



· 导读版 ·

Cell Biology

A Laboratory Handbook

细胞生物学实验手册

4

大分子的转移、表达系统、基因表达模型、蛋白质

Julio E. Celis



科学出版社
www.sciencep.com

Cell Biology A Laboratory Handbook

Third Edition

Volume 4

细胞生物学实验手册

第三版

第4卷

Edited by

Julio E. Celis

Institute of Cancer Biology, Danish Cancer Society, Copenhagen, Denmark

Associate Editors

Nigel P. Carter

The Sanger Center, Wellcome Trust, Cambridge, UK

Kai Simons

Max-Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden, Germany

J. Victor Small

Austrian Academy of Sciences, Salzburg, Austria

Tony Hunter

The Salk Institute, La Jolla, California, USA

David M. Shotton

University of Oxford, UK

科学出版社

北京

图字:01-2007-5365 号

This is an annotated version of

Cell Biology A Laboratory Handbook (Third Edition) Volume 4 by Julio E. Celis, Nigel P. Carter, Kai Simons, J. Victor Small, Tony Hunter, David M. Shotton.

Copyright © 2006, Elsevier Inc.

ISBN 13: 978-0-12-164734-6

ISBN 10: 0-12-164734-X

Set ISBN 13: 978-0-12-164730-8

Set ISBN 10: 0-12-164730-7

All rights reserved.

No part of this publication may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopy, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher.

AUTHORIZED EDITION FOR SALE IN P. R. CHINA ONLY

本版本只限于在中华人民共和国境内销售

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学实验手册:第3版.第4卷:英文/(丹)赛利斯(Celis, J.)主编. —北京:科学出版社, 2008

(科爱传播 生命科学)

ISBN 978-7-03-020386-1

I. 细… II. 赛… III. 细胞生物学-实验-手册-英文 IV. Q2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 178058 号

责任编辑:孙红梅 李小汀

责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

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>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2008年1月第 一 版 开本:889×1194 1/16

2008年1月第一次印刷 印张:40 1/4 插页:2

印数:1—1 800 字数:1 108 000

定价:136.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈科印〉)

细胞生物学技术方法领域中的“4 颗闪亮之星”

2002 年第 420 卷第 6916 期的 *Nature* 扉页写着“细胞生物学是一门大学科”(Cell Biology is a Big Science)。

或许我们可以从下述两段权威性讲话中,感受细胞生物学学科之“大”,及其在生命科学中的重要地位。

“地球上所有的生物都起源于 30 亿年前的一个原始细胞,从那时起细胞分裂从未间断。每一个人的生命都开始于单个细胞——受精卵,经不断分裂最终产生了我们整个身体 100 万亿(10^{14}) 个细胞。在我们身体内每秒钟都有成百上千个细胞在分裂。”这是本世纪第一个年头,即 2001 年生理学/医学诺贝尔奖颁奖仪式上,主持人安德斯·塞特博格的演讲。

“每一个生物学问题的关键最终必将从细胞中寻求(The key to every biological problem must finally be sought in the cell)”。这是上个世纪 20 年代细胞生物学和细胞遗传学一代宗师 Wilson E. B. 在他的不朽著作《细胞的发育与遗传》中的格言。

其实,除了相距近一个世纪的两位大师的格言之外,我们还可从细胞生物学研究领域之广阔,领略它在生命科学与医学中的重要地位。细胞生物学研究内容几乎涉及机体中的所有重要且基本的生命现象,其中包括细胞的生长、增殖、运动、发育、遗传、突变(尤其是癌变)、衰老和死亡(尤其是凋亡)等。由于细胞的生命现象是整个机体生命现象的基础与本质所在,其重要性是不言而喻的。因此,也毫不奇怪近些年来不少诺贝尔奖的工作大都属于细胞生物学范畴,或是与之密切相关。譬如 1999 年生理学/医学奖授予了细胞内信号系统的研究,2000 年授予神经细胞传导的研究,2001 年授予细胞周期的研究,2002 年授予细胞凋亡的研究,2003 年的化学奖授予细胞膜通道的研究,2006 年授予 RNA 干扰的研究,2007 年授予基因打靶的研究。

正是由于细胞生物学的重要地位,它的发展也极其迅猛,如今,细胞生物学的研究内容已突破了细胞本身的局限性,扩展到对细胞、亚细胞、分子等多个层次进行生命现象的探索。今天的细胞生物学家也不再是“纯粹”的细胞学家,他们集细胞生物学家、分子生物学家、免疫学家等于一身。同样,分子生物学家、免疫学家,甚至临床学家也努力地向细胞生物学靠拢,他们热切地希望了解细胞生物学知识,并期盼将细胞生物学技术引入他们的学科。在这种态势下,细胞生物学理论及技术方法倍受相关学科的青睐,于是有关细胞生物学研究方法的专著也应运而生。近年来最受人瞩目的专著或许要数下列几种:《精编细胞生物学实验指南》*Short Protocols in Cell Biology*、《当代细胞生物学实验方法全编》*Current Protocols in Cell Biology*。国内也有数种出版物,诚然,各种版本各具特色。

就实验手册的本质而言,无疑要求它们有如下几个根本的特征:

其一,内容要新,即所介绍的方法具有时代性、前沿性。我们认为,只有能反映与推动细胞生物学及相关学科继续发展的那些新技术才称得上具有时代性与前沿性。本书中有关干细胞、显像技术、大分子转移的内容都不乏新颖性与前沿性。

其二,可操作性。无疑,实验手册是授以操作技能的,因此方案的制定和步骤的描述都必须条理清晰,而理论基础则需言简意赅。本书有关操作步骤的描述该详则详,不尚空谈,相信我国多数读者,遵循其步骤“按图索骥”便会取得明显的功效,因此可适用于各个层次的实验人员。

其三,系统性。虽然实验手册不一定要如教科书那样有十分严密的顺序连贯性,但作为一个学科(如细胞生物学)的技术介绍仍有它的脉络联系,它必然逐次深入,或称作由表及里、由此及彼。本手册共四卷,就方法学讲也是有机联系的,即从细胞培养,结构分析,形态研究到最后的大分子研究。这种布局从形态到机能,从细胞到分子也反映出全书的逻辑性联系。

