

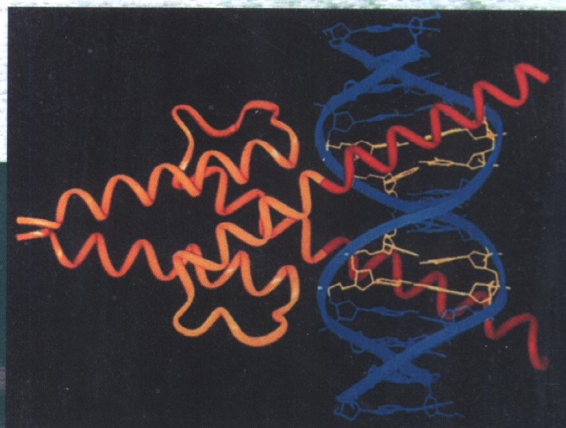
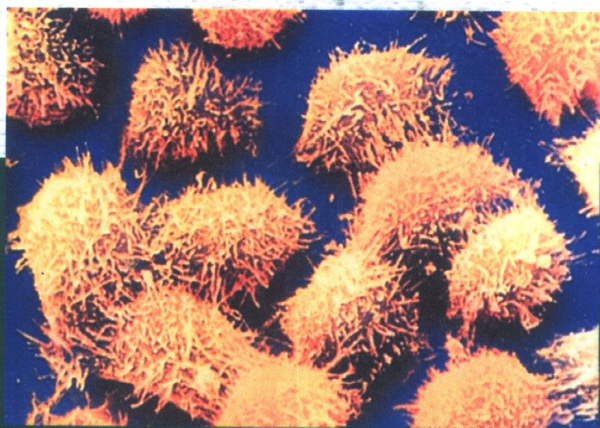
医学分子生物学

理论与研究技术

THEORY AND TECHNIQUE OF MEDICAL MOLECULAR BIOLOGY

(第二版)

温进坤 韩 梅 主编



科学出版社

医学分子生物学

理论与研究技术

THEORY AND TECHNIQUE
OF MEDICAL MOLECULAR BIOLOGY

(第二版)

温进坤 韩 梅 主编

科学出版社

2002

内 容 简 介

本书介绍分子生物学基础理论、医学分子生物学常用实验技术及其在科学研究中的应用,以及医学分子生物学发展较快的几个领域。主要内容有核酸和蛋白质分子生物学、基因克隆、分子杂交、聚合酶链反应、基因诊断、基因治疗及真核基因表达调控等方面的理论与研究技术,凋亡、细胞信息传递及原癌基因与抗癌基因细胞周期调控、干细胞、生物芯片、基因工程药物的研究现状和发展情况。

本书可供高等医学院校研究生、医学分子生物学及其相关研究领域
的研究及教学人员阅读参考。

图书在版编目(CIP)数据

医学分子生物学理论与研究技术/温进坤,韩梅主编. —2版. —北京:
科学出版社,2002.2

ISBN 7-03-009886-2

I. 医… II. ①温… ②韩… III. 医药学:分子生物学-研究 IV. R318

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 078950 号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

1999年10月上海科学普及出版社第一版

2002年2月第二版 开本:787×1092 1/16

2002年2月第一次印刷 印张:32 3/4

印数:1—5 000 字数:747 000

定价:39.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

编写人员名单

(按承担章节前后顺序)

周秀霞	韩 梅	温进坤
孙红霞	刘静芳	姜玲玲
杨学辉	刘虹彬	郑 斌
刘智敏		

绘 图

张 萌 张秋霞

前 言

20 世纪中叶, 沃森和克里克发现了 DNA 双螺旋结构, 20 年以后, Cohen 和 Boyer 实现了 DNA 的重组和转化, 1985 年 Mullis 发明了聚合酶链反应 (PCR) 技术, 这是 20 世纪分子生物学和生物技术发展中三个最伟大的里程碑, 这些基本理论的发展和实验技术的突破, 奠定了生物技术的基础, 也推动了其迅猛发展。从 DNA 的重组与转化成功开始, 分子生物学及生物技术的崛起仅有 20 年的时间, 现已几乎渗透到医学的所有领域, 促使现代医学由细胞向分子水平深入, 形成了分子生理学、分子药理学、分子病理学、分子神经学、分子毒理学、分子遗传学、分子细胞学、分子免疫学、分子微生物学、分子流行病学、分子肿瘤学、分子心脏病学、分子内分泌学等新学科。

