

现代生物技术译丛

# 分子医学技术

[德] F.希尔德布兰特 著  
[美] P.伊格莱西

林建银 郑志竑 译  
章涛 林玲 黄勤

科学出版社

2001

## 内 容 简 介

迄今,分子生物学技术已应用到现代生物医学研究的各个领域,并正渗透到诊断甚至治疗之中。本实验室手册是为那些已经开始或正计划使用分子生物学技术并需要可靠的实验室工作方案的研究人员而设计。它也是分子医学基础课程教学的一本理想工具书。

本手册涉及直接用于实验室的 DNA 和 RNA 的提纯、分离、标记、杂交、测序和酶学修饰、聚合酶链式反应、克隆、文库以及蛋白质技术等广泛主题,对分子生物学理论背景的详尽描述也使作为这些技术基础的原理得以充分理解。全书条理清晰,设计新颖,行文流畅。

Translation from the English language edition

*Techniques in Molecular Medicine*

edited by Friedhelm Hildebrandt and Peter Igarashi

Copyright ©Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1999

All Rights Reserved

图字 01-2000-0839

图书在版编目 (CIP) 数据

分子医学技术/[德]希尔德布兰特(Hildebrandt, F.), [美]伊格莱西(Igarashi, P.)著;林建银等译. -北京:科学出版社, 2000.9  
(现代生物技术译丛)

ISBN 7-03-008441-1

I. 分… II. ①希… ②伊… ③林… III. 分子生物学-生物工程: 医学工程 IV. R318

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 06467 号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号  
邮政编码: 100717

新蕾印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2000 年 9 月第 一 版 开本: 787 × 1092 1/16  
2001 年 6 月第二次印刷 印张: 19 插页: 2  
印数: 3 001—6 000 字数: 428 000

定价: 45.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈新欣〉)

## 译者序

分子医学是新兴学科,它在分子水平上研究人类疾病的发生、发展、诊断和治疗,从本质上掌握疾病的规律及其根本性的防治策略。它是 20 世纪末医学研究最活跃的领域之一,新理论、新技术层出不穷。由 F.希尔德布兰特和 P.伊格莱西主编的《分子医学技术》一书是一部集分子医学最新技术的基本原理和操作方法之大成的工具书。全书共 24 章,囊括了直接用于实验室的 DNA 和 RNA 的提纯、分离、标记、杂交、测序和酶学修饰、聚合酶链式反应、克隆、文库以及蛋白质技术等当今分子医学的主要技术。本书内容新颖、丰富、实用。

我们组织翻译这本书,主要为我国从事基础和临床医学的工作者提供参考,以推动分子医学学科的迅速发展。本书的翻译工作由我主持,郑志竑、章涛、林玲和黄勤四位同事共同承担,胡建石和朱进伟同志帮助文字录入。我们同心协力,夜以继日,辛勤工作,在短期内完成了这部译著。在此,谨向鼓励、支持和帮助我们所有专家学者以及科学出版社的马学海博士及其同仁表示衷心感谢。

这部译著因时间紧迫,作者水平有限,疏忽与错漏在所难免,恳请同行专家和读者批评指正,万分感谢。

林建银

2000 年 7 月于福州

## 前 言

标准的分子生物学技术广泛地用于生物医学研究,并对生理过程和疾病机制的理解有较大的影响。它们在分子遗传学诊断和新的治疗方法中也起着越来越大的作用。

这本实验室手册是为那些在实验室工作中需要可靠方案的研究人员设计的,它提供了循序渐进的分子生物学标准方法。本手册广泛收入了直接用于实验室的方案,涉及DNA和RNA的提纯、分离、标记、杂交、测序和酶学修饰、聚合酶链式反应、克隆、文库以及蛋白质技术等主题。

本手册以作者所教的分子生物学技术实用课程的经验为基础。因为分子生物学的大多数方法是在试管中重演细胞中自然发生的机制,所以前三章阐述了分子生物学的基本机制。对这些基本机制了解得越多,就能够使研究人员据其掌握的知识,更准确地应用这些技术。我们希望,使用者能发现这本手册对指导他们获得真知灼见大有裨益。

F.希尔德布兰特

1999年春于 Freiburg

# 目 录

## 译者序

## 前言

## 第一篇 分子生物学技术

### 第 1 章

#### 人类基因组的结构和功能

FRIEDHELM HILDEBRANDT ..... ( 3 )

### 第 2 章

#### DNA 与 RNA 的酶修饰

KAI-OLAF NETZER ..... ( 20 )

亚方案 1:限制性内切核酸酶 ..... ( 20 )

亚方案 2:外切核酸酶,其他核酸酶和连接酶 ..... ( 26 )

亚方案 3:磷酸酶-牛小肠碱性磷酸酶反应 ..... ( 28 )

亚方案 4:激酶 ..... ( 29 )

