

目 录

实验须知	(1)
实验一	基本操作	(3)
实验二	蛋白质的等电点	(7)
实验三	核酸组成成分的鉴定	(9)
实验四	淀粉酶的专一性、温度、PH对酶活性的影响.....	(11)
实验五	血糖的测定 附分光光度计的使用	(16)
实验六	血清总胆固醇的测定	(29)
实验七	尿中酮体的定性测定	(32)
实验八	细胞色素氧化酶的作用及其抑制	(33)
实验九	琥珀酸脱氢酶的作用与抑制	(34)
实验十	血液尿素氮的测定	(36)
实验十一	血清谷丙转氨酶活性测定	(39)
实验十二	血清蛋白质醋酸纤维素薄膜电泳	(43)
实验十三	常规肝功能试验	(46)
实验十四	血清钾的测定	(54)
实验十五	血浆二氧化碳结合力测定	(58)

实 验 须 知

实验目的：

- 1、培养学生严谨的科学态度和作风，提高分析问题和解决问题的能力。
- 2、通过实验，加深对生物化学基本理论的理解，使学生更好地将理论与实践密切结合。
- 3、使学生熟练地掌握生化实验的基本操作技术。

实验前的准备：

- 1、根据实验计划，认真预习“实验指导”。
- 2、复习有关理论。
- 3、明确实验目的。
- 4、熟悉实验的主要操作步骤。
- 5、初步判断实验的预期结果。

实验时的注意事项：

- 1、必须严肃认真，一丝不苟地进行操作，仔细观察和综合分析出现的现象与结果，及时有条理地将现象与结果记录下来。
- 2、如果实验结果与理论结果不符时，必须进行科学分析，找出原因并重做，直到结果正确为止。
- 3、试剂用后放回原处。瓶盖切勿盖错，否则，试剂即受损坏。标准试剂不应用潮湿吸管取用，取出后不得再行放入原瓶。
- 4、使用玻璃仪器，既要大胆，又要小心，稳拿轻放，尽量避免损坏。使用分光光度计，离心机，电泳仪等贵重仪器时，更应仔

细小心。如感到使用生疏或不会时，应先请教师指导。任何仪器如有损坏，应立即报告教师，说明损坏原因，以便吸取教训，并进行登记。

5、实验室应保肃静，注意清洁卫生。公用仪器及试剂等设备，未经教师允许，不得随意搬动。

6、实验用过的滤纸、火柴梗以及沉淀物等不得倒入水槽，以防阻塞水管。舍去的浓酸、浓碱，均须倒入废液缸中，不得倒入水池，以免损坏下水道。

实验后的注意事项：

1、实验后，即将所用仪器清洗干净，放回原处，以备下次使用。

2、如有仪器损坏，应填写“仪器损坏单”，经教师签字后，去准备室换取。

3、离开实验室时，一定要将实验室整理清洁，关好门、窗、水、电，方能离去。

实验报告：

每次做完实验，须及时整理实验记录，依照规定的格式和内容写出实验报告，交指导教师评阅。报告内容包括：

实验题目

实验目的

原理

操作：简叙实验过程，但不要抄录讲义。

结果：详细地记录实验中的现象，不得伪造、抄录讲义。

讨论：分析实验结果，经过自己思考，得出明确的结论。

实验一 基本操作

(实验目的)

- 1、了解实验室的一般规则。
- 2、掌握一般玻璃仪器的洗涤法。
- 3、了解并练习吸量管的使用。
- 4、掌握液体混匀法。

生物化学实验中需要用多种基本技术操作，如玻璃仪器的洗涤；各种玻璃仪器和测量仪器的正确使用；样品混匀法等。如果这些操作不正规，将影响实验结果的准确性。因此，要求同学们对生化实验的一些基本操作加以了解和掌握，是非常重要的。

生物化学的实验方法基本上是化学的方法，也就是用定性及定量的分析方法来观察物质代谢的规律，必须做到定性的洁净及定量的准确，为了做好这一点，首先介绍一些常用的基本操作，并要求同学们反复练习，以达到熟练的程度。

一、玻璃仪器的洗涤

(一)、一般玻璃仪器，如烧杯、试管等，可直接用肥皂或去污粉刷洗，再用自来水多次冲洗去尽肥皂或去污粉，最后用少量蒸馏水冲洗2~3次，倒置沥干备用。洗净的容器壁应是光洁不沾挂水珠。

(二)、容量分析仪器，如吸量管、量瓶及滴定管等，先用自来水冲洗多次，待沥干后，再用铬酸洗液浸泡数小时，然后用自来水

充分冲洗，直到将洗液全部洗净为止，最后用少量蒸馏水冲洗2~3次，倒置沥干备用。

二、吸量管的使用

常用的吸量管有以下三种：

1、刻度吸量管 刻度吸量管供量取10 ml 以下的任意体积的液体之用。有0.1 ml、0.2 ml、0.25 ml、0.5 ml、1 ml、2 ml、5 ml及10 ml几种。这类吸量管有刻度到尖端者与刻度不到尖端者两种。因生产单位不同，有自上而下或自下而上的两种刻度法。因此，使用时应仔细分清，千万不要弄错。若使用刻度到尖端者，则在所量取的液体全部放出后，须将残留在管尖的液体吹出；若使用刻度不到尖端者，则以刻度为准。例如使用1 ml吸量管吸取1 ml液体时，则将液体恰巧放出至下端刻度即可。决不可放液达到最低的刻度线以下。

2、移液吸量管 移液吸量管供准确量取5 ml、10 ml、20 ml、25 ml、50 ml及100 ml液体之用，每根移液吸量管上只有一个刻度，放液时待管内液体流出后，吸量管管尖在容器内壁上继续停留15~30秒钟，管尖残留液体不得吹出。这类吸量管常作为化学容量分析及定量稀释之用。

3、奥氏吸量管 奥氏吸量管供准确量取0.5 ml、1 ml、2 ml、3 ml、5 ml及10 ml液体之用。每根吸量管上只有一个刻度，放液时最后必须吹出残留在管尖的液体。这类吸量管的特点是在同一容量的各类吸量管中以它的容量表面积为最小，故准确度最高。它常作为量粘度较大的液体（如血液等）之用。

吸量管的使用法：使用吸量管时，操作者左手持橡皮球，右手

持吸量管上端，将吸管浸入液体内大约 1 cm 深处，不得过深，以免管的外壁沾附溶液太多，也不可太浅，防止空气突然进入管内，将溶液吸入皮球内。用橡皮球吸取液体至刻度上方时，立即用右手食指按住管口，不让液体从管内流出。将已充满液体的吸管提出液面，用碎滤纸片抹干吸管外壁的液体。然后持吸管与地面保持垂直，以管尖端接触瓶壁；放松食指控制液体缓慢地下降刚好降至所需刻度处（液体凹面、刻度和视线应在一水平面上），立即按紧吸量管口，将吸量管插入另一容器中，放松食指，使液体顺容器壁流出。

三、溶液的混匀

欲使一反应充分进行，必须使作用物质很好地互相接触，因此必须彻底混匀，浓溶液稀释时亦须混匀。溶液的混匀方法有下列几种，可随使用器皿、液体容量而选用之。

1、旋转混匀法：手持容器作离心旋转，适用于盛液体较多的试管或小口器皿，如三角瓶等。

2、指弹混匀法：左手持试管使之直立，以右手食指轻击试管之下部，使管内液体呈旋涡状转动。

3、甩动混匀法：右手握住试管上端，将试管倾斜放在桌面上来回迅速甩动，使管内液体呈旋涡状转动。此法只适用于少量液体的混匀。

4、倒转混匀法，适用于有玻璃塞的瓶子，如容量瓶等。

5、搅拌混匀法：适用烧杯等大口容器所盛之溶液的混匀，一般在配制混合试剂时，用玻棒搅拌以助溶，或混匀大量的溶液。

四、离心机的使用

离心机是生化实验的常用仪器。一般转速的电动离心机，每分

钟1000~4000转。离心法分离沉淀物较过滤法快，又可以避免母液或沉淀物的丢失，所以多用在颗粒较小、量少，不适宜用过滤法分离的实验中，如蛋白质及其它胶体颗粒，无机盐的分离沉淀等。使用离心机要按以下规程操作。

- 1、检查离心机套管底部的垫子，若有玻璃碎片，必须除去，以免发生破碎离心管。
- 2、离心管内加液量不要过满，一般在管口下2cm处。
- 3、套管与离心管之间，须装水缓冲之，以免互碰破碎。
- 4、将对称的金属套管及离心管（内盛欲离心的液体）置于托盘天平上平衡之，如不相等，可调整缓冲水之量。要注意对称离心管内液体之量不可相差悬殊，以免妨碍平衡。
- 5、开启开关，顺时针转动变速旋钮，使速度缓慢增加。
- 6、转动时，机身应平稳，声音均匀，否则表示对称的物体重量不等。此时需立即停止，进行检查，找出原因，予以纠正。如不平衡，应重新平衡，以免损伤转轴。
- 7、转动时，如发现离心管破碎应停止离心，小心清除玻璃碎渣。
- 8、所需速度和时间按规定执行，离心时间一般不超过半小时为宜。
- 9、停止离心时，先将旋钮拨至零位，然后关闭开关，让机器自动停止。

实验二 蛋白质的等电点

22/11

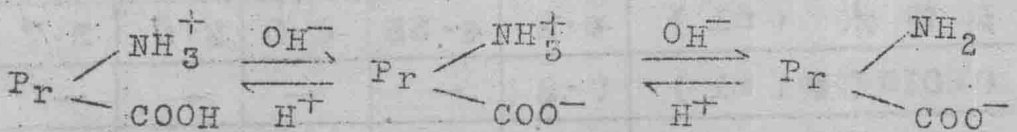
〔实验目的〕明确等电点的意义及蛋白质在等电点时的性质。

〔实验原理〕在蛋白质分子中所含的氨基酸，虽然大部分氨基与羧基是以肽键的形式相结合，但还有一定数量的酸性基团与硷性基团以游离状态存在，其酸性基团主要是二羧基氨基酸的羧基、酚基、巯基及肽链的末端羧基；硷性基团主要是二氨基氨基酸的氨基、胍基、亚氨基及肽链末端氨基。因此，蛋白质也和氨基酸一样是一种两性电解质，它在硷性（ H^+ 浓度低）溶液中，蛋白质释放 H^+ ，

分子带负电荷（ $Pr \begin{matrix} NH_2 \\ \diagdown \\ COO^- \end{matrix}$ ）；在酸性溶液中（ H^+ 浓度高），

蛋白质分子结合 H^+ ，分子带正电荷（ $Pr \begin{matrix} NH_3^+ \\ \diagdown \\ COOH \end{matrix}$ ）。若调节

溶液的氢离子浓度，使蛋白质分子中所带正负电荷相等，此时溶液的 PH 值称为该蛋白质的等电点（PI）。



正离子

两性离子

负离子

(PH < PI)

(PH = PI)

(PH > PI)

上述溶液的酸、硷性是对蛋白质的等电点而言，PH 小于 PI

为酸性环境；PH大于PI为硷性环境。因为不同蛋白质氨基酸的种类和含量各不相同，故在不同PH溶液中所带的电荷也不相同，所以每种蛋白质有它自己的等电点。

蛋白质在等电点时，溶解度最小，故将此特性应用于蛋白质的分离及提纯。

〔试剂〕

1、酪蛋白——醋酸钠溶液：称取纯酪蛋白0.25g，置于50ml容量瓶内，加蒸馏水20ml及1.00N NaOH 5ml（必须准确）。摇荡使酪蛋白溶解，然后加1.00N醋酸溶液5ml（必须准确）。最后用蒸馏水稀释至刻度，混匀。结果是酪蛋白溶于0.10N醋酸钠液内，酪蛋白浓度为0.5%。

2、0.01N醋酸溶液。

3、0.10N醋酸溶液。

4、1.00N醋酸溶液。

〔操作〕

取干燥而直径相近的试管五支，按下表加入各种试剂：

剂 试	管 号	1	2	3	4	5
蒸 馏 水 (ml)		4.2	4.35	4.0	2.5	3.7
0.01N 醋酸 (ml)		0.3	—	—	—	—
0.10N 醋酸 (ml)		—	0.15	0.5	2.0	—
1.00N 醋酸 (ml)		—	—	—	—	1.6
酪蛋白0.1N醋酸钠 (ml)		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
摇匀后，放置10至20分钟						
各管相当的PH值		5.9	5.3	4.7	4.1	3.5
混 浊 程 度		+	++	+++	++	+

观察各管的混浊度，以0、+、++、+++表示，沉淀最多那一管溶液的PH值最接近酪蛋白的等电点。

〔思考题〕

- 1、为什么蛋白质在等电点时最不稳定而容易沉淀？
- 2、为什么多数蛋白质的等电点偏酸性？有没有等电点偏碱性的蛋白质？
- 3、试估计各试管中酪蛋白带什么电荷？

实验三 核酸组成成分的鉴定

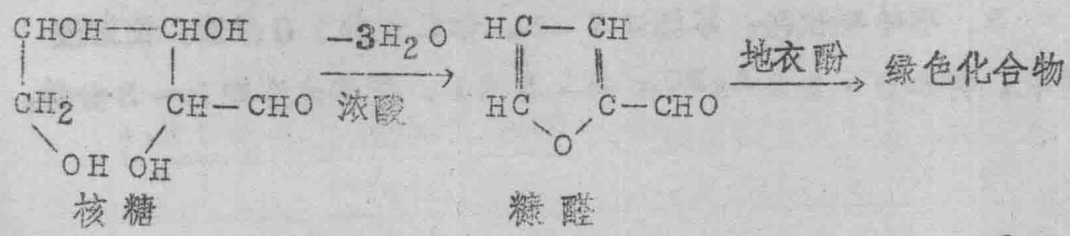
〔实验目的〕 了解核酸各成分及其鉴定法。

〔实验原理〕 核酸由核糖或脱氧核糖、磷酸、硷基所组成。

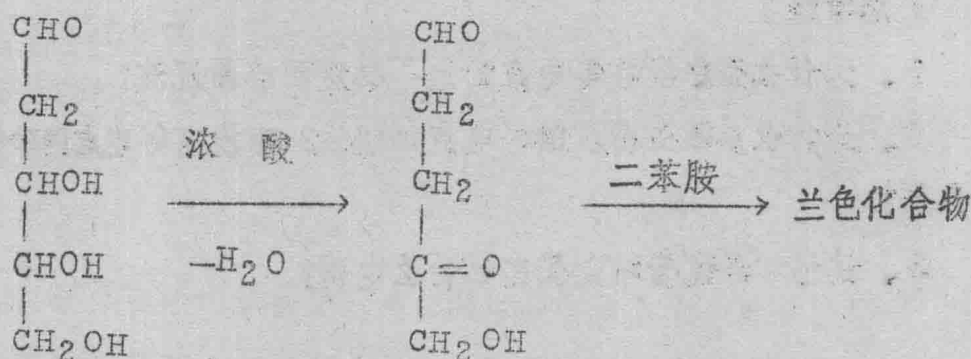
本实验采用酵母为样品。酵母核酸中RNA含量较多，DNA很少，故鉴定脱氧核糖时颜色反应较弱。核酸在强酸中水解，主要释放嘌呤碱，嘧啶碱很难在同类条件下水解释放，因此本实验不做嘧啶碱的鉴定。

RNA在碱性溶液中水解最好，在强酸中也可部分水解。由于脱氧核糖、核糖仍需在强酸中脱水变成相应的醛类才可被鉴定，因此本实验采用酸水解法。

1、核糖在浓酸中加热，转变成糠醛衍生物，与地衣酚试剂作用可生成绿色化合物。



2、脱氧核糖在浓酸中加热生成 ω -羟基 γ -酮基戊醛，此化合物与二苯胺试剂反应生成兰色化合物。



脱氧核糖

ω -羟基 γ -酮基戊醛

3、磷酸与钼酸铵作用生成黄色的磷钼酸铵。

4、嘌呤碱能与硝酸银产生灰褐色絮状嘌呤银化合物。

(操作)

(一)、酵母的水解:

取100 mg干酵母粉，放入试管中，加入5% H_2SO_4 10ml，充分混匀，放沸水浴中煮30分钟(以水沸计时)。冷却，用滤纸过滤。滤液分别进行以下实验。

(二)、水解产物的鉴定:

1、核糖试验: 取滤液0.1 ml，加地衣酚试剂1 ml，放沸水浴煮3分钟，观察有何颜色产生?

2、脱氧核糖试验: 取滤液1 ml，加二苯胺试剂5 ml，置沸水浴中煮15分钟，观察出现什么颜色?

3、嘌呤碱试验: 取滤液1 ml，加氨水约10余滴，使溶液硷化，再加0.1 N AgNO_3 0.5 ml，置沸水浴中2~3分钟，

拿出静置，观察有何现象出现？

4、磷酸试验：取滤液 1 ml，加钼酸铵试剂 2 ml，沸水浴中煮沸 5 分钟，观察有何颜色变化？

〔试剂〕

1、干酵母

2、5% H_2SO_4

3、浓氨水。

4、0.1 N 硝酸银溶液：取硝酸银 8.495 克加水至 500 ml。

5、钼酸铵试剂：取钼酸铵 2 克，溶于 100 ml 10% 硝酸中。

6、地衣酚试剂：取 HCl, 100 ml，加 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 100 mg，溶解后，再加地衣酚 100 mg。贮于棕色瓶中，此试剂应用前现配。

7、二苯胺试剂：称 4 克 苯胺溶于 400 ml 冰醋酸中，加入 11 ml 浓 H_2SO_4 (比重 1.84) 贮于棕色瓶中。若试剂呈兰绿色，表示冰乙酸不纯，不能使用，正常应为淡黄色。此试剂也需临时配制。

实验四 淀粉酶的专一性、温度、PH 对 酶活性的影响

〔实验目的〕了解淀粉酶的特异性和温度与 PH 对淀粉酶活性

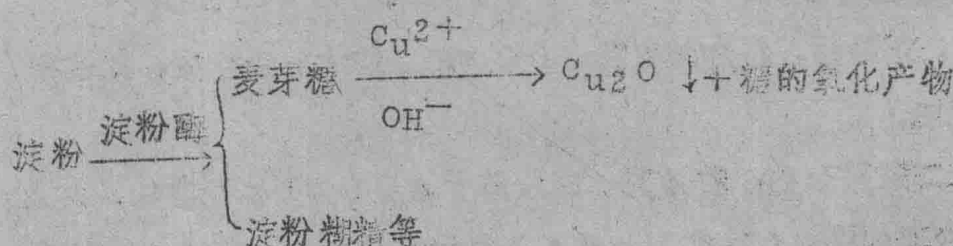
的影响。

一、淀粉酶的专一性（即特异性）

〔实验原理〕 酶具有高度的专一性，对其作用的底物有严格的选择性。一种酶只能作用于一种或一类化合物、或一定的化学键，催化一定的化学反应并生成一定的产物。例如，淀粉酶只能催化淀粉水解，而不能水解蔗糖。

本实验是利用人体口腔内的唾液淀粉酶能使淀粉水解，产生具有还原性的麦芽糖，而不能使蔗糖水解产生还原性糖的特点，来判断酶是否发挥作用。

具有还原性的糖，在碱性溶液中能使高价铜还原成砖红色的氧化亚铜沉淀。利用此法可以鉴别酶反应产物是否有还原性糖产生。



〔操作〕

1. 鉴定蔗糖：取试管1支，加1%蔗糖液3滴，加班氏试剂1ml，加热煮沸2至3分钟，溶液颜色不变，则证明蔗糖溶液纯净。

2. 水浴的准备：37℃——40℃水浴

3. 唾液淀粉酶的制备：先用蒸馏水漱口，然后含一口蒸馏水（10至15ml），5分钟后吐于试管中备用。

4. 取2支试管编号，按下表操作：

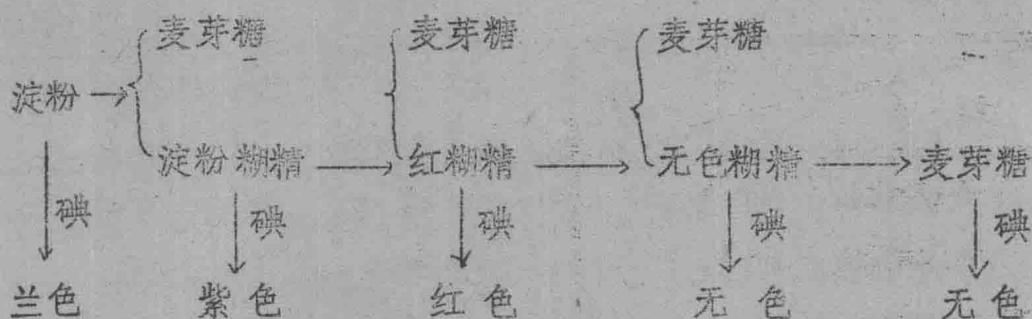
试 剂 \ 管 号	1	2
1%淀粉液 (ml)	1	—
1%蔗糖液 (ml)	—	1
唾液淀粉酶液 (ml)	0.5	0.5
	混匀，放 37℃——40℃水浴 10分钟	
班氏试剂 (ml)	3	3
	放沸水浴中煮沸数分钟	
结 果	红色↓	蓝色沉淀

观察结果如何？将结果填于表中，说明了什么？

注意：因水解后溶液中还原糖量多少不同（与酶的活性有关），故在加入班氏试剂煮沸后，溶液可呈现砖红色、黄色或绿色沉淀。

二、温度对酶活性的影响

〔实验原理〕 酶促反应在低温下进行很慢，其反应速度随温度的升高而增加，但温度过高则酶蛋白变性，甚至完全失活，反应速度随之下降。酶活性最高时的温度称为酶的最适温度。人体内的酶最适温度接近体温。唾液中的淀粉酶可使淀粉水解，酶的催化能力越强，水解就越快。因此，本实验用淀粉及其水解产物遇碘液生成不同的颜色，来判断淀粉被水解的程度，从而来鉴定淀粉酶活性的大小。



〔操作〕 取试管3支编号，按下表操作：

管 号	1	2	3
试 剂			
1% 淀粉液 (ml)	1	1	1
2-3	置冰水中	置37℃水浴中	置沸水浴中
唾液淀粉酶 (滴)	5	5	5
	摇 匀		

5分钟后，取出并向各管加碘液1滴（第3管需冷却后加入碘液才会变色），比较各管颜色。

三、PH对酶活性的影响

〔实验原理〕 酶的化学本质是蛋白质，所以，它对酸碱度的改变非常敏感。每一种酶都有它一定的最适PH，在这一PH时该酶活性最大。PH能影响酶分子活性中心内某些基团的解离状态，只有在最适PH时，才能使酶分子处于最适合的电离状态；酶才能发挥其最大催化活性。PH大于或小于最适PH，酶活性均减弱。

不同的酶最适PH是不同的，人体内多数酶最适PH在6~8之间。唾液淀粉酶的最适PH是6.8。

〔操作〕 取3支试管编号，按下表操作。

试 剂 \ 管 号	1	2	3
缓冲溶液 (ml)	2 (PH=3)	2 (PH=6.8)	2 (PH=10)
1% 淀粉液 (ml)	1	1	1
唾液淀粉酶 (ml)	1	1	1
	混匀	混匀	混匀

结果:

- 1、取一反应板，并在其三个小池中各加碘溶液 1 滴。
- 2、从以上三管中各取 1 滴溶液与碘反应，观察所呈颜色。
- 3、将三管一同放入 37~40°C 水浴中保温。每隔 1 分钟从第 2 管中取 1 滴溶液与反应板上的碘溶液混合，观察呈色反应。
(注意：每次取溶液与碘反应后，必须将玻璃棒或滴管洗净，才能再放入试管中取第二次)。

4、待第 2 管取出的溶液与碘不呈颜色反应时，立即向每一试管中各加入碘液 5 滴，比较各管所呈颜色，并解释之。

(试剂)

1、1% 淀粉液：取可溶性淀粉 1 克，用少许蒸馏水调成糊状，然后倒入已煮沸的 100 ml 生理盐水中，继续煮沸约 1 分钟，冷却后移入干净的 100 ml 容量瓶中，再加生理盐水补足到 100 ml 刻度即可。

2、1% 蔗糖液：取蔗糖 1 克，用少许蒸馏水溶解后，倒入 100 ml 容量瓶中，然后加蒸馏水至 100 ml 刻度。

3、班氏试剂：取 17.3 克 CuSO_4 溶于 100 ml 蒸馏水

中，再取柠檬酸钠 173 克，取无水 Na_2CO_3 100 克，二者同放烧杯中，加蒸馏水 400 ml 溶解，待完全溶解后，与已溶解的 CuSO_4 溶液混合，移入干净的 100 ml 容量瓶中，混匀，加蒸馏水至 1000 ml 刻度即可。（注意：勿将 CuSO_4 与无水 Na_2CO_3 和柠檬酸钠放在一起溶解）。

4、碘溶液：取碘 2 克，碘化钾 3 克，加少量蒸馏水溶解，待完全溶解后，移入干净的 500 ml 棕色瓶中，加蒸馏水至刻度。

5、 $\text{PH} 3$ 缓冲液：取 0.730 克 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 1.670 克柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)，加蒸馏水少许溶解，然后移入干净的 100 ml 容量瓶中，加蒸馏水至 100 ml 刻度混匀即可。

6、 $\text{PH} 6.8$ 缓冲液：取 3.510 克 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 1.592 克 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，加蒸馏水少许溶解，然后移入干净的 100 ml 容量瓶中，加蒸馏水至 100 ml 刻度，混匀即可。

7、 $\text{PH} 10$ 缓冲液：取甘氨酸 1.501 克， NaOH 0.512 克，加蒸馏水少许溶解，然后移入干净的量筒中，加蒸馏水至 164 ml 刻度，混匀即可。

实验五 血糖的测定

〔实验目的〕

- 1、了解血糖测定的原理、方法和临床意义。
- 2、了解分光光度计的使用及注意事项。