



张变红 刘 敏◎主编

生物化学与分子生物学
基础实验指导

华东师范大学精品教材建设专项基金资助编写

生物化学与分子生物学 基础实验指导

张变红 刘敏◎主编



图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学基础实验指导/张变红,刘敏主编. —上海:华东师范大学出版社,2017
华东师范大学教材基金
ISBN 978-7-5675-6487-9

I. ①生… II. ①张…②刘… 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(2017)第 104991 号

华东师范大学教材出版基金资助出版

生物化学与分子生物学基础实验指导

主 编 张变红 刘 敏
编 著 张变红 刘 敏 杨捷频 党永岩
组稿编辑 孔繁荣
项目编辑 夏 玮
特约编辑 陈俊学
装帧设计 卢晓红

出版发行 华东师范大学出版社
社 址 上海市中山北路 3663 号 邮编 200062
网 址 www.ecnupress.com.cn
电 话 021-60821666 行政传真 021-62572105
客服电话 021-62865537 门市(邮购)电话 021-62869887
地 址 上海市中山北路 3663 号华东师范大学校内先锋路口
网 店 <http://hdsdcbs.tmall.com>

印 刷 者 浙江省临安市曙光印务有限公司
开 本 787×1092 16 开
印 张 9.75
字 数 168 千字
版 次 2017 年 6 月第 1 版
印 次 2017 年 6 月第 1 次
书 号 ISBN 978-7-5675-6487-9/Q·030
定 价 30.00 元

出版人 王 焰

(如发现本版图书有印订质量问题,请寄回本社客服中心调换或电话 021-62865537 联系)

本书编撰人员

张变红 刘一敏

杨捷频 党永岩

序 言

生物化学实验留给大多数同学的印象可能是枯燥、难懂、琐碎且不够系统，一直想能有一本图文并茂、形象易于理解、系统编写、最终让人爱不释手的实验教材；同时，一直从事科研工作的背景也不停召唤我们将科研感受与教学紧密结合起来。基于此初衷，我们编写了这本实验教材。

本教材主要由三大部分组成：基础实验篇、综合实验篇和拓展实验篇。基础实验篇涵盖了蛋白质（包括酶）、糖类等生物大分子的含量及活性测定实验，在课程进行过程中，使学生逐步掌握一些基本的实验技术及仪器的原理及应用。综合实验篇是一个连续的操作过程，以基因工程技术为主线，包括分子克隆及蛋白质表达纯化检测，涵盖了核酸及蛋白质生物大分子的纯化、检测等实验；系统实验将更利于学生的理解及拓展应用。拓展实验篇主要为科研工作中常用到的一些实验技术，包括 DNA 限制酶酶切图谱分析、利用酵母菌系统检测两种蛋白质之间相互作用、基因敲除小鼠的基因型鉴定、斑马鱼胚胎总 RNA 提取及反转录实验。这部分的增加更加丰富了实验内容，使本科生实验课程与前沿科学研究更加紧密联系起来。

本教材最大的特点除了生动形象、图文并茂外，就是在每一个实验中，在传统的实验目的、实验原理、实验试剂和仪器、实验步骤之外，增加了“实验设计关键点及注意事项”、“拓展内容”及“推荐阅读材料”版块。同时，附录部分单独列出“科研素质训练”版块。“实验设计关键点及注意事项”版块旨在结合每一个基础实验，潜移默化地训练学生设计实验的基本能力；“拓展内容”版块则更大程度地增加了教材的信息量，让学生在完成本实验之余，还能了解与实验相关的其他内容，开阔了学生的思维；“推荐阅读材料”版块则列出与该实验技术相关的一些高水平杂志上发表的研究论文，让学生体会所学基础技术的重要性，也可以潜移默化地提升学生阅读文献及论文写作能力；“科研素质训练”版块则旨在讲解做实验的一些基本常识，培养学生基本的科研素养以及严谨的实验态度，

