

SHENGWUHUAXUESHIYANZHIDAO

生物化学 实验指导

汪亚伦 ◎ 主编



 辽宁科学技术出版社

生物化学实验指导

汪亚伦 主编

辽宁科学技术出版社
沈 阳

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学实验指导 / 汪亚伦主编. —沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2013. 8

ISBN 978-7-5381-8247-7

I. ①生… II. ①汪… III. ①生物化学—化学实验 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 197976 号

出版发行: 辽宁科学技术出版社

(地址: 沈阳市和平区十一纬路 29 号 邮编: 110003)

印刷者: 沈阳新华印刷厂

经销者: 各地新华书店

幅面尺寸: 185mm×260mm

印 张: 8

字 数: 200 千字

印 数: 1~2000

出版时间: 2013 年 8 月第 1 版

印刷时间: 2013 年 8 月第 1 次印刷

责任编辑: 寿亚荷

封面设计: 先知视觉

版式设计: 袁 舒

责任校对: 刘美思

书 号: ISBN 978-7-5381-8247-7

定 价: 19.00 元

联系电话: 024—23284370

邮购热线: 024—23284502

E-mail: syh324115@126.com

<http://www.lnkj.com.cn>

主 编 汪亚伦

副主编 冯德日 韩 翰

编 委 付 浩 金明林 师秀艳 张 艳

李丹妮 江 岩 邢 辉

前 言

生物化学与分子生物学已经成为当代生命科学领域中一门重要的基础学科。它涵盖的基础理论、基础知识、基本技术与医学研究各学科领域密切相关，其理论与技术的发展，推动了生命科学的发展，对人类的科技进步与文明产生了巨大影响。生物化学理论与实验技术的应用已经渗透到许多与生命科学、环境科学、海洋科学等相关的其他学科。生物化学实验技术已成为生命科学的基石与主要技术，同时也是其他相关学科深入研究的必备技术。随着生命科学的飞速发展，生物化学的理论知识、研究方法和技术手段呈现出高度综合化的发展趋势。传统的生物化学实验教学模式已无法满足时代的需求。

为适应当前我国高等教育的改革与发展的需要，较好地体现本学科的进展与我国医学现代化的趋势，本书参编人员查阅大量文献，广泛收集资料，结合生物化学教学实践进行深入细致的研究，进而对实验内容进行了全面更新，力图在教材的结构形式、内容选材和参考资料的收录等方面有所突破。

本书主要侧重于给学生以基本的实验和技能的训练，让学生了解并掌握生物化学的四大基本实验方法，即：分光光度法、离心法、层析法和电泳法。同时也注意引进一些新近发展起来的、重要的生物化学及分子生物学研究技术及临床常用的生化检验技术，如基因工程等。

本实验教程内容包括三大篇：生物化学实验技术及原理、生物化学实验和附录。

编著者

2013年7月

目 录

第一篇 生物化学实验技术及原理

第一章 生物化学基础操作	(3)
第二章 实验样品的制备	(7)
第三章 离心技术与离心机使用	(9)
第四章 分光光度法与分光光度计的使用	(12)
第五章 层析法	(19)
第六章 电泳法	(25)
第七章 基因重组	(32)

第二篇 生物化学实验

实验一 分光光度法测定血清蛋白含量	(37)
实验二 绘制吸收曲线	(41)
实验三 温度对酶促反应速度的影响	(42)
实验四 pH 对酶促反应速度的影响	(45)
实验五 激动剂和抑制剂对酶活性的影响	(47)
实验六 底物浓度对酶促反应速度的影响——碱性磷酸酶米氏常数测定	(49)
实验七 血清 γ -球蛋白的分离、纯化与鉴定	(54)
实验八 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离纯化血清 γ -球蛋白	(59)
实验九 动物组织细胞内核酸的检定	(66)
实验十 聚合酶链式反应 (PCR)	(72)
实验十一 M13 噬菌体载体 DNA 的重组和克隆	(76)
实验十二 醋酸纤维素薄膜电泳分离及测定血清蛋白	(81)
实验十三 血糖定量	(84)
实验十四 微量离子交换层析法定量分析 HbA ₂	(88)



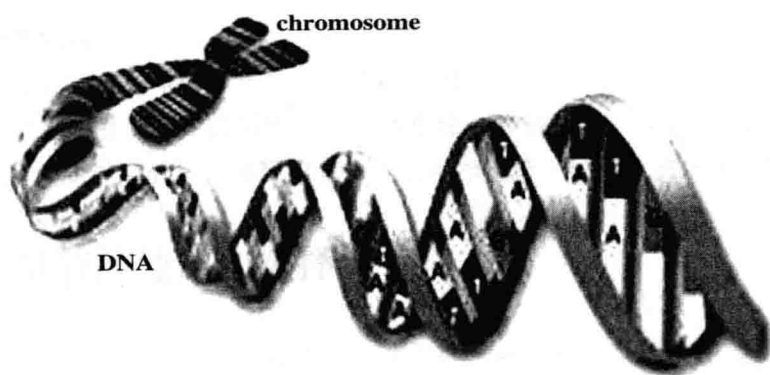
实验十五	维生素 B ₁ 的定性试验——荧光法	(91)
实验十六	尿素氮测定 (二乙酰—脲法)	(93)
实验十七	肌酐测定 (碱性苦味酸法)	(96)
实验十八	酶的提纯及比活性测定	(99)
实验十九	血清转氨酶的测定——谷丙转氨酶活性测定	(104)

第三篇 附 录

附表一	常用 pH 指示剂	(111)
附表二	常见元素的原子量表	(112)
附表三	常用酸碱浓度表	(113)
附表四	临床生化指标 (血清)	(114)
附表五	缓冲溶液的配制	(115)
附表六	硫酸铵饱和度常用表	(117)
参考文献		(119)

第一篇

生物化学实验技术及原理





第一章 生物化学基础操作

一、玻璃仪器的洗涤

生化实验中经常使用各种玻璃器皿，它的清洁直接影响实验结果的准确性，故需要在实验之前把仪器洗涤干净，根据具体情况，可以采用不同方法：

1. 一般器皿

新购置的玻璃器材，先用洗衣粉水洗刷，然后用 1%~2% 的盐酸溶液浸泡过夜，再用自来水冲净，蒸馏水冲洗 3 次。

日常使用的玻璃器材，如烧杯、试管等可先用自来水冲洗，之后用洗衣粉或去污粉或肥皂水刷洗，再用自来水冲净洗涤剂。洗至容器内壁不挂水珠即可，最后以少量多次原则用蒸馏水冲洗 3 次倒置晾干。

比较脏的器皿先用软纸擦去可能存在的凡士林或其他污物，用有机溶剂（如苯等）擦净，再用自来水冲洗后控干，放铬酸洗液中浸数小时，取出后用自来水反复冲洗以除去过量的洗液，最后用蒸馏水冲洗 3 次。

普通玻璃仪器可在烘箱内烘干，或者自然晾干，定量的玻璃仪器不能加热，一般采取自然晾干。

2. 容量分析仪器

吸量管等用毕后，立即用自来水冲洗多次，直至管壁不挂水珠为止，再用少量蒸馏水冲洗 3 次，晾干备用。若冲洗后的仪器仍挂水珠，应将其控干后，于洗液中浸泡数小时，取出时，尽量使洗液流尽，再用自来水彻底冲净洗液，最后步骤同上。

二、吸量管的使用和选择

吸量管是生化实验最常用的仪器之一，测定的准确度和吸量管的正确选择及使用有密切关系。

1. 吸量管的分类

生化常用吸量管有 3 类（图 1-1）



(1) 奥氏吸管：供准确量取黏度较大液体使用。每根吸管上只有一个刻度，有一卵形空球及一短小的出口。放液时必须吹出最后残留在吸管尖端的液体。

(2) 移液管：供准确量取标准溶液或当量溶液使用。每根吸管上只有一个刻度，它的中部有一圆柱状空泡。放出液体流毕后，将管尖在容器内壁上继续停留 15 秒，注意不要吹出尖端内的最后部分。

(3) 刻度吸管：可用来准确量取 10ml 以下的任何体积的液体。每根吸管上都有许多等分刻度，规格有 10ml、5ml、2ml、1ml、0.5ml、0.2ml、0.1ml 等。分完全流出式和不完全流出式两种：完全流出式包括了吸管尖端不能自然流出的液体，使用时要将最后不能自然流出的液体吹出，通常在管壁上标一个“吹”字。不完全流出式刻度吸管的容量，不包括管尖最后不能自然流出的液体，使用时应将管尖靠在容器内壁上并稍停留一下，同时转动刻度吸管，至液体不再继续流出为止，不能吹。个别旧制的吸管，刻度不到尖端，即不包括吸管的最下部分，使用时绝不可放液到最低的刻度线以下。

2. 吸量管的使用

上述 3 种吸管操作规程相同。量取时，先认清试剂标签，选取与量取体积相同容量或者大于量取体积的最小容量的吸管后，用右手拇指及中指握住吸管标线以上部分，左手持吸耳球，将吸管尖插入所量取试剂的液面下约 1cm 处，用吸耳球将液体轻轻吸上，眼睛注视正在上升的液面位置，当液面上升到刻度以上时，迅速用右手食指按紧管口。抽出吸管，用滤纸将吸管的外壁擦干，然后将管尖靠于瓶内壁，稍松抬右手食指，液面即缓缓下降，此时视线平视吸管上端刻度线，等液体凹液面最底端与刻度线相切，立即按紧食指，使液体不再流出。将吸管移入准备接受液体的容器，其尖端轻轻触及受器内壁，抬起右手食指，让液体自然流下，放至所需液体之量（图 1-2）。放液之后，管中残液“吹”与“不吹”则依各类吸管而不同，详见前述。

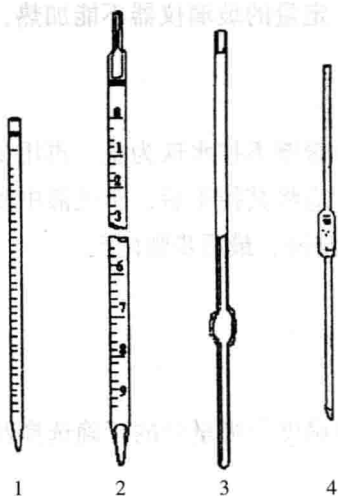


图 1-1 3 类吸量管示意图

1、2. 刻度吸量管；3. 奥氏吸量管；4. 移液管

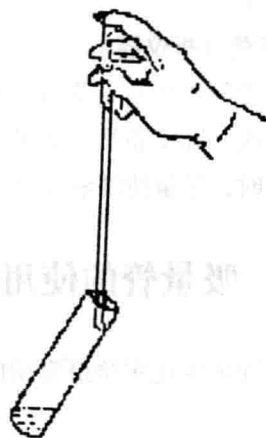


图 1-2 放液体时的姿势



3. 可调式移液器的使用

(1) 可调式移液器的结构 (图 1-3)

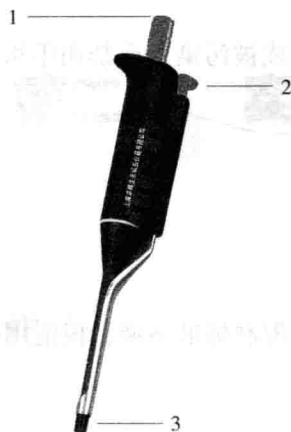


图 1-3 可调式移液器的结构



图 1-4 持移液器的姿势

1. 按钮 (调节杆); 2. 卸吸头按钮; 3. 吸嘴

注: 推动按钮内部的活塞分 2 段行程, 第一档为吸液, 第二档为放液, 手感十分清楚。

(2) 可调式移液器的操作 (图 1-4)

- 调整调节轮至所需体积值;
- 套上吸头, 旋紧;
- 垂直持握可调式移液器, 用大拇指按至第一档;
- 将吸头插入溶液, 慢慢松开大拇指, 使其复原, 液体被吸入;
- 将可调式移液器移出液面, 必要时可用纱布或滤纸拭去附于吸头表面的液体 (注意不要接触吸头口);
- 排放时, 重新将大拇指按下, 至第一档后, 继续按至第二档以排空液体。

注意: 移取另一样品时, 按卸吸头按钮弃掉吸头并更换新吸头。

三、混匀法

欲使一反应充分进行, 必须使反应体系内各种物质分子间充分接触。因此, 每加一种试剂后, 必须充分混匀, 当溶液稀释时, 仍需充分混匀方为浓度均一的溶液。

常用的溶液混匀方法有 3 种:

- (1) 旋转: 使盛器作离心运动。适用于三角烧瓶、大试管内溶液的混匀。振动溶液时, 手握住盛器后以手腕、肘或肩作轴旋转盛器, 不能上下振荡。
- (2) 搅拌: 搅拌棒沿着器壁运动, 适用于烧杯内溶液的混匀。
- (3) 弹打: 一手持管的上端, 用另一手的手指弹动管, 也可以用同一手的大拇指和



食指持管的上端，用其余 3 个手指弹动管，适用于离心管、小试管内溶液的混匀。

在容量瓶中混合液体时，应倒持容量瓶摇动，用食指或手心顶住瓶塞，并不时翻转容量瓶。

无论何种方法，均需防止盛器内液体溅出或被污染，严禁用手指填塞管口或瓶口作混匀动作。

四、容量仪器的使用和校正

1. 量筒

量筒为粗量器，无须校正。量筒不能用来配制标准溶液，仅能用作粗略地度量液体体积。

2. 容量瓶

(1) 使用方法：容量瓶主要用于制备标准溶液。瓶颈上有一刻度，加入液体达此刻度时，就相当于瓶上所表明的温度（通常为 20℃）时的体积，使用容量瓶时不要把溶质直接倒入量瓶然后加水到刻度，而应使溶质首先在小烧杯中加入少量水溶解，再把溶液沿玻璃棒引入量瓶。磨口的瓶塞，应事先检查是否漏水。盖上塞子后，用食指或手心顶住瓶塞，倒置量瓶，并不时摇动和翻转量瓶，以使溶液充分混匀，然后加蒸馏水至刻度。

(2) 校正方法

①洗净容量瓶，自然干燥后称其重量，然后盛入蒸馏水至刻度处，用滤纸吸去附着于瓶颈内壁之水珠，再称其重量，按照水在校正温度下之密度求得其容量（称重准确至 0.01g）。

②将量瓶洗净晾干，然后用移液管吸取蒸馏水放入量瓶，待量瓶内之液面静止后，再用玻璃刀在液面凹液面处刻一切线，此线即代表原来刻度。

3. 吸管

吸管的种类及使用方法在基本操作方法部分已述，在此仅仅介绍一下吸管的校正。

首先以分析天平称出带盖称量瓶重量，然后取洁净干燥的吸管吸取蒸馏水至刻度处，将蒸馏水放入称量瓶内，盖好盖再称其重，由前后两次的称量值求出吸管中水的重量，重复称量 2~3 次取其平均值，再按水在校正温度下的密度求得其校正体积。



第二章 实验样品的制备

一、血液样品

1. 全血

取清洁干燥的试管或其他容器，收集人或动物的新鲜血液，立即与适量的抗凝剂充分混合，所得到的抗凝血为全血。每毫升血液中加入抗凝剂的种类可以根据实验的需要进行选择，但是用量不宜过大，否则将影响实验的结果。常用剂量如下：草酸钾或草酸钠 12mg；柠檬酸钠 5mg；氟化钠 5~10mg；肝素 0.1~0.2mg。

抗凝剂宜先配成水溶液，按取血量的需要加于试管或适当容器内，横放，再蒸干水分（肝素不宜超过 30℃），使抗凝剂在容器内形成薄层，利于血液与抗凝剂的均匀接触。

取得的全血如不立即使用应储于 4℃冰箱之中。

2. 血浆

抗凝全血在离心机中离心，使血球下降，如此得到的上清液即为血浆。质量上乘的血浆应为淡黄色。为避免产生溶血，必须采用干燥清洁的采血器具和容器，并尽可能地少振摇。

3. 血清

收集不加抗凝剂的血液，室温下自然凝固，所析出的草黄色液体，即为血清。制备血清时血凝块收缩析出血清，大约需要 3 小时。为促使血清尽快析出，必要时可以采用离心的方法缩短分离时间，并且可得到较多的血清。

制备血清同样要防止溶血，所以，应用的器具应当干燥清洁。而且血清析出后宜用干净的玻璃棒轻轻分离血凝块与容器壁的粘连，及时取出析出的血清。

二、组织样品

在生化实验中，经常利用离体组织研究各种物质代谢途径和酶系的作用。或者从组织中分离、纯化核酸、酶以及某些有意义的代谢物质进行研究。

但是，在生物组织中，因含有大量的催化活性物质，离体组织的采集必需在低温条



件下进行,并且尽快完成测定。否则其所含物质的量和生物活性物质的活性都将发生变化。

一般采用断头法处死动物,放出血液,立即取出所需脏器或组织,除去脂肪和结缔组织之后,用冰冷生理盐水洗去血液,再用滤纸吸干,称重后,按试验要求制成匀浆或者组织糜。

组织糜:迅速将组织剪碎,用捣碎机绞成糜状,或者加入少量黄沙于乳钵中,研磨至糊状。

组织匀浆:取一定量新鲜组织剪碎,加入适量匀浆制备液,用高速电动匀浆器或者玻璃匀浆器磨碎组织。由于匀浆器的杵头在高速运转中会产生热量,因此在制备匀浆时,需将匀浆器置于冰水中。

常用的匀浆制备液有生理盐水、缓冲液和 0.25mol/L 的蔗糖液等,可根据实验的要求,加以选择。

组织浸出液:上述组织匀浆液再经过离心分离出的上清液就是组织浸出液。



第三章 离心技术与离心机使用

一、离心技术概念

离心技术是利用物体高速旋转时产生强大的离心力,使置于旋转体中的悬浮颗粒发生沉降或漂浮,从而使某些颗粒达到浓缩或与其他颗粒分离之目的。离心技术是生物化学实验室中常用的分离、纯化或澄清的方法,是蛋白质、酶、核酸及细胞亚组分分离的最常用的方法之一,尤其是超速冷冻离心已经成为研究生物大分子实验室中的常用技术方法。离心技术主要用于各种生物样品的分离和制备,生物样品悬浮液在高速旋转下,由于巨大的离心力作用,使悬浮的微小颗粒(细胞器、生物大分子的沉淀等)以一定的速度沉降,从而与溶液得以分离,而沉降速度取决于颗粒的质量、大小和密度。

【离心力】

离心力等于被离心物体的质量与向心加速度的乘积,向心加速度 $=4\pi^2 V^2 r$ (其中 V 为每秒的转数, r 为离心半径,单位 cm)。在某一转数秒的条件下,离心机的离心力 F 通常可用重力加速度 g 的倍数来表示,因而又称相对离心力 RCF ,或者用数字 $\times g$ 表示。一般情况下,常以每分钟的转数(revolutions per minute, rpm)表示离心速度,所以 $F=4\pi^2 (V/60)^2 r/g$ (其中 V 为每分钟的转数, r 为离心半径、单位 cm , g 为重力加速度)。

为了计算方便,经推导后可得相对离心力 F (或 RCF) $=1.118 \times 10^{-5} \times V^2 \times r$ 。

例如: $V=2\,000$ 转/分、 $r=12\text{cm}$,则 $F=1.118 \times 10^{-5} \times 2\,000^2 \times 12=536.64$,即相对离心力为 $536.64 \times g$ 。

【离心机的种类】

根据离心机的转速分类可分为3类:

1. 普通离心机:转速在 $5\,000\text{rpm}$ 以下;通常在室温下操纵,不带冷冻系统,用于收集易沉降的大颗粒物质。
2. 高速离心机:转速在 $5\,000 \sim 25\,000\text{rpm}$;一般都有制冷系统,以消除高速旋转转头与空气之间摩擦而产生的热量。



3. 超速离心机：转速在 25 000rpm 以上，甚至可高达 100 000rpm；为降低摩擦产热且达到所需的超高速，超速离心机不仅有制冷装置，而且装有真空系统。

【超速离心技术】

根据物质的沉降系数、质量、浮力因子等不同，应用强大的离心力（在 105g 以上）使物质分离、浓缩、提纯的方法称为超速离心技术。

目前，随着生物化学及分子生物学的发展，超速离心技术已成为分离、提纯、鉴别生物高分子的重要技术之一。近 10 年来，常用超速离心技术（差速离心、等密度梯度离心、蔗糖密度梯度离心等方法）分离提取各种亚细胞物质如线粒体、微粒体、染色体、溶酶体、肿瘤病毒等。用 500 000g 以上的强大离心力，长时间离心（如 17h 以上）后，获得具有生物活性的各种与蛋白质合成有关的酶系，作为物质基础的 DNA 及各种 mRNA 和 tRNA 等，从而为遗传工程、酶学工程的发展提供了物质基础。

蛋白质、DNA、RNA 等生物大分子在超速离心力的作用下可以发生沉降，其沉降的速度与分子量有关。为了研究方便，采用沉降系数这一概念，所谓沉降系数就是在离心速度恒定时，沉降速度与向心加速度之比 $\frac{dx/dt}{W_2X} = S_{20w}$ [X 为沉降界面与旋转中心的距离；t 为时间（秒）dx/dt 为沉降速度 W 为转头的角速度，S 为沉降系数，单位为 Svedberg=1×10⁻¹³ 秒，S 右下角的 20 指校正温度为 20℃，w 指校正溶剂为水]。

一般来说，分子量越大，S 值越大。当发现某种新高分子物质（不一定是纯化合物）时，往往根据它的沉降系数来区别于类似物质，并利用这一特点进行该物质的分离精制，甚至可利用沉降系数来命名或进行分类及测定高分子物质的分子量。

二、普通离心机操作方法

- (1) 使用前应先检查外套管是否完整。
- (2) 离心时先将待离心物质转移到大小合适的离心管内，盛量不宜过多（占管的 2/3 体积），以免溢出。将此离心管放入外套管。
- (3) 一对外套管（连同离心管）放在天平上平衡，每次离心操作时，必须严格遵守配平原则。
- (4) 将已平衡好的一对套管，对称放入离心机中，关闭离心机顶盖。
- (5) 打开电源开关，设置转数和时间，确定后启动离心机。待离心机自动停止后，打开离心机顶盖，取出样品。
- (6) 使用后，将套管清洗干净。