

李充璧 李芸瑛 吴秀兰 黄丽华

编

实用

生物化学  
实验



SHIYONG  
SHENGWU  
HUAXUE  
SHIYAN

# 实用生物化学实验

李充璧 李芸琪 吴秀兰 黄丽华 编

广东高等教育出版社

· 广州 ·

## 图书在版编目 (CIP) 数据

实用生物化学实验/李充璧等编. —广州: 广东高等教育出版社, 2012. 5  
ISBN 978 - 7 - 5361 - 4268 - 8

I. ①实… II. ①李… III. ①生物化学 - 实验 IV. ①Q5 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 072012 号

广东高等教育出版社出版发行

地址: 广州市天河区林和西横路

邮编: 510500 电话: (020) 87553735

网址: <http://www.gdgjs.com.cn>

佛山市浩文彩色印刷有限公司印刷

787 mm × 1 092 mm 1/16 印张: 6.25 字数: 140 千

2012 年 5 月第 1 版 2012 年 5 月第 1 次印刷

印数: 1 ~ 2 000 册

定价: 19.80 元

# 前 言

生物化学实验是生物学实验中的一个重要组成部分，是生命科学学科中的专业基础实验课程，由于它与社会需求关系紧密，所以在学科中占有重要的地位。近年来，生物化学实验技术进展十分迅速，以有限的篇幅将其全部收罗，显然是不可能的。但是，对生物化学实验技术的新进展应力求有所反映，对基本知识应着重要求学生掌握。考虑到社会以及就业的需要，生命科学不同专业学生对生物化学实验知识需求的不同，本书以生物大分子，包括糖、脂、蛋白质、酶、核酸、维生素为实验对象，结合动物、植物、卫生、食品和药物的生化检测内容，从性质、功能的检测技术入手进行设计实验，力求让学生在实践中得到锻炼。特别需要指出的是，本书是编者根据现代生物化学教学大纲的要求以及本科师范院校的实际，结合多年来教学工作的经历和实践编写的，是一本实用的生物化学实验教材。本书可供大专院校各级各类生命科学专业学生使用。

本书概括了生物化学的主要实验技术，概括了糖、蛋白质、核酸和脂肪的测定方法，以及现代生物化学中的基因工程部分。全书共安排有实验 26 个，既有普通生物化学实验，也有综合性实验，内容全面，涉及生物分子的提取、分离、纯化，定性、定量实验以及 DNA 转化。就方法学而言，实验方法简单易行，教师可根据学生实际情况及实验时间选择各类实验。每一实验都分目的、原理、器具、材料、试剂和操作步骤等部分，对需要注意的地方也加以了说明，便于学生学习和掌握。

由于水平有限，本书难免有错误或不足之处，恳请读者批评指正。

编 者  
2012 年 2 月

# 目 录

## 第一部分 基础性实验

实验一	蛋白质及氨基酸的颜色反应 .....	(3)
实验二	蛋白质的沉淀反应 .....	(6)
实验三	氨基酸的分离鉴定——纸层析法 .....	(9)
实验四	考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质质量浓度 .....	(11)
实验五	紫外吸收法测定蛋白质质量浓度 .....	(14)
实验六	醋酸纤维素薄膜电泳法分离血清蛋白 .....	(16)
实验七	蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....	(19)
实验八	酵母 RNA 的提取及组分鉴定 .....	(24)
实验九	动物肝脏中 DNA 的提取 .....	(26)
实验十	DNA 的定量测定(二苯胺法) .....	(28)
实验十一	细菌总 DNA 的提取和琼脂糖凝胶电泳 .....	(30)
实验十二	碱性磷酸酶的提取及活力的测定 .....	(33)
实验十三	水稻萌发前后淀粉酶活力的比较 .....	(36)
实验十四	血清谷丙转氨酶(SGPT)的测定 .....	(39)
实验十五	维生素 C 含量的测定 .....	(42)

## 第二部分 综合性实验

实验十六	凝胶过滤法分离蛋白质 .....	(47)
实验十七	超氧化物歧化酶(SOD)活力测定 .....	(49)
实验十八	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) .....	(54)
实验十九	大肠杆菌感受态细胞的制备及转化 .....	(57)
实验二十	DNA 重组技术(体外连接) .....	(60)
实验二十一	Southern 杂交技术 .....	(63)
实验二十二	DIG 试剂盒杂交实验 .....	(67)
实验二十三	基因的翻译表达 .....	(69)
实验二十四	基因的诱导表达 .....	(71)
实验二十五	细菌内表达产物的分离 .....	(73)
实验二十六	免疫双扩散检测抗 GFP 血清抗体 .....	(75)

附录一	生物化学实验课程要求 .....	(77)
附录二	生物化学实验室规则 .....	(79)
附录三	常用缓冲液的配制 .....	(80)
附录四	常用数据表 .....	(84)
附录五	常用贮存液的配制 .....	(86)
附录六	常用的电泳缓冲液 .....	(91)
附录七	常用凝胶电泳加样缓冲液 .....	(92)
参考文献	.....	(93)

# 第一部分

# 基础性实验



JICHUXING  
SHIYAN





# 实验一 蛋白质及氨基酸的颜色反应

## 一、实验目的

学习几种常用的鉴定蛋白质和氨基酸的方法及其原理，了解蛋白质的基本结构单位的主要连接方式。

## 二、实验原理

蛋白质分子中某种氨基酸或某些基团与显色剂作用，可产生特定的颜色反应，不同蛋白质所含氨基酸不完全相同，颜色反应亦不同。颜色反应不是蛋白质的专一反应，一些非蛋白质亦可产生相同的颜色反应，因此不能仅根据颜色反应的结果判断被测物质是不是蛋白质。颜色反应通常是一些常用蛋白质的定性依据，也可定量测定蛋白质。

## 三、实验器材

1. 试管及试管架。
2. 试管夹。
3. 滴管。
4. 水浴锅。
5. 酒精灯。

## 四、实验试剂

1. 卵清蛋白（蛋白质溶液）：将鸡蛋白用蒸馏水稀释 20 倍，用 2~3 层纱布过滤，滤液冷藏备用。
2. 0.5% 苯酚溶液：苯酚 0.5 mL，加蒸馏水稀释至 100 mL。
3. 米伦（Millon）试剂：40 g 汞溶于 60 mL 浓硝酸（相对密度 1.42），水浴加热助溶，溶解后加 2 倍体积蒸馏水，混匀，静置澄清，取上清液备用。此试剂可长期保存。
4. 0.1% 茚三酮溶液：0.1 g 茚三酮溶于 95% 乙醇并稀释至 100 mL。
5. 尿素：若颗粒较粗，最好研成细粉末状。
6. 10% NaOH 溶液：10 g NaOH 溶于蒸馏水中，稀释至 100 mL。
7. 浓硝酸：相对密度 1.42。
8. 1% 硫酸铜溶液：硫酸铜 1 g 溶于蒸馏水中，稀释至 100 mL。

## 五、操作步骤

### (一) 米伦氏反应

米伦试剂为硝酸、亚硝酸、硝酸汞和亚硝酸汞的混合物，能与苯酚及某些二羟苯衍生物起颜色反应。

最初产生的有色物质可能是羟苯基亚硝基衍生物，以变位作用变成颜色更深的邻醌肟，最终成为具有稳定红色的产物，此红色产物的结构尚不了解。组成蛋白质的氨基酸只有酪氨酸能产生羟苯衍生物，因此具有该反应的即证明有酪氨酸的存在。

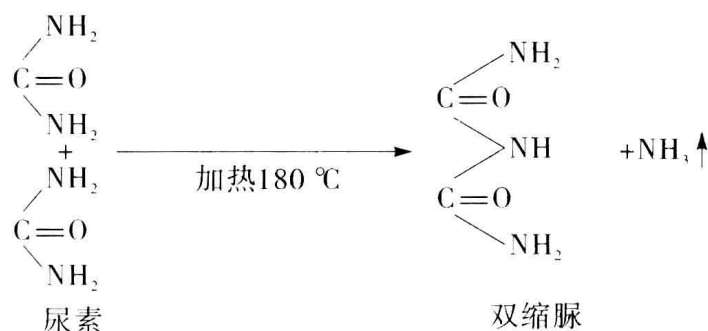
#### • 操作方法

(1) 苯酚实验：取 0.5% 苯酚溶液 1 mL 置于试管中，加米伦试剂约 0.5 mL，小心加热，溶液即出现玫瑰红色。

(2) 蛋白质溶液实验：取 2 mL 蛋白质溶液，加 0.5 mL 米伦试剂，此时出现蛋白质沉淀（因试剂含汞盐和硝酸缘故）。小心加热，凝固的蛋白质出现红色。

### (二) 双缩脲反应

尿素被加热至 180°C 左右时，两分子尿素缩合放出一分子氨而形成双缩脲。双缩脲在碱性条件下可与硫酸铜结合成红紫色的络合物。此反应称为双缩脲反应。



蛋白质或二肽以上的多肽分子中具有肽键，其结构与双缩脲结构相似，因此也有双缩脲反应，生成蓝紫色或紫红色的络合物。可用此法鉴定蛋白质的存在或测定其含量。双缩脲反应的干扰因素较多，一些含有一个肽键和一个—CO—NH<sub>2</sub>、—CS—NH<sub>2</sub>、—CH<sub>2</sub>—NH<sub>2</sub>等基团的物质也能发生双缩脲反应。NH<sub>3</sub>对此反应有严重的干扰，因为NH<sub>3</sub>与铜离子可生成深蓝色的铜氨络合物。因此，蛋白质和多肽都有双缩脲反应，但有双缩脲反应的物质不一定是蛋白质或多肽。此反应产生的颜色的深浅与蛋白质的浓度成正比。

#### • 操作方法

(1) 取少量尿素结晶，放入干燥试管中，微火加热，尿素熔化并形成双缩脲，释放出的氨可用红色石蕊试纸试之。至试管内有白色固体出现，停止加热，冷却。然后加 10% NaOH 溶液 1 mL 摇匀，再加 1% CuSO<sub>4</sub> 溶液 1~2 滴，混匀，观察紫色的出现。注意，要避免添加过量 CuSO<sub>4</sub> 溶液，因其生成的蓝色氢氧化铜能掩盖紫色。

(2) 另取一支试管，加入蛋白质溶液 10 滴，再加入 10% NaOH 溶液 10 滴及 1% CuSO<sub>4</sub> 溶液 2 滴，混匀，观察玫瑰紫色的出现。

### (三) 茛三酮反应

除脯氨酸和羟脯氨酸与茛三酮反应生成黄色物质外，所有的  $\alpha$ -氨基酸及蛋白质都能和茛三酮反应生成蓝紫色物质。该反应分两步进行：首先是氨基酸被氧化，生成  $\text{CO}_2$ 、 $\text{NH}_3$  和醛，而水合茛三酮被还原成还原型茛三酮；然后是所生成的还原型茛三酮与另一个水合茛三酮分子、 $\text{NH}_3$  缩合生成有色物质。此反应的适宜 pH 为 5~7。该反应十分灵敏，1:1 500 000 的氨基酸水溶液即能显示反应，此反应已广泛地应用于氨基酸的定量测定。但也有些物质对茛三酮呈类似的阳性反应，如氨、 $\beta$ -丙氨酸和许多一级胺化合物等。

#### • 操作方法

取 2 支试管，分别加入蛋白质溶液和 0.5% 甘氨酸溶液 1 mL，再加 0.1% 茛三酮溶液 5 滴，混匀，加热至沸，即有蓝紫色出现。

### (四) 黄色反应

凡是含有苯环的化合物都能与浓硝酸作用产生黄色的硝基苯衍生物。该化合物在碱性溶液中进一步转化成橘黄色的硝酞酸钠。对蛋白质分子，酪氨酸和色氨酸残基易发生上述反应，而苯丙氨酸不易被硝化，需加少量浓硫酸才有黄色反应。

#### • 操作方法

取 1 支试管，加蛋白质溶液 10 滴及浓硝酸 5 滴，由于强酸作用，出现蛋白质沉淀，加热至沸，沉淀变成黄色。冷却后，逐滴加入 10% NaOH 溶液，当试管中溶液呈碱性时，沉淀即转变为橘黄色。

## 六、思考题

1. 蛋白质有哪几种颜色反应？
2. 为什么浓硝酸与某些蛋白质会发生颜色反应？
3. 能否用茛三酮反应可靠地鉴定蛋白质的存在？

## 实验二 蛋白质的沉淀反应

### 一、实验目的

加深对蛋白质胶体溶液稳定因素的认识。区分可逆沉淀作用及不可逆沉淀作用，了解其在实际工作中的应用。

### 二、实验原理

在水溶液中蛋白质分子的表面由于形成水化层和双电层而成为稳定的亲水胶体颗粒。但是，蛋白质胶体颗粒的稳定性是有条件的、相对的。在一定的物理化学因素影响下，蛋白质颗粒失去电荷、脱水，甚至变性而丧失稳定因素，即以固态形式从溶液中析出，这种作用称为蛋白质的沉淀反应。

蛋白质的沉淀反应可分为两类。

#### (一) 可逆沉淀反应

在发生沉淀反应时，蛋白质虽已沉淀析出，但其分子内部结构并未发生显著变化，基本上保持原有的天然性质。如将致使沉淀的因素除去后，蛋白质沉淀可再溶于原来的溶剂中。这种沉淀反应称为可逆沉淀反应。属于此类反应的有盐析作用、低温下乙醇或丙酮对蛋白质的短时间作用以及等电点沉淀等。

用大量中性盐使蛋白质从溶液中析出的过程称为蛋白质的盐析作用。蛋白质是亲水胶体，在高浓度的中性盐影响下，蛋白质分子被盐脱水化层，同时，蛋白质分子所带的电荷被中和，蛋白质胶体的稳定性遭到破坏而沉淀析出。沉淀出的蛋白质仍保持其天然蛋白质的性质，若降低盐的浓度，还能溶解。

沉淀不同的蛋白质所需中性盐的浓度、种类不同，所以在不同条件下，采用不同浓度的盐类可将各种蛋白质从混合溶液中分别沉淀析出，这种方法称为蛋白质的分级盐析。它在酶的生产 and 制备中被广泛应用。

#### (二) 不可逆沉淀反应

在发生沉淀反应时，蛋白质的分子内部结构发生重大改变，特别是空间构象遭到破坏，使其失去天然蛋白质的性质，这时蛋白质已发生变性。变性后的蛋白质沉淀不能再溶解于原来的溶剂中，这种沉淀反应称为不可逆沉淀反应。重金属盐、生物碱试剂、强酸、强碱、加热、震荡、超声波、有机溶剂等都能使蛋白质发生不可逆沉淀反应。

蛋白质变性后，有时由于维持溶液稳定的条件仍然存在（如电荷）而并不析出。因此，变性蛋白质并不一定都表现为沉淀，而沉淀的蛋白质也未必都已变性。

### 三、实验器材

1. 试管及试管架。
2. 试管夹。
3. 滴管。
4. 玻棒。
5. 漏斗。
6. 酒精灯。

### 四、实验试剂

1. 蛋白质溶液：卵清蛋白（见实验一）。
2. 硫酸铵粉末。
3. 饱和硫酸铵溶液。
4. 95%乙醇。
5. 结晶氯化钠。
6. 1%醋酸铅溶液：1 g 醋酸铅溶于蒸馏水中，稀释至 100 mL。
7. 5%鞣酸溶液：5 g 鞣酸溶于蒸馏水中，稀释至 100 mL。
8. 1%硫酸铜溶液：硫酸铜 1 g 溶于蒸馏水中，稀释至 100 mL。
9. 饱和苦味酸溶液。
10. 1%醋酸溶液：冰醋酸 1 mL 用蒸馏水稀释至 100 mL。

### 五、操作步骤

#### （一）蛋白质的盐析作用

向蛋白质溶液加入中性盐至一定浓度，蛋白质即沉淀析出，这种作用称为盐析。由盐析获得的蛋白质沉淀，当降低其盐类浓度时，又能再溶解，故蛋白质的盐析作用是可逆过程。

##### • 操作方法

（1）取试管 1 支，加入蛋白质溶液 3 mL 和饱和硫酸铵溶液 3 mL，微微摇动试管，使溶液混合，静置数分钟，球蛋白即沉淀析出。

（2）将上述混合液过滤，滤液中加入硫酸铵粉末，边加边用玻璃棒搅拌，至粉末不再溶解，析出的沉淀即为清蛋白。取部分清蛋白沉淀加水稀释，观察沉淀是否溶解。

#### （二）乙醇沉淀蛋白质

乙醇、丙酮等一类有机溶剂能破坏蛋白质胶体颗粒的水化层，使蛋白质沉淀析出。如果溶液中有少量中性盐（如氯化钠），可加速沉淀并使沉淀完全。

##### • 操作方法

取 1 支试管，加入 1 mL 蛋白质溶液，再加入 2 mL 95% 的乙醇，观察沉淀的生成（如沉淀不明显，再加少许晶体 NaCl，混匀，观察有无沉淀析出）。

### (三) 重金属盐沉淀蛋白质

蛋白质与重金属离子（如  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  等）结合成不溶性盐类而沉淀。

#### • 操作方法

取试管 2 支，各加入蛋白质溶液 2 mL，一管内滴加 1% 醋酸铅溶液 3~5 滴，另一管内滴加 1% 硫酸铜溶液 1~2 滴，观察沉淀的生成。放置片刻，倾去上清液，向沉淀中加入少量的水，观察沉淀是否溶解。

### (四) 生物碱试剂沉淀蛋白质

生物碱是植物体内具有显著生理作用的一类含氮碱性化合物。凡能使生物碱沉淀或与生物碱发生颜色反应的物质，都称为生物碱试剂，如鞣酸、苦味酸、磷钨酸等。在酸性环境中，蛋白质以正离子形式与试剂中的负离子发生反应，形成不溶性复合物。

#### • 操作方法

取试管 2 支，各加 2 mL 蛋白质溶液及 1% 醋酸溶液 4~5 滴，向一管中加 5% 鞣酸溶液 2 滴，另一管中加饱和苦味酸溶液 4 滴，振荡，观察蛋白质沉淀析出现象。

## 六、思考题

1. 为什么鸡蛋清可用作铅、汞中毒的解毒剂？
2. 蛋白质分子中的哪些基团可以与重金属离子作用而使蛋白质沉淀？
3. 在等电点时，蛋白质溶液为什么容易发生沉淀？

## 实验三 氨基酸的分离鉴定——纸层析法

### 一、实验目的

学习氨基酸纸层析法的基本原理和操作方法。

### 二、实验原理

以滤纸为支持物进行层析的方法，称为纸层析法。纸层析所用展层溶剂大多由水和有机溶剂组成，滤纸纤维与水的亲和力强，与有机溶剂的亲和力弱，因此在展层时，水是固定相，有机溶剂是流动相。溶剂由下向上移动的，称上行法；由上向下移动的，称下行法。将样品点在滤纸上（此点称为原点），进行展层，样品中的各种氨基酸在两相溶剂中不断进行分配。由于它们的分配系数不同，不同氨基酸随流动相移动的速率就不同，于是就将这些氨基酸分离开来，形成距原点距离不等的层析点。

溶质在滤纸上的移动速率用  $R_f$  值表示：

$$R_f = \frac{\text{原点到层析点中心的距离}}{\text{原点到溶剂前沿的距离}}$$

只要条件（如温度、展层溶剂的组成）不变， $R_f$  值是常数，故可根据  $R_f$  值作定性依据。

样品中如有多种氨基酸，其中某些氨基酸的  $R_f$  值相同或相近，此时如只用一种溶剂展层，就不能将它们分开。为此，当用一种溶剂展层后，将滤纸转动  $90^\circ$ ，再用另一溶剂展层，从而达到分离目的，这种方法称为双向纸层析法。

氨基酸无色，可利用茚三酮显色反应，将氨基酸层析点显色作定性、定量用。

### 三、实验器材

层析缸（或标本缸），毛细管，电吹风，层析滤纸（新华一号），喷雾器，针、白线、直尺、铅笔，一次性手套。

### 四、实验试剂

#### （一）扩展剂

将正丁醇、冰醋酸和水以体积比 4 : 1 : 3 混合，放入分液漏斗中，充分振荡，静置后分层，弃去下层水层。

#### （二）氨基酸溶液

0.5% 甘氨酸、脯氨酸、亮氨酸以及它们的混合液（各组分均为 0.5%）。

### (三) 显色剂

0.1% 水合茚三酮正丁醇溶液。

## 五、操作步骤

### (一) 滤纸准备

取层析滤纸（长 16 cm、宽 12 cm）一张，在纸的一端距边缘 2 cm 处用铅笔画一直线，在直线上作 4 个记号，记号之间间隔 2 cm，此为原点的位置。

### (二) 点样

用毛细管将各氨基酸样品分别点在 4 个位置上，干后重复点样 2~3 次。每点在纸上扩散直径最大不能超过 0.5 cm。

### (三) 展层

将点好样的滤纸用白线缝成圆筒，纸的两侧边缘不能接触且要保持平行。将滤纸筒直立于标本缸中（点样的一端在下，扩展剂的液面需低于点样线 1 cm）。当溶剂上升 10~12 cm 时即取出滤纸，剪断连线，用铅笔描出溶剂前沿界线，迅速用电吹风热风吹干。

### (四) 显色

用喷雾器均匀地喷上 0.1% 水合茚三酮正丁醇溶液，然后用电吹风热风吹干，即显出各层析斑点。

### (五) 计算

用直尺测量并计算出各标准氨基酸的  $R_f$  值，同时计算出混合氨基酸 3 个层析斑点的  $R_f$  值，通过与标准氨基酸比较，确定混合氨基酸中各氨基酸在滤纸上的位置。

## 六、注意事项

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。要将取出的滤纸平放在洁净的滤纸上，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”现象。

3. 点样点（原点）要高于扩展剂液面约 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。

## 七、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？
3. 用手直接接触滤纸会引起什么不良后果？为什么？



## 实验四 考马斯亮蓝 G-250 法测定 蛋白质质量浓度

### 一、实验目的

学习考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质质量浓度的原理和方法，掌握标准曲线法测定蛋白质质量浓度的基本操作，熟练掌握 722 型分光光度计的使用和操作方法。

### 二、实验原理

考马斯亮蓝法测定蛋白质质量浓度，是利用蛋白质-染料结合的原理，定量测定微量蛋白质质量浓度的快速、灵敏的方法。

考马斯亮蓝 G-250 存在着两种不同的颜色形式：红色和蓝色。考马斯亮蓝 G-250 在酸性游离状态下呈棕红色，最大吸收峰在 465 nm；当它与蛋白质以范德华力结合成复合物后变为蓝色，其最大吸收峰移至 595 nm。在一定的蛋白质质量浓度范围内（1 ~ 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），蛋白质-染料复合物在波长为 595 nm 处的吸光度与蛋白质含量成正比，故可用于蛋白质的定量测定。

一些阳离子（如  $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ ）， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、乙醇等物质不干扰测定，而大量的去污剂如 TritonX-100、SDS 等严重干扰测定，少量的去污剂可通过用适当的对照来消除。

蛋白质和考马斯亮蓝 G-250 结合，在 2 min 左右的时间内达到平衡，完成反应十分迅速，其复合物在室温下 1 h 内保持稳定。蛋白质-染料复合物具有很高的消光系数，因此大大提高了蛋白质测定的灵敏度（最低检出量为 1  $\mu\text{g}$ ）。由于染色法简单迅速，干扰物质少，灵敏度高，现已广泛应用于蛋白质质量浓度的测定。

### 三、实验器材

1. 试管：1.5 cm × 15 cm。
2. 吸管：0.10 mL、0.50 mL、2.0 mL、5.0 mL。
3. 722 型分光光度计。
4. 容量瓶：1 000 mL。
5. 量筒：100 mL。
6. 电子分析天平。
7. 旋涡混合器。