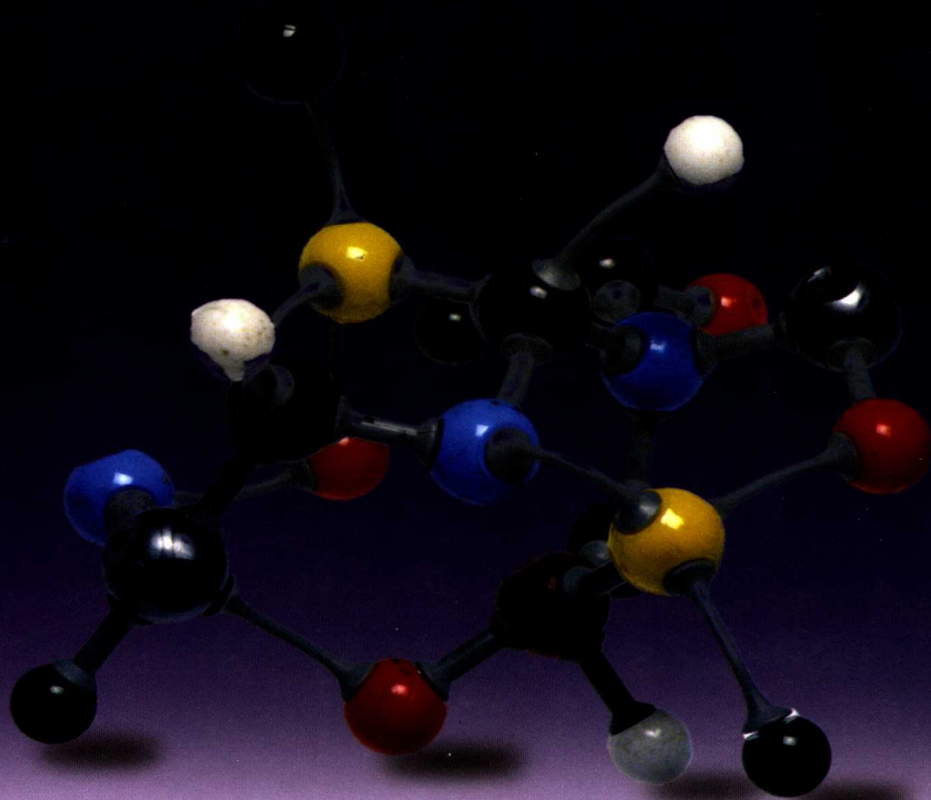


实用分子生物学 操作指南

主编 曹 亚



人民卫生出版社

实用分子生物学 操作指南

主 编 曹 亚

副主编 李 官 成

编者 (以汉语拼音为序)

曹 亚	邓锡云	董 利	冯湘玲	关勇军	胡锦跃
韩为农	李 萃	李官成	李 江	李小玲	李忠花
黎 明	任彩萍	史剑凌	谭运年	谭 琛	唐发清
陶永光	王洁如	向 秋	谢海龙	杨力芳	杨 静
张必成	张小慧	赵晓荣	祝和成	朱建高	朱诗国

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所)

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

实用分子生物学操作指南/曹亚主编. —北京: 人民卫生出版社, 2003

ISBN 7-117-05609-6

I. 实... II. 曹... III. 分子生物学-实验-指南
IV. Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 059178 号

实用分子生物学操作指南

主 编: 曹 亚

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 67616688)

地 址: (100078) 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网 址: [http://www. pmph. com](http://www.pmph.com)

E - mail: [pmph@pmph. com](mailto:pmph@pmph.com)

印 刷: 北京市卫顺印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 29.75

字 数: 670 千字

版 次: 2003 年 10 月第 1 版 2003 年 10 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 7-117-05609-6/R·5610

定 价: 12.00 元

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)



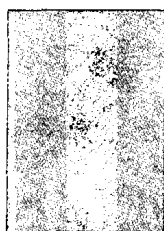
关键词

2'-脱氧助间型霉素 (dCF)
5-溴脱氧尿苷 (BrdU)
BrdU 掺入标记法流式细胞技术
cDNA-代表性差异展示法
cDNA 末端快速扩增技术 (RACE)
cDNA 文库
cDNA 文库筛选
CGH 芯片
DEAE-葡聚糖介导法
DEAE-葡聚糖介导法
DNA 聚合酶
DNA 结合蛋白的分离纯化
DNA 芯片
DNA 阵列
DNA 足迹分析
G418 (Geneticin)
HAT 培养基
Kit
mRNA 差异显示法
mRNA 差异展示
PCR
RNA 病毒
Southwestern 印迹
T-A 克隆
 α 互补
氨基蝶呤 (aminopterin)
氨基环多醇 (aminocyclitol)
氨基糖苷磷酸转移酶 (APH)
氨甲蝶呤 (methotrexate, MTX)
包涵体
包装细胞
表达芯片
表型克隆
测序芯片
插入失活
长末端重复序列 (LTRs)
潮霉素 B 磷酸转移酶 (HPH)
传代培养
次黄苷酸 (IMP)
次黄嘌呤 (hypoxanthine)
大肠杆菌
代表性差异分析法
单核苷酸多态性
单克隆挑选法
单链抗体
单细胞显微操作法
担体序列
蛋白质芯片
电穿孔法
定位候选克隆
定位克隆
定向连接
多态性微卫星遗传标记限制性片段长度多态性
多维标度分析
二向聚类分析

- 发现性分类
非洲爪蟾
呋喃木糖苷 (Xyl - A)
改形抗体
感染
感受态
感受态菌
共转染 (co - transfection)
谷胱苷肽巯基转移酶 (GST)
光蚀刻法
光纤 DNA 生物传感器微阵列
核酸的定量
核转录分析
互补决定区
黄苷酸 (XMP)
黄嘌呤
基因表达
基因表达系列分析 (SAGE) 技术
基因工程抗体
基因克隆
基因芯片
基因组递减杂交
激光共聚焦荧光检测系统
甲基化分析
兼噬性的包装细胞
碱裂解法
酵母双杂交
聚丙烯酰胺凝胶电泳
聚凝胺
菌落原位杂交
克隆 (集落) 形成率
克隆载体
磷酸钙沉淀法
绿色荧光蛋白
氯霉素乙酰基转移酶分析
霉酚酸
末端终止法
耐热 DNA 聚合酶
逆病毒载体法
逆转录病毒
凝胶滞留分析
嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (XGPRT)
平板克隆 (集落) 形成实验
平端连接
平皿克隆分离法
器官培养
亲噬性的包装细胞
琼脂糖凝胶电泳
全套抗体库
染色体步移法
人抗鼠抗体
人-鼠嵌合抗体
融合蛋白
软琼脂克隆 (集落) 形成实验
神经网络聚类分析
生物芯片
噬菌体
噬菌体抗体库
瞬时转染
四环素基因表达系统
四唑盐 (MTT) 法
松弛型质粒
缩微芯片实验室
探针的标记
体内表达系统
体外转录
贴壁细胞
微流体学
微型全分析系统
稳定表达
系统聚类分析
细胞分裂指数
细胞记数法
细胞培养
细胞生长曲线
细菌的转化

显微注射
 腺病毒载体法
 腺苷脱氨酶 (ADA)
 腺苷脱氨酶 (adenosine deaminase, ADA)
 腺嘌呤-9- β -D-
 芯片实验室
 胸苷 (thymidine)
 胸苷激酶 (TK)
 悬浮细胞
 选择标记 (selectable marker)
 压电印刷法
 严紧型质粒
 液相杂交
 前病毒 (provirus)
 引物设计
 引物延伸法

荧光酶
 噬斑形成单位 (pfu)/ml
 预测性分类
 原核细胞
 原位杂交
 粘端连接
 真核细胞
 脂质体介导法
 重构型抗体
 逐步聚类分析
 主成分分析
 煮沸裂解法
 转导 (transduction)
 转化 (transformation)
 转染 (transfection)
 自组图分析
 组合抗体库



前

言

从上个世纪五十年代初沃森与克里克确定 DNA 双螺旋结构到七十年代重组 DNA 技术问世, 仅仅短短的二十来年。从此, 分子生物学技术蓬勃发展, 并向各个学科广泛渗透, 而且分子生物学与细胞生物学技术相互交叉, 极大地推动了多学科的发展, 使学科间的界线变得越来越模糊, 分子生物学技术已成为共同工具。

在廿多年的科研实践中, 我们不断应用分子生物学技术对肿瘤发病机理进行研究, 把对鼻咽癌的研究深入到分子水平。应用全基因组扫描, 定位候选克隆, 基因差异表达结合 cDNA 文库筛选等基因克隆策略克隆与鼻咽癌发病相关的候选基因; 建立了非洲爪蟾体内表达以及可诱导性的四环素体外表达体系; 利用 DNase I、EMSA 等多种策略进行真核基因表达调控; 展开了基因工程抗体, 基因工程小鼠研究; 随着功能基因组时代的提前到来, 高通量微阵列、二维电泳与质谱分析, 生物信息等相关软件的应用都一一建立起来。我们将相关的分子生物学技术理论与在实践中获得的经验总结成这本书, 奉献给各位朋友, 并相信各位将从这本操作指南中获益。

《实用分子生物学操作指南》还提供了细胞生物学方面的技术信息, 如细胞生长曲线和倍增时间、细胞分裂指数、细胞周期参数、克隆形成率的测定以及裸鼠致瘤实验、染色体核型分析等, 这对于从事肿瘤研究的同行们会有帮助。同时, 我们在此书中不仅介绍了有关分子生物学的基本技术, 更注意将新近国内外发展与建立的新的技术归纳整理成相应的章节。此外, 在此书的附录中我们分别就分子生物学研究所需的常规仪器设备、放射性核素、细胞培养室、生物信息学等软件作了精炼的介绍。

二十一世纪将是生命科学的世纪。人类基因组计划的实施与进展将推动分子生物学技术的不断发展。《实用分子生物学操作指南》从 DNA、RNA 到蛋白质三个层面提供了理论与技术信息, 将帮助各个学科的同行与朋友们一起走进一个精彩的天地。

雷 亚

2003 年 6 月于长沙



前言	1
关键词	1
第一章 组织培养技术及细胞生物学检测	1
第一节 组织培养的基本技术	1
一、培养用品的清洗和消毒灭菌	1
二、无菌操作	4
三、培养用液	5
四、组织细胞的分离与培养	8
五、传代培养	10
六、一些特殊培养法	10
第二节 特殊细胞和组织的培养	11
一、上皮细胞原代培养	11
二、中胚层细胞的培养	15
三、神经组织细胞培养	16
四、巨噬细胞的培养	16
第三节 细胞克隆化培养	17
一、有限稀释法	17
二、平皿克隆分离法	18
三、单细胞显微操作法	18
第四节 细胞培养污染的检测和排除	19
一、污染途径	19
二、污染对细胞的影响	20
三、微生物污染的检测和防治	20
第五节 细胞生物学和遗传学检测	21
一、相差显微镜观察	21
二、细胞计数	22
三、接种存活率测定	23

四、细胞生长曲线和倍增时间测定	24
五、细胞分裂指数测定	25
六、细胞周期参数的测定	26
七、克隆形成率测定	27
八、裸鼠接种致瘤实验	28
九、染色体核型分析	29
第二章 分子生物学实验基本技术	31
第一节 质粒和噬菌体 DNA 的制备	31
一、质粒 DNA 的小量制备	31
二、质粒 DNA 的大量制备	33
三、质粒 DNA 的纯化和保存	34
四、噬菌体 DNA 的制备	37
第二节 原核细胞核酸的制备	39
一、原核细胞基因组 DNA 的制备	39
二、原核细胞基因组 RNA 的制备	41
第三节 真核细胞基因组核酸的制备	43
一、真核细胞基因组 DNA 的制备	43
二、真核细胞总 RNA 的制备	48
第四节 核酸的纯化及定量	51
一、核酸的纯化	51
二、核酸的定量	53
第五节 凝胶电泳	54
一、琼脂糖凝胶电泳	55
二、聚丙烯酰胺凝胶电泳	59
三、脉冲场凝胶电泳	61
第六节 核酸的酶学操作	62
一、限制性内切酶的酶学分析	62
二、其他常用酶类	66
第三章 核酸分析技术	70
第一节 核酸分子探针的标记	70
一、核酸分子探针的来源	70
二、核酸分子探针的标记	71
第二节 核酸杂交技术	78
一、滤膜印迹杂交	79
二、液相杂交技术	91
三、核酸原位杂交	95
第三节 DNA 序列测定	101

一、测序策略	102
二、末端终止法	104
三、Maxam - Gilbert DNA 化学降解法	118
第四节 基因突变分析技术	121
一、限制性片段长度多态性	122
二、以聚合酶链反应为基础的突变检测技术	123
三、单核苷酸多态性	127
四、其它方法	128
第四章 聚合酶链式反应	130
第一节 原理	130
一、DNA 模板的变性	130
二、模板与引物的结合	130
三、引物延伸	131
第二节 PCR 反应的成分和作用	131
一、耐热 DNA 聚合酶	131
二、缓冲液	133
三、dNTP	133
四、模板核酸	133
五、引物	134
第三节 引物设计一般性原则	134
一、引物长度	134
二、G+C 含量	134
三、碱基分布的随机性	134
四、引物自身	135
五、引物之间	135
六、引物的 3' 端	135
七、引物的 5' 端	135
八、引物的特异性	135
第四节 PCR 相关技术	135
一、通用 PCR	135
二、RT - PCR	137
三、多重 PCR	137
四、套式 PCR	137
五、PCR 结合特异寡核苷酸探针斑点杂交法	138
六、PCR-限制性片断长度多态性分析	138
七、任意引物 PCR	138
八、PCR-单链构象多态性分析	139

九、原位 PCR	139
第五节 PCR 产物纯化、回收、定量、克隆及测序	140
一、PCR 产物纯化、回收	140
二、PCR 产物的定量	141
三、PCR 产物的克隆	141
四、PCR 产物的测序	142
第五章 基因克隆	143
第一节 基因克隆策略	143
一、全基因组扫描基因定位策略	143
二、定位-候选克隆和计算机克隆策略	145
三、基因表达差异克隆策略	146
第二节 cDNA 文库的构建及筛选	147
一、cDNA 文库的构建	147
二、cDNA 文库筛选	149
第三节 差异表达的基因克隆方法	151
一、mRNA 差异显示法	151
二、抑制性消减杂交	155
第四节 cDNA 全长克隆方法	158
一、cDNA 末端快速扩增技术	158
二、染色体步移法	167
三、EST 介导的基因克隆	171
第六章 DNA 重组技术	172
第一节 DNA 重组技术的定义及步骤	172
一、目的基因的制备	172
二、载体的构建	173
第二节 细菌感受态的制备和质粒的转化	177
一、菌株的培养、保存和复苏	177
二、感受态细胞的制备	177
三、细菌的转化	178
第三节 DNA 重组反应	179
一、粘端连接	179
二、平端连接	180
三、定向连接	181
第四节 含重组质粒的细菌菌落的鉴定	181
一、 α 互补	181
二、插入失活	182
三、菌落原位杂交	183

四、限制酶酶切分析	184
五、DNA 序列测定	184
第七章 基因转染技术	185
第一节 物理化学法	185
一、磷酸钙沉淀法	185
二、DEAE-葡聚糖介导法	188
三、电穿孔法	189
四、脂质体介导法	191
第二节 病毒载体法	193
一、逆病毒载体法	193
二、腺病毒载体法	200
第三节 转染细胞的筛选与分离	203
一、哺乳动物细胞常用的遗传选择标记	204
二、利用 G418 筛选和分离转染的细胞	206
第八章 真核基因表达分析	208
第一节 体内表达系统	208
一、主要设备	209
二、主要试剂	209
三、获得胚胎	209
四、去除胶状外膜和卵黄膜	211
五、显微注射	211
六、动物帽切割和培养	212
第二节 体外表达系统	212
一、四环素基因表达系统	213
二、荧虫酶	216
三、绿色荧光蛋白	217
第三节 真核基因表达调控研究方法	220
一、DNase - I 超敏感性分析	221
二、DNA 甲基化分析	223
三、引物延伸法确定转录的起始位点	224
四、体外转录	224
五、进行中的核转录分析	225
六、氯霉素乙酰基转移酶分析	225
七、凝胶滞留分析	227
八、Southwestern 印迹	227
九、DNA 足迹分析	228
十、DNA 结合蛋白的分离纯化	229

十一、酵母双杂交	230
第九章 基因表达蛋白质的检测与分析	231
第一节 蛋白质的体外表达	231
一、蛋白质在大肠杆菌中的表达	231
二、蛋白质在真核细胞中的表达	234
第二节 表达蛋白的纯化	237
一、细菌裂解	238
二、包涵体的洗涤与纯化	239
三、包涵体的溶解	240
四、蛋白质的复性	241
五、融合蛋白的定点裂解	241
六、融合蛋白的纯化	244
第三节 抗体制备和纯化	246
一、多克隆抗体制备	246
二、单克隆抗体制备	248
三、盐析法纯化免疫球蛋白	250
四、DEAE-Sephadex A-50 柱层析纯化免疫球蛋白	252
五、Sephacrose CL-4B 亲和柱层析纯化 IgG 及 IgG 亚类	254
六、高效液相色谱纯化小鼠腹水中单克隆抗体	255
第四节 免疫学检测	256
一、免疫酶技术	256
二、免疫组织化学	258
三、放射免疫技术	262
四、免疫斑点试验	264
五、免疫沉淀法	265
六、Western 印迹法	267
第五节 蛋白质组学技术	270
一、蛋白质组学简介	270
二、蛋白质组学研究常用的技术方法	272
三、蛋白质组学研究技术目前存在的问题	275
第十章 基因工程抗体	277
第一节 嵌合抗体	277
一、构建嵌合抗体的基本原理	277
二、方法	278
第二节 改形抗体	279
一、构建改形抗体的一般性原则	279
二、改形抗体可变区基因的构建与表达	280

第三节 抗体库技术	283
一、基本原理	283
二、方法	284
第四节 基因工程抗体的纯化和鉴定	299
一、抗体的纯化	299
二、抗体活性的测定	300
三、抗体亲和力的测定	300
四、抗体可变区基因序列测定及分析	301
第十一章 DNA 芯片技术	303
第一节 DNA 芯片的制作原理	303
一、载体材料的选择	304
二、DNA 方阵的构建方法	304
三、样品制备、杂交和检测	304
第二节 微阵列的选择	306
第三节 芯片技术在医学领域的应用	307
一、测序	307
二、基因表达水平的检测	307
三、基因诊断	308
四、基因芯片在肿瘤研究中的潜在用途	308
五、药物筛选	309
六、给药个性化	309
七、检测基因突变和多态性	310
第四节 芯片技术存在的问题和前景	311
一、存在问题	311
二、进展	312
第十二章 基因工程小鼠	317
第一节 胚胎干细胞	317
一、实验材料	318
二、ES 细胞的培养	319
第二节 转基因小鼠	328
一、微注射 DNA 的制备与纯化	329
二、转基因鼠的构建方法	330
三、转基因鼠系的建立	335
第三节 基因敲除/敲入小鼠	335
一、基因打靶载体的构建	336
二、将打靶载体转入受体细胞中	346
三、用选择性培养基筛选已击中细胞	346

四、基因打靶细胞鉴定工作	347
五、产生嵌合体动物和基因打靶动物	347
第四节 核移植技术	348
一、供体细胞准备	350
二、受体细胞的准备和移核	351
三、去核卵母细胞与供体细胞融合	351
四、移核后卵母细胞的激活	353
五、核移植重构胚的体外培养	353
六、克隆胚胎的移植	354
第十三章 生物信息学	356
第一节 概论	356
一、生物信息数据库	357
二、生物信息学软件	363
三、生物信息学资源	365
第二节 基因组生物信息学	366
一、序列比对与数据库搜索	368
二、基因识别	377
三、序列翻译与 ORF 预测	379
四、蛋白质基序和结构域识别	380
五、蛋白 3D 同源模型构建	382
六、限制性酶切图谱	383
七、引物设计	383
第三节 蛋白质组信息学	386
一、蛋白质组信息学	386
二、蛋白质组信息学相关资源	390
附录一 分子生物实验室的常规仪器及设施	392
附录二 放射性核素的基本知识	404
附录三 细胞培养室	411
附录四 常用试剂的配制	416
附录五 常用单位换算	425
附录六 在线生物软件介绍	427
附录七 英汉医学分子生物学常用缩略语	432
附录八 主要参考文献	456

组织培养技术及细胞生物学检测

组织培养 (Tissue Culture) 是指模拟体内生理环境, 在无菌、适当温度和一定培养条件下, 使从体内取出的组织或细胞生存和生长, 并维持其结构和功能的方法。从广义上讲, 组织培养泛指所有体外培养, 它包括器官培养、组织培养和细胞培养。一般来讲, 直接从体内取出的细胞、组织和器官进行的第一次培养, 称原代培养 (又称初代培养)。当原代培养的细胞、组织等在体外扩增一段时间后, 将培养的细胞从一个容器以一定比率转移到新的容器中扩大培养, 此时称传代培养。体外培养细胞可根据能否贴附于支持物上生长的性质分为贴壁细胞和悬浮细胞。贴壁细胞在培养时能贴附在培养皿、培养瓶等支持物上生长。大多数体外培养细胞属于这个类型。但有的细胞在培养时不贴附于支持物上, 而呈悬浮状态生长, 这类细胞称悬浮细胞。

组织培养不仅是一种技术, 也是一门科学, 培养的组织或细胞是良好的实验材料, 可以应用于现代医学和生物学的许多领域中, 特别是培养的细胞携带有与体内细胞同等的基因组, 是分子生物学的研究对象。目前, 组织培养技术已日趋完善和规范, 并成为分子生物学的重要实验组成部分。

第一节 组织培养的基本技术

组织培养技术的基本技术包括: 无菌操作、培养用液的配制、组织取材和分离、培养用品的处理及储存等。

一、培养用品的清洗和消毒灭菌

组织培养工作需要使用大量的器材, 特别是玻璃器皿需要反复使用, 因而需要对其进行清洗和消毒灭菌, 以达到去除器皿上的杂质和对细胞生长有影响的物质及微生物。

(一) 清洗

细胞对任何有害物质都十分敏感，因此，组织培养器皿清洗的要求比普通实验用器皿要高，无论是新的器皿还是每次实验后，器皿必须及时清洗。并且，每种器皿的清洗方法不同，以下介绍几种常用器皿的清洗方法：

1. 玻璃器皿

玻璃器皿用于培养细胞、培养用液的存放等。提供细胞生长的玻璃表面不但要清洗干净，而且要带适当的电荷。碱性清洗剂会使玻璃表面带的电荷不适当，需以盐酸或硫酸中和。清洁的玻璃器皿要求干净透明、无油迹，不能残留任何有毒物质。一般的清洗工作有以下几个步骤：

(1) 浸泡：新的玻璃器皿的表面呈碱性，带有一些如铅和砷等对细胞有害的物质，并有许多灰尘，使用前应彻底清洗。先用自来水初步刷洗，在 5% 盐酸溶液中浸泡过夜，以中和表面的碱性物质。如果是使用过的玻璃器皿，应立即浸入水中，避免器皿内蛋白质干涸后粘附于玻璃上以至难于清洗。

(2) 刷洗：含洗涤剂的溶液浸泡玻璃器皿后用软毛刷子刷去器皿表面的杂质。刷洗过程中，应注意选用软毛刷子和优质的洗涤剂，并在刷洗过程中不能用力过猛。

(3) 清洁液浸泡：清洁液由浓硫酸、重铬酸钾和蒸馏水配制而成，具有很强的氧化作用，去污能力强，对玻璃器皿无腐蚀作用，残留的微量杂质可经冲洗去除。一般最常用的为次强液。新配制的清洁液为棕红色，多次使用后因水分增多或遇到有机溶剂成为绿色，此时表明清洁液已经失效，应废弃、重新配制。清洁液配制如表 1-1。

表 1-1 清洁液配制

	弱液	次强液	强液
重铬酸钾 (克)	100	120	63
浓硫酸 (ml)	100	200	1 000
蒸馏水 (ml)	1 000	1 000	200

(4) 冲洗：每个器皿应用自来水反复灌满、倒掉，重复十次以上，以确保清洁液完全被冲洗干净。再用蒸馏水漂洗 2~3 次，三蒸水漂洗一次，烤干备用。

2. 胶塞、盖子、针头等

这些用品均不能用清洁液浸泡。新的胶塞因有滑石粉，应先用自来水冲洗干净，再进行常规的清洗。使用后的胶塞、盖子等应及时浸泡在清水中，用洗涤剂刷洗。针头也需先用自来水冲洗干净。将它们置于 2% NaOH 中煮沸 10~20 分钟，冲洗干净，再以 1% 稀盐酸浸泡 30 分钟，冲洗，用蒸馏水漂洗 2~3 次，三蒸水漂洗一次，晾干备用。

3. 塑料器皿

主要有培养板、培养皿和培养瓶等。这些一次性使用的产品，已经消毒好，打开包装即可使用。若要重复利用，可以将使用过的塑料器皿立即浸泡于清水中，用超声波清洗机加入少量的洗涤剂清洗，再用流水冲洗干净，清洁液浸泡过夜，流水冲洗干净，蒸馏水漂洗 2~3 次，三蒸水漂洗一次，晾干备用。