

普通高等教育“十一五”规划教材

生物化学技术 实验指导

孙培龙 吴石金 主编



化学工业出版社

普通高等教育“十一五”规划教材

生物化学技术实验指导

孙培龙 吴石金 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目(CIP)数据

生物化学技术实验指导/孙培龙, 吴石金主编. —北京:

化学工业出版社, 2008.7

普通高等教育“十一五”规划教材

ISBN 978-7-122-03118-1

I. 生… II. ①孙…②吴… III. 生物化学-实验-高等学校-教学参考资料 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 090517 号

责任编辑: 赵玉清

文字编辑: 马丽平

责任校对: 李 林

装帧设计: 关 飞

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装: 北京市彩桥印刷有限责任公司

720mm×1000mm 1/16 印张 9 字数 182 千字 2008 年 8 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686)

售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 17.00 元

版权所有 违者必究

前 言

生命科学在 20 世纪以来有了突飞猛进的发展,生物化学是其中最活跃的分支学科之一。如今,生物化学的方法与理论已经渗透到了生命科学中的每一分支学科,并对其他分支学科的发展起着关键的作用。生物化学同时也是一门实验性很强的科学,鉴于近几十年来生物化学新内容不断补充,新的实验方法和技术不断出现,为了跟上学科的发展,我们生物化学实验课程教学一直采用自编的生物化学实验讲义,该讲义每年都做些改动和更新。但最近几年,随着大学招生人数的增加,需要学习生物化学实验这门课程的人数也逐年增加,一方面,考虑到自编讲义再不能满足学生学习的需要;另一方面,从近几年的教学实践中发现,现在的学生学习热情高,但对一些常规的实验技术规范掌握得又不够,很难在市面上找到一本既介绍基础实验技术规范,同时又包含基本实验技术的简明扼要的实验教材。由此,我们就有了出版该书的初衷。

本教材是在使用了十多年的自编生物化学实验讲义的基础上编写而成的,全书内容分生物化学技术原理、生物化学实验和附录三部分。为了让学生养成规范的科学实验习惯,树立严谨的科研作风,生物化学技术原理部分首先介绍了正确记录实验过程及书写实验报告的一般规则,然后再介绍包括玻璃仪器的洗涤,洗液的配制,以及过滤、离心等一般实验室技术。对其他最常见最重要的生物化学技术原理如离心分离技术、电泳原理、分光分析、层析分离技术,本部分也重点做了介绍,内容尽可能地简洁扼要。生物化学实验部分除了一些生物化学基础实验外,还突出了有关酶的综合大实验及免疫化学实验的内容,由基本实验、综合性实验和选择性实验三大模块组成,共选编了 32 个实验,内容覆盖了当今生物化学研究中常用的方法和技术。其中既保留了一些旨在加强学生基本实验方法和技能训练的传统实验,也引进了一些新近发展起来的生化实验技术。旨在培养学生的动手能力和良好的科研素质,使学生有一个完整的实验锻炼过程,培养学生科研思维和独立开展研究工作的能力。本教材适用于高等院校生物化学实验教学,生物、医药和农林等专业学生可根据各自特点选择使用。本书各实验单元也可按照各高校的实际情况自行拆分组合。

本书由浙江工业大学生物与环境工程学院组织编写。第一部分主要由孙培龙和吴石金编写,参与第二部分编写的人员有孙培龙、吴石金、许培雅、邱乐泉、刘书来、孟祥和和鄢洪德。

本书的编写和出版得到了浙江工业大学重点教材建设项目的资助,同时,还得到了相关单位领导,各位同仁和化学工业出版社的支持和帮助,在此表示诚挚的谢意。

限于作者水平,若存在疏漏和不当之处,恳请广大读者和专家批评指正。

编者

2008 年 5 月

目 录

第一部分 生物化学技术原理

一、实验记录与实验报告的书写	1
二、实验室基本操作	2
(一) 玻璃仪器的洗涤与清洁	2
(二) 塑料器皿的清洗	3
(三) 清洗液的原理与配制	3
(四) 量器类的使用法	4
(五) 过滤方法	7
(六) 试管及离心管中液体的混匀操作	7
三、几种常规仪器的使用	8
(一) 分光光度计	8
(二) 电子天平	11
(三) 干燥箱和恒温箱	13
(四) 电热恒温水浴	14
(五) 离心机	15
四、生物大分子的制备及鉴定	16
(一) 盐析技术	17
(二) 透析和超滤	20
(三) 减压浓缩和冷冻干燥	20
五、层析技术	21
(一) 吸附层析	21
(二) 分配层析	22
(三) 离子交换层析	23
(四) 凝胶过滤层析	26
(五) 亲和层析	28
六、电泳技术	29
(一) 基本原理	29
(二) 影响泳动率的因素	29
(三) 电泳技术的种类	31

第二部分 生物化学实验

第一节 基本实验	35
实验一 苯酚-硫酸法测定水溶性多糖	35
实验二 氨基酸纸上层析	37

实验三	糖的硅胶 G 薄层层析	39
实验四	磷脂的分离与鉴定——薄层层析法	41
实验五	甲醛滴定法定量测定氨基酸	44
实验六	蛋白质的两性反应和等电点的测定	45
实验七	蛋白质浓度的测定	49
实验八	微量凯氏定氮法测总蛋白氮	55
实验九	核酸的定量测定	59
实验十	维生素 C 的定量测定——2,6-二氯酚靛酚滴定法	63
第二节	综合性实验	66
实验一	蔗糖酶的提取及初提纯	66
实验二	蔗糖酶的纯化——Q Sepharose-柱层析法	68
实验三	蔗糖酶活力的测定	71
实验四	蔗糖酶蛋白质含量测定及比活力计算	73
实验五	SDS-PAGE 测定蛋白质的相对分子质量	76
实验六	蔗糖酶的固定化及活力测定	81
第三节	选择性实验	84
实验一	底物浓度对酶促反应速度的影响——米氏常数的测定	84
实验二	酶的特异性、温度、pH 及激活剂对酶活性的影响	86
实验三	大豆总异黄酮的提取及含量测定	90
实验四	类胡萝卜素的色层分析及鉴定	92
实验五	组织 DNA 的提取及定量测定	94
实验六	DNA 琼脂糖凝胶电泳	98
实验七	纸电泳法定量分析腺苷三磷酸	101
实验八	葡聚糖凝胶层析法测定蛋白质的分子量	103
实验九	酶联免疫吸附实验 (ELISA) 测定乳汁中孕酮含量	107
实验十	血清蛋白质的层析分离——血清 γ -球蛋白的分离纯化 (分子筛层析法)	110
实验十一	血清蛋白质的电泳分离——醋酸纤维素薄膜电泳	112
实验十二	脲酶的凝胶过滤分离纯化	114
实验十三	血清蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳	118
实验十四	肝糖原的提取和定量	120
实验十五	蛋白质印迹分析	122
实验十六	单向定量免疫电泳	126

附 录

一、生物化学实验室规则	129
二、实验室安全及防护知识	129
三、常用数据表	131
参考文献	137

第一部分 生物化学技术原理

本部分的内容为生物化学实验中所涉及的主要原理。介绍如何正确记录实验过程及书写实验报告的一般规则，是训练学生进行正规科学实验，树立严谨科研作风的重要内容。普通实验技术包括玻璃仪器的洗涤，洗液的配制，吸量管的使用、混匀的方法以及过滤、离心等一般实验室技术。其他最常见最重要的生物化学技术原理如离心分离技术、电泳原理、分光分析、层析分离技术，本部分重点介绍这些技术的基本原理，内容尽可能简洁扼要，作为具体实验操作过程中的学习和参考。

一、实验记录与实验报告的书写

实验是在理论指导下的科学实践，目的在于通过实践掌握科学理论和规律的基本方法和技能，培养学生科学思维、分析判断和解决实际问题的能力。也是培养探求真知、尊重科学事实和真理的学风，培养科学态度的重要环节。

1. 实验记录

详细、准确、如实地作好实验记录是极为重要的，记录如果有误，会使整个实验失败，这也是培养学生实验能力和严谨科学作风的一个重要方面。

① 每位同学必须准备一个实验记录本，实验课前应认真预习，看懂实验原理和操作方法，在记录本上写好实验预习报告，包括详细的实验操作步骤（可以用流程图表示）和数据记录表格等。

② 记录本上要编好页数，不得撕缺和涂改，写错时可以划去重写。不得用铅笔记录，只能用钢笔和圆珠笔。记录本的左页作计算和草稿用，右页用作预习报告和实验记录。同组的两位同学合做同一实验时，两人必须都有相同、完整的记录。

③ 实验中应及时准确地记录所观察到的现象和测量的数据，条理清楚、字迹端正，切不可潦草以致日后无法辨认。实验记录必须公正客观，不可夹杂主观因素。

④ 实验中要记录的各种数据，都应事先在记录本上设计好各种记录格式和表格，以免实验中由于忙乱而遗漏测量和记录，造成不可挽回的损失。

⑤ 实验记录要注意有效数字，如吸光度值应为“0.050”，而不能记成“0.05”。每个结果都要尽可能重复观测两次以上，即使观测的数据相同或偏差很大，也都应如实记录，不得涂改。

⑥ 实验中要详细记录实验条件，如使用的仪器型号、编号、生产厂等；生物材料的来源、形态特征、健康状况、选用的组织及其重量等；试剂的规格、化学

式、分子量、试剂的浓度等,都应记录清楚。两人一组的实验,必须每人都做记录。

2. 实验报告

实验报告是实验的总结和汇报,通过实验报告的写作可以分析总结实验的经验和问题,学会处理各种实验数据的方法,加深对有关生物化学与分子生物学原理和实验技术的理解和掌握,同时也是学习撰写科学研究论文的过程。实验报告的格式应为:①实验目的;②实验原理;③仪器和试剂;④实验步骤;⑤数据处理;⑥结果讨论。

每个实验报告都要按照上述要求来写,实验报告的写作水平也是衡量学生实验成绩的一个重要方面。实验报告必须独立完成,严禁抄袭。写实验报告要用实验报告专用纸,以便教师批阅,不要用练习本和其他片页纸。

为了使实验结果能够重复,必须详细记录实验现象的所有细节,例如,若实验中生成沉淀,那么沉淀的真实颜色是什么,是白色、淡黄色或是其他?沉淀的量是多还是少,是胶状还是颗粒状?什么时候形成沉淀,立即生成还是缓慢生成,热时生成还是冷却时生成?在科学研究中,仔细地观察,特别注意那些未予想到的实验现象是十分重要的,这些观察常常引起意外的发现,报告并注意分析实验中的真实发现,是对学生非常重要的科学研究训练。

实验报告使用的语言要简明清楚、抓住关键,各种实验数据都要尽可能整理成表格并作图表示以便比较,一目了然。实验作图尤其要严格要求,必须使用坐标纸,每个图都要有明显的标题,坐标轴的名称要清楚完整,要注明合适的单位,坐标轴的分度数字要与有效数字相符,并尽可能简明,若数字太大,可以化简,并在坐标轴的单位上乘以10的方次。实验点要使用专门设计的符号,如○、●、□、■、△、▲等,符号的大小要与实验数据的误差相符。不要用“×”、“+”和“·”。有时也可用两端有小横线的垂直线段来表示实验点,其线段的长度与实验误差相符。通常横轴是自变量,往往知道得很准确,纵轴是应变量,是测量的数据。曲线要用曲线板或曲线尺画成光滑连续的曲线,各实验点均匀分布在曲线上和曲线两边,且曲线不可超越最后一个实验点。两条以上的曲线和符号应有说明。

实验结果的讨论要充分,尽可能多查阅一些有关的文献和教科书,充分运用已学过的知识和生物化学原理进行深入的探讨,勇于提出自己独到的分析和见解,并欢迎对实验提出改进意见。

二、实验室基本操作

(一) 玻璃仪器的洗涤与清洁

实验中所用的玻璃仪器清洁与否直接影响实验的结果,往往由于仪器的不清洁或被污染而造成较大的实验误差,有时甚至会导致实验失败。做生物化学实验对玻璃仪器清洁程度的要求,比一般化学实验的要求更高。这是因为:①生物化学实验

中蛋白质、酶、核酸等往往都是以“毫克”和“微克”计的，稍有杂质，影响就很大；②生物化学实验对许多常见的污染杂质十分敏感，如金属离子（钙、镁离子等）、去污剂和有机物残基等，因此玻璃仪器（包括离心管等塑料器皿）是否彻底清洗净就是非常重要的。

（1）初用玻璃仪器的清洗 新购买的玻璃仪器表面常附着有游离的碱性物质，可先用 0.5% 的去污剂洗刷，再用自来水洗净，然后浸泡在 1%~2% 盐酸溶液中过夜（不可少于 4h），再用自来水冲洗，最后用去离子水冲洗两次，在 100~120℃ 烘箱内烘干备用。

（2）使用过的玻璃仪器的清洗 先用自来水洗刷至无污物，再用合适的毛刷沾去污剂（粉）洗刷，或浸泡在 0.5% 的清洗剂中超声清洗（比色皿不可用超声清洗），然后用自来水彻底洗净去污剂，用去离子水洗两次，烘干备用（计量仪器不可烘干）。清洗后器皿内外不可挂有水珠，否则需重洗，若重洗后仍挂有水珠，则需用洗液浸泡数小时后（或用去污粉擦洗）重新清洗。

（3）石英和玻璃比色皿的清洗 不可用强碱清洗，因为强碱会侵蚀抛光的比色皿。只能用洗液或 1%~2% 的去污剂浸泡，然后用自来水冲洗，这时使用一支绸布包裹的小棒或棉花球棒刷洗效果会更好，清洗干净的比色皿也应内外壁不挂水珠。

（二）塑料器皿的清洗

聚乙烯、聚丙烯等制成的塑料器皿，在生物化学实验中的应用越来越多。第一次使用塑料器皿时，可先用 8mol/L 尿素（用浓盐酸调 pH=1）清洗，接着依次用去离子水、1mol/L KOH 和去离子水清洗，然后用 3~10mol/L EDTA 除去金属离子的污染，最后用去离子水彻底清洗，以后每次使用时，可只用 0.5% 的去污剂清洗，然后用自来水和去离子水洗净即可。

（三）清洗液的原理与配制

（1）肥皂水、洗衣粉溶液和去污粉 肥皂水、洗衣粉溶液和去污粉是常用的洗涤剂，有乳化作用，可除去污垢，能使脂肪、蛋白质及其他黏着性物质溶解或松弛，一般玻璃仪器可直接用肥皂水浸泡或刷洗。

（2）铬酸洗液

① 原理：铬酸洗液由重铬酸钾（或重铬酸钠）和浓硫酸配制而成，其清洁效力主要应用其强氧化性和强酸性。

铬酸越多硫酸越浓，其清洁效力也就越强，当洗液变绿色后则不宜应用。

② 洗液的配制：称取重铬酸钾 5g 放于 250ml 烧杯中，加热水 5ml 搅拌，使其尽量溶解，烧杯下垫一石棉网以防过热，然后慢慢加入工业用浓硫酸 100ml，随加随搅拌，尽量避免红色铬酸沉淀析出。此时洗液由红黄色转为黑褐色，冷却后储存于指定容器内，盖紧盖子以防吸水，贴上标签（洗液变绿后不宜使用）。

使用洗液前需将玻璃仪器用自来水冲洗数次，并将仪器上的水分尽量除去再放

洗液中浸泡，数小时后取出仪器，用自来水充分清洗至无水分止，冲洗时注意勿将洗液溅出水槽，再用少量蒸馏水冲洗数次，晾干备用。

上述两种洗液常用，实验中遇到特殊污染物，需用针对性强的洗涤液。

(四) 量器类的使用法

量器是指对液体体积进行计量的玻璃器皿，如滴定管、移液管、容量瓶、量筒、刻度吸量管、刻度离心管及自动加液管等。

1. 滴定管

滴定管分常量与微量滴定管。常量滴定管又分为酸式与碱式两种，各有白色、棕色之分。酸式滴定管用于盛装酸性、氧化性以及盐类的稀溶液。碱式滴定管用来盛装碱性溶液。棕色滴定管用于盛装见光易分解的溶液。常量滴定管的容积有20ml、25ml、50ml、100ml四种规格。微量滴定管分为一般微量滴定管和自动微量滴定管，容积为5ml、10ml升等规格，刻度精度因规格不同而异。

滴定管主要用于容量分析。它能准确读取试液用量，操作比较方便。一般是左手握塞，右手持瓶；左手滴液体，右手摇动。在滴定台上衬以白纸或者白磁板，以便观察锥形瓶内的颜色。滴定速度以10ml/min、即每秒3~4滴为宜。接近终点时，滴速要慢。甚至每秒半滴或1/4滴地进行滴定，以免过量。达到终点后稍停1~2min，等待内壁挂有的溶液完全流下时再读取刻度数。正确读取容积刻度是减少容量分析实验误差的重要措施。滴定管的读数方法，可依个人的习惯而不同。但是在同一实验中读取容积刻度时，必须以液面的同一特征标志为准，以保证其系统误差。

一般读数方法：普通滴定管读取数据，双眼与液面同水平读数。有色液读取数据是溶液弯月面两侧最高点连线与刻度线重合点。无色液读取数据是溶液弯月面最低点水平线与刻度线重合点。见图1-1。

2. 吸管

吸管是生化实验中最常应用的容量分析仪器，用于准确移取试液，其精密度按不同的容积可达移取量的0.1%~1%。一般用橡皮球吸液，操作时以右手拇指和中指夹管身，把吸管的尖端伸入液体中，左手将橡皮球捏扁，接在吸管上口，慢慢放松橡皮球把液体吸入管内至刻度以上，移去橡皮球，迅速以右手食指按住吸管的上口控制试液的泄放，不应用拇指控制管口（图1-2），注意橡皮球不能骤然放松，以免试液吸入球内。吸液后应将吸管扶正保持垂直位置，使右眼与刻度等高，然后稍微放松食指或轻轻转动吸管，使试液面缓慢降落。到管内液面弧线的最低点与刻度线齐（注意：将吸管斜持读数的操作是错误的，因可造成很大的读数误差）。如所吸取的试液颜色很深，不易看清液面最低点，则最好选用分刻度吸管放取两个刻度之间的容积的方法，此时可改以液面的边缘与刻度对齐。但在单刻度的吸管一次放出所标明的全量时不能这样做，仍应尽可能看清液面弧线的最低点。此外，生化实验中因大多数分析属微量分析，吸取试液的量往往很小，如不除去吸管外壁所沾

