



生化实验技术 与实施教程

■ 主 编 钱国英

副主编 汪财生 尹尚军 斯越秀



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

SHENGHUA SHIYAN JISHU YU SHISHI JIAOCHENG

生化实验技术与 实施教程

■ 主 编 钱国英

副主编 汪财生 尹尚军 斯越秀



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生化实验技术与实施教程 / 钱国英主编. —杭州: 浙江大学出版社, 2009. 5

ISBN 978-7-308-06669-3

I. 生… II. 钱… III. 生物化学—实验—高等学校—教材 IV. Q5—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 041148 号

生化实验技术与实施教程

钱国英 主编

汪财生 尹尚军 斯越秀 副主编

责任编辑 周卫群

封面设计 刘依群

出版发行 浙江大学出版社

(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310028)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 杭州中大图文设计有限公司

印 刷 德清县第二印刷厂

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 20.25

字 数 495 千

版 次 2009 年 5 月第 1 版 2009 年 5 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-06669-3

定 价 33.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部邮购电话(0571)88925591

前言

生物化学是一门实验性很强的学科,近年来发展相当迅速,其任何进展都是以实验为基础的。生化实验手段不仅推动了本学科的进展,而且被生物其他学科利用,促进了各学科的共同发展。生化实验技术的学习已经成为理解近代生命科学的重要基础之一。

近几年来,我国高等教育改革步伐加快。二十一世纪的教育是以开发人的创造力、想象力,培养创造能力、创新性人才的教育。根据新时代发展的需要,高等院校必须进行全面的教育改革,实现单一的验证理论向探索未知的转变;实现学科专业素质培养向综合素质教育的转变;实现侧重获取知识的教育向增强创造性教育的转变;实现学生被动接受知识向主动合作性学习知识的观念转变。近年来,随着生命科学的迅猛发展和教育改革的不断深入,实验教学改革也在不断深化,构建相关实验的课程项目体系、改革实验教学模式及建立科学的实验考评考核方式是应用型人才培养的必要措施。本指导书结合浙江万里学院《生物化学自主学习合作式理论教学、开放探究式实验教学方式》的教改项目,生物技术、生物工程专业实验教学体系,以及近十年的实践教学经验而编写,作为《生物化学》课程课改配套教材。

《生化实验技术与实施教程》是新的教学形势催生的产物,不同于传统的生化实验指导书,其主要特点是以鼓励和培养学生自己动手、开发创新的精神为主导,在编写实验项目和内容的同时,更体现教学方法的改革和创新。教材内容由生化实验技术学习要求及教学组织实施、生物化学实验技术与原理、实验和附录四部分组成,并全程体现实验教学方法的实施和运用。教程中所选实验项目融入了教师几十年的实验教学经验,收集了部分现代生化实验指导教材的精华,内容涵盖糖、脂、蛋白质、核酸和酶等领域,涉及层析技术、电泳技术、膜分离技术、分光光度法、大型精密仪器现代分析检测法等常用的分离鉴定、定性定量分析手段,是高校非生物化学专业学生自主学习的良好生物化学实验教材,特别有利于教师组织和实施实验、学生预习和复习实验,对生物化学实验和生物化学实验课程建设改革也有很大帮助。

实验部分着重介绍了 43 个实用性、综合性强的实验,分为基础实验、设计综合开放实验及应用设计实验三部分。基础实验部分采用问题式、全程参与式教学方法,着重对学生的基本生化技能进行训练,使学生了解生物体内基本物质成分的分离、分析和鉴定常用方法以及物质代谢的研究方法,并通过实验技术加深对理论知识的理解;设计综合开放实验选择几类生化重要物质为分离纯化与鉴定训练项目,教师针对每个实验项目提出实验目标和要求,每组学生根据实验总要求,自行确定实验材料,自主设计实验技术路线,再参考实验指导书中的相关步骤与方法进行实验,也可以查阅其他方法进行实验操作,从而进一步培养学生综合运用各种生化实验技术的能力、分析与设计能力、逻辑思维能力;应用设计实验将生化实

验技术与行业应用相对接,并与大型的现代分析检测仪器的使用相结合设计实验项目,要求学生针对不同的对象、参考指导书设计的案例式实验方法,运用不同的手段进行分析检测,做出比较和分析,训练学生的生化技术应用能力和解决问题能力。同时每部分实验项目为适应自主式学习需要,提供了一定的课后思考题及学习参考资料,便于学生开展实验讨论及实验设计参考。

在附录中,收集了生化实验室常用仪器性能指标及使用说明、缓冲溶液的配制、指示剂的配制、生化常用数据等,为从事综合性的生物化学实验的师生们提供方便。

本书特色:(1)明确生化实验技术教学基础—综合—应用渐进式实验教学技能体系;(2)提供了大量的参考资料,有利于学生开展自主设计实验;(3)实验研讨:学生之间互相分析讨论实验全过程;(4)规范操作技能,强化动手能力,开发学生思维;(5)教材中穿插了实践教学组织形式,便于教师实验教学的开展。

本教材主要针对地方本科院校、应用型人才培养目标而设计编写,也可供其他理工科高等院校的生命科学、生物技术、生物工程等专业及农林院校的农学、林学、植保、园艺、食品、理学等专业的学生及相关领域的科技人员使用。

本教材由钱国英、汪财生、尹尚军、斯越秀等老师参与,借鉴兄弟院校生化实验教材经验,编写了这本《生化实验技术与实施教程》,供我院开设的各专业选用。借此出版机会,在此表示由衷的感谢。

本书作为生物技术专业课程实验教材,我们力求使之具备实用性、可操作性,与后续专业课程如基因工程、酶工程等课程相结合。但是,由于主客观条件所限,限于我们的学识和水平,而且编写时间仓促,肯定有不少缺点和错误,敬请各位老师与同学提出宝贵意见,帮助我们不断改进教学,谢谢!

编者
2009年2月

目 录

生化实验技术学习要求及教学组织实施	1
-------------------	---

第一部分 生物化学实验技术与原理

第一章 离心分离技术	15
第二章 层析技术	21
第三章 电泳技术	49
第四章 膜分离技术	62
第五章 光学检测技术	67
第六章 生物大分子制备技术	71

第二部分 基础实验

实验项目

蛋白质

实验一 氨基酸的分离鉴定——纸层析法	89
实验二 蛋白质的性质实验——蛋白质及氨基酸的呈色反应	93
实验三 蛋白质的等电点测定和沉淀反应	96
实验四 血清蛋白质醋酸纤维薄膜电泳	100
实验五 茚三酮显色法测定氨基酸浓度	106
实验六 蛋白质浓度测定方法	108
实验七 蛋白质溶液脱盐——透析脱盐、凝胶层析法脱盐	122
实验八 凝胶层析法测定蛋白质相对分子质量	128
实验九 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的相对分子质量	133

糖类

实验十 3,5-二硝基水杨酸比色法测定糖的浓度	139
实验十一 费林试剂热滴定定糖法	143
实验十二 可溶性总糖的测定(蒽酮比色法)	145
实验十三 糖的分离鉴定——硅胶 G 薄层层析法	148

酶

实验十四 酶的基本性质	153
-------------	-----

实验十五	植物组织中过氧化氢酶的活力测定——高锰酸钾滴定法	160
实验十六	底物浓度对酶促反应速度的影响——米氏常数的测定	162
脂类		
实验十七	种子粗脂肪提取和定量测定——索氏提取法	165
实验十八	脂肪碘值的测定	167
核酸类		
实验十九	核酸碱基的分离——纸层析法	170
实验二十	核酸的紫外扫描及浓度测定	173
实验二十一	定磷法测定 RNA 浓度	175
实验二十二	二苯胺显色法测定 DNA 浓度	177
实验二十三	苔黑酚法测定 RNA 浓度	180
维生素		
实验二十四	维生素 C 的定量测定——2,6-二氯酚靛酚法	183
实验二十五	维生素 B ₁ 的定量测定——荧光法	187
实验二十六	核黄素的荧光法测定	190
代谢类		
实验二十七	肌糖元酵解作用	193
实验二十八	脂肪酸 β -氧化作用	196
实验二十九	发酵过程中无机磷的利用和检测	199
实验三十	氨基转换反应及其产物的鉴定	202

第三部分 设计综合开放实验

课前设疑	207
实验项目	
实验三十一	动物脾脏 DNA 提取与分离鉴定 207
实验三十二	免疫球蛋白的分离纯化 212
实验三十三	酯酶的分离、纯化与活性测定 217
实验三十四	细胞色素 C 的制备和测定 222
实验三十五	蔗糖酶的分离纯化及活力测定 228
实验三十六	亲和层析纯化胰蛋白酶 245

第四部分 设计应用实验

实验项目

实验三十七	血糖的定量测定(Hagedorn-Jendou 定糖法实验设计)	257
实验三十八	几种水果中有机酸的定量测定与分析(HPLC 法检测水果中有机酸浓度实验设计)	261
实验三十九	维生素 E 浓度测定方法与比较(HPLC 法检测食品中维生素 E 浓度实	

验设计)	272
实验四十 多糖分离及鉴定(天然产物多糖提取分离、纯化、鉴定实验设计).....	276
实验四十一 高级脂肪酸的浓度的测定与分析(脂肪浓度测定及高级脂肪酸组分气相 色谱法分析实验设计)	282
实验四十二 食品中微量元素的浓度测定与分析(食品中铜浓度原子吸收法的测定实 验设计)	292
实验四十三 正交法测定几种因素对酶活力的影响.....	296
附录.....	301
一、实验基本操作及要求	301
二、常用蛋白质相对分子质量标准参照物	306
三、常用缓冲溶液的配制方法	306
四、实验室中常用酸碱的比重和浓度	312
五、常见蛋白质相对分子质量参考值	312
六、常见蛋白质等电点参考值	314
参考文献.....	316

生化实验技术学习要求及教学组织实施

一、实验学习目标

《生化实验技术与实施教程》是以渐进式训练学生生物化学基础技能、学科研究综合设计技能、行业应用研究技能为目标的实验训练技能性教材。实验采用研讨合作、全程参与、开放滚动式实验教学模式。通过实验预习与自主实验设计的要求,在技能训练的同时提高学生的创新意识与创新能力;通过学生之间互相分析与讨论实验全过程的要求,在提高学生规范操作技能、强化动手能力的同时,培养学生分析研究问题的逻辑思维能力。

《生化实验技术与实施教程》根据教学大纲要求开设实验项目,通过设计的四十多个实验,以达到强化操作技能规范训练、技能综合应用训练和技能应用综合训练目的,并达到以下目标:

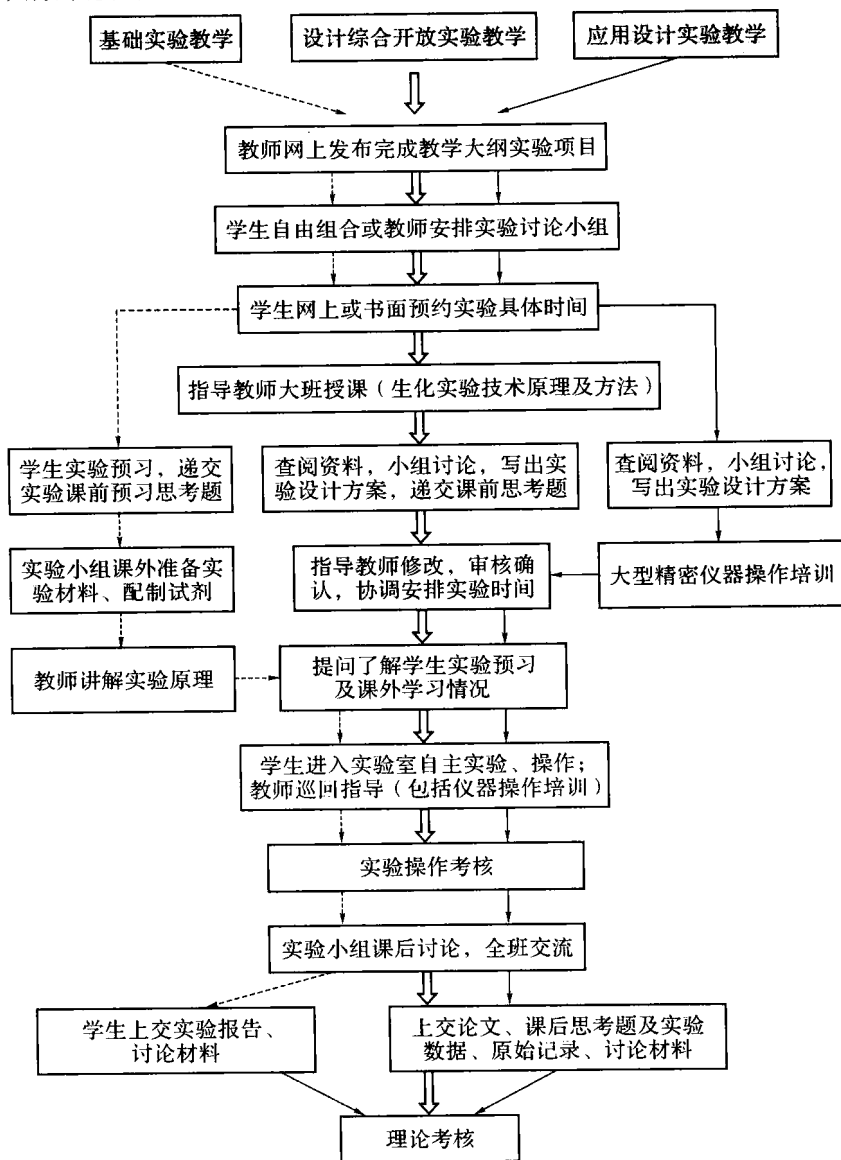
1. 巩固深化对生物化学基本理论的理解,训练并掌握蛋白质、核酸、糖、脂类等物质的相关技术实验的基本操作技能,为今后专业学习和科研工作打下实验技能基础。
2. 通过对生物样品制备、分离、分析、鉴定等设计综合实验学习,掌握生物样品提取分离及分析方法,包括生物大分子的提取制备、沉淀分离、层析分离、电泳等技术,培养学生综合实验设计、实践创新的能力,逐步提高观察问题、分析问题、解决问题的能力。
3. 通过对色谱、质谱、光谱、电化学等大型仪器使用方法的训练,具有根据实际需要选择适宜的研究方法与途径,逐步提高在生物科学、环境保护、食品分析等领域中的综合应用,解决行业实际问题的能力。

二、实验学习要求

1. 课前预习:明确实验目的、原理、方法及操作中的注意事项,并写出实验预习报告,完成预习思考题。设计综合及应用设计部分实验前,务必对生化实验技术原理与方法部分做好学习,完成课前设疑内容,明确实验目标,查阅资料,写好实验设计方案。
2. 实验过程:基础实验按照实验指导书所列步骤和要求实施实验操作,设计综合及应用设计实验项目,鼓励学生综合所学知识开拓创新,运用多种实验方法完成实验目标,也可根据指导书示例进行操作学习。
3. 实验结果与分析:真实记录实验数据,认真分析实验结果,得出结论;异常的结果要进行理论分析并找出原因。坚持实验的严肃性、严格性、严密性。
4. 讨论与报告:对实验结果进行分析研讨,写出实验报告或小论文,并汇报交流实验收获和知识拓展情况。
5. 注意事项:严格遵守大型精密仪器操作管理及实验室规则,防止各种事故发生。

三、实验教学组织实施流程

生化技术实验教程分为三部分:基础实验约 32 学时(必修 8 个实验项目),设计综合开放实验约 64 学时(必修 2 个实验项目),应用设计实验约 64 学时(必修 7 个实验项目)。生化实验室根据教学大纲要求开设几个实验项目,每个项目配套相应几套实验器材及仪器,保证每组学生一套;同一个实验室开设多个实验项目,学生在同一个时间内各自进行不同的实验,在一个学期内轮流完成大纲所规定的全部实验。实施流程如下:



四、实验考核评价方式

本教程是以实验实施的参与过程、技能提高、设计与研究能力、实验结果分析能力等为观察点,作为考核评价的主要依据。具体指标如下:

1. 实验研讨表现:以小组为单位对本实验进行小组研讨,形成研讨成果,并定期在全班大组中进行讨论汇报。讨论评价以小组为单位;
2. 实验预习及思考题完成情况:实验网站预习,思考题完成及每次抽查提问回答情况;
3. 实验设计的科学性:考核实验设计方案格式、可行性、创新性、参考文献资料等;
4. 实验报告:每次实验完成实验报告,重点考核实验讨论分析题;
5. 研究性实验小论文:每个设计综合实验项目书写一篇研究性小论文。评价实验论文格式、实验论文数据及图谱结果、实验讨论分析、引用文献、观点阐述、最新实验技术应用等;
6. 实验操作测评:每个实验确定知识点与技能点,明确测评内容和要求,考试时由学生抽取1个考题,当场操作完成,当场评定打分;
7. 实验原理理论测试:针对每个实验原理进行理论考试;
8. 平时操作与出勤等:实验前的准备、实验过程、实验后的清理、结果分析等给予相应的成绩。

生化实验技术课程成绩构成表

构 成	基础实验	设计综合	应用设计
实验研讨	20%	15%	20%
实验预习思考题	10%	5%	
实验设计		10%	10%
实验报告	10%		
实验操作测评	20%	15%	20%
实验原理理论测试	30%	15%	20%
平时表现与出勤	10%	10%	10%
实验小论文		30%	20%

五、实验研讨活动组织实施细则

(一)组织形式

1. 实验每组1~2人,4人组成一个实验研讨小组,实施同一个项目实验;以一个自然班为单位进行大组研讨交流。
2. 每项实验讨论小组由指导老师指定一名研讨小组组长。研讨小组组长的职责是:预约实验时间,召集小组准备实验材料,确定讨论时间和讨论地点;研讨活动中的具体任务分解与分配;主持每次活动的发言;收集每个实验小组所提交的书面材料,并给本小组的成员进行评价。
3. 每小组推荐一名发言人,负责收集整理自己小组的实验经过、操作体会、对实验结果的分析以及本实验的知识拓展情况等,并形成书面材料,代表本小组在课堂上发言。
4. 每小组推荐一名记录员,负责小组讨论时的记录工作;每份讨论记录中要包括时间、地点、主持人、参加人员、记录员、所讨论主题和各组的研讨材料。
5. 组员必须服从组长讨论课的任务安排,不得拒绝;准时参加所在研讨小组的研讨活动;协助组长做好发言报告;原则上小组组长、发言人和记录员要实行轮换制。

(二)研讨活动的基本要求

1. 讨论必选题:每个实验后都有“讨论分析题”作为限定的必选研讨题目。主题选择主要涉及实验内容中的一些重要原理、操作难点、对实验结果的分析探讨以及与相关专业领域

应用知识。

2. 讨论自选题:学生也可以自选研讨题目,范围应符合生化知识的基本范畴;也可从多角度、多学科交叉对实验原理、基本操作、实验结果等进行分析。

3. 讨论要求:小组成员应就所讨论实验问题、现象,从不同层面、不同角度展开全面深入的讨论。每位小组成员均应参与讨论,发表自己的意见;记录员做好讨论记录;发言人总结整理汇报材料;小组组长负责研讨过程组织和人员分工,并负责本组研讨资料的汇总、上交。

(三)实验研讨小组评价

1. 研讨主题和总结报告:从研讨主题所涉及相关资料及其他组员观点的归纳概括是否全面,分析是否详实,最终结论是否明确,论证是否充分,格式是否规范等方面进行考核,占实验研讨成绩的 30%。

2. 实验结果分析和汇报:从实验结果是否正确,实验分析是否有理有据,能否运用所学知识进行探讨,汇报是否具有条理性、流畅性、完整性等方面进行考核,占实验研讨成绩的 30%。

3. 资料清单:从资料数量、质量、格式规范等几个方面进行考核,占实验研讨成绩的 10%。

4. 研讨现场和记录评分:从语言是否清晰流畅,观点是否明确,分析是否合理,答问是否敏捷,多学科知识是否丰富,研讨气氛是否活跃激烈等几方面进行考核,占实验研讨成绩的 10%。

5. 书面材料汇编:从制作是否清晰,填写是否完整,汇编材料是否齐全,提交是否及时等几方面进行考核,占实验研讨成绩的 20%。

(四)研讨活动相关资料的收集、整理与上交(格式见附录)

在指导教师指导下,各分组就研讨主题开展资料收集、汇总工作;将所收集的资料按要求格式上交指导老师。每一组员应认真阅读并归纳总结所收集的资料。

1. 由组长负责在实验研讨活动结束后,将有关的书面资料与电子文稿按要求加以收集整理,并形成《实验研讨课书面材料汇编》,在规定时间内及时上交给指导老师。

2. 材料汇编包括:封面与目录、研讨总结报告、研讨参考资料清单、分组研讨记录表、实验研讨评分表、研讨小组整体评分表。

六、附录

1. 研讨材料格式

“生物化学基础实验”研讨活动书面材料汇编

班级：_____

组别：第____研讨小组

本次研讨实验：_____

具体研讨主题：1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

组 长：学号_____姓名_____

小组发言人：学号_____姓名_____

小组记录员：学号_____姓名_____

其 他 组 员：学号_____姓名_____

学号_____姓名_____

学号_____姓名_____

学号_____姓名_____

学号_____姓名_____

指导教师：_____

提交时间：_____

小组研讨总结报告(每组 1 份打印)

_____班 第____研讨小组

本次研讨实验：_____

该报告内容主要包括如下方面：

(1)已搜集资料中涉及本研讨主题的主要观点及相应分析理由；

(2)小组成员对上述观点的分析评价；

(3)小组成员对本研讨主题的主要观点和相应理由；

(4)小组对本研讨主题的最终结论及理由分析。

研讨主题 1：

研讨主题 2：

研讨主题 3：

研讨主题 4：

研讨主题 5：

参考资料清单格式(每组 1 份打印)

_____班 第_____研讨小组

本次研讨实验:_____

一、专著

格式:作者.书名[M].出版地:出版单位,出版年,起止页码.如:

[1]周振甫.周易译注[M].北京:中华书局,1991:12-18.

二、期刊

格式:作者.文题[J].刊名,年,卷(期):起止页码.如:

[2]何龄修.读顾城《南明史》[J].中国史研究,1998,(3):167-173

三、报纸

格式:作者.文题[N].报名,出版日期(版次).如:

[3]谢希德.创造学习的新思路[N].人民日报,1998-12-25(10).

四、论文集

格式:作者.引文文题.主编.论文集名[C].出版地:出版者,出版年,引文起止页码.如:

[4]钟文发.非线性规划在可燃毒物配置中的应用.赵玮.运筹学的理论与运用[C].西安:西安电子科技大学出版社,1996.468-471.

五、学位论文类

格式:作者名.题名[D].保存地点:保存单位,年份.如:

[5]朱爱华.城市社区建设中的物业管理研究[D].苏州:苏州大学,2003.

六、电子文献

格式:作者.电子文献题名[电子文献及载体类型标识].电子文献的出处或可获得地址,发表或更新日期/引用日期.如:

[6]王明亮.关于中国学术期刊标准化数据库工程的进展[EB/OL].<http://www.cajcd.edu.cn/pub/wml.txt/980810-2.html>,1998-08-16/1998-10-04.

分组学习研讨记录(每组 1 份,手写记录)

_____班 第_____研讨小组

研讨时间:_____年_____月_____日_____时至_____时

研讨地点:_____

主持人:_____ 参与人:_____

记录员:_____

本次研讨实验:_____

研讨主要内容记录**1. 主持人发言(说明研讨规则及程序)**

签名:_____

2. 发言人:_____ ;学号:_____

签名:_____

3. 发言人:_____ ;学号:_____

签名:_____

4. 发言人:_____ ;学号:_____

签名:_____

5. 发言人:_____ ;学号:_____

签名:_____

6. 发言人:_____ ;学号:_____

签名:_____

7. 发言人:_____ ;学号:_____

签名:_____

8. 发言人:_____ ;学号:_____

签名:_____

9. 发言人:_____ ;学号:_____

签名:_____

10. 发言人:_____ ;学号:_____

签名:_____

11. 发言人:_____ ;学号:_____

签名:_____

12. 发言人：_____；学号：_____

签名：_____

主持人总结：_____

签名：_____