

山东大学基础医学院

《生物化学与分子生物学实验》教学大纲

编写人：张鹏举，陈蔚文，肖鹏

审定人：田克立，张莲英

编制时间：

审定时间：

一、课程基本信息

课程名称	生物化学与分子生物学实验(双语)				
英文名称	Experiment of Biochemistry and Molecular Biology				
课程编码	sd02321870				
开课单位	基础医学院生物化学与分子生物学系				
实验类型	<input checked="" type="checkbox"/> 专业基础实验 <input type="checkbox"/> 专业实验 <input checked="" type="checkbox"/> 综合实验 <input type="checkbox"/> 创新实验 <input type="checkbox"/> 开放实验				
课程性质	<input checked="" type="checkbox"/> 必修 <input type="checkbox"/> 选修				
实验类别	<input checked="" type="checkbox"/> 独立设课 <input type="checkbox"/> 非独立设课				
学分	2	总学时	48	实验学时	48
适用专业	临床医学、药学、预防、口腔				
先修课程					
课程网站	http://course.sdu.edu.cn/G2S/Template/View.aspx?action=view&courseType=0&courseId=3046				

二、课程描述

生物化学实验是配合生物化学理论教学而设置的一门基础课程，课程内容基本与课堂理论授课内容同步，包括分光光度技术、电泳技术等常用生物化学实验技术的基本原理和操作以及运用相关实验方法对蛋白质、核酸、血液成分等进行生化测定。本课程一方面使学生在实验课中验证理论的来源和正确性，加深对理论的理解；另一方面，在学生的实验实践中锻炼学生的动手能力，培养学生理论

联系实际，独立分析问题、解决问题的能力以及创新意识。

分子生物学实验是一门基础实验技术训练课程，内容涵盖基因工程操作的基本过程，包括目的基因获得、酶切、回收、连接、转化、筛选、鉴定、表达、蛋白提取纯化，整个实验是一个连续的过程，力求实验方法的经典和实用性。通过学习学生能在相关理论知识的基础上，较全面和深入理解基因工程原理，基本掌握基因工程常用的实验方法，能够初步设计分子生物学实验。

Experiment of Biochemistry is a fundamental course designed for a better understanding of the theoretical knowledge of Biochemistry. This course are mostly in synchronization with theoretical curriculum. The contents include the basic principle of biochemistry techniques, such as spectrophotometry, electrophoresis and so on, as well as the application of such methods into biochemical assay of protein, nucleic acid, blood sample, etc. On one hand, our course enhances the understanding of learned theories through guiding students in proving the origin and validity of them during class. One the other hand, students' operation ability, theory-to-practice-linking capability, independent thinking, problem-solving capacity and innovative thoughts are cultivated by experimental training.

Molecular biology experiment is a basic experimental technology training course , covering the basic process of genetic engineering, including preparation of plasmid DNA, the digestion of DNA with restriction endonuclease, connection, transformation, screening, identification, expression and extraction and purification of protein. The whole experiment is a continuous process, aiming at classic and practicability of the method. By learning, students can develop a comprehensive and deep understanding of genetic engineering principle, basic genetic engineering experiment methods, ability of preliminary design of molecular biology experiments on the basis of the relevant theoretical knowledge.

三、课程性质和教学目标

【教学目标】

生物化学实验是配合生物化学理论教学而设置的一门基础课程，通过实验课的教学，力求使学生能够对生化和分子生物学实验技术的基本理论和概念有更加深刻的认识，激发学生对探索生物化学规律的浓厚兴趣。更为重要的是，在实验过程中培养学生观察问题、分析问题和解决问题的能力，锻炼学生的实际操作能

力，增强学生的创新意识和团队协作精神。

分子生物学是从分子水平揭开生物世界奥秘的实验学科，其基本理论和实验技术已经渗透到生命科学的各个领域，并带动和推进了其他许多学科的发展。分子生物学实验以基因工程操作为主线，强调实验方法的经典、实用性。实验内容涉及基因工程的主要过程。通过本实验课程的开设，让学生将基础理论知识与实验技能相结合，巩固分子生物学知识、培养学生基本技能、训练学生创造性思维，初步培养学生从分子水平分析和解决问题的综合能力，使学生具有初步设计分子生物学实验的能力，增强学生的科研思维能力和团队协作精神。

