

全国高等学校配套教材  
供基础、临床、预防、口腔医学类专业用

# 医学分子生物学 实验指导

主 编 许彦鸣 药立波

 人民卫生出版社

全国高等学校配套教材  
供基础、临床、预防、口腔医学类专业用

# 医学分子生物学 实验指导

主编 许彦鸣 药立波

编者（以姓氏汉语拼音字头为序）

黄 勇 刘 娜 王 妍

王 芳 王立锋 吴有胜

人民卫生出版社

### 图书在版编目(CIP)数据

医学分子生物学实验指导/许彦鸣等主编. —北京:人民  
卫生出版社, 2006. 2

ISBN 7-117-07397-7

I. 医… II. 许… III. 医学:分子生物学—实验  
—医学院校—教材 IV. Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 160865 号

### 医学分子生物学实验指导

---

主 编: 许彦鸣 药立波

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 67616688)

地 址: (100078) 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: [pmph@pmph.com](mailto:pmph@pmph.com)

邮购电话: 010 - 67605754

印 刷: 三河市宏达印刷有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 8

字 数: 184 千字

版 次: 2006 年 2 月第 1 版 2006 年 2 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 7-117-07397-7/R · 7398

定 价: 13.00 元

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

# 前 言

分子生物学是从分子水平研究生命本质的一门新兴边缘学科，它以核酸和蛋白质等生物大分子的结构及其在遗传和细胞信息传递中的作用为研究对象，是当前生命科学中发展最快并与其它学科广泛交叉与渗透的重要前沿领域。分子生物学技术的诞生源于生物化学与分子生物学、遗传学、免疫学和生理学等的不断发展和重大发现，同时也为这些领域的研究工作提供了新的研究工具和手段。分子生物学的发展为人类认识生命现象带来了前所未有的机会，也为人类利用和改造生物创造了极为广泛的前景。

自从 DNA 重组技术诞生以来，分子生物学技术取得了迅速的发展，已经渗透到生物学的各个分支学科及医药农林的各个分支领域，并正在迅速改变着它们的面貌。随着人类基因组计划的完成，分子生物学技术被更广泛地应用到现代生物医学研究的各个领域，并正渗透到疾病的诊断甚至治疗之中。对分子生物学实验技术的掌握已经成为这些学科在新的高度和水平揭示生命奥秘的共同需求。

全书以现代分子生物学研究的思路为线索，将多种常用的实验技术分五部分进行介绍。第一部分主要介绍了进行分子生物学实验之前必须掌握的实验室规则、安全常识及基本的操作。第二部分以分子克隆的流程为序分别介绍了目的基因的获取、目的基因与载体的连接以及重组 DNA 分子的鉴定等。第三部分在重组 DNA 构建成功的基础上，介绍了在原核与真核细胞中表达外源 DNA 的方法、蛋白质的分离与定量和蛋白质分子的免疫印记等技术。第四部分主要侧重于核酸分子的鉴定，分别从探针标记、杂交方法等方面进行了讲解，还补充了目前发展迅猛的基因芯片技术。第五部分介绍了一些目前分子生物学研究中常用的生物信息学方法，包括常用网站、软件和分析方法等。

本书介绍的实验技术有以下三个特点：一是与理论教材内容衔接较紧密，使学生掌握知识更系统；二是书中的实验技术绝大多数为常规方法，且结合目前多种实验试剂盒大量使用的实际情况，操作步骤和注意事项具体、详实，能更好的结合研究实际；三是本书在考虑了国内大多数院校实际情况的基础上安排实验，多数实验可以在消耗不多、实验条件要求较低的情况下开展，而且是不需要大规模的协作、个人可操作的实验。主要适用于开设分子生物学实验课的医学院校本科、专科学生，也可以作为研究生和初级科研工作者分子生物学实验技术的参考用书。

本书在编写过程中得到了第四军医大学刘新平教授的无私帮助，在此表示诚挚的感谢。但是由于编者水平受限，时间仓促，不仅内容上涵盖不够全面，而且难免有错误和不足之处，真诚希望读者提出宝贵的意见和建议。

编 者

2005 年 5 月于第四军医大学

# 目 录

第一部分 实验须知	1
第二部分 DNA 重组实验	11
第一章 目的基因的获取	12
实验一 组织细胞中基因组 DNA 的提取	12
实验二 组织细胞中 RNA 的提取及 cDNA 的合成	14
实验三 核酸分子的定量	18
实验四 聚合酶链式反应扩增目的基因	20
第二章 目的基因与载体的重组	24
实验五 限制性核酸内切酶对 DNA 进行酶切	24
实验六 电泳分离 DNA 片段	26
实验七 DNA 片段的回收与纯化	27
实验八 目的基因与载体片段的连接	29
第三章 重组 DNA 的筛选与扩增	31
实验九 感受态细胞的制备	31
实验十 重组 DNA 的转化与筛选	33
实验十一 重组质粒的提取与鉴定	34
第三部分 重组 DNA 的表达	37
第一章 在大肠杆菌中表达重组蛋白	37
实验十二 温度诱导表达	38
实验十三 化学诱导表达	42
第二章 蛋白质表达产物的鉴定	45
实验十四 细菌裂解与蛋白质表达产物的电泳鉴定	45
实验十五 蛋白质表达产物的分离	55
实验十六 蛋白质表达产物的定量	58
第三章 在哺乳动物细胞中表达重组 DNA	64
实验十七 重组 DNA 转染哺乳动物细胞	64
实验十八 细胞裂解与免疫沉淀	67
实验十九 蛋白质印记技术	70
第四部分 核酸分子杂交	77

<b>第一章 核酸探针的标记</b> .....	77
实验二十 切口平移法 .....	78
实验二十一 随机引物法 .....	80
实验二十二 DNA 探针的末端标记 .....	82
<b>第二章 核酸分子杂交</b> .....	85
实验二十三 Southern 印迹杂交 .....	85
实验二十四 Northern 印迹杂交 .....	90
实验二十五 原位杂交 .....	94
<b>第五部分 生物信息学在分子生物学实验中的应用</b> .....	101
实验二十六 网上生物学资源的利用 .....	101
实验二十七 序列的数据库查询 .....	105
实验二十八 序列的相似性分析 .....	107
实验二十九 软件分析开放读框及预测二级结构 .....	109
<b>附录一 医学分子生物学实验常用参数</b> .....	111
<b>附录二 常用试剂的配制</b> .....	114

# 第一部分 实验须知

欢迎同学们进入分子生物学实验室！这不是大家第一次做生物学实验，但是我们相信，分子生物学实验将会是大家最感兴趣、最激动人心的实验，当然也是花费最大、耗时最多、最辛苦的实验之一。想要学好这门课程，在很大程度上，取决于同学们对这些实验技术掌握的熟练程度及对原理的深入理解。

当同学们进行实验时，无疑将会与以前做的各种实验进行比较。在分子生物学实验中，同学们将进行的是“毫克”和“微克”数量级的研究，并且在多数情况下，生物分子是溶解在溶液中的，而且往往看不到所研究的物质，但是将会看到动态的生命过程和由生物分子引起的生物学变化。实验中所用到的各种技术和方法，将起到“眼睛”的作用，用以对各种生命过程进行监测。

本课程是医学各专业本科生必修的专业技术基础实验课，通过实验教学要达到以下三方面的目的：①培养严谨的科学态度，开拓创新的思维能力，实验设计的一般方法，以及规范的书写实验报告论文等知识，提高分析问题和解决问题的能力。②掌握基本的分子生物学实验方法和技术，通过本课程的严格训练，为进一步学习、掌握复杂的综合性的生物化学与分子生物学技术打下坚实的基础。③通过实验，进一步加深对生物化学与分子生物学理论知识的理解。

针对本实验课，提出几方面的基本要求：①进入实验室的学生须严格遵守实验室规则；②课前复习有关课堂讲授的理论知识，并根据实验教程认真预习实验。对于每步操作，建议不仅要知其然，更应知其所以然；③明确实验目的，掌握实验设计的原理。做到心中有数，有备而来；④认真对待每一次实验，按照要求和拟定好的流程进行操作，详细、真实地记录实验中每一个细小变化；⑤实验结束后须按照要求完成实验报告，实验报告的风格可以因人而异，但应该书写工整、内容翔实、表述清晰、分析有据。除此之外，鼓励学生自行设计实验并积极参与实验教学改革，保持活跃的思维，积极与教师交流观点。

## 一、实验室规则

1. 保持肃静 不得喧哗、嬉闹，使用器物时轻拿轻放，讨论问题时不得影响他人。
2. 保持整洁 上实验课时应穿工作服，书包等物品应在规定位置摆放整齐，尽量避免被试剂等实验用品玷污。实验结束后，按具体要求清洗试管、烧杯等实验用品，所用的试剂和器材整理后放回原处，实验废品（火柴棍、滤纸等）放入指定地方。
3. 严格操作 做实验时严格遵守操作规程，仔细观察，如实记录，课后认真书写实验报告。玻璃器皿轻拿轻放，移液器吸头、滴管专用专放，防止交叉污染。使用仪器

必须在教师的指导下进行，不得随意动用。使用微量移液器前，必须熟悉微量移液器的使用方法。

4. 注意节约 爱惜样品、器材，节约试剂、水电，防止器物的破损。使用不当所造成的损坏须酌情赔偿。

5. 保证安全 室内严禁吸烟。使用有毒试剂、放射性核素等危险物品时要严格按照要求操作，注意防护、防止污染。如有意外立即报告。实验完毕后，清洁室内卫生，关好门、窗、水、电等。

## 二、实验室常识

1. 称量固体试剂，应用硫酸纸，不可用滤纸。量筒是量器，不可用做容器。

2. 取用试剂和标准溶液后，应立即将瓶塞严，放回原处。取出的试剂和标准溶液，如未用尽，切勿倒回瓶内，以免污染。

3. 使用有挥发性或毒性的试剂和进行会产生有异味气体的实验操作时，均应在通风柜内。试剂用后严密封口，尽量缩短操作时间、减少外泄。操作者最好戴口罩、手套进行操作。

4. 使用有机溶剂时注意两点：①许多有机溶剂易燃，如乙醚、丙酮、乙醇、苯等，使用时要远离火源；②许多有机溶剂有毒，如含氯有机溶剂可累积于人体有损肝，因此要最大限度减少与有机溶剂的接触机会和时间。

5. 凡见光易变质的试剂，用棕色瓶贮存，或用黑纸包裹，并每次少量配制。

6. 配制试剂时，对所配试剂的组分、用途和配制方法等都应熟悉。配制完成的试剂须及时做好标记，标签纸的大小应与容器相称，标签上要写明试剂的名称、规格、浓度、配制日期及配制人等必要信息，标签应贴在试剂瓶上1/3处。

7. 实验用过的器皿应及时用自来水浸泡，以便于清洗和减少试剂对器皿的侵蚀。洗净的器皿应倒置架上自然干燥，不能用抹布擦拭。

8. 低温存放的试剂应标记清楚，放置有序，冰箱打开后应及时关闭。低温下的操作应配戴手套，尽量避免与低温物品尤其是金属制品长时间接触，防止冻伤。

9. 使用贵重仪器如分析天平、分光光度计、离心机、微量移液器等，应十分慎重。使用前，应熟知使用方法，有疑问随时请教指导教师。使用时，要严格遵守操作规程，如遇试剂溅污仪器，及时用洁净纱布擦拭。发生故障时，应立即关机，告知管理人员，不得擅自拆修。

10. 使用离心机前必须配平样品，设置转速、时间、温度等须参照离心机的性能指标和安全使用范围，离心时若有异常的噪音应立即停止机器，关闭电源后方可仔细查找原因，排除故障前不得继续使用离心机。低温离心结束后，离心机应敞开晾至室温并清理凝结水后方可关闭。操作中如有样品不慎洒入离心机的管槽或底盘，必须及时清理后才能继续使用。

11. 无菌操作台在使用后应及时清理废弃物品，清洁台面。

## 三、实验室安全

在实验室里，经常会与毒性很强、有腐蚀性、易燃烧或是有爆炸性的化学药品直接接触，还常常使用易碎的玻璃器皿，以及水、电、高温电器设备等，因此，必须十分重



视安全工作。

1. 了解电闸、水阀门、煤气总阀门所在处，最后离开实验室时，一定要将室内检查一遍，应将水、电、煤气等关好，门窗锁好。

2. 使用电器设备时，如烘箱、恒温水浴锅、离心机、电泳仪等，严防触电，绝不可用湿手开关电闸和电器开关。检查电器设备是否漏电时，应将手背轻轻触及仪器表面，凡是漏电的仪器，一律不能使用。

3. 使用高压锅消毒时，人不得离开。消毒液体时，容器不得密闭，盖子拧上后再松开，消毒完成，温度降至室温后方可及时拧紧容器。易燃、易爆、腐蚀、有毒等试剂，不能放入高压锅内消毒，以防发生爆炸，造成人身伤亡。不耐高温的容器，如塑料容器等，不得置于高压锅内消毒。

4. 使用可燃物，特别是易燃物时，如乙醚、丙酮、乙醇等，应特别小心。如果不慎倒出相当量的易燃液体，应按下列方法处理。

(1) 立即关闭室内所有的电源和电加热器。

(2) 关门，开启小窗及窗户。

(3) 用毛巾或抹布擦拭洒出的液体，并将液体拧到大的容器中，然后再倒入带塞的玻璃缸中。

5. 凡使用腐蚀性试剂如浓酸、浓碱等，必须极为小心地操作，防止溅出，对于挥发性酸如 HCl 等，应在通风柜内取用，同时应在盘内操作，一旦有洒出，立即用大量自来水冲洗，若溅在实验台或地面，必须及时用湿抹布或拖布反复擦洗干净，不得留痕迹。

6. 废液，特别是强酸和强碱不能直接倒在水池中，应先以水大量稀释，然后倒入水池，再用大量自来水冲洗水池及下水道。

7. 毒物应按实验室的规定办理审批手续后方可领取，使用时严格操作，用后妥善处理。

#### 四、实验室防护知识

实验室中着火、爆炸、中毒、触电和割伤的危险均时刻存在，每一位在分子生物学实验室工作的人员不仅要有正确实验操作的知识，还必须有充分的安全意识，严格的防范措施和实用的防护救治知识，一旦发生意外能正确地进行处置，以防事故进一步扩大。

1. 着火 分子生物学实验室经常使用大量的有机溶剂，如甲醇、乙醇、丙酮、氯仿等，而实验室又经常使用电炉、酒精灯等火源，因此极易发生着火事故。常用有机溶剂的易燃性列表如下：

表 1-1 常见有机溶剂的易燃性

名称	沸点(°C)	闪点* (°C)	自燃点** (°C)
乙醚	34.5	-40	180
丙酮	56	-17	538
二硫化碳	46	-30	100
苯	80	-11	
乙醇 (95%)	78	12	400

\* 闪点：液体表面的蒸气和空气的混合物在遇明火或火花时着火的最低温度。

\*\* 自燃点：液体蒸气在空气中自燃时的温度。

低闪点液体的蒸气只需接触红热物体的表面便会着火，由上表可以看出：乙醚、二硫化碳、丙酮和苯的闪点都很低，其中二硫化碳尤其危险，因此不得存放于可能会产生电火花的普通冰箱内。

预防火灾必须严格遵守以下操作规程：

(1) 严禁在开口容器和密闭体系中用明火加热有机溶剂，只能使用加热套或水浴加热。

(2) 废弃的有机溶剂不得倒入废物桶，只能倒入回收瓶，以后再集中处理。量少时用水稀释后排入下水道。

(3) 不得在烘箱内存放、干燥、烘焙有机物。

(4) 在有明火的实验台面上不允许放置开口的有机溶剂或倾倒入有机溶剂。

灭火方法：

实验室中一旦发生火灾切不可惊慌失措，应保持镇静，根据具体情况正确地进行灭火或立即报火警（火警电话 119）。

(1) 容器中的易燃物着火时，须用灭火毯盖灭。因已证明石棉有致癌性，故改用玻璃纤维布作灭火毯。

(2) 乙醇、丙酮等可溶于水的有机溶剂着火时可以用水灭火。汽油、乙醚、甲苯等有机溶剂着火时不能用水扑灭，只能用灭火毯和砂土盖灭。

(3) 导线、电器和仪器着火时不能用水和二氧化碳灭火器灭火，应先切断电源，然后用 1211 灭火器（内装二氟一氯一溴甲烷）灭火。

(4) 个人衣服着火时，切勿慌张奔跑，以免风助火势，应迅速脱衣，用水龙头浇水灭火，火势过大时可就地卧倒打滚压灭火焰。

2. 爆炸 分子生物学实验室防止爆炸事故是极为重要的，因为一旦爆炸其毁坏力极大，后果将十分严重。

常见的引起爆炸事故的原因有：①随意混合化学药品，并使其受热、摩擦和撞击；②在密闭的体系中进行蒸馏、回流等加热操作；③在加压或减压实验中使用了不耐压的玻璃仪器，或反应过于激烈而失去控制；④易燃易爆气体大量逸入室内；⑤高压气瓶的减压阀摔坏或失灵。

加热时会发生爆炸的混合物有：有机化合物-氧化铜、浓硫酸-高锰酸钾、三氯甲烷-丙酮等。

分子生物学实验室常用的易燃物蒸气在空气中的爆炸极限（体积百分数）见表 1-2。

表 1-2 易燃物质蒸气在空气中的爆炸极限

名称	爆炸极限（体积%）	名称	爆炸极限（体积%）
乙醚	1.9~36.5	乙醇	3.3~19
丙酮	2.6~13	氢气	4.1~74.2
甲醇	6.7~36.5	乙炔	3.0~82

3. 中毒 分子生物学实验室常见的化学致癌物有：石棉、砷化物、铬酸盐、溴化乙锭等。

剧毒物有：氰化物、砷化物、乙腈、甲醇、氯化氢、汞及其化合物等。

中毒的原因主要是由于不慎吸入、误食或由皮肤吸收。

中毒的预防：①保护好眼睛最重要，使用有毒或刺激性气体时，必须配戴防护眼镜，并应在通风橱内进行；②取用毒品时必须配戴橡皮手套；③严禁用嘴吸移液管，严禁在实验室内饮水、进食、吸烟，禁止赤膊和穿拖鞋；④不要用乙醇等有机溶剂擦洗溅洒在皮肤上的药品。

中毒急救的方法主要有：①误食了酸和碱，不要催吐，可先立即大量饮水，误食碱者再喝些牛奶，误食酸者，饮水后再服氢氧化镁乳剂，最后饮些牛奶；②吸入了毒气，立即转移至室外，解开衣领，休克者应施以人工呼吸，但不要对口法；③砷和汞中毒者应立即送医院急救。

#### 4. 外伤

##### (1) 化学灼伤

1) 眼睛灼伤或掉进异物：眼内若溅入任何化学药品，应立即用大量的水冲洗 15 分钟，不可用稀酸或稀碱冲洗。若有玻璃碎片进入眼内则十分危险，必须十分小心谨慎，不可自取，不可转动眼球，可任其流泪，若碎片不出，则用纱布轻轻包住眼睛急送医院处理。若有木屑、尘粒等异物进入，可由他人翻开眼睑，用消毒棉签轻轻取出或任其流泪，待异物排出后再滴几滴鱼肝油。

2) 皮肤灼伤：①酸灼伤：先用大量水洗，再用稀碳酸氢钠或稀氨水浸洗，最后再用水洗。②碱灼伤：先用大量水冲洗，再用 1% 硼酸或 2% 醋酸浸洗，最后再用水洗。③溴灼伤：这很危险，伤口不易愈合，一旦灼伤，立即用 20% 硫代硫酸钠冲洗，再用大量水冲洗，包上消毒纱布后就医。

(2) 烫伤：使用火焰、蒸气、红热的玻璃和金属时易发生烫伤，应立即用大量水冲洗和浸泡，若起水泡不可挑破，包上纱布后就医，轻度烫伤可涂抹鱼肝油和烫伤膏等。

(3) 割伤：割伤是分子生物学实验室常见的伤害，要特别注意预防，尤其是在向橡皮塞中插入温度计、玻璃管时一定要用水或甘油润滑，用布包住玻璃管轻轻旋入，切不可用力过猛，若发生严重割伤时要立即包扎止血，就医时务必检查伤部神经是否被切断。

实验室应准备一个完备的小药箱，专供急救时使用。药箱内备有：医用乙醇、红药水、紫药水、止血粉、创口贴、烫伤油膏（或万花油）、鱼肝油、1% 硼酸溶液或 2% 醋酸溶液、1% 碳酸氢钠溶液、20% 硫代硫酸钠溶液、医用镊子和剪刀、纱布、药棉、棉签、绷带等。

5. 触电 分子生物学实验室要使用大量的仪器、烘箱和电炉等，因此每位实验人员都必须能熟练地安全用电，避免发生一切用电事故，当 50Hz 的电流通过人体 25mA 电流时呼吸会发生困难，通过了 100mA 以上电流时则会致死。

(1) 防止触电：①不能用湿手接触电器；②电源裸露部分都应绝缘；③坏的接头、插头、插座和不良导线应及时更换；④先接好线路再插接电源，停止使用时应先关电源再拆线路；⑤仪器使用前要先检查外壳是否带电；⑥如遇有人触电要先切断电源再救人。

(2) 防止电器着火：①保险丝、电源线的截面积、插头和插座都要与使用的额定电

- 流相匹配；②三条相线要平均用电；③生锈的电器、接触不良的导线接头要及时处理；④电炉、烘箱等电热设备不可过夜使用；⑤仪器长时间不用要拔下插头，并及时拉闸；⑥电器、电线着火不可用泡沫灭火器灭火。

## 五、微量移液器的使用及注意事项

微量移液器是一种取液量连续可调的精密取液仪器。它具有重量轻、精度高、读数直观、使用方便等特点，微量移液器好似战士手中的枪，是实验室使用频率最高、必备的取液仪器。

### 1. 微量移液器的构造及工作原理

(1) 构造 (图 1-1)

(2) 持微量移液器标准方法 (图 1-2)

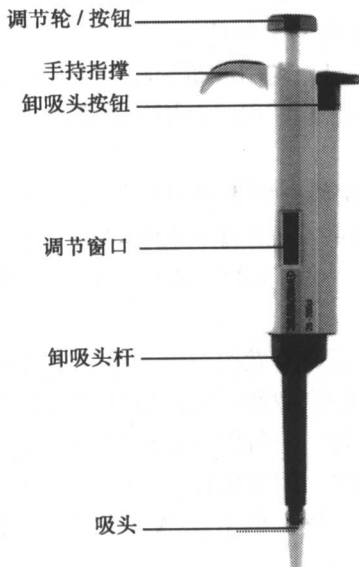


图 1-1 微量移液器的构造

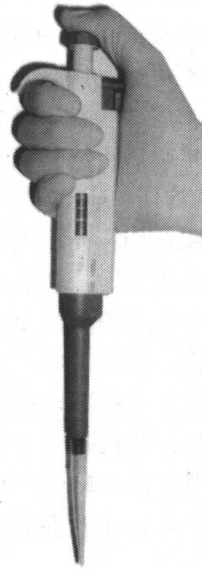


图 1-2 持微量移液器的标准方法

(3) 容量数据表示

微量移液器的最大容量	20 $\mu$ l	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
调节窗口的显示值	1	0	1	0
	2	8	5	3
	5	0	6	5
微量移液器的实际容量	12.5 $\mu$ l	80 $\mu$ l	156 $\mu$ l	350 $\mu$ l

(4) 工作原理：推动按钮带动推杆使活塞向下移动、排出了活塞腔内气体，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 (图 1-3、4)。而活塞移动的距离可以由调节轮控制螺杆机构来实现，决定吸取和排出的液体量。

2. 操作程序

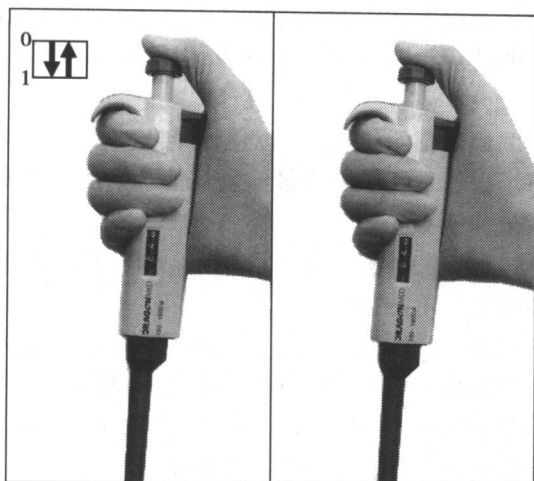


图 1-3 吸液

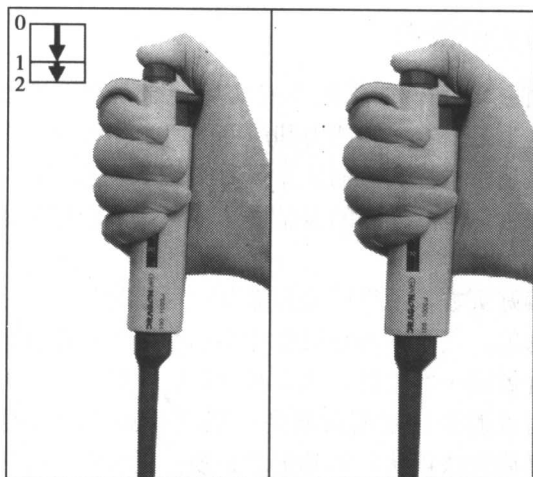


图 1-4 排液

(1) 准备：将移液器吸头套在移液器杆上，稍加扭转压紧使之与移液器杆间无空气间隙。转动调节轮至所需容积，按图 1-2 所示手握移液器。

(2) 吸液：轻轻按下推动按钮，使按钮由位置“0”推到位置“1”，将移液器吸头垂直浸入液体 2~4mm 处，缓慢松开按钮，使按钮位置 1 复位到 0 位，完成吸液程序，停 1~2s 后将移液器移出液面，若移液器吸头表面残留液体，可用少许滤纸轻轻擦掉，注意勿触及移液器吸头口。

(3) 排液：将移液器吸头尖部（口）以  $10^{\circ}$ ~ $45^{\circ}$  倾斜于容器内壁，缓慢按下推动按钮至位置 1，继续推至位置 2 处，排放所有液体。停 1~2s 后移走移液器，松开推动按钮，压下移液器吸头，即完成一次吸、排液的全过程。

### 3. 使用注意事项

(1) 特别强调两点：第一，要看准微量移液器的最大量程，切勿拧过头！否则易导

致调节轮失灵甚至报废，造成不必要的经济损失；第二，微量移液器是实验必备的量液精密仪器，它不是手中的“玩具”，因此，请不要用微量移液器敲打桌面等物体，并严防摔落。

(2) 排液时要推下两档至图示位置 2，以便排净液体。

(3) 移液过程中每步操作一致可获得最佳重复性，请注意速度及平稳性，浸入试剂的深度，并垂直握持微量移液器。

(4) 为了避免液体进入移液器套筒内，请在压、放按钮时要缓慢且平稳，排液要保持垂直，吸头中有液体时绝对不准放倒。

(5) 为获得较高的精度，在取液时应先用吸液的方法浸渍吸头尖，以消除误差，因为当所吸液体是血清蛋白或有机溶剂时，吸头内壁会明显残留一层“液膜”，如果吸头只用一次，这样误差可能会超出规定的误差范围，因为这个值对同一个吸头是一个常数，如果用这个吸头再吸一次，则精度是可以保证的。

(6) 浓度大的液体其消除误差的补偿量由实验确定，其取液量可通过增加或减少容量计上的读数加以补偿。

## 六、实验记录与实验报告

1. 实验记录 详细、准确、如实地作好实验记录是极为重要的，记录如果有误，会使整个实验失败，这也是培养实验能力和严谨的科学作风的一个重要方面。

(1) 准备一个实验记录本，实验前认真预习实验，看懂实验原理和操作方法，在记录本上写好实验预习报告，包括详细的实验操作步骤（可以用流程图表示）和数据记录表格等。

(2) 记录本上要编好页数，不得撕缺和涂改，写错时可以划去重写。不得用铅笔记录，只能用钢笔和圆珠笔。记录本的左页作计算和草稿用，右页用做预习报告和实验记录。同组的两位同学合做同一实验时，两人必须都有相同、完整的记录。

(3) 实验中应及时准确地记录所观察到的现象和测量的数据，条理清楚，字迹端正，切不可潦草以致日后无法辨认。实验记录必须公正客观，不可夹杂主观因素。

(4) 实验中要记录的各种数据，都应事先在记录本上设计好各种记录格式和表格，以免实验中由于忙乱而遗漏测量和记录，造成不可挽回的损失。

(5) 实验记录要注意有效数字，如吸光度值应为 0.050，而不能记成 0.05。每个结果都要尽可能重复观测两次以上，即使观测的数据相同或偏差很大，也都应如实记录，不得涂改。

(6) 实验中要详细记录实验条件，如使用的仪器型号、编号、生产厂家等，生物材料的来源、形态特征、健康状况、选用的组织及其重量等，试剂的规格、化学式、分子量、试剂的浓度等，都应记录清楚。两人一组的实验，必须每人都作记录。

2. 实验报告 实验报告是实验的总结和汇报，通过实验报告的写作可以分析总结实验的经验和问题，学会处理各种实验数据的方法，加深对有关生物化学与分子生物学原理和实验技术的理解和掌握，同时也是学习撰写科学研究论文的过程。实验报告中应包括：①实验目的；②实验原理；③仪器和试剂；④实验步骤；⑤数据处理；⑥结果讨论。

每个实验报告都要按照上述要求来写，实验报告的写作水平也是衡量学生实验能力的一个重要方面。实验报告必须独立完成，严禁抄袭。写实验报告要用实验报告专用纸，以便教师批阅，不要用练习本和其他片页纸。

为了使实验结果能够重复，必须详细记录实验现象的所有细节，例如，若实验中生成沉淀，那么沉淀的真实颜色是什么，是白色、淡黄色或是其他？沉淀的量是多还是少，是胶状还是颗粒状？什么时候形成沉淀，立即生成还是缓慢生成，热时生成还是冷却时生成？在科学研究中，仔细地观察，特别注意那些未预想到的实验现象是十分重要的，这些观察常常引起一些意外的发现。注意分析实验中的真实发现，是一种非常重要的科学研究训练。

实验报告使用的语言要简明清楚，抓住关键，各种实验数据都要尽可能整理成表格并作图来表示，以便比较，一目了然。实验作图尤其要严格要求，必须使用坐标纸，每个图都要有明显的标题，坐标轴的名称要清楚完整，要注明合适的单位，坐标轴的分度数字要与有效数字相符，并尽可能简明，若数字太大，可以化简，并在坐标轴的单位上乘以10的方次。实验点要使用专门设计的符号，如：○、●、□、■、△、▲等，符号的大小要与实验数据的误差相符。不要用×、+和·（小圆点）。有时也可用两端有小横线的垂直线段来表示实验点，其线段的长度与实验误差相符。通常横轴是自变量，往往知道的很准确，纵轴是应变变量，是测量的数据。曲线要用曲线板或曲线尺画成光滑连续的曲线，各实验点均匀分布在曲线上和曲线两边，且曲线不可超越最后一个实验点。两条以上的曲线和符号应有说明。

实验结果的讨论要充分，尽可能多查阅一些有关的文献和教科书，充分运用已学过的知识和分子生物学原理，进行深入的探讨，勇于提出自己独到的分析和见解，并欢迎对实验提出改进意见。

## 七、实验器皿的清洗

1. 玻璃仪器的清洗 实验中所用的玻璃仪器清洁与否，直接影响实验的结果，往往由于仪器的不清洁或被污染而造成较大的实验误差，有时甚至会导致实验的失败。做分子生物学实验对玻璃仪器清洁程度的要求，比一般化学实验的要求更高。这是因为：①分子生物学实验中蛋白质、酶、核酸等往往都是以毫克和微克计的，稍有杂质，影响就很大。②分子生物学实验对许多常见的污染杂质十分敏感，如金属离子（钙、镁离子等）、去污剂和有机物残基等，因此玻璃仪器（包括离心管等塑料器皿）是否彻底洗净就是非常重要的。

（1）初用玻璃仪器的清洗：新购买的玻璃仪器表面常附着有游离的碱性物质，可先用0.5%的去污剂洗刷，再用自来水洗净，然后浸泡在1%~2%盐酸溶液中过夜（不可少于4小时），再用自来水冲洗，最后用去离子水冲洗两次，在100~120℃烘箱内烘干备用。

（2）使用过的玻璃仪器的清洗：先用自来水洗刷至无污物，再用合适的毛刷沾去污剂（粉）洗刷，或浸泡在0.5%的清洗剂中超声清洗（比色皿不可超声洗涤），然后用自来水彻底洗净去污剂，用去离子水洗两次，烘干备用（计量仪器不可烘干）。清洗后器皿内外不可挂有水珠，否则重洗，若重洗后仍挂有水珠，则需用洗液浸泡数小时后

(或用去污粉擦洗), 重新清洗。

(3) 石英和玻璃比色皿的清洗: 决不可用强碱清洗, 因为强碱会浸蚀抛光的比色皿。只能用洗液或1%~2%的去污剂浸泡, 然后用自来水冲洗, 这时使用一支绸布包裹的小棒或棉花球棒刷洗, 效果会更好, 清洗干净的比色皿也应内外壁不挂水珠。

2. 塑料器皿的清洗 聚乙烯、聚丙烯等制成的塑料器皿, 在分子生物学实验中已用的越来越多。第一次使用塑料器皿时, 可先用8mol/L尿素(用浓盐酸调至pH=1)清洗, 接着依次用去离子水、1mol/L氢氧化钾和去离子水清洗, 然后用1mmol/L EDTA除去金属离子的污染, 最后用去离子水彻底清洗, 以后每次使用时, 可只用0.5%的去污剂清洗, 然后用自来水和去离子水洗净即可。

3. 洗液的配制 因已确定铬有致癌作用, 因此配制和使用洗液时要极为小心, 常用两种配制方法如下:

(1) 取100ml工业浓硫酸置于烧杯内, 小心加热, 然后慢慢加入5g重铬酸钾粉末, 边加边搅拌, 待全部溶解并缓慢冷却后, 贮存在磨口玻璃塞的细口瓶内。

(2) 称取5g重铬酸钾粉末, 置于250ml烧杯中, 加5ml水使其溶解, 然后慢慢加入100ml浓硫酸, 溶液温度将达80℃, 待其冷却后贮存于磨口玻璃瓶内。

#### 4. 其他洗涤液

(1) 工业浓盐酸: 可洗去水垢或某些无机盐沉淀。

(2) 5%草酸溶液: 用数滴硫酸酸化, 可洗去高锰酸钾的痕迹。

(3) 5%~10%磷酸三钠( $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )溶液: 可洗涤油污物。

(4) 30%硝酸溶液: 洗涤二氧化碳测定仪及微量滴管。

(5) 5%~10%乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $\text{Na}_2$ )溶液: 加热煮沸可洗脱玻璃仪器内壁的白色沉淀物。

(6) 尿素洗涤液: 为蛋白质的良好溶剂, 适用于洗涤盛过蛋白质制剂及血样的容器。

(7) 有机溶剂: 如丙酮、乙醚、乙醇等可用于洗脱油脂、脂溶性染料污痕等, 二甲苯可洗脱油漆的污垢。

(8) 氢氧化钾的乙醇溶液和含有高锰酸钾的氢氧化钠溶液: 是两种强碱性的洗涤液, 对玻璃仪器的侵蚀性很强, 可清除容器内壁污垢, 洗涤时间不宜过长, 使用时应小心慎重。

5. 玻璃和塑料器皿的干燥 分子生物学实验中用到的玻璃和塑料器皿经常需要干燥, 通常都是用烘箱或烘干机在110~120℃进行干燥, 而不要用丙酮荡洗后吹干的方法来干燥, 因为那样会有残留的有机物覆盖在器皿的内表面, 从而干扰生物化学反应。硝酸纤维素的塑料离心管加热时会发生爆炸, 所以决不能放在烘箱中干燥, 只能用冷风吹干。



## 第二部分 DNA 重组实验

DNA 重组技术，是指应用酶学的方法，在体外将各种来源的遗传物质（同源的或异源的、原核的或真核的、天然的或人工的 DNA）与载体 DNA 接合成一具有自我复制能力的 DNA 分子——复制子（replicon），继而通过转化或转染宿主细胞，筛选出含有目的基因的转化子细胞，再进行扩增提取获得大量同一 DNA 分子，也称基因克隆或重组 DNA（recombinant DNA）。

1973 年美国斯坦福大学的科学家构建第一个重组 DNA 以来，该技术便得到了突飞猛进的发展，如今已经成为包括基因工程、蛋白质工程、酶工程、细胞工程等在内的众多分子生物学研究领域中最基本的技术手段。

从本质上来讲，DNA 重组技术的主要目的是分离获得某一感兴趣的基因和获得感兴趣基因的表达产物（蛋白质）。要实现这些目的，基本的程序包括：①目的基因的获取；②目的基因与载体的重组；③重组 DNA 的筛选与扩增。其中，限制性核酸内切酶与 DNA 连接酶的发现与应用是 DNA 重组技术得以建立的关键。

下图是 DNA 重组技术的基本步骤：

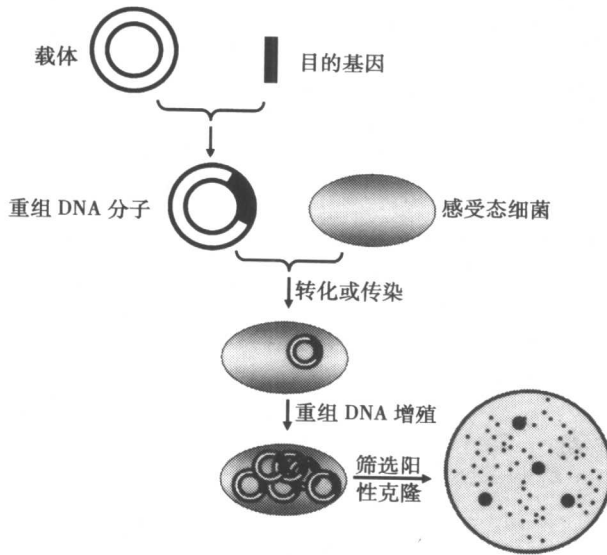


图 2-1 基因重组流程