

医学细胞与分子生物学

理论与技术

杜娟 主编

医学细胞与分子生物学理论与技术

主 编 杜 娟

副主编 刘 华 刘艳丽 李 笛

席文锦 祁建妮

(排名按姓氏笔画, 不分先后)

编 委 鞠 瑛 赵晨燕 姚 昕

~~边红军~~ ~~王双连~~ 王士凯

~~董小峰~~ 娄运伟 夏 雨

~~赵晓红~~ ~~赵培辰~~ 乌琳琳

吉林大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学细胞与分子生物学理论与技术 / 杜娟主编.

—长春: 吉林大学出版社, 2012. 7

ISBN 978 - 7 - 5601 - 8693 - 1

I. ①医… II. ①杜… III. ①人体细胞学 - 细胞生物学

②分子生物学 IV. ①R329. 2②Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 162707 号

书 名: 医学细胞与分子生物学理论与技术

作 者: 杜娟 主编

责任编辑: 王丽 责任校对: 林栋

吉林大学出版社出版、发行

开本: 787 × 1092 毫米 1/16

印张: 17.5 字数: 310 千字

ISBN 978 - 7 - 5601 - 8693 - 1

封面设计: 刘瑜

长春市新世纪印业有限公司 印刷

2012 年 7 月 第 1 版

2012 年 7 月 第 1 次印刷

定价: 35.00 元

版权所有 翻印必究

社址: 长春市明德路 501 号 邮编: 130021

发行部电话: 0431 - 89580026/28/29

网址: <http://www.jlup.com.cn>

E-mail: jlup@mail.jlu.edu.cn

Preface

Cell and Molecular Biology is at the center of today's biotechnology revolution that is affecting every facet of our lives. The speed at which it renews itself is tantalizing and challenging for educators and students alike.

In this book, Dr. Du and colleagues take on this challenge and present us with a simple logical framework through which Cell and Molecular Biology can be taught and discussed at graduate level. It is a dream textbook for those interested in learning Cell and Molecular Biology.

Juan Du is an extraordinary young woman. In her 10 – year researches, Juan had shown herself as very diligent and independent researcher. During this period of time, Juan worked together with group members. She has been indeed a team player. This book is a crystallization of her 10 years research work.

To conclude, I would like to restate my strong recommendation this book to you!



June 11, 2012

目 录

第一篇 医学细胞生物学	1
第一章 原代细胞培养	1
第一节 基本知识	1
一、原代培养的一般过程	1
二、体外培养细胞的生长方式	2
三、培养细胞生命期(Life Span of Culture Cells)	3
四、每代细胞的生长过程	4
第二节 培养用液	5
一、细胞培养基和血清的选择	5
二、培养基的介绍	6
三、血清——天然细胞培养基	7
四、培养基的配置	8
五、其他常用液体的配置	9
第三节 原代细胞基本培养技术和要领	11
一、组织块贴壁法	12
二、消化培养法	13
第四节 细胞培养的污染及检测	14
一、细胞污染的种类和判定	14
二、微生物污染的排除	16
第二章 传代细胞的培养	18
第一节 基本知识	18
一、基本概念	18
二、建立细胞系(或株)的要求	19

三、已建立细胞系或株的鉴定、管理和使用	20
四、国内外的主要细胞库	21
第二节 细胞培养液	21
第三节 传代细胞的培养	25
一、传代细胞的复苏	25
二、细胞传代	26
三、细胞的冻存	26
第四节 传代细胞污染鉴定	27
第三章 淋巴细胞分离培养	28
第一节 基本知识	28
一、淋巴细胞分离液与淋巴细胞的分离	28
二、流式分选技术	29
三、磁珠分离技术	30
第二节 淋巴细胞分离液分离淋巴细胞	30
一、原理	31
二、材料和仪器	31
三、实验方法	31
四、结果分析	35
第三节 流式细胞分选技术	36
一、原理	36
二、材料和仪器	37
三、实验方法	37
四、结果分析	38
第四节 免疫磁珠法分离淋巴细胞	38
一、原理	38
二、材料和仪器	41
三、实验方法	41

四、结果分析	41
第四章 细胞学实验	43
一、细胞接种孔板的相关参数	43
二、细胞培养板培养细胞操作中的注意事项	44
第二节 细胞的增殖与抑制情况检测	45
一、实验原理	45
二、操作步骤	45
三、细胞增殖和抑制实验中的试剂配制	46
四、细胞增殖和抑制实验中对细胞的要求及细胞悬液的制备	47
第三节 细胞计数方法	48
一、传统细胞计数板进行计数的方法	48
二、新兴的细胞计数仪对细胞进行计数的方法	49
第四节 免疫组织化学技术	54
一、免疫组织化学技术基本介绍	54
二、免疫组织化学技术的具体操作步骤举例	56
三、关于抗原修复相关问题	57
四、细胞爬片和细胞涂片的制作及免疫细胞化学固定液的选择	58
第五节 肿瘤细胞迁移、侵袭实验	59
一、Transwell 迁移及侵袭实验	59
二、实验中所用结晶紫染料的配方	63
第六节 肿瘤细胞黏附实验	64
第五章 细胞凋亡的检测方法	66
第一节 概述	66
一、细胞凋亡的生物学功能	67
二、细胞凋亡的生物学意义	69
三、细胞凋亡与坏死的区别	69
四、细胞凋亡的形态学特征	69

五、细胞凋亡的分子机制	70
第二节 TUNEL 法检测凋亡	71
一、原理	71
二、材料和仪器	72
三、实验方法	73
四、结果分析	74
第三节 Annexin V - FITC 凋亡检测	74
一、原理	75
二、材料与仪器	75
三、实验方法	76
四、结果分析	76
第四节 细胞周期与细胞凋亡	77
一、原理	77
二、材料与仪器	78
三、实验方法	78
四、结果分析	79
第二篇 医学分子生物学	80
第一章 基因工程	80
第一节 基本知识	80
一、基因工程的研究内容	80
二、基因工程常用载体	81
三、基因工程技术在医学中的应用	86
第二节 原核表达载体系统	88
一、原核细胞表达载体及特点	88
二、大肠埃希菌表达系统	90
第三节 真核表达载体系统	96
一、真核细胞表达载体及特点	96

二、真核细胞基因导入方法	97
三、酵母表达系统	98
四、哺乳动物细胞表达系统	100
第四节 基因克隆	102
一、目的基因 DNA 片段的分离	103
二、目的基因 DNA 片段与载体的连接	104
三、重组基因导入受体细胞	106
四、重组 DNA 克隆的筛选与鉴定	108
五、质粒 DNA 的扩增和抽提	110
六、目的基因的表达	112
第二章 基因转染	117
第一节 基本知识	117
一、磷酸钙共沉淀法	117
二、电穿孔转染法	121
三、脂质体介导 DNA 转染法	125
四、逆转录病毒载体介导的 DNA 转染法	128
第二节 瞬时转染和稳定转染	132
一、瞬时转染	133
二、稳定转染	135
三、基因转染的主要应用	140
第三章 基因转录水平的检测	141
第一节 PCR 和 northern 法技术概论	141
第二节 逆转录 PCR 检测基因表达基本原理和分类	141
一、PCR 技术基本原理	141
二、RT-PCR 引物设计原则方法	142
三、PCR 反应条件的优化	144
四、逆转录 PCR	147

二、实验器具的处理与准备	148
三、试剂配制	148
四、步骤	148
五、PCR 产物电泳结果分析	155
第三节 实时荧光定量 PCR 方法简介	157
一、实时荧光定量 PCR 的基本原理	157
二、引物与探针的设计	159
三、实时荧光定量 PCR 的步骤	160
四、实时荧光定量 PCR 技术的应用	160
第四节 Northern Blot 法	162
一、试剂准备	163
二、操作步骤	163
第四章 蛋白表达的检测	166
第一节 Western blot 检测蛋白表达	166
一、基本原理	166
二、仪器和材料、试剂的准备	167
三、实验步骤	169
四、背景信息	175
五、Western Blot 常见问题分析	176
六、Western Blot 的应用	178
七、Western Blot 实验中的小 tip	178
第五章 蛋白与 DNA 的相互作用	181
第一节 概述	181
第二节 凝胶迁移或电泳迁移率实验(EMSA)	181
一、EMSA 原理示意图	182
二、EMSA 实验过程示意图	182
三、EMSA 所用试剂的配制	182

