

3.5.3 实验内容

目录

1. 纤维素薄层层析——氨基酸分离
2. 醋酸纤维薄膜电泳——血清蛋白质分析
3. 酶的特性
4. 淀粉酶的活力测定
5. 1398 中性蛋白酶活力测定及 pH 对酶活力的影响
6. 氨基置换反应
7. 酵母核糖核酸 (RNA) 的提取
8. 单核苷酸的纸上电泳—RNA 水解产物的鉴定
9. 紫外吸收法测核酸含量
10. 蛋白质浓度测定 (福林酚法)
11. 维生素 C 的含量测定
12. 二苯胺法测定 DNA 含量
13. 总糖还原糖测定
14. RNA 的定量测定 (改良苔黑酚法)
15. 自选实验

具体内容

1. 纤维素薄层层析——氨基酸分离

【实验原理】薄层层析是一种微量而快速的层析方法,是将吸附剂或支持剂均匀地铺在玻板上成为薄层的一种层析技术。本次实验是以纤维素作支持物,用酸性溶剂系统展开,使混合 AA 得以分离。以茚三酮为显色剂,获得层析图谱。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, 温度等)下,各物质有固定的 Rf 值,据此可达到分离鉴定的目的。

【实验方法】制纤维素板,点样,层析,显色,计算 Rf 值并画出层析图谱。

【实验材料】标准 AA 溶液:亮氨酸、脯氨酸、组氨酸、谷氨酸以及上述四种氨基酸的混合样品。

【实验课时】3 学时

【代表性实验结果】

2. 醋酸纤维薄膜电泳——血清蛋白质分析

【实验原理】采用醋酸纤维素薄膜为支持物的电泳方法叫醋酸纤维薄膜电泳。由于血清中各种蛋白质等电点不同,在同一 pH 下所带电荷量不同,因而在电场中的泳动速度不同,从而将血清蛋白分为清蛋白、 α 1-球蛋白、 α 2-球蛋白、 β 球蛋白及 γ 球蛋白五个区带。

【实验方法】在醋酸纤维素薄膜上点样、电泳、染色、漂洗、画出电泳图谱。

【实验材料】血清

【实验课时】 3 学时

【代表性实验结果】

3. 酶的特性

【实验原理】 本实验利用唾液淀粉酶水解不同阶段淀粉与碘有不同颜色反应，定性观察唾液淀粉酶的水解作用。淀粉经酶促水解后不同阶段的产物与碘作用颜色反应如下：

淀粉(遇碘显蓝色) -----> 紫色糊精(遇碘显紫色) -----> 红色糊精(遇碘显红色) -----> 无色糊精、麦芽糖、葡萄糖等(遇碘不显色)。

【实验方法】 本实验有四组实验组成：(1) 温度对酶活性的影响；(2) pH 对酶活性的影响；(3) 激动剂和抑制剂对酶活性的影响；(4) 酶的专一性。

【实验材料】 唾液

【实验课时】 3 学时

【代表性实验结果】

4. 淀粉酶的活力测定

【实验原理】 淀粉酶能从淀粉中分解出具还原性的碳水化合物，这些化合物能将 3,5-二硝基水杨酸还原成 3-氨基-5-硝基水杨酸的显色基团，在一定范围内其颜色的深浅与还原物质的浓度成正比，用分光光度法在 540nm 处测 OD 值，计算淀粉酶活力。

【实验方法】 用 752 分光光度计进行比色测定。制作标准曲线，测定待测样品，计算淀粉酶活力。

【实验材料】 唾液

【实验课时】 3 学时

【代表性实验结果】

5. 1398 中性蛋白酶活力测定及 pH 对酶活力的影响

【实验原理】 酶活力的大小，通常是采用该酶作用最适条件下，让酶催化一定时间后反应物中底物减少的量或产物形成的量来表示。本实验是用测定产物形成的量来表示蛋白酶的活力，即采用 Folin 酚试剂与水解出来的酪氨酸作用生成蓝色物，从蓝色深浅的程度可以得知酪氨酸的多少，计算出酶活力。

【实验方法】 用 752 分光光度计进行比色测定。先用 Folin 酚试剂与已知的不同浓度的酪氨

酸溶液作用，制作标准曲线。再将酶与底物反应后的产物与 Folin 酚试剂作用在分光光度计上测出 OD 值，从标准曲线上查得相当于多少微克的酪氨酸，计算出酶活力。

【实验材料】 1398 中性蛋白酶

【实验课时】 3 学时

【代表性实验结果】

6. 氨基置换反应

【实验原理】 氨基置换反应在氨基酸的合成和分解上很重要。本实验观察动物肌肉糜中谷丙转氨酶 (GPT) 催化的氨基置换反应。

【实验方法】 兔肌肉与试剂保温反应后，用标准液和反应液点样，以饱和酚进行纸层析，画出层析图谱，分析原因。

【实验材料】 兔肌肉

【实验课时】 3 学时

【代表性实验结果】

7. 酵母核糖核酸 (RNA) 的提取

【实验原理】 微生物是工业上大量生产核酸的原料，其中以酵母最为理想。因为酵母核酸中主要是 RNA (2.67~10.0%)，DNA 很少 (0.03~0.516%)，菌体容易收集，RNA 也易于分离。本实验利用浓盐法提取 RNA，在加热条件下，利用高浓度的盐改变细胞膜的通透性，使 RNA 释放出来。

【实验方法】 RNA 提取过程，先使 RNA 从细胞中释放，使它和蛋白质分离，离心除去菌体。根据等电点溶解度最小的性质，将 pH 调到 2.0~2.5，使 RNA 沉淀，离心收集 RNA。

【实验材料】 酵母

【实验课时】 3 学时

【代表性实验结果】

8. 单核苷酸的纸上电泳—RNA 水解产物的鉴定

【实验原理】 纸电泳用于核苷酸类物质的分离，操作方便，更适用于纸层析较难分离的四种核苷酸。当 pH 3.5 时，核苷酸上磷酸基的一级解离完全，而二级解离不能进行，核苷酸上碱基因解离常数不同而解离度也各不相同。四种单核苷酸向正极移动速度是:UMP> GMP >

AMP > CMP。碱基存在共轭双键，在 260nm 处有紫外吸收，电泳后的滤纸可在紫外灯下观察结果。

【实验方法】 本实验通过纸电泳法，与四种标准单核苷酸作比较，定性鉴定 RNA 制品经碱水解后生成的四种单核苷酸的成分，画出电泳图谱。

【实验材料】 四种标准单核苷酸(UMP、GMP、AMP、CMP)、核糖核酸水解液

【实验课时】 3 学时

【代表性实验结果】

9. 紫外吸收法测核酸含量

【实验原理】 核酸、核苷酸及其衍生物含有嘌呤环和嘧啶环的共轭双键系统，具有紫外吸收。可根据其在 260nm 处的紫外吸收值计算出含量。

【实验方法】 用 752 分光光度计进行比色测定，计算出核酸浓度。

【实验材料】 RNA 制品

【实验课时】 3 学时

【代表性实验结果】

10. 蛋白质浓度测定（福林酚法）

【实验原理】 本实验选用 Folin-酚法测定蛋白质含量。Folin-酚试剂(Folin-pHenol reagent)由试剂甲和试剂乙组成。试剂甲由碳酸钠、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试剂中的铜离子作用生成蛋白质-铜复合物。试剂乙由磷钼酸、磷钨酸、硫酸、溴等组成。试剂乙中的磷钼酸及磷钨酸易被蛋白质中酪氨酸及色氨酸还原显蓝色，在一定条件下蓝色的深浅与蛋白质含量成正比，故可作为蛋白质的定量测定。

【实验方法】 用 752 分光光度计进行比色测定。制作标准曲线，测定待测样品，从标准曲线上查出待测蛋白质的浓度。

【实验材料】 牛血清白蛋白

【实验课时】 3 学时

【代表性实验结果】

11. 维生素 C 的含量测定

【实验原理】钼酸铵在一定条件下(有硫酸盐和磷酸根离子存在下)与维生素 C 反应生成蓝色络合物。在一定浓度范围(控制样品浓度在 25~250ug/ml)内光密度与浓度成线性关系。在偏磷酸存在下,样品所存在的还原糖及其它常见的还原性物质均无干扰,专一性好且反应迅速。

【实验方法】用 752 分光光度计进行比色测定。制作标准曲线,提取并测定样品,从标准曲线上查出待测样品 Vc 含量。

。

【实验材料】蔬菜、水果等富含维生素 C 的生物材料

【实验课时】3 学时

【代表性实验结果】

12. 二苯胺法测定 DNA 含量

【实验原理】DNA 含有 2-脱氧核糖,在酸性条件下脱水生成 ω -羟基- γ 酮基戊醛,后者与二苯胺试剂反应生成蓝色物质,在 595nm 处有最大吸收,在 40~400ug 范围内吸收度与 DNA 浓度成正比。

【实验方法】用 752 分光光度计进行比色测定。制作标准曲线,测定待测样品,从标准曲线上查出待测 DNA 样品浓度。

【实验材料】待测 DNA 样品

【实验课时】3 学时

【代表性实验结果】

13. 总糖还原糖测定

【实验原理】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。利用单糖、双糖与多糖的溶解度不同,先把它们分开。酸水解法使没有还原性的双糖与多糖彻底水解为具有还原性的单糖进行测定,分别求知样品中总糖和还原糖的量。本实验利用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)与还原糖共热后被还原成棕红色的氨基化合物,在一定浓度范围内,还原糖的量和棕红色物质颜色的深浅程度成一定比例。

【实验方法】用 752 分光光度计进行比色测定。制作葡萄糖标准曲线,测定山芋粉中还原糖和总糖含量,从标准曲线上查出待测样品的浓度,计算出山芋粉中还原糖及总糖的百分含量。

【实验材料】山芋粉

【实验课时】3 学时

【代表性实验结果】

14. RNA 的定量测定（改良苔黑酚法）

【实验原理】RNA 与浓 HCl 共热，酸解后生成嘧啶核苷酸、嘌呤碱基及核糖。核糖在浓酸中脱水环化生成糖醛，它与苔黑酚(3,5-二羟甲苯)作用显示蓝绿色，在 670nm 处有最大吸收。待测样品最适浓度在每毫升含 5~50 微克 RNA 之间，光密度与 RNA 浓度成线性关系。

【实验方法】用 752 分光光度计进行比色测定。作标准曲线使用与被测物相同来源的纯化核酸。通过标准曲线计算被测 RNA 含量。

【实验材料】从酵母中提取的 RNA 制品

【实验课时】3 学时

【代表性实验结果】

15. 自选实验：

【实验原理】该实验与上述实验不同，实验选题、内容、步骤等由学生自己设计完成。这是个特色实验，从 1994 年开始开设。目的是增加学生对实验课的兴趣，更好地利用生物化学基本原理解决实际问题，培养学生独立思考和动手能力，发挥他们的对实验的积极性和主动性。

【实验方法】学生自由组合 4-8 人为一个实验小组，根据已经学到的基础知识和实验技能，在实验室所能提供的基本实验条件和仪器设备基础上，自行立题和设计。在教师的原则指导下，整个实验从立题、设计到安排，从试剂配制到实验操作，从结果分析到完成实验报告都要求学生独立完成。

【实验材料】学生根据实验原理和方法提出材料清单，之后与老师讨论确定

【实验课时】18 学时

【代表性实验结果】