



普通高等教育“十三五”规划教材

生命科学综合实验指导

杨玉红 王虹玲 汪 琢 主编

东北大学出版社

普通高等教育“十三五”规划教材

生命科学综合实验指导

杨玉红 王虹玲 汪 琢 主编

东北大学出版社

主 编：杨玉红 王虹玲 汪 琢
副主编：马 爽 王珊珊 阚国仕 王媛媛 林 英 张 良
参 编：邵 玉 王家庆 段庆斌 陈红漫 徐 艳 杜立宇 廖 林 康宗利
主 审：任大明

© 杨玉红 王虹玲 汪 琢 2016

图书在版编目 (CIP) 数据

生命科学综合实验指导 / 杨玉红, 王虹玲, 汪琢主编. —沈阳: 东北大学出版社,
2016.7

ISBN 978-7-5517-1359-7

I. ①生… II. ①杨… ②王… ③汪… III. ①生命科学-实验-高等学校-教学
参考资料 IV. ①Q1-0

中国版本图书馆CIP数据核字 (2016) 第172333号

出 版 者：东北大学出版社

地址：沈阳市和平区文化路3号巷11号 110004

电话：024-83687331 (市场部) 83680267 (社务室)

传真：024-83680180 (市场部) 83680265 (社务室)

E-mail: neuph@neupress.com Web: <http://www.neupress.com>

印 刷 者：沈阳市第二市政建设工程公司印刷厂

发 行 者：东北大学出版社

幅面尺寸：210 mm × 285 mm

印 张：24

字 数：688千字

出版时间：2016年7月第1版

印刷时间：2016年7月第1次印刷

组稿编辑：郭 健

责任编辑：郎 坤

封面设计：刘江旻

责任出版：唐敏智

ISBN 978-7-5517-1359-7

定 价：48.00元

目 录 CONTENTS

实验室规则 1**第一章 基础生物化学实验 2**

实验一	氨基酸的纸层析	2
实验二	蛋白质的等电点测定和沉淀反应	3
实验三	考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量	6
实验四	基因组 DNA 的快速提取——碘化钾法	9
实验五	琼脂糖凝胶电泳技术——DNA 样品检测	10
实验六	酵母 RNA 的提取与鉴定	11
实验七	淀粉酶活力的测定	13
实验八	温度、pH 等对酶促反应速度的影响	16
实验九	丙二酸对琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制	18
实验十	过氧化物酶活性的测定	19
实验十一	维生素 C 的定量测定	21
实验十二	还原糖和总糖含量的测定——3, 5- 二硝基水杨酸比色法	23
实验十三	植物组织中丙二醛含量的测定	25
实验十四	卵黄中卵磷脂的提取和鉴定	27
实验十五	植物组织中可溶性糖、淀粉、氨基酸及蛋白质的系列测定	28
实验十六	三种腺苷酸的分离与鉴定	32

第二章 微生物学实验 34

实验一	培养基的配制	34
实验二	微生物的消毒与灭菌	37
实验三	微生物的纯种分离技术	45
实验四	显微镜的使用	46
实验五	微生物的形态观察	52

实验六 细菌染色技术.....	64
实验七 血球计数板计数法测定微生物数目	73
实验八 微生物的菌种保藏技术.....	74
实验九 微生物细胞大小的测定.....	75
实验十 食品中菌落总数的检测.....	78
实验十一 食品中大肠菌群的计数.....	79

第三章 植物组织培养实验.....81

实验一 植物组织培养基母液的配制和保存	81
实验二 植物组织 MS 培养基的配制	84
实验三 培养基和培养用具的灭菌.....	86
实验四 外植体的选择与初代培养.....	87
实验五 植物离体培养物的形态观察.....	88
实验六 植物离体培养物的继代培养操作技术	89
实验七 植物离体培养物的生根培养操作技术	90
实验八 试管苗的驯化、移栽和管理.....	91

第四章 食用菌栽培实验.....93

实验一 食用菌分类与形态观察.....	93
实验二 母种培养基制作.....	94
实验三 母种接种扩大培养.....	95
实验四 原种培养基制作.....	97
实验五 原种接种与扩大培养.....	98
实验六 北虫草液体菌种的制作.....	100
实验七 菌种分离——组织分离法.....	101
实验八 香菇的栽培.....	102
实验九 木耳栽培.....	104
实验十 羊肚菌栽培.....	105
实验十一 金针菇栽培.....	107

第五章 微生物遗传育种实验.....109

实验一 白色链霉菌的筛选与鉴定.....	109
实验二 紫外诱变技术.....	110
实验三 北虫草退化菌种的复壮.....	112

实验四	微生物抗药性突变株的分离	113
实验五	β -半乳糖苷酶基因 (lacZ) 转化入 E.coli DH5 α	115
实验六	β -半乳糖苷酶基因 (lacZ) 插入突变	116

第六章 天然药物化学实验 119

实验一	薄层色谱法	119
实验二	一叶秋碱的分离和鉴定	120
实验三	芦丁的提取及鉴定	122
实验四	大黄中蒽醌类成分的提取分离和鉴定	124
实验五	黄连中小檗碱与掌叶防己碱的提取、分离和鉴定	126
实验六	急性子抗氧化活性物质的分离纯化	128
实验七	急性子提取物对猴头菌菌丝生长作用的影响	130
实验八	北冬虫夏草多糖的提取与鉴定	131
实验九	汉防己生物碱的提取、分离与鉴定	133
实验十	秦皮中七叶苷、七叶内酯的提取、分离和鉴定	136
实验十一	薯蓣皂苷元的提取和鉴别	138
实验十二	中草药成分鉴别法	140

第七章 生化分离工程实验 146

实验一	卵磷脂的薄层分析	146
实验二	微生物细胞的破碎与分离	147
实验三	pH 值对红霉素萃取的影响	148
实验四	牛奶中酪蛋白和乳蛋白粗品的制备	150
实验五	大蒜中生物活性物质的提取与检测	151
实验六	超声波辅助法提取茶多酚	153
实验七	大孔吸附树脂法精制茶多酚	154
实验八	双水相萃取体系提取糖化酶	156
实验九	豆粕中蛋白和低聚糖的分离	158
实验十	离子交换色谱法分离混合氨基酸	159

第八章 生物产品开发实验 162

实验一	四环素的生产	162
实验二	柠檬酸的生产	171
实验三	维生素 C 的生产——二步发酵法	175

第九章 发酵工程实验 181

实验一	pH、温度及转速对细胞生长和产物积累的影响	181
实验二	蛋白酶生产菌的筛选	183
实验三	红曲的发酵及色素提取	185
实验四	链霉菌噬菌体的纯化和效价的测定	187
实验五	果酒的酿造	189
实验六	啤酒的酿造	191
实验七	酱油的酿造	194
实验八	碳源种类及浓度对细胞生长及产物积累的影响	198
实验九	玉米淀粉的乙醇发酵及乙醇含量测定	200
实验十	谷氨酸的发酵生产	202

第十章 生物工程专业综合实验 205

实验一	可溶性糖的硅胶 G 薄层层析	205
实验二	固态发酵法生产白酒	207
实验三	凝固型酸奶制作	208
实验四	纤维素酶生产	210
实验五	纤维素酶在加工蔬菜汁中的应用	216
实验六	体积氧传递系数 $K_L a$ 的测定	219
实验七	玉米超氧化物歧化酶 (SOD) 的提取及活性测定	220
实验八	超氧化物歧化酶 (SOD) 活性染色	224
实验九	影响酶促反应速度的因素——激活剂与抑制剂	230
实验十	BIOF-2005 型发酵罐操作及使用	232
实验十一	青霉素的 pH 纸层析	238
实验十二	植物分生组织培养快速繁殖	241
实验十三	CTAB 法提取植物基因组 DNA	243
实验十四	碱裂解法提取大肠杆菌中的质粒 DNA	245
实验十五	酿酒酵母的筛选鉴定	247
实验十六	植物淀粉酶活性的测定	249

第十一章 专业实践与实习 252

实验一	纳豆芽孢杆菌的活化、液体培养以及纳豆的发酵生产	252
实验二	面包的生产	253

实验三 酒酿的发酵生产	255
实验四 格瓦斯的生产	256
实验五 液态白酒发酵	258
实验六 葡萄酒的酿造	258
实验七 葡萄酒的过滤和灌装	260
实验八 白兰地的生产	261
实验九 树莓酒生产	262
实验十 葡萄酒酵母的分离、纯化	263
实验十一 固态白酒的低温发酵	264
实验十二 凝固型酸奶的发酵生产	266
实验十三 苹果醋的发酵生产	267
实验十四 酒曲(小曲)的发酵生产	268
实验十五 泡菜的制作	269
实验十六 果酱的制作	271
实验十七 山楂酒的生产	272
实验十八 啤酒生产之麦汁的制造	274
实验十九 啤酒发酵	274
实验二十 黄酒发酵	275