比如如何做好实验记录，如何分析图片型实验结果，如何进行文献查阅，等。篇幅有限，知识无限，增加这些篇幅更倾向于对学生抛砖引玉地引导及潜能的触发。

在编写本教材的过程中，我们也大胆尝试了让学生真正参与，学生的潜力始终是远远超出我们想象的。非常感谢上海中医药大学 2014 级本硕生李亚鼎和鲁晓箬同学在本书图片绘制中的出色工作，以及从学生的角度对教材编写提出的宝贵意见！同时，也非常感谢华东师范大学生命科学学院胡婧婧老师在化学式编写中的鼎力相助！感谢华东师范大学生命科学学院 2015 级研究生马雪晴和张玲玲、2013 级研究生童璐一起拍摄实验图片！最后，非常感谢华东师范大学生命科学学院李晓涛教授从专业的角度对本教材编写提出的宝贵意见！

虽基于美好的初衷，但因为第一次编写教材，难免会有编写错误、偏颇及遗漏之处，还望专家与读者朋友予以指正。

编者

2016.09.10

目 录

第一部分 基础实验篇	1
实验一 维生素 C 的定量测定 ——2,6-二氯酚靛酚滴定法	3
实验二 蛋白质溶液浓度测定 ——福林酚法 (Lowry 法)	8
实验三 还原糖和总糖含量测定 ——3,5-二硝基水杨酸比色法	14
实验四 种子萌发前后淀粉酶活力的测定比较	20
实验五 正交法分析几种因素对酶活力的影响	27
实验六 蛋白质 N 末端氨基酸测定 ——DNS - CI 法	33
实验七 硫酸铵分级沉淀法分离纯化蛋白质	39
实验八 凝胶过滤层析法分离纯化蛋白质	43
第二部分 综合实验篇	51
实验九 小量大肠杆菌质粒 DNA 的提取和纯化	53
实验十 质粒 DNA 纯度、浓度和分子量测定及其构型观察 ——琼脂糖凝胶电泳法	61
实验十一 质粒 DNA 浓度及纯度检测 ——紫外分光光度法	67
实验十二 DNA 的体外扩增——PCR 技术	71

实验十三	DNA 的酶切和连接	77
实验十四	质粒 DNA 转化大肠杆菌	83
实验十五	His-tag 融合蛋白诱导表达	89
实验十六	SDS-PAGE 电泳检测蛋白质的诱导表达	95
实验十七	His-tag 蛋白的亲和层析纯化及检测	102
实验十八	纯化蛋白质的浓度检测——BCA 法	109
第三部分	拓展实验篇	115
实验十九	利用酵母双杂交系统检测蛋白间相互作用	117
实验二十	DNA 限制性内切酶酶切图谱分析	125
实验二十一	基因敲除小鼠的基因型鉴定	131
实验二十二	斑马鱼胚胎总 RNA 提取及反转录	137
附 录	基本科研素质培养	142
参考文献		147

第一部分 基础实验篇

本部分属于基础实验篇，着重于基础实验的学习以及基础能力的提高。本篇实验涉及最基本的实验技术，包括分光光度技术（比色法）和层析技术（色谱技术）。通过本部分一系列基础实验学习，能熟练掌握分光光度技术的原理及应用，理解层析技术的基本原理及应用；而电泳技术的原理及应用将在第二部分实验中重点介绍。通过本部分实验，旨在使学生具备基本的实验设计、实验操作的能力、规范的实验操作习惯和基本的科研素质，为更复杂系统的实验做好准备。

实验一 维生素 C 的定量测定

——2,6-二氯酚靛酚滴定法

一、想解决的问题

1. 想要知道水果蔬菜中维生素 C 的含量，如何利用生化方法检测？
2. “滴定法”测定物质含量的一般原理是什么？

二、实验原理

(一) 维生素 C 参与的颜色反应

维生素 C 因含有烯醇式结构而具有还原性，2,6-二氯酚靛酚具有氧化性，两者可以发生氧化还原反应。氧化型的 2,6-二氯酚靛酚在酸性溶液中呈现红色，在碱性溶液中呈蓝色。在微酸性环境中，维生素 C 能将氧化型的 2,6-二氯酚靛酚还原成无色产物，而维生素 C 被氧化成脱氢维生素 C (图 1-1)。

