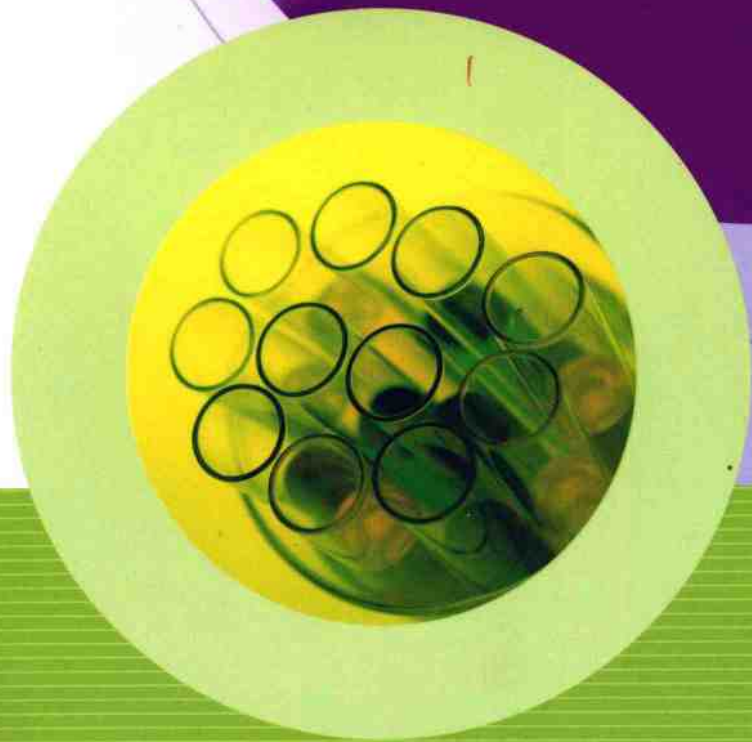




全国高职高专教育“十一五”规划教材

生物检测技术

■ 张丽君 主 编
王德芝 黄志立 副主编



高等教育出版社
Higher Education Press

全国高职高专教育“十一五”规划教材

生物检测技术

张丽君 主编

王德芝 黄志立 副主编



高等教育出版社

Higher Education Press

内容提要

本书是全国高职高专教育“十一五”规划教材。

本教材以生物检测技术中关键技术为主线,围绕现代生物技术在生物制品、食品、环境等检测方面的应用编写而成。

主要包括:生物检测基本知识与基本技能;生物化学检测基本技术——电泳技术、光学检测技术;免疫学检测技术——酶联免疫技术、放射免疫技术、免疫印迹技术、免疫组织化学技术;分子生物学检测技术——PCR 技术、核酸分子杂交技术;细胞生物学检测技术——细胞形态观察技术、细胞活性检测技术、免疫细胞化学技术、流式细胞技术;生物芯片检测技术——基因芯片检测技术、蛋白质芯片检测技术。

本书可作为应用性、技能型人才培养生物技术类、生物制药、食品等专业教学用书,也可供从事相关工作的人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物检测技术/张丽君主编. —北京:高等教育出版社,
2007. 12

ISBN 978 - 7 - 04 - 022525 - 9

I. 生… II. 张… III. 生物监测 - 高等学校: 技术
学校 - 教材 IV. X835

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 182509 号

策划编辑	张庆波	责任编辑	田 军	封面设计	张 楠	责任绘图	尹 莉
版式设计	马敬茹	责任校对	胡晓琪	责任印制	朱学忠		

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街 4 号
邮政编码 100011
总 机 010 - 58581000

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司
印 刷 肥城新华印刷有限公司

购书热线 010 - 58581118
免费咨询 800 - 810 - 0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

开 本 787×1092 1/16
印 张 13.75
字 数 330 000

版 次 2007 年 12 月第 1 版
印 次 2007 年 12 月第 1 次印刷
定 价 17.60 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 22525 - 00

高职高专教育生物技术类专业教材 编写委员会

主任委员

李世敏(深圳职业技术学院)

副主任委员

胡虹文(信阳农业高等专科学校)

侯建平(包头轻工职业技术学院)

闫丽霞(天津生物工程职业技术学院)

委员

刘大程(长春医学高等专科学校)

刘 冬(深圳职业技术学院)

王德芝(信阳农业高等专科学校)

王衍安(山东农业大学)

庞俊兰(北京城市学院)

前 言

分子生物学技术、细胞生物学技术以及免疫学技术日新月异的发展极大地拓宽了这些技术的应用领域,其中作为新型的检测技术已开始用于生命科学研究、临床诊断以及生物制品、食品、环境等行业的检测方面,形成了新型的现代生物检测技术。与传统的分析检验技术相比,不仅提高了检测效率和检测限值,而且突破了以往技术的局限性,很多以往不能检测的项目迎刃而解,因此新型生物检测技术的应用为理论研究、生产实践提供了必需的工具和有力保证。所以学习和掌握现代生物检测技术,不仅使高职高专院校相关专业学生具备了职业岗位能力,更是实施创新教育的重要内容。

针对高职高专培养目标和培养对象,本教材以生物检测技术中关键技术为主线,理论够用为原则,围绕现代生物技术在生物制品、食品、环境等检测方面的应用取材编写而成。本书将生物检测技术各项综合能力划分成模块,每项综合能力模块由若干单项能力模块组成,每一能力模块均有对应的实训项目进行训练。根据技能模块之间的内在联系,形成平行模块间的组合式以及模块内递进等多级进阶式结构编写。编写过程中力求实训方法具体详尽,突出操作过程注意事项及常见问题的解决,使本书不仅是一本教材,还是一本操作手册。

本教材由6位编者集体拟定编写大纲、分头执笔,主编审阅修改而成。第一章由信阳农业高等专科学校魏秋玉执笔,第二章由信阳农业高等专科学校王伟、王德芝执笔,第三章由信阳职业技术学院米伟执笔,第四、六章由深圳职业技术学院黄志立执笔,其他章节由深圳职业技术学院张丽君执笔并负责全书的统稿和定稿。

本书的完成得到了深圳市康泰生物技术有限公司质控部李俊华、黄克丹工程师的大力支持,他们对全书进行了校对和修改工作,他们科学严谨的态度使我们受益匪浅,在此一并感谢!

深圳出入境检验检疫局李一农高级工程师对全书进行了认真审定,李一农高级工程师长期从事一线检测工作,具有丰富的实践经验,为本书提出了许多宝贵的建议,使本书真正做到理论联系实际。在此深表谢意!

本教材自组织编写至脱稿付印,时间仓促,加之编者知识和能力水平有限,难免存在诸多不足之处,谨请使用本教材的广大师生、读者批评指正,多提宝贵意见。

编者

2007年9月于深圳

郑 重 声 明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话：(010)58581897/58581896/58581879

