

生物科学
生物技术
系 列

BIOCHEMICAL EXPERIMENT

普通高等教育“十二五”规划教材

生物化学实验 原理与技术

祁元明 主编 高艳锋 张守涛 副主编



化学工业出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

生物化学实验原理与技术

祁元明 主编

高艳锋 张守涛 副主编



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学实验原理与技术/祁元明主编. —北京:
化学工业出版社, 2011. 1

普通高等教育“十二五”规划教材

ISBN 978-7-122-10231-7

I. 生… II. 祁… III. 生物化学-实验-高等
学校-教材 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 260627 号

责任编辑: 赵玉清

文字编辑: 刘 畅

责任校对: 郑 捷

装帧设计: 尹琳琳

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装: 三河市延风印装厂

787mm×1092mm 1/16 印张 15½ 字数 409 千字 2011 年 2 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 25.00 元

版权所有 违者必究

《生物化学实验原理与技术》

编写人员名单

主 编 祁元明

副 主 编 高艳锋 张守涛

编写人员（按姓氏笔画）

祁元明 闫红霞 杨艳坤 张一折 张守涛

李 杰 高艳锋 康巧珍 崔惠芳 翟明霞

前言

生物化学是生物科学、生物技术、生物工程专业的主干课，医学、农学各专业的基础课，是一门授课节奏快、知识信息量大，教与学难度大的必修课。生物化学实验是培养学生的基本操作能力，养成良好的科研素质的重要环节。随着该学科的不断发 展，一些旧的实验方法不断被改进或淘汰，而新的研究方法和 技术不断涌现，因此非常需要一本涵盖面较广而又实用的实验教材。基于此，结合我校具体情况，在参考兄弟院校实验教材的基础上，我们编写了这本教材。

本实验教材本着实用、够用、适用的原则，力争与大多数高等院校的教学实际相符。与此同时，我们精选了一些针对高年级本科生的创新性实验，使得他们在进入研究生阶段学习之前熟悉实验室常用的生物化学实验操作，加入了一些上机实验和选作实验，以开阔学生的视野，锻炼其综合能力。

本书分为三大部分，第一部分为基础实验，包括糖类、脂类、蛋白质、核酸、维生素及其他小分子的内容，其中实验一至四由张一折老师编写，实验五、实验六、实验二十二、实验二十六至实验二十八以及实验三十和实验三十一由杨艳坤老师编写，实验七、实验九至实验十五和实验二十五在本校生物化学基础实验讲义原有基础上经张守涛老师整理编写，实验八、实验十六、实验十七、实验二十二至实验二十四由张守涛老师编写，实验十八至实验二十一由翟明霞老师编写，实验三十二和实验三十三由崔惠芳老师编写，实验三十四和实验三十五由高艳锋老师编写。本书第二部分为综合实验，其中综合实验一在本校生物化学综合实验讲义原有基础上经高艳锋老师整理编写，综合实验二至综合实验五由高艳锋老师编写，综合实验六由康巧珍老师和闫红霞老师编写，综合实验七由康巧珍老师和李杰老师编写。第三部分是附录，由张一折老师编写。主编负责全书的通稿。本校的刘伟老师、陈鲤翔老师以及吴亚红、吴宗胤、刘伟等研究生在本书的编写过程中的前期也做了大量资料搜集及文字工作，在此表示感谢。

