



普通高等教育“十二五”规划教材
全国普通高等教育基础医学类系列配套教材

朱月春 杨银峰 主编

生物化学与分子生物学 实验教程

供基础、临床、预防、口腔、护理等
医学类专业使用



科学出版社



普通高等教育“十二五”规划教材

全国普通高等教育基础医学类系列配套教材

供基础、临床、预防、口腔、护理等医学类专业使用

生物化学与分子生物学 实验教程



朱月春 杨银峰 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

《生物化学与分子生物学实验教程》是为了适应高等医学院校的实验教学改革和发展需要而编写的。本教材由生物化学与分子生物学实验(包括基础性实验、综合性实验和创新设计实验)、生物化学与分子生物学技术两篇构成。实验内容既有基础性实验(蛋白质、核酸的分离纯化,酶学、糖类、脂类分析等),也有来源于教师科研项目的综合性实验和创新设计实验,有利于培养学生的实践能力、综合分析能力。此外,本教材增加了RNA干扰、荧光标记技术等实验基础理论,作为实验的补充。附录中有常用仪器、技术等中英文词汇对照表。本教材内容较新颖,体系较完整,不同层次实验的培养目标有所侧重,便于不同层次学生选择。

本教材可供医学院校本(专)科及研究生实验教学使用,也可作为教师、医师和技术人员的科研参考书。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验教程/朱月春,杨银峰主编. —北京:科学出版社,2015.1

普通高等教育“十二五”规划教材

ISBN 978-7-03-042722-9

I. ①生… II. ①朱… ②杨… 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(2014)第288777号

责任编辑:刘 畅/责任校对:胡小洁
责任印制:霍 兵/封面设计:迷底书装

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>

文林印务有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015年1月第一版 开本:787×1092 1/16

2015年1月第一次印刷 印张:14 1/2

字数:343 000

定价:35.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

专家指导委员会

主任委员

侯一平

副主任委员

孙 俊 王应雄 胡华强

委 员

(以姓氏笔画为序)

王应雄(重庆医科大学)

王建伟(重庆医科大学)

左 丽(贵阳医学院)

龙汉安(泸州医学院)

阮永华(昆明医科大学)

孙 俊(昆明医科大学)

李 华(四川大学华西基础医学与法医学院)

吴玉章(第三军医大学)

张 波(川北医学院)

张 晓(成都医学院)

欧刚卫(遵义医学院)

胡华强(中国科技出版传媒股份有限公司)

侯一平(四川大学华西基础医学与法医学院)

高永翔(成都中医药大学)

《生物化学与分子生物学实验教程》

编委会名单

主 编

朱月春 杨银峰

主 审

田兴亚

副主编

李治纲 狄 勇 王 昕 范 浩

编 委

(按姓氏汉语拼音排序)

曹西南	崔映波	冯维杨	贺 铭
黄尤光	李树德	李思熯	李小洁
梁 璇	梁蕾蕾	刘 佳	秦 钰
单 妍	孙千鸿	唐 璟	童淑芬
吴 静	吴冠儒	谢 薇	杨 云
袁 方	张 明	张 巧	赵一卉

前 言

医学实验教学是医学教育的重要组成部分,是培养学生实践能力、科学思维和创新精神的主要途径,因此,提高医学实验教学质量将有助于提升整体医学教育水平。生物化学与分子生物学实验技术是当代医学研究的重要手段和方法,也是医学相关专业和各层次学生的必修实验课。为了适应高等医学院校实验教学改革和发展的需要,构建多层次、多模块的医学生物化学与分子生物学实验教学体系,我们编写了本教材。

本教材分为两篇,第一篇为生物化学与分子生物学实验,第二篇为生物化学与分子生物学技术。根据实验内容和要求,结合教学逻辑和规律,为满足不同层次学生的需求,将实验分为基础性实验、综合性实验和创新设计实验3个模块。基础性实验有助于巩固学生基本理论知识和培养学生基本实验操作技能;综合性实验多来源于教师的科研项目,应用了多种生物化学与分子生物学实验技术,经过多轮教学的实际检验,有利于培养学生的综合分析能力;创新设计实验从临床病例出发,通过设计实验方案,探讨疾病的生物化学与分子机制,培养学生的科研能力。

本教材注重实验的科学性与实用性相结合、知识传授与素质培养相结合、实验技术与临床应用相结合。为了便于学生自主学习,还介绍了生物化学与分子生物学常用软件和网络资源。此外,为配合双语教学的开展,附录中有本教材中使用的仪器、常用试剂、名词等的中英文对照。

各高等医学院校根据各专业各层次学生的培养目标和要求,可选择本教材中不同模块的实验项目实施实验教学。此外,本教材可以作为广大教师、研究生、医师和技术人员科研工作的重要参考书。

由于编者水平有限,且各医学院校的实验教学模式和条件存在差异,教材中不当之处在所难免,恳请同行专家和同学批评指正,提出宝贵意见。

朱月春 杨银峰

2014年11月于昆明

目 录

前言

第一篇 生物化学与分子生物学实验

第一章 基础性实验	3
实验 1 蛋白质的呈色反应、沉淀现象观察及等电点的测定	3
实验 2 蛋白质含量的测定	6
实验 3 丙二酸对琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制作用	10
实验 4 红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性测定	12
实验 5 血清丙氨酸转氨酶活性测定（紫外速率法及改良穆氏法）	17
实验 6 糖化血红蛋白的测定	21
实验 7 血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	23
实验 8 血红蛋白的醋酸纤维薄膜电泳	25
实验 9 血糖测定	27
实验 10 胰岛素、肾上腺素对家兔血糖浓度的影响	31
实验 11 血清总胆固醇测定	33
实验 12 质粒 DNA 的提取、酶切与鉴定	37
实验 13 酵母 RNA 的成分鉴定	40
实验 14 PCR 扩增 <i>G6PD</i> 基因外显子 11-12 片段	41
实验 15 尿中酮体的检出	43
实验 16 血清尿素氮测定（二乙酰一肟法）	44

第二章 综合性实验	47
实验 17 真核细胞基因组 DNA 的提取、定量和纯度测定	47
实验 18 小鼠基因组 DNA 的 Southern blotting 分析	49
实验 19 小鼠脑组织总 RNA 提取与 RT-PCR 获取真核基因片段	54
实验 20 pMD19- <i>G6PD</i> 重组子的蓝白斑筛选及酶切鉴定	59
实验 21 pThioHis (A) - <i>G6PD</i> 重组表达质粒的鉴定	63
实验 22 <i>G6PD</i> 重组酶的诱导表达、分离及比活性测定	66
实验 23 ATP、ADP 和 NADPH 对 <i>G6PD</i> 酶促反应的影响	70
实验 24 小鼠 <i>PKCϵ</i> 基因的克隆、鉴定及其 6His 融合蛋白的大肠杆菌表达和纯化	76
实验 25 SDS-PAGE 测定蛋白质的表观分子量	83
实验 26 小鼠血清 IgG 的 Western blotting 分析	87
实验 27 血红蛋白的等电聚焦分离及其等电点测定	94
实验 28 醋酸纤维薄膜电泳技术分离乳酸脱氢酶同工酶	97
实验 29 血清蛋白的盐析及清蛋白/球蛋白的测定	100
实验 30 血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳分离及定量测定	103
实验 31 酶的特异性及温度、pH、激活剂、抑制剂对酶活性的影响	106
实验 32 小鼠肝细胞核的分离、纯化与鉴定	109
实验 33 动脉硬化指数的计算	112
实验 34 糖的硅胶 G 薄层层析分析鉴定	114
第三章 创新设计实验	117
实验 35 乙醛脱氢酶 2 基因型的检测	117
实验 36 针刺“足三里”穴位对家兔血糖浓度的双向调节作用	120
实验 37 小鼠 <i>PKCϵ</i> 相互作用蛋白质的捕获、鉴定	122
实验 38 小鼠肝总蛋白质的双向电泳分离	125
实验 39 人血浆同型半胱氨酸的测定 (ELISA 方法)	129
实验 40 自毁容貌综合征的生化与分子生物学分析	131
实验 41 <i>G6PD</i> 缺陷的诊断及其发病的分子基础	132
实验 42 HL-60 细胞中 <i>DAPK</i> 基因甲基状态的检测	133
实验 43 胰岛素促进 HepG2 细胞对葡萄糖吸收的检测	135

