

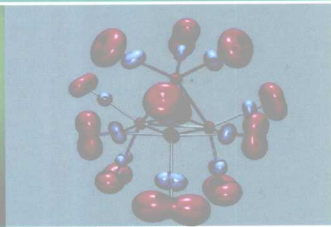
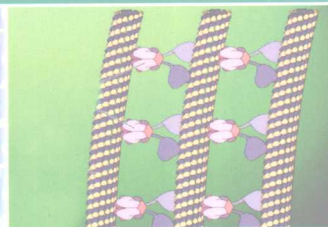


21世纪高等教育规划教材
生物学系列

生物化学与分子生物学实验教程

SHENGWU HUAXUE YU FENZI SHENGWUXUE SHIYAN JIAOCHENG

■ 主编 熊 丽 丁书茂 罗 勤



教育部直属师范大学
华中师范大学出版社

SHENGWU HUAXUE YU FENZI SHENGWUXUE SHIYAN JIAOCHENG

本书由华中师范大学出版基金全额资助

生物化学与分子生物学实验教程

主 编：熊 丽 丁书茂 罗 勤
编 委：袁均林 刘德立 李 睿
邹煜平 胡芹芹 李 今
郑永良

华中师范大学出版社

内 容 提 要

本书以糖类、蛋白质、脂类及核酸的分离和鉴定、代谢及其调控以及分子生物学基本技术为重点;介绍了生物高分子的提取和纯化、结构和性质、酶动力学分析、分子克隆技术、层析法、电泳法等基础研究技术,并介绍了一些分子生物学新技术。本书内容全面,包括基础实验、开放及综合设计性实验,供不同院校、不同专业根据具体条件选用。

本书可作为高等院校生物类各专业本科生和研究生生物化学与分子生物学实验教材,也可供相关教学和科研工作者参考。

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/熊丽 丁书茂 罗勤 主编. —武汉:华中师范大学出版社,2007. 11

ISBN 978-7-5622-3653-5

I. 生… II. ①熊… ②丁… ③罗… III. ①生物化学—实验—教材 ②分子生物学—实验—教材

IV. Q5-33 Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 148697 号

生物化学与分子生物学实验教程

主 编:熊 丽 丁书茂 罗 勤◎

责任编辑:李 蓉 责任校对:刘 峥 封面设计:罗明波

编 辑 室:文字编辑室

社 址:湖北省武汉市洪山区珞喻路 152 号 邮 编:430079

电 话:027-67863426 67863040

传 真:027-67863291

邮 购:027-67861321

网 址:<http://www.ccnupress.com>

电子信箱:hscbs@public.wh.hb.cn

印 刷 者:武汉市新华印刷有限责任公司

督 印:章光琼

字 数:260 千字

印 张:14.25

开 本:787 mm×960 mm 1/16

版 次:2007 年 11 月第 1 版 2007 年 11 月第 1 次印刷

印 数:1-2000

定 价:24.00 元

敬告读者:欢迎上网查询、购书;欢迎举报盗版,电话 027-67861321。



前 言

在生命科学迅猛发展的今天,作为基础学科的生物化学与分子生物学,其教材和实验参考书层出不穷,但作为一名长期从事该课程课堂和实验教学的普通教师,在工作中时常感到在不同层次、不同教学条件的高校,应该因地制宜地使用适合自身教学特点和教学条件的教材。因此我们结合自编教材并在使用多年的基础上,编写了这本实验教程。

《生物化学与分子生物学实验教程》涵盖普通生物化学实验、生物化学技术大实验和分子生物学实验三部分。其中,普通生物化学实验部分为 16 个实验,生物化学技术大实验部分为 16 个实验,分子生物学实验部分为 14 个实验,每一部分均设计成基础实验、开放及综合设计性实验两个单元,共 46 个实验。

本教材注重加强基本实验方法和技能训练,同时引进了一些新近发展起来的、重要的生物化学及分子生物学研究方法和技术。书中详细叙述了实验的具体操作,罗列了每个实验所需的仪器和材料,并对实验中应注意的地方给予了提示。为了便于教学,使学生深入了解实验内容的重点和难点,掌握实验操作步骤的关键问题,提高学生对实验结果的分析能力,在每个实验后增添了思考题。书后设有附录,选择了重点知识、重要数据和参考资料共 8 项。

本书可供综合性大学尤其是师范院校的生物技术、生物工程、生物科学等专业及农林院校的农学、植保、农化、园艺、林学等专业的学生和医学院校相关专业本科生和研究生学习之用,也可供从事生物科学工作的有关工作人员参考。

湖北师范学院的李今老师、黄冈师范学院的郑永良老师参加了本教材的编写工作。

尽管我们尽了最大的努力来编写本教材,但由于才疏学浅,书中错误和不足在所难免,敬请读者批评指正。

编 者
2007. 11



目 录

第一部分 普通生物化学实验

一、基础实验	1
实验一 微量凯氏(Kjeldahl)定氮法	1
实验二 氨基酸的分离鉴定——纸层析法	4
实验三 蛋白质的性质实验(一)——蛋白质及氨基酸的呈色反应	6
实验四 蛋白质的性质实验(二)——蛋白质的等电点测定和沉淀反应	14
实验五 血清蛋白的醋酸纤维薄膜电泳	19
实验六 核酸的定量测定——定磷法	21
实验七 酵母核糖核酸的分离及组分鉴定	25
实验八 酶的特性	27
二、开放及综合设计性实验	32
实验九 血糖的定量测定(Hagedorn-Jensen 二氏定糖法)	32
实验十 脂肪酸的 β -氧化	35
实验十一 血液中转氨酶活力的测定(分光光度法)	37
实验十二 2,6-二氯酚靛酚法测定维生素 C 的含量	40
实验十三 过氧化氢酶的作用	42
实验十四 过氧化物酶的作用	43
实验十五 尿液淀粉酶活力测定(Winslow 氏法)	45
实验十六 柑橘皮提取果胶	47

第二部分 生物化学技术大实验

一、基础实验	48
实验一 离子交换柱层析法分离氨基酸	48
实验二 蛋白质含量的测定	51
实验三 凝胶过滤法测定蛋白质相对分子质量	57
实验四 薄层层析法分离 AMP、ADP 和 ATP	60
实验五 动物肝脏 DNA 的制备和含量测定	62
实验六 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	65
二、开放及综合设计性实验	69



实验七	SDS-聚丙烯酰胺电泳法测定蛋白质相对分子质量	69
实验八	DNS-Cl 法分析蛋白质 N-末端氨基酸	77
实验九	酵母蔗糖酶的提取及纯化	80
实验十	蔗糖酶动力学研究	89
实验十一	脲酶动力学研究	100
实验十二	乳酸脱氢酶(LDH)同工酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)	105
实验十三	L-谷氨酸脱羧酶的固定化	111
实验十四	枯草杆菌细胞固定化	113
实验十五	细胞色素 c 的制备及测定	114
实验十六	大鼠肝细胞的单细胞凝胶电泳	120

第三部分 分子生物学实验

一、基础实验	123	
实验一	质粒 DNA 的提取	123
实验二	质粒 DNA 的酶切及凝胶电泳	129
实验三	大肠杆菌感受态细胞的制备及转化	135
实验四	重组质粒的连接、转化及筛选	139
实验五	基因组 DNA 的提取及检测	144
实验六	RNA 的分离与纯化	149
实验七	PCR 基因扩增	152
实验八	DNA 片段的回收与纯化	156
实验九	外源基因在大肠杆菌中的诱导及表达	158
实验十	核酸杂交技术	160
实验十一	双向聚丙烯酰胺凝胶电泳	165
二、开放及综合设计性实验	169	
实验十二	用 <i>exo</i> III 外切酶构建亚克隆	169
实验十三	利用 T 载体克隆绿色荧光蛋白(GFP)基因	172
实验十四	cDNA 文库构建	175
三、分子生物学新实验技术	180	
第一节	生物芯片技术	180
第二节	核糖核酸干扰技术(RNAi 技术)	186
第三节	原位核酸分子杂交技术	190

附 录

附录一	实验室规则	195
-----	-------	-----

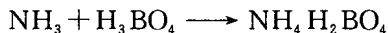
附录二	实验室安全及防护知识	196
附录三	实验室常识	199
附录四	常用数据表	201
附录五	核酸基础数据	207
附录六	缓冲溶液	208
附录七	常用缓冲液的配制	209
附录八	常用贮存液的配制	215





