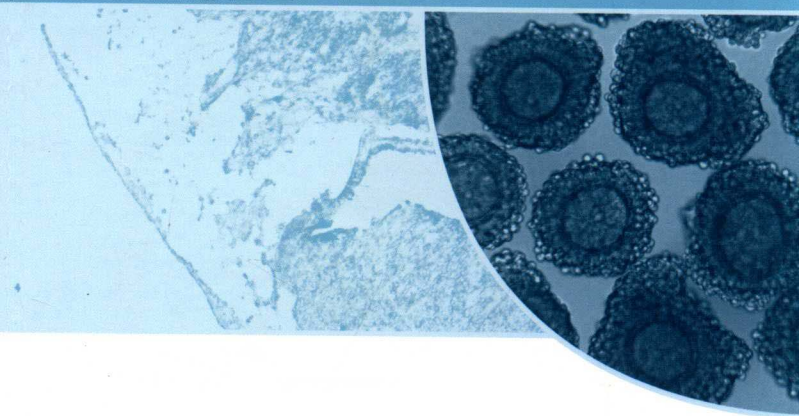


现代生命科学研究技术

(视频版)

主编 刘国琴



高等教育出版社

现代生命科学研究技术

XIANDAI SHENGMING KEXUE YANJIU JISHU

(视频版)

主 编 刘国琴

副主编 杨海莲 曹勤红 吴晓岚

编 导 (按姓氏拼音排序)

曹勤红 陈艳梅 陈智忠 韩玉珍 李秋艳 李 媛 李赞东
李 湊 刘佳利 毛同林 田杰生 王保民 王 毅 王 颖
王幼群 吴 玮 杨永青 张美佳 张晓燕 张学琴 张永亮
赵要风 朱 蕾

视频制作 纪晓峰

策划团队 中国农业大学生物学院教学中心

中国农业大学国家级生命科学实验教学中心

出品单位 中国农业大学生物学院

协助单位 植物生理学与生物化学国家重点实验室

农业生物技术国家重点实验室

高等教育出版社·北京

内容简介

《现代生命科学研究技术》(视频版)是由中国农业大学生物学院教学中心组织,由“植物生理学与生物化学国家重点实验室”和“农业生物技术国家重点实验室”40余名科研一线骨干教师和高年级博士研究生自编、自导、自演,历经两年完成的。

本书涉及从组织到细胞,从基因到蛋白质,从动植物到微生物,从体内到体外的30余项生命科学研究关键技术,包括免疫荧光标记、共聚焦激光扫描、基因定向敲除、凝胶阻滞、突变体筛选、免疫共沉淀、病毒侵染分子检测、胞质内单精子注射显微受精、胚胎体外培养、酵母双杂交、双分子荧光标记等,代表了现代生命科学研究技术水平。

本书将技术环节、要点和难点如实呈现,不仅有实际操作录像、现场解说(关键步骤还有文字标注),同时配套文字实验指导。上述内容收录于与本书配套的数字课程中,供生命科学研究领域的教师和学生参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

现代生命科学研究技术:视频版/刘国琴主编. --
北京:高等教育出版社,2014.9
ISBN 978-7-04-040753-2

I. ①现… II. ①刘… III. ①生命科学-高等学校-教材 IV. ①Q1-0

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第182313号

策划编辑 赵晓媛

责任编辑 赵晓媛 李融

封面设计 姜磊

责任印制 韩刚

出版发行	高等教育出版社	咨询电话	400-810-0598
社址	北京市西城区德外大街4号	网址	http://www.hep.edu.cn
邮政编码	100120		http://www.hep.com.cn
印刷	涿州市星河印刷有限公司	网上订购	http://www.landrac.com
开本	787mm×1092mm 1/32		http://www.landrac.com.cn
印张	3.25	版次	2014年9月第1版
字数	180千字(含数字课程)	印次	2014年9月第1次印刷
购书热线	010-58581118	定价	68.00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 40753-00

数字课程 (基础版)

现代生命科学 研究技术 (视频版)

主编 刘国琴

登录方法:

1. 访问 <http://abook.hep.com.cn/40753>
2. 输入数字课程用户名 (见封底明码)、密码
3. 点击“进入课程”

使用本账号如有任何问题

请发邮件至: lifescience@pub.hep.cn

现代生命科学研究技术 (视频版)