第二篇 生物化学与分子生物学技术

第四章 分光光度技术	141
第一节 分光光度技术的基本原理	141

第二节	分光光度计的组成与结构	143
第三节	分光光度技术的应用	145
第五章	电泳技术	148
第一节	概述	148
第二节	几种常用电泳简介	149
第六章	层析技术	152
第七章	离心技术	156
第一节	离心技术的基本原理	156
第二节	离心机的类型	157
第三节	制备型离心的分离方法	158
第四节	离心操作的注意事项	159
第八章	聚合酶链反应与印迹技术	161
第一节	PCR 技术	161
第二节	印迹技术	165
第九章	基因工程技术	170
第一节	基因工程技术的相关概念	170
第二节	基因工程技术的基本原理及技术路线	171
第三节	基因工程技术在医学领域的应用	175
第十章	荧光标记技术	177
第一节	荧光现象	177
第二节	荧光探针	179
第三节	荧光标记样品的检测	180
第十一章	RNA 干扰技术	187
第一节	RNA 干扰的作用机制	187
第二节	RNA 干扰技术的应用	189
第十二章	生物芯片技术	191
第一节	基因芯片	191
第二节	蛋白质芯片	193

第十三章 双向凝胶电泳	196
第十四章 蛋白质三维结构建模	200
第一节 蛋白质结构相关知识	200
第二节 蛋白质结构预测实例	201
参考文献	205
附录一 生物化学与分子生物学常用数据库和软件	208
附录二 生物化学与分子生物学常用试剂和培养基的配制方法	210
附录三 生物化学及分子生物学实验常用缩略语	213
附录四 生物化学与分子生物学实验常用词中英文对照	216

第一篇 生物化学与分子生物学实验

第一章 基础性实验

经过长期实验教学实践证明,本章收录的16个基础性实验有利于巩固学生的生物化学与分子生物学基本理论知识,有助于培养学生的基本实验操作技能。根据医学生物化学与分子生物学教学的逻辑和规律,实验内容按物质分类编排,实验1、实验2是与蛋白质定性和定量测定有关的实验,实验3~实验5是与酶学有关的实验,实验6~实验8则涉及蛋白质分离,实验9~实验11是糖类与脂类物质的分析,实验12~实验14是与核酸分析鉴定有关的基础实验,实验15、实验16则是关于酮体、尿素氮等其他物质的分析。这些基础性实验几乎涉及了大部分生物化学与分子生物学的基本技术,如分光光度技术、电泳技术、层析技术、离心技术、PCR技术等,是医学院校本科生实验教学的重要组成部分。

实验1 蛋白质的呈色反应、沉淀现象观察及等电点的测定

【实验目的】

1. 掌握蛋白质呈色反应、沉淀现象及等电点的原理。
2. 掌握维持蛋白质胶体溶液稳定的因素,以及引起蛋白质变性和沉淀的主要原因。

【实验原理】

将尿素加热至 180°C 左右,两分子尿素脱去一分子氨缩合成双缩脲,在碱性溶液中,双缩脲与硫酸铜结合,生成紫色或紫红色的复合物,此即双缩脲反应。凡含有两个以上肽键的化合物,都能发生双缩脲反应,故一切蛋白质及二肽以上的物质都有此反应。