【教学要求】

1. 通过本课程的学习，使学生掌握生物化学基本实验技术的原理和方法，包括分光光度技术、电泳技术、层析技术、离心技术等基本的生物化学实验技术。
2. 通过教师课堂讲授和学生实验操作，以形象生动的实验现象帮助学生加深理解与掌握生化与分子生物学理论知识。蛋白质、核酸、酶类的提取、测定，学习血液成分生化测定，以及部分生物化学理论知识的验证。
3. 引导学生利用已学到的理论知识来发现、分析和解决实际问题，培养学生实际应用和独立分析问题、解决问题的能力，为学习其它基础医学和临床医学课程奠定扎实的理论和实践基础。
4. 培养学生的创新意识，提高学生的动手操作能力。
5. 培养学生严肃认真、实事求是的科学态度和作风，培养学生的团队协作精神。
6. 分子生物学实验部分在方法上力求经典，内容涵盖基因工程操作的基本过程，整个实验是一个连续的过程，通过学习学生能在相关理论知识的基础上，较全面和深入理解基因工程原理，基本掌握基因工程常用的实验方法，能够初步设计分子生物学实验。

四、课程教学内容及学时分配

(一) 生物化学部分

实验一：蛋白质定量测定（8 学时）

【教学目标和要求】

1. 掌握分光光度技术的基本原理，学会规范正确使用分光光度计。
2. 掌握考马斯亮兰法、双缩脲法和紫外分光光度法测定蛋白质含量的原理和方法。
3. 学会选择合适的方法进行特定蛋白质样品含量的测定。

【主要仪器设备和药品】

分光光度计、玻璃比色皿、石英比色皿、恒温水浴箱、双缩脲试剂、考马斯亮蓝试剂

【实验要求】

1. 标准曲线使用注意事项：标准曲线范围在测定浓度的一半到二倍之间；吸光度在 0.05-1.0 范围内；所作标准曲线仅供短期使用；标准曲线制作与测定管测定应在同一台仪器上进行，避免误差产生。
2. 分光光度计使用注意事项：波长选择；机器预热；不测量时，应使样品室盖处于开启状态；不应把盛有腐蚀性液体的比色皿放在仪器表面；选择合适的比色皿。
3. 比色皿使用注意事项：紫外光区测量时用石英比色皿；同组使用的比色皿必须配套；比色皿光学表面对准光路，不能有任何污损；比色皿中所盛溶液约占全部容积的 2/3；腐蚀性溶液不得长期盛放在比色皿中，每次使用后，应立即倒空或以吸液泵吸干，然后用水冲洗比色皿 3~4 次；本次试验，考马斯亮蓝可使玻璃比色皿着色，酒精浸泡后清洗。

实验二：血清 γ -球蛋白的分离，纯化和鉴定（8 学时）

【教学目标和要求】

1. 掌握盐析法、凝胶层析和离子交换层析的实验原理及操作技术。
2. 熟悉蛋白质分离纯化的总体思路。
3. 掌握醋酸纤维素薄膜电泳操作技术。

【主要仪器设备和药品】

离心机、层析系统、电泳仪、电泳槽、醋酸盐缓冲液、饱和硫酸铵溶液

【实验要求】

1. 饱和硫酸铵的滴加，边摇边逐滴加入。
2. 流洗柱子：3~4 个柱长。
3. 上样：转圈滴加，起跑线一致。
4. 防止柱上液层干涸。
5. G-25 干胶用纸条少量多次加入，液层高 $<0.5\text{ml}$ 。
6. 用过的 G-25 干胶倒入收集缸，回收利用。

实验三：物质代谢实验（8 学时）

【教学目标和要求】

1. 联系理论授课内容，深入理解胰岛素对血糖浓度的调控作用和作用机制。
2. 掌握血糖及血清胆固醇含量测定的原理和方法，并结合生化代谢分析血糖、血胆固醇异常的原因及临床意义。
3. 自主设计实验进行糖酵解中间产物的鉴定。

【主要仪器设备和药品】

离心机、电泳仪、电泳槽、恒温水浴箱、胰岛素、邻甲苯胺、酵母液、一碘乙酸、硫酸胍

【实验要求】

1. 严格规范操作：包括离心机的正确使用；避免多种试剂间交叉污染；各组试管的正确标记等。
2. 实验家兔已经饥饿 12 小时，在采血和注射胰岛素时动作尽量温和；纵向割开耳缘静脉取血，同时避免溶血。
3. 成脘反应前，溶液必须先碱化并在室温放置 10min。
4. 沸水浴加热时避免烫伤，实验用过的强酸试剂倒入实验室指定腐蚀性废液回收缸。

（二）分子生物学部分

实验四：GFP（绿色荧光蛋白）表达质粒构建（8 学时）

【教学目标和要求】

1. 掌握 DNA 限制性内切酶酶切的基本方法
2. 理解琼脂糖凝胶的制备、能够掌握加样、从琼脂糖凝胶中回收纯化的 DNA 片段的方法和技术。
3. 理解 DNA 体外连接反应的基本原理
4. 掌握制备感受态的制备及转化的基本方法。

【实验内容】

- 1、质粒提取
- 2、载体和含目的基因的两个质粒分别进行限制性酶切，琼脂糖凝胶电泳回收目的片段；
- 3、将 GFP 基因片段和 pET-22b 质粒混合，37°C 连接；
- 4、感受态细胞制备（DH5a）；
- 5、将连接好的 pET-22b-GFP 质粒转化 DH5a 感受态细胞。

（学生第二天需要来实验室和带实验的老师一起观察平板，分析实验结果）

【主要仪器设备和药品】

电泳仪、电泳槽、恒温水浴箱、离心机、限制性内切酶、连接酶等

【实验要求】

1. 严格规范操作：包括离心机的正确使用；加样枪的正确使用
2. 分子生物学实验中各种试剂都是按微升为单位，确保加样量准确、避免多种试剂间交叉污染。
3. 回收 DNA 片段时确保切下来的凝胶块含有要回收的 DNA 片段。
4. 在转化实验时要严格控制温度和时间，所用器皿高压灭菌无菌操作防止污染。

实验五：筛选鉴定、阳性克隆质粒提取及表达菌株转化（8 学时）

【教学目标和要求】

1. 掌握重组子筛选和鉴定的常用方法及原理
2. 掌握菌落 PCR 的方法及原理。
3. 掌握碱裂解法提取质粒的基本方法
4. 了解克隆菌株和表达菌株的区别

【实验内容】

上次实验的结果——长有菌落的平板用于菌落 PCR；培养好的菌液（确定含有 pET-22b-GFP 质粒），用于学生进行质粒提取

1. 菌落 PCR 鉴定阳性克隆；
2. pET-22b-GFP 质粒提取；
3. PCR 结果和提取质粒的琼脂糖凝胶电泳检测；
4. 感受态细胞制备（BL21）；
5. 将质粒（pET-22b-GFP）转化 BL21 感受态细胞

（学生第二天需要来实验室和带实验的老师一起观察平板，分析实验结果）

【主要仪器设备和药品】

电泳仪、电泳槽、PCR 仪、离心机、引物、DNA 聚合酶等

【实验要求】

1. 质粒 DNA 提取过程中避免对 DNA 造成损伤、因为残留的乙醇影响后续实验提取质粒后应尽量扣干，
2. PCR 扩增温度的选择，循环时间
3. 在转化实验时要严格控制温度和时间，所用器皿高压灭菌无菌操作防止污染。

实验六：EGFP 蛋白表达提取纯化及鉴定（8 学时）

【教学目标和要求】

1. 理解蛋白表达的诱导作用
2. 掌握亲和层析法纯化蛋白质的基本原理，掌握 Ni-NTA 树脂纯化 His 标签蛋白的原理和技术。
3. 掌握聚丙烯酰胺凝胶电泳对纯化鉴定的技术。
4. 通过分子生物学的三次实验完成基因工程制备荧光蛋白完整实验，使学生建立初步的科研创新思维，能够运用分子生物学的知识初步设计分子生物学的实验。

【实验内容】

1. 目的蛋白的诱导表达，培养好的菌液（诱导表达 12h 后的），Ni-NTA 树脂(用于纯化 His 标签蛋白)
2. 表达蛋白的提取，菌液裂解，高速离心，分离上清（含有 His-GFP 蛋白）和沉淀；
3. 亲和层析纯化目的蛋白，
4. SDS-PAGE 检测目的蛋白

【主要仪器设备和药品】

超声破碎仪，台式离心机(转速达到 12000 rpm)，电泳仪，电泳槽；Ni-NTA 树脂；咪唑；聚丙烯酰胺

【实验要求】

1. 超声的时间

2. 根据纯化蛋白的量确定需要多少 Ni-NTA 树脂

五、每年更新实验项目

(按照教育部实验教学要求, 每年实验教学更新项目不少于 20%)

六、实验教学要求对应关系

	教学要求 1	教学要求 2	教学要求 3	教学要求 4	教学要求 5
实验一	X	X	X	X	X
实验二	X	X	X	X	X
实验三	X	X	X	X	X
实验四	X	X	X	X	X
实验五	X	X	X	X	X
实验六	X	X	X	X	X

七、考核及成绩评定方式

【考核内容】预习+操作+结果+报告+实验设计

【成绩评定】日常实验占 10%, 实验报告占 30%, 实验设计 30%, 实验操作考试 30%

八、教材及参考书目

【教材】 编著者, 教材名, 出版社, 出版年, 教材类别 (规划、获奖教材等)
国家级实验教学示范中心基础医学实验教学系列教材——医学细胞分子生物学实验, 苑辉卿主编, 科学出版社, 2018 年 (第 3 版)

【参考书】 3-5 本相关的教材或者专著、杂志或网络资源