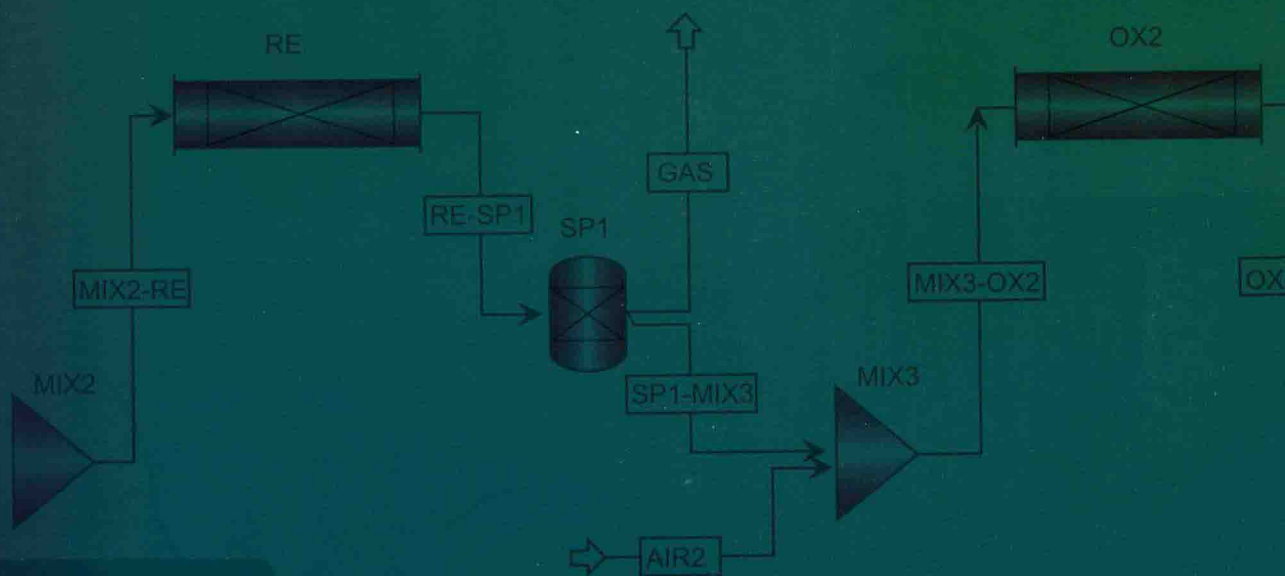


生物化学实验指导

主编 王丽燕



生物化学实验指导

主 编 王丽燕
副主编 谢兆辉 魏振林
参 编 曹际云 王丽梅 李 娟
朱新军 吕英海

 北京理工大学出版社

BEIJING INSTITUTE OF TECHNOLOGY PRESS

内 容 简 介

本书是编者结合多年的生物化学实验教学研究和科研成果编写的,分为生化实验须知、常用仪器设备的使用、生化实验和常用缓冲液的配置四个部分。为了便于使用,生化实验部分按生物化学理论课的顺序编排。在实验项目选择上,以基础性、验证性实验为主,同时对基础性、验证性实验进行改进,力图将基础性实验与解决实际问题相结合。本书可作为生物、农学、医学、园艺等专业的生物化学实验教材,对于相关行业从事生物化学检测的人员也有一定的参考意义。

版权专有 侵权必究

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验指导 / 王丽燕主编. —北京:北京理工大学出版社, 2017. 8
ISBN 978-7-5682-4611-8

I. ①生… II. ①王… III. ①生物化学-化学实验-医学院校-教学参考资料 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 194634 号

出版发行 / 北京理工大学出版社有限责任公司

社 址 / 北京市海淀区中关村南大街 5 号

邮 编 / 100081

电 话 / (010)68914775(总编室)

(010)82562903(教材售后服务热线)

(010)68948351(其他图书服务热线)

网 址 / <http://www.bitpress.com.cn>

经 销 / 全国各地新华书店

印 刷 / 北京市国马印刷厂

开 本 / 787 毫米×1092 毫米 1/16

印 张 / 6.25

字 数 / 150 千字

版 次 / 2017 年 8 月第 1 版 2017 年 8 月第 1 次印刷

定 价 / 35.00 元

责任编辑 / 王玲玲

文案编辑 / 王玲玲

责任校对 / 周瑞红

责任印制 / 施胜娟

图书出现印装质量问题,请拨打售后服务热线,本社负责调换

前 言

生物化学是生物、农学、医学、园艺等专业的理论基础课，生物化学实验对掌握生物化学基础理论知识和实验技能起着举足轻重的作用。根据生物化学实验的教学目标和人才培养要求，结合多年的生物化学实验教学研究和科研成果，我们编写了这部教材。本书根据创新性应用型能力培养的要求，以使学生掌握生物化学基本操作技术、培养生物思维为目的。本书分为生化实验须知、常用仪器设备的使用、生化实验、附录四个部分，为便于使用，其中生化实验部分以生物化学理论课的顺序编排。在实验项目选择上以基础性、验证性实验为主，同时对基础性验证性实验进行改进，力图将基础性实验与解决实际问题相结合。通过生物化学实验的学习不仅有益于学生进一步掌握生物化学理论知识，而且有益于增强知识运用能力和创新能力，同时为后续理论课的学习打下坚实基础。

本书由德州学院生命科学学院多位多年从事生物化学实验教学的教师编写，虽然有很多内容还有待完善，但这本书也凝聚了我们多年的心血。全书由王丽燕教授统筹组织，主要编者有王丽燕（实验 7, 13, 24, 25, 26, 27, 29, 31, 36, 37）、谢兆辉（实验 1, 2, 3, 21, 22, 23 以及附录部分）、魏振林（实验 12, 20, 38, 39, 40, 41,）、曹际云（实验 8, 9, 10, 11）、王丽梅（实验须知，常用仪器设备的使用，实验 4, 6）、李娟（30, 32, 33, 34）、朱新军（14, 15, 16, 17）、吕英海（实验 5, 18, 19, 35）。本书可作为生物、农学、医学、园艺等专业的生物化学实验教材，对于相关行业从事生物化学检测的人员也有一定的参考意义。在编写过程中借鉴参考了国内相关教材、专著、文献及网络资料，在此一并表示诚挚的谢意。

本书在编写过程中得到了德州学院教材建设基金项目、德州学院精品课程项目、名师工程项目的资助、并得到了北京理工大学出版社的帮助，在此表示诚挚的谢意。教材虽经过编者的细心校对，疏漏和不妥之处依旧在所难免，恳请读者提出宝贵意见和建议。

编者

目 录

第一部分 生化实验须知	1
一、实验室规则	1
二、实验室安全及防护知识	1
三、生化实验基本操作	2
四、实验记录及实验报告撰写	3
第二部分 常用仪器设备的使用	5
一、离心机的使用	5
二、pH计的使用	5
三、T6紫外可见分光光度计的使用	7
第三部分 生化实验	9
实验1 糖的颜色反应	9
实验2 还原性糖的鉴定	11
实验3 蒽酮比色法测定糖的含量	12
实验4 苯酚法测定可溶性糖含量	14
实验5 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原性糖含量	15
实验6 邻甲苯胺法测定血糖含量	17
实验7 油脂碘价的测定	18
实验8 油脂皂化值的测定	20
实验9 脂肪氧化、过氧化值及酸价的测定(滴定法)	21
实验10 血清胆固醇含量的测定——邻苯二甲醛法	22
实验11 乙酰丙酮显色法测定血清甘油三酯含量	24
实验12 氨基酸的分离与鉴定——纸层析	26
实验13 蛋白质的沉淀反应	28
实验14 紫外线吸收法测定蛋白质含量	30
实验15 考马斯亮蓝法测定植物总蛋白质含量	31
实验16 双缩脲法测定蛋白质含量	33
实验17 Folin-酚试剂法测定蛋白质含量	35
实验18 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清总蛋白	37
实验19 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离植物总蛋白	41
实验20 醋酸纤维薄膜电泳法分离血清蛋白质	44
实验21 酪蛋白的制备	46
实验22 温度、pH、激活剂及抑制剂对酶促反应速度的影响	47
实验23 酶的专一性	50
实验24 淀粉酶活力的测定	52

实验 25	果蔬中超氧化物歧化酶含量的测定	55
实验 26	血清谷丙转氨酶的测定	57
实验 27	愈创木酚法测定过氧化物酶 (POD) 活力	59
实验 28	DNA 的定量测定——二苯胺法	60
实验 29	核酸浓度测定——紫外线 (UV) 吸收法	61
实验 30	酵母 RNA 提取与地衣酚显色法含量测定	63
实验 31	CTAB 法提取植物 DNA	65
实验 32	琼脂糖凝胶电泳	67
实验 33	SDS 法提取动物肝脏 DNA	68
实验 34	二联吡啶法测定植物还原性和氧化性维生素 C 含量	70
实验 35	转基因植物的蛋白质印迹免疫分析	72
实验 36	聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳法测定蛋白质等电点	74
实验 37	离子交换柱层析法分离氨基酸	77
实验 38	酶联免疫吸附测定	80
实验 39	聚合酶链式反应	82
第四部分	常用缓冲液的配置	86

第一部分 生化实验须知

一、实验室规则

(1) 自觉遵守课堂纪律，维护课堂秩序，不迟到，不早退，不大声谈笑。

(2) 实验前必须认真预习，熟悉本次实验的目的、原理、操作步骤，懂得每一操作步骤的意义，了解所用仪器的使用方法，否则不能开始实验。

(3) 实验过程中要听从教师的指导，严肃认真地按操作规程进行实验，并把实验结果和数据及时、如实地记录在实验记录本上。

(4) 实验台面应随时保持整洁，仪器、药品摆放整齐。公用试剂用完后，应立即盖严放回原处。勿使试剂、药品洒在实验台面或地上。

(5) 使用仪器、药品、试剂和各物品必须注意节约。洗涤和使用仪器时，应小心仔细，防止损坏仪器。

(6) 实验完毕，仪器洗净放好，将实验台面整理干净，经教师检查同意后，才能离开实验室。

(7) 废液体可倒入水槽内，同时放水冲走。强酸、强碱溶液必须先用水稀释。其他固体废物和带渣滓的废物倒入废品缸内，不能倒入水槽或到处乱扔。

(8) 使用贵重精密仪器时，应严格遵守操作规程，发现故障须立即报告教师，不得擅自手检修。要精心使用和爱护仪器，如使用分光光度计时，不能将比色杯直接置于分光光度计上，并注意拿放比色杯时，不要打碎。

(9) 仪器损坏时，应如实向教师报告，并填写损坏仪器登记表，然后补领。

(10) 实验室内的一切物品，未经本室负责教师批准，严禁带出室外。借物必须办理登记手续。

(11) 实验完毕后，未用完物品应放回原处，不得在实验台上存放。

(12) 离开实验室前应认真、负责地检查水电，严防发生安全事故。

二、实验室安全及防护知识

(一) 实验室安全知识

在生物化学实验室中，经常会与毒性很强、有腐蚀性、易燃烧和具有爆炸性的化学药品直接接触，常常使用易碎的玻璃和瓷质器皿，以及在水、电等高温电热设备的环境下进行着紧张而细致的工作，因此，必须十分重视安全工作。

(1) 进入实验室，开始工作前，应了解水阀门及电闸所在处。离开实验室时，一定要将室内检查一遍，应将水、电的开关关好，门窗锁好。

(2) 使用电器设备（如烘箱、恒温水浴、离心机、电炉等）时，严防触电；绝不可用湿手开关电闸和电器。

(3) 使用浓酸、浓碱时，必须极为小心地操作，防止溅出。用移液管量取这些试剂时，

正确使用洗耳球。酸碱溶液若不慎溅到实验台上或地面，必须及时用湿抹布擦洗干净。如果触及皮肤，应立即治疗。

(4) 使用可燃物，特别是易燃物（如乙醚、丙酮、乙醇等）时，应特别小心。不要将其大量放在桌上，更不要在靠近火焰处操作。只有在远离火源时，或将火焰熄灭后，才可大量倾倒易燃液体。低沸点的有机溶剂不准在火上直接加热，只能在水浴上利用回流冷凝管加热或蒸馏。

(5) 如果不慎倾出了相当量的易燃液体，则应按如下法处理：

① 立即关闭室内所有的火源和电加热器。

② 关门，开启小窗及窗户。

③ 用毛巾或抹布擦拭洒出的液体，并将液体拧到大的容器中，然后再倒入带塞的玻璃瓶中。

(6) 废液，特别是强酸和强碱，不能直接倒在水槽中，应先稀释，然后倒入水槽，再用大量自来水冲洗水槽及下水道。

(7) 毒物应按实验室的规定办理审批手续后领取，使用时严格操作，用后妥善处理。

(二) 实验室灭火法

实验中一旦发生了火灾，切不可惊慌失措，应保持镇静。首先立即切断室内一切火源和电源，然后根据具体情况正确地进行抢救和灭火。

(1) 在可燃液体燃着时，应立即拿走着火区域内的一切可燃物质，关闭通风器，防止扩大燃烧。若着火面积较小，可用抹布、湿布、铁片或砂土覆盖，隔绝空气使之熄灭。但覆盖时要轻，避免碰坏或打翻盛有易燃溶剂的玻璃器皿，导致更多的溶剂流出而再着火。

(2) 酒精及其他可溶于水的液体着火时，可用水灭火。

(3) 汽油、乙醚、甲苯等有机溶剂着火时，应用石棉布或砂土扑灭。绝对不能用水，否则会扩大燃烧面积。

(4) 导线着火时，不能用水及二氧化碳灭火器，应切断电源或用四氯化碳灭火器。

(5) 衣服烧着时切忌奔走，可用衣服、大衣等包裹身体或躺在地上滚动，以灭火。

(6) 发生火灾时，应注意保护现场。较大的着火事故应立即报警。

三、生化实验基本操作

(一) 玻璃仪器的洗涤

1. 洗涤液

① 洗衣粉，肥皂水，洗洁精。

② 玻璃仪器专用洗涤液：主要成分为中性稀氯氧化剂。

2. 洗涤的要求与步骤

要求：应养成对使用过的仪器及时清洗的习惯。对于洁净的玻璃器皿，洗涤后表面应不挂任何水滴。

步骤：不净的器皿首先用洗衣粉或肥皂水洗刷，然后用自来水冲净，最后用去离子水冲洗。

3. 玻璃器皿的干燥

一般的玻璃仪器均可洗净后倒置架上，让水分蒸发，自然干燥。如需迅速干燥，应按仪

器的不同类型用下述不同方法处理:

① 试管、离心管、烧杯、烧瓶等普通玻璃器皿,可置于烘箱中在 $100\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下烘烤。

② 吸管及比色皿等玻璃仪器,应避免烘烤。

(二) 移液操作

1. 吸量管的使用

① 吸量管的选择:在确保一次完成转移的前提下,应选用容量较小的吸量管。对于同一次实验中同一种试剂的移取,应选用同一支吸量管。

② 操作:用洗耳球将液体吸至超过标线,右手移开洗耳球,迅速用食指压紧管口。需要时将管尖端外围拭净,调液面至标线,放开食指,使液体流入容器。

③ 读数:吸量管保持垂直,视线与液面应水平,管中液面与刻度线应相切。

2. 枪式移液器的使用

(1) 枪式移液器的结构如图 1-1 所示。

其内部柱塞分 2 段行程,第 1 挡为吸液,第 2 挡为放液。

(2) 操作:

① 调体积选取钮至所需值;

② 套上枪头,旋紧;

③ 垂直持握枪式移液器外壳,按下大拇指至第 1 挡;

④ 将枪头插入溶液,慢慢松开大拇指,使其复原;

⑤ 排放时,重新将大拇指按下,至第 1 挡后,继续按至第 2 挡以排空。

注:移取过程中应控制速度、力度。如需移取另一样品,按枪头排放钮,更换枪头。

(三) 混匀

① 旋转法:手持容器,使溶液做离心旋转。

② 指弹法:一手执试管上端,另一手轻弹试管下部,使其中液体做涡旋运动。

③ 搅动法:使用玻璃棒搅拌,此方法多用于溶解烧杯中的固体。

④ 混匀器法:将试管置于漩涡振荡器的振动盘上,稍用力下压,使内容物旋转。

⑤ 倒转混匀法:适用于具塞的容器,如容量瓶、具塞量筒及具塞离心管等。操作时,将容器反复倒转。

⑥ 吸管混匀法:用吸管将溶液反复吸吹数次,以达到混匀的目的。

4. 保温

将容器放入恒温水浴锅,调节温度设定钮至所需温度。水浴锅中的水量要充足。实验过程中要随时监测温度,并及时调节。

四、实验记录及实验报告撰写

1. 实验记录

实验过程中要详细、准确、如实地做好实验记录,记录如果有误,会导致整个实验失败。实验记录对培养严谨的科学作风至关重要。

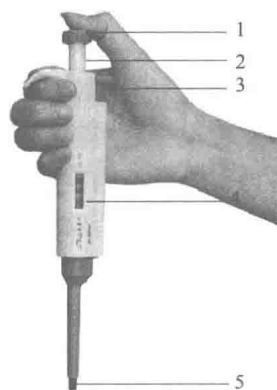


图 1-1 枪式移液器

1—体积选取钮; 2—液体吸放钮;
3—枪头排放钮; 4—体积显示屏;
5—枪头接嘴

(1) 实验前认真预习实验, 看懂实验原理和操作方法, 在记录本上写好实验预习报告, 包括简要的实验流程图和数据记录表格等。

(2) 实验中及时、准确地记录所观察到的现象和测量的数据, 条理清楚, 字迹端正, 切不可潦草, 以免日后无法辨认。

(3) 实验记录必须公正、客观, 不可夹杂主观因素。

(4) 实验中要记录的各种数据, 都应事先在记录本上设计好各种记录格式和表格, 以免实验中由于忙乱而遗漏测量和记录, 造成不可挽回的损失。

(5) 实验记录要注意有效数字, 如吸光度值应为“0.050”, 而不能记成“0.05”。每个结果都要尽可能重复观测 2 次以上, 即使观测的数据相同或偏差很大, 也都应如实记录, 不得涂改。

(6) 实验中要详细记录实验条件, 如使用的仪器型号、编号、生产厂家等; 生物材料的来源、形态特征、健康状况、选用的组织及其质量等; 试剂的规格、化学式、相对分子质量、试剂的浓度等。

2. 实验报告撰写

实验报告是实验的总结和汇报, 通过实验报告的撰写可以分析总结实验的经验, 学会处理各种实验数据的方法, 加深对有关生物化学与分子生物学原理和实验技术的理解和掌握, 同时也是学习撰写科学研究论文的过程。实验报告的格式应为: ① 实验目的; ② 实验原理; ③ 仪器和试剂; ④ 实验步骤; ⑤ 数据处理; ⑥ 结果讨论; ⑦ 实验心得。

每个实验报告都要按照上述要求来写, 实验报告的写作水平也是衡量学生实验成绩的一个重要方面。实验报告必须独立完成, 严禁抄袭教科书上的原理方法。实验报告使用的语言要简明清楚, 抓住关键, 各种实验数据都要尽可能整理成表格并作图表示之, 以便比较, 一目了然。通常采用 Excel 软件作图, 每个图都要有明显的标题, 坐标轴的名称要清楚完整, 要注明合适的单位。

实验结果和讨论是实验报告书写的重中之重, 总结一定要充分, 尽可能多查阅一些有关的文献和教科书, 充分运用已学过的知识, 进行深入的探讨, 勇于提出自己独到的分析和见解, 并对实验提出改进意见。

第二部分 常用仪器设备的使用

一、离心机的使用

离心机是利用离心力对混合溶液进行分离和沉淀的一种常用仪器，在实验过程中，在沉淀有黏性、沉淀颗粒小、沉淀量过多而疏松、母液量很少等情况下，如果需要将沉淀和母液分离开，使用离心方法较为合适。

(一) 低速冷冻离心机的使用方法

(1) 插上电源，打开离心机开关，使离心机预冷 20 min 左右。

(2) 使用“TIME”（时间）键设定离心时间、旋转“SPEED”（速度）键设定转速或相对离心力。

(3) 打开预冷好的离心机，旋开离心机转子盖，将装有样品的离心管先在天平上平衡，然后擦干离心管外壁，放入离心机中，盖上离心机的转子盖及离心机盖，按“START/STOP”键启动离心。

(4) 离心停止后，取走离心样品。

(5) 敞开离心机盖，关闭离心机电源。待离心机内壁冰融化后，用软毛巾擦去离心机内的水分和转头。

(6) 盖上离心机转子盖，合上离心机盖，按离心机开关键关闭离心机，拔下插头。

(二) 注意事项

(1) 每次离心操作都必须严格遵守平衡的要求，否则将会损坏离心机部件，甚至造成严重事故。

(2) 离心过程中，若听到特殊响声，表明离心管可能破碎，应立即停止离心。

(3) 离心时，先将待离心的物质转移到大小合适的离心管内，盛量不宜过多（占管的 2/3 体积），以免溢出。

(4) 有机溶剂和酚等具有腐蚀作用，若有渗漏现象，必须及时擦洗干净。

(5) 避免连续使用时间过长。

(6) 定期检查离心机内电动机的电刷与整流子磨损情况，严重时更换电刷或轴承。

二、pH 计的使用

(一) 使用前的准备

(1) 准备调节用的 NaOH 溶液、HCl 溶液及标定溶液。

(2) 打开 pH 计，调定 pH，按选项键选择 pH 和电压选项，选择其中的 pH 项，调节温度补偿旋钮到所测的温度值下。

(二) pH 计的使用方法

(1) 打开电源开关后，调节到 pH 测量挡。

(2) 将复合电极从电极液中取出，用去离子水冲洗后插入 pH 6.86 标准溶液中，调节

仪器定位旋钮,调至读数 6.86,直到稳定后,按“确定”按钮确定。

(3) 将复合电极从 pH 6.86 标准溶液中取出,用去离子水洗净,用滤纸擦干。

(4) 将复合电极插入与待测溶液 pH 接近的标准溶液中,用斜率旋钮调至对应的标准溶液 pH (pH 4.00 或 9.18)。读数稳定后,按“确定”按钮。

(5) 将复合电极插入待测溶液中,读取 pH,然后根据需要滴加 NaOH 溶液或 HCl 溶液至所需 pH。

(三) pH 计使用时的注意事项

(1) pH 计在连续使用时,每天要标定一次;一般在 24 h 内仪器不需要再标定。

(2) 标定的缓冲溶液一般第一次用 pH=6.86 的溶液,第二次用接近被测溶液 pH 的缓冲液。如被测溶液为酸性,缓冲液应选 pH=4.00;如被测溶液为碱性,则选 pH=9.18 的缓冲液。

(3) 测量时,电极的引入导线应保持静止,否则会引起测量不稳定。

(4) 电极切忌浸泡在蒸馏水中。pH 计所使用的电极如为新电极或长期未使用的电极,则必须在使用前用蒸馏水进行数小时的浸泡,这样 pH 计电极的不对称电位可以被降低到稳定水平,从而降低电极的内阻。

(5) pH 计在进行 pH 测量时,要保证电极的球泡完全进入被测量介质内,这样才能获得更加准确的测量结果。

(6) 使用 pH 计时,要去除参比电极电解液加液口的橡皮塞,这样参比电解液就能够在重力的作用下,持续向被测溶液渗透,避免造成读数上的漂移。

(7) 保持电极球泡的湿润,如果发现干燥,在使用前应在 3 mol/L 氯化钾溶液或微酸性的溶液中浸泡几小时,以降低电极的不对称电位。

(8) 配置 pH=6.86 和 pH=9.18 的缓冲液所用的水,应预先煮沸 15~30 min,除去溶解的二氧化碳。在冷却过程中应避免与空气接触,以防止二氧化碳的污染。

(9) 复合电极的外参比补充液为 3 mol/L 氯化钾溶液,补充液可以从电极上端小孔加入。复合电极不使用时,拉上橡皮套,防止补充液干涸。

(10) 电极经长期使用后,如发现斜率略有降低,则可把电极下端浸泡在 4% 氢氟酸中 3~5 s,用蒸馏水洗净,然后在 0.1 mol/L 盐酸溶液中浸泡,使之复新。

(11) pH 计的电子单元使用必须注意电路的保护,在不进行 pH 测量时,要将 pH 计的输入短路,以避免 pH 计的损坏。

(12) pH 计的玻璃电极插座必须保持干净、清洁和干燥,不能接触盐雾和酸雾等有害气体,同时,严禁玻璃电极插座上沾有任何水溶液,以避免 pH 计高输入阻抗。

(13) 未到需要的 pH 时,要小心地加入 NaOH 溶液和 HCl 溶液,防止超过所需的 pH 范围。

(14) 测定时温度不能过高,如超过 40 °C,测定结果不准确。

(15) 复合电极应避免和有机物接触,一旦接触或沾污,要用无水乙醇清洗干净。

(16) 仪器在使用前必须进行校准。如果仪器不关机,可以连续测定,一旦关机,就要校准。

三、T6 紫外可见分光光度计的使用

(一) 分光光度计的工作原理

被分析的物质经一定频率的紫外或可见光照射，引起分子中价电子的跃迁，导致光波被有选择地吸收。吸收光谱可以反映待测样的特征，在紫外可见光的范围内，对于一个特定的波长，吸收的程度与试样中该成分的浓度成正比，因此，通过测量光谱可以进行定性分析，并且根据吸收与已知浓度的标样的比较，还可以进行定量分析。

(二) 紫外可见分光光度计特点和主要用途

紫外可见分光光度计涉及的波长范围是 $0.2 \sim 0.8 \mu\text{m}$ ，它在物质检测中得到广泛的应用。通常用作物质鉴定、纯度检查，有机分子结构的研究。在定量方面，可测定结构比较复杂的化合物和混合物中各组分的含量，也可以测定物质的离解常数、络合物的稳定常数。用于物质相对分子质量鉴别和微量滴定中指示终点，以及在高效液相色谱中作检测器等。

(三) 操作步骤

(1) 开机自检、预热：依次打开打印机、仪器主机电源，仪器开始初始化，如图 2-1 所示；约 3 min 时间初始化完成，自检完成后机器预热 20 min 后尚可进行测定。

初始化完成后仪器进入主菜单界面，如图 2-2 所示。



图 2-1 开始初始化

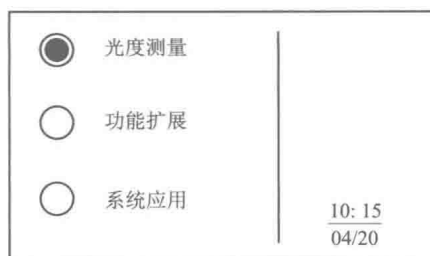


图 2-2 主菜单界面

(2) 进入光度测量状态：按“ENTER”键进入光度测量主界面，如图 2-3 所示。

(3) 进入测量界面：按“START/STOP”键进入样品测定界面，如图 2-4 所示。



图 2-3 光度测量主界面

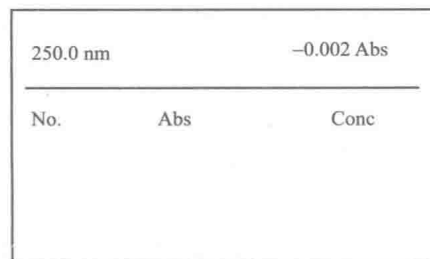


图 2-4 样品测定界面

(4) 设置测量波长：按“GOTO入”键，在界面中输入测量的波长，如图 2-5 所示。例如，需要在 460 nm 处测量，输入 460，按“ENTER”键确认，仪器将自动调整波长。

调整完波长后如图 2-6 所示。



图 2-5 设置测量波长

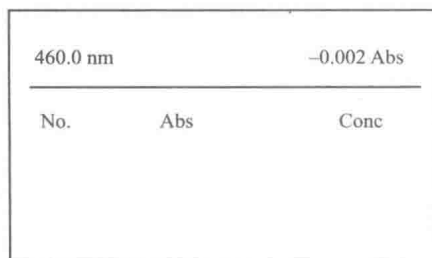


图 2-6 调整波长

(5) 进入设置参数：按“SET”键进入参数设定界面，按“下”键使光标移动到“试样设定”，如图 2-7 所示。按“ENTER”键确认，进入设定界面。

(6) 设定使用样品池个数：按“下”键使光标移动到“使用样池数”，按“ENTER”键循环选择需要使用的样品池个数，如图 2-8 所示。



图 2-7 选定“试样设定”

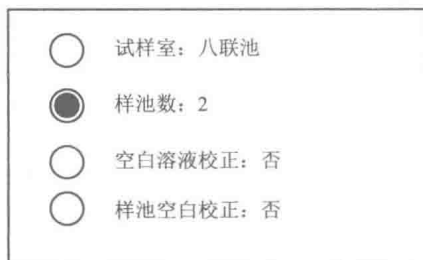


图 2-8 设置样品池数

460.0 nm		-0.002 Abs
No.	Abs	Conc
1-1	0.012	1.000
2-2	0.052	2.000

图 2-9 放置样品

(7) 样品测量：按“RETURN”键返回到参数设定界面，再按“RETURN”键返回到光度测量界面。在 1 号样品池内放入空白溶液，2 号池内放入待测样品，如图 2-9 所示。关闭好样品池盖后，按“ZERO”键进行空白校正，再按“START/STOP”键进行样品测量。

① 如需要测量下一个样品，取出比色皿，更换为下一个要测量的样品，按“START/STOP”键即可

读数。

② 如需更换波长，可直接按“GOTO入”键调整波长。注意，更换波长后，必须重新按“ZERO”键进行空白校正。如果每次使用的比色皿数量是固定的，下一次使用仪器可以跳过步骤(5)、(6)直接进入样品测量。

(8) 结束测量：退出程序，从样品池中取走所有比色皿，清洗干净，以便下一次使用。按“RETURN”键直接返回到仪器主菜单界面后，再关闭仪器电源。对于被考马斯亮蓝等污染的比色皿，可用乙醇浸泡后清洗。

第三部分 生化实验

实验 1 糖的颜色反应

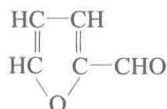
一、实验目的

- (1) 了解糖类颜色反应的原理。
- (2) 学习利用糖的颜色反应鉴别糖类的方法。

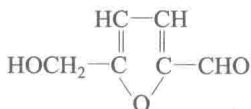
二、实验原理

1. α -萘酚反应 (Molisch 反应)

糖在浓无机酸(硫酸、盐酸)作用下,脱水所生成的糠醛及糠醛衍生物能与 α -萘酚生成紫红色复合物,可在糖溶液和浓硫酸之间形成紫环,因此又称为紫环反应。自由存在和结合存在的糖均呈阳性反应。此外,糠醛及糠醛衍生物、甲酸、丙酮等对此反应均呈阳性。因此,阴性反应可以表明没有糖类存在,而阳性反应则代表反应的一定是糖。



糠醛(呋喃醛)



糠醛衍生物羟甲基糠醛

2. 间苯二酚反应 (Seliwanoff 反应)

在浓酸作用下,酮糖脱水生成羟甲基糠醛,后者与间苯二酚作用生成红色物质。此反应是酮糖的特异反应。醛糖在同样条件下颜色反应缓慢,只有在糖浓度较高或煮沸时间较长时,才呈微弱的阳性反应。根据反应速度的快慢,可用此方法鉴定醛糖和酮糖。在实验条件下,蔗糖有可能水解而呈阳性反应。

3. 甲基间苯二酚反应 (Bial 反应)

戊糖与浓盐酸加热形成糠醛,在有 Fe^{3+} 存在下,它与甲基间苯二酚(地衣酚)缩合,形成深蓝色的沉淀物。此沉淀物溶于正丁醇。己糖也能发生反应,但产生灰绿色甚至棕色的沉淀物。

三、试剂与器材

1. 试剂

- (1) 莫氏(Molisch)试剂:5% α -萘酚的酒精溶液。称取 α -萘酚5g,溶于95%酒精

中, 总体积达 100 mL, 储于棕色瓶内, 用前配制。

(2) 塞氏 (Seliwanoff) 试剂: 0.05% 间苯二酚-盐酸溶液。称取间苯二酚 0.05 g 溶于 30 mL 浓盐酸中, 再用蒸馏水稀释至 100 mL, 用前配制。

(3) Bial 氏试剂: 溶解 1.5 g 地衣酚 (甲基间苯二酚) 于 500 mL 浓盐酸中, 并加 20~30 滴 10% 三氯化铁溶液。

(4) 1% 阿拉伯糖。

(5) 1% 半乳糖。

(6) 1% 葡萄糖溶液。

(7) 1% 果糖溶液。

(8) 1% 蔗糖溶液。

(9) 1% 淀粉溶液。

(10) 1% 麦芽糖溶液。

(11) 浓硫酸。

2. 器材

(1) 试管及试管架。

(2) 滴管。

(3) 水浴锅。

四、实验操作

1. α -萘酚反应 (Molisch 反应)

取 5 支试管, 分别加入 1% 葡萄糖溶液、1% 果糖溶液、1% 蔗糖溶液、1% 淀粉溶液、1% 麦芽糖溶液各 1 mL。再向 5 支试管中各加入 2 滴莫氏试剂, 充分混合。将试管倾斜, 沿管壁慢慢加入浓硫酸约 1 mL, 慢慢立起试管, 切勿摇动。浓硫酸沉到试液下, 从而形成两层。在两液分界处有紫红色环出现。观察、记录各管颜色。

2. 间苯二酚反应 (Seliwanoff 反应)

取 3 支试管, 分别加入 1% 葡萄糖溶液、1% 果糖溶液、1% 蔗糖溶液各 0.5 mL。再向各管分别加入塞氏试剂 5 mL, 混匀。将 3 支试管同时放入沸水浴中, 注意观察、记录各管颜色的变化及变化时间。

3. 甲基间苯二酚反应 (Bial 反应)

取 3 支试管, 分别加入 Bial 试剂 1 mL, 再分别加入 1% 葡萄糖溶液、1% 半乳糖、1% 阿拉伯糖溶液各 0.5 mL, 混匀。将 3 支试管同时放入沸水浴中, 注意观察、记录各管颜色的变化及变化时间。

五、注意事项

(1) 糖的颜色反应非常灵敏, 所用的试剂、器材应干净, 防止污染。

(2) 糖的浓度会影响实验中颜色的深浅。

(3) 各试管加热前要做好标记, 以防混淆。

(4) 用吸量管或移液器吸取溶液时, 防止溶液间相互污染。

六、思考题

- (1) 如何鉴别酮糖和醛糖?
- (2) α -萘酚反应的原理是什么?

实验 2 还原性糖的鉴定

一、实验目的

掌握还原性糖的鉴定原理和方法。

二、实验原理

1. 斐林反应 (Fehling 反应)

斐林试剂是含有硫酸铜和酒石酸钾钠的氢氧化钠溶液。硫酸铜与碱溶液混合加热,生成黑色的氧化铜沉淀。若同时有还原性糖存在,则产生砖红色的氧化亚铜沉淀。为防止铜离子和碱反应生成氢氧化铜或碱性碳酸铜沉淀,可在斐林试剂中加入酒石酸钾钠,它可与 Cu^{2+} 形成可溶性的酒石酸钾钠络合铜离子。该反应是可逆的。费林试剂是一种弱的氧化剂,它不与酮和芳香醛发生反应。

2. 本尼迪克特反应 (Benedict 反应)

本尼迪克特试剂是斐林试剂的改良,利用柠檬酸作为 Cu^{2+} 的络合剂,碱性比斐林试剂的弱,灵敏度高,干扰因素少。

三、试剂及器材

1. 试剂

(1) 斐林 (Fehling) 试剂:

甲液 (硫酸铜溶液): 称取 34.5 g 硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 溶于 500 mL 蒸馏水中。

乙液 (碱性酒石酸盐溶液): 称取 125 g 氢氧化钠和 137 g 酒石酸钾钠溶于 500 mL 蒸馏水中。

用前将甲、乙两液等量混合。

(2) 本尼迪克特 (Benedict) 试剂:

称取 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 无水碳酸钠溶于 400 mL 水中,另外,称取 8.5 g 硫酸铜溶于 50 mL 热水中。将硫酸铜溶液缓慢加入柠檬酸钠-碳酸钠溶液中,边加边搅拌,如有沉淀,需过滤后使用。

(3) 其他:

1%葡萄糖溶液、1%果糖溶液、1%蔗糖溶液、1%麦芽糖溶液、1%淀粉溶液。

2. 器材

(1) 试管及试管架。

(2) 吸管。