本书编者均为在教学一线从事多年基础生化理论与实验教学、具有丰富工作经验的科技工作者，但由于编者水平有限，本书可能存在疏漏或不当之处，敬请广大读者指正，以便改进。

编 者
2010 年 10 月

目 录

实验室规则	1
实验记录与实验报告	3
基础实验	4
实验一 可溶性糖的硅胶 G 薄层层析	5
实验二 糖酵解中间产物的鉴定	6
实验三 葡萄糖氧化酶法测定血清葡萄糖	7
实验四 肾上腺素对血糖浓度的影响	9
实验五 脂肪的粗提取和定量测定	10
实验六 脂肪酸的 β 氧化——酮体的生成及其测定	12
实验七 氨基酸的分离与鉴定——滤纸层析法	15
实验八 氨基转移反应的定性鉴定	17
实验九 血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	20
实验十 蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳	24
实验十一 影响酶促反应的因素——温度、pH、激活剂及抑制剂	28
实验十二 乳酸脱氢酶活力测定	31
实验十三 紫外吸收法测定蛋白质含量	33
实验十四 双缩脲法测定浆总蛋白质含量	35
实验十五 Folin-酚法测定血清蛋白质含量	37
实验十六 考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量	39
实验十七 样品中总氮量的测定——微量凯氏定氮法	41
实验十八 蛋白质基本性质分析与结构预测	43
实验十九 小分子与蛋白质相互作用的模拟与分析	47
实验二十 蛋白质抗原 T 细胞表位在线预测	51
实验二十一 蛋白质抗原 B 细胞表位预测	56
实验二十二 动物组织细胞基因组 DNA 提取	60
实验二十三 植物 DNA 的提取	63
实验二十四 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	64
实验二十五 酵母 RNA 的提取与地衣酚显色测定法	66
实验二十六 维生素 A 的提取和含量测定——三氯化锑比色法	68
实验二十七 维生素 B ₁ 含量的测定——荧光法	72
实验二十八 维生素 B ₁ 含量的测定——质量法	75
实验二十九 维生素 C 的定量测定 (2,6-二氯酚靛酚滴定法)	76
实验三十 维生素 C 含量的测定——碘量法	79
实验三十一 ATP 的生物合成和发光法测定含量	81
实验三十二 碳纳米管电极定量测定维生素 C	84
实验三十三 碳纳米管电极定量测定尿酸	87
实验三十四 肌肽清除羟自由基活性测定	90

实验三十五 谷胱甘肽清除 DPPH 自由基活性测定	92
综合实验	94
综合实验一 酵母蔗糖酶的提取纯化及性质研究	95
分实验一 蔗糖酶的提取与初步纯化	96
分实验二 蔗糖酶的离子交换层析纯化	98
分实验三 蔗糖酶活性和蛋白质含量的测定	100
分实验四 反应时间对产物的影响	104
分实验五 pH 对蔗糖酶活性的影响	105
分实验六 温度对蔗糖酶活性的影响	107
分实验七 蔗糖酶米氏常数的测定	108
分实验八 正交法测定三种因素对蔗糖酶活性的影响	110
综合实验二 兔肌磷酸化酶 b 的提取与纯化	114
分实验一 兔肌总蛋白的提取和初步纯化	114
分实验二 葡聚糖凝胶过滤层析纯化	116
分实验三 离子交换层析纯化	117
分实验四 SDS-PAGE 电泳、蛋白含量测定以及纯化率计算	119
综合实验三 阿斯巴甜的合成与高效液相色谱纯化	122
分实验一 苯丙氨酸甲酯盐酸盐的合成	122
分实验二 阿斯巴甜二肽粗产物的合成	123
分实验三 高效液相色谱纯化	126
综合实验四 肿瘤细胞的培养和活力测定	128
分实验一 实验用品的准备及试剂配制	128
分实验二 肿瘤细胞的复苏、传代与冻存	131
分实验三 台盼蓝染色方法检测细胞活力	134
分实验四 吖啶橙染色方法检测细胞活力	136
分实验五 MTT 方法检测细胞活力	137
分实验六 LDH 方法检测细胞活力	139
综合实验五 肿瘤抗原 MAGE-4 的 RT-PCR 检测	142
分实验一 细胞总 RNA 的提取	143
分实验二 反转录合成 cDNA	145
分实验三 PCR 及产物检测	146
综合实验六 原核型重组表达质粒的构建及融合蛋白的诱导表达和纯化	150
分实验一 目的基因的 PCR 扩增技术	153
分实验二 DNA 分子的琼脂糖凝胶电泳	157
分实验三 微量质粒 DNA 提取与纯化(碱裂解法)	160
分实验四 紫外分光光度法测定核酸浓度	163
分实验五 限制性核酸内切酶消化 DNA	165
分实验六 琼脂糖凝胶中 DNA 片段的纯化与回收	169
分实验七 DNA 分子的体外重组(目的基因与载体的连接)	170
分实验八 大肠杆菌感受态细胞制备	171
分实验九 大肠杆菌转化与重组克隆的筛选鉴定	173
分实验十 外源基因在大肠杆菌中的诱导表达	177
分实验十一 蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)	178
分实验十二 直链淀粉树脂亲和层析纯化 MBP 融合蛋白	180

综合实验七	真核型重组表达质粒的构建及哺乳动物细胞转染与检测	183
分实验一	真核型重组表达载体 pEGFP-4.1N 的构建	186
分实验二	细胞的传代与培养	188
分实验三	无内毒素质粒的大量提取	190
分实验四	脂质体法转染真核细胞	192
分实验五	EGFP 在真核细胞中的瞬时表达	195
分实验六	G418 筛选稳定转染细胞株	197
分实验七	真核细胞基因组 DNA 的提取	199
分实验八	Southern 杂交	201
分实验九	总 RNA 的提取和电泳	206
分实验十	RT-PCR	208
分实验十一	Northern 杂交	209
分实验十二	Western blotting 检测	211
分实验十三	细胞免疫荧光法	216
附录		218
附录一	玻璃仪器的洗涤及一些常用的洗涤剂 and 干燥剂	219
附录二	试剂及试剂配制与保存	220
附录三	层析技术有关介质性质及数据	229
附录四	生化实验室常见仪器的使用方法	230
附录五	实验室常用数据表	235
参考文献		238

实验室规则

一、实验室安全规则

1. 水电使用安全规则

注意节约用水，清洗器皿时，先用自来水洗干净后，根据实验需要再用纯净水冲洗 1~3 遍；随时注意水龙头是否关掉，水池是否堵塞、漏水；注意节约用电，仪器使用前应了解是否漏电、短路，使用完后按操作程序关掉电源；最后离开实验室的同学应将实验室的照明灯、仪器电源、水龙头的开关关掉，门窗锁好。

2. 药品使用安全规则

易燃易爆药品远离火源；注意有毒或腐蚀性药品的使用方法；禁止药品、试剂间的相互污染；废弃液体倒入水池后，要尽快用水冲掉，固体废弃物严禁入水池；有毒的废弃物必须倒到指定地点。

3. 仪器使用安全规则

实验室任何仪器不能随意操作，严格按照操作规程进行；仪器在使用过程中若出现故障要及时报告，请厂家专业人员维修，不能自行处理；仪器使用完毕后，要及时清洁仪器和操作台面，并记录仪器使用情况。

二、实验室卫生规则

1. 维护实验室的清洁卫生；不随地吐痰，不乱扔纸屑等物品。每次做完实验后，各个实验小组同学要分别清洗器皿和清理台面。

2. 严格执行卫生值日制度，实验完后实验室的清洁卫生由值日小组按照规定严格执行。

三、学生守则

1. 实验室同学应衣冠齐整，自觉遵守课堂纪律，维护课堂秩序，不得无故迟到早退，保持室内安静。

2. 注意实验室环境、仪器和实验桌面的整洁，器皿等清洗完后按原位放好，经老师检查后方可离开。

3. 开始做实验前，应预习好实验指导，要充分了解实验原理、方法及仪器设备的使用方法。

4. 节约使用仪器、药品、试剂和各种物品，保持药品和试剂的纯净，严防混杂。

5. 注意安全。易燃易爆物远离火源，注意有毒或腐蚀药品的使用方法，玻璃器皿的使用、洗涤，尽可能减少损坏。废弃液体倒入水池后，要尽快用水冲掉，固体废弃物严禁入水池。

6. 认真执行实验室的清洁卫生及其值日制度。

7. 团结同学，注意相互交流和协作。

8. 认真对待每次实验，记录好实验结果，并在实验结束后提交实验报告。

四、实验室灭火法

实验中意外发生火灾，不可惊慌失措，应冷静处置。首先要立即切断室内火源和电源，然后根据具体情况积极正确地进行抢救和灭火。下面介绍几个常用的应急方法：

1. 在可燃液体燃着时，应立即拿开着火区域内的一切可燃物质。若着火面积较小，可用石棉布、湿布或砂土覆盖，隔绝空气使之熄灭。
2. 酒精及其他可溶于水的液体着火时，可用水扑灭。
3. 汽油、乙醚、甲苯等有机溶剂着火时，应用石棉布或砂土扑灭（注意：不能用水，否则会扩大燃烧面积）。某些物质燃烧时可用的灭火剂如下表所示。

燃烧物质	灭火剂	燃烧物质	灭火剂
丙酮	泡沫、CO ₂ 、CCl ₄	橡胶	水
漆	泡沫	蜡	泡沫
苯	泡沫、CO ₂ 、CCl ₄		

五、实验室自救

在实验过程中若不慎发生受伤事故，应立即采取适当的急救措施。

1. 受玻璃割伤及其他机械损伤。首先必须检查伤口内有无玻璃或金属等碎片，然后用硼酸水洗净，再涂搽碘酒，必要时用纱布包扎。若伤口较大或过深而大量出血，应迅速在伤口上部和下部扎紧血管止血，并立即到医院诊治。
2. 烫伤一般先用浓酒精（90%~95%）消毒后，涂上苦味酸软膏。如果伤处红痛或红肿，可擦医用橄榄油或用棉花蘸酒精覆盖伤处；若皮肤起泡，则不要弄破水泡，以防感染；若伤处皮肤呈棕色或黑色，应用干燥无菌的消毒纱布轻轻包扎好，并急送医院治疗。
3. 强碱（如氢氧化钠、氢氧化钾）等触及皮肤而引起灼伤时，要先用大量自来水冲洗，再用 5% 硼酸溶液或 2% 乙酸溶液涂洗。
4. 一般强酸溅到皮肤上，应先用干净布迅速拭去，然后用大量水冲洗，最后再涂抹碳酸氢钠稀溶液；进入眼睛，直接用大量水冲洗，边洗边眨眼；溅到实验台上，用湿抹布直接擦去就行。
5. 浓硫酸等遇水放热的酸少量溅到皮肤上，应先用干净布迅速拭去，然后用大量水冲洗，再涂抹碳酸氢钠稀溶液，大量沾染或进入敏感部位（如眼睛），应立即去医院；溅到实验台上用布擦去，然后用大量的水清洗。
6. 若酚触及皮肤引起灼伤，可以用酒精洗涤。

实验记录与实验报告

一、实验记录

实验前应认真预习，写好实验预习报告。实验中应及时准确地记录所观察到的现象和测量的数据，记录须使用钢笔或圆珠笔。

实验记录要注意有效数字，如吸光度值应为“0.050”，而不能记成“0.05”。每个结果都要尽可能重复观测二次以上，即使观测的数据相同或偏差很大，也都应如实记录，不得涂改。

实验中要详细记录实验条件，如使用的仪器型号、编号、生产厂家等；生物材料的来源、试剂的规格、试剂的浓度等。学习期间，要养成一丝不苟、严谨求实的科学作风。

二、实验报告

实验报告是学生实验研究结果的记录和总结，同时也是评价学生实验课成绩的重要依据。

实验报告的格式应为：

- (1) 实验目的；
- (2) 实验原理（简明扼要概括）；
- (3) 主要仪器、材料和试剂；
- (4) 实验方法与步骤；
- (5) 实验数据记录、处理及结果分析。

书写实验报告应注意以下几点：

(1) 书写实验报告应使用实验报告纸，为避免遗失，实验课全部结束后可装订成册以便保存。

(2) 简明扼要地概括出实验原理，涉及的化学反应最好用化学反应式表示。

(3) 应列出所用的试剂和主要仪器。

(4) 实验方法与步骤的描述要简洁，不要照抄实验指导书或实验讲义，但要写得明白，以便他人能够重复。

(5) 实验结果的讨论要充分，尽可能多查阅一些有关的文献和教科书，充分运用已学过的知识和生物化学原理，进行深入的探讨，勇于提出自己独到的分析和见解，对实验提出改进意见。讨论部分不是对实验结果的重述，而是实验结果、实验方法和实验异常结果的分析和讨论，以及对实验设计的认识、体会及建议。

三、考核方式与评分方法

采取“学生实验平时考核”的方法进行实验考核。预习报告、实验过程、实验报告等每个环节都进行评分，各实验项目总成绩的平均值就是实验成绩。

基础实验

实验一

可溶性糖的硅胶 G 薄层层析

一、实验目的

1. 了解薄层层析测定可溶性糖的原理。
2. 掌握硅胶 G 薄层层析的操作方法。

二、实验原理

薄层层析（简称 TLC）是一种微量而快速的层析方法，是在吸附剂或支持剂均匀涂布的薄层上进行的，故称薄层层析。为了使所要分析的样品各组分得到分离，必须选择合适的吸附剂。硅胶、氧化铝和聚酰胺是广泛采用的吸附剂，硅藻土和纤维素是分配层析中常用的支持剂，在吸附剂或支持剂中添加合适的黏合剂后再涂布，可使薄层紧贴在玻璃板上。

硅胶 G 是一种添加了黏合剂的硅胶粉，约含 12%~13% 的石膏（ CaSO_4 ），它可以把一些物质从溶液中吸附于自身表面。利用它对各种物质吸附能力的不同，再用适当的溶剂系统展层，能使不同的物质得以分离。例如，糖在硅胶 G 薄层上的移动速度与糖的相对分子质量和羟基数有关，经过适当的溶剂展开后，糖在薄板上的移动速度是戊糖 > 己糖 > 双糖 > 三糖。对已分开的斑点显色，而将与它位置相当的另一个未显色的斑点从薄层上与硅胶 G 一起刮下，以适当的溶剂将糖从硅胶 G 上洗脱下来，就可用糖的定量测定方法测出各组分的含糖量。薄层层析与其他方法比有明显的优点：层析时间短、样品用量范围大（ $1\mu\text{g} \sim 0.5\text{g}$ ）、观察结果方便、可以分离多种化合物等，其灵敏度比纸层析高 10~100 倍，显色方法甚至可以用腐蚀性显色剂。而且薄层层析法操作方便，设备简单，所以薄层层析法目前应用范围相当广泛。

三、试剂

- (1) 1% 糖标准溶液：取木糖、葡萄糖、果糖和蔗糖各 100mg，分别用 75% 的乙醇定容 10mL，使其浓度均为 10mg/mL。
- (2) 0.1mol/L 硼酸（ H_3BO_3 ）溶液。
- (3) 层析溶剂：氯仿：甲醇 = 60：40（体积比）。
- (4) 苯胺/二苯胺/磷酸显色剂：取 1g 二苯胺、1mL 苯胺和 5mL 85% 磷酸溶于 50mL 丙酮中。
- (5) 蒽酮试剂：称取 0.2g 蒽酮和 1g 硫脲于烧杯中，缓缓加入 100mL 浓硫酸，边加边搅拌，溶解后呈黄色透明溶液，将其贮存于棕色瓶中，最好现配现用，置冰箱中可存放 2 周。

四、实验材料与仪器

烘箱、吹风机、薄层玻板（20cm×20cm）、分光光度计。

五、操作步骤

1. 硅胶 G 薄层板的制备

取硅胶 G 粉 30g，加入 75mL 0.1mol/L 硼酸溶液中，调匀后铺于洁净、平整的玻板上，将铺层后的薄板于 100℃ 烘箱中烘干。取出后即可使用，亦可贮于干燥器中备用。薄层表面要求平整，厚薄均匀。

2. 糖在硅胶 G 薄层上的分离

选取制备好的薄板一块,在距底边 1.5cm 的直线上选 4 个点,各点间距 2cm。用毛细管分别点上不同的糖样品于 4 个点,样品量控制在 5~10 μ g,斑点直径不超过 2mm,待薄层上样品自然干燥后,将薄板置于盛有层析溶剂的层析缸中,自下向上展层,当展层溶剂到达离薄板顶端约 1cm 处时取出薄板,前沿作以记号,于 60 $^{\circ}$ C 下烘干 2~3h (或在空气中晾干),除尽溶剂后均匀地喷上一层苯胺-二苯胺-磷酸显色剂,于 85 $^{\circ}$ C 下烘干 10min,则各种糖分别显出不同的颜色。不同的糖与苯胺-二苯胺-磷酸试剂反应呈不同颜色,如木糖呈黄绿色,葡萄糖呈蓝绿色,果糖呈棕红色,蔗糖呈蓝褐色。根据斑点的颜色、位置并与标准品对照可鉴定糖的种类。

3. 糖的定量测定

分别取 5 块干硅胶 G 板,在每块板上间隔均匀地点上同样的 5 个样,即每块薄板上分别点上 1 μ L、2 μ L、3 μ L、4 μ L、5 μ L 的糖标准液 5 点,操作方法同上,待溶液前沿到达薄板顶端 1cm 处时取出,挥发尽溶剂后,将每块板中间 3 个样品层析部位用玻璃盖住,左右面边层析部位用显色剂进行定位。根据已显色斑点的位置,用刀片刮下中间 3 个相应部位的硅胶 G 并放入试管中。在上述各试管中加 1mL 蒸馏水,于室温下浸提 1h,取 1mL 滤液加 2mL 蒽酮试剂,于沸水浴中加热 10min,冷却后用空白试样调零,在波长 620nm 处测出各糖的吸光值 A_{620} 。

六、结果处理

记下各斑点的位置、颜色,计算 R_f 值,绘出层析图谱。

实验二

糖酵解中间产物的鉴定

一、实验目的

了解用专一性的酶抑制剂研究代谢中间步骤的原理和方法,增加对糖酵解过程的认识。

二、实验原理

利用碘乙酸对糖酵解过程中 3-磷酸甘油醛脱氢酶的抑制作用,使 3-磷酸甘油醛不再向前变化而积累。硫酸肼作为稳定剂,用来保护 3-磷酸甘油醛使不自发分解。然后用 2,4-二硝基苯肼与 3-磷酸甘油醛在碱性条件下形成 2,4-二硝基苯肼-丙糖的棕色复合物,其棕色程度与 3-磷酸甘油醛含量成正比。

三、试剂

- (1) 5% 葡萄糖溶液。
- (2) 10% 三氯乙酸溶液。
- (3) 0.75mol/L 氢氧化钠溶液。
- (4) 0.002mol/L 碘乙酸溶液。
- (5) 2,4-二硝基苯肼溶液 称取 0.1g 2,4-二硝基苯肼溶于 100mL 2mol/L HCl 溶液中,贮于棕色瓶备用。
- (6) 0.56mol/L 硫酸肼溶液 称取 7.28g 硫酸肼溶于 50mL 蒸馏水中,此时不易全部

溶解，当加入氢氧化钠使 pH 达 7.4 时则完全溶解。此时也可用水合肼溶液配制，按其浓度稀释成 0.56mol/L，此时溶液呈碱性，可用浓硫酸调 pH 达 7.4 即可。

四、实验材料与仪器

发酵管、试管、烧杯（50mL）、刻度吸管（1mL、5mL）、漏斗、药物天平、恒温箱。

五、操作步骤

1. 取小烧杯 3 只，分别加入新鲜酵母 0.3g，并按表 1-1 分别加入各试剂，混匀。然后，将各杯混合物分别倒入编号相同的发酵管内，放入 37℃ 保温 1.5h，观察发酵管产生气泡的量有何不同？为什么？

表 1-1 发酵管试剂配比

杯号	5%葡萄糖 /mL	10%三氯醋酸 /mL	碘乙酸 /mL	硫酸肼 /mL	发酵时 气泡的量
1	10	2	1	1	
2	10	—	1	1	
3	10	—	—	—	

2. 把发酵管中发酵液倾倒入同号小烧杯中并在 2 和 3 号杯中按表 1-2 补加各试剂，摇匀放 10min 后和第一只烧杯中内容物一起分别过滤，取滤液进行测定。见表 1-2。

表 1-2 发酵管补加试剂

杯 号	10%三氯醋酸/mL	碘乙酸/mL	硫酸肼/mL
2	2	—	—
3	2	1	1

3. 取三个试管，分别加入上述滤液 0.5mL，并按表 1-3 加入试剂和处理。

表 1-3 试剂配比和处理方法

管号	滤液 /mL	0.75mol/L NaOH /mL	室温放置 10min	2,4-二硝 基苯肼/mL	38℃水浴保温 10min	0.75mol/L NaOH /mL	观察结果
1	0.5	0.5		0.5		3.5	
2	0.5	0.5		0.5		3.5	
3	0.5	0.5		0.5		3.5	

六、结果处理

哪一支试管发酵生成的气泡最多？哪一支管最少？哪一支管最后生成的颜色反应最深？哪一管最浅？为什么？

实验三

葡萄糖氧化酶法测定血清葡萄糖

一、实验目的

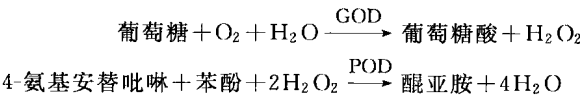
掌握葡萄糖氧化酶法测定血糖含量的原理和方法，学会取液器及紫外可见分光光度计的

使用。

二、实验原理

糖是组成人体的重要成分之一，也是能量的主要来源，血液中的葡萄糖称为血糖。血清葡萄糖测定用于诊断和监测糖类代谢紊乱及其治疗效果的评价。过去测定血糖多采用全血，但目前多采用血清或血浆。测定血糖的方法很多，可分为三大类：氧化还原法、缩合法和酶法。国际上推荐的参考方法是己糖激酶法，我国推荐的方法是葡萄糖氧化酶法。

在 pH7.0 条件下，葡萄糖氧化酶（GOD）可催化血样中葡萄糖氧化生成葡萄糖酸，并释放过氧化氢。后者在过氧化物酶（POD）的作用下与苯酚和 4-氨基安替吡啉氧化缩合为红色醌类化合物，在 505nm 处有最大吸收峰，标本中葡萄糖含量与吸光度成正比，可求得血样中葡萄糖含量。用本法测定葡萄糖具有高度特异性，是科研工作中常用的葡萄糖测定方法。随着试剂药盒的推广普及，此法已广泛应用于临床检测。



三、试剂

(1) 试剂一

磷酸盐缓冲液（pH7.0）	100mmol/L
过氧化物酶（POD）	1.0kU/L
苯酚	10mmol/L

(2) 试剂二

磷酸盐缓冲液（pH7.0）	100mmol/L
葡萄糖氧化酶（GOD）	15kU/L
4-氨基安替吡啉	0.5mmol/L

临用前将试剂一和试剂二按 2：1 的比例混合即成为工作试剂。

(3) 100mmol/L 葡萄糖标准贮存液 称取已干燥恒重的无水葡萄糖 1.802g，溶于 12mmol/L 苯甲酸溶液约 70mL 中，以 12mmol/L 苯甲酸溶液定容至 100mL。2h 以后方可使用。

(4) 5mmol/L 葡萄糖标准应用液 吸取葡萄糖标准贮存液 5.0mL 放于 100mL 容量瓶中，用 12mmol/L 苯甲酸溶液稀释至刻度，混匀。

四、实验材料与仪器

试管、移液管、722 型分光光度计、恒温水浴锅。

五、操作步骤

(1) 操作参数 波长 505nm；温度 37℃；测定模式为终点法。

(2) 操作流程 取试管 3 支，标明测定管（U）、标准管（S）、标本空白管（B），按表 1-4 操作。

表 1-4 血清葡萄糖测定

加入物/mL	空白管	标准管	测定管	加入物/mL	空白管	标准管	测定管
蒸馏水	0.01			血清			0.01
葡萄糖标准液		0.01		工作试剂	1.0	1.0	1.0

混匀，37℃ 水浴 15min，使用 722 型分光光度计在 505nm 波长下比色，以空白管调零，测定各管的吸光度。

六、结果处理

$$\text{血清葡萄糖}(\text{mmol/L}) = \frac{\text{测定管吸光度}}{\text{标准管吸光度}} \times \text{葡萄糖标准液浓度}(\text{mmol/L})$$

参考值：成人空腹血清葡萄糖浓度为 3.9~6.2mmol/L。

七、注意事项

1. 葡萄糖氧化酶对 β -D 葡萄糖高度特异，溶液中的葡萄糖约 36% 为 α 型，64% 为 β 型。葡萄糖的完全氧化需要 α 型到 β 型的变旋反应。国外某些商品葡萄糖氧化酶试剂盒含有葡萄糖变旋酶，可加速这一反应，但在终点法中，延长孵育时间可达到完成自发变旋过程。新配制的葡萄糖标准液主要是 α 型，故须放置 2h 以上（最好过夜），待变旋平衡后方可应用。

2. 葡萄糖氧化酶法可直接测定脑脊液葡萄糖含量，但不能直接测定尿液葡萄糖含量。因为尿液中尿酸等干扰物质浓度过高，可干扰过氧化物酶反应，造成结果假性偏低。

3. 测定标本以草酸钾-氟化钠为抗凝剂的血浆较好。取草酸钾 6g，氟化钠 4g。加水溶解至 100mL。吸取 0.1mL 到试管内，在 80℃ 以下烤干使用，可使 2~3mL 血液在 3~4d 内不凝固并抑制糖分解。

4. 本法用量甚微，操作中应直接加标本至试剂中，再吸试剂反复冲洗吸管，以保证结果可靠。

5. 分离血清要求使用未溶血样品，否则测定结果偏大。

6. 要求在 30min 内分离血清，糖酵解在全血中以 7% 每小时的速率进行。

7. 样本在 4~8℃ 可稳定 24h，样本放置时间过长会使结果偏低。

实验四

肾上腺素对血糖浓度的影响

一、实验目的

学习对家兔进行采血和注射方法，了解血糖浓度的测定方法，验证肾上腺素对血糖浓度的调节作用。

二、实验原理

血糖正常含量比较恒定，空腹血糖为 3.9~6.2mmol/L 这个量是维持各种生理活动所必需的。血糖含量的恒定是通过各方面的因素调节的，激素是调节血糖浓度恒定的重要因素，其中肾上腺素起升高血糖的作用。将实验动物家兔进行空腹采血后，注射肾上腺素，作用一段时间后再采血，同时观察注射激素前后的家兔血糖浓度变化，以验证激素的调节作用。

三、试剂

肾上腺素注射液 (1mg/mL)、葡萄糖溶液 (250g/L)、二甲苯及凡士林、肝素抗凝剂 (配成 2500 单位/mL)、葡萄糖氧化酶试剂、葡萄糖标准应用液 (6.5mmol/L)。

四、实验材料与仪器

1mL 及 10mL 注射器、台式磅秤、兔固定箱、刀片、酒精棉球及干棉球、试管及试管架、0.5mL 及 5mL 吸管、滴管、水浴锅。