

普通高等教育“十二五”规划教材

生物系列

生物化学与分子生物学实验教程

SHENGWU HUAXUE YU FENZI SHENGWUXUE SHIYAN JIAOCHENG

主编 陈思礼



教育部直属师范大学
华中师范大学出版社

生物化学与分子生物学实验教程

主 编：陈思礼

副主编：吴士筠

编 者：（按姓氏笔画排列）

王红莹 王朝元 陈思礼

李 刚 李 劲 吴云华

林爱华 赵 平 耿 红

程 钢 彭勇波 薛 璐



华中师范大学出版社



北航

C1631705

Q5-33
98

内 容 简 介

本实验教程按照实验技术自身的体系,分为生物化学和分子生物学两篇,共69个实验,分实验目的,实验原理,试剂、材料与器材,操作步骤,注意事项和思考题六个部分,介绍生物化学与分子生物学实验技术,可供不同条件的学校选做。

该教程是一本系统的、实用性强的实验教材,将生物化学与分子生物学实验技术独立开课,通过讲做结合的模式,对生命科学各专业本科生和部分专业硕士研究生进行系统的生物化学与分子生物学技术训练。本教程也可以供农林类及医学各科学生参考使用。

新出图证(鄂)字 10 号

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验教程/陈思礼主编. —武汉:华中师范大学出版社,2012.7

ISBN 978-7-5622-5635-9

I. ①生… II. ①陈… 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. ①Q5-33 ②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 153808 号

生物化学与分子生物学实验教程

©陈思礼 主编

编辑室:第二编辑室

电话:027-67867362

责任编辑:沈艳青 王文琴

责任校对:张晶晶

封面设计:罗明波

出版发行:华中师范大学出版社

社址:湖北省武汉市珞喻路 152 号

邮编:430079

销售电话:027-67863426 67863280

邮购电话:027-67861321

传真:027-67863291

网址:<http://www.ccnupress.com>

电子信箱:hscbs@public.wh.hb.cn

督印:章光琼

印刷:武汉市新华印刷有限责任公司

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:12

字数:292 千字

版次:2012 年 8 月第 1 版

印次:2012 年 8 月第 1 次印刷

印数:1—3000

定价:26.00 元

欢迎上网查询、购书

敬告读者:欢迎举报盗版,请拨打举报电话 027-67861321

前 言

为了使高等院校生命科学相关专业学生能够系统地学习和掌握生物化学与分子生物学的基本实验技能,我们编写了这本实验教程。本教程主要包括生物化学和分子生物学两部分内容,根据不同的教学目标,本着“由浅入深、循序渐进”的原则,可根据不同教学层次和对象酌情选用。

本实验教程按 144 学时编写,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。教程的体系设计思想以方法学为主,对当今生命科学领域常用实验技术从实验目的,实验原理,试剂、材料与器材,操作步骤,注意事项和思考题六个方面作了系统的描述和介绍。在内容的选择上,以我们多年来试用的自编教材为蓝本,尽可能选择常用的、适合生命科学各专业的实验内容,同时也介绍一些现今最新的生命科学技术。

教程还包括附录内容,刊载了生物化学与分子生物学常用数据及资料,供学生在学习中查阅参考。

希望通过本教程的指导,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,在今后专业课的学习和将来的工作中能够灵活应用。

教程的生物化学部分的实验一、三十一、四十三和四十四由赵平编写,实验二至六由林爱华编写,实验七至十一由耿红编写,实验十二、十六、十九至二十二、二十七、二十九、三十八、三十九和四十八由陈思礼编写,实验十三、十四、十七和十八由王红莹编写,实验十五和四十七由程钢编写,实验二十三和二十四由吴云华编写,实验二十五、二十八、三十和三十二由王朝元编写,实验二十六、四十一由彭勇波编写,实验四十由彭勇波、陈思礼编写,实验三十三至三十七由李刚编写,实验四十二由李劲、陈思礼编写,实验四十五由薛璐编写,实验四十六由程钢、陈思礼、林爱华和王红莹编写。分子生物学部分的实验一至三由彭勇波编写,实验四至六由薛璐编写,实验七至十一、十九由赵平编写,实验十二、十三、十五至十八由李劲编写,实验十四由吴云华编写,实验二十由程钢编写,实验二十一由薛璐编写,武汉长江工商学院工学院副院长吴士筠老师参与了全书的整理、校对工作。

