

生物工程实验 技术手册

栾雨时 包永明 主编



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

生物工程实验技术手册

栾雨时 包永明 主编



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

· 北 京 ·

(京)新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

生物工程实验技术手册/栾雨时, 包永明主编. —北京:
化学工业出版社, 2005.6

ISBN 7-5025-7282-1

I. 生… II. ①栾…②包… III. 工程-实验-技术手册
IV. TB-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 063218 号

生物工程实验技术手册

栾雨时 包永明 主编

责任编辑: 董琳 管德存

文字编辑: 陈曦

责任校对: 洪雅姝

封面设计: 关飞

*

化学工业出版社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010) 64982530

(010) 64918013

购书传真: (010) 64982630

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

*

新华书店北京发行所经销

北京云浩印刷有限责任公司印刷

三河市东柳装订厂装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 31¼ 字数 862 千字

2005 年 8 月第 1 版 2005 年 8 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-7282-1

定 价: 80.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

前 言

生命科学是一门前沿学科，研究进展日新月异；生命科学也是一门交叉学科，与其他学科的交叉不断推动理论研究的突破；生命科学更是一门实验学科，在研究技术、方法及应用方面，既有经典的精细，又有现代的高效。

生物工程作为生命科学技术应用的体现，涵盖了生命科学基础学科实验及研究方法、应用领域的工业化技术。鉴于此，编写了这本《生物工程实验技术手册》，旨在满足生物技术领域从事教学及科研的教师、本科生、研究生及研究人员的工作、学习需要。

本书选取了生物化学、微生物学、分子生物学、细胞生物学及生物工程应用学科中有代表性的实验方法、研究技术，结合科研教学实践，进行了详细的比较、论述，给出的实验方案、技术路线只是作为参考，目的是培养读者的主观能动性，有利于设计实验能力及综合能力的培养；同时为了便于读者进行实验操作及查阅相关资料，将一些常用试剂、缓冲液等的配制方法，常用数据、网站地址等在附录部分列出，内容选择突出实用性和代表性。

参加本书编写工作的有大连理工大学包永明、高晓蓉、金礼吉、栾雨时、苏乔、谢健、夏秀英、杨君、袁文杰。由于作者水平及查阅的资料有限，在实验内容选择、实验技术及实验方法叙述方面定会有不足和疏漏之处，恳请读者批评指正。

编者

2005 年 5 月

内 容 提 要

本书对生物工程实验中涉及的实验技术、反应原理、流程安排等问题进行了较为详细的阐述。全书共分为6章,内容包括生物化学实验、微生物学实验、分子生物学实验、细胞生物学实验、生物工程(技术)专业综合实验和附录。书中在介绍不同的实验技术时,选取了各学科中有代表性的实验方法和研究技术,并结合科研、教学实践进行了比较和分析;附录还列出了一些常用试剂、缓冲溶液等的配制方法及一些常用数据和缩略语等,具有很强的实用性。

本书可供生物工程及相关领域本科生、研究生及研究人员进行学习和参考。

目 录

1 生物化学实验	1
1.1 糖的定性及定量分析	1
1.2 蛋白质定量分析	7
1.3 核酸的提取及定量分析	16
1.4 电泳技术	23
1.5 色谱技术	35
1.6 酶促反应动力学	81
1.7 酶联免疫吸附测定	89
参考文献	93
2 微生物学实验	95
2.1 培养基的配制与灭菌	95
2.2 显微镜的构造、使用及微生物大小与数量的测定	103
2.3 微生物菌落形态的识别及霉菌、放线菌形态观察	112
2.4 细菌的简单染色和革兰染色	117
2.5 细菌的生理生化实验	119
2.6 微生物菌种的分离与筛选	122
2.7 噬菌体的分离与纯化	128
2.8 微生物的诱变育种	129
2.9 酵母菌单倍体原生质体融合	133
2.10 微生物菌种的鉴定	134
2.11 细菌总数及大肠菌群检验	143
2.12 菌种保藏法	148
参考文献	154
3 分子生物学实验	155
3.1 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	155
3.2 质粒 DNA 的提取与检测	157
3.3 大肠杆菌感受态细胞的制备及质粒转化和检测	162
3.4 植物和动物总基因组 DNA 的提取	164
3.5 限制性内切酶的酶切反应	169
3.6 聚合酶链式反应	173
3.7 重组 DNA 分子的构建、筛选和鉴定	177
3.8 农杆菌叶盘法转化植物	184
3.9 外源基因转染动物细胞	191
3.10 Southern 杂交	193

3.11	植物和动物总 RNA 的提取及 Northern 杂交	198
3.12	蛋白质的提取和 Western 杂交	201
	参考文献	205
4	细胞生物学实验	206
4.1	细胞形态结构的显微镜观察	206
4.2	细胞骨架观察	216
4.3	显微摄影	224
4.4	动物细胞培养技术	239
4.5	染色体制备与 C 带染色	256
4.6	植物组织培养	263
4.7	杂交瘤技术	284
4.8	肿瘤治疗药物诱导细胞凋亡	290
4.9	免疫组织化学技术	295
4.10	流式细胞技术	300
	参考文献	305
5	生物工程(技术)专业综合实验	308
5.1	酒精发酵	308
5.2	柠檬酸发酵	312
5.3	青霉素发酵	335
5.4	生物碱的提取和鉴定	341
5.5	基因工程重组蛋白质的表达及分离纯化	358
	参考文献	361
6	附录	363
6.1	实验室安全及防护知识	363
6.2	常用培养基配制	381
6.3	常用抗生素的配制与使用	396
6.4	常用试剂的配制与保存	398
6.5	常用数据表	425
6.6	化学试剂的分类及用途	449
6.7	常用指示剂的配制与变色范围	454
6.8	浓度的表示方法及单位换算	457
6.9	生物学常用软件及数据库	458
6.10	基因工程常用载体	470
6.11	常用限制性核酸内切酶	486
6.12	大肠杆菌主要基因型	489
6.13	实验动物常用的生物学数据	490
6.14	常用荧光探针	491
6.15	常用动物细胞系	492
6.16	常用正交设计表	493
6.17	常用缩略语	495

1 生物化学实验

1.1 糖的定性及定量分析

1.1.1 概述

糖包括单糖、寡糖和多糖，是维持细胞生命和支持细胞生长的能源和碳源物，不仅是生物的结构物质、能源物质、生命物质的碳架物质，而且参与生命过程的生物信号传导。

1.1.1.1 糖的定性分析

(1) Molish 反应 (α -萘酚反应) Molish 反应是鉴定糖类最常用的颜色反应。糖在浓酸作用下形成的糠醛及衍生物与 α -萘酚作用，形成红紫色复合物，在糖溶液和浓硫酸液面间出现紫环，因此又称紫环反应。自由存在和结合存在的糖均呈阳性反应，各种糠醛衍生物、丙酮、甲酸、乳酸等都有颜色近似的阳性反应。因而，阴性反应证明没有糖类物质的存在；而阳性反应说明有糖类存在的可能性，需要进一步通过其他定性方法确定糖的存在。

(2) 蒽酮反应 糖经浓酸水解、脱水生成的糠醛及衍生物与蒽酮 (10-酮-9,10-二氢酮) 反应生成蓝绿色复合物。

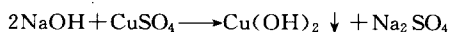
(3) Seliwanoff 反应 (间苯二酚反应) 此反应是鉴定酮糖的特殊反应。在酸作用下，己酮糖脱水生成羟甲基糠醛，与间苯二酚结合生成鲜红色化合物，反应迅速；相同条件下，醛糖生成羟甲基糠醛速度较慢，只有高浓度、长时间煮沸时，才有微弱的阳性反应。

(4) Bial 反应 (3,5-二羟基甲苯反应) 戊糖与浓盐酸加热形成糠醛，在有 Fe^{3+} 存在条件下，与 3,5-二羟基甲苯 (地衣酚) 发生缩合反应，形成深蓝色的沉淀物；沉淀物溶于正丁醇。己糖也能发生此反应，产生灰绿色至棕色的沉淀物。

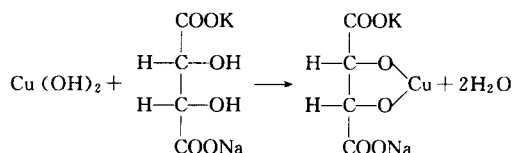
(5) 还原糖鉴定 有自由醛基和 (或) 酮基的单糖和二糖为还原糖。在碱性溶液中，还原糖能将金属离子还原，本身被氧化成酸类化合物，这一性质常用于检验糖的还原性及进行定量分析。

1.1.1.2 糖的定量分析

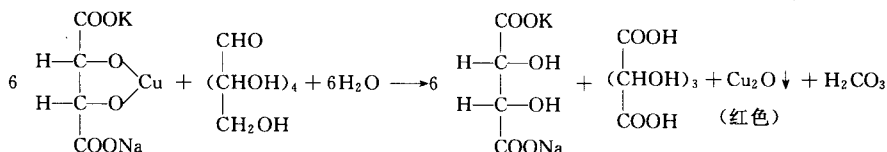
(1) 费林滴定法 将一定量的碱性酒石酸铜甲液和乙液等体积混合时，硫酸铜与氢氧化钠反应，生成氢氧化铜沉淀：



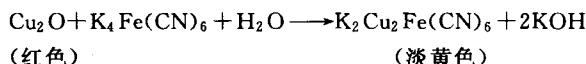
所生成的氢氧化铜沉淀与酒石酸钾钠反应，生成可溶性的酒石酸钾钠铜：



在加热条件下用样液滴定，样液中的还原糖与酒石酸钾钠铜反应，酒石酸钾钠铜被还原糖还原，产生红色氧化亚铜沉淀，还原糖则被氧化和降解，其反应如下：

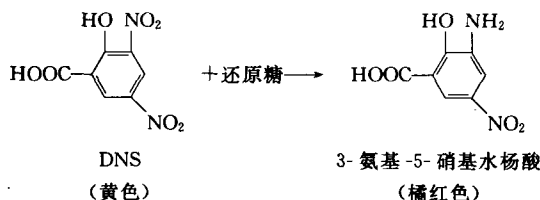


反应生成的氧化亚铜沉淀与费林试剂中的亚铁氰化钾（黄血盐）反应生成可溶性复盐，便于观察滴定终点。

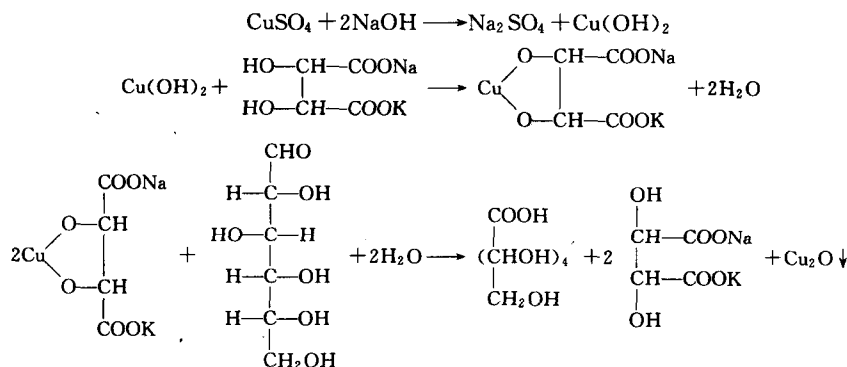


滴定时以亚甲基蓝为氧化-还原指示剂。因为亚甲基蓝氧化能力比二价铜弱，待二价铜离子全部被还原后，稍过量的还原糖可使蓝色的氧化型亚甲基蓝还原为无色的还原型的亚甲基蓝，即表示达到滴定终点；根据样液量可计算出还原糖含量。

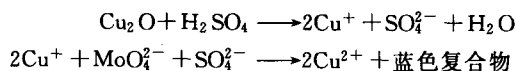
(2) 3,5-二硝基水杨酸比色法 在 NaOH 和丙三醇存在下, 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 与还原糖共热后被还原生成氨基化合物。在过量的 NaOH 碱性溶液中此化合物呈橘红色, 在 540nm 波长处有最大吸收。在一定的浓度范围内, 还原糖的量与光吸收值呈线性关系, 利用比色法可测定样品中的含糖量。



(3) 砷钼酸比色法 还原糖在碱性条件及有酒石酸钾钠存在条件下加热，可以定量地还原二价铜离子为一价铜离子，产生砖红色的氧化亚铜沉淀，其本身被氧化。具体反应如下：



氧化亚铜在酸性条件下可将钼酸铵还原，还原型的钼酸铵再与磷酸氢二钠作用，生成一种蓝色复合物——砷钼蓝，其颜色深浅在一定范围内与还原糖的含量（即被还原的 Cu_2O 量）成正比，用标准葡萄糖与砷钼酸作用，比色后作为标准，即可测得样品中还原糖的含量。



(4) 硫酸蒽酮比色法 硫酸蒽酮法是测定多糖含量较为常用的方法。其原理为多糖类在浓硫酸作用下先水解为单糖分子,并迅速脱水生成糠醛衍生物,糠醛衍生物再与蒽酮结合成有色络合物,以比色法在适当波长下即可测定多糖含量。生成的有色络合物不论游离形式还是存在于多糖中,都呈现蓝绿色,620nm处有最大光吸收。可用来测定己糖、戊醛糖、己糖醛酸等。该方法迅速、方便,但不宜用于含大量色氨酸的蛋白质测试样品。该反应不稳定。

1.1.2 实验目的

掌握还原糖和总糖的测定原理，学习测定还原糖、总糖的方法。

1.1.3 实验方法

1.1.3.1 费林滴定法

(1) 实验用品

① 样品 新鲜植物样品或烘干粉碎过的植物样品（山芋粉）。

② 试剂

a. 碱性酒石酸铜甲液 称取 15g 五水硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 及 0.05g 亚甲基蓝，溶于蒸馏水中并稀释到 1000mL。

b. 碱性酒石酸铜乙液 称取 50g 酒石酸钾钠及 75g NaOH，溶于蒸馏水中，再加入 4g 亚铁氰化钾 [$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$]，待完全溶解后，用蒸馏水稀释到 1000mL，贮存于具橡皮塞的玻璃瓶中。

c. 0.1%葡萄糖标准溶液 准确称取 1g 经 98~100℃干燥至恒重的无水葡萄糖，加蒸馏水溶解后移入 1000mL 容量瓶中，加入 5mL 浓 HCl（防止微生物生长），用蒸馏水稀释到 1000mL。

d. 6mol/L HCl 取 250mL 浓 HCl (35%~38%)，用蒸馏水稀释到 500mL。

e. 碘-碘化钾溶液 称取 5g 碘、10g 碘化钾溶于 100mL 蒸馏水中。

f. 6mol/L NaOH 称取 120g NaOH 溶于 500mL 蒸馏水中。

g. 0.1%酚酞指示剂。

③ 器材 电热恒温水浴锅，调温电炉，250mL 锥形瓶，滴定管，756 分光光度计，分析天平（感量 0.0001g），具塞刻度试管，刻度吸管，容量瓶，研钵，离心机。

(2) 实验步骤

① 样品中还原糖的提取 准确称取 2g 山芋粉放在 100mL 烧杯中，先以少量蒸馏水调成糊状，然后加入 50mL 蒸馏水，混匀，于 50℃恒温水浴中保温 20min，不时搅拌，将还原糖浸出。将溶液过滤后全部收集在 100mL 的容量瓶中，用蒸馏水定容至刻度，即为还原糖提取液。

② 样品中总糖的水解及提取 准确称取 1g 山芋粉放在锥形瓶中，加入 6mol/L HCl 10mL、蒸馏水 15mL，在沸水浴中加热 0.5h，取出 1~2 滴置于白瓷板上，加 1 滴 I-KI 溶液检查水解是否完全。如已水解完全，则不呈现蓝色。水解完毕冷却至室温，加入 1 滴酚酞指示剂，以 6mol/L NaOH 溶液中和至溶液呈微红色，并定容到 100mL，过滤，取滤液 10mL 于 100mL 容量瓶中，定容混匀，即为稀释 1000 倍的总糖水解液，用于总糖测定。

③ 碱性酒石酸铜溶液的标定 准确吸取碱性酒石酸铜甲液和碱性酒石酸铜乙液各 5mL，置于 250mL 锥形瓶中，加蒸馏水 10mL，加玻璃珠 3 粒。从滴定管滴加约 9mL 葡萄糖标准溶液，加热使其在 2min 内沸腾，准确沸腾 30s，趁热以每 2s 1 滴的速度继续滴加葡萄糖标准溶液，直至溶液蓝色刚好褪去为止（终点）。记录消耗葡萄糖标准溶液的总体积。平行操作 3 次，取其平均值，按下式计算：

$$F = CV$$

式中， F 表示 10mL 碱性酒石酸铜溶液对应的葡萄糖的量，mg； C 表示葡萄糖标准溶液的浓度，mg/mL； V 表示标定时消耗葡萄糖标准溶液的总体积，mL。

④ 样品糖的定量测定

a. 样品溶液预测定 吸取碱性酒石酸铜甲液及乙液各 5mL，置于 250mL 锥形瓶中，加 10mL 蒸馏水，加玻璃珠 3 粒，加热使其在 2min 内沸腾，准确沸腾 30s，趁热以先快后慢的速度从滴定管中滴加样品溶液，滴定时要保持溶液呈沸腾状态。待溶液由蓝色变浅时，以每 2s 1 滴的速度滴定，直至溶液的蓝色刚好褪去为止（终点）。记录样品溶液消耗的体积。

b. 样品溶液测定 吸取碱性酒石酸铜甲液及碱性酒石酸铜乙液各 5mL, 置于锥形瓶中, 加 10mL 蒸馏水, 加 3 粒玻璃珠, 从滴定管中加入比与测试样品溶液消耗的总体积小 1mL 的样品溶液, 加热使其在 2min 内沸腾, 准确沸腾 30s, 趁热以每 2s 1 滴的速度继续滴加样液, 直至蓝色刚好褪去为终点。记录消耗样品溶液的总体积。平行操作 3 次, 取其平均值。

(3) 试验数据处理

$$\text{还原糖含量(以葡萄糖计, \%)} = \frac{FV_1}{1000mV} \times 100\%$$

$$\text{总糖含量(以葡萄糖计, \%)} = \frac{FV_1}{1000mV} \times 100\%$$

式中, m 表示样品质量, g; F 表示 10mL 碱性酒石酸铜溶液相当于葡萄糖的量, mg; V 表示标定时平均消耗还原糖或总糖样品溶液的总体积, mL; V_1 表示还原糖或总糖样品溶液的总体积, mL; 1000 表示 mg 换算成 g 的系数。

(4) 注意事项

① 本法是根据一定量的碱性酒石酸铜溶液 (Cu^{2+} 量固定) 消耗的样液量来计算样液中还原糖的含量, 反应体系中 Cu^{2+} 的含量是定量的基础。所以在样品处理时, 不能用铜盐作为澄清剂, 以免在样液中引入 Cu^{2+} , 得到错误的结果。

② 碱性酒石酸铜甲液和乙液应分别贮存, 用时才混合。否则酒石酸钾钠铜络合物长期在碱性条件下会慢慢分解析出氧化亚铜沉淀, 使试剂有效浓度降低。

③ 滴定必须是在沸腾条件下进行。其原因一是加快还原糖与 Cu^{2+} 的反应速度; 二是亚甲基蓝的变色反应是可逆的, 还原型的亚甲基蓝遇空气中的氧时会再被氧化为氧化型。此外氧化亚铜也极不稳定, 易被空气中的氧所氧化。保持反应液沸腾可防止空气进入, 避免亚甲基蓝和氧化亚铜被氧化而增加滴定液消耗量。

④ 滴定时不能随意摇动锥形瓶, 更不能把锥形瓶从热源上取下来滴定, 以防止空气进入反应溶液中。

⑤ 样品溶液应先进行预测定。其目的之一是本法对样品溶液中还原糖浓度有一定要求 (0.1% 左右), 测定时样品溶液的消耗体积应与标定葡萄糖标准溶液时消耗的体积相近, 通过预测定可了解样品溶液浓度是否合适, 浓度过大或过小应加以调整, 使预测定时消耗样液量在 10mL 左右; 二是通过预测定可以知道样液大概消耗量, 以便在正式测定时预先加入比实际用量少 1mL 左右的样液, 只留下 1mL 左右样液在继续滴定时加入, 以保证在 1min 之内完成继续滴定工作, 提高测定的准确度。

⑥ 必须严格控制反应液的体积, 标定和测定时消耗的体积应接近, 使反应体系碱度一致。热源一般采用 800W 电炉, 电炉温度恒定后才能加热, 热源强度应控制在使反应液在两分钟内沸腾, 且应保持一致; 否则加热至沸腾所需时间就会不同, 引起蒸发量不同, 使反应液碱度发生变化, 从而产生误差。沸腾时间和滴定速度对结果影响也较大, 一般沸腾时间短, 消耗糖液多, 反之, 消耗糖液少; 滴定速度过快, 消耗糖量多, 反之, 消耗糖量少。因此, 测定时应严格控制上述条件, 力求一致。平行试验的样液消耗量相差不应超过 0.1mL。

1.1.3.2 3,5-二硝基水杨酸比色法

(1) 实验用品

① 样品 藕粉, 玉米淀粉。

② 试剂

a. 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 试剂 称取 6.5g DNS 溶于少量热蒸馏水中, 溶解后移入 1000mL 容量瓶中, 加入 2mol/L 氢氧化钠溶液 325mL, 再加入 45g 丙三醇, 摇匀, 冷却后定容至 1000mL。

b. 葡萄糖标准溶液 准确称取干燥至恒重的葡萄糖 200mg, 加少量蒸馏水溶解后, 以蒸馏水定容至 100mL, 使葡萄糖浓度为 2.0mg/mL。

c. 6mol/L HCl 取 250mL 浓 HCl (35%~38%), 用蒸馏水稀释到 500mL。

d. 碘-碘化钾 (I-KI) 溶液 称取 5g 碘、10g 碘化钾溶于 100mL 蒸馏水中。

e. 6mol/L NaOH 称取 120g NaOH 溶于 500mL 蒸馏水中。

f. 0.1% 酚酞指示剂。

③ 器材 762 分光光度计, 水浴锅, 电炉, $\phi 15\text{mm} \times 180\text{mm}$ 试管。

(2) 实验步骤

① 葡萄糖标准曲线制作 取 5 支 $\phi 15\text{mm} \times 180\text{mm}$ 试管, 按表 1-1 加入 2.0mg/mL 葡萄糖标准液和蒸馏水。

表 1-1 3,5-二硝基水杨酸比色定糖标准曲线制作

管号	葡萄糖标准液体积/mL	蒸馏水体积/mL	葡萄糖质量/mg	OD ₅₄₀
0	0.0	1.0	0.0	
1	0.2	0.8	0.4	
2	0.4	0.6	0.8	
3	0.6	0.4	1.2	
4	0.8	0.2	1.6	
5	1.0	0.0	2.0	

在上述试管中分别加入 DNS 试剂 2.0mL, 于沸水浴中加热 2min 进行显色, 取出后用流动水迅速冷却, 各加入蒸馏水 9.0mL, 摇匀, 在 540nm 波长处测定吸光度值。以 1.0mL 蒸馏水代替葡萄糖标准液按同样显色方法操作作为空白调零点。以葡萄糖含量 (mg) 为横坐标、吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线。

② 样品中还原糖的提取 准确称取 0.5g 藕粉, 放在 100mL 烧杯中, 先以少量蒸馏水 (约 2mL) 调成糊状, 然后加入 40mL 蒸馏水, 混匀, 于 50℃ 恒温水浴中保温 20min, 不时搅拌, 将还原糖浸出。过滤, 将滤液全部收集在 50mL 的容量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度, 即为还原糖提取液。

③ 样品总糖的水解及提取 准确称取 0.5g 玉米淀粉, 置于锥形瓶中, 加入 6mol/L HCl 10mL、蒸馏水 15mL, 在沸水浴中加热 0.5h, 取出 1~2 滴置于白瓷板上, 加 1 滴 I-KI 溶液检查水解是否完全。如已水解完全, 则不呈现蓝色。水解完毕, 冷却至室温后加入 1 滴酚酞指示剂, 以 6mol/L NaOH 溶液中和至溶液呈微红色, 并定容到 100mL。过滤, 取滤液 10mL 于 100mL 容量瓶中, 定容混匀, 即为稀释 1000 倍的总糖水解液, 用于总糖测定。

④ 样品中含糖量的测定 取 7 支 $\phi 15\text{mm} \times 180\text{mm}$ 试管, 按表 1-2 加入试剂。

表 1-2 3,5-二硝基水杨酸比色定糖样品含糖量测定

项 目	空白	还 原 糖			总 糖		
管号	0	1	2	3	4	5	6
样品溶液体积/mL	0	1	1	1	1	1	1
3,5-二硝基水杨酸试剂体积/mL	2	2	2	2	2	2	2

加完试剂后, 于沸水浴中加热 2min 进行显色, 取出后用流动水迅速冷却, 各加入蒸馏水 9.0mL, 摇匀, 在 540nm 波长处测定吸光度值。测定后, 取样品的吸光度平均值在标准曲线上查出相应的含糖量。

(3) 试验数据处理 按下式计算出样品中还原糖和总糖的质量分数 (%) :

$$\text{还原糖含量(以葡萄糖计, \%)} = \frac{cV}{1000m} \times 100\%$$

$$\text{总糖含量(以葡萄糖计, \%)} = \frac{cV}{1000m} \times 100\%$$

式中, c 表示还原糖或总糖提取液的浓度, mg/mL ; V 表示还原糖或总糖提取液的总体积, mL ; M 表示样品质量, g ; 1000 表示 mg 换算成 g 的系数。

(4) 注意事项 标准曲线制作与样品含糖量测定应同时进行, 一起显色和比色。

1.1.3.3 砷钼酸比色法

(1) 实验用品

① 实验材料 苹果、面粉等。

② 试剂

A. 铜试剂 a. $4\% \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; b. 称取 24g 无水碳酸钠, 用 850mL 水溶于大烧杯中, 加入 2g 含 4 分子结晶水的酒石酸钾钠, 待全溶 (应加热) 后加入碳酸氢钠 16g, 再加入 120g 无水硫酸钠 (加热), 全溶及冷却后加水至 900mL, 沉淀 1~2d, 取上清液 (要求严格时需过滤) 备用。使用前将 a 与 b 按 1:9 比例混匀即可使用。

B. 砷钼酸试剂 25g 钼酸铵 $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ 溶于 450mL 蒸馏水中 (加热溶解, 但注意温度接近 150°C 时易分解), 待冷却后再加入 21mL 浓硫酸混匀。另将 3g 砷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 溶解于 25mL 蒸馏水中, 然后加到钼酸铵溶液中, 室温下放置于棕色瓶中可长期使用。

C. $200\mu\text{g/mL}$ 标准葡萄糖原液 准确称取分析纯葡萄糖 200mg, 溶解定容到 1000mL。

③ 主要仪器 756 分光光度计, 水浴锅, 具塞刻度试管 ($20\text{mL} \times 10$), 刻度吸管 ($1\text{mL} \times 1$, $2\text{mL} \times 4$, $5\text{mL} \times 3$), 容量瓶 ($100\text{mL} \times 2$), 漏斗, 研钵。

(2) 实验步骤

① 标准曲线的制作 在一系列刻度试管中, 分别加入 $200\mu\text{g/mL}$ 标准葡萄糖 0、0.1mL、0.2mL、0.3mL、0.4mL、0.5mL 及 0.6mL, 再按顺序加入蒸馏水 2.0mL、1.9mL、1.8mL、1.7mL、1.6mL、1.5mL 及 1.4mL, 配成浓度分别为 0、 $10\mu\text{g/mL}$ 、 $20\mu\text{g/mL}$ 、 $30\mu\text{g/mL}$ 、 $40\mu\text{g/mL}$ 、 $50\mu\text{g/mL}$ 及 $60\mu\text{g/mL}$ 的系列葡萄糖溶液。每试管加入铜试剂 2mL, 混匀后置沸水浴中加热 10min, 立即冷却, 再加入 2mL 砷钼酸试剂, 振荡 2min 后稀释到 20mL, 用分光光度计在 620nm 波长下比色, 测其光密度 OD_{620} (做两次平行实验)。以糖浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标、光密度 OD_{620} 为纵坐标, 绘制标准曲线。

② 植物样品中还原糖的提取 将样品洗净, 吸干其表面水分, 切碎, 称取 1g 放入研钵中, 加入约 0.5g 石英砂, 磨成匀浆, 加水将样品通过玻璃漏斗冲入 100mL 容量瓶中, 加水 70~80mL, 摇匀后置于 80°C 恒温水浴上浸提 30min。

待上述样品冷却后, 沉淀蛋白质——加入 5% 硫酸锌 5mL, 再慢慢滴入 0.3mol/L $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 5mL, 振荡后静置以沉淀蛋白质。至上层出现清液后再加一滴 $\text{Ba}(\text{OH})_2$, 直至无白色沉淀为止, 向容量瓶中加水至刻度。

③ 还原糖含量的测定 过滤上述已定容的样品液, 取 5mL 滤液, 再定容到 100mL (此步视样品的含糖量而定)。取已稀释的溶液 2mL, 操作与标准葡萄糖显色法相同: 加铜试剂 2mL, 煮沸 10min, 加砷钼酸试剂 2mL, 振荡 2min 后定容到 15mL, 于 620nm 波长下比色, 记下光密度 OD_{620} (至少重复两次)。

(3) 试验数据处理

$$\text{还原糖含量(\%)} = \frac{G \times \text{稀释液倍数}}{W \times 10^6} \times 100\%$$

式中, G 表示从标准曲线上查得的含糖量, μg ; W 表示样品质量, g 。

1.1.3.4 硫酸蒽酮比色法

(1) 实验用品

① 试剂

a. 蒽酮试剂 溶解 0.2g 蒽酮于 100mL 浓硫酸中 (A. R., 相对密度 1.84, 含量 95%)。当日配置使用。

b. 0.100g/L 葡萄糖标准液

c. 10% 钨酸钠溶液

d. 6mol/L 硫酸

② 主要仪器 762 分光光度计, 水浴锅, 刻度试管, 刻度吸管 (1mL、5mL 及 10mL)。

③ 样品 人或实验动物全血。

(2) 实验步骤

① 标准点测定 分别量取蒽酮试剂 4mL 和标准糖液 1mL 置试管中, 迅速浸于冰浴中冷却, 然后在沸水浴上加热 10min (应加盖, 防止水蒸发损失), 冷却, 在 620nm 波长处用分光光度计测空白 (1mL H_2O 代替糖液) 的吸光度 (A) 值。

② 无蛋白血滤液制备 用奥氏吸量管吸取全血 (已加抗凝剂) 1mL, 缓缓加入到 20mL 锥形瓶内, 加水 7mL, 摇匀, 溶血后 (血液变为红色透明时) 加 10% 钨酸钠 1mL, 摇匀, 再加 6mol/L 硫酸 1mL, 随加随摇, 加毕充分摇匀, 放置 5~15min, 至沉淀由鲜红变为暗棕色。用干滤纸过滤 (先倾入液体少许, 待滤纸湿润后, 再全部倒入), 如滤液不清, 必须重滤。每毫升无蛋白血滤液相当于 0.1mL 全血。

③ 样品血糖测定 将 4mL 蒽酮试剂加到 1mL 无蛋白血滤液中, 按上述①的办法处理, 测得测试样品的 A_{620} 值。

(3) 试验数据处理 参考 Beer 定律, 由上面测得的标准点, 即已知葡萄糖浓度时的 A 值, 计算样品液糖含量:

$$\frac{\text{标准液 } A \text{ 值}}{\text{标准液糖含量}} = \frac{\text{样品液 } A \text{ 值}}{\text{样品液糖含量}}$$

$$\text{即: 样品液糖含量} = \frac{\text{标准液糖含量}}{\text{标准液 } A \text{ 值}} \times \text{样品液 } A \text{ 值}$$

将测得的结果再换算为 100mL 全血中含葡萄糖质量 (mg) (按使用全血量及制备无蛋白血滤液稀释倍数等数值进行计算)。

1.2 蛋白质定量分析

1.2.1 概述

目前蛋白质含量测定有两类方法, 一类是利用蛋白质的物理化学性质, 如折射率、相对密度、紫外吸收等进行测定; 另一类是利用化学方法测定蛋白质含量, 如微量凯氏定氮、双缩脲反应、Folin-酚试剂法 (Lowry 法)。这两类方法各有优缺点, 在测定蛋白质含量时, 可根据实验要求及实验室条件进行选择。

1.2.1.1 Folin-酚比色法

目前实验室多用 Folin-酚法测定蛋白质含量, 此法的优点是操作简单、迅速, 不需特殊仪器设备, 灵敏度高, 较紫外吸收法灵敏 10~20 倍, 较双缩脲法灵敏 100 倍, 反应 15min 内有最大显色, 并至少可稳定几小时。其不足之处是此反应受多种因素干扰, 测试时应排除干扰因素或做空白试验消除。

Folin-酚比色法是在 Folin-酚法的基础上引入双缩脲试剂, 因此凡干扰双缩脲反应的基团, 如 $-\text{CO}-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CS}-\text{NH}_2$ 以及在性质上是氨基酸或肽的缓冲剂, 如 Tris 缓冲剂以及蔗糖、硫酸铵、巯基化物均可干扰 Folin-酚反应。此外, 所测的蛋白质样品中若含有酚类及柠檬酸, 均对此反应有干扰作用。而含量较低的尿素 (约 0.5% 左右)、胍 (0.5% 左右)、硫酸钠 (1%)、硝酸钠 (1%)、三氯乙酸 (0.5%)、乙醇 (5%)、乙醚 (5%)、丙酮 (0.5%) 对显色无影响, 这些物质在所测样品中含量较高时, 则需绘制校正曲线。若所测的样品中含硫酸铵, 则只需增大碳酸钠-氢氧化钠浓度即可显色测定。若样品酸度较高, 也需提高碳酸钠-氢氧化钠的浓度 1~2 倍, 这样即可克服显色后色浅的缺点。

Folin-酚试剂由甲试剂与乙试剂组成。甲试剂由碳酸钠、氢氧化钠、硫酸铜及酒石酸钾钠组成。蛋白质中的肽键在碱性条件下与酒石酸钾铜盐溶液起作用, 生成紫红色络合物。乙试剂是由磷钼酸和磷钨酸、硫酸、溴等组成。此试剂在碱性条件下易被蛋白质中酪氨酸的酚羟基还原呈蓝色, 其色泽深浅与蛋白质含量成正比。本法可测定含量在 25~250 μg 之间的蛋白质。本法也适用于测定酪氨酸、色氨酸含量。

1.2.1.2 考马斯亮蓝比色法

考马斯亮蓝比色法测定蛋白质浓度是利用蛋白质-染料结合的原理, 定量测定微量蛋白质浓度的快速、灵敏的方法。

考马斯亮蓝 G-250 在不同条件下存在着两种不同的颜色, 红色和蓝色。它和蛋白质通过范德瓦耳斯键 (van der Waals bond) 结合, 在一定蛋白质浓度范围内, 蛋白质和染料的结合符合比尔定律 (Beer's law)。此染料与蛋白质结合后由红色形式转变成蓝色形式, 最大光吸收波长由 465nm 变成 595nm, 通过测定 595nm 处吸光度的增加量可知与其结合蛋白质的量。

蛋白质和染料结合是一个很快的过程, 约 2min 即可反应完全, 呈现最大光吸收, 并可稳定 1h, 之后, 蛋白质-染料复合物发生聚合并沉淀出来。蛋白质-染料复合物具有很高的吸收系数, 使得在测定蛋白质浓度时灵敏度很高, 在测定溶液中含蛋白质 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时就有 0.275 吸光度值的变化, 比 Lowry 法灵敏 4 倍, 测定范围为 10~100 μg 蛋白质, 微量测定范围是 1~10 μg 蛋白质, 此反应重复性好、精确度高、线性关系好。标准曲线在蛋白质浓度较大时稍有弯曲, 这是由于染料本身的两种颜色形式光谱有重叠, 试剂背景值随更多染料与蛋白质结合而不断降低, 但直线弯曲程度很轻, 不影响测定。

此方法干扰物少, 研究表明, NaCl、KCl、 MgCl_2 、乙醇、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对此法无干扰。强碱缓冲剂在测定中有一些颜色干扰, 这可以用适当的缓冲液对照扣除其影响。Tris、乙酸、2-巯基乙醇、蔗糖、甘油、EDTA (乙二胺四乙酸) 及微量的去污剂如 Triton X-100、SDS (十二烷基磺酸钠)、玻璃去污剂有少量颜色干扰, 用适当的缓冲液对照很容易除掉。但是大量去污剂的存在对颜色影响太大而且不易消除。

1.2.1.3 紫外吸收法

由于蛋白质分子中苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸残基的苯环含有共轭双键, 因此蛋白质具有吸收紫外线的性质, 吸收高峰在 280nm 波长处。在此波长范围内, 蛋白质溶液的吸光度 (A_{280}) 与其含量成正比, 可用于定量测定。

利用紫外吸收法测定蛋白质含量的优点是迅速、简便、不消耗样品, 低浓度盐类不干扰测定。因此, 在蛋白质和酶的生化制备中 (特别是在柱色谱分离中) 广泛应用。

此法的缺点是: ①对于测定那些与标准蛋白质中酪氨酸和色氨酸含量差异较大的蛋白质, 有一定的误差; ②若样品中含有嘌呤、嘧啶等吸收紫外线的物质, 会出现较大的干扰。

不同的蛋白质和核酸的紫外吸收是不相同的, 即使经过校正, 测定结果也还存在一定的

误差,但可作为初步定量的依据。

1.2.1.4 双缩脲法

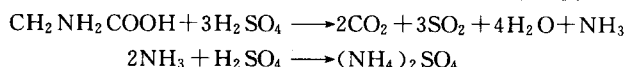
双缩脲法是第一种用比色原理测定蛋白质浓度的方法,至今仍被广泛采用。此法常用于需要快速但不十分准确的测定中。由于硫酸铵不干扰显色,因此对蛋白质早期阶段的提纯是非常有利的。双缩脲法的原理是具有两个或两个以上肽键的化合物皆有双缩脲反应,因此在碱性溶液中, Cu^{2+} 与蛋白质的肽键以及酪氨酸残基络合,形成蓝紫色络合物,此络合物在 540nm 波长处有最大吸收。双缩脲法常用于浓度为 0.5~10g/L 的蛋白质溶液的测定。干扰物有硫醇以及具有肽键性质的缓冲液,如 Tris、Good 缓冲液等。干扰物可用沉淀法除去,即用等体积 10% 冷的三氯乙酸沉淀蛋白质,然后弃去上清液,再用已知浓度的 1mL NaOH 溶液溶解沉淀的蛋白质再进行定量测定。

1.2.1.5 总氮测定法

常用凯氏定氮法测定天然有机物(如蛋白质、核酸及氨基酸等)的含氮量。

含氮的有机物与浓硫酸共热时,其中的碳、氢两种元素被氧化成二氧化碳和水,而氮则转变成氨,并进一步与硫酸作用生成硫酸铵。此过程通常称为“消化”。

但是,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液的沸点,并需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,借水蒸气将产生的氨蒸馏到一定量、一定浓度的硼酸溶液中,硼酸吸收氨后使溶液中氢离子浓度降低,然后用标准无机酸滴定,直到恢复溶液中原来氢离子浓度为止,最后根据所用标准酸的物质的量(mol)[相当于待测物中氨的物质的量(mol)]计算出待测物中的总氮量。

1.2.2 实验目的

- ① 学习测定蛋白质含量的原理及方法。
- ② 了解不同蛋白质定量方法的特点。

1.2.3 实验方法

1.2.3.1 Folin-酚比色法

(1) 实验用品

① 试剂

a. 标准蛋白质溶液 结晶牛血清白蛋白或酪蛋白,预先经微量凯氏定氮法测定蛋白氮含量,根据其纯度配制成 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白质溶液。

b. Folin-酚试剂

试剂 A: 4% 碳酸钠溶液; 0.2mol/L 氢氧化钠溶液; 1% 硫酸铜溶液; 2% 酒石酸钾钠溶液。用前将 4% 碳酸钠溶液与 0.2mol/L 氢氧化钠溶液等体积配制成碳酸钠-氢氧化钠溶液; 1% 硫酸铜溶液与 2% 酒石酸钾钠溶液等体积配合成硫酸铜-酒石酸钾钠溶液; 这两种试剂按 50:1 的比例配合,即成 Folin-酚试剂 A。此试剂用前配制,1d 内有效。

试剂 B: 称取钨酸钠 ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 100g、钼酸钠 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 25g 置 2000mL 磨口回流装置内,加蒸馏水 700mL、85% 磷酸 50mL 和浓盐酸 100mL。充分混匀,使其溶解。小火加热,回流 10h (烧瓶内加小玻璃珠数颗,以防溶液溢出),再加入硫酸锂 (Li_2SO_4) 150g,蒸馏水 50mL,液溴数滴。在通风橱中开口煮沸 15min,以除去多余的溴。冷却后定容至 1000mL,过滤即成 Folin-酚试剂 B 贮存液,此液应为鲜黄色,不带任何绿色。

置棕色瓶中，可在冰箱中长期保存。若此贮存液使用过久，颜色由黄变绿，可加几滴液溴，煮沸数分钟，恢复原色后仍可继续使用。试剂 B 贮存液在使用前应确定其酸度，以酚肽为指示剂，滴定标准氢氧化钠溶液（1mol/L 左右），当溶液颜色由红→紫红→紫灰→墨绿时即为滴定终点，该试剂的酸度应为 2mol/L 左右，将之稀释至相当于 1mo/L 酸度应用。

② 测试样品 血清，使用前稀释 100 倍。

③ 器材 试管及试管架，0.5mL、1mL 及 5mL 吸管，恒温水浴锅，756 型分光光度计、762 型分光光度计。

(2) 操作步骤

① 绘制 Folin-酚法标准曲线

取 14 支试管，分两组按表 1-3 进行平行操作。

表 1-3 Folin-酚法标准曲线实验

试剂处理	试 管 编 号						
	1	2	3	4	5	6	7
标准蛋白溶液/mL	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水/mL	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	0
Folin-酚甲试剂/mL	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
混匀，于 20~25℃ 放置 10min							
Folin-酚乙试剂/mL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
迅速混匀，于 30℃（或室温 20~25℃）水浴保温 30min，以蒸馏水为空白对照，在 640nm 处比色 ^①							
A ₆₄₀							

① 由于这种呈色化合物组成尚未确立，它在可见光红光区呈现较宽吸收峰区，不同书籍中选用不同的波长，有的选用 500nm 或 540nm，有的选用 660nm、700nm 或 750nm。选用较长波长，样品呈现较大的吸光度。本实验选用波长 640nm。

以 A₆₄₀ 值为纵坐标，标准蛋白含量为横坐标，绘制标准曲线。

② 测定示知样品蛋白质浓度

取 4 支试管，分两组按表 1-4 进行平行操作。

表 1-4 Folin-酚法测蛋白质浓度

试 剂 处 理	试 管 编 组	
	空白管(×2)	样品管(×2)
血清稀释液/mL	0.0	0.2
蒸馏水/mL	1.0	0.8
Folin-酚甲试剂/mL	5.0	5.0
混匀，于 20~25℃ 放置 10min		
Folin-酚乙试剂/mL	0.5	0.5
迅速混匀，于 30℃（或室温 20~25℃）水浴保温 30min，以蒸馏水为空白对照，在 640nm 处比色		
A ₆₄₀		

(3) 实验结果

① 绘制标准曲线

② 计算