




卫生部“十一五”规划教材

全国高等医药教材建设研究会规划教材

全国高等学校配套教材 • 供药学类专业用

# 生物化学实验指导

主 编 刘 煜

 人民卫生出版社

卫生部“十一五”规划教材  
全国高等医药教材建设研究会规划教材  
全国高等学校配套教材  
供药学类专业用

# 生物化学实验指导

主 编 刘 煜

主 审 吴梧桐

编 者 (以姓氏笔画为序)

白 玲 (桂林医学院)

刘 煜 (中国药科大学)

孙红颖 (浙江大学药学院)

楼 滨 (复旦大学药学院)

人 民 卫 生 出 版 社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学实验指导/刘煜主编. —北京: 人民卫生出版社, 2007.7

ISBN 978-7-117-08903-6

I. 生… II. 刘… III. 生物化学-实验-医学院校-教学参考资料 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 097688 号

号 010 010 010 010 010 010

主 编 刘 煜

主 审 吴 群

(武汉大学为教材) 参 编

(武汉大学林封) 参 编

(武汉大学田中) 参 编

(武汉大学王彦) 参 编

(武汉大学旦夏) 参 编

## 生物化学实验指导

主 编: 刘 煜

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-67616688)

地 址: 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

邮 编: 100078

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: [pmph@pmph.com](mailto:pmph@pmph.com)

购书热线: 010-67605754 010-65264830

印 刷: 中国农业出版社印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 8

字 数: 180 千字

版 次: 2007 年 7 月第 1 版 2007 年 7 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-08903-6/R · 8904

定 价: 13.00 元

版权所有, 侵权必究, 打击盗版举报电话: 010-87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

# 前 言

《生物化学实验指导》是卫生部“十一五”规划教材《生物化学》(第6版)的配套教材。为适应当前我国高等教育的改革与发展的需要,较好的体现本学科的进展与我国医药现代化的发展趋势,《生物化学》教材的部分内容进行了调整,加强了遗传信息的传递和结构分子生物学的内容与基因组学、蛋白质组学和系统生物学的研究进展等。因此,该配套教材针对理论教材的内容调整,对实验内容也进行了全面更新,删减了部分验证性实验项目,增加了质粒提取、质粒的酶切鉴定及 PCR 扩增  $\beta$ -globin 基因等分子生物学实验项目,还增加了 Western Blot 鉴定抗原、磺胺药物的解毒分析等实验内容,尽可能反映生命科学与化学相结合的现代药学研究模式的特点,突出了生物化学的基础理论与现代生物技术的进展及其在现代药学研究中的地位与作用。

在实验内容的选择上,我们综合了几所医药院校目前正在开设的实验内容,按难易程度分为验证性实验和综合性实验,可供各类医药院校相关专业的本科生、专科生使用。另外为了加大实验教学改革力度,充分发挥实验课在培养学生创新能力与实际操作能力中的作用,我们还增加了一些具有综合性、典型性、探索性和可操作性的设计性实验内容。以培养学生把所学到的理论知识和实验技能,运用于解决实际问题,使学生掌握实验设计的一般步骤与方法,了解科学实验的程序和实施过程,培养综合应用知识的能力,激发学生的学习热情和积极性,提高他们的独立思考能力,激励他们的创新精神。

本教材由吴梧桐教授审定,在全书的编写中,特别是在实验内容的选择上给予了大量指导性建议,对吴老师渊博的知识、严谨求实的治学态度以及对我们年轻后辈的关心爱护表示由衷的敬意和衷心的感谢!

由于编者水平有限,书中的缺点和错误在所难免,恳请使用本教材的广大师生与读者指正。

编 者

2007年6月

# 目 录

## 第一篇 验证性实验

实验一 蛋白质的性质	1
实验二 酶的性质	10
实验三 蛋白质的定量测定	14
实验四 分子筛层析(凝胶层析)	
——用 Sephadex G-25 分离蓝色葡聚糖与铬酸钾	23
实验五 离子交换层析分离混合氨基酸	25
实验六 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的分子量	27
实验七 观察血清中谷丙转氨酶的活力变化	34
实验八 血糖浓度测定及胰岛素、肾上腺素对血糖浓度的影响	37
实验九 酸性磷酸酶的提取及 $K_m$ 值的测定	42
实验十 酶的竞争性抑制作用	44
实验十一 血清高密度脂蛋白-胆固醇的分离、测定	46
实验十二 血清总胆固醇及甘油三酯的测定	49
实验十三 质粒 DNA 的微量快速提取及纯化	53
实验十四 质粒 DNA 的限制酶酶切鉴定	58
实验十五 聚合酶链反应扩增 $\beta$ -globin 基因	61
实验十六 磺胺类药物在体内的代谢分析	64
实验十七 Western Blot 鉴定抗原	67
实验十八 转氨基作用	70

## 第二篇 综合性实验

综合实验一 血清 $\gamma$ -球蛋白的分离、纯化与分析	73
综合实验二 大肠杆菌碱性磷酸酶的制备及活力测定	78
综合实验三 动物组织中核酸的提取、鉴定及含量测定	84
综合实验四 真核生物基因组 DNA 的提取和含量测定	91

## 第三篇 设计性实验

设计性实验一	93
--------	----

设计性实验二 .....	95
设计性实验三 .....	97

## 附 录

附录一 实验须知 .....	99
附录二 常用缓冲液的配制方法 .....	106
附录三 层析法常用数据表 .....	112

# 第一篇 验证性实验

## 实验一 蛋白质的性质

### 目的要求

1. 加深对蛋白质形成胶体溶液稳定因素的认识;
2. 了解沉淀蛋白质的几种方法及其实用意义;
3. 了解蛋白质变性与沉淀的关系;
4. 了解蛋白质、氨基酸的呈色反应;
5. 学习透析的基本原理、操作及应用。

### 实验原理

蛋白质的定性实验是根据蛋白质的结构和理化性质,一部分实验利用组成蛋白质分子的某种基团的化学特性;另一部分实验利用蛋白质的胶体化学性质。以下实验选择了一些在生物化学研究中常用的实验方法,以加深对蛋白质性质理论知识的理解,并学习将理论知识与实际应用相结合的能力。

### 一、蛋白质的沉淀反应

蛋白质是高分子化合物,所有可溶性蛋白质都是亲水胶体,能在水溶液中形成比较稳定的亲水胶体。稳定蛋白质亲水胶体的因素主要由两个:蛋白质表面的水化层和同性电荷。当某些理化因素破坏了这两个稳定因素,使蛋白质分子脱水和失去电荷而从溶液中析出,即为蛋白质沉淀。

蛋白质沉淀反应可分为两类:

1. 可逆沉淀反应 这种沉淀的蛋白质分子空间结构未发生显著变化,除去沉淀因素后蛋白质沉淀仍能溶于原来的溶液中,并保持天然的性质,如大多数蛋白质的盐析作用或低温有机溶剂的短时间作用,等电点沉淀等。这种反应的主要特点是使蛋白质沉淀而不变性,所以广泛用于制备具有生物活性的蛋白质类药物。

2. 不可逆沉淀反应 在一些理化因素的影响下蛋白质分子的空间结构受到破坏,丧失蛋白质的天然活性,这种蛋白质沉淀不能再溶解于原来的溶液中。如重金属盐、生物碱试剂、加热等反应。这类反应常用于除去细菌,或除去所需溶液中的蛋白质杂质。

