

高等学校试用教材

生物化学实验

南京大学生物系

袁玉荪 朱婉华 陈钧辉编

人民教育出版社

高等学校试用教材

生物化学实验

南京大学生物系

袁玉荪 朱婉华 陈钧辉编

人民教育出版社

高等学校试用教材

生物化学实验

南京大学生物系

袁玉荪 朱婉华 陈钧辉编

*

人民教育出版社出版

新华书店北京发行所发行

北京印刷三厂印装

*

开本 787×1092 1/32 印张 5 2/16 字数 123,000

1979年5月第1版 1981年3月第3次印刷

印数 26,501—36,800

书号 14012·024 定价 0.39 元

前 言

近年来,由于生物化学实验技术发展较快,许多院校对生物化学实验教材的需要又较迫切,因此,我们将使用数年的生物化学实验讲义加以修改充实,并配合郑集教授编著的《普通生物化学》编成此书,供有关院校生物化学实验教学之用。

本书共有糖、脂、蛋白质、核酸、酶、维生素、激素、生物氧化和物质代谢等方面的实验 60 个,其中既有与《普通生物化学》相配合、印证理论的实验,又有一些常用的提取分离、定性、定量实验。如就方法学而言,则既有经典方法,如血糖定量、粗脂肪测定、克氏定氮、纸层析、纸电泳法等等,亦有近年广泛应用的 DEAE——纤维素薄板层析、尼龙 66 薄膜层析、各种凝胶电泳和免疫电泳等新方法。每一实验都分原理、试剂和操作三部分阐述,对需要特别注意或解释之处,便分别加注说明,帮助学生学习 and 减少错误。

本书内容较多,并且还有一些较大型的实验,主要是出于以下两点考虑:①可供不同专业选做,如生化专业可多做一些;②各校实验室条件不同,可根据具体条件选做。

由于水平所限,本书的缺点错误在所难免,希望读者批评指正。

在编写过程中,承我室朱长生、张太平、张国保三同志以及进修教师葛辉同志大力协助。生物系胡蓓蒂同志绘制全部插图,在此一并致谢。

生物化学教研室

袁玉荪、朱婉华、陈钧辉

目 录

实 验 一	糖的颜色反应	1
实 验 二	糖的还原作用	3
实 验 三	血糖定量(Folin-Wu 法)	4
实 验 四	多糖的试验	7
实 验 五	肝素钠的定量测定	9
实 验 六	糖的旋光性和变旋现象	12
实 验 七	脂肪的组成	14
实 验 八	卵磷脂的提取和鉴定	17
实 验 九	粗脂肪的定量(Soxhlet 提取法)	18
	附:水分测定	20
实 验 十	碘价的测定(Hanus 法)	21
实 验 十一	皂化价的测定	23
实 验 十二	酸价的测定	25
实 验 十三	血清甘油三酯简易测定法	26
实 验 十四	血清胆固醇的定量测定(磷硫铁法)	28
实 验 十五	蛋白质的颜色反应	29
实 验 十六	蛋白质的沉淀反应	34
实 验 十七	微量克氏(Kjeldahl)定氮法	36
实 验 十八	非蛋白氮(NPN)的测定	40
实 验 十九	甲醛滴定法	43
实 验 二十	双缩脲法测定蛋白浓度	44
实 验 二十一	Folin-酚试剂法测定蛋白质浓度	46
实 验 二十二	紫外光吸收法测定蛋白质浓度	47
实 验 二十三	醋酸纤维薄膜电泳法分离血清蛋白质	48
实 验 二十四	尿素对蛋白质的变性作用	51
实 验 二十五	用纸层析法分析氨基酸	54
实 验 二十六	DNP-氨基酸的制备和鉴定	56
实 验 二十七	肽的顺序分析(PTH 法)	60
实 验 二十八	聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离血清蛋白质	64

实验二十九	用等电聚焦电泳法测定蛋白质等电点	68
实验三十	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质分子量	71
实验三十一	对流免疫电泳法测定胎儿甲种蛋白质	73
实验三十二	核酸的定量测定(定磷法)	75
实验三十三	RNA 的定量测定(苔黑酚法)	78
实验三十四	酵母 RNA 的提取	79
实验三十五	从肝脏中提取脱氧核糖核酸	81
实验三十六	DNA 的定量测定(二苯胺法)	83
实验三十七	腺三磷的定量测定(纸电泳法)	85
实验三十八	DEAE-纤维素薄板层析法测定核苷酸	87
实验三十九	5'-核苷酸的定量测定(过碘酸氧化法)	89
实验四十	底物浓度对酶促反应速度的影响(米氏常数的测定)	92
实验四十一	激活剂和抑制剂对酶活力的影响	97
实验四十二	用正交法测定几种因素对酶活力的影响	98
实验四十三	溶菌酶的提纯结晶和活力测定	102
实验四十四	醇脱氢酶的提纯	105
实验四十五	醇脱氢酶的专一性	108
实验四十六	用琼脂糖凝胶电泳法分离乳酸脱氢酶同工酶	111
实验四十七	维生素 A 的定性测定	114
实验四十八	维生素 B ₁ 的定性测定	115
实验四十九	维生素 C 的定量测定(2,6-二氯酚靛酚滴定法)	116
实验五十	尿中 17-羟皮质类固醇的测定(Porter-Silber 法)	119
实验五十一	乳酸脱氢酶及其辅酶的作用	122
实验五十二	过氧化氢酶的作用	124
实验五十三	过氧化物酶的作用	125
实验五十四	细胞色素氧化酶的作用	126
实验五十五	发酵过程中无机磷的被利用和 ATP 的生成(ATP 的生物合成)	128
实验五十六	脂肪酸 β -氧化	130
实验五十七	华氏(Warburg)呼吸仪瓶常数的测定	133
实验五十八	L-谷氨酸的酶促脱羧作用(测压法测定 L-谷氨酸)	136
实验五十九	酶促转氨反应	139

附 录

一、市售浓酸、浓氨水的比重和浓度	147
二、常用指示剂的 pK 值、pH 范围、颜色变化和配制方法	147
三、常用缓冲液的配制方法	148
四、滤色片的颜色、透过光波长范围和试液颜色的关系	154
五、N, N'-甲叉双丙酰胺(Bis)的合成法	154
六、恒沸盐酸的制备	154
七、大肠杆菌丙酮粉的制备	155
八、几种 5'-核苷酸的分子量	155
九、丙酮酸钠重结晶	155
十、汞的密度(g/cm^3)	156

实验一 糖的颜色反应

一、莫氏(Molisch)试验①

原理 糖经浓无机酸(硫酸、盐酸)脱水产生糠醛或糠醛衍生物,它们在浓无机酸作用下,能与 α -萘酚②生成紫红色缩合物。

试剂

1. 莫氏试剂:称取 α -萘酚 5g,溶于 95%酒精并用此酒精稀释至 100 ml。此试剂需新鲜配制,并贮于棕色瓶中。

2. 1%蔗糖溶液:称取蔗糖 1g,溶于 100 ml 蒸馏水。

3. 1%葡萄糖溶液:称取葡萄糖 1g,溶于 100 ml 蒸馏水。

4. 1%淀粉溶液:将 1g 可溶性淀粉与少量冷蒸馏水混和成薄浆状物,然后缓缓倾入沸蒸馏水中,边加边搅,最后以沸蒸馏水稀释至 100 ml。

操作 于 4 支试管中,分别加入 1 ml 1%葡萄糖溶液, 1%蔗糖溶液, 1%淀粉溶液和少许纤维素(棉花或滤纸浸在 1 ml 水中)然后各加莫氏试剂 2 滴③,摇匀,将试管倾斜,沿管壁慢慢加入浓硫酸 1.5 ml (切勿振摇!),硫酸层沉于试管底部与糖溶液分成 2 层。观察液面交界处有无紫红色环出现。

二、塞氏(Seliwanoff)试验

① 一些非糖物质(如糠醛、糖醛酸等)亦呈阳性反应。此外,样液中如含高浓度有机化合物,将因浓硫酸的焦化作用,而出现红色,故试样浓度不宜过高。

② 亦可用麝香草酚或其它苯酚化合物代替 α -萘酚。麝香草酚的优点是溶液比较稳定,且灵敏度与萘酚一样。

③ 莫氏试剂应直接滴入试液中,勿使试剂接触试管壁,否则试剂会与硫酸接触生成绿色而掩盖紫色环。

原理 酮糖在浓酸的作用下,脱水生成 5-羟甲基糠醛,后者与间苯二酚作用,呈红色反应;有时亦同时产生棕色沉淀,此沉淀溶于乙醇,成鲜红色溶液①。

试剂

1. 塞氏试剂: 溶 50 mg 间苯二酚于 100 ml 盐酸中② ($H_2O:HCl = 2:1 V/V$) 临用时配制。

2. 1%果糖溶液: 称取果糖 1 g,溶于 100 ml 蒸馏水即成。

3. 1%葡萄糖溶液: 见试验一。

4. 1%蔗糖溶液: 见试验一。

操作 于 3 支试管中分别加入 1%葡萄糖溶液, 1%蔗糖溶液或 1%果糖溶液 0.5 ml, 各加塞氏试剂 2.5 ml, 摇匀, 同时置沸水浴内。比较各管颜色变化及红色出现的先后次序。

三、杜氏(Tollen)试验

原理 戊糖在浓酸溶液中脱水生成糠醛, 后者与间苯三酚结合成深红色物质。

本试验虽常用以鉴定戊糖, 但并非戊糖的特有反应。果糖、半乳糖和糖醛酸等都呈阳性反应。戊糖反应最快, 通常在 45 秒钟内即产生深红色沉淀。

试剂

1. 杜氏试剂: 2%间苯三酚乙醇(95%)溶液 3 ml, 缓缓加入浓盐酸 15 ml 及蒸馏水 9 ml 即得。临用时配制。

2. 1%阿拉伯糖溶液: 称取阿拉伯糖 1 g, 溶于 100 ml 蒸馏水即成。

① 在此实验条件下, 蔗糖有可能水解成果糖与葡萄糖, 而呈阳性反应。葡萄糖与麦芽糖亦呈阳性反应, 但呈色反应的速度较酮糖缓慢。果糖的红色出现及沉淀的产生, 应在加热后 20—30 秒钟内, 生成的沉淀必须能溶于乙醇并成红色溶液。

② 盐酸的浓度不宜超过 12%, 因在 12% 的盐酸中最易生成糠醛或其衍生物。

3. 1%半乳糖溶液：溶 1g 半乳糖于 100 ml 蒸馏水即成。

4. 1%葡萄糖溶液：见试验一。

操作 于 3 支试管中各加杜氏试剂 1 ml，再分别加 1 滴 1% 葡萄糖溶液，1%半乳糖或 1%阿拉伯糖溶液，混匀。将各试管同时放入沸水浴中，观察颜色的变化，并记录颜色变化的时间。

实验二 糖的还原作用

原理 斐林 (Fehling) 试剂和班乃德 (Benedict) 试剂均为含 Cu^{2+} 的碱性溶液，能使具有自由醛基或酮基的糖氧化，其本身则被还原成红色或黄色的 Cu_2O ①。此法常用作还原糖的定性或定量依据。

目前临床上多用班乃德法，因此法具有：①试剂稳定，不需临时配制；②不因氯仿的存在而被干扰；③肌酐或肌酸等物质所产生的干扰程度远较斐林试剂小等优点。

试剂

(一) 斐林试剂

试剂 A：将 34.5 g 硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 溶于 500 ml 蒸馏水中。

试剂 B：将 125g 氢氧化钠和 137 g 酒石酸钾钠溶于 500 ml 蒸馏水中。

临用时将试剂 A 与 B 等量混合。

(二) 班乃德试剂：溶 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 无水碳酸钠于 400 ml 水中。另溶 8.5g 硫酸铜于 50 ml 热

① 由于沉淀速度不同，形成的颗粒大小不同，颗粒大的为红色，小的为黄色。

水。将硫酸铜溶液缓缓倾入柠檬酸钠-碳酸钠溶液中，边加边搅，如有沉淀可过滤。此混合液可长期使用^①。

(三) 1%葡萄糖溶液：见实验一。

(四) 1%蔗糖溶液^②：见实验一。

(五) 1%淀粉溶液：见实验一。

操作 于3支试管中各加斐林试剂A及B 1ml，混匀，分别加入1%葡萄糖溶液、1%蔗糖溶液或1%淀粉溶液1ml，置沸水浴中加热数分钟，取出，冷却，观察各管的变化。

另用班乃德试剂（每管加2ml）重作上述试验，比较其结果。

实验三 血糖定量(Folin-Wu 法)

原理 无蛋白血滤液中的葡萄糖与硷性硫酸铜溶液共热， Cu^{2+} 即被血滤液中的葡萄糖还原成 Cu^+ (Cu_2O)， Cu_2O 又使钼酸试剂还原成低价的蓝色钼化合物。血滤液的糖含量和产生的 Cu_2O 量成正比， Cu_2O 的量与形成钼化合物的量成正比，可用比色法测定。

试剂

(一) 标准葡萄糖溶液

1. 1%葡萄糖母液：称取 1.000g 纯葡萄糖，溶于蒸馏水，并稀释至 100 ml。

2. 葡萄糖标准液：取 1.0 ml 母液置 100 ml 容量瓶内，加蒸

① 如因存放较久而产生沉淀，可取上清液使用，不必重新配制。存放较久的班乃德试剂较新配制的更好。

② 所用蔗糖应为 C. P. 以上规格，且应事先以班乃德试剂检验合格再用，否则将因药品不纯，或部分分解而有还原性。

馏水至刻度。

(二) 碱性硫酸铜溶液

A液：无水碳酸钠 35 g，酒石酸钠 13 g 及碳酸氢钠 11 g 溶于蒸馏水后，稀释至约 700 ml，待溶液清晰后再稀释至 1000 ml。

B液：晶体硫酸铜 5 g，溶于蒸馏水并稀释至 100 ml，加浓硫酸数滴作保存剂。

临用时，取 A 液 25 ml，B 液 5 ml，混合后，再加 A 液至 50 ml，摇匀。此混合液置冰箱内可保存数日，如暴露于阳光下，数小时即失效。

(三) 酸性钼酸盐溶液：称取钼酸钠 600 g，置烧杯内，加入少量蒸馏水，溶解后倾入 2000 ml 容量瓶中，加蒸馏水至刻度，摇匀，倾入另一较大的试剂瓶中，加溴水 0.5 ml，摇匀，静置数小时。取上清液 500 ml，置于 1000 ml 容量瓶中，徐徐加入 225 ml 85% 磷酸，边加边摇匀。再加 25% 硫酸 150 ml，置暗处至次日，用空气将剩余的溴赶去^①，然后加入 99% 醋酸 75 ml，摇匀，加蒸馏水稀释至 1000 ml，贮于棕色瓶中。

(四) 10% 钨酸钠溶液：钨酸钠 10 克，溶于蒸馏水并稀释至 100 ml。

(五) 2/3N 硫酸溶液：于 53 ml 蒸馏水中加入 1 ml 浓硫酸。

① 赶溴装置如下图所示：

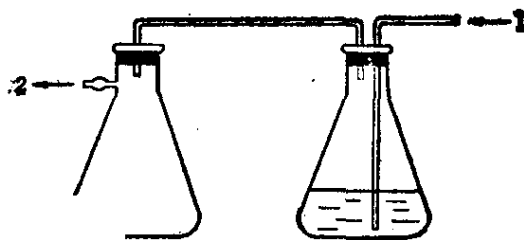
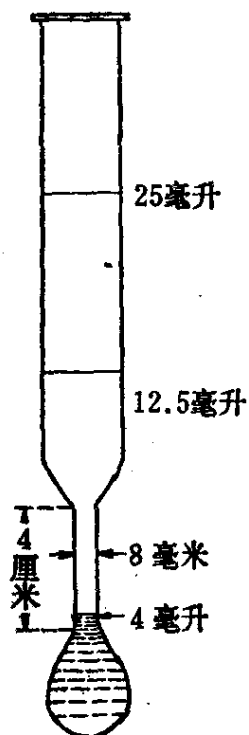


图 1 赶溴装置

1. 空气 2. 抽气

操作

(一) 无蛋白血滤液的制备：用奥氏吸管①吸取全血(已加抗凝剂——草酸钾或草酸钠) 1 ml, 缓缓放入② 20 ml 锥形瓶内, 加水 7 ml, 摇匀, 溶血后(血液变为红色透明时)加 10% 钨酸钠 1 ml, 摇



匀, 再加 $2/3N$ H_2SO_4 1 ml (皆用吸管)随加随摇, 加毕充分摇匀, 放置 5—15 分钟, 至沉淀由鲜红变为暗棕色③。用干滤纸过滤(先倾入液体少许, 待滤纸润湿后, 再全部倒入), 并在漏斗上盖一表面皿。如滤液不清, 需重滤。每毫升无蛋白血滤液相当于 $1/10$ ml 全血。

(二) 血糖测定：取具有 25 ml 刻度之血糖管(见图 2)④ 3 支, 编号。用奥氏吸管吸取无蛋白血滤液 2 ml (如含糖量较高, 只取 1 ml, 另加水 1 ml)放入第一支血糖管内。于第二支血糖管中加 2 ml 标准葡萄糖溶液(1 ml 含 0.1 mg 葡萄糖)。第三支血糖管中加 2 ml 蒸馏水。然后各加 2 ml 新配制的硷性硫酸铜溶液, 同时置于

沸水浴内煮 8 分钟, 取出, 在流水中迅速冷却, 各加 4 ml 酸性钼酸

① 奥氏吸管俗称胖肚吸管, 因吸管中部有一膨大部分, 用以吸取血液, 可减少血液与管壁的接触面, 使吸量更为准确。

② 欲得准确结果, 所取血液的量必须准确。如由吸管中放出血液的速度太快, 则有大量血液粘在吸管内壁, 容量不准, 一般放出 1 ml 血液所用的时间不应少于 1 分钟。

③ 沉淀由鲜红变为暗棕色, 是因钨酸钠与 H_2SO_4 作用生成钨酸, 在适当酸度时, 使血红蛋白变性、沉淀。如血沉淀经放置后不变为暗棕色或重滤后仍混浊, 系因血中所加抗凝剂过多, 可在钨酸与血混合液中加入 10% H_2SO_4 1—2 滴, 待变为暗棕色后再滤。

④ Folin-Wu 血糖管, 可减少 Cu^+ 与空气的接触, 防止氧化成 Cu^{2+} 。

盐溶液①，1 分钟后，以蒸馏水稀释至 25 ml，混匀，倒入比色杯，用 72 型分光光度计 420—440nm 波长比色（先以空白管调节零点，继测标准管及样品管）。按下式计算 100 ml 全血中所含血糖之毫克数：

$$100\text{ml 全血含血糖毫克数} = \frac{\text{OD}_1}{\text{OD}_2} \times C \times 10 \times 100$$

式中 C = 标准液葡萄糖含量(mg)；

OD_1 = 未知液光密度；

OD_2 = 标准液光密度。

实验四 多糖的试验

一、马铃薯淀粉的制备

原理 淀粉广布于植物界，谷、果实、种子、块茎中含量丰富，工业用的淀粉主要以玉米、山芋、马铃薯制取。本实验以马铃薯为原料，利用淀粉不溶或难溶于水的性质，制备淀粉。

操作 生马铃薯去皮，再在研钵中充分研碎，加水混合，用纱布过滤，除去粗颗粒，滤液中的淀粉很快沉到底部，多次用水洗淀粉，抽滤，滤饼放在表面皿上，在空气中干燥即得。

二、淀粉与碘的反应

原理 淀粉与碘呈蓝色②，是由于碘被吸附在淀粉上，形成一复合物，这复合物不稳定，极易被醇、氢氧化钠和热等使颜色褪去，

① 血液中除葡萄糖外，尚有其它还原物质，故所得结果可能偏高 20—30mg%，若用 α -氨基联苯 (α -aminobiphenyl) 试剂代替硷性硫酸铜和酸性钼酸盐两溶液即可避免此误差。

② 进行此试验时，溶液需呈中性或酸性。

其他多糖大多能与碘呈特异的颜色,这些呈色物质亦不稳定。

试剂

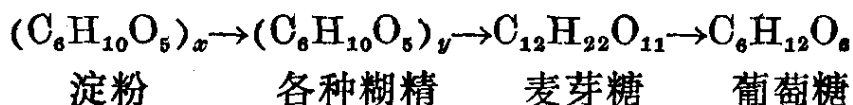
1. 自制马铃薯淀粉。
2. 0.1%淀粉: 称取淀粉 1g,加少量水,调匀,倾入沸水,边加边搅,并以热水稀释至 1000ml,可加数滴甲苯防腐。
3. 稀碘液: 配制 2%碘化钾溶液,加入适量碘,使溶液呈淡棕黄色即可。
4. 10% NaOH 溶液: 称取 NaOH 10g,溶于蒸馏水并稀释至 100 ml。

操作

1. 置少量自制淀粉于白瓷板上,加 1—3 滴稀碘液,观察颜色。
2. 取试管一支,加 0.1%淀粉液 5ml,再加 2 滴稀碘液,摇匀后,观察其颜色。将管内液体分成 3 份,其中一份加热,颜色是否褪去,冷却后,颜色是否全部恢复。另二份分别加入乙醇或 10% NaOH 溶液,观察颜色变化并解释之。

三、淀粉的水解

原理 淀粉在酸催化下加热,逐步水解成分子较小的糖,最后水解成葡萄糖,其过程如下:



淀粉完全水解后,失去与碘的作用,同时出现单糖的还原性。

试剂

1. 0.1%淀粉溶液: 同上。
2. 稀碘液: 同上。
3. 班乃德试剂: 见实验二。
4. 20%硫酸: 量取蒸馏水 78ml 置烧杯中,加入浓硫酸

20 ml, 混匀, 冷却后贮于试剂瓶中。

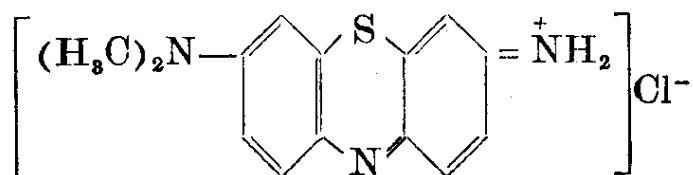
5. 10% 碳酸钠溶液: 称取无水碳酸钠 10 g, 溶于水并稀释至 100 ml。

操作 在一小烧杯内加 1% 淀粉溶液 25 ml 及 20% 硫酸 1 ml, 放在石棉网上小火加热, 微沸后每隔 2 分钟取出反应液 2 滴置于白瓷板上作碘试验。与此同时另取反应液 3 滴, 用 10% 碳酸钠溶液中和后, 作班乃德试验(参阅实验二), 记录实验结果并解释之。

实验五 肝素钠的定量测定

原理 肝素是一种粘多糖, 在多糖链上带有很多阴离子基团如磺酸基、羧基等, 因而肝素具有强负电性, 能与阳离子或带正电荷的分子结合生成复合物。

天青 A 染料是一种碱性染料



其正电荷部份能与肝素的阴离子结合, 生成“肝素-天青”复合物, 并能表现因光异色现象, 即产生一种较原来染料颜色不同的反应, 这一反应程度与肝素的结合量有一定关系。1967 年杰奎斯等在贝克曼 DK-2 分光光度计上利用天青 A 作肝素的定量测定, 发现低浓度肝素在波长 505nm、pH 8.6 的条件下, 肝素的浓度与光吸收值之间符合朗白-比耳定律。

天青法测定肝素含量时, 首先以肝素的标准品作出光密度与

肝素浓度间的标准曲线,然后测定样品的光密度,对照标准曲线,查算出样品中肝素的含量。

试剂

(一) 巴比妥缓冲液(pH8.6, 0.05 M): 将 1g 氢氧化钠溶于 50ml 加热至沸的蒸馏水中,即得 0.5N NaOH 溶液。称取巴比妥(二乙基巴比妥酸)5.52g,溶于上述 0.5N NaOH 溶液中,待完全溶解后,冷却,用蒸馏水稀释至 500 ml,用 pH 计校正之。

(二) 西黄蓍胶溶液① (0.1%): 称取西黄蓍胶(医用、白色) 0.5g,用少量蒸馏水使其分散,再用水稀释至 500 ml,用滤纸过滤。

(三) 天青溶液: 称取天青 I② (生物染料) 0.5g,先用少量蒸馏水将其完全溶解,再稀释至 500 ml,过滤,滤液(即贮液)保存于冰箱中。临用时,吸取贮液 5 ml,加蒸馏水 25 ml,混匀即得。

(四) 标准肝素溶液: 准确称取一定量的肝素标准品(药检部门供应),用蒸馏水配成每毫升含 700 μ g 肝素的溶液(贮液)。临用时取一定量贮液,准确稀释 100 倍,即得每毫升含 7 μ g 肝素的标准液③。

操作

(一) 标准曲线的绘制

取 15 $\times$ 180mm 试管(试管口径宜大,易使溶液混匀) 6 支编号,按下表加入试剂:

加入天青溶液前,应充分摇匀。加入天青溶液后,应立即摇

① 西黄蓍胶具有稳定颜色的作用。质量差的西黄蓍胶不能用。如无优质西黄蓍胶,可省去,但显色后应尽快比色,否则将因颜色不稳定而造成较大误差。

② 天青 I 含 80%天青 A 和少量天青 B。

③ 肝素标准液所以配制成每毫升含 7 μ g 肝素的浓度,系因 7 μ g S₆ 肝素标准品相当于美国药典 1 效价单位。如所用并非我国 S₆ 肝素标准品,则应按实际情况配制。S₆ 表示第 6 代标准品,目前我国已有第 7 代 (S₇) 标准品。