四、EMSA 实验步骤	184
五、结果分析	188
第三节 染色体免疫共沉淀(ChIP)	189
一、ChIP 原理示意图	189
二、ChIP 所需试剂的配制	190
三、ChIP 实验步骤	190
四、结果分析	193
五、注意事项	193
第四节 DNase I 足迹法(DNase I foot printing)	194
第五节 其他相关的实验技术和方法	195
一、酵母单杂交技术(yeast one hybrid system)	195
二、SELEX 与核酸适体技术	196
三、扫描探针显微镜技术	197
四、生物质谱技术和表面等离子共振技术	198
第六章 蛋白质与蛋白质相互作用检测	199
第一节 概述	199
第二节 酵母双杂交系统	199
一、酵母双杂交系统原理	199
二、酵母双杂交系统的实验步骤	200
三、酵母双杂交系统的特点	200
四、酵母双杂交系统的应用	201
第三节 Pull-down 检测	201
一、Pull-down 检测原理示意	202
二、Pull-down 检测所用标签蛋白及与相对应的亲和配体	202
三、Pull-down 检测实验步骤	202
第四节 免疫共沉淀技术	205
一、Co-IP 原理示意图	206

二、Co-IP 所需试剂的配制	206
三、Co-IP 实验步骤	207
四、Co-IP 实验注意事项	207
五、Co-IP 的优点与不足	208
第五节 其他相关的实验技术和方法	209
一、噬菌体展示技术	209
二、等离子共振技术	209
三、荧光能量转移技术	209
四、抗体与蛋白质阵列技术	209
第七章 生物医学文献检索	211
第一节 概述	211
一、信息、知识、情报、文献和信息素养	211
二、文献检索的基本知识	212
三、计算机检索基本知识	218
第二节 中文生物医学文献检索数据库	220
一、中文文摘型数据库	220
二、中文全文型数据库	229
第三节 外文生物医学文献检索数据库	236
一、外文文摘型数据库	236
二、外文全文型数据库	244
第四节 引文数据库	254
一、Web of Science 数据库	254
二、《中文科技期刊数据库》(引文版)	257
第五节 NCBI 数据库	260
一、概况	260
二、数据库资源	261
三、检索方法	262

3. 培养

将取得的组织细胞移入培养瓶或培养板中的过程称为培养。如果是机械破碎法培养细胞,是将剪碎的组织块直接移入培养器皿底部,分散均匀,几个小时后组织可贴牢在底部时,再加入适当培养基。如果是消化法培养细胞,一般在移入培养器皿之前进行细胞计数,按含有一定浓度细胞的培养基移入培养器皿,放入培养箱中培养。

对正在培养的细胞,应每隔一定时间观察一次,观察内容包括细胞是否生长良好,形态是否正常,有无污染,培养基酸碱度,此外多培养箱内的温度、湿度及 CO_2 浓度也要定时检查。

一般原代培养的细胞,初期细胞处于一定的潜伏期,细胞不分裂,但可贴壁或游走。过了潜伏期后,细胞进入旺盛的分裂生长期。这时要及时观察细胞,待细胞基本铺满培养器皿底后,要进行细胞传代,将细胞消化悬浮后,分到 2~3 个培养器皿中继续培养。每传代一次成为“一代”。正常二倍体细胞只能传几十代,而对一些转化的细胞,如肿瘤组织细胞可无限地传代下去。

