



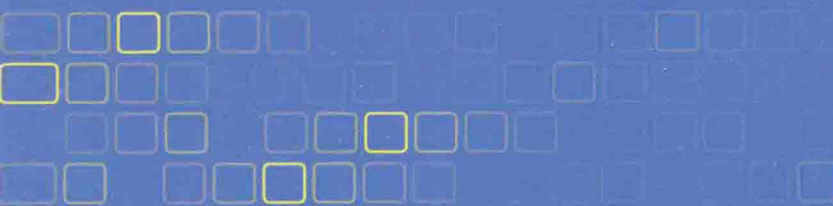
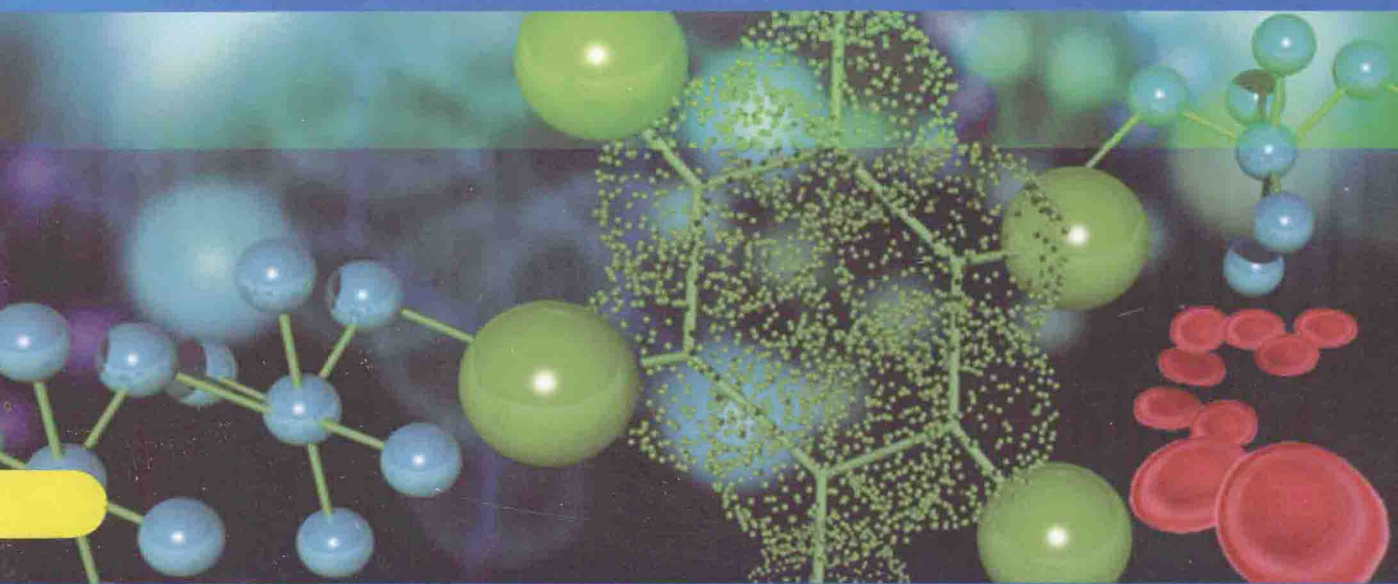
普通高等教育“十二五”规划教材
国家精品课程配套教材



生命科学经典教材系列

生物化学实验

(第五版) 陈钧辉 李俊 主编



BIOCHEMISTRY
EXPERIMENT
(Fifth Edition)



科学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材
国家精品课程配套教材

生物化学实验

第五版

主编	陈钧辉	李俊	
编者	陈钧辉	李俊	张太平
	张冬梅	卢彦	张春妮

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书在第四版多年使用的基础上进行了全面修订。全书共 100 多个实验,内容设置与陈钧辉教授等编著的《普通生物化学》第五版教材一致,包括糖、脂、蛋白质、核酸、酶、维生素、激素、物质代谢与生物氧化,以及为培养学生应用能力和创新能力的综合实验,非常适合作为本科教学的同步教材。为进一步拓宽学生的知识面,我们将与本书配套的一些生物化学仪器分析的内容放在科学出版社教学服务网站上,网站上还有 16 个生物化学实验操作流程的视频,供学生观看。

本书内容全面,可操作性强,实验重复性好,可作为高等院校生命科学相关专业大学生的实验教材,也可供有关教师和科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验/陈钧辉,李俊主编. —5 版. —北京:科学出版社,2014.4
普通高等教育“十二五”规划教材·国家精品课程配套教材
ISBN 978-7-03-040448-0

I. ①生… II. ①陈…②李… III. ①生物化学-实验-高等学校-教材
IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 078063 号

责任编辑:刘 畅/责任校对:张凤琴
责任印制:阎 磊/封面设计:迷底书装

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京市农林印务有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2003 年 4 月第 三 版 开本:787×1092 1/16

2008 年 6 月第 四 版 印张:19 1/4

2014 年 5 月第 五 版 字数:505 000

2014 年 5 月第一次印刷

定价:35.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

本书配套的数字资源如下：

1. 部分实验操作视频

实验 8 蒽酮比色定糖法



实验 14 糖的旋光性和变旋现象



实验 17 粗脂肪含量的测定 (Soxhlet 抽提法)



实验 30 蛋白质浓度测定 (微量凯氏定氮法)



实验 32 蛋白质浓度测定 (Folin-酚试剂法)



实验 33 蛋白质浓度测定 (紫外光吸收法)



实验 34 蛋白质浓度测定 (考马斯亮蓝结合法)



实验 39 用 DNS 法鉴定蛋白质或多肽的 N-端氨基酸



实验 56 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的相对分子质量



实验 57 用等电聚焦电泳法测定蛋白质等电点



实验 63 酵母 RNA 的提取 & 实验 64 RNA 的定量测定 (苔黑酚法)



实验 65 动物肝脏中 DNA 的提取 & 实验 66 DNA 的定量测定 (二苯胺法)



实验 72 DNA 琼脂糖凝胶电泳



实验 104.1 α -淀粉酶的活力测定



实验 104.2 α -淀粉酶的疏水层析



实验 104.3 α -淀粉酶的离子交换柱层析



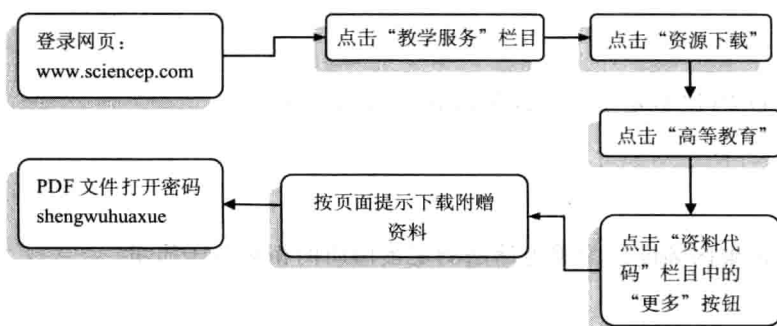
2. 第十章 临床生化指标的自动测定 (见科学出版社教学服务网站)

3. 附录八 自动生化分析仪 (见科学出版社教学服务网站)

附录九 全自动免疫分析仪 TOSOH AIA 2000 标准化操作规程 (见科学出版社教学服务网站)

附录十 血红蛋白检测仪 Bio-Rad D-10 标准化操作规程 (见科学出版社教学服务网站)

科学出版社教学服务网站访问方式



更多资源, 请持续关注。

第五版前言

本书自 1979 年出版第一版，1988 年、2003 年、2008 年相继出版第二版、第三版和第四版以来，均受到许多高等院校生命科学相关专业教师、学生的欢迎，也使本书内容不断充实和完善。生物化学的发展日新月异，新的技术不断涌现。为了能跟上时代的步伐，与时俱进，也为了更好地培养学生的动手能力、科学思维能力和创新意识，我们在第四版的基础上，对实验内容进行了更新和补充。淘汰了一些验证性实验，增加了一些应用性强的实验和综合实验，此外，每个实验还增加了注意事项和思考题。

全书共 100 多个实验，内容设置与陈钧辉教授等编著的《普通生物化学》第五版教材一致，该理论教材入选为“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材。实验内容包括糖、脂、蛋白质、核酸、酶、维生素、激素、物质代谢与生物氧化，以及综合实验。本书除了涵盖生物化学研究中常用的方法和技术外，还包括科研中的一些新技术和新方法。

在修订过程中，为了不增加篇幅，我们将有些生物化学仪器分析的内容，如自动生化分析仪的使用、临床生化指标的自动测定等放在科学出版社的教学服务网站上，以拓展学生的知识面，增加一些临床生化检验的知识，网站上还有 16 个生物化学实验操作流程的视频，供学生观看。

本书内容较多，还有一些较大型的实验和综合实验，不同学校、不同专业可根据具体条件选做。

本书是南京大学生物化学国家精品课程的配套教材，在修订过程中受到教育部下拨的国家精品课程建设经费的资助。王传怀教授、何执静副教授为本书的修订提供了许多帮助；袁玉荪教授、朱婉华副教授曾负责和参加本书早期的编写工作；焦瑞清、袁达文、唐惠炜、李俊和张冬梅老师拍摄了生物化学实验的视频，在此一并致谢。

由于我们水平有限，书中错误和不足仍属难免，敬请读者批评指正。

南京大学生命科学学院

生物化学系

陈钧辉

2014 年 1 月

第四版前言

本书自 2003 年第三版出版以来，深受高等院校生命科学相关专业学生的欢迎。随着生物化学实验技术的迅猛发展，对人才培养质量提出了新的更高的要求，培养创新意识和创新能力的高质量优秀人才成为高校培养学生的重要任务。为此，我们在第三版的基础上，对部分实验内容进行了更新和补充，更重要的是增加了六个综合实验，这些实验是将科研中一些常用的生物化学和分子生物学方法及技术进行有机的组合，有很强的应用价值，对培养学生的综合应用能力和创新能力很有帮助。对本书的实验，不同学校、不同专业可根据具体条件选做。

在修订过程中，王传怀教授为我们提供了一个综合实验，还有长期参与生物化学实验教学工作的唐惠炜、李学信、焦瑞清、袁达文和卢彦等教师为本书的修订提供了许多帮助。本书是南京大学生物化学国家精品课程的配套教材，在修订过程中还受到教育部下拨的国家精品课程建设经费的资助，在此一并致谢。

由于我们水平有限，书中错误和不足仍属难免，敬请读者批评指正。

南京大学生命科学学院

生物化学系

陈钧辉

2008 年 3 月

目 录

第五版前言

第四版前言

第一章 糖类	1
实验 1 糖的颜色反应	1
实验 1.1 莫氏实验	1
实验 1.2 塞氏实验	2
实验 1.3 杜氏实验	3
实验 2 糖的还原作用	4
实验 3 血糖的定量测定(Folin-Wu 法)	5
实验 4 血糖的定量测定(Folin-Malmros 法)	7
实验 5 血糖的定量测定(葡萄糖氧化酶法)	9
实验 6 血液中葡萄糖的测定(邻甲苯胺法)	11
实验 7 葡萄糖含量测定(苯酚法)	13
实验 8 蒽酮比色定糖法	14
实验 9 植物组织中可溶性总糖的测定(蒽酮比色法)	16
实验 10 总糖和还原糖的测定(3,5-二硝基水杨酸法)	18
实验 11 多糖的实验	20
实验 12 果胶的提取与果胶含量的测定	21
实验 13 肝素钠的定量测定	24
实验 14 糖的旋光性和变旋现象	26
第二章 脂质	28
实验 15 脂肪的组成	28
实验 16 卵磷脂的提取和鉴定	30
实验 17 粗脂肪含量的测定(Soxhlet 抽提法)	30
实验 18 碘价的测定(Hanus 法)	33
实验 19 皂化价的测定	35
实验 20 脂肪酸价的测定	37
实验 21 脂肪乙酰价的测定	38
实验 22 血清胆固醇的定量测定(磷硫铁法)	39
实验 23 血清总胆固醇的测定(邻苯二甲醛法)	41
实验 24 血清胆固醇的定量测定(醋酸酐法)	42
实验 25 血清甘油三酯简易测定法	44
实验 26 血清甘油三酯的测定(GPO-PAP 法)	46
实验 27 丙二醛(MDA)的测定	48

第三章 蛋白质	51
实验 28 蛋白质的颜色反应	51
实验 29 蛋白质的沉淀反应	54
实验 30 蛋白质浓度测定(微量凯氏定氮法)	55
实验 31 蛋白质浓度测定(双缩脲法)	58
实验 32 蛋白质浓度测定(Folin-酚试剂法)	60
实验 33 蛋白质浓度测定(紫外光吸收法)	61
实验 34 蛋白质浓度测定(考马斯亮蓝结合法)	63
实验 35 非蛋白氮(NPN)的测定	64
实验 36 甲醛滴定法	66
实验 37 DNP-氨基酸的制备和鉴定	68
实验 38 DNS-氨基酸的制备和鉴定	71
实验 39 用 DNS 法鉴定蛋白质或多肽的 N-端氨基酸	73
实验 40 用 DNS 法测定多肽的氨基酸组成	76
实验 41 肽的序列分析(PTH 法)	77
实验 42 甲硫氨酰甘氨酸二肽的合成	80
实验 43 尿素对蛋白质的变性作用	82
实验 44 氨基酸纸层析法	84
实验 45 氨基酸微晶纤维素薄板层析法	87
实验 46 离子交换柱层析法分离氨基酸	88
实验 47 血清白蛋白的分离与纯化	90
实验 48 凝胶层析法分离纯化蛋白质	93
实验 49 DEAE-Sephadex A-25 分离纯化多肽	95
实验 50 亲和层析法分离纯化单克隆抗体	97
实验 51 醋酸纤维薄膜电泳法分离血清蛋白质	98
实验 52 血清糖蛋白醋酸纤维薄膜电泳	101
实验 53 牛乳中酪蛋白和乳糖的制备与鉴定	103
实验 54 聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳法分离血清蛋白质	105
实验 55 聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳法鉴定胰岛素	108
实验 56 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的相对分子质量	110
实验 57 用等电聚焦电泳法测定蛋白质等电点	114
实验 58 对流免疫电泳法测定胎儿甲种蛋白质	116
实验 59 火箭免疫电泳法	118
实验 60 Western 印迹	119
实验 61 酶联免疫吸附测定(ELISA)	121
第四章 核酸	124
实验 62 核酸的定量测定(定磷法)	124
实验 63 酵母 RNA 的提取	126
实验 64 RNA 的定量测定(苔黑酚法)	127

实验 65 动物肝脏中 DNA 的提取	129
实验 66 DNA 的定量测定(二苯胺法)	130
实验 67 5'-核苷酸的定量测定(过碘酸氧化法)	132
实验 68 DEAE-纤维素薄板层析法测定核苷酸	134
实验 69 腺苷三磷酸的定量测定(纸电泳法)	136
实验 70 核酸的酶法降解以及葡聚糖凝胶层析法制备 5'-单核苷酸	138
实验 71 质粒 DNA 的提取	139
实验 72 DNA 琼脂糖凝胶电泳	141
第五章 酶	144
实验 73 影响酶促反应的因素——温度、pH、激活剂及抑制剂	144
实验 74 胰蛋白酶米氏常数的测定	147
实验 75 胆碱酯酶米氏常数的测定	150
实验 76 过氧化氢酶米氏常数的测定	152
实验 77 用正交法测定几种因素对酶活力的影响	153
实验 78 胰蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氯对胰蛋白酶的抑制作用	156
实验 79 溶菌酶的提纯结晶和活力测定	159
实验 80 猪胰糜蛋白酶的制备和纯度鉴定	161
实验 81 大肠杆菌碱性磷酸酶的制备	163
实验 82 碱性磷酸酶的提取和分离及比活力测定	166
实验 83 琼脂糖凝胶电泳法分离乳酸脱氢酶同工酶	170
实验 84 聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离乳酸脱氢酶同工酶	172
实验 85 肝脏谷丙转氨酶活力测定	174
实验 86 血清谷丙转氨酶活力测定	177
实验 87 固定化 5'-磷酸二酯酶的制备及其在分离核苷酸中的应用	178
第六章 维生素	184
实验 88 维生素 A 的定性测定	184
实验 89 维生素 B ₁ 的定性测定	185
实验 90 维生素 C 的定量测定(2,6-二氯酚靛酚滴定法)	186
实验 91 维生素 C 的定量测定(磷钼酸法)	188
实验 92 核黄素(维生素 B ₂)荧光光度定量测定法	190
实验 93 胡萝卜素的定量测定	192
实验 94 荧光法测定核黄素结合蛋白-核黄素的解离常数	194
第七章 激素	197
实验 95 尿中 17-羟皮质类固醇的测定(Porter-Silber 法)	197
第八章 物质代谢与生物氧化	200
实验 96 肌糖原的酵解作用	200
实验 97 脂肪酸的 β -氧化	202
实验 98 华氏(Warburg)呼吸仪瓶常数的测定	204
实验 99 L-谷氨酸的酶促脱羧作用(测压法测定 L-谷氨酸)	206

实验 100 发酵过程中无机磷的被利用和 ATP 的生成(ATP 的生物合成)	208
第九章 综合实验	211
实验 101 用高效液相层析 (HPLC) 定量测定胰岛素中的氨基酸	211
实验 101.1 胰岛素的酸水解	211
实验 101.2 用 HPLC 定量测定胰岛素水解产物中的氨基酸	212
实验 102 维生素 C 对过氧化氢 (H_2O_2) 诱导的小鼠巨噬细胞氧化损伤的保护作用	214
实验 102.1 小鼠腹腔巨噬细胞的收集与培养	214
实验 102.2 MTT 法测定巨噬细胞死亡率	216
实验 102.3 活性氧检测试剂盒探测细胞内活性氧的水平	217
实验 102.4 NO 和 NO 合成酶活性的测定	219
实验 103 酵母醇脱氢酶的提纯及其性质的研究	220
实验 103.1 酵母醇脱氢酶的提纯	220
实验 103.2 酵母醇脱氢酶的凝胶层析	223
实验 103.3 酵母醇脱氢酶的专一性	224
实验 103.4 酵母醇脱氢酶的动力学研究	226
实验 104 α -淀粉酶的分离纯化、鉴定和 K_m 、 V_{max} 的测定	231
实验 104.1 α -淀粉酶的活力测定	232
实验 104.2 α -淀粉酶的疏水层析	234
实验 104.3 α -淀粉酶的离子交换柱层析	236
实验 104.4 聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳法鉴定 α -淀粉酶	238
实验 104.5 米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_{max})的测定	240
实验 105 螺旋藻藻蓝蛋白的分离、纯化与鉴定	242
实验 105.1 螺旋藻粗藻蓝蛋白的制备	242
实验 105.2 离子交换柱层析法分离藻蓝蛋白	243
实验 106 原花色素的提取、纯化与测定	244
实验 106.1 山楂原花色素的提取	245
实验 106.2 原花色素的测定(I)	246
实验 106.3 原花色素的测定(II)	248
实验 107 熊果酸的制备和测定	249
实验 107.1 山楂熊果酸的制备	249
实验 107.2 熊果酸含量测定	250
实验 108 镍化合物诱导人 Jurkat 细胞凋亡途径的研究	252
实验 108.1 Jurkat 细胞的培养	252
实验 108.2 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡	253
实验 108.3 RT-PCR 检测凋亡相关基因 <i>bcl-2</i> 的表达	255
实验 108.4 酶联免疫吸附检测 Bcl-2 蛋白表达水平	257
第十章 临床生化指标的自动测定 (见科学出版社教学服务网站)	260
附录	261

一、生物化学实验须知	261
二、玻璃仪器的洗涤及一些常用的洗涤剂	262
三、移液器的使用	263
四、吸管的使用	265
五、过滤和离心	265
六、930 型荧光光度计的使用	266
七、UV2600 紫外可见分光光度计的使用	268
八、自动生化分析仪(见科学出版社教学服务网站)	271
九、全自动免疫分析仪 TOSOH AIA 2000 标准化操作规程(见科学出版社教学服务网站)	271
十、血红蛋白检测仪 Bio-Rad D-10 标准化操作规程(见科学出版社教学服务网站)	271
十一、实验室常用酸碱的相对密度和浓度	271
十二、常用酸碱指示剂	271
十三、缓冲液的配制	272
十四、恒沸盐酸的制备	278
十五、大肠杆菌丙酮粉的制备	278
十六、生物化学中某些重要化合物的 M_r 及 pK 值	279
十七、氨基酸的一些物理常数	281
十八、某些蛋白质的物理性质	283
十九、化学元素的相对原子质量表	284
二十、离心机转速(r/min)与相对离心力(RCF)的换算	285
二十一、硫酸铵饱和度的常用表	287
二十二、常用离子交换剂	288
二十三、常用凝胶过滤层析介质	291
二十四、汞的密度	293

贮于棕色试剂瓶中。

2. 1%蔗糖溶液：称取蔗糖 1g，溶于蒸馏水并定容至 100ml。

3. 1%葡萄糖溶液：称取葡萄糖 1g，溶于蒸馏水并定容至 100ml。

4. 1%淀粉溶液：将 1g 可溶性淀粉与少量冷蒸馏水混合成薄浆状物，然后缓缓倾入沸蒸馏水中，边加边搅，最后以沸蒸馏水稀释至 100ml。

五、操作

于 4 支试管中，分别加入 1ml 1%葡萄糖溶液、1%蔗糖溶液、1%淀粉溶液和少许纤维素（棉花或滤纸浸在 1ml 水中），然后各加莫氏试剂 2 滴^①，摇匀，将试管倾斜，沿管壁慢慢加入浓硫酸 1.5ml（切勿振摇！），硫酸层沉于试管底部与糖溶液分成两层，观察液面交界处有无紫红色环出现。

六、注意事项

1. 试管中加入各种糖后，应做好标记，浓硫酸加入的方式应保持一致。
2. 莫氏反应非常灵敏，所用的试管应洗净，不可在样品中混入纸屑等杂物。
3. 当糖浓度过高时，由于浓硫酸对它的焦化作用，将呈现红色及褐色而不呈紫色，需稀释后再做。

思考题

1. 解释 α -萘酚反应的原理。
2. 用莫氏试验鉴定糖时需注意哪些？

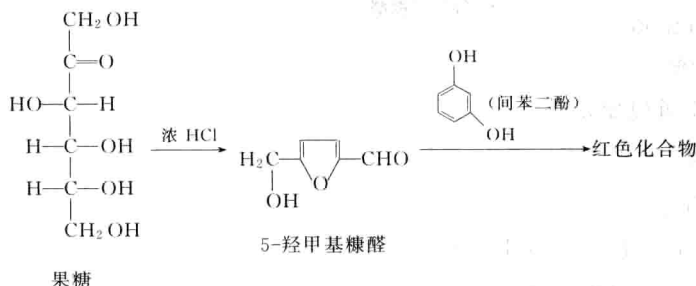
实验 1.2 塞氏实验

一、目的

掌握塞氏(Seliwanoff)实验鉴定酮糖的原理和方法。

二、原理

酮糖在浓酸的作用下，脱水生成 5-羟甲基糠醛，后者与间苯二酚作用，呈红色反应；有时亦同时产生棕色沉淀，此沉淀溶于乙醇，成鲜红色溶液^②。以果糖为例，其反应如下：



三、实验器材

1. 吸管 0.50ml(×3)、5.0ml(×1)。

^① 莫氏试剂应直接滴入试液中，勿使试剂接触试管壁，否则试剂会与硫酸接触生成绿色而掩盖紫色环。

^② 在此实验条件下，蔗糖有可能水解成果糖与葡萄糖，而呈阳性反应。葡萄糖与麦芽糖亦呈阳性反应，但呈色反应的速度较酮糖缓慢。果糖的红色出现及沉淀的产生，应在加热后 20~30s 内，生成的沉淀能溶于乙醇并成红色溶液。

2. 试管 $1.5\text{cm} \times 15\text{cm} (\times 3)$ 。

3. 水浴锅。

四、实验试剂

1. 塞氏试剂：溶 50mg 间苯二酚于 100ml 盐酸中 $[V(\text{H}_2\text{O}) : V(\text{HCl}) = 2 : 1]$ ，临用时配制。

2. 1%果糖溶液：称取果糖 1g，溶于蒸馏水并定容至 100ml。

3. 1%葡萄糖溶液：见实验 1.1。

4. 1%蔗糖溶液：见实验 1.1。

五、操作

于 3 支试管中分别加入 1%葡萄糖溶液、1%蔗糖溶液和 1%果糖溶液各 0.5ml，各加塞氏试剂 2.5ml，摇匀，同时置沸水浴内。比较各管颜色变化及红色出现的先后次序。

六、注意事项

1. 试管中加入各种糖后，应做好标记，并按顺序置于沸水浴锅内。

2. 实验过程中，要仔细观察溶液颜色的变化情况。

思考题

1. 在塞氏实验中，反应产生的沉淀为何能够溶于乙醇溶液并产生鲜红色？

2. 蔗糖为何会有塞氏反应？

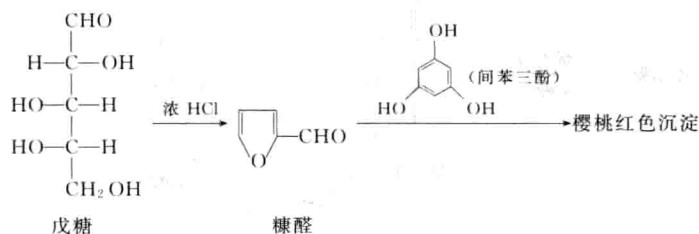
实验 1.3 杜氏实验

一、目的

掌握杜氏(Tollen)实验鉴定戊糖的原理和方法。

二、原理

戊糖在浓酸溶液中脱水生成糠醛，后者与间苯三酚结合成樱桃红色物质：



本试验虽常用以鉴定戊糖，但并非戊糖的特有反应。果糖、半乳糖和糖醛酸等都呈阳性反应。戊糖反应最快，通常在 45s 内即产生樱桃红色沉淀。

三、实验器材

1. 吸管 $1.0\text{ml} (\times 3)$ 。

2. 试管 $1.5\text{cm} \times 15\text{cm} (\times 3)$ 。

3. 水浴锅。

四、实验试剂

1. 杜氏试剂：2%间苯三酚乙醇溶液(2g 间苯三酚溶于 100ml 95%乙醇中)3ml，缓缓加入浓盐酸 15ml 及蒸馏水 9ml 即得，临用时配制。

2. 1%阿拉伯糖溶液：称取阿拉伯糖 1g，溶于蒸馏水并稀释至 100ml。

3. 1%葡萄糖溶液：见实验 1.1。

4. 1%半乳糖溶液：称取半乳糖 1g，溶于蒸馏水并稀释至 100ml。

五、操作

于 3 支试管中各加入杜氏试剂 1ml，再分别加入 1 滴 1%葡萄糖溶液、1%半乳糖溶液和 1%阿拉伯糖溶液，混匀。将各试管同时放入沸水浴中，观察颜色的变化，并记录颜色变化的时间。

六、注意事项

1. 试管中加入各种糖后，应做好标记，并按顺序置于沸水浴锅内。

2. 实验过程中，要仔细观察溶液颜色的变化情况。

思考题

1. 在 Tollen 反应分析未知样品时，应注意些什么问题？

2. 列表总结和比较本实验三种颜色反应的原理及其应用。

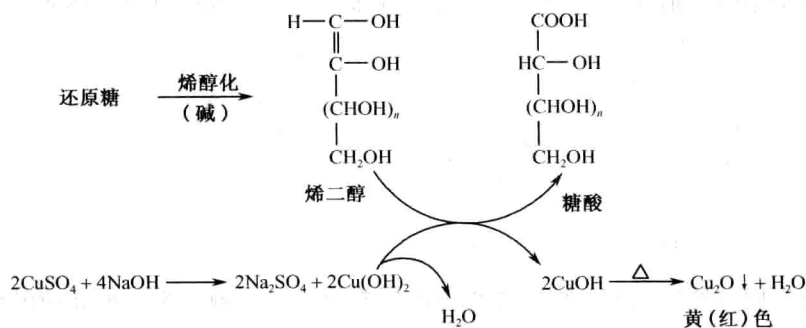
实验 2 糖的还原作用

一、目的

掌握用糖的还原反应来鉴定糖的原理和方法。

二、原理

费林(Fehling)试剂和本尼迪克特(Benedict)试剂均为含 Cu^{2+} 的碱性溶液，能使具有自由醛基或酮基的糖氧化，其本身则被还原成红色或黄色的 Cu_2O ①。此法常用作还原糖的定性或定量测定。其反应表示如下：



目前临床上多用本尼迪特法，因此法具有以下优点：①试剂稳定，不需临用时配制；②不因氯仿的存在而被干扰；③肌酐或肌酸等物质所产生的干扰程度远较费林试剂小。

三、实验器材

1. 吸管 1.0ml(×5)、2.0ml(×1)。

2. 试管 1.5cm×15cm(×6)。

3. 水浴锅。

① 由于沉淀速度不同，形成的颗粒大小不同，颗粒大的为红色，小的为黄色。

四、实验试剂

1. 费林试剂

试剂 A: 称取硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 34.5g, 溶于蒸馏水并稀释至 500ml。

试剂 B: 称取氢氧化钠 125g, 酒石酸钾钠^① 137g, 溶于蒸馏水并稀释至 500ml。

临用时将试剂 A 与试剂 B 等体积混合。

2. 本尼迪特试剂: 称取 85g 柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 11\text{H}_2\text{O}$)及 50g 无水碳酸钠, 溶解于 400ml 蒸馏水中。另溶解 8.5g 硫酸铜于 50ml 热水中。将硫酸铜溶液缓缓倾入柠檬酸钠-碳酸钠溶液中, 边加边搅, 如有沉淀可过滤。此混合液可长期使用^②。

3. 1%淀粉溶液: 见实验 1。

4. 1%蔗糖溶液^③: 见实验 1。

5. 1%葡萄糖溶液: 见实验 1。

五、操作

于 3 支试管中加入费林试剂 A 和 B 各 1ml, 混匀, 分别加入 1%葡萄糖溶液、1%蔗糖溶液和 1%淀粉溶液 1ml, 置沸水浴中加热数分钟, 取出, 冷却, 观察各管的变化。

另取 3 支试管, 分别加入 1%葡萄糖溶液、1%蔗糖溶液和 1%淀粉溶液 1ml, 然后每管加本尼迪特试剂 2ml, 置沸水浴中加热数分钟, 取出, 冷却, 和上面结果比较。

六、注意事项

1. 酮基本身没有还原性, 只有在变成烯醇式后, 才显示还原作用。

2. 溶液中还原糖含量如果很低, 则产生的氧化亚铜便会较少, 试验后可能会有绿色、混浊的黄色或橙色等现象。

3. 在酸性环境中, Cu^{2+} 较为稳定, 不容易发生反应, 所以不能进行试验。

思考题

1. 试比较这两种还原反应的异同。

2. 牛乳中含有 5%的二糖, 请设计一个方案来鉴定牛乳中二糖存在的真实性及其种类。

实验3 血糖的定量测定(Folin-Wu法)

一、目的

1. 掌握 Folin-Wu 法测定血糖含量的原理和方法。

2. 学会制备无蛋白血滤液。

二、原理

无蛋白血滤液中的葡萄糖与碱性硫酸铜溶液共热, Cu^{2+} 即被血滤液中的葡萄糖还原成 Cu^+ (Cu_2O), Cu_2O 又使钼酸试剂还原成低价的蓝色钼化合物(钼蓝)。血滤液的糖含量和产生的 Cu_2O 成正比, Cu_2O 的量与形成钼化合物的量成正比, 可用比色测定法。

① 酒石酸钾钠的作用是防止反应产生的氢氧化铜或碳酸铜沉淀, 使之变为可溶性的而又略能解离的复合物, 从而保证继续供给 Cu^{2+} 。

② 如因存放较久而产生沉淀, 可取上清液使用, 不必重新配制。存放较久的本尼迪特试剂较新配制的更好。

③ 所用蔗糖应用 C.P. 以上规格, 且应事先以本尼迪特试剂检验合格再用, 否则将因药品不纯, 或部分分解而有还原性。

三、实验器材

1. 全血。
2. 滤纸。
3. 紫外可见分光光度计。
4. 血糖管 25ml(×3)。
5. 奥氏吸管 1.0ml(×3)、2.0ml(×1)。
6. 吸管 2.0ml(×3)、10.0ml(×1)、5.0ml(×4)。
7. 锥形瓶 20ml(×1)。
8. 表面皿 $\phi 6\text{cm}$ (×1)。
9. 漏斗 $\phi 5\text{cm}$ (×1)。
10. 水浴锅。
11. 电炉(或煤气灯)。

四、实验试剂

1. 标准葡萄糖溶液

(1) 1%葡萄糖母液(10mg/ml): 称取 1.000g 葡萄糖(A.R.), 溶于蒸馏水并稀释至 100ml。

(2) 葡萄糖标准液(0.1mg/ml): 取 1.0ml 葡萄糖母液置 100ml 容量瓶内, 加蒸馏水至刻度。

2. 碱性硫酸铜溶液

A 液: 称取无水碳酸钠 35g, 酒石酸钠 13g 及碳酸氢钠 11g, 溶于蒸馏水后, 稀释至约 700ml, 待溶液清晰后再稀释至 1 000ml。

B 液: 称取硫酸铜晶体 5g, 溶于蒸馏水并稀释至 100ml, 加浓硫酸数滴作稳定剂。

临用时, 取 A 液 25ml, B 液 5ml, 混合后, 再加 A 液至 50ml, 摇匀。此混合液置冰箱内可保存数日, 如暴露于阳光下, 数小时即失效。

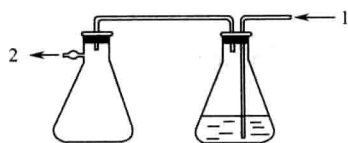


图 1 赶溴装置

1. 空气 2. 抽气

3. 酸性钼酸盐溶液

称取钼酸钠 600g, 置烧杯内, 加入少量蒸馏水, 溶解后倾入 2 000ml 容量瓶中, 加蒸馏水至刻度, 摇匀, 倾入另一较大的试剂瓶中, 加溴水 0.5ml, 摇匀, 静置数小时。取上清液 500ml, 置于 1 000ml 容量瓶中, 徐徐加入 225ml 85%磷酸, 边加边摇匀。再加 150ml 25%硫酸, 置暗处至次日, 用空气将剩余的溴赶去(见图 1), 然后加入 75ml 冰醋酸, 摇匀, 用蒸馏水稀释至 1 000ml, 贮于棕色瓶中。

4. 10%钨酸钠溶液

钨酸钠 10g, 溶于蒸馏水并稀释至 100ml。

5. 0.33mol/L H_2SO_4 溶液

于 53ml 蒸馏水中加入 1ml 浓硫酸。

五、操作

1. 无蛋白血滤液的制备

用奥氏吸管①吸取全血(已加抗凝剂——草酸钾或草酸钠)1ml, 缓缓放入② 20ml 锥形瓶内, 加水 7ml, 摇匀, 溶血后(血液变为红色透明时)加 10%钨酸钠 1ml, 摇匀, 再加 0.33mol/L H_2SO_4 1ml(皆用吸管), 随加随摇, 加毕充分摇匀, 放置 5~15min, 至沉淀由

① 奥氏吸管俗称胖肚吸管, 因吸管中部有一膨大部分, 用以吸取血液, 可减少血液与管壁的接触面, 使吸量更为准确。

② 欲得准确结果, 所取血液的量必须准确。如由吸管中放出血液的速度太快, 则有大量血液黏在吸管内壁, 容量不准, 一般放出 1ml 血液所用的时间不应少于 1min。