

<<生物化学与分子生物学实验指导>>

图书基本信息

书名：<<生物化学与分子生物学实验指导>>

13位ISBN编号：9787307039698

10位ISBN编号：7307039699

出版时间：2003-10

出版时间：武汉大学出版社

作者：邵雪玲,毛歆,郭一清

页数：230

版权说明：本站所提供下载的PDF图书仅提供预览和简介，请支持正版图书。

更多资源请访问：<http://www.tushu007.com>

## <<生物化学与分子生物学实验指导>>

### 内容概要

本教材按162学时编写，总共分为七大部分，实验分上下学期完成，本学期完成生物化学部分，下学期完成分子生物学部分。

希望通过本教材的指导，同学们能够顺利完成分子生物学部分。

希望通过本教材的指导，同学们能够顺利完成生物化学与分子生物学实验，并了解现代生物学与分子生物学实验最基本的技术。

并在今后专业课程的学习和将来的工作中能灵活应用。

本教材所涉及的技术面比较广泛。

可供理科、农林类及医学各科学学生参考使用。

## &lt;&lt;生物化学与分子生物学实验指导&gt;&gt;

## 书籍目录

第一部分 生物化学与分子生物学实验入门 一、实验室规则 (一) 实验室安全规则 (二) 实验室卫生规则 (三) 学生守则 二、常用仪器的使用方法 (一) 722型分光光度计 (二) 752型紫外可见分光光度计 (三) 离心机 (四) 微量移液器 (五) 电子天平 (六) Elx酶标仪 (七) Pct-100pcr仪 三、器皿的洗涤及要求 (一) 一般实验要求 (二) 分子生物学实验要求 四、实验结果的记录及保存 五、实验报告的完成 六、实验成绩评分方法 第二部分 生物大分子的制备及鉴定实验 实验一 蛋白质的盐析分离及凝胶层析脱盐 实验二 凝胶过滤层析法测定蛋白质的分子量 实验三 醋酸纤维素膜电泳分离鉴定蛋白质 实验四 蛋白质含量的测定 实验五 琼脂糖凝胶电泳分离乳酸脱氢酶 实验六 常规蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳 实验七 蛋白质的双向电泳 实验八 丹磺酰化法分析蛋白N-末端氨基酸 实验九 动物基因文库DNA的分离纯化 实验十 核酸的定量测定 实验十一 SNA 的 $T_m$ 值测定 实验十二 植物总RNA的提取 实验十三 甲醛变性凝胶电泳的鉴定RMA 实验十四 离子交换柱层析分离核苷酸 第三部分 酶动力学测定实验 实验一 酵母蔗糖的制备 实验二 DEAE纤维素柱层析纯化酶蛋白 实验三 各级分蔗糖酶活性测定及纯化率的计算 实验四 底物浓度对催化反应速度的影响及米氏常数 $K_m$ 和最大反应速度 $V_{max}$ 的测定 实验五 反应时间对产物形成的影响 实验六 pH值、温度、抑制剂对蔗糖酶活性的影响 第四部分 免疫化学检测实验 实验一 免疫血清的制备 实验二 双向免疫扩散法测定抗血清效价 ..... 第五部分 分子生物学实验 第六部分 开放及综合设计性实验附录

## &lt;&lt;生物化学与分子生物学实验指导&gt;&gt;

## 章节摘录

2. 蛋白质N末端氨基酸的DNS化 取0.5mg蛋白质样品,置于有塞玻璃管中。用少量水溶解后,加入0.5ml 0.2mol/L碳酸氢钠溶液。再加入0.5ml DNS-Cl丙酮溶液,用三乙胺调至pH9,0-9,5,塞好塞子,于40℃烘箱中反应2h,或室温(25℃左右)放置2—4h,生成DNS-蛋白质。

3. DNS蛋白质的水解 DNS化反应结束后。真空蒸去丙酮,加入0.5ml 6mol/L盐酸溶解DNS-蛋白质。全部移入水解管。

抽真空封管,于110℃烘箱中水解18-24h。开管后蒸去盐酸,加少量水,再蒸干。

重复2—3次以除尽盐酸。

4. DNS-氨基酸的抽提 将上述水解产物,加0.5ml水,用1mol/L盐酸调至pH2—3加入0.5ml乙酸乙酯抽提,分层可在细长滴管中进行。

重复抽提2—3次,将上层抽提液合并于小试管中,抽去乙酸乙酯,置于干燥器中备用。

5. DNS-氨基酸的层析与检测 生成的DNS-氨基酸和标准DNS-氨基酸分别进行聚酰胺薄膜层析。

(1)聚酰胺薄膜的准备 将聚酰胺薄膜剪成7cm×7cm的方块,在距边0.5cm处画互为垂直的两条基线,交叉点为原点。

若只做单相层析,则只画一条基线,在基线上每隔1cm画一点样点。

(2)点样 用毛细管取样,点在点样位置上,点样直径应小于2mm。

若多次点样,则点一次,吹干一次。

(3)展开 将点好样的聚酰胺薄膜卷成圆筒形。

样品则在筒内,箍以线圈固定。

放在小层析槽内(可在小干燥器内置一培养皿代替),槽内(培养皿)放入5-10ml展开溶剂,进行展开,以溶剂前沿到达距顶端0.5cm左右为止(约20min)。

取出膜片,吹干。

进行双向层析时,在第一向层析完毕,完全吹干(有时需晾过夜。

才能充分吹干),将聚酰胺薄膜片转90度,用展开溶剂展开。

为了区分DNS-苏氨酸或者区分DNS-天门冬氨酸与DNS-谷氨酸,可在溶剂展开后,吹干,接着用溶剂沿同一个方向展开,只需展开至一半高度即可。

为了区别DNS-赖氨酸、DNS-组氨酸与DNS-精氨酸,应在溶剂展开后,吹干,接着在溶剂中沿同一个方向展开。

(4)DNS,氨基酸的检测 展开结束后,取出薄膜,用电吹风机吹干,在360nm、或280nm的紫外灯下检测。

DNS-氨基酸呈黄色荧光。

此外还有其他颜色的杂点,如DNS-OH显绿色荧光等。

用样品的层析谱与标准DNS-氨基酸层析谱相比较,可鉴别样品DNS-氨基酸的种类。

【思考】 1. 薄膜层析与其他层析法比较有哪些优点?

2. 选用展开剂的依据是什么?

实验九 动物基因组DNA的分离纯化 【目的和要求】 掌握盐溶法大量制备动物基因组DNA的基本原理和方法。

【实验原理】 根据核糖核蛋白与脱氧核糖核蛋白在一定浓度的氯化钠溶液中的溶解度不同进行分离,然后用蛋白质变性沉淀剂去除蛋白,使核酸释放出来,再利用核酸不溶于乙醇的性质将核酸析出,达到分离提纯的目的。

在0.14mol/L的氯化钠溶液中,RNA核蛋白(RNP)溶解度大,而DNA核蛋白(ODNP)溶解度较小;相反,在1mol/L的氯化钠溶液中,ONP溶解度最大,而RNP溶解度却很小,从而使DNA、RNA核蛋白

## <<生物化学与分子生物学实验指导>>

分开。

核蛋白分离后可用蛋白变性沉淀剂(氯仿+异戊醇、十二烷基硫酸钠、热酚等)去除蛋白质,释放核酸,核酸便从溶液中析出。

动物肝中含有核糖核酸酶和脱氧核糖核酸酶,因此要保持低温,要防止 $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ 及 $CO_2$ 等激活离子。

【实验器材和试剂】 1. 试剂: (1)sc缓冲液: 2.94g柠檬酸钠和9.0g氯化钠溶于1L蒸馏水。

用盐酸调pH至7.0。

(2)5%SDS溶液 (3)95%乙醇、氯仿、异戊醇。

2. 器皿 冷冻离心机、组织捣碎机、烧杯、量筒、玻璃棒、三角烧瓶、离心管。

【实验方法】 新鲜猪肝4g,用SC溶液洗去血液,低温剪碎后,加入8ml上述溶液,继续捣碎,将匀浆物于4000r/min离心10min,上层是RNP提取液,下层是DNP及细胞碎片。

将上层倾出(也可留下制备RNA),下层再用5mlSC溶液重复抽提两次,以减少RNP对DNP抽提的影响。

下层沉淀移入三角烧瓶,加同SC溶液20ml,混匀,加4ml15%SDS混匀。

加15ml氯仿/异戊醇(20/1)混合液混匀,边摇边加固体氯化钠,使其终浓度达:1mol/L,充分振荡30rain。

4000r/min离心20rain,小心取出离心管,观察有三层,上层为水相(I)NA溶解在此,中间乳白色为蛋白质沉淀层,下层为氯仿层。

用吸管小心吸取上层。

同样方法去蛋白,至中间层无蛋白沉淀层为止。

量取上层水相体积后,在烧杯中加等体积冷乙醇(95%),边倾边搅拌(沿一个方向),玻璃棒上有纤维状DNA缠绕,当DNA全部绕上后,挤干,再用无水乙醇洗一次,取出于干燥器干燥。

称重,计算得率。

.....

## <<生物化学与分子生物学实验指导>>

### 媒体关注与评论

**前言** 随着生物化学与分子生物学实验技术的迅速发展，生命科学在理论与应用上都取得了惊人的进展。

生物化学与分子生物学实验技术逐渐系统化，现已成为生命学科各领域研究的常规技术。

为了培养创新人才，与世界接轨，我们在实验教学中进行了大量的改革：根据实验室条件，尽可能删除一些落后的实验方法，引进现代的实验方法，在原有实验教材的基础上，减去了部分验证性实验，加强了生物化学技术训练的实验，其内容包括了生物物质的定量测定技术、电泳技术、层析技术、大分子物质的提取及离心技术、酶联免疫技术、酶活性测定及动力学分析、质粒DNA的提取、酶切、鉴定；PCR技术；感受态细胞的制备及转化技术；DNA重组及表达等。

本教材按162学时编写，总共分为七大部分，实验分上下学期完成，上学期完成生物化学部分，下学期完成分子生物学部分。

希望通过本教材的指导，同学们能够顺利完成生物化学与分子生物学实验，并了解现代生物化学与分子生物学实验最基本的技术，并在今后专业课的学习和将来的工作中能灵活应用。

本教材所涉及的技术面比较广泛，可供理科、农林类及医学各科学学生参考使用。

尽管我们用最大努力来编写本教材，但由于编写本教材的时间紧，有错误的地方是在所难免的，希望同学们在使用的过程中提出意见，以便更好地完善教材。

使用本教材的同时，同学们还应参看其他教材或文献，拓宽自己的视野，这样才能写出较好的实验报告。

本教材第一部分、第二部分、第六部分及第七部分由邵雪玲编写；第三部分、第四部分由郭一清编写；第五部分由毛歆编写。

参加教学改革实验的还有杨惠、沈小玲。

感谢武汉大学生命科学学院教学办、武汉大学教务部及武汉大学出版社对本教材出版的支持。

编者 2003.6.6

版权说明

本站所提供下载的PDF图书仅提供预览和简介, 请支持正版图书。

更多资源请访问:<http://www.tushu007.com>