

现代生物学实验

(下 册)

主编 林加涵 魏文铃 彭宣宪



CHEP
高等教育出版社



Springer
施普林格出版社

图书在版编目(CIP)数据

现代生物学实验.下册/林加涵等 主编. —北京:高等教育出版社;
海德堡:施普林格出版社,2001.10

ISBN 7-04-010352-4

I. 现… II. 林… III. 生物学-实验-高等学校教材 IV. Q-331

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 068713 号

责任编辑:吴雪梅 封面设计:张楠 责任印制:陈伟光

现代生物学实验(下册)

林加涵 魏文铃 彭宣宪 主编

出版发行 高等教育出版社 施普林格出版社

社 址 北京市东城区沙滩后街 55 号

邮政编码 100009

电 话 010-64054588

传 真 010-64014048

网 址 <http://www.hep.edu.cn>

<http://www.hep.com.cn>

经 销 新华书店北京发行所

印 刷 北京民族印刷厂

开 本 787×1092 1/16

版 次 2001 年 10 月第 1 版

印 张 20.25

印 次 2001 年 10 月第 1 次印刷

字 数 550 000

定 价 28.00 元

© China Higher Education Press Beijing and Springer - Verlag Berlin Heidelberg 2001

版权所有 侵权必究

序

进入 21 世纪, 生命科学将在社会进步、科学发展、经济繁荣和人民健康中起到更重要的作用。如何使培养出来的学生能较好地适应和满足这一需要, 是摆在教育工作者面前的重要任务。厦门大学生命科学学院历来十分重视这一工作。《现代生物学实验》的编写就是其具体的体现。

《现代生物学实验》是厦门大学生命科学学院承担的教育部创名牌课程之一“现代生物学实验”的主要内容, 是“面向二十一世纪生物学实验教学内容和教学体系改革”的具体实践。它较全面和系统地介绍了生物显微实验技术, 生物无菌培养实验技术, 生化物质的制备、分析与测试实验技术, 基因工程实验技术。其实验内容和体系都有较大的创新, 既系统阐述了实验的基本原理和基本技能, 又反映了学科的发展前景, 特别是汇集近期较为新颖的技术方法, 把经典的实验内容和前沿新技术有机地结合在一起。这样, 提出了新的实验课程设计方案, 改革了原有的实验教学方法和手段, 增添了新的实验教学内容, 建立了新的实验教学系统。所以, 这是一本具有科学性、系统性、先进性和适用性的好教材。它将在促进生命科学实验教学的发展中起到积极的作用。

厦门大学生命科学学院其前身为厦门大学生物学系, 长期以来形成了重视教学的良好风气。参加本书编写工作的人员均为来自教学第一线的具有丰富的教学工作经验的老师。在他们当中的大多数人, 或是从教 30 年以上的老一辈专家, 或是具有博士学位的年轻学者。他们一起研讨、取长补短、反复酌量、精益求精。由此, 不但形成了本书编写人员在教学经历、学术层次、年龄结构等诸方面合理安排的特点, 而且反映了厦门大学生命科学学院的老专家关心青年教师成长, 青年教师尊重老专家, 老专家和青年教师热心教育事业的优良传统。

由此, 乐而作序。书中的不足之处, 还望同道不吝赐教。

唐宗揚

中国科学院院士

2000 年 7 月 14 日

前 言

当今,生命科学发展迅速,新技术、新方法层出不穷。为了适应学科发展的需要,厦门大学生命科学学院在“面向二十一世纪生物学实验教学内容 and 教学体系改革”具体实践的基础上,组织教师进行了《现代生物学实验》教材的编写。

《现代生物学实验》是我院承担的教育部创名牌课程之一“现代生物学实验”的主要内容。全书分上、下两册,较全面和系统地介绍了生物显微实验技术,生物无菌培养实验技术,生化物质的制备、分析与测试实验技术,基因工程实验技术。其实验内容和体系都有较大的创新,既系统阐述了实验的基本原理和基本技能,又反映了学科的发展前景,特别是汇集了近期较为新颖的技术方法,把经典的实验内容与前沿的新技术有机地结合在一起,改革了原有实验教学方法和体系,增添了新的实验教学内容,建立了新的教学系统。它将在促进生命科学实验教学的发展中起一定的作用。各院校和研究单位在教学中可根据自己的设备条件和专业需要,酌情择取。

本书大部分实验由我院生物学系林加涵、徐金森、陈美、谢宏、陈德海、黄跃坚、郑忠辉、许玉德、叶军、沈明山、陈清西、彭宣宪、杨盛昌、刘月英、周兴旺、刘仁海、石艳、周涵韬、章军、李雪松、李庆阁、邹寒娟等编写。并聘请清华大学生命科学与技术系周海梦及浙江大学生命科学学院李凤玉编写部分实验。在本书编写过程中,由于时间和水平的限制,书中难免存在不当与错误之处,恳请同行专家及广大读者批评斧正,以便再版时修改。

本书编写过程中,上册由杨汉金、魏文铃、赖垣忠、林秀敏、洪水根教授审阅,下册由许良树、陈素丽、楼士林教授、宋思杨副教授审阅。他们皆提出许多宝贵意见。在出版过程中,还得到高等教育出版社林金安、吴雪梅同志的热心指导和帮助,得到了厦门大学校、院领导的大力支持。在此,谨向他们致以诚挚的谢意。

编 者

于厦门大学生命科学学院

2001年7月

目 录

第三篇 生化样品的制备和分析

第七章 糖类的实验

实验九十六	还原糖和总糖的测定	(2)
实验九十七	多糖的苯酚-硫酸法定量测定	(7)
实验九十八	血清葡萄糖的葡萄糖氧化酶法测定	(9)
实验九十九	粗纤维的测定	(11)
实验一百	膳食纤维的测定	(13)
实验一百零一	糖的高效液相色谱法分离与定量测定	(15)

第八章 脂类化学的实验

实验一百零二	粗脂肪的定量测定——索氏提取法	(19)
实验一百零三	卵磷脂的提取和定性鉴定	(20)
实验一百零四	Hanus 法测定不饱和脂肪酸的碘价	(21)
实验一百零五	红细胞膜的制备	(23)
实验一百零六	膜磷脂的分析	(25)

第九章 蛋白质的实验

实验一百零七	蛋白质含量的测定	(29)
实验一百零八	蛋白质与氨基酸的颜色反应	(37)
实验一百零九	血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳	(41)
实验一百一十	聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳分离血清蛋白	(45)
实验一百一十一	聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳测定蛋白质的等电点	(50)
实验一百一十二	SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质亚基相对分子质量	(53)
实验一百一十三	蛋白质的脲梯度电泳	(57)
实验一百一十四	蛋白质的 NR/R 双向对角线电泳	(59)
实验一百一十五	毛细管无胶筛分电泳分离 SDS-蛋白质复合物	(62)
实验一百一十六	凝胶过滤层析法测定蛋白质相对分子质量	(65)
实验一百一十七	DNS-CI 法测定蛋白质多肽链 N 端氨基酸残基	(70)

第十章 酶的实验

实验一百一十八	碱性磷酸酶的分离提取及比活力的测定	(74)
实验一百一十九	DEAE-纤维素柱层析纯化碱性磷酸酶	(78)
实验一百二十	碱性磷酸酶动力学性质的测定	(81)
实验一百二十一	磷酸盐对碱性磷酸酶的抑制作用	(87)
实验一百二十二	碱性磷酸酶活性功能基团的化学修饰	(91)
实验一百二十三	碱性磷酸酶在 NBS 修饰过程中的失活动力学	(93)

第十一章 核酸的实验

实验一百二十四	DNA 的制备	(98)
实验一百二十五	RNA 的制备	(103)
实验一百二十六	核酸的含量测定	(108)
实验一百二十七	核酸的组成分析	(114)
实验一百二十八	DNA 的 T_m 值和 (G+C)% 测定	(117)

第十二章 生物活性物质的实验

实验一百二十九	核黄素的荧光法定量测定	(120)
实验一百三十	β 胡萝卜素的定量测定	(122)
实验一百三十一	维生素 C 的定量测定	(124)
实验一百三十二	赤霉素的定量测定	(126)
实验一百三十三	抗生素的分离和鉴别 (薄层层析法)	(127)
实验一百三十四	DNA 拓扑异构酶 II 抑制剂活性的测定	(129)
实验一百三十五	紫杉醇抗微管活性的检测	(131)

第十三章 免疫学实验技术

实验一百三十六	抗原获取与抗体制备	(134)
实验一百三十七	经典的血清学反应及其应用	(138)
实验一百三十八	免疫标记技术	(144)
实验一百三十九	免疫细胞的检测	(149)
实验一百四十	细胞因子检测	(157)
实验一百四十一	双特异性循环免疫复合物的检测	(160)
实验一百四十二	免疫病理试验——动物过敏反应	(162)

第四篇 基因工程实验

第十四章 基因工程载体制备

实验一百四十三	碱变性法大量制备大肠杆菌质粒 DNA	(165)
实验一百四十四	λ 噬菌体 DNA 的制备	(168)
实验一百四十五	酵母 YAC DNA 的分离制备	(170)
实验一百四十六	DNA 的鉴定	(172)

第十五章 目的基因的获得

实验一百四十七	DNA 的限制性内切酶酶解	(183)
实验一百四十八	酶切 DNA 片段的脱磷酸化处理	(186)
实验一百四十九	凝胶中 DNA 片段的分离与回收	(188)
实验一百五十	DNA 的重组连接	(190)
实验一百五十一	λ 基因组文库的构建	(193)
实验一百五十二	cDNA 文库的构建	(200)
实验一百五十三	DNA 的 PCR 扩增技术	(207)
实验一百五十四	mRNA 差别显示法分离特异表达的基因片段	(210)

第十六章 DNA 的导入

实验一百五十五	细菌的化学转化及转化子的初步筛选	(216)
实验一百五十六	细菌的电转化实验	(218)
实验一百五十七	用超声波法对丝状蓝藻进行质粒转化	(219)
实验一百五十八	磷酸钙转染技术	(221)
实验一百五十九	DEAE 葡聚糖转染技术	(222)
实验一百六十	基因枪转化技术	(224)
实验一百六十一	PEG 介导的植物转化技术	(227)
实验一百六十二	植物致癌农杆菌介导的转化技术	(229)

第十七章 重组 DNA 的鉴定

实验一百六十三	^{32}P -DNA 放射性探针的缺口平移法制备	(236)
实验一百六十四	随机引物法制备 DIG-dVTP 标记的 DNA 探针	(240)
实验一百六十五	Southern 印迹杂交法	(242)
实验一百六十六	Northern 印迹杂交	(246)
实验一百六十七	菌落原位杂交	(250)

实验一百六十八 双脱氧链终止法测定 DNA 序列	(253)
--------------------------------	-------

第十八章 目的基因的表达及鉴定

实验一百六十九 目的基因的亚克隆	(259)
实验一百七十 利用大肠杆菌表达真核基因	(260)
实验一百七十一 大肠杆菌表达产物包含体的分离与纯化	(262)
实验一百七十二 蛋白质的 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 (SDS - PAGE)	(264)
实验一百七十三 酶联免疫吸附 (ELISA) 技术检测基因表达产物	(267)
实验一百七十四 蛋白质印迹技术	(269)

第十九章 表达产物的分离纯化

实验一百七十五 毛细管电泳技术	(274)
实验一百七十六 离子交换层析技术	(276)
实验一百七十七 凝胶过滤层析技术	(278)
实验一百七十八 快速蛋白液相层析 (FPLC 技术)	(281)

第二十章 目的 DNA 片段的定点诱变及检测

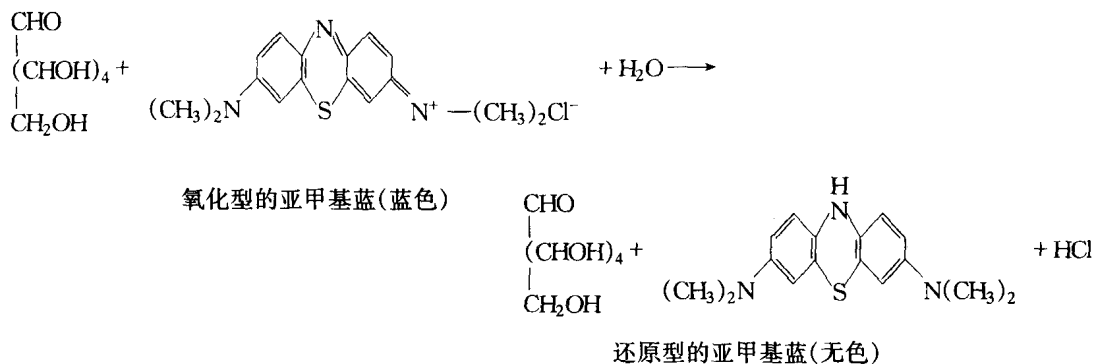
实验一百七十九 寡聚核苷酸介导的克隆 DNA 的定点突变	(284)
实验一百八十 利用 PCR 技术进行定点突变	(288)
实验一百八十一 SSCP 法检测基因突变	(291)
附 录	(294)
参考文献	(312)

第三篇 生化样品的制备和分析

第七章 糖类的实验

糖为广泛分布于生物界的有机化合物。它是生物维持生命活动的主要能量来源,也是有机体重要的组成成分。糖的复合物还参与细胞识别、细胞间物质运输和免疫功能的调节。在植物中,糖含量可以高达干重的 80%。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的意义。在微生物发酵生产中,常以淀粉、葡萄糖等作为微生物生长的碳源和能源,为了提高产量和质量,必须控制和测定培养基中糖的含量及其变化。在食品工业中常以糖作为主要原料和辅助材料,糖是大多数食品的主要成分之一。在农、畜产品评价利用中,也无一不与糖密切相关。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。因此,糖的分析测定对于科学研究和指导生产实践都十分重要。

糖类包括多糖、寡糖和单糖。其中单糖和某些寡糖具有游离醛基或酮基,称为还原糖;多糖和蔗糖等则为非还原糖。糖的测定方法很多,测定单糖和低聚糖常用的方法有物理法、化学法、色谱法和酶法等。物理法包括相对密度法、折光法和旋光法。化学法是应用最为广泛的常规分析方法,主要有利用糖的游离醛基或酮基的还原性进行测定的斐林氏滴定法、3,5-二硝基水杨酸法、蒽酮-硫酸法、地衣酚-硫酸法和地衣酚法等。色谱法有纸色谱法、薄层层析法、柱色谱法、亲和色谱法、气相色谱法、高效液相色谱法和离子色谱法等。酶法测定糖类,如用葡萄糖氧化酶测定葡萄糖,用半乳糖脱氢酶测定半乳糖、乳糖等。对于多糖,可用苯酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法等直接定量测定;淀粉的测定常使之水解为单糖,然后测定所生成的单糖的含量。而纤维素和果胶的测定则多采用重量法。在实际工作中要根据需要和可能选择适当的方法。本章介绍糖的几种化学测定法以及酶法、重量法和高效液相色谱法等测定糖的方法。



二、实验用品

(一)器材

- (1)电热恒温水浴锅。
- (2)调温电炉。
- (3)250 mL 锥形瓶,滴定管。

(二)试剂

(1)碱性酒石酸铜甲液:称取 15 g 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)及 0.05 g 亚甲基蓝,溶于蒸馏水中并稀释到 1 000 mL。

(2)碱性酒石酸铜乙液:称取 50 g 酒石酸钾钠及 75 g NaOH,溶于蒸馏水中,再加入 4 g 亚铁氰化钾 $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6]$,完全溶解后,用蒸馏水稀释到 1 000 mL,贮存于具橡皮塞玻璃瓶中。

(3)0.1% 葡萄糖标准溶液:准确称取 1.000 g 经 98~100℃ 干燥至恒重的无水葡萄糖,加蒸馏水溶解后移入 1 000 mL 容量瓶中,加入 5 mL 浓 HCl(防止微生物生长),用蒸馏水稀释到 1 000 mL。

(4)6 mol/L HCl:取 250 mL 浓 HCl(35%~38%)用蒸馏水稀释到 500 mL。

(5)碘-碘化钾溶液:称取 5 g 碘,10 g 碘化钾溶于 100 mL 蒸馏水中。

(6)10% NaOH:称取 50 g NaOH 溶于 500 mL 蒸馏水中。

(7)0.1% 酚酞指示剂。

(三)材料

山芋粉。

三、实验程序

(一)操作方法

1. 样品中还原糖的提取

准确称取 2 g 山芋粉,放在 100 mL 烧杯中,加入 85% 乙醇 50~60 mL,混匀,于 50℃ 恒温水浴中保温 30 min,不时搅拌,使还原糖浸出,过滤,滤渣用 85% 乙醇提取二次,合并提取液,即为还原糖提取液。

2. 样品中总糖的水解及提取

准确称取 1 g 山芋粉,放在锥形瓶中,加入 6 mol/L HCl 10 mL,蒸馏水 15 mL,在沸水浴中加热 0.5 h 取出 1~2 滴置于白瓷板上,加 1 滴 I-KI 溶液检查水解是否完全。如已水解完全,则不

呈现蓝色。水解毕,冷却至室温后加入 1 滴酚酞指示剂,以 10% NaOH 溶液中和至溶液呈微红色,并定容到 100 mL,过滤取滤液 10 mL 于 100 mL 容量瓶中,定容至刻度,混匀,即为稀释 1 000 倍的总糖水解液,用于总糖测定。

3. 碱性酒石酸铜溶液的标定

准确吸取碱性酒石酸铜甲液和乙液各 5.00 mL,置于 250 mL 锥形瓶中,加蒸馏水 10 mL,加玻璃珠 3 粒。从滴定管滴加约 9 mL 葡萄糖标准溶液,加热使其在 2 min 内沸腾,准确沸腾 30 s,趁热以每 2 s 1 滴的速度继续滴加葡萄糖标准溶液,直至溶液蓝色刚好褪去为终点。记录消耗葡萄糖标准溶液的总体积。平行操作 3 次,取其平均值,按下式计算:

$$F = C \times V$$

式中: F ——10 mL 碱性酒石酸铜溶液相当于葡萄糖的量,mg;

C ——葡萄糖标准溶液的浓度,mg/mL;

V ——标定时消耗葡萄糖标准溶液的总体积,mL。

4. 样品中糖的定量测定

(1) 样品溶液预测定:吸取碱性酒石酸铜甲液及乙液各 5.00 mL,置于 250 mL 锥形瓶中,加蒸馏水 10 mL,加玻璃珠 3 粒,加热使其在 2 min 内沸腾,准确沸腾 30 s,趁热以先快后慢的速度从滴定管中滴加样品溶液,滴定时要始终保持溶液呈沸腾状态。待溶液由蓝色变浅时,以每 2 s 1 滴的速度滴定,直至溶液的蓝色刚好褪去为终点。记录样品溶液消耗的体积。

(2) 样品溶液测定:吸取碱性酒石酸铜甲液及乙液各 5.00 mL,置于锥形瓶中,加蒸馏水 10 mL,加玻璃珠 3 粒,从滴定管中加入比预测时样品溶液消耗的总体积少 1 mL 的样品溶液,加热使其在 2 min 内沸腾,准确沸腾 30 s,趁热以 2 s 1 滴的速度继续滴加样液,直至蓝色刚好褪去为终点。记录消耗样品溶液的总体积。同法平行操作 3 份,取平均值。

5. 结果处理

$$\text{还原糖(以葡萄糖计)\%} = \frac{F \times V_1}{m \times V \times 1000} \times 100$$

$$\text{总糖(以葡萄糖计)\%} = \frac{F \times V_1}{m \times V \times 1000} \times 100$$

其中: m ——样品重量,g;

式中: F ——10 mL 碱性酒石酸铜溶液相当于葡萄糖的量,mg;

V ——标定时平均消耗还原糖或总糖样品溶液的总体积,mL;

V_1 ——还原糖或总糖样品溶液的总体积,mL;

1 000——mg 换算成 g 的系数。

(二) 注意事项

1. 本法是根据一定量的碱性酒石酸铜溶液(Cu^{2+} 量固定)消耗的样液量来计算样液中还原糖含量,反应体系中 Cu^{2+} 的含量是定量的基础,所以在样品处理时,不能用铜盐作为澄清剂,以免样液中引入 Cu^{2+} ,得到错误的结果。

2. 碱性酒石酸铜甲液和乙液应分别贮存,用时才混合,否则酒石酸钾钠铜络合物长期在碱性条件下会慢慢分解析出氧化亚铜沉淀,使试剂有效浓度降低。

3. 滴定必须在沸腾条件下进行,其原因一是可以加快还原糖与 Cu^{2+} 的反应速度;二是亚甲基蓝的变色反应是可逆的,还原型的亚甲基蓝遇空气中的氧时会被再氧化为氧化型。此外,氧化亚铜也极不稳定,易被空气中的氧所氧化。保持反应液沸腾可防止空气进入,避免亚甲基蓝和氧化亚铜

被氧化而增加耗糖量。

4. 滴定时不能随意摇动锥形瓶,更不能把锥形瓶从热源上取下来滴定,以防止空气进入反应溶液中。

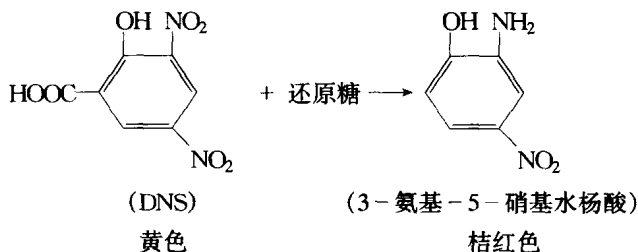
5. 样品溶液应预测,其目的:一是本法对样品溶液中还原糖浓度有一定要求(0.1%左右),测定时样品溶液的消耗体积应与标定葡萄糖标准溶液时消耗的体积相近,通过预测可了解样品溶液浓度是否合适,浓度过大或过小应加以调整,使预测时消耗样液量在 10 mL 左右;二是通过预测可知道样液大概消耗量,以便在正式测定时,预先加入比实际用量少 1 mL 左右的样液,只留下 1 mL 左右样液在继续滴定时加入,以保证在 1 分钟内完成继续滴定工作,提高测定的准确度。

6. 必须严格控制反应液的体积,标定和测定时消耗的体积应接近,使反应体系碱度一致。热源一般采用 800 W 电炉,电炉温度恒定后才能加热,热源强度应控制在使反应液在两分钟内沸腾,且应保持一致;否则加热至沸腾所需时间就会不同,引起蒸发量不同,使反应液碱度发生变化,从而引入误差。沸腾时间和滴定速度对结果影响也较大,一般沸腾时间短,消耗糖液多,反之,消耗糖液少。滴定速度过快,消耗糖量多,反之,消耗糖量少。因此,测定时应严格控制上述实验条件,力求一致。平行试验的样液消耗量相差不应超过 0.1 mL。

II. 3,5-二硝基水杨酸比色法

一、实验原理

在 NaOH 和丙三醇存在下,3,5-二硝基水杨酸(DNS)与还原糖共热后被还原生成氨基化合物。在过量的 NaOH 碱性溶液中此化合物呈桔红色,在 540 nm 波长处有最大吸收,在一定的浓度范围内,还原糖的量与光吸收值呈线性关系,利用比色法可测定样品中的含糖量。



二、实验用品

(一)器材

- (1)722 型分光光度计。
- (2)水浴锅。
- (3)电炉。
- (4)15 mm×180 mm 具塞试管。

(二)试剂

(1)3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂:称取 6.5 g DNS 溶于少量蒸馏水中,移入 1 000 mL 容量瓶中,加入 2 mol/L 氢氧化钠溶液 325 mL,再加入 45 g 丙三醇,摇匀,冷却后定容至 1 000 mL。

(2)葡萄糖标准溶液:准确称取干燥恒重的葡萄糖 200 mg,加少量蒸馏水溶解后,以蒸馏水定

容至 100 mL,即含葡萄糖为 2.0 mg/mL。

其他试剂同直接滴定法中的试剂(4)~(7)。

(三)材料

山芋粉。

三、实验程序

1. 葡萄糖标准曲线制作

取 5 支 15 mm×180 mm 具塞试管,按表 7-1 加入 2.0 mg/mL 葡萄糖标准液和蒸馏水。

表 7-1

管号	葡萄糖标准液	蒸馏水	葡萄糖含量
	/mL	/mL	/mg
1	0.2	0.8	0.4
2	0.4	0.6	0.8
3	0.6	0.4	1.2
4	0.8	0.2	1.6
5	1.0	0	2.0

在上述试管中分别加入 DNS 试剂 2.0 mL,于沸水浴中加热 2 min 进行显色,取出后用流动水迅速冷却,各加入蒸馏水 9.0 mL,摇匀,在 540 nm 波长处测定光吸收值。以 1.0 mL 蒸馏水代替葡萄糖标准液按同样显色操作为空白调零点。以葡萄糖含量(mg)为横坐标,光吸收值为纵坐标,绘制标准曲线。

2. 样品中还原糖的提取

按直接滴定法中“样品中还原糖的提取”方法进行操作,但还原糖提取液改为用 50 mL 容量瓶定容至 50 mL。

3. 样品总糖的水解及提取

按直接滴定法中“样品中总糖的水解及提取”方法进行操作,但提取液用 10% 氢氧化钠溶液中和至溶液呈微红色后,用容量瓶定容至 250 mL,即总糖提取液总体积为 250 mL。

4. 样品中糖含量的测定

取 7 支 15 mm×180 mm 具塞试管,分别按表 7-2 加入试剂:

表 7-2

项 目	空白	还原糖			总糖		
	0	1	2	3	4	5	6
样品溶液/mL	0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
3,5-二硝基水杨酸试剂/mL	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

加完试剂后,其余操作均与制作标准曲线时相同。测定后,取样品的的光吸收平均值在标准曲线上查出相应的糖量。

5. 结果处理

按下式计算出山芋粉中还原糖和总糖的百分含量:

$$\text{还原糖(以葡萄糖计)\%} = \frac{C \times V}{m \times 1\,000} \times 100$$

$$\text{总糖(以葡萄糖计)\%} = \frac{C \times V}{m \times 1\,000} \times 100$$

式中: C ——还原糖或总糖提取液的浓度, mg/mL ;

V ——还原糖或总糖提取液的总体积, mL ;

m ——样品重量, g ;

1 000—— mg 换算成 g 的系数。

四、作业

1. 从山芋粉提取还原糖, 用 85% 乙醇作为溶剂有何优点?
2. 在直接滴定法中为什么可用亚甲基蓝作为滴定终点的指示剂?
3. 用直接滴定法测定还原糖, 为什么整个滴定过程必须使溶液处于沸腾状态?
4. 用直接滴定法, 为什么必须用已知浓度的葡萄糖标准液标定碱性酒石酸铜溶液?
5. 在直接滴定法中样品溶液预测定有何作用?
6. 在直接滴定法中影响测定结果的主要操作因素是什么? 为什么必须严格控制实验条件和操作步骤?
7. 比较直接滴定法与 3,5-二硝基水杨酸比色法测定山芋粉中还原糖和总糖的结果, 这两种方法各有何优点?

实验九十七 多糖的苯酚-硫酸法定量测定

一、实验原理

游离的寡糖和多糖中的已糖、戊糖及其糖醛酸经浓硫酸脱水生成糖醛或羟甲基糖醛酸, 生成物可与酚类化合物缩合产生有色物质, 已糖的生成物于 490 nm、戊糖及糖醛酸的生成物在 480 nm 波长处有最大吸收, 吸收值与糖含量呈线性关系, 用比色法可测定糖含量。

二、试验用品

(一) 器材

- (1) 电炉。
- (2) 水浴锅。
- (3) 722 分光光度计。

(二) 试剂

- (1) 75%、95% 乙醇。

(2)饱和 KCl 溶液。

(3)浓硫酸:分析纯,95.5%。

(4)80%苯酚:80 g(分析纯、重蒸馏试剂)加 20 mL 蒸馏水使之溶解。可置冰箱中避光长期保存。

(5)6%苯酚:临用前以 80%苯酚配制。

(6)葡聚糖(或葡萄糖)标准溶液:准确称取标准葡聚糖或经干燥恒重的葡萄糖 50 mg 于 500 mL 容量瓶中,加蒸馏水溶解并定容至刻度,即含糖为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

(三)材料

酵母菌胞外多糖发酵液。

三、实验程序

(一)操作方法

1. 葡聚糖(或葡萄糖)标准曲线制作

取 6 支具塞试管,分别加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 糖标准液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,各补加蒸馏水至 1.0 mL,然后加入 6%苯酚 1.0 mL,浓 H_2SO_4 5.0 mL,摇匀静置 10 min 后,在 25~30℃ 水浴中放置 20 min,于 490 nm 波长处测光吸收值,以 1.0 mL 蒸馏水代替糖标准液,按同样步骤操作为空白调零。以糖含量(μg)为横坐标,光吸收值为纵坐标,绘制标准曲线。

2. 样品中多糖含量测定

以测定酵母菌胞外多糖发酵液中多糖含量为例。

(1)样品的制备:在酵母菌胞外多糖发酵培养物中加入三倍体积的蒸馏水以降低其粘度,离心(3 500 r/min,15 min)除去菌体,取上清液 1.0 mL,加入 95%乙醇 3 mL 和饱和 KCl 溶液 1 滴,充分混合,静置后,离心弃上清液,沉淀用 75%乙醇洗涤 1 次,然后用蒸馏水溶解并于 100 mL 容量瓶定容至刻度,即为样品液。

(2)多糖的测定:吸取样品液 1.0 mL(含多糖 50 μg),按标准曲线制作的操作方法显色,测光吸收值,从标准曲线上查出相应的葡聚糖(或葡萄糖)量。

3. 结果处理

用下式计算出发酵液中多糖的含量:

$$\text{多糖含量} / \text{g} \cdot \text{L}^{-1} = \text{葡聚糖浓度} \times \text{样品稀释倍数}$$

$$\text{或多糖含量} / \text{g} \cdot \text{L}^{-1} = \text{葡萄糖浓度} \times \text{样品稀释倍数} \times 0.9$$

式中 0.9 为葡萄糖换算成多糖的系数。

(二)注意事项

1. 制作标准曲线宜用相应的标准多糖,如用单糖制作标准曲线,应以校正系数校正。

2. 对杂多糖,分析结果可根据各单糖的组成比及主要组分单糖的标准曲线的校正曲线加以校正计算。

四、作业

1. 苯酚-浓硫酸法、直接滴定法和 3,5-二硝基水杨酸比色法测糖的原理有何区别?

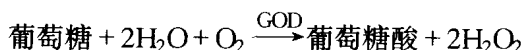
2. 用苯酚-浓硫酸法测定不同样品多糖的含量,为什么宜用相应的多糖作标准品?若用单糖制作标准曲线,分析结果应作如何处理才能得到满意结果?

实验九十八 血清葡萄糖的葡萄糖氧化酶法测定

一、实验原理

正常机体的血糖水平在 80~120 mg % (4.4~6.7 mmol/L) 范围之内。由于胰岛素缺乏或其受体异常,不能对抗由肾上腺素、高血糖素、肾上腺皮质激素等引起的血糖升高,使机体在空腹时血糖浓度超过 6.7 mmol/L (120 mg/dL),产生高血糖。当机体血糖浓度超过正常值而高达 9.0 mmol/L (160 mg/dL) 时,即出现尿糖。当机体的血糖含量低于 3.3~3.9 mmol/L (60~70 mg/dL) 时,可能出现低血糖症。低血糖症多见于胰岛素分泌过多或治疗上应用胰岛素过量、肾上腺皮质和脑下垂体机能减退、长期不能进食及严重肝脏疾病患者。因此,临床诊断上根据血糖或尿糖的高低,可以帮助诊断某些疾病。血清葡萄糖的测定有葡萄糖氧化酶法、蒽酮比色法和磷钼酸比色法等。由于葡萄糖氧化酶对 β 葡萄糖有高度的特异性,因此,用葡萄糖氧化酶法测定更准确可靠。

葡萄糖氧化酶测定法是利用葡萄糖氧化酶(GOD)能催化葡萄糖氧化成葡萄糖酸,并产生过氧化氢:



在有过氧化物酶和色素原性氧受体(如 4-氨基安替比林偶联酚,联大茴香胺,)同时存在时,过氧化物酶催化过氧化氢氧化色素原(如 4-氨基安替比林偶联酚),生成有色化合物,通过比色测定可计算出葡萄糖含量。

二、实验用品

(一)器材

- (1) 电热恒温干燥箱。
- (2) 恒温水浴锅。
- (3) 722 分光光度计

(二)试剂

推荐应用有批准文号的优质市售试剂盒。以下试剂配制仅供参考。

(1) 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0) 溶解无水 Na_2HPO_4 8.6 g 及无水 KH_2PO_4 5.3 g 于 800 mL 蒸馏水中,用 1 mol/L NaOH 或 HCl 调节 pH 值至 7.0,然后用蒸馏水稀释至 1 L。

(2) 酶试剂 取葡萄糖氧化酶 1 200 U,过氧化物酶 1 200 U,4-氨基安替比林 10 mg,叠氮化钠 100 mg,加入上述磷酸盐缓冲液至 80 mL 左右,调节 pH 值至 7.0,加磷酸盐缓冲液至 100 mL,置冰箱保存,至少可稳定 3 个月。

(3) 酚溶液 重蒸馏酚 100 mg 溶于 100 mL 蒸馏水中,贮存于棕色瓶中。

(4) 酶酚混合试剂 酶试剂及酚溶液等量混合,在冰箱内可以存放 1 个月。

(5) 葡萄糖标准贮存液(100 mmol/L) 称取无水葡萄糖(预先置 80℃ 恒温干燥箱内干燥恒重,移置于干燥器内保存)1.802 g,以 12 mmol/L 苯甲酸溶液溶解并移入 100 mL 容量瓶内,再以 12