

高等學校教學用書

動物生物化學  
實驗指導

Н. П. МЕШКОВА, С. Е. СЕВЕРИН 著  
四川醫學院生物化學教研組譯

高等教育出版社

高等學校教學用書



# 動物生物化學實驗指導

H. II. 梅什科娃, C. E. 謝維林著  
四川醫學院生物化學教研組譯

高等教育出版社

本書係根據蘇聯“蘇維埃科學”出版社（Государственное издательство “Советская наука”）出版的梅什科娃（Н. П. Мешкова）和謝維林（С. Е. Северин）合著的“動物生物化學實驗指導”（Практикум по биохимии животных）一書 1950 年版譯出。原書經蘇聯高等教育部審定為國立大學用教學參考書。

全書共分五章，內容主要為新陳代謝的實驗，並包括了有關製劑的製備及各種測定的方法，本書可做生物系動物生物化學專門化的大實驗或醫學院、農學院、獸醫學院高級生物化學課程的實驗教材，也可做生理、生化及其他生物科學研究工作者和教師的參考用書。

參加本書翻譯和校訂工作的有四川醫學院生物化學教研組張傳麟、孫芝琳、劉宗定、姚鳴春、王中樞、侯助存、徐仲呂、張玉鈿、藍天鶴、盧文筠等十位同志。

## 動物生物化學實驗指導

書號 309(譯 283)

梅什科娃，謝維林著

四川醫學院生物化學教研組譯

高等教育出版社出版

北京琉璃廠一七〇號

（北京市書刊出版業營業許可證出字第〇五四號）

新華書店總經理

京華印書局印刷

北京南新華街甲三七號

開本 850 × 1168<sup>1</sup>/<sub>32</sub> 印張 9<sup>5</sup>/<sub>8</sub> 字數 255,000

一九五五年五月北京第一版 印數 1—3,500

一九五五年五月北京第一次印刷 定價(7) ¥1.22

## 序 言

在提供給讀者的這本實習指導中，著者曾力求將國立莫斯科大學動物生物化學教研組對四年級學生作業的佈置和進行的某些經驗總結出來。可是，遠非近十年來學生所有的全部工作皆已敘述於本書中，因為，一方面不符合於教學的需要；另一方面本書預定的篇幅亦有限。

四年級生物化學實驗的基本任務乃是：訓練學生能確切地概括出研究的目的，選擇實驗的條件，綜合及製備必需的製劑，掌握研究的方法，最後並進行實驗。四年級學生的每一實驗皆應為小小的科學研究工作。其特點是實驗的結果早已預知。因此對實驗的佈置和實施是否正確便可以進行檢查。本書第一章內所述的實驗就是這類的研究工作。其中有測定蛋白水解酶的活性，醣類磷酸化合物的酶促反應，以及氨基酸的脫氨基作用與氨基移換作用的過程等等實驗。

要進行第一章內所列舉的那些實驗，還必需有一系列的基質，其中包括有，比如說，各種酮酸（丙酮酸、草醯醋酸、酮戊二酸）或各種磷酸化合物（醣類磷酸酯及其分解產物、腺苷酸體系內各物質、磷酸肌酸等等）。

大實驗的任務還要使一個學生在求學時代，便着手獨立製備實驗中所必需的化合物，以便將來不致因進行實驗所需物品的缺乏而阻礙了生物化學的研究工作。

第二第三兩章的內容為敘述進行第一章內實驗所需各物品的製備方法。這裏敘述了分離與合成各種化合物的方法。

最後，進行實驗尚必需掌握研究工作中的分析方法。其中有些已敘述於本書第四章內。至於學生在小實驗中已熟知的那些分析方法，如測定無機物、還原物及尿素等，則未曾列入。

在學生獨立製備實驗所必需的物品，獨立探求相當的研究方法，以及以後獨立進行生物化學的實驗的情況下，進行大實驗所獲得的經驗，據著者看來，是極其有價值的。學生們經常總是對實驗極有興趣，他們由實驗室的獨立工作而獲得經驗。並從實際工作中熟悉如何分析與評判所得的結果。

在本書中所敘述的全部實驗，皆曾經學生反覆試驗過，其實現的真實性可無問題。

如以上所述，在這本書內只敘述了某些實驗和少數化合物的製備方法，由於本書所選的材料中缺少一些重要的示範工作，這難免不引起若干應得的責難。著者希望以後能夠出版本書之第二部分，其中將對第一部分加以補充，並有適合於作動物生物化學專門化學生實驗室作業所用的材料。

於文獻索引中，僅列入了在編纂本書時引用較為廣泛的那些書籍的名稱，著者認為在本書中沒有必要去引證原文，因為在編寫實驗教程時，照例為了適合於實驗工作，對原文中的材料不得不有所更改。

在編寫本實驗時於“組織的呼吸”與“血內的氣體”兩章內，著者曾採用本教研組 A. B. 高盧勃佐夫副教授好意所提供的個人實驗方法和材料，對 A. B. 高盧勃佐夫友好的幫助，著者衷心地致以謝忱。

無疑地，本書尚有許多缺點。對一切指正和批評，著者皆將懷着深切的謝意予以接受。

H. 梅什科娃，C. 謝維林。

# 目 錄

序言 .....	1
第一章 組織代謝過程的研究 .....	1
I. 蛋白分解酶作用的研究 .....	1
1. 組織中蛋白分解酶活性的測定 .....	1
2. 多肽酶作用的研究 .....	8
II. 氨基酸的酶促合成 .....	7
1. 由氨與酮酸酶促合成氨基酸 .....	7
2. 氨基移換過程的研究 .....	12
III. 酯的磷酸化合物酶促變化的研究 .....	17
1. 磷酸化酶作用的研究 .....	17
2. 6-磷酸葡萄糖的酶促合成 .....	21
3. 二磷酸果糖的酶促合成 .....	24
4. 二磷酸果糖的酶促分解 .....	27
5. 磷酸甘油酸的酶促合成 .....	30
IV. 磷酸移換酶作用的研究 .....	33
1. 磷酸甘油酸的變化 .....	33
2. 肌肉提取液中磷酸肌酸的酶促合成與分解 .....	37
V. 肌凝蛋白的三磷酸腺苷酶活性的研究 .....	43
VI. 組織的呼吸 .....	48
1. 氧的吸收 .....	48
2. $d$ -丙- $\alpha$ -氨基酸的氧化脫氨基作用 .....	54
3. 氧化磷酸化作用 .....	57
4. 組織呼吸係數的測定 .....	60
5. 草酰醋酸對組織吸收氧氣、形成二氧化碳及呼吸係數的影響 .....	68
6. 琥珀酸對組織吸收氧氣、形成二氧化碳及呼吸係數的影響 .....	70
VII. 組織內醣酵解作用的研究(測壓法) .....	70

VIII. 血液內的氣體 .....	75
1. 氧結合曲線 .....	76
2. 血內氧含量及血液對氧的飽和度的測定 .....	89
3. 二氧化碳結合曲線 .....	90
4. 用氣量法測定血液氫離子濃度( $P_H$ ) .....	92
5. 血內氣體的全部分析 .....	94
第二章 個別製劑的合成 .....	98
I. 以合成法製備磷酸肌酸 .....	98
II. 丙酮酸的合成 .....	100
III. 草醯醋酸的合成 .....	103
1. 草醯二乙酯的合成 .....	103
2. 草醯醋酸酯鈉衍生物的合成 .....	104
3. 草醯醋酸的製備 .....	107
IV. 以合成法製備 $\alpha$ -酮戊二酸 .....	108
1. 琥珀酸二乙酯的合成 .....	109
2. 乙醇鈉的製備 .....	110
3. $\alpha$ -酮戊二酸的合成 .....	113
V. 氯代乙醯胺的合成 .....	115
1. 鹽酸酪氨酸乙酯的合成 .....	115
2. 氯化氯代乙醯的合成 .....	119
3. 氯代乙醯酪氨酸乙酯的合成 .....	120
4. 從氯代乙醯酪氨酸酯製備氯代乙醯酪氨酸 .....	122
VI. 甘氨酸甘氨酸的合成 .....	122
1. 一氯醋酸的合成 .....	122
2. 甘氨酸的合成 .....	124
3. 鹽酸甘氨酸酯的合成 .....	125
4. 甘氨酸酐的製備 .....	126
5. 甘氨酸甘氨酸的製備 .....	127
VII. 以合成法製備 $\beta$ -丙氨酸 .....	127
1. 琥珀醯亞胺的合成 .....	128

2. $\beta$ -丙氨酸的合成 .....	180
VIII. 水楊醛的合成 .....	182
IX. 一溴醋酸合成 .....	186
<b>第三章 某些化合物的製備</b> .....	<b>188</b>
I. 三磷酸腺苷(ATP)的分離 .....	188
II. 從 ATP 製備磷酸腺苷 .....	142
III. 肌肉組織中的含氮提取物 .....	144
1. 從牛、羊肌肉中分離肌肽 .....	145
2. 鵝肌肽的分離 .....	150
3. 肌酸的分離 .....	154
IV. 穀氨酸的分離 .....	156
V. 肝醣的分離 .....	158
VI. 膽汁酸 .....	159
1. 從膽汁中分離甘氨酸 .....	160
2. 從膽汁中製備膽酸 .....	161
<b>第四章 定量測定的一些方法</b> .....	<b>168</b>
I. 含氮部分的測定法 .....	168
1. 總氮量的測定法 .....	163
2. 蛋白氮的測定法 .....	166
3. 剩餘氮的測定法 .....	167
4. 用氣量法測定氨基酸 .....	168
5. 二羧基氨基酸的測定法 .....	175
6. 氮的等溫蒸餾測定法 .....	176
II. 各種含磷化合物測定的方法 .....	179
1. 原有無機磷的測定法 .....	179
2. 磷酸肌酸的測定法 .....	181
3. 三磷酸腺苷(ATP)的測定 .....	182
4. 磷酸丙酮酸的測定法 .....	184
5. 磷酸丙醯的測定法 .....	185



6. 二磷酸果糖的測定法	186
7. 總磷量的測定法	188
III. 丙酮酸的測定法	189
IV. 乳酸的測定法	192
V. 醱醣的定量測定法	198
VI. 用氣量法測定混合氣體內 $O_2$ 及 $CO_2$ 的含量	200
VII. 血液內氣體的測定方法	206
VIII. 測壓法測定細胞與組織的代謝	228
IX. 比色測定法	248
X. 緩衝溶液的製備	251
XI. 氫離子濃度測定法	254
1. 氫離子濃度的比色測定法	254
2. 氫離子濃度的電測法	258
XII. 用冰點降低法對總滲透濃度的測定	272

## 第五章 附表

表 1. 某些元素的原子量	275
表 2. 各種溫度時水銀的密度	275
表 3. 硝酸溶液的比重和濃度	276
表 4. 鹽酸溶液的比重和濃度	276
表 5. 硫酸溶液的比重和濃度	276
表 6. 氫氧化銨溶液的比重和濃度	277
表 7. 苛性鉀溶液的比重和濃度	277
表 8. 苛性鈉溶液的比重和濃度	278
表 9. 乙醇水溶液的比重	278
表10. 飽和水蒸汽壓	279
表11. 不同溫度時各種氣體在水中的溶解度係數	279
表12. 在 $38^\circ C$ 時幾種氣體的溶解度係數	279
表13. 按文·司來克法計算血液內 $CO_2$ 含量的因數	280
表14. 按文·司來克法計算血液內 $O_2$ , $CO$ 及 $N_2$ 含量的因數	281

---

表15. 計算小反應瓶體積的係數 .....	282
表16. 乙醇的用水稀釋法 (15.6°C時) .....	283
表17. 在水上收集的1毫升氮的重量(毫克) .....	284
表18. 應用於酸鹼滴定和比色測定的 $P_H$ 指示劑.....	288
表19. 試紙 .....	288
表20. 四位對數表(以10為底).....	290

# 第一章 組織代謝過程的研究

## 1. 蛋白分解酶作用的研究

高分子蛋白質及其分解產物在蛋白分解酶的作用下即發生分解。蛋白分解酶類可以再分為：分解蛋白質的，和分解它的分解產物——多肽——的兩種酶類。前者稱為蛋白質分解酶，後者稱為肽酶或多肽酶。蛋白質分解酶及多肽酶都廣泛地存在於動植物組織及微生物中。

### 1. 組織中蛋白分解酶活性的測定

蛋白分解酶存在於動物消化道中（如胃蛋白酶、胰蛋白酶）及其他組織中。動物組織的蛋白分解酶稱為組織分解酶（катепсин），不同組織的組織分解酶具有完全不同的活性：實質器官——肝、腎、脾——的組織分解酶的活性最強，而肌肉組織分解酶的活性則較弱。在微酸性環境—— $P_H=4-5$ 中，組織分解酶的作用最強，在中性環境中其作用甚微。

#### 自溶過程強度的測定

當動物死後，組織的分解過程稱為自溶作用。組織蛋白的自溶作用是由於組織分解酶所引起的。在活組織內，環境近於中性，故蛋白分解酶不發生作用。但當死後組織變酸時，蛋白分解酶即顯出作用。組織變酸係由於乳酸及其他酸類的積聚。自溶作用在實質器官中進行得最快。死後蛋白分解作用的強度可由組織經過一定時間保溫後，殘餘氮（譯註——即非蛋白氮）及氨基氮量的增加來測定。

試劑：

1. 醋酸-磷酸鹽緩衝溶液： $P_H=4.0$  及  $7.0$ （製備方法參看 253

(1)

頁)。

2. 三氯醋酸——20% 溶液。
3. 測定殘餘氮的試劑(參看 167 頁)。
4. 測定氨基氮的試劑(參看 168 頁)。

### 操 作

置肌肉、肝或腎等組織的糜於  $P_H=4.0$  及  $7.0$  的緩衝液中。因為這些溶液的緩衝作用經常是在  $P_H 4.0$  及  $7.0$  之間，爲了使所有樣品中鹽的成分相同，所以製備  $P_H=4.0$  及  $7.0$  的兩種溶液時就不可以用緩衝混合物中之任何一種，而用醋酸—磷酸鹽混合的緩衝液(參看 253 頁)。

將剛殺死的動物的組織仔細地剪碎，置於小紙碟中(參看 49—50 頁)，於扭力天平或藥房用天秤上稱取數份，每份 0.5 克，分別置於盛有緩衝液之小錐形瓶中。

樣 品 號 碼	樣 品 組 成			
	緩 衝 液		組 織	備 註
	$P_H=4.0$	$P_H=7.0$		
	毫 升	毫 升		
1	8.0	—	肝(腎)	在樣品 1 及 5 中，當組織放入之前，先加 2 毫升三氯醋酸。
2	8.0	—	肝(腎)	
3	—	8.0	肝(腎)	
4	8.0	—	肌肉組織	
5	—	8.0	肌肉組織	
6	—	8.0	肌肉組織	

小心將各錐形瓶內樣品混勻，並用塞子塞妥，然後將第 2、第 3、第 4 及第 6 號樣品置於  $37^{\circ}\text{C}$  恆溫器中，經 5—6 小時後取出，各加 2 毫升三氯醋酸，混勻，30 分鐘後過濾。測定濾液中之殘餘氮(參看 167 頁)及氨基氮(參看 168 頁)。在保溫前後，樣品中殘餘氮及氨基氮量

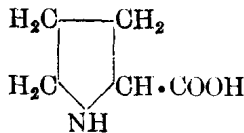
的差數能够表示不同組織在不同環境中自溶作用的強度。一般來說，實質組織在酸性環境中 ( $P_H=4-5$ ) 的自溶作用較在中性環境中要大 5—10 倍。肌肉組織的自溶作用，甚至於在酸性環境中亦甚微弱。而在中性環境中，則無自溶作用。茲引證實驗結果為例。500 毫克肌肉組織在  $37^\circ\text{C}$  時經 5 小時保溫後：

實 驗 條 件	殘餘氮(毫克)			氨基氮(毫克)		
	保 溫		增加量	保 溫		增加量
	前	後		前	後	
肝組織 $P_H=5.0$ .....	1.53	2.66	1.13	1.17	2.37	1.20
肝組織 $P_H=7.0$ .....	1.51	1.61	0.10	1.25	1.51	0.26
肌肉組織 $P_H=5.0$ .....	2.17	2.50	0.33	0.56	0.80	0.24
肌肉組織 $P_H=7.0$ .....	2.17	2.30	0.13	0.56	0.60	0.04

## 2. 多肽酶作用的研究

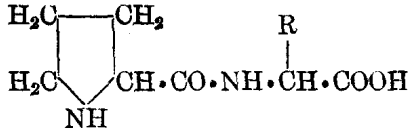
多肽酶是能够分解蛋白質的中間產物及人工合成的多肽的那些酶類，至於分解多肽的酶類，又可再分為二肽酶類、氨基多肽酶類、羧基多肽酶類、脯羧酶(пролиназы)及脯氨酸酶(пролидазы)。

在二肽酶中又包括許多酶。這些酶的基質是由天然的 *l*-氨基酸構成的二肽，其中的氨基、羧基、以及肽鍵上的氫都是未被置換的。作用於含有自由氨基的多肽的酶則屬於氨基多肽酶類。若氨基上一個氫原子被置換(例如甲基丙氨酸醯胺甘氨酸)，氨基多肽酶仍有分解此肽鍵的作用。若氨基上兩個氫原子都被置換，就不再能被這些酶所分解了。羧基多肽酶能分解含有自由羧基的肽鍵。脯羧酶及脯氨酸酶的作用，可用含有脯啉：

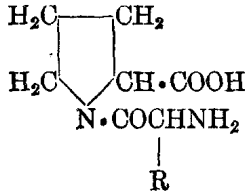


的肽鍵為例說明之。

能分解那些由脯氨酸的羧基與其他氨基酸的氨基所形成的肽鍵的酶稱為脯羧肽酶：



分解由脯氨酸的氨基與其他氨基酸的羧基所形成的肽鍵的酶稱為脯氨酸肽酶：

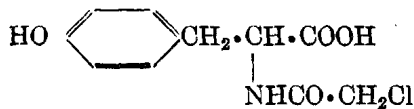


多肽酶廣泛地存在於動物組織、植物組織及微生物界中。

### 多肽酶作用的特異性的測定

#### 原理

肽酶作用的特異性可以用小腸黏膜的甘油浸出液及胰腺甘油浸出液中的二肽酶及羧基多肽酶為例來說明。小腸黏膜中實際上不含羧基多肽酶而胰腺中則不含二肽酶。二肽——甘氨酸甘氨酸及氯代乙酰酪氨酸可作為這兩種酶的基質。氯代乙酰酪氨酸，這個人工合成的製劑雖非肽類，但其結構中有肽鍵且其自由羧基是在 *l*-氨酸——酪氨酸上：



因此，和天然肽類相似的氯代乙酰酪氨酸，便能被羧基多肽酶分解。至於甘氨酸甘氨酸及氯代乙酰酪氨酸是否分解，可以用保溫後氨基的增加來判斷。

試劑：

1.  $P_H=7.4$  磷酸鹽緩衝液，加 20 毫升  $0.1N$   $HCl$  於 40 毫升  $1/4M$   $Na_2HPO_4$  溶液中，然後加水至 100 毫升。
2. 甘氨酸甘氨酸溶液<sup>①</sup>，每毫升中含量約 5 毫克。
3. 氯代乙酰酪氨酸溶液<sup>②</sup> 用鹼中和到  $P_H=7.4$ ，1 毫升中含量為 10 毫克。
4. 甘油——87% 水溶液。
5. 三氯醋酸——20% 溶液。
6. 測定氨基氮的試劑(參看 168 頁)。

### 操 作

二肽酶及羧基多肽酶的溶液要先準備好。

二肽酶溶液的製備：將鼠、兔、或狗的小腸中部剪成小段，長約 5—7 厘米置於玻片上而沿縱向剖開，這樣就使腸的內面一層在切開後向着上面。用蒸餾水洗腸的表面並用外科刀背刮下腸表面的黏膜層，取下黏膜(10 毫克)置於乳鉢中，加 50 毫升 87% 甘油液，仔細將其磨碎後，轉置於錐形瓶內，於室溫中靜置一晝夜，然後用兩層紗布過濾。

羧基多肽酶溶液的製備：將兔<sup>③</sup>、狗或貓的胰腺置於乳鉢中，加 5 倍其量之 87% 甘油液及砂，仔細將其磨碎，然後全部轉置於錐形瓶中，於室溫下靜置一晝夜後，再用兩層紗布過濾。

測定肽酶作用特異性的實驗可照下表安排：

在第 1、3、5 號樣品中，於加酶液之前先加 2 毫升三氯醋酸，將各錐形瓶內容物仔細搖勻，且用軟木塞塞妥，將第 2、4、6、7、8 及 9 各號樣品置於  $37^{\circ}C$  恆溫器中 6 小時<sup>④</sup>，然後取出，各加 2 毫升三氯醋酸並濾去蛋白沉澱。

① 合成法參看 123 頁。

② 合成法參看 121 頁

③ 齧齒類動物的胰腺沿十二指腸成葡萄串狀分佈。

④ 如將樣品留置恆溫器中超過 6 小時，就必須於每瓶中加入 2—3 毫升甲苯，以防止細菌的作用。

樣品號碼	樣品組成				
	甘氨酸 甘氨酸溶液	氯代乙酰 酪氨酸溶液	酶溶液		緩衝液
			二肽酶 (腸黏膜)	羧基多肽酶 (胰腺)	
毫升	毫升	毫升	毫升	毫升	
1	2	—	1	—	5
2	2	—	1	—	5
3	—	2	1	—	5
4	—	2	1	—	5
5	—	—	1	—	7
6	—	—	1	—	7
7	2	—	—	1	5
8	—	2	—	1	5
9	—	—	—	1	7

測定濾液中的氨基氮(參看 168 頁)然後計算甘氨酸甘氨酸和氯代乙酰酪氨酸分解的百分率。

茲引用一次實驗結果及計算實例如下:

樣品號碼	加入物	實驗條件	氨基氮增加量(毫克)
來自腸黏膜的樣品			
1	甘氨酸甘氨酸	保溫 前	1.7
2	甘氨酸甘氨酸	保溫 後	2.7
3	氯代乙酰酪氨酸	保溫 前	0.9*
4	氯代乙酰酪氨酸	保溫 後	1.5
5	無基質	保溫 前	0.8*
6	無基質	保溫 後	1.1
來自胰腺的樣品			
7	甘氨酸甘氨酸	保溫 後	1.4
8	氯代乙酰酪氨酸	保溫 後	1.3
9	無基質	保溫 後	0.4

\* 在第 3 及第 5 號樣品中,實際上氨基氮應該相等,因氯代乙酰酪氨酸無自由的氨基。



常用腸提取物保溫時發現：

1. 在保溫前的樣品中：甘氨酸甘氨酸的氨基氮等於  $1.7 - 0.8 = 0.9$  毫克。

2. 在保溫後的樣品中：甘氨酸甘氨酸及其分解產物部分的氨基氮等於  $2.7 - 1.1 = 1.6$  毫克。

3. 在保溫後的樣品中：氯代乙醯酪氨酸分解產物部分的氨基氮等於  $1.5 - 1.1 = 0.4$  毫克。

4. 甘氨酸甘氨酸在腸黏膜酶作用下分解的百分率等於  $\frac{1.6 - 0.9}{0.9} \times 100 = 77\%$ 。

5. 氯代乙醯酪氨酸在腸黏膜酶作用下分解的百分率等於  $\frac{0.4}{1.09} \times 100 = 37\%$ 。

1.09 是氯代乙醯酪氨酸氮的毫克數，按所用樣品重量計算其中含有 20 毫克氯代乙醯酪氨酸（2 毫升溶液，1 毫升中含 10 毫克）或氮  $\frac{14 \cdot 20}{257} = 1.09$  毫克；257 是氯代乙醯酪氨酸的分子量。

常用胰腺提取物保溫時發現：

1. 保溫後樣品中：甘氨酸甘氨酸及其分解產物部分的氨基氮等於  $1.4 - 0.4 = 1.0$  毫克。

2. 在保溫後樣品中：氯代乙醯酪氨酸及其分解產物部分的氨基氮等於  $1.3 - 0.4 = 0.9$  毫克。

3. 甘氨酸甘氨酸在胰腺酶作用下的分解百分率等於  $\frac{1.0 - 0.9}{0.9} \times 100 = 11\%$ 。

4. 氯代乙醯酪氨酸在胰腺酶作用下的分解百分率等於  $\frac{0.9}{1.09} \times 100 = 82\%$ 。

## II. 氨基酸的酶促合成

### 1. 由氨與酮酸酶促合成氨基酸

將腎組織的切片放在含有丙酮酸與碳酸銨的生理鹽溶液中保溫，