

21世纪高等学校研究生教材

生命科学系列教材

现代生物学实验技术指导

XIANDAI SHENGWUXUE SHIYAN JISHU ZHIDAO

■ 向本琼 / 主 编



北京师范大学出版集团

BEIJING NORMAL UNIVERSITY PUBLISHING GROUP

北京师范大学出版社

21世纪高等学校研究生教材

生命科学系列教材

现代生物学实验技术指导

XIANDAI SHENGWUXUE SHIYAN JISHU ZHIDAO

向本琼 / 主 编

向本琼 尹燕霞 佟 丽 / 编 著
刘 凯 刘 进 廖万金



北京师范大学出版集团
BEIJING NORMAL UNIVERSITY PUBLISHING GROUP
北京师范大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

现代生物学实验技术指导 / 向本琼主编. —北京: 北京师范大学出版社, 2009.9

ISBN 978-7-303-10453-6

I. 现… II. 向… III. 生物学—实验 IV. Q-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 157716 号

营销中心电话 010-58802181 58808006
北师大出版社高等教育分社网 <http://gaojiao.bnup.com.cn>
电子邮箱 beishida168@126.com

出版发行: 北京师范大学出版社 www.bnup.com.cn

北京新街口外大街 19 号

邮政编码: 100875

印刷: 北京京师印务有限公司

经销: 全国新华书店

开本: 170 mm × 230 mm

印张: 32.5

字数: 557 千字

版次: 2009 年 9 月第 1 版

印次: 2009 年 9 月第 1 次印刷

定价: 45.00 元

策划编辑: 姚斯研 责任编辑: 姚斯研

美术编辑: 高霞 装帧设计: 高霞

责任校对: 李茵 责任印制: 李丽

版权所有 侵权必究

反盗版、侵权举报电话: 010-58800697

北京读者服务部电话: 010-58808104

外埠邮购电话: 010-58808083

本书如有印装质量问题, 请与印制管理部联系调换。

印制管理部电话: 010-58800825

前言

现代生物技术迅猛发展，取得了令人瞩目的成就，推动着科学的进步，促进着经济的发展，改变着人类的生活与思维，影响着人类社会的发展进程；同时它也是21世纪高新技术革命的核心内容，具有巨大的经济效益和现实的与潜在的生产力。实验技能训练是传授知识和培养科研能力、创新能力、分析问题与解决问题等的综合实践能力的重要阵地，也是全面提高人才培养质量和素质的关键之所在。

综览目前的实验教材或参考书，还没有一本囊括现代生物技术中多学科交叉的实验内容于一体，并适合于生物学高年级本科生及研究生进行综合科研素质和实践技能训练的实验教材或参考书。在这样的背景下，国内迫切需要一部实验课程体系和内容的设置以系统综合大实验为核心和以科学研究思路为线索，并融合多学科交叉的现代生物技术于一体的实验教材或参考书。

本书的撰写基本上是总结和升华了我们多年实验教学改革、建设与实践的经验。分为两大部分，前一部分扼要介绍了有关现代生物学的实验技术理论和方法，内容包括显微技术、切片技术、层析技术、电泳技术、核酸研究技术、蛋白质研究技术、免疫学相关技术、细胞研究技术以及中药研究相关技术。后一部分学生实验内容包括酶蛋白基因的克隆与表达、纯化及其结构与功能研究、酵母双杂交及免疫共沉淀研究蛋白相互作用、基因沉默及RNA干扰研究基因功能、动植物细胞与组织培养、中药有效成分的分离纯化与鉴定及其对细胞增殖与凋亡的影响等。实验内容彻底改变了传统实验教学模

式中条块分割的状况，让学生在实验课程中体验科研的过程，使学生从整体上了解进行生命科学研究的思路和方法，培养学生们正确的科研思维能力和综合素质。本书的部分实验通过我们多年教学实践的检验，得到了广大师生的一致好评。

本书的编写风格简明，强调方法学上的严谨、实用与可靠，编写中突出实验的技能性和综合性。通过学习使学生综合进行接近正规科研的实验训练，同时培养学生的研究思维以及分析问题与解决问题等综合实践能力。本书可作为高等院校生物和医药农林等专业研究生和本科生综合实验的教学用书，也可作为生物类相关领域研究人员的参考书。

由于编者的水平有限，有关实验内容的选择又较多地考虑教学上的需要，故难以满足各界读者的要求；同时书中可能会出现这样那样的问题。在此衷心欢迎各位专家学者、广大师生对本书提出批评指正。

在本书的出版过程中，得到了学校领导、研究生院及北京师范大学出版社的大力支持，在此对他们表示衷心的感谢。

编者

2009.4 于北京师范大学

目 录

第 1 篇 常用现代生物学实验技术及原理

第 1 章 显微技术 /3

- 1.1 明视野显微镜 /3
- 1.2 暗视野显微镜 /7
- 1.3 相差显微镜 /8
- 1.4 微分干涉差显微镜 /9
- 1.5 荧光显微镜 /10
- 1.6 激光扫描共聚焦显微镜 /11
- 1.7 多光子荧光显微镜 /15
- 1.8 电子显微镜 /15

第 2 章 切片技术 /26

- 2.1 石蜡切片技术 /26
- 2.2 碳蜡切片技术 /29
- 2.3 冷冻切片技术 /30
- 2.4 超薄切片技术 /32
- 2.5 其他切片技术 /37

第 3 章 层析技术 /38

- 3.1 层析技术的定义及分类 /38
- 3.2 色谱图及其专业术语 /41

- 3.3 层析分离的基本理论和重要参数 /44
- 3.4 层析定性定量分析的基本原理及方法 /52
- 3.5 层析技术的基本操作 /57
- 3.6 常用的色层分离技术简介 /61

第4章 电泳技术 /94

- 4.1 电泳的基本原理 /94
- 4.2 琼脂糖凝胶电泳 /95
- 4.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳 /98
- 4.4 毛细管电泳 /109
- 4.5 单细胞凝胶电泳 /110

第5章 核酸研究技术 /112

- 5.1 核酸的分离纯化与鉴定 /112
- 5.2 核酸的序列分析 /117
- 5.3 基因扩增 /121
- 5.4 分子杂交 /129
- 5.5 DNA重组 /141
- 5.6 目的基因的分离与克隆 /148
- 5.7 基因功能研究 /157
- 5.8 生物芯片 /163
- 5.9 噬菌体展示和细菌表面展示 /166
- 5.10 分子标记 /170

第6章 蛋白质研究技术 /179

- 6.1 蛋白质的分离纯化与检测 /179
- 6.2 蛋白质结构研究技术 /187
- 6.3 蛋白质的变复性研究技术 /201
- 6.4 蛋白质相互作用研究技术 /205
- 6.5 蛋白质组学研究技术 /208

第 7 章 免疫学相关技术 /217

- 7.1 抗体的制备 /217
- 7.2 标记免疫技术 /226
- 7.3 免疫细胞化学技术 /238

第 8 章 细胞研究技术 /248

- 8.1 动物细胞培养的基本原理与技术 /248
- 8.2 植物组织培养的基本原理与技术 /278
- 8.3 流式细胞术 /303

第 9 章 中药研究相关技术 /312

- 9.1 中药有效成分的分离纯化 /312
- 9.2 药理学简介 /319
- 9.3 动物实验基本常识及常用技术 /323
- 9.4 整体动物实验研究技术 /331
- 9.5 离体实验研究技术 /335
- 9.6 分子水平的药理药效学研究技术 /344
- 9.7 新药临床前及临床药理学研究简介 /350
- 9.8 药物筛选方法简介 /352
- 9.9 抗肿瘤药物的药理药效学研究方法 /353

第 2 篇 学生实验

- 实验 1 碱性磷酸酶突变体的构建及其结构功能分析 /361
- 实验 2 小鼠碱性磷酸酶基因的克隆及其在昆虫细胞中的表达 /384
- 实验 3 酵母双杂交法寻找烟草 CaM 结合蛋白 /395
- 实验 4 烟草突变体库的构建及其 T-DNA 侧翼序列的分析 /411
- 实验 5 RNAi 研究线虫肌丝蛋白 unc22 基因的功能 /421
- 实验 6 细菌表面展示绿色荧光蛋白 GFP /428
- 实验 7 辽东栎的分子标记分析 /435
- 实验 8 烟草原生质体分离和体细胞杂交 /445

- 实验 9 红豆杉次生代谢产物紫杉醇的生产与检测 /450**
实验 10 紫杉醇诱导宫颈癌 Hela 细胞凋亡作用机制的研究 /454
实验 11 紫杉醇的在体药理学研究 /461
实验 12 单克隆抗体的制备 /465

第 3 篇 附 录

附录 1 常用缓冲液及培养基的配制 /475

- 1.1 常用 pH 缓冲液的配制 /475
- 1.2 常用电泳缓冲液及凝胶加样缓冲液 /483
- 1.3 常见限制性内切酶的酶切位点及其缓冲液 /485
- 1.4 常用抗生素溶液 /487
- 1.5 常用培养基 /487

附录 2 相关实验资料和常用数据 /494

- 2.1 常用单位及换算方法 /494
- 2.2 氨基酸符号及相应密码子 /494
- 2.3 常用核酸与蛋白质换算数据 /495
- 2.4 离心机转速与相对离心力的换算 /497
- 2.5 常见市售酸碱的浓度 /499
- 2.6 几种主要同位素的衰变及半衰期 /500
- 2.7 硫酸铵饱和度表 /501
- 2.8 常用层析介质 /503
- 2.9 菌种保存 /511

第 1 篇

常用现代生物学实验 技术及原理



第 1 章 显微技术

显微技术的发明，不仅把人类的视觉从宏观延伸到了微观，而且直接导致了 19 世纪细胞学和微生物学等微观学科的建立。最早的显微镜是由荷兰眼镜商 Janssen (1588~1628) 于 1604 年制造的。1665 年，英国的科学家 Hooke (1635~1703) 用自制的显微镜观察木栓并发现了细胞。真正观察到活细胞的是荷兰科学家 Leeuwenhoek (1632~1723)，他用自制的显微镜观察到了池塘水中的原生动物、人和哺乳动物的精子以及细菌等，为光学显微镜的发展做出了重大贡献。经历了 3 个多世纪，人们不断地改进、创新并拓展显微镜的性能，适用于各种用途的显微镜被制造出来，为研究细胞和微生物等微观领域的科学家们提供了非常重要的必备工具。

根据显微镜成像原理的不同，目前常见的显微镜可分为：明视野显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜、微分干涉差显微镜、荧光显微镜、激光扫描共聚焦显微镜、电子显微镜等。

1.1 明视野显微镜

明视野显微镜 (bright field microscope) 是最常用的一种光学显微镜。利用光线照明，标本中各点依其光吸收 (即光的振幅发生变化) 的不同而在明亮的背景中成像。

1.1.1 普通光学显微镜的基本结构

普通光学显微镜在结构上可分为光学系统和机械装置两个部分。光学系统主要包括目镜、物镜、聚光器、光阑及光源等部分，机械装置主要包括镜筒、镜柱、载物台、镜座、粗细调节螺旋等部分，其中物镜和目镜是使微小物体放大成像的主要部件，聚光器和光源主要用于显微镜的照明 (图 1-1)。

1.1.1.1 物镜

物镜常位于显微镜筒的下方，是实现第一级放大的镜头，一般由 8~10 片透镜组成。物镜的放大倍率通常为 5~100 倍，如低倍 (4×)、中倍 (10×或

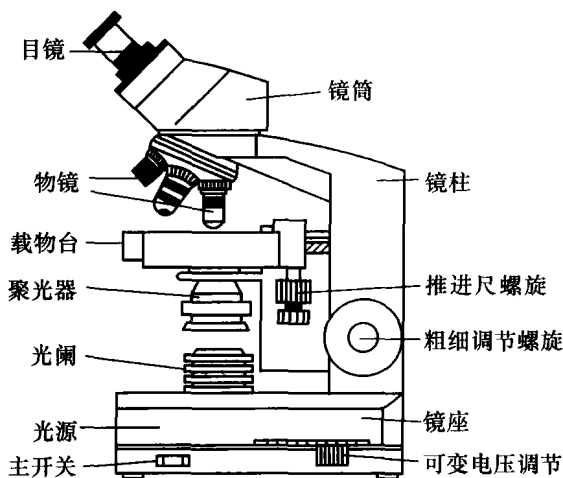


图 1-1 普通光学显微镜的基本结构

20×)、高倍(40×)和油浸物镜(100×)等。多个物镜共同镶在物镜转换器上,转动转换器就可让不同倍率的物镜进入工作光路,从而选择不同倍数的物镜。物镜是决定成像质量优劣的重要光学元件,为了消除像差提高成像的质量,目前常用能对两种颜色的光线校正色差的消色差物镜;质量更高的还有能对三种色光校正色差的复消色差物镜;能保证物镜的整个像面为平面,以提高视场边缘成像质量的平像场物镜。

物镜的主要参数包括放大倍数、数值孔径和工作距离。

放大倍数是指眼睛看到像的长度大小与对应样品长度大小的比值,如:放大倍数为100倍,指的是长度为 $1\mu\text{m}$ 的样品,放大后像的长度是 $100\mu\text{m}$ 。显微镜的总放大倍数等于物镜和目镜放大倍数的乘积。

数值孔径也叫镜口率(numerical aperture, N. A.),是物镜和聚光器的主要参数,与显微镜的分辨率成正比。 $N. A. = n \cdot \sin(\theta/2)$, n 为物镜与标本之间介质折射率, θ 为透镜的孔径角(图1-2)。干燥物镜的数值孔径一般为 $0.05\sim 0.95$,油浸物镜(香柏油)的数值孔径为1.25或更大。

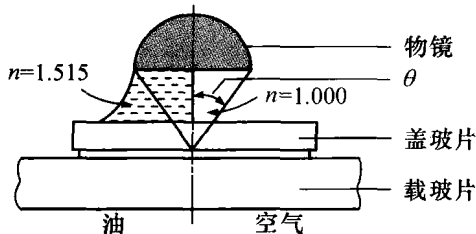


图 1-2 透镜的孔径角

工作距离是指当所观察的标本最清晰时物镜前端的透镜下面到标本的盖玻片上面的距离。物镜的工作距离与物镜的焦距有关，物镜的焦距越长，放大倍数越低，其工作距离越长。如 10 倍物镜上标有 10/0.25 和 160/0.17，其中 10 为物镜的放大倍数、0.25 为数值孔径、160 为镜筒长度（单位 mm）、0.17 为盖玻片的标准厚度（单位 mm）。10 倍物镜有效工作距离为 6.5 mm，40 倍物镜有效工作距离为 0.48 mm。

1.1.1.2 目镜

目镜常位于显微镜筒的上方，一般由两个凸透镜构成，是实现第二级放大的镜头。目镜和物镜安装在镜筒的两端，它们的距离是固定的。目镜进一步放大了物镜所形成的实像，但也限制了眼睛所观察的视野。按照所能看到的视场大小，目镜可分为视场较小的普通目镜和视场较大的大视场目镜（广角目镜）两类。按放大倍率分，常用目镜有 5 倍、10 倍和 15 倍三种。

1.1.1.3 聚光器

聚光器能使更多的光能集中到被观察的部位，提供亮度足够且均匀的物面照明。它的功能是保证光束能充满物镜孔径角，否则就不能充分利用物镜所能达到的最高分辨率。为此目的，在聚光器中设有可以调节开孔大小的可变孔径光阑，用来调节照明光束孔径，与物镜孔径角匹配。

1.1.1.4 载物台

载物台是用于放置样本的平台。利用调焦旋钮可以使载物台做粗调或细调的升降运动，调整样本与物镜之间的距离以获得清晰的物像。操作过程中，一般先使用粗调焦螺旋使载物台接近物镜，使物像出现在视野中，然后用细调焦螺旋使目镜内的影像清晰即可进行观察。

1.1.2 普通光学显微镜的成像原理

普通光学显微镜的成像原理如图 1-3 所示，被观察的物体（AB）放在物镜焦点（ f_1 ）稍外处，物体的光线通过物镜后在目镜焦点（ f_2 ）稍内处形成一个倒立的放大实像（ $B'A'$ ），观察者的眼睛通过目镜将该实像（ $B'A'$ ）进一步放大为一个倒立的虚像（ $B''A''$ ）。

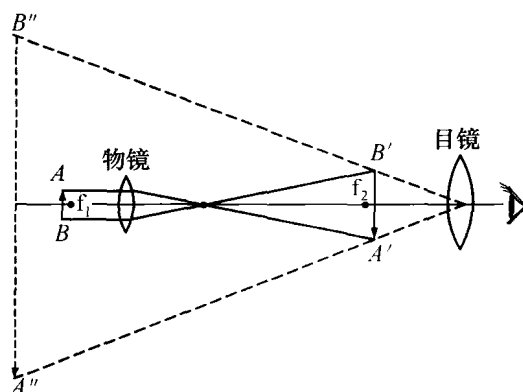


图 1-3 光学显微镜的成像原理

1.1.3 决定光学显微镜成像质量的主要参数

显微镜的分辨率、反差和放大倍数是决定光学显微镜成像质量高低的主要参数。

1.1.3.1 显微镜的分辨率

显微镜的分辨率 (D) 是影响显微镜成像清晰度的关键, 其大小用分辨距离 (所能分辨开的两个物点间的最小距离) 的数值来表示。

$$D = 0.61\lambda / N.A. = 0.61\lambda / n \cdot \sin(\theta/2)$$

式中 λ 为光波波长, $N.A.$ 为物镜的数值孔径, n 为物镜与样品之间介质的折射率。依此式计算, 可见光照明的显微镜分辨率极限为 $0.2 \mu\text{m}$ 或 200 nm 。从式中不难看出, 入射波长越短、介质折射率越高和孔径角越大, 显微镜的分辨距离越小, 即表示它的分辨率越高, 其性能也越好。

1.1.3.2 反差

反差是指显微镜形成的影像与背景之间的光强度对比。对于明视野显微镜而言, 可以通过调节聚光器孔径光阑的大小以调节反差。孔径光阑越大, 反差越小 (分辨率增高); 反之, 孔径光阑越小, 反差越大 (分辨率降低)。因此, 在实际应用中, 调节孔径光阑的大小应兼顾分辨率和反差。为了提高显微成像技术中的反差效果, 后来发展的如暗视野显微镜、相差显微镜、微分干涉差显微镜、偏光显微镜等多种类型显微镜均为增强反差作出了贡献。

1.1.3.3 放大倍数

显微镜的放大倍数是指物镜和目镜放大倍数的乘积。如果这个乘积在 $500\times$ 物镜 N. A. $\sim 1\,000\times$ 物镜 N. A. 范围之内，则为有效的放大倍数；如果低于上述范围，就不足以显示样品的细节；如果高于上述范围，则为无效的放大，即不能看到更多的细节。

由于普通光学显微镜的光源光线自镜体下方向上透射，通过聚光器、物镜，达到目镜，因此在医学及生物学研究中一般须将被观察的样品切成能透过光线的薄片（厚 $4\sim 7\,\mu\text{m}$ ），并且要进行各种染色之后才能观察到组织和细胞等的细微结构。

1.2 暗视野显微镜

暗视野显微镜（dark field microscope）是为了提高反差而设计的一种光学显微镜，在普通光学显微镜台下配一个暗视野聚光器。在明视野显微镜中，照明光线可以直接通过聚光器进入物镜而成像，而暗视野聚光器的中央有挡光片，使照明光线形成一个空心光锥，以倾斜的光线照射到样品上，只允许被样品反射和衍射的光线进入物镜，而样品周围的背景由于不能散射光线，使视野的背景呈现为黑色，而样品是亮的（图 1-4）。正如我们在白天看不到的星辰却可在黑暗的夜空中清楚地显现一样，在暗视野显微镜中由于样品与背景之间的反差增大，可以清晰地观察到在明视野显微镜中不易看清的活菌体等透明的微小颗粒。而且，即使所观察微粒的尺寸小于显微镜的分辨率，依然可以通过它

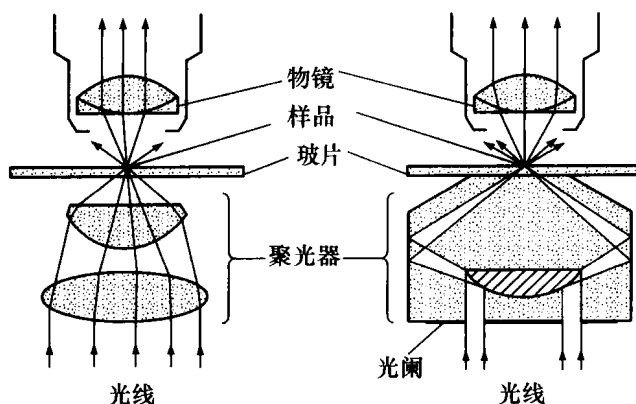


图 1-4 明视野显微镜（左）与暗视野显微镜（右）的光路图

们散射的光而发现其存在。利用这种显微镜能见到小至 $4\sim 200\text{ nm}$ 的微粒子，分辨率可比普通显微镜高 50 倍。因此，暗视野显微镜适用于观察单细胞有机体、硅藻、细菌、细胞中的线状结构，如鞭毛和纤维等。

1.3 相差显微镜

相差显微镜 (phase contrast microscope) 又称位差显微镜或相衬显微镜。20 世纪 30 年代荷兰科学家 Zermike 首先设计并制造了第一台相差显微镜，并因此获得了 1953 年诺贝尔物理学奖。活细胞和未染色的生物标本，因细胞各部细微结构的折射率和厚度的不同，光波通过时，波长和振幅基本不变，仅相位发生变化（相位差），只是这种相位差人眼无法观察。而 Zermike 设计的相差显微镜利用光的衍射和干涉现象可以将这种相位差转变为人眼可以看到的振幅（光强度）变化。因此，相差显微镜使人们能在不染色的情况下比较清楚地观察到在普通光学显微镜和暗视野显微镜下都看不到或看不清的活细胞及细胞内的某些细微结构。

相差显微镜与普通光学显微镜的不同之处在于：它具有环形光阑的聚光器和带有相板的相差物镜。环形光阑位于光源与聚光器之间，它的作用是使透过聚光器的光线形成空心光锥，聚焦到样品上。相差物镜中的相板可以将入射光线的相位提前或延迟 $1/4$ 波长。当光线经过环形光阑、聚光器照射到样品之后，分为两部分光束，一部分光线透过样品产生衍射光，偏离了原来的光路，同时被延迟了 $1/4$ 波长；另一部分光线则为穿透背景的直射光，直射光经过相板之后被提前或延迟了 $1/4$ 波长，两束光的光程差变为 $1/2$ 波长（图 1-5）。直射光与衍射光干涉后，如果光波振幅减弱，造成像暗背景亮，则称为正反差（暗反差）；反之，如果光波振幅增强，造成像亮背景暗，则称为负反差（亮反差）。

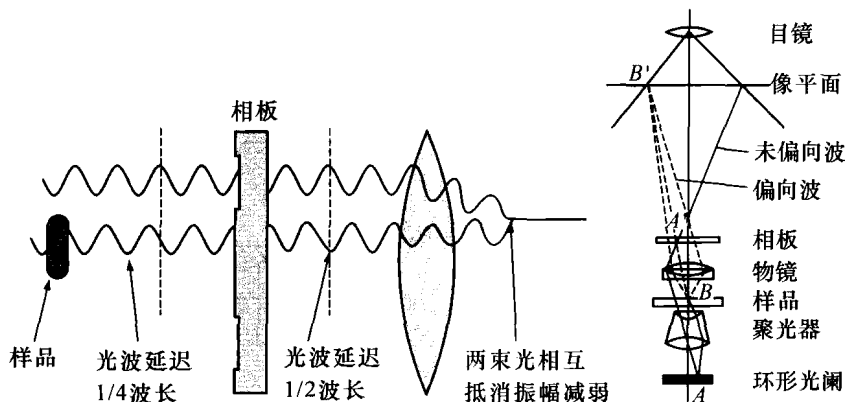


图 1-5 相差显微镜的成像原理