

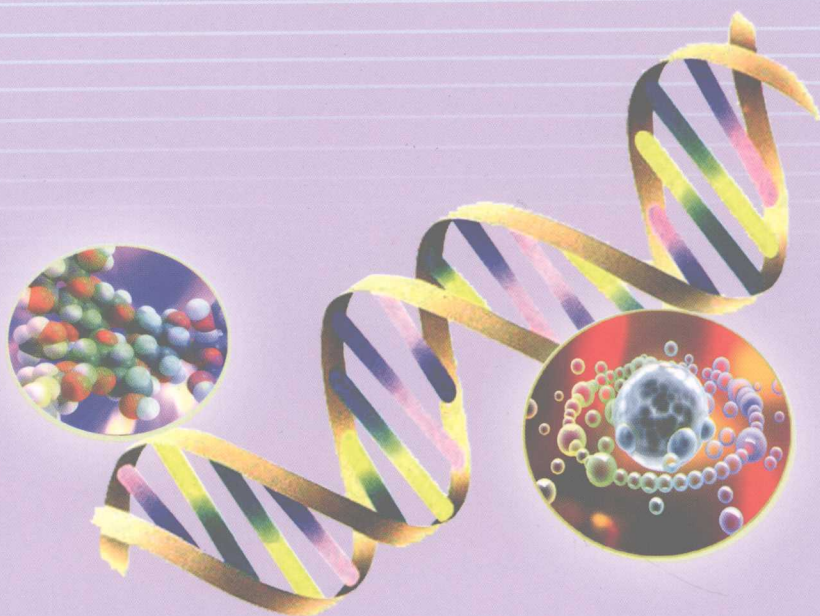
高等农业院校教材

生物化学与分子生物学实验教程

张爱联 主 编

张添元 副主编

SWHXYFZSWXSYJC



中国农业大学出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

生物化学与分子生物学实验教程

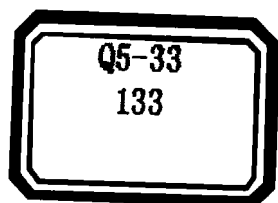
张景明 主编

张景文 副主编

北京协和医学院 北京协和医学院药学院 北京协和医学院基础学院



中国协和医科大学出版社



高等农业院校教材

生物化学与分子生物学 实 验 教 程

张爱联 主编
张添元 副主编

中国农业大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验教程/张爱联主编;—北京:中国农业大学出版社,2009.1

ISBN 978-7-81117-588-2

I. 生… II. 张… III. ①生物化学-实验-高等学校-教材 ②分子生物学-实验-高等学校-教材 IV. Q5-33 Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 158569 号

书 名 生物化学与分子生物学实验教程

作 者 张爱联 主编 张添元 副主编

策划编辑 林孝栋

封面设计 郑 川

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路 2 号

电 话 发行部 010-62731190,2620

编辑部 010-62732617,2618

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

经 销 新华书店

印 刷 涿州市星河印刷有限公司

版 次 2009 年 1 月第 1 版 2009 年 1 月第 1 次印刷

规 格 787×1 092 16 开本 33 印张 817 千字

印 数 1~1 500

定 价 55.00 元

责任编辑 冯雪梅

责任校对 陈 莹 王晓凤

邮政编码 100193

读者服务部 010-62732336

出 版 部 010-62733440

e-mail cbsszs @ cau.edu.cn

图书如有质量问题本社发行部负责调换

主 编 张爱联 (中国热带农业科学院)

副主编 张添元 (中山大学)

审 稿 罗进贤 (中山大学)

编 者 彭世清 (中国热带农业科学院)

符策奕 (海南省药品检验所)

李辉亮 (中国热带农业科学院)

屠发志 (中国热带农业科学院)

朱家红 (中国热带农业科学院)

易国辉 (中国热带农业科学院)

前 言

生物化学与分子生物学是一门重要的课程,生物化学与分子生物学实验是生物化学与分子生物学课程中的重要组成部分。生物化学与分子生物学领域的研究发展迅速,不仅有新的理论,而且新的实验技术也在不断涌现。虽然已经有一些关于生物化学和(或)分子生物学实验教程的书籍,但是没有查到近两年出版的关于生物化学和(或)分子生物学实验教程的研究生学习用书。据此,我们编写了此书。

