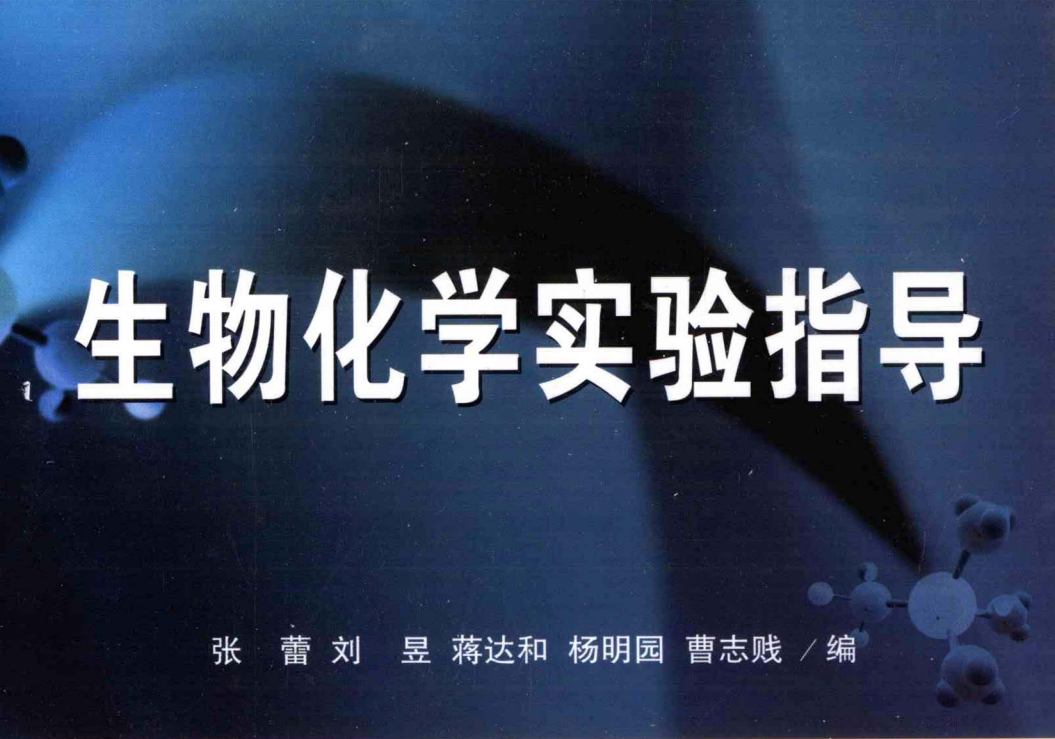
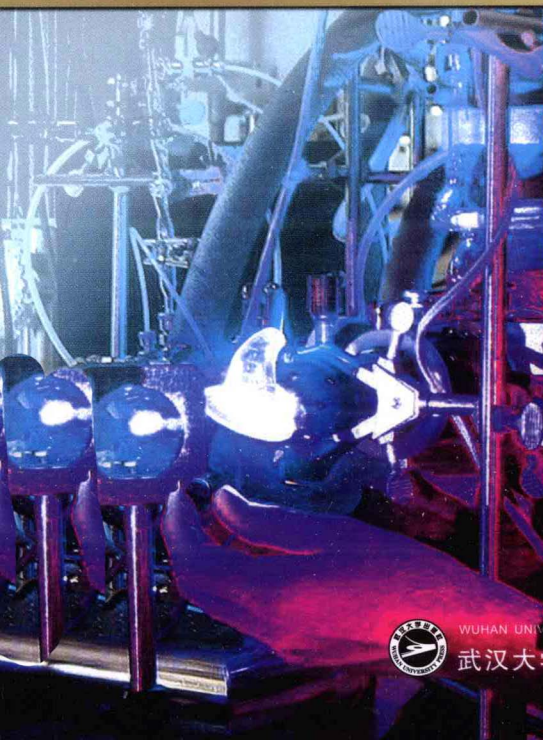




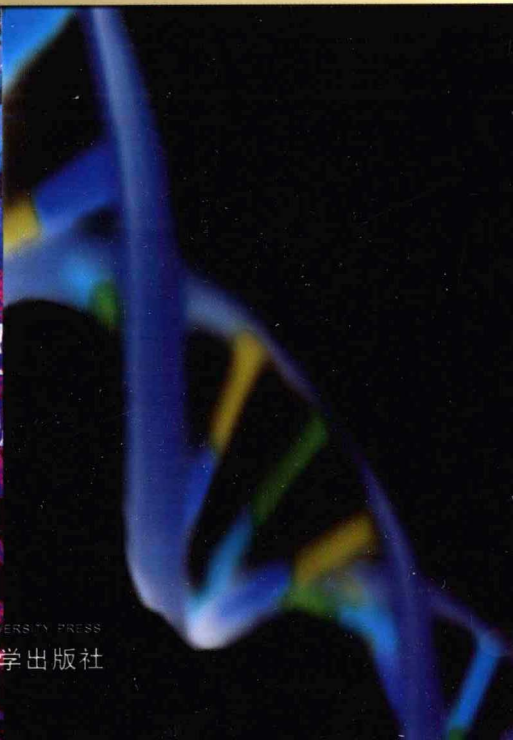
生物化学实验指导

张 蕾 刘 昱 蒋达和 杨明园 曹志贱 / 编



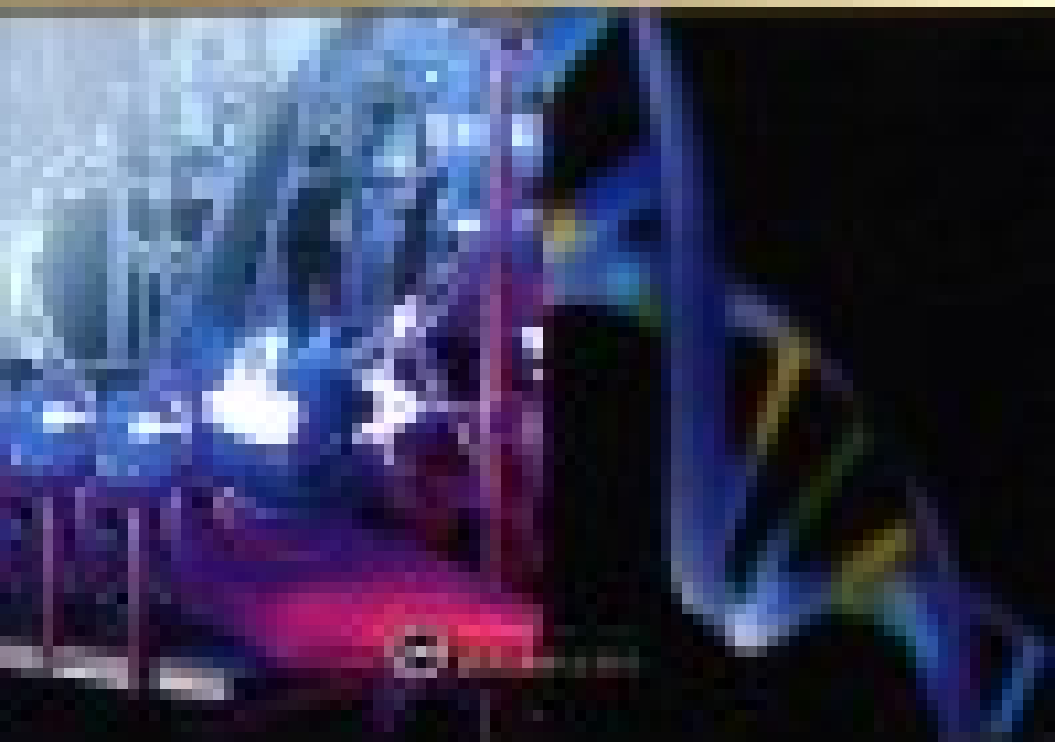
WUHAN UNIVERSITY PRESS

武汉大学出版社



生物化学实验指导

主 编 周 强 副主编 陈 强 潘 强 王 强



生物化学实验指导

张 蕾 刘 昱 蒋达和 杨明园 曹志贱 / 编



WUHAN UNIVERSITY PRESS

武汉大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验指导/张蕾,刘昱,蒋达和,杨明园,曹志贱编. —武汉:武汉大学出版社,2011. 8

ISBN 978-7-307-08832-0

I. 生… II. ①张… ②刘… ③蒋… ④杨… ⑤曹…
III. 生物化学—化学实验—高等学校—教学参考资料 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 108747 号

责任编辑:黄汉平 责任校对:黄添生 版式设计:马 佳

出版发行:武汉大学出版社 (430072 武昌 珞珈山)

(电子邮件:wdp4@whu.edu.cn 网址:www.wdp.com.cn)

印刷:武汉珞珈山学苑印刷有限公司

开本:880×1230 1/32 印张:10 字数:260千字 插页:1

版次:2011年8月第1版 2011年8月第1次印刷

ISBN 978-7-307-08832-0/Q·100 定价:18.00元

版权所有,不得翻印;凡购买我社的图书,如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请与当地图书销售部门联系调换。

前 言

生物学在 20 世纪取得了惊人的进展,其中生物化学研究领域的飞速发展作为生物学其他学科如细胞生物学、分子生物学、微生物学以及病毒学等的发展提供了必要的前提和条件。

为了紧跟科技发展的脚步,为国内外生物学研究和应用领域培养创新型高技术人才,我们在生物化学实验教学中进行了大量改革,既体现生化基本原理、基础知识和基本技能的训练,同时融入科学性、启发性和先进性的新技术,顺应学科发展的需要。鉴于免疫学实验课单独开设并有独立的实验课教材,所以在生化实验教材中删除了免疫学实验部分。蛋白质、脂类和糖类是组成生物体的重要的三大物质,新版生物化学教材中在原有蛋白质研究方法的基础上,添加了脂类和糖类分析鉴定的实验方法。新版教材总共分为六章,内容以生物大分子的鉴定分析为线索,包括糖、脂类、蛋白质、酶学、代谢产物和核酸六部分,此外本书最后单独设立一章专门介绍生物化学实验过程中的基本常识,包括实验室安全规则介绍、常规仪器使用方法、常用试剂配制等,方便学生在实验过程中进行查阅。

希望通过本教材的学习,学生能够顺利完成生物化学实验,了解现代生物化学实验最基本的技术,掌握实验设计、综合运用、宏观思维以及逻辑分析问题的基本实验素质,并在今后的学习和工作中灵活应用。本教材中涉及的技术和方法比较广泛,可供理科、农林类及医学专业学生参考使用。

本教材的第一章、第五章和第六章由蒋达和和曹志贱协作完成;

第三章蛋白质部分由刘昱撰写;第二章脂类和第四章酶学实验由张蕾编写。教材中的附录部分即实验室安全知识、溶液配制等由杨明园完成。尽管我们在编写的过程中尽力做到完善,但是疏忽或者考虑不周的地方在所难免,希望学生在使用过程中提出宝贵意见和建议,以便再版时更好地完善教材。

编 者

2011年3月于珞珈山

目 录

第一章 糖类鉴定和定量测定.....	1
第一节 糖类的鉴定和分析方法	3
实验一 糖的呈色反应和定性鉴定.....	3
实验二 糖类的薄层层析鉴定.....	7
实验三 Smith 降解法测定糖链的序列.....	13
第二节 糖类定量测定方法	16
实验四 总糖和还原糖的测定(一)	16
实验五 总糖和还原糖的测定(二)	21
实验六 还原糖的测定(三)	24
实验七 还原糖的测定(四)	27
实验八 碘量法测定葡萄糖的含量	31
实验九 蒽酮比色法测定可溶性糖含量	33
实验十 邻甲苯胺法测定血糖的含量	36
实验十一 糖原的测定	38
第二章 脂类	41
第一节 脂肪提取和测定	41
实验一 粗脂肪的提取和测定	43
实验二 卵磷脂的提取及鉴定	47
第二节 脂类的鉴定方法	49

实验三 薄层层析法分析膜磷脂	49
实验四 脂类染色法	54
第三节 油脂的化学性质	59
实验五 油脂酸价的测定	60
实验六 脂肪碘值的测定	62
实验七 油脂皂化值的测定	67
实验八 油脂羟值的测定	70
实验九 油脂过氧化值的测定	73
实验十 油脂总羧基价的测定	75
第四节 血清中脂类的测定	77
实验十二 血清胆固醇的测定	78
实验十三 血清中甘油三酯的测定	81
实验十四 血清中磷脂的测定	83
实验十五 酶法测定血清中游离脂肪酸	86
 第三章 蛋白质	89
第一节 蛋白质含量的测定	91
实验一 紫外吸收法测定蛋白质含量	91
实验二 Folin 酚法 (Lowry 法) 测定蛋白质的含量	95
实验三 考马斯亮蓝法 (Bradford 法) 测定蛋白质含量	99
实验四 BCA 法测定蛋白质含量	102
第二节 蛋白质的纯度和亚单位的检测	104
实验五 连续的非变性凝胶电泳法	104
实验六 不连续 SDS-PAGE 垂直电泳及 考马斯亮蓝染色法	107
实验七 SDS-PAGE 蛋白凝胶的酸性银染法	115
实验八 蛋白免疫印迹法	116
实验九 等电聚焦测定蛋白质等电点	119

第三节 蛋白质的分类纯化	124
实验十 蛋白质盐析分离	124
实验十一 分子筛法对蛋白质脱盐	127
实验十二 DEAE 纤维素柱层析纯化酶蛋白	130
实验十三 亲和层析——镍柱纯化分离天然状态的带 有 His 标签的蛋白质	134
实验十四 TCA 法和丙酮法沉淀浓缩蛋白质	139
第四章 酶学实验	142
第一节 常见酶活力的测定	142
实验一 水解酶活力的测定	143
实验二 氧化还原酶活力的测定	146
实验三 转移酶活力的测定	149
实验四 异构酶活力的测定	152
实验五 裂解酶活力的测定	155
第二节 酶的动力学研究	157
实验六 酵母蔗糖酶的粗酶制备过程	157
实验七 蔗糖酶活力的测定和比活力的分析	159
实验八 蔗糖酶的盐析和凝胶层析脱盐	165
实验九 DEAE 纤维素柱层析纯化蔗糖酶	170
实验十 底物浓度对催化反应速度的影响及 米氏常数 K_m	173
实验十一 用正交法测定几种因素 对蔗糖酶活力的影响	177
第五章 代谢产物的鉴定和测量	184
第一节 代谢产物的定性鉴定	185
实验一 糖酵解中间产物的鉴定	185

实验二	肌糖原的酵解作用·····	188
实验三	ATP 的生物合成的测定·····	192
实验四	纸层析法定性检测氨基移换反应 ·····	195
实验五	生物氧化的电子传递实验·····	198
实验六	脂肪转化为糖的定性实验·····	201
实验七	激素对血糖浓度的调控作用·····	202
第二节	代谢产物的定量测定·····	204
实验八	脂肪酸的 β -氧化——酮体测定法 ·····	204
实验九	氨基转换作用的测定(分光光度法) ·····	209
实验十	二乙酰-胨法测定血清尿素氮 ·····	212
第六章	核酸类实验·····	215
第一节	核酸的提取和鉴定·····	216
实验一	琼脂糖凝胶电泳检测 DNA ·····	216
实验二	RNA 的变性琼脂糖凝胶电泳 ·····	219
实验三	质粒 DNA 的碱裂解法提取与纯化 ·····	221
实验四	植物组织中 DNA 的提取 ·····	224
实验五	酵母 RNA 的分离与鉴定 ·····	228
实验六	动物肝脏 DNA 的提取与纯化 ·····	230
第二节	核酸的定量测定·····	233
实验七	紫外吸收法测定核酸的含量·····	233
实验八	定磷法测定核酸的含量·····	236
实验九	二苯胺法测定 DNA 的含量 ·····	240
实验十	地衣酚(苔黑酚)法测定 RNA 的含量 ·····	242
附录	·····	245
一	生物化学实验室规则·····	245
二	实验误差·····	246

三 实验室安全知识	248
四 关于有毒化学药品的知识	253
(一) 高毒性固体	253
(二) 毒性危险气体	254
(三) 毒性危险液体和刺激性物质	254
(四) 其他有毒物质	255
(五) 致癌物质	256
(六) 具有长期积累效应的毒物	256
(七) 溴化乙锭溶液的净化处理	257
(八) 实验操作中对所用的特殊化学试剂应注意的 安全事项	257
五 生物化学实验室基本知识和操作	261
(一) 玻璃仪器的洗涤、清洁与干燥	261
(二) 清洗液的原理与配制	262
(三) 吸量管的种类和使用	263
(四) 容量瓶及量筒	266
(五) 滴定管	267
(六) 易变质及需要特殊方法保存的试剂	268
(七) 溶液的配制	268
(八) 溶液的混匀	269
(九) 过滤	269
六 生物化学实验常用仪器的使用	270
(一) 722S 型分光光度计的使用方法	270
(二) UV/VIS-5100 紫外-可见分光光度计的使用	276
(三) 酸度计的使用	283
(四) 离心机的使用	287
(五) 可调式微量移液器的使用	291
七 生物化学实验常用数据及参数	295

(一) 硫酸铵饱和度的计算表	295
(二) 常用酸、碱的密度和浓度	297
(三) 氨基酸的主要参数	298
(四) 常用蛋白质相对分子质量标准参照物	299
(五) 核酸、蛋白质换算数据	299
八 缓冲液的配制	300
(一) 常用缓冲溶液的配制	300
(二) 酸度计用的标准缓冲液的配制	304
九 常用酸碱指示剂	305
十 层析技术有关介质性质及数据	307
(一) 离子交换纤维素	307
(二) 常见离子交换树脂的有关性质	308
(三) 葡聚糖凝胶的有关技术数据	310
(四) 聚丙烯酰胺凝胶的有关技术数据	311
(五) 琼脂糖凝胶的有关技术数据	311
(六) 各种凝胶所允许的最大操作压	312

第一章 糖类鉴定和定量测定

糖类物质是由碳、氢、氧三种元素组成的一大类多羟基醛类 (aldehyde) 或多羟基酮类 (ketone) 化合物。其化学式 $(\text{CH}_2\text{O})_n$ 类似于“碳”与“水”聚合,故又称为碳水化合物。它是构成机体的重要物质,供给人体生命活动 60% ~ 70% 的热能,参与细胞的多种代谢过程。

糖类物质包括单糖、低聚糖(蔗糖、乳糖和麦芽低聚糖和异麦芽低聚糖、低聚果糖、低聚半乳糖、低聚木糖等)和多糖(如糖原、淀粉、纤维素等)。单糖是糖的最基本组成单位,低聚糖和多糖是由单糖组成的。在这些糖类物质中,人体能消化利用的是单糖、普通低聚糖和多糖中的淀粉,称为有效碳水化合物;纤维素、半纤维素、果胶等由于不能被人体消化利用,称为无效碳水化合物。这些无效碳水化合物能促进肠道蠕动,改善消化系统的机能,对维持人体健康有重要作用,是人们膳食中不可缺少的成分。

糖类物质在自然界中分布很广,存在的形式和含量各不相同。因而糖类物质的分析测定具有十分重要的意义。

分析和检测糖类物质的方法很多,可分为直接法和间接法两大类。间接法是根据测定的水分、粗脂肪、粗蛋白质、灰分等含量,利用差减法计算出来,常以总碳水化合物或无氮抽提物来表示。直接法是根据糖的一些理化性质作为分析原理进行的各种分析方法,包括物理法、化学分析法、酶法、色谱法、电泳法、生物传感器及各种仪器分析法。间接法多用于测定样品中糖类化合物的总量,而样品中各

种糖的含量则采用直接法来测定。

物理法包括相对密度法、折光法、旋光法和重量法等,可用于测定糖液浓度、糖品的糖分、谷物中淀粉及粗纤维含量等。化学分析法是应用最广泛的常规分析方法,包括直接滴定法、高锰酸钾法、铁氰化钾法、碘量法、蒽酮法等。在许多分析和检测方法中常常将物理法(如光学)和化学分析法(如显色反应)结合起来。样品中还原糖、蔗糖、总糖、淀粉和果胶物质等的测定多采用化学分析法,但所测得的多是糖类物质的总量,不能确定混合糖的组分及其每种糖的含量。利用纸色谱法、薄层色谱法、气相色谱法、高效液相色谱法和糖离子色谱法等可以对混合糖中各种糖分进行分离和定量测定,纸色谱法和薄层色谱法不需特殊的试剂和仪器,薄层色谱法和高效液相色谱法已被确定为异麦芽低聚糖测定的国家标准方法。电泳法可对样品中各种可溶性糖分进行分离和定量测定,如葡萄糖、果糖、乳糖、棉子糖等常用纸上电泳法和薄层电泳法进行检验。近年来毛细管电泳法在一些低聚糖和活性多糖方面的测定越来越广泛。生物传感器简单、快速,可实现在线分析,如用葡萄糖生物传感器可在线检测混合样品中葡萄糖的含量,是一种具有很大潜力的检测方法。

在糖类分子中含有游离醛基或酮基的单糖和含有游离的半缩醛羟基的双糖都具有还原性。不具还原性的双糖(如蔗糖)、三糖乃至多糖(如糊精、淀粉等)都可以通过水解而生成相应的还原性单糖,测定水解液的还原糖含量就可以求得样品中相应糖类的总含量。因此,还原糖的测定是糖类化学定量检测的基础。

在糖的化学分析法之中,直接滴定法由于反应复杂,影响因素较多,所以不如铁氰化钾法准确,但其操作简单迅速,试剂稳定,故被广泛采用。高锰酸钾滴定法准确度和重现性都优于直接滴定法,适用于各类食品中还原糖的测定,但操作复杂、费时。碘量法广泛用于醛糖的测定,与直接滴定法结合,也可做果糖含量的测定。3,5-二硝基水杨酸法(简称 DNS 法)也具有操作简便、快速、灵敏度高、杂

质干扰较小等优点,近年来逐渐被应用于生物药中糖含量的测定。蒽酮比色法要求比色时糖液浓度在一定范围内,同时要求检测液澄清,此外,在大多数情况下,测定要求不包括淀粉和糊精,这就要在测定前将淀粉和糊精去掉,使操作复杂化,因而其应用受到一定限制。

糖链是继蛋白质、核酸之后的第三条生命之链。糖链作为生物信息分子参与细胞生物几乎所有的生命过程,特别是在细胞分化、发育、免疫、老化、癌变、信息传递等生命和疾病过程中起着特异性的识别、介导与调控作用。由于糖链的结构极为复杂,加之糖链结构测定和糖链合成等关键技术尚未突破,糖链所蕴涵的生命奥秘远未被揭示。对糖链结构与生物学作用的研究,不仅可揭示基因功能等生命本质,还将阐明众多疾病机制,已成为 21 世纪生命科学的前沿和热点领域。因此,本章中也收录和介绍了糖链的结构鉴定方法。

第一节 糖类的鉴定和分析方法

实验一 糖的呈色反应和定性鉴定

【实验目的】

1. 学习鉴定糖类及区分酮糖和醛糖的方法。
2. 了解鉴定还原糖的方法及其原理。

【实验原理】

Molish 反应—— α -萘酚反应:糖在浓硫酸或浓盐酸的作用下脱水形成糠醛及其衍生物与 α -萘酚作用形成紫红色复合物,在糖液和浓硫酸的液面间形成紫环,因此又称紫环反应。自由存在和结合存在的糖在 Molish 反应中均呈现阳性反应。此外,各种糠醛衍生物、葡萄糖醛酸以及丙酮、甲酸和乳酸均呈颜色近似的阳性反应。因

此,阴性反应证明没有糖类物质的存在;而阳性反应,则说明有糖存在的可能性,需要进一步通过其他糖的定性试验才能确定是否有糖存在。

蒽酮反应:糖与浓酸作用后生成的糠醛及其衍生物与蒽酮(10-蒽-9,10-二氢蒽)作用生成蓝绿色复合物。

酮糖的 Seliwanoff 反应:该反应是鉴定酮糖的特殊反应。酮糖在酸的作用下较醛糖更易生成羟甲基糠醛。后者与间苯二酚作用生成鲜红色复合物,反应仅需 20 ~ 30 秒。醛糖在浓度较高或长时间煮沸时,才产生微弱的阳性反应。

Fehling(费林)试验:费林试剂是含有硫酸铜和酒石酸钾钠的氢氧化钠溶液。硫酸铜与碱溶液混合加热,则生成黑色的氧化铜沉淀。若同时有还原糖存在,则产生黄色或砖红色的氧化亚铜沉淀。为防止铜离子和碱反应生成氢氧化铜或碱性碳酸铜沉淀,费林试剂中加入酒石酸钾钠,它与 Cu^{2+} 形成的酒石酸钾钠络合铜离子是可溶性的络合物,该反应是可逆的。平衡后溶液内保持一定浓度的氢氧化铜。费林试剂是一种弱的氧化剂,它不与酮和芳香醛发生反应。

Benedict 试验:Benedict 试剂是费林试剂的改良。Benedict 试剂利用柠檬酸作为 Cu^{2+} 的络合剂,其碱性较 Fehling 试剂弱,灵敏度高,干扰因素少。

Barfoed 试验:在酸性溶液中,单糖和还原二糖的还原速度有明显差异。Barfoed 试剂为弱酸性。单糖在 Barfoed 试剂的作用下能将 Cu^{2+} 还原成砖红色的氧化亚铜,时间约为 3 分钟,而还原二糖则需 20 分钟左右。所以,该反应可用于区别单糖和还原二糖。当加热时间过长,非还原性二糖经水解后也能呈现阳性反应。

【药品试剂】

1. Molish 试剂:取 5 g α -萘酚用 95% 乙醇溶解至 100 ml,临用前配制,棕色瓶保存。

2. 1% 葡萄糖溶液。

3. 1% 蔗糖溶液。

4. 1% 淀粉溶液。

5. 蒽酮试剂: 取 0.2 g 蒽酮溶于 100 ml 浓硫酸中, 当日配制。

6. Sediwanoff 试剂: 0.5 g 间苯二酚溶于 1 L 盐酸 ($H_2O:HCl = 2:1$) (V/V) 中, 临用前配制。

7. 费林试剂: 试剂甲: 称取 34.5 g 硫酸铜溶于蒸馏水中, 定容至 500 ml。试剂乙: 称取 125 g NaOH 和 137 g 酒石酸钾钠, 溶于蒸馏水中, 定容至 500 ml, 储存在具橡皮塞玻璃瓶中。临用前, 将试剂甲和试剂乙等量混合。

8. Benedict 试剂: 将 170 g 柠檬酸钠和 100 g 无水碳酸钠溶于 800 ml 水中; 另将 17 g 硫酸铜溶于 100 ml 热水中。将硫酸铜溶液缓缓倾入柠檬酸钠-碳酸钠溶液中, 边加边搅, 最后定容到 1000 ml。该试剂可长期使用。

9. Barfoed 试剂: 16.7 g 乙酸铜溶于近 200 ml 水中, 加 1.5 ml 冰醋酸, 定容到 250 ml。

【实验方法】

1. Molish 反应: 取试管, 编号, 分别加入各待测糖溶液 1 ml, 然后加两滴 Molish 试剂, 摇匀。倾斜试管, 沿管壁小心加入约 1 ml 浓硫酸, 切勿摇动, 小心竖直后仔细观察两层液面交界处的颜色变化。用水代替糖溶液, 重复一遍, 观察并记录实验结果。

2. 蒽酮反应: 取试管, 编号, 均加入 1 ml 蒽酮溶液, 再向各管滴加 2~3 滴待测糖溶液, 充分混匀, 观察各管颜色变化并记录。

3. 酮糖的 Seliwanoff 反应: 取试管, 编号, 各加入 Seliwanoff 试剂 1 ml, 再依次分别加入待测糖溶液各 4 滴, 混匀, 同时放入沸水浴中, 比较各管颜色的变化过程。

4. Fehling 试验: 取试管, 编号, 各加入 Fehling 试剂甲和试剂乙 1 ml。摇匀后, 分别加入 4 滴待测糖溶液, 置沸水浴中加热 2~3 分