第十二章 葡萄酒质量指标检测分析 277

实验一 葡萄酒酒精度测定	277
实验二 葡萄酒中多酚物质含量的检测	278
实验三 葡萄酒总酸含量测定	279
实验四 葡萄酒挥发酸含量测定	281
实验五 葡萄酒干浸出物测定	282
实验六 葡萄酒残糖含量测定	284
实验七 葡萄酒单宁含量测定	285
实验八 葡萄酒色度以及色调的测定	286
实验九 葡萄酒总酚测定	287
实验十 葡萄酒总二氧化硫测定	288

第十三章 白酒质量指标检测分析 290

实验一 白酒的感官尝评	290
实验二 白酒酒精度测定	292
实验三 白酒总酯含量测定	293

实验四	白酒杂醇油含量测定	295
实验五	白酒中固形物含量测定	296
实验六	白酒中甲醇含量测定	297
实验七	白酒中铅含量测定	298

第十四章 化工原理实验 300

实验一	流动形态观察	300
实验二	能量转换实验	302
实验三	单相流动阻力测定实验	304
实验四	离心泵性能曲线实验	308
实验五	恒压过滤常数测定实验	312
实验六	气-汽对流传热实验	316
实验七	精馏塔实验	323
实验八	填料吸收实验	327
实验九	洞道式干燥器实验	330

附 录 333

附录一	常用仪器使用	333
附录二	常用染色液的配制	336
附录三	显微镜的介绍	337
附录四	玻璃器皿的洗涤、包扎与灭菌	343
附录五	纤维素酶活力测定	345
附录六	硫酸铵溶液饱和度计算表 (25℃)	346
附录七	酸奶质量标准	347
附录八	常用缓冲溶液的配制	347
附录九	常用试剂及配制方法	352
附录十	常用有机溶媒的性质及回收精制	358
附录十一	实验室安全	361
附录十二	各类成分的鉴定	362
附录十三	中草药化学成分检出试剂配制法	364
附录十四	化工原理实验数据的处理方法	369

实验室规则

SHIYANSHIGUIZE

(1) 每个同学都应该自觉地遵守课堂纪律，维护课堂秩序，不迟到，不早退，保持室内安静，不大声谈笑。

(2) 在实验过程中要听从教师的指导，严肃认真地按操作规程进行实验，并简要、准确地将实验结果和数据记录在实验记录本上。完成实验后经教师检查同意，方可离开。课后写出简要的报告，由课代表收交给教师。

(3) 环境和仪器的清洁整齐是做好实验的重要条件。实验台面、试剂、药品架必须保持整洁，仪器药品要井然有序。公用试剂用毕应立即盖严放回原处。勿使试剂药品洒在实验台面和地上。实验完毕，需将药品试剂排列整齐，玻璃器皿要洗净倒置放好，将实验台面抹拭干净，经教师验收仪器后，方可离开实验室。

(4) 使用仪器、药品、试剂和各种物品必须注意节约，不要使用过量的药品和试剂。应特别注意保持药品和试剂的纯净，严防混杂污染。不要将滤纸和称量纸做其他用途。使用和洗涤仪器时，应小心仔细，防止损坏仪器。使用贵重精密仪器时，应严格遵守操作规程，发现故障立即报告教员，不要自己动手检修。要爱护国家财产，厉行节约。

(5) 注意安全。实验室内严禁吸烟！煤气灯应随用随关，必须严格做到：火着人在，人走火灭，乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热，并要远离火源操作和放置。实验完毕，应立即关好煤气门和水龙头，拉下电闸，各种玻璃器皿应放置稳妥。离开实验室以前应认真负责地进行检查，严防事故的发生。

(6) 废弃液体（强酸强碱溶液必须先用水稀释）可倒入水槽内，同时放水冲走。废纸、火柴头及其他固体废物和带有渣滓沉淀的废物都应倒入废品缸内，不能倒入水槽或到处乱扔。

