

● 主编 卢方安



生物分子

实验教程

高等学校实验教材

人民卫生出版社

高等学校实验教材

(供临床医学、麻醉、影像、药学、护理、检验、口腔等专业用)

生物分子实验教程

主 编 卢方安

副主编 孙设宗 朱名安 邓维秀

编 者 (按姓氏笔画为序)

丁爱玲 王生慧 邓守恒 邓维秀 卢方安

朱名安 孙设宗 许景云 严世荣 汤红明

余柏林 林 丽 杨敬宁 赵 杰 彭吉林

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物分子实验教程/卢方安主编. -- 北京:
人民卫生出版社, 2006. 3

ISBN 7-117-07464-7

I. 生… II. 卢… III. 分子生物学—实验—教材
IV. Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 014118 号

生物分子实验教程

主 编: 卢方安

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 67616688)

地 址: (100078)北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网 址: [http://www. pmph. com](http://www.pmph.com)

E - mail: [pmph@pmph. com](mailto:pmph@pmph.com)

邮购电话: 010-67605754

印 刷: 北京人卫印刷厂(尚艺)

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 11.5

字 数: 335 千字

版 次: 2006 年 3 月第 1 版 2006 年 3 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 7-117-07464-7/R·7465

定 价: 22.00 元

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

编 写 委 员 会

主任委员 杨江林

副主任委员 卢方安 姚俊霞 郭鄂平
曾凡龙 邓成国 裴德翠

委 员 (按姓氏笔画为序)

卫荣华	邓成国	邓维秀	卢方安	阮绪芝
李 斌	朱名安	朱名胜	孙各琴	孙设宗
杜兴贵	陈公财	张光玉	杨 虹	杨江林
金志雄	胡承江	姚俊霞	桑 明	郭鄂平
曾凡龙	彭吉林	雷怀成	熊 琛	裴德翠

总 序

医学教育不仅要让学生系统掌握医学理论知识,更需要关注学生实践技能、科学思维和创新能力的培养。从人才培养体系整体观出发,建立以能力培养为主线,分层次、多模块、相互衔接的实验教学体系,与理论教学既联系又相对独立,实现基础与前沿、经典与现代的有机结合是我们编写本教程的初衷。依照此要求编写的医学基础课实验系列教材,其基本理念是面向学生未来,立足创新能力教育,体现科学体质,突出科学探索,反映当代科学成果。设计思路突出“整合”和“探究”两个特点。力图从实际应用性出发构建具有自身特点的实验教学内容,进而通过实验结果的分析与思辨,期望在医学基础课实验教学体系和方法上有所继承与突破。

本系列教材系统介绍了医学生物学、人体正常与病理组织形态学、生物化学与分子生物学、医学免疫学、病原生物学等学科实验研究所必需的知识与技术。教学层次分为基本实验、提高型实验和研究创新型实验,实验内容与理论教学有机结合,实验方法与实验条件相匹配,内容丰富而翔实,其基本理念和设计思路具有以下特点:

1. 在注重基础性、可操作性的前提下,兼顾现有实验条件,避免过分追求实验设备的“高、精、尖”,用现代的观点进行审视,强调动手能力,突出先进性,使选定的实验内容和技术手段既保留动手机会,又与现代生命科学发展的步伐相一致。

2. 实验内容去旧增新,删繁就简。将原来一些经典实验与现代科学思维相结合,适当压缩,并进行内容和教学方法的改革。对原书的插图进行了精选。对所开设的每一个实验要求达到的培养目的作了清晰而明确的阐述。教材内容选择性大。

3. 层次分明,难易适宜。基本实验以理论验证为主,加深学生对基础理论的正确理解,培养实事求是的科学精神。提高型实验在内容设计上不拘泥于单一学科知识领域,趋向于对学科间融合的探索。研究创新型实验设计力图呈现教材的开放性,增加了扩展(延伸)探究活动,为学生留下更多的问题空间,把扩展和提高的学习任务交由学生自主探究,旨在通过探索让学生更加有效地学习,以培养学生的综合能力和知识迁移能力,学会连续性思维,跳跃性思维,并能自行设计实验。

4. 运用“思考题”加强教材的启发性、开拓性和应用性。实验项目后面的思考题是一个十分广阔的思维空间,可使学生在基本实验中做到既要对每一个实验进行严格要求,强调基本技能的训练,同时又使学生的思想不受其束缚,启发他们的创新精神。

本套实验教程是一套配合人民卫生出版社发行的全国高等学校医学专业第六轮规划教材的系列实验教材,主要用于医学本科实验教学。教材非常重视生命科学研究中如何发挥学生观察、分析与思辨能力的培养,它的主要任务是使大学生通过动手,得到实验技术的基本操作技能训练、科学思维和创新能力的培养,同时也要使他们初步了解或掌

握先进技术和方法，与迅速发展的学科前沿接轨。

撰写本套教材的作者均为郧阳医学院长期从事医学基础理论及实验教学的教师 and 实验技术人员，其中不乏有成就的中青年专家、学者，所写部分均为自己熟悉的教学或科研内容，涉及面较广，可供其他院校根据具体条件酌情选用。

由于水平和时间的限制，缺点和错误在所难免，恳请读者和同行专家提出宝贵意见。

编写委员会

杨江林

2005. 7. 28

前 言

21 世纪是生命科学的世纪,生物化学、免疫学、分子生物学是生命科学的重要组成部分,其发展迅速,富有朝气。促使这些学科迅速发展的一个重要因素是实验方法及新技术的不断开发和应用,这些实验方法及新技术已经成为生物学科以及其他有关研究领域中的一个非常重要和强有力的工具。因此,要提高教学质量,除必须加强课堂教学外,还需要学生掌握和了解必要的生物化学、免疫学和分子生物学实验技术,对同学们进行一定的基本技能、基本操作训练,以培养同学们独立实验操作、分析问题和解决问题的能力。这也是从事该领域乃至其他相关学科研究工作的十分重要的前提。基于上述考虑,我校于 2001 年将生物化学、免疫学、分子生物学实验教学与理论教学剥离,组建成立生物化学与免疫学综合实验室。在此基础上,于 2003 年底又组建成立生物分子学部。为了适应全国高等医药教材建设研究会、卫生部规划教材《生物化学》第 6 版和《医学免疫学》第 4 版的教学要求以及《医学分子生物学》的基本教学需要,我们依照教学大纲,在历年编写和使用的实验课教材的基础上,结合近年来生物化学、免疫学与分子生物学实验技术和方法的发展以及实验室条件、仪器设备现状,编著了这本《生物分子实验教程》。

本书在内容上分为三个部分:第一篇是常用的实验技术,对分光光度技术、色谱技术、电泳技术、离心技术、聚合酶链式反应技术、基因工程技术和实验方法及质量控制等有关理论进行了较为系统的论述。第二篇是常用的生物化学、免疫学及分子生物学实验项目,该实验项目又根据新时期实验室建设和医学生实践技能培养的新要求而分为三个部分,包括基本实验、提高型实验和研究创新型实验。所有实验都设置有“实验目的”和“实验思考”,同一实验尽可能介绍多种常用的方法,以便于教和学。第三篇为专题篇,介绍了实验室基本操作、实验室常用数据,便于查询使用,并对学生进入实验室的基本要求和实验报告书写的要求进行了阐述。

教材编写考虑了多层次教学的要求,适合于医学院校各专业本、专科人才培养目标需要,也可供生命科学研究工作者参考使用。

教材编写过程中参考了国内多所院校正式或非正式出版的相关实验教材,在此一并表示诚挚的谢意!尽管本教材中各个实验均经过多年教学实践的检验,但由于时间仓促和水平的限制,书中错误和不足之处在所难免。诚挚欢迎使用本书的教师、实验技术人员和同学们多提宝贵意见。

卢方安

2005 年 8 月

目 录

第一第 常用实验技术

第一章 分光光度技术.....	1
一、光的基本知识.....	1
二、朗伯-比尔 (Lambert-Beer) 定律	2
三、分光光度计结构简介.....	3
四、分光光度技术的应用.....	4
五、分光光度法的误差.....	5
六、使用分光光度计的注意事项.....	6
第二章 色谱技术.....	7
第一节 概述.....	7
一、色谱法的概念和特点.....	7
二、色谱法的分类.....	8
第二节 常用的色谱方法.....	9
一、吸附色谱.....	9
二、分配色谱	12
三、凝胶色谱	14
四、离子交换色谱	19
五、亲和色谱	21
六、高效液相色谱	23
第三章 电泳技术	27
第一节 基本原理	27
一、电荷的来源	27
二、迁移率	28
三、影响电泳速度的因素	29
第二节 醋酸纤维薄膜电泳	30
第三节 琼脂糖凝胶电泳	31
一、核酸分子大小与琼脂糖浓度的关系	31
二、核酸构型与琼脂糖凝胶电泳分离的关系	32

三、琼脂糖凝胶电泳基本方法简介	32
第四节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	33
一、聚丙烯酰胺凝胶聚合原理及相关特性	33
二、聚丙烯酰胺凝胶电泳原理	34
三、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳原理	37
四、聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳原理	38
五、聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳原理	39
六、聚丙烯酰胺凝胶双向电泳原理	40
第五节 毛细管电泳	41
一、基本原理	41
二、毛细管电泳仪	41
三、电渗	42
四、进样	42
五、电泳和检测	42
六、毛细管电泳分离模式	43
七、毛细管电泳的特点	43
第六节 染色方法	44
一、蛋白质染色	44
二、脂蛋白染色	45
三、核酸的染色	45
第四章 离心技术	47
第一节 离心理论	47
一、离心分离的原理	47
二、沉降系数	49
三、相对离心力和离心时间	49
四、离心机的分类	50
第二节 离心分离的种类	51
一、差速离心法	51
二、密度梯度离心法	52
第三节 离心操作要领	53
第五章 透析和超滤	55
一、透析	55
二、超滤	56
第六章 实验方法及质量控制	57
一、准确度	57
二、特异性	58

三、精密度	58
四、灵敏度	59
五、质量控制图	60
第七章 PCR 技术	62
一、PCR 原理和特点	62
二、PCR 系统的组成及 PCR 最适条件	63
第八章 基因工程技术	65
第一节 概述	65
一、基因和基因工程的概念	65
二、基因工程的兴起和发展	65
三、基因工程的基本技术程序	66
第二节 目的基因的制备	66
一、限制性内切酶酶切获取	66
二、化学法合成	67
三、反转录合成 cDNA	67
四、组建“基因组文库”，钓取目的基因	67
五、采用 PCR 方法制备目的基因	67
第三节 基因载体的选择	68
一、克隆载体	68
二、表达载体	68
三、常用的克隆载体	70
第四节 基因工程常用的工具酶	71
一、限制性核酸内切酶	71
二、DNA 聚合酶	74
三、T4 DNA 连接酶	74
四、末端脱氧核苷酸转移酶	74
五、逆转录酶	75
六、S1 核酸酶	75
七、脱氧核糖核酸酶 I	75
八、碱性磷酸酶	75
第五节 重组体的构建	75
一、连接方式	75
二、重组效率的影响因素	76
第六节 重组体导入受体细胞	76
一、重组体导入原核细胞	76
二、重组体导入真核细胞	77
第七节 基因导入受体细胞后的筛选和鉴定	79

一、筛选	79
二、鉴定	80

第二篇 实验项目

第九章 基本实验	81
实验一 蛋白质的定量测定	81
一、Folin-酚试剂法	82
二、考马斯亮蓝 G-250 染色法	84
三、紫外分光光度法	85
四、双缩脲法	87
实验二 氨基酸的离子交换柱色谱分离	88
实验三 血红蛋白与核黄素的凝胶柱色谱分离	90
实验四 醋酸纤维薄膜电泳分离血清蛋白	92
实验五 蛋白质的透析纯化	94
实验六 血清过氧化氢酶 K_m 值的测定	95
实验七 血糖测定	98
一、改良的邻甲苯胺硼酸法	98
二、葡萄糖氧化酶法	99
三、吴宪-Folin 法	101
实验八 胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的影响	102
实验九 血清甘油三酯 (TG) 的测定	103
一、酶法测定甘油三酯	103
二、乙酰丙酮法测定甘油三酯	105
实验十 血浆高密度脂蛋白-胆固醇和总胆固醇的测定	107
实验十一 酮体的生成和利用	109
一、酮体的生成和利用定性测定	109
二、酮体的生成与利用定量测定	110
实验十二 血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 活性的测定	112
实验十三 免疫血清的制备	115
实验十四 吞噬细胞的功能测定	117
一、中性粒细胞的吞噬作用 (小吞噬)	117
二、巨噬细胞的吞噬作用 (大吞噬)	118
实验十五 细胞免疫功能测定	118
一、外周血单个核细胞的分离	118
二、E 玫瑰花环试验	120
三、淋巴细胞转化试验	121
四、NK 细胞活性的检测	124

实验十六 凝集反应	127
一、直接凝集反应	127
二、间接凝集反应	130
实验十七 沉淀反应	132
一、琼脂扩散试验	132
二、对流免疫电泳	135
三、免疫电泳	136
四、火箭免疫电泳	138
实验十八 免疫荧光技术	139
实验十九 免疫酶技术	141
一、夹心法检测 HBsAg	141
二、夹心法检测 HBeAg	144
三、夹心法检测抗-HBsAg	145
四、竞争法检测抗-HBc	146
五、竞争法检测抗-HBe	147
实验二十 放射免疫测定技术	149
实验二十一 细胞因子的检测	150
一、IL-1 的检测 (生物活性测定)	151
二、夹心法检测 TNF	152
第十章 提高型实验	155
实验二十二 不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白	155
实验二十三 琥珀酸脱氢酶的作用及其可逆性抑制	158
实验二十四 真核基因组 DNA 的分高纯化	159
一、组织细胞 DNA 提取 (酚抽提法)	160
二、外周血白细胞 DNA 提取 (NaI 法)	162
实验二十五 核酸凝胶电泳	163
一、DNA 的琼脂糖凝胶电泳	165
二、聚丙烯酰胺凝胶电泳	167
实验二十六 DNA 浓度的测定 (紫外分光光度计法)	170
实验二十七 DNA 为模板的 PCR 扩增	171
实验二十八 质粒 DNA 的提取 (碱变性裂解法)	173
实验二十九 限制性核酸内切酶的酶切和鉴定	174
实验三十 载体与目的基因的连接	177
实验三十一 重组质粒转化大肠杆菌及初步筛选	180
实验三十二 免疫系统组分的分高及活性检测	181
一、小鼠胸腺、脾摘除术	181
二、小鼠淋巴细胞分离及活性检测	182

第十一章 研究创新型实验	183
实验三十三 肝糖原的提取和鉴定	183
实验三十四 不同组织 ALT 活性测定及温度、pH 的影响	184

第三第 专 题 篇

第十二章 实验室基本操作	185
第一节 常用玻璃器皿的洗涤	185
一、初用玻璃仪器的清洗	185
二、使用过的玻璃仪器的清洗	185
三、各种洗涤液的配方及使用	186
第二节 常用量器的校正	187
第三节 常用量器的正确使用	189
一、容量瓶	189
二、量筒	189
三、有分度吸量管	189
四、奥氏吸管	189
第四节 加样器的使用和校正	190
一、操作方法	190
二、注意事项	190
三、加样器的校正	190
第五节 试剂的选用和保管	191
一、化学试剂	191
二、试剂配制与使用原则	192
第六节 常用实验样品的制备	194
一、血液样品	195
二、尿液样品	195
三、组织样品	196
第七节 分光光度计的使用	196
一、721 型分光光度计	196
二、722S 分光光度计的使用	198
第十三章 实验室常用数据	201
第十四章 免疫学新技术	206
第一节 基因工程抗体技术	206
一、人-鼠嵌合抗体	207
二、单链抗体的构建	208
第二节 流式细胞术	208

一、基本原理.....	208
二、意义.....	209
三、仪器的操作和使用.....	210
第三节 酶联免疫斑点试验	211
第十五章 实验须知和实验报告的书写要求	214
第一节 实验须知	214
一、实验目的.....	214
二、实验要求.....	214
三、试剂使用.....	214
四、实验室规则.....	214
第二节 实验报告的书写要求	214

第一篇 常用实验技术

第一章 分光光度技术

有色溶液对光线有选择性的吸收作用,不同物质由于其分子结构不同,对不同波长光线的吸收能力也不同,因此,每种物质都具有其特异的吸收光谱。有些无色溶液,虽对可见光无吸收作用,但所含物质可以吸收特定波长的紫外线或红外线。从一个有连续光谱的光源,逐步地分出各个波长的光,使其透过待测物的真溶液,测出其在不同波长时的吸光度;然后以波长为横坐标,吸光度为纵坐标,就可以得到待测物的吸收光谱曲线,由此找出其中吸收最强的波长,作为灵敏光波长对该物质未知液进行定量测定。分光光度法主要是指利用物质特有的吸收光谱来鉴定物质性质及含量的技术,其理论依据是 Lambert 和 Beer 定律。

一、光的基本知识

光是由光量子组成的,具有二重性,即不连续的微粒性和连续的波动性。波长和频率是光的波动性的特征,可用下式表示:

$$\lambda = c/\nu$$

式中 λ 为波长,具有相同的振动相位的相邻两点间的距离叫波长。 ν 为频率,即每秒钟振动次数。 c 为光速,等于 $(299770 \pm 4) \text{ km/s}$ 。光属于电磁波。

自然界存在各种不同波长的电磁波(表 1-1)。分光光度法所使用的光谱范围在 $200 \text{ nm} \sim 10 \mu\text{m}$ ($1 \mu\text{m} = 1000 \text{ nm}$) 之间。其中 $200 \sim 400 \text{ nm}$ 为紫外光区, $400 \sim 760 \text{ nm}$ 为可见光区, $760 \sim 10000 \text{ nm}$ 为红外光区。

表 1-1 电磁波谱

区 域	波 长		来 源
	M	常用单位	
γ 射线	$10^{-12} \sim 10^{-10}$	$10^{-3} \sim 0.1 \text{ nm}$	原子核
X 射线	$10^{-10} \sim 10^{-18}$	$0.1 \sim 10 \text{ nm}$	内层电子
远紫外	$10^{-8} \sim 2 \times 10^{-7}$	$10 \sim 200 \text{ nm}$	中层电子

续表

区 域	波 长		来 源
	M	常用单位	
紫外	$(2\sim4)\times 10^{-7}$	200~400 nm	外层价电子
可见	$(4\sim7.6)\times 10^{-7}$	400~760 nm	外层价电子
红外	$7.6\times 10^{-7}\sim 5\times 10^{-5}$	0.76~50 μm	分子的振动与转动
远红外	$5\times 10^{-5}\sim 10^{-3}$	50~1000 μm	分子的振动与转动
微波	$10^{-3}\sim 1$	0.1~100 cm	分子转动
无线电波	$1\sim 10^3$	1~1000 m	核磁共振

二、朗伯-比尔 (Lambert-Beer) 定律

朗伯-比尔定律是比色分析的基本原理, 这个定律是讨论有色溶液对单色光的吸收程度与溶液的浓度及液层厚度间的定量关系。此定律是由朗伯定律和比尔定律归纳而得。

1. 朗伯定律 一束单色光通过溶液后, 由于溶液吸收了一部分光能, 光的强度就要减弱, 若溶液浓度不变, 则溶液的厚度愈大 (即光在溶液中所经过的途径愈长), 光的强度减低也愈显著。

设光线通过溶液前的强度为 I_0 (入射光的强度), 通过液层厚为 L 溶液后光的强度为 I_t (透过光的强度), 则 I_t/I_0 表示透过光的强度是入射光强度的几分之几, 称为透光度 (transmittance), 用 T 表示。透光度随溶液厚度的增加而减少, 但实践证明, 透光度和溶液层厚度间并不存在简单的定量关系, 只有透光度的负对数 ($-\lg T$) 才随着溶液厚度的增加而成正比例增加, 即

$$-\lg T = -\lg \frac{I_t}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I_t} \propto L$$

将上述比例写成等式, 得到 $\lg \frac{I_0}{I_t} = K_1 L$, 式中 $\lg \frac{I_0}{I_t}$ 称为吸光度 (A) (absorbance),

又称为消光度 (E) (degree of extinction) 或光密度 (OD) (optical density), 所以

$$A = K_1 L$$

式中以 K_1 为比例系数, 其值取决于入射光的波长、溶液的性质和浓度以及溶液的温度等。上式表明, 当溶液的浓度不变时, 吸光度与溶液液层的厚度成正比, 这就是朗伯定律。

2. 比尔定律 当一束单色光通过有色溶液后, 溶液液层的厚度不变而浓度不同时, 则溶液浓度愈大, 透射光的强度愈弱, 其定量关系如下:

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = K_2 C \quad \text{即 } A = K_2 C$$

式中 C 为有色物质溶液的浓度; K_2 为比例系数, 其值取决于入射光的波长、溶液的性质和液层的厚度以及溶液的温度等。上式表明, 当溶液液层的厚度不变时, 吸光度与溶液的浓度成正比, 这就是比尔定律。

3. 朗伯-比尔定律 如果同时考虑吸收层的厚度和溶液浓度对光吸收的影响,则必须将朗伯定律和比尔定律合并起来,得

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = KLC \quad \text{即 } A = KLC$$

吸光度与溶液的浓度和液层的厚度的乘积成正比,这就是朗伯-比尔定律。

在上式中,若 L 用厘米表示, C 用克/升表示,则比例常数 K 称为吸光系数,其值取决于入射的波长、溶液的性质和温度等,而与光的强度、溶液的浓度及液层的厚度无关。

若 L 用厘米表示, C 用摩尔/升表示,而上式中的比例常数用 ϵ 表示,得到

$$A = \epsilon LC$$

式中 ϵ 称为物质的摩尔吸光率 (molar absorptivity) 或摩尔吸光系数 (molar absorption coefficient)。

不同的物质可能会有相同的最大吸收波长,但其摩尔吸光系数不一定相同。 ϵ 值愈大,说明该物质溶液对光吸收愈强烈,则比色测定的灵敏度愈高。

三、分光光度计结构简介

能从含有各种波长的混合光中将每一单色光分离出来,并测量其强度的仪器称为分光光度计。分光光度计因使用的波长范围不同而分为紫外光、可见光、红外光以及万用(全波段)分光光度计等。无论哪一类分光光度计都由下列五部分组成,即光源、单色器、狭缝、样品池、检测系统,如图 1-1 所示。

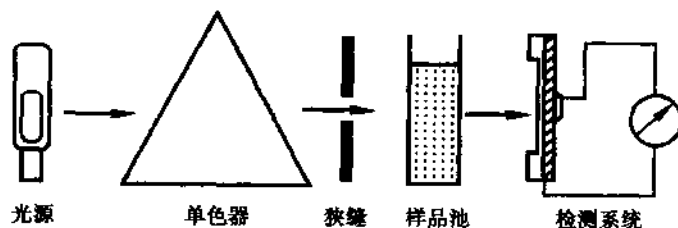


图 1-1 分光光度计各部分示意图

1. 光源 要求能提供所需波长范围的连续光谱,稳定而有足够的强度。常用的有白炽灯(钨丝灯、卤钨灯等),气体放电灯(氢灯、氘灯及氙灯等),金属弧灯(各种汞灯)等多种。

钨灯和卤钨灯发射 320~2000 nm 连续光谱,最适宜工作范围为 360~1000 nm,稳定性好,可用作可见光分光光度计的光源。氢灯和氘灯能发射 150~400 nm 的紫外线,可用作紫外光区分光光度计的光源。汞灯发射的不是连续光谱,能量绝大部分集中在 253.6 nm 波长处,一般作波长校正用。

钨灯在出现灯管发黑时应及时更换,如换用的灯型不同,还需要调节灯座的位置和焦距,氢灯及氘灯的灯管或窗口是石英的,且有固定的发射方向,安装时必须仔细校正。接触灯管时应戴手套以防留下污迹。

2. 分光系统(单色器) 单色器是指能从混合光波中分解出所需单一波长光的装置,由棱镜或光栅构成。