

高等农业院校教材

生物化学实验指导

张云贵 刘祥云 李天俊 主编



天津科学技术出版社

内容提要

全书分糖类、脂类、蛋白质及氨基酸、核酸、酶、维生素、代谢等七部分，共56个实验，包括重量法、分光光度法、荧光法、层析技术、电泳技术、PCR操作技术及免疫技术。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验指导/张云贵，刘祥云，李天俊编著. —天津：天津科学技术出版社，2005
高等农业院校教材

ISBN 7-5308-4019-3

.高张生物化学—实验—高等学校—教学参考资料

.Q5-33

书 名：生物化学实验指导

作 者：张云贵，刘祥云，李天俊编著

出版发行：天津科学技术出版社

版 本：2005 年1 月第 1 版

2005 年 1 月第 1 次印刷

定 价：18.50 元

内 容 提 要

本书参照农业部“基础生物化学教学大纲”中基础生物化学实验内容,结合作者多年教学实践编写而成。全书分糖类、脂类、蛋白质及氨基酸、核酸、酶、维生素、代谢等七部分,共 56 个实验,包括重量法、分光光度法、荧光法、层析技术、电泳技术、PCR 操作技术及免疫技术。有关实验同时编入了动、植物材料操作内容,可供不同专业选用。本教材的突出特点是适用面宽,可作为农学、园艺、植保、农副产品加工、畜牧、兽医、水产养殖及食品加工等专业本、专科大学生的实验教材,也可供有关教师参考。

编写人员名单

主 编:张云贵 刘祥云 李天俊

编写人员: (按姓氏笔画顺序)

王英超(天津农学院)

区炳庆(佛山科学技术学院)

刘祥云(天津农学院)

任 健(天津农学院)

李天俊(天津农学院)

张云贵(天津农学院)

柳 荣(天津农学院)

覃广泉(广州仲恺农业技术学院)

蔡 马(广州仲恺农业技术学院)

主 审:覃广泉 张云贵 刘祥云

前 言

21 世纪生命科学处于科学研究的中心地位,生命科学之所以成为新世纪的带头学科,是由于生物化学和它的相关学科——分子生物学引人瞩目发展的结果。

生物化学所取得的卓越成就与实验方法的发展密切相关。生物化学实验技术不仅是生命科学研究的重要手段,而且与工业、农业、食品加工、医药卫生、环境保护等方面有着十分广泛的联系。为此,生物化学实验在高等农业院校列为必修的专业基础课。为学生提供一本适用性强的《生物化学实验指导》是十分必要的。

1993 年天津农学院、广州仲恺农业技术学院、北京农学院三所院校结合各自的教学实践,合编出版了《生物化学实验指导》,2001 年出版了修订版。几年来的教学实践证明,这本教材在各校实验教学中,发挥了良好的作用。鉴于 10 多年来新的生物化学实验方法和技术不断出现,为了跟上科学的发展,我们本着继承、创新相结合的精神,保留上版“指导”的精华,并引入一些新的实验内容,编写了这本新的“实验指导”。

全书包括生物化学实验和附录两部分。生物化学实验选编 56 个实验,包括生物化学中的分离、制备、分析和鉴定技术(如滴定、比色、纸层析、薄层层析、凝胶层析、各种电泳和免疫技术)及 PCR 等分子生物学操作技术。其中既保留一些对加强学生基本技能训练行之有效的传统实验,也引进一些新的生物化学实验技术(如质粒的制备和 PCR 技术、限制性内切酶酶切 DNA 片段的鉴定、感受态细胞的制备、免疫印迹操作技术等),为学生进行更高层次生物化学、分子生物学实验及从事科学研究工作打下基础。

书中动植物材料处理、实验 4、5、10、13、14、21、23、31、41、44、46、48 及附录中的结果分析与数据处理等内容由张云贵编写;实验 3、15、16、18、22、28、30、34、35、36、37、49、50、51、56、前言和附录的其余部分由刘祥云编写;实验 1、2、11、12、17、19、20、25、27、32、38、39、42、43、45、53 由李天俊编写;实验 6、9、54 由覃广泉编写;实验 7、24、26、33 由王英超编写;实验 47、52 由任健编写;实验 8 由蔡马编写;实验 29、55 由区炳庆编写;实验 40、蛋白质含量测定总论由柳荣编写;最后由张云贵、刘祥云进行全书的统稿及附录的编辑工作。

本书是集体劳动的成果,笔者所在各单位为不断完善这些实验方法付出了长期艰辛的劳动。各单位教务处在教材编写过程中,给予了极大的支持,特别是天津农学院教材科张孝义同志,在教材出版、发行等方面做了大量的工作。在此一并表示谢意。

由于水平所限,缺点错误在所难免,诚挚欢迎使用本教材的同行和读者批评指正。

编者 2005 年 5 月于天津

目 录

实验室规则	(1)
实验记录和实验报告	(2)
植物样品的采取、处理与浸提	(3)
血液样品的处理及组织匀浆的制备	(5)
糖类	
实验一 可溶性总糖的测定——地衣酚 - 硫酸法	(8)
实验二 还原糖含量的测定——3,5 - 二硝基水杨酸比色法	(10)
实验三 可溶性糖的硅胶 G 薄层层析	(12)
实验四 Teles 微量快速乳糖测定法	(14)
实验五 血糖含量测定	(15)
脂类	
实验六 粗脂肪的索氏 (Soxhlet) 提取	(17)
蛋白质及氨基酸	
实验七 甲醛滴定法测定氨基氮	(19)
实验八 植物水溶性氨基酸测定——茚三酮法测定氨基酸总量	(21)
实验九 植物水溶性氨基酸的薄层层析	(23)
实验十 动物蛋白质的水解及纸层析法分离氨基酸	(25)
实验十一 谷物种子中赖氨酸含量的测定	(28)
实验十二 玉米种子中色氨酸含量的测定	(30)
实验十三 植物体游离脯氨酸的测定	(31)
实验十四 动物材料赖氨酸、色氨酸、甲硫氨酸含量测定	(32)
实验十五 蛋白质的两性反应及等电点的测定	(37)
蛋白质含量测定总论	(39)
实验十六 蛋白质含量测定——微量凯氏 (Kjeldahl) 定氮法	(40)
实验十七 蛋白质含量测定——考马斯亮蓝 G - 250 法	(44)
实验十八 紫外吸收法测定蛋白质含量	(46)
实验十九 蛋白质含量测定——双缩脲法	(48)
实验二十 蛋白质含量测定——Folin - 酚法	(50)
实验二十一 血清 γ - 球蛋白的分离——分子筛凝胶层析法	(52)
实验二十二 醋酸纤维薄膜电泳法分离动物血清蛋白质	(55)
实验二十三 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳测蛋白质分子量	(58)

实验二十四	利用免疫印迹法鉴定未知蛋白质	(61)
实验二十五	聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳测定蛋白质等电点	(64)

核酸

实验二十六	植物核 DNA 的提取和检测	(67)
实验二十七	酵母 RNA 的制备、鉴定及含量测定	(69)
实验二十八	动物肝脏 DNA 的提取	(71)
实验二十九	动物组织 RNA 的提取及鉴定	(72)
实验三十	大肠杆菌质粒 DNA 的提取和鉴定	(75)
实验三十一	聚合酶链式反应(PCR)实验技术	(78)
实验三十二	琼脂糖凝胶电泳法分离鉴定质粒 DNA 的限制性内切酶酶切片段	(80)
实验三十三	大肠杆菌感受态细胞的制备——氯化钙法	(83)
实验三十四	紫外吸收法测定核酸含量	(85)
实验三十五	定磷法测定核酸含量	(87)
实验三十六	地衣酚法测定 RNA 含量	(89)
实验三十七	二苯胺显色法测定 DNA 含量	(90)

酶学

实验三十八	淀粉酶活力测定	(91)
实验三十九	谷丙转氨酶和谷草转氨酶活性的测定	(93)
实验四十	酪氨酸酶催化二羟苯丙氨酸氧化反应的动力学	(95)
实验四十一	植物保护酶系统——过氧化氢酶、过氧化物酶、超氧歧化酶活力测定	(98)
实验四十二	果实菠萝蛋白酶的动力学测定	(101)
实验四十三	胰蛋白酶和胰蛋白酶抑制剂的制备及活力测定	(106)
实验四十四	血清乳酸脱氢酶同工酶的分离与测定——聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳法	(108)
实验四十五	酯酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳	(113)
实验四十六	过氧化物酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳	(117)
实验四十七	多酚氧化酶的制备和化学性质	(119)
实验四十八	结晶乳酸脱氢酶的制备	(121)

维生素

实验四十九	维生素 A 的提取和含量测定——三氯化锑比色法	(125)
实验五十	维生素 B ₁ 含量的测定——荧光法	(128)
实验五十一	维生素 B ₁ 含量测定——重量法	(131)
实验五十二	抗坏血酸含量测定——2,6 - 二氯酚靛酚法	(132)

代谢

实验五十三	丙酮酸含量的测定	(135)
实验五十四	糖酵解中间产物的鉴定	(137)
实验五十五	脂肪酸的 β - 氧化——酮体的生成及其测定	(139)
实验五十六	应用纸层析法鉴定酶促转氨基作用	(141)

附录

一	结果分析与数据处理	(143)
二	量器的校准	(148)
三	试剂配制的一般注意事项	(150)
四	标准摩尔浓度酸、碱溶液的配制	(151)
五	常用数据表	(153)
六	常用缓冲液的配制方法	(155)
七	层析法常用的一些数据	(160)

实验室规则

1. 实验室是进行科学实验的场所,在实验室工作时,要遵守纪律,不迟到不早退,保持室内有一个良好的实验环境。
2. 课前要预习实验指导,课上注意听讲,严格按指导要求操作,实验中注意做好记录,培养科学的工作态度。
3. 保持实验环境和仪器的整洁,试剂、仪器排列有序,严格按操作规程洗刷仪器和量取试剂,注意节约,不要浪费药品及试剂。
4. 注意安全,室内严禁吸烟,需用明火加热时,要做到火着人在,人走火灭。易燃品应放在远离火源的地方,切记不可直接加热易燃品。实验完毕注意关好水龙头、拉下电闸。
5. 熟悉实验中需用仪器的使用方法和注意事项,按操作规程使用仪器。出现故障及时报告教师,不要自己处理。
6. 爱护仪器,细心操作,发现损坏要及时报告教师,并按有关规定处理。
7. 室内一切物品未经教师许可,不准私自携出室外。需按手续办理借物登记。
8. 实验完毕班长安排值日人员打扫实验室卫生,经教师验收合格后值日人员方可离室。

实验记录和实验报告

一、实验记录

为了获得准确的实验结果,实验前一定要认真预习,并写出预习报告。其内容包括:日期,实验名称、目的、原理、操作步骤及预料中的现象。做到心中有数。

记录一定是实际观察到的现象而不是照抄书本上写着的那些现象。记录要详细、具体。如沉淀的生成,是立即生成,还是缓慢生成;是加热后生成,还是低温下生成。对试剂、样品及个别仪器(称量瓶)的重量,在准确称重的基础上记录时要表示出准确度。如样品称重要求 3 mg,那么应写成 0.003 0g,而不应写成 0.003g。对于没有预见到的实验现象的记录更是十分重要的,绝不可以忽视。为了重复自己做过的实验和今后他人进行重复实验,准确的实验记录是非常重要的,对学生也是重要的科学研究训练。

记录的方式可以用表格或图示。用表格要注明表格题目、栏目、单位、数值。用图示可记下层析或电泳的图谱,纯化的流程及结果。这样可简明扼要地描述实验结果,省略大量文字叙述。

二、试验报告

写实验报告的目的是向人们说明实验的方法、结果及实验者得出的结论。写好实验报告也是学生写好科学论文的基础训练。

实验报告应包括:日期、题目(要简明,并一目了然地说明实验目的)、仪器及试剂(列出所用仪器和试剂,重点试剂的配制和特殊仪器的图示)、材料、实验步骤(简明如实写出实际操作方法以使别人能重复操作)、结果与计算(参考数据处理)、讨论或结论。要注意讨论或结论不是结果的重复,而是在结果的基础上根据实验中每一步骤的真实操作、产生的现象、得到的数据等进行综合分析后得出的合理结论。讨论中还包括对实验方法的改进及建议,对特殊现象的分析及讨论。

实验结束后,应及时整理和总结实验结果,写出实验报告。

植物样品的采取、处理与浸提

植物样品生化分析所得数据是否可靠关键在于样品的采取、处理及浸提方法。现将一些必须遵守的原则介绍如下。

一、取样要有明确的目的性

取样方法主要取决于测试目的。比如,测谷子在大田生长条件下叶片某特定指标,需按统计学原则进行抽样。如果要测定同一植株不同器官的生化指标,取样应在同一植株内进行。为避免个体差异产生的误差,可以多取几组数字,把所得结果按统计学原则进行处理。高等植物同一器官许多生化指标的分布是不均匀的,比如大白菜的嫩叶与老叶的 Vc 含量相差十多倍,甘薯淀粉酶在靠近芽眼处与远离芽眼处每克样品酶活力有很大差异,大米表层与内部维生素 B₂ 及蛋白质的含量有一个明显的梯度,取样时就应充分注意这些差异。因此要取器官生化指标的平均值,可把整个植物的同一器官打碎后再取样;如果要测定同一器官不同部位的生化指标,应在不同部位取样,否则测定的结果就毫无意义。

二、取样要充分注意即时性

植物样品离体前后不少指标会发生剧烈变化,采样后应及时进行处理。除个别情况外一般应做到取样后即时分析,如不能则应低温保存。否则所得结果将失去意义。

三、样品处理过程应尽量控制生化反应进程

样品离体后,甚至在匀浆过程中生化反应也并不停止,尤其匀浆后,细胞内分隔被破坏,代谢的可控性受到破坏,各种生化反应在匀浆里充分作用,这将使测定的指标与客观实际相差甚远。在低温条件下匀浆,可大大降低或避免这种误差。分析酶反应底物的即时浓度可先灭酶后分析。

四、不同目的采用不同的浸提液

生化分析最常用的方法是对匀浆进行浸提,这里浸提液的选择是关键。例如某酶等电点 pH6.5,实验室用蒸馏水的 pH 如果恰也是 6.5,用这样的蒸馏水浸提所需的这个酶,测定值将会大大偏离实际值。一般生化指导书都给出了具体的浸提液,可以省略选择浸提液这一步,但如果对某一陌生指标进行测定,浸提液的选择常常是成败的关键。

五、对浸提液的计算处理原则

分析指标一般是浸提后上清液的指标,还原成样品含量时需进行必要的数据处理。常用的数据处理原则是:干样品可按浸提液体积进行计算。多汁样品情况比较复杂,如浸提液体积远远大于样品所含液体量时,样品体积可以忽略不计(如用 10 ml 浸提液浸提 0.1 g 豆芽菜时,豆芽菜的汁液体积可忽略不计),计算时可直接按浸提液体积取值。如果浸提液量与样品量接近时,如 5 ml 浸提液浸提 2 g 苹果果肉,样品匀浆后,测定的指标就不能按 5 ml 计算,而应先估算浸提液体积。常用的方法是烘干法测定样品含水量。浸提液与 2 g 苹果所含水分总量是总浸提液体积,这一点常被忽视,但它又是十分重要的。从这个角度看一些结果的计算公式,应按这一原则加以推导核实。

鉴于本书主要是供学生掌握分析方法,所以每一实验后给出了相应的公式,但如果采用本书的方法从事科研工作时,则应按本原则独立推导出相应的计算公式,否则计算出的结果将失去意义。

血液样品的处理及组织匀浆的制备

一、血液样品

基础生物化学实验中,最常用的人体或动物体血液样品是全血、血清、血浆及无蛋白血液。为此必须掌握正确处理血液样品的方法。

血液的采取,各种动物的采血部位不尽相同:马、牛、猪等多由颈静脉采血;小动物如兔等可由耳静脉或心脏采血;狗由隐静脉采血;天竺鼠和大白鼠则由心脏采血;家禽由翼静脉或隐静脉采血;鱼类多由尾动脉或心脏采血。

作为正常成分测定的血液样品,应在清晨动物饲喂前采取,从而避免食物成分的影响。血液中许多化学成分在血浆(清)和血细胞中分布是不相同的,有的差别很大,因而在血液分析中常需分别测定血浆(清)和血细胞的相应含量。为此在采血时一定要避免出现溶血现象,因为溶血现象会造成成分混乱,引起测定误差。为避免出现溶血,采血时所用的注射器、针头及盛血容器要干燥清洁,采出的血要沿器壁慢慢注入到盛血容器中。用注射器采血后要先取下针头,再慢慢注入容器内,注意推动注射器内管不可太快,以免吹起气泡造成溶血,盛血的容器不可用力摇动。

1. 全血

若需全血做样品,必须即时加入抗凝剂以防止血液凝固。

操作:将新采取的血液注入预先加有适量抗凝剂的试管中,轻轻摇动,使抗凝剂完全溶解并分布于血液中。此即全血,可供使用。取得之全血如不立即使用应贮存于冰箱中。

全血的量取:已制备好的抗凝血液,放置一定时间后红细胞将会自然下沉,造成量取全血的误差,因此量取全血时,须先用玻璃塞或洁净干燥的胶塞,塞严管口,缓慢上下颠倒数次,使之混匀。切记颠倒时,不可用力过猛,以免出现气泡或溶血。也可用一弯成脚形的小玻璃棒插入管内上下移动若干次,混匀后立即量取,且每次量取前都必须重复此操作。用刻度吸管量取全血时,要将血液吸至需要量的刻度上方,并用滤纸擦净管外血液,放出多于需要量的血,再次擦净管尖血液,靠壁慢慢将血液放入容器内。血液放出后吸量管的管壁应清明,看不到血液薄层附着。

2 血清

采取的血液,不加抗凝剂,室温下 5~20 min 自行凝固,血块收缩,析出淡黄色的血清。为促进血清分出,必要时可离心,这样可缩短时间,并取得较多的血清。

操作:将新采集的血液,直接注入试管内,将试管倾斜,使血液形成一斜面,夏季于室温下放置即可。待血液凝固收缩后,即有血清析出。冬季室温低,血液凝固缓慢,应将血液置 37℃ 水或温箱中,促进血清析出。血清析出后,以吸管吸取上层血清置另一试管中。注意,血块收缩后要及早将血清分离出,否则因放置过久,血块中血球也可能溶血。若分离出的血清不清或血细胞影响使用时,可离心去除。分离出的血清应加盖,置入冰箱保存。

3 血浆

将已加抗凝剂的全血于 2 000 r/min 离心 10 min,沉降血细胞,所得上清液即为血浆。血浆

比血清分离得快且量多,两者的差别主要是血浆比血清多含一种纤维蛋白原,其他成分基本相同。

4.常用的抗凝剂

(1)草酸盐(钾、钠):优点是溶解度大,可迅速与血中钙离子结合,形成不溶性草酸钙,使血液不凝固。每毫升血液用1~2 mg即可。

10%草酸盐溶液0.1 ml放入试管中,转动试管使之附着在试管壁上,80℃烘干,每管可抗凝5 ml血液。此抗凝剂不适用于血钾、钙的测定,且对乳酸脱氢酶和淀粉酶具有抑制作用。

(2)草酸钾-氟化钠:氟化钠是一种弱抗凝剂。但浓度在2 mg/ml时能抑制血液内葡萄糖的分解。因此在测定血糖时常与草酸钾混合使用。

取草酸钾6 g,氟化钠3 g,水溶成100 ml。于每试管加0.25 ml,80℃烘干。每管可抗凝5 ml血液。此抗凝剂因氟化钠可抑制脲酶,故不能用于脲酶法的尿素氮测定;也不能用于淀粉酶及磷酸酯酶的测定。

(3)EDTANa₂:EDTANa₂最易与Ca²⁺络合而使血液不凝。应用中的有效浓度是1 ml血液加入0.8 mg。

(4)肝素:肝素为最佳抗凝剂,主要抑制凝血酶原转变为凝血酶,从而阻止纤维蛋白原形成纤维蛋白而凝血。0.1~0.2 mg或20单位可抗凝1 ml血液。

取10 mg/ml肝素溶液0.1 ml,30℃下蒸干,可抗凝5~10 ml血液(市售肝素钠溶液,每毫升含12500国际单位,相当于100 mg,故每125国际单位相当于1 mg)。

除上述抗凝剂外,还有柠檬酸钠、草酸等,因在生化分析中使用不多,故不再介绍。

抗凝剂用量不可过多,否则会影响实验结果。如草酸盐过多,将造成钨酸法制备血滤液时蛋白质沉淀不完全,测氮时加奈氏试剂易产生混浊等现象。

5.无蛋白血滤液的制备

许多生化分析要避免蛋白质的干扰,为此要先将其中的蛋白质沉淀除去。

无蛋白血滤液制备的基本原理是以蛋白质沉淀剂沉淀蛋白,用过滤法或离心法除去沉淀蛋白质。现介绍几种常用的方法。

(1)福林-吴宪(Folin-Wu)氏法(钨酸法)

原理: $\text{NaWO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4 \longrightarrow \text{H}_2\text{WO}_4 + \text{Na}_2\text{SO}_4$ 。

血液中蛋白质在pH值小于等电点的溶液中可被钨酸沉淀,沉淀经过滤或离心除去,上清液即为无蛋白的滤液。pH约等于6的无蛋白滤液可供非蛋白氮、血糖、氨基酸、尿素、尿酸及氯化物等项测定使用。

试剂: 10%钨酸钠:10 gNaWO₄·2H₂O加水溶解定容至100 ml。此液以1%酚酞为指示剂试之,应为中性(无色)或微碱性(粉红色)。 0.33 mol/L硫酸。

操作:取加抗凝剂血液1份,7份水混匀,使完全溶血,加0.33 mol/L硫酸1份,随加随摇;加10%钨酸钠溶液1份,随加随摇,放置5 min,如振摇不再产生气泡说明蛋白质已完全变性沉淀,用滤纸或2500r/min离心10 min,可得到澄清无色之无蛋白血滤液。

制备血浆或血清的无蛋白血滤液与上述方法相似,所不同之处是加8份水,而钨酸钠和硫酸各加1/2份。

黑登(Haden)法:1份血样,加8份0.04 mol/L硫酸,此时血细胞迅速破裂,颜色变黑,再加入10%钨酸钠1份摇匀,过滤或离心即可。此法的优点是产生的滤液较多。

由上述任何方法制得的血滤液,都是将原来的血样稀释 10 倍(1:10)所以 1 ml 无蛋白血滤液相当于 0.1 ml 全血、血浆或血清。

(2) 氢氧化锌法

原理:血液中蛋白质在 pH 大于等电点时可用 Zn^{2+} 沉淀。硫酸锌与氢氧化钠反应生成氢氧化锌,氢氧化锌胶体可将血中除葡萄糖以外的许多还原性物质吸附而沉淀下来。所以此法所得到的滤液最适作血液葡萄糖含量测定。但测定尿酸和非蛋白氮时含量会降低,故不宜使用此法。

试剂:10% 硫酸锌溶液($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)取 10 g 溶于蒸馏水,定容至 100 ml。

0.5 mol/L 氢氧化钠溶液。

操作:取干燥洁净的 50 ml 锥形瓶或大试管,加 7 份水、1 份抗凝剂摇匀;加 10% 硫酸锌 1 份,摇匀;慢慢加入 0.5 mol/L 氢氧化钠 1 份,边加边摇。放置 5 min,过滤或离心,即可得无蛋白的血滤液。此滤液较原来的血样亦稀释 10 倍。

(3) 三氯乙酸法

原理:三氯乙酸为强有机酸,可使蛋白质变性沉淀。

试剂:10% 三氯乙酸溶液。

操作:取 10% 三氯乙酸溶液 9 份置于 50 ml 锥形瓶或大试管中,加 1 份抗凝剂,边加边摇,使其均匀,静置 5 min,过滤或离心,即可得 10 倍之稀释液。

二、组织样品

离体不久的组织在适宜的温度及 pH 等条件下,可以进行一定程度的物质代谢,因此在生物化学实验中,常用离体组织来研究各种物质代谢的途径与酶系的作用。也可以从组织中分离和提取 DNA、RNA、酶及各种代谢物质。所以,如何处理动物组织使之符合实验要求,是生化实验中的基本操作之一。

动物各种组织器官离体过久,都要发生变化,如一些酶在久置后会变性失活。一些组织成分如糖原、ATP 等,甚至在动物死亡后数分钟至十几分钟内,其含量即有明显降低。因此,利用离体组织进行代谢研究或作为提取材料时,都必须迅速取出,并尽快提取和测定。宰杀后的动物放出血后,立即取出实验所需之脏器或组织,除去外层之脂肪及结缔组织,用冰冷生理盐水洗去血液,必要时也可用冰冷生理盐水灌注脏器洗去血液,用滤纸吸干,即可做实验材料。根据不同的实验目的,以不同方法,制成不同的组织样品。

组织糜:将新鲜的组织用剪刀剪碎,用匀浆器或绞肉机绞碎即可。

组织匀浆:将新鲜的组织用剪刀剪碎,加适量的组织制备液(常用的组织制备液有生理盐水、缓冲液、Krebs-Ringer 溶液和 0.25 mol/L 蔗糖液等),用电动或手动匀浆器研磨。用电动匀浆器制备组织匀浆时,应在冰浴中进行。制备好的匀浆应及时使用,或低温短时贮存。

组织浸出液:将上法制得的组织匀浆,3 000 r/min 离心 15 min,上清液即为浸出液。若将新鲜组织整体冷冻,需要将冷冻组织切开放室温下,切面的渗出液即为组织浸出液。

糖 类

实验一 可溶性总糖的测定

地衣酚 - 硫酸法

一、目的

学习一种测定可溶性总糖的方法:地衣酚 - 硫酸比色法。

二、原理

可溶性糖经无机酸(通常使用硫酸)处理脱水产生糠醛(戊糖)或糠醛衍生物(如羟甲基糠醛)(己糖),生成物能与酚类化合物缩合生成有色物质。常用的酚有地衣酚(又名苔黑酚)、间 - 苯二酚、 α - 萘酚等。

三、仪器和试剂

(1) 仪器: 紫外可见分光光度计; 试管; 刻度吸管(5 ml); 电热恒温水浴。

(2) 试剂: 100 μ g/ml 标准甘露糖溶液(10 mg 甘露糖,溶解后定容至 100 ml); 地衣酚 - 硫酸试剂(将 600 ml 冷却到 4℃ 的浓硫酸小心地加入到 400 ml 冷水中,为 60% 硫酸,4℃ 储存。另配制 1.6% 地衣酚水溶液,4℃ 贮存。使用前将 75 ml 60% 硫酸加到 10 ml 地衣酚溶液中,即为地衣酚 - 硫酸试剂)。

四、操作步骤

1. 甘露糖标准曲线的制作

取 7 支试管编号,分别加入 100 μ g/ml 甘露糖标准溶液 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml,再各加蒸馏水 3.0、2.5、2.0、1.5、1.0、0.5、0 ml。各管加 8.5 ml 冷却到 4℃ 的地衣酚 - 硫酸试剂,管口各加一玻璃球,将试管放入 80℃ 水浴中加热 15 min。取出后用流动水冷却,505 nm 比色(以 0 管调零)。

2. 可溶性糖样品显色

将可溶性糖样品适量(约含糖 50 ~ 200 μ g)加入试管中,加蒸馏水补至 3.0 ml,再加 8.5 ml 冷的地衣酚 - 硫酸试剂,管口各加一玻璃球,将试管放入 80℃ 水浴中加热 15 min。冷却后 505 nm 比色。

五、结果计算

以甘露糖含量(μ g)为横坐标,以 A_{505} 为纵坐标,制作标准曲线。

根据样品的 A_{505} 在标准曲线上查出相当的甘露糖含量(μ g),再按下式计算样品中可溶性糖含

量(以甘露糖计)。

$$\text{植物样品可溶性糖}(\%) = \frac{\text{查曲线所得糖量}(\mu\text{g}) \times \text{稀释倍数} \times 100}{\text{样重}(\text{g}) \times 10^6}$$