

生物化学实验

北京大学生物学系
1979.7.

目 录

一、生物化学实验室规则	1
二、实验	2
糖的化学	3
实验一 糖的颜色反应	3
实验二 糖的还原性的检验	5
实验三 低聚糖和差糖的水解	9
脂肪的化学	11
实验四 中性脂肪的组成	11
实验五 脂肪的不饱和脂肪酸	14
蛋白质的化学	15
实验六 蛋白质与氨基酸的呈色反应	15
实验七 蛋白质的沉淀反应	19
实验八 蛋白质的两性反应和等电点的测定	24
核酸的化学	28
实验九 脱氧核糖核酸的水解及其组成	28
成分的测定	28
酶	29
实验十 酶的特异性	30
实验十一 酶的激活剂与抑制剂	32
实验十二 温度对酶活性的影响	32
实验十三 pH对酶活性的影响	35
实验十四 小麦萌发前后淀粉酶活性的比较	37
实验十五 脂肪酶分解脂肪的作用	38

生物氧化	-----	40
实验十六	脱氢酶的显现	-----40
实验十七	黄素蛋白酶的定性实验	-----41
实验十八	细胞色素体系的定性反应	-----43
实验十九	末端氧化酶的显现	-----46
实验二十	过氧化物酶的定性反应	-----47
实验二十一	过氧化物酶的定性反应	-----48
组织代谢	-----	50
实验二十二	肌糖元的酵解作用	-----50
实验二十三	发酵过程中无机磷的作用	-----53
实验二十四	脂肪转化为糖的定性实验	-----56
实验二十五	氨基转换反应的定性实验	-----58
三、附注：试剂的配制	-----	60

一、生物化学实验室规则

(一) 纪律：每个学员都应该自觉地遵守课堂纪律，维护课堂秩序，严肃认真地按操作规程进行实验。

(二) 预习：为了提高独立地分析问题、解决问题的能力，实验前必须认真预习，熟悉本次实验的目的、原理、操作步骤，懂得每一操作步骤的意义和了解所用仪器的使用方法。通过必要的检查和讨论，只有弄懂后才能开始实验。

(三) 实验和报告：实验时，按实验要求认真操作，并把实验结果和数据及时记录在实验记录本上，文字要简单、准确。完成实验后，经教员检查同意，方可离开实验室。课后应写出简要的报告，说明和分析实验结果，由课代表及时收齐交给教员。

(四) 整洁：环境和仪器的整洁整齐是搞好实验的重要条件。实验台面、试剂药品架上必须保持整洁，仪器药品要井然有序。公用试剂用毕应立即盖严放回原处。勿使试剂药品洒在实验台面和地上。实验完毕，须将药品试剂排列整齐，仪器要洗净倒置放好，将实验台面抹干净，经教员验收仪器后，方可离开实验室。

(五) 厉行节约：使用仪器、药品、试剂和各种物品必须注意节约，不要使用过量的药品和试剂。不要将滤纸和称量纸做其他用途。使用和洗涤仪器时，应小心仔细，防止仪器损坏。使用贵重精密仪器时，应严格遵守操作规程，发现故障应立即报告教员，不要自己动手检修。要爱护国家财产，厉行节约。

(六) 安全：实验室内严禁吸烟！煤气灯应随时随关，必须

~ 2 ~

严格做到：人在火在，人走火灭。乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热，并要远离热源操作和放置。实验完毕，应立即关好煤气门和水龙头，拉下电闸，各种玻璃器皿应放置稳妥，离开实验室以后应认真负责地进行检查，严防安全事故。

(七)：废物处理：废弃液体可倒入水槽内，同时放水冲走，强酸强碱溶液必须先用水稀释。废纸、火柴头及其他固体废物和带有渣滓沉淀的废物都应倒入废品缸内，不能倒入水槽或到外乱扔。

(八)：报损：仪器损坏时，应及时向教员报告，认真填写损坏仪器登记表，然后补领。

(九)：值日：每次实验课要有值日生，由班主任负责安排，轮流值日。值日生的职责是负责当天实验室的卫生、安全和一些服务性的工作。

(十)：实验室内一切物品，未经本室负责教员批准，严禁携出室外，借物必须办理登记手续。

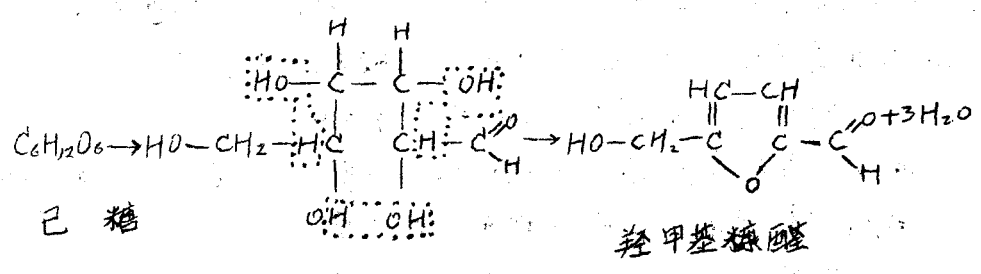
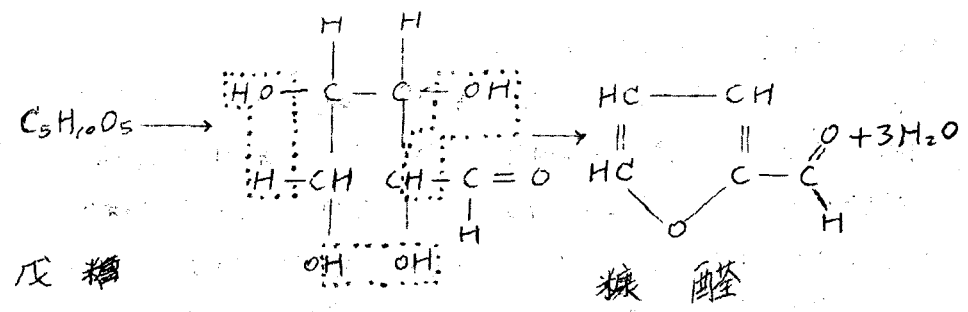
糖的化学

糖是自然界分布最广的有机化合物。在植物组织中，其含量可达干重的80%。在动物及人体组织中含量较少，约占干重的2%。糖为生命活动的主要能源来源。

糖也叫做碳水化合物。按其他化学结构，糖是多元醇的醛或酮及其衍生物。如葡萄糖为醛糖、果糖为酮糖。通常根据分子中单糖的数目把糖分为单糖、低聚糖和多糖三类。单糖与低聚糖都是晶体，能溶于水，有甜味。多糖是非晶体，绝大多数不溶于水，无甜味。

实验一 糖的颜色反应

原理：糖经浓无机酸处理，脱水产生糠醛或糠醛衍生物。通常使用的无机酸为硫酸。如用盐酸，则必须加热。



~ 4 ~

这些糖醛和糠醛衍生物在双无机酸作用下，能与酚类化合物缩合生成有色物质。常用的酚类有 α -萘酚（鉴定糖类）、间苯二酚（区别酮糖和醛糖）、甲基苯二酚（检验戊糖）和间苯三酚（检验戊糖）等。

器材：试液：试液架、水浴锅。

试剂：(1) 2% 葡萄糖溶液；(2) 2% 果糖溶液；(3) 2% 阿拉伯糖溶液；(4) 2% 麦芽糖溶液；(5) 2% 蔗糖溶液；(6) 1% 淀粉溶液；(7) 梨汁；(8) 丙酮；(9) 浓硫酸；(10) α -萘酚试剂^[1]；(11) 间苯二酚试剂^[2]。

一、 α -萘酚反应 (Molisch 反应)

糖类经浓硫酸脱水生成糠醛或其衍生物。后者与 α -萘酚结合生成紫红色物质。在糖溶液与浓硫酸两液面间亦现紫环，故又叫紫环反应。自由存在的糖和结合存在的糖均呈阳性反应。此外，丙酮、果酸、乳酸、葡萄糖醛酸、各种糠醛衍生物等皆呈颜色近似的阳性反应。因此，阴性反应证明没有糖类物质存在，而阳性反应，则只说明有糖存在的可能，需要进一步作其他糖的定性试验才能肯定。

操作：取八支试液，标号后，分别加入2%葡萄糖、果糖、阿拉伯糖、蔗糖、麦芽糖、1%淀粉、梨汁、丙酮各1毫升，再各加入 α -萘酚试剂2滴，混匀。将试液倾斜，沿液壁缓慢加入浓硫酸约1毫升。硫酸液与糖溶液清楚地分为两层。注意观察两液面间紫色环的出现。如做分钟内无颜色变化，可在水浴中加热几分钟。记录各液出现颜色的先后次序。

二、间苯二酚反应 (Seliwanoff 反应)

该反应是检验酮糖的特殊反应。在酸的作用下，己酮糖脱水生成羟甲基糠醛。后者与间苯二酚结合成鲜红色的物质，反应迅速，约需20—30秒。在同样条件下，醛糖形成羟甲基

糠醛化物。只有在糖浓度较低时，或煮沸时间较长时，才给出微弱弱阳性反应。蔗糖被盐酸水解生成果糖也能给出阳性反应。

操作：取试管4支，编号，各加入间苯二酚试剂10滴。再依次加入果糖、葡萄糖、蔗糖及阿拉伯糖各1滴，混匀。将4支试管放入沸水浴中，注意记录各管首先出现颜色的时间。继续煮沸15分钟，每隔5分钟观察一次，记录各管颜色变化和有无沉淀。

实验二 糖的还原性的检验

原理：含有自由醛基（ $-CHO$ ）或酮基（ $>C=O$ ）的单糖和双糖叫还原糖。还原糖能将金属离子（铜、铋、汞、银等）还原，糖本身被氧化成酸类化合物。此性质常用于检验糖的还原性，并且常成为测定还原糖含量的各种方法的依据。

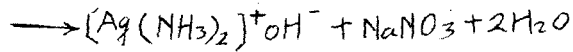
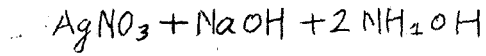
器材：试管、试管架、竹试管夹、水浴锅。

试剂：(1) 2% 葡萄糖溶液；(2) 2% 果糖溶液；(3) 2% 阿拉伯糖溶液；(4) 2% 麦芽糖溶液；(5) 2% 蔗糖溶液；(6) 1% 淀粉溶液；(7) 乙醛；(8) 丙酮；(9) 3N 氢氧化钠溶液；(10) 5% 硝酸银溶液；(11) 1N 氢氧化铵；(12) 斐林试剂；(13) 试剂A和试剂B；(13) 本尼迪克特试剂。

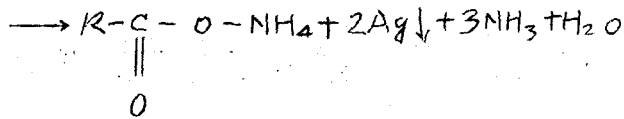
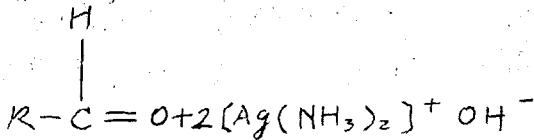
(一) 与土伦 (Tollen) 试剂的反应

土伦试剂是由 $AgNO_3$ 与 NH_4OH 配合成的银铵络离子溶液。即配合氢氧化银溶液。它是一种温和的氧化剂。在一般条件下可以使醛（包括脂肪醛、芳香醛）和醛糖以及酮糖发生氧化生成相同碳原子的酸，而酮不被氧化。被还原的金属银附着在试管壁上像镜子一样，因此该反应又称银镜反应。

~ 6 ~



羰基氧化银



操作：取4支洗净的试管，各加入1毫升5%硝酸银溶液和1滴3N氢氧化钠溶液，混匀后再逐滴加入1N氢氧化铵，边不断摇动，直到生成的氧化银沉淀恰好溶解为止（过多的氢氧化铵会降低土伦试剂的灵敏度！）。

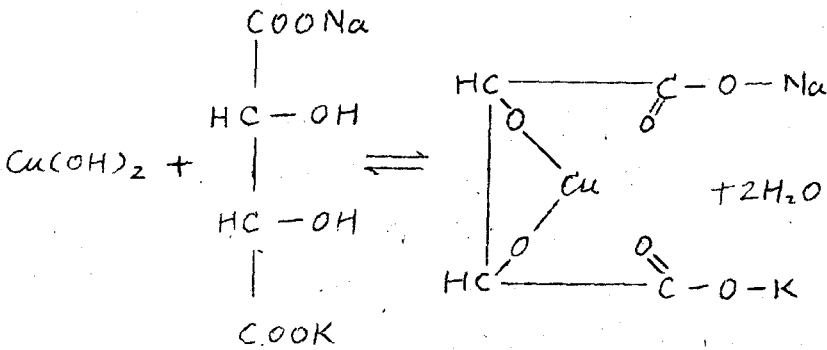
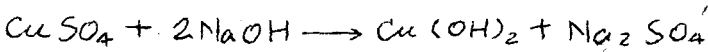
将已配好溶液的4支试管编号，甲管内加入两滴乙醛乙管内加入两滴2%葡萄糖溶液，丙管内加入两滴丙酮，丁管内加入两滴2%果糖溶液。各自摇匀后，在室温下放置几分钟。如果试管壁上没有银镜生成，可再放入水浴中稍热几分钟（加热时间不可过久！），观察各管有无银镜生成。

