

高等医药院校配套教材
(供药学、生命科学专业用)

XIANDAI YAOXUE SHENGWU JISHU
ZONGHE SHIYAN JIAOCHENG

现代药学生物技术 综合实验教程

主 编 杜 军
副主编 周 勤



中山大學出版社
SUN YAT-SEN UNIVERSITY PRESS

高等医药院校配套教材
(供药学、生命科学专业用)

XIANDAI YAOXUE SHENGWU JISHU
ZONGHE SHIYAN JIAOCHENG

现代药学生物技术 综合实验教程

主 编 杜 军
副主编 周 勤



中山大学出版社
SUN YAT-SEN UNIVERSITY PRESS

· 广州 ·

版权所有 翻印必究

图书在版编目 (CIP) 数据

现代药学生物技术综合实验教程/杜军主编;周勤副主编. —广州:中山大学出版社, 2014. 12

ISBN 978 - 7 - 306 - 05110 - 3

I. ①现… II. ①杜… ②周… III. ①药理学—生物工程—实验—医学院校—教材 IV. ①R9 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 298366 号

出版人: 徐 劲

策划编辑: 曹丽云

责任编辑: 曹丽云

封面设计: 曾 斌

责任校对: 周 玢

责任技编: 何雅涛

出版发行: 中山大学出版社

电 话: 编辑部 020 - 84111996, 84113349, 84111997, 84110779

发行部 020 - 84111998, 84111981, 84111160

地 址: 广州市新港西路 135 号

邮 编: 510275 传 真: 020 - 84036565

网 址: <http://www.zsup.com.cn> E-mail: zdcbs@mail.sysu.edu.cn

印 刷 者: 虎彩印艺股份有限公司

规 格: 787mm × 1092mm 1/16 11.75 印张 250 千字

版次印次: 2014 年 12 月第 1 版 2014 年 12 月第 1 次印刷

定 价: 28.00 元

如发现本书因印装质量影响阅读, 请与出版社发行部联系调换

本书编委会

主 编 杜 军

副主编 周 勤

编 委 杜 军 亓毅飞 张 帆 张 革 周 勤

作者简介



杜军，男，教授，博士生导师，中山大学药学院微生物与生化制药研究室主任，中山大学药学院教授委员会主任。1984年毕业于白求恩医科大学，获医学学士学位，并于同年攻读该校基础医学硕士学位，于1987年获硕士学位。先后在白求恩医科大学基础医学院任助教、讲师。于1994年前往日本名古屋大学医学部攻读免疫学科博士学位，其后留在该校任教官，担任免疫学的本科教学、科研工作。2004年作为“中山大学百人计划人才和学科带头人”引进，就职于中山大学药学院。主要从事肿瘤免疫相关基础研究，在基因调控与遗传改造及基因敲除等技术方面有丰富的工作经验。近5年在国际重要学术期刊发表相关论文60余篇。任德国杂志 *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 和英国杂志 *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 特约审稿人。熟悉当前肿瘤免疫治疗领域的研究热点、前沿及发展趋势。

前 言

随着生物技术的基础医学研究、疾病诊断与治疗以及药物开发中的广泛应用，掌握分子生物学、微生物学、免疫学等相关知识与某些实验技术，已经成为广大医药研究人员的迫切要求。

为适应药学发展及培养高素质人才的需要，中山大学药学院自 2009 年开始为全院本科生开设了“现代药学生物技术制药综合大实验”课程，受到历届本科生的欢迎。本书以增强型绿色荧光蛋白（enhanced green fluorescent protein, EGFP）为中心，从基因工程、蛋白的分离纯化，以及抗体的制备与效价的测定三个部分系统阐述了利用现代生物技术手段以及常用实验方法来获得多克隆抗体的方法。

编者在近 10 年的科研与教学实践基础上，参阅大量文献与论著，并结合自身实验经验编写成本书。本书对医药院校本科生、研究生、科研单位的实验研究人员均有实用价值和指导意义。

编者
2014 年 8 月

医药分子生物学实验目的与要求

- (1) 通过实验验证理论，学生的理论知识和概念得到巩固和深化。
- (2) 通过亲自动手操作，学生得到全面的基本操作技术的训练。
- (3) 培养学生独立操作、独立思考、分析问题及解决问题的能力。
- (4) 培养学生严谨、科学的工作态度和作风，培养创新能力和科研能力。

医药分子生物学实验室学生守则

(1) 实验前必须认真预习实验内容，明确本次实验的目的和要求，掌握实验原理，写好实验预习报告。

(2) 进入实验室应穿白大褂，离室时脱下，反折放回原处，不必要的物品不得带入实验室，必须带入的书籍和文具等应放在指定的非操作区，以免受到污染。

(3) 实验室内严禁吸烟、饮水和进食，实验时自觉遵守实验室纪律，保持室内安静，不大声说笑和喧哗。

(4) 严禁用嘴吸移液管和虹吸管。易燃液体不得接近明火和电炉。凡产生烟雾、有害气体和不良气味的实验，均应在通风条件下进行。

(5) 实验时认真如实地进行实验记录，实验完毕及时整理数据，按时上交实验报告。

(6) 实验过程中发生差错或意外事故时，禁止隐瞒或自作主张不按规定处理，应立即报告老师进行正确的处理。

(7) 爱护实验室内仪器设备，严格按操作规则使用。节约使用实验材料。不慎损坏了器材等，应主动报告老师进行处理。

(8) 实验废弃物的处理要严格执行生物安全管理规定，不得随意将含微生物的培养液直接倒入水池，严禁将生物垃圾混入普通生活垃圾。

(9) 实验完毕，应物归原处并将桌面整理清洁，值日生要认真做好实验室的卫生清洁工作。

目 录

第一部分 基础知识

第一章 实验室安全防护知识.....	3
一、化学试剂安全防护知识.....	3
二、放射性核素安全防护知识.....	5
三、生物安全知识.....	7
四、用电安全及其他安全知识	13
第二章 分子生物学实验室标准及功能分区	15
一、生物学约束	15
二、物理学约束	15
三、标准实验室的组成	16
第三章 分子生物学实验室常规仪器设备	18
一、紫外分光光度计	18
二、离心机	21
三、制水系统	24
四、PCR 仪	27
五、凝胶成像系统	29
六、酶标仪	30
七、微量移液器	32
八、pH 计.....	34
九、生物安全柜	35
十、超净工作台	36
十一、凝胶电泳系统	37
十二、高压蒸汽灭菌器	39
十三、液氮罐	41
第四章 实验基本技能与实验室常规基础知识	42



一、常用器材的清洗处理	42
二、实验用品及实验环境的消毒灭菌	44
三、细菌接种技术	49
四、细菌培养技术	51
五、细胞培养技术	54
六、实验材料的采集与处理	59
七、试剂及样品的保存	63
八、溶液的混匀法	66
九、实验室废弃物的处理	66

第二部分 实 验

实验一 质粒 DNA 的提取及鉴定	71
实验二 构建重组质粒 EGFP/pET-28a	78
实验三 阳性克隆的筛选与鉴定	87
实验四 IPTG 诱导 EGFP 蛋白表达	92
实验五 SDS-PAGE 蛋白质电泳	98
实验六 重组蛋白的分离与纯化	105
实验七 多克隆抗体的制备	114
实验八 间接 ELISA 法测定抗体效价	121
实验九 Western blotting 检测抗体含量	126
参考文献	136

附 录

附录一 核酸及蛋白质数据	139
附录二 分子克隆中常用缓冲液与试剂的配制	142
1. Tris 缓冲液	142
2. 磷酸缓冲液	143
3. 电泳缓冲液和上样缓冲液	144
4. 其他常用缓冲液	148
附录三 常用贮存液的配制	151
附录四 常用酶的配制	156
1. 溶菌酶	156



2. 蛋白水解酶类	156
3. 无 DNA 酶的 RNA 酶	157
附录五 细菌培养基、抗生素的配制	158
1. 常用培养基	158
2. 常用抗生素溶液	160
附录六 溴化乙锭 (EB) 的净化处理	161
1. EB 浓溶液 (即质量浓度 >0.5 g/L) 的净化处理	161
2. EB 稀溶液 (如含有 0.5 mg/L EB 的电泳缓冲液) 的净化处理	161
3. 其他处理方法	162
附录七 常用试剂的作用	163
1. 水饱和酚溶液去除蛋白质的原理	163
2. 溶液 I : 溶菌液	163
3. 溶液 II : NaOH-SDS 液	163
4. 溶液 III : 3 mol/L NaAc (pH 4.8) 溶液	164
5. 无水乙醇沉淀 DNA 的原理	164
6. 乙醇沉淀 DNA 时, 加 NaAc 或 NaCl 的作用	164
7. 使用乙醇沉淀 DNA, 降温保存的作用与方式	164
8. 加 DNase 降解核糖核酸后再用 SDS 与 KAc 处理的原因	165
9. 在保存或抽提 DNA 过程中, 用 TE 缓冲液的作用	165
10. 抽提 DNA 去除蛋白质时使用酚与氯仿的方法	165
11. 用酚与氯仿抽提 DNA 时还要加少量异戊醇的原因	166
12. pH 8 的 Tris 水溶液饱和酚的作用原理	166
附录八 常见载体图谱	167
1. GST 融合表达载体	167
2. His 标签融合表达载体	168
3. 真核表达载体	169
4. RNA 干扰载体	171
5. 酵母表达载体	172
6. T 载体	173

第一部分 基础知识





第一章 实验室安全防护知识

分子生物学实验室中可以说是“危机四伏”，即着火、爆炸、中毒、触电的危险时刻存在。因此，每一位实验人员都必须有充分的安全意识、严格的防范措施和丰富实用的防护救治知识，一旦发生意外能正确地进行处置，以防事故进一步扩大。

一、化学试剂安全防护知识

为安全起见，化学试剂在使用之前，必须对其安全性能，如是否有毒，是否有腐蚀性，是否易燃易爆，是否有强氧化性，是否有放射性，等等，有一个全面的了解，这样在使用时才能有针对性地采取一些安全防范措施，以避免由于使用不当造成对实验人员及实验设备的危害。下面将按化学试剂的安全性能，对各类化学试剂使用中的注意事项分别加以介绍。

(一) 有毒化学试剂

一般的化学试剂对人体都有毒害，有毒化学药品可通过呼吸道、消化道和皮肤进入人体而发生中毒现象。实验人员在使用时一定要避免大量吸入，在使用后，要及时洗手、洗脸、洗澡、更换工作服。吸入或食入少量即能中毒致死的化学试剂，生物试验中致死量 (LD_{50}) 在 50 mg/kg 以下的称为剧毒化学试剂，如氰化钾、氰化钠及其他氰化物，三氧化二砷及某些砷化物，二氯化汞及某些汞盐，硫酸，二甲酯，等等。在使用性能不清的化学试剂时，一定要了解它的 LD_{50} 。对一些常用的剧毒化学试剂，一定要了解中毒时的急救处理方法。剧毒化学试剂一定要有专人保管，并严格控制使用量。

防毒注意事项：实验前应了解所用药品的毒性、性能和防护措施；使用有毒气体（如 H_2S , Cl_2 , Br_2 , NO_2 , HCl , HF ）时，应在通风橱中进行操作；苯、四氯化碳、乙醚、硝基苯等蒸气经常久吸会使人嗅觉减弱，必须高度警惕；有机溶剂能穿过皮肤进入人体，应加强防护，避免其直接与皮肤接触；剧毒药品如汞盐、镉盐、铅盐等应妥善保管；实验操作要规范，离开实验室要洗手。



(二) 腐蚀性化学试剂

皮肤、黏膜、眼以及呼吸器官沾到任何化学试剂时都要及时清洗，特别是对皮肤、黏膜、眼以及呼吸器官有极强腐蚀性的化学试剂（不论是液体还是固体），如各种酸和碱、三氯化磷、氯化氧磷、溴、苯酚等，在使用前一定要了解接触到这些腐蚀性化学试剂的急救处理方法，如酸溅到皮肤上要用稀碱液清洗等。

(三) 易燃易爆化学试剂

一般将燃点（也称“闪点”）在 25 ℃ 以下的化学试剂列为易燃化学试剂，它们多是极易挥发的液体，遇明火即可燃烧。闪点越低，越易燃烧。常见闪点在 -4 ℃ 以下的有乙醚、汽油、苯、乙酸乙酯等。

使用易燃化学试剂时绝对不能使用明火，也不能直接用加热器加热，一般用水浴加热。这类化学试剂应存放在阴凉通风处；如果放在冰箱中，一定要使用防爆冰箱。曾经发生过将乙醚存放在普通冰箱而引起火灾，烧毁整个实验室的事故。在大量使用这类化学试剂的地方，一定要保持良好的通风，所用电器一定要采用有防爆装置的，现场绝对不能有明火。

易燃试剂在激烈燃烧时也可引发爆炸，一些固体化学试剂如硝化纤维、苦味酸、三硝基甲苯、三硝基苯、叠氮化合物等，遇热或明火，极易燃烧或分解，发生爆炸。在使用这些化学试剂时绝不能直接加热，还要注意周围不要有明火。

还有一类固体化学试剂，遇水即可发生激烈反应，并放出大量热量，也可发生爆炸。这类化学试剂有金属钾、钠、锂、钙，氢化铝，电石等，在使用这些化学试剂时一定要避免它们与水直接接触。

有些固体化学试剂与空气接触即能发生强烈的氧化作用，如黄磷；还有些试剂与氧化剂接触或在空气中受热、受冲击或摩擦能引起剧烈燃烧，甚至爆炸，如硫化磷、赤磷、镁粉、锌粉、铝粉等。在使用这些化学试剂时，一定要注意周围环境温度不要太高（一般不要超过 30 ℃，最好在 20 ℃ 以下），不要与强氧化剂接触。

使用易燃化学试剂的实验人员，要穿戴好必要的防护用具，最好戴上防护眼镜。

(四) 强氧化性化学试剂

强氧化性化学试剂都是过氧化物或是含有强氧化能力的含氧酸及其盐，如过氧化氢、硝酸铵、硝酸钾、高氯酸及其盐、重铬酸及其盐、高锰酸及其盐、过氧化苯甲酸、五氧化二磷，等等。强氧化性化学试剂在适当条件下可放出氧而发生爆炸，并且与有机物、镁、铝、锌粉、硫等易燃物形成爆炸性混合物，有些遇水也可能发生爆炸。在使用这类强氧化性化学试剂时，环境温度不要高于 30 ℃，通风要良好，



并且不要与有机物或还原性物质共同使用（加热）。

防火防爆注意事项：防止煤气管、煤气灯漏气，使用煤气后一定要把阀门关好；乙醚、乙醇、丙酮、二硫化碳、苯等有机溶剂易燃，实验室不得存放过多，切不可倒入下水道，以免积聚引起火灾；钠、钾、铝粉、电石、黄磷以及金属氢化物使用和存放时要注意安全，尤其不宜与水直接接触。万一着火，应冷静判断情况，采取适当措施灭火；可根据不同情况，选用水、沙、泡沫、二氧化碳或四氯化碳灭火器灭火。

（五）放射性化学试剂

使用放射性化学试剂时，一定要按放射性物质使用方法，采取保护措施。从事X射线相关工作的人员，应具备放射卫生防护基本知识，在工作前后做好个人卫生防护。工作时必须按规定穿戴好防护用具，如白布工作服、口罩、胶皮手套、铅围裙、铅手套、铅眼镜等，工作结束后做好个人清洁工作。要养成良好习惯，不在工作场所进食、饮水，不用嘴吹、吸放射性物质。

二、放射性核素安全防护知识

（一）基本概念

放射性是自然界存在的自然现象。大多数物质的原子核是稳定不变的，但有些物质的原子核不稳定，会自发地发生某些变化，这些不稳定的原子核在发生变化的同时会发射各种各样的射线，这种现象被称为放射性。放射性物质可分为天然放射性物质如铀、钍、镭，及人工放射性物质如一些医疗诊断用放射性示踪剂。

放射源发射出的射线具有一定能量，可以破坏组织细胞，从而对人体造成伤害。当人体受到大量射线照射时，可产生头痛、恶心等症状。放射源发射的射线有 α 射线、 β 射线、 γ 射线、中子射线等，必须使用专门的仪器才能探测到。不同的射线在物体中的穿透能力也各不相同。放射源包装容器一般都是特殊设计的专用容器，以防对人体造成伤害，大多为球形和圆柱形，一般用铅、铸铁、钢等材料制成。放射源警示标志如图1.1.1所示，国家标准规定，所有放射性工作场所及放射源的包装容器上都必须有警示标志。



图 1.1.1 放射源警示标志

（二）放射防护的“三原则”

国际放射防护委员会（ICRP）1977年第26号出版物中提出，放射防护的基本



原则是放射实践的正当化、放射防护的最优化和个人剂量限制。

1. 放射实践的正当化

在进行任何放射性工作时，都应当进行代价和利益的分析，要求任何放射实践对人群和环境可能产生的危害比起个人和社会从中获得的利益，应当是很小的，即效益明显大于付出的全部代价时，所进行的放射性工作就是正当的，是值得进行的。

2. 放射防护的最优化

应使放射性和照射量在可以合理达到的尽可能低的水平，避免一些不必要的照射。要求对放射实践选择防护水平时，必须在由放射实践带来的利益与所付出和健康损害的代价之间权衡利弊，以期用最小的代价获取最大的净利益。放射防护的最优化在于促进社会公众集体安全的卫生保健，它是剂量限制体系中的一项重要原则。

3. 个人剂量限制

在放射实践中，应不产生过高的个体照射量，保证任何人的危险度不超过某一数值，即必须保证个人所受的放射性剂量不超过规定的相应限值。ICRP 规定，工作人员全身均匀照射的年剂量当量限值为 50 mSv（毫希沃特），居民的年剂量当量限值为 1 mSv（0.1 rem*）。我国放射卫生防护基本标准中，对工作人员年剂量当量限值采用了 ICRP 推荐规定的限值，为防止随机效应，规定放射性工作人员受到全身均匀照射的年剂量当量不应超过 50 mSv（5 rem），公众中个人受照射的年剂量当量应低于 5 mSv（0.5 rem）。当长期持续受放射性照射时，公众中个人在一生中每年全身受照射的年剂量当量限值不应高于 1 mSv（0.1 rem），且以上这些限制不包括天然本底照射和医疗照射。

个人剂量限制是强制性的，必须严格遵守。各种规定的个人剂量限值是不可接受的剂量范围的下限，而不是可以允许接受的剂量上限。即使个人所受剂量没有超过规定的相应的剂量当量限值，仍然必须按照最优化原则考虑是否要进一步降低剂量。所规定的个人剂量限值不能作为达到满意防护的标准或设计指标，只能作为以最优化原则控制照射的一种约束条件。

（三）放射性同位素的实验室操作规程

在放射性实验室工作期间，必须穿着工作服、戴手套等，在相应的防护条件下

* rem：雷姆。1979 年第 16 届国际计量大会决定用 Sv 代替 rem。1 Sv = 100 rem。



操作；放射性核素操作需在盛有吸水纸的托盘上进行；使用挥发性试剂要在通风橱内进行；操作不同放射性核素要在相应的实验室内进行；实验过程中不得在无关实验室内随意走动；严禁在实验室内饮水、进食、吸烟以及任何口吸法操作或鼻嗅放射性制剂；穿戴工作手套后切勿触碰与实验无关的物件，防止污染；发生放射性污染要及时向实验室责任人报告，并及时清理去污；严格区分放射性与非放射性用具及设备，不得将不同被污染器皿放置于同一清洁池内；实验完毕，要清理实验用品，处理放射性废物，清除放射性污染。依据标准，废弃试剂可采用贮存衰变法、稀释排放法、焚烧浓缩法处理。

放射性防护主要有以下四点：用量防护，即降低放射性试剂的活度，采取最低需要剂量；时间防护，缩短受到照射的时间；距离防护，增大与放射源之间的距离；屏蔽防护，设置防护屏蔽物，如铅板等。

三、生物安全知识

生物安全是指人们对于由动物、植物、微生物等生物体给人类健康和自然环境可能造成不安全的防范。从实验室研究到产业化生产，从技术研发到经济活动，从个人安全到国家安全，都涉及生物安全性问题。生物安全性问题包括：①外来物种迁入导致生态系统的不良改变或破坏；②人为造成的环境剧烈变化危及生物的多样性；③科学研究、开发、生产和应用中，经遗传修饰的生物体和危险的病原体等可能对人类健康、生存环境造成危害。

（一）生物安全的含义

生物安全的概念有狭义和广义之分。狭义生物安全是指防范由现代生物技术的研究、开发和应用所产生的负面影响对生物多样性、生态环境及人体健康可能构成的危险或潜在风险。特别是各类转基因生物活体被释放到环境中，可能对生物多样性构成潜在威胁。

广义生物安全是指防范与生物有关的各种因素对社会、经济、人类健康及生态环境所产生的危害或潜在风险。它不仅针对现代生物技术的研究、开发和应用，还涵盖了狭义生物安全的概念并且包括了更广泛的内容。大致分为三个方面：一是指人类的健康安全；二是指人类赖以生存的农业生物安全；三是指与人类生存有关的环境生物安全。因此，广义生物安全涉及多个学科和领域，包括预防医学、环境保护、植物保护、野生动物保护、生态、农药、林业等。

在广义生物安全的定义里，“与生物有关的各种因素”主要有三种因素：一是天然的生物因子，主要包括动物、植物和微生物。其中，由微生物特别是致病性微生物所导致的安全问题，如生物武器、生物恐怖袭击、重大传染病的暴发流行等，