



现代分子生物学实验

郑伟娟 主编

 高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS



现代分子生物学实验

Xiandai Fenzi Shengwuxue Shiyan

郑伟娟 主编

编者 (以姓氏笔画为序)

马定远	南京大学
王盛	南京大学
庄红芹	南京大学
李石营	南京大学
沈燕	南京大学
陈媛	南京大学
郑伟娟	南京大学
闻崇炜	江苏大学
曹林	南京农业大学
黄启来	澳门科技大学
程伟	南京大学
臧宇辉	南京大学
魏钦俊	南京医科大学



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

内容提要

本书的编写注重实用性和创新性统一,在实验内容的编排上不再按照“基础实验+综合实验”的基本模式,而是依据分子生物学研究的自身特点和一般流程,分为特定基因的克隆、克隆基因的表达和表达产物的纯化、特定基因的功能研究、蛋白质与蛋白质的相互作用、DNA与蛋白质的相互作用5个部分。每部分整合若干实用的分子生物学研究技术,使读者对每一个实验的目的和适用领域更加明确,也便于快速地选择相关实验技术参考借鉴。

书中除了分子生物学最为基础的实验技术外,也涵盖了目前比较先进的研究技术和研究方法,如RNA干扰、实时荧光定量PCR、流式细胞仪分析、荧光共振能量转移技术等。在每个实验中,都特别强调操作的注意事项和实验取得成功的关键,注重实用性。

本书适合作为高等院校生命科学类及相关专业分子生物学实验课程的教材使用,也可供相关科研及实验技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

现代分子生物学实验/郑伟娟主编. —北京:高等教育出版社,2010.8

ISBN 978-7-04-029586-3

I. ①实… II. ①郑… 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(2010)第124247号

出版发行 高等教育出版社

社 址 北京市西城区德外大街4号

邮政编码 100120

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司

印 刷 廊坊市文峰档案印务有限公司

开 本 787×1092 1/16

印 张 16

字 数 380 000

购书热线 010-58581118

咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>

<http://www.hep.com.cn>

网上订购 <http://www.landaco.com>

<http://www.landaco.com.cn>

畅想教育 <http://www.widedu.com>

版 次 2010年8月第1版

印 次 2010年8月第1次印刷

定 价 24.50元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 29586-00

序

我相信分子生物学领域的众多大学生、研究生和科技工作者,在浏览了本书的内容后,都会感觉到这本书正是他们需要的那一类。首先,本书涵盖了分子生物学的基础实验技术,和更高层次的研究用实验技术,以及掌握这些技术的诀窍。因此本书的适用范围较广。大学生、研究生、教师、研究工作者和实验技术人员,在本书中都能找到他们在日常工作中或建立研究技术平台之所需。其次,本书编写的特点是“项目导向”,亦即依据分子生物学研究的特点和实验流程编排,而不采用通常实验技术类书只是实验方法罗列的编写。“项目导向”的编排方法有助于阐明每种实验技术的原理、适用环境和所需条件,从而达到活学活用的目的。

本书集合了13位作者的智慧和辛勤努力,所包含的36个实验都经过编写者或相关实验人员的实践和验证,具有很高的可靠性和可重复性。因此,本书提供的实验技术是“鲜活”的,可用的,也反映了实验分子生物学的前沿。

鉴于我对本书的以上体会,我很乐意为之作序,向读者推荐这本好书,相信它对广大读者定有助益。

朱德煦

原南京大学生命科学学院院长兼南京大学医药生物技术国家重点实验室主任

2010年7月15日

前 言

多年的分子生物学教学与科研工作使我深刻认识到实验技术在这门学科中的重要地位。跟其他的生物学学科一样,分子生物学也是一门实验学科,任何理论上的突破都必须建立在坚实的实验基础上,所以对于任何一位希望真正掌握分子生物学这门学科的人来说,都需要在学习分子生物学基础理论的同时,熟悉和掌握分子生物学的基本实验技术。

实际上随着科学技术的普遍发展,生物学的各个分支学科,无论是传统的植物学、动物学、生理学、遗传学,还是新兴的生物化学、神经生物学、发育生物学;无论是宏观的生态学、进化生物学,还是微观的微生物学、细胞生物学的研究,都已经深入到分子水平,与其说分子生物学是生物学的一个新兴学科,不如说分子生物学是生物学各学科共同的基础,是生物学研究的一种先进的理念和手段。正因为意识到这一点,现在分子生物学已经成为生物学一级学科所有学生必须掌握的一门基础核心课程。

更进一步说,分子生物学也与生命科学领域的其他相关学科,如医学、农学、林学、药学、古生物学等密切相关,甚至化学、环境科学、物理学、地质学等学科也开辟了利用分子生物学理论与技术研究自身学科科学问题的方向,出现了化学生物学、结构生物学、生物物理学、地质生物学等交叉学科,越来越多的专业人员需要分子生物学的专业知识,越来越多的专业人员希望熟悉和掌握相关的分子生物学实验技术,因此综合性院校、农林医专业院校等均开设了分子生物学课程,选修人数相当可观。

