



普通高等教育“十三五”规划教材

生物化学实验指导

第2版

A Guide for Biochemistry Experiments

张宽朝 金青◎主编



中国农业大学出版社
China Agricultural University Press

普通高等教育“十三五”规划教材

生物化学实验指导

第2版

张宽朝 金 青 主编

中国农业大学出版社

· 北京 ·

内 容 简 介

《生物化学实验指导》第2版以经典生物化学实验为基础,既适当保留传统验证性实验,又增加了一定比例的综合性、设计性实验。全书以研究技术为主线,共收集了38个实验项目,内容涵盖糖类化学、脂质化学、蛋白质化学、酶学、核酸化学、新陈代谢六大方面,包括物质提取、分离、定性鉴定、定量测定等常用实验,也包含DEAE-纤维素薄板层析法、等电聚焦电泳等新技术。书后附录包括常用仪器的使用方法、常用缓冲溶液的配制方法、实验室常用参考数据等内容,便于读者查阅。

在编写风格上,本书突出基础、实用,可操作性强,紧扣生物化学实验技术的核心知识,补充反映学科发展方向的新实验,注重实验科学的先进性及学生基本实验技能和综合创新素质的培养。本书适用于高等农业院校、综合性院校、师范类院校的生物科学类、植物生产类、食品工程类、环境科学类、动物生产类等相关专业的本科教学实验,也可供高等师范院校、综合性大学相关领域的科技工作者参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验指导/张宽朝,金青主编.—2版.—北京:中国农业大学出版社,2019.6
ISBN 978-7-5655-2216-1

I. ①生… II. ①张…②金… 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(2019)第096508号

书 名 生物化学实验指导 第2版

作 者 张宽朝 金 青 主 编

策划编辑 潘晓丽

责任编辑 潘晓丽

封面设计 郑 川

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区学清路甲48号

邮政编码 100083

电 话 发行部 010-62733489,1190

读者服务部 010-62732336

编辑部 010-62732617,2618

出版部 010-62733440

网 址 <http://www.caupress.cn>

E-mail cbsszs@cau.edu.cn

经 销 新华书店

印 刷 北京鑫丰华彩印有限公司

版 次 2019年6月第2版 2019年6月第1次印刷

规 格 787×980 16开本 14.5印张 265千字

定 价 38.00元

图书如有质量问题本社发行部负责调换

第2版编写人员

主 编 张宽朝 金 青

副主编 余 梅 吴 彦 魏练平

参 编 (以姓氏笔画为序)

马 欢	王传宏	王朝霞	龙雁华	阮 飞
孙 锋	刘 鑫	何孔泉	余江流	张 琛
芮 斌	汪 曙	陶 芳	商 飞	蒋而康

第 1 版编写人员

主 编 金 青

副主编 余 梅 张宽朝

参 编 (以姓氏笔画为序)

马 欢 文 汉 龙雁华 孙 锋 何孔泉

阮 飞 汪 曙 张 琛 芮 斌 陶 芳

蒋而康 魏练平

第2版前言

生物化学是关于生命的化学,是生命科学类、植物生产类、动物科学类、环境科学类、食品科学类等相关学科和专业的基础核心课程。生物化学是一门实验性学科,生物化学实验技术日益成为当代生命科学及相关学科研究的重要手段,生物化学实验技术和方法的改进直接推动了生命科学及其相关学科领域的飞速发展。生物化学实验技术的训练,对加深学生理解和掌握生物化学实验基本原理和基础知识,加强学生对生物化学实验操作技术的实践和运用能力的培养,提升学生的观察、分析和解决问题的综合能力,塑造学生的团队合作意识和严谨的科学实验态度等都起着十分重要的作用。

《生物化学实验指导》第2版是在第1版的基础上,结合新形势下生物化学实验教学研究 and 教学改革的经验体会,对第1版教材进行了大量修订编写而成。全书以技术方法为主线,在传统验证性实验的基础上,增加设计性、研究性和综合性的实验项目,构建基础性、综合性、设计性3个层次的实验教学课程体系,既努力体现课程内容的创新性、实践性、先进性的特点,又兼顾不同学科、不同专业学生对生物化学实验学习的需求。

《生物化学实验指导》第2版共收集了38个实验,分为基础性实验、综合性实验、设计性实验3个单元,内容涵盖糖类化学、脂质化学、蛋白质化学、酶学、核酸化学、新陈代谢六大方面的研究技术,既有经典的物质提取、分离、定性鉴定、定量测定实验,也有广泛应用的DEAE-纤维素薄板层析、等电聚焦电泳等新技术。书后附录包括常用仪器的使用方法、常用缓冲溶液的配制方法、实验室常用参考数据等内容,便于读者查阅。

本教材由来自安徽农业大学、安庆师范大学、合肥师范学院的教师共同参与编写,融合了编者多年从事生物化学实验教学实践的心得和对一些实验方法改进所做的有益尝试。本书实验内容均经过各位编委多年的实验教学及科研工作的反复验证,同时也参考了一些报道的其他研究方法,均为成熟的操作。本书可用于高等农业院校、高等师范院校及综合性大学生物科学类、植物生产类、食品工程类、环

境科学类、动物生产类等相关专业的本科或研究生实验教学,也可供相关领域的科技工作者参考使用。

本教材在编写中借鉴和引用了国内外一些优秀教材与资料,在出版过程中得到安徽农业大学教务处、教材中心和中国农业大学出版社的大力支持和帮助,在此一并致以衷心的感谢!

在教材编写和出版过程中,编委们精益求精,突出基础,力求简练、实用,方便教学,但鉴于编者水平有限,书中错误及疏漏之处在所难免,敬请各位读者批评指正。

编 者

2019年1月

第 1 版前言

生物化学是一门实验性科学,是农、林、医等院校相关专业重要的学科基础课程,生物化学实验技术日益成为当代生命科学及相关学科研究的重要手段,生物化学实验技术和方法的改进直接推动了生命科学及其相关学科的飞速发展。加强生物化学实验教学,掌握生物化学的实验技术、基本原理以及研究过程,不仅使学生加深对生物化学基本原理、基础知识的理解,而且对培养学生分析问题、解决问题的能力及严谨的科学态度及提高科研技能等都具有十分重要的作用。

为了培养学生的创新思维和实践能力,我们进行了教学改革,重组了实验教学内容,在传统验证性实验基础上,适当增加了一定比例的综合性和设计性实验,将全书实验内容整合为“基础实验”“综合性实验”“设计性实验”三大板块。在实验教学改革实践中,建立了既突出生物化学专业特色,又能提高学生基本实验技能、培养综合创新素质的实验教学体系。

《生物化学实验指导》共收集了 36 个实验,包括糖类、脂类、蛋白质、核酸、酶、生物代谢六大方面,既有常用的物质提取、分离、定性鉴定、定量测定实验,也有广泛应用的 DEAE-纤维素薄板层析、各种凝胶电泳等新技术,对于一些传统经典而有特色的实验和方法仍作保留。在编写风格上,突出基础,简明、实用。本书强调生物化学的最基本实验原理、基本技术和方法,实验所用材料简单易得,尽量避免使用昂贵的器材。每个实验详细列出所需仪器、材料和试剂及其配制方法,且对于学生实验中易出错处及实验关键处,在注意事项中特别列出作为提示指导。书后附录部分更新了当前生物化学实验室常用仪器的使用方法介绍,并附常用数据表及常用试剂的配制等内容,可供读者查阅。

本书实验内容经过实验教学及科研的反复验证,同时也参考了其他一些研究方法,均为成熟的操作。本书可作为高等院校及专科院校生物、农、林、医等相关专业的本科教学实验,也可供高等师范院校、综合性大学相关领域的科技工作者参考使用。

书中借鉴了国内一些优秀教材与资料,在此表示衷心的感谢!本教材出版得

到安徽农业大学教务处、教材中心和中国农业大学出版社的大力支持和帮助,在此一并表示感谢!

本教材融合了编者自身多年从事生物化学教学实践的心得和对一些实验方法改进所做的有效尝试。鉴于编者水平有限,书中必存在不当之处,真诚希望能得到广大读者的批评指正。

编者

2014年5月

目 录

绪论	1
一、生物化学实验室规则	1
二、生物化学实验的学习方法	2
第一单元 基础性实验	7
实验一 还原糖的测定——3,5-二硝基水杨酸比色法	9
实验二 总糖的测定——蒽酮比色定糖法	12
实验三 血糖的测定——邻甲苯胺法	15
实验四 粗脂肪的提取与含量测定——索氏抽提法	18
实验五 血清总胆固醇的测定——邻苯二甲醛法	22
实验六 脂肪碘值的测定——氯化碘加成法	25
实验七 氨基酸的分离鉴定——纸层析法	29
实验八 谷物种子中赖氨酸含量的测定——茚三酮比色法	32
实验九 胰岛素 N 末端的测定——聚酰胺薄膜层析法	36
实验十 蛋白质含量的测定	40
I. 微量凯氏定氮法	40
II. Folin-酚试剂法	44
III. 考马斯亮蓝 G-250 染色法	47
IV. 紫外吸收法	49
实验十一 蛋白质的脱盐——凝胶层析法	52
实验十二 血清蛋白质的分离——醋酸纤维素薄膜电泳法	56
实验十三 蛋白质亚基分子量的测定——SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法	62
实验十四 酶的化学特性	67
实验十五 米氏常数(K_m)和最大反应速率(V_{max})的测定	72
实验十六 酶的竞争性抑制作用——琥珀酸脱氢酶	77
实验十七 植物过氧化物酶同工酶的分离、鉴定——等电聚焦电泳法	80

实验十八	维生素 A、维生素 B ₁ 和维生素 B ₂ 的鉴定	84
实验十九	维生素 A 含量的测定	88
实验二十	维生素 C 含量的测定——2,6-二氯酚靛酚滴定法	91
实验二十一	核酸含量的测定	95
	I. 紫外吸收法	95
	II. 定磷法	97
实验二十二	酵母 RNA 的提取、鉴定及含量测定	101
实验二十三	动物组织中 DNA 的提取	105
实验二十四	核苷酸的分离鉴定——DEAE-纤维素薄板层析法	107
实验二十五	DNA 的琼脂糖凝胶电泳	110
实验二十六	糖酵解中间产物的鉴定——抑制剂法	114
实验二十七	酶促转氨反应的鉴定——纸层析法	117
实验二十八	末端氧化酶——多酚氧化酶的显现与活性测定	120
实验二十九	脂肪酸的 β -氧化——硫代硫酸钠滴定法	123
第二单元	综合性实验	127
实验三十	蛋白质分子量的测定——凝胶层析法	129
实验三十一	牛奶中酪蛋白的提取与含量测定	134
实验三十二	豆磷脂的制备与鉴定	140
实验三十三	酵母蔗糖酶的分离提取及效果分析	147
实验三十四	综合实践: 盐胁迫对小麦种子萌发及幼苗生理生化特性的影响	152
第三单元	设计性实验	157
实验三十五	毛发的水解、鉴定和胱氨酸制备	159
实验三十六	外界因素对酶活性的影响	161
实验三十七	小麦萌发前后淀粉酶活力的比较	164
实验三十八	多糖的提取与分析鉴定	166
附录	169
附录一	实验室安全与防护知识	171
附录二	玻璃仪器的清洗与干燥	172
附录三	试剂的配制与保存	175

附录四	常用缓冲溶液的配制·····	179
附录五	常用酸碱指示剂及有机溶剂的性质·····	184
附录六	常用仪器设备的使用·····	190
附录七	离心机转速($r \cdot \text{min}^{-1}$)与相对离心力(RCF)的换算·····	212
附录八	常见蛋白质的相对分子质量和等电点参考值·····	214
附录九	硫酸铵饱和度常用表·····	216
参考文献	·····	218

绪 论

一、生物化学实验室规则

生物化学实验室是培养学生科学、严谨的学习态度和工作作风,学习生物化学实验技术基本知识,训练并掌握生物化学实验技术的重要场所。学生应严格遵守生物化学实验室的规则,养成良好的实验习惯和实验规范,不断提高生物化学实验技术的运用和实践能力。

(1)认真预习实验指导,明确实验目的和要求,了解实验基本原理,掌握实验的步骤和操作方法,熟悉仪器设备的操作规程和注意事项。

(2)遵守实验课程纪律,上课不迟到、不早退、不无故旷课;自觉保持实验室的安静,认真听讲,按照要求回答老师问题,不得喧哗、谈笑;随时注意保持实验室整洁,滤纸、废品等必须按照要求放入废物桶内。

(3)实验中要认真、严格操作,仔细观察,如实记录实验现象和数据,并认真分析问题、处理数据,独立、按时完成实验报告。

(4)使用精密、贵重仪器,必须了解其性能和操作方法,严格遵守操作规程,并在老师指导下操作。实验中因故损坏仪器、器皿,应及时报告,并要给予适当赔偿。

(5)实验中应注意节约药品,取用药品不得超过规定用量;公用药品须按规定使用,用后及时放回原处,以备他人使用。

(6)凡进行有危险性的实验,实验人员应先检查防护措施,确证防护妥当后,才可进行实验。实验中不得擅自离开,实验完成后立即做好善后清理工作,以防事故发生。

(7)凡有害或有刺激性气体发生的实验应在通风柜内进行,加强个人防护,不得把头部伸进通风柜内。实验室所用的易燃物品,如乙醚、石油醚、乙醇等低沸点有机溶剂使用时严禁明火,远离火源。若需加热,不可直接在电炉上加热,使用水浴。

(8)腐蚀和刺激性药品,如强酸、强碱、氨水、过氧化氢、冰醋酸等,取用时尽可能戴上橡皮手套和防护眼镜,倾倒时,切勿直对容器口俯视,吸取时,应该使用橡皮球。若操作不小心被强酸、强碱溅到皮肤上,应立即用大量自来水冲洗。若被强酸灼伤,用饱和 NaHCO_3 溶液中和;若被碱灼伤,用饱和 H_3BO_3 溶液中和;被氧化剂

伤害,用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 处理。

(9)不使用无标签(或标志)容器盛放的试剂或试样。

(10)实验室内严禁吸烟、饮食,以免误食和吸入有害物质。

(11)实验室内的一切物品,未经本室负责教师批准,严禁带出室外。借物必须办理登记手续。

(12)实验结束,应及时洗涤器皿、整理台面,并检查水电(如水龙头是否关紧,电源插头是否拔下)。值日生处理废物,清扫地面;待老师检查认可后方可离开实验室。

二、生物化学实验的学习方法

(一)基本要求

生物化学实验是采用生物化学的原理和方法探究生命现象化学本质的实验科学。它是生命科学类、植物生产类、环境资源类、动物科学类等各专业重要的专业基础实验课程。通过生物化学实验理论学习、实验技术训练及实验技术的综合应用,可以提高学生的实验技能,培养学生的实验动手能力和创新创造性思维能力,为应用生物化学实验技术手段进行综合性科学研究奠定基础。

要学好生物化学实验,需要科学的学习方法,应做好以下 5 个方面。

(1)充分预习。充分预习是学好生物化学实验的前提和保证。在实验课前应认真预习实验教材,明确实验的目的要求,初步了解实验的原理、方法、操作步骤,写出预习报告,明确实验的研究内容和所要解决的问题。通过课前的充分预习,可以深入地理解实验原理,初步掌握实验操作步骤和关键注意事项,对实验做到心中有数,实验中才能有的放矢,收到成效。

(2)规范操作。规范、认真的操作是培养和提高学生实践动手能力的关键。通过按拟定的操作步骤和计划、方案进行实验操作,可以进一步巩固预习效果,掌握实验技术的操作要点、仪器设备的操作规范等,提高实际动手操作技能。

(3)观察记录。实验环节中对实验现象的仔细观察和对实验数据的及时如实记录是提高实验能力的重要环节。对实验现象的观察和对实验数据的记录是积极思维的过程,是综合实验能力的重要组成方面和科研工作者的基本素质之一。

(4)归纳分析。对实验数据的归纳和对实验结果的综合分析解读是学好生物化学实验的根本。生物化学实验教学的最终目的在于提高学生的创新思维、创造能力。通过对实验现象与结果的整理、归纳、分析,将实验原理、实验操作、实验结果等融会贯通,极大提高学生分析问题、解决问题的能力。

(5)实验报告。实验报告是将对实验的感性认知提高到理性认识的有效载体。

按时按质按量地完成实验报告是对实验过程的总结和再思考,是综合实验能力培养的重要方式。

(二) 实验记录

实验记录指的是在实验室中进行科学研究的过程中,通过采用实验、观察、调查或资料分析等方法,根据研究实际情况直接记录或统计而形成的各种数据、文字、图表、图片、照片、声像等原始资料,是在进行科学实验过程中对所获得的原始资料的直接记录。

(1) 实验记录本或记录纸应注意保持完整,不得随意缺页或挖补。

(2) 实验记录应用字规范,字迹工整。实验记录时应使用规范科学的专业术语,计量单位应采用国际标准计量单位;对于常用的外文缩写(包括实验试剂的外文缩写)应符合规范,首次出现时必须用中文加以注释。

(3) 实验记录必须做到及时、真实、准确、完整,防止漏记和随意涂改。实验过程中的具体操作、实验中观察到的现象、对于异常现象的处理、产生异常现象的可能原因及影响因素的分析等,都应该如实完整记录。实验中配制溶液的过程、加样的体积、使用仪器的类型以及试剂的规格、浓度也应该记录清楚,以便在总结实验时,查找实验失败的原因。另外,对实验时的环境条件(如温度、湿度、光度等)及反应时间等也要认真记录,以便于成为今后实验的参考数据。

(4) 记录实验数据时,必须注意使用有效数字。有效数字的取舍应符合实验要求。记录数据时应选取几位有效数字,取决于实验方法与所用仪器的精确程度。如吸光度值应记录为“0.170”,而不能记录为“0.17”。

(5) 实验过程中通过计算机、自动记录仪器打印的图表和数据资料等应按顺序粘贴在记录本或记录纸相应位置上,并在相应处注明实验的日期和时间。对于不宜粘贴的,可另行整理装订成册、编号,同时在记录本相应处注明,便于查对。实验图片、照片应粘贴在实验记录的相应位置上,底片、磁盘、声像资料等特殊记录媒体应装在统一制作的资料袋内,编号另存。对于用热敏纸打印的实验记录,须保留其复印件。

(6) 对实验记录应及时整理,探究和分析实验中的细节和规律。

(三) 实验误差

生物化学实验中,由于分析方法、测量仪器、实验试剂、分析工作者等方面的不同,测量值与真实值之间往往存在一定的差异,也即误差。误差不是错误,在实验操作中,误差是不可避免的,但为了提高实验的准确度,应尽量地减少误差。

1. 误差的分类

根据误差产生的原因及性质可将误差分为系统误差与偶然误差两类。

系统误差,又称恒定误差,是由确定原因引起,服从一定函数规律的误差。一般有一定的方向,即测量值总是比真实值大或比真实值小。这种误差通常由以下因素造成:①仪器不准或不灵敏。如滴度管刻度不准、砝码未校正等;②试剂不纯,试剂质量不符合要求;③周围环境的改变,如外界温度、压力、湿度的变化等;④个人的习惯与偏向。如刻度吸管取液读数常偏高或偏低,记录某一信号的时间总是滞后,判定滴定终点的颜色程度各人不同等。因此,可根据仪器的特点、外界条件变化影响的大小、个人的偏向等分别加以校正后予以消除。

偶然误差,又称随机误差,是由不确定原因引起的服从统计规律、具有抵偿性的误差。偶然误差的大小,正负方向不一定,其产生原因一般不详,因而也就无法控制。但在同一精密仪器、同样实验条件下,可发现偶然误差完全服从统计规律。因此,误差与测量的次数有关,而且,随着测量次数的增加,测量结果的算术平均值将更接近于真实值。这种误差的发生完全出于偶然,受到或然率的支配,可以用概率理论来处理。偶然误差的存在,主要是由于通常测量者所注意的只是被认为影响较大的一些因素,其他一些小的影响,不是尚未被发现,就是无法被控制,而这些因素,正是造成随机误差的原因。

实验中常用精密度、准确度来评价实验结果中误差的大小。分析结果的准确度是指测定值与“真实值”相符合的程度。准确度是由系统误差和随机误差所决定的,它反映结果的可靠性。测定值与“真实值”越接近,说明准确度越高。在相同条件下,多次重复测定结果彼此相接近的程度叫精密度。精密度是由随机误差所决定的,它代表方法的稳定性和重现性。因此,提高实验结果的正确性必须减少实验误差。

2. 减少系统误差的方法

(1)校正仪器。通过校正仪器可降低由仪器不准确而引起的系统误差。实验前对使用的天平、砝码、容器皿或其他仪器进行预先校正以减少误差。

(2)空白试验。指在不加样品情况下,而按与样品测定完全相同的操作和完全相同的条件下进行分析,得到空白值。空白试验可以消除由于试剂中存在干扰物质所产生的系统误差。将样品分析的结果扣除空白值,可以得到比较准确的结果。

(3)对照实验。用标准样品代替试样,在与样品测定完全相同的操作和完全相同的条件下进行测定以判断反应条件是否合适,仪器是否正常,试剂是否有效等。对照试验是检验方法误差的,所以对照试验是检验系统误差的有效方法。

