

许秀珍 梁山 编



生物化学与分子生物学实验指导

SHENGWUHUAXUE
YU
FENZISHENGWUXUE
SHIYAN
ZHIDAO

第 2 版

生物化学与分子生物学实验指南

SHENG HUO HUO XUE YU FEN ZI SHENG HUO HUO XUE SHI XIAN ZHI NAN

第 2 版

SHENG HUO HUO XUE YU FEN ZI SHENG HUO HUO XUE SHI XIAN ZHI NAN

SHENG HUO HUO XUE YU FEN ZI SHENG HUO HUO XUE SHI XIAN ZHI NAN

SHENG HUO HUO XUE YU FEN ZI SHENG HUO HUO XUE SHI XIAN ZHI NAN



第 2 版

生命科学实验教材系列

生物化学与分子生物学实验指导

许秀珍 梁山 编

暨南大学出版社

中国·广州

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学与分子生物学实验指导/许秀珍, 梁山编. —广州: 暨南大学出版社, 2003.8

(生命科学实验教材系列)

ISBN 7-81079-274-1

I. 生…

II. ①许…②梁…

III. ①生物化学—实验—高等学校—教材②分子生物学—实验—高等学校—教材

IV. ①Q5-33②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 072130 号

出版发行: 暨南大学出版社

地 址: 中国广州暨南大学

电 话: 编辑部 (8620) 85226205 85228986

营销部 (8620) 85226712 85228291 85220602 (邮购)

传 真: (8620) 85221583 (办公室) 85223774 (营销部)

邮 编: 510630

网 址: <http://www.jnupress.com> <http://press.jnu.edu.cn>

排 版: 暨南大学出版社照排中心

印 刷: 暨南大学印刷厂

开 本: 787mm × 1092mm 1/16

印 张: 13.75

字 数: 310 千

版 次: 2003 年 8 月第 1 版

印 次: 2003 年 8 月第 1 次

定 价: 25.00 元

(暨大版图书如有印装质量问题, 请与出版社营销部联系调换)

前 言

生命科学实验教材系列含：《生物学基础实验指导》、《微生物学实验指导》、《生物化学与分子生物学实验指导》，由华南师范大学生命科学学院基础课实验教学示范中心组织编写和审核。

生物化学是生命的化学，它用化学的方法，从分子水平研究和了解生命现象的本质。分子生物学是在分子水平上研究生命现象的一门新兴学科。两门学科之间有着相互交叉、密不可分的联系。

根据教育部教学大纲的要求和目前国内师范大学生命科学学院课程的设置，我们总结自己多年教学实践的经验和体会，在吸取其他高等院校的经验与信息资料的基础上，编写了《生物化学与分子生物学实验》一书。本书介绍了生物化学与分子生物学的基本研究技术和方法，如层析法、电泳法、分光光度法、分子克隆技术等；大多数实验都编写了“注意事项”和“思考题”，有利于学生更好地把握实验操作中的关键因素和实验前后进行思考、总结、提高。本书还包含综合实验内容，能较全面培养学生正确理解实验原理和掌握生物化学和分子生物学实验技术的能力，初步培养进行科学研究的能力。

全书内容分两部分。第一部分为生物化学实验，基础实验内容包括蛋白质、核酸、酶与维生素、糖、脂及物质代谢等方面的经典性实验及相应的实验技术；综合实验包括专题系列实验和设计实验。第二部分为分子生物学实验。学生在完成规定的基础实验后，在老师的指导下，以小组为单位，选题开展综合实验。目的是培养学生独立操作和设计实验的能力，为开展科学研究和完成毕业论文打下基础。

本书可作高等师范院校生命科学学院各专业本科生教学用书，也可作研究生参考及其他院校教学参考。鉴于我们的知识和能力所限，书中的错误与不足之处在所难免，敬请各位读者批评指正。

华南师范大学生命科学学院

2003 年 7 月

实验规则

一、实验目的在于培养学生研究自然科学的严谨科学态度，实事求是的作风和正确的思维方法；通过实验证明生物化学和分子生物学的基本理论，加深对基本理论的理解。通过实验，学生掌握基本研究方法，学习设计实验。