注意：土伦试剂放置久了会析出黑色的氮化银（ Ag_3N ）沉淀，干的氮化银受震动易分解发生爆炸。另外，加热时间过长、氨水加的过量或用直接火加热，都会生成易爆炸的雷酸银（ $\text{AgC}_2\text{N}_2\text{O}_2$ ）。所以，该试剂一定要临时配制。在反应完毕以后，立即将试管洗净，若放置较久，应当用1:1的硝酸

分解后，再用水才能洗净。

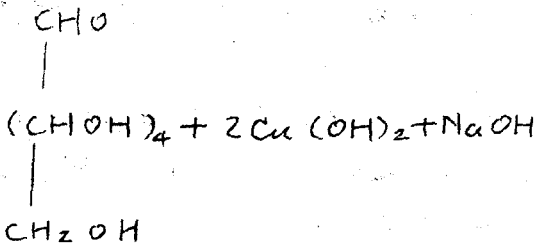
(二) 与费林 (Fehling) 试剂的反应

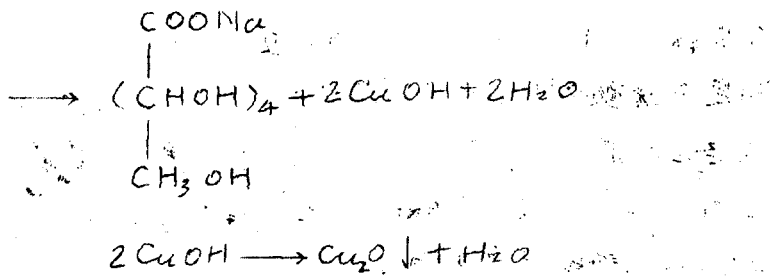
费林试剂是含硫酸铜与酒石酸钾钠的络合物的溶液。与酒石酸钾钠形成络合状态的 Cu^{++} 可以对还原糖和脂肪醛氧化成相应的酸类化合物， Cu^{++} 被还原成砖红色的氧化亚铜沉淀。费林试剂是比土伦试剂更强的氧化剂。



酒石酸钾钠络合铜离子

酒石酸钾钠络合铜离子是可溶性的络离子，该反应是可逆的，平衡后，溶液内有一定浓度的络合铜。





糖在试剂所含有的碱的作用下，不仅发生烯醇化、异构化等作用，也能发生糖分子的分解、氧化、还原或多聚作用等。由这些作用所形成的复杂混合物具有强烈的还原作用，也能使金属离子还原。因此，企图用简单的氧化还原作用来写出其反应平衡式是不可能的。

操作：取6支试管，各加入1毫升费林试剂A和1毫升费林试剂B。混匀后，分别加入2%葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、阿拉伯糖、1%淀粉溶液和梨汁各4滴，放入沸水浴中加热2—3分钟后，取出冷却。注意观察各管内溶液颜色的变化，以及是否有红色沉淀的生成。

(三) 与本尼迪克特 (Benedict) 试剂的反应：

本尼迪克特试剂是含硫酸铜和柠檬酸钠的碳酸钠溶液。它是费林试剂的改良。它用柠檬酸钠作为 Cu^{++} 的络合剂，碱性也比费林试剂弱，同时只需要一种溶液，所以在实际应用上有更多优点。

操作：取6支试管，各加入2毫升本尼迪克特试剂，再分别加入2%葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、阿拉伯糖、果糖溶液和梨汁各4滴。在沸水浴中加热2—3分钟，取出冷却后，注意观察各管内的变化。

实验三 低聚糖和多糖的水解

低聚糖又叫做寡糖，包括双糖（蔗糖）、三糖和肆糖等，如乳糖、麦芽糖、蔗糖、棉子糖、水苏糖。

蔗糖是典型的非还原糖。在酸或蔗糖酶的作用下，水解成葡萄糖和果糖。

多糖包括淀粉、糖元、纤维素、半纤维素、果胶类等。淀粉是人类的重要食物，它是由葡萄糖分子聚合而成的大分子化合物。在酸或酶的作用下，最终可水解成葡萄糖。

器材：试管、试管架、竹试管夹、水浴锅、白瓷板、滴管、小烧杯。

试剂：(1) 2% 蔗糖溶液；(2) 10% 硫酸；(3) 3N 氢氧化钠；(4) 费林试剂——A和B⁽³⁾；(5) 1% 淀粉溶液；(6) 浓盐酸；(7) 碘试剂⁽⁵⁾。

操作：

(一) 蔗糖的水解 取两支试管，编号后各加入 1 毫升 2% 蔗糖溶液。向甲管内再加入 0.5 毫升 10% 硫酸，混匀，放入沸水浴中加热 10—15 分钟，取出冷却后，用 3—5 滴 3N 氢氧化钠中和剩余的酸。然后，用费林试剂 3—5 滴检查甲管的蔗糖水解液和乙管的蔗糖溶液的还原性，即各加入费林试剂 A 和 B 各 1 毫升后，在沸水浴煮 2—3 分钟，观察各管内颜色变化。

(二) 淀粉的水解 取 1% 淀粉约 10 毫升，放在小烧杯内，加入浓盐酸 5 滴，放在水浴上加热，每隔 2 分钟取出 1 小滴，放在白瓷板上，加 1 滴碘试剂，注意观察其颜色变化直到完全无蓝色为止。然后，取 1 毫升淀粉水解液和 1 毫升 1%

~ 10 ~

淀粉溶液分别放入两支试管中，用斐林试剂检查它们的还原性，观察颜色变化，并加以解释。

脂肪的化学

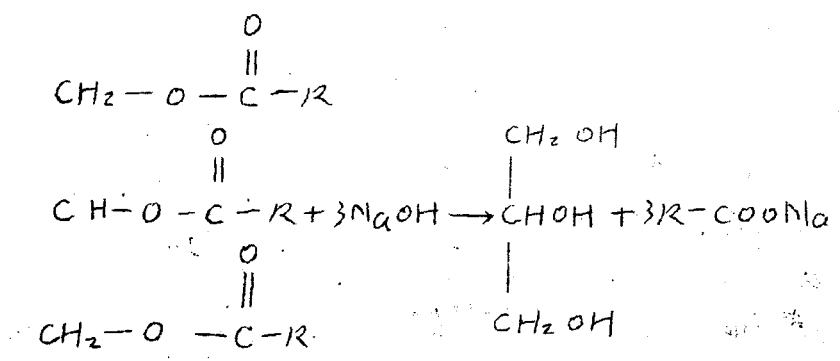
脂肪类化合物是人类、动物和植物组织的基本组成成分之一。脂肪类化合物是脂肪和类脂质的总称，根据其化学成分可分为三类：(1) 真脂（或中性脂肪），是高级脂肪酸的甘油三酯，如油和脂；(2) 类脂质，是在化学或物理性质上类似脂肪的物质，如磷脂、糖脂、固醇酯和蜡等；(3) 衍生脂肪——脂肪类化合物的水解产物，包括脂肪酸、脂肪族之分子醇及固醇。

脂肪类化合物一般都溶于脂肪溶剂，如乙醚、石油醚、二硫化碳、氯仿和苯等，但不溶于水或微溶于水。

实验四 中性脂肪的组成

中性脂肪也叫真脂，如油和脂。它们是由高级脂肪酸与甘油构成的甘油酯。在酸、碱或酯酶的作用下易被水解。用碱如氢氧化钠或氢氧化钾水解时，产物为能溶于水的脂肪酸钠盐或钾盐（即肥皂）和甘油。此过程叫皂化作用。

~ 12 ~

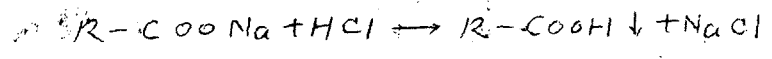


脂肪

甘油

脂肪酸钠

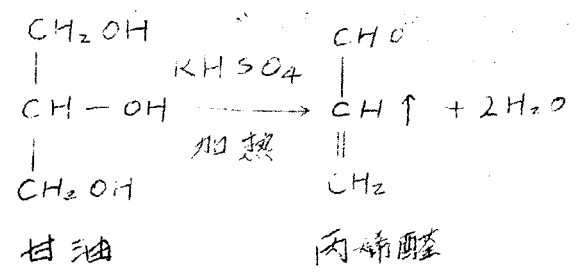
用无机酸去皂化渣，则难溶于水的低级脂肪酸被分离析出。



脂肪酸钠

脂肪酸

甘油与脱水剂 (如: KH_2SO_4 ; P_2O_5 ; CaCl_2 或无水 Na_2SO_4) 共热，或单独热至 450°C 以上时，则脱水生成丙烯醛。丙烯醛有刺激性和特异，可供鉴别。丙烯醛还可以将银离子还原成金属银。



器材: 试管、试管架、竹试管夹、锥形瓶、烧筒、水浴锅、玻璃漏斗、表面皿、石蕊试纸、滤纸。

试剂: (1) 炼好的猪油; (2) 0.5N 氢氧化钠—乙醇溶

渣(6); (3) 10% 盐酸; (4) 3N 氢氧化钠; (5) 95% 乙醇;
 (6) 固体硫酸氢钾; (7) 无水乙醇; (8) 10% 硝酸银溶液;
 (9) 浓氨水。

操作:

(一) 皂化作用: 称取约 0.7 克猪油, 放入 100 毫升锥形瓶中, 加 10 毫升 0.5N NaOH-乙醇溶液。在瓶口上推一个漏斗, 漏斗上盖一表面玻片, 然后在沸水浴中加热约 1 小时, 观察其变化, 说明起了什么反应? 如何检查反应已完成? 移去漏斗继续加热, 以除去瓶内乙醇。再加入约 10 毫升蒸馏水, 加热, 使皂化物溶解成为混合液, 说明其中含有什么成份?

(二) 肥皂的分离: 在上述混合液中, 依次加入固体氯化钠直至饱和为止。肥皂就会浮到溶液表面而析出。这种作用称为盐析作用。过滤, 挤干后可得到肥皂, 保留滤液鉴定甘油。

(三) 甘油的分离与鉴定: 取一支试管, 滴入甘油数滴和少量固体硫酸氢钾, 混匀。另外取一条滤纸, 滴上硝酸银溶液数滴及浓氨水数滴以润湿, 挂在试管口上, 将试管在小火上依次加热, 注意丙烯醛的臭味, 并观察纸条的变化。

将(二)所得的滤液倒入表面皿, 在水浴上蒸干, 加无水乙醇 5 毫升, 混匀, 静置数分钟, 移入试管内, 在水浴上浓缩至浆状, 按照上述方法鉴定有无甘油。

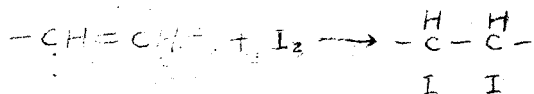
(四) 脂肪酸的分离: 将一小块自制的肥皂放入 100 毫升锥形瓶内, 加入约 5 毫升蒸馏水, 水浴上温热使之全部溶解。然后, 依次滴加 10% 盐酸进行酸化, 边加边搅, 直至淡黄或白色脂肪酸完全析出为止。冷却后过滤。用少量蒸馏水冲洗滤纸上的沉淀, 直至洗出液呈中性为止 (用石蕊试纸检验)。取少量洗过的脂肪酸, 放入一小表面皿上, 滴加 95% 乙醇, 待溶解后, 用石蕊试纸检验其是否为酸性反应。

实验五 脂肪的不饱和脂肪酸

脂肪中包括饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸两类，不饱和脂肪酸可以与卤族元素（ Cl_2 、 Br_2 或 I_2 ）起加成反应。不饱和脂肪酸的含量愈高，消耗就愈多。通常以“碘值”来表示。“碘值”是指100克脂肪所能吸收碘的克数。即碘值愈高，不饱和脂肪酸的含量愈高。

油脂工业中生产的油酸是橡胶合成工业的原料，亚油酸是医药上治疗高血压药物的重要原材料。它们都是不饱和脂肪酸。这些产品出厂规格都要求碘值在一定的范围内，而另一类饱和脂肪酸产品如硬脂酸，常会掺有一些不饱和脂肪酸杂质。这里，碘值被用来表示产品的纯度。若碘值高，表明分离杂质（指不饱和脂肪酸杂质）还不够。因此，测定碘值也是生产中常用的测定方法。碘值是检定和鉴别油脂的一个主要常数。

本实验通过比较猪油和豆油吸收碘溶液数目的不同，了解动物脂肪和植物油中不饱和脂肪酸含量的差异。这是检查脂肪不饱和性的一种简便方法。



器材：试管、试管架、10毫升量筒。

试剂：(1) 豆油；(2) 猪油；(3) 氯仿（三氯甲烷）；(4) 碘液 (7)。

操作：取二支试管，各加氯仿2毫升，再分别加入豆油和融化的猪油各1滴，混匀，使完全溶解。再逐滴加入碘液30滴，边加边摇动，并置于50℃水浴中加热，比较两支试管的颜色。