

SPT 21世纪高等院校教材

生命科学类

生物化学实验方法和技术

陈毓荃 主编



科学出版社

www.sciencep.com

21 世纪高等院校教材(生命科学类)

生物化学实验方法和技术

陈毓荃 主编

科学出版社

2002

内 容 简 介

《生物化学实验方法和技术》不同于以前传统的生物化学实验指导书的编写模式。全书分为上、中、下三篇。上篇为生物化学实验方法和技术原理,分为生化分离方法、生化分析方法、生化制备方法、生化代谢研究方法等4章。中篇为生物化学实验,设计了基础训练、基本实验、重点实验、综合实验、选择实验等5个单元,共45个实验。下篇为附录,选择了重点知识、重点数据和重要资料共17项。

本书可供生物技术、生物工程、生物科学及农林院校的农学、植保、农化、园艺、林学等专业的学生及与生物科学相关的科技人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验方法和技术/陈毓荃主编. —北京:科学出版社,2002.8

(21世纪高等院校教材(生命科学类))

ISBN 7-03-010685-7

I. 生… II. 陈… 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(2002)第054198号

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>

源海印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2002年8月第 一 版 开本:B5 (720×1000)

2002年8月第一次印刷 印张:17 插页:1

印数:1—8 000 字数:324 000

定价:21.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈北燕〉)

本书编著人员

主 编 陈毓荃 (西北农林科技大学)

编 者 (按姓氏笔画为序)

马静芳 (甘肃农业大学)

文建雷 (西北农林科技大学)

巩普遍 (西北农林科技大学)

刘卫群 (河南农业大学)

刘香利 (西北农林科技大学)

张大鹏 (西北农林科技大学)

陈毓荃 (西北农林科技大学)

陈 鹏 (西北农林科技大学)

范三红 (西北农林科技大学)

易晓华 (莱阳农学院)

孟 玲 (沈阳化工学院)

赵丽莉 (西北农林科技大学)

胡景江 (西北农林科技大学)

高 玲 (莱阳农学院)

郭红祥 (河南农业大学)

审 校 李品愈 (莱阳农学院)

前 言

近几年来,我国高等教育改革步伐加快。不少院校组建了生命科学学院或生物学院,相继建立了生物技术、生物工程、生物科学等新专业。生物化学是这些专业的重要基础课,受到各院校的高度重视。如何改革生物化学教学,进一步提高教学质量,促进生命科学新专业的成熟与发展,有两个问题亟待解决,一是实现生物化学理论课教学与实验技术课教学的分离,真正加强实验课教学;二是编写一部适合生命科学各新专业需要又兼顾农林学科各相关专业使用的新型技术课教材。本书就是在这种形势下,经几所院校全体编者共同努力完成的。

这本《生物化学实验方法和技术》不同于以前传统的生物化学实验指导书的编写模式。全书分为上、中、下三篇。上篇为生物化学实验方法和技术原理,分生化分离方法、生化分析方法、生化制备方法、生化代谢研究方法等4章,把现代生物化学技术的精华系统扼要地介绍给读者。中篇为生物化学实验,设计了基础训练、基本实验、重点实验、综合实验、选择实验等5个单元,共计45个实验。实验内容层次分明,相对独立,由浅入深,循序渐进,着眼于学生的能力素质培养。由于安排了难易程度不一的选择实验单元,加大了各院校的选择余地,兼顾了学生知识面的开拓。经过讲授和操作,学生将受到系统的生化实验方法和技术的基本训练,他们获得的实验知识和实验技能系统新颖、实用,对将来从事科学研究具有奠基作用。下篇为精编的附录,内容广泛,实用性强,使本书具有部分工具书的属性,值得读者收藏,随时查阅。本书融入编者多年教学和科研的经验,是对所有参编院校历届版本生化实验教材的继承和发展。

本书由陈毓荃任主编,负责制定编写大纲,对全书进行统稿、修改,并承担了上篇全部、中篇的实验5、8、9、17、35、36、37、38、44、45,下篇附录1~13、15的全部内容,附录16的大部分内容,实验16、18~20、27、28及附录14部分内容的编写。陈鹏承担了实验11、16、18、19、27、30~32和附录9、16的编写。胡景江、文建雷承担了实验1、2、4、7的全部内容和附录16部分内容的编写。实验12、20由张大鹏编写。范三红编写实验22、上篇凝胶成像技术部分,并为全书绘制了大部分插图。实验28由巩普遍编写。赵丽莉编写了实验6和附录16部分内容。刘香利编写了实验21。刘卫群、郭红祥编写实验41~43。马静芳编写实验13、33、34。高玲、易晓华编写实验3、14、23、25、29、40。孟玲编写实验10、15、24、26、39。

在编写过程中,参阅了众多书籍和资料,在参考文献中恕未能全部列出。李品愈教授在百忙之中精心审校全部书稿,提出许多宝贵意见。西北农林科技大学教材科薛辉、陈俊峰同志为本书的出版做了周密安排并给予热情支持。科学出版社

李锋、霍春雁编辑为本书的出版和润色付出了辛勤劳动。在此一并表示衷心地感谢。

从决定编写本书开始到书稿完成,仅仅4个月时间。虽然有陈毓荃主编的《生物化学实验方法和技术》(世界图书出版公司,1999)为蓝本,但新增内容很多,时间显得过于仓促,错误及不当之处在所难免,敬请读者批评指正。

谨以此书敬献给我国农业生化奠基者之一阎隆飞教授。

编 者

2002年6月30日于杨凌

目 录

前言

上篇 生物化学实验方法和技术原理

第一章 生物化学分离方法	3
第一节 离心技术	3
一、离心沉降速率影响因素	3
二、沉降系数	5
三、离心设备	7
四、制备超离心法	7
第二节 层析技术	10
一、薄层层析	10
二、聚酰胺薄膜层析	11
三、凝胶层析	11
四、离子交换层析	13
五、亲和层析	13
六、气相色谱	15
七、高效液相色谱	16
第三节 电泳技术	16
一、影响电泳的主要因素	17
二、常用电泳支持介质	18
三、聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳	19
四、连续密度梯度电泳	20
五、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	21
六、等电聚焦电泳	22
七、双向凝胶电泳	22
八、毛细管电泳	22
九、电泳新技术	23
十、电泳相关技术	24
第四节 膜分离技术	28
一、膜的分类	28
二、膜的性能	29

三、膜的使用寿命·····	30
四、膜的分离技术·····	30
第二章 生物化学分析方法 ·····	33
第一节 重量法·····	33
第二节 化学法·····	34
第三节 分光光度法·····	35
第四节 酶法·····	36
一、化学方法·····	37
二、仪器方法·····	37
第五节 色谱法·····	37
第六节 主要生物物质分析·····	38
一、碳水化合物分析·····	38
二、核酸分析·····	42
三、蛋白质分析·····	44
第三章 生物化学制备方法 ·····	46
第一节 生物化学制备方法的特点·····	46
第二节 溶剂提取法·····	46
第三节 沉淀法·····	48
一、盐析法·····	48
二、有机溶剂沉淀法·····	49
三、非离子多聚物沉淀法·····	49
第四节 浓缩与干燥·····	49
第五节 超临界流体萃取·····	50
第六节 萃取与相分离·····	52
第七节 结晶·····	53
第四章 生物化学代谢研究方法 ·····	55

中篇 生物化学实验

第一单元 基础训练 ·····	61
实验一 生化实验要求及基本实验设备知识·····	61
实验二 植物试材水分测定和干样制备·····	63
实验三 高等植物材料丙酮粉的制备·····	67
实验四 缓冲溶液的配制和氨基酸两性性测定·····	69
实验五 分光光度计线性分辨范围测定·····	73
第二单元 基本实验 ·····	76
实验六 酶的基本性质·····	76

实验七 转氨酶活性鉴定(薄层层析法)	80
实验八 淀粉酶活力测定	83
实验九 脲酶 K_m 值测定	86
实验十 蛋白质的水解和氨基酸的纸层析法分离	90
实验十一 蛋白质的两性性质及等电点的测定	93
实验十二 蛋白质含量测定(考马斯亮蓝 G-250 法)	95
实验十三 还原糖和总糖含量的测定(3,5-二硝基水杨酸比色法)	97
实验十四 丙酮酸含量的测定	100
实验十五 抗坏血酸含量测定(2,6-二氯酚靛酚法)	102
第三单元 重点实验	107
实验十六 脂肪含量的测定及高级脂肪酸组分分析(气相色谱法)	107
实验十七 单核苷酸的离子交换柱层析分离	110
实验十八 RuBP 羧化酶-加氧酶的纯化	114
实验十九 连续密度梯度电泳法测定蛋白质的分子质量及纯度	117
实验二十 过氧化物酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳	120
实验二十一 双向免疫扩散试验	124
实验二十二 质粒 DNA 的提取、酶切及电泳鉴定	127
实验二十三 高等植物 DNA 的提取和纯度鉴定	131
实验二十四 酵母蛋白质和 RNA 的制备(稀碱法)	133
实验二十五 酵母 RNA 的提制(浓盐法)	136
实验二十六 多酚氧化酶的制备和化学性质	139
第四单元 综合实验	142
实验二十七 种子蛋白质系统分析	142
实验二十八 果实菠萝蛋白酶的动力学测定	150
实验二十九 苯丙氨酸解氨酶的纯化及活性测定	156
第五单元 选择实验	162
实验三十 蛋白质含量测定(双缩脲法)	162
实验三十一 蛋白质含量测定法(Folin-酚法)	164
实验三十二 紫外吸收法测定蛋白质含量	166
实验三十三 还原糖含量的测定(Somogyi-Nelson 比色法)	168
实验三十四 可溶性总糖的测定(蒽酮比色法)	171
实验三十五 可溶性总糖的测定(地衣酚-硫酸法)	174
实验三十六 直链淀粉和支链淀粉的测定(双波长法)	175
实验三十七 粗纤维的测定(酸性洗涤剂法)	179
实验三十八 果胶质含量测定(重量法)	180
实验三十九 1398 中性蛋白酶活性的测定	183

实验四十 谷物种子中赖氨酸含量的测定	186
实验四十一 甲醛滴定法测定氨基氮	188
实验四十二 醋酸纤维薄膜电泳分离核苷酸	191
实验四十三 蛋白质脱盐(透析和凝胶过滤)	193
实验四十四 叶绿素含量测定(分光光度法)	197
实验四十五 质膜透性与抗旱性鉴定(连续升温电导法)	200

下篇 附录

一、实验室安全及防护知识	207
二、Union Carbide 各种型号透析管的渗透范围	210
三、Sepetro por 再生纤维素膜透析袋的数据	210
四、纤维素酯膜透析袋的数据	212
五、Amicon 圆形超滤膜的规格和有效过滤面积的数据	213
六、Amicon 圆形超滤膜的流速	214
七、硫酸铵饱和度的常用表	214
1. 调整硫酸铵溶液饱和度计算表(25℃)	214
2. 调整硫酸铵溶液饱和度计算表(0℃)	215
3. 调整硫酸铵溶液饱和度计算表(23℃)	216
八、缓冲溶液的配制方法	217
1. 氯化钾-盐酸缓冲液(0.05mol/L, pH1.0~2.2, 25℃)	217
2. 甘氨酸-盐酸缓冲液(0.05mol/L, pH2.2~3.6, 25℃)	217
3. 邻苯二甲酸氢钾-盐酸缓冲液(0.05mol/L, pH2.2~4.0, 25℃)	217
4. 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(0.1mol/L, pH3.0~6.2)	218
5. 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH2.6~7.6)	218
6. 乙酸-乙酸钠缓冲液(0.2mol/L, pH3.7~5.8, 18℃)	218
7. 二甲基戊二酸-氢氧化钠缓冲液(0.05mol/L, pH3.2~7.6)	219
8. 丁二酸-氢氧化钠缓冲液(0.05mol/L, pH3.8~6.0, 25℃)	219
9. 邻苯二甲酸氢钾-氢氧化钠缓冲液(pH4.1~5.9, 25℃)	220
10. 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(0.2mol/L, pH5.8~8.0, 25℃)	220
11. 磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液(pH5.8~8.0)	220
12. Tris-HCl 缓冲液(0.05mol/L, pH7~9)	221
13. 巴比妥-盐酸缓冲液(pH6.8~9.6, 18℃)	221
14. 2,4,6-三甲基吡啶-盐酸缓冲液(pH6.4~8.3)	221
15. 硼砂-硼酸缓冲液(pH7.4~9.0)	222
16. 硼砂缓冲液(pH8.1~10.7, 25℃)	222

