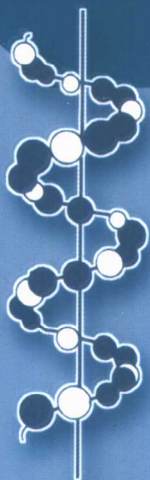


能力培养型生物学基础课系列实验教材

生物化学实验教程



刘箭 主编

SHENGWUHUAXUE
SHIYAN
JIAOCHENG



科学出版社

www.sciencep.com

能力培养型生物学基础课系列实验教材

生物化学实验教程

刘 箭 主编

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书比较系统、全面地介绍了生物化学常用实验技术与方法。全书共分为三部分,第一部分为基础性实验,介绍生物化学实验的基本原理和技术。第二部分为综合性实验,主要介绍蛋白质的纯化和鉴定及部分分子生物学实验技术。这两部分内容涵盖蛋白质、核酸、酶、维生素、糖、脂、激素的分离、制备、性质功能及定性和定量分析技术,包括层析法、分光光度法、电泳法、离心分离法及物质代谢研究法等。第三部分为研究性实验,以培养独立科研能力为主要目的。

本书的实验方法严谨可靠,可操作性强,可供高等师范院校生命科学专业的本、专科学生使用,也可供非师范院校相关专业的学生、生命科学研究工作者和中学生物学教师参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验教程/刘箭主编. —北京:科学出版社,2004
能力培养型生物学基础课系列实验教材
ISBN 7-03-014131-8

I. 生... II. 刘... III. 生物化学-实验-高等学校-教材
IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 081901 号

责任编辑:陈 露 谭宏宇/责任校对:连秉亮
责任印制:刘 学 /封面设计:一 明

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

南京展望文化发展有限公司排版

江苏省句容市排印厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2004年9月第 一 版 开本: B5(720×1000)

2004年9月第一次印刷 印张: 7 $\frac{3}{4}$

印数: 1—3 200 字数: 141 000

定价: 12.80 元

能力培养型生物学基础课系列实验教材编委会

主任委员：安利国（山东师范大学）

副主任委员：刘家尧（曲阜师范大学）

孙虎山（烟台师范学院）

郭善利（聊城大学）

委 员：（按姓氏笔画为序）

付荣恕（山东师范大学）

艾洪滨（山东师范大学）

刘 箭（山东师范大学）

刘林德（烟台师范学院）

刘家尧（曲阜师范大学）

孙虎山（烟台师范学院）

安利国（山东师范大学）

杨 革（曲阜师范大学）

侯福林（山东师范大学）

赵遵田（山东师范大学）

郭善利（聊城大学）

《生物化学实验教程》编写人员

主 编：刘 箭

副 主 编：杜希华 徐德立

编 者：(按姓氏笔画为序)

马忠明 王元秀 王洪燕 石东里

刘莲芬 杨立红 原永洁 谢守安

出版说明

生物科学是一门实验性学科,实验教学在其专业课学习中占有十分重要的地位,动手能力、综合分析能力和创新能力的培养主要依靠实验教学来完成。

受传统教育思想的影响,几十年来我国高等师范院校生物科学专业的实验教学以学科知识为体系,从属于理论教学,以验证理论知识和学习实验技术为主要目的,忽视了能力的培养,扼杀了学生的创新欲望。实验内容繁琐,存在大量低水平的重复,远远不能适应创新型人才培养的要求。

近年来,随着创新人才教育的开展,能力培养已引起国家和学校的普遍重视。高教部下发的《关于加强高等学校本科教学工作,提高教学质量的若干意见》中特别强调“进一步加强实践教学,注重学生创新精神和实践能力的培养”,其中指出:“实践教学对于提高学生的综合素质、培养学生的创新精神与实践能力具有特殊作用。高等学校要重视本科教学的实验环节,保证实验课的开出率达到本科教学合格评估标准,并开出一批综合性、设计性实验。”但是,与此相适应的教材却很少,尤其是针对生物科学基础实验的系列教材未见出版。本套能力培养型实验教材就是适应我国高等教育创新性人才培养的需要而编写的。

