

生物化学实验

辽宁师范学院生物系

一九七九年十二月

生物化学实验目录

实验一	蛋白质的颜色反应.....	7
(一)	双缩脲反应	7
(二)	蛋白黄色反应	2
(三)	米伦(Millon)氏反应	3
(四)	茚三酮反应	4
实验二	蛋白质的变性	6
(一)	乙醇沉淀蛋白质	6
(二)	蛋白质的加热变性	6
(三)	用生物碱试剂沉淀蛋白质	7
(四)	重金属离子对蛋白质的变性沉淀作用	8
(五)	重分子酸对蛋白质的变性沉降作用	9
实验三	蛋白质等电点的测定	10
实验四	Serensen氏甲醛滴定法	11
实验五	氨基酸的分离	13
	(薄层层析法, 硅胶G)	13
实验六	血清蛋白的分离	
	(醋酸纤维薄膜电泳)	16
实验七	总氮量的测定	
	微量凯氏(micro-Kjeldahl)定氮法.....	19
实验八	血清蛋白聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳(示教).....	24
实验九	酵母核糖核蛋白的水解及核糖核酸成分的鉴定.....	29
实验十	核糖核酸的水解	31

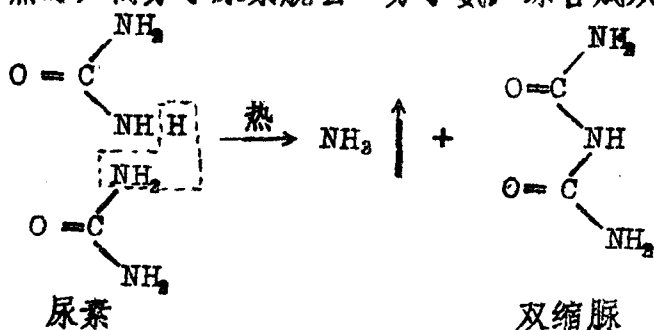
实验十一	核糖核酸水解产物的分离和鉴定(纸上电泳).....	37
实验十二	薄层层析分离核苷酸(AMP、ADP、ATP) (DEA 纤维素)	
实验十三	酶的特异性	36
实验十四	温度对酶活性的影响	37
实验十五	PH 对酶活性的影响	38
实验十六	酶的激活与抑制 (电解质对唾液淀粉酶的影响)	40
实验十七	枯草杆菌旦白酶活力测定 (72一型分光光度计)	41
实验十八	小麦萌发前后淀粉酶活力的比较 (581-G型光电比色计).....	43
实验十九	乳酸脱氢酶同工酶的分离 (醋酸纤维薄膜电泳)	46
实验二十	乳酸脱氢酶	50
实验二十一	琥珀酸脱氢酶	52
实验二十二	醛脱氢酶	53
实验二十三	细胞色素氧化酶	54
实验二十四	过氧化氢酶及过氧化物酶	56
实验二十五	发酵过程中无机磷的利用	58
实验二十六	脂肪酸的 β -氧化	60
实验二十七	氨基移换反应 (纸上层析)	63
附录一	分析天平的使用和保护	69
附录二	离心机的使用	70
附录三	光电比色计的原理使用	71
附录四	缓冲溶液及其配制	76
附录五	一些常用数据表	79
	实验室规则	82

实验一 蛋白质的颜色反应

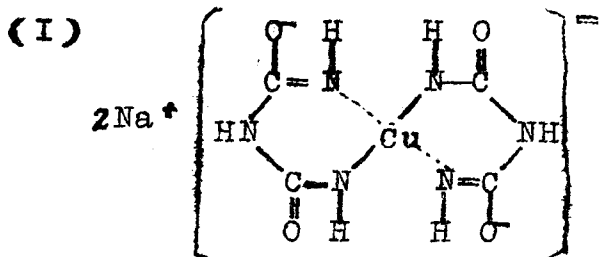
(一) 双缩脲反应

〔原理〕

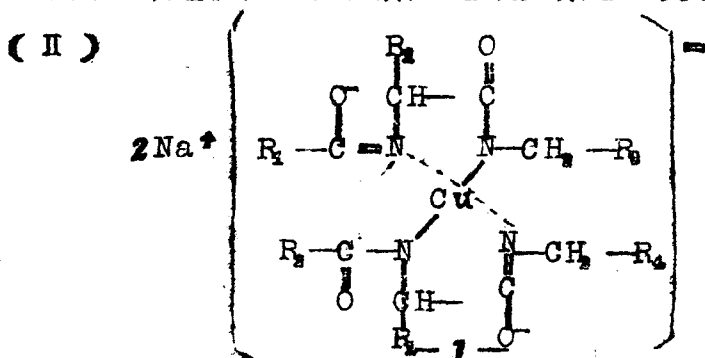
将尿素加热时，两分子尿素脱去一分子氨，综合成双缩脲。



双缩脲在碱性溶液中能与 Cu^{2+} 结合生成紫红色的复杂化合物 (I)，这一呈色反应称为双缩脲反应。



蛋白质分子中含有肽键 ($-\text{CO}-\text{NH}-$) 与双缩脲结构相似，故亦能呈双缩脲的颜色反应，形成紫红色或兰紫色的复合物 (II)。



复合物的量越少，颜色越红。

一切蛋白质都有双缩脲反应，是用来检查蛋白质存在与否的重要方法之一。但是，双缩脲反应并不是蛋白质所特有。某些别的物质也可呈双缩脲反应。

【器材】

1 试管及试管架 2 水浴锅

【试剂】

1 尿素(晶体) 2 10% NaOH

3 0.5% CuSO_4

4 1% 旦清液：取鸡旦清10ml用1%NaCl溶液稀释至100ml，必要时以棉花过滤。

【操作】

1 取尿素结晶少许(约相当于一粒黄豆大)，放于干燥试管内，用微火加热使尿素溶解。有气味，继续加热，当溶解的尿素开始硬化时，停止加热，已形成双缩脲。

冷后，加10%苛性钠液约20滴，并振荡之，再加1%硫酸铜溶液1—2滴，再振荡，观察颜色(注意硫酸铜量不可多加)。

2 取1%旦清液20滴，加10%苛性钠10滴，振荡。加1%硫酸铜1滴—2滴。摇匀。观察颜色变化。

(二) 旦白黄色反应

【原理】

绝大多数的蛋白质与浓硝酸共热时，发生黄色，此反应称为旦白黄色反应。它是含有芳香族氨基酸，特别是含有酪氨酸或色氨酸的蛋白质所特有的。此反应是硝酸将蛋白质分子中的苯核硝化，产生黄色或橙黄色硝基衍生物。苯核上含有羟基，加碱颜色变深。这可能由于

硝醌酸的生成所致。

酪氨酸及色氨酸均易呈此反应，色氨酸所呈颜色较深。此外，一些芳香族化合物，如苯酚也能发生此反应。

〔器材〕

- 1 试管及试管架； 2 水浴锅

〔试剂〕

- 1 0.1%苯酚液 2 1% 旦清液
3 浓 HNO₃ 4 10% NaOH

〔操作〕

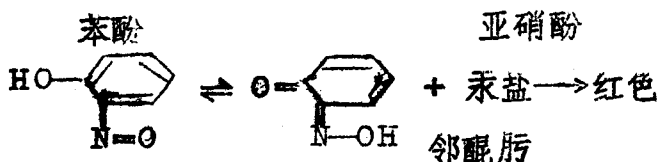
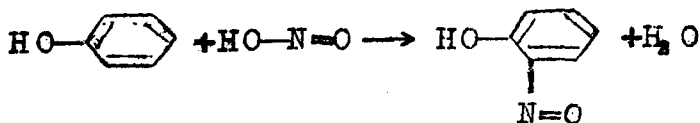
取苯酚溶液 20 滴放入试管内，加浓硝酸 2 滴，观察有无沉淀生成。放水浴锅内加热，有何变化？冷却后加 NaOH 溶液 10 滴，使呈碱性，观察现象。

取旦白质溶液 20 滴置于试管内，加浓硝酸 2 滴，重复加热的操作。

(三) 米伦 (Millon) 氏反应

〔原理〕

Millon 氏试剂为硝酸、亚硝酸、硝酸汞、亚硝酸汞之混合物。能与单酚及衍生物如酪氨酸加热产生颜色。此反应的化学过程尚未十分明了，最初产生的有色物质可能是酚之亚硝基衍生物。经变位作用，成为颜色更深的邻醌肟。最终具有稳定红色产物，成分不明。



凡含有酪氨酸的旦白质均呈此反应。

用白明胶作Millon氏反应。如白明胶很纯，则反应不出现，因为白明胶不含酪氨酸。

【器材】

1 小试管及试管架 2 滴管

【试剂】

1 1% 旦清液（不含NaCl）

2 0.5% 苯酚液 3 白明胶

4 米伦试剂：汞40克溶于比重1.42的浓硝酸60毫升中，在水浴上温热，帮助溶解。溶后，用2倍的蒸馏水稀释之。待澄清后，取出上清液使用。

【操作】

1 向试管中加苯酚液5滴及米伦试剂1滴，混匀，小心加热，颜色有何变化？

2 向试管中加旦清液5滴及米伦试剂1滴，混匀，观察有无沉淀，小心加热，观察颜色。避免加入过量的米伦试剂，因为试剂中的硝酸能与许多旦白产生黄色反应，而干扰（这是关键）。

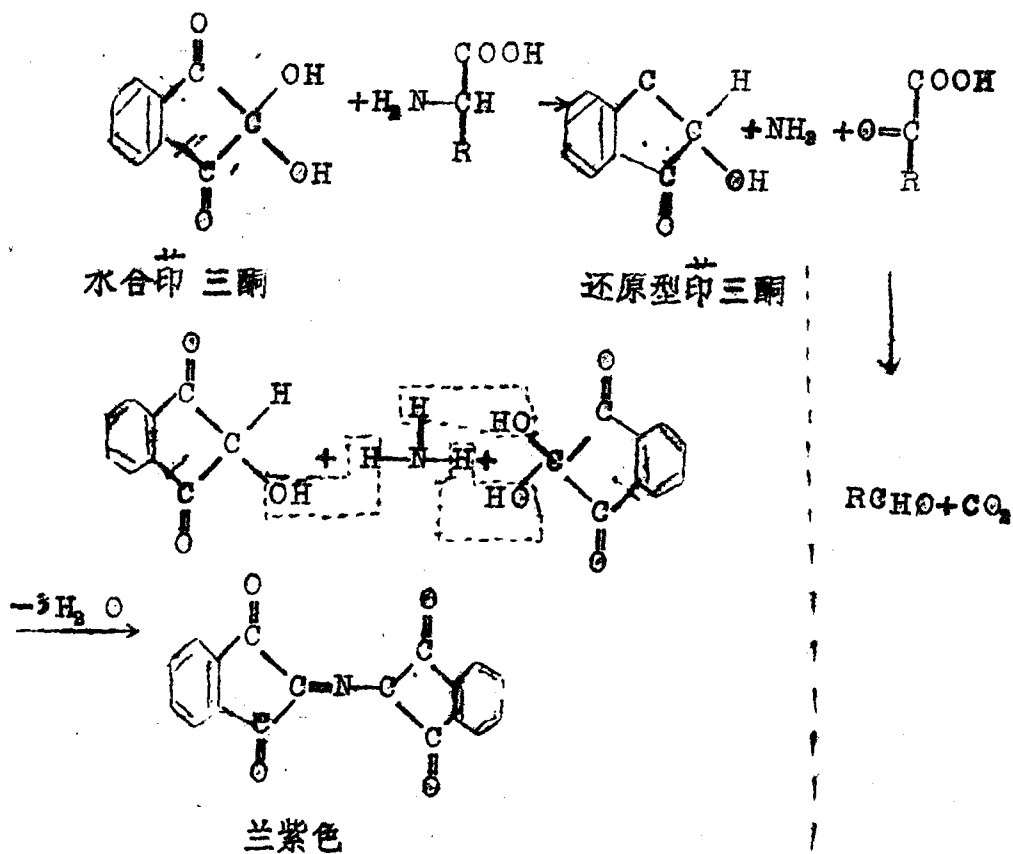
（四）茚三酮反应

【原理】

此反应是所有氨基酸共有的反应。反应十分灵敏，1:1500,000的氨基酸水溶液即能发生反应。反应在PH5-7溶液中进行最好。

氨基酸与茚三酮共热，即呈现从紫红到蓝的颜色，该反应的机制如下

脯氨酸与茚三酮反应产生不强的黄色。β-丙氨酸、氨、许多一级胺都呈正反应。



【仪器】

- 1 小试管和试管架
- 2 水浴锅

【试剂】

- 1 1% 旦清液
- 2 0.1% 水合印三酮酒精溶液：溶于水合印三酮 50mg 于 50ml 95% 乙醇中，贮于棕色瓶中，仅能保存数日。

- 3 0.1M 的甘氨酸水溶液

【操作】

1 取 1% 旦清液 5 滴置小试管中，加 0.1% 水合印三酮 2 滴，混匀，置沸水浴中 5—10 分钟，观察颜色变化。

2 取 0.1M 甘氨酸溶液 5 滴，重复以上操作，观察现象。

化
实
生

实验二 蛋白质的变性

【原理】

多数蛋白质是亲水胶体，当胶体的稳定因素（如胶体颗粒的电荷、水化层）被破坏或与某些试剂结合成不溶解的盐后，即发生变性。

（一）乙醇沉淀蛋白质

【原理】

酒精为脱水剂，能破坏蛋白质胶体颗粒的水化层而使其沉淀析出。溶液中如有少量的中性盐（如NaCl），则沉淀的形成更加迅速而完全。

【器材】

- | | |
|----------|------|
| 1 小试及试管架 | 2 滴管 |
|----------|------|

【试剂】

- | | |
|----------|-------------|
| 1 1% 蛋清液 | 2 10% NaCl液 |
| 3 95%乙醇 | 4 蒸馏水 |

【操作】

向试管中加蛋清液10滴，10% NaCl液1滴，再加入95%乙醇10滴摇匀。观察有无沉淀析出。

（二）蛋白质的加热变性

【原理】

几乎一切蛋白质都因加热而凝固变性。加热的时间，盐类的多少及氢离子浓度对蛋白质加热凝固有重要影响。

在酸性或碱性溶液内，蛋白质胶粒分别带有正或负电荷，蛋白质虽加热不凝固。若同时溶液中有足量的中性盐，也能凝固。

〔器材〕

- 1 试管及试管架 2 水浴锅

〔试剂〕

- 1 1% 鸡蛋清液 2 0.1% 醋酸液
3 10% 醋酸液 4 饱和 NaCl 液
5 10% NaOH 液

〔操作〕

- 1 取小试管 5 支，编号，按下表加入试剂：

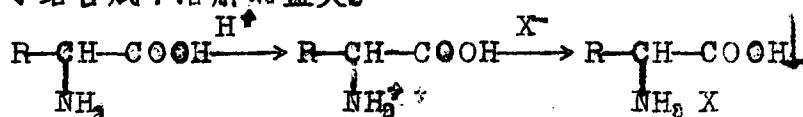
管号 \ 试剂	1% 鸡蛋清液	0.1% 醋酸液	10% 醋酸液	饱和 NaCl 液	10% NaOH 液	蒸馏水
1	10 滴	—	—	—	—	4 滴
2	10 滴	2 滴	—	—	—	2 滴
3	10 滴	—	2 滴	—	—	2 滴
4	10 滴	—	2 滴	2 滴	—	—
5	10 滴	—	—	—	2 滴	2 滴

- 2 将各管摇匀，放入沸水浴中加热 20 分钟，比较各管的沉淀情况，并解释结果。

(三) 用生物碱试剂沉淀蛋白质

〔原理〕

鞣酸、苦味酸、 $KI-HgI_2$ 、 $K_3Fe(CN)_6$ 、 $KI-BiI_3$ 等植物碱试剂，能和蛋白质结合生成沉淀。蛋白质和植物碱含有相似的含氮基团，在酸性溶液中，蛋白质分子带有正电，能与生物碱试剂的负离子结合成不溶解的盐类。



{ 器材 }

1 小试管及试管架 2 滴管

{ 试剂 }

1 1% 旦清液 2 1% 醋酸液
 3 饱和苦味酸液 4 20% 鞣酸液
 5 10% 三氯醋酸液

{ 操作 }

1 取小试管 3 支，编号，按下表加试剂：

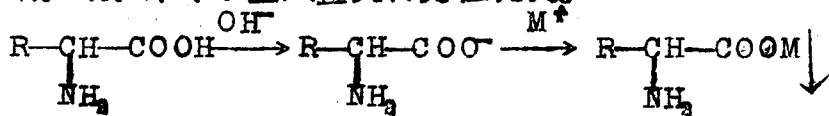
管 号	试剂	1% 旦清液	1% 醋酸	饱和 苦味酸液	20% 鞣酸液	10% 三氯醋酸液
1		10滴	2滴	2滴	/	/
2		10滴	2滴	/	2滴	/
3		10滴	2滴	/	/	2滴

2 混匀，观察各管中沉淀的形成。

(四) 重金属离子对蛋白质的变性沉淀作用

{ 原理 }

蛋白质在碱性溶液中带正电，能和带正电的重金属离子结合（铅、铜、银、汞等）生成盐类而变性沉淀。



{ 器材 }

1 小试管及试管架。 2 滴管

〔试剂〕

- | | |
|------------|------------|
| 1 1% 旦清液 | 2 0.5% 醋酸铅 |
| 3 0.5% 硫酸铜 | 4 3% 硝酸银 |
| 5 1% 硫酸 | 6 2% 氢氧化钠 |
| 7 去离子水 | |

〔操作〕

1 取小试管 4 只，编号，按下表加入试剂：

试剂 试管	1% 旦清液 (滴)	2% 氢氧化钠 (滴)	0.5% 醋酸铅 (滴)	0.5% 硫酸铜 (滴)	3% 硝酸银 (滴)	1% 硫酸 (滴)	去离子水 (滴)
1	4	2	1	/	/	/	10
2	4	2	/	1	/	/	10
3	4	/	/	1	/	2	10
4	4	2	/	/	1	/	10

2 混匀，观察四管混浊度，记录并说明。

3 在 1、2 号试管中，分别滴加过量的醋酸铅和硫酸铜，观察沉淀的溶解并解释之。

(五) 重分子酸对蛋白质的变性沉降作用

〔原理〕

蛋白质在酸性溶液中带正电，能和带负电的重分子酸根结合变性生成沉淀。

〔器材〕

- | | |
|----------|------|
| 1 试管及试管架 | 2 滴管 |
|----------|------|

〔试剂〕

- | | |
|----------|--------------------------------------|
| 1 1% 旦清液 | 2 10% Na_2WO_4 (钨酸钠) |
|----------|--------------------------------------|

3 浓硫酸

4 浓硝酸

〔操作〕

1 取小试管 3 支，编号，按下表加试剂：

试 管	试 剂	1 % 旦清液	浓硫酸	浓硝酸	10% Na ₂ WO ₄
1		10 滴	2 滴	—	—
2		10 滴	—	2 滴	—
3		10 滴	—	—	2 滴

2 观察沉淀的形成。三种酸沉淀蛋白质的原理相同否？

3 在 1、2 号试管中加过量的酸，观察沉淀溶解的情况，并加以解释。

实验三 蛋白质等电点的测定

〔原理〕

本实验利用蛋白质在等电点时溶解度最低的特性，配制不同氢离子浓度的缓冲溶液，以观察蛋白质在这些溶液中的沉淀情况，即可确定蛋白质的等电点。

此外，更为精确的方法可用等电聚焦法测其等电点。

〔器材〕

1 中试管及试管架 2 吸量管

〔试剂〕

1 酪蛋白—醋酸钠液：取纯净酪蛋白 0.25 克，盛于 50 毫升容量瓶内，加入蒸馏水约 20 毫升，并准确地加入标准的 1 N NaOH 5 毫升。当酪蛋白溶解后，准确地加入标准的 1 N 醋酸 5 毫升，加水稀释

至 50 毫升，充分摇匀。

2 0.01 N 醋酸液

3 0.1 N 醋酸液

4 1 N 醋酸液

〔操作〕

1 取干燥而直径相近的中试管 5 支，按下表准确地加入试剂：

试 剂	管号	1	2	3	4	5
	PH	3.5	4.7	4.7	5.9	5.9
蒸 馏 水 (ml)		24	—	30	15	33.8
1N 醋酸 (ml)		16	—	—	—	—
0.1N 醋酸 (ml)		—	40	10	—	—
0.01 N 醋酸 (ml)		—	—	—	25	0.62

2 在每管内各加入酪蛋白——醋酸钠液 1 ml，立即混匀，混匀后各管内溶液的 PH 如上表。

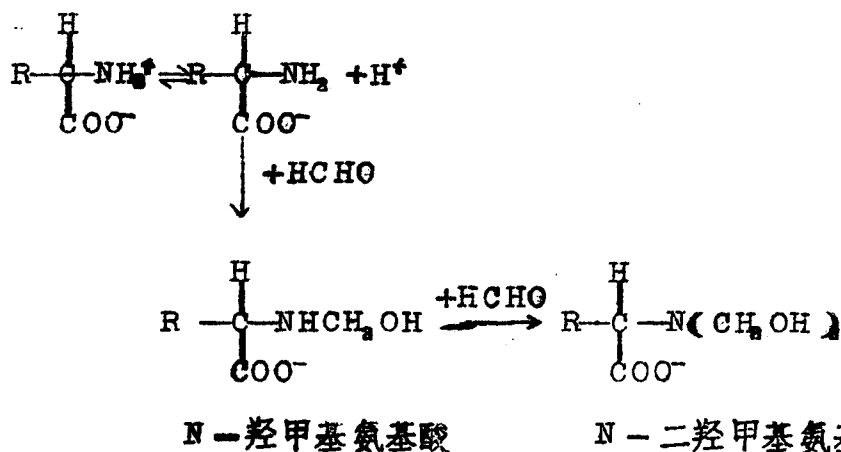
3 静置约 30 分钟，观察各管的混浊度，以 0、+、++ 表示。根据实验结果，指出那一 PH 是酪蛋白的等电点。

实验四 Sørensen 氏甲醛滴定法

〔原理〕

蛋白质和氨基酸的 $-NH_3^+$ 的 PK 值常在 9.0 以上，不能用一般酸碱指示剂（包括酚酞）作滴定测量。但可用 Sørensen 甲醛滴定法测量。

用甲醛处理氨基酸，甲醛与氨基结合。



结果使滴定曲线向酸性方向移动，移动的多少决定于溶液中的甲醛浓度。当滴定终点移至 $\text{pH} 9$ 左右时，即可用酚酞作指示剂，用碱来滴定 $-\text{NH}_3^+$ 上的 H^+ 。如蛋白质或氨基酸分子中的 $-\text{NH}_3^+$ 基数目与 $-\text{COO}^-$ 基相等，甲醛滴定所滴定的虽然是氨基，也可以说是羧基。如果 $-\text{NH}_3^+$ 基和 $-\text{COO}^-$ 基的数目不相等，甲醛滴定的结果不能代表羧基。

甲醛滴定法简单易行，但不能准确地测定蛋白质水解液中氨基数量。测定标准氨基酸时，其误差可达 10% 左右。脯氨酸与甲醛作用时，产生不安定的化合物，测定的结果偏低。酪氨酸由于含有酚基，可能使结果偏高。

【器材】

- 1 100 毫升锥形瓶；
- 2 吸量管
- 3 滴定管。

【试剂】

- 1 约 0.1N 的甘氨酸溶液；
- 2 0.1 N 的氢氧化钠标准溶液；
- 3 0.5% 酚酞酒精溶液；

4 中性甲醛溶液：取市售甲醛溶液蒸馏（或过滤）取45毫升，加0.5%酚酞指示剂3毫升，再加0.1 N氢氧化钠溶液至呈浅粉红色。使用前，重新中和至中性。

〔操作〕

取三个标有号码的100毫升锥形瓶，于第一、二号瓶内各加甘氨酸溶液2毫升，水5毫升。于第三号瓶内加入7毫升蒸馏水。

在上述三个锥形瓶内，各加中性甲醛2毫升，酚酞5滴，摇匀。然后用0.1 N NaOH溶液滴定至桃红色

计算：每毫升氨基酸溶液中含氨基氮的毫克数：
$$N \left(\frac{\text{克}}{\text{毫升}} \right) = \frac{(A - B) \times 14008}{2}$$

A：滴定样品消耗 NaOH 的毫升数

B：滴定空白消耗 NaOH 的毫升数

14008 = 1 毫升 0.1 N NaOH 溶液相当的氮毫克数。

实验五 氨基酸的分离（薄层层析法：硅胶 G）

〔原理〕

薄层层析是应用较广的一种分离分析方法。它是将吸附剂涂成薄层于玻璃板上，把需分析的样品点于薄层上，用适当的溶剂展开后达到分离目的。其分离原理主要是吸附层离的原理，即利用吸附剂对各种物质吸附能力不同，而使物质分离。

薄层层析可选择多种吸附剂，广泛地应用于生物碱、氨基酸、核酸、糖类、维生素物质的分离鉴定。本实验以硅胶 G 为吸附剂。

〔器材〕

- 1 玻璃板(7×8 cm);
- 2 毛细管(0.5mm直径);
- 3 喷雾器;
- 4 电吹风机;
- 5 研钵;
- 6 层析缸(染色缸);

〔试剂〕

- 1 溶剂系统(展开剂): 正丁醇: 冰醋酸: 水 = 4:1:2

(当天配制)

2 氨基酸溶液:

① 0.01 N 精氨酸: 称取精氨酸 174mg 溶于 10% 异丙醇溶液 10 ml 中。

② 0.01 N 丙氨酸: 称取丙氨酸 87mg 溶于 10% 异丙醇溶液 1 ml 中。

③ 将①、②两溶液各取 2 ml 混合。

3 硅胶 G;

4 1% 羧甲基纤维素溶液(CMC)。

5 0.5% 印三酮丙酮溶液: 称取印三酮 0.5g 溶于无水丙酮溶液 100ml 中。

〔操作〕

1 制板: 称取硅胶 G 3g 加 CMC 溶液 3 ml, 蒸馏水 4 ml, 在研钵中研匀, 并滴加少量 95% 乙醇, 使之气泡除尽。将此匀浆等量分别倒至两块玻璃板上, 自然坦平, 水平放置 8—12 小时。然后放入 110°C 烘箱中活化干燥 30 分钟。取出保存在干燥器中备用。

2 点样: 在薄层下端边缘 7mm 处用铅笔划一线与边平行, 作为原线。以距板左边 1.5cm 处开始, 每隔 2 cm 用毛细管蘸取①、②、③号