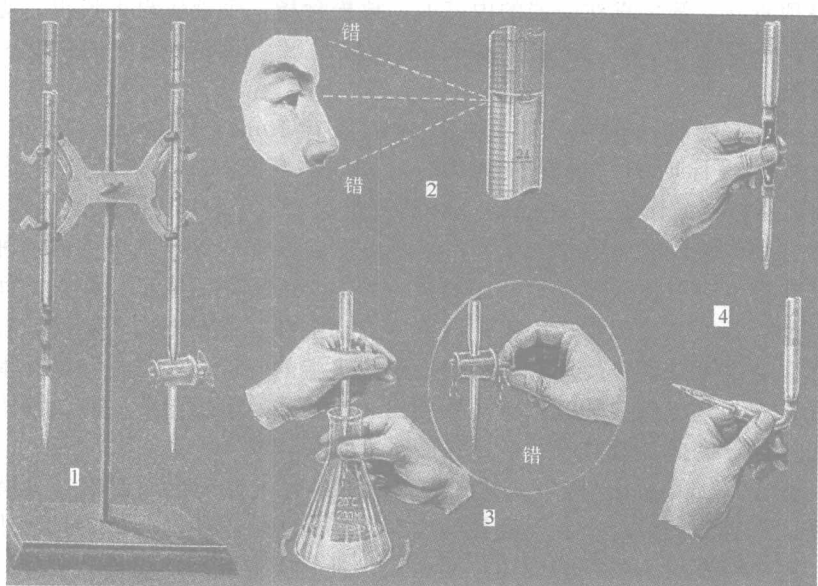


图 1-1 滴定管的使用

1—滴定管架上的滴定管（左：碱式；右：酸式）；2—观看管内液面的位置，视线跟管内液体的凹液面的最低处保持水平；3—酸式滴定管的使用为右手拿住锥形瓶颈，向同一方向转动，左手旋开（或关闭）活塞，使滴定液逐滴加入；4—碱式滴定管的使用为左手捏玻璃球处的橡皮管，使液体逐滴下降，如果管内有气泡，要先赶掉气泡

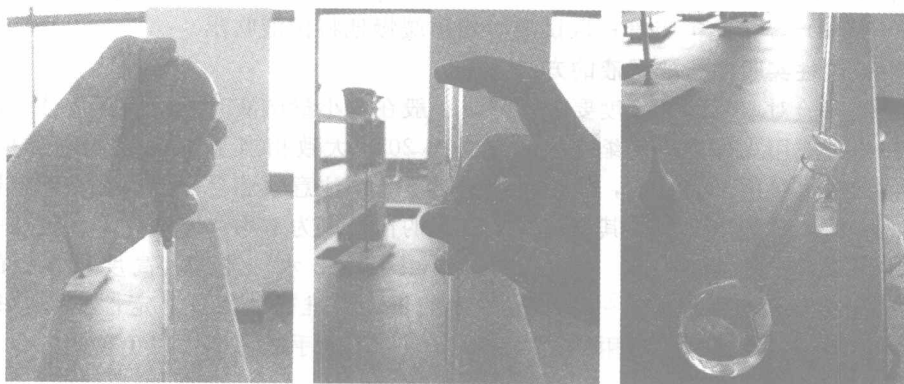


图 1-2 吸管的使用

液体可造成很大误差，一般应用干净的碎滤纸片拭净吸管外壁然后放出管内液体。

吸管的类型很多，在使用上也有某些差别，因此应先了解所持吸管的类型，掌握正确的使用方法，现将常用的吸管类型及其特点分述如下。

（1）移液吸管 为化学定量分析实验所常用，用作移取吸臂所标明数量的试液，常见的有 50ml、25ml、10ml、5ml、2ml、1ml 等容量规格。试液自管内放出

时，管身须直立，管尖靠在受器的内壁上，放松食指，令液体自由流出。等液体不再流出时，还要贴靠 15s，最后管尖的残液不应吹出，因该类吸管的刻度一般表示液体的泄出量。

(2) 分刻度吸管 分刻度吸管常见的容量有 10ml、5ml、2ml、1ml、0.5ml 等。通常将管身标明的总容量分刻为 100 等分，因此 10ml 总量的此类吸管有 0.1ml 的分格，有效读数至 0.1ml，1ml 的此类吸管有 0.01ml 的分格，其余类推。这类吸管常用作移取非整数量的试液。有刻度到尖端和刻度不到尖端的两种，刻度到管尖的在最上刻度线与管尖之间的容量，为管身所标明的容量并在这之间 100 等分。这两类吸管的刻度因生产厂家不同有零点在上和零点在下两种刻法，在使用前应先认明以免发生错误。使用时如系刻度不到尖端的，应用食指控制液体泄放至最下刻度线，如为刻度到尖端的，于液体放出后应将残留管内最后一点试液沿容器壁轻轻吹出（国产的此类吸管有的厂家在管身上刻有“吹”字）。

(3) 奥氏（Ostward）吸管 此种吸管的管身有一橄榄形玻璃泡。其特点是在各种类型同一容量的吸管中此类吸管的内表面积最小，使用时吸管内壁黏附的试液也最少，因此特别用于黏稠的液体，如血液、蛋白质溶液及油脂等的吸量，血液化学分析中用于血样的吸取。此种吸管常见的有 10ml、5ml、2ml、1ml 和 0.5ml 几种容量的。用时应注意缓慢将试液放出，最后一点试液要轻轻吹出（国产奥氏吸管管身刻有“吹”字样）。

(4) 微量吸管 为吸取小量试液设计的特种毛细吸管，有单刻度的，也有无刻度的。临床化验室用于血细胞计数的稀释吸管也是一种微量吸管。生化测定中常见的微量吸管的容量有 0.2ml(200 μ l)、0.1ml(100 μ l)、0.05ml(50 μ l)、0.02ml(20 μ l)、0.01ml(10 μ l) 等，此类吸管移取试液时均须缓慢地将试液吹出。

附：定性实验中量取试液的方法

定性实验对取量的准确度要求不严，一般在取小量试液时可以滴数估计。可将滴管口锉大或用火焰烧灼使缩小，校正至每 20 滴大致相当于 1ml，数毫升的试液可用估计法直接用试管量取，学生可于平时实验中注意锻炼自己以视力估计容器中液量的能力，熟能生巧，尤其是试管中液量的估计更为常用，应该熟练。可在一系列试管中用吸管分别量入 1ml、2ml、3ml、5ml、10ml 水。注意其高度与管径的关系，多次训练不难掌握对 1~10ml 范围内液量大致准确的估计，定性实验中较大的液体可用量筒量取。取用试剂时应养成瓶塞不离手的习惯，以免盖错。

3. 定量移液管的使用

定量移液管（加样器）是利用排代原理，由活塞在活塞套内作定程运动，产生负压，吸入定量液体，有容量固定式、容量（数字）可调式、单臂加样和多管加样等多种不同型式；也有众多的容量规格，0.5 μ l~5ml 不等。生化实验中将主要用到容量固定式和数字可调式单管定量移液管。定量移液管管身上端为一活塞（或称按钮），下端为一可装卸的吸液嘴。使用时步骤为：①先将吸液嘴套在移液管头上，轻轻转动，以保证密封；②将移液管吸液和排液几次，以保证腔内外气压一致；

③垂直握住移液管，将活塞推到第一停止点，把吸液嘴浸入液面下2~3mm，再缓慢放松活塞、使之复位，此时应注意不可骤然放松按钮以免液体经吸液嘴进入管身，等待1~2s后从液体中取出；④泄放时轻轻按下活塞到第一停止点，再稍稍加重按压活塞按钮。以排尽全部液体。使用完后，移液管仍应套上吸液嘴，以保持管内清洁。

（五）过滤方法

生化实验室中所作的过滤除定量分析化学操作相同者外，很多实验中的过滤往往因不可使滤液稀释而使用滤纸过滤，为了增快过滤速度常把滤纸折成“菊花形”以增大过滤表面（图1-3），并且在漏斗上加盖表面皿，以避免滤液蒸发浓缩。除了用滤纸过滤外，粗过滤也可使用脱脂棉球替代滤纸，有些实验可改用离心沉淀来替代过滤，以节省时间。



图1-3 “菊花形”滤纸过滤



图1-4 手持试管作圆周运动的混匀方法

（六）试管及离心管中液体的混匀操作

使试管中先后加入的几种试剂充分混匀往往是实验成败的关键之一。由经验得知，不少学生实验的失败原因是未能在反应前将试管内容物混匀，应引起充分注意。常用于混匀试管及离心管内液体的方法有以下几种：①少量液体的混匀可简单地将试管轻轻振摇或挥动即可。②较多的液体用振摇、挥动不易混匀时，可一手持试管，另一手轻轻叩击或拨动试管底使管内液体搅动出现旋涡而达到混合的目的。③在试管中盛有多量液体以上述方法难于使之混合时，可试用手持试管作圆周运动。使管内液体也作旋涡运动而混合（图1-4）。④将试管置于旋涡混匀器上。启动电钮，由于旋涡混匀器的马达转动而使管内液体产生较强的旋涡而充分混合。操作时应注意持试管的手指位置，管内液体较满时，手指持管的位置不可太高以免液体溅失。⑤如液体太满，以上方法均不能使之混合的情况可考虑是否允许用玻璃棒搅拌混匀，或采用管口衬一清洁塑料薄膜。以手掌按住反复颠倒混匀的方法。用拇指直接堵住试管口作颠倒混匀的操作是错误的。在任何情况下均不应采用。

1. 容量瓶

用于配制一定浓度标准溶液或试样溶液。颈上刻有标线，表示在20℃，溶液装至标线的容积。有10ml、25ml、50ml、100ml、250ml、500ml、1000ml、2000ml几

种规格，并有白色、棕色两种颜色。

使用方法：使用前应先检查容量瓶的瓶塞是否漏水，瓶塞应系在瓶颈上，不得任意更换。瓶内壁不得挂有水珠，所称量的任何固体物质都必须先在小烧杯中溶解或加热溶解，冷却至室温后，才能转移到容量瓶中。

2. 量筒

量筒是用来量取要求不太严格的溶液体积的。在配制要求不太准确的溶液浓度时，使用量筒比较方便。它有 5~2000ml 十余种规格。用量筒量取液体体积是一种粗略的计量法，所以，在使用中必须选用合适规格，不要用大量筒计量小体积，也不要用小量筒多次量取大体积的溶液。读取刻度的方法与容量瓶和滴定管相同。

三、几种常规仪器的使用

生物化学实验操作中会涉及一系列仪器，使用不当会导致实验失败、减少仪器使用寿命或损坏仪器。因此在进行操作前细致地了解各种仪器的使用方法及注意事项，是使后续实验事半功倍的一个必要准备。

(一) 分光光度计

1. 分光光度计的结构原理

不论光度计 (photometers)、比色计 (colorimeters) 还是分光光度计 (spectrophotometers)，其基本结构原理都是相似的，都由光源、单色光器、狭缝、吸收杯和检测器系统等部分组成 (图 1-5)。

(1) 光源 一个良好的光源要求具备发光强度高、光亮稳定、光谱范围广和使用寿命长等特点。几乎所有的光度计都采用稳压调控的钨灯 (tungsten lamp)，适

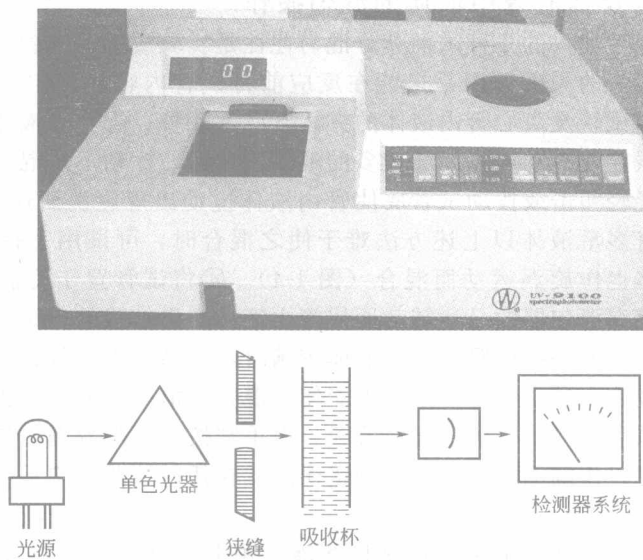


图 1-5 分光光度计结构原理

用于作 340~900nm 范围的光源。更先进的分光光度计外加有稳压调控的氢灯 (hydrogen lamp), 适用于做 200~360nm 的紫外分光分析的光源。

(2) 单色光器 分光光度法测定某一物质的光密度需要在某一特定波长下进行。单色光器的作用在于根据需要选择一定波长范围的单色光。在实际工作中欲选择出单个某波长的光线是困难的。所谓单色光是指在此波长有最大发射, 而在相邻较长和较短波长范围内的发射能量较少而言。单色光的波长范围愈窄, 仪器的敏感度愈高, 测量的结果愈可靠。

最简单的单色光器是光电比色计上所采用的滤光片 (一定颜色的玻璃片)。由于通过光线的光谱范围较宽, 所以光电比色计的分辨效果较差, 但对比色分析还是可以得到较为满意的效果的。棱镜 (prism) 的衍射光栅 (diffraction grating) 是较好的单色光器。它们能在较宽光谱范围内分离出相对单一波长的光线。

(3) 狭缝 通过单色光器的发射光的强度可能过强也可能过弱不利于进一步检测。狭缝是由一对隔板在光通路上形成的狭缝。通过调节狭缝的大小来调节入射单色光强度并使入射光形成平行光线, 以适应检测器的需要。光电比色计的狭缝是固定的, 而光度计和分光光度计的狭缝大小是可调的。

(4) 吸收杯 吸收杯又叫样品杯 (sample cell), 是光度测量系统的最重要部分之一。在可见光范围内测量时选用光学玻璃吸收杯, 在紫外线范围内测量时要选用石英吸收杯。注意保护吸收杯的质量是取得好分析结果的重要条件之一。不得用粗糙、坚硬物质接触吸收杯, 不能用手指握取吸收杯的光学面; 用后要用水及时冲洗, 不得残留测定液, 尤其是蛋白质和核酸溶液。

(5) 检测器系统 硒光电池、光电管或光电倍增管等光电元件常用来作为受光器, 将通过吸收杯的光线 (I) 的能量转变成电能。进一步再用适当的方法测量所产生的电流。

光电比色计用硒光电池为受光器。硒光电池的光敏感性低, 它不能检出强度非常弱的光线。并且, 对波长在 270nm 以下和 700nm 以上的光波不敏感。

较精密的分光光度计都是采用真空光电管或光电倍增管作为受光器的, 并采用放大装置以提高敏感度。虽然光谱范围狭窄的单色光的能量比范围宽的光弱很多, 但还是可以被这种有放大线路的灵敏检测系统准确地检测出来。

2. 几种常用的国产分光光度计

(1) 721 型分光光度计 见图1-6。

这是一种采用光电管为受光器的较高级可见光分光光度计。由稳压电源供电的光源灯发出稳定的白光。光线经反射镜投入狭缝, 再经准直镜反射进入棱镜, 在棱镜中发生色散后, 光线经铝面反射, 其中一部分经原路返回, 并穿过狭缝, 透过反射镜进入吸收杯。从吸收杯射出的光线再经光门射到光电管上, 产生相应的电流, 并经电流表指示出相应的刻度值。

其中色散棱镜装在一个可以转动的圆盘上, 旋转波长选择钮可使之发生偏转, 使不同波长的光线通过狭缝形成一定波长的单色平行光线。同时, 波长盘也随之转

动以指示波长数字。此型分光光度计给出 360~800nm 范围的波长, 在 410~710nm 之间灵敏、适用。

使用方法如下 (各调节部位参看图 1-6)。

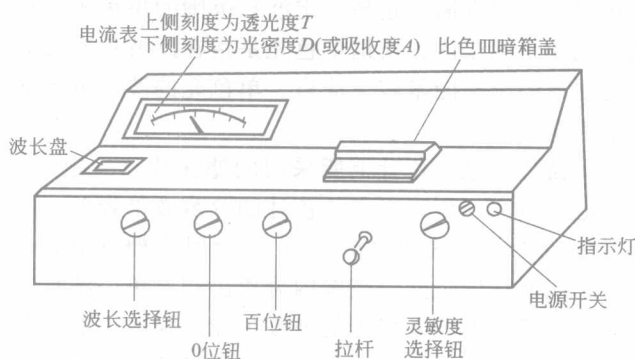


图 1-6 721 型分光光度计示意图

- ① 灵敏度选择钮放在“1”档 (如调不到“0”时, 再选用较高的档)。
- ② 转动波长选择钮, 选用所需的波长。
- ③ 接通电源 (指示灯亮)。
- ④ 揭开比色皿暗箱盖, 转动“0”位钮, 使电表指针对准 $T=0$ 处。
- ⑤ 将比色杯放入比色杯架上, 使空白管对向光路, 盖好比色皿暗箱盖, 转动“百位钮”调准电表指针使之指向 $D=0$ ($T=100$ 处)。
- ⑥ 推动比色皿座的拉杆, 使测定杯进入光路, 迅速从电表上读出光密度值, 记录。测读过程中, 随时将拉杆推回到原位, 使空白杯进入光路, 并转动“百位钮”, 使指针回到 $D=0$ 处。
- ⑦ 比色完毕后, 关上电源开关, 取出比色杯, 将比色皿暗箱盖盖好, 清洗比色皿并控干。

(2) UV-754 型分光光度计 这是一种可供在紫外区到红外区 (200~1000nm) 测量吸收光谱的较高级分光光度计。此仪器的光学部分与 721 型分光光度计相似, 但它采用石英棱镜作单色光器, 有钨丝灯和氢弧灯两种光源。754 型分光光度计的电学部分较为复杂。光电流经过放大线路加以放大后, 得到的样品信号变为与透光率成比例的值。其后, 调零、变换对数、浓度计算、打印数据等均由微处理机进行。

仪器的使用方法

① 测试准备

- a. 打开电源开关之前, 检查一下试样室是否放置遮光物。
- b. 试样槽置“参考”位置。
- c. 接电源开关 (工作波长在 200~360nm 时需按氘灯触发按钮)。参见图 1-6。显示器显示“754”后, 数显为“100.0”, 则表示仪器已通过自检程序。

d. 仪器预热 30min 后开始测试。

② 测试

a. 数显为 100.0 后, 稳定 2~3s, 即可把试样槽置“样品”位置进行测试。待第一个数据打印完毕后, 可将试样槽置第二个“样品”位置测试。

b. 每当需要调换波长时, 必须把试样槽置于“参考”位置, 重新调满度。

3. 使用注意事项

① 仪器连续使用不应超过 2h, 每次使用后需要间歇 30min 以上。

② 每台仪器都配有固定规格的比色皿, 测量时使用的比色皿要一致。每套比色皿不得随意更换。

③ 比色皿由两个面组成, 即透光面和毛玻璃面, 在使用时要将透光面对准光路。

④ 在测定过程中, 勿用手触摸比色皿透光面, 且比色皿光面的清洁不可用滤纸、纱布或毛刷擦拭, 只能用镜头纸轻轻擦拭。

⑤ 脏的比色皿须在肥皂水或 5% 硝酸中浸泡后, 再用自来水和蒸馏水冲洗干净, 使用前用待测溶液润洗数次, 方可使用。

⑥ 盛待测液时, 达到比色皿的 2/3 左右, 不宜过多, 若不慎使溶液溢出, 必须先用滤纸吸干, 再用镜头纸擦净。

⑦ 分光光度计的吸光值在 0.2~0.7 (透光率 20%~60%) 时准确度最高, 低于 0.1 而超出 1.0 时误差较大。如未知样品的读数不在此范围时, 应将样品做适当稀释。

⑧ 每次测试完毕或更换样品液时, 必须打开样品室的盖板, 以防止光照过久, 使光电池疲劳。

⑨ 在仪器尚未接通电源时, 电表的指针必须处于“0”刻度上, 否则可用电表上的校正螺丝调节。

⑩ 分光光度计应放置在平稳的仪器台上, 不能随意搬动, 严防震动、潮湿、光照。

⑪ 分光光度计内的干燥剂 (内装变色硅胶) 应定期检查, 如发现硅胶变色应立即更换, 以防止单色器受潮, 读数不稳定。

⑫ 放大器灵敏度选择是根据不同的单色光波长光能量不一致时分别选用的, 一般为 5 档, 1 档灵敏度最低。选用原则是保证能使空白档调到“100”的情况下, 尽可能采用灵敏度较低的档。

(二) 电子天平

1. 电子顶载天平

电子顶载天平是粗天平的更新换代产品, 最大载荷 280g, 感量 0.001g, 对使用环境要求不太高, 在现代实验室中广泛应用。采用压力传感器进行单盘称量, 有称量范围选择开关, 最大称量量设 280g (精度 0.01g) 和 28g (精度 0.001g) 两