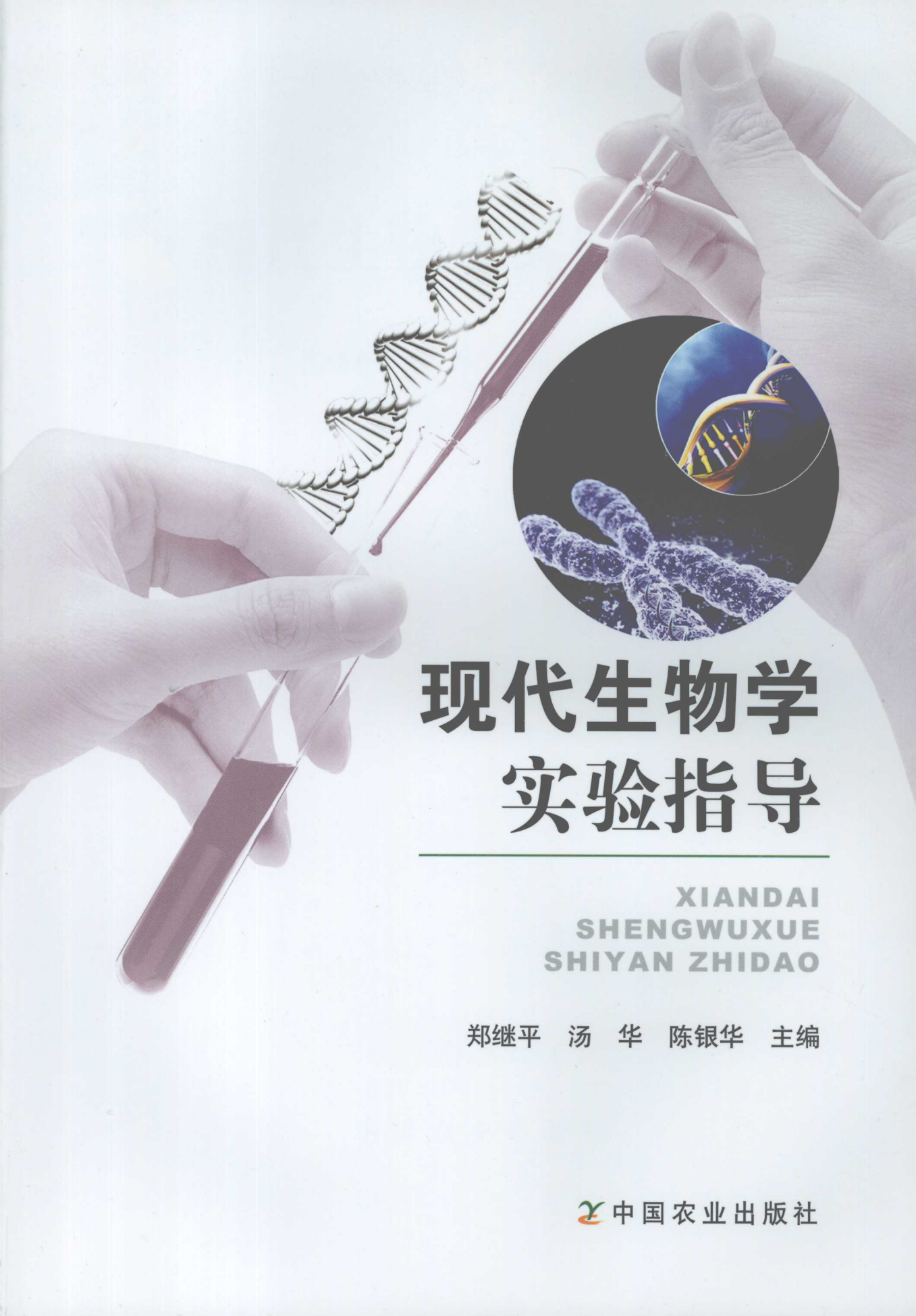




现代生物学 实验指导

XIANDAI
SHENGWUXUE
SHIYAN ZHIDAO

郑继平 汤 华 陈银华 主编

 中国农业出版社

现代生物学实验指导

郑继平 汤 华 陈银华 主编

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

现代生物学实验指导 / 郑继平, 汤华, 陈银华主编.
北京: 中国农业出版社, 2007. 5
ISBN 978-7-109-11629-0

I. 现… II. ①郑…②汤…③陈… III. 生物学-实验
IV. Q-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 061822 号

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)
(邮政编码 100026)
责任编辑 李红枫 蒋雨菲

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行
2007 年 6 月第 1 版 2007 年 6 月北京第 1 次印刷

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 16

字数: 366 千字

定价: 30.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

前 言

1953年，Watson和Crick发现了DNA双螺旋结构，奠定了现代生物学发展的基础，以此为契机，在此后的数十年间，建立了基因工程、蛋白质工程、酶工程、细胞工程、抗体工程等一系列现代生物学的代表性技术体系；以人类基因组计划和水稻基因组计划为开端，兴起了结构基因组学、功能基因组学、蛋白质组学、生物信息学、代谢组学等一系列旨在探索和揭示生命现象奥秘的前沿学科，从而将生命科学推向了整个自然科学界发展的中心与前沿位置。

为适应现代生物学发展对人才的需求，按照国家教育部的指示精神，我国大多数高校目前已设立了生物技术专业。该专业旨在培养具有坚实的现代生物科学理论基础，掌握现代生物高新技术，富有较强创新意识和实践能力的高级生物类专业人才。所设主干课程有植物生物学、动物生物学、微生物学、遗传学、细胞生物学、生物化学，分子生物学和基因工程等。在生物类专业中，实验课教学占有相当大的比重，是衡量培养计划优劣的一项重要指标。我们在教学实践中发现，由于不同课程知识点的融汇与交叉，一些实验课程间的重复现象比较严重，为此，我们组织编写本书，旨在打破原有各实验课程体系间的相互孤立状态，进行系统、合理地安排和综合，以增强学生在实验技能学习过程中的整体性和系统性。

本书共分四个部分，内容涵盖了目前生物类专业核心课程中的生物化学、遗传学、细胞生物学和分子生物学的实验教学内容。在组织编写中，我们以严谨的科学态度，兼顾教学与科学研究的特点；在内容的安排上，力求典型、实用和先进，既立足于阐述基础知识和基本概念，也注重介绍最新的研究方法；在全书的布局上，力求系统、综合和全面，既避免实验内容的重复，也避免经典实验的遗漏。

本书由多位老师合作编写，第一部分生物化学实验的第一章至第十六章由王罗霞编写，第十七章至第十九章由韦双双编写；第二部分细胞生物学实

验由汤华编写；第三部分遗传学实验由陈银华编写；第四部分分子生物学实验由郑继平编写。另外，本书的部分插图收集和文字校对工作由谢俊、郭桂英、黄玮、向福英等同志参与完成，向他们致以衷心的感谢。

本书的编写是我们所承担的海南大学《生物技术特色人才培养模式的探索研究》教研课题的一项重要内容，是对现代生物学实验教学改革的一次有益尝试。本书适合于当前生物技术、生物制药以及生物工程等生物类专业本科生的实验教学使用，也可从事生命科学研究的科研人员提供参考。

由于编者水平有限，书中难免存在不足与纰漏，敬请专家和读者给予批评指正。

编 者

2007年4月1日于海南大学

目 录

前言

第一部分 生物化学实验	1
实验一 糖的还原作用	1
实验二 植物组织中总糖和还原糖的测定	2
实验三 血液中葡萄糖含量的测定 (氧化酶法)	4
实验四 粗脂肪含量的测定 (索氏抽提法)	6
实验五 碘值的测定	8
实验六 氨基酸分离鉴定——纸层析法	10
实验七 蛋白质及氨基酸的呈色反应	13
一、双缩脲反应	14
二、茚三酮反应	15
三、黄色反应	16
实验八 蛋白质含量的测定 (考马斯亮蓝染色法)	16
实验九 血清蛋白质醋酸纤维薄膜电泳	19
实验十 总氮量的测定——微量凯氏定氮法	22
实验十一 过氧化氢酶、过氧化物酶的作用	26
实验十二 不同因素对淀粉酶活力的影响	28
实验十三 动物肝脏 DNA 的提取	31
实验十四 核酸的定量测定——二苯胺法	32
实验十五 核酸的定量测定——紫外吸收法	33
实验十六 维生素 C 含量的测定 (2,6-氯酚靛酚滴定法)	35
实验十七 兔血清免疫球蛋白 IgG 的分离纯化与鉴定	38
一、盐析法分离兔血清免疫球蛋白 IgG	38
二、蛋白质脱盐和浓缩	40
三、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定兔血清 IgG 分子量	46
四、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳银染色法	52
五、等电聚焦电泳法测定蛋白质等电点	54
六、酶联免疫吸附测定法 (ELISA)	58
实验十八 单核苷酸的离子交换柱层析分离	59
实验十九 自行设计实验	64

附录 1	生化实验室常用仪器设备的使用方法	65
附录 2	常用试剂及缓冲液的配制	73
第二部分 细胞生物学实验		82
实验一	细胞大小的测量	82
实验二	细胞膜的渗透性	85
实验三	线粒体的活体染色与观察	87
实验四	线粒体的分离制备与观察	88
实验五	植物液泡的活体染色与观察	91
实验六	叶绿体的分离与荧光观察	93
实验七	细胞内过氧化物酶的观察	96
实验八	细胞内含物的观察	98
实验九	细胞骨架的光学显微镜观察	101
实验十	植物原生质体分离和活性鉴定	104
实验十一	聚乙二醇法诱导的细胞融合	107
实验十二	细胞中 DNA 的 Feulgen 染色观察	109
实验十三	DNA 和 RNA 的甲基绿-派洛宁原位染色法	112
实验十四	植物染色体结构与 Giemsa 分带技术	113
实验十五	染色体核仁组织区的银染法	117
实验十六	细胞凋亡的检测	119
实验十七	染色体荧光原位杂交技术	122
附录 1	细胞生物学实验室守则	127
附录 2	细胞生物学染色技术	128
附录 3	生物绘图与临时装片知识	130
附录 4	实验报告的书写	131
第三部分 遗传学实验		132
实验一	有丝分裂与减数分裂的观察与比较	132
实验二	植物染色体压片法	136
实验三	植物染色体组型分析	138
实验四	质量性状的遗传分析	140
实验五	植物染色体分带技术	143
实验六	高等植物有性杂交	146
实验七	植物多倍体诱发和鉴定	147
实验八	果蝇唾腺染色体	149
实验九	果蝇的二对因子的自由组合	151
实验十	果蝇三点测交	152

实验十一	果蝇的伴性遗传实验	154
实验十二	大肠杆菌的杂交	156
实验十三	细菌转化实验	158
实验十四	链孢霉四分子分析	160
实验十五	环境因子对生物遗传物质的损伤	161
实验十六	两栖动物血细胞培养的染色体观察	162
实验十七	利用基因组原位杂交比较不同物种亲缘关系	163
实验十八	数量性状实验	165
附录 1	遗传学实验室工作规程	166
附录 2	遗传学实验基本技能	170
附录 3	χ^2 值表	177
第四部分	分子生物学实验	178
实验一	质粒 DNA 的制备与电泳检测	178
实验二	大肠杆菌感受态细胞的制备及转化	186
实验三	质粒 DNA 的酶切鉴定	190
实验四	目的 DNA 片段的回收	193
实验五	重组质粒的构建	197
实验六	重组质粒 DNA 的 PCR 鉴定	202
实验七	外源基因在大肠杆菌中诱导表达	208
实验八	蛋白质免疫印迹 (Western Blotting)	213
实验九	哺乳动物基因组 DNA 的制备	217
实验十	植物基因组 DNA 的制备	219
实验十一	植物总 RNA 的制备	222
实验十二	DNA 探针标记	225
实验十三	DNA 分子杂交 (Southern Blotting)	230
实验十四	RNA 分子杂交 (Northern Blotting)	235
实验十五	随机扩增片段多态性 (RAPD) 分析	243
参考文献		246

第一部分

生物化学实验

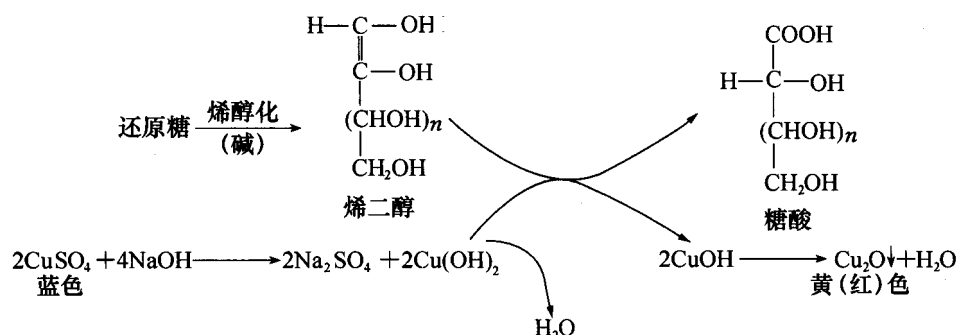
实验一 糖的还原作用

【实验目的】

掌握用糖的还原反应鉴定糖的原理和方法。

【实验原理】

斐林 (Fehling) 试剂和本尼迪特 (Benedict) 试剂都是含有 Cu^{2+} 的碱性溶液, 能够将具自由醛基和酮基的还原糖氧化为相应的糖酸, 而自身还原成 Cu^+ , 在碱性条件下生成红色或黄色的 Cu_2O (生成沉淀颗粒大的为红色, 小的为黄色)。反应式如下:



相比较而言, 本尼迪特试剂较稳定, 因此临床上较多采用, 药房出售的某些家庭用糖尿病自测试剂盒就是应用本尼迪特反应。

【材料、仪器与试剂】

(一) 仪器设备

刻度吸管 ($\times 6$); 刻度试管 ($\times 6$); 水浴锅。

(二) 试剂

1. 斐林试剂

A 液: 40 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶解于蒸馏水定容至 1 L。

B 液: 200 g 酒石酸钾钠 ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 与 150 g NaOH 溶于蒸馏水中, 并定容至 1 L。

A、B 两液分别贮存, 使用前等体积混合。

2. 本尼迪特试剂: 称取 85 g 柠檬酸钠 ($\text{NaC}_6\text{H}_3\text{O}_7 \cdot 11\text{H}_2\text{O}$) 及 50 g 无水碳酸钠, 溶解于 400 ml 蒸馏水中。另溶解 8.5 g 硫酸铜于 50 ml 热水中。将硫酸铜溶液缓缓倾入柠

檬酸钠-碳酸钠溶液中,边加边搅,如有沉淀可过滤。此混合液可长期使用。

3. 1%葡萄糖溶液:取葡萄糖 1 g,加蒸馏水溶解,定容至 100 ml。

4. 1%蔗糖溶液:取蔗糖 1 g,加蒸馏水溶解,定容至 100 ml。

5. 1%淀粉溶液:取可溶性淀粉 1 g 与少量冷蒸馏水混合成薄浆状物,然后缓缓倾入沸蒸馏水中,边加边搅,最后以蒸馏水定容至 100 ml。

【实验操作】

1. 于 3 支试管中加入斐林试剂 A 和 B 各 1 ml,混匀,分别加入 1%葡萄糖溶液、1%蔗糖溶液和 1%淀粉溶液各 1 ml,置沸水浴中加热数分钟,取出,冷却,观察现象。

2. 另取 3 支试管,分别加入 1%葡萄糖溶液、1%蔗糖溶液和 1%淀粉溶液各 1 ml,然后加入本尼迪特试剂 2 ml,置沸水浴中加热数分钟取出,冷却,观察现象,和操作 1 结果比较。

实验二 植物组织中总糖和还原糖的测定

【实验目的】

1. 掌握蒽酮法测定总糖和还原糖的基本原理和方法。

2. 学习 722 型分光光度计的原理和操作方法。

【实验原理】

总糖是指样品中的还原糖及非还原糖(如蔗糖、麦芽糖和淀粉等),利用糖的溶解度不同,可将植物样品中的单糖、双糖和多糖分别提取出来。对于非还原糖,可用酸水解法将其降解为还原性的单糖,再利用还原糖的性质进行测定,这样可分别求出总糖和还原糖的含量。由于多糖水解时,在每个单糖残基上加了一分子水,因而在计算时,需扣除加入的水量,当样品里多糖含量远大于单糖含量时,则比色测定所得总糖含量应乘以折算系数($1-18/180=0.9$),即得比较接近实际的样品中总糖含量。

蒽酮比色法是一个快速而简便的定糖方法。糖在浓硫酸作用下,可经脱水反应生成糠醛或羟甲基糠醛,生成的糠醛或羟甲基糠醛可与蒽酮($C_{14}H_{10}O$)反应生成蓝绿色糠醛衍生物,在一定范围内(溶液含糖量在 $150\mu\text{g/ml}$ 以内),颜色的深浅与糖的含量成正比,故可用于糖的定量。

该法的特点是几乎可以测定所有的碳水化合物,不但可以测定戊糖与己糖,而且可以测所有寡糖类和多糖类,其中包括淀粉、纤维素等(因为反应液中的浓硫酸可以把多糖水解成单糖而发生反应),所以用蒽酮法测出的碳水化合物含量,实际上是溶液中全部可溶性碳水化合物总量。在没有必要细致划分各种碳水化合物的情况下,用蒽酮法可以一次测出总量,省去许多麻烦,因此,有特殊的应用价值。但在测定水溶性碳水化合物时,则应注意切勿将样品的未溶解残渣加入反应液中,不然会因为细胞壁中的纤维素、半纤维素等与蒽酮试剂发生反应而增加了测定误差。此外,不同的糖类与蒽酮试剂的显色深度不同,果糖显色最深,葡萄糖次之,半乳糖、甘露糖较浅,五碳糖显色更浅,故测定糖的混合物时,常因不同糖类的比例不同造成误差,但测定单一糖类时,则可避免此种误差。

糖类与蒽酮反应生成的有色物质在可见光区的吸收峰为 630 nm, 故在此波长下进行比色。当样品中存有含有较多色氨酸的蛋白质时, 反应不稳定, 呈红色。但对于特定糖类, 反应较稳定。本法多用于测定糖原含量, 也可用于测定葡萄糖含量。

【材料、仪器与试剂】

(一) 实验材料

新鲜植物样品或烘干粉碎过的植物样品。

(二) 仪器设备

722 型分光光度计; 电子分析天平; 水浴锅; 离心机; 具塞刻度试管; 刻度吸管; 容量瓶; 漏斗; 研钵; 三角烧瓶; 量筒。

(三) 试剂

1. 蒽酮试剂: 取分析纯蒽酮 2 g, 溶于 1 000 ml 体积分数为 80% 的硫酸中, 即配即用。
2. 葡萄糖标准液 (0.1 mg/ml): 取 80 °C 下烘至恒重的葡萄糖 0.100 0 g, 加蒸馏水溶解, 定容至 1 000 ml。
3. 6 mol/L HCl 溶液。
4. 10% NaOH 溶液: 称取 10 g NaOH 固体, 溶于蒸馏水并稀释至 100 ml。
5. 甲基红指示剂: 0.1 g 甲基红溶于 250 ml 60% 乙醇中。
6. 10% Pb (Ac)₂。
7. 饱和 Na₂SO₄。

【实验操作】

1. 标准曲线的制作: 取 20 ml 刻度试管 6 支, 从 0~5 分别编号, 按下表加入溶液和水, 然后按顺序向试管内加入 4 ml 蒽酮试剂, 摇匀, 沸水浴 10 min 显色, 待冷却后以空白为参比, 620 nm 处比色。以糖含量为横坐标, 光密度为纵坐标, 绘制标准曲线, 求出标准直线方程。

2. 样品中还原糖的提取和测定: 称取植物材料。取新鲜的植物样品洗净、擦干、剪碎, 称取 3.00 g, 放入研钵中加入少量蒸馏水研磨至糊状, 转入 100 ml 三角烧瓶中, 并用约 30 ml 的蒸馏水冲洗研钵 2~3 次, 洗出液也转入三角瓶中。加 2~3 滴甲基红指示剂, 如呈红色, 可用 0.1 mol/L 的 NaOH 中和至微黄色。若用风干样品, 可称取干粉 1.00 g, 加入 100 ml 三角烧瓶中, 如显酸性, 可用上法中和。将三角烧瓶置于 50 °C 的恒温水浴中保温 30 min, 其间摇动数次, 以便将还原糖充分提取出来。对含蛋白质较多的样品, 此间可加 10% Pb (Ac)₂, 除去蛋白质, 至不再产生白色絮状沉淀时, 加饱和 Na₂SO₄ 除去多余的铅离子。30 min 后取出冷却, 转入 100 ml 容量瓶中, 定容至刻度, 摇匀后过滤, 进行还原糖的测定。

3. 样品中总糖的提取、水解和测定: 称取植物材料 3.00 g, 放入研钵中加入少量蒸馏水研磨至糊状, 转入三角烧瓶中, 并用 15 ml 蒸馏水冲洗研钵 2~3 次。再向三角烧瓶中加入 6 mol/L HCl 15 ml, 摇匀后在沸水浴中水解 30 min, 冷却后用 10% NaOH 溶液中和至中性, 然后用蒸馏水定容在 100 ml 容量瓶中, 混匀。将定容后的水解液过滤, 取滤

液 10 ml，转入另一 100 ml 容量瓶中定容，混匀，作为总糖待测液。

表 1-2-1 总糖和还原糖的测定

管号	操作	空白	标准葡萄糖浓度梯度					样 品	
		0	1	2	3	4	5	I	II
	标准葡萄糖液 (ml)		0.2	0.4	0.6	0.8	1.0		
	样品待测液 (ml)							1.0	1.0
	蒸馏水 (ml)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0	0	0
置冰水浴中 5 min									
	蒽酮试剂 (ml)								
	反应	各管混匀，沸水浴 10 分钟，自来水冷却，室温放置 10 min							
	比色	以 0 号管为空白参比，测定波长 620 nm 处的吸光度							
	记录吸光度 (A_{620})								

【结果与讨论】

按照下列公式计算还原糖和总糖的含量。

$$w(\text{还原糖}) = C_1 V_1 \times 100\% / m$$

$$w(\text{总糖}) = C_2 V_2 \times 0.9 \times 100\% / m$$

式中 w ——糖的质量分数 (%)；

C_1 ——从标准曲线上查出的还原糖质量浓度 (mg/ml)；

C_2 ——从标准曲线上查出的水解后还原糖质量浓度 (mg/ml)；

V_1 ——样品中还原糖提取液的体积 (ml)；

V_2 ——样品中总糖提取液的体积 (ml)；

m ——样品的质量 (mg)。

【注意事项】

1. 样品溶液必须透明，样品中如含有蛋白质，对实验有影响，须设法除去。
2. 要在冰浴条件下加入蒽酮，以防止先加入的各管发生颜色反应，影响平行效果。操作时要严格控制反应过程的温度和加热时间。
3. 样品液显色后若颜色很深，可将样品提取液适当稀释后再显色测定。
4. 计算总糖含量的公式，在测定干扰杂质很少、还原糖含量相对总糖含量很少时适用。

实验三 血液中葡萄糖含量的测定（氧化酶法）

【实验目的】

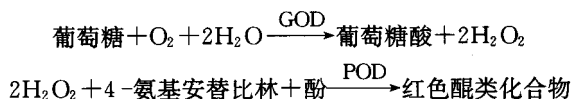
1. 了解葡萄糖氧化酶法测定血糖的原理，能进行血糖测定的操作。
2. 掌握 722 型分光光度计的原理与使用方法。

【实验原理】

葡萄糖是血液主要的糖类，因此测血糖含量就是测血液中葡萄糖的含量。正常情况下血糖浓度维持相对平衡。当摄入高糖饮食或注射葡萄糖后，或精神紧张、交感神经兴奋，肾上腺分泌增加时血糖浓度升高，称为生理性高血糖。病理性高血糖常见于胰岛素绝对或相对不足的糖尿病患者，其他如甲状腺功能亢进、肾上腺皮质功能及髓质功能亢进、腺垂体功能亢进、胰岛 α -细胞瘤等可使血糖浓度增高。当饥饿或剧烈运动、注射胰岛素或口服降血糖药过量会出现生理性低血糖。而胰岛素分泌过多、腺垂体功能减退、肾上腺皮质功能减退和甲状腺功能减退等都会导致病理性低血糖。

测定血液中葡萄糖的含量，有多种方法，目前主要有三种。一是利用葡萄糖的还原性，与碱性硫酸铜溶液共热，葡萄糖可将铜离子还原成氧化亚铜，后者又可使钼酸试剂还原成低价的钼蓝（蓝色），血糖的含量与产生的氧化亚铜成正比，氧化亚铜的量与形成的钼化合物的量成正比，可以用比色的方法进行测定。此法受血液中其他还原性物质如谷胱甘肽、Vc 等物质的影响。二是利用葡萄糖在加热的有机酸溶液中能与某些芳香族胺类如苯胺、邻甲苯胺等生成有色衍生物，可用分光光度法（比色法）进行测定。三是利用葡萄糖氧化酶对葡萄糖的氧化作用，此法特异性最高。

葡萄糖氧化酶（glucose oxidase, GOD）能将葡萄糖氧化为葡萄糖酸和过氧化氢。后者在过氧化物酶（peroxidase, POD）作用下，分解为水和氧的同时将无色的 4-氨基安替比林与酚氧化缩合生成红色的醌类化合物，即 Trinder 反应。其颜色的深浅在一定范围内与葡萄糖浓度成正比，在 505 nm 波长处测定吸光度，与标准管比较可计算出血糖的浓度。反应式如下：

**【材料、仪器与试剂】****（一）实验材料**

新鲜血清。

（二）仪器设备

试管；吸管；试管架；恒温水浴箱；722 分光光度计。

（三）试剂

1. 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液（pH 7.0）：称取无水磷酸氢二钠 8.67 g 及无水磷酸二氢钾 5.3 g 溶于 800 ml 蒸馏水中，用 1 mol/L 氢氧化钠（或 1 mol/L 盐酸）调节 pH 至 7.0，然后用蒸馏水稀释至 1 L。

2. 酶试剂：称取过氧化物酶 1 200 U，葡萄糖氧化酶 1 200 U，4-氨基安替比林 10 mg，叠氮钠 100 mg，溶于上述磷酸盐缓冲液 80 ml 中，用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0，加磷酸缓冲液至 100 ml。置冰箱保存，4℃可稳定 3 个月。

3. 酚溶液：称取重蒸馏酚 100 mg 溶于 100 ml 蒸馏水中（酚在空气中易氧化成红色，可先配成 500 g/L 的溶液，贮存于棕色瓶中，用时稀释），用棕色瓶贮存。

4. 酶酚混合试剂：取上述酶试剂与酚溶液等量混合，4℃可以存放一个月。

5. 12 mmol/L 苯甲酸溶液：溶解苯甲酸 1.4 g 于蒸馏水约 800 ml 中，加温助溶，冷却后加蒸馏水至 1 L。

6. 葡萄糖标准贮存液 (100 mmol/L)：称取已干燥恒重的无水葡萄糖 1.802 g，溶于 12 mmol/L 苯甲酸溶液约 70 ml 中，并移入 100 ml 容量瓶内，再以 12 mmol/L 苯甲酸溶液加至 100 ml。

7. 葡萄糖标准应用液 (5 mmol/L)：吸取葡萄糖标准贮存液 5.0 ml 于 100 ml 容量瓶中，加 12 mmol/L 苯甲酸溶液至刻度。

【实验操作】

取 3 支试管，编号，按下表操作：

表 1-3-1 血糖测定操作步骤

加入物 (ml)	空白管	标准管	测定管
血清	—	—	0.02
葡萄糖标准液	—	0.02	—
蒸馏水	0.02	—	—
酶酚混合液	3.0	3.0	3.0

混匀，置 37℃ 水浴中保温 15 min，在波长 505 nm 处比色，以空白管调零，读取标准管及测定管吸光度。

【结果与讨论】

1. 计算。

$$\text{血清葡萄糖 (mmol/L)} = \frac{\text{标准管吸光度}}{\text{测定管吸光度}} \times 5$$

正常参考范围：人血糖浓度 3.9~6.1 mmol/L。

2. 思考题。

(1) 血糖有哪些来源和去路，机体是如何调节血糖浓度恒定的？

(2) 酶试剂为什么要用磷酸缓冲液配制，用蒸馏水是否可以？为什么？

【注意事项】

防止阳光对试剂直接照射。

实验四 粗脂肪含量的测定（索氏抽提法）

【实验目的】

学习索氏提取法测定粗脂肪含量的原理及方法。

【实验原理】

脂肪广泛存在于油料植物种子和果实中，测定脂肪的含量，可以鉴别其品质的优劣，也是油料作物选种和种质资源调查的常规测定项目。

所谓粗脂肪，是脂肪、游离脂肪酸、蜡、磷脂、固醇及色素等脂溶性物质的总称。脂

肪不溶于水，易溶于有机溶剂（如石油醚）。利用这一特性，选用有机溶剂直接浸提出样品中的脂肪进行测定。具体的实验操作粗脂肪的提取，一般采用索氏脂肪提取器。

索氏（soxhlet）脂肪提取器为一回馏装置，由浸提管、小烧瓶及冷凝管三者连接而成，各部分连接处要严密不能漏气。浸提管两侧分别有虹吸管及通气管，盛有样品的脱脂滤纸斗（包）放在浸提管内。溶剂（如乙醚、石油醚等）盛于小烧瓶中，加热后，溶剂蒸气经通气管至冷凝管，冷凝之溶剂滴入浸提管，浸提样品。浸提管内溶剂愈积愈多，当液面达到一定高度，溶剂及溶于溶剂中的粗脂肪即经虹吸管流入小烧瓶。流入小烧瓶的溶剂由于受热而气化，气体至冷凝管又冷凝而滴入浸提管内，如此反复提取回馏，即将样品中的粗脂肪提尽并带到小烧瓶中。最后，将小烧瓶中的溶剂蒸去，烘干，小烧瓶增加之重量，即样品中粗脂肪含量。

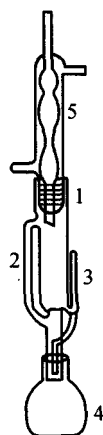


图 1-4-1 索氏脂肪提取器

1. 浸提管 2. 通气管 3. 虹吸管
4. 小烧瓶 5. 冷凝管

（引自王秀奇等编《基础生物化学实验》，高等教育出版社，2003）

粗脂肪含量的计算方法有残余法和油重法，前者是计算回流前后样品包质量的减少量，后者是计算小烧瓶质量的增加量。后者测定结果准确、稳定，但费时；前者速度快，几个样品可共用一套装置，适用于大批样品的分析。

【材料、仪器与试剂】

（一）实验材料

各种动、植物材料。

（二）仪器设备

索氏提取器（一套）；烧杯；干燥器；脱脂滤纸；镊子；分析天平；烘箱；恒温水浴锅；脱脂棉；铁架台；橡皮管；万能夹；电吹风。

（三）试剂

无水乙醚或低沸点石油醚（分析纯，沸程 30~60℃）。

【实验操作】

1. 将洗净、晾干的材料放在 80~100℃烘箱中烘 4 小时。待冷却后，置于研钵中研磨细，过 40 目筛，准确称取 1 g 样品（精确到 0.001 g，对于含脂量较低的样品，可适当增加取样量），用脱脂滤纸包住用丝线扎好，勿让样品漏出。或用特制的滤纸斗装样品后，斗口用脱脂棉塞好，用长镊子放入索氏提取器的提取管内。

2. 洗净索氏提取瓶，在 105℃烘箱内烘干至恒重，记录重量。将石油醚（或乙醚）加到提取瓶内约为瓶容积的 1/2~2/3。把提取器各部分连接后，接口处不能漏气。用 70~80℃恒温水浴加热提取瓶，开通冷却水，调节水温使流速保持 120~150 滴/min 或每小时回流 3~5 次，使抽提进行 3 h 左右（对含脂量较高的样品，可适当增加回流时间），直至抽提管内的石油醚（或乙醚）用滤纸检验无油迹为止。此时表示提取完全。

3. 提取完毕, 取出滤纸包, 再回馏一次, 洗涤提取管。再继续蒸馏, 当提取管中的石油醚液面接近虹吸管口而未流入提取瓶时, 倒出石油醚, 回收。若提取瓶中仍有石油醚, 继续蒸馏, 直至提取瓶中石油醚完全蒸完。取下提取瓶, 用吹风机将瓶中残留乙醚吹尽, 洗净瓶的外壁, 放入 105 °C 烘箱中烘干至恒重, 记录重量, 由小烧瓶增加之重量可计算出样品的脂肪含量。

4. 按同法, 用不包样品的滤纸包做空白测定。

测定脂肪后, 小烧瓶需先用 2% 氢氧化钠酒精浸泡, 再用肥皂洗净烘干保存。

【结果与讨论】

1. 计算。

$$\text{粗脂肪含量} = \frac{\text{回流后小烧瓶重量} - \text{回流前小烧瓶重量}}{\text{样品重量}} \times 100\%$$

2. 思考题。

(1) 索氏提取法提取的为什么是粗脂肪?

(2) 做好本实验应注意哪些事项?

(3) 如果所取样品未烘干至恒重, 那么实验中称得粗脂肪重与滤纸包内容物重之和是否与所取样品重量相等? 为什么?

【注意事项】

1. 本法采用沸点低于 60 °C 的有机溶剂, 不能提取出样品中结合状态的脂类, 故此法又称为游离脂类定量测定法。

2. 待测样品若是液体, 应将一定体积的样品滴在脱脂滤纸上在 60~80 °C 烘箱中烘干后放入提取管内。

3. 进行本实验时应切实注意防火, 乙醚和石油醚皆为易燃品, 切忌明火加热, 同时要注意提取器各连接处是否漏气以及冷凝管冷凝效果是否良好, 以免大量乙醚蒸气外逸。

4. 在整个操作过程中, 应保持称量瓶清洁。

实验五 碘值的测定

【实验目的】

掌握测定碘值的原理与方法。

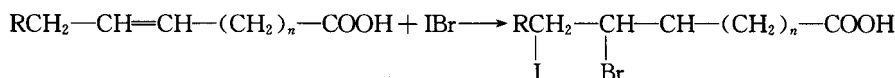
【实验原理】

油脂分子中存在饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸, 由于许多不饱和脂肪酸是人和哺乳动物的必需脂肪酸, 因此脂肪酸含量的比例和组成种类直接影响到油脂的品质。不饱和脂肪酸碳链上有不饱和键, 可以吸收卤素 (Cl_2 、 Br_2 或 I_2), 不饱和键数目越多, 吸收的卤素量也越多。每 100 g 脂肪, 在一定条件下, 所吸收的碘的克数, 设为该脂肪的碘值, 即碘值愈高, 不饱和脂肪酸的含量愈高。碘值是检定和鉴别油脂的一个重要常数, 可以用来推算油、脂的定量组成。

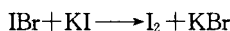
由于碘和脂肪的加成作用很慢, 本实验采用汉诺斯 (Hanus) 溶液, 它由碘与溴相混

合产生 IBr，溴化碘更易与脂肪起加成作用，该溶液中加入冰醋酸，可使溶液更加稳定，反应过程如下：

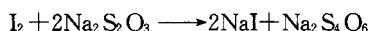
加成作用：



剩余溴化碘中碘的释放：



用硫代硫酸钠滴定释放出来的碘：



【材料、仪器与试剂】

(一) 实验材料

花生油和猪油，或其他各种油脂。

(二) 仪器设备

碘量瓶 (250~300 ml)；量筒；滴定管 (棕色)；吸量管；滴管；分析天平。

(三) 试剂

1. 汉诺斯 (Hanus) 溶液：取 12.2 g 碘，放入 1500 ml 锥形瓶内，徐徐加入 1000 ml 冰醋酸 (99.5%)，边加边摇，同时略加温热，使碘溶解。冷却后，加溴约 3 ml。贮于棕色瓶中。注：所用冰醋酸须为高纯度，不能含有还原性物质，可取 2 ml 冰醋酸加少许重铬酸钾及硫酸水浴加热，不呈绿色者为宜。

2. 四氯化碳或氯仿。

3. 1% 淀粉溶液 (溶于饱和氯化钠溶液中)。

4. 10% 碘化钾溶液。

5. 0.1 mol/L 标准硫代硫酸钠溶液：将结晶硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 25 g 溶在经煮沸后冷却的蒸馏水中 (无 CO_2 存在)，添加硼砂 7.6 g 或氢氧化钠 1.6 g (硫代硫酸钠溶液在 pH 9~10 最稳定)。稀释到 1000 ml，用标准 0.1 mol/L 碘酸钾溶液标定后贮于棕色瓶中。

【实验操作】

1. 称样：准确称取 0.3~0.4 g 花生油和 0.5 g 猪油分别放入两只干燥的碘量瓶中，第三只碘量瓶不加样品作为空白。三只碘量瓶中各加入 10 ml 四氯化碳轻轻摇动，使油全部溶解。

2. 加汉诺斯溶液：每只碘量瓶中各准确加入 25 ml，勿使溶液接触瓶颈。塞好玻璃塞，在玻璃塞与瓶口之间加数滴 10% 碘化钾溶液封闭缝隙，以防止碘升华渗出，造成测定误差，在 20~30 °C 暗处放置 30 min，并不时摇动。

3. 使过剩的 IBr 出 I_2 ：放置 30 min 后，小心打开瓶塞，使塞旁溶液流入瓶内，切勿丢失，由瓶口边缘加入 10% 碘化钾 10 ml，用 50 ml 蒸馏水冲洗瓶塞与瓶颈。

4. 用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 滴定释放的 I_2 ：用 0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液迅速滴定至瓶内溶液呈浅黄色，加入 1% 淀粉约 1 ml，继续滴定，将近终点时，用力振荡，使碘由四氯化碳全部进入水溶液内。再滴至蓝色消失为止，即达到滴定终点。