

前言

分子生物学是从分子水平对生物学进行研究的科学,自从现代分子生物学技术诞生以来,大大推进了生命科学的发展,分子生物学技术在生物学、医学、农林业、制药学等多个领域得到了广泛的应用。该技术是目前从事生命科学研究的重要手段,是每个从事这个领域的科技工作者都必须熟练掌握的基本技能。

编写本书的目的在于弥补以往的书籍中对实验结果分析的缺乏,本书强调对实验结果作具体的分析,如需附结果的图或照片,图中要有阴阳性对照等。结合照片分析研究结果,列举实验中经常遇到的问题及可能的解决方法是本书的特色。读者阅后在实验结果解读和改进实验方法等方面都能豁然开朗。此外,本书在编写的内容上也力求全面,第 1-6 章包括分子克隆所需的技术,从基因的提取、克隆到目的基因的表达;第 7-13 章分别介绍了包括报告基因分析、双向电泳、蛋白质与核酸/蛋白质的相互作用、细菌体内 DNA 同源重组、基因打靶和转基因动物等;最后三章则对于干细胞的分离培养与诱导分化技术、小 RNA、以及非编码 RNA 数据库及在线分析工具进行了介绍。我们尝试编写了主题索引,以技术方法和应用领域的关键点为主,置书后,读者可参考使用。本书适用于所有从事生命科学研究的科技工作者、教师和研究生。

本书大多由工作在第一线的青年科技工作者和博士研究生撰写,但由于时间仓促,加上编者水平有限,书中难免有疏漏和错误之处,恳请读者指正。

叶棋浓

军事医学科学院生物工程研究所

2015 年 月 日 于北京

目录

第一章 分子生物学技术概述

- 一、 引言
- 二、 目的基因的获取
- 三、 克隆载体的构建和选择
- 四、 载体的转化
- 五、 重组子的筛选
- 六、 基因表达
- 七、 生物工程技术的应用

第二章 核酸提取技术

第一节 质粒 DNA 的提取

- 一、 引言
- 二、 碱裂解法小量质粒提取所需的仪器、材料及基本步骤
- 三、 Promega 质粒小量提取试剂盒操作程序
- 四、 注意事项
- 五、 实验结果说明
- 六、 疑难解析

