



普通高等教育农业部“十二五”规划教材
全国高等农林院校“十二五”规划教材

刘维全◎主编

☆本书经农业部教材办公室教材建设专家委员会审定

☆本书适合动物医学、动物科学及其相关专业使用



全国高等院校兽医专业教材实践系列

动物生物化学实验指导 第四版

DONGWU SHENGWU HUAXUE SHIYAN ZHIDAO

 中国农业出版社

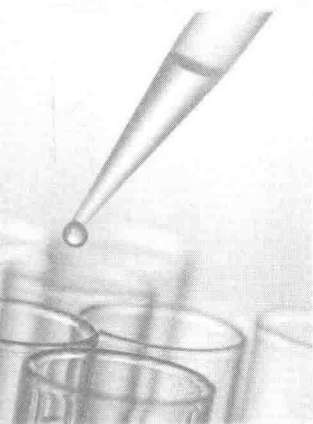
普通高等教育农业部“十二五”规划教材
全国高等农林院校“十二五”规划教材

动物生物化学实验指导

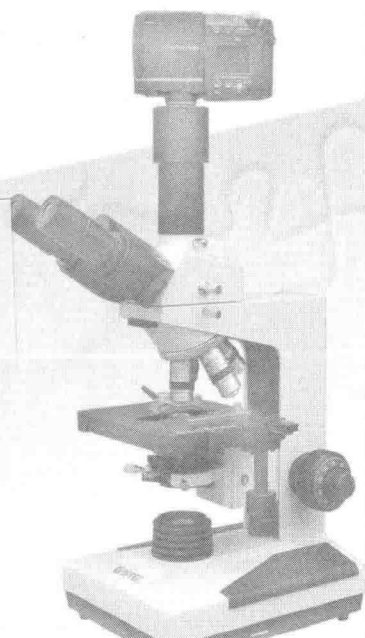
第四版



刘维全 主编



中国农业出版社



图书在版编目 (CIP) 数据

动物生物化学实验指导/刘维全主编. — 4 版. —
北京: 中国农业出版社, 2014.12

普通高等教育农业部“十二五”规划教材 全国高等
农林院校“十二五”规划教材

ISBN 978-7-109-19697-1

I. ①动… II. ①刘… III. ①动物学-生物化学-实
验-高等学校-教材 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 245109 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码 100125)

刘维全

北京中新伟

1

北京发行所发行

第 4 版

刷

开本: 787mm×

张: 13.75

字数: 316 千字

定价: 24.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

第四版前言

全国高等农林院校“十一五”规划教材《动物生物化学实验指导》(第三版)是高等农业院校的基本实验教材。第一版由齐顺章教授主持编写(1984年),第二版由周顺伍教授主持编写(2002年)。这两版都曾对全国高等农业院校的动物生物化学实验教学发挥了重要的指导作用。第三版(2008年)是在前两版的基础上,经过修改、更新、补充和完善而成。第三版在使用过程中,得到了广大使用者的肯定,同时也提出了一些修订意见。在综合考虑各方面修订意见的基础上,我们组织编写了第四版《动物生物化学实验指导》。

本版基本保持了第三版的编排结构,仅在第二章动物生物化学基本实验技术原理中增加了超滤技术的基本原理、方法和用途介绍;在第四章蛋白质(酶)技术中增加了血清转氨酶的测定、超滤法制备小牛胸腺肽两个实验;在第五章核酸技术中,将核酸成分的鉴定内容放在动物组织中染色体DNA的制备实验中。其他内容在先后次序上做了个别调整。

综上所述,新版《动物生物化学实验指导》基本保留了前三版的绝大部分实验内容,在编排方式上仍然是以实验对象为主线,由浅入深,从易到难进行排列。继续突出生物大分子蛋白质(包括酶)和核酸技术,使本实验指导更加贴近当前生命科学发展的总趋势,从而为学生将来从事畜牧兽医以及相关领域的生产实践和科学研究打下良好的基础。

生物化学实验方法与技术的内容范围很广,包括了生物大分子物质的分离技术、离心技术、层析技术、电泳技术、光谱光度技术、电镜技术、同位素技术、微量减压技术(Warburg呼吸计)、免疫化学技术、DNA重组及相关的技术等。由于本书属于大学本科的基础教材,不可能对它们一一进行介绍,因此选择实验的原则是具有代表性、基础、取材容易和方法成熟。即使这样,由于各院校的实际情况有差异,可根据条件选用,部分实验也可供硕士研究生课程之用。

新版《动物生物化学实验指导》共有十所农业院校的十二位作者参加编写。

他（她）们都是在教学、科研一线工作多年的中青年骨干教师，具有丰富的教学和科研经验。大家同心协力，在较短的时间内完成了本书的初稿。在编写过程中，还得到了南京农业大学邹思湘教授，中国农业大学周顺伍教授的大力支持，两位前辈不辞辛苦，对本书内容进行了仔细审校，提出了许多建设性意见和建议，在此表示最衷心的感谢！

本书中的实验虽然经编者多年实践验证，但仍会有不妥和疏漏之处，请使用该书的同行和同学及时指出，我们将不胜感谢。

编 者

2014年6月

第三版前言

《动物生物化学实验指导》是高等农业院校的基本实验教材。第一版由齐顺章教授主持编写（1984年），第二版由周顺伍教授主持编写（2002年）。这两版都曾对全国高等农业院校的动物生物化学实验教学起到了重要的指导作用。第三版是在前两版的基础上，经过修改、更新、补充和完善而成。

本版《动物生物化学实验指导》虽然保留了前两版的绝大部分实验内容，但在编排方式上做了较大调整。以实验对象为主线，由浅入深，从易到难进行排列。并注意突出生物大分子蛋白质（包括酶）和核酸技术，使新的实验指导更加贴近当前生命科学发展的总趋势，从而为学生将来从事畜牧兽医以及相关领域的生产和科学实践打下良好的基础。因此，本书这次修订，除保留部分效果明显的验证性实验外，还考虑了技术操作训练要与生产实践相结合，对部分实验进行更新和整合，成为相对综合性的实验。希望通过这样的基本技能训练，学生不仅能对实验原理有深入的理解，而且能够接触到目前科学研究中的新方法，更重要的是能增强学生的动手能力和解决问题的能力。

生物化学实验方法与技术的内容范围很广，包括了生物大分子物质的分离技术、离心技术、层析技术、电泳技术、光谱光度技术、电镜技术、同位素技术、微量减压技术（Warburg呼吸计）、免疫化学技术、DNA重组及相关的技术等。由于本书属于大学本科的基础教材，不可能对它们一一进行介绍，因此选择实验的原则是具有代表性、基础、取材容易和方法成熟。即使这样，由于各院校的实际情况有差异，可根据条件选用，部分实验也可供硕士研究生课程使用。

新版的《动物生物化学实验指导》由7所农业院校的8位作者参加编写。他们都是在教学、科研一线工作多年的中青年骨干教师，具有丰富的教学和科研经验。大家同心协力，在较短的时间内完成了本书的初稿。在编写过程中，还得到了中国农业大学周顺伍教授、南京农业大学邹思湘教授的大力支持，两位前辈不辞辛苦，对本书内容进行了仔细审校，提出了许多建设性意见和建议，

在此表示最衷心的感谢!

本教材编写的具体分工如下:第一章,刘维全;第二章,高学军、陈书明、张源淑;第三章,刘芑芑、刘维全、王清吉、陈书明、郑玉才;第四章,郑玉才、张源淑、刘芑芑、王清吉、陈书明、刘维全;第五章,高学军、刘维全、高士争、郑玉才;第六章,高士争;附录,刘维全。全书由刘维全统稿。

本教材中的实验虽然经编者多年实践验证,但仍会有不妥和疏漏之处,敬请读者批评指正。

编 者

2007年8月

第四版编审人员

主 编 刘维全 中国农业大学

副主编 刘芃芃 中国农业大学

高士争 云南农业大学

陈书明 山西农业大学

参 编 (按姓氏汉语拼音为序)

汉丽梅 沈阳农业大学

梁俊荣 河北北方学院

王清吉 青岛农业大学

肖红波 湖南农业大学

张 莉 东北农业大学

张源淑 南京农业大学

赵素梅 云南农业大学

郑玉才 西南民族大学

审 稿 周顺伍 中国农业大学

邹思湘 南京农业大学

目 录

第四版前言	
第一版前言	
第二版前言	
第三版前言	

第 1 章 总论	1
第 1 节 绪论.....	3
第 2 节 动物生物化学实验室安全与防护知识.....	7
第 3 节 常用仪器设备及其使用方法简介.....	11
第 4 节 实验室基本操作技术.....	16
第 2 章 动物生物化学常用实验技术原理	23
第 5 节 沉淀分离技术.....	25
第 6 节 离心技术.....	29
第 7 节 超滤技术.....	33
第 8 节 光谱分析技术.....	35
第 9 节 层析技术.....	41
第 10 节 电泳技术.....	50
第 3 章 动物生物化学基本实验技术	59
第 11 节 血液样品的处理与组织匀浆的制备.....	61
第 12 节 血糖的测定——福林-吴宪法.....	66
第 13 节 血液非蛋白氮的测定.....	69
第 14 节 血清总脂的测定.....	72
第 15 节 血清钠、钾、钙、无机磷的测定.....	75
第 16 节 肝糖原的提取与鉴定.....	79
第 17 节 维生素 B ₁ 的提取与含量测定.....	81
第 18 节 酮体的生成与测定.....	83
第 19 节 脂类的提取和薄层层析分离.....	87

第 4 章 蛋白质(酶)技术	89
第 20 节 蛋白质提取、纯化与鉴定的一般步骤和方法	91
第 21 节 蛋白质定量测定技术	100
第 22 节 唾液淀粉酶活性的观察	109
第 23 节 碱性磷酸酶活性及比活性的测定	113
第 24 节 琥珀酸脱氢酶的作用及竞争性抑制的观察	115
第 25 节 血清氨基转移酶的活性测定	117
第 26 节 纸层析鉴定酶促转氨基作用	119
第 27 节 乳酪蛋白的制备及部分性质检测	123
第 28 节 超滤法制备新生小牛胸腺肽	125
第 29 节 血清蛋白质醋酸纤维素薄膜电泳	127
第 30 节 等电聚焦电泳法测定蛋白质的等电点	129
第 31 节 卵清蛋白的分离提纯	132
第 32 节 细胞色素 C 的制备及含量测定	134
第 33 节 血浆(清) IgG 的分离纯化	139
第 34 节 聚丙烯酰胺凝胶柱状电泳分离血清蛋白质	144
第 35 节 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的分子量	147
第 5 章 核酸技术	151
第 36 节 动物组织中染色体 DNA 的制备与成分鉴定	153
第 37 节 核酸定量测定技术	157
第 38 节 大肠杆菌感受态细胞的制备及质粒的转化	164
第 39 节 质粒的提取及琼脂糖凝胶电泳鉴定	167
第 40 节 利用凝胶层析技术纯化质粒 DNA	171
第 41 节 聚合酶链式反应	173
第 6 章 实验记录与数据处理	177
第 42 节 实验记录与数据处理	179
第 43 节 实验报告	186
附录	189
一、常用缓冲溶液的配制方法	189
二、层析技术常用数据	194
三、硫酸铵饱和度常用表	199
四、常用蛋白质和核酸分子量标准	201
主要参考文献	202

第 1 章

绪 论

1

第1章

总 论

第 1 节

绪 论

生物化学是生命科学中一门重要的实验科学。任何生命现象的解释，如营养物质在生物体内的代谢，机体生长发育、遗传变异等过程中的化学变化规律，都需要进行大量的科学实验。可见，实验在生物化学这门课中的作用是很大的。可以说，生物化学作为一门学科的发展与实验技术的发展密切相关，每一种新的生物化学物质的发现及其功能的阐明都离不开各种实验技术，而实验技术的每一次新发明都极大地推动了生物化学研究的进展，因而对于每一位现代生物科学工作者，尤其是生物化学工作者，学习并掌握各种生物化学实验技术极为重要。

(一) 生物化学实验技术发展简史

生物科学在 20 世纪有惊人的发展，其中生物化学与分子生物学的发展尤为迅速，这样一门最具活力和生气的实验科学，在 21 世纪必将成为带头的学科，这主要有赖于生物化学与分子生物学实验技术的不断发展和完善。这里我们简单回顾一下生物化学实验技术的发展历史。

20 世纪初期，俄国的植物学家 M. Tswett 首先发明了层析技术。他用 CaCO_3 粉末作为填料，在室温下对绿色植物叶压成的汁进行柱层析，当绿色的液汁随着石油醚流过 CaCO_3 时，不同的色素逐渐被分离，柱内慢慢出现一层一层的色带，最终得到了叶绿素、叶黄素等不同的色素带，他把这个方法定名为色谱法。

20 世纪 20 年代，微量分析技术导致了维生素、激素和辅酶等的发现。瑞典著名的化学家 T. Svedberg 奠基了“超离心技术”，1924 年制成了第一台 $5\,000\text{ g}$ ($5\,000\sim 8\,000\text{ r/min}$) 相对离心力的超离心机，开创了生物化学物质离心分离的先河。他准确测定了血红蛋白等复杂蛋白质的分子质量，并因此获得了 1926 年的诺贝尔化学奖。

30 年代，电子显微镜技术打开了微观世界，使我们能够看到生物的亚细胞结构，甚至生物大分子的内部结构。

40 年代，瑞典的著名科学家 Tisellius 创建了电泳技术，从而开创了电泳技术的新时代，他因此获得了 1948 年的诺贝尔化学奖。同期，英国科学家 A. J. P. Martin 和 R. L. M. Syngne 用具有亲水能力的硅胶介质填充的层析柱成功地混合氨基酸溶液中的氨基酸进行了分离，并提出了最初的液-液分配层析的塔板理论，第一次把层析中出现的实验现象上升为理论。他们因此获得了 1952 年的诺贝尔化学奖。由此，电泳技术和层析技术成为分离、鉴定以及制备生物化学物质的关键技术。

在 1944 年，Avery 建立了 DNA 转化技术。用光滑型肺炎链球菌的 DNA 转化粗糙型肺炎链球菌，获得了光滑型肺炎链球菌，从而能够致死小鼠。

自 1935 年 Schoenheimer 和 Rittenberg 首次将放射性同位素示踪用于糖类及脂类物质的

中间代谢的研究以后，“放射性同位素示踪技术”在50年代有了很大的发展，为各种生物化学代谢过程的阐明发挥了决定性的作用。

在1953年，英国科学家 Wilkins 等利用 X 射线衍射技术研究了 DNA 的结构。美国科学家 Watson 和英国科学家 Crick 在前人工作的基础上，创造性地提出了 DNA 的反向平行双螺旋模型，他们的研究成果开创了生物科学的历史新纪元。他们3人因此共享了1962年的诺贝尔生理学或医学奖。

英国生物化学家 Sanger 于1953年确定了牛胰岛素中氨基酸的精确顺序，从而获得了1958年的诺贝尔化学奖。

就在同一时期，英国物理学家 Perutz 利用 X 射线衍射技术对血红蛋白的结构进行了分析，Kendrew 测定了肌红蛋白的结构，成为研究生物大分子立体结构的先驱，他们共同获得了1962年诺贝尔化学奖。

60年代，各种仪器分析方法用于生物化学研究，取得了很大的发展，如高压液相 (high pressure liquid chromatography, HPLC) 技术，红外、紫外、圆二色等光谱技术，核磁共振技术 (NMR) 等。自1958年 Stem、Moore 和 Spackman 设计出氨基酸自动分析仪，大大加快了蛋白质的分析工作。1967年 Edman 和 Begg 制成了多肽氨基酸序列分析仪，到1973年 Moore 和 Stein 设计出氨基酸序列自动测定仪，又大大加快了对多肽一级结构的测定，十多年间氨基酸的自动测定工作得到了很大的发展和完善。

此外，在60年代，层析和电泳技术又有了重大的进展，在1968—1972年 Anfinsen 创建了亲和层析技术，开辟了层析技术的新领域。1969年 Weber 应用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术测定了蛋白质的分子质量，使电泳技术取得了重大进展。

70年代，基因工程技术取得了突破性的进展，Arber、Smith 和 Nathans 三个小组发现并纯化了限制性内切酶。1972年，美国斯坦福大学的 Berg 等人首次用限制性内切酶切割了 DNA 分子，并实现了 DNA 分子的重组。1973年，又由美国斯坦福大学的 Cohen 等人第一次完成了 DNA 重组体的转化技术，这一年被定为基因工程的诞生年，Cohen 成为基因工程的创始人。从此，生物化学进入了一个新的大发展时期。与此同时，各种仪器分析手段进一步发展，研制成了 DNA 序列测定仪、DNA 合成仪等。

80年代，基因工程技术进入辉煌发展的时期。1980年，英国剑桥大学的 Sanger 和美国哈佛大学的 Gilbert 分别设计出两种测定 DNA 分子内核苷酸序列的方法，而与 Berg 共获诺贝尔化学奖。从此，DNA 序列分析法成为生物化学与分子生物学最重要的研究手段之一。他们3人在 DNA 重组和 RNA 结构研究方面都做出了杰出的贡献。1981年由 Jorgenson 和 Lukacs 首先提出的高效毛细管电泳技术 (HPCE)，由于其高效、快速、经济，尤其适用于生物大分子的分析，因此受到生命科学、医学和化学等学科的科学工作者的极大重视，发展极为迅速，是生物化学实验技术和仪器分析领域的重大突破，意义深远。现今，由于 HPCE 技术的异军突起，HPLC 技术的发展重点已转到下游的大量制备应用方面。

在1980年，Gordon 成功建立了动物转基因技术，使人们能够在机体水平上研究 DNA 的结构与功能。

在1984年，德国科学家 Kohler、美国科学家 Milstein 和丹麦科学家 Jerne 由于发展了单克隆抗体技术，完善了极微量蛋白质的检测技术而共享了诺贝尔生理学或医学奖。

在1985年,美国加利福尼亚州 Cetus 公司的 Mullis 等发明了 PCR (polymerase chain reaction) 技术,即聚合酶链式反应的 DNA 扩增技术,对于生物化学和分子生物学的研究工作具有划时代的意义,因而与第一个设计基因定点突变的 Smith 共享了1993年的诺贝尔化学奖。

90年代以后,生物芯片技术 (biochip)、动物克隆技术等相继诞生。

进入21世纪后,随着人类基因组计划的完成,生命科学研究进入了后基因组时代,相信还会有大量新技术不断涌现出来。

除上述历史以外,还可以列出许多生物化学发展史上的重要成就,例如,美国哈佛大学的 Folin 教授和中国的吴宪教授对生物化学常用的各种分析方法(血糖分析、蛋白质含量分析、氨基酸测定等)的建立作出了历史性的贡献。

(二) 动物生物化学实验的特点

动物生物化学实验的主要研究对象是动物组织、细胞等材料,利用各种技术手段检测、鉴定或分离、提取、纯化某种生物成分。这就决定了动物生物化学实验与一般的化学实验或分析化学实验具有很大的不同之处,其最明显的特点如下。

(1) 所用的动物组织、细胞等材料必须保持新鲜,以保证被检测成分不被降解或生物活性不丢失。为此,样品采集后必须立即进行实验,或低温保存,特殊条件下,需要在超低温或液氮中保存。在整个实验过程中,一般也要求在低温条件下进行。

(2) 被检测成分在动物组织、细胞中含量很少,往往以毫克(mg)和微克(μg)甚至纳克(ng)、皮克(pg)为单位进行计量。特别是当今生物化学的研究已进入分子生物学时代,所要检测的目的分子含量极少。这就要求实验者在进行实验时高度的仔细和认真,使实验的每一个条件都必须最佳。

(3) 被检测成分不仅含量很少,而且与动物的生理状态、营养状况、年龄、性别等因素有关,还存在个体差异。取材时应对这些影响因素加以考虑。

(4) 由于生物分子的特殊性,体外操作时应尽可能模拟生理环境条件。凡能够引起蛋白质(酶)和核酸结构完整性破坏,导致生物活性丧失,或影响它们的结构完整性和生物活性测定的因素,都必须在操作过程中避免。

(5) 在绝大多数情况下,体外操作的生物分子是溶解在溶液中的,很难直接看到所研究的物质,但每一步实验操作都必须有一个可见的实验结果,以证明操作的正确性,为下一步实验打好基础。实验中所用到的许多技术和方法,将起到“眼睛”的作用,用以对各种生物化学过程进行监测。

上述几点都是从大的方面考虑的,不同的实验对象可能还有具体的特点,希望同学们在做实验时仔细考虑,具体情况具体分析。

(三) 动物生物化学实验的主要目的和要求

(1) 掌握各个实验的基本原理,学会严密地组织自己的实验,合理地安排实验步骤和时间。

(2) 训练实验的动手能力,熟练地掌握各种生物化学实验仪器的使用方法,包括各种天平、各种分光光度计、各种离心机、自动部分收集器、恒流泵、核酸蛋白检测仪、冰冻干燥

机、酸度计、电导率仪、高速分散器、各种电泳装置和摇床等。

(3) 学会准确翔实地记录实验现象和数据的技能,提高实验报告的写作能力,能够整齐清洁地进行所有的实验,培养严谨细致的科学作风。

(4) 掌握生物化学的各种基本实验方法和实验技术,尤其是各种电泳技术和层析技术,为今后参加科研工作打下坚实的基础。

(5) 学习实验设计的基本思路,提高自己的实验设计能力。

第 2 节

动物生物化学实验室安全与防护知识

在动物生物化学实验室中，安全的内容主要包括以下几个方面：人身安全，仪器设备、试剂的安全以及环境安全等。人身安全最为重要，一切安全和防护救治措施的实施都是以人为本而设计的。但仪器设备、试剂的安全以及环境安全也决不可以忽视，而且人身安全常常与这两者联系在一起，操作者在使用仪器设备、试剂时由于操作不当或失误，轻者导致仪器设备的损毁和试剂的浪费以及环境的污染，重者造成人身安全事故的发生。

就人身安全而言，着火、爆炸、中毒、触电、外伤和生物伤害等是动物生物化学实验室中易发生的危险性比较大的安全事故，下面分别予以简要介绍。

(一) 着火

由于实验的需要，一方面，生物化学实验室中经常使用电炉、微波炉等火（热）源，另一方面又经常大量使用有机溶剂，如甲醇、乙醇、丙酮、氯仿等，因此，稍有不慎极易发生着火事故。常用有机溶剂的易燃性列于表 1-1。

表 1-1 常见有机液体的易燃性

名 称	沸点/℃	闪点*/℃	自燃点**/℃
乙醚	34.5	-40	180
丙酮	56	-17	538
二硫化碳	46	-30	100
苯	80	-11	550
乙醇 (95%)	78	12	400

* 闪点：液体表面的蒸汽和空气的混合物在遇明火或火花时着火的最低温度。

** 自燃点：液体蒸汽在空气中自燃时的温度。

由表 1-1 可以看出，乙醚、二硫化碳、丙酮和苯的闪点都很低，因此不得存于可能会产生电火花的普通冰箱内。低闪点液体的蒸汽只需接触红热物体的表面便会着火，其中二硫化碳尤其危险。

1. 预防火灾必须严格遵守以下操作规程

(1) 严禁在开口容器和密闭体系中用明火或微波炉加热有机溶剂，只能使用加热套或水浴加热。

(2) 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。量少时用水稀释后排入下水道（有条件的实验室应避免这样做）。

(3) 不得在烘箱内存放、干燥、烘焙有机物。