

蔡武城 李碧羽 编著
李 玉 民

生物化学实验技术教程

SHENG WU HUA XUE SHI YAN JI SHU JIAO CHENG

复旦大学出版社

生物化学实验技术教程

蔡武城 李碧羽
李李玉民

复旦大学出版社

生物化学实验技术教程

复旦大学出版社出版

新华书店上海发行所发行

复旦大学印刷厂印刷

字数 86千 开本 850×1168 1/32 印张 8.75

1983年9月第一版 1987年5月第二次印刷

印数：7001—12000

书号：7253·006 定价：1.60元

内 容 提 要

本教程以蛋白质、核酸、酶等生物大分子物质的分离纯化、性质测定和结构分析为主要内容，介绍了多种常用的生物化学实验技术，包括各种电泳法、层析法、分光光度法、电镜观察法以及同位素标记法等。

本教程不仅注重于基本实验方法的训练，而且还根据国内外的科研成果引进了一些新的实验技术，可作为高等院校生物化学专业学生以及其它有关专业研究生的教材，也可供有关的教师、科研工作者参考。

前 言

《生物化学实验技术教程》主要是为生物化学专业高年级学生编写的以实验为主的专业课教程。本教程中的实验综合性较强，有一定难度，要求修读这门专业课的学生必须具备一定的生物化学基础知识和实验操作技能。学完本教程，学生应该能够比较熟练地掌握生物化学常用的实验技术，进而能够从事有关的科学研究工作。

本教程的实验以蛋白质、核酸和酶等生物大分子物质为材料，在实验内容和技术训练方面，既有物质的制备和提纯，又有结构和功能的分析；既兼顾各种最常用的生物化学实验方法，又根据现有的教学实验室条件，结合本单位以及其他有关单位的科研工作，引进一些新的技术，力求能反映当前国内外的水平。实验部分共分十三个单元，除第五、十三单元外，其它各单元都包含两个或两个以上的实验。同一单元内的实验彼此之间多数是连贯的，只有少数相对独立，将独立的实验合并为一个单元主要是从实验时间的安排以及实验仪器、材料和试剂的重复性这两方面来考虑的。

本教程每个单元的实验都安排三天时间，由两名学生组成一个实验小组共同完成。要做好实验，必须认真预习，必要时还要复习与实验有关的基础理论知识。实验操作过程中要合理安排时间，实验小组的两名成员要密切配合，严格操作，细致观察现象，忠实记录数据。每个单元的实验结束后要及时完成实验报告。

尽管本教程中的各个实验都经过作者反复摸索和多次教学实践的考验，但由于实验条件和水平的限制，仍有许多不足之处，甚至可能会有错误，希望读者批评指正。

参加本教程编写、实验工作和教学实践的还有陶静芳和张培德。所列实验有一部分是在本生物化学教研室科研工作的基础上按教学实验的要求建立起来的，在编写过程中曾得到本教研室同志的关心、帮助和审阅。此外，蛋白质的放射性同位素标记部分由生物物理教研室彭励吾协助编写，pUB110质粒DNA分子的电子显微镜观察部分由复旦大学遗传学研究所汪训明、王顺德协助编写，中国科学院上海生物化学研究所、上海儿童医院医学遗传研究室等单位都曾给予很大的帮助，在此一并表示感谢。

作者 一九八二年一月

目 录

实 验 部 分

一、蛋白质分子量和等电点的测定	1
实验一(1) 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定 蛋白质分子量	1
实验一(2) 用凝胶等电聚焦法测定蛋白质等电点	8
附 1 有关试剂的纯化	18
附 2 凝胶等电聚焦电泳中蛋白质区带染色法	19
二、蛋白质 N-末端的测定	22
实验二(1) 用 DNP-氨基酸聚酰胺薄膜层析法 测定胰岛素 N-末端	23
实验二(2) 用 DNS-氨基酸聚酰胺薄膜层析法 测定胰岛素 N-末端	30
附 聚酰胺薄膜的制备	38
三、异常血红蛋白分子的检测和分析	40
实验三(1) 用混合淀粉凝胶电泳法检测异常血 红蛋白	45
实验三(2) 用虹吸式淀粉板电泳法分离纯化异 常血红蛋白	50
实验三(3) 用肽链解离试验分析异常血红蛋白 亚基特征	54
实验三(4) 用种间分子杂交法鉴定和分析异常 血红蛋白亚基的异常	58

附 1 常用的两种肽链解离法——PMB 解离 法和 PCMB 解离法	64
附 2 透析式种间分子杂交法	65
四、蛋白质的亲和层析	68
实验四(1) 用分离纯化巯基蛋白的亲和层析法 提纯巯基酶	70
实验四(2) 亲和层析洗脱流出液中巯基酶的活 力测定	78
附 1 PAPMA (对氨基苯汞乙酸盐) 的制备 方法	85
附 2 DHT-酪蛋白的制备方法	85
五、蛋白质的放射性同位素标记	87
实验五 氯胺 T 法碘标记蛋白质	88
六、RNA 碱基组成分析	92
实验六(1) RNA 的碱水解	93
实验六(2) 单核苷酸的离子交换树脂柱层析分 离	96
实验六(3) 单核苷酸的鉴定及 RNA 碱基组成 分析	104
附 1 RNA 纯度测定(紫外法)	107
附 2 单核苷酸在 pH 1.5, pH 3.5 时所带 净电荷量的计算示例	107
七、DNA 的 (G + C) % 测定	110
实验七(1) DNA 的酶水解	111
实验七(2) 脱氧单核苷酸的纸电泳分离及 (G + C) % 测定	113
附 桔青霉 5'-磷酸二酯酶的制备及酶活力 测定	119

八、枯草杆菌 pUB110 质粒 DNA 的提取和若干分子特性	
的鉴定.....	121
实验八(1) pUB110 质粒 DNA 的提取	122
实验八(2) pUB110 质粒 DNA 的纯化	
.....	127
实验八(3) pUB110 质粒 DNA 制品的纯度鉴定	
和限制性内切酶 EcoRI 的酶切.....	132
实验八(4) pUB110 质粒 DNA 分子的电子显微镜	
观察(示范实验).....	139
附 1 羟基磷灰石的制备	144
附 2 尿素重结晶	145
附 3 琼脂糖浓度与适宜分离的物质分子量	
范围.....	145
附 4 复盖有 Parlodion 支持膜铜网的制备	145
九、大肠杆菌 ColE1 质粒 DNA 的快速提取	147
实验九(1) 快速酚法.....	149
实验九(2) 碱性 SDS 法	159
附 酚重蒸法	166
十、从鸡蛋壳膜中制备溶菌酶结晶	168
实验十(1) 溶菌酶的提取、纯化和结晶.....	169
实验十(2) 溶菌酶纯化过程中各步骤的分析测定.....	177
附 艳红 K-2BP 标记溶性微球菌 <i>M. lysodeik-</i>	
<i>ticus</i> 的制备	181
十一、酸性磷酸酯酶的动力学性质的分析	183
实验十一(1) 进程曲线的制作和初速度的测定.....	184
实验十一(2) pH~活性曲线的制作和酸碱稳定性	
试验.....	187
实验十一(3) 温度~活性曲线的制作和热稳定	

性试验.....	192
实验十一(4) 米氏常数 (K_m) 和最大反应速度 (V_m) 的测定.....	196
实验十一(5) 氟化钠及磷酸盐的抑制作用——抑制类 型的判断和抑制剂常数(K_i)的测定...	202
十二、酶的固定化与菌体细胞的固定化技术	210
实验十二(1) 5'-磷酸二酯酶的固定化	211
实验十二(2) 产 α -半乳糖苷酶菌体细胞的固定化 ...	217
附 1 产 α -半乳糖苷酶菌体的制备	222
附 2 α -半乳糖苷酶活力的测定	222
十三、正交试验法在实验条件选择中的应用——考马斯 亮蓝染色测定蛋白质浓度的条件选择	225
实验十三 考马斯亮蓝染色测定蛋白质浓度的实验 条件选择.....	226

