

21世纪生物科学  
基础课系列实验教材

王林嵩 主编

# 生物化学实验技术

 科学出版社  
[www.sciencep.com](http://www.sciencep.com)

21 世纪生物科学基础课系列实验教材

# 生物化学实验技术

王林嵩 主编

科学出版社

北 京

## 内 容 简 介

全书共分四部分,包括 35 个实验。基础实验部分重在基本实验技能的培训;综合实验部分着重实验原理的应用和分析能力的提高。这两部分涵盖了与生物化学理论相适应的生物化学实验内容和技术,包括糖、脂、蛋白质、核酸、酶、维生素的分离、纯化、定性或定量分析、功能和代谢的研究等。设计性实验部分在前两部分的基础上给学生一个独立实验的空间,着重培养学生的独立科研能力。附录介绍了生物化学实验室守则、实验报告书写、常用实验室操作规范、试剂的配制和一些生物化学常用数据。

本书可作为普通高等院校生命科学专业本、专科及农学、食品、生物技术各专业的教材,也可作为中学生物教师的参考用书。

### 图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验技术/王林嵩主编. —北京:科学出版社,2007  
(21 世纪生物科学基础课系列实验教材)  
ISBN 978-7-03-019834-1

I. 生… II. 王… 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(2007)第 134946 号

责任编辑:王国栋 彭克里 刘 晶 / 责任校对:刘小梅  
责任印制:张克忠 / 封面设计:耕者设计工作室

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>

北京市文林印务有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2007 年 9 月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2007 年 9 月第一次印刷 印张:12

印数:1—4 000

字数:228 000

定价:18.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈文林〉)

## 《生物化学实验技术》编写人员

主 编：王林嵩（河南师范大学）

副主编：毛慧玲（南昌大学）

祁元明（郑州大学）

朱 筠（江西师范大学）

编 者：（以作者姓氏笔画为序）

王 丽（河南师范大学）

王 琳（河南师范大学）

李成伟（商丘师范学院）

胡炳义（周口师范学院）

施军琼（河南师范大学）

梁子安（南阳师范学院）

靳同霞（河南师范大学）

## 前 言

生物学是一门对实验技术依赖性很强的学科。生物技术的任何一项发明创造，都推动和伴随着生物学基础理论的进一步发展。20 世纪中期的生物学已经进入分子生物学水平，这是与生物化学技术和方法的迅猛发展分不开的。有关的生物化学实验教学用书有很多，但若是从适合于地方性普通高等院校教学的角度来说，找一本合适的教材并不容易，不同学校其设备条件、师资力量和学生情况均不相同，教学要求也有差异。为此，我们在参考兄弟院校实验教材的基础上，根据我们多年的教学经验，结合教学改革的要求，编写了这本教材。

本书的特点是力求全面培养学生的实验技能，使其能正确地理解实验原理，较好地掌握生物化学实验技术和方法。本书适应新的实验教学体系，实验内容少而精，既适合普通高等院校生物化学实验教学，又能留给老师和学生一定的发挥空间。同时，它不仅是一本教材，也可作为实验记录。在内容的安排上，基础性实验和综合性实验包括普通生物化学各章节相应的实验，设计性实验仅涵盖部分章节内容，重点在于创新能力的培养，既有前沿性，又有实用性。附录介绍了生物化学实验室守则、实验报告书写、常用实验室操作规范、试剂的配制和一些生物化学常用数据。每一实验后的“思考题”，有助于学生在实验前后进行思考和总结提高。

本书的编写是采用集体讨论，分别持笔的方式，主编负责全书的通稿和安排，其中李成伟编写实验一至实验六，胡炳义编写实验九至实验十八，梁子安编写实验二十至实验二十二，王琳、靳同霞编写实验二十三至实验三十一和附录。鉴于我们的水平，缺点和错误是难免的，欢迎批评指正。

