

面向**21**世纪高等医药院校精品课程教材

高等医学院校实验实训系列教材

JICHU YIXUE SHIYAN XILIE JIAOCHENG

基础医学实验系列教程

——生物化学与生物技术分册

《基础医学实验系列教程》编审委员会 组编

本册主编 梁 勇 郑云郎

本册副主编 赵志强



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

第2版 新世纪高等院校医药类教材

普通医学类实验课程系列教材

编委会主任委员 顾德明 副主任委员 王世明 委员 陈永祥 曹建群

基础医学实验系列教程

——生物化学与生物技术分册

（适用于医学类及相关专业）顾德明 主编

主编 王德明 副主编 曹建群

本教材分两册 第1册

面向 21 世纪高等医药院校精品课程教材
高等医学院校实验实训系列教材

基础医学实验系列教程

——生物化学与生物技术分册

《基础医学实验系列教程》编审委员会 组编

本 册 主 编 梁 勇 郑云郎

本册副主编 赵志强

编 者 (以姓氏笔画为序)

包兆胜 金万花 郑云郎 赵志强

杨 巍 梁 勇



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

基础医学实验系列教程/《基础医学实验系列教程》编审委员会组编. —杭州:浙江大学出版社, 2009. 7

(高等医学院校实验实训系列教材)

面向 21 世纪高等医药院校精品课程教材

ISBN 978-7-308-06999-1

I. 基… II. 基… III. 基础医学—实验—医学院校—教材
IV. R3—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 152116 号

基础医学实验系列教程

《基础医学实验系列教程》编审委员会 组编

本册主编 梁 勇 郑云郎

丛书策划 阮海潮(ruanhc@163.com)

责任编辑 阮海潮 严少洁

封面设计 刘依群

出版发行 浙江大学出版社

(杭州天目山路 148 号 邮政编码 310028)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 杭州大漠照排印刷有限公司

印 刷 杭州浙大同心教育彩印有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 41.75

字 数 1069 千

版 印 次 2009 年 7 月第 1 版 2009 年 7 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-06999-1

定 价 74.00 元(共四册)

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部邮购电话 (0571) 88925591

高等医学院校实验实训系列教材

《基础医学实验系列教程》

编审委员会

主 任

周 军 张增安

副主任

梁 勇 赵传昌 陈万平

委 员

吴仲敏 郑景璋 王红梅

包兆胜 郑云郎 黄 芳

史 平 杨通河 陈佳玉

编写说明

实验教学是高等学校实验室的基本任务,是训练学生掌握实验技能的一个重要实践性教学环节,是对学生进行最佳智能结构培养的必修课。为适应当今世界科技迅猛发展对传统实验教学提出的严峻挑战,适应 21 世纪高校医学实验教学改革,培养 21 世纪的实用型人才,提高学生的动手能力和实验教学质量,需要我们及时把新知识、新技术纳入到高等医学教育的教学内容之中。为此,我们坚持“加强基础、培养素质、发展个性、突出创新”的实验教学改革方针和“以学生为主体、以就业为导向、以职业实践为主线、以项目课程为引导”的实验教学改革理念,兼顾知识传授和能力培养、素质提高,使学生全面、协调发展,彻底改变传统的实验教学模式。按照学院人才培养模式,围绕学院实验教学学分制,结合实验课程体系、实验教学内容、教学方法、考核模式等诸方面改革的要求,注重素质教育和创新性与实践性的培养,为学生知识、能力、素质协调发展创造条件。为此,学院牵头组织相关医学院校共同编写了这套《高等医学院校实验实训系列教材》。

本系列教材在编写过程中,以着重培养学生动手能力和分析解决问题的能力为基础,把握实验教学改革思路,突出特色,确定了“四个三”的编写原则。首先要有思维新、知识新、结构新等“三个创新”。其次,把握好实验课程的系统性与创新性的关系,传统实验内容删减与实验知识完整性的关系,实验教学课程的独立开设与相关课程理论教学的协同关系等“三个关系”。再次,体现实践经验与经典技术的结合,技术创新与素质培养的结合,实验项目与科研工作的结合等“三个结合”。最后,实验内容要包括“三个层次”,即基础性实验、综合设计性实验、研究创新性实验,分别占 60%、30%、10%左右。对所选择的实验内容进行系统的优化组合,具有代表性、先进性、实用性和特色性。

