

一本由富有进取心和研究经验的博士生们精心打造的参考书，即使初学者也可轻轻松松掌握。

细胞与分子生物学 常用实验技术

XIBAO YU FENZI SHENGWUXUE CHANGYONG SHIYAN JISHU

● 主编 李燕 张健



第四军医大学出版社

“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材
普通高等教育生物类专业系列教材
第2版

细胞与分子生物学 常用实验技术

Cell and Molecular Biology Laboratory Manual (2nd Edition)

李士琦 李康 张健

清华大学出版社

细胞与分子生物学 常用实验技术

主 编 李 燕 张 健
副主编 李绍青 赵华栋

第四军医大学出版社·西安

图书在版编目(CIP)数据

细胞与分子生物学常用实验技术/李燕,张健主编.
—西安:第四军医大学出版社,2009.6
ISBN 978-7-81086-622-4

I. 细… II. ①李… ②张… III. 细胞生物学-实验;分子生物学-实验 IV. Q2-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2009)第093924号

细胞与分子生物学常用实验技术

主 编 李 燕
责任编辑 王 坤
出版发行 第四军医大学出版社
地 址 西安市长乐西路17号(邮编:710032)
电 话 029-84776765
传 真 029-84776764
网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>
印 刷 人民日报西安印务中心
版 次 2009年7月第1版 2009年7月第1次印刷
开 本 787×1092 1/32
印 张 8.5
字 数 170千字
书 号 ISBN 978-7-81086-622-4/Q·23
定 价 24.00元

(版权所有 盗版必究)

前 言

在基础医学研究中,基本上都要涉及细胞和分子生物学实验技术。对于多数实验原理,即使刚接触实验的人,也会了解得比较透彻。然而在实验技术上,即使专业的研究技术人员,也有很多实验技巧需要注意,更别提初学者了。纵观整个图书市场,关于细胞和分子生物学的参考书很多,但往往侧重于实验原理与最新进展,对实验技术和技巧的讲解不够深入和透彻。为了改变这一现状,更利于初学者顺利地完成研究计划,我们组织了一群年富力强的博士研究生们站在初学者的角度编写了这本《细胞与分子生物学常用实验技术》。

全书共分 11 章。第一章讲述了细胞学常用的实验技术,第二章至第十一章则重点阐述了分子生物学常用的实验技术。本书有以下几个特点:一是编写人员大部分为在读的博士研究生,对所写的实验技术非常熟悉,而且对实验技术有着自己独特的见解;二是所涉及内容均是最常用而且成熟的实验方法;三是侧重于实验的具体操作、注意事项以及个人的体会;四是从初学者的角度出发,符合初学者的需要,也可为从事基

础医学研究的人员提供帮助;五是在本书中,每一章节都附有作者的联系方式,若遇到相关问题,可以与作者进行交流。

本书是全体同仁共同努力的结晶,但是由于水平有限,时间仓促,内容上并不全面,而且难免有不足或错误之处,真诚希望读者提出宝贵的意见和建议。

药立波

(第四军医大学生物化学与分子生物学教研室主任,教授、博士生导师)

2009年5月

第二章 PCR 技术	(62)
第一节 RT - PCR	(62)
第二节 荧光定量 PCR	(76)
第三章 分子克隆常用技术	(84)
第一节 感受态的制备	(84)
第二节 转化	(87)
第三节 质粒提取	(89)
第四节 琼脂糖凝胶电泳	(91)
第五节 凝胶回收	(93)
第六节 重组 DNA 的构建	(95)
第四章 病毒载体的构建	(100)
第一节 复制缺陷型腺病毒载体的构建	(100)
第二节 慢病毒载体的包装	(113)
第五章 RNAi 技术	(119)
第六章 蛋白原核表达与纯化	(127)
第七章 酵母双杂交筛选相互作用蛋白及验证	(136)
第一节 基本原理及应用	(136)

第二节	酵母双杂交实验的基本流程	(138)
第三节	酵母双杂交实验具体实验步骤	(139)
第八章	Western - blot	(172)
第一节	蛋白样品制备	(172)
第二节	蛋白定量	(176)
第三节	蛋白质电泳	(179)
第四节	转膜	(184)
第五节	抗体杂交	(188)
第六节	发光检测或荧光扫描	(191)
第九章	转录调控机制研究的策略	(199)
第一节	启动子克隆	(200)
第二节	报告基因分析	(203)
第三节	转录因子结合位点的确定	(209)
第四节	DNA - 转录因子结合分析	(211)
第十章	基因组 DNA 提取及甲基化分析	(221)
第一节	基因组 DNA 提取	(221)
第二节	甲基化分析	(227)

第十一章 实验研究中基本的生物信息学技术

.....	(241)
第一节 序列数据的获取.....	(241)
第二节 转录因子结合位点分析.....	(245)
第三节 基因表达谱数据库的查询.....	(247)
第四节 蛋白质在细胞内定位的预测.....	(250)
第五节 蛋白质序列中模体的鉴定.....	(252)
第六节 蛋白质结构数据库.....	(254)
第七节 同源蛋白的搜索.....	(256)
第八节 各物种数据库.....	(262)

第一章 细胞及组织学 常用实验技术

第一节 细胞冻存

一、基本原理及实验目的

细胞冻存是通过向培养液中加入保护剂,减少冻存过程中细胞内冰晶形成,来保护细胞,是保存细胞的最基本方法。

二、主要仪器及试剂

1. 0.25% 胰蛋白酶:称取胰蛋白酶粉末 0.25g,加入 100ml PBS,充分溶解后过滤除菌备用,4℃ 保存。

2. 含 20% 胎牛血清的培养液:将培养液和胎牛血清按 4:1 比例混合,过滤除菌备用,4℃ 保存。

3. 细胞冻存液:含 20% 胎牛血清的培养液和 DMSO 按照 9:1 比例混合,备用。

4. 弯头滴管、移液器及枪头、冻存管等。

三、操作步骤(以贴壁生长的细胞为例)

1. 取对数生长期的细胞,当细胞增殖至培养瓶底(25cm² 培养瓶为例)80% 时,用弯头滴管吸出培养基。

2. 加入 1ml 胰蛋白酶,洗涤 1 次后弃去瓶中液体。
3. 重新加入 1ml 胰酶,消化细胞。
4. 倒置显微镜下观察,当细胞变圆并有部分细胞脱壁后,加入 1ml 含有血清的培养基终止消化。
5. 用滴管吸取瓶中液体轻轻吹打培养瓶底,使细胞完全脱壁。
6. 将细胞悬液移入离心管,800rpm 离心 5min。
7. 弃去离心管中液体,加入培养基 2ml,用滴管轻轻吹打,使细胞重悬。
8. 800rpm 离心 5min。
9. 用滴管吸去离心管中液体。
10. 加入 1ml 细胞冻存液,重悬细胞。
11. 将细胞悬液移入冻存管中,4℃放置 30min。
12. -20℃放置 2h; -70℃过夜。
13. 放入液氮中保存。

四、结果判读

判断细胞冻存的好坏,需要看复苏后,细胞的贴壁率及细胞状态。若复苏后细胞 95% 以上贴壁,而且细胞状态良好,这就说明细胞冻存的过程没有问题。

五、注意事项

1. 所有的细胞实验中均需要注意无菌操作。
2. 细胞冻存的过程,降温的速率要小。过快地降温,会因细胞内形成冰晶而使细胞死亡。
3. 冻存的细胞一定要做好名称和日期等标记。

六、个人心得

在细胞冻存前,一定要观察细胞的状态,细胞状态的好坏直接决定了复苏后细胞的生长情况。在冻存的前一天最好给细胞换液,保证细胞冻存前有足够的营养,以保持最好的细胞增殖状态。对于增殖比较旺盛的细胞,在冻存时可以用相对较小的浓度,一般情况下,长满一个 25cm^2 培养瓶的细胞冻存一支就足够了。对于增殖比较缓慢的细胞,一般长满两个 25cm^2 培养瓶的细胞冻存一支。

对于一些原代细胞来说(如某些正常细胞),冻存的效果可能不会太好。在实验的过程中我们发现,配制冻存液的时候,用含10%胎牛血清的培养液或者含20%胎牛血清的培养液或者纯血清,好像对细胞的影响并不是很大,但是如果DMSO的浓度高于10%,将会对细胞产生很大的毒性。如果细胞只是短期内不用(3个月以内),将细胞冻存在 -70°C 冰箱中即可;若长期不用,最好还是将其保存在液氮中。对于悬浮生长的细胞,省去胰酶消化环节,直接收集细胞悬液,离心即可。另外,操作细胞前,最好将培养基和胰酶平衡到室温或 37°C ,以减小对细胞的影响。

第二节 细胞复苏

一、基本原理及实验目的

细胞复苏是将冻存在液氮或者 -70°C 中的细胞解冻

后重新培养。与细胞冻存不同,细胞复苏过程升温要快,防止在解冻过程中水分进入细胞,形成冰晶,影响细胞存活。

二、主要仪器及试剂

1. 含 10% 血清的培养基。
2. 弯头滴管、离心管、水浴锅等。

三、操作步骤

1. 将水浴锅温度调整至 37℃。
2. 向离心管中加入 9ml 培养基。
3. 从液氮中取出细胞,迅速放进水浴锅中。
4. 当完全融化时,将细胞悬液加入离心管中。
5. 800rpm 离心 5min,弃上清。
6. 用培养基重悬细胞沉淀。
7. 接种培养瓶,常规培养。
8. 次日换液。

四、结果判读

判断细胞复苏成功与否,需要看复苏后细胞的贴壁率及细胞状态。如果复苏后 95% 以上的细胞贴壁,而且细胞状态良好,这就说明细胞复苏的过程没有问题。

五、注意事项

1. 注意无菌操作。
2. 细胞复苏过程中,升温的速率要大。

六、个人心得

细胞复苏时,应先准备好水浴锅及离心管等物品,然后再解冻细胞。

从液氮中取细胞时,要做好个人防护工作,防止液氮溅出冻伤人体。一般,每个液氮罐冻存盒中会放置很多细胞,这就需要在取细胞的时候动作一定要迅速。因为如果冻存盒在外面放置时间过长,会影响其他细胞的生存状况。所以,在冻存细胞时一定要做好标记,取细胞时做到有的放矢。

在接种细胞时,尽量使细胞的浓度高一些,这样贴壁的细胞很快就能长满培养瓶,对细胞状态影响会小一些。

第三节 细胞计数法测定生长曲线

一、基本原理及实验目的

细胞计数是细胞培养研究中最常用的技术之一。在测定培养基、药物等作用以及细胞生长曲线的实验中,细胞计数是最简便而且重要的手段。其原理是:测定单位体积内细胞数量,从而计算出细胞浓度。

二、主要仪器及试剂

1. 0.25%胰酶、含血清的培养基。
2. 离心管、血球计数板、移液器、枪头、24孔板等。

三、操作步骤

1. 将计数板及盖玻片冲洗干净,晾干。

2. 常规消化细胞,离心。
3. 加入适量培养基重悬细胞,使之成为单细胞悬液。
4. 按一定的倍数稀释细胞悬液。
5. 用移液器吸取约 $10\mu\text{l}$ 稀释后的细胞悬液,加样到血球计数板上。

6. 10 倍物镜下计数血球计数板四角大方格内细胞的数量。

7. 按公式计算出细胞悬液的浓度,再根据原细胞悬液的体积计算出总细胞数。调整细胞浓度至 1×10^5 个/ml。

细胞浓度 = (计数板四角大方格内细胞的数量/4) \times 稀释倍数 $\times 10^4$ 个/ml

8. 将 24 孔板内每孔加入 $900\mu\text{l}$ 培养基,另外加入 $100\mu\text{l}$ 细胞悬液(即 10^4 个细胞)。

9. 按十字形晃动孔板,使细胞均匀分散,放入孵箱常规培养。

10. 以后每 2d 换液 1 次。

11. 从第 2 天开始,每隔 24h 取出孔板,随机选择 3 孔,吸弃培养液,加入 1ml 胰酶消化细胞,然后加入 1ml 培养基中和消化,制备单细胞悬液。

12. 重复 5 ~ 7 操作,计算每孔总细胞数,取平均值。

13. 以时间为横轴,细胞数为纵轴绘制细胞生长曲线。

四、结果判读

所得结果如图 1-1 所示,前几天细胞处于潜伏期,而后进入对数生长期,最后进入平台期。因此,所得曲线类似“S”形。一般的实验选择细胞时都会选择对数生长期的细胞。在对数生长期内,利用作图法可得细胞群体倍增时间(即细胞总数翻倍的时间)。

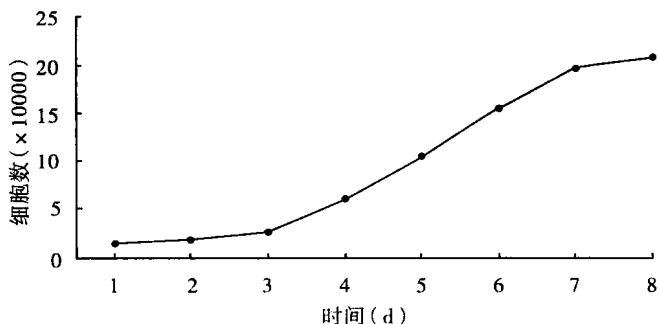


图 1-1 细胞计数法绘制细胞生长曲线

五、注意事项

1. 消化细胞时,一定要将细胞消化完全,重悬时要将细胞悬液制备成单细胞悬液。

2. 计数前应将细胞彻底混匀,尤其在连续取样计数的时候,更须注意。

3. 在计数的时候遇见细胞团块,应接单细胞计算。如果细胞团很多,这说明消化或者重悬不够充分,应分散细胞后重新取样计数。

4. 当每个大方格中细胞少于 20 或者大于 300 个时,说明稀释的倍数不当,应重新稀释,计数。

5. 向 24 孔板接种细胞时,一定要十字形晃动,使细胞分散均匀。

六、个人心得

在消化计数前,可以大概估计培养瓶中的细胞数,这样可以指导计数之前应该稀释多少倍。如果实验的目的是为了知道培养容器中总的细胞数,在消化的时候可以