

生物化学

学生实验报告

专业_____

学号_____

班级_____

姓名_____

第二军医大学出版社

生物化学

学生实验指导

一、实验目的	1
二、实验原理	2
三、实验材料	3
四、实验步骤	4

实验一 蛋白质两性解离和等电点测定

实验日期_____

【实验目的】

- (1) _____
- (2) _____
- (3) _____

【实验原理】

实验原理	蛋白质是高分子的化合物,分子量很大,多在_____万之间,它能形成稳定均一的溶液,是由于蛋白质分子都带有_____,同时蛋白质分子周围有一层_____,避免蛋白质分子之间聚沉 在某一溶液中蛋白质分子所带_____相等时,即净电荷为零,以兼性离子形式存在,此时溶液的_____称为该蛋白质的等电点(pI)
------	---

【实验步骤】

1. 蛋白质的两性解离

实验项目	操作步骤
蛋白质的两性解离	取试管1支,加入20滴0.5%_____溶液,逐滴加入0.01%的溴甲酚绿溶液(5~7滴),充分混匀,观察溶液的颜色_____ 取0.02 mol/L _____溶液逐滴加入,边加边摇,当出现明显沉淀时止,用精密pH试纸测溶液的pH,观察溶液的颜色_____ 继续滴加0.02 mol/L HCl溶液,观察溶液的沉淀和颜色_____ 然后加入0.02 mol/L _____溶液,使溶液pH接近中性,观察溶液_____ 继续滴加0.02 mol/L NaOH溶液,沉淀再次溶解,是因为_____

2. 等电点测定

实验项目	操作步骤
等电点测定	取5支大试管,按表2-1-1顺序操作,准确加入蒸馏水、0.01 mol/L HAc、0.1 mol/L HAc、1.0 mol/L HAc、0.5%酪蛋白-_____溶液,测定最终pH值,观察混浊。静置10 min及30 min后再观察,据_____来判断酪蛋白的等电点。观察时可用+,++,+++表示混浊度。沉淀最多而上清液_____的那管pH值,即为_____的pI

【思考题】

(1)为什么在等电点时蛋白质的溶解度最低?

(2)本实验中,酪蛋白在等电点时从溶液中沉淀析出,所以说凡是蛋白质在等电点时必然沉淀出来。这种结论对吗?为什么?

(3)为什么蛋白质两性解离中会出现颜色及沉淀变化?

实验二 蛋白质变性与沉淀

实验日期_____

【实验目的】

- (1) _____
- (2) _____
- (3) _____

【实验原理】

1. 蛋白质的盐析

实验项目	操作步骤
盐析	在蛋白质溶液中加入_____, 蛋白质表面的水化膜即_____, 其所带电荷也被中和, 蛋白质颗粒因失去这_____因素而沉淀, 这种过程称为盐析

2. 重金属盐及某些酸类沉淀蛋白

实验项目	操作步骤
重金属盐及某些酸类	当溶液 pH 值 $> pI$ 时蛋白质分子带_____电荷, 能与重金属离子(如 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ag^{2+} 、 Hg^{2+} 等)结合成_____化合物; 在临床上, 用_____或_____在重金属未被吸收之前可作为重金属盐类中毒的解毒剂, 使用催吐剂使沉淀吐出, 或用洗胃方法除去。当溶液 pH 值 $< pI$ 时, 蛋白质分子带_____电荷, 与某些有机酸根生成_____而难溶于水

3. 加热沉淀蛋白质

实验项目	操作步骤
加热	变性的蛋白质_____沉淀, 沉淀的蛋白质也不一定_____, 凝固的蛋白质都发生变性, 并且不再溶于稀酸或稀碱溶液中

4. 乙醇沉淀蛋白质

实验项目	操作步骤
加入乙醇	可与水任意混合的有机溶剂如_____等是脱水剂, 可与_____争夺水化膜, 同时有机溶剂使水的介电常数变小, _____蛋白质的电离程度, 故能使蛋白质沉淀。但易引起蛋白质变性而_____活性

【实验步骤】

1. 蛋白质的盐析

实验项目	操作步骤
盐析	取一支试管,加入 5% _____ 5 ml,再加饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液 5 ml,混匀静置数分钟观察 _____ 现象,此沉淀是 _____ 蛋白质 用干滤纸过滤,是因为 _____ 取 1 ml 滤液,用 _____ 试剂检查,观察 _____ 现象,在剩余滤液中加固体 _____ 直至不再溶解达饱和状态。观察 _____ 现象,说明是 _____ 蛋白质。此液用干滤纸过滤,取 1 ml 滤液用米伦试剂检查,有何 _____ 现象,此时为 _____

2. 重金属盐及某些酸类沉淀蛋白

实验项目	操作步骤
重金属盐及某些酸类	取 4 支试管按表 2-2-2 进行操作,分别加入 1% 蛋白液、1/3 mol/L _____、0.5 mol/L _____、10% ZnSO_4 、_____ Na_2WO_4 。混匀后 1 号管会出现 _____、2 号管出现 _____、3 号管出现 _____、4 号管出现 _____

3. 加热沉淀蛋白质

实验项目	操作步骤
加热	取 4 支试管,按表 2-2-3 进行操作,分别加入 1% _____ 溶液、蒸馏水、0.1 mol/L _____、0.1 mol/L HCl、饱和 NaCl,上述试管混匀后置 _____ 内 5 min,观察 1 号管 _____、2 号管 _____、3 号管 _____、4 号管 _____。冷却后将 2 号、3 号管各加 1 滴 _____ (pH 4.2 红色,pH 6.3 黄色),分别用 0.1 mol/L HCl 及 0.1 mol/L NaOH 缓慢进行中和,2 号管 _____、3 号管 _____,请解释 _____。加热一定时间后再加酸和碱有 _____ 变化

4. 乙醇沉淀蛋白质

实验项目	操作步骤
加入乙醇	取 2 支试管按表 2-2-4 进行操作,分别加入 1% 蛋白液、结晶 NaCl、95% _____,请仔细观察,当蛋白质溶液中加入少量 _____ 后有 _____ 现象,请比较说明最后结果,1 号管 _____、2 号管 _____

【思考题】

(1) 沉淀蛋白质的方法有几种形式?

(2) 沉淀、变性与凝固三者之间有什么关系?

实验三 血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳

实验日期_____

【实验目的】

- (1) _____
- (2) _____

【实验原理】

实验原理	电泳是指_____在电场中向其相反电极移动的现象。血清蛋白质的_____大部分都在 pH 值 7 以下,故在 pH 值 8.6 的缓冲溶液中都带_____电荷,在电场中向_____移动。用_____薄膜作支持物进行电泳,可将血清蛋白质分为 5 条主要区带,从正极端起依次为_____、 α_1 、 α_2 、_____、_____球蛋白区带
------	--

【实验步骤】

1. 薄膜的准备

实验项目	操作步骤
薄膜的准备	将醋酸纤维薄膜切成_____ cm 大小,在无光泽面的一端约_____ cm 处用铅笔划一直线作为点样位置,将薄膜_____向下,浸入 pH 值为_____ 巴比妥缓冲溶液中,待完全浸透(约 20 min),即薄膜已无_____后取出,夹在滤纸中间,轻轻吸去多余的缓冲液

2. 点样

实验项目	操作步骤
点样	取少量_____置于玻璃板上,用加样器取血清_____均匀地印在点样线上,待血清渗入膜内后,移开_____。应使血清形成具有一定_____、粗细均匀的直线

3. 电泳

实验项目	操作步骤
电泳	将薄膜点样的一端靠近_____极,无光泽面向_____,平整地贴于电泳槽支架的滤纸桥上,使其平衡约_____ min,打开电源开关,调节电压为 100~160 V,电流为_____ mA/cm膜宽,通电_____ min,使电泳区带展开约 3.5 cm 即可关闭电源

4. 染色

实验项目	操作步骤
染色	用镊子小心取出_____, 浸入_____中染色 3 min, 然后取出, 浸入_____中反复漂洗数次, 直至背景颜色脱净为止。一般每隔_____ min 左右换一次漂洗液, 连续漂洗 3 次即可。此时即得_____条蛋白色带, 从正极端起, 依次为_____, _____、_____, _____和_____球蛋白

5. 定量

实验项目	操作步骤
洗脱法	取试管 6 支并编号, 按蛋白_____剪开, 并于空白部位剪一相当于_____蛋白宽度的薄膜作为空白, 分别浸于_____ mol/L NaOH 溶液中, 清蛋白管为_____ ml, 其余各管为_____ ml, 振摇数次, 约经 30 min, _____即可完全浸出。用_____比色, 于 600~620 nm 波长下, 以_____管调零, 测定各管的吸光度, 计算各部分蛋白质所占百分比(相对百分含量)

6. 计算

实验项目	按公式计算结果
清蛋白 α_1 -球蛋白 α_2 -球蛋白 β -球蛋白 γ -球蛋白	

7. 透明

实验项目	操作步骤
透明	将完全_____的薄膜置于透明液中浸泡_____ min, 然后取出, 贴于_____板上, 注意不要_____, 经 2~3 min, 薄膜便完全透明。待干后撕下压平, 可长期保存

【思考题】

(1) 说出电泳的定义。

(2) 电泳时应注意哪几个关键步骤?

(3) 醋酸纤维薄膜电泳可将血清蛋白依次分为哪几条区带? 有何临床意义?

实验四 血清总蛋白测定双缩脲法

实验日期_____

【实验目的】

- (1) _____
- (2) _____
- (3) _____
- (4) _____

【实验原理】

实验原理	血清(浆)中蛋白质的_____在碱性溶液中能与 2 价的_____作用生成稳定的紫红色络合物。此反应和 2 个_____缩合后生成的双缩脲($\text{H}_2\text{N}-\text{OC}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) 在碱性溶液中与铜离子作用形成紫红色的反应相似,故称之为双缩脲反应。颜色的深浅与蛋白质含量成_____
------	--

【实验步骤】

1. 加入试剂

实验项目	操作步骤
实验步骤 1	取试管 4 支,标出测定管(U)、标准管(S)、标本空白管(B)、试剂空白管(RB),按表 2-4-1 操作,加入_____,蛋白标准液、蒸馏水、双缩脲空白试剂、_____试剂,将各管混匀,置于水浴_____ 10 min,选择波长_____ nm,用蒸馏水调零,测各管吸光度(A),1 号管_____,2 号管_____,3 号管_____,4 号管_____

2. 计算

实验项目	操作步骤
实验步骤 2	计算结果 $\text{血清总蛋白(g/L)} = \frac{A_U - A_{RB} - A_B}{A_S - A_{RB} - A_B} \times \text{蛋白标准液浓度}$

【思考题】

- (1)何谓双缩脲试剂?

(2)为什么在双缩脲试剂中加入酒石酸钾钠和碘化钾?

(3)简述双缩脲比色法测定血清中蛋白的原理和方法。

(4)血清总蛋白的测定有何临床意义?

实验五 血清清蛋白测定(溴甲酚绿法)

实验日期_____

【实验目的】

- (1) _____
- (2) _____
- (3) _____

【实验原理】

实验原理	血清清蛋白在 pH _____ 的缓冲液中带正电荷,在有非离子型表面活性剂存在时,可与带 _____ 电荷的染料溴甲酚绿(BCG)结合形成 _____ 复合物,在波长 _____ nm 处有吸收峰,其颜色深浅与清蛋白浓度成正比,与同样处理的清蛋白标准液比较,可求得血清中清蛋白含量
------	--

【实验步骤】

1. 加入试剂

实验项目	操作步骤
血清清蛋白测定	取试管 3 支,分别是 _____ 管(B)、_____ 管(S)、测定管(U),按表 2-5-1 操作,分别加入 _____、清蛋白标准液、_____ 水、BCG 试剂,在波长 _____ nm 处用空白管 _____,用 _____ 器加 _____ 试剂,与测定管血清混合后,立即在 30 ± 3 s 内读取 _____ 吸光度,分别为 _____、_____、_____

2. 计算

实验项目	操作步骤
计算测定管清蛋白含量	血清清蛋白(g/L) = $\frac{\text{测定管吸光度}}{\text{标准管吸光度}} \times \text{清蛋白标准液浓度(g/L)}$

【思考题】

(1)阐述 BCG 法测定血清清蛋白的原理和临床意义。

(2)如何使用微量加样器?

实验六 酶的专一性及影响酶促反应的因素

实验日期_____

【实验目的】

- (1) _____
- (2) _____
- (3) _____

【实验原理】

原理	唾液淀粉酶能催化_____发生水解,生成一系列水解产物,即糊精、麦芽糖、葡萄糖。麦芽糖或葡萄糖都属于还原糖,能使_____中的 2 价铜离子(Cu^{2+})还原成亚铜,并生成_____的氧化亚铜(Cu_2O)。淀粉酶不能催化_____水解,且蔗糖本身不是还原糖,所以不能与班氏试剂作用呈颜色反应。以此证明酶催化底物的专一性
----	---

【实验步骤】

1. 酶的专一性

实验项目	操作步骤
酶的专一性	取 3 支试管,分别加入 pH 6.8 缓冲液、1% 淀粉溶液、1% 蔗糖溶液、稀释唾液,将各管混匀,置于 37℃ 水浴箱保温 10 min 后取出,在各管内加入_____ 20 滴混匀,置于 37℃ 水浴箱 3~5 min,观察结果:1 号管_____,2 号管_____,3 号管_____,为什么_____

2. pH 对酶促反应速度的影响

实验项目	操作步骤
pH 对酶促反应速度的影响	取 3 支试管按要求,分别加入 1% 淀粉溶液、pH 4.8 缓冲液、pH 6.8 缓冲液、pH 8.0 缓冲液,加稀释_____液,将各管混匀,置于_____水浴箱保温 5~10 min 后取出,加稀碘液,观察 1 号管_____,2 号管_____,3 号管_____,为什么_____

3. 温度对酶促反应速度的影响

实验项目	操作步骤
温度对酶促反应速度的影响	取 3 支试管分别加入 1% 淀粉溶液、pH 6.8 缓冲液、稀释唾液,将各管混匀后分别置于_____℃、_____℃、100℃ 预温 5 min。加稀碘液,观察 1 号管_____,2 号管_____,3 号管_____,为什么_____

4. 激活剂、抑制剂对酶促反应速度的影响

实验项目	操作步骤
激活剂、 抑制剂对 酶促反应 速度的影响	取试管 4 支并编号, 按要求分别加入 1% _____、pH 6.8 缓冲液、0.1% Na_2SO_4 溶液、 _____ NaCl 溶液、0.1% CuSO_4 溶液、稀释唾液、蒸馏水, 将各管混匀, 置于 37°C 水浴箱保温 5~10 min 后取出, 加入 _____ 液。观察结果 1 号管 _____、2 号管 _____、3 号管 _____, 4 号管 _____

【思考题】

(1) 结合本试验说明 pH、温度、激活剂、抑制剂对酶促反应速度的影响。

(2) 简述酶的定义及临床意义。

实验七 胡萝卜素的柱层析

实验日期_____

【实验目的】

- (1) _____
- (2) _____

【实验原理】

实验原理	绿色的植物中含有多烯色素类,如_____,又可分为 α 、 β 、 γ 等,因其在动物体内可转变成维生素 A,故又称_____。在_____,胡萝卜中含量较高。胡萝卜素可用乙醇、石油醚和丙酮等有机溶剂从_____提取出来,且能被_____和氧化镁(MgO)等吸附,由于胡萝卜与其他色素的化学结构不同,因而被氧化铝吸附的_____以及在有机溶剂中的_____都不相同,故利用氧化铝层析柱,再用_____等冲洗层析柱,即可把胡萝卜素分离成不同的_____
------	---

【实验步骤】

1. 胡萝卜素提取

实验项目	操作步骤
提取	称取干红辣椒皮_____,剪碎后放入研钵中加 95%乙醇_____ ml,研磨到_____呈现红色,再加_____ 10 ml,研磨 3~5 min。用双层_____过滤,将提取液置于 50 ml 分液漏斗中,用 40 ml _____洗涤数次,直到水层透明为止,借以除去提取液中的_____。然后将红色石油醚层倒入_____中,加少量无水 Na_2SO_4 除去_____,用软木塞紧以免石油醚挥发

2. 层析柱的制备

实验项目	操作步骤
制备	取直径 1 cm,高度为_____ cm 的玻璃层析柱,在其底部放入少量_____。然后装入氧化铝粉末达_____ cm 的高度,于其上部铺一张小圆形_____。然后,将层析柱垂直_____铁架上备用

3. 层析

实验项目	操作步骤
层析	当层析柱上端石油醚尚_____浸入氧化铝时,即用细吸管吸取_____ 1 ml 沿管壁加入层析柱上端,待提取液_____入层析柱时,立即加入含 10% _____的石油醚冲洗,使吸附在柱上端的_____逐渐展开成为数条颜色不同的_____,仔细观察色带的位置、宽度及颜色,并绘图记录

【思考题】

(1)何谓维生素 A 原?

(2)简述维生素 A 的功能及缺乏症。

实验八 血糖的测定

实验日期_____

【实验目的】

- (1) _____
- (2) _____
- (3) _____

一、血清葡萄糖测定邻甲苯胺法

【实验原理】

实验原理	葡萄糖在_____溶液中,加热后其醛基与邻甲苯胺缩合生成_____,后者脱水生成希夫(Schiff)碱,即_____化合物(吸收峰在 630 nm 波长),其颜色深浅在一定范围内与_____含量成正比
------	--

【实验步骤】

1. 加入试剂

实验项目	操作步骤
实验步骤 1	取 3 支试管,按要求分别加入血清、葡萄糖标准应用液、蒸馏水、_____试剂等,混匀后,置于沸水浴中,加热_____ min,取出置冷水中冷却 5 min。于分光光度计波长_____ nm 处以空白管调零进行比色,读取标准管_____,测定管_____,吸光度_____

2. 计算

实验项目	操作步骤
实验步骤 2	计算结果 $\text{空腹血清葡萄糖}(\text{mmol/L}) = \frac{A_u}{A_s} \times 5$

【思考题】

- (1) 邻甲苯胺法测定血糖的意义是什么?

(2)血清葡萄糖测定邻甲苯胺法的原理是什么?

(3)在邻甲苯胺试剂中加入硫脲、硼酸有何作用?

二、血清葡萄糖测定葡萄糖氧化酶法

【实验原理】

实验原理	葡萄糖氧化酶能催化葡萄糖氧化生成_____,并产生 1 分子过氧化氢。在色原性氧受体(4-氨基安替比林和酚)存在时,_____酶可将过氧化氢分解为水和氧,并使 4-氨基安替比林和酚去氢缩合成为_____醌类化合物——醌亚胺,即 Trinder 反应。红色的醌类化合物的生成量与_____含量成正比
------	--

【实验步骤】

1. 加入试剂

实验项目	操作步骤
实验步骤 1	取 3 支试管,按要求分别加入_____,葡萄糖标准应用液、蒸馏水、_____混合试剂,混匀后,置于 37℃ 水浴中,保温 15 min,在_____ nm 波长处以空白管调零进行比色,读取标准管吸光度_____与测定管吸光度_____

2. 计算

实验项目	操作步骤
实验步骤 2	计算结果 $\text{空腹血清葡萄糖}(\text{mmol/L}) = \frac{A_u}{A_s} \times 5$

【思考题】

(1)葡萄糖氧化酶法测定血糖时,配制的葡萄糖标准液为何须放置 2 h 以上,最好过夜方可应用?