17. 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH8.6~10.6, 25℃)	222
18. 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 (0.1mol/L, pH9.2~10.8)	223
19. 硼酸-氯化钾-氢氧化钠缓冲液 (0.1mol/L, pH8.0~10.2)	223
20. 二乙醇胺-盐酸缓冲液 (0.05mol/L, pH8.0~10.0, 25℃)	223
21. 硼砂-氢氧化钠缓冲液 (0.05mol/L 硼酸根, pH9.3~10.1)	224
22. 磷酸氢二钠-氢氧化钠缓冲液 (0.025mol/L, pH11.0~11.9, 25℃)	224
23. 氯化钾-氢氧化钠缓冲液 (0.05mol/L, pH12.0~13.0, 25℃)	224
24. 广范围缓冲液 (pH2.6~12.0, 18℃)	225
25. 离子强度恒定的缓冲液 (pH2.0~12.0)	225
26. 酸度计标准缓冲溶液的配制	226
九、凝胶数据表	227
1. Sephadex G 型交联葡聚糖凝胶的数据	227
2. Sephadex G 型交联葡聚糖凝胶溶胀所需时间	228
3. 琼脂糖凝胶的数据	228
4. Superose 的数据	229
5. 琼脂糖凝胶 Bio-Gel A 型的数据	229
6. Bio-Gel P 型凝胶的数据	230
7. 交联聚苯乙烯凝胶 Bio-Beads S-X 型的数据	230
8. 制备级 Superdex 凝胶过滤介质的数据	231
9. 聚乙烯醇型凝胶 Toyopearl 的数据	231
10. 各种凝胶所允许的最大操作压	231
十、凝胶过滤用标准蛋白	232
1. 凝胶过滤用低分子质量标准的组成	232
2. 凝胶过滤用高分子质量标准的组成	233
3. 凝胶过滤用分子质量标准品	233
十一、薄层层析分离各类物质常用的展层溶剂	233
十二、各类物质常用的薄层显色剂	235
十三、腐蚀性万能薄层显色剂	235
十四、电泳染色方法	235
(一) 核酸染色	235
(二) 蛋白质染色	237
(三) 糖蛋白染色	238
(四) 脂蛋白染色	239
(五) 同工酶染色	239
十五、实验误差与提高实验准确度的方法	245

(一) 实验误差	245
(二) 误差来源	246
十六、常用仪器使用方法	247
(一) 恒温箱	247
(二) 电热恒温水浴	248
(三) 电动离心机	248
(四) 722 型光栅分光光度计	249
(五) 751G 型分光光度计	250
(六) 自动部分收集器	251
(七) 核酸蛋白检测仪	253
(八) 电子顶载天平	253
(九) 电子分析天平	254
(十) pH5-3C 型数字酸度计	255
(十一) pH5-2 型酸度计	255
(十二) 移液器的使用	257

上 篇

生物化学实验方法和技术原理

第一章 生物化学分离方法

细胞是生物体的基本结构单位。细胞体积虽小,其内含物成分却极为复杂。进行细胞成分的生化分析或从细胞中制备所需的生物物质,一般是先用适当的方法破碎细胞,并用相应的溶剂提取。细胞一旦破裂,各种组成成分就高度混合在一起。从细胞提取物中要获得某类或某种特定成分,必须采用各种有效的生物化学分离方法。其中最重要的方法是离心技术、层析技术、电泳技术和膜分离技术。

第一节 离心技术

当物体围绕一中心轴做圆周运动时,运动物体就受到离心力的作用。旋转速度越高,运动物体所受到的离心力越大。如果装有悬浮液或高分子溶液的容器进行高速水平旋转,强大的离心力作用于溶剂中的悬浮颗粒或高分子,会使其沿着离心力的方向运动而逐渐背离中心轴。在相同转速条件下,容器中不同大小的悬浮颗粒或高分子溶质会以不同的速率沉降。经过一定时间的离心操作,就有可能实现不同悬浮颗粒或高分子溶质的有效分离。在生命科学研究中广泛使用的离心机,就是基于上述基本原理设计的。

一、离心沉降速率影响因素

盛有某种悬浮液体的容器静置时,在重力场作用下悬浮颗粒会逐渐沉降下来。假设悬浮颗粒具有刚性球状,在其自然沉降过程中同时受到摩擦力 F_1 和浮力 F_2 的双重作用:

$$F_1 = 6\pi\eta r_p \frac{dr}{dt} \quad (1-1)$$

$$F_2 = (\rho_p - \rho_m) Vg \quad (1-2)$$

(1-1)式中, η —溶剂介质的黏度系数;

r_p —悬浮颗粒的半径;

$\frac{dr}{dt}$ —悬浮颗粒的沉降速率,即单位时间内沉降的距离。

(1-2)式中, ρ_p —悬浮颗粒的密度;

ρ_m —溶剂介质的密度;

V —悬浮颗粒的体积;

g —重力加速度。

当悬浮颗粒呈匀速沉降时, $F_1 = F_2$, 因此,

$$6\pi\eta r_p \frac{dr}{dt} = (\rho_p - \rho_m) Vg \quad (1-3)$$

由于球形颗粒体积 $V = \frac{4}{3}\pi r_p^3$, 代入(1-3)式得

$$\begin{aligned} 6\pi\eta r_p \frac{dr}{dt} &= (\rho_p - \rho_m) \cdot \frac{4}{3}\pi r_p^3 \cdot g \\ \therefore \frac{dr}{dt} &= \frac{2r_p^2(\rho_p - \rho_m)g}{9\eta} \end{aligned} \quad (1-4)$$