示剂。

2. 直接法:用硼酸作为氨的吸收溶液,结果使溶液中氢离子浓度降低,混合指示剂(pH5.2~5.6)由葡萄紫色变为绿色。再用标准酸来滴定,使硼酸恢复到原来的氢离子浓度为止,指示剂出现葡萄紫色即为滴定终点,此时所耗的盐酸量即为氨的量。



为了加速消化,可加入硫酸铜作催化剂,同时加入硫酸钾或硫酸钠可提高溶液的沸点。此外硒汞混合物或钼酸钠也可作为催化剂缩短消化时间。 H_2O_2 也可加速反应。

三、试剂

1. 样液:1g 卵清蛋白溶于0.9%氯化钠溶液,并稀释至100mL。如有不溶物,离心取上清液备用。

2. 浓硫酸(A. R.)。

3. 硫酸钾:硫酸铜=3:1(W/W),混匀研成粉末。

4. 30%氢氧化钠溶液:30g 氢氧化钠溶于蒸馏水,稀释至100mL。

5. 2%硼酸溶液:2g 硼酸溶于蒸馏水,稀释至100mL。

6. 混合指示剂:0.1%甲基红乙醇溶液和0.1%甲烯蓝乙醇溶液按4:1比例(V/V)混合,贮于棕色试剂瓶中备用。本指示剂在pH5.2时为紫红色,pH5.4时为暗蓝(或灰)色,pH5.6时为绿色,变色点pH为5.4。

7. $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准盐酸溶液:用浓盐酸稀释,基准试剂标定。

四、操作方法

1. 消化:取两支消化管并编号,一支加1.0mL 蒸馏水作为空白对照,另一支加1.0mL 样液。然后加硫酸钾—硫酸铜混合物约20mg及浓硫酸2mL,将其放到电炉上加热消化。开始时应控制火力,勿使管内液体冲出。待管内水气蒸完,硫酸开始分解释放出 SO_2 白烟后,适当加强火力,直至消化液透明并呈淡绿色为止(约1h~2h),冷却,准备蒸馏。

2. 蒸馏:取50mL~100mL 锥形瓶3支,先按一般方法洗净,再用蒸气洗涤数分钟,冷却,用吸管各加入2%硼酸溶液5.0mL及指示剂4滴。如锥形瓶内液体呈葡萄紫色或红色,可再加硼酸溶液5.0mL,盖好备用;如锥形瓶内液体呈绿色,需要用蒸气重新洗涤。

将消化好的消化液连同消化管装在定氮仪上,再在冷凝管下置一盛有硼酸液及指示剂的锥形瓶,并使冷凝管口插入酸液液面下约0.5cm处(10mL 酸液置于



50mL~100mL 锥形瓶内,液体厚度不大,可将锥形瓶斜放。冷凝管口必须插在液面下,但也不宜太深,这样,万一发生倒吸现象时,硼酸溶液不致被吸入反应室内)。

打开碱泵开关,将30%氢氧化钠溶液泵入消化管中,至消化管内液体呈灰褐色为止,关掉碱泵开关。打开蒸馏开关开始蒸馏,开始蒸馏后,即应注意硼酸溶液颜色的变化。当酸液由葡萄紫色变成绿色后,再蒸馏1min,然后降低锥形瓶,使冷凝管口离开酸液液面约1cm,再蒸馏30s,用少量蒸馏水洗冷凝管口,移去锥形瓶,盖好,准备滴定。

3. 滴定:用 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液滴定锥形瓶中的硼酸溶液至呈葡萄紫色,记录所耗标准盐酸溶液量。

4. 计算:

$$\text{样品含氮量}(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}) = \frac{(A-B)\times M\times 14.008}{C}$$

A=滴定样品用去的盐酸溶液毫升数;

B=滴定空白用去的盐酸溶液毫升数;

C=相当于未知样品的毫升数;

M=盐酸的浓度;

14.008=氮的相对原子质量。

思考题

指出本测定方法易产生误差的原因。



实验二 氨基酸的分离鉴定——纸层析法

一、实验目的

学习并掌握纸层析法的基本原理及操作方法,学会分析未知样品的氨基酸的成分。

二、实验原理

纸层析法是用滤纸作为惰性支持物的分配层析法,层析溶剂由有机溶剂和水组成。

物质被分离后在纸层析图谱上的位置是用 R_f 值(比移)来表示的(见图 1):

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

在一定的条件下某种物质的 R_f 值是常数。 R_f 值的大小与物质的结构、性质、溶剂系统、层析滤纸的质量和层析温度等因素有关。

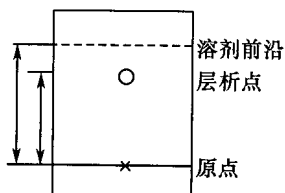


图 1 纸层析示意图

三、器材

层析缸^①、毛细管、喷雾器、培养皿、层析滤纸(新华一号)。

四、试剂

1. 扩展剂:

4 份水饱和的正丁醇和 1 份冰醋酸的混合物。将 20mL 正丁醇和 5mL 冰醋酸放入分液漏斗中,与 15mL 水混合,充分振荡,静置后分层,放出下层水层。取漏斗内的扩展剂约 5mL 置于小烧杯中做平衡溶剂,其余的倒入培养皿中备用,约 650mL。

2. 氨基酸溶液:

0.5%的赖氨酸、脯氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸溶液及它们的混合液(各组分浓度均为 0.5%)各 5mL。

3. 显色剂:

^① 本实验所用层析缸是用大的标本缸代替的。若用标准的层析缸,滤纸平衡后应用长颈漏斗从层析缸上部小孔中加入扩展剂。



0.1%水合茚三酮—正丁醇溶液,50 mL~100mL。

五、操作方法

1. 将盛有平衡溶剂的小烧杯置于密闭的层析缸中。
2. 取层析滤纸(长 22cm,宽 14cm)一张,在纸的一端距边缘 2cm~3cm 处用铅笔画一条直线,在此直线上每间隔 2cm 做一记号(见图 2)。

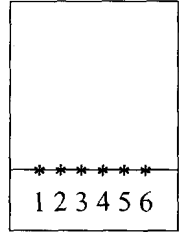


图 2 点样示意图

3. 点样:用毛细管将各氨基酸样品分别点在这六个位置上,干后再点一次。每点在纸上扩散的直径最大不超过 3mm。

4. 扩展:用线将滤纸固定成筒状,纸的两边不能接触。将盛有约 20mL 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(点样的一端在扩展剂中,液面需低于点样线 1cm)。待溶剂上升 15cm~20cm 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。

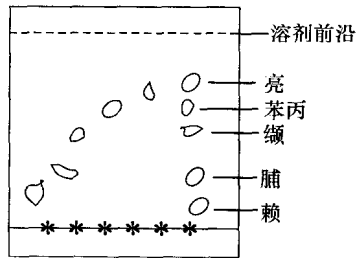


图 3 层析结果图谱

5. 显色:用喷雾器均匀喷上 0.1%水合茚三酮—正丁醇溶液,然后置烘箱中烘烤 5min(100℃)或用热风吹干即可显出各层析斑点(见图 3)。

思考题

1. 计算各种氨基酸的 R_f 值,指出混合氨基酸的种类。
2. 各种氨基酸中,哪些是亲水性氨基酸? 哪些是疏水性氨基酸?
3. 如何用纸层析法对氨基酸进行定性和定量的测定?



实验三 蛋白质的性质实验(一) ——蛋白质及氨基酸的呈色反应

一、实验目的

1. 了解构成蛋白质的基本结构单位及主要连接方式。
2. 了解蛋白质和某些氨基酸的呈色反应原理。
3. 学习几种常用的鉴定蛋白质和氨基酸的方法。

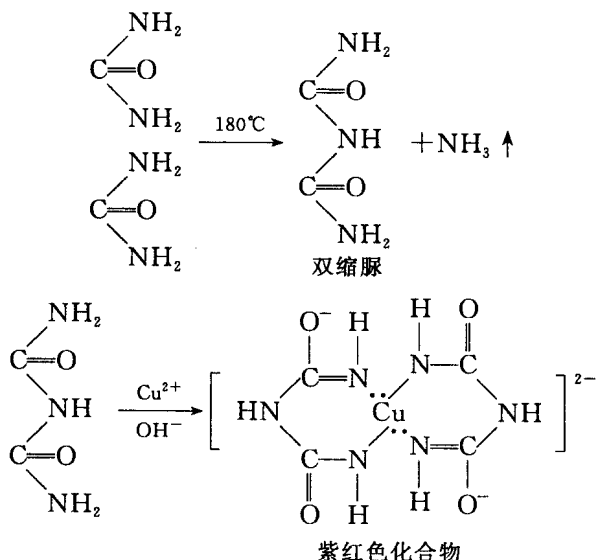
二、实验内容

(一) 双缩脲反应

1. 实验原理:

尿素加热至 180°C 左右,生成双缩脲并放出一分子氨。双缩脲在碱性环境中能与 Cu^{2+} 结合生成紫红色化合物,此反应称为双缩脲反应。蛋白质分子中有肽键,其结构与双缩脲相似,也能发生此反应。此反应可用于蛋白质的定性或定量测定。

反应式如下:



双缩脲反应不仅为含有两个以上肽键的物质所具有,含有一个肽键和一个 $-\text{CS}-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CRH}-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CHNH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ 或

$-\text{CHOHCH}_2\text{NH}_2$ 等基团的物质以及乙二酰二胺 ($\text{O}=\overset{\text{NH}_2}{\text{C}}-\overset{\text{NH}_2}{\text{C}}=\text{O}$) 等物质也有



此反应。 NH_3 可干扰此反应，因为 NH_3 与 Cu^{2+} 可生成暗蓝色的络离子 $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ 。因此，一切蛋白质或二肽以上的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。

2. 试剂：

- (1) 尿素 10g
- (2) 10% 氢氧化钠溶液 250mL
- (3) 1% 硫酸铜溶液 60mL
- (4) 2% 卵清蛋白溶液 80mL

3. 操作方法：

取少量尿素结晶放在干燥试管中，用微火加热使尿素熔化。熔化的尿素开始硬化时停止加热，此过程尿素放出氨形成双缩脲。冷却后，加 10% 氢氧化钠溶液约 1mL，振荡混匀，再加 1% 硫酸铜溶液 1 滴，再振荡，观察粉红色的出现。避免添加过量硫酸铜，否则生成的蓝色氢氧化铜能掩盖粉红色。

向另一试管加卵清蛋白溶液约 1mL 和 10% 氢氧化钠溶液约 2mL，摇匀，再加 1% 硫酸铜溶液两滴，边加边摇。观察紫玫瑰色的出现。

(二) 茚三酮反应

1. 实验原理：

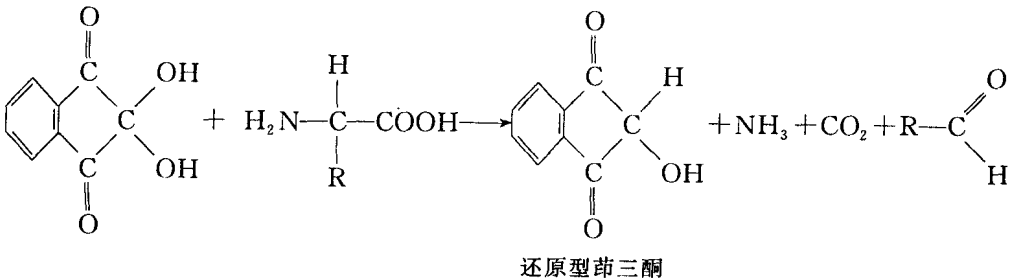
除脯氨酸、羟脯氨酸与茚三酮反应产生黄色物质外，所有 α -氨基酸及一切蛋白质都能与茚三酮反应生成蓝紫色物质。

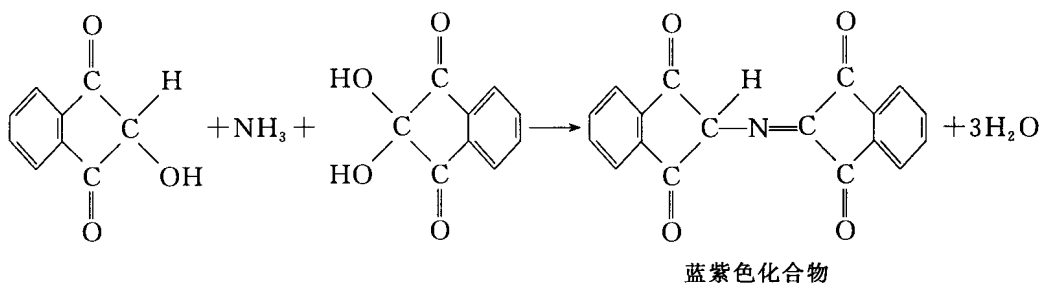
β -丙氨酸、氨和许多一级胺都呈现此反应。尿素、马尿酸、二酮吡嗪和肽链上的亚氨基不呈现此反应。因此，虽然蛋白质和氨基酸均有茚三酮反应，但能与茚三酮呈阳性反应的不一定就是蛋白质或氨基酸。在定性定量测定中，应严防干扰物存在。

该反应十分灵敏，1 : 1500000 浓度的氨基酸水溶液即能出现反应，是一种常用的氨基酸定量测定方法。

茚三酮反应分为两步，第一步是氨基酸被氧化形成 CO_2 、 NH_3 和醛，水合茚三酮被还原成还原型茚三酮；第二步是所形成的还原型茚三酮同另一个水合茚三酮分子与氨缩合成有色物质。

反应机理如下：





此反应的适宜 pH 为 5~7, 同一浓度的蛋白质或氨基酸在不同 pH 条件下的颜色深浅不同, 酸度过大时甚至不显色。

2. 试剂:

- (1) 蛋白质溶液 100mL
- 2% 卵清蛋白或新鲜鸡蛋清溶液(蛋清:水=1:9)。
- (2) 0.5% 甘氨酸溶液 80mL
- (3) 0.1% 茚三酮水溶液 50mL
- (4) 0.1% 茚三酮-乙醇溶液 20mL

3. 操作方法:

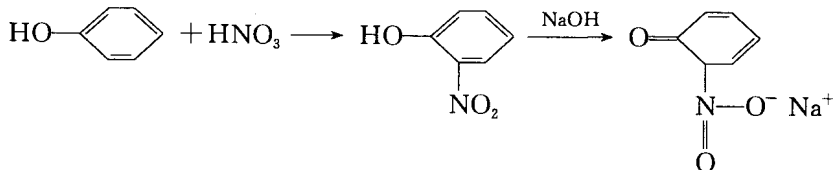
(1) 取两支试管分别加入蛋白质溶液和甘氨酸溶液 1mL, 再各加 0.5mL 0.1% 茚三酮水溶液, 混匀, 在沸水浴中加热 1min~2min, 观察颜色由粉色变为紫色再变为蓝色。

(2) 在一小块滤纸上滴上一滴 0.5% 的甘氨酸溶液, 风干后, 再在原处滴一滴 0.1% 的茚三酮-乙醇溶液, 在微火旁烘干显色, 观察紫红色斑点的出现。

(三) 黄色反应

1. 实验原理:

含有苯环结构的氨基酸如酪氨酸和色氨酸, 遇硝酸后, 可被硝化成黄色物质, 该化合物在碱性溶液中进一步形成深橙色的邻硝醌酸钠。反应式如下:



硝基酚(黄色)

邻硝醌酸钠(橙黄色)

多数蛋白质分子含有带苯环的氨基酸, 所以有黄色反应。苯丙氨酸不易硝化, 需加入少量浓硫酸才有黄色反应。

2. 试剂:

- (1) 鸡蛋清溶液 100mL

将新鲜鸡蛋清与水按 1:20 混匀, 然后用 6 层纱布过滤。

(2) 大豆提取液 100mL

将大豆浸泡充分吸胀后研磨成浆状用纱布过滤。

(3) 头发

(4) 指甲

(5) 0.5% 苯酚溶液 50mL

(6) 浓硝酸 200mL

(7) 0.3% 色氨酸溶液 10mL

(8) 0.3% 酪氨酸溶液 10mL

(9) 10% 氢氧化钠溶液 100mL

3. 操作方法:

向 7 支试管中分别按表 1 加入试剂, 观察各管出现的现象。有的试管反应慢可略放置或用微火加热, 待各管出现黄色后, 于室温下逐滴加入 10% 氢氧化钠溶液至碱性, 观察颜色变化。

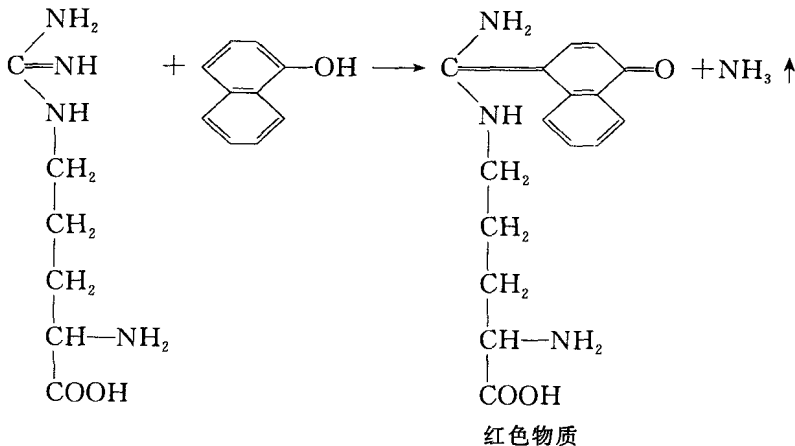
表 1 蛋白质和氨基酸的黄色反应

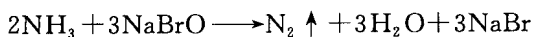
管号	1	2	3	4	5	6	7
材料	鸡蛋清溶液	大豆提取液	指甲	头发	0.5% 苯酚	0.3% 色氨酸	0.3% 酪氨酸
(滴)	4	4	少许	少许	4	4	4
浓硝酸(滴)	2	4	40	40	4	4	4
现象							

(四) 坂口反应

1. 实验原理:

精氨酸和许多胍代化合物与 α -萘酚在碱性次溴酸钠溶液中发生反应, 产生红色物质。





精氨酸是唯一呈此正反应的氨基酸,反应极为灵敏。此反应可用于定性鉴定含有精氨酸的蛋白质和定量测定精氨酸。

2. 试剂:

- (1) 0.3%精氨酸溶液 10mL
- (2) 蛋白质溶液 100mL
- 鸡蛋清:水=1:20;配法见“黄色反应”。
- (3) 20%氢氧化钠溶液 100mL
- (4) 1%α-萘酚—乙醇溶液 20mL(临用时配制)
- (5) 次溴酸钠溶液 10mL

2g 溴溶于 100mL 5% 氢氧化钠溶液中。置棕色瓶中,在冷暗处可保存两周。

3. 操作方法:

向各试管中按表 2 加入试剂,记录出现的现象。

表 2 精氨酸的坂口反应

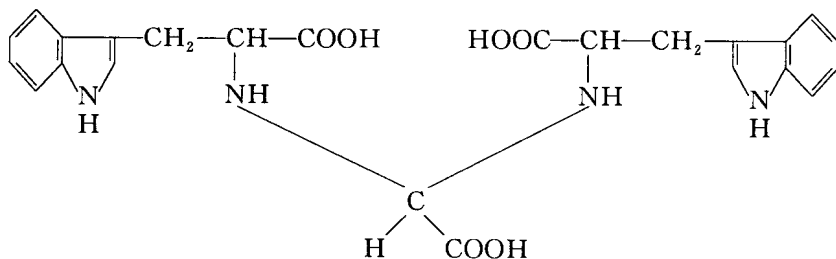
试剂(滴) 管号	H ₂ O	0.3% 精氨酸	蛋白质 溶液	20% NaOH	1% α-萘酚— 乙醇溶液	NaBrO	现象
1	—	—	5	5	3	1	
2	4	1	—	5	3	1	
3	5	—	—	5	3	1	

本实验十分灵敏。α-萘酚要过量。次溴酸钠、精氨酸及蛋白质均不可过多,过多的次溴酸钠可继续氧化有色产物使颜色消失。

(五) 乙醛酸反应

1. 实验原理:

在浓硫酸存在下,色氨酸与乙醛酸反应生成紫色物质,反应机理尚不清楚,可能是一分子乙醛酸与两分子色氨酸脱水缩合形成与靛蓝相似的物质。



2. 试剂:

- (1) 蛋白质溶液 100mL
- 鸡蛋清:水=1:20。