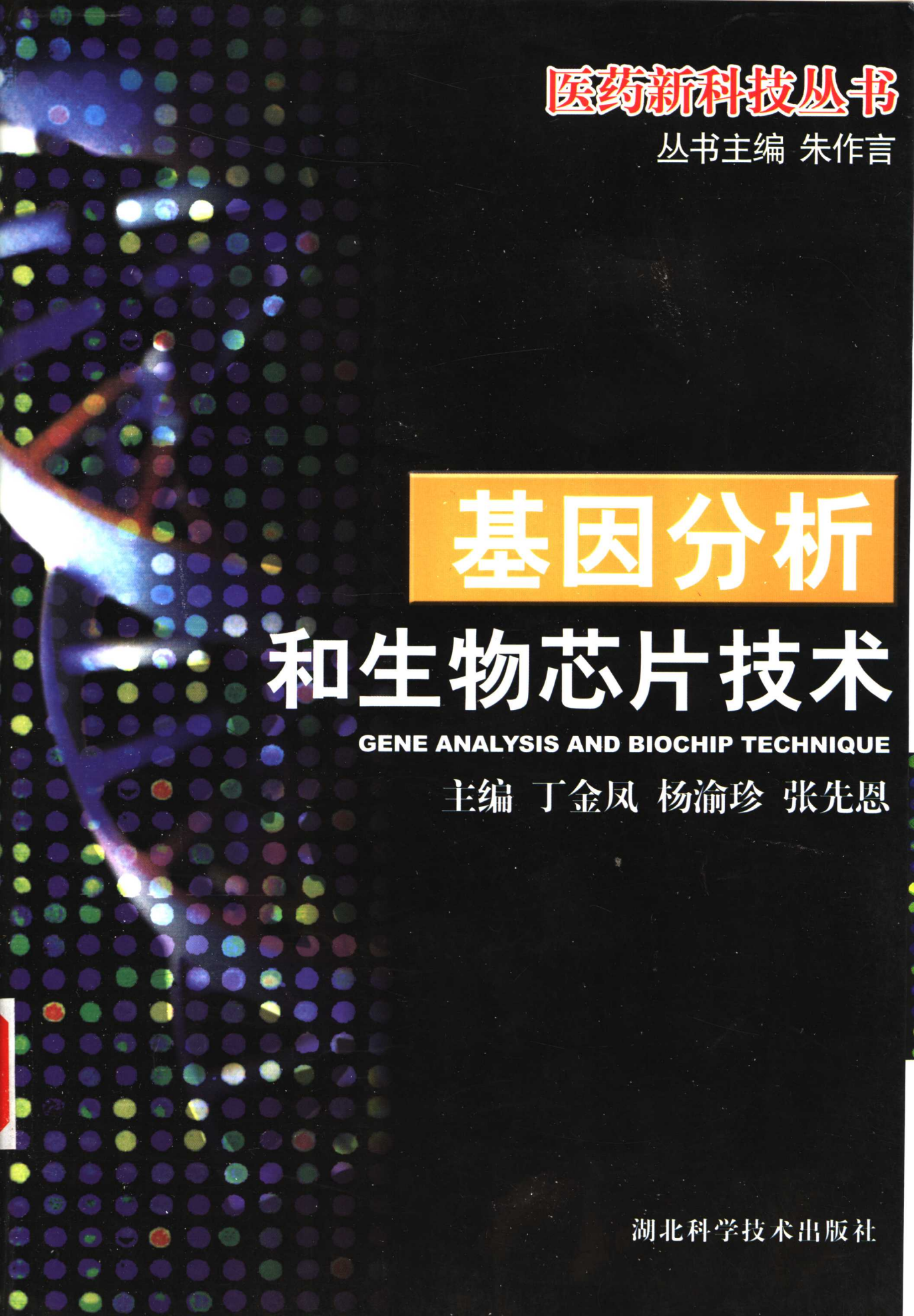




医药新科技丛书

丛书主编 朱作言

基因分析 和生物芯片技术

GENE ANALYSIS AND BIOCHIP TECHNIQUE

主编 丁金凤 杨渝珍 张先恩

湖北科学技术出版社

Q78
D513



医药新科技丛书

丛书主编 朱作言

基因分析 和生物芯片技术

GENE ANALYSIS AND BIOCHIP TECHNIQUE

主编 丁金凤 杨渝珍 张先恩



A1110648



湖北科学技术出版社

HAN 75/67

图书在版编目(CIP)数据

基因分析和生物芯片技术/丁金凤等主编. —武汉:湖北科学技术出版社,2004.1
(医药新科技丛书/朱作言主编)