亚方案 5:DNA 依赖的 DNA 聚合酶——大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 和 Klenow 酶 ..... ( 30 )

亚方案 6:T4 和 T7 DNA 聚合酶 ..... ( 32 )

亚方案 7:依赖 RNA 的 DNA 聚合酶 ..... ( 33 )

亚方案 8:依赖 DNA 的 RNA 聚合酶 ..... ( 36 )

亚方案 9:末端脱氧核苷酸转移酶(TdT) ..... ( 37 )

### 第 3 章

#### 真核生物细胞核酸的纯化

HANS GERD NOTHWANG 和 FRIEDHELM HILDEBRANDT ..... ( 39 )

亚方案 1:核酸提取 ..... ( 39 )

亚方案 2:哺乳动物细胞基因组 DNA 的分离 ..... ( 43 )

亚方案 3:胞质 RNA 分离 ..... ( 46 )

亚方案 4:硫氰酸胍/酚/氯仿/提取,快速制备总 RNA ..... ( 49 )

亚方案 5:poly(A)<sup>+</sup> RNA 制备 ..... ( 51 )

**第 4 章****DNA 和 RNA 片段电泳**

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| FENG QIAN 和 GREGORY G. GERMINO ..... | ( 54 ) |
| 亚方案 1: DNA 片段的回收 .....               | ( 56 ) |
| 亚方案 2: RNA 电泳 .....                  | ( 58 ) |

**第 5 章****单链构象多态性(SSCP)分析**

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| FENG QIAN 和 GREGORY G. GERMINO ..... | ( 61 ) |
|--------------------------------------|--------|

**第 6 章****变性梯度凝胶电泳(DGGE)**

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| KAI-OLAF NETZER ..... | ( 64 ) |
|-----------------------|--------|

**第 7 章****脉冲场凝胶电泳导言(PFGE)**

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| FENG QIAN 和 GREGORY G. GERMINO ..... | ( 72 ) |
|--------------------------------------|--------|

**第 8 章****脉冲场凝胶电泳:方案**

|                                                                                |        |
|--------------------------------------------------------------------------------|--------|
| GUDRUN A. RAPPOLD, KARIN RIED, ALBRECHT KLINK, ERCOLE RAO 和 BIRGIT WEISS ..... | ( 78 ) |
| 亚方案 1: 高分子量 DNA 琼脂糖凝胶块制备和加工 .....                                              | ( 79 ) |
| 亚方案 2: 大小标志物的制备 .....                                                          | ( 80 ) |
| 亚方案 3: 琼脂糖凝胶块中 DNA 的限制性内切酶消化 .....                                             | ( 82 ) |
| 亚方案 4: 凝胶电泳 .....                                                              | ( 83 ) |

**第 9 章****DNA 及 RNA 探针的放射性标记**

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| PETER IGARASHI .....             | ( 87 ) |
| 亚方案 1: T4 多核苷酸激酶末端标记 .....       | ( 87 ) |
| 亚方案 2: 应用激酶交换反应的末端标记 .....       | ( 89 ) |
| 亚方案 3: 末端转移酶标记 3' 末端(正向反应) ..... | ( 89 ) |
| 亚方案 4: 随机引物标记 .....              | ( 90 ) |
| 亚方案 5: 核糖核酸探针 .....              | ( 92 ) |

**第 10 章****杂交技术(Southern 和 Northern 印迹法)**

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| KAI-OLAF NETZER .....     | ( 97 ) |
| 亚方案 1 : DNA 斑点印迹的制备 ..... | ( 99 ) |

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| 亚方案 2: 基因组 DNA Southern 印迹的制备 ..... | ( 100 ) |
| 亚方案 3: DNA 印迹杂交 .....               | ( 103 ) |
| 亚方案 4: RNA 斑点印迹的制备 .....            | ( 106 ) |
| 亚方案 5: Northern 印迹的制备 .....         | ( 107 ) |
| 亚方案 6: RNA 印迹杂交 .....               | ( 109 ) |
| 亚方案 7: 从杂交膜上除去探针 .....              | ( 111 ) |

## 第 11 章

### 荧光原位杂交用于细胞遗传学分析的标本制备技术

|                                                                      |         |
|----------------------------------------------------------------------|---------|
| STEFAN JOOS, MARTIN BENITZ, ANTON H. N. HOPMAN 和 PETER LICHTER ..... | ( 112 ) |
| 亚方案 1: 血淋巴细胞培养 .....                                                 | ( 113 ) |
| 亚方案 2: 血淋巴细胞中期相染色体和间期相核的制备 .....                                     | ( 113 ) |
| 亚方案 3: 血淋巴细胞的胃蛋白酶消化 .....                                            | ( 114 ) |
| 亚方案 4: 成纤维细胞进行荧光标记原位杂交的标本制备(贴壁生长细胞) .....                            | ( 115 ) |
| 亚方案 5: 血涂片的处理 .....                                                  | ( 116 ) |
| 亚方案 6: 骨髓涂片 .....                                                    | ( 116 ) |
| 亚方案 7: 临床实体瘤标本: 用多聚 L-赖氨酸预处理载玻片 .....                                | ( 117 ) |
| 亚方案 8: 实体瘤单细胞悬液的制备 .....                                             | ( 118 ) |
| 亚方案 9: 冰冻切片的制备 .....                                                 | ( 120 ) |
| 亚方案 10: 石蜡包埋组织切片 .....                                               | ( 120 ) |

