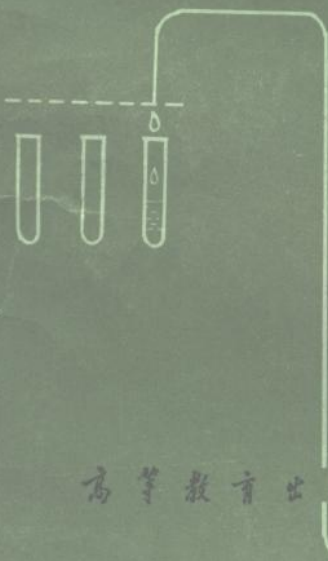


高等学校试用教材

基础生物化学实验

北京师范大学生物系生物化学教研室 编

高等教育出版社



本书原由人民教育出版社出版。1983年3月9日，上级同意恢复“高等教育出版社”。本书今后改用高等教育出版社名义继续印行。

2429/24

高等学校试用教材

基础生物化学实验

北京师范大学生物系生物化学教研室编

高等教育出版社出版

新华书店北京发行所发行

四川新华印刷厂印刷

开本850×1168 1/32 印张8.25 字数190,000

1982年10月第1版 1984年2月第2次印刷

印数14,801—26,900

书号13010·0804 定价0.75元

前 言

本书根据 1980 年教育部制定的师范院校教学大纲编写而成，另外多增加了一些实验以供选用。可与《生物化学简明教程》配合使用。全书共分三篇。

第一篇选取了若干与所编写实验有关的技术理论和应用，使学生扩大这方面的知识。共分八章，包括实验的准确性、透析法、层析法、电泳法、分光光度法、同位素技术等。

在第二、三篇中共编写了四十组学生实验(每组用 3—4 学时，个别实验用 6—8 学时)和演示实验，其中多数是我们在历年教学中采用的；少数是从国内外参考书上选取，经过我们试作，认为适合基础生物化学实验用的。演示实验是根据目前一般师范院校实验教学学时和实验条件考虑的，各校应创造条件将其中若干实验改为学生实验。

由于我们的经验不足，理论水平有限，书中的错误和不足之处，敬希读者指正。

北京师范大学生物系生物化学教研室

1982 年 5 月

目 录

第一篇 常用生物化学实验技术及原理

第一章 实验的准确性	1
一、单位和量	1
(一) 基本单位	1
(二) 导出单位	2
(三) 词头	3
(四) 与 SI 并用的单位	3
(五) 摩尔和浓度	4
二、准确测量	5
(一) 误差来源	5
(二) 正态分布曲线	8
(三) 生物材料中数据的变化	10
(四) 容量玻璃仪器	11
三、实验报告	11
(一) 结果的记录	11
(二) 表格和图解	13
第二章 透析	17
一、膜	17
二、溶剂	18
三、物理条件	18
四、Donnan 膜平衡	18
第三章 层析法	20
一、柱层析法的一般技术	21

二、几种常用的层析法	24
(一) 吸附层析	24
(二) 离子交换层析	25
(三) 分配层析	30
(四) 薄层层析	35
(五) 凝胶层析	37
第四章 电泳技术	43
一、电泳技术基本原理	44
(一) 电场强度(电势梯度)	45
(二) 溶液的 pH 值	46
(三) 溶液的离子强度	46
(四) 电渗现象	47
二、纸电泳	47
三、醋酸纤维薄膜电泳	48
四、琼脂凝胶电泳	49
五、聚丙烯酰胺凝胶电泳	50
第五章 分光光度法	60
一、原理	60
二、分光光度计的基本部件	63
(一) 光源	63
(二) 单色器	64
(三) 吸收池	65
(四) 检测器	65
(五) 测量装置	67
三、几种国产分光光度计的介绍	67
(一) 72 型分光光度计	67
(二) 721 型分光光度计	68
(三) 751 G 型分光光度计	69
第六章 放射性同位素技术	72
一、基本知识	72
(一) 同位素	72
(二) 射线的性质	74
(三) 放射性衰变的规律	74

(四) 放射性强度的单位·····	76
二、射线的探测·····	76
(一) 盖革计数器·····	77
(二) 闪烁计数器·····	77
三、放射自显影术·····	78
四、放射性同位素法的优缺点·····	79
第七章 Warburg氏呼吸计测压法 ·····	80
一、基本原理·····	80
二、仪器的构造·····	80
三、仪器使用的理论和操作要点·····	81
(一) 操作要点和计算方法·····	81
(二) 温压计·····	82
(三) 反应瓶体积的测定·····	83
第八章 实验样品的制备 ·····	86
一、组织样品·····	86
二、血液样品·····	88
三、尿液样品·····	88

第二篇 学生实验

第九章 蛋白质的化学 ·····	91
实验一 总氮量的测定——凯氏定氮法·····	91
实验二 氨基酸的分离鉴定——纸层析法·····	97
实验三 蛋白质的性质实验(一)——蛋白质及氨基酸的呈色反应·····	99
实验四 蛋白质的性质实验(二)——蛋白质的等电点测定 和沉淀反应·····	109
实验五 血清蛋白的醋酸纤维薄膜电泳·····	116
实验六 酪蛋白的制备·····	119
实验七 甲醛滴定法测定氨基氮·····	121
第十章 核酸的化学 ·····	124
实验八 酵母核糖核酸的分离及组分鉴定·····	124
实验九 菜花(花椰菜)中核酸的分离和鉴定·····	126
实验十 醋酸纤维薄膜电泳分离核苷酸·····	130

实验十一	薄层层析法分离 AMP、ADP 和 ATP	132
第十一章	酶	136
实验十二	酶的特性	136
实验十三	枯草杆菌蛋白酶活力测定	142
实验十四	底物浓度对酶促反应速度的影响——米氏常数的测定	145
实验十五	酶浓度对酶促反应速度的影响——用分光光度法测定碱性磷酸酶活性	148
实验十六	胰凝乳蛋白酶的制备及活力测定	152
第十二章	组织代谢	159
实验十七	肌糖原的酵解作用	159
实验十八	小麦萌发前后淀粉酶活力的比较	162
实验十九	血糖的定量测定——Hagedorn-Jensen 二氏定糖法	165
实验二十	胰岛素对血糖浓度的影响	169
实验二十一	发酵过程中无机磷的利用	170
实验二十二	脂肪酸的 β -氧化	173
实验二十三	精氨酸酶的作用	176
实验二十四	氨基转移反应(一)——血液中转氨酶活力的测定(分光光度法)	179
实验二十五	氨基转移反应(二)——谷丙转氨酶活性的测定(纸层析法)	182
第十三章	柱层析法的基本训练	186
实验二十六	用阳离子交换树脂摄取氯化钠	186
第三篇 演示实验		
实验二十七	聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳(血清蛋白的分离)	188
实验二十八	离子交换柱层析法分离氨基酸	193
实验二十九	凝胶过滤法测定蛋白质分子量	196
实验三十	血红蛋白的两性解离	200
实验三十一	紫外分光光度法测定核酸的含量	202
实验三十二	透析实验(一)蛋白质的透析	204

实验三十三	透析实验(二)糖类的透析	205
实验三十四	锂盐存在时蔗糖的燃烧	207
实验三十五	用铂和血液过氧化氢酶分解过氧化氢	207
实验三十六	肝组织耗氧量的测定	209
实验三十七	用碳酸钙分离菠菜的色素	212
实验三十八	吸附层析法分离叶子色素	213
实验三十九	用 ^{32}P 测定小麦幼苗根部的吸收功能	215
实验四十	小白鼠氨中毒	217

附录.....219

一、实验室规则.....219

二、实验室基本操作.....220

(一)玻璃仪器的洗涤.....220

(二)搅拌和振荡.....221

三、常用仪器的使用.....222

(一)容量玻璃仪器的使用方法.....222

(二)台秤.....225

(三)光学天平.....226

(四)分光光度计.....229

(五)电动离心机.....234

(六)干燥箱和恒温箱.....235

(七)电热恒温水浴.....237

(八)电冰箱.....237

(九)酸度计.....238

四、常用缓冲溶液的配制.....241

(一)磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液.....242

(二)柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液.....243

(三)醋酸-醋酸钠缓冲液.....243

(四)磷酸盐缓冲液.....243

(五)巴比妥钠-盐酸缓冲液.....245

(六)Tris-盐酸缓冲液.....245

(七)碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液.....246

五、常用酸碱指示剂.....246

六、常用酸碱试剂的浓度及比重.....247

七、标准溶液的制备和标定.....	247
八、元素的原子量表.....	250
九、基础生物化学实验学生使用仪器清单(一组).....	251

第一篇 常用生物化学实验技术及原理

第一章 实验的准确性

准确性可以定义为与真实性一致的程度。因此，科学家们除正确设计实验之外，还要寻求在实验室中准确测量的方法以便获得准确的数据。我们把这些实际工作的概念写在第一章中，因为只有当准确性的要求达到以后，任何实际工作对于学生和阅读实验报告的人才有意义。在讨论有关的基本概念之前有必要先介绍在生物化学实验中常用的单位和量。

一、单位和量

本书所使用的单位是SI单位(国际单位制)，是以米制为基础的。SI单位为全世界的科学实验室所普遍接受。1981年8月公布的中华人民共和国计量单位名称与符号方案亦与国际单位制基本一致。

(一)基本单位

共有7种基本单位，均列在表1-1中。

表 1-1 基本单位

量	单 位 名 称	单 位 符 号
长度	米	m
质量	千克, (公斤)	kg
时间	秒	s
电流	安[培]	A
热力学温度	开[尔文]	K
物质的量	摩[尔]	mol
发光强度	坎[德拉]	cd

注：表中单位名称，去掉方括号时为单位名称的全称，去掉方括号及其中的字即成为单位名称的简称；无方括号的单位名称，简称与全称同。圆括号中的名称与它前面的名称是同义词。下同。

(二)导出单位

除以上基本单位外，还有一些因适当组合这些基本单位而得到的导出单位。为了方便起见，这些导出单位都给以专门名称，在生物化学工作中常遇到的导出单位列在表 1-2 中。

表 1-2 某些具有专门名称的导出单位

量	单 位 名 称	单 位 符 号
频率	赫[兹]	Hz
力	牛[顿]	N
压强, (压力), 应力	帕[斯卡]	Pa
能, 功, 热量	焦[耳]	J
功率, 辐[射]通量	瓦[特]	W
电量, 电荷	库[仑]	C
电位, 电压, 电动势, 电势	伏[特]	V
电容	法[拉]	F
电阻	欧[姆]	Ω
摄氏温度	摄氏度	$^{\circ}\text{C}$

(三) 词头

有时单位太大或太小。此时, 为了避免写许多 0, 可在单位符号前加一个词头。最好每一次单位改变的倍数为 1000 倍(表 1-3)。如 0.000015mol 应写成 $15\mu\text{mol}$ 。13400m 应写成 13.4km。

表 1-3 词头

因 数	词 头 名 称		符 号
	原文(法)	中 文	
10^6	mega	兆	M
10^3	kilo	千	k
10^{-1}	deci	分	d
10^{-2}	centi	厘	c
10^{-3}	milli	毫	m
10^{-6}	micro	微	μ
10^{-9}	nano	毫微	n
10^{-12}	pico	微微	p

词头和符号组合成为一个新符号。例如 mm^3 的意思是 $(10^{-3}\text{m})^3$ 而不是 10^{-3}m^3 。因此在书写时, 词头和符号之间不应留有空格或缀以一点。反之, 在导出单位中, 符号之间则应留有空格, 或者为了更清楚起见, 加上一个点。例如:

$\text{ms} = \text{毫秒}$, 即 10^{-3}s

而 $\text{m} \cdot \text{s} = \text{米} \times \text{秒}$, 即 $\text{m} \times \text{s}$

(四) 与 SI 并用的单位

在生物化学工作中有些比较方便而不能代替的单位, 这些单位有时与 SI 单位并用。

1. 升(l) 在生物化学工作中用升作为体积基本单位。一升准确等于一立方分米。

所以: $1000 \text{ 升} = 1 \text{ 立方米} = \text{m}^3$

$$1 \text{ 升(l)} = 1 \text{ dm}^3 = 10^{-3} \text{ m}^3$$

$$1 \text{ 毫升(ml)} = 1 \text{ cm}^3 = 10^{-6} \text{ m}^3$$

$$1 \text{ 微升}(\mu\text{l}) = 1 \text{ mm}^3 = 10^{-9} \text{ m}^3$$

2. 克(g) 在生物化学中用克作为质量的基本单位。克有时和词头合用,如千克(kg),毫克(mg),微克(μg)等。

3. 秒(s) 时间的基本 SI 单位为秒,但是通用的时间单位[即分(min)、小时(h)、日(d)]在方便时也可以用。

(五)摩尔和浓度

1. 摩尔(mol):

摩尔是“物质的量”的单位。当物质含有 6×10^{23} 个微粒时,这种微粒的物质的量称为 1 摩尔。微粒可以是原子、分子、离子以及其它粒子。1 摩尔任何物质的质量称为该物质的摩尔质量。某物质的摩尔质量就等于该物质的分子量以克为单位。例如

葡萄糖分子的摩尔质量(分子量 180)是 180g,

清蛋白分子的摩尔质量(分子量 68,000)是 68,000g 或 68 kg。

2. 摩尔浓度(摩尔/升或 mol/l):

单位体积溶液中溶质的量叫做溶质的浓度。在生物化学工作中量的单位是摩尔,体积的单位是升。1 摩尔浓度因此定义为每升溶液中含溶质 1 摩尔。

1 mol/l = 每升溶液中含溶质的分子量以克为单位

摩尔浓度过去的符号是 M ($0.15 M \text{ NaCl}$),但是国际单位制建议用 mol/l 代替 (0.15 mol/l NaCl)。

3. 重量浓度:

有时待测的物质组分不明,如某种抽提液中的蛋白质或核酸的浓度,在这种情况下,用单位体积的重量而不是用摩尔来表示浓度。在生物活性物质的分子量还未查明的时候,如维生素 B_{12} 或

血清免疫球蛋白,也可以这样用。体积的单位还是升,因此所有的浓度都以升而不是以 100ml 为基础(g/l, mg/l, μ g/l, 等)。仍然使用%这个术语,但必需意义明确(写入下列括号中的意义)。例如 2%醋酸溶液可能意味着:

每 100g 水中含 2g 醋酸(W/W)

每 100ml 水中含 2g 醋酸(W/V)

每 100ml 水中含 2ml 醋酸(V/V)

4. 从摩尔浓度换算为每毫升的摩尔数:

在许多生物化学反应中需要知道试管中物质的摩尔数,它可从溶液的摩尔浓度和其体积来计算。首先需计算 1ml 溶液中物质的摩尔数,然后乘以试管中溶液的体积。如每次将摩尔数和体积各缩小 10^3 倍,绝对数就不变;这种关系在实际中很有用。

1 摩尔浓度溶液 = 1mol/l

= 1mmol/ml

= 1 μ mol/ μ l

同样,1 毫摩尔浓度溶液 = 1mmol/l

= 1 μ mol/ml

二、准确测量

(一)误差来源

所有实验室工作都包含某些形式的测量。由于所有的测量都可能存在误差,故应懂得这些误差的可能来源。

1. 个人误差:这可能来源于一个设计不好的实验,其中的控制实验不够。例如在许多生物实验中环境的温度和光照可能对所研究的系统有深刻的影响,因而必需小心地控制。设计实验时每

次应只引入一个变量而其他所有能影响实验的因素都保持恒定。

个人误差还常常来源于由视差引起的不正确读数。因此，在许多仪器上，都在指针的背面装一面镜子，这样当指针和其镜影重合时就可得到真实的读数。在某些仪器上则使用数字计数来代替刻度的反射。但是吸管刻度目前还只能用肉眼观察，而不正确地在吸管中液体的弯月面上读数可能是生物化学实验中误差最大的来源之一(图 1-1)。这类的个人误差可以通过仔细的工作加以纠正或消除。

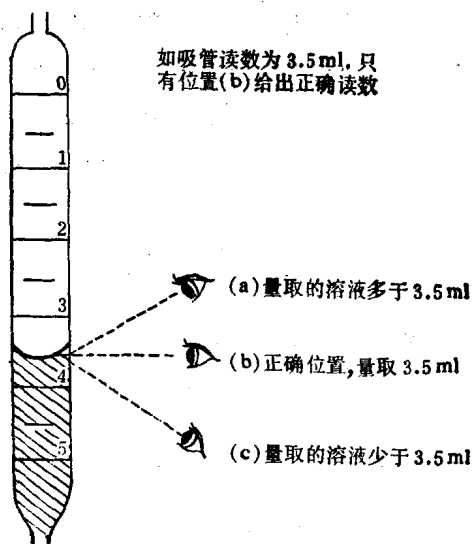


图 1-1 避免由于视差引起的错误

2. 仪器的局限：一种特殊装置的准确度的局限通常是已知的，在选择仪器时应考虑在内。例如 10ml 分度吸管的误差是 0.2%，这种吸管可以相当准确地转移大量的液体，如 9.2ml，但要转移 0.1ml，其误差则可高达 20%。因此应根据实验的要求选择合适的量器，天平等。

3. 标准物和空白实验

为了在测量时尽可能得到准确的数值,必需使误差减至最小。可以通过仔细的工作和使用标准溶液做到这一点。在任何实验中,甚至在使用标定仪器和基准试剂时,都应使用待测物质的标准溶液。这种做法能对方法的准确性提供一种有用的检查,因为测量所得的数据必需落在真值范围之内。标准溶液应与所研究的溶液用完全相同的方法处理。此时可以画出一条能指示用浓度测量物质量变的标准曲线。从待测液得到的数值应落在标准曲线范围之内,然后读出实验数值。通常在容量测定时只有一种标准物,可以预先画好标准曲线。

在任何测量实验中都应包括有空白溶液。用同体积的蒸馏水代替待测液并严格按照待测液和标准液那样的方法处理,即得所谓的空白溶液。当然,在最终计算时,应从实验值和标准值中减去从空白溶液中得到的任何数值,因为空白值是所用的试剂而不是待测物(所研究的物质)所造成的。在本书众多的比色测定中对空白和标准溶液的实际应用有很好的阐述。在酶的工作中常需用几个空白或对照溶液。

4. 偶然误差 还有一种无法预料的偶然误差。同一个实验者在同样条件下进行一系列测定时,每一次测量的结果都略有不同,这就是偶然误差所造成的。进行大量的测定并计算平均值(表 1-4)可以有效地减少偶然误差。如果测量结果相当一致的话,两次测定就够了,而这通常是在制定标准曲线时的情况。重复实验间的一致程度叫做精密度。精密度和准确度不是一个概念。因为测量可以高度精密但由于仪器或技术的误差而并不准确。

在许多情况下,精确度并不像例子(表 1-4)中那样高,实验结果要分散的多。因此,测量一下所得数据的分布是有益的。为此,应介绍统计学的一些概念。

表 1-4 血清中氯离子的测定

测定次数	氯化物 (mmol/l)	
	实验值	平均值
1	102	102
2	104	103
3	106	104
4	104	104
5	103	104
6	105	104

以下从统计学原理所引出的方程式是作为工具使用的、公式的推导已略去。

(二) 正态分布曲线

如果得到某种量(x)的一大批数据,就可画出一个表示数据的数目与 x 值关系的曲线(图 1-2)。这种实验结果的正态或 Gaussian 分布曲线有一些特征,即

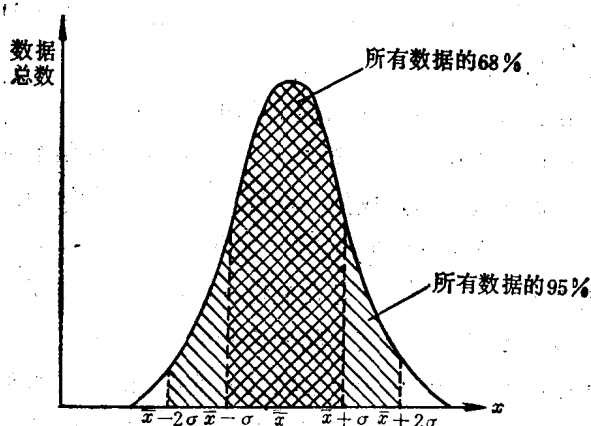


图 1-2 数据的正态或 Gaussian 分布

- ① 曲线是对称的, 其最大值为平均值 $\bar{x}$ 。