

生物科学
生物技术
系 列

BIOCHEMISTRY

普通高等教育“十一五”规划教材

普通生物化学教程 实验指导

高继国 郭春绒 主编 蒋立科 主审



化学工业出版社

三
星
級
教
材

BIOCHEMISTRY

普通生物化学教程 实验指导

主编 王德林 副主编 王德林 王德林 王德林



高等教育出版社

普通高等教育“十一五”规划教材

普通生物化学教程实验指导

高继国 郭春绒 主编

蒋立科 主审



化学工业出版社

· 北 京 ·

《普通生物化学教程实验指导》(以下简称《实验指导》)是与蒋立科、高继国等人所编《普通生物化学教程》而配套的实验指导教材,全书以生物体的初生物质和次生物质的提取、纯化、鉴定为线索,引导读者认识到生物体内组成成分不应仅局限于糖类、脂类、蛋白质和核酸“四大类”物质,还应关注生物体为适应逆境下生存而产生的次生物质,即凡是由生物体所产生的物质均属于“生物分子”的范畴。本《实验指导》设绪论、实验及附录三大部分,精选 50 个实验,分糖、脂、蛋白质、核酸、酶、维生素、生物氧化等几个方向。

本书突出实验与教材知识的一致性,是为消化和巩固在课堂中所学习知识服务的,不仅体例、取材新颖,而且选取的实验经过反复实践,可操作性好,既可作为各类院校生物等专业的本科教材,也可作为生物化学教学和研究人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

普通生物化学教程实验指导/高继国,郭春绒主编.
北京:化学工业出版社,2009.9
普通高等教育“十一五”规划教材
ISBN 978-7-122-06330-4

I. 普… II. ①高…②郭… III. 生物化学-实验-高等学校-教学参考资料 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 122490 号

责任编辑:赵玉清

文字编辑:刘 畅

责任校对:徐贞珍

装帧设计:尹琳琳

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装:北京市彩桥印刷有限责任公司

787mm×1092mm 1/16 印张 10¼ 字数 259 千字 2009 年 8 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:18.00 元

版权所有 违者必究

目 录

绪论	1
第一节 做好生化实验的“6字令”	1
第二节 学会当好“小先生”	3
第三节 实验室规则	4
第四节 实验记录与实验报告	5
第一章 糖的化学	10
实验一 还原糖和总糖的测定——3,5-二硝基水杨酸比色法	10
实验二 还原糖含量测定——砷钼酸比色法	12
实验三 可溶性总糖测定——蒽酮比色法	14
实验四 可溶性糖的分离提取与薄层层析鉴定	15
实验五 真菌多糖的提取与鉴定	19
实验六 牛眼透明质酸的分离及含量测定	21
第二章 脂类化学	24
实验七 脂肪碘值的测定	24
实验八 油脂酸价的测定	26
实验九 粗脂肪含量的测定——索氏抽提法	27
实验十 豆磷脂的制备与鉴定	29
第三章 蛋白质化学	34
实验十一 氨基酸纤维素薄层层析	34
实验十二 胰岛素 N-末端氨基酸 DNS 分析法	35
实验十三 总氮含量的测定	37
实验十四 脯氨酸含量的测定	40
实验十五 茚三酮显色法测定氨基酸含量	41
实验十六 赖氨酸含量测定——茚三酮显色法	42
实验十七 考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量	44
实验十八 Folin-酚法测定蛋白质含量	46
实验十九 紫外吸收法测定蛋白质含量	48
实验二十 蛋白质分子量测定——SDS-PAGE 法	49
实验二十一 凝胶层析法测定蛋白质的分子量	52
实验二十二 牛乳中酪蛋白的提取与检测	57
第四章 核酸化学	60
实验二十三 酵母 RNA 的提制——浓盐法	60
实验二十四 酵母 RNA 与 DNA 的提取（稀碱法）及颜色反应	62
实验二十五 地衣酚显色法测定 RNA 含量	64
实验二十六 三种腺苷酸分离鉴定——醋酸纤维素薄膜电泳法	65
实验二十七 紫外吸收法测定核酸的含量	66
实验二十八 植物 DNA 的提取与测定	69

实验二十九 总 RNA 提取与 mRNA 分离	72
实验三十 质粒 DNA 的提取、酶切与鉴定	74
实验三十一 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化	77
实验三十二 多聚酶链式反应 (PCR)	79
第五章 酶	82
实验三十三 淀粉酶活力的测定	82
实验三十四 淀粉酶酶学性质研究	84
实验三十五 植物组织中蔗糖酶活力的测定	86
实验三十六 硝酸还原酶活性的测定	88
实验三十七 蛋清溶菌酶的提取及活性测定	90
实验三十八 谷氨酸-丙酮酸转氨酶活性测定	93
实验三十九 纤维素酶活力的测定	95
实验四十 过氧化物酶活性的测定	99
实验四十一 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离过氧化物同工酶	100
实验四十二 超氧化物歧化酶 (SOD) 活力测定——邻苯三酚法	105
实验四十三 玉米超氧化物歧化酶 (SOD) 的分离纯化、活力测定及电泳鉴定	108
第六章 维生素	113
实验四十四 维生素 A 的含量测定	113
实验四十五 维生素 B ₁ 含量测定	115
实验四十六 维生素 C 的含量测定——滴定法	117
实验四十七 维生素 C 的含量测定——比色法	119
第七章 生物氧化	121
实验四十八 细胞色素体系的作用及其抑制	121
实验四十九 琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制实验	122
实验五十 过氧化氢酶的酶活性测定	124
附录	129
附录一 玻璃仪器的洗涤及各种洗液的配制	129
附录二 实验室常用仪器的使用	130
附录三 试剂的配制与保存	138
附录四 常见蛋白质、核酸等的相关参数	152
附录五 层析法有关数据表	155
参考文献	158

