

全国高等医学院校配套实验教材

生物化学与分子生物学实验指导

库热西·玉努斯 关亚群 主编



科学出版社

www.sciencep.com

全国高等医学院校配套实验教材

生物化学与分子生物学 实验指导

主 编 库热西·玉努斯 关亚群

主 审 赵学信

副主编 张丽萍 斯坎德尔·白克力 许晨波

编 者 (以姓氏笔画为序)

关亚群 许晨波 刘晓宇 刘 玲

库热西·玉努斯 张丽萍 张景萍

杨 梅 陈 艳 阿不来提·阿合买提

武贵臻 贺 提 袁武梅 黄静静

斯坎德尔·白克力 彭 嘉 韩明国

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书为《生物化学与分子生物学》教材的配套实验教材。全书共分三部分:概论、基本原理与技术以及教学实验。本书内容涵盖了生物化学与分子生物学基本实验技术和原理,又包含了学科前沿的实验内容。

本书适合于医学院校各学制学生使用。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验指导/库热西·玉努斯,关亚群主编. —北京:科学出版社,2006

全国高等医学院校配套实验教材

ISBN 7-03-017918-8

I. 生… II. ①库…②关… III. ①生物化学-实验-医学院校-教学参考资料②分子生物学-实验-医学院校-教学参考资料 IV. ①Q5-33②Q7-Q33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 100877 号

责任编辑:胡治国 夏 宇 李国红 / 责任校对:赵桂芬

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄 超

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用。

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

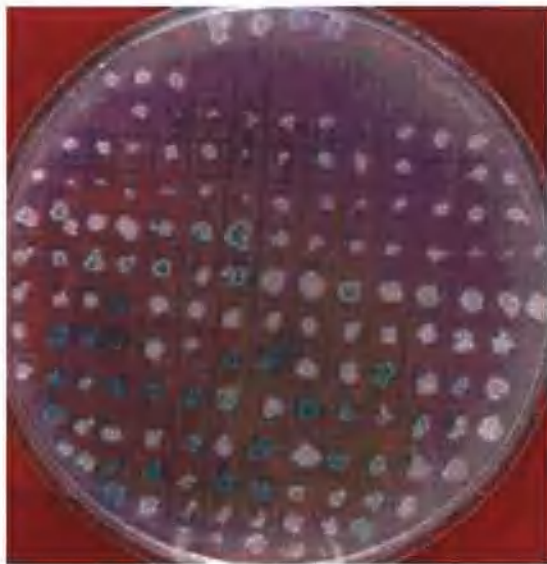
2006 年 8 月第 一 版 开本:85(720×1000)

2006 年 8 月第一次印刷 印张:7 1/2

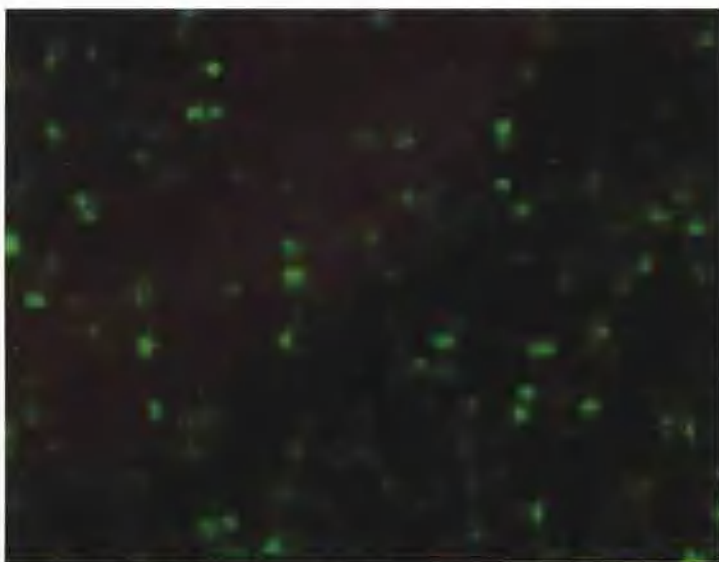
印数:1—3 000 字数:141 000

定价:19.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)



彩图1 蓝白斑筛选重组质粒



彩图2 GFP融合蛋白基因在cos-7细胞中的荧光蛋白表达产物

前 言

生物化学与分子生物学是20世纪发展起来的生命科学的前沿学科。目前分子生物学的理论与实验技术已广泛渗透到生命科学的各个领域,在医学基础理论和临床应用中正显示出日益重要的意义。为此,学习和掌握生物化学与分子生物学的基本实验技术不仅是医学生的必备能力,更是实施创新教育的重要手段。

生物化学与分子生物学实验课的开设,旨在加强对学生实验技术理论知识和动手能力训练,以及从事科学研究和技术工作的基本素质和创新意识的培养,同时提高学生动手动脑的能力和严谨的科研思维能力。

本书的编写在保留原有生物化学实验的基础上,又增加了分子生物学的先进技术。全书共分三部分:概论、基本原理与技术以及教学实验。其中,基本原理与技术包括分光光度技术、PCR技术、层析、电泳、离心、分子杂交技术等,教学实验包括了验证型、综合型、设计型实验,每个实验均阐述实验目的与要求、原理和详细操作过程以及试剂与器材等。本书是系列丛书中的一本,内容涵盖了生物化学与分子生物学的基本实验技术和原理,又包含了学科前沿的实验内容。编写时以少而精为原则,内容简单易懂,可作为医学本科、大专学生的实验教科书,也可作为医学院校老师实验各课和教学的参考书。

本教材由主编拟定大纲,各作老分工编写,集体审阅、讨论、定稿、各位同仁精诚合作、辛勤劳动的共同结果。由于能力、水平所限且时间较为仓促,尽管编写人员尽了很大努力,仍难免出现疏漏、错误及种种不妥之处,敬望广大师生提出宝贵意见。

编者

2006年7月25日

• i •

目 录

第一部分 概 论

第二部分 生物化学及分子生物学实验基本原理与技术

第一章 分光光度技术	(9)
第二章 PCR 扩增技术	(17)
第三章 层析技术	(21)
第四章 电泳技术	(30)
第五章 离心技术	(36)
第六章 分子杂交技术	(39)
第七章 透析、超滤、沉淀技术	(45)

第三部分 生物化学及分子生物学教学实验

第八章 验证性实验	(50)
实验一 标准曲线的制作及硫酸铜含量测定	(50)
实验二 血清谷丙转氨酶活性的测定(赖氏法)	(52)
实验三 酶的竞争性抑制作用	(54)
实验四 酮体的生成和氧化	(56)
实验五 尿蛋白定性试验	(57)
实验六 尿酮体定性试验	(59)
实验七 尿三胆定性试验	(61)
第九章 综合性实验	(64)
实验一 血糖测定及激素对血糖水平的影响	(64)
实验二 血清 γ -球蛋白的分离纯化与鉴定	(67)
实验三 基因组 DNA 的分离、提取、鉴定与扩增	(74)
实验四 基因工程(DNA 重组技术)	(81)
实验五 组织 RNA 的分离提取与 RT-PCR	(87)
实验六 真核表达载体的构建	(92)
第十章 设计性实验	(95)
附录	(105)

第一部分 概 论

一、实验室规则

1. 自觉遵守实验室纪律,不迟到,不早退,不得大声喧哗。
2. 实验课穿白大衣,带实验讲义和实验报告,按名单对号入座。
3. 实验前仔细清点实验器材,如有缺损立即报告,由教师补发或调换;其后如有破损,应报告教师并认真填写登记表,按规定制度赔偿。
4. 实验室器材和试剂应按规定使用,公用试剂用毕应立即盖严放回原处,应保持药品试剂的纯净,严防污染;试剂瓶和实验器材用后必须洗净放回原位,严禁乱放乱用。
5. 实验按规定分组进行,保持实验台面干净、整洁、有序。实验中认真操作,准确记录实验结果,当堂完成实验报告。出现问题及时分析原因并报告教师,由教师决定是否重作。
6. 实验过程中不得高声说话,严禁用器械及动物开玩笑。
7. 精密贵重仪器要按要求正规操作,凡不熟悉操作方法的仪器不得随意动用和盲目操作,如仪器发生故障应立即关闭电源并报告带教老师,不得擅自拆修。
8. 注意安全,实验室严禁吸烟!易燃易爆物品应远离火源,低沸点有机溶剂不得在火焰上直接加热。
9. 实验完毕要认真清洗自己所用的玻璃器材,放回指定位置,整理实验台面。
10. 一般废液倒入水池中冲洗,特殊废液(强酸、强碱、有毒物质等)倒入指定容器内,固体废物和沉渣倒入废品桶内。
11. 值日生负责当天实验的服务性工作,领取、送还公用器材和试剂,实验结束后负责打扫实验室的卫生,关好水、电、门、窗。

二、实验记录及实验报告

每次实验要做到课前认真预习,实验操作中仔细观察并如实记录实验现象与数据,课后及时完成实验报告。

(一) 课前预习

实验课前要将实验名称、目的和要求、实验内容与原理、操作方法和步骤等简单扼要地写在记录本中,做到心中有数。

(二) 实验记录

从实验课开始就要培养严谨的科学作风,养成良好习惯。实验条件下观察到

的现象应仔细地记录下来,实验中观测的每个结果和数据都应及时如实地直接记在记录本上,记录时必须使用钢笔或圆珠笔,并做到原始记录准确、简练、详尽、清楚。如称量试剂样品的重量、滴定管的读数、分光光度计的读数等,都应设计一定的表格准确记下正确的读数,并根据仪器的精确度准确记录有效数字。例如,光密度值为 0.050,不应写成 0.05。每一个结果至少要重复观测两次以上,当符合实验要求并确知仪器工作正常后再写在记录本上。另外,实验中使用仪器的类型、编号以及试剂的规格、化学式、分子量、准确的浓度等,都应记录清楚,以便总结实验完成报告时进行核对和作为查找成败原因的参考依据。如果发现记录的结果有可疑、遗漏、丢失等,都必须重做实验。

(三) 书写实验报告应包括下列内容

1. 标题 课程和实验名称、实验者姓名、实验日期等都写在实验报告上。
2. 目的与要求 简明扼要的概括出实验的目的以及实验要求。
3. 实验原理 详细阐明实验原理,涉及化学反应的最好用反应式表示。
4. 操作步骤 列出简要明了的操作步骤,以便自己将来或他人能够重复,尽量用流程图或表格表示。
5. 数据处理与结果分析 实验过程中应及时详细的记录实验数据,根据实验要求,整理归纳数据后进行计算得出结果。
6. 讨论 对实验结果、实验方法和实验异常的分析和探讨,对实验课遇到的问题和思考题进行探讨,以及对实验设计的认识、体会和建议。

三、基本实验操作

(一) 玻璃仪器的洗涤

生化实验常用的各种玻璃仪器,其清洁度直接影响到实验结果的准确性。因此,清洗玻璃仪器不仅是生化实验前后的常规工作,也是一项重要的技术性工作。清洗玻璃仪器的方法很多,需根据实验要求、污物的性质和沾污程度选用合适的清洁方法。

1. 新购玻璃仪器的清洗 新购玻璃仪器,表面附有碱质和灰尘,可先用洗衣粉水刷洗,再用流水冲洗干净后,放入 1%~2% 盐酸溶液中浸泡过夜,然后取出用自来水冲洗,最后用蒸馏水冲洗 3 遍,干燥备用。

2. 使用过的玻璃仪器的清洗

(1) 一般玻璃仪器:如试管、烧杯、三角烧瓶、量筒等,先用洗衣粉水刷洗,再用自来水冲洗干净,最后用蒸馏水冲洗 3 遍,干燥备用。

(2) 容量分析仪器:如吸量管、滴定管、容量瓶等,先用自来水冲洗,再用铬酸洗液浸泡3~5小时(或过夜),取出用自来水冲洗干净,最后用蒸馏水冲洗3遍,干燥备用。

(3) 比色杯:用后立即用自来水反复冲洗。如不能洗净时,可用盐酸或适当溶剂冲洗,再用自来水冲洗干净,最后用蒸馏水冲洗3遍,干燥备用。切不可用刷子或粗糙的布(纸)擦拭,也不可用碱液或强氧化剂清洗。

上述所有玻璃器材洗净后,以倒置后器壁不挂水珠为干净的标准。

(二) 液体的混匀

样品与试剂的混匀是保证化学反应充分进行的一种有效措施。为使反应体系内各物质迅速地互相接触,必须借助于外加的机械作用。混匀时须防止容器内液体溅出或污染。严禁用手指直接堵塞试管口或锥形瓶口震荡。混匀的方式大致有下面几种,可根据使用的器皿和液体容量而选用。

1. 旋转混匀法 适用于锥形瓶、大试管内液体的混匀。操作时手握住容器后,以手腕、肘或肩做轴旋转容器,使管内液体做旋涡运动而混匀。

2. 弹打混匀法 适用于离心管、小试管内液体的混匀。用左手持试管上端,用右手手指轻轻弹动试管下部,使管内溶液做旋涡运动;或用右手持试管上端,在左手掌上打击的方法以混匀内容物。

3. 颠倒混匀法 适用于有塞的容量瓶及有塞试管内容物的混匀。一般试管内容物混匀时可用聚乙烯等薄震封口,再用手按住管口颠倒混匀。

4. 吸量管混匀法 用吸量管将溶液反复吸放数次,使溶液充分混匀。

5. 玻棒搅动法 适用于烧杯、量筒内容物的混匀。

其他尚有电磁棒搅拌混匀法和振荡器混匀法等。

(三) 吸量管的种类及使用

1. 吸量管的种类及用途

(1) 刻度吸量管:这类吸量管带有许多刻度,刻度标记有自下而上和自上而下两种(图1-1),供量取10ml以下任意体积的液体之用。其规格有0.1ml、0.2ml、0.5ml、1ml、2ml、5ml、10ml等。刻度吸量管有两种类型:一种是全流出式刻度吸量管,此管刻度标至尖端,容量包括液体的全部,放液时需将管尖残留液体吹出,这种吸量管在管的上端标有“吹”字。另一种是不完全流出式的刻度吸量管,此管在放液时让液体自然流出,尖端在受器内壁停留片刻,所余液体不得吹出。值得注意的是有些标有“快”字,表明此吸量管检校时,已校正过尖端残留液的误差,故也不能吹出管尖残留液体。

为了便于准确、快速地选取所需的吸量管,国际标准化组织统一规定,在刻度

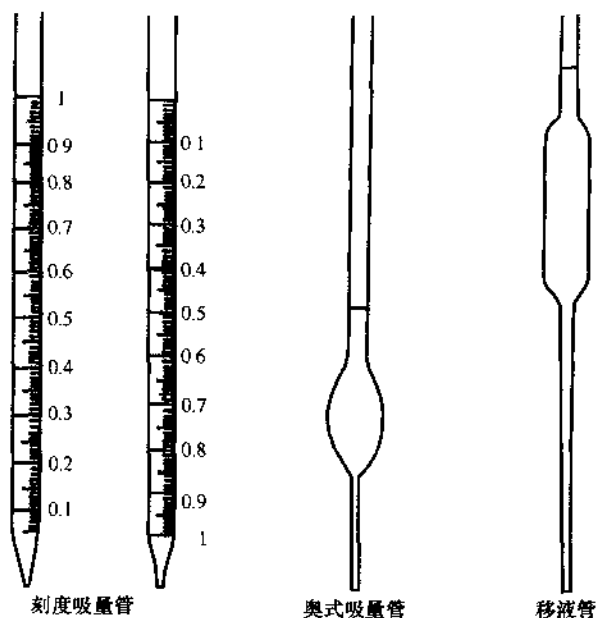


图 1-1 吸量管的种类

吸量管的上方要印有各种彩色环,以示容积区别如表 1-1。

表 1-1 国际统一规定吸量管色标、环数含义

	标准容量(ml)						
	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10
色标	红	黑	红	黄	黑	红	橘红
环数	单	单	双	单	单	单	单

(2) 奥式吸量管:这类吸量管的特点是在同一容量的各类吸量管中,其内壁表面积最小,故准确性最高。奥式吸量管上只有一个刻度(图 1-1),放液时残留于管尖的液体必须吹出,它常用于量取黏度较大的液体,如血液、油脂类等。其规格有 0.5ml、1.0ml、2.0ml、5.0ml 等。

(3) 移液管:每根移液管上只有一个刻度(图 1-1),放液时任其自然流出后,让管尖接触容器内壁 10 秒,管尖残留液体不得吹出。其规格有 10ml、20ml、25ml、50ml 等。

