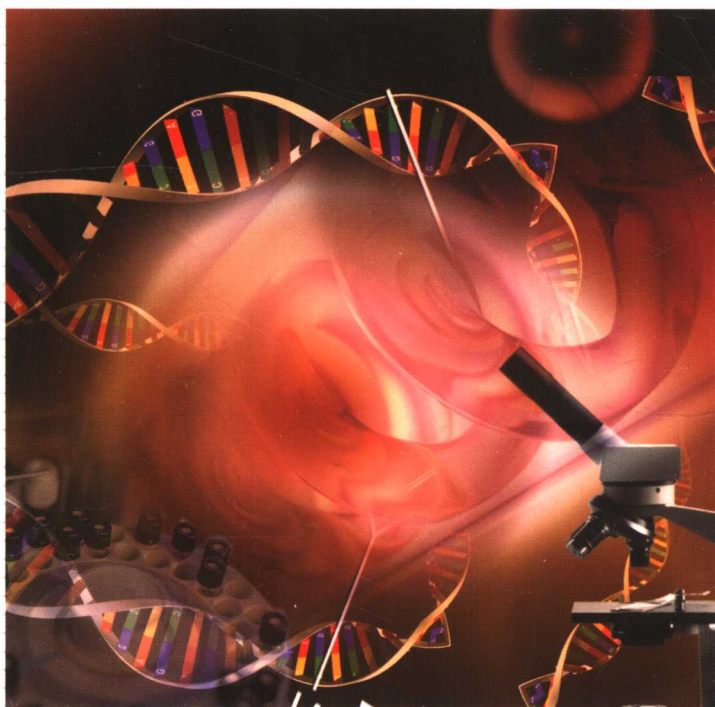


普通高等教育“十一五”规划教材

生物工程 生物技术系列

生物化学实验

胡琼英 狄 洌 主 编
聂 理 张益民 副主编



化学工业出版社

普通高等教育“十一五”规划教材

生物化学实验

胡琼英 狄 浏 主 编
聂 理 张益民 副主编



化学工业出版社

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学实验/胡琼英, 狄洊主编. —北京: 化学工业出版社, 2007.7
普通高等教育“十一五”规划教材
ISBN 978-7-122-00516-8

I. 生… II. ①胡…②狄… 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 (2007) 第 075514 号

责任编辑: 赵玉清

文字编辑: 张春娥

责任校对: 顾淑云

装帧设计: 郑小红

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装: 北京市彩桥印刷有限责任公司

720mm×1000mm 1/16 印张 9 字数 180 千字 2007 年 7 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 15.00 元

版权所有 违者必究

编写人员

主 编 胡琼英 狄 洌

副主编 聂 理 张益民

编 者 (按姓氏笔画排序)

卢亚萍 芮 琪 李少琼 杨志敏

狄 洌 汪 瑾 沈文飏 张益民

林国庆 胡琼英 聂 理

制 图 狄 洌 张益民 刘琳莉

主 审 杨志敏 徐朗莱

前 言

生物化学实验技术不仅是生物化学的重要内容和理论基础，也是生物科学研究的重要方法和手段。学生通过生物化学实验，不仅可以进一步巩固生物化学的基本理论，了解实验原理，还能熟悉生物化学实验的基本方法和技术以及许多大型精密仪器的使用，从而为以后的专业课学习以及生产、科研工作打下良好基础。

《生物化学实验》供理工科高等院校的生命科学、生物技术、生物工程及农林院校的农学、林学、植保、资环、园艺、食品、理学等各专业的本科生使用，要求学生学会蛋白类、糖类、脂类、核酸、氨基酸、酶和维生素的分离提取、定量测定或定性鉴定等方法；掌握电泳、层析、离心和光谱法检测等技术；培养学生综合性、设计性实验创新能力。

本书在南京农业大学生命科学院编写的《生物化学实验指导》讲义基础上，又吸取了该校多年的教学、科研、开发工作中的经验和广大学生的建议，对原教材内容进行了必要的修改，重新编写了这本《生物化学实验》教材，并补充了许多新的实验内容，便于学生自学。我们还增设了“自行设计实验”、“综合性选做实验”和“综合性开放实验”，鼓励和培养学生自己动手、开发创新的精神。在附录中，我们还整理和翻译了有关“常用仪器性能指标及使用说明”、“缓冲溶液的配制”、“植物样品的采集、处理及保存”等内容，为从事综合性生物化学实验的师生们提供方便。

本教材多年来得到了苏业瑜、叶茂炳、周培根、徐朗莱、戚晓玉各位教授和欧瑜等老师以及生命科学院领导、实验教学中心领导的大力支持和帮助；还有生物基地 51 班的张亮、齐继艳、陈舟舟和王潇同学的积极参与，谨此深表谢意！鉴于作者水平有限，欢迎广大师生提出宝贵意见。

编者

2007 年 3 月

目 录

实验室规则	1
实验记录及实验报告	2
基础实验	4
实验一 分光光度计线性分辨范围测定	4
实验二 缓冲液配制和 pH 值测定	5
实验三 荧光光度法测定核黄素的含量	7
综合性必做实验	10
实验四 3,5-二硝基水杨酸比色法测定糖的含量	10
实验五 RNA 的提取与核酸的颜色反应	13
实验六 影响淀粉酶活性的一些因素	16
实验七 硫酸铵沉降法纯化蛋白质	19
实验八 葡聚糖凝胶层析脱盐	21
实验九 淀粉酶活力的测定	24
实验十 Folin-酚比色法测定蛋白质含量	26
实验十一 茆三酮比色法测定赖氨酸含量	29
实验十二 考马斯亮蓝 G-250 比色法测定蛋白质含量	30
实验十三 2,6-二氯酚靛酚滴定法测定 L-抗坏血酸的含量	32
实验十四 间隔法测定过氧化物酶的活力	34
实验十五 连续记录法测定过氧化氢酶的活力	36
实验十六 纸电泳分离鉴定三种腺苷酸	38
综合性选做实验	40
实验十七 斐林-碘量滴定法测定糖的含量	40
实验十八 血糖的定量测定 (Folin-Malmros 法)	43
实验十九 残余法测定粗脂肪的含量	44
实验二十 对二甲氨基苯甲醛比色法测定色氨酸含量	46
实验二十一 凯氏定氮法测定蛋白质含量	48
实验二十二 DNA 与 RNA 的提取分离及颜色反应	51
实验二十三 紫外吸收法测定核酸的含量	53
实验二十四 钼酸铵比色法测定 L-抗坏血酸的含量	55
实验二十五 硫酸铵分级沉淀及透析脱盐纯化过氧化氢酶	57
实验二十六 紫外分光光度法测定蛋白酶活力	59
实验二十七 鸡卵类黏蛋白的制备	61

实验二十八	质粒的提取和电泳检测	63
实验二十九	几丁质酶提取与 Western 杂交	66
实验三十	脂肪酶的活力测定	68
实验三十一	离子交换柱层析分离氨基酸	71
实验三十二	吸附柱层析分离 β -胡萝卜素	75
实验三十三	纸层析研究植物体内的转氨基作用	78
实验三十四	硅胶 G 薄层层析分离可溶性糖	81
实验三十五	连续的聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳	82
实验三十六	不连续聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳	86
实验三十七	血清总胆固醇的测定	89
实验三十八	维生素 A 的提取及含量测定	91
实验三十九	从牛奶中分离制备酪蛋白	92
实验四十	工业淀粉酶的纯化与分析 (自行设计实验)	94
综合性开放实验		95
参考实验项目		95
附录		97
附录一	植物样品的采取、处理与保存	97
附录二	常用缓冲溶液的配制	99
附录三	硫酸铵溶液饱和度计算表 (0℃)	105
附录四	色谱显色剂	105
附录五	常用凝胶及层析过滤的规格和性能	110
附录六	玻璃仪器的洗涤及一些常用洗涤剂	112
附录七	移液器的使用	113
附录八	分光光度计	114
附录九	离心机	122
附录十	电泳设备	127
附录十一	pH 计	131
附录十二	电子天平	132
附录十三	实验室安全及防护知识	133

实验室规则

1. 每位同学应该自觉地遵守课堂纪律，维护课堂秩序，不迟到，不早退，保持室内安静，不大声谈笑。

2. 在实验过程中要听从教师的指导，严肃认真地按操作规程进行实验，并简要、准确地将实验结果和数据记录在实验记录本上，并交给指导教师审阅。课后写出实验报告，由科代表收交给指导教师。

3. 环境和仪器的清洁整齐是做好实验的重要条件。实验台面、试剂药品架上必须保持整洁，仪器药品要井然有序，公用试剂用完后应立即盖严，放回原处，勿使试剂药品洒在实验台面和地上。实验完毕，需将药品试剂排列整齐，仪器要洗净倒置放好，将实验台面抹拭干净。完成实验后，经指导教师检查验收后方可离开实验室。

4. 使用药品、试剂和各种物品必须注意节约，不要使用过量的药品和试剂。应特别注意保持药品和试剂的纯净，严防混杂，不要将滤纸和称量纸做其他用途。使用和洗涤玻璃仪器时，应小心仔细，防止损坏仪器。使用贵重精密仪器时，应严格遵守操作规程，发生故障立即报告指导教师，不要自己动手检修。要爱护国家财产，厉行节约。

5. 注意安全。实验室内严禁吸烟！煤气灯应随用随关，必须严格做到：火着人在，人走火灭。乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热，并要远离火源操作和放置，实验完毕，应立即关好煤气阀门和水龙头、拉下电闸，各种玻璃器皿放置稳妥，离开实验室以前应认真负责地进行检查，严防产生安全事故。

6. 废弃液体（强酸、强碱、溶液必须先用水稀释）可倒入水槽内，同时放水冲走；废纸、火柴头及其他固体废物和带有渣滓沉淀的废物都应倒入废品缸内，不能倒入水槽或随处乱扔。

7. 仪器损坏时，应如实向指导教师报告，认真填写损坏仪器登记表，然后补领。

8. 实验室内一切物品，未经本室负责指导教师批准严禁携出室外，借物必须办理登记手续。

9. 每次实验课由班长安排同学轮流值日，值日生要负责当天实验室的卫生、安全和一些服务性的工作。

10. 对实验的内容和安排不合理的地方可提出改进意见，对实验中出现的一些反常现象应进行讨论，并大胆提出自己的看法，做到生动、活泼、主动地学习。

实验记录及实验报告

一、实验记录

实验课前应认真预习，将实验名称、目的和要求、原理、实验内容、操作方法和步骤等简单扼要地写在记录本中。实验记录本应标上页数，不要撕去任何一页，更不要擦抹及涂改，写错时可以准确地划去重写，记录必须使用钢笔或圆珠笔。

实验中观察到的现象、结果和数据，应该及时地直接记在记录本上，绝对不可以用单片纸做记录或作草稿。原始记录必须准确、简练、详尽、清楚。从实验课开始就应该养成这种良好的习惯。

记录时，应做到正确记录结果，切忌夹杂主观因素，这是十分重要的。在实验条件下观察到的现象，应如实仔细记录下来，在定量实验中观测的数据，如称量物的质量、滴定管的读数、光电比色计或分光光度计的读数等，都应设计一定的表格准确记下正确的读数，并根据仪器的精确度准确记录有效数字。例如，光密度值为0.050，不应写成0.05，每一个结果最少要重复观测两次以上，当符合实验要求并确知仪器工作正常后再写在记录本上。实验记录上的每一个数字，都是反映每一次的测量结果，所以，重复观测时，即使数据完全相同也应如实记录下来，数据的计算也应该写在记录本的另一页上，一般写在正式记录左边的一页。总之，实验的每个结果都应正确无遗漏地做好记录。

实验中使用仪器的类型、编号以及试剂的规格、化学式、分子量、浓度等，都应记录清楚，以便总结实验时进行核对，并作为查找成败原因的参考数据。

如果发现记录的结果有遗漏、丢失或对此有怀疑等，都必须重做实验。将不可靠的结果当作正确的记录，在实际工作中可能造成难以估计的损失，更主要的是这不是实事求是的态度。因此，在学习期间就应养成一丝不苟、严谨求实的科学作风。

二、实验报告

实验结束后，应及时整理和总结实验结果，写出实验报告。按照实验内容可分为定性实验和定量实验两大类，下面分别列举两大类实验报告的格式，仅供参考。

1. 关于定性实验报告

实验编号及实验名称

- (1) 目的
- (2) 原理
- (3) 实验材料及设备
- (4) 试剂配制
- (5) 操作方法

(6) 结果分析

(7) 讨论

一般每次实验课只做一个定性实验。实验报告中的实验目的要写出针对这次实验课的内容而达到的实验目的和要求。在写实验报告时,可以按照实验内容分别写出原理、操作方法、结果与讨论等。原理部分简述基本原理。操作方法(或步骤)可以采用工艺流程图的方式或自行设计表格来表示。某些实验的操作方法可以和结果与讨论部分合并。结果与讨论应包括观察到的现象和实验结果,对实验中遇到的问题和提出的思考题进行探讨,并对实验过程或方法提出改进意见等。

2. 关于定量实验报告

实验编号及实验名称

(1) 目的

(2) 原理

(3) 实验材料及设备

(4) 试剂配制

(5) 操作方法

(6) 结果计算

(7) 讨论

通常每次实验课只做一个定量实验。在实验报告中,目的和要求、原理以及操作方法部分应简单扼要地叙述,但是对于实验条件(试剂配制及仪器)和操作的关键环节必须写清楚。对于实验结果部分,应根据实验课的要求将一定实验条件下获得的实验结果和数据进行整理、归纳、分析和对比,并尽量总结成各种图表,如原始数据及其处理的表格、标准曲线以及比较实验组与对照组实验结果的图表等。另外,还应针对实验进行必要的说明和分析。讨论部分可以包括:实验方法或操作技术等有关问题,实验结果是否异常,思考题的探讨,对实验设计的认识、体会和建议以及对实验课的改进意见等。

基础实验

实验一 分光光度计线性分辨范围测定

一、目的

1. 学习分光光度计的工作原理，掌握比色测定的基本操作方法。
2. 掌握标准曲线的制作及最佳浓度范围的确定。

二、原理

比色法是常用的生化分析方法。利用分光光度计可以很方便地完成多种生物物质的定量分析。比色法的理论基础是 Lambert-Beer 定律（朗伯-比尔定律），其测定范围要求在分光光度计线性分辨范围内。

光线的本质是电磁波的一种，有不同的波长。肉眼可见的彩色光称为可见光，波长范围在 400~750nm；小于 400nm 的光线称为紫外光；大于 750nm 的光线称为红外光。

当光线通过透明溶液介质时，其辐射的波长有一部分被吸收，一部分透过，因此光线射出溶液之后，部分光波减少，这种光波的吸收和透过可用于某些物质的定性定量分析。

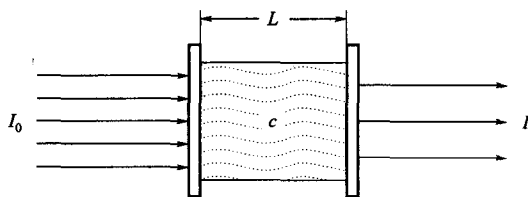


图 1-1 Lambert-Beer 定律示意图

分光光度法依据 Lambert-Beer 定律（图 1-1）： $\lg \frac{I_0}{I} = KcL$

令 $A = \lg \frac{I_0}{I}$ ， $T = \frac{I}{I_0}$ ，则 $A = KcL$ ， $A = -\lg T$

式中 T ——透光率；

A ——吸光度 [有时用光密度 (OD) 表示]；

I ——透射光强度；

I_0 ——入射光强度；

K ——吸收系数；

L ——溶液的光径长度；

c ——溶液浓度。

从上式可以看出，一束单色光通过溶液后，光波被吸收一部分，其吸收多少与溶液浓度和溶液厚度成正比，当入射光、吸收系数（ K ）和溶液的光径长度（ L ）不变时，吸光度（ A ）与溶液浓度（ c ）成正比。

三、实验材料及设备

1. 仪器

UV9100 分光光度计。

2. 器材

刻度试管：25mL×14；

洗耳球：2；

移液管：2mL×1；

滴管：2；

烧杯：250mL×1；

洗瓶、试管架、移液管架：各 1。

四、试剂的配制

0.015mol/L 硫氰化铁 $[\text{Fe}(\text{SCN})_3]$ 溶液：

称取 8.95g KSCN 和 5.00g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，蒸馏水溶解后定容至 2000mL。

五、操作步骤

取 14 支试管，按表 1-1 所示顺序操作。

表 1-1 分光光度计线性分辨范围测定

实验编号 操作	空白	硫氰化铁标准液												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
硫氰化铁(mL)		0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0	2.2	2.4	2.6
蒸馏水(mL)	定容至 10mL,各管混匀													
比色	以 0 号管为空白参比,测定 $\lambda=540\text{nm}$ 处的吸光度													
吸光度(A_{540})														

六、结果处理

1. 由 0~13 号管的数据，以硫氰化铁含量为横坐标，吸光值为纵坐标，在坐标纸上绘制曲线。

2. 根据曲线分析分光光度计线性分辨范围。

七、思考题

1. 做比色测定时，标准溶液的浓度范围应怎样选定？待测样品溶液的浓度应稀释在什么范围？

2. 比色时，设一个“0”号空白试样的意义是什么？

实验二 缓冲液配制和 pH 值测定

一、目的

1. 了解配制缓冲液的基本原理以及 pH 计的基本原理。

2. 掌握配制缓冲液和使用 pH 计的基本方法。

二、原理

在一定的酸或碱作用下,能够自动调整并保持溶液 pH 值基本不变的溶液称为缓冲液。以 HAc 和 NaAc 组成的缓冲液为例,它的 pH 符合下面关系: $\text{pH} = \text{pK}_a - \lg[\text{HAc}]/[\text{Ac}^-]$, 因此改变 $[\text{HAc}]/[\text{Ac}^-]$ 的比值,可以在一定范围内配制不同 pH 值的缓冲液。缓冲液的缓冲容量大小不仅与其总浓度有关,而且与其组分比也有关。总浓度越大,缓冲容量越大;总浓度一定,其组分浓度比越接近 1,缓冲容量越大。将缓冲液适当稀释或浓缩,其 pH 值基本保持不变。

测定 pH 值的 pH 计(或称酸度计)一般是由一支对 H^+ 敏感的玻璃电极和一支不随溶液中被测离子活度变化而改变其本身电位的甘汞电极以及一个测量电位的电位计所组成,两支电极和测试溶液构成一个伏特电池,电极在不同的 pH 值溶液中产生不同的电位,它符合电化学理论中的 Nernst 方程,即 $E = E^\ominus - (2.303RT/F)\text{pH}$ 。测定中,首先测得已知 pH 的标准缓冲液中产生的电位 E_s ,然后,由测得未知 pH 缓冲液中产生的电位 E_x 通过 $\text{pH}_x = \text{pH}_s + \frac{(E_s - E_x)F}{2.303RT}$ 可直接算出该缓冲液的 pH (pH_x)。

为了方便,pH 计上装有一个定位调节器,当测量标准缓冲液 pH 时,利用它可把读数直接指示在标准的 pH 值上,这样在以后测未知 pH 的缓冲液时,该电位读数也就直接表示相应的 pH 值。在本实验使用的 Beckman $\Phi 61$ pH 计中,以上过程均由仪器自动完成。

三、实验试剂及设备

1. 试剂

磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、冰醋酸、醋酸钠 ($\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、甘氨酸 (Gly)、盐酸 (HCl)、标准 pH 缓冲液 (pH4.01、7.00、10.01)。

2. 仪器

电子天平(感量 0.001g)、pH 计。

3. 器材

容量瓶: 100mL $\times$ 2;

烧杯: 100mL $\times$ 1、200mL $\times$ 2;

量筒: 50mL $\times$ 1;

移液管: 10mL $\times$ 1;

漏斗、洗瓶、洗耳球、移液管架、玻棒: 各 1。

四、操作步骤

1. 重量法: 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液配制 (0.05mol/L, pH7.0)

(1) 由附录“常用缓冲溶液的配制”的表中通过计算,分别称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ _____ g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ _____ g,用蒸馏水溶解后,定容至 100mL。

(2) 将配好的缓冲液倒入试剂瓶,贴上标签,保存备用。

2. 母液法: 醋酸-醋酸钠缓冲液配制 (0.1mol/L, pH5.4)

(1) 0.1mol/L 醋酸钠母液的配制:

称取 $\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ _____ g, 用蒸馏水溶解后, 定容至 50mL。

(2) 0.1mol/L 醋酸母液的配制:

吸取冰醋酸 _____ mL, 用蒸馏水定容至 50mL。

(3) 取 0.1mol/L 醋酸钠母液 47mL、0.1mol/L 醋酸 7mL, 于烧杯中混匀, 用 pH 计测定 pH 值, 使混合液的 pH 值最终达到 5.4。

(4) 将配制好的缓冲液倒入试剂瓶, 贴上标签, 保存备用。

3. 调制法: Tris-Gly-HCl 缓冲液配制 (0.025mol/L, pH8.3)

(1) 称取三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 0.300g、甘氨酸 1.404g, 加入 80mL 蒸馏水, 加热溶解。

(2) 冷却后, 用 pH 计测定 pH 值, 并不断滴加 2.5mol/L 盐酸, 使 pH 值最终达到 8.3。

(3) 用蒸馏水定容至 100mL。

(4) 将配制好的缓冲液倒入试剂瓶, 贴上标签, 保存备用。

五、思考题

1. 配制缓冲液时要选取合适的缓冲试剂, 主要根据什么原则?
2. 配制缓冲液, 常用的方法有哪几种?

实验三 荧光光度法测定核黄素的含量

一、目的

1. 了解荧光法测定核黄素的原理和方法。
2. 学习荧光光度计的操作和使用。

二、原理

核黄素 (维生素 B_2) 是一种异咯嗪衍生物, 它在中性或弱酸性的水溶液中为黄色并且有很强的荧光。这种荧光在强酸和强碱中易被破坏。核黄素可被亚硫酸盐等还原成无色的二氢化物, 同时会失去荧光, 因而检测样品时要防止荧光的衰减。二氢化物在空气中易重新氧化, 恢复其荧光, 其反应如图 3-1 所示。

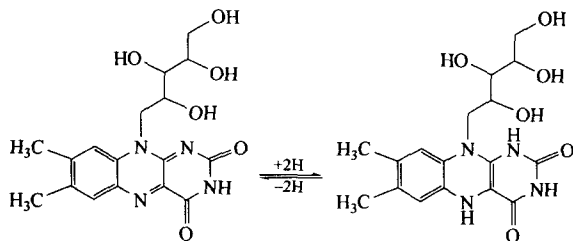


图 3-1 核黄素氧化-还原机理图

核黄素的激发光波长范围约为 440~500nm (一般为 440nm), 发射光波长范围约为 510~550nm (一般为 520nm)。利用核黄素在稀溶液中荧光的强度与核黄

六、结果处理

1. 由 1~6 号管的数据, 以核黄素含量 (μg) 为横坐标, F 值为纵坐标, 在坐标纸上绘制标准曲线;
2. 求样品管 F 的平均值 $\bar{F}$;
3. 由 $\bar{F}$ 从标准曲线中求样品管中核黄素的含量 (μg);
4. 计算所取生物材料中核黄素的含量 (单位用 $\mu\text{g/g}$ 鲜重)。

七、思考题

为什么在核黄素的整个测定过程中, 需要避光操作?

八、附注

荧光光度计使用说明:

核黄素荧光测定的激发光波长为 440nm, 发射光波长为 520nm。因此可选用带通型 400nm (蓝字) 滤色片为激发光滤色片, 选用截止型 510nm (红字) 滤色片为发射光滤色片。

待仪器预热并调好零点后, 用参比溶液调荧光光度计的荧光强度读数到满刻度 (100%), 然后分别测定其他溶液的相对荧光强度 (F) 值。

综合性必做实验

实验四 3,5-二硝基水杨酸比色法测定糖的含量

一、目的

1. 了解 3,5-二硝基水杨酸比色法测定糖的原理。
2. 掌握还原糖和总糖定量测定的操作方法。

二、原理

还原糖是指含自由醛基或酮基的单糖（如葡萄糖）和某些具有还原性的双糖（如麦芽糖）。它们在碱性条件下，可变成非常活泼的烯二醇。遇氧化剂时，具有还原能力，烯二醇本身则被氧化成糖酸及其他产物。

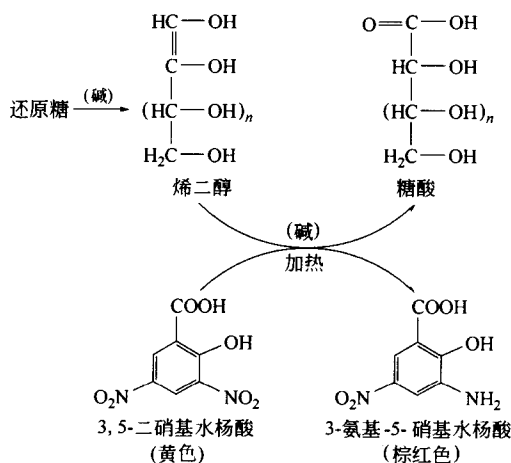


图 4-1 还原糖与 DNS 试剂的反应机理图

黄色的 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 试剂与还原糖在碱性条件下共热后，自身被还原为棕红色的 3-氨基-5-硝基水杨酸 (图 4-1)。在一定范围内，反应液棕红色的深浅与还原糖的含量成正比，在波长为 540nm 处测定溶液的吸光度，查对标准曲线并计算，便可求得样品中还原糖的含量。

多数还原性糖具有水溶性，可以将样品直接用水浸提，获得还原糖溶液。对于非还原性的双糖（如蔗糖）以及还原性很小的多糖（如淀粉），应先用酸水解法将它们彻底水解成单糖，再借助于测定还原糖的方法，可推算出总糖的含量。由于多糖水解时，在每个单糖残基上加了 1 分子水，因而在计算时，须扣除加入的水量，