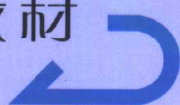


高等院校生命科学与技术实验教材

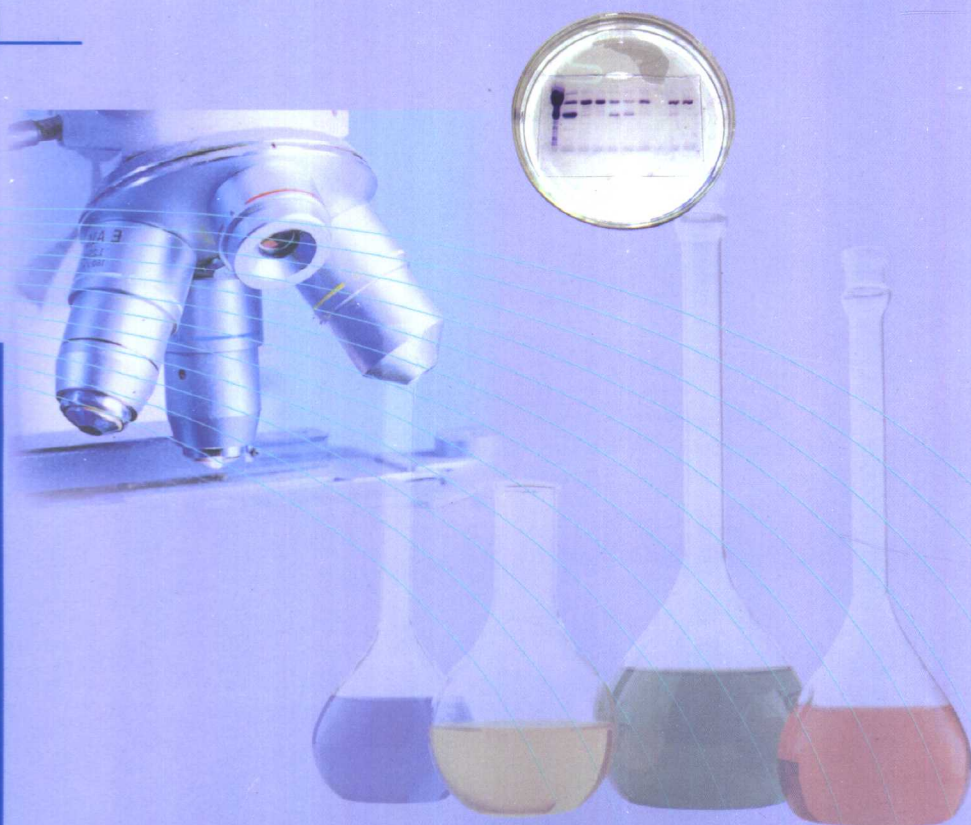


# 生物化学

# 实验指导

The Practical Approach  
of Biochemistry

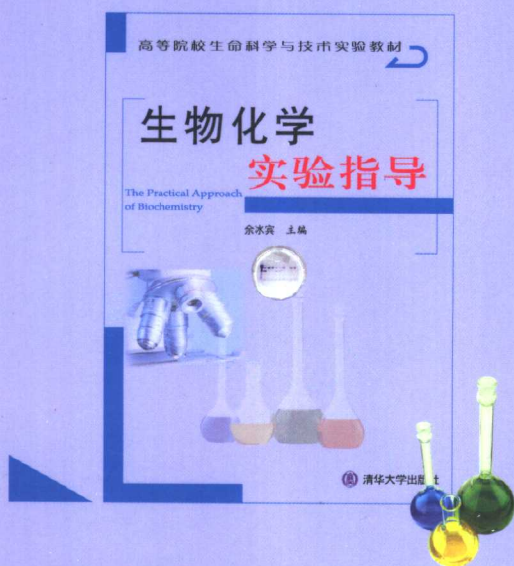
余冰宾 主编



清华大学出版社

□责任编辑 罗 健 □封面设计 吴朝洪

高等院校生命科学与技术实验教材



本书理论部分包括生物大分子制备、层析技术、电泳技术、离心技术、分光光度技术及免疫化学技术；实验部分除了原理和实验步骤外，还有思考题。本教材末的附录还包括了生物化学仪器常规操作规程。一些与实验相关的英文资料、优秀学生实验报告举例及生物化学试剂的配制等内容见本书所附光盘。

**G**aodeng Yuanxiao  
**S**hengming Kexue Yu Jishu Shiyao Jiaocai

ISBN 7-302-07519-0



9 787302 075196 >  
定价：28.00 元(含光盘)



本书附赠光盘

高等院校生命科学与技术实验教材

# 生物化学实验指导

主 编 余冰宾  
编著者 余冰宾 段明星 周广业  
陈坚刚 徐 峰

清华大学出版社  
北 京

## 内 容 简 介

本教材是在十多年生物化学实验教学的基础上,为本科生和研究生的生物化学实验课编写的。教材的理论部分包括生物大分子的制备、层析技术、电泳技术、离心技术、分光光度技术及免疫化学技术;实验部分除了一些生物化学基础实验外,还列举了有关酶的综合大实验及免疫化学实验;一些与实验相关的英文资料及优秀学生实验报告举例见本书所附光盘。书末的附录还包括了生物化学常规仪器设备的操作规程、常用试剂和溶液的配制以及常用数据列表等内容。

### 图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验指导/余冰宾等编著. —北京:清华大学出版社,2003

(高等院校生命科学与技术实验教材)

ISBN 7-302-07519-0

I. 生… II. 余… 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(2003)第 098896 号

出 版 者: 清华大学出版社

<http://www.tup.com.cn>

社 总 机: 010-62770175

地 址: 北京清华大学学研大厦

邮 编: 100084

客户服务: 010-62776969

责任编辑: 罗 健

封面设计: 吴朝洪

印 刷 者: 北京市昌平环球印刷厂

装 订 者: 北京国马印刷厂

发 行 者: 新华书店总店北京发行所

开 本: 185×260 印 张: 16.25 字 数: 368 千字

版 次: 2004 年 1 月第 1 版 2004 年 1 月第 1 次印刷

书 号: ISBN 7-302-07519-0/Q·35

印 数: 1~4000

定 价: 28.00 元(含光盘)

---

本书如存在文字不清、漏印以及缺页、倒页、脱页等印装质量问题,请与清华大学出版社出版部联系调换。联系电话:(010)62770175-3103 或(010)62795704

原《生物化学实验技术讲义》，自1989年编写以来，一直作为清华大学生物系本科生及研究生的实验教材，受到学生欢迎。研究生的“现代生命科学与生物技术实验”课与本科生的生化大实验(一)(96学时)和(二)(120学时)作为生物化学系列实验课，1996年曾获得清华大学教学工作优秀成果奖一等奖和北京市的二等奖(在清华大学13项二等奖中排名第一)。1997年6月在清华大学召开的全国生物学、心理学“理科基地”工作研讨会上，曾受到教委高教司领导的推荐和表扬。“兔肌酸激酶的分离纯化及部分性质的测定”综合大实验，获1998年清华大学实验技术成果一等奖。

这次重新编写《生物化学实验指导》教材并出版，主要想为更多的对生物化学实验感兴趣的读者，提供一本参考书或工具书。自2000年以来，我们对“生物化学实验技术”课进行了一些教学改革，实施部分实验内容的英文教学，要求学生们用英文书写实验报告。编写过程中，我们很想在该教材的“实验部分”后面，附一些优秀的学生实验报告(英文)，但因为排版等因素未能如愿，故在该教材所附的光盘中，补充了近两年学生英文实验报告举例以及相关的英文教学内容，仅供读者们参考。

清华大学生物系周广业教授为本教材的出版倾注了心血，原《生物化学实验技术讲义》的最初原稿均由他亲自编写；段明星教授编著了该教材“层析技术”及相关实验部分的主要内容；陈坚刚老师为该教材的仪器图片及仪器操作规程的整理做了大量的工作；助教博士生徐峰花费了许多时间和精力修正该教材全部插图及表格。在此，对他们表示深深的感谢！另外，编写过程中，我们参考了已出版的国内外生物化学实验技术方面的书籍，谨向这些编者致以诚挚的谢意！

敬请读者给本教材提出宝贵的意见和建议，以利于我们再版时进一步地提高和修正。

清华大学生物系 副教授  
牛津大学生化系 博士  
余冰宾

2003年8月于清华园

理论部分

1 绪论 .....	3
1.1 生物化学实验技术发展简史 .....	3
1.2 实验室规则 .....	6
1.3 实验室安全及防护知识 .....	7
1.3.1 着火 .....	7
1.3.2 爆炸 .....	8
1.3.3 中毒 .....	8
1.3.4 外伤 .....	9
1.3.5 触电 .....	9
1.4 实验记录与实验报告 .....	10
1.4.1 实验记录 .....	10
1.4.2 实验报告 .....	10
1.5 实验室基本操作 .....	11
1.5.1 玻璃仪器的清洗 .....	11
1.5.2 塑料器皿的清洗 .....	12
1.5.3 洗液的配制 .....	12
1.5.4 其他洗涤液 .....	12
1.5.5 玻璃和塑料器皿的干燥 .....	12
1.5.6 移液 .....	13
1.6 缓冲溶液与 pH 值测定 .....	16
1.6.1 基本概念 .....	16
1.6.2 生物化学常用缓冲液 .....	18

1.6.3	pH 值的测定 .....	19
1.7	生物化学实验室的基本设施与装备 .....	22
1.7.1	温度与环境设施 .....	22
1.7.2	实验室用纯水 .....	22
1.7.3	消毒系统 .....	23
1.7.4	计量系统 .....	23
1.7.5	离心设备 .....	23
1.7.6	电泳装置 .....	23
1.7.7	层析装置 .....	23
1.7.8	光密度仪 .....	24
1.7.9	真空印迹系统 .....	24
1.7.10	核酸自动合成仪与测序仪 .....	24
1.7.11	蛋白质的自动合成与测序仪 .....	24
1.7.12	PCR 仪 .....	24
1.7.13	核素实验设施 .....	24
1.7.14	生物培养设施 .....	24
1.7.15	基因导入仪 .....	25
1.7.16	高效液相色谱仪和毛细管电泳仪 .....	25
1.7.17	暗室 .....	25
1.7.18	冷室 .....	25
1.7.19	其他设备 .....	25
	思考题 .....	26
2	生物大分子的制备 .....	27
2.1	概述 .....	27
2.2	生物大分子制备的前处理 .....	28
2.2.1	生物材料的选择 .....	28
2.2.2	细胞的破碎 .....	29
2.2.3	生物大分子的提取 .....	30
2.3	生物大分子的分离纯化 .....	32
2.3.1	沉淀法 .....	32
2.3.2	透析 .....	37
2.3.3	超滤 .....	38
2.3.4	冰冻干燥 .....	40
2.3.5	样品的保存 .....	41
2.3.6	分离纯化方法的选择 .....	43
	思考题 .....	44

<b>3 层析技术</b> .....	45
3.1 层析技术概述.....	45
3.1.1 引言.....	45
3.1.2 层析的基本理论.....	45
3.1.3 层析的基本概念.....	46
3.1.4 层析法的分类.....	50
3.1.5 柱层析的基本装置及基本操作.....	51
3.2 凝胶层析.....	54
3.2.1 简介.....	54
3.2.2 凝胶层析的基本原理.....	54
3.2.3 凝胶层析的基本概念.....	54
3.2.4 凝胶的种类和性质.....	57
3.2.5 凝胶的选择、处理和保存.....	59
3.2.6 凝胶层析的基本操作.....	60
3.2.7 凝胶层析的应用.....	62
3.3 离子交换层析.....	63
3.3.1 简介.....	63
3.3.2 基本原理.....	63
3.3.3 离子交换剂的种类和性质.....	64
3.3.4 离子交换剂的选择、处理和保存.....	66
3.3.5 离子交换层析的基本操作.....	67
3.3.6 离子交换层析的应用.....	68
3.4 亲和层析.....	69
3.4.1 简介.....	69
3.4.2 亲和层析的基本原理.....	69
3.4.3 亲和吸附剂.....	70
3.4.4 亲和层析的基本操作.....	75
3.4.5 亲和层析的应用.....	76
思考题.....	79
<b>4 电泳技术</b> .....	80
4.1 电泳技术发展简史.....	80
4.2 电泳的基本原理.....	80
4.3 影响电泳分离的主要因素.....	82
4.4 电泳的分类.....	83
4.5 纸电泳和醋酸纤维薄膜电泳.....	84
4.6 琼脂糖凝胶电泳.....	85

MAG 51/05



4.7	聚丙烯酰胺凝胶电泳	86
4.8	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	88
4.9	梯度凝胶电泳	91
4.10	等电聚焦	91
4.11	二维聚丙烯酰胺凝胶电泳	93
4.12	蛋白质的检测、鉴定及回收	93
4.13	蛋白质印迹	94
4.14	毛细管电泳	96
	思考题	99
<b>5</b>	<b>离心技术</b>	<b>100</b>
5.1	基本原理	100
5.2	离心机的主要构造和类型	101
5.3	制备性超速离心的分离方法	104
5.4	离心机操作的注意事项	106
	思考题	106
<b>6</b>	<b>分光光度技术</b>	<b>107</b>
6.1	基本原理	107
6.2	分光光度计的组成和构造	111
6.3	分光光度法在生物化学实验技术中的应用	116
	思考题	116
<b>7</b>	<b>免疫化学技术</b>	<b>117</b>
7.1	免疫化学技术简介	117
7.2	抗原的免疫原性和专一性	117
7.3	抗体的结构和功能	118
7.4	抗原抗体的结合	120
7.5	动物的常规免疫	122
7.6	双向免疫扩散及免疫电泳	123
7.7	酶联免疫吸附法	125
	思考题	127

## 实验部分

<b>实验 1</b>	<b>蛋白质含量测定法</b>	<b>131</b>
1.	微量凯氏定氮法	131
2.	双缩脲法	132
3.	Folin-酚试剂法	133

4. 改良的简易 Folin-酚试剂法 .....	136
5. 考马斯亮蓝法 .....	136
6. 紫外吸收法 .....	138
思考题.....	140
<b>实验 2 凝胶层析法测定蛋白质分子质量 .....</b>	<b>142</b>
1. 实验目的 .....	142
2. 实验原理 .....	142
3. 器材与试剂 .....	143
4. 实验操作 .....	143
思考题.....	145
<b>实验 3 等电聚焦电泳法测定蛋白质的等电点 .....</b>	<b>146</b>
1. 实验目的 .....	146
2. 实验原理 .....	146
3. 仪器和用具 .....	147
4. 试剂 .....	147
5. 溶液配制 .....	148
6. 操作步骤 .....	148
7. 数据处理 .....	149
思考题.....	150
<b>实验 4 蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....</b>	<b>151</b>
1. SDS 聚丙烯酰胺凝胶的配制 .....	152
2. SDS 聚丙烯酰胺凝胶的灌制 .....	153
3. 用考马斯亮蓝对 SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行染色 .....	155
4. 干胶 .....	156
5. 测量并计算相对分子质量 .....	156
思考题.....	157
<b>实验 5 小牛胸腺 DNA 的制备 .....</b>	<b>158</b>
1. 实验目的 .....	158
2. 实验原理 .....	158
3. 器材与试剂 .....	159
4. 实验步骤 .....	159
思考题.....	160

<b>实验 6 小牛胸腺 DNA 溶解温度的测量</b> .....	161
1. 实验目的 .....	161
2. 实验原理 .....	161
3. 器材与试剂 .....	162
4. 操作步骤 .....	162
思考题 .....	163
<b>实验 7 脱辅基血红蛋白的制备和重组</b> .....	164
1. 实验目的 .....	164
2. 实验原理 .....	164
3. 实验方法 .....	164
思考题 .....	166
<b>实验 8 离子交换柱层析分离核苷酸</b> .....	167
1. 实验目的 .....	167
2. 实验原理 .....	167
3. 试剂与器材 .....	170
4. 操作步骤 .....	171
5. 结果处理 .....	173
思考题 .....	174
<b>实验 9 酵母蔗糖酶的提取及其性质的研究</b> .....	175
1. 蔗糖酶的提取与部分纯化 .....	176
2. 离子交换柱层析纯化蔗糖酶 .....	177
3. 蔗糖酶各级分活性及蛋白质含量的测定 .....	179
4. 反应时间对产物形成的影响 .....	183
5. pH 值对蔗糖酶活性的影响 .....	184
6. 温度对酶活性的影响和反应活化能的测定 .....	185
7. 底物浓度对催化反应速度的影响及米氏常数 $K_m$ 和 最大反应速度 $V_{max}$ 的测定 .....	187
8. 尿素(脲)抑制蔗糖酶的实验 .....	189
9. 棉子糖和果糖抑制蔗糖酶的实验 .....	191
思考题 .....	193
<b>实验 10 猪胰蛋白酶的纯化及其活性测定</b> .....	194
1. 实验目的 .....	194
2. 实验原理 .....	194

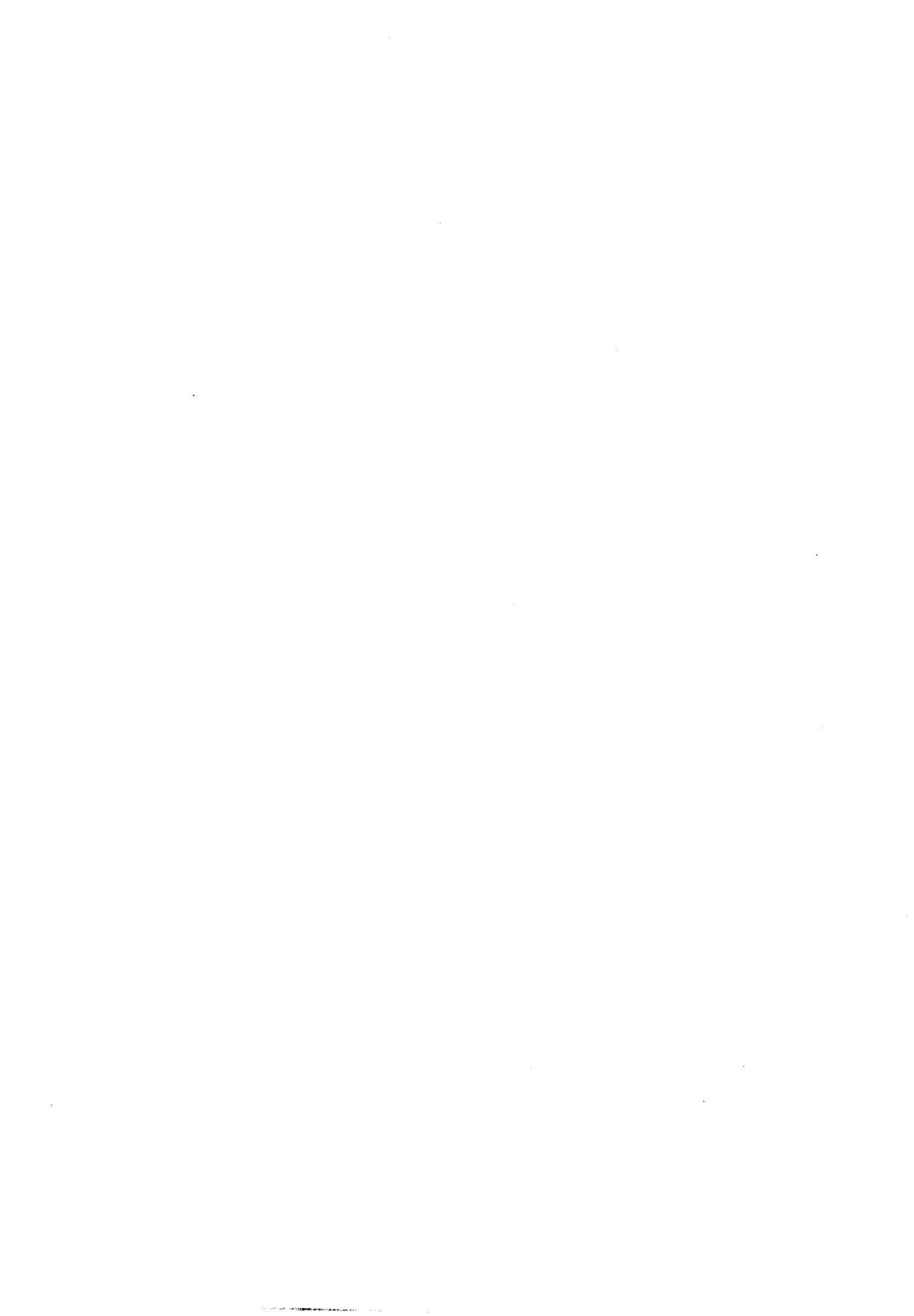
3. 器材与试剂 .....	195
4. 实验步骤 .....	195
5. 注意事项 .....	197
思考题 .....	197
<b>实验 11 亲和层析纯化胰蛋白酶 .....</b>	<b>198</b>
1. 引言 .....	198
2. 实验目的与要求 .....	198
3. 基本原理 .....	198
4. 试剂与器材 .....	199
5. 实验操作步骤 .....	200
6. 实验结果处理 .....	203
7. 参考资料 .....	204
思考题 .....	205
<b>实验 12 兔肌肌酸激酶的分离纯化及部分性质的测定 .....</b>	<b>206</b>
1. 实验原理 .....	206
2. 实验试剂 .....	207
3. 实验步骤 .....	207
思考题 .....	211
<b>实验 13 免疫化学实验 .....</b>	<b>212</b>
1. 免疫血清的制备 .....	212
2. 沉淀反应定量法 .....	213
3. 双向免疫扩散法 .....	214
4. 对流免疫电泳法 .....	215
5. 微量免疫电泳法 .....	216
6. 单向定量免疫电泳法(火箭电泳法) .....	217
7. 双向免疫电泳法(交叉免疫电泳法) .....	219
8. 酶联免疫吸附测定(ELISA) .....	219
9. 蛋白质印迹 .....	225
思考题 .....	227
<b>实验 14 “干实验”: 微机模拟蛋白质纯化实验 .....</b>	<b>228</b>
思考题 .....	230

附录	231
1. 722 型分光光度计操作规程	231
2. 753 型(53W)紫外/可见分光光度计操作规程	231
3. 美国 UNICO 7202B 型可见分光光度计	232
4. 恒流泵操作规程	232
5. 自动部分收集器操作规程	233
6. 电导率仪使用说明	233
7. 日立高速冷冻离心机操作程序	233
8. 各种仪器的使用注意事项	235
9. 德国耶拿(蔡司)SPECORD-200 和 SPEKOL-1100 使用说明	238
SPECORD-200 使用说明	238
SPEKOL-1100 使用说明	245
参考文献	247

---

# 理论部分

---



# 1 绪 论

欢迎同学们到生物化学实验室来！对于大多数学生来说，这不是第一次做化学实验，但是我们相信，生物化学实验一定是大家最感兴趣、最激动人心的实验，当然也是花费最大、最辛苦的实验。同学们在过去几年中所学到的各种实验技术和操作技能，在这些实验中将会经常用到，当然更重要的是要学会一些新的、在生物化学的科学研究中最常用的实验方法。同学们在生物化学实验方面要取得好成绩，在很大程度上，取决于你们对这些专门化实验技术的熟练掌握和对生物化学原理的深入了解。

当同学们进行实验时，无疑将会把生物化学实验与以前做的各种实验进行比较。在生物化学实验中，大家会发现，极少有像无机化学和有机化学实验那样进行化学反应和分离出“克”数量级的产物。同学们将进行的是“毫克”和“微克”数量级的研究，并且在多数情况下，生物分子是溶解在溶液中的，而且往往看不到所研究的物质，但是将会看到动态的生物化学过程和由生物分子引起的生物化学变化。实验中所用到的各种技术和方法，将起到“眼睛”的作用，用以对各种生物化学过程进行监测。

同学们通过生物化学实验应该做到：

(1) 学习设计实验的基本思路，掌握各个实验的基本原理，学会严密地组织自己的实验，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、各种分光光度计、各种离心机、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、各种电泳装置和摇床等。

(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。

预祝同学们以优异的成绩跨进这一新的科学殿堂，成为攀登生物科学高峰的新的勇士！

## 1.1 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进展尤为迅速，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：微量分析技术导致了维生素、激素和辅酶等的发现。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  $5000 \times g$  ( $5000 \sim$



8000 r/min)相对离心力的超离心机(相对离心力“RCF”的单位可表示为“ $\times g$ ”),开创了生物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分子质量,获得了1926年的诺贝尔化学奖。

20世纪30年代:电子显微镜技术打开了微观世界,使我们能够看到细胞内的结构和生物大分子的内部结构。

20世纪40年代:层析技术大发展,两位英国科学家 Martin 和 Synge 发明了分配色谱(层析),他们获得了1952年的诺贝尔化学奖。由此,层析技术成为分离生物物质的关键技术。

“电泳技术”是由瑞典的著名科学家 Tiselius 所奠基,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。

20世纪50年代:自1935年 Schoenheimer 和 Rittenberg 首次将放射性核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20世纪50年代有了大的发展,对各种生物化学代谢过程的阐明起了决定性的作用。

20世纪60年代:各种仪器分析方法,如 HPLC 技术,红外、紫外、圆二色等光谱技术, NMR 磁共振技术等用于生物化学研究,生物化学研究取得了很大的发展。自1958年 Stem、Moore 和 Spackman 设计出氨基酸自动分析仪后,蛋白质的分析工作大大加快。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。

1962年,美国科学家 Watson 和英国科学家 Crick 因为在1953年提出的 DNA 分子反向平行双螺旋模型而与英国科学家 Wilkins 分享了当年的诺贝尔生理医学奖, Wilkins 通过对 DNA 分子的 X-射线衍射研究证实了 Watson 和 Crick 的 DNA 模型,他们的研究成果开创了生物科学的历史新纪元。在 X-射线衍射技术方面,英国物理学家 Perutz 对血红蛋白的结构进行 X-射线结构分析, Kendrew 测定了肌红蛋白的结构,成为研究生物大分子空间立体结构的先驱,他们同获1962年诺贝尔化学奖。

此外,在20世纪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分子质量,使电泳技术取得了重大进展。

20世纪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,制成了 DNA 序列测定仪、DNA 合成仪等。

20世纪80—90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 分子内核苷酸序列的方法,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