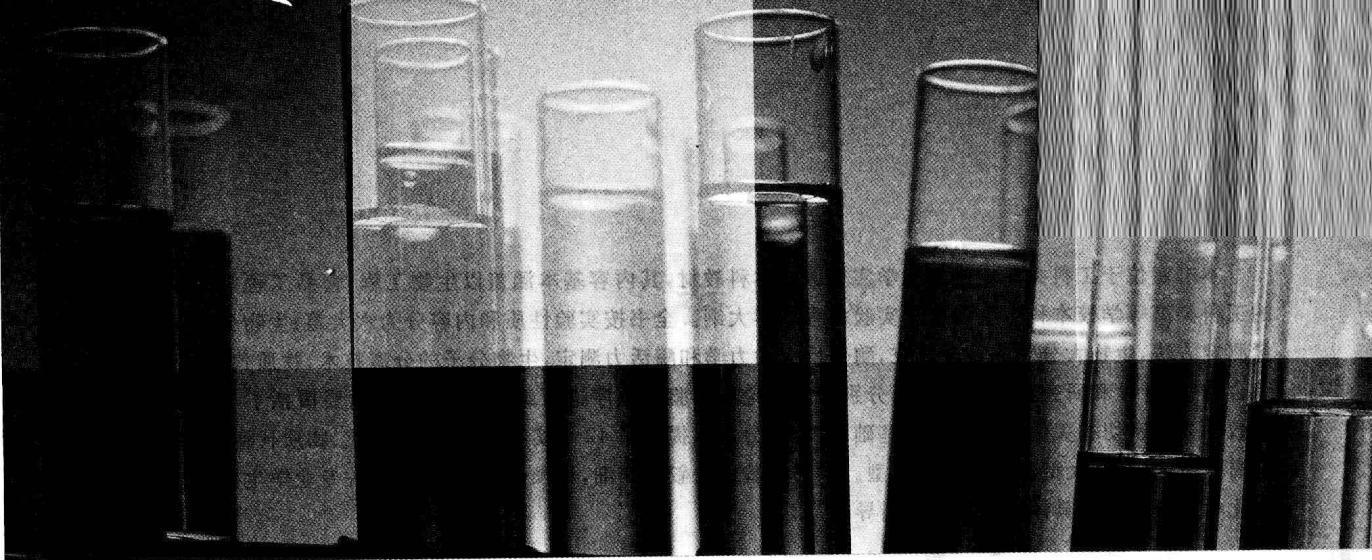




# 生物化学实验指导

## Experimental Guide for Biochemistry

周楠迪 史 锋 田亚平 编



# 生物化学实验指导

SHENGWU HUAXUE SHIYAN ZHIDAO

周楠迪 史锋 田亚平 编



高等教育出版社·北京  
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

## 内容提要

本书定位于工科类专业生物化学实验课程本科教材,其内容基本涵盖以生物工程、食品工程等专业为代表的工科类高等学校本科生生物化学实验课程教学大纲。全书按实验性质和内容分为六大篇:生物分子的定性定量测定方法,生物大分子的性质研究,酶促反应动力学和酶活力测定,生物分子的分离技术,物质代谢过程研究,综合性、设计性和研究型实验。每篇分别按先理论后实验的顺序进行编排,理论部分简要概括了与生物化学实验教学大纲密切相关的原理和技术基础;实验部分总共提供了42个实验,包含静态生化、物质代谢、生物分子的分离分析、综合性大型实验等各种类型。本书实验方法叙述详细,可操作性强,可为相关专业学生提供全面的生物化学实验理论和具体实验操作的指导。

## 图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验指导/周楠迪,史锋,田亚平编. —北京:高等教育出版社,2011.2

ISBN 978-7-04-031652-0

I. ①生… II. ①周… ②史… ③田… III. ①生物化学—实验—高等学校—教材 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第006656号

策划编辑 王莉 责任编辑 王莉 封面设计 张楠 责任印制 尤静

出版发行 高等教育出版社  
社 址 北京市西城区德外大街4号  
邮政编码 100120

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司  
印 刷 北京泽明印刷有限责任公司

开 本 787×1092 1/16  
印 张 9.75  
字 数 240 000

购书热线 010-58581118  
咨询电话 400-810-0598  
网 址 <http://www.hep.edu.cn>  
<http://www.hep.com.cn>  
网上订购 <http://www.landaco.com>  
<http://www.landaco.com.cn>  
畅想教育 <http://www.widedu.com>

版 次 2011年2月第1版  
印 次 2011年2月第1次印刷  
定 价 18.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 31652-00

# 前 言

生物化学理论和实验技术是包括生物、食品、医药在内的众多学科领域的重要基础。其中的生物化学实验是一门实践性很强的课程,一方面,它与生物化学理论课程紧密联系,通过实验可以加深对生物化学基本理论知识的理解,学习掌握生命科学及其相关领域常规研究的一些基本方法和技术;另一方面,其教学体系不如生物化学理论课那样已形成固定架构,而且不同学科对生物化学实验技术培养的侧重点也各不相同。目前在教材方面,国外同类书籍并不多见,而国内与生物化学实验有关的书籍目前已有数十种,但是绝大多数是适用于理科生物科学和生物技术专业,或师范、医学专业,适用于生物工程、食品工程等工科专业的寥寥可数。

编写本教材的目的是致力于提供一本定位于高等学校生物工程及其他工科类专业本科生物化学实验课程的教材。首先,在选材方面,编者尽可能做到学科特色鲜明,突出工科类专业生物化学实验的特点和偏向性,实验总数不求多,但基本涵盖相关专业教学大纲的全部内容,并且相对易于开展,可操作性强,即使是综合性的实验也可以分阶段进行,适合于单元教学的要求;其次,在教材的结构和内容编排方面,按实验的性质和涉及内容分为六大篇,每篇内部的实验在分析对象、操作方法、定性定量手段等方面具有一些共同特征和内在规律性,每一篇按照先理论后实验的顺序进行组织,理论部分的内容精炼,且与实验直接相关,是进行有关实验的知识基础,从而保证实验者能以自学方式掌握必需的知识背景并顺利的开展实验;再次,本教材在基本单元实验的基础上引入综合性、设计性和研究型实验,实验内容紧扣工科类专业特色,部分实验方法和步骤需要实验者自己进行一定的设计和优化,从而在掌握生物化学实验大纲内容的基础上培养实验者进一步开展相关研究的能力。

本教材由江南大学生物工程学院周楠迪和史锋负责编写,田亚平负责统编审阅全稿。江南大学食品学院王森、医药学院邬敏辰等老师在提供素材等方面给予了大力支持。

本教材在编写过程中,参考了同行专家已出版的生物化学实验技术书籍,在此对相关作者表示衷心感谢。

最后要感谢高等教育出版社的大力支持,使此书得以顺利出版。鉴于编者水平有限,书中一定还存在不足与缺陷,真诚希望能得到广大读者的赐教。

编 者

2010年11月于江南大学

# 目 录

实验课要求及实验室安全规则 .....	1	实验五 核酸的定量分析 .....	23
第一篇 生物分子的定性定量测定方法 .....	2	I. 紫外分光光度法测定核酸含量 .....	23
1 滴定分析法 .....	2	II. 利用糖类的颜色反应测定核酸含量 .....	24
1.1 酸碱滴定法的原理和操作 .....	2	III. 定磷法测定核酸含量(钼蓝比色法) .....	26
1.2 氧化还原滴定法的原理和操作 .....	3	实验六 维生素 B <sub>2</sub> (核黄素)的荧光测定法 .....	28
2 紫外-可见分光光度法 .....	4	实验七 食物中维生素 C 的提取和含量测定 .....	30
2.1 原理 .....	4	实验八 植物材料中总黄酮的提纯与鉴定 .....	32
2.2 紫外-可见分光光度计 .....	5	第二篇 生物大分子的性质研究 .....	34
2.3 吸光度的测定和浓度计算 .....	5	7 糖类的理化性质 .....	34
3 荧光分光光度法 .....	6	7.1 物理性质 .....	34
3.1 原理 .....	6	7.2 单糖的氧化反应 .....	34
3.2 荧光分光光度计 .....	6	7.3 单糖的强酸脱水和颜色反应 .....	35
3.3 荧光强度的测定和浓度计算 .....	7	7.4 多糖的水解 .....	35
4 电化学检测法 .....	7	8 脂质的理化性质 .....	36
4.1 原理 .....	7	8.1 物理性质 .....	36
4.2 电化学检测仪 .....	8	8.2 甘油三酯的水解和皂化 .....	36
4.3 电流值的测定和浓度计算 .....	8	8.3 不饱和脂肪酸的化学性质 .....	36
5 其他测定方法 .....	8	8.4 羟基脂肪酸的酰基化 .....	37
6 实验部分 .....	8	9 蛋白质的理化性质 .....	37
实验一 总糖和还原糖含量的测定 .....	8	9.1 胶体性质 .....	37
实验二 葡萄糖传感器检测样品中葡萄糖含量 .....	11	9.2 两性解离和等电点 .....	38
实验三 玉米种子中色氨酸含量的测定 .....	13	9.3 沉淀作用 .....	38
实验四 蛋白质的定量分析 .....	15	9.4 变性作用 .....	39
I. 总氮量的测定——微量凯氏定氮法 .....	15	9.5 颜色反应 .....	39
II. Folin-酚试剂法(Lowry 法) .....	17	9.6 紫外吸收性质 .....	40
III. 考马斯亮蓝染色法(Bradford 法) .....	19	10 核酸的理化性质 .....	40
IV. 双缩脲法 .....	20	10.1 物理性质 .....	40
V. 紫外吸收法 .....	22		

10.2 紫外吸收性质 .....	40	常数的测定 .....	62
10.3 显色反应 .....	41	实验十七 过氧化物酶动力学性质	
10.4 变性和复性 .....	41	分析 .....	65
11 实验部分 .....	42	实验十八 大麦萌发前后淀粉酶	
实验九 糖类的呈色反应 .....	42	活力的比较 .....	66
实验十 脂肪碘值的测定 .....	44	实验十九 糖化型淀粉酶活力的	
实验十一 氨基酸和蛋白质的呈		测定 .....	68
色反应 .....	46	实验二十 发色底物测定大曲中	
实验十二 蛋白质的两性反应和		$\alpha$ -葡萄糖苷酶活力 .....	70
等电点的测定 .....	48	实验二十一 蛋白酶活力的测定 .....	72
实验十三 蛋白质的沉淀和变性			
反应 .....	49		
<b>第三篇 酶促反应动力学和酶活力测定</b> ..	<b>52</b>	<b>第四篇 生物分子的分离技术</b> .....	<b>75</b>
12 酶的概论 .....	52	16 生物分离的一般过程和特点 .....	75
12.1 酶的概念和分类 .....	52	17 生物样品的预处理 .....	76
12.2 酶的催化特点 .....	52	17.1 固液分离 .....	76
12.3 生物工程常用酶制剂简介 .....	53	17.2 细胞的破碎 .....	76
13 酶促反应动力学 .....	54	17.3 生物分子的提取技术 .....	77
13.1 底物浓度对酶促反应速率的		18 生物分子的粗分级 .....	77
影响 .....	54	18.1 浓缩技术 .....	77
13.2 温度对酶促反应速率的		18.2 沉淀技术 .....	78
影响 .....	55	18.3 膜分离技术 .....	79
13.3 pH 对酶促反应速率的影响 ..	56	19 生物分子的细分级 .....	80
13.4 激活剂对酶促反应速率的		19.1 层析技术 .....	80
影响 .....	56	19.2 电泳技术 .....	81
13.5 抑制剂对酶促反应速率的		19.3 离心分离技术 .....	83
影响 .....	56	20 实验部分 .....	83
14 酶活力测定 .....	57	实验二十二 酵母 RNA 的提取及其	
14.1 酶活力单位的定义和酶		组分的鉴定 .....	83
活力的概念 .....	58	实验二十三 核苷酸的 DEAE-纤维	
14.2 酶活力测定方法的类型和		素薄板层析法 .....	85
特点 .....	59	实验二十四 氨基酸纸层析及蛋清氨	
15 实验部分 .....	59	基酸成分研究 .....	86
实验十四 酶作用的专一性 .....	59	实验二十五 蛋白酶的盐析沉淀 .....	89
实验十五 酶的激活和抑制 .....	61	实验二十六 醋酸纤维薄膜电泳分离	
实验十六 底物浓度对酶活性的		蛋白质 .....	91
影响——蔗糖酶米氏		实验二十七 凝胶过滤层析测定蛋白	
		质的相对分子质量 .....	93
		实验二十八 SDS-聚丙烯酰胺凝	

胶电泳(SDS-PAGE)	定性实验 .....	114
法测定蛋白质的相对	实验三十四 脂肪酸的 $\beta$ -氧化	
分子质量 .....	作用 .....	115
实验二十九 DNA 的琼脂糖凝胶	实验三十五 植物组织的转氨基	
电泳 .....	作用 .....	118
<b>第五篇 物质代谢过程研究</b> .....	实验三十六 瓦勃氏呼吸仪法研究	
21 物质代谢概论 .....	氨基酸的脱羧作用 .....	120
21.1 代谢的概念和含义 .....	实验三十七 设计正交实验比较几	
21.2 代谢途径和代谢中间产物 .....	种因素对酵母发酵作	
21.3 代谢的催化剂和调节位点 .....	用的影响 .....	125
22 物质代谢的研究方法 .....	<b>第六篇 综合性、设计性和研究型实验</b> .....	129
22.1 测量气体法 .....	实验三十八 酵母蔗糖酶粗提取、纯	
22.2 代谢物化学分析法 .....	化及其酶性质研究 .....	129
22.3 同位素示踪法 .....	实验三十九 固定化酵母细胞水解	
22.4 添加酶的抑制剂 .....	蔗糖 .....	135
22.5 代谢工程方法 .....	实验四十 马铃薯多酚氧化酶制备	
23 实验设计和数据统计方法 .....	及性质实验 .....	137
24 实验部分 .....	实验四十一 用不同分离技术提	
实验三十 葡萄糖代谢中间产物的	取柠檬酸的工艺比	
定性分析 .....	较研究 .....	140
实验三十一 碘乙酸抑制糖酵解 .....	实验四十二 蛋白酶抑制剂的筛选	
实验三十二 发酵过程中无机磷的	和制备 .....	144
利用和 ATP 的生成 .....	<b>参考文献</b> .....	147
实验三十三 脂肪转化为糖类的		



# 实验课要求及实验室安全规则

生物化学实验是生物化学课程中的一个重要组成部分,通过实验不仅可以加深对课程内容的理解,学习有关生物化学的基本方法和技术,还可以培养实验者的操作能力及进一步开展相关研究所需的能力。

为保证实验能够顺利进行,实验者应遵守以下规则:

## 1. 预习

为了提高独立分析和解决问题的能力,实验前必须认真预习,熟悉实验的目的、原理和操作步骤及其意义,了解所用仪器的使用方法。

## 2. 实验操作

按实验步骤认真开展实验,使用仪器时必须按规定仔细操作,防止损坏仪器,在实验记录本或实验报告纸上及时记录实验结果和数据,且文字简练准确。

## 3. 实验报告

课后根据实验记录写出详细的实验报告,报告的内容应包括:① 实验目的,② 实验原理,③ 实验试剂和器材,④ 实验步骤和操作要点,⑤ 实验结果分析与讨论,⑥ 思考题;实验报告书写过程中严禁任意篡改数据,应针对实验现象和数据作必要的计算、讨论及误差分析,并给出相应的结论。

## 4. 实验室整洁

环境和仪器的整洁是做好实验的基本条件,实验台和试剂架必须保持整洁,公用试剂用完后立即盖好放回原处,勿使药品试剂洒在实验台或地上,废弃液体应倒入水槽内并放水冲走,有毒液体应当收集在特定的废液缸内,固体废物应倒入废品篓内,实验完毕及时清理仪器,洗净玻璃器皿;在冰箱内放置物品、试剂等必须注明试剂名称、存放人姓名和存放时间。

## 5. 实验室安全

凡产生烟雾、有毒气体的实验,均应在通风橱内进行,反应时橱门应紧闭,实验室内严禁吸烟,乙醇、丙酮和乙醚等易燃液体勿直接加热,切不可接近明火,遇有火险,先切断电源,再用沙土和灭火器灭火。



# 第一篇

## 生物分子的定性定量测定方法

### 1

### 滴定分析法

#### 1.1 酸碱滴定法的原理和操作

酸碱滴定法是以溶液中的酸碱度,即 pH 的变化为基础的一种滴定分析方法。以强酸(如 0.1 mol/L HCl 溶液)和强碱(如 0.1 mol/L NaOH 溶液)相互滴定的反应为例,滴定曲线如图 1.1。滴定终点即化学计量点为 pH 7.0。在滴定终点附近 pH 有一个突变过程,这就是滴定突跃,这个突跃范围很宽,为 pH 4.3~9.7。因此可以选择酸性指示剂(甲基橙、甲基红和溴甲酚绿等)或碱性指示剂(酚酞和百里酚酞等)来指示滴定终点(表 1.1)。

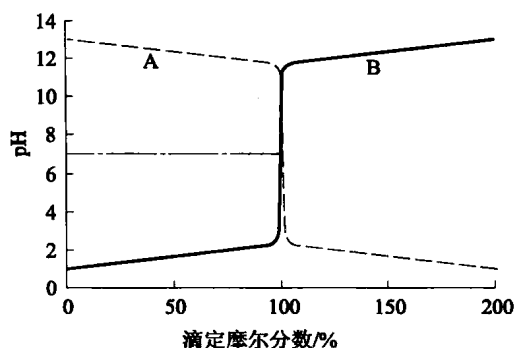


图 1.1 0.1 mol/L HCl 溶液与 0.1 mol/L NaOH 溶液之间的滴定曲线  
A. HCl 滴定 NaOH; B. NaOH 滴定 HCl

表 1.1 常用酸碱指示剂及其变色范围

指示剂类型	指示剂名称	变色 pH	酸色	碱色
酸性指示剂	甲基黄	2.8~4.0	红色	黄色
	溴酚蓝	3.0~4.6	黄色	蓝紫色
	甲基橙	3.1~4.4	红色	黄色
	溴甲酚绿	4.0~5.4	黄色	蓝色
	甲基红	4.8~6.2	红色	黄色

续表

指示剂类型	指示剂名称	变色 pH	酸色	碱色
酸性指示剂	溴甲酚紫	5.2~6.8	黄色	紫色
	甲烯蓝-甲基红混合指示剂	5.2~5.6	紫红色	绿色
中性指示剂	溴百里酚蓝	6.0~7.6	黄色	蓝色
	中性红	6.8~8.0	红色	黄橙色
	酚红	6.8~8.0	黄色	红色
碱性指示剂	酚酞	8.0~9.0	无色	紫红色
	百里酚酞	9.4~10.6	无色	蓝色

强酸与弱碱相互滴定时, 滴定终点在酸性区, 突跃范围较窄,  $\Delta\text{pH}$  约为 2 个单位, 应选用酸性指示剂来指示滴定终点; 强碱与弱酸相互滴定时, 滴定终点在碱性区, 突跃范围也较窄,  $\Delta\text{pH}$  约为 2 个单位, 应选用碱性指示剂来指示滴定终点。

一些生物分子具有广义酸或广义碱的性质, 如氨基酸、核苷酸等, 如果有合适的指示剂指示滴定终点, 则可以直接用酸碱滴定法定量测定。但是生物分子通常都是弱酸或弱碱, 甚至多元酸碱, 且往往具有两性解离性质, 因此难以找到合适的指示剂, 并需要确定滴定起点和滴定方向。例如, 中性氨基酸溶于水时, 滴定起点约为  $\text{pH } 6.0$ , 对其  $-\text{NH}_3^+$  进行碱滴定, 滴定终点为  $\text{pH } 12\sim 13$ , 对其  $-\text{COO}^-$  进行酸滴定, 滴定终点为  $\text{pH } 1\sim 2$ , 没有合适的指示剂可用, 因此可通过氨基酸的甲醛滴定, 降低  $-\text{NH}_3^+$  碱滴定的终点至  $\text{pH } 9$  附近, 从而用酚酞指示剂判定滴定终点。如果某个特定的生物分子在它的特征性生化反应中涉及酸碱变化, 也可以间接地用酸碱滴定法进行定性定量测定。例如, 在微量凯氏定氮法中, 蛋白质的氮转变成硫酸铵后, 与  $\text{NaOH}$  作用释放出的  $\text{NH}_3$  可以吸收在有甲烯蓝-甲基红混合指示剂的硼酸溶液中, 再经标准无机酸滴定, 即可定量测定  $\text{NH}_3$ , 计算出氮的含量(见实验四)。

酸碱滴定的操作采用专用的酸式或碱式滴定管。为了使指示剂的变色不发生异常而导致误差, 指示剂的用量不可过多, 温度不宜过高, 强酸或强碱的浓度不宜过大, 滴定速度应以每秒钟 3~4 滴为宜。

## 1.2 氧化还原滴定法的原理和操作

氧化还原滴定法是以溶液中氧化剂和还原剂间的电子转移为基础的一种滴定分析方法。它以氧化剂或还原剂为滴定剂, 直接滴定一些具有还原性或氧化性的物质; 或间接滴定本身并没有氧化还原性, 但能与某些氧化剂或还原剂起反应的物质。滴定终点通常借助指示剂来判断。

氧化还原指示剂主要有 3 类: ① 自身指示剂以滴定剂或被滴定物质本身作为指示剂, 其自身有颜色而反应后褪色, 如高锰酸钾为紫色, 还原后褪色; 碘为棕褐色, 还原后褪色。② 专用指示剂是指能和氧化剂或还原剂生成特殊色泽, 明显提高观测灵敏度的物质, 如碘量法滴定中的可溶性淀粉能与碘形成深蓝色, 当碘被还原成碘离子时, 深蓝色消失。③ 氧化还原指示剂则是指示剂本身具有氧化还原性质, 能因氧化还原作用发生颜色变化, 如二苯胺磺酸钠在酸性溶液中以无色的二苯胺磺酸形式存在, 在被标准滴定溶液氧化时, 生成紫色的二苯联苯胺磺酸紫。

碘量法是一种重要的氧化还原滴定法, 以碘( $\text{I}_2$ )作氧化剂, 或以碘离子( $\text{I}^-$ )作还原剂, 进行

氧化还原滴定。直接碘法以  $I_2$  为标准溶液,直接滴定还原性物质,基本反应是  $I_2 + 2e^- \rightarrow 2I^-$ 。间接碘法则是  $I^-$  被氧化剂氧化,定量反应析出的  $I_2$  用  $Na_2S_2O_3$  标准溶液滴定;或加过量  $I_2$  液于被测物中,待  $I_2$  被还原剂还原成  $I^-$  后,用  $Na_2S_2O_3$  标准溶液回滴剩余的  $I_2$ ,基本反应是  $I_2 + 2S_2O_3^{2-} \rightarrow S_4O_6^{2-} + 2I^-$ 。碘量法一般在中性或弱酸性溶液中进行,在强酸中  $I^-$  易被空气中的  $O_2$  所氧化;而在较强碱中  $I_2$  会发生歧化反应, $Na_2S_2O_3$  也存在副反应。碘量法一般用淀粉作指示剂,在间接碘法中,应在临近终点时加入淀粉,以防  $I_2$  被淀粉表面吸附过牢,不易与  $Na_2S_2O_3$  迅速作用,使终点推迟。间接碘法也可以用碘作自身指示剂,通过滴定时碘颜色的消失判定终点。在用碘量法测定糖化酶酶活时,就是采用间接碘法,以碘作指示剂,通过碘的还原来测定还原糖含量(见实验十九)。碘量法的主要误差来源是  $I_2$  的挥发及  $I^-$  被空气中的氧所氧化。

氧化还原滴定在操作时根据滴定剂的性质采用酸式或碱式滴定管,其操作类似于酸碱滴定的操作,滴定速度也以每秒钟 3~4 滴为宜。

## 2 紫外-可见分光光度法

紫外-可见分光光度法是利用物质特有的紫外-可见吸收光谱进行定性、定量和结构分析的一项技术。该方法操作简便快速,灵敏度和精确度都很高且重复性好。许多生物分子都具有紫外光或可见光吸收特性,有些生物分子虽然本身没有吸收,但经过特定的显色反应后,可以转变成有吸收特性的物质。例如,实验一测定还原糖含量时,利用还原糖与 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂反应生成棕红色的氨基化合物。而一些具有紫外光或可见光吸收特性的生物分子,如蛋白质、核酸等,当样品不纯时,往往会受到其他光吸收物质的干扰,为了排除杂质的干扰,提高测定的准确性,有时会利用特异性显色反应,将其转变成具有特征光吸收的物质后再测定。由于生物分子所具有的直接或间接光吸收特性,紫外-可见分光光度法已成为生物化学研究中广泛使用的方法。

### 2.1 原理

紫外-可见分光光度法根据物质分子对 200~760 nm 波长光波的吸收特性进行定性、定量测定和结构分析。分子的紫外-可见吸收光谱是由于分子中的某些基团吸收了紫外-可见光后,发生电子能级跃迁而产生的吸收光谱。它反映了分子中某些基团的信息,因此可以用标准光谱并结合其他手段对分子进行定性分析。而在某一分子的特征吸收波长下,单色光通过光吸收物质时,光强度随物质浓度的增加及光径的增长而呈指数减少,可根据 Lambert-Beer 定律对含量进行定量分析:

$$-\lg T = A = \epsilon cl$$

式中: $T$  为透光率(transmittance); $A$  为吸光度(absorbance,又称光密度 O. D, optical density); $\epsilon$  为摩尔吸收系数 [ $L/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ ]; $c$  为物质浓度 ( $\text{mol/L}$ ); $l$  为样品池(比色皿)厚度 ( $\text{cm}$ )。  $\epsilon$  是某一物质的特征性常数,因此当样品池厚度固定时,某一物质的浓度与吸光度成正比,可由此测定其浓度。

## 2.2 紫外-可见分光光度计

紫外-可见分光光度计由光源、单色器、比色皿、检测器和显示装置 5 个部件组成。光源负责提供仪器使用波段的连续光谱,一般采用钨灯提供波长 350~2500 nm 的连续光谱,氘灯或氢灯提供波长 180~460 nm 的连续光谱。比色皿有石英比色皿和玻璃比色皿 2 种,前者适用于紫外到可见区,后者只适用于可见区,其光程一般为 0.5~1.0 cm。常用的检测器有光电管或光电倍增管,近年来还使用光导摄像管或光电二极管矩阵,能进行快速扫描。较高级的分光光度计常配备微处理机、荧光屏显示和记录仪或打印装置等,可将图谱、数据和操作条件都显示出来。有的分光光度计甚至配备了比色皿控温装置,可测定某一恒定温度下吸光度值的变化,因此可进行恒温反应体系中紫外-可见光吸收动力学的研究。

## 2.3 吸光度的测定和浓度计算

在测定吸光度之前,应根据被测物的最大吸收峰选择合适的波长,然后以空白溶液调整透光率( $T$ )为 100%和吸光度( $A$ )为 0 后,测定样品溶液的吸光度值。吸光度的数值应控制为 0.1~0.8,过大或过小都会存在较大的测量误差。可通过调节被测溶液的浓度,使测出的吸光度值处于合适范围之内。

测定时,空白溶液的选择非常重要。如果被测物本身就有特征光吸收,不需要显色剂时,可以用配制被测物的溶液或蒸馏水作为空白溶液,直接测定被测物的光吸收值。如果被测物本身没有光吸收,而是经特定显色剂作用后产生光吸收,则可以用配制被测物的溶液或蒸馏水与显色剂作用后的溶液作为空白溶液,测定被测物显色后的光吸收值。

样品溶液的浓度根据已知浓度的标准样品溶液进行计算。可以采用单点标样法(标准比较法),使用单一浓度的标样,根据公式:

$$\text{样品浓度} = \text{标样浓度} \times \frac{\text{样品吸光度}}{\text{标样吸光度}}$$

进行计算;也可以采用多点标样法,使用几种不同浓度的标样,绘制出标准曲线,或得出标准系数或回归方程后,将样品的吸光度值代入曲线或方程进行计算。后者由于准确度高、误差低,因此更为常用。现在许多分光光度计可以直接对系列浓度的标样进行回归分析,并计算出回归方程,然后根据样品溶液的吸光度值,直接给出样品的浓度值。

对于本身就有特征光吸收的被测物质,如 DNA、RNA,如果样品较纯,还可以通过测定的吸光度值,根据其摩尔消光系数,按公式  $A = \epsilon cl$  直接计算其浓度。例如,DNA 的摩尔磷消光系数  $\epsilon$  为 6000~8000 L/(mol·cm),若采用厚度为 1 cm 的比色皿,则浓度为 1  $\mu\text{g/mL}$  的 DNA 溶液在 260 nm 波长下的吸光度值  $A$  为 0.020,因此 DNA 溶液的浓度  $c$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) =  $A/0.020$ 。这种方法现在常被用于计算提纯的 DNA 样品的浓度。同样,RNA 的摩尔磷消光系数  $\epsilon$  为 7000~9000 L/(mol·cm),RNA 溶液的浓度  $c$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) =  $A/0.022$ ,常被用于计算纯化的 RNA 样品的浓度(见实验五)。

荧光分光光度法是利用某些物质被紫外光或可见光照射后所发出的特征性荧光进行定性或定量分析的方法。这种方法和紫外-可见分光光度法一样操作简便快速,而灵敏度比紫外-可见分光光度法更高,达  $10^{-10} \sim 10^{-12}$  g/mL,且选择性好,取样量少,工作曲线线性范围宽。但是由于许多生物分子并不具有荧光特性,因此其应用不如紫外-可见分光光度法广泛。荧光分光光度法除了被直接应用于荧光分光光度计测定之外,还可以作为高效液相色谱法(HPLC)的检测器使用,现在后者的使用更多。实验六采用荧光分光光度法测定维生素 B<sub>2</sub> 的含量。

### 3.1 原理

物质荧光的产生是由在通常状况下处于基态的物质分子吸收激发光后变为激发态,这些处于激发态的分子是不稳定的,在返回基态的过程中将一部分能量又以发射光的形式放出,从而产生荧光,发射光的波长比激发光的波长更长。不同物质由于分子结构不同,其激发态能级的分布具有各自不同的特征,这种特征反映在荧光上表现为各种物质都有其特征性激发光谱和发射光谱,因此可以用荧光激发光谱和发射光谱的不同来定性的进行物质鉴定。

在进行荧光发射光谱扫描时,将激发光波长调节到最适当的波长处,而记录样品在这一固定波长激发光的激发下所产生的发射光在各波长下的荧光强度,这种荧光强度与发射光波长间的光谱即为荧光发射光谱。在进行荧光激发光谱的扫描时,将发射光的波长调节到最适当的荧光波长处,而记录样品在各波长的激发光激发下所产生的发射光在这一固定波长下的荧光强度,这种荧光强度与激发光波长间的光谱即为荧光激发光谱。

当荧光物质溶液浓度较低时,在特征性激发光激发下,发射光荧光强度与该物质的浓度通常有良好的正比关系,即  $F=kc$ ,  $F$  为荧光强度,其单位因仪器而异,多为光能量或光子计数的单位; $k$  为荧光强度和样品浓度  $c$  之间的系数,可通过标样计算出来,其数值和单位因仪器的测量条件和  $F$ 、 $c$  的单位而异。利用这种关系可以进行荧光物质的定量分析。

### 3.2 荧光分光光度计

荧光分光光度计是用于扫描液体或固体荧光标记物所发出荧光光谱的一种仪器。它能提供激发光谱、发射光谱及荧光强度、量子产率、荧光寿命和荧光偏振等许多物理参数,从各个角度反映分子的成键和结构情况。通过对这些参数的测定,不但可以定量分析,还能定性鉴定,且可以推断分子在各种环境下的构象变化,从而阐明分子结构与功能之间的关系。荧光分光光度计的激发波长扫描范围一般是 190~650 nm,发射波长扫描范围是 200~800 nm。

荧光分光光度计由光源、激发光单色器、样品室、发射光单色器、检测器 5 个部件组成。光源负责提供仪器使用波段的连续光谱,一般为高压汞蒸气灯或氙弧灯,后者能发射出强度较大的连续光谱,且波长为 300~400 nm 时强度几乎相等,故较常用。激发光单色器位于光源和样品室之间,用于将光源发射出的连续光谱分解成特定波长的单色光,将此单色激发光照射在样品上。样品室通常由石英池或固体样品架组成。在测量液体样品时,光源与检测器成直角安排;在测量固体样品时,光源与检测器成锐角安排。发射光单色器位于样品室和检测器之间,用于将荧光物

质在激发光照射下所发出的荧光变成特定波长的单色荧光,即发射光,从而进行检测。检测器一般采用光电管或光电倍增管,可将光信号放大并转为电信号。

### 3.3 荧光强度的测定和浓度计算

与紫外-可见分光光度法类似,荧光分析通常也采用标准比较法或标准曲线法进行。与紫外-可见光的吸光度不同的是,荧光强度的工作曲线线性范围更宽。

在测定被测物的荧光强度之前,应根据被测物的荧光吸收特性选择合适的激发光波长和发射光波长,并配制标准溶液及其空白液进行荧光分光光度计的校准。对于一定浓度的荧光物质溶液,当激发光强度、激发光波长、发射光波长、溶剂及温度等条件固定时,其发射光强度与荧光物质的浓度成正比。但是当荧光物质的浓度太大时,会有“自熄灭”作用,这时在液面附近溶液会吸收激发光,使发射光强度下降,导致发射光强度与浓度不成正比,因此在测定荧光强度之前,需要用标准溶液确定荧光强度与被测物浓度之间的线性范围。然后在相同的激发光波长、发射光波长及其他条件下,分别测定标准溶液及其空白液的荧光强度,以及样品溶液及其空白液的荧光强度,根据公式计算出样品的浓度:

$$c_2 = \frac{F_2 - F_{20}}{F_1 - F_{10}} \times c_1$$

式中: $c_2$  为样品溶液浓度; $c_1$  为标准溶液浓度; $F_2$  为样品溶液荧光强度; $F_{20}$  为样品空白液荧光强度; $F_1$  为标准溶液荧光强度; $F_{10}$  为标准空白液荧光强度。样品荧光强度的数值应与标样荧光强度的数值具有可比性,即处于荧光强度与被测物浓度之间的线性范围内,过大或过小都会存在较大的测量误差。可通过调节被测溶液的浓度使测出的荧光强度值处于合适的范围之内。

荧光分析法因灵敏度高,故干扰因素也多。溶剂不纯会带入较大误差,故应测定空白的  $F$  值,并保持所用器具洁净。温度对荧光强度也有较大的影响,测定时应控制相同的温度。

## 4 电化学检测法

电化学检测法是建立在物质的电化学特性基础上的一类仪器分析方法,早期极谱法的建立确立了电化学仪器分析方法的应用,此后电化学方法和技术得到了极大的发展,出现了多种不同类型的分析方法,在包括生命科学在内的众多领域中得到了广泛的应用。

### 4.1 原理

电化学检测法的原理是根据包含样品的电化学池中某种参数(如电阻、电导、电位、电流和电量等)与被测物质浓度间存在一定的关系而进行测定的方法,其基础是待测物质在电化学池中发生特定类型的电化学反应,而该反应能够引起可供检测的信号改变。在生物样品检测中,大多是通过电流信号来对待测物的浓度进行表征。例如,将电化学方法与传感器技术结合得到的电化学生物传感器,被广泛应用于各类物质的检测。该器件由一套电化学检测仪和一组电极系统组成,其中电化学检测仪可提供检测所需的电位等参数,并能实时检测电极-溶液界面的电流、电位、阻抗等信号改变情况。电极是传感器的重要部件,通过与识别元件结合,识别溶液中待测物质的浓度信号并转换成电信号。传感器设计中最为常用的识别元件是酶,相应的电极则是酶电

极。修饰在电极表面的酶能特异性催化溶液中的待测物质发生化学反应,在此过程中伴随的电子得失或生成的产物在电极表面的氧化还原能够转化为电流信号而被测定。酶的特异性保证了检测过程的选择性,而电流信号强弱与待测物质浓度间的关系成为定量分析的依据。目前应用最多的传感器是基于氧化还原酶的酶传感器,这类酶在催化待测物氧化的同时伴随过氧化氢( $H_2O_2$ )的产生,后者在电极表面被氧化,失去的电子传递给电极而产生电流信号,电流大小与待测物浓度之间存在比例关系。采用不同种类的氧化还原酶制备成酶电极,就能分别用于对相应的酶的底物进行检测。

## 4.2 电化学检测仪

电化学检测仪的种类较多,比较先进的是电化学工作站,通常包含快速数字信号发生器、高速数据采集系统、电位电流信号滤波器、多级信号增益、iR 降补偿电路,以及恒电位仪/恒电流仪,集成了常用的电化学测量技术,如:恒电位、恒电流、电位扫描、电流扫描、电位阶跃、电流阶跃、脉冲、方波、交流伏安法、流体力学调制伏安法、库仑法、电位法及交流阻抗等。仪器由外部计算机控制,仪器软件具有很强的功能进行文件管理、实验控制及数据处理。而在以浓度检测为目的的分析中,所用到的电化学技术种类有限,最常用的电流型生物传感器是采用在恒定电位下检测电流值的方法,如上面所提到的基于氧化还原酶的酶传感器,因此所用仪器不需要整合大量的电化学技术,但是需要对酶膜、样品池、管路系统及数据处理与显示单元做合适的设计,如实验二中采用的生物传感自动分析仪。

## 4.3 电流值的测定和浓度计算

用电流型生物传感器测定样品浓度时,需建立电流大小与浓度间的换算关系,这可以通过绘制标准曲线或用标样标定来实现。其中标准曲线法不仅能准确反映电流值与浓度的关系,还能显示检测的线性范围。而用标样直接标定操作简便,但往往需要对线性进行校正。

# 5 其他测定方法

其他还有通过特定反应中气体量的变化对底物进行定性定量分析(见实验三十六)。对于一些难以直接检测的生物分子,可以通过 HPLC 进行分析,结合标样的使用,对比洗脱峰位置和峰面积对生物分子进行分离鉴定和定量分析。

# 6 实验部分

## 实验一 总糖和还原糖含量的测定

### 一、实验目的

1. 掌握还原糖和总糖测定的基本原理;
2. 掌握比色法测定还原糖的操作方法和分光光度计的使用。



## 二、实验原理

糖类物质的测定方法较多,大多建立在对还原糖测定的基础上。还原糖是指含有游离醛基或酮基的糖类,单糖都是还原糖,寡糖多数具有还原性,而多糖都不具备还原性。利用还原糖与氧化剂发生氧化还原反应时产生的有色产物,可以对还原糖进行定性定量分析。

还原糖在碱性条件下会转化成烯醇式结构,在加热条件下能与3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂发生氧化还原反应,被氧化成糖酸和其他产物,3,5-二硝基水杨酸则被还原为棕红色的3-氨基-5-硝基水杨酸(图1.2),最大吸收波长在540 nm。在一定浓度范围内,还原糖含量与吸光度之间呈线性关系,从而可以对还原糖进行定量分析(还原糖以葡萄糖含量计)。

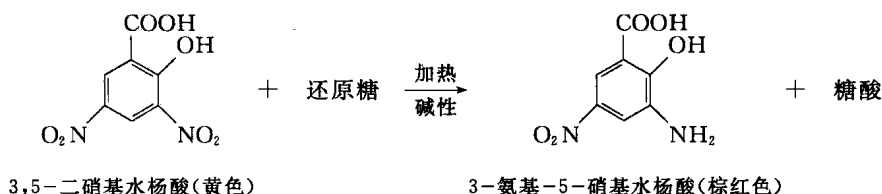


图 1.2 还原糖与 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂反应

总糖含量包括了还原糖和非还原糖。在对总糖进行测定时,可用酸水解法使多糖和寡糖降解成有还原性的单糖进行测定,再分别求出样品中还原糖和总糖的含量。由于多糖水解为单糖时,每断裂一个糖苷键需加入一分子水,所以在计算多糖质量时应乘以系数 0.9。

## 三、试剂和器材

### (一) 试剂

1. 1 mg/mL 葡萄糖标准溶液:称取 100 mg 葡萄糖(预先在 80 °C 烘至恒重),用少量蒸馏水溶解后,转移到 100 mL 容量瓶定容至刻度,摇匀,4 °C 保存备用。

2. DNS 试剂:溶液 I:取 4.5% NaOH 溶液 300 mL,1% DNS 溶液 880 mL 及酒石酸钾钠(KNaC<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O)255 g,三者一起混合均匀。溶液 II:取结晶酚 10 g,10% NaOH 溶液 22 mL,加蒸馏水至 100 mL 混匀;将溶液 II 和溶液 I 混合,激烈振荡混匀,放置 1 周后备用。

3. 碘-碘化钾溶液:称取 5 g 碘和 10 g 碘化钾,溶于 100 mL 蒸馏水。

4. 酚酞指示剂:称取 0.1 g 酚酞,溶于 250 mL 的 70%乙醇中。

5. 6 mol/L 盐酸:50 mL 浓盐酸加蒸馏水稀释至 100 mL。

6. 6 mol/L NaOH 溶液:240 g NaOH 溶于蒸馏水并定容至 1000 mL。

7. 面粉或山芋粉。

## (二) 器材

1. 25 mL 具塞比色管
2. 离心管
3. 烧杯
4. 锥形瓶
5. 容量瓶
6. 移液管
7. 恒温水浴锅
8. 电炉
9. 离心机
10. 电子天平
11. 分光光度计
12. 白瓷板
13. 滤纸

## 四、实验步骤

### 1. 葡萄糖标准曲线的绘制

取 6 支具塞比色管编号,按表 1.2 分别加入各种试剂,配成不同葡萄糖含量的反应液。在沸水浴中加热 5 min,取出后用自来水冷却至室温,用蒸馏水定容至 25 mL,混匀后以 0 号管调零点,测定各管在 540 nm 的吸光度值。以吸光度为纵坐标,葡萄糖含量(mg)为横坐标,绘制出标准曲线。

表 1.2 葡萄糖标准曲线制作

管号	葡萄糖标准溶液体积/mL	蒸馏水体积/mL	DNS 体积/mL	葡萄糖含量/mg	$A_{540}$
0	0	2	3.0	0	
1	0.2	1.8	3.0	0.2	
2	0.4	1.6	3.0	0.4	
3	0.6	1.4	3.0	0.6	
4	0.8	1.2	3.0	0.8	
5	1.0	1.0	3.0	1.0	

### 2. 样品中还原糖和总糖含量的测定

(1) 还原糖的测定:称取 3.0 g 面粉到 100 mL 三角瓶中,先以少量蒸馏水调成糊状,然后加 50 mL 蒸馏水搅匀,于 50 °C 恒温水浴中保温 20 min 使还原糖浸出。将浸出液(含沉淀)转移到 50 mL 离心管中,于 4000 r/min 离心 5 min,沉淀用 20 mL 蒸馏水洗一次,再次离心,将两次离心后的上清液收集合并,定容至 100 mL 作为待测液。取 2 支具塞比色管编号 6、7 号管,按表 1.2 加入各种试剂后在沸水浴中加热 5 min,冷却后用蒸馏水定容至 25 mL,以上述 0 号管调零点测定各管在 540 nm 处的吸光度。

(2) 总糖的测定:称取 1.0 g 面粉到 100 mL 三角瓶中,加入 10 mL 6 mol/L 盐酸及 15 mL 蒸馏水,于沸水浴中加热水解 30 min。取 1~2 滴水解液于白瓷板,加 1 滴碘-碘化钾溶液,如果不显蓝色说明已水解完全。水解液冷却后,加入 1 滴酚酞指示剂,以 6 mol/L NaOH 溶液中和至微红色,过滤,再用少量蒸馏水冲洗三角瓶及滤纸,将滤液全部收集合并,定容至 100 mL。吸取 10 mL 水解液,移入另一个 100 mL 容量瓶,再次以蒸馏水稀释定容至 100 mL 作为总糖待测液。取 2 支具塞比