

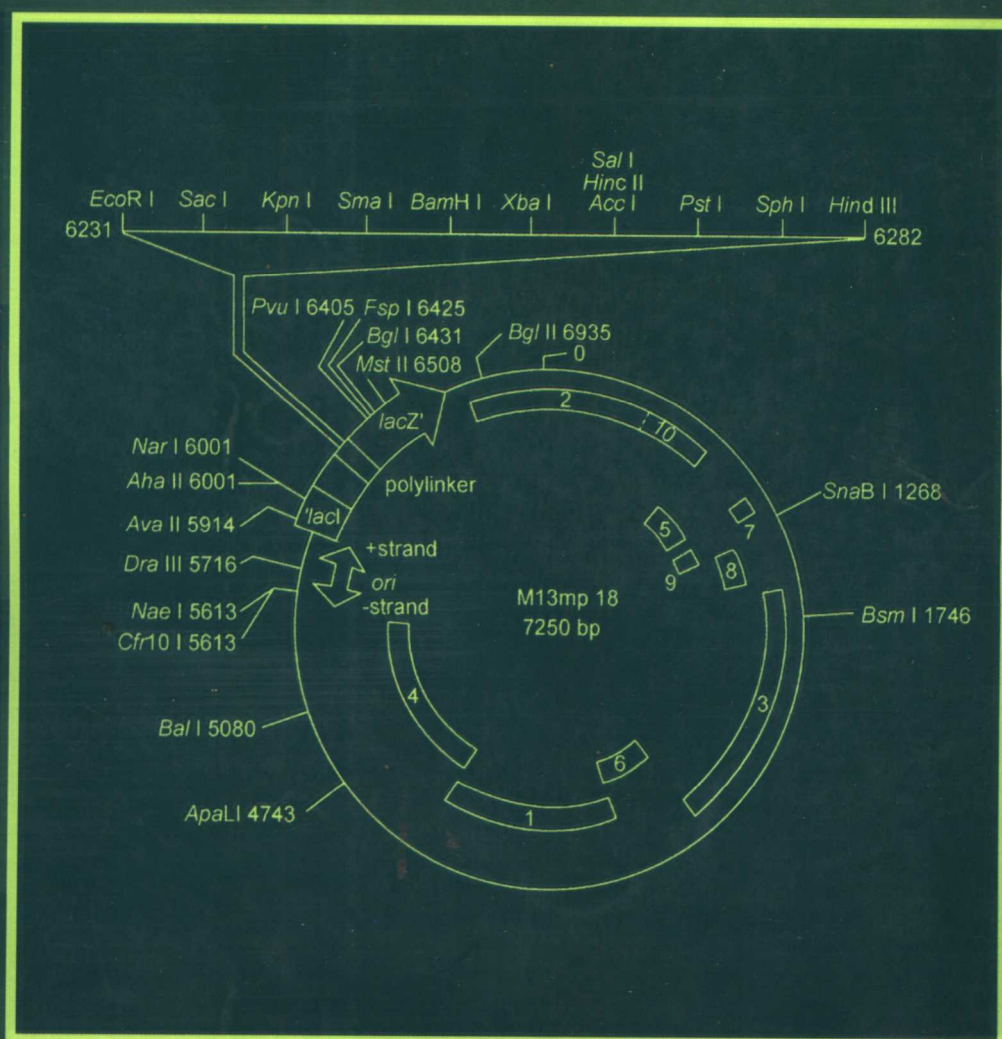
分子克隆

实验指南系列

现代细胞分子生物学技术

林菊生 主 编

冯作化 副主编



科学出版社

www.sciencep.com

现代细胞分子生物学技术

林菊生 主 编

冯作化 副主编

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书为“分子克隆实验指南系列”之一,是一本全面阐述现代细胞分子生物学最新技术的基本原理、操作步骤与方法评注的大型工具书。全书共18章,内容涉及大肠杆菌、质粒、噬菌体工具, DNA、RNA 的制备与分析, 工具酶操作, PCR 技术, DNA 转染, 蛋白质表达与分析, 蛋白质磷酸化和糖复合物分析, DNA 与蛋白质相互作用, 免疫学, 原位杂交和免疫组化, 生物芯片, 细胞培养, 流式细胞术, 细胞凋亡检测, 转基因动物等。内容丰富、实用, 充分反映了近年来细胞分子生物学技术的迅猛发展。

本书可作为从事细胞生物学、生物化学、分子生物学、生物技术、医药学及农学等生命科学领域的科研、教学人员的指导性参考书。

图书在版编目(CIP)数据

现代细胞分子生物学技术/林菊生主编. —北京: 科学出版社, 2004.8
(分子克隆实验指南系列)

ISBN 7-03-011103-6

I. 现… II. 林… III. 细胞学: 分子生物学 IV. Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 000954 号

策划编辑: 李 锋 霍春雁/文案编辑: 彭克里 吴慧涵
责任校对: 柏连海/责任印制: 刘士平/封面设计: 王 浩

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>

丽源印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2004年8月第一版 开本: 787×1092 1/16
2004年8月第一次印刷 印张: 66 3/4
印数: 1—3 000 字数: 1 547 000

定价: 148.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈新欣〉)

在分子水平上探讨
生命本质

从分子水平上掌握

研究技术

贺现代细胞分子生物学技术问世

裘法祖 二〇〇三
春节

《现代细胞分子生物学技术》编写人员

主 编 林菊生 华中科技大学同济医学院同济医院教授、博士生导师

副主编 冯作化 华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学教研室教授、博士生导师

编 委 (以姓氏笔画为序)

孙 明 华中农业大学生命科学技术学院博士

朱 帆 武汉大学生命科学学院博士

朱作言 中国科学院水生生物研究所教授、中国科学院院士

李 东 华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学教研室副研究员

李凌云 武汉大学生命科学学院病毒研究所博士

汪道文 华中科技大学同济医学院同济医院基因治疗研究中心教授、博士生导师

沈士亮 美国斯坦福大学博士

沈关心 华中科技大学同济医学院免疫研究所教授、博士生导师

肖庚富 武汉大学生命科学学院病毒研究所教授

宋家武 华中科技大学同济医学院同济医院博士

杨渝珍 华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学教研室教授、博士生导师

吴金明 华中科技大学同济医学院同济医院博士

陈义发 华中科技大学同济医学院同济医院博士

陈尉梅 武汉大学生命科学学院病毒研究所博士

屈 伸 华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学教研室教授、博士生导师

胡 炜 中国科学院水生生物研究所博士

皇甫永穆 华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学教研室教授、硕士生导师

郇金荣 武汉大学生命科学学院教授、博士生导师

徐玉会 美国国家卫生研究院博士

黄海涛 华中科技大学同济医学院同济医院硕士

龚建平 华中科技大学同济医学院同济医院分子医学中心教授、博士生导师

程元桥 华中科技大学同济医学院同济医院博士

黎培员 华中科技大学同济医学院同济医院博士

戴五星 华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学教研室副教授、硕士生导师

序 一

21 世纪是生命科学的世纪；分子生物学是生命科学领域重要的前沿学科和技术支撑。自从 1953 年 Watson 和 Crick 提出脱氧核糖核酸 (DNA) 双螺旋结构模型，开辟了现代分子生物学的新纪元以来，生命科学的发展日新月异，如农学上新的绿色革命的兴起、医药学上新的诊疗方法的诞生、生命密码的破译、后基因组计划的提出和蛋白质组学的开展。近年来，分子生物学迅猛发展，新技术、新方法层出不穷，并自成体系，渗透到生命科学的各个领域。1992 年《分子克隆实验指南》(病毒基因工程国家重点实验室金冬雁、黎孟枫博士主译) 和 1998 年《精编分子生物学实验指南》(病毒基因工程国家重点实验室颜子颖、王海林博士主译) 两部译著的出版，对我国生命科学的发展起了重要的促进作用。

