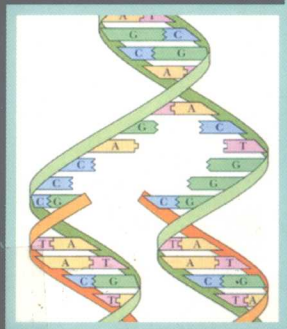
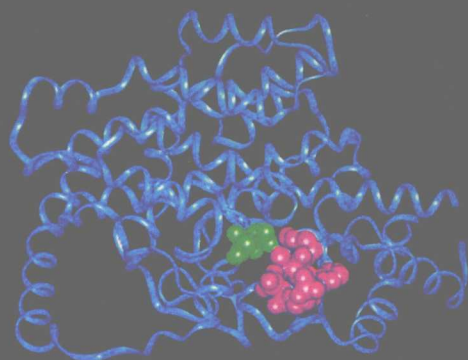
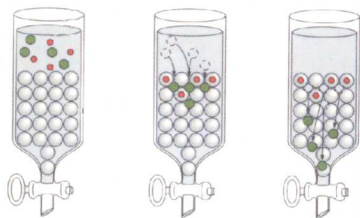


生物化学与分子生物学 实验技术教程

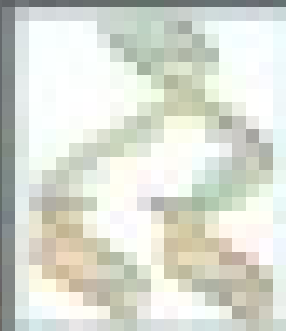
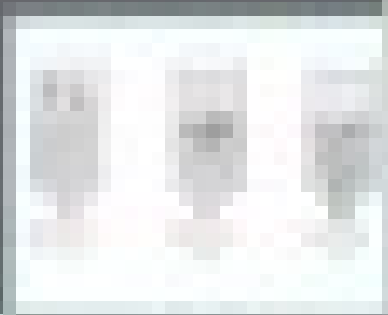
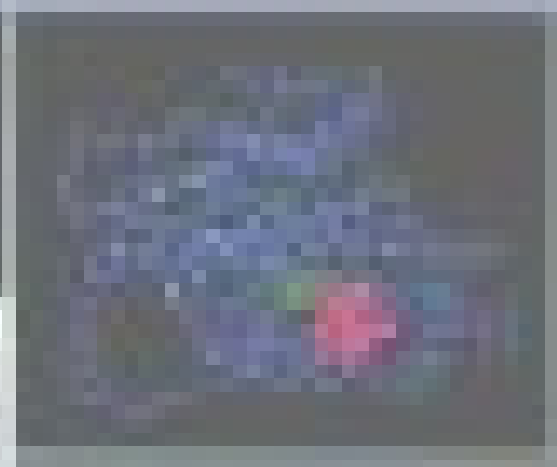
安建平 王廷璞 编著



LANZHOU UNIVERSITY PRESS

生物化学与分子生物学 实验技术教程

王德平 王瑞雪 编著



科学出版社

生物化学与分子生物学 实验技术教程

安建平 王廷璞 编著

兰州大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验技术教程 / 安建平, 王廷璞主编. —兰州: 兰州大学出版社, 2005.7

ISBN 7-311-02624-5

I. 生... II. ①安...②王... III. ①生物化学-实验-师范大学-教材②分子生物学-实验-师范大学-教材 IV. ①Q5-33②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 077795 号

生物化学与分子生物学实验技术教程

安建平 王廷璞 编著

兰州大学出版社出版发行

兰州市天水南路 222 号 电话:8617156 邮编:730000

E-mail: press@onbook.com.cn

<http://www.onbook.com.cn>

天水新华印刷厂印刷

开本:787×1092 毫米 1/16 印张:23.75

2005 年 7 月第 1 版	2005 年 7 月第 1 次印刷
字数:578 千字	印数:1—1500 册

- 311 - 02624 - 5/Q·34 定价:42.00 元

前 言

生物化学和分子生物学作为生命科学中最重要的学科,近年来发展十分迅速,尤其是生物化学和分子生物学实验理论、技术和方法都有较快的发展,其技术和方法已经渗透到了生命科学的各个领域,使生命科学的各个领域发生了根本性的改变。生物化学和分子生物学实验教学在生命科学领域和人才培养中的地位也显得十分重要,这就给生物化学和分子生物学实验教学提出了更高的要求。因此,为了适应高校实验教学改革的要求,加强生物化学与分子生物学实验教学间的联系,保持实验教学内容的连续性和连贯性,编写一部适合于生命科学领域各专业需求又可兼顾师范院校各相关专业使用的生物化学和分子生物学实验教程就显得十分必要。

《生物化学与分子生物学实验技术教程》不同于以前传统的生物化学和分子生物学实验教材的编写模式。全书分为一、二、三篇。第一篇为生物化学和分子生物学实验技术基本理论,包括生物大分子制备技术、分光光度技术、电泳技术、离心技术、层析技术、核酸的分离纯化技术、DNA 重组技术、分子杂交技术、聚合酶链式反应技术、DNA 序列测定技术、生物芯片技术等 11 章。将现代生物化学和分子生物学技术的精华系统扼要地介绍给读者。第二篇为生物化学和分子生物学实验,该篇包括 21 个生物化学实验及 19 个分子生物学实验。在实验内容的选择上,遵循了新颖性、系统性、连贯性、综合性和层次性的原则,适当减少了验证性实验内容,增加了综合性实验内容;兼顾学生知识面的拓宽和能力的培养以及各高等学校的实验教学条件,经过讲授和操作,学生将受到系统的生物化学和分子生物学实验方法和技术的训练,使他们能够获得生物化学和分子生物学基本实验技术的理论和系统、新颖、实用的实验技能,为他们将来从事科学研究奠定一定的基础。本教程第一篇的每一章和第二篇的每个实验后都附有思考题,目的是通过思考题使读者对现代生物化学和分子生物学实验技术的理论和方法有较为系统和深入的理解。第三篇为精编附录,内容广泛,实用性强,使本教程具有一定的工具书的属性。本教程是在原生物化学实验指导的基础上编写的,以师范院校有关专业的本科生为对象,也可供其他院校相关专业的本科生和生物化学及分子生物学实验技术工作者参考。

本教程第一篇第一至第五章,第二篇第一章,第三篇附录一至十三由安建平编写。第一篇第六至第十一章,第二篇第二章,第三篇附录十四至二十四由王廷璞编写。

在编写过程中,我们参阅了众多的书籍和资料,在参考文献中未能全部列出。

由于本教程涉及的知识面广及我们的水平有限,书中难免存在错误和不妥,敬请广大读者和同行们批评指正。

编者

2005 年 1 月 28 日

目 录

第一篇 生物化学与分子生物学实验技术基本理论

第一章 生物大分子制备技术	(3)
第一节 概述	(3)
一、生物大分子制备的特点	(3)
二、生物大分子制备的方法和步骤	(3)
三、生物大分子制备过程中的分析和鉴定	(4)
四、生物大分子分离纯化的方法	(4)
第二节 生物大分子制备的前处理	(4)
一、生物材料的选择	(4)
二、细胞破碎的方法	(5)
三、生物大分子的提取	(6)
第三节 生物大分子的分离纯化	(8)
一、沉淀	(8)
二、透析	(12)
三、超滤	(13)
四、超临界流体萃取	(14)
五、萃取与相分离	(16)
六、结晶	(16)
七、冰冻干燥	(17)
八、分离纯化方法的选择	(18)
第四节 生物大分子样品的保存	(18)
一、影响生物大分子样品保存的主要因素	(18)
二、蛋白质和酶等生物大分子样品的保存方法	(19)
第二章 分光光度技术	(21)
第一节 基本原理	(21)
一、光谱	(21)
二、分子能态	(21)
三、吸收光谱曲线	(22)
四、紫外光谱中常用的术语	(23)
五、光吸收定律	(24)
第二节 分光光度计的组成、构造和类型	(25)

一、分光光度计的组成	(25)
二、分光光度计的构造	(25)
三、紫外-可见分光光度计的类型	(28)
四、分光光度法在生物化学和分子生物学实验技术中的应用	(28)
第三章 电泳技术	(30)
第一节 基本理论	(30)
一、电泳发展的历史	(30)
二、电泳装置	(30)
三、电泳的基本原理	(31)
四、影响电泳分离的主要因素	(32)
第二节 电泳的分类	(33)
一、电泳的分类	(33)
二、生物化学和分子生物学实验中常用的电泳	(34)
第三节 常用电泳支持介质和染色方法	(45)
一、常用电泳支持介质	(45)
二、染色方法	(46)
第四章 离心技术	(49)
第一节 离心技术基本原理	(49)
一、离心力	(49)
二、相对离心力	(49)
三、沉降系数	(50)
四、沉降速度	(50)
五、沉降时间	(50)
六、相对分子量	(50)
第二节 离心设备	(51)
一、离心机的主要类型和构造	(51)
二、制备性超速离心的分离方法和离心操作的注意事项	(53)
第五章 层析技术	(57)
第一节 层析技术概述	(57)
一、层析技术的发现与发展	(57)
二、层析技术的应用范围	(57)
三、层析技术的分类	(58)
四、层析技术的术语	(59)
第二节 层析技术基本理论	(61)
一、分离现象	(61)
二、塔板理论	(62)
三、速率理论	(63)
四、分辨率	(64)
第三节 吸附层析	(65)

一、吸附层析的基本原理	(65)
二、吸附介质的分类及其性质	(66)
三、吸附层析技术	(69)
第四节 凝胶层析	(71)
一、凝胶层析的基本原理	(71)
二、凝胶层析的基本概念	(72)
三、凝胶的种类和性质	(74)
四、凝胶的选择、处理和保存	(76)
五、凝胶层析的基本操作	(77)
六、凝胶层析的应用	(78)
第五节 离子交换层析	(79)
一、离子交换层析的基本原理	(79)
二、离子交换剂的种类和性质	(80)
三、离子交换剂的选择、处理和保存	(82)
四、离子交换层析的基本操作	(83)
五、离子交换层析的应用	(84)
第六节 亲和层析	(85)
一、亲和层析的基本原理	(86)
二、亲和吸附剂	(86)
三、亲和层析的基本操作	(90)
四、亲和层析的应用	(91)
第六章 核酸的分离纯化技术	(94)
第一节 概述	(94)
一、核酸的理化性质	(94)
二、DNA 提取的几种方法	(94)
第二节 核酸的分离、纯化和鉴定	(95)
一、质粒 DNA 的分离、纯化和鉴定	(95)
二、基因组 DNA 的提取	(98)
三、RNA 提取操作中的一般要求	(98)
四、DNA 酶切及凝胶电泳	(99)
第七章 DNA 重组技术	(102)
第一节 工具酶	(103)
一、限制性核酸内切酶的概念	(103)
二、限制性核酸内切酶的命名	(104)
三、限制性核酸内切酶的分类	(104)
四、限制性核酸内切酶的作用	(104)
第二节 基因工程载体	(105)
一、质粒载体	(106)
二、噬菌体载体	(107)

三、动物病毒载体·····	(109)
第三节 目的序列与载体的连接·····	(109)
一、粘性末端连接·····	(109)
二、平末端连接·····	(111)
第四节 目的基因序列的来源和分离·····	(111)
一、基因组 DNA 文库·····	(111)
二、cDNA 文库·····	(112)
三、聚合酶链式反应·····	(113)
四、人工化学合成·····	(114)
第五节 基因序列导入细胞·····	(114)
一、转化·····	(114)
二、感染·····	(114)
三、转染·····	(114)
第六节 目的基因序列克隆的筛选与鉴定·····	(115)
一、根据重组载体的标志作筛选·····	(115)
二、核酸杂交法·····	(115)
三、PCR 法·····	(116)
四、免疫学方法·····	(116)
五、DNA 限制性内切酶图谱分析·····	(116)
六、核苷酸序列测定·····	(116)
第七节 克隆基因的表达·····	(116)
第八章 分子杂交技术·····	(119)
第一节 DNA 的变性与复性·····	(119)
一、DNA 的变性·····	(119)
二、DNA 的复性·····	(121)
第二节 放射性同位素标记核酸探针·····	(122)
一、缺口平移法·····	(122)
二、末端标记法·····	(122)
三、应用特异单引物法标记 DNA 探针·····	(122)
四、双引物法标记 DNA 探针·····	(122)
五、聚合酶链式反应 (PCR) 标记高活性 DNA 探针·····	(123)
第三节 非放射性标记的核酸探针·····	(123)
一、生物素标记核酸探针方法·····	(123)
二、光敏生物素标记核酸探针·····	(124)
三、生物素 - 补骨脂素标记法·····	(125)
四、生物素 - α - 氨基乙酸 - N - 羟基琥珀酰标记化学修饰的 DNA 法·····	(125)
五、缺口平移法标记生物素 DNA 探针·····	(125)
六、生物素随机引物标记探针方法·····	(125)
七、异羟基洋地黄毒甙 (Digoxigenin) 标记核酸探针·····	(126)

八、光敏 2,4-二硝基苯(光敏 DNP) 标记 DNA 法	(126)
九、三硝基苯磺酸(TNBS) 标记核酸探针	(126)
十、生物素化的 RNA 探针标记	(126)
十一、辣根过氧化物酶标记核酸探针法	(127)
十二、用聚合酶链式反应标记高活性 DNA 探针	(127)
第四节 几种常见的核酸分子杂交方法	(127)
一、Southern 杂交	(128)
二、Northern 杂交	(129)
三、菌落原位杂交	(129)
四、斑点杂交	(129)
五、杂交反应的条件及参数的优化	(130)
第九章 聚合酶链式反应(PCR) 技术	(131)
第一节 PCR 技术的原理	(131)
第二节 PCR 反应体系的组成	(131)
一、PCR 反应体系的组成	(131)
二、电泳分析	(133)
三、PCR 操作范例	(133)
第三节 影响 PCR 的主要因素	(135)
一、温度循环参数	(135)
二、引物设计	(136)
三、DNA 聚合酶	(137)
四、影响 PCR 特异性的因素	(139)
五、扩增平坡	(140)
第四节 PCR 各种应用模式	(140)
一、兼并引物 PCR	(140)
二、套式引物 PCR	(141)
三、复合 PCR	(141)
四、反向 PCR	(141)
五、不对称 PCR	(142)
六、标记 PCR 和彩色 PCR	(142)
七、加端 PCR	(142)
八、锚定 PCR 或固定 PCR	(143)
九、玻片 PCR	(143)
十、反转录 PCR 方法检测 RNA	(143)
十一、定量 PCR	(144)
第五节 样品处理与注意事项	(145)
一、样品处理	(145)
二、注意事项	(146)
第六节 PCR 仪器的发展	(147)

第七节 其他链扩增技术及应用范围	(148)
一、免疫 PCR	(148)
二、转录依赖的扩增系统 (TAS)	(149)
三、再生式序列复制技术	(149)
四、连接酶链式反应 (LCR)	(150)
五、PCR - SSCP 分析技术	(150)
第十章 DNA 序列测定技术	(151)
第一节 测序原理与策略	(151)
一、Sanger 双脱氧链终止法	(151)
二、Maxam - Gilbert DNA 化学降解法	(154)
三、测序策略	(154)
第二节 非同位素银染测序系统和 T_7 DNA 聚合酶测序技术	(157)
一、非同位素银染测序系统	(157)
二、 T_7 DNA 聚合酶测序技术	(157)
第三节 DNA 序列分析的自动化和杂交测序法	(158)
一、DNA 序列分析的自动化	(158)
二、DNA 杂交测序法 (SBH)	(159)
第十一章 生物芯片技术	(162)
第一节 生物芯片及应用简介	(162)
一、生物芯片	(162)
二、应用领域	(162)
第二节 生物芯片的制作	(165)
一、点样设备	(166)
二、芯片片基	(167)
三、点样样品	(168)
第三节 图像的采集和分析	(176)
一、磷感屏成像系统	(176)
二、荧光芯片扫描仪	(177)
三、基因芯片上各克隆荧光信号的分析原理	(177)
四、Microarray 数据分析	(178)
第四节 生物芯片 (DNA 微阵列) 荧光扫描仪中的激光共聚焦扫描技术	(179)
一、微阵列的相关特性	(179)
二、微阵列扫描仪	(180)
三、激光共聚焦扫描仪	(182)

第二篇 生物化学与分子生物学实验

第一章 生物化学实验	(187)
实验一 3,5 - 二硝基水杨酸比色定糖法	(187)

实验二	粗脂肪的定量测定 (Soxhlet 提取法)	(189)
实验三	蛋白质和氨基酸的呈色反应	(191)
实验四	蛋白质的沉淀、变性反应	(196)
实验五	聚丙烯酰胺等电聚焦电泳法测定蛋白质的等电点	(199)
附	pH 法测定蛋白质的等电点	(205)
实验六	Folin - 酚法测定血清蛋白质含量	(206)
附 1	双缩脲法测定蛋白质含量	(208)
附 2	考马斯亮蓝 G - 250 染色法测定蛋白质含量	(209)
实验七	紫外吸收法测定蛋白质含量	(210)
实验八	SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质分子量	(212)
实验九	凝胶过滤层析法测定蛋白质分子量	(218)
实验十	血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	(223)
实验十一	吸附层析法分离制备细胞色素 C	(229)
实验十二	菜花 (花椰菜) 中核酸的分离和鉴定	(231)
实验十三	定磷法测定核酸浓度	(233)
附 1	RNA 的定量测定 (苔黑酚法)	(237)
附 2	DNA 的定量测定 (二苯胺法)	(238)
实验十四	紫外线 (UV) 吸收法测定核酸含量	(239)
实验十五	薄层层析法分离 AMP、ADP 和 ATP	(241)
实验十六	离子交换柱层析分离核苷酸	(243)
实验十七	酶的特性	(249)
实验十八	酯酶同工酶的垂直板不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳分析	(252)
实验十九	超氧化物歧化酶的分离纯化	(255)
实验二十	亲和层析法纯化胰蛋白酶	(259)
实验二十一	饱食、饥饿及激素对肝糖原含量的影响	(265)
第二章	分子生物学实验	(268)
实验一	植物组织基因组 DNA 的提取	(268)
实验二	动物组织基因组 DNA 的提取	(270)
实验三	细菌基因组 DNA 的制备	(271)
实验四	DNA 定量和电泳检测	(272)
实验五	质粒 DNA 的碱裂解法提取与纯化	(273)
实验六	DNA 酶切及凝胶电泳	(276)
实验七	大肠杆菌感受态细胞的制备和转化	(279)
实验八	动植物组织 mRNA 提取	(281)
实验九	植物病毒 RNA 提取	(283)
实验十	重组质粒的连接、转化及筛选	(284)
实验十一	RFLP 技术	(287)
实验十二	RAPD 技术	(289)
实验十三	聚合酶链式反应 (PCR)	(291)

实验十四	Southern 杂交	(294)
实验十五	Northern 杂交	(296)
实验十六	菌落原位杂交	(298)
实验十七	斑点杂交	(300)
实验十八	非同位素银染测序系统操作技术	(301)
实验十九	T_7 DNA 聚合酶测序技术	(308)

第三篇 附 录

附录一	实验室安全及防护知识	(317)
一、	实验室安全知识	(317)
二、	实验室灭火法	(318)
三、	实验室急救	(319)
附录二	实验室基本操作	(319)
一、	玻璃仪器的清洗	(319)
二、	塑料器皿的清洗	(320)
三、	洗液的配制	(320)
四、	其他洗涤液	(320)
五、	玻璃和塑料器皿的干燥	(320)
六、	移液	(320)
七、	缓冲液与 pH 值的测定	(322)
附录三	实验记录与实验报告	(324)
一、	实验记录	(324)
二、	实验报告	(325)
附录四	实验误差与提高实验准确度的方法	(325)
一、	实验误差	(325)
二、	误差来源	(326)
三、	提高实验准确度的方法	(327)
附录五	常用酸碱指示剂的配制	(327)
附录六	常用缓冲溶液的配制方法	(328)
一、	甘氨酸 - 盐酸缓冲液 (0.05mol/L)	(328)
二、	甘氨酸 - 氢氧化钠缓冲液 (0.05mol/L)	(328)
三、	邻苯二甲酸氢钾 - 盐酸缓冲液 (0.05mol/L, 20℃)	(328)
四、	磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液	(329)
五、	柠檬酸 - 氢氧化钠 - 盐酸缓冲液	(329)
六、	柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液 (0.1mol/L)	(330)
七、	乙酸 - 乙酸钠缓冲液 (0.2mol/L, 18℃)	(330)
八、	磷酸盐缓冲液	(330)
九、	巴比妥钠 - 盐酸缓冲液 (18℃)	(332)

十、Tris - 盐酸缓冲液 (0.05mol/L, 25℃)	(332)
十一、硼砂 - 硼酸缓冲液 (0.2mol/L 硼酸根)	(332)
十二、硼砂 - 盐酸缓冲液 (0.05mol/L 硼酸根)	(333)
十三、硼砂 - 氢氧化钠缓冲液 (0.05mol/L 硼酸根)	(333)
十四、碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液 (0.1mol/L)	(333)
附录七 Union Carbide 各种型号透析管的渗透范围	(334)
附录八 Sepetro por 再生纤维素膜透析袋数据	(334)
附录九 纤维素酯膜透析袋的数据	(336)
附录十 Amicon 圆形超滤膜的规格和有效过滤面积的数据	(337)
附录十一 Amicon 圆形超滤膜的流速	(337)
附录十二 常用蛋白质分子量标准参照物	(337)
附录十三 凝胶数据表	(338)
一、Sephadex G 型交联葡聚糖凝胶的数据	(338)
二、Sephadex G 型交联葡聚糖凝胶溶胀所需时间	(339)
三、琼脂糖凝胶的数据	(339)
四、Superose 的数据	(340)
五、琼脂糖凝胶 Bio - Gel A 型的数据	(340)
六、Bio - Gel P 型凝胶的数据	(341)
七、交联聚苯乙烯凝胶 Bio - Beads S - X 型的数据	(341)
八、制备级 Superdex 凝胶过滤介质的数据	(342)
九、聚乙烯醇型凝胶 Toyopearl 的数据	(342)
十、各种凝胶所允许的最大操作压	(343)
附录十四 凝胶过滤用标准蛋白	(344)
一、凝胶过滤用低分子质量标准的组成	(344)
二、凝胶过滤用高分子质量标准的组成	(344)
三、凝胶过滤用分子质量标准品	(344)
附录十五 凝胶层析中遇到的故障、原因与排除方法	(345)
附录十六 薄层层析分离各类物质常用的展层溶剂	(346)
附录十七 各类物质常用的薄层显色剂	(347)
附录十八 离子交换纤维素及技术参数	(348)
一、离子交换纤维素	(348)
二、交换层析介质的技术数据	(348)
附录十九 实验室中常用酸碱的比重和浓度	(349)
附录二十 硫酸铵饱和度的常用表	(350)
一、调整硫酸铵溶液饱和度计算表 (25℃)	(350)
二、调整硫酸铵溶液饱和度计算表 (0℃)	(350)
附录二十一 常见蛋白质分子量参考值	(351)
附录二十二 蛋白质等电点参考值	(352)
附录二十三 离心机转速和离心力的列线计算图	(354)

一、低速转子的相对离心力列线图	(354)
二、高速转子的相对离心力列线图	(355)
附录二十四 分子生物学常用溶液、培养基的配制方法	(355)
一、常用贮液与溶液	(355)
二、电泳缓冲液、染料和凝胶加样液	(359)
三、常用培养基	(361)
四、常用抗生素	(362)
参考文献	(364)

第一篇

生物化学与分子生物学实验技术

基本理论

