



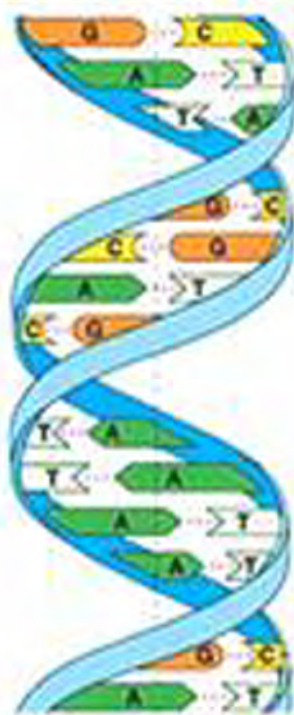
中国地质大学(武汉)实验教学系列教材

生物化学 实验指导书

SHENGWU HUAXUE SHIYAN ZHIDAO SHU

侯新东
盛桂莲
葛台明
李继红

◎ 编 著



中国地质大学出版社有限责任公司
ZHONGGUO DIZHI DAXUE CHUBANSHE YOUXIAN ZEREN GONGSI

中国地质大学(武汉)实验教学系列教材(三)

生物化学实验指导书

SHENGWU HUAXUE SHIYAN ZHIDAOSHU

侯新东 盛桂莲 葛台明 李继红 编著



中国地质大学出版社有限责任公司

ZHONGGUO DIZHI DAXUE CHUBANSHE YOUXIAN ZEREN GONGSI

内 容 简 介

全书共四部分内容,包括生物化学实验基本知识、实验原理与技术、基础实验、综合性实验。主要对实验室规则、安全与防护知识、实验记录和实验报告、基本实验操作及生物大分子制备技术等方面进行了简单的介绍;同时对生物化学实验技术与原理进行了较为详实的介绍,以期使读者能够熟悉和掌握这些内容,为更好地学习生物化学并打下一个较好的基础;在基础实验安排中,很好地考虑了实验内容与生物化学理论授课的衔接,选取了生物化学实验中较为成熟的糖类、脂类、蛋白质、酶类、核酸类和代谢类实验;综合性实验部分重点安排了古 DNA 研究的提取、PCR 扩增、分子克隆等相关实验。

本书可作为高等院校生命科学、医药卫生、环境科学等相关专业的实验教材,也可作为相关专业科研人员和教育工作者的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验指导书/侯新东,盛桂莲,葛台明,李继红编著. —武汉:中国地质大学出版社有限责任公司,2011. 12

ISBN 978 - 7 - 5625 - 2747 - 3

I. ①生…

II. ①侯…②盛…③葛…④李…

III. ①生物化学-化学实验-高等学校-教学参考资料

IV. ①Q5 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 226958 号

生物化学实验指导书

侯新东 盛桂莲 葛台明 李继红 编著

责任编辑:胡珞兰

责任校对:戴莹

出版发行:中国地质大学出版社有限责任公司(武汉市洪山区鲁磨路 388 号) 邮政编码:430074

电 话:(027)67883511

传 真:67883580

E-mail:cbb@cug.edu.cn

经 销:全国新华书店

<http://www.cugp.cug.edu.cn>

开本:787 毫米×1 092 毫米 1/16

字数:372 千字 印张:14.5

版次:2011 年 12 月第 1 版

印次:2011 年 12 月第 1 次印刷

印刷:武汉珞南印务有限公司

印数:1 - 1 000 册

ISBN 978 - 7 - 5625 - 2747 - 3

定价:28.00 元

如有印装质量问题请与印刷厂联系调换

前言

生物化学是生命的化学,是研究植物、动物、微生物及人体等生物体的化学本质及其在生命活动过程中变化规律的一门科学。生物化学既是现代生物学中的一门分支基础学科,同时又是现代生物学中发展最快的一门前沿学科。现今,生物化学的方法与理论已经渗透到了生物学中的每一分支学科,并对其他生物分支学科的发展起着关键性作用。

生物化学实验是生物化学教学的重要组成部分,是贯彻理论联系实际、培养学生动手能力和科学作风的重要教学环节,在提供学生理解生物化学知识平台、将理性知识转化为感性认识、实践中加深生物学科思维训练等方面具有不可替代的作用。生物化学实验可对学生进行生物化学基本技能的培训,培养学生运用理论知识解决实际问题的能力,并为学生今后开展科学研究奠定基础。

当笔者第一次为中国地质大学(武汉)的生物科学专业本科生讲授生物化学实验相关的原理、方法和实验时,手里却没有一本与生物化学理论授课内容衔接性较好的实验教材。为了解决这一问题,只好自己查阅与生物化学实验相关的资料,结合教学和科研工作,着手编写《生物化学实验指导讲义》,旨在为学生提供一本合适的生物化学实验讲义。这本实验讲义用于本科生的教学实践后,取得了良好的教学效果。针对讲义在使用中发现的问题,及时进行了修改和补充,现以这本讲义为蓝本,在此基础上,经反复增删,终于完成了本书的撰写工作。

本教材分为四大部分:第一部分简要介绍了生物化学实验的基本知识;第二部分为生物化学基本实验原理和技术,包括分光光度技术、电泳技术、层析技术、离心技术与透析技术;第三部分为基础实验,共有 45 个实验,主要涉及了糖类、脂类、蛋白质、酶、核酸等生物大分子的提取、含量和纯度的检测、性质的验证,帮助学生熟悉和掌握生物化学基本实验方法和技能;在第四部分设立了一个以古 DNA 分子为研究对象的综合性实验,包括古 DNA 的提取、PCR 扩增及电泳检测、PCR 产物的纯化及有效 PCR 产物的分子克隆等,使学生能够系统地学习古 DNA 研究的方法和技术。通过设立综合性实验,旨在培养学生综合应用生物化学实验原理与技术的能力,使他们能够成为具有独立分析问题、解决问题能力的创新型人才。附录包括各种常用数据表、生物化学试剂的配制方法和有关参考资料,可供相关人员查阅参考。

本书前言、第二章、第三章、第五章至第十五章、第十七章与第十八章由侯新

东编写,第一章由李继红编写,第四章由葛台明编写,第十六章由盛桂莲编写,最后由侯新东统编定稿。

在本教材编写过程中很多教师都提出了宝贵的意见和建议;本书的编写和出版得到了中国地质大学(武汉)实验教材出版项目和教学研究项目的资助;同时,还得到了校、院各级领导、各位同仁及中国地质大学出版社的编辑们的支持和帮助,在此表示诚挚的谢意!

由于编者水平及经验有限,书中难免出现疏漏和不足之处,敬请读者批评指正,以期在教材再版时进一步补充和修正。

编者

2011年10月于武汉

目 录

第一部分 生物化学实验基本知识

第一章 生物化学实验的安全与要求	(3)
第一节 生物化学实验室规则	(3)
第二节 生物化学实验室安全与防护常识	(4)
一、实验室安全要求	(4)
二、实验室可能出现的危险情况	(5)
第二章 实验记录与实验报告	(8)
第一节 实验记录	(8)
第二节 实验报告	(9)
一、实验报告的格式	(9)
二、实验报告的内容	(9)
三、实验结果的讨论	(9)
第三章 生物化学实验基本实验操作	(11)
第一节 玻璃仪器的洗涤与干燥	(11)
一、玻璃仪器的清洗	(11)
二、一些常用的洗涤剂	(12)
三、玻璃仪器的干燥	(12)
四、溶液的混匀	(13)
五、过滤	(13)
第二节 计量仪器的选择与使用	(14)
一、液体的量取	(14)
二、液体的盛放和储存	(18)
第三节 灭菌及消毒方法	(19)
一、物理方法灭菌	(19)
二、化学方法灭菌	(20)
三、过滤除菌	(20)

四、紫外杀菌	(20)
第四章 生物化学实验室的基本设施与装备	(20)
第一节 基本设施	(21)
一、温度与环境设施	(21)
二、生物培养设施	(21)
三、暗室	(21)
第二节 主要装备	(22)
一、消毒设备	(22)
二、实验室纯水设备	(22)
三、计量仪器与设备	(22)
四、电泳装置	(22)
五、离心设备	(22)
六、层析设备	(23)
七、PCR 仪	(23)
八、其他设备	(23)
第五章 生物大分子制备技术	(24)
第一节 生物大分子制备的前处理	(24)
一、材料的选择	(24)
二、细胞的破碎	(24)
第二节 生物大分子的分离纯化	(25)
一、生物大分子的提取	(25)
二、生物大分子分离纯化的方法	(26)

第二部分 生物化学实验原理与技术

第六章 分光光度技术	(30)
一、基本原理	(30)
二、分光光度计的分类和构造	(31)
第七章 电泳技术	(33)
一、基本原理	(33)
二、几种常用电泳	(36)
第八章 层析技术	(41)
一、层析的分类	(41)
二、层析中的常用术语	(42)
三、纸层析	(45)

四、薄层层析	(46)
五、离子交换层析	(47)
六、凝胶层析	(49)
七、亲和层析	(51)
第九章 离心技术	(52)
一、基本原理	(52)
二、离心机和转子的种类	(52)
三、制备型超速离心的分离方法	(55)
四、离心操作的注意事项	(57)
第十章 透析技术	(58)
一、透析原理及影响因素	(58)
二、透析技术的应用	(59)
三、透析操作及注意事项	(59)

第三部分 生物化学基础实验

第十一章 糖与脂类	(64)
实验一 糖定量测定(蒽酮法)	(64)
实验二 脂肪皂化值的测定	(66)
实验三 脂肪碘值的测定	(68)
第十二章 蛋白质	(70)
实验四 氨基酸的分离与鉴定	(70)
实验五 DNS - C1 法测定蛋白质 N -末端的氨基酸	(73)
实验六 蛋白质的沉淀作用	(75)
实验七 蛋白质的两性反应与等电点的测定	(78)
实验八 氨基酸和蛋白质的颜色反应	(80)
实验九 牛乳中蛋白质的提取与鉴定	(83)
实验十 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质	(84)
实验十一 蛋白质总氮量的测定——凯氏定氮法	(88)
实验十二 凝胶层析法测定蛋白质相对分子质量	(91)
实验十三 细胞色素 c 的制备及其测定	(93)
实验十四 醋酸纤维薄膜电泳分离血清蛋白质	(96)
实验十五 血红蛋白的凝胶过滤	(99)
实验十六 SDS -聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)测定蛋白质相对分子质量	(99)
实验十七 DEAE -离子交换剂纯化血清 IgG	(109)

第十三章 酶	(112)
实验十八 酶的性质研究	(112)
实验十九 细胞色素氧化酶的作用	(117)
实验二十 胰蛋白酶抑制剂的制备与抑制活性的测定	(118)
实验二十一 亲和层析法从鸡蛋清中分离溶菌酶	(121)
实验二十二 聚丙烯酰胺凝胶分离过氧化物同工酶	(124)
实验二十三 水果或蔬菜中抗坏血酸的测定(2,6-二氯酚靛酚法)	(127)
实验二十四 超氧化物歧化酶(SOD)活力测定	(130)
实验二十五 酯酶和乳酸脱氢同工酶分析	(134)
实验二十六 胡萝卜素的柱层析分离	(137)
第十四章 糖、脂肪、蛋白质代谢	(140)
实验二十七 胰岛素对血糖水平的影响	(140)
实验二十八 肝糖原的提取与鉴定	(142)
实验二十九 脂肪酸 β -氧化作用	(144)
实验三十 植物体内的转氨基作用	(146)
实验三十一 纸层析分析动物组织的转氨基作用	(147)
实验三十二 转氨酶活性的测定	(149)
第十五章 核酸	(152)
实验三十三 肝脏 DNA 的提取	(152)
实验三十四 动物肝脏 RNA 的制备	(155)
实验三十五 碱性 SDS 法提取大肠杆菌质粒	(157)
实验三十六 酵母核糖核酸的分离及组分鉴定	(160)
实验三十七 浓盐法提取酵母 RNA	(162)
实验三十八 紫外吸收法测定核酸含量	(164)
实验三十九 二苯胺显色法测定 DNA 含量	(165)
实验四十 定磷法测定 RNA 含量	(167)
实验四十一 植物 DNA 的提取与测定	(169)
实验四十二 植物总 RNA 的提取与分析	(172)
实验四十三 PCR 扩增技术	(174)
实验四十四 DNA 琼脂糖凝胶电泳	(177)
实验四十五 总 RNA 的提取及 RT-PCR 扩增目的基因	(179)

第四部分 综合性实验

第十六章 古 DNA 研究简介	(186)
------------------------	-------

第十七章 古 DNA 的提取与 PCR 扩增	(189)
实验四十六 古 DNA 的提取	(189)
实验四十七 古 DNA 多重 PCR 扩增	(191)
实验四十八 PCR 产物的电泳及纯化	(194)
第十八章 古 DNA 片段的分子克隆	(196)
实验四十九 大肠杆菌感受态细胞的制备	(196)
实验五十 重组 DNA 分子连接及转化	(198)
实验五十一 转化菌落 PCR 检测	(201)
附 录	(205)
一、常用酸碱和固态化合物的部分数据	(205)
二、溶液的配制	(206)
三、标准缓冲溶液的配制方法	(206)
四、常用缓冲液的配制	(207)
五、常用试剂和电泳缓冲液的配制	(210)
六、电泳染色方法	(211)
七、硫酸铵饱和度的常用表	(214)
八、常用核酸与蛋白质的换算数据	(215)
九、常用层析介质数据	(216)
十、离心力与离心机转速测算表	(219)
十一、与 DNA 凝胶电泳有关的数据	(220)
十二、常用培养基的配制	(221)
十三、常用蛋白质相对分子质量标准参照物	(222)
十四、十进位数量词头及符号	(222)
参考文献	(223)

第一部分

生物化学实验基本知识

第一章 生物化学实验的安全与要求

第一节 生物化学实验室规则

为了提高实验教学的质量和效果,促进学生参与实验实践的积极性,针对生物化学实验的特点,对其基本要求整理如下:

(1)实验前必须预习实验指导和有关理论,明确实验目的、原理、操作步骤、预期的结果及注意事项,懂得每一操作步骤的意义和了解所用仪器的使用方法。在进实验室前需准备好实验指导、课本、实验记录本、实验报告本、文具等。

(2)实验时要严肃、认真、专心操作,每个同学都应该自觉遵守课堂纪律,维护课堂秩序,不迟到,不早退,不大声谈笑。注意观察实验过程中出现的现象和结果,结果不良时,必须重做。实验过程中要听从教师的指导,严肃认真地按操作规程进行实验,并把实验结果和数据及时、如实记录在实验记录本上,文字要简练、准确。完成实验后经教师检查签字同意,方可离开实验室。

(3)实验结束后及时将实验结果交指导教师审核。根据实验结果进行科学分析,得出实验结论,撰写实验报告并按时上交教师评阅。

(4)实验台面应随时保持整洁,仪器、药品摆放整齐。公用试剂用毕,应立即盖严放回原处。勿使试剂、药品洒在实验台面和地上。用过的滤纸、棉花、动物组织等固体废物切勿倒入水池,以免堵塞下水道。实验完毕,仪器洗净放好,试剂瓶及仪器等物品要放置整齐、有序,将实验台面抹拭干净,才能离开实验室。

(5)使用的仪器、药品、试剂和各种物品必须注意节约。洗涤和使用器皿时应小心仔细,防止损坏仪器。如果仪器损坏应如实向教师报告,并填写损坏仪器登记表,然后补领。

(6)容量瓶是量器,不能用来盛放试剂。带磨口玻璃塞的器皿,如果暂时不使用,要用纸条把瓶塞和瓶口隔开。

(7)不要用滤纸称量药品,更不能用滤纸做记录。标签纸的大小应与容器相称,标签上要写明物质的名称、浓度、配制的日期及配制人姓名。标签应贴在试剂瓶 $2/3$ 处,试管等细长容器则贴在上部。

(8)取出试剂后,立即将瓶塞盖好,切勿盖错,放回原处。试剂瓶塞、专用吸量管、滴管不得与试剂瓶分家,以免错用而污染试剂,造成自己或他人实验的失败。未用完的试剂不得倒回瓶内。

(9)使用贵重仪器如分析天平、分光光度计、冷冻离心机及层析设备前,应熟知使用方法。

如有问题,及时请指导实验的教师解答。使用时,要严格遵守操作规程。发生故障时,应立即关闭仪器并告知管理人员,不得擅自拆修。

(10)取标准溶液时,应先将标准液倒入干净试管中,再用清洁吸管吸取标准液,以免污染瓶中的标准溶液。使用滴管时,滴管尖端朝下,切勿倒置,勿使试剂流入橡皮帽内。

(11)实验室内的一切物品,未经本室负责教师批准,严禁携出室外,借物必须办理登记手续。

(12)每次实验课由班长负责安排值日生。值日生的职责是负责当天实验室的环境卫生工作。

第二节 生物化学实验室安全与防护常识

在生物化学实验室中,需要经常与毒性很强、有腐蚀性、易燃烧和具有爆炸性的化学药品直接接触,常常会使用易碎的玻璃和瓷质器皿以及在煤气、水、电等高温电热设备的环境下进行紧张而细致的工作,因此,必须十分重视安全工作。

一、实验室安全要求

(1)穿白大褂进入实验室,不许穿拖鞋进入实验室,以免酸碱等试剂腐蚀衣服、灼伤皮肤。

(2)进入实验室开始工作前应了解煤气总阀门、水阀门及电闸所在处。离开时,一定要将室内检查一遍,应关闭水、电和煤气的开关,关好门窗。

(3)使用浓酸、浓碱时,必须小心操作,防止飞溅。在用移液管量取这些试剂时,必须使用橡皮吸耳球,绝对不能用口吸取。若不慎溅在实验台或地面,必须及时用湿抹布擦洗干净。如果触及皮肤应立即治疗。

(4)易燃和易爆炸物质的残渣(如金属钠、白磷等)不得倒入污染桶或水槽中,应收集在指定的容器内。

(5)废液,特别是强酸和强碱,不能直接倒入水槽中,必须倒入专门的废液桶;实验完成后的沉淀物或其他混合物如含有有毒、有害或贵重药品者不可随意丢弃,必须放入专门的容器,最后由实验主管部门统一回收处理。

(6)凡属产生烟或产生有毒气体的化学实验,均应在通风橱内进行,以免对人体造成危害。

(7)在领取毒性物质之前应按实验室的规定办理审批手续,使用毒性物质时必须根据试剂瓶上的标签说明严格操作、安全称量、妥善处理 and 保存。操作时应戴手套,必要时戴口罩或面罩,并在通风橱中进行。沾过毒性物质的容器应该单独清洗和处理。

(8)使用煤气灯时,灯焰大小和火力强弱应根据实验的需要来调节。用煤气加热水浴锅时,切勿踏灭煤气软管,同时注意勿烧干水浴锅。用火时,应做到火着人在,人走火灭。

(9)了解化学药品的警告标志(图1-1)。

(10)生物材料如微生物、动物组织和血液样品都可能存在细菌和病毒感染的潜在危险,因此,在处理各种生物材料时必须谨慎、小心,做完实验后必须用肥皂、洗手液或消毒液洗净双

手。



图 1-1 危险化学药品分类所用标志

二、实验室可能出现的危险情况

(一) 着火

生物化学实验室经常使用大量的有机溶剂,如甲醇、乙醇、丙酮、氯仿等,而实验室又经常使用电炉、酒精灯等火源,因此,极易发生着火事故。

1. 预防火灾的操作规程

(1)使用可燃物,特别是乙醚、丙酮及乙醇等易燃物时,不要大量放在实验台上,更不要把它们放在靠近火焰的地方。

(2)只有在远离火源时,或将火焰熄灭后,才可大量倾倒易燃液体。

(3)低沸点的有机溶剂,如乙醚、石油醚、酒精等不准在火焰上直接加热,只能用水浴来加热。

(4)废有机溶剂不得倒入废物桶,只能倒入回收瓶,以后再集中处理。量少时用水稀释后可排入下水道。

2. 灭火方法

实验室一旦发生火灾,切不可惊慌失措,要保持镇静,根据具体情况正确地进行灭火,如火势较大需立即报火警(火警电话 119)。灭火的方法有:

(1)乙醇、丙酮等可溶于水的有机溶剂着火时可以用水灭火。汽油、乙醚等有机溶剂着火时不能用水,只能用灭火毯和砂土盖灭。

(2)容器中的易燃物着火时,用玻璃纤维布、灭火毯盖灭。

(3)个人衣服着火时,切勿慌张奔跑,应迅速脱掉衣服,浇水灭火,火势较大时可就地卧倒打滚压灭火焰。

(4)导线、电器一起着火时不能用水和二氧化碳灭火器灭火,应先切断电源,然后用 1211 灭火器(内装二氟一氯一溴甲烷)灭火。

(二) 中毒

生物化学实验室常见的剧毒物有氰化物、砷化物、乙腈、叠氮化物、汞及其化合物等,化学致癌物有铬酸盐、溴化乙锭等。

中毒的主要原因是由于不慎吸入、误食或由皮肤渗入。

中毒的预防:①取用有毒物质时必须佩戴橡胶手套;②严禁用嘴吸移液管,严禁在实验室内饮水、进食,禁止赤膊和穿拖鞋;③不要用乙醇等有机溶剂擦洗溅洒在皮肤上的试剂与药品。

中毒急救的方法主要有:①误食了酸或碱,可先立即大量饮水,误食碱者再喝些牛奶;误食酸者,饮水后再服 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 乳剂,最后饮些牛奶;②吸入了有毒气体者,应立即转移到室外,解开衣领,休克者应施以人工呼吸,但不要对口对口法;③砷和汞中毒者,应立即送医院急救。

(三) 爆炸

防止生物化学实验室发生爆炸事故非常重要,因为一旦爆炸其毁坏力极大,后果十分严重。加热时会发生爆炸的混合物有:有机化合物和氧化铜、浓硫酸和高锰酸钾、三氯甲烷和丙酮等。

常见的引起爆炸事故的原因有:①随意混合化学药品,并使其受热、受摩擦和撞击;②在密闭的体系中进行蒸馏、回流等加热操作;③在加压或减压实验中使用了不耐压的玻璃仪器,或反应过于激烈而失去控制;④易燃易爆气体大量溢入室内;⑤高压气瓶减压阀损坏或失灵。

(四) 触电

在生物化学实验室要使用大量的仪器和设备,因此,每位实验人员都必须能熟练地安全用电,避免发生一切用电事故。

1. 防止触电

防止触电需做到:①不能用湿手开关电闸和电器;②电源裸露部分都应绝缘;③凡是漏电的仪器,经检修合格后方可继续使用;④坏的接头、插头、插座和不良导线应及时更换;⑤先接好线路再插电源,反之先关电源再拆线路;⑥仪器使用前要先检查外壳是否漏电;⑦如遇有人触电,要先切断电源再救人。

2. 防止电器着火

防止电器着火需做到:①生锈的电器、接触不良的导线接头要及时处理;②保险丝、电源线、插头和插座都要与使用的额定电流相匹配;③仪器长时间不用,要拔下电源插头;④电炉、烘箱等电热设备不可过夜使用;⑤电器、电源线着火不可用泡沫灭火器灭火。

(五) 外伤

1. 化学灼伤

1) 眼睛灼伤

眼内若溅入化学试剂,应立即用自来水或蒸馏水冲洗眼部 15min,然后再滴入几滴油性护眼液起滋润保护作用,不可用稀酸或稀碱冲洗。

2) 皮肤灼伤

(1) 酸灼伤:先用大量水冲洗,再用稀 NaHCO_3 或稀氨水浸洗,最后再用水冲洗。

(2) 碱灼伤:先用大量水冲洗,再用 1% 硼酸或 2% 醋酸浸洗,最后再用水清洗。

(3) 溴灼伤:伤口不易愈合,一旦灼伤,立即用 20% 硫代硫酸钠冲洗,再用大量水冲洗,包上消毒纱布后就医。

2. 烫伤

使用火焰、蒸汽、加热的玻璃仪器和金属时易发生烫伤。轻度烫伤时一般可涂上苦味酸软膏。如果伤处红痛(一级烫伤),可擦医用橄榄油;若皮肤起水泡(二级烫伤),不要弄破水泡,防止感染;若烫伤皮肤呈棕色或黑色(三级烫伤),应用干燥无菌的消毒纱布轻轻包扎好,急送医院治疗。

3. 割伤

这是在生物化学实验室常见的伤害,要特别注意预防,尤其是在向橡皮塞中插入温度计、玻璃管时一定要用水或甘油润滑,用布包住玻璃管轻轻旋入,切不可用力过猛。如不慎被玻璃割伤,应先检查伤口内有无玻璃碎片,然后用硼酸水洗净,再涂擦碘酒,必要时用纱布包扎。若伤口较大或较深,应迅速在伤口上部和下部扎紧血管止血,然后立即送医院诊治。