附 录 部 分

一、常用仪器的使用方法	234
〈一〉 721 型分光光度计	234
〈二〉 751G 型分光光度计	235
〈三〉 LXJ II 离心沉淀机.....	237
〈四〉 自动部分收集器.....	238
〈五〉 FH-408 定标器	239
二、生物化学实验用缓冲液的配制方法	240
〈一〉 广范围缓冲液 (pH2.6—12.0)	240
〈二〉 氯化钾-盐酸缓冲液 (pH 1.0—2.2)	240
〈三〉 甘氨酸-盐酸缓冲液 (pH 2.2—3.6).....	241
〈四〉 邻苯二甲酸氢钾-盐酸缓冲液 (pH 2.2—4.0)	

.....	241
〈五〉 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (pH 2.6—7.6)	
.....	242
〈六〉 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 3.0—6.2).....	242
〈七〉 乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH 3.7—5.8).....	243
〈八〉 二甲基戊二酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 3.2—7.6)	
.....	243
〈九〉 丁二酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 3.8—6.0).....	245
〈十〉 邻苯二甲酸氢钾-氢氧化钠缓冲液 (pH 4.1—	
5.9).....	245
〈十一〉 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (pH 5.8—	
8.0).....	246
〈十二〉 磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液 (pH 5.8—8.0)	
.....	246
〈十三〉 Tris-盐酸缓冲液 (pH 7—9).....	247
〈十四〉 巴比妥-盐酸缓冲液 (pH 6.8—9.6).....	247
〈十五〉 2, 4, 6 三甲基吡啶-盐酸缓冲液 (pH 6.4—	
8.3).....	247
〈十六〉 硼砂-硼酸缓冲液 (pH 7.4—8.0).....	248
〈十七〉 硼砂缓冲液 (pH 8.1—10.7)	
.....	248
〈十八〉 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 8.6—10.6)	
.....	249
〈十九〉 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 (pH 9.2—10.8)	
.....	249
〈二十〉 硼酸-氯化钾-氢氧化钠缓冲液 (pH 8.0—10.2)	
.....	250
〈二十一〉 二乙醇胺-盐酸缓冲液 (pH 8.0—10.0)	

.....	251
〈二十二〉 磷酸氢二钠-氢氧化钠缓冲液 (pH 11.0—11.9).....	251
〈二十三〉 氯化钾-氢氧化钠缓冲液 (pH 12.0—13.0).....	252
.....	252
〈二十四〉 离子强度恒定的缓冲液 (pH 2.0—12.0).....	252
.....	252
三、常用数据	253
〈一〉 葡聚糖凝胶的技术数据.....	253
〈二〉 聚丙烯酰胺凝胶的技术数据.....	255
〈三〉 琼脂糖凝胶的技术数据.....	256
〈四〉 常见蛋白质分子量参考值.....	257
〈五〉 常见蛋白质等电点参考值.....	258
〈六〉 常用碱基、核苷和核苷酸常数表.....	261

一、蛋白质分子量和等电点的测定

蛋白质的分子量和等电点是蛋白质分析研究中两个基本的物理化学参数，其测定方法很多。用于蛋白质分子量测定的方法有渗透压法、沉降平衡法、分子筛过滤法等。用于蛋白质等电点测定的方法有沉淀法、电泳法等。

本实验以聚丙烯酰胺凝胶为支持介质，用电泳的方法来测定蛋白质的分子量和等电点。实验分以下两部分：

实验一（1）用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质分子量

实验一（2）用凝胶等电聚焦法测定蛋白质等电点

附 1 有关试剂的纯化

（1）丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺的重结晶

（2）SDS 的重结晶

附 2 凝胶等电聚焦电泳中蛋白质区带染色法

实验一(1) 用 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质分子量

一、目的

了解 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法的原理，学会用这种方法测定蛋白质分子量。

二、原理

一个蛋白质混合样品经过聚丙烯酰胺凝胶电泳以后，各组

分的电泳迁移率各不相同。这种差异就蛋白质分子本身而言主要与所带净电荷以及分子量和形状有关。采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法之所以能直接从电泳迁移率推算出蛋白质的分子量,原因就在于电泳体系中含有一定浓度的 SDS,它将其他因素对电泳迁移率的差异所产生的影响减少到了可以忽略不计的程度,使得电泳迁移率的大小只取决于蛋白质的分子量。

SDS 是十二烷基硫酸钠的简称。这种阴离子去污剂能够与蛋白质结合,破坏蛋白质分子内部、分子之间以及与其他物质分子之间的非共价键,使蛋白质变性而改变原有的空间构象。当有强还原剂存在使蛋白质分子内的二硫键被彻底还原,并且 SDS 的总量为蛋白质量的 3—10 倍、SDS 单位浓度大于 1 mM 时,这两者的结合是定量的,大约每克蛋白质可结合 1.4 克 SDS。蛋白质分子一经结合了一定量的 SDS 阴离子,所带负电荷量便远远超过了它原有的电荷量,从而消除了不同种类蛋白质间电荷符号的差异,而且由于分子量越大的蛋白质结合的 SDS 越多、带负电荷也越多,这就使各蛋白质-SDS 复合物的电荷密度(或荷质比)趋于一致;同时,不同蛋白质的 SDS 复合物形状也相似,都呈长椭圆状。因此,在自由电泳时,它们的泳动率基本相同,而在某一适宜浓度的聚丙烯酰胺凝胶介质中电泳时,由于凝胶的分子筛效应,电泳迁移率就取决于蛋白质-SDS 复合物的尺寸,也可以说是取决于蛋白质分子量的大小。

根据经验得知,当蛋白质的分子量在 11,700—165,000 之间时,蛋白质-SDS 复合物的电泳迁移率与蛋白质分子量的对数呈线性关系,符合直线方程式: $\lg M \cdot W = -bx + k$ ($M \cdot W$ 为蛋白质的分子量, x 为蛋白质-SDS 复合物电泳相对迁移率, k 和 b 均为常数)。将已知分子量的标准蛋白质在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中的电泳迁移率对分子量的对数作图,即可得到一条

标准曲线。只要测得未知分子量的蛋白质在相同条件下的电泳迁移率，就能根据标准曲线求得其分子量。

三、仪器、材料和试剂

1. 主要仪器

双通玻璃管（内径0.6厘米，长10厘米）12支；
制胶玻管架； 圆盘电泳槽；
100微升微量进样器； 10毫升注射器1只；
7号注射针头（长4厘米）1只；
10厘米长注射针头1只； 培养皿（直径14厘米）3只；
分析天平； 电泳仪（300伏）；
鸭嘴形镊子（夹片用）1把；镊子1把；
胶柱托板（白色）1块； 半对数坐标纸。

2. 材料

- (1)细胞色素 C（生化试剂，上海酵母厂产品）
- (2)大豆胰蛋白酶抑制剂（生化试剂，Sigma 产品或其他来源的产品）
- (3)胰蛋白酶（生化试剂，Difco 产品）
- (4)卵白蛋白（生化试剂，BDH 产品）
- (5)牛血清白蛋白（生化试剂，上海市牛奶公司综合厂产品）

3. 试剂

- (1)0.2M pH7.8 磷酸盐缓冲液
- (2)0.1M pH7.8 磷酸盐缓冲液
- (3)10%(W/V) SDS 溶液：称取 SDS（十二烷基硫酸钠，经乙醇一次或两次重结晶）2克，加蒸馏水 20 毫升，微热使溶解。
- (4)电极液（0.1% SDS—0.1M pH7.8 磷酸盐缓冲液）：取 0.2M pH7.8 磷酸盐缓冲液 250 毫升，加 10% SDS 溶液 5 毫

升，再加蒸馏水 245 毫升。

(5) 蛋白质样品处理液 (1%SDS—1%巯基乙醇—0.01M pH 7.8 磷酸盐缓冲液)：取 0.1M pH 7.8 磷酸盐缓冲液 1 毫升，10%SDS 溶液 1 毫升，巯基乙醇 $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 0.1 毫升，加蒸馏水定容至 10 毫升。临用前配制。

(6) 15% (W/V) 凝胶贮备液 (15%丙烯酰胺—0.4%甲叉双丙烯酰胺溶液)：称取 15 克丙烯酰胺 (简称 Acr, E.M.K 进口分装)，0.4 克 N,N'-甲叉双丙烯酰胺 (简称 Bis 或 MBK, Aldrich 产品)，溶于蒸馏水并定容至 100 毫升，滤去不溶物后置棕色瓶内，放冰箱贮存备用。

(7) 20% (W/V) 过硫酸铵溶液：称取过硫酸铵 ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (简称 AP) 2 克，溶于 10 毫升蒸馏水。临用前配制。

(8) 1% (V/V) TEMED 溶液：取 1 毫升 TEMED (N, N, N', N'-四甲基乙二胺, BDH 产品) 加蒸馏水稀释至 100 毫升，置棕色瓶内，放冰箱贮存。

(9) 溴酚蓝—蔗糖指示液 (0.1%溴酚蓝—60%蔗糖—0.01M pH 7.8 磷酸盐缓冲液)：称取蔗糖 (分析纯) 60 克，溴酚蓝 0.1 克，加入 0.1M pH 7.8 磷酸盐缓冲液 10 毫升，蒸馏水 90 毫升，微热使溶解。

(10) 10% (W/V) 三氯乙酸溶液

(11) 0.25% (W/V) 考马斯亮蓝染色液：称取 0.5 克考马斯亮蓝 R250 (Fluka 进口分装)，溶于 200 毫升蒸馏水。

(12) 7% (V/V) 乙酸脱色液：取冰乙酸 35 毫升，加蒸馏水 465 毫升。

四、操作步骤

1. 5%凝胶柱的制备

(1) 配 胶

在 50 毫升烧杯内按下列配方配制 30 毫升凝胶液：

15%凝胶贮备液	10 毫升
0.2M pH 7.8 磷酸盐缓冲液	15 毫升
10%SDS 溶液	0.3 毫升
1%TEMED 溶液	2 毫升
蒸馏水	2.5 毫升
20%过硫酸铵溶液	0.2 毫升(最后加入)

以上各液加入后用玻棒轻轻稍加搅动使混合均匀。〔注：为了去除抑制聚合的氧气，最好在灯泡瓶内配胶，并在 20%过硫酸铵溶液加入之前进行抽气处理。本实验将此步省略并不影响实验结果〕。

(2) 装 管

将洗液清洗过的干燥洁净的双通玻璃管（内径 0.6 厘米，长 10 厘米）12 支，垂直插放于制胶玻管架上（参见图 1—1），玻璃管的底端必须紧紧与橡皮塞相贴以保证底端封闭。用滴管取凝胶液沿玻璃管内壁缓缓加入，直至离玻璃管上端 1 厘米处为止。再用一注射器通过注射针头将蒸馏水沿玻璃管内壁缓慢而连续地加入，进行水封。水封的目的是隔离空气中的氧，并消除液柱表面的弯月面，使凝胶液表面平坦。操作时注意尽量不

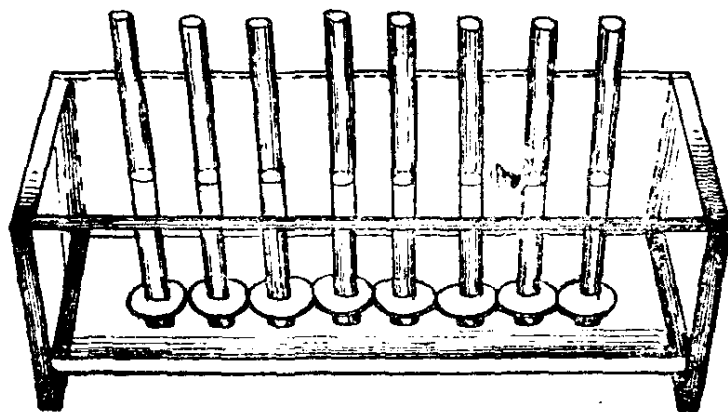


图 1—1 在制胶玻管架上装管