

生物化学实验

南京医学院生物化学教研组编著

江苏人民出版社

生物化学实验

南京医学院生物化学教研组

曹元宇 任孝衡 俞正荣 陈育英 編 著
徐 贇 季坤元 苗秉鑑

江苏人民出版社

生物化学实验

南京医学院生物化学教研组编著

*

江苏省书刊出版业营业许可证出〇〇一号

江苏人民出版社出版

南京湖南路十一号

江苏省新华书店发行 江苏新华印刷厂印刷

*

开本 787×1092 耗1/25 印张 2 21/25 字数 81,000

一九五八年九月第一版

一九五八年九月南京第一次印刷

印数 1—3 600

序 言

生物化学实验能加深学员对生物化学理论的了解和记忆，而且还有許多实验能辅助诊断疾病，这是医学工作者所必须掌握的。不但如此，生物化学实验本身也就是一种科学技术，通过实验又能达到培养正确的科学思维方法。因而单说生物化学实验是生物化学理论的助手或附庸，这是不够全面的。

生物化学实验，絕大部分是需要較长的时间与特殊设备的，因此尽管与理论大有关系的实验，也有許多是不适于作实验教材的；目前能作教材的，只是不花费很长时间、不需要繁杂精微的仪器、做起来比較容易而又能说明問題的重要实验而已。学生所做的生物化学实验，是内容比較簡單而意义又比較重大的，因此，要由实验获得較好的效果，就必须举一反三，从多方面联系課堂所讲理论，同时要好好地的学习实验技术，鍛鍊观察与思维的能力。

生物化学实验也应该努力做到多快好省。一堂实验，内容虽有限制，但所关連的理论和事实却非常丰富，細心观察和努力学习研究，能多知道一些就更好些。要实验做得快，应该在事前有充分准备，做起来才能获得准确而良好的結果。生物化学实验所用的药剂、蒸馏水、燃料和滤紙等等，用后常不能再用，故做实验时必须經常注意节省物资。

这本书是我們教研组根据多年教学經驗，指导学生做生物化学实验而集体編写的，曾經在教学的試用中作过几次修訂。虽然这样，其中可能还存在缺点和不妥之处，希望讀者指正。

曹元宇 1958年6月

目 录

实验 1	蛋白質的颜色反应.....	(1)
实验 2	蛋白質的沉淀作用和因热凝固.....	(4)
实验 3	蛋白質的两性反应和氨基酸的分开 (紙 上 色 譜 法)	(6)
实验 4	凱氏(Kjeldahl)定氮法(微量的)(示教).....	(9)
实验 5	酶(第一部分).....	(12)
实验 6	酶(第二部分).....	(14)
实验 7	比色計(示教).....	(16)
实验 8	光电比色計(示教).....	(18)
实验 9	无蛋白血滤液的制备.....	(20)
实验10	維生素(第一部分)和吸附色譜法(示教).....	(22)
实验11	維生素(第二部分).....	(24)
实验12	生物氧化	(26)
实验13	肝糖元的提取和水解.....	(29)
实验14	血糖的測定 I.	(30)
实验15	血糖的測定 II.	(31)
实验16	胰島素与肾上腺素对血糖含率的影响.....	(33)
实验17	尿糖測定, 尿酮体試驗和胰脂酶試驗.....	(34)
实验18	血中非蛋白氮的測定.....	(36)
实验19	血浆蛋白的測定.....	(37)
实验20	血中尿酸的測定.....	(39)
实验21	血脲的測定.....	(40)
实验22	尿中总氮量的測定.....	(41)
实验23	尿中氮氮的測定.....	(42)
实验24	血中氯化物的測定.....	(43)

实验25	血清鉀的測定.....	(45)
实验26	血鈉的測定.....	(46)
实验27	血浆二氧化碳容量(示教).....	(47)
实验28	血清鈣的測定.....	(50)
实验29	血中无机磷的測定.....	(51)
实验30	血液色素的分光分析(示教).....	(53)
实验31	血鉄的測定.....	(54)
实验32	胃液的消化蛋白質作用, 胃液的游离盐酸和总酸 量.....	(55)
实验33	胆盐, 胆色素, 尿胆素和尿胆素元实验, 血浆胆紅 素的測定.....	(57)
附录1.	注釋.....	(61)
附录2.	試剂和标准溶液配制法.....	(71)
附录3.	緩冲剂.....	(81)
附录4.	南医生物化学实验簡介.....	(85)

实 驗 I

蛋白質的顏色反应

蛋白質分子含有某些基团和某些特殊化学結構，能和某些化学試剂起作用而发生种种顏色反应。这种反应名为“顏色反应”。顏色反应是很多的；我們常利用来鑑別蛋白質和确定它們的存在与否。由于蛋白質的种类极多，結構极不一样，故一种蛋白質未必都能发生一切的顏色反应。而非蛋白質的物质有时也能起类似于蛋白質的某些顏色反应。因此，我們应用顏色反应以檢查蛋白質时，就必须注意到这一点。

一 米龙(Millon)氏反应

米龙氏反应，需要一种特別試剂，名“米龙氏試剂”(这种試剂的制法，見附录2)。简单地說来，它是一个含有硝酸、亚硝酸、硝酸汞、亚硝酸汞的混合物，能与酪氨酸的酚核作用，而生成紅色物质。因为一般的蛋白質都含有酪氨酸单位，故一般蛋白質多能发生这顏色反应(1)。

此反应不能直接应用来鑑識尿中的蛋白質，因为尿中含有高濃度的氯化物，能使試剂中的汞沉淀而失效(2)。汞遇硷質也生沉淀，所以檢液如为硷性，就必须中和后再施行米龙氏反应。

操作 (1) 試管中加1%鸡蛋的清蛋白溶液(檢液)(3)2ml.，再加米龙氏試剂5滴(4)。

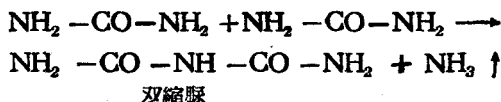
(2) 慢慢地加溫到沸騰(5)。在加溫过程中，观察其变化。

(3) 以1%酪氨酸溶液2ml. 代蛋白溶液，照(1)(2)做实验，观察其变化。

* 此数目指“註釋”号数，見附录I。

二 双缩脲反应

双缩脲是脲(即尿素)被加热,发出氨气而遗留下来的物质:



双缩脲与硷性铜稀薄溶液作用,使后者变为紫红色。这颜色反应名为“双缩脲反应”。这生成的有色物质是怎样组成,现今还未解决(6)。蛋白质和多肽也有此反应。蛋白质的呈色是青紫色,多肽是红紫色。

操作 (1)于小试管中,加1%清蛋白溶液(3)约0.5ml。

(2)加20%NaOH 10滴(7)。混匀。

(3)再滴加0.1%硫酸铜溶液(8)至紫色出现。

(4)又取约1%的脲溶液,照(1)(2)(3)实验。但0.1%硫酸铜溶液所加滴数与做清蛋白实验时相等滴数即可。结果如何?

(5)取脲固体一小撮于试管中,加热至熔,继续沸腾约1分钟。此加热不可太过。

(6)待冷后,加水2ml.再进行(2)(3)实验。比较以上三组实验的结果。

三 黄蛋白反应

蛋白质遇浓硝酸,则变黄色。这为黄蛋白反应。原因是蛋白质的酚基部分(即酪氨酸部分)和色氨酸部分被硝化而生硝基衍生物。这物质再遇硷性物质,即变橙黄色(9)。

操作 (1)于小试管中,加1%清蛋白溶液(3)0.5ml。

(2)再滴加浓硝酸10滴,即有白色沉淀发生。

(3)加热使沉淀溶解。观察颜色。

(4)冷后,慢慢加20%NaOH(10)使成硷性(约14滴)。观察颜色。

(5)以1%酪氨酸溶液代替蛋白溶液,照做(1)——(4)实验,比较其结果。

四 乙醛酸反应

在濃硫酸存在下,乙醛酸($\text{CHO} \cdot \text{COOH}$)能与色氨酸縮合而生紫色物質。含色氨酸的蛋白質,也有此顏色反应⁽¹¹⁾。

操作 (1)取1%鸡蛋白溶液⁽³⁾1 ml. 于小試管中。

(2)加乙醛酸試剂2滴,0.1%硫酸銅溶液1滴,混勻。

(3)傾斜試管,由管壁滑入純濃硫酸約1 ml.。靜置勿搖。

(4)觀察輕重兩層交界處,有否紫色環生成。

(5)以1%白明膠溶液代替上文蛋白溶液,照做(1),(2),(3)(4)試驗,試看有无紫色環生成。解釋結果。

五 福林—达尼斯(Folin—Denis)二氏反应

福林——达尼斯二氏反应是依靠酪氨酸与色氨酸能还原“酚試剂”中的鉬酸而成藍色的“鉬藍”⁽¹²⁾。含此二氨酸的蛋白質也有此顏色反应。

操作 (1)于小試管中,加1%鸡蛋白溶液⁽³⁾2滴,再用水20滴稀釋。

(2)再加20%NaOH 5滴。

(3)繼加“酚試剂”1滴。結果如何?

(4)用1%酪氨酸溶液以代鸡蛋白溶液,重做(1)(2)(3)實驗。結果如何?

六 坂口氏反应⁽¹³⁾

精氨酸在碱性溶液中,能与 α -萘酚及次溴酸盐作用而生紅色物質。含精氨酸的蛋白質也有此反应。

操作 (1)試管中,放1%鸡蛋白溶液⁽³⁾1ml.。

(2)加20%NaOH 5滴,1% α -萘酚的酒精溶液1滴,和次溴酸鈉溶液2滴。混勻。

(3)經過片刻,觀察顏色。出現鮮紅色是阳性反应。

实 驗 2

蛋白質的沉淀作用和因热凝固

蛋白質溶液与其他胶体溶液相似,具有不安定的特点,因此在各种不同作用的影响下,蛋白質很容易成沉淀而析出。促使蛋白質沉淀的原因很多;按其沉淀溶解性的不同,可分为两大类。

第一类是可逆的沉淀反应;这时蛋白質未遭受重大改变,因此可因除去沉淀的原因而使之再溶解。例如因盐析或低濃度的乙醇水溶液在低溫时所发生的蛋白質沉淀,就可重行溶解。

第二类是不可逆的沉淀反应;这时蛋白質遭受到重大改变,不能再溶于水。例如蛋白質經重金属盐类或膾硷試剂的作用而生的沉淀,就是如此。

一 蛋白質的盐析

原理 由于增高盐类(非重金属盐)的濃度而使蛋白質自其溶液中沉淀而出的方法名叫“盐析”。由盐析得到的蛋白質沉淀,經過透析或用水稀釋以降低盐类濃度时,又能再溶解。

同一盐类,因其濃度不同,可使不同种类的蛋白質发生沉淀;所以,可用調节盐类濃度的方法,从蛋白質混合溶液中,分开蛋白質。例如在半飽和的硫酸銨溶液中,球蛋白被沉淀出来,而清蛋白則仍呈溶解状态;此时即可过滤或用离心法把它們分开。

操作 (1)于試管中,取 5 % 蛋白質溶液 2ml., 加等体积的飽和硫酸銨溶液。数分鐘后,观察有无沉淀发生⁽¹⁴⁾。

(2)过滤。濾液和濾紙上沉淀保存待用。

(3)取濾液 7—8 滴于試管中,加 20% NaOH 10 滴,和酚試剂 3 滴,檢查濾液中有无蛋白質存在。

(4) 滤纸上沉淀用半饱和硫酸铵溶液洗涤。括取沉淀，于试管中加蒸馏水1ml.，再照(3)法检查是否蛋白质。

(5) 取(2)中余剩滤液，加固体硫酸铵振荡使之饱和。

(6) 过滤。取滤液少许，如(3)法检查有无蛋白质。

二 用酒精沉淀蛋白质

原理 在有少量中性盐存在下，加酒精(乙醇)(15)可使蛋白质沉淀。如果操作是在严格的低温条件下进行，则蛋白质可不发生变性。

(1) 于20ml. 试管中加1%鸡蛋白溶液(溶于0.9% NaCl 中) 2ml.，再加95%酒精2ml.。立刻可见沉淀发生。混匀，立即加0.9% NaCl 约15ml. 混匀，放置一旁。

(2) 于20ml. 试管中，如(1)做法，取1%鸡蛋白溶液2ml. 再加95%酒精2ml.，混匀，放置大约15分钟。然后再加0.9% NaCl 约15ml. 混匀，放置一旁。

(3) 于另二试管中，分别放1%鸡蛋白溶液2ml. 和95%酒精2ml.，分别在冷冻剂(碎冰混和固体食盐约1/5)中冷却。然后把冷酒精倒于冷的鸡蛋白溶液中(冷却继续)，用玻棒搅匀。经数分钟，用冷却的0.9% NaCl 约15ml. 稀释。

(4) 比较三管的结果，并加解释。

三 用重金属盐类沉淀蛋白质

原理 pH 在等电点以上的蛋白质溶液，重金属盐类(如铅、铜、银、汞等盐类)易与蛋白质结合而形成沉淀。

操作 (1) 试管中，加1%清蛋白水溶液 2—3 ml.。

(2) 再滴加2%醋酸铅溶液，观察有何现象发生。

四 用胨试剂使蛋白质沉淀

蛋白质能与胨试剂结合而生沉淀。胨试剂有苦味酸、鞣酸、亚铁氰化钾、磷钨酸、磷钼酸、二硝基柳酸、三氯乙酸、锡酸等等；它们常用来沉淀蛋白质。

操作 (1)于試管中,放1%鸡蛋白溶液2—3ml.,再滴加0.1%苦味酸溶液数滴。观察所生的变化。

(2)同样,1%清蛋白溶液2—3ml.加10%三氯醋酸数滴。观察有无沉淀析出。

(3)于第三个試管中,放1%清蛋白溶液2—3ml.,再加10%錫酸鈉溶液10滴,和 $\frac{2}{3}$ N H_2SO_4 10滴。混勻。观察有无沉淀发生。

五 加热使蛋白質凝固

原理 某些蛋白質,能因加热而凝固。在該蛋白質的等电点时,凝固最容易,过酸过碱都难或竟不凝固。

操作 (1)第一試管中,放1%鸡蛋白溶液2ml.和1%醋酸水溶液1滴。

(2)第二試管中,放1%鸡蛋白溶液2ml.和10%醋酸水溶液10滴。

(3)第三試管中,放1%鸡蛋白溶液2ml.和10%NaOH 2滴。

(4)把上述三試管分別加热至沸。观察各管的变化。

实 驗 3

蛋白質的两性反应和氨基酸的分开

(紙上色譜法)

一 蛋白質的两性反应

原理 蛋白質是两性电解质;它的分子同时有阴阳两种电荷。但两种电荷的多寡或相对的多寡,是因溶液的pH而有变化的。在所謂“等电点”时,电荷最少,而阴阳两电荷量相等;此时最容易发生沉淀(也就是溶解度最小)。在过酸(即pH小于等电点)时,蛋白質分子(粒子)阳电荷較多,在过碱(即pH大于等电点)时,阴电荷較多。在此两种情况,蛋白質的溶解度都較大,也就是难于生成沉淀。

操作 (1)取两个試管,各加1%鸡蛋白溶液2ml.

(2) 于第一試管中, 加N HCl 10滴, 第二試管中加N NaOH 10滴。

(3) 第一試管中, 再沿管壁慢慢滑下N NaOH 1—2 ml. 此时切勿搖动; 如此即分成上下二层。观察二层相接处, 有无沉淀发生。

(4) 同样, 第二試管中, 也沿管壁慢慢滑下N HCl 1—2 ml. 此时切勿搖动; 观察上下二层間有无沉淀发生。

(5) 解釋(3)(4)二实验的結果。

二 氨基酸的分开

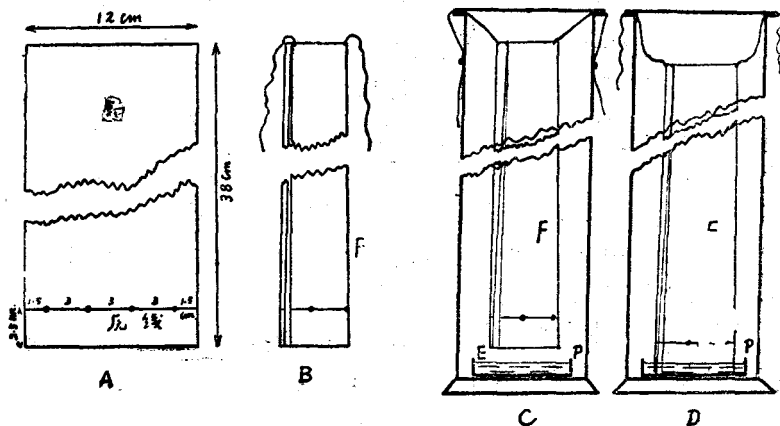
(紙上色譜上升法)

(示 教)

原理 色譜法的原理是根据各种物質对吸附剂吸附能力的强弱, 和对溶媒亲和力的的大小的相異而将这些物質分开。在吸附剂上吸附較强的物質, 經一种溶媒冲洗时, 該物質在吸附剂上移动得較慢; 反之, 吸附力較小的物質, 就移动得較快。移动快慢不同, 就可把物質分开。

紙上色譜法的原理和一般色譜法相同, 而用濾紙来代替吸附柱, 不但操作方便, 也比較容易將物質分开, 故現今利用紙上色譜法甚为广泛。

紙上色譜法, 溶媒是靠濾紙的毛細管作用, 在紙上移动。因溶媒的移动方向的不同而有(a)上升法, 和(b)下降法两种。又因紙上暴露面积



第一圖

很大，溶媒很易蒸发，故层离必須在密閉容器中进行。

紙上层离时，一物質在紙上移动的距离和溶媒在同時間移动的距离的比名为 R_f ，即

$$R_f = \frac{\text{物質斑点移动的距离}}{\text{溶媒移动的距离}}$$

在一定条件(溶媒組成，溫度，滤紙性質等)下，一种物質的 R_f 值是一定的。 R_f 常小于1； R_f 如等于零，意即該物質不能移动。

以下是紙上色譜法的上升法。

操作 在約长38cm. 闊12cm. 的滤紙条上，距短边約2.5cm. 处，用鉛笔輕輕画一橫綫。这綫名为原綫(第1图, A)。在原綫上从紙的长边1.5cm. 处开始，每隔3cm. 順次滴加三种氨基酸混合液，和三种氨基酸溶液共四个小滴。这些氨基酸溶液見下文說明。滴时要用微移液管，每滴是1—3 μ l. (1 μ l. = 0.001 ml.) 滤紙上的点滴直徑都不超过5 mm.。点滴干燥后，把滤紙在沸水浴上，大約熏10分钟，使紙上吸着一层水分。将滤紙卷成圓筒状，上端用綫縫定，或用針夹夹往(第一图 B)，并安綫二或三根于上端。把圓筒掛于层离室中(16)，用橡皮膏固定綫头，不使圓筒触及溶媒(見后述)E。这样經過3小时以上，使滤紙与蒸汽达成平衡。然后(17)将滤紙下端(即有原綫的一端)浸入溶媒(E)中，溶媒就自动上升，大約經14—18小时后，溶媒前綫可接近紙的上端。将紙取出，在空气中干燥，然后用0.1%苯肼环三酮戊烷(18)的正丁醇溶液噴上滤紙；在80°C烘3—5分钟。如此，氨基酸所在处呈紫紅色斑点。

上文实验，氨基酸混合液可取甘氨酸10mg.，酪氨酸15mg.，亮氨酸5mg.。共溶于1 ml. 水中，更加6N HCl 1—3滴。各个氨基酸溶液，可照上述分量，溶于1 ml. 水中，但酪氨酸还要加6 N-HCl 1—3滴。

所用溶媒，用“正丁醇——醋酸——水”以4:1:5的体积比混合。搖匀后，放置半天以上；取上层液体应用。

如果用上文种种氨基酸，則在滤紙上次序就是上文所記的次序(即甘氨酸移动最小，亮氨酸最大)。

实 驗 4

凱(Kjeldahl)氏定氮法

(微 量 的)

(示 教)

原理 存在于机体中的含氮化合物(例如蛋白質, 氨基酸等)若与濃硫酸一同加热(这过程名为“消化”)則含氮有机物被破坏; 其中的氮即变为銨盐。如消化剂为单纯硫酸, 則消化是比较緩慢的, 但是也可加硫酸鉀(或硫酸鈉)以升高消化液的沸点, 又可加入催化剂如硫酸銅之类, 以促进消化速率。消化后所生的銨盐, 可加氫氧化鈉使成强碱性而蒸餾之。随水蒸汽蒸餾出来的氮, 吸收于硼酸溶液中, 再用强酸来滴定(在适宜指示剂存在下, 从强酸的当量濃度和用量, 可算出氮的分量。

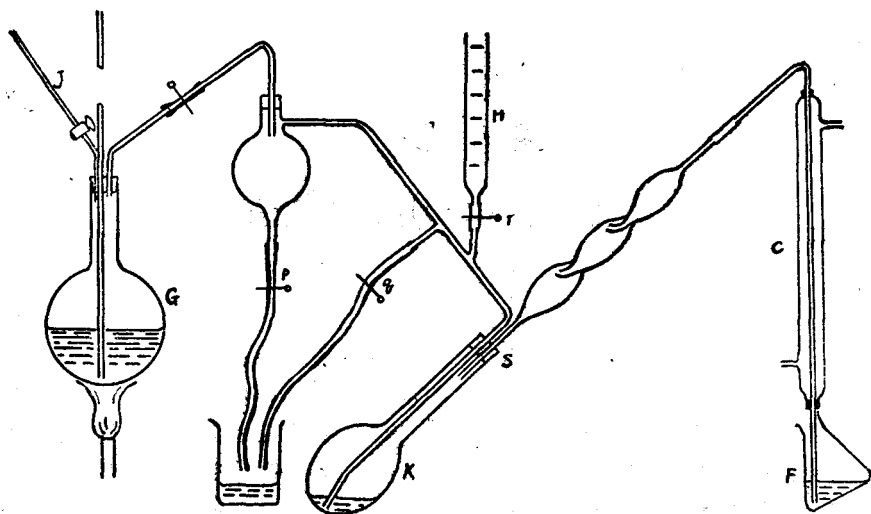
这定氮方法是微量的方法(19), 操作要在洁淨的室中进行。普通实验室的空气常含少量的氮, 必須注意。

操作 1. 仪器准备 在装置仪器之前, 全套仪器必須先用重铬酸洗液浸泡1—2天, 再用自来水冲洗洁淨。照第二图装置妥当。

在当天开始实验时, 必先将水蒸汽发生器(G, 第二图)加热, 使发生的水蒸汽通过全部装置15—30分钟。三角瓶F, 也先要倒套于水汽发生管(J)上, 用水汽冲洗2—3分钟以除痕迹的銨盐, 然后应用。

2. 消化 (1)取凱氏燒瓶(一种长頸耐热瓶, 即图上K), 于其中加入下列物質:

檢样:	血清	0.100 ml.
消化剂:	粉末硫酸鉀	0.2 gm.
	12.5%硫酸銅	0.3 ml.
	純濃硫酸	1.2 ml.
攪动用:	小玻璃球	2 个。



第二图

(2) 将此烧瓶斜装于消化架上; 用小火焰加热使沸, 最初有水汽发出, 后来又发生白烟。至此, 将一个玻璃塞虚掩瓶口, 再继续加热。烧瓶必须斜置, 以免瓶中消化液因沸腾而溅出瓶外。火焰的大小, 必须调节适宜, 使沸腾时所生白烟虽然充满全瓶, 但不致大量逃出瓶外。加热约10—15分钟, 瓶中消化液即可变为澄清的蓝绿色。如仍为黄黑色不澄清, 还必须继续加热到澄清为止。放冷; 用吸管取蒸馏水 5 ml. 冲洗瓶颈, 任洗液流入瓶中。

3. 蒸馏 (1) 取事先用水蒸汽洗涤过的 125 ml. 三角瓶一只, 加入:

2 % 硼酸水溶液 10 ml.

混合指示剂(附录 2, 5) 5 滴

此时溶液呈紫色。

(2) 将p夹子开放, 水汽从它下面喷出; 将上文准备好的三角瓶, 装于图上F处, 位置稍倾斜, 使冷凝器C的管咀, 适全部没入硼酸溶液之内。

(3) 将盛有消化液的K氏瓶(2. (2) 节) 照图装好(K)。瓶塞(S) 必须紧密。

(4) 从H管把30%NaOH 7 ml. 流入K. 氏瓶中, 即将夹子 r 夹紧。此时K. 氏瓶中液体为深蓝色或褐色。

(5) 关闭夹子p, 使水汽经K. 氏瓶, 带出NH₃, 而流入三角瓶F的硼酸液中。

(6) 如温度不够高, 水汽在K. 氏瓶中就凝结, 则可在瓶下助以火焰热力。但火焰不能太大; 太大则瓶中内容物有冲入冷凝器和硼酸液中的危险。

(7) 记录蒸汽在冷凝管中开始凝结的时间。继续蒸馏6分钟。此时三角瓶内液体应呈蓝色。

(8) 6分钟到达后, 将三角瓶下移, 使冷凝管咀离开硼酸液面约1 cm.。用洗瓶吹洗冷凝管咀, 任洗液流入硼酸液中。最后再继续蒸馏1分钟。

(9) 开放p夹, 停止蒸馏, 移去火焰, 拆下三角瓶。

4. 滴定和空白试验

(1) 用0.01N HCl滴定三角瓶中的溶液, 至蓝色适变为紫色。如因故不能立刻滴定, 三角瓶就必须加塞密闭。

(2) 空白试验 用蒸馏水以代替血清, 执行上文的消化, 蒸馏和滴定等操作, 方法完全与用血清时同。

5. 计算

氮的 mg. % = [(滴定检样所用 HCl ml. 数) - (空白滴定所用 HCl ml. 数)] × 盐酸当量浓度 × 14 × 100 ÷ (所供检样 gm. 或 ml. 数)

蛋白质的 % = $\frac{\text{氮的 mg. \%} \times 6.25}{1000}$