ISBN 7-5352-2933-6

I. 基… II. 丁… III. ①基因—分析②生物—芯片 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 074709 号

医药新科技丛书

基因分析和生物芯片技术

© 丁金凤 杨渝珍 张先恩 主编

策 划:冯友仁

封面设计:戴 旻

责任编辑:冯友仁

出版发行:湖北科学技术出版社

电话:87679468

地 址:武汉市雄楚大街 268 号湖北出版文化城 B 座 12-14 层

邮编:430070

印 刷:湖北新华印务有限公司

邮编:430034

督 印:刘春尧

787 毫米 × 1092 毫米 16 开 26 印张

530 千字

2004 年 1 月第 1 版

2004 年 1 月第 1 次印刷

ISBN 7-5352-2933-6/R·659

定价:58.00 元

本书如有印装质量问题 可找承印厂更换

编委名单及工作单位

中国医学科学院心血管病研究所

丁金凤 李 健 刘冬青

孟宪敏 杨菊先 陈兰英

赵 勇 曹慧青 潘德思

华中科技大学同济医学院

杨渝珍 杨庆恩 陈 慧

徐顺清 黄 巍 朱 科

孟宪芳 赵云斌 黄代新

廖 芳 王小利 王 震

韩 玲

华中科技大学同济医院

林菊生

华中科技大学协和医院

李一荣 张德太 吴健民

华中科技大学生命科学院

骆清明

军事医学科学院生物工程研究所

杨 晓

中国科学院武汉分院病毒所

张先恩 文继开 刘 强

汪世华 陆红兵

华中农业大学

吴良志

美国耶鲁大学留美学者

马先勇

UTMD Anderson Cancer Center

魏英杰

主 编:丁金凤 杨渝珍 张先恩

副主编:陈 慧 廖 芳

编 者:(以姓氏笔画为序)

丁金凤 马先勇 王小利

王 震 文继开 李一荣

李 健 刘冬青 刘 强

朱 科 杨庆恩 杨 晓

杨渝珍 杨菊先 张先恩

张德太 陈兰英 陈 慧

孟宪芳 孟宪敏 吴良志

吴健民 陆红兵 汪世华

林菊生 赵云斌 赵 勇

骆清明 徐顺清 黄代新

黄 巍 曹慧青 韩 玲

廖 芳 潘德思 魏英杰

内 容 提 要

本书共分为两大部分。第一部分主要介绍基因分析技术,但并不包括常规的DNA(或RNA)常规分离、纯化、基因的克隆,表达、PCR等技术;而是重点地介绍一些对未知基因的结构和功能分析时所需要的关键技术,包括cDNA文库构建、差减杂交法和差减文件的构建、mRNA差异显示技术、荧光原位杂交(FISH)技术、放射性杂交、计算机克隆及染色体定位、核酸及蛋白序列的计算机初步分析、酵母双杂交技术、SELEX技术、基因打靶技术、转基因动物技术、RNA干扰技术,还概要地介绍了常用数据库及分子生物学软件。

作为基因分析的重要技术之,特将生物芯片技术列在第二部分进行专门介绍,共分五章,包括芯片概介、生物芯片的制备和检测、微阵列探测中的共聚焦扫描技术、生物芯片在医学中的应用(涵盖了生物芯片在基因组功能、单核苷酸多态性检测、遗传性疾病诊断、肿瘤研究、肝癌及病毒性肝炎诊断、微生物变异及耐药性检测、药学、法医学中的应用诸多领域)及蛋白质芯片。

本书编写目标定位于医学专业参考书,编写者来自生物学、医学、光电子学、化学、计算机学、生物信息学等不同的专业领域,从不同的视野来阐述一个共同的主题。在编写风格上力求深入浅出、强调图文并茂,以求一目了然,为医药学院的研究生、教师、科研人员、临床医生等提供帮助。

序

自 DNA 双螺旋结构被发现 50 年以来,生命科学和生物技术得到了前所未有的发展,并推动相关学科向分子水平不断深入。生命科学的重大发现,以及与信息技术、生物技术、纳米技术的结合,赋予 21 世纪医药学研究旺盛的生命力,引导着理论和技术上的重大突破。由中外医学相关领域的专家和学者共同编写的《医药新科技丛书》,重点介绍了纳米技术、新基因分析技术、生物芯片技术和基因治疗技术。充分反映了前沿科学技术对医学的影响,必将为学科交叉和高新技术应用起推动作用。

纳米科学技术是 10 余年来逐渐发展起来的一项高新科学技术。著名的诺贝尔奖获得者理查德费曼早在 20 世纪 60 年代就预言,如果人类能够在原子和分子的尺度上来加工材料、制备装置,就能得到大量的异乎寻常的新发现。纳米科学技术是在纳米尺度($1 \sim 100$ 纳米,即 $10^{-9} \sim 10^{-7}$ 米)研究物质新颖的物理、化学和生物特性并制造有特定功能产品的科学技术,在生物工程和医学上有光明的应用前景。科研人员已经成功地利用纳米微粒进行了细胞分离;用金纳米粒子进行病变靶向治疗,以减少副作用;用纳米微粒作为载体的病毒转导颗粒已经取得了突破性进展并用于动物实验,有望在疾病的基因治疗中发挥作用;科学家们还设想利用纳米技术制造出分子机器人,对人体的精细部位实施特殊诊断或治疗,例如修复损伤的血管壁等。希望《医药新科技丛书》中这部分内容能为相关研究领域的有志者提供第一手资料并促进纳米技术与医学的整合。

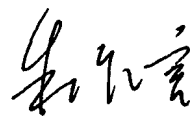
随着人类基因组精确图的绘制,越来越多的动植物、微生物基因组测序也相继完成。然而,如何去面对如此众多的基因序列,并逐一诠释他们的功能,成为全世界生命科学工作者共同面对的课题。寻找及发现新的疾病相关基因并确定它们的功能,无疑是更大的挑战;而其中隐藏了无限的商机,药物新靶标将是生物技术公司和药物开发商竞相追逐的目标。《医药新科技丛书》的编者注意到了这个问题的重要性,不吝笔墨对基因及其分析技术作了详尽描述。基因的“敲除”、“敲入”和“敲低”都是实时在体研究基因功能的关键技术。

当然,书中所提及的生物芯片更是颇有时代象征的高新技术。美国《财富》杂志将微电子芯片和生物芯片列为 20 世纪科技史上有深远影响的两件事。生物芯片技术借用计算机芯片制作理念,以高通量、高效率、自动化、微型化为特征,提供了一个从分子、基因水平向基因组、蛋白质、细胞乃至组织器官组水平回归的研究平台,有利于在整体水平上解释和探讨生命现象,具有广泛应用前景。国内已有多所大学和科研单位启动了这方面的研究,也取得了一定的进展,《医药新科技丛书》对此作了及时的反映。内容深入浅出,其主要阅读群体定位在活跃于医疗卫生领域的医生、教师、学生,兼具普及和提高的双重作用。

《医药新科技丛书》的另外一册介绍了“癌症的基因治疗”。基因治疗是一种全新的理念,折射着现代分子生物学理论和技术在医学领域中所掀起的冲击波。基因治疗的基本概念来源于人类对自身遗传本质的了解。基因作为遗传的基本单位,不仅决定着我们的相貌、高矮和气质特征,而且其细小的异常将不可避免地导致各种疾病。基因疗法的原理是用一个正常基因来置换有缺陷的基因,或者补偿缺陷基因的致病因素。自 1990 年第 1 例腺苷脱氨酶基因治疗以后的 8 年中,世界上已有 373 个临床方案被实施,累计 3 134 人接受了转基因试验,而且基因治疗的概念及策略已扩展到单基因遗传病的范围之外。当然,目前基因治疗的技术还有待成熟,有关安全、伦理、社会的问题还有待人们更理性地思考,希望读者和作者互动,共同促进基因治疗沿着健康的方向走向成熟。