本套教材将实验分为基础性实验、综合性实验和研究性实验三种类型。

基础性实验是经过精选的最基本的、最代表学科特点的实验方法和技术,通过学习使学生掌握相应学科的基本知识与基本技能,为综合性实验奠定基础。

综合性实验由多种实验手段与技术 and 多层次的实验内容所组成,要求学生独立完成预习报告、试剂配制、仪器安装与调试、实验记录、数据处理和总结报告。综合性实验主要训练学生对所学知识和实验技术的综合运用能力、对实验的独立工作能力、对实验结果的综合分析能力,为研究性实验的顺利开展做好准备。

研究性实验是在完成基础性实验和综合性实验的基础上,以相应学科的研究为主结合其他学科的知识与技术,由学生自己设计实验方案,开展科学研究,撰写课程研究论文,使学生得到科学研究的初步训练,为毕业论文研究工作的开展打下基础。部分优秀课程研究论文可进一步深化、充实,作为毕业论文参加答辩。

三种类型实验所占比例根据不同年级、不同课程而确定。低年级课程以基础性实验为主,基础性、综合性和研究性实验的比例为7:2:1。随年级升高,逐渐增加综合性和研究性实验的比例,基础性、综合性和研究性实验的比例达到5:

3:2。

本套教材试图从下述几个方面有所突破和创新:

1. 以能力培养为核心,通过综合性实验和研究性实验的开设,启发学生思维,引导学生创新。

2. 本套教材是我国高校第一套生物科学基础实验课系列性教材,在编委会的统一领导下完成,避免了低层次重复,体现了实验内容的系统性。

3. 本套教材特别强调实用性和可操作性,实验内容在编写单位已经经过了2~3遍的试用。

4. 本套教材充分体现先进性,尽可能反映生命科学的最新进展。

5. 每本教材都附有实验报告和研究论文范文,为学生提供了实验报告的规范性样板,对培养学生严谨、仔细的学风具有一定的指导作用。

6. 本套教材已着手制作电子光盘版,使之成为立体化教材。多数实验将配有录像和多媒体课件,用于实验之前播放,指导学生的实验操作。

尽管各位主编和编委已经尽了最大努力,但是,由于编者水平所限,肯定会有不少的错误,恳请各位同仁不吝赐教,以便再版时减少谬误。

本套教材得到国家教育部《面向二十一世纪,我国生物教育专业的培养目标、培养方案和课程体系的研究》和山东省高校生物科学(师范类)改革试点专业专项经费的资助,承蒙山东师范大学和科学出版社的领导与老师的大力支持,在此一并感谢。

安利国

2004年8月

前 言

生物化学是一门实验性很强的学科,生物化学实验是生物化学教学的重要组成部分,它与理论教学既相互联系,又相对独立,有其自身的规律特点和要求。编者多年生物化学实验课的教学经验表明,若使实验内容难易适度,保证实验顺利流畅地进行,需要一本好用实用的实验教材。编写一本符合高等师范院校基础生物化学教学特点,与生物化学理论教学内容相匹配,难度适中,可操作性强的实验教材是编写本书的初衷。

本教程内容分为基础性实验、综合性实验和研究性实验三部分。基础性实验部分重点介绍生物化学实验的基本原理和技术,强调对基本实验技能的培养,是在几学时内可以完成的精选实验;综合性实验主要介绍蛋白质的纯化和鉴定及部分分子生物学实验技术,其过程相对复杂、耗时较长,可酌情选用;研究性实验模式类似一项科研任务,需要实验人员首先进行资料收集,参考实验教程中提供的研究大纲,拟定实验方法,运用已经掌握的生物化学基本实验技能,进行比较复杂的实验和探究,目的是培养独立开展科技工作的能力。

