

生物化学及分子生物学 实验与技术



吉昌华

陈南春

杨安钢

等编著

陕西科学技术出版社

生物化學及分子生物學

第二版 第二版



黃國忠

黃國忠

黃國忠

黃國忠

高等教育出版社

生物化学及分子生物学 实 验 与 技 术

吉昌华 陈南春 杨安钢 等编著

陕西科学技术出版社

(陕)新登字第 002 号

生物化学及分子生物学实验与技术

吉昌华 陈南春 杨安钢 等编著

陕西科学技术出版社出版发行

(西安北大街 131 号)

新华书店经销 第四军医大学印刷厂印刷

787×1092 毫米 16 开本 25.75 印张 2 插页 62 万字

1994 年 4 月第 1 版 1994 年 4 月第 1 次印刷

印数: 1-3000

ISBN 7-5369-2069-5/R. 491

定 价: 13.80 元

编著者

邓健蓓 吉昌华 刘新平 杨安钢
陈南春 陈 萍 阎小君 韩 骅

前 言

21 世纪将是生命科学的世纪。生物化学和分子生物学是生命科学中发展迅速的前沿性基础学科, 不仅其理论内涵和成就在整个生命科学的进步中起着重要的作用, 而且其研究方法和技术也广泛渗透到生命科学和医学许多其它学科领域, 促进着这些学科领域的发展。经典的生物化学分析方法如酶学分析、电泳、色谱和分光光度法等, 不少早已应用于临床疾病的诊断和研究, 近年来又有新的发展。50 年代分子生物学崛起以来, 其实验新技术、新方法更是层出不穷, 而且被迅速地应用到医学的各个领域, 给诊断、治疗和预防开辟了新途径。像分子杂交、聚合酶链反应 (PCR) 等技术正在越来越广泛地用于临床诊断, 许多基因工程药物和疫苗都已开始临床使用, 人类疾病的基因治疗已于 80 年代末开始实施。可以预料: 医学基础和临床的许多学科今后的工作、研究和进展将会更多地涉及到生物化学和分子生物学的技术。因此医学生不仅要掌握生物化学和分子生物学的基础理论, 而且应当学习医学上常遇到的生物化学和分子生物学基本实验技术和方法。

作为医学院校的生物化学实验课, 曾经有过不同的教学目的。例如学习营养成份分析、临床生化检验方法等, 但在不少医学院校教学中, 这些内容都逐步移向其后设置的营养学、临床检验学等课程。在生化实验课中安排验证生化理论的实验, 以加深学生对生化理论的理解, 也能收到较好的教学效果。但生化和分子生物学实验课不仅是为本专业理论课学习服务, 从医学生培养的总体目标出发, 在有限的教学时间内, 主要的教学目的应当是使学生掌握作为跨世纪的医务工作者需要知道的几种主要类型生物化学和分子生物学实验技术的基本原理和方法, 在这方面具有现代化和系统的知识和技能, 能举一反三, 有利于其后医学课程的学习, 有利于今后的发展。这也是我们编写这本实验教材的一个主要指导思想。

本书分四部分。第一和第二部分共十章, 分别列出生物化学和分子生物学常用实验技术, 较详细地叙述了这些实验技术的理论依据、方法类型、特点和用途等。每章后附有思考题, 以帮助学生复习。十章内容较多, 可针对不同教学对象选用, 有的章节要求学生掌握, 有的只作一般了解或供作参考, 有的则可不用。这些实验技术是通过具体的实验项目来学习的, 本书第三部分提供的实验项目, 都是我们在教学中采用过、并取得较好教学效果的项目, 可供选用。第四部分汇集了生物化学和分子生物学常用资料和数据等, 以便需要时查寻。

这本书是在我们多年教学经验积累的基础上编写的, 但改写成这样的新系统、增添不少新内容, 还显得比较仓促, 各章节的份量和内容难免有不妥之处, 需经教学实践不断修正, 并期望读者提出宝贵意见, 以利再版时改进。

第四军医大学生物化学及分子生物学教研室

陈 苏 民

1994 年 4 月

第 一 部 分

生物化学实验技术

目 录

第一部分 生物化学实验技术

第一章 分光光度技术	(1)
第一节 基本原理	(1)
一、光的基本知识	(1)
二、朗伯 - 比尔 (Lamber - Beer) 定律	(2)
第二节 分光光度计结构简介	(3)
一、光源	(3)
二、分光系统 (单色器)	(4)
三、狭缝	(4)
四、比色杯	(4)
五、检测器系统	(4)
第三节 分光光度技术的应用	(5)
一、测定溶液中物质的含量	(5)
二、用紫外光谱鉴定化合物	(5)
第四节 分光光度法的误差	(6)
第五节 常见国产分光光度计的使用	(6)
一、72 型分光光度计	(6)
二、721 型分光光度计	(7)
三、751 型分光光度计	(8)
四、使用分光光度计的注意事项	(10)
参考文献	(10)
思考题	(10)
第二章 色谱技术	(11)
第一节 概述	(11)
一、引言	(11)
二、层析过程	(12)
三、层析法分类	(12)
四、各类色谱法简介	(14)
第二节 凝胶色谱	(14)
一、基本理论	(15)
二、凝胶的种类及性质	(16)
三、实验技术	(17)

第三节 离子交换色谱	(18)
一、基本理论	(18)
二、离子交换的分类及常见种类	(19)
三、实验操作	(20)
第四节 亲和色谱	(21)
一、基本理论	(21)
二、实验方法	(23)
第五节 高压液相色谱	(23)
一、分类	(23)
二、易出现的问题	(25)
三、主要设备及操作流程	(26)
第六节 气相色谱	(27)
一、气相色谱法的分类及发展	(27)
二、气相色谱仪的构成及一般流程	(27)
三、气相色谱中层析柱及固定相的特点	(28)
参考文献	(29)
思考题	(29)
第三章 电泳	(30)
第一节 基本理论	(31)
第二节 醋酸纤维素薄膜电泳	(33)
第三节 琼脂糖凝胶电泳	(33)
第四节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(34)
第五节 电泳后大分子的检测	(38)
第六节 等电聚焦	(40)
一、基本原理	(41)
二、载体两性电解质	(41)
三、密度梯度等电点聚焦	(42)
参考文献	(43)
思考题	(43)
第四章 放射性同位素技术	(44)
第一节 概述	(44)
一、放射性同位素的特点	(44)
二、放射性强度及其度量单位	(44)
三、射线与物质的相互作用	(45)
第二节 放射性同位素的应用——同位素示踪法	(46)
一、同位素示踪法基本原理和特点	(46)
二、示踪实验的设计原则	(47)
三、同位素示踪法在生物化学和分子生物学中的应用	(57)

第三节 放射性测量	(63)
一、闪烁型探测器	(64)
二、晶体闪烁计数	(65)
三、液体闪烁计数	(68)
四、放射测量的注意事项	(77)
第四节 放射防护	(78)
一、放射性的危害及防护的必要性	(78)
二、放射防护的三原则	(79)
三、我国现行的放射卫生防护标准	(80)
四、内照射和外照射的防护	(81)
五、放射性污染的清除	(87)
六、合理处理放射性三废	(90)
参考文献	(91)
思考题	(92)
第五章 生物大分子制备基本技术	(93)
第一节 选择材料及预处理	(93)
第二节 细胞的破碎及细胞器的分离	(93)
一、细胞的破碎	(93)
二、细胞器的分离	(94)
第三节 提取和纯化	(95)
一、蛋白质(包括酶)的提取	(95)
二、蛋白质的分离纯化	(96)
三、核酸的提取与纯化	(97)
第四节 浓缩、干燥及保存	(98)
一、样品的浓缩	(98)
二、干燥	(99)
三、贮存	(100)
参考文献	(100)
思考题	(100)
第六章 超离心技术	(101)
第一节 基本原理	(101)
一、相对离心力	(101)
二、沉降速度	(102)
三、沉降系数	(103)
四、沉降时间	(105)
第二节 转头和离心管	(105)
一、固定角度转头	(105)
二、甩开吊筒式转头	(106)
三、垂直管转头	(106)

四、区带转头	(106)
五、离心管	(107)
第三节 离心方法	(107)
一、差速沉淀离心	(108)
二、速度区带离心	(109)
三、等密度离心	(113)
第四节 仪器装置和操作	(114)
一、离心机的类型和应用范围	(114)
二、超速离心机	(114)
三、高速离心机	(117)
四、台式医用离心机	(117)
参考文献	(118)
思考题	(118)

第二部分 基因分子生物学基本技术

第七章 核酸杂交技术	(123)
第一节 DNA 的变性与复性	(123)
一、DNA 变性	(123)
二、复性	(125)
第二节 核酸杂交技术概述	(126)
一、前言	(126)
二、探针-靶反应	(128)
第三节 核酸探针	(128)
一、核酸探针的种类	(129)
二、核酸探针的标记和检测	(132)
第四节 核酸分子杂交方法	(137)
一、核酸分子杂交的类型	(137)
二、核酸分子杂交实验因素的优化	(145)
参考文献	(149)
思考题	(150)
第八章 重组 DNA 技术	(151)
第一节 分子克隆常用技术	(151)
一、核酸的纯化	(151)
二、核酸的浓缩	(151)
三、DNA、RNA 的定量	(152)
四、核酸的凝胶电泳和分子量参照物	(152)
第二节 分子克隆常用载体	(154)
一、质粒	(154)

二、单链丝状噬菌体和噬粒	(156)
第三节 分子克隆中常用的酶	(157)
一、限制性内切核酸酶	(157)
二、DNA 聚合酶	(162)
三、连接酶	(163)
四、T4 噬菌体多核苷酸激酶	(164)
五、碱性磷酸酶	(164)
第四节 DNA 的限制酶切割及限制片段的回收	(164)
一、限制酶消化反应的进行	(164)
二、消化产物的凝胶电泳分析	(165)
三、凝胶中 DNA 片段的回收	(165)
第五节 DNA 的连接	(166)
第六节 外源 DNA 导入宿主细胞	(169)
一、大肠杆菌感受态细胞的制备和转化	(169)
二、高压电穿孔法转化大肠杆菌	(170)
第七节 含重组质粒的细菌菌落的鉴定	(170)
一、插入失活	(170)
二、 α 互补	(172)
三、小规模制备质粒 DNA 进行限制酶切分析	(173)
四、杂交筛选	(174)
五、DNA 序列分析	(175)
参考文献	(175)
思考题	(175)
第九章 聚合酶链反应 (PCR)	(176)
第一节 PCR 的基本原理和方法	(176)
一、PCR 原理	(176)
二、用于 PCR 的 DNA 聚合酶	(177)
三、PCR 方法	(179)
四、PCR 样品的快速制备	(179)
第二节 PCR 技术的应用	(183)
一、在基因工程中的应用	(183)
二、在医学中的应用	(187)
第三节 PCR 的设计	(197)
一、标准反应	(197)
二、PCR 缓冲液	(197)
三、循环参数	(198)
四、引物的设计	(199)
五、PCR 的灵敏度和特异性	(200)
六、PCR 污染和残余物	(201)

七、PCR 的错误掺入	(201)
参考文献	(202)
思考题	(202)
第十章 DNA 序列测定技术	(203)
第一节 序列测定的技术和策略	(203)
一、Sanger 双脱氧链终止法	(203)
二、Maxam-Gilbert DNA 化学降解法	(207)
三、测序策略	(209)
第二节 Sanger 双脱氧链终止法测序	(210)
一、设立双脱氧测序反应	(210)
二、变性聚丙烯酰胺凝胶	(211)
三、应用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段的双脱氧测序反应	(219)
四、应用测序酶的双脱氧测序反应	(221)
五、测定变性双链 DNA 模板的序列	(224)
六、测定 DNA 扩增产物的序列	(224)
第三节 双脱氧测序中出现的问题	(226)
一、模板特异的问题	(227)
二、全局性问题	(229)
三、聚丙烯酰胺凝胶出现的问题	(229)
参考文献	(229)
思考题	(230)

第三部分 生物化学和分子生物学实验

实验一 蛋白质的变性、凝固及沉淀反应	(233)
实验二 蛋白质等电点的测定	(236)
实验三 几种因素对唾液淀粉酶的作用	(237)
实验四 乳酸脱氢酶 (LDH) 同工酶的分离	(239)
实验五 脲酶 K_m 值简易测定法	(241)
实验六 血清白蛋白、 γ -球蛋白的分离和提纯	(243)
实验七 血清蛋白质醋酸纤维素薄膜电泳	(248)
实验八 Lowry's 法测定蛋白质含量	(251)
实验九 紫外吸收法测定蛋白质含量	(252)
实验十 各种血红蛋白吸收光谱的观察	(253)
实验十一 组织 DNA 与 RNA 的分离、提纯	(255)
实验十二 DNA 与 RNA 的定量测定	(257)
实验十三 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	(259)
实验十四 RNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳	(260)
实验十五 RNA 的合成及其抑制	(261)

实验十六	NK 细胞活性的示踪 — ^{125}I -UdR 同位素释放试验	(264)
实验十七	放射性焦磷酸 (^{32}ppi) - 腺三磷交换法测定核糖核酸连接酶的活性	(266)
实验十八	蛋清溶菌酶的分离	(268)
实验十九	肾碱性磷酸酶的分离	(270)
实验二十	聚丙烯酰胺凝胶电泳	(272)
实验二十一	胰凝乳蛋白酶的制备及活力测定	(275)
实验二十二	用 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质分子量	(280)
实验二十三	煮沸法快速提取质粒 DNA	(284)
实验二十四	碱裂解法快速提取细菌质粒 DNA	(286)
实验二十五	琼脂糖凝胶电泳检查 DNA	(288)
实验二十六	DNA 体外重组实验	(290)
实验二十七	核酸分子杂交实验	(293)

第四部分 附录

I	生物化学实验须知	(299)
一、	实验室规则	(299)
二、	实验室急救	(299)
三、	玻璃仪器的洗涤及洗液的配制	(300)
四、	生化实验样品的制备	(301)
五、	实验误差与数据处理	(304)
II	试剂的配制	(307)
一、	溶液浓度的表示与计算	(307)
二、	常用缓冲液配方	(309)
三、	指示剂	(316)
四、	冷却剂和干燥剂	(318)
五、	试剂配制中常用数据	(319)
六、	闪烁液配方	(326)
III	分子克隆中使用的试剂与缓冲液的配制	(328)
一、	酸和碱的浓度	(328)
二、	贮存液	(330)
三、	杂交试验中用于降低背景的封闭剂	(335)
四、	酶类	(336)
五、	常用缓冲液	(336)
IV	分子克隆中的常用技术	(343)
一、	玻璃制品和塑料制品	(343)
二、	核酸的纯化	(343)
三、	DNA 和 RNA 的定量	(345)
四、	溴化乙淀溶液的净化处理	(345)

五、核酸的浓缩	(346)
六、核酸中放射性的测定	(349)
七、用于凝胶电泳的标准参照物	(351)
八、放射自显影	(351)
九、凝胶过滤层析	(352)
十、离心柱层析	(353)
十一、透析管的处理	(355)
十二、质粒 DNA 的纯化	(355)
V 生物化学和分子生物学实验常用数据资料	(357)
一、层析法常用数据	(357)
二、硫酸铵饱和度的常见表	(367)
三、离心机转数与离心力的列线表	(369)
四、纯化的人血浆蛋白质的分子参数	(371)
五、常用参考蛋白质分子量	(377)
六、透光度和吸光度换算表	(378)
七、同位素资料	(381)
八、元素周期表	(382)
九、DNA 资料	(383)
十、字母与词头	(384)
十一、元素表	(386)
十二、常用药品中英文对照及分子式分子量表	(391)

第一章 分光光度技术

有色溶液对光线有选择性的吸收作用，不同物质由于其分子结构不同，对不同波长光线的吸收能力也不同，因此，每种物质都具有其特异的吸收光谱。有些无色溶液，虽对可见光无吸收作用，但所含物质可以吸收特定波长的紫外线或红外线。分光光度技术（分光光度法）主要是指利用物质特有的吸收光谱来鉴定物质性质及含量的技术，其理论依据是 Lambert 和 Beer 定律。

分光光度法是比色法的发展。比色法只限于在可见光区，分光光度法则可以扩展到紫外光区和红外光区。比色法用的单色光是来自滤光片，谱带宽度从 40 ~ 120nm, 精度不高，分光光度法则要求近于真正单色光，其光谱带宽最大不超过 3 ~ 5nm, 在紫外区可到 1nm 以下，来自棱镜或光栅，具有较高的精度。

第一节 基本原理

一、光的基本知识

光是由光量子组成的，具有二重性，即不连续的微粒性和连续的波动性。波长和频率是光的波动性和特征，可用下式表示：

$$\lambda = \frac{C}{\nu}$$

式中 λ 为波长，具有相同的振动相位的相邻两点间的距离叫波长。 ν 为频率，即每秒钟振动次数。 C 为光速，等于 299770 ± 4 千米 / 秒。光属于电磁波。

自然界中存在各种不同波长的电磁波，列成表 1-1 所示的波谱图。分光光度法所使用的光谱范围在 200nm - 10 μ (1 μ = 1, 000nm) 之间。其中 200nm ~ 400nm 为紫外光区，400nm ~ 760nm 为可见光区，760 ~ 10,000 nm 为红外光区。

表 1-1 电 磁 波 谱

区 域	波 长		来 源
	米	常用单位	
γ 射线	$10^{-12} \sim 10^{-10}$	$10^{-2} \sim 1\text{\AA}$	原子核
X 射线	$10^{-10} \sim 10^{-8}$	1 ~ 100 $\text{\AA}$	内层电子
远 紫 外	$10^{-8} \sim 2 \times 10^{-7}$	10 ~ 200nm	中层电子
紫 外	$2 \times 10^{-7} \sim 4 \times 10^{-7}$	200 ~ 400nm	外层价电子
可 见	$4 \times 10^{-7} \sim 7.6 \times 10^{-7}$	400 ~ 760nm	外层价电子
红 外	$7.6 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-5}$	0.76 ~ 50 μm	分子振动与分子转动
远 红 外	$5 \times 10^{-5} \sim 10^{-3}$	50 ~ 1000 μm	分子振动与分子转动
微 波	$10^{-3} \sim 1$	0.1 ~ 100cm	分子转动
无线电波	1 ~ 10^3	1 ~ 1000 m	核磁共振

二、朗伯 - 比尔 (Lambert - Beer) 定律

朗伯 - 比尔定律是比色分析的基本原理, 这个定律是讨论有色溶液对单色光的吸收程度与溶液的浓度及液层厚度间的定量关系。此定律是由朗伯定律和比尔定律归纳而得。

1. 朗伯定律

一束单色光通过溶液后, 由于溶液吸收了一部分光能, 光的强度就要减弱: 若溶液浓度不变, 则溶液的厚度愈大 (即光在溶液中所经过的途径愈长), 光的强度减低也愈显著。

设光线通过溶液前的强度为 I_0 (入射光的强度), 通过液层厚为 L 溶液后, 光的强度为 I_t (透过光的强度), 则 $\frac{I_t}{I_0}$ 表示透过光的强度是入射光强度的几分之几, 称为透光度 (Transmittance), 用 T 表示。透光度随溶液厚度的增加而减少, 但实践证明, 透光度和溶液厚度间并不存在简单的定量关系, 只有透光度的负对数 ($-\lg T$) 才随着溶液厚度的增加而成正比例地增加, 即

$$-\lg T = -\lg \frac{I_t}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I_t} \propto L$$

将上述比例式写成等式, 得到

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = K_1 L$$

式中 $\lg \frac{I_0}{I_t}$ 称为吸光度 (A) (Absorbance), 又称为消光度 (E) (Degree of extinction) 或光密度 (D) (Optical density)。所以

$$A = K_1 L$$

式中 K_1 为比例系数, 其值取决于入射光的波长, 溶液的性质和浓度以及溶液的温度等。

上式表明, 当溶液的浓度不变时, 吸光度与溶液液层的厚度成正比, 这就是朗伯定律。

2. 比尔定律

当一束单色光通过有色溶液后, 溶液液层的厚度不变而浓度不同时, 溶液的浓度愈大, 则透射光的强度愈弱, 其定量关系如下:

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = K_2 C$$

$$A = K_2 C$$

式中 C 为有色物质溶液的浓度; K_2 为比例系数, 其值取决于入射光的波长, 溶液的性质和液层的厚度以及溶液的温度等。

上式表明, 当溶液液层的厚度不变时, 吸光度与溶液的浓度成正比, 这就是比尔定律。

3. 朗伯 - 比尔定律

如果同时考虑吸收层的厚度和溶液浓度对光吸收的影响, 则必须将朗伯定律和比尔定律合并起来, 得