其四,人性化。这主要表现在各种方法步骤的描述皆以读者为本,处处考虑到能让读者理解与操作无

误，因此语言简洁、并配有必要的示意图。此外还特别指出可能会出现差错与“不尽人意”之处，并因此提出对策。读者无疑会在本手册中体会出这些特性，并感到特别实用甚至非常亲切。

本书分四卷，第一卷主要介绍细胞培养及相关的实验方法。其中有关线虫和其他非共生线虫的实验室培养是不可多得资料（国内尚未发现相关信息）。第二卷主要介绍细胞器的分类与检测，方法之多、之新，是类似的其他手册不可企及的。第三卷介绍各种成像技术。除了常规的光学和电镜技术，还深入至组织矩阵、基因组学的研究等，这些内容无疑反映了“与时俱进”的特色。第四卷主要介绍大分子转移及表达系统的研究方法，其中包括体细胞核转移技术。可以认为本卷是分子生物学与细胞生物学理论与技术相结合的产物，或许可以认为是最具时代性的篇章。

由上也就不难看出本手册不仅适用于细胞生物学研究，对于从事分子生物学、生物化学、生物工程、发育生物学、病毒学、遗传学，甚至临床医学的研究者也是必不可缺的工具。

本书由 Elsevier Academic Press 出版。主编 Julio E. Celis 为世界著名肿瘤生物学家。副主编等人皆在各自领域中有所建树，并富有实验室经验。正如美国 Thomas Jefferson 大学的 Gregory J. B. 教授所评述的那样“4 颗闪亮之星——此 4 卷总结了几乎全部的现代细胞生物学方案”，我国学者清华大学吴畏教授、陈晔光教授对此书都有很高的评价，认为“非常细致、实用”、“是一套好书，其中的一些编著者也很有名，如 Tony Hunter 和 K. M. Simons 等。”

“他山之石，可以攻玉”，相信本手册为推动我国细胞生物学及相关学科的发展将起到一定的作用。

章静波

中国医学科学院中国协和医科大学基础医学研究所

二零零七年八月

前 言

当有新技术的创建，或是旧程序的改良时，常常会促成科学的进步。时至今日，随着从对单个分子的分析迅速地转向对复杂生物学问题的研究时，人们比以往更加需要有互补性的多种技术平台，以解决复杂的生物学问题。《细胞生物学实验手册》第3版萃集了236篇文章，涵盖了细胞学、分子生物学、蛋白质组学、基因组学和功能基因组学中的各种新技术和程序。其中165篇为新征集的文章，多数是应科学界的反馈意见而撰写的。

一如本书第二版那样，本版也分四卷。第一卷包括组织培养及其相关技术、病毒、抗体和免疫组织化学。第二卷包括细胞器和细胞结构，以及细胞生物学检测技术。第三卷涉及成像技术、电子显微镜、扫描探针和扫描电子显微镜、显微解剖、组织矩阵、细胞遗传学和原位杂交、基因组学、转基因、基因敲除和基因削减方法等。最后一卷包括大分子转移、表达系统、除各种蛋白质组学技术之外的基因表达模型。附录收集具代表性的培养细胞系及它们的特征、细胞生物学互联网资源、计算机模拟的蛋白质组分析系统中的生物信息资源。本手册能独到地提供从事生命科学研究所不可缺少的经典及最新的技术。若你身边缺乏专家，则本手册在你科研生涯的任何阶段，均能帮助你利用各种技术和模型系统进行生物学问题的研究。本书所介绍的技术都以一种人性化的、循序渐进的方式娓娓道来，并且还教你某些有用的小窍门以避免实验操作中可能遭遇到的小麻烦。

在此，我向那些辛勤工作、竭力支持、在遴选新技术方面具有远见卓识的副主编们表示由衷的感谢。我同样感谢 Elsevier 出版社的工作人员对出版本书的不懈支持和敬业精神。许多朋友也参与了本手册的出版，我特别要感谢的是 Lisa Tickner, Karen Dempsey, Angela Dooley, Carl Soares 以及 Tari Paschall，是他们通力协作并组织各卷的撰写。我还要表达对所有作者的谢意，乃因他们不惜时间与精力献身于本书的出版工程。

主编：Julio E. Celis

(章静波 译)

第4卷目录

其他卷目录

撰稿人

前言

B 表达系统

第4篇 表达系统

A 大分子的转移

第1篇 蛋白质

1. 大分子物质冲击式进入贴附细胞 5
MARK S. F. CLARKE, DANIEL L. FEEBACK
AND CHARLES R. VANDERBURG
2. 用肽载体将生物活性蛋白导入哺乳动物细胞应用
于抗体和治疗性蛋白的转送 13
MAY C. MORRIS, JULIEN DEPOLIER, FREDERIC HEITZ
AND GILLES DIVITA
3. 用链球菌溶血素 A (Streptolysin O) 研究细胞
表面膜的选择性透化作用 19
JØRGEN WESCHE AND SJUR OLSNES

第2篇 基因

4. 用于基因转移的新的阳离子脂质体 25
NANCY SMYTH TEMPLETON
5. 基因转送的阳离子多聚体: 聚阳离子 DNA 复合物的
形成及体外转染 29
YONG WOO CHO, JAE HYUN JEONG, CHEOL-HEE AHN,
JONG-DUK KIM AND KINAM PARK
6. 活体胚胎的电穿孔术 35
TAKAYOSHI INOUE, KRISTEN CORREIA
AND ROBB KRUMLAUF