## 第 12 章

### 荧光原位杂交的染色体分析

|                                                  |         |
|--------------------------------------------------|---------|
| MARTIN BENITZ, STEFAN JOOS 和 PETER LICHTER ..... | ( 125 ) |
| 亚方案 1: 标本的制备 .....                               | ( 127 ) |
| 亚方案 2: 缺口平移法标记探针 .....                           | ( 127 ) |
| 亚方案 3: 斑点印迹分析法检测标记物 .....                        | ( 129 ) |
| 亚方案 4: 荧光标记原位杂交探针的混合与变性 .....                    | ( 130 ) |
| 亚方案 5: 载玻片上 DNA 的变性 .....                        | ( 131 ) |
| 亚方案 6: 检测 .....                                  | ( 132 ) |
| 亚方案 7: 染色体原位抑制(CISS)杂交 .....                     | ( 133 ) |
| 亚方案 8: 信号放大 .....                                | ( 134 ) |
| 亚方案 9: 多色荧光标记原位杂交 .....                          | ( 135 ) |

## 第 13 章

### DNA 序列测定

|                                              |         |
|----------------------------------------------|---------|
| KLAUS DEICHMANN .....                        | ( 139 ) |
| 亚方案 1: 用 T7 DNA 聚合酶(Sequenase™)测序的标准方案 ..... | ( 145 ) |
| 亚方案 2: 用 Taq 聚合酶测序的标准方案 .....                | ( 147 ) |

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| 亚方案 3: 变性聚丙烯酰胺测序胶 ..... | ( 149 ) |
|-------------------------|---------|

## 第 14 章

### 聚合酶链式反应

|                                                 |         |
|-------------------------------------------------|---------|
| FRIEDHELM HILDEBRANDT 和 IVA SINGH-SAWHNEY ..... | ( 155 ) |
|-------------------------------------------------|---------|

## 第 15 章

### 克隆载体

|                                           |         |
|-------------------------------------------|---------|
| ANNETTE DEICHMANN 和 KLAUS DEICHMANN ..... | ( 169 ) |
|-------------------------------------------|---------|

|                                            |         |
|--------------------------------------------|---------|
| 亚方案 1: 用钙离子沉淀法将重组质粒转化细菌(Mandel 1970) ..... | ( 176 ) |
|--------------------------------------------|---------|

|                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| 亚方案 2: 用电穿孔将重组质粒转化细菌(Dower 1988) ..... | ( 178 ) |
|----------------------------------------|---------|

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| 亚方案 3: 重组噬菌体 DNA 转化细菌 ..... | ( 180 ) |
|-----------------------------|---------|

|                        |         |
|------------------------|---------|
| 亚方案 4: 小量制备法分离质粒 ..... | ( 182 ) |
|------------------------|---------|

|                      |         |
|----------------------|---------|
| 亚方案 5: 层析法制备质粒 ..... | ( 184 ) |
|----------------------|---------|

|                                    |         |
|------------------------------------|---------|
| 亚方案 6: 大规模制备噬菌体 DNA[复制型(RF)] ..... | ( 185 ) |
|------------------------------------|---------|

## 第二篇 基因分离和鉴定的策略

## 第 16 章

### 克隆策略: 概述

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| FRIEDHELM HILDEBRANDT ..... | ( 193 ) |
|-----------------------------|---------|

## 第 17 章

### 基因组文库

|                                            |         |
|--------------------------------------------|---------|
| LUIZ F. ONUCHIC 和 GREGORY G. GERMINO ..... | ( 196 ) |
|--------------------------------------------|---------|

## 第 18 章

### cDNA 文库

|                                            |         |
|--------------------------------------------|---------|
| LUIZ F. ONUCHIC 和 GREGORY G. GERMINO ..... | ( 205 ) |
|--------------------------------------------|---------|

## 第 19 章

### cDNA 文库筛选

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| JOHANN PETER HOSSLE ..... | ( 215 ) |
|---------------------------|---------|

|                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| 亚方案 1: $\lambda$ gt11 cDNA 文库铺平板 ..... | ( 220 ) |
|----------------------------------------|---------|

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| 亚方案 2: 杂交筛选——cDNA 序列作为探针 ..... | ( 221 ) |
|--------------------------------|---------|

|                   |         |
|-------------------|---------|
| 亚方案 3: 免疫筛选 ..... | ( 223 ) |
|-------------------|---------|