与理论课教材建设相比,分子生物学实验课的教材建设相对薄弱,多数学校的师生仍困惑于缺少实用的、适用的分子生物学实验教材。这一方面固然与教材编写本身的动力不足有关,另一方面也与分子生物学的学科特点有关。分子生物学是一门发展迅速的、充满活力的高技术学科,既有比较基础、比较简单的实验技术,更多的则是不断发展起来的全新的实验技术,这些技术对实验设备依赖性强,对操作的熟练度和经验性要求高,要将这些新技术反映到实验教材中,对编写者而言是一个很大的挑战。

但是作为一名一直在分子生物学教学和科研第一线的高校教师,我深刻感受到师生们对这样一本教材的迫切需求。幸运的是,我周围有一群熟练掌握各种分子生物学实验技术的年轻人,他们有多年的使用某项实验技术、某种实验仪器进行相关科研工作的经历,熟悉实验操作流程,了解仪器的性能和各项参数,知道仪器说明书和实验 protocol 以外需要注意的各种因素,也就是说掌握了如何保证实验取得成功的诀窍。有他们的参与,有南京大学生命科学学院和医药生物技术国家重点实验室的支持,我终于决定开始这一项艰巨而有意义的编写工作。

这本《现代分子生物学实验》在实验内容的编排上不再按照“基础实验+综合实验”的基本模式,而是依据分子生物学研究的自身特点和一般流程,分为特定基因的克隆、克隆基因的表达和表达产物的纯化、特定基因的功能研究、蛋白质与蛋白质的相互作用、DNA 与蛋白质的相互作用 5 个部分,每部分整合若干实用的分子生物学研究技术,既包含了分子生物学最为基础和常用的实验技术,如基因的克隆、表达和纯化;定点突变、RT-PCR、Western blotting、pull-down、IP、荧

光显微镜、EMSA、染色体免疫共沉淀等；也涵盖了目前分子生物学研究中比较先进的研究技术和研究方法，如酵母双杂交技术、二维电泳、RNA 干扰、real time-PCR、流式细胞仪分析、荧光共振能量转移技术(FRET)等。

第1章 特定基因的克隆是分子生物学的基本操作，实际上这也是大多数学校分子生物学实验课必设的内容。这部分实验内容比较简单，对实验设备、实验条件没有特殊要求，所需要的试剂、耗材成本很低，绝大多数院校、包括基础条件比较薄弱的学校都具备开设这类实验的基本条件。同时这些实验技术也是每一个从事分子生物学或相关研究的师生必须掌握的基本技术，是他们或早或晚、或多或少都要用到的技术，是真正的实用分子生物学技术。虽然已有的大多数分子生物学实验教材都包含这部分技术，但本书的特色在于从查找基因序列、分析相关信息、设计引物、选择载体、选择合适的酶切条件等这些通常由老师包办、实验课并不涉及的实验步骤开始，将网络数据库的使用、引物设计软件的使用、不同载体的区别、影响酶切的因素、不同凝胶的适用范围等，这些实验课一般不介绍，甚至某些教师都知之不详的知识点贯穿到各个相关实验中，把这些相互关联的基本技术作为一个完整的研究任务进行编排。我们希望通过这一组实验，每一个学生都可以真正掌握特定基因的克隆技术，不至于在开始科研工作、需要克隆特定基因时，无从下手；在实验遇到困难时，感到茫然，不知道问题出在哪里，如何调整实验条件。

第2章 克隆基因的表达和表达产物的纯化中精心选择了4个实验，涵盖了目前常用的三种蛋白质表达系统：大肠杆菌、酵母和昆虫细胞，并选择 His-tag 和 GST 两种最常用的融合表达体系，介绍融合蛋白的表达和纯化方法。

第3章 特定基因的功能研究包含12个实验，介绍了基因定点突变、外源基因转染、RNA 干扰、Western blotting、real time-PCR、荧光显微镜分析、流式细胞仪检测等实用的实验技术。

第4章 蛋白质与蛋白质的相互作用汇总了研究蛋白质相互作用的各种实验技术，既有经典的 pull-down、IP 实验，也有比较复杂或比较新的实验技术，如酵母双杂交、二维电泳、噬菌体展示肽库技术和荧光共振能量转移技术。

第5章 DNA 与蛋白质的相互作用介绍了研究 DNA 与蛋白质相互作用的3个经典技术：EMSA、染色质免疫共沉淀和利用荧光素酶作为报告基因的体外转录体系。

为方便师生使用本教材，书后附录中收集了各种常用数据。

从第2章到第5章涉及了二十几种分子生物学实用技术，这些技术在部分已有的分子生物学实验教材也有涉及，但是比较零散，一般在一本教材中只能介绍少数几个实验技术，而且在编排上没有规律，只作为新技术加以介绍。考虑到这些实验技术并不是每一个研究者都需要用到的，更常见的是在研究某一课题时可能需要某一种或几种相关技术，所以我们按照这些技术的适用研究领域和分子生物学的研究对象，将这些技术按基因的表达和表达产物的纯化、特定基因的功能、蛋白质与蛋白质的相互作用、DNA 与蛋白质的相互作用四块进行归类划分，这样既便于读者按照研究兴趣寻找相关技术，也便于读者了解每一项实验技术的使用领域。虽然这些技术不是每一位研究者都需要用到的技术，但是很难说是否以后需要用到，而且对于科研工作者来说，了解和熟悉尽可能多的新技术，对于科研工作的深入、拓宽和创新将是受益无穷的。

