

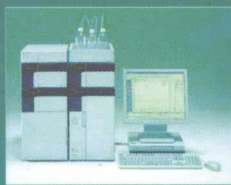
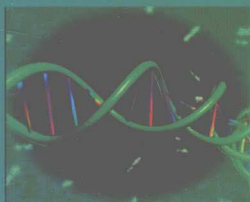
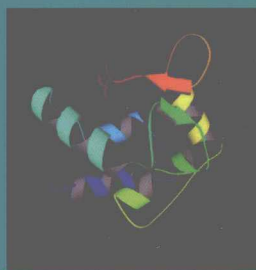
高等院校动植物类本科专业实验指导系列教材（之九）

Biochemistry Experiment Manual

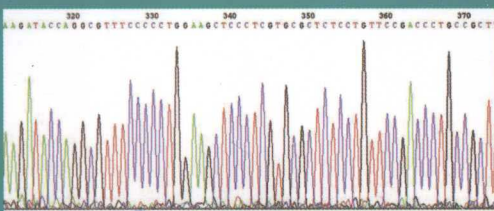
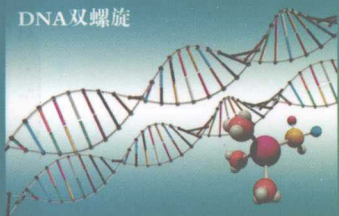
生物化学 实验技术

主 编：刘松财 张明军 李 莉

主 审：欧阳红生



DNA双螺旋



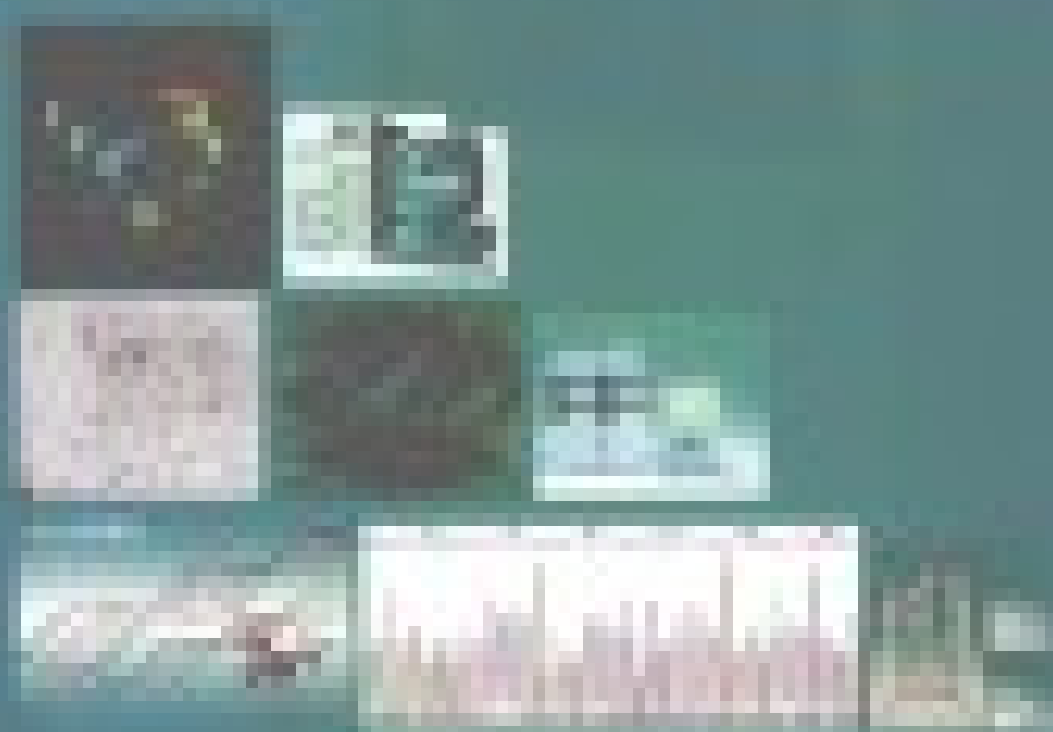
吉林大学出版社

普通高等教育生物类专业实验教材 / 生物化学实验 / 第2版

Biochemistry Experiment Manual

生物化学 实验教材

主 编 王 强 副主编 王 强 王 强
编 者 王 强 王 强 王 强



北京理工大学出版社

高等院校动植物类本科专业实验指导系列教材(之九)

生物化学实验技术

主 编 刘松财 张明军 李 莉
主 审 欧阳红生

吉林大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验技术/刘松财,张明军,李莉主编.—长春:吉林大学出版社,2010.1

(高等院校动植物类本科专业实验指导系列教材之九)

ISBN 978-7-5601-4421-4

I. ①生… II. ①刘… ②张… ③李… III. ①生物化学-实验-高等学校-教材 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 016851 号

书 名:高等院校动植物类本科专业实验指导系列教材(之九)

生物化学实验技术

作 者:刘松财 张明军 李 莉 主编

责任编辑、责任校对:矫正

吉林大学出版社出版、发行

开本:787×1092 毫米 1/16

印张:16.125 字数:276 千字

ISBN 978-7-5601-4421-4

版权所有 翻印必究

社址:长春市明德路 421 号 邮编:130021

发行部电话:0431-88499826

网址:<http://www.jlup.com.cn>

E-mail:jlup@mail.jlu.edu.cn

封面设计:杨 举

吉林省金山印务有限公司 印刷

2010 年 06 月 第 1 版

2010 年 06 月 第 1 次印刷

定价:34.00 元

高等院校动植物类本科专业实验指导系列教材

编写委员会

主任委员	曾凡勤			
编委	张乃生	潘洪玉	刘静波	王忠东
	张嘉保	赵志辉	王庆钰	张梅
	王守宏	柳增善	丁洪浩	常晓宏

编审人员

主 编 刘松财 张明军 李 莉

副主编 张 英 任林柱 逢大欣

编 者 (按姓氏音序排序)

艾永兴 董怀智 郝林琳 焦虎平

贾 锐 刘松材 李 莉 逢大欣

任林柱 饶家辉 宋 宇 王铁东

王大成 王宏娟 于 浩 张明军

张 英 张丽颖

主 审 欧阳红生

前 言

生物化学既是现代生命科学最重要的基础学科,同时又是现代生物学中发展最快的一门前沿学科。其理论与技术的应用已渗透到生命科学、环境科学、海洋科学等相关学科。随着生物工程上游技术的不断发展,生物工程下游技术尤其是蛋白质的分离、纯化、复性、鉴定等技术的应用越显重要,由于蛋白质的多样性,所以下游技术综合应用的难度要大于上游技术。因此,本书是编者在长期的教学、实验、科研的基础上,尤其在生物技术系历年开设的硕士研究生高级生化实验课和生物技术专业本科生物化学实验技术课程的基础上,经过不断的充实、总结和修改而成。全书共分8大部分,包括13个大实验,以蛋白质和核酸等生物大分子的分离、制备、定性和定量为主要内容。选用的方法主要是科研中经常需要采用的生化技术,如电泳技术、层析技术、分光光度技术、膜分离技术、大分子印迹技术等。既有经典常规的实验方法,又有近年来国内外发展起来或广泛应用的一些新方法、新技术。内容比较全面,方法切实可行,重复性高。

本书按实验技术系统编写,便于读者全面、系统地掌握生化实验技术的基本理论和基本操作。在实验的理论阐述上,力求系统、简明、易于理解;操作步骤上做到具体、详尽、可操作性强。其中将生物化学样品制备技术和蛋白质沉淀技术单独列为一部分,使实验理论和技术更系统;在电泳部分增加蛋白质组学需要的2D电泳技术;在印迹部分只编写了蛋白印迹,核酸印迹可参考分子生物学实验内容,这样可突出重点;在亲和层析内容编写过程中,增加了近几年基因工程实验中,常采用His或蛋白标签来分离纯化融合蛋白的内容。许多实验既能单独进行,又可相互组合,形成综合性较强和难度较大的大型实验,(如沉淀技术、层析技术和电泳技术)。这样可进一步提高独立分析问题和解决问题的能力。本书可作为生物化学实验教材或从事生物化学科研工作者的参考。

本书虽数易其稿,但由于生物化学实验技术日新月异,加之作者水平有限,仍可能有疏漏或不足之处,敬请读者批评指正,使其日臻完善,作者不胜感谢。

编 者

2009.08

序

培养学生实践动手能力和创新能力,是高等学校人才培养的主要目标之一,是本科教学质量与教学改革工程的重要内容。而大力加强实验教学,建设一批具有科学性、系统性、先进性和可操作性的实验教材,是不断提高实验教学水平和人才培养质量的有效保障。

吉林大学农学部历来重视通过实验教学培养学生的动手技能 and 创新能力。目前,在加强实验教学条件建设的同时,为适应人才培养目标和教学内容改革,加强实验教材建设,现以本校为主体,联合相关院校,编写了这套高等院校动植物类本科专业实验指导系列教材,涵盖了动物类专业、植物类专业和食品类专业等实验课程,计划出书 20 余部,与高水平实验教学示范中心建设相匹配,从而使实验教材建设规范化、配套化、系列化,进一步规范实验教学,对相关专业实验教学起到示范和带动作用。这套实验教材有三个比较突出的特点:

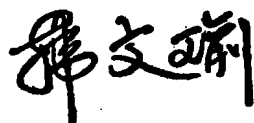
一是系统性。丛书涵盖了高等院校动植物类的动物医学、动物科学、生物技术、农学、园艺、植物保护、农业资源与环境、食品科学与工程、食品质量与安全等专业主要学科基础和专业必修课程,与每门课程的理论教材相配合,完善了教材体系建设。每本实验指导既单独成册、自成体系,同时又按专业分类规划、成型配套。这种实验教材编写方式,在其它学科专业领域有过成功范例,但在动植物类专业尚不多见。

二是实用性。参加丛书编写的教师,既有具有较高学术造诣的专家学者,又有长期从事实验教学的行家里手,均具有较强的教学内容选择和把握能力,在编写过程中注重了简洁明快,宜学宜用。每本教材对实验关键仪器设备的使用方法、注意事项给予了介绍,对每个项目的实验目的、材料、方法进行了说明,对实验内容、原理、操作、仪器设备的使用等进行了规范,加强了实验准备、基本规范、标准操作、参数测定、数据合成、误差分析、实验报告写作等训练,书中图例丰富,示范方法准确,着力强化基本实验操作能力的规范培养。丛书适用于全日制动植物类专业的本科生及研究生实验教学,也可作为相关专业科研人员的参考书

和技术人员的培训教材。

三是创新性。教材依据动植物类专业实验课程的教学基本要求,融合专业改革和课程改革成果,结合理论教学的需要和实验条件的改进,以广受认可的高水平专业理论教材为蓝本,有计划地调整实验内容,对经典实验项目进行了改造,引入了本专业最新相关科研成果和国外高水平教材内容。在编写体例上,每本教材将实验项目划分成了演示性实验、验证性实验、综合性实验、设计性实验和研究性实验等类型,分章节安排编写,部分课程的综合性、设计性实验项目所占比例达到了30%以上,并安排了一定数量的由学生自主完成的综合性实验项目,引导学生自主设计、自主实验,加强了学生科学研究能力和团队协作精神培养,推进学生自主学习、合作学习、研究性学习。

系列化出版这样一套动植物类专业实验教学指导教材,在高等农业教育中还属于一个尝试。相信这套系列实验指导教材的出版和推广应用,能为提高学生的实践动手能力,为创新型人才培养起到应有的推动作用。



2009年5月28日

目 录

第一部分 生物化学样品制备技术	1
第二部分 沉淀技术	10
第三部分 膜分离技术	16
第四部分 色谱技术	28
实验一 分子筛层析	35
实验二 离子交换层析	43
实验三 亲和层析	50
第五部分 分光光度技术	56
实验四 蛋白质的定量检测	61
实验五 核酸含量的测定	67
实验六 血液葡萄糖的测定	71
实验七 血清钙的测定	76
实验八 血清无机磷的测定	79
实验九 血清甘油三酯的测定——酶法	83
实验十 血清胆固醇测定(胆固醇氧化酶法)	84
实验十一 血液尿酸的测定	85
实验十二 抗坏血酸(维生素 C)的测定	87
实验十三 维生素 A 的测定	90

第六部分 离心技术	93
实验十四 动物肝脏 DNA 的提取和鉴定	99
实验十五 差速离心法分离大鼠肝脏细胞核和线粒体	102
实验十六 家兔血清、血浆和无蛋白血滤液的制备	104
第七部分 电泳技术	109
实验十七 不连续聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳分离血清蛋白质	118
实验十八 SDS-不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质分子量	128
实验十九 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳测定蛋白质的等电点	135
实验二十 蛋白质双向电泳	146
实验二十一 琼脂糖凝胶电泳分离血清乳酸脱氢酶同工酶	159
实验二十二 醋酸纤维膜电泳	164
第八部分 印迹技术	167
实验二十三 蛋白质印迹	175
附录部分	185

第一部分 生物化学样品制备技术

生物物质的制备包括特殊细胞器或细胞组分(如膜、线粒体、叶绿体、核糖体或高尔基体)的分离,或四种主要类型生物分子(蛋白质、糖、核酸和脂)的分离和纯化。采用的特殊实验技术有细胞溶解、组织匀浆化、过滤、离心、层析、盐析或有机溶剂沉淀、浓缩等。

本章介绍的这些基本方法,描述可被分离纯化的不同细胞组分和生物物质的特殊制备以及所使用的不同方法。

概念:

从生物材料中获得某一组分的方法称为生物化学样品制备技术。它是生物工程、生化制药及生化分析的基础。

意义:

生物分子制备是研究生物分子特别是生物大分子的前提。

一、生物化学样品制备特点

生物大分子通常是指动物、植物和微生物在进行新陈代谢时所产生的蛋白质(包括酶)和核酸等有机化合物的总称。它不仅是生物科学工作者研究的主要对象,而且与化学、医学和食品学科有密切关系。在这些方面,特别是科研方面,随着人类基因组的 30 亿碱基对测序工作的完成,生命科学进入了后基因组时代。蛋白质的研究也进入了一个空前活跃的时期,因此分离纯化和测试分析蛋白质技术显得十分重要。

与化学产品的分离制备相比较,生物大分子的制备有以下主要特点:

1. 生物材料的组成极其复杂,常常包含有数百种乃至几千种化合物。
2. 许多生物大分子在生物材料中的含量极微,分离纯化的步骤繁多,流程长。
3. 许多生物大分子一旦离开了生物体内的环境就极易失活,因此分离过程中如何防止其失活是生物大分子提取制备最困难之处。
4. 生物大分子的制备几乎都是在溶液中进行的,温度、pH 值、离子强度等各种参数对溶液中各种组成的综合影响,很难准确估计和判断。

5. 为保护所提取物质的生理活性及结构上的完整性,生化分离方法多采取温和的“多阶式”进行(常说逐层剥皮式)。常常少至几个多至几十个步骤,并不断变换各种分离方法,才能达到纯化目的。

6. 生化分离方法的最后均一性的证明与化学上纯度的概念并不完全相同,其均一性的评定常常是有条件的或者只能通过不同角度测定,最后才能给出相对的“均一性”结论。

二、生化分离制备实验设计

1. 生命物质提取的材料千变万化,所用的方法通用性差,尤其是提取分离蛋白质的方法,这也给制备工作带来了麻烦。尽管如此,在实践中,确实需要一定纯度的生命大分子物质,制备这些物质的程序也存在不少共同点。生物大分子的制备通常可按以下步骤进行:

(1)确定要制备的生物大分子的目的和要求,是进行科研、开发还是要发现新的物质。

(2)建立相应的可靠的分析测定方法,这是制备生物大分子的关键。

(3)通过文献调研和预备性实验,掌握生物大分子目的产物的物理化学性质。

(4)生物材料的破碎和预处理。

(5)分离纯化方案的选择和探索,这是最困难的过程。

(6)生物大分子制备物的均一性(即纯度)的鉴定,要求达到一维电泳一条带,二维电泳一个点,或 HPLC 和毛细管电泳都是一个峰。

(7)产物的浓缩,干燥和保存。

2. 生物大分子的制备和分析方法:

(1)分析测定方法有两类:生物学和物理、化学的测定方法。

(2)生物学的测定法主要有:酶的各种测活方法、蛋白质含量的各种测定法、免疫化学方法、放射性同位素示踪法等。

(3)物理、化学方法主要有:比色法、气相色谱和液相色谱法、光谱法(紫外、可见、红外和荧光等分光光度法)、电泳法、以及核磁共振等。

(4)实际操作中尽可能多用仪器分析方法,以使分析测定更加快速、简便。

掌握生物分子的物理、化学性质,要了解的生物大分子的物理、化学性质主要有:

①在水和各种有机溶剂中的溶解性。

②在不同温度、pH 值和各种缓冲液中生物大分子的稳定性。

③固态时对温度、含水量和冻干时的稳定性。

④各种物理性质：如分子的大小、穿膜的能力、带电的情况、在电场中的行为、离心沉降的表现，在各种凝胶、树脂等填料中的分配系数。

⑤其他化学性质：如对各种蛋白酶、水解酶的稳定性和对各种化学试剂的稳定性。

⑥对其他生物分子的特殊亲和力。

3. 利用性质差异设计纯化方法制备生物大分子的分离纯化方法多种多样，主要是利用它们之间特异性的差异，如分子的大小、形状、酸碱性、溶解性、溶解度、极性、电荷和与其他分子的亲和性等。

各种方法的基本原理可以归纳为两个方面：

(1)利用混合物中几个组分分配系数的差异，把它们分配到两个或几个相中，如盐析、有机溶剂沉淀、层析和结晶等。

(2)将混合物置于某一物相(大多数是液相)中，通过物理力场的作用，使各组分分配于不同的区域，从而达到分离的目的，如电泳、离心、超滤等。

目前纯化蛋白质等生物大分子的关键技术是电泳、层析和高速与超速离心。

三、生物大分子的提取

1. 选择材料及预处理

起始材料可来自微生物、动物组织和植物组织。如何选择起始材料取决于研究目标。例如，具有某种特殊作用的确定的酶可由确定种类的细菌来生产。为了获得大量酶，则要大规模培养细菌。对于分泌到培养液中的胞外酶来说，需要的是不含细胞的培养上清液；相反，对胞内酶来说，需要的是细胞本身。上述两种情况都要求用离心或过滤分离细胞。

所需要的组分或分子可以来自某种动物或植物的某些部分。例如，实验研究可能涉及兔的骨骼肌、鼠肝、牛心或猪心、胰、脑或人血、唾液，或者涉及个别植物的叶、茎、花、根、块茎或种子。器官的种属和类型则决定使用方法的类型。

材料选择应遵循的原则是：有效成分含量多、稳定性好；来源丰富、保持新鲜；提取工艺简单、有综合利用价值等。

选择到合适的材料后，应及时应用，否则所需要的成分会部分甚至全部被破

坏,从而影响收得率。例如,从猪肠黏膜提取肝素时,如果用新鲜材料,每千克小肠可得肝素钠 5~6 万 IU;如将材料置 25℃ 以上的室温存放约 1h,肝素钠的含量会显著降低。其原因是,猪小肠内的大量微生物($2.5 \sim 3 \times 10^8$ 个/g)不停地繁殖(如大肠杆菌约 20min 繁殖一次),有的会产生降解肝素的酶系。若选择的材料难于立即使用时,一般采用冰冻或干燥等处理方法,同时还应将易于去除的非需要物质(如脂类)除去。因常用的动物、植物和微生物材料的特点各异,故处理要求也不尽相同。

(1) 动物组织

选材:必须选择有效成分含量丰富且易分离的脏器组织为原材料。如磷酸单酯酶,从含量看,虽然在胰脏、肝脏和脾脏中较丰富,但是因其与磷酸二酯酶共存,进行提纯时,这两种酶很难分开。所以实践中常选用含磷酸单酯酶少,几乎不含磷酸二酯酶的前列腺作材料。

脱脂:脏器中含量较高的脂肪,容易氧化酸败,导致原料变质影响纯度操作和制品得率。常用的脱脂方法有:人工剥去脏器外的脂肪组织;浸泡在脂溶性的有机溶剂(丙酮,乙醚)中脱脂;采用快速加热(50℃ 左右),快速冷却的方法,使熔化的油滴冷却后凝聚成油块而被除去。

保存:对预处理好的材料,若不立即进行实验,应冷冻保存。

①冰冻:剥去脂肪和筋皮等结缔组织,短期保存: -10℃ 的冰箱内;长期保存: -70℃ 低温冰箱内。

②干燥:对于像脑垂体一类小组织,可置丙酮液中脱水,干燥后磨粉储存备用;对于含耐高温有效成分(如:肝素)的肠黏膜,可在沸水蒸煮处理,烘干后能长期保存。

冰箱的除霜循环,可能对细胞造成伤害,要特别小心。解冻时要越快越好,但要避免局部过热。

(2) 植物材料

选材:注意植物品种和生长发育状况不同,其中所含生物大分子的量变化很大,另外与季节性关系密切。种子须泡胀或粉碎才可使用。含油脂较多的也要进行脱脂处理。

①提取核 DNA:选用黄化苗(生长 7~10d 小麦,水稻),防止叶绿体 DNA 的干扰。

②提取 RNA:根据实验目的选用生长幼嫩组织为好。

保存:冷冻采样后尽快放于 $-4^{\circ}\text{C}\sim-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱内。

DNA, RNA 采样后,液氮中速冻,置 -70°C 冰箱。对 RNA 样品,如不立即使用,冷冻保存尤为重要。

(3)微生物

选材:应注意它的生长期,在微生物的对数生长期,酶和核酸的含量较高,可以获得高产量,以微生物为材料时有两种情况:

①利用微生物菌体分泌到培养基中的代谢产物和胞外酶等。一般用离心法收集上清液,上清液只能在低温下短期保存。

②利用菌体含有的生化物质,如:蛋白质,核酸和胞内酶等,须破碎菌体细胞分离,湿菌体可低温短期保存,冻干粉可在 4°C 保存数月。

2. 细胞的破碎

细胞是生物体结构和功能的基本单位。一个细胞就是一个生物体,其一般构造包括细胞壁、细胞质膜、细胞质和核区。通常人们所需要的物质有些分泌于胞外,如淀粉酶和蛋白酶就是分泌在胞外的培养液中,用适当的溶剂可直接提取;有些则存在于胞内,欲提取存在于胞内的物质时,必须把细胞破碎。一般动物细胞的细胞膜比较脆弱,极易破损,往往在组织绞碎或提取时就被破坏了。而植物和微生物的细胞壁较牢固,需要在提取前进行专门的破细胞操作。

(1)机械破碎

①研磨法

剪碎的动物组织如鼠肝、兔肝等置研钵中,用研磨棒研碎。为了提高研磨效果,可加入一定量的石英砂。用匀浆器处理,也能破碎动物细胞。此法较温和,适宜实验室使用。但加石英砂时,要注意其对有效成分的吸附作用。如系大规模生产时,可用电动研磨法。细菌和植物组织的细胞破碎均可用此法。

②组织捣碎器法

用捣碎器(转速 $8\,000\sim10\,000\text{r/min}$)处理 $30\sim45\text{s}$ 可将植物和动物细胞完全破碎。如用其破碎酵母菌和细菌的细胞时,需加入石英砂才有效。但是在捣碎期间必须保持低温,捣碎的时间不宜太长,以防温度升高引起有效成分变性。现在多用细胞破碎仪。

③超声波法

借助声波的震动力破碎细胞壁和细胞器的有效方法。多用于微生物细胞的破碎,一般输出功率 100~200W,破碎时间 3~15min。如果在细胞悬浮液中加入石英砂则可缩短时间。为了防止电器长时间运转产生过多的热量,常采用间歇处理和降低温度的方法进行。

④压榨法

是一种温和、彻底破碎细胞的方法。用 30MPa 左右的压力迫使几十毫升细胞悬液通过一个小孔(小于细胞直径的孔),致使其被挤破、压碎。

⑤冻融法

将细胞置低温下冰冻一定时间,然后取出置室温下(或 40℃左右)迅速融化。如此反复冻融多次,细胞可在形成冰粒和增高剩余胞液盐浓度的同时,发生溶胀、破碎。

(2)溶胀和自溶

溶胀:细胞膜为天然的半透膜,在低渗溶液如低浓度的稀盐溶液中,由于存在渗透压差,溶剂分子大量进入细胞,引起细胞膜发生胀破的现象称溶胀。例如红血球置清水中会迅速溶胀破裂并释放出血红蛋白。

自溶:细胞结构在本身所具有的各种水解酶,如蛋白酶和酯酶等作用下,发生溶解的现象称自溶。

应用此法时要特别小心操作,因为水解酶不仅可使细胞壁、细胞膜破坏,同时也可将某些有效成分在自溶时分解。

(3)化学处理

用脂溶性的溶剂(如丙酮、氯仿、甲苯)或表面活性剂(如十二烷基磺酸钠、十二烷基硫酸钠)处理细胞时,可将细胞壁、细胞膜的结构部分溶解,进而使细胞释放出各种酶类或 DNA 等物质,并导致整个细胞破碎。

(4)生物酶降解

生物酶(如溶菌酶)有降解细菌细胞壁的功能。在用此法处理细菌细胞时,先是细胞壁消解,随之而来的是因渗透压差引起的细胞膜破裂,最后导致细胞完全破碎。

例如从某些细菌细胞提取质粒 DNA 时,不少方法都采用了加溶菌酶(来自蛋清)破坏细胞壁的步骤。当有些细菌对溶菌酶不敏感时,可加巯基乙醇(ME)