4. 冻存与复苏

为了保存细胞,特别是不易获得的突变细胞,我们要及时将细胞收集至冻存管中,加入保护剂(如二甲基亚砜)冻存起来。长时间保存(数月数年)一般放入液氮中(-196°C),短时间保存(数月内)可放在 -80°C 冰箱中。

复苏一般采用快速溶解法,即从液氮或 -80°C 冰箱中取出,迅速放入 37°C 水中,使之在极短时间内溶解,然后将细胞移入培养器皿中进行培养。保护剂的选择、细胞冻存密度、降温速度、复苏融化速度、冻存前细胞状态对复苏后细胞活力有影响。

二、体外培养细胞的生长方式

1. 贴附生长型

附着在某一固相支持物表面才能生长的细胞。绝大多数培养细胞属于此类细胞。支持细胞生长的支持物可以是其他细胞、胶原、玻璃或塑料等。培养细胞在未贴附于底物之前一般呈球体状,当与支持物贴附后,细胞将逐渐伸展而形成一定的形态。体外培养的细胞从形态上大体可分为:

①成纤维细胞型:胞体呈梭型或不规则三角形,中央有卵圆形核,胞质突起,生长时呈放射状。除真正的成纤维细胞外,凡由中胚层间充质起源的组织,如心肌、平滑肌、成骨细胞、血管内皮等常呈本型状态。另外,凡培养中细胞的形态与成纤维类似时皆可称之为成纤维细胞。

②上皮型细胞：细胞呈扁平不规则多角形，中央有圆形核，细胞彼此紧密相连成单层膜。生长时呈膜状移动，处于膜边缘的细胞总与膜相连，很少单独行动。起源于内、外胚层的细胞如皮肤表皮及其衍生物、消化管上皮、肝胰、肺泡上皮等皆成上皮型形态。

③游走细胞型：呈散在生长，一般不连成片，胞质常突起，呈活跃游走或变形运动，方向不规则。此型细胞不稳定，有时难以和其他细胞相区别。

④多型细胞型：有一些细胞，如神经细胞难以确定其规律和稳定的形态，可统归于此类。

除了贴附生长外，接触抑制与密度依赖性细胞生长的另一特点。在接种细胞数量适宜情况下，随细胞数量不断增多、生长空间渐趋减少、最后细胞相互接触汇合成片。细胞相互接触后，如培养的是正常细胞，由于细胞的相互接触能抑制细胞的运动，这种现象称接触抑制（Contact Inhibition）。而恶性细胞则无接触抑制现象，因此接触抑制可作为区别正常与癌细胞标志之一。肿瘤细胞由于无接触抑制能继续移动和增殖，导致细胞向三维空间扩展，使细胞发生堆积（Piled up）。细胞接触汇合成片后，虽发生接触抑制，只要营养充分，细胞仍然能够进行增殖分裂，因此细胞数量仍在增多。但当细胞密度进一步增大，培养液中营养成分减少，代谢产物增多时，细胞因营养的枯竭和代谢物的影响，则发生密度抑制（Density Inhibition），导致细胞分裂停止。因此细胞接触抑制和密度抑制是两个不同的概念，不应混淆。

2. 悬浮生长型

不必附着于固相支持物表面，而在悬浮状态下即可生长的细胞。只有少数细胞类型如某些肿瘤细胞和来源于血液、淋巴组织的细胞可在悬浮状态下生长。这类细胞胞体圆形，不贴附在支持物上，传代方便，易于收获。由于细胞生长空间大，容易繁殖。

三、培养细胞生命期（Life Span of Culture Cells）

所谓培养细胞生命期，是指细胞在培养中持续增殖和生长的时间。体内组织细胞的生存期与完整机体的死亡衰老基本相一致。细胞系在培养中能够存活时间的长短，主要取决于细胞来源的种类、性状和原供体的年龄等情况。人胚二倍体成纤维细胞培养，在不冻存和反复传代条件下，可传30~50代，相当于150~300个细胞增殖周期，能维持一年左右的生存时间，最后衰老凋亡（Apoptosis）。如供体为成体或衰老个体，则生存时间较短；如培养的为其他细胞如肝细胞或肾细胞，生存时间更短，仅能传几代或十几代。只有当细胞发生遗传性改变，如获永生性或恶性转化时，细胞的生存期才可能发生改