本书是继《分子克隆实验指南》与《精编分子生物学实验指南》之后又一部集现代细胞分子生物学最新技术之大成的著作，它囊括当今分子生物学的主要技术，并对近年来迅速发展起来的新领域有所侧重。本书共 18 章，详细介绍了各种方法的基本原理和操作步骤，而且在每一方法之后，专门开辟“方法评注”，针对每一方法的背景、关键、注意事项等评述自己的体会，所谓“知其然，知其所以然”。在内容上，除其他同类书籍已涉及的之外，还增补了一些新的章节，如细胞培养技术、细胞凋亡检测、流式细胞技术、糖复合物的制备与分析、转基因动物及生物芯片技术等，尽可能全面地反映当今国际上细胞分子生物学技术的新进展。在结构上，各章节独立成篇，又互相联系，成为一个整体。写作层次分明，深入浅出，体现了丰富、新颖、实用的特点。本书确为一部反映当代国内外细胞分子生物学技术最新成就的重要参考书。

本书作者大多为留学回国人员或博士，他们中有的正在承担国家 973 计划、863 计划或国家重点项目，有的仍然在国外从事科研工作。他们年轻有为，开拓进取，在出色地完成自己繁重的科研任务之余，致力于结合自己的科研实践编写著作，向我国读者奉献了又一部难得的好书。对此，我们深感欣慰。

我相信本书的出版必将对我国生命科学及生物技术的发展起到重要的推动作用。谨为此书的问世表示衷心的祝贺。

病毒基因工程国家重点实验室



于化东

序 二

2000 年人类基因组全测序初告完成, 标志着生命科学和人类社会同步进入了一个新纪元。

随着人类基因组计划 (HGP) 的顺利完成, 蛋白质组、转录基因组、药物基因组、毒物基因组等项研究纷纷浮出台面, 成果纷呈迭出。细胞生物学、分子生物学和生物技术研究正以加速步伐向前迈进。例如, 科学家们以 9 年的时间, 在 1989 年克隆了一个囊性纤维病基因, 8 年之后, 在 HGP 的协同努力下, 只花了 9 天时间就克隆了一个帕金森病基因 (引自美国前总统克林顿 2000 年 6 月 26 日在人类基因组计划全测序完成庆祝会上的讲话)。

由于分子科学技术的加速发展, 预计在不久的将来, 医学家们将有可能应用病人的“基因表达谱”进行辨证论治。迄今为止, 被认为单一的疾病、在形态学上即使应用电子显微镜也无法区分的疾病, 按照基因表达谱的不同, 实际上可以分为数种不同的亚型, 其治疗方法和应答有很大的区别, 由此诞生了疾病的分子分类学。不仅如此, 单核苷酸多态性 (SNP) 的研究还发现, 在同种病的不同个体之间还可能存在着细微的, 然而非常重要的差别, 影响病体对疾病的易感性和对药物的不同反应性。因此, 新时代的医学将强调疾病的个体化治疗, 并说明为什么同一种药对某个人效果好而对另外一个人效果不好, 从而达到正确用药提高疗效的目的。

在 5~20 年内, 前瞻性的基因检测 (predictive gene test) 将逐步实施和普及。这项检测根据基因多态性的分析, 可以推测人体对疾病的易感性以及与环境因素的关系。例如, 携带有结肠癌易感基因的“正常人”应定期作直肠指检或镜检, 以便发现早期的肿瘤, 及时治疗; 携带有高血压基因的“正常人”应限制食盐的摄入和减轻体重, 等等, 由此诞生了分子预防学。随着人民生活质量的不断提高, 前瞻性的基因检测和分子预防学将日益显示其重要性。它将上千年来“预防为主”的医学理论提高到分子水平, 继之实现。

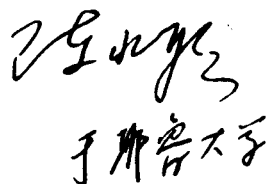
基因组和基因表达谱差异性的研究, 将促使制药工业产生革命性的变化, 也即根据疾病基因组和基因表达谱来设计药物, 这样制造出来的药物将更有效和低毒。

基因分子生物学的研究也会为人类社会带来一些新问题, 例如怎样防止滥用个人基因信息而引起的就业或医疗歧视, 如何防止基因操作使人体变成工业产品等就是一些严峻的课题, 需要大众、科学家和政府共同认识和对待。

综上所述, 在这分子医学的新纪元里, 我们从事生命科学的工作者都面临着一个分子医学的再教育问题。

华中科技大学同济医学院肝病研究所、附属同济医院内科学教授、主任医师林菊生

博士 1995~1997 年应邀赴美国耶鲁大学做博士后期间, 承担 NIH 的课题, 从事抗癌、抗病毒分子药理学研究, 做出了突出的成绩。回国后, 在获得 4 项国家自然科学基金课题的基础上, 又获得“十五”国家重大科技专项“功能基因组学和生物芯片”子课题的资助。他和另一位留美回国的我国分子生物学研究领域的新秀冯作化教授及时地编撰了这本《现代细胞分子生物学技术》, 正是适应这个新时期的需求, 这对于普及和加强细胞和分子生物学教育和科研具有非常重要的意义。我衷心地祝贺这本书的问世, 竭力向我国从事生命科学的研究者推荐这部生物技术的巨著。



王军

前言

生命科学在新的世纪愈发蓬勃,细胞分子生物学技术则是生命科学的主要研究手段。一方面,生命科学的发展促进了新的研究方法的诞生;另一方面,新的研究技术的建立和完善又极大地推动了各个学科的迅猛发展。鉴于细胞分子生物学技术的重要地位及其在生命科学研究工作中的迫切需要,目前国内已出版多本相关参考书,对我国生命科学研究起到了重要的指导作用,如 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (《分子克隆实验指南》,第二版,金冬雁和黎孟枫等译,1992)、《现代分子生物学实验技术》(卢圣栋主编,1993)、*Short Protocols in Molecular Biology* (《精编分子生物学实验指南》,颜子颖和王海林译,1998)等。

因为细胞分子生物学技术的发展日新月异,新的技术和手段如转基因动物、生物芯片等层出不穷,所以有必要将这些新的知识汇编成册。另外,在掌握实验基本操作步骤的同时,如能了解其详细的原理,则思路将更为清楚;同时,实验中往往会不可避免地出现各种问题(尤其对于那些新手),导致实验结果不理想或出现偏差,具体操作中的注意事项和影响实验的重要参数对实验的成功和分析也甚为重要;实验方法的背景资料、适用范围、预期结果、时间安排等对实验也有重要的参考价值。鉴于此,我们编写了这本《现代细胞分子生物学技术》。本书可作为从事生物学、生物化学、分子生物学、生物技术、医药学及农学等领域的科研、教学人员的指导性参考书。

全书共18章,详细阐述了大肠杆菌、质粒、噬菌体工具,DNA、RNA的制备与分析,工具酶操作,PCR技术,DNA转染,蛋白质表达与分析,蛋白质磷酸化和糖复合物分析,DNA与蛋白质相互作用,免疫学,原位杂交和免疫组化,生物芯片,细胞培养,流式细胞术,细胞凋亡检测,转基因动物等内容。为保证全书的系统性和结构完整性,本书也涵盖了其他同类书籍的相关内容,部分章节主体内容参考了 *Current Protocols in Molecular Biology*。本书内容按章编排,章的结构如下:

引言 介绍本章实验方案的基础知识,包括方法的建立和发展、总体原理、相关内容和实验方法的选择及适用范围。部分内容较庞大的章节也归纳出专门的小节加以阐述。

小节及其下属单元 为同一类方法的汇总或逐步进行达到相应目的的各种方法。多个方案则并行排列,依使用频率的高低或由简到繁编排。通常采用第一方案即可,如需达到特殊目的则可选用后续的方案。

原理或概述 介绍具体方案的原理或概述其特点和应用范围。

材料 列出所述方法需要的试剂及设备。但一些实验室常规的试剂和设备未予列出。需读者自己配制的试剂,其后括号内列出其详细成分和配制方法。商品化的试剂则列出其供应商,读者可通过当地的代理商联系订购。第一个方案列出全部的材料,后续的方案如为附加材料,则是在前一方案基础上所需添加的材料。除非特别说明,所有的

水溶液均应用去离子的蒸馏水配制。

试剂配制 对于一些较为特殊的试剂,在本栏详细说明其配制方法和注意事项。

操作步骤 按顺序列出所述实验方法的每一操作步骤,其后的小字为该步骤的详细注释,说明该步骤的注意事项、可见的结果或其他可替代的方法。

方法评注 在每一方法后列出,或在几个类似方法后一并列出。介绍该实验方案的建立、发展、应用等背景资料,对实验结果产生重要影响的参数,实验中可能遇到的问题及其解决方法,实验的结果和时间安排等。

参考文献 在每一章的末尾列出了此章的主要参考文献,供读者查阅。

附录 提供了本书中出现的英文缩写的全称及实验室常用仪器和设备,细胞分子生物学常用操作技术。

实验中应严守操作规程和相应的法律法规,注意安全操作,避免自身的伤害和环境污染。

本书的完成是一项极其复杂繁重的工作,在这里要特别感谢皇甫永穆教授,他除了出色地完成自己的编写工作外,还在百忙之中,抱病审校了全书的大部分章节,并为本书提供了宝贵的建议;感谢中国科学院资深院士、华中科技大学同济医学院裘法祖教授欣然提笔为本书题词;感谢中国工程院院士、北京病毒基因工程国家重点实验室侯云德教授和我国分子生物学的先驱、耶鲁大学的陈兆聪教授为本书作序;感谢肝病研究所所长梁扩寰教授、李绍白教授对本书编者的勉励;感谢黎培员博士夜以继日的编辑、排版和审校,促成本书的早日出版;感谢华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所、内科教研室和消化内科的领导、全体老师及研究生对本书编写工作的支持和帮助。

本书内容广泛,由于时间紧迫,加之编写者对大型工具书的编写经验有限,肯定存在诸多不足,恳请各位读者不吝指正,以期再版时予以修订和完善。

编 者

2003 年元旦于武汉

目 录

序一

序二

前言

第一章 大肠杆菌、质粒和噬菌体	1
引 言	1
第一节 大肠杆菌	5
一、培养基的制备和细菌学工具	5
二、在液体培养基中培养	9
三、在固体培养基中培养	10
四、经典的细菌遗传学选择标志	12
第二节 质粒	24
一、质粒的分子生物学	24
二、质粒 DNA 的小量制备	31
三、质粒 DNA 的大量制备	38
四、质粒 DNA 转化细胞	49
第三节 λ 噬菌体及其衍生载体	55
一、 λ 噬菌体的分子生物学	56
二、 λ 噬菌体克隆载体	60
三、影印 λ 噬菌体产生空斑	72
四、 λ 噬菌体衍生质粒的培养	75
五、从噬菌体裂解物制备 λ DNA	78
第四节 丝状噬菌体载体	87
一、丝状噬菌体的分子生物学	87
二、M13 噬菌体衍生载体的制备与应用	92
第五节 黏粒载体	100
一、黏粒载体简介	100
二、应用黏粒载体构建基因组文库	109
三、黏粒文库的扩增和贮存	118
主要参考文献	125
第二章 DNA 的制备与分析	127
引 言	127
第一节 DNA 溶液的纯化和浓缩	128
第二节 基因组 DNA 的制备	136
一、从哺乳动物组织中制备基因组 DNA	136
二、从植物组织中制备基因组 DNA	138
三、细菌基因组 DNA 的制备	141
第三节 大片段 DNA 的分离与回收	146

一、琼脂糖凝胶电泳	146
二、脉冲电场凝胶电泳	153
三、用琼脂糖凝胶分离和回收大的 DNA 片段	160
第四节 DNA 小片段的分离与回收	169
一、非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	169
二、筛分型琼脂糖凝胶电泳	174
第五节 DNA 印迹与杂交分析	175
一、Southern 印迹	176
二、DNA 的斑点印迹和狭线印迹	184
三、DNA 印迹的杂交分析	188
第六节 寡核苷酸和 DNA 片段的纯化	199
一、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化寡核苷酸	199
二、羟磷灰石层析法分离双链和单链核苷酸	202
三、阴离子交换层析法纯化 DNA	204
主要参考文献	209
第三章 RNA 的制备与分析	211
引 言	211
第一节 真核细胞和原核细胞 RNA 的制备	211
一、组织培养细胞胞质 RNA 的制备	212
二、胍盐法制备总 RNA	215
三、植物 RNA 的制备 (酚/SDS 法)	221
四、细菌 RNA 的制备	223
五、带有 poly(A) ⁺ RNA 的制备	229
第二节 RNA 结构分析和合成	231
一、用单链 DNA 探针和 S1 核酸酶分析 mRNA	232
二、核糖核酸酶保护测定	240
三、引物延伸	246
四、用 Northern 与狭线印迹杂交分析 RNA	248
五、新转录 RNA 的鉴别	255
主要参考文献	262
第四章 DNA 和 RNA 的酶学操作	263
引 言	263
第一节 限制性内切核酸酶	264
一、限制性内切核酸酶的特性	281
二、限制性内切核酸酶消化 DNA 的方法	281
三、影响酶切效率的主要因素	285
第二节 限制性作图	286
一、多种限制性内切核酸酶消化法作图	287
二、限制性内切核酸酶部分消化法作图	290
三、末端标记法作图	291
第三节 用于修饰与放射性标记核酸的酶	292

一、用于操作核酸的试剂和放射性同位素	293
二、依赖 DNA 的 DNA 聚合酶	301
三、不依赖模板的 DNA 聚合酶	312
四、依赖 RNA 的 DNA 聚合酶	313
五、依赖 DNA 的 RNA 聚合酶	316
六、不依赖 DNA 的 RNA 聚合酶	318
七、磷酸酶和激酶	318
八、外切核酸酶	323
九、内切核酸酶	326
十、核糖核酸酶	330
十一、DNA 连接酶	332
十二、RNA 连接酶	335
第四节 重组 DNA 分子的构建	336
一、DNA 片段的亚克隆	337
二、PCR 构建重组的 DNA 分子	343
第五节 非同位素探针标记及其应用	347
一、非同位素探针的标记和比色检测	347
二、非同位素探针的化学发光检测	353
主要参考文献	357
第五章 聚合酶链式反应	358
引 言	358
第一节 PCR 的基本原理	358
第二节 PCR 的基本技术	360
一、PCR 引物的设计	360
二、模板的制备	362
三、PCR 的基本反应	367
四、PCR 反应条件的控制与优化	368
五、扩增大片核酸的 PCR 条件优化	370
六、PCR 实验中应注意的事项	374
第三节 PCR 技术的扩展	375
一、多重 PCR	375
二、筑巢式 PCR	375
三、二次 PCR	375
四、中断性 PCR	376
五、共享引物 PCR	376
六、不对称 PCR	376
七、反向 PCR	376
八、彩色 PCR	377
第四节 用 PCR 扩增 DNA 的基本方法	378
一、以 DNA 为模板扩增 DNA	378
二、以 mRNA 为模板扩增 DNA	379
三、筛选最适 Mg^{2+} 离子浓度的方案	381

四、方法评注	382
第五节 用 PCR 定量分析微量 DNA	383
一、基本方法	383
二、方法评注	386
第六节 以低丰度 RNA 为模板扩增 cDNA	388
第七节 制备直接用于 DNA 序列测定的 PCR 产物	391
一、用不对称 PCR 制备适合双脱氧测序的单链产物	391
二、用单个引物再扩增制备适合于双脱氧测序的单链模板	392
三、用 λ 外切核酸酶消化双链 PCR 产物产生单链的测序模板	393
四、制备用于双脱氧测序的双链 PCR 产物	394
五、标记 PCR 产物进行化学测序	395
六、PCR 产物的基因组测序法	396
第八节 连接介导 PCR 与基因组足迹分析和测序	397
一、连接介导 PCR 的基本原理	397
二、连接介导 PCR	399
三、从单层细胞制备基因组 DNA 进行 DMS 足迹分析	404
四、从悬浮细胞制备基因组 DNA 进行 DMS 足迹分析	408
五、基因组 DNA 的化学测序反应	409
六、方法评注	411
第九节 用锚式 PCR 扩增 cDNA	414
一、锚式 PCR 的基本原理	415
二、扩增已知序列的 3' 端下游区段 (下游锚式 PCR)	417
三、扩增已知序列 5' 端上游区段 (上游锚式 PCR)	418
四、方法评注	421
第十节 PCR 扩增产物的克隆	422
一、T-A 突出端的产生	422
二、利用引物产生半位点	423
三、利用引物引入新的酶切位点	424
第十一节 用 PCR 差异显示 mRNA	425
一、差异显示 PCR 的基本原理	425
二、差异显示 PCR 的基本方法	425
三、方法评注	429
主要参考文献	430
第六章 DNA 导入哺乳动物细胞	431
引 言	431
第一节 DNA 转染真核细胞	434
一、磷酸钙转染法	434
二、用 DEAE-葡聚糖转染	440
三、用电穿孔转染	445
四、脂质体介导的转染	449
五、基因稳定转入哺乳动物细胞	452
第二节 DNA 转染哺乳动物细胞的检测	457

一、融合报道基因概述	457
二、氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 的收获和测定	464
三、萤火虫荧光素酶报道系统分析	469
四、人生长激素报道系统测定	473
五、 β -半乳糖苷酶报道系统测定	475
六、转染后 RNA 的直接分析	476
七、转染方法的优化	477
第三节 用逆转录病毒载体转导基因	480
一、逆转录病毒转导系统概述	480
二、特异逆转录病毒产生细胞株的制备	485
三、逆转录病毒原种的大量制备与浓缩	494
四、逆转录病毒原株中辅助病毒的检测	497
五、体外与体内细胞的逆转录病毒感染	500
主要参考文献	502
第七章 蛋白质的表达	504
引 言	504
第一节 蛋白质在大肠杆菌中的表达	504
一、表达策略	504
二、T7 噬菌体 RNA 聚合酶/启动子表达系统	506
三、融合蛋白表达系统	509
四、疑难分析	516
第二节 杆状病毒表达系统	517
一、杆状病毒表达系统的特点和原理	517
二、杆状病毒转移载体	521
三、构建重组病毒的策略	525
四、杆状病毒克隆表达的新策略	528
主要参考文献	534
第八章 蛋白质分析	535
引 言	535
第一节 蛋白质的光吸收法和生物化学法定量	535
一、紫外光吸收法	535
二、Lowry 氏比色法	536
三、考马斯亮蓝染色法	538
第二节 蛋白质的电泳分离	539
一、蛋白质的一维电泳分离	539
二、蛋白质的二维电泳分离 (双相凝胶电泳)	554
三、染色凝胶中蛋白质的电洗脱	560
第三节 蛋白质的检测	562
一、凝胶中蛋白质的染色	563
二、印迹到膜上的蛋白质的检测	568
三、蛋白质的免疫印迹和免疫检测技术	570
第四节 蛋白质的常规层析法纯化	582

一、凝胶过滤层析	582
二、离子交换层析	588
三、免疫亲和层析	592
四、金属螯合亲和层析	596
第五节 高效液相色谱分离和纯化蛋白质	607
一、反相高效液相色谱	608
二、离子交换高效液相色谱	614
三、体积排阻高效液相色谱	621
四、高效聚焦色谱	625
五、高效疏水作用色谱	629
第六节 用免疫沉淀法纯化蛋白质	632
一、用 Sepharose 交联抗体免疫共沉淀放射性标记的抗原	633
二、Sepharose 偶联抗体的制备	635
三、用抗 Ig 血清免疫共沉淀放射性标记的抗原	636
四、用抗 Ig-Sepharose、A 蛋白-/G 蛋白-Sepharose 或金葡菌菌体免疫共沉淀放射性标记的抗原	637
五、使用强力裂解液和洗涤缓冲液进行免疫共沉淀	637
六、Sepharose 交联抗体与未标记抗原的免疫共沉淀	638
七、方法评注	639
第七节 专门应用	639
一、通过克隆基因的转录和翻译在体外合成蛋白质	640
二、蛋白质的生物合成标记技术	643
三、用于微序列分析的蛋白质分离方法	648
主要参考文献	653
第九章 DNA 与蛋白质的相互作用	656
引 言	656
第一节 哺乳动物细胞核或细胞质内蛋白的提取	659
一、细胞核中提取蛋白质	659
二、细胞质部分的提取	662
三、方法评注	663
第二节 用凝胶电泳进行迁移率改变试验检测 DNA 结合	665
一、低离子强度的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳迁移率改变试验检测法	666
二、高离子强度的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳迁移率改变试验检测法	668
三、方法评注	669
第三节 甲基化和尿嘧啶干扰反应分析蛋白质-DNA 的作用	671
一、甲基化干扰反应	672
二、尿嘧啶干扰实验	673
三、方法评注	675
第四节 DNase I 足迹法分析蛋白-DNA 结合位点	676
一、DNase I 足迹分析法	677
二、光密度及数值分析法对蛋白结合滴定进行定量分析	679
三、粗制品的 DNase I 足迹法	681

四、方法评注	682
第五节 蛋白质与核酸的紫外交联反应	682
一、用溴脱氧尿嘧啶核苷替代的探针进行紫外交联反应	683
二、用非溴脱氧尿嘧啶核苷替代的探针进行紫外交联反应	685
三、原位紫外线交联反应	685
四、方法评注	686
第六节 用生物素/链亲和素亲和系统纯化 DNA 结合蛋白	687
一、基本方案	687
二、用微型柱进行纯化	690
三、用链亲和素-琼脂糖进行纯化	691
四、方法评注	691
第七节 编码 DNA 结合蛋白 cDNA 克隆的检测、纯化和鉴定	692
一、用识别位点处的 DNA 探针筛选 λ gt11 表达文库	692
二、盐酸胍对干燥的影印膜进行反复变性与复性	695
三、从 λ gt11 重组的溶源性细菌的粗提取物鉴定融合蛋白 DNA 结合活性	696
四、方法评注	697
第八节 滤膜分离游离 DNA 及与蛋白质结合的 DNA	698
一、蛋白质结合 DNA 的定量测定	698
二、DNA 结合特异性的检测	699
三、结合 DNA 的洗脱	700
四、方法评注	700
第九节 体外合成克隆基因蛋白质分析 DNA-蛋白质反应	701
第十节 序列特异性 DNA 结合蛋白的亲亲和层析纯化	703
一、基本方案	703
二、将 DNA 偶联于溴化氰活化琼脂糖上	706
三、用制备性凝胶电泳纯化寡核苷酸	707
四、DNA 亲和层析法	708
五、非同位素竞争性 DNA 的选择和制备	710
六、方法评注	711
主要参考文献	711
第十章 蛋白质磷酸化的分析	716
引 言	716
第一节 磷酸化蛋白质的标记和制备	717
一、 ^{32}P 标记培养细胞	717
二、制备细胞裂解物	719
三、SDS 煮沸法裂解细胞	720
四、免疫沉淀法制备分析磷酸化蛋白质	721
第二节 标记的磷酸化蛋白质的检测	722
一、SDS-PAGE 检测	722
二、磷酸氨基酸分析	723
第三节 未标记的磷酸化蛋白质的检测	726
一、Western Blot 检测未标记的磷酸化蛋白质 (ECL 法)	726