

21世纪 高等院校教材

分子生物学

基本技能和策略

周俊宜 编著



科学出版社
www.sciencep.com

21 世纪高等院校教材

分子生物学

基本技能和策略

周俊宜 编著

罗超权 审校

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书以分子生物学理论为指导,以基因工程技术流程为主导路线,系统介绍了基因克隆、基因表达、蛋白质分析等经典理论和实用技术,既包括简明扼要的纲领性技术原理,又覆盖了生物化学与分子生物学领域最常见和最实用的技术方法和实验方案。

本书适合于高等院校生命科学专业的师生和从事生命科学研究的工作者使用。

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学基本技能和策略/周俊宜编著. —北京:科学出版社, 2003.8

(21世纪高等院校教材)

ISBN 7-03-011302-0

I. 分… II. 周… III. 分子生物学—高等院校—教材 IV. Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 019160 号

策划编辑:周 辉/文案编辑:邱 璐 贾学文/责任校对:陈丽珠
责任印制:安春生/封面设计:陈 敬

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>

源海印刷有限责任公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2003年8月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2003年8月第一次印刷 印张:15

印数:1-5 000 字数:282 000

定价:23.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈路通〉)

前 言

任何事物都有其成功之道。如果你有志于生命科学,生化与分子生物学技术便是你开启这扇科技之门必备的钥匙。然而,面对这门融艰涩深奥的基础理论和错综复杂的操作技术于一体的综合性学科,尚未入门的学子们常常会望而生畏,不知所措;初涉此道的研究者也往往因其日新月异的研究方法和浩如烟海的技术资料而无所适从,难以把握。怎样才能以更快捷的方式、更高的效率获取这把金钥匙,使自己在那些堪称扑朔迷离、变化多端的实验流程中应对自如、游刃有余,是每一位学子渴望达到的境界,也是作者编写本书的主要宗旨。

涉足一门新的学科,首先必须领略其整体的特性。如果你把生化与分子生物学技术当作一门单纯的操作技能来对待,那么,你最多也只能是一个只会“依葫芦画瓢”、不断重复简单劳动的“工匠”,难以心领神会其中的奥妙和机理;如果你把自己当作一个可以兼收并蓄的“聚宝盆”,幻想能把那包罗万象、让人眼花缭乱的技术方法都网罗其中,那么,你永远会被那些繁文缛节的技术细节所羁绊,忙忙碌碌而又不得要领。其实,任何事物都有其核心所在,所谓“万变不离其宗”。生化与分子生物学技术作为一门在严格、系统的基础理论指导下的技能性学科,尤其对于初学者来说,纲领性理论原理的掌握和主导性技术路线的梳理,是迈向成功之路最关键的一步。它能使你在整个学习或研究过程中,始终保持清晰的思路、敏锐的感觉,由浅入深,由简而繁,以不变应万变。本手册力求以最简洁的语言、最形象的图表,为你描绘一幅覆盖了生化与分子生物学技术最关键环节的全景性蓝图,帮助你在最短的时间内获得本学科的精髓和要领。

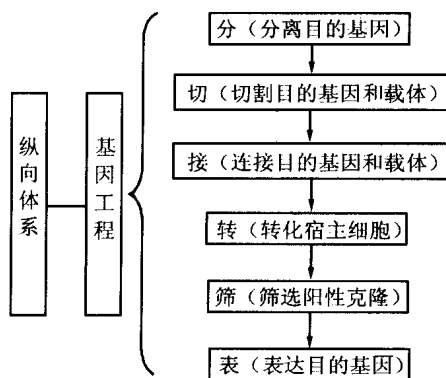
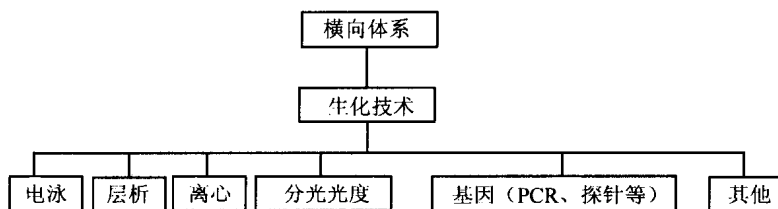
作者愿以自己涉足本学科十余年的经验和教训,与大家共同切磋,相互勉励,不断成长,在各自的学习和研究领域中开辟出一片崭新的天地。