### (一) 盐析沉淀

#### 【实验原理】

在蛋白质溶液中加入适量的无机盐(硫酸铵、硫酸钠、氯化钠等)浓溶液会使蛋白质析出,这种作用称为蛋白质的盐析作用。当盐浓度不同,析出的蛋白质也不同。如球蛋白可在半饱和硫酸铵溶液中析出,而清蛋白则在饱和硫酸铵溶液中才能析出。降低盐溶液浓度后,由盐析作用获得的蛋白质沉淀能再溶解,因此蛋白质的盐析作用是可逆过程。盐析法分离蛋白质广泛应用于蛋白质制品的制备和个别蛋白质的分离、纯化。选择适当的盐(最常用的是硫酸铵)的浓度、介质的pH和温度,能使一种目的蛋白质沉淀,而其他仍留在溶液中。在低温下用乙醇或甲醇的部分分离法将大大提高分离效果。

#### 【实验材料】

1. 蛋白质溶液:5%卵清蛋白溶液或鸡蛋清水溶液(新鲜鸡蛋清:水=1:9);
2. 饱和硫酸铵溶液;
3. 固体硫酸铵。

#### 【实验方法】

1. 取锥形瓶(或大试管)一个,加入5%卵清蛋白溶液5.0ml,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。转移至离心管,2'000rpm离心5min,小心将上清液转移至小烧杯;向沉淀中加少量水,观察是否溶解,为什么?

2. 向小烧杯中上清液添加硫酸铵粉末,边加边摇,直至不再溶解为止,此时析出的沉淀为清蛋白。转移至离心管,2'000rpm离心5min,弃上清,向清蛋白沉淀中加少量蒸馏水,观察沉淀的再溶解。

### (二) 等电点沉淀

#### 【实验原理】

蛋白质分子中含有可解离的自由氨基和羧基,为两性电解质。当溶液的pH大于蛋白质等电点时,氨基解离受到抑制而羧基解离增加,蛋白质分子带负电荷,反之,当溶液的pH小于蛋白质等电点时,羧基解离受到抑制而氨基解离增加,蛋白质带正电荷。当蛋白质所带正负电荷相等,这时溶液的pH,称为该蛋白质的等电点。在等电点时,蛋白质溶解度降低,易产生沉淀。每种蛋白质具有特定的等电点,与其所含酸性氨基酸与碱性氨基酸比例,及可解离基团的解离度有关。通过调节蛋白质溶液不同pH,可使等电点差别较大的蛋白质得到初步分离。

#### 【实验材料】

1. 0.01mol/L醋酸溶液;
2. 0.1mol/L醋酸溶液;
3. 1mol/L醋酸溶液;
4. 0.5%酪蛋白醋酸钠溶液:取纯酪蛋白0.25g,加蒸馏水约20ml,1mol/L NaOH



溶液 5ml,混合使其溶解,再加 1mol/L 醋酸溶液 5ml,转移至 50ml 容量瓶中,用水稀释至刻度即得。

### 【实验方法】

1. 取试管 9 支,编号,按下表加试剂。

试 剂	管 号								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0.01mol/L HAc(ml)	0.31	0.53	—	—	—	—	—	—	—
0.1mol/L HAc(ml)	—	—	0.13	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	—
1mol/L HAc(ml)	—	—	—	—	—	—	—	—	0.8
蒸馏水(ml)	4.19	3.87	4.37	4.25	4.0	3.5	2.5	0.5	3.7
pH	5.9	5.6	5.3	5.0	4.7	4.4	4.1	3.8	3.5

2. 在上述各管中,分别加入 0.5ml 酪蛋白醋酸钠溶液,每管加入后立即摇匀,静置数分钟,比较各管浊度,以 + + +, + +, +, - 等表示。判断酪蛋白 pI 的 pH 范围。

### (三) 有机溶剂沉淀

#### 【实验原理】

蛋白质不溶于某些有机溶剂(如乙醇、丙酮等),若在蛋白质溶液中加入乙醇使其达到一定浓度时,蛋白质产生沉淀。因为乙醇能使蛋白质胶体颗粒脱水,降低其在水溶液中的稳定性。不同蛋白质产生沉淀所需的乙醇浓度也不同。在蛋白质溶液中加入少量中性盐(如氯化钠),沉淀将更迅速和完全。

#### 【实验材料】

1. 蛋白质溶液:2% 卵清蛋白溶液;
2. 95% 乙醇;
3. 固体氯化钠。

#### 【实验方法】

1. 取一支试管,加入蛋白质溶液 4 滴及一些氯化钠晶体(约火柴头大小),摇匀使之溶解。
2. 在试管中慢慢滴加 95% 乙醇数滴,强力振摇,观察沉淀的生成。
3. 取 3 支试管编号,按下表顺序加入试剂,振荡混匀后,观察各管变化。放置片刻后,在各管内加水 8ml,然后在第 2、3 号管中各加一滴甲基红,在分别用 0.1mol/L 醋酸溶液及 0.1mol/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,观察沉淀的溶解。

管号	5% 卵清蛋白 (ml)	0.1mol/LNaOH (ml)	0.1mol/LHCl (ml)	95% 乙醇 (ml)	pH4.7 醋酸缓 冲液(ml)
1	1	—	—	1	1
2	1	1	—	1	—
3	1	—	1	1	—

#### (四) 加热沉淀

##### 【实验原理】

蛋白质加热时,空间结构被破坏,使蛋白质变性凝固,从而丧失其天然活性。蛋白质的热变性作用随温度的升高而加快。加热时,盐类的存在及溶液酸碱度对蛋白质的凝固有很大影响。处于等电点状态的蛋白质加热时凝固最完全、最迅速。在强酸强碱溶液中,蛋白质分子带有正电荷或负电荷,虽加热也不凝固。但溶液中若有中性盐存在,则蛋白质可因加热而凝固。

##### 【实验材料】

1. 蛋白质溶液:5% 卵清蛋白溶液或鸡蛋清水溶液(新鲜鸡蛋清:水=1:9);
2. 1% 醋酸溶液;
3. 10% 醋酸溶液;
4. 10% 氢氧化钠溶液;
5. 饱和氯化钠溶液。

##### 【实验方法】

1. 取试管 5 支按下表所示添加试剂:

试 剂	试 管 号				
	1	2	3	4	5
蛋白质溶液(ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
1% 醋酸溶液(滴)	1	—	—	—	—
10% 醋酸溶液(滴)	—	5	5	—	—
10% 氢氧化钠溶液(滴)	—	—	—	5	—
饱和氯化钠溶液(滴)	—	—	5	—	—

2. 加毕,混匀,将 5 支试管同时置于沸水浴中加热并观察现象,解释原因。

#### (五) 重金属离子沉淀蛋白质

##### 【实验原理】

溶液 pH 在蛋白质等电点以上时,重金属盐类(如  $Pb^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$  及  $Ag^+$  等)易与蛋白质结合成不溶性盐而沉淀。重金属盐类沉淀蛋白质通常较为完全,故常用重金属盐除去液体中的蛋白质。但应注意,在使用某些重金属盐(如硫酸铜或醋酸铅)沉淀蛋白质时,不可过量,否则将引起沉淀再溶解。

##### 【实验材料】

1. 2% 卵清蛋白溶液或新鲜鸡蛋清水溶液(新鲜鸡蛋清:水=1:9);
2. 5%  $CuSO_4$  溶液;
3. 3%  $AgNO_3$  溶液;
4. 0.01% NaOH 溶液;
5. 10% 醋酸溶液。

##### 【实验方法】

- 取试管 4 支按下表所示滴加试剂:

试 剂	管 号			
	1	2	3	4
蛋白质溶液(滴)	2	2	2	2
0.01% NaOH 溶液(滴)	—	—	1	—
5% CuSO <sub>4</sub> 溶液(滴)	1	—	—	—
10% 醋酸溶液(滴)	—	—	—	1
3% AgNO <sub>3</sub> 溶液(滴)	—	1	1	1

加毕,摇匀,观察各管中变化,记录结果并解释原因。若在1、2两试管中加入过量CuSO<sub>4</sub>及AgNO<sub>3</sub>试剂,又有何结果。

### (六) 生物碱试剂沉淀蛋白质

#### 【实验原理】

生物碱是植物中具有显著生理作用的一类含氮的碱性物质。凡能使生物碱沉淀,或能与生物碱作用产生颜色反应的物质,称为生物碱试剂,如鞣酸,苦味酸,磷钨酸等。当蛋白质溶液pH低于其等电点时,蛋白质为阳离子,能与生物碱试剂的阴离子结合成不溶性盐而沉淀。

#### 【实验材料】

1. 蛋白质溶液:2% 卵清蛋白溶液或新鲜鸡蛋清水溶液(新鲜鸡蛋清:水=1:9);
2. 饱和鞣酸溶液;
3. 5% 三氯醋酸溶液;
4. 1% 醋酸溶液。

#### 【实验方法】

取试管2支,按下表所示滴加试剂

试 剂	管 号	
	1	2
蛋白质溶液(滴)	3	3
1% 醋酸溶液(滴)	1	—
饱和鞣酸溶液(滴)	3	—
5% 三氯醋酸溶液(滴)	—	4

加好后混匀,观察并记录结果,解释原因。

## 二、蛋白质及氨基酸的呈色反应

### (一) 双缩脲反应

#### 【实验原理】

尿素加热到180℃左右,生成双缩脲并放出一分子氨,双缩脲在碱性条件下能与Cu<sup>2+</sup>结合生成紫红色化合物,称为双缩脲反应。蛋白质分子中的肽键结构与双缩脲相似,所以也能产生该反应;氨基酸无此反应。双缩脲反应不仅是含有两个以上肽键的物质具有,在含有一个肽键和一个—CS—NH<sub>2</sub>, —CH<sub>2</sub>—NH<sub>2</sub>, —CRH—NH<sub>2</sub>, —CH<sub>2</sub>—NH<sub>2</sub>—CHNH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>OH或—CHOHCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>等基团及含乙二酰二氨基等

$$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \quad \text{NH}_2 \\ | \quad | \\ \text{O}=\text{C}-\text{C}=\text{O} \end{array}$$
 基团的物质也有此反应。 $\text{NH}_3$  能干扰此反应, 因为  $\text{NH}_3$  与  $\text{Cu}^{2+}$  可生成暗蓝色的络离子  $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ , 所以双缩脲反应不是蛋白质或多肽的特异性反应。

#### 【实验材料】

1. 尿素;
2. 10% 氢氧化钠溶液;
3. 1% 硫酸铜溶液;
4. 2% 卵清蛋白溶液。

#### 【实验方法】

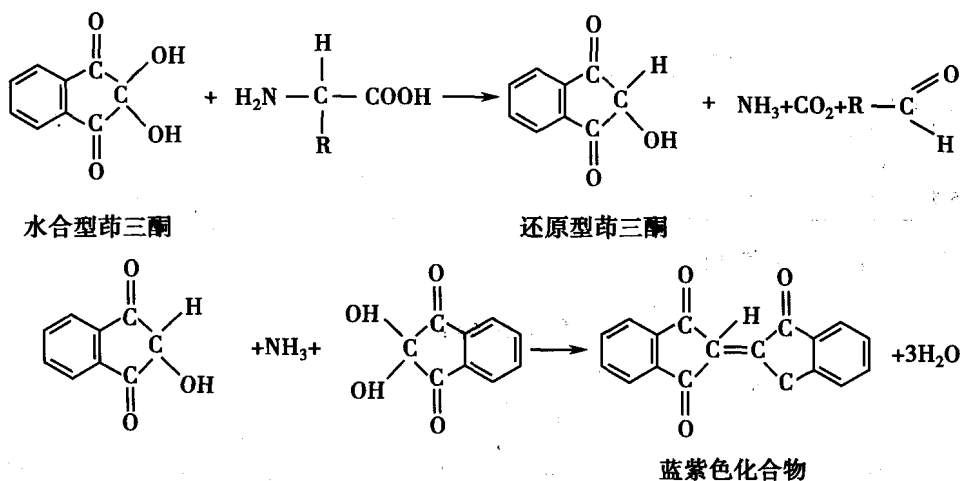
1. 取少量尿素结晶, 置于干燥试管中, 用微火加热使尿素熔化。当熔化尿素开始硬化时, 停止加热, 这时尿素放出氨, 形成双缩脲。将得到的物质放置冷却后, 加 10% 氢氧化钠溶液约 1ml, 振荡混匀, 再加 1% 硫酸铜溶液 1 滴, 边振荡边观察出现的粉红色。实验中避免加过量硫酸铜, 否则生成的蓝色氢氧化铜溶液会掩盖粉红色的出现。

2. 向另一试管加卵清蛋白溶液约 1ml 和 10% 氢氧化钠约 2ml, 摇匀后加入 1% 硫酸铜溶液 2 滴, 边加边振荡并观察紫玫瑰色的出现。

### (二) 茚三酮反应

#### 【实验原理】

除了脯氨酸、羟脯氨酸和茚三酮反应生成黄色物质外, 所有  $\alpha$ -氨基酸和蛋白质都和茚三酮反应生成蓝紫色物质。具有氨基或能释放氨的化合物都有此反应, 但尿素、马尿酸、二酮吡嗪、和肽键上的亚氨基不呈现此反应。因此, 蛋白质和氨基酸的茚三酮反应不是特异性反应, 在定性定量测定中, 应严防干扰物存在。该反应十分灵敏, 1:1 500 000 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。具体反应如下:



该反应的适宜 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, 如果反应液酸度过大甚至会不显色。

#### 【实验材料】

1. 蛋白质溶液, 2% 卵清蛋白或新鲜鸡蛋清溶液(鸡蛋清: 水 = 1:9);

- 0.5% 甘氨酸溶液；
- 0.1% 茚三酮水溶液；
- 0.1% 茚三酮乙醇溶液。

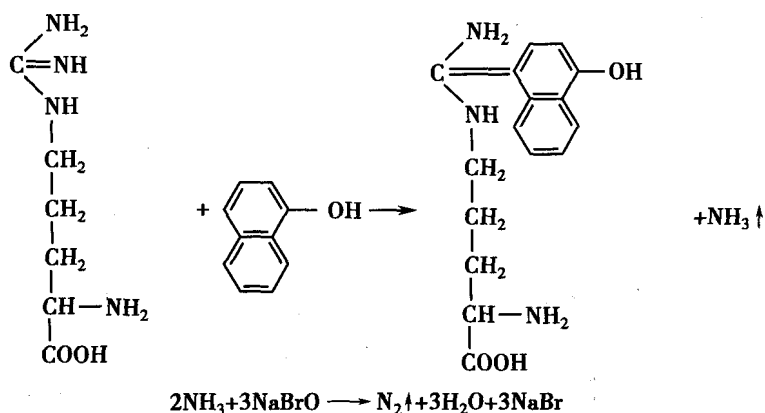
## 【实验方法】

- 取2支试管分别加入蛋白质溶液和甘氨酸溶液1ml,再加入0.5ml 0.1% 茚三酮水溶液,充分混匀后,在沸水浴中加热1~2min。观察颜色由粉红色变为紫红色再变为蓝色。
- 取小块滤纸,加一滴0.5% 甘氨酸溶液,吹干后在原处加一滴0.1% 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) 坂口反应

## 【实验原理】

精氨酸和许多胍代化合物与 $\alpha$ -萘酚在碱性次溴酸钠溶液中发生反应,产生红色物质。具体反应如下式所示:



精氨酸是唯一参与反应的氨基酸,反应特别灵敏,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。

## 【实验材料】

- 0.3% 精氨酸溶液；
- 蛋白质溶液:将新鲜鸡蛋清与水按1:20混匀,然后用6层纱布过滤；
- 20% 氢氧化钠溶液；
- 1%  $\alpha$ -萘酚乙醇溶液,临用时配制；
- 次溴酸钠溶液:2g 溴溶于100ml 5% 氢氧化钠溶液中,置于棕色瓶中,可在冷暗环境中保存两周。

## 【实验方法】

在各个试管中,按下表加入试剂,记录出现的现象。

试剂(滴)	水	0.3% 精氨酸溶液	蛋白质溶液	20% 氢氧化钠溶液	$\alpha$ -萘酚	次溴酸钠溶液	现象
1	—	—	5	5	3	1	
2	4	1	—	5	3	1	
3	5	—	—	5	3	1	

该实验十分灵敏,在操作中 $\alpha$ -萘酚要过量,但次溴酸钠、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。

### 三、蛋白质的透析

#### 【实验原理】

蛋白质是大分子物质,它不能透过半透膜,而小分子物质可以自由透过半透膜。在分离纯化蛋白质的过程中,常利用透析的方法使蛋白质与小分子杂质分离。如用盐析法沉淀蛋白质后,常用透析方法除去中性盐。

#### 【实验材料】

1. 蛋白质溶液:5% 卵清蛋白溶液或鸡蛋清水溶液(新鲜鸡蛋清:水=1:9);
2. 饱和硫酸铵溶液;
3. 固体硫酸铵;
4. 透析袋,烧杯,电磁搅拌器,试管;
5. 考马斯亮蓝液:50mg 考马斯亮蓝 G250、95% 乙醇 25ml、85% 磷酸 50ml 混合搅拌彻底溶解后,加蒸馏水到 500ml 于棕色瓶中保存;
6. 2%  $\text{BaCl}_2$  溶液;
7. 3% 硝酸银:称 3g 硝酸银溶于 100ml 蒸馏水中。

#### 【实验方法】

1. 将“盐析”操作中所得的两种沉淀分别加蒸馏水至溶解;
2. 取两个透析袋,分别加入 2.5ml 上述两种蛋白质溶液分别放入盛有蒸馏水的烧杯中,开口端应位于水面之上,烧杯置磁力搅拌器上搅拌;
3. 透析 1h 后自烧杯中取出 2~3 滴水溶液,置于小试管中,滴加入  $\text{BaCl}_2$  溶液,检查是否有  $\text{SO}_4^{2-}$  存在(有白色沉淀出现说明有  $\text{SO}_4^{2-}$ )。
4. 从烧杯中取水 10 滴于小试管中,加入考马斯亮蓝 G250 溶液 2 滴,摇匀,观察试管中是否有颜色变化,以检查是否有蛋白质存在。
5. 不断更换烧杯中的蒸馏水(并用磁力搅拌器不断搅拌),以加速透析过程,数小时后烧杯中水不再能检出  $\text{SO}_4^{2-}$ ,停止透析并检查透析袋中是否有蛋白质或  $\text{SO}_4^{2-}$  离子存在(此时一个透析袋中应观察到球蛋白沉淀出现,因为球蛋白不溶于纯水)。

#### 【结果处理】

根据所见的实验现象进行详细的描述做好实验记录,并结合所学的理论知识讨论。

#### 【注意事项】

1. 虽然是定性实验,但实验时也需注意加样的准确性。
2. 凡需加热的实验均不可使用明火加热,可用水浴加热。
3. 双缩脲反应时,硫酸铜不能加入过多,否则产生蓝色  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ,而掩盖对红紫颜色反应的观察。
4. 茚三酮反应适宜的 pH 为 5~7。
5. 蛋白质盐析实验中,应先加蛋白质溶液,然后加饱和硫酸铵溶液。
6. 固体硫酸铵若加至过饱和则有结晶析出,勿将其与蛋白质沉淀混淆。

