

高等学校实验教材

生物技术实验

主编 徐文弟



人民卫生出版社

高等学校实验教材

生物技术实验

主 编 徐文弟

副主编 陈 峰 杨歌德 李 波

编 委 (按姓氏笔画排序)

于 畅	马 宁	王淑娟	任 欢
孙金圣	吕雪莹	李 光	李 波
李冀宏	杨歌德	陈 峰	姜玉梅
徐文弟	徐晓莹	贾秀志	富东旭
裴春颖			

主 审 张凤民 李 光



人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目(CIP)数据

生物技术实验/徐文弟主编. —北京:人民卫生出版社,
2005. 11

ISBN 978-7-117-07207-6

I. 生… II. 徐… III. 生物技术-实验-医学院校-
教材 IV. Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 128715 号

门户网: www.pmph.com 出版物查询、网上书店
卫人网: www.ipmph.com 护士、医师、药师、中医师、卫生资格考试培训

版权所有, 侵权必究!

生物技术实验

主 编: 徐文弟

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

010-59787586 010-59787592

印 刷: 三河市富华印刷包装有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 7.5

字 数: 173 千字

版 次: 2005 年 11 月第 1 版 2013 年 7 月第 1 版第 6 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-07207-6/R·7208

定 价: 15.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换)

目录

M U L U

第一章 生物技术基本原理	1
第一节 概述	1
一、生物技术及其研究意义	1
二、生物技术研究现状与发展	1
第二节 基本原理	3
一、核酸研究基本技术	3
二、蛋白质研究基本技术	10
三、细胞研究基本技术	14
第三节 生物信息技术	20
一、生物信息学	20
二、相关生物学数据库	21
第二章 生物技术实验基本知识	24
第一节 实验常识	24
一、实验须知	24
二、实验报告	25
第二节 生物技术实验设计	25
一、实验设计的目的与意义	25
二、实验设计的基本内容	26
第三章 生物技术实验方法	28
第一节 核酸研究技术相关实验	28
实验一 动物组织细胞内 DNA 的分离和含量测定	28
实验二 质粒的提取和纯化	30
实验三 核酸的琼脂糖凝胶电泳	31
实验四 人类基因组 DNA 的提取	34
实验五 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	36

实验六 聚合酶链式反应 (PCR)	37
实验七 利用 PCR-RFLP 技术检测人 MTHFR 基因多态性	39
实验八 利用 PCR-EMSA 技术检测人 OPB7 基因启动子活性	41
第二节 蛋白质研究技术相关实验	43
实验九 蛋白质的两性反应和等电点测定	43
实验十 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白质	45
实验十一 葡聚糖凝胶层析分离蛋白质	48
实验十二 Lowry 氏法测定蛋白质含量	50
实验十三 血清蛋白质醋酸纤维薄膜电泳	53
实验十四 ELISA 法 (双抗体夹心法) 检验 IL-2	55
实验十五 温度、pH、激活剂、抑制剂对酶活性的影响	57
实验十六 酵母蔗糖酶米氏常数 (K_m) 的测定	59
实验十七 血清乳酸脱氢酶同工酶的分	62
实验十八 抗核抗体的检验	65
实验十九 胶体金技术	66
实验二十 琼脂扩散试验	67
实验二十一 对流免疫电泳试验	70
实验二十二 火箭电泳试验	72
实验二十三 玻片凝集反应	73
实验二十四 间接血细胞凝集试验	75
实验二十五 免疫印记法	76
第三节 细胞研究技术相关实验	78
实验二十六 感受态细胞的制备和转化	78
实验二十七 人外周血淋巴细胞染色体标本制备及核型分析	80
实验二十八 G 显带染色体标本制备与识别	82
实验二十九 光学显微镜的构造原理和使用方法	84
实验三十 动物细胞的显微测量	89
实验三十一 细胞形态结构的观察和细胞计数	90
实验三十二 细胞组分的分级分离	94
实验三十三 细胞组分的化学反应	96
实验三十四 细胞的原代培养和传代培养	97
实验三十五 细胞融合	99
实验三十六 特异性细胞免疫	100
实验三十七 淋巴细胞转化试验	102
实验三十八 人外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞的检测	103
第四节 其他实验	105
实验三十九 动物血清过敏症	105
实验四十 维生素 C 的性质与食物中维生素 C 含量的测定	106
第五节 综合性设计性实验	109

实验四十一	血清白蛋白、 γ -球蛋白的分离纯化及鉴定	109
实验四十二	心肌组织双向电泳分析; GOT 提取、纯化、鉴定及活性检测	110
实验四十三	基因工程生产人类 EPO 的实验设计	110
实验四十四	抗独特型单克隆抗体的制备与检测	110
实验四十五	苯丙酮尿症的实验室诊断	110
实验四十六	先天愚型的产前诊断	111
实验四十七	肝癌细胞蛋白表达谱的分析	111

第一节 概 述

生物技术是多种技术的集成,是一种系统工程,从科学研究到产品研发再到产品上市需要多学科的科学家和企业家共同努力才能完成,客观上需要研究机构与生物企业之间、国内外生物企业之间形成多元化的战略联盟,进行产研结合和产业结构调整。

一、生物技术及其研究意义

(一) 生物技术

生物技术是指用活的生物体(或生物体的产物)来改进产品、改良植物和动物,或为特殊用途而培养微生物的技术。

生物工程则是生物技术的统称,是指运用生物化学、分子生物学、微生物学、遗传学等原理与生化工程相结合,来改造或重新创造设计细胞或遗传物质,培育化新物种,以工业规模利用现有生物体系,以生物化学过程来制造工业产品,或是将活的生物体、生物体系或生命过程产业化的过程。包括基因工程、细胞工程、酶工程、微生物发酵工程、生物电子工程、生物反应器、分离技术及新兴的蛋白质工程等。美国工业界习惯称生物工程为四个:细胞工程是取不同生物的部分在体外进行组合,产生细胞(质粒、噬菌体、病毒)等的重组,然后植入受体细胞或细胞内进行克隆,使受体人的基因在细胞/微生物内表达产生所需产物或细胞。

(二) 生物技术研究意义

以基因工程为基础的现代生物技术在医学上的广泛应用,不仅极大地促进了对传统医药产业的改造,而且使医药诊断、治疗和预防手段产生革命性的变化,使医疗技术发展日新月异,千细胞工程,成为工程研究的重大突破,为再生医学开拓日益广阔的前景。

当前,生物产业已成为发达国家和其他地区新的经济增长点,加速生物产业发展,抢占生物经济时代制高点,已经成为世界许多国家经济综合发展战略的重点。

二、生物技术研究现状与发展

生物技术产业在国内外都是一个相对年轻、新兴的产业部门。直到 20 世纪 80 年代中期,生物技术产业还普遍用来特指从事与生命体有关的行业,以便它与传统的化学工业

第一章

生物技术基本原理

第一节 概 述

生物技术是多种技术的集成，是一种系统工程，从科学研究到产品研发再到商品上市需要多学科科学家和企业家共同努力才能完成，客观上需要研发机构与生物企业之间、国内外生物企业之间形成多元化的战略联盟，进行产品创新和产业结构调整。

一、生物技术及其研究意义

(一) 生物技术

生物技术是指用活的生物体（或生物体的物质）来改进产品、改良植物和动物，或为特殊用途而培养微生物的技术。

生物工程则是生物技术的统称，是指运用生物化学、分子生物学、微生物学、遗传学等原理与生化工程相结合来改造或重新创造设计细胞的遗传物质、培育出新品种，以工业规模利用现有生物体系，以生物化学过程来制造工业产品，就是将活的生物体、生命体系或生命过程产业化的过程。包括基因工程、细胞工程、酶工程、微生物发酵工程、生物电子工程、生物反应器、灭菌技术及新兴的蛋白质工程等，基因工程是现代生物工程的核心。基因工程是将不同生物的基因在体外剪切组合，并和载体（质粒、噬菌体、病毒）DNA 连接，然后转入微生物或细胞内进行克隆，并使转入的基因在细胞/微生物内表达产生所需要的蛋白质。

(二) 生物技术研究意义

以基因工程为基础的现代生物技术在医学上的广泛应用，不仅极大地促进了对传统医药产业的改造，而且使疾病诊断、治疗和预防手段产生革命性的变化，使医疗技术发生质的飞跃。干细胞、组织工程研究的重大突破，为再生医学开拓日益广阔的前景。

当前，生物产业已经成为一些发达国家和地区新的经济增长点。加速生物产业发展，抢占生物经济时代制高点，已经成为世界许多国家经济社会发展战略的重点。

二、生物技术研究现状与发展

生物技术产业在国内外都是一个相对年轻、新兴的产业部门，直到 20 世纪 90 年代中期，生物技术产业还被用来特指从事与生命体有关的行业，以使它与传统的化学工业

相区别,但是随着科学的进步以及研究成果产业化步伐的加快,该部门已变得越来越复杂了。

生物技术企业是指运用生命科学知识,利用高技术工具,通过富有创新性的研究来生产或销售其产品和服务的公司。

(一) 新生物技术的主要特点

1. 打破了几千年来遗传学上远缘不能杂交的规律,打破了种属间屏障。人们可以任意将一种基因引入生命体而赋予它新的遗传特征,例如,将某种细菌的毒蛋白基因引入棉花,使棉花获得抗虫害的性能;又如将某一种抗病毒基因引入烟草或蔬菜而使后者获得抗病毒的植物新品种;又如将生长激素基因引入鱼或猪有可能获得快速生长的鱼或瘦肉型猪的新品种等等,这就是转基因植物或转基因动物,这是育种史上的一次伟大革命。

2. 提供了一种手段或直接进行基因或蛋白质的人工合成,或利用简单微生物来大量生产有用的蛋白质,用于人类和牲畜重要疾病的预防、治疗和诊断。甚至可以改造自然蛋白质使之更符合于人们的需求,这就是蛋白质工程。过去,人体中极微量的蛋白质,难以提取,现在可以用大肠杆菌发酵大量生产,进行生物治疗以及形成新的医药工业。

3. 提供了基因治疗手段,在基因水平上进行防病治病,以治疗难以治疗的遗传病、恶性肿瘤等。

(二) 新兴的生物技术产业的优点

1. 投资少,产值高,周期短,见效快。
2. 利用自然界的再生能源,工程细菌可以无限大量繁殖。
3. 经基因工程改造的新生物品种、菌种有相对的遗传稳定性,可以连续、长期使用它来创造财富。
4. 一般无环境污染。

(三) 全球生物技术行业发展表现出的一些特点

出现了一批影响未来的重大技术,人类基因组学/蛋白质组学、干细胞技术与组织工程、生物信息学、转基因技术、克隆技术、生物芯片/蛋白芯片/组织芯片、基因治疗与细胞治疗、反义核酸技术、单抗技术等对现代生命科学及生物技术产业产生了巨大的影响;生物技术产业格局从治病为主向治病、保健、提高生活质量的健康产业过渡;跨国公司平均研究与发展投入与销售收入的比例已经超过 10%,创新型产品不断涌现。1998 年以来,世界生物技术产业格局发生了剧烈变化,全球市场排名的前五强中四席是重组的结果,二十强的市场集中度高达 67.8%。小型企业走向专业化道路,在生物制药行业尤其明显。如 Amgen 公司、Genentech 公司、Celera 公司、Isis 公司等分别成为基因工程药物、大规模基因组测序与生物信息学、反义核酸药物等领域的典范。

(四) 生物技术的发展趋向

1. 基因操作技术日新月异,不断完善,特别是基因转移技术、基因扩增技术、基因克隆技术、基因修饰技术等,并通过商业渠道,出售专项技术全套试剂,大力推广。目前,基因技术已经推广到基层,例如临床医生采用基因扩增技术诊断疑难病症。

2. 生物治疗技术突飞猛进。新型药物和疫苗已有多种新产品投放市场,产生巨大的经济和社会效益,本世纪将面临医药工业的更新。

3. 转基因植物和动物有重大突破。抗虫、抗病毒的农作物,如抗虫的棉花,已经进入实用化阶段,本世纪初,就可以推广社会上可接受的抗虫、抗病毒的农作物。培育耐盐碱、耐干旱的农作物,在本世纪就能实现。采用新生物技术改造整个农业,估计要到 2030 年才能全面开展。

4. 人基因组图谱成为国际间协作的一项大科学研究课题,为开发新药提供了美好前景。

5. 基因治疗取得重大进展。自 1990 年治疗 1 例先天性免疫缺陷症以来,仅 4 年时间基因治疗的对象已很快扩展到治疗恶性肿瘤、艾滋病、乙型肝炎、心血管等严重疾病。估计到本世纪初,恶性肿瘤、艾滋病等严重疾病的防治可望有所突破。

(五) 医药生物技术的应用研究新进展

医药生物技术是生物技术研究开发的热点,近 10 多年来,一些发达国家投放大量的人力、财力、物力研究和开发医药领域的生物技术,已取得新的进展,其中基因治疗技术和新型生物药剂方面的开发应用最为广泛。

1. 基因治疗 基因治疗研究取得突破。基因治疗是将基因直接导入人体,通过控制目的基因的表达,抑制替代或补偿缺陷基因,从而恢复受体细胞、组织或器官的生理功能,达到治疗疾病的一种方法。目前,基因治疗已从实验室研究阶段进入临床试验与应用阶段,发达国家的基因治疗技术可谓日新月异,有可能革新整个医学预防和治疗领域。原本用于治疗单基因遗传缺陷的基因治疗技术,现已快速扩展到治疗癌症、艾滋病、心血管病等严重疾病,长期困扰人类的某些不治之症,有望得到治愈。1996 年医学生物技术已在肥胖病基因治疗、血液替代品开发、把人类基因转化的猪器官移植给人体等方面取得重大进展。我国在基因治疗研究方面,如血友病的基因治疗,已进入临床试验,取得了明显的治疗效果。针对肝癌等恶性肿瘤的基因治疗已开展多方面的实验研究,为通过药品审评,从而进入临床试验奠定技术基础。

2. 生物技术药物 采用 DNA 重组技术或其他生物技术研制的蛋白质或核酸类药物称为生物技术药物。自 20 世纪 80 年代以来,仅日、美两国开发的生物技术新药物就达 200 余种,大都是重组蛋白质药物和重组 DNA 药物。目前,美国已有 50 多种生物药物、疫苗和各种生物制剂投放市场,另有 400 多种各类生物制剂正在临床试验。目前,世界范围内应用最多的生物技术药物有:免疫干扰素(r-IFN)、治疗贫血病的 EPO、治疗免疫抑制患者的 GCSF 和溶血栓药 tPA。

第二节 基本原理

一、核酸研究基本技术

(一) 核酸分离纯化技术

1. DNA 提取技术 制备基因组 DNA 是进行基因结构和功能研究的重要步骤,通常要求得到的片段的长度不小于 100~200kb。在 DNA 提取过程中应尽量避免使 DNA

断裂和降解的各种因素,以保证 DNA 的完整性,为后续的实验打下基础。一般真核细胞基因组 DNA 有 $10^7 \sim 10^9$ bp,可以从新鲜组织、培养细胞或低温保存的组织细胞中提取,常是采用在 EDTA 以及 SDS 等试剂存在下用蛋白酶 K 消化细胞,随后用酚抽提而实现的。这一方法获得的 DNA 不仅经酶切后可用于 Southern 分析,还可用于 PCR 的模板、文库构建等实验。

根据材料来源不同,采取不同的材料处理方法,尔后的 DNA 提取方法大体类似,但都应考虑以下两个原则:①防止和抑制 DNase 对 DNA 的降解;②尽量减少对溶液中 DNA 的机械剪切破坏。

质粒 DNA 是细菌细胞中小的共价闭合环状双链 DNA。由于基因工程中使用的载体主要是质粒,因此,质粒 DNA 的提取和纯化是进行基因工程的重要前提。提取质粒 DNA 的方法很多,几种有代表性的程序介绍如下:

(1) 酚提取法。

(2) 碱提取法:其基本原理是在溶菌酶和 SDS 破壁释放 DNA 后,在强碱条件下, DNA 变性成单链,当加醋酸钠 (NaAc) 适当中和 pH 时,质粒 DNA 复性;而 DNA 和大分子 RNA 仍为单链并与蛋白质-SDS 复合物被高盐沉淀,质粒 DNA 留在溶液中。不需经酚氯仿抽提,即可直接用乙醇沉淀上清中的质粒 DNA。

(3) 煮沸提取法:此法快速简便,既可小规模检验也可大规模制备质粒 DNA。其基本原理是在溶菌酶和 Triton 破壁释放 DNA 后,迅速煮沸,使 DNA 和蛋白质沉淀,质粒 DNA 留在溶液中。

2. RNA 提取 完整 RNA 的提取和纯化是进行 RNA 方面的研究工作,如 Northern 杂交、mRNA 分离、RT-PCR、定量 PCR、cDNA 合成及体外翻译等的前提。所有 RNA 的提取过程中都有五个关键点,即①样品细胞或组织的有效破碎;②有效地使核蛋白复合体变性;③对内源 RNA 酶的有效抑制;④有效地将 RNA 从 DNA 和蛋白混合物中分离;⑤对于多糖含量高的样品还牵涉到多糖杂质的有效除去。但其中最关键的是抑制 RNA 酶活性。

RNA 的提取目前阶段主要可采用两种途径:①提取总核酸,再用氯化锂将 RNA 沉淀出来;②直接在酸性条件下抽提,酸性条件下 DNA 与蛋白质进入有机相,而 RNA 留在水相。第一种提取方法将导致小分子量 RNA 的丢失,目前该方法的使用频率已很低。

一些生物技术公司推出的总 RNA 提取试剂盒,可以用来制备高质量的可用于建库的 RNA。该总 RNA 纯化系统采用两种著名的 RNA 酶抑制剂——异硫氰酸胍 (GTC) 和 β -巯基乙醇,加上整个操作都在冰浴下进行,这样就能显著降低 RNA 的降解速率。GTC 和 N-十二烷基肌氨酸钠的联合使用,将促使核蛋白复合体的解离,使 RNA 与蛋白质分离,并将 RNA 释放到溶液中。而进一步从复合体中纯化 RNA,则根据 Chomczynski 和 Sacchi 的一步快速抽提法进行,采用酸性酚-氯仿混合液抽提。低 pH 值的酚将使 RNA 进入水相,这样使其与仍留在有机相中的蛋白质和 DNA 分离。水相中的 RNA 可用异丙醇沉淀浓缩。进一步将上述 RNA 沉淀复溶于 GTC 溶液中,接着用异丙醇进行二次沉淀,随后用乙醇洗涤沉淀,即可去除所有残留的蛋白质和无机盐,而 RNA 中如含无机盐,则有可能对以后操作中的一些酶促反应产生抑制。

(二) DNA 含量分析

DNA 在 260nm 处有最大的吸收峰,蛋白质在 280nm 处有最大的吸收峰,盐和小分子则集中在 230nm 处。因此,可以用 260nm 波长进行分光测定 DNA 浓度,OD 值为 1 相当于大约 50 μ g/ml 双链 DNA。如用 1cm 光径,用 H₂O 稀释 DNA 样品 n 倍,并以 H₂O 为空白对照,根据此时读出的 OD₂₆₀ 值即可计算出样品稀释前的浓度:DNA (mg/ml) = 50 × OD₂₆₀ 读数 × 稀释倍数 / 1000。

DNA 纯品的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.8,故根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值可以估计 DNA 的纯度。若比值较高说明含有 RNA,比值较低说明有残余蛋白质存在。OD₂₃₀/OD₂₆₀ 的比值应在 0.4~0.5 之间,若比值较高说明有残余的盐存在。

(三) 分子杂交技术

1. 分子杂交技术 互补的核苷酸序列通过 Watson-Crick 碱基配对形成稳定的杂合双链 DNA 分子的过程称为杂交。杂交过程是高度特异性的,可以根据所使用的探针已知序列进行特异性的靶序列检测。

杂交的双方是所使用探针和要检测的核酸。该检测对象可以是克隆化的基因组 DNA,也可以是细胞总 DNA 或总 RNA。根据使用的方法被检测的核酸可以是提纯的,也可以在细胞内杂交,即细胞原位杂交。探针必须经过标记,以便示踪和检测。使用最普遍的探针标记物是同位素,但由于同位素的安全性,近年来发展了许多非同位素标记探针的方法。

核酸分子杂交具有很高的灵敏度和高度的特异性,因而该技术在分子生物学领域中已广泛地用于克隆基因的筛选,酶切图谱的制作,基因组中特定基因序列的定性、定量检测和疾病的诊断等方面。因而它不仅在分子生物学领域中具有广泛地应用,而且在临床诊断上的应用也日趋增多。

核酸探针根据核酸的性质,可分为 DNA 和 RNA 探针;根据是否使用放射性标记物的,可分为放射性标记探针和非放射性标记探针;根据是否存在互补链,可分为单链和双链探针;根据放射性标记物掺入情况,可分为均匀标记和末端标记探针。下面将介绍各种类型的探针及标记方法。

2. 双链 DNA 探针及其标记方法 分子生物学研究中,最常用的探针即为双链 DNA 探针,它广泛应用于基因的鉴定、临床诊断等方面。

双链 DNA 探针的合成方法主要有两种:切口平移法和随机引物合成法。

(1) 切口平移法:当双链 DNA 分子的一条链上产生切口时, *E. coli* DNA 聚合酶 I 就可将核苷酸连接到切口的 3' 羟基末端。同时该酶具有从 5'→3' 的核酸外切酶活性,能从切口的 5' 端除去核苷酸。由于在切去核苷酸的同时又在切口的 3' 端补上核苷酸,从而使切口沿着 DNA 链移动,用放射性核苷酸代替原先无放射性的核苷酸,将放射性同位素掺入到合成新链中。最合适的切口平移片段一般为 50~500 个核苷酸。切口平移反应受几种因素的影响:①产物的比活性取决于 [α -32 P] dNTP 的比活性和模板中核苷酸被置换的程度。②DNA 酶 I 的用量和质量会影响产物片段的大小。③DNA 模板中的抑制物如琼脂糖会抑制酶的活性,故应使用纯化后的 DNA。

(2) 随机引物合成法:随机引物合成双链探针是使寡核苷酸引物与 DNA 模板结合,在 Klenow 酶的作用下,合成 DNA 探针。合成产物的大小、产量、比活性依赖于

反应中模板、引物、dNTP 和酶的量。通常,产物平均长度为 400~600 个核苷酸。利用随机引物进行反应的优点是:①Klenow 片段没有 5'→3' 外切酶活性,反应稳定,可以获得大量的有效探针。②反应时对模板的要求不严格,用微量制备的质粒 DNA 模板也可进行反应。③反应产物的比活性较高,可达 4×10^9 cpm/ μ g 探针。④随机引物反应还可以在低熔点琼脂糖中直接进行。

(四) DNA 体外扩增 PCR 技术

核酸研究已有 100 多年的历史,20 世纪 60 年代末、70 年代初人们致力于研究基因的体外分离技术,Korana 于 1971 年最早提出核酸体外扩增的设想:“经过 DNA 变性,与合适的引物杂交,用 DNA 聚合酶延伸引物,并不断重复该过程便可克隆 tRNA 基因。”

1985 年美国 PE-Cetus 公司人类遗传研究室的 Mullis 等发明了具有划时代意义的聚合酶链反应 (PCR) 技术。PCR (Polymerase Chain Reaction, 聚合酶链反应) 是一种选择性体外扩增 DNA 或 RNA 的方法。其原理类似于 DNA 的体内复制,只是在试管中给 DNA 的体外合成提供合适的条件,即模板 DNA,寡核苷酸引物, DNA 聚合酶,合适的缓冲体系, DNA 变性、复性及延伸的温度与时间。

DNA 体外扩增 PCR 技术由变性—退火—延伸三个基本反应步骤构成,这三个基本步骤组成一轮循环,理论上每一轮循环将使目的 DNA 扩增 1 倍。这些经合成产生的 DNA 又可作为下一轮循环的模板。类似于 DNA 的天然复制过程,其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。

1. 模板 DNA 的变性 模板 DNA 经加热至 93℃ 左右一定时间后,使模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离,使之成为单链,以便它与引物结合,为下一轮反应做准备。

2. 模板 DNA 与引物的退火 (复性) 模板 DNA 经加热变性成单链后,温度降至 55℃ 左右,引物与模板 DNA 单链的互补序列通过氢键配对结合。

3. 引物的延伸 DNA 模板-引物结合物在 Taq DNA 聚合酶的作用下,以 dNTP 为反应原料,靶序列为模板,按碱基配对与半保留复制原理,合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链,重复循环变性—退火—延伸三过程,就可获得更多的“半保留复制链”,而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需 2~4 分钟,2~3 小时就能将待扩目的基因扩增放大几百万倍。

(五) 基因工程基本技术

基因工程是将不同生物的基因在体外剪切组合,并和适当载体 DNA 连接,然后转入受体细胞内进行克隆,并使转入的基因在受体细胞内表达产生所需要目的蛋白质的技术。

1. 基因工程的操作步骤 基因工程一般包括四个方面的基本内容:一是取得符合人们要求的 DNA 片段,这种 DNA 片段被称为“目的基因”;二是将目的基因与质粒或病毒 DNA 连接成重组 DNA (质粒和病毒 DNA 称为载体);三是把重组 DNA 引入某种细胞 (称为受体细胞);四是把目的基因能表达的受体细胞挑选出来。

DNA 分子很小,其直径只有 20Å,约相当于 1/500 万 cm,在它们身上进行“手术”是非常困难的,因此基因工程实际上是一种“超级显微工程”,对 DNA 的切割、

缝合与转运,必须有特殊的工具。首先,要把所需基因——目的基因从供体 DNA 长链中准确地剪切下来。1968 年,沃纳·阿尔伯博士、丹尼尔·内森斯博士和汉密尔·史密斯博士第一次从大肠杆菌中提取出了限制性内切酶能够在 DNA 上寻找特定的“切点”,认准后将 DNA 分子的双链交错地切断。人们把这种限制性内切酶称为“分子剪刀”,这种“分子剪刀”可以完整地切下个别基因。自 20 世纪 70 年代以来,人们已经分离提取了 400 多种“分子剪刀”,其中许多“分子剪刀”的特定识别切点已被弄清。有了形形色色的“分子剪刀”,人们就可以随心所欲地进行 DNA 分子长链的切割了。由于限制性内切酶的发现,阿尔伯、史密斯和内森斯共享 1978 年诺贝尔生理和医学奖。

DNA 的分子链切开后,还得缝接起来以完成基因的拼接。1976 年,科学界在 5 个实验室里几乎同时发现并提取出一种酶,这种酶可以将两个 DNA 片段连接起来,修复好 DNA 链的断裂口。1974 年以后,科学界正式肯定了这一发现,并把这种酶叫做 DNA 连接酶。从此, DNA 连接酶就成了名符其实的“缝合”基因的“分子针线”。只要在用同一种“分子剪刀”剪切的两种 DNA 碎片中加上“分子针线”,就会把两种 DNA 片段重新连接起来。

把“拼接”好的 DNA 分子运送到受体细胞中去,必须寻找一种分子小、能自由进出细胞,而且在装载了外来的 DNA 片段后仍能照样复制的运载体。

基因的理想运载工具是病毒和噬菌体,病毒不仅在同种生物之间,甚至可以在人和兔培养细胞转移。还有一种理想的载体是质粒。质粒能自由进出细菌细胞,当用“分子剪刀”把它切开,再给它安装上一段外来的 DNA 片段后,它依然如故地能自我复制。因此,它是一种理想的运载体。有了限制性内切酶、连接酶及运载体,进行基因工程就可以如愿以偿了。

把目的基因装在运载载体上,运载体将目的基因运到受体细胞是基因工程的最后一步。一般情况下,转化成功率为 1/100 万。为此,遗传工程师们创造了低温条件下用氯化钙处理受体细胞和增加重组 DNA 浓度的办法来提高转化率。采用氯化钙处理后,能增大体细胞的细胞壁通透性,从而使杂种 DNA 分子更容易进入。目的基因的导入过程是肉眼看不到的。因此,要知道导入是否成功,事先应找到特定的标志。例如我们用一种经过改造的抗四环素质粒 PSC100 作载体,将一种基因移入自身无抗性的大肠杆菌时,如果基因移入后大肠杆菌不能被四环素杀死,就说明转入获得成功。

2. 基本概念

(1) 目的基因:所谓目的基因就是我们想要的基因片段,它在生物体内能表达产生所要的蛋白产物。生物界的基因有上亿个,多数存在于染色体上,少数存在于细胞质中。取得目的基因的办法是用“分子剪刀”剪切供体 DNA 分子,把它切成一些比基因略长的片段,然后再从中找出包含所需目的基因的 DNA 片段。到目前为止,人们用这种方法已分离出 40 种大肠杆菌蛋白质基因、鸡的组蛋白基因等。另一种获得目的基因的方法是人工合成。随着技术的进步,已有用自动测定 DNA 顺序的专门仪器和自动合成 DNA 仪器。还有一种基因合成方法是模板合成。基因工作指令的传递是按照“DNA-RNA-蛋白质”这一方向进行的,相反的信息传递即由 RNA-DNA 也存在。基因模板合成法就是先以信使 RNA 为模板,反向转录出一条 DNA 单链,再以互补的方式

加倍成 DNA 双链。用这种方法人们已先后合成了家兔、鸭和人的珠蛋白基因、羽毛角蛋白基因等。

(2) 载体：目的基因片段很难直接转入生物体细胞，而且由于它自身常无 DNA 复制所需信息，在细胞分裂时不能复制给子细胞，就会丢失，所以人们要把它连在一些能独立于细胞染色体之外可复制的 DNA 片段上，这些 DNA 片段就叫载体。常用的载体有质粒和病毒。当然载体还有其他作用，如促进目的基因转化、表达等。人们对天然质粒及病毒进行了一系列改造，如加上耐药性基因片段等，提高基因的转化、筛选、表达效率。

(3) 限制性内切酶：在细菌内存在的一类能识别并水解外源 DNA 限制性内切酶，它具有极好的专一性，能识别 DNA 上的特定位点，将 DNA 的两条链都切断，形成粘性末端或平末端。DNA 经限制性内切酶切割后产生的具有碱基互补单链的末端称为粘性末端。限制性内切酶的生物学功能在于降解外面侵入的 DNA 而不降解自身细胞中的 DNA，因自身 DNA 的酶切位点经修饰酶的甲基化修饰而受到保护。限制性内切酶较为稳定，常用的约 100 多种，并已大多转化为商品。限制性内切酶在分析染色体结构、制作 DNA 的限制酶图谱、测定较长 DNA 序列以及基因的分离、基因的体外重组等研究中是不可缺少的重要工具酶。

(4) 转化：重组 DNA 进入受体的过程叫“转化”，得到重组 DNA 的细胞叫“转化细胞”。目的基因难以直接送进受体细胞，因为地球上的生物都是长期历史进化的产物，都有保卫自身不受异种生物侵害和稳定地延续自己种族的功能。如果外来的 DNA 闯进受体细胞，受体细胞就会把它“消灭”。当外来的 DNA 进入大肠杆菌时，大肠杆菌内部的内切酶就会使其“粉身碎骨”。在这种情况下，生物工程师们就要采用 DNA 重组技术。首先将目的基因与质粒经过内切酶的“裁剪”，然后靠连接酶的作用，将目的基因和质粒（或病毒 DNA）重新组合起来形成重组 DNA。重组 DNA 就能在质粒（或病毒 DNA）的“带领”下进入受体细胞。

（六）基因芯片

1. 基因芯片 也叫做基因微矩阵，是将大量靶基因片段高密度、有序地排列并固定在固相载体上，与标记的样品分子进行杂交，通过检测每个样品分子的杂交信号强度，得到样品分子的数量和序列信息。所用的基片材料有玻璃、尼龙膜、硝酸纤维素膜和滤纸等，其中以前两种应用最为广泛。标记方法主要有荧光标记、放射性同位素标记和酶学标记等。基片上的 DNA 可以采用寡核苷酸或 cDNA，固定在载体上的方法有原位合成和合成点样。新近还开发出了微流管芯片和电子芯片等。基因芯片技术的制作工艺不断更新，不仅集成技术不断提高，而且检测的灵敏度和特异性亦有了长足发展。

基因芯片技术已发展成为一项物理学、微电子学、数学、计算机科学与分子生物学综合交叉的高新技术。利用芯片技术中信息的集约化和平行处理原理，一次可以获取数千乃至数万基因的表达信息，具有传统生物技术无可比拟的高通量特点。

2. 基因芯片的应用 基因芯片技术的应用主要分为两大领域：一是用于研究基因型；二是用于分析基因表达。前者是利用基因芯片进行序列分析，包括研究基因的单核苷酸多态性和杂交测序等；后者则是研究基因的功能，利用基因表达的微阵列分析，获取某一组织或细胞在特定的生理或病理状态或外界干预时基因表达谱的信息，定量描述

基因的表达水平,不仅有助于未知功能基因的筛选和未知基因的克隆,而且还可以根据基因表达模式,并通过适当的生物信息学分析方法,获取基因与基因之间相互关系的重要信息。

现在基因芯片技术已逐渐应用到医学基础研究、临床医学诊断、药物筛选、指导临床用药、环境保护、农业乃至军事和司法等方面。

(1) 基础研究:在基础医学研究中主要应用于基因测序、基因图绘制、基因组分型和基因突变的检测,而更多的是用于基因表达谱的研究。

许多有关基因芯片基因表达谱的研究报道了观察在某一刺激因素作用下或处于某种生理或病理状态时基因的差异表达,这种研究方法能够提供一定的基因表达水平的相关信息,如在筛选肿瘤标记或药物靶点时非常有用,但却不能提供细胞在某一生物过程中 mRNA 表达的全景式的信息。比较引人注目的是对酵母的研究,包括芽胞形成、细胞周期、基因的调节机制以及信号转导通路等。

(2) 基因芯片在药物研究中的应用:基因芯片在药物研究中的应用主要是筛选药物和指导用药。由于人类基因组计划的进展,不断有人类基因序列和图谱成为已知,这就为从事开发药物的学者和商人提供了基因靶资源。利用集成基因信息,高通量、高特异性寻找药物靶基因,使高效快速筛选新药成为可能。

人体是一个复杂的体系,在生理情况下,各系统的生理活动是由非常复杂的网络调控而完成的。即使是单一细胞的单一生理反应往往也是由多种基因和多个信号分子形成网络共同完成的,在疾病发生和发展过程中更是涉及多个因素。疾病的致病因素往往是多重的,很难归结为单一因素的变化。多因素导致的病理变化也是多环节、多靶点的。因此应用经典的手段,一个一个因素、环节、靶点去研究,不可能真正了解疾病的全部。而基因芯片可以从疾病和药物两方面对机体进行研究,寻找致病基因,药物靶点,甚至药物副作用的靶点。

遗传多态性使临床药物应用更加复杂化。由于个体差异,不同人对同一剂量的药物有不同的反应,为了合理用药,减少副作用,降低用药成本,可以根据疾病基因谱的分型选择治疗用药,制定个体化用药基因谱。随着基因芯片技术的发展和成本的降低,基因芯片技术将会成为药物个体化的必须检测手段之一,药物基因组学这门新兴的学科也会逐渐发展,并受到重视。

(3) 基因芯片在医学研究中的应用:对恶性肿瘤的大量研究证实,不同的细胞转录水平往往可以反映在表型的差异上,某一细胞状态常常有其特征性的基因表达模式。某些按照传统方法归为一类的肿瘤,它们的基因表达谱非常相似。而患者的预后或对某种治疗的反应亦可以通过基因表达模式来预测,甚至可以找到一些标志基因,即这些基因的行为具有特征性。这些无疑对肿瘤的诊断、疗效和预后的评价具有重要的实际应用价值。

与心血管系统病理生理过程相关的信号转导系统是一个综合的调控网络,其状态的描述需要借助复杂系统的研究理论和方法来完成。基因芯片技术,由于可以同时检测到组织或细胞内多种基因(可多达 10 000 种)的表达水平,即达到了一定意义上的全基因表达谱的检测,与针对单一因素的研究方法相比,能更好地满足心血管系统信号转导研究的要求。

二、蛋白质研究基本技术

(一) 蛋白质提取、分离纯化技术

研究蛋白质,首先要得到高度纯化并具有生物活性的目的蛋白质。能从成千上万种蛋白质混合物中纯化出一种蛋白质的原因,是不同的蛋白质在它们的许多物理、化学和生物学性质方面有着一些不同,这些性质是由于蛋白质的氨基酸序列和数目不同造成的。连接在多肽主链上氨基酸残基可以是荷正电的、荷负电的、极性的或非极性的、亲水的或疏水的,此外,多肽可折叠成非常确定的二级结构、三级结构和四级结构,形成独特的大小、形状和残基在蛋白质表面的分布状况。利用待分离的蛋白质与其他蛋白质之间在性质上的差异,即能设计出一组合理的分级分离步骤。

1. 蛋白质的制备 蛋白质的制备工作涉及物理、化学和生物学等各方面知识,但基本原理不外乎两方面:一是利用混合物中几个组分分配率的差别,把它们分配到可用机械方法分离的两个或几个物相中,如盐析、有机溶剂提取、层析和结晶等;二是将混合物置于单一物相中,通过物理力场的作用使各组分分配于不同区域而达到分离目的,如电泳、超速离心、超滤等。在所有这些方法的应用中必须注意保存生物大分子的完整性,防止酸、碱、高温、剧烈机械作用而导致所提取物质生物活性的丧失。

蛋白质的制备一般分为以下四个阶段:①选择材料和预处理;②细胞的破碎及细胞器的分离;③提取和纯化;④浓缩、干燥和保存。

2. 蛋白质的分离纯化 蛋白质的分离纯化方法很多,主要介绍如下:

(1) 根据蛋白质溶解度不同的分离方法:

1) 蛋白质的盐析:中性盐对蛋白质的溶解度有显著影响,一般在低盐浓度下随着盐浓度升高,蛋白质的溶解度增加,此称为盐溶;当盐浓度继续升高时,蛋白质的溶解度不同程度下降并先后析出,这种现象称为盐析;将大量盐加到蛋白质溶液中,高浓度的盐离子(如硫酸铵的 SO_4 和 NH_4) 有很强水化力,可夺取蛋白质分子的水化层,使之“失水”,于是蛋白质胶粒凝结并沉淀析出。盐析时若溶液 pH 值在蛋白质等电点则效果更好。由于各种蛋白质分子颗粒大小、亲水程度不同,故盐析所需的盐浓度也不一样,因此调节混合蛋白质溶液中的中性盐浓度可使各种蛋白质分段沉淀。

影响盐析的因素有:①温度:除对温度敏感的蛋白质在低温(4°C)操作外,一般可在室温中进行。一般温度低蛋白质溶解度降低。但有的蛋白质(如血红蛋白、肌红蛋白、清蛋白)在较高的温度(25°C)比 0°C 时溶解度低,更容易盐析。②pH 值:大多数蛋白质在等电点时在浓盐溶液中的溶解度最低。③蛋白质浓度:蛋白质浓度高时,欲分离的蛋白质常常夹杂着其他蛋白质一起沉淀出来(共沉现象)。因此在盐析前血清要加等量生理盐水稀释,使蛋白质含量在 $2.5\%\sim 3.0\%$ 。

蛋白质盐析常用的中性盐,主要有硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、氯化钠、磷酸钠等。其中应用最多的硫酸铵,它的优点是温度系数小而溶解度大(25°C 时饱和溶液为 4.1M ,即 767g/L ; 0°C 时饱和溶解度为 3.9M ,即 676g/L),在这一溶解度范围内,许多蛋白质和酶都可以盐析出来;另外硫酸铵分段盐析效果也比其他盐好,不易引起蛋白质变性。硫酸铵溶液的 pH 值常在 $4.5\sim 5.5$ 之间,当用其他 pH 值进行盐析时,需用硫酸或稀氨溶液(氨水)调节。

蛋白质在用盐析沉淀分离后,需要将蛋白质中的盐除去,常用的办法是透析,即把蛋白质溶液装入透析袋内(常用的是玻璃纸),用缓冲液进行透析,并不断地更换缓冲液,因透析所需时间较长,所以最好在低温中进行。此外,也可用葡萄糖凝胶 G-25 或 G-50 过柱的办法除盐,所用的时间就比较短。

2) 等电点沉淀法:蛋白质在静电状态时颗粒之间的静电斥力最小,因而溶解度也最小,各种蛋白质的等电点都有差别,可利用调节溶液的 pH 值达到某一蛋白质的等电点使之沉淀,但此法很少单独使用,可与盐析法结合采用。

3) 低温有机溶剂沉淀法:用与水可混溶的有机溶剂,甲醇、乙醇或丙酮,可使多数蛋白质溶解度降低并析出,此法分辨率比盐析高,但蛋白质较易变性,应在低温下进行。

(2) 根据蛋白质分子大小差别的分离方法:

1) 透析与超滤:透析法是利用半透膜将分子大小不同的蛋白质分开。

超滤法是利用高压或离心力,强使水和其他小的溶质分子通过半透膜,而蛋白质留在膜上,可选择不同孔径的滤膜截留不同分子量的蛋白质。

2) 凝胶过滤法:也称分子排阻层析或分子筛层析,这是根据分子大小分离蛋白质混合物最有效的方法之一。柱中最常用的填充材料是葡萄糖凝胶和琼脂糖凝胶。

(3) 根据蛋白质带电性质进行分离:蛋白质在不同 pH 值环境中带电性质和电荷数量不同,因而可将其分开。

1) 电泳法:各种蛋白质在同一 pH 值条件下,因分子量和电荷数量不同而在电场中的迁移率不同,从而得以分开。值得重视的是等电聚焦电泳,这是利用一种两性电解质作为载体,电泳时两性电解质形成一个由正极到负极逐渐增加的 pH 梯度,当带一定电荷的蛋白质在其中泳动时,到达各自等电点的 pH 位置就停止,此法可用于分析和制备各种蛋白质。

2) 离子交换层析法:离子交换剂有阳离子交换剂(羧甲基纤维素、CM-纤维素)和阴离子交换剂(二乙氨基乙基纤维素),当被分离的蛋白质溶液流经离子交换层析柱时,带有与离子交换剂相反电荷的蛋白质被吸附在离子交换剂上,随后用改变 pH 值或离子强度办法将吸附的蛋白质洗脱下来。

(4) 根据配体特异性的分离方法——亲和层析法:亲和层析法是分离蛋白质的一种极为有效的方法,它经常只需经过一步处理即可使某种待提纯的蛋白质从很复杂的蛋白质混合物中分离出来,而且纯度很高。这种方法的根据是某些蛋白质与另一种称为配体的分子能特异而非共价地结合。

至今还没的单独或一套现成的方法能够把任何一种蛋白质从复杂的混合蛋白质中提取出来,因此往往采取几种方法联合使用。

3. 蛋白质浓缩技术

(1) 透析袋浓缩法:利用透析袋浓缩蛋白质溶液是应用最广的一种。将要浓缩的蛋白溶液放入透析袋(无透析袋可用玻璃纸代替),结扎,把高分子(6 000~12 000)聚合物如聚乙二醇、聚乙烯吡咯、烷酮等或蔗糖撒在透析袋外即可。也可将吸水剂配成 30%~40%浓度的溶液,将装有蛋白液的透析袋放入即可。吸水剂用过后,可放入温箱中烘干或自然干燥后,仍可再用。