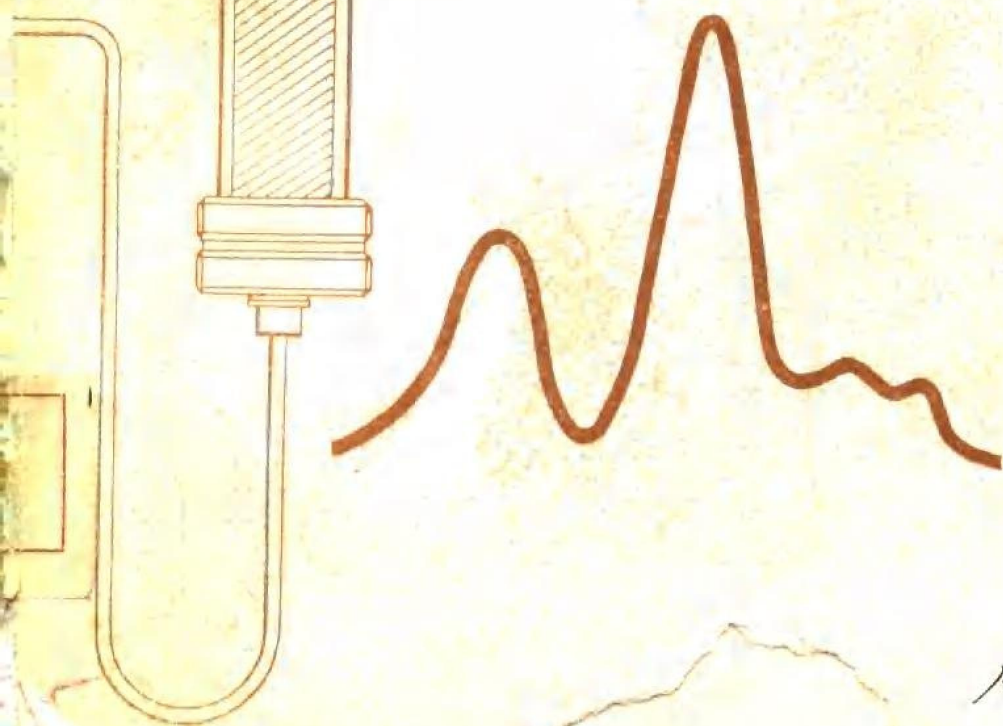


高等学校教材

生化实验方法和技术

张龙翔 张庭芳 李令媛 主编



人民教育出版社

内 容 提 要

本书是根据北京大学生化教研室历年教学工作中编写的实验教材和科学研究工作中应用到的实验技术,经过总结经验,重新整理编写而成。全书分八章,共 61 个实验,包括生物大分子的分离制备、测定及结构分析方法、各种电泳技术、薄层层析、柱层析和亲和层析技术、同位素方法、免疫技术以及代谢研究方法等。在注意加强基本实验方法和技能训练的同时也引进一些新近发展起来的生物化学研究技术。这些实验均在实践中反复验证,比较成熟。大多数实验都有综合性,需要 15—25 个学时完成。每个实验后附有参考文献,书后编有附录,包括重要仪器的使用方法及各种常用数据表,供读者查用。

本书可供综合性大学、师范院校生化专业及其他高等院校有关专业的大学生、研究生作实验课教材,也可供有关教师和科研工作者参考。

高等学校教材

生化实验方法和技术

张龙翔 张庭芳 李令媛 等编著

*

人民教育出版社出版

新华书店北京发行所发行

北京第二新华印刷厂印装

*

开本 787×1092 1/16 印张 26.5 字数 592,000

1981 年 11 月第 1 版 1982 年 5 月第 1 次印刷

印数 00,001—11,500

书号 13012·0665 定价 2.00 元

序

“工欲善其事，必先利其器”。这是我国古代的一句成语，意思是：要把一件事情做好，一定先要有好的器械或工具。由于近代依据物理学、化学及生物学的基本理论和实验方法而建立起来的生物化学实验研究技术的发展与应用，使生物化学无论是在基础理论方面还是在实践应用方面，都获得了迅速发展。本世纪二十年代，微量分析的发展，导致了一系列维生素、激素和辅酶等的发现，并促进了这些化合物的结构测定。三十年代出现了电子显微镜，揭开了生物界微观世界的奥秘，使我们可以看到细胞内部的亚显微结构，并观察到病毒等超分子的内部结构。四十年代，层析技术和电泳技术的兴起，极大地推进了生物大分子——蛋白质、酶、多糖、核酸等的分离、分析和结构测定工作。同位素示踪技术的应用，对于阐明生物体内的代谢过程起了决定性作用。近二十多年来，各种光谱技术、核磁共振及顺磁共振技术的应用，激光、超导等新技术的出现，以及电子计算技术的突飞猛进，不仅使生物化学的实验手段和工作效率提高到一个崭新的水平，而且通过大量事实材料的积累，使生物化学合乎逻辑地发展成为一门具有统一的基本概念和原理的学科。所有这些，都说明掌握生物化学实验方法和研究技术，对于生物化学工作者来说，是十分重要的。

《生化实验方法和技术》一书的主要目的是为综合大学和师范院校的生物化学专业，以及其它高等学校的有关专业的大学生和研究生提供一本实验教材，以满足教学上的需要。因此在选材时，从加强基础的观点出发，侧重于给学生以生物化学中基本的实验方法和技能的训练，同时也注意引进一些新近发展起来的、重要的生物化学研究技术，作为大学生、研究生进入生物化学科学研究领域的准备。

本书是根据北京大学生物学系生物化学教研室历年教学工作中编写的实验教材和科学研究工作中接触到的实验技术，经过总结经验，重新整理编写而成的。编写大纲曾请复旦大学、南京大学、北京师范大学等校的有关同志审阅，他们提出了许多宝贵的意见。现在所列的 61 个实验中，有 28 个实验是经过改编的，8 个实验是重写的，25 个实验是新增的。改编、重写的 36 个实验都是历年来生物化学专业大学生所做过的；新增的 25 个实验也是近年来教师和研究生在研究工作中经常应用的实验技术。可以说，这些实验都是比较成熟并经过在实践中反复验证的。每个实验大致需要 15—25 学时，有些实验需要更多的时间。考虑到各高等学校当前的实际情况和专业特点各不相同，对大学生和研究生的要求也有所不同，因此各校可以根据情况，选用本书中的部分实验。

本书可与高等学校试用教材《生物化学》配合使用。每个实验后面都附有参考文献，书后编有附录，可供读者查阅。

本书大部分编写工作由生物化学教研室张庭芳、李令媛承担。王镜岩、胡美浩、朱圣赓、茹炳

根、王重庆、刘美华、倪逸声、马树义、谭国华、陈廉生、王孟淑等参加了个别实验的编写工作。全书最后的统一编审工作是在张龙翔教授主持下，由张龙翔、张庭芳、李令媛三人共同完成的。较长时间参加生物化学实验教学工作的李德昌、杨端、俞梅敏、徐长法等，近年来参加实验教学工作的刘德富、李云兰等，参加实验辅助工作的向志恒、孟秀荣、关家敏等，和生物化学教研室其它同志在编写过程中都提出过宝贵的修改意见。历届生物化学专业的大学生和研究生通过参加实验课也提出过很好的意见和建议。李云兰、周先碗参加了个别新增实验的预做工作。生物学系绘图室张瑞兴同志绘制了大部份图片。人民教育出版社安名勋同志担任本书的责任编辑，为本书的出版做了大量工作。编者在此表示感谢。

编者欢迎读者在使用过程中，对本书提出批评指正。

编者

1981年8月于北京

目 录

序	1
第一章 糖	1
实验一 铜试剂法测定还原糖	1
实验二 费林试剂法测定还原糖	6
实验三 3,5-二硝基水杨酸比色定糖法	9
实验四 细菌细胞壁糖的薄层层析	11
实验五 葡糖-1-磷酸的制备及其纯度测定	17
第二章 脂类	21
实验六 红细胞膜的制备及其结构成分的分析	21
一 红细胞膜的制备	21
二 膜蛋白的分析(SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法)	23
三 膜磷脂的分析(薄层层析法)	24
四 膜胆固醇的测定	26
实验七 猪心肌线粒体、亚线粒体的制备及可溶性腺三磷酶的提纯	28
实验八 猪心线粒体腺三磷酶复合体在脂质体上的重组	32
第三章 蛋白质	37
实验九 苯甲酰 L-酪氨酰胺的合成	37
实验十 N-乙酰-L-酪氨酸乙酯的合成	41
实验十一 双甘二肽的合成	44
实验十二 胱氨酸的制备	48
实验十三 量气法测定氨基酸——Van Slyke 仪测定 α -氨基氮	51
实验十四 总氮量的测定——微量凯氏定氮法	55
实验十五 蛋白质中色氨酸含量的测定	60
实验十六 蛋白质及肽的 N-末端氨基酸 DNS 分析法——聚酰胺薄膜层析技术	62
实验十七 蛋白质及肽的顺序分析——PTH 分析法	67
实验十八 蛋白质及肽的 N-末端氨基酸 FDNB 分析法	71
实验十九 邻苯二甲醛荧光分析法及其在肽检测中的应用	80
实验二十 血清蛋白质的纸上电泳	83
实验二十一 血清脂蛋白的琼脂糖凝胶电泳	90
实验二十二 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分离蛋白质	94
实验二十三 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的分子量	112
实验二十四 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法测定蛋白质的分子量	119
实验二十五 蛋白质分子量的测定——凝胶层析法	124

实验二十六	细胞色素 c 的制备及测定	133
实验二十七	鸡卵类粘蛋白的制备	138
第四章	酶	143
实验二十八	脲酶的动力学研究	145
〔附〕	康维微量等温蒸馏定氮法	152
实验二十九	酰化酶 I 的制备和活力测定	155
〔附 1〕	氨基酸含量的测定法: 茚三酮溶液显色法, 甲醛滴定法	160
〔附 2〕	蛋白质含量的测定法: 双缩脲法, Folin-酚试剂法, 紫外吸收法	164
实验三十	猪胰蛋白酶的结晶和活力测定	169
实验三十一	从生产胰岛素后的猪胰残渣中制备胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶	175
实验三十二	辣根过氧化物酶的制备和活力测定	179
实验三十三	结晶乳酸脱氢酶的制备	183
实验三十四	大肠杆菌碱性磷酸酯酶的制备	188
实验三十五	羧肽酶 Y 的分离提纯	195
实验三十六	限制性内切酶 EcoRI 的纯化和活力测定	201
实验三十七	亲和层析法纯化胰蛋白酶	206
实验三十八	亲和层析法分离牛脾二肽酶 I	209
第五章	核酸	216
实验三十九	动物肝脏 RNA 的制备(苯酚法)和纯度测定	216
〔附 1〕	紫外吸收法测定核酸含量	218
〔附 2〕	二苯胺显色法测定 DNA 含量	219
〔附 3〕	地衣酚显色法测定 RNA 含量	220
〔附 4〕	定磷法测定核酸含量	221
实验四十	酵母和白地霉 RNA 的制备(稀碱法和浓盐法)	224
实验四十一	酵母转移 RNA 的制备(苯酚法)	225
实验四十二	小牛胸腺 DNA 的制备(浓盐法)	227
实验四十三	质体的分离、纯化和鉴定	229
实验四十四	细胞核的分离	239
实验四十五	大鼠肝细胞染色质的分离	242
实验四十六	RNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳	244
实验四十七	DNA 的琼脂糖凝胶电泳	247
实验四十八	离子交换柱层析分离核苷酸	251
实验四十九	高压纸上电泳法分析鉴定核苷酸	255
实验五十	肌二磷和胞二磷的化学合成	258
第六章	组织代谢	265
实验五十一	瓦氏呼吸计测压法及组织呼吸强度的测定	265
一	瓦氏呼吸计测压法	265
二	组织耗氧量的测定	271

实验五十二 D-系- α -氨基酸的氧化脱氨基作用	276
〔附〕 等温蒸馏定氮法	280
实验五十三 用液氮固定法研究动物的新陈代谢	
——自然缺氧条件下机体乳酸含量变化的测定	281
实验五十四 用滤纸定量层析法研究大白鼠在自然缺氧状态下脑组织中游离氨基酸含量的变化	288
第七章 免疫化学	300
实验五十五 免疫吸附亲和层析法分离、纯化甲胎蛋白	301
实验五十六 免疫电泳技术	310
一 双向免疫扩散法	311
二 微量免疫电泳	313
三 对流免疫电泳	315
四 单向定量免疫电泳(火箭电泳)	316
五 双向定量免疫电泳	318
实验五十七 用免疫荧光法观察甲胎蛋白在人胚肝中的分布	319
第八章 放射性同位素	325
实验五十八 放射性焦磷酸盐(^{32}PPi)的制备	333
实验五十九 酶促合成高比放射性 γ - ^{32}P -腺三磷	337
实验六十 放射性焦磷酸(^{32}PPi)-腺三磷交换法测定核糖核酸连接酶活性	342
实验六十一 寡核苷酸的同系层析分离及鉴定	344
附录	350
一 实验室安全及防护知识	350
(一) 实验室安全知识	350
(二) 实验室灭火法	350
(三) 实验室急救	351
二 实验室常识	352
三 玻璃仪器的洗涤及各种洗液的配制法	354
四 一些重要仪器的使用法	355
(一) 酸度计	355
(二) 分光光度计	358
1. 72 型分光光度计	358
2. 751 型分光光度计	360
(三) 部分收集器及紫外检测仪	362
(四) 荧光分光光度计	364
(五) 冰冻离心机	365
五 缓冲溶液	369
(一) 一些常用作缓冲剂的化合物的酸解离常数	370
(二) 常用缓冲溶液的配制方法	371
六 生物化学中某些重要化合物的分子量及 pK 值	376

七 某些重要生化物质的克分子消光系数·····	377
八 氨基酸的一些物理常数·····	380
九 某些蛋白质的物理性质·····	382
十 核苷、核苷酸及其衍生物的一些物理常数·····	382
十一 某些生物大分子、亚细胞器及微生物的沉降系数·····	388
十二 指示剂·····	389
十三 冷却剂和干燥剂·····	390
十四 层析法常用数据表·····	392
(一) 离子交换纤维素·····	392
(二) 常用离子交换树脂某些物理化学性质表·····	393
(三) 各类常用离子交换树脂型号对照表·····	396
(四) 葡聚糖凝胶的某些技术数据·····	397
(五) 聚丙烯酰胺凝胶的技术数据·····	397
(六) 琼脂糖凝胶的技术数据·····	398
(七) 各种凝胶所允许的最大操作压·····	398
十五 硫酸铵饱和度的常用表·····	399
十六 测压法常用物理常数表·····	400
十七 放射性测量单位·····	401
十八 离心机转数(rpm)与相对离心力(RCF)的换算·····	402
十九 试剂的配制及一些常用数据表·····	403
(一) 一般注意事项·····	403
(二) 常用数据表·····	404
1. 元素的原子量表·····	404
2. 常用酸碱百分浓度、比重和当量浓度的关系·····	406
3. 实验室中常用酸碱的比重和浓度的关系·····	407
4. 常用固态化合物的当量浓度(或克分子浓度)配制参考表·····	407
5. 一些常用化合物的溶解度(20°C)·····	408
6. 常用基准物质的干燥温度和应用范围·····	408
7. 某些有机溶剂的主要物理常数·····	409
二十 一些常用单位·····	409
(一) 长度单位·····	409
(二) 体积单位·····	410
(三) 重量单位·····	410
(四) 摩[尔]数与摩[尔]浓度表示法·····	410
(五) 十进位数量词头及符号·····	411
二十一 一些重要的生物化学期刊及手册·····	411

第一章 糖

糖为生物界分布极为广泛的有机化合物，它是许多粮食作物和糖用植物的种子、根、茎的重要组成部分，也是蔬菜、水果等的重要组成部分。糖是生物维持生命活动的主要能量来源。在植物和许多微生物中，糖类物质也是细胞壁的重要组成部分。在植物组织中，糖含量可以高达干重的80%左右，在动物组织及人体组织中含量较少，约为干重的2%。植物中糖的种类和含量的分析，对于选种及控制培育条件有着重要意义。在微生物发酵工业中，为了提高产量和质量，必须控制培养基中糖(淀粉、糊精、还原糖等)等物质的含量，因此含糖量的测定和分析对指导生产实践是很重要的。在医学方面根据血糖或尿糖含量的高低可以帮助诊断某些疾病。

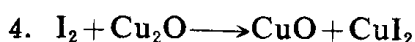
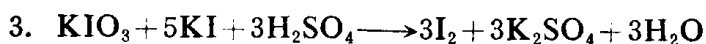
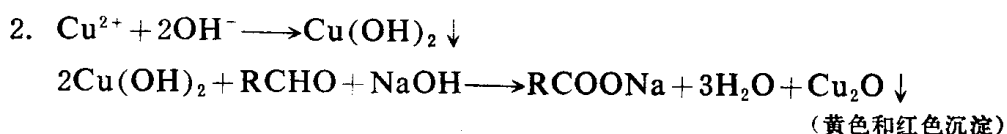
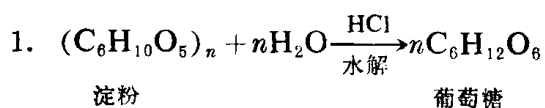
糖的定量测定方法很多，根据糖溶液的折射率、比重、旋光活性等物理性质，可分别用折光仪、波美比重计、旋光仪来测定糖的含量。根据糖的化学性质可用滴定法、比色法进行定量测定。近年来又建立起氧电极、酶电极等快速微量的定糖方法。在实际工作中要根据需要和可能来选用适当的方法。本章中将着重介绍较常用的糖的快速分析鉴定方法(薄层层析法)和糖的定量测定方法(铜试剂法、费林试剂法和比色法)，并介绍一种糖的磷酸酯的制备方法。

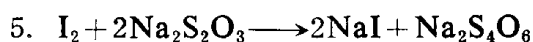
实验一 铜试剂法测定还原糖

原 理

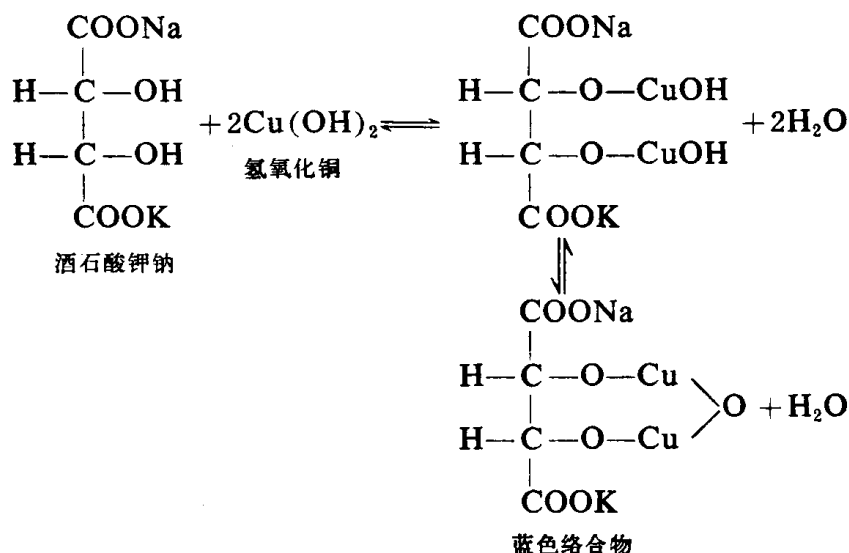
糖类物质是多羟醛或多羟酮，或水解后产生多羟醛或多羟酮的化合物。还原糖是指含有自由醛基或酮基的单糖类，以及某些二糖(如乳糖、麦芽糖等)。在碱性溶液中还原糖能将 Ag^+ 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 等金属离子还原，而糖本身则被氧化成各种羟酸。上述特性成为化学方法测定糖含量的基础。

本实验是根据还原糖将高价铜(Cu^{2+})还原成低价铜(Cu^+)，而低价铜又被铜试剂中的碘氧化成高价铜，最后用硫代硫酸钠滴定反应液中剩余的碘。还原糖与滴定用去的硫代硫酸钠有定量关系，根据硫代硫酸钠的用量及浓度可推算出样品中糖的含量。其主要反应如下：





由于铜离子在碱性条件下会生成氢氧化铜或碱性碳酸铜沉淀。为了防止沉淀的形成，可在铜试剂中加入适量的酒石酸钾钠、柠檬酸盐或甘油。这些含羟基的化合物能与铜离子反应，生成可溶性络离子。反应是可逆的，反应平衡后，溶液内含有一定浓度的氢氧化铜。氢氧化铜与酒石酸钾钠的反应如下：



铜试剂法测定糖的含量范围以 0.1——2 毫克为宜。

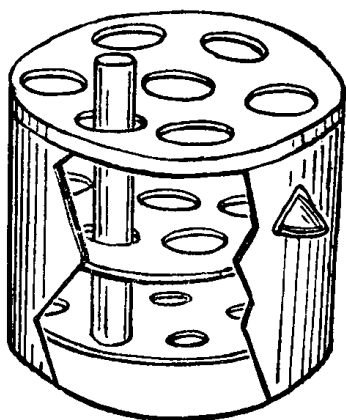
操作方法

一、标准曲线的制定

准确称取 0.6000 克分析纯的无水葡萄糖(预先在 105°C 干燥至恒重)，用蒸馏水溶解后移至 100 毫升容量瓶中，并用蒸馏水洗称量瓶数次，以使全部葡萄糖移入容量瓶中，最后定容到刻度，摇匀。吸取 5 毫升至另一个 100 毫升容量瓶中，再稀释到刻度，其浓度为 0.3 毫克/毫升。

数量 项 目	标 号	空 白	1	2	3	4	5	6
标准糖溶液(毫升)		0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
相当于糖含量(毫克)		0	0.15	0.30	0.45	0.60	0.75	0.90
蒸馏水(毫升)		5.0	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0
铜试剂(毫升)		5	5	5	5	5	5	5

按表格中所列，取 7 支 25×250 毫米的试管标号，依次用吸量管准确地吸取各项试剂，加入各号试管内，用自制的玻璃泡盖在试管口上。将试管置沸水浴锅(图 1-1)中加热 20 分钟。取出试管，均冷却到室温。(注意：以下两个步骤应做完一个管再做第二个管。)取一个管加入 5 毫升 1N 硫酸，振荡，待其中红色(或黄色)沉淀溶解后，立即用 0.005N 的硫代硫酸钠溶液滴定。滴定



1

图 1-1 水浴锅



2

图 1-2 环状玻璃搅棒

过程中用自制的环状玻璃搅棒(图 1-2) 做升降式搅拌。至溶液呈浅黄色时, 加入 5 滴淀粉指示剂, 继续用硫代硫酸钠溶液滴定到蓝色刚刚消失, 溶液突然变为清亮的天蓝色时即为终点。记录所用硫代硫酸钠溶液毫升数。以糖的含量毫克数为横坐标, 以空白滴定值减标准样品滴定值得出的硫代硫酸钠毫升数为纵坐标, 绘出标准曲线。

二、总糖的测定(以发酵液为例)

1. 样品的稀释: 用大口吸量管吸取 5 毫升发酵液, 置于 25 毫升容量瓶中(平行作三份样品), 用蒸馏水稀释到刻度, 摇匀(注意: 外壁上的发酵液要用滤纸擦去, 移液管内壁上的发酵液要洗入容量瓶中, 如有泡沫可先加酒精消沫, 再稀释到刻度。)

2. 加酸水解: 用吸量管吸取上述稀释好的样品 0.5 毫升, 置于 50 毫升锥形瓶中, 加 5 毫升 3N 盐酸, 放入沸水浴中加热 10—45 分钟(视淀粉含量而定)。

3. 除去蛋白质: 冷却后的水解液, 加 10 毫升 10% 硫酸锌溶液, 加 3 滴 0.5% 酚酞指示剂。先用 3N 氢氧化钠中和溶液的酸度, 再小心地用 0.5N 氢氧化钠调至溶液呈微红色(若调过头, 可用 0.1N 硫酸调回)。将溶液转移到 50 毫升容量瓶中, 稀释到刻度, 摇匀, 过滤, 将滤液收集在干燥的容器中, 待用。

数 量 项 目	标 号	样 品			空 白	
		1	2	3	1	2
滤 液(毫升)		5	5	5	0	0
蒸馏水(毫升)		0	0	0	5	5
铜试剂(毫升)		5	5	5	5	5
加 热		在沸水浴中加热 20 分钟				
冷 却		冷却至室温				
1N 硫酸(毫升)		5	5	5	5	5
0.005 N 硫代硫酸钠溶液(毫升)		A			B	

4. 与铜试剂反应: 取 5 支 25×250 毫米的试管, 3 个作样品管, 2 个作空白管, 标号后按表中的项目操作。滴定方法与制定标准曲线时相同。求出平均值 A (毫升)及 B (毫升)。根据 B 减 A 的差数, 查标准曲线, 并考虑稀释倍数, 计算出发酵液中总糖的百分含量(克/100 毫升或克%)。

三、还原糖的测定

1. 取样: 取前述稀释 5 倍的发酵液 10 毫升, 于 3500 转/分离心 10 分钟。

2. 除去蛋白质: 取离心后的上清液 5 毫升, 置 50 毫升容量瓶中, 加 10 毫升 10% 硫酸锌溶液, 加 3 滴 0.5% 酚酞指示剂, 用 0.5*N* 氢氧化钠调 pH 至溶液呈微红色, 稀释到刻度, 过滤, 取滤液测定。

3. 与铜试剂反应: 操作与总糖测定相同。用空白与样品滴定值的差值, 直接查标准曲线, 计算出发酵液中还原糖的百分含量。

试剂和器材

试剂

1. 铜试剂: 称取 3.5 克硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 溶于 50 毫升蒸馏水中; 25 克酒石酸钾钠($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)溶于 200 毫升蒸馏水中; 25 克碳酸钠(Na_2CO_3)溶于 200 毫升蒸馏水中; 20 克碳酸氢钠(NaHCO_3)溶于 300 毫升蒸馏水中; 5 克碘化钾溶于 50 毫升蒸馏水中; 0.535 克碘酸钾(KIO_3)(称准!)溶于 200 毫升蒸馏水中。分别溶解后, 依次混合均匀, 过滤后放置两天方可应用。

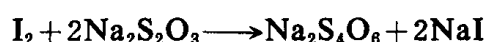
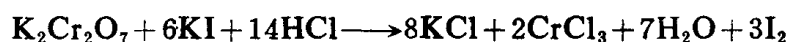
2. 硫代硫酸钠溶液的配制和标定: 先配制 0.05*N* 硫代硫酸钠溶液, 标定后, 在临用前再稀释成 0.005*N*。

(1) 0.05*N* 硫代硫酸钠溶液的配制: 称取 6.5 克结晶硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)溶于 500 毫升新煮沸放冷的蒸馏水中。加入 0.5 克碳酸钠, 摇匀后放置在棕色瓶内, 盖紧, 避免与空气和日光接触, 过 8—14 天后再标定。

(2) 0.05*N* 重铬酸钾溶液的配制: 将分析纯的重铬酸钾在 150°C 恒重, 准确称取 0.615 克, 用少量蒸馏水溶解后, 定容到 250 毫升。

(3) 标定: 用吸量管吸取 10 毫升重铬酸钾溶液置于 250 毫升碘瓶中, 加入 7 毫升 2*N* 盐酸和 0.32 克碘化钾, 立刻塞好玻璃塞, 摇匀, 并在玻璃塞与瓶颈之间加数滴水封闭空隙, 以免碘挥发损失。然后置暗处 5 分钟。用 10 毫升蒸馏水稀释。立刻用待标定的硫代硫酸钠溶液滴定到稻草黄色, 加入数滴淀粉指示剂, 继续滴定到蓝色刚刚消失, 即为终点。记下所用硫代硫酸钠溶液的体积。再重复两次, 要达到数据平行。

滴定过程反应如下:



(4) 硫代硫酸钠溶液当量浓度的计算:

重铬酸钾溶液的当量浓度: 重铬酸钾的氧化还原当量为 $\frac{294.22}{6} = 49.03$, 所配重铬酸钾溶液的浓度为 $\frac{0.615(\text{克})}{49.03(\text{克}) \times 0.25(\text{升})} = 0.0502N$ 。

硫代硫酸钠溶液的当量浓度: $N = \frac{10 \times 0.0502}{V}$ 此处, V 代表滴定时所用硫代硫酸钠溶液的毫升数。

3. $3N$ 氢氧化钠溶液。

4. $0.5N$ 氢氧化钠溶液。

5. $1N$ 硫酸。

6. $0.1N$ 硫酸。

7. $3N$ 盐酸。

8. 10% 硫酸锌溶液。

9. 淀粉指示剂: 称取 0.5 克可溶性淀粉, 加 10 毫升蒸馏水, 搅成糊状, 倒入正在沸腾的 95 毫升蒸馏水中, 随倒随搅拌, 继续煮沸几分钟, 到溶液透明为止。冷至室温, 倒在滴瓶内, 加甲苯数滴, 摇匀。

器材

1. 碘瓶。

2. 台式离心机。

3. 水浴锅(图 1-1)。

4. 自制环状玻璃搅棒(图 1-2)。

5. 碱式滴定管及酸式滴定管。

6. 25×250 毫米试管。

7. 待测的样品: 例如发酵液。

主要参考资料

1. Hodge, J. E. and Hofreiter, B. T. Determination of reducing sugars and carbohydrates. Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol 1, 1962, 380—386, Whistler, Roy L. and Wolfrom, M. L. (Eds) Academic Press. New York and London.

2. 彭伟堂编著: 还原糖——夏、薛、哈 (Somogyi-Shaffer-Hartman) 三氏法。微量生物化学实验, 1964, 43—45 页, 上海科学技术出版社。

3. 北京大学生物系生物化学教研室编: 铜试剂法(半微量测定法)。生物化学实验方法和研究技术, 第一册, 1977, 1—7 页。

实验二 费林试剂法测定还原糖

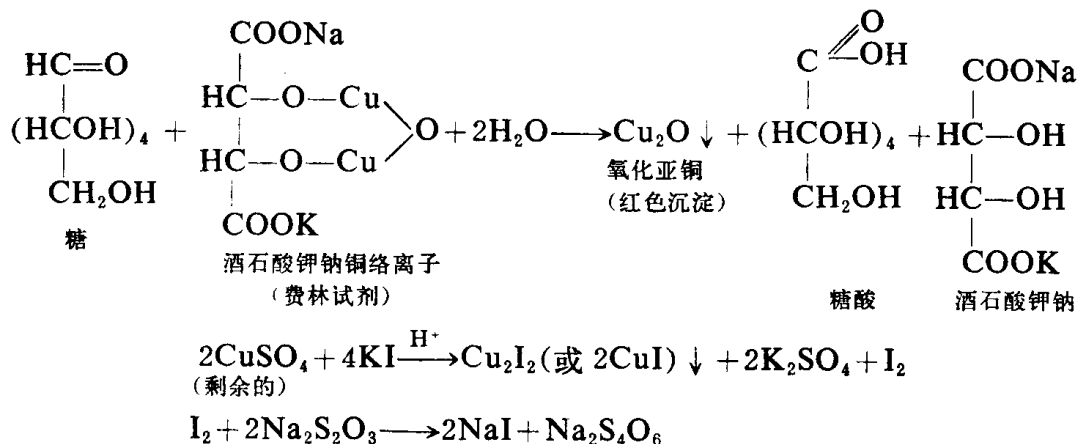
原 理

还原糖在硷性溶液中将硫酸铜的二价铜离子(Cu^{2+})还原成氧化亚铜的一价铜离子(Cu^+)。多余的 Cu^{2+} 在酸性溶液中与碘化钾作用析出碘。用标准硫代硫酸钠溶液滴定所析出的碘, 这样就可以推算出糖的含量。

定糖用的费林(Fehling)试剂, 为便于长期保存, 分成两部分配制, 即费林溶液 A(只含硫酸铜)与费林溶液 B(含有酒石酸钾钠与氢氧化钠), 临用前等体积混合。

费林溶液 A 中的硫酸铜主要用于定量地供给 Cu^{2+} , 费林溶液 B 中的酒石酸钾钠主要作用是使 Cu^{2+} 形成络离子, 不发生沉淀。氢氧化钠是用来满足溶液碱化的需要。

费林试剂与糖加热发生作用, 以及在测定过程中有关的化学反应如下:



用费林试剂测定还原糖的方法是定糖的最常用与最广泛的方法, 因此对于费林试剂有多种改良的配方, 本实验用最基本的配方。该方法测定糖的范围约为 10—90 毫克。

操 作 方 法

一、标准曲线的制定

1. 标准糖溶液的配制: 准确称取 1.000 克分析纯的无水葡萄糖 (预先在 105°C 干燥至恒重), 用蒸馏水溶解后, 移至 100 毫升容量瓶中, 用蒸馏水洗称量瓶数次, 将全部葡萄糖定量地移入容量瓶中, 最后定容到刻度, 摇匀。浓度为 10 毫克/毫升。为了防腐可加入 0.25 克苯甲酸。

将配好的标准糖溶液倒入干燥的 50 毫升滴定管中, 分别于 3 个锥形瓶 (200—300 毫升) 中, 各加入 10 毫升标准糖溶液, 每一锥形瓶内含糖量为 100 毫克。另取 3 个锥形瓶, 分别加入标准糖溶液 8 毫升, 蒸馏水 2 毫升, 每一锥形瓶 10 毫升溶液含糖量为 80 毫克, 糖溶液的浓度为 8 毫克/毫升。按照此法配制每一锥形瓶中 10 毫升糖溶液, 其含糖量为 60 毫克, 40 毫克, 20 毫克。每种配 3 瓶。

2. 滴定标准糖溶液：逐个滴定不同浓度的标准糖溶液，每一锥形瓶标准糖溶液中加入 20 毫升费林试剂，在电炉上加热至沸腾，沸腾 3 分钟，取下，在冷水中冷却到室温。应该加过量的费林试剂，使其与测定液中的糖作用后还有剩余的 Cu^{2+} ，因此在沸腾以后溶液必须呈蓝色。如果溶液中蓝色全部消失，而形成红色的氧化亚铜(Cu_2O)，就不能保证溶液中所有的糖全部氧化，则不能得到准确的结果。在这种情况下必须增加费林试剂的量，或稀释测定液来减少糖含量，如果增加费林试剂就要变动所有其他试剂的量，涉及范围较大，一般都采用稀释测定液的方法以减少糖含量。

溶液冷却后，立即加入 15 毫升 4N 硫酸，析出碘。迅速用 0.1N 硫代硫酸钠溶液滴定到浅黄色(碘的颜色快退尽时)，加入数滴淀粉指示剂，再继续滴定，直至蓝色刚消失为止，即为终点。记下滴定值(即所消耗的硫代硫酸钠溶液的毫升数)。

3. 空白：因为测定糖的原理是氧化还原反应，如果试剂的杂质中或蒸馏水中含有氧化还原物质，就会影响滴定值。为了消除这种影响，必须进行空白滴定，以 10 毫升蒸馏水代替样品，操作同前，进行滴定，即得空白滴定值。平行滴定三份。

4. 数据处理与标准曲线的绘制：每一浓度糖溶液与空白均有 3 个平行的滴定值，理论上这 3 个滴定值应完全相等，但是由于操作与仪器本身的误差，这 3 个滴定值往往不同，一般允许的误差是 0.05 毫升(相当于 50 毫升滴定管滴出的一滴)。如果 3 个平行滴定值均在允许误差范围之内，可以取平均值。如两个在允许误差范围之内，舍去第 3 个，取这两个的平均值。如果 3 个滴定值之间差值均不在允许误差范围之内，就需要重新滴定。不同浓度糖溶液的滴定值减去空白滴定值就得到与不同糖含量相应的 0.1N 硫代硫酸钠溶液的毫升数。以糖的毫克数为横坐标，以相应的 0.1N 硫代硫酸钠溶液毫升数为纵坐标，可绘制出标准曲线。

还原糖的量与相应的硫代硫酸钠溶液毫升数在一定范围内成直线关系，该范围样品含糖量一般是 10—90 毫克。因此应用标准曲线时，样品的含糖量一定要控制在这个范围内。

二、还原糖的测定 一般样品中主要含有多糖与单糖。单糖即还原糖。如果样品不经过水解，直接测定，所得到的含糖量为样品中还原糖的含量，而多糖的含量不能测出。

具体操作见标准糖溶液的测定，将样品稀释在标准曲线的最适范围内，然后以样品代替标准糖溶液，其它步骤同上。

进行样品测定时，因样品中含有许多有色物质，所以终点颜色不如标准溶液明显。费林试剂与样品液加热以后，剩下的硫酸铜与杂质颜色相混呈绿色。加淀粉指示剂后，颜色转变成紫黑色，随样品而不同。到滴定终点时，溶液往往混浊呈灰白色等。必须先进行滴定，熟习终点，然后正式滴定。同时做空白滴定。将空白滴定值减样品滴定值，然后从标准曲线上查出相应的糖含量，考虑样品的稀释倍数，计算出样品中还原糖的百分含量(克/100 毫升或克%)。

三、总糖的测定 先将样品经酸水解，使所含多糖转变成单糖，再测定还原糖，即为总的糖含量。操作如下：

取样品(例如发酵液)数毫升，用固体草酸酸化至 pH1.8—2.0，用滤纸过滤，得滤液。

取 0.5 毫升滤液三份，分别移入三个 200 毫升锥形瓶中，每一锥形瓶内再加 10 毫升蒸馏水

与 5 毫升 6*N* 盐酸。在电炉上加热到沸腾, 沸腾 3 分钟, 立即取下, 在冷水中冷却, 使样品中的多糖转变成单糖。

每一锥形瓶中加 5 毫升 6*N* 氢氧化钠溶液, 中和样品中所含的酸。吸取 20 毫升费林试剂加入锥形瓶中, 摇匀。在电炉上加热到沸腾, 沸腾 3 分钟(此时溶液中必须有剩余的费林试剂, 呈蓝色, 否则样品需要稀释)。用冷水立即冷却到室温, 进行滴定, 以下操作同标准糖溶液的测定。同时做空白滴定。用空白滴定值减样品滴定值, 从标准曲线上查出相应的糖含量, 计算样品中总糖的百分含量。

试剂和器材

试剂

1. 费林试剂

费林溶液 A: 称取 30 克硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 溶于 500 毫升蒸馏水中。

费林溶液 B: 称取 93.8 克酒石酸钾钠与 62.5 克氢氧化钠, 溶于 500 毫升蒸馏水中。

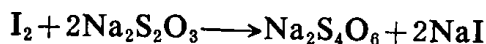
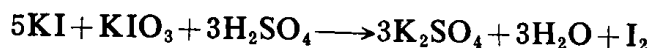
临用前将 A 与 B 等体积混合。有时为了简化操作步骤, 可将 30% 碘化钾溶液预先加到费林试剂中。混合时比例为费林试剂: 30% 碘化钾溶液 = 4:1(V/V)。

2. 硫代硫酸钠溶液的配制和标定: 先配制成 1*N* 硫代硫酸钠溶液, 稀释成 0.1*N* 后进行标定。

称取 125 克结晶硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 溶于 500 毫升新煮沸过而冷却的蒸馏水中, 并加入 2 克碳酸钠(Na_2CO_3), 贮于棕色瓶中, 最好装有 CO_2 吸收管, 用虹吸管放取溶液, 可防止因空气中二氧化碳的进入而影响浓度。放置 8—14 天后, 进行标定。

硫代硫酸钠标准溶液的标定: 精确地取 1*N* 硫代硫酸钠溶液 50 毫升, 放入 500 毫升容量瓶中, 用经过煮沸冷却后的蒸馏水定容至刻度, 即成 0.1*N* 的硫代硫酸钠溶液。摇匀, 装入 50 毫升碱滴定管中备用。精确地吸取 20 毫升 0.1*N* 碘酸钾溶液 3 份, 分别移入 3 个 250 毫升碘瓶中, 加溶液时勿使溶液接触瓶颈, 各加 1.0 毫升 10% 碘化钾溶液, 10 毫升 2*N* 硫酸, 立刻塞好玻璃塞, 在玻璃塞与瓶颈之间加数滴 10% 碘化钾溶液封闭缝隙, 以免碘挥发损失。然后置暗处 5 分钟。取出, 各加 20 毫升蒸馏水, 立即用待标定的 0.1*N* 硫代硫酸钠溶液滴定, 当黄色快要退尽时加入数滴淀粉指示剂, 继续滴定到蓝色刚刚消失时即为终点。得滴定值 *A*。同时做空白滴定, 即以 20 毫升蒸馏水代替碘酸钾溶液, 其他操作同上, 得滴定值 *B*。

滴定过程的反应如下:



计算

$$N_1 = \frac{N_2 V_2}{A - B}$$

N_1 为硫代硫酸钠标准溶液待标定的当量浓度; A 为滴定碘酸钾标准溶液时所消耗硫代硫酸钠溶液的毫升数; B 为滴定空白所消耗硫代硫酸钠溶液的毫升数; N_2 为碘酸钾标准溶液的已知

当量浓度(本实验为 0.1N); V_2 为滴定时所取碘酸钾标准溶液的毫升数(本实验为 20 毫升)。

3. 淀粉指示剂: 配法见实验一。

4. 待测样品。

器材

1. 碘瓶。

2. 碱式滴定管。

3. 电炉。

主要参考资料

1. 中山医学院生物化学教研组许鹏程等译(Hawk, P. B., Oser, B. L., Summerson, W. H.): 萧哈二氏法。实用生物化学 1965, 595 页, 人民卫生出版社。

2. 北京大学生物系生物化学教研室编: 费林(Fehling) 试剂法。生物化学实验方法和研究技术, 第一册, 1977, 7—13 页。

实验三 3, 5-二硝基水杨酸比色定糖法

原 理

本实验是利用 3, 5-二硝基水杨酸溶液与还原糖溶液共热后被还原成棕红色的氨基化合物, 在一定范围内还原糖的量和棕红色物质颜色深浅的程度成一定比例关系, 可用于比色测定。操作简便, 快速, 杂质干扰较少。

操 作 方 法

一、葡萄糖标准曲线的制定

葡萄糖标准液的配制: 准确称取 100 毫克分析纯的无水葡萄糖(预先在 105°C 干燥至恒重), 用少量蒸馏水溶解后, 定量转移到 100 毫升容量瓶中, 再定容到刻度, 摇匀。浓度为 1 毫克/毫升。

取 9 支 25×250 毫米的试管, 分别按下表加入试剂:

项 目 \ 数 量 \ 管 号	管 号								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
葡萄糖标准液(毫升)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6
相当于葡萄糖量(毫克)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6
蒸馏水(毫升)	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6	0.4
3, 5-二硝基水杨酸试剂(毫升)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

将各管溶液混合均匀, 在沸水浴中加热 5 分钟, 取出后立即用冷水冷却到室温, 再向每管加入