

<<分子诊断学实验指导>>

图书基本信息

书名：<<分子诊断学实验指导>>

13位ISBN编号：9787030346049

10位ISBN编号：7030346041

出版时间：2012-6

出版时间：科学出版社

作者：黄*祝

页数：97

字数：152500

版权说明：本站所提供下载的PDF图书仅提供预览和简介，请支持正版图书。

更多资源请访问：<http://www.tushu007.com>

<<分子诊断学实验指导>>

内容概要

本教材共四篇24个实验。

第一篇基本实验操作，介绍分子诊断学实验室的常规仪器设备、安全注意事项及基本实验操作技术；第二篇基础训练型实验，介绍分子诊断学基本实验技术，包括核酸的提取及鉴定、PCR技术、分子杂交技术、DNA测序技术。

第三篇综合提高型实验及第四篇研究应用型实验，着重对综合性、设计性、应用性实验以及适用于临床或有临床应用前景的分子诊断实验进行了介绍。

尤其介绍了最新的分子诊断临床项目，如EGFR基因突变的检测、PCR-单链构象多态性分析、BCR/ABL融合基因的检测和定量PCR的质量控制中检测灵敏度、准确度、特异度判断等。

每个检查项目让学生掌握技术原理、实验方法和标准操作规程，在此基础上，结合分子诊断临床应用的特点，让学生了解临床常用分子诊断检测项目的临床意义以及分子诊断室质量控制方法。

《分子诊断学实验指导》可供高等院校医学检验专业、卫生检验专业学生实验使用，也可供从事临床检验工作和医学研究的技术人员参考使用，并可用作临床医学、医学影像学、麻醉学、法医学、预防医学以及药学专业实验教学的参考用书。

<<分子诊断学实验指导>>

作者简介

黄韻祝、张吉才、黄山、杨红英

<<分子诊断学实验指导>>

书籍目录

第一篇 基本实验操作实验一 分子诊断学实验室的常规仪器设备及有关操作实验二 分子诊断学实验基本操作技术及安全注意事项第二篇 基础训练型实验实验三 基因组DNA的分离实验四 质粒DNA的提取与鉴定实验五 真核细胞RNA的制备实验六 核酸浓度及纯度鉴定实验七 质粒DNA的限制性核酸内切酶酶切分析实验八 聚合酶链反应实验九 人 α -肌动蛋白mRNA反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测实验十 探针的制备实验十一 荧光原位杂交实验十二 Western印迹分析法实验十三 DNA测序技术第三篇 综合提高型实验实验十四 ApoE基因多态性的检测实验十五 多重Gap-PCR进行 α -地中海贫血基因诊断实验十六 反向点杂交法进行 α -地中海贫血基因诊断实验十七 荧光定量PCR技术检测乙型肝炎病毒(HBV)核酸实验十八 荧光定量PCR技术检测HCV RNA实验十九 PCR-SSCP检测p53基因的突变实验二十 BCR/ABL融合基因核酸的定量检测实验二十一 EGFR基因突变的检测第四篇 研究应用型实验实验二十二 荧光定量PCR扩增检测仪的维护和光路校准实验二十三 PCR检验室内质控图的建立和应用实验二十四 荧光定量乙型肝炎病毒PCR试剂盒性能评价附录参考文献彩图

<<分子诊断学实验指导>>

章节摘录

第一篇 基本实验操作实验 一 分子诊断学实验室的常规仪器设备及有关操作 【实验目的】 掌握分子诊断学实验室常规仪器的功能和使用方法。

【实验器材】 温度控制系统、水净化装置、灭菌设备、计量设备、离心设备、电泳装置、超净工作台、PCR 仪等。

【实验内容】 (一) 温度控制系统 1. 冰箱 根据药品、试剂及多种生物制剂保存的需要, 必须具备不同控温级别的冰箱, 最常使用的有4℃、-20℃和-80℃冰箱。

4℃冰箱适用于储存某些溶液、试剂、药品等。

-20℃冰箱适用于某些试剂、药品、酶、血清、配好的抗生素和DNA、蛋白质样品等的保存。

-80℃冰箱适用于某些长期低温保存的样品、纯化的样品、特殊的低温处理消化液等的保存。

0~10℃的冷柜适用于低温条件下的电泳、层析、透析等实验。

2. 液氮罐 某些实验材料, 如细胞株、菌株、组织标本以及纯化的样品等要求速冻或长期低温保存, 应放置在更低温度的环境中, 液氮罐就是这样的冷冻保存装置, 它可达-196℃的低温。

液氮罐为双层结构, 中间为真空层, 在罐内盛放液氮。

其规格有多种, 如10L、15L、30L、35L、50L等, 可根据需要选用。

初次启用液氮罐时, 应缓慢加入液氮, 使容器内部温度均匀下降, 液氮温度低, 切勿溅到皮肤上, 以防冻伤。

冻存细胞时, 应逐步降温, 不能直接将待冻存的细胞放入液氮罐, 而应先经-20℃过夜, 再经-70℃过夜后转入液氮罐保存。

3. 培养箱 37℃恒温箱主要用于细菌的固体培养和细胞培养; CO₂培养箱适用于培养各种细胞; 利用37℃恒温空气摇床可以进行液体细菌的培养。

4. 水浴箱 水浴箱有不同类型, 可根据需要选用。

25~100℃水浴摇床可用于分子杂交、各种生物化学酶反应等实验的保温; 25~100℃水浴箱用于常规实验; 循环式或恒温水浴箱是可以制冷也可以加热的水浴箱, 主要用于DNA探针缺口标记、酶反应试验、电泳冷却循环用水等。

5. 烤箱 烤箱主要用于烘干实验器皿, 有些需要温度高些, 有些需要温度低些, 如涉及RNA实验的用具, 就需要在250℃烤箱中进行烘干, 而有些塑料用具只能在42~45℃的烤箱中进行烘干。

(二) 水净化装置 随着分子诊断学的飞速发展, 许多实验对水的纯度要求很高。

1. 蒸馏水器 它的工作原理是利用液体遇热气化遇冷液化的原理制备蒸馏水。

单蒸水常难以满足实验要求。

双蒸水、三蒸水可用于试剂配制, 许多实验要求采用去离子水。

多次蒸馏水可除去水中挥发性杂质, 不能完全除去水中溶解的气体杂质。

2. 离子交换器 用离子交换法制备的水称去离子水。

离子交换器去离子效果好, 但不能除去水中的非离子型杂质, 其中常含有微量的有机物(树脂等)。

3. 超纯水 用蒸馏水、离子交换水、反渗透纯水作为供水, 磁铁耦合齿轮泵作用使水循环制备而得。

用于PCR、氨基酸分析、DNA测序、酶反应、组织和细胞培养等。

(三) 灭菌设备 细菌和细胞培养及核酸等有关的实验, 所用的试剂、器皿及其他实验用具, 应严格灭菌, 有的实验还要求没有核酸酶的污染, 故应将实验器械、试剂等进行高压灭菌。

对于经过导入DNA重组分子的菌株, 操作后必须进行严格的高压灭菌处理。

常用的灭菌器械有: 蒸汽高压锅、干烤箱、过(超)滤器、紫外灯、酒精灯等。

此外, 消毒剂浸泡也是常用的灭菌方法。

(四) 计量设备 1. 液体体积度量系统 除各种量筒、移液管、容量瓶等液体容器外, 各种型号的微量加样器是分子诊断学实验中经常使用的液体量取器具。

2. 称量设备 最常用的称量工具是各种不同感量的天平和电子天平等, 它们适用于各种缓冲液的配制和标准物质的称量。

大于或等于0.1g的物质常用双托盘天平称量, 而0.1g以下物质应使用电子天平称量。

<<分子诊断学实验指导>>

3.pH 测量系统 pH 计：是测定溶液中 H^+ 浓度的仪器，主要通过一对电极，在不同的pH 溶液中产生不同的电动势用pH 表示出来。

pH 试纸：只适用于培养液、缓冲液或其他试剂溶液的pH 的粗略估计。

而大部分试剂的配制要求严格的pH，需精确度高（小数点后两位）的pH 计。

4.分光光度计 分光光度计是利用物质在可见光和紫外线区域中的吸收光谱来鉴定该物质的性质及其含量的一种仪器。

它是由光源、单色器、吸收池、接收器、测量仪表或显示屏幕所组成。

吸光度值是许多溶液中溶质定量的方便指标之一，通过所产生的单色光测定某一溶液对该单色光的吸收值，利用它可进行核酸溶液定量和纯度的初步判断。

主要有可见分光光度计、紫外/可见分光光度计等。

（五）离心设备 在分子诊断学实验过程中，离心技术是最常用的技术之一。

主要利用离心机转头转动时产生的强大离心力场对物质进行沉淀、分离、纯化、浓缩等处理。

离心机按其转速分为低速（普通）离心机、高速离心机和超速离心机三种类型。

通过这些离心机的使用，可以完成分子诊断学研究中分离、提纯、鉴定、生物大分子分析等重要的研究工作。

1.普通离心机 普通离心机最大转速为6000r/min，最大离心力为6000g。

（1）医用或台式离心机：是离心机中最简单且廉价的，最常用于压紧或收集小量快速沉降的物质，如红细胞、粗大的沉淀物、酵母菌和细菌等。

（2）低速冷冻离心机：主要用于细胞、细胞核、细胞膜、细菌的沉淀和收集等。

2.高速离心机 高速离心机最大转速为25 000r/min，最大离心力为89 000 g。

多用于制备、收集微生物、细胞碎片、细胞、大的细胞器、硫酸铵沉淀物以及免疫沉淀物等。

台式高速冷冻离心机（3K15）由德国SIGMA 公司生产，最大离心力可达23031g，最大容量可达4 × 200ml，用于混合样品中目标组分的分离与鉴定。

其操作程序如下：（1）开盖并安装转子。

（2）打开电源，设置转子、转速、时间、温度等参数。

1）按“Deckel Lid Couvercle”键开仓门，把所需的转子放入仓内，卡入螺钉，用扳拧紧，加转子盖。

2）按转速面板中功能选择键，选到“Rotor”后再按“Edit”键，此时转速面板显示窗中数字闪动，通过“”或“”键将显示窗中的数字设为与转子编号一致，按“Enter”键确定。

3）按转速面板中功能选择键，选到“Drehzahl Speed Vitesse”后再按“Edit”键，此时转速面板显示窗中数字闪动，通过“”、“”、“”或“”键设置所需转速（不同的转子有不同的最高转速，请注意设置），按“Enter”键确定。

4）按温度和时间面板中功能选择键，选到“Zeit Time Minuterie”后再按“Edit”键，此时温度和时间面板显示窗中数字闪动，通过“”、“”、“”或“”键设置所需时间，按“Enter”键确定。

5）按温度和时间面板中功能选择键，选到“Temperatur”后再按“Edit”键，此时温度和时间面板显示窗中数字闪动，通过“”、“”、“”或“”键设置所需温度，按“Enter”键确定。

6）转速、时间、温度等参数都设置好后关仓门，预冷离心机到所需温度。

7）程序面板“Programm”中的程序已经设置好，不需要进行设置，请不要随便更改。

（3）严格平衡离心样品管，开仓放样品管，拧紧转子盖，关仓门，按“Start”键开机工作。

如果平衡警告灯“Unwucht Imbalance Balourd”亮起，提示离心样品管没有达到平衡，必须重新配平。

按“Deckel Lid Couvercle”键开仓门取出离心样品管重新配平，配平后重新开始离心。

（4）离心结束，按“Deckel Lid Couvercle”键开仓门取出离心样品管，关电源擦拭离心机内仓和转子。

将离心机仓门打开，不要扣上，让离心机内仓的冷凝水蒸发干，以免发生离心机运转时电源短路烧坏机心。

（5）使用注意事项 1）严格平衡样品。

<<分子诊断学实验指导>>

- 2) 每次使用离心机前,都要将离心机内仓里的水擦干,避免水下漏发生电源短路烧坏机心。
- 3) 必须预冷离心机到所需的温度,才能开始运行仪器。
- 4) 每次离心时必须把转子盖旋紧盖好。

离心过程中如果发生异常响声,按“ Stop ”键停止,报告实验室老师。

- 5) 离心结束,关闭电源,打开仓门,擦拭离心机内仓和转子。
- 6) 严禁样品洒落弄脏离心机内仓,以免仪器发生意外事故。

3.超速离心机最大转速90 000r/min,最大离心力694 000 g。

(六) 电泳装置 电泳技术是检测、鉴定各种生物大分子的纯度、含量及描述它们的特征,甚至还是分离、纯化、回收和浓缩样品的工具之一。

电泳装置由电泳仪和电泳槽两部分组成。

1.电泳仪 它是作为电泳时的外加电源设备,将220V 交流电整流后通过稳压器,它既能输出稳定的电流,又能输出稳定的电压,起到在被分离样品两端加外接电场的作用。

常压电泳仪:一般为输出0~500V和0~150mA 的电源装置。

中压电泳仪:一般为输出400~1000V 的电源装置。

高压电泳仪:一般为输出1000V 以上的电源装置。

2.电泳槽装置 (1) 水平式电泳槽:可用于乙酸纤维薄膜电泳、琼脂糖凝胶电泳等。

琼脂糖水平电泳是分离、鉴定和纯化DNA 片段的标准方法。

采用低浓度的荧光嵌入染料溴化乙锭进行染色,可以确定DNA 在凝胶中的位置,用琼脂糖凝胶电泳可以分离200bp~50kb的DNA。

(2) 垂直式电泳槽:分为垂直平板电泳槽和圆柱形电泳槽装置。

垂直平板电泳槽也是分离、鉴定、纯化DNA 片段的标准方法。

一般用聚丙烯酰胺凝胶作为分离载体,其分辨率较琼脂糖凝胶电泳高,相差仅1 bp 的DNA 都可分开。它的加样量大,从聚丙烯酰胺凝胶中回收的DNA 样品纯度很高。

常用的聚丙烯酰胺凝胶有两种:一种是用于分离、纯化双链DNA 片段的非变性聚丙烯酰胺凝胶;另一种是用于分离、纯化单链DNA 片段的变性聚丙烯酰胺凝胶。

变性聚丙烯酰胺凝胶需加入尿素或甲醛等变性剂,主要用于放射性DNA 探针的分离、S1 核酸酶消化产物的分析及DNA 的测序。

(七) 超净工作台 超净工作台是细胞培养及无菌实验操作工作中最重要的设备之一,在分子诊断学实验室中细菌增殖、质粒的纯化等都需要在超净工作台进行。

工作原理即内设鼓风机驱动空气通过高效的过滤装置而得到净化,净化后的空气通过工作台面形成无菌环境。

根据滤器中滤垫的微孔径和密度的不同,除滤过细菌等微生物外,对病毒的通过也有一定的阻挡作用。

超净工作台根据净化气流的流动方式分为侧流式、直流式、外流式等几种类型。

(八) PCR 仪 PCR 仪也称DNA 热循环仪、基因扩增仪。

它使一对寡核苷酸引物结合到正、负DNA 链上的靶序列两侧,从而酶促合成拷贝数为百万倍的靶序列DNA 片段,它的每一循环包括在三种不同温度进行DNA 变性、引物复性、DNA 聚合酶催化的延伸反应三个过程。

Eppendorf PCR 5331 仪操作规程:(1) 打开仪器后面电源开关。

(2) 进入主菜单后进行程序编写。

(3) 选择“ FILES ”后按“ ENTER ”键进行程序编辑。

(4) 选择“ EDIT ”,按“ ENTER ”键,进行所使用程序的编写。

(5) 程序编写完后,选择“ EXIT ”,按“ ENTER ”键,这时屏幕出现是否保存,选择YES,就可以保存程序,设定好的程序名可任选,按“ OPTION ”键进行程序的命名。

如果不需要保存,则按“ OPTION ”键,选择“ NO ”,则程序没有被保存。

(6) 在进行程序编写时,如果默认的程序不够时,可以按“ INSERTION ”键进行程序的增加,如果默认的程序多时,选择“ DELETION ”删除。

<<分子诊断学实验指导>>

(7) 程序编写完后, 回到主菜单选择“START”, 按“ENTER”键, 则进行程序的运行。

(8) 在程序进行运行的过程中, 可以查看程序运行完毕的时间。

选择“OPTION”键就可以查看。

(9) 如果“PCR”仪器内所能容纳的程序满后, 可以将一部分不用的程序删除。

则可选择“FILES”, 进入“LOAD”, 选择需要删除的程序名, 然后选择DELETION键删除不需要的程序。

(10) 如需要在原来编号的程序上修改运行程序, 则选择“FILES”, 进入“LOAD”, 进行程序的修改, 修改完毕后再需要保存。

(11) 当程序运行完毕时, 选择“STOP”, 按“ENTER”键确认, 回到主菜单, 即可关闭电源, 取出样品。

(九) 紫外分析仪及凝胶成像分析系统 本系统用于对电泳后含溴化乙锭(EB)的核酸样品进行观察及结果记录。

电泳后的DNA肉眼是观察不到的, 它必须与溴化乙锭(EB)结合, 在紫外灯的照射下产生荧光来进行观察。

一般采用由紫外灯发射的300~360nm波长的紫外线, 用于核酸分析的紫外分析仪常采用254nm、300nm、365nm等几个波长, 在此波长范围内, DNA与EB结合物对紫外光吸收较强, 从而诱导产生590nm波长的橙红色荧光。

产生荧光的强度及样本带的大小与DNA量相关, 其迁移率与DNA分子的大小相关, 也可根据样本带的形状判断其纯度。

近年来许多厂家都推出了先进的凝胶成像系统, 由于它具有强大的图像采集、软件分析能力, 可以对DNA、RNA、蛋白质电泳凝胶以及各类杂交, 放射自显影结果进行拍摄、处理、分析和保存。由于可以在计算机上进行分析处理, 其应用越来越广泛。

(十) 其他设备 1.微波炉 微波炉用于一些溶液的快速加热与定温加热, 如对配制的电泳琼脂糖凝胶液进行融化。

2.真空加热干燥箱 广泛应用于核酸在硝酸纤维素膜和尼龙膜上的固定, 用于Southern、Northern等杂交实验。

3.电泳凝胶干燥器 这是将电泳后的凝胶进行脱水干燥的仪器, 一般可将凝胶干燥到一张玻璃纸上, 干燥后的凝胶易于保存。

4.印迹系统、DNA合成/测序仪这些都是对核酸进行深入研究的必备仪器。

【思考题】(1) 分子诊断学实验室的常规仪器设备有哪几大类?

简要说明。

(2) 蒸馏水与去离子水的区别?

PCR技术需要哪种纯度的水?

(方文)

<<分子诊断学实验指导>>

编辑推荐

《全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材:分子诊断学实验指导》可供高等院校医学检验专业、卫生检验专业学生实验使用,也可供从事临床检验工作和医学研究的技术人员参考使用,并可用作临床医学、医学影像学、麻醉学、法医学、预防医学以及药学专业实验教学的参考用书。

<<分子诊断学实验指导>>

版权说明

本站所提供下载的PDF图书仅提供预览和简介，请支持正版图书。

更多资源请访问:<http://www.tushu007.com>