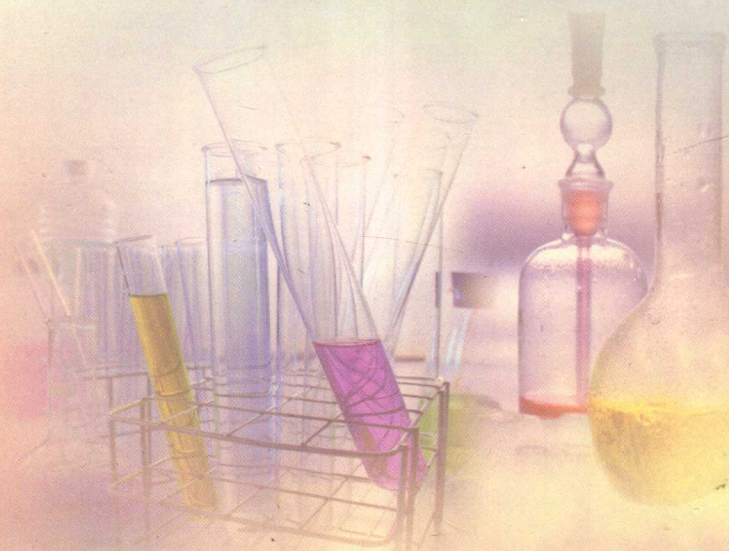


SHENGWUHUAXUESHISHIYANZHIDAO

# 生物化学实验指导

石庆华 主编



中国农业大学出版社

# 生物化学实验指导

石庆华 主编

中国农业大学出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验指导/石庆华主编. —北京:中国农业大学出版社,2006.9

ISBN 7-81117-051-5

I. 生… II. 石… III. 生物化学-实验 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 076964 号

书 名 生物化学实验指导

作 者 石庆华 主编

---

策划编辑	潘晓丽	责任编辑	冯雪梅
封面设计	郑川	责任校对	陈莹 王晓凤
出版发行	中国农业大学出版社		
社 址	北京市海淀区圆明园西路2号	邮政编码	100094
电 话	发行部 010-62731190,2620	读者服务部	010-62732336
	编辑部 010-62732617,2618	出版部	010-62733440
网 址	<a href="http://www.cau.edu.cn/caup">http://www.cau.edu.cn/caup</a>	e-mail	cbsszs @ cau.edu.cn
经 销	新华书店		
印 刷	涿州市星河印刷有限公司		
版 次	2006年9月第1版	2006年9月第1次印刷	
规 格	787×980	16开本	14.75印张 365千字
印 数	1~3 000		
定 价	20.00元		

---

图书如有质量问题本社发行部负责调换

主 编 石庆华

副主编 张 桦 王希东

参 编 沙依拉 罗淑萍 杨金菊 柴新星 吴阳升

# 前 言

随着生物技术和分子生物学知识在各学科和各研究领域中的广泛应用,生物化学作为其基础课程,在生物学科中的地位显得越来越重要,而生物化学又是一门重要的实验学科。为使学生在学习过程中掌握必要的生化实验技术,巩固相应的理论知识,为适应学科发展的需要,新疆农业大学生命科学系组织编写了这本生物化学实验指导。

本实验指导共收编 33 个实验,除包括基本的生化试验外,还增加了部分最新生化实验技术。在实验前对各实验技术的原理做了简要说明,以便学生对当前常用的生化技术有较全面的了解,同时还可使学生了解和接触最新的生化实验技术。此外,在附录中列出了我们觉得必须提供的实验室常识和常用数据。本书适用于农、林、渔、牧、医、草、园艺、植保等学科的本、专科生,还可作为生命学科研究生及研究人员的实验参考资料。

本实验指导书由生命科学系的石庆华、张桦、王希东、沙依拉、罗淑萍、杨金菊、柴新星、吴阳升编写。由于编者水平有限,可能会存在缺点和错误,希望读者在使用过程中给予指正,并提出宝贵意见。

新疆农业大学生命科学系

2006 年 6 月

# 目 录

## 第一部分 常见的实验方法及基本原理

透析	( 3 )
沉淀	( 5 )
层析	( 9 )
电泳	( 20 )
分光光度法	( 26 )