这些实验对实验设备、实验条件的依赖性比较高，实验的周期一般比较长，实验试剂、耗材等费用比较高，有些院校可能一时难以开设，但也正因如此，在本书中尽可能多地包含这些新技术才更加有意义。我们希望这本书可以为那些教学和科研条件暂时比较薄弱的院校的师生提供一

个接触、了解和熟悉这些新技术的平台,每一个实验的编写都特别注意介绍该技术的起源、原理和用途,在尽可能详细地介绍实验步骤、实验操作的同时,特别列出实验操作的关键点、心得、实验成功的窍门、避免失败的注意事项等,一些涉及特殊仪器、特殊软件的实验,还不厌其烦地配上电脑截图、附上标准的实验结果图等,以后条件成熟时,我们还可以制作相应的影像资料,便于进行示范性实验教学。为便于师生使用本教材,灵活地选择和组合实际开设的实验,我们还准备提供部分实验所需的特殊材料,比如质粒、凝胶介质、转染试剂等。我们也很愿意随时提供任何所需要的咨询和服务。

本书从2007年初开始酝酿,迄今已近3年,此期间得到了南京大学生命科学学院领导的鼓励和支持;得到了南京大学生命科学学院创新实验教材编写专项经费的支持;2009年得到南京大学“985工程”二期精品教材建设项目的立项和经费支持。参与本书编写的是来自南京大学、南京医科大学、南京农业大学、江苏大学、澳门科技大学生命科学相关专业的一群青年科学工作者,他们都具有多年的分子生物学研究经历,熟悉相关的研究技术,特别是具有丰富的实际操作经验和心得。书中的很多操作技巧、注意事项和实验结果都是他们的亲身体会和实验所得,这一点弥足珍贵!在此特别感谢参与编写的每一位老师付出的辛苦努力。

感谢每一位使用这本书的人,我希望和这本书一样成为你的朋友,欢迎任何形式的交流和批评(wjzheng@nju.edu.cn)。

编 者

2010年3月于南京

目 录

第 1 章 特定基因的克隆	1
附 1.1 <i>Bad</i> 基因介绍	4
实验 1.1 从核酸数据库中获得 <i>mBad</i> 基因编码序列	4
实验 1.2 从细胞中提取总 RNA	11
实验 1.3 逆转录获得小鼠 B16F10 细胞的 cDNA	15
实验 1.4 PCR 扩增目的基因 <i>mBad</i>	17
附 1.2 <i>mBad</i> 基因 PCR 引物的设计	22
实验 1.5 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳回收	44
实验 1.6 SDS 碱裂解法提取质粒 DNA	49
实验 1.7 用质粒 DNA 小量抽提试剂盒制备质粒 DNA	51
附 1.3 克隆载体的选择	53
实验 1.8 DNA 的限制性酶切和酶切产物的回收	55
附 1.4 酶切位点的选择	60
实验 1.9 连接	62
附 1.5 平端 DNA 的连接反应	64
实验 1.10 转化	64
实验 1.11 阳性重组子的筛选以及测序验证	69
第 2 章 克隆基因的表达和表达产物的纯化	73
实验 2.1 His-tag EGFP 在大肠杆菌中的表达和纯化	77
附 2.1 融合蛋白表达载体 pHis-EGFP 的构建及融合蛋白的亲纯化结果	81
实验 2.2 GST-EBFP 融合蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化	83
附 2.2 GST-EBFP 的纯化结果	88
实验 2.3 GST-EBFP 在巴氏毕赤酵母中的表达	89
附 2.3 pPICZ C-GST-EBFP 重组质粒的构建、鉴定	94
实验 2.4 GST-EGFP 在昆虫细胞中的表达纯化	95
附 2.4 重组 AcNPV-EGFP 病毒的构建与筛选	98
第 3 章 特定基因的功能研究	101
实验 3.1 用重叠延伸 PCR 法进行 EGFP 基因的定点突变	102
附 3.1 重叠延伸 PCR 法基因定点突变的实验结果	109
实验 3.2 用单管大引物 PCR 法进行 EGFP 基因的快速定点突变	111

附 3.2 单管大引物 PCR 法基因定点突变的实验结果	115
实验 3.3 <i>mBad</i> 基因在 293T 细胞中的瞬时表达	116
实验 3.4 Western blotting 检测瞬时转染基因的表达	118
实验 3.5 人 <i>DNMT1</i> 基因干扰质粒 shRNA 真核表达载体的构建	126
附 3.3 干扰质粒的设计	131
实验 3.6 质粒 DNA 的大量纯化	131
实验 3.7 脂质体法转染哺乳动物细胞 MCF-7	133
附 3.4 质粒转染结果	135
实验 3.8 实时荧光定量 PCR 法检测 <i>DNMT1</i> 基因 mRNA 表达水平	135
附 3.5 荧光定量 PCR 实验结果	139
实验 3.9 利用荧光显微镜检测细胞骨架蛋白 β -actin 在 A549 细胞中的定位	140
附 3.6 A549 细胞中 β -actin 的荧光显微镜照片	145
实验 3.10 流式细胞仪检测紫杉醇对 A549 细胞周期的影响	145
附 3.7 紫杉醇处理对 A549 细胞周期的影响	154
实验 3.11 流式细胞仪检测脐静脉内皮细胞增殖	155
附 3.8 流式细胞仪检测脐静脉内皮细胞的增殖	158
实验 3.12 流式细胞仪检测细胞凋亡	158
附 3.9 流式细胞仪检测 Jurkat 淋巴瘤细胞的凋亡	162
第 4 章 蛋白质与蛋白质的相互作用	165
实验 4.1 酵母双杂交体系发现 FADD 与 Fas 的相互作用	166
实验 4.2 二维电泳比较 FADD 和 FADD ^{-/-} 细胞株的蛋白质表达差异	172
附 4.1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶的经验配方	181
附 4.2 2DE 常见问题与解决办法	183
实验 4.3 GST pull-down 验证 FADD 与 Fas 的相互作用	184
附 4.3 GST pull-down 验证 FADD 与 Fas 相互作用的结果示意图	188
实验 4.4 免疫共沉淀分析 FADD 与 Fas 相互作用的结构域	188
附 4.4 Fas 与 FADD 不同结构域相互作用的 Co-IP 结果示意图	192
实验 4.5 荧光共振能量转移技术(FRET)分析 FADD 与 Fas 相互作用	192
实验 4.6 利用噬菌体肽库展示技术筛选与链霉亲和素特异性结合的氨基酸序列	199
第 5 章 DNA 与蛋白质的相互作用	205
实验 5.1 EMSA 分析转录因子 NF- κ B 与 DNA 结合序列的结合	206
实验 5.2 染色质免疫沉淀(ChIP)分析 NF- κ B 与 <i>TRAF1</i> 基因启动子序列的 结合	212
实验 5.3 报告基因检测技术分析不同细胞中 <i>PSMA</i> 基因的启动子活性	215
附录 I 网络资源	220

附录 II	常用仪器及供应商	223
附录 III	著名生物试剂公司及其特色产品	226
附录 IV	常用溶液配制	229
附录 V	常用工具酶	237
附录 VI	实验室常用技术参数资料	242

第 1 章

特定基因的克隆



特定基因的克隆是分子生物学的基本操作,实验内容、设备与条件比较简单,实验成本也低,绝大多数院校都具备开设此部分实验的条件。

本章以小鼠*mBad*基因为例,将基因克隆的整个过程编排成 11 个既相互独立又相互关联的实验,系统地介绍基因克隆的一般方法和具体步骤。对于某些通常由老师包办、实验课并不涉及的实验步骤,以及实验课一般不介绍、甚至某些教师都知之不详的知识点贯穿到各个相关实验中。

希望通过这一组实验,每个学生都可以真正掌握特定基因的克隆技术,不至于在开始科研工作、需要克隆特定基因时,无从下手;在实验遇到困难时,感到茫然,不知道问题出在哪里、如何调整实验条件。

生命活动的本质是遗传信息的复制、表达以及发挥功能。基因是含有特定遗传信息的核苷酸序列,是遗传物质的最小功能单位。依据中心法则,基因通过指导蛋白质的合成来表达自己所携带的遗传信息,从而控制生物个体的性状表现。基因具有忠实性和可变性两种特征,前者使遗传信息能够完整地传递到下一代,实现物种的延续性,而后者则是物种多样性的基础。为了研究特定基因的结构与功能,往往需要通过基因克隆技术将该基因的编码序列克隆到合适的载体中做进一步的研究。

基因克隆是 20 世纪 70 年代发展起来的一项具有革命性的技术,它的出现大大推动了分子生物学的发展,目前已经成为分子生物学领域中一项非常重要的基础性技术。基因克隆技术通常把外源基因(目的基因片段)和有自主复制能力的载体 DNA 在体外人工连接,构建成新的重组 DNA,然后将其转移到受体生物中表达外源基因,从而产生遗传物质和遗传表型的转移和重新组合。因此基因克隆技术又称为分子克隆、基因的无性繁殖、基因操作、重组 DNA 技术以及基因工程等。

基因克隆是由一系列技术组成的过程,主要包括:目的基因片段的获取、载体的选择、限制性酶切、连接、转化以及筛选等环节(图 1-1)。

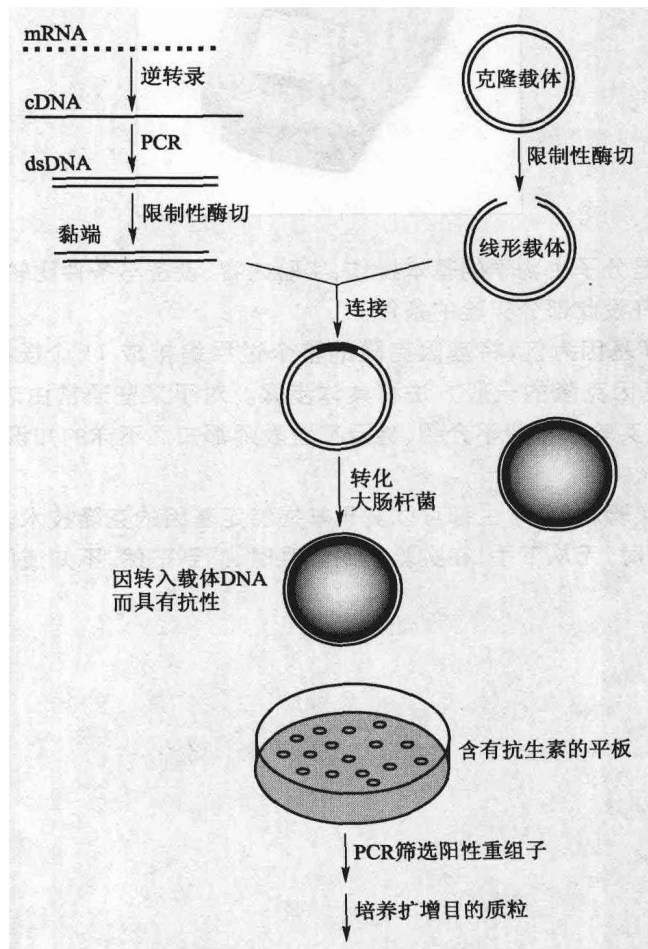


图 1-1 基因克隆示意图

一、目的基因片段的获取

首先需要从核酸数据库中检索目的基因序列,根据不同情况通过化学合成、从基因组分离或者从 mRNA 逆转录获得目的基因片段,然后根据克隆要求设计 PCR 引物,再通过 PCR 扩增目的基因片段。

化学合成法比较适合于合成较短的目的基因。随着合成技术的不断进步,化学合成 DNA 的成本越来越低,合成的速率越来越快,长度也越来越长,但是仍然存在合成长度的限制。而如果需要根据工程菌的密码子偏爱性对目的基因的密码子进行优化,化学合成法则是唯一可行的方法。

对于没有内含子的真核基因,以及结构比较简单的原核基因,可以用基因组 DNA 为材料直接获取目的基因的编码片段。

由于绝大部分真核基因中存在复杂的内含子结构,因此只能以基因的转录产物为模板,通过逆转录获取编码目的基因的 DNA 片段。逆转录与 PCR 偶联的 RT-PCR 技术是获得基因克隆所需的基因片段的最常用手段。

二、载体的选择

有很多商业化的载体可供选择。用于基因克隆的载体必须具备 3 个基本条件:具有自主复制能力、带有多克隆位点以及可用做筛选标记的抗性基因。

三、限制性酶切

用可以识别和切割特异性 DNA 序列的限制性酶切割载体和目的 DNA 片段,产生对合的黏端,使目的 DNA 片段可以插入到载体中。

四、连接

在 DNA 连接酶的作用下将目的 DNA 片段的黏端与载体 DNA 片段的黏端连接,形成完整的质粒 DNA(重组 DNA)。

五、转化

选择合适的宿主菌株,通过特定的方法将连接产物导入到细菌中,每个连接产物分子转化到一个细胞中,形成转化子,扩增后形成一个单克隆菌落,为阳性重组子的筛选提供了便利。

六、筛选

载体 DNA 上通常带有对抗生素的抗性基因比如氨苄青霉素抗性(Amp^r)基因、卡那霉素抗性(Kan^r)基因、四环素抗性(Tet^r)基因等,导入了重组 DNA 的转化子,因此获得了对相应抗生素的抗性,能够在含有该抗生素的琼脂糖平板上生长,形成单克隆菌落。进一步可通过菌落原位杂交、PCR 扩增等多种方法从转化子中筛选插入了目的 DNA 片段的阳性重组子。

本章以小鼠 *Bad(mBad)* 基因为例,系统地介绍基因克隆的整个过程,包括:从核酸数据库中检索 *mBad* 基因的编码序列;从细胞培养物中制备 RNA;从 mRNA 逆转录制备 cDNA;针对 *mBad* 基因设计 PCR 引物;PCR 扩增 *mBad* 基因;克隆载体的选择;质粒 DNA 的扩增和提取;目的 DNA 片段和质粒 DNA 的限制性酶切;DNA 连接;转化 TOP10 感受态细胞;阳性重组子的筛选等步骤。每一步设计为一个相对独立的实验,这一组相关实验则构成基因克隆的一个完整过程。

■ 【附 1.1】 *Bad* 基因介绍

Bad 是 *Bcl2* 基因家族中与细胞凋亡功能密切相关的重要基因。在高等生物的生长、发育、衰老和死亡的过程中,细胞的增殖和凋亡形成一个动态的平衡。细胞内有两类与凋亡相关基因:促进凋亡的基因和抑制凋亡的基因,对凋亡相关基因的研究对于阐明生命活动的机理具有重要的作用。大量研究表明,引起 B 细胞淋巴瘤的原癌基因:B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell leukemia-2, *Bcl2*)是最重要的抑制细胞凋亡的基因,进一步的研究发现,生物中还存在多种与 *Bcl2* 有较高同源性的基因,它们构成庞大的 *Bcl2* 家族,共同调控细胞凋亡的平衡状态。其中有些是抑制细胞凋亡的基因,包括 *Bcl2*、*Bcl-xL*、*Bcl-w*、*Mcl-1*、*Al*、*Ced-9* 等,另外一些是促进细胞凋亡的基因,包括 *Bad*、*Bax*、*Bak*、*Bid*、*Bik*、*Bim*、*Bcl-xs* 等。*Bad* (*Bcl-Xl/Bcl2* associated death promoter)是 *Bcl2* 家族中与 *Bcl2* 和 *Bcl-xL* 相关的促凋亡基因。*Bad* 基因编码 204 个氨基酸,相对分子质量为 22.1×10^3 ,*Bad* 蛋白能够与 *Bcl2* 和 *Bcl-xL* 形成异源二聚体,从而解除 *Bcl2* 和 *Bcl-xL* 对细胞凋亡的抑制作用,发挥其促进细胞凋亡的功能。

实验 1.1 从核酸数据库中获得 *mBad* 基因编码序列

【实验目的】

学习从网络共享的数据库中查找目的基因的编码序列以及相关信息。

【实验原理】

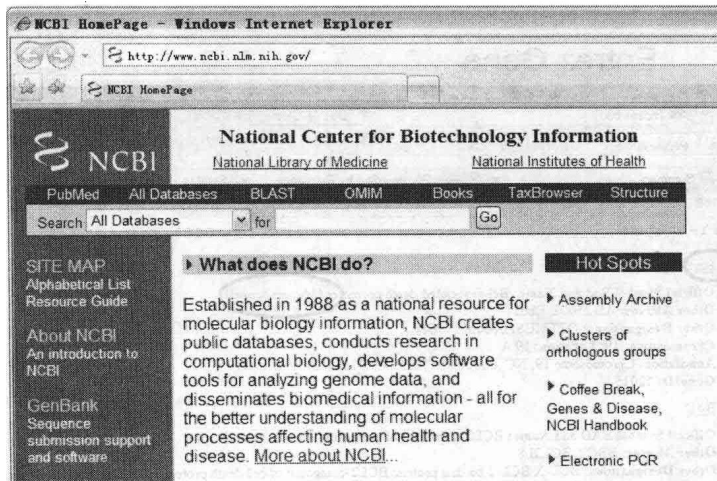
目前可供网络共享的核酸序列数据库主要有 3 个,分别是美国国立卫生研究院维护的 GenBank、欧洲分子生物学实验室的 EMBL 以及日本的核酸数据库 DDBJ (DNA Data Bank of Japan),网络地址分别为 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.ebi.ac.uk/embl.html> 和 <http://www.ddbj.nig.ac.jp>,内容包括所有已公布的核酸序列及其翻译产物的氨基酸序列和其他相关信息,3 个数据库之间每天都会交换数据,因此这 3 个数据库是相等的,数据库的 accession number、序列数据和注解都是相同的。美国国立生物技术信息中心研制的 Entrez 系统可以实现对各种数据库的访问。本实验学习如何通过 Entrez 系统获取 *Bad* 基因的编码序列以及相关信息。

