

SHENGWU HUAXUE SHIYAN

高等学校教材

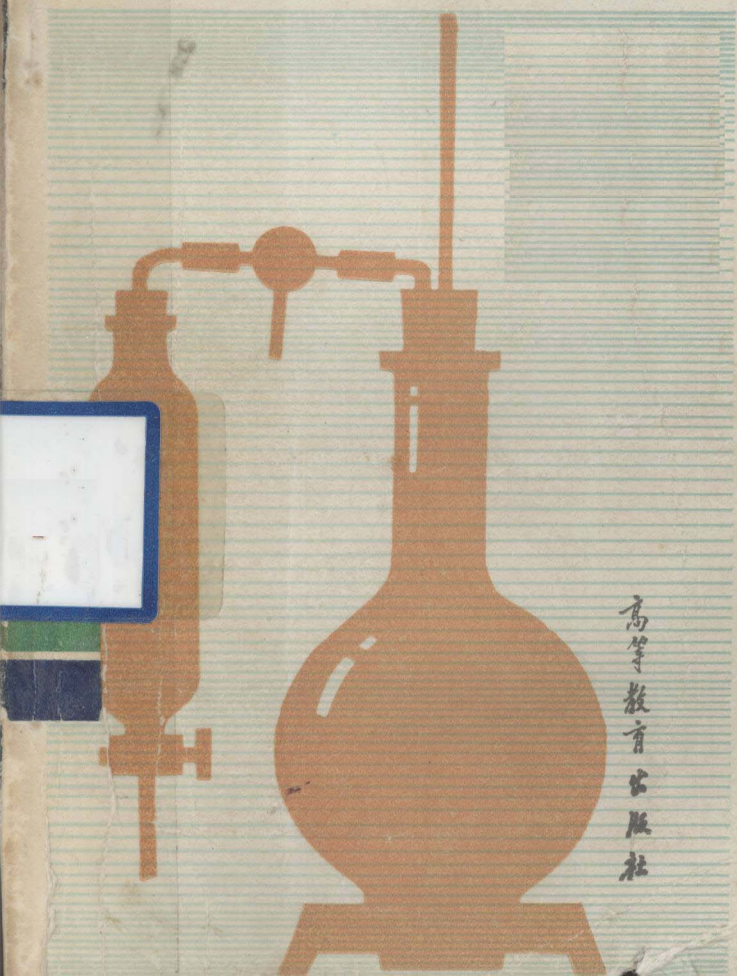
生物化学实验

〔第二版〕

南京大学生物化学系

袁玉荪 朱婉华 陈钧辉 编

高等教育出版社



再版前言

本书自1979年出版以来,受到许多高等院校和研究单位的欢迎,同时也收到了不少宝贵意见。为此,我们在本书使用数年的基础上进行了修订。在修订过程中,删去了一些结果不明显的实验,如脂肪酸 β -氧化;补充了一些新技术,如固相酶技术等;增加了一些生物化学制备方面的实验,如5'-核苷酸的制备,胰糜蛋白酶的制备等;另外对同一类物质的测定和分离分析方法选用几种不同的实验方法供读者选用。全书共有72个实验。

由于我们水平所限,书中缺点和错误仍属难免,敬请读者批评指正。

在修订过程中,朱长生、张太平和荣翠琴等同志参与部分工作,在此表示感谢。

编者

1986年5月

前 言

近年来,由于生物化学实验技术发展较快,许多院校对生物化学实验教材的需要又较迫切,因此,我们将使用数年的生物化学实验讲义加以修改充实,并配合郑集教授编著的《普通生物化学》编成此书,供有关院校生物化学实验教学之用。

本书共有糖、脂、蛋白质、核酸、酶、维生素、激素、生物氧化和物质代谢等方面的实验 60 个,其中既有与《普通生物化学》相配合、印证理论的实验,又有一些常用的提取分离、定性、定量实验。如就方法学而言,则既有经典方法,如血糖定量、粗脂肪测定、克氏定氮、纸层析、纸电泳法等等,亦有近年广泛应用的 DEAE-纤维素薄板层析、尼龙 66 薄膜层析、各种凝胶电泳和免疫电泳等新方法。每一实验都分原理、试剂和操作三部分阐述,对需要特别注意或解释之处,便分别加注说明,帮助学生学习和减少错误。

本书内容较多,并且还有一些较大型的实验,主要是出于以下两点考虑,① 可供不同专业选做,如生化专业可多做一些;② 各校实验室条件不同,可根据具体条件选做。

由于水平所限,本书的缺点错误在所难免,希望读者批评指正。

在编写过程中,承我室朱长生、张太平、张国保三位同志以及进修教师葛辉同志大力协助。生物系胡蓓蒂同志绘制全部插图,在此一并致谢。

南京大学生物化学教研室
袁玉荪、朱婉华、陈钧辉

68	去交商第甲	三十二
78	奥奈混白蛋蛋糖若甜酸双	四十二
88	奥奈混白蛋蛋糖若甜酸双	五十二
97	奥奈混白蛋蛋糖若甜酸双	六十二
目 录			
实验一	糖的颜色反应	1
实验二	糖的还原作用	4
实验三	血糖定量测定(Folin-Wu 法)	5
实验四	血糖定量测定(Folin-Malmros 法)	9
实验五	蒽酮比色定糖法	13
实验六	多糖的试验	15
实验七	肝素钠的定量测定	17
实验八	糖的旋光性和变旋现象	20
实验九	脂肪的组成	23
实验十	卵磷脂的提取和鉴定	26
实验十一	粗脂肪的定量(Soxxhlet 提取法)	27
实验十二	碘价的测定(Hanus 法)	31
实验十三	皂化价的测定	34
实验十四	酸价的测定	36
实验十五	脂肪乙酰价的测定	38
实验十六	血清胆固醇的定量测定(磷硫铁法)	40
实验十七	血清总胆固醇的测定(邻苯二甲醛法)	42
实验十八	血清甘油三酯简易测定法	44
实验十九	蛋白质的颜色反应	46
实验二十	蛋白质的沉淀反应	52
实验二十一	微量克氏(Kjeldahl)定氮法	54
实验二十二	非蛋白氮(NPN)的测定	62

实验一 糖的颜色反应

一、莫氏(Molisch)试验①

原理 糖经浓无机酸(硫酸、盐酸)脱水产生糠醛或糠醛衍生物,它们在浓无机酸作用下,能与 α -萘酚②生成紫红色缩合物。

实验材料与仪器

棉花。滤纸。

吸管 1 ml($\times 4$)、2 ml($\times 1$)。

试管 1.5 \times 15 cm($\times 4$)。

试剂

1. 莫氏试剂:称取 α -萘酚 5 g,溶于 95%酒精并用此酒精稀释至 100 ml。此试剂需新鲜配制,并贮于棕色瓶中。

2. 1%蔗糖溶液:称取蔗糖 1 g,溶于 100 ml 蒸馏水。

3. 1%葡萄糖溶液:称取葡萄糖 1 g,溶于 100 ml 蒸馏水。

4. 1%淀粉溶液:将 1 g 可溶性淀粉与少量冷蒸馏水混成薄浆状物,然后缓缓倾入沸蒸馏水中,边加边搅,最后以沸蒸馏水稀释至 100 ml。

操作 于 4 支试管中,分别加入 1 ml 1%葡萄糖溶液,

① 一些非糖物质(如糠醛、糖醛酸等)亦呈阳性反应。此外,样液中如含高浓度有机化合物,将因浓硫酸的焦化作用,而出现红色,故试样浓度不宜过高。

② 亦可用麝香草酚或其他苯酚化合物代替 α -萘酚。麝香草酚的优点是溶液比较稳定,且灵敏度与萘酚一样。

1%蔗糖溶液, 1%淀粉溶液和少许纤维素(棉花或滤纸浸在1 ml 水中)然后各加莫氏试剂2滴^①, 摇匀, 将试管倾斜, 沿管壁慢慢加入浓硫酸1.5 ml(切勿振荡!), 硫酸层沉于试管底部与糖溶液分成两层。观察液面交界处有无紫红色环出现。

二、塞氏(Seliwanoff)试验

原理 酮糖在浓酸的作用下, 脱水生成5-羟甲基糠醛, 后者与间苯二酚作用, 呈红色反应; 有时亦同时产生棕色沉淀, 此沉淀溶于乙醇, 成鲜红色溶液^②。

仪器

吸管 0.5 ml($\times 3$)、5 ml($\times 1$)。

试管 1.5 \times 15 cm($\times 3$)。

水浴锅。

试剂

1. 塞氏试剂: 溶50 mg 间苯二酚于100 ml 盐酸^③中($H_2O:HCl=2:1 V/V$)临用时配制。

2. 1%果糖溶液: 称取果糖1 g, 溶于蒸馏水定容至100 ml。

3. 1%葡萄糖溶液: 见试验一。

4. 1%蔗糖溶液: 见试验一。

^① 莫氏试剂应直接滴入试液中, 勿使试剂接触试管壁, 否则试剂会与硫酸接触生成绿色而掩盖紫色环。

^② 在此实验条件下, 蔗糖有可能水解成果糖与葡萄糖, 而呈阳性反应。葡萄糖与麦芽糖亦呈阳性反应, 但呈色反应的速度较酮糖缓慢。果糖的红色出现及沉淀的产生, 应在加热后20—30秒内, 生成的沉淀必须能溶于乙醇并形成红色溶液。

^③ 盐酸的浓度不宜超过12%, 因在12%的盐酸中最宜生成糠醛或其衍生物。

实验二 糖的还原作用

原理 斐林(Fehling)试剂和班乃德(Benedict)试剂均为含 Cu^{2+} 的碱性溶液,能使具有自由醛基或酮基的糖氧化,其本身则被还原成红色或黄色的 Cu_2O ①。此法常用作还原糖的定性或定量测定。

目前临床上多用班乃德法,因此法具有:①试剂稳定,不需临用时配制;②不因氯仿的存在而被干扰;③肌酐或肌酸等物质所产生的干扰程度远较斐林试剂小等优点。

仪器

吸管 1 ml($\times 5$)、2 ml($\times 1$)。

试管 1.5 \times 15 cm($\times 6$)。

水浴锅

试剂

1. 斐林试剂

试剂 A: 将 34.5 g 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)溶于 500 ml 蒸馏水中。

试剂 B: 将 125 g 氢氧化钠和 137 g 酒石酸钾钠溶于 500 ml 蒸馏水中。

临用时将试剂 A 与 B 等量混合。

2. 班乃德试剂: 溶 85 g 柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 11\text{H}_2\text{O}$)及 50 g 无水碳酸钠于 400 ml 水中。另溶 8.5 g 硫酸铜于 50 ml

① 由于沉淀速度不同,形成的颗粒大小不同,颗粒大的为红色,小的为黄色。

少量蒸馏水，溶解后倾入 2000 ml 容量瓶中，加蒸馏水至刻度，摇匀，倾入另一较大的试剂瓶中，加溴水 0.5 ml，摇匀，静置数小时。取上清液 500 ml，置于 1000 ml 容量瓶中，徐徐加入 225 ml 85% 磷酸，边加边摇匀。再加 25% 硫酸 150 ml，置暗处至次日，用空气将剩余的溴赶走^①，然后加入 99% 醋酸 75 ml，摇匀，加蒸馏水稀释至 1000 ml，贮于棕色瓶中。

4. 10% 钨酸钠溶液，钨酸钠 10 g，溶于蒸馏水并稀释至 100 ml。

5. 0.33 mol/L H_2SO_4 溶液^②，于 53 ml 蒸馏水中加入 1 ml 浓硫酸。

操作

1. 无蛋白血滤液的制备：用奥氏吸管^③吸取全血（已加抗凝剂——草酸钾或草酸钠）1 ml，缓缓放入^④ 20 ml 锥形瓶内，加水 7 ml，摇匀，溶血后（血液变为红色透明时）加 10% 钨酸钠 1 ml，摇匀，再加 0.33 mol/L H_2SO_4 1 ml（皆用吸管），随加随摇，加毕充分摇匀，放置 5—15 分钟，至沉淀由鲜红变为暗棕色^⑤。用于滤纸过滤（先倾入液体少许，待滤纸润湿

① 赶溴装置如图 1 所示。见下页。

② 相当于 $2/3 NH_2SO_4$ 溶液。

③ 奥氏吸管俗称胖肚吸管，因吸管中部有一膨大部分，用以吸取血液，可减少血液与管壁的接触面，使吸量更为准确。

④ 欲得准确结果，所取血液的量必须准确。如由吸管中放出血液的速度太快，则有大量血液粘在吸管内壁，容量不准，一般放出 1 ml 血液所用的时间不应少于 1 分钟。

⑤ 沉淀由鲜红变为暗棕色，是因钨酸钠与 H_2SO_4 作用生成钨酸，在适当酸度时，使血红蛋白变性、沉淀。如血沉淀经放置后不变为暗棕色或重滤后仍混浊，系因血中所加抗凝剂过多，可在钨酸与血混合液中加入 10% H_2SO_4 1—2 滴，待变为暗棕色后再滤。

试 剂 \ 管 号	空白管	样品管	标准管
血 滤 液(ml)	—	0.5	—
标准糖应用液(ml)	—	—	0.5
蒸 馏 水(ml)	0.5	—	—
碱性铁溶液(ml)	1	1	1
沸水浴 5 分钟，趁热加磷铁溶液			
磷铁溶液(ml)	1	1	1
静置 1 分钟后加水			
蒸 馏 水(ml)	4.5	4.5	4.5
混匀后比色			
670 nm			
相当血糖 mg %			

计算

$$\frac{R}{S} \times 0.01 \times \frac{100}{0.01} = \frac{R}{S} \times 100 = \text{血糖 mg \%}$$

R : 样品管光密度

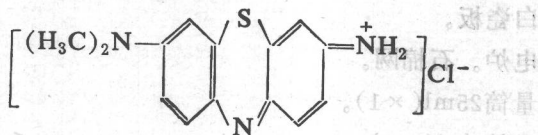
S : 标准管光密度

[正常值] 75—120mg%, 平均 106mg%

注意事项:

1. 加碱性铁溶液后，沸水浴应控制在 5—10 分钟，取出后趁热加磷铁溶液，利用余热加速反应。
2. 颜色能稳定 10 小时。
3. 吸收光谱在 660—680nm。
4. 试管注意清洁，防止还原物质污染。

天青 A 染料是一种碱性染料



其正电荷部分能与肝素的阴离子结合，生成“肝素-天青”复合物，并能表现因光异色现象，即产生一种较原来染料颜色不同的反应，这一反应程度与肝素的结合量有一定关系。1967年杰奎斯等在贝克曼 DK-2 分光光度计上利用天青 A 作肝素的定量测定，发现低浓度肝素在波长 505 nm、pH 8.6 的条件下，肝素的浓度与光吸收值之间符合朗白-比耳定律。

天青法测定肝素效价时，首先以肝素标准品作出光密度与肝素浓度之间的标准曲线，然后测定样品的光密度值对照标准曲线，查算出样品的效价数。

实验材料与仪器

粗制肝素、精制肝素。

72 型(或 721 型)分光光度计。

分析天平(万分之一)。

pH 计。

试管 1.5 × 18 cm (× 8)。

吸管 1 ml (× 5)、2 ml (× 2)、5 ml (× 3)。

容量瓶 250 ml (× 2)。

试剂

1. 巴比妥缓冲液 (pH 8.6, 0.05 mol/L, 将 1 g 氢氧化钠溶于 50 ml 加热至沸的蒸馏水中，即得 0.5 mol/L NaOH 溶液。称取巴比妥 (二乙基巴比妥酸) 5.52 g，溶于上述

0.5 mol/L NaOH 溶液中,待完全溶解后,冷却,用蒸馏水稀释至 500 ml,用 pH 计校正之。

2. 西黄耆胶溶液^①(0.1%):称取西黄耆胶(医用、白色)0.5 g,用少量蒸馏水使其分散,再用水稀释至 500 ml,用滤纸过滤。

3. 天青溶液:称取天青 I^②(生物染料)0.5 g,先用少量蒸馏水将其完全溶解,再稀释至 500 ml,过滤,滤液(即贮液)保存于冰箱中。临用时,吸取贮液 5 ml,加蒸馏水 25 ml,混匀即得。

4. 标准肝素溶液:准确称取一定量肝素标准品(药检部门供给),用蒸馏水配成 100 单位/ml,作贮备液,置冰箱保存,测定时取贮备液 2.5 ml 于 250 ml 容量瓶内加水稀释至刻度,即成 1 单位/ml。(也可配成 1—1.5 单位/ml)。

操作

1. 标准曲线的绘制:取 1.5 × 18 cm 试管(试管口径宜大,易使溶液混匀)6 支编号,按下表加入试剂:

管号	0	1	2	3	4	5
肝素标准液(ml)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
蒸馏水(ml)	2.5	2.0	1.5	1	0.5	0
巴比妥缓冲液(ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
西黄耆胶液(ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
天青染料(ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
光密度(OD)						

① 西黄耆胶具有稳定颜色的作用。质量差的西黄耆胶不能用。如无优质西黄耆胶,可省去,但显色后应尽快比色,否则将因颜色不稳定而造成较大误差。

② 天青 1 含 80% 天青 A 和少量天青 B。

加入天青溶液前,应充分摇匀。加入天青溶液后,应立即摇匀,并用 72 型分光光度计(505 nm)测定光密度,零号管为空白。

重复三组,测定结果取平均值,以效价为横坐标,光密度为纵坐标绘制标准曲线。

2. 样品测定,精确称取一定量(10—15 mg)样品①,用蒸馏水溶解成含 1 mg/ml 样品的溶液。再于 1 只 250 ml 容量瓶中加 2.5 ml 上述样液,加水稀释至刻度,即得含 10 μg/ml 的测定液。吸取 1—2.5 ml 测定液②置大口径试管内,再依次加入巴比妥缓冲液、西黄蓍胶液及天青溶液各 1 ml,摇匀后,用 505 nm 测光密度。根据测定的光密度值,从标准曲线上查出相应的单位数,按下式计算样品的效价③。

$$\text{肝素钠样品效价 } P(\text{单位/mg}) = \frac{P_i \times V}{V_i \times S_w}$$

P_i = 测定样品的光密度值在标准曲线上查出的单位数。

V = 测定样品总体积(ml)。

V_i = 测定时所用的样液体积(ml)。

S_w = 样品称取量(mg),

实验八 糖的旋光性和变旋现象

原理 凡具有不对称碳原子的化合物都有旋光性,它能

- ① 肝素吸湿性很强,应用称量瓶减重法称取。
- ② 吸取测定液的量视样品中肝素效价而定,效价高的少吸,效价低的多吸。吸取的测定液不足 2.5 ml 时,应加蒸馏水补足 2.5 ml。
- ③ 肝素是具有抗凝血活性的药品,因此在药典中以抗凝活性(即效价)表示其质量。这里所计算出的生物效价是样品具有的抗凝活性相对量。

使偏振光的偏振面^①旋转。使偏振面向右旋转的称右旋用(+)表示,使偏振面向左旋转的称左旋用(-)表示。测定物质旋光性的仪器称旋光仪。

旋光仪的主要部件是两个尼科尔棱镜,其中一个棱镜的位置是固定的,用以产生偏振光,称为起偏镜。而另一个棱镜是可以旋转的,用以检查偏振面的转动角度,称为检偏镜。两个棱镜间放一盛有待测液的玻管(样品管)。当光线经过起偏镜变成偏振光,再通过样品管中的旋光物质,即发生偏振面的旋转。转动检偏镜使已偏转的偏振面恢复到原来的角度。由检偏镜转动的角度,可以推知旋光的能力。

旋光度的大小不仅取决于物质的本性,而且还与溶液的浓度、液层的厚度、光的波长、测定温度以及溶剂的性质等有关。

若把偏振光通过厚度为1 dm, 浓度含有1 g/ml 待测物

① 在普通光线里,光波可以在一切可能的平面上振动,如图A所示。若使普通光线通过尼科尔棱镜,则透过棱镜的光线只在一个平面上振动,如图B所示。这种光就叫做平面偏振光,简称偏振光。与偏振光振动平面相垂直的平面,叫做偏振面。



A-普通光



B-平面偏振光

图 3 光的振动面

质的溶液所测得的旋光度，则称为比旋光度 $[\alpha]_t^{\lambda}$ ，它是物质的一个特性常数，如下式所示：

$$[\alpha]_t^{\lambda} = \frac{\alpha}{c \cdot l}$$

式中 t 为测定时的温度。

λ 为测定时所用光源的波长(钠光)。

α 为实测的旋光度。

c 溶液的浓度(g/ml)。

l 玻管长度(dm)。

上式又可改写为：

$$[\alpha]_t^{\lambda} = \frac{\alpha \cdot 100}{l \cdot c}$$

式中 c 代表 100 ml 溶液中所含溶质的克数。

一个有旋光性的溶液放置后变更其比旋的现象称变旋。变旋的原因是糖从 α -型变到 β -型，或由 β -型变为 α -型。一切单糖都有变旋现象。无 α -、 β -型的糖类即无变旋性。

仪器

旋光仪。

容量瓶 100 ml ($\times 1$)。

分析天平。

① 一般糖类的比旋度 $[\alpha]_D^{20}$ 如下：

D-葡萄糖 + 52.5°

D-果糖 - 92.3°

D-半乳糖 + 81.5°

蔗糖 + 66.5°

乳糖 + 52.5°

麦芽糖 + 137.0°

可溶性淀粉 + 196.0°

糖原 + 197.0°



光强分布图

图 8 图

烧杯 25 ml($\times 1$)。玻棒。

试剂

1. 未知浓度的蔗糖溶液。
2. 10%葡萄糖溶液:10 g 葡萄糖溶于水,稀释至100 ml。

操作

1. 利用糖的旋光性测定糖的浓度:

(1) 转开样品管螺母,洗净玻管,然后将管中注满蒸馏水,盖上玻片,注意管中不能有气泡,玻片上的水渍必须擦干。

(2) 把样品管放入旋光仪内,打开光源,俟钠光稳定1—2分钟后,转动刻度盘,使目镜中两半圆的亮度相等,记下刻度盘的读数,以此为零点。

(3) 用蔗糖液代替蒸馏水测其旋光度,并按公式计算出蔗糖的浓度。

2. 糖的变旋现象:

用新配制的10%葡萄糖溶液按上法测其旋光度并计算比旋,以后每隔二小时测定其旋光度、计算比旋直至比旋不再改变^①,说明此时 α -、 β -型互变已达平衡。

实验九 脂肪的组成

原理 脂肪即中性脂,为脂酸与丙三醇所成的酯。一切脂肪都能被酸、碱、蒸汽及酶所水解,产生甘油和脂酸。如果催化剂是碱,则得甘油和脂酸的盐类,这种盐类称皂,脂肪的

^① 10%葡萄糖溶液一般需8—10小时变旋性达到平衡。在碱性溶液中则加速其平衡。

烘箱(200°C)。

试剂

1. 95%乙醇(C.P.)。
2. 浓盐酸(C.P.)。
3. 乙醚(A.R.)。
4. 苯(A.R.)。
5. 氯化钙(C.P.)。
6. 甘油(C.P.)。
7. 40:100(W/W)NaOH溶液:称取40g NaOH,置250ml烧杯中,逐渐加入100ml水,搅拌使其溶解。

操作

1. 水解:约2.5g脂肪置于250ml烧瓶中,加入95%乙醇①250ml,及40:100(W/W)氢氧化钠溶液5ml,烧瓶口接一冷凝管,置沸水浴中回馏1/2—1小时②。然后蒸去乙醇,至所剩溶液约为5ml时,加入75ml热水,使浓缩液溶解。

2. 脂肪酸与甘油的分离:将上述溶液,加浓盐酸(约5—6ml)使呈酸性(以石蕊试纸试之),加热,至能清楚见到脂肪酸呈油状浮于上层时,用分液漏斗,将下层水溶液分开(此水溶液须保留,供以后实验用)。用热水重复洗涤脂肪酸三次,每次用热水约100ml,以除去混杂于脂肪酸中的无机盐、甘油及剩余之盐酸等。然后移入试管中,静置澄清③,上清液即为脂肪酸。

① 乙醇中如含有乙醛,遇碱即成黄色树脂类化合物,如颜色较深,可用无醛乙醇,无醛乙醇的制法是:溶1.5g AgNO₃于3ml水,加入1000ml乙醇中,混和;另溶3g KOH于15ml热乙醇中,冷后倾入上述硝酸银-乙醇液,再混匀,静置,使氧化银沉下,虹吸取出上清液,蒸馏即得。

② 冷却后瓶内液体无油滴,即皂化完成。

③ 如因脂肪酸熔点较低而凝固,可保温澄清。

3. 脂肪酸溶解度试验：将脂肪酸用滴管吸出注入另一试管中，置烘箱（90—95°C）内干燥，试验脂肪酸在水、乙醚和苯中的溶解度。

4. 甘油的提取：将分离脂肪酸时所保留的水层，置蒸发皿中于蒸汽浴上蒸干，加入少量乙醇（约5—10 ml），再蒸干，残留物大部分为氯化钠及少量甘油，用35 ml乙醇，分3次提取并略加热以助提取之完全，合并3次所得提取液，置蒸发皿内，在水浴上蒸发至浆状。

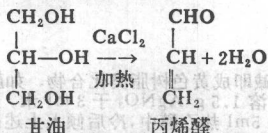
5. 甘油的丙烯醛试验：取上述浆状物少许，置于试管内，加入少量氯化钙或硫酸氢钾^①，小心加热，注意放出之特殊臭味，与厨房中过度煎熬脂肪之气味相似。另以数滴纯甘油按同法试之，比较其结果。

实验十 卵磷脂的提取和鉴定

原理 卵磷脂在脑、神经组织、肝、肾上腺和红细胞中含量较多，蛋黄中含量特别多。卵磷脂易溶于醇、乙醚等脂溶剂，可利用此等溶剂提取。

新提取得的卵磷脂为白色蜡状物，与空气接触后因所含

① 甘油脱水成丙烯醛反应如下：



用 KHSO_4 作脱水剂时，如加热过猛 KHSO_4 可还原为 SO_2 ，其气味易误认为丙烯醛；故加热时应小心。