

高等农林院校基础生物学系列实验教材

生物化学 实验教程

主编 高玲 刘卫群



 高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

高等农林院校基础生物学系列实验教材

生物化学实验教程

Shengwu Huaxue Shiyān Jiāochéng



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

■ 内容简介

本书较为系统、全面地介绍了农林院校生物化学常用实验方法与技术。全书共分三个部分,第一部分为基础性实验,精选了最能代表生物化学实验课程特点的、最基本的实验方法与技术,使学生掌握相应的基本知识与基本技能,为综合性实验奠定基础;第二部分为综合性实验,是由多种实验手段与技术及多层次的实验内容组成,主要训练学生对所学知识和实验技能的综合运用能力、独立操作能力以及对实验结果的分析能力;第三部分为研究性实验,以培养学生独立科研能力为主要目的。

本书的实验方法严谨可靠、可操作性强,可供高等农林院校农学、园艺、食品、生物工程、动物科学等专业的本、专科学生使用,也可供农林院校生物科学和生物技术等专业的学生使用。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验教程/高玲,刘卫群主编.—北京:高等教育出版社,2010.9(2011重印)

ISBN 978-7-04-030820-4

I. 生… II. ①高… ②刘… 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(2010)第 170835 号

策划编辑 吴雪梅 李光跃

封面设计 张志奇

出版发行 高等教育出版社

社 址 北京市西城区德外大街 4 号

邮政编码 100120

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司

印 刷 北京天来印务有限公司

开 本 787×1092 1/16

印 张 8.25

字 数 200 000

购书热线 010-58581118

咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>

<http://www.hep.com.cn>

网上订购 <http://www.landaco.com>

<http://www.landaco.com.cn>

畅想教育 <http://www.widedu.com>

版 次 2010 年 9 月第 1 版

印 次 2011 年 1 月第 2 次印刷

定 价 14.80 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 30820-00

高等农林院校基础生物学系列 实验教材编委会

主任委员:刘家尧

副主任委员:郭立忠 王 伟 王冬梅

委 员:(以姓氏笔画为序)

王明友 王晶珊 朱 伟

全先庆 刘 新 刘洪庆

初庆刚 咸洪全 高 玲

海利力·库尔班 薛仁镐

穆 平

▶ 前 言

生物化学实验课程是生物化学教学重要的组成部分,通过生化实验技术相关理论的学习和实验技能的训练,培养学生发现问题、分析问题和解决问题等方面能力。进入 21 世纪以来,我国高等教育的发展改革步伐加快,各个高等农林院校的发展规模也逐步扩大,为了充分发挥生物化学作为一门重要的专业基础课在培养学生严谨的科学态度和独立工作方面所起的不可替代的作用,我们数所高等农林院校的相关教师结合多年来的实际教学经验,分工协作,共同编写了这本实验教程。

本教材从基础性实验、综合性实验和研究性实验三个层次进行内容的编排。

基础性实验是精选的最能代表本课程特点的最基本的实验方法与技术,使学生掌握相应的基本知识与基本技能,为综合性实验奠定基础。

综合性实验与基础性实验相比较要复杂些,是由多种实验手段与技术及多层次的实验内容组成,主要训练学生对所学知识和实验技能的综合运用能力、独立操作能力以及对实验结果的分析能力,为研究与创新性实验的进行打好基础。

研究性实验是在学生完成基础性实验、综合性实验的基础上,以本课程为主,与相关专业的知识相联系,由学生自己设计实验方案,撰写研究型课程论文,为毕业论文的开展打下坚实的基础。

为了减少不必要的重复,凡是相同的实验原理、操作步骤等,均集中在一个实验中详细叙述,其余实验仅注明应参阅某个实验。刘卫群、孟凡荣、石永春承担了实验 1、2、3、15 的编写。萧蓓蕾承担实验 36 的编写。高玲承担实验 37 的编写。孙晓红承担实验 13、35、39、40 的编写。王茂广承担实验 21、25、29 的编写。刘刚、刘娜承担实验 8、11、19、24、31、33 的编写。易晓华承担实验 4、17、26 的编写。葛蔚承担实验 14、20 的编写。朱新产承担实验 28 的编写。孙新承担实验 32 的编写。张勇承担实验 16、30、38 的编写。张丽承担实验 22、34 的编写。刘春英承担实验 5、6、7 的编写。张弢承担实验 18、23 的编写。唐超承担实验 9、10、12、27 的编写。

本教程的特点是针对性、目的性、实用性等较强、较具体。所选实验都是参编院校多年实验教学开设过的重复性好、结果明显的实验项目。但由于编者的水平所限,难免会出现错误与不足之处,敬请同行给予指教。

编者

2010年6月30日于青岛

目 录

第一部分 基础性实验

实验 1	双向纸层析法分离氨基酸	2
实验 2	离子交换层析分离氨基酸	5
实验 3	甲醛滴定法测定氨基氮	8
实验 4	谷类作物种子中赖氨酸含量的测定	11
实验 5	双缩脲法测定蛋白质含量	13
实验 6	考马斯亮蓝 G-250 法(Bradford 法)测定蛋白质含量	15
实验 7	紫外吸收法测定蛋白质含量	18
实验 8	蛋白质的等电点测定和沉淀反应	21
实验 9	血清蛋白质醋酸纤维素薄膜电泳	25
实验 10	聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分离蛋白质	28
实验 11	聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳测定蛋白质的等电点	33
实验 12	凝胶过滤分离血红蛋白与硫酸铜	37
实验 13	蛋白质透析法脱盐	41
实验 14	血液葡萄糖含量的测定(Folin-Wu 法)	43
实验 15	醋酸纤维素薄膜电泳分离核苷酸	45
实验 16	单核苷酸的离子交换柱层析分离	47
实验 17	酵母 RNA 的提取(浓盐法)	49
实验 18	酶的基本性质	51
实验 19	脲酶 K_m 值的测定	56
实验 20	转氨酶活性的测定	59
实验 21	乳酸脱氢酶(LDH)同工酶的琼脂糖凝胶电泳	61
实验 22	淀粉酶活力的测定	64
实验 23	丙酮酸含量的测定	67
实验 24	糖酵解中间产物的鉴定	69
实验 25	脂肪酸的 β -氧化	72

实验 26	维生素 C 的定量测定(2,6 - 二氯酚靛酚滴定法)	75
实验 27	血清钙的测定	78

第二部分 综合性实验

实验 28	直链淀粉和支链淀粉含量的测定	82
实验 29	小麦萌发前后淀粉酶活力的比较	85
实验 30	发酵过程中无机磷的利用	88
实验 31	PCR 扩增小麦管家基因 <i>Tubulin</i>	90
实验 32	高等植物材料丙酮粉的制备	92
实验 33	植物基因组 DNA 提取(CTAB 法)	94
实验 34	细胞色素 c 的制备及测定	96
实验 35	SOD 提取及活力测定	99
实验 36	SOD 的聚丙烯酰胺凝胶电泳	103
实验 37	聚丙烯酰胺凝胶电泳分离过氧化物酶(POD)同工酶	105
实验 38	SDS - PAGE 测定蛋白质相对分子质量	108

第三部分 研究性实验

实验 39	果实菠萝蛋白酶的动力学测定	112
实验 40	鸡卵黏蛋白的纯化及分析测定	116
参考文献		121

第一部分

基础性实验

实验 I

双向纸层析法分离氨基酸

一、目的

1. 学习双向纸层析的原理。
2. 掌握纸层析法分离混合氨基酸的操作方法。

二、原理

纸层析是以滤纸作为支持物,用一定的溶剂系统展开,使混合样品达到分离分析的层析方法。其一般操作是将样品溶解在适当溶剂中,在滤纸的一端点样;再选用适当的溶剂系统,从点样端通过毛细现象向另一端展开,展开完毕,取出滤纸晾干或烘干,再以适当的显色剂或紫外灯、荧光灯下观察其图谱。样品经展开后某一物质在纸层析谱上的位置常用迁移率 R_f 来表示。

$$R_f = \frac{\text{原点至纸层析斑点中心点的距离}}{\text{原点至溶剂前沿的距离}}$$

纸层析可看作是溶质(样品)在固定相与流动相之间的连续抽提,由于溶质在两相之间的分配系数不同而达到分离。一定的物质在两相间有固定的分配系数,因而在恒定条件(溶剂、pH、温度)下,各物质有固定的 R_f 值,据此可达到分析鉴定的目的。

由于滤纸纤维可吸收 20% ~ 25% 的水分,且其中 6% ~ 7% 以氢键形式与纤维素上羟基结合,一般条件下难脱去,所以纸层析实际上是以吸附的水层作固定相,展开的溶剂作流动相。

纸层析操作按溶剂展开方向可分为上行、下行和径向三种。氨基酸分离一般用上行法。上行法又分单向(成分较为简单的样品)和双向(单向时斑点重叠分离不开,于是在其垂直方向用另一种溶剂系统展层)。双向层析谱可分辨十几种以上的样品。

层析溶剂要求:

- (1) 被分离物质在该溶剂系统中 R_f 在 0.05 ~ 0.8 之间,各组分的 R_f 值相差最好能大于 0.05,以免斑点重叠。
- (2) 溶剂系统中任一组分与被分离物之间不能起化学反应。
- (3) 被分离物质在溶剂系统中的分配较恒定,不随温度而变化,且易迅速达到平衡,这样所得斑点较圆整。

本实验采用 8 种混合氨基酸为样品,用酸性和碱性两种溶剂进行双向层析,以茚三酮为显色剂,可获得分离清晰的层析图谱,如图 1-1 所示。

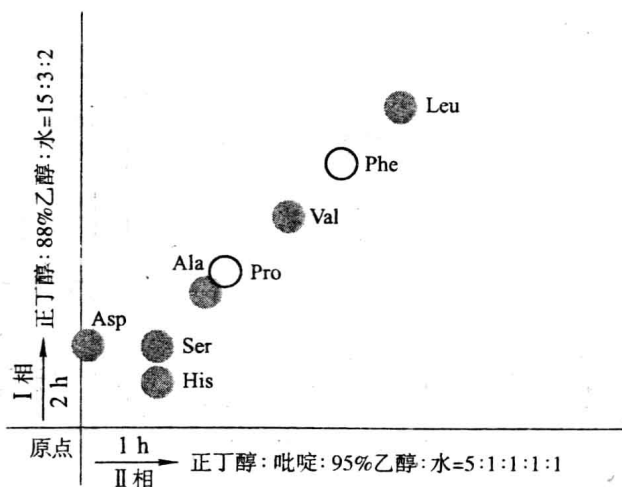


图 1-1 8 种混合氨基酸双向层析图谱

三、器材与试剂

1. 器材

层析缸 25 cm × 40 cm (×2); 培养皿 15 cm (×2); 喷雾器; 毛细管 (内径 0.1 cm); 吹风机; 烘箱; 层析滤纸 12 cm × 12 cm; 铅笔; 尺。

2. 试剂

- (1) 0.1% 茚三酮丙酮溶液。
- (2) 第一相 正丁醇:88%甲酸:水 = 15:3:2 (V/V)。
- (3) 第二相 正丁醇:吡啶:95%乙醇:水 = 5:1:1:1 (V/V)。
- (4) 标准氨基酸混合溶液 亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、组氨酸和丝氨酸各 100 mg 溶于 50 mL 0.01 mol/L HCl 中。

四、操作步骤

1. 点样

取层析滤纸一张 (12 cm × 12 cm), 在距纸边 1.2 cm 处划一基线; 再将纸转 90°, 距纸边 1.2 cm 处作一垂线。以毛细管吸取混合氨基酸溶液, 点于二线交点处 (图 1-2), 点的直径控制在 2 mm 左右, 不可过大。待样品干燥后再点一次。滤纸上点样斑点干燥后, 把滤纸用棉线垂直悬挂于层析缸中, 不可令滤纸边缘碰到层析缸壁。

2. 展层

在层析缸中平稳地放入装有第一相层析溶剂的培养皿。将滤纸放入, 点样端接触溶剂, 以点样处不浸入溶剂为准。待溶剂自下而上均匀展开, 约 2 h 后溶剂到达距纸边 0.5 cm 处取出滤纸, 悬挂于室温中, 用电吹风充分吹尽溶剂。然后裁去不含溶剂的滤纸边缘, 将滤纸转 90°, 如前放入盛有第二相溶剂的层析缸内展层 (操作同上, 图 1-2), 约 1 h 后溶剂展开到