【材料、试剂与仪器】

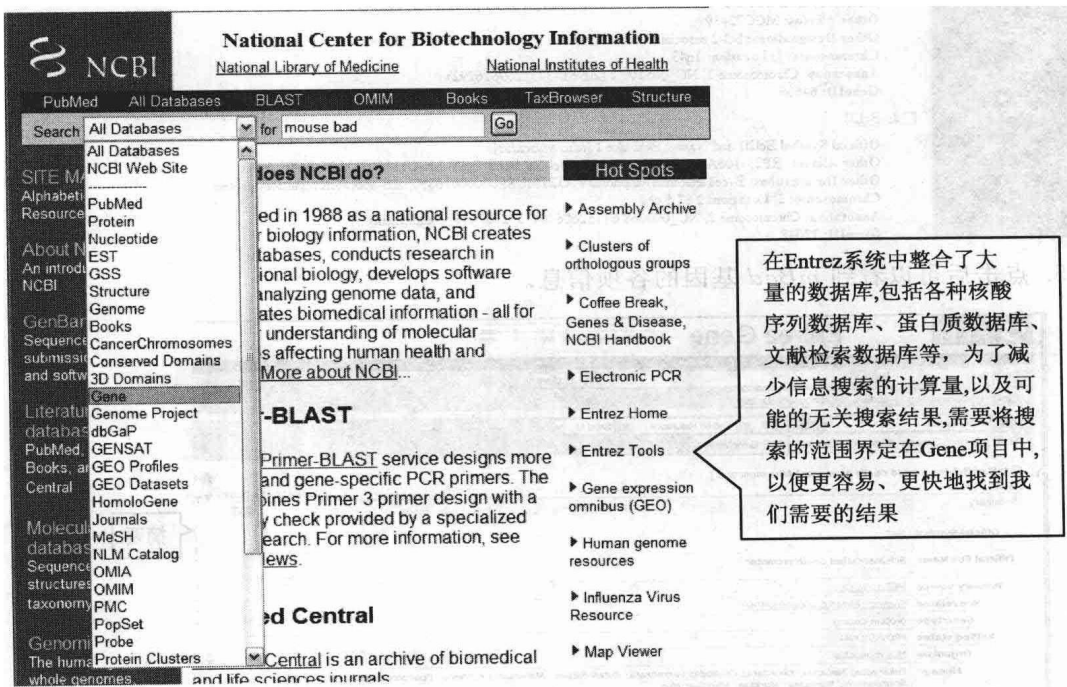
可连接互联网的电脑。

【实验步骤】

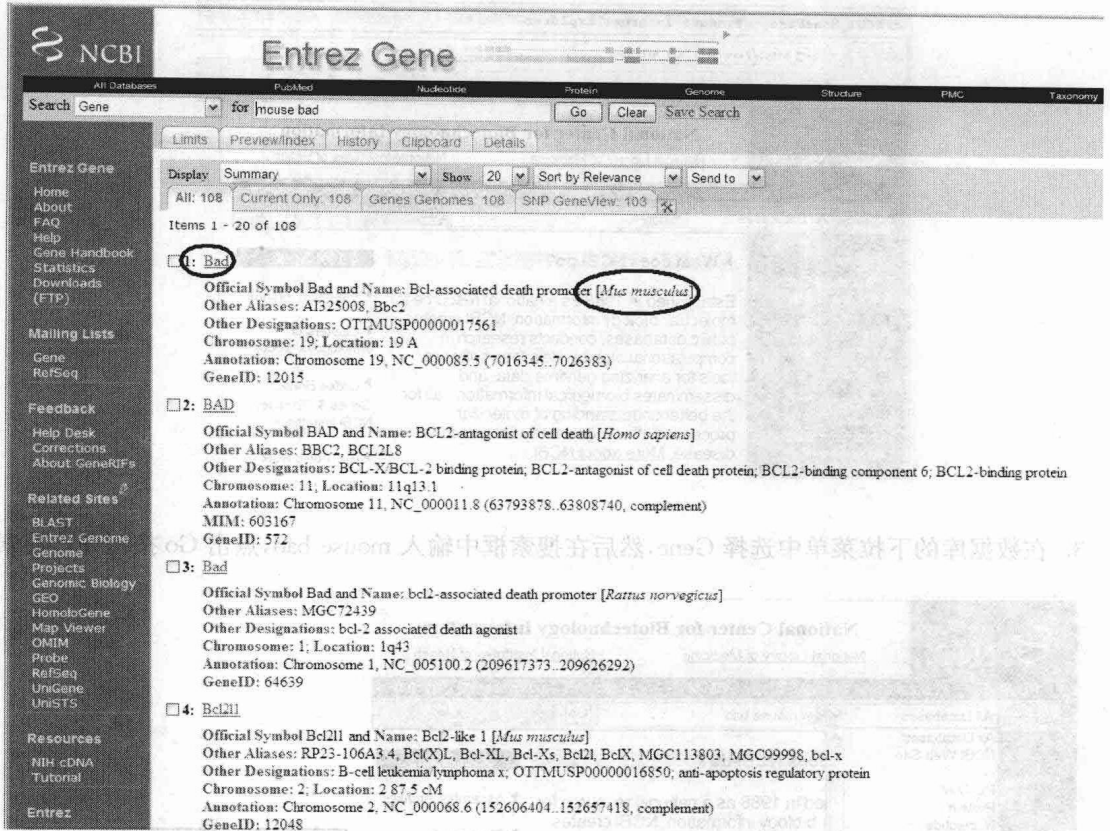
1. 打开电脑,并将电脑连接到网络。
2. 在 IE 的地址栏中输入网络地址 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>,进入 NCBI 主页。



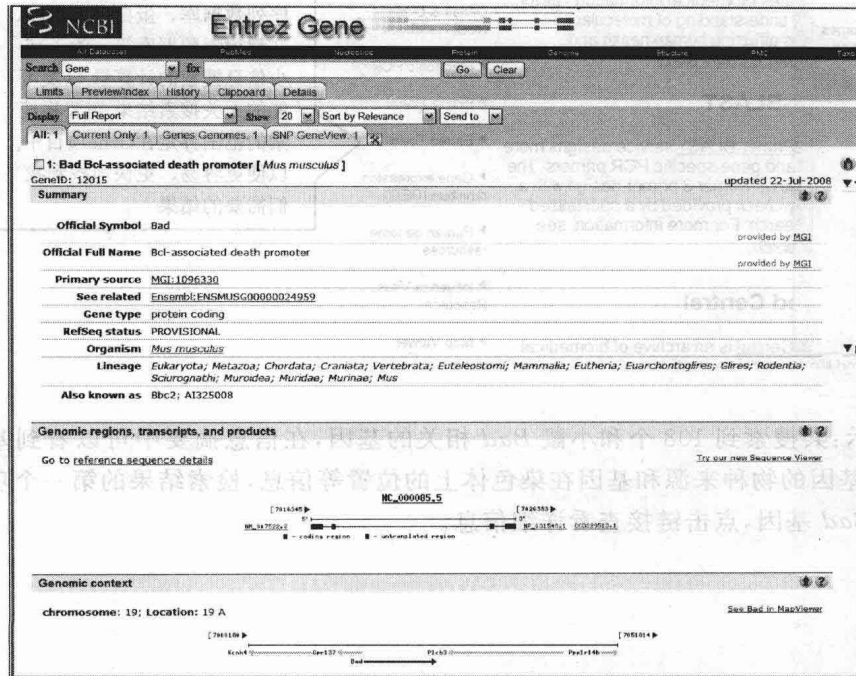
3. 在数据库的下拉菜单中选择 Gene,然后在搜索框中输入 mouse bad,点击 Go 按钮开始搜索。



4. 搜索结果显示:共搜索到 108 个和小鼠 *Bad* 相关的基因,在信息摘要中可以看到基因的正式标识、全名以及基因的物种来源和基因在染色体上的位置等信息,检索结果的第一个项目就是我们所需的小鼠 *Bad* 基因,点击链接查看详细信息。



5. 点击后可以看到 *mBad* 基因的各项信息。



摘要

在基因组上的位置、转录本和基因产物

在基因组中的上下文

Bibliography

Related Articles in PubMed
PubMed links

GeneRIFs: Gene References into Function

1. Raf-1 in beta-cells led to a striking loss of Bad phosphorylation at serine 112 and an increase in the protein levels of both Bad and Bax
2. These findings provide genetic proof of the bifunctional activities of BAD in both beta cell survival and insulin secretion.
3. The proapoptotic protein Bad is a key player in cell survival decisions, and is regulated post-translationally by several signaling networks.
4. combination of proteomics, genetics and physiology indicates an unanticipated role for BAD in integrating pathways of glucose metabolism and apoptosis
5. PP2A dephosphorylation of pSer112 is the key initiating event regulating the activation of BAD during interleukin-3 withdrawal-induced apoptosis
6. BAD phosphorylation protects cells from the deleterious effects of apoptotic stimuli and attenuates death pathway signaling by raising the threshold at which mitochondria release cytochrome c to induce cell death
7. cellular cholesterol biosynthesis is critical for the activation and maintenance of the Akt-Bad cell survival cascade in response to growth factors such as insulin.
8. All three Dm kinase family members predominantly phosphorylate Bad on Ser112 and in addition are capable of phosphorylating Bad on multiple sites associated with the inhibition of the pro-apoptotic function of Bad in HEK-293 cells
9. activation by therapeutic inhibition of epidermal growth factor receptor and transactivation by insulin-like growth factor receptor

Submit: [New GeneRIF](#) [Correction](#)

Alleles

Alleles of this type are documented at Mouse Genome Informatics (MGI)

- Targeted (knock-out) (1) [1 citation](#)
- Targeted (knock-in) (2) [2 citations](#)

Interactions

Description	Interactant	Other Gene	Complex	Source	Publs
Akt interacts with and phosphorylates Bad.					
NP_031548.1	NP_032782.1	Akt1		EIND	PubMed
BCL-2 interacts with BAD					
NP_031548.1	NP_033871.1	Bcl2		EIND	PubMed

Bad interacts with Bcl-XL. This interaction was modelled on a demonstrated interaction between mouse Bad and human Bcl-XL.

General gene information

Markers

Bad(e-PCR)
Links: [UniSTS:141153](#)
Alternate name: MGI:1205887

AI325008(e-PCR)
Links: [UniSTS:186142](#)
Alternate name: 415179

Bad(e-PCR)
Links: [UniSTS:225851](#)
Alternate name: MGI:1933317

NoName(e-PCR)
Links: [UniSTS:461952](#)
Alternate name: MGI:3050444

Genotypes

[See Bad SNP GeneView Report](#)

Pathways

KEGG pathway: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)
05030

KEGG pathway: Apoptosis
04210

KEGG pathway: Chronic myeloid leukemia
05220

KEGG pathway: Colorectal cancer
05210

KEGG pathway: Endometrial cancer
05213

KEGG pathway: ErbB signaling pathway
04012

KEGG pathway: Focal adhesion
04510

KEGG pathway: Insulin signaling pathway
04910

KEGG pathway: Melanoma
05218

KEGG pathway: Neurodegenerative Disorders
01510

KEGG pathway: Non-small cell lung cancer
05221

KEGG pathway: Pancreatic cancer
05212

KEGG pathway: Prostate cancer
05215

KEGG pathway: VEGF signaling pathway
04370

Pubmed 上的相关文章

和功能相关的参考文献

等位基因

相互作用分子

基因的一般信息

基因标记

基因型

参与的信号通路