



国家卫生和计划生育委员会“十二五”规划教材
全国高等医药教材建设研究会“十二五”规划教材
科研人员核心能力提升导引丛书
供研究生及科研人员用

第3版

医学分子生物学实验技术

The Techniques in Medical Molecular Biology

主 编 药立波
副主编 韩 骅 焦炳华 常智杰

 人民卫生出版社

014035017

Q7-33
47-3



国家卫生和计划生育委员会“十二五”规划教材
全国高等医药教材建设研究会“十二五”规划教材
科研人员核心能力提升导引丛书
供研究生及科研人员用

医学分子生物学实验技术

The Techniques in Medical Molecular Biology

第 3 版

主 编 药立波

副主编 韩 骅 焦炳华 常智杰

编 者 (以姓氏笔画为序)

马文丽	南方医科大学	倪菊华	北京大学医学部
王丽颖	吉林大学白求恩医学部	夏 斌	北京大学生命科学院
王丽影	复旦大学基础医学院	钱小红	军事医学科学院
冯作化	华中科技大学同济医学院	高 旭	哈尔滨医科大学
吕社民	西安交通大学医学院	高国全	中山大学中山医学院
关一夫	中国医科大学	常智杰	清华大学医学院
汤立军	中南大学湘雅医学院	韩 骅	第四军医大学
何凤田	第三军医大学	焦炳华	第二军医大学
张 健	第四军医大学	德 伟	南京医科大学
赵 晶	第四军医大学	燕 秋	大连医科大学
药立波	第四军医大学		

秘 书 王景媛 第四军医大学



人民卫生出版社



北航 C1715078

Q7-33
47-3

图书在版编目 (CIP) 数据

医学分子生物学实验技术 / 药立波主编 . — 3 版 . — 北京 : 人民卫生出版社 , 2014.3

ISBN 978-7-117-18615-5

I. ①医… II. ①药… III. ①医学 - 分子生物学 - 实验技术 - 医学院校 - 教材 IV. ①Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 015635 号

人卫社官网	www.pmph.com	出版物查询, 在线购书
人卫医学网	www.ipmph.com	医学考试辅导, 医学数据库服务, 医学教育资源, 大众健康资讯

版权所有, 侵权必究!

医学分子生物学实验技术
第 3 版

主 编: 药立波

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 潮河印业有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 850 × 1168 1/16 印张: 22 插页: 2

字 数: 665 千字

版 次: 2002 年 10 月第 1 版 2014 年 3 月第 3 版

2014 年 3 月第 3 版第 1 次印刷 (总第 6 次印刷)

标准书号: ISBN 978-7-117-18615-5/R · 18616

定 价: 69.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

主编简介



药立波,教授,博士生导师,第四军医大学生物化学与分子生物学教研室主任。现任国务院学科评议组成员、中国生物化学与分子生物学会常务理事、中国生物化学与分子生物学会教育分会副理事长、全军生物化学与分子生物学学会副理事长、陕西省生物化学与分子生物学学会理事长。

从事生物化学与分子生物学教学 32 年,是“陕西省教学名师”,获国家教学成果二等奖和军队教学成果一等奖各 1 项。担任国家级医学院校规划教材《医学分子生物学》第 2 版和第 3 版主编;卫生部研究生规划教材《医学分子生物学实验技术》第 1 版和第 2 版主编;国家级规划教材《生物化学》第 5 版、第 6 版和第 7 版编者,第 8 版主编。从事细胞信号转导机制及其在肿瘤发生和发展中的作用研究工作,是国家杰出青年科学基金获得者,国家“973”、“863”、国家自然科学基金重点项目等多项课题的负责人,在癌基因和肿瘤抑制基因研究方面有重要发现。近 10 年发表 SCI 收录论文 56 篇,获发明专利 6 项,以第一完成人获国家科技进步奖二等奖 1 项、陕西省科学技术一等奖和军队科技进步一等奖各 1 项。

全国高等学校第二轮医学研究生规划教材目录

1	医学哲学	主 编 柯 杨 张大庆 副主编 赵明杰 段志光 罗长坤 刘 虹
2	医学科研方法学(第2版)	主 编 刘 民 副主编 陈 峰
3	医学统计学(第4版)	主 编 孙振球 徐勇勇
4	医学实验动物学(第2版)	主 编 秦 川 副主编 谭 毅 张连峰
5	实验室生物安全(第2版)	主 审 余新炳 主 编 叶冬青
6	医学科研课题设计、申报与实施(第2版)	主 审 龚非力 主 编 李卓娅 副主编 李宗芳
7	医学信息搜集与利用(第2版)	主 编 代 涛 副主编 赵文龙 张云秋
8	医学实验技术原理与选择(第2版)	主 编 魏于全 副主编 向 荣 郭亚军 胡 汛 徐宁志
9	统计方法在医学科研中的应用	主 编 李晓松 副主编 李 康
10	医学科研论文撰写与发表(第2版)	主 编 张学军 副主编 王征爱 吴忠均
11	IBM SPSS 统计软件应用(第3版)	主 编 陈平雁 黄浙明 副主编 安胜利 欧春泉 陈莉雅
12	SAS 统计软件应用(第3版)	主 编 贺 佳 副主编 尹 平

- | | | |
|----|------------------|---------------------------------------|
| 13 | 医学分子生物学实验技术(第3版) | 主 编 药立波
副主编 韩 骅 焦炳华 常智杰 |
| 14 | 医学免疫学实验技术(第2版) | 主 编 柳忠辉 吴雄文
副主编 王全兴 吴玉章 储以微 |
| 15 | 组织病理技术(第2版) | 主 编 李甘地 |
| 16 | 组织和细胞培养技术(第3版) | 主 审 宋今丹
主 编 章静波
副主编 张世馥 连小华 |
| 17 | 组织化学与细胞化学技术(第2版) | 主 编 李 和 周 莉
副主编 周德山 周国民 肖 岚 |
| 18 | 人类疾病动物模型(第2版) | 主 审 施新猷
主 编 刘恩岐
副主编 李亮平 师长宏 |
| 19 | 医学分子生物学(第2版) | 主 审 刘德培
主 编 周春燕 冯作化
副主编 药立波 何凤田 |
| 20 | 医学免疫学 | 主 编 曹雪涛
副主编 于益芝 熊思东 |
| 21 | 基础与临床药理学(第2版) | 主 编 杨宝峰
副主编 李学军 李 俊 董 志 |
| 22 | 医学微生物学 | 主 编 徐志凯 郭晓奎
副主编 江丽芳 龙北国 |
| 23 | 病理学 | 主 编 来茂德
副主编 李一雷 |
| 24 | 医学细胞生物学(第3版) | 主 审 钟正明
主 编 杨 恬
副主编 易 静 陈誉华 何通川 |
| 25 | 分子病毒学(第3版) | 主 编 黄文林
副主编 徐志凯 董小平 张 辉 |
| 26 | 医学微生态学 | 主 编 李兰娟 |
| 27 | 临床流行病学(第4版) | 主 审 李立明
主 编 黄悦勤 |
| 28 | 循证医学 | 主 编 李幼平
副主编 杨克虎 |

- | | | |
|----|-------------|---|
| 29 | 断层影像解剖学 | 主 编 刘树伟
副主编 张绍祥 赵 斌 |
| 30 | 临床应用解剖学 | 主 编 王海杰
副主编 陈 尧 杨桂姣 |
| 31 | 临床信息管理 | 主 编 崔 雷
副主编 曹高芳 张 晓 郑西川 |
| 32 | 临床心理学 | 主 审 张亚林
主 编 李占江
副主编 王建平 赵旭东 张海音 |
| 33 | 医患沟通 | 主 编 周 晋
副主编 尹 梅 |
| 34 | 实验诊断学 | 主 编 王兰兰 尚 红
副主编 尹一兵 樊绮诗 |
| 35 | 核医学(第2版) | 主 编 张永学
副主编 李亚明 王 铁 |
| 36 | 放射诊断学 | 主 编 郭启勇
副主编 王晓明 刘士远 |
| 37 | 超声影像学 | 主 审 张 运 王新房
主 编 谢明星 唐 杰
副主编 何怡华 田家玮 周晓东 |
| 38 | 呼吸病学(第2版) | 主 审 钟南山
主 编 王 辰 陈荣昌
副主编 代华平 陈宝元 |
| 39 | 消化内科学(第2版) | 主 审 樊代明 刘新光
主 编 钱家鸣
副主编 厉有名 林菊生 |
| 40 | 心血管内科学(第2版) | 主 编 胡大一 马长生
副主编 雷 寒 韩雅玲 黄 峻 |
| 41 | 血液内科学(第2版) | 主 编 黄晓军 黄 河
副主编 邵宗鸿 胡 豫 |
| 42 | 肾内科学(第2版) | 主 编 湛贻璞
副主编 余学清 |
| 43 | 内分泌内科学(第2版) | 主 编 宁 光 周智广
副主编 王卫庆 邢小平 |

