

SHENGWU HUAXUE SHIYAN

高等学校教材

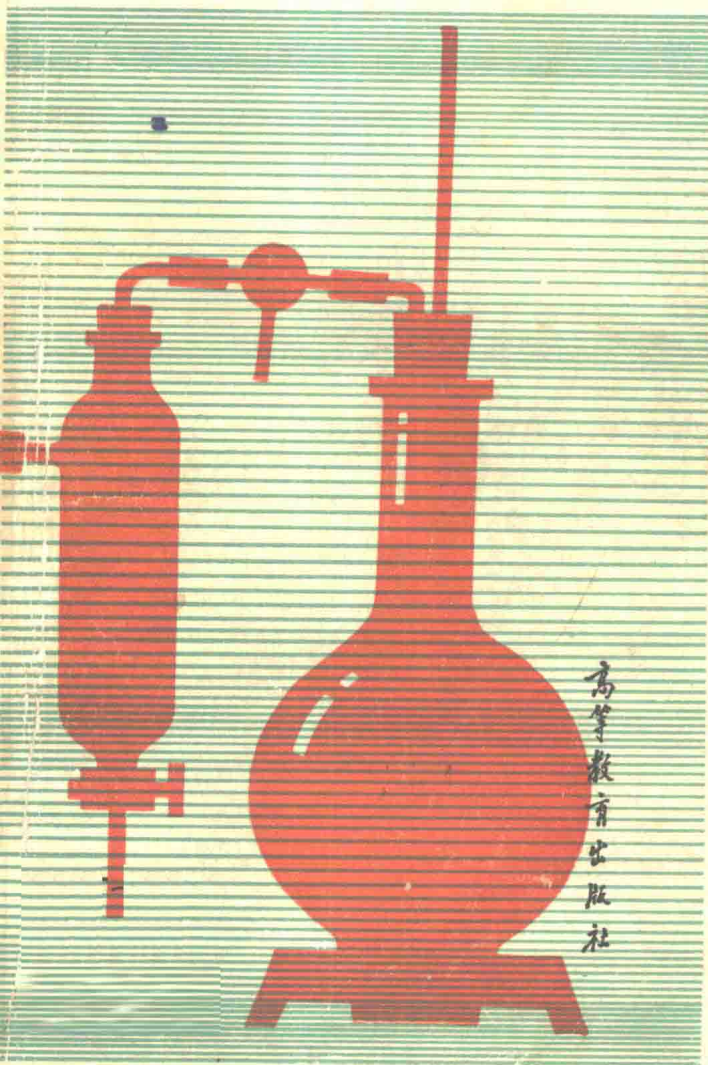
生物化学实验

〔第二版〕

南京大学生物化学系

袁玉荪 朱婉华 陈钧辉 编

高等教育出版社



高等学校教材

生物化学实验

(第二版)

袁玉荪 朱婉华 陈钧辉 编

高等教育出版社

高等学校教材
生物化学实验

(第 二 版)

袁玉荪 朱婉华 陈钧辉 编

*

高等教育出版社出版

新华书店北京发行所发行

国防工业出版社印刷厂印装

*

开本787×1092 1/32 印张 7.625 字数 164 000

1979年5月第1版 1988年3月第2版 1988年3月第1次印刷

印数 0 001—6 140

ISBN 7-04-000242-6/Q·17

定价 1.30元

再 版 前 言

本书自 1979 年出版以来,受到许多高等院校和研究单位的欢迎,同时也收到了不少宝贵意见。为此,我们在本书使用数年的基础上进行了修订。在修订过程中,删去了一些结果不明显的实验,如脂肪酸 β -氧化;补充了一些新技术,如固相酶技术等;增加了一些生物化学制备方面的实验,如 5'-核苷酸的制备,胰糜蛋白酶的制备等;另外对同一类物质的测定和分离分析方法选用几种不同的实验方法供读者选用。全书共有 72 个实验。

由于我们水平所限,书中缺点和错误仍属难免,敬请读者批评指正。

在修订过程中,朱长生、张太平和荣翠琴等同志参与部分工作,在此表示感谢。

编 者

1986 年 5 月

前 言

近年来,由于生物化学实验技术发展较快,许多院校对生物化学实验教材的需要又较迫切,因此,我们将使用数年的生物化学实验讲义加以修改充实,并配合郑集教授编著的《普通生物化学》编成此书,供有关院校生物化学实验教学之用。

本书共有糖、脂、蛋白质、核酸、酶、维生素、激素、生物氧化和物质代谢等方面的实验 60 个,其中既有与《普通生物化学》相配合、印证理论的实验,又有一些常用的提取分离、定性、定量实验。如就方法学而言,则既有经典方法,如血糖定量、粗脂肪测定、克氏定氮、纸层析、纸电泳法等等,亦有近年广泛应用的 DEAE-纤维素薄板层析、尼龙 66 薄膜层析、各种凝胶电泳和免疫电泳等新方法。每一实验都分原理、试剂和操作三部分阐述,对需要特别注意或解释之处,便分别加注说明,帮助学生学习和减少错误。

本书内容较多,并且还有一些较大型的实验,主要是出于以下两点考虑:① 可供不同专业选做,如生化专业可多做一些;② 各校实验室条件不同,可根据具体条件选做。

由于水平所限,本书的缺点错误在所难免,希望读者批评指正。

在编写过程中,承我室朱长生、张太平、张国保三位同志以及进修教师葛辉同志大力协助。生物系胡蓓蒂同志绘制全部插图,在此一并致谢。

南京大学生物化学教研室

袁玉荪、朱婉华、陈钧辉

目 录

实验一	糖的颜色反应	1
实验二	糖的还原作用	4
实验三	血糖定量测定(Folin-Wu 法)	5
实验四	血糖定量测定(Folin-Malmros 法)	9
实验五	蒽酮比色定糖法	13
实验六	多糖的试验	15
实验七	肝素钠的定量测定	17
实验八	糖的旋光性和变旋现象	20
实验九	脂肪的组成	23
实验十	卵磷脂的提取和鉴定	26
✓实验十一	粗脂肪的定量(Soxhlet 提取法)	27
实验十二	碘价的测定(Hanus 法)	31
实验十三	皂化价的测定	34
实验十四	酸价的测定	36
实验十五	脂肪乙酰价的测定	38
✓实验十六	血清胆固醇的定量测定(磷硫铁法)	40
✓实验十七	血清总胆固醇的测定(邻苯二甲醛法)	42
✓实验十八	血清甘油三酯简易测定法	44
实验十九	蛋白质的颜色反应	46
实验二十	蛋白质的沉淀反应	52
实验二十一	微量克氏(Kjeldahl)定氮法	54
实验二十二	非蛋白氮(NPN)的测定	62

实验二十三	甲醛滴定法·····	65
实验二十四	双缩脲法测定蛋白质浓度·····	67
实验二十五	福林(Folin)-酚试剂法测定蛋白质浓度·····	69
实验二十六	紫外光吸收法测定蛋白质浓度·····	70
实验二十七	醋酸纤维薄膜电泳法分离血清蛋白质·····	72
实验二十八	血清糖蛋白醋酸纤维薄膜电泳·····	75
实验二十九	聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离血清蛋白 质(核黄素-TEMED 聚合系统) ·····	79
实验三十	聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离血清蛋白 质(过硫酸铵-TEMED 聚合系统) ·····	85
实验三十一	聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳·····	88
实验三十二	聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 LDH 同 工酶·····	92
实验三十三	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定 蛋白质分子量·····	96
实验三十四	用等电聚焦电泳法测定蛋白质等电 点·····	99
实验三十五	对流免疫电泳法测定胎儿甲种蛋白质·····	102
实验三十六	火箭免疫电泳法·····	105
实验三十七	尿素对蛋白质的变性作用·····	107
实验三十八	氨基酸纸层析法·····	111
实验三十九	氨基酸微晶纤维素薄板层析法·····	115
实验四十	DNP-氨基酸的制备和鉴定 ·····	118
实验四十一	肽的顺序分析(PTH 法) ·····	123
实验四十二	核酸的定量测定(定磷法)·····	127
实验四十三	RNA 的定量测定(苔黑酚法) ·····	130

实验四十四	5'-核苷酸的定量测定(过碘酸氧化法)	132
实验四十五	DNA 的定量测定(二苯胺法)	136
实验四十六	DEAE-纤维素薄板层析法测定核苷酸	138
实验四十七	腺苷三磷酸的定量测定(纸电泳法)	140
实验四十八	核酸的酶法降解以及葡聚糖凝胶过滤法制备 5'-单核苷酸	144
实验四十九	固定化 5'-磷酸二酯酶的制备及其在分离核苷酸中的应用	146
实验五十	从肝脏中提取 DNA	153
实验五十一	酵母 RNA 的提取	156
实验五十二	底物浓度对酶促反应速度的影响(米氏常数的测定)	158
实验五十三	胆碱酯酶的米氏常数测定	163
实验五十四	用正交法测定几种因素对酶活力的影响	167
实验五十五	醇脱氢酶的提纯	171
实验五十六	醇脱氢酶的专一性	176
实验五十七	用琼脂糖凝胶电泳法分离乳酸脱氢酶同工酶	178
实验五十八	溶菌酶的提纯结晶和活力测定	182
实验五十九	猪胰糜蛋白酶的制备和纯度鉴定	185
实验六十	激活剂和抑制剂对酶活力的影响	188
实验六十一	尿中 17-羟皮质类固醇的测定(Porter-Silber 法)	190

实验六十二	维生素A的定性测定·····	193
实验六十三	维生素B ₁ 的定性测定·····	194
实验六十四	维生素C的定量测定(2,6-二氯酚 靛酚滴定法) ·····	196
实验六十五	华氏(Warburg)呼吸仪瓶常数的测 定·····	200
实验六十六	L-谷氨酸的酶促脱羧作用(测压法 测定L-谷氨酸)·····	203
实验六十七	发酵过程中无机磷的被利用和 ATP的生成(ATP的生物合成) ·····	207
实验六十八	过氧化氢酶的作用·····	210
实验六十九	过氧化物酶的作用·····	211
实验七十	细胞色素氧化酶的作用·····	212
实验七十一	乳酸脱氢酶及其辅酶的作用·····	214
实验七十二	血清转氨酶测定——赖氏 (Reitman-Frankel)法 ·····	217

实验一 糖的颜色反应

一、莫氏(Molisch)试验^①

原理 糖经浓无机酸(硫酸、盐酸)脱水产生糠醛或糠醛衍生物,它们在浓无机酸作用下,能与 α -萘酚^②生成紫红色缩合物。

实验材料与仪器

棉花。滤纸。

吸管 1 ml($\times 4$)、2 ml($\times 1$)。

试管 1.5 $\times$ 15 cm($\times 4$)。

试剂

1. 莫氏试剂:称取 α -萘酚 5 g,溶于 95%酒精并用此酒精稀释至 100 ml。此试剂需新鲜配制,并贮于棕色瓶中。

2. 1%蔗糖溶液:称取蔗糖 1 g,溶于 100 ml 蒸馏水。

3. 1%葡萄糖溶液:称取葡萄糖 1 g,溶于 100 ml 蒸馏水。

4. 1%淀粉溶液:将 1 g 可溶性淀粉与少量冷蒸馏水混成薄浆状物,然后缓缓倾入沸蒸馏水中,边加边搅,最后以沸蒸馏水稀释至 100 ml。

操作 于 4 支试管中,分别加入 1 ml 1%葡萄糖溶液,

^① 一些非糖物质(如糠醛、糖醛酸等)亦呈阳性反应。此外,样液中如含高浓度有机化合物,将因浓硫酸的焦化作用,而出现红色,故试样浓度不宜过高。

^② 亦可用麝香草酚或其他苯酚化合物代替 α -萘酚。麝香草酚的优点是溶液比较稳定,且灵敏度与萘酚一样。

1%蔗糖溶液, 1%淀粉溶液和少许纤维素(棉花或滤纸浸在1 ml 水中)然后各加莫氏试剂2滴^①, 摇匀, 将试管倾斜, 沿管壁慢慢加入浓硫酸1.5 ml(切勿振摇!), 硫酸层沉于试管底部与糖溶液分成两层。观察液面交界处有无紫红色环出现。

二、塞氏(Seliwanoff)试验

原理 酮糖在浓酸的作用下, 脱水生成5-羟甲基糠醛, 后者与间苯二酚作用, 呈红色反应; 有时亦同时产生棕色沉淀, 此沉淀溶于乙醇, 成鲜红色溶液^②。

仪器

吸管 0.5 ml($\times 3$)、5 ml($\times 1$)。

试管 1.5 $\times$ 15 cm($\times 3$)。

水浴锅。

试剂

1. 塞氏试剂: 溶50 mg 间苯二酚于100 ml 盐酸^③中($H_2O:HCl=2:1 V/V$)临用时配制。

2. 1%果糖溶液: 称取果糖1 g, 溶于蒸馏水定容至100 ml。

3. 1%葡萄糖溶液: 见试验一。

4. 1%蔗糖溶液: 见试验一。

① 莫氏试剂应直接滴入试液中, 勿使试剂接触试管壁, 否则试剂会与硫酸接触生成绿色而掩盖紫色环。

② 在此实验条件下, 蔗糖有可能水解成果糖与葡萄糖, 而呈阳性反应。葡萄糖与麦芽糖亦呈阳性反应, 但呈色反应的速度较酮糖缓慢。果糖的红色出现及沉淀的产生, 应在加热后20—30秒内, 生成的沉淀必须能溶于乙醇并成红色溶液。

③ 盐酸的浓度不宜超过12%, 因在12%的盐酸中最宜生成糠醛或其衍生物。

操作 于3支试管中分别加入1%葡萄糖溶液,1%蔗糖溶液或1%果糖溶液0.5 ml,各加塞氏试剂2.5 ml,摇匀,同时置沸水浴内。比较各管颜色变化及红色出现的先后次序。

三、杜氏(Tollen)试验

原理 戊糖在浓酸溶液中脱水生成糠醛,后者与间苯三酚结合成深红色物质。

本试验虽常用以鉴定戊糖,但并非戊糖的特有反应。果糖、半乳糖和糖醛酸等都呈阳性反应。戊糖反应最快,通常在45秒内即产生深红色沉淀。

仪器

吸管 1 ml($\times 3$)。

试管 1.5 $\times$ 15 cm($\times 3$)。

水浴锅。

试剂

1. 杜氏试剂:2%间苯三酚乙醇(95%)溶液3 ml,缓缓加入浓盐酸15 ml及蒸馏水9 ml即得。临用时配制。

2. 1%阿拉伯糖溶液:称取阿拉伯糖1 g,溶于100 ml蒸馏水即成。

3. 1%葡萄糖溶液:见试验一。

4. 1%半乳糖溶液:溶1 g半乳糖于100 ml蒸馏水即成。

操作 于3支试管中各加杜氏试剂1 ml,再分别加1滴1%葡萄糖溶液,1%半乳糖或1%阿拉伯糖溶液,混匀。将各试管同时放入沸水浴中,观察颜色的变化,并记录颜色变化的时间。

实验二 糖的还原作用

原理 斐林(Fehling)试剂和班乃德(Benedict)试剂均为含 Cu^{2+} 的碱性溶液,能使具有自由醛基或酮基的糖氧化,其本身则被还原成红色或黄色的 Cu_2O ①。此法常用作还原糖的定性或定量测定。

目前临床上多用班乃德法,因此法具有:①试剂稳定,不需临用时配制;②不因氯仿的存在而被干扰;③肌酐或肌酸等物质所产生的干扰程度远较斐林试剂小等优点。

仪器

吸管 1 ml($\times 5$)、2 ml($\times 1$)。

试管 $1.5 \times 15 \text{ cm}$ ($\times 6$)。

水浴锅。

试剂

1. 斐林试剂

试剂 A:将 34.5 g 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$)溶于 500 ml 蒸馏水中。

试剂 B:将 125 g 氢氧化钠和 137 g 酒石酸钾钠溶于 500 ml 蒸馏水中。

临用时将试剂 A 与 B 等量混合。

2. 班乃德试剂:溶 85 g 柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 11 \text{ H}_2\text{O}$)及 50 g 无水碳酸钠于 400 ml 水中。另溶 8.5 g 硫酸铜于 50 ml

① 由于沉淀速度不同,形成的颗粒大小不同,颗粒大的为红色,小的为黄色。

热水。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^①。

3. 1%淀粉溶液:见实验一。

4. 1%蔗糖溶液^②:见实验一。

5. 1%葡萄糖溶液:见实验一。

操作

于3支试管中各加入斐林试剂A和B 1 ml,混匀,分别加入1%葡萄糖溶液、1%蔗糖溶液和1%淀粉液 1 ml,置沸水浴中加热数分钟,取出,冷却,观察各管的变化。

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 1 ml,然后每管加入班乃德试剂 2 ml,置沸水浴中加热数分钟,取出,冷却,和上面结果比较。

实验三 血糖定量测定(Folin-Wu法)

原理 无蛋白血滤液中的葡萄糖与碱性硫酸铜溶液共热, Cu^{2+} 即被血滤液中的葡萄糖还原成 Cu^+ (Cu_2O), Cu_2O 又使钼酸试剂还原成低价的蓝色钼化合物。血滤液的糖含量和产生的 Cu_2O 量成正比, Cu_2O 的量与形成钼化合物的量成正比,可用比色法测定。

实验材料与仪器

① 如因存放较久而产生沉淀,可取上清液使用,不必重新配制。存放较久的班乃德试剂较新配制的更好。

② 所用蔗糖应为C.P.以上规格,且应事先以班乃德试剂检验合格再用,否则将因药品不纯,或部分分解而有还原性。

全血。滤纸。

72 型(或721 型)分光光度计。

血糖管 25 ml($\times 3$)。

奥氏吸管 1 ml($\times 1$)、2 ml($\times 1$)。

吸管 2 ml($\times 3$)、10 ml($\times 1$)、5 ml($\times 4$)。

锥形瓶 20 ml($\times 1$)。

表面皿 ϕ 6 cm($\times 1$)。

漏斗 ϕ 5 cm($\times 1$)。

水浴锅。

电炉(或煤气灯)。

试剂

1. 标准葡萄糖溶液

(1) 1%葡萄糖母液:称取 1.000 g 葡萄糖(A.R.), 溶于蒸馏水, 并稀释至 100 ml。

(2) 葡萄糖标准液:取 1.0 ml 母液置 100 ml 容量瓶内, 加蒸馏水至刻度。

2. 碱性硫酸铜溶液

A 液: 无水碳酸钠 35 g, 酒石酸钠 13 g 及碳酸氢钠 11 g 溶于蒸馏水后, 稀释至约 700 ml, 待溶液清晰后再稀释至 1000ml。

B液: 晶体硫酸铜 5 g, 溶于蒸馏水并稀释至 100 ml, 加浓硫酸数滴作稳定剂。

临用时, 取A液 25 ml, B液 5 ml, 混合后, 再加A液至 50 ml, 摇匀。此混合液置冰箱内可保存数日, 如暴露于阳光下, 数小时即失效。

3. 酸性钼酸盐溶液: 称取钼酸钠 600 g, 置烧杯内, 加入

少量蒸馏水,溶解后倾入 2000 ml 容量瓶中,加蒸馏水至刻度,摇匀,倾入另一较大的试剂瓶中,加溴水 0.5 ml,摇匀,静置数小时。取上清液 500 ml,置于 1000 ml 容量瓶中,徐徐加入 225 ml 85% 磷酸,边加边摇匀。再加 25% 硫酸 150 ml,置暗处至次日,用空气将剩余的溴赶去^①,然后加入 99% 醋酸 75ml,摇匀,加蒸馏水稀释至 1000 ml,贮于棕色瓶中。

4. 10% 钨酸钠溶液:钨酸钠 10 g,溶于蒸馏水并稀释至 100 ml。

5. 0.33 mol/L H_2SO_4 溶液^②:于 53 ml 蒸馏水中加入 1ml 浓硫酸。

操作

1. 无蛋白血滤液的制备:用奥氏吸管^③吸取全血(已加抗凝剂——草酸钾或草酸钠)1 ml,缓缓放入^④ 20 ml 锥形瓶内,加水 7 ml,摇匀,溶血后(血液变为红色透明时)加 10% 钨酸钠 1ml,摇匀,再加 0.33 mol/L H_2SO_4 1ml (皆用吸管),随加随摇,加毕充分摇匀,放置 5—15 分钟,至沉淀由鲜红变为暗棕色^⑤。用干滤纸过滤(先倾入液体少许,待滤纸润湿

① 赶溴装置如图 1 所示。见下页。

② 相当于 $2/3 N H_2SO_4$ 溶液。

③ 奥氏吸管俗称胖肚吸管,因吸管中部有一膨大部分,用以吸取血液,可减少血液与管壁的接触面,使吸量更为准确。

④ 欲得准确结果,所取血液的量必须准确。如由吸管中放出血液的速度太快,则有大量血液粘在吸管内壁,容量不准,一般放出 1ml 血液所用的时间不应少于 1 分钟。

⑤ 沉淀由鲜红变为暗棕色,是因钨酸钠与 H_2SO_4 作用生成钨酸,在适当酸度时,使血红蛋白变性、沉淀。如血沉淀经放置后不变为暗棕色或重滤后仍混浊,系因血中所加抗凝剂过多,可在钨酸与血混合液中加入 10% H_2SO_4 1—2 滴,待变为暗棕色后再滤。



图 1 赶溴装置

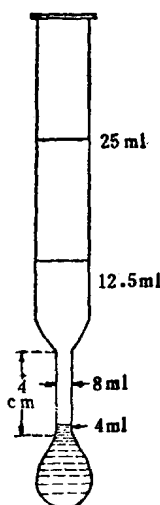


图 2 血糖管

后,再全部倒入),并在漏斗上盖一表面皿。如滤液不清,需重滤。每毫升无蛋白血滤液相当于 1/10ml 全血。

2. 血糖测定:取具有 25ml 刻度之血糖管(见图2)①3支,编号。用奥氏吸管吸取无蛋白血滤液 2ml(如含糖量较高,只取 1ml,另加水 1ml),放入第一支血糖管内。于第二支血糖管中加 2ml 标准葡萄糖溶液(1ml 含 0.1mg 葡萄糖)。第三支血糖管中加 2ml 蒸馏水。然后各加 2ml 新配制的碱性硫酸铜溶液,同时置于沸水浴内煮 8 分钟,取出,在流水中迅速冷却,各加 4ml 酸性钼酸盐溶液②,1分钟后,以蒸馏水稀释至

① Folin-Wu 血糖管,可减少 Cu^+ 与空气的接触,防止氧化成 Cu^{2+} 。

② 血液中除葡萄糖外,尚有其他还原物质,故所得结果可能偏高 20—30 mg%,若用 α -氨基联苯(α -aminobiphenyl)试剂代替碱性硫酸铜和酸性钼酸盐两溶液即可避免此误差。