



新世纪高等学校规划教材·生物科学系列

生物化学 实验指导

主 编◎刘国花 胡 凯
副主编◎邓 欢 冉 烈 刘 静

SHENGWU HUAXUE
SHIYAN ZHIDAO



北京师范大学出版集团
BEIJING NORMAL UNIVERSITY PUBLISHING GROUP
北京师范大学出版社



新世纪高等学校规划教材·生物科学系列

重庆文理学院特色应用型教材建设资助

生物化学 实验指导

主 编◎刘国花 胡 凯
副主编◎邓 欢 冉 烈 刘 静

SHENGWU HUAXUE
SHIYA



北京师范大学出版集团
BEIJING NORMAL UNIVERSITY PUBLISHING GROUP
北京师范大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验指导/刘国花, 胡凯主编. —北京: 北京师范大学出版社, 2019. 1

(新世纪高等学校规划教材·生物科学系列)

ISBN 978-7-303-23999-3

I. ①生… II. ①刘… ②胡… III. ①生物化学-化学实验-高等学校-教学参考资料 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 182698 号

营销中心电话 010-62978190 62979006
北师大出版社科技与经管分社 www.jswsbook.com
电子信箱 jswsbook@163.com

出版发行: 北京师范大学出版社 www.bnup.com
北京市海淀区新街口外大街 19 号
邮政编码: 100875

印刷: 保定市中画美凯印刷有限公司
经销: 全国新华书店
开本: 787 mm×1092 mm 1/16
印张: 12.50
字数: 260 千字
版次: 2019 年 1 月第 1 版
印次: 2019 年 1 月第 1 次印刷
定 价: 34.90 元

策划编辑: 刘风娟 责任编辑: 刘风娟
美术编辑: 刘 超 装帧设计: 刘 超
责任校对: 赵非非 黄 华 责任印制: 赵非非

版权所有 侵权必究

反盗版、侵权举报电话: 010-62978190

北京读者服务部电话: 010-62979006-8021

外埠邮购电话: 010-62978190

本书如有印装质量问题, 请与印制管理部联系调换。

印制管理部电话: 010-62979006-8006

前 言

生命科学在 21 世纪有着惊人的发展，生物化学是其中最为活跃的学科之一。作为生命科学的核心，其基础理论和技术手段已被广泛地应用于生命科学研究的各个领域。开展生物化学实验的目的是为了让学生巩固和加深对生物化学基础理论的理解，掌握生物化学基本操作技术，培养初步的科研思维和实验数据的整理和分析能力，为其后期学习和将来进行科学研究打下坚实的基础。

目前大学教育已由精英教育转变为大众教育，随着近年来高等教育事业的改革，也带来一系列问题。学生的基础知识和接受能力，以及教材的适应性都存在一定问题，迫切需要一系列改革，但是目前大多数教材都存在追求高、精、尖的情况，很多普通院校只能在这些教材中适当选用很少部分内容使用，大多数只能作为参考资料，很多教材并不适合于这些院校使用，目前很多学校需要的是既适合教学要求，又能满足学生需要的教材。本书是为了适应应用型本科院校而编写的，由于社会的转型需要大量的应用型高级人才，这种专门型人才既不同于以往的普通高校，也不同于高职高专，其既要有普通高校的基础理论，又要有高职高专的动手技能，为了适应这一类型人才的教学需求，我们特编写一套适用于应用型高校的教材。本书适用于应用型本科院校的生物科学、生物技术、生物工程、动物科学、农业科学、园艺、食品科学与工程等专业学生使用，也可供相关技术人员参考。

本书共分两个部分：第一部分是生物化学常用实验技术，阐述了生物化学一些常用的实验技术，包括普通实验技术、分光光度技术、电泳技术、透析及膜分离技术、层析技术、色谱技术、离心技术及核酸分离纯化技术；第二部分是生物化学实验，主要包括 26 个实验项目，分为三个部分，生物大分子的分离、质量及活力检测和活性成分分析。这些实验项目包含了三个层次的项目，基础实验、综合实验以及开放或小课题实验，可以满足不同层次学生的多方面的需求。其中的第二、八章及实验十二、二十二、二十四由邓欢编写，第一章、实验十六、十七及附录中的实验室安全由冉烈编写，第七章及实验十九、二十、二十三由刘静编写，

其余部分由刘国花和胡凯编写。

在编写过程中，参阅了众多书籍和资料，在参考文献中恕未能全部列出。由于我们水平有限及时间仓促，收中难免存有一些不足和疏漏，恳请谅解并竭诚希望广大读者给予批评指正。

2018年11月

目 录

课程要求 /1

上篇 生物化学常用实验技术

第一章 普通实验技术 /5

- 第一节 玻璃仪器的洗涤与干燥 5
- 第二节 常用量器的使用 6
- 第三节 一般操作法 8

第二章 分光光度技术 /9

- 第一节 分光光度计的原理 9
- 第二节 分光光度计的结构和类型 12

第三章 电泳技术 /18

- 第一节 电泳原理 18
- 第二节 常用电泳方法 21

第四章 透析及膜分离技术 /27

- 第一节 透析技术 27
- 第二节 膜分离技术 31

第五章 层析技术 /34

- 第一节 层析原理 34
- 第二节 常见的层析方法 34

第六章 色谱技术 /52

第一节 气相色谱	52
第二节 液相色谱	55

第七章 离心技术 /60

第一节 离心基本原理	60
第二节 离心机的分类和使用方法	60

第八章 核酸分离纯化技术 /64

第一节 核酸的理化性质	64
第二节 常用分离方法和纯化技术	65
第三节 基因组 DNA 的分离与纯化	70
第四节 质粒 DNA 的提取与纯化	73
第五节 RNA 的分离与纯化	75

下篇 生物化学实验

第九章 生物大分子的分离 /81

实验一 氨基酸的分离鉴定	81
实验二 牛乳中酪蛋白的制备	83
实验三 醋酸纤维薄膜电泳分离血清蛋白	84
实验四 透析法分离蛋白质	87
实验五 超氧化物歧化酶的提取与纯化	90
实验六 植物组织 DNA 的提取	93
实验七 动物组织 DNA 的提取	98
实验八 可溶性糖硅胶 G 薄层层析	102
实验九 油料作物粗脂肪的提取	104

第十章 质量及活力检测 /108

实验十 游离氨基酸总量的测定	108
实验十一 蛋白质浓度测定	110
实验十二 SDS-PAGE 电泳测定蛋白质相对分子质量	116
实验十三 核酸的纯度和浓度分析	122
实验十四 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA	124

实验十五	酶的性质	126
实验十六	酶促转氨反应酶活力的测定	130
实验十七	过氧化物酶、多酚氧化酶和超氧化物歧化酶活性的测定	133
实验十八	果蔬中抗坏血酸的测定	136
实验十九	还原糖和总糖含量的测定	138
实验二十	血糖的定量测定	144
实验二十一	血清总胆固醇的测定	148

第十一章 活性成分分析 /150

实验二十二	天然产物中多糖的提取、测定及成分分析	150
实验二十三	动物肝脏碱性磷酸酶(AKP)的分析	154
实验二十四	植物材料总黄酮的提取及含量测定	161
实验二十五	果蔬色素的分离与检测	166
实验二十六	大豆磷脂的提取与分析	170

附 录 /173

参考文献 /189

课程要求

一、课程目标

1. 学习设计一个实验的基本思路,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. 培养严谨细致的科学作风,规范有序地进行所有的实验,准确翔实地记录实验现象和数据,撰写规范的实验报告。
3. 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。
4. 掌握生物化学的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。

二、预习报告、实验记录与实验报告

1. 预习与讨论

(1) 钻研实验教材,阅读其他参考资料的相关内容,弄清实验原理,明白做好实验的关键及有关实验操作的要领和仪器用法。

(2) 合理安排好实验。

(3) 写出预习报告,内容包括:每次实验的标题,用反应式、流程图等表明实验步骤,留出合适的位置记录实验数据和实验现象或设计一个记录实验数据和实验现象的表格等。

(4) 实验前教师以提问的形式指出实验的关键,由学生回答,然后讨论与交流。

2. 实验记录

(1) 每位同学必须准备一个实验记录本,实验前在记录本上写好实验预习报告,包括详细的实验操作步骤(可以用流程图表示)和数据记录表格等。

(2) 记录本上要编好页码,不得撕缺和涂改,写错时可以划去重写。不得用铅笔记录,只能用钢笔和圆珠笔。

(3) 实验中应及时准确地记录所观察到的现象和测量的数据,条理清楚,字迹端正,切不可潦草以致日后无法辨认。

(4) 实验中要记录的各种数据,都应事先在记录本上设计好各种记录格式和表格,以免实验中由于忙乱而遗漏测量和记录,造成不可挽回的损失。

(5) 实验记录要注意有效数字,如吸光度值应为“0.050”,而不能记成“0.05”。每个结果都要尽可能重复观测2次以上。

(6) 实验中要详细记录实验条件,如使用的仪器型号、编号、生产厂等;生物材料的来源、形态特征、健康状况、选用的组织及其重量等;试剂的规格、化学式、分子量、试剂的浓度等,都应记录清楚。

3. 实验报告

实验报告是实验的总结和汇报,通过实验报告的写作可以分析总结实验的经验和问题,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。实验报告的格式应为：(1)目的；(2)原理；(3)器材和试剂；(4)实验步骤或操作；(5)结果与分析。

三、实验室规则

1. 实验前必须认真预习实验内容，明确本次实验的目的和要求，掌握实验原理，写好预习报告，设计实验数据记录表格。

2. 实验时自觉遵守实验室纪律，保持室内安静，不大声说笑和喧哗。

3. 实验过程中要听从教师指导，认真按照实验步骤和操作规程进行实验。若想改进和设计新的实验方法，必须取得教师的同意。实验时认真进行实验记录，实验完毕及时整理数据，按时上交实验报告。

4. 要规范整洁，实验台面、称量台、药品架、水池以及各种实验仪器内外都必须保持清洁整齐，药品称完后立即盖好瓶盖放回药品架，严禁瓶盖及药匙混杂，切勿使药品洒落在天平和实验台面上，毛刷用后必须立即挂好，各种器皿不得丢弃在水池内。

5. 注意节约，按实验实际使用量配制试剂。

6. 做好标记，配制的试剂和实验过程中的样品，必须贴上标签并写上品名、浓度、姓名和日期等，放在冰箱中的易挥发溶液和酸性溶液，必须严密封口。

7. 配制和使用洗液必须极为小心，强酸强碱必须倒入废液缸或冲稀后排放。电泳后的凝胶和各种废弃物不得倒入水池，只能倒入废物桶。

8. 使用贵重精密仪器应严格遵守操作规程。使用分光光度计时不得将溶液洒在仪器内外和地面上。

9. 实验室内严禁吸烟、饮水和进食，严禁用嘴吸移液管和虹吸管。易燃液体不得接近明火和电炉，凡产生烟雾、有害气体和不良气味的实验，均应在通风条件下进行。

10. 实验完毕必须及时洗净并放好各种玻璃仪器，保持实验台面和实验柜内的整洁。

11. 不得将器皿遗弃在所使用的仪器内和其他实验台面上，打碎了玻璃仪器要及时向教师报告，并自觉登记，学期结束时按规定进行处理。

12. 烘箱、恒温水浴锅和电炉用毕必须立即断电，不得过夜使用，要严格遵守实验室安全用电规则和其他安全规则。

13. 每日实验完毕，值日生要认真做好实验室的卫生值日工作。最后离开实验室的实验人员，必须检查并关好水、电、门、窗。

上篇 生物化学常用实验技术

第一章

普通实验技术

第一节 玻璃仪器的洗涤与干燥

生物化学实验中经常使用各种玻璃仪器，其洁净与否关系实验结果的可靠性。因此，实验前必须将所使用的玻璃仪器清洗干净并及时干燥。

一、玻璃仪器的洗涤

玻璃仪器上附着的污物一般为尘土、可溶性物质以及其他不溶性物质、有机物等，应根据实验要求以及污物性质等具体情况，采取适当的洗涤方法。

1. 直接刷洗

用毛刷蘸水刷洗，可除去附着的尘土、可溶性物质和易刷洗掉的不溶性物质。

2. 用去污粉(或洗衣粉、洗涤剂)洗

先用少量自来水润湿器皿表面，再加入适量去污粉(洗衣粉)或倒入适量洗涤剂后刷洗，可除去有机污物及油污。

3. 用特殊洗液洗

(1) 铬酸洗液

铬酸洗液具有强酸性和强氧化性，能很好地去除油污及有机物。洗涤时装入适量洗液，倾斜仪器并缓慢转动，使洗液润湿器皿全部内壁，转动数圈后将洗液倒回原瓶中，残留洗液用自来水清洗。移液管、容量瓶等玻璃器皿常用此洗液洗涤。

(2) 盐酸(1:1)溶液

可洗涤碱性物质及大多数无机物残留杂质。

(3) 有机溶剂

可去除油污或可溶于该溶剂的有机物。

(4) 氢氧化钠-乙醇溶液

可去除油污及部分有机污物。

(5) 盐酸-乙醇溶液

被染色的移液管等玻璃器皿可用此溶液洗涤。

4. 新购玻璃仪器

用自来水洗净后，先浸泡在1%~2%盐酸溶液中过夜以除去玻璃表面的碱性物质，再用自来水冲洗。

所有玻璃器皿洗净后必须用蒸馏水润洗(“少量多次”原则)，清洗干净的玻璃器皿壁上不挂水珠也不成股下流，而是留有均匀的一层水膜。

二、玻璃仪器的干燥

玻璃仪器洗净后,可根据不同情况,采取适宜的干燥方法。

1. 晾干

仪器洗净后不急需使用的,可放置于干燥、洁净处让其自然晾干。

2. 烤干

烧杯、试管等可放置于电炉或酒精灯上用小火烤干。

3. 烘干

可放置于电热鼓风干燥箱中烘干。先将仪器内的水尽量沥干,再将仪器口朝下放置于烘箱内(若倒置后不稳的器皿则平放),于 $100\sim 105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干。

4. 吹干

可用电吹风或压缩空气将其吹干。

5. 用有机溶剂干燥

一些不宜加热的玻璃仪器可加入少量乙醇、丙酮或其混合液,使壁上的水与有机溶剂混合后倒出,少量残留混合液便很快挥发干燥。

第二节 常用量器的使用

.....

实验中经常进行溶液的配制、液体体积的量取等基本操作,涉及常用量器的使用。因此,规范、熟练地使用常用量器是十分重要的,关系到实验结果的准确性。

一、量筒和量杯

量筒和量杯是量取液体体积不十分精确的常用普通玻璃量器。常用规格有5、10、50、100、250、500、1000 mL等,可根据实验需要选择合适的量筒或量杯,切勿用大容量量器量取小体积。

量取液体时,左手持量器,大拇指指尖指示所需体积的刻度处,右手持试剂瓶,瓶口紧靠量器口边缘,慢慢注入溶液到所需刻度,停留15 s,读数时视线与液体的弯月面最低处保持水平,刻度与溶液凹液面相切。

二、移液管和吸量管

移液管是定容量的大肚管,俗称大肚吸管,只有一条刻度线,无分度刻度线,常用规格有10、20、25 mL等;吸量管有分度刻度线,用于量取非固定量的体积,有0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20 mL等规格。移液管和吸量管都是用于准确量取液体体积的玻璃量器,其精密度较高。

移液管或吸量管使用时,右手拇指及中指握住管颈标线以上部分,左手拿洗耳球,将管尖插入液体中,先将洗耳球内空气排除后尖端插入管口并使其密封,慢慢地让洗耳球自然恢复原状,直至液体上升到管颈标线以上,迅速朝上移去洗耳球,立即用右手食指按住管口,将移液管或吸量管垂直提高到标线与视线在同一水平,左手握住盛

放被移取溶液的器皿口接在移液管尖下方，右手拇指及中指轻轻转动管身，使食指与管口间微微打开，让溶液平稳下降至液面弯月面与标线相切，立即按紧食指。将移液管或吸量管转入承接溶液的容器中，管尖停靠在器皿内壁上，管身保持竖直，承接的器皿倾斜(管身与器皿成 30°)，松开食指，让溶液自然地全部流入，停留15 s后移开。

在使用移液管或吸量管时，应注意：移液管或吸量管尽量插入液面底部，但勿与器皿底部接触，防止液面降低使管内液体吸入洗耳球；管口以及封堵管口的食指一定要保持干燥；若管身上标注有“吹”字，应用洗耳球将管内剩余的一滴溶液吹入。

三、容量瓶

容量瓶主要用于配制准确浓度溶液或定量稀释溶液，由无色或棕色玻璃制成，常用规格有10、25、50、100、200、250、500、1000 mL等。容量瓶使用步骤如下。

1. 检漏

容量瓶使用前先检查瓶口是否漏水，即装入自来水后盖好塞子，右手(或左手)大拇指和中指握住瓶颈，食指按住塞子，左手(或右手)托住瓶底，将瓶子倒立数分钟，观察瓶塞与瓶口处是否渗水或漏水，不渗水或不漏水方可使用。

2. 洗涤

用自来水冲洗或洗液洗涤后再用自来水冲洗，最后用蒸馏水润洗。

3. 溶液配制

(1) 用固体试剂配制溶液

先把固体药品(试剂)在烧杯中溶解后，用玻璃棒引流转移到容量瓶中，再用少量蒸馏水多次洗涤烧杯并完全转移到容量瓶中。加水至容量瓶容积的 $3/4$ 左右，沿水平方向摆动容量瓶几周以初步混匀溶液(勿塞塞子)。加水至刻度线下约1 cm处，静置约1 min，再用滴管或洗瓶缓缓加水至刻度线。塞紧瓶塞，右手(或左手)大拇指和中指握住瓶颈，食指按住塞子，左手(或右手)托住瓶底，将容量瓶颠倒15次左右，并且在倒置状态时水平摇动几周。

(2) 稀释溶液

用移液管或吸量管量取一定体积溶液加入瓶中，再加蒸馏水，其后操作步骤同上。

四、加样器的使用

加样器，常称为“移液枪”“移液器”，是一种精密的取液仪器，分为固定容量加样器和可调式加样器两类，固定容量加样器常用规格有25、50、100、200、500、1000 μL ，可调式加样器规格有0.5~10、10~100、20~200、100~1000 μL 等。每种加样器都对应专用塑料吸头，常用吸头规格有10、20、100、200、1000 μL 等，颜色为白色、黄色、蓝色，吸头一般为一次性使用。

使用加样器时，先将相应塑料吸头装在加样器前端，轻轻转动吸头以确保气密性，可调式加样器先转动调节旋钮至所需体积示数。右手四指并拢握住加样器上端，拇指向下按住加样器顶端按钮至第一停止位置，然后将加样器的吸头插入待取溶液中，缓缓松开按钮取出液体，停留约2 s后移出液面，擦去吸头表面溶液。排液时吸头接触倾斜的器皿内壁，向下按动加样器顶端按钮至第一停止位置，停留1 s后按压至第二停止

位置。按下吸头推杆，将吸头推出。

第三节 一般操作法

一、溶液配制

根据实验需要以及实验性质，选择不同配制方法。溶液配制好后，根据实验要求将其放置于指定地方(如放置于暗处或保存于冰箱中)。

1. 用固体试剂配制

用药匙(牛角药匙或不锈钢药匙)取用固体试剂，药匙必须干净且不得交叉使用，以防止污染试剂。配制前，先计算所需固体试剂的质量，称量时可将试剂放置于称量纸或洁净的表面皿等上，将称好的试剂倒入烧杯中溶解，定容至所需体积即可。

2. 用液体试剂配制

定量取用液体试剂时需用量筒、移液管或吸量管等，取用前核对试剂标签，取好后倒入烧杯、试剂瓶或容量瓶中，加蒸馏水至所需刻度即可。

二、过滤

1. 常压过滤

取一张圆形滤纸，对折两次后展开，用适量蒸馏水润湿，使滤纸紧贴玻璃漏斗内壁，用玻璃棒轻压滤纸赶走气泡，过滤时在三层滤纸一边缓缓倒入溶液，液面高度低于滤纸 2~3 cm。

2. 减压过滤

减压过滤可加速过滤，同时起到干燥的作用。减压过滤时使用布氏漏斗和抽滤瓶、真空泵，过滤前先剪好一张圆形滤纸(滤纸直径比漏斗内径略小)，用少量水润湿滤纸，打开真空泵，使滤纸紧贴漏斗，然后开始过滤。

三、离心

离心分离速度较快，有利于迅速判断是否沉淀完全。离心时先将沉淀和溶液装在离心管中，再放入离心机中高速旋转，使沉淀集中在离心管底部，上层为清液。在离心操作过程中，应注意：将离心管放入离心机转子时，应对称、平衡；离心时，切勿超过离心机允许的最高转速；离心结束，应让离心机自然停止转动，切勿用手强制其停止。

第二章

分光光度技术

分光光度法是通过测定被测物质在特定波长处或一定波长范围内光的吸收度,对该物质进行定性和定量分析的方法。它具有灵敏度高、操作简便、快速等优点,是生物化学实验中最常用的实验方法,广泛用于糖、蛋白质、核酸、酶等的快速定量检测。

第一节 分光光度计的原理

一、光学的基础知识

1. 光的本质

光是一种电磁辐射(或称电磁波),它具有波动性和粒子性。

(1)波动性:波长 λ 、波数 σ 和频率 ν 之间的关系:

$$\nu = c/\lambda$$

$$\sigma = 1/\lambda = \nu/c$$

(2)粒子性:每个光量子的能量(E)与其频率(ν)及波长(λ)之间的关系为:

$$E = h\nu = hc/\lambda = hc\sigma$$

式中, E 为电磁波能量(J); h 为普朗克常数,其值 $6.63 \times 10^{-36} \text{ J} \cdot \text{s}$; c 为光速,其值约为 $3 \times 10^{10} \text{ cm/s}$; σ 为波数(每厘米长度内所含波长的数目)(cm^{-1}); λ 为波长(nm)。由上式可见,波长越短,光子的能量越大。

2. 电磁波谱

电磁波按电磁波长顺序排列,称为电磁波谱(表 2-1)。

表 2-1 电磁波谱

区域	光谱区	波长范围	频率范围 (MHz)	光子能量 (eV)	所涉及电子的 跃迁类型
高能 辐射	γ 射线	5~140 pm	$6 \times 10^{10} \sim 2 \times 10^{12}$	$8.3 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^6$	核能级
	X 射线	$10^{-3} \sim 10 \text{ nm}$	$3 \times 10^{10} \sim 3 \times 10^{14}$	$1.2 \times 10^2 \sim 1.2 \times 10^6$	内层电子能级
	远紫外	10~200 nm	$1.5 \times 10^9 \sim 3 \times 10^{10}$	6~125	
光学 光谱 区	近紫外	200~400 nm	$7.5 \times 10^8 \sim 1.5 \times 10^9$	3.1~6	价电子或成键 电子能级
	可见光	400~750 nm	$4.0 \times 10^8 \sim 7.5 \times 10^8$	1.7~3.1	
	近红外	0.75~2.5 μm	$1.2 \times 10^8 \sim 4.0 \times 10^8$	0.5~1.7	分子振动能级
	中红外	2.5~50 μm	$6.0 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^8$	0.02~0.5	
波谱区	远红外	50~1000 μm	$10^5 \sim 6.0 \times 10^6$	$4 \times 10^{-4} \sim 2.0 \times 10^{-2}$	分子转动能级
	微波	0.1~100 cm	$10^2 \sim 10^5$	$4 \times 10^{-7} \sim 4 \times 10^{-4}$	
	射频	1~1000m	$0.1 \sim 10^2$	$4 \times 10^{-10} \sim 4 \times 10^{-7}$	电子和核自旋