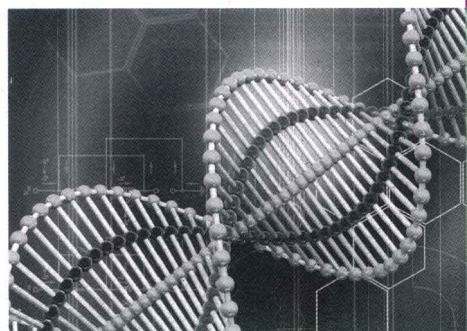


高等医药院校基础课实验教材

生物化学与 分子生物学



实验教程

SHENGWUHUAXUE YU
FENZISHENGWUXUE
SHIYAN JIAOCHENG

刘汉才 陈舒丽 主编



科学出版社

高等医药学校基础课实验教材

生物化学与分子生物学 实验教程

刘汉才 陈舒丽 主编

科学出版社

北 京

版权所有,侵权必究

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303

内 容 简 介

本书有四部分,其中第一部分为实验基本知识,包括第一章实验须知、第二章实验基本操作、第三章实验样品的制备、第四章常用的实验方法与技术,第二部分为基础验证性实验(实验一至十三),第三部分为综合提高性实验(实验十三至二十六),第四部分为研究创新性实验(实验二十七),最后附有主要参考文献和附录。

本书可用于高等院校临床医学、临床药学、医学生物工程、口腔、护理等专业本专科实验课教学。由于各专业的要求、学时不同,可根据实际情况选择实验项目。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验教程/刘汉才,陈舒丽主编. —北京:科学出版社,2013.9

高等医药院校基础课实验教材

ISBN 978-7-03-038634-2

I. 生… II. ①刘… ②陈… 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. ①Q5-33 ②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 218248 号

责任编辑:杨瑰玉 / 责任校对:王望容

责任印制:彭 超 / 封面设计:苏 波

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

武汉首壹印务有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

开本:787×1092 1/16

2013 年 9 月第 一 版 印张:8 1/2

2013 年 9 月第一次印刷 字数:186 000

定价:18.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《生物化学与分子生物学实验教程》

编者名单

主 编 刘汉才 陈舒丽

副主编 林 丽 邓秋红 王梅娟

编 者 (按姓氏笔画为序)

王梅娟 邓秋红 刘汉才 刘红梅 陈舒丽

陈 晓 罗丽丹 罗德生 金科华 郑红花

周立勇 高晚霞 秦灵芝

前 言

为了适应高校教学改革,提高教学质量,培养开拓、创新高级医学人才,生物化学与分子生物学实验从以验证型实验为主逐步向验证型、综合型、设计型三个层次的实验转变,通过这种转变希望学生能掌握生物化学与分子生物学实验的常用基本技术,使学生对生物化学与分子生物学实验技术的特点及其实际应用有初步了解。本教材是在原生物化学教研室 2007 年编写的《生物化学与分子生物实验教程》的基础上加以修改后精心编撰的,主要加强了实验基本技术的理论与操作的综合运用方面的内容,剔除了陈旧的实用性较差的实验,力求能给学生在实验方法与技术上有一个比较系统的、实用的基本技能训练,以及培养学生具有独立分析问题与解决问题的能力。

本教程主要包括四部分内容。第一部分为实验基本知识,包括实验须知、实验基本操作、实验样品的制备和常用的实验方法与技术,第二部分为基础验证性实验(实验一至十三),第三部分为综合提高性实验(实验十四至二十六),第四部分为研究创新性实验(实验二十七),最后附有附录和参考文献。

本教程适用于高等院校临床医学、临床药学、医学生物工程、口腔、护理等各专业本专科实验课教学。由于各专业的要求、学时不同,可根据实际情况选择实验项目。

限于编者水平,疏漏之处在所难免,望广大师生在使用过程中提出宝贵意见,以便于修订时完善。

编者

2013 年 6 月

目 录

第一部分 实验基本知识

第一章 实验须知	3
第二章 实验基本操作	5
第三章 实验样品的制备	8
第四章 常用的实验方法与技术	10

第二部分 基础验证性实验

实验一 蛋白质的定量实验	27
实验二 核酸的定量测定	32
实验三 DNA 琼脂糖凝胶电泳	39
实验四 血清尿素氮的测定	41
实验五 影响酶促反应的因素	43
实验六 底物浓度对酶促反应速度的影响(碱性磷酸酶米氏常数的测定)	46
实验七 丙二酸对琥珀酸脱氢酶的竞争抑制	49
实验八 血清乳酸脱氢酶同工酶分离——琼脂糖凝胶电泳法	51
实验九 β -胡萝卜素吸附层析分析	54
实验十 血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳	56
实验十一 血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	60
实验十二 血清总胆固醇含量测定	63
实验十三 聚合酶链反应技术(PCR)	67

第三部分 综合提高性实验

实验十四 动物肝组织中核酸的提取与鉴定	73
实验十五 肾上腺素与胰岛素对血糖浓度的影响	76
实验十六 饥饿与饱食对肝糖原含量的影响	79
实验十七 转氨基作用与氨基酸纸层析法	82
实验十八 质粒 DNA 的制备与纯化	85
实验十九 质粒 DNA 的酶切与琼脂糖电泳鉴定	88
实验二十 从琼脂糖凝胶中分离回收 DNA 片段	91
实验二十一 DNA 片段的连接反应	96
实验二十二 用重组质粒 DNA 转化大肠杆菌	98
实验二十三 蛋白质免疫印迹分析	101
实验二十四 Southern 印迹法	105
实验二十五 Northern 印迹法	108
实验二十六 聚丙烯酰胺凝胶电泳银染分析 DNA	111

第四部分 研究创新性实验

实验二十七 设计性实验	117
主要参考文献	118
附录一 各种洗涤液的配方及使用	119
附录二 实验室常用酸碱的比重和浓度	121
附录三 缓冲溶液的配制	122

第一部分

实验基本知识

第一章 实验须知

一、实验目的和要求

生物化学与分子生物学实验课是一门实践性很强的医学基础课程,是整个教学活动中一个重要的环节。实验课教学的目的不仅是通过实验验证生物化学与分子生物学的部分基本理论,巩固和加深理论课所学的知识,更重要的是要掌握生物化学与分子生物学实验的原理、基本操作技能和一般仪器的正确使用,培养独立的工作能力和正确的思维方法,养成严肃、认真、实事求是的科学作风和爱护国家财物、勤俭朴实的工作作风。

为了达到实验课教学的上述目的,要求同学们先做到:

- (1) 了解实验室规则,明确有关规章制度,并制定自己的学习计划。
- (2) 了解实验的基本操作要求,明确各项实验的训练目的。
- (3) 了解实验报告的书写格式,明确实验报告的书写要求。

二、实验室规则

(1) 实验前必须预习。预习实验指导和有关理论,明确实验目的,了解实验基本原理及实验操作的基本步骤或方法要点及注意事项,并计划安排好实验工作时间,以便顺利进行实验。

(2) 实验过程中应有严肃的态度、严密的方法、严格的操作。做到正规操作,周密观察,认真记录(记录要求真实、完整、原始、条理),实验程序未经指导教师商谈同意,不得随意更改。对实验结果要做出科学的分析,获得实事求是的结论。

(3) 遵守课堂纪律,保持实验室整洁安静,不得在实验室内吸烟、谈笑与打闹,不得随意缺课、迟到或早退。严格实验评分标准。

(4) 公用器材就原处使用,药品用毕须复原(原盖、原处放置),以免试剂错乱、污染,影响实验结果。

(5) 爱护器材,防止破损。若有损坏及时登记、并报告原因。凡属精密仪器,不得任意扳弄,如遇故障应立即报告指导教师,不得擅自拆修。

(6) 注意安全,厉行节约。一旦发生中毒、创伤触电或火灾等事故,应果断处理,并立即报告指导教师。不得将实验器材、药品试剂等拿出实验室。

(7) 实验后的动物、组织或标本、药品、试剂等统一由准备室教师收回。注意污物、废物的处理,水槽内勿放入易引起阻塞的物品。

(8) 实验完毕,清洗仪器,公用器材放回原处,不得锁入自己的柜内。

(9) 值日生要负责实验后清洁、整理实验室的工作,并关好门、窗、水、电。

三、实验报告书写及要求

(1) 实验报告书写是基本科学训练之一。每次需要完成的报告,必须按要求认真书写,

在规定时间内交指导教师评阅。

(2) 实验报告包括项目名称、日期、目的与原理、操作、现场记录、计算(指定量实验)、结果与讨论。其中,重点是操作与观察的现场记录以及对实验结果的分析讨论;操作过程可以用简表、流程图等方式表示;观察到的现象,一定要及时、真实、条理、详细记录下来;定量实验在实验报告本上记录原始数据,养成良好的科学工作习惯;目的与原理等项目,要求扼要说明,不要照抄课本或实验指导书,培养用自己的语言表达科学思维的能力。

四、训练项目安排及要点指导

本实验教程编写了两部分内容:第一部分为实验理论,第二部分为生物化学与分子生物学实验项目。每项实验又按实验目的、实验原理、实验材料、实验步骤及思考题等部分阐述。这些实验的总的要求是要掌握所做实验的原理、方法、操作技术及结果与意义,通过实验,了解、掌握及运用第一部分的内容。

第二章 实验基本操作

生物化学与分子生物学实验中需要运用多种基本操作,且这些基本操作的正确与否及熟练程度,对实验结果的准确性都会产生影响。因此,要求我们必须加强基本操作的训练,熟练掌握基本操作的方法。

一、玻璃仪器的清洗

1. 普通玻璃仪器的清洗

(1) 初用玻璃仪器的清洗。新购买的玻璃仪器(如试管、烧杯、烧瓶、试剂瓶等),先用肥皂水或清洁剂洗刷再用自来水冲洗,然后浸泡在 1%~2% 盐酸溶液中过夜(不少于 4 h),再用自来水冲洗,最后用蒸馏水冲洗 2 或 3 次,在 100~130 °C 烘箱内烤干或倒置在仪器架上风干备用。

(2) 用过的玻璃仪器的清洗。使用过的玻璃仪器应及时用自来水冲洗,再用毛刷蘸清洁剂刷洗数遍,然后用自来水反复冲洗,至容器内壁不挂水珠时为止,最后用少量蒸馏水冲洗后倒置在仪器架上。若发现内壁有难以去掉的污迹,通常放置在洗液中浸泡数小时或过夜后再用自来水反复冲洗,然后用蒸馏水冲洗 2 或 3 次。

注:洗液配制—取重铬酸钾 80 g 溶于 1 L 自来水中,慢慢加入工业硫酸 100 mL,边加边搅拌,冷却后储存备用。重铬酸钾的浓度不严格规定。

2. 容量分析仪器的清洗

吸量管、滴定管等,用完后立即用自来水冲洗,至内壁不挂水珠时再用蒸馏水冲洗,倒置在吸管架上干燥后备用。如果冲洗后仍不洁净,则应用铬酸洗液浸泡数十小时后再用自来水反复冲洗,最后用蒸馏水冲洗,倒置吸管架上干燥后备用。

3. 比色杯的清洗

比色杯用完后,立即用自来水反复冲洗,如果冲洗仍不洁净,则应用清洁剂或稀盐酸浸泡后再冲洗。忌用毛刷或粗糙物体摩擦,忌用碱液或强氧化剂清洗,以避免损坏其透光性能。

二、移液操作

1. 吸量管的使用

生化常用的吸量管分为刻度吸量管,刻度标记有自上而下和自下而上两种,规格有 0.1 mL、0.2 mL、0.5 mL、1 mL、2 mL、5 mL、10 mL 等。在一次完成移液的前提下,应选用容积较小的吸量管;对于同一次实验中同一试剂的移液,应选用同一支吸量管。具体使用

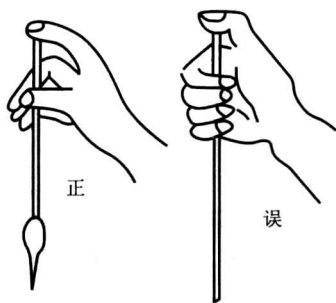


图 0-1

方法如下：

(1) 选择与体积要求相适应的吸量管。

(2) 使用刻度吸量管时，操作者拇指和中指及无名指、小指拿住吸量管的上端，食指按住吸量管的上口以便控制流速，同时将刻度数字朝向操作者(图 0-1)。

(3) 吸取液体时，操作者右手持吸量管上端，左手持橡皮球(持法同吸量管)，将吸量管伸入所取液体内部大约 0.1 cm 深处，同时将橡皮球捏扁按在吸量管上口，然后缓慢放松橡皮球吸取液体至所需液体刻度的上端 1.0~2.0 cm 处，移去橡皮球，立即用食指按住吸管口，然后将吸管提离液面，并使吸管

垂直，再慢慢松开食指使液面下降至所需刻度处，以吸管尖端触壁以除去多余的液体。

(4) 将吸管插入另一容器中松开食指，使液体流出。管尖残液是否需要吹出，视具体情况而定。一般来说，1 mL 及 1 mL 以下的均需吹出，大于 1 mL 的视标记而行，如果吸量管上方标有“吹”字，则残液需吹出；标有“快”字，应使残液自然流下。

(5) 放液时，吸管尖端应接触容器内壁，不能将吸管尖端插入容器内原有的溶液中，避免污染吸管和试剂。

2. 微量取液器的使用

微量取液器由本体和吸头两部分组成。使用时，将洁净的吸头安装在本体上，然后用拇指按压上部按钮到第一档，同时将尖端插入溶液中 3~4 mm 缓慢放松按钮，液体则被吸入吸头，擦拭尖端外壁以除去所沾液体。在加样品时，首先将尖端靠近容器内壁，缓慢按压按钮到第一档，以排出液体并持续 1~3 s，然后继续按压按钮到第二档使液体完全排出。在吸取不同的液体时应注意更换吸头，以免污染试剂。

三、溶液的混匀

实验中为保证化学反应得以充分进行，必须使反应体系中先后加入的各种试剂充分混匀。混匀溶液时应根据容器的不同及容器内溶液的多少，采用不同的方式进行混匀。

(1) 甩动混匀法：适用于试管中液体量较少的混匀。

(2) 弹指混匀法：适用于离心管、小试管内微量溶液的混匀。

(3) 旋转混匀法：适用于试管中液体量较多的混匀。

(4) 倒转混匀法：适用于有玻璃塞的试管或容量瓶内液体的混匀。

(5) 吸管混匀法：适用于液体量少且无沉淀的液体混匀。

(6) 旋涡器混匀：适用于样品较多时的液体混匀。

(7) 搅拌混匀法：适用于液体量较多且难于混匀的溶液混匀。

四、溶液的过滤

溶液进行过滤的目的是使液体与沉淀物分离开来，可以采用滤纸、纱布、棉花、抽滤等

方法进行过滤,根据实验要求具体选择。同时在过滤时应注意如下三点:

(1) 定量地收集滤液时,不能将滤纸先用水浸湿,以避免滤液的浓度被稀释而影响实验结果。

(2) 漏斗颈的出口不能与溶液接触,更不能将漏斗颈浸在滤液中。

(3) 漏斗边缘要比滤纸边缘高出 $0.5 \sim 1.0$ cm,滤纸锥体的三层一边应放在漏斗出口短的一边,漏斗出口长的一边应紧靠容器壁。

第三章 实验样品的制备

在生物化学与分子生物学实验中,无论是分析组织中各物质的含量,还是研究组织中物质代谢过程,都需利用特定的生物样品。掌握这些样品的收集与制备方法是做好生化实验的先决条件。

最常用的实验样品是人或动物的组织样品、血液样品或尿液样品,组织样品常采用肝、肾、胰或肌肉组织,血液样品常采用全血、血浆、血清或血滤液。

一、组织样品

离体不久的组织在适宜的温度及 pH 条件下,可以进行一定程度的物质代谢,因此在生化实验中,常利用离体组织来研究各种物质代谢途径与酶系的作用,也可以从中提取各种代谢物质及酶进行研究。

各种组织器官离体过久,其物质含量及生物活性都将发生变化。因此,当利用离体组织作为提取材料或代谢研究材料时,应在低温条件下尽快处理。

一般采用断头法处死动物,放出血液,立即取出所需脏器或组织,除去外层脂肪及结缔组织并用冷生理盐水洗去血液后,再用滤纸吸干。根据不同目的,制成不同的组织样品。

(1) 组织糜:将组织用剪刀或绞肉机迅速剪成糜状。

(2) 组织匀浆:将剪碎的组织倒入电动匀浆器或玻璃匀浆器中并加入适量冰冷的匀浆制备液磨成匀浆。由于匀浆过程中快速摩擦而产生热量,匀浆制备过程中应将匀浆管置于冰水中。

注:匀浆制备液通常用生理盐水、蔗糖溶液或适当的缓冲液等。

(3) 组织浸出液:组织匀浆低速离心后所收集的上清液即组织浸出液。

二、血液样品

(1) 全血:在收集血液时,既要注意收集器皿的清洁与干燥,又要及时加入适当的抗凝剂以防血液凝固。一般在取出血液后迅速盛于含有抗凝剂的干燥试管或烧杯中,同时轻轻摇动使血液和抗凝剂充分混匀即得全血。全血如果不立即使用,应在冰箱中储存,不能冰冻以防溶血。

(2) 血浆:全血离心后所得的上清液即为血浆,血浆制备过程中要谨防溶血。

(3) 血清:收集血液时不加抗凝剂,在室温下血液自行凝固 2~3 h 后可分离出血清。在做生物活性物质的实验时,为了避免血样在室温中放置时间过长以至待测物失活,可采血 20~30 min 后离心使血块下沉,收集上清液即血清,制备血清时也要防止溶血,如需低温存放,应先与血块分离。

(4) 无蛋白血滤液:许多生化分析中,为避免蛋白质干扰,需预先除去血液中蛋白质成

分,制成无蛋白血滤液后再进行分析测定。

三、尿液样品

一般定性实验可随时收集尿液样品,但一天之中各次排出尿液的成分随饮食状况及生理条件的不同有很大的差异,因此定量测定尿液中的各种成分应收集 24 h 尿液,混合后再取样。通常,在早晨某一时间排出的尿液应弃去,以后将每次排出的尿液收集在一起,包括次日早晨同一时间排出的尿液,随即混合后取样。此法非常繁琐,在临床上常常难以做到,因此一般情况下定量测定只收集一次尿,但必须以肌酐作定量参照。

收集的尿液如不能立即实验,应低温保存,长时间保存还需加入防腐剂,通常每升尿液加入约 5 mL 的甲苯或盐酸即可。

收集实验动物尿液时,可将动物放在代谢笼中,再按上述方法通过代谢笼下的漏斗收集动物 24 h 的尿液。

第四章 常用的实验方法与技术

第一节 分光光度法

一、朗伯-比尔定律

物质有发射光谱并对光谱有选择性吸收的特性,因而物质在可见光谱内能呈现不同的颜色。不同物质由于其分子结构不同,其发射光谱和吸收光谱也各不相同,对不同波长光线的吸收能力也不同,因而每种物质都具有其特异的吸收光谱。相同的物质在一定条件下,其发射光谱或吸收光谱的强度与该物质的含量存在着正比例关系。因此,把根据物质吸收光谱的特性进行定性或定量分析的方法称为吸收光谱法或分光光度法。分光光度法所使用的光谱范围包括可见光、红外光和紫外光。

分光光度法是利用物质对光线的吸收性质,根据朗伯-比尔(Lambert-Beer)定律建立起来的一种分析方法。当一单色光(I_0)通过一浓度为 C ,厚度为 L 的溶液介质时,该物质将对此入射光进行吸收,使透过的光强度(I)减弱,两者的比值即为透光率 $T(T = \frac{I}{I_0})$, T 值应该小于 1,表示溶液介质吸收了某一部分的光能,其对光吸收的程度称为光密度、吸光度或消光度,用 D 或 A 表示。吸光度与溶液的浓度和液层的厚度的乘积成正比,这就是朗伯-比尔定律,即

$$A = -\lg T = \lg \frac{I_0}{I} = KCL$$

式中,若 L 单位为 cm , C 单位为 g/L ,则比例常数 K 称为吸光系数,单位为 $\text{L}/(\text{g} \cdot \text{cm})$,其值取决于入射光的波长、溶液的性质和温度等,而与光的强度、溶液的浓度及液层的厚度无关;若 L 单位为 cm , C 单位为 mol/L ,上式中的 K 用 Σ 表示,则得到 $A = \Sigma LC$,其中 Σ 称为物质的摩尔吸光率或摩尔吸光系数,单位为 $\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$,其值相当于 $L = 1 \text{ cm}$, $C = 1 \text{ mol/L}$ 时,在一定波长下的吸光度,它是物质的特性常数。

朗伯-比尔定律是讨论有色溶液对单色光的吸收程度、溶液的浓度及液层厚度间的定量关系。根据此定律,吸光度与物质浓度在一定范围内成正比,可得到物质的含量。

在吸光光度分析中,通常固定溶液的厚度不变,然后用比色计或分光光度计测量一系列标准溶液的吸光度。根据朗伯-比尔定律,吸光度与被测物质的浓度成正比,以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标作图,得到一条通过原点的直线,此直线称为标准曲线或工作曲线。一条理想的标准曲线应是斜率接近于 1 且通过原点的直线,其范围应在被测物浓度的一半到两倍之间,吸光度在 0.05~1.0。在实际工作中经常发现标准曲线不为直线的情况,特别是浓度较高时,明显可见曲线向浓度轴弯曲,这种情况称为偏离朗伯-比尔定律。引起偏离的原因有:

(1) 由非单色光引起的偏离。朗伯-比尔定律严格来讲,只适用于单色光,但在实际工作中很难得到理论上的纯单色光,故朗伯-比尔定律中的 K 值往往随使用的仪器不同而不