绪 论

生物化学实验与理论课紧密联系，是对课堂教学质量的检验，但也是一个独立的部分，有自己的特色。因此，要求学生通过实验不仅是检验理论知识，更为重要的是提升课堂理论，同时又使自己能主动地通过实验懂得如何获得新的知识，其中最重要的是深刻理解怎样去创造知识并充实自己。

第一节 做好生化实验的“6字令”

生物化学实验与其他自然科学中的实验要求相同，除需要有清新、整洁、有序的实验环境，还要师生间的协调和合作，从教师方来说，要把学生放在核心位置，而学生应把教师看作是指路的明灯，相互配合是做好实验教学的基本保证。归纳起来是：良好而有序的开端，聚精会神的操作过程，善始善终的结尾。即将看、讲、管、查、改、评，分别分散到这三个阶段。

一、良好而有序的开端

在这一阶段包括“看”、“讲”二字。

1. 看

看，包括教师和学生两个方面。对教师来说，在一堂课的开始，首先就是引领学生环视实验室的环境是否干净、整洁，实验所需器具、试剂是否齐全，仪器是否正常、水电是否畅通等；对学生一方，通过教师的引导，一一核查实验的材料，对实验环境清理状况作下记录，使自己明确实验结束后应该怎样做，以便为别人创造良好的环境。其次是教师要通过提问，了解学生对当堂实验指导是否作了预习，看其对实验的基本内容熟悉了没有。若还是不了解或生疏，就要引导学生进行课前预习，一定要做到在实验前要较好地了解当堂实验的基本内容，真正了解当堂实验是做什么，怎么做，解决什么问题，这样才可使当堂实验取得良好的效果。第三，通过引导学生对当堂实验所使用仪器工作原理、基本使用方法的了解，使学生了解仪器的正确使用，避免操作时因不规范的操作而导致仪器的损坏。

总之，“看”是体现在对实验准备的了解，对实验内容的明确、实验中仪器操作规程的熟悉，减少实验中的盲目性，充分做好“实战”前的准备。

2. 讲

通常所指的讲是讲解当堂实验课的基本内容。在这里的“讲”是讲解学生通过对当堂实验已预习的状态下的讲。重点不是全面的讲述，而是针对实验的重点问题、操作的要点、重要的注意事项进行讲解，借以提请学生对该堂实验的重视，明确当堂实验的难点和关键问题，避免在实验过程中出现不该存在的问题，提高实验的效果；其次，要做好实验中关键操作的示范，加深学生对实验难点问题解决的印象，而不是过多的重复已讲过的内容。第三，讲的内容是突出本实验的基本点，引导学生懂得怎样观察，关注实验的过程，怎样记录实验过程中测定的基本数据及发生现象的转变过程，为做好实验报告奠定基础，尤其是实验中对重要或较新型仪器使用的规则，要讲清并反复强调对贵重仪器使用方法及影响仪器测定的有关因素，提高对实验操作中数据测定的准确性，必要时，对自己所认定的重点注意的地方要提问学生，借以提起学生的注视。

二、聚精会神的操作过程

在这里强调的问题是对学生在实验中的“管”和“查”。

1. 管

管是教师要加强对整个实验过程中的巡视，看一看学生的操作是否依操作规程进行，动作是否规范，是否符合安全操作要求。不仅重视大型仪器的安全，还要注意对常规仪器典型案例的提示，如移液管、滴定管的正确使用。相当多的学生的操作不符合要求（如像握拳头似的操作移液管，操作滴定管时只注意看颜色的变化，而忽视控制滴定液的流速等），这些操作虽是平常又平常，但却影响所测数据的正确性。因此，在巡视中，对出现的严重不规范的典型操作，要及时纠正指出并进行示范操作，借以引起广泛的重视，培养学生严谨的工作作风、树立正确的科学态度。

2. 查

实验结束时，教师及值日生要立足于做好当班实验的结束工作。主要是“四查”。

一查学生实验数据和结果的处理。实验教师要有目的抽查和记录当班学生的实验情况，及时教育学生要以实事求是的态度对待实验结果，不允许抄袭，不允许借鉴他人的结果，注意对学生道德的培养。如发现伪造或抄袭的不良现象要及时纠正，或者另改时间重做。

二查学生实验后对本身使用操作台的清理工作。为值日生整理实验室提供方便，培养学生善于体贴他人，树立把困难留给自己，把方便留给他人的优秀品质，促进人际关系的和谐与团结。要求该清洗的清洗，归位的归位，确保实验室的整洁、干净，让值日生不为每个方面的清理消耗较多时间，保障实验室药品、仪器、器皿整齐划一，教育学生要有对值日工作保持高度的责任感。

