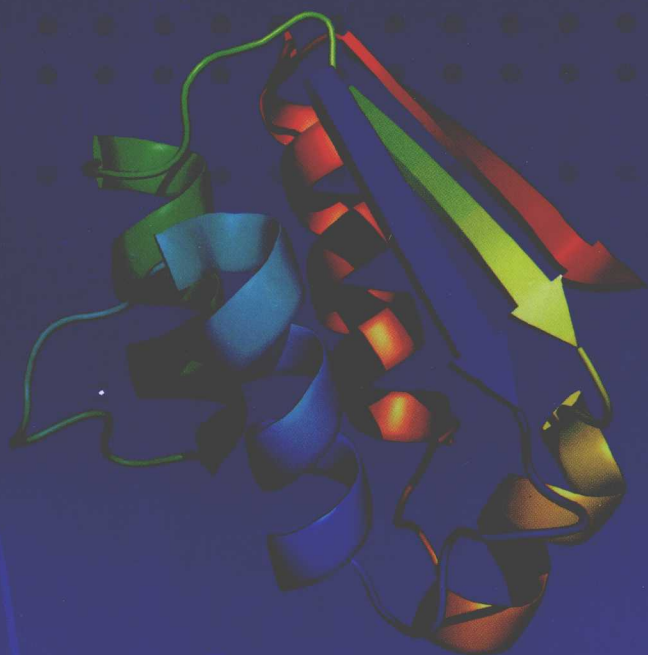


生物化学与 分子生物学实验

SHENGWU HUAXUE YU FENZI SHENGWUXUE SHIYAN

沈剑敏 主编



兰州大学出版社

生物化学与分子生物学实验

主 编 沈剑敏

副主编 胡建成 张东凯



兰州大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验/沈剑敏主编. —兰州:兰州大学出版社, 2009. 8

ISBN 978-7-311-03237-1

I. 生… II. 沈… 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. Q5-33
Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 141026 号

策划编辑 陈红升
责任编辑 龚 静 陈红升
封面设计 管军伟

书 名 生物化学与分子生物学实验
作 者 沈剑敏 主编
出版发行 兰州大学出版社 (地址:兰州市天水南路 222 号 730000)
电 话 0931-8912613(总编办公室) 0931-8617156(营销中心)
0931-8914298(读者服务部)
网 址 <http://www.onbook.com.cn>
电子信箱 press@onbook.com.cn
印 刷 白银兴银贵印务有限公司
开 本 787×1092 1/16
印 张 14.75
字 数 357 千
版 次 2009 年 8 月第 1 版
印 次 2009 年 8 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 978-7-311-03237-1
定 价 26.00 元

(图书若有破损、缺页、掉页可随时与本社联系)

前 言

培养大学生的创新实践能力已成为当前我国高等教育教学改革的核心目标之一,也是促进我国高等教育可持续发展的不竭动力。21 世纪是生命科学发展的重要时机,研究成果日新月异。生物化学与分子生物学研究方法和实验技术已经成为生命科学各领域的重要工具,该课程作为我国生物科学、生物技术、生物工程及其他相关专业学生必修的一门重要基础课,在训练学生的基本技能、培养动手能力和创新能力等方面起着重要的作用。在高校,创新的源头在实验室,我们迫切需要能够体现新知识体系的教材作为实验教学的载体。本书就是在这样的时代背景和强烈责任感的冲击下编写完成的。

本教材按 144 学时编写,分 3 个学期完成。根据生物化学与分子生物学实验技术从易到难的顺序,分为四篇十三章,将四十七个有代表性的实验按技术难度等级分列于第二篇和第三篇中。第一篇为基本技能训练,下设七章,主要介绍了生物化学与分子生物学实验的基本知识与基本操作。第二篇是生物化学实验,分三章,包括生物化学基础、强化、综合共三十六个实验,第一学期完成其中的基础实验与强化实验,第二学期完成综合实验。第三篇是分子生物学实验,第三学期完成,内容分二章,包括基础和综合共十一个实验。第四篇中设计了二十一个创新项目,可作为课外创新训练题材自由选做。最后的附录中收录了常用仪器的使用方法、常用缓冲溶液的配制、一些数据表等。全书内容设置包括对糖、脂质、氨基酸、蛋白质、酶、维生素、核酸、激素等生命大分子的研究,还包括物质代谢与生物氧化实验,在综合实验和创新项目方面均得到充实和加强。实验方法涵盖滴定、蒸馏、离心、分光光度比色、薄层层析、凝胶层析、离子交换层析、亲和层析、气相色谱、高效液相色谱、电泳、荧光、旋光法、质粒 DNA 的提取、酶切、鉴定、基因芯片鉴定、DNA 杂交、重组和转化、PCR、RAPD 等技术。选编的实验代表性强,除了对一些经典实验中的某些步骤有创新外,其中“卵磷脂的制备及气相色谱分析”、“高效液相色谱法测定雌激素含量”和“旋光法测定淀粉含量”三个实验是编者根据多年教学科研工作积累编著的,填补了这些教学内容的空白。

全书从学习该课程的基本技能训练入手,以培养学生掌握基本的研究手段,强化提高其综合运用,最后能独立完成创新课题为主线,将生物化学与分子生物学实验原理和技术方法直接融入到具体的实验之中,不作单独阐述,这样既便于学生掌握,又避免了理论与实际相脱离的弊端。本书是对同类教材的继承和发展,力求广度和深度有所突破。本教材可操作性强,内容全面精练,图文并茂,适用于生命科学各专业本科生和部分专业硕士研究生进行系

统的生物化学与分子生物学技术训练,可供草业、农林和医学院校选做,也可供有关教师和科研人员参考使用。

本书由沈剑敏任主编,负责制定编写大纲,对全书进行统编、修改、定稿,联系出版的全部事项,并承担了第一篇、第二篇和第四篇的编写;胡建成编写了第三篇内容;张东凯编写了附录。在编写和出版本书的过程中,得到了陈强教授的大力支持,在此表示衷心的感谢。

全书在编写过程中参阅了大量的书籍和资料,在参考文献中恕不能一一列出。编写本书从构思、确定提纲到编写、统稿、修改历经了半年多的时间,我们希望能编写成一本先进实用的教材,但由于知识水平有限,难免存在纰漏之处,编者诚恳希望读者提出批评和指正。

附注:封面蛋白质图片出自 Shouliang Dong, Luis Moroder, Nediljko Budisa. Protein Iodination by Click Chemistry. ChemBioChem, 2009(10):1149-1151.

作者在此表示诚挚的感谢。

编 者

2009年6月

目 录

第一篇 基本技能训练

第一章 实验室规则	(003)
一、学生实验守则	(003)
二、实验室安全防护知识	(003)
三、实验室灭火法	(004)
第二章 玻璃仪器的洗涤	(006)
一、生物化学与分子生物学实验常用玻璃仪器	(006)
二、实验室常用的洗涤方法	(006)
三、常用玻璃仪器的洗涤	(007)
四、玻璃器皿的干燥	(009)
第三章 常用容量器的正确使用	(010)
一、吸管	(010)
二、微量移液器	(010)
三、容量瓶	(011)
四、滴定管	(012)
五、量筒	(014)
第四章 试剂的配制	(015)
一、溶液浓度的表示及配制	(015)
二、溶液浓度的调整	(015)
三、试剂配制中的注意事项	(016)
第五章 制备生命大分子物质的基本操作	(017)
一、实验材料的选择和处理	(017)
二、细胞的破碎	(018)
三、有效成分的提取	(018)
四、振荡与搅拌	(019)
五、离心	(019)
六、沉淀的过滤与洗涤	(019)
七、生命大分子物质的浓缩	(020)
八、生命大分子物质的冷冻干燥	(021)

第六章 实验误差和数据处理	(022)
一、实验误差	(022)
二、数据处理	(023)
第七章 实验记录、实验报告及考评方式	(025)
一、实验记录	(025)
二、实验报告	(025)
三、考核方式与评分方法	(026)

第二篇 生物化学实验

第八章 生物化学基础实验	(031)
实验一 硅胶 G 薄层层析法分离鉴定糖类	(031)
实验二 植物水溶性总糖的提取和含量测定(蒽酮比色法)	(034)
实验三 脂肪碘值的测定	(037)
实验四 磷硫铁法测定血清总胆固醇含量	(040)
实验五 甲醛滴定法测定氨基氮	(042)
实验六 纸层析法分离鉴定氨基酸	(045)
实验七 蛋白质两性性质与等电点的测定	(049)
实验八 蛋白质的沉淀、变性反应	(051)
实验九 蛋白质含量的测定(双缩脲法)	(056)
实验十 蛋白质含量的测定(Folin-酚法)	(059)
实验十一 蛋白质含量的测定(考马斯亮蓝法)	(061)
实验十二 酶的特异性	(064)
实验十三 酶促反应动力学	(066)
实验十四 动物肝脏 DNA 的提取	(071)
实验十五 二苯胺定糖法测定 DNA 含量	(074)
实验十六 定磷法测定 RNA 含量	(076)
实验十七 2,6-二氯酚靛酚法测定维生素 C 含量	(079)
第九章 生物化学强化实验	(083)
实验十八 3,5-二硝基水杨酸比色定糖法	(083)
实验十九 粗脂肪的提取及含量的测定	(086)
实验二十 酪蛋白的制备及含量的测定	(088)
实验二十一 蛋白质含量的测定(微量凯氏定氮法)	(092)
实验二十二 血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	(096)
实验二十三 蛋白质的分级盐析及凝胶过滤法脱盐	(101)
实验二十四 琼脂糖凝胶电泳分离乳酸脱氢酶同工酶	(104)
实验二十五 薄层层析法鉴定转氨酶的转氨基作用	(107)
实验二十六 荧光分光光度法测定维生素 B ₂ 的含量	(110)
第十章 生物化学综合实验	(114)
实验二十七 卵磷脂的制备及气相色谱分析	(114)

实验二十八 大豆蛋白的提取、含量测定及氨基酸组成分析	(119)
实验二十九 鸡卵类粘蛋白的分离与纯化	(122)
实验三十 细胞色素 C 的制备及测定	(125)
实验三十一 SDS-PAGE 测定蛋白质相对分子质量	(129)
实验三十二 凝胶过滤层析法测定蛋白质相对分子质量	(135)
实验三十三 亲和层析法纯化胰蛋白酶	(141)
实验三十四 高效液相色谱法测定雌激素含量	(147)
实验三十五 离子交换柱层析分离核苷酸	(152)
实验三十六 旋光法测定淀粉含量	(157)

第三篇 分子生物学实验

第十一章 分子生物学基础实验	(163)
实验一 碱变性法提取质粒 DNA 及纯化	(163)
实验二 质粒 DNA 的限制内切酶酶切及琼脂糖凝胶电泳分析	(165)
实验三 脉冲电泳技术	(169)
实验四 λ 噬菌体感染与效价测定	(171)
实验五 提取纯化大肠杆菌基因组 DNA	(173)
实验六 哺乳动物 mRNA 的分离及纯化	(175)
第十二章 分子生物学综合实验	(179)
实验七 Western Blotting	(179)
实验八 DNA 重组和转化	(183)
实验九 大肠细菌的基因芯片鉴定	(185)
实验十 DNA 的 Southern 杂交	(188)
实验十一 生物系统学研究中的 RAPD 技术	(191)

第四篇 创新设计项目

第十三章 生物化学与分子生物学创新设计项目	(197)
一、实验目的	(197)
二、基本要求	(197)
三、结果处理	(197)
四、选题范围	(197)

附 录

一、生物化学与分子生物学实验常用仪器的使用方法	(199)
(一)分光光度计	(199)
(二)离心机	(200)
(三)电泳仪	(202)
(四)PCR 仪	(203)
(五)凝胶成像系统	(204)

(六)恒温水浴锅	(204)
(七)酸度计	(205)
(八)恒温振荡培养箱	(206)
(九)旋转蒸发仪	(207)
(十)高效液相色谱仪	(207)
(十一)核酸蛋白检测系统	(208)
(十二)超净工作台	(210)
(十三)高压灭菌锅	(210)
二、常用缓冲溶液的配制	(211)
(一)甘氨酸—盐酸缓冲液(0.05mol/L,pH2.2~3.6,25℃)	(211)
(二)氯化钾—盐酸缓冲液(0.05mol/L,pH1.0~2.2,25℃)	(212)
(三)邻苯二甲酸氢钾—盐酸缓冲液(0.05mol/L,pH2.2~4.0,20℃)	(212)
(四)醋酸—醋酸钠缓冲液(0.2mol/L,pH3.6~5.8,18℃)	(212)
(五)邻苯二甲酸氢钾—氢氧化钠缓冲液(pH4.1~5.9,25℃)	(213)
(六)柠檬酸—柠檬酸钠缓冲液(0.1mol/L,pH3.0~6.2)	(213)
(七)磷酸二氢钾—氢氧化钠缓冲液(0.05mol/L,pH5.8~8.0)	(214)
(八)磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液(pH2.6~7.6)	(214)
(九)磷酸氢二钠—磷酸二氢钠缓冲液(0.2mol/L,25℃)	(215)
(十)巴比妥—盐酸缓冲液(pH6.8~9.6,18℃)	(215)
(十一)Tris—盐酸缓冲液(0.05mol/L,pH7~9,25℃)	(216)
(十二)硼酸—硼砂缓冲液(pH7.4~9.0)	(216)
(十三)硼砂缓冲液(pH8.1~10.7,25℃)	(216)
(十四)甘氨酸—氢氧化钠缓冲液(0.05mol/L,pH8.6~10.6,25℃)	(217)
(十五)碳酸钠—碳酸氢钠缓冲液(0.1mol/L,pH9.2~10.8)	(217)
(十六)酸度计常用标准缓冲溶液的配制	(218)
三、层析法常用数据表	(218)
(一)凝胶过滤用相对分子质量标准品	(218)
(二)琼脂糖凝胶技术数据	(219)
(三)Sephadex G 型交联葡聚糖凝胶的数据	(220)
(四)Sephadex G 型交联葡聚糖凝胶溶胀所需时间	(221)
(五)聚丙烯酰胺凝胶技术数据	(221)
(六)层析介质的选择	(221)
(七)薄层层析分离各类物质常用的展层溶剂	(222)
四、硫酸铵饱和度常用表	(223)
(一)不同温度下饱和硫酸铵溶液的数据	(223)
(二)调整硫酸铵溶液饱和度计算表(0℃)	(223)
(三)调整硫酸铵溶液饱和度计算表(25℃)	(224)
五、细菌培养基、抗生素	(224)
(一)LB 培养基配制方法	(224)

(二)NZCYM 培养基配制方法	(225)
(三)NZYM 培养基配制方法	(225)
(四)高浓度肉汤配制方法	(225)
(五)SOB 培养基配制方法	(225)
(六)M9 培养基	(225)
(七)2×YT 培养基	(225)
(八)固体培养基	(225)
(九)常用抗生素溶液	(226)

第一篇 基本技能训练

第一章 实验室规则

一、学生实验守则

(一)学生每次实验前,必须按照实验教学计划和教材规定的实验项目认真预习实验内容,做好预习报告,明确实验目的,了解原理和操作规程。

(二)按时进入实验室,不得将与实验无关的物品带入室内,在教师的指导下认真操作。实验时不准做无关的事情,中途不得无故擅自离开。

(三)不准穿背心、拖鞋进入实验室。每次实验结束离开时,按要求洗净双手。

(四)室内保持安静,不得高声喧哗、接打手机、听音乐、谈笑打闹。实验室严禁吸烟,不准随地吐痰,不准吃零食和乱扔果皮纸屑。

(五)实验中,实事求是地记录数据,不抄袭、不伪造,保持严谨的科学态度。欲增加或改变实验内容,须事先征得教师同意。每次实验结束后,应将实验记录交实验指导教师审查、签字认可后,方可离开实验室。

(六)与本次实验无关的仪器设备及材料未经教师允许不得擅自自动用。不得将实验室内的仪器、材料及药品等带出实验室,违者通报批评并按其原值加倍罚款。损坏了仪器、设备必须立即向教师报告,并做出书面检查。责任事故者按《兰州大学实验室仪器设备的借用、损坏、丢失赔偿处理办法》进行赔偿处理。

(七)操作易燃性有机溶剂时,不能临近明火或用明火直接加热;沸水浴加热时,要放沸石或一端封死的毛细管,若在加热时发现无沸石则应冷却后再加入,防止爆沸冲出。

(八)实验中,如有毒气或腐蚀性气体产生时,应在通风橱中进行操作。必要时可戴好防护用具进行操作。启封易挥发溶剂瓶盖时,脸面要避开瓶口慢慢启开,以防气体冲在脸上。

(九)爱护仪器设备,节约用水、用电及实验材料。实验结束后应将实验用过的器材摆放整齐或交回,试剂用完后立即放回原处,不可调错瓶塞,以免污染。在实验过程中要随时做到仪器、水槽、实验柜、桌面、地上的清洁整齐,养成良好的习惯。

(十)做实验时注意安全,防止人身及设备事故的发生。若发生事故,要保持镇定,迅速切断电源,及时向指导教师报告,并保护现场,不得自行处理。

(十一)实验结束时,值日生负责当天实验室卫生,应将门、窗、水、电、煤气关好,室内打扫干净,并清点仪器后方可离去。

二、实验室安全防护知识

在生物化学与分子生物学实验室中,经常需要接触毒性强、有腐蚀性、易燃烧和具有爆炸性的化学药品,常常会使用易碎的玻璃器皿以及在煤气、水、电等高温电热设备的环境下

进行紧张而细致的工作,因此,必须十分重视安全工作。

(一)进入实验室首先应观察煤气总阀门、水阀门及电闸所处的位置。离开实验室时,一定要将室内检查一遍,应将水、电、煤气的开关关好,门窗锁好。

(二)使用电器设备(如烘箱、恒温水浴、离心机、电炉、电泳槽等)时,严防触电;绝不可用湿手或在眼睛旁视时开关电闸和电器开关。应该用试电笔检查电器设备是否漏电,凡是漏电的仪器,一律不能使用。

(三)对于其他气体存放容器使用的压力表、减压阀及管路都可能会由于损坏而造成气体泄漏,在空气中达到一定浓度后,遇明火有可能引发爆炸。所以,使用前要仔细检查气密性和防爆部件,定时对压力容器检验试压,发现气体泄漏及时处理。

(四)使用浓酸、浓碱时要小心谨慎,防止溅出。用移液管量取这些试剂时,必须使用洗耳球,绝对不能用品口吸取。稀释浓酸、浓碱时要严格按照操作规程进行。若不慎溅在实验台上或地面上,必须及时用湿抹布擦洗干净。如果触及皮肤应立即进行科学治疗。

(五)使用可燃物,特别是易燃物(如乙醚、丙酮、乙醇、苯、金属钠等)时,应特别小心。不要大量放在桌上,更不要放在靠近火焰处。只有在远离火源时,或将火焰熄灭后,才可大量倾倒易燃液体。低沸点的有机溶剂不准在明火上直接加热,只能在加热套或水浴上加热。不得在烘箱内存放、干燥、烘焙有机物。

(六)如果不慎倾出了相当量的易燃液体,首先要镇定,然后按下面方法处理:

1. 立即关闭室内所有的火源和电加热器。
2. 关门,打开窗户。
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瓶中。

(七)动物尸体或被解剖的动物器官应及时用专用塑料袋将其密封,集中焚烧或深埋处理。使用挥发性有毒、有害的生化试剂时必须在通风橱内进行。至于分子生物学实验经常用到的溴乙锭等卤化物,其残留物按要求进行无害化处理。

(八)易燃和易爆炸物质的残渣(如金属钠、白磷、火柴头)不得倒入污物桶或水槽中,应收集在指定的容器内。废有机溶剂不得倒入废物桶,只能倒入回收瓶,再集中处理。

(九)强酸和强碱之类的废液不能直接倒在水槽中,应先稀释,然后倒入水槽,再用大量自来水冲洗水槽及下水道。

(十)有毒物品应按实验室的规定办理审批手续后领取,使用时严格操作,用后妥善处理。

三、实验室灭火法

实验中一旦发生了火灾,切不可惊慌失措,应保持镇静。首先立即切断室内一切火源、电源和气源。然后根据具体情况正确地进行抢救和灭火或立即报火警(火警电话 119)。常用的方法有:

(一)在可燃液体燃着时,应立即拿开着火区域内的一切可燃物质,关闭通风器,防止扩大燃烧。若着火面积较小,可用抹布、湿布、铁片或砂土覆盖,隔绝空气使之熄灭。但覆盖时要轻,避免碰坏或打翻盛有易燃溶剂的玻璃器皿,导致更多的溶剂流出而再着火。

(二)酒精及其他可溶于水的液体着火时,可用水灭火。

(三)汽油、乙醚、甲苯等有机溶剂着火时,应用石棉布、灭火毯或砂土扑灭。绝对不能用

水,否则会扩大燃烧面积。

(四)金属钠着火时,可把沙子倒在它的上面。

(五)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灭火器灭火。

(六)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,火势过大时可用衣服、大衣等包裹身体,就地卧倒打滚压灭火焰。

(七)发生火灾时应注意保护现场,较大的着火事故应立即报警。

第二章 玻璃仪器的洗涤

一、生物化学与分子生物学实验常用玻璃仪器

生物化学与分子生物学实验中常用的普通玻璃仪器有试管、烧杯、研钵、容量瓶等(如图 2-1 所示)。

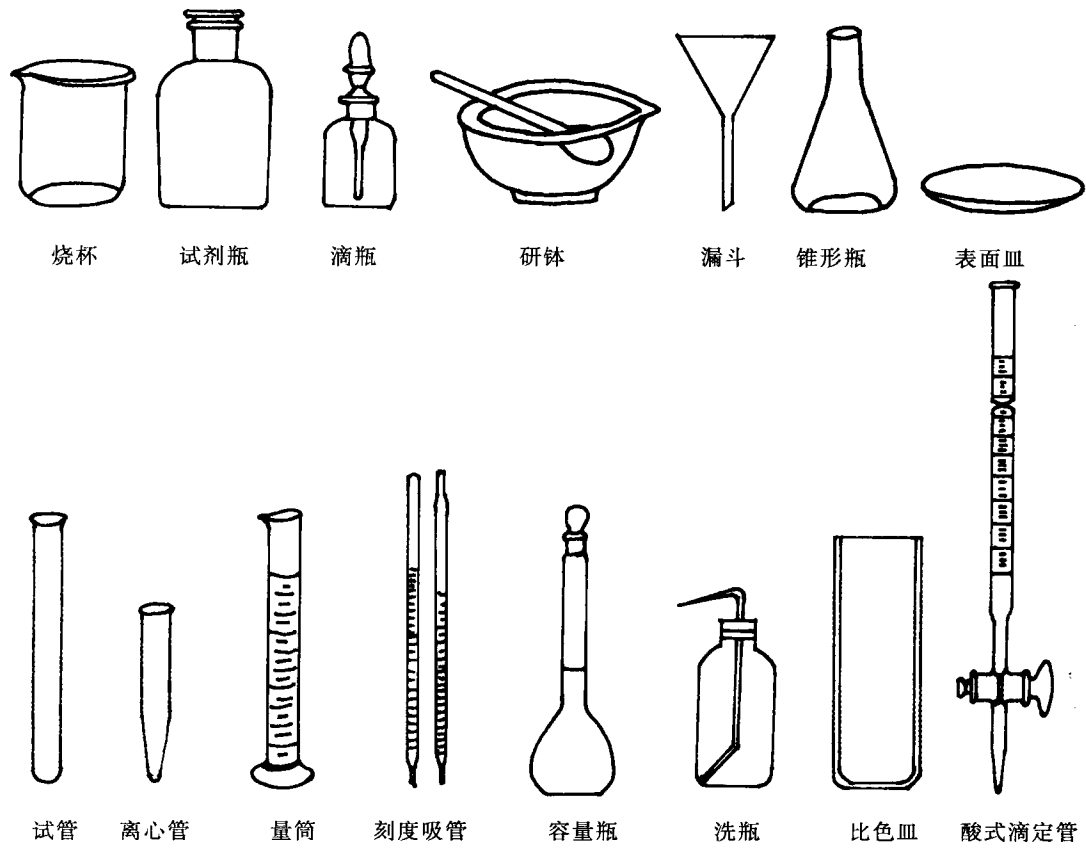


图 2-1 常用玻璃仪器

二、实验室常用的洗涤方法

(一)一般洗涤

肥皂水、合成洗涤剂、洗衣粉、去污粉是最常用的洗涤剂,它们的特点是使用方便、去污力好。这些洗涤剂含有十二烷基硫酸钠和十二烷基磺酸钠,属于阴离子表面活性剂,适合洗

涤油脂或某些有机物沾污的容器。使用时配制成 1%~2% 的温水溶液,直接用毛刷刷洗,即可除去一般玻璃仪器的污物。

(二)重铬酸钾洗液

称取 10g 工业纯重铬酸钾置于 500mL 烧杯中,加少量水溶解后,慢慢加入 200mL 粗硫酸(工业纯),边加边搅,如发现升温过高可放慢加硫酸的速度(注意:决不可将上述水溶液往浓硫酸里加,以免发生危险)。配制好的溶液应呈深红色。待溶液冷却后转入玻璃瓶中备用,因浓硫酸易吸水,应用磨口塞子塞好。容量仪器使用铬酸洗液时应特别小心。铬酸溶液为强氧化剂,腐蚀性很强,易烫伤皮肤,烧坏衣物;铬有毒,使用时应注意安全,绝对不能用口吸,只能用洗耳球。具体操作如下:

1. 使用洗液前,必须先将仪器用自来水和毛刷刷刷,倾尽水,以免洗液稀释后降低洗液的效率。

2. 用过的洗液不能随意乱倒,应倒回原瓶,以备下次再用。当洗液变绿而失效时,绝对不能倒入下水道,只能倒回废液缸内,另行处理。

3. 用洗液洗涤后的仪器,应先用自来水冲净,再用蒸馏水润洗内壁 2~3 次。

(三)5%磷酸三钠溶液

称取磷酸三钠($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)50g,加 1 000mL 蒸馏水溶解,该溶液呈碱性,有油污的玻璃器材放在此溶液中浸泡数小时,油污即可除去。

(四)45%尿素溶液

该液对蛋白质有较好的清除能力。有时玻璃器皿中残留的血液蛋白质难以洗去,用此浸泡液,可得满意效果。

(五)NaOH-KMnO₄ 水溶液

称取 10g KMnO_4 于 250mL 烧杯中,加入少量水使之溶解,向该溶液中慢慢加入 100mL 10% NaOH 溶液,混匀后储存在带有橡皮塞的玻璃瓶中备用。此洗涤液适用于洗涤油污及有有机物沾污的器皿。用此洗涤液洗后的器皿上如残留有沉淀物,可用 HCl - NaNO_2 混合液洗涤。

(六)KOH-乙醇溶液

适合于洗涤被油脂或某些有机物沾污的器皿。一般配制成 m/V 百分浓度的溶液。

(七) HNO_3 -乙醇溶液

适用于洗涤油脂或有机物沾污的酸式滴定管。使用时先在滴定管中加入 3mL 乙醇,沿管壁加入 4mL 浓硝酸,用小表面皿,或小滴帽盖住滴定管。让溶液在管中保留一段时间,即可除去污垢。

(八) HCl -乙醇(1:2)洗涤液

适合于洗涤染有颜色的有机物质的比色皿。

(九)超声波洗涤

在超声波清洗器中放入需要洗涤的仪器,再加入合适洗涤剂和水,接通电源,利用声波的能量和振动,就可把仪器清洗干净,既省时又方便。

三、常用玻璃仪器的洗涤

玻璃仪器是生物化学与分子生物学实验中必不可少的器材,它的清洁度直接影响着实验结果的准确性,因此,必须掌握仪器的清洗技术。