

全国高等医药院校药学类实验教材

# 生物化学与 分子生物学实验

(第三版)

主编 张 嵘



中国健康传媒集团  
中国医药科技出版社



全国高等医药院校药学类实验教材

# 生物化学与分子生物学实验

(第三版)

主 编 张 嵘

副主编 刘岩峰

英文主审 赵雪梅

编 者 (以姓氏笔画为序)

王 森 王月秋 刘岩峰

刘晓辉 杜秉娜 杨 宇

李 洋 李相儒 来琳琳

宋永波 汪 琳 张 嵘

林盛国 金汝天 赵勇山

赵斯奇 宾 文 曾 红



中国健康传媒集团  
中国医药科技出版社

## 内 容 提 要

本书为“全国高等医药院校药理学类实验教材”之一。全书分为两大部分，分别为基础生物化学与分子生物学实验和药学生物化学与分子生物学实验。为适应普通高等教育国际化的要求，增加了英文对照内容，以便于学生在阅读英文文献、撰写英文论文时参考。

本书可作为药学、中药学及药学相关各专业本科生或硕士研究生实验技术课程的教材使用，也可供有关科研技术人员参考。

### 图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学与分子生物学实验/张嵘主编. —3 版. —北京: 中国医药科技出版社, 2019. 3  
全国高等医药院校药理学类实验教材  
ISBN 978 - 7 - 5214 - 0838 - 6

I. ①生… II. ①张… III. ①生物化学 - 实验 - 医学院校 - 教材 ②分子生物学 - 实验 - 医学院校 - 教材 IV. ①Q5 - 33 ②Q7 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2019) 第 034134 号

美术编辑 陈君杞

版式设计 郭小平

出版 中国健康传媒集团 | 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲 22 号

邮编 100082

电话 发行: 010 - 62227427 邮购: 010 - 62236938

网址 www.cmstp.com

规格 787 × 1092mm  $\frac{1}{16}$

印张 13  $\frac{1}{2}$

字数 265 千字

初版 2006 年 3 月第 1 版

版次 2019 年 3 月第 3 版

印次 2019 年 3 月第 1 次印刷

印刷 北京市密东印刷有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978 - 7 - 5214 - 0838 - 6

定价 38.00 元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

# 全国高等医药院校药学类规划教材常务编委会

名誉主任委员 邵明立 林蕙青

主任委员 吴晓明 (中国药科大学)

副主任委员 (以姓氏笔画为序)

刘俊义 (北京大学药学院)

匡海学 (黑龙江中医药大学)

毕开顺 (沈阳药科大学)

吴春福 (沈阳药科大学)

张志荣 (四川大学华西药学院)

姚文兵 (中国药科大学)

高思华 (北京中医药大学)

彭 成 (成都中医药大学)

委 员 (以姓氏笔画为序)

田景振 (山东中医药大学)

李 高 (华中科技大学同济药学院)

李元建 (中南大学药学院)

杨 波 (浙江大学药学院)

杨世民 (西安交通大学药学院)

陈思东 (广东药科大学)

侯爱君 (复旦大学药学院)

宫 平 (沈阳药科大学)

祝晨蓀 (广州中医药大学)

柴逸峰 (第二军医大学药学院)

黄 园 (四川大学华西药学院)

朱卫丰 (江西中医药大学)

秘 书 夏焕章 (沈阳药科大学)

徐晓媛 (中国药科大学)

沈志滨 (广东药科大学)

# 前 言

生物化学与分子生物学是生命科学的重要组成部分，其理论与基本实验技术已广泛渗透并常规应用于生命科学乃至药学的各个领域。尤其是20世纪70年代以来，分子生物学技术完成了发展、成熟与广泛应用的过程，使生命科学步入迅猛发展、日新月异的崭新阶段，展现了惊人的发展潜力和极其广阔的应用前景。科学与技术从来就是密不可分的，理论的突破促进了技术的发展，实验技术方法和手段的不断更新又为理论研究提供了必需的工具和有力保证。二者彼此促进、相互协作，共同推动了生命科学的蓬勃发展。

同样，生物化学与分子生物学实验教学也是高等药学教育基本的教学组成，实验教学体现了学生参与、师生互动、加强实践、思维开拓的教学教育理念，是培养学生科学思维方法、创新意识和科研能力的必备手段。在教学过程中，实验教学既依靠理论教学的支持，又具有相对独立性。因此实验教学是学生理论知识学习的必要补充，也是后续专业技能学习与提高的必要手段。