周俊宜

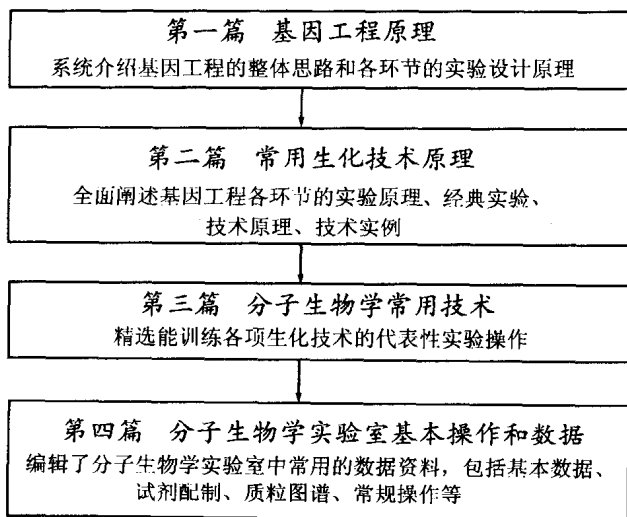
2003年3月于广州

本书说明

生物化学与分子生物学技术是一门实践性和应用性极强的新型学科,完整、系统的理论知识和全面、实用的操作技能相结合,是这一学科的主要特点,也是学习者学习过程的必由之路。它的理论和技术是不可分割的统一体。两者相互融合、相互渗透,形成一门集实验设计与实验技术于一体的综合性学科。



针对这一学科综合性和复杂性的特点,根据本学科的学科特征和学习者心理接受能力,本书在整体思路上进行了科学化的编排和设计。



目 录

第一篇 基因工程原理

概论	(3)
0.1 分子生物学概述	(3)
0.2 基因工程概述	(4)
0.3 基因重组技术的应用前景	(5)
第1章 分离目的基因和基因载体	(7)
1.1 目的基因的获取	(7)
1.2 基因载体的选择	(10)
第2章 限制性内切核酸酶的应用	(15)
2.1 概念	(15)
2.2 序列特征	(16)
2.3 作用方式	(17)
2.4 同裂酶和同尾酶	(18)
2.5 影响酶切活性的主要因素	(18)
第3章 目的基因和基因载体的体外连接	(19)
3.1 DNA连接酶	(19)
3.2 连接方式	(21)
第4章 重组DNA转化宿主细胞	(24)
4.1 受体细胞的选择	(24)
4.2 重组基因的导入方法	(25)
4.3 转化细胞的扩增	(27)
第5章 重组体阳性克隆的筛选	(28)
5.1 遗传检测法	(28)
5.2 物理检测法	(29)
5.3 菌落杂交筛选法	(30)
5.4 免疫化学检测法	(31)
5.5 DNA-蛋白筛选法	(32)
5.6 PCR法确定重组体	(32)
5.7 DNA序列分析	(32)
5.8 真核宿主细胞的筛选标记	(33)
第6章 外源基因表达及表达产物的检测	(34)

6.1 宿主细胞	(34)
6.2 表达载体	(34)
6.3 表达产物和表达水平	(35)
6.4 表达产物的检测	(38)
6.5 表达蛋白质的分离纯化	(39)

第二篇 常用生化技术原理

第1章 电泳技术	(43)
1.1 电泳基本原理	(43)
1.2 影响泳动度的主要因素	(43)
1.3 常用的电泳方法	(44)
第2章 层析技术	(54)
2.1 概述	(54)
2.2 层析原理	(54)
2.3 柱层析法	(56)
2.4 凝胶过滤层析法	(58)
2.5 气相色谱和高效液相色谱	(61)
第3章 分光光度技术	(66)
3.1 光学原理	(66)
3.2 Lambert-Beer 定律	(67)
3.3 分光光度计的基本构造	(68)
3.4 紫外可见光分光光度计	(69)
3.5 荧光分光光度计	(71)
3.6 酶标仪	(72)
第4章 离心分析法	(76)
4.1 离心机基本原理	(76)
4.2 离心机的分类	(77)
4.3 离心机的结构	(77)
4.4 离心方法	(81)
第5章 透析	(85)
5.1 透析膜(袋)	(85)
5.2 溶剂	(85)
5.3 物理条件	(86)

第三篇 分子生物学常用技术

第1章 目的基因和基因载体的分离	(89)
实验1 质粒 DNA 的提取	(89)

实验 2 真核生物基因组 DNA 的提取	(94)
实验 3 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	(96)
实验 4 DNA 的定量分析	(101)
实验 5 PCR 基因扩增	(102)
实验 6 哺乳动物 mRNA 的纯化与鉴定	(106)
实验 7 基因组 DNA 文库的建立	(111)
第 2 章 酶切与连接	(117)
实验 1 限制性内切核酸酶的酶切与鉴定	(117)
实验 2 载体与目的基因的连接	(121)
第 3 章 重组 DNA 的转化与筛选	(125)
实验 1 重组质粒转化大肠杆菌及初步筛选	(125)
实验 2 核酸探针的制备和标记	(126)
实验 3 原位杂交法进行重组质粒的筛选	(129)
实验 4 Northern 杂交	(131)
实验 5 真核细胞基因转染和筛选	(133)
实验 6 转染细胞的筛选	(135)
第 4 章 外源基因在宿主细胞中的表达	(138)
实验 1 在大肠杆菌(<i>E. coli</i>)表达蛋白产物	(138)
实验 2 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	(142)
实验 3 蛋白质杂交法检测表达蛋白	(145)
附: 常用生物化学实验技术	
实验 1 不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳	(149)
实验 2 凝胶过滤法测定蛋白质相对分子质量	(157)
实验 3 透析实验	(161)
实验 4 双缩脲反应	(162)
实验 5 胰岛素及肾上腺素对血糖含量的影响	(163)
实验 6 血糖含量测定	(164)
实验 7 蛋白质定量测定	(165)

第四篇 分子生物学实验室基本操作和数据

第 1 章 分子生物学实验室常规仪器设备	(169)
1.1 实验室的常规仪器及设施	(169)
1.2 离心机室的装备	(173)
1.3 分析仪器室的设置	(174)
1.4 核素实验室	(181)
1.5 细胞培养室	(184)
1.6 暗室	(187)
1.7 冷室	(187)

第2章 实验室基本操作.....	(188)
2.1 玻璃仪器的洗涤	(188)
2.2 搅拌和振荡	(188)
2.3 容量玻璃仪器的使用方法	(189)
2.4 分光光度计的使用	(190)
2.5 干燥箱和恒温箱	(192)
2.6 电热恒温水浴	(193)
2.7 酸度计	(193)
第3章 实验室常用数据.....	(196)
第4章 常用载体图谱.....	(204)
主要参考文献.....	(230)

第一篇 基因工程原理

概 论

0.1 分子生物学概述

分子生物学是研究核酸、蛋白质等生物大分子的形态、结构、功能及其规律性和相互关系的科学(图 1-0-1)。它意味着人类从分子水平揭示生命的奥秘,从而由被动地适应自然界到主动地改造和重组自然界的科学过程。

从总体上,分子生物学的研究内容主要包括以下三个方面。

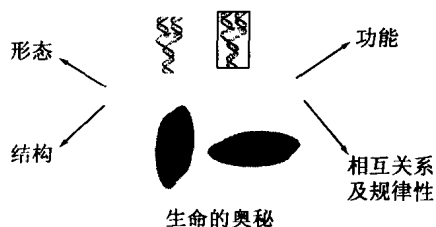


图 1-0-1 分子生物学概况

1. 生物大分子的结构功能研究

生物大分子特定的空间结构及结构的动态变化与其生物学功能的关系。

2. 基因表达调控

在遗传信息的传递过程中,复制、转录和翻译水平所进行的表达调控过程(图 1-0-2)。

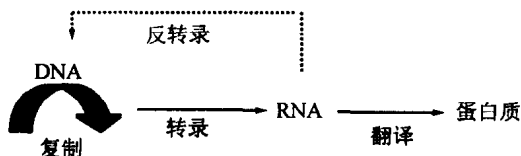


图 1-0-2 生物学的中心法则

3. 基因重组技术(基因工程)

对 DNA 大分子上的遗传单元(基因)进行体外操作,与载体系统形成新的基因组(即重组体),再把它引入特定的受体细胞并在细胞内进行复制和表达,产生新的遗

传性状(图 1-0-3)。

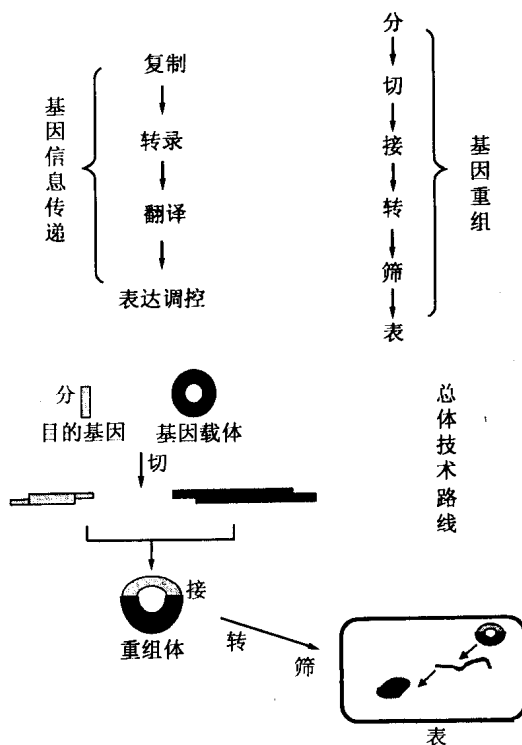


图 1-0-3 基因工程

0.2 基因工程概述

基因工程是使外源基因和载体系统所组成的重组体在一定的受体细胞或宿主体内复制和表达的过程。它是分子生物学的一个重要领域,为生命科学研究提供了崭新的技术手段。基因工程包括以下主要步骤(简称六字方针)(图 1-0-4)。

