

动物生物化学实验指导书

沈阳农学院



目 录

一	动物生物化学实验室规则.....	1
二	实验 1. 基本操作法.....	2
三	实验 2. 动物体中各种酶的定性反应。(附离心机 使用法).....	12
	①唾液酶 ②脱氢酶 ③氧化酶 ④尿酸酶	
四	实验 3. 血清过氧化氢酶的定量测定(附微量吸管 使用法).....	18
五	实验 4. 几种维生素的定性反应.....	21
	①维生素A ②维生素B ③维生素K ④维生素B ₁	
	⑤维生素P	
六	实验 5. 维生素U的定量测定(附微量滴定 管使用法).....	26
七	实验 6. 血糖的定量测定.....	29
八	实验 7. 尿中淀粉酶指数的测定.....	33
九	实验 8. 尿中酮体的定性反应.....	37
十	实验 9. 碘值的测定.....	39
十一	实验 10. 胰脂肪酶活性的测定.....	42
十二	实验 11. 血清中总氮及非蛋白氮的测定.....	44
十三	实验 12. 几种含氮产物的定性反应.....	46
	①肌酸 ②肌酐 ③肌肝 ④尿酸 ⑤尿素	
十四	实验 13. 氨基酸脱羧作用(附纸层析法) 水及无机盐的代谢.....	56
十五	实验 14. 血中无机磷的定量.....	60
十六	实验 15. 血清钙的定量.....	65
十七	注解.....	67
十八	附录.....	76

动物生物化学实验規則

动物生物化学是晚近新兴的一門科学。但是，它在社会主义建設和整个人类的生活活动中已佔据十分重要的位置；它不但是医学、生理学、化学工业的重要基础，全时对于农业尤其是畜牧业更是具有不可分割的联系；通过动物生化了介到的知識可以研究改变动物代謝性能，使其更符合于人民的需要。全时它也是判断家畜疾病或健康状况的一种不可缺少的診斷法。所以，学好动物生化对于每一个畜牧兽医工作者來說都是一件十分重要的事情。

本实验的目的在于巩固課堂讲授知識，掌握操作技术、熟悉科学研究方法、学会分析結果和得到正确結論的能力。所以，全学們应以認真的态度，科学的精神进行实验工作。实验需要較复杂的条件，因此所有讲过的理論不是完全都能实验，全学們应据此举一反三，要从所学中进一步体会，要想解决某一实际问题应如何来組織实验的过程。本实验所写内容，某些部分仅供全学学习和今后工作之參攷。实验之具体进行步驟将由老师課堂交待。现将实验規則簡列于后：

1. 全学在进行实验前必須仔細閱讀实验指导、了介实验原理，拟出实验进行計劃（尤以一次实验課有几項不全内容时，更应特別注意科学的安排時間）。老师将在課前全学准备情况，作为攷查的一部分成績。如老师认为被檢全学不合要求时，可停止其实验，直到手习合乎要求再开始操作。

2. 公用藥品只許在原来地方使用，公用仪器用完也应立即送还原处。仪器藥品应当爱护，以免造成不必要的損失和浪費。如有损坏时，应立即填写仪器损坏单。仪器用完后必須洗刷干净，离开实验前，实验台应整理清洁（每次实验结束后，派两名全学打扫清洁）。

3.室内要保持肃静，不得高声谈话，妨碍他人思考及操作，每次实验老师进行讲解和提问题时，全学们应认真听讲，每次实验后应按要求按时交实验报告。

4.天秤砝码要用镊子取，砝码盒镊子不准作其它用途。酸碱溶液，棉花及废纸等严禁倒入水槽内，以免堵塞或损坏自来水管。使用有毒药品易燃及危险药品时要特加小心。药品仪器不准带出实验室。

实验1 基本操作法

1 要求：

1.了解实验室的一般规则 2.点收仪器 3.了解并掌握洗涤玻璃仪器法 4.掌握某些仪器的使用法及某些基本操作法 5.了解比色法使用法。

I：仪器：见实验仪器单

II 本实验的具体进程

(一) 点收仪器：根据实验仪器单，逐项查点仪器是否完整无缺，若有缺损者应立即向教员声明并请求补充或更换。在收点过程中，如有不认识的仪器，应请教师解释。

(二) 玻璃仪器的洗涤：一般玻璃仪器、如烧杯试管等可先用肥皂刷洗，刷洗时使其尽可能产生泡沫，然后用自来水冲洗至无肥皂为止，最后用少量蒸馏水冲洗两次或三次。但定量用玻璃仪器，如确定管，吸量管、量瓶等须先用水或用肥皂尽量洗涤。然后将仪器内水倒干，仪器外壁水擦干，用铬酸洗液浸渍数小时。再用自来水冲洗，将洗液完全洗去，最后再用少量蒸馏水冲洗两次或三次。凡洗净的玻璃器皿不应在器壁上带水珠，否则是未洗干净。

(三) 某些仪器的用法及某些基本操作的复习：作好动物生化实

驗是掌握這門科學的關鍵之一而且規地，科學地進行實驗操作又是做好動物生化實驗的先決條件，因此全學門有必要進行認真的了解，巩固，熟練本驗中的某些基本操作。

1. 吸量管的使用：常用吸量管有三種：①刻度吸量管。刻度吸量管有刻度刻到尖端的及不刻到尖端的兩種，使用前要仔細分清，如使用刻度到尖端者時，則當欲將所量取液體全部放出時，須將最後留在管內的少量液體吹出，如使用刻度不到尖端者時，將液體放出至下端的刻度為止，不應吹出最後留在管端的少量液體，②移液吸量管，將所量取的液體放出時，只須將管之尖端觸及受器之壁約半分鐘即可，不得吹出留在尖端的液體。③奧民吸量管，準確度最大，使用時必須吹出留在尖端的液體。在使用上述任何一種吸量管時均用食指堵蓋吸量管上孔：當自液體中取出後均需將管外之外壁用濾紙擦干：放出所需要之液體後，均需使管下端暫能及受器之壁。

2. 量瓶的使用：量瓶也為準確之定量儀器。瓶頸上有一刻度及二刻度者兩種、二刻度者可兼作移液用，但此時以上面刻度為準。

3. 量筒之使用：量取液體時，如準確度要求不嚴格，可用量筒。

4. 混勻法：欲使一反應充分進行，必須使反應體系內各種物質很好的互相關接觸。因此必須徹底混勻，液體稀釋時亦須混勻。混勻之方法通常有三種：①使盛器作離心運動，②左手持試管使之直立，以右手指輕擊管之下半部，使管內液體作旋轉流動。③不得已時可用玻璃棒攪動。無論那種方法，均須防止管內液體濺出或被污染，不得用手指堵蓋管口或瓶口振盪。

5. 保溫法：可用暖箱保溫或水浴保溫。

6. 加熱法：可用直接火或水浴加熱，使用水浴時須防止浴中容器傾倒。

7.酒精灯及酒精喷灯使用法：在每次使用酒精灯后，必須将灯罩盖上使火焰熄火，不得点着酒精灯离开座位。酒精喷灯目前常用着，有座式、挂式、巴式三种，在使用喷灯前，必須将喷气管充分烧热后再行打开閥門，点火使用。

8.过滤法：可用漏斗及滤纸或滤布法，当将欲过滤之物质倾入漏斗时，須使其沿玻璃棒慢慢流下，以防損失。

9.沉淀的洗滌：使沉淀和溶剂分开常用过滤（或吸滤）的方法。此时沉淀中尚会有部分溶剂，須洗滌后方得到純的沉淀。洗滌沉淀时需注意：① 沉淀不应溶于洗滌阶用液体中。为使其溶介得最少常在低温进行。② 每次用少量液体，多洗几次，③ 必須等待前一次所有洗滌液体完全滤过后，再加入液体进行第二次的洗滌。

10.防止錐瓶或試管等中液体蒸发太多，或在加热时防止液体挥发太多，可在瓶口或管口加一表玻璃。放置时使表玻璃之凸面向下。

11.烘干法：烘干試管时应将管口向下約成 45° 角，由上往下，先烤管底，最后将管口的水分烤干，烘干时需经常移动，而且应注意火力不要过大以免爆炸。

12.滴定管的使用：使用前注意活塞是否已涂油。① 读刻度时视线和液面須在全一水平面。② 閥門中的油要涂得均匀。③ 滴定时用左手轉动閥門，右手持受器，④ 在滴定过程中須边滴定，边摇匀如滴定管盛过 N_2O_5 溶液后应立即洗淨。

13.贴标签：全时使用两个或更多的試管（或其它容器）进行操作时。为避免混淆，必須用紙块写好标签贴在試管上，或用蜡笔直接在容器上写明。

四.比色計使用法：生物体内許多成分的含量均甚微，不能使用重量分析法測定，故常用容量分析法或比色法測定，比色法尤为常用。

比色計可分爲兩類，即目光比色計及光电比色計。

一、目光比色計的使用法

1. 原理：

当光线透过有色溶液时，則透出溶液的出射光强度 I，与入射光强度 I₀ 及有色溶液厚度 t 有一定关系，可用芝伯特

(Lambert) 氏(註①)定律表示如下：

$$\text{Log} \frac{I}{I_0} = -k \cdot t \dots\dots\dots(1)$$

透过溶液的出射光强度 I，与入射光强度 I₀ 及有色溶液浓度 U 也有一定的关系，可用毕尔 (Beer) 氏定律表示如下：

$$\text{Log} \frac{I}{I_0} = -k_1 U \dots\dots\dots(2)$$

合并(1)及(2)式可得到下列公式

$$\text{Log} \frac{I}{I_0} = -k U t \dots\dots\dots(3)$$

(3)式中 $\frac{I}{I_0}$ 可用 T 表示，T 称为透光率。

$$\text{Log} T = -k U t \quad \text{或} \quad -\text{Log} T = k U t$$

設以 D 代表 $-\text{Log} T$

$$\text{則} \quad D = k U t \dots\dots\dots(4)$$

(4)式中 D 称为光密度。D 也可表示在观察时有色溶液顏色之深淺。

以下說明利用(4)式計測溶液中有色物質的含量的方法。以全种方法配制某有色物質的溶液二种(即标准液和未知液)分別称为溶液 1 及溶液 2。它們的浓度为 U₁ 及 U₂，厚度为 t₁ 及 t₂，溶液的光密度为 D₁ 及 D₂。因为溶液是以全种方法配制的故 k 值一样，将这些数值代入(4)式即得：

$$D_1 = k_1 U t_1$$

$$D_2 = k_2 U t_2$$

我們可以調节薄層厚度 t_1 及 t_2 ，使二溶液顏色的 $D_1 = D_2$ (即由目鏡中观察二溶液的顏色并調节到深浅相全)。

則合并以上二式得到下式： $k_1 U_1 t_1 = k_2 U_2 t_2$

由于 k 相全

$$\therefore U_1 t_1 = U_2 t_2$$

$$\text{或 } U_2 = \frac{t_1}{t_2} U_1$$

U_1 为标准液浓度， t_1 为标准液厚度， t_2 为未知液厚度， U_2 及 t_2 可由此色計标尺上直接讀出，則未知液的浓度：

$$U_2 = \frac{\text{标准液誤数}}{\text{未知液誤数}} \times \text{标准液浓度(毫克)} \quad (\text{注2}) \dots\dots (5)$$

由(4)及(5)式可以得到以下結論：1. 有色溶液顏色的深浅与浓度成正比。2. 当全一物质的不全浓度溶液的光密度相全时，浓度与厚度成反比。实际上若二种互相比色的溶液的浓度相差很多时，則顏色的深浅往往与浓度不成直接关系。所以在比色时两溶液顏色的深浅愈相近愈好，此外浓度的选择亦須审慎，如浓度过高則顏色深吸收光也多。杯中液柱(厚度)即浅，所引起的誤差較大，如浓度过低，則顏色太浅，不易比色。

但是在血液或其它体液的化学檢驗中，未知液和标准液都是經過一定程度的稀釋后才使用的，因此除了得出从二者比色中得出厚度不全的初步結果外，还要进一步乘以检查液和标准液稀釋后总量的比例，最后再將已測知的在測定时实际上用标本内某成份的含量，計录出100毫升标本内含量的总值，因此实际使用的計录方法應該是：

$$\text{每100毫升标本内含量(毫克)} = \frac{\text{标准液读数(毫米)}}{\text{未知液读数(毫米)}} \times$$

$$\text{标准液浓度(毫克)} \times \frac{\text{未知液总量(毫升)}}{\text{标准液总量(毫升)}} \times \frac{100(\text{毫升})}{\text{测定时实际应用的标本量(毫升)}}$$

例如：测定马血内胆固醇含量，所配制的胆固醇标准液之总量为100毫升，其中含有胆固醇8毫克，未知液总量为15毫升，其中含有实际应用标本量1毫升（即由7毫升血浆配制而成）。检查时标准液读数为15毫米，未知液读数为10毫米。则

$$\frac{15}{10} \times 8 \times \frac{15}{100} \times \frac{100}{1} = 180 \text{毫克\%}$$

I 构造：

目光比色计之主要部分包括反光镜、杯、玻璃柱、棱镜、透镜组及杯托等。液柱之长度可用螺絲紐将杯上下移动以调节之。棱镜可使两视野靠近。优良的仪器，其两视野之分界线很细。如两视野的距离远，则比色的结果很难准确。

II 用法：

1. 比色计之光学部分应洗净，如有尘埃，着色物应用脱脂棉或纱布擦净，其次复查两测杯托是否在固定位置，如位置不正确时，应加正校正。

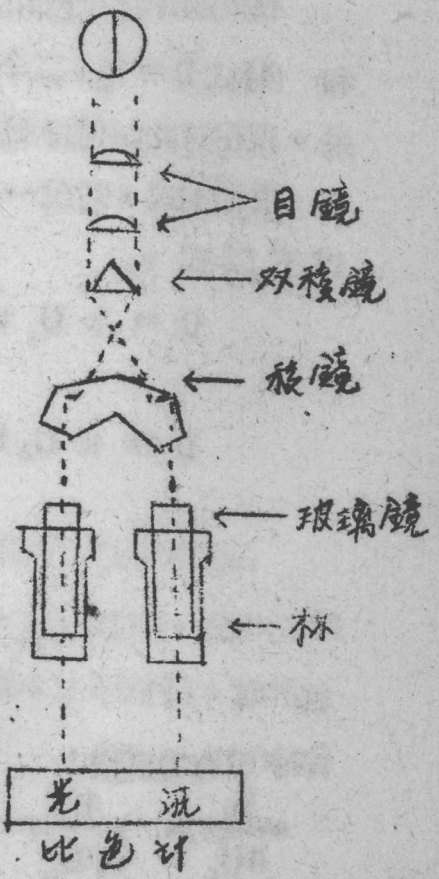
2. 两杯中均盛半杯标准液。注意：切勿装满，以免液柱插入后将液体挤出杯外。小心向上移动杯托使杯底与玻璃柱接触（注意切勿挤破玻璃杯或玻璃柱）以赶走玻璃柱下可能存在的气泡。此时两标尺

之讀數均應為零，否則需設法調整至零或在計算時校正之。〔注③〕

3. 固定左杯在 15.0 毫米處。下移右杯至左右兩半視野光的強度完全相等為止。讀出其讀數，重復上述操作，再讀兩次，（共三次），取其平均值，是為標準液讀數（此數應接近於 15.0 毫米，如相差太遠表示比色計不良，應繼續校正之）。在觀察目鏡中之顏色時，時間不宜過長，因眼睛的疲勞能影響對顏色之判斷，致使誤差增大。

4. 右杯改盛未知，先將右杯上移使杯底與玻璃柱接觸以赶走氣泡。（注意：切勿擠破玻璃杯或玻璃柱）下移右杯至兩半視野深淺完全相等為止。讀出讀數，重復上述操作，再讀二次（共三次）取其平均值，是為未知液讀數。

注意：取出杯子時，須先將杯托移到最低地位，當確定取杯時不會碰及玻璃柱後，再將玻璃杯取出，以免損壞，杯子用過後，必須用蒸餾水洗淨，（注意：洗時切勿碰破玻璃杯）洗玻璃柱時，將杯中盛半杯蒸餾水，用手上下移動數次，不可左右搖晃以免碰及玻璃柱。



然后取出，如此法重复2—3次后 用棉紙(或紗布)將金屬部分拭干；拭淨玻璃柱時須用棉紙(或紗布)由下向上，如由上向下，則日久可能將玻璃柱拖松。

每次比色前，須用該溶液少許，將杯及柱洗滌一次，以免溶液之濃度變更而生誤差。在上述各項操作過程中，均勻將液體灑在比色計反光鏡或比色計座上。

二、光电比色計使用法

1. 原理：

1. 光密度及透光度与浓度的关系

在敘述普通比色計的使用法時，我們已談到(3)式 $\log T = k_2 t$ 和 (4)式 $D = k_3 t$ 二个公式；这二式即表示了它們之間的互相關系。現在討論如何將(4)式应用到光电比色計中。

依照(4)式，对全一有色物質的二种不同浓度的溶液，可以得出以下二式。

$$D_1 = k U_1 t_1 \quad \text{或} \quad t_1 = \frac{D_1}{k U_1} \dots \dots \dots (6)$$

$$D_2 = k U_2 t_2 \quad \text{或} \quad t_2 = \frac{D_2}{k U_2} \dots \dots \dots (7)$$

在使用普通比色計時，是調節厚度 t 及 t ，使二种溶液的顏色深度相全。即 $D_1 = D_2$ ，再依(5)式求出未知液濃度 U_2 。在使用光电比色計時，溶液厚度 t 是固定的，(普通为1毫米)即 $t_1 = t_2$ 。

合併(6)与(7)式得：

$$\frac{D_1}{k U_1} = \frac{D_2}{k U_2}$$

∴ 全一种溶液 k 值相全

$$\therefore \frac{D_1}{U_1} = \frac{D_2}{U_2}$$

$$\text{或 } U_1 = \frac{D_2}{D_1} \times U_2 = \frac{\text{未知液光密度}}{\text{标准液光密度}} \times \text{标准液浓度 (毫克/毫升)}$$

(毫克/毫升).....(8)

2. 光密度(或透光度)的测定:

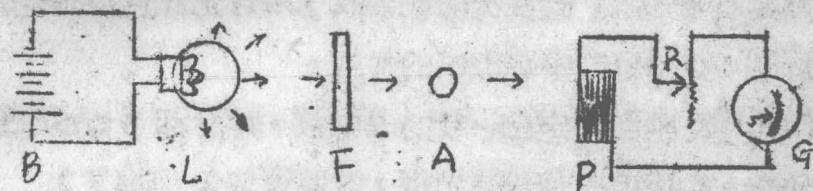
由溶液中透出的光之强度,可用光度计测定。光度计内的光电池可将光能变为电能。产生电流的强弱与光的强度成正比。电流通过电流计,由电流计指针的位置,即可在刻度盘上直接读出光密度或透光度。一般光电比色计的刻度盘上,全时刻有光密度和透光度二种刻度,为计标便利常读取光密度的值,应用公式(8)求浓度。

3. 光密度(或透光度)与波长的关系。滤过板的功用。有色溶液对大多数波长的光线,皆能吸收其一部分;但对于某一部分波长的光线,吸收特多。此现象称为最大吸收,与该物质的颜色有关。

当浓度增加时,对各种波长的光线吸收量亦行增加。此种增加,对于某种波长更为显著。用此种波长的光作光源时,其灵敏度最大,所以在使用光电比色计时,必须选择一定波长的光。其余的波长的光则应设法除去,滤光板即此作用。〔注④〕

III 构造:

最普通的光电比色计为单光电池式。如图示:



单光电池式光电比色计

B——电池, L——光源 F——滤光板 A——吸收管(样品管) P——光电池, R——可变电阻; G——电流计。

1. 用法：

各种光电比色计的用法，各有不全，具体操作法须参阅该仪器所附之说明书。

现在介绍一种单光电池式光电比色计的操作方法：

1. 取比色管三支（注意：小心使用切勿损坏。）分别加入对照液（注⑤），标准溶液和未知溶液各约5毫升。
2. 依照互补色原则选择滤光板。
3. 检查电阻是否放在最大的地方，再接电源。
4. 将对照管（注⑥）插入A的位置，开电门，此时可得看到指示灯已亮。
5. 转动可变电阻，调节指针到光密度为零处。（此外透光度为100%）
6. 取出对照管，插入标准液管，读数 D_1 。
7. 取出标准液管，插入未知液管，读数 D_2 。
8. 将未知液管取出，再插入对照管，此时指针应仍在光密度为零处。若不在时可调节电阻使指针达到零数处。重复第6、7操作。
9. 比色完后应将可变电阻转到零处，关电门、切断电源。
10. 比色管应用蒸馏水洗三次，但不可用肥皂或去污粉洗刷。

附：测定硫酸铜含量

1. 取某号未知液（硷性硫酸铜溶液）用目光比色计测定其浓度，并计算每100毫升中硫酸铜的含量。
2. 再用光电比色计测定全一号的未知液，并计算100毫升中硫酸铜的含量。（应选择何种滤光板，对照管应含何物？）

实验2 动物体内几种酶的定性反应。(附离心机使用法)

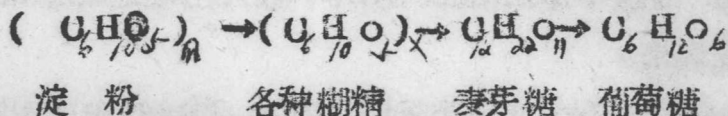
要求：

掌握下述几种酶的测定方法，了解酶在动物机体活动中的作用。

I. 唾液淀粉酶：

1. 原理：

淀粉水解的生成糊精，麦芽糖和葡萄糖：



淀粉遇碘呈兰色，糊精随其分子逐渐减小，和碘反应就呈兰紫色、紫色、紫红色、褐色和黄色。最简单的糊精遇碘不呈颜色，麦芽糖遇碘亦不呈色。

淀粉可被唾液淀粉酶水解，其水解的程度与酶所处的温度条件有关，在100°C溶液中酶很快的失去活性，低温不能使酶失去活性，仅能延缓或停止酶的作用。

II. 器：

1. 试管及试管架
2. 水浴及冰水浴
3. 温度计
4. 漏斗
5. 锥形瓶
6. 吸量管

III. 试剂：

1. 碘溶液〔注7〕
2. 0.5% 淀粉的氯化钠溶液〔注8〕
3. 班尼地试剂〔注9〕
4. 唾液(自己收集)
5. 脱脂棉

IV. 操作：

1. 取漏斗一个，放入一层脱脂棉，将此漏斗置于干净试管内，收集唾液于棉花上，滤过之，取滤液1毫升，放入锥形瓶内，加水1.9毫升混匀，所得的溶液即为1:20的稀释唾液。

2. 取三支試管(標以1号、2号及3号), 各加0.5%淀粉的氯化鈉溶液約2毫升, (第一試管置于沸水浴中, 第二試管置于37°C水浴中, 第三試管于0°C水浴中。使各管在以上各溫度下維持5分鐘)。然后加稀釋唾液1毫升, 混勻之。在上述溫度中再保溫10分鐘。

3. 10分鐘后, 用碘液及班尼地試劑檢查各試管中反應的結果。方法如下:

4. (1) 自第一試管中取出溶液一毫升, 如入班尼地氏劑1毫升煮沸, 觀察反應結果。

(2) 向第一試管剩餘的2毫升溶液中加入一筒碘溶液, 觀察反應結果。

(3) 用全样的操作步驟, 檢查第二及第三試管中的反應結果。

I 脫氧酶:

1. 原理:

从脫氧的方式而促進各種物質氧化的酶, 称为脫氧酶。其名称为脫氧, 故其酶亦从此而得名。

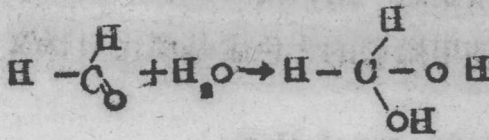
在脫氧酶的作用下, 物質的氧化并不需氧气参与(无氧之化)即能进行。所脫下之氧則傳遞給其他物質, 此种物質即所謂受氧体。

[注(10)]

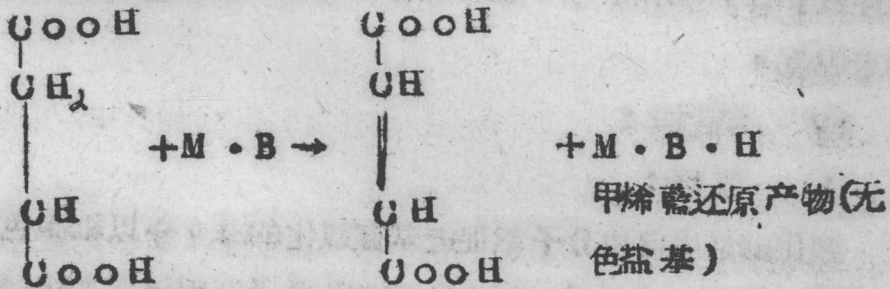
脫氧酶的作用, 可由存在于乳中的所謂Subarinder酶以及肌肉琥珀酸脫氧酶两例看出。

若取甲醛作为氧化的底質, 取甲烯兰作为受氧体, 将此二者加于牛乳中, 并熱至70°C 則藍色迅速消失。以上反应之所以进行。是因为乳的脫氧酶脫去甲醛上的氢傳交給甲烯藍, 因而使前者氧化而后者則被还原无色【无色盐基($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_3$)】

此时所进行的反应可图示如下：



琥珀酸脱氢酶将琥珀酸脱氢并全时氧化其为反丁烯二酸。因此当琥珀酸脱氢酶，琥珀酸及甲烯蓝全时存在时，则发生甲烯蓝的还原反应（脱色反应）。



琥珀酸

反丁烯二酸

I. 仪器： 1. 试管及试管架 2. 水浴 3. 温度计

II. 试剂： 1. 新解牛乳 2. 肌肉膜的生理盐水溶液。

(注①) 3. 1.4% 甲醛水溶液。 4. 0.02% 甲烯蓝水溶液。

5. 3% 琥珀酸水溶液(系用10%苛性的中和至对石蕊纸呈弱性反应者) 6. 石蜡油

III. 操作：

(1) 1. 取两个带磅码的试管，各加牛乳约5毫升。煮沸第二管并冷却之。两试管各加甲醛约0.5毫升及甲烯蓝液4滴，振荡并