

第二版

# 现代分子生物学实验技术



卢圣栋 主编

中国协和医科大学出版社

# 现代分子生物学实验技术

CURRENT PROTOCOLS FOR MOLECULAR BIOLOGY

(第二版)

主 编 卢圣栋

编 委 (以姓氏笔画为序)

马清钧 刘德培 李尹雄 陆士新 郑德先  
胡晓年 黄尚志 黄秉仁 崔莲仙 惠汝太  
鲁桂琛

编 者 (以姓氏笔画为序)

于 文 于英杰 马清钧 王越英 王新国  
卢圣栋 刘玉清 刘彦信 刘海玲 刘强远  
刘德培 安海谦 孙 颖 李 涛 李尹雄  
李德春 杜 恺 陆士新 吴 军 吴晓林  
余 跃 陈昭烈 杨靖轩 明 洪 周宪良  
郑德先 胡爱华 胡晓年 敖朝晖 徐晓石  
徐雁英 黄尚志 黄秉仁 盛 华 崔莲仙  
梁红雁 惠汝太 鲁桂琛

中国协和医科大学出版社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

现代分子生物学实验技术/卢圣栋主编. - 2 版. - 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 9  
ISBN 7-81072-006-6

I. 现… II. 卢… III. 分子生物学-实验-技术 IV. 07

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 28313 号

---

### 现代分子生物学实验技术 (第二版)

---

主 编: 卢圣栋  
责任编辑: 谢 阳  
技术设计: 栾广明  
责任校对: 李爱平  
责任印制: 姜文祥

---

出版发行: 中国协和医科大学出版社  
(北京市东单三条九号 邮编 100730 电话 65228583)  
经 销: 新华书店总店北京发行所  
印 刷: 北京市迪鑫印刷厂

---

开 本: 850×1168 毫米 1/16 开  
印 张: 52  
字 数: 1448 千字  
版 次: 1999 年 12 月第一版 1999 年 12 月北京第一次印刷  
印 数: 1—6000  
定 价: 148.00 元

---

ISBN 7-81072-006-6/R·006

---

(凡购本书, 如有缺页、倒页、脱页及其它质量问题, 由本社发行部调换)

## 内 容 简 介

本书比较系统、全面地介绍了现代分子生物学常用实验技术与方法。全书共分 32 章，绪论部分对基因工程与分子生物学主要进展进行了鸟瞰式的评述，其它章节包括分子生物学实验室常规仪器设备、分子生物学实验室常用技术、核酸的分离与纯化、核酸分子探针的标记、核酸分子杂交、基因克隆技术、基因组文库、cDNA 文库、DNA 序列测定及其自动测定、外源基因在原核细胞中的表达、外源基因在真核细胞中的表达、基因工程菌的大规模培养、工程菌生产的蛋白复性与纯化、动物细胞的大规模培养、多聚酶链式反应 (PCR) 技术、DNA 的化学合成、多肽的固相合成、蛋白质氨基酸组成及序列测定、真核基因表达调控、转基因动物、转基因植物、人类基因治疗、体内外转基因方法、非病毒载体基因治疗、细胞凋亡的研究方法、微卫星技术、cDNA 末端快速扩增技术、mRNA 差异显示法、DNA 芯片技术、常用遗传统计分析方法等。全书强调方法学上的严谨、实用与可靠。该书可作为理、工、农、医、药、林、牧、环保、海洋、食品等专业研究生用书，也可供从事生命科学各专业科研人员参考。

## 再 版 前 言

本书的第一版自 1993 年出版以来，受到了社会的欢迎，并流入世界诸多国家。应读者的要求，现经修改与增删，予以再版。

本书第一版为 17 章，再版为 32 章，增加了 15 章。为了反映当代基因工程与分子生物学研究的主要进展与发展趋势，全文改写了第一章的绪论开篇，以期引起读者对从事本领域研究的兴趣。新增加的技术方法包括基因工程菌的大规模培养、工程菌生产的蛋白的复性与纯化、动物细胞的大规模培养、转基因植物、基因治疗的主要技术 *Ex vivo* 法，多肽的固相合成、蛋白质的氨基酸组成及序列测定、细胞凋亡的研究方法、DNA 序列的自动测定、微卫星技术、mRNA 差异显示技术、cDNA 末端快速扩增技术，常用遗传统计方法等。这些技术方法的提供，仍以实用可行、辅以实验经验介绍为特点。作为相关技术方法研究进展的介绍与述评，还编入了关于高效率感受态细胞的制备、非病毒载体的基因治疗，及 DNA 芯片技术等，以资参考。所有这些技术方法的增补，既为了反映当代本领域新技术方法的前沿进展，更为了满足我国社会的需求。我们深切期望本书的再版对我国从事基因工程与分子生物学研究与开发的青年科技工作者及同行专家有点助益。

为了本书的再版，中国军事医学科学院马清钧教授及其年轻同仁提供了丰厚的支持，本院校一批新的编委与作者、插图绘制人员、校对人员，以及本院校出版社编辑室的专家们付出了辛勤的劳动，在此一并表示深切的感谢。

本书的错误与缺点依然难免，诚恳欢迎批评与指正。

卢圣栋

中国医学科学院  
中国协和医科大学  
1999 年 3 月于北京

---

本书由国家重点基础研究专项经费资助出版

## 前 言

分子生物学研究，对于认识生命本质和国计民生都具有重大意义。本院校一批青年科学家为推动分子生物学在我国的发展，在老一辈科学家的扶持下，编写了本书并以电教的方式拍摄了教学片。

参加本书写作的青年科学家，主要由近年毕业的分子生物学博士组成，部分是分子生物学硕士，一位是分子生物学副研究员。他们是李尹雄（第二、三、四、七章）、胡晓年（第五、六、十五章）、刘德培（第十六、十七章）、于文（第八章）、杜恺（第十章）、于英杰（第十一章）、敖朝晖（第十三、十四章）、刘强远（第十二章）、吴晓林（第九章）、余跃（第二章，与李尹雄合作）、李德春（第六章，与胡晓年合作）。

这些青年科学家选择了现代分子生物学研究中最重要和最常用的技术方法做了比较详细的介绍。本书的写作和教学片的摄制的指导思想是：既介绍取得实验成功的关键，也分析可能导致实验失败的因素。在国内外现行的为同一个实验目的而设计的不同技术方法中，选择被认为最佳的一种方法作为重点加以介绍。这些，对于初学者是可贵的。上述种种也是本书的特点。本书及教学片所提供的实验技术已初步经受了实践的考验。1992年盛夏，这些青年科学家举办了一期大约有200人参加的全国性讲习班。讲习班上所有分组所进行的14种研究方法的技术练习均取得了成功。我们希望，本书的出版对于同行科学家和初学者小有裨益。

青年科学家朝气蓬勃、精力旺盛、思想活跃、心灵手巧，是一支攻克科学堡垒的劲旅。只要引导得当，在我国科学技术发展的道路上，他们是有可能成就大事业的。为他们提供崭露头角、大显身手的机会，是时代的需要和要求。

本院校基础医学研究所分子生物学研究室梁植权、强伯勤、方福德、王琳芳、缪时英、沈翊珩、琦祖和、邱长春、袁建刚等中老年专家审改了本书的有关章节；石淑贞、秦瑶、杨钧、刘巨洪等同志绘制了本书的插图；吕向东、穆修前、侯忠诚、王明生等同志校对了本书；王安、关淑启、张立新、王茹、曲虹等同志承担了书稿的打字与复印工作；王家腾、江沪沪、王影、岳颖、栾童林、李景和等同志承担了编务工作；高等教育出版社生物学编辑室的编辑们，在本书形成与出版过程中给予了热情的指教、帮助与支持，在此一并表示深切的谢意。

本书的缺点与错误在所难免，欢迎指正。

卢圣栋

中国医学科学院

中国协和医科大学

1993年6月于北京

## 目 录

1. 绪论 .....	( 1 )	2.4.5 DNA 合成仪 .....	( 54 )
1.1 分子生物学与基因工程一瞥 .....	( 1 )	2.4.6 DNA 测定仪 .....	( 54 )
1.1.1 Watson 和 Crick 的 DNA 模板学说 .....	( 1 )	2.4.7 PCR 仪 .....	( 55 )
1.1.2 Monod 和 Jacob 的操纵子学说 .....	( 4 )	2.5 核素实验室 .....	( 56 )
1.1.3 基因工程的工具酶和载体 .....	( 5 )	2.5.1 放射性核素操作实验室 .....	( 56 )
1.1.4 基因工程的基本程序 .....	( 6 )	2.5.2 放射性核素测定室 .....	( 57 )
1.2 基因工程与分子生物学进 展一览 .....	( 7 )	2.6 细胞培养室 .....	( 57 )
1.2.1 基因工程的研究成就 .....	( 7 )	2.6.1 无菌操作设施 .....	( 58 )
1.2.2 分子生物学的研究成就 .....	( 26 )	2.6.2 温育和贮存区 .....	( 58 )
1.3 基因工程与分子生物学的 发展趋势及展望 .....	( 40 )	2.6.3 观察和研究室 .....	( 59 )
1.3.1 蛋白质工程: 改造基因、 改造蛋白质、改造生命 .....	( 40 )	2.6.4 清洗和消毒 .....	( 59 )
1.3.2 分子生物电子学的兴起以 及不同学科的相互渗透 .....	( 41 )	2.7 暗室 .....	( 59 )
1.3.3 走向海洋, 走向宇宙空间 .....	( 42 )	2.8 冷室 .....	( 60 )
1.3.4 大规模深入研究的重大战略 部署 .....	( 43 )	3. 分子生物学实验室常用技术 .....	( 61 )
1.4 不结束语 .....	( 44 )	3.1 核酸的纯化 .....	( 61 )
2. 分子生物学实验室常规仪器设备 .....	( 46 )	3.1.1 酚/氯仿抽提核酸溶液 的制备 .....	( 61 )
2.1 实验室的基本要求 .....	( 46 )	3.1.2 酚的重蒸馏与水饱和 .....	( 62 )
2.2 实验室的常规仪器及设施 .....	( 47 )	3.2 核酸的浓缩 .....	( 63 )
2.2.1 温度控制系统 .....	( 47 )	3.2.1 固体聚乙二醇 (PEG) 吸水 浓缩法 .....	( 63 )
2.2.2 水的净化装置 .....	( 47 )	3.2.2 丁醇抽提浓缩法 .....	( 63 )
2.2.3 消毒设备 .....	( 48 )	3.3 核酸的沉淀 .....	( 64 )
2.2.4 计量系统 .....	( 48 )	3.3.1 核酸沉淀的盐类及浓度 .....	( 64 )
2.2.5 其它设备 .....	( 49 )	3.3.2 核酸沉淀的温度与时间 .....	( 65 )
2.3 离心机室的装备 .....	( 50 )	3.3.3 离心力与离心时间 .....	( 66 )
2.4 分析仪器室的设置 .....	( 50 )	3.3.4 有机沉淀剂 .....	( 66 )
2.4.1 电泳装置 .....	( 50 )	3.3.5 核酸沉淀的操作方法 .....	( 66 )
2.4.2 层析装置 .....	( 52 )	3.4 核酸的定量 .....	( 69 )
2.4.3 光密度仪 .....	( 54 )	3.4.1 分光光度法测定核酸的浓度 .....	( 69 )
2.4.4 真空印迹系统 .....	( 54 )	3.4.2 荧光分光光度法测定核 酸浓度 .....	( 69 )
		3.5 核酸的贮存 .....	( 70 )
		3.6 限制性内切酶及其应用 .....	( 71 )
		3.6.1 限制性内切酶的功能、 分类及命名 .....	( 71 )

- 3.6.2 限制性内切酶的数量单位及质量控制 ..... (72)
- 3.6.3 限制性内切酶酶解体系的建立 ..... (73)
- 3.6.4 限制性内切酶酶解中常见的问题和解决措施 ..... (75)
- 3.6.5 限制性内切酶的星号活力 ..... (77)
- 3.6.6 限制性内切酶的底物位点优势效应 ..... (77)
- 3.6.7 琼脂糖包埋完整染色体 DNA 的内切酶酶解 ..... (78)
- 3.6.8 限制性内切酶对单链 DNA 的切割 ..... (79)
- 3.6.9 限制性内切酶位点上的甲基化 ..... (79)
- 3.7 电泳 ..... (80)
  - 3.7.1 原理 ..... (80)
  - 3.7.2 影响电泳动率的四大因素 ..... (80)
  - 3.7.3 核酸电泳的指示剂与染色剂 ..... (83)
  - 3.7.4 电泳装置 ..... (85)
  - 3.7.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳 ..... (85)
  - 3.7.6 琼脂糖凝胶电泳 ..... (88)
  - 3.7.7 脉冲场凝胶电泳 ..... (92)
  - 3.7.8 双相电泳 ..... (93)
- 3.8 超速离心分离技术 ..... (94)
  - 3.8.1 离心分离物质的原理 ..... (94)
  - 3.8.2 超速离心的分类 ..... (95)
  - 3.8.3 超速离心在核酸分离中的应用 ..... (96)
- 3.9 柱层析 ..... (97)
  - 3.9.1 排阻层析 ..... (98)
  - 3.9.2 亲和层析 ..... (99)
  - 3.9.3 羟基磷灰石柱层析 ..... (99)
  - 3.9.4 离子交换层析 ..... (99)
  - 3.9.5 反相层析 ..... (100)
- 4. 核酸的分离与纯化 ..... (101)
  - 4.1 核酸分离提取的原则 ..... (101)
  - 4.2 真核细胞染色体 DNA 的制备 ..... (102)
  - 4.3 质粒和噬菌体 DNA 的提取与纯化 ..... (109)
    - 4.3.1 质粒 DNA 的提取与纯化 ..... (109)
    - 4.3.2 质粒 DNA 的小量制备 ..... (111)
    - 4.3.3 质粒 DNA 的大量制备 ..... (115)
    - 4.3.4 质粒 DNA 的纯化 ..... (117)
    - 4.3.5 噬菌体 DNA 的提取与纯化 ..... (121)
  - 4.4 DNA 片段的分离及纯化 ..... (126)
    - 4.4.1 从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段的原则 ..... (126)
    - 4.4.2 DEAE 纤维素纸插片电泳法 ..... (127)
    - 4.4.3 电泳洗脱法 ..... (128)
    - 4.4.4 低熔点琼脂糖凝胶挖块回收法 ..... (132)
    - 4.4.5 玻璃粉末洗脱法 ..... (133)
    - 4.4.6 琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段的纯化 ..... (134)
    - 4.4.7 聚丙烯酰胺凝胶中回收 DNA 片段 ..... (135)
    - 4.4.8 蔗糖梯度超速离心分离 DNA 片段 ..... (136)
  - 4.5 RNA 的分离与纯化 (真核细胞 RNA 的制备) ..... (136)
    - 4.5.1 创造一个无 RNase 的环境 ..... (137)
    - 4.5.2 RNA 的提取方法 ..... (139)
    - 4.5.3 mRNA 的分离与纯化 ..... (149)
- 5. 核酸分子探针的标记 ..... (155)
  - 5.1 概述 ..... (155)
    - 5.1.1 探针的种类及其选择 ..... (155)
    - 5.1.2 各种标记物及其选择 ..... (159)
    - 5.1.3 放射性核素的探测 ..... (161)
    - 5.1.4 放射性核素的卫生防护 ..... (162)
    - 5.1.5 各种标记方法及其选择 ..... (162)
  - 5.2 探针的放射性核素标记法 ..... (163)
    - 5.2.1 切口平移法 ..... (163)
    - 5.2.2 随机引物法 ..... (166)
    - 5.2.3 单链 DNA 探针的标记 ..... (169)
    - 5.2.4 cDNA 探针的标记 ..... (171)
    - 5.2.5 RNA 探针的制备与标记 ..... (173)
    - 5.2.6 DNA 探针的末端标记 ..... (176)
    - 5.2.7 寡核苷酸探针的标记 ..... (185)
    - 5.2.8 碘放射性核素标记法 ..... (186)
  - 5.3 非放射性标记法 ..... (186)
    - 5.3.1 酶促标记法 ..... (187)
    - 5.3.2 化学标记法 ..... (187)
  - 5.4 探针的纯化 ..... (191)
    - 5.4.1 凝胶过滤柱层析法 ..... (191)



5.4.2 反相柱层析法	(192)	7.5.4 一种快速 DNA 连接技术	(276)
5.4.3 乙醇沉淀法	(193)	7.6 重组子导入受体细胞	(277)
5.5 探针比放射活性的测定	(193)	7.6.1 概述	(277)
5.5.1 三氯乙酸沉淀法	(193)	7.6.2 转化方法	(278)
5.5.2 DE-81 滤膜吸附法	(194)	7.7 重组子的筛选与鉴定	(282)
6. 核酸分子杂交	(195)	7.7.1 针对遗传表型改变筛选法	(282)
6.1 膜上印迹杂交	(195)	7.7.2 分析重组子结构特征的 筛选法	(284)
6.1.1 印迹技术	(195)	7.8 亚克隆技术	(287)
6.1.2 固-液相杂交技术	(207)	7.9 高效率感受态细胞的制备	(290)
6.1.3 杂交信号的检测	(213)	7.9.1 感受态细胞制备的影响因素	(291)
6.1.4 滤膜的重复使用	(217)	7.9.2 高效率感受态细胞制备方法	(292)
6.2 液相杂交技术	(217)	8. 基因组文库	(295)
6.2.1 核酸酶 S <sub>1</sub> 保护分析法	(217)	8.1 构建基因组文库的载体	(295)
6.2.2 RNA 酶保护分析法	(219)	8.2 λ 噬菌体载体	(296)
6.3 核酸原位杂交及其应用	(220)	8.2.1 应用 λ 噬菌体构建基因组 文库的基本步骤	(296)
6.3.1 核酸原位杂交的基本原理	(220)	8.2.2 几种 λ 噬菌体载体	(296)
6.3.2 核酸原位杂交的基本操 作方法	(224)	8.3 载体 DNA 的制备	(302)
6.4 新技术简介	(230)	8.3.1 载体 DNA 的酶解	(302)
6.4.1 亲和捕捉法	(230)	8.3.2 酶切后载体的再连接及 包装后的滴度检测	(303)
6.4.2 夹心杂交法	(230)	8.3.3 载体臂的纯化	(303)
6.4.3 链取代法	(231)	8.3.4 载体的脱磷处理	(305)
7. 基因克隆技术	(233)	8.3.5 Lamda GEM11/Lamda GEM 12BamHI. XhoI 酶切后载 体臂的部分填充	(305)
7.1 基因工程诞生的历史背景	(233)	8.4 真核细胞 DNA 的制备	(306)
7.2 基因克隆的策略与技术路线	(234)	8.4.1 几种染色体 DNA 的提取方法	(306)
7.2.1 通过建立基因库分离靶基因	(234)	8.4.2 限制性内切酶部分酶解 高分子量真核 DNA	(308)
7.2.2 通过载体在适当宿主中扩增	(235)	8.5 连接和包装	(310)
7.3 目的基因的来源与产生	(235)	8.5.1 连接浓度	(310)
7.4 基因克隆的载体	(236)	8.5.2 连接条件的确定	(312)
7.4.1 质粒载体	(236)	8.5.3 包装抽提物的制备和体外包装	(313)
7.4.2 λ 噬菌体载体	(241)	8.6 基因组文库的保存和扩增	(316)
7.4.3 粘粒	(245)	8.7 粘性质粒为载体的基因组 文库	(317)
7.4.4 丝状噬菌体载体	(249)	9. cDNA 文库	(319)
7.4.5 真核细胞的克隆载体	(251)	9.1 概述	(319)
7.5 DNA 分子的体外连接	(256)		
7.5.1 DNA 连接酶及连接机制	(256)		
7.5.2 DNA 浓度对连接产物构 型的影响	(259)		
7.5.3 DNA 分子连接的策略与 方案	(262)		

