

高等学校实验教学示范中心系列规划教材

生物化学实验

SHENGWU HUAXUE SHIYAN

刘士平 龚美珍 主编



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

生物化学实验

主 编 刘士平 龚美珍
副主编 熊 泽 薛艳红

华中科技大学出版社
中国·武汉

内 容 提 要

全书主要分为实验基本知识和实验内容两部分。编写中以糖类、脂类、蛋白质、核酸等生物大分子的相关性质反应为主线,突出每个实验的基本原理、实验方法及完成实验后需要进一步思考的问题。为适应“既注重实践能力的提高,又培养具有独立思维能力”的人才培养理念,遵循“厚基础、重应用、高工程素质”的培育模式,目前,许多高校的生命科学相关专业均开设有生物化学实验课程,本书可为此课程提供成套的生物化学实验内容。

本书不仅可以作为生命科学及相关学科学生学习生物化学课程时的实验教材,对工、农、医、食品等领域的专业人员也有一定的参考价值和指导作用。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验/刘士平,龚美珍主编. —武汉:华中科技大学出版社,2014.5
ISBN 978-7-5680-0090-1

I. ①生… II. ①刘… ②龚… III. ①生物化学-实验 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 100167 号

生物化学实验

刘士平 龚美珍 主编

策划编辑:王新华

责任编辑:程芳

封面设计:李嫒

责任校对:张会军

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)81321915

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:华中理工大学印刷厂

开 本:710mm×1000mm 1/16

印 张:9.5

字 数:188千字

版 次:2014年6月第1版第1次印刷

定 价:22.00元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

前 言

生物化学,顾名思义是研究生物体中的化学进程的一门学科,常常被简称为生化。它主要用于研究细胞内各组分,如蛋白质、糖类、脂类、核酸等生物大分子的结构和功能。

生物化学对其他各门生物学科的深刻影响首先反映在与其关系比较密切的细胞学、微生物学、遗传学、生理学等领域。通过对生物高分子结构与功能进行深入研究,揭示生物体物质代谢、能量转换、遗传信息传递、光合作用、神经传导、肌肉收缩、激素作用、免疫和细胞间通讯等许多奥秘,使人们对生命本质的认识跃进到一个崭新的阶段。

生物学中一些看来与生物化学关系不大的学科,如分类学和生态学,以及在探讨人口控制、世界食品供应、环境保护等社会性问题时都需要从生物化学的角度加以考虑和研究。

此外,生物化学作为生物学和物理学之间的桥梁,将生命世界中所提出的重大而复杂的问题展示在物理学面前,产生了生物物理学、量子生物化学等边缘学科,从而丰富了物理学的内容,促进了物理学和生物学的发展。

生物化学是在医学、农业、某些工业和国防部门的生产实践的推动下成长起来的,反过来,它又促进了这些部门生产实践的发展。

生命科学及相关专业开设生物化学实验课程,旨在强化学生的实践环节、提高学生动手能力、强化分析实验现象的逻辑思维能力。通过实验训练,学生可以在实验设计能力、操作能力、分析能力、创新能力、团队合作能力等各方面得到提高,并能把课本上学习到的理论知识转化成实际应用,不仅为后续的毕业课题研究打下基础,也能提高毕业后就业的市场竞争力。

本书重点介绍了生物化学实验技术和分析方法,比较全面地介绍了生物分子如糖类、脂类、蛋白质、酶、核酸,以及维生素的提取、鉴定、定性或定量分析技术,其中不仅包括颜色反应、层析法、离子交换法、电泳法等研究方法,也包括部分分子生物学实验的内容。这些实验技术和分析方法均是我们从事教学和科研一线的教师们总结而来的,对学生学习生物化学课程有更明确的指导作用。通过实验的操作让学生更充分地了解生物化学知识,增强动手操作能力,在深刻掌握理论知识的同时学会技术操作。本书不仅可以作为生命科学及相关学科学生学习生物化学课程时的实验教材,对工、农、医、食品等领域的专业人员也有一定的参考价值和指导作用。