变。

正常细胞培养时，不论细胞的种类和供体的年龄如何，在细胞全生存过程中，大致都经历以下三个阶段：

1. 原代培养 (Primary Culture) 期

也称初代培养，即新鲜组织细胞自体内取出并在体外培养生长至第一次传代的时期，一般持续 1~4 周。此期细胞呈活跃的移动，可见细胞分裂，但不旺盛。初代培养细胞与体内原组织在形态结构和功能活动上相似性大。细胞群是异质的 (Heterogeneous)，也即各细胞的遗传性状互不相同，细胞相互依存性强。如把这种细胞群稀释分散成单细胞，在软琼脂培养基中进行培养时，细胞克隆形成率 (Cloning Efficiency) 很低，即细胞独立生存性差。初代培养细胞多呈二倍体核型；由于原代培养细胞和体内细胞性状相似性大，是检测药物很好的实验对象。

2. 传代期

原代培养细胞生长一定时间后，如贴附型细胞融合成片而逐渐铺满附着物的表面，此时需要将细胞分开接种至 2 个或更多的培养器皿中，即传代。在培养条件较好情况下，细胞增殖旺盛，一般仍能维持二倍体核型，并保留原组织细胞的很多特性。一般情况下当传代 10~50 次左右，细胞增殖逐渐缓慢，失去其二倍体性质，细胞进入第三期。

3. 衰退期

此期细胞仍然存活，但增殖很慢或不增殖；细胞形态轮廓增强，最后衰退、死亡。体外培养的细胞有所谓的“危机期” (crisis)。有限细胞系生长过程中若不能通过危机期，将进入衰退期而趋于死亡。但少数情况下，在以上三期任何一点 (多发生在传代末或衰退期)，由于某种因素的影响，细胞可能发生自发转化 (Spontaneous Transformation)。转化的标志之一是细胞可能获得永生性 (Immortality) 或恶性性 (Malignancy)。细胞永生性也称不死性，即细胞获持久性增殖能力，这样的细胞群体称无限细胞系 (Infinite Cell Line)，也称连续细胞系 (Continuous Cell Line)。培养细胞无限增殖生长的能力能否获得，与其种族、来源及性质有关。

四、每代细胞的生长过程

所有体外培养细胞，包括初代培养及各种细胞系，当生长达到一定密度后，都需做传代处理。传代的频率或间隔与培养液的性质、接种细胞数量和细胞增殖速度等有关。细胞自接种至新培养器皿到其下一次再传代接种的时间为细胞的一代。细胞传一代后，一般要经过以下三个阶段：

1. 滞后期 (Lag Phase)

包括悬浮期及潜伏期。

细胞接种培养后, 先经过一个在培养液中呈悬浮状态的悬浮期。此时细胞胞质回缩, 胞体呈圆球形。接着是细胞附着或贴附于底物表面上, 称贴壁, 悬浮期结束。各种细胞贴附速度不同, 初代培养细胞贴附慢, 可长达 10 ~ 24h 或更多; 连续细胞系和恶性细胞系快, 10 ~ 30min 即可贴附。

细胞贴附于支持物后, 除先经过前述延展过程变成极性细胞, 还要经过一个潜伏阶段, 才进入生长和增殖期。细胞处在潜伏期时, 可有运动活动, 基本无增殖, 少见分裂相。细胞潜伏期与细胞接种密度、细胞种类和培养基性质等密切相关。初代培养细胞潜伏期长, 约 24 ~ 96h 或更长, 连续细胞系和肿瘤细胞潜伏期短, 仅 6 ~ 24h; 细胞接种密度大时潜伏期短。当细胞分裂相开始出现并逐渐增多时, 标志细胞已进入指数增生期。

2. 指数增生期 (Logarithmic growth Phase)

