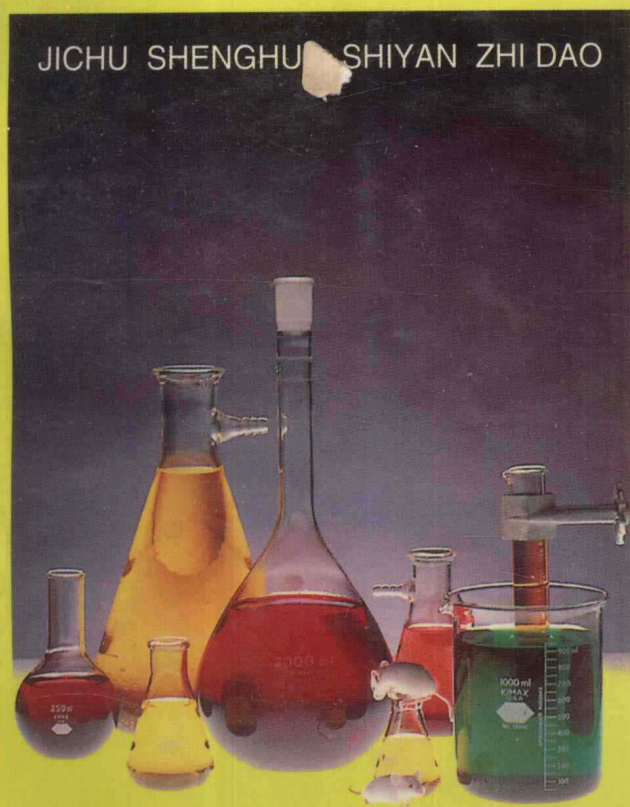


基础生化实验指导

钱万英 余嗣明 主编



安徽大学出版社

基础生化实验指导

姚乃昌 申纪明 主编



普通高等教育教材

基础生化实验指导

钱万英 余嗣明 主编

安徽大学出版社
一九九七年·合肥

内 容 提 要

本书是在编者历年来教学工作中编写的实验教材和科研工作中应用到的实验技术的基础上,同时参照其他院校的有关实验教材和讲义,经重新整理编写而成的。全书共编入 38 个实验,包括糖类、脂类、蛋白质、酶、核酸、维生素、激素等的分离、制备、纯化、分析和鉴定技术。其中既有加强学生掌握基本理论知识和基本实验技能的传统实验,同时也注意引进一些新近发展起来的生化研究技术。这些实验均经过历年教学实践的反复验证,比较成熟。书后附有参考文献及附录,包括一些重要仪器的使用方法及各种常用数据表,供读者查阅。

本书可供综合性大学、师范、医药和农林院校等有关专业作实验课教材之用,也可供有关教师 and 科技人员参考。

基 础 生 化 实 验 指 导

钱万英 余嗣明 主编

安徽大学出版社出版发行

(合肥市肥西路 3 号 邮编 230039)

铁四局印刷厂印刷 新华书店经销

开本 850×1168 1/32 印张 8.25 字数 201 千

1997 年 7 月第 1 版 1997 年 7 月第 1 次印刷

印数 5000

责任编辑张青棋 封面设计孟献辉

ISBN 7-81052-105-5/Q·2 定价 12.50 元

前 言

近年来,随着生物化学的迅速发展,生化实验技术不断更新。虽然有关生物化学实验技术方面的教材不算太少,但是,由于各个院校的具体实验条件的限制,要找到一本适合自己特点的教材也并非易事。因此,我们在历年实验教学的基础上,根据自己的科研工作的体会,同时参阅其他兄弟院校的有关实验教材、讲义,将我们使用数年的生物化学实验讲义加以修改、补充,编成此书。其宗旨在于加强学生学习和掌握生物化学的基本理论、基本知识和基本实验技能的训练,同时也注意引进一些新近发展起来的重要的生物化学研究技术,培养学生具有初步的分析问题和解决问题的能力以及严格的科学作风,为今后从事生物化学和分子生物学研究作准备。

本实验指导共有糖类、脂类、蛋白质、酶、核酸、维生素、激素、生物氧化和物质代谢等方面的实验共 38 个,其中既有一些经典的定性、定量、印证实验,也有一些近年来发展起来的比较成熟的而得以广泛使用的新方法。它包括比色、纸层析、薄层层析、醋酸纤维素薄膜电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、超薄层等电聚焦、离子交换和分子筛柱层析、生化制备等基本实验技术。

本书可供综合性大学、师范、医药和农林院校等有关专业作为实验教材之用,也可供有关教师和科技人员参考。

参加本书编写工作的有安徽大学、安徽农业大学、安徽师范大学和安徽机电学院的教师和实验技术人员,他们长期担任着实验教学和从事科研工作,具有较为丰富的实践经验。其中大部分编写工作由钱万英、余嗣明、张部昌和战广琴承担,最后由钱万英、余

嗣明二人负责统稿。本书在编写过程中还参阅了许多兄弟院校的有关教材,并始终得到了安徽大学出版社的大力支持和帮助,在此一并表示衷心感谢。

限于编者的理论水平和实践经验,加之编写时间仓促,书中的缺点和错误在所难免,真诚地欢迎使用和阅读本书的教师、同学、技术人员和读者不吝批评指正。

编著者

一九九七年三月于合肥

目 次

前言	(I)
实验室规则	(1)
实验记录及实验报告	(3)
实验一 糖类的定量测定——3,5-二硝基 水杨酸比色定糖法	(5)
实验二 Somogyi 比色法测定还原糖	(9)
实验三 血糖的测定——邻甲苯胺法	(13)
实验四 粗脂肪的定量测定——索氏(Soxhlet) 提取法	(17)
实验五 血清胆固醇的测定——磷硫铁法	(22)
实验六 蛋白质及氨基酸的呈色反应	(25)
实验七 蛋白质的两性反应和等电点的测定	(31)
实验八 蛋白质浓度的测定——总氮量的测定	(35)
实验九 Folin-酚法测定血清蛋白质含量	(42)
实验十 纸层析法分析氨基酸	(45)
实验十一 离子交换柱分离氨基酸	(49)
实验十二 血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	(52)
实验十三 盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 血清蛋白质	(61)
实验十四 超薄层等电聚焦电泳	(77)
实验十五 蛋白质分子量测定 ——SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	(83)
实验十六 凝胶层析(分子筛层析)	(95)

实验十七	DEAE—纤维素薄层层析法分离 鉴定核苷酸·····	(101)
实验十八	动物组织 DNA 的制备与测定 ·····	(104)
实验十九	酵母 RNA 的提取及含量测定 ·····	(109)
实验二十	核酸的定量测定——定磷法·····	(112)
实验二十一	发酵过程中无机磷的测定·····	(116)
实验二十二	酶的化学特性·····	(120)
实验二十三	外界因素对酶活性的影响·····	(127)
实验二十四	底物浓度对酶促反应速度的影响 ——米氏常数(K_m)的测定 ·····	(132)
实验二十五	琥珀酸脱氢酶及丙二酸的抑制作用·····	(136)
实验二十六	过氧化物酶和过氧化氢酶的定性反应·····	(140)
实验二十七	酶促转氨反应·····	(144)
实验二十八	乳酸脱氢酶的提取及活力测定·····	(148)
实验二十九	枯草杆菌蛋白酶活力的测定·····	(151)
实验三十	液化型淀粉酶活力的测定·····	(155)
实验三十一	糖化型淀粉酶活力的测定·····	(158)
实验三十二	透析对酵母发酵力的影响·····	(162)
实验三十三	猪胰糜蛋白酶的制备及活力测定·····	(164)
实验三十四	维生素 A、B ₁ 和 B ₂ 的定性试验 ·····	(172)
实验三十五	维生素 C 的定量测定 ——2,6-二氯酚靛酚滴定法 ·····	(176)
实验三十六	碘滴定法测定抗坏血酸·····	(181)
实验三十七	肾上腺素的提取与鉴定·····	(184)
实验三十八	脂肪酸的 β -氧化 ·····	(186)
附录	·····	(191)
一、实验室安全及防护知识	·····	(191)

二、实验室常识	(195)
三、玻璃仪器的洗涤及各种洗涤液的配制方法	(196)
四、常用缓冲溶液的配制方法	(199)
五、层析法常用数据表	(205)
六、氨基酸的一些物理常数	(215)
七、一些常用数据表	(217)
八、常用仪器的使用方法	(226)

实验室规则

为了保证实验室的安全和安静,使实验工作顺利进行,要求遵守下列规则:

1. 每个同学都应该自觉地遵守课堂纪律,维持课堂秩序,不迟到、不早退,实验室内不准大声喧哗,不准进食、喝水。不准穿拖鞋和汗背心参加实验。

2. 实验前一定要预习好实验指导书,明确实验的目的,了解实验的内容和原理,熟悉实验步骤。实验过程中,要听从教师的指导,严格认真地按操作规程进行,并简要地、准确地、如实地将实验结果和数据记录下来。严禁抄袭别人的数据,课后写出实验报告,由课代表按时交给教师。

3. 环境和仪器的清洁整齐是搞好实验的重要条件。实验台面、试剂药品架上必须保持整洁,仪器药品要井然有序,公用试剂用毕应立即盖严放回原处,勿使试剂药品洒在实验台面及地上。实验完毕,需将药品试剂排列整齐,玻璃仪器要洗净倒置放好,将实验台面擦拭干净,经指导教师检查后,方得离开实验室。

4. 使用仪器、药品试剂和各种物品必须注意节约。特别要注意保持药品和试剂的纯净,严防混杂污染,特别使用贵重精密仪器时,应严格遵守操作规程。

5. 废弃物(滤纸、滤渣、碎玻璃管等)不准乱扔乱倒,要倒入废液缸或指定的回收容器中。

6. 仪器损坏时,应如实向指导教师报告,然后补领,并在损坏仪器登记簿上登记。

7. 实验室内一切物品,未经本室教师批准,严禁携出室外。

8. 每次实验课由班长安排同学轮流值日。值日主要负责当天实验室的卫生、安全和一些服务性的工作(水龙头是否关紧,电插头是否拔下等)。

9. 对实验的内容和安排不合理的地方可提出改进意见,对实验中出现的一些反常现象,应进行讨论,并大胆提出自己的看法,做到生动、活泼、主动地学习。

实验记录及实验报告

一、实验记录

实验课前除了要认真预习本次实验的内容外,还要备有实验课记录本,将实验中观察到的现象结果和数据及时地直接记录在记录本上,绝对不可用单片纸或草稿。原始记录必须准确、简炼、清楚。从第一堂实验课开始,就应养成这种良好的习惯。

记录时,应做到正确记录实验结果,切忌夹杂主观因素,这是十分重要的。在实验条件下,观察到的现象应如实地记录下来,如滴定管的读数,分光光度计的读数,实验中使用仪器的类型、编号及试剂的规格、化学式、分子量、准确的浓度等都应记录清楚,以便总结实验时进行核对和作为查找成败原因的参考依据。

如发现记录的结果有怀疑、遗漏、丢失或实验中出现异常现象,都必须找原因重做实验,如将不可靠的结果当成正确的记录,在实际工作中可能造成难以估计的损失。因此在学习期间就应一丝不苟,努力培养严谨的科学作风。

二、实验报告

实验结束后,应及时整理和总结实验结果,写出实验报告。下面列举实验报告的格式,供参考。

实验(编号) (实验名称)

一、实验目的

二、实验原理

三、操作步骤

四、结果与讨论

说明:实验报告中的实验名称和目的,应该是针对这次实验课的全部内容而必须达到的目的。在写实验报告时可以按照实验内容分别写原理、操作步骤、结果与讨论。原理部分应简述基本原理;操作步骤可采用工艺流程图的方式或自行设计的表格来表示。某些实验的操作步骤可以和结果与讨论部分合并,自行设计各种表格综合书写。结果与讨论的内容包括实验结果及观察现象的小结、对实验课遇到的问题如实验的正常结果和异常现象以及思考题进行探讨、对于实验设计的认识体会建议、对实验课的改进意见等。

实验一 糖类的定量测定

——3,5-二硝基水杨酸比色定糖法

一、目的与要求

1. 掌握 3,5-二硝基水杨酸比色法定糖的原理及方法。
2. 用 3,5-二硝基水杨酸定糖法测定青菜叶、山芋粉中的还原糖和总糖。
3. 熟悉 721 型分光光度计的原理及使用方法。

二、原理

糖的测定方法有物理和化学两类。由于化学方法比较准确，常常使用之。还原糖的测定是糖定量测定的基本方法。还原糖是指含有自由醛基和酮基的糖类。

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，在一定范围内，棕红色物质颜色的深浅程度与还原糖的量成正比。因此，我们可以利用比色法测定样品中还原糖以及总糖的量。

该法是半微量定糖法，操作简便、快速，杂质干扰较少。

三、器材与试剂

(一)器材

- | | |
|---------------|-------------|
| 1. 721 型分光光度计 | 2. 电热恒温水浴锅 |
| 3. 铜水浴锅 | 4. 大试管和大试管架 |
| 5. 容量瓶(100ml) | 6. 玻璃漏斗和烧杯 |

7. 吸量管(1ml、2ml)和吸量管架 8. pH 试剂

9. 量筒(10ml、100ml)

(二)材料

青菜叶或苹果(去皮) 山芋粉

(三)试剂

1. 3,5-二硝基水杨酸试剂(又称 DNS 试剂)

配制方法 I :

甲液——溶解 6.9g 结晶酚于 15.2ml 10% NaOH 中,并稀释 69ml,在此溶液中加入 6.9g 亚硫酸氢钠。

乙液——称取 255g 酒石酸钾钠,加到 300ml 10% NaOH 中,再中入 880ml 1% 3,5-二硝基水杨酸溶液。

将甲液与乙液相混合即得黄色试剂,贮于棕色试剂瓶中,在室温下放置 7~10 天以后使用。

配制方法 II :

精确称取 3,5-二硝基水杨酸 2g 溶于 20ml 1N NaOH 中并加入 50ml 蒸馏水,再加入 30g 酒石酸钾钠,待溶解后,用蒸馏水稀释至 100ml,盖紧瓶塞,勿使二氧化碳进入。

2. 0.1% 葡萄糖标准液:准确称取 100mg 分析纯的葡萄糖(预先在 105℃ 干燥至恒温),用少量蒸馏水溶解后定容至 100ml,置于冰箱保存备用。

3. 碘-碘化钾($KI-I_2$)溶液:把 20g 碘化钾和 10g 碘溶于 100ml 水中,使用前,取 1ml 加水稀释到 10ml。

4. 6N HCl。

5. 10% NaOH。

6. 酚酞指示剂。

7. 85% 乙醇。

四、操作步骤

1. 样品中还原糖的提取:称取青菜叶 5g(除去主叶脉)或苹果 1g(去皮)加石英砂少许于研钵中研磨,加 50ml 蒸馏水洗研钵并移至大试管,放入 50℃ 恒温水浴中保温 30 分钟。保温完毕先用纱布过滤,再用滤纸过滤,移入 100ml 容量瓶,蒸馏水定容备用。

2. 样品中总糖的水解及提取:准确称取山芋粉 1g,放入大试管中,加入 10ml 6N HCl 和 15ml 蒸馏水,混匀。在沸水浴中加热半小时后,用 KI-I₂ 溶液检查水解程度。若已水解完全,则不呈现蓝色。冷却后加入酚酞指示剂一滴,以 10% NaOH 中和至溶液呈微红色。过滤并定容至 100ml。再精确吸取上述溶液 10ml,放入 100ml 容量瓶中,稀释到刻度,备用。

3. 葡萄糖标准曲线的制作:取 5 支大试管分别按下表顺序加入各种试剂。

表 1-2 制作葡萄糖标准曲线时各试剂用量

项目 \ 管号	空白	1	2	3	4	5	6
含糖总量(mg)	0	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
葡萄糖液(ml)	0	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
蒸馏水(ml)	2.0	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6
DNS 试剂(ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
加热	均在沸水浴中加热 5 分钟						
冷却	立即用流动冷水冷却						
蒸馏水(ml)	21.5	21.5	21.5	21.5	21.5	21.5	21.5
光密度(O.D. 520)							

将以上各管溶液混匀后,在 721 型分光光度计(520nm)进行比色测定,用空白管溶液调零点,记录光密度值,以葡萄糖浓度为横坐标,光密度为纵坐标,绘制出标准曲线。

4. 样品中含糖量的测定:取 7 支大试管,分别按下表加入各种试剂。

表 1-3 测定样品中含糖量时各试剂用量

项目 \ 数量	管号	空白	还原糖			总 糖		
			1	2	3	4	5	6
样品量(ml)		0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
蒸馏水(ml)		2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
DNS 试剂(ml)		1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
加热	均在沸水浴中加热 5 分钟							
冷却	立即用流动冷水冷却							
蒸馏水(ml)		21.5	21.5	21.5	21.5	21.5	21.5	21.5
光密度(O. D. 520)								

将各管混匀后,按制作标准曲线时同样的操作测定各管的光密度,在标准曲线上查出相应的还原糖含量,按下述公式计算出山芋粉、青菜叶或苹果内还原糖与总糖的百分含量。

$$\text{还原糖 \%} = \frac{\text{还原糖克数} \times \text{样品稀释倍数}}{\text{样品重量}} \times 100$$

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

五、注意事项

在实验过程中所有的试管要干净,加入各种试剂量要准确。

六、思考题

1. 写出 3,5-二硝基水杨酸的化学结构式。
2. 比色测定时为什么要设空白管?