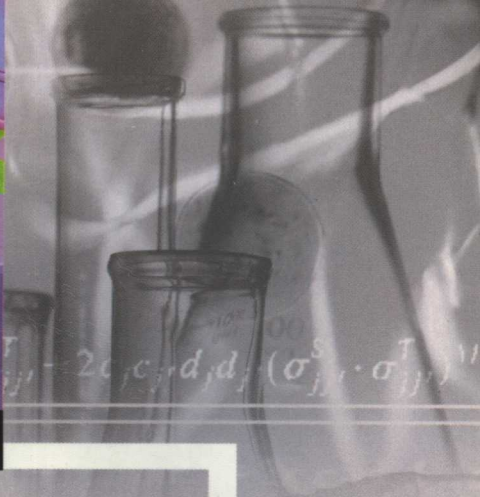
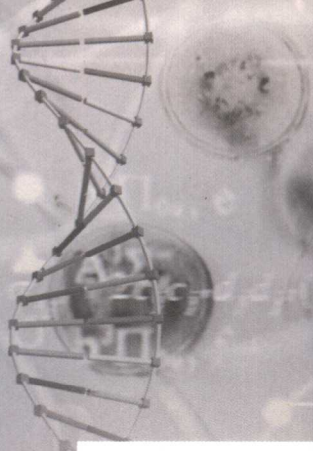
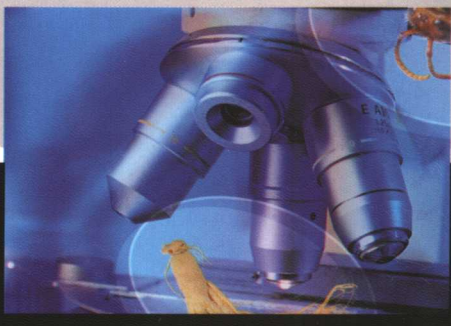




武金霞 主编

# 生物化学实验 原理与技术



河北大学出版社

河北大学教材出版基金资助出版

# 生物化学实验原理与技术

主编 武金霞(河北大学)  
编者 武金霞(河北大学)  
张贺迎(河北大学)  
张瑞英(河北大学)  
崔凤英(保定市人民医院)  
审校 王冬梅(河北农业大学)

河北大学出版社

责任编辑:马 力

封面设计:王占梅

责任印制:李晓敏

### 图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验原理与技术/武金霞主编. —保定:河北大学出版社, 2005. 1

ISBN 7-81097-003-8

I. 生... II. 武... III. 生物化学-实验-高等学校-教材 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 005460 号

---

出版:河北大学出版社(保定市合作路 88 号)

印制:保定天德印务有限公司

印张:11.25

版次:2005 年 3 月第 1 版

经销:全国新华书店

规格:1/16(787mm×1092mm)

印数:0001~3000 册

印次:2005 年 3 月第 1 次

---

ISBN 7-81097-003-8/Q·10

定价:18.00 元

# 内容简介

《生物化学实验原理与技术》与以前同类教材的编写模式不同。全书按生物化学技术分章,每一章都包括基本原理和实验部分。该书包含了生物物质的定性鉴定、纸层析技术、薄层层析技术、离子交换层析技术、分子筛层析技术、亲和层析技术、离心技术、分光光度技术、电泳技术、蛋白质转移技术及其他技术,附录包括常用仪器的使用说明及生物化学常用的重要资料等。

本书可供综合性大学生物科学相关专业及农学、医学相关专业的学生使用,也可供与生物科学相关的科研人员参考。

# 前 言

21 世纪是生命科学的世纪,这已经成为全世界的共识。生物化学是生命科学最重要的分支学科之一,经过几十年的发展,它已经成为研究生命科学以及其他分支学科必不可少的方法与手段。因此生物化学在工业、农业、医药、卫生及环境科学等领域的研究中正发挥着越来越重要的作用。生物化学也成为高等学校生物科学专业及相关专业的必修课程,同时亦是这些专业考研的必考科目之一。许多学校也越来越重视生物化学实验课的教学效果,它直接关系到学生就业后能否很快地适应工作,考研后能否顺利地进行科学研究。如何提高学生的生物化学实验技能和素质,是摆在我们面前的重要任务,因而,编写一本新型的适用的生物化学实验教材是十分必要的。

本教材就是在这种形势下,由长期从事生物化学实验教学的教师共同编写的。

这本《生物化学实验原理与技术》,吸取了各时期不同版本的生物化学实验教材的优点,结合作者多年实验教学中总结出的经验,在实验内容选择、编排形式、原理介绍、步骤描述、结果分析等方面,都有所创新。

本书分十一章,第一章为生物物质的定性鉴定,包括蛋白质、氨基酸的呈色反应, DNA、RNA 的显色反应,糖的定性鉴定等。

第二章为纸层析技术,包括氨基酸的纸层析分离。

第三章为薄层层析技术,包括核苷酸、单糖的薄层层析分离。

第四章为离子交换层析技术,包括离子交换树脂交换容量的测定、无离子水的制备及检测、超氧化物歧化酶和酯酶的分离纯化。

第五章为分子筛层析技术,包括分子筛层析脱盐及分子筛层析测定蛋白质的分子量。

第六章为亲和层析技术,包括亲和层析纯化蚯蚓纤溶酶。

第七章为离心技术,介绍了离心技术的原理及用途,具体实验融汇于各个实验中。

第八章为分光光度技术,包括蛋白质浓度测定(双缩脲法、Folin - 酚法、紫外吸收法、考马斯亮蓝法)、核酸浓度测定(定磷法、二苯胺法)。

第九章为电泳技术,包括醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白、聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白及测定蛋白质的分子量和等电点。

第十章为蛋白质的 Western-Blotting,介绍了蛋白质转移技术的要点。

第十一章为其他技术,以消化和滴定技术为主,包括微量凯氏定氮法测定蛋白质浓度、维生素 C 的定量测定、甲醛滴定法测定氨基氮、 $\alpha$ -淀粉酶的激活剂、抑制剂及其特异性、温度和 pH 对酶活性的影响。

附录包括实验室安全知识、常用仪器的使用说明、常用生化试剂的配制方法、常用生化材料的性能参数。

最后为本书的参考文献。

本书由武金霞任主编,负责制定编写大纲,对全书进行统稿、修改,并承担全部实验的基本原理、注意事项及思考题的编写。张贺迎负责全部实验的原理部分和操作步骤的编写。

张瑞英负责全部实验的材料与试剂、器材部分及附录部分第二节的编写。崔凤英负责附录其他部分的编写。

编者多年从事生物化学实验教学和科研工作,在长期实践中,反复验证、完善了上述实验,使之更适用于综合性大学和师范、医药、农林院校有关专业的大学本科实验教学,也可供生物化学研究人员、实验技术人员及生化检验人员参考。但鉴于作者知识及能力所限,加之多种多样的客观原因,书中错误和不足之处在所难免,敬请读者指正。

编者

2004 年 10 月

# 目 录

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| 第一章 生物物质的定性鉴定         | ( 1 )  |
| 第一节 蛋白质和氨基酸的结构特点及反应基础 | ( 1 )  |
| 一、氨基酸的结构特点            | ( 1 )  |
| 二、氨基酸的化学反应            | ( 2 )  |
| 第二节 核酸的结构组成特点         | ( 3 )  |
| 一、核酸的结构               | ( 3 )  |
| 二、核酸的水解               | ( 5 )  |
| 第三节 糖的基本性质            | ( 5 )  |
| 一、糖的概念                | ( 5 )  |
| 二、单糖的性质               | ( 6 )  |
| 第四节 实验部分              | ( 6 )  |
| 实验一 蛋白质的双缩脲反应         | ( 6 )  |
| 实验二 蛋白质和氨基酸的茚三酮反应     | ( 7 )  |
| 实验三 蛋白质的黄色反应          | ( 8 )  |
| 实验四 蛋白质的沉淀反应          | ( 9 )  |
| 实验五 酵母 RNA 的提取与鉴定     | ( 11 ) |
| 实验六 糖的呈色反应及还原糖的检验     | ( 12 ) |
| 第二章 纸层析技术             | ( 17 ) |
| 第一节 纸层析的基本原理          | ( 17 ) |
| 第二节 影响 $R_f$ 值的主要因素   | ( 17 ) |
| 一、物质结构与极性对 $R_f$ 值的影响 | ( 17 ) |
| 二、层析溶剂对 $R_f$ 值的影响    | ( 18 ) |
| 三、pH 对 $R_f$ 值的影响     | ( 18 ) |
| 四、展层温度对 $R_f$ 值的影响    | ( 19 ) |
| 五、滤纸的性质对 $R_f$ 值的影响   | ( 19 ) |
| 第三节 实验部分              | ( 19 ) |
| 实验 氨基酸的纸层析分离          | ( 19 ) |
| 第三章 薄层层析技术            | ( 22 ) |
| 第一节 薄层层析原理            | ( 22 ) |
| 一、原理                  | ( 22 ) |
| 二、有限斑容量问题             | ( 22 ) |
| 第二节 固定相支持介质的选择        | ( 23 ) |
| 一、支持介质的性能             | ( 23 ) |
| 二、支持介质的选择原则           | ( 23 ) |

|                                                |        |
|------------------------------------------------|--------|
| 三、几种常用支持介质 .....                               | ( 23 ) |
| 第三节 薄层层析的显色 .....                              | ( 25 ) |
| 第四节 实验部分 .....                                 | ( 26 ) |
| 实验一 DEAE - 纤维素薄层层析分离鉴定核苷酸 .....                | ( 26 ) |
| 实验二 细菌细胞壁糖的薄层层析 .....                          | ( 28 ) |
| 第四章 离子交换层析技术 .....                             | ( 32 ) |
| 第一节 离子交换层析原理 .....                             | ( 32 ) |
| 一、基本原理 .....                                   | ( 32 ) |
| 二、离子交换剂的结构与分类 .....                            | ( 32 ) |
| 三、离子交换技术的操作 .....                              | ( 34 ) |
| 第二节 实验部分 .....                                 | ( 35 ) |
| 实验一 离子交换树脂交换容量的测定 .....                        | ( 35 ) |
| 实验二 无离子水的制备及检测 .....                           | ( 36 ) |
| 实验三 DEAE - Cellulose 柱层析分离纯化超氧化物歧化酶 .....      | ( 37 ) |
| 实验四 酯酶的分离纯化及活性测定 .....                         | ( 39 ) |
| 第五章 分子筛层析技术 .....                              | ( 43 ) |
| 第一节 分子筛层析原理 .....                              | ( 43 ) |
| 一、基本原理 .....                                   | ( 43 ) |
| 二、分子筛层析实验技术 .....                              | ( 44 ) |
| 第二节 实验部分 .....                                 | ( 46 ) |
| 实验一 分子筛层析脱盐 .....                              | ( 46 ) |
| 实验二 分子筛层析法测定蛋白质的分子量 .....                      | ( 47 ) |
| 第六章 亲和层析技术 .....                               | ( 51 ) |
| 第一节 亲和层析原理 .....                               | ( 51 ) |
| 一、基本原理 .....                                   | ( 51 ) |
| 二、亲和层析的操作技术 .....                              | ( 51 ) |
| 第二节 实验部分 .....                                 | ( 53 ) |
| 实验 亲和层析纯化蚯蚓纤溶酶 .....                           | ( 53 ) |
| 第七章 离心技术 .....                                 | ( 55 ) |
| 第一节 离心技术的基本原理 .....                            | ( 55 ) |
| 一、离心设备 .....                                   | ( 55 ) |
| 二、离心机的用途 .....                                 | ( 55 ) |
| 第八章 分光光度技术 .....                               | ( 60 ) |
| 第一节 分光光度技术的原理 .....                            | ( 60 ) |
| 一、郎伯—比尔(Lambert - Beer)定律 .....                | ( 60 ) |
| 二、实际测定时吸光度与物质浓度之间偏离 Lambert - Beer 定律的原因 ..... | ( 61 ) |
| 三、测定条件的选择 .....                                | ( 63 ) |
| 四、分光光度计的构造 .....                               | ( 63 ) |
| 第二节 实验部分 .....                                 | ( 65 ) |

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| 实验一 双缩脲法测定蛋白质浓度·····                  | ( 65 )  |
| 实验二 Folin - 酚法测定蛋白质浓度 ·····           | ( 66 )  |
| 实验三 紫外吸收法测定蛋白质浓度·····                 | ( 68 )  |
| 实验四 考马斯亮蓝染色法测定蛋白质浓度·····              | ( 70 )  |
| 实验五 定磷法测定酵母核糖核酸浓度·····                | ( 71 )  |
| 实验六 二苯胺法测定 DNA 的浓度 ·····              | ( 73 )  |
| <b>第九章 电泳技术</b> ·····                 | ( 75 )  |
| 第一节 电泳的基本原理·····                      | ( 75 )  |
| 一、电荷的来源 ·····                         | ( 75 )  |
| 二、泳动度 ·····                           | ( 75 )  |
| 三、影响泳动速度的外界因素 ·····                   | ( 76 )  |
| 第二节 电泳的分类·····                        | ( 77 )  |
| 一、按分离原理分类 ·····                       | ( 77 )  |
| 二、按有无固体支持物分类 ·····                    | ( 77 )  |
| 第三节 实验部分·····                         | ( 78 )  |
| 实验一 醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白·····              | ( 78 )  |
| 实验二 聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳分离血清蛋白·····           | ( 83 )  |
| 实验三 SDS - PAGE 测定蛋白质的分子量 ·····        | ( 92 )  |
| 实验四 等电聚焦电泳法测定蛋白质的等电点·····             | ( 96 )  |
| <b>第十章 蛋白质转移技术</b> ·····              | ( 100 ) |
| 第一节 蛋白质转移原理·····                      | ( 100 ) |
| 第二节 实验部分·····                         | ( 100 ) |
| 实验 蛋白质转移(Western Blotting)·····       | ( 100 ) |
| <b>第十一章 其他技术</b> ·····                | ( 104 ) |
| 第一节 基本原理·····                         | ( 104 ) |
| 第二节 实验部分·····                         | ( 104 ) |
| 实验一 微量凯氏定氮法测定蛋白质浓度·····               | ( 104 ) |
| 实验二 维生素 C 的定量测定(2,6 - 二氯酚靛酚滴定法) ····· | ( 108 ) |
| 实验三 甲醛滴定法测定氨基氮·····                   | ( 110 ) |
| 实验四 $\alpha$ - 淀粉酶的激活剂、抑制剂及其特异性·····  | ( 112 ) |
| 实验五 温度、pH 对酶活性的影响·····                | ( 114 ) |
| <b>附录</b> ·····                       | ( 117 ) |
| 第一节 实验室安全及防护知识·····                   | ( 117 ) |
| 一、实验室安全知识 ·····                       | ( 117 ) |
| 二、实验室灭火法 ·····                        | ( 118 ) |
| 三、实验室急救 ·····                         | ( 118 ) |
| 四、生物化学实验要求 ·····                      | ( 119 ) |
| 第二节 生化实验常用仪器的使用说明·····                | ( 120 ) |
| 一、烘箱和恒温箱 ·····                        | ( 120 ) |

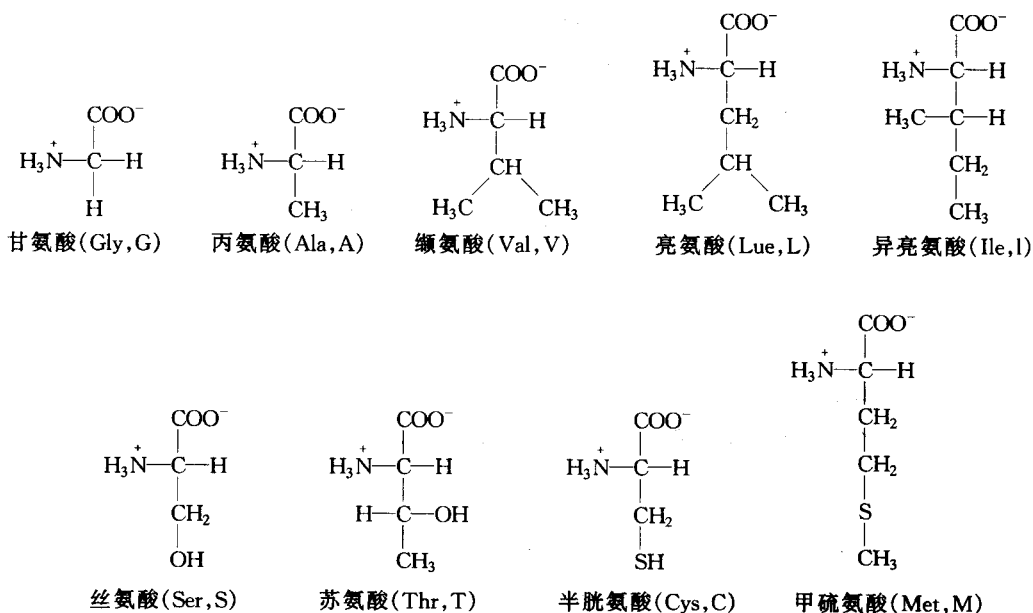
|                          |       |
|--------------------------|-------|
| 二、电热恒温水浴 .....           | (121) |
| 三、离心机 .....              | (122) |
| 四、电子天平 .....             | (124) |
| 五、紫外检测仪 .....            | (124) |
| 六、冷冻干燥机 .....            | (126) |
| 七、724 - 微机型可见分光光度计 ..... | (127) |
| 八、721 型分光光度计 .....       | (130) |
| 九、紫外 - 可见分光光度计 .....     | (131) |
| 十、酸度计 .....              | (133) |
| 十一、电泳仪 .....             | (135) |
| 第三节 常用缓冲液的配制方法 .....     | (138) |
| 第四节 硫酸铵饱和度的调整用表 .....    | (144) |
| 第五节 柱层析材料 .....          | (146) |
| 第六节 其他常用数据表 .....        | (157) |
| 参考文献 .....               | (167) |

# 第一章 生物物质的定性鉴定

## 第一节 蛋白质和氨基酸的结构特点及反应基础

### 一、氨基酸的结构特点

蛋白质是由 20 种氨基酸以肽键的形式连接而成的多肽链(poly peptide chain),蛋白质最基本的结构单位是氨基酸,构成蛋白质的 20 种氨基酸依侧链(side chain)的极性可分为四大类,非极性 R 基氨基酸共八种,分别为丙氨酸(Ala,A)、缬氨酸(Val,V)、亮氨酸(Leu,L)、异亮氨酸(Ile,I)、脯氨酸(Pro,P)、苯丙氨酸(Phe,F)、色氨酸(Trp,W)和甲硫氨酸(Met,M),不带电荷的极性 R 基氨基酸共七种,分别为甘氨酸(Gly,G)、丝氨酸(Ser,S)、苏氨酸(Thr,T)、半胱氨酸(Cys,C)、酪氨酸(Tyr,Y)、天冬酰胺(Asn,N)和谷氨酰胺(Gln,Q);带正电荷 R 基氨基酸共有三种,分别为赖氨酸(Lys,K)、精氨酸(Arg,R)和组氨酸(His,H);带负电荷 R 基氨基酸共有两种,分别为天冬氨酸(Asp,D)和谷氨酸(Glu,E)。这 20 种氨基酸在形成蛋白质以后,其  $\alpha\text{-NH}_2$  和  $\alpha\text{-COOH}$  都形成肽链主链(N—末端和 C—末端除外),蛋白质的性质一方面由多肽主链决定,另一方面由组成它的氨基酸残基的侧链决定,因此要定性鉴定蛋白质,就要依据蛋白质作为生物大分子所具有的特性以及组成它的氨基酸残基的侧链所具有的特性。组成蛋白质的 20 种氨基酸的结构式如图 1-1 所示。



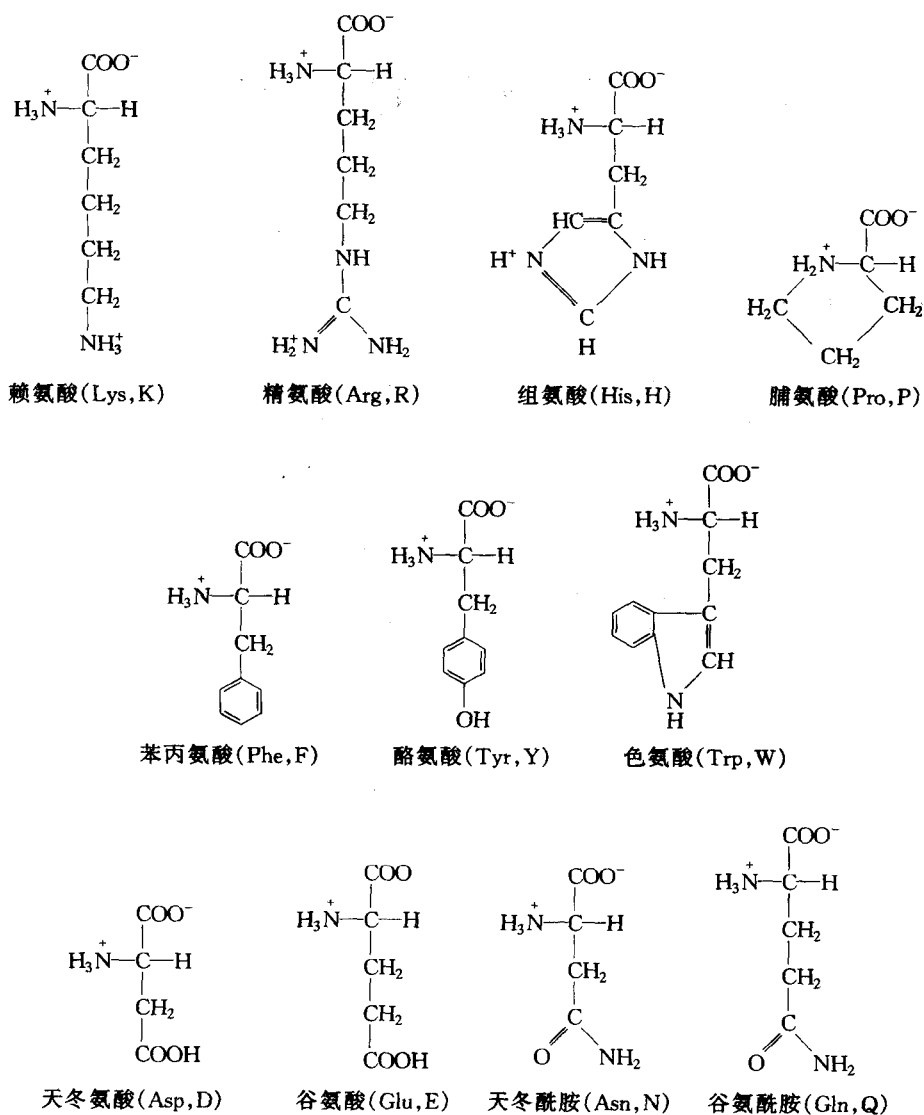


图 1-1 组成蛋白质的 20 种氨基酸的结构式

## 二、氨基酸的化学反应

氨基酸的化学反应主要是指它的  $\alpha$ -氨基与  $\alpha$ -羧基以及侧链上的功能基团所参与的反应。

### 1. $\alpha$ -氨基的反应

如  $\alpha$ -氨基能与亚硝酸反应放出氮气,这是 Van Slyke 法测定氨基氮的基础; $\alpha$ -氨基在弱碱性溶液中与酰氯或酸酐作用,被酰基化,这类反应被用于蛋白质和多肽人工合成中进行氨基保护; $\alpha$ -氨基的氢原子能被烃基或烃的衍生物取代,如与 2,4-二硝基氟苯(FDNB 或 DNFB)反应,产生 DNP-氨基酸,此反应首先被英国的 Sanger 用来鉴定蛋白质和多肽的 N-末端氨基酸,与异硫氰酸苯酯(PITC)反应,产生 PTH-氨基酸,这个反应被 Edman 用

于鉴定多肽和蛋白质的 N-末端氨基酸,当 N-末端氨基酸形成 PTH-衍生物之后,它与第二个氨基酸之间的肽键就变得容易断裂,第二、第三个氨基酸同样也能依次形成 PTH 衍生物,可以通过分析 PTH 衍生物来推断氨基酸的排列顺序,这是全自动氨基酸顺序分析仪的基础,称为 Edman 降解; $\alpha$ -氨基能与醛类形成西佛碱。

#### 2. $\alpha$ -羧基的反应

$\alpha$ -羧基能与碱形成盐;与醇形成酯;如果氨基被保护,则  $\alpha$ -羧基能与二氯亚砷或五氯化磷作用生成酰氯,此反应在多肽和蛋白质人工合成中用于活化羧基;如果氨基被保护之后,羧基先转变为甲酯,再与肼和亚硝酸反应,形成叠氮化合物,也是活化羧基的反应。

#### 3. $\alpha$ -氨基和 $\alpha$ -羧基共同参加的反应

(1)与茚三酮反应:茚三酮在弱酸性溶液中,与  $\alpha$ -氨基酸共热,使氨基酸氧化、脱氨、脱羧,放出氨,茚三酮再与氨、还原茚三酮发生作用,形成紫色物质,该紫色物质在 570nm 有最大光吸收,可以用来定性、定量测定氨基酸。

(2)成肽反应:一个氨基酸的羧基与另一个氨基酸的氨基缩合脱水,形成的键称为肽键。

多肽和蛋白质分子中含有肽键,游离的氨基酸分子中不含有肽键。

#### 4. 侧链基团的反应

氨基酸的侧链具有功能团时也能发生化学反应,这些功能基包括羟基、酚基、巯基、吲哚基、咪唑基、胍基、甲硫基以及非  $\alpha$ -氨基和非  $\alpha$ -羧基。如酪氨酸的酚(羟)基能与重氮化合物结合成橘黄色物质,称为 Pauly 反应;精氨酸能与  $\alpha$ -萘酚在碱性次溴酸钠溶液中反应,产生红色物质。

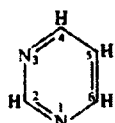
## 第二节 核酸的结构组成特点

### 一、核酸的结构

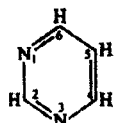
核酸(nucleic acid)是重要的生物大分子,在生物体的生长、发育、繁殖、遗传变异等基本生命过程中起着重要的作用。

核酸分脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)和核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)两大类。核酸是由许多单核苷酸(nucleotide)以 3',5'磷酸二酯键连接成的多聚核苷酸(poly nucleotide)。单核苷酸由核苷(nucleoside)与磷酸构成,核苷由 D-核糖(D-ribose)或 D-2-脱氧核糖(D-2-deoxyribose)和碱基构成,碱基又分为嘧啶碱(pyrimidine bases)和嘌呤碱(purine bases)两大类,嘌呤碱包括腺嘌呤(adenine)、鸟嘌呤(guanine),嘧啶碱包括胞嘧啶(cytosine)、尿嘧啶(uracil)和胸腺嘧啶(thymine)。碱基、核苷、核苷酸及 DNA 和 RNA 的结构如图 1-2 所示。

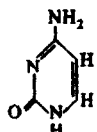
碱基具有共轭双键,因此碱基、核苷、核苷酸及核酸在 240~290nm 范围内有强烈吸收峰,最大吸收值在 260nm 附近。不同核苷酸有不同的吸收特性,可以用紫外分光光度计定性、定量测定。



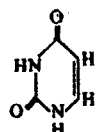
咪唑  
(新系统)



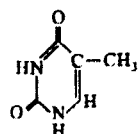
咪唑  
(旧系统)



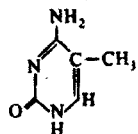
胞嘧啶



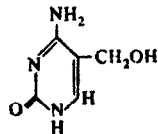
尿嘧啶



胸腺嘧啶

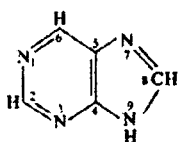


5-甲基胞嘧啶  
(5-methylcytosine)

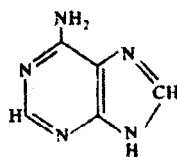


5-羟甲基胞嘧啶

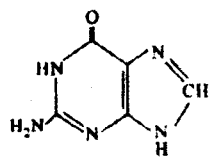
(5-hydroxy-methylcytosine)



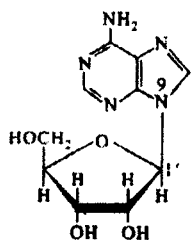
嘌呤



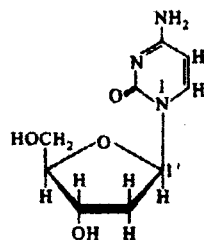
腺嘌呤



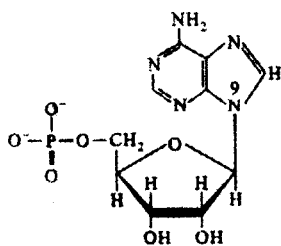
鸟嘌呤



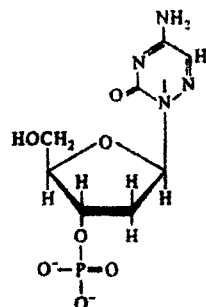
腺嘌呤核苷



胞嘧啶脱氧核苷



5'-腺嘌呤核苷酸  
(AMP)



3'-胞嘧啶脱氧核苷酸  
(3'-dCMP)

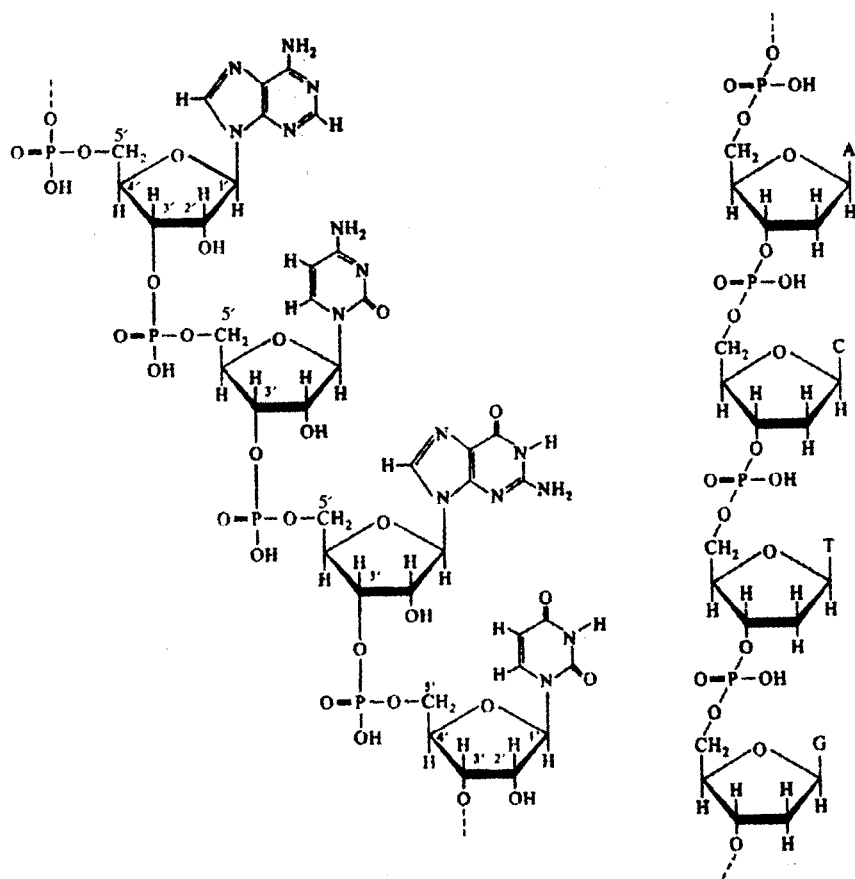


图 1-2 碱基、核苷、核苷酸、RNA 分子和 DNA 分子中部分结构

## 二、核酸的水解

DNA 和 RNA 为大分子物质,其分子中的糖苷键和磷酸酯键都能被酸水解,糖苷键比磷酸酯键更易被酸水解,其中,嘌呤碱与脱氧核糖之间的糖苷键最不稳定。RNA 的磷酸酯键易被碱水解,产生核苷酸,而 DNA 的磷酸酯键不易被碱水解。核苷酸进一步被水解为核糖或脱氧核糖,碱基和磷酸。核糖与浓盐酸或浓硫酸作用脱水形成糠醛,糠醛与地衣酚又名苔黑酚(3,5-二羟基甲苯)反应生成深绿色物质,反应产物在 670nm 有最大吸收,吸收值与核酸浓度成正比关系。脱氧核糖与浓硫酸作用,脱水形成  $\omega$ -羟基- $\gamma$ -酮基戊醛,与二苯胺反应形成蓝色化合物,反应产物在 595nm 处有最大吸收,且吸收值与 DNA 浓度成正比关系。

## 第三节 糖的基本性质

### 一、糖的概念

糖从化学角度看,为多羟基的醛或酮,或它们的衍生物,或水解时能产生这些化合物的物质。糖分为单糖、寡糖和多糖。还可以根据分子中含醛基还是酮基分为醛糖和酮糖。大多数糖类物质只含有 C、H、O 三种元素。

## 二、单糖的性质

几乎所有的单糖及其衍生物都具有旋光性,分子上的多个羟基使单糖具有很好的溶解性。单糖对稀酸稳定,但在碱溶液中能发生多种反应,产生不同的产物,如发生异构化形成不同构型。游离醛基具有很好的还原性,碱性溶液中的重金属离子(Fehling 试剂或 Benedict 试剂)是一种弱氧化剂,能将醛基氧化成羧基,产物为糖醛酸。能使氧化剂还原的糖称为还原糖,所有的醛糖都是还原糖,许多酮糖也是还原糖,例如果糖在碱性条件下能异构化为醛糖。Fehling 试剂或 Benedict 试剂常用来检测还原糖。单糖的羰基在适当的还原条件下,被还原成多元醇。许多还原糖与苯肼发生反应,生成含有两个苯腙基的衍生物,称为糖蒽。单糖的许多化学行为很象简单的醇,如羟基能形成酯或醚。环状单糖的半缩醛(或半缩酮)羟基能与另一化合物发生缩合反应,形成缩醛,称为糖苷或苷。糖苷分子中提供半缩醛羟基的糖部分称糖基,与之缩合的非糖部分称为糖苷配基,这两部分之间的连接键称为糖苷键。糖苷键可以通过氧、氮、硫原子起连接作用。糖是半缩醛,容易变成游离醛,从而给出各种醛的反应,糖苷属于缩醛,一般不显示醛的性质。单糖与酸共热时脱水生成糠醛,不同的糠醛与多元酚产生不同的颜色反应。如鉴定酮糖的方法有(Seliwanoff 试验),酮糖在酸的作用下形成羟甲基糠醛,与间苯二酚反应生成红色缩合物。糖脱水形成的糠醛及其衍生物与  $\alpha$ -萘酚反应形成红紫色缩合物(Molish 试验),用于鉴定糖类物质,阴性反应确证无糖存在,但阳性反应只表明有糖存在的可能。糖类物质脱水与蒽酮缩合形成蓝绿色复合物,常用于总糖量的测定。

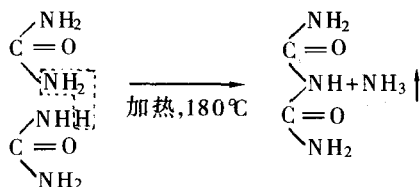
## 第四节 实验部分

### 实验一 蛋白质的双缩脲反应

#### 一、双缩脲反应的原理

当尿素加热到  $180^{\circ}\text{C}$  时,两分子尿素缩合,放出一分子氨形成双缩脲(biuret)。双缩脲在碱性溶液中与铜离子( $\text{Cu}^{2+}$ )结合生成复杂的紫红色化合物。

蛋白质或二肽以上的多肽分子中,含有多个与双缩脲结构相似的肽键,因此也有双缩脲反应。应当指出,含有一个  $-\text{CS}-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CRH}-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CHNH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{NH}_2$  等基团的物质时,或过量的铵盐也干扰本实验。



紫红色铜双缩脲复合物的结构如图 1-3 所示。

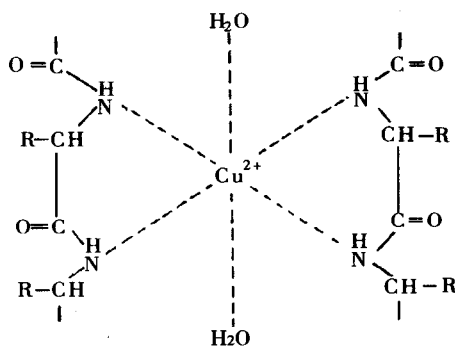


图 1-3 紫红色铜双缩脲复合物的结构

## 二、实验步骤

(1) 干燥洁净试管→少许尿素→酒精灯加热融化(有  $\text{NH}_3$  味)→冷却→1mL 10% 氢氧化钠, 振荡, 使双缩脲溶解→2 滴 1% 硫酸铜溶液→观察颜色变化(紫红色)。

(2) 干燥洁净试管→10 滴鸡蛋清溶液→10 滴 10% 氢氧化钠→2 滴 1% 硫酸铜溶液, 摇匀→观察颜色变化(紫红色)。

(3) 干燥洁净试管→10 滴酪蛋白溶液→10 滴 10% 氢氧化钠→2 滴 1% 硫酸铜溶液, 摇匀→观察颜色变化(紫红色)。

## 三、注意事项

避免  $\text{CuSO}_4$  过量, 否则生成  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , 其蓝色将遮盖紫红色。

## 四、材料及试剂

(1) 材料: 稀释 20 倍的鸡蛋清溶液, 2% 酪蛋白溶液。

(2) 试剂: 10% 氢氧化钠, 1% 硫酸铜, 尿素少量。

## 五、器材

试管架及试管, 试管夹, 酒精灯, 滴管, 牛角勺。

## 六、思考题

为什么双缩脲反应能检测蛋白质的水解程度?

## 实验二 蛋白质和氨基酸的茚三酮反应

### 一、基本原理

蛋白质、多肽和各种氨基酸具有茚三酮反应。除无  $\alpha$ -氨基的脯氨酸呈黄色外, 其他氨基酸生成紫红色, 最终为蓝紫色化合物。除蛋白质、多肽和各种氨基酸能进行茚三酮反应外, 氨、 $\beta$ -丙氨酸和许多一级胺都呈正反应。脲、马尿酸、三酮吡嗪和肽键上的亚氨基呈负反应。该反应灵敏度达 1:1500 000 (pH5~7), 现已广泛的用于氨基酸定量测定。

