

昆虫生物化学分析法



冯 慧 编 著
农 业 出 版 社

昆虫生物化学分析法

冯 慧 编著

农 业 出 版 社

昆虫生物化学分析法

冯 慧 编著

责任编辑 郭秉德

农业出版社出版（北京朝阳区枣营路）

新华书店北京发行所发行 密云县印刷厂印刷

787×1092mm32开本 4.25印张 82千字

1989年2月第1版 1989年2月北京第1次印刷

印数 1—1,820册 定价 2.30元

ISBN 7-109-00612-3/Q·21

前 言

昆虫生物化学是一门边缘学科，它的任务是以生物化学的观点和方法来研究昆虫的生命现象。昆虫生物化学这门学科在本世纪中期开始创立。近年来生物化学的研究技术日新月异，昆虫生理学及内分泌学的迅速发展，这些都促进了昆虫生物化学的发展。

我国昆虫生物化学自60年代开始建立以来，近年许多研究机构 and 高等学校也展开了这方面的研究工作，发展比较迅速。现在国内尚缺少昆虫生物化学分析方法的书。近年来我收集了一些国内外昆虫碳水化合物、脂类、蛋白质、氨基酸、核酸及昆虫激素分析方法的资料。有些是在自己的实验室里用过的，有些是其他实验室建立的，还有生物化学上的常规方法适用于昆虫的。根据我国目前实验室的条件，加以整理，力求方法比较具体明了，易于操作。由于个人的学识水平有限，难免有许多缺点和错误，希望广大读者批评指正。

编著者

1984年9月

内 容 提 要

本书介绍了昆虫生物化学中比较常用的研究方法。内容包括昆虫碳水化合物、脂类、蛋白质、氨基酸、核酸及蜕皮激素的研究技术和分析方法，其中有分光光度法、纸层析、薄层层析、凝胶电泳、放射免疫分析法及荧光测定法等。

本书可供昆虫学、生物化学科学研究工作者，农业科研人员，农林院校有关专业师生参考。

目 录

前言

第一章 昆虫碳水化合物分析法.....	(1)
一、碳水化合物的分类.....	(1)
(一) 单糖类.....	(1)
(二) 低聚糖类.....	(3)
(三) 多糖类及其衍生物.....	(3)
二、碳水化合物的性质.....	(4)
(一) 糖的颜色反应.....	(4)
(二) 糖的还原性.....	(5)
(三) 土伦试剂反应.....	(5)
(四) 费林试剂反应.....	(6)
(五) 糖脎的形成.....	(6)
三、糖的测定法.....	(8)
(一) 蒽酮比色测糖法.....	(8)
(二) 纳尔生法测糖.....	(10)
(三) 糖元的测定.....	(11)
(四) 醛基糖的测定.....	(12)
(五) 氨基葡萄糖的测定.....	(14)
(六) 海藻糖酶的测定.....	(15)
四、糖类的纸上层析法.....	(16)
(一) 样品制备.....	(16)
(二) 展开溶剂与 R_f 值.....	(16)
(三) 显色剂与检出方法.....	(16)
(四) 纸层析法糖的定量测定.....	(18)
五、糖类的薄层层析.....	(20)
(一) 薄层的制备.....	(20)

(二) 糖的显色剂	(21)
(三) 展层剂	(24)
(四) 糖类在硅胶G薄层上的分离鉴定及定量测定	(24)
(五) 糖类的聚酰胺薄层层析	(26)
第二章 昆虫脂类的分析法	(27)
一、脂的分类	(27)
二、昆虫脂类的抽提技术〔福尔琪 (Folch) 改良法〕	(28)
三、脂类的化学性质	(29)
(一) 碘值	(29)
(二) 皂化值	(30)
(三) 酸值	(32)
四、脂类的色谱分析法	(32)
(一) 滤纸层析法	(32)
(二) 柱层析	(35)
(三) 薄层层析	(44)
五、甾醇分析	(52)
(一) 总胆甾醇的测定法 (邻苯二甲醛法)	(52)
(二) 总胆甾醇和游离胆甾醇的测定	(54)
六、甘油三酯测定法 (变色酸法)	(55)
第三章 昆虫蛋白质及氨基酸的分析法	(58)
一、蛋白质及氨基酸的分类	(58)
(一) 蛋白质的分类	(58)
(二) 氨基酸的分类	(59)
二、蛋白质及氨基酸的定性测定	(63)
(一) 蛋白质的一般显色反应	(63)
(二) 复合蛋白质的显色反应	(64)
(三) 氨基酸的一般显色反应	(66)
三、蛋白质的定量测定	(69)
(一) 总氮量的测定法 (凯氏定氮法)	(69)
(二) 甲醛滴定氨基酸法	(72)
(三) 双缩脲法	(74)

(四) 福林-酚试剂法	(75)
四、氨基酸的纸上层析	(77)
(一) 样品处理	(77)
(二) 纸层析的点样	(78)
(三) 层析用具及溶剂系统	(79)
(四) 检出试剂和检出方法	(79)
五、氨基酸的薄层层析	(82)
(一) 薄层的种类	(82)
(二) 样品的制备	(82)
(三) 展开剂	(82)
(四) 显色	(83)
六、盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质	(86)
(一) 原理	(86)
(二) 试剂	(87)
(三) 操作步骤	(88)
第四章 昆虫核酸的分析法	(90)
一、核酸的化学组成	(91)
二、从昆虫材料提取核酸	(96)
三、核酸的测定法	(97)
(一) Burton改良法测 DNA	(97)
(二) 二苯胺法测DNA	(99)
(三) 苔黑酚法测RNA	(100)
(四) 改良苔黑酚法测RNA	(101)
(五) 定磷法测定核酸含量	(102)
(六) 紫外吸收法	(104)
(七) 核酸的微量测定法——非荧光法	(104)
四、核酸水解产物的层析分离鉴定	(107)
(一) 纸层析法	(107)
(二) DEAE纤维素薄层层析法分离鉴定核苷酸	(108)
第五章 昆虫蜕皮激素测定法	(111)
一、蜕皮激素的存在和化学结构	(112)

二、昆虫体蜕皮激素样品的提取	(113)
三、蜕皮激素的放射免疫测定法	(114)
(一) 抗原的制备	(114)
(二) 抗血清	(115)
(三) 碘 ¹²⁵ 标记抗原的制备	(116)
(四) 放射免疫测定	(117)
(五) 计算	(118)
四、生物测定法	(118)
(一) 家蝇分离腹部测定法	(118)
(二) 家蚕无脑蛹的测定法	(119)
(三) 二化螟幼虫测定法(浸渍法)	(119)
五、荧光法	(120)
六、薄层层析法	(121)
参考文献	(124)

第一章 昆虫碳水化合物分析法

碳水化合物、蛋白质和脂肪是组成生物（包括昆虫）有机体的主要有机化合物。碳水化合物存在于昆虫的细胞核、质、膜、肌肉、脂肪体、血淋巴及支持组织中。它是昆虫的重要能量来源。

昆虫碳水化合物代谢一般和脊椎动物的类似，但是也有它的特殊性。它富含氨基多糖，几丁质的外骨骼。它还含有一种特殊的双糖——海藻糖，作为葡萄糖的一种贮存形式。围绕这些化合物的合成和降解是昆虫碳水化合物代谢的特征。

一、碳水化合物的分类

糖是由碳、氢、氧三种元素所组成，绝大多数糖分子中所含的氢与氧的比例为 2 : 1，与水分子中的氢氧比例相同，所以也将糖称为碳水化合物。

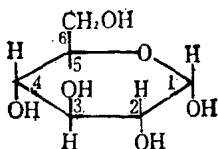
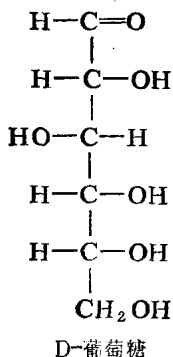
在有机化学中碳水化合物属于多羟基的醛或酮及其衍生物，按其分子大小可以分为三种类型。

（一）单糖类

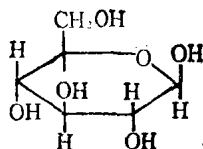
不能分解为更简单的糖分子的多羟基醛或酮的化合物，其分子式可用 $(CH_2O)_n$ 表示， $n = 3 - 7$ ，常见的是戊糖、己糖，如核糖、葡萄糖、果糖、甘露糖等。

1. 葡萄糖 葡萄糖是生物体最常见的一种己糖。在昆虫的血液里含有少量的葡萄糖。自然界存在的葡萄糖是 D-异构体。许多低聚糖和多糖都是由葡萄糖衍生出来的糖类。

单糖分子可以异构化，葡萄糖分子中的醛基能以环状半缩醛状态存在，有 α 及 β 两种异构体。在溶液中 α 及 β 型及醛式糖之间呈平衡状态。醛式糖只占微量。

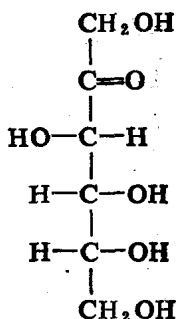


α -D-吡喃葡萄糖



β -D-吡喃葡萄糖

2. 果糖 果糖是己酮糖。马胃蝇血液中含有果糖，家蚕和粘虫血液中也含有少量果糖。蜂蜜中含有大量果糖。果糖也是某些低聚糖的组分。



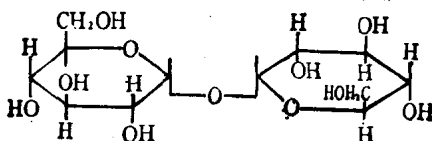
D-果糖

(二) 低聚糖类

含有 2—10 个单糖残基的糖称为低聚糖或寡糖。

含有两个单糖残基所组成的糖，称为双糖或贰糖，双糖最为重要。昆虫的重要双糖是海藻糖。

海藻糖是由两个葡萄糖分子所组成的双糖，但这两个分子是以 1, 1'- α -结合键结合。两个葡萄糖残基的潜在还原基形成了糖苷键。因此海藻糖是非还原性糖，下图为海藻糖的结构式。



海藻糖

(三) 多糖类及其衍生物

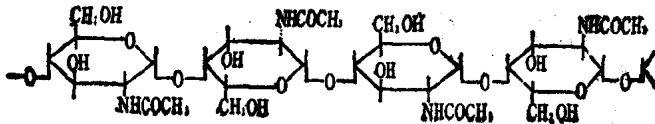
10 个以上的单糖残基所组成的糖，称为多糖。多糖完全水解后能形成多个分子的单糖。昆虫体重要的多糖为糖元，重要的多糖衍生物为几丁质。

1. 糖元 糖元是昆虫糖类贮存物的主要形式，它贮藏在脂肪体中，在肌肉及其他组织中亦有一些贮存。

糖元是由多个葡萄糖分子通过 1,4- α 葡萄糖苷键连结的，支链处是 1,6- α -葡萄糖苷键。直链约含 12—18 个葡萄糖分子即行分支。

糖元呈白色粉末，可溶于水，无还原性，遇碘形成红色。糖元完全水解后形成葡萄糖。昆虫体内糖元、海藻糖和葡萄糖之间经过相应酶的作用可以互相转化。它们在能量代谢中起重要作用。

2. 几丁质 几丁质是昆虫体最主要的结构组分，是形成内、外表皮、气管、消化道及生殖管道的主要成分。它是由无分支的链状的 β -(1,4)-2=乙酰氨基-2=脱氧-D=葡萄糖所组成。



几丁质

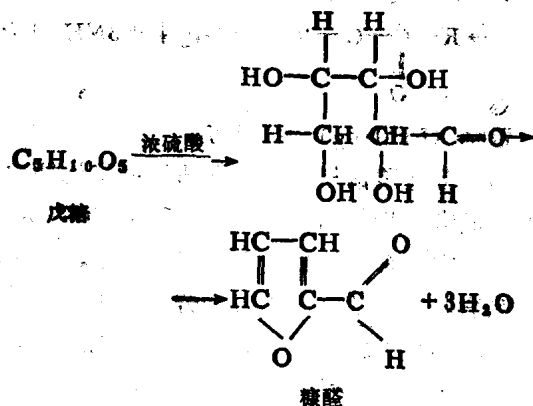
二、碳水化合物性质

糖的外观多为无色或白色的晶体或粉末。单糖易溶于水，在甲醇、乙醇、吡啶等极性有机溶剂中也溶解。低聚糖易溶于水，但在极性有机溶剂中溶解度很小或不溶，在非极性有机溶剂中则单糖及低聚糖均不溶解。多糖类多数不溶于水，有的在热水中有一定溶解度，不溶于有机溶剂。

(一) 糖的颜色反应



糖经浓无机酸处理，脱水产生糠醛或糠醛衍生物。通常使用的无机酸为硫酸。



这些糠醛或糠醛衍生物在浓无机酸作用下，能与芳香族酚类或胺类缩合生成有色化合物。纸及薄层层析的显色剂多半属于这类反应。

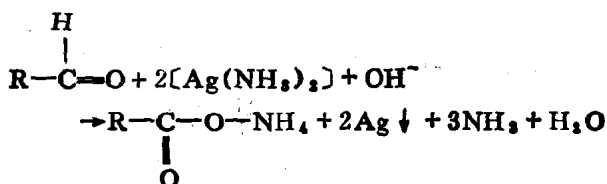
(二) 糖的还原性

含有自由醛基或酮基的单糖或双糖叫还原糖。在碱性溶液中，还原糖能将金属离子（铜、铋、汞、银等）还原，糖本身氧化成酸类化合物，此性质常用于检验糖的还原性。并且成为测定还原糖含量的各种方法的依据。

(三) 土伦 (Tollen) 试剂反应

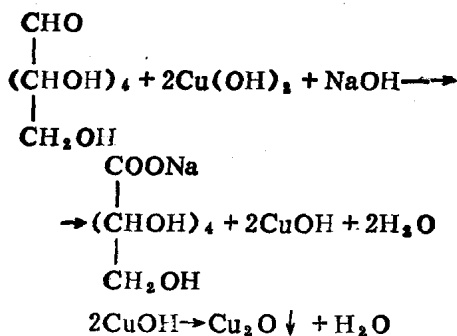
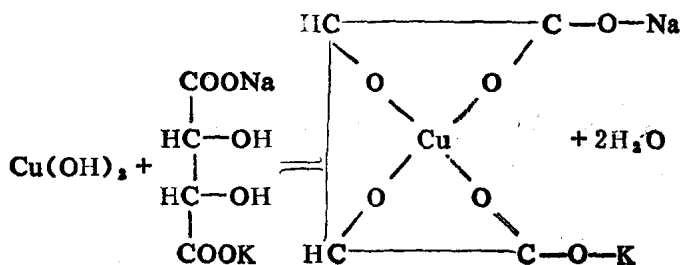
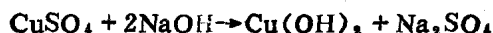
土伦试剂是硝酸银与氢氧化铵配成的氨合氢氧化银溶液。它是一种温和的氧化剂，可以使醛和醛糖以及酮糖发生氧化，而酮则不被氧化。被还原的金属银附着在试管壁上，象镜子一样。故称银镜反应。





(四) 费林 (Fehling) 试剂反应

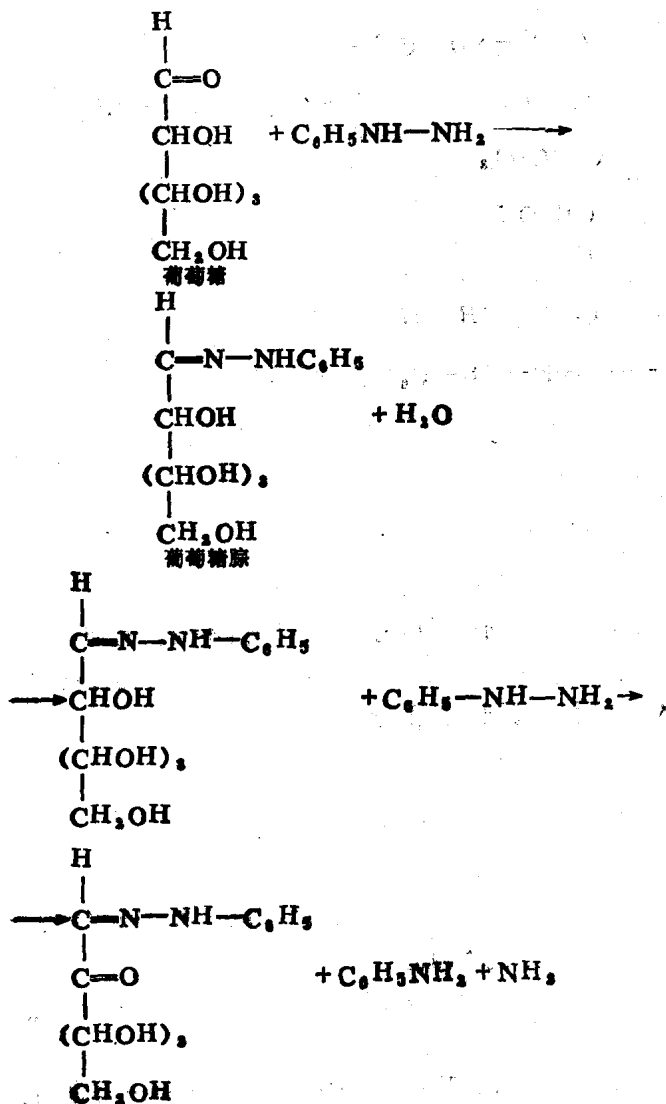
费林试剂是含硫酸铜与酒石酸钾钠的氢氧化钠溶液。与酒石酸钾钠形成络合状态的 Cu^{++} ，可以将还原糖和脂肪醛氧化成相应的酸类化合物。 Cu^{++} 被还原成 Cu^+ ，产生砖红色的氧化亚铜沉淀。费林试剂不与酮和芳醛发生反应。

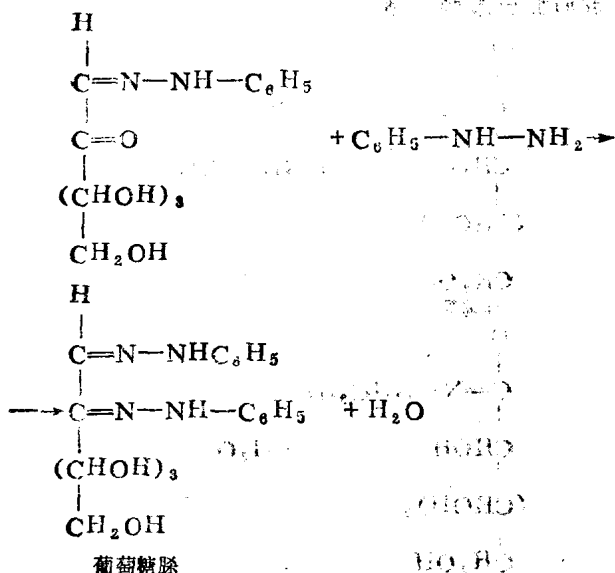


(五) 糖脎的形成

还原糖与苯肼作用，首先形成特异的苯腙，与苯肼继续

反应，最后形成苯脲（糖脲）。





不同还原糖所生成的脎，化学构造不同，晶形，熔点和溶解度亦各不相同。不同的糖反应而生成糖脎的速度也不相同，由此可以鉴别不同的糖。

三、糖的测定法

(一) 蒽酮比色测糖法

本法可用于测定糖元含量，亦可用于测定葡萄糖含量，是一个快速而方便的测糖法。

1. 原理 蒽酮可以和游离的或多糖中存在的己糖、醛糖及己糖醛酸起反应，反应后溶液呈蓝绿色，在光电比色计于 620 纳米处有最大吸收。蒽酮也可以与其他一些糖类发生