



普通高等学校“十四五”规划生命科学类创新型特色教材

编 委 会



主任委员

陈向东 武汉大学教授,2018—2022年教育部高等学校大学生物学课程教学指导委员会秘书长,中国微生物学会教学工作委员会主任

副主任委员(排名不分先后)

胡永红 南京工业大学教授,食品与轻工学院院长

李 钰 哈尔滨工业大学教授,生命科学与技术学院院长

卢群伟 华中科技大学教授,生命科学与技术学院副院长

王宜磊 菏泽学院教授,牡丹研究院执行院长

委员(排名不分先后)

陈大清	郭晓农	李 宁	陆 胤	宋运贤	王元秀	张 明
陈其新	何玉池	李先文	罗 充	孙志宏	王 云	张 成
陈姿喧	胡仁火	李晓莉	马三梅	涂俊铭	卫亚红	张向前
程水明	胡位荣	李忠芳	马 尧	王端好	吴春红	张兴桃
仇雪梅	金松恒	梁士楚	聂呈荣	王锋尖	肖厚荣	郑永良
崔韶晖	金文闻	刘秉儒	聂 桓	王金亭	谢永芳	周 浓
段永红	雷 忻	刘 虹	彭明春	王 晶	熊 强	朱宝长
范永山	李朝霞	刘建福	屈长青	王文强	徐建伟	朱德艳
方 俊	李充璧	刘 杰	权春善	王文彬	闫春财	朱长俊
方尚玲	李 峰	刘良国	邵 晨	王秀康	曾绍校	宗宪春
冯自立	李桂萍	刘长海	施树良	王秀利	张 峰	
耿丽晶	李 华	刘忠虎	施文正	王永飞	张建新	
郭立忠	李 梅	刘宗柱	舒坤贤	王有武	张 龙	



普通高等学校“十四五”规划生命科学类创新型特色教材

作者所在院校

(排名不分先后)

北京理工大学	华中科技大学	云南大学	辽宁大学
广西大学	南京工业大学	西北农林科技大学	燕山大学
广州大学	暨南大学	中央民族大学	临沂大学
哈尔滨工业大学	首都师范大学	郑州大学	山西医科大学
华东师范大学	湖北大学	新疆大学	宁夏大学
重庆邮电大学	湖北工业大学	青岛科技大学	重庆第二师范学院
滨州学院	湖北第二师范学院	青岛农业大学	齐鲁理工学院
河南师范大学	湖北工程学院	青岛农业大学海都学院	六盘水师范学院
嘉兴学院	湖北科技学院	山西农业大学	河西学院
武汉轻工大学	湖北师范大学	陕西科技大学	广西贵港工业学院
长春工业大学	汉江师范学院	陕西理工大学	
长治学院	湖南农业大学	上海海洋大学	
常熟理工学院	湖南文理学院	塔里木大学	
大连大学	华侨大学	唐山师范学院	
大连工业大学	武昌首义学院	天津师范大学	
大连海洋大学	淮北师范大学	天津医科大学	
大连民族大学	淮阴工学院	西北民族大学	
大庆师范学院	黄冈师范学院	北方民族大学	
佛山科学技术学院	惠州学院	西南交通大学	
阜阳师范大学	吉林农业科技学院	新乡医学院	
广东第二师范学院	集美大学	信阳师范学院	
广东石油化工学院	济南大学	延安大学	
广西师范大学	佳木斯大学	盐城工学院	
贵州师范大学	江汉大学	云南农业大学	
哈尔滨师范大学	江苏大学	肇庆学院	
合肥学院	江西科技师范大学	福建农林大学	
河北大学	荆楚理工学院	浙江农林大学	
河北经贸大学	南京晓庄学院	浙江师范大学	
河北科技大学	辽东学院	浙江树人学院	
河南科技大学	锦州医科大学	浙江中医药大学	
河南科技学院	聊城大学	郑州轻工业大学	
河南农业大学	聊城大学东昌学院	中国海洋大学	
石河子大学	牡丹江师范学院	中南民族大学	
菏泽学院	内蒙古民族大学	重庆工商大学	
贺州学院	仲恺农业工程学院	重庆三峡学院	
黑龙江八一农垦大学	宿州学院	重庆文理学院	

第二版前言

生命科学被公认为 21 世纪的带头学科之一。生命科学的发展离不开生物化学,生物化学既是生命科学的基础,又是生命科学的前沿,它是生物、农、医、药等与生命科学相关专业的必修课程,不仅学习生命科学及与其相关学科的学生需要学习生物化学,而且学习化学、物理学、环境科学、信息科学、材料科学等的学生也需要对生物化学有所了解。

生物化学是一门实验性科学,实验教学占有重要的位置,学生动手能力、创新能力、科学思维能力的培养主要依靠实验教学来完成。

本书第一版于 2014 年 8 月出版,至今已近 8 年。这期间不仅生物化学学科及其技术方法有许多新进展,而且教学模式、教学方法也发生了很大变化,国家“双万计划”的实施也极大地推动了丰富多彩的线上资源的推广应用,因此,教材应适应新形势,并使学生尽快地与迅猛发展的学科前沿接轨。为此,我们对第一版进行了修订。第二版在总体指导思想上仍遵循第一版的原则,本书以不同生物分子为单元,全面、系统地介绍与相应生物分子有关的生物化学实验技术与方法,全书共分为五章,涵盖蛋白质、核酸、酶及维生素、糖类、脂类等物质的分离、纯化、定性或定量分析、功能和代谢的研究等,每章又按实验内容的复杂程度分为三类,基础性实验介绍其基本原理和技术,综合性实验介绍生物分子连续分离制备研究技术,设计性实验以培养学生科研技能为主。第二版在编写形式上进一步突出以学生为本的指导思想,在内容和形式上进行了部分变动。

1. 调整部分实验内容。“血清中谷丙转氨酶活力的测定”改为“肝脏谷丙转氨酶活力的测定”,“蛋白质的酶解及多肽的分离纯化”改为“蛋白质的酶解及凝胶层析法测定多肽相对分子质量”,“酵母细胞壁多糖的提取及凝胶层析法测定分子量”改为“酵母细胞壁多糖的制备”,增加实验“丙二醛(MDA)含量的测定”。

2. 为了实验安全,提升人文关怀,实验项目前增加“生物化学实验安全”,实验步骤后增加“废弃物处理”。

3. 关于设计性实验,为了继续激发学生的实验创新能力,同时提高这些实验的开设率,设计性实验步骤处给予简单资料说明。

4. 为了提升本教材的直观性、启发性、开拓性及应用性,本教材以二维码形式增加设备使用、实验操作、实验结果分析等数字资源,使学生能更主动、正确地完成实验。

本书可供高等院校的生命科学等专业本、专科学生使用,也可供非生命科学专业的学生使用,还可供其他专业的科研人员参考。

感谢第一版作者对本书编写工作付出的努力。虽然编者对本书的修订和再版付出了很大努力,但限于编者水平,书中仍难免存在缺点和不足,恳请读者提出宝贵意见。您的宝贵意见与建议可以通过华中科技大学出版社转达,或直接发 E-mail 给编者:chm_wangyx@ujn.edu.cn。

编者

第一版前言

生命科学已被公认为 21 世纪的带头学科之一。生命科学的发展离不开生物化学,生物化学既是生命科学的基础,又是生命科学的前沿,它是生物、农、医、药等与生命学科相关专业的必修课程,不仅学习生命科学及与其相关学科的学生需要学习生物化学,而且学习化学、物理学、环境科学、信息科学、材料科学等的学生也需要对生物化学有所了解。

生物化学是一门实验性科学,实验教学占有重要的位置,学生动手能力的培养、创新能力的培养主要依靠实验教学来完成。

本书以不同生物分子为单元,全面、系统地介绍了与相应生物分子有关的生物化学实验技术与方法。全书共分为五章,内容涵盖蛋白质、核酸、酶及维生素、糖类、脂类的分离分析方法,每章又按实验内容的复杂程度分为三类,其中基础性实验介绍其基本原理和技术,综合性实验介绍生物分子连续分离制备研究技术,设计性实验以培养学生科研技能为主。通过以不同生物分子为实验对象,学生能掌握分配层析、电泳、离子交换等分离制备技术,掌握分光光度、分子筛等定性定量分析技术,这些实验技术和方法均是从事教学和科研一线教师多年工作的总结,因而本书可供高等院校的生命科学类专业本、专科学生使用,也可供非生命科学专业的学生使用,还可供其他相关专业的科研人员参考。

鉴于本书是专业基础课实验教材,本书编者在着重考虑教材所要求的基础性的同时,也考虑了它的系统性,还考虑了相关内容与后续专业课程的关联性,以及内容的先进性。编写人员在总结多年教学经验的基础上,根据生物化学研究的进展和人才培养的需求,对本书的结构体系和教学内容进行了认真的思考与探讨,并做了一些改革与尝试,是否得当尚需经过进一步的教学实践检验。本书的特点:①内容系统全面,删繁就简、突出重点,编写形式上层次鲜明、图文并茂;②融汇了编者多年的教学经验;③为使学生更好地理解、学习,每一实验均附有要点提示和思维拓展。

本书是全体编写人员集体劳动和智慧的结晶。虽然我们做了很大的努力,并反复修改,但深感自己知识与能力有限,书中难免存在不足之处,恳请读者不吝指正。

编者

目 录

生物化学实验安全 /1

第一章 蛋白质 /3

第一节 基础性实验 /3

- 实验 1 纸层析法分离鉴定氨基酸 /3
- 实验 2 微量凯氏(micro-Kjeldahl)定氮法测定蛋白质含量 /5
- 实验 3 Folin-酚试剂法(Lowry 法)测定蛋白质含量 /9
- 实验 4 考马斯亮蓝染色法(Bradford 法)测定蛋白质含量 /11
- 实验 5 BCA 法测定蛋白质的含量 /13
- 实验 6 紫外分光光度法测定蛋白质的含量 /16
- 实验 7 蛋白质的性质(显色反应、等电点沉淀) /17
- 实验 8 乙酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白 /25

第二节 综合性实验 /28

- 实验 9 膜分离技术分离纯化蛋白质 /28
- 实验 10 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白 /33
- 实验 11 葡聚糖凝胶过滤层析法测定蛋白质相对分子质量 /37
- 实验 12 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质相对分子质量 /41
- 实验 13 蛋白质印迹(Western-Blotting) /44

第三节 设计性实验 /50

- 实验 14 细胞色素 c 的提取制备与含量测定 /50
- 实验 15 不同生物材料中氨基酸的提取及分离分析 /53

第二章 核酸 /55

第一节 基础性实验 /55

- 实验 16 定磷法测定核酸的含量 /55
- 实验 17 改良苔黑酚法测定 RNA 含量 /57
- 实验 18 紫外分光光度法测定核酸的含量 /59

第二节 综合性实验 /61

- 实验 19 RNA 的提取与组分鉴定 /61
- 实验 20 离子交换柱层析分离核苷酸 /63

第三节 设计性实验 /69

- 实验 21 动物肝脏 DNA 的提取、分离与检测(琼脂糖凝胶电泳) /69

第三章 酶及维生素 /72

第一节 基础性实验 /72

实验 22 酶的特异性与高效性 /72

实验 23 酶促反应动力学——pH 值、温度、激活剂、抑制剂对酶促反应速率的影响 /74

实验 24 过氧化氢酶米氏常数(K_m)的测定 /77

实验 25 唾液淀粉酶活力的测定 /79

实验 26 琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制 /81

第二节 综合性实验 /83

实验 27 脲酶的活力测定 /83

实验 28 肝脏谷丙转氨酶活力的测定 /86

实验 29 碱性磷酸酶的分离纯化及比活力测定 /90

实验 30 酵母醇脱氢酶的分离纯化及活力测定 /93

实验 31 乳酸脱氢酶(LDH)同工酶的琼脂糖凝胶电泳 /97

实验 32 维生素 C 的定量测定——2,6-二氯酚靛酚滴定法 /100

第三节 设计性实验 /102

实验 33 蛋白质的酶解及凝胶层析法测定多肽相对分子质量 /102

第四章 糖类 /105

第一节 基础性实验 /105

实验 34 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖 /105

实验 35 蒽酮法测定可溶性总糖 /108

第二节 综合性实验 /111

实验 36 肌糖原的酵解作用 /111

第三节 设计性实验 /114

实验 37 酵母细胞壁多糖的制备 /114

第五章 脂类 /117

第一节 基础性实验 /117

实验 38 粗脂肪含量的测定(索氏抽提法) /117

实验 39 酸值的测定 /119

实验 40 卵磷脂的制备和脂肪碘值的测定 /121

实验 41 丙二醛(MDA)含量的测定 /124

实验 42 薄膜层析法分离血清脂蛋白 /126

第二节 综合性实验 /128

实验 43 脂肪酸的 β -氧化 /128

第三节 设计性实验 /130

实验 44 大豆品种的质量分析 /130

附录 常用缓冲液的配制 /133

参考文献 /138



生物化学实验安全

一、生物化学实验室安全

1. 身体欠佳者不应进入实验室进行实验。
2. 进入实验室时应着干净整洁的实验服,长发者应将头发束于脑后或实验帽内,不穿凉鞋、拖鞋。
3. 在实验室内不得奔跑、打闹、嬉戏及进食,以免产成安全隐患及健康隐患。
4. 熟悉实验室内水、电开关的分布,遇到紧急情况时应立刻关闭相应的开关。
5. 实验台上不放置与实验无关的物品,衣物、书包等杂物应远离实验台。
6. 在进行动物尸体解剖过程中,解剖前必须穿专用的防护性外衣或制服,面部应佩戴专门的保护装置,包括护目镜、口罩、个体呼吸保护用品等,最基本、最常用也是最重要的个体防护装置是手套,在解剖操作过程中必须戴手套,并且一定要确保手套完好。
7. 实验室分为公用区域和个人实验区域,实验室的任何东西都有它应该放置的地方,保持清洁,要哪里拿的放回哪里。
8. 离开实验室前将手洗净,检查水、电、窗等是否关闭。

二、生物化学实验常用设备安全

生物化学实验常用设备为离心机、水浴锅、分光光度计、电泳装置、核酸蛋白分析装置、烘箱等。

1. 实验室各种仪器的使用应遵守仪器操作流程,任何因个人操作不当而引起的仪器故障应主动承担责任,及时报告并联系检修。
2. 不可以用手触摸刚加热完的器皿。
3. 离心机:离心机应放置在坚固平稳的工作台上;离心前加样量不能超过离心管容积的 $2/3$;离心样品应对称放置;启动离心机前,应盖上离心机顶盖后慢慢启动;离心期间,实验者不得离开去做别的事;离心结束后,先关闭离心机,在离心机停止转动后,方可打开离心机顶盖,取出样品,不可用外力强制其停止运动。
4. 水浴锅:水浴锅放平稳;注入清水,水位必须高于不锈钢隔板,切勿无水或水位低于隔板加热,否则会损坏加热管;未加水或加水不够切勿打开电源;保持水质清澈干净。
5. 分光光度计:放置在坚固平稳的工作台上;预热 20 min;调节 T 100% 及 0%;样品量不超过比色杯容积的 $3/4$ 或 $4/5$,用吸水纸将比色杯外壁擦洗干净后放入样品池;测试完毕关闭电源,取出比色杯清洗、晾干,放入盒中,样品池用吸水纸擦净。
6. 电泳装置:包括电泳槽、电泳仪。放置在坚固平稳的工作台上;在电泳槽中加入缓冲溶

液及样品;检查电泳仪电源开关调至关的位置,电压旋钮转到最小;正确连接电泳槽与电泳仪的输出输入端;接通电源,缓缓旋转电压调节钮直到达到所需的电压为止,根据工作需要选择稳压稳流方式及电压电流范围;电泳仪通电进入工作状态后,禁止人体接触电极、电泳物及其他可能带电部分,也不能在电泳槽内取放东西;仪器通电后,不要临时增加或拔出输出导线插头,以防短路现象发生,虽然仪器内部设有保险丝,但短路现象仍有可能导致仪器损坏;电泳完毕后,应将各旋钮、开关旋至零位或关闭状态,并拔出电源插头。

7. 核酸蛋白分析装置:核酸蛋白分析装置包括层析柱、蠕动泵、核酸蛋白分析仪、自动收集器。放置在坚固平稳的工作台上,配套仪器通过软管连在一起;打开分析仪电源,预热 20 min;将分离介质装入层析柱,注意不要出现气泡,样品加在液面下、介质上;调整蠕动泵转速及方向;调整分析仪“灵敏度”,选择测试波长;根据蠕动泵转速调整自动收集器转动时间;测试结束,关闭各仪器电源,清洗层析柱并干燥,蠕动泵与分析仪连在一起,先用蒸馏水清洗分析仪通路,再通过空气干燥分析仪通路,然后关闭电源。

8. 烘箱:运行前必须留意所用电源电压能否符合;在通电运行时,切勿用手触及箱体左侧空间的电器局部或用湿布揩抹、用水冲洗;检验时应将电源切断;箱内物品切勿放置过挤,必须留出空气天然对流的空间,使湿润空气能从顶上减速逸出。

三、生物化学实验试剂安全

生物化学实验中,很多试剂为易燃、易爆、有毒或有腐蚀性的危险品,必须高度重视试剂安全。

1. 了解化学药品的警示标志,实验过程中保持台面整洁,试剂瓶盖随开随盖,不得混淆。
2. 凡属产生烟或产生有毒气体的实验,均应在通风橱内进行,以免对人体造成危害。
3. 实验过程中,使用的乙醇、丙酮、乙醚等易燃试剂时,需远离火源放置和操作。
4. 实验过程中,使用溴化乙锭、丙烯酰胺、过硫酸铵、考马斯亮蓝、氯仿、十二烷基磺酸钠、溴酚蓝等试剂时,应戴手套、口罩,在通风橱操作。
5. 从试剂瓶内取出的试剂,不可再倒回瓶内。
6. 实验完成后,对于沉淀物或其他混合物,如含有毒、有害或贵重药品,不可随意丢弃,必须放入专门的容器,最后由实验主管部门统一回收处理;对于废液,特别是强酸、强碱,不能直接倒入水槽中,必须倒入专门的废液桶。

第一章

蛋白质

第一节 基础性实验

实验 1 纸层析法分离鉴定氨基酸

1. 实验目的

- (1) 学习纸层析法的基本原理。
- (2) 掌握纸层析法的操作技术。
- (3) 了解分配层析法及影响分配系数的因素。

2. 实验原理

纸层析法(paper chromatography)是分离、鉴定氨基酸混合物的常用生物化学实验技术,可用于氨基酸组分的定性鉴定和定量测定,它也是定性或定量测定蛋白质、多肽、核酸碱基、糖、有机酸、维生素、抗生素等物质的一种分离分析工具。纸层析法是用滤纸作为惰性支持物的分配层析法,其中滤纸纤维素上吸附的水是固定相,展层用的有机溶剂是流动相。在层析时,将样品点在距滤纸一端 2~3 cm 的某一处,该点称为原点;然后在密闭容器中层析溶剂沿滤纸的一个方向进行展层,这样混合氨基酸在两相中不断分配,由于分配系数(K_d)不同,它们在滤纸上的分布位置不同。物质被分离后在纸层析图谱上的位置可用比移值(rate of flow, R_f)来表示。 R_f 是指在纸层析中,从原点至氨基酸停留点(又称为层析点)中心的距离(X)与原点至溶剂前沿的距离(Y)的比值,即

$$R_f = \frac{\text{原点至层析点中心的距离}}{\text{原点至溶剂前沿的距离}} = \frac{X}{Y}$$

在一定条件下某种物质的 R_f 值是常数。 R_f 值的大小与物质的结构、性质、溶剂系统、温度、湿度、层析滤纸的型号和质量等因素有关。

3. 试剂与器材

1) 试剂

(1) 扩展剂(水饱和的正丁醇和乙酸混合液):将正丁醇和乙酸以体积比 4:1 在分液漏斗中进行混合,所得混合液再按体积比 5:3 与蒸馏水混合;充分振荡,静置后分层,放出下层水层,漏斗内即为扩展剂。

(2) 氨基酸溶液:赖氨酸、脯氨酸、亮氨酸的溶液(0.5%),以及它们的混合液(各组分均为

0.5%)。

(3) 显色剂:0.1%水合茚三酮正丁醇溶液。

2) 器材

层析缸、点样毛细管、小烧杯、培养皿、量筒、喷雾器、吹风机(或烘箱)、层析滤纸(新华一号)、直尺及铅笔。

4. 实验步骤

1) 准备滤纸

取层析滤纸(长 22 cm、宽 14 cm)一张,在纸的一端距边缘 2~3 cm 处用铅笔画一条直线,在此直线上每间隔 3 cm 做一记号(共 4 个),如图 1-1 所示。

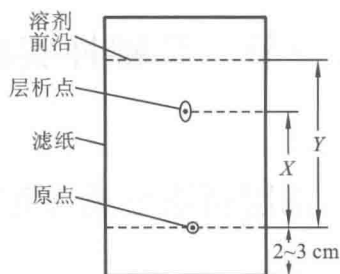


图 1-1 纸层析点样和展层示意图

2) 点样

用毛细管将各氨基酸样品分别点在这 4 个记号位置上,干后重复点样 2~3 次。每点在纸上扩散的直径不超过 3 mm。

3) 扩展

用线将滤纸缝成筒状,纸的两边不能相接触。将盛有约 20.0 mL 扩展剂的培养皿迅速置于密闭且已达到溶剂系统蒸气饱和的层析缸中,并将滤纸直立于培养皿中(点样的一端在下,扩展剂的液面需低于点样线 1 cm)。待溶剂上升 15~20 cm 时取出滤纸,用铅笔描出溶剂前沿界线,自然干燥或用吹风机热风吹干。

4) 显色

用喷雾器均匀喷上 0.1%水合茚三酮正丁醇溶液,然后用吹风机热风吹干或置于烘箱(100 °C)中烘烤 5 min,即可显出各层析斑点。

5) 计算

计算各种氨基酸的 R_f 值。

6) 废弃物处理

废液倒入废液桶。

5. 要点提示

(1) 取滤纸前要将手洗净,并尽可能少接触滤纸,因为手上的汗渍会污染滤纸;如条件许可,也可戴上一次性手套拿取滤纸。要将滤纸平放在洁净的纸上,不可放在实验台上,以防污染。

(2) 点样时样点的直径不能大于 0.3 cm,否则分离效果不好,并且样品用量大会造成“拖尾”现象。

(3) 展层开始时切勿使样点浸入溶剂中。

6. 思维拓展

影响 R_f 值的主要因素是什么?

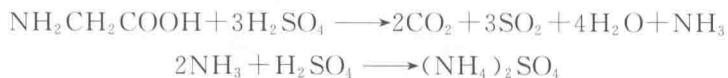
实验 2 微量凯氏(micro-Kjeldahl)定氮法测定蛋白质含量

1. 实验目的

- (1) 学习微量凯氏定氮法测定蛋白质含量的原理。
- (2) 了解凯氏定氮仪的结构。
- (3) 掌握微量凯氏定氮法测定蛋白质含量的操作技术。

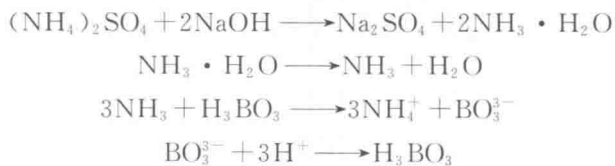
2. 实验原理

蛋白质(或其他含氮有机化合物)与浓 H_2SO_4 共热时,其中碳、氢两种元素被氧化成 CO_2 和 H_2O ,而氮元素转变成 NH_3 ,并进一步与 H_2SO_4 反应生成 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,残留于消化液中,该过程通常称为“消化”。以甘氨酸为例:



但是,该反应进行得很慢,消化时间较长,通常需加入 K_2SO_4 或 Na_2SO_4 以提高反应液的沸点,并加入 CuSO_4 作为催化剂,以加速反应的进行;氧化剂 H_2O_2 也能加速反应。

消化完毕,加入过量浓碱(如 NaOH)使消化液中的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分解放出 NH_3 ,以蒸馏法借水蒸气蒸出 NH_3 ,用一定量、一定浓度的 H_3BO_3 溶液吸收。 NH_3 与酸溶液中 H^+ 结合成 NH_4^+ ,使溶液中的 H^+ 浓度降低,然后用标准强酸(如 HCl 溶液)滴定,至恢复溶液中原来的 H^+ 浓度为止。



最后根据所用标准 HCl 溶液的量计算出样品中的含氮量。蛋白质的含氮量平均为 16%,所以将测得的蛋白质的含氮量乘蛋白质系数 6.25(即每含氮 1 g,就表示该物质含蛋白质 6.25 g),即可计算出蛋白质的含量。

3. 试剂与器材

1) 试剂

- (1) 消化液:30% H_2O_2 、浓 H_2SO_4 、 H_2O 体积比为 3 : 2 : 1。
- (2) 30% NaOH 溶液。
- (3) 2% H_3BO_3 溶液。
- (4) 混合催化剂(粉末状 K_2SO_4 - CuSO_4 混合物): K_2SO_4 与 CuSO_4 以 3 : 1 质量比充分研细混匀。
- (5) 0.01 mol/L 标准 HCl 溶液。
- (6) 混合指示剂(田氏指试剂):取 0.1% 甲烯蓝(亚甲蓝)-无水乙醇溶液 50.0 mL、0.1% 甲基红-无水乙醇溶液 200.0 mL,混合,贮于棕色瓶中备用。该指示剂酸性时为紫红色,碱性时为绿色,变色范围很窄(pH 5.2~5.6)且很灵敏。

(7) 普通面粉或其他样品。

2) 器材

100 mL 凯氏烧瓶、改进型凯氏定氮仪、容量瓶(50 mL)、分析天平(电子天平)、烘箱、电炉、酒精灯、小玻璃珠、滴定管、洗瓶、锥形瓶、铁架台。

4. 实验步骤

1) 改进型凯氏定氮仪的构造和安装

改进型凯氏定氮仪由蒸汽发生器、反应室及冷凝器三部分组成。蒸馏装置的结构如图2-1所示,可分成三部分。

(1) 蒸汽发生器和反应室:蒸汽发生器有 3 个开口(图中 3、4、5),反应室有 1 个开口(图中 6)。

(2) 冷凝器和通气室:冷凝器有 2 个开口(图中 9、10),通气室有 2 个开口(图中 12、13)。

(3) 排水柱:排水柱有 3 个开口(图中 15、16、17)。

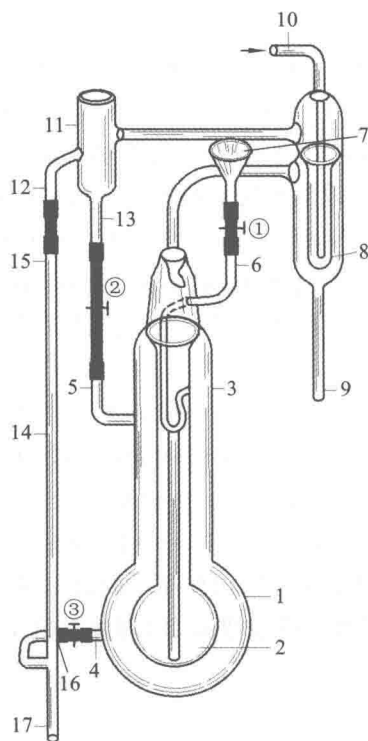


图 2-1 改进型凯氏定氮蒸馏装置

1. 蒸汽发生器;2. 反应室;3. 蒸汽排出孔;4. 排水排气孔;5. 外源水入口;6. 进样口;7. 加样漏斗;8. 冷凝器;9. 冷凝器出口;10. 自来水入口;11. 通气室;12. 通气室出口;13. 通气室出口;14. 排水柱;15. 排水柱入口;16. 排水柱入口;17. 冷凝水和废水出口;①②③为自由夹

安装时,按图中的连接方式仔细安装在平稳的实验台上。先将主体部分固定在铁架台上,其底部放上电炉或酒精灯。然后将 12 与 15 用橡皮管连接。将 5 与 13、4 与 16、6 与 7 用橡皮管连接,并夹上自由夹。最后用长橡胶管分别连接进水口 10 和出水口 17。

2) 样品处理

样品若是液体,如血清、稀释蛋清等,可取一定体积直接消化测定。样品若是固体,一般是

用 100.0 g(干重)该物质中所含氮的克数来表示(%),因此在消化前,应先将固体样品中的水分除掉。样品烘干的温度一般为 105 °C,因为非游离的水不能在 100 °C 以下烘干。

取一定量磨细的样品放入已称重的称量瓶内,然后置于 105 °C 的烘箱内持续干燥 4 h。用坩埚钳将称量瓶取出放入干燥器内,待温度降至室温后称重。按上述操作继续烘干样品,每干燥 1 h 重复称量一次,直至两次称量数值不变,即达到恒重。精确称量已达恒重面粉 0.1 g,作为本实验的样品。

3) 消化

(1) 编号。

取清洁、干燥 100 mL 凯氏烧瓶 4 个,标号后各加数粒玻璃珠。

(2) 加样。

在 1、2 号瓶中各加样品 0.1 g,混合催化剂 0.2 g,消化液 5.0 mL。注意加样品时应直接送入瓶底,而不要沾在瓶口和瓶颈上。在 3、4 号瓶中各加蒸馏水 0.1 mL 代替样品,其他试剂同样品瓶,作为对照,用以测定试剂中可能含有的微量含氮物质。

(3) 加热消化。

将凯氏烧瓶 45° 倾斜放置,每个瓶口放一个漏斗,在通风橱内,于电炉上加热消化。开始消化时应以微火加热,烧瓶内物质炭化变黑,并产生大量泡沫,不要让液体冲到瓶颈或冲出瓶外,否则将严重影响测定结果。待瓶内水汽蒸完,泡沫消失并停止产生, H_2SO_4 开始分解并放出 SO_2 白烟后,适当加大火力,使瓶内液体微微沸腾而不致跳荡。继续消化,直至消化液呈透明淡绿色为止。在消化过程中要随时转动烧瓶,以使内壁黏着物质均能流入烧瓶底部,以保证样品完全消化。

(4) 定容。

消化完毕,静置,待烧瓶中液体冷却后,缓慢沿瓶壁加蒸馏水 10.0 mL,边加边摇。冷却后将瓶内液体倾入 50 mL 的容量瓶中,并以少量蒸馏水洗涤烧瓶数次,将洗液并入容量瓶中,并加水稀释到刻度,混匀备用。

4) 蒸馏

(1) 蒸馏器的洗涤。

接通冷凝水,打开自由夹②,先向蒸汽发生器中加入一定量的水(以排水管的高度为宜),并关闭自由夹②,用酒精灯将水烧开。

将蒸馏水从加样漏斗处加入反应室,关闭自由夹①,移开酒精灯片刻,可使反应室中的水自动吸出,如此反复清洗 3~5 次。

清洗后在冷凝管下端放一个盛有 2% H_3BO_3 溶液 5.0 mL 和混合指示剂 1~2 滴的锥形瓶。蒸馏数分钟后,观察锥形瓶内溶液是否变色,如不变色则表明蒸馏装置内部已洗涤干净。

(2) 蒸馏。

取 50 mL 锥形瓶 3 个,各加入 2% H_3BO_3 溶液 5.0 mL 和指示剂 1~2 滴,溶液呈淡紫色,用表面皿覆盖备用。

关闭冷凝水,打开自由夹②,使蒸汽发生器与大气相通。将上述已加试剂的锥形瓶放在冷凝器下面,并使冷凝器下端浸没在液体中。

用移液管取消化液 5.0 mL,打开自由夹①,仔细地从小漏斗下端加入反应室,随后加入 30% NaOH 溶液 5.0 mL,关闭自由夹①;在加样漏斗中加少量水做水封,以防止气体从漏斗处逸出。

关闭自由夹②,打开冷凝水(注意不要过快过猛,以免水溢出)。当观察到锥形瓶中的溶液由紫色变绿色时(2~3 min),开始计时,蒸馏 3 min,移开锥形瓶,使冷凝器下端离开液面约 1 cm,同时用少量蒸馏水洗涤冷凝管口外侧,继续蒸馏 1 min,取下锥形瓶,用表面皿覆盖瓶口。

蒸馏完毕后,应立即清洗反应室,方法如前述。打开自由夹③,将水放出,再加热,再清洗,如此 3~5 次。最后将自由夹①、③同时打开,将蒸汽发生器内的废水全部换掉。关闭夹子,再使蒸汽通过整个装置数分钟后,继续下一次蒸馏。

待样品和空白消化液均蒸馏完毕,同时进行滴定。

5) 滴定

全部蒸馏完毕后,用 0.01 mol/L 标准 HCl 溶液滴定各锥形瓶中收集的 NH_3 , 滴定终点为 H_3BO_3 指示剂溶液由绿色变为淡紫色。

6) 计算

样品中总氮量可按下面的公式计算:

$$\text{总氮量(质量分数)} = \frac{c(V_1 - V_2) \times 14}{m \times 1000} \times \frac{\text{消化液总量(mL)}}{\text{测定时消化液用量(mL)}} \times 100\%$$

式中: c ——标准 HCl 溶液浓度(mol/L);

V_1 ——滴定样品用去的标准 HCl 溶液的平均体积(mL);

V_2 ——滴定空白消化液用去的标准 HCl 溶液的平均体积(mL);

m ——样品质量(g);

14——氮的相对原子质量。

若测定的样品含氮部分只是蛋白质,则

$$\text{样品中蛋白质含量(质量分数)} = \text{总氮量} \times 6.25$$

若样品中除蛋白质外,尚含有其他含氮物质,则需向样品中加入三氯乙酸,然后测定未加三氯乙酸的样品及加入三氯乙酸后样品上清液中的含氮量,得出非蛋白氮及总氮量,从而计算出蛋白氮,再进一步算出蛋白质含量。

$$\text{蛋白氮} = \text{总氮量} - \text{非蛋白氮}$$

$$\text{蛋白质含量(质量分数)} = \text{蛋白氮} \times 6.25$$

7) 废弃物处理

废液倒入废液桶。

5. 要点提示

(1) 本实验时间较长,需要 8~10 学时。所以做本实验时,建议分 2 次完成。第 1 次完成步骤 3) 消化,该步骤所需时间较长;第 2 次从步骤 4) 蒸馏做起。

(2) 一般样品消化终点为溶液呈透明淡绿色或无色透明,若带有黄色表示消化不完全;另外,消化液的颜色也常因样品成分的不同而异。因此,每测一个新样品时,最好先实验一下需多少时间才能使样品中的有机氮全部变成无机氮,以后即以此时间为标准。本实验到消化液呈透明淡绿色时即消化完全,消化时间过长,会引起 NH_3 的损失,同样影响测定结果。

(3) 如果蛋白质样品中含赖氨酸或组氨酸(如蚕蛹蛋白质)较多,则消化时间要延长 1~2 倍;为了缩短消化时间,可在催化剂中再加少量 HgCl_2 (约 0.032 g/g(催化剂)),则赖氨酸中的氮 4~5 h 可消化完全,组氨酸约需 8 h 才能消化完全。

(4) 蒸馏 NH_3 时,为了使所有 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分解放出 NH_3 ,必须加入足量的 30% NaOH 溶液。加入时应缓慢,加入 NaOH 后,有 $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ 、 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 或 CuO 等生成,溶液呈蓝

色或褐色,并有胶状沉淀产生,这是正常现象;如果颜色不变,说明碱液可能不够。

(5) 定氮仪各连接处应使玻璃对准玻璃后外套橡皮管,绝对不能漏气;所有橡皮管、塞须经预处理(预处理方法:浸在 10% NaOH 溶液中煮约 10 min,水洗,水煮 10 min,再水洗数次);蒸馏过程中切忌火力不稳,否则将发生倒吸现象。

6. 思维拓展

- (1) 为什么称微量凯氏定氮法测出的蛋白质含量为粗蛋白含量?
- (2) 消化过程中加入粉末状 K_2SO_4 - $CuSO_4$ 混合物的作用是什么?

实验 3 Folin-酚试剂法(Lowry 法)测定蛋白质含量

1. 实验目的

- (1) 掌握 Folin-酚试剂法定量测定蛋白质的原理与方法。
- (2) 学习分光光度计的使用方法。

2. 实验原理

用于蛋白质测定的 Folin-酚试剂反应是双缩脲方法的发展。该法所用试剂由两部分组成:碱性铜试剂相当于双缩脲试剂,Folin 试剂含有磷钨酸和磷钼酸。在碱性条件下,蛋白质与铜作用生成蛋白质-铜配合物,该配合物可将磷钨酸-磷钼酸还原成深蓝色混合物(钼蓝和钨蓝)。在一定蛋白质浓度范围内(25~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$),其颜色深浅与蛋白质含量成正比,因此可通过比色法定量测定蛋白质含量。

此法操作简便,灵敏度比双缩脲法高 100 倍,是测定蛋白质浓度应用较广泛的方法之一,并适用于酪氨酸和色氨酸的定量测定。但 Folin-酚试剂反应是由酪氨酸和色氨酸的还原性基团(酚基、吲哚基)引起的,因此样品中含有的酚类、柠檬酸、Tris、蔗糖、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、巯基化合物等对测定均有干扰。此外,由于各种蛋白质中酪氨酸和色氨酸的含量各不相同,故在测定时需使用同种蛋白质做标准。

3. 试剂与器材

1) 试剂

(1) 蛋白质标准溶液:准确称取经微量凯氏定氮法校正的结晶牛血清蛋白,配制成 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液。

(2) 碱性铜试剂:称取 NaOH 10.0 g、 Na_2CO_3 50.0 g 溶于 400.0 mL 蒸馏水中;另称取 CuSO_4 0.25 g、酒石酸钾钠 0.5 g,溶于 80.0 mL 蒸馏水中。以上两者混合,定容至 500.0 mL (当天使用)。

(3) Folin 试剂:在 2 L 回流装置(磨口)内加入 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100.0 g、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 25.0 g、蒸馏水 700.0 mL、85% H_3PO_4 50.0 mL、浓盐酸 100.0 mL,充分混合后,小火回流 10 h,再加入 Li_2SO_4 150.0 g、蒸馏水 50.0 mL 及数滴液体溴,开口维持沸腾 15 min。冷却后转入 1000 mL 容量瓶中,定容。过滤,滤液保存于棕色瓶中。此为 Folin 试剂储备液。可在冰箱中长期保存。

使用时取 Folin 试剂储备液,以酚酞为指示剂,用标准 NaOH 溶液滴定,计算储备液浓度,而后适当稀释,使最后酸浓度为 1 mol/L。此为 Folin 试剂工作液。

- (4) 卵清蛋白待测液(或人血清蛋白待测液)。

2) 器材

可见光分光光度计、移液枪、刻度吸管、试管。

4. 实验步骤

1) 标准曲线法

(1) 标准曲线的制作。

取试管 6 支,按表 3-1 操作。

表 3-1 制作标准曲线

	试 管 号					
	1	2	3	4	5	6
250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准蛋白质溶液体积/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水体积/mL	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
碱性铜试剂体积/mL	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	混匀,室温放置 10 min					
Folin 试剂体积/mL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	混匀,室温放置 30 min					
A_{500}	调零					

以 A_{500} 为纵坐标,标准蛋白质含量为横坐标,绘制标准曲线。

(2) 样品蛋白质含量的测定。

取试管 4 支,按表 3-2 操作。

表 3-2 样品测定

	试 管 号			
	1	2	3	4
卵清蛋白待测液体积/mL	—	1.0	1.0	1.0
蒸馏水体积/mL	1.0	—	—	—
碱性铜试剂体积/mL	5.0	5.0	5.0	5.0
	混匀,室温放置 10 min			
Folin 试剂体积/mL	0.5	0.5	0.5	0.5
	混匀,室温放置 30 min			
A_{500}	调零			

根据所测定的 A_{500} 值,在标准曲线上查出其相当于标准蛋白质的量,计算 3 个平行样品中蛋白质浓度的平均值。

2) 标准比较法(或称标准管法)

(1) 取试管 3 支,按表 3-3 操作。

表 3-3 标准管法

	标准管(S)	测定管(U)	对照管(B)
250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准蛋白质溶液体积/mL	0.4	—	—
蒸馏水体积/mL	0.6	—	1.0

续表

	标准管(S)	测定管(U)	对照管(B)
卵清蛋白待测液体积/mL	—	1.0	—
碱性铜试剂体积/mL	5.0	5.0	5.0
		混匀,室温放置 10 min	
Folin 试剂体积/mL	0.5	0.5	0.5
		混匀,室温放置 30 min	
A_{500}			调零

(2) 计算:

$$\text{卵清蛋白待测液蛋白质浓度} = (A_U/A_S) \times 100 \mu\text{g/mL}$$

3) 废弃物处理

废液倒入废液桶。

5. 要点提示

Folin-酚试剂法是在双缩脲反应基础上发展起来的蛋白质测定方法,因此凡双缩脲反应呈阳性的物质或基团($\text{O}=\text{C}-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $\text{S}=\text{C}-\text{NH}_2$)均对此法有干扰。此外,蛋白质样品中如有柠檬酸、酚类物质对此法也有干扰。

6. 思维拓展

(1) Folin-酚试剂法测定蛋白质含量的原理是什么? 该法有哪些优缺点?

(2) 测定卵清蛋白或人血清蛋白用什么蛋白质作为标准蛋白质为好?

实验 4 考马斯亮蓝染色法(Bradford 法)测定蛋白质含量

1. 实验目的

(1) 掌握考马斯亮蓝染色法定量测定蛋白质含量的原理与方法。

(2) 熟悉掌握分光光度计的使用方法。

2. 实验原理

考马斯亮蓝 G_{250} 测定蛋白质含量属于染料结合法的一种。考马斯亮蓝 G_{250} 在酸性溶液中呈棕红色,最大吸收峰在 465 nm 波长处;当它与蛋白质通过范德华力结合成复合物时变为蓝色,其最大吸收峰移至 595 nm 波长处,而且吸光系数更大。在一定蛋白质浓度范围(1~1000 $\mu\text{g/mL}$)内,蛋白质-染料复合物在 595 nm 波长处的吸光度值与蛋白质含量成正比,故可用于蛋白质的定量测定。

考马斯亮蓝染色法的突出优点:①灵敏度高:据估计,本法比 Folin-酚试剂法的灵敏度高 4 倍,其最低蛋白质检出量可达 1 μg 。这是因为蛋白质与染料结合后产生的颜色变化很大,复合物有更高的吸光系数,因而吸光度随蛋白质浓度的变化比 Folin-酚试剂法要大得多;②测定简便、快速:完成一个样品的测定只需加一种试剂,且只需要 5 min 左右。由于蛋白质与染料结合十分迅速,约 2 min 即可完成反应,复合物在室温下 1 h 内保持稳定,且在 5~20 min 内颜色的稳定性最好,因而完全不用像 Folin-酚试剂法那样费时,并严格控制时间;③干扰物质少:如干扰 Folin-酚试剂法的 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、Tris、蔗糖、甘油、巯基乙醇、EDTA 等均不干扰此法的测定。