



面向“十三五”高等教育规划教材

生物工程与技术专业 基础实验教程

SHENGWU GONGCHENG YU JISHU ZHUANYE
JICHU SHIYAN JIAOCHENG

于源华 主编



北京理工大学出版社

BEIJING INSTITUTE OF TECHNOLOGY PRESS

面向“十三五”高等教育规划教材

生物工程与技术专业 基础实验教程

主编 于源华

 **北京理工大学出版社**
BEIJING INSTITUTE OF TECHNOLOGY PRESS

图书在版编目 (CIP) 数据

生物工程与技术专业基础实验教程/于源华主编. —北京: 北京理工大学出版社, 2016. 6

ISBN 978 - 7 - 5682 - 2547 - 2

I. ①生… II. ①于… III. ①生物工程 - 实验 - 高等学校 - 教材 IV. ①Q81 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 150802 号

出版发行 / 北京理工大学出版社有限责任公司

社 址 / 北京市海淀区中关村南大街 5 号

邮 编 / 100081

电 话 / (010) 68914775 (总编室)
82562903 (教材售后服务热线)
68948351 (其他图书服务热线)

网 址 / <http://www.bitpress.com.cn>

经 销 / 全国各地新华书店

印 刷 / 北京泽宇印刷有限公司

开 本 / 787 毫米 × 1092 毫米 1/16

印 张 / 27

字 数 / 626 千字

版 次 / 2016 年 6 月第 1 版 2016 年 6 月第 1 次印刷

定 价 / 68.00 元

责任编辑 / 张慧峰

文案编辑 / 张慧峰

责任校对 / 周瑞红

责任印制 / 王美丽

本书编委会

主 编:于源华

编委会:

张 晓 张淑华 李景梅 何秀霞 葛淑敏

刘 建 范丽颖 刁昱文 嵇 冶 冀 伟

王清爽 孙立志 王一东 李洪广 崔海丹

何乃彦 李 甜 张 扬 张 昊

前言

本书是在之前多年使用教材的基础上,根据学科及专业发展的需要,进一步增减相应的实验内容改编修订而成,是目前高校生物工程和生物技术及相关专业配套的专业基础课程综合性实验指导用书,包括生物化学、分子生物学、微生物学和细胞生物学等四门实验课的实验原理与技术。这几门实验课是生物工程和生物技术及相关专业的必修专业基础实验课程。这些实验的开设,可使学生系统掌握这四门专业基础实验的基本技术及操作,了解并掌握学科发展的前沿技术及方法,加强学生创新思维、创新能力和实践能力的培养,为提高学生生物技术实验基本技能、科学素养和创新能力,提供实验工具。本书可作为本专科生、研究生及高校教师等教学及科研参考用书。

全书共分四章,第一章是生物化学实验部分,包括蛋白质、核酸、糖类、脂类、维生素、酶等的分离提取、纯化鉴定及检测等实验内容,具体包括盐析与透析、离心、冷冻干燥、光谱、层析、电泳、核酸杂交、免疫分析、基因重组等实验技术。第二章是分子生物学实验部分,主要由 DNA 技术、RNA 技术、蛋白质技术以及生物大分子相互作用等,具体介绍了基因分离、克隆,目的基因的鉴定、表达,PCR 扩增,核酸序列分析,核酸杂交、蛋白免疫印迹分析等实验原理和方法。第三章是微生物学实验部分,分模块介绍了显微操作技术、微生物分离纯化与菌种保藏技术、微生物形态观察技术、微生物生理生化鉴定技术、微生物专题实验技术、微生物应用实验技术。主要涉及无菌操作、显微观察、微生物培养、微生物鉴定、微生物检测等方法。第四章是细胞生物学实验部分,主要包括细胞形态结构、细胞化学、细胞生理、染色体与核型分析、细胞和组织培养技术、细胞化学成分分离、细胞工程技术及细胞凋亡检测技术等。

本书由于源华主编,主要负责制定编写大纲,对全书进行统稿、修改,并承担生物化学实验部分及附录 1~5 的编写工作;其他章节由多年从事本课程教学的张晓、张淑华、李景梅、何秀霞、葛淑敏、刘建、范丽颖等教师编写。这些教师具有多年的教学经验,学术水平较高。全书由毛亚杰教授进行了校对,同时李甜、孙立志、王一东、王清爽、李洪广、何乃彦、冀伟、嵇冶、崔海丹等教师也参与了部分编写及校对工作。

由于编者水平所限,书中不当之处,敬请批评指正。

编者

目 录

第一章 生物化学实验	1
实验 1 氨基酸的分离鉴定——纸层析法	1
实验 2 总氮量的测定——凯氏定氮法	3
实验 3 蛋白质脱盐(透析和凝胶过滤)	7
实验 4 考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量	10
实验 5 Folin-酚法测定蛋白质含量	12
实验 6 蛋白质浓度测定——双缩脲法	14
实验 7 紫外吸收法测定蛋白质含量	16
实验 8 大豆蛋白的提取及浓度测定	18
实验 9 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)	20
实验 10 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(银染色法)	24
实验 11 动物细胞蛋白质的提取和含量测定	26
实验 12 离子交换柱层析法分离蛋白质	28
实验 13 大肠杆菌 DNA 和 RNA 的同步提取法	33
实验 14 菜花中核酸的分离和鉴定	34
实验 15 酵母核糖核酸的分离及组分鉴定	36
实验 16 酵母 RNA 提取与地衣酚显色法	38
实验 17 紫外吸收法测定核酸含量	40
实验 18 糖类的性质实验——糖类的颜色反应	42
实验 19 糖类的性质实验——糖类的还原作用	45
实验 20 还原糖和总糖含量的测定——3,5-二硝基水杨酸比色定糖法	46
实验 21 可溶性总糖的测定(地衣酚-硫酸法)	49
实验 22 蔗糖酶米氏常数的测定	50
实验 23 肌糖元的酵解作用	52
实验 24 粗纤维的测定(酸性洗涤剂法)	54

实验 25	细胞中糖类化合物的提取及成分鉴定	56
实验 26	脂肪的提取和定量测定	63
实验 27	脂肪碘值的测定	65
实验 28	维生素 C 的定量测定	67
实验 29	酶的特性	69
实验 30	超氧化物歧化酶的分离纯化	75
实验 31	亲和层析纯化乳酸脱氢酶	80
实验 32	聚丙烯酰胺凝胶电泳分离乳酸脱氢酶同工酶(活性染色鉴定法)	84
实验 33	黑木耳多糖的提取、分离、纯化及初步测定	88
实验 34	单向定量免疫电泳	89
实验 35	IEF 电泳测定蛋白质等电点	92
实验 36	免疫印迹技术与酶联免疫吸附测定法	98
实验 37	利用 RNAi 技术鉴定基因功能	103
实验 38	胰蛋白酶的比活力测定	107
实验 39	基因工程重组蛋白的表达、分离、纯化和鉴定	108
实验 40	维生素 A 的提取及定量测定	112
实验 41	植物总 DNA 的提取及鉴定	113
实验 42	大肠杆菌总 DNA 的提取及鉴定	114

第二章 分子生物学实验

116

实验 1	质粒 DNA 的提取	116
实验 2	琼脂糖凝胶电泳鉴定 DNA	124
实验 3	琼脂糖凝胶中 DNA 片段的回收	127
实验 4	DNA 定量分析	130
实验 5	DNA 的酶切	132
实验 6	真核细胞 RNA 的提取	137
实验 7	pUC57 T 载体的制备	139
实验 8	DNA 的连接	145
实验 9	重组 DNA 的转化	148
实验 10	转化子的鉴定	150
实验 11	PCR 实验	153
实验 12	RT - PCR 实验	156
实验 13	从序列数据库查找序列	158

实验 14	PCR 引物设计软件	159
实验 15	核酸分析软件 DNASIS	160
实验 16	基因组 DNA 的提取及检测	161
实验 17	Southern 杂交	165
实验 18	Northern 杂交	169
实验 19	免疫印迹(Western blotting)	175
第三章	微生物学实验	178
I	显微镜技术	178
实验 1	普通光学显微镜的使用	178
实验 2	微生物细胞大小的测定	182
实验 3	显微镜直接计数法	184
II	微生物的分离纯化与菌种保藏	187
实验 4	培养基的制备	187
实验 5	消毒与灭菌	192
实验 6	微生物的分离与纯化	196
实验 7	噬菌体的分离纯化与效价测定	201
实验 8	平板菌落计数法	206
实验 9	菌种保藏	208
III	微生物的形态学观察实验	217
实验 10	细菌的简单染色和革兰氏染色	217
实验 11	细菌运动性观察	220
实验 12	细菌的芽孢染色法	223
实验 13	荚膜染色法	225
实验 14	酵母菌的形态观察及死活细胞鉴别	227
实验 15	放线菌的培养及形态观察	229
实验 16	霉菌的培养及形态观察	231
IV	微生物生理生化实验	233
实验 17	细菌生长曲线的制作	233
实验 18	厌氧微生物的培养技术	236
实验 19	环境因素对微生物生长发育的影响	239
实验 20	大分子物质的水解实验	254
实验 21	IMViC 和硫化氢实验	256