生物化学与分子生物学实验技术具有完整而系统的知识体系，为结合高等药学教育的实际需要，使学生不仅能够系统地学习和掌握生物化学与分子生物学的基本实验技能，而且通过实验教学达到创新性教育的目的，本教材对基本实验内容进行了精心选择和取舍，根据不同的教学目标，本着由浅入深、循序渐进、注重应用、培养创新的原则，将实验内容分为基础生物化学与分子生物学实验和药学生物化学与分子生物学实验两个部分。其中，基础生物化学与分子生物学实验主要包括理论验证实验和基本技术实验，前者着重验证学科理论教学内容，突出实验教学和理论教学的密切关系，加强对理论知识的理解；后者则通过实验操作，使学生掌握基本实验技能。药学生物化学与分子生物学实验的内容结合学科理论、技术及其在药学领域的常见应用，主要包括综合性实验和设计性实验两个部分。其中，综合性实验是指一个实验中包含着几个内容，要运用几种不同的技术才能完成一个完整的实验内容，以此强化训练学生的综合实验技能和综合分析能力。设计性实验则根据教师限定的实验题目，学生自选方案、自查文献、自行设计实验以完成指定实验目标和任务，以此培养创新意识、动手能力和基本科研思维，有利于全面素质的提高。此外，本教材采用中文-英文双语体系编写，有助于提高学生的科技英语水平，沈阳药科大学多年实验双语教学实践表明，学生完全能够接受双语教材的教学。

本教材适合于作为药学、中药学及药学相关各专业本科生或硕士研究生实验技术课程的教材使用，也可供有关科研技术人员参考。

本教材的编写由长期从事生物化学与分子生物学实验教学的中青年教师执笔，他们有着较为丰富的实验教学经验，能够将教学感受及经验有机地融入教材，帮助学生

更好地掌握实验要点,规范实验操作。实验一由赵勇山编写,实验二由王淼编写,实验三由金汝天编写,实验七、十七由杜秉娜编写,实验四、十二由刘岩峰编写,实验五由林盛国编写,实验六、十一由杨宇编写,实验八、九、二十五由张嵘编写,实验十由赵斯奇编写,实验十三由刘晓辉编写,实验十四由李相儒编写,实验十五、二十一由王月秋编写,实验十六、十八、十九由宋永波编写,实验二十由汪琳编写,实验二十二由宾文编写,实验二十三由李洋编写,实验二十四由来琳琳编写,附录由曾红编写,全书的英文部分由赵雪梅责任校对。张景海教授在教材编写过程中提出了宝贵的意见和建议,谨表示衷心感谢。

本教材中不当或错误之处恳请同行专家和使用者的谅解,并衷心希望读者提出宝贵的意见和建议,以便今后不断完善。

编者  
2019年2月

## 第一部分 基础生物化学与分子生物学实验

实验一 氨基酸及蛋白质的性质 .....	(1)
Experiment 1 The Properties of Protein and Amino Acid .....	(8)
实验二 蛋白质的定量测定方法 .....	(16)
Experiment 2 Protein's Quantification .....	(22)
实验三 葡聚糖凝胶层析 .....	(30)
Experiment 3 Sephadex Gel Chromatography .....	(32)
实验四 疏水作用层析 .....	(34)
Experiment 4 Hydrophobic Interaction Chromatography .....	(36)
实验五 离子交换层析 .....	(38)
Experiment 5 Ion Exchange Chromatography .....	(40)
实验六 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....	(43)
Experiment 6 SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis .....	(46)
实验七 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦 .....	(49)
Experiment 7 Polyacrylamide Gel Isoelectric Focusing .....	(51)
实验八 聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳 .....	(53)
Experiment 8 Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Cylindrical Tube .....	(56)
实验九 蛋白质印迹分析 .....	(60)
Experiment 9 Western Blot Analysis .....	(63)
实验十 酶联免疫吸附法 .....	(66)
Experiment 10 Enzyme-linked Immunosorbent Assay .....	(71)
实验十一 动物组织中 DNA 的提取与含量测定 .....	(76)
Experiment 11 Extraction and Quantitation of DNA from Animal Tissues .....	(79)
实验十二 琼脂糖凝胶电泳 .....	(82)
Experiment 12 Agarose Gel Electrophoresis .....	(85)
实验十三 动物组织 RNA 的提取与鉴定 .....	(88)
Experiment 13 RNA Extraction and Identification from Animal Tissue .....	(90)
实验十四 PCR 扩增 DNA .....	(92)
Experiment 14 PCR Amplification of DNA .....	(95)
实验十五 酮体的生成和利用 .....	(98)

Experiment 15	Production and Utilization of Ketone Body	(100)
实验十六	转氨作用	(102)
Experiment 16	Transamination	(105)

## 第二部分 药学生物化学与分子生物学实验

实验十七	酶的活力测定和性质研究	(109)
Experiment 17	Measurement of Enzyme Activity and Properties	(116)
实验十八	细胞色素 C 的制备及鉴定	(123)
Experiment 18	Preparation and Identification of Cytochrome C	(127)
实验十九	溶菌酶的制备及其性质	(131)
Experiment 19	Preparation of Lysozyme and Its Properties	(135)
实验二十	碱性磷酸酶的分离纯化及其酶学研究	(140)
Experiment 20	Separation, Purification of Alkaline Phosphatase and Its Enzymology Study	(146)
实验二十一	香菇多糖的制备及初步分析	(154)
Experiment 21	Preparation and Primary Analysis of Lentinan	(157)
实验二十二	激素对血糖浓度的影响	(160)
Experiment 22	Effects of Hormone on Blood Sugar Concentration	(162)
实验二十三	降钙素基因在大肠埃希菌中的重组表达	(165)
Experiment 23	Recombinant Expression of Calcitonin Gene in <i>Escherichia coli</i>	(171)
实验二十四	动物基因组多态性分析	(178)
Experiment 24	Analysis of the Animal Gene Polymorphism	(181)
实验二十五	多克隆抗体的制备、纯化及免疫电泳	(184)
Experiment 25	Preparation, Purification of Polyclonal Antibody and Immunoelectrophoresis	(189)

附录		(196)
一、实验须知		(196)
二、常用仪器的使用方法		(196)
三、常用洗涤液的种类和用途		(198)
四、常用缓冲溶液浓度及 pH 范围		(198)
五、硫酸铵饱和度的常用表		(200)
六、离心机转数和相对离心力换算		(202)
七、生物大分子常用分离纯化柱料使用及处理		(202)
八、常用蛋白质分子量标准参照物		(204)
九、常用蛋白质与核酸换算关系		(205)
十、常用限制性内切酶位点及缓冲溶液		(205)
十一、分子生物学实验常用培养基的配制方法		(206)



# 第一部分 基础生物化学与分子生物学实验

## 实验一 氨基酸及蛋白质的性质

### 【实验目的】

1. 加深对所学相关蛋白质性质理论知识的理解。
2. 掌握氨基酸和蛋白质常用定性、定量分析的方法及其原理。

### 一、蛋白质呈色反应

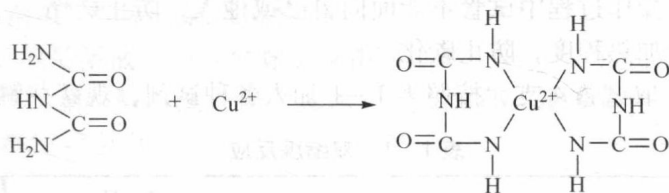
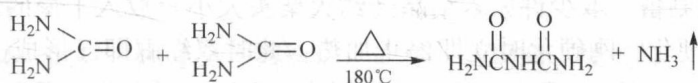
蛋白质的呈色反应是指蛋白质所含的某些氨基酸残基及其特殊结构，在一定条件下可与某些试剂生成有色物质的反应。

不同蛋白质分子所含的氨基酸残基不完全相同，因此所发生的呈色反应也不完全一样。另外，呈色反应并不是蛋白质的专一反应，某些非蛋白质类物质（含有一CS—NH、—CH<sub>2</sub>—NH<sub>2</sub>、—CRH—NH<sub>2</sub>、—CHOH—CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>等基团的物质）也能发生类似的颜色反应。因此，不能仅仅根据呈色反应的结果判断被测物质一定是蛋白质。

