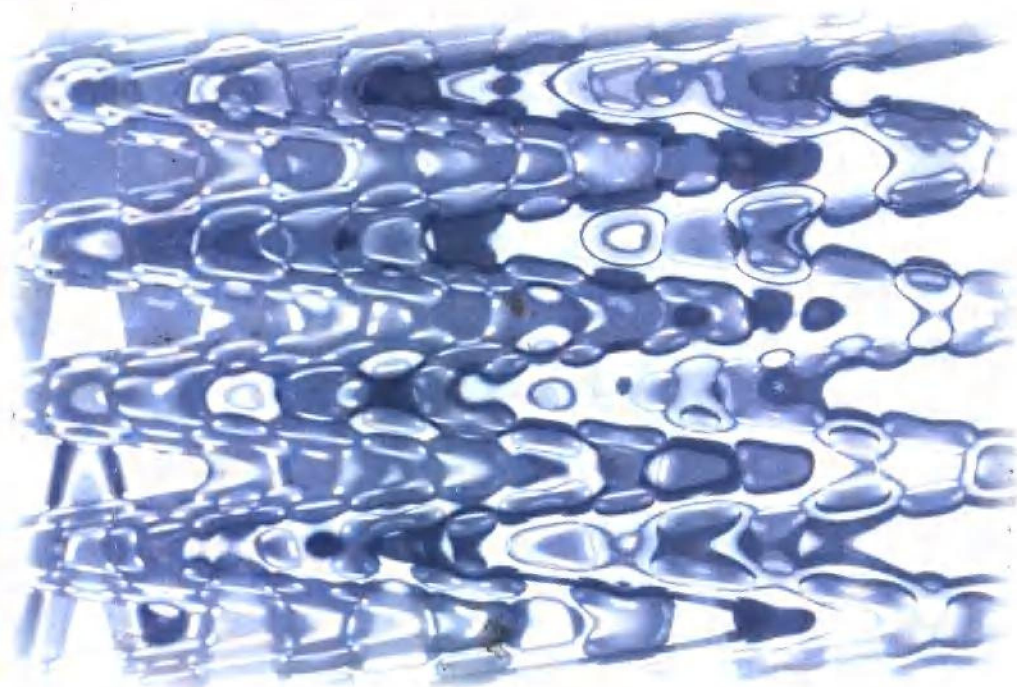




生物化学实验

主编 李如亮

武汉大学出版社

Q5-33
LRL

VX115-117

生物化学实验

主 编 李如亮
副主编 王延枝 张楚富
吴志平

武汉大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验/李如亮主编. —武汉: 武汉大学出版社,
1998. 1

(武汉大学本科生系列教材)

ISBN 7-307-02492-6

- I 生…
- II 李…
- III 生物化学—实验
- IV Q5-33

武汉大学出版社出版

(430072 武昌 珞珈山)

湖北省安陆市印刷厂印刷

(432600 湖北省安陆市儒学路4号)

新华书店湖北发行所发行

1998年1月第1版 1998年1月第1次印刷

开本: 850×1168 1/32 印张: 10.75

字数: 280千字 印数: 1—2000

ISBN 7-307-02492-6/Q·60 定价: 11.80元

本书如有印装质量问题, 请寄承印厂调换

前 言

随着生物化学的发展和生物化学教学内容的不断丰富,作为生物化学教学的一个重要方面——生物化学实验也在不断更新与提高。1988年,我们编写了一本生物化学实验讲义作为本科生的实验教材。自那时以来,我们对实验内容进行了多次修改和补充,并专门组织人员对新的实验内容进行了检验。这次正式出版的生物化学实验就是在这些工作的基础上并参考了国内外的生化实验教材编写而成的。

在这本生物化学实验教材中,我们做了一些大胆尝试:①去掉了许多定性和验证性实验,加大了定量分析的内容;②在同一项目实验中,同时介绍多种方法,以便让学生根据材料对能达到同一目的的方法进行分析比较;③以从材料到结果及分析为主线,分层次、有步骤地介绍实验方法和技术,使学生有一个完整的实际锻炼过程,有利于培养学生设计、分析能力以及独立工作能力。我们希望这些尝试能得到学生的认可。

本实验教材共计 67 个实验,内容覆盖了当今生物化学研究中常用的方法与技术。大多数实验是由李如亮编写的,吴志平、王延枝和张楚富也参与了实验编写。刘利东、张西平及李曼铭参与了一些实验工作。全书由李如亮和张楚富统稿。

书中的插图由陈宝联和王莉娟绘制,生化教研室的老师们对该书的编写与出版给予了很多支持。在此,我们一并表示谢意。

限于编者的水平,书中难免存在错误之处,望读者批评指正。

编 者

一九九七年九月

目 录

1. 糖的定性鉴定	1
2. 还原糖的测定	5
3. 糖的硅胶 G 薄层层析	14
4. 钼酸铵比色法测定果糖	17
5. 蔗糖的测定——Roe 比色法	19
6. 酚-硫酸法测定己糖含量	21
7. 氨基葡萄糖的测定	23
8. 唾液酸的测定	25
9. 粗脂肪的定量测定	27
10. 中性脂肪的组成	30
11. 碘价的测定(Hanus 法)	32
12. 皂化值的测定	35
13. 卵磷脂的提取和鉴定	37
附:蛋白质分离纯化的一般原则	37
14. 微量凯氏(Kjeldahl)定氮法	41
15. 双缩脲法测定蛋白质含量	45
16. 福林-酚法测定蛋白质含量	48
17. 紫外吸收法测定蛋白质浓度	54
18. 考马斯亮蓝 G-250 染色法测定蛋白质含量	57
19. 氨基酸的分离鉴定——纸层析法	59
20. 从牛奶中分离酪蛋白	63

21. α -乳清蛋白的分离和纯化	65
22. α -乳清蛋白的分析鉴定	68
23. 微白蛋白的提取和纯化	75
24. 凝胶过滤层析法测定蛋白质的分子量	79
25. 凝胶层析法的应用	85
26. 血脂蛋白的醋酸纤维素薄膜电泳	88
27. 盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白质	93
28. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS—测定 蛋白质的分子量	101
29. 等电聚焦法测定蛋白质等电点	106
30. 蛋白质 N-末端的测定	110
31. 丙氨酸转氨酶活性的测定	119
32. 蛇毒磷酸酯酶的底物专一性实验	121
33. 碱性磷酸酯酶的定性实验	125
34. 硫醇蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶的激活和抑制	128
35. 从鸡蛋清中制备溶菌酶	133
36. 亲和层析法分离乳酸脱氢酶	138
37. 乳酸脱氢酶的垂直板型凝胶电泳	144
38. 酰化酶 I 的制备与检测	148
39. Procion Red HE-3B 柱分离纯化胆绿素还原酶	154
40. 酶活性修饰实验	157
41. 酵母蔗糖酶的部分纯化和性质测定	159
42. 辅酶的测定	176
43. 抗生物素蛋白-生物素复合物:配体结合滴定曲线	183
44. 血红素的光吸收测定	186
45. 维生素 A 的比色测定	188
46. 维生素 B ₁ (硫胺素)的测定	192
47. 维生素 C 的定量测定(2,6-二氯酚靛酚滴定法)	197
48. 核酸的定量测定——定磷法	202

49. 核酸的定量测定——定糖法	205
50. 核酸的定量测定——紫外吸收法	210
51. 细胞核的分离	213
52. 染色质结构和组成分析	217
53. 核苷酸的电泳分离鉴定	221
54. 小牛胸腺 DNA 的提取	225
55. 植物 DNA 的提取	227
56. 从细菌细胞中提取 DNA	229
57. DNA 的 T_m 值的测定	234
58. 兔肝 RNA 的制备	239
59. 大肠杆菌 ColE1 质粒的大量制备与纯化	241
附一碱裂解法大量制备质粒	246
附二 SD—裂解法大量制备质粒 DNA	248
60. 限制性内切酶对质粒 DNA 的消化	250
61. Southern 印迹	254
62. PCR 技术	257
63. 柠檬酸合酶的抑制	260
64. 乳糖合成酶——一种酶调节系统	265
65. 大肠杆菌中蛋白质合成的抑制	270
66. 血清胆固醇的测定	274
67. 血液中尿素的测定	276
附录一 生物化学实验室规则	278
附录二 实验室安全及防护知识	280
附录三 实验室常识	284
附录四 常用数据表	288
附录五 常见蛋白质分子量参考值	295
附录六 离心机转数(rpm)与相对离心力(RCF)的换算	298
附录七 某些生物大分子、亚细胞器及微生物的沉降系数	300

附录八	硫酸铵饱和度常用表.....	301
附录九	缓冲溶液.....	304
附录十	层析数据表.....	329

实验一 糖的定性鉴定

I. Molish 反应—— α -萘酚反应

一、原理

糖在浓硫酸或浓盐酸的作用下脱水形成糠醛及其衍生物,后者与 α -萘酚作用形成紫红色复合物,在糖液和浓硫酸的液面间形成紫环。自由存在和结合存在的糖均呈阳性反应。此外,各种糠醛衍生物、葡萄糖醛酸以及丙酮、甲酸和乳酸均呈颜色近似的阳性反应。它是鉴定糖类存在与否的简便方法。

二、试剂

Molish 试剂:取 5g α -萘酚用 95%乙醇溶解至 100ml,临用前配制,棕色瓶保存。

1%葡萄糖溶液; 1%蔗糖溶液; 1%淀粉溶液。

三、操作方法

取试管,编号,分别加入各种待测糖溶液 1ml,然后加 2 滴 Molish 试剂,摇匀。倾斜试管,沿管壁小心加入约 1ml 浓硫酸,切勿摇动,小心竖直后仔细观察两层液面交界处的颜色变化。用水代替糖溶液,重复一遍,观察结果。记录各管中出现的颜色。

Ⅱ. 蒽酮反应

一、原理

糖经浓酸作用后生成的糠醛及其衍生物与蒽酮(10-酮-9,10-二氢蒽)作用生成蓝绿色复合物。

二、试剂

蒽酮溶液,取 0.2g 蒽酮溶于 100ml 浓硫酸中,当日配制。

待测糖溶液,同 Molish 试验。

三、操作方法

取试管,编号,均加入约 2ml 蒽酮溶液,再向各管滴加 5 滴各种待测糖溶液,充分混匀,观察各管颜色变化并记录。

Ⅲ. 酮糖的 Seliwanoff 反应

一、原理

酮糖在酸作用下较醛糖更易生成羟甲基糠醛,随后与间苯二酚作用生成鲜红色复合物。反应仅需 20~30 秒。醛糖在浓度较高时或长时间煮沸,也能产生阳性反应。

二、试剂

Seliwanoff 试剂:0.5g 间苯二酚溶于 1 升盐酸($H_2O : HCl = 2 : 1$)(V/V)中,临用前配制。

待测糖溶液:1%葡萄糖,1%蔗糖,1%果糖。

三、操作方法

取试管,编号,各加入 Seliwanoff 试剂 1ml。再依次分别加入

待测糖溶液各 4 滴,混匀,同时放入沸水浴中,比较各管颜色的变化过程。

IV. Tollen 试验

一、原理

戊糖在浓酸作用下脱水生成糠醛,后者与间苯三酚作用生成深红色物质。本反应并非专门对戊糖特异,有些己糖(果糖、半乳糖)及糖醛酸等亦呈阳性反应,但以戊糖速度最快。

二、试剂

Tollen 试剂:2%间苯三酚乙醇(95%)溶液 3ml,缓缓加入浓盐酸 15ml 及蒸馏水 9ml 即成,需临用前配制。

待测糖溶液:1%阿拉伯糖;1%半乳糖;1%葡萄糖。

三、操作方法

取几支干净试管,编号,各加入 1ml Tollen 试剂,分别加入 1 滴待测糖溶液后混匀,置沸水浴中加热,观察颜色变化及次序。

V. Benedict 试验

一、原理

Benedict 试剂和 Fehling 试剂(费林试剂)均为含 Cu^{2+} 的碱性溶液,能使还原糖氧化成酸类化合物,而其自身被还原成红色或黄色的 Cu_2O 。

这两个方法常用作还原糖的定性或定量试验。Benedict 试剂利用柠檬酸作为 Cu^{2+} 的络合剂,其碱性较 Fehling 试剂弱,灵敏度高,干扰因素少。

二、试剂

Benedict 试剂: 将 170g 柠檬酸钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 11\text{H}_2\text{O}$) 和 100g 无水碳酸钠溶于 800ml 水中, 另将 17g 硫酸铜溶于 100ml 热水中。将硫酸铜溶液缓缓倾入柠檬酸钠-碳酸钠溶液中, 边加边搅, 最后补足至 1000ml (如有沉淀需过滤, 可长期使用)。

待测糖溶液: 1% 葡萄糖溶液; 1% 蔗糖溶液; 1% 淀粉溶液。

三、操作方法

加 2ml Benedict 试剂和 1ml 待测糖溶液于试管中, 沸水浴中加热 5 分钟, 取出后冷却, 观察各管中的颜色变化。

VI. Barford 试验

一、原理

单糖在弱酸性溶液中具有还原作用。Barford 试剂为弱酸性。单糖在 Barford 试剂的作用下能将 Cu^{2+} 还原成砖红色的氧化亚铜, 时间约 3 分钟。但 Cu_2O 沉淀量少, 应观察试管底部的 Cu_2O 沉淀。还原二糖在 20 分钟左右也可产生阳性反应。非还原性二糖经水解后也可产生阳性反应。

二、试剂

Barford 试剂: 16.7g 乙酸铜溶于近 200ml 水中, 加 1.5ml 冰醋酸, 定容至 250ml 即可。

待测糖溶液: 1% 葡萄糖; 1.0% 蔗糖; 1% 淀粉溶液。

三、操作方法

分别加入 2ml Barford 试剂和 1ml 待测糖溶液于试管中, 煮沸 2~3 分钟, 放置 20 分钟以上, 比较各管颜色变化。

实验二 还原糖的测定

还原糖是指含有自由醛基和酮基的单糖类以及某些二糖,如乳糖、麦芽糖。

糖的测定方法有物理法(如折光率、比旋度的变化)和化学法,其中以化学法常用且准确。

还原糖的定量测定基础是:在碱性溶液中还原糖能将二价铜离子等金属离子还原成一价离子,而糖本身氧化成各种羟酸。

利用单糖、双糖与多糖的溶解度不同可把它们彼此分开,进而测得生物材料中可溶性还原糖的多少。利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,就可知道生物样品中的总糖。

在介绍糖类的测定方法之前首先谈谈生物材料的处理问题。在分析生物材料的糖类物质之前要进行预处理,所谓预处理主要包括四个方面的内容:一是生物材料的糖分提取;二是除去糖测定过程中的干扰物质,诸如植物组织中的单宁、色素、蛋白质等以及动物血液中的蛋白质等;三是如果要测定低聚糖或多聚糖,则要对样品进行水解处理,使其转化为单糖后再测定;四是在必要时还要对生物组织提取液中的各种糖类进行分离,然后进行测定。

1. 植物材料的一般处理方法

植物材料中的糖存在于细胞中,因此必须先将被分析植物材料进行研磨,使之成糊状或粉状物,然后依据糖易溶于水这一性质,加入一定量的蒸馏水,并在 $75\sim 80^{\circ}\text{C}$ 的水浴上加热 1 小时,再定容过滤,取滤液测定糖的含量。对某些含有大量淀粉的植物材

料,在用水提取糖分时,常会使其部分或全部地带入到提取液中,从而使测定结果偏高,此时可用 25%~85% 的乙醇回流提取约 30 分钟,提取几次后合并之,再蒸去乙醇,用水定容后再测定糖的含量。

植物材料中如含有其它的还原性物质和蛋白质时,可用 10% 中性或碱性乙酸铅溶液沉淀去除之。具体方法是将乙酸铅一滴滴加入到热的未定容的提取液中,待沉淀完全时再过滤。向滤液中再逐滴加入饱和硫酸钠以彻底去除铅,滤去沉淀后定容,再测定糖含量。

如果要测定植物材料中的低聚糖,如二糖、三糖等,将植物材料提取液按 16:1(V/V)加入 2% HCl, 80°C 水解半小时,再用饱和碳酸钠中和(以甲基红为指示剂),然后再用乙酸铅除蛋白质,最后测定糖含量。用此糖含量减去未经水解的提取液含糖量即为该液的低聚糖量。

淀粉含量的测定首先是将植物材料磨碎后称量,加入 3% HCl 在沸水浴中水解 1~2 小时,使淀粉彻底水解,冷却后用 10% NaOH 中和至中性。再按前述方法除去干扰物质后测定糖含量,用总糖量减去未经酸水解的提取液含糖量即为淀粉含量。

2. 动物材料——血液的去蛋白方法

(1)无蛋白血滤液的制备:在血糖含量测定前必须先除蛋白,方法有:

①钨酸钠-硫酸法:取全血(加抗凝剂)1ml 于 20ml 三角瓶中,加蒸馏水 7ml,摇匀后使溶血,加入 10% 钨酸钠 1ml 并摇匀,然后加入 0.4mol/L H_2SO_4 1ml,随加随摇,加完后充分振荡,放置 5~15 分钟,当沉淀变为暗棕色时,用干滤纸过滤,每毫升滤液相当于 1/10 全血。

②硫酸锌法

a. 0.45% 硫酸锌 5ml 和 0.1mol/L NaOH 1ml 混合成胶体溶液,然后加入血液 0.1ml,在沸水浴中加热 4 分钟,冷却后用棉花

过滤,滤液可直接用于测定糖含量,尤其是滴定法。

b. 向试管中加入 1ml 0.30mol/L $\text{Ba}(\text{OH})_2$, 蒸馏水 7.5ml, 混匀后加 0.5ml 全血, 血清或血浆, 混合后放置半分钟, 再加入 1ml 5% ZnSO_4 , 混匀后放置 2 分钟, 过滤或离心, 滤液为 1:20 的无蛋白滤液。

(2) 不溶血的无蛋白血滤液的制备

采用等渗的硫酸钠溶液稀释血液, 使血球不受破坏, 再用蛋白质沉淀剂去蛋白。

① 硫酸钠-硫酸锌试剂法: 取血液 0.1ml, 加 1.8ml 硫酸钠-硫酸锌试剂和 0.1ml 0.5mol/L NaOH , 混匀后离心, 取上清液测糖含量, 上清液为 1/20 全血浓度。

② 等渗硫酸钠和钨酸钠法: 取 0.1ml 血液和 3.8ml 等渗硫酸钠-硫酸铜试剂混合后可在室温放置几小时 (CuSO_4 可抑制酵解), 在测糖前加入 0.1ml 的 10% 钨酸钠溶液, 蛋白质沉淀后离心, 取上清用于测糖, 此血滤液稀释了 40 倍。

注释

1. 抗凝剂: 草酸钾 2 克, 氟化钠 1.5 克加水 100 毫升。

2. 硫酸锌和氢氧化钡:

0.3mol/L $\text{Ba}(\text{OH})_2$: 取 $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 94g 用水溶解后定容到 1 升。

5% 硫酸锌。

0.3mol/L $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 和 5% 硫酸锌溶液配制后要调节浓度, 方法是: 100ml 三角瓶中加入 10ml 5% 硫酸锌液和 25ml 水, 用酚酞作指示剂, 以 0.3mol/L $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 液滴定至浅红色终点。 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 用量应为 $10.0 \pm 0.1\text{ml}$, 否则调整二者的浓度再标定。

3. 硫酸钠-硫酸锌试剂: 55ml 10% 硫酸锌溶液 (10g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 用水定容至 100ml) 加等渗硫酸钠溶液 (30g $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 或 13.2g 无水硫酸钠用水定容至 1 升) 到 1 升即成。

4. 等渗硫酸钠-硫酸铜试剂: 300ml 3% $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 溶液和 30ml 7% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液混合即成。

I. 蒽酮比色法

一、原理

糖在浓硫酸作用下生成糠醛, 产物与蒽酮反应生成蓝绿色复合物。蒽酮法适用于己酮糖和己醛糖的测定, 在 $10 \sim 100 \mu\text{g}$ 范围内其颜色的深浅与糖含量成正比, 但蒽酮也与其它糖(如戊醛糖)反应呈现不同的颜色。由于蒽酮试剂与糖反应的呈色强度随时间变化, 故必须在反应后立即在同一时间内比色。

二、试剂

蒽酮试剂: 将 1.0g 蒽酮溶于 1 升 95% 浓硫酸中, 临用前配制。

糖的标准溶液: 0.1mg/ml 葡萄糖溶液, 0.1mg/ml 果糖溶液, 0.1mg/ml 木糖溶液和 0.1mg/ml 淀粉溶液。几种试剂可同时用, 也可选择其一作标准曲线。

待测糖溶液: 可用无蛋白滤液或 RNA 制品。注意控制糖浓度在 $10 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内。

三、操作方法

1. 制作标准曲线: 取 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 糖标准溶液 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.60, 0.80ml 于试管中, 用水补足到 2ml, 加入 4ml 蒽酮试剂, 摇匀, 沸水浴加热 15 分钟, 流动水冷却后测 OD_{620} 。以含糖数为横坐标, OD_{620} 为纵坐标绘制标准曲线。

2. 未知液的糖量测定: 取待测糖溶液 2ml, 按上一步操作, 读其 OD_{620} 值。利用标准曲线计算出样品含糖量。