

揭阳职业技术学院
生物工程系

授 课 教 案

2025— 2026 学年度第二学期

课程名称 食品生物化学

班 级 食品检验检测技术 251 (3+)

教 研 室 食品教研室

授课教师 林潇红

实验一 蛋白质等电点的测定

授课章节	实验一 蛋白质等电点的测定		
课时安排	3	教学方法	实践法
教学主要内容： 一、蛋白质等电点的基本概念及理化意义 二、酪蛋白的理化性质特点 三、沉淀法测定蛋白质等电点的实验原理 四、不同 pH 缓冲体系对蛋白质溶解度及沉淀的影响规律 五、蛋白质等电点的实验判定方法与结果分析			
教学目的、要求： (一) 知识目标 - 理解蛋白质等电点 (pI) 的基本概念、核心特征及实际意义。 - 掌握沉淀法测定蛋白质等电点的实验原理。 - 了解酪蛋白的基本理化性质及等电点特性。 (二) 能力目标 - 能熟练配制不同 pH 值缓冲溶液，规范完成实验操作流程。 - 能准确观察、对比各实验组蛋白质浑浊与沉淀程度。 - 能结合实验现象准确判定酪蛋白等电点，完成实验结果分析。 (三) 素养目标 - 养成严谨规范、细致观察的实验习惯，树立科学实验思维。 - 培养实事求是、客观记录实验数据的科学素养。 - 提升理论联系实际、分析实验现象与总结规律的探究能力。 (四) 课程思政 - 秉持严谨求实的科研态度，精准把控实验细节，坚守科学求真的治学理念。			
教学重点、难点： (一) 教学重点 蛋白质等电点的概念与理化特性；沉淀法测定蛋白质等电点的实验原理与操作要点。 (二) 教学难点			

理解 pH 值对蛋白质带电性质、溶解度及沉淀效果的影响机制；根据实验现象精准判定蛋白质等电点。

教学过程：

实训原理

蛋白质是两性电解质，其分子上的氨基和羧基会随溶液 pH 值变化而解离，使蛋白质带正电或负电。当溶液处于某一特定 pH 值时，蛋白质分子所带正负电荷数目相等，净电荷为零，此时的 pH 值即称为该蛋白质的等电点（pI）。

在等电点时，蛋白质分子间缺乏静电排斥力，加上水化程度最小，因此溶解度最低，最易发生凝聚沉淀。本实验通过在不同 pH 值的缓冲液中加入蛋白质，观察各管的沉淀（混浊）程度，沉淀最明显的那一管所对应的 pH 值，即为该蛋白质的等电点

实训材料与器材

1. 实验器材

试管、移液管

2. 实验试剂

① 酪蛋白

② NaOH 溶液 0.1 mol/L 100mL

③ 醋酸溶液 1.00 mol/L 100mL

④ 醋酸溶液 0.10 mol/L 100mL

⑤ 醋酸溶液 0.01 mol/L 100mL

实训步骤

1. 0.4% 酪蛋白溶液（碱性，pH 约 8.0-8.5，共 100mL）、

称取 0.4g 酪蛋白于乳钵中，加入约 1mL 蒸馏水，研磨成均匀糊状顺时针研磨，无颗粒感，逐滴加入 0.1 mol/L NaOH，边加边继续研磨（约需 2-3mL），研磨至溶液完全澄清透明（无悬浮颗粒）、完全溶解，转移至 100mL 烧杯，用蒸馏水洗涤乳钵 2-3 次，洗液一并转移，转入 100mL 容量瓶，加蒸馏水定容至刻度。

2. 取 5 支干燥试管，按下表顺序加入试剂（每管总体积 10mL）

试管号	1	2	3	4	5
蒸馏水 (mL)	8.4	8.7	8.0	7.4	9.0
0.01M醋酸 (mL)	0.6	—	—	—	—
0.10M醋酸 (mL)	—	0.3	1.0	—	—
1.00M醋酸 (mL)	—	—	—	1.6	—
预测pH值	约5.9	约5.3	约4.7	约3.5	约7.5-8.0

3. 加入酪蛋白溶液观察沉淀

向上述 5 支试管中各加入 1mL 0.4%酪蛋白溶液（碱性），每加一管立即摇匀，即刻观察并记录各管的浑浊程度，静置 10 分钟后再次观察并记录

4. 按照以下标准做好实验记录

符号	含义
++++	极浑浊，沉淀最多
+++	浑浊
++	稍浑浊
+	微浑浊
-	澄清透明

五、实验结果与讨论

实验二 维生素C含量的测定

授课章节	实验二 维生素 C 含量的测定		
课时安排	3	教学方法	实践法
教学主要内容： 一、维生素 C 的理化性质与生理功能 二、2,6-二氯酚靛酚滴定法测定维生素 C 的实验原理 三、样品预处理、试剂配制与滴定实验操作流程 四、滴定终点的判断方法与实验数据计算			
教学目的、要求： (一) 知识目标 - 理解维生素 C 的理化性质与氧化还原特性。 - 掌握 2,6-二氯酚靛酚滴定法定量测定维生素 C 的原理和方法。 - 熟悉滴定终点判定依据及维生素 C 含量的计算方式。 (二) 能力目标 - 能规范完成实验样品处理、试剂配制与滴定操作。 - 能准确观察、判断滴定终点，规范记录实验数据。 - 能根据滴定消耗试剂体积，准确计算样品中维生素 C 含量，完成结果分析。 (三) 素养目标 - 养成严谨规范、细致精准的定量实验操作习惯。 - 培养实事求是、客观记录数据的科学实验素养。 - 提升理论结合实践、分析实验误差与总结实验规律的能力。 (四) 课程思政 - 秉持严谨求真、精益求精的科研态度，精准把控实验数据，树立科学务实的专业素养。			
教学重点、难点： (一) 教学重点 2,6-二氯酚靛酚滴定法测定维生素 C 的实验原理；滴定操作规范与维生素 C 含量计算方法。 (二) 教学难点			

精准判断滴定终点，减少实验误差；理解氧化还原反应在维生素 C 定量检测中的应用机制。

教学过程：

实验原理：

维生素 C (抗坏血酸) 具有很强的还原性，能将染料 2,6-二氯酚靛酚还原成无色，而抗坏血酸本身被氧化成脱氢抗坏血酸。氧化型 2,6-二氯酚靛酚在酸性溶液中呈粉红色，在中性或碱性溶液中呈蓝色，当用此染料滴定含有抗坏血酸的酸性溶液时，在抗坏血酸未全部氧化前，则滴下染料立即被还原成无色，一旦溶液中的抗坏血酸全部被氧化时，则滴下的染料即使溶液显示粉红色，此时为滴定终点，即表示溶液中的抗坏血酸刚刚被氧化完全，从滴定时 2,6-二氯酚靛酚标准液的消耗量，可以计算出被检物质中抗坏血酸的含量。

实验试剂与仪器

(一) 实验试剂

2%草酸溶液、抗坏血酸 (维生素 C) 标准品、2,6-二氯酚靛酚钠盐、碳酸氢钠、蒸馏水、新鲜柠檬

(二) 实验仪器

电子天平、碱式滴定管、50mL 锥形瓶、移液管、容量瓶、烧杯、玻璃棒、研钵、滤纸、水浴锅、洗耳球

实训过程：

(一) 配制 2%草酸溶液

准确称取 10g 草酸固体，加入 500mL 蒸馏水中，用玻璃棒持续搅拌至固体完全溶解，摇匀后备用，作为维生素 C 的抗氧化保护液。

(二) 配制维生素 C 标准液

1. 用电子天平精准称取 100mg 抗坏血酸粉末；
2. 加入少量配制好的 2%草酸溶液，搅拌至粉末完全溶解；
3. 将全部溶液转移至 500mL 容量瓶中，用 2%草酸溶液洗涤烧杯 2-3 次，洗涤液全部并入容量瓶；
4. 加 2%草酸溶液定容至 500mL 刻度线，盖紧瓶塞充分摇匀；
5. 配好的标准液浓度为：1mL 溶液含 0.2mg 维生素 C，避光备用。

(三) 配制 0.02% 2,6-二氯酚靛酚滴定液

1. 分别称取 50mg 2,6-二氯酚靛酚钠盐、52mg 碳酸氢钠；
2. 量取 200mL 蒸馏水，加热至 40-60℃，倒入洁净烧杯中；
3. 先加入碳酸氢钠，搅拌至完全溶解，再加入染料粉末，持续搅拌至全部溶解；
4. 溶液冷却至室温后，转移至 250mL 容量瓶，加蒸馏水定容至刻度线，摇匀后避光保存备用。

(四) 滴定液浓度标定 (测定参数 A)

1. 准备两组 50mL 锥形瓶，设置标准组、空白组，两组均平行测定 2 次；
2. 标准组：加入 1mL 维生素 C 标准液 (含 0.2mg 维生素 C) + 9mL 2%草酸溶液，摇匀；
3. 空白组：仅加入 10mL 2%草酸溶液，无维生素 C 添加；
4. 用配制好的滴定液分别滴定两组溶液，边滴加边匀速摇晃锥形瓶，直至溶液呈现淡粉红色且 15 秒不褪色，立即停止滴定；
5. 分别记录两组两次滴定的消耗体积，计算平均值，得到标准组平均消耗体积、空白组平均消耗体积；
6. 计算标定系数 A。A 为 1mL 滴定液可氧化的维生素 C 质量 (mg/mL)。

(五) 样品处理

1. 新鲜柠檬用清水洗净，吸水纸吸干表面水分，去除果皮杂质；
2. 准确称取 0.5g 柠檬果肉，充分剪碎后放入洁净研钵中；
3. 向研钵中加入 5-10mL 2%草酸溶液，快速充分研磨成均匀匀浆；
4. 用滤纸过滤匀浆，将滤液收集至 50mL 容量瓶中；
5. 用少量 2%草酸溶液多次洗涤研钵及滤渣，洗涤液全部并入容量瓶；
6. 加 2%草酸溶液定容至 50mL 刻度线，摇匀，得到柠檬待测液；
7. 用移液管准确吸取 10mL 柠檬待测液，该取样体积记为 B。

(六) 样品滴定与数据记录 (测定 V_1 、 V_0)

1. 样品滴定：将备好的样品溶液置于锥形瓶中，用已标定的滴定液快速滴定，至溶液呈淡粉红色且 15 秒不褪色即为终点，平行滴定 2 次，记录消耗体积，取平均值记为 V_1 ；
2. 空白滴定：取 10mL 2%草酸溶液作为空白样品，同等条件下平行滴定 2 次，

记录消耗体积，取平均值记为 V_0 ；

3. 全程滴定速度不宜过慢，控制在 2 分钟内完成，防止维生素 C 氧化失效。

八、结果计算

$$W = ((V_1 - V_0) \times A) / B \times 50 / 0.5 \times 100$$

式中：

W：每 100g 柠檬样品中维生素 C 含量，mg/100g；

V_1 ：样品待测液滴定消耗滴定液的平均体积，mL；

V_0 ：空白滴定消耗滴定液的平均体积，mL；

A：1mL 滴定液相当于维生素 C 的质量，mg/mL；

B：滴定时吸取的柠檬待测液体积，mL；

50：柠檬样品定容总体积，mL；0.5：柠檬样品称取质量，g。

九、注意事项

1. 维生素 C 极易被空气氧化，样品处理、滴定操作需快速完成，减少溶液暴露在空气中的时间。
2. 严格把控滴定终点，以淡粉红色保持 15 秒不褪色为准，避免滴定过量导致实验误差。
3. 柠檬样品需现处理、现滴定，防止维生素 C 流失。
4. 所有玻璃仪器需洁净、无杂质、无残留水分，避免污染溶液、干扰实验结果。
5. 标准液、滴定液需避光保存，现配现用，长时间放置会导致浓度失效，影响标定和滴定精度。
6. 所有平行实验需在相同温度、光照条件下完成，保证实验变量唯一，数据真实可靠。

作业布置：

1. 实验有哪些注意事项？

实验三 考马斯亮蓝考G-250染色法测定蛋白质含量

授课章节	实验三 考马斯亮蓝考 G-250 染色法测定蛋白质含量		
课时安排	3	教学方法	实践法
<p>教学主要内容：</p> <ul style="list-style-type: none"> 一、考马斯亮蓝 G-250 染色法的检测原理与反应特性 二、蛋白质标准曲线的绘制方法与浓度梯度设置 三、实验试剂配制、样品处理与上机操作流程 四、分光光度计使用及 595nm 吸光度测定方法 五、基于标准曲线的蛋白质含量计算与数据分析 			
<p>教学目的、要求：</p> <p style="padding-left: 20px;">（一）知识目标</p> <ul style="list-style-type: none"> - 了解考马斯亮蓝 G-250 染色法的基本特点与适用范围。 - 掌握考马斯亮蓝法测定蛋白质含量的基本原理与检测方法。 - 熟悉标准曲线法定量检测蛋白质的实验原理与数据处理逻辑。 <p style="padding-left: 20px;">（二）能力目标</p> <ul style="list-style-type: none"> - 能规范配制实验试剂、设置蛋白质浓度梯度，独立绘制标准曲线。 - 能熟练操作分光光度计，准确测定样品吸光度值。 - 能依托标准曲线计算样品蛋白质含量，完成实验数据整理与结果分析。 <p style="padding-left: 20px;">（三）素养目标</p> <ul style="list-style-type: none"> - 养成规范操作、精准定量的实验习惯，树立严谨的定量分析思维。 - 培养客观记录数据、科学分析实验误差的专业素养。 - 提升理论结合实践，运用生化检测技术解决实际检测问题的能力。 <p style="padding-left: 20px;">（四）课程思政</p> <ul style="list-style-type: none"> - 秉持严谨求实、精益求精的科研态度，规范每一步实验操作，保障检测数据真实可靠。 			
<p>教学重点、难点：</p> <p style="padding-left: 20px;">（一）教学重点</p> <p style="padding-left: 40px;">考马斯亮蓝 G-250 染色法测定蛋白质含量的实验原理；</p>			

标准曲线绘制方法与蛋白质含量定量计算。

(二) 教学难点

精准把控实验反应时间，保证吸光度检测稳定性；

规范绘制标准曲线并精准分析实验误差。

教学过程：

实验原理：

考马斯亮蓝 G-250 在酸性溶液中为棕红色，其所含疏水基团在酸性条件下与蛋白质的疏水区具有亲和力，通过疏水作用与蛋白质相结合，形成蓝色的蛋白质染料复合物，在 595nm 处有最大吸光度，在一定的蛋白质浓度范围内，蛋白质染料复合物在 595nm 处的吸光度与蛋白质浓度成正比，因此，可用于蛋白质含量测定，反应 2-5 分钟即呈最大光吸收，至少稳定 1 小时。

实验仪器与试剂：

(一) 试剂

- 1、染色液：取考马斯亮蓝 G-250 100mg 溶于 50ml 95%乙醇中，加 100ml 85%磷酸，加水稀释至 1 升。
- 2、标准蛋白溶液：0.1mg/ml 牛血清白蛋白。
- 3、未知浓度的蛋白质溶液

(二) 器具

- 1、试管及试管架
- 2、移液管(1ml, 5ml)
- 3、可见光分光光度计

实验步骤：

标准曲线的制作

- 1、取 7 支试管，按下表加入试剂

试管编号	0	1	2	3	4	5	6
蛋白标准溶液	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1
蒸馏水	1	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	0
考马斯亮蓝	5	5	5	5	5	5	5

- 2、将试管摇匀，放置 20 分钟。
- 3、用分光光度计比色测定吸光值 A_{595nm}。

4、以 A595nm 为纵坐标，标准蛋白质浓度为横坐标，绘制标准曲线。

五、实验结果：

绘制标准曲线。

作业布置：

1、实验过程有哪些注意事项？