本书以怎样获取生命大分子物质(包括重组蛋白)和怎么分析研究生命大分子物质为线索,系统地介绍生物化学与分子生物学的主要实验原理、方法和应用。全书共分为三个部分(共16章)。第一部分介绍核酸制备、文库构建、基因的获取和敲除;第二部分介绍基因重组和重组蛋白生产;第三部分介绍纯化技术、电泳技术、杂交技术、生物质谱技术、生物芯片技术、噬菌体展示技术、生命大分子相互作用分析和生物信息学。

本书为研究生实验教程。适用于农业、医学和工业等领域的生物化学与分子生物专业的研究生学习,也可作为生物学和遗传学等专业研究生的学习参考书。

本书编写的资料主要来源于有关的参考文献和一些有关的参考书籍,部分资料来源于中山大学罗进贤教授实验室已经公开发表的研究资料。

中山大学罗进贤教授是本书的审稿人,本书的撰写得到了罗进贤教授的指导和彭世清研究员的协助,并得到原华南热带农业大学特色教材的立项资助。

编 者
2008年9月

目 录

第一章 核酸提取.....	(1)
第一节 基因组 DNA 的制备	(1)
一、制备植物细胞基因组 DNA	(1)
二、制备动物细胞基因组 DNA	(3)
三、制备细菌基因组 DNA	(4)
四、制备酵母基因组 DNA(以 <i>Pichia pastoris</i> 基因组 DNA 提取为例).....	(5)
五、结果分析	(6)
六、基因组 DNA 提取注意事项	(7)
第二节 RNA 的制备	(7)
一、动物 RNA 提取(以人脐带组织总 RNA 的抽提为例).....	(7)
二、植物 RNA 的分离	(8)
三、绿色叶片植物叶线粒体 RNA 的分离	(12)
四、酵母 RNA 分离	(14)
五、酵母 tRNA 制备(苯酚法)	(15)
六、细菌 RNA 分离	(16)
七、结果分析	(17)
第三节 质粒 DNA 制备	(17)
一、大肠杆菌质粒 DNA 制备(碱裂解法)	(17)
二、农杆菌质粒 DNA 提取	(19)
三、结果分析	(24)
第二章 cDNA 文库构建	(27)
第一节 应用常规方法构建 cDNA 文库	(27)
一、原理	(27)
二、cDNA 第一条链的合成	(27)
三、cDNA 第二条链的合成	(30)
四、补平 cDNA 链末端	(34)
五、cDNA 甲基化	(35)
六、cDNA 与接头或衔接子相连接	(37)
七、凝胶过滤分离 cDNA	(39)
八、cDNA 与 λ 噬菌体臂的连接	(40)
九、重组子的筛选与鉴定	(43)
第二节 构建 cDNA 文库新方法	(44)
一、减数 cDNA 文库	(44)

二、标准化 cDNA 文库	(45)
第三节 cDNA 文库构建及应用实例	(45)
一、主要材料	(45)
二、实验操作要点	(46)
三、结果及分析	(47)
第三章 已知目标 DNA 片段的获取	(51)
第一节 PCR 法扩增目标 DNA 片段	(51)
一、原理	(51)
二、PCR 条件	(52)
三、引物设计原则	(52)
四、PCR 反应特点	(53)
五、试剂	(53)
六、温度与时间的设置	(54)
七、PCR 扩增效果的检查	(55)
八、注意事项	(55)
九、用 PCR 扩增目标基因实例	(56)
十、PCR 技术扩展	(58)
第二节 基因的化学合成	(69)
一、磷酸二酯法	(69)
二、磷酸三酯法	(71)
三、固相亚磷酸三酯法	(71)
四、用寡核苷酸片段组装	(72)
第四章 已知部分序列的 DNA 片段的获取	(78)
第一节 RACE	(78)
一、5'RACE	(78)
二、3'RACE	(84)
三、RACE 方案的 PCR 优化	(86)
四、RACE 应用实例	(86)
第二节 染色体步移	(87)
一、原理	(88)
二、材料	(89)
三、实验操作	(90)
第三节 反向 PCR	(94)
一、原理	(94)
二、材料	(95)
三、实验操作	(96)
四、反向 PCR 应用实例	(97)
第四节 锚定 PCR	(98)
一、原理	(98)

二、以同聚物为锚定引物进行互补锚定 PCR 扩增已知基因侧翼序列	(98)
三、用人工合成的特定序列为锚定引物扩增已知基因侧翼序列	(103)
四、锚定应用实例	(104)
第五章 未知 DNA 片段的获取	(108)
第一节 应用 PCR 技术获取新基因	(108)
一、应用简并 PCR 技术获取新基因	(108)
二、应用限制性显示 PCR(restriction display PCR, RD-PCR) 技术获取新基因	(111)
三、外显子捕获 PCR(exon trapping PCR) 获取新基因	(114)
第二节 应用杂交技术获取新基因	(120)
一、抑制差减杂交法	(120)
二、荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH) 技术	(127)
第三节 应用差异显示技术获取新基因	(133)
一、原理	(133)
二、材料	(134)
三、实验操作	(136)
四、应用实例	(140)
第四节 克隆新基因的其他技术	(141)
第六章 RNAi 技术	(147)
第一节 概述	(147)
一、定义	(147)
二、RNAi 的发现	(147)
三、RNAi 的作用的可能机制	(147)
四、RNAi 的作用特点	(148)
五、RNAi 的应用	(149)
六、研究方法	(152)
七、RNAi 研究的一般技术路线	(152)
第二节 RNAi 实验技术	(155)
一、siRNA 序列的选择	(155)
二、制备长 dsRNA 分子	(155)
三、制备 siRNA 双链体	(159)
四、细胞培养及 24 孔板细胞制备	(160)
五、转染	(161)
六、基因敲除结果分析	(170)
七、RNAi 应用实例	(171)
第七章 DNA 重组	(175)
第一节 传统 DNA 重组技术	(175)
一、分子克隆载体与宿主	(175)
二、分子克隆常用的工具酶	(184)
三、重组载体的构建	(190)

四、重组 DNA 导入宿主细胞及其重组子的筛选	(197)
第二节 重组工程	(221)
一、细菌中的内源性重组系统(RecA 重组系统)	(221)
二、不依赖 RecA 的重组系统(来源于噬菌体的重组系统)	(221)
三、单链 DNA 重组工程	(222)
第八章 生产重组蛋白	(225)
第一节 应用微生物细胞生产重组蛋白	(225)
一、概述	(225)
二、应用大肠杆菌生产重组蛋白	(235)
三、应用 <i>Pichia pastoris</i> 生产重组蛋白	(251)
第二节 应用植物生产重组蛋白	(259)
一、概述	(259)
二、植物细胞培养基本技术	(260)
三、在生物反应器中培养植物细胞	(284)
四、应用植物表达外源蛋白应用实例	(288)
第三节 应用动物细胞生产重组蛋白	(288)
一、概述	(288)
二、动物细胞及组织基本培养技术	(295)
三、动物细胞发酵工艺	(298)
四、应用动物细胞生产重组蛋白实例	(303)
第九章 纯化技术	(307)
第一节 材料的选择与处理	(307)
一、材料的选择、样品的保存与发酵液的预处理	(307)
二、细胞的破碎	(307)
第二节 抽提、萃取与浓缩	(308)
一、抽提目标成分	(308)
二、萃取	(311)
三、浓缩技术	(311)
第三节 层析	(320)
一、吸附层析 (absorption chromatography)	(320)
二、分配层析(partition chromatography)	(320)
三、离子交换层析(ion-exchange chromatography)	(321)
四、凝胶过滤层析	(332)
五、亲和层析	(336)
第四节 纯化技术应用实例	(339)
一、 <i>Pichia pastoris</i> 分泌重组蛋白的纯化(以纯化重组 angiostatin 为例)	(339)
二、大肠杆菌中表达产物(包涵体)的纯化(以纯化重组 careticulin-N58 为例)	(340)
第十章 电泳技术	(346)
第一节 概述	(346)

一、电泳技术原理	(346)
二、影响电泳迁移率的因素	(346)
三、电泳技术的分类	(347)
第二节 醋酸纤维素薄膜电泳	(347)
一、材料	(347)
二、实验操作	(348)
三、应用	(349)
第三节 琼脂糖凝胶电泳	(349)
一、原理	(349)
二、特点	(350)
三、材料	(350)
四、实验操作	(350)
五、应用	(351)
第四节 SDS-PAGE	(351)
一、原理	(351)
二、材料	(352)
三、实验操作	(354)
第五节 双向电泳	(359)
一、原理	(359)
二、实验操作	(359)
第六节 毛细管电泳	(369)
一、概述	(369)
二、原理	(369)
三、分离模式	(370)
四、毛细管电泳的应用	(371)
五、应用实例	(372)
第十一章 杂交技术	(375)
第一节 核酸分子杂交	(375)
一、原理	(375)
二、常用探针的种类及其制备	(375)
三、杂交	(385)
第二节 蛋白印迹(Western Blot)	(398)
一、原理	(398)
二、材料	(399)
三、实验操作	(400)
第十二章 生物质谱技术	(404)
第一节 生物质谱(biological mass spectrometry)的特点与应用	(404)
一、生物质谱的特点	(404)
二、生物质谱的应用	(404)

第二节 物质谱基本技术	(407)
一、质谱仪的主要元件	(407)
二、物质谱工作基本原理	(408)
三、物质谱基本方法(举例)	(410)
四、色谱-质谱联机	(412)
第十三章 生物芯片	(417)
第一节 概述	(417)
一、生物芯片技术的形成	(417)
二、生物芯片的分类	(417)
第二节 生物芯片的操作原理及其操作程序	(419)
一、操作原理	(419)
二、操作程序	(420)
第三节 生物芯片具体操作方法及应用	(430)
一、生物芯片具体操作方法	(430)
二、生物芯片应用概述	(433)
三、生物芯片应用实例	(436)
第四节 生物芯片技术的难点与展望	(438)
第十四章 噬菌体展示技术	(443)
第一节 概述	(443)
一、原理	(443)
二、用于噬菌体展示的表达载体	(443)
三、噬菌体显示与筛选技术	(443)
四、应用	(444)
第二节 噬菌体展示实验技术应用实例(用噬菌体展示技术筛选 CCR5 亲和短肽)	(445)
一、材料	(445)
二、实验操作	(447)
三、结果与分析	(450)
第十五章 生命大分子相互作用分析	(461)
第一节 酵母单杂交	(461)
一、原理	(462)
二、材料	(462)
三、实验操作	(464)
第二节 酵母双杂交	(470)
一、原理	(470)
二、材料	(471)
三、实验操作	(474)
第三节 酵母三杂交系统	(482)
一、原理	(482)

二、酵母三杂交系统的应用	(482)
三、常用载体和菌株	(483)
四、基本实验操作举例	(483)
第四节 DNase I 足迹法研究 DNA 蛋白质相互作用	(487)
一、原理	(487)
二、材料	(487)
三、实验操作	(488)
第十六章 生物信息学概况及生物信息数据库	(491)
第一节 生物信息学概况	(491)
一、生物信息学的产生和发展	(491)
二、生物信息学的研究内容	(491)
第二节 生物信息数据库	(493)
一、核酸数据库	(493)
二、蛋白质数据库	(495)
三、其他数据库资源	(498)
第三节 生物信息学应用实例	(508)
一、生物信息学在作物抗性研究中的应用	(508)
二、生物信息学与人类基因组计划	(510)

第一章 核酸提取

第一节 基因组 DNA 的制备

DNA 是生物的主要遗传物质,是基因工程的物质基础。基因组 DNA 的制备包括裂解细胞、去除蛋白质和抽提 DNA 三个基本过程。由于生物形式的多样性,对于不同的物种,其细胞的结构和成分有差别,制备 DNA 的具体方法也各异。

一、制备植物细胞基因组 DNA

由于植物细胞有细胞壁以及细胞内具有高含量的多糖类物质,因此用于真核细胞基因组 DNA 提取的一般方法用在植物细胞上并不十分有效。这里介绍两种常用的 CTAB 和 SDS 法。

(一)CTAB 法

CTAB 法是由 Murray 和 Thompson(1980)的方法修改而成。

1. 原理

CTAB(十六烷基三乙基溴化铵)是一种去污剂,可溶解细胞膜,它能与核酸形成复合物,在高盐溶液中(0.7 mol/L NaCl)是可溶的,当降低溶液盐浓度到一定程度(0.3 mol/L NaCl)时,从溶液中沉淀,通过离心就可将 CTAB-核酸的复合物与蛋白,多糖类物质分开。最后通过乙醇或异丙醇沉淀 DNA,而 CTAB 溶于乙醇或异丙醇而除去。

