

现代生物技术前沿

分子医学技能

周俊宜 主编



科学出版社

www.sciencep.com

现代生物技术前沿

分子医学技能

周俊宜 主编

科学出版社
北京

内 容 简 介

本书以分子医学概论为引导,围绕分子医学研究相关的技术领域,系统介绍了核酸技术、蛋白质技术、免疫分析技术、细胞培养技术以及近年来发展起来的几种前沿技术。内容全面详尽,既有实用性极强的技术方案和实验数据,又辅以简明扼要、形象生动的原理描述和具有针对性的技术问题讨论。

本书是从事分子医学以及相关领域科学研究的工具书,同时可作为高等院校医学和生命科学专业教材使用。

图书在版编目(CIP)数据

分子医学技能/周俊宜主编. —北京:科学出版社,2006

(现代生物技术前沿)

ISBN 7-03-017123-3

I. 分… II. 周… III. 医学-分子生物学 IV. Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 031459 号

责任编辑:王 静 彭克里 席 慧/责任校对:朱光光

责任印制:钱玉芬/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>

双 青 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2006年6月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2006年6月第一次印刷 印张: 30 3/4

印数: 1—5 000 字数: 592 000

定价: 38.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换<双青>)

前 言

分子生物学的飞速发展已渗透到医学研究和应用的各个领域,并派生出了一门全新的学科——分子医学。分子医学的出现犹如分子生物学对于生命科学之伟大意义,将全面更新传统医学的模式,并开拓出医学发展的新潮流。所以,无论是正处于医科学习阶段的青年学生,还是已翱翔在医学领域的广大医学工作者,对这一新型学科的领略或贯通已是势在必行。

顺应这一新的形势,中山大学北校区在学校专项基金的投入下,建立了设备先进、设施完善的“分子医学教学实验室”,并对基础医学教育中一部分沿袭多年的实验课程进行全新的综合和改进,创建了一门集分子生物学基本技能和医学应用于一体的全新的系统化实验课程——分子医学技能。本教材便是配合该新课程而编写的。

分子医学的主体内容是分子生物学在医学中的应用,既涵盖了其主要的理论和技术体系,又侧重于医学领域中的应用,其中的技术体系是开展该领域研究的核心内容。因其涉及面极其广泛又错综复杂,众多的技术原理和细节常常会令学子们迷惘而难以融会贯通。本书集编者多年从事医学分子生物学教学和科研之经验与教训,力求以全面系统的框架、简明扼要的文字、形象易懂的图表,把分子医学的基本轮廓和主要技术系统梳理成册,奉献于众。全书共分七篇,以分子医学概论为引导;第一篇为核酸技术;第二篇为蛋白质技术;第三篇和第四篇为免疫分析技术和细胞培养技术,是本书的主体内容,包括了分子生物学和分子免疫学中最实用的技术原理和操作细节,叙述详尽,对从事相关实验操作极有帮助;第五篇概述了近年出现的分子医学前沿技术;第六篇简要介绍了分子医学技术在医学中的应用;第七篇为分子医学技术数据库。

分子生物学的诞生被认为是第三次技术革命的标志之一,而分子医学又将生物医学推向了一个崭新阶段。愿本书能对大家在最短的时间内系统地掌握分子医学这门前沿学科的基本理论和技能有所帮助,在不断发展的医学领域中具备更大的适应力和竞争力。

“分子医学技能”课程的创建和本教材的编写都是在中山大学各级管理部门的大力支持下完成的,尤其是实验室与设备管理处林明河处长、基础医学院主管教学的吴忠道副院长;汪华侨教授一直以来关注并亲自指导这一工作的进行,付出了大量心血;实验教学中心潘实清主任、颜少平副主任、教学科朱敬欢科长、前期工作的林达老师和曹开源老师等,都为此付出了艰辛劳动;本实验室的骆晓枫、黄小荣、谢金卫等技师为本书的文字编辑和校对等做了大量工作。愿我们的

劳动没有白费，愿这一新型课程的开展和新编教材的出版能为广大学子的学习和科研工作提供有益的帮助，那将是我们所能得到的最有价值的报答！

周俊宜

2006年1月

目 录

前言

本书内容说明	1
分子医学概论	2
1 疾病的分子机制	2
2 疾病的基因诊断	3
3 疾病的基因治疗	4
4 疾病的基因预防	5
5 分子医学技术	5
6 分子医学的社会、伦理问题	7
7 分子医学在现代医学发展中的意义	8
7.1 分子医学使临床思维方式不断更新	8
7.2 分子医学促进实验医学和经验医学的融合	8
7.3 分子医学加快了医学教育的改革	9
主要参考文献	9

第一篇 核酸技术

第 1 章 核酸制备与扩增	12
1.1 基因组 DNA 的提取与纯化	12
1.1.1 原理	12
1.1.2 材料	12
1.1.3 实验方案	13
1.1.4 常见问题及可能原因	14
1.2 RNA 的提取和 cDNA 合成	14
1.2.1 原理	14
1.2.2 实验方案	16
1.2.3 注意事项	21
1.3 聚合酶链反应 (PCR)	21
1.3.1 PCR 技术原理	21
1.3.2 材料	25
1.3.3 方案	25
1.3.4 注意事项	26

第 2 章 核酸的检测	29
2.1 电泳分析法	29
2.1.1 原理	29
2.1.2 材料	33
2.1.3 DNA 的琼脂糖凝胶电泳的实验方案	34
2.1.4 注意事项	34
2.1.5 结果讨论	35
2.2 分光光度分析法	36
2.2.1 原理	37
2.2.2 紫外光谱分析法检测 DNA 含量	39
2.2.3 分光光度法检测 RNA 浓度	40
第 3 章 核酸杂交与核酸探针	41
3.1 概论	41
3.1.1 探针的种类	41
3.1.2 标记物的选择	42
3.1.3 核酸探针标记的方法	42
3.1.4 几种常见的杂交方法	50
3.2 核酸探针与杂交常规实验	50
3.2.1 核酸探针的制备和标记	50
3.2.2 原位杂交法进行重组质粒的筛选	52
3.2.3 Southern 杂交	53
3.2.4 Northern 杂交	57
第 4 章 基因克隆	60
4.1 分离目的基因和基因载体	60
4.1.1 概论	60
4.1.2 目的基因的获取	66
4.1.3 质粒制备的常规方案	67
4.2 限制性内切核酸酶切割目的基因和基因载体	77
4.2.1 概论	77
4.2.2 限制性内切核酸酶的酶切与鉴定	81
4.3 目的基因和基因载体的体外连接	85
4.3.1 概论	85
4.3.2 载体与目的基因的连接	89
4.4 重组 DNA 转化宿主细胞	93
4.4.1 概论	93
4.4.2 重组 DNA 转化大肠杆菌	96

4.5 重组体阳性克隆的筛选	99
4.5.1 概论	99
4.5.2 实验方案	103
4.6 外源基因在宿主细胞中的表达	107
4.6.1 概论	107
4.6.2 在大肠杆菌中表达蛋白产物	112
主要参考文献	115

第二篇 蛋白质技术

第5章 蛋白质样品的制备技术	118
5.1 蛋白质样品的预处理	118
5.2 细胞的破碎	118
5.2.1 机械方法	119
5.2.2 物理方法	119
5.2.3 化学及生物化学方法	119
5.3 蛋白质的提取	120
5.3.1 水溶液提取法	120
5.3.2 有机溶剂提取法	121
5.3.3 表面活性剂的利用	121
5.3.4 提取过程中的蛋白质保护	121
5.4 蛋白质的分离纯化	122
5.4.1 根据蛋白质溶解度不同的分离方法	122
5.4.2 根据蛋白质分子质量大小不同的分离方法	123
5.4.3 根据蛋白质带电性质进行分离	125
5.4.4 根据配体特异性的分离方法——亲和层析法	125
5.5 蛋白质浓缩、干燥和保存	126
5.5.1 蛋白质的浓缩	126
5.5.2 蛋白质的干燥	127
5.5.3 蛋白质的储存	128
第6章 蛋白质定量检测技术	129
6.1 紫外(UV)吸收测定法	129
6.1.1 实验原理	129
6.1.2 试剂和设备	129
6.1.3 操作方法	130
6.1.4 注意事项	130
6.2 Folin-酚试剂法(Lowry法)	131

6.2.1	基本原理	131
6.2.2	试剂和设备	132
6.2.3	操作步骤	132
6.2.4	注意事项	133
6.3	考马斯亮蓝法 (Bradford 检测法)	133
6.3.1	基本原理	133
6.3.2	试剂与设备	134
6.3.3	操作步骤	134
6.3.4	注意事项	134
6.4	二喹啉甲酸 (BCA) 检测法	135
6.4.1	基本原理	135
6.4.2	试剂与设备	135
6.4.3	操作步骤	135
6.4.4	注意事项	136
第 7 章	蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	137
7.1	聚丙烯酰胺凝胶的合成和结构	138
7.2	聚丙烯酰胺凝胶浓度和孔径的选择	139
7.3	不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳的基本原理	140
7.4	实验材料和试剂	141
7.5	实验步骤	142
7.5.1	SDS-聚丙烯酰胺凝胶的灌制	142
7.6	胶的染色及处理	144
7.6.1	用考马斯亮蓝对 SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行染色	144
7.6.2	用银盐对 SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行染色	145
7.6.3	SDS-聚丙烯酰胺凝胶的干燥	146
7.7	注意事项	146
附:	圆盘电泳	147
	材料	147
	操作	147
第 8 章	蛋白质的免疫印迹技术	152
8.1	蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺电泳	153
8.2	蛋白质从凝胶转移至膜上	153
8.2.1	基本原理	153
8.2.2	试剂与器材	154
8.2.3	操作步骤	154
8.2.4	注意事项	156

8.3	蛋白质转移膜的免疫检测	157
8.3.1	基本原理	157
8.3.2	试剂	158
8.3.3	操作步骤	159
8.4	免疫印迹后膜的重复使用	161
8.4.1	消除缓冲液 (100ml)	161
8.4.2	操作步骤	161
8.5	免疫印迹中需要注意的问题	161
8.5.1	抗体的性质与使用	161
8.5.2	样品中待检测蛋白质的含量	162
8.5.3	背景问题	162
8.5.4	转印效率低	163
8.5.5	设置对照与解释结果	163
8.5.6	免疫印迹技术的灵敏度	163
第9章	蛋白质层析技术	164
9.1	层析的基本概念	164
9.2	层析的基本理论	165
9.3	层析法的分类	166
9.4	柱层析的基本装置及基本操作	167
9.4.1	柱层析的基本装置	167
9.4.2	柱层析的基本操作	167
9.5	几种常见的蛋白质层析技术	169
9.5.1	凝胶层析	169
9.5.2	离子交换层析	176
9.5.3	亲和层析	181
9.5.4	高效液相色谱法	186
附:	实验	190
实验一	血清 γ -球蛋白的分离纯化 (分子筛层析法)	190
实验二	血清蛋白质的分离 (离子交换层析法)	192
实验三	凝胶层析法分离蛋白质	193
	主要参考文献	195

第三篇 免疫分析技术

第10章	单向琼脂扩散实验	198
10.1	实验目的和要求	198
10.2	实验原理	198

10.3	实验方法	198
10.3.1	材料	198
10.3.2	方法	198
10.4	实验结果分析	199
第11章	双向琼脂扩散实验	200
11.1	实验目的和要求	200
11.2	实验原理	200
11.3	实验方法	200
11.3.1	材料	200
11.3.2	方法	200
11.4	实验结果观察分析	201
11.4.1	结果观察	201
11.4.2	结果分析	201
第12章	火箭免疫电泳	203
12.1	实验目的和要求	203
12.2	实验原理	203
12.3	实验方法	203
12.3.1	材料	203
12.3.2	方法	203
12.4	结果判定	204
12.5	注意事项	204
第13章	凝集反应	205
13.1	实验目的和要求	205
13.2	实验原理	205
13.3	实验方法	205
13.3.1	玻片凝集反应	205
13.3.2	试管凝集反应	206
第14章	E玫瑰花环形成实验	208
14.1	实验目的和要求	208
14.2	实验原理	208
14.3	实验方法	208
14.3.1	材料	208
14.3.2	方法	209
14.3.3	操作程序	210
14.4	实验结果判断	210
14.5	注意事项	210

第 15 章 T 淋巴细胞转化实验	212
15.1 实验目的和要求	212
15.2 实验原理	212
15.3 实验方法	213
15.3.1 试剂	213
15.3.2 操作	213
15.4 实验结果观察及分析	213
第 16 章 免疫荧光技术	216
16.1 实验目的和要求	216
16.2 实验原理	216
16.3 实验方法	216
16.3.1 材料	216
16.3.2 方法	217
16.4 实验结果观察	217
第 17 章 酶联免疫吸附实验	218
17.1 实验目的和要求	218
17.2 实验原理	218
17.3 实验方法	218
17.3.1 材料	218
17.3.2 试剂的配制	218
17.3.3 方法与步骤	219
17.4 结果观察及分析	220
第 18 章 酶联免疫斑点实验	221
18.1 实验目的和要求	221
18.2 实验原理	221
18.3 方法特点	221
18.4 实验材料	221
18.5 实验过程	221
18.6 实验注意事项	222
18.7 实验用途	222
18.8 实验结果示范	222
第 19 章 酶标抗体法检查 EB 病毒 IgA 抗体 (玻片法)	224
19.1 实验目的和要求	224
19.2 实验原理	224
19.3 实验方法	224
19.4 实验结果的观察分析	225

19.4.1 对照的设立	225
19.4.2 阳性细胞的染色特征	226
第 20 章 对流免疫电泳	227
20.1 实验目的和要求	227
20.2 实验原理	227
20.3 实验方法	227
20.3.1 材料	227
20.3.2 方法	228
附: 甲胎蛋白酶标对流电泳测定法	228
原理	228
材料	229
注意事项	229
第 21 章 细胞内细胞因子染色法	230
21.1 实验目的和要求	230
21.2 实验原理	230
21.3 方法特点	230
21.4 实验材料	230
21.5 实验过程	230
21.6 实验结果示范	231
第 22 章 小鼠体液免疫应答的观测	232
22.1 实验目的和要求	232
22.2 实验原理	232
22.3 实验方法	232
22.3.1 材料和试剂	232
22.3.2 方法与步骤	232
22.4 实验结果分析	233
附一 福氏佐剂制备方法	233
附二 动物的选择	234
附三 抗原的处理	234
附四 动物的免疫	235
附五 多克隆抗体制备的具体方法	235
主要参考文献	236

第四篇 细胞培养技术

第 23 章 细胞培养概述	238
23.1 细胞培养的基本概念	238

23.2	细胞培养的环境	238
23.2.1	无污染环境	238
23.2.2	恒定的温度	238
23.2.3	气体环境	239
23.2.4	细胞培养基	239
23.3	细胞培养设施和基本条件	241
23.3.1	实验室设计	241
23.3.2	常用设施及设备	241
23.3.3	培养器皿	242
第24章	细胞培养的准备工作的	243
24.1	培养环境的准备	243
24.1.1	培养室和超净台的消毒	243
24.1.2	培养前准备	243
24.2	培养实验用品的前期处理	243
24.2.1	清洗和浸泡	243
24.2.2	包装	245
24.2.3	消毒	245
24.3	细胞培养用液及培养基(液)的准备	246
24.3.1	培养基(液)	246
24.3.2	水	247
24.3.3	平衡盐溶液(PBS)	248
24.3.4	消化液	248
24.3.5	抗生素	248
24.3.6	细胞冻存液	248
附一	细胞培养的实验程序	249
附二	细胞冻存程序	249
第25章	培养细胞的取材	251
25.1	取材的基本器材和要求	251
25.1.1	基本器材和用品	251
25.1.2	基本要求	251
25.2	各种组织的取材方法	252
25.2.1	皮肤和黏膜的取材	252
25.2.2	内脏和实体瘤的取材	252
25.2.3	血细胞的取材	253
25.2.4	鼠胚组织的取材	253
25.2.5	鸡胚组织的取材	253

25.2.6 骨髓、羊水、胸水、腹水内细胞的取材	253
第 26 章 培养细胞的分离方法	254
26.1 组织材料的分离	254
26.1.1 细胞悬液的分离方法	254
26.1.2 组织块的分离方法	254
第 27 章 细胞的原代培养	259
27.1 组织块培养法	259
27.1.1 原理	259
27.1.2 用品与试剂	259
27.1.3 操作步骤	260
27.1.4 注意事项	261
27.2 消化培养法	261
27.2.1 原理	261
27.2.2 用品与试剂	261
27.2.3 操作步骤 (胎鼠或新生鼠)	261
27.2.4 注意事项	262
第 28 章 细胞的传代培养	263
28.1 贴壁细胞的传代培养	263
28.1.1 原理	263
28.1.2 用品与试剂	263
28.1.3 操作步骤	263
28.1.4 注意事项	264
28.2 悬浮细胞的传代培养	265
28.2.1 原理	265
28.2.2 用品与试剂	265
28.2.3 操作步骤	265
28.2.4 注意事项	265
28.3 细胞计数法	266
28.3.1 原理	266
28.3.2 用品与试剂	266
28.3.3 操作步骤	266
28.3.4 细胞计数要点	267
28.3.5 初学者易犯的错误	268
28.4 细胞的复苏与冻存	268
28.4.1 细胞的复苏	268
28.4.2 细胞的冻存	269

第 29 章 培养细胞的细胞生物学	272
29.1 体内、外细胞的差异和分化	272
29.1.1 差异	272
29.1.2 分化	272
29.2 体外培养细胞的分型	272
29.2.1 贴附型	272
29.2.2 悬浮型	273
29.3 培养细胞的生长和增殖过程	273
29.3.1 培养细胞生命期	273
29.3.2 组织培养细胞一代生存期	274
第 30 章 建立细胞系或细胞株	277
30.1 体外培养细胞的种类和命名	277
30.1.1 初代培养	277
30.1.2 细胞系	277
30.1.3 克隆细胞株	278
30.1.4 二倍体细胞	278
30.1.5 遗传缺陷细胞	278
30.1.6 肿瘤细胞系或细胞株	278
30.2 建立细胞系（或细胞株）的要求	279
30.2.1 组织来源	279
30.2.2 细胞生物学检测	279
30.2.3 培养条件和方法	279
30.3 已建立细胞系或细胞株的鉴定、管理和使用	279
附一 细胞培养常见问题及解决方法	280
附二 细胞培养常识问答	282
主要参考文献	286

第五篇 分子医学前沿技术

第 31 章 蛋白质组学	288
31.1 蛋白质组学的产生背景	288
31.2 蛋白质组学及研究技术路线	289
31.2.1 蛋白质组学的研究内容	289
31.2.2 蛋白质组学研究技术路线	289
31.3 蛋白质组学常用技术	291
31.3.1 LCM-双向电泳-后续分析	291
31.3.2 蛋白质芯片技术	299

31.3.3	双色荧光检测技术	301
31.3.4	酵母双杂交系统	301
31.3.5	噬菌体表面展示技术	302
31.4	蛋白质组学面临的问题及发展前景	303
	主要参考文献	305
第 32 章	生物芯片技术	306
32.1	概念	306
32.1.1	生物芯片	306
32.1.2	基因芯片	306
32.1.3	蛋白质芯片	307
32.1.4	芯片实验室	308
32.2	工作原理	308
32.2.1	芯片制备	308
32.2.2	探针的准备	311
32.2.3	杂交	312
32.2.4	信号检测	313
32.2.5	结果分析	314
32.2.6	生物信息学分析	315
32.3	新一代蛋白质研究工具——抗体芯片	316
32.4	生物芯片的应用	318
32.4.1	基因表达水平的检测	318
32.4.2	基因诊断	319
32.4.3	药物筛选	320
32.4.4	个体化医疗	322
32.4.5	测序	323
32.4.6	生物信息学研究	323
	主要参考文献	325
第 33 章	干细胞技术	327
33.1	干细胞概述	327
33.1.1	干细胞研究的起源与进展	327
33.1.2	干细胞的定义与分类	328
33.1.3	干细胞的应用前景	329
33.2	胚胎干细胞的分离、扩增及鉴定	332
33.2.1	小鼠胚胎干细胞的分离、扩增	332
33.2.2	胚胎干细胞的鉴定	332
33.3	人骨髓间充质干细胞的分离、扩增及鉴定	334