2. 刻度吸量管的使用方法

(1) 执管:用中指和拇指拿住吸量管的上部,食指按住吸量管上口以控制流速,刻度数字应对向操作者,切忌用大拇指堵住管口控制液流(图 1-2)。

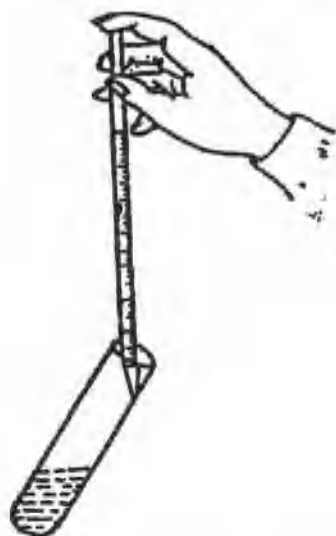


图 1-2 执管方法

(2) 取液:把吸量管插入液体内(切忌悬空,避免液体误吸入洗耳球内),用洗耳球吸取液体至所取液量的刻度上端 1~2cm 处,然后迅速用食指按紧吸量管上口,使管内液体不再流出。

(3) 调准刻度:将已充足液体的吸量管提出液面,用滤纸片擦干管尖外壁液体,然后垂直提吸量管于供器内(管尖悬离供器内液面)。用食指控制液体流至所需刻度,此时液体凹面、视线和刻度应在同一水平面上,凹面与刻度相切,并立即按紧吸量管上口,使液体不再流出。

(4) 放液:放松食指,让液体自然流入受器内。此时,管尖应接触受器内壁停留约 15 秒,但不应插入受器内的原有液体之中,以免污染吸量管及试剂。

(5) 洗涤:吸取血液、尿、组织样品及黏稠试剂的吸量管,用后应及时用自来水冲洗干净,晾干水分,浸泡于铬酸洗液中数小时后,再用流水冲净,最后用蒸馏水冲洗,晾干备用。

(四) 微量加样器的种类及使用

在生物化学与分子生物学,实验中常用可调式微量加样器来精确量取实验所需试剂,其规格有 10 μ l、20 μ l、100 μ l、200 μ l、1000 μ l 等,选择相应规格的吸头,在规定的容量范围内可根据需要随意调节取液容量。可调式微量加样器如图 1-3 所示,具体使用方法如下:



图 1-3 微量加样器

1. 吸头尖装在吸液杆上,应套牢避免漏气。

2. 依据所需容量旋转旋钮,使数轮显示所需值。

3. 轻轻将推动钮下压,使推动按钮从图“0”位置推至“1”位置(图 1-4)。

4. 手持微量加样器垂直浸入溶液中,吸头尖浸入深度为 2~4mm,停留 2~3s 后缓慢放松按钮,即回到位置“0”,溶液吸入后稍停即可将吸头尖移出液面。

5. 将枪头尖置于排液容器内,使枪头尖紧贴容器内壁,按压推动按钮至位置“1”,稍停继续按压至位置“2”。同时将枪头尖在容器内壁往复移动几次,排尽溶

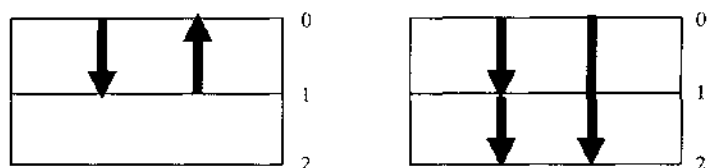


图 1-4 微量加样枪的使用

液,松开按钮移出容器。

6. 移液完毕,按压卸头按钮,将吸头尖脱卸。

(五) 血液样品的制备

1. 采取血液样品的注意事项

(1) 空腹采血:血液中不少化学成分可受饮食影响,一般需在早晨空腹或禁食 6 小时以上采取血液。

(2) 防止酶的分解作用:血液内若干化学成分在离体后继续分解,如血糖被红细胞糖酵解酶系统分解而降低。为防止酶分解作用,可用氟化钠、碘乙酸等保存剂,或将血液立即制成无蛋白血滤液。

(3) 防止溶血:红细胞与血浆中成分与含量皆有显著的差别,因此,溶血可影响一些血清或血浆生化检验的结果。为防止溶血,抽血用具必须干燥清洁,避免剧烈振摇,防止污染。

2. 抗凝剂 根据所测定血液成分不同,标本可应用血清、血浆或全血。若需血浆或全血应加抗凝剂。

(1) 草酸钾:为最常用的抗凝剂,0.2mg 可使 1ml 血液不凝固。它与血液内钙离子形成草酸钙使血液不再凝固,但不能用于钾、钙测定。

(2) 草酸钾-草酸铵混合剂(3:2):铵盐使红细胞膨胀,钾盐使之皱缩,故两者混合能保持红细胞体积不变。

(3) 柠檬酸盐:与钙离子混合成可溶性络合物,从而防止血液凝固。比草酸钾较少产生溶血,故用于红细胞沉降率测定及输血。但抗凝能力较弱,一般不作生化检验抗凝剂用。

(4) 氟化钠:有弱抗凝作用,但能抑制糖酵解和一些水解酶类。草酸钾-氟化钠(3:1)、氟化钠-麝香草酚(10:1)是测定血糖、尿酸、肌酐、无机磷等的良好抗凝剂。

(5) 肝素:能抑制凝血酶原转化为凝血酶而抗凝血。抗凝能力强,20U 可使 1ml 血液不凝固,且较少产生溶血。

**第二部分 生物化学
及分子生物学实验
基本原理与技术**



第一章 分光光度技术

一、可见分光光度计原理

S22PC 分光光度计是一种简洁易用的可见分光光度法通用仪器,测定波长范围为 340 ~ 1000nm。

S22PC 分光光度计由光源室、单色器、样品室、光电管暗盒、电子系统及数字显示器等部件组成,仪器的工作原理如图 2-1 所示。仪器内部光路系统如图 2-2 所示。从钨灯发出的连续辐射经滤光片选择聚光镜聚光后投向单色器进此狭缝,此狭缝正好位于聚光镜及单色器内准直镜的焦平面上,因此,进入单色器的复合光通过平面反射镜反射及准直镜变成平行光射向色散光栅。光栅将入射的复合光通过衍射作用形成按照一定顺序均匀排列的连续单色光谱,此时,单色光谱重新返回到准直镜,然后通过聚光原理成像在出射狭缝上。出射狭缝选出指定带宽的单色光通过聚光镜落在试样室被测样品中心,样品吸收后透射的光经光门射向光电管阴极面。根据光电效应原理,会产生一股微弱的光电流。此光电流经电流放大器放大,送到数字显示器,测出透光率或吸光度,或通过对数放大器实现对数转换,显示出被测样品的吸光度(A)值。

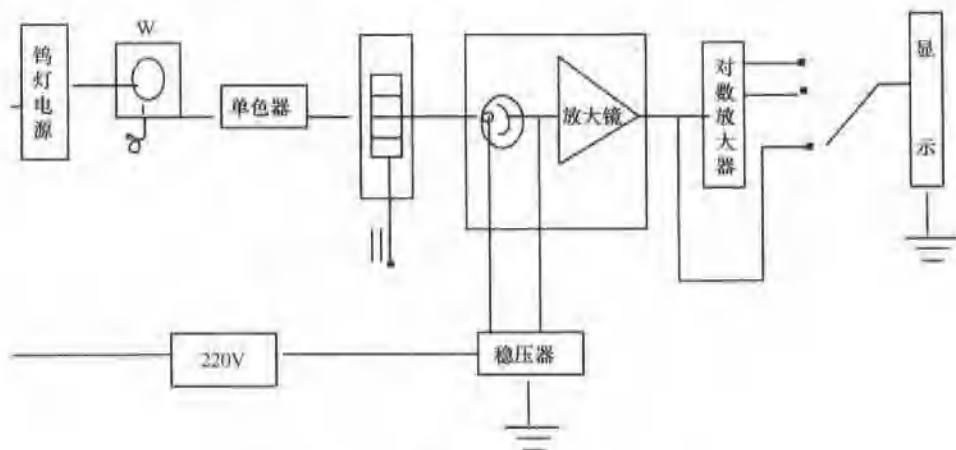


图 2-1 S22PC 分光光度计的工作原理

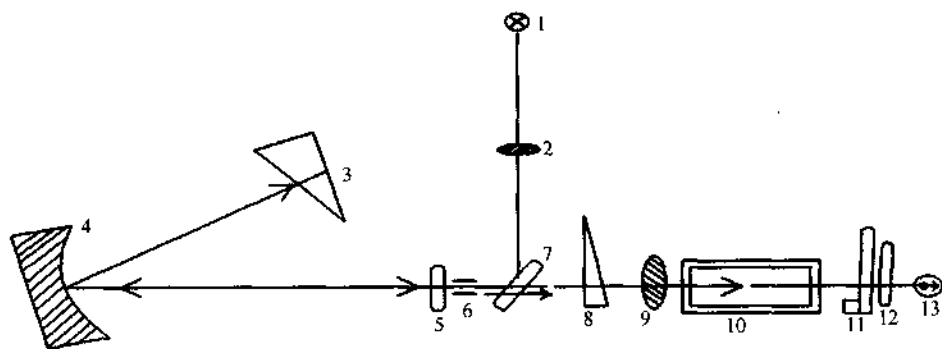


图 2-2 S22PC 分光光度计光学系统图

1. 光源灯 2. 透镜聚光 3. 色散棱镜 4. 准直镜 5、12. 保护玻璃 6. 狭缝 7. 反射镜 8. 光栏
9. 聚光透镜 10. 比色杯 11. 光门 13 光电管

二、紫外分光光度计的原理

（一）基本工作原理

和可见分光光度计相似,利用一定频率的紫外光照射被分析的有机物质,引起分子中介电子的跃迁,它将有选择地被吸收。一组吸收随波长而变化的光谱,反映了试样的特征。在紫外可见光的范围内,对于一个特定的波长,吸收的程度正比于试样中该成分的浓度,因此,测量光谱可以进行定性分析,而且根据吸收与已知浓度的标样的比较,还能进行定量分析。

（二）特点和主要用途

S53/S54 紫外分光光度计是简洁易用的紫外光谱分光光度法通用仪器,能在从 200 ~ 1000nm 波长范围内执行透射比,吸光度和浓度直读测定,打印结果,连接 PC 结合专用软件包,可做波长、时间扫描等高级功能,可广泛适用于医学卫生、临床检验、生物化学、石油化工、环保监测、质量控制等部门做定性定量分析用。

三、分光光度计的操作使用

（一）S22PC 可见光分光光度计的使用方法

（1）预热:开机预热 20 分钟后使仪器达到稳定状态才能进行测定工作,如紧急应用时请注意随时调 0,调 100% T。

(2) 调整波长:选择实验所需要的波长范围。

(3) 调零:打开试样盖(关闭光门)或用不透光材料在样品室中遮断光路,然后按“0%”键,即能自动调整零位。

(4) 调整 100% T:将用作背景的空白样品置入样品室光路中,盖下试样盖(同时打开光门),按下“100% T”键即能自动调整 100% T(一次有误差时可加按一次)。

(5) 将空白管、标准管及测定管溶液分别倒入洁净的比色杯中,依次放在比色杯架上。盖上样品室盖,将参比溶液比色杯置于光路,调节透光度按下“100% T”使数字显示为 100.0,然后再按功能 MODE 键吸光度(ABS),使数字显示为 000.0 即可进行测定。用仪器前面的试样槽拉杆来改变仪器标准配置中的试品槽,打开样品室盖以便观察样品槽中的样品位置,最靠近测试者的为“0”位置,依次为“1”、“2”、“3”位置。当拉杆到位时有定位感,到位时请前后轻轻推动一下以确保定位正确。

(二) S54 紫外分光光度计的使用方法

(1) 开机自检与自校:本仪器具备计算机自检与波长及 100% 线自校正功能,开机后显示窗两侧 8 灯全亮,指示进入自检与自校状态,约需十余分钟,当 TRANS 灯亮即说明自校结束进入待机状态,可随时应用。

(2) 设定波长:选择实验所需要的波长范围。

(3) 调零:按 0% 键,即能自动调整零位。

(4) 调整 100% T:将用作背景的空白样品置入样品室光路中,盖下试样盖(同时打开光门),按一下 100% T 键即能自动调整 100% T(一次有误差时可加按)。

(5) 将空白管、标准管及测定管溶液分别倒入洁净的玻璃或石英比色杯中,依次放在比色杯架上。盖上样品室盖,将参比溶液比色杯置于光路,调节透光度按下“100% T”,使数字显示为 100.0,然后再按功能 MODE 键吸光度(ABS),使数字显示为 000.0 即可进行测定。用仪器前面的试样槽拉杆来改变,打开样品室盖以便观察样品槽中的样品位置,最靠近测试者的为“0”位置,依次为“1”、“2”、“3”位置。当拉杆到位时有定位感,到位时请前后轻轻推动一下以确保定位正确。

四、分光光度比色法

生物体内有许多成分含量甚微,不能用重量分析法或滴定分析法测定,而是采用比色法来测定。很多物质本身就具有一定的颜色,如高锰酸钾呈紫色等。另有许多物质本身虽无色,但在适当条件下与显色剂作用后,就能够形成有色物质。当