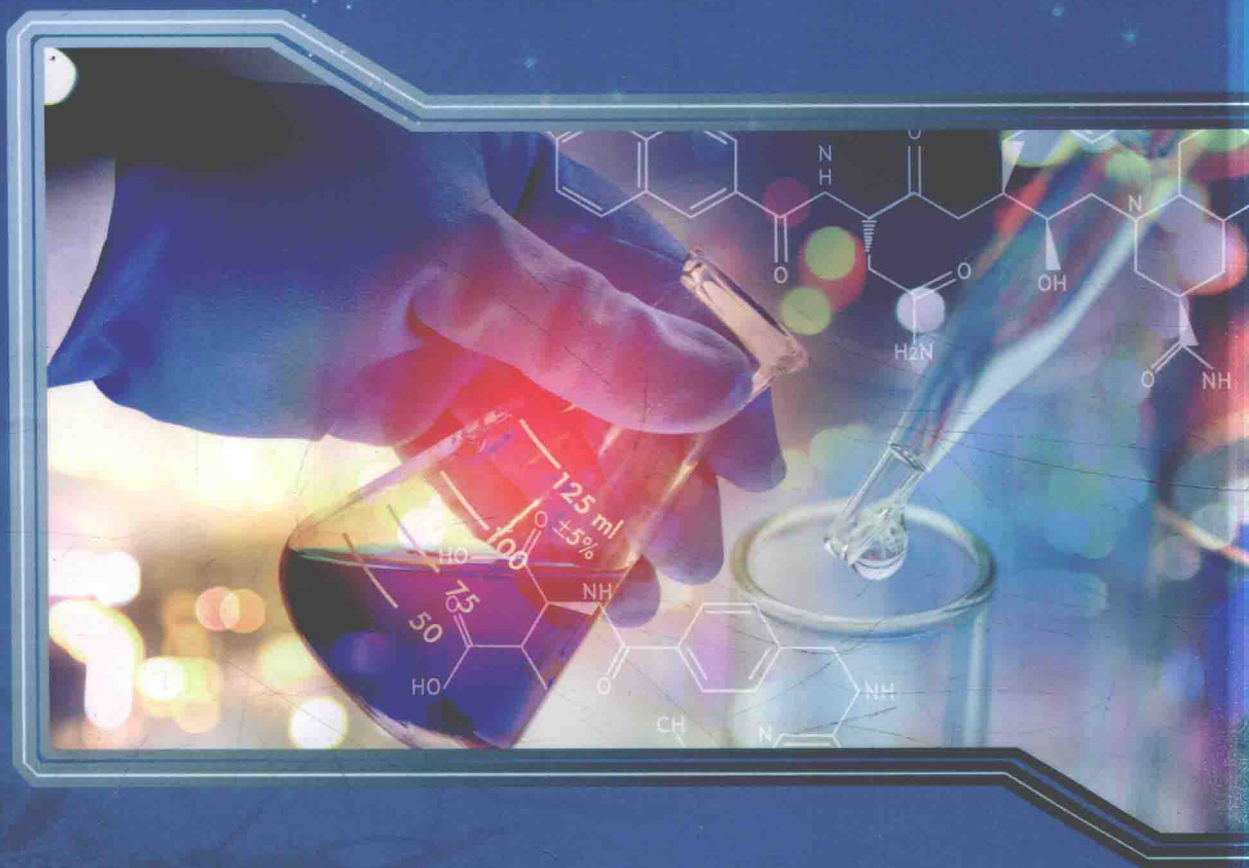


高等医学院校实验系列规划教材

生物化学与分子生物学实验

SHENGWU HUAXUE YU FENZI SHENGWUXUE SHIYAN

主编 秦宜德 张胜权



中国科学技术大学出版社

高等医学院校实验系列规划教材

生物化学与分子生物学实验

SHENGWU HUAXUE YU FENZI SHENGWUXUE SHIYAN

主 编 秦宜德 张胜权



中国科学技术大学出版社

内 容 简 介

本实验教材基本上涵盖了目前大多数医学院校生物化学与分子生物学实验课的内容。主要包括生物化学与分子生物学一般验证性实验如蛋白质定性等、生物化学与分子生物学基本实验技能训练如电泳和色谱(层析)分析等、综合性实验如基因工程和蛋白质分离纯化等。

本书适合医学院校大多专业(包括临床医学、护理学、药学、口腔医学、预防、检验和生物技术等)生物化学与分子生物学实验教学使用,也适合医学院校科学学位的研究生选修生物化学与分子生物学课程的实验教学使用,还可供相关专业和科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

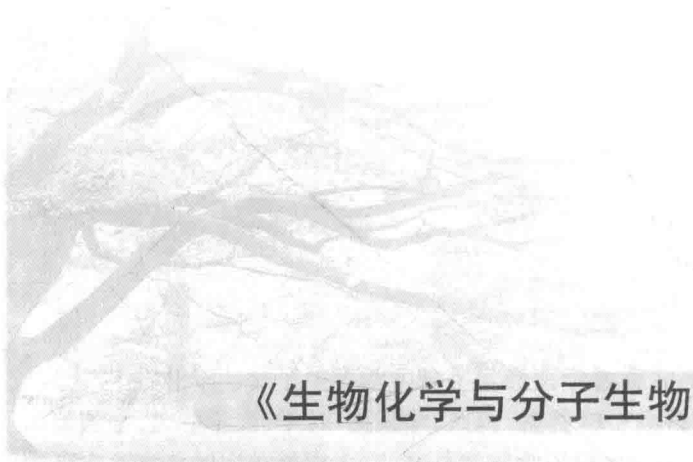
生物化学与分子生物学实验/秦宜德,张胜权主编. —合肥:中国科学技术大学出版社, 2017. 1

ISBN 978-7-312-04138-9

I. 生… II. ①秦… ②张… 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. ①Q5-33 ②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 009562 号

出版 中国科学技术大学出版社
地址:安徽省合肥市金寨路 96 号,邮编:230026
网址:<http://press.ustc.edu.cn>
印刷 安徽省瑞隆印务有限公司
发行 中国科学技术大学出版社
经销 全国新华书店
开本 787 mm×1092 mm 1/16
印张 6.5
字数 166 千
版次 2017 年 1 月第 1 版
印次 2017 年 1 月第 1 次印刷
定价 20.00 元



《生物化学与分子生物学实验》编委会

主 编

秦宜德 张胜权

编 委 (以姓氏拼音为序)

安 然 范新炯 冯婷婷 顾 芳

胡若磊 华 娟 黄海良 秦宜德

查晓军 张胜权 张素梅 章华兵

前 言

生物化学与分子生物学实验是生命医学教育和研究的重要基础和技能,是医学院校临床医学、护理学、药学、口腔医学、预防、检验和生物技术等专业的必修课。依据高等医学院校大多专业制定的教学大纲,在总结安徽医科大学多年实验教学经验的基础上,结合了大多省部医学院校的生物化学与分子生物学学科的教学条件,我们组织一线教师编写了这本实验教材。

本实验教材基本上涵盖了目前大多数医学院校生物化学与分子生物学实验课的内容。主要包括生物化学与分子生物学一般验证性实验如蛋白质定性等、生物化学与分子生物学基本实验技能训练如电泳和色谱(层析)分析等、综合性实验如基因工程和蛋白质分离纯化等。本书适合医学院校大多专业包括临床医学、护理学、药学、口腔医学、预防、检验和生物技术等生物化学与分子生物学实验教学使用,也适合医学院校科学学位的研究生选修生物化学与分子生物学课程的实验教学使用,还可供相关专业和科研人员参考。

由于编写时间仓促,加之我们的水平有限,本书难免存在不妥之处,敬请同行专家和使用的师生批评指正。

编 者

2016年10月·

目 录

前言	(i)
绪论	(1)
实验一 蛋白质的定性实验	(4)
实验二 凝胶渗透层析	(10)
实验三 醋酸纤维素薄膜电泳法分离血清蛋白质	(13)
实验四 蛋白质定量分析(双缩脲法)	(16)
实验五 酶的定性实验	(19)
实验六 碱性磷酸酶 K_m 值测定	(24)
实验七 蔗糖酶的酶活力和 K_m 测定	(28)
实验八 糖酵解实验	(32)
实验九 胆固醇氧化酶法测定血清总胆固醇	(36)
实验十 氨基移换及精氨酸酶在尿素形成中的作用	(38)
实验十一 细菌质粒 DNA 提取	(43)
实验十二 PCR 及琼脂糖凝胶电泳	(46)
实验十三 细菌基因组 DNA 的提取	(50)
实验十四 真核细胞基因组 DNA 提取	(53)
实验十五 真核细胞 RNA 的提取	(56)
实验十六 RT-PCR	(60)
实验十七 目的基因 DNA 的回收	(63)
实验十八 限制性内切酶酶切	(66)
实验十九 DNA 片段和载体的连接反应	(70)
实验二十 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化	(72)
实验二十一 阳性克隆的筛选	(75)
实验二十二 基因表达产物的鉴定——Western blot	(79)
实验二十三 血清中 IgG 的分离纯化和鉴定	(88)

绪 论

生物化学与分子生物学实验是一门指导学生掌握科学探索方法、熟悉实验仪器操作、验证基本理论的重要课程。该课程重在培养学生创新思维能力、动手操作能力和团队协作能力,为学生日后的科学探索和医学实践打好基础。正如老一代科学家钱临照教授所说:“实验室是发现与培养人才的良好地方。培养学生能力,尤其是创新能力,是实验室的重要功能与任务。”实验室是学校办学的基本条件之一,是学生进行技能训练,开展科技活动的重要场所。实验室除必备仪器设备、实验材料和高素质的实验技术人员外,还必须具备良好的实验环境和必要的安全设施,以确保实验结果的质量和实验室的安全。因此加强实验室的管理工作是实验教学、学生科研以及课外活动正常进行的重要保证。

一、实验室规则

1. 实验的基本要求

自觉遵守课堂纪律,不迟到,不早退。养成文明习惯,不大声喧哗,不随地吐痰。注意节约试剂、药品及水电。实验前认真预习,熟悉实验目的和基本原理;实验中认真听课,按照要求认真操作,仔细观察实验现象和结果,如实做好原始记录,对于实验过程中发现的问题要善于思考,不能解决时请示指导老师;实验后认真总结,根据原始记录严肃认真地书写实验报告。

2. 仪器保管及清洁

各种仪器、药品应存放整齐,取用方便,用后清洗干净、复原。对于贵重仪器和易燃、易爆、剧毒药品须小心谨慎,防止意外事故。

3. 试剂使用规则

养成良好习惯,试剂瓶及药品用后即盖,防止其内容物氧化和污染(空气污染和交叉污染);废弃物品倒入指定盛器内,不得乱丢。

4. 实验室安全常识

① 进入实验室开始工作前应了解水阀门及电闸所在位置。离开实验室时,一定要将室内检查一遍,将水和电的开关关好。② 使用电器设备时要严防触电,绝不可以用湿手或在眼睛旁视时开关电闸和电器开关。③ 使用浓酸、浓碱时,必须极为小心地操作,防止溅失。使用吸量管量取这些试剂时,必须使用橡皮球,绝不可以用口吸取。若不慎溅在试验台或地面上,必须及时用湿抹布擦洗干净。如触及皮肤应及时治疗。

5. 废弃物处理

废液,特别是强酸和强碱不能直接倒在水槽中,应先稀释,然后倒入水槽,再用大量自来水冲洗水槽及下水道。毒物、动物组织或/和尸体要按要求丢弃在指定的冰柜中或特定的

地方。

6. 实验室清洁

在整个实验过程中,要保持实验台面的整洁;实验完毕后,清理实验台,打扫实验室,检查完灯、火、水后,再离开实验室。

二、实验报告的书写

实验报告的书写是实验课教学的重要环节。实验报告是科学实验的忠实记录和总结,记录实验结果、书写实验报告是锻炼学生分析能力的有效途径,也是对学生实验课学习成绩考查的参考。每次实验结束后,应认真做好实验报告。

1. 实验记录

实验记录是实验过程的原始资料,也是书写实验报告的依据。实验前必须认真预习,弄清原理和操作方法,并在实验记录本上写出扼要的预习报告,内容包括实验基本原理、简要的操作步骤(可用流程图等表示)和记录数据的表格等。

2. 实验报告

实验报告是实验的总结和汇报,通过实验报告的写作可以分析总结实验,学会处理各种实验数据的方法,加深对有关生物化学与分子生物学原理和实验技术的理解和掌握,同时也是学习撰写科学研究论文的过程。实验报告的内容应包括实验题目、实验目的、实验原理、实验试剂和仪器、实验步骤、实验结果与现象(定性实验)或实验结果与计算(定量实验)、实验结论、实验讨论、实验者姓名和实验日期。

生物化学与分子生物学的实验报告分为定性报告和定量报告两种,下面的实验报告格式可供参考。

实验× ×××××××(题目) 年 月 日
一、实验目的
二、实验原理(可用反应式)
三、实验试剂和仪器
四、实验步骤(表格式或条文式)
五、实验结果与现象(定性实验)/实验结果与计算(定量实验)
六、实验讨论
七、实验结论
实验者:×××

实验报告必须独立完成,严禁抄袭。实验报告要语言简洁,重点突出,各种实验数据都要尽可能整理成表格并作图表示,以便进行比较。每个图都要有明显的标题,坐标轴的名称要清楚完整,要注明合适的单位。实验结果中讨论和结论部分要尽可能多查阅一些有关的文献和教科书,充分运用已学过的知识,进行深入的讨论,勇于提出自己独到的分析和见解。书写实验报告应注意以下几点:

- ① 书写实验报告最好用练习本。
- ② 应简明扼要地概括出实验的原理,如涉及化学反应,最好用化学反应式表示。
- ③ 应列出所用的试剂和主要的仪器。
- ④ 实验步骤的描述要写明白,以便他人能够重复。

⑤ 讨论不应是实验结果的重述,而是以结果为基础的逻辑推论。如对定性实验,在分析实验结果的基础上应有一简短而中肯的结论。讨论部分还可以包括关于实验方法(或操作技术)的一些问题,如实验异常结果的分析,对于实验设计的认识、体会和建议,对实验课的改进意见等。

(秦宜德)

实验一 蛋白质的定性实验

【实验目的】

通过实验验证进一步理解蛋白质的理化性质。

一、沉淀反应

(一) 盐析法

【实验原理】

在水溶液中,蛋白质分子表面由于形成水化层和双电层,而成为稳定的亲水胶体颗粒分散于水相中。但在高浓度的中性盐影响下,分子表面的水化层被脱去,蛋白质所带电荷被盐离子中和,结果蛋白质的胶体稳定性因素遭到破坏而沉淀析出。各种蛋白质分子颗粒大小及亲水程度不同,盐析所需的盐浓度也不一样,因此调节蛋白溶液中的中性盐浓度,可使不同蛋白质分段沉淀。如球蛋白在半饱和硫酸铵中即可析出,而清蛋白则须在饱和硫酸铵中才能析出。盐析沉淀蛋白质一般是可逆的,加水稀释降低盐浓度后,蛋白质可重新溶解并保持其生物活性。

【主要仪器及器材】

试管、刻度吸管、玻璃棒、普通离心机等。

【实验试剂】

1. 蛋清稀释液:将鸡蛋清用蒸馏水稀释 10 倍(V/V),相当于 10%鸡蛋清溶液。
2. 饱和硫酸铵溶液:称取硫酸铵 80 g,溶于 100 mL 蒸馏水中,用时取上清液。

【实验操作】

1. 取 10% 鸡蛋清溶液 10 滴,沿管壁缓慢加入 10 滴饱和硫酸铵溶液,观察结果,并加以解释。
2. 向沉淀管中逐滴加入蒸馏水,观察沉淀是否溶解,并加以解释。
3. 向上清液管中逐渐加入固体硫酸铵(约 100 mg),观察蛋白质是否沉淀,并加以解释;再加入蒸馏水,观察沉淀是否溶解。

(二) 乙醇沉淀法

【实验原理】

乙醇可以减少蛋白质分子表面的水化膜,并可降低溶液的介电常数,从而降低蛋白质亲水胶体颗粒在溶液中的稳定性,使这些大分子脱水并互相聚积析出,若同时加入少量中性盐,则沉淀更为迅速。

【主要仪器及器材】

试管、刻度吸管、滴管等。

【实验试剂】

1. 5% 鸡蛋清溶液:将鸡蛋清用蒸馏水稀释 20 倍即成。
2. 95% 乙醇。
3. 饱和氯化钠溶液。

【实验操作】

取试管 1 支,加入 5% 鸡蛋清溶液 10 滴,缓慢加入 95% 乙醇 20 滴。边加边摇匀,静置片刻,观察有无沉淀。再加入饱和氯化钠溶液 2~3 滴,观察结果并加以解释。

(三) 重金属盐沉淀法

【实验原理】

重金属离子可与蛋白质结合成稳定的沉淀而析出。蛋白质在水溶液中是两性电解质，在弱碱性溶液中，蛋白质分子带负电荷，能与带正电荷的重金属离子如 Pb、Ag、Zn 等结合成蛋白质金属盐而沉淀。重金属离子与蛋白质结合成难溶的盐类，因而沉淀是不可逆的。

【实验试剂】

1. 5%鸡蛋清溶液，见乙醇沉淀法。
2. 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液。
3. 3%醋酸铅溶液。
4. 0.5%硫酸锌溶液。

【实验操作】

取试管 2 支，按表 1.1 操作。

表 1.1 2 支试管的加液步骤

管号	5%鸡蛋清溶液	0.1 mol/L 氢氧化钠	3%醋酸铅	0.5%硫酸锌
1	10 滴	2 滴	4 滴	—
2	10 滴	2 滴	—	4 滴

充分混匀后，观察结果并加以解释。

(四) 有机酸沉淀

【实验原理】

有机酸如磺基水杨酸、三氯醋酸可与蛋白质分子表面的正电荷结合，使蛋白质沉淀。这种沉淀作用可使血清等生物样品中的蛋白质完全除去，因此得到广泛应用。

【实验试剂】

1. 5%鸡蛋清溶液。
2. 10%三氯醋酸。
3. 20%磺基水杨酸。

【实验操作】

取试管 2 支,按表 1.2 操作。

表 1.2 2 支试管的加液步骤

管号	5%鸡蛋清溶液	20%磺基水杨酸	10%三氯醋酸
1	20 滴	10 滴	—
2	20 滴	—	10 滴

充分混匀后,观察结果并加以解释。

二、蛋白质的两性反应**【实验原理】**

蛋白质分子上有些基团可以放出质子而带负电荷,也有一些基团可接受质子而带正电荷。蛋白质分子在水溶液中所带正、负电荷的多少,取决于溶液的氢离子浓度。当溶液达到某一 pH 时,可使某种蛋白质所带的正、负电荷相等,此 pH 称为这种蛋白质的等电点。蛋白质达到等电点时溶液溶解度最低。溶液的 pH 在蛋白质的等电点碱侧时该蛋白带负电荷,而溶液的 pH 在蛋白质的等电点酸侧时该蛋白带正电荷。溶液的 pH 离等电点愈远,所带相应电荷也愈多。在远离等电点时,因各蛋白质分子带同种电荷而相互排斥,故不易发生凝聚沉淀,溶解度增大,当达到等电点时,电荷的排斥作用消除,故易凝聚而沉淀。

【实验试剂】

1. 0.5%酪蛋白溶液:以 0.01 mol/L NaOH 溶液作溶剂。
2. 0.01%溴甲酚绿指示剂:称取 100 mg 溴甲酚绿溶于 100 mL 蒸馏水中(内含 1 mL

0.1 mol/L NaOH)。此指示剂变色范围为 pH 3.8~5.4,酸式型为黄色,碱式型为蓝色。

3. 0.02 mol/L HCl。

4. 0.02 mol/L NaOH。

【实验操作】

取一支试管,加 0.5% 酪蛋白溶液 10 滴和 0.01% 溴甲酚绿 2 滴,混匀,观察溶液呈现的颜色,并说明原因。

用滴管缓慢加入 0.02 mol/L HCl 溶液,边加边摇,直至有明显的大量沉淀产生,此时溶液的 pH 接近酪蛋白等电点,观察溶液颜色的变化,并说明原因。

继续滴加 0.02 mol/L HCl 溶液,观察沉淀的消失和溶液颜色的变化,并说明原因。

再缓慢滴加 0.02 mol/L NaOH,注意观察发生的变化,并解释之。

三、蛋白质的变性、凝固——pH 对于变性蛋白质再溶性的影响

【实验原理】

高温能使蛋白质变性,变性蛋白质在等电点附近最易发生絮析和凝固;在远离等电点,虽因加热蛋白质变性,但因变性蛋白质带有相同的电荷而相互排斥,仍不易发生絮析或凝固。

【实验试剂】

1. 10% 鸡蛋清溶液。

2. 0.1% 醋酸。

3. 10% 醋酸。

4. 1 mol/L NaOH。

【实验操作】

取试管 3 支,按表 1.3 操作。

表 1.3 3 支试管的加液步骤

管号	10%鸡蛋清溶液	0.1%醋酸	10%醋酸	1 mol/L NaOH
1	16 滴	4 滴	—	—
2	16 滴	—	4 滴	—
3	16 滴	—	—	4 滴

混匀各管后,沸水浴 5 min,比较各管的情况。并解释之。

(冯婷婷)

实验二 凝胶渗透层析

【实验目的】

利用 Sephadex G-25 凝胶层析,分离含有不同大小溶质分子的样品,并测出洗脱曲线,通过实验了解并熟悉凝胶渗透层析的原理和实际应用。

【实验原理】

凝胶渗透层析是按照溶质分子大小的不同而进行分离的一种层析技术。当溶液分子中大小不同的样品通过凝胶柱时,由于凝胶颗粒内部的网络结构具有分子筛效应,分子大小不同的溶质就会受到不同的阻滞作用。分子量大的因不易渗入网络,被排阻在凝胶颗粒之外,因而所受到的阻滞作用小,先流出层析床;分子量小的因能渗透到网络的内部,洗脱流程长,所受到的阻滞作用大,后流出层析床。这样就可以达到分级分离的目的,见图 2.1。

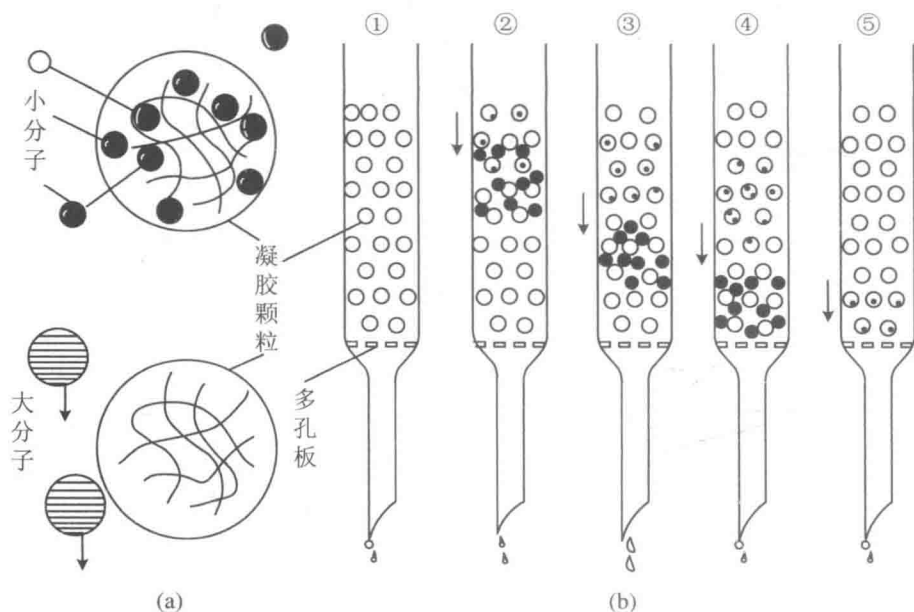


图 2.1 凝胶层析的原理

- (a) 水分子由于扩散作用进入凝胶颗粒内部而被滞留,大分子被排阻在凝胶颗粒外面,在颗粒之间迅速通过。
(b) ① 蛋白质混合物上柱;② 洗脱开始,小分子扩散进入颗粒内,大分子则被排阻于颗粒外;③ 小分子被滞留,大分子向下移动,大、小分子开始分开;④ 大、小分子完全分开;⑤ 大分子行程较短,已洗脱出层析柱,小分子尚在进行中。

【实验试剂】

1. Sephadex G-25 (干胶)。

2. 样品: 血红蛋白, 核黄素(以洗脱液溶解)。

3. 洗脱液: 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.3)。配制: ① A液, 称取磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 7.808 g 溶于蒸馏水中, 加蒸馏水稀释至 1000 mL。② B液, 称取磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 17.929 g 溶于蒸馏水中, 加蒸馏水稀释至 1000 mL。③ 取 A液 775 mL, 加于 B液 225 mL 中, 混匀后即成。

【实验操作】

1. 凝胶的处理。

① 溶胀与浮选: 将凝胶放入过量的水中浸泡 6 h(沸水浴中为 2 h)。浸泡后搅动凝胶再静置, 待凝胶沉淀后, 用倾泻法去除上层细悬浮液, 如此反复数次。② 平衡: 将浸泡后的凝胶抽干, 用 10 倍量的洗脱液处理约 1 h, 搅拌后继续去除上层细悬浮液。

2. 装柱。

将层析柱垂直装好, 待气泡排除后, 使溶液在底端留至约 1 cm 高即可行关闭, 将处理好的凝胶在烧杯内用 1 倍的溶液搅拌调成悬浮液, 自柱顶部沿管内壁缓慢加入柱中。待底部凝胶沉淀至 1~2 cm 时, 缓慢打开底端出口管, 随之继续添加凝胶悬浮液直至床体积沉淀至 20 cm 高度为止(操作中应注意防止产生气泡与节痕)。

3. 平衡。

柱装好后, 使层析床稳定 5~10 min, 然后接上恒流泵或恒压洗脱瓶打开出口, 用两倍于床体积的洗脱液平衡, 使层析床稳定。若采用恒流泵则要预先调好流速, 流速为 10~15 滴/min(以下均同)。

注意: 在洗脱时要将恒流泵至层析柱的连接管内泡全部排除, 以免影响流速(对于采用恒压瓶调节流速时可在靠近柱的顶部加一调节阀, 另外在调节中务必防止流速过大以及层析床液体流干)。此外, 如果需要稳定平衡则同时在层析柱夹套内通入恒温冷却水。

4. 层析床校正。

为了取得良好的层析效果, 在层析前需要对所装的层析柱进行检查。检查方法如下: ① 用肉眼观察层析床是否均匀, 有没有“纹路”和气泡, 床表面是否平整。② 用蓝葡聚糖 2000 进行层析行为的检查, 在层析柱内加进 1 mL(2 mg/mL) 蓝葡聚糖 2000, 然后用洗脱液进行洗脱(洗脱的作用压与流速同前), 在层析中, 当移动的指示剂色带狭窄均一则说明装柱良好。③ 检查后再经洗脱液平衡, 即重复步骤 3 就可使用。

5. 加样与洗脱。

打开平衡好的层析柱底部出口, 使柱内溶液至床表面时关闭, 将吸取 0.5 mL 样品的加样滴管在距床表面 1 mm 处沿管壁轻轻转动加进样品, 加完后, 再打开底端出口使样品流至床表面, 用少量洗脱液同样小心清洗表面 1~2 次, 使洗脱液流至床表面, 然后将洗脱液在柱