## 第二部分 实 验

实验 1 氨基酸的分离鉴定(纸层析法)	( 35 )
实验 2 胰蛋白酶抑制剂的分离纯化和活性测定	( 40 )
实验 3 胰蛋白酶的分离纯化	( 44 )
实验 4 蛋白质含量测定 ——双缩脲法,紫外分光光度法,考马斯亮蓝法	( 52 )
实验 5 紫外吸收光谱法测定核酸类物质	( 57 )
实验 6 凝胶层析法应用	( 60 )
实验 7 离子交换柱层析法分离氨基酸	( 68 )
实验 8 血清免疫球蛋白 G 的分离纯化及鉴定	( 70 )
实验 9 牛乳中蛋白质的提取与鉴定	( 76 )
实验 10 DNS-Cl 法测定蛋白质 N-末端的氨基酸	( 78 )
实验 11 等电聚焦电泳法测定蛋白质等电点	( 82 )
实验 12 酶的基本性质	( 85 )
实验 13 琥珀酸脱氢酶的作用及其竞争性抑制的观察	( 92 )
实验 14 小麦萌发前后淀粉酶活力测定	( 94 )
实验 15 同工酶分析	( 98 )
实验 16 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质相对分子质量	( 104 )
实验 17 蛋白质印迹(Western)	( 109 )
实验 18 免疫电泳	( 114 )

实验 19	血清蛋白的醋酸纤维薄膜电泳法分析 .....	(129)
实验 20	肝糖原的提取与鉴定 .....	(133)
实验 21	糖定量测定(蒽酮法) .....	(135)
实验 22	发酵过程中无机磷的利用 .....	(138)
实验 23	脂肪酸的 $\beta$ 氧化——酮体测定法 .....	(141)
实验 24	维生素 C 含量测定 .....	(145)
实验 25	转氨酶活力测定 .....	(149)
实验 26	纸层析法鉴定酶促转氨基作用 .....	(154)
实验 27	酵母核糖核酸的分离与组分鉴定 .....	(159)
实验 28	植物组织中 DNA 的提取和分析 .....	(162)
实验 29	质粒 DNA 的提取和鉴定 .....	(165)
实验 30	哺乳动物基因组 DNA 的提取 .....	(168)
实验 31	化学法测定 DNA 的含量 .....	(171)
实验 32	醋酸纤维薄膜电泳分离核苷酸 .....	(173)
实验 33	基因的 PCR 扩增 .....	(175)
<b>附录一</b>	<b>生物化学实验的基本要求 .....</b>	<b>(179)</b>
第一节	实验的准确性 .....	(179)
第二节	实验记录及报告 .....	(181)
第三节	实验样品的制备 .....	(182)
第四节	植物样品的采取、处理与保存 .....	(184)
第五节	实验的基本操作及要求 .....	(186)
<b>附录二</b>	<b>生物化学实验的常规知识 .....</b>	<b>(193)</b>
第一节	实验室安全及防护知识 .....	(193)
第二节	实验室常识 .....	(196)
第三节	试剂的配制及一些常用数据表 .....	(197)
第四节	常用仪器的使用方法 .....	(200)
第五节	层析技术常用数据 .....	(205)
第六节	常用缓冲液的配制 .....	(209)
第七节	硫酸铵溶液饱和度计算表 .....	(212)
第八节	离心机转数与相对离心力的换算 .....	(213)
第九节	分子生物学及基因工程常用数据 .....	(214)

---

第十节 与 DNA 凝胶电泳有关的数据 .....	(217)
第十一节 细菌培养基和抗生素 .....	(219)
第十二节 溴化乙锭溶液的净化处理 .....	(222)
第十三节 各种试剂和缓冲液的母液配制 .....	(224)
<b>参考文献</b> .....	(227)



# 第一部分

## 常见的实验 方法及基本原理



## 透 析

透析是一种膜分离方法。透析膜为半透膜,允许小分子物质透过,而截留蛋白质等大分子物质,因此,透析可用于蛋白质等生物大分子溶液的脱盐或缓冲液交换,是一种实验室分离纯化蛋白质等生物大分子的常用方法。

透析的一般操作过程如图 1-1 所示。将待分离的样品放进用半透膜制成的透析袋中,透析袋的两端打上结,并浸没于水或低离子强度的缓冲液(透析液)中,轻轻搅拌。在此过程中,小分子溶质在浓度差的作用下从透析袋逐渐扩散进入外部的透析液,而外部透析液中的缓冲液组分也可扩散进入透析袋,从而达到除去样品中小分子溶质或样品缓冲液交换的目的。

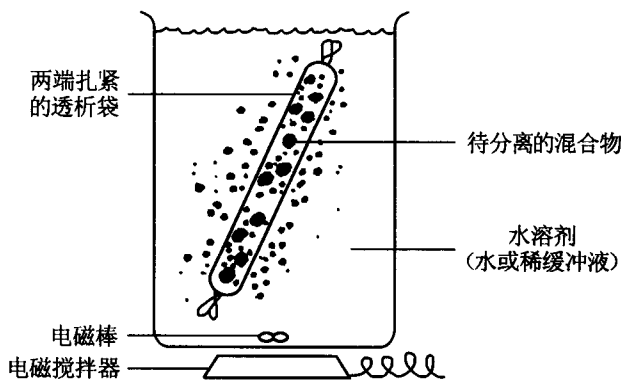


图 1-1 透析操作示意图

透析膜通常用玻璃纸、火棉胶、纤维素和聚丙烯腈等亲水性材料制成,具有一定的孔径,允许相对分子质量较小的物质通过,而截留相对分子质量较大的蛋白质和其他分子,将它们保留在膜内。透析膜的孔径通常用“截留相对分子质量”(或截留相对分子质量)表示。“截留相对分子质量”是用假定的平均球蛋白的大小为基础标定的,是个标称量。如果待分离物质(如蛋白质)是线状的,那么即使其相对分子质量大于膜的截留相对分子质量,有可能透过透析膜。因此,在透析操作时最好选择截留相对分子质量远小于待保留物质相对分子质量的透析膜。

透析操作的一个重要指标是透析率,即小分子溶质的去除率。透析率取决于若干因素,如样品的浓度、溶质的相对分子质量、样品和透析液的体积、透析时间等。无机盐等分子溶质的扩散系数大,透析速度快。较频繁地更换透析液,使样品与透析液间保持较大的浓度差,可提高透析速度,缩短透析时间。

在透析过程中,由于膜内外存在浓度差(渗透压),透析液中的水进入膜内,使样品体积增大。因此初始样品量应装添至透析袋体积的一半,另一半是空的,并且不含空气。如果不留出样品体积膨胀所需要的空间,袋内压力就会不断升高,最终导致透析膜涨破或使膜孔变形,造成透析袋中的蛋白质等大分子物质流失。另外,透析操作的时间一般较长,最好在低温下进行,以防待分离的生物活性物质变性失活或发生微生物污染。透析速度是与温度相关的。为了加快透析的速度,可用磁力搅拌器搅拌并且频繁更换透析液。

# 沉 淀

沉淀是因环境的变化引起溶质的溶解度降低、生成固体凝聚物的现象。与结晶相比,沉淀是不定形的固体颗粒,构成成分复杂,除含有目标分子外,还夹杂共存的杂质、盐和溶剂。因此,沉淀法是一种初级分离技术。但多步沉淀操作也可制备高纯度的目标产品。

利用沉淀原理分离蛋白质是传统的分离技术之一,目前广泛应用于实验室和工业规模蛋白质等生物产物的回收、浓缩和纯化。本节根据蛋白质的特性及其沉淀原理简单介绍几种常见的沉淀方法。

## 一、蛋白质的特性

蛋白质是两性高分子电解质,主要由疏水性各不相同的 20 种氨基酸组成。在水溶液中,多肽链中的疏水性氨基酸残基具有向内部折叠的趋势,使亲水性氨基酸残基分布在蛋白质立体结构的外表面。即使如此,一般仍有部分疏水性氨基酸残基暴露在外表面,形成疏水区。疏水性氨基酸含量高的蛋白质的疏水区大,疏水性强。因此,蛋白质表面由不均匀分布的荷电基团形成的荷电区、亲水区和疏水区构成。

蛋白质的相对分子质量在  $6 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$  之间,分子直径为  $1 \sim 30$  nm。因此,蛋白质的水溶液呈胶体性质,在蛋白质分子周围存在与蛋白质分子紧密或疏松结合的水化层,它是蛋白质形成稳定的胶体溶液,防止蛋白质凝聚和沉淀的屏障之一。

蛋白质沉淀的另一屏障是蛋白质分子间的静电排斥作用。偏离等电点的蛋白质的净电荷或正或负,成为带电粒子,在电解质溶液中吸引相反电荷的离子(简称反离子)。由于离子的热运动,该反离子层并非全部整齐地排列在一个面上,而是距表面由高到低有一定的浓度分布,形成分散双电层。当双电层的电位足够大时,静电排斥作用抵御分子间的相互吸引作用(分子间力),使蛋白质溶液处于稳定状态。

因此,可通过降低蛋白质周围的水化层和双电层厚度来降低蛋白质在溶液中的稳定性,实现蛋白质的沉淀。水化层厚度和电位与溶液性质(如电解质的种类、浓度、pH 值等)密切相关,所以,蛋白质的沉淀可采用恒温条件下添加各种不同试剂的方法,如加入无机盐的盐析法,加入酸碱调节溶液 pH 值的等电点沉淀法,加

入水溶性有机溶剂的有机溶剂沉淀法等来实现。

## 二、常见的蛋白质沉淀方法

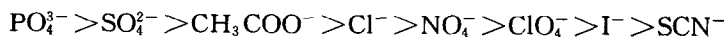
### (一) 盐析沉淀

1. 原理 在水溶液中,蛋白质的溶解度一般在生理离子强度范围内(0.15~0.2 mol/kg)最大,而低于或高于此范围时溶解度均降低。蛋白质在高离子强度的溶液中溶解度降低,发生沉淀的现象称为盐析。

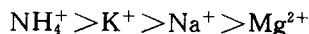
目前电解质影响蛋白质溶解度的机理尚不十分清楚,存在不同的理论解释。但一般认为,向蛋白质的水溶液中逐渐加入电解质时,开始阶段蛋白质的活度系数降低,并且蛋白质吸附盐离子后,带电表层使蛋白质分子间相互排斥,但蛋白质分子与水分子间的相互作用却加强,因而使蛋白质的溶解度增大,出现盐溶现象。随着离子强度的增大,蛋白质表面的双电层厚度降低,静电排斥作用减弱;同时,由于盐离子的水化作用使蛋白质表面疏水区附近的水化层脱离蛋白质,暴露出疏水区域,从而增大了蛋白质表面疏水区之间的疏水相互作用,容易发生凝集,进而沉淀。所以,一般在蛋白质的溶解度与离子强度的关系曲线上存在最大值,该最大值在较低的离子强度下出现,在高于此离子强度的范围内,溶解度随离子强度的增大迅速降低。

### 2. 影响沉淀的主要因素

(1)无机盐。在相同的离子强度下,不同种类的盐对蛋白质的盐析效果不同。离子半径小而带电荷较多的阴离子的盐析效果较好。例如,含高价阴离子的盐比低价盐的盐析效果好,即盐析常数大。常见阴离子的盐析作用顺序为:



阳离子的盐析作用的顺序为:



在选择盐析的无机盐时,除考虑上述各种离子的盐析效果外,对盐还有如下要求:

- ①溶解度大,能配制高离子强度的盐溶液;
- ②溶解度受温度影响较小;
- ③盐溶密度不高,以便蛋白质沉淀的沉降或离心分离。

硫酸铵价格便宜、溶解度大且受温度影响很小,具有稳定蛋白质(酶)的作用,因此是最普遍使用的盐析盐。但硫酸铵有如下缺点:硫酸铵为强酸弱碱盐,水解后使溶液 pH 值降低,在高 pH 值下释放氨;硫酸铵的腐蚀性强,后处理困难;残留在食品中的少量的硫酸铵可被人味觉感知,影响食品风味;临床医疗有毒性,因此在

最终产品中必须完全除去。除硫酸铵外,硫酸钠和氯化钠也常用于盐析。硫酸钠在 40℃ 以下溶解度较低,主要用于热稳定性高的胞外蛋白质的盐析。

(2) 温度和 pH 值。除盐的种类外,盐析操作的温度和 pH 值是获得理想盐析沉淀分级的重要参数。一般物质的溶解度随温度的升高而增大,但在高离子强度溶液中,升高温度有利于某些蛋白质的失水,因而温度升高,蛋白质的溶解度下降。但是,必须指出,这种现象只在离子强度较高时才出现。在低离子强度溶液或纯水中,蛋白质的溶解度在一定温度范围内一般随温度升高而增大。

在 pH 值接近蛋白质等电点的溶液中蛋白质的溶解度最小,所以调节溶液 pH 值在等电点附近有利于提高盐析效果。

因此,蛋白质的盐析沉淀操作需选择合适的 pH 值和温度,使蛋白质的溶解度较小。同时,盐析操作条件要温和,不能引起目标蛋白质的变性。所以,盐析和前述的其他沉淀法一样,需在较低温度下进行,但不像有机溶剂沉淀法那样要求严格。

### (二) 等电点沉淀

蛋白质在 pH 值为其等电点的溶液中净电荷为零,蛋白质之间静电排斥力最小,溶解度最低。利用蛋白质的这一性质进行沉淀分级的方法称为等电点沉淀法。

在上述的盐析沉淀中,一般也要结合等电点沉淀的原理,使盐析操作在等电点附近进行,降低蛋白质的溶解度。但是,利用中性盐进行盐析时,使蛋白质溶解度最低的溶液,pH 值一般略小于蛋白质的等电点。

等电点沉淀的操作条件是低离子强度;pH 值 $\approx$ pI 值。因此,等电点沉淀操作需在低离子强度下调整溶液 pH 值至等电点,或在等电点的 pH 值时利用透析等方法降低离子强度,使蛋白质沉淀。由于一般蛋白质的等电点多在偏酸性范围内,故等电点沉淀操作中,多通过加入无机酸(如盐酸、磷酸和硫酸等)调节 pH 值。

等电点沉淀法一般适用于疏水性较大的蛋白质(如酪蛋白),而对于亲水性很强的蛋白质(如明胶),由于在水中溶解度较大,在等电点的 pH 值下不易产生沉淀。所以,等电点沉淀法不如盐析沉淀法应用广泛。但该方法仍不失为有效的蛋白质初级分离手段。例如,从猪胰脏中提取胰蛋白酶原(pI 值=8.9)时,可先于 pH 值 3.0 左右进行等电点沉淀,除去共存的许多酸性蛋白质(pI 值=3.0)。

与盐析法相比,等电点沉淀的优点是无需后续的脱盐操作。但是,如果沉淀操作的 pH 值过低,容易引起目标蛋白质的变性。

### (三) 有机溶剂沉淀

向蛋白质溶液中加入丙酮或乙醇等水溶性有机溶剂,水的活度降低。随着有机溶剂浓度的增大,水对蛋白质分子表面电荷基团或亲水基团的水化程度降低,溶

液的介电常数下降,蛋白质分子间的静电引力增大,从而凝聚和沉淀。同等电点沉淀一样,有机溶剂沉淀也是利用同种分子间的相互作用。因此,在低离子强度和等电点附近,沉淀易于生成,或者说所需有机溶剂的量较少。一般来说,蛋白质的相对分子质量越大,有机溶剂沉淀越容易,所需加入的有机溶剂量也越少。

有机溶剂沉淀法的优点是有机溶剂密度较低,易于沉淀分离;与盐析法相比,沉淀产品不需脱盐处理。但有机溶剂沉淀法容易引起蛋白质变性,必须在低温下进行。另外,应用有机溶剂沉淀时,所选择的有机溶剂应与水互溶、不与蛋白质发生作用的物质。常用的有丙酮和乙醇。

#### (四)热沉淀

在较高温度下,热稳定性差的蛋白质将发生变性沉淀。利用这一现象,可根据蛋白质间的热稳定性的差别进行蛋白质的热沉淀,分离纯化热稳定性高的目标产物。

必须指出,热沉淀是一种变性分离法,带有一定的冒险性,使用时需对目标产物和共存杂蛋白的热稳定性有充分的了解。

#### (五)其他沉淀

非离子型聚合物、聚电解质和某些高价金属离子也可作为蛋白质的沉淀剂。例如,非离子型聚合物聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)是蛋白质稳定剂,也可促进蛋白质的沉淀。其作用机理尚不清楚,其一认为与有机溶剂的作用相似,即降低蛋白质的水化度,增大蛋白质间的静电引力而使蛋白质沉淀;其二认为是 PEG 的空间排斥作用使蛋白质被迫挤靠在一起而引沉淀。

聚电解质对蛋白质的沉淀作用机理与絮凝作用类似,是在蛋白质间起架桥作用。同时,聚电解质还兼有盐析和降低水化程度的作用。利用聚电解的沉淀方法主要应用于酶和食用蛋白的回收,常用于回收食品蛋白的聚电解质有酸性多糖和羧甲基纤维素、海藻酸盐、果胶酸盐和卡拉胶等。

某些金属离子可与蛋白质分子上的某些残基发生相互作用而使蛋白质沉淀。例如,  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  能与羧基结合,  $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  能与羧基、含氮化合物(如胺)以及杂环化合物结合。金属离子沉淀法的优点是可使浓度很低的蛋白质沉淀,沉淀产物中的重金属离子可用离子交换树脂或螯合剂除去。



# 层 析

## 一、层析原理

层析法也叫色谱法(chromatography),是一种以两相间分配或吸附平衡为机理的物理化学分离和分析方法。层析系统包括两相,即固定相(固相或液相)和流动相(液相或气相)。当流动相流过加有样品的固定相时,由于样品中各组分在理化性质上的微小差别,所受固定相的阻滞作用和受流动相推动作用的影响各不相同,因而各组分在固定相与流动相之间的分配也不相同,从而使混合组分以不同速度移动而达到彼此分离的目的。与一般化学方法相比,层析法对于许多化学性质相同或相似,很难用萃取、蒸馏等技术分离的复杂混合物,以及相似化合物的异构体、同系物的分离有特效。层析法具有分离速度快、精确性高、适用范围广、设备简单、操作方法简便等特点,因此在生化、化工、医药卫生、食品、环境保护等领域得到了广泛的应用。

层析法从发明至今已有一个世纪的历史。1903年俄国科学家 Tswett 首先使用层析法分离植物色素,他向填充碳酸钙的柱中加入植物色素的萃取液,接着用石油醚淋洗,发现柱内有数条相互分离的连续色带产生,于是将这种连续色带称为色层或色谱,用 chroma(色彩)和 graphs(图谱)构成色谱一词,层析法由此而得名,层析技术也逐渐被广泛应用于各种有机、无机化合物的分析与分离。层析法目前已发展成许多类型,随着计算机、光谱技术的广泛应用,层析使用的仪器也由最简单的自制组合装置发展成各种现代化、全自动并带数据处理系统的层析仪,并具有更高的灵敏性和精确性。由于层析技术可同时实现物质的分离和分析,因此这种方法已成为纯化和鉴定化合物的一种重要手段。

层析法有若干种类,如气相色谱、液相色谱、柱状层析、开床式滤纸层析、薄层层析以及分配、吸附、离子交换、凝胶过滤层析等。各种层析的原理和特性见表 1-1。

表 1-1 各种层析法的原理和特性

名 称	原 理	床形式	固定相	流动相	载 体
吸附层析	疏水力和静电引力	柱状	固体	液体	硅胶、氧化铝、疏水性吸附剂
分配层析	溶解度	柱状	液体	液体	纤维素、硅藻土、硅胶