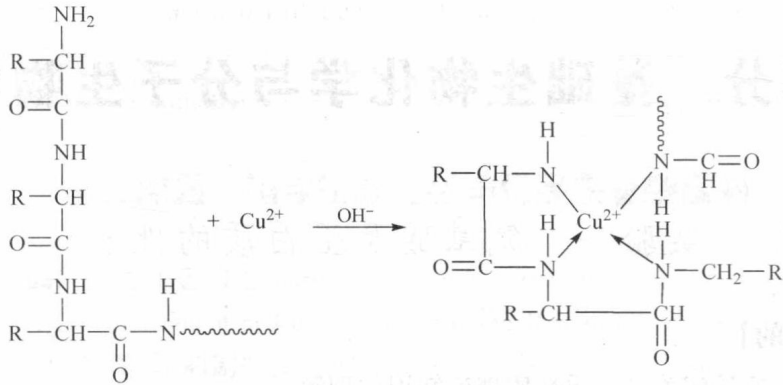
#### （一）双缩脲反应

##### 【实验原理】

尿素加热至 180℃ 左右时，2 分子尿素脱去 1 分子氨，缩合成 1 分子双缩脲。在碱性条件下，双缩脲与铜离子结合生成紫红色络合物，此反应称为双缩脲反应。其反应过程如下。



多肽及蛋白质分子结构中均含有许多肽键，其结构与双缩脲分子中的亚酰胺键相同。因此，在碱性条件下与铜离子也能呈现出类似于双缩脲的呈色反应，其反应过程如下。



**【实验材料】**

1. 实验器材 试管、试管架、移液管、烧杯、煤气灯、胶头滴管。

2. 实验试剂

(1) 蛋白质溶液 鸡蛋清用蒸馏水稀释 10 倍，通过 2~3 层纱布滤去不溶物。

(2) 0.1% 甘氨酸溶液 少量蒸馏水溶解 1g 甘氨酸后，转移至 1000ml 容量瓶中，蒸馏水定容至 1000ml。

(3) 0.01% 精氨酸溶液 少量蒸馏水溶解 0.1g 精氨酸后，转移至 1000ml 容量瓶中，蒸馏水定容至 1000ml。

(4) 10% NaOH 溶液 少量蒸馏水溶解 10g 氢氧化钠后，转移至 100ml 容量瓶中，蒸馏水定容至 100ml。

(5) 1% CuSO<sub>4</sub> 溶液 少量蒸馏水溶解 1g 硫酸铜后，转移至 100ml 容量瓶中，蒸馏水定容至 100ml。

(6) 尿素结晶。

**【实验步骤】**

1. 双缩脲的制备 取少许尿素结晶（约火柴头大小）放入干燥的试管中，微火加热至尿素溶解至硬化，刚硬化时立即停止加热，此时双缩脲即已形成。冷却后加 10% 氢氧化钠溶液 1ml 并振荡，再加入 1% 硫酸铜溶液 2 滴，再振荡，观察颜色的变化。

注意：(1) 在操作过程中试管不能面向自己或他人，防止烫伤。

(2) 控制试管加热程度，防止碳化。

2. 观察现象 取试管 4 支，按照表 1-1 加入各种试剂，观察并解释现象。

表 1-1 双缩脲反应

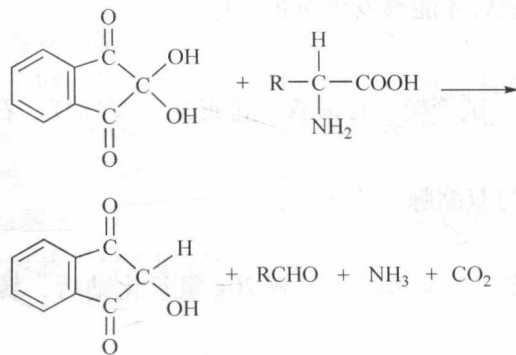
试剂	管号			
	1	2	3	4
蛋白质溶液 (ml)		1.0		
0.01% 精氨酸 (ml)			1.0	
0.1% 甘氨酸 (ml)				1.0
10% NaOH (ml)	2.0	2.0	2.0	2.0
蒸馏水 (ml)	1.0			
1% CuSO <sub>4</sub> (滴)	2.0	2.0	2.0	2.0
现象				

## (二) 茚三酮反应

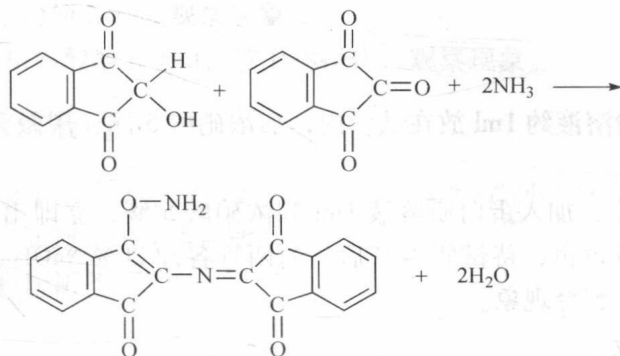
### 【实验原理】

在弱酸条件下 (pH 5~7), 蛋白质或氨基酸与茚三酮共热生成蓝紫色缩合物。此反应为一切蛋白质和  $\alpha$ -氨基酸所共有 (亚氨基酸, 如脯氨酸和羟脯氨酸产生黄色化合物)。含有氨基的其他化合物亦可发生此反应。

第一步:



第二步:



### 【实验材料】

1. 实验器材 试管、试管架、移液管、烧杯、石棉网、煤气灯。

2. 实验试剂

(1) 蛋白质溶液 与双缩脲反应相同。

(2) 0.1% 甘氨酸溶液 与双缩脲反应相同。

(3) 0.2% 茚三酮乙醇溶液 少量无水乙醇溶解茚三酮 0.2g 后, 转移至 100ml 容量瓶中, 无水乙醇定容至 100ml。

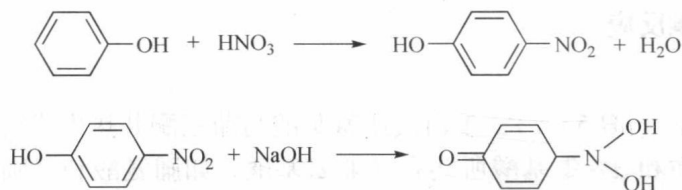
### 【实验步骤】

取试管 2 支, 分别加入蛋白质溶液及 0.1% 甘氨酸溶液 1ml, 然后各加入茚三酮溶液 0.5ml, 混匀后置于沸水浴中加热数分钟, 观察现象, 记录结果并解释原因。

## (三) 蛋白黄反应

### 【实验原理】

在蛋白质分子中, 具有芳香环的氨基酸 (如酪氨酸、色氨酸等) 残基上的苯环经硝酸作用可生成黄色的硝基化合物, 在碱性条件下硝基化合物可转变为橘黄色的硝醌衍生物, 其反应过程如下。



多数蛋白质分子含有带苯环的氨基酸残基，所以都会发生黄色反应。苯丙氨酸不易硝化，需加少量浓硫酸后才能够发生黄色反应。

### 【实验材料】

1. 实验器材 试管、试管架、移液管、锥形瓶、煤气灯、石棉网、胶头滴管。

2. 实验试剂

(1) 蛋白质溶液 与双缩脲反应相同。

(2) 浓硝酸。

(3) 20% NaOH 溶液 少量蒸馏水溶解 20g 氢氧化钠后，转移至 100ml 容量瓶中，蒸馏水定容至 100ml。

(4) 0.1% 苯酚溶液 少量蒸馏水溶解 1g 苯酚后，转移至 1000ml 容量瓶中，蒸馏水定容至 1000ml。

### 【实验步骤】

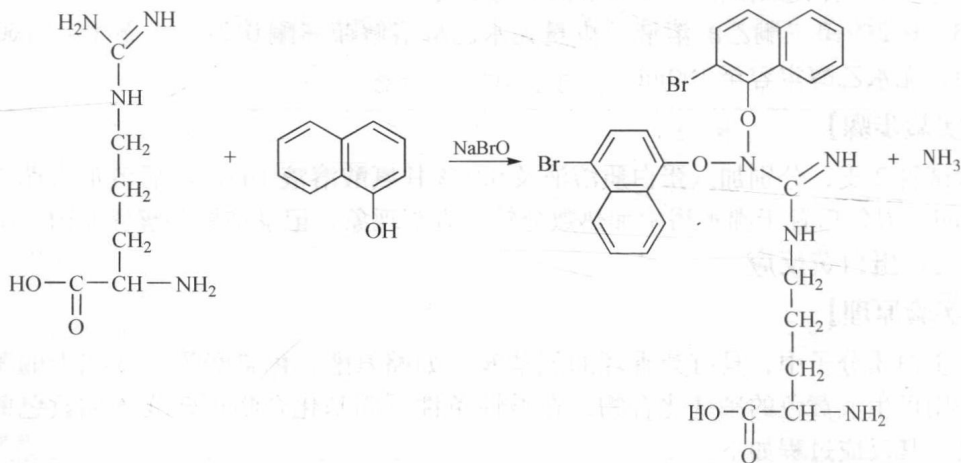
(1) 取 1% 苯酚溶液约 1ml 放在试管内，加浓硝酸 5 滴，用微火或水浴小心加热，观察结果。

(2) 取试管 1 支，加入蛋白质溶液 1ml 和浓硝酸 5 滴，立即出现沉淀，加热，不必至沸腾，沉淀变成黄色，待试管冷却后，向两管各加 20% NaOH 溶液混匀，观察颜色变化，记录结果并解释现象。

### (四) 坂口反应

#### 【实验原理】

蛋白质在碱性溶液中与次氯酸钠（或次溴酸钠）和  $\alpha$ -萘酚作用生成红色的产物。这是蛋白质分子中精氨酸胍基的特征反应。许多胍的衍生物，如胍乙酸、胍基丁胺等也发生此反应。精氨酸是惟一呈正反应的氨基酸，反应灵敏度达 1:250000。反应式如下。



在次溴酸钠缓慢作用下，红色产物继续氧化，引起颜色消失，因此过量的次溴酸钠对反应不利。加入浓尿素，破坏过量的次溴酸钠，能增加颜色的稳定性。此反应可以用来定性鉴定含有精氨酸的蛋白质和定量测定精氨酸的含量。

### 【实验材料】

1. 实验器材 试管、试管架、移液管、烧杯、胶头滴管。

### 2. 实验试剂

(1) 蛋白质溶液 与双缩脲反应相同。

(2) 次溴酸钠溶液 300g NaOH 溶解于 1L 水中，冷却后放在通风橱中，在不断搅拌下，小心地加入纯溴 50g (约 16ml)，溶液保存在棕色瓶中。此溶液可保存 2~3 个月。

(3) 10% NaOH 溶液 与双缩脲反应相同。

(4) 0.2%  $\alpha$ -萘酚溶液 0.5g  $\alpha$ -萘酚溶于 50ml 乙醇中，使用前以 5 倍水稀释。

(5) 0.01% 精氨酸溶液 与双缩脲反应相同。

### 【实验步骤】

(1) 于试管中加入蛋白质溶液 1ml，10% NaOH 溶液 0.5ml，0.2%  $\alpha$ -萘酚 2 滴，混合后加入次溴酸钠溶液 2 滴，观察现象。

(2) 取 0.01% 精氨酸溶液 1ml，按上述操作，观察现象。

## 二、蛋白质沉淀反应

蛋白质是亲水胶体，当其稳定因素被破坏或与某些试剂结合成不溶性盐类后，即自溶液中沉淀析出，此现象叫作蛋白质的沉淀反应。

### (一) 蛋白质的盐析作用

#### 【实验原理】

盐析现象是指向蛋白质溶液中加入大量的中性盐（例如硫酸铵、硫酸钠或氯化钠等），破坏蛋白质的胶体稳定性而聚集沉淀。盐析作用与两种因素有关：①蛋白质分子被浓盐脱水；②分子所带电荷被中和。

蛋白质的盐析作用是可逆过程，用盐析方法沉淀蛋白质时较少引起蛋白质变性，经透析或用水稀释后又可溶解。

盐析不同的蛋白质所需中性盐浓度与蛋白质种类及 pH 有关。分子量大的蛋白质（如球蛋白）比分子量小的（如清蛋白）易于析出。球蛋白在半饱和硫酸铵溶液中即可析出，而清蛋白需在饱和硫酸铵溶液中才能析出。

#### 【实验材料】

1. 实验器材 试管、试管架、移液管、烧杯、漏斗、滤纸。

### 2. 实验试剂

(1) 蛋白质溶液 与双缩脲反应相同。

(2) 固体硫酸铵。

(3) 10% NaOH 溶液 与双缩脲反应相同。

(4) 1%  $\text{CuSO}_4$  溶液 与双缩脲反应相同。

**【实验步骤】**

(1) 取蛋白质溶液约 2ml 于试管中，加入硫酸铵粉末，至硫酸铵饱和不再溶解为止，此时溶液颜色为乳白色，用滤纸过滤。

(2) 取滤液做双缩脲反应，检查滤液中是否有蛋白质存在。

(3) 蛋白质沉淀用少量蒸馏水溶解后作双缩脲反应，证明盐析的蛋白质重新溶解于水。

**(二) 重金属盐类沉淀蛋白质****【实验原理】**

当溶液 pH 大于蛋白质等电点时，蛋白质带负电荷，能与带正电荷的重金属（如  $Pb^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$  及  $Ag^+$  等）结合成不溶性盐而沉淀。

重金属盐类沉淀蛋白质通常比较完全，故常用重金属盐除去溶液中的蛋白质。

**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. 实验器材 试管、试管架、移液管、烧杯、胶头滴管。

**2. 实验试剂**

(1) 蛋白质溶液 与双缩脲反应相同。

(2) 5%  $CuSO_4$  溶液 少量蒸馏水溶解 5g 硫酸铜后，转移至 100ml 容量瓶中，蒸馏水定容至 100ml。

(3) 3%  $AgNO_3$  溶液 少量蒸馏水溶解 3g 硝酸银后，转移至 100ml 容量瓶中，蒸馏水定容至 100ml，转移至棕色瓶中保存。

**【实验步骤】**

(1) 取试管 2 支，各加入蛋白质溶液 1ml。

(2) 向两管分别加入 5%  $CuSO_4$  溶液和 3%  $AgNO_3$  溶液 2~3 滴，观察各管所生成的沉淀。

(3) 在硫酸铜产生沉淀的试管中，倒掉大部分沉淀，只保留少量沉淀，继续加入 5%  $CuSO_4$  溶液，观察沉淀的溶解。

**(三) 有机酸沉淀蛋白质****【实验原理】**

生物碱是一类含氮的碱性物质。凡能使生物碱沉淀，或能与生物碱发生颜色反应的物质称为生物碱试剂，如三氯醋酸、5-磺基水杨酸、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，生成不溶性的盐而沉淀。三氯醋酸的作用最为灵敏而且特异，因此广泛应用于沉淀蛋白质。

**【实验材料】**

1. 实验器材 试管、试管架、移液管、烧杯、胶头滴管。

**2. 实验试剂**

(1) 蛋白质溶液 与双缩脲反应相同。

(2) 10% 三氯醋酸溶液 少量蒸馏水溶解 10g 三氯醋酸固体, 蒸馏水定容至 100ml。

(3) 20% 5-磺基水杨酸溶液 少量蒸馏水溶解 20g 5-磺基水杨酸, 蒸馏水定容至 100ml。

### 【实验步骤】

(1) 取蛋白质溶液 1ml 于试管中, 加数滴三氯醋酸溶液, 观察现象。

(2) 取蛋白质溶液 1ml 于试管中, 加数滴 5-磺基水杨酸溶液, 观察现象。

### (四) 加热沉淀蛋白质

#### 【实验原理】

大多数蛋白质在加热时, 由于空间结构被破坏而丧失其稳定性而变性沉淀。蛋白质的热变性作用与加热时间平行, 并随温度的升高而加快。短时间加热即可引起沉淀。加热时, 盐类的存在及溶液酸碱度对蛋白质的沉淀有很大影响。当蛋白质处于等电点时, 加热时沉淀凝固最完全、最迅速。在强酸、强碱溶液中, 蛋白质分子由于带有正电荷或负电荷, 加热也不沉淀, 但溶液中若有中性盐存在, 虽在酸性或碱性溶液中, 则蛋白质亦可因加热而沉淀。

#### 【实验材料】

1. 实验器材 试管、试管架、移液管、烧杯、石棉网、煤气灯、胶头滴管。

#### 2. 实验试剂

(1) 蛋白质溶液 与双缩脲反应相同。

(2) 1% 醋酸溶液 量取 1ml 冰醋酸, 用蒸馏水定容至 100ml。

(3) 10% 醋酸溶液 量取 10ml 冰醋酸, 用蒸馏水定容至 100ml。

(4) 10% 氢氧化钠溶液 与双缩脲反应相同。

(5) 饱和氯化钠溶液 室温下配制过饱和氯化钠溶液, 过滤即得饱和氯化钠溶液。

#### 【实验步骤】

取试管 4 支, 按表 1-2 所示添加试剂。

表 1-2 加热沉淀蛋白质反应

试剂	管号			
	1	2	3	4
蛋白质溶液 (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0
1% 醋酸 (滴)	1.0			
10% 醋酸 (滴)		10.0		
10% NaOH (滴)			10.0	
蒸馏水 (滴)	10.0	1.0	1.0	11.0
现象				

加毕混匀, 观察各管的情况。放入沸水浴中加热 10 分钟, 注意比较各管的沉淀情况。其中 1 号管溶液 pH 接近于蛋白质等电点, 在加热之前最先产生沉淀; 其次是 4 号管在加热之后产生沉淀; 3 号和 2 号管因在较强的酸性或碱性条件下, 蛋白质带有大量

的电荷，虽然加热也不沉淀。向 2 号管中加入少许饱和氯化钠溶液，立即出现白色沉淀。

### 【思考题】

1. 盐析作用的原理是什么？盐析在化学工作中有什么应用？
2. 哪个反应可以用于区别氨基酸与蛋白质？
3. 蛋白质的沉淀试验和颜色反应实验时应注意哪些问题？

## Experiment 1 The Properties of Protein and Amino Acid

### Purposes

1. To deepen understanding of speculative knowledge about properties of protein which has been learned.
2. To master the methods and principles of quantitative and qualitative experiments of protein and amino acid.

### 1. Color reactions of protein

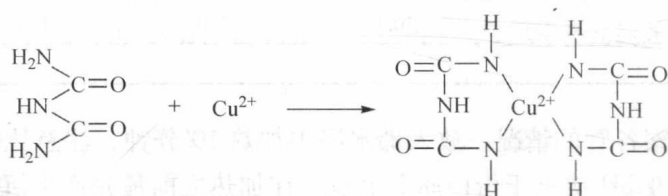
Color reactions of protein mean that some chemical bonds of protein or chemical groups of amino acid residues can react with specific reagents to form specific colored products under certain condition.

The amino acid residues of different proteins are not quite the same. Therefore, colors of the products are not exactly the same. Color reactions are not the specific reactions of protein. Some non-protein substances (e. g.  $-\text{CS}-\text{NH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CRH}-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{NH}_2$ ) also have similar color reactions. Consequently we cannot judge protein according to the results of the color reactions.

### ( I ) Biuret reaction

#### Principle

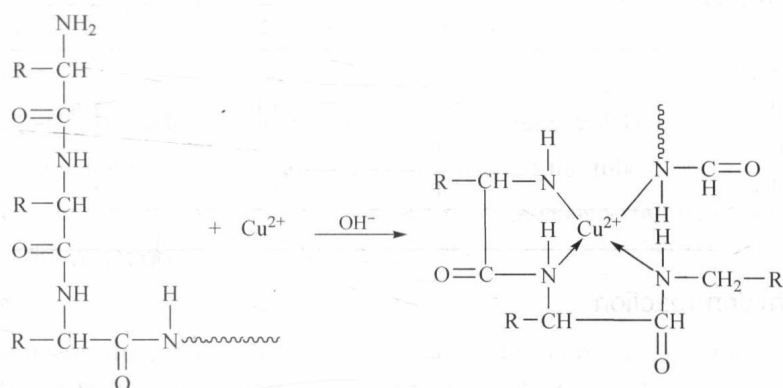
Two molecules of carbamide are heated to give a molecule of biuret when the temperature is  $180^\circ\text{C}$  and release a molecule of ammonia. Biuret reacts with an alkaline solution of copper cation can form a purple-colored complex, This reaction is called biuret reaction. The process of biuret reaction is as follows.



There are many peptide bonds in polypeptides and proteins. The structure of peptide bond



is the same as the imido bond of biuret. Therefore protein or polypeptide can react with alkaline solution of copper cation in a similar way to biuret. The process of reaction is as follows.



## Materials

### 1. Apparatus

Test tubes, test tube shelf, pipette, flask, gas lamp, glue head dropper.

### 2. Reagents

- (1) Protein solution Egg white is diluted with distilled water to ten volumes and filtered by 2 ~ 3 layers of gauze.
- (2) 0.1% Glycine solution Dissolve 1g glycine into little water, then dilute to 1000ml.
- (3) 0.01% Arginine solution Dissolve 0.1g arginine into little water, then dilute to 1000ml.
- (4) 10% NaOH solution Dissolve 10g NaOH into little water, then dilute to 100ml.
- (5) 1% CuSO<sub>4</sub> solution Dissolve 1g CuSO<sub>4</sub> into little water, then dilute to 100ml.
- (6) Crystal carbamide.

### Procedures

1. Preparation of biuret Add a little crystal carbamide (about the size of a match head) into a dry test tube. Low heat to liquate, stop heating when it begins to vulcanize and biuret can be formed. Cool and add 1ml 10% NaOH solution, mix up, then add 2 drop of 1% CuSO<sub>4</sub> solution, mix up again, observe the change of the color.

Cautions: (1) To prevent burns, the tube can not face themselves or others in the process of operation.

(2) To prevent carbonization, the heating degree of the tube should be controlled.

2. Observing the phenomenon Take four test tubes, in which the reagents as the Table 1-1 are added and mixed, observation and then make an explanation.

Table 1 - 1 Biuret reaction

Reagents	Test tube			
	1	2	3	4
Protein solution (ml)		1.0		
0.01% Arginine (ml)			1.0	