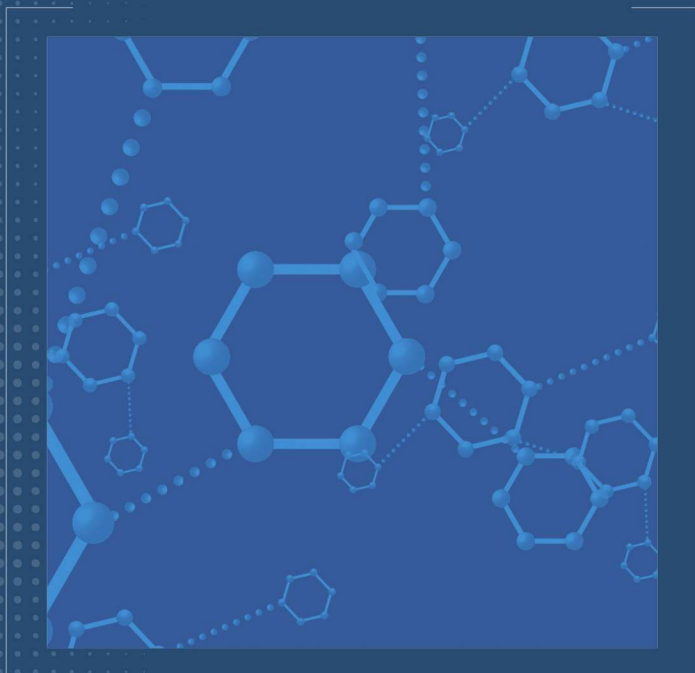


卓越农林人才培养实验实训教材

本书配有学习交流群

SHENGWU HUAXUE
YU
FENZI SHENGWUXUE
SHIYAN



向 恒 张瑞芝 王 炜 吴荣华 主编

生物化学 与分子生物学实验



西南师范大学出版社
国家一级出版社 全国百佳图书出版单位

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学与分子生物学实验 / 向恒等主编. — 重庆:
西南师范大学出版社, 2019.6
卓越农林人才培养实验实训教材
ISBN 978-7-5621-9774-4

I. ①生… II. ①向… 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.
①Q5-33②Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2019)第082495号

生物化学与分子生物学实验

主编 向 恒 张瑞芝 王 炜 吴荣华

责任编辑: 杜珍辉 魏焯昕

责任校对: 刘 凯

装帧设计: 观止堂_未 氓 黄 冉

排 版: 重庆大雅数码印刷有限公司·夏洁

出版发行: 西南师范大学出版社

印 刷: 重庆紫石东南印务有限公司

幅面尺寸: 195 mm×255 mm

印 张: 14

字 数: 270千字

版 次: 2019年11月 第1版

印 次: 2019年11月 第1次印刷

书 号: ISBN 978-7-5621-9774-4

定 价: 45.00元

这是一本配备学习交流群的实验教材

建议配合二维码一起使用本书

使用说明

本书配有学习交流群，您可以在群内与其他读者交流，解决阅读过程中的疑问，
共同交流、共同提高；还可以在群内回复关键词获取本书相关学习资源。

入群步骤

- 1 用微信扫描本页二维码；
- 2 根据提示加入本书学习交流群；
- 3 群内回复关键词领取学习资源。

群资源介绍

- 拓展资料** 获取相关实验文献资料，了解学科前沿理论。
- 课程 PPT** 获取相关实验课程 PPT，巩固学科知识。
- 资源合集** 获取生物信息软件及生物信息数据，让学习更高效。

高效学习，省时省力



微信扫描二维码
加入本书交流群

卓越农林人才培养实验实训教材

生物化学 与分子生物学实验

主 编

向 恒 张瑞芝 王 炜 吴荣华

副 主 编

王 营 罗献梅 许金山 徐玉薇

编写人员

王 炜（西南大学动物科技学院）

王 营（西南医科大学基础医学院）

王 琳（西南大学药学院）

向 恒（西南大学动物科技学院）

刘含登（重庆医科大学基础医学院）

许金山（重庆师范大学生命科学学院）

吴荣华（西南大学动物科技学院）

张瑞芝（西南大学药学院）

陈 洁（西南大学生物技术学院）

罗 洁（重庆文理学院园林与生命科学学院 / 特色植物研究院）

罗献梅（西南大学动物科学学院）

徐玉薇（西南大学动物科技学院）



西南师范大学出版社
国家一级出版社 全国百佳图书出版单位

卓越农林人才培养实验实训教材

总编委会

主任

刘娟 苏胜齐

副主任

赵永聚 周克勇

王豪举 朱汉春

委员

曹立亭 段彪 黄兰香

黄庆洲 蒋礼 李前勇

刘安芳 宋振辉 魏述永

吴正理 向恒 赵中权

郑小波 郑宗林 周朝伟

周勤飞

2014年9月,教育部、原农业部(现农业农村部)、原国家林业局(现国家林业和草原局)批准西南大学动物科学专业、动物医学专业、动物药学专业本科人才培养为国家第一批卓越农林人才教育培养计划专业,学校与其他卓越农林人才培养高校广泛开展合作,积极探索卓越农林人才培养的模式、实训实践等教育教学改革,加强国家卓越农林人才培养校内实践基地的建设,不断探索校企校地协调育人机制的建立,开展全国专业实践技能大赛等,在卓越人才培养方面取得了巨大的成绩。西南大学水产养殖学专业、水族科学与技术专业同步与国家卓越农林人才培养计划专业开展了人才培养模式改革等教育教学探索与实践。2018年10月,教育部、农业农村部、国家林业和草原局发布《关于加强农科教结合实施卓越农林人才教育培养计划2.0的意见》明确提出,经过5年的努力,全面建立多层次、多类型、多样化的中国特色高等农林教育人才培养体系,提出了农林人才培养要开发优质课程资源,注重体现学科交叉融合、体现现代生物科技课程建设新要求,及时用农林业发展的新理论、新知识、新技术更新教学内容。

为适应新时代卓越农林人才教育培养的教学需求,促进“新农科”和“双万计划”顺利推进,进一步强化本科理论知识与实践技能培养,西南大学联合相关高校,在总结卓越农林人才培养改革探索与实践的经验基础之上,结合教育部《普通高等学校本科专业类教学质量国家标准》以及教育部、财政部、国家发展与改革委员会《关于高等学校加快“双一流”建设的指导意见》等文件精神,决定推出一套“卓越农林人才培养实验实训教材”。本套系列教材包含动物科学、动物医学、动物药学、中兽医学、水产养殖学、水族科学与技术等本科专业的学科基础课程、专业发展课程和实践等教学环节的实验(实训)实践内容,适合作为动物科学、动物医学和水产养殖学专业及相关专业的教学用书,也可作为教学辅助材料。

本套教材面向全国各类高校的畜牧、兽医、水产及相关专业的实践(实验、实训)教学环节,具有较广泛的适用性。归纳起来,这套教材有以下特点:

1. 准确定位,面向卓越 本套教材的深度与广度力求符合动物科学、动物医学和水产养殖学专业及相关专业国家人才培养标准的要求和卓越农林人才培养的需要,紧扣教学活动与知识

结构,对人才培养体系、课程体系进行充分调研与论证,及时用现代农林业发展的新理论、新知识、新技术更新教学内容以培养卓越农林人才。

2. 夯实基础,切合实际 本套教材遵循卓越农林人才培养的理念和要求,注重夯实基础理论、基本知识、基本思维、基本技能;科学规划、优化学科品类,力求考虑学科的差异与融合,注重各学科间的有机衔接,切合教学实际。

3. 创新形式,案例引导 本套教材引入案例教学,以提高学生的学习兴趣和教学效果;与创新创业、行业生产实际紧密结合,增强学生运用所学知识 with 技能的能力,适应农业创新发展的特点。

4. 注重实践,衔接实训 本套教材注意厘清教学各环节,循序渐进,注重指导学生开展现场实训。

“授人以鱼,不如授人以渔。”在教材中尽可能地介绍各个实验(实训)的目的要求、原理和背景、操作关键点、结果误差来源、生产实践应用范围等,通过对知识的迁移延伸、操作方法比较、案例分析等,培养学生的创新意识与探索精神。本套教材是目前国内出版的第一套落实“卓越农林人才培养意见”精神的实验实训教材,能对我国农林的人才培养和行业发展起到一定的借鉴引领作用。

以上是我们编写这套教材的初衷和理念。把它们写在这里,主要是为了自勉,并不表明这些我们已经全部做好了、做到位了。我们更希望使用这套教材的师生和其他读者多提宝贵意见,使教材得以不断完善。

本套教材的出版,凝聚了西南大学和西南师范大学出版社相关领导的大量心血和支持,在此向他们表示感谢!

总编委会

2019年6月

鉴于现今教材中生物化学实验、分子生物学实验、生物信息学实验常单独成书,使得其中的实验内容多重复,且缺乏科学性和系统性。为此,本教材利用乳酸脱氢酶(Lactate Dehydrogenase, LDH)这一基因将书中所有实验项目串联起来。各实验项目既相对独立,又交叉连续。

本教材共包括3个部分、27个实验。针对乳酸脱氢酶的一系列生物化学、分子生物学、生物信息学实验进行系统性编排。在每个实验后都有实验拓展,便于学生课后更深入地自学,牢固地掌握所学知识。在实际教学过程中,根据教学大纲和实验条件,任课教师可以选择其中单个项目进行实验教学,也可以选择多个项目构建成一个综合性的实验课题进行授课。

第一部分的生物化学实验包括LDH的提取与鉴定,离子交换层析法纯化LDH,亲和层析法纯化LDH,凝胶过滤层析法纯化LDH,蛋白质含量的测定(考马斯亮蓝法),LDH酶活力测定,非变性凝胶电泳分离LDH同工酶,聚丙烯酰胺凝胶电泳测定LDH相对分子质量,LDH蛋白质免疫印迹9个实验项目。通过该部分实验,学生将掌握蛋白质提取和纯化、蛋白质浓度测定、酶活力检测、蛋白质相对分子质量测定以及免疫印迹等生物化学实验技术的原理和操作方法。

第二部分的分子生物学实验包括动物组织基因组DNA提取,PCR扩增LDH基因,琼脂糖凝胶电泳检测DNA,提取纯化质粒载体,DNA限制性酶切,制备大肠杆菌感受态细胞,DNA重组、转化及阳性克隆筛选,外源基因的原核表达及纯化8个实验项目。通过该部分实验,学生将掌握从提取基因组DNA到目的DNA重组、转化、原核表达的分子克隆实验技术的原理和操作方法。

第三部分的生物信息学实验包括PCR引物设计,凝胶电泳图像分析,NCBI数据库介绍及序列下载,序列格式转换,DNA序列分析,序列同源检索,多重序列比对,系统进

化分析,蛋白质序列分析,蛋白质结构预测 10 个实验项目。通过该部分实验,学生不但能够掌握 PCR、电泳实验的设计和验证过程,还能系统地学习核酸和蛋白质序列分析、蛋白质结构分析、同源序列检索以及系统进化分析等生物信息学实验技术的原理和操作方法。由于该部分的图均为实验步骤的过程图,因此参考张成岗和贺福初编著的《生物信息学方法与实践》(科学出版社,2002 年)未加题图。

通过对本书的学习,可培养生物学类、农学类、医学类专业学生以下几方面的能力:①掌握现代生命科学的基础实验技能,并能够运用所学知识对专业相关领域的复杂问题开展系统分析和研究,提出相应的对策和建议,进而解决问题;②具备较强的团队意识、沟通协作和科学创新精神,能从事专业领域的技术研发、协作与管理等;③具有一定的学科交叉能力,能在多学科、多元文化团队中进行有效的沟通交流,具备在国内外一流学术机构继续深造的能力。

本书主要适用于生物学类、农学类、医学类专业的生物化学、分子生物学、生物信息学等课程的实验教学,也可作为生物化学与分子生物学、基因组与生物信息学等专业相关教师及学生的参考用书。

本书编者是从事生物化学、分子生物学、生物信息学相关教学工作的一线教师,经验丰富,编写认真。审稿者也付出了很多宝贵的个人休息时间,在此表示衷心感谢。此外,本书从策划、编写、修订到出版一直得到西南师范大学出版社的大力支持,在此也一并表示诚挚的谢意。

由于本书编写时间较紧,加之编者水平有限,不足之处在所难免,恳请各位读者批评指正,不吝赐教。

向恒

2018 年 12 月

第一部分

生物化学实验

实验1 乳酸脱氢酶(LDH)的提取与鉴定	3
实验2 离子交换层析法纯化LDH	10
实验3 亲和层析法纯化LDH	16
实验4 凝胶过滤层析法纯化LDH	21
实验5 蛋白质含量的测定(考马斯亮蓝法)	29
实验6 LDH酶活力测定	33
实验7 非变性凝胶电泳分离LDH同工酶	38
实验8 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定LDH相对分子质量	41
实验9 LDH蛋白质免疫印迹	46

第二部分

分子生物学实验

实验10 动物组织基因组DNA提取	53
实验11 PCR扩增LDH基因	57
实验12 琼脂糖凝胶电泳检测DNA	60
实验13 提取纯化质粒载体	64
实验14 DNA限制性酶切	67

实验 15	制备大肠杆菌感受态细胞	71
实验 16	DNA 重组、转化及阳性克隆筛选	75
实验 17	外源基因的原核表达及纯化	82

第三部分

生物信息学实验

实验 18	PCR 引物设计	91
实验 19	凝胶电泳图像分析	99
实验 20	NCBI 数据库介绍及序列下载	106
实验 21	序列格式转换	121
实验 22	DNA 序列分析	131
实验 23	序列同源检索	143
实验 24	多重序列比对	151
实验 25	系统进化分析	161
实验 26	蛋白质序列分析	176
实验 27	蛋白质结构预测	190
参考文献		210

第
CONTENTS 一
部分

生物化学实验



实验 1

乳酸脱氢酶(LDH)的提取与鉴定

通常,科学实验的第一步都是初始材料或者初始数据的获取。本次实验,我们将从动物组织中分离、纯化乳酸脱氢酶(Lactate Dehydrogenase, LDH),并对LDH的活力、浓度和回收率进行测定与计算,进而为后续实验做准备。

【实验目的】

- (1)了解蛋白质分离、纯化与鉴定的整体思路。
- (2)理解硫酸铵盐析的基本原理。
- (3)掌握LDH粗分离的方法及其基本性质鉴定的方法。

【实验原理】

LDH是以NAD⁺(氧化态烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)为辅酶,催化体内糖代谢过程中乳酸与丙酮酸之间可逆反应的一组同工酶,广泛存在于动物、植物和微生物中,具有组织特异性。在缺氧条件下,LDH催化丙酮酸接受NADH(还原态烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)提供的H⁺,合成乳酸;在缺少葡萄糖时,LDH可以氧化乳酸生成丙酮酸,丙酮酸通过糖异生途径转变成糖。反应式如下:



蛋白质属于大分子物质,其分子直径为1~100 nm,具有胶体颗粒性质,不能随意穿过半透膜。在水溶液中,蛋白质分子利用其表面水化膜和同性电荷相互排斥的作用形成亲水胶体并维持胶体性质。在蛋白质溶液中,中性盐[如(NH₄)₂SO₄、Na₂SO₄、NaCl等]既可以中和电荷,又能抢夺蛋白质表面的水分子而破坏水化膜。当溶液中中性盐的浓度足够高时,蛋白质失去水化膜而从溶液中沉淀下来,这个现象称为盐析。利用溶液中蛋白质呈

胶体颗粒的性质,选择孔径适宜的半透膜进行透析处理,可除去蛋白质沉淀中的中性盐和其他小分子物质。盐析获得的蛋白质沉淀经透析处理可恢复蛋白质原有的结构和生物活性。

本实验以牛心肌组织为材料,通过组织匀浆和离心获得总蛋白,硫酸铵盐析和透析获得LDH粗蛋白样品。

【课前思考题】

- (1) LDH分离提取与鉴定实验的设计依据是什么?
- (2) 如何确定酶促反应达到平衡的时间?
- (3) 样品离心操作时应注意哪些问题?
- (4) LDH粗分级过程中硫酸铵有什么作用? 组织匀浆液中加入硫酸铵时为什么要缓慢?

【实验材料】

1. 仪器与耗材

紫外-可见分光光度计,高速组织匀浆机,冷冻离心机,手术剪,研钵,比色皿等。

2. 材料

牛心肌组织。

3. 试剂

匀浆缓冲液: $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.5); 酶促反应缓冲液: $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-(环己胺)-1-丙磺酸缓冲液(CAPS, pH 10.0), $6 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAD^+ , $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乳酸; Q-Sepharose 缓冲液: $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ N,N-二羟乙基甘氨酸(pH 8.5)或 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5); 无水硫酸铵; 等等。

【实验步骤】

所有实验步骤均在低温($4 \text{ }^\circ\text{C}$ 或冰上)环境进行。LDH分离提取过程中,实验者需记录每一步中样品的含量。

1. LDH的制备

(1) 取牛心肌组织 25 g,用剪刀剔除外周脂肪和结缔组织,用预冷的无菌纯净水冲洗干净后剪碎成 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 的小块。

(2)将剪碎的牛心肌组织与75 mL预冷的 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 7.5)混合,置于高速组织匀浆机中匀浆2 min。预存0.5 mL匀浆液用于后续酶动力学实验和蛋白浓度测定。其余匀浆液以20 000 r/min,在4 °C下离心15 min后收集上清液,并预存0.5 mL上清液用于后续检测。

(3)将收集的上清液置于冰上,向其缓慢加入研磨成粉的硫酸铵,使组织液中硫酸铵饱和度达40%(0.242 g/mL),冰上静置15 min。15 000 r/min,4 °C离心15 min,收集上清液。

(4)预存0.5 mL上清液用于后续实验。其余上清液再次置于冰上,继续缓慢加入硫酸铵,使溶液中硫酸铵饱和度达到65%(0.166 g/mL),冰上静置15 min。15 000 r/min,4 °C离心15 min,分别收集上清液和沉淀。

(5)预存0.5 mL上清液用于后续实验。向65%饱和度硫酸铵处理后的沉淀中加入5~10 mL $0.03 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的N,N-二羟乙基甘氨酸(pH 8.5),使沉淀充分溶解。

(6)预存0.2 mL沉淀溶解液用于后续实验,其余溶解液移入预先处理的透析袋中。将透析袋放入 $0.03 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的N,N-二羟乙基甘氨酸(pH 8.5)缓冲液中,4 °C透析。

2.LDH 酶促反应

蛋白粗提物中的酶很不稳定,因此需要尽快检测LDH提取过程中预存样品的蛋白质含量和酶活力[实验原理及步骤见《实验5 蛋白质含量的测定(考马斯亮蓝法)》和《实验6 LDH酶活力测定》]。

通过检测NADH的生成量可间接获得LDH酶活力。每个样品的酶促反应体积均为3 mL,反应体系如下:

1.9 mL $0.15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAPS(pH 10.0)

0.5 mL $6\times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NAD^+

0.5 mL $0.15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乳酸

每个反应体系中分别加入LDH粗提液10 μL 、纯净水90 μL ,颠倒混匀,紫外-可见分光光度计检测混合液在340 nm处的吸光度($A_{340\text{nm}}$)。

3.LDH 活力、浓度和回收率计算

本实验反应液中含乳酸和 NAD^+ ,在一定条件下,加入一定量酶液,观察反应过程中混合液 $A_{340\text{nm}}$ 的变化,判断LDH的活性。

LDH的活力单位(U)定义:在25 °C,pH 10.0条件下,每分钟催化1 μmol 乳酸转化为丙酮酸所用LDH的量为1 U,1 U=1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

LDH提取过程中所有预存样品的酶活力、比活力、纯化倍数和回收率的计算公式

如下:

$$\text{LDH活力} = \frac{\Delta A_{340\text{nm}}}{\epsilon b} \times \frac{1}{t} \times V_{\text{反}}$$

式中:

$\Delta A_{340\text{nm}}$: 溶液在 340 nm 吸光度的变化量, 无单位;

ϵ : 吸光物质的摩尔吸光系数, 单位为 $\text{L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$, 1 cm 吸光皿内吸光物质的摩尔吸光系数为 $6\,220 \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$;

b : 光程, 即光线穿过溶液的距离, 通常为比色皿透光面宽度, 单位为 cm;

t : 反应时间, 单位为 min;

$V_{\text{反}}$: 反应液体积, 单位为 L。

$$\text{LDH相对活力} = \frac{\text{LDH活力}}{\text{样品体积}}$$

$$\text{LDH总活力} = \text{LDH相对活力} \times \text{样品总体积}$$

$$\text{LDH比活力} = \frac{\text{LDH总活力}}{\text{总蛋白含量}}$$

$$\text{LDH纯化倍数} = \frac{\text{LDH每步纯化比活力}}{\text{LDH初始提取液比活力}}$$

将 LDH 初始提取液的回收率设定为 100% (本实验中以组织匀浆液为 LDH 初始提取液), 其他提取步骤所获得的样品蛋白质回收率为:

$$\text{LDH回收率} = \frac{\text{LDH每步纯化总活力}}{\text{LDH初始提取液总活力}} \times 100\%$$

例如, LDH 粗提匀浆液体积为 20 mL, 取 20 μL 样品与 80 μL 酶促反应液混合, 测得样品混合液在 340 nm 处每分钟的吸光度为 0.31, 则 LDH 活力和相对活力分别为:

$$\frac{0.31}{6\,220 \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1} \times 1 \text{ cm}} \times \frac{1}{1 \text{ min}} \times 0.003 \text{ L} \approx 0.15 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} = 0.15 \text{ U}$$

$$\frac{0.15 \text{ U}}{0.02 \text{ mL}} = 7.5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$$

总酶活力和初始提取步骤中的回收率分别为:

$$7.5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1} \times 20 \text{ mL} = 150 \text{ U}$$

$$\frac{150 \text{ U}}{150 \text{ U}} \times 100\% = 100\%$$

若用 Bradford 蛋白浓度测定法检测 20 μL 预先稀释 10 倍的初始提取液, 测得其中蛋白含量为 3 μg , 则样品中:

$$\text{蛋白浓度} = \frac{\text{总蛋白含量}}{\text{样品体积}} \times \text{样品稀释倍数} = \frac{3 \times 10^{-3} \text{ mg}}{2 \times 10^{-2} \text{ mL}} \times 10 = 1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$$