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| 亚方案 4: 噬菌体颗粒纯化, DNA 分离和亚克隆 ..... | ( 227 ) |
|----------------------------------|---------|

**第 20 章****应用蟾蜍卵母细胞的表达克隆**

DANIEL MARKOVICH, ANDREAS WERNER 和 HEINI MURER ..... ( 230 )

**第 21 章****转基因动物**

ECKART SCHOTT, MARTIN PAUL 和 DETLEV GANTEN ..... ( 237 )

**第 22 章****真核细胞中的表达：利用反转录病毒载体的基因转移**

MARTIN MARX ..... ( 250 )

亚方案 1: 插入片段的合成 ..... ( 252 )

亚方案 2: 纯化 ..... ( 252 )

亚方案 3: 插入片段与载体的连接 ..... ( 252 )

亚方案 4: *E. coli* HB101 的转染和质粒 DNA 分离 ..... ( 253 )

亚方案 5: DNA 插入片段存在性分析 ..... ( 254 )

亚方案 6:  $\phi 2$  包装细胞的转染 ..... ( 255 )亚方案 7:  $\phi$ AM 细胞的感染 ..... ( 258 )

亚方案 8: 靶细胞的感染 ..... ( 258 )

**第 23 章****定位克隆和连锁分析**

FRIEDHELM HILDEBRANDT 和 HEYMUT OMRAN ..... ( 261 )

**第三篇 蛋白质方法****第 24 章****蛋白质技术**

ROBERT F. REILLY ..... ( 273 )

亚方案 1: 体外翻译和免疫沉淀 ..... ( 273 )

亚方案 2: Western 印迹 ..... ( 278 )

专业词汇索引 ..... ( 281 )

第一篇

# 分子生物学技术



# 人类基因组的结构和功能

FRIEDHELM HILDEBRANDT

## 核酸结构

“分子生物学”一词系指**核酸生物学**。分子生物学方法是将自然发生的机制用于**体外实验**，例如转录和转化。大多数分子生物学技术基于两个基本原理：

- 核酸修饰酶的应用
- 核酸两条互补链之间的杂交（碱基配对）。

在聚合酶的帮助下，**DNA 修饰酶**通常用于特异位点（限制酶消化）切割 DNA、重组 DNA 片段（连接）或扩增和测定 DNA 序列。**杂交方法**允许人们用确定的探针通过碱基配对对感兴趣的核酸片段进行特异的选择。为检测相应的杂交片段，利用放射性或非放射性方法标记探针。

单倍体人类基因组的大小（即它的复杂度）约为  $3 \times 10^9$  个核苷酸。图 1.1 表明中期染色体电子显微镜图：用去污剂处理过的仅留下从染色体骨架散落的带有 DNA 的蛋白支架残迹。这个结构为我们在研究个体核苷酸序列时所论述的大小给了一个印象，就一条完整人染色体的结构而言，它约有  $10^8$  个核苷酸。下面，从最小结构成分——核苷酸开始讨论人类基因组结构，接着依照增加的复杂度依次描述 DNA 双螺旋结构、核小体、染色体结构和全套染色体。最后概述人类基因组的一些功能。

## 核苷酸

一个单核苷酸由一分子含氮碱基、一分子糖和一分子磷酸组成。

- 含氮碱基（图 1.2A）：嘌呤：腺嘌呤（A）；鸟嘌呤（G）；嘧啶：胞嘧啶（C）；胸腺嘧啶（T）[RNA：尿嘧啶（U）]；罕见的碱基：dA,  $m^5C$
- 糖：2'-脱氧核糖（DNA），核糖（RNA）
- 一磷酸残基，二磷酸残基，三磷酸残基

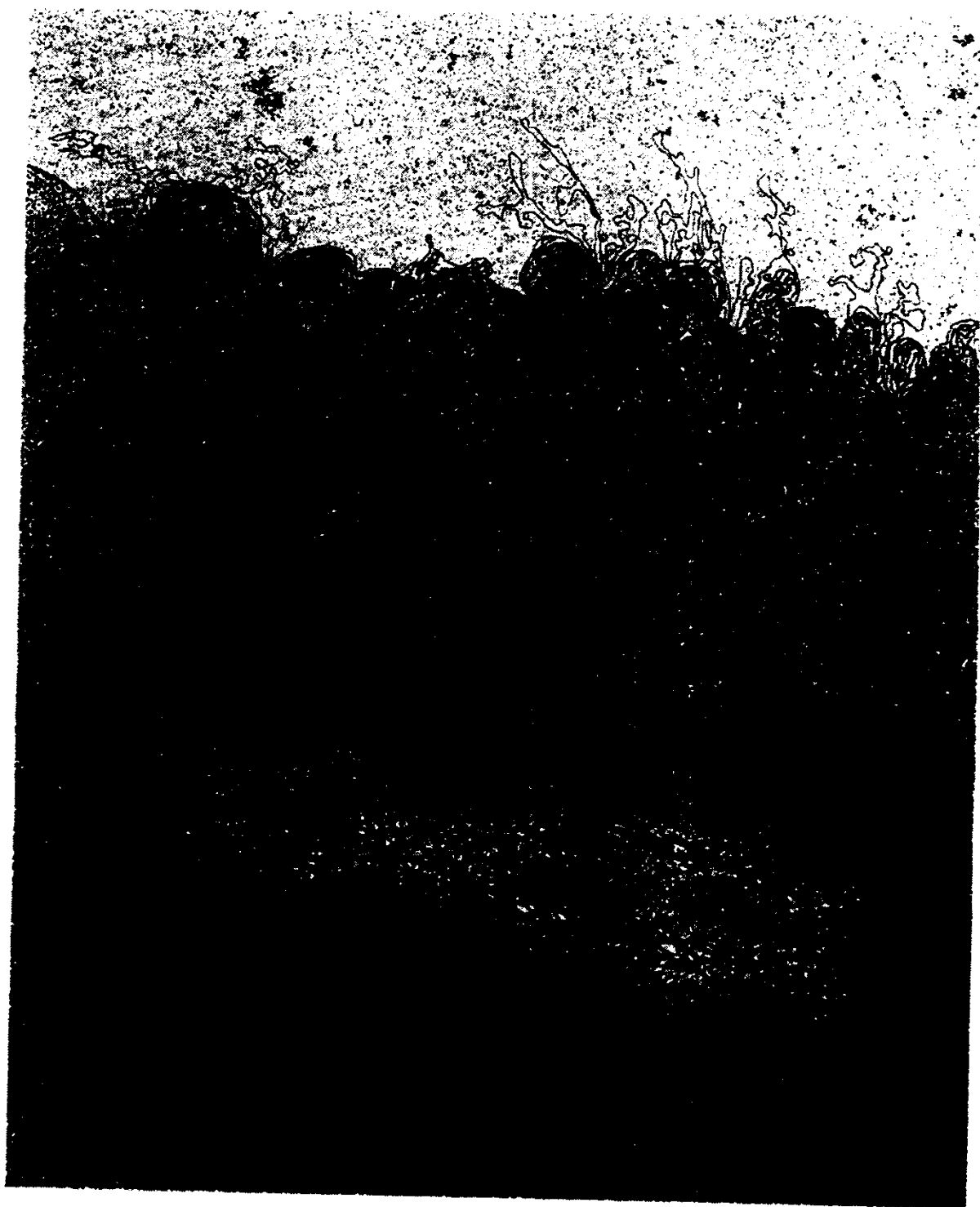


图 1.1 中期染色体的电子显微图，用去污剂处理后仅留下从染色体骨架中散落的带有 DNA 的蛋白支架残迹（从参考文献 1 修改）。

图 1.2B 表明核苷酸成分图解：含氮碱基 + 糖 = 核苷（即，腺嘌呤 + 核糖 = 腺苷）

核苷 + 磷酸 = 核苷酸 [即，腺苷 + 单磷酸 = 单磷酸腺苷 (AMP)，腺苷 + 二磷酸 = 二磷酸腺苷 (ADP)，腺苷 + 三磷酸 = 三磷酸腺苷 (ATP)]。

单核苷酸是构成核酸 (DNA、RNA) 的基本结构单位。核酸的命名见表 1.1。

表 1.1 核酸的命名

| 碱基   | 核苷 | 核苷酸 | 缩写  |      |
|------|----|-----|-----|------|
|      |    |     | RNA | DNA  |
| 腺嘌呤  | 腺苷 | 腺苷酸 | AMP | dAMP |
| 鸟嘌呤  | 鸟苷 | 鸟苷酸 | GMP | dGMP |
| 胞嘧啶  | 胞苷 | 胞苷酸 | CMP | dCMP |
| 胸腺嘧啶 | 胸苷 | 胸苷酸 |     | dTMP |
| 尿嘧啶  | 尿苷 | 尿苷酸 | UMP |      |

## DNA 一级结构

在图 1.2D 中，三磷酸分子与腺苷五碳糖的第 5 位碳原子的羟基缩水成键结合形成的三磷酸残基与另一个核苷酸戊糖环第 3 位碳原子上的羟基相互作用，并与焦磷酸裂解后的**磷酸二酯键**连接，这个过程产生能量供其反应所需。反应结果表明于图 1.2C。核酸合成从 5'端开始向 3'端进行。如惯例，核苷酸序列从左边 5'端到右边 3'端编写（图 1.2C）。在双链 DNA 中，这个规则用于上排链的编写。

