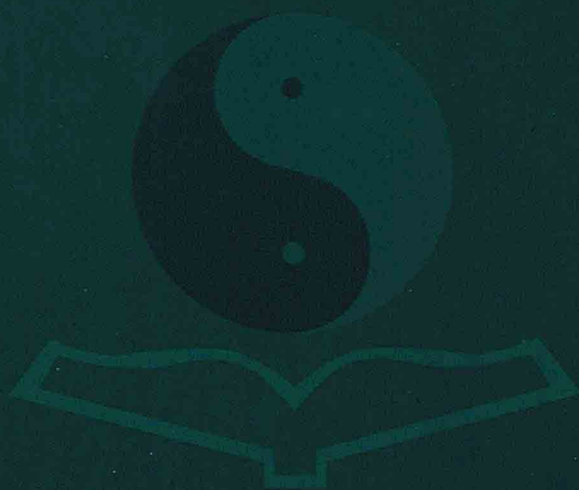


中医院校课程体系改革系列教材

# 生物化学与分子生物学实验

SHENGWU HUAXUE YU FENZI SHENGWUXUE SHIYAN

郑晓珂 主编



 人民军医出版社  
PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

中医院校课程体系改革系列教材

# 生物化学与分子生物学实验

SHENGWUHUAXUE YU FENZI SHENGWUXUE SHIYAN

 人民军医出版社  
PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

北京

---

**图书在版编目(CIP)数据**

生物化学与分子生物学实验/郑晓珂主编. —北京:人民军医出版社,2008.10  
(中医院校课程体系改革系列教材)  
ISBN 978-7-5091-2065-1

I. 生… II. 郑… III. ①生物化学—实验—中医学院—教材②分子生物学—实验—中  
医学院—教材 IV. Q5-33 Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 143323 号

---

策划编辑:于 哲 丁金玉 文字编辑:于 哲 责任审读:余满松

出版人:齐学进

出版发行:人民军医出版社 经销:新华书店

通信地址:北京市 100036 信箱 188 分箱 邮编:100036

质量反馈电话:(010)51927270;(010)51927283

邮购电话:(010)51927252

策划编辑电话:(010)51927300-8052

网址:[www. pmmp. com. cn](http://www.pmmp.com.cn)

---

印刷:三河市春园印刷有限公司 装订:春园装订厂

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:7 字数:162千字

版、印次:2008年10月第1版第1次印刷

印数:0001~3200

定价:16.50元

---

**版权所有 侵权必究**

购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换

## 内 容 提 要

本书为中医院校课程体系改革系列教材之一。主要包括四部分内容：生物化学实验、分子生物学基本实验方法、设计性实验和附录。对各实验基本原理、试剂配制、实验步骤、实验器材等都作了较为详细的介绍，特别是注重对学生进行分子生物学基本知识和技能的训练，以帮助学生掌握现代生命科学基本实验方法和现代实验技术。本书可供高等中医院校各专业、各层次的学生选用。

## 编写说明

随着生命科学的发展,生物化学与分子生物学技术已渗透到生命科学的各个研究领域。为了培养基础扎实、知识面宽、适应性强、有创新意识和能力的高素质人才,适应 21 世纪社会对医学生综合素质的要求,我们在原有生物化学实验指导的基础上,又增编了分子生物学基本原理和技术。本改革教材为一系列教材,实验的基本知识及基本操作技能在《医学基本实验技能学》中已经介绍,《生物化学与分子生物学实验》主要包括四部分内容:生物化学实验、分子生物学基本实验方法、设计性实验和附录。

我们力求每个实验的科学性、实用性和可靠性,对其中基本原理、试剂配制、实验步骤、实验器材等都作了较为详细的介绍。特别是注重对学生进行分子生物学基本知识和技能的训练,培养学生独立思考、独立工作的能力。为了帮助学生·学习撰写科研论文,我们编入了设计性实验内容,以帮助学生采用现代生命科学基本实验方法和现代实验技术来解决实际工作中所遇到的问题。本书可供高等中医院校各专业、各层次的学生选用。

本书是我们在多年生物化学实验教学的基础上,总结经验,不断完善编写而成的。在编写过程中,得到了北京中医药大学、长春中医药大学、广西中医学院、陕西中医学院等单位的大力支持,在此表示感谢。分子生物学技术发展非常迅猛,加之我们水平有限,希望读者在使用过程中发现不妥之处,给予批评指正。

编者

# 目 录

## 第一部分 生物化学实验

实验一	蛋白质的性质与鉴定	(3)
实验二	肝组织中核酸的分离与鉴定	(9)
实验三	影响酶作用的因素	(12)
实验四	乳酸脱氢酶及其辅酶的作用	(16)
实验五	脂质的薄层层析	(18)
实验六	食物中维生素 C 的提取和含量测定(2,4-二硝基苯肼法)	(21)
实验七	类胡萝卜素柱层析及鉴定	(23)
实验八	葡糖氧化酶法测血糖浓度	(25)
实验九	饱食和饥饿家兔肝糖原含量的比较	(29)
实验十	血清三酰甘油的含量测定	(31)
实验十一	血清总胆固醇测定(高铁-硫酸显色法)	(33)
实验十二	血清蛋白质醋酸纤维素薄膜电泳	(36)
实验十三	纸层析法鉴定氨基转移作用	(40)
实验十四	血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	(43)
实验十五	血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性测定	(45)
实验十六	肝的生酮作用及酮体检出	(49)
实验十七	考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量	(51)
实验十八	血清胆红素的定量测定	(54)
实验十九	血清蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳	(57)
实验二十	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)测定蛋白质的相对分子质量	(61)

## 第二部分 分子生物学基本实验方法

相关基本概念	(67)	
实验二十一	细菌的培养	(69)
实验二十二	质粒 DNA 的提取与纯化	(71)
实验二十三	核酸浓度及纯度的测定	(74)
实验二十四	琼脂糖凝胶电泳检测 DNA	(75)

实验二十五	DNA 限制性内切酶技术	(77)
实验二十六	DNA 重组、转化与鉴定	(80)
实验二十七	Southern 印迹转移	(85)
实验二十八	原位杂交	(90)
实验二十九	聚合酶链式反应(PCR)	(93)
实验三十	酶联免疫吸附实验(ELISA)	(95)

### 第三部分 设计性实验

---

设计性实验的开设目的	(99)
附录 A 分子生物学实验中常用试剂及溶液、缓冲液的配制	(101)
附录 B 常见限制性核酸内切酶酶切位点	(103)
附录 C 常用的电泳试剂	(105)

# 第一部分

## 生物化学实验





# 实验一 蛋白质的性质与鉴定

蛋白质(protein)是生命的物质基础,是生物体最重要的生物大分子之一,所有的生命活动都离不开蛋白质。对蛋白质的结构、性质和功能的研究是生命科学的核心问题。认识蛋白质首先要从了解蛋白质的性质入手,并进一步掌握利用蛋白质的性质对样品中的蛋白质进行鉴定和分离的技术。本实验主要介绍对样品中是否含有蛋白质进行定性鉴定以及蛋白质沉淀分离的基本方法。

## 一、蛋白质的呈色反应

蛋白质的呈色反应是指利用蛋白质的结构或某些特殊基团的化学性质,与一些化学试剂发生反应,生成有色物质而呈现不同颜色的反应。不同的蛋白质结构不同,其氨基酸的种类和含量也不同,因此其呈色反应的特征也不同。利用蛋白质呈色反应的强度和特征差异,可对蛋白质进行定性和定量分析。

### 【实验目的】

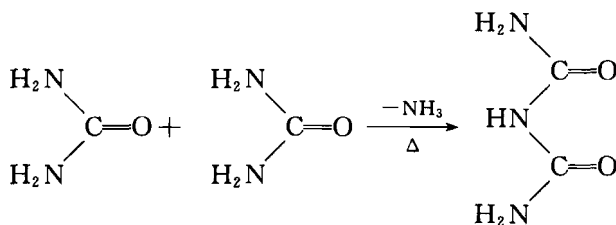
学习和了解常用的几种鉴定蛋白质与氨基酸的方法,进一步认识氨基酸是蛋白质的基本结构单位。

### 【实验内容】

#### (一)双缩脲反应

### 【实验原理】

当加热至 180°C 左右时,两分子尿素缩合脱去一分子氨,生成双缩脲。



双缩脲反应是指在碱性条件下,双缩脲( $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ )与二价铜离子作用,生成紫红色配合物的反应。在肽和蛋白质分子中具有肽键( $-\text{CO}-\text{NH}-$ ),其结构与双缩脲类似,也能发生此反应,生成蓝紫色或紫红色的配合物,且呈色强度在一定浓度范围内与肽键数量,即与蛋白质含量成正比,而与蛋白质分子量及氨基酸成分无关,故常用于蛋白质的定性或定量测定。

凡分子中含二个或二个以上酰胺基( $-\text{CO}-\text{NH}_2$ ),或与此相似的基团,如 $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ , $-\text{CS}-\text{NH}_2$ , $-\text{C}(\text{NH})\text{NH}_2$ 的任何化合物,无论这类基团直接相连,还是通过一个碳或氮原子间接相

连,均可发生上述反应,并且该反应的干扰因素较多。 $\text{NH}_3$ 对此反应具有严重的干扰,因为 $\text{NH}_3$ 与铜离子可生成深蓝色的铜氨配合物。应当注意,蛋白质和多肽都有双缩脲反应,但有双缩脲反应的物质不一定是蛋白质或多肽。

**【器材和试剂】**

1. 器材 酒精灯,试管等。
2. 试剂  
(1)1:10 鸡蛋白溶液。  
(2)10%NaOH 溶液。  
(3)1% $\text{CuSO}_4$ 。  
(4)尿素。

**【操作步骤】**

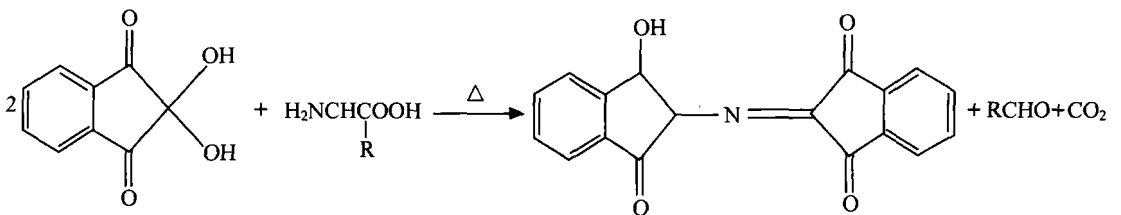
1. 取小试管 1 支,加 1:10 鸡蛋白液 2 滴、10%NaOH 溶液 5 滴及 1%硫酸铜溶液 1 滴,混匀后,呈紫红色的双缩脲反应。
2. 另取小试管 1 支,加小匙尿素,小火加热至熔,试嗅其气味。继续加热使之凝固,这固体是什么?加水 15 滴使熔,然后加 10%NaOH 5 滴,1%硫酸铜 1 滴,可见什么现象?

**(二)茚三酮反应**

**【实验原理】**

凡含有自由氨基的化合物与茚三酮共热时,可生成蓝紫色物质,此反应为茚三酮反应。伯氨化合物、 $\text{NH}_3$ 和 $\alpha$ -氨基酸及一切蛋白质都能和茚三酮反应生成蓝紫色物质。但脯氨酸、羟脯氨酸氧化时不能放出 $\text{NH}_3$ 和茚三酮反应生成黄色物质。在定性或定量测定生物样品中的 $\alpha$ -氨基酸及蛋白质时,应严防伯氨化合物和能释放出 $\text{NH}_3$ 的干扰物的存在。

$\alpha$ -氨基酸及蛋白质的茚三酮反应分二步进行,首先是氨基酸被氧化,产生 $\text{CO}_2$ 和醛,而水合茚三酮被还原成还原型茚三酮;第二步是所生成的还原型茚三酮与另一个水合茚三酮分子和氨缩合生成有色物质。此反应的适宜 pH 为 5~7,同一浓度的蛋白质或氨基酸在不同 pH 条件下的颜色深浅不同,酸度过大时甚至不显色。该反应十分灵敏,1:1 500 000 浓度的氨基酸水溶液即能显示反应,因此是一种常用的氨基酸定量方法。



**【器材和试剂】**

1. 1:10 鸡蛋白溶液。
2. 0.1%茚三酮乙醇溶液。
3. 0.25%丙氨酸溶液:称取丙氨酸 0.25g,加水 100ml。

**【操作步骤】**

1. 取小试管 1 支,加 1:10 鸡蛋白溶液 4 滴、蒸馏水 10 滴、0.1%茚三酮乙醇溶液 6 滴,混

匀,于沸水浴中加热约 1min,室温冷却后,即成粉红色,以后慢慢变成紫色或蓝色。

2. 取小试管 1 支,加丙氨酸 4 滴重复上述操作,观察结果。

## 二、蛋白质的沉淀反应

亲水胶体在水中的稳定因素有两个,即同种电荷和溶剂化膜。蛋白质是高分子化合物,其分子大小在 1~100nm,蛋白质分子的-COOH、-NH<sub>2</sub> 和-OH 都是亲水基团,因此,蛋白质是亲水胶体。蛋白质在体液中的稳定存在对生物非常重要。在水溶液中,蛋白质表面的亲水基团与极性水分子相互作用形成水化膜,同时蛋白质分子本身带有电荷,与溶液的反离子作用形成双电层,削弱了蛋白质分子之间的吸附力,因而每个蛋白质分子可形成一个稳定的胶粒。整个蛋白质溶液就形成稳定的亲水溶胶体系。蛋白质分子表面极性基团越多,水化层越厚,蛋白质分子与溶剂分子之间的亲和力越大,因而溶解度也越大。

在一定物理化学因素影响下,蛋白质分子失去水化膜或失去电荷,就丧失了稳定因素,即以固态形式从溶液中析出,这种作用称为蛋白质的沉淀作用。

沉淀法操作简便,成本低廉,不仅用于实验室中,也用于某些以生产为目的的制备过程,是分离纯化生物大分子,特别是制备蛋白质和酶时最常用的方法。根据沉淀作用的结果,可将蛋白质的沉淀作用分为两类:

(1)可逆沉淀作用:在发生沉淀作用时,虽然蛋白质已经沉淀析出,然而其分子内部结构并没发生明显的改变,仍保持原有的结构和性质。如除去沉淀因素,蛋白质可重新溶解。因此,这种沉淀作用称为可逆沉淀作用。属于此类的有盐析作用,低温下丙酮、乙醇使蛋白质沉淀的作用,以及利用等电点的沉淀等。

(2)不可逆沉淀作用:在发生沉淀反应时,蛋白质分子内部结构、空间构型遭到破坏,失去原来的天然性质,这时蛋白质已发生变性。这种变性蛋白质的沉淀不能再溶解于原来溶剂中,称为不可逆沉淀反应。重金属盐、生物碱试剂、过酸、过碱、加热、震荡、超声波、有机溶剂等都能使蛋白质发生不可逆沉淀反应。

### 【实验目的】

1. 通过实验加深对蛋白质溶液的溶胶特性及其稳定因素的认识。
2. 了解各种沉淀试剂使蛋白质沉淀的本质,区分可逆的盐析沉淀及不可逆的沉淀作用。

### 【实验内容】

#### (一)蛋白质的盐析作用

### 【实验原理】

用大量中性盐使蛋白质从溶液中析出的过程称为蛋白质的盐析作用或中性盐沉淀。

蛋白质是亲水胶体,在高浓度的中性盐影响下,蛋白质分子被盐脱去水化层,同时蛋白质分子所带的电荷被中和,结果蛋白质的胶体稳定性遭受破坏而沉淀析出。中性盐并不破坏蛋白质的分子结构和性质,因此,析出的蛋白质仍保持其天然蛋白的性质,若除去中性盐或减低盐的浓度,还能重新溶解。

沉淀不同的蛋白质所需中性盐的浓度不同,而盐类不同其沉淀作用也有差异。例如,加硫酸铵至饱和则清蛋白沉淀析出;加硫酸铵至半饱和,则球蛋白沉淀析出。向含有清蛋白和球蛋白的鸡蛋清溶液中加入硫酸镁或氯化钠至饱和,则球蛋白沉淀析出。所以在不同条件下,用不同浓度的

盐类可将各种蛋白质从混合溶液中分别沉淀析出,该法称为蛋白质的分级盐析。目前,蛋白质的盐析作用在各种蛋白质和酶的分离纯化、生产、科研工作和临床化验等工作中广泛应用。

### 【器材和试剂】

1. 1:10 鸡蛋白溶液。
2. 饱和硫酸铵溶液:称取 377g 硫酸氨溶于 500ml 20℃ 的水中。可称取过量的硫酸氨,加热助溶,冷却后应有晶体析出。
3. 固体硫酸铵。

### 【操作步骤】

1. 取 5ml 鸡蛋白溶液于试管中,加入等量饱和硫酸铵溶液,混匀,静置 20min 后,则球蛋白全部析出。
2. 过滤,收集透明滤液,滤液中含有清蛋白,若滤液浑浊,须继续过滤至透明为止。
3. 向 1ml 清滤液中加固体硫酸铵约 0.5g,边加边振摇,直至达到饱和,溶液出现浑浊,再向浑浊液加 1.5~2.0ml 水,观察结果。

## (二)生物碱试剂沉淀蛋白质

### 【实验原理】

植物体内具有显著生理作用的含氮碱性化合物称为生物碱(或植物碱),能沉淀生物碱或与其产生颜色反应的物质称为生物碱试剂,如鞣酸、苦味酸、磷钨酸等。蛋白质在水溶液中是酸碱两性电解质,蛋白质溶液的 pH 小于等电点时,蛋白质分子的碱性基团带有较多的正电荷,它能与生物碱试剂中的负电荷结合形成不溶物而沉淀。生物碱试剂以及三氯乙酸、磺基水杨酸在血液与尿液分析时都很重要,进行血液化学成分滴定时,常用作去除蛋白质的试剂,以消除蛋白质对测定的干扰。

### 【器材和试剂】

1. 1:10 鸡蛋白溶液。
2. 10% HCl 溶液。
3. 10% NaOH 溶液。
4. 10% 磺基水杨酸溶液。

### 【操作步骤】

1. 取试管 1 支,加入 1:10 鸡蛋白溶液 1ml、10% HCl 1 滴,混匀,再加入 10% 磺基水杨酸溶液 2 滴。
2. 另观察两管蛋白质的沉淀。

## (三)重金属盐沉淀蛋白质

### 【实验原理】

蛋白质溶液的 pH 大于等电点时,蛋白质分子的酸性基团带有较多的负电荷,易与带正电荷的重金属盐类  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^{+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  和  $\text{Hg}^{2+}$  等结合成稳定的沉淀而析出。

在有机体内,蛋白质常以其可溶性的钠盐或钾盐的形式存在,当加入汞、铅、铜、银等重金属盐时,则蛋白质形成不溶性的盐类而沉淀。经过这种处理后的蛋白质沉淀不再溶解于水中,说明它已发生了变性。

重金属盐类沉淀蛋白质的反应通常很完全,特别是在碱金属盐类存在时。因此,生化分析中,常用重金属盐除去体液中的蛋白质;临床上用蛋白质解除重金属盐的食物性中毒。但应注

意,使用乙酸铅或硫酸铜沉淀蛋白质时,试剂不可加过量,否则可使沉淀出的蛋白质重新溶解。

#### 【器材和试剂】

1. 1:10 鸡蛋白溶液。
2. 10% NaOH 溶液。
3. 0.5% 硫酸锌溶液。
4. 3% 硝酸银溶液。
5. 0.5% 乙酸铅溶液。
6. 0.1% 硫酸铜溶液。

#### 【操作步骤】

1. 取试管 1 支,加入 1:10 鸡蛋白溶液 1ml、10% NaOH 1 滴,混匀,再加入 0.5% 硫酸锌 6 滴,观察结果。

2. 取试管 3 支,各加入约 1ml 蛋白质溶液,分别加入 3% 硝酸银 3~4 滴,0.5% 乙酸铅 1~3 滴和 0.1% 硫酸铜 3~4 滴,观察沉淀的生成。第 1 支试管的沉淀留作透析用,然后向第 2、3 支试管再分别加入过量的乙酸铅和饱和硫酸铜溶液,观察沉淀的再溶解。

3. 将第 1 支试管中的沉淀放入透析袋中,于烧杯中逆水透析,观察沉淀变化。

#### (四) 加热沉淀蛋白质

##### 【实验原理】

由于温度升高,破坏了蛋白质的次级键,会引起蛋白质的变性。几乎所有的蛋白质都因加热变性而凝固,变成不可逆的不溶状态。盐类和 pH 对蛋白质加热凝固有重要影响。少量盐类促进蛋白质的加热凝固。当蛋白质处于等电点时,不带电荷,加热凝固最完全、最迅速。在过酸或过碱溶液中,蛋白质分子带有正电荷或负电荷,虽变性也不会凝固沉淀。在冷却后,调节 pH 达到蛋白质的等电点,则有沉淀析出。若同时有足量的中性盐存在,则蛋白质可因加热而凝固。

##### 【器材和试剂】

1. 1:10 鸡蛋白溶液。
2. 0.1% 乙酸溶液。
3. 10% 乙酸溶液。
4. 饱和 NaCl 溶液。
5. 10% NaOH 溶液。

##### 【操作步骤】

取 5 支试管、编号,按表 1-1 加入有关试剂(单位:滴)。

表 1-1 实验一试剂配置

试剂管号	1:10 鸡蛋白	0.1% 乙酸	10% 乙酸	饱和 NaCl	10% NaOH	蒸馏水
1	10	—	—	—	—	7
2	10	5	—	—	—	2
3	10	—	5	—	—	2
4	10	—	5	2	—	—
5	10	—	—	—	2	5

## 生物化学与分子生物学实验

1. 将各管混匀,观察记录各管现象后,放入沸水浴中加热 10min,注意观察比较各管的沉淀情况。然后,将第 3、4、5 号管分别用 10%NaOH 或 10%乙酸中和,观察并解释实验结果。

2. 3、4、5 号管继续分别加入过量的酸或碱,观察它们发生的现象;然后,用过量的酸或碱中和第 3、5 号管,沸水浴加热 10min。

观察沉淀变化,检查这种沉淀是否溶于过量的酸或碱中,并解释实验结果。

### **【思考题】**

1. 如果蛋白质水解作用一直进行到双缩脲反应呈阴性结果,此时可对水解程度作出什么结论?

2. 能否用茚三酮反应可靠地鉴定蛋白质的存在?

3. 为什么鸡蛋清可用作铅、汞中毒的解毒剂?

4. 蛋白质分子中的哪些基团可以:

(1) 与重金属离子作用,而使蛋白质沉淀?

(2) 与有机酸、无机酸作用,而使蛋白质沉淀?

(3) 与生物碱试剂作用,而使蛋白质沉淀?

# 实验二 肝组织中核酸的分离与鉴定

## 一、肝组织中 DNA 的分离与鉴定

### 【实验目的】

1. 掌握 DNA 分离纯化的原理和方法。
2. 熟悉台式离心机的使用。
3. 掌握 DNA 定量技术。

### 【实验原理】

细胞内的核酸多以核蛋白的形式存在,其中脱氧核糖核蛋白主要存在于细胞核中,核糖核蛋白主要存在于细胞质中。这两类核蛋白在 0.14mol/L 氯化钠溶液中的溶解度相差大,核糖核蛋白在此溶液中具有很高的溶解度,脱氧核糖核蛋白的溶解度却相当低。制成肝匀浆后,用 0.14mol/L 氯化钠溶液抽提,可将两种核蛋白分离。分离过程中加入少量柠檬酸钠,可抑制脱氧核糖核酸酶对 DNA 的水解作用。SDS(十二烷基硫酸钠)能使脱氧核糖核蛋白产生解聚作用,在含有脱氧核糖核蛋白的溶液中加入 SDS,DNA 即与蛋白质分离开,用氯仿将蛋白质沉淀除去,而 DNA 溶解于水相,最后用冷乙醇将 DNA 析出,而获得纯化的 DNA。在氯仿中加入少量异戊醇能减少操作过程中泡沫的产生,并有助于分相,使离心后的上层水相,中层变性蛋白,下层有机溶剂相维持稳定。DNA 和 RNA 在波长 260nm 处有很高的吸收峰值,蛋白质则在 280nm 处有很高的吸收峰值。利用这个原理,测定纯化样品在 260nm 和 280nm 处的吸光度,可以推算出样品中 DNA 的浓度,并判断其纯度。在标准条件下,当  $A_{260} = 1$  时,样品中双链 DNA 浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,单链 DNA 或 RNA 浓度为 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。纯净的 DNA 样品  $A_{260}/A_{280}$  的比值约为 1.8,样品中含有蛋白质或其他杂质,会使  $A_{260}/A_{280}$  的比值下降。

### 【器材和试剂】

1. 器材 玻璃匀浆器、离心机、试管、刻度吸管、紫外可见分光光度计。
2. 试剂
  - (1) 0.9%氯化钠溶液。
  - (2) 10%氯化钠溶液。
  - (3) 0.14mol/L 氯化钠溶液(含 0.01 mol/L 柠檬酸钠):称取氯化钠 8.182g 和柠檬酸钠  $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.941g,用蒸馏水溶解并稀释至 1 000ml。
  - (4) 95%乙醇溶液(冷藏)。
  - (5) 5%十二烷基磺酸钠(SDS)溶液:称取 25gSDS 溶于 500ml 45%乙醇。
  - (6) 氯仿-异戊醇混合液:氯仿:异戊醇=24:1。
  - (7) 0.1mol/L NaOH。

### 【操作步骤】



1. 肝匀浆制备:新鲜猪肝,用 0.9% NaCl 洗去血液,除去结缔组织,剪碎,称取 4g 肝组织,加 4ml 0.14mol/L NaCl 溶液,匀浆器中研磨,制成肝匀浆。

2. 分离核蛋白:肝匀浆倒入试管中,4 000r/min 离心 5min,上清弃去。沉淀加 2 ml 0.14 mol/L NaCl 搅匀后再置匀浆器中研磨,4 000r/min 离心 5min,上清弃去,沉淀重复上述操作,上清弃去,沉淀为 DNA-蛋白质复合物。

3. 沉淀中加入 0.14mol/L NaCl 2.0ml,搅匀,滴加 5%SDS 2.0ml,边加边搅,60℃水浴 10 min(不停搅拌),冷至室温,均匀分成两管为 B1、B2。

4. B1、B2 管中各滴加氯仿-异戊醇液 4.0ml(边加边搅),搅至溶液颜色均匀,3 000r/min 离心 15min。溶液分三层,上层液为水相(含 DNA),中层为蛋白质沉淀,下层为有机相,吸取 B1、B2 管中上层液合倒于另一试管中。

5. 上清液加入 95%冷乙醇 4.0ml,混匀(颠倒混匀法),3 000r/min 离心 15min,去上清液,沉淀为纯化 DNA。

6. DNA 的溶解:沉淀中加入 0.1 mol/L NaOH 4.0ml,搅拌溶解,2 000r/min 离心 10min,上清液则为 DNA 水解液。

7. DNA 的测定:用 0.1mol/L NaOH 将样品稀释到一定浓度,以 0.1mol/L NaOH 调零,测定样品的  $A_{260}$  和  $A_{280}$ ,计算出每克肝组织中的 DNA 含量,并判断纯化 DNA 的纯度。

#### 【注意事项】

1. 在制备肝匀浆时,应尽量在冰冷条件下进行,并尽快加入含 0.01 mol/L 柠檬酸钠的 0.14mol/L 氯化钠溶液,以抑制脱氧核糖核酸酶,防止 DNA 的分解,以提高核酸得量。

2. 各步骤操作应力求准确,尽量减少中途核酸的丢失,保证定量测定的准确性。

3. 稀释后应该尽量使样品  $A_{260}$  和  $A_{280}$  处于 0.1~0.7 的范围内。

## 二、肝组织中 RNA 的分离与鉴定

#### 【实验目的】

1. 掌握 RNA 分离纯化的原理及操作方法。

2. 掌握 RNA 定量技术。

#### 【实验原理】

根据前面所述,DNA 和 RNA 这两类核蛋白在 0.14mol/L 氯化钠溶液中的溶解度不同,制成肝匀浆后,用 0.14mol/L 氯化钠溶液抽提,可将两种核蛋白分离。在含有核糖核蛋白的 0.14mol/L 氯化钠溶液中,调节 pH 至 4.2,使其达到等点电,核糖核蛋白即从溶液中沉淀出;用热的 10%氯化钠溶液抽提核糖核酸,最后用冷乙醇将核糖核酸钠析出,而获得纯化的 RNA。

分离过程中注意 RNase 的活性,防止 RNA 的降解。RNase 无处不在,且耐高温,RNA 的提取条件比 DNA 要严格得多,常采用 DEPC(焦碳酸二乙酯)来抑制 RNase 的活性。样品中 RNA 的浓度及纯度测定,与前相同,在此不再赘述,纯度较高的 RNA 样品,  $A_{260}/A_{280} = 1.8 \sim 2.0$ ,如果  $A_{260}/A_{280} < 1.8$ ,说明样品中含有蛋白质等,可用苯酚-氯仿抽提除去。

#### 【器材和试剂】

1. 器材 玻璃匀浆器、离心机、紫外可见分光光度计、试管、刻度吸管。