21 世纪的生命科学和技术将以难以预测的方向和难以估计的速度发展,其结果将极大地改变人类的生活方式和提高生活质量。我们面临着一个崭新的世界,《医药新科技丛书》似乎是一条小径,可以引导读者去开拓、耕耘和拥抱未来的光明。

中国科学院院士、国家自然科学基金委员会副主任



2003 年 5 月于北京

前言

20 世纪末和 21 世纪初,以人类基因组计划(HGP)为标志的先进科学技术发展日新月异,PCR 技术、测序技术、纳米技术、生物芯片技术、基因打靶和基因治疗技术等一个接一个地出现,生命科学正以前所未有的速度向前发展,并推动其分支学科向分子水平深入。作为 21 世纪的医药学研究领域,得益于基因组和后基因组时代的福荫,在疾病的诊断、治疗、预防及发病机制等各方面正都已发生、正在发生和将要发生理论和技术方面的重大突破。

我们都是从事生物化学和分子生物学领域研究和教学的,很希望能将这种进步反映和应用在我们的工作中。因此本书的编写目标定位于医学专业参考书,为医药院校的研究生、教师、科研人员、临床医生等提供帮助。本书共分为两大部分。第一部分主要介绍基因分析技术,但是并不从基础的 DNA 或 RNA 的分离、鉴定、纯化、外源基因的克隆、表达和鉴定、PCR 技术等方面入手,而是选择性地介绍一些新的基因分析技术,特别是对未知基因的结构和功能分析时需要采用的关键技术,例如从 cDNA 文库的构建开始,在基因组、cDNA、mRNA 差减杂交或差异显示的基础上,对差异显示的片段进行计算机克隆、全长分析、放射性杂交及染色体定位;对基因打靶技术、转基因技术、RNA 干扰技术、SELEX 技术也都有介绍;同时还详细介绍了基因功能研究的酵母双杂交技术。参与这部分编写的大部分人员是对这些技术的亲自操作者,因而包含了他们的经验和体会。考虑到不同层次、不同实验室的技术和设备的差异,我们特意将生物芯片技术单独组合成为第二部分,进行详细地介绍,从基本概念、定义到医学领域的应用;从基片选择、化学修饰、生物芯片种类和制作、检测流程、杂交方法,到杂交结果处理和分析,生物信息提取的原则和方法等,尽量给予深入浅出的全面的介绍。从实用的角度出发并为本书的读者群体考虑,本书并不想过多地在芯片化学修饰的分子机制、信息处理软件设计和分析原理等方面过多地染笔,只是突出生物芯片作为一种高通量、超微量的分子杂交技术和以往的经典核酸或蛋白质检测技术相比优越在何处?特点是什么?以及由此带来的技术难点和仪器设备如何与之配套等一系列问题。在弄清这些问题的基础上,本书强调了如何利用现有的,由各生物技术公司提供的生物芯片进行检测;如有条件的话,读者还可以结合自己科研的需要,制备一些特色芯片,此时也可以从本书中获得一些启发和要领。

现代科学技术是生物、化学、物理、计算机、生物信息、工程、微电子等诸多领域的综合体,学科之间的交叉、融合、渗透与整合不断地发生、发展,推动着技术的进步和新技术的诞生。因此,这本书的编写者来自医学、生物学、光电子学、化学、计算机学等不同的专业领域,从不同的视野来阐述一个共同的主题。此外,本书还得到了目前还在海外学习或工作的学子的支持和响应,及时地寄来书稿,以尽