主编 刘国琴

用户名 密码 验证码 7392 进入课程

内容介绍

纸质教材

版权信息

联系方式

本数字课程与《现代生命科学研究技术》(视频版)配套使用,内容包括书中30余项技术的实际操作录像和文字实验指导等,以便生命科学研究领域的教师和学生参考使用。

高等教育出版社

<http://abook.hep.com.cn/40753>

前 言

生命科学在快速发展,新理论、新知识、新技术不断涌现。生命科学研究早已不是依靠单一技术就能解决问题的时代,无论研究动物、植物还是微生物,都需要综合利用现代研究技术,从不同层次、不同角度进行综合分析,例如从个体、组织观察到细胞特异性标记,从生物化学分析到目的基因操作,从蛋白质结构比较到分子互作关系,等等。生命科学是实验性科学,先进实验技术的准确操作往往是取得重要创新成果的关键。在整个研究的过程中,技术细节往往决定成败。

近十年来,随着国家对生命科学研究投入的不断加大,国外优秀人才被大批引进,我国生命科学研究进入到一个新阶段。一方面,很多高校、科研院所,科研经费充裕,科研仪器现代化,实验技术先进,研究人员数量可观,呈现“欣欣向荣”的景象;另一方面,学术骨干们忙于追踪科学前沿、申请科研课题、搭建科研平台、指导学位论文,处于高强度的工作漩涡中,而高水平实验技术人员匮乏,研究主体多是新入行的学生而非技术娴熟的专业人员。上述状况会直接影响科研室精细化管理,导致实验技术交流、应用和准确传承的不畅。这不仅极易造成科研经费的无谓浪费,更会严重影响科研成果的产出水平和人才培养的质量。

为了促进生命科学研究成果的产出和高水平专门人才的培养,中国农业大学生物学院教学中心联合“植物生理学与生物化学国家重点实验室”和“农业生物技术国家重点实验室”,从20多个优秀研究生导师的实验室筛选了30余项现代生命科学研究技术,组织40余名科研

第一线教师和高年级博士研究生,通过自编、自导、自演,编成《现代生命科学研究技术》(视频版)一书,将技术环节、要点和难点如实呈现,不仅有实际操作录像、现场解说、关键步骤文字标注,同时配套文字实验指导。生命科学不同领域的研究技术在细胞、蛋白质、基因、分子互作等水平上具有共性和借鉴性,相信本书在传承实验技术的同时,还能使低年级研究生和提前进入实验室实习的本科生们得到及时、具象的指导,也给生命科学科研工作者们带来帮助。

《现代生命科学研究技术》(视频版)具有以下特点:

(1)以视频为主,具象指导性强。35项视频,每项时长6~20分钟,共计500分钟左右。每项都配套文字实验指导,详细说明试剂配置条件、操作注意事项及参考文献出处等。读者可通过登录本书配套的数字课程网站,在线观看学习所有视频,并下载、打印相关文档。

(2)研究技术先进,适用性强。技术类别分为组织细胞水平、蛋白质水平、核酸水平、分子互作和其他技术5部分,包括免疫荧光标记、共焦激光扫描、基因定向敲除、凝胶阻滞、突变体筛选、免疫共沉淀、病毒侵染分子检测、胞质内单精子注射显微受精、胚胎体外培养、酵母双杂交、双分子荧光标记等(详见本书目录),代表了现代生命科学研究技术水平。技术层次从组织到细胞,从基因到蛋白质,从动植物到微生物,从体内到体外,适用范围广。

(3)技术可靠,操作规范。参与本书编制的40多位科研第一线教师和高年级博士研究生多为国家重点实验室科研骨干,学术水平高,技术操作准确娴熟。

(4)专业制作,视频质量高。现场拍摄和后期制作均由影视专业人员完成,确保了系列视频质量和格式的规范统一。

《现代生命科学研究技术》(视频版)的制作完成,得到国家自然科学基金“国家基础科学人才培养基金”项目(J1103520)、教育部“高等学校专业综合改革试点”项目和中国农业大学“985 工程研究生课程建设”项目的资助,更得益于中国农业大学生物学院勤于奉献的科研骨干和教师队伍,以及“植物生理学与生物化学国家重点实验室”、“农业生物技术国家重点实验室”的协助,在此表示衷心感谢!

本书编写和制作历经两年,生物学院教学中心从初始立项到项目筛选,从规范脚本到实验指导编写,从现场拍摄到后期制作,从视频审核到文字审稿,做了大量组织、指导和审核工作。尽管如此,视频或文字实验指导难免存在一些错误,竭诚希望广大观者和读者批评指正。

编 者

2013 年 3 月于北京

目 录

1 组织细胞水平

- 1.1 膜片钳技术——拟南芥花粉原生质体全细胞钾电流记录/王毅 等/3
- 1.2 拟南芥根尖细胞微管的免疫荧光标记技术/朱蕾/5
- 1.3 拟南芥气孔运动调控实验技术/陈智忠 等/7
- 1.4 小鼠卵母细胞体外培养技术/张美佳 等/9
- 1.5 猪体细胞核移植技术/李秋艳 等/11
- 1.6 胞质内单精子注射显微受精技术/李秋艳 等/13
- 1.7 禽类胚胎体外培养技术/李赞东 等/14
- 1.8 玉米根尖薄壁细胞过氧化物酶的电镜免疫金标定位技术/王幼群 等/17
- 1.9 免疫组织化学技术检测植物激素/王保民 等/19
- 1.10 拟南芥雌配子体发育进程的观察/张学琴 等/22
- 1.11 拟南芥花药发育的形态学观察/张学琴 等/26
- 1.12 拟南芥胚胎发育的形态学观察/张学琴 等/28

2 蛋白质水平

- 2.1 蛋白质结晶技术/吴玮 等/33
- 2.2 磷酸化蛋白质组学研究技术/陈艳梅 等/37
- 2.3 使用基质辅助激光解离质谱法分析蛋白质酶解样品/李溱 等/40
- 2.4 蛋白质双向电泳技术/王颖 等/43
- 2.5 蛋白质聚丙烯酰胺凝胶银染技术/李媛/45
- 2.6 猪脑微管蛋白的纯化/毛同林 等/47
- 2.7 利用荧光蛋白 LUC 筛选拟南芥突变体/杨永青 等/48
- 2.8 病毒的侵染性及其分子检测技术/张永亮 等/51
- 2.9 利用全内角反射荧光显微镜(TIRFM)观察微管的动态变化/毛同林 等/54

3 核酸水平

- 3.1 动物组织原位杂交技术/刘佳利 等/59
- 3.2 基因的定向敲除技术/王颖 等/61
- 3.3 利用氯化铯密度梯度离心法纯化质粒/杨永青 等/65
- 3.4 mRNA 降解动态分析实验技术/韩玉珍 等/67
- 3.5 利用 DNA 印迹方法验证转基因阳性小鼠/赵要风 等/68

4 分子互作

- 4.1 利用 Pull-down 技术分析蛋白质间的相互作用/李媛/73
- 4.2 酵母双杂交验证蛋白质间的相互作用/张晓燕 等/75
- 4.3 蛋白质凝胶阻滞实验技术(化学发光法)/陈智忠 等/78
- 4.4 利用双分子荧光互补技术验证蛋白质间的相互作用/
张晓燕 等/79
- 4.5 染色质免疫沉淀技术/陈智忠 等/82
- 4.6 利用凝胶阻滞实验(EMSA)分析蛋白与 DNA 底物的结
合特性/曹勤红 等/83

5 其他技术

- 5.1 发酵法制备生物塑料——聚羟基烷酸/田杰生 等/87
- 5.2 代谢组学样品的制备与分析/李溱 等/90

1 组织细胞水平

1.1 膜片钳技术——拟南芥花粉原生质体全细胞钾电流记录

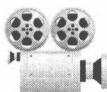
膜片钳技术(patch clamp technique)由德国马普生物物理研究所的 Erwin Neher 和 Bert Sakmann 在 1976 年创立。该技术的出现极大推动了生物膜离子通道的研究。膜片钳技术可测量多种离子通道电流,其值可小到 pA (10^{-12} A)级,已达到当今电子测量的极限。这两位科学家也因此而获得了 1991 年诺贝尔生理学或医学奖。膜片钳技术利用玻璃微电极与生物膜封接来测量生物膜上的微弱电信号。测量时,尖端处理过的微电极与细胞膜发生紧密接触,其封接阻抗达到吉欧姆($G\Omega$)以上,使微电极尖端下的细胞膜片在电学特性上与其他细胞膜分离。

