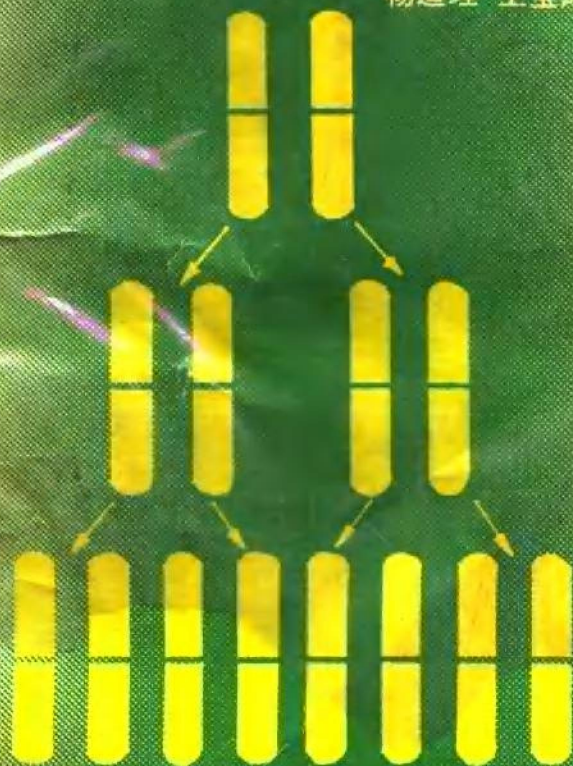


DNA 扩增技术与 医学应用

杨道理 王宝成 主编



山东科学技术出版社

DNA 扩增技术与医学应用

杨道理 王宝成 主编

山东科学技术出版社

主 编 杨道理 王宝成
副主编 克丙申 齐法莲
编著者 (按姓氏笔画为序)

于春宝 王宝成 安 娟
孙文杰 孙晓明 齐法莲
克丙申 杨道理 罗南萍
武翠华 徐 军 薛 燕

责任编辑 颜承隆 李坤华
封面设计 李承东

(鲁) 新登字 05 号

DNA 扩增技术与医学应用

杨道理 王宝成 主编

*

山东科学技术出版社出版

(济南市玉函路 邮政编码 250002)

山东省新华书店发行

山东新华印刷厂德州厂印刷

*

787×1092 毫米 32 开本 16 印张 335 千字

1992 年 11 月第 1 版 1992 年 11 月第 1 次印刷

印数: 1—3300

ISBN 7—5331—1121—4/R · 313

定价 7.90 元

序

生物高技术的应用是现代医学的一大特征。生物高技术包括了遗传工程、细胞工程、酶工程和发酵工程四大方面。遗传工程是核心，它在基因水平上研究人类的生、老、病、死，且已取得令人瞩目的成就。被誉为生物学及医学界“里程碑”的崭新技术——聚合酶链反应(PCR)，就是生物高技术在医学中应用的范例。PCR，这一巧妙的设计和令人赞叹的放大效果，是由 Mullis 及其同事(1985)发现和描述的。该技术是利用 DNA 天然复制双螺旋结构的原理，科学地设计了变性、退火、延伸三步法，通过数十个循环周期，几个分子的 DNA 片段，至少可扩增 $10^6 \sim 10^7$ 倍，使极微量的核酸分子扩增到极易检测的程度。无疑，这是目前最敏感的检测手段。

PCR 技术一问世，就显示出强大的生命力，仅经数年，竟以惊人的速度广泛应用于分子生物学各个领域，如细菌及病毒感染的早期诊断、癌基因的分析、遗传性疾病的预诊、法医学的检查，HLA、细胞因子等基础研究工作也取得极大成功。相信，今后几年将会有更快的发展和更普及的应用。

杨道理主任、王宝成主治医师多年从事 PCR 的基础和临床研究，积累了丰富的经验和宝贵的资料，他们结合自己的实践，参阅了国内外最新文献，全面、系统地阐述了 PCR 的基本原理，介绍了各种操作技术和临床应用。本书文笔流畅、

图文并茂、深入浅出、通俗易懂，确实不失为一本较好的应用技术专著。

中国免疫学会临床专业委员会 主任委员

上海免疫学会 理事长

第二军医大学长征医院免疫研究室 主任、教授孔宪涛

1992年5月 于上海

前 言

DNA 是生物遗传的物质基础,是分子生物学研究工作的主要对象之一。DNA 扩增技术是进行 DNA 研究的重要手段。近几十年来,由于该项技术操作复杂,对实验技术条件要求高,使其在医学研究中的应用受到限制。1985 年,美国 Cetus 公司的 K. B Mullis 等首创了一种体外 DNA 扩增技术——聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)。这种技术可利用耐热 DNA 聚合酶,使极少量 DNA 在短时间内扩增数百万倍。该项技术被誉为生物、医学界的一次技术革命和里程碑。为了使更多的医务工作者,特别是基层医务工作者了解和掌握 DNA 扩增技术,根据 DNA 扩增技术的发展和应用的现状,并结合我们的工作经验和成果,编写《DNA 扩增技术与医学应用》一书。本书由两部分组成。上篇为 DNA 扩增技术,详尽地介绍了 DNA 的提取制备、DNA 扩增技术的原理、操作方法以及 DNA 扩增产物的检测等。下篇为医学应用,其中对病原体检测、免疫学研究、癌基因、抗癌基因的应用等作了重点介绍。

本书的特点是新颖、系统、实用。从 DNA 的提取制备到较为复杂的操作研究都深入浅出地予以论述,便于基层医务人员和初涉分子生物学研究的人员掌握、理解;所涉及的实验技术,每项都详细地介绍了操作步骤,实验者只要按所述程序操作,便能顺利地完成实验并取得满意的结果;医学应

用部分结合当前医学领域的研究热点，如病原体检测，癌基因、抗癌基因、免疫学研究等予以较详尽的介绍，这不仅对医学基础研究人员，而且对广大临床医务工作者从事疾病的分子水平的研究、诊断和治疗，都有较高的参考价值。

本书理论联系实际，图文并茂，通俗易懂，具有较强的针对性和可读性。可供广大肿瘤学、微生物学、临床检验学、免疫学、传染病学、遗传学、分子生物学等有关科研工作者，大专院校师生及临床医师参考使用。本书请孔宪涛教授作序，在此表示衷心感谢！

由于时间仓促和水平有限，书中不当之处在所难免，恳望读者批评指正。

济南军区总医院免疫科

杨道理 王宝成

1992年6月

目 录

上篇 DNA 扩增技术

第一章 DNA 的性质	3
第一节 DNA 的理化性质	4
一、DNA 的紫外吸收	4
二、DNA 的沉降特性	6
三、DNA 的变性与复性	7
第二节 DNA 的复制	11
一、DNA 复制的基本特点	11
二、DNA 复制中的酶和蛋白因子	12
三、DNA 复制过程	20
四、DNA 的损伤与修复	21
第二章 DNA 扩增常用的克隆载体	26
第一节 质粒	27
第二节 噬菌体载体	30
一、 λ 噬菌体载体	31
二、单链噬菌体载体	33
三、粘性质粒载体	35
第三节 动物病毒载体	35
一、SV ₄₀ 载体	36
二、痘苗病毒载体	37
第四节 细菌菌株	38
一、细菌菌株的生长和保存	39

二、细菌菌株	40
第三章 DNA 扩增——PCR 技术	42
第一节 DNA 的一般制备与扩增技术概述	43
一、DNA 的一般制备方法	43
二、DNA 的传统扩增技术	44
第二节 PCR 原理与特点	51
一、PCR 基本原理	51
二、PCR 的特点	53
第三节 Taq DNA 聚合酶	54
一、Taq 聚合酶的性质	55
二、影响酶活性的因素	58
第四节 PCR 基本技术	61
一、设备与试剂	61
二、模板 DNA 提取方法	64
三、PCR 反应体系	69
四、PCR 操作步骤	69
第五节 PCR 具体实施中的有关问题	71
一、模板选择	71
二、引物的设计与合成	72
三、引物合成后的处理	73
四、引物的纯化	74
五、Mg ²⁺ 浓度的影响	79
六、dNTP 的浓度	79
七、循环参数	79
八、扩增平台期	81
九、标本的污染和假阳性的出现	81
第六节 DNA 扩增仪及基因诊断技术自动化模式	83
一、DNA 扩增仪	83

二、基因诊断技术自动化模式	87
第七节 PCR 试剂盒	88
一、美国 PE 公司试剂盒	89
二、济南军区总医院 HPV ₁₆ 、HPV ₁₈ 试剂盒	90
第四章 DNA 扩增产物的常用检测方法	95
第一节 琼脂糖凝胶电泳	95
一、琼脂糖凝胶的制备	95
二、琼脂糖凝胶中 DNA 的染色与脱色	100
三、微型凝胶电泳	101
四、酶切 DNA 片段的琼脂糖凝胶电泳	101
五、从琼脂糖凝胶中回收 DNA	105
六、碱性琼脂糖凝胶电泳	109
七、脉冲电场凝胶电泳	110
八、Southern 吸印法	113
第二节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	116
一、凝胶聚合原理	117
二、垂直板型电泳	118
三、从聚丙烯酰胺凝胶中分离 DNA 片段	123
四、酶切后 DNA 片段的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析	124
第三节 分离链的凝胶电泳	126
一、聚丙烯酰胺凝胶分离链	126
二、琼脂糖凝胶分离链	128
三、变性梯度凝胶电泳	130
第四节 离子交换层析技术	134
一、离子交换剂种类	135
二、操作步骤	136
第五节 用标记探针检测 DNA	140
一、探针的选择	140

二、探针的末端标记	142
三、标记的探针杂交	143
四、斑点杂交检测 DNA 扩增产物	146
第六节 PCR 扩增产物的直接测序	148
一、化学断裂法	149
二、Taq DNA 聚合酶直接测序	150
三、三引物法	152
四、不对称 PCR 制备单链模板 DNA 测序	153
五、GAWTS 法	155
六、测序反应的自动化	155
七、高效液相色谱法 (HPLC)	157
第七节 DNA 酶免疫试验	157
一、DEIA 的基本原理	158
二、DEIA 的特异性与敏感性	159
三、PCR—DEIA 操作方法	163
第五章 PCR 技术进展	167
第一节 固定 PCR	167
第二节 重组 PCR	168
第三节 引物标记 PCR	171
第四节 定量 PCR	174
一、DNA—PCR 定量	174
二、mRNA—PCR 定量	175
第五节 反向 PCR	179
第六节 逆转录 PCR	182
一、cDNA 的合成	182
二、灭活逆转录酶	183
三、PCR	183
四、产物分析	184

第七节 竞争性 PCR	184
一、引物竞争 PCR	184
二、模板竞争 PCR	186
第八节 多重引物 PCR	188
第九节 等位特异 PCR	189
第十节 简并引物 PCR	191
第十一节 其他衍生的 PCR 技术	193
一、加端 PCR	193
二、错误配对 PCR	193
三、一步扩增法	194
四、体外转录放大系统	195
五、Q β 复制酶系统	197
六、“套式” PCR	197
七、不完全配对 PCR	198
八、PCR—单链构型多态性分析	199
第六章 常用的试剂和基本技术	202
第一节 试剂的配制	202
一、有机试剂的配制	202
二、缓冲液和溶液的配制	202
三、抗生素的配制	207
四、部分酶的配制	208
五、常用凝胶载样缓冲液的配制	208
第二节 基本技术	209
一、玻璃与塑料器皿的处理	209
二、透析袋的制备	210
三、塑料袋封口	210
四、DNA 抽提及沉淀	210
五、放射自显影及凝胶拍照	212

六、限制性内切酶及其应用	215
七、DNA 含量测定	220
八、核酸保存技术	222
九、实验室安全	223

下篇 DNA 扩增的医学应用

第七章 病原体 DNA 的检测	229
第一节 PCR 在病毒学领域中的应用	230
一、乙型肝炎病毒	234
二、人乳头瘤病毒	256
三、丙型肝炎病毒	274
四、人巨细胞病毒	282
五、人免疫缺陷病毒	286
六、EB 病毒	293
七、腮腺炎病毒	297
第二节 PCR 在检测细菌中的应用	299
一、VT 毒素大肠杆菌	299
二、痢疾性腹泻病原菌	300
三、结核杆菌及其他分枝杆菌	304
第三节 其他病原微生物	310
一、沙眼衣原体	310
二、肺炎支原体	313
三、立克次体	315
第八章 DNA 扩增技术在免疫学中的应用	324
第一节 细胞因子	324
一、检测通则	327
二、IL-2	327

三、IL-3	330
四、IL-4	334
五、IL-6	338
六、其他细胞因子	340
第二节 HLA 基因分型	346
一、HLA 基因结构简述	346
二、HLA-D 区基因的特点	347
三、HLA-D 区基因的 PCR 扩增检测	348
四、HLA 配型在器官移植中的意义及发展趋势	352
第三节 T 细胞受体、免疫球蛋白及补体的研究	357
一、T 细胞受体	357
二、免疫球蛋白及补体	366
第四节 自身免疫性疾病	369
一、自身免疫性肝炎	370
二、风湿性关节炎	372
第九章 肿瘤相关基因的检测	377
第一节 原癌基因与癌基因	378
一、常见原癌基因、癌基因的特点	382
二、原癌基因、癌基因的激活方式	386
第二节 原癌基因、癌基因的一般检测方法	389
一、DNA 转染实验	389
二、分子生物学与免疫学检测	391
第三节 原癌基因、癌基因的 PCR 检测	393
一、PCR 检测的范围及特点	393
二、ras 基因点突变的 PCR 检测	396
第四节 原癌基因、癌基因与恶性肿瘤	406
一、胃癌	407
二、肺癌	408

三、乳腺癌	409
四、结肠癌、直肠癌	411
五、宫颈癌	412
六、血液系统恶性肿瘤	413
七、其他恶性肿瘤	414
第五节 抗癌基因	416
一、抗癌基因的生物学功能	417
二、抗癌基因的检测	419
三、Rb 基因	421
四、p 53抗癌基因	427
五、其他抗癌基因	443
第六节 原癌基因与心脑血管疾病	445
一、癌基因与高血压	446
二、癌基因与心肌肥厚	448
三、癌基因与动脉粥样硬化	451
第七节 其他肿瘤相关基因	453
一、慢粒白血病 bcr-abl 嵌合基因 mRNA 的 PCR 检测 ...	453
二、B 淋巴细胞瘤染色体重排	455
第十章 遗传病相关基因检测	460
第一节 地中海贫血的基因诊断	460
第二节 杜氏肌营养不良症	465
第三节 甲型血友病	468
第四节 苯丙酮尿症	470
第五节 性连锁鱼鳞病	471
第六节 Leber's 视神经病	473
第七节 自毁容貌综合征	475
第八节 胎儿产前性别鉴定	476

第十一章 分子生物学及法医学应用.....	480
第一节 基因分离和基因表达的检测.....	480
一、基因分离	480
二、基因表达	482
第二节 突变体和重组体的构建.....	483
一、突变体的构建	484
二、重组体的构建	485
第三节 法医学应用	488
一、个体识别	488
二、性别鉴定	492
三、血缘关系的确定	494

上 篇

DNA 扩增技术