



生物化学实验 教程与学习指导

主编 李敏艳 金徽



西安电子科技大学出版社
<http://www.xduph.com>

生物化学实验教程与学习指导

主 编 李敏艳 金 徽

副主编 成 伟

参 编 张 迁 晏 丽

西安电子科技大学出版社

内 容 简 介

本书根据学习情况分为三大部分：第一部分为生物化学实验，针对高等职业院校学生的特点，给出了十四个项目，这些实验均可以在几小时内完成，成功率较高，成本适当，特别适合作为高职高专的实验教材，也可以帮助学生知识进行巩固和练习。每个实验项目后设有思考题，有利于引导学生分析问题、解决问题，提高综合分析能力。第二部分为生物化学习题，包括十四个章节的习题。第三部分为十套综合测试题，有利于学生明确学习目标，及时巩固学习内容。整套教材的编写是一项系统工程，既要遵循教材基本原则，体现学科专业特色，反映学科最新进展，又要兼顾学科间的相互联系，突出实际操作能力，培养学生的综合素质。

本书适合作为高职高专院校生物科学、医药学类专业的教材。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验教程与学习指导 / 李敏艳, 金徽主编. —西安: 西安电子科技大学出版社, 2018.9

ISBN 978-7-5606-4873-6

I. ① 生… II. ① 李… ② 金… III. ① 生物化学—化学实验—教学参考资料 IV. ① Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 023947 号

策划编辑 毛红兵

责任编辑 张 岚 阎 彬

出版发行 西安电子科技大学出版社(西安市太白南路 2 号)

电 话 (029)88242885 88201467 邮 编 710071

网 址 www.xduph.com 电子邮箱 xdupfxb001@163.com

经 销 新华书店

印刷单位 陕西大江印务有限公司

版 次 2018 年 9 月第 1 版 2018 年 9 月第 1 次印刷

开 本 787 毫米×1092 毫米 1/16 印 张 9.5

字 数 222 千字

印 数 1~3000 册

定 价 22.00 元

ISBN 978-7-5606-4873-6 / Q

XDUP 5175001-1

如有印装问题可调换

前 言

生物化学是当今医药卫生、生命科学及相关学科教学的必修课程，生物化学实验技术则是这些学科不可缺少的技术支撑，也是临床医学、药学、医学检验技术、生物科学、生物技术等专业学生必修的实验课程。为了更好地满足高等职业教育改革和教学需求，加强实验教学比例，提高学生操作技能，加强学生对生物化学理论知识的理解，培养学生的创新意识和能力，我们根据多年的教学经验，参照课程标准，编写了本书。

生物化学实验难度大、成本高，要想在普通高等职业院校增加实验课比例，开设更多的内容，就需要一本实用、易用、好用的实验教材。针对高等职业院校学生的特点，我们进行了实验教学内容的改革和优化，编撰了本书。本书涉及的实验均可以在两个课时内完成，实验的成功率较高，实验成本适当，较适合于高职高专学生使用。

全书分为三大部分：第一部分为生物化学实验，包括十四个实验项目，每个实验项目后设立有思考题，引导学生分析问题、解决问题；第二部分为生物化学习题，给出了各章的习题；第三部分为综合测试题，有利于学生明确学习目标，及时巩固学习内容。

由于编者水平有限，再加上生物化学技术还在不断发展，书中难免有不妥之处，望广大读者不吝批评指正，提出宝贵意见，以便再版时完善。

编 者

2017年9月

目 录

第一部分 生物化学实验

实验一	蛋白质两性解离和等电点测定	2
实验二	蛋白质变性与沉淀	4
实验三	蛋白质的显色反应	7
实验四	蛋白质含量测定	12
实验五	血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳	16
实验六	血清总蛋白测定(双缩脲法)	19
实验七	酶的专一性	21
实验八	影响酶促反应的因素	23
实验九	血糖的测定(葡萄糖氧化酶法)	26
实验十	尿糖的定性测定(班氏试剂法)	28
实验十一	血清尿素氮含量测定(二乙酰一肟法)	30
实验十二	血清总胆固醇测定(酶法)	32
实验十三	尿酮体的定性测定	34
实验十四	血清钾、钠的测定	35

第二部分 生物化学习题

第一章	绪论	38
第二章	蛋白质的结构与功能	40
第三章	核酸化学	42
第四章	酶	44
第五章	维生素	48
第六章	糖代谢	51
第七章	脂类代谢	55
第八章	生物氧化	57
第九章	氨基酸代谢	60
第十章	核苷酸代谢	63
第十一章	基因信息的传递与表达	65
第十二章	水盐代谢	69
第十三章	酸碱平衡	72
第十四章	细胞信号转导	74

第三部分 综合测试题

综合测试题(一)	78
综合测试题(二)	82
综合测试题(三)	88
综合测试题(四)	95
综合测试题(五)	99
综合测试题(六)	103
综合测试题(七)	107
综合测试题(八)	113
综合测试题(九)	118
综合测试题(十)	122

附 录

附录一 生物化学实验室守则	130
附录二 实验记录及实验报告	132
附录三 化学试液的配制	134
附录四 实验报告书写要求	137
附录五 常用生化单位正常值	138
附录六 常用生化单位换算表	140
附录七 实验室中常用酸碱的相对密度和浓度的关系	142
附录八 常用元素原子量表	143
附录九 常用缓冲液的配置方法	144
附录十 常用酸碱指示剂	145
参考文献	146

第一部分

生物化学实验

实验一 蛋白质两性解离和等电点测定

【实验目的】

- (1) 学会测定蛋白质等电点的基本方法。
- (2) 熟悉蛋白质的两性解离性质。
- (3) 了解等电点的意义及其与蛋白质分子聚沉能力的关系。

【实验原理】

蛋白质和氨基酸都是两性电解质。蛋白质由许多氨基酸组成，其中绝大多数氨基酸残基的氨基与羧基成肽键结合，但是仍然存在一定数量的自由氨基与羧基。此外，蛋白质还含有酚基、巯基、胍基、咪唑基等酸碱基团。

调节溶液的酸碱度时，蛋白质会随着电离，形成阴离子或者阳离子(见图 1-1)。蛋白质的等电点(pI)是指，当溶液中的氢离子达到一定浓度时，蛋白质分子所带的正、负电荷相等，成为兼性离子状态时的 pH 值。当溶液的 pH 值低于蛋白质等电点时，H⁺较多，蛋白质分子带正电荷；当溶液的 pH 值大于等电点时，OH⁻较多，蛋白质分子带负电荷。碱性氨基酸含量较多的蛋白质等电点较大，如组蛋白和精蛋白；酸性氨基酸含量较多的蛋白质等电点较小，如酪蛋白和胃蛋白酶。

在等电点时，蛋白质的理化性质都有所变化，溶解度、黏度、渗透压、膨胀性及导电能力均最小，可利用这些性质的变化测定蛋白质的等电点。最常用的方法是测定蛋白质溶解度最低时溶液的 pH 值。如测定酪蛋白的等电点时，用醋酸与醋酸钠(醋酸钠与酪蛋白混合形成溶液)配制成各种不同 pH 值的缓冲液，再加入酪蛋白，出现沉淀最多的缓冲液的 pH 值即为酪蛋白的等电点。

【实验用品】

1. 器材

胶头滴管、试管、试管架。

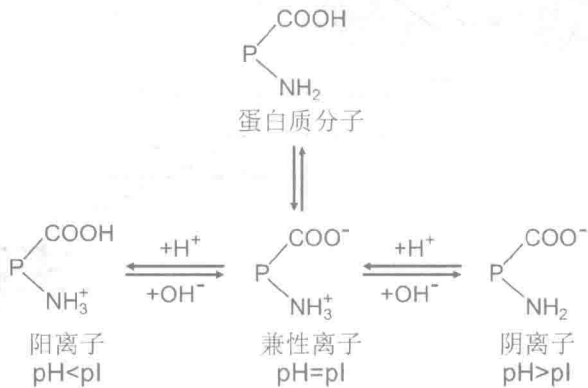


图 1-1 蛋白质的两性解离性质

2. 试剂

0.01%的溴甲酚绿、0.5%的酪蛋白溶液、0.02 mol/L 的 HCl 溶液、0.02 mol/L 的 NaOH 溶液、0.4%的酪蛋白醋酸钠溶液、1.0 mol/L 的醋酸溶液、0.1 mol/L 的醋酸溶液、0.01 mol/L 的醋酸溶液。

【实验步骤】

1. 蛋白质的两性解离

(1) 取干净试管 1 支, 加入 20 滴 0.5%的酪蛋白溶液, 逐滴加入 0.01%的溴甲酚绿溶液(约 5~7 滴), 边滴加边振荡使其充分混合, 观察溶液颜色的变化。

(2) 逐滴加入 0.02 mol/L 的 HCl 溶液, 边滴加边振荡直到出现明显的沉淀为止, 用精密 pH 试纸测溶液的 pH 值, 观察溶液的颜色变化。

(3) 继续加入 0.02 mol/L 的 HCl 溶液, 边滴加边摇匀, 观察沉淀的变化和溶液颜色的变化。

(4) 逐滴加入 0.02 mol/L 的 NaOH 溶液到上面的溶液中, 边滴加边摇匀使溶液的 pH 值接近中性, 观察沉淀是否形成。

(5) 继续滴加 0.02 mol/L 的 NaOH 溶液, 边滴加边摇匀, 观察沉淀的变化。

2. 酪蛋白等电点的测定

(1) 取同样规格的试管 4 支, 按表 1-1 的顺序精确地加入各试剂, 然后充分混匀。

表 1-1 酪蛋白测定上样量表

试管号	蒸馏水 /mL	0.01 mol/L 醋酸 /mL	0.1 mol/L 醋酸 /mL	1.0 mol/L 醋酸 /mL	酪蛋白醋酸钠溶液 /mL
1	8.4	0.6	—	—	1
2	8.7	—	0.3	—	1
3	8.0	—	1.0	—	1
4	7.4	—	—	1.6	1

(2) 此时 1、2、3、4 管的 pH 值依次为 5.9、5.3、4.7、3.5, 观察其混浊度。

(3) 静置 10 min 后, 再观察其混浊度, 最混浊的一管的 pH 值即为酪蛋白的等电点。

【实验结果】

观察每支管内溶液的混浊度, 用“+”、“-”表示沉淀的多少, 并判断酪蛋白的 pI 值。

【注意事项】

(1) 要求各试剂的浓度和加入量相当准确。

(2) 每种试剂加完后, 要振荡试管使其充分混合。

【思考题】

(1) 何谓蛋白质的等电点? 为什么在等电点时蛋白质的溶解度最低?

(2) 本实验中, 根据蛋白质的何种性质测定其等电点?

实验二 蛋白质变性与沉淀

【实验目的】

- (1) 学会沉淀蛋白质的方法。
- (2) 熟悉蛋白质胶体溶液的稳定性因素。
- (3) 了解蛋白质变性与沉淀的关系。

【实验原理】

1. 蛋白质的变性作用

受理化因素的影响,蛋白质分子的空间构象被破坏,使其自身理化性质发生改变并失去生物学活性的现象称为蛋白质的变性作用。变性作用并不会破坏蛋白质的一级结构,而是破坏其高级结构,即连接氨基酸残基的肽键并未断裂。变性后的蛋白质称为变性蛋白。

引起蛋白质变性的因素很多,物理因素有高温、紫外线、X射线、超声波、高压、剧烈的搅拌、振荡等,化学因素有强酸、强碱、尿素、胍盐、去污剂、重金属盐(如 Hg^{2+} 、 Ag^+ 、 Pb^{2+} 等)、三氯乙酸、浓乙醇等。不同蛋白质对不同因素的敏感程度有差异。

2. 蛋白质的沉淀反应

在水溶液中,蛋白质分子的表面有水化层和同性电荷,可形成稳定的胶体颗粒。在某些理化因素的作用下,蛋白质分子表面带电性质会发生变化,失去水化层,甚至发生蛋白质变性,导致蛋白质以固态形式从溶液中析出,这个过程称为蛋白质的沉淀反应。

蛋白质的沉淀反应可分为以下两种类型:

(1) 可逆沉淀反应。可逆沉淀反应是指发生沉淀反应后,蛋白质分子内部结构没有显著变化,去除沉淀因素后,又可恢复其亲水性。属于这类沉淀反应的有盐析作用、等电点沉淀等。

(2) 不可逆沉淀反应。不可逆沉淀反应是指蛋白质的空间结构发生了大的改变,甚至发生变性作用导致其沉淀,并丧失生物活性,即使除去沉淀因素,蛋白质也不会恢复其亲水性和生物活性。重金属盐、生物碱试剂、强酸、强碱、加热、强烈振荡、有机溶剂等都会使蛋白质发生不可逆沉淀反应。

3. 引起蛋白质沉淀的方法及其原理

(1) 盐析。

蛋白质是亲水胶体,在高浓度的中性盐影响下,一方面蛋白质会脱去水化层,另一方面蛋白质分子所带的电荷会被中和,使蛋白质的胶体稳定性遭到破坏而沉淀析出。盐析沉淀蛋白质一般不会引起蛋白质变性,故常用于分离各种天然蛋白质。蛋白质的组成及性质

不同,盐析时所需中性盐的浓度也不相同。例如半饱和的硫酸铵可以沉淀球蛋白,饱和的硫酸铵则可以沉淀清蛋白。

(2) 乙醇沉淀蛋白质。

加入乙醇能破坏蛋白质的胶体性质而使蛋白质沉淀。一方面乙醇作为脱水剂可与蛋白质争夺水化膜,另一方面乙醇可使蛋白质解离度降低,带电量减少。在低温环境中使用乙醇沉淀可使蛋白质保持其理化特性和生物学活性,在室温中乙醇可使蛋白质变性,形成不可逆沉淀。

(3) 重金属盐沉淀蛋白。

当溶液的 pH 值大于蛋白质的 pI 值时,蛋白质带负电荷。使用带正电的重金属离子,如 Ca^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 、 Pb^{2+} 等,可以与蛋白质结合成盐而沉淀。

(4) 生物碱试剂沉淀蛋白。

鞣酸、苦味酸、磷钨酸等物质能沉淀生物碱或与其产生颜色反应。当溶液的 pH 值小于蛋白质的 pI 值时,蛋白质带正电荷,使用带负电的生物碱试剂,可以结合成盐而沉淀。

【实验用品】

1. 器材

试管、试管架、小玻璃漏斗、滤纸。

2. 试剂

5%的蛋白质溶液(将 5 mL 的鸡蛋清稀释至 100 mL,搅拌均匀后用 4~8 层纱布过滤)、蒸馏水、氯化钠、95%的乙醇、饱和硫酸铵溶液、硫酸铵粉末、1%的醋酸铅溶液、1%的硫酸铜溶液、饱和苦味酸、1%的醋酸溶液。

【操作步骤】

1. 蛋白质的盐析作用

(1) 取 1 支试管,加入 5%的蛋白质溶液 2 mL,再加入饱和硫酸铵溶液 2 mL,充分摇匀,静止几分钟后观察现象。

(2) 将上述液体过滤。向滤液中逐渐加入硫酸铵粉末,直至饱和为止,摇匀后观察现象。

(3) 取上述液体 2 mL,加入 4 mL 蒸馏水,观察沉淀是否溶解。

2. 有机溶剂沉淀蛋白质

(1) 取一支试管,加入 5%的蛋白质溶液 1 mL,加入少量氯化钠,溶解后加 95%的乙醇 3 mL 并摇匀,观察现象。

(2) 再加入 10 mL 蒸馏水,摇匀,观察现象。

3. 重金属盐沉淀蛋白质

取 2 支试管,各加入 5%的蛋白质溶液 2 mL,一支管中逐渐滴加入 1%的醋酸铅溶液,另一支管中逐渐滴加入 1%的硫酸铜溶液,观察现象。

4. 生物碱试剂沉淀蛋白质

取一支试管，加入 5% 的蛋白质溶液 2 mL 及 1% 的醋酸 4~5 滴，再加入饱和苦味酸数滴，观察现象。

【实验结果】

观察并记录蛋白质变性和沉淀的实验现象。

【注意事项】

(1) 实验中使用的试剂较多，注意防止交叉污染。

(2) 蛋白质的盐析作用中饱和硫酸铵溶液中会出现结晶现象，注意与蛋白质沉淀相区别。

(3) 盐析出现沉淀后应当尽快加入蒸馏水观察是否溶解，时间过长容易造成蛋白质变性。

【思考题】

(1) 蛋白质沉淀有哪几种方法？哪些是可逆的沉淀反应？

(2) 为什么蛋清可用作铅中毒或汞中毒的解毒剂？

(3) 高浓度的硫酸铵对蛋白质溶解度有何影响，为什么？

实验三 蛋白质的显色反应

【实验目的】

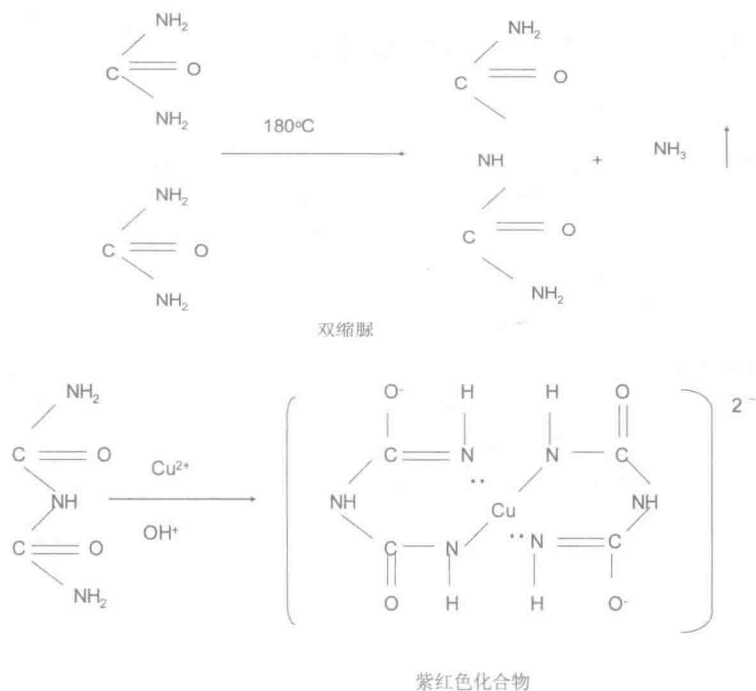
- (1) 了解构成蛋白质的基本结构单位及主要连接形式。
- (2) 了解蛋白质和某些氨基酸的呈色反应原理。
- (3) 学会几种常用的鉴定蛋白质和氨基酸的方法。

一、双缩脲反应

【实验原理】

尿素加热至 180°C 左右时, 会生成双缩脲并释放一分子氨。双缩脲在碱性条件下能与 Cu^{2+} 结合生成紫红色化合物, 此反应称为双缩脲反应。蛋白质分子中有肽键, 其结构与双缩脲相似, 也能发生此反应(二肽和氨基酸都不能发生双缩脲反应)。尿素可用于蛋白质的定性或定量测定。

双缩脲反应的反应式如下:



发生双缩脲反应的物质不仅包含有两个以上肽键的物质,还包含有一个肽键和一个 $-\text{CS}-\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$, $-\text{CHR}-\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2-\text{NH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ 或 $-\text{CHOHCH}_2\text{NH}_2$ 等基团的物质以及乙二酰二胺等物质。 NH_3 也会干扰此反应,因为 NH_3 与 Cu^{2+} 可以生成暗蓝色的络离子 $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ 。因此,一切蛋白质或二肽以上的多肽都能发生双缩脲反应,但能发生双缩脲反应的物质不一定是蛋白质或多肽。

【实验用品】

1. 器材

试管、试管架。

2. 试剂

尿素、10%的氢氧化钠溶液、1%的硫酸铜溶液、蛋白质溶液(蛋清:水 = 1:9)。

【实验步骤】

(1) 取少量尿素结晶,放在干燥试管中。

(2) 用微火加热使尿素熔化。熔化的尿素开始硬化时,停止加热,此时尿素放出氨,形成双缩脲。

(3) 冷却后,加入 10%的氢氧化钠溶液约 1 mL,振荡混匀,再加入 1%的硫酸铜溶液 1 滴,再振荡。

(4) 观察现象。试管中出现粉红颜色。应避免添加过量硫酸铜,否则,生成的蓝色氢氧化铜会掩盖粉红色。(由于杂质以及氨气的干扰,导致颜色不都是紫红色)

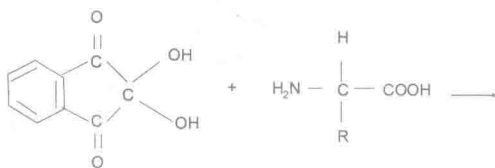
(5) 向另一试管中加入蛋白溶液(蛋清)约 1 mL 和 10%的氢氧化钠溶液约 2 mL,摇匀,再加入 1%的硫酸铜溶液 2 滴,随加随摇。仔细观察直到紫玫瑰色的出现。

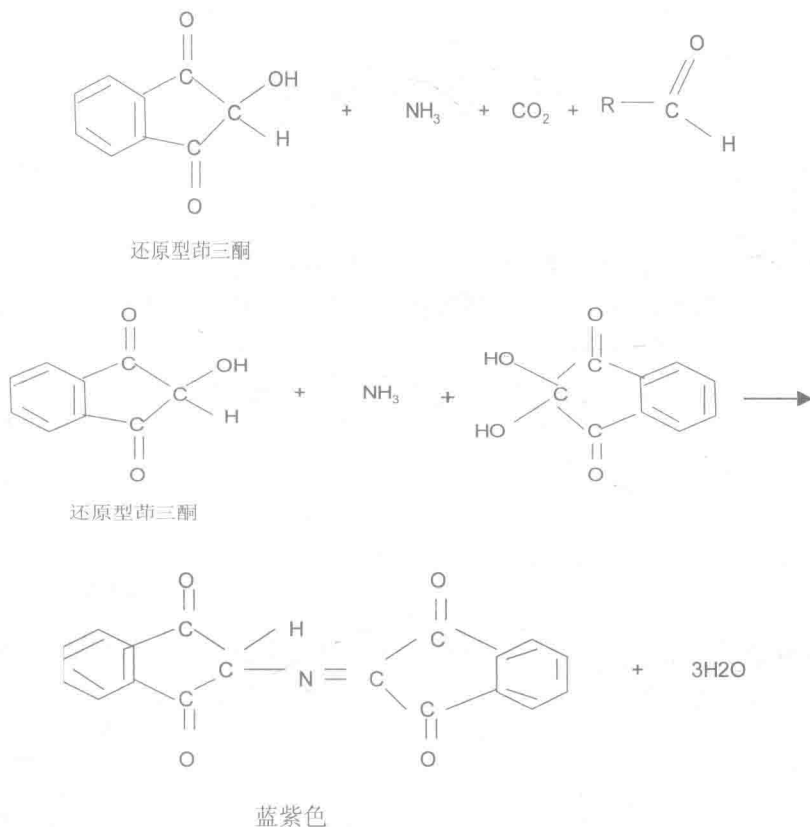
二、茚三酮反应

【实验原理】

蛋白质、多肽和各种氨基酸以及所有 α -氨基酸均能发生该反应,除无 α -氨基的脯氨酸和羟脯氨酸的反应呈黄色外,其它均生成蓝紫色化合物,最终生成蓝色化合物。氨、 β -丙氨酸和许多一级氮化合物都有此反应。尿素、马尿酸、二酮吡嗪和肽键上的亚氨基不呈现此反应。因此,虽然蛋白质或氨基酸均有茚三酮反应,但能与茚三酮呈阳性反应的都不一定是蛋白质或氨基酸。该反应分为两步,第一步是氨基酸被氧化脱氨形成酮酸,酮酸脱羧形成醛,放出 CO_2 、 NH_3 ,水合茚三酮被还原成还原型茚三酮;第二步是所形成的还原型茚三酮同另一个水合茚三酮分子和氨缩合生成蓝色物质。

茚三酮反应的反应式如下:





该反应非常灵敏，只要 1 : 150 万浓度的氨基酸水溶液即能给出反应，是一种常用的氨基酸定量测定方法。但在定性、定量测定中，一方面要严防干扰物存在，另一方面要在适宜的 pH 条件下进行测定。该反应的适宜的 pH 值为 5~7，同一浓度的蛋白质或氨基酸在不同 pH 条件下的颜色深浅不同，酸度过大时甚至不显色。

【实验用品】

1. 器材

试管、试管夹、小玻璃漏斗、滤纸。

2. 试剂

蛋白质溶液(蛋清：水=1：9)、0.5%的甘氨酸、0.1%的茚三酮水溶液、0.1%的茚三酮-乙醇溶液。

【实验步骤】

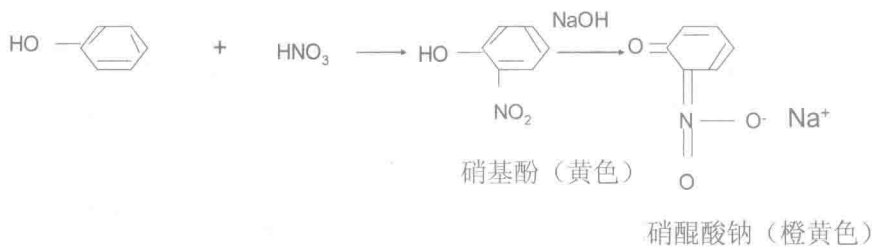
(1) 取两支试管分别加入蛋白质溶液和甘氨酸溶液 1 mL，再各加 0.5 mL 0.1%的茚三酮水溶液，混匀，在沸水浴中加热 1~2 分钟，观察颜色由粉色变紫色再变蓝色(pH 不同颜色深浅不同)。

(2) 在一小块滤纸上滴一滴 0.5%的甘氨酸溶液，风干后，再在原处滴一滴 0.1%的茚三酮-乙醇溶液，在微火旁烘干显色，仔细观察直到紫红色斑点的出现。

三、黄色反应

【实验原理】

含有苯环的氨基酸，如酪氨酸、色氨酸，遇硝酸后，可被硝化成黄色物质，该化合物在碱性溶液中会进一步形成深橙色的硝醌酸钠。黄色反应的反应式如下：



多数蛋白质分子中含有带苯环的氨基酸，所以呈黄色反应，苯丙氨酸不易硝化，需加入少量浓硫酸才有黄色反应。

【实验用品】

1. 器材

试管、试管夹、小玻璃漏斗、滤纸。

2. 试剂

蛋白质溶液(将新鲜鸡蛋清用 6 层纱布过滤,然后按蛋清：水=1：20 的比例配制而成),大豆提取液(将大豆浸泡充分吸胀后研磨成浆状再用纱布过滤)，头发、指甲、0.5%的苯酚溶液、浓硝酸、0.3%的色氨酸溶液、0.3%的酪氨酸溶液、10%的氢氧化钠溶液。

【实验步骤】

向 7 支试管中分别按表 3-1 加入试剂，观察各试管中出现的现象，有的试管反应慢可放置一会儿或用微火加热。待各试管出现黄色后，于室温下逐滴加入 10%的氢氧化钠溶液至碱性，观察颜色变化(1~4 号试管可能需要加热)。

表 3-1 黄色反应上样量表

管号	1	2	3	4	5	6	7
材料	鸡蛋清溶液	大豆提取液	指甲	头发	0.5%苯酚	0.3%色氨酸	0.3%酪氨酸
浓硝酸	4 滴	4 滴	少许	少许	4 滴	4 滴	4 滴
现象 1							
现象 2							

四、考马斯亮蓝反应

【实验原理】

考马斯亮蓝 G250(R250)具有红色和蓝色两种色调,在酸性溶液中,以游离态存在,呈棕红色;当它与蛋白质通过疏水作用结合后变为蓝色。

它染色灵敏度高,比氨基黑高 3 倍。反应速度快,约在 2 分钟左右时间达到平衡,在室温下一小时内稳定。在 0.01~1.0 mg 蛋白质范围内,蛋白质浓度与 A595 nm 值成正比。所以常用来测定蛋白质含量。

【实验试剂】

(1) 蛋白质溶液(由蛋清:水 = 1:20 比例配制)。

(2) 考马斯亮蓝溶液:将考马斯亮蓝 G₂₅₀100 mg 溶于 50 mL 95%的乙醇中,加 100 mL85%的磷酸混匀,配成原液。临用前取原液 15 mL,加蒸馏水至 100 mL,用粗滤纸过滤后,最终浓度为 0.01%。

【实验步骤】

(1) 取两支试管,分别按表 3-2 加入试剂。

表 3-2 考马斯亮蓝反应上样量表

管号 \ 试剂	蛋白质溶液/mL	蒸馏水/mL	考马斯亮蓝染液/mL
1	0	1	5
2	0.1	0.9	5

(2) 观察实验结果。

【思考题】

- (1) 常用的鉴定蛋白质和氨基酸的方法有哪些?
- (2) 简述双缩脲反应的实验步骤?
- (3) 简述双缩脲反应、茚三酮反应、黄色反应和考马斯亮蓝反应鉴定蛋白质的优缺点。