## DNA 二级结构

在自然状态下，一个完整的 DNA 分子结构呈双链。Waston 和 Crick 于 1953 年提出的 DNA 二级结构为**右手双螺旋**模型，由两股反向平行的脱氧多核苷酸链组成，即两股链走向相反，一股链中的磷酸二酯键是 5'→3'走向，而另一股链中的则为 3'→5'走向（图 1.3A）。核糖与磷酸二酯键连接构成 DNA 分子的骨架，这个结构类似 2 个互相盘旋上升的楼梯。两股长链上的碱基是互补配对的。C 和 G 通过 3 个氢键连接，而 A 和 T 之间仅通过 2 个氢键连接（图 1.3A）。因为核糖和碱基之间的糖苷键实际上并不是平行排列的，所以双螺旋显示出一个**大沟**和一个**小沟**（图 1.3B）。DNA 结合蛋白，如限制酶和转录因子，主要通过与大沟相互作用识别特异的碱基（图 1.3C）。

双螺旋在水溶液中最常见的构象称 **B-DNA**（图 1.3D）。每转角有 10 个碱基对。因为碱基的糖苷键能够自由旋转，所以双螺旋会发生构象变化。在 **A 型**结构中大沟是短的，在罕见的 **Z 型**结构中，双螺旋转换为左手螺旋（图 1.3D）。DNA 的构象依赖于它的水合作用状态和核苷酸序列。不同的构象状态最可能有调节功能。扫描隧道电镜可直接观察 DNA 双螺旋（图 1.3E）。