实验 22 糖发酵实验·····	259
V 微生物专题实验·····	261
实验 23 抗原与免疫血清的制备·····	261
实验 24 沉淀反应·····	263
实验 25 病毒的血凝实验·····	265
实验 26 水中细菌总数的测定·····	266
实验 27 多管发酵法测定水中大肠菌群·····	269
实验 28 抗药性突变株的分离·····	274
实验 29 牛乳中细菌的检查·····	275
VI 实际应用实验·····	278
实验 30 发酵酸乳的制作·····	278
实验 31 秦皮的抑菌作用·····	281
第四章 细胞生物学实验·····	284
I 细胞的形态结构·····	284
实验 1 细胞形态结构的观察和显微测量·····	284
实验 2 细胞活体染色技术·····	287
实验 3 线粒体的分离与观察·····	290
实验 4 叶绿体的分离与荧光观察·····	293
实验 5 细胞器的分离·····	295
实验 6 细胞骨架观察·····	301
实验 7 联会复合体的染色与观察·····	308
II 细胞化学·····	310
实验 8 Feulgen 反应显示 DNA·····	310
实验 9 细胞中过氧化物酶的显示·····	314
实验 10 细胞中碱性蛋白的显示·····	315
实验 11 酸性磷酸酶的定位·····	317
实验 12 叶绿体 DNA 的提取与检测·····	319
III 细胞生理·····	321
实验 13 细胞膜透性的观察·····	321
实验 14 细胞电泳·····	322
实验 15 植物原生质体融合与体细胞杂交·····	326
实验 16 小鼠巨噬细胞吞噬羊红细胞实验·····	328

IV 细胞培养技术	330
实验 17 细胞培养的准备——实验用品的清洗与消毒	330
实验 18 动物细胞培养	334
实验 19 细胞冻存技术	340
实验 20 植物原生质体的分离、培养	343
实验 21 植物细胞的悬浮培养	347
实验 22 细胞集落形成实验	349
实验 23 MTT 法检测细胞活力	351
V 染色技术与核型分析	354
实验 24 小鼠骨髓染色体的制备与 C 带染色	354
实验 25 植物染色体标本的制备和观察	358
实验 26 保护性胶显影剂和硝酸银染核仁组织区的一步染色法	360
VI 细胞工程	363
实验 27 早熟染色体凝集的诱导和观察	363
实验 28 细胞凝集与细胞融合实验	366
实验 29 单克隆抗体的制备	369
VII 其他技术	377
实验 30 细胞凋亡的测定	377
实验 31 荧光标记技术	387
附录	391
附录 1 常用试剂种类配制	391
附录 2 常用试剂的配制	405
附录 3 常用染色液的配制	409
附录 4 缓冲液的配制	415
附录 5 指示剂的配制	418

第一章

生物化学实验

实验 1 氨基酸的分离鉴定——纸层析法

实验目的

通过氨基酸的分离,学习纸层析法的基本原理及操作方法。

通过实验求出室温、中性 pH 条件下各氨基酸的 R_f 值。

实验原理

纸层析法是使用滤纸作为惰性支持物的分层析法。层析溶剂由有机溶剂和水组成。展层时,水为静止相,它与滤纸纤维亲和力强;有机溶剂为流动相,它与滤纸纤维亲和力弱。

将样品在滤纸上确定的原点处展层,由于样品中各种氨基酸在两相中不断进行分配,且它们的分离系数各不相同,所以不同的氨基酸随流动相移动的速率也不相同,于是各种氨基酸在滤纸上就相互分离出来,形成距原点不等的层析点。在一定条件下(室温、展层剂的组成、滤纸的质量、pH 值等),不同的氨基酸有各自固定的移动速率(R_f 值)。

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:

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

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,本实验利用纸层析法分离氨基酸。

实验器材

1. 层析缸
2. 毛细管
3. 喷雾器
4. 培养皿
5. 层析滤纸(新华一号)

实验试剂

(一) 氨基酸溶液(样品溶液)

0.5% (质量分数)的赖氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、半胱氨酸、亮氨酸溶液及它们的混合液

(混合液各组分浓度均为 0.5%)。

(二) 扩展剂

扩展剂是 4 份水饱和的正丁醇和 1 份乙酸的混合物。配制方法是:正丁醇:冰乙酸:水 = 4:1:3 混合,充分振荡,静置后分层,放出下层水层。

(三) 显色剂

0.1% 水合茚三酮正丁醇溶液:取 0.1 g 茚三酮加入 100 mL 正丁醇即可。

实验操作

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 20 cm、宽 14 cm)一张,在纸的一端距边缘 2~3 cm 处用铅笔画一条直线,在此直线上每间隔 2 cm 作一记号,如图 1-1-1 所示。
3. 点样。用毛细管将各氨基酸样品分别点在这 6 个位置上(如图 1-1-1),干后再点一次。每点在纸上扩散的直径最大不超过 3 mm。
4. 扩展。如图 1-1-2 所示,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,用吹风机热风吹干(或 60℃烘箱)。



图 1-1-1 在层析滤纸上作记号

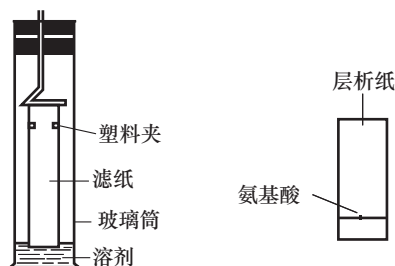


图 1-1-2 氨基酸纸层析示意图

5. 显色。用喷雾器均匀喷上 0.1% 茚三酮正丁醇溶液(注意纸上溶液不倒流、不间断),用吹风机吹干(温度不宜过高),观察每一个点样原点扩展上方有无紫色斑点出现,若都出现,进行下一步。反之,重复喷雾吹干,直至每一个原点上方都出现紫色斑点。
6. 观察层析点,确定其几何中心。
7. 量取数值。

实验结果处理

1. 量取扩展剂前沿到原点线的距离。
2. 量取各氨基酸几何中心到原点的距离。
3. 用测量的值计算各氨基酸在室温、中性 pH 条件下的 R_f 值。

实验分析

实验报告上需要有实验时所用的滤纸展示。

分析自己的实验结果是否理想,参照正规实验步骤及注意事项发现问题。

思考题

1. 何谓纸层析法?
2. 何谓 R_f 值? 影响 R_f 值的主要因素是什么?
3. 怎样制备扩展剂?
4. 层析缸中平衡溶剂的作用是什么?
5. 根据 R_f 值比较实验所用的几种氨基酸的水溶性与脂溶性。

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。尽可能少接触滤纸,在整个操作过程中,手只能接触滤纸边缘,否则手指上的氨基酸会造成滤纸上出现众多斑点。要将滤纸平放在洁净的滤纸上,不可放在试验台上,以防止污染。
2. 展层结束后,切勿忘记用铅笔描出溶剂前沿。
3. 点样防止扩散面积过大,使展层效果不佳或直接影响实验结果。
4. 样品用量过大,会造成“拖尾巴”的现象。
5. 展层剂接触滤纸时一定要均匀保持前沿线与滤纸平行。
6. 注意点样线要高于层析液面,防止点样氨基酸溶解于层析液中。
7. 滤纸不要贴在层析缸壁上,防止滤纸左右两端展层速度过快,影响实验结果。
8. 扩展距离不宜过短,否则展层不彻底,难以区分。
9. 风温度不宜过高,否则斑点变黄。
10. 染色液本身有毒性,应在通风橱内使用。实验时应打开门和窗户。
11. 影响 R_f 值的因素有:
 - (1) 物质本身的化学结构;
 - (2) 展层所用溶剂系统;
 - (3) 展层剂 pH 值;
 - (4) 展层时的温度;
 - (5) 展层所用滤纸;
 - (6) 展层的方向(横向、上行或下行)

实验 2 总氮量的测定——凯氏定氮法

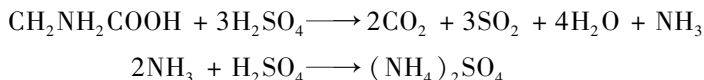
实验目的

学习凯氏定氮法的原理和操作技术。

实验原理

常用凯氏定氮法测定天然有机物(如蛋白质、核酸及氨基酸等)的含氮量。

含氮的有机物与浓硫酸共热时,其中的碳、氢二元素被氧化成二氧化碳和水,而氮则转变成氨,并进一步与硫酸作用生成硫酸铵。此过程通常称为“消化”。但是,这个反应进行得比较缓慢,通常需要加入硫酸钾或硫酸钠以提高反应液的沸点,并加入硫酸铜作为催化剂,以促进反应的进行。甘氨酸的消化过程可表示如下:



浓碱可使消化液中的硫酸铵分解,游离出氨,借水蒸气将产生的氨蒸馏到一定量、一定浓度的硼酸溶液中,硼酸吸收氨后使溶液中的氢离子浓度降低,然后用标准无机酸滴定,直至恢复溶液中原来的氢离子浓度为止,最后根据所用标准酸的摩尔数(相当于待测物中氨的摩尔数)计算出待测物中的总氮量。

实验器材

- | | |
|---------------------------|----------------------|
| 1. 50 mL 消化管或 100 mL 凯氏烧瓶 | 2. 凯氏定氮蒸馏装置或改进型凯氏定氮仪 |
| 3. 50 mL 容量瓶 | 4. 3 mL 微量滴定管 |
| 5. 分析天平 | 6. 烘箱 |
| 7. 电炉 | 8. 1 000 mL 蒸馏烧瓶 |
| 9. 小玻璃珠 | 10. 远红外消煮炉 |

实验试剂

- | | |
|---|----------|
| 1. 消化液(过氧化氢:浓硫酸:水=3:2:1) | 200 mL |
| 2. 粉末硫酸钾—硫酸铜混合物 | 16 g |
| K ₂ SO ₄ 与 CuSO ₄ ·5H ₂ O 以 3:1 配比研磨混合。 | |
| 3. 30% 氢氧化钠溶液 | 1 000 mL |
| 4. 2% 硼酸溶液 | 500 mL |
| 5. 标准盐酸溶液(约 0.01 mol/L) | 600 mL |
| 6. 混合指示剂(田氏指示剂) | 50 mL |

由 50 mL 0.1% 甲烯蓝乙醇溶液与 200 mL 0.1% 甲基红乙醇溶液混合配成,贮于棕色瓶中备用。这种指示剂酸性时为紫红色,碱性时为绿色,变色灵敏且范围很窄。

7. 市售标准面粉和富强粉^①各 2 g

操作方法

(一) 凯氏定氮仪的构造和安装

凯氏定氮仪由蒸汽发生器、反应管及冷凝器 3 部分组成(图 1-2-1)。

蒸汽发生器包括电炉(热源)及一个 1~2 L 容积的烧瓶。蒸汽发生器借橡皮管与反应

管相连,反应管上端有一个玻璃杯,样品和碱液可由此加入到反应室中。反应室中心有一个长玻璃管,其上端通过反应室外层与蒸汽发生器相连,下端靠近反应室的底部。反应室外层下端有一开口,上有一皮管夹,由此可放出冷凝水及反应废液。反应产生的氨可通过反应室上端的细管及冷凝器通到吸收瓶中,反应管及冷凝器之间借磨口连接起来,防止漏气。

安装仪器时,先将冷凝器垂直地固定在铁支台上,冷凝器下端不要距离实验台太近,以免放不下吸收瓶。然后将反应管通过磨口连接与冷凝器相连,根据仪器本身的角度将反应管固定在另一铁支台上,这一点务须注意,否则容易引起氨的散失及反应室上端弯管折断。然后将蒸汽发生器放在电炉上,并用橡皮管把蒸汽发生器与反应管连接起来。安装完毕后,不得轻易移动,以免仪器损坏。

(二) 样品处理

某一固体样品中的含氮量用 100 g 该物质(干重)中所含氮的克数来表示(%)。因此在定氮前,应先将固体样品中的水分除掉。一般样品烘干的温度都采用 105 ℃,因为非游离的水都不能在 100 ℃ 以下烘干。

在称量瓶中称入一定量磨细的样品,然后置于 105 ℃ 的烘箱内干燥 4 小时。用坩埚钳将称量瓶放入干燥器内,待降至室温后称重,按上述操作继续烘干样品。每干燥 1 小时后,称重一次,直到两次称量数值不变,即达恒重。

若样品为液体(如血清等),可取一定体积样品直接消化测定。

精确称取 0.1 g 左右的干燥面粉作为本实验的样品。

(三) 消化

取 4 个 100 mL 凯氏烧瓶或 50 mL 消化管并标号。各加 1 颗玻璃珠,在 1 及 2 号瓶中各加样品 0.1 g,催化剂($K_2SO_4-CuSO_4 \cdot 5H_2O$) 200 mg,消化液 5 mL。注意加样品时应直接送入瓶底,而不要沾在瓶口和瓶颈上。在 3 及 4 号瓶中各加 0.1 mL 蒸馏水和与 1 及 2 号瓶相同量的催化剂和浓硫酸,作为对照,用以测定试剂中可能含有的微量含氮物质。每个瓶口放一个漏斗,在通风橱内的电炉上进行消化^②。

在消化开始时应控制火力,不要使液体冲到瓶颈。待瓶内水汽蒸发完,硫酸开始分解并放出 SO_2 白烟后,适当加强火力,继续消化,直至消化液呈透明淡绿色为止^③。消化完毕,等烧瓶中溶物冷却后,加蒸馏水 10 mL(注意慢加,随加随摇)。冷却后将瓶中溶物倾入 50 mL 的容量瓶中,并以蒸馏水洗烧瓶数次,将洗液并入量瓶,用水稀释到刻度,混匀备用^④。

(四) 蒸馏

(1) 蒸馏器的洗涤。蒸汽发生器中盛有用几滴硫酸酸化的蒸馏水。关闭皮管夹,将蒸汽发生器中的水烧开,让蒸汽通过整个仪器。约 15 min 后,在冷凝器下端放一个盛有 5 mL 2% 硼酸溶液和 1~2 滴指示剂混合液的锥形瓶。位置倾斜如图 1-2-1 所示,冷凝器下端

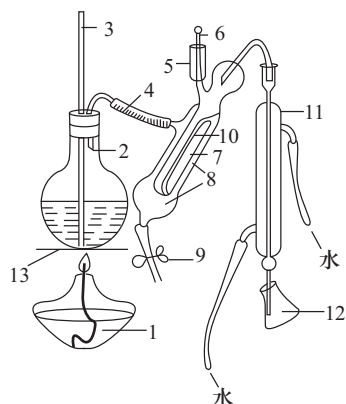


图 1-2-1 凯氏定氮仪

1—热源;2—烧瓶;3—玻璃管;4—橡皮管;5—玻璃杯;6—棒状玻璃塞;7—反应室;8—反应室外壳;9—夹子;10—反应室中插管;11—冷凝管;12—锥形瓶;13—石棉网

完全浸没在液体中,继续蒸汽洗涤 1~2 min,观察锥形瓶内的溶液是否变色,如不变色则证明蒸馏装置内部已洗涤干净。向下移动锥形瓶,使硼酸液面离开冷凝管口约 1 cm,继续通蒸汽 1 min。用水冲洗冷凝管口后,用手捏紧橡皮管。此时由于反应室外层蒸汽冷缩,压力减小,反应室内凝结的水可自动吸出,进入反应室外层。最后打开皮管夹,将废水排出。

(2) 蒸馏操作。取 50 mL 锥形瓶数个,各加 5 mL 硼酸和 1~2 滴指示剂,溶液呈紫色,用表面皿覆盖备用。

用吸管取 10 mL 消化液,细心地由蒸馏器小玻璃杯注入反应室,塞紧棒状玻璃塞。将一个含有硼酸和指示剂的锥形瓶放在冷凝器下,使冷凝器下端浸没在液体内。

用量筒取 30% 的氢氧化钠溶液 10 mL 放入小玻璃杯,轻提棒状玻璃塞使之流入反应室(为了防止冷凝管倒吸,液体流入反应室必须缓慢)。尚未完全流入时,将玻璃塞盖紧,向玻璃杯中加入蒸馏水约 5 mL,再轻提玻璃塞,使一半蒸馏水慢慢流入反应室,另一半留在玻璃杯中作水封。加热蒸汽发生器,沸腾后夹紧皮管夹,开始蒸馏。此时锥形瓶中的酸溶液由紫色变成绿色。自变色时起计时,蒸馏 3~5 min。移动锥形瓶,使硼酸液面离开冷凝管约 1 cm,并用少量蒸馏水洗涤冷凝管口外面。继续蒸馏 1 min,移开锥形瓶,用表面皿覆盖锥形瓶。

