



全国普通高等医学院校药学类专业“十三五”规划教材

配套教材

(供药学类专业用)

生物化学

实验指导

□ 主编 杨 红

中国医药科技出版社



全国普通高等医学院校药学类专业“十三五”规划教材配套教材

生物化学实验指导

(供药学类专业用)

主 编 杨 红

副主编 李春梅 孙丽萍 熊 伟

编 者 (以姓氏笔画为序)

任 历 (辽宁医学院)

杨 红 (广东药学院)

赵 乐 (河南中医学院)

唐小龙 (安徽理工大学医学院)

孙丽萍 (北京中医药大学)

李春梅 (广东药学院)

栗学清 (长治医学院)

熊 伟 (大理大学基础医学院)

中国医药科技出版社

内 容 提 要

本书是全国普通高等医学院校药学类专业“十三五”规划教材《生物化学》的配套实验教材。全书共分四篇：第一篇生物化学实验及生物化学实验室基本要求；第二篇常用生物化学实验技术及其应用；第三篇基础性生物化学实验；第四篇综合性生物化学实验；既有经典的基础性生物化学实验和技术，又有与医药研究和生物化学临床实践密切结合的应用性和综合性生物化学实验。

本书可供高等医学院校药学类专业使用，也可供普通高等院校药学类、中药学类、生物制药各专业使用。

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学实验指导 / 杨红主编. — 北京 : 中国医药科技出版社, 2016. 2

全国普通高等医学院校药学类专业“十三五”规划教材配套教材

ISBN 978-7-5067-7929-6

I. ①生… II. ①杨… III. ①生物化学-化学实验-医学院校-教学参考资料
IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 026762 号

美术编辑 陈君杞

版式设计 郭小平

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲 22 号

邮编 100082

电话 发行: 010-62227427 邮购: 010-62236938

网址 www.cmstp.com

规格 787×1092mm $\frac{1}{16}$

印张 9

字数 206 千字

版次 2016 年 2 月第 1 版

印次 2016 年 2 月第 1 次印刷

印刷 三河市百盛印装有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978-7-5067-7929-6

定价 22.00 元

版权所有 盗版必究

举报电话: 010-62228771

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

全国普通高等医学院校药学类专业“十三五”规划教材

出版说明

全国普通高等医学院校药学类专业“十三五”规划教材,是在深入贯彻教育部有关教育教学改革和我国医药卫生体制改革新精神,进一步落实《国家中长期教育改革和发展规划纲要》(2010-2020年)的形势下,结合教育部的专业培养目标和全国医学院校培养应用型、创新型药学专门人才的教学实际,在教育部、国家卫生和计划生育委员会、国家食品药品监督管理总局的支持下,由中国医药科技出版社组织全国近100所高等医学院校约400位具有丰富教学经验和较高学术水平的专家教授悉心编撰而成。本套教材的编写,注重理论知识与实践应用相结合、药学与医学知识相结合,强化培养学生的实践能力和创新能力,满足行业发展的需要。

本套教材主要特点如下:

1. 强化理论与实践相结合,满足培养应用型人才需求

针对培养医药卫生行业应用型药学人才的需求,本套教材克服以往教材重理论轻实践、重化工轻医学的不足,在介绍理论知识的同时,注重引入与药品生产、质检、使用、流通等相关的“实例分析/案例解析”内容,以培养学生理论联系实际的应用能力和分析问题、解决问题的能力,并做到理论知识深入浅出、难度适宜。

2. 切合医学院校教学实际,突显教材内容的针对性和适应性

本套教材的编者分别来自全国近100所高等医学院校教学、科研、医疗一线实践经验丰富、学术水平较高的专家教授,在编写教材过程中,编者们始终坚持从全国各医学院校药学教学和人才培养需求以及药学专业就业岗位的实际要求出发,从而保证教材内容具有较强的针对性、适应性和权威性。

3. 紧跟学科发展、适应行业规范要求,具有先进性和行业特色

教材内容既紧跟学科发展,及时吸收新知识,又体现国家药品标准[《中国药典》(2015年版)]、药品管理相关法律法规及行业规范和2015年版《国家执业药师资格考试》(《大纲》、《指南》)的要求,同时做到专业课程教材内容与就业岗位的知识 and 能力要求相对接,满足药学教育教学适应医药卫生事业发展要求。

4. 创新编写模式,提升学习能力

在遵循“三基、五性、三特定”教材建设规律的基础上,在必设“实例分析/案例解析”

模块的同时，还引入“学习导引”“知识链接”“知识拓展”“练习题”（“思考题”）等编写模块，以增强教材内容的指导性、可读性和趣味性，培养学生学习的自觉性和主动性，提升学生学习能力。

5. 搭建在线学习平台，丰富教学资源、促进信息化教学

本套教材在编写出版纸质教材的同时，均免费为师生搭建与纸质教材相配套的“爱慕课”在线学习平台（含数字教材、教学课件、图片、视频、动画及练习题等），使教学资源更加丰富和多样化、立体化，更好地满足在线教学信息发布、师生答疑互动及学生在线测试等教学需求，提升教学管理水平，促进学生自主学习，为提高教育教学水平和质量提供支撑。

本套教材共计 29 门理论课程的主干教材和 9 门配套的实验指导教材，将于 2016 年 1 月由中国医药科技出版社出版发行。主要供全国普通高等医学院校药学类专业教学使用，也可供医药行业从业人员学习参考。

编写出版本套高质量的教材，得到了全国知名药学专家的精心指导，以及各有关院校领导和编者的大力支持，在此一并表示衷心感谢。希望本套教材的出版，将会受到广大师生的欢迎，对促进我国普通高等医学院校药学类专业教育教学改革和药学类专业人才培养作出积极贡献。希望广大师生在教学中积极使用本套教材，并提出宝贵意见，以便修订完善，共同打造精品教材。

中国医药科技出版社
2016 年 1 月

全国普通高等医学院校药学类专业“十三五”规划教材

书 目

序号	教材名称	主编	ISBN
1	高等数学	艾国平 李宗学	978-7-5067-7894-7
2	物理学	章新友 白翠珍	978-7-5067-7902-9
3	物理化学	高 静 马丽英	978-7-5067-7903-6
4	无机化学	刘 君 张爱平	978-7-5067-7904-3
5	分析化学	高金波 吴 红	978-7-5067-7905-0
6	仪器分析	吕玉光	978-7-5067-7890-9
7	有机化学	赵正保 项光亚	978-7-5067-7906-7
8	人体解剖生理学	李富德 梅仁彪	978-7-5067-7895-4
9	微生物学与免疫学	张雄鹰	978-7-5067-7897-8
10	临床医学概论	高明奇 尹忠诚	978-7-5067-7898-5
11	生物化学	杨 红 郑晓珂	978-7-5067-7899-2
12	药理学	魏敏杰 周 红	978-7-5067-7900-5
13	临床药物治疗学	曹 霞 陈美娟	978-7-5067-7901-2
14	临床药理学	印晓星 张庆柱	978-7-5067-7889-3
15	药物毒理学	宋丽华	978-7-5067-7891-6
16	天然药物化学	阮汉利 张 宇	978-7-5067-7908-1
17	药物化学	孟繁浩 李柱来	978-7-5067-7907-4
18	药物分析	张振秋 马 宁	978-7-5067-7896-1
19	药用植物学	董诚明 王丽红	978-7-5067-7860-2
20	生药学	张东方 税丕先	978-7-5067-7861-9
21	药剂学	孟胜男 胡容峰	978-7-5067-7881-7
22	生物药剂学与药物动力学	张淑秋 王建新	978-7-5067-7882-4
23	药物制剂设备	王 沛	978-7-5067-7893-0
24	中医药学概要	周 晔 张金莲	978-7-5067-7883-1
25	药事管理学	田 侃 吕雄文	978-7-5067-7884-8
26	药物设计学	姜凤超	978-7-5067-7885-5
27	生物技术制药	冯美卿	978-7-5067-7886-2
28	波谱解析技术的应用	冯卫生	978-7-5067-7887-9
29	药学服务实务	许杜娟	978-7-5067-7888-6

注：29 门主干教材均配套有中国医药科技出版社“爱慕课”在线学习平台。

全国普通高等医学院校药学类专业“十三五”规划教材

配套教材书目

序号	教材名称	主编	ISBN
1	物理化学实验指导	高 静 马丽英	978 - 7 - 5067 - 8006 - 3
2	分析化学实验指导	高金波 吴 红	978 - 7 - 5067 - 7933 - 3
3	生物化学实验指导	杨 红	978 - 7 - 5067 - 7929 - 6
4	药理学实验指导	周 红 魏敏杰	978 - 7 - 5067 - 7931 - 9
5	药物化学实验指导	李柱来 孟繁浩	978 - 7 - 5067 - 7928 - 9
6	药物分析实验指导	张振秋 马 宁	978 - 7 - 5067 - 7927 - 2
7	仪器分析实验指导	余邦良	978 - 7 - 5067 - 7932 - 6
8	生药学实验指导	张东方 税丕先	978 - 7 - 5067 - 7930 - 2
9	药剂学实验指导	孟胜男 胡容峰	978 - 7 - 5067 - 7934 - 0

前言

PREFACE

21 世纪是生命科学的世纪，生物化学是当代生命科学领域中一门重要的基础学科，它涵盖的基础理论、基本知识、基本技术与医药学各学科领域密切相关。生物化学也是一门实验性很强的学科，因此，生物化学实验是药学类及其相关专业学生必修的一门基础性实验课程，它重在培养学生的创新思维能力、动手能力和团队协作能力，为学生日后的科学探索和医药学实践打好基础。

《生物化学实验指导》是根据全国普通高等医学院校药学类专业“十三五”规划教材的编写原则与要求，按照普通高等医学院校药学类（本科）专业的培养目标编写而成，是理论课《生物化学》的配套实验教材。全书分四篇：第一篇生物化学实验及生物化学实验室基本要求，第二篇常用生物化学实验技术及其应用，第三篇基础性生物化学实验，第四篇综合性生物化学实验；既有经典的基础性生物化学实验和常用技术，又有与医药研究和生物化学临床实践紧密结合的应用性和综合性实验，理论与实践相结合，有利于培养学生正确的科研思维能力和实践技能，提高学生的综合素质。

在编写本教材过程中，得到了各参编院校的大力支持及合作，在此一并表示衷心感谢。

由于编者水平有限，难免存在不妥和不足之处，敬请各位同行专家、广大师生和其他读者们批评指正。

编者

2015 年 12 月

目录

CONTENTS

第一篇 生物化学实验及实验室基本要求	1
一、生物化学实验室规则、要求及注意事项	1
二、生物化学实验记录和实验报告	2
三、生物化学实验基本操作	2
第二篇 常用生物化学实验技术及其应用	6
一、电泳技术	6
二、分光光度技术	11
三、色谱技术	16
四、离心技术	22
五、透析技术	28
第三篇 基础性生物化学实验	30
第一章 蛋白质含量的测定	30
实验一 蛋白质含量的测定——紫外分光光度法	30
实验二 蛋白质含量的测定——微量凯氏定氮法	31
实验三 蛋白质含量的测定——福林-酚试剂法 (Lowry 法)	34
实验四 蛋白质含量的测定——双缩脲法	36
实验五 蛋白质含量的测定——考马斯亮蓝法	38
实验六 蛋白质含量的测定——二喹啉甲酸法 (BCA 法)	40
第二章 蛋白质的分离及鉴定	43
实验七 聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离血清蛋白质	43
实验八 醋酸纤维素薄膜电泳法分离血清蛋白质	46
实验九 醋酸纤维素薄膜电泳法分离血清乳酸脱氢酶同工酶	50
实验十 蛋白质的盐析作用	53
实验十一 蛋白质的沉淀反应	54
实验十二 蛋白质的呈色反应——茚三酮呈色反应	57
实验十三 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质分子量	58

实验十四 凝胶色谱法测定蛋白质分子量	61
实验十五 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳法测定蛋白质等电点	64
第三章 酶的性质及活性测定	68
实验十六 酶的性质——酶的特异性（专一性）	68
实验十七 影响酶促反应速度的因素——底物浓度、酶浓度	69
实验十八 影响酶促反应速度的因素——温度、pH 值	73
实验十九 影响酶促反应速度的因素——抑制剂、激活剂	74
实验二十 酶的竞争性抑制作用	76
实验二十一 碱性磷酸酶 K_m 值的测定	78
实验二十二 乳酸脱氢酶及其辅酶 I 的作用	80
实验二十三 血清谷丙转氨酶活性的测定	81
第四章 核酸的分离及鉴定	84
实验二十四 离心提取动物组织中的 DNA 和 RNA	84
实验二十五 核酸的定性分析	85
实验二十六 琼脂糖凝胶电泳法分离 DNA	88
第五章 生物化学相关指标的检测	90
实验二十七 血清葡萄糖的测定——葡萄糖氧化酶偶联法	90
实验二十八 胰岛素、肾上腺素对家兔血糖含量的影响	91
实验二十九 肝糖原的提取与定性	93
实验三十 饱食和饥饿大白鼠肝糖原含量的比较	94
实验三十一 血清三酰甘油的测定	96
实验三十二 琼脂糖凝胶电泳法测定血清脂蛋白	98
实验三十三 血清总胆固醇的测定	100
实验三十四 维生素 C 含量的测定——2,6-二氯酚靛酚滴定法	103
实验三十五 葡聚糖凝胶过滤法分离葡聚糖和重铬酸钠	105
实验三十六 纸色谱法验证肝组织的转氨基作用	106
实验三十七 二乙酰-茚三酮法测定血清尿素	110
实验三十八 磷钨酸还原法测定血清尿酸	112
实验三十九 改良 J-G 法测定血清总胆红素和结合胆红素	114
第四篇 综合性生物化学实验	117
实验四十 大肠杆菌质粒的提取与 PCR 鉴定	117
实验四十一 口腔拭子基因组 DNA 提取（试剂盒法）及琼脂糖凝胶电泳检测	121
实验四十二 食物中维生素 C 的提取和含量测定	123
实验四十三 血清 γ -球蛋白的分离、纯化与鉴定	126
实验四十四 脲酶的凝胶过滤提取及分离纯化	130
参考文献	134

第一篇 生物化学实验及 实验室基本要求

一、生物化学实验室规则、要求及注意事项

(一) 实验室规则

1. 实验室是进行科学实验的场所，在实验室工作时应该自觉遵守纪律，维护课堂秩序，不迟到，不早退。
2. 进入实验室必须穿好实验服，不准穿拖鞋进入实验室。实验室内严禁饮食、吸烟或打闹。一切化学药品禁止入口。
3. 保持实验环境和仪器的整洁，试剂、仪器排列有序，严格按操作规程洗刷仪器和量取试剂，注意节约，不要浪费药品和试剂。实验完毕要按各类仪器的清洗方法和要求将仪器清洗干净。
4. 爱护仪器，细心操作，发现损坏要及时报告教师并按有关规定处理。
5. 使用试剂前应仔细辨认标签，看清名称及浓度，是否为本实验所需要。
6. 取出试剂后，立即将瓶塞盖好，切勿盖错，并将试剂瓶放回原处。试剂瓶塞、专用吸量管、滴管不得与试剂瓶分离，以免错用而污染试剂，造成自己或他人实验的失败。未用完的试剂不得倒回瓶内。
7. 所有实验材料及废弃物不得随意丢弃。有毒试剂、强腐蚀性试剂及实验废弃的有毒药品严禁倒入下水道或生活垃圾处，必须经分类回收后统一处理。
8. 实验完毕后应将试验台整理干净，试剂瓶要摆放整齐，洗净双手；安排值日生打扫实验室卫生，关闭水、电等的开关后，经教师验收后才能离开实验室。

(二) 实验要求

1. 实验前认真预习实验指导和相关理论，明确实验目的、原理、预期的结果、操作关键步骤及注意事项。
2. 实验中认真听课，按要求操作，认真观察实验过程中出现的现象和结果，如实做好原始记录。结果不良时，必须认真分析后重做。
3. 实验结束后要及时对实验结果进行科学分析，按时将实验报告交教师评阅。

(三) 注意事项

1. 低沸点有机溶剂，如乙醚、石油醚、乙醇等均系易燃物品，使用时应禁明火，远离火源，若需加热要用水浴加热，不可直接在火上加热。
2. 凡能产生有毒气体或烟雾的化学实验，均应在通风柜内进行，以免对人体造成危害。

3. 若发生酸、碱灼伤事故,先用大量自来水清洗,酸灼伤者用饱和 NaHCO_3 溶液中和,碱灼伤者用饱和 H_3BO_3 溶液中和,氧化剂伤害者用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理。
4. 若发生起火事件,根据发生起火性质分别采用砂、水、 CO_2 或 CCl_4 灭火器扑灭。
5. 离开实验室必须关好窗户,切断电源、水源,以确保安全。

二、生物化学实验记录和实验报告

(一) 实验记录要求

实验中观察到的现象、结果和数据,应及时、准确、如实、详尽、清楚地记录在记录本上,它是实验过程的原始资料,也是书写实验报告的依据。简单的实验记录应包括实验日期、室温、题目(内容)、现象及结果(包括计算结果及各种图表)。使用精密仪器进行实验时还应记录仪器的型号及编号。若发现实验结果与预期结果不一致时,应尊重客观事实,真实记录,认真分析讨论原因,总结经验教训。

表格式的记录方式简练而清楚,值得提倡使用。记录时字迹必须清楚,不提倡使用易于涂改或消褪的笔墨做原始记录。实验记录不能擦抹或涂改,写错时可划去重写或保留原错处并在其后加以说明。自觉培养一丝不苟的严谨科学作风。

(二) 实验报告要求

实验结束后,应及时整理和总结实验结果,书写实验报告。实验报告是实验的汇报和总结,通过实验报告的书写可以总结经验,学会处理各种实验数据的方法,加深对有关生物化学原理和实验技术的理解和掌握,同时也是学习撰写科学研究论文的过程。

一个完整的实验报告应包括实验名称、日期、目的、原理、试剂和仪器、操作方法、结果及计算、讨论、结论等内容。在实验报告中,实验目的、原理、设备、试剂及操作方法等部分应简明扼要的叙述,不需要照抄实验指导书或实验讲义,但要写得清楚明白,以便他人能够重复;实验结果及计算部分除了包括实验现象和结果的原始记录,还应包括根据实验要求整理、归纳后进行计算的过程及计算结果,以及根据实验数据及计算做出的各种图表(如曲线图、对照表等);讨论部分不是对结果的重述,而是对实验结果、实验方法和异常现象进行探讨和评论,以及对实验设计的认识、体会及建议,对实验课的改进意见等;结论部分要简明扼要地说明本次实验所获得的结果。

三、生物化学实验基本操作

(一) 玻璃仪器的洗涤

生物化学实验常用各种玻璃仪器,其清洁程度将直接影响实验结果的可靠性。因此,玻璃仪器的清洁不仅是实验前后的常规工作,也是一项重要的基本技术。

玻璃仪器的清洗方法很多,需要根据实验的要求,以及污物的性质选用不同的清洁方法。

1. 新购玻璃仪器的清洗 新购玻璃仪器表面附着油污和灰尘,特别是附着有可游离的金属离子。因此,新购仪器需要用肥皂水刷洗,流水冲净后,浸于 10% Na_2CO_3 溶液中煮沸 10 分钟;用流水冲净后,再浸泡于 1%~2% HCl 溶液中过夜;流水洗净酸液,用蒸馏水少量多次冲洗后,干燥备用。

2. 使用过的玻璃仪器的清洗

(1) 一般非计量玻璃仪器或粗容量仪器 如试管、烧杯、量筒等先用肥皂水刷洗,再用

自来水冲洗干净，最后用蒸馏水冲洗 2~3 次后，干燥备用。

(2) 容量分析仪器 如吸量管、滴定管、容量瓶等，先用自来水冲洗，沥干后，浸于重铬酸洗液浸泡数小时，然后用自来水和蒸馏水冲洗干净，干燥备用。

(3) 比色杯等 用毕立即用自来水反复冲洗，蒸馏水洗净晾干；如有污物黏附于杯壁，宜用盐酸或适当溶剂清洗，然后用自来水、蒸馏水冲洗干净晾干备用。切忌用刷子、粗糙的布或滤纸等擦拭。

(二) 吸量管的种类和使用

吸量管是生化实验最常用的仪器之一，测定的准确度与吸量管的正确选择和使用有密切关系。

1. 吸量管的分类 常用的吸量管可以分为三类(图 1)。

(1) 奥氏吸量管 供准确量取 0.5ml、1.0ml、2.0ml 和 3.0ml 液体所用。此种吸量管只有一个刻度，当放出所量取的液体时，管尖余留的液体必须吹入容器内。

(2) 移液管 常用来量取 50ml、25ml、10ml、5ml、2ml、1ml 的液体，这种吸量管只有一个刻度，放液时，量取的液体自然流出后，管尖需在盛器内壁停留 15 秒钟，注意管尖残留液体不要吹出。

(3) 刻度吸量管 供量取 10ml 以下任意体积的溶液。若吸量管上端标有“吹”字或“◇”型符号，则刻度包括尖端部分，所量液体全部放出后，还需要吹出残留于管尖的溶液，此类吸量管为“吹出式”；若未标“吹”字的吸量管，则不应吹出管尖的残留液体；此外，还有一种标有“快”字的吸量管，应使残液自然流下。

2. 吸量管的使用

(1) 选用原则 准确量取整数量液体，应选用奥氏吸量管。量取大体积时要用移液管。量取任意体积的液体时，应选用取液量最接近的刻度吸量管。如欲取 0.15ml 液体，应选用 0.2ml 的刻度吸量管。同一定量实验中，同种试剂的移取，应选择一支与最大取液量接近的刻度吸量管。如各试管应加的试剂量为 0.30ml、0.50ml、0.70ml、0.90ml 时，应选用一支 1.0ml 刻度吸量管。

(2) 吸量管的使用 使用吸量管时，先调整刻度朝向操作者，用一只手的拇指和中指夹近顶端部分，将管的下端插入液体（插入液面的部分不可太深，也不可太浅，防止空气突然进入管内或将溶液吸入吸耳球内），另一手持吸耳球吸取液体到需要刻度标线上 1~2cm 处，然后移开吸耳球并迅速用示指封闭上口，同时将刻度吸量管提出液面，且使管内液体凹面最低处与眼睛处于同一水平线上，再通过控制示指与管上端的紧密度调节管内液体的量，最后再将吸量管移到另一容器，吸量管下端靠在容器内壁上，垂直放液（图 2），放液结束后静置 10 秒，并根据规定吹出或不吹出尖端的液体。

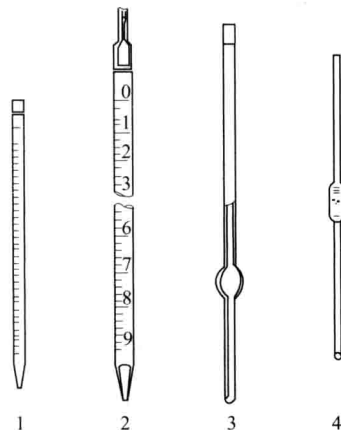


图 1 三类吸量管

1, 2. 刻度吸量管; 3. 奥氏吸量管; 4. 移液管

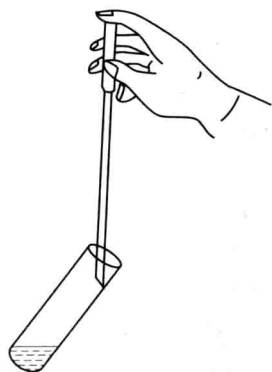


图 2 放液时的姿势

3. 可调式移液器的使用

(1) 可调式移液器的结构 如图3所示。



图3 可调式移液器的结构及其使用姿势

注：推动按钮内部的活塞分2段行程，第一挡为吸液，第二挡为放液，手感十分清楚。

(2) 可调式移液器的操作 首先选取与量取液体体积最接近的移液器，调节至所需体积值，套上吸头并旋紧，垂直持握可调式移液器并用大拇指按至第一挡，然后将吸头插入溶液中，徐徐松开大拇指使其复原，再将移液器移出液面，必要时可用纱布或滤纸拭去附于吸头表面的液体（注：不要接触吸头孔口）。放液时，将大拇指按下至第一挡后，继续按至第二挡以排空吸头内的液体。移取不同样品时，需更换新吸头。

(三) 混匀

样品和试剂的混匀是保证化学反应充分进行的一种有效措施。为使反应体系内各物质迅速充分地接触，必须借助于外力的机械作用。常用的混匀方法有以下几种。

1. 旋转法 手持容器，使溶液做离心旋转，适用于未盛满液体的试管或小口器皿，如锥形瓶。

2. 指弹法 一手执试管上端，另一只手轻弹试管的下部，使管内溶液做漩涡运动。

3. 搅动法 使用玻璃棒搅匀，多用于溶解烧杯中的固体。

4. 电磁搅拌混匀 使用磁力搅拌器混匀，利用磁场变换带动容器内转子旋转而使管内溶液做漩涡运动。

5. 振荡器法 将容器置于振荡器的振动盘上，逐渐用力下压，使内容物旋转。

注意：混匀时谨防容器内液体溅出或被污染；严禁用手堵塞管口或瓶口振荡。

(四) 保温

生物化学反应常常需要保持某个特定的温度和一定的时间，实验室中常用恒温水浴箱达到此目的。水浴箱使用前一定要先注入适量清水，调节温度至所需，待水温达到设定温度时将容器放入恒温水浴箱。

注意：水浴箱中水位不可过低，实验过程中要随时监测温度，并及时调节。另外，水浴箱内要保持清洁，定期洗刷，防止生锈、漏水、漏电。水浴箱内的水要定期更换，如较长时间停用，水浴箱内的水要全部放掉并用布擦干，以免生锈。

(五) 过滤

用于收集滤液、沉淀或洗涤沉淀。在生化实验中，如需收集滤液应选用干滤纸，而不应

将滤纸先弄湿（湿滤纸将影响滤液的稀释比例）。滤纸过滤一般采用平折法（即对折后，再对折），然后使滤纸上缘与漏斗壁完全吻合，不留缝隙；再向漏斗内加液时，需沿着玻璃棒导入且加液速度不应过快，勿使液面超过滤纸上缘。较粗的过滤可用脱脂棉或纱布代替滤纸。有时以离心沉淀法代替过滤法可达到省时、快捷的目的。

（杨 红）

第二篇 常用生物化学 实验技术及其应用

一、电泳技术

(一) 概述

电泳 (electrophoresis, EP) 是指带电颗粒在电场中向着与其所带电荷极性相反方向移动的现象。许多重要的生物分子, 如氨基酸、多肽、蛋白质、核苷酸、核酸等都具有可电离基团, 在特定的 pH 值下因带正电或负电而在电场中移动。电泳技术就是以此为基础而建立的一种分离鉴定技术。待分离样品中各种颗粒带电性质以及分子本身大小、形状等性质的差异, 其在电场中的迁移速度不同, 从而得以分离或鉴定。

电泳现象早在 19 世纪初就被人们发现, 到 20 世纪初 Field 及 Teague 曾研究过白喉毒素在琼脂中的电泳, 但未引起人们的重视。直到 1937 年瑞典生物化学家 Arne Tiselius 建立了“移动界面电泳法” (moving boundary EP), 并对血清蛋白质进行了电泳, 把血清蛋白质分成清蛋白、 α -球蛋白、 β -球蛋白、 γ -球蛋白四种。1948 年 Arne Tiselius 因研究电泳和血清蛋白质分离技术获诺贝尔化学奖。20 世纪 60~70 年代, 自滤纸、醋酸纤维素薄膜、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等介质相继引入电泳之后, 电泳技术得到迅速发展。20 世纪 80 年代发展起来的毛细管电泳技术是化学和生物化学分析鉴定技术的重要发展, 已受到人们的充分重视。由于电泳技术具有操作简单、快速、灵敏等优点, 故已在生物化学、分子生物学、医学、药学、食品、农业环保等学科得到广泛应用, 并成为蛋白质、核酸分析鉴定的主要技术之一。

(二) 原理

任何一种物质颗粒, 若含有在溶液中能被解离的基团或其表面对其他带电粒子具有吸附作用, 那么该物质在溶液中就带有一定量的电荷, 在电场中必然会向着与其所带电荷极性相反方向移动, 这种现象称为电泳现象。电泳时不同的带电颗粒在同一电场中移动速度不同, 带电颗粒 (主要指球形分子) 在电场中的电泳速度 (V)

$$V = \frac{QE}{6\pi r\eta} \quad (1)$$

从式 (1) 看出, 带电颗粒在电场中的电泳速度 (V) 与颗粒带电荷量 (Q) 和电场强度 (E) 成正相关, 与球形分子的大小 (半径为 r) 和所在介质的黏度 (η) 成反比。因此, 在同一电场、同一介质中进行电泳时, 电量和半径大小各不相同的颗粒就可以通过电泳而被分离。带电颗粒在单位电场强度下的电泳速度常用电泳迁移率 (move rate, M) 来表示, 它是带电颗粒的电泳特性, 即各种带电颗粒在一定条件下测得的迁移率是一个常数。

$$M = \frac{V}{E} = \frac{Q}{6\pi r\eta} \quad (2)$$

由式(2)可见,带电颗粒的净电荷越多,颗粒半径越小,在电场中的迁移率就越快;反之,越慢。

影响电泳的主要因素如下。

1. 带电颗粒的性质 带电颗粒的分子大小、颗粒形状、空间构象、所带净电荷数量是影响电泳迁移率的首要因素。一般来说,颗粒所带净电荷越多,直径小而近于球形,则电泳迁移率越快;反之,颗粒形状越大,与支持物介质摩擦力越大,电泳迁移率则越慢。电泳迁移率与颗粒表面电荷呈正相关,与介质黏度及颗粒半径呈负相关。然而在实际电泳中,带电颗粒的电泳迁移率总是比在理想的稀溶液中要低些,这是因为电泳中使用的是具有一定浓度的缓冲溶液,带电荷的颗粒在电解质缓冲溶液中将带有相反电荷的离子吸引到其周围,形成离子扩散层。在电场中,当颗粒向相反电极移动时,离子扩散层所带有的过剩电荷向颗粒泳动的反方向移动,结果,颗粒与离子扩散层之间的静电引力使颗粒的泳动速度减慢。另外,分子颗粒表面有一层水化膜,在电场影响下,它与颗粒一起移动,可以认为是颗粒的一部分。

2. 缓冲液的 pH 值 缓冲液的 pH 值是决定带电颗粒的解离程度,即可决定该物质的带电量(Q)。对于蛋白质、氨基酸、核酸等两性电解质来说, pH 值小于等电点(pI),分子带正电荷,向负极泳动;如果 pH 大于 pI,分子带负电荷,向正极泳动。缓冲液的 pH 值偏离 pI 越远,分子所带净电荷越多,其电泳迁移率越快;反之,则越慢。当缓冲液 pH 值等于其 pI 时,分子所带净电荷为零,不移动。因此,在电泳时,应根据样品性质选择合适 pH 值的缓冲液。通常所用的缓冲液的成分是甲酸盐、乙酸盐、枸橼酸盐(柠檬酸盐)、磷酸盐、硼酸盐、巴比妥盐和 trihydroxymethyl aminomethane, Tris) 缓冲液等,要求缓冲液的性质稳定,不易电解。

3. 缓冲液的离子强度 若离子强度低,电泳迁移率快,则分离区带不清晰;若离子强度高,电泳迁移率慢,则区带分离清晰。如离子强度过低,缓冲液的缓冲量小,不易维持 pH 的恒定;离子强度过高,则降低蛋白质的带电量,使电泳迁移率减慢。所以,对缓冲液离子强度的选择,必须两者兼顾,一般常用缓冲液的离子强度在 0.02~0.2。

4. 电场强度的影响 电场强度和电泳迁移率成正比关系。电场强度以每厘米的电势差计算(V/cm),也称电势梯度。如果以滤纸作为支撑物,电泳的滤纸长 15cm,两端电压(电势差)为 150V,则电场强度为 $150\text{V}/15\text{cm}=10\text{V}/\text{cm}$,电场强度愈高,则带电粒子的移动愈快,但随着电场强度的增高,电流强度增加,产热也增多。产热的不良后果是:①引起水的蒸发,改变缓冲液 pH 值和离子强度;②引起介质温度高,可使蛋白质变性。因此,电泳必须控制电压在一定范围之内,电压在 500V 以上,电场强度在 20~200V/cm 时为高压电泳,当进行高压电泳时,应装备有效的冷却装置。

5. 支持物 电泳支持物要求是具有较大惰性的材料,且不与被分离的样品或缓冲液起化学反应;此外,还要求具有一定的坚韧度,不易断裂,容易保存。由于支持物的结构对分离物的电泳迁移率有很大影响,所以对支持物的选择应取决于被分离物质的类型。多数电泳都有支持物,如醋酸纤维素薄膜电泳、琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳,然而支持物的结构与性质对带电颗粒的迁移率有很大影响,主要表现为对样品的吸附,产生电渗与分子筛效应。支持物对样品的吸附,使带电颗粒泳动过程中,摩擦力增加,一方面降低了迁移速度,另一方面导致样品拖尾,故使分辨率下降。

在电场中,由于支持物吸附缓冲液中的水分子使支持物表面相对带电,在电场作用下,溶液就向一定方向移动,此种现象称为电渗。如纸电泳所用的滤纸纤维素带有负电荷;琼脂