

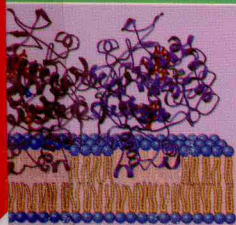


21世纪高等教育规划教材
生物学系列

生物化学实验教程

SHENGWU HUAXUE SHIYAN JIAOCHENG

■ 主编 熊、丽 丁书茂 郑永良



教育部直属师范大学
华中师范大学出版社

SHENGWU XUE

生物化学实验教程

主 编：	熊 丽	丁书茂	郑永良
副主编：	朱世明	赵玉宏	
编 者：	李 睿	耿 辉	袁永泽
	刘金林	杨继红	王玉凤
	刘 晨	李 娜	周巧巧
	胡 庆	罗 勤	袁均林
	刘德立	邹煜平	

华中师范大学出版社

内 容 提 要

本书以糖类、蛋白质、脂类及核酸的分离和鉴定、代谢及其调控等基本技术为重点,介绍了生物大分子的提取和纯化、结构和性质、酶动力学分析、层析法、电泳法等基本实验技术。本书内容全面,包括基础实验、综合性实验,还精选了一些中学生物化学实验,供不同院校、不同专业根据具体条件选用。

本书可作为高等院校生物类各专业本科生和研究生的生物化学实验教材,也可供相关教学和科研工作者参考。

新出图证(鄂)字 10 号

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验教程/熊丽 丁书茂 郑永良主编. —武汉:华中师范大学出版社,2011.8
ISBN 978-7-5622-4966-5

I. 生… II. ①熊… ②丁… ③郑… III. ①生物化学—实验—教材 IV. ①Q5-33
中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 089448 号

生物化学实验教程

主 编:熊 丽 丁书茂 郑永良◎

责任编辑:李 蓉

责任校对:张晶晶

封面设计:罗明波

编 辑 室:第二编辑室

社 址:湖北省武汉市洪山区珞喻路 152 号

邮 编:430079

电 话:027-67863426 67863040

传 真:027-67863291

邮 购:027-67861321

网 址:<http://www.ccnpublish.com>

电子信箱:hscbs@public.wh.hb.cn

印 刷 者:武汉理工大印刷厂

督 印:章光琼

字 数:285 千字

印 张:15.5

开 本:787mm×960mm 1/16

版 次:2011 年 8 月第 1 版 2011 年 8 月第 1 次印刷

印 数:1—3000

定 价:26.80 元

敬告读者:欢迎上网查询、购书;欢迎举报盗版,电话 027—67861321。



前 言

在生命科学迅猛发展的今天,作为基础学科的生物化学,其教材和实验参考书类型繁多,体例各异,但作为长期从事该课程和实验教学的普通教师,在工作中时常感到在不同层次、不同教学条件的高校,应该因地制宜使用适合自己学校教学特点和教学条件的教材。因此我们结合自编教材并在使用多年的基础上,编写了这本实验教程。

《生物化学实验教程》涵盖生物化学基础实验、生物化学技术实验、综合性实验、中学生物化学实验精选四部分。其中生物化学基础实验 25 个,生物化学技术实验 18 个,综合性实验 8 个,中学生物化学实验 6 个,共 57 个实验。

本教材注重加强基本实验方法和技能训练,同时引进了一些新近发展起来的、重要的生物化学实验技术和方法。书中详细叙述了实验的具体操作,罗列了每个实验所需的仪器和材料,并对实验中应注意的地方给予了提示。为便于学生深入了解实验内容的重点和难点,掌握实验操作步骤的关键问题,提高学生对实验结果的分析能力,特在每个实验后设计了思考题。附录部分选择了共 8 项重点知识、重要数据和参考资料以备读者查询。

本书可供综合性大学尤其是师范院校的生物技术、生物工程、生物科学等专业及农林院校的农学、植保、农化、园艺、林学等专业的学生和医学院校相关专业的本科生和研究生学习之用,也可供从事生物科学相关工作的人员参考。

尽管我们尽了最大的努力来编写本教材,但由于才疏学浅,书中错误和不足之处在所难免,恳请读者批评指正。

编 者

2011.8



目 录

第一部分 生物化学基础实验

实验一 糖类的性质实验(一)——糖类的颜色反应	1
实验二 糖类的性质实验(二)——糖类的还原作用	3
实验三 总糖的测定——蒽酮比色法	5
实验四 氨基酸的分离鉴定——纸层析法	7
实验五 蛋白质的性质实验(一)——蛋白质及氨基酸的呈色反应	9
实验六 蛋白质的性质实验(二)——蛋白质的等电点测定和沉淀反应	17
实验七 微量凯氏定氮法	22
实验八 血清蛋白的醋酸纤维薄膜电泳	25
实验九 牛乳中酪蛋白的提取与鉴定	27
实验十 酶的特性	29
实验十一 核酸的定量测定	34
(一) 定磷法	34
(二) 地衣酚法定量测定 RNA	38
(三) 二苯胺法定量测定 DNA 含量	39
实验十二 血糖的定量测定	42
(一) Hagedorn-Jensen 二氏定糖法	42
(二) Folin-Wu 法定量测定血糖含量	45
实验十三 脂肪酸的 β -氧化	48
实验十四 血液中转氨酶活力的测定(分光光度法)	50
实验十五 紫外分光光度法测定鱼肝油中维生素 A 的含量	53
实验十六 食物中脂溶性维生素含量分析(高效液相色谱法)	55
实验十七 荧光光度法测定维生素 B ₂ 的含量	59
实验十八 2,6-二氯酚靛酚法测定维生素 C 的含量	61
实验十九 过氧化氢酶的作用	63
实验二十 过氧化物酶的作用	64
实验二十一 尿液淀粉酶活力测定(Winslow 氏法)	66
实验二十二 枯草芽孢杆菌蛋白酶活力测定	68
实验二十三 小麦萌发前后淀粉酶活力的比较	71



实验二十四	柑橘皮提取果胶	74
实验二十五	索氏提取法测定粗脂肪含量	75

第二部分 生物化学技术实验

实验二十六	离子交换柱层析法分离氨基酸	78
实验二十七	蛋白质含量的测定	81
实验二十八	凝胶过滤法测定蛋白质相对分子质量	87
实验二十九	薄层层析法分离 AMP、ADP 和 ATP	90
实验三十	动物肝脏 DNA 的制备和含量测定	92
实验三十一	DNA 的琼脂糖凝胶电泳	95
实验三十二	SDS-聚丙烯酰胺电泳法测定蛋白质相对分子质量	99
实验三十三	DNS-Cl 法分析蛋白质 N-末端氨基酸	107
实验三十四	DNP-氨基酸的制备和鉴定	110
实验三十五	酵母蔗糖酶的提取及纯化	114
实验三十六	蔗糖酶动力学研究	123
实验三十七	脲酶动力学研究	134
实验三十八	乳酸脱氢酶(LDH)同工酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)	139
实验三十九	药用植物超氧化物歧化酶(SOD)同工酶分析及活性比较	145
实验四十	枯草杆菌细胞固定化	148
实验四十一	超氧化物歧化酶的固定及其酶活性的测定	149
实验四十二	细胞色素 c 的制备及测定	152
实验四十三	大鼠肝细胞的单细胞凝胶电泳	158

第三部分 综合性实验

实验四十四	重组 pnpC 的原核表达与亲和色谱纯化	161
实验四十五	免疫血清的制备与检测	167
实验四十六	HmgD 基因过量表达对果蝇发育的影响	179
实验四十七	天然产物中多糖的分离、纯化与鉴定	183
实验四十八	植物总黄酮类化合物的提取与测定	186
实验四十九	卵磷脂的提取和鉴定	188
实验五十	食品(奶粉)中三聚氰胺含量的测定——液相色谱法	190
实验五十一	双向聚丙烯酰胺凝胶电泳	194

第四部分 中学生物化学实验精选

实验五十二	制作泡菜并检验亚硝酸盐含量	198
-------	---------------------	-----



实验五十三	果胶酶在果汁生产中的作用.....	201
实验五十四	探讨加酶洗衣粉的洗涤效果.....	204
实验五十五	血红蛋白的提取和分离.....	207
实验五十六	植物芳香油的提取.....	209
实验五十七	胡萝卜素的提取.....	212

附 录

附录一	实验室规则.....	214
附录二	实验室安全及防护知识.....	215
附录三	实验室常识.....	218
附录四	常用数据表.....	220
附录五	核酸基础数据.....	226
附录六	缓冲溶液.....	227
附录七	常用缓冲液的配制.....	228
附录八	常用贮存液的配制.....	234
主要参考文献.....		240



第一部分 生物化学基础实验

实验一 糖类的性质实验(一)——糖类的颜色反应

一、实验目的

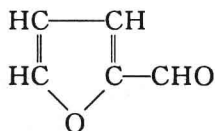
1. 了解糖类某些颜色反应的原理。
2. 学习应用糖的颜色反应鉴别糖类的方法。

二、实验内容

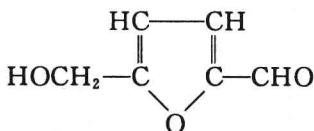
(一) α -萘酚反应(Molisch 反应)

1. 实验原理

糖在浓无机酸(硫酸、盐酸)作用下,脱水生成糠醛及糠醛衍生物,后者能与 α -萘酚生成紫红色物质。在糖溶液与浓无机酸(本实验采用浓硫酸)的液面间出现紫环,因此又称紫环反应。糠醛及糠醛衍生物对此反应均呈阳性,故此反应不是糖类的特异反应。



糠醛(呋喃醛)



羟甲基糠醛(糠醛衍生物)

2. 器材

试管及试管架、滴管。

3. 试剂

(1) 莫氏(Molisch)试剂(5% α -萘酚的酒精溶液):称取 α -萘酚 5 g,溶于 95% 酒精并稀释至 100 mL,贮于棕色瓶内。用前配制。

(2) 1%葡萄糖溶液 100 mL

(3) 1%果糖溶液 100 mL

(4) 1%蔗糖溶液 100 mL

(5) 1%淀粉溶液 100 mL

(6) 0.1%糠醛溶液 100 mL

(7) 浓硫酸 500 mL



4. 实验步骤

取 5 支试管,分别加入 1%葡萄糖溶液、1%果糖溶液、1%蔗糖溶液、1%淀粉溶液、0.1%糠醛溶液各 1 mL。再向 5 支试管中各加入 2 滴莫氏试剂,充分混合。将试管倾斜,沿管壁慢慢加入浓硫酸 1 mL,慢慢竖直试管,切勿摇动。硫酸层沉于试管底部与糖溶液分成两层。在液面分界处有紫红色环出现。观察、记录各管颜色。

(二) 间苯二酚反应(Seliwanoff 反应)

1. 实验原理

在浓酸作用下,酮糖脱水生成羟甲基糠醛,后者再与间苯二酚作用生成红色物质,反应迅速,仅需 20 s~30 s。有时也同时产生棕红色沉淀,此沉淀溶于乙醇,呈鲜红色溶液。此反应是酮糖的特异反应。醛糖在同样条件下呈色反应缓慢,只有在糖浓度较高或煮沸时间较长时,才呈微弱的阳性反应。在实验条件下蔗糖有可能水解而呈阳性反应。

2. 器材

试管及试管架、滴管、水浴锅。

3. 试剂

(1) 塞氏(Seliwanoff)试剂:取间苯二酚 0.05 g 溶于 50 mL 浓盐酸溶液,再用蒸馏水稀释至 100 mL。现配现用。

(2) 1%葡萄糖溶液 100 mL

(3) 1%果糖溶液 100 mL

(4) 1%蔗糖溶液 100 mL

4. 实验步骤

取 4 支试管,分别加入 1%葡萄糖溶液、1%果糖溶液、1%蔗糖溶液及蒸馏水各 0.5 mL。再向各管分别加入塞氏试剂 5 mL,混匀。将 4 支试管同时放入沸水浴中,注意观察、记录各管颜色的变化及变化时间。

思考题

1. 可用何种颜色反应鉴别酮糖的存在?
2. α -萘酚反应的原理是什么?完成下表。

α -萘酚反应的实验总结

试剂	现象	解释现象
1%葡萄糖溶液		
1%果糖溶液		
1%蔗糖溶液		
1%淀粉溶液		
0.1%糠醛溶液		



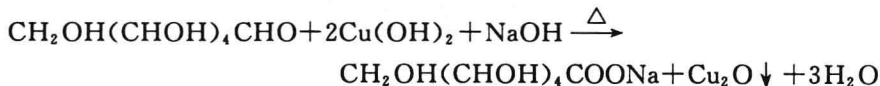
实验二 糖类的性质实验(二)——糖类的还原作用

一、实验目的

掌握用糖的还原反应来鉴定糖的原理和方法。

二、实验原理

费林(Fehling)试剂和本尼迪特(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 Cu_2O 沉淀。由于沉淀的速度不同,形成的颗粒大小也不同,颗粒大的为红色,颗粒小的为黄色。此法常用于还原糖的定性或定量测定。



三、试剂与材料

1. 费林试剂

试剂 A: 称取硫酸铜晶体 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 34.6 g, 溶于蒸馏水并稀释至 500 mL。

试剂 B: 称取氢氧化钠 125 g, 酒石酸钾钠 137 g, 溶于蒸馏水并稀释至 500 mL。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 85 g 柠檬酸钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 11\text{H}_2\text{O}$) 及 50 g 无水碳酸钠, 溶解于 40 mL 蒸馏水中。另溶解 8.5 g 硫酸铜晶体于 50 mL 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。(如果长期存放产生沉淀, 可取上清液使用。)

3. 1% 淀粉溶液

将 1 g 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, 最后以沸水稀释至 100 mL。

4. 1% 蔗糖溶液

称取蔗糖 1 g (A. R.), 溶于蒸馏水并定容至 100 mL。

5. 1% 葡萄糖溶液

称取葡萄糖 1 g, 溶于蒸馏水并定容至 100 mL。



四、器材

5支1.0 mL吸管、1支2.0 mL吸管、6支1.5 cm×15 cm 试管、水浴锅。

五、实验步骤

于3支试管中加入费林试剂A和B各1 mL,混匀,分别加入1%葡萄糖溶液、1%蔗糖溶液和1%淀粉溶液1 mL,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1 mL,然后每管加本尼迪特试剂2 mL,置沸水浴中加热数分钟,取出,冷却,和上面结果比较。

思考题

1. 本尼迪特法较费林法测定糖的还原作用有什么优点,为什么?
2. 费林试剂中加入酒石酸钾钠的作用是什么?



实验三 总糖的测定——蒽酮比色法

一、实验目的

1. 学习蒽酮比色定糖法的原理和方法。
2. 学习 722 型分光光度计的使用原理和操作方法。

二、实验原理

总糖是指样品中的还原糖及在本法测定条件下水解成还原单糖的蔗糖、麦芽糖和可部分水解为葡萄糖的淀粉。

蒽酮比色法是一种灵敏、快速、简便地测定样品中总糖量的方法。其原理是糖类在较高温度下被硫酸作用脱水生成糠醛或糠醛衍生物后与蒽酮 ($C_{14}H_{10}O$) 缩合成蓝色化合物。溶液含糖量在每毫升 150 微克以内, 与蒽酮反应生成的颜色深浅与糖量成正比。

蒽酮不仅能与单糖也能与双糖、糊精、淀粉等直接起作用, 样品不必经过水解。

三、试剂与材料

1. 蒽酮试剂: 称取 100 mg 蒽酮溶于 100 mL 98% 硫酸溶液 (A. R.) 中, 用时配制。
2. 葡萄糖标准溶液 ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$): 精确称取 100 mg 干燥葡萄糖, 用蒸馏水定容至 1000 mL, 可滴加几滴甲苯作防腐剂。
3. 白薯。

四、器材

试管(或具塞试管)及试管架、吸量管、沸水浴、冰浴、722 型分光光度计。

五、实验步骤

1. 制作标准曲线

取 7 支干燥洁净的试管, 编号后按下表操作。

表 1 制作标准曲线的加样表

试剂 \ 编号	1	2	3	4	5	6	7
葡萄糖标准液 ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (mL)	0	0.10	0.20	0.30	0.40	0.60	0.80
水 (mL)	1.0	0.90	0.80	0.70	0.60	0.40	0.20
蒽酮试剂 (mL)	10	10	10	10	10	10	10



每管加入葡萄糖标准液和水后立即混匀,迅速置于冰浴中,待各管都加入蒽酮试剂后,同时置于沸水浴中,准确加热 7 min,立即取出置于冰浴中迅速冷却。待各管溶液达室温后,用 1 cm 厚度的比色皿,以第一管为空白,在 620 nm 处迅速测其余各管的光吸收值。然后以第 2~7 管溶液含糖量微克数为横坐标,吸光度($A_{620\text{ nm}}$)为纵坐标,画出含糖量与 $A_{620\text{ nm}}$ 的相关标准曲线。

2. 制备样品溶液

称取 500 g 市售白薯,洗净切碎后用小型多功能食品加工机磨成浆,4 层纱布压滤、弃滤液留渣,将渣放入烘箱内 $80^{\circ}\text{C}\sim 85^{\circ}\text{C}$ 烘干后,再用植物粉碎机(微型)研细,过 100 目筛,筛下物为待测样品。

取样品在烘箱内 120°C 烘干,恒重后,精确称取 1 g~5 g,置于锥形瓶中,加入 80 mL 沸蒸馏水,放入沸水浴。不时摇动,提取 0.5 h。取出立即过滤,残渣用沸蒸馏水反复洗涤并过滤,合并滤液。冷却至室温,用蒸馏水定容至 100 mL。

3. 测定样品的含糖量

取 4 支试管按下表操作。

表 2 测定样品的含糖量加样表

编号 试剂	1	2	3	4
样品溶液 (mL)	0	1.0	1.0	1.0
水 (mL)	1.0	0	0	0
蒽酮试剂 (mL)	10.0	10.0	10.0	10.0

其他操作与制作标准曲线相同。将测出的第 2~4 管 $A_{620\text{ nm}}$ 求平均值,根据 $A_{620\text{ nm}}$ 平均值从标准曲线上查出相应的含糖量 (μg),再换算成 100 g 样品中总糖的含量。

【注意事项】

1. 如没有小型多功能食品加工机和植物粉碎机(微型),可通过反复捣碎、研磨等途径进行样品预处理。

2. 白薯也可用市售红薯面粉代替。

思 考 题

用蒽酮比色法测定样品中糖含量时,应注意哪些问题?为什么?



