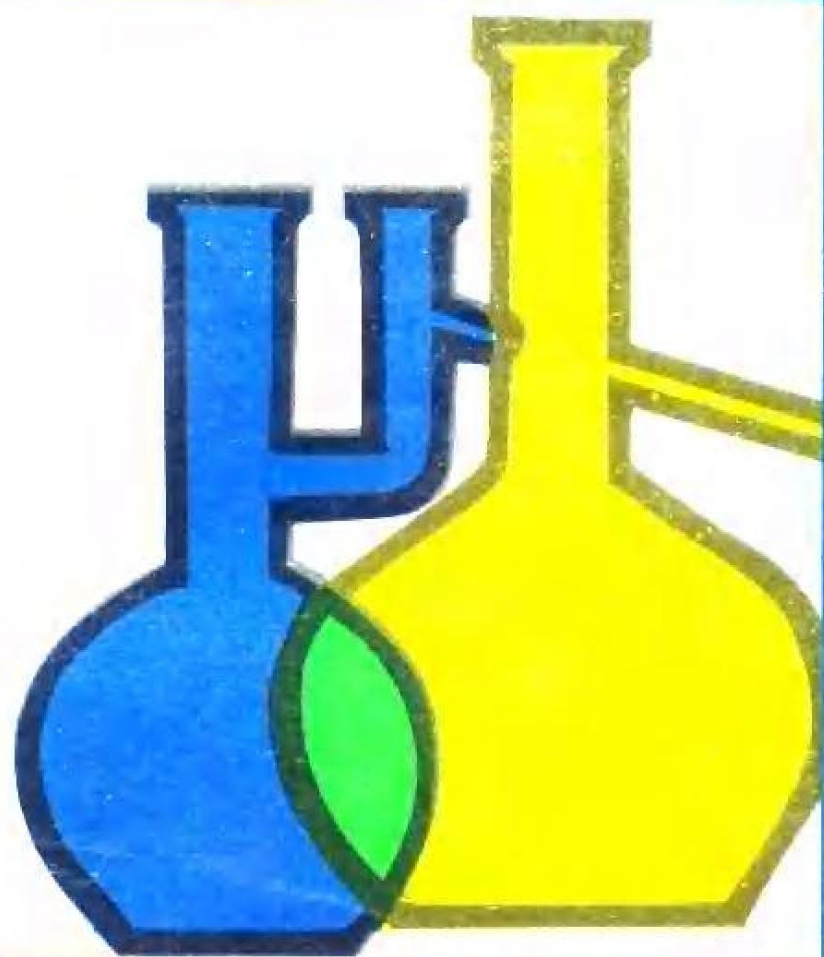




刘粤梅 朱怀荣 主编

# 物化学实验教程

人民卫生出版社

# 生物化学实验教程

主 编 刘粤梅 朱怀荣

副主编 韦罗生 李建远

编者（以姓氏笔画为序）

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 万福生 | 朱怀荣 | 刘瑞芳 | 刘粤梅 |
| 刘奉亭 | 刘观昌 | 刘瀛龙 | 刘淑萍 |
| 李建远 | 张晓伦 | 张文峰 | 赵家坤 |
| 周晓钢 | 郑锡山 | 钟为群 | 郭俊明 |
| 解荷芝 | 樊建设 |     |     |

人 民 卫 生 出 版 社

## 图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验教程/刘粤梅,朱怀荣主编. —北京:人民卫生出版社, 1997  
ISBN 7-117-02590-5

I. 生… II. ①刘… ②朱… III. 生物化学-实验-教材 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (97) 第 03179 号

## 生物化学实验教程

刘粤梅 朱怀荣 主编

人民卫生出版社出版发行  
(100050 北京市崇文区天坛西里 10 号)

人民卫生出版社印刷厂印刷

新华书店经销

787×1092 16 开本  $5\frac{1}{8}$  印张 1 插页 113 千字

1997 年 5 月第 1 版 1997 年 5 月第 1 版第 1 次印刷  
印数:00 001—7 000

ISBN 7-117-02590-5/R·2591 定价:7.00 元

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

# 前 言

生物化学是医学院校的一门重要学科，它之所以能够迅速发展，其主要原因就是由于生物化学实验技术的突飞猛进。生物化学实验教学是生物化学课程中十分重要的组成部分。不断加强和改进实验教学是提高教学质量的重要环节。掌握生物化学常用实验方法和技术，不仅是学习生物化学这门课本身的要求，也是学好其它课程及进行科学研究的需要。为了提高生物化学实验课的教学质量，由菏泽医专、江西医学院、江西医学院抚州分院、赣南医学院、内蒙古医学院、恩施医专等院校的生化同道，总结多年的教学经验，共同编写了这本实验教程。

本教程既有现代生物化学的重要技术和方法，如各种类型的电泳、层析、分光光度法、微量气体分析等，又有经实践证明效果好又实用的经典方法。本书共 40 个实验，实验项目较多，各院校可根据自己的实际情况进行选择。

本教程除主要供临床医学、儿科、卫生、口腔等本科学生使用外，医学大专班等也可选用。

由于水平所限，缺点错误在所难免，望使用本书的各位老师和同学们提出修改意见，以求更加完善。

编 者

一九九五年二月

# 目 录

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 实验须知                          | 1  |
| 实验一 基本操作                      | 3  |
| 实验二 分光光度法                     | 9  |
| 实验三 蛋白质的沉淀反应                  | 16 |
| 实验四 蛋白质等电点的测定                 | 21 |
| 实验五 紫外吸收法测定蛋白质含量              | 23 |
| 实验六 双缩脲法测定蛋白质含量               | 25 |
| 实验七 微量凯氏定氮法测定蛋白质含量            | 27 |
| 实验八 血清 $\gamma$ -球蛋白的分离、纯化及鉴定 | 33 |
| 实验九 血清蛋白质醋酸纤维素薄膜电泳            | 36 |
| 实验十 血清蛋白质聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳          | 39 |
| 实验十一 动物组织中核酸的提取和含量测定          | 47 |
| 实验十二 酵母 RNA 的提取及鉴定            | 55 |
| 实验十三 温度、pH、激活剂和抑制剂对酶活性的影响     | 58 |
| 实验十四 淀粉酶和脲酶的特异性               | 62 |
| 实验十五 乳酸脱氢酶同工酶的分离              | 64 |
| 实验十六 胡萝卜素的柱层析分离               | 70 |
| 实验十七 维生素 B <sub>1</sub> 的测定   | 72 |
| 实验十八 维生素 C 的定量测定              | 77 |
| 实验十九 血糖的测定                    | 81 |
| 实验二十 胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的影响         | 84 |
| 实验二十一 剧烈运动对尿中乳酸含量的影响          | 86 |

|        |                                |     |
|--------|--------------------------------|-----|
| 实验二十二  | 发酵过程中无机磷的利用 .....              | 87  |
| 实验二十三  | 细胞色素氧化酶的作用及其抑制与解毒 ...          | 91  |
| 实验二十四  | 琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制 .....             | 93  |
| 实验二十五  | 线粒体的制备与 P/O 比值的测定 .....        | 95  |
| 实验二十六  | 血浆高密度脂蛋白-胆固醇、总胆固醇的测定 .....     | 98  |
| 实验二十七  | 血清甘油三酯的测定 .....                | 101 |
| 实验二十八  | 酮体的生成及其定性 .....                | 107 |
| 实验二十九  | 血清脂蛋白的琼脂糖电泳 .....              | 109 |
| 实验三十   | 谷氨酸的氧化脱氨基作用 .....              | 112 |
| 实验三十一  | 血清尿素氮的测定 .....                 | 116 |
| 实验三十二  | 血清谷丙转氨酶的测定 .....               | 119 |
| 实验三十三  | 纸层析鉴定转氨基作用 .....               | 125 |
| 实验三十四  | 精氨酸酶的测定 .....                  | 128 |
| 实验三十五  | 氨基酸的薄层层析 .....                 | 132 |
| 实验三十六  | 血清钾的测定 .....                   | 134 |
| 实验三十七  | 血清无机磷的测定 .....                 | 137 |
| 实验三十八  | 血清钙的测定 .....                   | 139 |
| 实验三十九  | 家兔低钙实验 .....                   | 143 |
| 实验四十   | 血浆 CO <sub>2</sub> 结合力测定 ..... | 144 |
| 附录 I   | 常用缓冲液及酸碱指示剂的配制方法 .....         | 150 |
| 附录 II  | 各种洗涤液的配方及使用 .....              | 155 |
| 附录 III | 元素周期表 .....                    | 158 |

# 实 验 须 知

## 实验目的

生物化学实验课是生物化学教学的重要组成部分，加强和改进实验课教学是提高教学质量的重要环节，通过生化实验课教学要达到以下三方面的目的。

1. 培养学生严谨的科学态度，提高分析问题和解决问题的能力。
2. 掌握生物化学的基本实验方法和实验技术。
3. 通过实验，进一步加深对生物化学理论的理解。

## 实验前的准备

1. 复习好有关课堂讲授的理论。
2. 根据实验计划，认真预习“实验教程”。
3. 明确本实验的目的，掌握实验设计的原理。
4. 了解操作步骤和初步判断实验的预期结果。

## 实验时的注意事项

1. 严格遵守实验规则，注意保持实验台面及仪器整洁，公用仪器及试剂不得随意搬动。
2. 必须严肃认真，一丝不苟地按照“实验教程”进行操作，仔细观察，综合分析实验所出现的现象与结果，并及时记录下来。
3. 如果实验结果与理论不相符时，必须进行科学分析，找出原因并重做，直到结果正确为止。
4. 试剂用后放回原处，瓶盖切勿盖错。标准试剂不应用潮湿吸管或滴管与之直接接触，取出后不得再行放入原瓶。

5. 使用玻璃仪器时，要稳拿轻放，尽量避免损坏。使用分光光度计、离心机、电泳仪等贵重仪器时，必须先熟悉使用方法，严禁随意开动。

6. 实验用过的滤纸、火柴梗以及沉淀物不得倒入水槽，以防阻塞水管。舍去的浓酸、浓碱，均须倒入废液缸中，不得倒入水槽，以免损坏下水道。

### **实验后注意事项**

1. 及时清洗试管仪器，整理实验台面，打扫室内卫生。

2. 如有仪器损坏，应填写“仪器损坏单”交给老师，说明损坏原因，以便吸取教训。

3. 离开实验室前要将门、窗、水、电、煤气均关闭好。

### **实验报告**

每次做完实验，须及时整理实验记录，按照规定的格式和内容写出实验报告，交指导老师评阅。实验报告内容包括：

1. 实验名称及实验日期

2. 实验原理 用自己的语言表达，不要抄实验教程。

3. 操作 简述实验过程。

4. 结果 如实记录观察到的实验现象和数据，对数据进行必要的运算。

5. 讨论 分析实验结果，经过自己思考，得出明确的结论。

### **安全注意事项**

1. 低沸点有机溶剂，如乙醚，石油醚，酒精，丙酮等均系易燃物品，应远离火源，若要加热时，须用水浴加热。

2. 万一发生失火，首先将一切易燃物品移至远处，然后将火扑灭。灭火方法：可用湿布或工作服盖上扑灭，或取沙扑灭。若乙醚、油类等比水轻而易燃之物品着火时，切勿用

水，火势大者速取灭火机灭之。

3. 万一发生酸、碱灼伤事故，先用大量自来水冲洗，酸灼伤者用饱和  $\text{NaHCO}_3$  溶液中和，碱烧伤者用饱和  $\text{H}_3\text{BO}_3$  溶液中和，氧化剂伤害者用  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  处理。

## 实验一 基本操作

生物化学实验中需要多种基本技术操作，如各种玻璃仪器和测量仪器的正确使用；技术操作中的样品混匀、保温、加热、沉淀、过滤、离心等。如果这些操作不正规，将影响实验结果的准确性。因此熟悉和掌握生化实验的一些基本操作，是非常重要的。

生物化学的实验方法基本上是化学的方法，也就是用定性及定量的分析方法来观察物质代谢的规律，必须做到定性的洁净及定量的准确。为此，首先介绍一些常用仪器的使用和操作过程中的几项基本技术。并要求同学们反复练习，以达到熟练的程度。

### 吸量管

吸量管是精密的卸量容器，在生物化学实验中最为常用。使用时操作者左手持橡皮球，右手持吸量管上端，将吸量管浸入液体内大约 1cm 处，不得过深与过浅。用橡皮球吸取液体至所需刻度上方时，立即用右手示指按住管口。将吸量管下端提出液面，慢慢放开示指使液面下降至所需刻度处。以吸量管尖端接触瓶壁，去除多余液体。然后将吸量管插入另一容器中，再放开示指，使液体流出。

观察刻度时，应保持吸量管于垂直状态，吸量管的刻度

面要面对操作者,操作者的视线应与液面处于同一水平面上。弧形液面应与刻度成切线。

常用的吸量管有以下三种:

1. 刻度吸量管 有 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0ml 等规格。刻度吸量管又分刻度到尖端和刻度不到尖端的两种。使用前者时,要将吸量管中的全部液体放出,特别注意的是要将最后留在管尖端中的液体吹出,才能达到指定体积。使用刻度不到尖端的吸量管时,仅需将吸量管内的液体放下到达下端指定的刻度,即达到指定的体积。

2. 移液吸量管 也称容量吸量管或胖肚吸量管,是单一刻度的吸量管,中间呈圆柱状膨大,为定量移出整量液体之用。有 5、10、15、20、25、50 及 100ml 等规格。其溶液是根据液体自内流出量来计算,卸放液体时,将管尖紧靠容器内壁,使液体自行流出,流完后管尖在容器内壁上停留 15~30 秒即可,管尖残余液体不要吹出。如管壁刻有吹字,则应吹出。

3. 奥氏吸管 也称欧氏吸管,亦为一种单一刻度的吸量管,中下部呈球形膨大,所以液体与吸管表面接触面积较小,用于吸取血液等粘度较大的液体。流放标本时,应让其自然地缓慢流出,以减少内壁粘附。若为吹出式,管尖最后 1 小滴应吹出。在学生实验中常用的有 1.0、2.0、5.0ml 等规格。

### **容量瓶及量筒**

容量瓶是一细长颈梨形的平底瓶,具有磨口塞,颈上有标线,表示在所示温度下(一般为 20℃)当液体充满到标线时,液体体积恰好与瓶上所注明的体积相等。容量瓶有 10、25、50、100、200、250、500、1000、2000ml 等规格。

使用容量瓶配制溶液时,一般是先将固体物质在烧杯中

用小量溶剂溶解,然后将溶液沿玻棒定量地转移到量瓶中,烧杯用少量水冲洗 2~3 次,并注入容量瓶中,再加入溶剂混匀稀释。当稀释至溶液面接近标线时,应等待 1~2 分钟,使附在瓶颈内壁的水流下,并待液面之小气泡消失后,再用滴管逐滴加入溶剂,使之恰至刻度处。即溶液弯月面下缘的最低点和标线相切。然后将容量瓶塞塞好,将它反复倒置摇动数次混匀之。

容量瓶不能直接用火加热,水浴加热时也不宜骤热和骤冷,也不能置烘箱烘烤,以免变形而引起容量误差。

量筒为粗量器,当所量取的液体要求不十分准确时,可使用之。常用的有 25、50、100、250、500、1000ml,量取时视线与量筒内液体凹面的最低点在同一水平上,偏高或偏低都会造成较大的误差。量筒之底坐及筒身是焊接一起的,因而不能量取过热液体,更不能直接加热,以防炸裂。

### 滴定管

滴定管是供容量分析滴定之用,按其容量大小可分为常量滴定管和微量滴定管两种。

(1) 常量滴定管:常用的有 25ml 和 50ml 两种规格,按其用途分为酸式滴定管和碱式滴定管两种:①酸式滴定管附有玻璃活塞,可盛酸性、中性以及氧化性( $\text{KMnO}_4$ 、 $\text{I}_2$  和  $\text{AgNO}_3$ )等溶液,不宜盛碱性溶液,因为碱常使活塞与活塞套粘合,难以转动;②碱式滴定管,碱式滴定管下端套有一段约 10cm 长的橡皮管(内装玻璃珠)接尖嘴玻璃管。可盛碱性溶液,不宜盛氧化性溶液,因为氧化性溶液易与橡皮起作用。

(2) 微量滴定管:总容积有 1、2 和 5ml,最小刻度为 0.05 或 0.01ml,有的附有自动加液装置,微量滴定管尖的口径小,故流出的液滴细小。使用滴定管应注意以下事项:

1. 检查是否清洁干燥、是否漏水、玻塞是否滑润，如有漏水转动不灵，应拆下活塞重新涂抹凡士林。涂抹前要将玻塞擦干，用手指沾少量凡士林在活塞两头各擦一薄层，将活塞插入槽内，然后向同一方向转动活塞，直到从外面看时全部透明为止。油涂好后，在活塞的小头的槽上套一橡皮圈，以防活塞滑脱。

2. 使用前必须认出每一格表示多少毫升。先用少量滴定液清洗滴定管 2~3 次，然后方可装液。装液体后，管内如有气泡必须排出。

3. 滴定前先应读取起始点。滴定时，左手控制玻塞，右手持瓶，边滴边摇，密切注意被滴定溶液的颜色变化。

4. 装置滴定管时，管身必须与地面垂直。读数时眼睛与溶液月形面下缘同一水平线上，不要仰头或低头读数。

### 离心机

离心机是利用离心力对混合液进行分离和沉淀的一种专用仪器。利用离心机可使混合液中的悬浮微粒快速沉淀，借以分离比重不同的各种物质成分。

按每分钟转速 (revolution per minute, rpm) 不同可分为低速离心机 (转速在 6000rpm 以下)、高速离心机 (转速低于 25000rpm)、超速离心机 (转速在 30000rpm 以上)。本教程中所用的离心机是低速离心机。

使用离心机要按以下规程操作：

1. 检查离心机套管底部的垫子，若有玻璃碎片或沙粒等，必须除去，以免发生破管。

2. 离心管内加液量不要过满，一般在管口下 2cm 处。

3. 金属套管与离心管之间须装水缓冲之，以免互碰破碎。

4. 将对称的金属套管及离心管(内盛欲离心的液体)置于托盘天平上平衡,若不相等,可调整缓冲水之量。每次离心操作都必须严格遵守平衡的要求,否则将会损坏离心机部件。

5. 开动时,先开启开关,然后缓慢转动旋钮,使转速逐渐增加。

6. 离心机工作时,机身应平衡,声音均匀,否则表示对称的物质重量不等。若听到特殊响声,表明离心管可能破碎,应立即停止离心,清除破碎玻璃片,换上新管,按上述操作重新平衡、离心。若管未破碎,也需要重新平衡后再离心,以免损伤转轴。

7. 离心时间及速度按实验要求执行,离心时间一般不超过 30 分钟为宜。

8. 停止离心时,先调节旋钮进行减档降速,最后将旋钮拨到“0”,待离心机自动停止后,才能打开离心机盖取出样品。

### **其它基本操作**

1. 溶液的混匀 欲使化学反应充分进行,必须使反应体系内各种物质迅速地相互接触。溶液的混匀方式有下列几种,可随使用器皿、液体容量而选用之。

(1) 旋转混匀法:手持容器作离心旋转,适用于未盛满液体的试管或小口器皿,如三角烧瓶等。

(2) 弹指混匀法:左手持试管使之直立,以右手示指轻击试管之下部,使管内溶液作旋转流动。

(3) 倒转混匀法:适用于有玻璃塞的瓶子,如容量瓶等(图 1-1)。

(4) 弹动混匀法:以右手大拇指、示、中指握住试管上部,将试管放平,于左手掌中弹动。

(5) 吸管混匀法:用吸管将溶液反复吸放数次,适用于

量少而无沉淀的液体。

(6) 搅拌混匀法：适应烧杯等大口容器所盛之溶液的混匀，一般在配制混合剂用，用玻棒搅拌以助溶，或混匀大量的溶液。

## 2. 保温与加热

(1) 保温：为使某一化学反应在一恒定温度下进行，常需要保温，如酶促化学反应。保温需要用恒温箱或恒温水浴箱，使用恒温箱或恒温水浴箱时应注意：①箱中温度调好后，切勿再转动调节钮；②随手关好温箱门或水浴盖，防止热的散失；③小心操作，防止药品撒于仪器内。如有药品撒于其中，须立即设法清除。

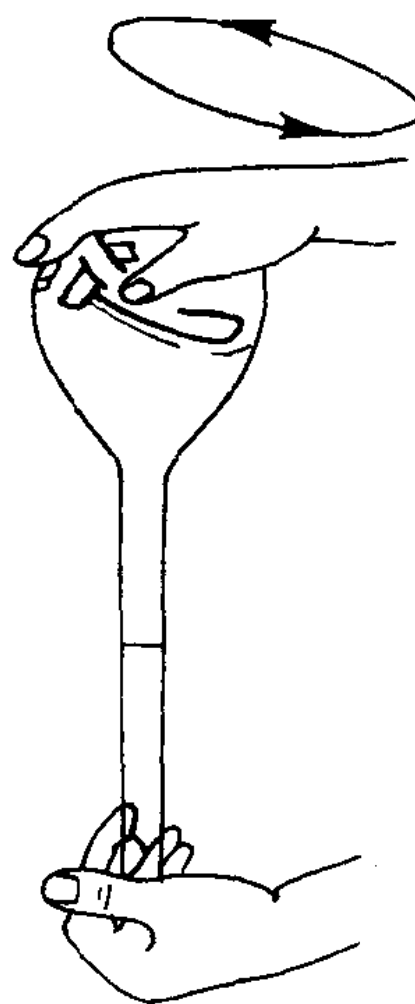


图 1-1 容量瓶的  
倒置混匀

(2) 加热：常用的加热方法有两种：一是把试管或其它器皿在酒精灯或电炉、煤气灯上加热，二是在水浴中加热或煮沸。要按实验要求去做。

3. 过滤 过滤的目的是使沉淀物与液体分离。可用滤纸、纱布、棉花、抽滤等方法过滤，根据实验要求选择。过滤时应注意以下几点：

(1) 当定量地收集滤液时，不要预先用水浸湿滤纸，以免影响滤液的浓度。

(2) 漏斗边缘要比滤纸边高出大约 0.5~1.0cm，滤纸锥体的三层一边应放在漏斗出口短的一边，漏斗出口长的一边应紧靠容器壁。

(3) 漏斗颈的出口不应与溶液接触，更不应将漏斗颈浸

在滤液中。

(刘 粤 梅)

## 实验二 分光光度法

分光分析是目前生物化学实验室及临床生化检验中最常用的定量方法之一。它是通过有色物质溶液颜色深浅的比较来测该物质浓度的方法。

### 原理

光线的本质是电磁波，有不同的波长，肉眼可见的彩色光称可见光，波长在400~750nm，小于400nm的光线称为紫

表 2-1 光波波长与区带表

| 光           | 波                          | 波 长                 | (λ)   |
|-------------|----------------------------|---------------------|-------|
| 紫外线         | 真 空<br>紫 外<br>近紫外          | $-10^{-6}$ (cm)     | 10nm  |
|             |                            | $-10^{-5}$          | 100nm |
|             |                            | $-2 \times 10^{-5}$ | 200nm |
|             |                            | $-4 \times 10^{-5}$ | 400nm |
| 可<br>见<br>光 | 紫<br>蓝<br>绿<br>黄<br>橙<br>红 |                     | 420nm |
|             |                            |                     | 490nm |
|             |                            |                     | 530nm |
|             |                            |                     | 590nm |
|             |                            |                     | 650nm |
| 红<br>外<br>线 | 近红外<br>中红外<br>远红外          | $-10^{-4}$          | 1μ    |
|             |                            | $-10^{-3}$          | 10μ   |
|             |                            | $-10^{-2}$          | 100μ  |

外线，大于 750nm 的光线称为红外线，如表 2-1。

分光分析的基本原理是据有色溶液在光线照射下，对光线有选择的吸收，不同的物质由于其分子结构不同，对光线的吸收能力也不同，不同的物质具有其各自的吸收光谱，其理论依据是 Lambert-Beer 定律。

1. Lambert 定律 一束单色光通过有色透明液时，一部分波长的光波会被吸收，被吸收光波的量与溶液厚度量成一定的比例关系，如图 2-1 所示。

设入射光的强度为  $I_0$ ，透射光的强度为  $I$ ，则  $\frac{I}{I_0}$  表示光线透过溶液的程度，称为透光度。用  $T$  表示： $T = \frac{I}{I_0}$

$T$  值是随溶液厚度的增加而减小，通过计算推导， $T$  与溶液厚度间并不存在简单的定量关系，只有  $T$  的负对数 ( $\lg T$ ) 才随溶液厚度的增加而成正比的增加。

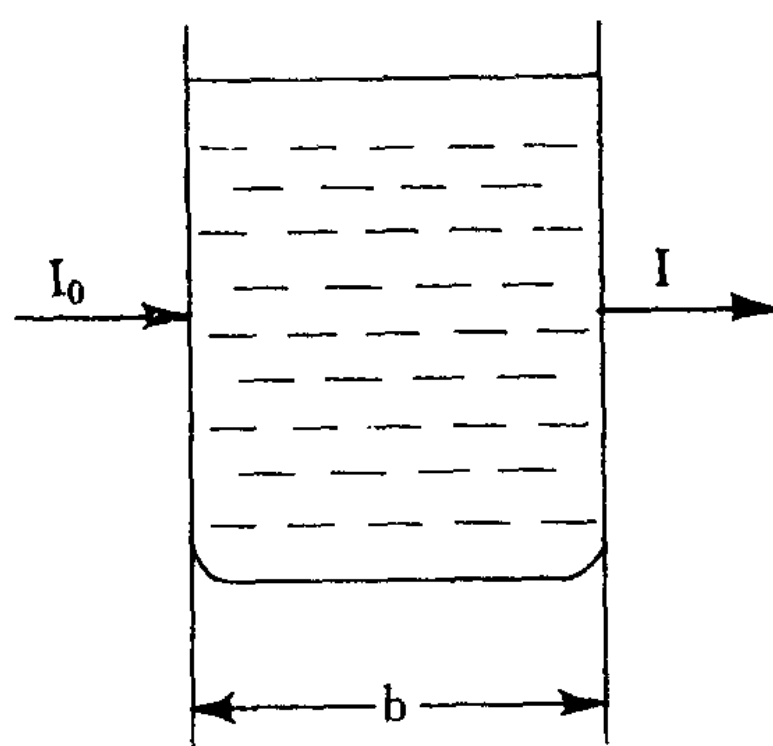


图 2-1 比色原理示意图

$$-\lg T = -\lg \frac{I}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I} = a_1 b$$

$a_1$  为常数， $b$  为溶液的厚度。式中  $\lg \frac{I_0}{I}$  称为吸光度  $A$ ，又称消光度 ( $E$ ) 或称光密度 ( $OD$  或  $D$ )。所以： $A = a_1 b$ 。

2. Beer 定律 当一束单光通过有色溶液后，溶液的厚度不变。而浓度不同时，溶液浓度愈大，则透射光的强度愈弱。

其它关系的推导同 Lambert 定律推导。

$$\lg \frac{I_0}{I} = a_2 c$$

$c$  为溶液的浓度,  $a_2$  为常数。

如果同时考虑到溶液的厚度和溶液的浓度对光吸收的影响时, 上式合并起来即得:

$$\lg \frac{I_0}{I} = abc \quad \text{即: } A = abc$$

在此  $a$  为吸光率 (也称吸光系数)

上式即为 Lambert-Beer 定律的表达式。是分光分析的基本计算公式。

采用适当的光源、棱镜和适当的光源接受器, 可使介质浓度测定范围不仅局限于可见光, 尚可扩大到紫光区和红外光区。经单色器 (棱镜) 得到的光源虽然不是纯的单色光, 但波长范围更狭窄, 也更符合 Lambert-Beer 定律, 使灵敏度大为提高。

以不同波长的单色光作为入射光, 测定某一溶液的吸光度, 然后以入射光的不同波长为横轴, 各相应的吸光度为纵轴作图, 可得到溶液的吸收光谱曲线。不同的物质, 分子结构不同, 其吸收光谱曲线也有其特殊形状。许多动、植物组织中所含的组分用化学方法不易分离, 此组分可借助于吸光光度法测定出不同的吸收光谱曲线, 用以确定各组分的性质和含量。由于分光光度计波长范围较大, 既可用于可见光, 也可用于紫外线和红外线吸收测定。又由于分光光度法可利用物质特有的吸收光谱曲线进行定性定量, 因此, 测定物质既可是有色物质, 也可是无色物质。从而使测定手续简化, 有时标本还可回收, 减少消耗。

目前, 在科研教学及应用中最常用 721 型分光光度计, 因