以上讨论的是悬浮颗粒在重力场中的自然沉降现象。如果该颗粒的沉降是在强大的离心力场中发生, 颗粒受到的离心加速度 $\omega^2 r$ 代替(1-4)式中的 g , 其沉降速率

$$\frac{dr}{dt} = \frac{2r_p^2(\rho_p - \rho_m) \cdot \omega^2 r}{9\eta} \quad (1-5)$$

(1-5)式仅适用于球形颗粒。对非球形颗粒来说, 沉降过程中沉降运动的颗粒与悬浮介质之间的摩擦系数 f 不同于球状颗粒状况下的摩擦系数 f_0 , (1-5)式经校正可得一般状况下的沉降速率:

$$\frac{dr}{dt} = \frac{2r_p^2(\rho_p - \rho_m) \cdot \omega^2 r}{9\eta(f/f_0)} \quad (1-6)$$

从(1-6)式可以看出, 悬浮液中颗粒在离心力场中的沉降速率 $\frac{dr}{dt}$ 主要受以下因素影响: 颗粒半径 r_p 的大小、颗粒形状(影响摩擦系数 f)、颗粒与悬浮介质的密度差 $(\rho_p - \rho_m)$ 、一定温度条件下悬浮介质的黏度系数及离心加速度 $\omega^2 r$ 。在确定的离心操作中, 沉降速率 $\frac{dr}{dt}$ 实际上主要取决于悬浮颗粒所受到的离心力大小, 即与离心机旋转的角速度平方值 ω^2 及颗粒距转轴中心线的距离 r 成正比。

习惯上以相对离心力 RCF 即离心加速度 $\omega^2 r$ 与重力加速度 g 的比值表示沉降颗粒在离心力场中所受到的离心作用:

$$RCF = \frac{\omega^2 r}{g} \quad (1-7)$$

其大小用重力加速度 g 值的倍数来表示, 如 10 000 g , 50 000 g 等。

(1-7)式中的角速度 ω 不便测量, 而角速度 ω 与离心机转速 n (单位: r/min) 之间有如下关系:

$$\begin{aligned} \omega &= \frac{2\pi \cdot n}{60} = \frac{\pi \cdot n}{30} \\ \therefore RCF &= \frac{\omega^2 r}{g} = \frac{(\pi \cdot n/30)^2 \cdot r}{g} \end{aligned}$$

$$= \frac{\pi^2 \cdot n^2 \cdot r}{900g} = 1.119 \times 10^{-5} n^2 \cdot r$$

这样,当知道了离心机转速 n 及转头半径 r 后,就很容易计算出相对离心力 RCF。需要指出的是,大多数离心机转头说明上标示 2 个半径参数,即最大半径与最小半径,其最大半径一般指从离心管底到旋转轴中心的距离。而科技文献作者所列离心力一般为平均离心力,表示离心管中溶液中心位点到旋转轴之间的离心力。

二、沉降系数

当一个已知大小和密度的颗粒悬浮在一种已知密度和黏度系数的液体中进行离心沉降时,它的 r_p 、 ρ_p 、 ρ_m 、 η 和 f/f_0 将是个定值,(1-6)式表示的沉降速率 $\frac{dr}{dt}$ 将与 $\omega^2 r$ 成正比,(1-6)式可改写成:

$$\frac{dr}{dt} = S\omega^2 r \quad (1-8)$$

(1-8)式中比例常数 S 称为沉降系数,表示单位离心力场下的沉降速率即通过单位离心力场所需要的时间,因此其单位为秒。1S 单位等于 1×10^{-13} 秒。质量未知的细胞器、亚细胞器、生物高分子常用 S 值粗略表示其大小,如 70S 核糖体、16S rRNA 等。

沉降系数 S 是一个实验值。(1-8)式可改写成:

$$S \cdot dt = \frac{1}{\omega^2} \cdot \frac{dr}{r}$$

对上式进行定积分,

$$S \int_{t_1}^{t_2} dt = \frac{1}{\omega^2} \int_{r_1}^{r_2} \frac{dr}{r}$$

得:

$$S(t_2 - t_1) = \frac{1}{\omega^2} \cdot \ln \frac{r_2}{r_1}$$

$$\therefore S = \frac{\ln \frac{r_2}{r_1}}{\omega^2(t_2 - t_1)} \quad (1-9)$$

将自然对数改为常用对数,得:

$$S = 2.303 \cdot \frac{\log(r_2/r_1)}{\omega^2(t_2 - t_1)} \quad (1-10)$$

由于 $\omega = \frac{2\pi \cdot n}{60}$,代入(1-10)式,得: