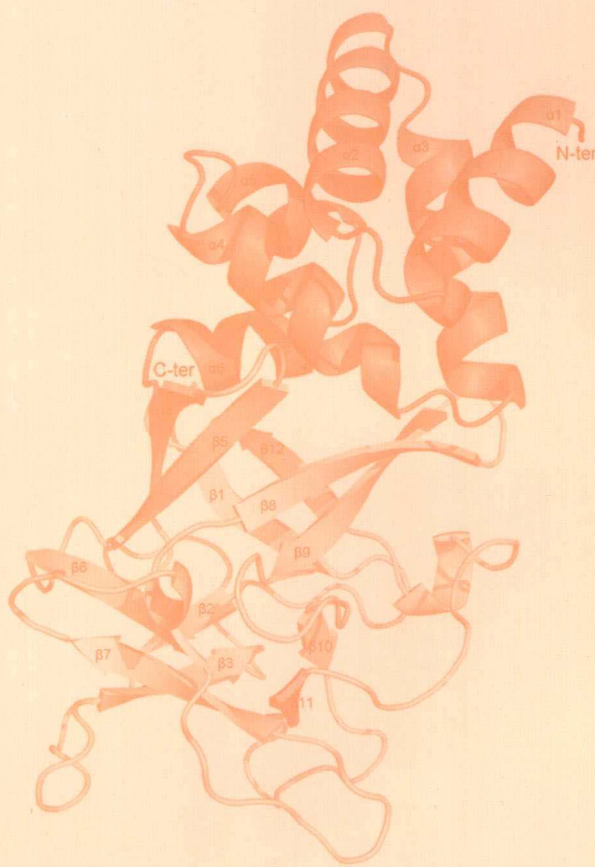


“十二五”国家重点图书出版规划项目

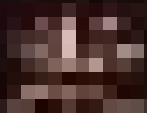
中国科学技术大学 **精品** 教材

生物化学与 分子生物学实验

► 李卫芳 俞红云 王冬梅 王秀海 编著



中国科学技术大学出版社



生物化学与 分子生物学实验

主编 王 健 副主编 王 健 王 健 王 健 王 健



中国医药出版社

“十二五”国家重点图书出版规划项目

中国科学技术大学精品教材

生物化学与 分子生物学实验

SHENGWU HUAXUE YU
FENZI SHENGWUXUE SHIYAN

李卫芳 俞红云 王冬梅 王秀海 编著

中国科学技术出版社

内 容 简 介

本书由中国科学技术大学生命科学学院实验教学中心编写,主要内容 by 学院多年使用的《生物化学与分子生物学基础实验讲义》及《生物化学与分子生物学高级讲义》综合选编而成。本书包括基础实验和综合实验两个部分,涵盖了生物化学与分子生物学的教学大纲的要求,从实验设计、实验选材到实验操作,都经历过多次的教学实践证实,很多实验内容由科研成果直接转化而来,是作者多年教学和科研经验的积累。

本书适合作为生命科学类专业及相关专业的本科生教材,重在基础实验和基础技能方面,旨在培养学生解决实际问题的能力和创新能力,为学生日后的毕业实习和科学研究奠定坚实的实验技术基础。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验/李卫芳等编著. —合肥:中国科学技术大学出版社,2012. 1

(中国科学技术大学精品教材)

“十二五”国家重点图书出版规划项目

ISBN 978-7-312-02965-3

I. 生… II. 李… 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(2011)第 270231 号

中国科学技术大学出版社出版发行

安徽省合肥市金寨路 96 号,230026

<http://press.ustc.edu.cn>

安徽省瑞隆印务有限公司印刷

全国新华书店经销

开本:787mm×1092mm 1/16 印张:15 插页:2 字数:372 千

2012 年 1 月第 1 版 2012 年 1 月第 1 次印刷

印数:1—3000 册

定价:28.00 元



编审委员会

主 任 侯建国

副主任 窦贤康 陈初升 张淑林
朱长飞

委 员 (按姓氏笔画排序)

方兆本	史济怀	古继宝	伍小平
刘 斌	刘万东	朱长飞	孙立广
汤书昆	向守平	李曙光	苏 淳
陆夕云	杨金龙	张淑林	陈发来
陈华平	陈初升	陈国良	陈晓非
周学海	胡化凯	胡友秋	俞书勤
侯建国	施蕴渝	郭光灿	郭庆祥
窦宏生	钱逸泰	徐善驾	盛六四
龚兴龙	程福臻	蒋 一	窦贤康
褚家如	滕脉坤	霍剑青	

总 序

2008年,为庆祝中国科学技术大学建校五十周年,反映建校以来的办学理念和特色,集中展示教材建设的成果,学校决定组织编写出版代表中国科学技术大学教学水平的精品教材系列.在各方的共同努力下,共组织选题281种,经过多轮、严格的评审,最后确定50种入选精品教材系列.

五十周年校庆精品教材系列于2008年9月纪念建校五十周年之际陆续出版,共出书50种,在学生、教师、校友以及高校同行中引起了很好的反响,并整体进入国家新闻出版总署的“十一五”国家重点图书出版规划.为继续鼓励教师积极开展教学研究与教学建设,结合自己的教学与科研积累编写高水平的教材,学校决定,将精品教材出版作为常规工作,以《中国科学技术大学精品教材》系列的形式长期出版,并设立专项基金给予支持.国家新闻出版总署也将该精品教材系列继续列入“十二五”国家重点图书出版规划.

1958年学校成立之时,教员大部分来自中国科学院的各个研究所.作为各个研究所的科研人员,他们到学校后保持了教学的同时又作研究的传统.同时,根据“全院办校,所系结合”的原则,科学院各个研究所在科研第一线工作的杰出科学家也参与学校的教学,为本科生授课,将最新的科研成果融入到教学中.虽然现在外界环境和内在条件都发生了很大变化,但学校以教学为主、教学与科研相结合的方针没有变.正因为坚持了科学与技术相结合、理论与实践相结合、教学与科研相结合的方针,并形成了优良的传统,才培养出了一批又一批高质量的人才.

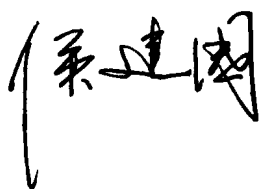
学校非常重视基础课和专业基础课教学的传统,也是她特别成功的原因之一.当今社会,科技发展突飞猛进、科技成果日新月异,没有扎实的基础知识,很难在科学技术研究中作出重大贡献.建校之初,华罗庚、吴有训、严济慈等老一辈科学家、教育家就身体力行,亲自为本科生讲授基础课.他们以渊博的学识、精湛的讲课艺术、高尚的师德,带出一批又一批杰出的年轻教员,培养了一届又一届优秀学生.入选精品教材系列的绝大部分是基础课或专业基础课的教材,其作者大多直接或间接受到过这些老一辈科学家、教育家的教诲和影响,因此在教材中也贯穿着这些先辈的教育教学理念与科学探索精神.

改革开放之初,学校最先选派青年骨干教师赴西方国家交流、学习,他们在带回先进科学技术的同时,也把西方先进的教育理念、教学方法、教学内容等带回到中国科学技术大学,并以极大的热情进行教学实践,使“科学与技术相结合、理论与实践相结合、教学与科研相结合”的方针得到进一步深化,取得了非常好的效果,培养的学生得到全社会的认可.这些教学改革影响深远,直到今天仍然受到学生的欢迎,并辐射到其他高校.在入选的

精品教材中,这种理念与尝试也都有充分的体现。

中国科学技术大学自建校以来就形成的又一传统是根据学生的特点,用创新的精神编写教材.进入我校学习的都是基础扎实、学业优秀、求知欲强、勇于探索和追求的学生,针对他们的具体情况编写教材,才能更加有利于培养他们的创新精神.教师们坚持教学与科研的结合,根据自己的科研体会,借鉴目前国外相关专业有关课程的经验,注意理论与实际应用的结合,基础知识与最新发展的结合,课堂教学与课外实践的结合,精心组织材料、认真编写教材,使学生在掌握扎实的理论基础的同时,了解最新的研究方法,掌握实际应用的技术。

入选的这些精品教材,既是教学一线教师长期教学积累的成果,也是学校教学传统的体现,反映了中国科学技术大学的教学理念、教学特色和教学改革成果.希望该精品教材系列的出版,能对我们继续探索科教紧密结合培养拔尖创新人才,进一步提高教育教学质量有所帮助,为高等教育事业作出我们的贡献。



中国科学技术大学校长
中国科学院院士
第三世界科学院院士

前 言

20 世纪,生命科学发展日新月异,取得了质的飞跃;而 21 世纪,生命科学将会有更大的突破,生物科学将会对人类社会和经济的发展做出更大的贡献。因而,以生物技术为基础和核心的生物经济将是未来代替信息产业的新兴经济形态。如何适应飞速发展的生物科学与生物技术的人才培养需要,培养出既能扎实地掌握生命科学的基础理论知识和实验技能,又能全面适应生命科学的科研、教学、研发和应用的创新型人才,以适应社会的需求?

创新型人才的培养成为生命科学人才培养的基础理论教学和实验教学体系改革的关键。在此理念指导下,中国科学技术大学生命科学学院对生物化学实验课程实施了改革和创新,开设了“生物化学与分子生物学基础实验”、“生物化学与分子生物学高级实验——葡萄糖异构酶 GI 的克隆、分离纯化和酶活鉴定”,以及“系统生物学实验”和“生物技术制药实验——重组人干扰素酵母菌的中试生产实验”分级系列实验课程。这四组实验课的设置已将技能训练、培养解决实际问题的能力及创新能力很好地结合在一起,为学生们日后的毕业实习和科学研究奠定了坚实的实验技术基础。

本实验教材正是在此理念下编写而成的,分为两部分。第一部分由 25 个独立的基础性生物化学与分子生物学实验组成,第二部分为综合性的生物化学与分子生物学实验。本书的实验内容是根据教学大纲的要求,并结合我们实验教学中心的实验条件而编写的,从实验设计、实验选材到实验操作,都已经过多次的教学实践所证实,并有很多内容是由科研实验室的科研成果直接转化而来。在每个实验中,我们简明扼要地阐述了“实验原理”,并在大部分实验后特意编写了“结果与讨论及注意事项”,对多年在教学和科研中积累的经验加以总结。诚然,生物化学发展到今天,各种组学以及蛋白质相互作用的研究已经是炙手可热,但是,由于本书是面向低年级本科生的,重在基础实验和基本技能方面,因此,这些热门实验并没有囊括其中,而将在以后的高级实验教材中逐一介绍。

经过我们多年的不懈努力与探索,“生物化学和分子生物学实验”终于得以面世,虽然显得很生涩,而且还有很多内容有待完善,但它毕竟凝聚了我们多年来的心血。本书主要编者有李卫芳(实验九、十、十一、十二、十三、十四、二十四、二十五)、俞红云(实验十八、十九、二十、二十一、二十二、二十三、二十六)、王冬梅(实验一、五、八、十五、十六)、王秀海

目 次

总序	i
前言	iii

第一部分 基础实验

实验一 蛋白质的定量测定	3
实验二 核酸的定量测定	12
实验三 糖的定量测定	20
实验四 不同去污剂对红血球细胞膜的溶解作用比较	24
实验五 凝胶过滤层析柱的装填及柱效测定	30
实验六 葡聚糖凝胶柱层析	34
实验七 离子交换柱层析法分离蛋白质	41
实验八 硫酸铵分级沉淀法分离纯化 Rubisco 蛋白	47
实验九 聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE)分离植物过氧化物酶同工酶(活性染色法)	53
实验十 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法测定蛋白质的分子量	65
实验十一 等电聚焦电泳(IEF)	74
实验十二 双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D-PAGE)	81
实验十三 酶联免疫吸附测定法(ELISA)	89
实验十四 蛋白质免疫印记(Western Blotting)	96
实验十五 交联法(Cross-linking)鉴定蛋白质的聚集特性	103
实验十六 肌动蛋白的体外聚合和共沉降	107
实验十七 用正交法测定几种因素对酶活力的影响	112
实验十八 酸性磷酸酯酶动力学性质的分析	118
实验十九 质粒 DNA 的提取	129
实验二十 质粒 DNA 的酶切与鉴定	134
实验二十一 PCR 基因扩增	147
实验二十二 DNA 样品的胶回收及连接	158
实验二十三 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化	163
实验二十四 酿酒酵母总 RNA 的提取、纯化与鉴定	167

实验二十五 反转录 PCR(RT-PCR)和实时荧光定量 PCR(ORT-PCR) 172

第二部分 综合实验

实验二十六 葡萄糖异构酶(GI)基因的克隆、表达及 GI 的纯化与性质鉴定 181

附录

附录一	实验室用水常识	203
附录二	玻璃器皿的洗涤和常用洗液的配制	204
附录三	常见市售酸碱的浓度	207
附录四	国际相对原子质量表(2001)	208
附录五	缓冲液的配制	210
附录六	硫酸铵饱和度常用表	215
附录七	常用分子量标准参照	217
附录八	常用核酸蛋白数据换算	219
附录九	柱层析介质的技术参数	220
附录十	电泳相关的常用缓冲液的配制	225
附录十一	常用培养基	228
附录十二	常用抗生素	229
附录十三	分子生物学常用软件	230
附录十四	学生实验守则	232
附录十五	生物化学与分子生物实验室安全及防护知识	233

第一部分 基础实验

实验一 蛋白质的定量测定

1 实验目的

(1) 掌握紫外吸收法、考马斯亮蓝染色法(Bradford 法)、Folin-酚试剂法(Lowry 法)和二辛可宁酸分析法(BCA 法)测定蛋白质含量的原理和方法。

(2) 掌握分光光度计的原理和使用方法。

2 实验方法

蛋白质含量测定有许多种方法,如何选择合适的方法主要基于以下五点考虑:① 有多少样品可供分析;② 蛋白质样品浓度大约是多少;③ 样品中含有哪些可能影响定量的化学物质;④ 含量测定的专一性要求是否很高;⑤ 所选方法是否简单、可靠。

最常用的方法主要有:① 紫外吸收法;② 考马斯亮蓝染色法(Bradford 法);③ Folin-酚试剂法(Lowry 法);④ 二辛可宁酸分析法(BCA 法)。每种方法都有一定的灵敏度,被测样品中蛋白含量应控制在其灵敏度范围内。必须强调的是灵敏度与被测蛋白样品的种类及体积有关,可以通过增大或者减少样品体积来改变测定方法的灵敏度。如常用的 1 cm 光径的比色皿测量所需的体积为 3 mL,若使用同样光径的微量比色皿,所需体积仅为 100 μ L,测量灵敏度相应提高了 30 倍。

2.1 紫外吸收法

2.1.1 实验原理

紫外吸收法有其突出的优点:① 不需添加任何试剂,因而对样品没有任何破坏;② 测量极其简单迅速;③ 蛋白浓度和吸光度是线性关系,容易计算。但紫外吸收法也有突出的缺点,就是干扰测定的影响因素特别多,要得到准确可靠的结果,必须严格控制样品溶液的 pH 和化学组成,使待测样品和标准样品的实验条件一致。

蛋白质在紫外光区(190~360 nm)有两个强烈吸收峰:280 nm 和 200 nm。电子吸收光子产生了吸收光谱。电子有基态轨道和更高能量的轨道,只有光子的能量水平与这两种轨道的能量差相符时才能被吸收。我们知道光子的波长越短其能量越高,所以在 280 nm 被激发的电子

体或聚合物;② 许多去污剂也吸收紫外光。

2.1.2 测量和计算方法

(1) 测量范围

$$OD_{280}: 20 \sim 3000 \mu\text{g}$$

$$OD_{205}: 1 \sim 100 \mu\text{g}$$

测量范围随样品蛋白质种类不同而有很大差异。

(2) 计算方法

对混合蛋白质样品或不知道其消光系数的蛋白样品,可用下式作出大概估计:

$$\text{浓度}(\text{mg/mL}) = A_{280}$$

注意:此时所用比色皿的光程为 1 cm。使用其他规格的比色皿需做相应换算。

对已知消光系数的样品,可用下面的公式计算。通常消光系数有以下几种单位:

$A_{1\text{ cm}}^{1\text{ mg/mL}}$ 、 $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 、 ϵ_M (即摩尔消光系数)。

$$\text{浓度}(\text{mg/mL}) = A_{280} / A_{1\text{ cm}}^{1\text{ mg/mL}}$$

$$\text{浓度}(\%) = A_{280} / A_{1\text{ cm}}^{1\%}$$

$$\text{浓度}(\text{mol/L}) = A_{280} / \epsilon_M$$

注意:① 消光系数与 pH 和离子强度有关,所以应尽可能使样品的测量条件与给定消光系数的条件相同;② 核酸类物质在 280 nm 有强吸收。对含 DNA 或 RNA 的样品,如细胞裂解液,必须同时测量 260 nm 的光吸收,并用下式计算其浓度:

$$\text{蛋白质浓度}(\text{mg/mL}) = 1.55A_{280} - 0.76A_{260}$$

光谱术语:吸光度

吸光度,也被称为吸光(A)、消光(E)或光密度(OD),被定义为 $A = \lg(I_0/I)$, I_0 是射到样品上的光的强度, I 是通过样品溶液没有被样品吸收的光的强度。

吸光度也可用 $A = acl$ 表达, c 是吸收物质的浓度, l 是用 cm 表示的光学通路长度,作为比例常数的 a 是吸光率指数。当吸光度以浓度单位 mol/L 表示,且路径长度用 cm 表示时,我们将其定义为摩尔吸光系数(或摩尔消光系数 ϵ_M)。因此,在这个定义下, ϵ_M 是 1 mol/L 溶液用 1 cm 的光径的吸光度,单位为 $\text{L/mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 或 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

当不知道或无法确定吸收物质的分子质量时,吸光度可以方便地用 $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (或 $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$) 表示,即 1% 溶液(如每毫升含有 10 mg 蛋白质的样品溶液)的吸光度用 Beer-Lambert 定律假设计算。经常将波长加入到这个术语中,表示在该波长测量的吸光度。例如, $A_{280}^{0.1\%}$ (或 $E_{280}^{0.1\%}$) 表示在 280 nm 下,使用 1 cm 的光径,每毫升含有 1 mg 蛋白质的样品溶液的吸光度。

2.1.3 试剂与仪器

(1) 标准蛋白:1 mg/mL BSA(牛血清白蛋白)。

(2) 未知蛋白样品:卵白蛋白或牛血清白蛋白。

(3) 紫外可见分光光度计。

2.1.4 实验操作

取 16 支短试管,按下表编号(每一管号做平行 2 管),加入相应试剂,摇匀,以 0 号管为参比,用光程为 1 cm 的石英比色皿测定其余各管溶液在 280 nm 处的光吸收 OD_{280} ,以标准蛋白浓度为横坐标, OD_{280} 为纵坐标绘制标准曲线,并从标准曲线上查出未知蛋白质的浓度。

