复的修改与验证。本书的特点在于它是由具有实践经验的中国留学生和学者编写的实验方法，它的发表一定

会对中国从事分子生物学研究和学习的学生、学者有所帮助。”

本书的翻译工作由我主持。由陈巍具体负责实施。承担翻译任务的都是我们研究室在读研究生，他们最有实践经验，在相关的研究工作中积累了经验，有胜任此项任务的才能。初稿由我所生物工程二室王以光教授、中国预防医学科学院病毒学研究所皮国华、谷淑燕教授审校。在此，我们谨向所有参加译校的专家学者表示崇高的敬意，谨向不断给予我们帮助以提高翻译质量的科学出版社的林鹏、李锋同志和责任编辑表示衷心感谢。我们还要感谢香港岁盛集团公司、大连岁盛集团公司对本书的顺利出版给予的大力支持。

这部译著因时间紧迫，疏忽与错漏在所难免。希望同行专家和读者批评指正，万分感谢。

李电东

中国医学科学院医药生物技术研究所以研究员

中国协和医科大学博士生导师

1997. 8. 25.

前 言

分子生物学不仅是发展最迅速的科学领域之一，也是使生命科学的许多其他领域发生改变的工具。它对于我们生活的影响不仅源于诸如 DNA 双螺旋、遗传密码、逆转录酶和聚合酶链式反应等的逐一发现，而且还来自于它们所涉及的技术的广泛应用。从克隆 Huntington 疾病的基因到用于法庭鉴定的 DNA 指纹分析，分子生物学技术在解决许多困扰科学家达数十年的问题中是必不可少的。可以毫不夸张地说新的分子生物学技术的发展在加深我们对生命的理解方面起了非常重要的作用。

《实用分子生物学方法手册》是由旅美中华职业联合会发起并主要由海外的中国科学家和技术操作者完成的。本书的目的是通过介绍近于艺术的分子生物学方法以促进中国现代生物技术的发展。值得一提的是本书本身就是电脑网络现代技术的产物。这本书的组织发起、方法选定、初稿的评阅和编辑讨论均通过 Internet 和 Bitnet 电子邮件网络来指挥管理的。尽管作者们经常从世界各地互相联系，我们中的大多数却至今尚未谋面。

本书旨在写成一本简明、综合并且在桌面上即可随时查阅的参考书，以供实验室工作的新手和有经验者使用，而对于生物技术产业来说也是必备的。它包括了分子生物学以及相关领域中精选出来的、实用的并且目前普遍使用的方法。每种方法均以尽可能简单的格式写成。然而我们仍建议读者在使用这些方法以前，应该首先获取分子生物学必要的背景知识。两本知名的实验手册：《最新分子生物学实验指南》*Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., 1989, 通常称之为“红皮书”) 和《分子克隆实验指南》*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook et al., 1989, 通常称之为“Maniatis”曼尼阿蒂斯书)，都提供了

很好的理论基础和技术细节。

本书的一个优势是书中介绍的许多方法是作者常规使用或已验证过的，它们在原始方法的基础上经过反复修改或优化，因此非常可靠并且重复性好。而且较之许多其他书中的类似方法更加简单和直接。一些由作者或其实验室所创造改进的新方法也为本书增加了特色。本书还包括了用以提高当前实验操作而改进的基因克隆新方法，例如 mRNA 差异显示，已在最近几年里得到广泛应用。此外，本手册中还介绍了许多使用商品试剂盒的方案。由于显而易见的原因，使用购置的试剂盒在许多实验室中是常事。本书中在某些情况下选择的产品仅仅反映了作者的个人喜好。读者可以根据自己的方便找到替代产品。我们向各位保证，本书既没有得到书中列出的任何公司的任何资助，也无意为任何商品做广告。

我们已尽力使本书前后一致。每个部分与其他部分保持独立，这样读者无需相互参考不同的方法。因此，一些方法可能与其他方法重复。但这不会影响每个独立方法的有效性。

我们希望您会发现《实用分子生物学方法手册》通俗易懂且适合您的专门需要。然而，由于不同作者的背景差异，所述的设备或特别的实验可能是为他们自己的目的明确设计的。因此，可以根据实际情况修改某些方法以适合自己的需要。

我们已敦促每位作者都尽可能列出原始文献。然而，从一个方法追寻出它的最初发明者有时很难，因此，我们可能无意中未能提及一些有贡献的人，一旦查实，我们将非常高兴地补进今后版本之中。非常欢迎同道和读者对新方法提出建议、批评和意见。你们的努力对于提高本书今后版本的质量至关重要。

最后，我们非常感激中国科学院科学出版社和其纽约分部在本书的出版中给予的帮助，并且特别感谢为此付出热心和高超技术支持的张矩先生和谭卫伦先生。我们还要感谢 Roche Diagnostics System, Inc. 允许并提供照片以供本书封面使用。我们感谢吴瑞博士为本书作序。吴博士是分子生物学领域中的一名先锋，他已经发展了大量的分子生物学方法，其中包括最早的 DNA 测序

的方法。我们还要感谢胡芝良和薛保国二位博士，他们作为电脑网络系统的协调者，使我们与作者之间的联络方便快捷。曲肖武、樊武舫、贾立斌和 David Palmer 等博士为本书的编辑提供了帮助。我们还特别感激 Betty Nhan, Annie Tan 和其他许多学者，他们校阅了本书的草稿并提出了非常宝贵的建议。

李永明 赵玉琪

1995. 4. 28.

目 录

序 1

序 2

译者的话

前言

第一章 脱氧核糖核酸 (DNA)	1
第一节 电泳	1
一、琼脂糖凝胶电泳	1
二、脉冲场凝胶电泳 (PFGE)	4
三、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)	9
四、变性梯度凝胶电泳 (DGGE)	11
五、双向琼脂糖凝胶电泳	16
第二节 DNA 定量分析	21
第三节 载体	23
一、质粒载体	23
二、酵母载体	26
(一) 裂殖酵母载体	26
(二) 酵母人工染色体 (YAC) 载体	31
三、逆转录病毒载体和基因转移	34
第四节 DNA 克隆	44
一、载体的选择	44
(一) 常用质粒载体	44
(二) 特殊用途的质粒载体	45
二、PCR 产物的 TA 克隆	46
三、基因组 DNA 文库的构建	49
四、DNA 文库的筛选	57
五、cDNA 杂交选择	60
六、应用 PCR 技术快速筛选克隆	72

第五节 DNA 转化与转染	74
一、质粒 DNA 转化入细菌	74
(一) 利用 TSS 缓冲液转化大肠杆菌	74
(二) 用快速冷冻法转化大肠杆菌	75
(三) 用氯化钙法进行感受态大肠杆菌的制备与转化	76
(四) 假单孢细菌的转化	78
二、酵母 DNA 转化	79
(一) 以球形体法为基础的裂殖酵母的转化方法	80
(二) 醋酸锂法为基础的转化酵母的方法	82
三、哺乳动物细胞的 DNA 转染	84
(一) 用磷酸钙法进行哺乳动物细胞的转染	84
(二) DEAE-Dextran 转染法	87
(三) 阳离子脂质体介导的转染	89
(四) 脂质体介导的转染法	91
辅助方案: 转染的甘油处理	92
辅助方案: 用 Hirt 氏提取法抽提染色体外游离 DNA	93
四、逆转录病毒介导的基因转移	95
第六节 基因表达与调控	99
一、在大肠杆菌中表达重组蛋白	99
二、利用杆状病毒在昆虫细胞中进行蛋白表达	104
三、外源 DNA 在蟾蜍卵及胚中的表达	113
四、VTF7-3 株重组痘苗病毒在哺乳动物细胞中瞬时表达	122
五、反义技术	123
(一) 寡聚脱氧核苷酸——合成的 DNA 或 RNA	124
(二) 反义 RNA: 从载体/cDNA 克隆转录而来的反义 RNA	130
(三) 反义 RNA 或 DNA 转导靶细胞的方法	132
(四) 反义 DNA 或 RNA 功能的检测	133
第七节 DNA 的提取	139
一、质粒 DNA 的提取	139
(一) 细菌质粒 DNA 的小量制备	139
1. 煮沸法	139

2. 碱裂解法	140
3. 测序用质粒 DNA 的小量制备	142
4. 单链质粒 DNA 的小量制备	144
5. 质粒 DNA 的快速小量制备	145
6. 不需要苯酚抽提的质粒 DNA 小量制备	147
7. 丁香假单胞菌 <i>Pseudomonas syringae</i> 质粒 DNA 的小 量制备	148
8. 用商品化试剂盒小量制备质粒 DNA	150
9. 用瞬间小量制备试剂盒进行 2min 小量制备	152
(二) 细菌质粒 DNA 的大量制备	153
1. 碱裂解法大量制备质粒 DNA	153
2. 用 PEG 沉淀法进行质粒 DNA 大量制备	155
3. 单链质粒 DNA 的大量制备	157
4. 用氯化铯离心法大量制备质粒 DNA	158
(三) 酵母质粒 DNA 的分离	161
1. 酵母质粒 DNA 的小量制备	162
2. 酵母质粒 DNA 的大量制备	163
3. YAC DNA 的分离	164
二、基因组或其他 DNA 的抽提	166
(一) 哺乳动物细胞基因组 DNA 的抽提	166
(二) 真核生物 DNA 的分离	169
(三) 从植物中分离基因组 DNA	173
(四) 用 CTAB 抽提植物 DNA	176
(五) 从琼脂糖凝胶上分离 DNA 片段	179
(六) 从琼脂糖凝胶上洗脱 DNA 片段	181
第八节 DNA 的酶修饰	183
一、DNA 聚合酶和聚合反应	183
二、用外切核酸酶 I 产生单向缺失	185
三、用磷酸酶使 DNA 脱磷酸化	188
四、用多核苷酸激酶使 DNA 磷酸化	189
五、利用 RNA 酶处理制备不含 RNA 的 DNA	191
六、DNA 连接	192
七、用 ^{32}P 或生物素标记 DNA 探针	194

第九节 DNA 检测与图谱分析	197
一、Southern 杂交	197
二、快速 Southern 杂交法	206
三、DNA 限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析	208
四、用聚合酶链式反应分析微卫星 DNA 遗传多态性	214
第十节 DNA 序列分析	217
一、用 Klenow 酶进行双/单链 DNA 序列分析	217
二、用 <i>Taq</i> DNA 聚合酶对 RNA 和 cDNA 进行序列分析	221
第十一节 突变	224
一、单向 DNA 缺失突变株的产生	224
二、寡聚核苷酸介导的克隆 DNA 的定点突变	234
辅助方案	237
方法 1: 如何制备辅助噬菌体 R408	237
方法 2: 如何滴定噬菌体贮备液	238
方法 3: 快速制备少量质粒 DNA 以用于测序	239
第二章 核糖核酸 (RNA)	242
第一节 RNA 和凝胶电泳	242
一、RNA 和无 RNA 酶的环境	242
二、RNA 凝胶电泳	244
第二节 RNA 的分离	248
一、RNA 一步分离法	248
二、使用 TRI REAGENT 一步分离 RNA	250
三、从大肠杆菌中分离 RNA	251
四、用 CsCl 法从动物组织中分离 RNA	252
五、用寡聚 (dT) 纤维素分离多聚 (A) ⁺ RNA	254
六、从 RNA 表达载体中制备 RNA 转录物	256
第三节 RNA 的合成和加工	261
一、RNA 的化学合成	261
二、RNA 标记	264
三、RNA 测序	268
四、用催化性 RNA 切割 RNA 专一位点	272
五、逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)	274