- 9.1.1 mRNA 的分离 ..... (319)
- 9.1.2 cDNA 第一链的合成 ..... (320)
- 9.1.3 cDNA 第二链的合成 ..... (320)
- 9.1.4 cDNA 与载体连接 ..... (320)
- 9.1.5 噬菌体的包装、转染及  
质粒 DNA 的转化 ..... (322)
- 9.2 cDNA 库的构建 ..... (323)
- 9.2.1 mRNA 分离 ..... (323)
- 9.2.2 第一链的合成 ..... (324)
- 9.2.3 第二链的合成 ..... (324)
- 9.2.4 cDNA 的甲基化 ..... (325)
- 9.2.5 cDNA 与连接子的连接 ..... (325)
- 9.2.6 cDNA 的分选分离 ..... (326)
- 9.2.7 cDNA 的克隆 ..... (326)
- 9.2.8 计算克隆效率 ..... (327)
- 9.2.9 cDNA 库的扩增 ..... (327)
- 10. DNA 序列测定 ..... (329)
- 10.1 概述 ..... (329)
- 10.1.1 末端终止法 ..... (329)
- 10.1.2 化学裂解法 ..... (331)
- 10.2 末端终止法测定 DNA 核苷  
酸序列 ..... (331)
- 10.2.1 末端终止法所需的关  
键试剂 ..... (331)
- 10.2.2 末端终止法测定 DNA  
序列方法的选择 ..... (332)
- 10.2.3 大片段待测 DNA 片段  
的定向连续次级克隆 ..... (332)
- 10.2.4 用噬菌体 M13 克隆待  
测 DNA 片段 ..... (337)
- 10.2.5 双脱氧末端终止法 ..... (339)
- 10.2.6 变性聚丙烯酰胺凝胶制备 ..... (343)
- 10.2.7 测序产物的凝胶电泳 ..... (344)
- 10.2.8 Taq DNA 聚合酶催化的测序  
反应及凝胶的银染色法 ..... (344)
- 10.3 Maxam - Gilbert 化学法测  
定 DNA 序列 ..... (347)
- 10.3.1 待测 DNA 的纯化 ..... (347)
- 10.3.2 碱基的特异性修饰及裂解 ..... (348)
- 10.3.3 测序图谱的识读 ..... (350)
- 11. DNA 序列的自动测定 ..... (352)
- 11.1 概述 ..... (352)
- 11.2 自动测序仪及操作原理 ..... (352)
- 11.2.1 ALF express<sup>TM</sup>全自动激  
光荧光核酸测序仪 ..... (352)
- 11.2.2 ABI 最新型全自动 DNA  
测序仪 ..... (354)
- 11.2.3 ABI PRISM310 型全自动  
DNA 测序仪 (遗传分析仪) ..... (354)
- 11.3 自动测序操作程序 ..... (354)
- 11.3.1 载体系统 ..... (354)
- 11.3.2 模板 DNA 的制备 ..... (359)
- 11.3.3 测序胶的制备 ..... (362)
- 11.3.4 测序模板 DNA 聚合酶延  
伸反应 ..... (363)
- 11.3.5 样品上样和电泳 ..... (364)
- 11.3.6 核苷酸顺序的阅读 ..... (364)
- 11.3.7 测序全程常见问题和解  
决办法 ..... (365)
- 12. 外源基因在原核细胞中的表达 ..... (367)
- 12.1 原核生物基因表达的特点 ..... (367)
- 12.2 外源基因在原核细胞中表  
达的重要调控元件 ..... (368)
- 12.2.1 启动子 ..... (368)
- 12.2.2 SD 序列 ..... (371)
- 12.2.3 终止子 ..... (371)
- 12.3 几种类型的原核表达载体 ..... (372)
- 12.3.1 非融合型表达蛋白载体  
pKK223-3 ..... (372)
- 12.3.2 分泌型克隆表达载体 PIN  
III 系统 ..... (373)
- 12.3.3 融合蛋白表达载体 pGEX  
系统 ..... (373)
- 12.4 用于原核细胞表达的外源  
基因 ..... (374)
- 12.5 提高外源基因表达水平的措施 ..... (375)
- 12.5.1 提高翻译水平 ..... (376)
- 12.5.2 减轻细胞的代谢负荷, 提  
高外源基因的表达水平 ..... (376)

12.5.3 提高表达蛋白的稳定 性,防止其降解	(377)	14.1.1 固体斜面法	(404)
12.6 关于包涵体	(378)	14.1.2 甘油冻存法	(404)
12.7 有关的实验	(379)	14.1.3 冷冻干燥法	(405)
12.7.1 外源基因的诱导表达	(379)	14.2 工程菌培养	(405)
12.7.2 细菌的裂解	(380)	14.2.1 影响工程菌生长和产物 合成的因素	(405)
12.7.3 包涵体的分离	(381)	14.2.2 工程菌培养方法	(408)
12.7.4 包涵体的溶解和复性	(381)	14.2.3 参数检测与控制	(408)
12.8 蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺 凝胶电泳	(382)	14.2.4 工程菌培养设备—发酵 罐及其控制系统	(409)
12.9 表达产物的免疫学及生物 活性的检测	(386)	14.2.5 工程菌培养过程	(410)
13. 外源基因在真核细胞中的表达	(388)	14.3 工程菌培养中的主要分析 方法	(413)
13.1 哺乳动物基因转移的遗传 选择标记	(388)	14.3.1 菌密度的测定	(413)
13.1.1 胸苷激酶基因(tk)选 择系统	(388)	14.3.2 发酵液中葡萄糖浓度的测定	(414)
13.1.2 二氢叶酸还原酶基因 (dhfr)选择系统	(388)	14.3.3 发酵液乙酸浓度的测定	(415)
13.1.3 新霉素抗性选择系统	(389)	15. 工程菌生产的蛋白的复性与纯化	(417)
13.1.4 氯霉素乙酰转移酶基 因检测系统	(389)	15.1 包涵体的制备和溶解	(417)
13.2 外源基因导入哺乳动物细 胞的载体	(389)	15.2 变性蛋白的纯化	(418)
13.2.1 SV40 载体	(389)	15.3 蛋白复性	(418)
13.2.2 其它病毒载体	(391)	15.3.1 影响蛋白复性的因素	(418)
13.3 外源 DNA 导入哺乳动物细 胞的方法	(392)	15.3.2 蛋白复性方法	(419)
13.3.1 磷酸钙转染技术	(392)	15.4 蛋白复性的检测方法	(420)
13.3.2 电穿孔转染技术	(394)	15.4.1 反相高压液相色谱法	(421)
13.3.3 基因显微注射技术	(395)	15.4.2 凝胶高压液相色谱法	(421)
13.3.4 脂质体载体法	(395)	15.4.3 细胞测活法	(422)
13.3.5 DEAE-葡聚糖转染技术	(396)	15.5 蛋白纯化	(423)
13.4 基因表达产物的检测	(397)	15.5.1 蛋白纯化的方法	(423)
13.4.1 免疫荧光抗体法检测表 达蛋白	(397)	15.5.2 蛋白纯化的操作方法	(425)
13.4.2 免疫沉淀法检测表达蛋白	(398)	15.5.3 层析柱的清洗	(427)
13.4.3 Western 印迹检测表达蛋白质	(400)	15.6 蛋白含量测定	(427)
14. 基因工程菌的大规模培养	(404)	15.6.1 紫外分光光度法	(428)
14.1 菌种保藏	(404)	15.6.2 Lowry 法	(428)
		15.6.3 BCA 法	(428)
		16. 动物细胞的大规模培养	(430)
		16.1 培养细胞的特性	(430)
		16.1.1 培养细胞的生长方式及 类型	(430)
		16.1.2 培养细胞的生长特点	(430)
		16.1.3 培养细胞的生长过程	(431)

- 16.2 培养细胞生长的条件 ..... (433)
- 16.2.1 细胞的营养需要 ..... (433)
- 16.2.2 细胞的生存环境 ..... (434)
- 16.2.3 无污染及无毒 ..... (435)
- 16.3 细胞培养的基本技术 ..... (435)
- 16.3.1 细胞培养基和血清的选择 ..... (435)
- 16.3.2 培养基的配制 ..... (435)
- 16.3.3 其他常用液体的配制 ..... (437)
- 16.3.4 原代培养 ..... (439)
- 16.3.5 传代培养和细胞系的维持 ..... (440)
- 16.3.6 细胞克隆 ..... (441)
- 16.3.7 细胞计数 ..... (443)
- 16.3.8 细胞的冻存与复苏 ..... (444)
- 16.3.9 细胞培养的污染及检测 ..... (446)
- 16.4 动物细胞大规模培养 ..... (451)
- 16.4.1 细胞培养规模的放大 ..... (451)
- 16.4.2 动物细胞培养生物反应器 ..... (452)
- 16.4.3 动物细胞微载体培养 ..... (452)
- 16.4.4 生物反应器的操作 ..... (454)
17. 多聚酶链式反应 (PCR) 技术 ..... (458)
- 17.1 PCR 技术的原理 ..... (458)
- 17.2 PCR 反应的成分和作用 ..... (459)
- 17.2.1 PCR 反应的缓冲液 ..... (459)
- 17.2.2 底物 (脱氧核糖核苷三磷酸, dNTPs) 浓度 ..... (459)
- 17.2.3 PCR 反应的酶及其浓度 ..... (460)
- 17.2.4 引物 ..... (460)
- 17.2.5 PCR 反应条件的选择 ..... (460)
- 17.2.6 PCR 反应的产物积累规律 ..... (460)
- 17.3 PCR 反应的自动化 ..... (461)
- 17.4 PCR 反应引物设计 ..... (461)
- 17.5 耐热 DNA 聚合酶 ..... (462)
- 17.6 PCR 反应模板的准备 ..... (464)
- 17.7 几种特殊的 PCR ..... (465)
- 17.7.1 锚定 PCR ..... (465)
- 17.7.2 不对称 PCR ..... (466)
- 17.7.3 反向 PCR ..... (466)
- 17.7.4 多重 PCR ..... (466)
- 17.7.5 着色互补 PCR ..... (467)
- 17.8 PCR 技术的应用 ..... (467)
- 17.8.1 遗传性疾病的基因诊断 ..... (467)
- 17.8.2 PCR 反应在检测艾滋病中的应用 ..... (471)
- 17.8.3 检测癌基因 ..... (473)
- 17.8.4 PCR 在法医学上的应用 ..... (475)
- 17.8.5 PCR 技术在分子生物学中的其它应用 ..... (477)
18. DNA 的化学合成 ..... (483)
- 18.1 DNA 化学合成原理 ..... (485)
- 18.2 DNA 的合成、纯化及鉴定 ..... (486)
- 18.2.1 DNA 合成仪的操作 ..... (486)
- 18.2.2 DNA 的切落及去保护 ..... (487)
- 18.2.3 寡核苷酸片段的纯化 ..... (487)
- 18.2.4 寡核苷酸片段的鉴定 ..... (488)
- 18.2.5 合成产物中 DNA 含量的测定 ..... (488)
- 18.3 DNA 化学合成的应用 ..... (488)
- 18.3.1 DNA 合成在基因工程和分子生物学研究中的应用 ..... (489)
- 18.3.2 DNA 合成在基因表达和调控方面的应用 ..... (490)
- 18.3.3 合成基因在医学中的应用 ..... (491)
19. 多肽的固相合成 ..... (493)
- 19.1 多肽合成原理 ..... (493)
- 19.1.1 液相多肽合成的简介 ..... (493)
- 19.1.2 固相多肽合成的简介 ..... (494)
- 19.2 固相多肽合成 ..... (495)
- 19.2.1 固相多肽合成的策略 ..... (495)
- 19.2.2 缩合反应 ..... (501)
- 19.2.3 反应的监测 ..... (502)
- 19.2.4 脱保护 ..... (503)
- 19.2.5 合成中应注意的问题 ..... (504)
- 19.2.6 肽从树脂上的裂解 ..... (505)
- 19.2.7 粗肽的纯化 ..... (506)
- 19.3 环肽的简介 ..... (506)
- 19.4 固相多肽合成 ..... (507)
- 19.4.1 实验材料 ..... (507)
- 19.4.2 第一个氨基酸与树脂的连接 ..... (507)
- 19.4.3 肽在树脂上的合成 ..... (509)

19.4.4	肽从树脂上的裂解	(515)	21.2.11	足纹法	(572)
19.4.5	脱盐	(520)	21.2.12	蛋白-核酸紫外交联法	(588)
19.4.6	纯化	(520)	21.2.13	DNA 结合蛋白的分离 纯化	(590)
19.4.7	分析技术	(521)	21.2.14	编码 DNA 结合蛋白的 cDNA 克隆的筛选	(592)
19.5	结束语	(524)	22.	转基因动物	(597)
20.	蛋白质氨基酸组成及序列测定	(525)	22.1	转基因方法	(597)
20.1	蛋白质及肽的氨基酸组 成分析	(525)	22.2	显微注射 DNA 的制备与纯化	(598)
20.1.1	实验前的准备: 蛋白 质水解	(525)	22.2.1	DNA 影响基因转移的因素	(598)
20.1.2	氨基酸的测定	(526)	22.2.2	显微注射 DNA 样品的 制备	(599)
20.2	蛋白质 N 末端氨基酸序 列测定	(528)	22.3	鼠的种类与饲养	(600)
20.2.1	蛋白质(肽链)的选 择性裂解	(528)	22.3.1	鼠的种类	(600)
20.2.2	肽段的分离、纯化	(529)	22.3.2	鼠的安置与饲养	(601)
20.2.3	肽段氨基酸顺序测定	(529)	22.4	超排卵与取卵	(601)
21.	真核基因表达调控	(533)	22.4.1	超排卵	(601)
21.1	真核基因表达调控基本 理论	(533)	22.4.2	取卵	(602)
21.1.1	真核基因结构功能特点	(533)	22.5	显微注射	(604)
21.1.2	真核基因表达调控的策略	(534)	22.5.1	制备持卵管与注射针	(604)
21.1.3	转录前的表达调控	(534)	22.5.2	显微注射操作	(605)
21.1.4	转录水平的调控	(538)	22.6	卵的转移	(607)
21.1.5	转录后水平的调控	(547)	22.6.1	输卵管转移	(607)
21.1.6	翻译水平的调控	(549)	22.6.2	子宫移卵	(608)
21.1.7	翻译后水平的调控	(550)	22.7	转基因鼠系的建立	(609)
21.2	基因表达调控研究方法	(550)	22.7.1	取鼠胚胎	(609)
21.2.1	DNase I 超敏感性分析	(551)	22.7.2	从胎鼠肌肉或幼鼠尾 巴提取大分子量 DNA	(610)
21.2.2	DNA 甲基化分析	(551)	22.7.3	转基因鼠中外源 DNA 的分析	(610)
21.2.3	转录起始位点的测定 (引物延伸法)	(553)	22.7.4	转基因鼠系	(610)
21.2.4	体外转录	(554)	22.8	卵培养液的配制与保存	(611)
21.2.5	进行中的核转录分析	(557)	22.8.1	配制 $M_2$ 与 $M_{16}$ 的培 养液的贮存液	(611)
21.2.6	差示文库	(558)	22.8.2	由贮存液配制 $M_2$	(612)
21.2.7	氯霉素乙酰转移酶分析	(560)	22.8.3	由贮存液配制 $M_{16}$	(612)
21.2.8	凝胶滞留法	(563)	22.9	转基因动物的应用	(612)
21.2.9	滤膜结合法	(566)	22.9.1	基因表达调控	(612)
21.2.10	Southwestern 印迹	(567)	22.9.2	转基因动物模型	(616)
			22.9.3	用转基因动物产生 物活性物质与药物	(617)

23. 转基因植物 ..... (618)
- 23.1 转基因植物的基本技术与方法 ..... (618)
- 23.1.1 植物转基因基本技术 ..... (618)
- 23.1.2 植物转基因方法 ..... (619)
- 23.1.3 根癌农杆菌 Ti 质粒表达载体 ..... (619)
- 23.1.4 植物组织培养和培养基 ..... (619)
- 23.2 PEG 介导的原生质体转染 ..... (622)
- 23.2.1 烟草悬浮细胞的培养 ..... (622)
- 23.2.2 原生质体的制备 ..... (622)
- 23.2.3 原生质体的转染 ..... (622)
- 23.2.4 报告基因产物的分析 ..... (622)
- 23.3 根癌农杆菌介导的叶盘转化法 ..... (623)
- 23.3.1 烟草无菌苗的培养 ..... (623)
- 23.3.2 根癌农杆菌感受态的制备及其转化 ..... (623)
- 23.3.3 烟草叶盘共培养 ..... (624)
- 23.3.4 转化植株的筛选 ..... (624)
- 23.3.5 转化植株的田间移栽 ..... (624)
- 23.4 基因枪法转化愈伤组织 ..... (624)
- 23.4.1 水稻愈伤组织的诱导与培养 ..... (625)
- 23.4.2 金粉制备 ..... (625)
- 23.4.3 微弹 (microcarrier) 制备 ..... (625)
- 23.4.4 轰击 ..... (625)
- 23.4.5 水稻转化细胞的筛选 ..... (625)
- 23.4.6 植株再生 ..... (625)
- 23.5 病毒载体表达系统 ..... (626)
- 23.5.1 病毒 cDNA 的克隆和外源基因的插入 ..... (628)
- 23.5.2 体外转录 ..... (629)
- 23.5.3 重组病毒的小量制备 ..... (629)
- 23.5.4 病毒的大量繁殖和提纯 ..... (629)
- 23.6 转基因植株的分析 ..... (629)
- 24 人类基因治疗 ..... (631)
- 24.1 基因治疗概述 ..... (631)
- 24.2 基因转移系统 ..... (632)
- 24.2.1 反转录病毒 ..... (632)
- 24.2.2 腺病毒 ..... (633)
- 24.2.3 腺病毒伴随病毒 ..... (634)
- 24.2.4 单纯疱疹病毒 ..... (634)
- 24.2.5 脂质体 ..... (635)
- 24.2.6 受体介导的蛋白 ..... (635)
- 24.3 受体细胞与转移基因的表达 ..... (635)
- 24.3.1 造血细胞 ..... (635)
- 24.3.2 肌肉细胞 ..... (636)
- 24.3.3 成纤维细胞 ..... (636)
- 24.3.4 肝细胞 ..... (637)
- 24.3.5 其它细胞 ..... (637)
- 24.4 人类基因治疗的审批程序 ..... (638)
- 24.5 基因标记与基因治疗 ..... (638)
- 24.6 遗传病基因治疗 ..... (639)
- 24.6.1 腺苷脱氨酶缺陷 ..... (639)
- 24.6.2 血友病 ..... (640)
- 24.7 肿瘤基因治疗 ..... (641)
- 24.8 伦理学安全性与社会效应 ..... (641)
- 24.9 问题与展望 ..... (642)
- 25 体内外基因转移方法 ..... (645)
- 25.1 体内外基因转移方法概述 ..... (645)
- 25.2 体内外基因转移方法实例 ..... (645)
26. 非病毒载体基因治疗 ..... (650)
- 26.1 完全非病毒的基因转移方式 ..... (650)
- 26.1.1 粒子轰击 (基因枪)  
- RNA 疫苗 ..... (650)
- 26.1.2 穿刺方法 ..... (650)
- 26.1.3 超声介导的转染方法 ..... (651)
- 26.1.4 脂质体介导的大脑内连续转移基因 ..... (651)
- 26.1.5 DNA-合成蛋白 (肽) 复合物 ..... (651)
- 26.1.6 哺乳动物人工染色体 ..... (652)
- 26.1.7 厌氧细菌-梭状芽胞杆菌在癌症基因治疗中的应用 ..... (652)
- 26.1.8 抗体作为酶或基因的载体 ..... (652)
- 26.2 病毒增强的基因转移方式 ..... (653)
- 26.2.1 腺病毒的核内体溶解 ..... (653)

26.2.2 多瘤病毒的假衣壳作 为载体 .....	(653)	28. 微卫星技术 .....	(677)
26.2.3 噬菌体显示肽定向转 移基因 .....	(653)	28.1 微卫星技术概述 .....	(677)
27. 细胞凋亡的研究方法 .....	(656)	28.1.1 概念 .....	(677)
27.1 细胞凋亡的形态学检测 方法 .....	(656)	28.1.2 微卫星技术基本特征 .....	(677)
27.1.1 凋亡细胞的显微镜观察 .....	(656)	28.1.3 微卫星产生机制 .....	(677)
27.1.2 凋亡细胞的姬姆萨染色 .....	(656)	28.1.4 微卫星标记的筛选 .....	(677)
27.1.3 凋亡细胞的电子显微 镜观察 .....	(657)	28.2 微卫星多态标记检测技术 .....	(678)
27.1.4 凋亡细胞的碘化丙啶 (PI) 排斥分析法 .....	(657)	28.2.1 扩增片段长度多态性 .....	(678)
27.1.5 双苯并咪唑染料 (Ho echst33342) 活细胞 吸收分析法 .....	(658)	28.2.2 荧光标记 PCR 法 - 采用 373A DNA 序列荧光 标记自动分析仪 .....	(680)
27.1.6 凋亡细胞对胰蛋白酶 和脱氧核糖核酸酶敏 感性分析法 .....	(659)	28.3 统计分析 .....	(681)
27.2 细胞凋亡的生物化学研究 方法 .....	(660)	28.3.1 不同人群之间等位基 因频率计算 .....	(681)
27.2.1 细胞群染色体 DNA 断 裂的测定 I .....	(660)	28.3.2 人群中 Hardy - Weinberg 平衡推算 .....	(681)
27.2.2 染色体 DNA 断裂的测 定 II .....	(661)	28.3.3 推算突变率 .....	(681)
27.2.3 同时分析凋亡细胞染 色体 DNA 断裂及其细 胞形态法 .....	(661)	29. cDNA 末端快速扩增技术 .....	(683)
27.2.4 大分子染色体 DNA 断 裂的测定 .....	(663)	29.1 RACE 的原理 .....	(683)
27.2.5 细胞凋亡时钙离子浓度 的测定 .....	(664)	29.2 RACE 的方法 .....	(684)
27.3 细胞凋亡的免疫化学分析 方法 .....	(666)	29.3 RACE 的改良和优化 .....	(687)
27.4 细胞凋亡的分子生物学研 究方法 .....	(668)	29.3.1 反转录 .....	(688)
27.4.1 过氧化物酶标记测定法 .....	(668)	29.3.2 加尾反应 .....	(688)
27.4.2 荧光素标记测定法 .....	(670)	29.3.3 PCR 扩增和 PCR 产物 的克隆 .....	(691)
27.4.3 生物素 - dUTP/酶标亲 和素测定法 .....	(672)	29.4 RACE 的其它应用及其前景 .....	(692)
27.4.4 Cy5 - dCTP 直接荧光标记法 .....	(673)	30. mRNA 差异显示法 .....	(694)
		30.1 mRNA 差异显示法原理 .....	(694)
		30.2 mRNA 差异显示技术 .....	(694)
		31. DNA 芯片技术 .....	(698)
		31.1 DNA 芯片的制作原理 .....	(698)
		31.2 DNA 芯片的应用 .....	(699)
		31.2.1 基因诊断 .....	(699)
		31.2.2 应用 DNA 芯片技术分析 基因组及发现新基因 .....	(699)
		31.2.3 DNA 芯片用于基因表 达的研究 .....	(700)
		31.2.4 利用 DNA 芯片进行 DNA	

序列分析 .....	(700)	32.6.1 只有一个孩子受累的家庭 .....	(716)
31.2.5 利用 DNA 芯片技术进 行后基因组研究 .....	(700)	32.6.2 有两个孩子患病的家庭 .....	(717)
<b>32. 常用遗传统计分析方法 .....</b>	<b>(702)</b>	32.6.3 有两个以上受累同胞的 家庭 .....	(717)
32.1 Hardy - Weinberg 定律 .....	(702)	32.7 等位基因共享分析 .....	(718)
32.1.1 常染色体基因的 Hardy - Weinberg 定律 .....	(702)	32.7.1 受累同胞对分析 .....	(719)
32.1.2 X - 连锁基因的 H - W 定律 .....	(702)	32.7.2 不一致同胞对 .....	(720)
32.1.3 近亲婚配和 Hardy - Weinberg 定律 .....	(703)	32.7.3 受累亲属对分析 .....	(720)
32.2 多态性 .....	(704)	<b>附录 .....</b>	<b>(722)</b>
32.2.1 遗传多态性 .....	(704)	1. 常用限制性内切酶酶切位点 .....	(722)
32.2.2 基因频率 .....	(707)	2. 放射性核素数据 .....	(725)
32.2.3 样本取样随机性的验证 .....	(707)	3. 离心机转速与离心力的换算 .....	(726)
32.2.4 多态性信息量计算 .....	(707)	4. 核酸及蛋白质数据 .....	(727)
32.3 多态性连锁分析 .....	(708)	5. 分子克隆中使用的试剂与常 用缓冲液的配制 .....	(733)
32.3.1 连锁分析 .....	(708)	6. 常用贮存液的配制 .....	(740)
32.3.2 连锁相 - 单体型与重组 .....	(709)	7. 常用酶的配制 .....	(745)
32.3.3 连锁不平衡 .....	(711)	8. 常用层析数据 .....	(747)
32.4 优势对数计分法与计算机程序 ..	(711)	9. 细菌培养基、抗生素和菌株 .....	(750)
32.5 关联分析 .....	(715)	<b>英汉分子生物学词汇 .....</b>	<b>(761)</b>
32.6 传递不平衡检验 .....	(716)	<b>索引 .....</b>	<b>(801)</b>



# 1. 绪 论

## ——基因工程与分子生物学的进展及展望

20世纪50年代 Watson 和 Crick 关于 DNA 双螺旋模板学说的提出, 60年代 Monod 和 Jacob 关于基因调节控制的操纵子学说的出现, 以及70年代初期 DNA 限制性内切酶的发现和一整套 DNA 体外重组技术——基因工程技术的发展, 推动了分子生物学在广度和深度两个方面以空前的高速度蓬勃发展。基因工程研究成果的实际应用, 基因治疗技术在治疗几种疾病方面的初步成功, 人类基因组计划的实施, 意味着生物技术相关产业和生命科学已经出现划时代的突破和历史性的变革。这样的科技进步震撼了人类社会。人们预言, 21世纪将是生命科学的世纪。以基因工程为主导的生物技术将可能左右一个国家经济前途的命运。生物技术引起了科学革命。生物技术可能会对世界的重大问题——饥饿、疾病、能源、污染等提供切实的解决办法。世界各国都看到, 以分子生物学为理论基础、以基因工程为主导的生物技术, 正以其巨大的活力推动着社会生产力的飞速发展, 并成为国与国之间、特别是大国之间竞争的主要手段之一。世界各国都把发展分子生物学与生物技术, 当作本国的强国之道和新的国策之一。

本文将深入浅出地介绍一些分子生物学与基因工程方面的最起码的知识以及这一领域在当代的主要进展与发展前景, 并期望引起读者对本领域研究的兴趣。

### 1.1 分子生物学与基因工程一瞥

这一节仅涉及分子生物学与基因工程的最基本的知识。

#### 1.1.1 Watson 和 Crick 的 DNA 模板学说

这个学说指的是作为主要的遗传物质的生物大分子 DNA (脱氧核糖核酸) 的结构及其自我复制的模式, 同时也说明了基因与蛋白质生物合成的关系。

这一学说指出, 构成 DNA 的基本单位是脱氧核糖、核苷酸和磷酸。核苷酸碱基主要有4种: A (腺嘌呤)、T (胸腺嘧啶)、G (鸟嘌呤) 和 C (胞嘧啶)。在 DNA 结构中 A-T、G-C 是严格配对的。DNA 大分子以反向互补的两条单链形成双螺旋的立体结构, 如图 1-1 和图 1-2 所示。其形状多少有点像人们常见的小食品“麻花”。DNA 的复制过程即如图 1-3 所示: 先是两链分开, 然后两条亲代链均以各自为模板复制另一条互补链, 之后再形成子1代的双螺旋结构, 继之再以同样的方式复制成子2代、子3代、子4代……。这样的复制方式称为半保留复制。DNA 存在于染色体中。因此上述过程是与一对亲代染色体复制成两对子代染色体过程同时发生的。这样的过程也是与1个亲代细胞分裂成两个子代细胞的过程同时发生的。DNA 是基因的物质基础, 从化学结构看, 1个基因就是 DNA 长链上的1个结构单位。每一个物种都有各自独特的 DNA 结构; 每一个基因也都有各自独特的 DNA 结构。因此, DNA 的半保留复制方式保证了遗传的稳定性。这就是“种瓜得瓜, 种豆得豆”的缘故。DNA 上 A-T、G-C 排列顺序的无穷无尽的变化, 便是物种多样性无可穷尽的原因。

至于基因 (DNA) 与蛋白质合成的关系, 便是 Watson 和 Crick 所指出的中心法则:  $\text{DNA} \xrightarrow{\text{转录}} \text{mRNA}$