距纸边 0.5 cm 时取出,用电吹风将滤纸吹干。

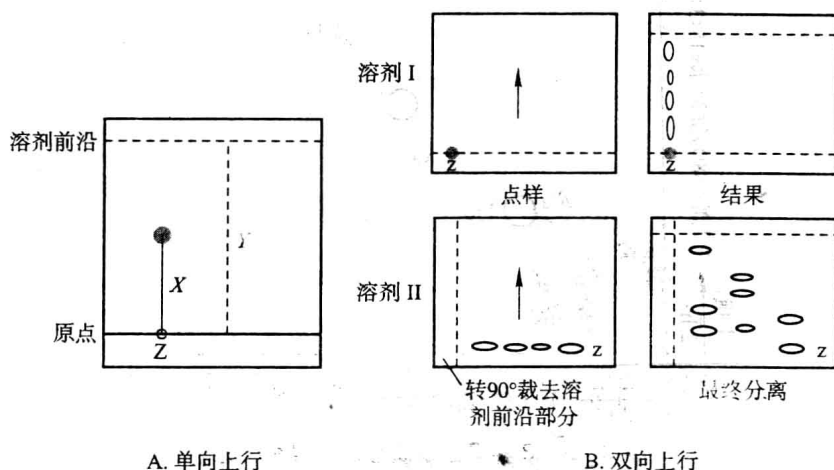


图 1-2 纸层析点样、展层示意图

(X, Y 分别为原点至斑点中心和溶剂前沿的距离, Z 为点样原点)

3. 显色

用喷雾器将 0.1% 茚三酮丙酮溶液均匀地喷在滤纸上,然后悬滤纸于 65 °C 烘箱内,烘 30 min,即可看到紫红色氨基酸斑点,将图谱上的斑点用铅笔圈出。用直尺量出各斑点中心与原点的距离以及溶剂前沿与原点的距离,求出各氨基酸的 R_f 值。将各显色斑点的 R_f 值与标准氨基酸的 R_f 值比较,可得知该斑点的准确成分。

五、注意事项

1. 烘箱加热温度不可过高,且不可有氨的干扰,否则图谱背景会泛红。
2. 第一相溶剂最好在使用前再按比例混合,否则会引起酯化,影响层析效果。
3. 整个实验操作应戴手套进行。

六、思考题

1. 酸性与碱性溶剂系统对氨基酸极性基团的解离各有何影响?
2. 为什么展层时要使用两种溶剂系统?

实验 2

离子交换层析分离氨基酸

一、目的

1. 熟悉离子交换层析技术的基本原理和方法。
2. 掌握离子交换层析分离氨基酸的基本原理和操作技术。

二、原理

离子交换树脂是一种合成的高聚物,不溶于水,能吸水膨胀。高聚物分子由能电离的极性基团及非极性的树脂组成。极性基团上的离子能与溶液中的离子起交换作用,而非极性的树脂本身物性不变,通常离子交换树脂按所带的基团可分为强酸($-R-SO_3H$)、弱酸($-COOH$)、强碱($-N^+-R_3$)和弱碱($-NH_2, -NHR, -NR_2$)。离子交换层析法主要是根据物质的解离性质的差异而选用不同的离子交换剂进行分离的方法。

氨基酸是两性电解质,有一定的等电点,在溶液 pH 小于其 pI 值时带正电,大于其 pI 时带负电。故在一定的 pH 条件下,各种氨基酸的带电情况不同,与离子交换剂上的交换基团的亲和力亦不同,因此可依据亲和力从小到大的顺序被洗脱液洗脱下来,达到分离的目的,最后利用氨基酸可与茚三酮反应生成有色化合物进行氨基酸鉴定。

三、器材与试剂

1. 器材

层析柱;恒流泵;梯度混合器;部分收集器;紫外分光光度计;磺酸型阳离子交换树脂(Dowex 50)。

2. 试剂

- (1) 2 mol/L HCl 溶液。
- (2) 0.1 mol/L HCl 溶液。
- (3) 2 mol/L NaOH 溶液。
- (4) 0.1 mol/L NaOH 溶液。
- (5) 0.06 mol/L pH 4.2 柠檬酸缓冲液。
- (6) 氨基酸混合液 Gly、Asp、His 各 10 mg 溶于 30 mL 0.06 mol/L pH 4.2 柠檬酸钠缓冲液中。
- (7) 0.2% 中性茚三酮溶液。
- (8) pH 5 醋酸缓冲液 0.2 mol/L NaAc 70 mL 加 0.2 mol/L HAc 30 mL。

四、操作步骤

1. 树脂的处理

将干的强酸型树脂用蒸馏水浸泡过夜,使之溶胀充分。用4倍体积的2 mol/L HCl 搅拌2 h,倾去酸液,用蒸馏水洗涤树脂至中性。再用2 mol/L NaOH 溶液处理,倾弃碱液,用蒸馏水洗涤至中性。最后树脂悬浮于pH 4.2 柠檬酸缓冲液中备用。

2. 装柱

取直径1 cm,长度10~12 cm 的层析柱,将柱垂直置于铁架上。关闭层析柱出口,自顶部注入上述处理好的树脂悬浮液,待树脂沉降后,打开柱出口放出过量溶液,再加入一些树脂,至树脂沉积面离层析柱上缘约3 cm 时停止。于柱子顶部继续加入pH 4.2 柠檬酸缓冲液洗涤,使流出液pH 为4.2 为止,关闭柱子出口,保持液面高出树脂表面1 cm 左右。

3. 加样、洗脱及洗脱液收集

打出口使缓冲液流出,待液面几乎平齐树脂表面时关闭出口(不可使树脂表面干燥)。用长滴管将15滴氨基酸混合液仔细地直接加到树脂顶部,打出口使其缓慢流入柱内。当液面刚平树脂表面时,加入0.1 mol/L HCl 3 mL,以10~12滴/min 的流速洗脱,收集洗脱液,每管20滴,逐管收存。当HCl 液面刚平树脂表面时,用1 mL pH 4.2 柠檬酸缓冲液冲洗柱壁一次,接着用2 mL pH 4.2 柠檬酸缓冲液洗脱,保持流速10~12滴/min 并注意勿使树脂表面干燥。

在收集洗脱液的过程中,逐管用茚三酮检验氨基酸的洗脱情况,方法是:于各管洗脱液中加10滴pH 5 醋酸缓冲液和10滴0.2% 中性茚三酮溶液,沸水浴中煮10 min,如溶液呈紫蓝色,表示已有氨基酸洗脱下来。显色的深度可代表洗脱的氨基酸浓度,可比色测定。

在用pH 4.2 柠檬酸缓冲液把第二个氨基酸洗脱出来之后,再收集两管茚三酮反应阴性部分,关闭层析柱出口,将树脂顶部剩余的pH 4.2 柠檬酸缓冲液移去。于树脂顶部加入2 mL 0.1 mol/L NaOH 溶液,打出口使其缓慢流入柱内,按上面操作方法继续用0.1 mol/L NaOH 溶液洗脱并逐管收集(注意仍然保持流速10~12滴/min),每管20滴。做洗脱液中氨基酸检验,在第三个氨基酸用0.1 mol/L NaOH 溶液洗脱下来之后,再继续收集两管茚三酮反应阴性部分。

4. 树脂的再生和回收

用0.1 mol/L NaOH 溶液洗脱层析柱10 min;拔去橡皮接收管,用洗耳球对着玻璃流出口将树脂吹入装树脂的小瓶内,加入0.1 mol/L NaOH 溶液浸泡。

五、结果分析

以洗脱液管号为横坐标,以洗脱液各管光吸收值(以水作空白,在570 nm 波长读取吸光度)或颜色深浅(以-, ±, +, ++... 表示)为纵坐标作图,即可画出一条洗脱曲线;根据氨基酸的解离性质,分析该实验条件下各氨基酸从层析柱洗脱下来的顺序,确定各峰为何种氨基酸。

六、注意事项

1. 在装柱时必须防止气泡、分层及交换柱液面在树脂表面以下等现象发生。
2. 洗脱过程中一直保持恒定流速,并注意勿使树脂表面干燥。

七、思考题

1. 为什么混合氨基酸从磺酸型阳离子交换树脂上逐个洗脱下来?
2. 为什么洗脱过程中树脂表面不能干燥?

实验 3

甲醛滴定法测定氨基氮

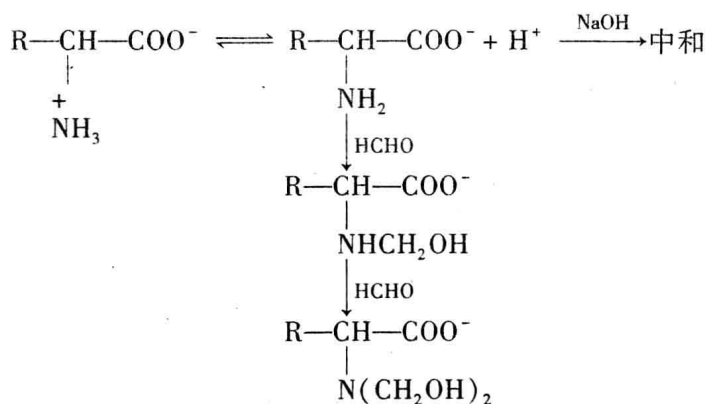
一、目的

初步掌握甲醛滴定法测定氨基氮含量的原理和操作要点。

二、原理

氨基酸是两性电解质,在水溶液中 $-\text{NH}_3^+$ 是弱酸,完全解离时 pH 为 11~12 或更高,超过酚酞的变色范围 (pH 8~10),因此不能用普通碱滴定法来测定氨基酸的氨基。

常温下,甲醛能迅速与氨基酸的氨基结合,生成羟甲基化合物,使平衡右移,促使 $-\text{NH}_3^+$ 释放 H^+ ,滴定中和终点移至酚酞的变色域内。因此可用酚酞作指示剂,用标准氢氧化钠溶液滴定。



甲醛滴定法可直接算出已知氨基酸的氨基氮含量,但不能对混合氨基酸样品的氨基氮进行准确定量。此法简便快速,有时也用于蛋白质水解程度的测定。

三、器材与试剂

1. 器材

25 mL 锥形瓶;50 mL 锥形瓶;容量瓶;3 mL 微量滴定管;吸管;研钵。

2. 试剂

- (1) 0.05 mol/L 标准甘氨酸溶液。
- (2) 0.02 mol/L 标准氢氧化钠溶液。
- (3) 酚酞指示剂 0.5% 酚酞乙醇溶液。
- (4) 甲醛溶液。

(5) 未知浓度的甘氨酸溶液。

四、操作步骤

1. 制备样品 称取鲜绿豆芽 5 g, 在研钵中研磨成匀浆, 用滤纸过滤后定容至 50 mL。

2. 取 3 个 25 mL 的锥形瓶, 编号。向 1、2 号瓶内加入 7 mL 水, 向 2、3 号瓶内各加入 0.05 mol/L 标准甘氨酸溶液 2 mL 和水 5 mL, 混匀。然后向三个瓶中各加入 5 滴酚酞指示剂, 混匀后各加 2 mL 甲醛溶液再混匀, 分别用 0.02 mol/L 标准氢氧化钠溶液滴定至溶液显微红色。

重复以上实验两次, 记录每次每瓶消耗的标准氢氧化钠溶液的毫升数。取平均值, 计算甘氨酸氨基氮的回收率。

3. 取未知浓度的甘氨酸溶液 2 mL, 依上述方法进行测定, 平行做几份, 取平均值。计算每毫升甘氨酸溶液中含有氨基氮的毫克数。

4. 取制备的豆芽样品溶液 2 mL, 依上述方法进行测定, 平行做几份, 取平均值。计算每毫升豆芽溶液中氨基氮的毫克数。

若按照两次重复本实验, 加样情况如下表所示。

瓶号	0.05 mol/L 甘氨酸	未知浓度 甘氨酸	豆芽 制品	H ₂ O	甲醛	酚酞	消耗 NaOH 的体积
1	—	—	—	7 mL	2 mL	5 滴	V ₁
2	2 mL	—	—	5 mL	2 mL	5 滴	V ₂
3	2 mL	—	—	5 mL	2 mL	5 滴	V ₃
4	—	2 mL	—	5 mL	2 mL	5 滴	V ₄
5	—	2 mL	—	5 mL	2 mL	5 滴	V ₅
6	—	—	2 mL	5 mL	2 mL	5 滴	V ₆
7	—	—	2 mL	5 mL	2 mL	5 滴	V ₇

五、结果分析

1. 回收率计算:

$$\begin{aligned} \text{甘氨酸氨基氮回收率}\% &= \frac{\text{实际测得量}}{\text{理论加入量}} \times 100 \\ &= \frac{((V_2 + V_3)/2 - V_1) \times M_{\text{NaOH}} \times 14.008}{2 \text{ mL} \times 0.05 \text{ mol/L} \times 14.008} \times 100 \end{aligned}$$

2. 未知浓度的甘氨酸溶液氨基氮计算:

$$\text{氨基氮}(\text{mg/mL}) = \frac{((V_4 + V_5)/2 - V_1) \times M_{\text{NaOH}} \times 14.008}{2}$$

3. 豆芽中氨基氮含量计算:

$$\text{氨基氮}(\text{mg/g}) = \frac{((V_6 + V_7)/2 - V_1) \times M_{\text{NaOH}} \times 14.008 \times \text{样液总体积}(\text{mL})}{2 \text{ mL} \times \text{样品鲜重}(\text{g})}$$