

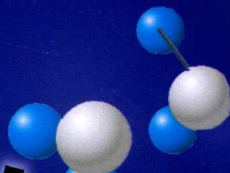


“十二五”江苏省高等学校重点教材

PAPD



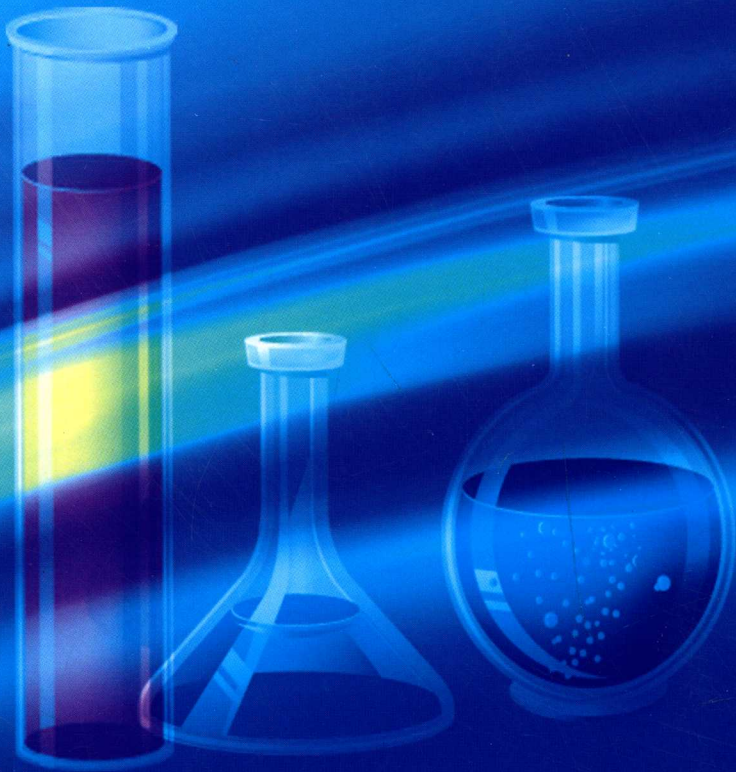
科学出版社普通高等教育“十二五”规划教材



生物化学实验 (双语)

Biochemistry Labwork Guide

何开跃 李关荣 主编



科学出版社

Q5-33
J0142

“十二五”江苏省高等学校重点教材



科学出版社普通高等教育“十二五”规划教材

生物化学实验(双语)

Biochemistry Labwork Guide

何开跃 李关荣 主编



江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书内容分为三大部分：第1部分系统介绍了生物化学实验基本原理及方法，包括生物分子分离纯化、分光光度技术、层析技术、电泳技术、离心技术和分子生物学技术基础；第2部分为基础性实验，主要是生物化学的经典实验，包括蛋白质、酶、维生素、核酸、糖和脂肪的分离和测定，共计30个实验项目，旨在强化生物化学基础实验技能，可操作性强；第3部分为7个综合性实验，每个实验项目涉及两个或两个以上的技术，目的在于培养学生的综合实验能力。第1部分的生物化学实验基础理论，在后两个部分中得到了切实应用和充分体现。

本书除了附录外，三个部分全部为中英文对照，可作为综合性大学及农林院校生物学科相关专业的本科生、研究生及外国留学生的生物化学实验课教材，适合相关任课教师和研究人员和参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验：双语：汉、英/何开跃，李关荣主编。—北京：科学出版社，2013.9

“十二五”江苏省高等学校重点教材(编号：2013-2-011) 科学出版社普通高等教育“十二五”规划教材

ISBN 978-7-03-038617-5

I. ①生… II. ①何… ②李… III. ①生物化学-实验-高等学校-教材-汉、英 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 217361 号

责任编辑：顾晋饴 于盼盼 / 责任校对：桂伟利
责任印制：肖 兴 / 封面设计：许 瑞

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码：100717

<http://www.sciencep.com>

北京市文林印务有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013年9月第一版 开本：B5(720×1000)

2013年9月第一次印刷 印张：25 1/4

字数：510 000

定价：59.00元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

《生物化学实验》编委会

主 编 何开跃(南京林业大学)

李关荣(西南大学)

副主编(按姓氏笔画排序)

王宏伟(东北林业大学)

徐 勇 (南京林业大学)

参 编(按姓氏笔画排序)

孙吉康(中南林业科技大学)

张汝民(浙江农林大学)

陈 牧(南京林业大学)

施大伟(南京林业大学)

夏 涛(南京林业大学)

谢寅峰(南京林业大学)

审 校 张双全(南京师范大学)

前 言

21 世纪生命科学的发展突飞猛进, 生物化学是其中最为活跃的领域之一。生物化学及其衍生的分子生物学对生命科学的发展起着举足轻重的作用。目前, 生物化学的理论、方法与技术已在生命科学的各个领域得到广泛应用, 在农林、医药等方面显得尤为突出。为了进一步提高教学质量, 促进生命科学各个新兴专业的成熟与发展, 国内的大部分高校实现了生物化学理论课教学与实验技术课教学的单列, 生物化学实验教学得到了高度重视和强化。生物化学实验课是其理论课的验证、完善和补充, 对生物技术、生物工程、生物科学及相关专业的学生提供了实验能力培养的良好平台, 有助于提升学生的动手操作能力及科研综合素质。

当前, 我国高等教育正全方位多角度与国际接轨, 教师、研究生乃至本科生的国际交流与合作越来越密切, 并日趋活跃与广泛。随着我国对外开放的逐步深入, 越来越多的外国留学生来到中国进行深造, 同时国内为本科生和研究生提供了很多出国留学进修的机会。因而, 大力推进双语教学势在必行。本书作为一本中英文对照的生物化学实验教材就这样应运而生。

本书分为三个部分: 第 1 部分为生物化学实验基本原理与方法, 重点介绍生物化学实验的经典内容, 包括生物分子分离纯化、分光光度技术、层析技术、电泳技术和离心技术等。鉴于分子生物学已渗透到生物科学的诸多领域, 成为 21 世纪生物学的带头学科, 本教材在选编经典实验的基础上, 增加了分子生物学的基础内容, 包括理论介绍和一套完整的分子生物学实验(实验 37)。本书第 2 部分为基础性实验, 包括蛋白质的定性与定量、制备与分子质量和等电点的测定; 酶的特性与活力测定; 维生素 C 的测定; 核酸的分离、鉴定和含量测定; 糖和脂肪的测定, 共计 30 个实验。实验项目安排由浅入深, 循序渐进, 适于学生进行基本训练。本书第 3 部分为 7 个综合性实验, 这一部分的实验采用了多种实验手段与技术, 由多层次的实验内容组成, 主要训练学生对所学知识和实验技术的综合运用能力、独立使用能力以及对实验结果的综合分析能力。

本书可作为综合性大学及农林院校生物学科相关专业的本科生、研究生和外国留学生的生物化学实验课教材, 适合相关任课教师和研究人員使用和参考, 内容具有较好的针对性, 可供各院校相关专业选择使用。

本书的出版得到了江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)的资助。本书的编写由六所高校长期从事生物化学和生物化学实验教学的具有丰富教学经验的资深教师共同完成。南京林业大学何开跃负责制定编写大纲, 对全书进行统稿、修改,

并承担了实验 20、21、24、26、28、29、30 的编写；西南大学李关荣承担了第 1 部分的全部内容和实验 8、17、18、33 的编写，并对全书的图、表和英文表达部分进行了全面详细的修改和统稿；东北林业大学王宏伟编写了实验 1、10、12、35 和附录；南京林业大学徐勇编写了实验 2、5、11、14、25；中南林业科技大学孙吉康编写了实验 13、32；南京林业大学陈牧编写了实验 3、7、9、19、27、31；浙江农林大学张汝民编写了实验 4、6、22、23、34；南京林业大学施大伟编写了实验 36；南京林业大学夏涛编写了实验 37；南京林业大学谢寅峰编写了实验 15、16。

南京师范大学张双全教授对本书进行了审校。南京林业大学肖飞教授对本书部分实验的英文对照内容进行了审核修改，彭方仁教授也对本书的编写给予了大力协助，南京林业大学植物生理生化专业方向 2008 级至 2012 级的研究生参加了部分实验的试做和文稿的录入、作图等，在此一并表示感谢。

由于编者水平有限，书中缺点和不当之处在所难免，欢迎广大师生批评指正，以便再版时修正。

编 者

2013 年 4 月 8 日

目 录

前言

第 1 部分 生物化学实验基本原理与方法 1

Part 1 Basic Principles and Methodologies of Biochemical Experiments 3

I 生物大分子的分离与纯化的一般步骤与方法 5

I General Procedures and Methods for Isolation and Purification of Biomacromolecules 13

II 分光光度法 25

II Spectrophotometry 28

III 层析 33

III Chromatography 38

IV 电泳 44

IV Electrophoresis 49

V 离心 55

V Centrifugation 58

VI 分子生物学技术基础——聚合酶链式反应(PCR) 61

VI Brief Introduction to Basic Technique of Molecular Biology—Polymerase Chain Reaction (PCR) 66

第 2 部分 基础性实验 75

Part 2 Basic Experiments 75

实验 1 蛋白质和氨基酸的呈色反应 77

Experiment 1 Color Reactions of Proteins and Amino Acids 82

实验 2 蛋白质的沉淀与变性 87

Experiment 2 Precipitation and Denaturation of Proteins 92

实验 3 微量凯氏定氮法测蛋白质总氮含量 97

Experiment 3 Quantification of Crude Proteins—Kjeldahl's Nitrogen Determination 101

实验 4 双缩脲法测定蛋白质含量 106

Experiment 4 Quantification of Proteins—Biuret Method 108

实验 5 Folin-酚试剂法测定蛋白质含量	110
Experiment 5 Quantification of Proteins — Folin-Lowry Method	113
实验 6 紫外吸收法测定蛋白质含量	115
Experiment 6 Quantification of Proteins by Ultraviolet Absorption	117
实验 7 染料结合法测定蛋白质含量	119
Experiment 7 Quantification of Proteins by Dye-binding Method	122
实验 8 几种重要氨基酸(赖氨酸、色氨酸和脯氨酸)的含量测定	124
Experiment 8 Determination of the Contents of Some Important Amino Acids (Lys, Trp and Pro)	129
实验 9 血清蛋白的醋酸纤维薄膜电泳	135
Experiment 9 Cellulose Acetate Membrane Electrophoresis of Serum Proteins	138
实验 10 酪蛋白的制备	141
Experiment 10 Preparation of Casein	143
实验 11 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)测定蛋白质分子质量	145
Experiment 11 Molecular Weight Determination of Proteins by SDS-PAGE	151
实验 12 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦测定蛋白质等电点	158
Experiment 12 pI Determination of Proteins by Polyacrylamide Gel Isoelectrofocusing	161
实验 13 酶的特性	165
Experiment 13 Properties of Enzymes	170
实验 14 多酚氧化酶米氏常数(K_m)的测定	176
Experiment 14 Determination of Michaelis Constant (K_m) of Polyphenol Oxidase	179
实验 15 核酸酶的活力测定	182
Experiment 15 Activity Assay of Nucleases	184
实验 16 谷丙转氨酶活力测定	187
Experiment 16 Determination of Activity of Glutamate-Pyruvate Transaminase	189
实验 17 植物抗氧化酶类(超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶)活 性测定	193
Experiment 17 Activity Assay of Common Antioxidant Enzymes (SOD, POD and CAT) In Plant	198
实验 18 乳酸脱氢酶(LDH)活性测定	205
Experiment 18 Activity Assay of Lactate Dehydrogenase (LDH)	208

实验 19 维生素 C 的定量测定——2,6-二氯酚靛酚法	211
Experiment 19 Quantification of Vitamin C by 2, 6-Dichlorophenolindo Phenol Method	214
实验 20 花菜中核酸的分离和鉴定	218
Experiment 20 Extraction and Identification of Nucleic Acids From Cauliflower	221
实验 21 酵母核糖核酸的分离及组分鉴定	225
Experiment 21 Extraction of Yeast RNA and Identification of Its Components	227
实验 22 定磷法测定核酸含量	230
Experiment 22 Quantification of Nucleic Acids by Method of Phosphate Determination	233
实验 23 定糖法测定 RNA 含量	236
Experiment 23 Quantification of RNA by Ribose Determination Method	238
实验 24 二苯胺法测定 DNA 含量	241
Experiment 24 Quantification of DNA by Diphenylamine Method	243
实验 25 紫外吸收法测定核酸含量	245
Experiment 25 Quantification of Nucleic Acids by Ultraviolet Absorption Method	247
实验 26 醋酸纤维薄膜电泳分离核糖核苷酸	249
Experiment 26 Separation of Ribonucleotides by Cellulose Acetate Membrane Electrophoresis	251
实验 27 还原糖和总糖的含量测定——DNS 法	253
Experiment 27 Determination of Reducing Sugar and Total Sugar by DNS Method	256
实验 28 血糖的定量测定——葡萄糖氧化酶-氨基安替比林(GOD-PAP)法	259
Experiment 28 Quantification of Blood Glucose by Glucose Oxidase-4- Aminoantipyrine (GOD-PAP)	261
实验 29 粗脂肪的提取和测定	263
Experiment 29 Extraction and Quantitative Determination of Crude Fat	265
实验 30 油脂的化学性质	267
Experiment 30 Chemical Properties of Oil or Fat	273
第 3 部分 综合性实验	281
Part 3 Comprehensive Experiments	281

实验 31 蛋白质的酸水解及其氨基酸的纸层析鉴定	283
Experiment 31 Acid Hydrolysis of Proteins and Isolation and Identification of Amino Acids by Paper Chromatography	285
实验 32 离子交换层析分离混合氨基酸	288
Experiment 32 Separating Mixed Amino Acids by Ion-exchange Chromatography	291
实验 33 血清球蛋白的盐析分离及分子筛凝胶层析法脱盐	294
Experiment 33 Salting-out Separation of Serum Globulins and Desalting by Molecular Sieving Gel Chromatography	297
实验 34 糖的测定和鉴定——蒽酮试剂和纸层析法	301
Experiment 34 Quantification and Identification of Saccharides by Anthrone Colorimetry and Paper Chromatography	304
实验 35 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离乳酸脱氢酶同工酶	307
Experiment 35 Separating LDH Isoenzymes by PAGE	312
实验 36 叶绿体的制备及相关分析	318
Experiment 36 Preparation and Analyses of Chloroplasts	325
实验 37 植物分子生物学系列实验	334
Experiment 37 Series Experiments of Plant Molecular Biology	352
参考文献	374
附录	375
附录 1 基础生物化学实验室常用仪器简介	377
附录 2 常用缓冲溶液的配制	385

第 1 部分 生物化学

实验基本原理与方法

细胞生物学家在分子、亚细胞和细胞水平研究复杂的结构与功能的关系。但是，一个复杂的生物系统比如一个生化途径，只有当其每个成分都被单独分析后才能了解。只有当一个生物分子或细胞组分为纯化的且仍然具有生物活性时，才可能对其鉴定和阐明其生物学功能。

分级分离程序能纯化蛋白质和其他细胞组分。在一系列独立的步骤中，目的蛋白的各种性质，如溶解度、电荷、分子大小、极性以及特异结合的亲和力等，都可以用来进行分级分离或逐步与其他物质分离。有四种主要的分离纯化方法，即分光光度法、层析、电泳和离心法。每种方法都依赖于生物分子的某些物理化学性质。

本部分首先概述生物分子分离纯化的一般程序和方法；然后介绍四类常用生物化学研究技术(分光光度法、层析、电泳和离心法)；最后，介绍分子生物学的基本技术：聚合酶链式反应(PCR)，因其在分子生物学中被广泛使用。实际上，它是生物化学技术的延伸和组合。

Part 1 Basic Principles and Methodologies of Biochemical Experiments

Cell biologists research the intricate relationship between structure and function at the molecular, subcellular, and cellular levels. However, a complex biological system such as a biochemical pathway can only be understood after each one of its components has been analyzed separately. Only if a biomolecule or cellular component is pure and biologically still active can be characterized and its biological functions elucidated.

Fractionation procedures purify proteins and other cell constituents. In a series of independent steps, the various properties of the protein of interest—solubility, charge, size, polarity, and specific binding affinity—are utilized to fractionate it, or separate it progressively from other substances. Four key separation and purification methods are spectrophotometry, chromatography, electrophoresis, and centrifugation. Each one relies on certain physicochemical properties of biomolecules.

In this section, first, the general procedures and methods for the isolation and purification of biomacromolecules are overviewed; and then four kinds of commonly used biochemical techniques (spectrophotometry, chromatography, electrophoresis and centrifugation) are introduced; and after that, the basic technique of molecular biology, polymerase chain reaction (PCR), is also discussed, since it has been extensively used in molecular biology. Actually, it is the extension and /or combinations of biochemical techniques.

I 生物大分子的分离与纯化的一般步骤与方法

1 概述

当今生命科学高速发展。生物大分子(蛋白质、酶和核酸等)结构与功能的探究成为了中心问题。生物大分子结构与功能的研究,首先要制备足够的量和一定纯度的生物大分子。

生物大分子的分离纯化与制备是一件十分细致而艰难的工作。有以下主要特点:

- (1) 生物材料组成极其复杂,常常含有数百种乃至几千种化合物;
- (2) 许多生物大分子在生物材料中的含量极微,分离纯化的步骤繁多,流程长;
- (3) 许多生物大分子一旦离开了生物体内的环境就极易失活,因此在分离过程中如何防止其失活,就是生物大分子提取制备的难点之一;
- (4) 生物大分子的制备几乎都是在溶液中进行的,温度、pH、离子强度等各种因素对溶液中各种成分有综合性的影响,且很难准确判断和控制。

生物大分子的制备通常步骤如下。

- (1) 确定要制备的生物大分子的目的和要求,制备的物质是用于进行科研、开发还是要发现新的物质;
- (2) 建立相应的可靠的分析测定方法,这是制备生物大分子的关键;
- (3) 通过文献调研和预备性实验,掌握要制备的生物大分子的物理化学性质;
- (4) 生物材料的破碎和预处理;
- (5) 分离纯化方案的选择和探索,这是最困难的过程;
- (6) 生物大分子制备物的均一性(纯度)的鉴定,要求用多种鉴定方法证实,如达到单向电泳呈现单一条带,双向电泳呈现一个点,或高效液相层析(HPLC)和毛细管电泳都是一个峰;
- (7) 制备物的浓缩、干燥和保存。

生物分子的分析测定的方法主要有两类:即生物学和物理、化学的测定方法。生物学的测定法主要有:酶的各种测活方法、蛋白质含量的各种测定方法、免疫化学方法、放射性同位素示踪法等;物理、化学方法主要有:比色法、气相和液相色谱法、光谱法(紫外/可见、红外和荧光等分光光度法)、电泳法以及核磁共振等。在实际操作中尽可能多用仪器分析方法,以使分析测定更加准确、快速、简便。

需要了解的生物大分子的物理、化学性质主要有：

- (1) 在水和各种有机溶剂中的溶解性；
- (2) 在不同温度、pH 和各种缓冲液中生物大分子的稳定性；
- (3) 固态时的含水量以及对温度和冻干时的稳定性；
- (4) 各种物理性质：如分子的大小、穿膜的能力、带电情况、在电场中的行为、离心沉降表现、在各种凝胶、树脂等填料中的分配系数等；
- (5) 其他化学性质：如对各种蛋白酶、水解酶的稳定性以及对各种化学试剂的稳定性；
- (6) 对其他生物分子的特殊亲和力。

制备生物大分子的分离纯化方法有多种，主要是利用它们之间的特异性差异，如分子的大小、形状、酸碱度、溶解性、极性、电荷以及与其他分子的亲和性等。各种方法的基本原理可以归纳为两个方面：

- (1) 利用混合物中几个组分分配系数的差异，把它们分配到两个或几个相中，如盐析、有机溶剂沉淀、层析和结晶等；
- (2) 将混合物置于某一物相(大多数是液相)中，通过物理力场的作用，使各组分分配于不同的区域，从而达到分离的目的，如电泳、离心和超滤等。

目前纯化蛋白质等生物大分子的关键技术是电泳、层析和高速与超速离心。

2 生物大分子制备的前处理

2.1 生物材料的选择

制备生物大分子，首先要选择适当的生物材料。选择的材料应来源丰富、目的组分含量高、制备工艺简单、成本低，并尽可能保持新鲜，尽快进行加工处理。动物组织要先除去结缔组织、脂肪等非活性部分，绞碎后在适当的溶剂中提取。如果所要制备的成分在细胞内，则要先破碎细胞。植物材料要先去壳、除脂。微生物材料要及时将菌体与发酵液分开。生物材料如暂不提取，应冰冻保存。动物材料则需深度冷冻保存。

2.2 细胞的破碎

不同的生物或同一生物的不同部位组织，其细胞破碎的难易不同，使用的方法也不相同。如动物脏器的细胞膜较脆弱，容易破碎；植物和微生物材料由于具有较坚固的纤维素、半纤维素组成的细胞壁，要采取专门的细胞破碎方法。

1) 机械法

- (1) 研磨：将剪碎的动物组织置于研钵或匀浆器中，加入少量石英砂研磨或

匀浆。

(2) 组织捣碎器：这是一种较剧烈的破碎细胞的方法，通常可先用家用食品加工机将组织打碎，然后再用 10 000~20 000r/min 的内刀式组织捣碎机(即高速分散器)将组织细胞打碎。

2) 物理法

(1) 反复冻融法：将待破碎的细胞冷至 $-20\sim-15^{\circ}\text{C}$ ，然后放于室温(或 40°C)迅速融化。如此反复冻融多次，由于细胞内形成冰晶的作用引起细胞溶胀而破碎。

(2) 超声波处理法：此法是借助高频超声波的振动力破碎细胞壁和细胞器。破碎微生物细菌和酵母菌时，时间要长一些。

(3) 压榨法：这是一种温和的、彻底破碎细胞的方法。借助高压匀质仪，在 $1\times 10^8\sim 2\times 10^8\text{Pa}$ 的高压下使细胞悬液通过一个小孔，然后突然释放至常压，细胞膨胀而彻底破碎。

(4) 冷热交替法：从细菌或病毒中提取蛋白质和核酸时可用此法。在 90°C 左右维持数分钟，立即放入冰浴中使之冷却，如此反复多次，绝大部分细胞可以被破碎。

3) 化学与生物化学方法

(1) 自溶法：将新鲜的生物材料存放于一定的 pH 和适当的温度下，细胞结构在自身所具有的各种水解酶(如蛋白酶和酯酶等)的作用下发生溶解，使细胞内含物释放出来。

(2) 渗透法：细胞膜为天然的半透膜，在低渗溶液和低浓度的稀盐溶液中，由于存在渗透压差，溶剂分子大量进入细胞，将细胞膜胀破释放出细胞内含物。

(3) 酶解法：利用各种水解酶，如溶菌酶、纤维素酶、蜗牛酶(蜗牛中复杂的酶制品，含纤维素酶、几丁质酶、脂酶等)和酯酶等，于 37°C ，pH=8 条件下，处理 15min，可以专一性地将细胞壁分解。

(4) 有机溶剂处理法：利用氯仿、甲苯、丙酮等脂溶性溶剂或 SDS(十二烷基硫酸钠)等表面活性剂处理细胞，可将细胞膜溶解，从而使细胞破裂，此法也可以与研磨法结合使用。

2.3 生物大分子的提取

“提取”是在分离纯化之前将经过预处理或破碎了的细胞置于溶剂中，使被分离的生物大分子充分地释放到溶剂中，并尽可能保持原来的天然状态，不丧失其生物活性的过程。影响提取的因素主要有：目的产物在提取溶剂中溶解度的大小、由固相扩散到液相的难易程度、溶剂的 pH 和提取时间等。通常，极性物质