三查当班实验室的安全隐患，即仪器设备的隐患及归位情况，电水开关安全状态，易燃、易爆、有毒药品等危险药品是否归位，避免引发事故，保证当班实验的安全，对于出现的问题要督促学生及时排除，特别是当班的值日生要做到在上述实验三方面检查后方可离开实验室。

四查室内卫生状况，值日生要对实验室进行清扫，对废弃物、垃圾、水槽内污物要放到指定地方。要通过清扫、整理垃圾，使学生体验到清静舒适环境要靠大家维护，树立良好的集体主义精神。

三、善始善终的结尾

这是一个实验的结束工作。通过这一步工作，学生对所做的工作进行总结，写出报告，由老师进行详阅，改正某些不当，甚至错误的概念，保证知识的科学性和准确性，使其对所获知识上升到一个新的水平。结尾工作包含“对实验报告的批改”和“对实验报告的评述”两部分。

1. 改

实验报告是学生对所做实验内容经科学分析后应作出的工作总结。实验教师于实验结束后要求学生撰写规范、详实的实验报告，对实验内容进行全面的、客观的评价，从中使学生了解该实验完成的质量。结果分析和讨论是实验报告的重点。基础实验是用于锻炼学生分析问题的能力，应要求学生充分、全面地把握和认识本次实验的精髓和实验成败的原因，真正懂得学会什么、不理解的问题是什么，达到纠正某些含糊不清的概念，牢固掌握已学过的知识。教师应对实验报告加注评语、评定。实验所完成的质量要以适当成绩予以标定，使学生能基本了解自己所完成实验的质量好坏和应改正之处。

2. 评

在进行新的实验之前，实验教师应对上一次实验教学情况与实验报告批改情况进行讲

评,可适当开展同组个人之间,组与组之间的交流,使学生互相取长补短,培养学生讨论、发现问题的能力,以提高教学质量。

综上所述,上文所叙实验运行中的“六字令”,不仅是生物化学实验教学过程规范管理的需要,也是其他自然科学实验要该遵守的通则,它的执行与推进不仅能带动生化实验的良性运行,还能增强指导教师之间的团结协作,提高了实验教学的质量。

第二节 学会当好“小先生”

生化实验过程像其他自然科学的实验一样,自始至终是一个师生互动的过程,不仅需要教师的精细组织指导,还需要学生的密切配合和协作才能完成实验任务。同时面对未来的择业,必须要有较好的专业素质,高度责任感,良好的动手、动脑能力才能适应未来工作的要求,普通生物化学实验是学生自我学习和锻炼的机会,通过教师面对面的言传身教,使学生获得练好“内功”的机会。

一、“小先生”的理念

“小先生”就是结合实验准备工作的需要,分期分批抽一定量的学生跟随实验教师实行3~5个人为一个团队,通过老师面对面地传授知识和技术,即同备课、同准备预实验、同观察及对结果的处理、分析,取得对进行该实验的初步经验,然后再回到所在班组与其他同学共同实验,介绍并讲解当班实验准备的全过程,辅导他人的实验操作,减轻指导老师管理压力。这些被抽出的学生称之为“小先生”。

“小先生”作用有三个方面:第一,通过跟指导老师做实验准备工作、做准备实验、发放实验所使用的仪器和试剂,使他们懂得实验的“准备、运行、结尾”的全过程,有利于对其他同学实验的指导、督促,提高当班实验的质量;第二,通过参与准备实验,使这些同学懂得什么才是进行实验的科学求真态度和做法,这不仅是学习科学知识,而且能培养治学态度;第三,通过学做“小先生”使这些学生优先从老师那里通过言传身教懂得做人处事的哲理,学会艰苦奋斗、勤俭节约等美德,要为其他同学树立好榜样;第四,通过与指导教师的面对面切磋,使学生学到如何管理实验过程、培养责任感,共同把当班实验管理好,为将来从事类似工作奠定基础。

二、培养“小先生”的途径

培养“小先生”涉及指导老师和学生两个方面的责任。对于指导老师来说,就是按照要求从严执教、从严管理;而对学生来说,严格按照教师制定的计划,努力完成学习任务,师生相互切磋,共同完成学习任务。

因此,对于学习者来说,严格按照指导教师或所发讲义或指导书所提出的要求,谨慎地实践,熟悉基本流程后再去探索,做到先熟悉并真正理解指导书所写内容及难点,在理解的基础上,完成实验所规定的任务,然后回到本组去指导其他学生,在协助任课教师做好帮带的过程中巩固已学的知识。

培养“小先生”是笔者的一种教学尝试,因为高校与中小学的教育不同,他的重点是在通过引导增强学生的独立思考的能力,从而达到实现跨越式的进步,为将来培养创新人才服务。因此,高校的教学不能是简单灌输,而是采取自主学习,独立思考,自主驾驭自己的学习方式,只有这样才能培养出创新式的人才。

三、“小先生”的任务

一切创造发明均来源于实践与观察,要有大的创造发明,首先要从小事做起,要经历由低级到高级、由简单到复杂、由模仿到设计的过程,可见“小先生”是当“高级先生”的基

础。学做小先生就是通过对试剂的配置、试剂分组、仪器调试、水电准备、常用仪器的清理洗涤等操作的系统训练,初步熟悉实验准备工作的基础过程,为将来从事同类工作奠定基础。其具体任务如下。

(1) 熟悉当班实验内容。在做实验准备工作前,首先依指导教师的安排,预习当班实验内容,了解实验是做什么,怎么做,解决什么问题;熟悉实验室基本环境,了解水电开关,使用的基础仪器、用具和排污情况。

(2) 协助指导教师准备当班实验所需仪器和试剂,并按实验要求配置与实验相关试剂。

(3) 对已配好的试剂,按各实验小组用量和对实验所需不同试剂的消耗,分发并放在指定的地方。

(4) 调试好各组实验台上所用仪器,供实验时使用,并采集当班实验所需实验材料供其他同学在实验的时候使用。

(5) 做好所在班所做实验的准备实验,回班级协助指导教师在上实验课时作好所在组的指导工作。

(6) 实验工作结束后,积极主动协助实验指导老师做好当班实验所使用试剂、仪器的收尾整理工作。

第三节 实验室规则

高等学校的实验室是专门用作实验教学和开展教学研究等非常重要的基地。生物化学实验既是验证理论知识的阵地,又是技术训练的平台,为使实验能正常运作,保证实验室的安全、安静、整洁,有下列管理规则。

一、实验前后的要求

(1) 为确保实验室的正常秩序,每位同学都应该自觉遵守实验室的纪律,不迟到、不早退、不得在实验室内大声喧哗、打闹、吸烟、进食、喝水、穿拖鞋或背心参加实验。

(2) 实验前须预习实验指导书,明确实验要求、原理、所作内容、注意事项、预期结果。

(3) 要集中思想,严格操作、发挥独立思考和分析判断能力、培养严肃的科学态度。如实验结果不佳,必须查找原因和重做,直至结果满意为止。

(4) 及时地记录实验现象、结果和数据,严禁相互抄袭,课后写出实验报告,按时交给老师。

二、仪器的使用,清洁和保养

(1) 常用仪器 实验前必须按仪器清单进行清点,并负责保管,若有缺损则报告老师并换领,若由于操作不当造成仪器损坏时应如实向指导老师报告,补领并在损坏仪器簿上登记。

(2) 环境和仪器的清洁 整洁是做好实验的重要前提,实验台面、试剂药品架必须保持整洁,仪器、药品的摆设要井然有序,勿使试剂、药品撒在实验台面或地面上。

(3) 实验完毕须将药品、试剂排列整齐,玻璃仪器须及时洗涤,按顺序放好,经指导老师检查后,方可离开实验室。

(4) 贵重、精密仪器要谨慎使用,非本次实验所用的仪器未经老师允许,不得随意乱动。本次实验需使用的仪器,使用前首先了解其使用方法,在老师的指导下认真操作,保持整洁,防止震荡或跌落。仪器使用后认真填写记录本,如有故障,务必详细、认真检查。

(5) 实验室的一切物品,未经本室教师许可,严禁带出室外。

三、试剂的使用规则

- (1) 使用试剂前一定要仔细辨认标签, 看清名称浓度是否为本实验所用。
- (2) 使用药品试剂和各种物品必须注意节约, 特别要保持药品和试剂的纯净, 公用试剂用毕, 立即将瓶塞盖严, 切勿盖错, 然后放回原处。未用完的试剂不得倒回瓶内。
- (3) 使用有毒或腐蚀性较强的试剂尽可能用量筒量取, 若必须用吸管时, 一定使用吸耳球, 切勿用嘴吸取, 以免造成意外。

四、实验安全事项

- (1) 实验室所用的易燃物品, 如乙醚、石油醚、乙醇等有机溶剂使用时严禁明火, 远离火源。若需加热, 不可直接在电炉上加热, 要使用水浴。
- (2) 凡使用有害或有毒的物品如 HCl 、 HgCl_2 等均应在通风橱进行, 以免造成人体危害。实验室若发生起火事件, 根据发生火情性质分别采用砂、 H_2O 、 CO_2 或 ClH_4 等灭火器扑灭。
- (3) 若操作不小心被强酸、强碱溅到皮肤上, 应立即用大量自来水冲洗。若被强酸灼伤, 用饱和 NaHCO_3 溶液中和; 若被碱灼伤用饱和 H_3PO_4 溶液中和; 若被氧化剂伤害, 要用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 处理。
- (4) 离开实验室时, 一定要切断电源、火源、水源以确保安全。

五、实验室清洁

- (1) 实验室的环境始终要保持清洁。同学不得随地吐痰, 不准乱丢、乱倒废弃物 (如滤纸、滤渣、碎玻璃等)。要倒入废液缸或指定的回收容器中。
- (2) 实验结束, 应清理使用过的仪器、实验台面、并将仪器统一摆放整齐。
- (3) 实验结束, 由班长安排同学轮流值日, 值日生负责当天实验室的卫生, 检查每组的实验台面、仪器的清理、摆放并拖洗地面和实验室安全等服务性工作 (如检查水龙头是否关紧, 电源插头是否拔掉), 经老师检查完毕方能离开实验室。

第四节 实验记录与实验报告

一、实验记录

实验课前应认真预习, 将实验名称、目的和要求、原理、实验内容、操作方法和步骤简明扼要地写在实验记录本上。

实验记录本应标上页数, 不要撕去任何一页, 更不要擦抹及涂改, 写错时可以划去重写, 记录时必须用钢笔, 勿用圆珠笔和铅笔撰写, 否则易脱色和渗透, 影响查阅。

实验中观察到的现象、结果和数据应及时如实地记在记录本上。绝对不可以用单片纸做记录或草稿。原始记录必须准确、简练详尽、清楚。

记录时应做到正确记录实验结果, 切勿夹杂主观因素。在定量实验中观测的数据, 如称量物的质量, 滴定管的读数、分光光度计的读数等, 都应设计一定的表格准确记下正确的读数, 并根据仪器的精确度准确记录有效数字。例如, 光密度值为 0.050 不应写成 0.05, 每一个结果最少要重复观测两次以上。当符合实验要求并确知仪器工作正常后写在记录本上。实验记录上的每一个数字, 都是反映每一次的测量结果。所以, 重复观测时即使数据完全相同也应如实记录下来, 数据的计算也应该写在记录本上。总之实验的每个结果都应正确无遗漏地做好记录。

实验中使用仪器的类型, 编号以及试剂的规格、化学式、分子量、准确的浓度等, 也都应记录清楚, 以便总结实验时, 进行核对和作为查找失败原因的参考依据。

如果发现记录的结果有疑问、遗漏、丢失等, 都必须重做实验。

二、实验报告

实验结束后,应及时整理和总结实验结果,写出实验报告。报告的形式可参照下列方式。

实验(编号)

实验名称

一、实验目的和要求

二、实验基本原理

三、实验简要操作步骤与注意事项

四、实验现象与结果

五、实验结果分析与讨论

六、思考题

在实验报告中,目的和要求、原理以及操作步骤部分应简明扼要的叙述。但是,对于实验操作的关键环节与实验注意事项应写清楚。对于实验结果部分,应根据实验的要求将一定实验条件下获得的实验结果和数据进行整理、归纳,分析和对比,并尽量总结成各种图表,如原始数据及其处理的表格,标准曲线图以及比较实验组与对照实验结果的图表等。另外,还应针对实验结果进行必要的说明和分析。讨论部分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,如实验的正常结果、异常现象以及思考题所进行的探讨。对于实验设计的认识、体会和建议,及对实验课的改进意见等,均可写在上面。

七、实验过程的记录

以下附课堂实验过程记录范例(I)和实验报告范例(II)。

I 实验过程记录的标准范例

广玉兰油对大鼠降脂实验记录

1. 实验材料

1.1 实验动物

健康雄性清洁级SD大鼠,体重200~220g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,合格证号:SCXK(沪)2008-0016。

1.2 药品及试剂

- (1) 广玉兰油:安徽农业大学生命科学学院提供,批号:待定;
- (2) 辛伐他汀:广东彼迪药业有限公司,批号:20090101;
- (3) 胆固醇:上海蓝季科技发展有限公司,批号:060920;
- (4) 丙硫氧吡啶:上海复星朝晖药业有限公司,批号:060901;
- (5) 牛黄胆酸钠:Sigma公司,批号:066K1704;
- (6) TG, TC, MDL-C, LDL-C测定试剂盒:长春汇力生物科技有限公司;
- (7) SOD, GSM-P_X; MDA试剂盒:南京建成生物工程研究所。

1.3 实验仪器

- (1) 756P紫外分光光度计:上海光谱仪器有限公司;
- (2) MM-420S数显恒温水箱:金培市大地自动化仪器厂;
- (3) FA/JA电子天平:上海精天电子仪器有限公司。

2. 实验方法

2.1 大鼠高脂血症模型

2.1.1 动物模型的建立 上述SD大鼠适应喂养一周后,随机分为2组,一组作为对照组(10只),另外一组作为造模组(70只),2组均给予基础饲料。参照文献方法[1]制

备高脂乳剂(含10%胆固醇,20%猪油,2%胆酸钠,1%丙硫氧吡啶,20%山梨醇甲酯,20%丙二醇)。造模组每天上午灌胃给予高脂乳剂 $0.01\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 体重,同时正常组灌胃等量生理盐水,连续用至第十天时,各组动物断尾取血,测血清TC,以造模组血清TC显著高于正常组为确定造模成功的指标。造模处理后,从模型组共选出50只造模成功的大鼠,即高脂血症大鼠。

2.1.2 分组给药及标本处理 除正常对照组外,模型组中高脂血症大鼠随机分为5组,每组10只,分别为:模型组、辛伐他汀对照组(阳性药组),广玉兰油 $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 4个剂量组。每天下午,正常组和模型组给等体积的饮用水,广玉兰油各剂量组分别给予广玉兰油 $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,阳性药组给予辛伐他汀 $200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,连续灌胃给药20d,给药过程中,除正常组外,其余各组上午继续给予高脂乳剂($0.01\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)灌胃。每周称体重一次,随体重调整给药量。末次给药后,禁食12h,乌拉坦腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,分离血清。

2.1.3 指标测定及方法 采用氧化酶法测定血清TC、TG、LDL-C、MDL-C;黄嘌呤氧化酶法测定血清SOD的含量;硫代芭比妥酸(TBA)法测定血清MDA的含量。采用比色法测定血清GSH-PX活性。

2.2 统计学分析

用SPSS11.0统计软件进行统计,数据以 $\bar{X}\pm S$ 表示;采用单因素方差分析和 t 检验,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

3. 参考文献:

刘明,董超仁,苏怡静.一种简便实用的大鼠高脂血症模型.中国药理学通报[J],1989,5(2):119。

4. 大鼠的生长情况观察,每周称体重一次,并且一一记录(表1)。

表1 大鼠的生长情况

组 别		日期	4.27	5.2	5.9	5.16	5.23	5.30	6.3
正 常 组	第一笼	A	183	242	279	300	326	342	355
		B	220	273	306	321	342	365	370
		C	217	266	297	335	375	393	411
		D	191	278	312	330	348	375	391
		E	180	236	260	273	295	318	325
	第二笼	F	180	227	265	322	350	350	347
		G	194	230	246	285	321	320	316
		H	216	242	273	301	320	321	322
		I	211	275	310	385	420	423	425

II 实验报告范例

实验(编号):4

实验名称: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质亚基的分子量

一、实验目的和要求

1. 掌握垂直板型聚丙烯酰胺凝胶电泳技术。
2. 掌握 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质亚基分子量的原理和方法。

二、实验基本原理

SDS是一种阴离子去污剂。在电泳体系中加入一定浓度 SDS 并与蛋白质分子结合成复

合物,使蛋白质分子带负电荷,这种负电荷远远超过了蛋白质分子原有的电荷,从而减低或消除了各种蛋白质分子天然电荷的差异,使蛋白质泳动率的大小完全取决于分子量。那么单体蛋白质或亚基的相对分子质量与电泳迁移率呈线性关系,即由下式表示:

$$\lg M_r = K - bx$$

上述式中的 M_r 为单体蛋白质或蛋白质亚基的相对分子质量; x 为电泳的相对迁移率; K 为截距; b 为斜率。

当测定某未知蛋白质的分子量时,只需用已知分子量标准蛋白质的迁移率对分子量的对数作图,即可获得一条标准曲线。因未知蛋白质与已知分子量蛋白质在相同条件下电泳时,得到样品电泳迁移率,再通过从标准曲线上查得相对应的分子量,即为未知蛋白质分子量。

三、实验简要操作步骤

(1) 安装电泳槽:按照电泳槽的使用说明安装电泳槽。

(2) 制备凝胶板:采用垂直平板不连续缓冲体系的凝胶电泳,电极缓冲液 pH 为 8.3。凝胶板的配方如下:

成分	10%分离胶	2.5%浓缩胶
单体贮液	10.0mL	2.5mL
分离胶缓冲贮备液	3.75mL	--
浓缩胶缓冲贮备液	--	5.0mL
10%SDS	0.3mL	0.2mL
DDH ₂ O	14.45mL	11.3mL
TEMED	15 μ L	15 μ L
1.5%过硫酸铵	1.5mL	1.0mL

① 制分离胶:按上述依凝胶配方所制溶液加试剂,向装好的电泳槽并制胶。当灌入分离胶至电泳槽灌胶线处,用正丁醇均匀、轻缓地封胶,使凝胶线平直。待分离胶完全聚合时,用滤纸吸干正丁醇溶液后待制浓缩胶。

② 制浓缩胶:取上述(2)配方中溶液配制浓缩胶,即灌浓缩胶至电泳槽顶部,并用少量水封胶,插入梳子。待浓缩胶完全聚合后,轻取出梳子,用滤纸吸干水待加样。

(3) 电泳蛋白样液的处理:样品酶液及标准蛋白分别与上样缓冲液混合后,沸水浴 5min,冷却后点样。

(4) 电泳:灌注电极缓冲液后,进行电泳;至溴酚蓝到达距离胶底约 1~2cm 处时,停止电泳。

(5) 染色:取胶,置于考马斯亮蓝 R-250 染色液中,在室温下轻摇染色。

(6) 脱色:加入脱色液,于摇床轻摇脱色,直至无背景色。

(7) 求分子量:计算各标准相对分子质量蛋白质和样品的相对迁移率 R_f 值。以 R_f 值为横坐标,标准相对分子质量的常用对数值 ($\lg M_r$) 作为纵坐标制作标准曲线,以样品的 R_f 值求出样品相对分子质量。

四、实验结果分析与讨论

实验结果见图 1。

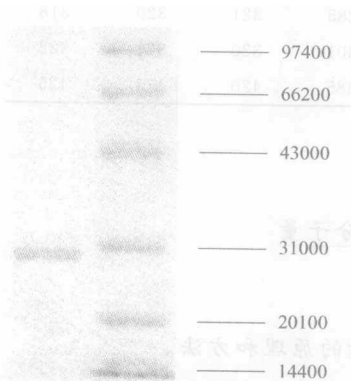


图 1 SDS-PAGE 电泳图谱

样品经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 结果显示为单一条带, 标准分子量蛋白显示 6 条条带。

计算各标准相对分子质量蛋白质和样品的相对迁移率 R_f 值, 可知图中标准分子量蛋白的 R_f 分别为 0.166、0.276、0.414、0.552、0.827、0.897, 作标准曲线如图 2 所示, 其回归方程为 $y = -1.0506x + 5.1142$, $R^2 = 0.9797$ 。再将样品电泳结果与标准蛋白比较, 其亚基 R_f 为 0.393, 因此, 其相对分子质量介于 $(43.0 \sim 66.2) \times 10^3$ 之间, 由回归方程可计算得出该蛋白亚基相对分子质量约为 50×10^3 。若该蛋白为由相同亚基组成的, 则可进一步推测该蛋白的全蛋白相对分子质量为 $50 \times 10^3 \times$ 所具亚基数。

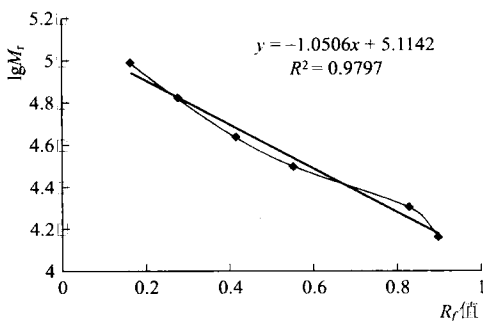


图 2 低分子量标准蛋白所作的标准曲线

图 2 低分子量标准蛋白所作的标准曲线

五、思考题

1. SDS-PAGE 电泳凝胶中各主要成分的作用?

答: 聚丙烯酰胺的作用: 聚丙烯酰胺为蛋白质电泳提供载体, 其凝固的好坏直接关系到电泳成功与否, 与促凝剂及环境密切相关;

TEMED 与 AP: AP 提供自由基, TEMED 是催化剂, 催化自由基引起的聚合反应进行;

十二烷基硫酸钠 (SDS): 阴离子去污剂, 作用有四方面: 去除蛋白质电荷、解离蛋白质之间的氢键、取消蛋白分子内的疏水作用、去除多肽折叠。

2. 为什么带出现拖尾现象?

答: 主要是样品融解及亚基分离效果不佳或分离胶浓度过大引起的。

处理办法: 加样前离心; 选择适当的样品缓冲液, 加适量样品促溶剂; 电泳缓冲液时间过长, 重新配制; 降低凝胶浓度。

本实验注意事项

(1) N,N' -亚甲基双丙烯酰胺为神经毒性物质, 可经皮肤直接吸收, 使用时应避免其直接接触皮肤, 必要时应戴手套。但其凝固后就变成无毒物质。

(2) 凝胶配制过程要迅速, 催化剂 TEMED 要在注入胶前再加, 否则凝胶凝结无法注胶, 而且注胶过程最好一次性完成, 避免产生气泡。

(3) 样梳需一次平稳插入, 梳口处不得有气泡, 梳底需水平。

(4) 加样时注射器不可过低, 以防刺破胶体, 也不可过高, 在样品下沉时会发生扩散。为避免边缘效应, 最好选用位于凝胶中间的梳齿孔注入样品。

(5) SDS 与蛋白质的结合按质量成比例 (即: 1.4g SDS 每克蛋白质), 蛋白质含量不可以随意超标, 否则 SDS 结合量不足。

(6) 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质相对分子质量时, 必须同时作标准曲线, 即每次制作该曲线只能使用一次, 由于环境是变量因素 (如温度等), 不能将这次的标准曲线作为下次用。并且 SDS-PAGE 测定分子量有 10% 误差, 不可完全信任。

(7) 有的蛋白质 (如电荷异常或结构异常的蛋白质; 带有较大辅基的蛋白质) 不能采用该法测相对分子质量。

(8) 如果该电泳中出现拖尾、染色带的背景不清晰等现象, 可能是 SDS 不纯所致。

第一章 糖的化学

实验一 还原糖和总糖的测定——3,5-二硝基水杨酸比色法

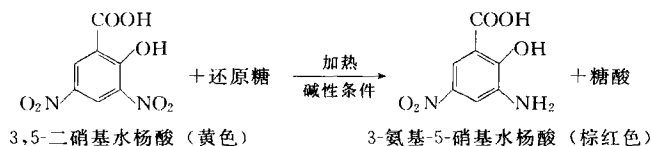
一、目的

掌握还原糖和总糖测定的基本原理，进一步熟练比色法测定还原糖的操作方法和分光光度计的使用。

二、原理

还原糖的测定是糖定量测定的基本方法。还原糖是指含有自由醛基或酮基的糖类，单糖都是还原糖，双糖和多糖不一定是还原糖，其中乳糖和麦芽糖是还原糖，蔗糖和淀粉是非还原糖。利用糖的溶解度不同，可将植物样品中的单糖、双糖和多糖分别提取出来，对没有还原性的双糖和多糖，可用酸水解法使其降解成有还原性的单糖进行测定，再分别求出样品中还原糖和总糖的含量（还原糖以葡萄糖含量计）。

还原糖在碱性条件下加热被氧化成糖酸及其他产物，3,5-二硝基水杨酸则被还原为棕红色的 3-氨基-5-硝基水杨酸。在一定范围内，还原糖的量与棕红色物质颜色的深浅成正比关系，利用分光光度计，在 540nm 波长下测定光密度值，查对标准曲线并计算，便可求出样品中还原糖和总糖的含量。由于多糖水解为单糖时，每断裂一个糖苷键需加入一分子水，所以在计算多糖含量时应乘以 0.9。



三、实验材料、主要仪器与主要试剂

1. 实验材料

小麦面粉；精密 pH 试纸。

2. 主要仪器

- | | |
|------------------------------|-------------|
| (1) 具塞玻璃刻度试管：20mL×11； | (7) 恒温水浴锅； |
| (2) 大离心管：50mL×2； | (8) 沸水浴； |
| (3) 烧杯：100mL×1； | (9) 离心机； |
| (4) 三角瓶：100mL×1； | (10) 扭力天平； |
| (5) 容量瓶：100mL×3； | (11) 分光光度计。 |
| (6) 刻度吸管：1mL×1；2mL×2；10mL×1； | |

3. 主要试剂

(1) 1mg/mL 葡萄糖标准液 准确称取 80℃ 烘至恒重的分析纯葡萄糖 100mg，置于小烧杯中，加少量蒸馏水溶解后，转移到 100mL 容量瓶中，用蒸馏水定容至 100mL，混匀，4℃ 冰箱中保存备用。

(2) 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 试剂 将 6.3g DNS 和 262mL 2mol/L NaOH 溶液, 加到 500mL 含有 185g 酒石酸钾钠的热水溶液中, 再加 5g 结晶酚和 5g 亚硫酸钠, 搅拌溶解, 冷却后加蒸馏水定容至 1000mL, 贮于棕色瓶中备用。

(3) 碘-碘化钾溶液 称取 5g 碘和 10g 碘化钾, 溶于 100mL 蒸馏水中。

(4) 酚酞指示剂 称取 0.1g 酚酞, 溶于 250mL 70% 乙醇中。

(5) 6mol/L HCl 和 6mol/L NaOH 各 100mL。

四、操作步骤

1. 制作葡萄糖标准曲线

取 7 支 20mL 具塞刻度试管编号, 按表 1-1 分别加入浓度为 1mg/mL 的葡萄糖标准液、蒸馏水和 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 试剂, 配成不同葡萄糖含量的反应液。

表 1-1 葡萄糖标准曲线制作

管号	1mg/mL 葡萄糖标准液/mL	蒸馏水/mL	DNS/mL	葡萄糖含量/mg	光密度值(OD_{540nm})
0	0	2	1.5	0	
1	0.2	1.8	1.5	0.2	
2	0.4	1.6	1.5	0.4	
3	0.6	1.4	1.5	0.6	
4	0.8	1.2	1.5	0.8	
5	1.0	1.0	1.5	1.0	
6	1.2	0.8	1.5	1.2	

将各管摇匀, 在沸水浴中准确加热 5min, 取出, 冷却至室温, 用蒸馏水定容至 20mL, 加塞后颠倒混匀, 在分光光度计上进行比色。调波长 540nm, 用 0 号管调零点, 测出 1~6 号管的光密度值。以光密度值为纵坐标, 葡萄糖含量 (mg) 为横坐标, 在坐标纸上绘出标准曲线。

2. 样品中还原糖和总糖的测定

(1) 还原糖的提取 准确称取 3.00g 食用面粉, 放入 100mL 烧杯中, 先用少量蒸馏水调成糊状, 然后加入 50mL 蒸馏水, 搅匀, 置于 50℃ 恒温水浴中保温 20min, 使还原糖浸出。将浸出液 (含沉淀) 转移到 50mL 离心管中, 于 4000r/min 下离心 5min, 沉淀可用 20mL 蒸馏水洗一次, 再离心, 将两次离心的上清液收集在 100mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度, 混匀, 作为还原糖待测液。

(2) 总糖的水解和提取 准确称取 1.00g 食用面粉, 放入 100mL 三角瓶中, 加 15mL 蒸馏水及 10mL 6mol/L HCl, 置沸水浴中加热水解 30min (水解是否完全可用碘-碘化钾溶液检查)。待三角瓶中的水解液冷却后, 加入 1 滴酚酞指示剂, 用 6mol/L NaOH 中和至微红色, 用蒸馏水定容在 100mL 容量瓶中, 混匀。将定容后的水解液过滤, 取滤液 10mL, 移入另一 100mL 容量瓶中定容, 混匀, 作为总糖待测液。

(3) 显色和比色 取 4 支 20mL 具塞刻度试管、编号, 按表 1-2 所示分别加入待测液和显色剂, 空白调零可使用制作标准曲线的 0 号管。加热、定容和比色等其余操作与制作标准曲线相同。

表 1-2 样品还原糖测定

管号	还原糖待测液/mL	总糖待测液/mL	蒸馏水/mL	DNS/mL	光密度值(OD_{540nm})	查曲线葡萄糖量/mg
7	0.5		1.5	1.5		
8	0.5		1.5	1.5		
9		1	1	1.5		
10		1	1	1.5		