(二) “滴定法”测定维生素 C 含量的原理

由此，可以利用上述颜色反应进行维生素 C 含量的测定。当用 2,6-二氯酚靛酚滴定酸性溶液中的维生素 C 时，在维生素 C 尚未完全被氧化时，滴下的 2,6-二氯酚靛酚立即被还原成无色，但当溶液中的维生素 C 刚好全部被氧化时，滴下的 2,6-二氯酚靛酚立即

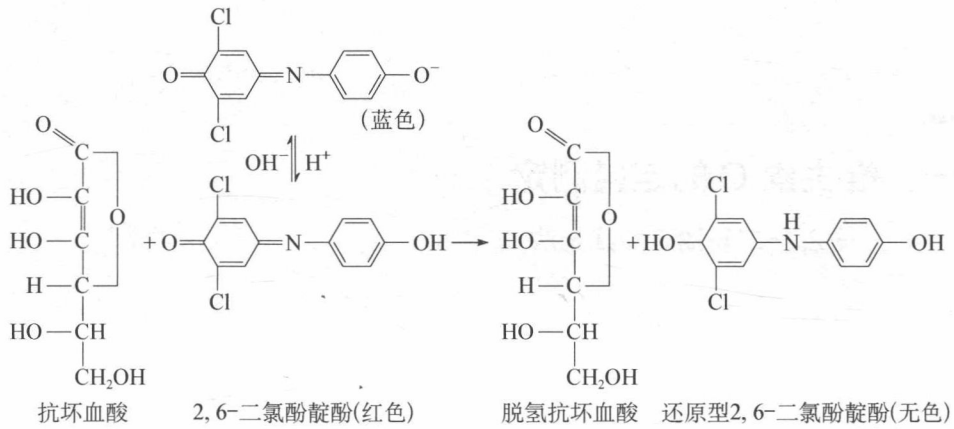


图 1-1 维生素 C 参与的颜色反应

使溶液呈红色，所以当溶液由无色变为淡红色时即表示溶液中的维生素 C 刚好全部被氧化，此时即为滴定终点。依据滴定过程中 2,6-二氯酚靛酚溶液的消耗量，即可计算出待测溶液中还原型维生素 C 的含量。

维生素 C 不稳定，容易被氧化，因此，2,6-二氯酚靛酚法测定维生素 C 含量时的影响因素较多，比如光照、温度、存储时间等，这些影响因素与样品的状态、接触氧气程度、处理时间长短等都有关系。

三、实验试剂和仪器

(一) 材料

新鲜水果、新鲜蔬菜。

(二) 试剂

1. 1%草酸溶液：1 g 草酸溶于蒸馏水中定容至 100 mL。
2. 2%草酸溶液：2 g 草酸溶于蒸馏水中定容至 100 mL。
3. 标准维生素 C 溶液 (0.01 mg/mL)：精确称取 40 mg 标准品维生素 C 溶于 1%草酸溶液中，稀释至 100 mL，再取其中 10 mL 稀释至 400 mL，即得 0.01 mg/mL 的维生素 C 溶液。使用前临时配制。

4. 2,6-二氯酚靛酚溶液 (0.012 5 mg/mL): 52 mg NaHCO_3 溶解在 200 mL 蒸馏水中, 加热至 60°C 左右, 再加入 62.5 mg 2,6-二氯酚靛酚充分溶解, 冷却后稀释至 500 mL, 过滤, 稀释 10 倍后置于棕色瓶中, 4°C 冰箱中保存备用。

(三) 仪器

研钵、天平、容量瓶、烧杯、移液管、微量滴定管、锥形瓶。

四、实验步骤

(一) 2,6-二氯酚靛酚溶液的标定

1. 空白对照

精确量取 10 mL 1% 的草酸溶液于锥形瓶中, 用 2,6-二氯酚靛酚溶液滴定至淡粉红色出现, 并保持 15 s 不褪色, 即为滴定终点, 此时所用溶液体积 (A) 作为空白对照。

2. 标准溶液的滴定

精确量取 10 mL 维生素 C 标准溶液 (0.01 mg/mL) 于锥形瓶中, 用 2,6-二氯酚靛酚溶液滴定至淡粉红色出现, 并保持 15 s 不褪色, 即为滴定终点, 记下此时所用溶液的体积 (B), 0.1 mg 标准维生素 C 溶液所消耗的 2,6-二氯酚靛酚溶液的体积为 (B - A), 由此可求出每消耗 1 mL 2,6-二氯酚靛酚溶液相当于维生素 C 的质量 (T)。

