

SPT 21世纪高等院校教材

生命科学类

生物化学实验

(第三版)

陈钧辉 陶力 李俊 编
朱婉华 袁玉荪



科学出版社

www.sciencep.com

21 世纪高等院校教材

生物化学实验

(第三版)

陈钧辉 陶力 李俊 编
朱婉华 袁玉荪

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书在第一版、第二版多年使用的基础上进行了修订,增加了生物化学和分子生物学方面的一些新方法、新技术。全书共 98 个实验,内容设置与《普通生物化学》教材一致,包括糖、脂、蛋白质、核酸、酶、维生素、激素、生物代谢与生物氧化,非常适合作为本科教学的同步教材。本书内容全面,包含一些综合性和较大型的实验,供不同学校、不同专业根据具体条件选用。本书力求结构清晰简洁,表达严谨规范,让学生易学好用。

本书可作为高等院校生物类各专业大学生的生物化学实验教材,也可供有关教师和科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验/陈钧辉等编. —3 版. —北京:科学出版社,2003.4
(21 世纪高等院校教材)

ISBN 7-03-010989-9

I. 生… II. 陈… 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(2003)第 009160 号

责任编辑:谢灵玲/责任校对:包志虹

责任印制:刘士平/封面设计:槐寿明

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

1988 年 3 月 第 二 版 高等教育出版社出版

2003 年 4 月 第 三 版 开本:B5(720×1000)

2003 年 4 月 第一次印刷 印张:17 1/2

印数:1—4 000 字数:334 000

定价:23.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

第三版前言

本书自1979年出第一版，1986年出第二版以来，转眼十多年又过去了，在这十多年期间，生物化学的发展极为迅速，生物化学实验手段和技术不断更新，分子生物学方法不断渗入到生物化学这个领域中。鉴于以上情况，我们在第二版的基础上，对其内容进行了更新，并补充了近年来发展起来的生物化学和分子生物学方面的一些新方法和新技术。

全书共98个实验，内容包括糖、脂、蛋白质、核酸、酶、维生素、激素、生物代谢与生物氧化，在修订过程中保留了第二版中的基础性实验，又增加了20多个新实验。这些新增加的实验大多是从科研中的一些新技术和新方法“转化”而来，使实验内容尽量与现代科学研究和应用相联系，更具有先进性、实用性，另外还增加了一些综合性实验。

本书内容丰富，涉及面广，还有一些较大型的实验，不同学校、不同专业可根据具体条件选做其中的部分实验。

在修订过程中，王传怀教授为我们提供了2个实验内容，还有长期参与生物化学实验教学工作的张太平、李学信、焦瑞清、张冬梅、袁达文和唐惠炜等教师和技术人员给本书的修订提供了许多帮助。本书在修订过程中还受到国家基础科学人才培养基金和南京大学创建世界高水平大学教材建设项目的资助，在此一并致谢。

由于我们水平有限，书中错误和不足在所难免，敬请读者批评指正。

南京大学生命科学学院

生物化学系

陈钧辉

2002.7.26

第二版前言

本书自 1979 年出版以来，受到许多高等院校和研究单位的欢迎，同时也收到了不少的宝贵意见。为此，我们在本书使用数年的基础上进行了修订。在修订过程中，删去了一些结果不明显的实验，如脂肪酸 β -氧化；补充了一些新技术，如固相酶技术等；增加了一些生物化学制备方面的实验，如 5'-核苷酸的制备，胰糜蛋白酶的制备等；另外对同一类物质的测定和分离分析方法选用几种不同的实验方法供读者选用。全书共有 72 个实验。

由于我们水平有限，书中缺点和错误在所难免，敬请读者批评指正。

在修订过程中，朱长生、张太平和荣翠琴等同志参与部分工作，在此表示感谢。

编者

1986 年 5 月

第一版前言

近年来，由于生物化学实验技术发展较快，许多院校对生物化学实验教材的需要又较迫切，因此，我们将使用数年的生物化学实验讲义加以修改充实，并配合郑集教授编著的《普通生物化学》编成此书，供有关院校生物化学实验教学之用。

本书共有糖、脂、蛋白质、核酸、酶、维生素、激素、生物氧化和物质代谢等方面的实验 60 个，其中既有与《普通生物化学》相配合、印证理论的实验，又有一些常用的提取与分离、定性、定量实验。如就方法学而言，则既有经典方法，如血糖定量、粗脂肪测定、克氏定氮、纸层析、纸电泳法等等，亦有近年广泛应用的 DEAE-纤维素薄板层析、尼龙 66 薄膜层析、各种凝胶电泳和免疫电泳等新方法。每一实验都分原理、试剂及材料和操作三部分阐述，对需要特别注意或解释之外，便分别加注说明，帮助学生学习和减少错误。

本书内容较多，并且还有一些较大型的实验，主要是出于以下两点考虑：① 可供不同专业选做，如生化专业可多做一些；② 各校实验室条件不同，可根据具体条件选做。

由于水平所限，本书的缺点错误在所难免，希望读者批评指正。

在编写过程中，承我室朱长生、张太平、张国保三位同志以及进修教师葛辉同志大力协助。生物系胡蓓蒂同志绘制全部插图，在此一并致谢。

南京大学生物化学教研室
袁玉荪 朱婉华 陈钧辉

目 录

| | |
|-------------------------------------|--------|
| 第一章 糖类 | (1) |
| 实验一 糖的颜色反应 | (1) |
| 实验二 糖的还原作用 | (4) |
| 实验三 血糖的定量测定 (Folin-Wu 法) | (5) |
| 实验四 血糖的定量测定 (Folin-Malmros 法) | (8) |
| 实验五 血液中葡萄糖的测定 (邻甲苯胺法) | (11) |
| 实验六 蒽酮比色定糖法 | (13) |
| 实验七 植物组织中总糖和还原糖含量的测定 | (15) |
| 实验八 多糖的试验 | (16) |
| 实验九 肝素钠的定量测定 | (18) |
| 实验十 糖的旋光性和变旋现象 | (20) |
| 第二章 脂类 | (23) |
| 实验十一 脂肪的组成 | (23) |
| 实验十二 卵磷脂的提取和鉴定 | (25) |
| 实验十三 粗脂肪含量的测定 (索氏抽提法) | (26) |
| 实验十四 碘价的测定 (Hanus 法) | (29) |
| 实验十五 皂化价的测定 | (31) |
| 实验十六 脂肪酸价的测定 | (33) |
| 实验十七 脂肪乙酰价的测定 | (34) |
| 实验十八 血清胆固醇的定量测定 (磷硫铁法) | (36) |
| 实验十九 血清总胆固醇的测定 (邻苯二甲醛法) | (37) |
| 实验二十 血清胆固醇的定量测定 (醋酸酐法) | (39) |
| 实验二十一 血清甘油三酯简易测定法 | (41) |
| 实验二十二 丙二醛 (MDA) 的测定 | (43) |
| 第三章 蛋白质 | (46) |
| 实验二十三 蛋白质的颜色反应 | (46) |
| 实验二十四 蛋白质的沉淀反应 | (49) |
| 实验二十五 微量克氏 (Kjeldahl) 定氮法 | (51) |
| 实验二十六 非蛋白氮 (NPN) 的测定 | (55) |
| 实验二十七 甲醛滴定法 | (57) |
| 实验二十八 双缩脲法测定蛋白质浓度 | (58) |

| | | |
|---------------|----------------------------|---------|
| 实验二十九 | 福林 (Folin) - 酚试剂法测定蛋白质浓度 | (59) |
| 实验三十 | 紫外光吸收法测定蛋白质浓度 | (61) |
| 实验三十一 | 考马斯亮蓝结合法测定蛋白质浓度 | (63) |
| 实验三十二 | DNP-氨基酸的制备和鉴定 | (64) |
| 实验三十三 | DNS-氨基酸的制备和鉴定 | (67) |
| 实验三十四 | 用 DNS 法鉴定蛋白质或多肽的 N-端氨基酸 | (70) |
| 实验三十五 | 用 DNS 法测定多肽的氨基酸组成 | (73) |
| 实验三十六 | 肽的序列分析 (PTH 法) | (75) |
| 实验三十七 | 甲硫氨酰甘氨酸二肽的合成 | (78) |
| 实验三十八 | 尿素对蛋白质的变性作用 | (81) |
| 实验三十九 | 氨基酸纸层析法 | (83) |
| 实验四十 | 氨基酸微晶纤维素薄板层析法 | (86) |
| 实验四十一 | 离子交换柱层析法分离氨基酸 | (88) |
| 实验四十二 | 血清白蛋白的分离与纯化 | (89) |
| 实验四十三 | 凝胶层析法分离纯化蛋白质 | (92) |
| 实验四十四 | DEAE-Sephadex A-25 分离纯化多肽 | (94) |
| 实验四十五 | 亲和层析法分离纯化单克隆抗体 | (97) |
| 实验四十六 | 醋酸纤维薄膜电泳法分离血清蛋白质 | (99) |
| 实验四十七 | 血清糖蛋白醋酸纤维薄膜电泳 | (102) |
| 实验四十八 | 聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳法分离血清蛋白质 | (104) |
| 实验四十九 | 聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳法鉴定胰岛素 | (108) |
| 实验五十 | SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的相对分子质量 | (110) |
| 实验五十一 | 用等电聚焦电泳法测定蛋白质等电点 | (114) |
| 实验五十二 | 对流免疫电泳法测定胎儿甲种蛋白质 | (116) |
| 实验五十三 | 火箭免疫电泳法 | (119) |
| 实验五十四 | Western 印迹 | (120) |
| 第四章 核酸 | | (123) |
| 实验五十五 | 核酸的定量测定 (定磷法) | (123) |
| 实验五十六 | 酵母 RNA 的提取 | (125) |
| 实验五十七 | RNA 的定量测定 (苔黑酚法) | (127) |
| 实验五十八 | 动物肝脏中 DNA 的提取 | (128) |
| 实验五十九 | DNA 的定量测定 (二苯胺法) | (130) |
| 实验六十 | 5'-核苷酸的定量测定 (过碘酸氧化法) | (131) |
| 实验六十一 | DEAE-纤维素薄板层析法测定核苷酸 | (134) |
| 实验六十二 | 腺苷三磷酸的定量测定 (纸电泳法) | (136) |

| | | |
|----------------|----------------------------------|---------|
| 实验六十三 | 核酸的酶法降解以及葡聚糖凝胶层析法制备 5'-单核苷酸 | (139) |
| 实验六十四 | 质粒 DNA 的提取 | (140) |
| 实验六十五 | DNA 琼脂糖凝胶电泳 | (143) |
| 第五章 酶 | | (146) |
| 实验六十六 | 过氧化氢酶的作用 | (146) |
| 实验六十七 | 过氧化物酶的作用 | (147) |
| 实验六十八 | 细胞色素氧化酶的作用 | (148) |
| 实验六十九 | 乳酸脱氢酶及其辅酶的作用 | (149) |
| 实验七十 | 激活剂和抑制剂对酶活力的影响 | (151) |
| 实验七十一 | 酵母醇脱氢酶的提纯 | (152) |
| 实验七十二 | 醇脱氢酶的专一性 | (155) |
| 实验七十三 | 酵母醇脱氢酶的动力学研究 | (156) |
| 实验七十四 | 胰蛋白酶米氏常数的测定 | (163) |
| 实验七十五 | 胆碱酯酶米氏常数的测定 | (166) |
| 实验七十六 | 过氧化氢酶米氏常数的测定 | (169) |
| 实验七十七 | 用正交法测定几种因素对酶活力的影响 | (170) |
| 实验七十八 | 溶菌酶的提纯结晶和活力测定 | (174) |
| 实验七十九 | 猪胰糜蛋白酶的制备和纯度鉴定 | (176) |
| 实验八十 | 疏水层析分离纯化 α -淀粉酶 | (178) |
| 实验八十一 | α -淀粉酶的活力测定 | (180) |
| 实验八十二 | 大肠杆菌碱性磷酸酶的制备 | (182) |
| 实验八十三 | 碱性磷酸酶的提取和分离及比活力测定 | (185) |
| 实验八十四 | 琼脂糖胶电泳法分离乳酸脱氢酶同工酶 | (190) |
| 实验八十五 | 聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离乳酸脱氢酶同工酶 | (192) |
| 实验八十六 | 肝脏谷丙转氨酶活力测定 | (195) |
| 实验八十七 | 血清谷丙转氨酶活力测定 | (198) |
| 实验八十八 | 固定化 5'-磷酸二酯酶的制备及其在分离核苷酸中的应用 | (199) |
| 第六章 维生素 | | (206) |
| 实验八十九 | 维生素 A 的定性测定 | (206) |
| 实验九十 | 维生素 B ₁ 的定性测定 | (207) |
| 实验九十一 | 维生素 C 的定量测定 (2, 6-二氯酚靛酚滴定法) | (208) |
| 实验九十二 | 维生素 C 的定量测定 (磷钼酸法) | (210) |
| 实验九十三 | 核黄素 (VB ₂) 荧光光度定量测定法 | (212) |
| 实验九十四 | 荧光法测定核黄素结合蛋白-核黄素的解离常数 | (215) |

| | |
|---|---------|
| 第七章 激素 | (218) |
| 实验九十五 尿中 17-羟皮质类固醇的测定 (Porter-Silber 法) | (218) |
| 第八章 生物代谢与生物氧化 | (221) |
| 实验九十六 华氏 (Warburg) 呼吸仪瓶常数的测定 | (221) |
| 实验九十七 L-谷氨酸的酶促脱羧作用 (测压法测定 L-谷氨酸) | |
| | (223) |
| 实验九十八 发酵过程中无机磷的被利用和 ATP 的生成 (ATP 的 | |
| 生物合成) | (225) |
| 附录 | (228) |
| 一、生物化学实验须知 | (228) |
| 二、玻璃仪器的洗涤及一些常用的洗涤剂 | (229) |
| 三、移液器的使用 | (231) |
| 四、吸管的使用 | (232) |
| 五、过滤和离心 | (233) |
| 六、722 型分光光度计的使用 | (234) |
| 七、930 型荧光光度计的使用 | (236) |
| 八、UV-9100 型紫外可见分光光度计的使用 | (239) |
| 九、实验室常用酸碱的比重和浓度 | (243) |
| 十、常用酸碱指示剂 | (243) |
| 十一、缓冲液的配制 | (244) |
| 十二、恒沸盐酸的制备 | (250) |
| 十三、大肠杆菌丙酮粉的制备 | (250) |
| 十四、生物化学中某些重要化合物的 M_r 及 pK 值 | (251) |
| 十五、氨基酸的一些物理常数 | (253) |
| 十六、某些蛋白质的物理性质 | (254) |
| 十七、化学元素的相对原子质量表 | (255) |
| 十八、离心机转速与相对离心力的换算 | (257) |
| 十九、硫酸铵饱和度的常用表 | (259) |
| 二十、常用离子交换剂 | (260) |
| 二十一、常用凝胶过滤层析介质 | (263) |
| 二十二、汞的密度 | (265) |

第一章 糖 类

实验一 糖的颜色反应

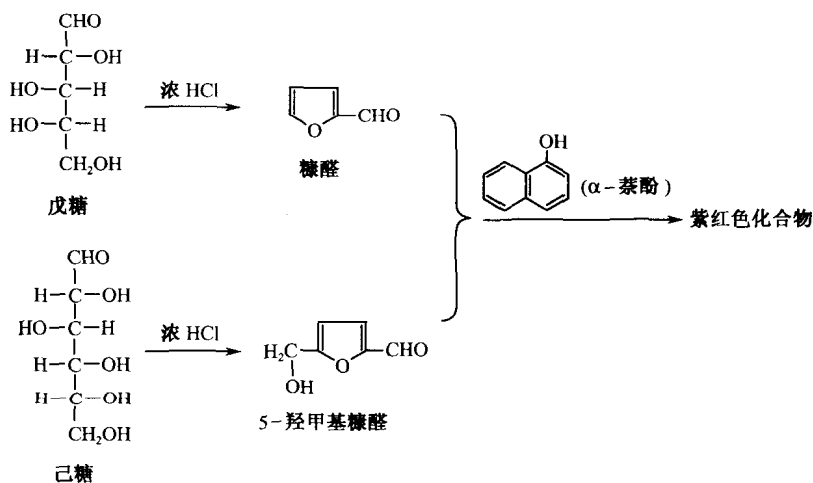
A. 莫氏试验^①

一、目的

掌握莫氏 (Molisch) 试验鉴定糖的原理和方法。

二、原理

糖经浓无机酸 (浓硫酸、浓盐酸) 脱水产生糠醛或糠醛衍生物, 后者在浓无机酸作用下, 能与 α -萘酚^② 生成紫红色缩合物。



利用这一性质可以鉴定糖。

三、实验器材

1. 棉花或滤纸。
2. 吸管 1.0ml ($\times 4$)、2.0ml ($\times 1$)。

^① 一些非糖物质 (如糠醛、糖醛酸等) 亦呈阳性反应。此外, 样液中如含高浓度有机化合物, 将因浓硫酸的焦化作用, 而出现红色, 故试样浓度不宜过高。

^② 亦可用麝香草酚或其他苯酚化合物代替 α -萘酚, 麝香草酚的优点是溶液比较稳定, 且灵敏度与萘酚一样。

3. 试管 1.5cm×15cm (×4)。

四、实验试剂

1. 莫氏试剂：称取 α -萘酚 5g，溶于 95% 乙醇并稀释至 100ml。此试剂需新鲜配制，并贮于棕色试剂瓶中。

2. 1% 蔗糖溶液：称取蔗糖 1g，溶于蒸馏水并定容至 100ml。

3. 1% 葡萄糖溶液：称取葡萄糖 1g，溶于蒸馏水并定容至 100ml。

4. 1% 淀粉溶液：将 1g 可溶性淀粉与少量冷蒸馏水混和成薄浆状物，然后缓缓倾入沸蒸馏水中，边加边搅，最后以沸蒸馏水稀释至 100ml。

五、操作

于 4 支试管中，分别加入 1ml 1% 葡萄糖溶液、1% 蔗糖溶液、1% 淀粉溶液和少许纤维素（棉花或滤纸浸在 1ml 水中），然后各加莫氏试剂 2 滴^①，摇匀，将试管倾斜，沿管壁慢慢加入浓硫酸 1.5ml（切勿振荡！），硫酸层沉于试管底部与糖溶液分成两层，观察液面交界处有无紫红色环出现。

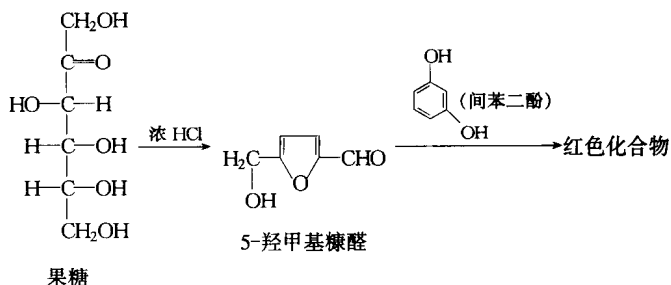
B. 塞氏试验

一、目的

掌握塞氏（Seliwanoff）试验鉴定酮糖的原理和方法。

二、原理

酮糖在浓酸的作用下，脱水生成 5-羟甲基糠醛，后者与间苯二酚作用，呈红色反应；有时亦同时产生棕色沉淀，此沉淀溶于乙醇，成鲜红色溶液^②。以果糖为例，其反应如下：



三、实验器材

1. 吸管 0.50ml (×3)、5.0ml (×1)。

① 莫氏试剂应直接滴入试液中，勿使试剂接触试管壁，否则试剂会与硫酸接触生成绿色而掩盖紫色环。

② 在此实验条件下，蔗糖有可能水解成果糖与葡萄糖，而呈阳性反应。葡萄糖与麦芽糖亦呈阳性反应，但呈色反应的速度较酮糖缓慢。果糖的红色出现及沉淀的产生，应在加热后 20~30s 内，生成的沉淀能溶于乙醇并成红色溶液。

2. 试管 1.5cm×15cm (×3)。

3. 水浴锅。

四、实验试剂

1. 塞氏试剂：溶 50 mg 间苯二酚于 100ml 盐酸中 [$V(H_2O) : V(HCl) = 2:1$]，临时配制。

2. 1% 果糖溶液：称取果糖 1g，溶于蒸馏水并定容至 100ml。

3. 1% 葡萄糖溶液：见试验 A。

4. 1% 蔗糖溶液：见试验 A。

五、操作

于 3 支试管中分别加入 1% 葡萄糖溶液、1% 蔗糖溶液和 1% 果糖溶液各 0.5ml，各加塞氏试剂 2.5ml，摇匀，同时置沸水浴内。比较各管颜色变化及红色出现的先后次序。

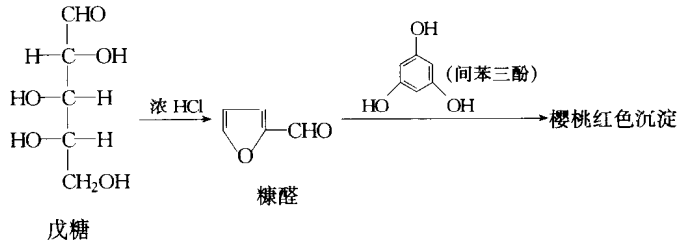
C. 杜氏试验

一、目的

掌握杜氏 (Tollen) 试验鉴定戊糖的原理和方法。

二、原理

戊糖在浓酸溶液中脱水生成糠醛，后者与间苯三酚结合成樱桃红色物质：



本试验虽常用以鉴定戊糖，但并非戊糖的特有反应。果糖、半乳糖和糖醛酸等都呈阳性反应。戊糖反应最快，通常在 45s 内即产生红色沉淀。

三、实验器材

1. 吸管 1.0ml (×3)。

2. 试管 1.5cm×15cm (×3)。

3. 水浴锅。

四、实验试剂

1. 杜氏试剂：2% 间苯三酚乙醇溶液 (2g 间苯三酚溶于 100ml 95% 乙醇中) 3ml，缓缓加入浓盐酸 15ml 及蒸馏水 9ml 即得，临时配制。

2. 1% 阿拉伯糖溶液：称取阿拉伯糖 1g，溶于蒸馏水并稀释至 100ml。

3. 1% 葡萄糖溶液：见试验 A。

4. 1%半乳糖溶液：称取半乳糖 1g，溶于蒸馏水并稀释至 100ml。

五、操作

于 3 支试管中各加入杜氏试剂 1ml，再分别加入 1 滴 1% 葡萄糖溶液、1% 半乳糖溶液和 1% 阿拉伯糖溶液，混匀。将各试管同时放入沸水浴中，观察颜色的变化，并记录颜色变化的时间。

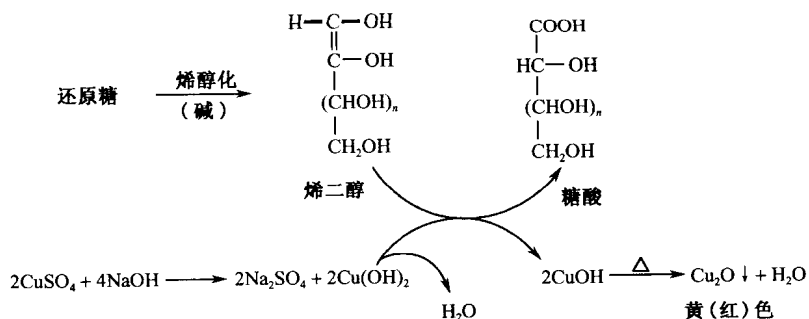
实验二 糖的还原作用

一、目的

掌握用糖的还原反应来鉴定糖的原理和方法。

二、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，其本身则被还原成红色或黄色的 Cu_2O ①。此法常用作还原糖的定性或定量测定。其反应表示如下：



目前临床上多用本尼迪特法，因此法具有：①试剂稳定，不需临用时配制；②不因氯仿的存在而被干扰；③肌酐或肌酸等物质所产生的干扰程度远较费林试剂小等优点。

三、实验器材

1. 吸管 1.0ml (×5)、2.0ml (×1)。
2. 试管 1.5cm×15cm (×6)。
3. 水浴锅。

① 由于沉淀速度不同，形成的颗粒大小不同，颗粒大的为红色，小的为黄色。

四、实验试剂

1. 费林试剂

试剂 A: 称取硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 34.5g, 溶于蒸馏水并稀释至 500ml。

试剂 B: 称取氢氧化钠 125g, 酒石酸钾钠^① 137g, 溶于蒸馏水并稀释至 500ml。

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 85g 柠檬酸钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_3\text{O}_7 \cdot 11\text{H}_2\text{O}$) 及 50g 无水碳酸钠, 溶解于 400ml 蒸馏水中。另溶解 8.5g 硫酸铜于 50ml 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^②。

3. 1% 淀粉溶液: 见实验一。

4. 1% 蔗糖溶液^③: 见实验一。

5. 1% 葡萄糖溶液: 见实验一。

五、操作

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

实验三 血糖的定量测定 (Folin-Wu 法)

一、目的

1. 掌握 Folin-Wu 法测定血糖含量的原理和方法。

2. 学会制备无蛋白血滤液。

二、原理

无蛋白血滤液中的葡萄糖与碱性硫酸铜溶液共热, Cu^{2+} 即被血滤液中的葡

① 酒石酸钾钠的作用是防止反应产生的氢氧化铜或碳酸铜沉淀, 使之变为可溶性的而又略能解离的复合物, 从而保证继续供给 Cu^{2+} 。

② 如因存放较久而产生沉淀, 可取上清液使用, 不必重新配制。存放较久的本尼迪特试剂较新配制的更好。

③ 所用蔗糖应用 C.P. 以上规格, 且应事先以本尼迪特试剂检验合格再用, 否则将因药品不纯, 或部分分解而有还原性。

葡萄糖还原成 Cu^+ (Cu_2O)， Cu_2O 又使钼酸试剂还原成低价的蓝色钼化合物（钼蓝）。血液的糖含量和产生的 Cu_2O 成正比， Cu_2O 的量与形成钼化合物的量成正比，可用比色测定法。

三、实验器材

1. 全血。
2. 滤纸。
3. 722 型（或 7220 型）分光光度计。
4. 血糖管 25ml ($\times 3$)。
5. 奥氏吸管 1.0ml ($\times 3$)、2.0ml ($\times 1$)。
6. 吸管 2.0ml ($\times 3$)、10.0ml ($\times 1$)、5.0ml ($\times 4$)。
7. 锥形瓶 20ml ($\times 1$)。
8. 表面皿 $\phi 6\text{cm}$ ($\times 1$)。
9. 漏斗 $\phi 5\text{cm}$ ($\times 1$)。
10. 水浴锅。
11. 电炉（或煤气灯）。

四、实验试剂

1. 标准葡萄糖溶液

(1) 1% 葡萄糖母液 (10mg/ml)：称取 1.000g 葡萄糖 (A.R.)，溶于蒸馏水并稀释至 100ml。

(2) 葡萄糖标准液 (0.1mg/ml)：取 1.0ml 葡萄糖母液置 100ml 容量瓶内，加蒸馏水至刻度。

2. 碱性硫酸铜溶液

A 液：称取无水碳酸钠 35g，酒石酸钠 13g 及碳酸氢钠 11g，溶于蒸馏水后，稀释至约 700ml，待溶液清晰后再稀释至 1 000ml。

B 液：称取硫酸铜晶体 5g，溶于蒸馏水并稀释至 100ml，加浓硫酸数滴作稳定剂。

临用时，取 A 液 25ml，B 液 5ml，混合后，再加 A 液至 50ml，摇匀。此混合液置冰箱内可保存数日，如暴露于阳光下，数小时即失效。

3. 酸性钼酸盐溶液：称取钼酸钠 600g，置烧杯内，加入少量蒸馏水，溶解后倾入 2 000ml 容量瓶中，加蒸馏水至刻度，摇匀，倾入另一较大的试剂瓶中，加溴水 0.5ml，摇匀，静置数小时。取上清液 500ml，置于 1 000ml 容量瓶中，徐徐加入 225ml 85% 磷酸，边加边摇匀。再加 25% 硫酸 150ml，置暗处至次日，用空气将剩余的溴赶走^①，然后加入冰醋酸 75ml，摇匀，用蒸馏水稀释至 1 000ml，贮于棕色瓶中。

^① 赶溴装置如图 1 所示，见下页。

4. 10% 钨酸钠溶液：钨酸钠 10g，溶于蒸馏水并稀释至 100ml。

5. 0.33mol/L H_2SO_4 溶液：于 53ml 蒸馏水中加入 1ml 浓硫酸。

五、操作

1. 无蛋白血滤液的制备

用奥氏吸管^①吸取全血（已加抗凝剂——草酸钾或草酸钠）1ml，缓缓放入^② 20ml 锥形瓶内，加水 7ml，摇匀，溶血后（血液变为红色透明时）加 10% 钨酸钠 1ml，摇匀，再加 0.33mol/L H_2SO_4 1ml（皆用吸管），随加随摇，加毕充分摇匀，放置 5—15min，至沉淀由鲜红变为暗棕色^③。用干滤纸过滤（先倾入液体少许，待滤纸润湿后，再全部倒入），并在漏斗上盖一表面皿。如滤液不清，需重滤。每毫升无蛋白血滤液相当于 0.1ml 全血。

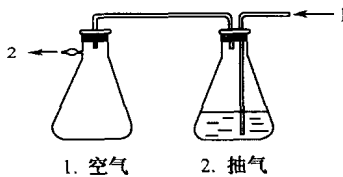


图1 赶溴装置

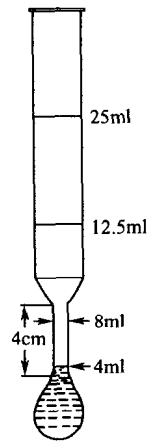


图2 血糖管

2. 血糖测定

取具有 25ml 刻度之血糖管^④（见图 2）3 支，编号。用奥氏吸管吸取无蛋白血滤液 2ml（如含糖量较高，只取 1ml，另加水 1ml），放入第一支血糖管内。于第二支血糖管中加 2ml 标准葡萄糖溶液（1ml 含 0.1mg 葡萄糖）。第三支血糖管中加 2ml 蒸馏水。然后各加 2ml 新配制的碱性硫酸铜溶液，同时置于沸水浴内煮

① 奥氏吸管俗称胖肚吸管，因吸管中部有一膨大部分，用以吸取血液，可减少血液与管壁的接触面，使吸量更为准确。

② 欲得准确结果，所取血液的量必须准确。如由吸管中放出血液的速度太快，则有大量血液粘在吸管内壁，容量不准，一般放出 1ml 血液所用的时间不应少于 1min。

③ 沉淀由鲜红变为暗棕色，是因钨酸钠与 H_2SO_4 作用生成钨酸，在适当酸度时，使血红蛋白变性、沉淀。如血沉淀经放置后不变为暗棕色或重滤后仍混浊，系因血中所加抗凝剂过多，可在钨酸与血混合液中加入 10% H_2SO_4 1—2 滴，待变为暗棕色后再滤。

④ Folin-Wu 血糖管，可减少 Cu^+ 与空气的接触，防止氧化成 Cu^{2+} 。