

生物学实验指导丛书



★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★

生物化学与分子生物学 实验指导

★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★

主编 贡成良 曲春香

生物化学与分子生物学丛书



生物化学与分子生物学 实验指导

王德成 王德成 王德成

2492850

生物学实验指导丛书

生物化学与分子生物学实验指导

主 编 贡成良 曲春香
副主编 薛仁宇 韩宏岩

苏州大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验指导/贡成良,曲春香
主编. —苏州:苏州大学出版社,2010.6
(生物学实验指导丛书)
ISBN 978-7-81137-455-1

I. ①生… II. ①贡… ②曲… III. ①生物化学—实
验—高等学校—教学参考资料②分子生物学—实验—高等
学校—教学参考资料 IV. ①Q5-33②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 104815 号

生物化学与分子生物学实验指导

贡成良 曲春香 主编

责任编辑 陈林华

苏州大学出版社出版发行

(地址:苏州市十梓街1号 邮编:215006)

金坛市教学印刷有限公司印装

(地址:金坛市金城镇江南路1号 邮编:213200)

开本 787 mm×1 092 mm 1/16 印张 27 字数 585 千

2010 年 6 月第 1 版 2010 年 6 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-81137-455-1 定价:52.00 元

苏州大学版图书若有印装错误,本社负责调换

苏州大学出版社营销部 电话:0512-65225020

苏州大学出版社网址 <http://www.sudapress.com>

生物学实验指导丛书

编 委 会

主 任 贡成良

副主任 戈志强 孟祥勋 张焕相

许维岸

编 委 戈志强 贡成良 韩宏岩

孟祥勋 曲春香 司马杨虎

孙丙耀 卫功元 许维岸

叶 荣 张焕相

《生物化学与分子生物学实验指导》

编写人员

主 编 贡成良 曲春香

副 主 编 薛仁宇 韩宏岩

编写人员 (按姓氏笔画顺序排列)

王雪峰 刘 超 曲春香 李 兵

陆 挺 贡成良 汪成富 郑小坚

徐 岚 顾福根 韩宏岩 薛仁宇

前言

本书系苏州大学医学部实验中心策划的生物学实验指导丛书之一,由江苏省生物学基础实验示范中心资助出版。

近年来,生物化学与分子生物学的基础理论与实验技术发展非常迅速,为了适应时代的发展和生物科学创新型人才的培养,许多高等院校对生物学相关专业的教学计划进行了较大幅度的调整和改革,在实验教学方面也开展了许多有益的探索。我们将原来依附于生物化学和分子生物学的实验课独立出来,单独开设。实验内容分基础实验、综合实验和自主创新实验3个部分。基础实验主要是经典实验方法和技术,综合实验主要是一些难度较大、花时较多的实验,自主创新实验主要是学生根据兴趣自主设计的研究性实验。这样既适合生物学大类招生又与完全学分制相呼应。

我们组织长期从事生物化学与分子生物学教学和研究的教师对原来使用多年的“生物化学实验指导”和“分子生物学实验指导”讲义进行了充实和完善,并增加了生物化学与分子生物学实验理论与技术方面的内容,从而保证了本教材的完整性。本书涉及面较广,并且有一些较大型的连续性实验,还有部分实验来源于教师的科研成果。我们希望通过本书的学习,使学生能够顺利完成根据实际情况所选择的实验内容,掌握生物化学与分子生物学实验最基本的技术,并在今后的研究工作中能灵活应用。

由于编写时间紧以及编者的水平有限,本教材的缺点、错误在所难免,敬请同学和同仁们不吝赐正。

编者

2009年夏于苏州独墅湖畔

目
录**第一篇 基础理论和技术**

第一章 离心技术	3
第一节 基本原理	3
第二节 离心机的种类和基本结构	5
第三节 常用离心技术	6
第四节 离心技术在生物学研究中的应用	9
第二章 分光光度法	11
第一节 基本原理	11
第二节 分光光度计	12
第三节 分光光度技术的应用	14
第三章 层析技术	17
第一节 层析基本理论	17
第二节 常用的层析技术	20
第四章 电泳技术	27
第一节 基本原理	27
第二节 电泳的分类	30
第三节 常用的电泳技术	31
第五章 生物化学实验样品制备技术	38
第一节 生物大分子制备的特点和一般步骤	38
第二节 植物样品的制备	39
第三节 动物样品的制备	41
第四节 微生物样品的制备	44
第五节 生物大分子——蛋白质	46

· 第六节 生物大分子——核酸	55
· 第六章 真核生物基因文库的构建	73
· 第一节 cDNA 文库的概念	73
· 第二节 cDNA 文库构建的策略	74
· 第三节 cDNA 文库的筛选	80
· 第七章 核酸杂交技术	83
· 第一节 分子杂交的一般过程	83
· 第二节 分子杂交的种类	84
· 第三节 探针	85
· 第四节 印迹技术	90
· 第五节 杂交体系	92
· 第六节 杂交信号的检测方法	92
· 第八章 聚合酶链式反应	94
· 第一节 聚合酶链式反应的发展历史	94
· 第二节 PCR 的原理	95
· 第三节 PCR 体系与条件	96
· 第四节 PCR 循环参数的确定	98
· 第五节 PCR 需注意的事项	99
· 第六节 PCR 的种类及用途	100
· 第九章 基因工程	105
· 第一节 基因工程的基本概念	105
· 第二节 基因工程的发展历史	109
· 第三节 基因工程的研究意义	111
· 第四节 基因工程的基本内容	113
· 第十章 DNA 序列测定技术	150
· 第一节 概述	150
· 第二节 Sanger 双脱氧链终止法	150
· 第三节 Maxam-Gilbert DNA 化学降解法	152
· 第四节 测序策略	154
· 第五节 DNA 序列测定自动化	157
· 第十一章 生物芯片技术	159
· 第一节 生物芯片的概念	159

第二节	生物芯片技术的发展历史	159
第三节	生物芯片的分类及特点	160
第四节	常用生物芯片的应用	163

第二篇 生物化学实验

第十二章	生物化学基础实验	171
实验一	缓冲溶液的配制和氨基酸两性性质的测定	171
实验二	分光光度计线性分辨范围的测定	176
实验三	还原糖和总糖含量的测定	178
实验四	用阳离子交换树脂摄取氯化钠	181
实验五	蛋白质的沉淀反应	183
实验六	定磷法测定 RNA 含量	185
实验七	紫外吸收法测定核酸的含量	187
实验八	可溶性糖的硅胶 G 薄层层析	189
实验九	血糖含量的测定	192
实验十	血清总胆固醇的测定	194
实验十一	血清甘油三酯的测定	196
实验十二	维生素 C 含量的测定(2,6-二氯酚靛酚法)	198
实验十三	氨基氮测定——甲醛滴定法	201
实验十四	酵母 RNA 的分离及组分鉴定	202
第十三章	生物化学综合实验	205
实验十五	双缩脲法测定蛋白质含量	205
实验十六	Folin-酚试剂法测定蛋白质含量	207
实验十七	考马斯亮蓝法测定蛋白质含量	209
实验十八	离子交换柱层析法分离氨基酸	212
实验十九	从牛奶中分离制备酪蛋白	213
实验二十	葡聚糖凝胶层析	215
实验二十一	等电聚焦电泳法测定蛋白质的等电点	219
实验二十二	醋酸纤维薄膜电泳法分离血清蛋白质	222
实验二十三	聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离血清蛋白质	225
实验二十四	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的 相对分子量	230

实验二十五	蛋白质印迹(Western blot)	234
实验二十六	血清谷丙转氨酶活性的测定	237
实验二十七	酶的专一性	239
实验二十八	激活剂和抑制剂对酶活性的影响	241
实验二十九	温度对酶活性的影响	243
实验三十	pH 对酶活性的影响	246
实验三十一	底物浓度对酶促反应速度的影响—— K_m 值的测定	249
实验三十二	绿豆超氧化物歧化酶的提取	252
实验三十三	硫酸铵沉淀法纯化 SOD	253
实验三十四	葡聚糖凝胶层析脱盐	256
实验三十五	有机溶剂分级沉淀法纯化 SOD	259
实验三十六	离子交换层析法纯化 SOD	260
实验三十七	SOD 活性的测定	263
实验三十八	绿豆 SOD 同工酶的鉴定	267
实验三十九	等电聚焦电泳法测定 SOD 的纯度及等电点	271

4 第三篇 分子生物学实验

第十四章	分子生物学基础实验	277
实验四十	质粒 DNA 的提取及纯化	277
实验四十一	质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	281
实验四十二	DNA 酶切与连接	288
实验四十三	DNA 片段的回收	293
实验四十四	植物组织基因组 DNA 的提取	297
实验四十五	动物组织基因组 DNA 的提取	298
实验四十六	细菌基因组 DNA 的制备	300
实验四十七	大肠杆菌感受态细胞的制备	302
实验四十八	外源 DNA 的连接与转化	304
实验四十九	重组转化子的酶切鉴定	307
第十五章	分子生物学综合实验	310
实验五十	PCR 扩增外源基因	310
实验五十一	Trizol 法提取总 RNA	315

实验五十二	RT-PCR	317
实验五十三	Southern 杂交	321
实验五十四	Northern 杂交	326
实验五十五	外源基因的诱导表达与检测	332
实验五十六	大肠杆菌包涵体的纯化与变复性	335
实验五十七	RNAi 抑制 GFP 基因的表达	338
实验五十八	寡聚核苷酸介导的克隆 DNA 的定点诱变	340
实验五十九	Real-time PCR 检测基因的表达水平	346
实验六十	热休克蛋白启动子的活性检测	350
实验六十一	体外翻译和免疫沉淀	352
实验六十二	双向电泳分离蛋白	354
实验六十三	体外转录	364
实验六十四	稳定转化细胞系的筛选	366
实验六十五	向 GenBank 提交 DNA 序列	368
实验六十六	常用生物学软件的使用	370

第四篇 创新性实验

一、创新实验操作流程	383
二、自主创新性实验参考题目	383
附 录	385
一、实验室中常用酸碱(液体)的比重和浓度	385
二、常用缓冲液的配制	385
三、硫酸铵溶液饱和度计算表	390
四、常用核酸的长度与分子量	391
五、常用核酸蛋白换算数据	392
六、常用蛋白质分子量标准参照物	393
七、常用 DNA 分子量标准参照物	393
八、常用酶的配制	393
九、常用抗生素的配制	394
十、常用贮存液的配制	395

十一、遗传密码	400
十二、氨基酸的特性	401
十三、几种最常用的限制性核酸内切酶位点	402
十四、离心机转速与相对离心力的换算	403
十五、常用离子交换剂	404
十六、常用凝胶过滤层析介质	406
十七、常用分子生物学网址	408
十八、实验室规则	410
十九、实验记录与实验报告	410
参考文献	412

生物学实验指导丛书

生物化学与分子生物学实验指导

第一篇

基础理论和技术

第一章

离心技术

要进行某种生物大分子物质(如蛋白质、核酸、酶)和细胞器的分离、提纯,或测定某些纯品的部分性质,离心是最常用的方法之一。随着离心技术的进步和离心设备的不断完善,尤其是高速和超速冷冻离心机的相继问世,离心分离已成为生命科学研究中一项最基本的技术。

第一节 基本原理

一、离心力

离心是利用旋转运动的离心力,以及物质的沉降系数或浮力密度的差别进行分离的一项实验技术。当质量为 m 的粒子以一定角速度做圆周运动时要受到一个外向的离心力 F 。这种力的大小取决于角速度(ω ,以 rad/s 表示)和旋转半径,方程式为:

$$F = m \cdot r \cdot \omega^2 = m \cdot r \cdot \left[\frac{2\pi N}{60} \right]^2$$

m 为沉降固体颗粒的有效质量(g), r 为离心半径(cm),即转子中心轴到沉降颗粒之间的距离。 N 为离心机转速(r/min)。目前, F 通常以相对离心力(R_{CF})来表示,即离心力 F 的大小相当于地球引力(mg)的多少倍,因而称相对离心力。可表示如下:

$$R_{CF} = \left[\frac{2\pi N}{60} \right]^2 \frac{rm}{mg} = 1.118 \times 10^{-5} N^2 \cdot r$$

习惯上, R_{CF} 单位常以重力加速度 g 的倍数表示;此公式描述了相对离心力与转速之间的关系。由于转头的形状及结构的差异,每台离心机的离心管从管口到管底各点与旋转中心的距离是不同的(图 1-1),因此旋转半径用 $r_{\text{平均}}$ 代替。

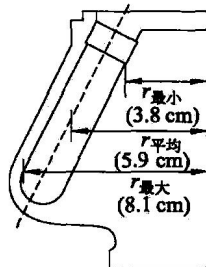


图 1-1 角度转头的剖面图
(Spinco L 型, 408 号转头)

(引自王宪泽. 生物化学实验技术原理和方法. 北京: 中国农业出版社, 2002)

$$r_{\text{平均}} = \frac{r_{\text{最大}} + r_{\text{最小}}}{2}$$

为了使用方便, Dole 和 Contzias 制作了转速(r/min)和半径相对应的测算图(图 1-2), 可以方便地将离心机转速换算成相对离心力 R_{CF} 。首先在半径 r 标尺上取已知的半径和转速 v_R 标尺上取已知的转速, 然后将这两点划一条直线, 与图中间 R_{CF} 标尺上的交叉点即为相应的 R_{CF} 。注意, 若已知的转速值处于 v_R 标尺的右边, 则应读取 R_{CF} 标尺右边的数值。同样, 转速处于 v_R 标尺的左边, 则读取 R_{CF} 标尺左边的数值。因此, 为了准确表示离心条件, 应该注明离心机的型号和采取的离心速度(r/min), 或者用 R_{CF} 表示。

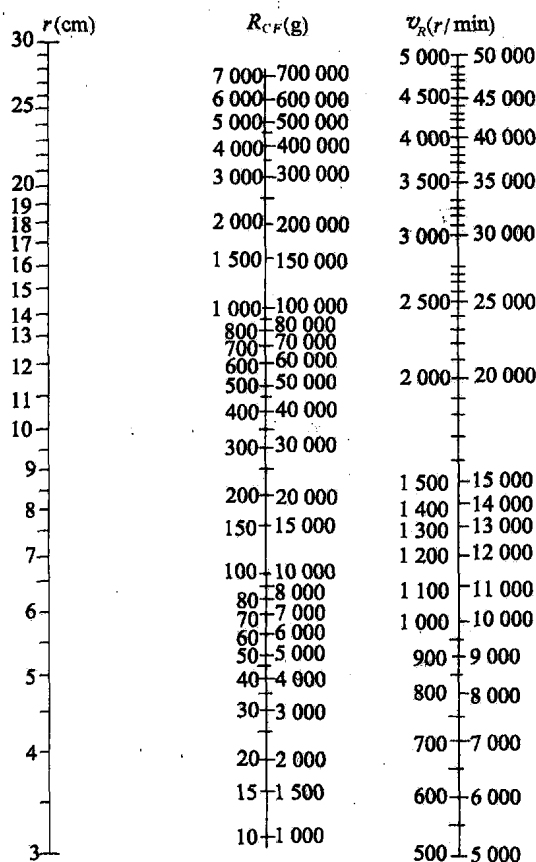


图 1-2 离心机的转速与离心力的列线图

(引自王宪泽. 生物化学实验技术原理和方法. 北京: 中国农业出版社, 2002)

二、沉降系数

受离心力作用的分子或颗粒, 单位时间内运动的距离称沉降速度。而单位离心力作用下的沉降速度称沉降系数。其单位用 Svedberg 表示, 简称 S, 量纲为秒。1S