本书得以完成,全靠所有编者的共同努力。尽管我们竭力使该实验教程满足读者的所有需要,但由于编者水平有限,不足及疏漏之处在所难免,还请同行、读者批评指正。

编 者

2014 年 3 月

目 录

第一部分 实验基本知识

第一章 生物化学实验须知	(3)
第二章 实验室常用知识	(5)

第二部分 实 验 内 容

实验一 糖的颜色反应	(13)
实验二 糖的化学性质	(15)
实验三 还原糖和总糖的测定(3,5-二硝基水杨酸比色法)	(17)
实验四 还原糖的测定(费林试剂法)	(21)
实验五 果胶的提取和果酱的制备	(24)
实验六 卵磷脂的提取、鉴定和应用	(27)
实验七 油脂碘值的测定(Hanus法)	(29)
实验八 油脂过氧化值的测定	(36)
实验九 油脂酸价的测定	(38)
实验十 粗脂肪含量的测定(索氏抽提法)	(41)
实验十一 蛋白质的变性、凝固及沉淀反应	(44)
实验十二 蛋白质的颜色反应	(48)
实验十三 氨基酸总量(氨态氮)的测定	(52)
实验十四 氨基酸的薄层层析	(55)
实验十五 氨基酸的分离鉴定——纸层析法	(59)
实验十六 离子交换法分离氨基酸	(62)
实验十七 蛋白质含量测定	(66)
实验十八 血清蛋白质乙酸纤维素薄膜电泳	(78)
实验十九 垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质	(82)
实验二十 理化因素对酶活力的影响	(88)
实验二十一 马铃薯多酚氧化酶的制备及性质实验	(92)
实验二十二 果胶酶活力的测定	(96)
实验二十三 碱性蛋白酶活力的测定(Folin-酚试剂法)	(99)

实验二十四	用正交法测定几种因素对蔗糖酶活力的影响·····	(102)
实验二十五	酵母 RNA 的提制 ·····	(107)
实验二十六	植物组织中 DNA 和 RNA 的提取与鉴定 ·····	(113)
实验二十七	DNA 片段的 PCR 扩增及电泳检测·····	(117)
实验二十八	质粒 DNA 的提取 ·····	(120)
实验二十九	质粒 DNA 的酶切、连接和转化 ·····	(123)
实验三十	维生素 C 的测定 ·····	(128)
实验三十一	发酵过程中无机磷的利用·····	(134)
实验三十二	从牛奶中分离酪蛋白和乳糖·····	(137)
实验三十三	从番茄中提取番茄红素和 β -胡萝卜素 ·····	(139)
参考文献	·····	(142)

第一章 生物化学实验须知

一、实验室规则

(1)实验课必须提前 5 min 到实验室,不迟到,不早退,应自觉遵守课堂纪律。

(2)使用仪器、药品、试剂和各种物品必须注意节约,应特别注意保持药品和试剂的纯净,严防混杂污染。

(3)实验台、试剂药品架必须保持整洁,仪器药品摆放井然有序。实验完毕,需将药品、试剂排列整齐,仪器洗净,倒置放好,实验台面抹拭干净,经教师验收合格后,方可离开实验室。

(4)使用和洗涤仪器时,应小心谨慎,防止损坏仪器。使用精密仪器时,应严格遵守操作规程,发现故障应立即报告教师,不要自己动手检修。

(5)在实验过程中要听从教师的指导,严肃认真地按操作规程进行实验,并简要、准确地将实验结果和数据记录在实验记录本上。课后写出实验报告,由课代表收齐交给指导教师。

(6)仪器损坏时,应如实向教师报告,认真填写损坏仪器登记表,然后补偿一定金额。

(7)每次实验课安排同学轮流值日,值日生要负责当天实验的卫生和安全检查。

二、实验记录

实验课前应认真预习实验内容,将实验名称、实验原理、实验内容和步骤等简单扼要写在记录本上。实验记录本要标明页码,不能随意撕掉任何一页。

实验中使用的试剂纯度和终浓度以及使用的仪器类型等都要记录清楚。实验中观察到的现象、结果和得出的数据,应及时记在记录本上,绝对不可以随意记在单片纸上。原始记录必须准确、简练、清楚。

三、实验报告的书写

实验结束后,应及时整理和总结实验结果,写出实验报告。实验报告应包括如

下内容。

(1)标题:应包括实验名称、实验时间、实验室名称、实验组号、实验者及同组者姓名、实验室条件。

(2)实验目的。

(3)实验原理:应简述基本原理,不要完全照抄实验指导书。

(4)操作步骤:可以采用流程图的方式或自行设计的表格来表达。

(5)实验结果:将实验中的现象、数据进行整理、分析,得出相应的结论。建议尽量使用图表法来表示实验结果,这样可以使实验结果清楚明了。

(6)讨论:包括对实验结果及观察现象的小结、对实验中遇到的问题和思考题的探讨以及对实验的改进意见等。

四、生物化学实验课评分标准

生物化学实验课按以下几个方面进行评分:

(1)实验预习情况(10%);

(2)实验操作情况(20%);

(3)实验报告情况(20%);

(4)实验考试成绩(50%)。

第二章 实验室常用知识

一、玻璃仪器的洗涤及一些常用的洗涤剂

1. 玻璃仪器的洗涤

(1)新购买的玻璃仪器,首先用自来水洗去表面灰垢,然后用洗衣粉刷洗,自来水冲净后,浸泡在1%~2%盐酸中过夜以除去玻璃表面的碱性物质,最后用自来水冲洗干净,并用蒸馏水冲洗2次。

(2)对于使用过的玻璃仪器,应先用自来水冲洗,再用毛刷蘸取洗衣粉刷洗。用自来水充分冲洗后再用蒸馏水冲洗2次。凡洗净的玻璃仪器壁上都不应带有水珠,否则表示尚未洗净,需重新洗涤。

(3)比较脏的仪器或不便刷洗的仪器,使用前应用流水冲洗,以除去黏附物,如果仪器上有凡士林或其他油污,应先用软纸擦除,再用有机溶剂擦净,最后用自来水冲洗。待仪器晾干后,放入铬酸洗液中浸泡过夜。取出后用自来水充分冲洗,再用蒸馏水冲洗2次。

(4)普通玻璃仪器可在烘箱内烘干,但定量的玻璃仪器如吸管、滴定管、量筒、容量瓶等不能加热,应晾干备用。另外,分光光度计中的比色杯的四壁是用特殊胶水黏合而成的,受热后会散架,所以也不能烘干。

(5)对疑有传染性的样品(如肝炎病人的血清),其容器应先消毒再清洗。盛过剧毒药物或放射性同位素物质的容器,应先经过专门处理后再清洗。

2. 一些常用的洗涤剂

1)肥皂水或洗衣粉溶液

肥皂水或洗衣粉溶液是最常用的洗涤剂,主要利用其乳化作用以除去污垢,一般玻璃仪器均可用其刷洗。

2)铬酸洗液(重铬酸钾-硫酸洗液)

铬酸洗液广泛用于玻璃仪器的洗涤,其清洁效力来自于它的强氧化性(6价铬)和强酸性。铬酸洗液具有强腐蚀性,使用时应注意安全。铬酸洗液可反复多次使用,如洗液由红棕色变为绿色或过于稀释则不宜再用。

3) 5%~10% 乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2)溶液

加热煮沸,利用 EDTA 和金属离子的强配位效应,可去除玻璃器皿内部钙、镁盐类的白色沉淀和不易溶解的重金属盐类。

4) 45% 尿素洗液

45% 尿素洗液是蛋白质的良好溶剂,适用于洗涤盛蛋白质制剂及血样的容器。

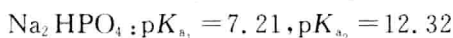
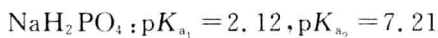
5) 乙醇-硝酸混合液

乙醇-硝酸混合液用于清洗一般方法难于洗净的有机物,适合于洗涤滴定管。

二、生物化学常用缓冲液

1. 磷酸盐缓冲液

磷酸盐是生物化学研究中使用最广泛的一种缓冲剂,由于它们是二级解离,有 2 个 pK_a 值,所以用它们配制的缓冲液, pH 值范围最宽。



配酸性缓冲液:用 NaH_2PO_4 , pH 值为 1~4。

配中性缓冲液:用混合的两种磷酸盐, pH 值为 6~8。

配碱性缓冲液:用 Na_2HPO_4 , pH 值为 10~12。

磷酸盐缓冲液的优点如下:

- (1) 容易配制成各种浓度的缓冲液;
- (2) 适用的 pH 值范围宽;
- (3) pH 值受温度的影响小;
- (4) 缓冲液稀释后 pH 值变化小,如稀释 10 倍后 pH 值的变化小于 0.1。

其缺点如下:

- (1) 易与常见的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 以及重金属离子缔合生成沉淀;
- (2) 会抑制某些生物化学过程,如对某些酶的催化作用会产生某种程度的抑制作用。

2. Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液

Tris 缓冲液在生物化学研究中使用得越来越多,有超过磷酸盐缓冲液的趋势,如在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中均使用 Tris 缓冲液,而很少再用磷酸盐缓冲液。

Tris 缓冲液的常用有效 pH 值范围是在“中性”范围,例如:

Tris-HCl 缓冲液的 pH 值为 7.5~8.5。

Tris-磷酸盐缓冲液的 pH 值为 5.0~9.0。

Tris-HCl 缓冲液的优点如下:

(1) 因为 Tris 碱的碱性较强, 所以可以只用这一种缓冲体系, 配制由酸性到碱性的大范围 pH 值的缓冲液;

(2) 对生物化学过程干扰很小, 不与钙离子及重金属离子发生沉淀。

其缺点如下:

(1) 缓冲液的 pH 值受溶液浓度影响较大, 缓冲液稀释 10 倍, pH 值的变化大于 0.1;

(2) 温度效应大, 温度变化对缓冲液 pH 值的影响很大, 例如 4 °C 时缓冲液的 pH 值为 8.4, 而 37 °C 时的 pH 值为 7.4, 所以一定要在使用温度下进行配制, 室温下配制的 Tris-HCl 缓冲液不能用于 0~4 °C;

(3) 易吸收空气中的 CO₂, 所以配制的缓冲液要盖严密封;

(4) 此缓冲液对某些 pH 电极可发生一定的干扰作用, 所以要使用与 Tris 溶液具有兼容性的电极。

3. 硼酸盐缓冲液

常用的有效 pH 值范围是 8.5~10.0, 因而它是碱性范围内最常用的缓冲液, 其优点是配制方便, 只使用一种试剂, 缺点是能与很多代谢产物形成配合物, 尤其是能与糖类的羟基反应生成稳定的复合物而使缓冲液受到干扰。

4. 氨基酸缓冲液

氨基酸缓冲液使用的范围宽, pH 值为 2.0~11.0, 最常用的氨基酸缓冲液如下。

甘氨酸-HCl 缓冲液: pH 值为 2.0~5.0。

甘氨酸-NaOH 缓冲液: pH 值为 8.0~11.0。

甘氨酸-Tris 缓冲液: pH 值为 8.0~11.0 (此缓冲液用于广泛使用的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的电极缓冲液)。

组氨酸缓冲液: pH 值为 5.5~6.5。

甘氨酸酰胺(glycine amide)缓冲液: pH 值为 7.8~8.8。

甘氨酸甘氨酸(glycylglycine)缓冲液: pH 值为 8.0~9.0。

此类缓冲体系的优点是细胞组分和各种提取液提供更接近的天然环境。

其缺点如下:

(1) 与羧酸盐和磷酸盐缓冲体系相似, 也会干扰某些生物化学反应过程, 如代谢过程等;

(2) 试剂的价格较高。

三、pH 值的测定

测定溶液 pH 值通常有两种方法,最简便但较粗略的方法是用 pH 试纸测定。pH 试纸分为广泛 pH 试纸和精密 pH 试纸两种。

精确测定溶液 pH 值要使用 pH 计,其精确度可达 0.005 个 pH 单位,关键是要正确选用和校对 pH 电极。过去常使用两个电极,即玻璃电极和参比电极,现在它们已被淘汰,被两种电极合一的复合电极所代替。

玻璃电极对溶液中的氢离子浓度敏感,其头部为一薄玻璃泡,内装有 0.1 mol/L HCl 溶液,上部由银-氯化银电极与铂金丝连接。当玻璃电极浸入样品溶液时,薄玻璃泡内外两侧的电位差取决于溶液的 pH 值,即玻璃电极的电极电位随样品溶液中氢离子浓度(活度)的变化而变化。

参比电极的功能是提供一个恒定的电位,作为测量玻璃电极薄玻璃泡内外两侧电位差的参照。常用的参比电极是甘汞电极($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$)或银-氯化银电极(Ag/AgCl)。参比电极电位是氯离子浓度的函数,因而电极内充以 4 mol/L KCl 溶液或饱和 KCl 溶液,以保持恒定的氯离子浓度和恒定的电极电位。使用饱和 KCl 溶液是为使电极内沉积有部分 KCl 结晶,以使 KCl 的饱和浓度不受温度和湿度的影响。

现在 pH 值测定都已改用玻璃电极与参比电极合一的复合电极,即将它们共同组装在一根玻璃管,使用时应注意如下事项。

(1)经常检查电极内的 4 mol/L KCl 溶液的液面,如液面过低则应补充 4 mol/L KCl 溶液。

(2)玻璃泡极易破碎,使用时必须极为小心。

(3)复合电极长期不用,可浸泡在 2 mol/L KCl 溶液中,平时可浸泡在无离子水或缓冲液中,使用时取出,用水洗并冲洗玻璃泡部分,然后用吸水纸吸干余水,将电极浸入待测溶液中,稍加搅拌,读数时电极应静止不动,以免数字跳动不稳定。

(4)使用时复合电极的玻璃泡和半透膜小孔要浸入溶液中。

(5)使用前要用标准缓冲液校正电极,常用的 3 种标准缓冲液的 pH 值为 4.00、6.88 和 9.23(20 °C),精度为 ± 0.002 pH 单位。校正时先将电极放入 pH 值为 6.88 的标准缓冲液中,用 pH 计上的“标准”旋钮校正 pH 读数,然后取出电极,洗净,再放入 pH 值为 4.00 或 9.23 的标准缓冲液中,用“斜率”旋钮校正 pH 读数,如此反复多次,直至两点校正正确,再用第三种标准缓冲液检查。标准缓冲液不用时应冷藏。

(6)电极的玻璃泡容易被污染。测定浓蛋白质溶液的 pH 值时,玻璃泡表面会覆盖一层蛋白质膜,不易洗净而干扰测定,此时可用 0.1 mol/L HCl 的 1 mg/mL

胃蛋白酶溶液浸泡过夜。若被油脂污染,可用丙酮浸泡。若电极保存时间过长,校正数值不准,可将电极放入 2 mol/L KCl 溶液中,40 °C 加热 1 h 以上,进行电极活化。

pH 测定时会有以下几方面的误差。

(1)钠离子的干扰:多数复合电极对 Na^+ 和 H^+ 都非常敏感,尤其是高 pH 值的碱性溶液, Na^+ 的干扰更加明显。例如,当 Na^+ 浓度为 0.1 mol/L 时,可使 pH 值偏低 0.4~0.5 个单位。为减少 Na^+ 对 pH 值测定的干扰,每个复合电极都应附有一条校正 Na^+ 干扰的标准曲线,有的新式的复合电极具有 Na^+ 不透过性能,如不具备以上两个条件,则可以将电极内的 KCl 换成 NaCl。

(2)浓度效应:溶液的 pH 值与溶液中缓冲离子浓度和其他盐离子浓度有关,因为溶液 pH 值取决于溶液中的离子活度而不是浓度,只有在很稀的溶液中,离子的活度才与其浓度相等。生化实验中经常配制比使用浓度高 10 倍的“贮存液”,使用时再稀释到所需浓度,由于浓度变化很大,溶液 pH 值会有变化,因此稀释后仍需对其 pH 值进行调整。

(3)温度效应:有的缓冲液的 pH 值受温度影响很大,如 Tris 缓冲液,因此配制和使用都要在同一温度下进行。

第二部分 实 验 内 容