本系列教材对每个实验的编写力求实用、简明、条理清晰,突出实验原理、实验方法的说明,并提供必要的图表,便于学生理解实验原理,方便教师指导实验操作。实验之后的思考题有助于学生理解、掌握实验原理和操作步骤,以期提高分析问题、解决问题的能力。

由于时间仓促,加之编写经验不足,本系列教材一定存在不尽如人意之处,敬请广大师生在使用过程中及时提出宝贵意见,以便再版时修订,使其更加完善。

周 军
2009 年 7 月

前 言

随着高等教育改革的不断深入,能力培养已引起高等学校的普遍关注。我们在学院领导的组织支持下,经过教研室全体教师的共同努力,编写了这本生物化学与生物技术实验教程,希望能借此提高学生的实验课质量,有助于学生对基本理论、基本知识和基本技能的掌握。

21 世纪是生命科学的世纪,生物化学与生物技术是当代生命科学领域中一门重要的基础学科,它涵盖的基础理论、基本知识、基本技术与医学研究各学科领域密切相关,其理论与技术的发展,推动了生命科学的发展,对人类的科技发展 with 文明进步产生了巨大影响。生物化学实验是医学院校学生必修的一门独立的基础实验技术课程,其研究技术的发展与应用是依据物理学、化学及生物学的基本理论和实验方法而建立起来的。20 世纪 20 年代微量分析的发展,30 年代电子显微镜的出现,40 年代层析技术和电泳技术的兴起,以及同位素示踪技术、各种光谱技术、磁共振技术的应用,激光、超导等新技术的出现,电子计算机技术的突飞猛进,使生物化学实验手段提高到一个崭新的水平,掌握生物化学实验方法和研究技术,对医学院校学生来说是十分重要的。

在选择实验内容和确定编写体系时,为适应学科的发展,满足教学的需要,培养学生理论联系实际、独立思考、独立操作的能力,借鉴其他医学院校相关实验教材的同时,注意到素质教育和创新能力的培养,为学生知识、能力、素质协调发展创造条件,结合我们的实际情况,在编写过程中,力求使每个实验实用、简明、条理清晰。本书突出实验原理、实验方法的说明,并提供必要的图表,便于学生对实验原理的理解和方便教师指导实验操作。实验之后的思考题有助于学生理解和掌握实验原理,以期提高学生分析问题、解决问题的能力。

由于编者水平有限,加上编写时间紧迫,书中难免存在缺点和不足,恳请广大师生给予指正,我们将在今后的教学工作中不断加以补充和完善。

梁 勇 郑云郎

2009 年 7 月

实验注意事项

生物化学与生物技术实验是医学生学习科学研究方法和培养实事求是的科学态度的必要途径。为了严格把握实验过程中的每个环节,取得良好的实验教学效果,提高教学质量,要求学生必须做到:

一、实验前预习实验内容,明确实验教学目的和要求,了解实验原理、试剂、器材、操作步骤和注意事项,同时根据实验内容,复习相关理论知识,为实验的顺利进行并达到预期效果做好充分的准备。

二、重视各项基本技能训练,按照实验步骤循序、规范操作,仔细观察实验过程中出现的各种现象。

三、准确、客观地记录实验现象和所得数据,不许凭空编造,培养实事求是的科学态度和严谨的工作作风,运用逻辑思维方法,科学地判断并分析实验结果。

四、按要求及时、规范、完整、独立地书写实验报告,做到讨论有理,分析透彻,并体现科学性和创造性,不得盲目抄袭。如果实验失败,应认真寻找原因,总结经验教训。实验报告内容包括实验名称、目的要求、原理、试剂、器材、操作方法和步骤、注意事项、结果及其分析等。要求书写时,字迹端正清楚,数据准确,图表清晰,并按时上交。

五、按操作规程使用仪器和设备,精密仪器使用后要及时登记,玻璃仪器要轻拿轻放,防止损坏。如有仪器运转异常,或损坏、缺少,应及时向指导老师报告,妥善处理。不浪费试剂和标本,节约用水和用电。

六、经常保持实验室地面、台面以及所用仪器的整洁和卫生。用过的玻璃仪器要及时清洗、整理。公用试剂用后应立即放回原处,放置有序,试剂瓶盖不张冠李戴。保持试剂和标本的纯净,防止混杂和污染。不乱倒有腐蚀性、有毒性的试剂,不乱扔废物。实验结束,由值日生做好各项值日工作。离开实验室时,门、窗、水、电等均要关好,检查

妥当。保持实验室整洁,是对实验室风貌和实验者素养的展示。

七、自觉遵守实验室各项规章制度。每次实验课,均要求穿好白大衣,提早 5~10min 进实验室,不得迟到;未经指导老师允许不得早退。实验时不做与实验无关的事。讲究文明和礼貌,不得大声喧哗。

严格执行实验室各项安全规定,严禁吸烟,易燃易爆物品必须远离火源,随时注意防火、防爆及用电安全,严防各种事故发生,保证人身安全。

(郑云郎)

目 录

第一篇 生物化学实验

- 实验一 生物化学实验基本操作 / 3
- 实验二 氨基酸的薄层层析 / 8
- 实验三 蛋白质含量的测定(Bradford 法) / 11
- 实验四 蛋白质的胶内酶解及肽段提取 / 13
- 实验五 酶的专一性 / 15
- 实验六 影响酶促作用的因素 / 17
- 实验七 琥珀酸脱氢酶的作用及其抑制 / 21
- 实验八 722、S22/722S 和 723N 型分光光度计的使用 / 23
- 实验九 血糖测定(葡萄糖氧化酶法) / 27
- 实验十 饱食与饥饿小鼠肝糖原的测定 / 29
- 实验十一 肝脏中酮体生成作用的检测 / 31
- 实验十二 血清胆固醇测定(酶法) / 33
- 实验十三 血清谷丙转氨酶活性测定(赖氏法) / 35
- 实验十四 血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳 / 38
- 实验十五 血浆二氧化碳结合力测定(滴定法) / 42
- 实验十六 胡萝卜素的柱层析分离法 / 45

第二篇 生物技术实验

第一章 分子生物学实验 49

- 实验一 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白质 / 53
- 实验二 酵母 RNA 的提取及组分鉴定 / 57
- 实验三 大肠杆菌质粒 DNA 的提取 / 59
- 实验四 大鼠肝 DNA 的提取与鉴定 / 61

实验五 聚合酶链反应(PCR)及产物鉴定 / 64

第二章 细胞生物学与医学遗传学实验 67

实验六 光学显微镜的构造和使用方法 / 67

实验七 细胞的基本形态与结构 / 74

实验八 细胞分裂 / 77

实验九 DNA 的细胞化学显示法——Feulgen 反应 / 83

实验十 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能检测 / 84

实验十一 染色体标本制作 / 86

实验十二 人类染色体 G 带标本制作及观察 / 92

实验十三 单克隆抗体的制备 / 95

参考文献 101

第一篇 生物化学实验

实验一 生物化学实验基本操作

一、玻璃仪器的洗涤与清洁

生物化学实验中常用的各种玻璃仪器,其清洁程度将直接影响样品测量的准确性和反应的可靠性。因此,玻璃仪器的洗涤和清洁不仅是每项实验前后的常规工作,而且是一项重要的基本技能。

洗涤后的玻璃仪器要求清洁、透明,玻璃表面不含有可溶解的物质,水沿器壁自然流下时不挂水珠。

玻璃仪器的清洗方法很多,应根据实验的要求和污染物性质选用不同的清洁方法。

1. 新购仪器的清洗 新购玻璃仪器的表面大多附有油污和灰尘,特别是附有可游离的金属离子。因此,新购玻璃仪器如试管、烧杯等均需要用洗涤剂刷洗,流水冲净,然后浸泡于1%~2%盐酸溶液中过夜,再用流水洗净,并用少量蒸馏水荡洗2~3次后干燥备用。

2. 使用过的玻璃仪器清洗

(1) 一般非计量玻璃仪器,如试管、烧杯等,以毛刷蘸取洗涤剂刷洗,然后用自来水冲洗干净,直到器壁光滑不挂水珠,最后用蒸馏水荡洗2~3次,倒置于清洁处晾干。

(2) 容量分析仪器,如吸量管、滴定管等,不能用毛刷刷洗,应先用自来水冲洗干净,再用蒸馏水荡洗2~3次,干燥备用。如果较脏,那么可先用铬酸洗液浸泡数小时,然后用自来水冲洗至内壁不挂水珠,再用蒸馏水荡洗2~3次,干燥备用。

(3) 比色杯用毕,立即用自来水反复冲洗,如有污物黏附于杯壁,宜先用盐酸或适当溶剂清洗,然后用自来水冲洗干净,再用蒸馏水荡洗2~3次,倒置晾干备用。切忌用刷子、粗糙的布等擦拭。

【附】 铬酸洗液的配制方法

用台秤称取25g重铬酸钾固体置于干净的烧杯中,先加入50mL蒸馏水使之溶解,再用量筒量取450mL浓硫酸,在不断搅动的条件下,将浓硫酸缓慢倒入重铬酸钾溶液中,使产生的热量能迅速地扩散。等冷却至室温后,把配制好的深褐色铬酸洗液转移到带玻璃塞的试剂瓶中并盖紧塞子,防止浓硫酸吸收空气中的水分或与空气中的还原性物质发生反应,从而降低铬酸洗液的洗涤能力。

注意:配制过程中切不可将重铬酸钾水溶液往浓硫酸里倒,因为浓硫酸的密度较大,溶解时放出的热量会使其上面的水溶液沸腾,硫酸会向四周飞溅,发生事故。

铬酸洗液对衣服、皮肤、桌面、橡胶等有强烈的腐蚀作用,使用时应注意安全。洗液用后可倒回到原瓶,可以反复使用至溶液变为绿色,此时重铬酸钾被完全还原为硫酸铬,洗液失效。

二、混 匀

在生物化学实验中,除特殊情况外,一般每加一种试剂后,都需要立即混匀,以保证反应的充分进行。如不进行混匀,则会影响实验结果。常用的混匀方法有:

1. 甩动法 右手持试管上部,利用腕力将试管多次甩动、振摇。甩动法适用于试管内少量液体的混匀,但要注意防止液体溅出。

2. 弹敲法 右手持试管上部,将试管下部往左手掌心作多次弹敲。此法也适用于试管内少量液体的混匀。

3. 旋转法 右手掌心顶住试管上口,5个手指向下拿紧试管,借助手腕力量,将试管向一个方向做圆周运动,可使液体产生旋转而达到混匀。

4. 搅拌法 如用烧杯或三角烧瓶配制溶液时,可用干净玻璃棒进行搅拌而使之溶解、混匀。

5. 颠倒法 当某些细口容器(如容量瓶等)内液体量较多时,可用瓶塞塞住瓶口,两手上下持瓶,用右手食指按牢瓶塞,颠倒数次即成。严禁用手掌直接按压瓶口或管口作颠倒混匀。

6. 吸管混匀法 用吸管将溶液反复吸放几次,可使溶液混匀。此法适用于量少而无沉淀的液体。成倍稀释某种液体往往采用此法。

7. 振荡器混匀法 将需要混合的液体装入容器内,体积约占容器的1/3,手持容器放在振荡器的工作台上,或用附件固定,即可混匀。

混匀操作时,应防止管内液体溅出,以免造成液体损失或皮肤污染及损伤。

三、过 滤

过滤是使不溶性固体和液体分离的一种常用方法。过滤时,液体穿过滤纸上的小孔,而固态物质留在滤纸上,从而使固体和液体分离。过滤可用于收集滤液、沉淀物或洗涤沉淀物。滤纸过滤一般采用平折法,即将滤纸对折后,再对折,打开后形成一边一层,另一边三层的圆锥体。滤纸放入漏斗时,其边缘与漏斗壁应完全吻合。滤纸上缘一般应低于漏斗口边缘约0.5cm,不能超出漏斗口边缘。过滤时,将玻璃棒靠在三层滤纸的中间部分,使液体顺玻璃棒流入漏斗。液体倒入速度不宜过快,不得使液面超过滤纸上缘下0.5cm。引流时勿使玻璃棒穿透滤纸,漏斗下端紧靠接受滤液的容器(如烧杯)内壁。用于收集滤液时应选用干滤纸,不能先用水将滤纸弄湿,湿滤纸将影响滤液的稀释比例。

除了滤纸过滤之外,对于粗颗粒物体的过滤可用脱脂棉或纱布代替。有些实验可改用离心沉淀法代替过滤,以达到省时、快捷的目的。

四、低速离心机的使用

离心机的型号比较多,这里只介绍低速台式离心机(最大转速4000r/min)和低速大容量离心机(最大转速5000r/min)的使用。

(一) 低速台式离心机的使用

该离心机是一种老式离心机,在使用前,应先检查离心机是否放置平稳,变速旋钮是否处于“0”位。打开离心机盖,检查套管与离心管的大小是否匹配,套管底部是否铺好软垫,有无碎玻片或漏孔,如有碎玻片必须取出,漏孔可用蜡封住。

检查无异常情况,将待离心的液体倒入离心管内,容量约占管的 $\frac{2}{3}$ 体积,以防液体溢出。然后,将一对放有内容物的离心管插入一对套管中,在粗天平上进行平衡,如不平衡,可用滴管调整离心管内容物的量,或向较轻一侧用滴管在离心管与套管之间加水,直到两侧重量相等为止。将已平衡的各对套管连同其内容物按对角线位置放置于离心机中,盖严离心机盖。然后,接通电源,开动离心机,慢慢转动变速旋钮,使转速逐渐加快,直到所需速度。

停止离心时,将变速旋钮逐步转回到“0”。不继续使用时,拔下电源插头。只有待离心机自动停稳后,才能打开离心机盖,取出离心管,绝对不能用手阻止离心机转动。提取离心管内样品后,清洗离心管,倒去离心套管内的平衡用水,倒置于干燥处晾干备用。

(二) 低速大容量离心机的使用

接上电源,打开离心机开关,按“开门”键打开离心机外盖,揭去内盖,取出离心管,倒入待离心液体,对离心管进行等重、平衡操作后,按对称部位放置,盖上内盖,关上外盖。

按“▼”键或“▲”键,液晶屏显示“××号转子参数设定”,先后按“选择”键和“记忆”键,再按“▼”键或“▲”键,设定所需转速后,按“记忆”键,此时离心力随设定转速大小自动变化,再按“▼”键和“记忆”键,分别设定所需的“加速时间(秒)”、“减速时间(秒)”、“离心时间(分)”,最后按“记忆”键,各项参数设定完毕。

按“离心”键,转子开始旋转,液晶屏上先后显示“升速-运行”、“定时-运行”、“减速-停止”、“停止-开门”字样。

转子停止转动后,蜂鸣器发出“嘟”、“嘟”的若干报警声,提醒离心完毕。按“开门”键,自动打开离心机外盖,揭掉内盖,取出离心管待用。

【离心机使用注意事项】

1. 离心机必须置于平整的地面或坚固的台面上,以确保安全。
2. 检查离心管是否有裂纹和老化等现象,如有应及时更换。
3. 样品必须按“等重、对称”的原则放置,以防意外情况发生。
4. 在离心机未停稳时不得打开盖门。

五、常用刻度吸管的使用

刻度吸管简称吸管,是生化实验中常用的计量分析仪器之一,其用途主要是在定量分析实验中用以准确吸取液体。刻度吸管的常用规格有 10mL、5mL、2mL、1mL、0.1mL 等。刻度吸管的刻度标记无论其总容量为多少,均分为 100 等分。正确使用刻度吸管,是保证取得正确生化实验结果的一项基本操作要求。其使用方法为:

右手持吸管上端,拇指和中指夹住管身,食指放于吸管上口,控制液体的流速和定位。吸液时,左手拿吸球(也叫洗耳球),先把吸球捏扁,挤出内腔空气,然后将吸球尖端对准吸管上

口,将吸管下端插入待吸液体中,轻轻放松吸球,将液体缓缓吸入吸管内,当液体上升至所需刻度线之上时,立即移去吸球,用右手食指迅速按紧吸管上口。将吸管提起离开液面,而管的下端仍保留在容器内,管身保持直立,稍稍放松右手食指对吸管上口的按压,或用右手拇指和中指微微捻转吸管,使管内液体缓慢下降,达到液体弯月面最低点与所需刻度线和操作者视线处于水平位时,立即再次按紧右手食指,使液体不再流出。取出吸管,用干净的小滤纸片擦净吸管外壁所沾附的液体,但不接触管口,以防管内液体吸出。而后将吸管插入准备放置该液体的受器(如试管等)中,保持吸管竖直,受器倾斜约 15° ,吸管尖端靠在受器内壁,放开食指使液体沿器壁自然流出。吸管上部未标有“吹”字的,残留在管尖的液体不可用外力强迫其流出,只需将管尖贴在受器内壁,停留 10~15 秒钟即可,因为厂家在校正吸管时,已考虑了末端残留溶液的微量体积。

【吸管使用注意事项】

1. 吸液前要正确选择适当规格的吸管,即选择相等或略大于所需液体体积规格的吸管,以尽可能减小误差。如要吸取 1.8mL 溶液时,宜选用 2mL 规格的吸管,而不选用 5mL 或 10mL 的吸管。
2. 刻度吸管有“流出式”和“吹出式”之分。使用“流出式”吸管时,不应将管尖最后不能自然流出的液体吹出,而“吹出式”吸管须将管尖最后残留的液体吹出,“吹出式”吸管在管壁上端标有“吹”字样。
3. 吸管应保持干燥清洁,开始使用时,用待吸溶液润洗内壁 1~2 次,弃于废液杯内,以确保持吸溶液的浓度恒定和纯净。
4. 不要用嘴代替吸球来吸取液体,以避免某些溶液(如酸、碱等)吸入口内发生意外。
5. 不可用右手拇指代替食指按压吸管上口来控制管内液体流量,因拇指灵活性比食指差,难以做到精细而自如地操作。
6. 操作时应将吸管刻度线向着自己,读数时吸管要竖直。要注意吸管刻度读数的标记方法,有的吸管是自上而下(“0”线在上)标记,而有的是自下而上(“0”线在下),切勿搞错。
7. 吸液时不要将管尖插到底,以免接触液体底部可能存在的沉淀物,影响实验结果,或堵塞管口。但也不要插得太浅,以免管尖脱空,而将液体吸入吸球内而被污染。
8. 只允许用同一支吸管吸取同一种液体,不可用同一支吸管未经处理就去吸取其他不同的液体。
9. 用后要及时用自来水冲洗和蒸馏水润洗,特别是吸取血液后,若放置过久,吸管内的血液干涸就很难清洗干净。洗净的吸管放回试管架上时,应将管尖朝上,以防管尖污染和破损。

六、微量可调加样器的使用

微量可调加样器又叫做微量可调移液器或移液枪,主要用于在特定量程范围内准确吸取液体。

微量加样器的型号和规格有多种,这里以 $50\mu\text{L}$ 的手动微量可调加样器为例加以介绍。

使用时,首先旋转加样器上部的旋钮,使其标线与所需刻度线重合,以精确设置移液量。在加样器下端安上相配套的聚丙烯塑料吸头,为达到良好的密封性,可左右轻轻转动吸头使其