凡是含有自由氨基的化合物,如蛋白质、多肽、各种氨基酸(脯氨酸和羟脯氨酸除外)及其他伯胺化合物(包括氨),与茚三酮的水合物共热时,可生成紫蓝色的化合物。

维持蛋白质胶体溶液稳定的因素主要是同种电荷和水化膜。当这两个因素遭破坏后,蛋白质分子颗粒就发生聚集、并析出沉淀。能使蛋白质沉淀的化学试剂主要有:中性盐类、某些有机溶剂、重金属盐类及生物碱试剂等。向蛋白质溶液中加入高浓度的中性盐时,蛋白质从溶液中沉淀析出,此即盐析。

蛋白质分子在酸性或碱性环境中,带有正电荷或负电荷,互相排斥,不易形成沉淀,

在等电点时，由于失去同种电荷相互排斥的作用，很容易形成沉淀。人体内各种蛋白质的等电点不同，但大多数蛋白质的等电点接近于 pH 5.0。

蛋白质分子在大于等电点的 pH 溶液中，与带有正电荷的重金属离子结合，即形成不再溶解的沉淀。重金属盐类沉淀蛋白质，能引起蛋白质变性，而中性盐类即使加入量很多也不改变蛋白质原有的性质。

生物碱是植物中具有显著生理作用的一类含氮的碱性有机物质。凡能够使生物碱沉淀，或能与生物碱作用而呈色的物质，称为生物碱试剂，主要有：磷钨酸、苦味酸、鞣酸等。蛋白质在小于等电点的 pH 溶液中，与生物碱试剂中的负离子结合而形成沉淀，此沉淀通常可在碱性溶液中再溶解。蛋白质能与沉淀生物碱的试剂作用而产生沉淀，可能是由于蛋白质含有与生物碱相似的含氮基团。

所有蛋白质都可因为高温加热破坏其分子内部的化学键而变性、凝固。溶液中的蛋白质在过酸或过碱环境中容易变性，此时若温度升高，蛋白质虽变性但不产生沉淀，冷却后，调节溶液的 pH 到等电点时，则有沉淀析出。

【实验器材与试剂】

1. 实验器材

移液器、试管、电炉或电磁炉、恒温水浴箱、滤纸、 ϕ 50 mm 漏斗、10 mL 量杯、刻度吸量管等。

2. 试剂

10%卵清蛋白溶液、10% NaOH 溶液、10% HCl 溶液、1% CuSO₄ 溶液、尿素、0.1%茛三酮乙醇溶液、0.25%丙氨酸溶液、0.5% NaOH 溶液、0.5% ZnSO₄ 溶液、饱和 (NH₄)₂SO₄ 溶液、10%磺基水杨酸溶液、1%乙酸溶液、10%乙酸溶液、0.5%酪蛋白的乙酸钠溶液（称取纯酪蛋白 0.5 g，置于 100 mL 容量瓶内，加蒸馏水 40 mL、1 mol/L NaOH 溶液 10 mL 后摇匀，使酪蛋白溶解后再加入 1 mol/L 乙酸 10 mL，最后用蒸馏水稀释至刻度）等。

【实验步骤】

1. 蛋白质的呈色反应

1) 双缩脲反应

(1) 取试管 1 支，加入 10%卵清蛋白溶液 0.1 mL、10% NaOH 溶液 0.25 mL 及 1% CuSO₄ 溶液 0.1 mL，混匀后，观察试管中的溶液呈现什么现象。记录并解释。

(2) 另取试管 1 支，加入尿素 0.5 g，加热使尿素熔化，此时可嗅到什么气味？继续加热使之凝固，该固体为何物？加入蒸馏水 2 mL 使固体溶解，再加入 10% NaOH 溶液 0.25 mL、1% CuSO₄ 溶液 0.1 mL，试管中的溶液呈现什么现象？记录并解释。