2. 材料

(1)新鲜的组织材料或 -80°C 冻存的材料。

(2) $2\times$ CTAB 溶液:

CTAB(W/V) 2%

Tris-HCl 100 mmol/L (pH 8.0)

EDTA 20 mmol/L (pH 8.0)

NaCl 1.4 mol/L

PVP 1%

高压灭菌备用。灭菌前呈黏稠状,灭菌后变成清亮的溶液。

(3)氯仿/异戊醇(49:1)。

(4) 10 mg/mL RNaseA 。

(5)乙醇或异丙醇。

(6) β -巯基乙醇。

(7)酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)。

(8)70%乙醇。

(9)灭菌 ddH₂O 或 TE。

(10)主要仪器:离心机,恒温水浴,台式高速离心机,电泳装置。

3. 实验操作

(1)在 2 mL 离心管中,加入 500 μ L 的 2 $\times$ CTAB 和 20 μ L β -巯基乙醇,65 $^{\circ}$ C 预热。

(2)植物组织材料 1~2 g,用蒸馏水冲洗干净,再用灭菌 ddH₂O 冲洗 2 次,放入经液氮预冷的研钵中,加入液氮研磨至粉末状,用干净的灭菌不锈钢勺转移粉末到预热的离心管中,总体积达到 1 mL 混匀后置 65 $^{\circ}$ C 水浴中保温 45~60 min,并不时轻轻转动试管。

注:冻存材料直接研磨,绝对不能化冻。而且粉末应在化冻前转移否则内源性 Dnase 有可能降解基因组 DNA。

(3)加等体积的酚/氯仿/异戊醇,轻轻地颠倒混匀,室温下 10 000 r/min 离心 10 min,移上清至另一新管中。

(4)向管中加入 1/100 体积的 RNaseA 溶液,置 37 $^{\circ}$ C 20~30 min。

(5)加等体积的氯仿/异戊醇,轻轻地颠倒混匀,室温下 10 000 r/min 离心 10 min,移上清至另一新管中。

(6)加入 2 倍体积的 100%乙醇或 0.7 倍体积异丙醇,会出现絮状沉淀,-20 $^{\circ}$ C 放置 30 min 或-80 $^{\circ}$ C 放置 10 min,12 000 r/min 离心 10~15 min 回收 DNA 沉淀。

(7)用 70%乙醇清洗沉淀 2 次,吹干后溶于适量的灭菌 ddH₂O 或 TE 中。

(二) SDS(十二烷基磺酸钠)法提取植物基因组 DNA

1. 原理

经研磨的组织细胞用热的 SDS 裂解后,加入高浓度的 KAc,0 $^{\circ}$ C 放置以除去蛋白和多糖类杂质,最后用乙醇或异丙醇沉淀核酸。

2. 材料

(1)新鲜的组织材料或-80 $^{\circ}$ C 冻存的材料。

(2)提取缓冲液:

100 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)

50 mmol/L EDTA(pH 8.0)

500 mmol/L NaCl

高压灭菌并冷至室温后加 β -巯基乙醇至终浓度 10 mmol/L。

(3)裂解液:20%SDS。

(4)高盐溶液:5 mol/L KAc。

(5)10 mg/mL RNaseA。

(6)酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)。

(7)异丙醇。

(8)100%乙醇。

(9)70%乙醇。

(10)灭菌 ddH₂O 或 TE。

(11)主要仪器:离心机,恒温水浴,台式高速离心机,电泳装置。

3. 实验操作

(1)取幼嫩的组织材料 1~2 g,用蒸馏水冲洗干净,再用灭菌 ddH₂O 冲洗 2 次,放入经液氮预冷的研钵中,加入液氮研磨至粉末状,用干净的灭菌不锈钢勺转移粉末到加有 500 μ L 提取液的离心管中,轻轻混匀。

(2)向管中加入 50 μ L 20% SDS 溶液,混匀,不可过于强烈震荡以防基因组 DNA 断裂,65℃保温 10 min,并不时摇动。

(3)加入 150 μ L 5 mol/L KAc,混匀,置冰上 20~30 min。

(4)4℃,15 000 r/min 离心 15 min,转移上清到另一离心管中,加入 0.7 倍体积的异丙醇,混匀,-20℃沉淀 30 min。

(5)12 000 r/min 离心 10 min 回收基因组 DNA 沉淀,吹干后加入适量的灭菌 ddH₂O 或 TE 溶解 DNA。

(6)加入 1/10 体积的 RNaseA,37℃保温 1 h,除去 RNA。

(7)酚/氯仿/异戊醇抽提后,上清加 2 倍体积乙醇,-20℃沉淀 30 min。12 000 r/min 离心 10 min 回收基因组 DNA 沉淀。

(8)用 400 μ L 70%乙醇洗一次后,吹干,加入适量的灭菌 ddH₂O 或 TE 溶解 DNA。

二、制备动物细胞基因组 DNA

(一)原理

迅速冷冻组织并捣碎片,在 SDS 和蛋白酶 K 的作用下消化细胞蛋白质;被消化物通过连续的酚/氯仿/异戊醇抽提去除剩余蛋白质;抽提液中的 DNA 在乙醇或异丙醇的作用下沉淀。

(二)材料

(1)液氮。

(2)消化缓冲液:

100 mmol Tris-HCl(pH 8.0)

25 mmol EDTA

0.5% SDS

0.1 mg/mL 蛋白酶 K(储存液 20 mg/mL,在-20℃储存,临用前稀释)

(3)(冰冷的)PBS:

137 mmol/L NaCl

2.7 mmol/L KCl

4.3 mmol/L Na₃PO₄

1.4 mmol/L KH₂PO₄

(4)25 mmol EDTA。

(5)酚:氯仿:异戊醇=25:24:1。

(6)100%乙醇。

(7)7.5 mmol/L 醋酸铵。

(8)乙醇 70%。

(9)ddH₂O。

(10) TE 缓冲液:

10 mmol Tris-HCl(pH 8.0)

1 mmol EDTA

(11) 10 mg/mL RNaseA

(12) 主要仪器: 离心机, 恒温水浴, 台式高速离心机, 电泳装置。

(三) 实验操作

1. 细胞的准备与消化

(1) 来源于组织块的细胞的制备

① 组织块离体后尽快切碎冻存于液氮中。

② 取 0.2~1 g 组织, 用预冷的碾钵碾碎(边加液氮边碾)。

③ 将碾碎的组织细胞悬浮于消化缓冲液中(100 mg 组织细胞/1.2 mL 消化缓冲液)。

(2) 来源于实验室培养细胞的准备

① 贴壁细胞经 EDTA 消化成细胞悬液, 1 000 r/min × 5 min 离心收集细胞。

② 预冷的 PBS 悬细胞沉淀, 1 000 r/min × 5 min 离心, 重复 2 次最后去上清。重复混匀和离心步骤。

③ 以等体积的消化缓冲液悬细胞, 3×10^7 个细胞/300 μ L 细胞消化缓冲液; 大量细胞时, 其细胞密度为 10^8 个细胞/mL 细胞消化缓冲液。

④ 消化细胞: 50℃ 振荡 12~18 h。

2. 核酸的抽提

① 以等体积酚/氯仿/异戊醇液抽提样本。

② 10 000 r/min × 5 min 离心, 收集上清。

③ 酚/氯仿/异戊醇抽提后, 加 2 倍体积的乙醇, -20℃ 沉淀 30 min。12 000 r/min 离心 10 min 回收基因组 DNA 沉淀。

④ 用 500 μ L 70% 乙醇洗 1 次后, 吹干。⑤ 用 500 μ L TE 溶解核酸, 加入 0.3 μ L RnaseA, 37℃ 孵育 1 h。

⑥ 用等体积酚/氯仿/异戊醇抽提, 离心取加上清。

⑦ 加入 2 倍体积的乙醇或 0.6 倍体积的异丙醇, -20℃ 沉淀 30 min。12 000 r/min 离心 10 min 回收基因组 DNA 沉淀。

⑧ 用适量 ddH₂O 或 TE 溶解核酸, -20℃ 保存。

三、制备细菌基因组 DNA

(一) 原理

溶解的细菌混合物在蛋白酶 K 的消化下去除蛋白质, 溴化十六烷三甲基铵选择性沉淀细胞壁碎片、多糖和残余的蛋白, 存在于上清液中的相对分子量高的基因组 DNA 经异丙醇沉淀获取。

(二) 材料

(1) TE 缓冲液: