

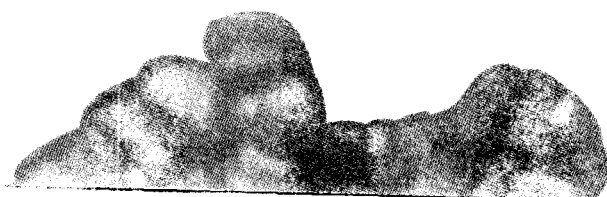
321
LONGMAN

生物分子科学实验技术

Rob Reeb, David Holmes,
Jonathan Weyers and Allan Jones 著

王小菁 李德红 孟祥春 翻译

湖南科学技术出版社



生物分子科学实验技术

著 者: Rob Reed, David Holmes, Jonathan Weyers and Allan Jones

翻 译: 王小菁 李德红 孟祥春

责任编辑: 唐乘花 刘堤地 张 珍

出版发行: 湖南科学技术出版社

社 址: 长沙市湘雅路 280 号

<http://www.hnstp.com>

邮购联系: 本社直销科 0731—4375808

印 刷: 益阳人民印刷有限公司

(印装质量问题请直接与本厂联系)

厂 址: 益阳市五一东路 268 号

邮 编: 413001

经 销: 湖南省新华书店

出版日期: 2001 年 11 月第 1 版第 1 次

开 本: 880mm × 1230mm 1/16

印 张: 24.75

字 数: 680000

书 号: ISBN 7-5357-3361-1/Q·61

定 价: 42.00 元

(版权所有·翻印必究)

前言

实验工作是科学知识的奠基石,我们目前对自然界的认识是建立在早期科学家从各个学科角度对自然界进行观察和实验的基础上的。近年来,随着技术和方法(如核酸分析和基因工程技术)的突飞猛进,我们对生物系统在细胞和分子水平上运作的认识大大加深了。同时,分析方法的改进使得科学家能够检测和研究恒量的生物分子。因而,细胞和分子生物科学中需要的实验技能训练是多种多样的,包括从实验的设计技能和一系列分析设备的正确使用,到实验结果的书面或口头报告。

编写本书是《生物学实验技术》(*Practical Skills in Biology*)一书反馈的直接结果。许多评论家、同事和学生建议写一本着重介绍生命科学的分子和细胞方面的教材,以帮助学生掌握微生物学、生物化学、遗传学、分子生物学、生物医学、生理学和护理学等学科的实验技能。在《生物学实验技术》(第二版)出版的同时,我们更新、修改了相关材料,将原先的内容(如实验结果的记录、解释和报告)与一些新的知识(主要集中在分析和分子方面,如分离方法、细胞培养、微生物遗传学)结合起来,编写了《生物分子科学实验技术》(*Practical Skills in Biomolecular Sciences*)。标题反映了本书涉及范围的广度——我们的目的不是为专家们写一本详尽的生物分析方法和生化技术手册,而是为学生们进行较为困难的实验工作提供方便的指导。本书与新版《生物学实验技术》的不同之处在于:后者涉及的范围更加广阔,包括生物个体和生态学的内容。学生们可根据自己的兴趣选择课本。

在本书中,我们根据自己的教学经验选取了有关内容,着重介绍了学生们需要指导的部分。对于个别学科的专家来说,本书有些章节介绍得不够详细,但对大多数入学不久就开设多门课程的学生来说,我们试图给予广泛的帮助和指导,其中包括在一般正式的教科书中没有详细介绍的内容(如第45节中对数和指数的应用,第59节中学习的技巧)。我们还特别介绍了一些实验方法和步骤,使得本书可作为各种有用信息资料的来源,诸如溶液的制备(第5节)、聚合酶链式反应(第41节)、从因特网上获取信息(第49节)及统计检验的解释(第47节)等等。

比较《生物学实验技术》(第二版)和本书可以发现,本书有18节是全新的(第17, 22, 25~34, 36, 37, 39~41, 49节),还有一些章节作了大幅度修订(如第9, 14, 21, 24, 35, 42, 46节),增加了生物分子、代谢及遗传学实验方面的内容。其他章节中与《生物学实验技术》(第二版)相关的内容保留了下来,如涉及基本实验原理的最初几节及涉及信息交流的最后几节。本书内容比《生物学实验技术》(第二版)多10%,反映出章节更多,涉及的分析技术和方法的范围更广。

有许多深入解释理论原理和涉及课堂知识的专业书籍(如结构生化和中间代谢详论)。本书的目的不是替代这些专业书籍,而是作为这些书籍的补充,更多地介绍实验技能、操作技巧、提示、实例、定义、要点、“怎

样做”的图文框和分类名目等实验课需要用到的技能。虽然在必要的地方给出了基本的理论原理,但重点始终仍是这些信息的实际应用。尽管大部分内容是写给大学初期阶段的学生的,但我们相信,该书在这些学生进入更高的学位层次以及毕业以后仍然有用,为此,有一些章节对现代技术作了介绍(如第 22 节的光谱技术和分光光度法,第 27 节的电泳技术及第 12 节的课题研究工作)。专业化的技术方法、设备和方案的更多详细介绍可见各节所引用的参考文献,以及教材如《实验方法丛书》[*Practical Approach Series* (IRL Press, Oxford)],《生物技术丛书》[*The Introduction to Biotechniques Series* (Bios, Oxford)],《酶学研究方法》[*Methods in Enzymology* (Academic Press, London)] 以及《分析化学实验技术》[*Analytical Chemistry by Open Learning*, (Wiley, Chichester)]。

我们希望学生在上实验课和进行课题研究时充分利用这本书,而不是将它束之高阁。教师可将本书作为一种有效工具,以弥补在实验课上因时间和资源的局限而导致学生动手少的不足。

在此,我们感谢家人们的支持和阅读本书草稿的同事们给予的帮助。特别要感谢: James Abbott, Jon Bookham, Brian Eddy, Mark Daniels, Martin Davies, John Dean, Jackie Eager, Howard Griffiths, Claire Halpin, Steve Hitchin, Derek Holmes, Ed Ludkin, Ian Kill, Pete Maskrey, Tom Marshall, Kate Maxwell, Steve Millam, Rachel Morris, John Raven, Zoe Reed, Pete Rowell, Bill Tomlinson, Will Whitfield, Katherine Williams, Ian Winship, Peter Wright, Bod Young 以及 Hilary - Kay Young。尽管有了这些帮助,我们仍该对书中存在的任何错误承担责任。我们衷心希望读者指出书中存在的错误与问题,以便尽快修改。请写信至 Northumbria 或 Dundee, 也可发 e-mail 到下列地址: rob. reed@unn. ac. uk (RHR); david. holmes@unn. ac. uk (DH); j. d. b. weyers@dundee. ac. uk (JDBW); a. m. jones@dundee. ac. uk (AMJ)。

罗伯·里德(ROB REED), 大卫·荷尔姆斯(DAVID HOLMES),
琼纳坦·威也斯(JONATHAN WEYERS)和 阿兰·琼斯(ALLAN JONES)

缩写词表

AC	亲和层析
ACDP	危险病源物咨询委员会
ADP	二磷酸腺苷
ANOVA	方差分析
ATP	三磷酸腺苷
BSA	牛血清蛋白
CCCP	碳酰氰 <i>m</i> -氯苯肼
CE	毛细管电泳
CFU	菌落形成单位
CGE	毛细管凝胶电泳
COSHH	健康危害物质控制法
CoV	变异系数
CTP	胞苷三磷酸
CZE	毛细管区带电泳
ddNTP	双脱氧核糖核苷三磷酸
DMSO	二甲基亚砷
DNA	脱氧核糖核酸
dsDNA	双链 DNA
dNTP	脱氧核糖核苷三磷酸
ECD	电子捕获检测器
EDTA	乙二胺四乙酸
EI	电子碰撞电离
EIA	酶免疫检测
ELISA	酶联免疫吸附测定
EMR	电磁辐射
EOF	电渗流
ESR	电子自旋共振
<i>F</i>	法拉第常数
FAB-MS	快速原子轰击-质谱法
FIA	荧光免疫测定
FID	氢火焰离子检测器
FPLC®	快速蛋白质液相色谱

FT	傅立叶变换
FT - IR	傅立叶变换红外光谱技术
GC	气相色谱
GPC	凝胶渗透层析
h	普朗克常数
HIC	疏水作用色谱
HPLC	高效液相色谱
IEC	离子交换色谱
IEF	等电聚焦
Ig	免疫球蛋白
IMAC	固定化金属离子亲和层析
IR	红外(辐射)
IRGA	红外气体分析仪
IRMA	免疫放射分析
IRMS	同位素比率质谱
ISE	离子选择性电极
K_m	米氏常数
LDH	乳酸脱氢酶
MEKC	微束电动力学层析
MPN	最大几率数
M_r	相对分子质量
MRI	磁共振成像
MS	质谱分析法
NAD ⁺	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(氧化态)
NADH	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(还原态)
NADP ⁺	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(氧化态)
NADPH	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(还原态)
NH	无效假设
NMR	核磁共振
PAGE	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PAR	光合有效辐射
PCR	聚合酶链式反应
PEG	聚乙二醇
PFD	光子流密度
PFU	噬菌斑形成单位

PGFE	脉冲场凝胶电泳
PI	光合辐照度
PPFD	光合光子流密度
PPI	焦磷酸
PVA	聚乙烯醇
PY - MS	热解 - 质谱法
<i>R</i>	普适气体常数
RCF	相对离心场
<i>R_f</i>	相对前沿迁移率
RIA	放射免疫测定法
RID	放射免疫扩散
RNA	核糖核酸
RP - HPLC	反相 - 高效液相色谱
RT	逆转录酶
SCOT	有帽的开口管(毛细管柱)
SDS	十二烷基磺酸钠
SE	(样本平均数的)标准误
SEM	扫描电子显微镜
SI	国际单位制
ssRNA	单链 RNA
STP	标准温度和压力
TCA	三氯乙酸
TCD	导热性检测器
TEM	透射式电子显微镜
TEMED	N, N, N', N' - 四甲基乙二胺
TLC	薄层层析
TMPD	四甲基对苯二胺
TRIS	三(羟甲基)氨基甲烷 或 2 - 氨基 - 2 - 羟甲基 - 1, 3 - 丙烷二醇
TTP	胸苷三磷酸
UNG	尿嘧啶 - N - 糖苷酶
URL	统一资源定位器
UV	紫外(辐射)
<i>v_{max}</i>	最大速度

1 基础实验技术	(1)
1 基本原则	(3)
2 健康与安全	(5)
3 溶液的量取	(7)
4 基本实验步骤	(13)
5 溶液化学原理	(21)
6 pH 与缓冲液	(28)
7 显微镜简介	(34)
8 光学显微镜的设置与使用	(36)
 2 研究方法	(43)
9 测量与记录	(45)
10 SI 单位及其应用	(50)
11 科学方法和实验设计	(55)
12 课题研究	(60)
 3 组织与细胞操作	(65)
13 无菌技术与微生物培养	(67)
14 微生物的分离与鉴定	(74)
15 动植物组织和细胞的研究	(83)
16 培养体系与生长测量	(89)
17 细胞和组织的匀浆与分离	(97)
 4 分析技术	(103)
18 免疫技术	(105)
19 放射性同位素及其应用	(111)
20 光的测定	(119)
21 基础光谱技术	(122)
22 现代光谱技术和分光光度计	(129)

23	离心技术	(135)
24	层析技术——分离方法	(141)
25	层析技术——检测与分析	(152)
26	电泳的原理与操作	(157)
27	高级电泳技术	(167)
28	电化学分析技术	(172)
5	生物分子分析与代谢研究	(181)
29	生物分子分析的基本原理	(183)
30	氨基酸和蛋白质的分析	(185)
31	脂类分析	(190)
32	碳水化合物的测定	(196)
33	核酸和核苷酸的分析	(200)
34	蛋白质提纯	(206)
35	酶学研究方法	(214)
36	膜转运过程	(223)
37	光合作用和呼吸作用的测定	(230)
6	遗传学技术	(237)
38	孟德尔遗传学	(239)
39	细菌和噬菌体遗传学	(245)
40	分子遗传学 I——基本原理	(253)
41	分子遗传学 II——PCR 及其应用	(262)
42	分子遗传学 III——基因工程技术	(267)
7	数据分析和统计	(275)
43	绘图	(277)
44	制表	(282)
45	解决数据问题的技巧	(285)
46	描述性统计学	(291)
47	统计检验的选取与使用	(298)
8	信息技术与图书馆资料	(309)
48	因特网与万维网简介	(311)

49	分子生物学的网上资源	(315)
50	制表软件的使用	(320)
51	文字处理器、数据库及其他软件包	(325)
52	文献的查找与引用	(332)
9	信息交流	(337)
53	科学论文写作概述	(339)
54	论文写作	(344)
55	实验报告和课题研究报告	(347)
56	文献综述	(352)
57	墙报的设计与展出	(354)
58	口头报告	(358)
59	考试	(363)
	参考文献	(370)
	索引	(374)

1 基础实验技术

1	基本原则	3
2	健康与安全	5
3	溶液的量取	7
4	基本实验步骤	13
5	溶液化学原理	21
6	pH 与缓冲液	28
7	显微镜简介	34
8	光学显微镜的设置与使用	36

基本原则

培养实践技能——包括：

- (a) 观察与测量；
- (b) 记录数据；
- (c) 设计实验；
- (d) 分析与解释数据；
- (e) 汇报/报告。

在实验室里使用课本——实验时带上有关的课本，以便在实验过程中充分利用各种资料。

汇报结果——虽然你不必成为绘图设计专家，但实验报告的陈述和展示非常重要，表达太差会丢分。

所有科学知识和理论都来自实践观察和实验，显微技术和分子遗传学等学科领域同样如此。实践工作是大多数课程和评价工作的重要组成部分。本书旨在为大家提供一本易学易用的参考资料，便于掌握生物分子科学中有关的基本实验技术与技能。在实验课中培养起来的能力对你完成学业十分有益，并对你将来从事科学和其他工作有深远影响。

充分准备

要点 实验前准备越充分，受益越多。不要认为实验课上的一切都已由老师准备好了，自己便不用动手了。

切记几点：

- 预习实验内容，明确实验目的和有关的实验技能。该实验与你当前的课堂学习有关吗？是否需要复习或预习这部分内容？
- 实验时带上课本，以便解答实验中遇到的问题。
- 在开始实验之前考虑一下可能出现的安全问题及应采取的预防措施。
- 认真聆听教导，记下重点，必要时调整一下实验方案。
- 实验过程中要保持桌面整洁：实验课本要靠近但不要放在工作区内；把清洁的玻璃器具等放在实验桌的一边，用过的器具放在另一边。
- 尽快完成实验报告并按时上交，否则会丢分。
- 尽快补做遗漏的实验，最好在下次实验之前补上。

基本要求

(一) 记录实验结果

活页装订的 A4 纸记事夹使用起来灵活方便，可以在适当的位置插入实验记录或实验图表。但其主要缺陷是容易丢失一张或多张记录纸。使用记事本可避免此类问题，但交替的线条/图表或线条/空白纸张会比较浪费——可根据需要将绘图纸粘贴在笔记本中。

建议准备一支质量较好的 HB 铅笔或活动铅笔记录原始数据或绘制图表等,以便于修改;用黑色的油性记号笔在玻璃器皿上做标记;优质的精细绘图/写字笔用于图表定稿;用透明直尺(边缘未破损)绘图,这样在绘制时能看清尺子下面的数据点/内容。

(二)计算器

计算器包括从只有一个存储器、没有任何预编程的函数的简单计算器,到具有多个存储器、可编程进行复杂运算的微型计算机。在使用计算器时,要了解以下几点:

- 电源。优先选用干电池(而不是交流电或太阳能)供电的计算器。计算器要具有乘方、对数、开方、求根、括号及统计函数(如样本平均数和标准差)等基本的数学或科学运算功能。

- 运算模式。旧运算系统(如惠普计算器)为逆向输入模式,如计算 2 与 4 的和,输入顺序为“2”,“Enter”,“4”,“+”,即显示结果“6”。该式更常见的计算方法是“2+4=”,绝大多数现代计算器采用这种运算模式。后一种方法显得更为直观。花点时间了解你的计算器的运算模式,例如,是否按几何逻辑运算(先输入“ ”,然后输入数字,而不是先输入数字,后输入“ ”)?它是如何处理科学符号的?

- 显示。有些计算器显示整个数学运算过程(如“2+4=6”),而其他计算器只显示最终结果。前者便于追踪查寻错误。

- 复杂性。初学阶段最好不要选用复杂的计算器,虽然它们看起来不错,但程序化的函数很少用到——应当选用具有较多存储器及括号和统计函数而不是工程或纯数学常数的计算器。较高级的学习研究则使用可编程的计算器。然而,要注意考试时常常不准使用这种计算器。

(三)制作高级实验报告

在许多实验报告和课题研究中,需要使用较高级的表达设备,如计算机绘图软件。在课题报告和墙报展示时,选用容易阅读的字体,并认真设计版面和内容(第 57 节)。另外,也可使用精细的绘图笔和字母/符号印章(如 Letraset® 产品)制作报告,但这种方法比使用计算机要花费更多时间。

可用油性记号笔和醋酸纤维胶片为口头报告制作透明胶片。用计算机软件制作的课题报告也可以用激光打印机直接打印在特制醋酸纤维胶片或直接制作在 35 mm 幻灯片上。报告内容也可直接影印到特制醋酸纤维胶片上。第 58 节将提供口头报告的内容和表达方面的建议。

绘制图表——图表要足够大,以便于阅读:经常因比例尺选择不当而使图表太小。

打印胶片——标准的透明胶片不能用于激光打印和影印,应选用特制的胶片类型。

健康与安全

在英国,《健康与安全工作法案(1974)》为健康与安全提供了重要的法律保障。《有害物质控制法规(1994)和(1996)》(COSHH)为有害化学物质和生物试剂的危险性评估提出了专门的法律要求。《实验操作核准代码》严格控制有害物质、致癌物、生物试剂(包括病原微生物)的使用。

定义

危险(hazard)——一种物质或生物试剂能引起毒害的能力。

危险性(risk)——在特定条件下,某种物质或生物试剂产生危害的可能性。

区别危险与危险性——水的危险之一是能使人溺死,而几滴水使人溺死的危险性是微乎其微的。



图 2.1 有害物质进入人体的主要途径

健康与安全法要求研究机构为工作人员提供安全无害的工作环境,并对工作人员进行安全操作的宣传和培训。学生和职员必须十分注意自己和他人的健康与安全,正确使用一切安全设施。

要点 时刻谨记一切实验工作都必须在安全条件下进行,将对自己和他人的危害降到最小。安全工作,人人有责。

危险性评估

开展安全工作的第一步通常是进行危险性评估,内容包括:

- 实验物质固有的化学、生物、物理的危险品及其最大的接触限量(maximum exposure limits, MELs)或职业性接触标准(occupational exposure standards, OESs)。化学药品生产商提供特定化学物质危害程度的列表,而病原(致病)微生物则根据其致病能力进行分类(第13节)。

- 危险性。要考虑到化学物质的使用量、使用方式及侵入人体的可能途径(图2.1)。在此,要区分特定物质的固有危险性与其在特定实验中的危险性。

- 处于危险环境中的人可能接触危险物质的途径,包括意外泄露(溅溢)。

- 阻止或控制有害物品泄露的措施。理想的方法是使用无害或微害的替代品。如果不行,则要采取适当的控制措施,如通风橱或其他操作间。除此之外,还要使用自我保护设施(如实验工作服、防护镜)。同时考虑废弃物的安全处理措施。

必须记录危险评估的结果,必须告诉在危险环境中工作的人员有关的安全知识。大多数实验室的危险评估由负责人提前进行:要把将危险降低到最小的必要知识写入操作规程。学生在实验前应了解系里提供的安全知识,并阅读有关资料。在实验开始时要与安全工作的负责人密切联系,了解主要的危险与危害所在。在课题研究中,开展实验前你需要与主管人员一起进行危险性评估。

除了专门的危险性评估外,大多数研究机构都有安全手册,给出了安全工作的一般细则以及安全负责人、急救员、医院等的姓名、名称



图 2.2 有害化学物质的警告标志

和电话号码。切记要阅读和遵守这些规则。

实验室工作的基本规则

- 保证熟悉如何处理着火事故,包括安全出口通道、怎样启动报警器、在哪里集中离开着火的建筑物等。切记,在任何时候人身安全是第一位的;非安全境地不要试图救火。

- 所有实验室都出示通知,告诉你万一发生意外/事故在哪里可找到急救箱、与谁联系等。事故后要向主管人员报告事故过程,包括看起来无关紧要的事故。管理人员将按照安全法规进行正式记录。

- 时刻穿着保护衣——整洁的实验服(扣好纽扣),还有防护镜(对眼睛有害的场合)。

- 严禁在实验室吸烟、饮食,以免吸入或误食污染物(图 2.1)。

- 使用移液管时,不要用嘴吸取液体,应使用洗耳球。

- 小心使用玻璃仪器,细节见“玻璃器皿的安全使用”。

- 了解危险化学药品的警告标志(图 2.2)。

- 使用危险化学药品要在通风橱中操作。保证通风橱正常工作,必要时只打开前门;通风橱上一般标有最大开口限度。

- 危险药品始终用最小剂量。

- 操作时有条理,干净利落,考虑周密,尽可能避免事故发生。

- 每次实验完毕要进行彻底清理。这是安全保证的重要方面,也可培养对实验工作负责的态度。

遗传工程与分子遗传学

有专门法规适用于遗传操作实验。在任何实验中使用遗传工程技术包括以 DNA 插入来修改一个细胞或有机体(第 42 节),这样的情形不是正常发生的,都要进行专门的危险性评估。在进行任何实验工作之前,必须经过遗传操作安全委员会的审定授权,并通报相应的权威机构。这样的工作必须在适当的监管下进行,以免遗传上改变了的生物意外地流入周围环境。

分子遗传学实验涉及一些遗传操作技术。重组 DNA 分子由有机体天然存在的 DNA 片段组成,这是“自我克隆”的例子,如用 pUC 质粒转化大肠杆菌的实验室菌株。像这样的情形,应用微生物不太可能引起人类疾病,通常不需通报和监管。

在英国,《遗传操作法规》(*Genetic Manipulation Regulations*)详细阐明了对涉及遗传操作的工作进行危险评估和通报的法律要求。

遗传操作顾问委员会(*Advisory Committee on Genetic Manipulation*)对遗传操作的生物体提供指导。

在英国,健康与安全执行委员会(*Health and Safety Executive, HSE*)专门负责这些法规的执行,并且是遗传操作的权威管理机构。

溶液的量取

液体的量取和分配

计量器具的选择应依量取液体的体积、准确度和量取的次数而定(表 3.1)。

表 3.1 计量器具的选择标准

计量方法	最佳量程	准确度	重复量取的效率
滴管	30 μL ~ 2mL	低/中等	极好
量筒	5 ~ 2 000 mL	中等	好
容量瓶	5 ~ 2 000 mL	高	好
滴定管	1 ~ 100 mL	高	极好
移液管/移液器	5 ~ 25 μL	高 ¹⁾	极好
微量注射器	0.5 ~ 50 μL	高	好
称量	任何量度(取决于天平的准确度)	极高	差
锥形瓶/烧杯	25 ~ 5000 mL	极低	好

1)要求正确校准和使用(见图文框 3.1)。

读取体积刻度——视线与液体弯月面的底部相平,然后读取该处的刻度。

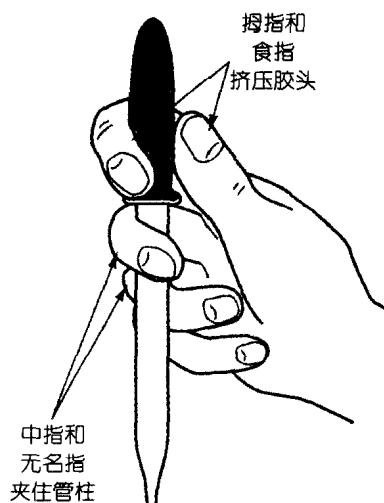


图 3.1 滴管的持握方法

某些液体可能引起的问题:

- 高黏度的液体难以分液,转移较费时。
- 有机溶剂挥发快,造成测量不准确;操作要迅速,密封容器要迅速。
- 易产生泡沫的溶液(如蛋白质和去污剂溶液)较难量取和分液:操作勿快,避免形成气泡。
- 悬浮液(如细胞培养物)容易形成沉淀,移取前要充分混匀。

(一)滴管

正确使用滴管(图 3.1)——保持滴管垂直,以中指和无名指夹住管柱,拇指和食指轻轻挤压胶头,使液体逐滴滴下。

使用滴管吸取有毒溶液时要小心:松开胶头之前一定要将管尖移离溶液,吸入的空气可防止液体溢散。为了避免交叉污染,不要将溶液吸入胶头或将滴管横放。一次性塑料滴管使用安全,可避免污染。