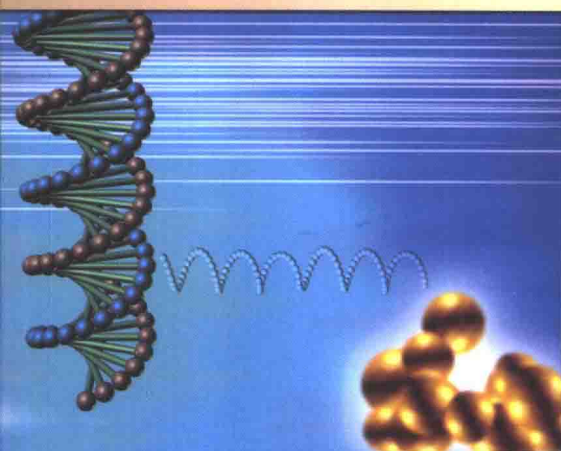


生物化学与分子生物学 实验指导

邵雪玲 毛 歆 郭一清 主编



全国优秀出版社
武汉大学出版社

生物化学与分子生物学实验指导

邵雪玲 毛 歆 郭一清 主编

武汉大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验指导/邵雪玲,毛歆,郭一清主编.
—武汉:武汉大学出版社,2003.10
ISBN 7-307-03969-9

I. 生… II. ①邵… ②毛… ③郭… III. ①生物化学—实
验—高等学校—教材 ②分子生物学—实验—高等学校—教材
IV. ①Q5-33 ②Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2003)第059434号

责任编辑:黄汉平 责任校对:刘欣 版式设计:支笛

出版发行:武汉大学出版社 (430072 武昌 珞珈山)

(电子邮件:wdp4@whu.edu.cn 网址:www.wdp.whu.edu.cn)

印刷:武汉大学出版社印刷总厂

开本:850×1168 1/32 印张:7.5 字数:185千字

版次:2003年10月第1版 2003年10月第1次印刷

ISBN 7-307-03969-9/Q·75 定价:13.00元

版权所有,不得翻印;凡购买我社的图书,如有缺页、倒页、脱页等质量问题者,请与当地图书销售部门联系调换。

前 言

随着生物化学与分子生物学实验技术的迅速发展，生命科学在理论与应用上都取得了惊人的进展。生物化学与分子生物学实验技术逐渐系统化，现已成为生命学科各领域研究的常规技术。为了培养创新人才，与世界接轨，我们在实验教学中进行了大量的改革：根据实验室条件，尽可能删除一些落后的实验方法，引进现代的实验方法，在原有实验教材的基础上，减去了部分验证性实验，加强了生物化学技术训练的实验，其内容包括了生物物质的定量测定技术、电泳技术、层析技术、大分子物质的提取及离心技术、酶联免疫技术、酶活性测定及动力学分析、质粒 DNA 的提取、酶切、鉴定；PCR 技术；感受态细胞的制备及转化技术；DNA 重组及表达等。

本教材按 162 学时编写，总共分为七大部分，实验分上下学期完成，上学期完成生物化学部分，下学期完成分子生物学部分。希望通过本教材的指导，同学们能够顺利完成生物化学与分子生物学实验，并了解现代生物化学与分子生物学实验最基本的技术，并在今后专业课的学习和将来的工作中能灵活应用。本教材所涉及的技术面比较广泛，可供理科、农林类及医学各科学学生参考使用。

尽管我们用最大努力来编写本教材，但由于编写本教材的时间紧，有错误的地方是在所难免的，希望同学们在使用的过程中

提出意见，以便更好地完善教材。使用本教材的同时，同学们还应参看其他教材或文献，拓宽自己的视野，这样才能写出较好的实验报告。

本教材第一部分、第二部分、第六部分及第七部分由邵雪玲编写；第三部分、第四部分由郭一清编写；第五部分由毛歆编写。参加教学改革实验的还有杨惠、沈小玲。感谢武汉大学生命科学学院教学办、武汉大学教务部及武汉大学出版社对本教材出版的支持。

编 者

2003.6.6

目 录

第一部分 生物化学与分子生物学实验入门

一、实验室规则	1
(一) 实验室安全规则	1
(二) 实验室卫生规则	1
(三) 学生守则	2
二、常用仪器的使用方法	2
(一) 722S 型分光光度计	2
(二) 752 型紫外可见分光光度计	5
(三) 离心机	6
(四) 微量移液器	7
(五) 电子天平	8
(六) Elx 酶标仪	9
(七) PCT-100PCR 仪	12
三、器皿的洗涤及要求	17
(一) 一般实验要求	17
(二) 分子生物学实验要求	18
四、实验结果的记录及保存	19
五、实验报告的完成	20
六、实验成绩评分方法	20

第二部分 生物大分子的制备及鉴定实验

实验一	蛋白质的盐析分级分离及凝胶层析脱盐	22
实验二	凝胶过滤层析法测定蛋白质的分子量	25
实验三	醋酸纤维素膜电泳分离鉴定蛋白质	30
实验四	蛋白质含量的测定	32
实验五	琼脂糖凝胶电泳分离乳酸脱氢酶同工酶	36
实验六	常规蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳	38
实验七	蛋白质的双向电泳	44
实验八	丹磺酰化法分析蛋白质 N-末端氨基酸	49
实验九	动物基因组 DNA 的分离纯化	52
实验十	核酸的定量测定	54
实验十一	DNA 的 T_m 值测定	59
实验十二	植物总 RNA 的提取	62
实验十三	甲醛变性凝胶电泳鉴定 RNA	64
实验十四	离子交换柱层析分离核苷酸	65

第三部分 酶动力学测定实验

实验一	酵母蔗糖酶的制备	75
实验二	DEAE 纤维素柱层析纯化酶蛋白	77
实验三	各级分蔗糖酶活性测定及纯化率的计算	80
实验四	底物浓度对催化反应速度的影响及米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max} 的测定	83
实验五	反应时间对产物形成的影响	87
实验六	pH 值、温度、抑制剂对蔗糖酶活性的影响	89

第四部分 免疫化学检测实验

实验一	免疫血清的制备	94
实验二	双向免疫扩散法测定抗血清效价	97

实验三	微量免疫电泳·····	100
实验四	单向定量免疫电泳·····	102
实验五	微量酶联免疫法测定 IgG ·····	104
实验六	免疫印迹法检测人 IgG ·····	108

第五部分 分子生物学实验

实验一	质粒 DNA 的提取·····	118
实验二	质粒 DNA 的酶切·····	122
实验三	琼脂糖凝胶电泳检测 DNA ·····	124
实验四	大肠杆菌感受态细胞制备及转化·····	127
实验五	目的基因片段的回收·····	130
实验六	DNA 重组·····	134
实验七	重组子鉴定·····	137
实验八	Southern 吸印·····	139
实验九	Southern 杂交·····	141
实验十	蛋白质的诱导表达及 SDS-PAGE 电泳检测·····	146
实验十一	PCR 扩增目的基因·····	153

第六部分 开放及综合设计性实验

实验一	还原糖的含量测定·····	156
实验二	总糖含量的测定(苯酚-硫酸法)·····	159
实验三	糖的硅胶 G 薄层层析·····	161
实验四	血清总胆固醇的测定·····	162
实验五	维生素 B ₂ (核黄素)荧光测定法·····	164
实验六	酪蛋白的制备·····	167
实验七	温度和 pH 对唾液淀粉酶活性的影响·····	168
实验八	琥珀酸脱氢酶及丙二酸的抑制作用·····	171
实验九	药用植物过氧化物酶同工酶分析及活性比较·····	173
实验十	谷丙转氨酶的活性测定·····	174

实验十一 离子交换法制备肝素	177
实验十二 mRNA 的分离	180
实验十三 标记亲和素生物素法 (BA-ELISA)	183
实验十四 藻类多糖的结构与生物活性研究	185
学生综合设计性实验论文选阅	188
Cu ²⁺ 胁迫条件对涡虫体内过氧化氢酶活性的影响	188
不同家禽蛋类营养成分的比较	195
新技术介绍	201
(一) 生物芯片简介	201
(二) 生命科学中的毛细管电泳	203
(三) USING THE COMPUTER IN BIOCHEMICAL RESEARCH	204

附 录

附录 1 常用缓冲液的配制	211
附录 2 层析技术有关介质性质及数据	214
附录 3 SDS-PAGE 标准蛋白质分子量	220
附录 4 硫酸铵饱和度计算	221
附录 5 细菌培养基、抗生素	223

第一部分 生物化学与分子生物学实验入门

一、实验室规则

(一) 实验室安全规则

1. 水电使用安全规则：注意节约用水（不管是自来水还是纯净水），清洗器皿时，先用自来水洗干净后，根据实验需要再用纯净水冲洗1~3遍；随时注意水龙头是否关掉，水池是否堵塞、漏水；注意节约用电，不能随意调节空调，仪器使用前应了解是否漏电、短路，使用完后按操作程序关掉电源；最后离开实验室的同学应检查实验室的照明灯、仪器电源、水龙头是否关掉。

2. 药品使用安全规则：易燃易爆药品远离火源；注意有毒或腐蚀性药品的使用方法；绝对禁止药品、试剂间的相互污染；废弃液体入水池后用水冲掉，固体废弃物严禁入水池；有毒废弃物倒到指定地点。

3. 仪器使用安全规则：实验室任何仪器不能随意操作，严格按照操作规程进行；仪器在使用过程中出现故障要报告，不能自行处理；使用完仪器后要清洁仪器和台面并记录仪器使用情况。

(二) 实验室卫生规则

1. 维护实验室的清洁卫生：不能随地吐痰，乱扔废纸屑等物品。每小组实验完后清洗器皿和清理台面。

2. 严格执行卫生值班制：实验完后实验室的清洁卫生由值日小组按照布置严格执行，不能无故不做。

(三) 学生守则

1. 每位同学都应衣冠整齐，自觉遵守课堂纪律，维护课堂秩序，不得无故迟到早退，保持室内安静。

2. 注意实验室环境、仪器和实验桌面的整洁，每次实验完后该清洗的器皿清洗完后按原位放好，经老师检查后方可离开。

3. 每次开始做实验前，应预习好实验指导，要充分了解实验原理、方法及仪器设备的使用方法，原则上按照实验指导的方法进行，如经预习，查资料后，有更好的实验方法，可与老师讨论后进行，鼓励创新。

4. 使用仪器、药品、试剂和各种物品必须注意节约，应特别注意保持药品和试剂的纯净，严防混杂。

5. 注意安全。易燃易爆物远离火源，注意有毒或腐蚀药品的使用方法，玻璃器皿的使用、洗涤，尽可能减少损坏、割伤手。行走时不要碰撞他物。废弃液体倒入水槽并用水冲走，固体废弃物严禁入水槽，应丢入垃圾桶中。

6. 实验室的清洁卫生及安全值日，经老师或班长安排后，严格执行。

7. 应注意同学之间相互协作能力方面的培养。

8. 真实认真地对待每次实验，记录好实验结果，实验完后，交实验报告或签名后方可离开。

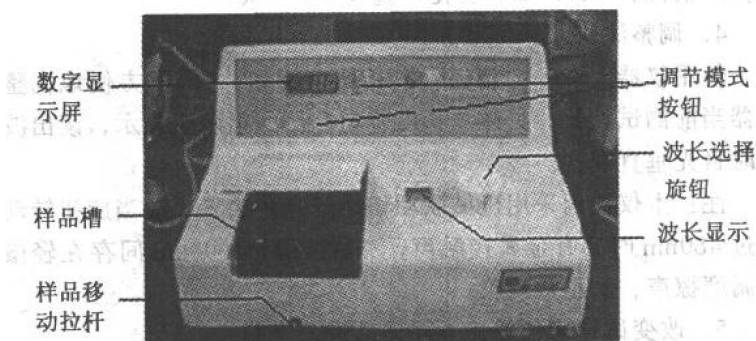
二、常用仪器的使用方法

(一) 722S 分光光度计

722S 分光光度计是一种简单易用的分光光度法通用仪器，能在 345~1000nm 波长范围内执行透过率、吸光度和浓度直读测定，可广泛用于医学卫生、临床检测、生物化学、石油化工、环保监测、质量控制等部门作定性定量分析，仪器的正常基本操作如下：

1. 预热

2



仪器开机后灯及电子部分需热平衡，故开机预热 30min 后才能进行测定工作，如紧急应用时请注意随时调零，调 100 % T。

2. 调零

目的：校正基本读数标尺两端（配合 100 % T 调节），进入正确测试状态；

调整时期：开机预热 30min 后，改变测试波长时或测试一段时间，以及作高精度测试前；

操作：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。

3. 调整 100 % T

目的：校正基本读数标尺两端（配合调零），进入正确测试状态；

调整时期：开机预热后，更换测试波长或测试一段时间后，以及作高精度测试前（一般在调零前加一次 100 % T 调整以使仪器内部自动增益到位）；

操作：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）。

注：调整 100 % T 时整机自动增益系统重调可能影响 0 %，

调整后请检查 0%，如有变化可重调 0% 一次。

4. 调整波长

使用仪器上惟一的旋钮（波长调节旋钮），即可方便地调整仪器当前测试波长，具体波长由旋钮左侧的显示窗显示，读出波长时目光垂直观察。

注：本仪器因采用机械联动切换滤光片装置，故当旋钮转动经过 480nm 时会有金属接触声，如在 480~1000nm 间存在轻微金属摩擦声，属正常现象。

5. 改变试样槽位置让不同样品进入光路

仪器标准配置中试样槽是四个位置的，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，以确保位置正确。

6. 确定滤光片位置

本仪器备有减少杂光，提高 340~380nm 波段光度准确性的滤光片，位于样品室内侧，用一拨杆来改变位置。

测试波长在 340~380nm 波段内作高精度测试时可将拨杆推向前（见机内印字指示）。通常不使用此滤光片，将拨杆置在 400~1000nm 位置。

注：如在 380~1000nm 波长测试时，误将拨杆置在 340~380nm 波段，则仪器将出现不正常现象，如噪音增加，不能调整 100% T 等。

7. 改变标尺

本仪器设有四种标尺：

TRANS（透射比）：用于对透明液体和透明固体测量透点；

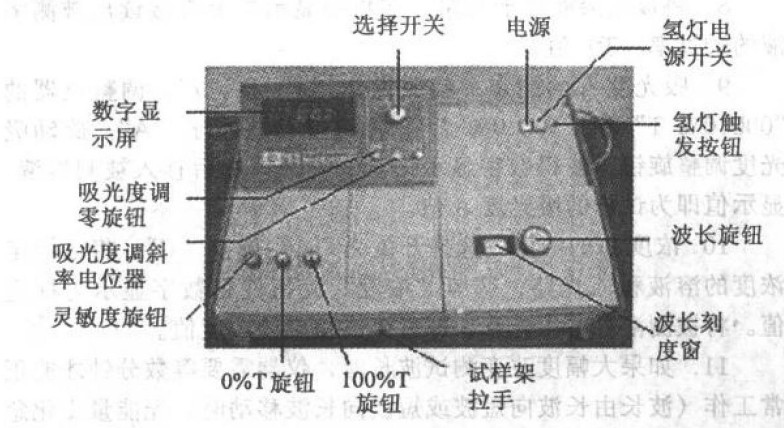
ABS（吸光度）：采用标准曲线法或绝对吸收法，在作动力学测试时也能利用本系统；

FACT（浓度因子）：用于在浓度因子法浓度直读时，设定浓度因子；

CONC (浓度直读): 用于标样法浓度直读时, 作设定和读出, 也用于设定浓度因子以后的浓度直读。

各标尺间的转换用 MODE 操作并由“TRANS”、“ABS”、“FACT”、“CONC”指示灯分别指示, 开机初始状态为 TRANS, 每按一次顺序循环。

(二) 752 型紫外可见分光光度计



1. 将灵敏度旋钮调置“1”档 (放大倍数最小)。
2. 按“电源”开关 (开关内两只指示灯亮), 钨灯点亮; 按“氢灯”开关 (开关内左侧指示灯亮); 氢灯电源接通, 再按“氢灯触发”按钮 (开关内右侧指示灯亮), 氢灯点亮。仪器预热 30min。

(注: 仪器背后有一个“钨灯”开关, 如不用钨灯时可将它关闭。)

3. 选择开关调置“T”。
4. 打开试样室盖 (光门自动关闭), 调节“0%”T 旋钮, 使数字显示为“000.0”。
5. 将波长置于所需要测的波长。

6. 将装有溶液的比色皿放置比色皿架中。

(注：波长在 360nm 以上时，可用玻璃比色皿。波长在 360nm 以下时，要用石英比色皿)。

7. 盖上样品室盖，将参比溶液比色皿置于光路，调节透过率“100”旋钮，使数字显示为 100.0% T，如显示不到 100.0% T，则可适当增加灵敏度的档数，同时应重复操作“4”，调整仪器的“000.0”。

8. 将被测溶液置于光路，在数字显示器上直接读出被测溶液的透过率(T)值。

9. 吸光度 A 的测定：参照操作“4”和“7”，调整仪器的“000.0% T”和“100.0% T”。将选择开关置于“A”。旋动吸光度调整旋钮，使得数字显示为“000.0”，然后移入被测溶液，显示值即为试样的吸光度 A 值。

10. 浓度 C 的测定：选择开关由“A”旋至“C”，将已标定浓度的溶液移入光路，调节“浓度”旋钮使得数字显示为标定值。将被测溶液移入光路，即可读出相应的浓度值。

11. 如果大幅度改变测试波长时，仪器需要等数分钟才能正常工作（波长由长波向短波或短波向长波移动时，光能量变化急剧，使光电管受光后响应缓慢，需一个移光响应时间）。

12. 仪器在使用时应常参照本操作方法中“4”和“7”进行调“000.0% T”和“100.0% T”的工作。

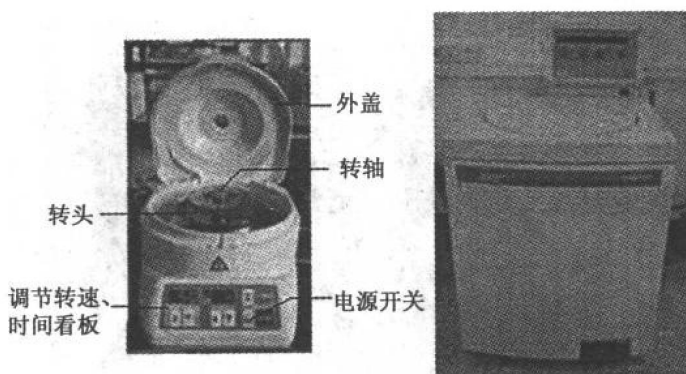
13. 每台仪器所配套的比色皿不能与其他仪器上的比色皿单个调换。

14. 本仪器数字显示后背部带有外接插座，可输出模拟信号。插座 1 脚为正，2 脚为负接地线。

(三) 离心机

离心机种类很多，有大型落地式的冷冻离心机，非冷冻台式离心机；按转速分为：超速、高速、低速离心机等，主要是由冷冻装置、调速装置、转轴、转头等组成。其基本操作过程如下：

1. 转速调到零位，接通电源。



2. 是冷冻离心机则调温度为所需温度，冷机开始工作。
3. 将所离心的物质于离心管进行平衡后，放于转头相对应位置。

4. 盖好转头盖和外盖，调转速为所需转速（高速时注意离心力与转速的换算

$RCF = 1.119 \times 10^{-5} \times \text{半径} \times \text{转速} (\text{r/min}^2)$ ，调所需的离心时间。

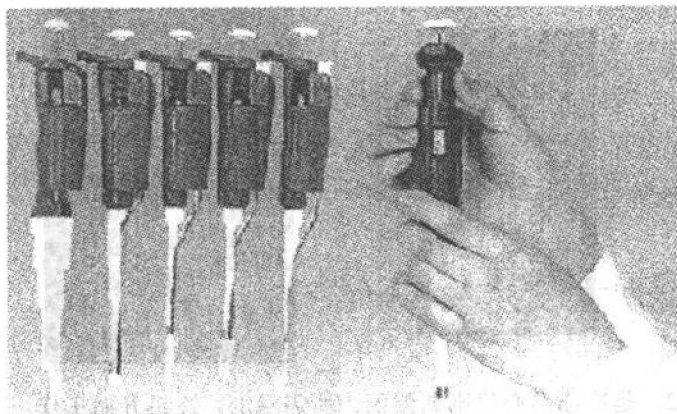
5. 启动离心机，进入离心过程。
6. 到了时间，转速指示为零时，打开离心机盖，小心拿出离心管（防震动）。
7. 使调速旋钮为零位，断电，清洁离心机。

不同离心机的使用方法，请看各自说明书。

（四）微量移液器

每一把移液器都有一定的移液范围，使用之前请选择。

1. 用旋钮调节到所需要的体积刻度，注意，使用旋钮时，绝对禁止超出刻度范围。
2. 选择吸头牢固地装在管嘴锥上，注意，保证吸头上无任何异物。
3. 当移液管、吸头和溶液的温度一致时，开始移液。



4. 将按钮压至第一停点位置。

5. 将移液管吸头浸入液面 2~3mm 深处，然后慢慢吸入液体。当吸头吸满液体后，将吸头撤出液面，擦掉吸头外侧的所有液滴。注意，不要触及吸嘴口。

6. 轻轻压下按钮至第一停点位置，放出液体。约一秒钟后，继续将按钮压至第二停点位置。待吸管液体放干净后，将吸头贴在容器壁上防止形成液滴滴入瓶中。撤出吸头。

7. 松开按钮使之回到起始位置。必要时换掉吸头以同样的操作吸另一种溶液。

(五) 电子天平

电子天平型号不同，称量范围、灵敏度等也不同。可以参看各自型号的说明。下面以 DT200 为例介绍操作方法。

1. 接通 220V 电源（应有良好地线），打开电源开关，此时，天平内部电源开始工作，而微机处于不工作状态不显示。

2. 在空称盘时，按一下 ON/OFF 键，显示窗内绿色显示器全亮 88888 后，接着依次显示 E-1 至 E-9，表示微机正在检查天平各个部分，然后，显示 0.0g，下面可进入正常称量工作（为