

生物化学实验教案

2008—2009 学年度第 一 学期

开课单位水产学院

课程名称生物化学实验

授课班级养殖 0711, 0712

任课教师肖志群

试验一蛋白质显色反应和氨基酸纸层析

(一) 蛋白质的显色反应

一、目的要求:

- 1、理解蛋白质具有双缩脲反应。
- 2、理解蛋白质和 α -氨基酸均能与茚三酮作用产生有色化合物。
- 3、了解氨基酸、蛋白质的某些侧链功能基团能发生黄色反应、米伦氏反应等显色反应。

二、教学方法和教学学时:

- 1、教学方法: 学生操作实验, 教师指导。
- 2、教学学时: 2 学时。

三、实验内容:

蛋白质是由很多氨基酸通过特殊的结构而形成的, 氨基酸以及这些特殊的结构与化学试剂作用而产生颜色, 称呈色反应。蛋白质的呈色反应非常灵敏, 常用作检验蛋白质和某些氨基酸的反应, 也是定量测定的依据。

<一>、双缩脲反应: 验证蛋白质具有双缩脲反应, 能观察到蓝紫色的出现。

1. 取少量固体尿素, 放在干燥小试管中, 在弱火上加热, 此时尿素熔融并放出氨, 直到溶融物呈白色而坚硬的停止加热。

2. 冷却后, 加入 10%NaOH 溶液 1ml, 摇匀溶解, 再加入 1%CuSO₄ 溶液 5 滴, 摇匀, 观察颜色。

3. 取另一小试管, 加入 10%NaOH 溶液 1ml 及 1%CuSO₄ 溶液 5 滴, 后逐滴加入 1%卵清蛋白溶液, 观察溶液颜色的变化。

<二>、茚三酮反应: 验证蛋白质能与茚三酮作用产生蓝紫色化合物。

1. 取干净滤纸一小片, 滴上 1%酪氨酸溶液 1 滴, 酒精灯上小火烘干。

2. 冷却后加 1~2 滴 0.1%茚三酮酒精溶液, 待酒精蒸发后烘干(注意勿着火), 观察出现颜色。

<三>、黄色蛋白反应: 验证蛋白质的某些侧链功能基团能发生黄色反应(与浓 HNO₃ 反应)。

1、取 1%卵清蛋白 1ml 于溶液中, 加浓硝酸(3-5)滴, 此时出现蛋白质沉淀(为什么?), 小心加热, 观察沉淀颜色的变化。

2、用自来水冷却试管, 逐渐滴入 40%NaOH 溶液使之成为碱性, 观察沉淀颜色的变化。

四、作业: 实验报告

(二) 氨基酸的纸层析法分离

一、目的要求：

- 1、掌握分配层析分离技术的原理。
- 2、掌握用纸上分配层析法分析氨基酸的方法。

二、教学方法和教学学时：

- 1、教学方法：学生操作实验，教师指导。
- 2、教学学时：2 学时。

三、实验内容：

以滤纸及其结合水作为固定相，以有机溶剂（正丁醇：醋酸：乙醇：水=4：1：1：2）作为流动相，分离混合氨基酸样品，并鉴定其成分。

四、结果与分析：

用铅笔轻轻描出显色斑点的形状，并用一直尺度量每一显色斑点中心与原点之间的距离和原点到溶剂前沿的距离，计算各色斑的 R_f 值，与标准氨基酸的 R_f 值对照，确定水解液中含有哪些氨基酸。

(一) 实验结果

| | 混合样品 | | | | 标准氨基酸 | | | |
|-------|------|--|--|--|-------|-----|-----|-----|
| | | | | | 亮氨酸 | 谷氨酸 | 酪氨酸 | 组氨酸 |
| R_f | | | | | | | | |
| 成分 | | | | | | | | |

计算公式：

(二) 分析结果：

五、注意事项

1. 点样时要避免手指或唾液等污染滤纸有效面（即展层时样品可能达到的部分）。
2. 点样斑点不能太大（直径应小于 0.3cm），防止层析后氨基酸斑点过度扩散和重叠，且吹风温度不宜过高，否则斑点变黄。
3. 展层开始时切勿使样品点浸入溶剂中。

六、思考题

1. 为什么点样时要避免手指或唾液等污染滤纸有效面？
2. 影响物质移动速率 R_f 值的因素有哪些？

七、作业：完成实验报告

实验三 蛋白质的粗提及含量测定（考马斯亮蓝 G-250 法）

一、目的要求：

- 1、掌握蛋白质粗提方法。
- 2、掌握考马斯亮蓝 G-250 法样品蛋白含量的原理。

二、教学方法和教学学时：

- 1、教学方法：学生操作实验，教师指导。
- 2、教学学时：4 学时。

三、实验内容：

1. 蛋白质的粗提：
2. 样品中蛋白质含量的测定

(1) 标准曲线的制作

取 6 支具塞试管，编号后，按下表加入试剂。

| 管号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 蛋白质标准液 (ml) | 0 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 |
| 蒸馏水 (ml) | 1.0 | 0.8 | 0.6 | 0.4 | 0.2 | 0 |
| 考马斯亮蓝 G-250 试剂 (ml) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 蛋白质含量 (μg) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |

盖上塞子，摇匀。放置 2min 后在 595nm 波长下比色测定（比色应在 1h 内完成）。以牛血清白蛋白含量 (μg) 为横坐标，以吸光度为纵坐标，绘出标准曲线。

(2) 另取 1 支具塞试管，准确加入 0.1ml 样品提取液，再加入 0.9ml 蒸馏水，5ml 考马斯亮蓝 G-250 试剂，充分混合，放置 2min 后，以标准曲线 1 号试管做参比，在 595nm 波长下比色，记录吸光度。

四、结果处理

根据所测样品提取液的吸光度，在标准曲线上查得相应的蛋白质含量 (μg)，按下式计算：

$$\text{样品蛋白质含量 } (\mu\text{g} / \text{g鲜重}) = \frac{\text{查得的蛋白质含量 } (\mu\text{g}) \times \text{提取液总体积 } (\text{ml})}{\text{样品鲜重 } (\text{g}) \times \text{测定时取用提取液体积 } (\text{ml})}$$

五、注意事项

比色应在出现蓝色 2min~1h 内完成。

六、思考题

1. 常用蛋白质的提取方法有哪些？各有何优缺点？
2. 考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量的原理是什么？还有哪些蛋白质定量法？
3. 如何正确使用分光光度计？

七、作业：完成实验报告。

实验四 还原糖和总糖含量的测定（3, 5-二硝基水杨酸比色法）

一、目的要求：

- 1、掌握用硝基水杨酸比色法测定样品中总糖和还原糖含量。
- 2、掌握总糖和还原糖的提取方法。

二、教学方法和教学学时：

- 1、教学方法：学生操作实验，教师指导。
- 2、教学学时：5 学时。

三、实验内容：

- 1、制作葡萄糖标准曲线
- 2、以面粉为材料，50°C 水浴提取还原糖；用硝基水杨酸比色法测定出还原糖的含量。
- 3、取食用面粉，酸解法制备总糖水解液；用硝基水杨酸比色法测定出总糖的含量。

四、结果与分析：

（一）糖的定量测定结果

| 管号 | 还原糖测定管号 | | 总糖测定管号 | |
|------------------|---------|-----|--------|-----|
| | ① | ② | I | II |
| 还原糖待测液 (ml) | 1 | 1 | | |
| 总糖待测液 (ml) | | | 1 | 1 |
| 蒸馏水 (ml) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3, 5-二硝基水杨酸 (ml) | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |

计算公式：

$$\text{还原糖}\% = \frac{\text{查曲线所得还原糖质量 (mg)} \times \frac{\text{提取液总体积}}{\text{测定时取用体积}}}{\text{样品质量 (mg)}} \times 100$$

$$\text{总糖}\% = \frac{\text{查曲线所得水解后还原糖质量 (mg)} \times \text{稀释倍数}}{\text{样品质量 (mg)}} \times 100$$

（二）结果分析：

- 1、面粉中主要含有何种糖？
- 2、在提取糖时，其他杂质是否会影响到测定？
- 3、分析操作误差和偶然误差。

五、注意事项

标准曲线制作与样品含糖量测定应同时进行，一起显色和比色。

六、思考题

1. 可用不同材料，以比较含糖量的差异。
 2. 面粉中主要含有何种糖？
 3. 在提取糖时，其他杂质是否会影响到测定？
- 七. 作业：完成实验报告

实验五 过氧化氢酶活性的测定——碘量法

一、目的要求：

掌握过氧化氢酶活性的测定的原理及方法。

二、教学方法和教学学时：

- 1、教学方法：学生操作实验，教师指导。
- 2、教学学时：4 学时。

三、实验内容：

- 1、 酶液的提取
- 2、 酶活力测定。

四、结果与分析：

(一) 实验结果

用空白滴定值减去样品滴定值即可求出此期间酶所分解的过氧化氢量。

被分解的 H_2O_2 量(mg) = [空白滴定值(ml) — 样品滴定值(ml)] × 硫代硫酸钠物质的量浓度 × 34.02

$$\text{过氧化氢酶活性} = \frac{\frac{\text{被分解的 } H_2O_2 \text{ 量 (mg)}}{\text{测定时用酶液量 (ml)}} \times \text{酶液总体积 (ml)}}{\text{样品质量 (g)} \times \text{时间 (min)}}$$

式中：34.02 为过氧化氢摩尔质量。

(二) 分析结果

五、作业：实验报告。

实验六 维生素 C 的定量测定

一、目的要求：

掌握用 2, 6—二氯酚靛酚滴定法测定样品中 V_c 的原理及方法。

二、教学方法和教学学时：

- 1、教学方法：学生操作实验，教师指导。
- 2、教学学时：4 学时。

三、实验内容：

以桔络、作实验样品，用 10 倍量的 1% 盐酸抽提（研磨），制得 50ml 抽提液；用 1% 盐酸作空白液。脉动和鲜橙多饮料，离心后的清液，过滤后作

样品液；蒸馏水作空白液。

用 2, 6—二氯酚靛酚滴定法测定该抽提液或样品液中 V_c 的含量。

1、提取 用分析天平准确称取洗净风干的桔皮 2g，放入研钵中研碎。加入 5mL 1% 盐酸溶液仔细研磨。浆液经滤纸过滤到 50mL 容量瓶中。如此反复提取 3—4 次。最后用 1% 盐酸溶液定容至刻度并混匀。

2、滴定 将已标定的 2, 6—二氯酚靛酚溶液装入微量滴定管 (5mL) 内。取 3 只 50mL 锥形瓶，各加入 10mL 桔皮提取液。用微量滴定管内的染料溶液进行滴定。当滴定至提取液呈淡红色，并保持 15 秒内不褪色时，即为滴定终点。记录所消耗的 2, 6—二氯酚靛酚溶液的毫升数。另取 3 只锥形瓶，各加入 10mL 1% 盐酸溶液如上作空白对照滴定。

3、计算 取滴定结果的平均值，按下式进行计算：

$$\begin{aligned} \text{维生素C含量 (mg/100g桔皮)} &= \frac{(V_a - V_b) \times W \times 50 \times 100}{10 \times 2} \\ &= (V_a - V_b) \times W \times 50 \times 100 \end{aligned}$$

式中 V_a 和 V_b 分别为滴定桔皮提取液和空白对照所消耗的染料溶液的平均毫升数； W 为标定的每毫升染料溶液相当于维生素 C 的毫克数；50 为桔皮提取液的总毫升数；10 为滴定时所取的提取液的毫升数；2 为桔皮的克数。

四、结果与分析：

五、注意事项

滴定过程应迅速，不要超过 2 分钟。因为在本滴定条件下，一些非维生素 C 的还原物质的还原作用较慢，快速滴定可以避免或减少它们的影响。

要使结果准确，滴定消耗的 2, 6—二氯酚靛酚溶液应在 1—4mL 之间。若超出此范围，则必须增减样品用量或者将提取液适当稀释。

六、作业：实验报告。

实验七 葡聚糖凝胶柱层析法基本训练

一、目的要求：

- 1、学习与掌握凝胶层析分离的一般原理和操作方法。
- 2、了解蓝色葡聚糖、细胞色素 C、DNP—甘氨酸的基本性质。

二、教学方法和教学学时：

- 1、教学方法：学生操作实验，教师指导。
- 2、教学学时：4 学时。

三、实验内容：

葡聚糖凝胶 G—50 或 G—100 加水，沸水浴溶胀 2hr，装柱，加样，洗脱与收集，绘制洗脱曲线。

1、溶胀

2、装柱 洗净的层析柱应保持垂直位置，柱内先装入洗脱液，排除层析柱滤板下的空气，关闭出口。柱内留下约 10mL 洗脱液，加入搅拌均匀的葡聚糖凝胶 G-50 的浆液，打开柱底部出口，调节流速为 0.3mL/min。凝胶颗粒随溶液慢慢流下而均匀沉降到层析柱底部。不断补入凝胶浆液，直到凝胶床高 15cm 为止。床面上保持有少量洗脱液，关闭出口。操作过程中应注意不能让凝胶床表面露出液面，并防止层析床内出现“纹路”。

3、加样 打开出口，使洗脱液凹液面恰好下降到床表面时，及时关闭出口。然后吸取 0.5mL 样品液，小心加于床表面成一薄层，切勿搅动床表面。小心打开出口，让样品液流入凝胶柱内。再用 0.5—1mL 洗脱液洗凝胶床表面 2 次，并使之完全进入凝胶柱内。注意每当液面降至床表面时，都要小心及时地加入洗脱液，以保持凝胶床面不露出液面。

4、洗脱与收集 当加样结束后，开始用洗脱液洗脱并收集流出液。调节洗脱液流速为 0.3mL/min。先收集 4mL 后，再以每管 0.3mL（约 6 滴）分部收集，观察并记录 3 种有色物质被分离的先后顺序和收集液颜色的深浅程度（以一、+、++、+++ 等符号表示）。

5、绘制洗脱曲线 以洗脱管数为横坐标，洗脱液颜色深浅为纵坐标，在坐标纸上绘制洗脱曲线。

四、结果与分析：

实验结果：

图 1 洗脱曲线



分析结果

五、注意事项

加样时，为了不让样品稀释，必须使洗脱液凹液面下降到与床表面相切。打开出口不容易控制，也可用滴管从上面吸取多余的洗脱液。

六、作业：实验报告。