蒸馏完毕后,须将反应室洗涤干净,在小玻璃杯中倒入蒸馏水,待蒸汽很足、反应室外层温度很高时,一手轻提棒状玻璃塞使冷水流入反应室,同时立即用另一只手捏紧橡皮管,则反应室外层内蒸汽冷缩,可将反应室中残液自动吸出,再用蒸馏水自玻璃杯倒入反应室,重复上述操作。如此冲洗几次后,将皮管夹打开,将反应室外层中废液排出。再继续下一个蒸馏操作。

待样品和空白消化液均蒸馏完毕后,同时进行滴定。

(3) 滴定。全部蒸馏完毕后,用标准盐酸溶液滴定各锥形瓶中收集的氨量,硼酸指示剂溶液由绿色变成淡紫色为滴定终点。

(4) 计算。

$$\text{总氮量} = \frac{C(V_1 - V_2) \times \frac{14}{1000} \times 100}{W} \times \frac{\text{消化液总量(mL)}}{\text{测定时消化液总量(mL)}} \times 100\%$$

式中 C ——标准盐酸溶液摩尔浓度;

V_1 ——滴定样品用去的盐酸溶液平均毫升数;

V_2 ——滴定空白消化液用去的盐酸溶液平均毫升数;

W ——样品质量(g);

14——氮的相对原子质量。

若测定的样品含氮量部分只是蛋白质,则,

$$\text{样品中蛋白质含量}(\%) = \text{总氮量} \times 6.25$$

若样品中除有蛋白质外,尚有其他含氮物质,则需向样品中加入三氯乙酸,然后测定未加三氯乙酸的样品及加入三氯乙酸后样品上清液中的含氮量,得出非蛋白氮及总氮量,从而计算出蛋白氮,再进一步算出蛋白质含量。

$$\text{蛋白氮} = \text{总氮} - \text{非蛋白氮}$$

$$\text{蛋白质含量}(\%) = \text{蛋白氮} \times 6.25$$

思考题

1. 何谓消化? 如何判断消化终点?
2. 在实验中加入粉末硫酸钾—硫酸铜混合物的作用是什么?
3. 固体样品为什么要烘干?
4. 蒸馏时冷凝管下端为什么要浸没在液体中?
5. 如何证明蒸馏器是否洗涤干净?
6. 本实验应如何避免误差?

附注

- ① 进行实验时可让部分同学用标准面粉, 部分同学用富强粉进行测定。
- ② 也可在“远红外消煮炉”内进行消化。
- ③ 并非所有样品在消化液透明时消化液作用即已完成, 另外消化液的颜色亦常因样品成分的不同而异。因此, 每测一种新样品时, 最好先实验一下需多少时间才能使样品中的有机氮全部变成无机氮, 以后即以此时间为标准。本实验至消化液呈透明淡绿色即消化完全时, 需 2~3 h。
- ④ 本实验可分为两次完成, 第一次进行消化, 第二次进行蒸馏。

实验 3 蛋白质脱盐(透析和凝胶过滤)

I. 蛋白质的透析

实验目的

学习透析的基本原理和操作。

实验原理

蛋白质是生物大分子, 它不能透过透析膜, 而小分子物质可以自由透过。在分离提纯蛋白质的过程中, 常利用透析的方法使蛋白质与其中夹杂的小分子物质分开。

实验器材

- | | |
|------------|----------|
| 1. 透析管或玻璃纸 | 2. 烧杯 |
| 3. 玻璃棒 | 4. 电磁搅拌器 |
| 5. 试管及试管架 | 6. 离心机 |
| 7. 冰箱 | 8. 电炉 |

实验试剂

- | | |
|-----------------|------------------------|
| 1. 1% 氯化钡溶液 | 2. 硫酸铵粉末 |
| 3. 1 mol/L EDTA | 4. 2% NaHCO_3 |