



普通高等教育“十三五”规划教材

生物化学 实验

BIOCHEMICAL EXPERIMENT



张峰 刘倩 主编



中国轻工业出版社

全国百佳图书出版单位



普通高等教育“十三五”规划教材

生物化学实验

主编 张峰 刘倩

副主编 傅一鸣 于大力

 中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学实验/张峰, 刘倩主编. —北京: 中国轻工业出版社,
2018. 7

普通高等教育“十三五”规划教材

ISBN 978-7-5184-0976-1

I. ①生… II. ①张… ②刘… III. ①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 (2018) 第 086630 号

责任编辑: 张 靓 责任终审: 劳国强 封面设计: 锋尚设计
版式设计: 砚祥志远 责任校对: 吴大鹏 责任监印: 张 可

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

印 刷: 三河市国英印务有限公司

经 销: 各地新华书店

版 次: 2018 年 7 月第 1 版第 1 次印刷

开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 9

字 数: 200 千字

书 号: ISBN 978-7-5184-0976-1 定价: 32.00 元

邮购电话: 010-65241695

发行电话: 010-85119835 传真: 85113293

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请与我社邮购联系调换

160308J1X101ZBW

生物化学是生命科学的基础学科。实验教学在本课程的学习中占有重要地位。

目前市场上生物化学实验教材种类较多，但多集中在基础实验部分，而且实验操作流程和技术水平少有改进。本教材的特点从技能培养的角度出发，提高了教材的针对性和实用性。除验证性实验和综合性实验外，还加入设计性实验，提高学生的技术应用能力。另外，在实验操作编写中，根据编者的教学经验，对部分试剂配比和实验流程做出改善，更有利于提高学生实验的成功率。

本教材包括三部分内容：第一部分介绍生物化学实验原理和实验技术，如目前生物化学研究中常用的分析分离技术，包括层析分离技术、电泳技术、生物大分子的制备技术等；第二部分介绍生物化学基础实验，选编 35 个实验，涵盖了糖类、脂类、酶类、蛋白质等生物大分子的分离制备、分析检测及功能特性研究等方法与技术；第三部分介绍设计性实验，由浅入深地培养学生掌握更多的研究方法和技术。本教材不仅注重加强学生基本实验方法和技能的训练，还引进了新的生物化学实验技术，指导学生进行小课题的探讨和设计。实验单元中除实验操作内容，还增加了注意事项及思考题，对实验原理和技术进行进一步解析。附录部分包括生物化学实验室的安全与防护知识、常用试剂和溶液的配制以及常用数据列表等内容。

本教材中配有 15 个实验操作视频，读者可直接扫描书中二维码观看学习，也可登录食课堂（www.qingongchuban.com）获取更多教学资源。

本教材可供综合性大学、师范和农林院校生物相关专业的本科生作为实验课教材，也可供相关教师及科研人员参考。

本教材编写分工如下：第一部分及附录由齐鲁师范学院傅一鸣、于大力编写；第二部分由齐鲁师范学院束德峰、刘倩、傅一鸣、柴振光、于大力、张才波、邵洪

伟、侯琳共同编写；第三部分由齐鲁师范学院刘倩编写。张峰、刘倩、傅一鸣、于大力负责本书的校正，由张峰、刘倩负责统稿。

在本书编写过程中，参考了众多文献资料，并得到了同行的多方面支持。在此，向文献资料编写者、同行等所有提供帮助的单位和个人表示感谢。

由于编者水平所限，书中难免有不当之处，希望读者批评指正。

编 者

第一部分 实验原理和实验技术

一、光谱分析实验技术	3
二、生物大分子的分离技术	7
三、免疫技术	15
四、生物大分子制备技术	17

第二部分 基础生物化学实验

实验一 糖的呈色反应和定性鉴定*	25
实验二 还原糖和总糖的测定——3,5-二硝基水杨酸比色法*	27
实验三 总糖的测定——蒽酮比色法	31
实验四 种子粗脂肪提取和定量测定——索氏提取法	33
实验五 碘值的测定	37
实验六 卵磷脂的提取和鉴定*	40
实验七 血清胆固醇的定量测定(磷钼铁法)	42
实验八 蛋白质与氨基酸的呈色反应*	44
实验九 蛋白质的沉淀及变性*	47
实验十 纸层析法分离氨基酸*	49
实验十一 氨基酸总量的测定(甲醛法)	50
实验十二 茚三酮显色法测定氨基酸浓度	53
实验十三 醋酸纤维薄膜电泳分离血清蛋白*	55
实验十四 蛋白质的定量测定(一)——考马斯亮蓝染色法*	57
实验十五 蛋白质的定量测定(二)——微量凯氏定氮法	58
实验十六 蛋白质的定量测定(三)——Folin-酚法	63

实验十七	牛乳中酪蛋白的制备	66
实验十八	IgG 葡聚糖凝胶过滤脱盐实验*	68
实验十九	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的相对分子质量*	71
实验二十	核酸的含量测定(一)——紫外吸收法	76
实验二十一	核酸的定量测定(二)——定磷法	78
实验二十二	核酸的定量测定(三)——定糖法(地衣酚法)	81
实验二十三	酵母 RNA 的分离及组分鉴定*	83
实验二十四	质粒 DNA 的提取和琼脂糖凝胶电泳*	85
实验二十五	酶的特性——底物专一性*	89
实验二十六	酶活力的影响因素*	91
实验二十七	底物浓度对酶促反应速度的影响——米氏常数的测定	95
实验二十八	枯草杆菌蛋白酶活力测定	97
实验二十九	大蒜细胞 SOD 的提取与分离	100
实验三十	还原性维生素 C 的定量测定*	102
实验三十一	发酵过程中无机磷的应用	104
实验三十二	糖酵解中间产物的鉴定	107
实验三十三	肌糖原的酵解作用	109
实验三十四	脂肪酸的 β -氧化	112
实验三十五	血液中转氨酶活力的测定	115

第三部分 设计性实验

实验一	果蔬中有机酸的定量测定与分析	121
实验二	真菌多糖的提取纯化与药用研究	121
实验三	血清中免疫球蛋白的分离纯化与鉴定	122
实验四	动物组织核酸的分离与鉴定	123
实验五	蔗糖酶的分离纯化及活力测定	124
附录一	实验室规则	125
附录二	实验室常用标准缓冲液的配制	127
附录三	常见蛋白质相对分子质量参考值	134
参考文献		136

注：* 表示该实验配有操作视频，可扫描书中二维码观看。

Part 1

第一部分

实验原理和实验技术

一、光谱分析实验技术

(一) 分光光度计法

分光光度计法 (spectrophotometry) 是利用物质所特有的吸收光谱来鉴别物质或测定其含量的一种方法。在分光光度计中, 将不同波长的光连续地照射一定浓度的样品溶液, 并测定物质对各种波长光的吸收程度 (吸光度 A 或光密度 D) 或透射程度 (透光度 T), 以波长 λ 为横坐标, A 或 T 为纵坐标, 画出连续的“ $A-\lambda$ ”或“ $T-\lambda$ ”曲线, 即为该物质的吸收光谱曲线, 见图 1-1。

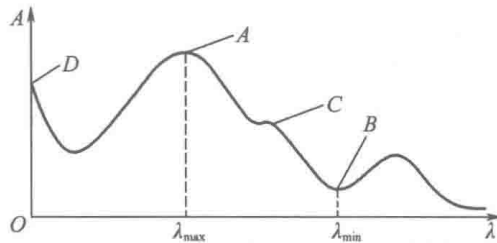


图 1-1 吸收光谱曲线示意图

由图 1-1 可以看出吸收光谱的特征:

(1) 曲线上 A 处称为最大吸收峰, 它所对应的波长称为最大吸收波长, 用 λ_{\max} 表示。

(2) 曲线上 B 处有一谷, 称为最小吸收, 所对应的波长称为最小吸收波长, 用 λ_{\min} 表示。

(3) 曲线上在最大吸收峰旁边有一小峰 C , 称为肩峰。

(4) 在吸收曲线的波长最短的一端, 曲线上 D 处, 吸收相当强, 但不成峰形, 此处称为末端吸收。

λ_{\max} 是化合物中电子能级跃迁时吸收的特征波长, 不同物质有不同的最大吸收峰, 所以它对鉴定化合物极为重要。吸收光谱中, λ_{\max} 、 λ_{\min} 、肩峰以及整个吸收光谱的形状取决于物质的性质, 其特征随物质的结构而异, 所以是物质定性的依据。

在分光比色分析中, 有色物质溶液颜色的深度取决于入射光的强度、有色

物质溶液的浓度和溶液的厚度。当一束单色光透过有色物质溶液时，溶液的浓度越大，透过液层的厚度越大，则光线的吸收越多。朗伯 - 比尔 (Lambert - Beer) 定律是利用分光光度计进行比色分析的基本原理。一束单色光照射于一吸收介质表面，在通过一定厚度的介质后，由于介质吸收了一部分光能，透射光的强度就要减弱。吸收介质的浓度越大，介质的厚度越大，则光强度的减弱越显著，其关系式为：

$$A = \lg \frac{I_0}{I_t} = \lg \frac{1}{T} = Klc$$

式中 A ——吸光度；

I_0 ——入射光的强度；

I_t ——透射光的强度；

T ——透射比，或称透光度；

K ——系数，可以是吸收系数或摩尔吸收系数；

l ——吸收介质的厚度，cm；

c ——吸光物质的浓度，g/L 或 mol/L。

朗伯 - 比尔定律的物理意义是，当一束平行单色光垂直通过某一均匀非散射的吸光物质时，其吸光度 A 与吸光物质的浓度 c 及吸收层厚度 l 成正比。

当介质中含有多种吸光组分时，只要各组分间不存在相互作用，则在某一波长下介质的总吸光度是各组分在该波长下吸光度的加和，这一规律称为吸光度的加和性。

系数 K ：当介质厚度 l 以 cm 为单位，吸光物质浓度 c 以 g/L 为单位时， K 用 a 表示，称为吸收系数，其单位为 $L/(g \cdot cm)$ 。这时朗伯 - 比尔定律表示为 $A = alc$ 。当介质厚度 l 以 cm 为单位，吸光物质浓度 c 以 mol/L 为单位时， K 用 k 表示，称为摩尔吸收系数，其单位为 $L/(mol \cdot cm)$ 。这时朗伯 - 比尔定律表示为 $A = klc$ 。两种吸收系数之间的关系为： $k = aM_m$ 。

若遵循朗伯 - 比尔定律，且 l 为一常数，光吸收对浓度绘图，得一通过原点的直线。根据朗伯 - 比尔定律，做出标准物质吸收对浓度的标准曲线，借助于这样的标准曲线，很容易根据测定其光吸收得知一未知溶液的浓度。

分光光谱技术可用于：

(1) 通过测定某种物质吸收或发射光谱来确定该物质的组成。

(2) 通过测定不同波长下的吸收来测定物质的相对纯度（在 DNA 的浓度测定中最为常用，测定 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ，纯净 DNA 样品的此值为 1.8。样品中若混有蛋白， $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 将变小。）

(3) 通过测量适当波长的信号强度确定某种单独存在或与其他物质混合存在的一种物质的含量。

(4) 通过测量某一种底物消失或产物出现的量同时间的关系，追踪反应过程。

(5) 通过测定微生物培养体系中 D 值，可以得到体系中微生物的密度，从而可以对培养体系中微生物的数量进行动态的监测。

(二) 荧光分光分析法

当紫外光照射某一物质时，该物质会在极短的时间内，发射出比照射波长要长的光。而当紫外光停止照射时，这种光也随之很快消失，这种光称为荧光。荧光是一种光致发光现象。物质所吸收光的波长和发射的荧光波长与物质分子结构有密切关系。同一种分子结构的物质，用同一波长的激发光照射，可发射相同波长的荧光，但其所发射的荧光强度随着该物质浓度的增大而增强。利用这些性质对物质进行定性和定量分析的方法，称为荧光光谱分析法，也称为荧光分光光度法。与分光光度法相比较，这种方法具有较高的选择性及灵敏度，试样量少，操作简单，且能提供比较多的物理参数，现已成为生化分析和研究的常用手段。

1. 荧光分析测定方法

荧光分析有定性和定量两种，一般定性分析采用直接比较法，就是将被测样品和已知标准样品在同样条件下，根据它们所发出的荧光的性质、颜色、强度等来鉴定它们属于同一种荧光物质。荧光物质特性的光谱包括激发光谱和荧光光谱两种。在分光光度法中，被测物质只有一种特征的吸收光谱，而荧光分析法能测出两种特征光谱，因此，鉴定物质的可靠性较强。

荧光分析法的定量测定方法较多，可分为直接测定法和间接测定法两类。

(1) 直接测定法 该法是利用荧光分析法对被分析物质进行浓度测定最简单的方法。某些物质只要本身能发荧光，将这类物质的样品做适当的前处理或分离除去干扰物质，即可通过测量它的荧光强度来测定其浓度。具体方法有

两种：

①直接比较法：配制标准溶液的荧光强度 F_1 ，已知标准溶液的浓度 c_1 ，便可求得样品中待测荧光物质的含量；

②标准曲线法：将已知含量的标准品经过和样品同样处理后，配成一系列标准溶液，测定其荧光强度，以荧光强度对荧光物质含量绘制标准曲线，再测定样品溶液的荧光强度，由标准曲线便可求出样品中待测荧光物质的含量。

为了使各次所绘制的标准曲线能重合一致，每次应以同一标准溶液对仪器进行校正。如果该溶液在紫外光照射下不够稳定，则必须改用另一种稳定而荧光峰相近的标准溶液来进行校正。例如，测定维生素 B_1 时，可用硫酸喹啉溶液作为基准来校正仪器；测定维生素 B_2 时，可用荧光素钠溶液作为基准来校正仪器。

(2) 间接测定法 有许多物质，它们本身不能发荧光，或者荧光量子产率很低仅能显现非常微弱助荧光，无法直接测定。这时可采用间接测定方法。间接测定方法有以下几种：

①化学转化法：通过化学反应将非荧光物质转变为适合于测定的荧光物质。例如金属离子与螯合剂反应生成具有荧光的螯合物。有机化合物可通过光化学反应、降解、氧化还原、偶联、缩合或酶促反应，使它们转化为荧光物质。

②荧光淬灭法：这种方法是利用本身不发荧光的被分析物质所具有使某种荧光化合物的荧光淬灭的能力，通过测量荧光化合物荧光强度的下降，间接地测定该物质的浓度。

③敏化发光法：对于很低浓度的分析物质，如果采用一般的荧光测定方法，其荧光信号太微弱而无法检测。在此种情况下，可使用一种物质（敏化剂）以吸收激发光，然后将激发光能传递给发荧光的分析物质，从而提高被分析物质测定的灵敏度。

以上三种方法均为相对测定方法，在实验时须采用某种标准进行比较。

2. 影响荧光强度的因素

(1) 溶剂 溶剂能影响荧光效率，改变荧光强度。因此，在测定时必须用同一溶剂。

(2) 浓度 在较浓的溶液中，荧光强度并不随溶液浓度呈正比增长。因此，必须找出与荧光强度呈线性的浓度范围。

(3) pH 荧光物质在溶液中绝大多数以离子状态存在，而发射荧光最有利的条件就是它们的离子状态。因为在这种情况下，由于离子间的斥力，最大限度地避免了分子之间的相互作用，每一种荧光物质都有它的最适发射荧光的离子状态，也就是最适 pH。因此，须通过条件试验，确定最适宜的 pH 范围。

(4) 温度 荧光强度一般随温度降低而提高，这主要是由于分子内部能量转化的缘故。因为温度升高分子的振动加强，通过分子间的碰撞将吸收的能量转移给了其他分子，干扰了激发态的维持，从而使荧光强度下降，甚至熄灭。因此，有些荧光仪的液槽配有低温装置，使荧光强度增大，以提高测定的灵敏度。在高级的荧光仪中，液槽四周有冷凝水并附有恒温装置，以便使溶液的温度在测定过程中尽可能保持恒定。

(5) 时间 有些荧光化合物需要一定时间才能形成，有些荧光物质在激发光较长时间照射下会发生光分解。因此，过早或过晚测定荧光强度均会带来误差。必须通过条件试验确定最适宜的测定时间，使荧光强度达到最大且稳定。为避免光分解所引起的误差，应在荧光测定的短时间内才打开光闸，其余时间均应关闭。

(6) 共存干扰物质 有些干扰物质能与荧光分子作用使荧光强度显著下降，这种现象称为荧光的淬灭；有些共存物质能产生荧光或产生散射光，也会影响荧光的正确测量。故应设法除去干扰物，并使用纯度较高的溶剂和试剂。

二、生物大分子的分离技术

(一) 离心技术

离心技术就是利用旋转运动的离心力，以及物质的沉降系数或浮力密度的差别进行分离、浓缩和提纯的一项操作技术。

1. 原理

当悬浮液静止不动时，由于重力的作用，较大的悬浮颗粒会逐渐沉降，颗粒越重下沉越快，反之会上浮。颗粒在重力场下移动的速度与颗粒的大小、形态、密度、重力场的强度及液体的黏度有关。如红细胞颗粒，直径为数微米，可以在通常重力作用下观察到它们的沉降过程。此外，颗粒在介质中沉降时还

伴随有扩散现象。对小于几微米的颗粒如病毒或蛋白质等，它们在溶液中呈胶体或半胶体状态，仅仅利用重力是不可能观察到沉降过程的，因为颗粒越小沉降越慢，而扩散现象则越严重。这样可以利用旋转产生的离心力代替重力，使之产生沉降。

2. 离心力和相对离心力

离心作用是根据在一定角度速度下作圆周运动的任何物体都受到一个向外的离心力进行的。离心力 (F_c) 的大小等于离心加速度 $\omega^2 x$ 与颗粒质量 m 的乘积，即：

$$F_c = m\omega^2 x$$

式中 ω ——旋转角速度，rad/s；

x ——颗粒离开旋转中心的距离，cm；

m ——质量，g。

很显然，离心力随着转速和颗粒质量的提高而加大，而随着离心半径的减小而降低。

目前离心力通常以相对离心力 (relative centrifugal force, RCF) 表示，即离心力 F_c 的大小相对于地球引力 (G) 的多少倍，单位为 g，其计算公式如下：

$$RCF = \frac{F_c}{G} = \frac{m\omega^2 x}{mg} = \frac{\omega^2 x}{g} = \frac{(2\pi n/60)^2}{980} \cdot x = 1.18 \times 10^{-5} n^2 x$$

式中 x ——离心转子的半径距离，cm；

g ——地球重力加速度 (980cm/s^2)；

n ——转子每分钟的转数，r/min。

在说明离心条件时，低速离心通常以转子每分钟的转数表示 (r/min)，如 4000r/min；而在高速离心时，特别是在超速离心时，往往用相对离心力来表示，如 65000r/min。

3. 沉降速度与沉降系数

沉降速度 (sedimentation velocity, v) 是指在离心力作用下，单位时间内颗粒沉降的距离：

$$v = \frac{dX}{dt} = \frac{2r^2(\rho_p - \rho_m)}{9\eta} \omega^2 x = \frac{d^2(\rho_p - \rho_m)}{18\eta} \omega^2 x$$

式中 r ——球形粒子半径；

d ——球形粒子直径；

η ——流体介质的黏度；

ρ_p ——粒子的密度；

ρ_m ——介质的密度。

从上式可知，粒子的沉降速度与粒子直径的平方、粒子的密度和介质密度之差成正比；离心力增大，粒子的沉降速度也增加。

沉降系数 (sedimentation coefficient, S) 是指在单位离心力的作用下，待分离颗粒的沉降速度

$$S = \frac{dX/dt}{\omega^2 x} = \frac{d^2(\rho_p - \rho_m)}{18\eta}$$

S 的单位为 s ，在实际应用时常在 $10^{-13}s$ 左右，为了纪念离心技术早期的奠基人 Svedberg，而把 $10^{-13}s$ 称为一个 Svedberg 单位 (S)，即 $1S = 10^{-13}s$ 。近年来，在生物化学、分子生物学及生物工程等书刊文献中，对于某些大分子化合物，当它们的详细结构和相对分子质量不很清楚时，常常用沉降系数这个概念去描述它们的大小。如核糖体 RNA (rRNA) 有 30S 亚基和 50S 亚基，这里的 S 就是沉降系数，现在更多地用于生物大分子的分类，特别是核酸。

4. 离心方法

根据离心原理，可设计多种离心方法，常见下列三大类型：

(1) 沉淀离心 沉淀离心技术是目前应用最广的一种离心方法。一般是指选用一种离心速度，使悬浮溶液中的悬浮颗粒在离心力的作用下完全沉淀下来，这种离心方式称为沉淀离心。离心时可根据颗粒大小来确定沉降所需要的离心力。主要适宜于细菌等微生物、细胞和细胞器等生物材料，及病毒和染色体 DNA 等的离心分离。

(2) 差速离心法 利用不同的粒子在离心力场中沉降的差别，在同一离心条件下，沉降速度不同，通过不断增加相对离心力，使一个非均匀混合液内的大小、形状不同的粒子分部沉淀。操作过程中一般是在离心后倾倒，把上清液与沉淀分开，然后将上清液加高转速离心，分离出第二部分沉淀，如此往复加高转速，逐级分离出所需要的物质。差速离心的分辨率不高，沉降系数在同一个数量级内的各种粒子不容易分开，常用于其他分离手段之前的粗制品提取。

(3) 密度梯度离心法 密度梯度离心技术是指离心前在离心管内先装入分

离介质，形成连续的或不连续的密度梯度介质，然后加入样品进行离心，根据操作方法的不同，密度梯度离心法又可分为速率区带离心和等密度梯度离心。

（二）层析技术

层析法又称色谱法或色层法，开始由分离植物色素而得名，后来不仅用于分离有色物质，而且在多数情况下用于分离无色物质。层析法是近代生物化学最常用的分析方法之一，此种方法可以分离和鉴定性质极为相似，而且用一般化学方法难以分离的多种化合物，如氨基酸、蛋白质、糖、脂类、核苷酸、核酸等。

1. 原理

层析法是利用混合物各组分的物理化学性质（溶解度、吸附能力、电荷、分子大小与形状及分子亲和力等）的差别建立起来的技术。所有的层析系统都由两个相组成：一是固定相，它是固体物质或者是固定于固体物质上的成分；另一是流动相，即可以流动的物质，如水和各种溶媒。当待分离的混合物随流动相通过固定相时，不断进行着交换、分配、吸附、解吸等过程，由于各组分的理化性质存在差异，与两相发生相互作用的能力不同，所受固定相的阻滞作用和受流动相推动作用的影响各不相同，从而使各组分以不同速度移动而达到彼此分离的目的。

2. 分类

层析根据不同的标准可分为多种类型，按原理不同可分为吸附层析、分配层析、离子交换层析、凝胶层析和亲和层析等；按照装置形式不同，可分为纸层析、薄层层析和柱层析等；按照流动相状态不同，可分为气相层析和液相层析等。现将几种层析技术简介如下。

（1）分配层析 分配层析是利用混合物中各组分在两相中分配系数不同而使之分离的层析技术，相当于一种连续性的溶剂抽提方法。分配系数是指某物质在两相溶液中溶解达平衡时的浓度比。如以一些吸附力小、反应性弱的惰性支持物（如淀粉、纤维素粉、滤纸等）上结合的水作为固定相，加入不与水混合或仅部分混合的溶剂作为流动相，由于混合物各组分在两相中发生不同的分配而逐渐分开，形成层析谱。固定相除水外，也可用稀硫酸、甲醇、仲酰胺等强极性溶液，流动相则采用比固定相极性小或非极性的有机溶剂。