实验四 氨基酸的分离鉴定——纸层析法

一、实验目的

学习并掌握纸层析法的基本原理及操作方法，学会分析未知样品的氨基酸的成分。

二、实验原理

纸层析法是用滤纸作为惰性支持物的分配层析法，层析溶剂由有机溶剂和水组成。

物质被分离后在纸层析图谱上的位置是用 R_f 值（比移）来表示的（见图 1）：

$$R_f = \frac{\text{原点到层析点中心的距离}}{\text{原点到溶剂前沿的距离}}$$

在一定的条件下某种物质的 R_f 值是常数。 R_f 值的大小与物质的结构、性质、溶剂系统、层析滤纸的质量和层析温度等因素有关。

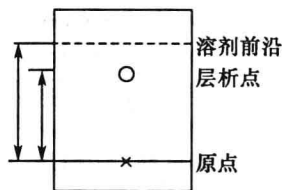


图 1 纸层析示意图

三、器材

层析缸^①、毛细管、喷雾器、培养皿、层析滤纸（新华一号）。

四、试剂

1. 扩展剂

4 份水饱和的正丁醇和 1 份冰醋酸的混合物。将 20 mL 正丁醇和 5 mL 冰醋酸放入分液漏斗中，与 15 mL 水混合，充分振荡，静置后分层，放出下层水层。取漏斗内的扩展剂约 5 mL 置于小烧杯中作平衡溶剂，其余的倒入培养皿中备用，约 650 mL。

2. 氨基酸溶液

0.5% 的赖氨酸、脯氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸溶液及它们的混合液（各组分浓度均为 0.5%）各 5 mL。

3. 显色剂

^① 本实验所用层析缸是用大的标本缸代替的。若用标准的层析缸，滤纸平衡后应用长颈漏斗从层析缸上部小孔中加入扩展剂。



0.1%水合茚三酮—正丁醇溶液, 50 mL~100 mL。

五、实验步骤

1. 将盛有平衡溶剂的小烧杯置于密闭的层析缸中。
2. 取层析滤纸(长 22 cm, 宽 14 cm) 一张, 在纸的一端距边缘 2 cm~3 cm 处用铅笔画一条直线, 在此直线上每间隔 2 cm 做一记号(见图 2)。

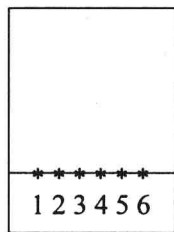


图 2 点样示意图

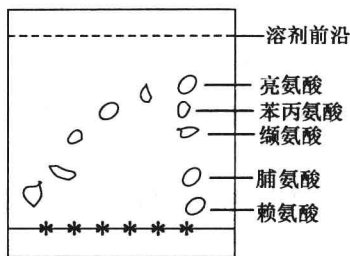


图 3 层析结果图谱

3. 点样: 用毛细管将各氨基酸样品分别点在这 6 个位置上, 干后再点一次。每点在纸上扩散的直径最大不超过 3 mm。
4. 扩展: 用线将滤纸固定成筒状, 纸的两边不能接触。将盛有约 20 mL 扩展剂的培养皿迅速置于密闭的层析缸中, 并将滤纸直立于培养皿中(点样的一端在扩展剂中, 液面需低于点样线 1 cm)。待溶剂上升 15 cm~20 cm 时即取出滤纸, 用铅笔描出溶剂前沿界线, 自然干燥或用吹风机热风吹干。
5. 显色: 用喷雾器均匀喷上 0.1% 水合茚三酮—正丁醇溶液, 然后置烘箱中烘烤 5 min (100 °C) 或用热风吹干即可显出各层析斑点(见图 3)。

思考题

1. 计算各种氨基酸的 R_f 值, 指出混合氨基酸的种类。
2. 各种氨基酸中, 哪些是亲水性氨基酸? 哪些是疏水性氨基酸?
3. 如何用纸层析法对氨基酸进行定性和定量的测定?



实验五 蛋白质的性质实验（一）

——蛋白质及氨基酸的呈色反应

一、实验目的

1. 了解构成蛋白质的基本结构单位及主要连接方式。
2. 了解蛋白质和某些氨基酸的呈色反应原理。
3. 学习几种常用的鉴定蛋白质和氨基酸的方法。

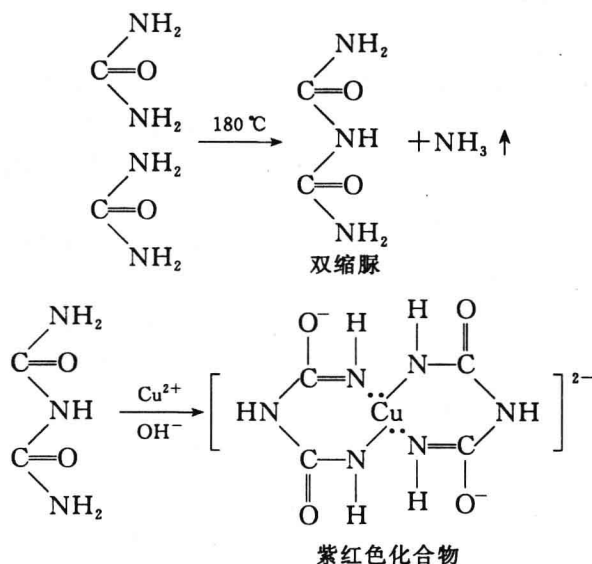
二、实验内容

（一）双缩脲反应

1. 实验原理

尿素加热至 180°C 左右，生成双缩脲并放出一分子氨。双缩脲在碱性环境中能与 Cu^{2+} 结合生成紫红色化合物，此反应称为双缩脲反应。蛋白质分子中有肽键，其结构与双缩脲相似，也能发生此反应。此反应可用于蛋白质的定性或定量测定。

反应式如下：



双缩脲反应不仅为含有两个以上肽键的物质所具有，含有一个肽键和一个 $-\text{CS}-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CRH}-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CHNH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ 或

$-\text{CHOHCH}_2\text{NH}_2$ 等基团的物质以及乙二酰二胺（ $\text{O}=\text{C}-\text{NH}_2-\text{NH}_2-\text{C}=\text{O}$ ）等物质也



有此反应。 NH_3 可干扰此反应, 因为 NH_3 与 Cu^{2+} 可生成暗蓝色的络离子 $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ 。因此, 一切蛋白质或二肽以上的多肽都有双缩脲反应, 但有双缩脲反应的物质不一定是蛋白质或多肽。

2. 试剂

- (1) 尿素 10 g
- (2) 10% 氢氧化钠溶液 250 mL
- (3) 1% 硫酸铜溶液 60 mL
- (4) 2% 卵清蛋白溶液 80 mL

3. 实验步骤

取少量尿素结晶放在干燥试管中, 用微火加热使尿素熔化。熔化的尿素开始硬化时停止加热, 此过程尿素放出氨形成双缩脲。冷却后, 加 10% 氢氧化钠溶液约 1 mL, 振荡混匀, 再加 1% 硫酸铜溶液 1 滴, 再振荡, 观察粉红色的出现。避免添加过量硫酸铜, 否则生成的蓝色氢氧化铜能掩盖粉红色。

向另一试管加卵清蛋白溶液约 1 mL 和 10% 氢氧化钠溶液约 2 mL, 摇匀, 再加 1% 硫酸铜溶液 2 滴, 边加边摇。观察紫玫瑰色的出现。

(二) 茚三酮反应

1. 实验原理

除脯氨酸、羟脯氨酸与茚三酮反应产生黄色物质外, 所有 α -氨基酸及一切蛋白质都能与茚三酮反应生成蓝紫色物质。

β -丙氨酸、氨和许多一级胺都呈现此反应。尿素、马尿酸、二酮吡嗪和肽链上的亚氨基不呈现此反应。因此, 虽然蛋白质和氨基酸均有茚三酮反应, 但能与茚三酮呈阳性反应的不一定就是蛋白质或氨基酸。在定性定量测定中, 应严防干扰物存在。

该反应十分灵敏, $1:1500000$ 浓度的氨基酸水溶液即能出现反应, 是一种常用的氨基酸定量测定方法。

茚三酮反应分为两步, 第一步是氨基酸被氧化形成 CO_2 、 NH_3 和醛, 水合茚三酮被还原成还原型茚三酮; 第二步是所形成的还原型茚三酮同另一个水合茚三酮分子与氨缩合成有色物质。

反应机理如下:

