

高等医药院校配套教材

基础生物化学实验

主编 白玲 黄健



 复旦大学出版社
www.fudanpress.com.cn

图书在版编目(CIP)数据

基础生物化学实验/白玲,黄健主编. —上海:复旦大学出版社,
2004.8

ISBN 7-309-04128-3

I. 基… II. ①白…②黄… III. 生物化学-实验 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 071653 号

基础生物化学实验

白玲 黄健 主编

出版发行 复旦大学出版社

上海市国权路 579 号 邮编 200433

86-21-65118853(发行部) 86-21-65109143(邮购)

fupnet@fudanpress.com <http://www.fudanpress.com>

责任编辑 宫建平

装帧设计 马晓霞

总编辑 高若海

出品人 贺圣遂

印刷 江苏句容市排印厂

开本 787×960 1/16

印张 11.75

字数 204 千

版次 2004 年 8 月第一版第一次印刷

印数 1—5 100

书号 ISBN 7-309-04128-3/R·859

定价 18.00 元

如有印装质量问题,请向复旦大学出版社发行部调换。

版权所有 侵权必究

前 言

生命科学在 20 世纪有了惊人的发展,生物化学是其中最活跃的分支学科之一。人类基因组计划的启动和进展,更显示出生物化学实验技术是生命科学研究领域和临床诊疗应用领域中一项非常重要的基本技术。因此,作为医药院校的学生必须掌握基本的生物化学实验技能,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,增强分析问题和解决问题的能力。

为此,在已使用多年的自编实验讲义基础上,积累多年教学实践之经验,参考国内外的生化实验教材,我们编写了这本《基础生物化学实验》。本教材适用于高等医药院校基础生物化学实验教学,可供临床医学、药学、医学检验、生物技术、护理等专业根据各专业特点选择使用。

全书共有六篇。第一篇到第四篇介绍实验室基本常识与生物化学实验基本操作、常用生物化学实验技术(如分光光度法、层析、电泳、离心、透析等),以及基础生物化学和分子生物学实验;第五篇在前四篇的基础上,安排了一些综合实验、设计实验及病例讨论,以进一步培养学生的综合应用能力、分析与设计能力、逻辑思维能力;第六篇为附录,可供使用者查阅有关资料与数据。

由于编者水平及经验有限,书中错误和不足之处难免,敬请读者批评指正。

编者
2004 年 8 月

目 录

第一篇 概 论

第一章 实验室基本常识	3
第二章 生物化学实验基本操作	7

第二篇 常用生物化学实验技术

第三章 分光光度法	13
第四章 层析技术	24
第五章 电泳技术	35
第六章 离心技术	46
第七章 透析技术	53

第三篇 基础生物化学实验

第八章 糖	59
实验一 糖类的性质实验(一):糖类的颜色反应	59
实验二 糖类的性质实验(二):糖类的还原作用	61
实验三 总糖的测定:蒽酮比色法	63
实验四 糖的薄层层析	65
第九章 脂	68
实验五 酮体的生成与鉴定	68
实验六 血清总胆固醇测定(硫磷铁法)	70
实验七 血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	72

实验八 血浆高密度脂蛋白-胆固醇含量的测定(肝素-Mn 法)	74
第十章 蛋白质	77
实验九 蛋白质的性质实验(一):蛋白质等电点的测定	77
实验十 蛋白质的性质实验(二):蛋白质的沉淀及变性	79
实验十一 蛋白质的透析	81
实验十二 蛋白质定量分析(一):紫外分光光度法	82
实验十三 蛋白质定量分析(二):酚试剂法	84
实验十四 蛋白质定量分析(三):双缩脲法	86
实验十五 蛋白质定量分析(四):考马斯亮蓝 G-250 染色法	87
实验十六 血清蛋白的醋酸纤维薄膜电泳	89
实验十七 血清蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳	92
实验十八 血清蛋白的聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳	95
实验十九 SDS-PAGE 测定蛋白质分子量	97
实验二十 凝胶层析(分子筛层析)	101
第十一章 核酸	104
实验二十一 核酸定量分析(一):紫外分光光度法	104
实验二十二 核酸定量分析(二):地衣酚法	106
实验二十三 核酸定量分析(三):二苯胺法	107
实验二十四 DNA 的琼脂糖凝胶电泳及其检测	108
实验二十五 肝细胞核的分离提纯,核 DNA 的提取及核酸的 提取、水解和鉴定	112
第十二章 酶	118
实验二十六 脲酶米氏常数的测定	118
实验二十七 细胞色素体系的作用及其抑制	121
实验二十八 乳酸脱氢酶及其辅酶的作用	123
实验二十九 酶的竞争性抑制作用	125
实验三十 用正交法测定几种因素对酶活性的影响	126
第十三章 新陈代谢	130
实验三十一 血糖测定(一):邻甲苯胺法	130
实验三十二 血糖测定(二):葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法	131
实验三十三 胰岛素、肾上腺素对血糖浓度的影响	133
实验三十四 肝糖原的提取与鉴定	134
实验三十五 血清尿素氮的测定	135

实验三十六 氨基移换作用(纸层析)	137
实验三十七 血清丙氨酸转氨酶活性的测定(赖氏法)	140

第四篇 基础分子生物学实验

实验三十八 质粒 DNA 的微量快速提取及纯化	145
实验三十九 质粒 DNA 的限制性内切酶酶解鉴定	149
实验四十 真核细胞基因组 DNA 的提取	152
实验四十一 聚合酶链反应	154

第五篇 综合实验、设计实验及病例讨论

实验四十二 血清 γ -球蛋白的分离、纯化与鉴定	159
实验四十三 设计实验	163
实验四十四 病例讨论	163

第六篇 附 录

附录一 洗涤液的种类和配制方法	169
附录二 一般化学试剂的分级	170
附录三 常见的市售酸碱制剂浓度与相对密度(比重)	170
附录四 缓冲液的配制	171
附录五 硫酸铵饱和度常用表	173
附录六 生物化学实验常用词中英文对照	175

第一篇

概 论

三石牛一石五斗

Abstract

第一章 实验室基本常识

一、实验须知

(一) 生物化学实验的目的

1. 通过实验让学生掌握基本的生物化学实验操作及技能。
2. 通过实验使学生加深对生物化学理论知识的理解。
3. 培养学生分析问题和解决问题的能力,以及创新求实的工作作风。

(二) 实验室规则及常识

1. 严格遵守实验课纪律,不迟到,不早退。必须穿白大衣进入实验室。
2. 不得高声说话,严禁用器械及动物开玩笑。
3. 取用试剂时必须“盖随瓶走”,用后立即盖好放回原处,切忌“张冠李戴”。
4. 爱护公物,节约水、电、试剂,遵守损坏仪器报告、登记、赔偿制度。
5. 严格按操作规程使用仪器,凡不熟悉操作方法的仪器不得随意动用。对贵重仪器必须先熟知使用方法,才能开始使用;仪器发生故障,应立即关闭电源并报告老师,不得擅自拆修。
6. 实验完毕,将有关仪器和器材洗净归置好,值日生负责整个实验室的清洁和整理,保持实验室整洁。

(三) 生物化学实验课的要求

1. 课前要充分预习实验课的有关内容,明确实验目的、原理、操作步骤及注意事项等,写出预习报告。
2. 实验过程中不做与实验无关的事情,不妨碍他人实验。
3. 加强基本技术训练,如移液、混匀、过滤等。
4. 熟悉常用仪器的使用方法,如分光光度计、离心机、电泳仪等。
5. 以实事求是的科学态度如实记录实验结果,仔细分析,作出客观结论。实验失败,须认真查找原因,不得任意涂改实验结果。
6. 及时写好实验报告并按时上交。

二、实验记录及实验报告的书写

获得了准确的实验结果还不是实验的结束,实验室工作的目的是用一种简单易懂的方式向他人传播实验结果和所引出的概念,书写实验报告是更严格地撰写科学论文的基础和极好的练习机会。书写实验报告最好用练习本,也可以用实验报告纸。为避免遗失,实验课全部结束后应装订成册,以便保存。书写实验报告应包括下列内容。

1. 标题:课程和实验名称、实验者姓名、实验日期等都写在实验报告上。
2. 目的和原理:简明扼要地概括出实验的目的、原理,涉及化学反应的最好用反应式表示。
3. 方法步骤:列出简要明了的操作步骤,以便自己将来或他人能够重复,尽量用流程图或表格表示。
4. 记录:实验记录应及时、准确详尽、真实、清楚。

及时是指在实验中观察到的现象、数据要马上记录在记录本(或“实验指导”的合适位置)上,回顾性记录易造成无意或有意的失真。

准确详尽记录实验中观察到的实验现象,而不是照抄实验书上所列应观察到的实验结果,记录实验现象的所有细节。如报告一个特殊实验中生成一种黄色沉淀是不够的,要写明在什么条件下(比如加热到什么温度、保温多长时间)、什么时候(快速还是缓慢)、生成多少、什么形状(胶状还是絮状或是颗粒状)、什么颜色(亮黄、橘黄或是其他)的沉淀。在科学研究中仔细观察,特别注意未预期的实验现象是十分重要的,这些观察常常引起意外的发现,而且为了重复工作也需要准确的实验报告。使用精密仪器进行实验时,还应记录仪器的型号及编号。

现象及数据的记录必须真实,不可掺杂任何主观因素;切忌拼凑实验数据、结果。对于“不正常”的现象和数据更应如实记录,并分析查找原因。

现象及数据的记录可以与操作步骤的表格合在一起。实验记录不能用铅笔,须用钢笔或圆珠笔记录清楚,不要擦抹及修改,但可以划去重写。

5. 数据处理及结果分析:根据实验要求,整理、归纳数据后进行计算得出结果,包括根据实验数据及计算结果作出的各种图表(如曲线图、对照表等)及从图表得出的结果。

6. 讨论:讨论部分不是对结果的重述,而是对实验结果、实验方法和实验异常结果的分析和探讨,以及对实验设计的认识、体会及建议。

7. 结论:结论要简明扼要,以说明本次实验所获得的结果。

8. 怎样画图: 在许多实验中都有一个量如浓度、pH 值或温度, 在系统地变化着, 要测量的是此量对另一量的影响。已知量叫做自变量, 未知量叫做应变量。画图时, 习惯把自变量画在横轴上, 而把应变量画在纵轴上。下面列出一些作图的提示。

(1) 每图应有简洁的标题, 清楚地标明两个轴的名称及计量单位。

(2) 两轴均要标明刻度标记, 选用合适的单位, 使轴上数字不要太大, 且最好用简单数字标明轴上的标度。如使用 10 mmol/L 就比 0.01 mol/L 和 $10\,000 \text{ }\mu\text{mol/L}$ 要好。

(3) 为了清楚起见, 调整标度使斜度约为 45° 。

(4) 尽可能使各点间距离相等, 不要使各点挤在一起或距离太大。

(5) 根据不同的实验用光滑连续的曲线或直线连接各点。

(6) 若同一张图上有两条以上曲线, 应用不同的符号分别标明相应的测定点。

三、实验误差与提高实验准确度的方法

生物科学研究中常需要对组成生物体的几类主要化学物质如糖、脂肪、蛋白质、核酸、维生素、酶等进行定量测定。由于受分析方法、测量仪器、所用试剂和分析工作者等方面的限制, 测量值与客观存在的真实值很难完全一致, 即所有的测量都可能产生误差。了解这些误差的可能来源, 才能尽量减少误差、提高实验准确度。根据误差的性质和来源, 一般将误差分为系统误差和偶然误差两类。

(一) 系统误差及减少的方法

1. 系统误差:

系统误差是在测定过程中由某些经常发生的原因所造成的。它对测定结果的影响比较稳定, 在同一条件下重复测定中常重复出现, 使测定结果不是偏高就是偏低, 而且大小有一定规律, 它的大小与正负往往可以测定出来, 至少从理论上来说是可以测定的, 故又称可测误差。主要有以下 4 个方面的来源。

(1) 方法误差: 由采用的分析方法本身造成。如重量分析中沉淀物沉淀不完全或洗涤过程中少量溶解, 给分析测定结果带来负误差, 或由于杂质共沉淀以及称量时沉淀吸水, 引起正误差。又如滴定分析中, 剂量点和滴定终点不完全符合等。

(2) 仪器误差: 由仪器本身不够精密所产生, 如天平、砝码和量器皿本身不够准确, 或没有根据实验的要求选择一定精密度的仪器等。

(3) 试剂误差: 来源于试剂或蒸馏水所含微量杂质。

(4) 个人操作误差: 由于每个分析工作者掌握操作规程、控制条件与使用仪器常有出入而造成。如不同操作者对滴定终点颜色变化的分辨判断能力有差异, 个人视觉差异也常引起不正确读数。

2. 减少系统误差常采取的对策:

(1) 标准物对照: 在任何测试中, 甚至在使用标定仪器和基准试剂时, 都应使用待测物质的标准溶液。这种做法能对方法的准确度提供一种有用的检查, 因为测量所得数据必须落在真实值范围之内。标准溶液应与待测溶液用完全相同的方法处理, 此时可以画出一条能够指示用浓度测量物质质量变的标准曲线, 从待测溶液得到的测定值应落在标准曲线范围之内, 然后读出测定数值; 或者取标准物某一确定浓度的溶液与待测液以同样的方法、在相同条件下平行测定(标准物的组成最好与待测物相近, 含量也相近), 然后求平均值。

(2) 设置空白试验: 在任何测量实验中都应设置空白溶液作为对照, 以消除由于试剂中含有干扰杂质或溶液对器皿的侵蚀等所产生的系统误差。用等体积的蒸馏水代替待测液作为空白液, 并在相同条件下将空白液、待测液和标准液严格按照相同方法处理后同时进行平行测定, 所得结果称为空白值。它是由所用的试剂而不是待测物所造成的。将待测物的分析结果扣除空白值, 就可以得到比较准确的结果。

(3) 校正仪器。

(二) 偶然误差及减少的方法

偶然误差来源于某些难以预料的偶然因素, 或是由于取样不随机, 或是因为测定过程中某些不易控制的外界因素(如测定时环境、温度、湿度和气压的微小波动)的影响。同一实验者在同样条件下进行一系列测定时, 每一次测量的结果都略有不同, 这就是偶然误差。平均取样及多次取样进行平行测定, 并计算平均值, 可以有效地减少偶然误差。

第二章 生物化学实验基本操作

一、玻璃仪器的洗涤

生物化学实验所用玻璃仪器清洁与否,是获得准确结果的重要环节。因为玻璃仪器不清洁或被污染,会造成实验误差,得不到正确的实验结果。因此,实验之前,将玻璃仪器清洗干净(以倒置时壁上不挂水珠为准),是非常重要的准备工作。

1. 一般玻璃仪器的洗涤:凡能用毛刷刷洗的仪器(如试管、烧杯、量筒等),先用自来水刷洗,再用毛刷蘸取洗衣粉或去污粉将仪器内外(特别是内壁)仔细洗刷,用自来水冲洗干净后,再用蒸馏水刷洗2~3次,倒置于仪器架上晾干备用。

2. 凡不能用毛刷刷洗的量器(如刻度吸管、容量瓶等),应先用自来水冲洗、沥干,再用重铬酸钾清洁液浸泡4~6h(或过夜);从清洁液中取出并沥干后,用自来水冲洗干净,再用蒸馏水刷洗2~3次,倒置于量器架上晾干备用。

3. 新购量器表面常附有游离的碱性物质及泥污,可先用洗衣粉洗刷再用自来水洗净,然后浸泡在1%~2%盐酸溶液中过夜(不少于4h),再进一步洗涤,最后再用蒸馏水刷洗2~3次,倒置于仪器架上晾干备用。

二、吸量管的选择和使用

吸量管是生物化学实验中常用的量取液体的仪器,分为奥氏吸量管、移液管和刻度吸量管3种。我们常用到的是刻度吸量管,有不同的规格,如10ml、5ml、2ml、1ml、0.5ml、0.1ml等几种,可任意量取0.01~10ml的液体。其选择和使用方法如下。

1. 选择:使用前根据需选择适当的吸量管,其总容量最好等于或稍大于取液量。临用前看清容量和刻度。

2. 执管:用右手拇指及中指(辅以无名指),拿住吸量管的上部,用示指堵住管口控制液流,刻度数字要向着自己,切忌用大拇指堵住管口控制液流。

3. 取液:左手捏压洗耳球,将吸量管的尖端插入所取试剂液面下,将洗

耳球的下端出口对准吸量管上口,将液体轻轻吸上,至最高刻度上端 1~2 cm 处,迅速用示指按紧管上口,使液体不会从管下口流出。

4. 调准刻度:将吸量管从溶液中取出后,如果是取黏性较大的液体,必须先用滤纸擦干管尖外壁,然后用示指控制液流使之缓慢下降至所需刻度(此时液体弯月面底部、视线和刻度应在同一水平线上),右手示指立即按紧吸量管上口,使液体不再流出。

5. 放液:将吸量管转移至盛有所取溶液的容器内,让吸管尖端接触容器内壁,但不能插入容器原有液体中,以免污染吸管及试剂。放松示指,让液体自然流出。放液后吸管尖端残留的液体是吹出还是不吹出,视所选用的吸量管种类要求而定。需要吹的则将其吹出;如要求不吹出的则让吸量管尖端停靠内壁约 15 s,同时转动吸管,重复一次。

6. 洗涤:吸取血液、尿、组织样品及黏稠样品的吸管,用后应及时用自来水冲洗干净;吸一般试剂的吸管可不必马上冲洗,待实验结束后再仔细清洗。

三、可调式微量加样器的使用

在生物化学与分子生物学实验中常用可调式微量加样器来精确量取实验所需试剂,其规格有 20 μl 、100 μl 、200 μl 及 1 000 μl 等,选择相应规格的吸头,在规定的容量范围内可根据需要随意调节取液容量。可调式微量加样器的结构如图 2-1 所示,具体使用方法如下。

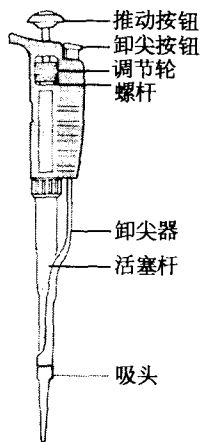


图 2-1 可调式微量加样器

1. 吸液:根据需要吸取的试剂量调准加样器容量,用右手握住加样器外壳,套上吸头,旋紧。用拇指按下推动按钮至第一段行程,将吸头尖口插入试剂液面下几毫米处,缓缓松开拇指,让推动按钮复原(图 2-2)。在吸取液体时要注意避免形成气泡,以保证取液的精确度。

2. 放液:重新将拇指按下推动按钮至第二段行程,完成放液,反复一次(图 2-3)。如果发现吸头尖口处仍残留有小液滴时,则应将吸头接触受器内壁,使液滴沿壁流下,同时拇指不能松开,以

免液滴倒流。

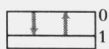


图 2-2 吸液操作示意图

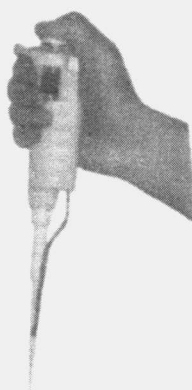
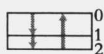


图 2-3 放液操作示意图

四、试管中液体的混匀法

生物化学实验常需将几种先后加入的试剂混匀,使其充分反应,因此“混匀”是生化实验中常用的基本操作技术。用于试管中液体混匀的方法主要有以下几种。

1. 甩动法: 是生物化学实验中最常用的方法。适用于试管中液体较少时,具体操作为右手持管上部,将试管轻轻甩动振摇即可将管内液体混匀。

2. 弹敲法: 右手持管上部,将试管的下部在左手掌心弹敲,也适用于试管中液体不多时。

3. 旋转法: 右手握住试管上端,五指握紧试管,利用腕力使试管向一个方向做圆周运动,使管内液体造成漩涡而混匀。适用于试管中液体较多时或小口器皿,如锥形瓶。

4. 吸管混匀法: 用清洁吸管将溶液反复吸放数次,使溶液充分混匀。适用于成倍稀释某种液体时。

5. 倒转法: 以大拇指隔着干净玻璃纸堵住管口,上下倒转数次,就可使液体充分混匀。适用于液体较多且损失少量液体不影响结果时。

6. 振荡器混匀: 将需要混合的液体装入容器内(液体约占容器的 $1/3$),手持容器于振荡器的工作台上即可将液体混匀。

7. 玻棒搅拌法: 如用上述方法尚不能将液体混匀,可用玻棒搅拌混匀之。

第二篇



常用生物化学实验技术