2) 茛三酮反应

(1) 取试管 1 支，加入 10%卵清蛋白溶液 0.2 mL、蒸馏水 0.5 mL 及 0.1%茛三酮乙醇溶液 0.3 mL，混匀后置于沸水浴中加热，1 min 后取出。观察试管中溶液呈现什么颜色，冷却后有何变化。

(2) 另取试管 1 支, 加入 0.25% 丙氨酸溶液 0.2 mL、蒸馏水 0.5 mL 及 0.1% 茚三酮乙醇溶液 0.3 mL, 混匀后置于沸水浴中加热, 1 min 后取出。观察试管中溶液呈现什么颜色, 冷却以后有何变化。

2. 蛋白质的沉淀反应

1) 蛋白质的盐析

(1) 取试管 1 支, 加入 10% 卵清蛋白溶液 5 mL、饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液 5 mL, 混匀, 静置 20 min 后, 球蛋白全部析出形成沉淀。将静置后的液体过滤, 收集过滤后的透明液 (滤液中含有清蛋白)。若滤液浑浊须重复过滤至透明为止。

(2) 另取试管 1 支, 加入上述透明液 1 mL、固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, 摇动试管至溶液出现浑浊。再向浑浊溶液 [不含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 结晶颗粒] 中加入蒸馏水 2.0 mL, 摇匀, 记录结果并解释。

2) 重金属盐类沉淀蛋白质

取试管 1 支, 加入 10% 卵清蛋白溶液 1 mL 和 0.5% NaOH 溶液 50 μL , 混匀。再加入 0.5% ZnSO_4 溶液 0.3 mL, 记录结果并解释。

3) 生物碱试剂沉淀蛋白质

(1) 取试管 1 支, 加入 10% 卵清蛋白溶液 1 mL、10% HCl 溶液 50 μL , 混匀。再加入 10% 磺基水杨酸溶液 0.2 mL, 混匀, 记录结果。

(2) 另取试管 1 支, 加入 10% 卵清蛋白溶液 1 mL、10% NaOH 溶液 0.3 mL, 混匀。再加入 10% 磺基水杨酸溶液 0.2 mL, 混匀, 记录结果。

(3) 比较两支试管中溶液的变化, 并解释原因。

4) 加热沉淀蛋白质

(1) 取试管 4 支, 编号后按表 1-1 加入试剂。

表 1-1 加热沉淀蛋白质反应体系配制

试剂	1	2	3	4
10% 卵清蛋白溶液/mL	1.0	1.0	1.0	1.0
1% 乙酸溶液/ μL	—	50	—	—
10% 乙酸溶液/mL	—	—	0.5	—
10% NaOH 溶液/mL	—	—	—	0.5

(2) 将 4 支试管同时放入沸水浴中, 1 min 后取出, 记录现象, 并解释原因。

(3) 冷却后, 向第 3 支试管中缓慢加入 10% NaOH 溶液, 每次 30 μL , 边加边摇动试管, 观察现象并记录所加 NaOH 溶液的体积。

(4) 向第 4 支试管中缓慢加入 10% 乙酸溶液, 每次 0.2 mL, 边加边摇动试管, 观察现象并记录所加乙酸溶液的体积。

3. 蛋白质等电点的测定

(1) 取直径相同的试管 5 支, 编号后按表 1-2 准确加入试剂。

表 1-2 蛋白质等电点测定的反应体系配制

试剂	1	2	3	4	5
蒸馏水/mL	8.4	8.7	8.0	8.2	7.4
0.01 mol/L 乙酸/mL	0.6	—	—	—	—
0.10 mol/L 乙酸/mL	—	0.3	1.0	—	—
1 mol/L 乙酸/mL	—	—	—	0.8	1.6
加酪蛋白乙酸钠溶液后相当的 pH	5.9	5.3	4.7	4.0	3.5

