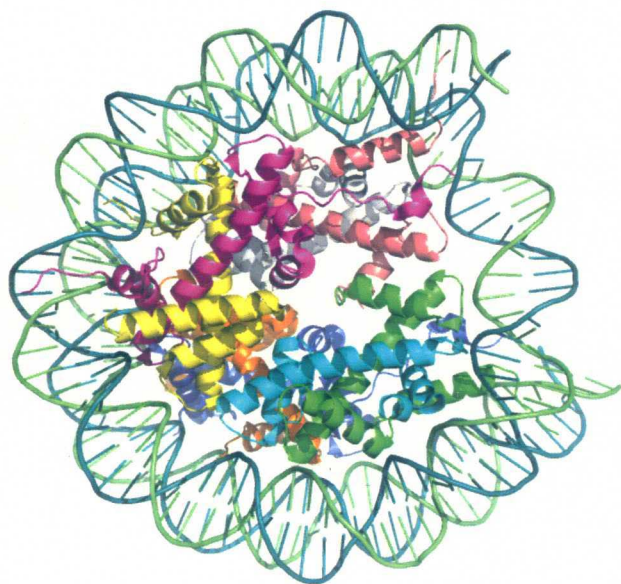


基础生物化学实验

周 浩 赵玉红 编著



南开大学出版社

基础生物化学实验

周 浩 赵玉红 编著

南开大学出版社
天 津

图书在版编目(CIP)数据

基础生物化学实验 / 周浩, 赵玉红编著. —天津:
南开大学出版社, 2018.12

ISBN 978-7-310-05729-0

I. ①基… II. ①周… ②赵… III. ①生物化学—化
学实验—高等学校—教材 IV. ①Q5—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 290759 号

版权所有 侵权必究

南开大学出版社出版发行

出版人:刘运峰

地址:天津市南开区卫津路 94 号 邮政编码:300071

营销部电话:(022)23508339 23500755

营销部传真:(022)23508542 邮购部电话:(022)23502200

*

北京建宏印刷有限公司印刷

全国各地新华书店经销

*

2018 年 12 月第 1 版 2018 年 12 月第 1 次印刷

230×170 毫米 16 开本 9 印张 73 千字

定价:28.00 元

如遇图书印装质量问题,请与本社营销部联系调换,电话:(022)23507125

内容提要

本书立足经典，结合学科发展前沿，精选了 11 个生物化学实验。实验内容主要涵盖蛋白质、核酸等生物大分子的制备、分离纯化、分析检测等，涉及离心、电泳、分光光度、层析等多项常用的生物化学技术与方法。每个实验言简意赅地介绍相关背景知识及其原理，描述实验操作步骤，并有针对性地指出实验中的注意事项，提出有价值的思考题。附录“常见生化仪器的使用及其注意事项”图文并茂、形象直观。每个实验既相对独立、完整，基本可在 4 学时内完成，有些又可以组合成一个综合实验，可根据课时灵活安排。

本书可供高等院校非生物类专业的本科生作为实验课教材。

前 言

现代生命科学领域的许多研究成果和重大发现几乎都与生物化学技术、方法有关。生物化学不仅是分子生物学、遗传学、细胞生物学等众多生物学科的重要研究技术手段，近年来更是随着自身基础理论的不断夯实和研究方法的拓展，与其他学科领域的交叉渗透日增月益。尤其是医学和药学，由于自身研究对象和研究方法的特点，与生物化学更是有着密切联系。

作为一门实验性很强的学科，“基础生物化学实验”是非生物类专业学生涉猎生命科学领域的一门重要基础前导课。根据非生物类专业学生的理论基础、基本实验技能和人才培养方向等与生物类专业学生的不同，我们编写了本书，以供其学习和参考。

本书编写侧重于加强非生物类专业学生基本生物化学实验技能的训练，使其了解与生物相关的基本研究方法和实验设计思路。在此基础上，为使非生物类专业学生能够将自身的专业知识与生命科学知识多角度、多层次地进行

