

生物科学
生物技术
系 列

BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

普通高等教育“十二五”规划教材

生物化学与 分子生物学实验

第二版

胡琼英 汪瑾 主编



化学工业出版社

BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

普通高等教育“十二五”规划教材

生物化学与 分子生物学实验

第二版

胡琼英 汪瑾 主编
聂理 卢亚萍 副主编



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学与分子生物学实验/胡琼英, 汪瑾主编. —2 版.
北京: 化学工业出版社, 2010. 5
普通高等教育“十二五”规划教材
ISBN 978-7-122-07952-7

I. 生… II. ①胡…②汪… III. ①生物化学-实
验-高等学校-教材②分子生物学-实验-高等学校-教材
IV. ①Q5-33②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 041702 号

责任编辑: 赵玉清

文字编辑: 刘 畅

责任校对: 宋 玮

装帧设计: 尹琳琳

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装: 大厂聚鑫印刷有限责任公司

787mm×1092mm 1/16 印张 10 $\frac{3}{4}$ 字数 254 千字 2011 年 5 月北京第 2 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 18.00 元

版权所有 违者必究

编写人员名单

主 编 胡琼英 汪 瑾

副主编 聂 理 卢亚萍

编 者 (按姓氏笔画排序)

卢亚萍 刘琳莉 芮 琪 李少琼 杨志敏

狄 洌 汪 瑾 沈文飏 张益民 林国庆

胡琼英 秦 春 聂 理

制 图 狄 洌 张益民 刘琳莉

主 审 沈文飏 徐朗莱

第一版前言

生物化学实验技术不仅是生物化学的重要内容和理论基础，也是生物科学研究的重要方法和手段。学生通过生物化学实验，不仅可以进一步巩固生物化学的基本理论，了解实验原理，还能熟悉生物化学实验的基本方法和技术以及许多大型精密仪器的使用，从而为以后的专业课学习以及生产、科研工作打下良好基础。

《生物化学实验》供理工科高等院校的生命科学、生物技术、生物工程及农林院校的农学、林学、植保、资环、园艺、食品、理学等各专业的本科生使用，要求学生学会蛋白质、糖类、脂类、核酸、氨基酸、酶和维生素的分离提取、定量测定或定性鉴定等方法；掌握电泳、层析、离心和光谱法检测等技术；培养学生综合性、设计性实验创新能力。

本书在南京农业大学生命科学院编写的《生物化学实验指导》讲义基础上，又吸取了该校多年的教学、科研、开发工作中的经验和广大学生的建议，对原教材内容进行了必要的修改，重新编写了这本《生物化学实验》教材，并补充了许多新的实验内容，便于学生自学。我们还增设了“自行设计实验”、“综合性选做实验”和“综合性开放实验”，鼓励和培养学生自己动手、开发创新的精神。在附录中，我们还整理和翻译了有关“常用仪器性能指标及使用说明”、“缓冲溶液的配制”、“植物样品的采集、处理及保存”等内容，为从事综合性生物化学实验的师生们提供方便。

本教材多年来得到了苏业瑜、叶茂炳、周培根、徐朗莱、戚晓玉各位教授和欧瑜等老师以及生命科学院领导、实验教学中心领导的大力支持和帮助；还有生物基地 51 班的张亮、齐继艳、陈舟舟和王潇同学的积极参与，谨此深表谢意！鉴于作者水平有限，欢迎广大师生提出宝贵意见。

编者
2007 年 3 月

第二版前言

生物化学与分子生物学实验技术是生物化学的重要内容，也是生物科学研究的重要方法和手段。学生通过生物化学与分子生物学实验，理解实验原理，进一步巩固生物化学与分子生物学的理论知识，并且掌握生物化学与分子生物学实验的基本方法和技术，熟悉实验室常用仪器和一些大型精密仪器的使用，从而为以后的专业课学习以及生产、科研工作打下一个良好的基础。

《生物化学与分子生物学实验》一书是在第一版《生物化学实验》的基础上，结合本校多年的实验教学经验和广大师生的建议，对原教材做了必要的修改。增添了一些新的实验内容、习题及答案。在附录中整理和翻译了“常用仪器性能指标及使用说明”、“缓冲溶液的配制”、“植物样品的采集、处理及保存”等资料。本教材包括蛋白质、糖类、脂类、核酸、氨基酸、酶和维生素的提取、分离、电泳、层析、光谱法检测及分子杂交等定性定量技术，以锻炼学生的基本实验技能，同时培养学生综合实验、设计实验的创新能力。

本书可供理工科高等院校的生物科学、生物技术、生物工程及农林院校的农学、林学、植保、资环、园艺、食品、理学等各专业的本科生使用。可以作为《生物化学实验》、《生物化学分析》、《分子生物学实验》等课程的教材和参考书。

本教材多年来得到了南京农业大学的苏业瑜、叶茂炳、徐朗莱等教授以及生命科学学院领导、实验教学中心领导的大力支持和帮助；还有生物基地 51 班的张亮、齐继艳、陈舟舟和生命基地 62 班的张艳红同学的积极参与，谨此深表谢意！欢迎广大师生提出宝贵意见。

编者

2010 年 5 月
南京农业大学

目 录

实验室规则	1
实验记录及实验报告	2
生物化学实验	4
实验一 缓冲液配制和 pH 值测定	4
实验二 分光光度计线性分辨范围测定	5
实验三 3,5-二硝基水杨酸比色法测定糖的含量	7
实验四 硅胶 G 薄层层析分离可溶性糖	10
实验五 RNA 的提取与核酸的颜色反应	12
实验六 纸电泳分离鉴定三种腺苷酸	15
实验七 影响淀粉酶活性的一些因素	16
实验八 硫酸铵分级沉淀及透析脱盐纯化过氧化氢酶	20
实验九 硫酸铵沉降法纯化蛋白质	22
实验十 葡聚糖凝胶层析脱盐	23
实验十一 淀粉酶活力的测定	26
实验十二 Folin-酚比色法测定蛋白质含量	28
实验十三 考马斯亮蓝 G-250 比色法测定蛋白质含量	31
实验十四 凯氏定氮法测定蛋白质含量	33
实验十五 茚三酮比色法测定赖氨酸含量	36
实验十六 离子交换柱层析分离氨基酸	38
实验十七 亲和层析法纯化胰蛋白酶	42
实验十八 2,6-二氯酚靛酚滴定法测定 L-抗坏血酸的含量	46
实验十九 钼酸铵比色法测定 L-抗坏血酸的含量	48
实验二十 维生素 A 的提取及含量测定	50
实验二十一 荧光光度法测定核黄素的含量	52
实验二十二 残余法测定粗脂肪的含量	54
实验二十三 间隔法测定过氧化物酶的活力	55
实验二十四 连续记录法测定过氧化氢酶的活力	57
实验二十五 不连续聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳	59
实验二十六 醋酸纤维素薄膜电泳法分离血清蛋白质	62
实验二十七 蛋白质亚基分子量测定——SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳	64
分子生物学实验	68
实验二十八 植物基因组 DNA 提取	68
实验二十九 DNA 的酶切与电泳	69
实验三十 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化	71
实验三十一 碱裂解法提取质粒	72

实验三十二	质粒 PCR	74
实验三十三	植物总 RNA 的提取与分析	76
实验三十四	RNA 电泳与纯度鉴定	77
实验三十五	反转录及 RT-PCR	78
实验三十六	几丁质酶提取与 Western 杂交	81
生物大分子分离与鉴定实验		84
实验三十七	过氧化氢酶和辣根过氧化物酶的层析分离与电泳鉴定	84
实验三十八	用 16S rDNA 方法鉴定细菌种属	86
自行设计实验		89
实验三十九	工业淀粉酶的纯化与分析	89
综合性开放实验		90
参考实验项目		90
附录		92
附录一	植物样品的采取、处理与保存	92
附录二	常用缓冲溶液的配制	94
附录三	硫酸铵溶液饱和度计算表 (0℃)	100
附录四	色谱显色剂	101
附录五	常用凝胶及层析过滤的规格和性能	105
附录六	玻璃仪器的洗涤及一些常用洗涤剂	107
附录七	移液器的使用	108
附录八	分光光度计	109
附录九	离心机	117
附录十	电泳设备	121
附录十一	pH 计	125
附录十二	电子天平	127
附录十三	EDC-810 型 PCR 仪	127
附录十四	实验室安全及防护知识	129
生物化学实验习题		132
生物化学实验习题答案		146

实验室规则

1. 每个同学都应该自觉地遵守课堂纪律，维护课堂秩序，不迟到，不早退，保持室内安静，不大声谈笑。

2. 在实验过程中要听从教师的指导，严肃认真地按操作规程进行实验，并简要、准确地将实验结果和数据记录在实验记录本上，并交给老师审阅。课后写出实验的报告，由课代表收交给教师。

3. 环境和仪器的清洁整齐是做好实验的重要条件。实验台面、试剂药品架上必须保持整洁，仪器药品要井然有序，公用试剂用完后应立即盖严，放回原处，勿使试剂药品洒在实验台面和地上。实验完毕，需将药品试剂排列整齐，仪器要洗净倒置放好，将实验台面擦拭干净。完成实验后，经老师检查验收后方可离开实验室。

4. 使用药品、试剂和各种物品必须注意节约，不要使用过量的药品和试剂。应特别注意保持药品和试剂的纯净，严防混杂。不要将滤纸和称量纸做其他用途。使用和洗涤玻璃仪器时，应小心仔细，防止损坏仪器。使用贵重精密仪器时，应严格遵守操作规程，出现故障立即报告教员，不要自己动手检修。要爱护国家财产，厉行节约。

5. 注意安全。实验室内严禁吸烟！煤气灯应随用随关，必须严格做到：火着人在，人走火灭。乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热，并要远离火源操作和放置，实验完毕，应立即关好煤气阀门和水龙头、拉下电闸，各种玻璃器皿放置稳妥，离开实验室以前应认真负责地进行检查，严防不安全事故。

6. 对于有毒有害的废弃液体，集中后由专业人员处理废纸、火柴头及其他固体废物和带有渣滓沉淀的废物都应倒入废品缸内，不能倒入水槽或到处乱扔。

7. 仪器损坏时，应如实向教员报告，认真填写损坏仪器登记表，然后补领。

8. 实验室内一切物品，未经本室负责教员批准严禁携带出室外，借物必须办理登记手续。

9. 每次实验课由班长安排同学轮流值日，值日生要负责当天实验室的卫生、安全和一些服务性的工作。

10. 对实验的内容和安排不合理的可提出改进意见，对实验中的一些反常现象应进行讨论，并大胆提出自己的看法，做到生动、活泼、主动地学习。

实验记录及实验报告

一、实验记录

实验课前应认真预习，将实验名称、目的和要求、原理、实验内容、操作方法和步骤等简单扼要地写在记录本中。实验记录本应标上页数，不要撕去任何一页，更不要擦抹及涂改，写错时可以准确地划去重写，记录必须使用钢笔或圆珠笔。

实验中观察到的现象、结果和数据，应该及时地直接记在记录本上，绝对不可以用单片纸做记录或作草稿。原始记录必须准确、简练、详尽、清楚。从实验课开始就应该养成这种良好的习惯。

记录时，应做到正确记录结果，切忌夹杂主观因素，这是十分重要的。在实验条件下观察到的现象，应如实仔细地记录下来，在定量实验中观测的数据，如称量物的重量、滴定管的读数、光电比色计或分光光度计的读数等，都应设计一定的表格准确记下正确的读数，并根据仪器的精确度准确记录有效数字。例如，光密度值为 0.050，不应写成 0.05，每一个结果最少要重复观测两次以上，当符合实验要求并确知仪器工作正常后再写在记录本上。实验记录上的每一个数字，都是反映每一次的测量结果，所以，重复观测时，即使数据完全相同也应如实记录下来，数据的计算也应该写在记录本的另一页上，一般写在正式记录左边的一页。总之，实验的每个结果都应正确无遗漏地做好记录。

实验中使用仪器的类型、编号以及试剂的规格、化学式、分子量、浓度等，都应记录清楚，以便总结实验时进行核对，并作为查找成败原因的参考数据。

如果发现记录的结果有遗漏、丢失或对此有怀疑等，都必须重做实验。将不可靠的结果当作正确的记录，在实际工作中可能造成难于估计的损失，更主要这不是实事求是的态度。因此，在学习期间就应养成一丝不苟、严谨求实的科学作风。

二、实验报告

实验结束后，应及时整理和总结实验结果，写出实验报告。按照实验内容可分为定性和定量实验两大类，下面分别列举两大类实验报告的格式，仅供参考。

1. 关于定性实验报告

实验编号及实验名称

- (1) 目的
- (2) 原理
- (3) 实验材料及设备
- (4) 试剂的配制
- (5) 操作方法
- (6) 结果分析
- (7) 讨论

一般每次实验课做一个定性实验。实验报告中的实验目的要写出针对这次实验课的内容而达到的实验目的和要求。在写实验报告时，可以按照实验内容分别写出原理、操作方法、结果与讨论等。原理部分简述基本原理。操作方法（或步骤）可以采用工艺流程图的方式或自行设计表格来表示。某些实验的操作方法可以和结果与讨论部分合并。结果与讨论应包括观察到的现象和实验结果，对实验中遇到的问题和布置的思考题进行探讨，并对实验过程或方法提出改进意见等。

2. 关于定量实验报告

实验编号及实验名称

- (1) 目的
- (2) 原理
- (3) 实验材料及设备
- (4) 试剂配制
- (5) 操作方法
- (6) 结果计算
- (7) 讨论

通常每次实验课只做一个定量实验。在实验报告中，目的和要求、原理以及操作方法部分应简明扼要地叙述，但是对于实验条件（试剂配制及仪器）和操作的关键环节必须写清楚。对于实验结果部分，应根据实验课的要求将一定实验条件下获得的实验结果和数据进行整理、归纳、分析和对比，并尽量总结成各种图表，如原始数据及其处理的表格、标准曲线以及比较实验组与对照组实验结果的图表等。另外，还应针对实验进行必要的说明和分析。讨论部分可以包括：实验方法或操作技术等有关问题，实验结果是否异常，本实验注意事项以及思考题的探讨。更重要的是与本实验有关的一些知识拓展，查阅几种与本实验类似的另外几种测定方法，比较其优缺点等。说出通过本实验，你的收获，总结经验，吸取教训，提出你的见解。

生物化学实验



实验一 缓冲液配制和 pH 值测定

一、目的

1. 了解配制缓冲液和 pH 计的基本原理。
2. 掌握配制缓冲液和使用 pH 计的基本方法。

二、原理

在一定的酸或碱作用下，能够自动调整和保持溶液 pH 值基本不变的溶液称为缓冲液。以 HAc 和 NaAc 组成的缓冲液为例，它的 pH 符合下面关系： $\text{pH} = \text{pK}_a - \lg[\text{HAc}]/[\text{Ac}^-]$ ，因此改变 $[\text{HAc}]/[\text{Ac}^-]$ 的比值，可以在一定范围内配制不同 pH 值的缓冲液。缓冲液的缓冲容量大小不仅与其总浓度有关，而且与其组分比也有关。总浓度越大，缓冲容量越大；总浓度一定，其组分浓度比越接近 1，缓冲容量越大。缓冲液适当稀释或浓缩，其 pH 值基本保持不变。

测定 pH 值的 pH 计（或称酸度计），一般是由一支对 H^+ 敏感的玻璃电极和一支不随溶液中被测离子活度变化而改变其本身电位的甘汞电极以及一个测量电位的电位计所组成，两支电极和测试溶液构成一个伏特电池，电极在不同的 pH 值溶液中产生不同的电位，它符合电化学理论中的 Nernst 方程，即 $E = E^\ominus - (2.303RT/F)\text{pH}$ 。测定中，首先测得已知 pH 的标准缓冲液中产生的电位 E_s ，然后，由测得未知 pH 缓冲液中产生的电位 E_x 通过 $\text{pH}_x = \text{pH}_s + \frac{(E_s - E_x)F}{2.303RT}$ 可直接算出该缓冲液的 pH (pH_x)。为了方便，pH 计上装有一个定位调节器，当测量标准缓冲液 pH 时，利用它可把读数直接指示在标准的 pH 值上，这样在以后测未知 pH 的缓冲液时，该电位读数也就直接表示相应的 pH 值。在本实验使用的 Beckman $\Phi 61$ pH 计中，以上过程均由仪器自动完成。

三、实验试剂及设备

1. 试剂

磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、冰醋酸、醋酸钠 ($\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、甘氨酸、盐酸、标准 pH 缓冲液 ($\text{pH} 4.01$ 、 7.00 、 10.01)。

2. 仪器

电子天平（感量 0.001g ）、pH 计。

3. 器材

容量瓶： $100\text{mL} \times 2$ ；量筒： $50\text{mL} \times 1$ ；

移液管：10mL×1；烧杯：100mL×1 200mL×2；
漏斗、洗瓶、洗耳球、移液管架、玻棒：各1。

四、操作步骤

1. 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液配制 (0.1mol/L, pH7.0)

(1) 由附录“常用缓冲溶液的配制”的表中通过计算，分别称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ _____ g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ _____ g, 用蒸馏水溶解后，定容至 100mL。

(2) 将配好的缓冲液倒入试剂瓶，贴上标签，保存备用。

2. 醋酸-醋酸钠缓冲液配制 (0.1mol/L, pH5.4)

(1) 0.1mol/L 醋酸钠母液的配制：

称取 $\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ _____ g, 用蒸馏水溶解后，定容至 50mL。

(2) 0.1mol/L 醋酸母液的配制：

吸取冰醋酸 _____ mL, 用蒸馏水定容至 1000mL。

(3) 取 0.1mol/L 醋酸钠母液 43mL, 0.1mol/L 醋酸 7mL, 于烧杯中混匀，用 pH 计测定 pH 值，使混合液的 pH 值最终达到 5.4。

(4) 将配制好的缓冲液倒入试剂瓶，贴上标签，保存备用。

3. Tris-Gly-HCl 缓冲液配制 (0.025mol/L, pH8.3)

(1) 称取三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 0.300g, 甘氨酸 1.44g, 加入约 80mL 蒸馏水，加热溶解。

(2) 冷却后，用 pH 计测定 pH 值，并不断滴加 2.5mol/L 盐酸，使 pH 值最终达到 8.3。

(3) 用蒸馏水定容至 100mL。

(4) 将配制好的缓冲液倒入试剂瓶，贴上标签，保存备用。

五、思考题

1. 配制缓冲液时，选取合适的缓冲试剂，主要根据什么原则？
2. 配制缓冲液，常用的方法有哪几种？



实验二 分光光度计线性分辨范围测定

一、目的

1. 学习分光光度计的工作原理，掌握比色测定的基本操作方法。
2. 掌握标准曲线的制作及最佳浓度范围的确定。

二、原理

比色法是常用的生化分析方法。利用分光光度计可以很方便地完成多种生物物质的定量分析。比色法的理论基础是朗伯-比尔定律，其测定范围要求在分光光度计线性分辨范围内。

光线的本质是电磁波的一种，有不同的波长。肉眼可见的彩色光称为可见光，波长范

围在 400~750nm: 小于 400nm 的光线称为紫外光; 大于 750nm 的光线称为红外光。

当光线通过透明溶液介质时, 其辐射的波长有一部分被吸收, 一部分透过、因此光线射出溶液之后, 部分光波减少, 这种光波的吸收和透过可用于某些物质的定性定量分析。

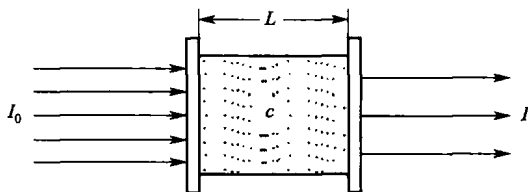


图 2-1 Lambert-Beer 定律示意图

分光光度法依据 Lambert-Beer 定律: $\lg \frac{I_0}{I} = KcL$

令 $A = \lg \frac{I_0}{I}$, $T = \frac{I}{I_0}$, 则 $A = KcL$, $A = -\lg T$

式中 T ——透光率;

I ——透射光强度;

K ——吸收系数;

A ——吸光度 (有时用光密度 OD 表示);

I_0 ——入射光强度;

L ——溶液的光径长度;

c ——溶液的浓度。

从上式可以看出, 一束单色光通过溶液后, 光波被吸收一部分, 其吸收多少与溶液中溶质的浓度和溶液厚度成正比, 当入射光、吸收系数 K 和溶液的光径长度 L 不变时, 吸光度 A 与溶液的浓度 c 成正比 (图 2-1)。

三、实验材料及设备

1. 仪器

UV9100 分光光度计。

2. 器材

刻度试管: 25mL×14; 移液枪: 1mL×1;

烧杯: 250mL×2, 50mL×1; 洗耳球: 2;

滴管: 2; 洗瓶、试管架、移液管架: 各 1。

四、试剂的配制

0.02mol/L 硫氰化铁 $[\text{Fe}(\text{SCN})_3]$ 溶液: 称取 6.000g (过量) KSCN 和 5.410g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 蒸馏水溶解后定容至 1000mL (保质期 1 星期)。

五、操作步骤

取 14 支试管, 按表 2-1 所示顺序操作。

表 2-1 分光光度计线性分辨范围测定

管号 操作	硫氰化铁标准液													
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Fe(SCN) ₃ /mL		0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.3	1.4	1.5	1.8	2.2	2.6	3.0
蒸馏水/mL	定容至 10mL,各管混匀													
比色	以 0 号管为空白参比,测定 $\lambda=540\text{nm}$ 处的吸光度													
吸光度(A_{540})														

六、结果处理

1. 由 0~14 号管的数据,以硫氰化铁含量为横坐标,吸光值为纵坐标,在坐标纸上绘制曲线。
2. 根据曲线分析分光光度计线性分辨范围。

七、思考题

1. 做比色测定时,标准溶液的浓度范围应怎样选定?待测样品溶液的浓度应稀释在什么范围?
2. 比色时,设一个“0”号管的意义是什么?



实验三 3,5-二硝基水杨酸比色法测定糖的含量

一、目的

1. 了解 3,5-二硝基水杨酸比色法测定糖的原理。
2. 掌握还原糖和总糖定量测定的操作方法。

二、原理

还原糖是指含自由醛基或酮基的单糖(如葡萄糖)和某些具有还原性的双糖(如麦芽糖)。它们在碱性条件下,可变成非常活泼的烯二醇。遇氧化剂时,具有还原能力,烯二醇本身则被氧化成糖酸及其他产物。

黄色的 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂与还原糖在碱性条件下共热后,自身被还原为棕红色的 3-氨基-5-硝基水杨酸。在一定范围内,反应液里棕红色的深浅与还原糖的含量成正比,在波长为 540nm 处测定溶液的吸光度,查对标准曲线并计算,便可求得样品中还原糖的含量(图 3-1)。

多数还原性糖具有水溶性,可以将样品直接用水浸提,获得还原糖溶液。对于非还原性的双糖(如蔗糖)以及还原性很小的多糖(如淀粉),应先用酸水解法将它们彻底水解成单糖。再借助于测定还原糖的方法,可推算出总糖的含量。由于多糖水解时,在每个单糖残基上加了一分子水,因而在计算时,须扣除加入的水量,当样品里多糖含量远大于单糖含量时,则比色测定所得总糖含量应乘以折算系数($1 - \frac{18}{180} = 0.9$),即得比较接近实

际的样品中总糖含量。

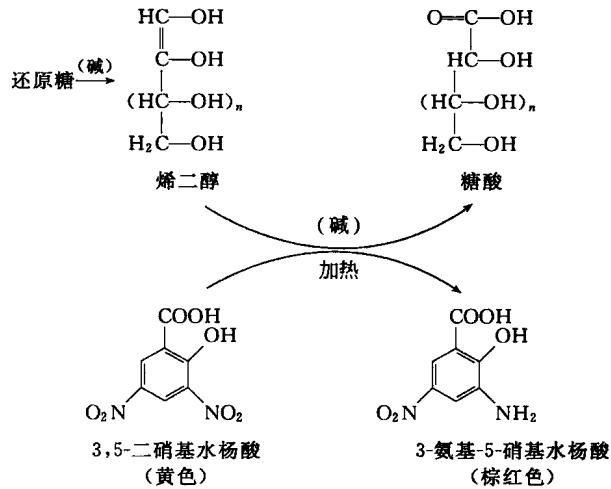


图 3-1 还原糖与 DNS 试剂的反应机理图

三、实验材料及设备

1. 材料

面粉。

2. 仪器

分光光度计、电子天平、沸水浴、恒温水浴。

3. 器材

刻度试管：25mL×14；容量瓶：100mL×2；

锥形瓶：100mL×2；移液管：1mL×4；

烧杯：250mL×2，50mL×1；加样瓶：10mL×2；

滴管：2；吸耳球：2；

滤纸：φ11cm；移液枪：1mL×1；

漏斗、洗瓶、白瓷板、试管架、移液管架、试管夹、玻棒：各 1。

四、试剂的配制

1. 葡萄糖标准液 (1mg/mL)

预先将分析纯葡萄糖置 80℃ 烘箱内约 12h。准确称取 500mg 葡萄糖于烧杯中，用蒸馏水溶解后，移至 500mL 容量瓶中，定容，摇匀，备用。

2. 3,5-二硝基水杨酸试剂 (DNS 试剂)

将 5.0g 3,5-二硝基水杨酸溶于 200mL 2mol/L NaOH 溶液中 (不适宜用高温促溶)，接着加入 500mL 含 130g 酒石酸钾钠的溶液，混匀。再加入 5g 结晶酚和 5g 亚硫酸钠，搅拌溶解后，定容至 1000mL。暗处保存备用。

3. 碘液

称取 5g 碘和 35g 碘化钾，溶于 1500mL 水中。

4. 酚酞指示剂

称取 0.1g 酚酞，溶于 250mL 70%（体积分数）的乙醇中。

5. HCl 溶液 (2.5mol/L)

取 500mL 12mol/L HCl，用水稀释至 2400mL。

6. NaOH 溶液 (2.5mol/L)

取 100g NaOH，加水溶解，定容至 1000mL。

五、操作步骤

1. 样品中还原糖的提取

- (1) 取材：准确称取 3.5g 左右的面粉，放在 100mL 三角瓶中。
- (2) 溶解：先用几滴蒸馏水调成糊状，然后加 50mL 蒸馏水，搅匀。
- (3) 浸提：置于 50℃ 恒温振荡水浴中保温 30min。
- (4) 离心：将样品液转移到 100mL 离心管中，以 4800r/min 离心 15min。
- (5) 分离：将上清液转移到 100mL 容量瓶中。
- (6) 洗涤：用约 20mL 蒸馏水将离心管中残渣悬浮转移到三角瓶中，置 50℃ 恒温振荡水浴中保温 5min。
- (7) 离心：将洗涤残渣的液体转移到 100mL 离心管中，以 4800r/min 离心 15min。
- (8) 分离：将上清液合并到上述 100mL 容量瓶中。
- (9) 重复：重复 (6) (7) (8) 操作。
- (10) 定容：将上述合并液用蒸馏水定容至 100mL，待测。

2. 样品中总糖的提取

- (1) 取材：称取 0.2g 左右的面粉，准确记录实际质量_____g，放入 100mL 锥形瓶中。
- (2) 溶解：先用几滴蒸馏水调成糊状；再加入 25mL 2.5mol/L HCl，搅匀。
- (3) 水解：置于沸水浴中水解 30min。用玻璃棒取一滴水解液于白瓷板中，加 1 滴碘液，检查淀粉水解程度。如显蓝色，表明未水解完全，应继续水解。如已水解完全，则不显蓝色，可以取出沸水浴中的锥形瓶，冷却。
- (4) 中和：加入 25mL 2.5mol/L NaOH 中和至微碱性。
- (5) 定容：将上述中和液用蒸馏水定容至 100mL。（注：本实验由于面粉水解后所剩残渣很少，残渣所占体积对定容体积 100mL 造成的误差可以忽略不计，所以可以采取先定容，后过滤，这样可以节省时间。）
- (6) 过滤：滤液收集于 1 支干净干燥的试管中，待测。

3. 标准曲线制作及样品测定

取 12 支 25mL 刻度试管，按表 3-1 所示顺序操作。

六、结果处理

1. 由 0~5 号管的数据，以葡萄糖含量 (mg) 为横坐标， A_{540} 为纵坐标，在坐标纸上绘制标准曲线；
2. 求样品管 A_{540} 的平均值 \bar{A}_{540} ；
3. 由 \bar{A}_{540} 从标准曲线中求样品管中葡萄糖的含量 (mg)；