本教程的特点主要体现在:①内容系统全面,编写形式简洁明了,图文并茂,对一些复杂的结构和具体的步骤利用图表表示,既形象直观,又压缩了篇幅;②教材融汇了编者多年的实践经验,且实验方案已试用多年,使之更具可操作性;③为使学生更好地理解实验原理,把握实验成功的关键,每一实验单元均附有详细的要点提示。

本实验教程依据我国高等师范院校课程体系的特点编写而成,可供高等师范院校生命科学专业的本、专科学生使用,也可供非师范院校相关专业的学生、生命科学工作者和中学生物学教师参考。

本教程是全体编写人员集体劳动和智慧的结晶。虽然我们做了很大的努力,但由于水平有限,难免存在纰漏或错误之处,恳请读者不吝指正。

编者

2004年6月

目 录

出版说明
前言

第一部分 基础性实验

实验 1	氨基酸的分离鉴定——纸层析法	(1)
实验 2	凝胶过滤法使蛋白质脱盐	(3)
实验 3	蛋白质的透析	(7)
实验 4	微量凯氏(Micro-Kjeldahl)定氮法测定蛋白质含量	(9)
实验 5	Folin-酚试剂法(Lowry 法)测定蛋白质含量	(14)
实验 6	考马斯亮蓝法(Bradford 法)测定蛋白质含量	(17)
实验 7	紫外吸收法测定蛋白质含量	(20)
实验 8	乙酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白	(22)
实验 9	盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白	(26)
实验 10	酶的特异性	(30)
实验 11	酶促反应动力学 ——pH、温度、激活剂、抑制剂对酶促反应速度的影响	(33)
实验 12	琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制	(38)
实验 13	乳酸脱氢酶(LDH)同工酶的琼脂糖凝胶电泳	(40)
实验 14	酵母 RNA 的分离及组分鉴定	(44)
实验 15	动物肝脏 DNA 的提取与检测	(47)
实验 16	RNA 定量测定——改良苔黑酚法	(50)
实验 17	核酸的定量测定——紫外分光光度法	(53)
实验 18	乙酸纤维素薄膜电泳分离核苷酸	(56)
实验 19	维生素 C 的定量测定——2,6-二氯酚靛酚滴定法	(58)
实验 20	血糖含量的测定(Folin-Wu 法)	(61)
实验 21	饱食、饥饿、肾上腺素、胰岛素对肝糖原含量的影响	(64)
实验 22	小麦萌发前后淀粉酶活性的比较	(66)
实验 23	脂肪酸的 β -氧化	(69)

实验 24 血清中谷丙转氨酶活性的测定 (72)
实验 25 鱼细胞 ATP 酶活性的测定 (75)

第二部分 综合性实验

实验 26 细胞色素 C 的提取制备与含量测定 (77)
实验 27 凝胶层析法测定蛋白质相对分子质量 (82)
实验 28 质粒的提取、酶切与电泳分析 (86)
实验 29 聚合酶链反应 (91)
实验 30 蛋白质印迹(Western-Blotting) (94)

第三部分 研究性实验

实验 31 质粒纯化方法的优化——二氧化硅晶体粉末吸附法 (102)
实验 32 转基因植物的 PCR 鉴定 (104)
实验 33 植物热激蛋白的 Western-blotting 分析 (105)
实验 34 读码框架影响融合蛋白表达正确性 (106)

附录

实验报告范例一 (108)
实验报告范例二 (109)

参考文献 (112)

第一部分

基础性实验

实验 1 氨基酸的分离鉴定 ——纸层析法

【实验目的】

1. 学习氨基酸纸层析的基本原理。
2. 掌握氨基酸纸层析的操作技术。

【实验原理】

纸层析法(paper chromatography)是生物化学上分离、鉴定氨基酸混合物的常用技术,可用于蛋白质的氨基酸成分的定性鉴定和定量测定;也是定性或定量测定多肽、核酸碱基、糖、有机酸、维生素、抗生素等物质的一种分离分析工具。纸层析法是用滤纸作为惰性支持物的分配层析法,其中滤纸纤维素上吸附的水是固定相,展层用的有机溶剂是流动相。在层析时,将样品点在距滤纸一端约 2~3 cm 的某一处,该点称为原点;然后在密闭容器中层析溶剂沿滤纸的一个方向进行展层,这样混合氨基酸在两相中不断分配,由于分配系数(K_d)不同,结果它们分布在滤纸的不同位置上。物质被分离后在纸层析图谱上的位置可用比移值(rate of flow, R_f)来表示。所谓 R_f ,是指在纸层析中,从原点至氨基酸停留点(又称为层析点)中心的距离(X)与原点至溶剂前沿的距离(Y)的比值:

$$R_f = \frac{\text{原点至层析点中心的距离}}{\text{原点至溶剂前沿的距离}} = \frac{X}{Y}$$

在一定条件下某种物质的 R_f 值是常数。 R_f 值的大小与物质的结构、性质、溶剂系统、温度、湿度、层析滤纸的型号和质量等因素有关。

【器材与试剂】

1. 器材

层析缸、点样毛细管、小烧杯、培养皿、量筒、喷雾器、吹风机(或烘箱)、层析滤纸(新华一号)、直尺及铅笔。

2. 试剂

(1) 扩展剂(水饱和的正丁醇和乙酸混合液)

将正丁醇和乙酸以体积比 4:1 在分液漏斗中进行混合,所得混合液再按体积比 5:3 与蒸馏水混合;充分振荡,静置后分层,放出下层水层,漏斗内即为扩展剂。

(2) 氨基酸溶液

0.5% 赖氨酸、脯氨酸、亮氨酸以及它们的混合液(各组分均为 0.5%)。

(3) 显色剂

0.1%水合茚三酮正丁醇溶液。

【实验步骤】

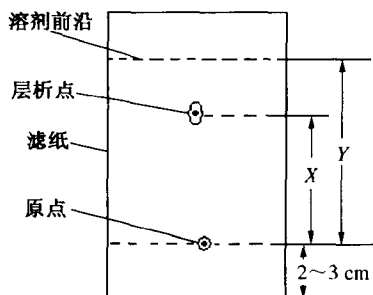


图 1-1 纸层析中的 R_f , $R_f = \frac{X}{Y}$

1. 准备滤纸

取层析滤纸(长 22 cm、宽 14 cm)一张,在纸的一端距边缘 2~3 cm 处用铅笔划一条直线,在此直线上每间隔 3 cm 作一记号,如图 1-1 所示。

2. 点样

用毛细管将各氨基酸样品分别点在这 4 个位置上,干后重复点样 2~3 次。每点在纸上扩散的直径最大不超过 3 mm。

3. 扩展

用线将滤纸缝成筒状,纸的两边不能接触。将盛有约 20 ml 扩展剂的培养皿迅速置于密闭的层析缸中,并将滤纸直立于培养皿中(点样的一端在下,扩展剂的液面需低于点样线 1 cm)。待溶剂上升 15~20 cm 时即取出滤纸,用铅笔描出溶剂前沿界线,自然干燥或用吹风机热风吹干。

4. 显色

用喷雾器均匀喷上 0.1%茚三酮正丁醇溶液,然后用吹风机热风吹干或者置烘箱中(100℃)烘烤 5 min 即可显出各层析斑点。

5. 计算

计算各种氨基酸的 R_f 值。

【要点提示】

1. 取滤纸前,要将手洗净,这是因为手上的汗渍会污染滤纸,并尽可能少接触滤纸;如条件许可,也可戴上一次性手套拿滤纸。要将滤纸平放在洁净的纸上,不可放在实验台上,以防止污染。

2. 点样点的直径不能大于 0.5 cm,否则分离效果不好,并且样品用量大,会造成“拖尾巴”现象。

3. 在滤纸的一端用点样器点上样品,点样点要高于培养皿中扩展剂液面约 1 cm。由于各氨基酸在流动相(有机溶剂)和固定相(滤纸吸附的水)的分配系数不同,当扩展剂从滤纸一端向另一端展开时,对样品中各组分进行了连续的抽提,从而使混合物中的各组分分离。

【思考题】

1. 纸层析法的原理是什么?
2. 何谓 R_f 值? 影响 R_f 值的主要因素是什么?

实验 2 凝胶过滤法使蛋白质脱盐

【实验目的】

学习凝胶过滤法分离纯化物质的原理与操作技术。

【实验原理】

凝胶过滤也称凝胶层析,其分离纯化物质的原理是:凝胶具有网状结构,小分子物质能进入其内部,而大分子物质却被排阻在外部,当一混合溶液通过凝胶过滤层析柱时,溶液中的物质就按不同相对分子质量被分开了。凝胶过滤过程中一般不变换洗脱液,具有设备简单、操作方便、重复性好和样品回收率高等优点。所以,此法除了常用于分离纯化蛋白质(包括酶类)、核酸、多糖、激素、氨基酸和抗生素等物质外,还可用于测定蛋白质的相对分子质量、样品的浓缩和脱盐等方面。目前常用的凝胶有葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶,其中最常用的是葡聚糖凝胶。

葡聚糖凝胶的商品名称为 Sephadex,它是葡萄糖通过 $\alpha-1,6$ -糖苷键形成的葡聚糖长链,与交联剂环氧氯丙烷以醚键相互交联而成的具有三维空间的多孔网状结构物(见图 1-2),呈珠状颗粒。

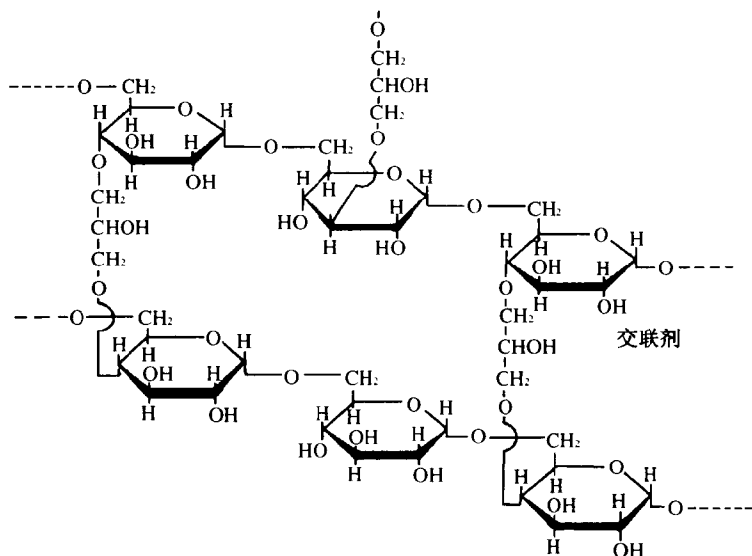


图 1-2 葡聚糖凝胶的多孔网状结构示意图

在合成凝胶时,控制环氧氯丙烷的用量,可以制成网孔大小不同的葡聚糖凝胶,即不同规格的凝胶。葡聚糖凝胶从 G-10 到 G-200 有多种类型。G 后的数字代表每克干胶充分溶胀后吸水的克数乘以 10,也反映了凝胶网孔的相对大小,G 后的数字越小,其溶胀后的网孔越小。一般 G-10 到 G-50 适用于蛋白质与小分

子或无机盐的分离,G-75到G-200适用于分子质量大于10 000 Da的蛋白质的相互分离。

蛋白质溶液中如含有无机盐离子,用葡聚糖凝胶过滤法可使蛋白质与无机盐分离,效果理想。本实验用G-25使蛋白质与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分离,当蛋白质的盐溶液进入葡聚糖凝胶时,小分子的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 扩散进入G-25的网孔中,而大分子的蛋白质因颗粒直径大,不能进入网孔中,被排阻在凝胶颗粒(固定相)的外面。加入洗脱液(流动相)洗脱时,因大分子的蛋白质从凝胶颗粒的间隙随洗脱液向下流动,首先被洗脱下来,而小分子的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 可以扩散进出凝胶颗粒的网孔之中(进入网孔中的分子不能随洗脱液流动),随洗脱液移动时受到阻滞力较大,在层析柱中移动较慢,需要较大的洗脱体积才能从柱中洗出,这样蛋白质与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 很容易地分离开,从而达到对蛋白质样品脱盐的目的(见图1-3)。

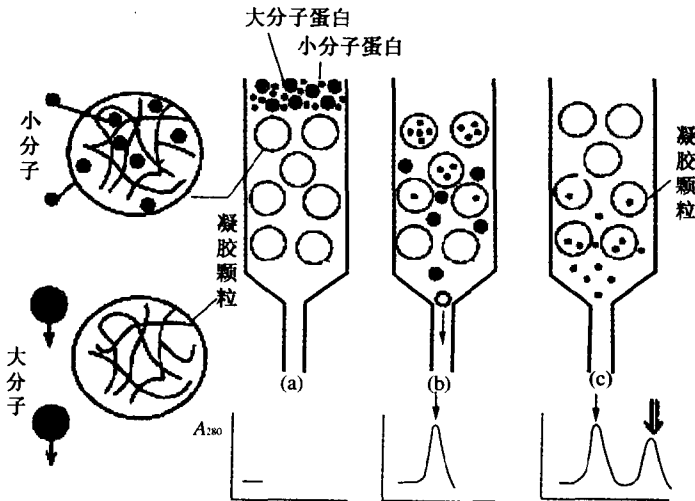


图1-3 凝胶层析原理示意图

- (a) 蛋白质混合物上柱; (b) 样品上柱后,小分子进入微孔,大分子不能进入,故先洗脱下来; (c) 小分子后洗脱下来

【器材与试剂】

1. 器材

铁架台、层析柱、滴定管夹、1 ml 刻度吸管、刻度离心管、白瓷板、Sephadex G-25(粒度粗,50~100目)、细乳胶管、螺旋夹、烧杯。

2. 试剂

(1) 10% 磷钼酸

(2) 纳氏试剂(蔡斯特试剂)

将 HgI_2 11.5 g 及 KI 8 g 溶于无离子水中,稀释至 50 ml,加入 6 mol/L NaOH

50 ml, 静止后取清液储存于棕色瓶中。

(3) 蛋白质- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液

实验前配制含 0.25% 牛血清蛋白、0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 10% 的蔗糖混合溶液。

(4) 无离子水(洗脱液)

【实验步骤】

1. 溶胀凝胶

用无离子水浸泡 Sephadex G-25 凝胶 24 h 以上(中间换一次水)或用无离子水沸水浴溶胀 2 h 左右。

2. 凝胶装柱

将层析柱固定在铁架台上, 两端分别连接乳胶管。上端与洗脱液连通, 下端装一螺旋夹调控洗脱速度, 先用少量洗脱液洗柱并排除乳胶管中的气泡, 待柱中洗脱液高度约 2 cm 时, 拧紧螺旋夹。

将溶胀好的 Sephadex G-25 依次倒入层析柱中, 使其自然沉降, 沉降后凝胶柱的高度为层析柱的 $3/4 \sim 4/5$ 且柱床面平整比较理想。拧松螺旋夹排除多余的洗脱液, 床面上维持约 2 cm 高的洗脱液, 拧紧螺旋夹。

3. 洗柱

通过细乳胶管小心地将烧杯中的洗脱液与层析柱接通, 然后拧松螺旋夹, 让洗脱液滴下冲洗层析柱, 以除去杂质并使柱床均匀密实(此步也称作平衡)。适当时间后(流下的洗脱液体积一般为柱床体积的 2~3 倍), 再拧紧螺旋夹。洗柱过程中注意调整流速约 2 ml/min。

4. 加样洗脱

用刻度吸管吸取 1 ml 样品(蛋白质- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液), 其尖头小心沿层析柱内壁伸到床面之上, 慢慢将样品加到凝胶床面上(不可搅动床面), 此时能看到床面上样品与洗脱液之间有一清晰界面。拧松螺旋夹, 待样品全部进入凝胶柱中, 接通洗脱液, 开始洗脱并收集洗脱液。

5. 收集检查

用刻度离心管收集洗脱液, 每管收集 1 ml。

边收集边进行蛋白质与铵盐的检查。取洗脱液 2 滴加入白瓷板穴中, 加入纳氏试剂 1 滴, 如有铵盐洗脱下来, 则有黄红色沉淀。取洗脱液 2 滴置小试管中, 加入磺柳酸 1 滴, 如有蛋白质洗脱下来, 则有白色浑浊或沉淀出现。

用+、-号记录检查结果。

【要点提示】

1. 装柱时, 凝胶中的水不宜过多, 用玻棒搅动小烧杯中的凝胶, 一次将柱加满, 凝胶自然下沉后, 凝胶的高度应以层析柱长度的 $3/4 \sim 4/5$ 为宜。如果层析柱中凝胶高度不够, 应在凝胶床面未形成之前再加入葡聚糖凝胶, 要尽量防止由于加

胶次数较多,胶中出现节痕。同时,要注意避免柱床内产生气泡。

2. 加入样品时应十分注意不要搅动床面,不要使样品与床面上的洗脱液混合,否则影响分离效果。

【思考题】

1. 蛋白质溶液中的盐分为何能通过凝胶过滤方法被脱除?
2. 凝胶过滤法在蛋白质分析中还有何应用?

实验 3 蛋白质的透析

【实验目的】

1. 学习蛋白质透析的基本原理。
2. 掌握透析法的基本操作技术。

【实验原理】

透析膜是半透膜,蛋白质是大分子物质,它不能透过透析膜,而小分子物质(无机盐、单糖等)可以自由通过透析膜与周围的缓冲溶液进行溶质交换,进入到透析液中。在实验室分离纯化蛋白质的过程中,常利用透析的方法除去蛋白质溶液中的小分子物质。

【器材与试剂】

1. 器材

透析袋、大烧杯、磁力搅拌器、搅拌子、透析袋夹。

2. 试剂

(1) 蛋白质/NaCl 溶液

取 3 个鸡蛋的蛋清,加水 800 ml 混合后,加饱和 NaCl 溶液 200 ml 溶解,用 3~4 层干纱布过滤。

(2) 10% HNO₃ 溶液

(3) 1% AgNO₃ 溶液

(4) 10% CuSO₄ 溶液

(5) 1% CuSO₄ 溶液

【操作步骤】

1. 蛋白质的检查

利用双缩脲反应进行蛋白质的检查。取待透析的蛋白质/NaCl 溶液 2 ml 和 10% NaOH 溶液 1 ml,摇匀,再加 1% CuSO₄ 溶液 1~2 滴,边加边摇,观察是否有紫红色出现。CuSO₄ 不可过量,否则生成的蓝色 Cu(OH)₂ 会掩盖浅紫红色。

2. 准备透析袋

市售的透析袋含有重金属、硫化物等化学杂质,须除去杂质后才能使用。常用方法是,用 10 mmol/L NaHCO₃-1 mmol/L EDTA - Na₂ 溶液煮沸 30 min,然后用双蒸水充分洗涤透析袋,储存于 1 mmol/L EDTA - Na₂ 溶液中,4℃ 保存备用。

3. 装样

取一段透析袋,将其一端用透析袋夹夹住(或打一死结),由开口端加入约 10 ml 待透析的样品溶液(不可装的太满,留出一半空隙,并适当排出空气,以防透析袋胀破),用透析袋夹夹住袋口(或打一死结)。