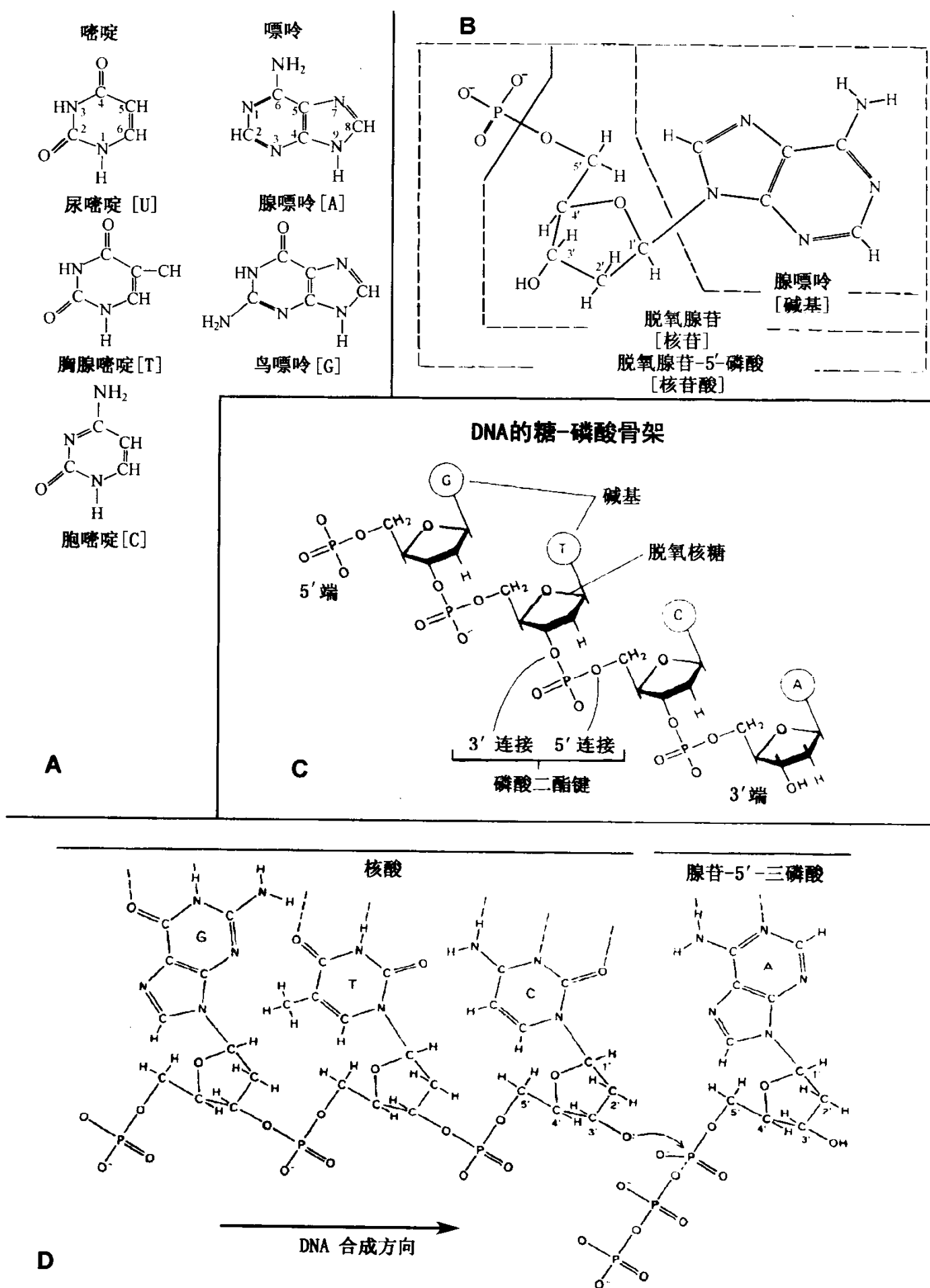


图 1.2 DNA 一级结构。详见原文 (从参考文献 1, 2 和 4 修改)。

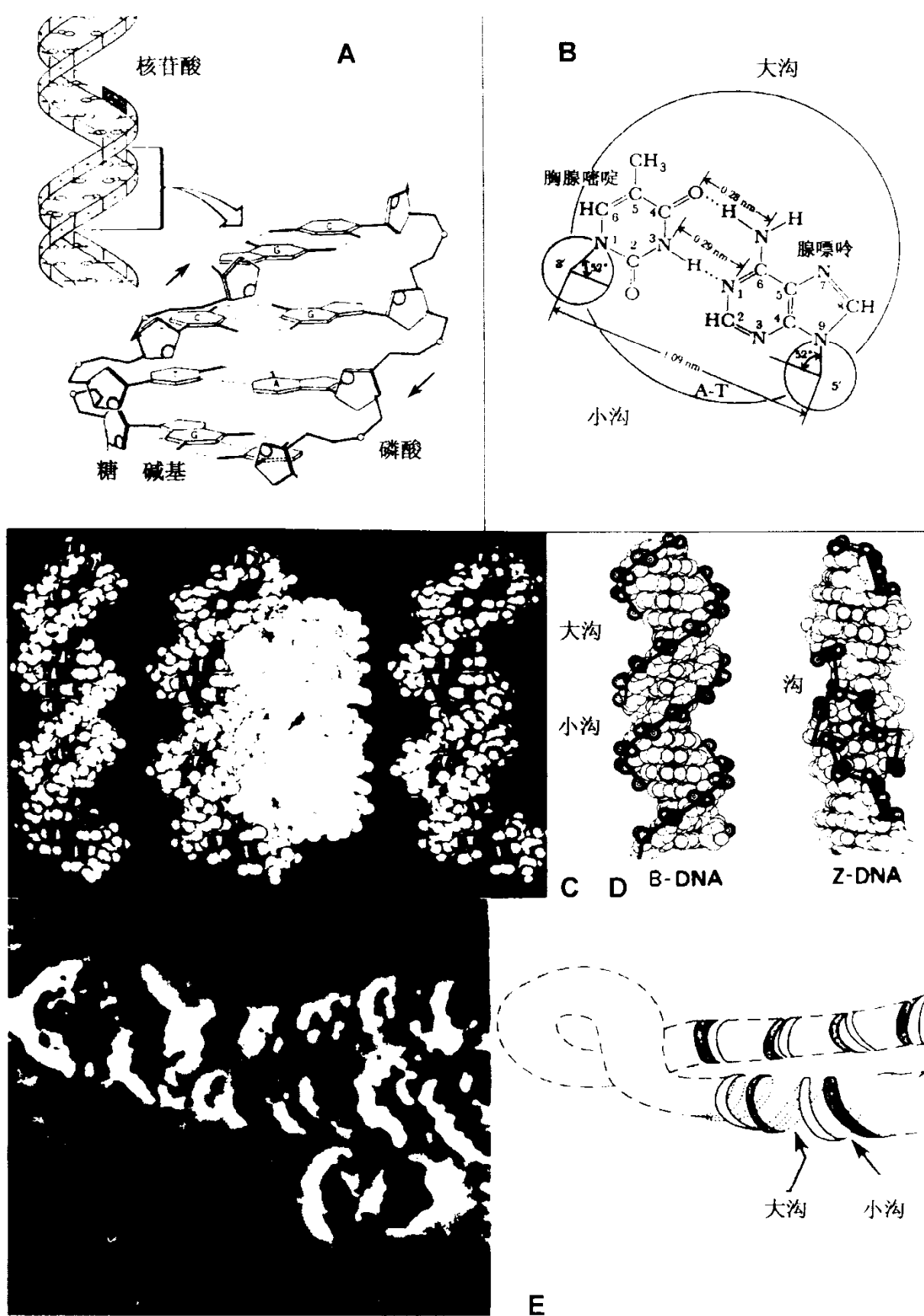


图 1.3 DNA 二级结构。详见原文（从参考文献 2、3、6 和 7 修改）。

### DNA 三级结构

如果一段双链 DNA 是未缠绕的，则超螺旋的三级结构即将出现（在普通实验中，一个过度弯曲的电话线作为超螺旋的形象例子）。图 1.4A 中，以细菌质粒的松环状双链 DNA 为例，说明负超螺旋结构。如

果质粒 DNA 被切割，导致的线状 DNA 是未缠绕的，然后两链端共价再连接，结果形成能量上最优构象：**右手超螺旋**或**左手螺旋**。大多自然状态下的 DNA 是以这种负超螺旋形式存在。如果仅单链被切割，那么负超螺旋消失并再形成松环状 DNA。这些结构的电镜图表明于图 1.4B。

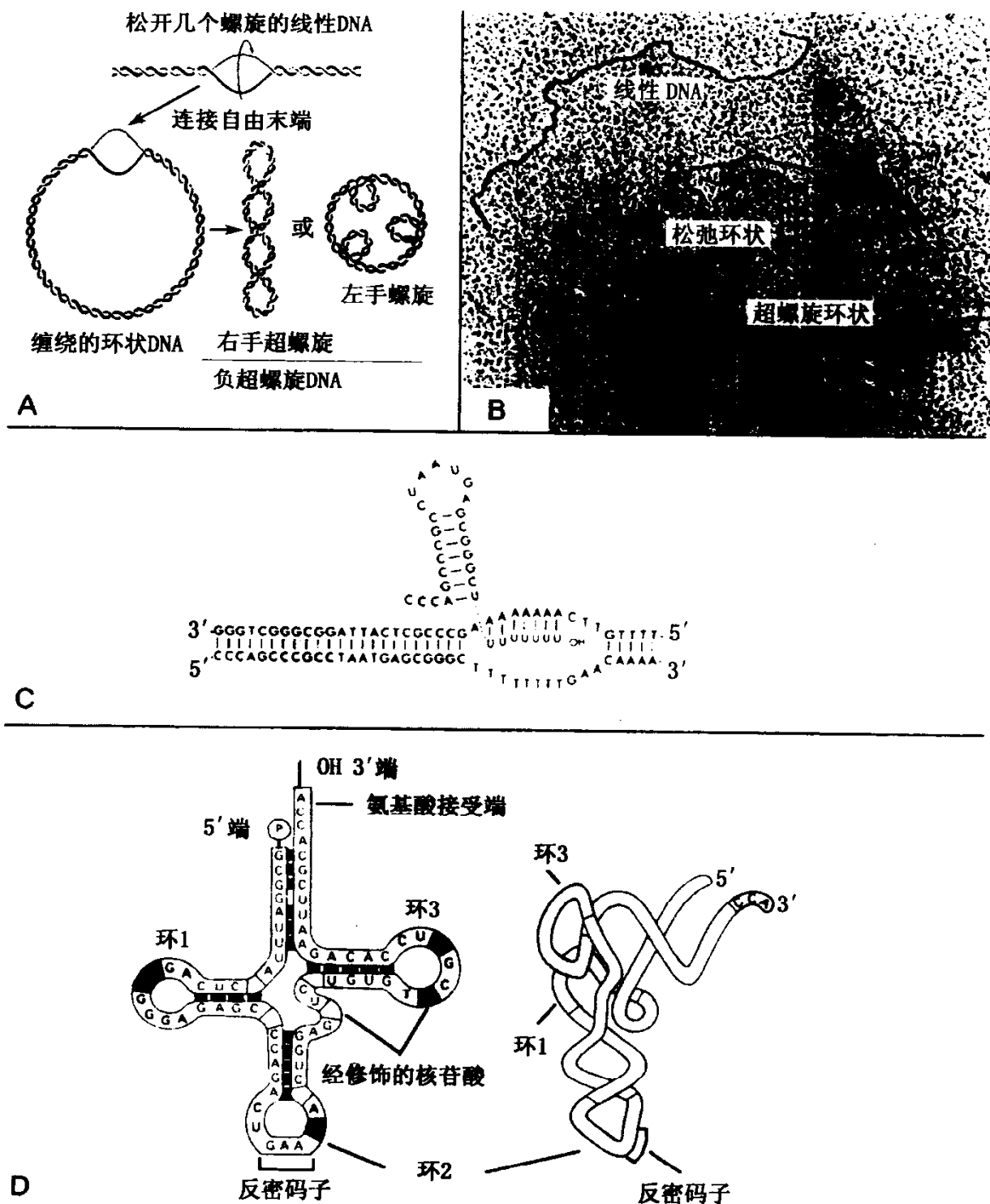


图 1.4 DNA 三级结构和转移 RNA 结构。详见原文（从参考文献 1, 2, 3, 5 修改）。

### RNA 结构

RNA 与 DNA 之间最重要的结构差异强调于表 1.2。在相同的单链核酸分子内经碱基配对 RNA（和单链 DNA）能自动形成能量上较稳定的二级结构。图 1.4C 表明 RNA 链呈“发夹”式结构的一个例子，这种结构可能现于显示二重对称的核苷酸序列中。如果一个序列跟随着逆互补