(7) 仪器损坏时，应如实向教员报告，认真填写损坏仪器登记表，然后补领。

(8) 实验室内一切物品，未经本室负责教员批准严禁携出室外，借物必须办理登记手续。

(9) 每次实验课由班长安排同学轮流值日，值日生要负责当天实验室的卫生、安全和一些服务性的工作。

(10) 对实验的内容和安排不合理的地方可提出改进意见。对实验中出现的一切反常现象应进行讨论，并大胆提出自己的看法，做到生动、活泼、主动地学习。

第一章 基础生物化学实验

DIYIZHANG JICHUSHENGWUHUAXUESHIYAN

实验一 氨基酸的纸层析

一、实验目的

学习层析技术的原理，掌握纸层析的具体操作方法。

二、实验原理

层析法又称色谱法 (Chromatography)、色层法或层离法，是近代生物化学实验中广泛应用的一种分离分析技术。层析法是利用混合物 (样品) 中各组分的理化性质 (如溶解度、吸附力、分子的形状、分子的大小、分子的极性、分子所带电荷的性质和数量以及分子表面的特殊基团等) 不同，而使各组分借以分离的分析方法。

纸层析从层析原理来讲属于分配层析，它是以小滤纸作固定相的载体。纸纤维上的羟基具有亲水性，因此以滤纸吸附的水作为固定相，有机溶剂作为流动相。将样品点在滤纸上 (此点称为原点)，进行展开，样品中的各种溶质 (如氨基酸) 即在两相溶剂中不断进行分配。由于它们的分配系数不同，因此不同的溶质随流动相移动的速率不等，于是就将这些溶质分离开来，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、展开溶剂的组成、滤纸的质量等) 不变， R_f 值便是常数。故可根据 R_f 值作定性分析。层析后，各种溶质在滤纸上的位置可用适当的化学或物理方法处理而使其显示出来。对于氨基酸常用茚三酮使之显色。

三、实验材料、仪器及试剂

1. 实验材料

绿豆芽。

2. 仪器

滤纸 (10cm × 15cm)，层析缸，毛细管，喷雾器，量筒 (100mL)。

3. 试剂

标准氨基酸溶液：甘氨酸、谷氨酸、丝氨酸、亮氨酸，分别以 0.01mol/L 盐酸配成 4mg/mL 的溶液。

层析溶剂系统：正丁醇（分析纯）、冰醋酸（分析纯）和水的体积比为 4 : 1 : 1。

显色剂：0.1% 茚三酮 - 丙酮溶液。

四、方法步骤

①向层析缸中加入展开剂，其深度约为 1.5cm。

②用竹镊子取一条滤纸（手指不可接触纸面），在滤纸条一端 2cm 处用铅笔画一水平线（原线），在此线上均匀地标出几个小点，并编号（1 ~ N）。

③用毛细滴管在各点上依次点上甘氨酸、谷氨酸、丝氨酸、亮氨酸、样品 1 和样品 2。点样直径以 3mm 为宜。

④待干燥后（可用吹风机吹干）可重复点样一二次，再干燥。然后用线将滤纸悬挂在上述准备好的层析缸内，使划线的一端向下并浸入展开剂约 1cm 深，注意必须使点样点在液面（展开剂）以上，然后把盖盖紧。

⑤约 40min 后，当溶剂上升到距离前沿 1 ~ 2cm 距离时，取出滤纸，并用铅笔标出溶剂前沿，把滤纸置于表面皿上再放入 105℃ 的烘箱中干燥约 15min（或用吹风机吹干）。

⑥用喷雾器在滤纸上喷上茚三酮试剂，再置干燥箱中烘干（或用吹风机吹干）5min。这时，在滤纸的不同位置便有紫红色的斑点出现，用铅笔标出斑点的中心，用刻度尺量出各斑点移动的距离和溶剂移动的距离。

五、结果记录与计算

用铅笔圈出氨基酸斑点，量出溶剂前沿的距离及各斑点中心与起点之间的距离，并计算各氨基酸的 R_f 值。根据已知标准氨基酸和 R_f 值，与小麦（或绿豆芽）提取液中氨基酸的 R_f 值比较，确定提取液中含有哪些种氨基酸。

【注意事项】

- ①在操作过程中，手必须洗净，只能接触薄板上层边角；不能对着薄板说话，以防唾液溅在板上。
- ②配制展层剂时，要用纯溶剂，应现用现配，以免放置过久其成分发生变化（酯化）。

【思考题】

分配层析中，影响 R_f 值的因素有哪些？

实验二 蛋白质的等电点测定和沉淀反应

一、实验目的

- ①了解蛋白质的两性解离性质。
- ②学习测定蛋白质等电点的方法。
- ③学习影响蛋白质胶体溶液稳定性的因素。
- ④了解沉淀蛋白质的方法及其实用意义。

二、实验原理

蛋白质是两性电解质。蛋白质分子的解离状态和解离程度受溶液的酸碱度影响。当溶液的 pH 值达

到一定数值时，蛋白质颗粒上正负电荷的数目相等，在电场中，蛋白质既不向阴极移动，也不向阳极移动，此时溶液的 pH 值称为此种蛋白质的等电点。不同蛋白质等电点不同。在等电点时，蛋白质的理化性质都有变化，可利用此种性质的变化测定各种蛋白质的等电点。最常用的方法是测其溶解度最低时的溶液 pH 值。

在水溶液中的蛋白质分子由于表面生成水化层和双电层而成为稳定的亲水胶体颗粒，在一定的理化因素影响下，蛋白质颗粒可因失去电荷和脱水而沉淀。本实验通过观察不同 pH 溶液中酪蛋白的溶解度以确定其等电点。用醋酸与醋酸钠（醋酸钠混合在酪蛋白溶液中）配制各种不同 pH 值的缓冲液。向诸缓冲溶液中加入酪蛋白后，沉淀出现最多的缓冲液的 pH 值即酪蛋白的等电点。

蛋白质的沉淀反应可分为两类：

(1) 可逆的沉淀反应

此时蛋白质分子的结构尚未发生显著变化，除去引起沉淀的因素后，蛋白质的沉淀仍能溶解于原来溶剂中，并保持其天然性质而不变性。如大多数蛋白质的盐析作用或在低温下用乙醇（或丙酮）短时间作用于蛋白质，均可使蛋白质发生可逆的沉淀反应。提纯蛋白质时，也常利用此类反应。

(2) 不可逆的沉淀反应

此时蛋白质分子内部结构发生重大改变，蛋白质常变性而沉淀，不再溶于原来溶剂中。加热引起的蛋白质沉淀与凝固。蛋白质与重金属离子或某些有机酸的反应都属于此类。

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），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、实验材料、仪器及试剂

1. 实验材料

新鲜鸡蛋。

2. 仪器

- ①水浴锅。
- ②温度计。
- ③ 200mL 锥形瓶。
- ④ 100mL 容量瓶。
- ⑤吸管。
- ⑥试管及试管架。
- ⑦研钵。

3. 试剂

- ① 0.4% 酪蛋白醋酸钠溶液。

取 0.4g 酪蛋白，加少量水在研钵中仔细地研磨，将所得的蛋白质悬胶液移入 200mL 锥形瓶内，用少量 40~50℃ 的温水洗涤研钵，将洗涤液也移入锥形瓶内。加入 10mL 浓度为 1mol/L 醋酸钠溶液。把锥形瓶放到 50℃ 水浴中，并小心地旋转锥形瓶，直到酪蛋白完全溶解为止。将锥形瓶内的溶液全部移到 100mL 容量瓶内，加水至刻度，塞紧玻塞，混匀。

- ②醋酸。

- ③蛋白质溶液。

5% 卵清蛋白溶液或鸡蛋清的水溶液（新鲜鸡蛋清与水的体积比为 1 : 9）。

- ④ pH4.7 醋酸 – 醋酸钠的缓冲溶液。
- ⑤ 3% 硝酸银溶液。
- ⑥ 5% 三氯乙酸溶液。
- ⑦ 95% 乙醇。
- ⑧ 饱和硫酸铵溶液。
- ⑨ 硫酸铵结晶粉末。
- ⑩ 0.1mol/L 盐酸溶液。
- ⑪ 0.1mol/L 氢氧化钠溶液。
- ⑫ 0.05mol/L 碳酸钠溶液。
- ⑬ 甲基红溶液。

四、方法步骤

1. 酪蛋白等电点的测定

(1) 取同样规格的试管 4 支，按表 1 顺序分别精确地加入各试剂，然后混匀。

表 1 酪蛋白等电点测定方法				
试管号	蒸馏水/mL	0.01mol/L 醋酸/mL	0.1mol/L 醋酸/mL	1.0mol/L 醋酸/mL
1	8.4	0.6	—	—
2	8.7	—	0.3	—
3	8.0	—	1.0	—
4	7.4	—	—	1.6

(2) 向以上试管中各加酪蛋白的醋酸钠溶液 1mL，摇匀。此时 1, 2, 3, 4 管的 pH 值依次为 5.9, 5.5, 4.7, 3.5。观察其浑浊度。静置 10min 后，再观察其浑浊度。最浑浊的一管 pH 值为酪蛋白的等电点。

2. 蛋白质的沉淀及变性

(1) 蛋白质的盐析

加蛋白质溶液 5mL 于试管中，再加等量的饱和硫酸铵溶液，混匀后静置数分钟则析出球蛋白的沉淀。倒出少量浑浊沉淀，加少量水，观察是否溶解，分析原因。将管内容物过滤，向滤液中添加硫酸铵粉末到不再溶解为止。此时析出沉淀为清蛋白。取出部分清蛋白，加少量蒸馏水，观察沉淀的再溶解。

(2) 重金属离子法沉淀蛋白质

取 1 支试管，加入蛋白质溶液 2mL，再加 3% 硝酸银溶液 1~2 滴，振荡试管，有沉淀产生。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。

(3) 有机酸法沉淀蛋白质

取 1 支试管，加入蛋白质溶液 2mL，再加入 1mL 5% 三氯乙酸溶液，振荡试管，观察沉淀的生成。放置片刻倾出清液，向沉淀中加入少量水，观察沉淀是否溶解。

(4) 有机溶剂法沉淀蛋白质

取 1 支试管，加入 2mL 蛋白质溶液，再加入 2mL 浓度为 95% 的乙醇。观察沉淀的生成（如果沉淀不明显，加少量 NaCl，混匀）。

(5) 乙醇引起的蛋白质变性与沉淀

取 3 支试管，编号。依表 2 顺序加入试剂。

表 2 乙醇引起的蛋白质变性与沉淀

管号	蛋白质溶液/mL	0.1mol/L 氢氧化钠 溶液/mL	0.1mol/L 盐酸溶液/ mL	95%乙醇/mL	pH4.7 缓冲溶液/mL
1	1	—	—	1	1
2	1	1	—	1	—
3	1	—	1	1	—

振摇混匀后，观察各管有何变化。放置片刻向各管内加入水 8mL，然后在第 2，3 号管中各加一滴甲基红，再分别用 0.1mol/L 醋酸溶液及 0.05mol/L 碳酸钠溶液中和。观察各管颜色的变化和沉淀的生成。每管再加 0.1mol/L 盐酸溶液数滴，观察沉淀的再溶解。解释各管发生的全部现象。

五、结果与分析

以表格形式总结实验结果，包括观察到的现象及结果分析。

【注意事项】

等电点测定实验要求所加各种试剂的浓度和加入量准确无误。

【思考题】

- ①什么是蛋白质的等电点？
- ②在等电点时，蛋白质溶液为什么容易发生沉淀？

实验三 考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量

一、实验目的

- ①了解蛋白质的两性解离性质。
- ②学习蛋白质的等电点的测定方法。
- ③加深对影响蛋白质胶体溶液稳定因素的认识。

二、实验原理

1976 年 Bradford 建立了考马斯亮蓝 G-250 测定蛋白质含量的方法。该法是利用蛋白质 - 染料结合的原理，定量测定微量蛋白浓度，具有快速、灵敏的特点。

考马斯亮蓝 G-250 存在着两种不同的颜色形式——红色和蓝色。它和蛋白质通过范德华力结合，在一定蛋白质浓度范围内，蛋白质和染料结合符合比尔定律 (Beer's law)。此染料与蛋白质结合后颜色有红色形式和蓝色形式，最大光吸收由 465nm 变成 595nm，通过测定 595nm 处光吸收的增加量可知与其结合蛋白质的量。

蛋白质和染料结合是一个很快的过程，约 2min 即可反应完全，呈现最大光吸收，并可稳定 1h，之后，蛋白质 - 染料复合物发生聚合并沉淀出来。蛋白质 - 染料复合物具有很高的消光系数，使得在测定蛋白质浓度时灵敏度很高，在测定溶液中含蛋白质 5 μL/mL 时就有 0.275 光吸收值的变化，比 Lowry 法灵敏 4 倍，比紫外吸收法灵敏 10 ~ 20 倍。

三、实验材料、仪器及试剂

1. 实验材料

新鲜绿豆芽。

2. 仪器

- ①分析天平、台式天平。
- ②刻度吸管。
- ③具塞试管、试管架。
- ④研钵。
- ⑤离心机、离心管。
- ⑥烧杯、量筒。
- ⑦微量取样器。
- ⑧分光光度计。

3. 试剂

①牛血清白蛋白标准溶液的配制：准确称取 100mg 牛血清白蛋白，溶于 100mL 蒸馏水中，即质量浓度为 1000 μ g/mL 的牛血白蛋白原液。

②蛋白试剂考马斯亮蓝 G-250 的配制：称取 100mg 考马斯亮蓝 G-250，溶于 50mL 的 90% 乙醇中，加入 85% (W/V) 的磷酸 100mL，最后用蒸馏水定容到 1000mL。此溶液在常温下可放置一个月。

- ③乙醇。
- ④磷酸 (85%)。

四、方法步骤

1. 标准曲线制作

(1) 0~100 μ g/mL 标准曲线的制作

取 6 支 10mL 干净的具塞试管，按表 1 取样。盖塞后，将各试管中溶液纵向倒转混合，放置 2min 在 595nm 波长下比色，记录各管测定的光密度 OD_{595} ，绘制标准曲线。

表 1 低浓度标准曲线的制作						
管号	1	2	3	4	5	6
1000 μ g/mL 标准蛋白液/mL	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
蒸馏水/mL	1.00	0.98	0.96	0.94	0.92	0.90
考马斯亮蓝 G-250 试剂/mL	5	5	5	5	5	5
蛋白质含量/ μ g	0	20	40	60	80	100
OD_{595}						

(2) 0~1000 μ g/mL 标准曲线的制作

另取 6 支 10mL 具塞试管，按表 2 取样。其余步骤同 (1) 操作，做蛋白质浓度为 0~1000 μ g/mL 的标准曲线。

高浓度标准曲线的制作						
管号	7	8	9	10	11	12
1000 μg/mL标准蛋白液/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水/mL	1.00	0.8	0.6	0.4	0.2	0
考马斯亮蓝G-250试剂/mL	5	5	5	5	5	5
蛋白质含量/μg	0	200	400	600	800	1000
OD ₅₉₅						

2. 样品提取液中蛋白质浓度的测定

(1) 待测样品制备

称取新鲜绿豆芽下胚轴 2g 放入研钵中，加 2mL 蒸馏水研磨成匀浆，转移到离心管中，用 6mL 蒸馏水分次洗涤研钵，洗涤液收集于同一离心管中，放置 0.5~1h 以充分提取，以 4000r/min 离心 20min，弃去沉淀，上清液转入 10mL 容量瓶，并以蒸馏水定容至刻度，即得待测样品提取液。

(2) 测定

另取 2 支 10mL 具塞试管，按表 3 取样。吸取提取液 0.1mL（做一重复），放入具塞刻度试管中，加入 5mL 考马斯亮蓝 G-250 蛋白试剂，充分混合，放置 2min 后在 595nm 下比色，记录光密度 OD₅₉₅，并通过标准曲线查得待测样品提取液中蛋白质的含量 X（μg）。以标准曲线 1 号试管做空白。

待测液蛋白质浓度测定		
试管号	13	14
蛋白质待测样品提取液/mL	0.1	0.1
蒸馏水/mL	0.9	0.9
考马斯亮蓝G-250试剂/mL	5	5
OD ₅₉₅		

五、结果与分析

样品蛋白质含量 (mg/g 鲜重) =

$$X \times \frac{\text{提取液总体积 (mL)}}{\text{测定时取样体积 (mL)}} \times \frac{1}{\text{样品鲜重 (g)}}$$

式中：X 为在标准曲线上查得的蛋白质含量（μg）

【思考题】

- ①制作标准曲线及测定样品时，为什么要将各试管中溶液纵向倒转混合？
- ②列举几种常用的蛋白质定量测定的方法，并与考马斯亮蓝染色法相比较，阐明其优缺点。