一份拳拳之心。衷心感谢所有参与本书编写的教授、专家、博士生,特别是目前还在国外工作或学习的学者,感谢他们在繁忙工作中还挤出时间为本书撰写书稿。

本书在编写风格上力求深入浅出、强调图文并茂,为了更好地说明问题,还采用了彩图。特别在计算机克隆和生物分析软件的介绍中,均配置和下载了电脑屏幕显示,以求一目了然。

由于时间仓促,水平有限,不能满足诸位读者的需求,敬请原谅,也欢迎批评和指正。

丁金凤 杨渝珍 张先恩

2003年11月于武汉

目 录

第一部分 基因分析技术

第一章 cDNA 文库的构建	(3)
第一节 cDNA 文库构建的基本原理	(3)
一、cDNA 的合成	(4)
二、ZAP 表达载体的结构	(4)
第二节 cDNA 文库构建的具体操作步骤	(6)
一、cDNA 第一链的合成	(7)
二、cDNA 第二链的合成	(7)
三、补平 cDNA 链末端	(8)
四、EcoR I 接头的连接	(9)
五、EcoR I 末端的磷酸化	(9)
六、Xho I 酶切	(9)
七、过柱分离 cDNA	(9)
八、cDNA 与 ZAP 表达载体的连接	(12)
九、准备宿主菌	(13)
十、应用 Gigapack III Gold 包装蛋白包装含有 cDNA 的 ZAP 重组载体	(13)
十一、铺盘和库容量鉴定	(13)
十二、原始库的扩增	(13)
第二章 差减杂交法和差减文件的构建	(15)
第一节 基因组差减杂交法	(15)
第二节 mRNA 或 cDNA 差减杂交法	(16)
一、羟基磷灰石(HAP)柱层析法	(17)
二、生物素-链亲和素的亲和分离	(17)
三、基于 PCR 反应的差减杂交法或抑制性差减杂交(SSH)	(22)
四、基因或表达序列文库(cDNA or EST libraries)杂交	(26)
第三章 mRNA 差异显示技术	(28)
第一节 mRNA DD-PCR 的基本原理	(28)
第二节 mRNA DD-PCR 技术的具体操作步骤	(29)
一、组织样品总 RNA 的提取	(29)
二、去除 RNA 样品中的微量 DNA	(30)

三、引物序列	(31)
四、反转录归类反应体系的建立	(31)
五、PCR 选择性扩增	(32)
六、mRNA DD-PCR 产物的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	(33)
七、差异表达条带的回收	(33)
八、回收条带的再次扩增	(34)
九、二次扩增产物的克隆、测序和 GenBank 查询	(36)
十、Northern Blot 和 Dot Blot 杂交	(36)
第四章 荧光原位杂交 (FISH) 技术	(40)
第一节 FISH 的原理和技术特点	(40)
一、FISH 技术的原理和优点	(40)
二、FISH 技术的基本操作过程	(41)
第二节 FISH 技术的实验操作步骤	(43)
一、染色体标本的制备	(43)
二、染色体显带	(44)
三、Alu-PCR 法制备探针	(45)
四、切口平移法标记探针	(45)
五、FISH 检测	(46)
第三节 FISH 技术的发展与应用	(48)
一、FISH 技术的发展	(48)
二、FISH 技术的主要应用	(49)
第五章 放射性杂交	(51)
第一节 放射性杂交的基本原理	(51)
一、构建 RH 图谱的方法	(52)
二、RH 嵌板	(53)
第二节 RH 图谱的应用	(54)
一、EST 定位	(54)
二、寻找新基因	(55)
三、基因克隆	(55)
四、测定距离	(56)
五、RH 相关网站及 RH 数据库	(56)
六、RH 的优缺点	(57)
第六章 计算机克隆及染色体定位	(58)
第一节 计算机克隆	(58)
一、基本原理	(58)
二、现状与发展	(58)

三、操作步骤	(59)
四、一点经验	(59)
五、简单实例	(60)
第二节 染色体定位	(61)
第三节 掌握和熟悉 NCBI 数据库和分析	(64)
第七章 核酸及蛋白序列的计算机初步分析	(66)
第一节 概述	(66)
第二节 核酸序列分析	(69)
一、数据库同源性或相似性搜索	(69)
二、读码框分析	(69)
三、寻找启动子区及其核酸序列中的功能位点	(70)
四、基因的染色体定位	(70)
第三节 蛋白序列分析	(70)
一、同源性或相似性分析	(70)
二、氨基酸序列的一般特性分析	(71)
三、蛋白基序和结构域分析	(71)
四、特殊结构或结构特征分析	(71)
五、直系同源物(Ortholog)和/或旁系同源物(Paralog)分析	(72)
六、二级结构的预测	(72)
第四节 多重序列排列和系统发育分析	(73)
一、多重序列排列	(73)
二、分子进化分析	(73)
三、举例	(75)
第五节 刊有生物信息学的期刊	(79)
第八章 酵母双杂交技术	(80)
第一节 酵母双杂交原理	(80)
一、原理	(80)
二、酵母双杂交的基本流程	(81)
第二节 酵母双杂交系统中常用的菌株与表达载体	(82)
一、酵母菌的一般特点	(82)
二、常用的菌株	(82)
三、表达载体的构建	(83)
四、表达载体与菌株表型之间的关系	(85)
五、对照载体的构建	(85)
六、酵母培养基的制备	(86)
七、菌株冻存与复苏	(88)
八、酵母菌的培养	(89)

第三节 诱饵质粒的鉴定	(89)
一、制备感受态酵母菌	(89)
二、诱饵质粒转化入感受态酵母细胞	(90)
三、诱饵蛋白的毒性检测	(90)
四、诱饵蛋白自激活检测	(91)
五、交配效率的检测与计算	(92)
第四节 正式筛选预转化 cDNA 文库	(93)
一、筛选前的准备	(93)
二、正式筛选预转化的 cDNA 文库	(94)
三、文库滴定(Library Titering)	(96)
四、计算酵母交配的效率和筛选的克隆数	(96)
第五节 对初步获取的阳性克隆的分析与验证	(97)
一、克隆表型验证——大规模筛选	(97)
二、 β -半乳糖苷酶活性分析	(97)
三、酵母质粒 DNA 的提取	(99)
四、酵母质粒转入大肠杆菌 DH5 α	(100)
五、克隆归类	(101)
六、在酵母体内再验证蛋白的相互作用	(102)
七、在酵母体外分析和验证蛋白的相互作用	(103)
八、测序	(103)
第六节 酵母双杂交技术的应用	(103)
一、酵母双杂交技术的应用	(103)
二、酵母双杂交技术的缺陷	(104)
三、使用酵母双杂交技术应注意的问题	(104)
第九章 SELEX 技术	(105)
第一节 SELEX 技术简介	(105)
第二节 SELEX 技术的基本原理	(106)
一、SELEX 技术的基本路线	(106)
二、Aptamer 的修饰与优化	(108)
三、影响 SELEX 技术的因素	(111)
第三节 核酸配基结合的特异性评价	(116)
一、配基结合特异性	(116)
二、配基序列及空间结构分析	(117)
第四节 SELEX 技术的改进与发展	(118)
一、导向 SELEX	(118)
二、复合靶分子 SELEX	(118)
三、基因组 SELEX	(119)
第五节 适配分子的特性	(119)

第六节 SELEX 技术和适配分子在各方面的应用	(120)
一、SELEX 技术在各方面的应用	(120)
二、Aptamer 在各方面的应用	(122)
第十章 基因打靶技术	(135)
第一节 基因打靶技术的概念及发展历史	(135)
一、基因打靶技术的概念	(135)
二、胚胎干细胞技术的发展	(136)
三、同源重组技术的发展	(137)
第二节 基因打靶技术在生物医学研究中的应用前景	(138)
一、基因打靶技术在基因功能研究中的应用	(138)
二、应用基因打靶技术研制人类疾病动物模型	(139)
三、应用基因打靶技术改良动物品系和研制动物反应器	(139)
第三节 研制基因打靶小鼠的实例— <i>Smad5</i> 基因剔除小鼠的研制和鉴定	(140)
一、靶基因 cDNA 探针的克隆	(140)
二、靶基因基因组 DNA 片断的筛选和克隆	(140)
三、基因剔除打靶载体的构建以及中靶 ES 细胞的筛选	(141)
四、基因剔除小鼠的获得及鉴定	(142)
五、基因剔除小鼠的表型分析	(143)
第四节 常用实验操作方法	(144)
一、小鼠基因组 DNA 的制备	(144)
二、基因组 DNA 的 PCR 分析	(144)
三、基因组 DNA 的 Southern 杂交分析	(144)
四、用原代小鼠胚胎成纤维细胞制备饲养层	(145)
五、小鼠胚胎干细胞的常规培养	(146)
六、ES 细胞的冻存和复苏	(147)
第十一章 转基因动物技术	(149)
第一节 原理和方法	(149)
一、转基因、转基因动物与转基因动物模型	(149)
二、目的基因的设计	(150)
三、转基因的方法	(150)
第二节 显微注射法的操作步骤	(153)
一、实验条件的准备	(153)
二、供体鼠和受体鼠的同步准备	(156)
三、受精卵的采集	(157)
四、受精卵的显微注射	(157)
五、转基因后受精卵的再植	(158)
第三节 转基因整合与表达的检测	(159)

一、基因组 DNA 的提取	(159)
二、外源基因的检测	(160)
第十二章 RNA 干扰	(164)
第一节 RNA 干扰的原理	(164)
第二节 RNA 干扰的生物功能	(165)
第三节 哺乳类中的 RNA 干扰	(165)
一、RNAi 在哺乳动物中存在的证据	(165)
二、哺乳动物中的 RNAi	(165)
三、长 dsRNA 引发的 RNAi	(166)
四、哺乳类稳定 RNAi	(166)
第四节 RNA 干扰的实验过程	(166)
一、RNAi 的产生	(166)
二、给予途径	(169)
三、沉寂效应鉴定	(169)
四、存在问题	(169)
第五节 RNA 干扰在生物医学和功能基因组中的应用	(169)
第十三章 常用数据库及分子生物学软件	(171)
第一节 常用数据库	(173)
第二节 分子生物学常用软件	(175)

第二部分 生物芯片技术

第十四章 生物芯片概介	(179)
第一节 生物芯片产生的科技背景及在医学中应用的优势	(179)
一、生物芯片的定义和特点	(179)
二、生物芯片产生的科技背景	(180)
三、生物芯片在医学中的应用概况与前景	(181)
第二节 生物芯片相关分子生物学概念	(185)
一、基因	(185)
二、基因组和基因组的信息含量	(185)
三、真核基因组和原核基因组	(186)
四、基因表达	(187)
五、基因突变	(187)
六、基因多态性	(187)
七、DNA 的变性与复性	(188)
八、探针	(188)

九、杂交	(189)
十、PCR	(190)
第三节 生物芯片的分类简介	(191)
第十五章 生物芯片的制备和检测	(193)
第一节 载体的表面修饰	(193)
一、芯片载体和载体材料	(193)
二、载体化学修饰	(195)
三、载体修饰后的固定及选择原理	(199)
第二节 生物芯片制作方式	(199)
一、微阵列芯片及其制备技术	(199)
二、微流控芯片及其制备技术	(203)
三、其他类型芯片制作方式	(204)
四、基因芯片和寡核苷酸芯片制备原理	(205)
第三节 生物芯片检测的实验流程	(207)
一、芯片样品的制备	(208)
二、杂交探针的种类和标记	(214)
三、核酸分子杂交和杂交微环境	(217)
四、DNA 微阵列操作应用实例	(219)
第四节 芯片杂交信号的收集及生物信息的分析	(232)
一、芯片杂交信号的收集及处理	(232)
二、生物信息的分析和提取	(234)
第十六章 微阵列探测中的共聚焦扫描技术	(243)
第一节 微阵列技术、荧光及荧光探测	(245)
一、微阵列探测特征	(245)
二、荧光基础理论	(246)
三、荧光探针的选择	(247)
四、探测设备的光学设计要求	(248)
第二节 样品处理	(253)
一、标准显微载玻片	(254)
二、其他规格载玻片	(254)
三、样品环境	(254)
第三节 共聚焦扫描原理	(254)
一、共聚焦原理	(254)
二、共焦微阵列扫描仪	(255)
三、共聚焦系统优点与缺点	(257)
四、共聚焦扫描实现与折衷考虑	(257)
第四节 共聚焦扫描仪光学设计及关键特征	(258)