

EXPERIMENTAL TECHNIQUES COURSE
OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY



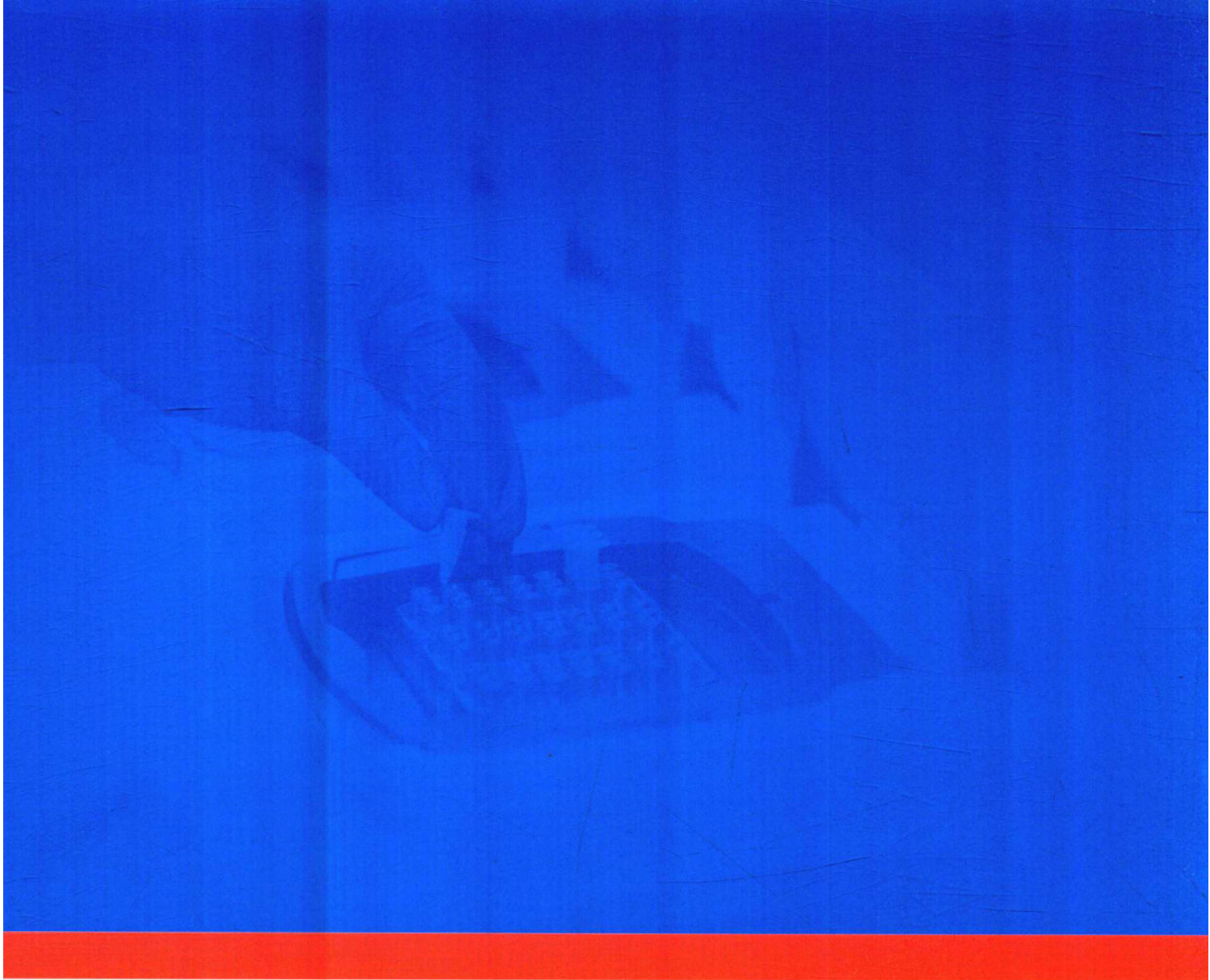
基础医学实验系列

生物化学与分子生物学 实验技术教程

主编 龙子江 宋 睿



中国科学技术大学出版社



定价: 30.00 元

责任编辑 饶静云 汪 媛
封面设计 刘俊霞

ISBN 978-7-312-04825-8



基础医学实验系列

EXPERIMENTAL TECHNIQUES COURSE
OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

生物化学与分子生物学 实验技术教程

主 编 龙子江 宋 睿

副主编 王 靓 洪星辉

编 委 (以姓氏笔画为序)

王 浩 王 靓 王舒舒 龙子江

吕 磊 江传玮 宋 睿 张新芳

张道芹 邹莹莹 俞丽华 洪星辉

徐志庆 高华武 鲍 鑫

中国科学技术大学出版社

此为试读, 需要完整PDF请访问: www.ertongbook.com

内 容 简 介

本书结合现代医药学操作技术研究发展的要求,以培养医药学专业学生医用化学和生物化学与分子生物学方面实验操作技能为目的。全书共分为2篇。第一篇共9章,主要介绍生物化学和分子生物学实验的基本理论,包括生物大分子物质的制备技术、分光光度技术、电泳技术、离心技术、层析技术、核酸的分离纯化技术等,系统扼要地介绍了现代生物化学和分子生物学技术的精华。第二篇主要介绍与技术相关的医用化学实验、生物化学和分子生物学实验,一共19个。通过教师讲授和实际操作,学生将受到系统的生物化学和分子生物学实验方法和技术的训练,能够获得生物化学和分子生物学基本实验技术的理论和系统、新颖、实用的实验技能,为将来从事科学研究奠定基础。

本书适合医药院校本科和专科医学专业和药学专业的学生学习使用。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验技术教程/龙子江,宋睿主编. —合肥:中国科学技术大学出版社,2020.1

ISBN 978-7-312-04825-8

I. 生… II. ①龙… ②宋… 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(2019)第 283787 号

出版 中国科学技术大学出版社
安徽省合肥市金寨路 96 号,230026
<http://press.ustc.edu.cn>
<https://zgkxjsdxcb.tmall.com>
印刷 合肥市宏基印刷有限公司
发行 中国科学技术大学出版社
经销 全国新华书店
开本 710 mm×1000 mm 1/16
印张 11.25
字数 221 千
版次 2020 年 1 月第 1 版
印次 2020 年 1 月第 1 次印刷
定价 30.00 元

前 言

传统教学重理论轻实验,实验课仅仅是理论课的附属品,教材建设方面也是重理论而轻实验,以简单、够用为度,难以自成体系。随着教育改革发展,实验教学的地位明显提高,实验课逐渐形成一门独立、完整的课程,实验内容紧密结合各学科的发展和实验手段的改进,实验课技术含量不断增加,减少验证性实验,增加综合性实验和创新性实验,培养学生的创新意识和能力,为社会培养新型实用性人才。实验技术既是生物化学与分子生物学学科形成和发展的基础,也是该学科完整体系的重要组成部分。理论体系和实验体系应相辅相成,同等重要。为了顺应生物化学与分子生物学学科的发展,我们以原生物化学实验教材为基础,结合现代技术和学科发展的需要,编写了本书。

本书既可自成体系,凸显实验教学的地位,也可与理论教材配套使用。

本书以大学本科医学专业及药学专业的学生为主要读者群,结合安徽中医药大学“生物化学与分子生物学”课程和人才培养大纲进行编写,对学习生物化学与分子生物学和医用化学的知识有指导意义。全书共分为2篇。第一篇共9章,主要介绍生物化学和分子生物学实验的基本理论,包括生物大分子物质的制备技术、分光光度技术、电泳技术、离心技术、层析技术、核酸的分离纯化技术等,系统扼要地介绍了现代生物化学和分子生物学技术的精华。第二篇主要介绍与技术相关的医用化学实验、生物化学和分子生物学实验,一共19个。通过教师讲授和实际操作,学生将受到系统的生物化学和分子生物学实验方法和技术的训练,能够获得生物化学和分子生物学基本实验技术的理论和系统、新颖、实用的实验技能,为将来从事科

学研究奠定基础。

由于本书涉及的知识面广,编写人员的水平有限,在编写过程中难免存在不妥之处,敬请广大读者批评指正。

编者

2019年12月

目 录

前言	(i)
----------	-------

第一篇 生物化学与分子生物学实验基础知识

第一章 实验室管理——实验达到最佳效果的前提	(2)
第一节 实验室规则	(2)
第二节 实验用品的清洗	(3)
第三节 实验样品的保存	(5)
第四节 常规实验仪器的使用	(7)
第五节 实验数据的常用处理方法	(19)
第六节 实验报告的撰写与要求	(20)
第二章 生物大分子制备技术——如何分离纯化生物大分子	(22)
第一节 前处理和细胞分离	(23)
第二节 分离与纯化	(27)
第三节 提纯后的处理	(34)
第三章 分光光度技术——测定物质的吸收光谱	(38)
第一节 分光光度技术的基本原理	(38)
第二节 分光光度计的基本构造	(39)
第三节 常用分光光度计的使用方法	(41)
第四节 分光光度法在生物化学和分子生物学实验技术中的应用	(42)
第四章 电泳技术——有效分离带电粒子	(45)
第一节 电泳技术的形成和发展	(45)

第二节	基本原理和影响泳动率的因素	(46)
第三节	电泳技术的分类	(48)
第五章	离心技术——利用离心场沉降高分子	(53)
第一节	离心技术的基本原理	(53)
第二节	离心机的类型、操作流程和操作注意事项	(54)
第三节	制备性超速离心的分离方法	(56)
第六章	层析技术——分开混合物中的各组分	(58)
第一节	层析技术概述	(58)
第二节	层析技术的基本原理	(61)
第三节	吸附层析	(61)
第四节	凝胶层析	(64)
第五节	离子交换层析	(68)
第七章	分子杂交技术——探查核酸序列	(73)
第一节	核酸分子杂交的基本原理	(73)
第二节	核酸探针	(75)
第三节	常见核酸分子的杂交类型	(78)
第八章	聚合酶链式反应(PCR)技术——微量 DNA 的体外扩增	(81)
第一节	PCR 技术的基本理论	(81)
第二节	PCR 技术的发展和应 用	(85)
第三节	PCR 的衍生技术	(86)
第四节	样品的处理与注意事项	(88)
第九章	核酸的分离纯化技术——离心技术的应用	(92)

第二篇 生物化学与分子生物学实验

实验一	蛋白质的沉淀、变性反应	(96)
实验二	紫外吸收法测定蛋白质含量	(99)

实验三	血清甘油三酯含量测定	(102)
实验四	血清丙氨酸氨基转移酶活性测定(赖氏法)	(105)
实验五	血糖的定量测定(葡萄糖氧化酶法)	(109)
实验六	血清高密度脂蛋白——胆固醇的含量测定	(112)
实验七	激素对血糖浓度变化的影响	(115)
实验八	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)测定蛋白质的 相对分子量	(118)
实验九	血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	(122)
实验十	DNA 的纯度、浓度的测定及 DNA 琼脂糖凝胶电泳技术	(126)
实验十一	DNA 的限制性内切酶的电泳分析和酶切图谱分析	(130)
实验十二	质粒 DNA 的大量制备与纯化	(137)
实验十三	含重组质粒的细菌菌落的鉴定	(141)
实验十四	凝胶过滤层析法测定蛋白质分子量	(144)
实验十五	Southern 杂交	(150)
实验十六	Northern 杂交	(154)
实验十七	聚合酶链反应体外扩增 DNA(PCR)	(157)
实验十八	TRNzol 法提取 RNA	(162)
实验十九	动物肝脏 DNA 的提取及含量测定	(165)
参考文献		(169)

第一篇 生物化学与分子生物学 实验基础知识

第一章 实验室管理——实验达到最佳效果的前提

生物化学与分子生物学实验技术是一门指导学生熟悉实验操作过程、掌握科学探索方法、验证基本理论的重要课程。重在培养学生的动手能力、思维创新能力和团队协作能力,为其今后的医学、药学实践打好基础。实验室是学生进行技能训练的重要场所。实验室除了必备的实验设备、实验材料和实验教师外,还必须具备良好的实验环境和较为完善的安全设施、应急预案,以确保实验结果的质量和实验室安全运行。

第一节 实验室规则

一、实验室环境保护及安全管理制度

- (1) 在实验过程中,要保持实验室的肃静,不要大声喧哗。
- (2) 要爱护实验仪器,尽量避免破损,节约使用实验试剂、水和电。若不慎损坏了实验仪器,须及时填写仪器破损单,注明破损原因,经指导教师同意后,方可换领,并按学院的规定进行赔偿和处理。
- (3) 保护实验台,不要将高温物品直接放在台面上,切勿将强酸、强碱等洒在台面上。
- (4) 在实验过程中,从试剂瓶中取完试剂后应及时将瓶盖盖好,放回原处,禁止乱扔乱放。切不可将取出的试剂放回到试剂瓶中。
- (5) 废弃的液体和固体物须按要求倒入规定的废液(物)缸内。实验动物尸体要按要求放在指定的地方。
- (6) 实验结束后,实验仪器应根据不同用途分类存放,定位入柜,存放整齐,做好防尘、防潮、避光等工作。对于贵重仪器和易燃、易爆、剧毒药品须设置专用柜,双人双管,防止发生意外事故。

(7) 实验室仪器、药品等未经领导批准一律不得外借。平时仪器的保管、保养及维修工作,要做到保管与保养结合,使仪器经常保持良好的使用状态,以延长其使用寿命。

(8) 在整个实验过程中,要保持实验台面整洁;实验完毕后,要清理实验台,打扫实验室,检查完电、火、水后再离开实验室。

二、实验操作要求

(1) 实验前应针对实验内容结合相关理论进行预习。

(2) 应在课前 10 min 到达实验室,并登记验证。

(3) 要认真倾听实验室老师对实验过程的讲解,如有不懂或不清楚的地方要及时与老师沟通。

(4) 实验中应严格按照实验步骤进行,认真观察并记录实验结果。

(5) 实验结束后,要认真总结分析实验结果,并结合理论知识进行解释。

(6) 实验结束后,要安排人员打扫卫生,将实验过程中的废弃物倾倒在指定地点,不能随意丢弃。

(7) 要结合实验结果认真撰写实验报告,对实验过程中出现的问题要进行仔细分析,查明原因,必要时重新进行实验。

第二节 实验用品的清洗

一、玻璃仪器的清洗

实验中所用的玻璃仪器的清洁与否,会直接影响实验结果,仪器不清洁或被污染会造成较大的实验误差,有时甚至会导致实验的失败。生物化学和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 生物化学和分子生物学实验中,蛋白质、酶、核酸等往往都是以“mg”和“ μg ”计的,稍有杂质,影响就很大。② 生物化学和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(钙离子、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)彻底清洗干净就显得非常重要。

1. 新的玻璃仪器的清洗

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%~25% HCl 溶液中过夜(不可少于 4 h),再用自来水冲洗,最后用无离子水冲洗 2 次,在 100~120 °C 烘箱内烘干备用。

2. 使用过的玻璃仪器的清洗

先用自来水洗刷玻璃仪器至无污物,然后用合适的毛刷沾上去污剂(粉)洗刷,或浸泡在 0.5% 的清洗剂中使用超声清洗(比色皿绝不可使用超声清洗),然后用自来水彻底洗净去污剂,再用双蒸水洗两次,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,否则要重洗。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)再重新清洗。

3. 石英和玻璃比色皿的清洗

石英和玻璃比色皿不可用强碱清洗,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是内、外壁不挂水珠。

二、塑料器皿的清洗

聚乙烯、聚丙烯等制成的塑料器皿,在生物化学和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 8 mol/L 尿素(用浓盐酸调 pH=1)清洗,接着依次用无离子水、1 mol/L KOH 和无离子水清洗,然后用 1.0×10^{-3} mol/L EDTA 除去金属离子的污染,最后用双蒸水彻底清洗,以后每次使用时,可只用 0.5% 的去污剂清洗,然后用自来水和双蒸水洗净即可。

三、洗液的配制方法

洗液由浓硫酸、重铬酸钾组成,现已确定铬有致癌作用,因此配制和使用洗液时要极为小心,常用的配制方法有以下两种:

(1) 量取 100 mL 工业浓硫酸置于烧杯内,小心加热,然后慢慢加入 5 g 重铬酸钾粉末,边加边搅拌,待全部溶解并缓慢冷却后,贮存于磨口玻璃瓶内。

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

四、其他洗涤液的使用范围

(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-2Na)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) KOH 的乙醇溶液和含有高锰酸钾的 NaOH 溶液是两种强碱性的洗涤液,对玻璃仪器的侵蚀性很强,可清除容器内壁的污垢,洗涤时间不宜过长,使用时应小心谨慎。

五、玻璃和塑料器皿的干燥

生物化学和分子生物学实验中用到的玻璃和塑料器皿经常需要干燥,通常都是在 $110\sim 120\text{ }^\circ\text{C}$ 的烘箱或烘干机中对其进行干燥,不要用丙酮荡洗后再吹干的方法干燥,因为那样处理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。

第三节 实验样品的保存

一、血液样品的保存

采集的血液样品如不能及时进行实验,必须做适当的处理,以防止其成分发生变化。通常血清和血浆样品保存于密闭的试管中,于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱内或冷冻保存。短时间(48 h)内全血样品应保存于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱内,实验时,样品恢复室温之后轻轻地颠倒数次,使血液充分混匀,方可实验。如果样品需要运送,24 h 内能送达实验室的,可保存于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保温箱内;24 h 不能抵达实验室的,必须冷冻处理并在低温条件下运输。长时间贮存的应将样品保存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱内。

二、尿液样品的保存

尿液中含有多种代谢产物。由于 24 h 内尿液所含化学物质的量会随着进食、进水、运动等具体情况而有所变动,所以做定量测定时,应收集 24 h 尿液。根据测定项目的不同,也可定时收集尿液,即一天中某一时间的尿液,如晨起空腹排出的晨尿,或做某种实验性测定时,要在服药后数小时采集尿液。

尿液应倒入有盖的清洁容器内。收集完毕后,立即量出总量并记录,以便计算待测物质在尿液中的含量。临检时,应将尿液摇匀,取适量的尿液测定。收集的尿液如不是立即进行实验,则需要置于阴凉处保存。为防止尿液腐败变质,影响测定结果,必要时可在收集尿液时加入防腐剂,通常每升尿液中约加入 5 mL 防腐剂。通常测定含氮物质时,用甲苯(5 mL/L 尿液)做防腐剂;测定激素的代谢物及无机盐时,宜采用浓盐酸(5 mL/L 尿液)做防腐剂。

三、组织样品的保存

离体不久的组织在适宜的温度及 pH 等条件下,仍可以进行一定程度的物质代谢。因此在生物化学与分子生物学实验中,常用离体组织来研究各种物质代谢的途径与酶系的作用,也可以从组织中分离和提取 DNA、RNA、酶及各种代谢物质。所以,处理动物组织使之符合实验要求,是生化实验中的基本技能之一。

动物各种组织器官离体过久都会发生变化,如一些酶在久置后会变性失活。因此利用离体组织进行代谢研究或作为提取材料时,必须迅速取出,尽快提取和测定。宰杀动物并放出血液后,立即取出实验所需的脏器或组织,除去外层脂肪及结缔组织,用冰的生理盐水洗去血液,必要时也可用冰的生理盐水灌注脏器并洗去血液,用滤纸吸干即可。

不同使用目的的标本保存时间有所差别。用于研究实验的标本,在新鲜取材后,先用液氮冷冻,再置于 -80°C 冰箱中保存。依据不同的科研需要确定标本的保存时间。一般用于 DNA 和 RNA 提取及其他分子生物学研究的标本,需要将组织切割成直径小于 1 cm 的组织块,然后保存。有条件的实验室,也可将标本置于液氮中长期保存。用于普通染色观察的标本,以 4% 的甲醛溶液常温固定,一般可以保存 1 个月。用于教学的标本,先暴露最显著的病变部位,然后进行固定,可以长期保存。

第四节 常规实验仪器的使用

一、移液器材

准确的分析方法对于生物化学和分子生物学实验是极为重要的,在各种生物化学和分子生物学分析技术中,首先要熟练掌握的就是准确的移液技术。下面列出了一些生物化学和分子生物学实验中常用的移液器具。

1. 滴管

滴管使用方便,可用于半定量移液,其移液量为 1~5 mL,常用 2 mL,可换不同大小的滴头。常用的滴管有橡皮头玻璃滴管(图 1.1.1)和一次性塑料滴管(图 1.1.2)。滴管有长、短两种,新出一种带刻度和缓冲泡的滴管,比普通滴管移液更准确,并可防止液体吸入滴头。

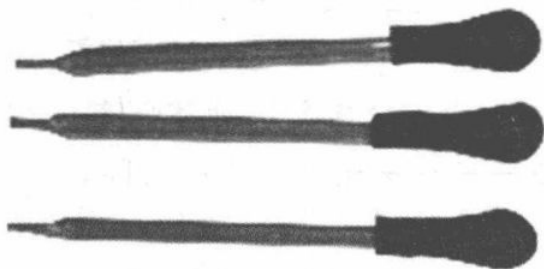


图 1.1.1 橡皮头玻璃滴管



图 1.1.2 一次性塑料滴管

2. 吸管

吸管使用前应清洗至内壁不挂水珠,1 mL 以上的吸管,用吸管专用刷刷洗,0.1 mL、0.2 mL 和 0.5 mL 的吸管可用洗涤剂浸泡,必要时可以用超声清洗器清洗。由于铬酸洗液致癌,应尽量避免使用。若有大批量的吸管需要洗后冲洗,可使用冲洗桶,将吸管尖端向上置于桶内,用自来水多次冲洗后再用蒸馏水或无离子水冲洗。吸管分为以下几种:

(1) 胖肚吸管(图 1.1.3)的精确度较高,其相对误差 A 级为 0.7%~0.8%,B 级为 1.5%~1.6%,液体自标线处流至口端(留有残液),A 级需等待 15 s,B 级需

等待 3 s。

(2) 分度吸管(图 1.1.4)的管身为粗细均匀的玻璃管,上面均匀刻有表示容积的分度线,其准确度低于胖肚吸管。分度吸管的准确度等级分为 A 级(0.2%~0.8%)和 B 级(0.4%~1.6%),其中 A 级为较高级,B 级为较低级。A 级、B 级在吸管管身上分别有 A、B 字样,有“快”字则为快流式,有“吹”字则为吹出式,无“吹”字的吸管不可将管尖的残留液吹出。吸、放溶液前要用吸水纸擦拭管尖。

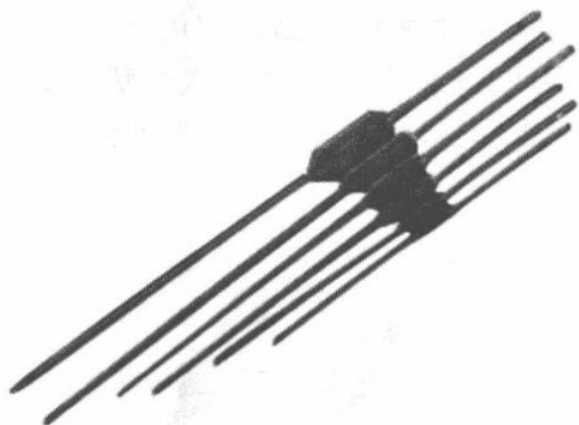


图 1.1.3 胖肚吸管



图 1.1.4 分度吸管

(3) 血清吸管的刻度一直刻到管端出口处,由于没有管尖,血清吸管不会残留液体,但需在液体流完后停留 15~20 s,血清吸管常用于吸取血清等黏度大的液体。

(4) 微量 λ 吸管用于 1~500 μL 的移液,用吸水纸蘸出多吸的液体。

(5) 毛细微量吸管用于 1~20 μL 的移液,常用于薄层层析和纸层析的点样。吸管吸取溶液时最常用的是洗耳球。此外,为了便于移液,还可以使用新式的吸液球,球上有 A、B、C 三个玻璃珠阀门,吸液之前,先用拇指和食指按捏 A 阀,用其他手指挤压球体,由 A 阀排气,使球内形成负压,插入吸管吸液时,用拇指和食指按捏 B 阀,将溶液吸至所需刻度,放液时按捏 C 阀,直至溶液流尽。若需吹出管尖残液时,可在按捏 C 阀的同时,用中指挤压 C 阀前面的小球泡,即可吹出管尖残液。还有一种“吸管泵”,使用更加方便,插入吸管后,用拇指转动上部的小轮,即可使圆柱形泵内的柱塞上下移动,将溶液吸入或排出吸管,尤其是在移取 10 mL 以上的溶液时,用“吸管泵”最为方便。