# 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·····                | 1  |
| 实验二 纸层析法分离氨基酸·····                   | 10 |
| 实验三 醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白·····             | 20 |
| 实验四 考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量·····             | 25 |
| 实验五 紫外吸收法测定蛋白质含量·····                | 27 |
| 实验六 温度、pH、激活剂和抑制剂对酶活性的影响·····        | 29 |
| 实验七 DNA 的含量测定(二苯胺法)·····             | 34 |
| 实验八 地衣酚显色法测定 RNA 含量·····             | 36 |
| 实验九 DNA 的琼脂糖凝胶电泳·····                | 38 |
| 实验十 肝糖原的提取和鉴定·····                   | 42 |
| 实验十一 3,5-二硝基水杨酸比色定糖法·····            | 44 |
| 实验十二 卵磷脂的提取和鉴定·····                  | 47 |
| 实验十三 油脂酸价的测定·····                    | 49 |
| 实验十四 荧光法测定维生素 B <sub>2</sub> 含量····· | 51 |
| 实验十五 血清谷丙转氨酶活力测定·····                | 53 |

## 第二部分 综合性实验

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| 实验十六 蛋白质含量的测定(凯氏定氮法)·····        | 57 |
| 实验十七 SDS-PAGE 测定蛋白质相对分子质量·····   | 62 |
| 实验十八 疏水层析分离纯化 $\alpha$ -淀粉酶····· | 67 |
| 实验十九 植物组织中过氧化物酶活力的测定·····        | 71 |
| 实验二十 乳酸脱氢酶(LDH)活力测定·····         | 74 |

|       |                                           |     |
|-------|-------------------------------------------|-----|
| 实验二十一 | 酵母蔗糖酶的提取及其性质的研究 .....                     | 77  |
| 实验二十二 | 质粒 DNA 的提取、酶切和鉴定 .....                    | 99  |
| 实验二十三 | 小牛胸腺 DNA 的制备 .....                        | 107 |
| 实验二十四 | 小牛胸腺 DNA 溶解温度的测量 .....                    | 111 |
| 实验二十五 | 植物基因组提取 (CTAB 法) .....                    | 114 |
| 实验二十六 | 萝卜过氧化物酶 <i>rsprx1</i> 的扩增 .....           | 117 |
| 实验二十七 | 酵母 RNA 的提取与组分鉴定 .....                     | 120 |
| 实验二十八 | 粗脂肪的定量测定 .....                            | 123 |
| 实验二十九 | 丙二醛的测定 .....                              | 126 |
| 实验三十  | 发酵过程中无机磷的利用和 ATP 的生成 (ATP 的生物合成)<br>..... | 130 |
| 实验三十一 | 维生素 C 的定量测定 (2,6-二氯酚靛酚滴定法) .....          | 133 |

### 第三部分 设计性实验

|       |                      |     |
|-------|----------------------|-----|
| 实验三十二 | 蛋白质的沉淀反应和等电点测定 ..... | 137 |
| 实验三十三 | 蛋白质含量的测定 .....       | 140 |
| 实验三十四 | 目的基因的扩增与鉴定 .....     | 143 |
| 实验三十五 | 影响肝糖原含量的因素 .....     | 147 |
| 附录    | .....                | 149 |
| 附录 A  | 实验室规则 .....          | 149 |
| 附录 B  | 实验记录及实验报告 .....      | 150 |
| 附录 C  | 实验室基本操作和实验室常识 .....  | 153 |
| 附录 D  | 试剂的配制 .....          | 169 |
| 参考文献  | .....                | 181 |

## 第一部分 基础性实验

### 实验一 蛋白质及氨基酸的颜色反应

#### 【实验目的】

学习和了解常用的几种鉴定蛋白质与氨基酸的方法。进一步认识氨基酸是蛋白质的基本组成单位这一概念。

#### 一、米伦氏反应 (Millon reaction)

#### 【实验原理】

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，经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是羟苯衍生物，因此具有该反应的即证明有酪氨酸的存在。

#### 【操作步骤】

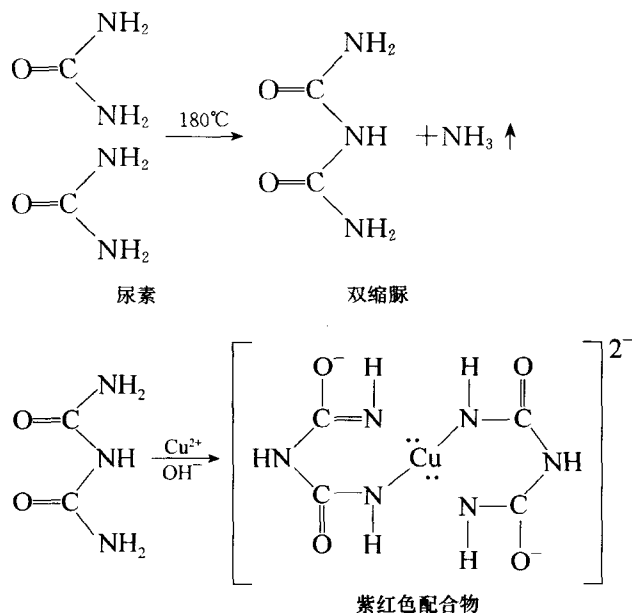
(1) 苯酚实验：取 0.5% 苯酚溶液 1ml 于试管中，加米伦试剂约 0.5ml，小心加热，溶液即出现玫瑰红色。

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

## 二、双缩脲反应 (biurea reaction)

### 【实验原理】

双缩脲反应是指在碱性条件下，双缩脲与二价铜离子作用，生成紫红色络合物的反应。当加热至  $180^{\circ}\text{C}$  左右时，两分子尿素缩合脱去一分子氨，生成双缩脲。在肽和蛋白质分子中具有肽键，其结构与双缩脲类似，也能发生该反应，生成蓝紫色或紫红色的络合物。该反应常用于蛋白质的定性或定量测定。应当指出，该反应的干扰因素较多，一些含有一个肽键和一个  $-\text{CO}-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CS}-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$  等基团的物质也能发生双缩脲反应。 $\text{NH}_3$  对此反应有严重的干扰，因为  $\text{NH}_3$  与铜离子可生成深蓝色的铜氨络合物。因此，我们可以说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。此反应所产生的颜色的深浅与蛋白质的浓度成正比，而与蛋白质的相对分子质量及氨基酸组成无关。



### 【操作步骤】

(1) 取少量尿素结晶，放入干燥试管中，用微火加热使尿素熔化。当熔化的尿素开始硬化时，停止加热，尿素放出氨，形成双缩脲。冷却后，加入 10%

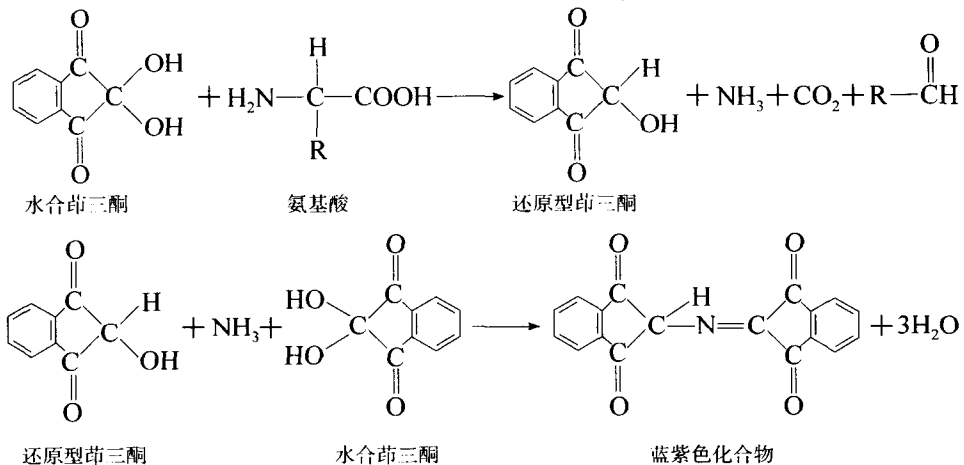
NaOH 溶液约 1ml, 振荡混匀, 再加入 1%  $\text{CuSO}_4$  溶液 1 滴, 振荡, 观察出现的粉红颜色。要避免添加过量  $\text{CuSO}_4$ , 因其生成的蓝色氢氧化铜能掩盖粉红色。

(2) 取另一支试管, 加 1ml 蛋白质溶液和 10% NaOH 溶液 2ml, 摇匀, 再加 1%  $\text{CuSO}_4$  溶液两滴, 边加边摇, 观察玫瑰紫色的出现。

### 三、茚三酮反应 (ninhydrin reaction)

#### 【实验原理】

除脯氨酸、羟脯氨酸能与茚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茚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, 产生  $\text{CO}_2$ 、 $\text{NH}_3$  和醛, 而水合茚三酮被还原成还原型茚三酮; 然后是所生成的还原型茚三酮与另一个水合茚三酮分子和  $\text{NH}_3$  缩合生成有色物质。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。该反应十分灵敏, 1:1 500 000 浓度的氨基酸水溶液即能显示反应, 因此是一种常用的氨基酸定量方法。但也有些物质对茚三酮呈类似的阳性反应, 如  $\beta$ -丙氨酸、 $\text{NH}_3$  和许多一级胺化合物等。因此, 定性或定量测定中, 应严防干扰物存在。



#### 【操作步骤】

(1) 取 2 支试管分别加入蛋白质溶液和 0.5% 甘氨酸溶液 1ml, 再加 0.1%

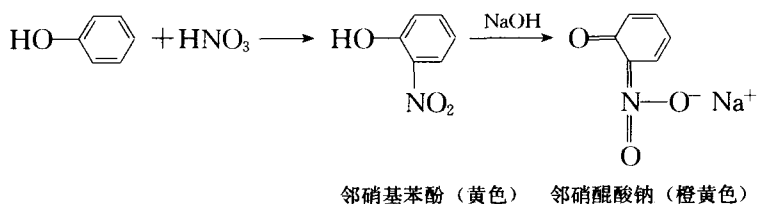
茚三酮水溶液 0.5ml, 混匀, 在沸水浴中加热 1~2min, 观察颜色由粉色变成紫红色再变成蓝色。

(2) 在一小片滤纸上滴上 1 滴 0.5% 甘氨酸溶液, 风干后, 再在原处滴 0.1% 茚三酮乙醇溶液 1 滴, 在微火旁烘干显色, 观察紫红色斑点的出现。

## 四、黄色反应 (xanthoproteic reaction)

### 【实验原理】

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深橙色的硝酞酸钠。



在蛋白质分子中, 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, 需加少量浓硫酸催化才能呈明显的阳性反应。皮肤、指甲、头发等遇浓硝酸变黄即为这一反应的结果。

### 【操作步骤】

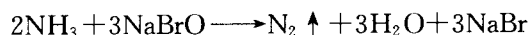
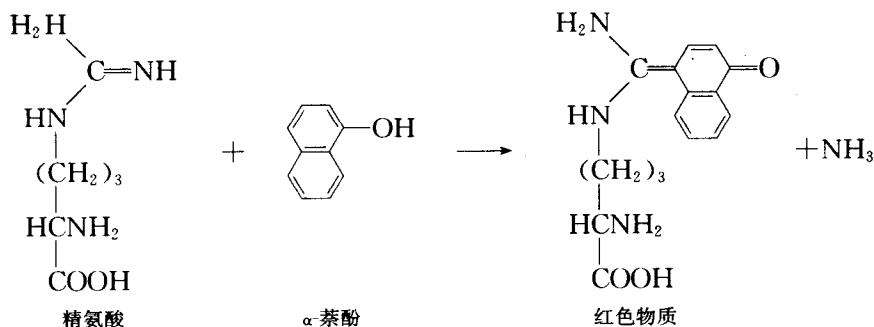
|       | 试管编号  |       |    |    |         |          |          |
|-------|-------|-------|----|----|---------|----------|----------|
|       | 1     | 2     | 3  | 4  | 5       | 6        | 7        |
| 材料    | 鸡蛋清溶液 | 大豆提取液 | 指甲 | 头发 | 0.5% 苯酚 | 0.3% 色氨酸 | 0.3% 酪氨酸 |
| /滴    | 4     | 4     | 少许 | 少许 | 4       | 4        | 4        |
| 浓硝酸/滴 | 2     | 2     | 40 | 40 | 4       | 4        | 4        |
| 现象    |       |       |    |    |         |          |          |

向 7 支试管中分别按上表加入试剂, 观察各管出现的现象, 有的试管反应慢可用微火加热。待各管出现黄色后, 于室温下逐滴加入 10% NaOH 溶液至碱性, 观察颜色变化。

## 五、坂口反应 (Sakaguchi reaction)

### 【实验原理】

在次溴酸钠或次氯酸钠存在的条件下,许多含有胍基的化合物(如胍乙酸、甲胍、胍基丁胺等)能与 $\alpha$ -萘酚发生反应生成红色物质。在20种氨基酸中只有精氨酸含有胍基,所以只有它呈颜色反应。反应方程式如下:



生成的 $\text{NH}_3$ 被次溴酸钠氧化生成 $\text{N}_2$ 。该反应中过量的次溴酸钠是不利的,因其能进一步缓慢氧化,使产物破裂分解,导致颜色消失。但加入适量尿素可抵消过量的次溴酸钠。酪氨酸、色氨酸和组氨酸也能降低产生颜色的强度,甚至会阻止颜色的生成。

该反应灵敏度达1:250 000,因此常用于定量测定精氨酸的含量和定性鉴定含有精氨酸的蛋白质。

### 【操作步骤】

向各试管中按下表加入试剂(单位:滴),摇匀,放置片刻,记录出现的现象。

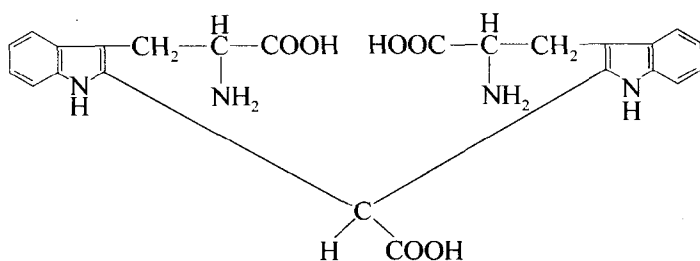
| 试 剂             | 试管编号 |   |   |
|-----------------|------|---|---|
|                 | 1    | 2 | 3 |
| 蒸馏水             | —    | 4 | 5 |
| 0.3%精氨酸/滴       | —    | 1 | — |
| 蛋白质溶液/滴         | 5    | — | — |
| 20% NaOH/滴      | 5    | 5 | 5 |
| 1% $\alpha$ -萘酚 | 3    | 3 | 3 |
| NaBrO/滴         | 1    | 1 | 1 |
| 现象              |      |   |   |

## 六、乙醛酸反应 (adamkiewica-hopkins-cole reaction)

### 【实验原理】

在浓硫酸存在的条件下，色氨酸与乙醛酸反应生成紫色物质，反应机制尚不清楚，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。

色氨酸在浓硫酸中与一些醛类反应也形成有色物质。很多人用含有少量醛杂质的冰醋酸或芳香醛等进行此反应。硝酸根、亚硝酸根、氯酸根及过多的氯离子均能妨碍此反应，有微量  $\text{CuSO}_4$  或  $\text{Fe}^{3+}$  离子存在时，可以加强色氨酸的阳性反应。



### 【操作步骤】

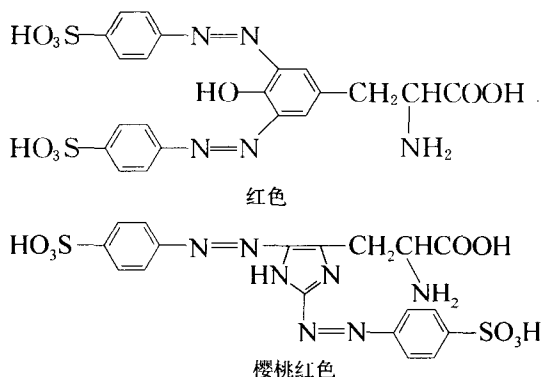
取 3 支试管，编号，分别按下表加入蛋白质溶液、色氨酸溶液和蒸馏水，然后各加入冰醋酸 2ml。混匀后倾斜试管，沿着管壁分别缓缓加入浓硫酸约 1ml，静置后，观察在两溶液界面上紫色环的出现。若不明显，可于水浴中微热，以加快色环形成。认真观察并记录出现的现象。

| 试 剂       | 试管编号 |   |   |
|-----------|------|---|---|
|           | 1    | 2 | 3 |
| 蒸馏水/滴     | —    | 4 | 5 |
| 0.3%色氨酸/滴 | —    | 1 | — |
| 蛋白质溶液/滴   | 5    | — | — |
| 冰醋酸/ml    | 2    | 2 | 2 |
| 浓硫酸/ml    | 1    | 1 | 1 |
| 现象        |      |   |   |

## 七、偶氮反应 (azo reaction)

### 【实验原理】

偶氮化合物 (Ehrlich 氏偶氮试剂) 与酚核或咪唑环结合产生有色物质。它与酪氨酸和组氨酸反应的产物分别为红色和樱桃红色。



含有酪氨酸和组氨酸的蛋白质都有此反应。

### 【操作步骤】

取 3 支试管, 编号, 按下表所示顺序和计量 (单位: 滴) 加入试剂, 摇匀后过几分钟, 观察有色产物的形成并记录出现的现象。

| 试 剂       | 试管编号 |   |   |
|-----------|------|---|---|
|           | 1    | 2 | 3 |
| 0.3%组氨酸/滴 | 4    | — | — |
| 0.3%酪氨酸/滴 | —    | 4 | — |
| 鸡蛋清溶液/滴   | —    | — | 4 |
| 重氮溶液/滴    | 8    | 8 | 8 |
| 20% NaOH  | 2    | 2 | 2 |
| 现象        |      |   |   |

### 【试剂和器材】

#### 1. 试剂

(1) 米伦试剂: 40g 汞溶于 60ml 浓硝酸 (比重 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。

(2) 蛋白质溶液：取 5ml 蛋清，用蒸馏水稀释至 100ml，搅拌均匀后，用纱布过滤。

(3) 0.1% 茚三酮乙醇溶液：称取 0.1g 茚三酮，溶于 100ml 95% 乙醇中。临用前配制。

(4) 尿素粉末。

(5) 1%  $\text{CuSO}_4$  溶液：称取 1g  $\text{CuSO}_4$ ，溶于 100ml 蒸馏水中。

(6) 10% NaOH 溶液和 20% NaOH 溶液：分别称取 10g 和 20g NaOH，各溶于 100ml 蒸馏水中。

(7) 0.5% 苯酚溶液：取 0.5g 苯酚，用蒸馏水稀释定容至 100ml。

(8) 浓硝酸和浓硫酸。

(9) 0.1% 茚三酮水溶液：称取 0.1g 茚三酮，溶于 100ml 蒸馏水中。

(10) 0.3% 精氨酸溶液：称取 0.3g 精氨酸，溶于 100ml 蒸馏水中。

(11) 0.3% 组氨酸溶液：称取 0.3g 组氨酸，溶于 100ml 蒸馏水中。

(12) 0.5% 甘氨酸溶液：称取 0.5g 甘氨酸，溶于 100ml 蒸馏水中。

(13) 0.03% 色氨酸溶液：称取 0.03g 色氨酸，溶于 100ml 蒸馏水中。

(14) 0.3% 酪氨酸溶液：称取 0.3g 酪氨酸，溶于 100ml 蒸馏水中。

(15) 鸡蛋清溶液：纯蛋清。

(16) 1%  $\alpha$ -萘酚乙醇溶液：称取 1g  $\alpha$ -萘酚，溶于 100ml 95% 乙醇中。临用时配制。

(17) 冰醋酸。

(18) 次溴酸钠溶液：在冰冷却的条件下，将 2g 溴溶于 100ml 5% NaOH 溶液中，将溶液保存在棕色瓶中，并放在冷暗处，两周内有效。

(19) Ehrlich 氏重氮试剂。

溶液 A：溶解 5g 亚硝酸钠于 1000ml 蒸馏水中。

溶液 B：溶解 5g  $\alpha$ -氨基苯磺酸于 1000ml 蒸馏水中。溶解后，再加入 5ml 浓硫酸。

A、B 溶液分别保存于密闭瓶内。临用时，以 1:1 的比例混合。

## 2. 器材

试管及试管架；水浴锅；酒精灯；量筒（10ml）；滤纸片；烘箱；试管夹；药勺。

## 【思考题】

(1) 如果蛋白质水解作用一直进行到双缩脲反应呈阴性结果，此时可对水解

程度作出什么推论？

(2) 能否用茚三酮反应可靠地鉴定蛋白质的存在？

(3) 白明胶对乙醛酸反应呈阴性，为什么？用白明胶做米伦实验，结果如何？请解释其原因。

## 实验二 纸层析法分离氨基酸

### 【实验目的】

掌握分配层析的原理，学习氨基酸纸层析法的操作技术（包括点样、平衡、展层、显色、鉴定及定量）。学习分析未知样品的氨基酸成分（水解、层析及鉴定）的方法。

### 【实验原理】

层析法又叫色层分离法、色谱分析法或色谱法。1903年，俄国化学家茨维特（M. Tswett）发现用挥发油冲洗菊粉柱时，各种颜色的色素在吸附柱上从上到下排列成色谱，故称“色层分离法”。1931年，有人用氧化铝柱分离了胡萝卜素的两种同分异构体，显示了这一分离技术的高度分辨力，从此引起了人们的广泛注意。自1944年应用滤纸作为固定支持物的“纸层析”诞生以来，层析技术的发展越来越快，20世纪50年代开始，相继出现了气相色谱和高效液相层析，其他如薄层层析、亲合层析、凝胶层析等也迅猛发展。层析分离技术操作简便，样品用量可大可小，既可用于实验室分离分析，又适用于工业生产中产品的分析制备。现已成为生物化学、分子生物学、生物工程等学科广泛应用而又必不可少的分析工具之一。

根据所用的支持物及其理化性质不同可将层析法分成三类：

- （1）用固体吸附剂作支持物的称为吸附层析；
- （2）用吸附了某种溶剂的固体物质（如滤纸）作支持物的称为分配层析；
- （3）用其表面所含离子能与溶液中的离子进行交换的固体物质作支持物的称为离子交换层析。

纸层析所依据的原理是分配层析，故属于分配层析的范畴。

#### 1. 分配层析

分配层析法是利用不同的物质在两个相混而互不相溶的溶剂中的分配情况不同而使之得到分离的方法。将分配层析法中的一种溶剂设法固定在一个固定柱内，再用另外一种溶剂来冲洗这个固定柱，同样可达到将不同物质分离的目的。我们把固定在柱内的液体称为固定相，把用作冲洗的液体叫做流动相。为了使固