为了测量离子通道电流或跨膜电压,必须将生物膜片钳制于某一固定的电位或电流上,因此称之为膜片钳技术。膜片钳可以使用电流钳技术或电压钳技术分别测量跨膜的电位和电流。电流钳技术是通过向细胞内注射恒定或变化的电流刺激,记录由此引起的膜电位变化。而电压钳技术是通过向细胞内注射一定的电流,抵消离子通道开放时所产生的离子流,从而将细胞膜电位固定在某一数值。由于注射电流的大小与离子通道产生的离子流大小相等、方向相反,因此它可以反映通道离子流的大小与方向。

膜片钳技术最早应用在动物神经细胞和肌细胞电生

理活动的研究上。现在,该技术已经广泛应用于各类细胞(包括植物细胞、微生物细胞等)和生物膜,并成为研究生物膜上各类离子通道活性和分子调控机制的重要手段。膜片钳技术发展到今天,已经成为现代电生理学研究的常规方法,并在生物医学、细胞生物学、生理学等研究领域发挥着重要作用。

本实验采用膜片钳技术,以拟南芥花粉为实验材料,对花粉原生质体的全细胞钾离子电流进行记录。



技术视频

10分26秒



实验指导

王 毅 沈立珂

中国农业大学生物学院

植物生理学与生物化学国家重点实验室

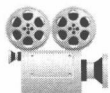
1.2 拟南芥根尖细胞微管的免疫荧光标记技术

免疫荧光标记技术 (immunofluorescent labeling technique) 是将已知的抗体或抗原分子标记上荧光素, 当其与相对应的抗原或抗体起反应时, 形成的复合物上就带有一定量的荧光素, 在荧光显微镜下可以直接观察呈现特异荧光的抗原抗体复合物及其存在部位。

荧光抗体标记方法分为直接法和间接法两种, 本实验中使用的方法是间接免疫荧光标记。间接免疫荧光标记检测过程分为两步: 第一步, 将待检测抗体(一抗)加在含有已知抗原的标本片上作用一定时间, 洗去未结合的抗体; 第二步, 滴加荧光素标记的抗抗体。如果第一步中的抗原抗体已发生结合, 此时加入的标记抗抗体就和已固定在抗原上的抗体(一抗)分子结合, 形成抗原-抗体-标记抗抗体复合物, 并显示特异荧光。此方法的优点是敏感度高, 并且无需特意制备一种荧光素标记的抗球蛋白抗体, 就可用于检测同种动物的多种抗原抗体系统。

微管骨架在植物生长发育过程中起重要作用, 细胞生物学研究中经常需要观察检测细胞骨架的状态和组织排列情况。免疫荧光标记技术是常用的观察植物细胞微管骨架结构的方法。

本实验采用间接免疫荧光标记技术, 以拟南芥根为实验材料, 观察植物细胞微管骨架。



技术视频

10 分 55 秒



实验指导

朱 蕾

中国农业大学生物学院

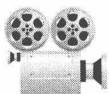
植物生理学与生物化学国家重点实验室

1.3 拟南芥气孔运动调控实验技术

植物激素脱落酸(abscisic acid, ABA)不仅影响植物的种子萌发、根生长、植物开花和种子成熟过程,而且在植物适应干旱、盐等逆境胁迫方面也起着重要的作用,被称为植物的一种“逆境激素”。干旱胁迫是植物生长发育过程中受到的主要逆境胁迫之一,严重影响了农作物的产量。植物叶片表面的保卫细胞,通过控制气孔的开度大小,调控植物的蒸腾作用、对 CO₂ 的吸收和 O₂ 的释放过程,在植物适应干旱胁迫中起着重要的作用。当植物受到干旱胁迫时,植物激素 ABA 会诱导植物气孔关闭,使植物降低蒸腾作用,以适应干旱胁迫。

本实验利用拟南芥野生型(Col-O,简称 WT)和 ABA 信号相关突变体(*ghr1*,简称 MT)为实验材料,按照 ABA 诱导植物气孔运动的原理,分别对拟南芥野生型和 ABA 信号相关突变体叶片的气孔进行 ABA 处理,通过光学显微镜观察二者气孔运动对 ABA 的反应情况。这是目前国际上研究 ABA 诱导拟南芥气孔关闭信号过程的常规方法之一,具有操作简便、结果直观、数据统计容易等特点,被大家广泛采用。

本实验采用拟南芥气孔运动调控实验技术,以拟南芥野生型和 ABA 相关突变体为实验材料,以实现比较分析二者气孔关闭过程中对 ABA 信号反应差异性的目的。



技术视频

9 分 43 秒



实验指导

陈智忠 华德平

中国农业大学生物学院

植物生理学与生物化学国家重点实验室