这是细胞增殖最旺盛的阶段, 细胞分裂相增多。指数增生期细胞分裂相数量可作为判定细胞生长旺盛与否的一个重要标志。此期持续时间的长短因细胞本身的特性及培养条件而异, 一般可持续 3 ~ 5d。指数增生期是细胞一代中活力最好的时期, 因此是进行各种实验最好的和最主要的阶段。

3. 停滞期 (Stagnate Phase)

细胞数量达饱和密度后, 细胞遂停止增殖, 进入停滞期。此时细胞数量不再增加, 故也称平预期 (Plateau)。停滞期细胞虽不增殖, 但仍有代谢活动, 继而培养液中营养渐趋耗尽, 代谢产物积累、pH 降低。此时需做分离培养即传代, 否则细胞会中毒, 发生形态改变, 重则从底物脱落死亡, 故传代应越早越好。传代过晚 (已有中毒迹象) 能影响下一代细胞的机能状态。在这种情况下, 虽进行了传代, 因细胞已受损, 需要恢复, 至少还要再传 1 ~ 2 代, 通过换液淘汰掉死细胞和使受损轻微的细胞得以恢复后, 才能再用。结果反而耽误了时间, 这是在实验中应特别注意的。

第二节 培养用液

一、细胞培养基和血清的选择

由于用于动物细胞培养的培养基的种类很多, 不同批号间的血清存在着差异, 因此, 细胞培养能否达到实验目的, 选择合适的培养基及血清是关键之一。

二、培养基的介绍

国内外普遍使用的动物细胞培养基是商品化的干粉合成培养基。干粉型合成培养基是用球磨机或喷雾法将各种培养基成分混合后制成的,具有性质稳定,便于储存和运输,使用方便的优点。干粉型培养基颗粒极细,很容易完全溶解于水,只要参照说明书的要求,按比例配制,经消毒灭菌后即可使用。

经典的培养基有很多种,Invitrogen (GIBCO)、Thermo Fisher (HyClone)、Sigma 等公司都可以提供。其中 DMEM、RPMI 1640、MEM、DMEM/F12 都是应用最广泛的培养基。其他如 M199、IMDM、L15 培养基等也用于某些细胞的培养。

◆ MEM 是由 Eagle's 基础培养基 (BME) 发展而来的,其中增加了组分的范围及浓度。

◆ Dulbecco 改良的 BEM (DMEM) 培养基是为小鼠成纤维细胞设计的,现在常用于贴壁细胞的培养。DMEM 的氨基酸浓度是 MEM 的两倍,维生素浓度是 MEM 的 4 倍,采用双倍的 HCO_3^- 和 CO_2 浓度起到更好的缓冲作用。最初的配方中葡萄糖含量为 1 000 mg/L,后来为了某些细胞的生长需要,将葡萄糖含量又调整为 4 500 mg/L,这就是大家常说的低糖和高糖了。

◆ aMEM 含有附加的氨基酸、维生素以及核苷和脂肪酸,它可广泛应用于各种细胞类型,包括对营养成分要求苛刻的细胞。

◆ Ham's F12 是为在低血清浓度下克隆 CHO 细胞而设计的,现在也广泛应用于克隆形成率的分析及原代培养。F12 还可以与 DMEM 等体积混合使用,得到一种高浓度与成分多样化相结合的产物,这种培养基已应用于许多原代培养及更难养的细胞系的培养。

◆ RPMI 1640 培养基是专为淋巴细胞培养而设计的,现在已广泛应用于悬浮细胞的培养。

实验中的小 tip

1. 建立某种细胞株所用的培养基应该是培养这种细胞首选的培养基。可以查阅参考文献,或在购买细胞株时咨询。

2. 其他实验室惯用的培养基不妨一试,许多培养基可以适合多种细胞。

3. 根据细胞株的特点、实验的需要来选择培养基。如小鼠细胞株多选 RPMI164。

4. 用多种培养基培养目的细胞,观察其生长状态,可以用生长曲线、集落形成率等指标判断,根据实验结果选择最佳培养基,这是最客观的方法,