六、竞争性 RT-PCR	276
七、一步 RT-PCR	281
八、信使 RNA 的差别显示	283
九、核的失控转录测定	291
十、RNA 的体外剪接	295
第四节 RNA 的检测和作图	297
一、Northern 杂交	297
二、Northern 杂交: 一种快速方法	301
三、原位杂交	303
四、RNase A/T1 保护和 RNase H 聚焦法	313
五、Fe(II)-EDTA 保护测定法	319
六、用引物延伸法进行 RNA 作图	320
第三章 蛋白质	325
第一节 蛋白质电泳	325
一、聚丙烯酰胺凝胶电泳	325
二、变性凝胶电泳 (SDS-PAGE)	327
三、非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)	333
四、琼脂糖凝胶免疫电泳	338
五、火箭电泳	341
六、双向聚丙烯酰胺凝胶电泳	342
七、染色凝胶中的蛋白	349
(一) 考马斯亮蓝染色法	349
(二) 银染法	351
(三) 染色转印膜上的蛋白质	352
八、凝胶的干燥	354
第二节 蛋白质的提取与分离	355
一、条件培养基的制备	356
二、膜蛋白的提取	357
三、用于蛋白质检测的细胞裂解物的制备	358
第三节 蛋白质的检测和控制	360
一、酶联免疫吸附实验法 (ELISA)	360
二、免疫沉淀法	363

三、蛋白质印迹法·····	366
四、增强化学发光蛋白免疫印迹法·····	368
五、蛋白质配基印迹法·····	370
六、配基和蛋白质间的亲合交联试验法·····	372
七、蛋白质和配基结合的免疫迁移移动测定法·····	374
八、以 ¹²⁵ I 标记的底物电泳检测蛋白酶的活性·····	376
九、检测蛋白酶的酶谱法·····	379
十、流式细胞术中的细胞免疫染色·····	381
十一、细胞蛋白的标记·····	385
十二、微量蛋白质的自动氨基酸序列分析·····	387
第四章 计算机辅助技术 ·····	392
第一节 用于分子生物学的计算机程序·····	392
一、GCG 软件包 (Genetics Computer Group Package) ·····	393
二、MacVector 计算机序列分析软件·····	394
三、DNASar-Lasergen ·····	394
四、Primer Designer ·····	395
五、Entrez Sequences and References ·····	396
第二节 分子生物学中的计算机网络·····	398
一、GenBank Retrieval (基因库) 检索和序列相似性搜寻·····	398
二、其他用于分子生物学的网络数据库或服务器·····	401
第三节 计算机网络中的生物信息·····	402
第四节 用 GCG 程序设计 PCR 引物·····	407
附录 ·····	417
供应商 ·····	423
名词 ·····	426
索引 ·····	433

第一章 脱氧核糖核酸 (DNA)

第一节 电 泳

一、琼脂糖凝胶电泳

作者：李忆扬 杨 滨

电泳是现在用于分离和纯化 DNA 片段的最常用技术。当装备一块“胶”即一块包含电解质的多孔支持介质并把它置于静电场中，DNA 分子将向阳极移动，这是因为 DNA 分子沿其双螺旋骨架两侧带有富含负电荷的磷酸根残基。当 DNA 长度增加时，来自电场的驱动力和来自凝胶的阻力之间的比率就会降低，不同长度的 DNA 片段就会表现出不同的迁移率。因而就可依据 DNA 分子的大小来使其分离。该过程可以通过把示踪染料或分子量标准参照物和样品一起进行电泳而得到检测。分子量标准参照物也可以提供一个用于确定 DNA 片段大小的标准。

依据制备凝胶的材料，凝胶电泳可被分成两个亚类：琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳。相比之下，琼脂糖凝胶在分离度上比聚丙烯酰胺差一些，而在分离范围上优于聚丙烯酰胺。一般，琼脂糖凝胶适用于分离大小在 0.2~50kb 范围内的 DNA 片段。下面是一个详细的步骤，它介绍了琼脂糖凝胶的制备及琼脂糖凝胶电泳在 DNA 片段分离中的应用。

应用

分离、纯化和鉴定 0.2~50kb 的 DNA 片段。

方案

(1) 凝胶制备

- 1) 移取适量的琼脂糖 (如制备 1% 的琼脂糖胶液，就移 1g 的琼脂糖溶于 100mL TAE 缓冲液中) 微波炉加热使其溶于 TAE