(2) 向各管中加入酪蛋白乙酸钠溶液 1 mL, 边加边摇 (切勿在各管都加完后才摇), 静置 10~30 min 后, 分别比较各管的浑浊度, 并用 (+) 符号表示。沉淀最多而上清液透明管的溶液 pH 即酪蛋白的等电点。记录其等电点。

【注意事项】

测定等电点时, 在向各管中加入酪蛋白乙酸钠溶液 1 mL 时, 边加边摇, 切勿在各管都加完后才摇动试管。静置后观察浑浊度时, 不能摇晃试管。

【思考题】

1. 什么是蛋白质的两性解离及等电点? 引起蛋白质沉淀的主要因素有哪些?
2. 是不是只要发生双缩脲反应就一定有蛋白质存在? 氨基酸能不能发生双缩脲反应?

(吴冠儒)

实验 2 蛋白质含量的测定

蛋白质含量的测定方法有很多, 各有优缺点, 本实验主要介绍了双缩脲法、考马斯亮蓝染色法的相关实验操作。

一、双缩脲法测定血清总蛋白含量

【实验目的】

1. 掌握双缩脲法测定蛋白质含量的原理和方法。
2. 了解血清总蛋白测定的临床意义。

【实验原理】

两分子脲经 180℃ 左右加热, 释放出一分子氨后, 得到双缩脲 ($\text{NH}_3\text{CONHCONH}_3$)。在强碱性条件下, 双缩脲与 Cu^{2+} 生成紫红色络合物, 称为双缩脲反应。凡具有两个酰

胺基或两个及两个以上肽键的化合物，都能进行双缩脲反应。紫红色络合物颜色的深浅与蛋白质浓度成正比，而与蛋白质分子质量及氨基酸成分无关，故可用来测定蛋白质含量。

本实验将血清中的总蛋白，经双缩脲试剂显色后，再通过比色测定其含量。

本法可测定 1~10 mg 蛋白质，优点是快速、干扰物质少，且不同蛋白质显色相似，缺点是灵敏度差，适用于精度要求不高但需快速测定的样本。

【实验器材与试剂】

1. 实验器材

刻度吸量管、洗耳球、试管、可见分光光度计等。

2. 试剂

(1) 稀释血清：取 1 mL 血清（人、兔或其他蛋白质样品），置于 100 mL 容量瓶中，加 0.9% NaCl 溶液稀释至刻度（此为稀释 100 倍，或根据具体情况酌情稀释 100~300 倍）。

(2) 双缩脲试剂（碱性铜试剂）：称取 1.75 g 硫酸铜（ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ）置于 100 mL 烧杯中，先加蒸馏水使之溶解，将此溶液移至 1000 mL 容量瓶中。再加入 300 mL 浓氨水和 200 mL 饱和 NaOH 溶液混匀，以蒸馏水加至 1000 mL，置于塑料瓶中避光长期保存，但有沉淀或无氨水气味则不能再用。

(3) 标准蛋白质溶液（1 mg/mL）：牛血清白蛋白用 0.9% NaCl 溶液溶解、稀释至终浓度 1 mg/mL，存于冰箱中，可保存一个月。此标准蛋白质溶液用以绘制标准曲线及在测定时用作标准对照。

【实验步骤】

1. 标准曲线的绘制

取试管 6 支，按表 1-3 操作。

表 1-3 标准蛋白质溶液稀释、比色的体系配制

试剂	空白管	1	2	3	4	5
标准蛋白质溶液/mL	—	0.6	1.2	1.8	2.4	3
0.9% NaCl 溶液/mL	3	2.4	1.8	1.2	0.6	—
蛋白质溶液浓度/(mg/mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
双缩脲试剂/mL	2	2	2	2	2	2

混匀各管，室温条件下放置 30 min，以空白管调零，在波长 540 nm 比色，记录各管吸光度。以各管的蛋白质浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，作图绘制标准曲线。

2. 稀释血清总蛋白浓度测定

取试管 2 支，按表 1-4 操作。