20 世纪 70 年代兴起的分子生物学实验, 经过 80 年代和 90 年代的技术积累和迅猛发展, 为生命科学在 21 世纪获得新的突破奠定了坚实的基础。因此, 可以预见, 21 世纪将是分子生物学为代表的生命科学的世纪。我国政府已把信息科学、生命科学、材料科学列为现代科学的三大前沿学科, 而分子生物学又是生命科学技术的前沿之一。近年, 人类基因组计划的实施和飞速发展, 有可能带来医药学和生命科学的巨大革命。纵观生命科学的发展历史, 技术与方法的进步占有举足轻重的地位, 它是取得科学成果的手段, 登上科学高峰的阶梯。因此, 凡是有志于从事生命科学研究的青年学者, 都应该学习分子生物学的实验原理, 掌握分子生物学的技术方法。

本书共分 16 章, 内容包括分子生物学基础知识、医学分子生物学实验原理、常用技术及应用等, 论述了细胞凋亡、细胞信息传递、癌基因与抑癌基因、细胞周期及其调控、干细胞、生物芯片、基因工程药物、基因诊断及基因治疗等医学分子生物学发展较快的几个领域。

本书是我们在多年从事研究生医学分子生物学教学和举办七期讲习班的基础上, 对有关章节进行补充完善后撰写而成的。参编者全部是处于教学与科研工作第一线的年轻教授、博士和在读博士研究生, 他们将各自在专项分子生物学技术方面所积累的丰富实践经验, 融汇归纳于书中, 因此, 具有内容新颖、实用性强的特点。

编者

2001 年 8 月

目 录

第一章 分子生物学基础知识	(1)
第一节 核酸研究的历史	(1)
第二节 核酸的化学组成	(2)
一、核酸的基本成分	(2)
二、核酸的基本组成单位——核苷酸	(3)
第三节 DNA 的分子结构和理化性质	(4)
一、DNA 的一级结构	(4)
二、DNA 的二级结构——双螺旋结构模型	(8)
三、DNA 的三级结构	(10)
四、DNA 的理化性质及其应用	(10)
第四节 RNA 的结构特征	(13)
一、核糖体 RNA	(13)
二、转移 RNA	(14)
三、信使 RNA	(14)
第五节 DNA 的生物合成	(15)
一、DNA 复制与相关蛋白	(16)
二、反转录	(23)
三、DNA 的损伤与修复	(24)
第六节 RNA 的生物合成——基因转录及转录后加工	(26)
一、转录的方式	(26)
二、RNA 聚合酶	(26)
三、基因转录的过程	(27)
四、真核生物基因转录后加工	(30)
五、复制、转录、反转录的比较	(31)
第二章 DNA 克隆技术	(33)
第一节 基因克隆技术概论	(33)
一、基因工程诞生的历史背景	(33)
二、基因克隆的策略与技术路线	(34)
第二节 基因克隆常用的工具酶	(34)
一、限制酶	(34)
二、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (全酶)	(39)
三、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 大片段	(39)
四、T4 噬菌体 DNA 聚合酶	(39)
五、Taq DNA 聚合酶	(39)

六、反转录酶 (依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶)	(40)
七、连接酶	(40)
八、末端脱氧核苷酸转移酶	(41)
九、碱性磷酸酶	(41)
第三节 目的基因与载体的来源	(41)
一、目的基因的分离	(41)
二、基因克隆的载体	(42)
第四节 目的基因与载体的剪切	(44)
一、限制酶切割后形成黏性末端	(45)
二、形成带有平末端的 DNA 片段	(46)
三、从平末端改造成黏末端	(47)
第五节 目的基因与载体的连接	(48)
一、同源黏末端的连接	(48)
二、平末端连接	(50)
三、定向克隆	(50)
四、接头连接	(50)
五、同聚物加尾连接	(51)
第六节 重组 DNA 转化大肠杆菌	(51)
一、宿主细胞	(52)
二、转化原理	(52)
第七节 重组 DNA 克隆的筛选与鉴定	(52)
一、针对遗传表型改变的初步筛选法	(53)
二、重组 DNA 的酶切分析和鉴定	(54)
第八节 基因克隆常用的实验方法与操作	(55)
一、质粒的提取和纯化	(55)
二、利用限制酶对 DNA 进行消化	(59)
三、DNA 凝胶电泳	(59)
四、核酸片段的回收与纯化	(65)
五、核酸的定量	(68)
六、DNA 分子的连接	(68)
七、大肠杆菌感受态的制备与转化	(70)
第三章 核酸分子杂交	(72)
第一节 概述	(72)
一、核酸分子杂交的原理	(72)
二、固相支持物的选择	(73)
三、核酸分子杂交的应用	(75)
第二节 印迹技术	(75)
一、Southern 印迹	(75)
二、Northern 印迹	(78)

三、斑点及狭缝印迹	(80)
第三节 探针的标记与纯化	(81)
一、概述	(81)
二、切口平移法	(83)
三、随机引物法	(85)
四、DNA 探针的 3'端标记	(87)
五、DNA 探针的 5'端标记	(90)
六、非放射性标记法	(92)
七、探针的纯化	(93)
第四节 固-液相杂交	(94)
一、杂交体系的建立	(94)
二、杂交过程	(96)
三、非放射性标记探针杂交	(98)
四、杂交信号的检测	(98)
五、滤膜的重复使用	(100)
第五节 核酸的制备	(101)
一、真核细胞 DNA 的制备	(101)
二、真核细胞 RNA 的制备	(103)
第四章 聚合酶链反应的原理及应用	(106)
第一节 PCR 技术的原理及基本操作	(106)
一、PCR 技术的基本原理	(106)
二、PCR 基本操作	(107)
第二节 PCR 体系中的各种组分	(108)
一、PCR 的缓冲液	(108)
二、底物 (脱氧核糖核苷三磷酸 dNTP)	(108)
三、 <i>Taq</i> DNA 聚合酶	(109)
四、引物	(110)
五、模板核酸	(112)
六、石蜡油	(112)
第三节 PCR 模板的制备	(112)
一、细菌和病毒标本的制备	(113)
二、血液或细胞标本的制备	(114)
三、临床拭子标本 DNA 的提取	(118)
四、固定和包埋的组织标本模板制备	(119)
五、凝胶中 PCR 产物的再扩增标本制备法	(120)
第四节 PCR 条件的优化	(121)
一、温度循环参数	(121)
二、其他因素	(122)
三、PCR 仪	(123)

四、PCR 扩增的自限性	(123)
五、PCR 扩增的忠实性	(123)
六、PCR 污染的对策	(124)
第五节 PCR 扩增产物的分析	(125)
一、凝胶电泳分析法	(125)
二、斑点杂交分析法	(125)
三、微孔板杂交法	(126)
四、PCR-ELISA 法	(127)
五、PCR-EIA 法	(128)
六、PCR-DLA 法	(128)
第六节 反转录 PCR	(129)
一、原理	(129)
二、方法	(129)
三、影响反转录反应的因素	(130)
四、应用	(131)
第七节 PCR 相关技术的发展	(131)
一、锚定 PCR	(131)
二、反向 PCR	(132)
三、不对称 PCR	(132)
四、多重 PCR	(132)
五、定量 PCR	(132)
六、原位 PCR	(133)
第八节 PCR 技术的应用	(134)
一、PCR 技术在分子生物学中的应用	(134)
二、PCR 技术在医学中的应用	(135)
三、PCR 技术在法医学中的应用	(136)
第九节 mRNA 差异显示技术	(136)
一、原理和方法	(136)
二、反应条件的优化	(137)
三、存在的问题及处理措施	(139)
四、相关方法比较	(140)
五、应用及前景	(141)
第五章 真核基因表达调控及研究技术	(143)
第一节 真核基因的表达调控	(143)
一、顺式作用元件	(143)
二、反式作用因子	(145)
第二节 细胞核提取液的制备	(149)
一、从 HeLa 细胞制备细胞核提取液	(149)
二、从大鼠肝脏制备细胞核提取液	(151)

第三节 基因表达调控研究技术	(154)
一、电泳迁移率改变分析	(154)
二、DNase I 足迹法	(156)
三、甲基化干扰足迹法	(161)
四、氯霉素乙酰转移酶分析	(163)
五、Run-on 分析	(169)
第六章 癌基因与抑癌基因	(173)
第一节 转化细胞的特性	(173)
第二节 癌基因和抑癌基因概述	(175)
一、癌基因	(175)
二、抑癌基因	(177)
第三节 细胞癌变的分子机制	(179)
一、致癌病毒的转化作用	(179)
二、原癌基因的激活	(183)
三、抑癌基因的失活	(190)
第四节 原癌基因与细胞增殖	(196)
一、原癌基因编码的生长因子受体具有酪氨酸激酶活性	(196)
二、原癌基因编码细胞质酪氨酸蛋白激酶	(197)
三、原癌基因编码转录调控因子	(197)
四、细胞生长信息传递与原癌基因的促细胞增殖作用	(199)
第五节 无限增殖与转化	(199)
一、肿瘤发生的多因素性	(199)
二、无限增殖与转化	(200)
三、无限增殖与分化	(201)
第六节 转基因动物	(201)
一、基本原理	(201)
二、步骤	(202)
第七章 蛋白质的分析	(204)
第一节 蛋白质的基础知识	(204)
一、蛋白质的基本组成单位及连接方式	(204)
二、蛋白质的分子结构	(207)
三、蛋白质的性质	(208)
四、蛋白质的分类	(209)
第二节 蛋白质分离纯化的基本原理	(209)
一、蛋白质的提取	(209)
二、蛋白质的分离和纯化	(210)
三、蛋白质的纯度鉴定	(214)
第三节 重组蛋白质的分离纯化	(214)
一、重组蛋白质分离纯化的特点	(214)

二、从大肠杆菌中提取纯化重组蛋白质的实例	(216)
第四节 蛋白质的定量	(217)
一、紫外吸收法	(218)
二、福林-酚法 (Lowry 法)	(218)
三、考马斯亮蓝 G250 法	(219)
第五节 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	(220)
一、凝胶的聚合	(221)
二、蛋白质与 SDS 的结合	(222)
三、浓缩胶浓缩蛋白质的原理	(222)
四、试剂	(223)
五、操作	(223)
六、电泳图谱分析	(226)
第六节 Western 印迹	(228)
一、Western 印迹必备的主要物品	(229)
二、转移用缓冲液	(230)
三、电印迹	(231)
四、免疫显色	(232)
五、膜上蛋白质的其他用途	(236)
第七节 Southwestern 印迹	(236)
一、试剂	(236)
二、操作	(237)
第八节 蛋白质分子质量的测定	(238)
一、超速离心法	(238)
二、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法	(240)
三、凝胶柱层析法	(240)
第八章 细胞凋亡	(244)
第一节 概述	(244)
一、细胞凋亡概念的形成	(244)
二、细胞凋亡的概念	(244)
三、细胞凋亡的形态学及生物化学改变	(244)
四、细胞凋亡与程序性细胞死亡	(245)
第二节 执行细胞凋亡的酶类	(246)
一、内源性内切核酸酶	(246)
二、拓扑异构酶及其抑制剂	(246)
三、转谷氨酰胺酶	(247)
四、ICE/CED-3 蛋白酶家族	(247)
第三节 细胞凋亡的信号传导	(248)
一、传统的信号途径与细胞凋亡	(249)
二、T 细胞受体介导的细胞凋亡	(251)

三、死亡受体介导的细胞凋亡	(251)
四、细胞周期的调控与细胞凋亡	(256)
第四节 调节细胞凋亡的基因	(258)
一、 <i>bcl-2</i>	(259)
二、 <i>c-myc</i>	(260)
三、 <i>P53</i>	(260)
四、 <i>bcr/abl</i>	(261)
第五节 细胞凋亡研究与医学的关系	(261)
一、细胞凋亡与机体免疫	(261)
二、细胞凋亡与肿瘤发生及治疗途径的研究	(262)
三、细胞凋亡与病毒感染疾病发病机制及防治的研究	(263)
第六节 细胞凋亡研究方法	(263)
一、细胞凋亡的形态学研究方法	(263)
二、细胞凋亡的生物化学检测方法	(266)
三、细胞凋亡的酶联免疫分析	(268)
四、流式细胞仪定量测定	(270)
五、分子生物学检测	(272)
第九章 基因诊断	(276)
第一节 概述	(276)
一、基因诊断的概念	(276)
二、基因诊断的特点	(277)
三、基因诊断的临床意义	(277)
第二节 基因诊断的原理	(278)
一、人类基因的结构	(278)
二、基因的表达与突变	(279)
三、核酸分子杂交	(280)
第三节 基因诊断的方法	(280)
一、基因突变的检测	(280)
二、基因连锁分析	(282)
三、mRNA 的检测	(283)
四、基因诊断常用的技术	(283)
第四节 基因诊断技术在临床上的应用	(285)
一、基因诊断在遗传病中的应用	(285)
二、基因诊断在恶性肿瘤中的应用	(287)
三、基因诊断在感染性疾病中的应用	(289)
四、多基因病的基因诊断	(292)
五、DNA 指纹分析在法医学中的应用	(294)
第十章 基因治疗	(296)
第一节 基因治疗概论	(296)

一、基因治疗的发展简史	(296)
二、基因治疗的策略	(297)
三、基因治疗的种类	(297)
第二节 基因治疗的步骤	(298)
一、目的基因的选择	(298)
二、受体细胞的选择	(299)
三、载体的选择	(300)
四、基因转移的方法	(302)
第三节 基因治疗在临床上的应用	(303)
一、遗传病的基因治疗	(303)
二、肿瘤的基因治疗	(303)
三、艾滋病的基因治疗	(304)
四、基因治疗在其他领域中的应用	(304)
第四节 反义 RNA 在基因治疗中的应用	(305)
一、生物体内的反义调节及机制	(305)
二、反义核酸的研究途径	(306)
三、反义指导的基因治疗	(306)
第五节 Ribozyme 在基因治疗中的应用	(307)
一、Ribozyme 分类	(307)
二、Ribozyme 的作用特点	(309)
三、Ribozyme 的应用	(309)
第十一章 细胞信息传递	(311)
第一节 激素和多肽生长因子	(311)
一、激素	(311)
二、多肽生长因子	(312)
第二节 受体	(314)
一、受体研究的发展简史	(314)
二、受体的概念及基本特征	(315)
三、受体的分类	(316)
四、受体的结构和功能	(316)
第三节 主要信息传递途径	(325)
一、第二信使的基本概念和发展	(325)
二、环核苷酸类第二信使物质介导的信号转导	(326)
三、肌醇磷脂信使系统	(332)
四、酪氨酸蛋白激酶信号传递途径	(338)
五、细胞内受体作用机制	(340)
第四节 信息传递研究进展	(342)
一、丝裂素活化蛋白激酶与细胞内信息传递	(342)
二、JAK-STAT 途径	(343)

第五节 与信号转导有关的研究方法	(347)
一、酪氨酸蛋白激酶活力测定	(348)
二、MAPK 的 SDS-PAGE 分析	(349)
第十二章 细胞周期及其调控	(352)
第一节 细胞周期	(352)
一、细胞周期的概念	(352)
二、细胞周期各时相的主要特点	(353)
第二节 细胞周期调控系统	(357)
一、细胞周期蛋白	(357)
二、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶	(360)
三、周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制蛋白	(364)
第三节 细胞周期的调控	(367)
一、细胞周期的控制点	(367)
二、生长因子的调控	(368)
三、原癌基因和抑癌基因的调控	(368)
四、转录因子 E2F 的调控	(371)
第四节 细胞周期与疾病	(371)
一、衰老与细胞周期	(371)
二、肿瘤与细胞周期	(372)
第十三章 免疫组织化学与原位杂交技术	(374)
第一节 抗体的制备	(374)
一、抗原的提取与纯化	(374)
二、特异性抗血清的制备	(375)
三、免疫球蛋白的制备	(376)
四、单克隆抗体制备技术	(377)
第二节 抗体的标记	(381)
一、荧光抗体的制备	(381)
二、酶标记抗体的制备	(382)
三、胶体金标记抗体的制备	(384)
第三节 免疫组织化学的常规技术	(385)
一、标本的处理	(385)
二、标本的固定	(386)
三、组织脱水、浸蜡及包埋	(388)
四、组织切片	(388)
五、免疫组化染色中的一些基本操作	(390)
第四节 荧光免疫组织化学染色	(392)
一、直接染色法	(393)
二、间接染色法	(394)
三、补体染色法	(394)

四、双标记染色法	(395)
五、染色标本的保存	(396)
第五节 酶标免疫组织化学染色	(396)
一、染色原理	(396)
二、染色步骤	(397)
三、抗生物素蛋白-生物素系统的免疫组化染色	(399)
第六节 免疫金染色法	(399)
一、染色原理	(400)
二、染色步骤	(400)
第七节 免疫组化染色应注意的问题	(401)
一、对照组的设计	(401)
二、非特异性染色的消除	(402)
三、显示系统	(403)
四、衬染剂	(404)
第八节 原位分子杂交技术	(404)
一、组织切片的预处理	(404)
二、杂交	(405)
三、杂交信号的检测	(407)
四、操作步骤	(407)
第十四章 干细胞	(409)
第一节 概述	(409)
一、干细胞的定义	(411)
二、干细胞的分化	(411)
三、干细胞的应用	(412)
第二节 胚胎干细胞	(414)
一、胚胎干细胞研究进展	(414)
二、人 ES 细胞系的建立	(415)
三、ES 细胞的生物学特性	(416)
四、ES 细胞的来源	(418)
五、ES 细胞系的开发和利用	(419)
第三节 造血干细胞	(420)
一、造血干细胞的生物学特性	(421)
二、造血干细胞的检测方法	(423)
三、造血干/祖细胞的分离纯化	(423)
四、造血干/祖细胞的体外扩增	(424)
五、胚胎期造血干细胞的来源及其调控	(424)
六、造血干细胞的细胞治疗与基因治疗	(427)
第四节 神经干细胞	(430)
一、神经干细胞的研究进展	(430)

二、神经干细胞的生物学特点	(432)
三、神经干细胞重建造血	(434)
四、临床应用前景	(435)
第五节 骨髓间质干细胞	(436)
一、MSC 的形态及表面分子特征	(436)
二、MSC 的分化	(437)
三、MSC 在骨髓中的生理功能	(439)
四、MSC 在组织工程和基因治疗上的应用前景	(439)
第六节 ES 细胞的培养	(441)
一、ES 细胞体外培养的基本条件	(441)
二、试剂配制	(442)
三、ES 细胞的培养	(443)
四、饲养层细胞的制备	(443)
五、细胞冻存	(444)
六、ES 细胞的鉴定	(444)
第七节 造血干细胞的采集及培养	(445)
一、脐血的采集	(445)
二、脐血的分离和冷冻保存	(445)
三、造血干/祖细胞的体外扩增	(446)
第八节 神经干细胞的分离和培养	(446)
一、小鼠神经干细胞的分离和培养	(447)
二、人胚神经干细胞的分离和培养	(447)
三、脊髓神经干细胞培养	(448)
第十五章 生物芯片技术	(450)
第一节 概述	(450)
一、基因芯片的一般概念	(450)
二、基因芯片的应用特点	(451)
三、基因芯片技术的基本要点	(451)
第二节 基因芯片的原理与制备	(452)
一、在片合成	(453)
二、点样法	(457)
第三节 样品的制备和杂交检测	(460)
一、靶基因样品的制备	(460)
二、样品与基因芯片的杂交	(460)
三、杂交结果的检测	(461)
第四节 基因芯片的设计	(462)
一、点样法基因芯片的设计	(462)
二、在片合成法基因芯片的设计	(462)
三、基因芯片的建库和数据分析	(465)

第五节 基因芯片的应用	(465)
一、基因表达水平的检测	(465)
二、基因型及单碱基多态性分析	(466)
三、基因诊断和药物基因组学	(467)
第六节 基因芯片的研究和发展趋势	(467)
一、基因芯片的相关研究	(467)
二、基因芯片技术存在的问题及发展前景	(469)
第七节 免疫芯片	(469)
一、免疫芯片的特点与分类	(469)
二、免疫芯片制备的技术路线	(470)
三、免疫芯片存在的问题	(470)
第十六章 基因工程药物和疫苗	(473)
第一节 目的基因在原核细胞中的表达	(474)
一、构建原核细胞的表达载体	(474)
二、重组基因在原核细胞中的表达形式	(476)
第二节 目的基因在真核细胞中的表达	(477)
一、酵母表达系统	(477)
二、昆虫细胞表达系统	(478)
三、哺乳动物细胞表达系统	(478)
第三节 蛋白质工程及其应用	(482)
一、蛋白质设计	(483)
二、定点突变	(483)
三、噬菌体显示技术	(484)
四、蛋白质工程的应用	(486)
第四节 基因工程药物	(487)
一、胰岛素	(487)
二、干扰素	(488)
三、促红细胞生成素	(488)
四、组织型纤溶酶原激活剂	(489)
第五节 基因工程抗体	(489)
一、嵌合抗体	(490)
二、改型抗体	(490)
三、小分子抗体	(490)
四、特殊类型的基因工程抗体	(491)
第六节 基因工程疫苗	(492)
一、乙肝疫苗	(493)
二、疟疾疫苗	(493)
第七节 核酸疫苗	(494)
一、核酸疫苗的构建	(494)