

大学化学实验丛书

创新研究实验

I 化学生物学实验

王骊丽 主编
杨科武 主审



科学出版社

大学化学实验丛书

创新研究实验 I

(化学生物学实验)

王骊丽 主编

杨科武 主审

国家基础科学人才培养基金(J0830417, J1103311)

国家级化学特色专业

国家级无机化学与分析化学教学团队

陕西省人才培养模式创新实验区项目

陕西省化学专业实验课教学团队

西北大学“211”基础实验室建设项目

西北大学质量工程项目



资助出版

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书共三部分,第一部分编写了7个化学生物学创新实验,可以拓展为化学生物学领域的一些研究课题,第二和第三部分共编写了24个不同层次的化学生物学基础操作实验和化学生物学综合实验,以扩展化学专业学生在本科阶段的学习范围。本书主要涉及化学、生物化学、分子生物学、基因工程、微生物学、化工医药方面的知识实践。

本书可作为高等学校化学、化工、药学、生物和医学相关专业本科生、研究生的实验教材,也可作为相关领域研究工作者的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

创新研究实验. 1, 化学生物学实验/王骊丽主编. —北京: 科学出版社, 2015. 6

(大学化学实验丛书)

ISBN 978-7-03-044977-1

I. ①创… II. ①王… III. ①化学实验-高等学校-教材②生物化学-实验-高等学校-教材 IV. ①O6-3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 130129 号

责任编辑:陈雅娴 / 责任校对:刘亚琦
责任印制:徐晓晨 / 封面设计:华路天然工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015 年 6 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2015 年 6 月第一次印刷 印张: 11 1/2

字数: 280 000

POD 定价: 38.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

《大学化学实验丛书》

编写委员会

主 编 申烨华

编 委(按姓名汉语拼音排序)

白 泉	陈六平	陈三平	崔 斌	董 林
高胜利	黄 怡	雷根虎	李剑利	李 珺
刘 斌	申烨华	宋俊峰	孙尔康	王俊儒
王骊丽	王尧宇	卫引茂	魏 青	阎宏涛
杨秉勤	杨科武	岳可芬		

《创新研究实验 I (化学生物学实验)》

编写委员会

主 编 王骊丽

主 审 杨科武

编 委(按姓名汉语拼音排序)

白 泉	高 栋	宫永宽	郭 媛	和 媛
李建军	李剑利	史素青	田 磊	王超展
王进义	王骊丽	张荣兰	赵景婵	

《大学化学实验丛书》编写说明

2006年西北大学化学实验教学中心被评为国家级实验教学示范中心。以此为契机,学院深化教学改革,进一步明确化学本科人才培养的目标,即培养具有扎实的化学基础和一定的生命科学与材料科学知识背景,实验技能强、综合素质高,受到系统科研训练、具有自主学习能力、实践能力、探索精神、创新能力和合作精神的高素质本科生,以强化实践教学为原则,育人为本、加强基础、注重交叉、突出创新、提高素质、体现特色。以此为指导,构建了“三层面、双系统、多途径实验课程新体系”。所谓三层面是指:第一层面,基础化学实验,包括基础化学实验Ⅰ(无机化学与化学分析实验)、基础化学实验Ⅱ(有机化学实验)、基础化学实验Ⅲ(物理化学实验)、基础化学实验Ⅳ(仪器分析实验),主要训练学生单元操作的能力,对基本技能进行训练;第二层面,综合化学实验平台,主要训练学生连接单元操作、设计实验、分析未知物等能力,对研究方法和思维能力进行训练;第三层面,创新研究实验平台,包括创新研究实验Ⅰ(化学生物学实验)和创新研究实验Ⅱ(材料化学实验),开设生命科学和材料科学等领域代表化学学科发展方向的实验,使学生对学科的发展方向和科研工作的一般规律有所认识,拓展科研思路,培养其科学素养和从事科研工作的能力。

《大学化学实验丛书》是西北大学化学国家级实验教学示范中心建设的重要成果。丛书由7本实验教材和2本手册组成,分别为《基础化学实验Ⅰ(无机化学与化学分析实验)》、《基础化学实验Ⅱ(有机化学实验)》、《基础化学实验Ⅲ(物理化学实验)》、《基础化学实验Ⅳ(仪器分析实验)》、《综合化学实验》、《创新研究实验Ⅰ(化学生物学实验)》、《创新研究实验Ⅱ(材料化学实验)》、《化学实验基本技能手册》和《常用分析仪器使用手册》。实验教材在内容上包括基础实验、综合实验和设计实验等。在三个不同层次的实验中,综合设计型实验的要求是:第一层次基础实验中,侧重于兴趣的提高和实验的延伸,为综合实验奠定基础;第二层次综合实验中,侧重于二级学科的融合和单元操作的衔接;第三层次创新研究实验中,注重学科前沿和科学研究能力的培养。《化学实验基本技能手册》注重基础能力的培养,《常用分析仪器使用手册》注重开拓学生研究视野,培养创新意识和实际操作能力。

《大学化学实验丛书》由西北大学组织,南京大学、中山大学、西北农林科技大学、西安交通大学、第四军医大学、陕西省进出口检验检疫局、西安近代化学研究所、咸阳师范学院、陕西省环境监测中心站等联合编写,适合于各层次理工科专业的化学实验教学。

本套《大学化学实验丛书》受到国家基础科学人才培养基金(J0830417, J1103311)、国家级化学特色专业、国家级无机化学与分析化学教学团队、陕西省人才培养模式创新实验区项目、陕西省化学专业实验课教学团队、西北大学“211”基础实验室建设项目、西北大学质量工程项

目等项目资助。

由于编者的水平和经验有限,书中难免有疏漏和不妥之处,敬请读者批评指正。

《大学化学实验丛书》编写委员会

2011 年 6 月

前 言

化学生物学是 20 世纪 90 年代后期发展起来的化学与生物学交叉的前沿学科。化学生物学运用化学的理论、方法、手段、思路或研究策略,了解、研究和解决生物学中的问题,并由此推进生命科学的研究和发展。就其研究对象而言,化学生物学与生物化学的重要区别之一在于,化学生物学是在分子水平上研究,包括体外外源性小分子(如药物分子)与生物大分子的作用,对生物大分子的调控乃至改变生物分子的功能等。化学生物学是一门综合性交叉学科,其内容涉及化学与生物学的各个学科,如生物有机化学、生物无机化学、药物化学、生物化学、分子生物学、细胞生物学、生物物理表征及计算化学等学科。

在化学生物学这一新兴学科诞生以来的十余年间,国际上一些一流大学及研究部门纷纷展开了化学生物学领域的研究,相应的学术期刊如 *ACS Chemical Biology*、*Nature Chemical Biology* 及 *BMC Chemical Biology* 等已于近年相继创刊。为顺应这一学科发展,国内一些综合性大学已开设专业研究,讲授生物学课程,组织国内会议。目前,除了几本外文版化学生物学教材之外,国内编写的化学生物学教材为数不多,而化学生物学实验教材屈指可数。本书是一本国内编写的化学生物学实验教材。

基于不同层次,本书除了化学生物学创新实验部分外,还增加了化学生物学基础操作实验和化学生物学综合实验。创新实验部分旨在培养学生的创造能力和训练创造性思维,学生可以通过关键词查阅文献,了解知识背景,进行多环节的知识梳理,实现从科学思维到实验台的转变,再进一步经实验延伸的引导,进行更高层次知识探索。基础操作实验部分旨在使化学专业的学生了解、熟悉和掌握生物化学、分子生物学、药学及微生物学等学科的基础知识、常用的实验技术。综合实验部分旨在培养学生的综合能力,即由书本到实践,通过由浅至深的实验内容,奠定化学学科与其他学科交叉过程中的一些知识衔接。本书第一部分共精选了 7 个代表性创新实验,第二部分编写了 10 个化学生物学基础操作实验,第三部分共 14 个综合实验,其中大多数实验是来自所有编者实验室的成熟工作,而部分实验出自编者目前从事的科研项目,实验内容新颖,体现了最新的国内外研究现状。本书的特色是操作性强,与研究工作紧密结合,贯穿了一条从技能学习到动手实践再到研究思维启迪的主线。

本书的编写分工为第一部分创新实验:王骊丽、白泉、李剑利、张荣兰、赵景婵、宫永宽;第二部分基础实验:王骊丽、田磊、李建军、高栋、和媛;第三部分综合实验:王骊丽、王超展、王进义、高栋、史素青、郭媛、和媛。全书由王骊丽统稿,杨科武教授主审。感谢西北农林科技大学王俊儒教授和王进义教授在编写过程中提出宝贵建议。

如上所述,化学生物学是一门综合性交叉学科,涵盖内容广泛,一本实验教材无法将其内容全部纳入,希望化学生物学学者和读者提出宝贵意见和建议,使本书的内容得以进一步提高和完善。

编 者

2013 年 6 月于西安

目 录

《大学化学实验丛书》编写说明

前言

第一部分 创新实验	1
创新实验 1 人工金属核酸酶——邻菲罗啉铜配合物的合成及其与 DNA 作用	1
一、知识背景	1
二、实验目的	4
三、实验原理	5
四、仪器与材料	9
五、实验方法与步骤	10
六、数据处理	11
七、结果与讨论	11
八、注意事项	12
九、思考题	12
十、实验延伸	12
十一、参考文献	13
创新实验 2 金属 β 内酰胺酶 L1 的表达及动力学表征	13
一、知识背景	13
二、实验目的	15
三、实验原理	15
四、仪器与材料	18
五、实验方法与步骤	19
六、数据处理	21
七、结果与讨论	21
八、注意事项	22
九、思考题	22
十、实验延伸	23
十一、参考文献	23
创新实验 3 大肠杆菌表达重组人粒细胞-集落刺激因子包涵体的 PFLC 复性与纯化	25
一、知识背景	25
二、实验目的	28
三、实验原理	28
四、仪器与材料	30
五、实验方法与步骤	30
六、数据处理	32

七、结果与讨论	32
八、注意事项	33
九、思考题	33
十、实验延伸	33
十一、参考文献	34
创新实验 4 多维色谱与 MALDI-TOF-MS 联用技术对人血清中低丰度蛋白的 分离与鉴定	34
一、知识背景	34
二、实验目的	38
三、实验原理	38
四、仪器与材料	40
五、实验方法与步骤	40
六、数据处理	41
七、结果与讨论	41
八、注意事项	41
九、思考题	42
十、实验延伸	42
十一、参考文献	42
创新实验 5 罗丹明基“OFF-ON”型荧光探针对金属离子的识别特性及其生物学 应用	43
一、知识背景	43
二、实验目的	45
三、实验原理	46
四、仪器与材料	48
五、实验方法与步骤	49
六、数据处理	50
七、结果与讨论	50
八、注意事项	51
九、思考题	51
十、实验延伸	51
十一、参考文献	51
创新实验 6 表面等离子共振技术测定叶酸与叶酸受体蛋白结合常数	52
一、知识背景	52
二、实验目的	53
三、实验原理	54
四、仪器与材料	55
五、实验方法与步骤	56
六、数据处理	58
七、结果与讨论	58
八、注意事项	58

九、思考题	58
十、实验延伸	59
十一、参考文献	59
创新实验 7 生物细胞膜的分离及其重要成分的分析	64
一、知识背景	64
二、实验目的	66
三、实验原理	67
四、仪器与材料	69
五、实验方法与步骤	70
六、数据处理	73
七、结果与讨论	73
八、注意事项	74
九、实验延伸	74
十、思考题	74
十一、参考文献	74
第二部分 化学生物学基础操作实验	75
基础操作实验 1 加样器的正确使用和校正	75
一、实验目的	75
二、实验原理	75
三、仪器与试剂	75
四、实验方法与步骤	75
基础操作实验 2 无菌操作的消毒灭菌与培养	76
一、实验目的	76
二、实验原理	77
三、仪器与材料	77
四、实验方法与步骤	78
五、结果与讨论	78
六、注意事项	78
七、思考题	78
基础操作实验 3 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA	79
一、实验目的	79
二、实验原理	79
三、仪器与试剂	81
四、实验方法与步骤	81
五、结果与讨论	81
六、注意事项	81
七、思考题	82
基础操作实验 4 大肠杆菌感受态细胞制备与质粒 DNA 的转化	82
一、实验目的	82
二、实验原理	82

三、仪器与材料	83
四、实验方法与步骤	83
五、结果与讨论	84
六、注意事项	84
七、思考题	84
基础操作实验 5 核酸的分离及其定量分析	84
一、实验目的	84
二、实验原理	85
三、仪器与材料	86
四、实验方法与步骤	87
五、结果与讨论	87
六、注意事项	88
七、思考题	88
基础操作实验 6 Bradford 法测定蛋白质含量	88
一、实验目的	88
二、实验原理	88
三、仪器与材料	89
四、实验方法与步骤	89
五、结果与讨论	90
六、注意事项	90
七、思考题	90
基础操作实验 7 高效液相色谱柱的装填与测试	91
一、实验目的	91
二、实验原理	91
三、仪器与材料	91
四、实验方法与步骤	92
五、结果与讨论	92
六、注意事项	92
七、思考题	92
基础操作实验 8 高效反相液相色谱过程热力学函数的测定	93
一、实验目的	93
二、实验原理	93
三、仪器与材料	94
四、实验方法与步骤	94
五、结果与讨论	94
六、注意事项	95
七、思考题	95
基础操作实验 9 体积排阻色谱法分离标准蛋白	95
一、实验目的	95
二、实验原理	96

三、仪器与材料	96
四、实验方法与步骤	97
五、结果与讨论	97
六、注意事项	97
七、思考题	97
基础操作实验 10 MTT 法检测秋水仙碱的细胞毒性	98
一、实验目的	98
二、实验原理	98
三、仪器与材料	99
四、实验方法与步骤	99
五、结果与讨论	100
六、注意事项	100
七、思考题	100
第三部分 化学生物学综合实验	101
综合实验 1 质粒 DNA 微量制备与鉴定	101
一、实验目的	101
二、实验原理	101
三、仪器与材料	103
四、实验方法与步骤	104
五、结果与讨论	105
六、注意事项	105
七、思考题	105
综合实验 2 外源基因体外扩增、质粒构建及其分析	105
一、实验目的	105
二、实验原理	105
三、仪器与材料	107
四、实验方法与步骤	108
五、结果与讨论	109
六、注意事项	109
七、思考题	110
综合实验 3 SDS-PAGE 及其蛋白质相对分子质量测定	110
一、实验目的	110
二、实验原理	110
三、仪器与材料	113
四、实验方法与步骤	114
五、结果与讨论	116
六、注意事项	116
七、思考题	116
综合实验 4 蛋白质的变性、凝固及其沉淀反应	117
一、实验目的	117

二、实验原理	117
三、仪器与材料	119
四、实验方法与步骤	120
五、结果与讨论	120
六、注意事项	121
七、思考题	121
综合实验 5 钙调蛋白的分离纯化	121
一、实验目的	121
二、实验原理	121
三、仪器与材料	122
四、实验方法与步骤	123
五、结果与讨论	123
六、注意事项	124
七、思考题	124
综合实验 6 一种天然无序蛋白质的表达、纯化及其构象变化	124
一、实验目的	124
二、实验原理	125
三、仪器与材料	126
四、实验方法与步骤	127
五、结果与讨论	127
六、注意事项	128
七、思考题	128
综合实验 7 弱阳离子交换蛋白折叠液相色谱法复性还原变性溶菌酶	128
一、实验目的	128
二、实验原理	129
三、仪器与材料	131
四、实验方法与步骤	131
五、结果与讨论	132
六、注意事项	132
七、思考题	132
综合实验 8 基于神经氨酸酶受体的分子对接	133
一、实验目的	133
二、实验原理	133
三、实验软件程序	134
四、实验方法与步骤	134
五、结果与讨论	135
六、思考题	135
综合实验 9 纳豆激酶及蚓激酶催化纤维蛋白降解反应的动力学	135
一、实验目的	135
二、实验原理	136

三、仪器与材料	136
四、实验方法与步骤	136
五、结果与讨论	136
六、注意事项	137
七、思考题	137
综合实验 10 功能切换型的防生物污染的表/界面构建	137
一、实验目的	137
二、实验原理	138
三、仪器与材料	138
四、实验方法与步骤	139
五、结果与讨论	140
六、注意事项	140
七、思考题	140
综合实验 11 药物作用后肿瘤细胞膜超微结构的原子力显微镜法	141
一、实验目的	141
二、实验原理	141
三、仪器与材料	142
四、实验方法与步骤	142
五、结果与讨论	142
六、注意事项	143
七、思考题	143
综合实验 12 荧光素类焦磷酸根离子荧光探针的制备及荧光性质	143
一、实验目的	143
二、实验原理	143
三、仪器与材料	144
四、实验方法与步骤	144
五、结果与讨论	145
六、注意事项	145
七、思考题	145
综合实验 13 2,7-二氯荧光素的合成	145
一、实验目的	145
二、实验原理	145
三、仪器与材料	146
四、实验方法与步骤	146
五、结果与讨论	147
六、注意事项	147
七、思考题	147
综合实验 14 新型香豆素类荧光探针的合成与性能	147
一、实验目的	147
二、实验原理	148

三、仪器与材料	148
四、实验方法与步骤	148
五、结果与讨论	149
六、思考题	149
附录	150
附录一 化学生物学实验须知	150
附录二 实验记录及实验报告的书写	152
附录三 常用器皿的洗涤与处理	153
附录四 缩写、符号、换算系数和数据	155
附录五 重要分子的物理常数及性质	160

第一部分 创新实验

创新实验 1 人工金属核酸酶——邻菲罗啉铜配合物的合成 及其与 DNA 作用

Experiment 1 Artificial metallonuclease—copper complex with
1,10-phenanthroline: synthesis and initial DNA interaction

关键词

人工金属核酸酶(artificial metallonuclease), DNA 相互作用(DNA interaction)

一、知识背景

1. 人工金属核酸酶

过渡金属离子配合物在识别核酸结构和核酸断裂方面具有独特的性质,因此被广泛地应用于核酸酶的研究中,称为人工金属核酸酶。

自 1993 年 Sigman 发现第一个金属核酸酶——邻菲罗啉铜配合物与天然核酸酶具有相同或类似的生物活性以来,人们合成出了大量的金属核酸酶并对其性能进行了深入的研究。人工金属核酸酶与限制性内切核酸酶相比,既具有高度专一性,又能在人们预先设计的任何位点断裂 DNA,而且克服了传统的限制性内切核酸酶识别位点仅为 4~8 个核苷酸的限制,可用于肿瘤基因治疗与新的化学疗法等临床医学领域。由于金属核酸酶能插入和识别核酸的一些特定结构,可以在光照等条件下使其特定部位断裂或通过电子传递使 DNA 的损伤得以修复,因此极有希望从人工金属核酸酶中遴选出一些与基因有关的疾病的“诊断试剂”和化学治疗药物。

金属核酸酶的识别作用已有很多成功的例子。1997 年, Barton 的研究小组利用铈配合物对大沟的嵌入使得偶联锌的小肽金属配合物实现了短链 DNA 的水解切割,并可能用于模拟限制性内切核酸酶的性质。也有研究发现,配合物 $[\text{Co}(\text{tfa})_2(\text{happ})]^{2+}$ ($\text{tfa} = \text{trifluoroacetate}$, $\text{happ} = [1, 3, 5, 8, 10, 12]\text{hexaazacylotetradecane}$) 可以作为 DNA 外凸(bulge)位点的结构探针。经过 H_2O_2 的激活,该金属配合物可以断裂 DNA, DNA 的断裂点正好在 DNA 的外凸处,从而使之成为 DNA 外凸位点的结构探针。Burrows 等发现平面结构的大环 $\text{Ni}(\text{II})$ 配合物与 DNA 中鸟嘌呤的 N7 原子发生配位作用,而对其他碱基则呈现反应惰性。大环 $\text{Ni}(\text{II})$ 配合物成为该类 DNA 的其他区域中碱基错配、外凸、成环及末端鸟嘌呤可靠的鉴定试剂。由此也开辟了大环 $\text{Ni}(\text{II})$ 配合物作为 DNA 分子中鸟嘌呤结构探针新的研究领域。国内的计亮年研究组对多吡啶钌配合物的核酸序列识别及拓扑异构酶抑制进行研究,得到了高效的拓扑异构酶

抑制剂。郭子建研究组对用多核铜的配合物对 DNA 进行切割的协同效应进行了研究,但切割的原因和机理尚不清楚。此外,杨频研究组用分子力学方法模拟了 Δ, Δ -[Ru(phen)₂dppz]²⁺ (dppz=dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine) 对含 G:T 错配的环丁烷嘧啶二聚体(cyclobutane pyrimidine dimer, CPD)双螺旋 DNA 的识别作用。模拟结果显示,这种金属配合物的 Δ 异构体优先从小沟方向识别与 G:T 错配相邻的区域,而 Δ 异构体则优先从大沟方向识别与 G:T 错配相邻的另一区域。以上涉及的金属核酸酶结构式如图 1-1 所示。

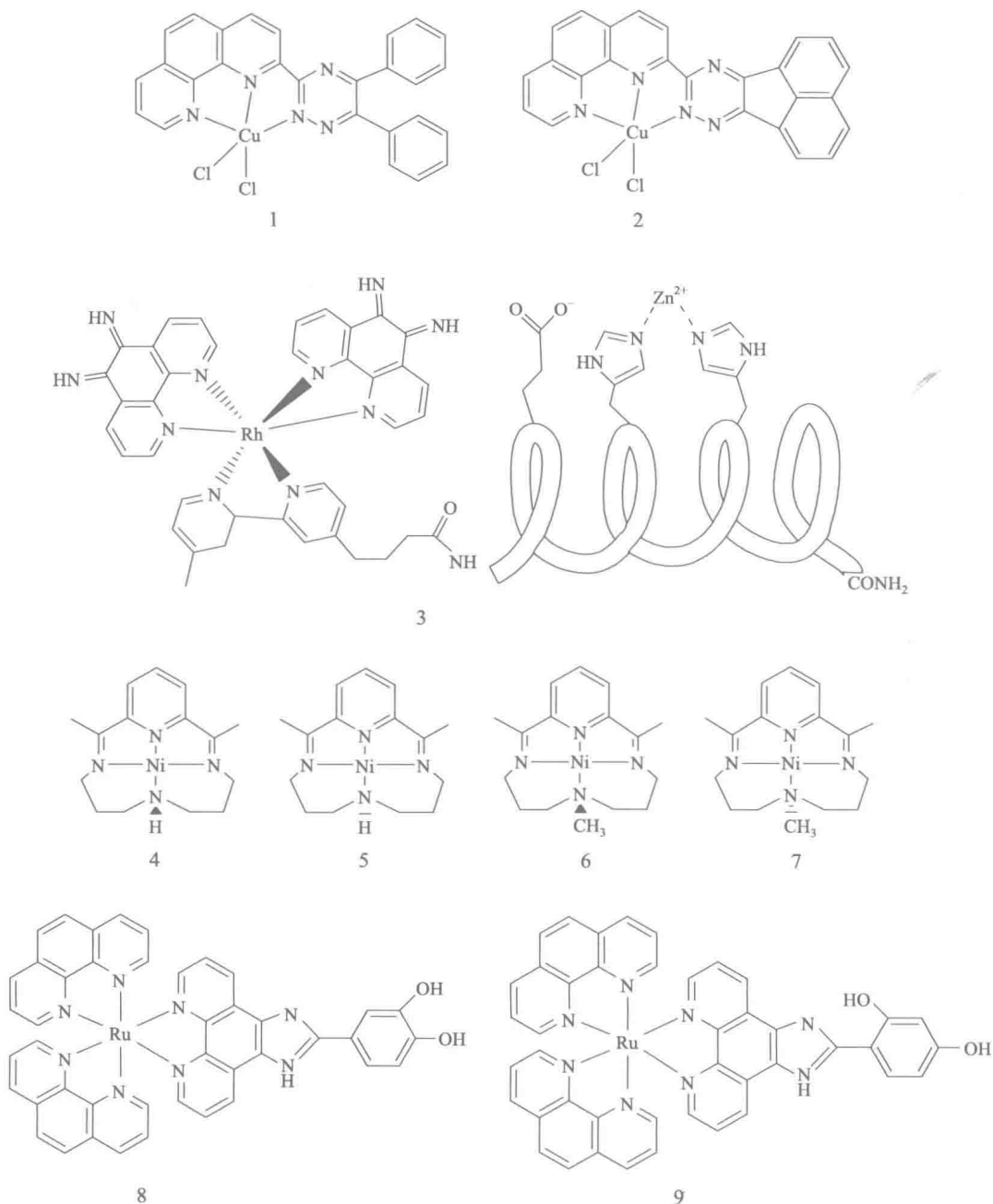


图 1-1 一些金属核酸酶的结构式