

生物化学实验教程

方家驹 主编 · 人民卫生出版

89734

生物化学实验教程

主编 方家驹 (浙江医科大学杭州分校)

主审 黄诒森 (镇江医学院)

编者 周庆堂 (上海奉贤医专)

韦罗生 (武汉冶金医专)

舒建德 (黔南民族医专)

林元藻 (宜春医专)

李昌玲 (石家庄医专)

朱怀荣 (菏泽医专)

陈斯东 (浙江医科大学杭州分校)

人 民 卫 生 出 版 社

(京) 新登字081号

责任编辑 郝巨为

生物化学实验教程

方家驹 主编

人民卫生出版社出版

(北京市崇文区天坛西里 10 号)

北京市卫顺印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

787×1092毫米 32 开本 3-4 印张 77千字

1993年4月第1版 1993年4月第1版第1次印刷

印数: 00 001—7 700

ISBN 7-117-01812-7/R·1813 定价: 2.00元

〔科技新书目290—217〕

前 言

生物化学是一门重要医学基础课，实验教学又是整个教学过程中重要组成部分。因此要提高生物化学教学质量，除加强课堂教学外，还必须使同学了解必要的生化实验技术，以增加感性认识，巩固理论知识。掌握一定的生物化学实验基本操作和技能，对于培养学生分析问题和解决问题能力，树立实事求是的科学态度是必不可少的，而且也为其基础医学课学习打下良好的基础。

为了配合医学专科学校教学，由7所医学专科学校共同编写了这本《生物化学实验教程》。参加编写的老师长期从事医学专科生物化学的教学，具有一定的教学经验。在人民卫生出版社大力协助下，该教程得到正式出版，并与《生物化学》(第三版)相配套使用。

本书可供高等医学专科学校医学、卫生、儿科、口腔、妇产科、麻醉等专业使用。

本书所收集的实验均系各校历年教学中使用，并取得较好的教学效果，编排上着重选择密切联系课堂讲授内容，验证课堂理论的实验，又选择一些突出实验基本技能、方法训练的实验，还有部分临床生化实验。考虑各校实验条件不一致，故在内容广度上作了扩大，留有一定的选择余地，各学校在使用时可根据学生水平、实验条件、教学时数等进行取舍，有些实验可作示教。

本书由黄诒森教授主审，在编写过程中浙江医科大学杭州分校许多同志帮助抄写、整理、校对稿件，在此表示感谢。

由于作者水平有限,编写时间比较仓促,缺点错误在所难免,望各校使用时提出宝贵意见,以便今后修订。

编 者

1992年2月

目 录

概论	1
实验一 生物化学实验基本操作	4
实验二 分光光度法	13
实验三 蛋白质定量测定	21
一、紫外分光光度法	21
二、双缩脲法	22
三、酚试剂法	24
实验四 氨基酸薄层层析	26
实验五 血清 γ -球蛋白的分离与纯化	28
实验六 凝胶层析法分离血红蛋白与鱼精蛋白	32
实验七 血清蛋白质的醋酸纤维素薄膜电泳	36
实验八 核糖核酸的水解及其组成成分鉴定	41
实验九 细胞内核酸的分布	44
实验十 温度、pH、抑制剂及激活剂对唾液淀粉酶活性的影响	51
一、温度对酶活性的影响	51
二、pH对酶活性的影响	53
三、激活剂和抑制剂对酶活性的影响	55
实验十一 胃蛋白酶原的激活	56
实验十二 血清乳酸脱氢酶同工酶的分离	58
实验十三 生物氧化实验	61
一、细胞色素氧化酶的作用及其抑制	61
二、琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制	64
三、过氧化物酶	66

四、过氧化氢酶·····	68
实验十四 剧烈运动对尿中乳酸含量的影响·····	69
实验十五 饱食、饥饿及激素对肝糖原含量的 影响·····	70
实验十六 胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的影响·····	73
实验十七 血糖的测定 ·····	75
一、邻甲苯胺法·····	75
二、葡萄糖氧化酶法·····	77
实验十八 血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳 ·····	78
实验十九 血清三脂酰甘油的测定·····	80
实验二十 酮体的生成和鉴定 ·····	83
实验二十一 血清总胆固醇的测定·····	85
一、硫磷铁法·····	85
二、酶联试剂法·····	88
实验二十二 氨基移换作用 ·····	90
实验二十三 精氨酸酶的作用 ·····	96
实验二十四 血浆二氧化碳结合力的测定（酸碱滴 定法）·····	100
实验二十五 血清无机磷测定及回收实验 ·····	102
实验二十六 血清尿素氮的测定·····	105

概 论

一、生物化学实验课目的

生物化学是门实验性学科,它之所以能够得到迅速发展,主要原因就是由于生物化学实验技术的突飞猛进。因此生物化学实验课是生物化学教学过程中的重要组成部份,加强和改进实验教学是提高生物化学教学质量的重要环节。

近年来,生物化学实验技术已成为生物学及医学研究中的一个非常重要手段。医学专科学生不仅要掌握生物化学基础理论,而且也必须掌握生物化学实验技术,为今后继续学习和提高打下良好基础。

通过生物化学实验课教学将达到下列四方面的要求:

1. 初步掌握生物化学常用实验基本操作技术,为今后临床医学的学习和工作打下必要基础。
2. 培养学生严肃、认真、实事求是的科学态度和科学作风。
3. 进一步加深课堂知识的理解,提高分析、判断和解决问题能力。
4. 培养学生爱护国家财产,关心集体,团结互助的优良品质。

二、生物化学实验课的基本要求

(一) 实验前

认真预习是做好实验的关键，每次实验前，应先按教学进度表了解实验内容，复习好有关课堂讲授理论，再预习实验教程的有关内容。掌握该次实验的目的和实验设计原理，了解操作的基本过程及注意事项。

(二) 实验中

1. 严格遵守实验室规则，随时注意保持实验桌面及仪器清洁整齐，实验过程井然有序。

2. 严格按实验教程要求正规操作，不得马虎从事。认真观察实验中出现的各种现象，客观及时地记录实验现象、结果和数据，应及时准确地写入记录本(严禁在手上或桌上乱划)。

3. 实验过程中要联系课堂讲授有关理论内容，积极地进行思考，力求理解每一实验步骤及每个实验结果的意义。

(三) 实验后

1. 实验结果应及时向老师汇报，结束实验必须经指导老师同意。

2. 实验结束后应及时清洗仪器，整理桌面。

3. 整理实验结果，分析讨论，写出实验报告，按时交给指导老师评阅。

4. 离开实验室前要把门、窗、水、电、煤气均关闭好。

三、实验报告的书写

实验报告的书写是一项重要的基本技能训练，是论文写作的基础，所以应认真完成。

书写实验报告要求简明扼要、文字简炼、通顺，实验现象描述准确，字迹清楚端正，无错别字，正确使用标点符号。

完整的实验报告应包括下列项目：

1. 实验日期及实验名称。

2. 实验原理：用自己的语言表达，切忌照抄实验教程。
3. 实验操作步骤：简明扼要叙述实验步骤（可用表格、箭头表示生化操作流程）。
4. 实验结果：如实纪录观察到的实验现象或数据，对数据进行必要的运算。
5. 讨论和结论：实验结果讨论是根据已知生化理论知识对实验结果进行解释和分析，是作出结论前的逻辑论证。实验结论是对所做实验所能验证的概念原则或理论加以简明扼要的总结。

四、实验室规则

1. 进实验室必须穿好工作服，严格遵守实验室纪律，不迟到早退，不得喧哗哄闹。书包杂物不得带入实验室。
2. 实验前认真预习，了解实验内容、目的、操作步骤及实验意义。
3. 按学号固定实验桌号，第一次实验借用常用生化实验仪器一套，一学期结束时如数归还。仪器如有破损遗失，应及时向指导老师报告、登记补领并按规定赔偿。玻璃仪器应始终保持明亮干净。
4. 实验过程中严格按实验教程规定操作，保持实验桌面及仪器清洁整齐，操作程序有条不紊，注意安全。
5. 公用试剂用毕后立即放归原处，公用仪器应尽快使用不得任意搬动。公用仪器和试剂如有损坏或污染应立即报告指导老师。
6. 将污物、渣屑、动物尸体丢入污物箱内统一处理。
7. 实验后轮流由值日生打扫实验室清洁，检查门窗、水电、煤气等有否关闭，经老师认可后方可离开实验室。

实验一 生物化学实验基本操作

一、玻璃仪器的洗涤

只有使用清洁的仪器和实验材料才能免除杂质的污染，从而得到符合实际的实验结果。各种不同性质的实验要求的清洁程度各不一样，因此对仪器的洗涤、清洁的要求也不相同。比如：一般定性的实验对仪器的清洁要求，只要仪器表面不含有干扰本实验的杂质就行；而定量分析的实验要求严格得多，应达到不影响分析结果；至于观察酶活性的实验、作代谢研究的实验，仪器的清洁要求则更严格，要防止微量杂质（如某些离子、重金属化合物、细菌代谢产物等）的干扰。

1. 一般定性、定量实验所用的玻璃敞口仪器如试管、离心管、烧杯、烧瓶等的洗涤，可先用蘸有肥皂或合成洗涤剂的毛刷擦洗，对表面有牢固地附着的污染物的玻璃仪器可用去污粉擦洗。某些难除去的污物应针对其化学本质采用相应的清除法，如用以上方法去除不干净，可根据具体情况试用热的碱溶液洗。用浓盐酸可洗去附着在器上的某些氧化物、碳酸盐、铁锈等，然后用自来水冲洗干净，最后用少量去离子水或蒸馏水淋洗内壁三次即可。洗干净的玻璃仪器对着光看，其表面应是光洁的，淋洗的水成片地从仪器上流下来，不应有水珠附着在内壁上。

2. 精密的容量仪器，量瓶、滴定管、吸管等的洗涤，其要

求是洗去杂质同时清除附在容器表面的微量油污，以使试液在容器内壁能光滑地流下，不形成液滴挂在容器内壁上，以致造成读数错误。洗涤容量分析仪器应尽可能不使内壁与硬物接触，以免造成器壁擦伤使容量不准。洗涤时一般可用水洗，或用一些合成洗涤剂，经水冲洗后尽量沥干，然后置浓的铬酸洗液中浸泡十五分钟以上，利用铬酸洗液的强氧化性除去器壁上附有的微量油污（这种微量油污可能是从空气中飘来的），然后将铬酸洗液倒回贮器中以备下次再用。经洗液浸过的仪器再用大量自来水冲洗，最后用去离子水或蒸馏水洗三次备用。大的容量分析仪器如量瓶、滴定管等不能浸在洗液中，可将洗液灌入容器内，如洗液量较少可经常转动容器使洗液浸湿器壁各部分即能达到去油污的效果。

使用铬酸洗液清洁容器应注意以下几点：① 水可使洗液中的硫酸被稀释以致铬酸析出，同时洗液的氧化力下降，甚至失效，因此用铬酸洗液时待洗的容器应尽量沥干。② Hg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Pb^{2+} 等离子与铬酸洗液作用可生成不溶的化合物沉积在器壁上，因此凡接触过含有此类化合物的容器应先除去这些离子（可用硝酸、EDTA 钠等先行清除），经水冲洗后再用铬酸洗液洗。③ 有机化合物、油类，有机溶剂均可使铬酸洗液还原失效，因此器壁如附有大量油类、有机物等，应先除去然后再用铬酸洗液。④ 铬酸洗液有很强的酸性和氧化性，皮肤、衣服接触到即可致损伤毁坏，使用时应仔细，以免造成损失。⑤ 铬酸洗液还原为硫酸铬时，洗液由原来的深棕色变成绿色，此时洗液不具有氧化性，不能继续使用。

3. 粘附有血液、血浆、血清或其他蛋白质的刻度吸管洗涤时，应首先用自来水冲洗，除去管内残液。如不能除去时可用45%尿素浸泡几小时使血浆蛋白溶解，然后再用水冲洗

干净，如尚不能达到清洁要求，则可浸泡于铬酸洗液 4~6 小时再用大量自来水冲洗，为了保证除去洗液的残酸，也可在冲洗后用 0.01mol/L NaOH 浸一下。只有确保吸管不再有残酸后，才可用蒸馏水最后冲洗。学生可用洗瓶的出水管尖对准吸管上口(但不要插入吸管上口)，将洗瓶所蓄的蒸馏水经吸管上端注入，从下端流出，如此三、四次，然后淋洗外壁。如此淋洗过的吸管可以先倒插在试管架上(管尖向上)，使其自然干燥以备下次使用，已淋过的吸管，切不可用手触其下端，以免污染，影响实验结果。

4. 酶学实验和代谢研究实验所用的玻璃仪器清洁要求很高，要特别注意微量重金属离子、细菌和细菌代谢物的干扰，仪器可用硝酸、盐酸多次反复洗涤，然后用蒸馏水(某些要求特别严的实验需要重蒸馏水，甚至三蒸馏水)洗涤，洗净的仪器应及时烘干，必要时需经灭菌，然后妥善保存以免污染。

二、玻璃仪器的干燥

一般的玻璃仪器均可于洗净后倒置架上，让其水分蒸发自然干燥，如需迅速干燥者应按仪器的不同类型按下述不同方法处理：

试管、离心管、烧杯、烧瓶等普通玻璃器皿可置烘箱中 100~105℃ 烘烤，如同时需灭菌者可升至 180℃ 以上烘烤，少量仪器如需急用也可在电炉上或酒精灯上烘烤。烘烤时应将器皿时时转动，务使受热缓慢且均匀，并将管口(或杯口)倾斜向下，以便水蒸气冷凝成水滴，顺口流出，不致使水滴接触烘热了的器壁而使仪器爆裂。使用电吹风干燥一般玻璃仪器也很便利用。

下列玻璃仪器应避免烘烤：① 各种容量分析仪器，如量瓶、量筒、吸管、滴定管等。因烘烤时温度较高，容易造成器壁变形而致容量不准。② 厚壁玻璃器皿和器壁厚薄不等、差别较大的器皿。此等仪器容易因壁受热不均而烘裂。③ 烧结玻璃仪器，如烧结的方形比色皿、各种烧结砂芯过滤器等，此等仪器也易在烘烤时发生破裂。

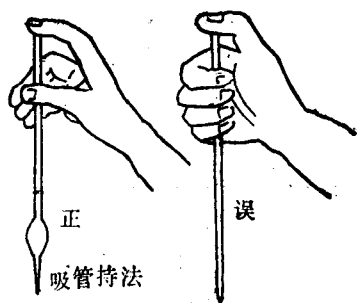
容量分析仪器以室温自然干燥或用试液灌注为宜。学生对实验中所用的吸管，哪些必须使用干燥的，哪些不一定用干燥的应心中有数。

三、吸管的使用

吸管是生化实验中最常用的容量分析仪器，用于准确移取试液，其精密度按不同的容积可达移取量的0.1%~1%。操作时以右手拇指和中指夹管身，把吸管的尖端伸入液体中，把液体吸入吸管内至刻度以上，迅速以右手食指按住吸管的上口控制试液的泄放（见图一）。不应用拇指控制管口，尽量不用口吸以免管口脱空把液体吸入口中。吸液后应将吸管扶正，保持垂直位置，使右眼与刻度等高，然后稍微放松食指或轻轻转动吸管，使试液面缓慢降落，到管内液面弧线的最低点与刻度线齐（注：将吸管斜持读数的操作是错误的，因可造成很大的读数误差）。如所吸取的试液颜色很深，不易看清液面最低点，则最好选用分刻度吸管放取两个刻度之间的容积的方法。此时可改用液面的边缘与刻度对齐。但在单刻度的吸管一次放出所标明的全量时不能这样做，仍应尽可能看清液面弧线的最低点（为什么？）。此外，生化实验中因大多数分析属微量分析，吸取试液的量往往很小，如不除去吸管外壁所沾液体可造成很大误差，一般应用干净的碎滤纸片

拭净吸管外壁然后放出管内液体。

吸管的类型很多，在使用上也有某些差别，因此应先了解所持吸管的类型，掌握正确使用法，现将常用的吸管类型及其特点分述如下：



(一) 吸管

1. 移液吸管 为

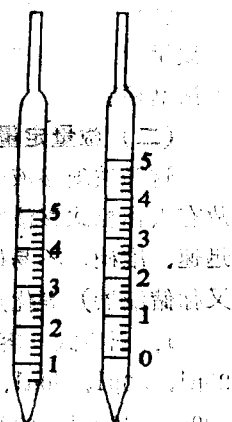
图一 吸管的正确使用

化学定量分析实验所常用，用作移取吸管所标明数量的试液。常见的有 50ml、25ml、10ml、5ml、2ml、1ml 等容量规格。试液自管内放出时，管身须直立，管尖靠在容器的内壁上，放松食指，令液体自然流出，等液体不再流出时，还要贴靠 15 秒钟，最后管的尖端一点残液不应吹出，因该类吸管的刻度一般表示液体的自然泄出量。

2. 分刻度吸管 分刻度吸管常见的容量有 10ml、5ml、2ml、1ml、0.5ml 等。通常将管身标明的总容量分刻为 100 等分，因此 10ml 总量的此类吸管有 0.1ml 的分格，有效读数至 0.01，1ml 的此类吸管有 0.01ml 的分格，其余类推。这类吸管常用作移取非整数量的试液，有刻度到尖端和刻度不到尖端的两种：刻度到管尖的在最上刻度线与管尖之间的容量为管身所标明的容量，并在这之间 100 等分。这两类吸管的刻度因厂家不同有零点在上和零点在下两种刻法，在使用前应先认明以免发生错误，使用时如系刻度不到管尖的，应用食指控制液体泄放至最下刻度线，如为刻度到管尖的，于液体放出后应将残留管内最后一点试液轻轻吹出（国产的

此类吸管有的生产厂家在管身上刻有“吹”字)(图二)。

3. 奥氏吸管 此种吸管的管身有一橄榄形的玻璃泡，其特点是各种类型的同一容量的吸管中此类吸管的内表面积最小，使用时吸管内壁粘附的试液也最少，因此特别适用于粘稠的液体，如血液、蛋白质溶液及油脂等的吸量，血液化学分析中用于血样的吸取。此种吸管常见的有10ml、5ml、2ml、1ml和0.5ml几种容量规格。用时应注意缓慢将试液放出，最后一点试液要轻轻吹出(国产奥氏吸管身上刻有“吹”字样)。



图二 两种不同刻度方式的
分刻吸管

4. 微量吸管 为吸取小量试液设计的特种毛细吸管，有单刻度的，也有分刻度的。临床化验室作血球计数的稀释吸管也是一种微量吸管。生化测定中常见的微量吸管的容量有0.2ml (200 μ l)、0.1ml (100 μ l)、0.05ml (50 μ l)、0.02ml (20 μ l)、0.01ml (10 μ l)等，此类吸管移取试液时均须缓慢地将试液吹出。

使用吸管应注意：

(1) 生化实验中常移取毒物或具有腐蚀性的药品、血清等必须用橡皮球吸液。使用时，先将橡皮球捏扁，按在吸管上口，然后慢慢放松橡皮球，此时液体即被吸入管内，移去橡皮球，如前述方法握持吸管，用食指堵住吸管上口并泄放到所需容积。使用时注意橡皮球不能骤然放松，以免试液吸

入球内。

(2) 使用吸管应干净无水，如急用而又有水时，可用少量欲量取试液灌洗三次，然后再吸取，否则留在管内的水会把试剂稀释。

(二) 微量定量移液器

这是玻璃移液管的革新产品，由塑料制成，形状象手枪，故有人称枪式移液管。它具有轻巧、使用方便，取液、加样迅速、准确，不易破损、能吸取多种样品(只换塑料吸液嘴，又称储液器)等优点。定量移液器有二种类型：

1. 固定式 容量恒定不能调节。其规格有 $10\mu\text{l}$ 、 $20\mu\text{l}$ 、 $25\mu\text{l}$ 、 $30\mu\text{l}$ 、 $50\mu\text{l}$ 、 $100\mu\text{l}$ 、 $125\mu\text{l}$ 、 $200\mu\text{l}$ 、 $250\mu\text{l}$ 、 $400\mu\text{l}$ 、 $500\mu\text{l}$ 、 $600\mu\text{l}$ 、 $1000\mu\text{l}$ 等。

2. 可调式 在一定容量范围内可根据需要调节取、加量。例如 $0\sim 10\mu\text{l}$ 、 $10\mu\text{l}\sim 200\mu\text{l}$ 、 $200\mu\text{l}\sim 1\text{ml}$ 等。

使用方法：正式使用之前，要连续按动多次，使管内空气同工作环境空气交换，保持管内空气工作负压恒定。吸液时手握定量移液器，下端插上塑料吸液嘴，轻轻扭转以保证接合严密。用拇指轻轻按下掀头与压盘接触，排出残存空气后即可将移液器塑料吸液嘴插入所需取样液内，深度为 $2\sim 3\text{mm}$ ，缓慢地松开拇指，让掀头自行返回原位，即完成取样。

排液时，将拇指轻轻按下掀头至压盘处，排出塑料吸液嘴里的全部液体。

在吸样时要避免气泡形成，以保证移液精确。吸取第二种样品时则要换上另一塑料吸液嘴。塑料吸液嘴可清洗，可经受 120°C 高温，高压消毒。

定量移液器是精密量器，不允许将移液器直接与液体接触。不使用时，也应插上塑料吸液嘴，以免液体或杂质进入