由于编者水平有限,诚望使用者提出意见,指正错漏,以便更好地完善本教程。使用本教程的同时,教师还应指导学生参看其他教材或文献,以拓宽视野。

本教程在编写过程中得到中南民族大学生命科学院相关领导和同仁的大力支持,华中师范大学出版社的高效率和精益求精的态度使本教程得以顺利出版,在此一并表示衷心的感谢。

笔 者

2011 年 12 月

实验须知

1. 学生实验之前应认真预习实验教材,未曾预习者或无故迟到者,实验指导教师有权停止其实验。

2. 学生实验时不得高声喧哗,不得随意串走,不得摆弄与本实验无关的仪器设备。

3. 学生应以实事求是的科学态度来进行实验,严格要求,认真做好实验的每一步骤。实验完毕,应及时递交实验报告;不准抄袭他人的实验报告,一经发现,抄袭者与被抄袭者均取消成绩。

4. 学生实验应该严格遵守操作规程,服从实验指导教师的指导。如因违反操作规程或因不听从指导而造成实验仪器设备损坏等事故,将按学校的有关规定,对肇事学生进行处理。

5. 实验过程中如发生故障,应立即向实验指导教师报告,以便及时处理。待故障排除后,继续进行实验。

6. 实验完毕后,应将仪器、工具、药品、试剂及时清理归还实验室,或按要求保管好。废液、废渣、废物不得随意倾倒,应集中在指定场所,由学校集中后统一处理。实验结束应打扫整理好实验场地,搞好清洁卫生工作。得到实验指导教师同意后,方可离开实验室。

实验室常用知识介绍

1. 实验前的各项准备工作

(1)预习。学生在进入实验室前,应当充分预习实验课内容。了解实验目的、意义、原理、实验方法与步骤、注意事项等。

(2)理论联系实际。将实验操作与课堂理论有机联系起来,做到理论联系实际,将课堂书本知识与实践有机结合。

(3)了解实验中可能出现的安全问题,以及所采取的相应的处理措施。

(4)随身带上实验教程、相关资料、实验记录本,以及实验中可能用到的学习用具,比如记号笔、米尺、标签纸、计算器和U盘等。

2. 实验室的安全规程

(1)熟悉易燃、易爆、有毒、腐蚀和生物毒害等有毒有害物品的标识。

(2)具有放射性物质的实验必须在规定的放射化学实验室内操作。

(3)严禁在实验室内进食、饮水和吸烟。

(4)使用移液管时,必须使用洗耳球吸取液体,切勿用嘴吸取。

(5)切记在无火源的环境中对易燃有机溶剂分装和转移。

(6)实验室一旦发生火灾,切记人身安全第一。事先一定要熟知安全防火、火灾救援常识。

(7)一旦发生动物致伤或生物材料划破肌肤,应及时消毒处理,并尽快到医院注射相应疫苗。

(8)严禁穿拖鞋进入实验室。

(9)严禁穿实验工作服进入食堂等公共场所。

(10)切勿乱动仪器设备。只有在熟悉仪器设备操作规程的前提下,才能使用仪器设备。

3. 从原始记录到实验报告

(1)学生必须认识到实验原始记录的重要性。原始记录是科学研究最重要的工具之一,手边没有记录本和笔就不宜开始做实验。

(2)实验记录应具有真实性、现场性、完整性和连续性。

(3)原始记录记得越详细越好。

(4)实验记录本的装订必须结实,有页码,有日期,纸张结实,墨迹明显,记录中不应留有空白页。

(5)原始实验记录的内容包括:实验标题和识别号;所记事件发生日期、时间和地点;实验目标;实验方法的文献出处;所有反应的平衡反应式;仪器参数及测量情况,注意记录合理的有效数字;记录重要的外界因素,比如温度和气压;不常见的或者不熟悉的仪器设备的描述和记载;有关药品、试剂的相对分子质量和物理性质;所有药品、试剂的生产厂家和纯度级别;所有动物、植物材料的种名和株系名及其来源;一切非商品材料的来源;原材料或试剂的提纯或实验所用的方法和结果;可能影响实验的偶发事件,比如停电、停水等;及时记录不正常的操作、数值和观察结果;将仪器测出的原始图表与实验记录黏贴在一起,切勿另外保存。

(6)实验报告。实验报告是一个对实验结果分析归纳、去粕取精、去伪存真、将感性认识上升到理性认识的过程。实验报告包括下列内容:前言、材料与方法、结果、讨论、致谢和参考文献。

(7)在实验报告的写作过程中,尽量利用软件,比如文字处理软件、图表制作软件、统计分析软件和生物化学与分子生物学的专用软件等。

目 录

第一篇 生物化学实验	1
实验一 植物细胞蛋白质的提取	1
实验二 牛乳中酪蛋白的制备及等电点的测定	3
实验三 大豆蛋白的提取及含量测定	5
实验四 双缩脲法(Biuret 法)测定蛋白质含量	7
实验五 Folin-酚法(Lowry 法)测定蛋白质含量	9
实验六 考马斯亮蓝染色法(Bradford 法)测定蛋白质含量	12
实验七 双辛丹宁法(BCA)测定蛋白质含量	14
实验八 紫外(UV)吸收法测定蛋白质含量	16
实验九 微量凯氏(Kjeldahl)定氮法测定蛋白质含量	18
实验十 凝胶过滤层析法测定蛋白质相对分子质量	20
实验十一 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质相对分子质量	23
实验十二 盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白	26
实验十三 滤纸层析及薄层层析法分离与鉴定氨基酸	28
一、氨基酸的纸层析	28
二、氨基酸的薄层层析	29
实验十四 离子交换柱层析法分离氨基酸	31
实验十五 定磷法定量测定核酸	33
实验十六 紫外(UV)吸收法定量测定核酸	35
实验十七 酵母 RNA 提取与地衣酚测定法	37
实验十八 发酵过程中无机磷的利用	40
实验十九 黄连素的提取	42
实验二十 黄连素的紫外光谱分析	44
实验二十一 肝糖原的提取及鉴定	46
实验二十二 血糖的定量测定	48
实验二十三 Somogyi-Nelson 比色法测定还原糖含量	50
实验二十四 硫酸—酚法测定糖含量	52
实验二十五 淀粉的测定	54
实验二十六 薄层层析法分离鉴定糖类物质	56
实验二十七 3,5-二硝基水杨酸法测定还原糖和总糖	58
实验二十八 糖的呈色反应和还原糖的检验	61
实验二十九 糖酵解中间产物的鉴定	65
实验三十 胰岛素、肾上腺素对血糖浓度的影响 ——邻甲苯胺法测定血液葡萄糖浓度	67
实验三十一 植物总黄酮的提纯与鉴定	70
实验三十二 2,6-二氯酚靛酚滴定法定量测定维生素 C	72

实验三十三	粗脂肪的提取和索氏(Soxhlet)提取法定量测定粗脂肪含量	74
实验三十四	脂肪碘值的测定	76
实验三十五	血清三酰甘油的测定	78
实验三十六	胆固醇氧化酶法测定血清总胆固醇	80
实验三十七	二乙酰-脲法测定血清尿素	82
实验三十八	酶促反应进程曲线的制作和初速度的测定	84
实验三十九	酸性磷酸酯酶的提取与 Folin-酚法测定其活力	86
实验四十	双倒数作图法测定碱性磷酸酶米氏常数	89
实验四十一	King 氏法测定血清谷丙转氨酶(SGPT)活性	92
实验四十二	酶联免疫吸附试验(ELISA)检测人体血清中乙型肝炎病毒表面抗体	94
实验四十三	激活剂、抑制剂、温度、pH 对酶活性的影响	98
实验四十四	细菌血栓溶解酶活性测定	100
实验四十五	过氧化氢酶 K_m 值的测定	102
实验四十六	用正交法测定几种因素对酶活力的影响	104
实验四十七	酯酶的分离、纯化与活性测定	108
实验四十八	脲酶 K_m 值的简易测定	111
第二篇	分子生物学实验	114
实验一	真核生物细胞染色体 DNA 的提取及含量测定	114
实验二	一步法提取动物肝脏组织总 RNA	117
实验三	植物总 RNA 的提取	119
实验四	目的基因 PCR 扩增及产物回收	122
实验五	碱裂解法微量制备质粒 DNA	125
实验六	质粒 DNA 的大量提取和纯化	127
实验七	大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞的制备	129
实验八	重组质粒的连接	131
实验九	重组质粒转化大肠杆菌感受态细胞及筛选、鉴定	133
实验十	重组质粒 DNA 的酶切	135
实验十一	DNA 酶切片段的分离与纯化	137
实验十二	重组表达质粒的原核表达	139
实验十三	DNA 印迹杂交	142
实验十四	凝胶电泳阻滞实验	146
实验十五	动物组织总蛋白的提取	148
实验十六	SDS-PAGE 与蛋白质印迹	150
实验十七	真核生物 mRNA 的分离纯化	153
实验十八	cDNA 文库的构建	157
实验十九	利用 RNAi 技术鉴定基因功能	164
实验二十	酵母双杂交系统测定蛋白质相互作用	166
实验二十一	GST 融合蛋白沉降(GST Pull-Down)技术	169
附录		171
一、实验室主要仪器使用操作规程与注意事项		171
二、常用缓冲溶液的配制		178

第一篇 生物化学实验

实验一 植物细胞蛋白质的提取

【实验目的】

掌握植物细胞蛋白质的提取方法和基本原理,熟悉实验操作技术。

【实验原理】

生物体内蛋白质由于其氨基酸组成、结构、大小、形状、电荷、等电点、疏水性、溶解度、密度、配体结合能力、金属结合能力及热稳定性等决定了分子作用类型,这些都是选择提取和分离方法的依据。用来分离纯化蛋白的方法很多,有沉淀法、离心法、电泳法、层析法等。在实施蛋白质提取和纯化的实际操作中,根据目标蛋白的不同,采用的方法或方法的组合也不同。本实验采用 Tris-HCl 缓冲液提取、丙酮沉淀的方法制备植物细胞蛋白的粗提物。

【试剂、材料与器材】

1. 试剂与材料

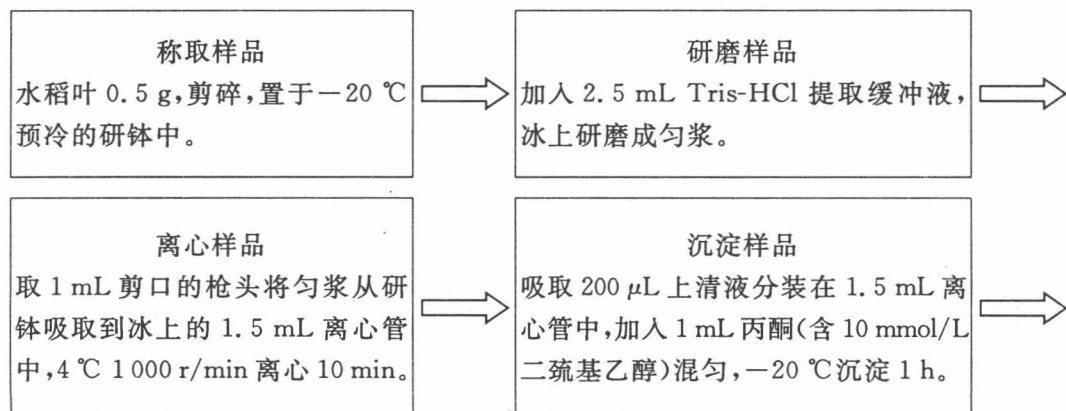
(1)试剂: Tris-HCl 提取缓冲液:30 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1 mmol/L DTT; 1 mmol/L EDTA; 5 mmol/L $MgCl_2$; 12 mg PVP/0.5 mL(研磨时加入)。

(2)材料:水稻嫩叶。

2. 器材

高速冷冻离心机、冰盒、不同型号的枪头和微量移液器。

【操作步骤】



纯化样品

沉淀 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液。沉淀用 80% 丙酮洗两次后在室温干燥 5 min~10 min, -20 °C 保存备用。

【注意事项】

研磨后用剪口枪头取样。离心后要取上清液, 避免将细胞碎片带人。

【思考题】

简述下列试剂在实验中的作用: Tris-HCl 提取缓冲液, 二巯基乙醇, 丙酮。

实验二 牛乳中酪蛋白的制备及等电点的测定

【实验目的】

1. 学习从牛乳中分离纯化酪蛋白的原理和方法。
2. 掌握通过聚沉测定蛋白质等电点的方法。

【实验原理】

在 pI 时,蛋白质溶解度最小,溶液的混浊度最大。配制不同 pH 缓冲液,观察蛋白质在这些缓冲液中的溶解情况即可确定蛋白质的 pI。

牛乳中含量最丰富的蛋白质是酪蛋白,约占牛乳蛋白质的 80%~82%。酪蛋白是一类含磷蛋白质的混合物,pI 为 4.7,不溶于水、乙醇及有机溶剂,但溶于碱溶液。本法先将牛乳的 pH 调至 4.7,使酪蛋白沉淀,再用乙醇和乙醚洗涤沉淀,除去脂类杂质可得纯酪蛋白。

【试剂、材料与器材】

1. 试剂与材料

(1) 试剂:①95%乙醇、无水乙醚、乙醇—乙醚混合液(V/V=1:1)。

②0.2 mol/L pH 4.7 醋酸—醋酸钠缓冲液 300 mL:

组分一:NaAc·3H₂O 54.44 g,定容至 200 mL。

组分二:优级纯醋酸(含量大于 99.8%)12.0 g,定容至 100 mL。

取组分一 177 mL,组分二 123 mL 混合,即得 pH 4.7 的醋酸—醋酸钠缓冲液 300 mL。

③1 mol/L 乙酸:99.5%乙酸(比重 1.05)2.875 mL,加水至 50 mL。

④0.1 mol/L 乙酸:1 mol/L 乙酸 5 mL,加水至 50 mL。

⑤0.01 mol/L 乙酸:0.1 mol/L 乙酸 5 mL,加水至 50 mL。

⑥1 mol/L NaOH:NaOH 2.000 g,加水至 50 mL,配成 1 mol/L NaOH。

⑦0.5%酪蛋白溶液:酪蛋白(干酪素)0.25 g 放入 50 mL 容量瓶中,加入约 20 mL 水,再准确加入 1 mol/L NaOH 5 mL,当酪蛋白溶解后,准确加入 1 mol/L 乙酸 5 mL,最后加水稀释定容至 50 mL,充分摇匀。

(2) 材料:市售牛乳。

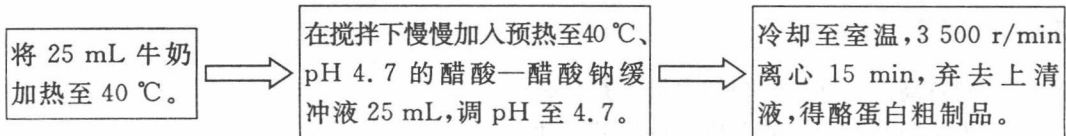
2. 器材

离心机、抽滤装置、精密 pH 试纸、恒温水浴、表面皿、天平、试管、移液管等。

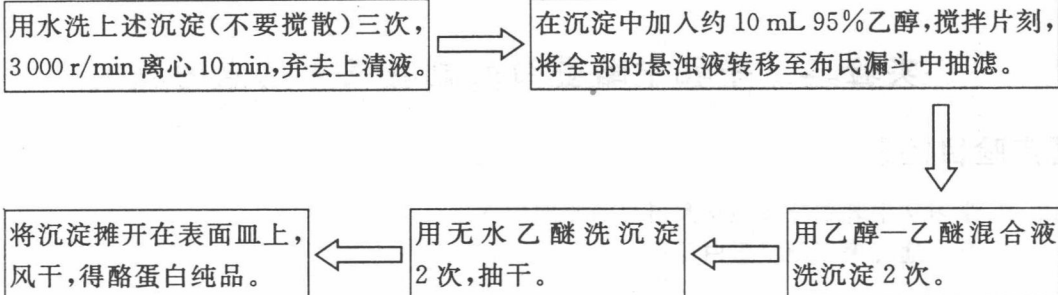
【操作步骤】

1. 牛乳中酪蛋白的制备

(1) 酪蛋白等电点沉淀



(2) 除脂类杂质



(3) 计算



2. 酪蛋白等电点的测定

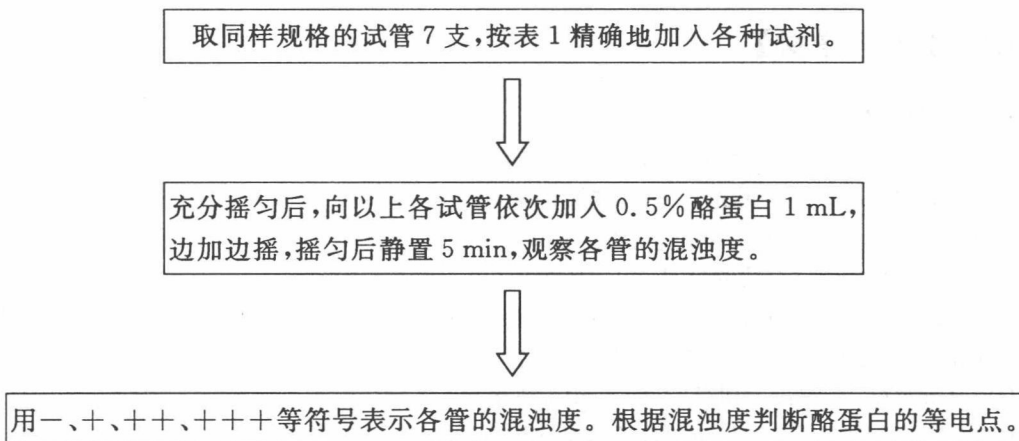


表 1 酪蛋白等电点测定加样

管号	1	2	3	4	5	6	7
1.0 mol/L 乙酸	1.6	0.8	0	0	0	0	0
0.1 mol/L 乙酸	0	0	4	1	0	0	0
0.01 mol/L 乙酸	0	0	0	0	2.5	1.25	0.62
H ₂ O	2.4	3.2	0	3	1.5	2.75	3.38
溶液的 pH	3.5	3.8	4.1	4.7	5.3	5.6	5.9

【注意事项】

1. 离心时, 对称位置的离心管必须配平。
2. 在测定等电点的实验中, 要求各种试剂的浓度和加入量相当准确。

【思考题】

1. 制备高产率纯酪蛋白的关键点是什么?
2. 本实验测定蛋白质等电点的原理是什么?

实验三 大豆蛋白的提取及含量测定

【实验目的】

1. 掌握大豆蛋白的提取及制备大豆蛋白丙酮干粉的原理和方法。
2. 学习计算蛋白质产率,测定蛋白质含量。

【实验原理】

大豆蛋白主要是酸性蛋白, pI 4.5~5.0, 能溶于碱溶液。丙酮(有机溶剂)可降低溶液的介电常数、破坏蛋白质的水化膜, 故可使蛋白质在一定条件下沉淀析出; 调节蛋白质溶液的 pH 到等电点附近, 有利于蛋白质的沉淀。

Folin-酚法测定蛋白质含量原理见实验五。

【试剂、材料与器材】

1. 试剂与材料

(1) 试剂: 0.2% NaOH、6 mol/L HCl、1 mol/L HCl、丙酮(预冷)、标准牛血清白蛋白溶液(见实验五)、Folin-酚试剂甲(见实验五)、Folin-酚试剂乙(见实验五)。

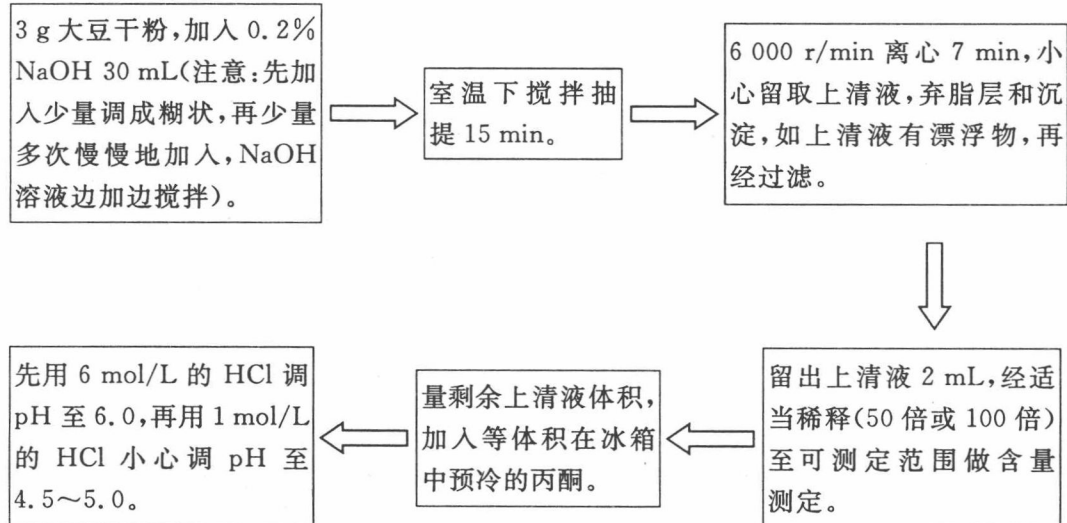
(2) 材料: 大豆干粉。

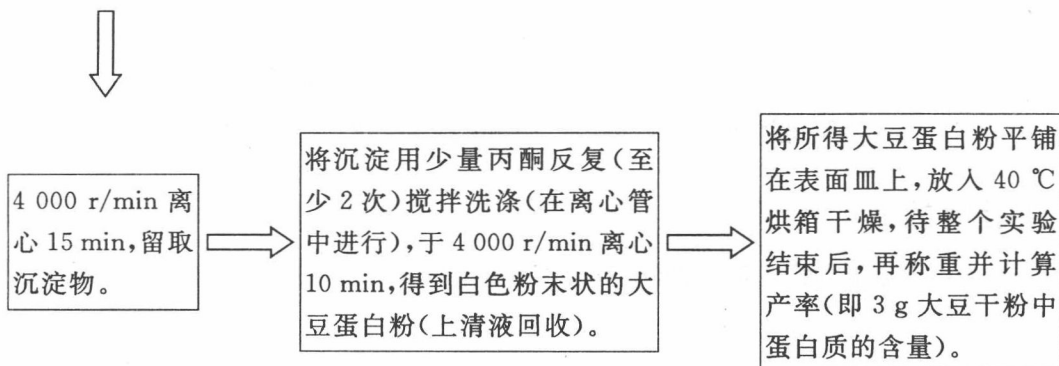
2. 器材

分光光度计、离心机、精密 pH 试纸(pH 0.5~5.0, pH 4.5~7.0)、玻璃棒、烧杯、天平、烘箱。

【操作步骤】

1. 蛋白提取





2. Folin-酚法测定蛋白质含量(见实验五)

3. 蛋白质浓度和产率的计算

$$\text{蛋白质浓度}(\text{mg/mL}) = \frac{A_{750\text{ nm}} \text{ 值对应的微克数}}{2\text{ mL} \times 1\,000} \times \text{稀释倍数}$$

$$\text{蛋白质产率}(\%) = \frac{\text{蛋白质浓度}(\text{mg/mL}) \times \text{上清液总体积}}{3\text{ g}} \times 100\%$$

【注意事项】

1. 离心时, 对称位置的离心管必须配平。
2. 制丙酮干粉时:
 - (1) 加入丙酮及加酸调 pH 时, 都要边加边搅拌。
 - (2) 丙酮一定要远离明火。
 - (3) 调 pH 时, 不能调过头。
 - (4) 制丙酮干粉, 要少量多次加入丙酮后, 将沉淀充分搅起。

【思考题】

1. 有机溶剂沉淀蛋白质的机理是什么?
2. 为提高蛋白质的产率, 应注意哪些操作事项?

实验四 双缩脲法(Biuret 法)测定蛋白质含量

【实验目的】

1. 掌握双缩脲法测定蛋白质含量的原理和方法。
2. 掌握分光光度计的使用、标准曲线的绘制、未知样品的测定、实验数据的处理与计算。

【实验原理】

当尿素经加热至 180 °C 左右时,两分子尿素脱去一分子氨,进而缩合成一分子双缩脲。在碱性条件下双缩脲与铜离子结合成紫红色络合物,此反应称为双缩脲反应。

多肽及蛋白质分子结构中均含有许多肽键,其结构与双缩脲分子中的亚酰胺键相同。因此,在碱性条件下与铜离子也能呈现出类似于双缩脲的颜色反应,形成紫红色络合物,其最大吸收波长在 540 nm 处,颜色的深浅与蛋白质的浓度成正比。

【试剂、材料与器材】

1. 试剂与材料

(1)双缩脲试剂:1.5 g 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)和 6.0 g 的酒石酸钾钠($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)溶于 500 mL 蒸馏水中,在搅拌下加入 300 mL 10% NaOH 溶液,用水稀释至 1 000 mL。贮存于内壁涂以石蜡的瓶内。此试剂可长期保存。

(2)标准蛋白质溶液:用 0.05 mol/L NaOH 溶液配制 10 mg/mL 结晶牛血清白蛋白溶液或相同浓度的酪蛋白溶液。作为标准用的蛋白质溶液要预先用微量凯氏定氮法测定蛋白质含量,根据其纯度称量,配制成标准溶液,于冰箱存放备用。

(3)待测蛋白质溶液:动物血清用水稀释 10 倍,或鸡蛋清用蒸馏水稀释 10 倍,通过 2~3 层纱布滤去不溶物,置于冰箱保存备用。

2. 器材

试管、试管架、移液管、恒温水浴、分析天平、分光光度计。

【操作步骤】

1. 标准曲线的制作及样品测定

取 9 支试管分成两组,按表 1 精确地加入各种试剂。



充分混匀,室温下(20℃~25℃)放置 30 min 后,以 0 号管为参比,测定各管的 $A_{540\text{ nm}}$ 值。



利用 Origin 等数据统计分析软件处理所得数据,以 1~5 号管的 $A_{540\text{ nm}}$ 值为纵坐标,标准蛋白质浓度为横坐标,绘制标准曲线,写出回归方程。

表 1 标准曲线的制作及样品测定加样

管号	0	1	2	3	4	5	6	7	8
标准蛋白液(mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	0.5 (样品)	0.5 (样品)	0.5 (样品)
H ₂ O(mL)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0	0.5	0.5	0.5
双缩脲试剂(mL)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0

2. 样品蛋白质含量的计算

取 6~8 号管的 $A_{540\text{ nm}}$ 值的平均值,根据回归方程算出相应的蛋白质浓度,则:

$$\text{血清样品蛋白质含量}(\text{mg}/100\text{ mL}) = \frac{c \times N}{V} \times 100$$

式中, c :由标准曲线查得样品蛋白质的浓度(mg/mL);

N :稀释倍数;

V :血清样品所取的体积(mL)。

【注意事项】

1. 须于显色后 30 min 内进行比色测定。各管由显色到比色的时间应尽可能一致。
2. 标准曲线制作与样品测定应同时进行,并使用同一空白调零点和比色。
3. 应使吸光度 A 值在 0.2~0.8 之间,若样品过浓,则稀释后再测。
4. 有大量脂肪性物质同时存在时,会产生混浊的反应混合物,这时可用乙醇或石油醚使溶液澄清后离心,取上清液再测定。

【思考题】

1. 根据自己的实验结果,总结出本实验应该注意的问题。
2. 说明双缩脲法的测定原理。

实验五 Folin-酚法(Lowry 法)测定蛋白质含量

【实验目的】

掌握 Folin-酚法测定蛋白质含量的原理和操作方法。

【实验原理】

Folin-酚法所用的试剂由试剂甲、试剂乙两部分组成。试剂甲相当于双缩脲试剂,其中的铜离子在碱性条件下可与蛋白质中的肽键结合生成深蓝色复合物;试剂乙在碱性条件下极不稳定,易被酚类化合物还原而呈蓝色反应(钼蓝和钨蓝的混合物)。由于蛋白质中含有带酚基的酪氨酸,故有此颜色反应。深蓝色复合物在 750 nm 处有最大吸收,在一定的条件下,蓝色的深浅度与蛋白质浓度呈线性关系。

与双缩脲法相比,Folin-酚法加入了第二种试剂,增加了显色量,提高了检测蛋白质的灵敏度,通常测定范围是 20 $\mu\text{g/mL}$ ~250 $\mu\text{g/mL}$ 。

【试剂、材料与器材】

1. 试剂与材料

(1) 试剂:①试剂甲

组分一:10 g Na_2CO_3 、2 g NaOH 和 0.25 g 酒石酸钾钠($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)溶解于 500 mL 蒸馏水中。

组分二:0.5 g 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)溶解于 100 mL 蒸馏水中。

每次使用前,将 50 份组分一与 1 份组分二混合,即为试剂甲。

②试剂乙:在 2 L 磨口回流瓶中,加入 100 g 钨酸钠($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、25 g 钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)及 700 mL 蒸馏水,再加 50 mL 85% 磷酸、100 mL 浓盐酸,充分混合,接上回流管,以小火回流 10 h,回流结束时,加入 150 g 硫酸锂(Li_2SO_4)、50 mL 蒸馏水及数滴液体溴,开口继续沸腾 15 min,以便驱除过量的溴,冷却后定容至 1 L,过滤,滤液置于棕色试剂瓶中,可在冰箱长期保存。使用前应确定其酸度,使最终的酸浓度为 1 mol/L 左右。

③标准蛋白质溶液:精确称取结晶牛血清白蛋白(BSA)溶于蒸馏水,稀释至浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$ 。牛血清白蛋白溶于水若混浊,可改用 0.9% NaCl 溶液。

(2)材料:白菜叶(大白菜叶或小白菜叶)。

2. 器材

分光光度计、研钵、容量瓶、移液管、离心机、试管、恒温水浴等。

【操作步骤】

1. 白菜叶提取液的制备