

生物化学实验

主 审
主 编
副主编

吴国利
张子健
夏承岳
王 健
刘聪生

实验

范大学出版社

(沪)新登字第201号

生 物 化 学 实 验

主 编：张子健

副主编：夏承岳 王健 刘聪生

华东师范大学出版社出版发行

(上海中山北路3663号)

邮政编码：200062

浙江温州人民印刷厂印刷

开本：787×1092 1/32 印张：5.75 字数：135千字

1995年8月第一版

1995年8月第一次印刷

印数：001—3,500本

ISBN7-5617-1240-5/O·044

定价：8.50元

《生物化学实验》编撰委员会

主 编：张子健

副主编：夏承岳 王 健 刘聪生

编写成员：（按姓氏笔画排列）

王 健

刘聪生

李万仝

吴文经

张子健

钟洪枢

胡秀玲

夏承岳

蒋立科

前 言

本书是根据1990年国家教委所颁发的全国师范专科学校生物专业《生物化学教学大纲》并结合我们多年的教学实践编写而成的；可与已出版的全国师专《生物化学》教材配套使用，也可供其他高等院校的有关专业教学、科研参考。

国家教委师范司教材处、华东师范大学、北京师范大学、温州师范学院、九江师范专科学校及宜宾师范专科学校等对本书的编写和出版工作予以大力支持，谨此，表示我们最衷心的感谢！同时，我们特邀请了著名生化专家、北京师范大学吴国利教授担任本书的主审，华东师范大学出版社彭仕齐副编审任责任编辑。蒙两位老师的热情指导和认真负责地审阅书稿，并及时地提供许多宝贵意见，这对保证本书的质量是起着非常重要作用的。在此，我们向两位老师深表由衷的感谢！

在编写过程中，我们曾参考北京师范大学生物系生化教研室编《基础生物化学实验》、北京大学生物系生化教研室编《生物化学实验指导》和南京大学生物系袁玉荪等编《生物化学实验》等国内外著名教材中一些内容。特此，我们向以上有关教材编著者表示由衷感谢！

本书中实验项目主要以全国师专《生物化学》教材的内容和章节顺序作相应的编排，能较好地配合课堂讲授，对提高教学质量大有裨益！虽然本书的内容比教学大纲所规定的要多些，共有实验33个，但是考虑到各校实验室设备情况的不同，这似乎更有利于供各校按具体条件选做其中的主要实验。

本书由温州师范学院张子健同志负责编写实验⑩、⑪、⑫、⑬、⑭、⑮、⑯、⑰、⑱、⑲、⑳、㉑、㉒、㉓、㉔、㉕、㉖、㉗、㉘、㉙、㉚、㉛、㉜、㉝、㉞、㉟、㊱、㊲、㊳、㊴、㊵、㊶、㊷、㊸、㊹、㊺、㊻、㊼、㊽、㊾、㊿、一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四、十五、十六、十七、十八、十九、二十、二十一、二十二、二十三、二十四、二十五、二十六、二十七、二十八、二十九、三十、三十一、三十二、三十三。

①7、①8、②1、②2、②4、②6 I。九江师专夏承岳同志负责编写实验⑥、⑨、⑭、②7及附录(1、2、3、4、6、7、10)部分。广东教育学院刘聪生同志和广州教育学院钟洪枢同志负责编写实验②8、②9、③0、③1、③2、③3。徽州师专蒋立科同志负责编写实验⑫ I、⑮、⑰、⑳、㉓、㉖ II。宜宾师专王健同志负责编写实验①、②、③、④、⑤、⑦、⑧、⑪。昌潍师专吴文经同志负责编写实验①6、②5。沈阳大学师范学院胡秀玲同志负责编写实验⑬。天津教育学院李万仑同志负责编写附录(5、7、8、9)部分。全书由张子健同志统稿。由于本学科研究的迅速发展以及编者认识水平所限,尽管我们在编写过程中尽了最大努力,但书中存在的不完善甚至错误之处恐难避免,敬望本书的广大读者在使用过程中不吝赐教,把有关意见惠寄浙江省温州师院生物系,以便再版时集中修改。

编 委 会

1994年 10 月

主要参考书目

- [1]北京师范大学生物系生物化学教研室编：《基础生物化学实验》，人民教育出版社，北京，1983年。
- [2]北京大学生物系生物化学教研室编：《生物化学实验指导》，人民教育出版社，北京，1983年。
- [3]南京大学生物系袁玉荪等编：《生物化学实验》，人民教育出版社，北京，1982年。
- [4]张龙翔等主编：《生化实验方法和技术》，高等教育出版社，北京，1985年。
- [5]徐晓利主译（Cooper, T.G. 著）：《生物化学工具》，人民卫生出版社，北京，1980年。
- [6]莽克强等编：《聚丙烯酰胺凝胶电泳》，科学出版社，北京，1975年。
- [7]Strong, F.M. and KoCh, G.H.: Biochemistry Laboratory Manual (2nd ed), McGRAW—HILL Book Company (U.K.) Limited, 1978.
- [8]Plummer, D.T.: An Introduction to Practical Biochemistry (2nd ed.), Wm. C. Brown Company Publishers, 1978.

(2) 混合指示剂:

指示剂溶液的组成	变色点 PH	酸色	碱色	备 注
1 份0.1%甲基黄乙醇溶液 1 份0.1%甲烯蓝乙醇溶液	3.28	蓝紫	绿	PH = 3.4绿色 PH = 3.2蓝色
4 份0.1%甲基红乙醇溶液 1 份0.1%甲烯蓝乙醇稀液	5.4	红紫	绿	PH = 5.2红紫 PH = 5.4暗紫 PH = 5.6绿色
1 份0.1%中性红乙醇溶液 1 份0.1%甲烯蓝乙醇溶液	7.0	蓝紫	绿	PH = 7.0蓝紫 保存于深色瓶中
1 份0.1% α -萘酚乙醇溶液 3 份0.1%酚酞乙醇溶液	8.9	浅红	紫	PH = 8.6浅绿 PH = 9.0紫色

目 录

实验一	蛋白质及氨基酸的呈色反应.....	(1)
实验二	蛋白质的沉淀反应.....	(9)
实验三	蛋白质等电点的测定.....	(13)
实验四	纸层析法分离鉴定氨基酸.....	(15)
实验五	总氮量的测定——微量凯氏定氮法.....	(21)
实验六	甲醛滴定法测定氨基氮.....	(27)
实验七	酪蛋白的制备.....	(30)
实验八	醋酸纤维薄膜电泳法分离血清蛋白质.....	(32)
实验九	酵母RNA的提取和鉴定.....	(36)
实验十	肝脏中核酸的提取和鉴定.....	(38)
实验十一	菜花中核酸的分离及鉴定.....	(41)
实验十二	酶的性质.....	(45)
实验十三	底物浓度对酶促反应速度的影响——米氏常数的测定.....	(52)
实验十四	小麦萌发前后淀粉酶活力的比较.....	(54)
实验十五	丙二酸对琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制作用.....	(56)
实验十六	猪胰蛋白酶结晶的制备和活力测定.....	(60)
实验十七	维生素C定量测定.....	(69)
实验十八	维生素A、维生素B ₁ 、维生素B ₂ 的定性试验.....	(72)

实验十九	碘和值酸价的测定.....	(76)
实验二十	过氧化氢酶和过氧化物酶的定性试验.....	(82)
实验二十一	血糖定量 (Folin—Wu法)	(86)
实验二十二	糖酵解过程中磷酸化反应.....	(88)
实验二十三	肌糖原的酵解.....	(91)
实验二十四	脂肪酸 β -氧化	(95)
实验二十五	卵磷脂的提取和鉴定.....	(98)
实验二十六	血清总胆固醇的测定.....	(100)
实验二十七	谷丙转氨酶活力测定.....	(106)
实验二十八	尿糖及尿氮的定性试验.....	(109)
实验二十九	葡萄糖-1-磷酸的制备及其纯度测定.....	(113)
实验三十	聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白质.....	(117)
实验三十一	离子交换柱层析法分离氨基酸.....	(125)
实验三十二	蛋白质及糖类的透析.....	(129)
实验三十三	吸附层析法分离叶子色素.....	(133)
附 录		(136)
一、实验室规则		(136)
二、实验室的安全及防护知识		(137)
(一) 实验室的安全		(137)
(二) 实验室灭火法		(138)
(三) 实验室急救		(138)
三、实验室基本操作		(139)
(一) 玻璃仪器的洗涤		(139)

(二) 搅拌和振荡·····	(140)
(三) 沉淀的过滤和洗涤·····	(140)
四、实验室中常见生化仪器介绍·····	(141)
(一) 光电比色计·····	(141)
(二) 721型分光光度计·····	(144)
五、实验样品的准备·····	(146)
(一) 组织样品·····	(146)
(二) 血液样品·····	(148)
(三) 尿液样品·····	(149)
六、溶液浓度的表示及其配制·····	(150)
(一) 百分浓度·····	(150)
(二) 物质的量浓度(单位为摩尔/升)·····	(151)
七、几种常用缓冲溶液的配制·····	(153)
(一) 甘氨酸—盐酸缓冲液(0.05摩尔/升)·····	(153)
(二) 甘氨酸—NaOH缓冲液(0.05摩尔/升)·····	(153)
(三) 醋酸—醋酸钠缓冲液(0.2摩尔/升)·····	(154)
(四) 磷酸盐缓冲液(0.2摩尔/升)·····	(154)
(五) 磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液·····	(157)
(六) 柠檬酸—柠檬酸钠缓冲液(0.1摩尔/升)·····	(158)
(七) 巴比妥钠—盐酸缓冲液(18℃)·····	(159)

(八) Tris—盐酸缓冲液 (0.05摩尔/升, 25℃)	 (159)
(九) 碳酸钠—碳酸氢钠缓冲液 (0.1摩尔/升)	 (160)
(十) 硼酸—硼砂缓冲液 (0.2摩尔/升硼酸根)	 (161)
八、分析试剂的配制方法	 (163)
(一) 酸溶液	 (163)
(二) 碱溶液	 (164)
九、常用数据表	 (165)
(一) 常用酸碱百分浓度和密度的关系	 (165)
(二) 一些常用试剂的溶解度 (20℃)	 (166)
(三) 常用酸碱指示剂	 (167)
十、基础生物化学实验学生使用的仪器—组配备的清单	 (169)
主要参考书目	 (170)

实验一 蛋白质及氨基酸的呈色反应

一、目的

1. 了解蛋白质和某些氨基酸的特殊颜色反应及其原理。
2. 掌握几种常用的鉴定蛋白质和氨基酸的方法。

蛋白质所含的某些氨基酸其侧链具有特殊结构，可以与某些试剂发生反应，生成有颜色的物质。这些反应往往非常特异和灵敏，可作为蛋白质或氨基酸的定性或定量的依据。

应注意的是，一些非蛋白物质亦可产生同样的颜色反应。只有确知在被测物中无此类非蛋白物质时，才能根据颜色反应确定某些蛋白质或氨基酸的存在或含量大小。

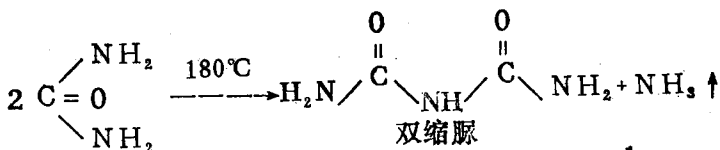
二、几种呈色反应

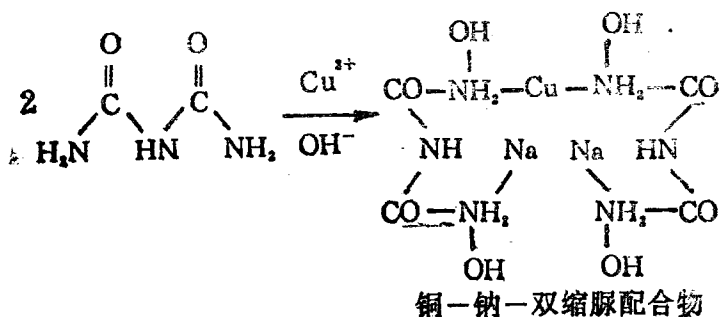
(一) 双缩脲反应

1. 原理：

当尿素加热至 180°C 左右时，两个分子的尿素缩合可放出一个分子氨后而形成双缩脲。双缩脲在碱性溶液中与铜离子结合生成复杂的红色配合物。此呈色反应称为双缩脲反应。由于蛋白质分子中含有多个肽键，其结构与双缩脲相似，故能呈此反应，而形成紫红色或蓝紫色的配合物。此反应常用作蛋白质的定性或定量的测定。

反应式如下：





含二肽以上的多肽及蛋白质均能产生双缩脲反应，但具有一个肽键和一个 $-\text{CS}-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$ 、 $-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{NH}_2$ 等基团的物质以及乙二酰二胺

$\text{NH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ ($\text{O}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$) 亦有此反应。所以，有双缩脲反应者未必都是蛋白质或多肽。

2. 试剂:

(1) 尿素。

(2) 10% NaOH 溶液。

(3) 1% CuSO_4 溶液。

(4) 卵清蛋白液: 将鸡蛋白用蒸馏水稀释10倍~20倍, 3层纱布过滤, 滤液冷藏备用。

3. 操作:

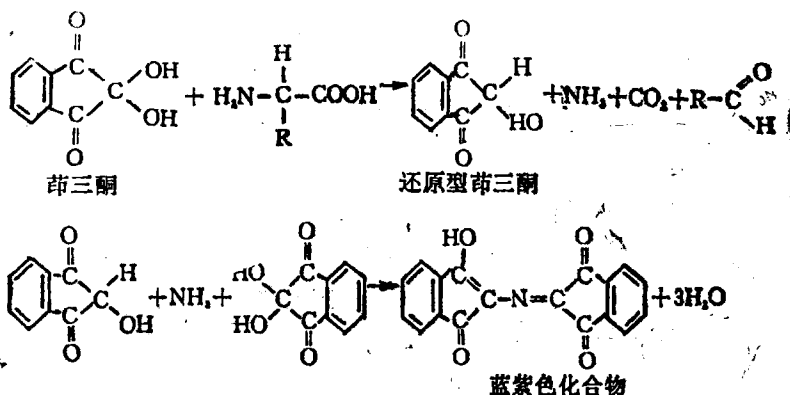
(1) 取少许结晶尿素放在干燥试管中, 微火加热, 则尿素开始熔化, 并形成双缩脲。释放的氨可用湿润的紫色石蕊试纸检定。待熔融的尿素开始硬化, 试管内有白色固体出现, 停止加热, 让试管缓慢冷却。然后加10% NaOH溶液1毫升, 摇匀, 再滴加2~3滴1% CuSO_4 溶液, 摇动后观察颜色的变化。

(2) 另取一试管，加蛋白溶液 1 毫升，10% NaOH 溶液 2 毫升及 1% CuSO₄ 2~3 滴，振荡后将出现的紫红色与双缩脲反应所产生的颜色相对比。

(二) 茚三酮反应

1. 原理:

除脯氨酸和羟脯氨酸与茚三酮作用生成黄色物质外，所有 α -氨基酸均与茚三酮发生反应生成紫红色最终形成蓝紫色化合物。此反应是灵敏度 1:1500000 浓度的氨基酸水溶液即能发生反应而显色。反应的适宜 PH 为 5~7。此反应目前广泛地应用于氨基酸定量测定。反应过程分下面两个步骤:



氨、 β -丙氨酸和多数的一级胺化物与茚三酮作用都给出正性反应。尿素、马尿酸和肽链上的亚氨基呈负反应。蛋白质与茚三酮仅呈弱的正性反应。

2. 试剂:

(1) 蛋白质溶液。(同前)

(2) 0.5% 甘氨酸。

(3) 0.1% 茛三酮水溶液。

(4) 0.1% 茛三酮—乙醇溶液。

3. 操作:

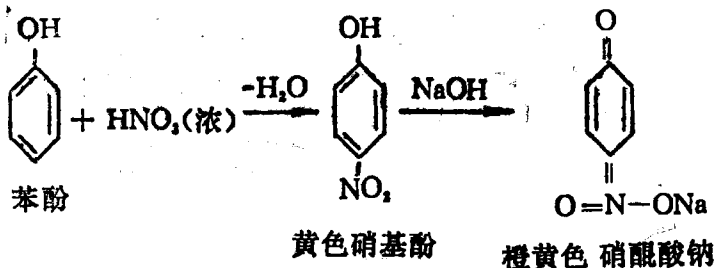
取 2 支试管分别加入蛋白质溶液和甘氨酸溶液 各 1 毫升, 再各加 0.5 毫升 0.1% 茛三酮水溶液, 混匀, 在沸水浴中加热 2~3 分钟, 观察颜色由粉红色再变蓝紫色。

(2) 在一小块滤纸上滴一滴 0.5% 的甘氨酸溶液, 风干后再向原处滴上 2 滴 0.1% 的茛三酮—乙醇溶液, 微火烘干, 观察紫红色斑点的出现。

(三) 黄色反应

1. 原理:

蛋白质分子中含有苯环结构的氨基酸, 如酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸等。这类蛋白质可被浓硝酸硝化生成黄色的硝基苯的衍生物。该物质在酸性环境中呈黄色, 在碱性环境中转变为橙黄色的硝酞酸钠。反应如下:



绝大多数蛋白质都含有芳香族氨基酸, 因此都有黄色反应。皮肤、毛发、指甲等遇浓 HNO_3 变黄即发生此类黄色反应结果。

2. 试剂:

- (1) 蛋白质溶液。(同前)
- (2) 头发。
- (3) 指甲屑。
- (4) 0.5% 苯酚溶液。
- (5) 0.3% 酪氨酸溶液。
- (6) 10% NaOH 溶液。
- (7) 浓硝酸 ($d = 1.42$ 克/毫升)。

3. 操作:

取 5 支试管编号后分别按下表 1—1 所示加入试剂, 观察各管出现的现象。若有反应慢者可放置微火 (或水浴中) 加热。待各管均先后出现黄色后, 于室温逐滴入 10% 的氢氧化钠溶液直至碱性。观察颜色变化。

表 1—1 蛋白质及氨基酸的呈色反应试验

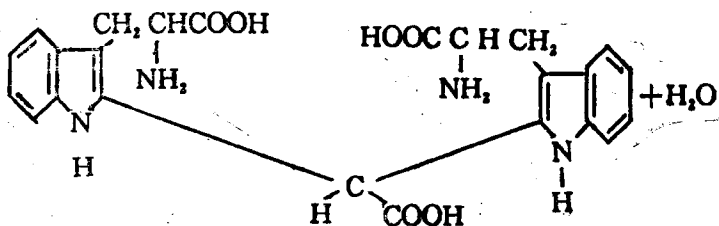
管 号	1	2	3	4	5
材 料 加 入	蛋白质液 (4 滴)	指 甲 (少许)	头 发 (少许)	苯 酚 (4 滴)	酪氨酸 (4 滴)
浓 硝 酸	2 滴	2ml	2ml	4 滴	2 滴
现 象					

注意: 向蛋白液中加浓硝酸时, 所出现的白色沉淀是强酸使蛋白质发生变性所致。

(四) 乙醛酸反应

1. 原理:

含有吲哚基的色氨酸在浓硫酸存在下与乙醛酸 (CHOCOOH) 缩合, 形成与靛蓝相似的物质。此反应机理尚不清楚, 可能是由一分子乙醛酸与两分子色氨酸脱水缩合而成的。含有色氨酸的蛋白质也有此反应。



2. 试剂:

(1) 蛋白质溶液。(同前)

(2) 0.03% 色氨酸溶液。

(3) 冰醋酸 (一般含有乙醛酸杂质, 故可用冰醋酸代替乙醛酸)。

(4) 浓硫酸 (分析纯)。

3. 操作:

取 2 支试管, 分别加入鸡蛋清溶液及色氨酸各 2 滴, 再加浓冰醋酸约 1~2 毫升。倾斜试管谨慎地沿管壁各加浓硫酸 1 毫升, 使之两相重叠。静置 5 分钟后则两液相界面处出现紫红色环, 若效果不明显可在水浴中加热。

(五) 偶氮反应

偶氮化合物与酚核或咪唑环结合产生有色物质。酪氨酸和组氨酸与之反应则相应的产物分别为橙红色和樱桃红色。含酪氨酸和组氨酸的蛋白质也有此反应。

偶氮苯磺酸与酪氨酸、组氨酸反应其产物结构如下: