

生物化学实验

复旦大学

朱 俭 曹凯鸣 周润琦 编著
蔡武城 袁厚积

上海科学技术出版社

生物化学实验

复旦大学

朱 俭 曹凯鸣 周润琦 编著
蔡武城 袁厚积

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路450号)

新华书店上海发行所发行 上海中华印刷厂印刷

开本 787×1092 1/32 印张 10.875 字数 228,000

1981年7月第1版 1981年7月第1次印刷

印数: 1—13,500

统一书号: 13119·924 定价: (科四)0.97元

前 言

生物化学实验技术在生物科学特别是分子生物学的发展中起着很重要的作用，它与工业、农业、医药等各个方面都有十分广泛而又密切的联系，因此该项实验技术已成为生物科学研究中一个非常重要的手段，并列为各高等院校生物系及有关专业的实验必修课程。

鉴于从事这类科学研究工作的科技人员及高等院校有关专业的需要，我们在历年实验教学的基础上，并根据近年来生物化学实验技术的发展作了若干修改和充实，汇编成这本《生物化学实验》。内容包括生物物质——糖、脂肪、蛋白质、核酸和酶等的分析测定方法及其分离提取技术；物质代谢部分实验。我们力求在原理阐述上做到简单明了，方法上具体详尽，以适应初学者的要求，并对同一类物质的测定和分离分析选用几种不同的实验方法，供读者选择参考。

限于我们的经验和水平，本书不免还存在不少缺点和问题，恳请读者不吝指正。

编 者

目 录

一、糖化学	1
1. 总糖和还原糖测定(一)——3,5-二硝基水杨酸法	1
2. 总糖和还原糖测定(二)——斐林氏法	4
3. 总糖和还原糖测定(三)——碱性铜试剂法	9
4. 糖的硅胶G薄层层析	12
5. 糖的聚酰胺薄膜层析	15
二、脂肪化学	19
6. 脂肪皂化值测定	19
7. 脂肪碘值测定	21
8. 脂肪酸值测定	23
9. 油料作物脂肪抽提和含量测定	25
三、有机酸化学	27
10. 柠檬酸的提取——离子交换树脂法	27
四、蛋白质化学	33
11. 人发中提取胱氨酸	33
12. 面粉中赖氨酸含量测定	35
13. 氨基酸双向纸层析	39
14. 氨基酸纤维素薄层层析	43
15. 缓冲液的性质	45
16. 蛋白质的电荷	49
17. 蛋白质等电点测定	51
18. 总氮测定(一)——常量克氏定氮法	53
19. 总氮测定(二)——微量克氏定氮法	56

20. 氨基氮测定——甲醛滴定法·····	61
21. 蛋白质浓度测定(一)——福林-酚试剂法·····	64
22. 蛋白质浓度测定(二)——染色测定法·····	66
23. 血清蛋白质醋酸纤维薄膜电泳·····	69
24. 胎儿甲种球蛋白对流免疫电泳·····	73
25. 血清蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳·····	76
26. 血清脂蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳·····	83
27. 蛋白质N-末端测定·····	86
28. 珠蛋白的制备及其N-末端测定·····	94
29. 葡聚糖凝胶层析特性·····	98
30. 蛋白质分子量测定(一)——SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 法·····	104
31. 蛋白质分子量测定(二)——葡聚糖凝胶过滤法·····	110
五、核酸化学·····	117
32. 生物材料中总磷量测定——比色法·····	117
33. 核糖核酸定量测定——改良苔黑酚法·····	120
34. 脱氧核糖核酸定量测定——改良二苯胺法·····	124
35. 紫外吸收法测定核酸及核苷酸含量·····	127
36. 动物组织细胞内核酸(DNA与RNA)含量测定·····	133
I. 肝脏组织中DNA和RNA的分离·····	133
II. 肝脏组织中DNA和RNA含量测定·····	136
37. 动物肝脏组织中核糖核酸的提取·····	140
38. 脱氧核糖核酸(DNA)的提取·····	142
I. 动物组织中DNA的提取·····	142
II. 细菌中DNA的提取·····	145
39. 从酵母中制备5'-核苷酸·····	149
I. 酵母核糖核酸的提制·····	149
II. 核糖核酸的酶解·····	153
III. 5'-核苷酸定量测定——过碘酸氧化法·····	156

Ⅳ. 单核苷酸的离子交换柱层析分离	159
Ⅴ. 单核苷酸的纸电泳法鉴定	166
40. 脱氧核糖核酸的碱基组成及其含量测定	169
41. DEAE-纤维素薄层层析——核苷及核苷酸的分离; AMP、ADP 及 ATP 的分离	172
42. 核糖核酸碱水解产物的琼脂糖电泳鉴定	175
43. ECORI 酶解 λ 噬菌体 DNA 片段的电泳分离	178
六、酶	182
44. 酶在生物组织中的分布和某些因素对酶的影响	182
45. 1398 中性蛋白酶活力测定	186
46. 脂肪酶活力测定	190
47. 蔗糖酶的纯化和比活力测定	193
48. 蔗糖酶进程曲线的制作及不同酶浓度对反应速度的 影响	199
49. 蔗糖酶的米氏常数 K_m 和最适 pH 测定	204
50. α -半乳糖苷酶酶学性质测定	211
Ⅰ. 进程曲线的制作	211
Ⅱ. pH 对酶活性的影响及酸碱稳定性测定	214
Ⅲ. 温度对酶活性的影响及热稳定性测定	217
Ⅳ. 米氏常数测定	220
Ⅴ. 抑制剂类型的判断及抑制常数 K_i 测定	226
51. 用正交试验设计法测定几种因素对溶菌酶活性的影响	234
52. 酶的超过滤浓缩	244
53. 固相 5'-磷酸二酯酶的制备	249
七、代谢	256
54. 发酵过程中无机磷的利用	256
55. 糖酵解中间产物的鉴定	257
56. 脱氢酶活性测定	260
57. 脂肪酸 β -氧化	262

58. 氨基移换反应.....	266
八、附录.....	270
1. 市售浓酸和氨水的比重和浓度	270
2. 标准溶液的制备和标定	270
3. 一些层析滤纸的规格与性能	273
4. 各种离子交换树脂类似商品对照表	274
5. 国产离子交换树脂的物理常数	276
6. 葡聚糖凝胶 Sephadex 的物理性质	281
7. 常用参考蛋白质的分子量	282
8. 常用核酸类物质常数表	284
9. 酸碱指示剂	292
10. 缓冲液配制方法.....	293
11. pH 计测溶液 pH 的原理和步骤	309
12. 分光光度法.....	313
九、参考文献.....	323

一、糖 化 学

1. 总糖和还原糖测定(一)

——3,5-二硝基水杨酸法

一、目的

掌握还原糖和总糖的测定原理, 学习用比色法测定还原糖的方法。

二、原理

糖的测定方法有物理的和化学的两类。物理方法有测定其折光率、比旋度的变化, 也可利用比重计进行测定。比较精确和常用的是化学测定法。

还原糖的测定是糖定量测定的基本方法。还原糖就是指含有自由醛基或酮基的糖类, 单糖都是还原性糖, 双糖和多糖不一定是还原糖, 其中乳糖和麦芽糖是还原糖。利用单糖、双糖与多糖的溶解度不同可把它们分开, 并且可以用酸水解法使没有还原性的双糖和多糖, 彻底水解成具有还原性的单糖, 再进行测定, 这样就可以分别求知样品中总糖和还原糖的量。

本实验是利用3,5-二硝基水杨酸与还原糖共热后被还原成棕红色的氨基化合物, 在一定浓度范围内, 还原糖的量和棕红色物质颜色的深浅程度成一定比例关系, 可以用分光光度计进行测定。本方法的优点是快速, 杂质干扰较小。

三、实验材料, 仪器和试剂

1. 实验材料

山芋粉; pH 试纸。

2. 仪器

容量瓶 100 毫升($\times 3$); 玻璃漏斗 6 厘米($\times 2$); 吸管 1 毫升($\times 9$), 10 毫升($\times 3$); 量筒 10 毫升($\times 1$), 100 毫升($\times 1$); 大试管 3.0×20 厘米($\times 8$); 试管 1.5×15 厘米($\times 12$)。

72 型分光光度计; 电热恒温水浴箱; 水浴锅。

3. 试剂

3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 试剂: 6.3 克 DNS 和 262 毫升 $2N$ 氢氧化钠, 加到 500 毫升含有 182 克酒石酸钾钠的热水中, 再加 5 克重蒸酚和 5 克亚硫酸钠, 搅拌溶解, 冷却后加水定容至 1000 毫升, 贮于棕色瓶中。

1000 微克/毫升葡萄糖标准溶液: 准确称取干燥恒重的葡萄糖 1 克, 加少量水溶解后再加 8 毫升 $12N$ 浓盐酸 (防止微生物生长), 以蒸馏水定容至 1000 毫升。

$6N$ 盐酸; $6N$ 氢氧化钠。

四、操作步骤

1. 葡萄糖标准曲线制作

取 5 支大试管按表加入 1000 微克/毫升标准葡萄糖液及

管号	1000微克葡萄糖/毫升 (毫升)	H ₂ O (毫升)	葡萄糖最终浓度 (微克/毫升)
1	1	9	100
2	2	8	200
3	4	6	400
4	6	4	600
5	8	2	800

蒸馏水,得到从 100 微克/毫升至 800 微克/毫升标准管。

分别吸取上述不同浓度的葡萄糖溶液 0.5 毫升, 3,5-二硝基水杨酸试剂 0.5 毫升, 混合均匀, 在沸水浴上加热 5 分钟, 取出后用水冷却, 每管再加入 4 毫升蒸馏水稀释, 最后在 72 型分光光度计上以 540 毫微米比色测出光密度值(OD)。另做一空白试验, 即用蒸馏水代替葡萄糖, 其他试剂相同, 在测光密度值时, 以此管作空白, 调光密度到零。

管号	含糖量 (微克)	葡 萄 糖 液		DNS试剂 (毫升)	沸水浴加热五分钟后冷水冷却	H ₂ O (毫升)	OD ₅₄₀
		浓 度 (微克/毫升)	用量 (毫升)				
1	50	100	0.5	0.5		4	
2	100	200	0.5	0.5		4	
3	200	400	0.5	0.5		4	
4	300	600	0.5	0.5		4	
5	400	800	0.5	0.5		4	
6	0	H ₂ O	0.5	0.5		4	

以葡萄糖含量(微克)为横坐标、光密度值为纵坐标作出葡萄糖标准曲线。

2. 山芋粉中还原糖和总糖的测定

(1) 样品中还原糖提取: 称取山芋粉 1.00 克放在大试管中, 先以少量水调成糊状, 再加 50~60 毫升水摇匀后, 50℃保温 20 分钟, 使还原糖浸出, 在容量瓶定容到 100 毫升, 经过滤, 取滤液测还原糖。

(2) 样品中总糖的水解和提取: 称取山芋粉 0.50 克, 放在大试管中, 加入 6N 盐酸 10 毫升, 水 15 毫升, 放沸水浴上

加热水解半小时，冷却后加入 6*N* 氢氧化钠溶液，调 pH 达到中性，并用容量瓶定容到 100 毫升，经过滤，取滤液 10 毫升稀释至 100 毫升，即为稀释 1000 倍的总糖水解液。

(3) 定糖：取上述还原糖和总糖的提取稀释液各 0.5 毫升，加入 DNS 试剂，与葡萄糖标准曲线制作同样处理。

管号	样品量 (毫升)		DNS试剂 (毫升)	沸水浴加热五分钟后冷水冷却	H ₂ O (毫升)	OD ₅₄₀	山芋粉内含糖 (%)
7	还	0.5	0.5		4		
8	原	0.5	0.5		4		
9	糖	0.5	0.5		4		
10	总	0.5	0.5		4		
11		0.5	0.5		4		
12	糖	0.5	0.5		4		

将样品所测得的 OD 值，在标准曲线上，查出相应的还原糖量，并按下式计算出山芋粉内含还原糖和总糖的百分量。

还原糖% =
$$\frac{\text{还原糖毫克数} \times \text{样品稀释倍数} \times 100}{\text{样品量} \times 0.5}$$

总糖% =
$$\frac{\text{水解后还原糖毫克数} \times \text{样品稀释倍数} \times 0.9 \times 100}{\text{样品量} \times 0.5}$$

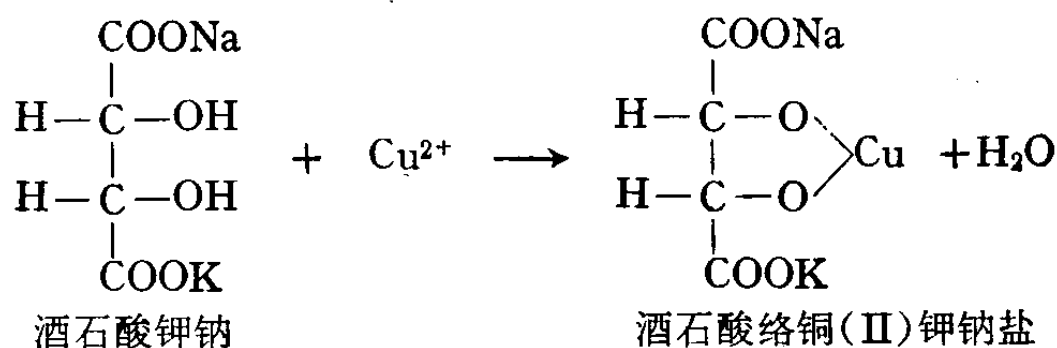
2. 总糖和还原糖测定(二)——斐林氏法

一、目的

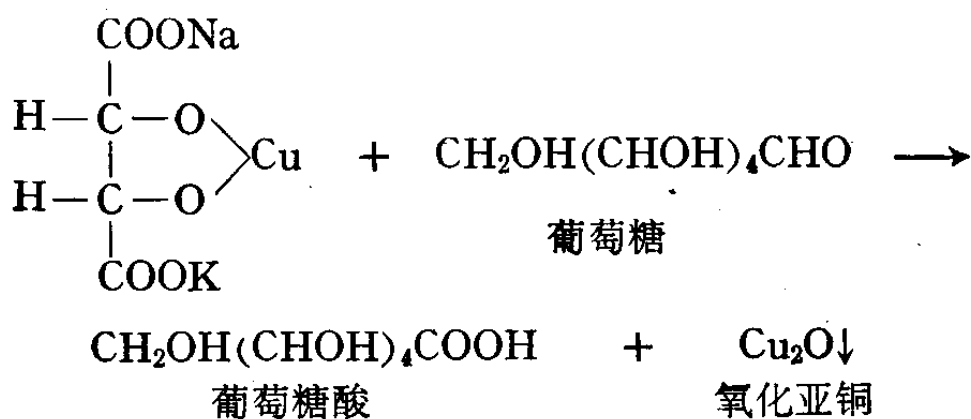
学习掌握生产实践中常用的快速定糖方法。

二、原理

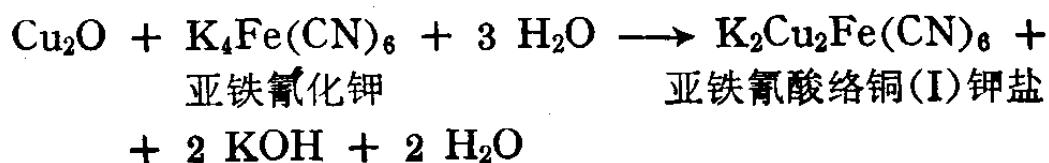
还原糖在碱性溶液中能将 Ag^+ , Hg^+ , Cu^{2+} , $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 等金属离子还原, 而糖本身则氧化成各种羟酸, 利用这一特性可以对还原糖进行定量测定。本实验采用斐林试剂热滴定法, 氧化剂是斐林试剂, 它是由甲乙两种溶液组成, 甲液中含有硫酸铜、次甲基蓝; 乙液中含有氢氧化钠、酒石酸钾钠和亚铁氰化钾(黄血盐)。当甲乙两液混合时, 硫酸铜和氢氧化钠作用形成氢氧化铜沉淀, 由于溶液中存在酒石酸钾钠, 它和氢氧化铜形成了可溶性络合物。



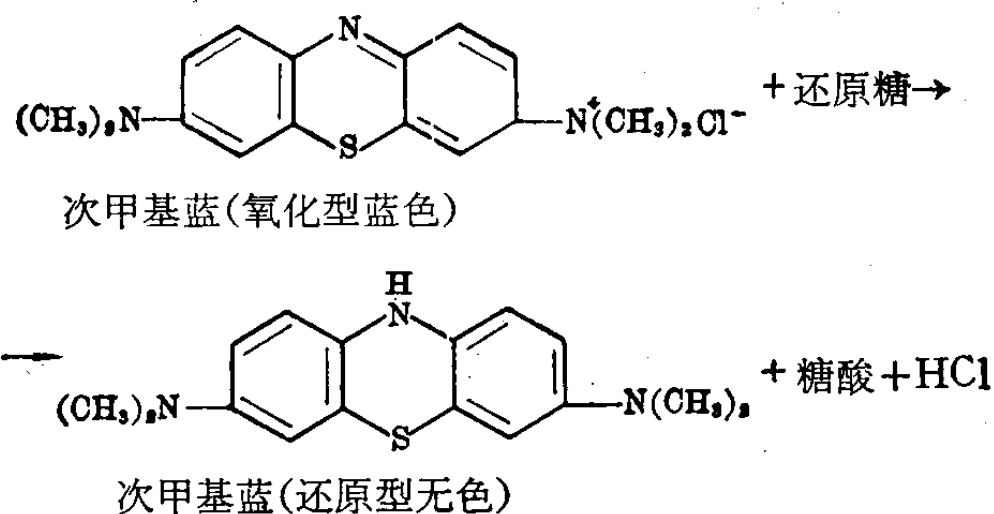
酒石酸络铜(II)钾钠盐在与还原糖共热时, 二价铜离子即被还原成一价的氧化亚铜红色沉淀。



此氧化亚铜与试剂中亚铁氰化钾反应生成可溶性的亚铁氰酸络铜(I)钾盐。



斐林试剂中二价铜的还原力比次甲基蓝强，因此所滴入的标准葡萄糖溶液首先使二价铜还原，只有当二价铜被还原完毕后，才能使次甲基蓝(甲烯蓝)还原为无色，测定中以此作为滴定终点。



在测定时先做一对照管(不加样品)，用标准葡萄糖滴定求知一定体积斐林试剂中二价铜和次甲基蓝的量，即测定对照管消耗的标准葡萄糖量(A)。再做样品管，样品中还原糖消耗斐林试剂中一部分二价铜，剩余的量再用标准葡萄糖来滴定，即样品消耗的标准葡萄糖量(B)。将(A)减去(B)就可求得样品中还原糖量。

三、实验材料, 仪器和试剂

1. 实验材料

山芋粉；广范试纸 pH1~12。

2. 仪器

吸管 5 毫升(×4), 10 毫升(×2); 容量瓶 100 毫升(×3); 烧杯 150 毫升(×1), 100 毫升(×1); 三角烧瓶 250 毫升(×6); 滴定管 25 毫升(×1); 双孔橡皮塞; 电炉 300W(×1); 天平。

3. 试剂

斐林氏甲液：15 克硫酸铜、0.05 克次甲基蓝溶于 1 升蒸馏水中。

斐林氏乙液：50 克酒石酸钾钠、54 克氢氧化钠、4 克亚铁氰化钾溶于 1 升蒸馏水中。

0.1% 标准葡萄糖溶液：准确称取干燥恒重的葡萄糖 1.00 克，加入少量蒸馏水溶解后，再加 8 毫升浓盐酸（防止微生物生长），蒸馏水定容至 1 升。

6N 盐酸；6N 氢氧化钠。

四、操作步骤

(1) 还原糖提取：称取 2.00 克山芋粉，在小烧杯中先用少量水调成糊状，再加入 70 毫升水，50℃保温 15 分钟，取出后在 100 毫升容量瓶中定容至 100 毫升，经过滤，取滤液进行还原糖测定。

(2) 总糖水解：称取 1.00 克山芋粉在小烧杯中，加 6N 盐酸 10 毫升，蒸馏水 15 毫升，在沸水浴上加热半小时，取出后用 6N 氢氧化钠中和至中性，然后定容至 100 毫升，经过滤，取滤液 10 毫升稀释至 100 毫升，即为稀释 1000 倍的总糖水解液。

(3) 糖的定量测定：按图 1 装置热滴定仪器。在三角瓶中按下表加入各试剂。在加入斐林试剂甲液和乙液后，为了

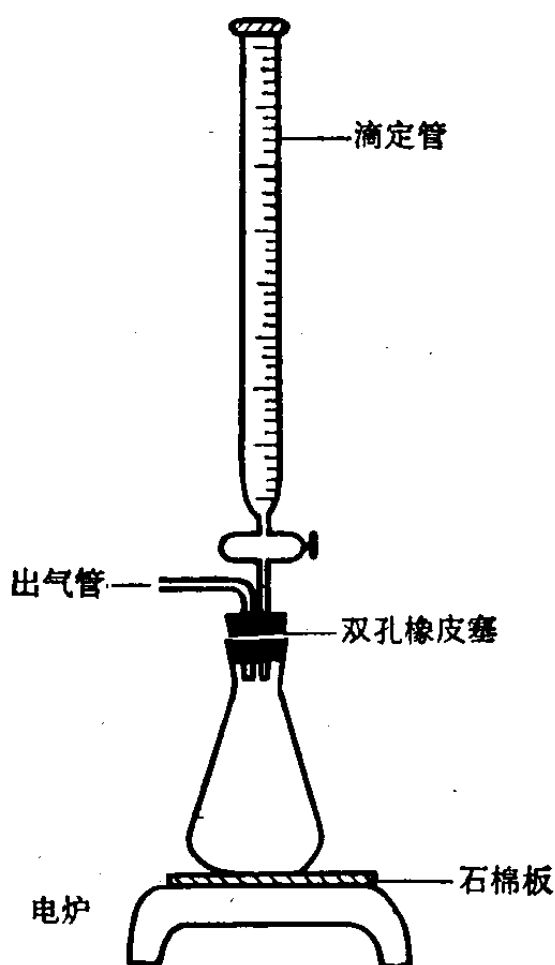


图 1 斐林氏热滴定装置

保证处于沸腾状态下快速滴定（整个滴定时间在三分钟内完成），在滴定前先从滴定管中加入适量的葡萄糖液，然后在沸腾状态下以 4~5 秒一滴的速度，继续自滴定管加入葡萄糖液，直至蓝色消失停止滴定。由于还原型的次甲基蓝遇到空气后又能转为氧化型，而恢复蓝色，因此当滴定到蓝色刚消失，出现黄色时应立即停止滴定，如果再现蓝色切勿继续滴定。

瓶号	斐林氏试剂		还原糖 提取液 (毫升)	总 糖 水解液 (毫升)	0.1% 葡萄 糖初滴入量 (毫升)		0.1%葡萄 糖滴定总量 (毫升)
	甲液 (毫升)	乙液 (毫升)					
1	5	5	—	—	7	加热至 沸腾状 态	
2	5	5	—	—	7		
3	5	5	5	—	—		
4	5	5	5	—	—		
5	5	5	—	5	—		
6	5	5	—	5	—		

五、计算

按下式分别计算山芋粉中还原糖和总糖的百分量。

$$\text{还原糖}\% = \frac{(A-B) \times \text{葡萄糖浓度mg/ml} \times \text{样品稀释倍数}}{\text{吸取测定毫升数} \times \text{样品量}} \times 100$$

$$\text{总糖}\% = \frac{(A-B) \times \text{葡萄糖浓度mg/ml} \times \text{样品稀释倍数}}{\text{吸取测定毫升数} \times \text{样品量}} \times 100$$

上式中 A 为空白所耗葡萄糖毫升数，B 为样品溶液所耗葡萄糖毫升数。

3. 总糖和还原糖测定(三)

——碱性铜试剂法

一、目的

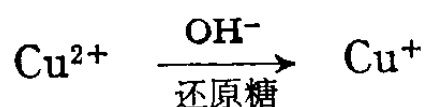
学习用碱性铜试剂法测定生物材料中总糖和还原糖的含量。

二、原理

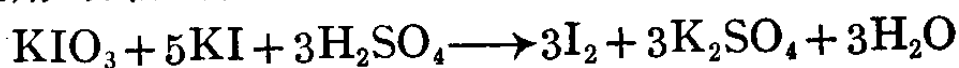
还原性糖与碱性铜试剂一起加热后, 试剂内二价铜离子就被还原成一价铜离子, 形成氧化亚铜的红色沉淀, 这样的一价铜在酸性条件下又被试剂中过量的碘氧化, 然后用硫代硫酸钠来滴定剩余的碘量, 就可计算出还原糖的含量。

实验过程中所包含的化学反应如下:

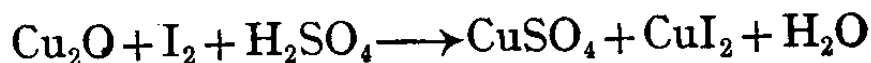
(1) 二价铜离子在碱性条件下被还原性糖还原为一价铜离子:



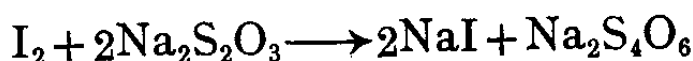
(2) 试剂中过量的碘是以碘酸钾与碘化钾的形式存在, 在应用时, 随时加入硫酸酸化, 碘就释放出来:



(3) 一价的铜离子在酸性条件下被碘氧化, 消耗了一部分碘:



(4) 剩余的碘, 用标准硫代硫酸钠来滴定:



由于被还原的铜量与还原糖之间的关系十分复杂, 它和糖的浓度、试剂的浓度、反应温度和时间等因素有关, 因此在测定样品时, 必须在相同条件下做一条已知糖浓度的标准曲

线,从标准曲线上找出样品的含糖量。

三、实验材料,仪器和试剂

1. 实验材料

山芋粉; 广范试纸 pH1~12; 滤纸。

2. 仪器

容量瓶 100 毫升($\times 3$); 量筒 50 毫升($\times 1$); 吸管 1 毫升($\times 4$), 5 毫升($\times 2$), 10 毫升($\times 1$); 大试管 3.0×20 厘米($\times 13$); 滴定管 25 毫升($\times 1$); 漏斗 6 厘米($\times 2$)。

3. 试剂

10% 氢氧化钠; 6*N* 盐酸; 5*N* 硫酸; 标准葡萄糖溶液 1 毫克/毫升; 1% 淀粉溶液。

0.005*N* 硫代硫酸钠溶液: 称取 1.24 克 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶解在蒸馏水中, 定容至 1 升。

碱性铜试剂: 25 克无水碳酸钠和 25 克酒石酸钾钠溶解在 500 毫升蒸馏水中。再加入 10% 硫酸铜溶液 75 毫升(7.5 克 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶解在 75 毫升水中), 两液混合时应慢慢加入并迅速捣拌。称碳酸氢钠 20 克, 碘化钾 5 克, 加到上述溶液中搅拌使溶解。取 150 毫升 0.1*N* 碘酸钾溶液(150 毫升中含有碘酸钾 3.210 克), 加到上述溶液中, 最后用蒸馏水定容至 1 升。

四、操作步骤

1. 样品中还原糖提取

称取山芋粉 1.00 克, 放在大试管中, 先用少量水调成糊状, 再加入 50 毫升水, 使搅拌均匀, 放在 50°C 水浴上保温半小时, 取出后定容至 100 毫升, 再经过滤, 滤液进行还原糖测定。

2. 样品中总糖的提取和水解

称取山芋粉 1.00 克, 放在大试管中用少量水调成糊状后,