(1) 分(分离目的基因)。从生物体复杂的基因组中,分离出所需要的 DNA 片段,即目的基因。

(2) 切(切割目的基因和基因载体)。用限制性内切核酸酶切割目的基因和基因载体,以利于将两者连接形成重组体。

(3) 接(连接目的基因和基因载体)。在体外,将目的基因连接到能够自我复制的载体 DNA 分子上,形成重组 DNA(重组体)。

(4) 转(转化至宿主细胞)。将重组体引入(转化或转染)到宿主细胞(受体细胞)中。转化后的细胞进行扩增繁殖,获得大量的细胞繁殖群体。

(5) 筛(筛选阳性细胞克隆)。从大量的细胞繁殖群体中,筛选出转化成功(带有

重组体)的阳性细胞克隆。

(6) 表(表达目的蛋白质)。重组体在宿主细胞中表达目的蛋白质。广义的基因工程还包括下游纯化及应用技术。

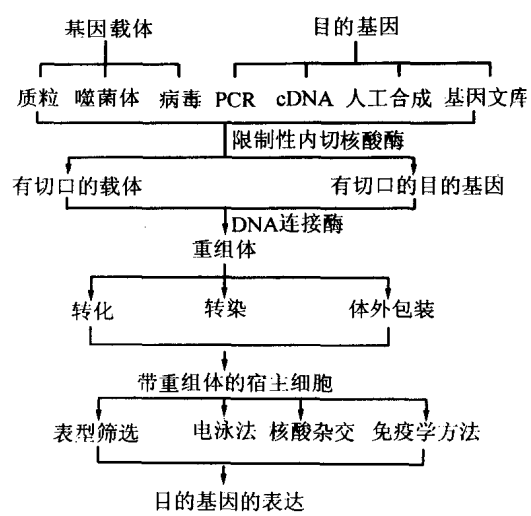


图 1-0-4 基因工程主要步骤

0.3 基因重组技术的应用前景

分子生物学及其技术是以生物学、遗传学、物理学及化学等学科为理论和实验基础发展起来的新型学科,广泛应用于生命科学各个领域(图 1-0-5)。

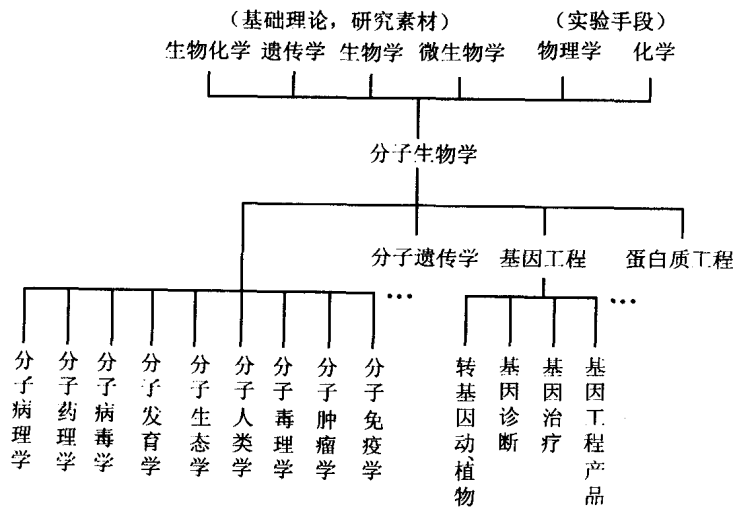


图 1-0-5 分子生物学与其他学科的关系

(1) 大量生产具有实用意义和应用价值的基因工程产物,如酶类、抗生素、抗体、激素等。

(2) 定向改造某些动植物的遗传特征,使之经济价值大大提高。

(3) 应用于生物学的基础研究,探讨基因信息传递的机制与调控过程。

(4) 应用于人类疾病的发病机制及基因诊断、治疗和预防的研究。

第 1 章 分离目的基因和基因载体

基因重组的第一步是要获取特定的目的基因和选择合适的基因载体。方法有多种,应根据具体情况进行选择。

1.1 目的基因的获取

目的基因,即需要克隆的 DNA 片段,是基因工程研究的主要目的和因素。目前主要有以下几种来源:化学合成法、基因文库、聚合酶链式反应(图 1-1-1)。操作时应按具体实验要求和实验条件选用既简便易行又能达到目的的途径。

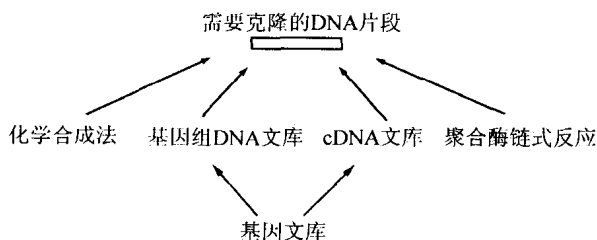


图 1-1-1 目的基因的获取方法

1.1.1 化学合成法

已知基因序列,利用 DNA 合成仪通过化学合成原理直接合成目的基因。一般用来合成数十个核苷酸长度的寡核苷酸片段。

用途:PCR 引物、测序引物、定点突变、杂交探针等的合成。

1.1.2 基因文库

基因文库如图 1-1-2 所示。

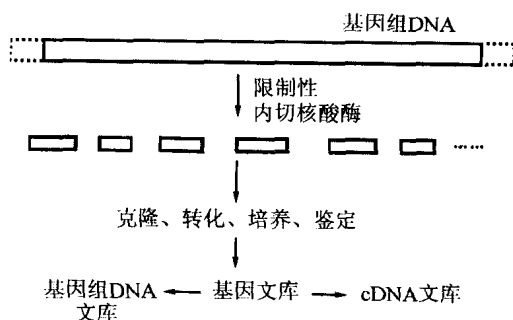


图 1-1-2 基因文库