7. 在等电点沉淀实验中,要求各种试剂的浓度和加入量相当准确。

### 复习思考

1. 为什么鸡蛋清可用作汞中毒的解毒剂?
2. 等电点时,蛋白质的溶解度为什么最低?
3. 能否用透析法浓缩蛋白质溶液?
4. 如何设计一个简易的方法测定蛋白质的等电点?
5. 请解释乙醇引起蛋白质变性与沉淀实验中各管发生的所有现象。
6. 为什么说变性不一定沉淀而沉淀不一定变性,试举例说明。

(楼 滨 费 正)

## 实验二 酶的性质

### 目的要求

1. 加深对酶的性质认识；
2. 掌握检查酶性质的方法及其原理。

### 一、酶的特异性

#### 【实验原理】

酶是一种生物催化剂,具有高度的特异性(专一性),即每一种酶只能使一种或一类物质发生化学反应。

本实验以唾液淀粉酶及酵母蔗糖酶催化不同底物的水解作用来观察酶的特异性。淀粉、蔗糖和棉籽糖没有还原性,经酶作用后释放出的还原糖可用班氏(Benedict)试剂加以检查。

#### 【实验材料】

##### 1. 试剂

- (1) 1% 淀粉溶液(含 0.3% NaCl);
- (2) 1% 蔗糖溶液;
- (3) 1% 棉籽糖溶液;
- (4) 班氏试剂:称取柠檬酸钠 173g 和无水碳酸钠 100g,溶于 700ml 热蒸馏水中,冷却,慢慢倾入 17.3%  $\text{CuSO}_4$  溶液 100ml(溶解 27g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  于水),边加边摇,加蒸馏水至 1 000ml。

##### 2. 器材

- (1) 试管及试管架;
- (2) 漏斗 1 只;
- (3) 研钵 1 只;
- (4) 恒温水浴 1 只;
- (5) 电炉 1 只;
- (6) 温度计 1 支。

#### 【实验方法】

1. 漱口后收集唾液,用小漏斗加少量脱脂棉过滤,滤液稀释 10 倍备用。



2. 取少量鲜酵母,于研钵中加少量水研磨,研磨均匀再加少量水稀释,滤纸过滤,滤液即为酵母蔗糖酶初提液。

3. 取小试管8支,按下表添加试剂。

加毕,各管置37℃水浴10min后,各加班氏试剂2滴,置沸水浴3min观察结果,并解释现象。

试 剂	管 号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1% 淀粉溶液(滴)	2	—	—	—	2	—	—	—
1% 蔗糖溶液(滴)	—	2	—	—	—	2	—	—
1% 棉籽糖溶液(滴)	—	—	2	—	—	—	2	—
唾液(滴)	2	2	2	2	—	—	—	—
蔗糖酶液(滴)	—	—	—	—	2	2	2	2
现象								

## 二、温度对酶活性的影响

### 【实验原理】

温度对酶活性有显著影响,在一定温度范围内,温度升高酶促反应加快,反之则降低。当温度升高至某一特定值时,酶活性最高,此温度称为该酶的最适温度。高于此温度,酶蛋白变性,逐渐失活,反应速度下降。

本实验以唾液淀粉酶在不同温度下对淀粉的作用为例,观察温度对酶活性的影响,淀粉的水解程度采用其与碘液的呈色反应加以观察。

### 【实验材料】

#### 1. 试剂

- (1) 1% 淀粉溶液;
- (2) 碘-碘化钾溶液:碘4g及碘化钾6g溶于100ml蒸馏水中,于棕色瓶中保存。

#### 2. 器材

- (1) 试管及试管架;
- (2) 500ml 烧杯3只;
- (3) 反应板1块。

### 【实验方法】

#### 1. 收集和稀释唾液;

#### 2. 取试管3支,操作如下表:

试 剂	管 号		
	1	2	3
1% 淀粉溶液(ml)	1	1	1
放置条件	沸水浴	37℃水浴	冰浴
稀释唾液(滴)	4	4	4

加毕,分别按上述放置条件继续放置10min;