第3篇 体细胞核转移

7. 体细胞核移植 45
KEITH H. S. CAMPBELL, RAMIRO ALBERIO,
CHRIS DENNING AND JOON-HEE LEE

8. 酵母菌中的 cDNA 表达 57
CATERINA HOLZ AND CHRISTINE LANG
9. Semliki 森林病毒表达系统 63
MARIA EKSTRÖM, HENRIK GAROFF
AND HELENA ANDERSSON
10. COS-1 细胞中 cDNAs 的瞬时表达: 双相凝胶
电泳的蛋白质分析 69
PAVEL GROMOV, JULIO E. CELIS
AND PEDER S. MADSEN
11. 大肠杆菌蛋白质的高通量纯化 73
PASCAL BRAUN AND JOSHUA LABAER

C 基因表达模型

第5篇 差异基因表达

12. 基因表达模型的微矩阵分析: 寡核苷酸微矩阵
的修正作用、RNA 分离、cRNA 的荧光标记、
杂交和扫描 83
MOGENS KRUGHØFFER, NILS E. MAGNUSSON,
MADS AABOE, LARS DYRSKJØT
AND TORBEN F. ØRNTØFT
13. 阵列表达: 微矩阵资料的公共贮存 95
HELEN PARKINSON, SUSANNA-ASSUNTA SANSONE,
UGIS SARKAN, PHILIPPE ROCCA-SERRA
AND ALVIS BRAZMA
14. 基因表达的系列分析 (SAGE): 哺乳动物细胞
转录组 SAGE 编目的详细方案 103
SERGEY V. ANISIMOV, KIRILL V. TARASOV
AND KENNETH R. BOHELER
15. 表现性差异分析: 研究差异基因表达的方法
113
MARCUS FROHME AND JÖRG D. HOHEISEL
16. 单个细胞基因表达模型——多重表达荧光原位

杂交：在培养细胞分析中的应用 121
JEFFREY M. LEVSKY, STEVEN A. BRAUT
AND ROBERT H. SINGER

D 蛋白质

第6篇 蛋白质确定和分析

17. 蛋白质确定 131
MARTIN GUTTENBERGER
18. 磷酸肽作图：一个基本方案 139
JILL MEISENHELDER AND PETER VAN DER GEER
19. 荧光标签与蛋白质的耦联 145
MARKUS GRUBINGER AND MARIO GIMONA
20. 蛋白质和肽的放射性碘化 149
MARTIN BÉHÉ, MARTIN GOTTHARDT
AND THOMAS M. BEHR

第7篇 蛋白质组学的标本组分分级

21. 自由流动场电泳 157
PETER J. A. WEBER, GERHARD WEBER
AND CHRISTOPH ECKERSKORN

第8篇 凝胶电泳

22. 凝胶蛋白质组学：蛋白质的高分辨双相凝胶电泳等电聚焦和非平衡 pH 梯度电泳 165
JULIO E. CELIS, SIGNE TRENTENMØLLE
AND PAVEL GROMOV
23. 高分辨双相电泳结合固定化 pH 梯度的蛋白质分析 175
ANGELIKA GÖRG AND WALTER WEISS
24. 双向差示凝胶电泳：在多生物样本中差示蛋白表达中的应用 189
JOHN F. TIMMS
25. 亲和电泳研究生物特异的相互作用：用高分辨双相亲和电泳从小鼠血中分离半抗原特异的多克隆抗体成为单克隆抗体 197
KAZUYUKI NAKAMURA, MASANORI FUJIMOTO,
YASUHIRO KURAMITSU AND KAZUSUKE TAKEO
26. 图像分析和定量 207
PATRICIA M. PALAGL DANIEL WALTHER,
GÉRARD BOUCHET, SONJA VOORDIJK AND RON D. APPEL

第9篇 检测凝胶中的蛋白质

27. 银染法检测凝胶中的蛋白质：一种与质谱分析相等的方法 219
IRINA GROMOVA AND JULIO E. CELIS
28. 用 SYPRO 染料荧光检测凝胶中的蛋白质 225
WAYNE F. PATTON
29. 放射自显术和荧光自显术：基于薄膜的检测平面标本放射活性的技术 235
ERIC QUÉMÉNEUR

第10篇 翻译后修饰蛋白的凝胶图型分析

30. 用体内同位素标记方法对翻译后修饰蛋白质进行双相凝胶图型分析 243
PAVEL GROMOV AND JULIO E. CELIS

第11篇 蛋白质/蛋白质及蛋白质/小分子物质的相互作用

31. 在非变性条件下进行蛋白质免疫沉淀 253
JIRI LUKAS, JIRI BARTEK AND KLAUS HANSEN
32. 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳作为研究蛋白质相互作用的一种方法：在线粒体氧化磷酸化复合物分析中的应用 259
JOËL SMET, BART DEVREESE, JOZEF VAN BEEUMEN
AND RUDY N. A. VAN COSTER
33. 天然固定化配体的亲和纯化 265
NISHA PHILIP AND TIMOTHY A. HAYSTEAD
34. 用化学交联法分析蛋白间相互作用 269
ANDREAS S. REICHERT, DEJANA MOKRANJAC,
WALTER NEUPERT AND KAI HELL
35. 过氧化体靶向作用作为检测蛋白质相互作用的一种工具 275
TRINE NILSEN, CAMILLA SKIPPE SKJERPEN
AND SJUR OLSNES
36. 生物分子相互作用分析质谱术 279
DOBRIN NEDELKOV AND RANDALL W. NELSON
37. 以³²P 标记的 GST-Ras 融合蛋白进行印迹重叠：在绘制蛋白质-蛋白质相互作用位点中的应用 285
ZHUO-SHEN ZHAO AND EDWARD MANSER
38. 配体印迹重叠试验：检测 Ca²⁺ 和小 GTP 结合蛋

白的技术 289

PAVEL GROMOV AND JULIO E. CELIS

39. 调谐性酵母双杂交筛选 295

CHRISTOPHER M. ARMSTRONG, SIMING LI
AND MARC VIDAL

第 12 篇 功能蛋白质组学

40. 用孔雀绿标记抗体进行蛋白质的发色团激光
灭活 307

THOMAS J. DIEFENBACH AND DANIEL G. JAY

第 13 篇 蛋白质/DNA 相互作用

41. 染色质免疫沉淀 (ChIP) 317

VALERIO ORLANDO

42. 凝胶泳动变位试验 325

PETER L. MOLLOY

43. 转录因子的 DNA 亲和层析: 寡核苷酸捕获技术
335

SUCHAREETA MITRA, ROBERT A. MOXLEY
AND HARRY W. JARRETT

第 14 篇 蛋白质降解

44. 蛋白质降解的方法: 陪伴分子介导的自噬过程
345

PATRICK F. FINN, NICHOLAS T. MESIRES
AND JAMES FRED DICE

45. 蛋白质泛素化作用的方法 351

AARON CIECHANOVER

**第 15 篇 质谱分析法: 蛋白质鉴定
和相互作用**

46. 蛋白质鉴定和序列测定的质谱方法 363

LEONARD J. FOSTER AND MATTHIAS MANN

47. 蛋白质组特异的样本制备法用于基质激光解析/
离子化质谱分析 371

MARTIN R. LARSEN, SABRINA LAUGESEN
AND PETER ROEPSTORFF

48. 蛋白质点的凝胶内消化用于质谱分析 379

KRIS GEVAERT AND JOËL VANDEKERCKHOVE

49. 用串联质谱法进行肽序列测定 383

JOHN R. YATES III, DAVID SCHIELTZ,
ANTONIUS KOLLER AND JOHN VENABLE

50. 用肽的串联质谱进行直接数据库搜索 391

JOHN R. YATES III AND WILLIAM HAYES MCDONALD

51. 利用串联质谱术和序列相似数据库搜索工具
对未测基因组机体的蛋白质进行鉴定 399

ADAM J. LISKA AND ANDREJ SHEVCHENKO

52. 用质谱鉴定蛋白质磷酸化位点 409

RHYS C. ROBERTS AND OLE N. JENSEN

53. 用质谱进行糖类/糖蛋白分析 415

MARK SUTTON-SMITH AND ANNE DELL

54. 用稳定同位素标记氨基酸在细胞培养中进行定量
蛋白质组学研究 427

SHAO-EN ONG, BLAGOY BLAGOEV,
IRINA KRATCHMAROVA, LEONARD J. FOSTER,
JENS S. ANDERSEN AND MATTHIAS MANN

55. 在复合肽混合液中进行半胱氨酸肽位点特异的
稳定同位素标记 437

HUILIN ZHOU, ROSEMARY BOYLE
AND RUEDI AEBERSOLD

56. 用电喷雾离子质谱术测定蛋白质氢交换 443

THOMAS LEE, ANDREW N. HOOFNAGLE,
KATHERYN A. RESING AND NATALIE G. AHN

57. 非凝胶蛋白质组学: 从复合肽混合液中用选择
反相层析分离含甲硫氨酸的肽 457

KRIS GEVAERT AND JOËL VANDEKERCKHOVE

58. 质谱术在非共价蛋白相互作用和蛋白组装中的
应用 457

LYNDA J. DONALD, HARRY W. DUCKWORTH
AND KENNETH G. STANDING

E

第 16 篇 附录

59. 用于 Silico 蛋白质组分析的生物信息资源供应商
名录 469

MANUELA PRUESS AND ROLF APWEILER

供应商 477

索引 533

其他卷目录

第 1 卷

A 细胞和组织培养： 相关技术

第 1 篇 一般技术

1. 建立细胞培养实验室 5
ROBERT O'CONNOR AND LORRAINE O'DRISCOLL
2. 细胞培养的一般程序 13
PAULA MELEADY AND ROBERT O'CONNOR
3. 细胞计数 21
TRACY L. HOFFMAN
4. 细胞增殖测定：用于测定培养细胞数的多种改良方法 25
TERRY L. RISS AND RICHARD A. MORAVEC
5. 无血清培养基的研发：营养成分的优化和运送方式 33
DAVID W. JAYME AND DALE F. GRUBER
6. 细胞系鉴定 43
ROBERT J. HAY
7. 细胞系微生物与病毒污染的检测 49
ROBERT J. HAY AND PRANVERA IKONOMI

第 2 篇 特殊细胞类型的培养：T 细胞

8. 神经嵴干细胞 69
MAURICE KLÉBER AND LUKAS SOMMER
9. 初生动物骨骼干细胞：从初生小鼠和人骨髓中分离和分析骨髓基质细胞 BMSCs 的方法 79
PAULO BIANCO, SERGEI A. KUZNETSOV,
MARA RIMINUCCI AND PAMELA GEHRON ROBEY
10. 用核转移方法以成体体细胞建立胚胎干细胞系 87
TERUHIKO WAKAYAMA

11. T 细胞的分离和体外增殖 97
MADS HALD ANDERSEN AND PER THOR STRATEN
12. 人和鼠树突状细胞的生成 103
ANDREAS A. O. EGGERT, KERSTIN OTTO,
ALEXANDER D. MCLELLAN, PATRICK TERHEYDEN,
CHRISTIAN LINDEN, ECKHART KÄMPGEN AND
JÜRGEN C. BECKER

第 3 篇 特殊细胞类型的培养： 造血细胞，间充质细胞和上皮细胞

13. 造血细胞半固体琼脂培养基的体外克隆培养 115
CHUNG LEUNG LI, ANDREAS HÜTTMANN
AND EUGENE NGO-LUNG LAU
14. 人骨骼肌细胞 121
ROBERT R. HENRY, THEODORE CIARALDI
AND SANDEEP CHAUDHARY
15. 狗肾细胞的生长及在上皮细胞生物学研究中的应用 127
KAI SIMONS AND HIKKA VIRTÄ
16. 人表皮角化细胞的培养和逆转录病毒感染 133
FIONA M. WATT, SIMON BROAD
AND DAVID M. PROWSE
17. 正常和恶性人乳腺上皮细胞的三维培养以维持如体内的构筑 139
CONNIE MYERS, HONG LIU, EVA LEE
AND MINA J. BISSELL
18. 果蝇胚胎细胞的原代培养 151
PAUL M. SALVATERRA, IZUMI HAYASHI,
MARTHA PEREZ-MAGALLANES AND KAZUO IKEDA
19. 线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 和其他非共生线虫的实验室培养 157
IAN M. CALDICOTT, PAMELA L. LARSEN
AND DONALD L. RIDDLE

第 4 篇 体细胞的分化和重编程

20. 人髓性白血病 HL-60 细胞的诱导分化和细胞学

操纵 165

DAVID A. GLESNE AND ELIEZER HUBERMAN

21. PC12 细胞的培养: 一个研究神经元功能, 分化和存活的模式 171

KENNETH K. TENG, JAMES M. ANGELASTRO,
MATTHEW E. CUNNINGHAM AND LLOYD A. GREENE

22. 胰细胞分化为肝细胞 177

DAVID TOSH

23. TERA2 及其 NTERA 亚系: 多能人胚胎癌细胞 183

PETER W. ANDREWS

24. 爪蟾 (*Xenopus laevis*) 胚胎外植块培养, 研究多能祖细胞分化的一种检测系统 191

THOMAS HOLLEMANN, YONGLONG CHEN,
MARION SÖLTER, MICHAEL KÜHL AND THOMAS PIELER

25. 电融合: 以多能干细胞细胞杂交研究体细胞核的重编程 199

MASAKO TADA AND TAKASHI TADA

26. 以细胞提取物研究体细胞核和细胞的重编程 207

ANNE-MARI HÅKELIEN, HELGA B. LANDSVERK,
THOMAS KÜNTZIGER, KRISTINE G. GAUSTAD AND
PHILIPPE COLLAS

第 5 篇 永生性

27. 具有端粒酶的原代人细胞的永生性 215

KWANGMOON LEE, ROBERT L. KORTUM
AND MICHEL M. OUELLETTE

28. 原代小鼠细胞的制备及永生性 223

NORMAN E. SHARPLESS

第 6 篇 体细胞杂交

29. 贴附细胞间的活性杂交体: 产生、增加产量及分析 231

DORIS CASSIO

第 7 篇 细胞分离技术

30. 人 T 细胞的分离和增殖 239

AXL ALOIS NEURAUTER, TANJA AARVAK,
LARS NORDERHAUG, ØYSTEIN ÅMELLEM
AND ANNE-MARIE RASMUSSEN

31. 用离心淘洗法分离细胞周期同步的细胞群体 247

R. CURTIS BIRD

32. 多色流体细胞仪 257

STEPHEN P. PERFETTO, STEPHEN C. DE ROSA AND
MARIO ROEDERER

33. 高速细胞分选 269

SHERRIF F. IBRAHIM, TIMOTHY W. PETERSEN,
JUNO CHOE AND GER VAN DEN ENGH

第 8 篇 细胞周期分析

34. 用流式和激光扫描细胞仪分析细胞周期 279

ZBIGNIEW DARZYNKIEWICZ, PIOTR POZAROWSKI,
AND GLORIA JUAN

35. 在生长性细胞群体中原位检测细胞周期各时相 291

IRINA SOLOVEI, LOTHAR SCHERMELLEH,
HEINER ALBIEZ AND THOMAS CREMER

36. 体内 (*in vivo*) DNA 复制标记 301

LOTHAR SCHERMELLEH

37. 活细胞 DNA 标记和多光子/共焦显微术 305

PAUL J. SMITH AND RACHEL J. ERRINGTON

第 9 篇 细胞毒和细胞生长测定

38. 细胞毒和细胞生长测定 315

GIUSEPPE S. A. LONGO-SORBELLO, GURAY SAYDAM,
DEBABRATA BANERJEE AND JOSEPH R. BERTINO

39. 微核和彗星测定 325

ILONA WOLFF AND PEGGY MÜLLER

第 10 篇 细胞凋亡

40. 细胞凋亡研究方法 335

LORRAINE O'DRISCOLL, ROBERT O'CONNOR
AND MARTIN CLYNES

第 11 篇 细胞转化、致癌性、 侵袭和创伤愈合试验

41. 癌基因转化的细胞试验 345
MICHELLE A. BOODEN, AYLIN S. ULKU
AND CHANNING J. DER
42. 裸鼠中的致癌性试验 353
ANNE-MARIE ENGEL AND MORTEN SCHOU
43. 细胞侵袭性的穿膜试验 359
GARTH L. NICOLSON
44. 内皮细胞侵袭性试验 363
NOONA AMBARTSUMIAN, CLAUD R. L. CHRISTENSEN
AND EUGENE LUKANIDIN
45. 用共焦激光显微术分析肿瘤细胞在器官型脑片
上的侵袭性 367
TAKANORI OHNISHI AND HIRONOBU HARADA
46. 血管生成试验 373
YIHAI CAO
47. 创伤修复的三维定量体外试验 379
DAVID I. SHREIBER
AND ROBERT T. TRANQUILLO

第 12 篇 电生理方法

48. 膜片钳技术 395
BETH RYCROFT, FIONA C. HALLIDAY
AND ALASDAIR J. GIBB

第 13 篇 器官培养

49. 器官型海马脑片培养的制备 407
SCOTT M. THOMPSON AND SUSANNE E. MASON
50. 用新方法可克服常规器官培养缺点的甲状腺
器官型培养技术 411
SHUJI TODA, AKIFUMI OOTANI, SHIGEHISA AOKI
AND HAJIME SUGIHARA

B 病毒

第 14 篇 病毒的生长和纯化

51. Semliki 森林病毒的生长 419

MATHILDA SJÖBERG AND HENRIK GAROFF

52. 人免疫缺陷病毒衍生载体的设计和生产 425
PATRICK SALMON AND DIDIER TRONO
53. 人腺病毒载体的构建和制备 435
MARY M. HITT, PHILLIP NG AND FRANK L. GRAHAM
54. 高容量腺病毒载体的生产和质量控制 445
GUDRUN SCHIEDNER, FLORIAN KREPPPEL
AND STEFAN KOCHANNEK
55. 生产重组体腺相关病毒的新方法 457
ANGELIQUE S. CAMP, SCOTT MCPHEE
AND R. JUDE SAMULSKI

C 抗体

第 15 篇 抗体的生产和纯化

56. 在兔体内生产肽抗体及免疫球蛋白的纯化 467
GOTTFRIED PROESS
57. 单克隆抗体的制备 475
PETER J. MACARDLE AND SHEREE BAILEY
58. 用重复免疫、多点注射快速开发单克隆抗体
483
ERIC P. DIXON, STEPHEN SIMKINS
AND KATHERINE E. KILPATRICK
59. 噬菌体展示抗体文库 491
ANTONIETTA M. LILLO, KATHLEEN M. MCKENZIE
AND KIM D. JANDA
60. 核糖体展示: 蛋白-蛋白相互作用的体外选择
497
PATRICK AMSTUTZ, HANS KASPAR BINZ,
CHRISTIAN ZAHND AND ANDREAS PLÜCKTHUN
61. 质谱表位作图 511
CHRISTINE HAGER-BRAUN AND KENNETH B. TOMER
62. SPOT 法对蛋白表位作图及特性分析 519
CLAUDE GRANIER, SYLVIE VILLARD
AND DANIEL LAUNE
63. 用蛋白印迹法检测抗体特异性 527
JULIO E. CELIS, JOSÉ M. A. MOREIRA
AND PAVEL GROMOV
64. 酶联免疫吸附试验 533
STAFFAN PAULIE, PETER PERLMANN

AND HEDVIG PERLMANN

65. 抗体的放射碘化作用 539

STEPHEN J. MATHER

D 免疫细胞化学

第 16 篇 免疫荧光

66. 培养细胞的免疫荧光显微术 549

MARY OSBORN

67. 细胞骨架的免疫荧光显微术 557

JOHANNA PRAST, MARIO GIMONA

AND J. VICTOR SMALL

68. 冰冻和石蜡组织切片的免疫细胞化学 563

MARY OSBORN AND SUSANNE BRANDFASS

E 附录

69. 代表性的培养细胞系及其特性 573

ROBERT J. HAY

第 2 卷

A 细胞器和细胞结构

第 1 篇 分离：质膜，细胞器，细胞结构

1. 去污剂抗性膜和胆固醇去除 5

SEBASTIAN SCHUCK, MASANORI HONSHO

AND KAI SIMONS

2. 质膜的分离和再分级，从脂筏中纯化细胞小窝 11

PHILIP OH, LUCY A. CARVER AND JAN E. SCHNITZER

3. 用磁性固相支持体进行细胞器的免疫分离 27

RALUCA FLÜKIGER-GAGESCU AND JEAN GRUENBERG

4. 大鼠肝高尔基复合体的分离 33

YANZHUANG WANG, TOMOHIKO TAGUCHI

AND GRAHAM WARREN

5. 分离大鼠肝内质网粗面和光面膜的结构域 41

JACQUES PAIEMENT, ROBIN YOUNG, LINE ROY AND

JOHN J. M. BERGERON

6. COPI 小泡的纯化 45

FREDRIK KARTBERG, JOHAN HIDING

AND TOMMY NILSSON

7. 从中脑、肝和肾上腺纯化网格蛋白包被小泡 51

ROBERT LINDNER

8. 分离含乳胶小珠和分支杆菌的吞噬体 57

MARK KÜHNEL, ELSA ANES AND GARETH GRIFFITHS

9. 过氧化物体的分离 63

ALFRED VÖLKL AND H. DARIUSH FAHIMI

10. 从哺乳动物组织和培养细胞中分离线粒体 69

ERIKA FERNÁNDEZ-VIZARRA,

PATRICIO FERNÁNDEZ-SILVA AND JOSÉ A. ENRÍQUEZ

11. 亚细胞分级分离和用 [³⁵S] 硫酸盐代谢标记从神经内分泌细胞系分离致密核心分泌颗粒 79

SHARON A. TOOZE

12. 从哺乳动物脑制备突触小泡 85

JOHANNES W. HELL AND REINHARD JAHN

13. 蛋白酶体的制备 91

KEIJI TANAKA, HIDEKI YASHIRODAS

AND NOBUYUKI TANAHASHI

14. 从人气管上皮细胞制备纤毛 99

LAWRENCE E. OSTROWSKI

15. 核仁的分离 103

YUN WAH LAM AND ANGUS I. LAMOND

16. 含中间体的剪接体纯化 109

MELISSA S. JURICA

17. Cajal 小体的分离 115

YUN WAH LAM AND ANGUS I. LAMOND

18. 复制簇：染色体构筑和染色质动力学分析的标记策略 121

DEAN A. JACKSON, CHI TANG AND CHRIS DINANT

19. 染色体分离用于流式分析和分选 133

NIGEL P. CARTER

第 2 篇 细胞/细胞器的活体染色

20. 用荧光脂质进行细胞活体染色 139

TOSHIHIDE KOBAYASHI, ASAMI MAKINO

AND KUMIKO ISHII

21. 用荧光探针标记胞吞泡研究液相胞吞作用 147
NOBUKAZU ARAKI

第3篇 蛋白纯化

22. 猪脑微管蛋白的制备 155
ANTHONY J. ASHFORD AND ANTHONY A. HYMAN
23. 平滑肌肌动蛋白的纯化 161
GERALD BURGSTALLER AND MARIO GIMONA
24. 非肌肉肌动蛋白的纯化 165
HERWIG SCHÜLER, ROGER KARLSSON
AND UNO LINDBERG
25. 骨骼肌肌动蛋白的纯化 173
SEBASTIAN WIESNER

B 测定方法

第4篇 内吞和胞吐途径

26. 用渗透性上皮细胞研究胞吐膜转运 181
FRANK LAFONT, ELINA IKONEN AND KAI SIMONS
27. 利用体外和肝细胞显微观察途径研究后高尔基
转运中间产物的外泄和表面释放 189
GERI E. KREITZER, ANNE MUESCH, CHARLES YEAMAN
AND ENRIQUE RODRIGUEZ-BOULAN
28. 测定内吞途径中膜转运的方法 201
LINDA J. ROBINSON AND JEAN GRUENERG
29. 用于以微粒体为基础的检测方法分析哺乳动物
细胞中从内质网到高尔基体的转运 209
HELEN PLUTNER, CEMAL GURKAN, XIAODONG WANG,
PAUL LAPOINTE AND WILLIAM E. BALCH
30. 蛋白质共翻译转运至哺乳动物细胞粗面内质网
的微粒体 215
BRUNO MARTOGLIO AND BERNHARD DOBBERSTEIN
31. 利用渗透性肥大细胞分析调控性胞吐作用 223
GERALD HAMMOND AND ANNA KOFFER

第5篇 膜

32. 针筒式荷载:一种反映机械诱导细胞荷载的质膜
功能测定方法 233

MARK S. F. CLARKE, JEFF A. JONES
AND DANIEL L. FEEBACK

33. 利用细胞表面生物素酰化作用和其他技术测定上皮
细胞单层的表面极性 241
AMI DEORA, SAMIT CHATTERJEE,
ALAN D. MARMORSTEIN, CHIARA ZURZOLO,
ANDRE LE BIVIC AND ENRIQUE RODRIGUEZ-BOULAN

第6篇 线粒体

34. 蛋白质转运至线粒体 253
SABINE ROSPERT AND HENDRIK OTTO
35. 线粒体功能的极谱测定 259
YE XIONG, PATTI L. PETERSON AND CHUAN-PU LEE

第7篇 核运输

36. 毛地黄皂苷透性细胞中核蛋白进入和排出分析
267
RALPH H. KEHLENBACH AND BRYCE M. PASCHAL
37. 异核体:核质穿梭测定法 277
MARGARIDA GAMA-CARVALHO
AND MARIA CARMO-FONSECA

第8篇 染色质组装

38. DNA 复制依赖性染色质组装系统 287
JESSICA K. TYLER

第9篇 信号转导试验

39. Cygnets: 利用荧光能量传递研究原代细胞中细
胞内鸟嘌呤3',5'-环磷酸盐 299
CAROLYN L. SAWYER, AKIRA HONDA
AND WOLFGANG R. G. DOSTMANN
40. Ca^{2+} 作为第二信使:钙的新报告基因 (Cameleons
和 Camgaroos) 307
KLAUS P. HOEFLICH, KEVIN TRUONG
AND MITSUHIKO IKURA
41. 比例性的 Pericam (一种嵌合蛋白) 317
ATSUSHI MIYAWAKI
42. 显示单个细胞中蛋白质磷酸化的荧光指示剂
325

MORITOSHI SATO AND YOSHIO UMEZAWA

43. 放射性核苷酸的原位电穿孔术: Ras 活性或细胞蛋白质³²P 标记的测定 329
LEDA RAPTIS, ADINA VULTUR,
EVI TOMAI, HEATHER L. BROWNELL
AND KEVIN L. FIRTH
44. 解析法, 原位电穿孔研究信号转导和间隙连接通讯 341
LEDA RAPTIS, ADINA VULTUR,
HEATHER L. BROWNELL AND KEVIN L. FIRTH
45. 利用氰和黄荧光蛋白检测体内蛋白间相互作用 355
FRANCIS KA-MING CHAN
46. 利用 *lac*^{OP} 位点和 GFP-*lac*ⁱ 阻遏蛋白整合矩阵示踪单个染色体: 酿酒酵母染色体位点的位置和动力学分析 359
FRANK R. NEUMANN, FLORENCE HEDIGER,
ANGELA TADDEI AND SUSAN M. GASSER

第 10 篇 体外和体内运动性的检测和模型

47. 微管运动性测定 371
N. J. CARTER AND ROBERT A. CROSS
48. 有丝分裂纺锤体组装和功能的体外测定 379
CELIA ANTONIO, REBECCA HEALD
AND ISABELLE VERNOS
49. 肌动蛋白的体外运动测定 387
JAMES R. SELLERS
50. 利用脑细胞提取物研究利斯特菌单细胞质基因 (*Listeria monocytogenes*) 肌动蛋白基础性的运动 393
ANTONIO S. SECHI
51. 病原性大肠杆菌的支座形成: 研究肌动蛋白细胞骨架信号转导的一个模型系统 399
SILVIA LOMMEL, STEFANIE BENESCH, MANFRED ROHDE
AND JÜRGEN WEHLAND
52. 利斯特菌单细胞质基因: 分析体外细菌感染的技术 407
JAVIER PIZARRO-CERDÁ AND PASCALE COSSART

第 11 篇 单个细胞中的机械应激

53. 利用模式高弹体测定细胞收缩力 419
NATHALIE Q. BALABAN, ULRICH S. SCHWARZ
AND BENJAMIN GEIGER

C 附录

54. 资料 427
JOSÉ M. A. MOREIRA AND EMMANUEL VIGNAL

第 3 卷

A 成像技术

第 1 篇 光学显微术

1. 荧光显微术 5
WERNER BASCHONG AND
LUKAS LANDMANN
2. 全内反射荧光显微术 19
DEREK TOOMRE AND DANIEL AXELROD
3. 显微术中的频节局限性和适当的取样 29
RAINER HEINTZMANN
4. 光学镊子: 在动力蛋白研究中的应用 37
WALTER STEFFEN, ALEXANDRE LEWALLE
AND JOHN SLEEP

第 2 篇 数字图像显微术

5. 生物标本光学显微镜观察中如何获取电子图像——导言 49
JENNIFER C. WATERS
6. 图像增强对比显微术 57
DIETER G. WEISS

第 3 篇 活细胞和固定细胞的共焦显微术

7. 活细胞的旋盘共焦显微术 69
TIMO ZIMMERMANN AND
DAMIEN BRUNNER
8. 果蝇胚胎的共焦显微术 77

MAITHREYI NARASIMHA AND NICHOLAS H. BROWN

9. 紫外激光微光束在果蝇胚胎解剖中的应用 87
DANIEL P. KIEHART, YOICHIRO TOKUTAKE,
MING-SHIEN CHANG, M. SHANE HUTSON,
JOHN WIEMANN, XOMALIN G. PERALTA,
YUSUKE TOYAMA, ADRIENNE R. WELLS,
ALICE RODRIGUEZ AND GLENN S. EDWARDS

第4篇 活细胞的荧光显微术

10. 活细胞荧光成像简介：逐项注释 107
YU-LI WANG
11. 细胞骨架蛋白 111
KLEMENS ROTTNER, IRINA N. KAVERINA
AND THERESIA E. B. STRANDAL
12. 新型蛋白质的系统型细胞定位 121
JEREMY C. SIMPSON AND RAINER PEPPERKOK
13. 用全内反射荧光显微镜进行活细胞单个分子
成像 129
ADAM DOUGLASS AND RONALD VALE
14. 肌动蛋白细胞骨架动力学及药物灌注干扰的
活细胞荧光斑点显微术 137
STEPHANIE L. GUPTON AND
CLARE M. WATERMAN-STORER
15. 活细胞内绿色荧光蛋白变体间成像荧光共振能
的传递 153
PETER J. VERVEER, MARTIN OFFTERDINGER
AND PHILIPPE I. H. BASTIAENS

第5篇 应用荧光染料研究细胞内的 物理学参数

16. 利用双重激发荧光成像技术测定活细胞内吞
小体的 pH 值 163
NICOLAS DEMAUREX AND SERGIO GRINSTEIN
17. 裂殖酵母细胞内蛋白质定位的基因组范围筛查
171
DA-QIAO DING AND YASUSHI HIRAOKA
18. 酵母中大范围的蛋白质定位 179
ANUJ KUMAR AND MICHAEL SNYDER

第6篇 数字成像制作、分析、 贮存和演示

19. 消除雾翳：用去失真技术重建成像 187
RICHARD M. PARTON AND ILAN DAVIS
20. 生物成像分析中的技巧概述 201
FEDERICO FEDERICI, SILVIA SCAGLIONE
AND ALBERTO DIASPRO
21. 生物成像数据库中的成像资料，一个生物学家的
成像数据库 207
CHRIS CATTON, SIMON SPARKS
AND DAVID M. SHOTTON

B 电子显微镜

第7篇 标本制备技术

22. 透射电子显微镜中的细胞与组织的固定和包埋
221
ARVID B. MAUNSBACH
23. 负染技术 233
WERNER BASCHONG AND UELI AEBI
24. 丙三醇喷雾/低角旋转金属投影 241
UELI AEBI AND WERNER BASCHONG

第8篇 恒冷技术

25. 生物标本快速冰冻用于冷冻断裂和深度蚀刻
249
NICHOLAS J. SEVERS AND DAVID M. SHOTTON
26. 冷冻断裂和冷冻蚀刻 257
DAVID M. SHOTTON

第9篇 细胞骨架的电子显微镜研究

27. 提取细胞骨架的电子显微术：负染、低温电子
显微术，以及与光学显微术的相关性 267
GUENTER P. RESCH, J. VICTOR SMALL
AND KENNETH N. GOLDIE
28. 细胞骨架光学和电子显微术的关联 277

第 10 篇 免疫电子显微术

29. 用 Lowicryl 树脂的免疫电子显微术 289
ARVID B. MAUNSBACH
30. 超薄冷冻和塑料切片的免疫细胞化学 299
NORBERT ROOS, PAUL WEBSTER
AND GARETH GRIFFITHS
31. 蛋白质复合物成分的直接免疫金标记 307
JULIE L. HODGKINSON AND WALTER STEFFEN

C 扫描探针和扫描电子显微镜

第 11 篇 扫描探针和扫描电子显微镜

32. 生物学研究中的原子力量显微镜 317
DIMITRIOS FOTIADIS, PATRICK L. T. M. FREDERIX,
AND ANDREAS ENGEL
33. 场致发射扫描电子显微镜和细胞内部的观察 325
TERENCE ALLEN, SANDRA RUTHERFORD,
STEVE MURRAY, SIEGFREID REIPERT
AND MARTIN GOLDBERG

D 显微解剖

第 12 篇 组织和染色体显微解剖

34. 激光捕获显微解剖 339
VIRGINIA ESPINA AND LANCE LIOTTA
35. 用常规方法进行染色体显微解剖 345
NANCY WANG, LIQIONG LI
AND HARINDRA R. ABEYSINGHE
36. 用激光显微外科(激光剪)和激光发生的光学力(激光钳)进行染色体和有丝分裂纺锤体的显微操纵 351
MICHAEL W. BERNs, ELLIOT BOTVINICK,
LIH-HUEI LIAW, CHUNG-HO SUN AND JAGESH SHAH

第 13 篇 组织矩阵

37. 组织微矩阵 369
RONALD SIMON, MARTINA MIRLACHER
AND GUIDO SAUTER

F 细胞遗传学和原位杂交

第 14 篇 细胞遗传学

38. 基本的细胞遗传学技术: 培养, 片子制作和 G 带 381
KIM SMITH
39. 从贴附生长细胞系获得高产量中期染色体标本的常用和可靠的方法: 细胞染色体组分的快速确证 387
DORIS CASSIO

第 15 篇 原位杂交

40. 用荧光原位杂交在中期染色体上绘制克隆 DNA 图 395
MARGARET LEVERSHA
41. 利用人类基因组计划资源进行断裂点制图 403
DEBORAH C. BURFORD, SUSAN M. GRIBBLE
AND ELENA PRIGMORE
42. 用延长染色方法进行基因排序的精细制图 409
THOMAS HAAF
43. 适用于培养细胞 mRNA 种间的原位杂交 413
ROELAND W. DIRKS
44. 同时检测 DNA、RNA 和蛋白质的原位杂交 419
NOÉLIA CUSTÓDIO, CÉLIA CARVALHO, T. CARNEIRO
AND MARIA CARMO-FONSECA
45. 基因组结构和单个分子水平 DNA 复制的荧光观察 429
RONALD LEBOFsky AND
AARON BENSIMON