- | | | | |
|----|------------|-----|--------------------|
| 44 | 风湿内科学(第2版) | 主 编 | 陈顺乐 邹和健 |
| 45 | 急诊医学(第2版) | 主 编 | 黄子通 于学忠 |
| | | 副主编 | 吕传柱 陈玉国 刘 志 |
| 46 | 神经内科学(第2版) | 主 编 | 刘 鸣 谢 鹏 |
| | | 副主编 | 崔丽英 陈生弟 张黎明 |
| 47 | 精神病学(第2版) | 主 审 | 江开达 |
| | | 主 编 | 马 辛 |
| | | 副主编 | 施慎逊 许 毅 |
| 48 | 感染病学(第2版) | 主 编 | 李兰娟 李 刚 |
| | | 副主编 | 王宇明 陈士俊 |
| 49 | 肿瘤学(第4版) | 主 编 | 曾益新 |
| | | 副主编 | 吕有勇 朱明华 陈国强
龚建平 |
| 50 | 老年医学(第2版) | 主 编 | 张 建 范 利 |
| | | 副主编 | 华 琦 李为民 杨云梅 |
| 51 | 临床变态反应学 | 主 审 | 叶世泰 |
| | | 主 编 | 尹 佳 |
| | | 副主编 | 洪建国 何韶衡 李 楠 |
| 52 | 危重症医学 | 主 编 | 王 辰 席修明 |
| | | 副主编 | 杜 斌 于凯江 詹庆元
许 媛 |
| 53 | 普通外科学(第2版) | 主 编 | 赵玉沛 姜洪池 |
| | | 副主编 | 杨连粤 任国胜 陈规划 |
| 54 | 骨科学(第2版) | 主 编 | 陈安民 田 伟 |
| | | 副主编 | 张英泽 郭 卫 高忠礼
贺西京 |
| 55 | 泌尿外科学(第2版) | 主 审 | 郭应禄 |
| | | 主 编 | 杨 勇 李 虹 |
| | | 副主编 | 金 杰 叶章群 |
| 56 | 胸心外科学 | 主 编 | 胡盛寿 |
| | | 副主编 | 孙立忠 王 俊 庄 建 |
| 57 | 神经外科学(第2版) | 主 审 | 周良辅 |
| | | 主 编 | 赵继宗 周定标 |
| | | 副主编 | 王 硕 毛 颖 张建宁
王任直 |

- | | | |
|----|----------------|---|
| 58 | 血管淋巴管外科学(第2版) | 主 编 汪忠镐
副主编 王深明 俞恒锡 |
| 59 | 小儿外科学(第2版) | 主 审 王 果
主 编 冯杰雄 郑 珊
副主编 孙 宁 王维林 夏慧敏 |
| 60 | 器官移植学 | 主 审 陈 实
主 编 刘永锋 郑树森
副主编 陈忠华 朱继业 陈江华 |
| 61 | 临床肿瘤学 | 主 编 赫 捷
副主编 毛友生 沈 铿 马 骏 |
| 62 | 麻醉学 | 主 编 刘 进
副主编 熊利泽 黄宇光 |
| 63 | 妇产科学(第2版) | 主 编 曹泽毅 乔 杰
副主编 陈春玲 段 涛 沈 铿
王建六 杨慧霞 |
| 64 | 儿科学 | 主 编 桂永浩 申昆玲
副主编 毛 萌 杜立中 |
| 65 | 耳鼻咽喉头颈外科学(第2版) | 主 编 孔维佳 韩德民
副主编 周 梁 许 庚 韩东一 |
| 66 | 眼科学(第2版) | 主 编 崔 浩 王宁利
副主编 杨培增 何守志 黎晓新 |
| 67 | 灾难医学 | 主 审 王一镗
主 编 刘中民
副主编 田军章 周荣斌 王立祥 |
| 68 | 康复医学 | 主 编 励建安
副主编 毕 胜 |
| 69 | 皮肤性病学 | 主 编 王宝玺
副主编 顾 恒 晋红中 李 岷 |
| 70 | 创伤、烧伤与再生医学 | 主 审 王正国 盛志勇
主 编 付小兵
副主编 黄跃生 蒋建新 |

全国高等学校第二轮医学研究生规划教材 评审委员会名单

顾 问

韩启德 桑国卫 陈 竺 赵玉沛

主任委员

刘德培

副主任委员 (以汉语拼音为序)

曹雪涛 段树民 樊代明 付小兵 郎景和 李兰娟 王 辰
魏于全 杨宝峰 曾益新 张伯礼 张 运 郑树森

常务委员 (以汉语拼音为序)

步 宏 陈安民 陈国强 冯晓源 冯友梅 桂永浩 柯 杨
来茂德 雷 寒 李 虹 李立明 李玉林 吕兆丰 瞿 佳
田勇泉 汪建平 文历阳 闫剑群 张学军 赵 群 周学东

委 员 (以汉语拼音为序)

毕开顺 陈红专 崔丽英 代 涛 段丽萍 龚非力 顾 晋
顾 新 韩德民 胡大一 胡盛寿 黄从新 黄晓军 黄悦勤
贾建平 姜安丽 孔维佳 黎晓新 李春盛 李 和 李小鹰
李幼平 李占江 栗占国 刘树伟 刘永峰 刘中民 马建辉
马 辛 宁 光 钱家鸣 乔 杰 秦 川 尚 红 申昆玲
沈志祥 谌贻璞 石应康 孙 宁 孙振球 田 伟 汪 玲
王 果 王兰兰 王宁利 王深明 王晓民 王 岩 谢 鹏
徐志凯 杨东亮 杨 恬 药立波 尹 佳 于布为 余祥庭
张奉春 张 建 张祥宏 章静波 赵靖平 周春燕 周定标
周 晋 朱正纲

前 言

分子生物学是生命科学发展中最重要的前沿领域,也是许多相关学科的理论和技术基础,其在医学研究中的重要性更是无论怎样强调也不过分。以重组 DNA 技术为中心内容的分子生物学方法在 20 世纪 80 年代初结束了创始阶段,实现了在全世界的普及,并且在多方面不断取得新的进展,手段日新月异。随着人类基因组计划的完成,分子生物学技术在医学领域中的应用越来越广泛。因此,分子生物学理论和技术在医学院校研究生教学中的重要性日益凸显。加强基础医学和临床医学专业研究生的分子生物学实验技术教学,将促进研究生在研究课题中充分利用先进的分子生物学技术手段以更好地解决医学问题。

虽然国内外已有多种介绍分子生物学相关技术的专门书籍,但是尚缺乏可供医学院校研究生分子生物学实验技术教学以及课题研究用的较系统的教学用书。2002 年,我们按照全国高等医药教材建设研究会的要求,组织编写了《医学分子生物学实验技术》第 1 版,满足了医学院校研究生分子生物学实验技术的教学需要,受到了广大师生的欢迎。随着分子生物学研究技术的发展和我国医药院校研究工作的进展,原有内容已不能适应当前需求,2011 年再版时内容和结构都进行了较大的更新和调整。本次再版仍力争反映当前分子生物学技术的发展,为研究生的课题研究提供最新的技术参考,同时更加贴近教科书风格,增加可读性。

本书的读者对象为高等医药院校及研究机构的硕士和博士研究生。主要是作为医学研究生分子生物学实验必修课或选修课教材,同时也可以作为医学院校研究生课题研究过程中分子生物学技术选择和应用的参考用书。本书的主要目的是帮助研究生理解各种分子生物学技术的基本原理、主要用途和主要流程,学会在研究中正确选用适合各自课题需要的分子生物学技术。

新版继续坚持突出研究生教学特点和课题研究方向,强调基本技术与进展、广度与深度并重。新版的最大特色是针对研究生课题研究,强调了研究策略的总体把握。为此,在每一章都以插图的方式增加了策略和技术路线总结,对于研究生课题研究中的技术选择更具指导性。在内容上增加了代谢及代谢组学研究技术一章,反映了当前生物化学与分子生物学的研究热点需求。

全书共 21 章,主要由三部分内容构成。第一部分是基因操作技术,涵盖体外基因获取、重组、序列分析、体外突变及表达等基本技术;第二部分属于蛋白质研究技术,包括分离与纯化、定性定量分析、结构及化学修饰分析、相互作用分析、代谢与代谢组学和蛋白质组学研究;第三部分集中介绍了基因功能研究相关技术,包含基因表达谱、基因表达调控、非编码 RNA、遗传修饰动物等实验技术,同时包含了基因研究策略的内容。此外,附录部分继续提供了分子生物学实验中常用的资料和参数以及常用试剂的配制。我们期望这样的架构可以帮助研究生对分子生物学技术有一个相对全面的

了解,以便在研究课题中选择使用。

本书属于实验技术类书籍,在编写时我们注意了每一项技术的可操作性,尤其是目前国内主要医学院校有条件开展的实验技术,均给出了具体的操作步骤和注意事项。为了帮助研究生更好地理解 and 利用这些技术,我们还在一部分章节附加了对部分实验结果的分析 and 讨论,期望对于研究思路 and 设计可以有所帮助。不过由于篇幅的限制,不可能对每一项技术介绍得过于具体,尤其是各种实验所需的试剂种类繁多,只有一些特殊试剂才在相应实验步骤中介绍。尽管本书附录IV给出了一些常用试剂的制备方法,但仍不能满足需要,读者可查阅相关技术的其他专门书籍或实验手册。

本教材由来自全国 17 所高等院校和科研院所的 21 位教授编写。作者均为生物化学与分子生物学教学和科研第一线的工作人员,在所编写的内容方面都有相当多的实践经验。部分章节如蛋白质组学研究技术、蛋白质空间结构分析等还专门邀请了综合大学和科研院所的专家撰写。

从方便教学组织的角度考虑,我们在附录中列举了医学院校研究生实验教学常用的系统实验,可以直接依照该内容实施分子生物学实验教学。

本教材在编写过程中得到了全国高等医药教材建设研究会、第四军医大学研究生院的大力支持,在此一并致谢。

药立波

2013 年 12 月

目 录

第一章 绪论	1	二、应用于实时定量 PCR 中的荧光探针与 荧光染料	20
第一节 分子生物学技术的历史和 意义	1	三、实时定量 PCR 的实验流程	21
一、医学分子生物学是分子生物学的 重要分支	1	四、实时定量 PCR 常见问题及优化方案	22
二、基因操作是所有分子生物学技术的 核心	1	五、实时荧光定量 PCR 的国际化标准	23
三、蛋白质研究较基因操作更为复杂	2	六、实时定量 PCR 技术在医学上的应用	25
第二节 医学分子生物学实验设计	3	第三章 DNA 体外重组	27
一、研究课题的选择	3	第一节 基本流程和必备工具	27
二、研究策略和技术路线设计	4	一、基本流程	28
三、实验方法选择原则	4	二、常用工具酶	28
四、实验设计注意事项	5	三、基因载体	31
五、实验数据的整理和分析	5	第二节 DNA 重组前的准备工作	34
第三节 分子生物学实验实施	6	一、选择载体	34
一、实验室基本设备需求	6	二、载体的准备	35
二、实施实验的细节	6	三、目的 DNA 的结构设计	36
三、实验室安全	7	第三节 目的 DNA 片段的获取及准备	36
第二章 聚合酶链反应	8	一、获取 DNA 片段的方法选择	36
第一节 PCR 技术概述	8	二、DNA 片段的末端处理	38
一、PCR 技术的发展历程及科学价值	8	第四节 DNA 片段与载体的重组	38
二、PCR 技术的基本原理	9	一、DNA 片段与载体的连接方式	38
三、PCR 反应体系	9	二、连接反应时需要考虑的一些因素	40
四、PCR 反应的基本步骤	10	三、非酶切 DNA 体外重组	41
第二节 PCR 的引物设计和反应条件 优化	11	第五节 重组 DNA 的克隆化及鉴定	41
一、PCR 引物的设计	11	一、重组 DNA 转化大肠埃希菌	41
二、PCR 反应条件的优化	11	二、重组 DNA 的克隆筛选及鉴定	43
第三节 PCR 技术的基本类型及应用	12	第四章 DNA 序列分析技术	46
一、PCR 技术的主要类型	12	第一节 DNA 测序技术的发展	46
二、PCR 技术的实际应用	15	一、第一代测序技术	46
第四节 PCR 产物的定性和定量检测 方法	17	二、第二代测序技术	47
第五节 实时定量 PCR	18	三、第三代测序技术	47
一、实时定量 PCR 技术的原理	18	第二节 常规 DNA 序列测定的原理	47
		一、双脱氧测序法的原理	47
		二、Maxam-Gilbert 化学降解法测序的原理	48
		第三节 自动激光荧光 DNA 测序—— 第一代测序技术	48

一、自动激光荧光 DNA 测序的基本原理	48	一、蛋白质在原核细胞中的表达特点	87
二、自动激光荧光 DNA 测序的基本程序	49	二、包含体的形成、变性与复性	87
三、自动激光荧光 DNA 测序的注意事项	50	三、蛋白质在原核细胞表达的调控	88
第四节 其他 DNA 序列分析新技术	51	四、外源基因在原核细胞中表达的鉴定	89
一、焦磷酸测序	51	第三节 外源基因表达条件和优化	89
二、循环芯片测序——第二代测序技术	52	一、表达载体的优化设计与选择	89
三、单分子测序——第三代测序技术	55	二、增加 mRNA 的稳定性	90
第五节 对所获 DNA 序列的初步分析	57	三、提高外源蛋白的稳定性	90
一、同源序列比对和限制性内切核酸酶		四、选择合适的宿主菌	90
位点分析	57	第四节 外源基因原核表达的基本	
二、外显子/内含子边界分析	57	操作	90
三、开放阅读框分析	57	一、获得目的基因并克隆入原核表达	
四、转录起点、启动子以及转录因子结合		载体	91
位点分析	57	二、工程菌的构建	91
第五章 基因突变技术	59	三、产物的表达与鉴定	91
第一节 体外基因突变	59	四、作为基因重组药物的样品检定	92
一、体外基因突变的原理和应用	59	第五节 无细胞表达系统	92
二、体外基因突变的策略和步骤	60	一、无细胞表达系统的类型	93
第二节 模式生物的基因组诱变	63	二、无细胞表达系统的操作	93
一、基因组诱变的基本原理及应用	63	三、无细胞表达系统的应用	94
二、利用 ENU 诱变的基本策略及流程	64	第八章 外源基因在真核细胞中的表达	95
三、利用转座子诱变的基本策略及流程	65	第一节 真核表达外源基因的系统 and	
第六章 核酸分子杂交	68	方式	95
第一节 核酸探针及其标记	68	一、常用表达载体和宿主	95
一、探针的种类及其选择	69	二、外源基因在真核细胞中表达的主要	
二、核酸标记物及其选择	69	方式	95
三、核酸探针的标记方法	71	三、外源基因在真核细胞中表达的鉴定	96
四、标记探针的纯化	74	第二节 真核细胞基因导入方法	96
第二节 Southern 印迹杂交	74	一、物理方法	96
一、固相支持物与印迹方法的选择	74	二、化学方法	96
二、Southern 印迹杂交的基本过程	76	三、病毒感染法	97
三、Southern 印迹杂交的注意事项	78	第三节 外源基因在酵母细胞中的	
第三节 Northern 印迹杂交	78	表达	97
一、Northern 印迹杂交的基本过程	79	一、常用的酵母细胞表达载体	97
二、Northern 印迹杂交的注意事项	79	二、酵母表达系统中的宿主	97
第四节 其他核酸分子杂交	80	三、酵母系统表达外源蛋白质的相关技术	
一、斑点杂交与狭缝印迹杂交	80	操作	98
二、原位杂交	80	第四节 外源基因在昆虫细胞中的	
三、液相分子杂交	81	表达	99
第七章 外源基因在原核细胞的表达	83	一、常用的昆虫表达系统	99
第一节 常用表达系统及其选择	84	二、昆虫表达系统中的宿主及其特点	99
一、大肠埃希菌表达系统	84	三、昆虫系统表达外源蛋白质的主要	
二、芽胞杆菌表达系统	86	步骤	100
三、链霉菌表达系统	86	第五节 外源基因在哺乳动物细胞中的	
第二节 外源基因的表达和鉴定	87	表达	101

一、常用的哺乳动物细胞表达载体	101	操作	128
二、常用哺乳动物细胞表达的宿主	102	第三节 蛋白质总含量测定	129
三、哺乳动物细胞表达外源蛋白质产物的 主要操作	103	一、凯氏定氮法	129
四、哺乳动物细胞表达系统用于制备和生产 重组蛋白质产品	104	二、Lowry 法	129
第九章 蛋白质的分离纯化	106	三、二喹啉甲酸法	131
第一节 生物样品的预处理	106	四、考马斯亮蓝法	131
一、机械破碎法	106	五、紫外光谱吸收法	132
二、超声破碎法	107	第四节 特定蛋白质的定性和定量 分析	132
三、反复冻融法	107	一、细胞可溶性蛋白质的含量测定	132
四、表面活性剂裂解及酶解法	107	二、细胞分泌蛋白的含量测定	139
第二节 蛋白质样品的粗分离	108	三、膜蛋白的含量测定	141
一、离心分离	108	第五节 蛋白质半衰期测定	142
二、透析和超滤	108	一、脉冲追踪标记法	142
三、沉淀	108	二、放线菌酮阻断法	143
第三节 蛋白质的层析纯化	109	第十一章 蛋白质的化学修饰分析	145
一、凝胶过滤层析	110	第一节 蛋白质磷酸化分析	145
二、离子交换层析	111	一、放射性核素示踪法用于蛋白质磷酸化 分析	146
三、亲和层析	115	二、抗磷酸化氨基酸抗体用于蛋白质磷酸化 分析	149
四、疏水作用层析	116	三、蛋白质磷酸化的规模化分析	150
第四节 蛋白质的电泳分离	117	第二节 蛋白质糖基化分析	151
一、聚丙烯酰胺凝胶电泳	117	一、酶解释放法鉴定糖蛋白	151
二、等电聚焦电泳	118	二、糖基化抑制剂用于鉴定糖蛋白	153
三、双向聚丙烯酰胺凝胶电泳	120	三、凝集素结合法富集和鉴定糖蛋白	154
第五节 特殊蛋白质的分离纯化	120	四、单糖放射性核素示踪法	154
一、包含体蛋白质的提取和纯化	120	五、糖蛋白的规模化研究技术	154
二、膜蛋白的提取和纯化	121	第三节 其他蛋白质共价修饰分析	155
三、蛋白质的脱盐和浓缩	121	一、蛋白质泛素化分析	155
四、蛋白质的干燥和保存	121	二、组蛋白的乙酰化和甲基化分析	157
第六节 蛋白质分离纯化的综合策略	121	第十二章 蛋白质的空间结构分析	159
一、基于蛋白质来源的考虑	121	第一节 蛋白质空间结构解析的 X-射线 晶体学技术	160
二、基于纯化目的的考虑	122	一、基本原理	160
三、基于纯度和成本的考虑	122	二、晶体结构解析步骤	161
第十章 蛋白质的定性定量分析	124	第二节 蛋白质溶液结构解析的核磁共振 波谱学技术	162
第一节 蛋白质分子量的测定	124	一、基本原理	162
一、SDS-PAGE 法测定蛋白质的相对 分子量	124	二、核磁共振溶液结构解析步骤	163
二、凝胶过滤层析法测定蛋白质相对 分子量	126	第三节 蛋白质空间结构的低温电镜三维 重构技术	166
三、质谱法测定蛋白质精确分子量	127	一、基本原理	166
第二节 蛋白质的等电点测定	128	二、低温电镜三维重构解析步骤	167
一、等电聚焦电泳测定蛋白质等电点的 原理	128	第四节 蛋白质空间结构预测及建模	169
二、等电聚焦电泳测定蛋白质等电点的			

一、蛋白质二级结构预测	169	第四节 翻译后修饰蛋白质组研究	
二、蛋白质三级结构建模	169	技术	199
三、蛋白质复合体结构的分子对接	170	一、翻译后修饰蛋白质富集与分离	
第十三章 蛋白质相互作用研究技术	171	技术	199
第一节 酵母双杂交法	171	二、翻译后修饰蛋白质质谱鉴定技术	200
一、酵母双杂交系统的基本原理和用途	171	第五节 蛋白质组学数据分析工具	200
二、酵母双杂交的主要实验步骤	173	一、质谱数据鉴定、分析方法和工具	200
三、酵母双杂交系统中的常见问题与解决		二、蛋白质组数据功能注释与分析方法	203
方案	176	三、蛋白质组整合软件包	203
四、逆向双杂交系统和三杂交系统	177	第十五章 物质代谢与代谢组学研究相关	
第二节 标签融合蛋白结合实验	177	技术	205
一、标签融合蛋白结合实验基本步骤	177	第一节 代谢途径中的关键酶活性和代谢	
二、标签融合蛋白结合实验常见问题的		产物分析	205
解决与改进	178	一、葡萄糖代谢关键酶活性和代谢产物	
第三节 免疫共沉淀分析	179	分析	206
一、基本原理和主要步骤	179	二、脂肪代谢产物分析	209
二、几种特殊的免疫共沉淀技术	180	三、氨基酸代谢产物分析	210
三、免疫共沉淀的常见问题及解决办法	181	四、活性氧自由基和清除体系活性	
第四节 物理学方法研究蛋白质-蛋白质		分析	211
相互作用	182	第二节 代谢途径物流分析	211
一、荧光共振能量转移技术	182	一、葡萄糖摄取能力分析及其意义	212
二、共振光散射技术和表面等离子共振		二、细胞氧耗分析	212
技术	185	三、细胞内 pH 值分析	212
三、共定位荧光染色技术	187	四、ATP 含量分析	213
第五节 蛋白质-蛋白质相互作用预测		五、CO ₂ 含量分析	213
方法	189	六、线粒体代谢状态分析	213
第十四章 蛋白质组学研究相关技术	191	第三节 代谢组学研究	214
第一节 基于双向电泳-质谱的蛋白质组		一、代谢组学研究对象和应用领域	215
研究策略	191	二、代谢组研究方法	215
一、双向凝胶电泳	191	第十六章 基因表达谱分析	218
二、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱		第一节 基因表达谱分析的基本	
鉴定蛋白质	193	方法	218
第二节 基于多维层析-质谱的蛋白质组		一、基因芯片技术	219
研究策略	194	二、基因表达系列分析	219
一、蛋白质样品制备与酶解	194	三、用于表达谱分析的基因测序技术	220
二、肽混合物层析分离技术及进展	195	第二节 基因芯片的原理及应用	221
三、电喷雾串联质谱鉴定蛋白质	196	一、基因芯片的工作原理	221
第三节 定量蛋白质组学研究技术	196	二、基因芯片技术的基本流程	222
一、荧光双向差异凝胶电泳技术	197	三、基因芯片的应用	224
二、细胞培养氨基酸代谢稳定核素标记		第三节 基因芯片的数据挖掘	225
技术	197	一、生物信息学数据库	225
三、核素辅助多重化学标记技术	197	二、基因芯片数据挖掘的常用方法	226
四、无标记定量技术	198	第四节 蛋白质芯片的原理及应用	227
五、基于质谱和核素标记辅助的绝对定量		一、蛋白质芯片的原理和实验流程	228
技术	198	二、蛋白质芯片的分类及应用	228

第十七章 基因转录调控分析	230	一、SNP 分型	263
第一节 转录调节蛋白与 DNA 的结合 分析	230	二、STR 分型	265
一、凝胶迁移或电泳迁移率实验	230	三、CNV 分型	266
二、染色质免疫沉淀技术	233	第三节 突变基因的检测	267
第二节 启动子转录活性分析	235	一、以 PCR 为基础的检测方法	267
一、报告基因技术	235	二、以核酸杂交为基础的检测方法	268
二、核实时转录分析技术	238	第二十章 遗传修饰动物的设计和应用	270
三、cDNA 的 5' - 端快速扩增技术	239	第一节 小鼠实验的一般要求	270
四、基于 Gal4 的 DNA 结合蛋白分析 技术	240	一、小鼠实验室的建立	270
第三节 DNA 甲基化分析	240	二、小鼠的基本饲养条件	271
一、甲基化特异性 PCR	241	三、小鼠的日常管理	271
二、亚硫酸盐修饰后基因组测序	243	四、小鼠培育	272
三、DNA 甲基化检测的其他方法	244	第二节 转基因小鼠	272
第四节 芯片技术在基因表达调控 研究中的应用	244	一、转基因载体的构建	273
一、染色质免疫共沉淀 - 芯片技术	245	二、受精卵的显微注射和移植	274
二、染色质免疫共沉淀 - 序列分析技术	245	三、转基因小鼠的鉴定和进一步培育	276
三、染色质构象捕获技术	245	四、转基因小鼠的表型分析	277
第十八章 非编码 RNA 研究策略与方法	247	第三节 基因剔除小鼠	277
第一节 miRNA 的研究策略及相关 技术	247	一、基因剔除载体的设计和构建	278
一、miRNA 的发现与克隆	247	二、在 ES 细胞进行基因打靶	280
二、miRNA 定量检测方法及其选择	248	三、ES 细胞注射入囊胚和囊胚的移植	283
三、miRNA 靶基因的预测与证实	252	四、基因剔除小鼠的基因型和表型分析	283
四、miRNA 的功能研究	253	第二十一章 基因功能的研究策略	284
第二节 siRNA 的设计与应用	256	第一节 从分子水平研究基因产物的 功能特点	285
一、应用 siRNA 的目的与原理	256	一、网络数据可用于蛋白质功能的预测	285
二、siRNA 的设计与合成	257	二、细胞内定位为基因表达产物的功能 提供基本线索	285
三、siRNA 的体内外递送方式	257	三、基因表达的定性定量分析是基因功能 及其调控的重要数据	286
第三节 长链非编码 RNA 的研究策略及 相关技术	258	四、定点突变是蛋白质功能的重要证据	287
一、lncRNA 与蛋白质相互作用的研究 方法	258	五、相互作用分子是蛋白质功能的重要 提示	287
二、lncRNA 的生物信息学研究方法	260	第二节 从细胞水平研究基因产物的 作用机制	287
第十九章 疾病相关基因的鉴定和分析	261	一、表达和纯化蛋白质作为细胞调节的 刺激信号	287
第一节 鉴定和分析疾病相关基因的 策略	261	二、在细胞内过表达特定基因以研究其 功能	287
一、疾病相关基因鉴定的基本原则	261	三、通过降低基因的表达水平分析基因 表达产物在细胞中的作用	288
二、DNA 标记的概念	261	四、通过下游分子验证基因表达产物的 功能	289
三、连锁分析进行基因定位	262	第三节 从整体水平研究基因产物的 生物学效应	289
四、关联分析	262		
五、动物模型	263		
第二节 基因分型	263		