(二) 提取样品中维生素 C

取适量材料于研钵中, 加入 10 mL 2% 草酸溶液研磨, 得匀浆液, 用四层纱布过滤至小烧杯中, 然后每次用 10 mL 的 1% 草酸溶液冲洗研钵, 并将冲洗溶液经纱布过滤, 冲洗三次, 尽量挤尽纱布中水分, 将滤液转移至 50 mL 容量瓶, 用 1% 草酸溶液定容至 50 mL, 充分摇匀。

(三) 滴定

取上述步骤中溶液 10 mL 于锥形瓶中, 立即用标定过的 2,6-二氯酚靛酚溶液滴定, 直至溶液呈淡粉红色 15 s 不褪色为止。记录所用 2,6-二氯酚靛酚溶液的体积。

(四) 计算

每 100 g 样品中维生素 C 含量 (mg) = $T(V - A)N/W \times 100$

式中: T 为 1 mL 溶液相对应的维生素 C 的含量 (mg)。

V 为滴定样品所消耗溶液的体积 (mL)。

A 为空白对照消耗的溶液的体积 (mL)。

N 为样品总体积和所取反应液体积的比值。

W 为样品质量 (g)。

(五) 实验结果记录

空白对照消耗的 2,6-二氯酚靛酚溶液的体积 (mL):

滴定标准维生素 C 溶液消耗的 2,6-二氯酚靛酚溶液的体积 (mL):

滴定 10 mL 某果蔬维生素 C 溶液所消耗的 2,6-二氯酚靛酚溶液的体积 (mL):

果蔬质量 (g):

100 g 某果蔬中维生素 C 含量 (mg):

五、实验设计关键点及注意事项

1. 标准维生素 C 溶液的精确配制非常重要。
2. 滴定体积在 1 mL~4 mL 最佳, 可调整取样重量或溶解体积来改变滴定体积。
3. 滴定终点的把握非常重要, 这是导致实验误差的主要因素之一。当氧化还原反应完全后, 滴入 2,6-二氯酚靛酚溶液, 溶液即刻成微红色, 此即为滴定终点。

拓展内容

维生素是生命体所必需的重要的微量有机物, 它既不参与构成细胞, 也不提供能量, 但在细胞生长、代谢、发育过程中发挥着重要作用。维生素 C 是维生素家族中最重要的维

生素之一，属于水溶性维生素，缺乏时会产生坏血病，因此又称为抗坏血酸。最近又有研究发现，维生素 C 可以选择性杀死某些肿瘤细胞，提示了其抗肿瘤的功能及应用前景。维生素 C 是不饱和多羟基化合物，水果及蔬菜中含量都很丰富，通常以 100 g 果蔬中的维生素 C 含量 (μg) 来计算。不同种类果蔬维生素 C 的含量差别较大，比如刺梨含量高达 2 500 mg 左右，酸枣可达 900 mg 左右，而苹果、梨、香蕉等则在 10 mg 左右。

滴定法测定维生素 C 含量简便、快速，但容易受其他还原物的影响，并且对于颜色较深的样品，滴定终点不好把握，不便于操作。故可以采用精度较高但较复杂的荧光法、2,4-二硝基苯肼法或高效液相色谱法测定。

推荐阅读材料

1. BLASCHKE K, EBATA K T, KARIMI M M, et al. Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells [J]. *Nature*, 2013, 500(7461): 222 - 226.
2. YUN J, MULLARKY E, LU C, et al. Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH [J]. *Science*, 2015, 350(6266): 1391 - 1396.

思考题

1. 比较维生素 C 含量的各种测定法的优缺点。
2. 设计一个小实验探究温度对维生素 C 含量的影响。

实验二 蛋白质溶液浓度测定

——福林酚法 (Lowry 法)

一、想解决的问题

1. 科研或食品行业中，经常需要测定某溶液或物质中的蛋白质含量。蛋白质本身为无色无味的物质，如何测定溶液中的可溶性蛋白质含量呢？
2. 为什么需要制作标准曲线？如何制作标准曲线？
3. 什么叫分光光度法？可以解决哪些问题？

二、实验原理

(一) 蛋白质参与的颜色反应

碱性条件下，双缩脲可以和铜离子发生反应生成双缩脲络合物，此为双缩脲反应（图 2-1）。蛋白质肽键结构类似于双缩脲，也可在碱性条件下与铜离子发生双缩脲反应，生成淡紫色的蛋白质-铜络合物（图 2-2），这种络合物不稳定，其中的某些氨基酸（如酪氨

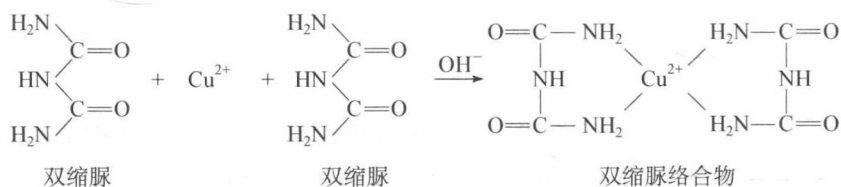


图 2-1 双缩脲反应

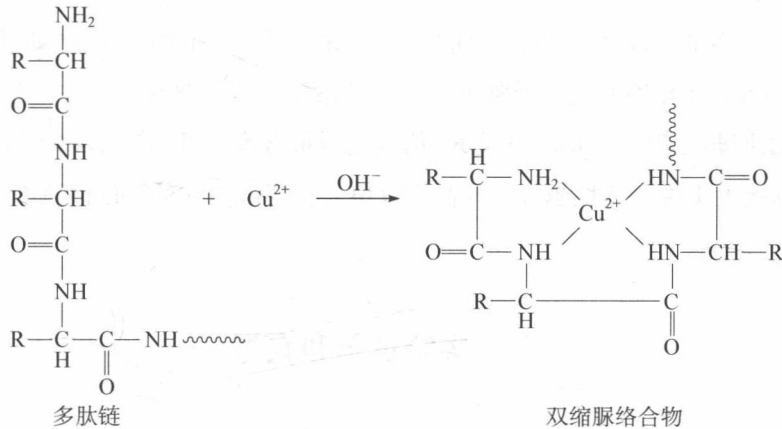


图 2-2 蛋白质多肽参与的双缩脲反应

酸、半胱氨酸、色氨酸)很容易还原福林酚(Folin)试剂中的磷钨酸和磷钼酸,使之生成钨蓝和钼蓝的混合物,蓝色的深浅即与蛋白质含量在一定范围内呈正相关性。

(二) 将蓝色产物量化并转换为蛋白质含量的方法

——分光光度法

分光光度法是利用物质对某种波长的光具有选择性吸收的特性建立起来的鉴别物质或测定含量的一项技术。当一束单色光通过溶液时(此为入射光,强度设为 I_0),一部分被吸收,一部分则透过溶液(此为透射光,强度设为 I_t),则透光度 $T = I_t/I_0$,吸光度(A)或光密度(OD)则可表示为 $A = -\lg T$ 。根据 Lambert-Beer 定律,吸光度与溶液的浓度成正比,与光束通过溶液的距离(即光程)成正比,即 $A = KLC$,式中 C 代表该物质的浓度, L 为光程(cm), K 为吸光系数。由上式可知,当 L 及 K 固定不变时, A 或 OD 与溶液浓度成正比例线性关系。当光通过待测溶液时,比色皿与其他试剂也吸收一部分光,这部分干扰需用空白对照管调零来消除。由此,可利用分光光度计测出深蓝色物质的 OD 值进而推算蛋白质含量。

(三) OD 值与蛋白质含量的转换—标准曲线的制作

分光光度计只能测得 OD 值,如何将 OD 值转换为蛋白质含量呢?这就需要制作标准曲线。首先测定溶液在不同波长下的吸收情况,以确定该物质的最大吸收波长;然后在此波长下,测定一系列已知浓度溶液(标准溶液)的 OD 值,做出 OD 值和蛋白质浓度之间的关系曲线,即为标准曲线。在分析未知溶液浓度时,根据测得的 OD 值,查标准曲线即