

Sheng Wu Hua Xue

生物化学

实验指导

李冰冰 主 编

地震出版社

图字01-113(1997)第005号

生物化学实验指导

李冰冰 主编

李冰冰 主编

ISBN 7-302-00573-2

生物化学实验指导

李冰冰 主编
李冰冰 副主编
李冰冰 副主编

ISBN 7-302-00573-2
定价：18.00元

ISBN 7-302-00573-2
定价：18.00元

北京理工大学出版社

地址：北京市海淀区中关村大街27号

电话：(010) 62770175

ISBN 7-302-00573-2

北京理工大学出版社

地址：北京市海淀区中关村大街27号

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学实验指导/李冰冰主编. —北京:地震出版社,
2007.9

ISBN 978 - 7 - 5028 - 3214 - 8

I. 生… II. 李… III. 生物化学—实验 IV. Q5 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 143017 号

地震版 XT200700272

生物化学实验指导

李冰冰 主编

责任编辑:李小明

责任校对:郭京平

出版发行:地震出版社

北京民族学院南路9号

邮编:100081

发行部:68423031 68467993

传真:88421706

门市部:68467991

传真:68467991

总编室:68462709 68423029

传真:68467972

E-mail: seis@mailbox.rol.cn.net

经销:全国各地新华书店

印刷:北京振兴源印务有限公司

版(印)次:2007年9月第1版 2007年9月第1次印刷

开本:787×1092 1/16

字数:210千字

印张:11.75

书号:ISBN 978 - 7 - 5028 - 3214 - 8/Q·6 (3904)

定价:20.00元

版权所有 翻印必究

(图书出现印装问题,本社负责调换)

编 委 会

主 编 李冰冰
参 编 胡建业 王福梅
审 核 单林娜

前 言

生物化学实验是生物工程专业及生物学各科的一门专业基础课。随着生物化学实验技术的迅速发展,生物科学在理论与应用上都取得了惊人的进展。生物化学实验技术已经成为生物各学科研究的常用技术,掌握和了解生物化学实验技术和方法,是从事该领域乃至其他相关学科学习与研究工作的重要前提。

本实验指导于2001年编写,经过三年的教学试用后,于2004年进行了第一次修订。2006年进行第二次修订,并补充了一些较新的实验技术理论和目前常用实验项目。在此基础上,本次修订进一步进行了完善与发展。编者依据目前我国生物技术和生物工程专业教学计划和教学大纲,介绍了当前较实用的生物化学实验技术理论,编写了切实可行的实验项目。本书共分三部分,其中第一部分(常用生物化学技术及原理)和第三部分(生物化学大实验)由李冰冰编写;第二部分(基础实验)中的实验一至实验十由胡建业编写;实验十一至实验十九由王福梅编写。作者在编写过程中,尽可能引进现代的实验方法和技术理论,旨在提高学生对于生物技术理论和实验原理的理解水平,初步对学生进行生物化学技术的训练,培养学生的实践操作能力。本教材包括“常用生物化学实验技术及原理”、“基础实验项目”和“生物化学大实验”等三大部分,精心编写了三十三三个实验项目。分别介绍了“分光光度法”、“层析法”、“电泳技术”、“离心分离技术”等常用生物化学实验技术的原理和基本操作方法。希望通过本教材的指导,同学们能够顺利完成生物化学实验,初步掌握糖、脂、蛋白质、酶、和酸等生物分子的分离、鉴定和活力测定等技术和知识、学会“电泳”、“可见-紫外分光光度计的使用”、“常用层析技术”等现代生物化学实验技术的操作与运用。并能够在今后的专业课学习和将来的工作中灵活运用。

在本实验指导的编写、使用和修订过程中,得到了陈兰英教授的支持和单林

娜博士（教授）的指导，同时得到了各位同行和同事的鼓励和支持，在此表示感谢。

由于编者的水平有限，不周之处在所难免，望各位同行及同学们在使用的过程中多提宝贵意见，以便今后更好地完善教材。

李冰冰

2007年7月

(26)
(27)
(28)
(11)
(24)
(18)
(22)
第一部分 常用生物化学实验技术及原理	(1)
第一章 生化实验基本操作	(1)
一、玻璃仪器的洗涤与清洁	(1)
二、吸量管的种类和使用	(3)
三、溶液的混匀	(6)
四、过滤	(6)
五、离心机的使用方法	(6)
六、生物化学常用缓冲液	(7)
第二章 实验样品的制备	(9)
一、植物样品的制备	(9)
二、动物样品的制备	(11)
三、微生物样品的制备	(13)
第三章 分光光度法	(15)
一、基本原理	(15)
二、分光光度法常用符号及意义	(17)
三、物质定性分析	(18)
四、物质定量分析	(18)
五、分光光度计	(21)
第四章 电泳技术	(23)
一、基本原理	(23)
二、纸电泳	(24)
三、醋酸纤维薄膜电泳	(25)
四、琼脂凝胶电泳	(26)
五、聚丙烯酰胺凝胶电泳	(26)

第五章 层析法	(35)
一、柱层析法的一般实验技术	(35)
二、吸附层析	(38)
三、分配层析	(41)
四、离子交换层析	(45)
五、凝胶层析	(50)
六、亲和层析	(55)
七、薄层层析	(58)
第二部分 基础实验	(62)
实验一 总糖的测定——蒽酮比色法	(62)
实验二 糖的硅胶 G 薄层层析	(65)
实验三 总氮量的测定——凯氏 (Micro-KJeldahl) 定氮法	(67)
实验四 蛋白质的两性反应和等电点的测定	(72)
实验五 蛋白质的沉淀及变性实验	(75)
实验六 蛋白质的呈色反应	(77)
实验七 纸层析法分离鉴定氨基酸	(81)
实验八 考马斯亮兰 G-250 染色法测定蛋白质含量	(83)
实验九 Lowry 酚试剂法测定蛋白质含量	(85)
实验十 酪蛋白的制备	(87)
实验十一 紫外光谱吸收法测定蛋白质含量	(89)
实验十二 血清蛋白的醋酸纤维薄膜电泳	(93)
实验十三 血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	(95)
实验十四 酶的特异性	(98)
实验十五 影响酶活性的因素	(100)
实验十六 淀粉酶活性的测定	(102)
实验十七 枯草杆菌蛋白酶活力测定	(105)
实验十八 紫外分光光度法测定核酸的含量	(108)
实验十九 琼脂糖凝胶电泳鉴定 DNA	(110)
第三部分 生物化学大实验	(112)
实验二十 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离禽类血清蛋白	(112)

目 录

实验二十一	SDS - 聚丙烯酰胺凝胶测定蛋白质相对分子质量	(115)
实验二十二	离子交换柱层析法分离氨基酸	(118)
实验二十三	卵清蛋白的分段盐析、透析和凝胶过滤脱盐	(121)
实验二十四	凝胶过滤法测定蛋白质相对分子质量	(125)
实验二十五	改良 Mohum 法测定血清谷 - 丙转氨酶活性	(127)
实验二十六	粗脂肪的提取和定量测定	(131)
实验二十七	维生素 C 的定量测定	(133)
实验二十八	大蒜细胞 SOD 的提取与分离	(135)
实验二十九	动物肝脏 RNA 的制备 (苯酚法)	(138)
实验三十	小牛胸腺 DNA 的制备 (浓盐法)	(140)
参考实验一	聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳——血清蛋白的分离	(142)
参考实验二	亲和层析纯化胰蛋白酶	(146)
参考实验三	PAGE 法分离过氧化物同工酶	(150)
参考资料		(153)
附 录		(154)
一、	硫酸铵饱和度计算表	(154)
二、	缓冲溶液的配制	(156)
三、	常见蛋白质相对分子质量参考值	(172)
四、	常见蛋白质等电点参考值	(174)
实验室规则		(177)

第一部分

常用生物化学实验技术及原理

第一章 生化实验基本操作

一、玻璃仪器的洗涤与清洁

生化实验常用各种玻璃仪器，其清洁程度将直接影响测量体积的可靠性和反应的准确。因此，玻璃仪器的清洁不仅是实验前后的常规工作，而且是一项重要的基本技术。

洗涤的玻璃仪器要求清洁透明，玻璃表面不含可溶解的物质。水沿器壁自然下流时不挂水珠。玻璃仪器的清洗方法很多，需要根据实验的要求，以及污物的性质选用不同的清洁方法。

(一) 新购仪器的清洗

新购仪器表面附着油污和灰尘，特别是附着有可游离的金属离子。因此，新购仪器需要用肥皂水刷洗，流水冲净后，浸于 10% Na_2CO_3 溶液中煮沸。用流水冲净后，再浸泡于 1%~2% HCl 溶液中过夜。流水洗净酸液，用蒸馏水少量多次冲洗后，干燥备用。

(二) 使用过的玻璃仪器的清洗

1. 一般非计量玻璃仪器或粗容量仪器

如试管、烧杯、量筒等先用肥皂水刷洗，自来水冲洗干净，最后用蒸馏水冲

洗 2~3 次后, 倒置于清洁处晾干。

2. 容量分析仪器

如吸量管、滴定管, 容量瓶等, 先用自来水冲洗, 沥干后, 浸于铬酸洗液浸泡数小时, 然后用自来水和蒸馏水冲洗干净, 干燥备用。

3. 比色皿

用毕立即用自来水反复冲洗。如有污物粘附于杯壁, 宜用盐酸或适当溶剂清洗, 然后用自来水、蒸馏水冲洗干净。切忌用刷子、粗糙的布或滤纸等擦拭。洗净后, 倒置晾干备用。

4. 塑料器皿

聚乙烯、聚丙烯等制成的塑料器皿, 在生物化学实验中已用得越来越多。第一次使用塑料器皿时, 可先用 8mol/L 尿素 (用浓盐酸调 pH 值为 1) 清洗, 接着依次用无离子水、1mol/L KOH 和无离子水清洗, 然后用 10^{-3} mol/L EDTA 除去金属离子的污染, 最后用无离子水彻底清洗, 以后每次使用时, 可只用 0.5% (体积分数) 的去污剂清洗, 然后用自来水和无离子水洗净即可。

(三) 玻璃和塑料器皿的干燥

生化实验中用到的玻璃和塑料器皿经常需要干燥, 通常都是用烘箱或烘干机在 $110^{\circ}\text{C} \sim 120^{\circ}\text{C}$ 进行干燥。硝酸纤维素的塑料离心管加热时会发生爆炸, 所以决不能放在烘箱中干燥, 只能用冷风吹干。

(四) 清洗液的原理与配制

1. 铬酸洗液

广泛用于玻璃仪器的洗涤。其清洁效力来自于它的强氧化型和强酸性。由重铬酸钾 ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 和浓硫酸配制而成。因洗液具有强腐蚀性, 所以使用时, 必须注意安全。当洗液由棕红色变为绿色时, 不宜再用。配制时有下列三种方法:

(1) 常用铬酸洗液 (浓度为 3%~5%): 称取重铬酸钾 5g 置 250mL 烧杯之中, 加入热水 5mL 搅拌, 为使其尽量溶解, 在烧杯下放一石棉网, 向烧杯中缓慢注入工业用浓硫酸 100mL, 随加随搅拌, 注意不要溅出来。因为放热较多, H_2SO_4 不宜加入过快。此时溶液由红黄色变为黑褐色。冷却后, 装瓶备用。盖严以防吸水。

(2) 取 100mL 工业用浓硫酸置烧杯中, 小心加热, 然后慢慢加入 5g 重铬酸钾粉, 边加边搅, 待全部溶解后冷却, 贮于具塞的细口瓶中。

(3) 取 80g 重铬酸钾溶于 1000mL 水中。慢慢加入工业用硫酸, 边加边搅, 冷却后, 备用。

2. 肥皂水和洗衣粉溶液

这是最常用的洗涤剂, 主要是利用其乳化作用以除去污垢, 一般玻璃仪器均可用其刷洗。

3. 5% $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 水溶液

碱性, 可用于洗涤油污。所洗仪器不可用于磷的测定。

4. 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA 二钠) 洗液

浓度为 5% ~ 10% 的 EDTA 二钠洗液, 加热煮沸, 可去除玻璃器皿内部钙镁盐类的白色沉淀和不易溶解的重金属盐类。

5. 尿素洗液

45% 的尿素溶液是清洗血污和蛋白质的良好溶剂。

6. 草酸洗液

称取 5 ~ 10g 草酸, 溶于 100mL 水中, 加入少量硫酸或浓盐酸, 可洗脱高锰酸钾的痕迹。

7. 盐酸 - 乙醇洗液

3% 的盐酸 - 乙醇可以除去玻璃器皿上的染料附着物。

8. 乙醇 - 硝酸混合液

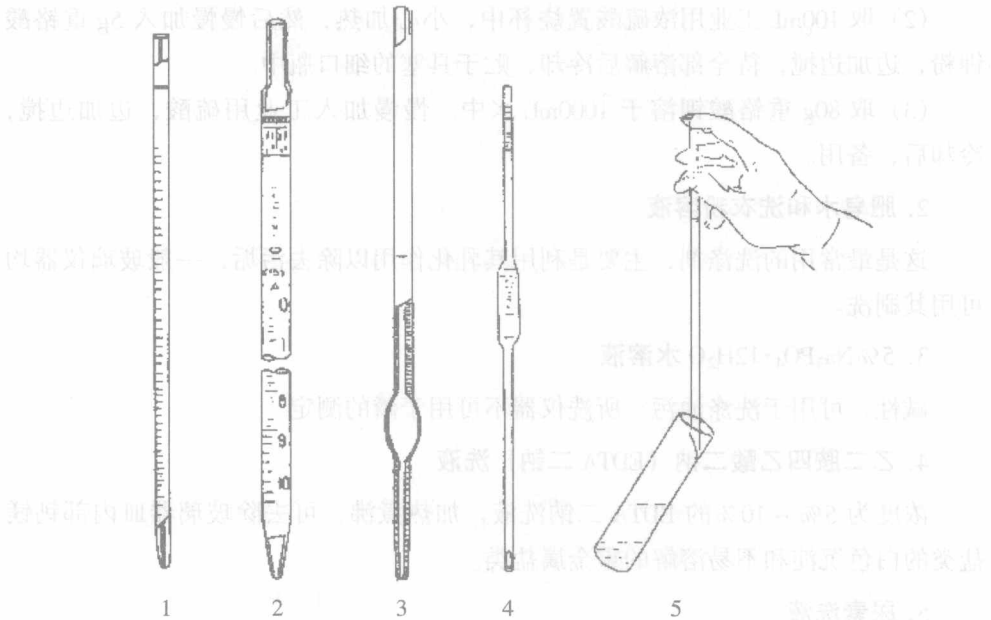
用于清洗一般方法难于洗净的有机物, 最适合于洗净滴定管。

9. 有机溶剂

如丙酮、乙醚、乙醇等可用于洗脱油脂、脂溶性燃料污痕等, 二甲苯可洗脱油漆的污垢。

二、吸量管的种类和使用

吸量管是生化实验最常用的仪器之一, 测定的准确度 and 吸量管的正确选择和使用有密切关系, 见图 1-1-1。



三类吸量管简图

1, 2. 刻度吸量管; 3. 奥氏吸量管; 4. 移液管; 5. 使用吸量管的姿势

图 1-1-1 吸量管的种类及使用姿势

(一) 吸量管的分类

常用的吸量管可以分为三类:

1. 奥氏吸量管

供准确量取 0.50 mL、1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL 液体所用。此种吸量管只有一个刻度, 当放出所量取的液体时, 管尖余留的液体必须吹入容器内。

2. 移液管

常用来量取 50.0 mL、25.0 mL、10.0 mL、5.0 mL、2.0 mL、1.0 mL 的液体, 这种吸量管只有一个刻度, 放液时, 量取的液体自然流出后, 管尖需在盛器内壁停留 15 秒钟。注意管尖残留液体不要吹出。

3. 刻度吸量管

供量取 10 mL 以下任意体积的溶液。一般刻度包括尖端部分, 将所量液体全部放出后, 还需要吹出残留于管尖的溶液。此类吸量管为“吹出式”, 吸量管上

端标有“吹”字。未标“吹”字的吸量管，则不必吹出管尖的残留液体。

(二) 吸量管的使用

1. 选用原则

量取整数量液体、并且取量要求准确时，应选用奥氏吸量管；量取大体积时要用移液管；量取任意体积的液体时，应选用取液量最接近的吸量管。如欲取 0.15mL 液体，应选用 0.2mL 的刻度吸量管。同一定量试验中，如欲加同种试剂于不同管中，并且取量不同时，应选择一支与最大取液量接近的刻度吸量管。如各试管应加的试剂量为 0.30mL、0.50 mL、0.70 mL、0.90mL 时，应选用一支 1.0mL 刻度吸量管。

2. 吸量管的使用

吸量管的正确使用方法和常见错误见表 1-1-1。

表 1-1-1 吸量管的使用方法正误对照表

步骤	正 确	错 误
拿法	中指和拇指拿住吸管上端，食指顶住吸管顶端	用拇指顶住吸量管顶端，其余四指拿住吸量管
取液	用吸耳球吸取液体至刻度上方，眼睛看着液面上升，吸完后用食指顶住吸量管上端，并用滤纸擦干其外壁	吸液时眼睛不看液面，之后不用滤纸擦或调刻度后再擦
调刻度	吸量管与地面保持垂直，下口与试剂接触，并成一定角度；用食指控制液体下降至所需刻度处；液体凹面、刻度和视线应在同一水平面上	吸量管倾斜，悬空调刻度 液体凹面、刻度和视线不在同一水平面上
放液	吸量管移入准备接受溶液的容器中，使其出口尖端接触器壁，并成一角度，吸量管仍然保持垂直；放开食指，使液体自动流出；奥氏吸量管和刻度到底的吸量管应吹出尖端残留的液体；移液管应最后靠壁 15 秒，不要吹	吸量管倾斜，其尖端不与容器接触并成一角度 过早吹，奥氏吸量管和刻度到底的吸量管未吹出尖端残留的液体

三、溶液的混匀

生化实验中，为保证化学反应的充分进行，加入试剂后，充分混匀，是保证试验成功的又一重要步骤。混匀方式大致有如下几种：

- (1) 使试管作圆周运动：右手持试管上端，利用手腕的旋转，使试管作圆周运动。
- (2) 指弹混匀：左手持试管上端，试管与地面垂直。右手手指呈切线方向轻拨试管下部，使管内液体呈旋涡状转动。
- (3) 吸量管混匀：用吸量管将溶液反复吹吸数次，使溶液混匀。
- (4) 玻棒搅动：本法适于烧杯内容物（如固体试剂）的混匀，在生化实验中很少应用。
- (5) 电磁搅拌混匀。
- (6) 振荡器混匀。

混匀操作时，应防止管内液体溅出，以免造成液体损失。同时严禁用手指堵住试管口混匀液体，防止污染和标样的损失。

四、过滤

用于收集滤液，收集沉淀或洗涤沉淀。在生化实验中如用于收集滤液应选用干滤纸，不应将滤纸先弄湿，湿滤纸将影响滤液的稀释比例。滤纸过滤一般采用平折法（即对折后，再对折）并且使滤纸上缘与漏斗壁完全吻合，不留缝隙。向漏斗内加液时，要用玻棒引导而且不应倒入过快，勿使液面超过滤纸上缘。较粗的过滤可用脱脂棉或纱布代替滤纸。有时以离心沉淀法代替过滤法可达到省时、快捷的目的。

五、离心机的使用方法

欲使沉淀与母液分开，过滤和离心都可以达到目的，但是当沉淀粘稠，或颗粒小得可以通过滤纸时，则需选用离心法。特别是溶液量小又需定量测定时，离心分离法更具优越性。

离心机种类很多。本节将简要叙述一般离心机的使用方法（特殊用途的离心机请参阅相关的说明书）。

- (1) 将待离心的液体置于离心管中。
- (2) 两只装有待离心液的离心管置天平两侧配平。
- (3) 检查离心机内无异物，并且运转平稳。将已配平的两个离心管对称地放置于离心机的离心平台上。盖好上盖，开启电源。
- (4) 慢慢推动转速调节杆，增加离心机转速。当离心机转速达到要求时，记录离心时间。
- (5) 达到离心时间后，逐渐减速，断开电源，当离心机自然停止后，取出离心管和离心套管。

六、生物化学常用缓冲液

(一) 磷酸缓冲液

磷酸盐是生物化学研究中使用最广泛的一种缓冲剂，由于它们是二级解离，有 2 个 pK 值，所以用它们配制的缓冲液，pH 范围最宽：

NaH_2PO_4 : $\text{pK}_{a1} = 2.12$, $\text{pK}_{a2} = 7.21$

Na_2HPO_4 : $\text{PK}_{a1} = 7.21$, $\text{PK}_{a2} = 12.32$

配酸性缓冲液：用 NaH_2PO_4 ，pH 值为 1~4

配中性缓冲液：用混合的两种磷酸盐，pH 值为 6~8

配碱性缓冲液：用 Na_2HPO_4 ，pH 值为 10~12

一般用钾盐比钠盐好，因为低温时钠盐难溶，钾盐易溶。但若配制 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳的缓冲液时，只能用磷酸钠而不能用磷酸钾，因为 SDS（十二烷基硫酸钠）会与钾盐生成难溶的十二烷基硫酸钾。磷酸盐缓冲液的优点为：①容易配制成各种浓度的缓冲液，②适用的 pH 范围宽，③pH 受温度的影响小；④缓冲液稀释后 pH 变化小，如稀释 10 倍后 pH 的变化小于 0.1。其缺点为：①易与常见的钙 (Ca^{2+}) 离子、镁 (Mg^{2+}) 离子以及重金属离子缔合生成沉淀；②会抑制某些生物化学过程，如对某些酶的催化作用会产生某种程度的抑制作用。

(二) Tris（三羟甲基氨基甲烷）缓冲液

Tris 缓冲液在生物化学研究中使用的越来越多，有超过磷酸盐缓冲液的趋势。如在 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳中已都使用 Tris 缓冲液，而很少再用磷酸盐。

Tris 缓冲液的常用有效 pH 范围是在“中性”范围，例如：

Tris-HCl 缓冲液：pH 值为 7.5~8.5

Tris - 磷酸盐缓冲液: pH 值为 5.0~9.0

配制常用的缓冲液的方法有两种: ①按书后附录中所列该缓冲液表中的方法, 分别配制 0.05mol/L Tris 和 0.05mol/L HCl 溶液, 然后按表中所列体积混合。Tris - HCl 缓冲液的优点是: ①因为 Tris 碱的碱性较强, 所以可以只用这一种缓冲体系, 配制 pH 范围由酸性到碱性的大范围 pH 值的缓冲液; ②对生物化学过程干扰很小, 不与钙、镁离子及重金属离子发生沉淀。其缺点是: ①缓冲液的 pH 值受溶液浓度影响较大, 缓冲液稀释 10 倍, pH 值的变化大于 0.1; ②温度效应大, 温度变化对缓冲液 pH 值的影响很大。所以一定要在使用温度下进行配制。室温下配制的 Tris - HCl 缓冲液不能用于 0℃~4℃。③易吸收空气中的 CO₂, 所以配制的缓冲液要盖严密封。④此缓冲液对某些 pH 电极发生一定的干扰作用, 所以要使用与 Tris 缓冲液具有兼容性的电极。

(三) 有机酸缓冲液

这一类缓冲液多数是用羧酸与它们的盐配制而成, pH 值范围为酸性。即 pH 值为 3.0~6.0, 最常用的是甲酸、乙酸、柠檬酸和琥珀酸等。

甲酸 - 甲酸盐缓冲液因其挥发性强, 使用后可以用减压法除之。乙酸 - 乙酸钠和柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲体系也使用的较多, 柠檬酸有 3 个 pK_a 值: pK_{a1} 值为 3.10, pK_{a2} 值为 4.75, pK_{a3} 值为 6.40。琥珀酸有 2 个 pK_a 值: pK_{a1} 值为 4.18, pK_{a2} 值为 5.60。

有机酸缓冲液的缺点是: ①所有这些羧酸都是天然的代谢产物, 因而对生化反应过程可能发生干扰作用; ②柠檬酸盐和琥珀酸盐可以和金属离子 (Fe³⁺、Zn²⁺、Mg²⁺ 等) 结合而使缓冲液受到干扰; ③这类缓冲液易与 Ca²⁺ 离子结合, 所以样品中有 Ca²⁺ 时, 不能用这类缓冲液。

(四) 硼酸盐缓冲液

该缓冲液常用的有效 pH 范围是: pH 值为 8.5~10.0, 因而它是碱性范围内最常用的缓冲液。其优点是配制方便, 只使用一种试剂。缺点是能与很多代谢产物形成络合物, 尤其是能与糖类的羟基反应生成稳定的复合物而使缓冲液受到干扰。

(五) 氨基酸缓冲液

此缓冲液使用的范围宽, 可用于 pH 值为 2.0~11.0, 例如最常用的有: