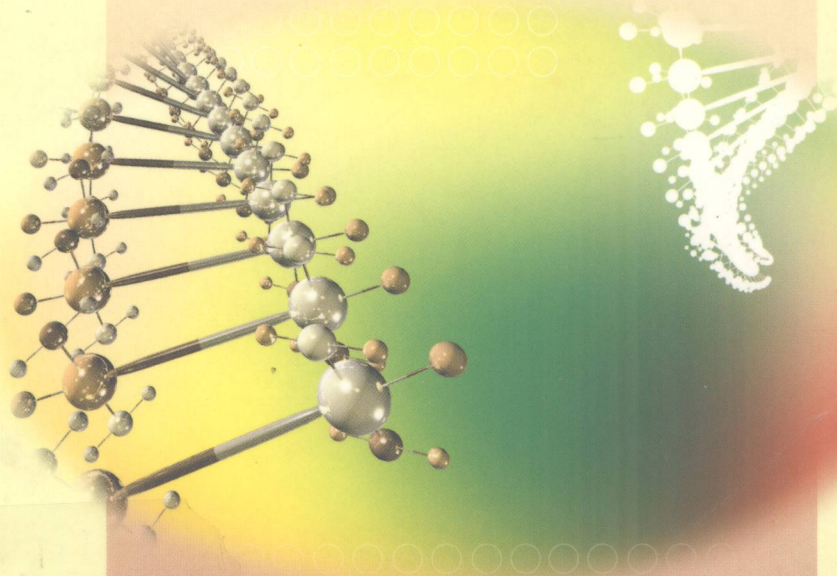


高等农业院校教材

基础生物化学实验指导

吕淑霞 主编



中国农业出版社

一三三
四三〇七
L

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

普通生物化学实验指导

王德明 主编



中国矿业大学出版社

高等农业院校教材

基础生物化学实验指导

吕淑霞 主 编

中国农业出版社

图书在版编目(CIP)数据

基础生物化学实验指导/吕淑霞主编. —北京:中国
农业出版社, 2003. 7
高等农业院校教材
ISBN 7-109-08361-6

I. 基... II. 吕... III. 生物化学-实验-高等学
校-教学参考资料 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 042480 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

出版人:傅玉祥

责任编辑 李国忠

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2003 年 7 月第 1 版 2003 年 7 月北京第 1 次印刷

开本:787mm×960mm 1/16 印张:9

字数:155 千字

定价:13.30 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误,请向出版社发行部调换)

内 容 提 要

本书主要以植物材料为研究对象,实验项目包括糖类、脂类、蛋白质和氨基酸、核酸、酶、维生素的测定,既有定性测定又有定量测定。实验内容不求齐全,而力求原理阐述简明扼要,通俗易懂,方法可靠,操作具体详尽,重复性好,灵敏度高。实验方法涉及传统的滴定法以及分光光度法、层析法和电泳等现代生物化学实验技术。本实验指导可供高等农业院校农学类、生物技术以及相关专业的本科、专科学生使用,也可供从事与生物科学有关的科研工作者参考。

主 编 吕淑霞

副主编 唐 咏

阚国仕

编写人员 吕淑霞 钟 鸣 陈红漫 唐 咏

任大明 迟乃玉 阚国仕 马 镛

杨雪莲 孟 玲 李贺民 林 英

主 审 陈祖洁

前 言

在以惊人速度发展的生物科学中,生物化学是其中最活跃的基础学科之一。作为一门研究生命活动基本规律的科学,生物化学又是一门实验科学。工业、农业、医药、食品、能源、环境科学等越来越多的研究领域都以生物化学理论为依据,以其实验技术为手段,生物化学已成为高等院校许多相关专业学生必修的专业基础课程。

基础生物化学课程是一门重要的专业基础课,又是实践性极强的应用学科。只有掌握扎实而广泛的基础知识和熟练的操作技能,才算真正掌握好这门应用科学。因此,我们组织编写了这本《基础生物化学实验指导》。

本书主要是配合基础生物化学教材,供高等农业院校农学类、生物技术以及相关专业的学生使用。实验多以植物材料为主要研究对象,以生物大分子——碳水化合物、核酸、蛋白质和酶等为主要研究内容。实验方法涉及分光光度法、层析、电泳等现代生物化学实验技术。在实验内容编排上,既有定性的测定又有定量的测定。实验项目包括糖类、脂类、蛋白质和氨基酸、核酸、酶、维生素的测定,有些项目包括几种不同方法,每一实验分为目的、原理、实验材料、仪器和试剂、操作步骤、结果计算、注意事项、思考题及其参考答案。

本书从一定角度反映了我国生物化学研究技术的水平,内容不求全,而力求其可靠性和方法性。在编写过程中,力求做到原理阐述简明扼要,通俗易懂;方法操作具体详尽,重复性好,灵敏度高;注重培养学生严谨的科学态度与独立分析问题、解决问题的能力,为造就其良好的科研素质奠定基础。

本书是集体劳动的结晶。主要由在教学第一线多年从事基础生物化学理论与实验课教学与研究工作的教授、副教授和具有博士、硕士学位的青年教师等共同编写。陈祖洁教授始终关注本书的编写,在百忙中审阅了全部稿件并提出许多宝贵意见。在此,我们表示深深的谢意。

由于我们的经验和水平有限,加之时间较仓促,书中难免出现错漏之处。我们真诚希望广大读者提出宝贵的意见和建议,以便再版时修改。

编者

2003年5月

目 录

前言

生物化学实验室规则	1
实验记录及实验报告	2
碳水化合物	5
实验一 还原糖和总糖的测定——3,5-二硝基水杨酸比色法	5
实验二 还原糖含量测定——砷钼酸比色法	9
脂类	13
实验三 脂肪碘值的测定	13
实验四 粗脂肪含量的测定——索氏抽提法	16
核酸	20
实验五 酵母 RNA 的提制	20
实验六 地衣酚显色法测定 RNA 含量	24
实验七 三种腺苷酸分离鉴定——醋酸纤维素薄膜电泳法	25
实验八 植物 DNA 的提取与测定	27
实验九 质粒 DNA 的提取、酶切与鉴定	32
实验十 紫外吸收法测定核酸的含量	36
蛋白质及氨基酸	41
实验十一 氨基酸纤维素薄层层析	41
实验十二 总氮含量的测定	43
实验十三 脯氨酸含量的测定	47
实验十四 考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量	49
实验十五 茚三酮显色法测定氨基酸含量	53
实验十六 Folin-酚比色法测定蛋白质含量	55
实验十七 紫外吸收法测定蛋白质含量	58

酶	62
实验十八 淀粉酶活力的测定	62
实验十九 硝酸还原酶活性的测定	66
实验二十 纤维素酶活力的测定	70
实验二十一 超氧化物歧化酶活力的测定	77
实验二十二 过氧化物酶活性的测定	82
实验二十三 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离过氧化物酶同工酶	85
实验二十四 植物组织中蔗糖酶活力的测定	95
维生素	98
实验二十五 维生素 A 的含量测定	98
实验二十六 维生素 C 的含量测定	101
附录	106
附录一 植物样品的采取、处理与保存	106
附录二 实验室安全及防护知识	108
附录三 基础生物化学实验室常用仪器简介	114
附录四 常用缓冲溶液的配制	121
附录五 硫酸铵饱和度的常用表	128
附录六 氨基酸的一些理化常数	130
附录七 常用酸碱和固态化合物的一些数据	132
主要参考文献	134

生物化学实验室规则

1. 每个同学都应该自觉遵守课堂纪律,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和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、如实记录在实验记录本上,文字要简练、准确。完成实验后经教师检查同意,方可离开实验室。

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、药品洒在实验台面和地上。实验完毕,仪器洗净放好,将实验台面擦拭干净,才能离开实验室。

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。使用贵重精密仪器时,更应严格遵守操作规程,发现故障须立即报告教师,不得擅自动手检修。

6. 实验室内严禁吸烟!加热用的电炉应随用随关,严格做到:人在炉火在,人走炉火关。乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热,并要远离火源操作和放置。实验完毕,应立即拔去电炉开关和关好水龙头,拉下电闸。离开实验室以前应认真、仔细地检查水电,严防发生安全事故。

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。废纸屑及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. 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,拿放比色杯时要拿稳,不要打碎。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。

9. 实验室内一切物品,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。

10. 每次实验课由班长或课代表负责安排值日生。值日生的职责是负责当天实验室的卫生、安全和一切服务性的工作。

实验记录及实验报告

每次实验要做到课前认真预习,实验操作中仔细观察并如实记录实验现象与数据,课后及时完成实验报告。

一、课前预习

实验课前要将实验名称、目的和要求、实验内容与原理、操作方法和步骤等简单扼要地写在记录本中,做到心中有数。

二、实验记录

从实验课开始就要培养严谨的科学作风,养成良好的习惯。实验条件下观察到的现象应详细地记录下来,实验中观测的每个结果和数据都应及时如实地直接记在记录本上,记录时必须使用钢笔或圆珠笔,并做到原始记录准确、简练、详尽、清楚。如称量试材样品的重量、滴定管的读数、分光光度计的读数等,都应设计一定的表格准确记下正确的读数,并根据仪器的精确度准确记录有效数字。例如,光密度值为 0.050,不应写成 0.05。每一个结果至少要重复观测两次以上,当符合实验要求并确知仪器工作正常后再写在记录本上。另外,实验中使用仪器的类型、编号以及试剂的规格、化学式、分子质量、准确的浓度等,都应记录清楚,以便总结实验完成报告时进行核对和作为查找成败原因的参考依据。如果发现记录的结果有怀疑、遗漏、丢失等,就必须重做实验。

三、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。按照实验内容可分为定性和定量两大类,实验报告的格式:

实验序号,实验名称

- (1) 目的和要求
- (2) 内容与原理
- (3) 主要仪器及试剂配制
- (4) 操作方法与实验步骤
- (5) 结果与讨论

定性实验报告中的实验名称和目的要求是针对该次实验课的全部内容而必须达到的目的和要求。在完成实验报告时,可以按照实验内容分别写原理、操作方法、结果与讨论等。原理部分应简述基本原理。操作方法(或步骤)可以流程图的方式或自行设计的表格来表示。结果与讨论包括实验结果及观察现象的

小结、对实验课遇到的问题和思考题进行探讨以及对实验的改进意见等。

定量实验报告中,目的和要求、原理以及操作方法部分应简单扼要地叙述,但是对于实验条件(试剂配制及仪器)和操作的关键环节必须写清楚。对于实验结果部分,应根据实验课的要求将一定实验条件下获得的实验结果和数据进行整理、归纳、分析和对比,并尽量总结成各种图表,如原始数据及其处理的表格、标准曲线图以及比较实验组与对照组实验结果的图表等。另外,还应针对实验结果进行必要的说明和分析。讨论部分可以包括:对实验方法(或操作技术)和有关实验的一些问题(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、体会和建议,对实验课的改进意见等。



碳水化合物

实验一 还原糖和总糖的测定

——3,5-二硝基水杨酸比色法

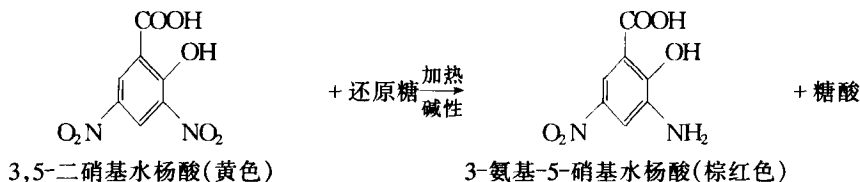
一、目的

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

二、原理

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或酮基的糖类,单糖都是还原糖,双糖和多糖不一定是还原糖(其中乳糖和麦芽糖是还原糖,蔗糖和淀粉是非还原糖)。利用糖的溶解度不同,可将植物样品中的单糖、双糖和多糖分别提取出来,对没有还原性的双糖和多糖,可用酸水解法使其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(还原糖以葡萄糖含量计)。

在碱性条件下加热,还原糖被氧化成糖酸及其他产物,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。在一定范围内,还原糖的量与棕红色物质颜色的深浅成正比关系,利用分光光度计,在540 nm波长下测定光密度值,查对标准曲线并计算,便可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,所以在计算多糖含量时应乘以0.9。



三、实验材料、主要仪器和试剂

1. 实验材料

小麦面粉,精密 pH 试纸。

2. 主要仪器

- (1) 具塞玻璃刻度试管:20 mL×11;
- (2) 大离心管:50 mL×2;
- (3) 烧杯:100 mL×1;
- (4) 三角瓶:100 mL×1;
- (5) 容量瓶:100 mL×3;
- (6) 刻度吸管:1 mL×1、2 mL×2、10 mL×1;
- (7) 恒温水浴锅;
- (8) 沸水浴;
- (9) 离心机;
- (10) 扭力天平;
- (11) 分光光度计。

3. 试剂

(1) 1 mg/mL 葡萄糖标准液:准确称取 80 ℃ 烘至恒重的分析纯葡萄糖 100 mg,置于小烧杯中,加少量蒸馏水溶解后,转移到 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至 100 mL,混匀,置 4 ℃ 冰箱中保存备用。

(2) 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂:将 6.3 g DNS 和 262 mL 2 mol/L NaOH 溶液,加到 500 mL 含有 185 g 酒石酸钾钠的热水溶液中,再加 5 g 结晶酚和 5 g 亚硫酸钠,搅拌溶解,冷却后加蒸馏水定容至 1 000 mL,贮于棕色瓶中备用。

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

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

(5) 6 mol/L HCl 和 6 mol/L NaOH 各 100 mL。

四、操作步骤

1. 制作葡萄糖标准曲线

取 7 支 20 mL 具塞刻度试管编号,按表 1 分别加入浓度为 1 mg/mL 的葡萄糖标准液、蒸馏水和 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂,配成不同葡萄糖含量的反应液。

表 1 葡萄糖标准曲线制作

管号	1 mg/mL 葡萄糖标准液 (mL)	蒸馏水 (mL)	DNS (mL)	含葡萄糖量 (mg)	光密度值 ($OD_{540\text{ nm}}$)
0	0	2	1.5	0	
1	0.2	1.8	1.5	0.2	

(续)

管号	1 mg/mL 葡萄糖标准液 (mL)	蒸馏水 (mL)	DNS (mL)	含葡萄糖量 (mg)	光密度值 ($OD_{540\text{nm}}$)
2	0.4	1.6	1.5	0.4	
3	0.6	1.4	1.5	0.6	
4	0.8	1.2	1.5	0.8	
5	1.0	1.0	1.5	1.0	
6	1.2	0.8	1.5	1.2	

将各管摇匀,在沸水浴中准确加热 5 min,取出,冷却至室温,用蒸馏水定容至 20 mL,加塞后颠倒混匀,在分光光度计上进行比色。调波长至 540 nm,用 0 号管调零点,测出 1~6 号管的光密度值。以光密度值为纵坐标,葡萄糖含量 (mg) 为横坐标,在坐标纸上绘出标准曲线。

2. 样品中还原糖和总糖的测定

(1) 还原糖的提取:准确称取 3.00 g 食用面粉,放入 100 mL 烧杯中,先用少量蒸馏水调成糊状,然后加入 50 mL 蒸馏水,搅匀,置于 50 ℃ 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 4 000 r/min 下离心 5 min,沉淀可用 20 mL 蒸馏水洗一次,再离心。将两次离心的上清液收集在 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,混匀,作为还原糖待测液。

(2) 总糖的水解和提取:准确称取 1.00 g 食用面粉,放入 100 mL 三角瓶中,加 15 mL 蒸馏水及 10 mL 6 mol/L HCl,置沸水浴中加热水解 30 min(水解是否完全可用碘-碘化钾溶液检查)。待三角瓶中的水解液冷却后,加入 1 滴酚酞指示剂,用 6 mol/L NaOH 中和至微红色,用蒸馏水定容在 100 mL 容量瓶中,混匀。将定容后的水解液过滤,取滤液 10 mL,移入另一 100 mL 容量瓶中定容,混匀,作为总糖待测液。

(3) 显色和比色:取 4 支 20 mL 具塞刻度试管,编号,按表 2 所示分别加入待测液和显色剂,空白调零可使用制作标准曲线的 0 号管。加热、定容和比色等其余操作与制作标准曲线相同。

表 2 样品还原糖测定

管号	还原糖待测液 (mL)	总糖待测液 (mL)	蒸馏水 (mL)	DNS (mL)	光密度值 ($OD_{540\text{nm}}$)	查曲线葡萄糖量 (mg)
7	0.5		1.5	1.5		
8	0.5		1.5	1.5		
9		1	1	1.5		
10		1	1	1.5		

五、结果与计算

计算出 7、8 号管光密度值的平均值和 9、10 号管光密度值的平均值,在标准曲线上分别查出相应的还原糖毫克数,按下式计算出样品中还原糖和总糖的百分含量。

$$\text{还原糖} = \frac{\text{查曲线所得葡萄糖毫克数} \times \frac{\text{提取液总体积}}{\text{测定时取用体积}}}{\text{样品毫克数}} \times 100\%$$

$$\text{总糖} = \frac{\text{查曲线所得水解后还原糖毫克数} \times \text{稀释倍数}}{\text{样品毫克数}} \times 0.9 \times 100\%$$

六、注意事项

- (1) 离心时对称位置的离心管必须配平。
- (2) 标准曲线制作与样品测定应同时进行显色,并使用同一空白调零点和比色。
- (3) 面粉中还原糖含量较少,计算总糖时可将其合并入多糖一起考虑。

七、思考题

1. 3,5-二硝基水杨酸比色法是如何对总糖进行测定的?
2. 如何正确绘制和使用标准曲线?

思考题参考答案

1. 植物中的总糖包括单糖、寡糖和多糖,单糖是还原糖,可直接测定。而没有还原性的寡糖和多糖,需用高浓度的酸在加热的条件下水解成有还原性的单糖,还原糖在碱性条件下加热被氧化成糖酸及其他产物,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。在一定范围内,还原糖的量与棕红色物质颜色的深浅成一定比例关系,利用分光光度计,在 540 nm 波长下测定光密度值,查对标准曲线并计算,可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要加入一分子水,所以在计算多糖含量时应乘以 0.9。

2. 标准曲线应在坐标纸上绘制,横坐标轴距坐标纸底边 1.5~2 cm,标出刻度示葡萄糖的毫克数;纵坐标轴距坐标纸左边 1.5~2 cm,标刻度示光密度值;曲线为过原点的直线,测定点均匀分布在直线的两侧;标准曲线只能在测试条件完全相同的情况下,用于确定样品中的物质含量。对于重复的测定,应取吸光度