

高等医学院校基础医学实验教学改革系列教材

生物化学与 分子生物学实验教程

主编 ◎ 黄春霞 龙 昱



北京大学医学出版社

高等医学院校基础医学实验教学改革系列教材

生物化学与 分子生物学实验教程

主 编 黄春霞 龙 昱

副主编 刘美玲 朱传炳 杨金莲

编 者 (以姓名汉语拼音为序)

陈 琳 郭 音 黄春霞 李 帆

李 妍 刘美玲 龙 昱 罗玥倩

欧阳文英 栗 敏 汤 婷 汪 茗

王 琳 王义军 杨金莲 曾 杰

朱传炳

北京大学医学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学与分子生物学实验教程/黄春霞, 龙昱主编. —北京: 北京大学医学出版社, 2014. 8
高等医学院校基础医学实验教学改革系列教材
ISBN 978-7-5659-0895-8

I. ①生… II. ①黄… ②龙… III. ①生物化学—实验—医学院校—教材 ②分子生物学—实验—医学院校—教材 IV. ①Q5-33②Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字 (2014) 第152438号

生物化学与分子生物学实验教程

主 编: 黄春霞 龙 昱

出版发行: 北京大学医学出版社

地 址: (100191) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

电 话: 发行部 010-82802230; 图书邮购 010-82802495

网 址: [http: //www.pumpress.com.cn](http://www.pumpress.com.cn)

E - mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 北京画中画印刷有限公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 张彩虹 责任校对: 张 雨 责任印制: 李 啸

开 本: 787mm × 1092 mm 1/16 印张: 12 字数: 301 千字

版 次: 2014 年 8 月 第 1 版 2014 年 8 月 第 1 次印刷

书 号: ISBN 978-7-5659-0895-8

定 价: 26.50 元

版权所有, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

高等医学院校基础医学实验教学改革系列教材

编审委员会

主 任 何彬生

副主任 卢捷湘 何建军 罗怀青 周启良

委 员（以姓名汉语拼音为序）

何彬生 何建军 何月光 黄春霞 刘 佳

刘万胜 卢捷湘 罗怀青 罗桐秀 秦晓群

孙继虎 吴长初 谢应桂 袁爱华 曾 明

张子敬 周启良 祝继明 朱传炳

总策划 罗怀青

序

随着我国医学教育的不断深入，医学教育的目标已向培养高素质、强能力、具有创新精神的综合型人才的目标转变。医学实验教学是医学人才培养的重要环节，国内各高校对实验教学内容、教学方法和手段、管理体制等进行了大量的改革和探索。教育部在全国开展医学院校专业认证评估，把实验教学改革再次推向新的高度。

在医学教育认证标准中（WFME 和 IIME），课程整合是其中一项重要的观察指标，实验课程融合和教学改革是其中的重要部分。为加强学生动手能力培养，强化学生创新思维训练，有效开展实验课程的融合，促进医学人才质量的提高，适应医学专业认证评估的需要，长沙医学院开展了基础医学实验教学改革探索，并组织编写了本系列教材。

本系列教材的编写，综合了“本科医学教育国际标准”和“全球医学教育最低基本要求”两个国际医学教育标准，更加注重学生能力培养的个性化教学需求，注重创新思维和创新精神的培养，注重基础与基础、基础与临床的知识融合及知识运用能力的培养。

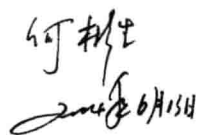
首先，对基础医学课程实验教学内容进行优化整合，形成形态学实验、机能学实验、生物化学与分子生物学实验、病原生物免疫学实验、化学实验等实验教学。

其次，实验项目按照“基础性实验”“综合性实验”“设计创新性实验”三大模块编写，精简了基础性实验和重复的实验项目，增加了“三性”实验项目，联系后续课程内容及临床，重点突出知识点的横向与纵向联系。

同时，融合最新的科研成果，将其转化为不同课程之间的综合性、创新性实验项目，有助于全面提升医学专业人才培养质量。

本次出版的基础医学实验教学改革系列教材是长沙医学院教育教学改革成果的重要组成部分，我们期盼着这些成果能够成为医学人才培养质量迈上新台阶的标志。

欢迎兄弟院校专家学者雅正指导！



前言

生物化学与分子生物学是医学各专业的重要基础课程，了解和掌握生物化学与分子生物学实验技术，是巩固理论知识的重要手段，不仅对医学生后续课程的学习具有支撑作用，还能为其从事临床医学及其他相关学科的医疗、教学和科研工作打下基础。为了适应高等医学院校基础医学实验教学的发展要求，培养医学生的实践能力和创新能力，我们结合近年的实验教学经验和改革经验，编写了这本实验教材。

本实验教材共分为四篇。第一篇为基本知识，介绍了实验室管理要求与实验课考核、基本实验操作及常用仪器的使用以及常见临床疾病的生物化学检测方法等，使学生对本门课程的相关技术有一个系统的认识，了解其在临床上的应用。第二篇是基础性实验，主要包括一些与临床联系密切的生物化学与分子生物学经典实验项目，目的在于使学生在提高实验操作能力的同时能进一步巩固所学的理论知识。第三篇是综合性实验，所选的实验项目涉及多种实验技术或者多个研究对象，目的在于使学生进一步提高实验技能及应用所学知识综合解决问题的能力。第四篇是设计创新性实验，通过让学生自行查阅资料，独立完成实验设计和实验操作，达到培养其创新意识、动手能力和基本科研能力的目的。此外，本书最后还增加了一些常用缓冲溶液的配制方法以及不同温度下物质在水中的溶解度表，以供实验者独立进行实验准备工作参考。

本实验教材的编者均是有多年生物化学与分子生物学实验一线教学经验的教师，他们熟悉专业知识及实验技能，了解课程及学生的实际情况。实验项目的设置主要按照实验技能递进的思路，循序渐进地开设了三个层次的实验项目，精简验证性实验，增加综合性及创新性实验，使逻辑性、系统性更强。在实验内容的选择上，我们注重与理论课程内容的联系，强调理论与实践的结合，并且每个实验项目都注意结合专业特点，增加了与临床实际的联系，同时融入科技创新及实验教学改革成果，突出教学与科研、基础与临床的结合。学生在掌握实验技能的同时能了解其临床应用，从而更好地理解实验的目的。

本实验教材中实验内容的选择考虑了学制和专业的差异，不同专业的学生根据其培养目标，可在实验项目的选择上实行必选项目和自选项目的结合。因此，本实验教材不仅适合临床医学专业学生使用，也可供其他医学相关专业的学生使用，同时也可供相关专业科研、教学及实验技术人员参考。

尽管我们付出了艰辛劳动，精心编写，严格把关，但由于编者水平有限，时间仓促，书中难免存在缺点或不当之处，恳请广大读者批评指正。

黄春霞 龙昱

2014年6月

目 录

第一篇 基础知识

第一章 实验室管理要求及实验课考核.....	3
第二章 基本实验操作.....	5
第一节 吸量管的使用.....	5
第二节 微量移液器的使用.....	7
第三节 玻璃仪器的洗涤方法及液体的混匀方法.....	8
第四节 操作练习与思考题.....	9
第三章 常用仪器的使用.....	11
第一节 分光光度法的基本原理及分光光度计的使用.....	11
第二节 离心技术及离心机的使用.....	15
第三节 电泳技术及电泳仪的使用.....	18
第四节 层析技术.....	26
第五节 PCR 技术及 PCR 仪的使用.....	31
第四章 血液标本的采集及制备方法.....	35
第五章 常见疾病的生物化学检测方法.....	39

第二篇 基础性实验

第六章 蛋白质定性定量分析实验.....	49
第一节 蛋白质的两性反应及等电点测定.....	49
第二节 血红蛋白及其衍生物的吸收光谱测定.....	51
第三节 紫外分光光度法测定蛋白质含量.....	53
第四节 二辛可酸法测定蛋白质含量.....	54

第五节	微量凯氏定氮法测定蛋白质含量	56
第六节	血清尿素氮的测定	58
第七章	层析实验	61
第一节	纸层析法观察转氨基作用	61
第二节	薄层层析法分离 AMP、ADP 和 ATP	64
第三节	离子交换层析分离混合氨基酸	66
第八章	电泳实验	69
第一节	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的分子量	69
第二节	等电点聚焦 (IEF) 分离血清蛋白质	74
第九章	酶学实验	77
第一节	血清谷丙转氨酶的活性测定	77
第二节	丙二酸对琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制作用	79
第三节	乳酸脱氢酶同工酶活性测定	81
第十章	糖类与脂类实验	85
第一节	酶法 (GOD-POD) 测定血清葡萄糖含量	85
第二节	酶法测定血清三酰甘油	87
第十一章	核酸分离纯化技术	91
第一节	外周血白细胞 DNA 提取 (微量法)	91
第二节	微量快速质粒 DNA 的提取与纯化	93
第十二章	维生素与无机物实验	97
第一节	血清无机磷测定	97
第二节	血清胡萝卜素的测定	99

第三篇 综合性实验

第十三章	蛋白质实验	105
第一节	福林 - 酚试剂法 (Lowry 法) 测定血清总蛋白含量	105
第二节	凝胶过滤分离高铁血红蛋白与高铁氰化钾	107
第三节	醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白质	111

第十四章 酶学实验.....	115
第一节 兔肌酸激酶的分离、纯化及部分性质的测定.....	115
第二节 蔗糖酶与淀粉酶的专一性.....	119
第十五章 核酸实验.....	123
第一节 酵母 RNA 的提取（浓盐法）及成分鉴定.....	123
第二节 肝细胞核中核酸（RNA 和 DNA）的分离和测定.....	126
第三节 聚合酶链反应扩增技术.....	128
第十六章 物质代谢相关实验.....	133
第一节 红细胞膜总胆固醇含量的测定.....	133
第二节 血清清蛋白、 γ -球蛋白的分离、纯化与鉴定.....	135
第三节 细胞色素 C 的制备和含量测定.....	138
第十七章 分子生物学实验.....	143
第一节 琼脂糖凝胶电泳.....	143
第二节 质粒 DNA 酶切、连接、转化及重组体筛选.....	144
第三节 蛋白质双向电泳.....	148
第四节 蛋白质印迹法.....	151

第四篇 设计创新性实验

第十八章 设计创新性实验.....	159
第一节 重要蛋白质或酶的分离和纯化.....	159
第二节 动物组织中核酸的提取、纯化及鉴定.....	160
第三节 激素对血糖浓度的影响.....	160
第四节 聚合酶链反应单链构象多态性技术的应用.....	161
第五节 肝、肾功能与血脂的检测.....	162
附 录.....	165
主要参考文献.....	180

第一篇

基础知识

第一章 实验室管理要求及实验课考核

一、学生实验总则

1. 学生进入实验室工作与学习之前,须认真阅读本总则及实验室其他规章制度,并严格遵守。
2. 实验前应认真进行预习,明确实验目的和要求,了解所做实验的原理、所用仪器和注意事项,掌握实验内容、方法和步骤,以便正确地进行实验操作。
3. 任何人不得私自挪用实验室的仪器设备、标本等。实验时除指定使用的仪器外,不得随意动用其他仪器。
4. 学生在实验时必须按编定的组别和指定的席位就座,不得任意调动。应遵守上课时间,不得无故迟到、早退、缺席。因故不能上实验课者,应向指导教师请假,所缺实验课应及时补上。无故不参加实验者作旷课处理。
5. 进入实验室或其他实验场地,必须着实验服,保持安静,严禁喧哗、吸烟、吃零食、随地吐痰和乱扔纸屑,不准做与实验无关的事。
6. 实验前检查、清理好所需的仪器、用具等。如有缺损,应及时向指导教师报告,不得自己任意挪用,不准擅自将任何实验器材、试剂、药品等带出实验室。
7. 实验时,服从教师指导,按规定和步骤进行实验,认真操作、细心观察,真实地记录各种实验数据,不允许抄袭他人数据,不得擅自离开操作岗位。
8. 注意安全与防护,严格遵守操作规程。爱护仪器设备,节约水、电、试剂和药品等。实验结束后,废液、废渣、废气、标本及含病菌的其他材料要按指定要求处置,不得随意丢弃。
9. 在实验过程中如仪器设备发生故障,应立即报告指导教师及时处理。凡违反操作规程或不听从指导而造成仪器设备损坏等事故者,必须写出书面检查,并按学校有关规定处理。
10. 实验结束后,学生应负责将仪器整理还原,桌面、凳子收拾整齐。由值日学生打扫卫生并协助教师收拾整理试剂及仪器,经指导教师审核测量数据和仪器还原情况并同意后方可离开实验室。
11. 应在指导教师规定时间内上交实验报告。
12. 开放性实验一般安排在非实验课时间,学生可以结合自己的兴趣爱好,选择合适的时间段进行开放性实验操作。
13. 对课外开放实验所需的仪器设备,须经指导教师签字同意后办理借用手续,实验结束后及时归还。归还时,经实验室人员认真检查后,方可离开。如发现损坏、遗失,按学校有关规定处理。消耗材料的领用按实验室规定办理手续。

二、实验报告的书写要求

实验报告是对整个实验过程及实验结果的如实记录。学生通过对具体实验步骤及获得的结果的记录,能分析总结实验过程中好的经验及出现的问题,从而加深对理论及技术的理解与掌握,同时这也是学习撰写科研论文的一个重要过程。实验报告的基本内容应包括实验名称、实验目的、实验原理、实验器材与试剂、实验步骤、实验结果、分析与总结、思考题。

1. 实验报告书写的注意事项

(1) 内容完整,字迹端正清晰,版面整洁。

(2) 实验原理简明扼要,涉及化学反应的最好用化学反应式表示。

(3) 实验步骤的描述要如实记录整个实验流程,语言简洁,可以采用流程图或表格等方式简化步骤。

(4) 实验结果应如实记录实验过程中所观察到的现象或测定的数据,不得照抄实验教材中的理论值,更不允许因结果存在误差而篡改自己的实验结果。

(5) 分析与总结不是对实验结果的重述,也不是将注意事项抄写一遍,而是以实际实验结果为基础的逻辑推论。分析与总结的内容应包括实验操作中是否存在问题和实验结果是否正常(有误差的必须要进行误差分析)的分析,对实验设计的体会和建议以及对实验教学的改进意见等。

(6) 实验报告的内容不得相互抄袭,不得篡改实验结果。教师批改后如有错误需及时更正。

2. 实验报告本的送交与领回要求

(1) 各专业学生以所在实验室的学习小组为单位,由小班长将所有同学的实验报告本按学号放好后统一送交老师。

(2) 各专业学生的实验报告本须在实验完成后3日内送交至生化教研室,放置于实验报告架上标有相应带教老师姓名的地方,由当次带教老师进行批改。老师批阅后将成绩登记入册,并记入期末考核成绩。不得无故缺交或迟交实验报告本,否则将酌情扣减实验成绩。

(3) 下次实验课前由本实验室小班长将老师批阅后的实验报告本领回并发放给每位同学。

三、实验成绩考核与评定办法

生物化学与分子生物学实验成绩主要由考勤、实验操作、实验报告和实验考试四部分组成。其中,考勤主要是记录学生是否有旷课、迟到或早退;实验操作是对每次实验过程中学生的表现进行评定,包括考查学生是否动手进行实验、操作是否准确、实验结果的准确性以及是否存在其他违纪的现象等。

(刘美玲)

第二章 基本实验操作

实验目的

1. 掌握刻度吸量管、微量移液器的使用方法。
2. 掌握一般玻璃仪器的洗涤方法和试剂混匀法。
3. 熟悉奥氏吸量管及移液管的使用方法。
4. 了解容量分析仪器的洗涤方法。

实验器材与试剂

1. 仪器 学生实验仪器一套、奥氏吸量管、移液管、刻度吸量管 (0.5ml、1ml、2ml、5ml 及 10ml 各 1 支)、微量移液器 (20 μ l、200 μ l、1 000 μ l 各 1 支)、Tip 头。
2. 材料及试剂 蒸馏水。

第一节 吸量管的使用

一、吸量管的种类

吸量管分为三类 (图 2-1)。

1. 奥氏吸量管

奥氏吸量管用来准确量取 0.5ml、1ml、2ml、5ml 及 10ml 液体。特点是每支奥氏吸量管上只有一条刻度线 (即一支奥氏吸量管只能量取一种体积的液体), 放液时最后需将残留在管尖的液体全部吹出。由于这类吸量管在同一容量的吸量管中内表面积最小, 故准确度最高。因其结构中球形膨大部分距离管尖的位置较近, 因此, 在实验中常作为量取黏度较大的液体之用。

2. 移液管 (移液吸量管)

移液管供准确量取 1ml、5ml、10ml、20ml、25ml、50ml 及 100ml 液体用。特点是每支吸量管上也只有一条刻度线, 放液时待管内液体流出后, 吸量管管尖需在容器内壁上继续停靠 10~15s, 而管尖残留的液体无需吹出。这类吸量管常作为容量分析中定量



图 2-1 三种吸量管

稀释之用。

3. 刻度吸量管

刻度吸量管可供量取 10ml 以下任意体积的液体之用，有 0.1ml、0.2ml、0.5ml、1ml、2ml、5ml 及 10ml 等不同规格。因生产厂家不同，这类吸量管的刻度线标示有自上而下或自下而上两种，使用前应仔细看清楚。若刻度吸量管上标注有“吹”字，则在放液完成后需将残留在管尖的液体吹出，否则放液时待管内液体流出后，吸量管管尖只需在容器内壁上停靠 10~15s 即可。

二、吸量管的使用方法

三类吸量管的主要操作方法基本相似，具体如下：

1. 拿法

使用前选择合适的刻度吸量管，并认真观察吸量管的规格、刻度线的标示及每格刻度线指示的数值大小等。用拇指、中指及无名指握紧吸量管上端（有刻度线的地方不可用手接触），示（食）指指腹扣住吸量管顶端，同时将有刻度线的一面对着操作者以便观察刻度。拿起吸量管后要始终保持管尖垂直朝下，不可倾斜。

2. 取液

将吸量管管尖插入液面下 1~2cm（不可接触试剂瓶底及瓶壁），将洗耳球中的空气排尽后塞紧管口，缓慢吸取液体至所取液量的刻度上端 1~2cm 处，然后移去洗耳球并迅速用示指按紧吸量管顶端，使液体不至于从管内流出。

3. 调刻度

将已吸取足够液体的吸量管提离液面（但不离开试剂瓶口），用碎滤纸片吸干吸量管外壁的液体。然后持吸量管，并与地面保持垂直，试剂瓶可略微倾斜使管尖能靠紧瓶壁，放松示指控制液体缓慢下降至所需体积的刻度线处（观察刻度时，液体凹面、刻度线和视线应在同一水平面上），立即按紧吸量管顶端。

4. 放液

放液时吸量管仍要保持垂直，容器（如试管）可略倾斜，使吸量管管尖靠紧瓶壁（引流），放松示指，使液体缓慢地流入容器内，不需吹出管尖液体的则在放液后停靠 10~15s。使用完成后将吸量管放回吸量管架上，管尖置于低的一端，管口置于高的一端，且管尖不可朝向操作者。

5. 洗涤

吸取血液、尿液、组织样品及黏稠试剂的吸量管，使用后应及时用自来水冲洗干净。如果用于吸取一般试剂，则使用后的吸量管可不必马上冲洗，待实验完毕后，用自来水冲洗干净，晾干水分后浸泡于铬酸洗液中 2~4h，再用自来水冲洗干净，最后用蒸馏水润洗，晾干，备用。

三、吸量管的选用原则

1. 量取整数体积的液体时，应首选奥氏吸量管；若量取体积较大的液体，可选用移液管。

2. 选用与取液量最接近的吸量管。如欲取 0.35ml 液体，则应选用 0.5ml 刻度吸量管，而不能用 1ml 刻度吸量管。

3. 做生化定量实验时, 当几个试管中需加入不同量的同种液体时, 要根据加入液体的量酌情选用吸量管。例如, 各管所加入的液体量分别为 0.2ml、0.4ml、0.6ml 及 0.8ml 时, 应选用一支与最大取液量接近的刻度吸量管, 即 1ml 刻度吸量管。但是如果各管加入的液体量分别为 1.8ml、2.4ml、3.6ml 及 8ml, 则不能选用 1 支 10ml 刻度吸量管, 而应该分别用 1 支 5ml 和 10ml 刻度吸量管量取, 因为用 10ml 刻度吸量管量取 1.8ml、2.4ml 及 3.6ml 溶液时, 因管内径太大, 精确度不及 5ml 刻度吸量管。

4. 取液的方法有定量法和卸量法两种。定量法是需要量取多少定量到多少; 卸量法则是先将体积定量到最大刻度, 然后放出所需体积的液体。在实际使用中可尽量选用卸量法, 因其量取的体积更为精确。

第二节 微量移液器的使用

微量移液器(也称为微量加样器)是一种取样量连续可调的精密取液仪器。其基本原理是依靠活塞的上、下移动, 活塞移动的距离是由调节轮控制螺杆机构来实现的, 推动按钮带动推杆使活塞向下移动, 排出活塞腔内的气体, 松手后, 活塞在复位弹簧的作用下恢复其原位, 从而完成一次吸液过程。

一、微量移液器的规格

微量移液器量取的液体是以微升(μl)为基本单位, 常见的规格有 5 000 μl 、1 000 μl 、200 μl 、100 μl 、20 μl 、10 μl 及 2.5 μl 等(图 2-2)。



图 2-2 1000 μl 微量移液器

二、微量移液器的使用方法

1. 选择合适的微量移液器, 轻轻转动微量移液器的调节旋钮, 使读数显示为所要量取的体积。

2. 套上合适规格的 Tip 头, 在轻轻用力下压的同时, 把手中的移液器左、右旋转半圈, 确保 Tip 头套紧, 防止滑落。

3. 手握移液器, 轻轻按下推动按钮, 推至第一档处保持不动, 然后将 Tip 头垂直浸入溶液中(管尖伸入液面下 2~4mm, 不可接触试剂瓶底), 缓慢松开推动按钮, 即从第一档还原。

4. 将微量移液器提离液面后, 在试剂瓶口将 Tip 头外壁残留的液体吸去。然后将移液器

垂直伸入容器底端，按动推动按钮至第一档使液体排出，再继续将推动按钮按至第二档，使 Tip 头末端残留液体完全排出。将 Tip 头提离容器口后再放松推动按钮，使之复原（防止将溶液吸回 Tip 头内）。

5. 使用完毕后，弃去 Tip 头，并将微量移液器的调节轮旋转至最大刻度。

三、微量移液器使用注意事项

1. 吸液时，移液器应保持垂直，且慢吸慢放。
2. 装配 Tip 头时应将移液器垂直插入 Tip 头，左右旋转半圈，不能用移液器撞击 Tip 头。
3. 吸有液体的移液器不可平放，否则 Tip 头内的液体很容易回流至移液器内从而导致移液器被污染、弹簧生锈等。
4. 取液体积应在移液器量程范围内，不可将按钮旋出量程，否则会卡住机械装置，损坏移液器。
5. 严禁吸取有强挥发性、强腐蚀性的液体。
6. 严禁使用移液器吹打混匀液体。

第三节 玻璃仪器的洗涤方法及液体的混匀方法

一、一般玻璃仪器的洗涤

一般玻璃仪器如试管、锥形瓶及烧杯等，可直接用试管刷蘸取肥皂水或去污粉刷洗，再用自来水多次冲洗，去尽肥皂水或去污粉，最后用少量蒸馏水润洗 2~3 次，倒置沥干，备用。清洗干净的容器内壁应光洁，不沾挂水珠。

二、容量分析仪器的洗涤

容量分析仪器如吸量管、量筒、容量瓶及滴定管等，因其要求容积精确，一般不用刷子机械地刷洗，应先用自来水冲洗多次，待沥干后，再用铬酸洗液浸泡 2~4h，然后用自来水充分冲洗，直到将洗液全部冲洗干净为止，最后用少量蒸馏水冲洗 2~3 次，沥干，备用。

三、其他一些容器的洗涤方法

临床上病毒、传染病患者的血清等沾污过的容器，应先进行消毒后再进行清洗。盛装过剧毒药品和放射性核素物质的容器必须经专门处理，确认没有残余毒物后方可进行清洗。