二、遵守实验室规则和课堂纪律，严格按操作规程操作，既要独立操作又要与其他同学密切配合。

三、每次实验前认真地预习实验内容，了解实验目的、要求、原理和操作步骤，懂得每一操作步骤的意义，了解仪器的使用方法。

四、在实验操作过程中，应注意几点：

1. 勿取用过量的实验材料及试剂。

2. 根据实验要求，使用适当精度级别的量具。

3. 试剂用后必须立即将瓶盖盖好，放回原处，自瓶中取出的试剂和标准溶液，如未用完，切勿倒回原瓶，以免混杂。

五、作好实验记录，完成实验报告。实验过程中，必须把实验数据、观察到的现象和实验结果及时地记录在记录本上。绝对不能用单片纸做记录或草稿，记录时应做到实事求是，切忌夹杂主观因素。如果发现记录的结果有疑问、缺失等，必须重做实验。

实验报告的文字要简练准确，根据实验内容，可采用叙述图表等形式。通过详细汇报本人的实验结果，分析总结实验的经验和问题，加深对有关理论和技术的理解与掌握。实验报告基本格式如下：

实验（编号）	实验名称	姓名	日期	页数
(一) 目的和要求				
(二) 原理				
(三) 试剂和仪器				
(四) 操作步骤				
(五) 结果与分析				
(六) 讨论				

在书写实验报告时应注意：

(1) 书写实验报告用统一的报告纸。

(2) 简明扼要地概括出实验的原理，涉及化学反应，最好用化学反应式表示。

(3) 实验方法步骤的描述要简洁。

(4) 为了能重复以前的某些实验结果，或此次的结果能在今后再现，应记录实际观察到的实验现象并记录实验现象的所有细节。报告在实验中的发现对学生将是非常重要的科学研究训练。在科学研究中，仔细观察，特别注意未预期的实验现象是十分重要的。

(5) 讨论是以结果为基础的逻辑推论。对定性实验，在分析实验结果基础上应有一简短而中肯的结论。还可以包括关于实验方法（或操作技术）和有关实验的一些问题，如实验异常结果的分析，对于实验设计的认识、体会和建议，对实验课的改进意见等。

六、使用仪器前应熟知使用方法。细心爱护仪器，严格按操作规程使用，对精密贵重仪器每次使用后应登记姓名并记录仪器使用情况。发现故障时应立即报告教师，不得擅自处理。

七、整洁的实验室是实验顺利进行的保证。实验完毕，须将试剂瓶和材料排列整齐，将仪器放好，并把桌面擦干净，经教师检查后方可离开实验室。

八、一般废物倒入水沟内放水冲走，强酸强碱废液须先用水稀释，然后倒入废物缸内。废纸、火柴棍、带有渣滓的废液和其他固体废物均应倒入废品缸内。

九、注意安全。含有易燃溶剂的实验不得接近火焰操作，对易燃液体加热必须用水浴。漏电的设备一律不得使用。遇有火险，必须冷静处理，切断电源。离开实验室前检查水、电、门、窗是否关好。

十、轮流值日，值日生负责当天实验室的卫生、安全。

目 录

实验规则	(1)
第一部分 生物化学实验	(1)
基础实验	
实验 1 总氮量的测定——微量凯氏 (Mirco - Kjeldahl) 定氮法	(1)
实验 2 醋酸薄膜电泳分离血清蛋白	(7)
实验 3 蛋白质的等电点测定和沉淀反应	(11)
实验 4 甲醛滴定法测定氨基酸含量	(16)
实验 5 酪蛋白的制备	(18)
实验 6 紫外吸收法测定蛋白质的含量	(20)
实验 7 考马斯亮蓝 G—250 染色法测定蛋白质含量	(24)
实验 8 Folin—酚法测定血清蛋白的含量	(26)
实验 9 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分离血清蛋白	(29)
实验 10 动物组织核酸的制备	(36)
实验 11 紫外吸收法测定核酸的含量	(40)
实验 12 二苯胺法测定 DNA 含量	(43)
实验 13 地衣酚法测定 RNA 含量	(46)
实验 14 定磷法测定核酸的含量	(49)
实验 15 薄层层析法分离鉴定核苷酸	(53)
实验 16 酶的特异性和影响酶反应速度的因素	(57)
实验 17 枯草杆菌蛋白酶活力测定	(62)
实验 18 过氧化氢酶活力的测定	(65)
实验 19 木瓜蛋白酶的提取和活力测定	(68)
实验 20 超氧化物歧化酶的分离提取及比活性测定	(72)
实验 21 维生素 C 的定量测定 (2, 6—二氯酚靛酚滴定法)	(76)
实验 22 维生素 A, B ₁ 和 B ₂ 的定性鉴定	(79)
实验 23 Folin - Wu 法测定血液葡萄糖含量	(82)
实验 24 粗脂肪的定量测定	(86)

实验 25	血清中游离脂肪酸的测定	(89)
实验 26	血清胆固醇的测定 (磷硫铁法)	(92)
实验 27	胰岛素对血糖浓度的调节	(95)
实验 28	脂肪酸的 β -氧化	(98)
实验 29	氨基移换反应的定性鉴定	(102)
实验 30	糖酵解中间产物的鉴定	(106)
实验 31	生物氧化与电子传递	(109)
综合实验		
实验 32	蛋白质的提取 (沉淀法) 和定量分析	(112)
实验 33	酶反应的动力学的研究	(114)
实验 34	植物组织中核酸的制备和定量测定	(116)
实验 35	酵母核糖核酸的水解及其产物的鉴定	(118)
实验 36	DNA 的碱基成分分析及含量测定	(119)

第二部分 分子生物学实验

基础实验

实验 37	质粒 DNA 的提取和初步纯化	(122)
实验 38	DNA 浓度和纯度的测定	(126)
实验 39	DNA 的酶切	(130)
实验 40	DNA 片段的连接	(132)
实验 41	DNA 的琼脂糖凝胶电泳	(134)
实验 42	RNA 的变性琼脂糖凝胶电泳	(139)
实验 43	大肠杆菌感受态细胞的制备与转化	(142)
实验 44	转化子的快速鉴定——一步法快速抽提质粒 DNA	(145)
实验 45	聚合酶链式反应 (PCR)	(147)
实验 46	植物总 RNA 的提取	(150)
实验 47	植物基因组 DNA 的提取	(154)
实验 48	银染法测定 DNA 的序列	(158)
实验 49	DNA 杂交	(161)

综合实验

实验 50	基因重组以及外源基因在大肠杆菌中的诱导表达	(165)
实验 51	DNA 连接效率的检测和连接条件的优化	(169)
实验 52	未知基因序列的电子拼接	(171)
实验 53	限制性内切酶酶谱分析	(173)
实验 54	优化条件提高质粒载体的提取产率和质量	(176)

附 录	(178)
附录 1 常用缓冲溶液的配制	(178)
附录 2 常用指示剂	(187)
附录 3 常用参数	(188)
附录 4 常用试剂配制	(202)
附录 5 细菌培养基和抗生素	(204)
附录 6 细菌保存	(206)
主要参考文献	(208)

第一部分 生物化学实验

实验 1 总氮量的测定 微量凯氏 (Micro - Kjeldahl) 定氮法

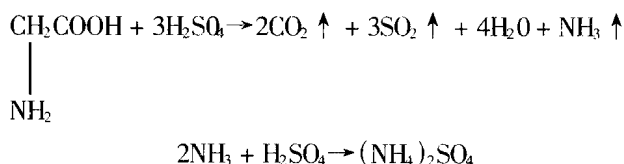
一、目的

1. 学习微量凯氏定氮法的原理
2. 掌握微量凯氏定氮法的操作技术，包括标准硫酸铵含量的测定，未知样品的消化、蒸馏、滴定及其含氮量的计算等。

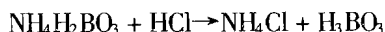
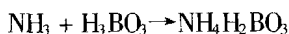
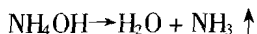
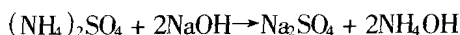
二、原理

凯氏定氮法常用于测定天然有机物（如蛋白质、核酸及氨基酸等）的含氮量。

天然的含氮有机物与浓硫酸共热时，其中的碳、氢二元素被氧化成二氧化碳和水，而氮则变成氨，并进一步与硫酸作用生成硫酸铵。此时程称之为“消化”。这个反应进行得比较缓慢，通常需要加入硫酸钾或硫酸钠以提高反应的沸点，并加入硫酸铜作为催化剂，以促进反应的进行。甘氨酸的消化过程可表示如下：



浓碱可使消化液中的硫酸铵分解，游离出氨，借水蒸汽将产生的氨蒸馏到硼酸溶液中，硼酸吸收氨后，氨与氢离子结合，生成铵离子，使溶液中氢离子浓度降低。然后用标准无机酸滴定，直至恢复溶液中原来氢离子浓度为止，最后根据所用标准酸的当量数（相当于待测物中氨的当量数）计算出待测物中的氮量。



用甲烯蓝和甲基红混合指示剂进行滴定，其指示范围为 pH5.2~5.6，将 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$ 的蓝色滴至原来 H_3BO_3 的蓝紫色即为终点。本法适用范围 0.2~1.0mg 氮。相对误差应小于 2%。

三、材料、试剂与器具

(一) 材料

人的血清或猪的血清

(二) 试剂

1. 浓硫酸（化学纯）
2. 30% 氢氧化钠（分析纯）溶液
3. 0.9% NaCl 溶液
4. 硫酸钾—硫酸铜混合物：硫酸钾与硫酸铜（ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ）以 3 : 1（W/W）的配比混合研磨成粉末。

5. 2% 硼酸

6. 混合指示剂的配制：

方法一：取 50mL 0.1% 甲烯蓝无水醇溶液与 200mL 0.1% 甲基红无水乙醇溶液混合配成，贮于棕色瓶备用，这种指示剂酸性时为紫色，碱性时为绿色，变色范围窄且灵敏。

方法二：0.1% 溴甲酚绿乙醇溶液 10mL 与 0.1% 甲基红乙醇溶液 2mL 混和即成。本指示剂的变色范围为 pH5.2→5.4→5.6

紫红色 灰色 绿色

7. 0.010 0mol/L HCl

8. 硼酸—指示剂混合液：取 100mL 2% 硼酸溶液，滴加 1mL 左右混合指示剂贮备液，摇匀后溶液呈现紫红色即可。

9. 标准硫酸铵溶液（0.3mg 氮/mL）

(三) 器具

1. 凯氏烧瓶
2. 消化架
3. 吸量管（1mL，2mL）
4. 量筒（10mL）
5. 凯氏定氮蒸馏装置

6. 微量滴定管 (3mL、5mL, 可读至 0.02mL)
7. 锥形瓶 (50mL、100mL)
8. 容量瓶 (50mL)

四、操作步骤

(一) 样品的处理

血清样品: 取人血 (或猪血), 放于离心管中, 离心除去凝血块, 上层黄色透明清液即为血清。准确吸取血清 1.0 mL 加入 0.9% NaCl 4.0 mL, 仔细混匀备用。

固体样品: 某一固体样品中的含氮量是 100g 该物质 (干重) 中所含氮的克数来表示 (%)。因此在定氮前, 应将固体样品中的水分除掉。一般样品采用 105℃ 烘干。

在称量瓶中称入一定量的磨碎的样品, 然后置 105℃ 干燥 4 小时。用坩埚将称量瓶放入干燥器内, 待降至室温后称重, 按上述操作继续烘干样品。每干燥 1 小时后, 称量一次, 直到两次称量的数量不变, 即达恒重。

(二) 消化

取 2 个 50mL 的凯氏烧瓶, 向第一个烧瓶内加 2mL 稀释血清溶液 (或 4mL 核酸制品溶液, 或 200mg 固体粉末)。注意, 用吸量管直接将溶液 (或用试管加入固体样品) 加至烧瓶底部, 切勿沾于瓶口或瓶颈上。向 2 号烧瓶加入 2mL 水作空白对照。

在每个烧瓶内加入硫酸钾—硫酸铜混合物约 0.2g, 浓硫酸 3mL, 小瓷片两粒, 摇匀。将烧瓶约 60 度角固定在铁架上, 每个瓶口放一小漏斗, 在通风厨内的电炉上消化。

消化开始时, 应控制火力, 不要使液体冲到瓶颈。待瓶内水汽蒸发完, 硫酸开始分解并放出 SO_2 白烟后, 适当加强火力, 继续消化, 直至消化液呈透明绿色为止。消化完毕, 待烧瓶内容物冷却后, 加蒸馏水 10mL (注意慢加, 边加边摇)。冷却后将瓶内容物转入 50mL 的容量瓶中, 并用蒸馏水洗烧瓶数次, 溶液一并倒入容量瓶, 最后定容至刻度摇匀, 做上记号备用。

(三) 蒸馏

1. 仪器的洗涤: 仪器应先经一般洗涤, 再经水蒸汽洗涤。蒸馏器 (图 1-1) 使用方法如下:

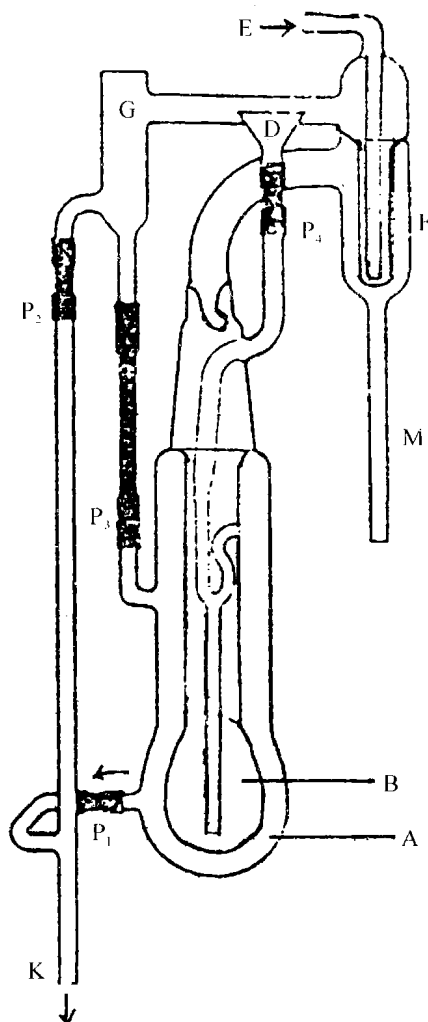


图 1-1 凯氏微量定氮蒸馏装置

开放自来水龙头，使水从 E 进入 G，从 K 管流出（控制水不要从 G 管溢出）。开放 P_3 ，使水进入 A 室，漏斗 D 中加蒸馏水约 10mL 入 B 室。用拇指将管口按紧，同时开放 P_1 ，则 B 室中的水先从 Y 型管口冲出，随后 A 室中水经 K 管流出，一般情况下如此重复洗涤两次即可。若蒸馏器内有氨存在，则应加入蒸馏水后，不加样品蒸馏一次方可使用（可用 pH 试纸检查。）

A 为蒸气发生室， P_3 为其开关， P_1 为出水开关，B 为蒸馏室，与出气室 M 相通，M 管插入盛有定量酸液的锥形瓶，B 室内有 Y 型管，一端与 A 室相通，另一端经 P_4 与漏斗 D 相连，将样品及试剂加入 B 室，F 为指形冷凝管，E 为进水管，水经 F、G、K 而流出，蒸馏时 B 室加入消化好的样品及 NaOH，二

者反应产生氨，氨经 M 管进入锥形瓶中的酸吸收。

2. 滴定标准样品

先用标准硫酸铵溶液试验 2~3 次。蒸馏器洗净后，开放水龙头 P3，使水进入 A 室，水放至 A 室球部即可。

取 3 个 50mL 的锥形瓶，各准确加入 10mL 硼酸（内加有混合指示剂）。用表面皿覆盖备用。

加样：用吸量管吸取 1mL 标准硫酸铵溶液，细心地由漏斗 D 倾入蒸馏室，再用蒸馏水 1mL 清洗漏斗。取一个盛有硼酸—混合指示剂的锥形瓶，置于 M 管下，使管口恰好接触硼酸溶液，用量筒从漏斗 D 加入 30% 氢氧化钠 8mL，随即将 P4 夹紧。并往漏斗加入少量蒸馏水封闭。

蒸馏：用酒精灯加热（应用挡风板将灯围拢，维持火力恒定，沸腾不可高于 Y 管口，以免 A 室溶液从 Y 管倒吸。待第一滴蒸馏液从冷凝柱 F 顶端滴下时起，继续蒸馏 5min，然后将锥形瓶放低，使导管离开液面再蒸 2min，最后用蒸馏水洗导管外壁，蒸馏完毕，取下锥形瓶，随即将蒸馏器洗净。）

3. 样品及空白蒸馏：用吸量管分别吸取 1mL 样品和 1mL 蒸馏水按上述操作步骤进行蒸馏。

4. 滴定：蒸馏完毕，用 0.010 0N 标准盐酸溶液滴定锥形瓶内溶液至淡紫色或灰色，记录所用盐酸的量。

（四）计算

$$\text{样品的总氮含量(克氮\%)} = \frac{(A - B) \times 0.010\ 0 \times 14}{C \times 1\ 000} \times 100$$

若测定的样品（如血清）含氮量部分只是蛋白，则：

$$\text{样品的总蛋白含量(克蛋白\%)} = \frac{(A - B) \times 0.010\ 0 \times 14 \times 6.25}{C \times 1\ 000} \times 100$$

式中：A 为滴定样品用去的盐酸平均 mL 数；B 为滴定空白用去的盐酸平均 mL 数；C 为称量样品的克数；0.010 0 为盐酸的当量浓度（实际上，此项应按实验中使用盐酸的实际浓度填写）；14 为氮的原子量；6.25 为常数（蛋白质的平均含氮量为 16%）。

若样品中除有蛋白外，尚有其他含氮物质，则样品蛋白质含量的测定要更复杂一些。首先需向样品中加入三氯乙酸，使其最终浓度为 5%，然后测定未加三氯乙酸的样品及加入三氯乙酸后的样品的上清液中的含氮量，从而计算出蛋白氮，再进一步算出蛋白质的含量。

$$\text{蛋白氮} = \text{总氮} - \text{非蛋白氮}$$

$$\text{蛋白质含量(克\%)} = \text{蛋白氮} \times 6.25$$

五、注意事项

1. 凯氏法可用于动植物的各种组织、器官及食品等成分复杂样品的测定，只要细心操作都能得到精确的结果。其缺点是操作比较复杂，含有大量碱性氨基酸的蛋白质使测定结果偏高。

2. 普通实验室中的空气中常含有少量的氨，会影响结果，所以操作应在单独洁净的房间中进行，并尽可能快地对硼酸吸收液进行滴定。

六、实验报告

绘画蒸馏装置图，计算待测样品的总氮量和蛋白质含量

七、思考题

1. 正式测定未知样品前为什么要测定标准硫酸铵的含氮量及空白？
2. 写出以下各步的化学反应式：
 - (1) 蛋白质消化
 - (2) 氨的蒸馏
 - (3) 氨的滴定
3. 分析凯氏法结果误差发生的可能原因。

实验 2 醋酸薄膜电泳分离血清蛋白

一、目的

1. 掌握醋酸纤维薄膜电泳的原理及操作
2. 学会用醋酸纤维薄膜电泳分离血清中各种蛋白质组分
3. 定量测定人血清中各种蛋白质的相对百分含量

二、原理

醋酸纤维薄膜电泳是用醋酸纤维薄膜作为支持物的电泳方法。醋酸纤维薄膜由二醋酸纤维素制成，它具有均一泡沫样的结构，厚度仅 120 微米，有强渗透性，对分子移动无阻力，作为区带电泳的支持物进行蛋白质电泳有简便、快速，样品用量少，应用范围广，分离清晰，没有吸附现象等优点。目前已广泛用于血清蛋白质，脂蛋白，血红蛋白，糖蛋白和同功酶的分离及用于免疫电泳中。

蛋白质是两性电解质，在 pH 小于其等电点的溶液中，蛋白质为正离子，在电场中向阴极移动；在 pH 大于其等电点的溶液中，蛋白质为负离子，在电场中向阳极移动。这种现象称为蛋白质电泳。利用这一原理可以分离蛋白质并定量测定。

本实验把血清放在 pH8.6 缓冲溶液湿透的醋酸纤维膜上电泳，血清蛋白在 pH 环境中以不同速度向正极移动，血清蛋白在膜条上分为前后几条平行带，清蛋白跑得快，以后顺序为 $\alpha_1, \alpha_2, \beta, \gamma$ -球蛋白。经固定染色后，呈现蛋白色带。定量测定时，把膜条上各区带剪下，浸于稀碱溶液中，进行比色测定；便可求出各蛋白质的百分数。

三、材料、试剂与器具

(一) 材料

1. 新鲜血清——无溶血现象（稀释 5 倍）。
2. 醋酸纤维素薄膜—— $2 \times 8\text{cm}$ （浙江黄岩曙光化工厂生产）。