第二节 基因组 DNA 的提取

- 一、 引言
- 二、 从植物组织提取基因组 DNA
- 三、 从动物组织提取基因组 DNA

四、 细菌基因组 DNA 的制备

五、 用 DNA 提取试剂盒从全血和组织中提取基因组 DNA

六、 注意事项

七、 实验结果说明

八、 疑难解析

第三节 RNA 的提取

一、 引言

二、 实验设计思路和基本步骤

三、 实验结果说明

四、 疑难解析

第三章 目的基因的获取及鉴定技术

第一节 普通 PCR

一、 普通 PCR 的基本概念和原理

二、 普通 PCR 技术的实验方法

三、 疑难解析

第二节 Real-time PCR

一、 荧光定量 PCR 的基本概念和原理

二、 荧光定量 PCR 的定量方法

三、 荧光定量 PCR 的实验方法

四、 荧光定量 PCR 技术的应用

五、 疑难解析

第三节 环介导恒温法快速检测病原菌

- 一、 引言
- 二、 环介导恒温核酸扩增的原理
- 三、 实验设计思路和基本步骤
- 四、 实验结果
- 五、 疑难解析
- 六、 小结

第四章 载体的构建和鉴定

第一节 克隆载体

- 一、 pBR322 载体
- 二、 pUC8 一种 lac 选择型质粒
- 三、 pGEM 3Z—克隆 DNA 的体外转录
- 四、 柯斯质粒载体

第二节 表达载体

- 一、 原核表达载体
- 二、 真核表达载体

第三节 载体构建中的关键工具和步骤

- 一、 关键工具
- 二、 关键步骤

第四节 载体构建的应用举例

- 一、 实验材料
- 二、 实验方法

第五章 细菌转化与细胞转染技术

第一节 细菌转化

- 一、 基本原理
- 二、 实验设计思路和基本步骤
- 三、 实验结果及分析
- 四、 疑难问题解析

第二节 细胞转染

- 一、 基本原理
- 二、 实验设计和基本步骤
- 三、 实验结果及分析
- 四、 疑难问题解析

第六章 外源基因表达的鉴定

第一节 Northern blot

- 一、 引言
- 二、 实验设计思路和基本步骤
- 三、 实验结果说明
- 四、 疑难解析

第二节 RT-PCR

- 一、 引言
- 二、 实验设计思路和基本步骤
- 三、 实验结果说明

第三节 Western Blot

- 一、 引言

二、 实验设计思路和基本步骤

三、 实验结果说明

四、 疑难解析

第四节 ELISA

一、 引言

二、 实验设计思路和基本步骤

三、 实验结果说明

四、 疑难解析

第七章 报告基因分析

第一节 报告基因的定义和种类

一、 报告基因的定义

二、 常用的报告基因

第二节 应用报告基因分析基因的转录活性

一、 实验原理

二、 实验设计和基本步骤

三、 实验结果分析

四、 疑难解析

第三节 报告基因在动物活体成像中的应用

一、 实验原理

二、 实验设计和基本步骤

三、 实验结果分析

四、 疑难解析

第八章 差异基因表达谱分析

第一节 基于双向电泳技术的蛋白质组学分析

- 一、 引言
- 二、 实验基本步骤和注意事项
- 三、 双向电泳实验结果说明及疑难解析
- 四、 质谱数据分析说明及疑难解析
- 五、 结语

第二节 基因芯片

- 一、 引言
- 二、 工作原理

第三节 基因芯片的制备

- 一、 概述
- 二、 探针的选择和制备
- 三、 基因芯片基片的选择和制备
- 四、 基因芯片的制作

第四节 基因芯片的检测

- 一、 基因芯片的杂交和数据库获取
- 二、 基因芯片分析常用的软件和数据库

第五节 基因芯片的应用

- 一、 基因芯片与病原微生物检测
- 二、 基因芯片与肿瘤
- 三、 基因芯片与药物研发

第九章 蛋白质核酸相互作用技术

第一节 凝胶迁移实验（EMSA）

- 一、 引言
- 二、 实验设计与基本步骤
- 三、 实验举例与结果说明
- 四、 需要注意的问题

第二节 染色质免疫共沉淀技术（CHIP）

- 一、 引言
- 二、 实验基本步骤
- 三、 实验举例
- 四、 实验注意事项

第三节 RNA pull-down

- 一、 实验基本原理
- 二、 实验基本思路
- 三、 实验举例说明

第十章 蛋白质-蛋白质相互作用技术

第一节 运用酵母双杂交技术筛选与靶点相互作用的蛋白质

- 一、 引言
- 二、 实验设计及材料
- 三、 实验设计流程
- 四、 实验方法

五、 实验结果说明

六、 疑难解析

第二节 GST Pull-down

一、 实验基本原理

二、 实验基本步骤

三、 实验举例

四、 实验注意事项

第三节 免疫共沉淀

一、 引言

二、 实验设计和基本步骤

三、 实验结果举例

四、 需要注意的问题

第四节 Colocalization (细胞共定位)

一、 引言

二、 实验设计和基本步骤

三、 实验结果举例说明

四、 实验注意事项

第十一章 微生物体内同源重组技术

第一节 传统的大肠杆菌体内同源重组方法（RecA 重组系统）

一、 引言

二、 利用 RecA 重组系统构建痢疾杆菌 hns 基因插入突变体

三、 RecA 重组系统构建突变体的其它方法

四、 存在的问题和解决方法

第二节 Red/ET 重组系统

一、 引言

二、 痢疾杆菌 hns 基因缺失突变体的构建

三、 Red 同源重组技术应用策略

四、 Red/ET 重组系统的其它应用

五、 小结

第十二章 转基因动物技术

第一节 转基因动物概述

一、转基因动物概念

二、转基因动物的分类

三、转基因动物的命名

四、转基因动物的基本原理

五、转基因动物的安全性和伦理学问题

六、转基因动物的发展概况

第二节 显微注射法制备转基因动物

一、 仪器设备及材料

二、 实验动物准备

三、 转基因动物制备方法

四、 影响转基因动物效率的因素

第三节 利用 ES 细胞制备转基因动物

- 一、 ES 细胞的研究历史
- 二、 ES 细胞的生物学特性
- 三、 ES 细胞分离培养的基本方法
- 四、 ES 细胞的遗传修饰
- 五、 转基因制备

第十三章 基因打靶技术

- 一、基因打靶技术的原理
- 二、利用同源重组构建基因打靶动物模型的基本步骤
- 三、基因打靶的策略
- 四、基因打靶的生物意义和应用前景

第十四章 流式细胞术实验方法

- 一、 引言
- 二、 实验方法
- 三、 实验结果分析
- 四、 流式细胞分析的质量控制

第十五章 干细胞的分离培养与诱导分化

第一节 人胚胎来源间充质干细胞的分离培养与纯化

- 一、 引言

二、 材料、试剂与主要仪器设备

三、 实验方法

四、 实验结果

五、 注意事项

第二节 小鼠间充质干细胞的分离培养与纯化

一、 引言

二、 骨髓法

三、 密质骨法

第三节 人胚胎干细胞的培养

一、 引言

二、 实验材料

三、 实验方法

四、 注意事项

第四节 $CD34^+$ 造血干细胞与 $CD14^+$ 单核细胞向树突状细胞的诱导分化

一、 引言

二、 实验材料与方法

三、 实验结果

四、 注意事项

第十六章 小 RNA 的构建及实验技术

第一节 mi RNA 克隆

一、 材料与设备

二、 实验方法

三、 疑难解析

第二节 mi RNA Northern Blot

一、 材料与设备

二、 实验方法

三、 疑难解析

第三节 mi RNA 原位杂交

一、 材料与设备

二、 实验方法

三、 疑难解析

第四节 基于 poly(A) 加尾的 mi RNA RT-PCR

一、 材料与设备

二、 实验方法

三、 疑难分析

第五节 mi RNA 功能研究

一、 mi RNA 表达检测

二、 mi RNA 功能筛选鉴定

三、 mi RNA 靶基因鉴定

第六节 si RNA 的构造及实验研究

一、 引言

二、 如何进行 si RNA 试验

三、 常用 siRNA 实验的基本步骤

四、 实验结果说明

五、 疑难解析

第十七章 非编码 RNA 数据库及在线分析工具介绍

一、 综合性非编码 RNA 数据库

二、 mi RNA 相关数据库及预测

三、 r RNA 相关数据库及预测

四、 s RNA 相关数据库及预测

五、 si RNA 相关数据库及预测

六、 t RNA 相关数据库及预测

七、 sno RNA 相关数据库及预测