关联和整合，在传统、经典内容基础上，引入学科发展前沿的技术与方法，并着重在背景知识、课后思考题以及参考文献中，体现这种学科间的交叉、渗透与融合，引导学生融会贯通、举一反三。

本书编写过程中得到了许多同事的帮助。感谢南开大学生命科学学院赵立青教授和南开大学化学学院李伯平高级工程师的帮助，感谢基础生物化学实验课程组同事们的支持。本书的出版得到南开大学生命科学学院和生物国家级实验教学示范中心的经费资助，在此表示衷心感谢。

如若本书尚有不足之处，恳请广大读者批评、指正。

作 者

2018 年 10 月于南开大学

目 录

实验一	酵母蛋白质的制备	1
实验二	多酚氧化酶的制备和性质研究	10
实验三	质粒 DNA 的提取	17
实验四	琼脂糖电泳法分离酶切质粒 DNA	28
实验五	维生素 C 的定量测定	35
实验六	胰蛋白酶米氏常数的测定	49
实验七	离子交换色谱法分离氨基酸	56
实验八	DNA 的制备	65
实验九	DNA 含量检测	77
实验十	转氨基作用	85
实验十一	SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测 蛋白质纯度	94
附录	常见生化仪器的使用及其注意事项	104

实验一 酵母蛋白质的制备

【实验目的和要求】

1. 了解生物大分子制备的一般过程；
2. 掌握从酵母细胞中分离制备蛋白质的方法；
3. 学习高速冷冻离心机的使用；
4. 学习酶标仪的使用。

【实验背景和原理】

1. 背景知识

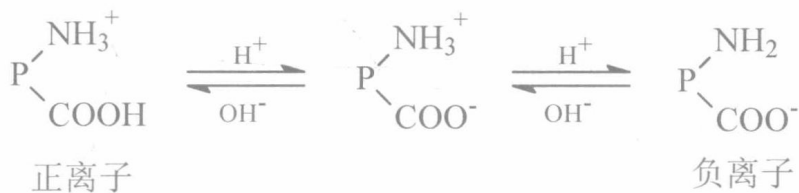
生物大分子是组成生命体系的基本元件，包括蛋白质（含酶）、核酸、多糖等。在自然科学，尤其是生命科学高度发展的今天，蛋白质、酶和核酸等生物大分子的结构与功能的研究是探求生命奥秘的中心课题，而生物大分子结构与功能的研究，必须首先解决生物大分子的制备问题，没有达到足够纯度的生物大分子，结构与功能的研究就无从谈起。

生物大分子制备的主要特点：①生物材料的组成极其复杂，常常包含有数百种乃至几千种化合物，有的生物大分子在分离过程中还在不断地代谢。所以生物大分子的制备需根据不同的实验材料，选择适宜的制备方法；②许多生物大分子在生物材料中的含量较低；③许多生物大分子一旦离开生物体内的环境时极易失活，因此在分离制备过程中如何防止其失活是关键。

生物大分子制备的一般思路：①材料的选择和预处理；②破碎细胞；③提取；④分离纯化；⑤干燥与保存。选材时应尽量选择新鲜、含量高、来源丰富、成本低的材料。由于不同的生物体或同一生物体的不同部位的组织，细胞膜（壁）组成不同，破碎细胞时应根据材料选择合适的方法。常见的破碎细胞方法有：机械法（如研磨和组织捣碎）、物理法（如反复冻融和超声）、化学与生物化学方法（如酶法、有机溶剂处理和碱处理）等。提取时应使被分离的生物大分子充分地释放到提取溶剂中，并尽可能保持温和的条件，譬如合适的缓冲体系、避免过酸或过碱引起其构象变化、合适的温度以避免酶对生物大分子的降解等，保证其结构及活性不受影响。根据制备生物大分子的理化性质（溶解度、分子大小、带电性质等），选择合适的分离纯化方法，如根据蛋白质溶解度不同，可采用盐析、等电点沉

淀、有机溶剂沉淀等方法；根据蛋白质带电性质不同，可采用电泳、离子交换层析等方法。制备的生物大分子一般要求低温保存，常见的有 4°C 、 -20°C 、 -80°C 和液氮，在一定时间内可保持生物大分子的生物活性。

对于生命体，蛋白质（protein）是体现基因功能和表现机体生理特征的执行者。蛋白质是由 20 种 α -氨基酸通过肽键相互连接而成的一类具有特定空间构象和生物活性的高分子有机化合物，其分子表面带有许多可解离的基团，如氨基、羧基等，因此是两性电解质。溶液中蛋白质的带电情况与它所处环境的 pH 有关，在某一 pH 值，蛋白质分子所带的正电荷数与负电荷数相等，即静电荷为零，此时溶液的 pH 值即为该蛋白质的等电点。蛋白质在等电点时，溶解度最小，易形成沉淀。



（P代表不包括链端氨基和羧基在内的蛋白质大分子）

蛋白质含量检测是生命科学研究中非常重要的一项分析技术，而 BCA 法是目前应用较为广泛的检测方法之一。

BCA 法检测蛋白质含量的基本原理是：BCA（2,2—

联喹啉—4,4—二甲酸二钠)与硫酸铜等组成的试剂,混合一起即 BCA 工作试剂。在碱性条件下,蛋白将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ , Cu^+ 与 BCA 试剂形成紫色络合物。测定其在 562 nm 处的吸收值,并与标准曲线对比,可测得待测蛋白样品的浓度。其优点在于受表面活性剂影响小,但缺点是易受金属离子螯合剂、还原剂干扰而影响检测结果。

不同的蛋白质含量检测方法各有优缺点,在选择时应考虑:①测定所需的灵敏度和精确度;②蛋白质的性质;③溶液中存在的干扰物质。

2. 实验原理

酵母是单细胞微生物,由细胞壁、细胞膜、细胞核、细胞质、液泡等组成。用氢氧化钠破坏酵母细胞壁,然后离心,获得的上清液中含有核蛋白。核蛋白是一类结合蛋白,它的辅基是核酸。调节上清液的 pH 至核蛋白的等电点,将产生大量的沉淀,离心收集沉淀物即可获得蛋白质粗制品。通过不同的检测方法,计算核蛋白的粗提率。

【实验材料】

1. 材料

市售酵母粉。

2. 试剂

(1) 5 % NaOH: 5 g NaOH 溶于 100 mL 水。

(2) 6 mol/L HCl: 50 mL 浓盐酸用水稀释至 100 mL。

3. 主要仪器及耗材

高速冷冻离心机、干燥箱、天平、100 mL 烧杯、50 mL 量筒、滴管、广泛 pH 试纸、玻璃棒、定性滤纸、酶标仪、96 孔板等。

【实验步骤】

1. 称取约 5 g (准确记录称取的精确数值) 酵母粉, 置于 100 mL 烧杯中, 加入 40 mL 5 % NaOH, 37℃ 水浴, 搅拌提取 30 min。

2. 8000 rpm, 4℃, 离心 10 min, 用滴管将上层清液转移至一个 50 mL 的烧杯中。

3. 加入 6 mol/L HCl, 调节溶液 pH 至 3.0 左右。

4. 8000 rpm, 4℃, 离心 10 min, 轻轻倒掉上层清液, 沉淀物即获得的蛋白质粗制品。

5. 通过不同的检测方法, 计算核蛋白的粗提率。

方法 I 干湿重法

1. 将获得的蛋白粗制品沉淀转到滤纸上，干燥箱内干燥后称重；
2. 根据公式，计算核蛋白的粗提率。

$$\text{蛋白质的提取率} = \frac{\text{沉淀干重} - \text{滤纸干重}}{\text{酵母质量}} \times 100\%$$

方法 II BCA 法

参照 BCA 蛋白定量试剂盒：

1. 配制 BCA 工作液：根据样品数量，将 BCA 试剂和 Cu 试剂按 50:1 配制适量的 BCA 工作液，充分混匀。
2. 稀释标准品：按表 1-1 稀释 BSA 标准品（每孔 20 μL ，每一浓度做 3 个平行实验）。

表 1-1 不同浓度 BSA 标准品的配制

编号	BSA (5 mg/mL) 体积 (μL)	PBS 体积 (μL)	BSA 终浓度 (mg/mL)
1	0	20	0
2	2	18	0.5
3	4	16	1.0
4	6	14	1.5
5	8	12	2.0
6	12	8	3.0
7	16	4	4.0
8	20	0	5.0

3. 蛋白样品溶于 10 mL PBS，8000 rpm，4℃，离心 10 min。取上清液，按表 1-2 用 PBS 分别做 10 倍、20 倍稀释，充分混匀。

表 1-2 蛋白样品稀释

编号	蛋白上清体积(μL)	PBS 体积(μL)	稀释倍数
1	10	90	10
2	5	95	20

4. 分别取 20 μL 不同浓度的 BSA 标准液和稀释后的样品到 96 孔板中，每组样品做 3 个平行实验。

5. 每孔加入 200 μL BCA 工作液，充分混匀，37℃反应 20 min。

6. 用酶标仪于 562 nm 处检测各孔吸光度。

7. 以 BSA 含量为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算核蛋白样品浓度及其粗提率。

【注意事项】

1. 6 mol/L 的 HCl 浓度较高, 挥发性较强, 使用时需注意安全, 如不慎溅到皮肤上, 立即用大量清水冲洗。

2. 离心前, 将离心管配平, 对称放置。

3. BCA 工作液配制前, 将 BCA 试剂摇晃混匀, 溶液在 24 h 内稳定。

4. 为使实验结果精确, 实验中必须规范使用移液器, 确保加样体积准确。

【思考题】

1. 本实验采用的破壁方法及其原理是什么?

2. 本实验采用的蛋白质分离纯化方法及其原理是什么?

3. 对待测蛋白样品做多个稀释梯度的目的是什么?

【参考文献】

1. 于自然, 黄熙泰, 李翠凤. 生物化学习题及实验技

术. 化学工业出版社, 2008, 239.

2. 石振华, 周悦寒, 常彦忠. 生物大分子的类型. 生物学通报, 2010, 45 (1): 16-17.

3. 梁玮, 王美霞, 刘宝林. 低温保存对生物样本及其生物大分子的影响. 中国生物医学工程学报, 2017, 6 (5): 615-621.

4. 韩富亮, 袁春龙, 郭安鹊等. 二喹啉甲酸法 (BCA) 分析蛋白多肽的原理、影响因素和优点. 食品与发酵工业, 2014, 40 (11): 202-207.

实验二 多酚氧化酶的制备和性质研究

【实验目的和要求】

1. 了解植物组织褐变和多酚氧化酶的关系；
2. 学习从组织细胞中制备酶的方法；
3. 掌握多酚氧化酶的化学性质；
4. 进一步巩固高速冷冻离心机的使用。

【实验背景和原理】

1. 背景知识

生活中，我们经常会遇到果蔬褐变的现象，譬如苹果、土豆等去皮或是切开稍加放置后，切口面的颜色就会由浅变深，最后变成深褐色。褐变有酶促褐变和非酶促褐变两种，经研究发现，多酚氧化酶（Polyphenol Oxidase, PPO）是引起植物组织酶促褐变的一类重要的酶。

正常条件下，植物组织中的内源性多酚物质和多酚氧化酶分布在正常组织的不同部位，彼此被质膜隔离开。但