

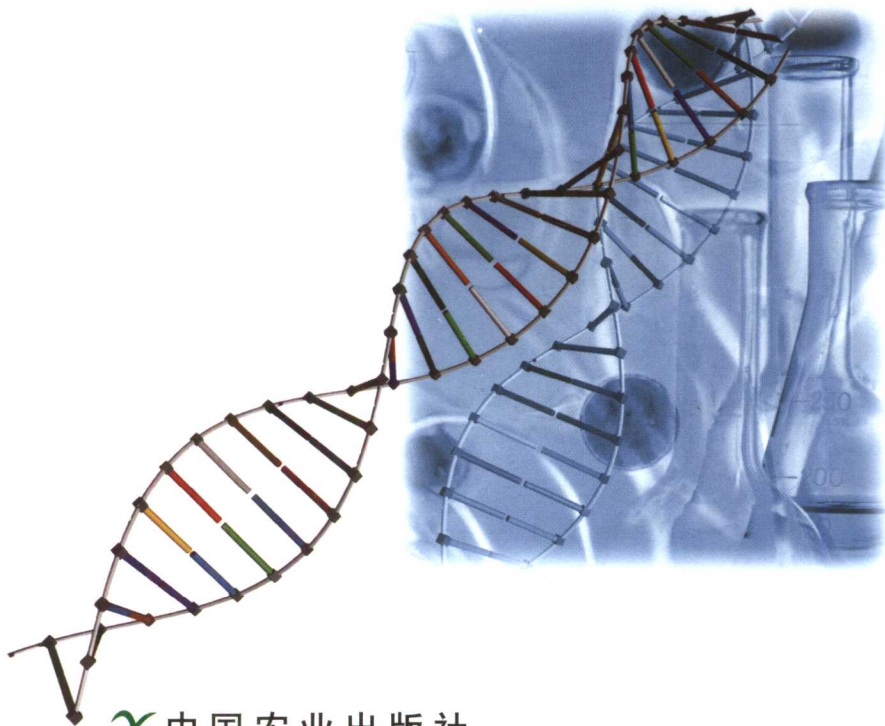



全国高等农林院校“十一五”规划教材

动物生物化学 实验指导

第三版

刘维全 主编



 中国农业出版社

DONGWU SHENGGWUHUAXUE
SHIYAN ZHIDAO

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

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. —3 版. —北京:
中国农业出版社, 2008. 1

全国高等农林院校“十一五”规划教材

ISBN 978-7-109-12013-6

I. 动… II. 刘… III. 动物学-生物化学-实验-高等
学校-教学参考资料 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 004037 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

责任编辑 武旭峰 李 恒

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2002 年 2 月第 1 版 2008 年 3 月第 3 版

2008 年 3 月第 3 版北京第 1 次印刷

开本: 820mm×1080mm 1/16 印张: 11.5

字数: 255 千字

定价: 18.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

第三版编著者

- 主 编 刘维全
- 副主编 高士争 刘芃芃
- 编 者 (按姓氏汉语拼音为序)
- 陈书明 山西农业大学
- 高士争 云南农业大学
- 高学军 东北农业大学
- 刘芃芃 中国农业大学
- 刘维全 中国农业大学
- 王清吉 青岛农业大学
- 张源淑 南京农业大学
- 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

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，刘芃芃、刘维全、王清吉、陈书明、郑玉才；第四章，郑玉才、张源淑、刘芃芃、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

第二版修订者

主 编 周顺伍 中国农业大学
编 者 汤艾菲 邹思湘 南京农业大学
赵 贛 华南农业大学

第二版前言

全国高等农业院校统编教材《动物生物化学实验指导》，自1984年编写至今已十余年，曾十余次印刷，是高等农业院校的基本实验教材。随着学科的发展，本书内容已十分陈旧，需要进行修改。

鉴于当时的情况，原书中的内容，除部分是与课程内容相关的验证性实验外，主要是动物血液生化成分的测定方法。生化实验方法与技术操作训练的内容较少。

而今，血液生化成分手工测定的方法，正在被“自动生化分析仪”所取代，有些测定方法已被淘汰。更重要的是随着蛋白质结构与功能以及核酸（DNA、RNA）体外操作研究的发展，促进了生物化学实验方法与技术的全面发展，尤其是20世纪70年代初DNA重组技术的创立及相关新技术的不断涌现，已形成新的分子生物学技术，从而更加丰富和发展了生物化学实验方法与技术，使之成为当今生物科学研究的重要手段，成为生物科学工作者必备的知识。

鉴于此，本书这次修改，除保留部分效果明显的验证性实验外，重点增加了生物化学实验方法与技术操作训练的内容。力求通过实验使学生认识和掌握基础的实验方法与技术，提高动手的能力。

生物化学实验方法与技术的内容范围很广，其中包括：生物大分子物质的粗分离技术、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。还有20世纪末发展起来，将在本世纪发挥重要作用的生物芯片（Biochip）技术。

由于本书属大学基础教材，不可能，也不必要介绍全部的生物化学实验技术与方法，我们仅选择了具有代表性、最基础、内容十分成熟、取材容易的一些实验。目的只在于通过实验使学生懂得这些技术的基本原理、掌握基本操作，达到提高动手能力的目的。

各院校的情况差别很大，书中的实验可根据情况选做，条件不成熟的可逐步创

造条件开展。部分实验可供硕士研究生训练之用。

本书第一版是由几个院校的同行共同编著，这次修改不可能邀请更多的同行参加。为集思广益、吸取精华，修编前我们曾征求了许多同行的意见，得到了大家热情的支持：东北农业大学李庆章、原中国人民解放军农牧大学王映强、原上海农学院杨丽娥、宁夏农业大学张慧茹、原浙江农业大学童富淡、贵州农学院范佳佑等同行，寄来了他们编著正式出版的生化实验教材或推荐了好的实验。许多同行还提出了许多建议与意见，在此表示最衷心的感谢！

实验教材重在有好的重复性。书中实验曾经编者多年实践，但仍会有不妥和错误之处，请读者及时指出。由于我们的水平有限，书中不足和错误请同行给予指教！

编 者

2001年春节

第一版编著者

主 编	齐顺章	北京农业大学
编 者	周顺伍	北京农业大学
	刘昌沛	江苏农学院
	喻梅辉	新疆八一农学院
	鲁安泰	西北农学院

第一版前言

这本实验教材是受农业部的委托编写的。1982年在北京召开了动物生物化学教学大纲审订会。本教材基本上是按该次会议制订的大纲编写的。

实验主要是按技术（如光度法、电泳法、层析法等）分类编排的。在每类实验之前对该种技术的原理做了简要的说明，以便使学生对当前常用的生化技术有较全面的了解。但在实际教学中，不一定按这个次序进行。

全书共编了36个实验，按现在的学时一般是不能全做的。多编一些是为了各兄弟院校根据自己的情况进行选择，也为了其他畜牧、兽医工作者参考。此外，在附录中列举了我们觉得必须提供的实验室常识和常用数据。

在编写过程中，新疆八一农学院郑世昌参加了初稿的全部审查工作；江苏农学院严锦文参加了部分实验的编写工作，特此致谢。

由于编者水平有限，而且为了尽快出版供大家使用，所以匆促编成，因而必然会有许多缺点和错误，渴望读者指正。实验课是培养学生技术操作、科学态度和独立工作能力的重要环节。在编写中我们虽然注意到了这一点，但做得很不够，望大家提出宝贵意见，以便再版时修订。

编者

1984年6月于北京

目 录

第三版前言	
第二版前言	
第一版前言	

第一章 总 论

第一节 绪论	1
第二节 动物生物化学实验室安全与防护知识	3
第三节 常用仪器设备及其使用方法简介	7
第四节 实验基本操作技术	12

第二章 动物生物化学基本实验技术原理

第一节 沉淀分离技术	19
第二节 离心技术	22
第三节 层析技术	25
第四节 电泳技术	34
第五节 光谱分析技术	41

第三章 动物生物化学基本实验技术

第一节 血液样品的处理与组织匀浆的制备	47
第二节 血糖的测定	52
第三节 血液非蛋白氮的测定	54
第四节 血清总脂的测定	56
第五节 血清钠/钾/钙/无机磷的测定	58
第六节 肝糖原的提取与鉴定	62
第七节 维生素 B ₁ 的提取与含量测定	64
第八节 脂肪酸的 β -氧化	65
第九节 脂类的提取和薄层层析分离	68

第四章 蛋白质（酶）技术

第一节 蛋白质提取、纯化与鉴定的一般步骤和方法	70
第二节 蛋白质定量测定技术	78
第三节 唾液淀粉酶活性的观察	87

第四节	碱性磷酸酶活性及比活性测定	90
第五节	琥珀酸脱氢酶的作用及其竞争性抑制的观察	92
第六节	乳酪蛋白的制备及部分性质检测	94
第七节	血清蛋白质醋酸纤维薄膜电泳	95
第八节	纸层析鉴定酶促转氨基作用	97
第九节	卵清蛋白的分离提纯	101
第十节	等电聚焦电泳法测定蛋白质的等电点	102
第十一节	细胞色素 C 的制备及含量测定	105
第十二节	血浆(清) IgG 的分离纯化	110
第十三节	聚丙烯酰胺凝胶柱状电泳分离血清蛋白	114
第十四节	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的分子质量	117

第五章 核酸技术

第一节	核酸定量测定技术	122
第二节	动物组织中染色体 DNA 的制备	128
第三节	大肠杆菌感受态细胞的制备及质粒的转化	130
第四节	质粒的提取及琼脂糖凝胶电泳鉴定	133
第五节	利用凝胶层析技术纯化质粒 DNA	137
第六节	聚合酶链式反应	139

第六章 实验记录与数据处理

第一节	实验记录与数据处理	143
第二节	实验报告	149

附 录

一、常用缓冲溶液的配制方法	152
二、层析技术常用数据	157
三、硫酸铵饱和度常用表	162
四、常用蛋白质和核酸分子质量标准	164
参考文献	165

第一章 总 论

第一节 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，每一种新的生化物质的发现与研究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 20 年代，微量分析技术促进了维生素、激素、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 $5\,000\times g$ ($5\,000\sim 8\,000\text{ r/min}$) 相对离心力的超离心机（相对离心力“RCF”的单位为“ $\times g$ ”），开创了生化物质离心分离的先河，并准确测定了血红蛋白等复杂蛋白质的相对分子质量，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 Tiselius 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 Martin 和 Synge 发明了层析技术（又称色谱技术），他们获得了 1952 年的诺贝尔化学奖。由此，电泳技术和层析技术成为分离、鉴定以及制备生化物质的关键技术。

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碳水化合物及类脂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 1962 年诺贝尔化学奖。

20 世纪 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，如高效液相层析 (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相对分子质量，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 3 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，英国剑桥大学的生物化学家 Sanger 和美国哈佛大学的 Gilbert 分别设计出两种测定 DNA 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、化学等学科的科学工作者的极大重视，发展极为迅速，是生化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制备和下游技术。

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，这是一种体外 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，大量新

技术将不断涌现出来。

(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,样品采集后最好立即进行实验,否则应低温保存,特殊条件下,需要在超低温或液氮中保存。

(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,这就要求在进行实验时高度仔细和认真,使实验的每一个条件都尽可能最佳。

(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,因此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,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,学会严密地组织实验,合理地安排实验步骤和时间。

(2) 训练实验的动手能力,学会熟练地使用各种生物化学实验仪器,包括各种天平、分光光度计、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、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。

第二节 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绝不可以忽视，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、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、生物伤害等是动物生物化学实验室中易发生的危险性较大的安全事故，下面分别予以简要介绍。

(一) 着火

由于实验的需要，一方面，生化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，稍加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 (°C)	闪点 (°C)	自燃点 (°C)
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

注：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) 废弃的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。

(4) 在有明火的实验台面上不允许放置开口的有机溶剂或倾倒有机溶剂。

2. 灭火方法 实验室中一旦发生火灾切不可惊慌失措，要保持镇静，根据具体情况正确地进行灭火或立即报火警（火警电话 119）。

(1) 容器中的易燃物着火时，用灭火毯盖灭。因石棉有致癌性，故用玻璃纤维布作灭火毯。

(2) 乙醇、丙酮等可溶于水的有机溶剂着火时可以用水灭火；汽油、乙醚、甲苯等有机溶剂着火时不能用水，只能用灭火毯和砂土盖灭。

(3) 导线、电器和仪器着火时不能用水和二氧化碳灭火器灭火，应先切断电源，然后用