

生物化学实验

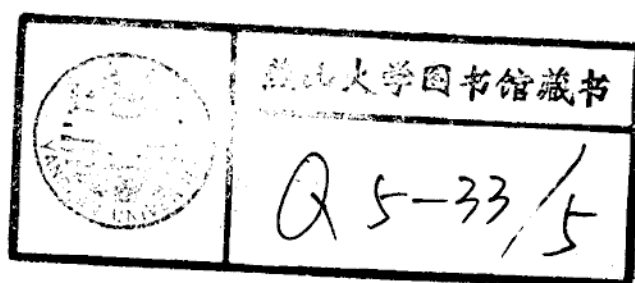
陈曾燮 刘兢 罗丹 编



中国科学技术大学出版社

生物化学实验

陈曾望 刘兢 罗丹 编



中国科学技术大学出版社

10041 合肥



0365753

(皖)新登字08号

生物化学实验

陈曾燮 刘 兢 罗 丹 编

中国科学技术大学出版社出版
(安徽省合肥市金寨路96号,230026)

安徽省金寨县印刷厂印刷
安徽省新华书店发行

开本: 787×1092/16 印张: 19.5 字数: 482千

1994年1月第1版 1994年1月第1次印刷

印数: 1—2500册

ISBN 7-312-00503-9/Q·9 定价: 9.40元

(凡购买中国科大出版社图书, 如有白页、缺页、倒页者, 由本社发行部负责调换)

内 容 简 介

本书是在中国科学技术大学生生化教研室历年开设生物化学实验课程的教学实践和自编的教材基础上,经过不断充实和总结改写而成。全书共编入47个实验,以蛋白质、核酸、酶等生物大分子的分离制备,结构分析及检测技术为主要内容。选用的方法包括教学和科学研究中常用的生化实验技术,如各种层析法、电泳法、分光光度法、大分子印迹技术及代谢研究方法等。这些实验内容具体,在实践中得到反复验证,切实可行。本教材旨在侧重加强基础知识,常规生化实验方法和技能训练,同时也注意吸收和引进国内外近年来发展起来或广泛应用的一些新方法、新技术。

本书适合于综合大学、师范院校生物系各专业作生化实验课教材,亦可作为其他高校有关专业的本科生、研究生的选用教材,并可供有关教师和科研工作者参考。

前 言

生物化学是现代生物学、医学和农学的基础,并与许多学科相互渗透,有着极为密切的联系,它是生物科学中最活跃和最有广阔发展前景的分支学科之一。促使生物化学迅速发展的一个主要因素是生化实验方法及新技术的不断开发和应用,生化实验技术在生物科学特别是分子生物学的发展中起着很重要的开拓作用,并在工业、农业、医药等各个方面得到广泛的应用,总之牵涉到生化实验工作的领域越来越多。因此,生化实验方法和研究技术已成为生物科学以及其它有关研究领域中的一个非常重要和强有力的工具,不再是单纯验证基本理论的手段。故熟练地掌握生化实验技术,对于从事生物化学和分子生物学工作者来说,更是十分必要的。为此,各高校生物系及有关专业将生化实验课列为主要的必修课之一或独立开设的专业基础课。

鉴于上述目的和满足教学上的需要,我们根据现行教学大纲,在历年编写和使用的生化实验课教材的基础上,经过不断充实和修改,以及结合实验室条件及仪器装备现状等综合考虑编写成此书。本教材侧重于给学生以基础知识、常用的实验方法和技能的训练,同时也注意吸收和引入近年来发展起来的一些新方法、新技术,力求能反映当前国内外现代生化实验的新成就。全书包括蛋白质、核酸、酶、物质代谢、维生素、激素等方面的实验 47 个,内容涉及到生物化学的各个主要领域。其中既有生物活性物质的分离纯化、结构分析、定性及定量测定等实验,使学生能受到比较全面的基本技能训练,又有配合生化理论课讲授的某些验证基本理论的实验,以加深学生的感性认识和学习兴趣。就方法学而言,则既有经典及基准方法(如定糖、定氮、定磷等),也有近年来广泛使用的生化研究技术(如凝胶电泳、薄层层析、亲和层析、印迹技术等)。本书内容比较丰富,方法切实可行。在实验原理阐述上尽量做到简明扼要,而操作步骤上力求做到具体和详尽,重复性高,以适应各类人员学习的要求。

本书可作为全年开设生化课教材之用,根据我们多年的教学实践,按照由浅入深,先易后难,循序渐进的方式,宜采用分段教学法,即上学期应选择简易的及验证性的小型实验,着眼于培养学生掌握基本的生化实验方法及初步科学实践的能力。当具备一定的生化基础知识和操作技能之后,下学期则可安排综合性较强,难度较大的大型实验,侧重于给学生以系统及专门的生化技术训练,藉此提高他们独立分析和独立工作的能力,从而比较熟练地掌握多种常用的实验方法及专门技术,为进行毕业论文实践及开展科研活动打下一个扎实的基础,以适应生命科学的发展和需要。

尽管本教材中各个实验均经反复验证和多年教学实践的检验,但由于经验和水平的限制,书中错误和不足之处在所难免,敬希同行和读者批评指正。

编 者

1992年6月于中国科学技术大学

目 录

实验一	蛋白质及氨基酸的呈色反应	(1)
实验二	总氮量的测定(微量凯氏定氮法)	(7)
实验三	醋酸纤维薄膜电泳分离血清蛋白	(12)
实验四	对流免疫电泳法测定 α - 甲胎蛋白质 (AFP)	(16)
实验五	聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳	(19)
实验六	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的分子量	(26)
实验七	凝胶等电聚焦法测定蛋白质的等电点	(32)
实验八	葡聚糖凝胶柱层析	(37)
实验九	离子交换葡聚糖凝胶柱层析法分离蛋白质	(43)
实验十	葡聚糖凝胶过滤法测定蛋白质分子量	(48)
实验十一	α -乳白蛋白的制备	(53)
实验十二	蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳(高灵敏度银染色法)	(57)
实验十三	氨基酸的定量测定(邻苯二甲醛法)	(61)
实验十四	色氨酸的定量测定	(64)
实验十五	蛋白质 N-末端氨基酸的测定(DNS-Cl 法)	(67)
实验十六	蛋白质及多肽 C-末端测定及顺序分析(羧肽酶法)	(75)
实验十七	蛋白质及多肽顺序分析(手工 Edman 降解法)	(79)
实验十八	蛋白质及多肽微量顺序分析(DABITC/PITC 双偶合法)	(85)
实验十九	蛋白质(RNase)的变性作用和复性	(91)
实验二十	蛋白质印迹技术	(97)
实验二十一	生物材料及核酸中含磷量的测定	(107)
实验二十二	紫外分光光度法测定核酸含量	(111)
实验二十三	脱氧核糖核酸(DNA)的制备及含量测定	(114)
实验二十四	核糖核酸(RNA)的制备及含量测定	(125)
实验二十五	单核苷酸的纸上电泳分离及鉴定	(136)
实验二十六	琼脂糖凝胶电泳分离单核苷酸	(140)
实验二十七	5'-核糖核苷酸的定量测定	(143)
实验二十八	EcoRI 酶解 λ DNA 片段的分离和鉴定	(147)
实验二十九	核酸印迹技术(Southern印迹法)	(152)
实验三十	酶作用的高度专一性	(160)
实验三十一	一些因素对酶活力的影响	(164)
实验三十二	蔗糖酶的分离纯化及活力测定	(169)
实验三十三	酶的最适温度和最适 pH 的测定	(175)

实验三十四	蛋白水解酶活力的测定	(180)
实验三十五	猪胰蛋白酶的制备及活力测定	(184)
实验三十六	高效液相色谱(HPLC)法纯化胰蛋白酶制剂	(192)
实验三十七	亲和色谱法分离纯化胰脏弹性蛋白酶	(201)
实验三十八	酪氨酸酶的分离纯化和活力测定	(208)
实验三十九	酪氨酸酶作用动力学性质的分析	(214)
实验四十	食物和生物体液中维生素 C 的定量测定	(230)
实验四十一	胰岛素对血糖水平的影响	(235)
实验四十二	肌糖元的酵解作用	(238)
实验四十三	琥珀酸脱氢酶在生物氧化中的作用及活性测定	(241)
实验四十四	发酵过程中无机磷的利用	(244)
实验四十五	血清总胆固醇的测定	(247)
实验四十六	血清 HDL-胆固醇的定量测定	(249)
实验四十七	氨基移换反应	(252)
附录		(257)
一、实验室规则及常识		(257)
二、实验室安全及防护知识		(258)
三、实验用器皿的清洗及洗涤液的配制		(259)
四、实验室常用仪器的使用		(261)
五、化学试剂的规格、保存及常用数据表		(275)
六、缓冲溶液的配制方法		(279)
七、氨基酸及蛋白质的一些物理常数		(288)
八、柱层析法的一些常用数据表		(290)
九、硫酸铵饱和度的常用表		(294)
十、实验室中常用的干燥剂		(300)
十一、常用的测量单位		(301)
十二、希腊字母表		(302)
参考文献		(303)

实验一 蛋白质及氨基酸的呈色反应

目的和要求

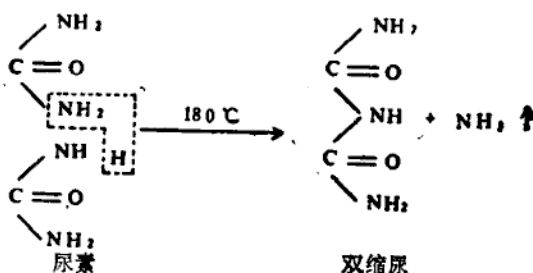
通过本实验的学习，可以加深对蛋白质结构和性质的理解，掌握一些常用的鉴定蛋白质及氨基酸呈色反应的原理和方法。

概说及原理

蛋白质是由氨基酸通过肽键构成的化合物，蛋白质分子的特殊结构——肽键，以及蛋白质分子组成中的一些氨基酸残基的侧链基团等，可以与某些试剂发生化学反应生成有色物质，这类显色作用通称蛋白质颜色反应，但并非是蛋白质分子的特异反应。由于这些反应比较灵敏，在蛋白质分析工作中，常作为蛋白质或氨基酸的定性和定量测定的依据。下面分别介绍几种重要的蛋白质呈色反应的原理。

一、双缩脲反应

双缩脲是由两分子尿素缩合而成的一种化合物。当尿素加热至 180°C 左右时，则两分子尿素缩合成一分子双缩脲，并放出一分子氨。其化学反应式如下：



双缩脲在碱性溶液中能与铜离子结合生成复杂的紫红色络合物，这一呈色反应称为双缩脲反应。

蛋白质分子中含有许多和双缩脲结构相似的肽键，因此也能起双缩脲反应，形成紫红色或蓝紫色络合物。通常可用此法来定性鉴定蛋白质的存在，也可根据反应生成颜色的深浅，在 540nm 波长处进行比色，定量测定蛋白质的浓度。允许测定范围为 $0.2\text{—}1.7\text{mg}$ 蛋白质/ ml 。

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。

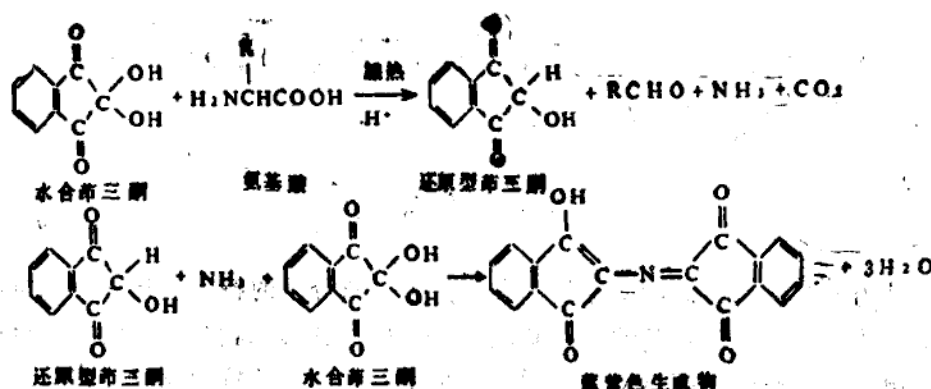
二、蛋白质黄色反应

这是含有芳香族氨基酸特别是含有酪氨酸和色氨酸的蛋白质所特有的呈色反应。蛋白质溶液遇硝酸后，先产生白色沉淀，加热则白色沉淀变成黄色，再加碱，颜色加深呈橙黄色，这是因为硝酸将蛋白质分子中的苯环硝化，产生了黄色硝基苯衍生物（邻-硝酞酸钠）。苯丙氨酸不易硝化，一般情况下几乎无黄色反应。绝大多数蛋白质均含有芳香族氨基酸，因此都有

黄色反应。如皮肤、指甲和毛发等遇浓 HNO_3 会变成黄色即为这种反应的结果。

三、茚三酮反应

茚三酮是使氨基酸和多肽显色的重要试剂，当茚三酮在弱酸性条件下和 α -氨基酸反应时，氨基酸被氧化分解生成醛，放出 NH_3 和 CO_2 ，水合茚三酮则变成还原型茚三酮，然后还原型茚三酮与 NH_3 及另一分子茚三酮进一步缩合生成蓝紫色化合物，最大吸收值的波长为 570nm。其化学反应步骤如下：



此反应为一切 α -氨基酸所共有，反应灵敏，测定范围 0.5—50 μg 氨基酸。因而本法是氨基酸定量测定应用最广泛的方法之一。脯氨酸和羟脯氨酸与茚三酮反应生成黄色化合物，最大吸收值的波长在 440nm。

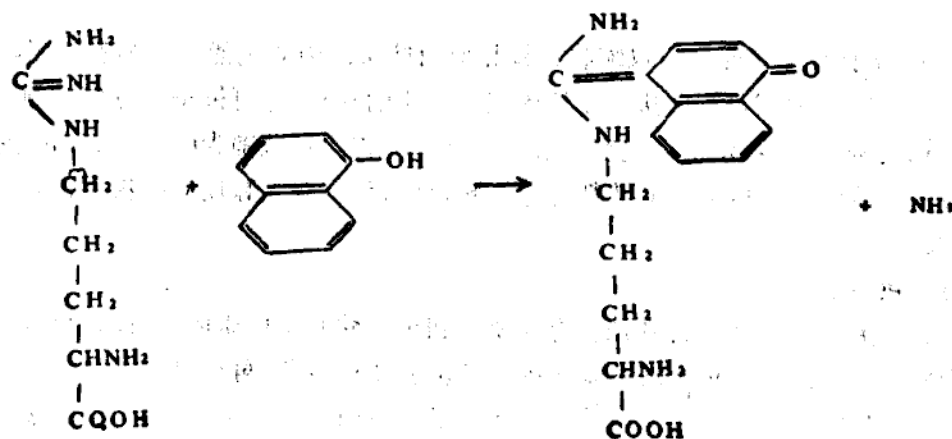
多肽和蛋白质虽然具有茚三酮反应，但肽链越大，灵敏度也越来越差，故不宜作定量测定之用。在多肽合成中常用来检验有无自由氨基的肽类存在。

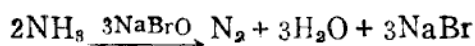
四、乙醛酸反应

在蛋白质溶液中加入乙醛酸 (CHOCCOH)，并沿试管壁慢慢注入浓硫酸，在两液层之间就会出现紫色环，凡含有吡啶基结构的化合物都有这一反应。色氨酸及含有色氨酸残基的蛋白质均有此反应。不含色氨酸残基的白明胶则无此反应。

五、坂口反应(Sakaguchi 反应)

精氨酸分子中所含胍基能与次溴酸钠(或次氯酸钠)及 α -萘酚在碱性溶液中形成红色产物。反应方程式如下：





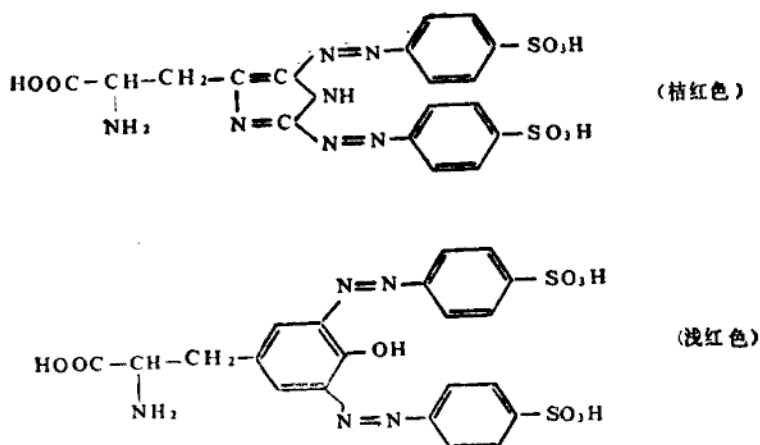
反应中生成的氨可被次溴酸钠氧化，在次溴酸钠缓慢作用下，有色物质继续氧化， α -氨基破裂，引起颜色消失，因此过量的次溴酸钠对反应不利。加入浓尿素，可破坏过量的次溴酸钠，增加颜色的稳定度。酪氨酸、组氨酸、色氨酸也能减低产生颜色的强度，甚至阻止颜色的生成。

坂口反应的灵敏度约为 $0.2\mu\text{g}$ 精氨酸，可以用来定性鉴定含有精氨酸的蛋白质，也可用来定量测定精氨酸的含量。

六、酪氨酸和组氨酸的显色 (Pauly 反应)

偶氮苯磺酸化合物与酚核或咪唑环作用产生有色物质。因此含有酪氨酸或组氨酸残基的蛋白质均能发生这一反应。酪氨酸与偶氮苯磺酸试剂反应后产生较淡的浅红色物，而组氨酸则形成桔红色产物。组胺、酪胺、肾上腺素等也能显示阳性反应。

偶氮苯磺酸与组氨酸及酪氨酸反应的产物如下。



七、米伦反应 (Millon 反应)

米伦试剂为硝酸汞、亚硝酸汞、硝酸和亚硝酸的混合液。蛋白质溶液加入米伦试剂后即产生白色沉淀，加热后沉淀变为红色。酚类化合物有此反应，酪氨酸含有酚基，故酪氨酸及含有酪氨酸的蛋白质都有此反应。

实 验

一、器材及试剂

1. 器材

- (1) 试管及试管架
- (2) 酒精灯
- (3) 水浴锅

- (4) 电炉
- (5) 量筒(10ml)
- (6) 烘箱
- (7) 鸡蛋白
- (8) 试管夹
- (9) 层析滤纸
- (10) 电吹风
- (11) 喷雾器

2. 试剂

- (1) 尿素(粉状)

(2) 蛋白质溶液 取鸡蛋清用蒸馏水稀释 20—30 倍, 混匀后用纱布(4 层)过滤, 滤液置冰箱保存备用。

- (3) 10% NaOH 溶液

- (4) 1% CuSO₄ 溶液

- (5) 0.5% 苯酚溶液

- (6) 浓硝酸(A. R.)

- (7) 0.1% 茚三酮-乙醇溶液 0.1g 茚三酮溶于 100ml 95% 乙醇(新鲜配制)。

- (8) 0.5% 酪蛋白溶液

- (9) 0.5% 甘氨酸溶液

- (10) 0.3% 精氨酸溶液

- (11) 1% α -萘酚酒精溶液(每 100ml 含 5g 尿素)

(12) 次溴酸钠溶液 0.7ml 溴水溶于 100ml 5% NaOH 溶液中, 溶液贮于棕色瓶内, 置冷暗处保存备用。

- (13) 20% 氢氧化钠

- (14) 冰醋酸(A. R.)

- (15) 浓硫酸(G. R.)

- (16) 20% 白明胶溶液

- (17) 0.3% 组氨酸溶液

(18) 偶氮试剂 试剂 A: 9g 对氨基苯磺酸与 90ml 浓 HCl 共热溶解后, 加蒸馏水定容至 1000ml。用时再与等体积的 5% NaNO₂ 溶液相混合(0℃ 配制)。

试剂 B: 10% Na₂CO₃ 溶液。

(19) 米伦氏试剂 40g 汞溶于 60ml 浓硝酸(A. R.) 中(水浴内加温助溶), 溶解后加 2 倍体积蒸馏水, 混匀, 静置澄清, 取上清液贮于棕色试剂瓶内备用。

二、操作步骤

1. 双缩脲反应

(1) 取干燥试管一支, 加入少量尿素粉末, 微火加热, 尿素熔化并开始固化时停止加热, 此时尿素已缩合成双缩脲, 缩合过程中放出之氨可由嗅觉辨别或用红色石蕊试纸检验。待试管冷却后, 加入 10% NaOH 溶液 1ml, 摇动使双缩脲溶解, 再加入 1 滴 1% CuSO₄ 溶液, 混

匀, 观察出现的紫红色, 此反应即为双缩脲反应。注意不可加入过量的硫酸铜溶液, 否则生成蓝色的 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 能掩盖生成的紫红色。

(2) 取 2 支试管, 分别加入数滴蛋白质溶液和 0.5% 酪蛋白溶液, 再加入数滴 10% NaOH 溶液, 混匀后再加入 1 滴 1% CuSO_4 溶液, 随即摇动观察颜色变化, 出现紫红色表示有蛋白质存在。

2. 黄色反应

(1) 取试管 1 支, 加蛋白质溶液 5 滴及浓硝酸 2—3 滴, 混匀, 出现蛋白质沉淀。微火加热则沉淀变成黄色。冷却后, 逐滴加入 10% NaOH 溶液, 边加边摇动, 当反应液呈碱性时, 颜色由黄色转变成深橙黄色。

(2) 取试管 1 支, 加入 0.5% 苯酚溶液数滴。重复上述操作, 注意观察黄色的生成及最后变为深橙黄色的过程。

(3) 剪下自己的指甲放入试管中, 加入数滴浓硝酸, 观察颜色的变化。

3. 茚三酮反应

(1) 取试管 1 支, 加入蛋白质溶液 4—5 滴及 0.1% 茚三酮-乙醇溶液 2 滴, 混匀后, 在小火上加热至沸 1—2min, 放置冷却, 观察颜色的变化过程。

(2) 取层析滤纸一小块, 滴加少量 0.5% 甘氨酸溶液, 随即用电风吹干后, 再加少量 0.1% 茚三酮-乙醇溶液, 吹干后, 置 100℃ 烘箱中约 5min 取出, 观察出现的紫红色斑点。

4. 乙醛酸反应

(1) 取试管 1 支, 加入数滴蛋白质溶液, 再加冰醋酸(含少量乙醛酸)约 1ml, 混匀。倾斜试管, 小心沿着管壁滴加浓 H_2SO_4 (G.R.) 约 1ml, 使其重叠, 切勿使两液混合。静置后, 观察在两液界面间出现的紫红色环, 在水浴中微热, 有助于颜色的形成。

(2) 取试管 1 支, 加入 20% 白明胶溶液数滴, 再加入冰醋酸约 1ml, 混匀。重复以上操作, 仔细观察有否紫红色环形成。纯白明胶分子中不含色氨酸残基, 应不呈现乙醛酸反应。

5. 坂口反应

(1) 取试管 1 支, 加入 0.3% 精氨酸溶液 1ml, 再加 20% NaOH 溶液 5 滴, 1% α -萘酚酒精溶液 2 滴, 混匀, 随后再加入次溴酸钠溶液 5—6 滴, 摇匀, 放置片刻, 溶液呈现红色。

(2) 取试管 1 支, 加入蛋白质溶液约 1ml, 重复以上操作, 注意观察出现的颜色。

6. Pauly 反应

取试管 2 支, 分别加入 0.3% 组氨酸溶液和 0.3% 酪氨酸溶液各 1ml, 再加入新配制的偶氮试剂 A 1ml, 混匀, 再加入试剂 B 溶液 1ml, 充分混合, 静置数分钟, 观察颜色的形成。一般有明显区别。也可将样品点在层析滤纸上, 吹干, 喷以偶氮试剂 A, 稍后再喷以 10% Na_2CO_3 溶液(试剂 B)。含组氨酸及酪氨酸残基的蛋白质(多肽)分别显示桔红色和浅红色。

7. 米伦反应

(1) 取试管 1 支, 加入 0.5% 苯酚溶液 1ml, 再加米伦试剂约 0.5ml, 混匀, 小心加热, 溶液变为红色。

(2) 取试管 1 支, 加入蛋白质溶液约 1ml, 再加米伦试剂 4—5 滴, 混匀, 产生白色沉淀, 小心加热, 沉淀即变为红色。注意米伦试剂加入量不可过多, 因米伦试剂中含有硝酸, 易使蛋白质呈黄色, 故加入量要适中。

(3) 取试管 2 支, 分别加入 20% 白明胶溶液数滴和 0.5% 酪蛋白溶液 1ml, 重复上述操作, 注意观察有何不同, 试解释之。

三、实验结果

根据蛋白质呈色反应的实验结果和现象观察, 用表格形式予以记录、归纳和总结, 并加以分析和讨论。

实验二 总氮量的测定(微量凯氏定氮法)

目的和要求

学习微量凯氏(Micro-Kjeldahl)定氮法测定生物样品中总氮含量的原理。掌握微量凯氏定氮法的基本操作技术,包括定氮仪的装置及清洗、样品的消化、蒸馏、滴定及含氮量的计算等。了解蛋白氮和非蛋白氮的测定方法和原理。

概说及原理

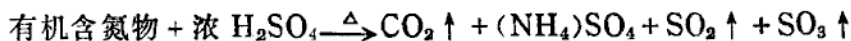
生物体内的有机含氮物(如蛋白质及核酸等)的含氮量常采用微量凯氏定氮法测定,此法比较精确和可靠,最低测出量为 $50\mu\text{g}$ 氮,约相当于 0.3mg 蛋白质,目前仍是生化分析中普遍使用的一种经典技术和基准方法。

各种蛋白质的含氮量都比较接近,平均为 16% ,因此将蛋白质含氮量乘以 6.25 (即每 1g 氮相当于 6.25g 蛋白质),便可计算出被测样品中蛋白质的含量。若测定的蛋白质样品中尚含有其它含氮物质,为测得蛋白质的真实含量,应分别进行蛋白氮和非蛋白氮测定,一般用三氯醋酸等沉淀剂将蛋白质从样品溶液中沉淀出来,按总氮法测定上清液的含氮量,便得到非蛋白氮,然后由总氮量减去非蛋白氮量,再乘以系数,即为蛋白质含量。或直接测定沉淀的蛋白质氮,也可得到所测样品的蛋白质含量。

尽管微量定氮法有不少改良及仪器结构有所不同,但其基本原理和步骤还是一致的,现概述如下:

一、消化

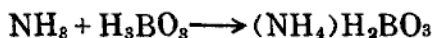
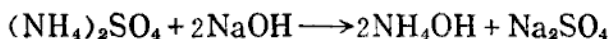
当被测的有机含氮物与浓硫酸混合共热时,被氧化为 CO_2 和水,其中的氮转变成氨,并与硫酸化合生成硫酸铵而残留于消化液中。



上述有机含氮物的分解反应进行很慢,为了加速有机物质的分解,缩短消化时间,常加少量催化剂以加速反应,硫酸铜是常用的催化剂,同时还添加硫酸钾以提高硫酸的沸腾温度,两者混合使用,起着加速氧化,促进分解的作用。在消化过程中还可以加入氧化剂,如过氧化氢也能加速反应。

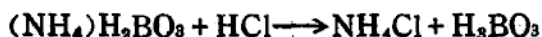
二、蒸馏

消化后所生成的硫酸铵样品,在微量凯氏定氮仪中与浓氢氧化钠作用,生成氢氧化铵,借水蒸汽将氨蒸出,用酸液吸收。一般使用硼酸-指示剂混合液收集氨,氨在酸性溶液中形成铵离子,使溶液中氢离子浓度降低,指示剂颜色发生改变。所用指示剂通常为 0.1% 甲基红- 0.1% 甲基蓝($4:1V/V$)混合指示剂,此指示剂在 $\text{pH}5.2$ 为紫红色, $\text{pH}5.4$ 为暗蓝色(或灰色), $\text{pH}5.6$ 为绿色,变色范围很窄,故很灵敏。



三、滴定

蒸馏完毕，用强酸(0.01mol/LHCl)标准溶液滴定，直至恢复溶液中原来氢离子浓度，即被滴定溶液由绿色变淡紫色为滴定终点。所用强酸的毫克摩尔数即相当于样品中氨的毫克摩尔数。



若用过量的标准盐酸吸收氨，则剩余未被中和的盐酸量可用标准氢氧化钠滴定，由所用盐酸毫克摩尔数减去滴定所耗之氢氧化钠毫克摩尔数，即为被吸收的氨量。此称回滴法。

实 验

一、器材及试剂

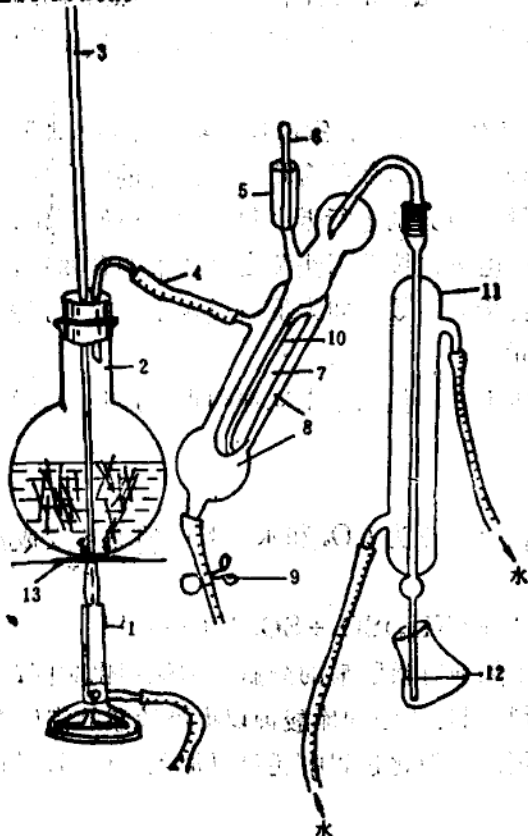


图 2.1 微量凯氏蒸馏装置

1. 煤气灯 2. 蒸汽发生器 3. 长玻璃管 4. 橡皮管 5. 小玻璃杯 6. 棒状玻璃塞 7. 反应室 8. 反应室外壳 9. 夹子 10. 反应室中插管 11. 冷凝管 12. 锥形瓶 13. 石棉网

1. 器材

- (1) 微量凯氏定氮仪(全套)
- (2) 凯氏烧瓶(25ml)
- (3) 移液管(1ml, 2ml, 5ml, 10ml)
- (4) 电炉或煤气灯
- (5) 锥形瓶(50ml, 100ml)
- (6) 量筒(10ml)
- (7) 小漏斗
- (8) 表面皿($\phi 5\text{cm}$)
- (9) 微量滴定管(2ml 或 5ml)
- (10) 酸式及碱式滴定管(25ml)
- (11) 容量瓶(50ml, 100ml)
- (12) 人血清(或其他蛋白质样品)
- (13) 洗耳球
- (14) 沸石或玻璃珠

2. 试剂

- (1) 浓硫酸(A.R.)
- (2) 30% H_2O_2 溶液
- (3) 硫酸钾-硫酸铜混合物 取硫酸钾 3 份和硫酸铜 1 份(W/W), 混合研磨成粉状。
- (4) 30% NaOH 溶液

(5) 2% 硼酸溶液

(6) 混合指示剂 取 0.1% 甲基红-无水乙醇溶液和 0.1% 甲基蓝-无水乙醇溶液按 4:1

比例(V/V)混合,贮于棕色试剂瓶内备用。

(7) 0.01mol/L 标准盐酸溶液

(8) 标准硫酸铵溶液(3mg/ml) 准确称取 141.6mg 干燥硫酸铵(A.R.),加蒸馏水定容至 100ml。

二、操作步骤

1. 定氮仪的装置

按图 2.1 细心进行装置,要求稳固和便于操作,管道连接处要严密无泄漏现象。

2. 仪器的清洗

定氮仪是由几个部分组装在一起的成套装置,结构较为特殊,连接处及进出口都是细口径管道,很难用一般方法清洗干净,需要采用水蒸气进行洗涤。同时在清洗过程中进一步检查仪器装置有否漏气和漏液发生。

向蒸气发生器内加入约 $2/3$ 体积的蒸馏水,再加数滴浓硫酸及几滴 0.1% 甲基红指示剂,使水保持酸性,这样可以避免水中残留的氨被蒸出。同时向蒸馏器中加入数粒沸石或玻璃珠,可以防止爆沸的发生。然后接通冷凝管用水,并在冷凝管下端放一容器承接冷凝水。开始加热至水沸腾,使蒸气通入定氮仪的所有部位,达到清洗的目的。洗涤时可先将小玻杯内的玻塞拔出,清洗 5 min,随后再闭上玻塞,使蒸气通过反应室至冷凝管,连续蒸馏 5—10 分钟,冷凝液由管下口排出。为了检查仪器是否已洗涤干净,可在冷凝管下端放一个盛有 10ml 2% 硼酸及几滴指示剂混合液的锥形瓶,并使冷凝管下口完全浸没在酸液内,继续蒸馏 1—2 min,如硼酸溶液变色不明显,表示仪器内部已洗净。此时将锥形瓶向下移动,使液面距离冷凝下口约 1cm,再蒸馏 1min,最后用蒸馏水冲洗冷凝管下口外壁。清洗完毕,关闭煤气灯或电炉,吸去反应室内残液,可准备样品测定。

3. 标准硫酸铵样品测定

为了练习和熟悉蒸馏及滴定的操作技术,常先用标准硫酸铵溶液测试 2—3 次。

取 3 个 50ml 锥形瓶,分别加入 5ml 含有混合指示剂的硼酸溶液。用表面皿覆盖备用。

加样前必须先将反应室外壳下端夹子打开,然后取下加样杯(小玻杯)内棒状玻塞,准确吸量 2ml 标准硫酸铵溶液,细心地插到样品杯的最下方,使样品液注入反应室中,闭上棒状玻塞。同时取 1 个盛有硼酸溶液的锥形瓶,放在冷凝管下口,并使冷凝管下口插入酸液内,以保证反应所释放的氨全被吸收。

向样品杯(小玻杯)中加入 30% NaOH 10ml,小心轻轻地旋转向上提起棒状玻塞,使碱液缓缓流入反应室,当样品杯内尚有少量碱液时,即应将玻塞盖紧(切勿使之完全流入),再向样品杯中加约 5ml 蒸馏水,同样轻提玻塞,使之缓缓流入反应室,并留少量水在样品杯内作水封。开始加热水蒸汽发生器,沸腾后关闭夹子,进行蒸馏,锥形瓶中酸液由于吸收了氨,由紫红色变成绿色。自变色起再蒸馏 3 min,移动锥形瓶使液面离开冷凝管下口约 1cm,继续蒸馏 1 min,并用少量蒸馏水冲洗冷凝管下口外面,移开锥形瓶,用表面皿盖好。按以上操作再练习蒸馏其他两个样品,待蒸馏完毕后,三瓶样品同时进行滴定。以减少实验误差。

在每次蒸馏完毕后,为了排出反应室中的废液,需要关闭夹子,向样品杯中加入冷蒸馏水,并让充足的蒸气通过反应室,使其中液体沸腾,然后一手夹紧蒸气发生器和定氮仪之间的橡

皮管，一手轻提棒状玻塞，使冷水迅速流入反应室。此时由于反应室外壳中大量蒸气凝缩，引起压力突然下降，而导致反应室中的废液被自动抽吸到反应室外壳(夹套)中。闭上玻塞，取约 20ml 蒸馏水，加入样品杯内，提起玻塞，冷水再次流向反应室，又自动吸出。如此冲洗 3—4 次，即可排尽反应废液及清洗反应室。将夹子打开，排除反应室外壳中积存的废液，关闭夹子，再让蒸气通过全套蒸馏仪清洗数分钟后，继续下一次蒸馏。

4. 生物样品总氮量的测定

生物材料中许多有机含氮物，不论液体或固体均可作为被测样品，测定其总氮含量。本实验选用人血清为材料，以液体样品进行其总氮含量测定。具体步骤如下：

(1) 样品准备

吸取 1ml 人血清，放入 50ml 容量瓶中，加蒸馏水稀释至刻度，混匀备用。若溶液浑浊，可加少量氯化钠，再混匀。

(2) 消化

取 4 个凯氏烧瓶，并编号，分别准确吸量 2ml 稀释血清溶液，细心地将血清样品加入到 1、2 号烧瓶内底部，注意切勿使样品沾于瓶口及瓶颈上。同时向 3、4 号烧瓶中各加入 2ml 蒸馏水，作为空白对照，用以消除试剂中微量含氮物质的影响。然后向 4 个烧瓶中各加入约 100mg 硫酸钾-硫酸铜混合物和 2ml 浓硫酸。移至通风橱内，倾斜放置在电炉上，微火加热至沸腾，这时瓶内物质碳化变黑，并产生大量泡沫，要特别注意控制火力，不能让黑色物质上升到瓶颈部，否则将严重影响样品的测定结果。当混合物停止冒泡，气体逸出也较均匀时，可适当加大火力使瓶内液体保持微微沸腾。如果在瓶颈上发现有黑色的小颗粒，应小心地用消化液将它冲洗下来。在消化过程中要时常转动烧瓶，使全部样品都浸没在硫酸内，以保证样品消化完全。待烧瓶中消化液逐步从棕黑色变成澄清，为保证反应的彻底完成，继续沸腾 1 h。或基本澄清后，将烧瓶取下，让其稍稍冷却后，沿瓶壁缓缓加入 30% H_2O_2 2 滴，再继续加热 10 min，如此可反复数次。反应終了，消化液应呈清彻淡蓝或无色透明，若为淡黄色表示消化尚未完全。消化时间一般约 5—6 h 即可，消化时间不宜过长，否则将会引起氮的损失。如果样品中含赖氨酸或组氨酸较多，则消化时间需要延长 1—2 倍。

消化完毕，关闭电炉，静置使烧瓶冷却至室温，准备蒸馏。

(3) 蒸馏

取洗净的 50ml 锥形瓶 4 个编号，按图 2.1 装置用蒸气冲洗锥形瓶数分钟，冷却后各加入 20% 硼酸溶液 5ml 及混合指示剂 2 滴，酸液应呈紫红色，用表面皿覆盖备用。如果锥形瓶内酸液呈绿色，需要再用蒸气重新洗涤。

蒸馏器每次使用前，需用蒸气洗涤 10min 左右，洗净后，吸去反应室内的残液，即可开始样品蒸馏。

将凯氏烧瓶中的消化液定量地转移到反应室内，并用蒸馏水将凯氏烧瓶中冲洗 3 次，每次约用 2ml，让洗涤液全部流入反应室，然后用少量蒸馏水洗涤加样杯(小玻杯)，闭上棒状玻塞。以下操作完全按“标准硫酸铵样品测定”步骤进行。待 4 个凯氏烧瓶中消化液均蒸馏完毕，再一同进行滴定。

蒸馏时实验室环境中切忌有碱性雾气(如氨等)，否则将严重影响实验结果的准确度。

在蒸馏过程中，碱加入后，有铜氨离子、氢氧化铜或氧化铜等化合物生成，溶液呈蓝色或