传 真：(010)82086060

E - mail: dd@ hep. com. cn

通信地址：北京市西城区德外大街4号

高等教育出版社打击盗版办公室

邮 编：100011

购书请拨打电话：(010)58581118

目 录

第一章 生物检测技术基本知识与

基本技能 1

第一节 基本常识 1

一、实验室规则 1

二、实验室安全及防护知识 3

三、实验记录与实验报告 5

第二节 基本技能 6

一、实验用水质量要求与制备 6

二、实验用玻璃器皿的清洗、 使用和校正 7

三、试剂配制、灭菌与保存 9

四、实验室常用仪器的使用与维护 11

第三节 实验设计与数据处理 11

一、设计原则与方法 11

二、数据处理分析方法 13

三、误差分析及控制原则 15

本章小结 17

思考题 18

第二章 生物化学检测基本技术 19

第一节 电泳检测技术 19

一、DNA 琼脂糖凝胶电泳 20

二、RNA 变性琼脂糖凝胶电泳 26

三、SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 28

四、蛋白质双向电泳 35

五、应用举例 39

第二节 光学检测技术 45

一、紫外 - 可见分光光度技术 45

二、荧光分光光度技术 51

三、应用举例 55

第三节 生物大分子含量测定方法 55

一、蛋白质含量的测定方法 55

二、核酸含量的测定方法 56

三、应用举例 57

本章小结 62

思考题 62

第三章 免疫学检测技术 63

第一节 免疫学检测基本原理 63

一、抗原抗体之间特异性结合 64

二、抗原抗体反应的特点 65

三、影响抗原抗体反应的因素 67

第二节 免疫组织化学检测技术 68

一、基本原理 69

二、基本操作流程 72

三、影响因素、常见问题及解决方法 78

四、应用实例 81

第三节 免疫印迹技术 83

一、基本原理 84

二、基本操作流程 84

三、影响因素、常见问题及解决方法 87

四、应用实例 88

第四节 酶联免疫检测技术 91

一、ELISA 基本原理 91

二、基本操作流程 92

三、影响因素、常见问题及解决方法 102

四、应用实例 106

第五节 放射免疫检测技术 109

一、基本原理 109

二、放射免疫分析技术 111

三、免疫放射技术 116

四、应用实例 117

本章小结 120

思考题 120

第四章 分子生物学检测技术 122

第一节 聚合酶链反应检测技术 122

一、PCR 的基本原理	123	三、细胞的染色	167
二、PCR 反应体系与基本操作	124	四、影响因素及注意事项	167
三、PCR 常见问题及解决办法	126	五、应用实例	168
四、几种新型 PCR 检测技术	127	第四节 流式细胞技术	169
五、应用实例	133	一、流式细胞仪基本结构及原理	170
第二节 核酸杂交检测技术	137	二、基本操作过程	172
一、DNA 杂交技术	138	三、流式细胞仪使用与维护	175
二、RNA 杂交技术	141	四、应用实例	176
三、原位杂交技术	142	本章小结	178
四、应用实例	144	思考题	178
本章小结	150	第六章 生物芯片检测技术	179
思考题	150	第一节 基因芯片检测技术	180
第五章 细胞生物学检测技术	151	一、原理	180
第一节 细胞形态观察技术	152	二、芯片制备	180
一、显微镜直接观察法	152	三、检测流程	181
二、细胞固定观察法	154	四、基因芯片的应用前景	183
三、电子显微镜	156	第二节 蛋白质芯片检测技术	185
四、应用实例	159	一、原理	185
第二节 细胞活性检测技术	160	二、芯片制备	185
一、细胞计数法	160	三、检测流程	187
二、四唑盐(MTT)比色法	161	四、蛋白质芯片的应用前景	187
三、 ^3H -TdR 掺入法	162	本章小结	189
四、应用实例	163	思考题	189
第三节 免疫细胞化学技术	165	附录	190
一、细胞标本的制备	165	参考文献	209
二、细胞的固定	167	后记	212

生物检测技术基本知识与基本技能

► 知识目标：

- 理解实验室安全与防护知识。
- 掌握实验用纯水的制备原理、方法和用途。
- 掌握普通玻璃仪器的正确清洗和使用方法。
- 掌握试剂的使用原则，熟悉试剂配制的方法。
- 掌握常用仪器的使用和校正方法。

► 能力目标：

- 能较好地进行试验设计与数据处理，能解决有关实际生产和科研中问题。

生物检测技术涉及基本生化技术、免疫学技术、分子生物学技术以及细胞生物学技术，因此实验过程中除用到常规的化学药品与仪器设备外，还用到上述各技术中相应的专用药品及仪器设备。实验环境要求严格，实验过程常遇到高温、高压、高频和辐射源等危险条件以及有毒有害的药品，影响实验结果的因素较多，对实验人员的操作技术要求较高，实验数据处理繁琐。因此为保证实验过程安全，实验结果准确，本章首先介绍学习生物检测技术所具备的基本常识、基本技能以及实验设计与结果处理等方面的知识。

第一节 基本常识

生物检测技术实验过程常会遇到危险的实验条件，若缺乏必要的安全防护知识，会造成生命和财产的巨大损失。因此实验室必须建立健全实验室各种安全制度，加强安全管理。同时要求学生基本操作要规范，实验过程记录要详尽，以便养成良好的科学作风，培养学生独立分析问题及解决问题的能力。本节首先介绍实验室安全防护常识，在此基础上学习基本操作及实验记录要求。

一、实验室规则

（一）在实验室进行操作，首先必须遵守以下实验室规则

1. 进入实验室，必须按规定穿戴必要的工作服；不许穿拖鞋；关闭个人娱乐、通信设备。
2. 严禁携带食品进入实验室；严禁在实验室内吃口香糖；禁止将食物储藏在实验用冰箱或储藏柜。
3. 实验室内不得吸烟、喧哗、打闹，自觉遵守实验室课堂纪律。

4. 实验教室要经常保持清洁整齐。室内地面、台面、试剂架及所用仪器器皿要整洁, 在实验台上, 不应放置与实验工作无关的物品, 尤其不能放置易燃、易爆的物品; 及时通风换气, 排除有害气体及实验中产生的废气。

5. 未经任课教师或实验教师允许, 不得动用仪器、药品及其他实验材料, 不得擅自拆卸仪器、设备, 实验教室的公共财产不得带出室外。

6. 实验前, 学生应按照教师的要求, 检查仪器、药品、器具及有关实验材料是否齐全和完好, 如有缺损, 及时报告。未经任课教师或实验教师批准, 不得进行实验。实验前要了解实验中使用试剂的性能、使用限量和操作方法, 严格按照规定操作。未经教师同意, 不得任意改变规定的操作方法和药品用量。

7. 实验室内的药品不得品尝味道和用手直接取用, 领取药品时, 要确认容器上标示的中文名称是否是需要的实验用药品并看清楚药品危害标示和图样, 确认是否有危害。

8. 实验过程要注意安全。严格做到安全用电、用气, 做好个人安全防护措施。

9. 基本操作要规范。使用挥发性有机溶剂、强酸强碱性、高腐蚀性、有毒性的药品必须在特殊通风橱中操作; 加热或倾倒液体时, 切勿俯视容器; 用试管加热时, 不能将管口朝向别人或自己, 以防液滴飞溅, 造成事故; 嗅闻气体时, 应该用手轻轻扇动, 使极少量气体飘进鼻孔, 不可将鼻子凑在容器上闻气味; 任何化学药品一经放至容器后, 必须立即贴上标签; 如果发现异常或疑问时, 应询问有关人员或进行验证, 不得随意乱丢乱放。

10. 进行有毒或危险性实验时必须穿好防护服, 戴好防护眼镜、防毒口罩或防毒面具。禁止用手直接接触毒物。

11. 要爱护仪器设备, 要节约药品、水、电等实验材料。

12. 实验完毕, 应按要求整理好仪器、药品以及其他实验材料。对于废弃液, 要按照实验室的统一处理方法进行处理, 不可未经处理擅自倒入下水道。

13. 仪器、设备若有损坏或丢失, 要及时报告任课教师, 并如实填写仪器报损单。

14. 值日生除搞好室内卫生外, 还要关好水、电、窗, 经任课教师检查允许后学生方可离开实验教室。

(二) 生物检测实验操作过程中注意事项

1. 实验前应做好试剂的配制、用品灭菌等准备工作, 配制分子生物学实验各种试剂, 必须要使用双蒸水(ddH_2O)。

2. 使用后的器皿必须认真清洗干净, 自来水洗完后还要用双蒸水冲洗三次。

3. 凡是可以进行灭菌的试剂与用具都必须经过高压蒸汽灭菌后进行使用, 防止其他杂质或酶对 DNA、RNA 或蛋白质的降解。

4. 凡是基因技术操作所用的一切塑料器具(Eppendorf 管、tip 头等), 在使用前都应装入盒子和瓶子中灭菌, 只能湿热灭菌, 然后置于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱中烘干后使用。且装盒或装瓶过程中都应采用镊子或戴上一次性手套进行操作, 不能直接用手去拿, 手套用完后捆好再弃于废物缸。Eppendorf 管、tip 头也为一次性用品, 用完后也要弃于废物缸。

5. 实验中加入任何试剂后应注意样品的混匀, 保温等反应后样品也应短暂离心(甩一下)后再进行下面的实验。

6. 实验过程中应做好每个样品的标记工作, 且一般在 Eppendorf 管上用记号笔作标记时,

应在两处重复做好标记。

二、实验室安全及防护知识

在实验室操作首先要具备安全意识，必须做到安全用水、用电、用气，以防火防爆。实验过程要做好个人防护，一旦受到伤害能够及时进行处理。

（一）实验室安全常识

1. 安全用水

（1）生物检测实验对水的质量有特别的要求（详见第二节），因此实验过程注意纯水的制备过程及储存，防止水被污染；

（2）用水完毕后注意关闭出水阀。若实验室发生停水现象，一定要关闭水龙头；

（3）用水要远离电源开关以及用电设备，以防漏电。

2. 安全用电

（1）实验室内的电气设备的安装和使用管理，必须符合安全用电管理规定。

（2）实验室内的用电线路和配电盘、板、箱、柜等装置及线路系统中的各种开关、插座、插头等均应经常保持完好可用状态，严禁破坏。

（3）手上有水或潮湿请勿接触电器用品或电器设备，严禁使用水槽旁的电器插座，防止漏电或触电。

（4）必须掌握实验室的仪器、设备的性能和操作方法，严格按操作规程操作。设备用完毕一定要关闭电源开关，拔掉电源插座。

（5）电器插座请勿接太多插头，以免电流负荷过大，引起电器火灾；如电器设备无接地设施，请勿使用，以免触电。

3. 安全使用压力容器

（1）使用气瓶时，严格按照气阀的打开顺序慢慢开启，注意气压表的读数，控制在设定值，使用完毕，按顺序关闭气阀；

（2）开启气门时应站在气压表的一侧，不准将头或身体对准气瓶总阀，以防万一阀门或气压表冲出伤人；

（3）气瓶内气体不可用尽，以防倒灌；

（4）使用高压灭菌锅严格按照设备操作说明进行操作，详见第二节。

（二）实验室防护常识

1. 实验室防火

使用乙醚、酒精、丙酮等易燃溶剂，要远离火源。如无菌操作时，酒精擦拭双手后，一定要挥发干后才能点燃或接近燃着的酒精灯，以防双手烧伤；使用设备如干燥箱，一定要按照操作要求使用以免仪器设备着火；实验过程万一着火，应冷静判断情况，采取适当灭火措施；可根据不同情况，选用水、沙、泡沫、CO₂或CCl₄灭火器等灭火。

2. 实验室防爆

防止可燃性气体或蒸气散失在室内空气中，保持室内通风良好。当大量使用可燃性气体时，严禁使用明火和可能产生电火花的电器；对于热爆炸用品，使用时轻拿轻放，远离热源；对于高压容器设备，如气瓶、高压灭菌锅，一定要严格按照要求操作使用。

3. 实验过程要注意个人安全防护

除了高温以外,液氮、强酸、强碱、强氧化剂、苯酚等物质都会灼伤皮肤;应注意不要接触,尤其防止溅入眼中;使用有毒试剂如溴化乙锭、聚丙烯酰胺,要戴手套、口罩;实验室的辐射,主要是指紫外线、X射线等,其中紫外线常用于实验室灭菌,但人体长期反复接受紫外线照射,会导致皮肤灼伤、皮肤癌、损伤视力等。因此要避免身体各部位(尤其是头部)直接受到射线照射,操作时需要屏蔽。实验室紫外灯灭菌后,进入实验室前要先关掉紫外灯,打开日光灯。

4. 实验室急救常识

(1) 普通伤口 实验时,皮肤如被玻璃或利器割伤,先检查伤口里是否有玻璃碎片,若有玻璃碎片,需小心地拔出,然后用3%双氧水或生理食盐水消毒,再在伤口上抹红药水,撒些消炎粉并包扎,伤口深的要接受医生的检查处理。

(2) 烧烫(灼)伤 以冷水冲洗15~30 min至散热止痛,以生理盐水擦拭(不要用药膏、牙膏、酱油涂抹或以纱布盖住),尽快送至医院。注意水泡不可自行刺破。

(3) 化学药物灼伤 以大量清水冲洗,以消毒纱布或消毒布块覆盖伤口,尽快送至医院处理。酸灼伤,立即用大量水冲洗,然后用5%的碳酸氢钠溶液洗涤,再用清水洗净,涂上甘油。碱灼伤,先用水冲洗,然后用饱和硼酸溶液或3%的醋酸溶液洗涤。酚灼伤,先用浸了甘油或聚乙二醇和酒精混合液(7:3)的棉花除去污物,再用清水冲洗干净,然后用饱和硫酸钠溶液湿敷。

(4) 中毒 如果只是溅入口中而没有下咽的毒物应立即吐出,用大量清水冲洗口腔。如果已吞下应据毒物性质服用解毒剂,并立即送医院;吸入有毒气体,应立即移至室外空气新鲜的地方,解开衣领,切勿随便进行人工呼吸。因吸入少量氯气、溴蒸气而中毒的,可用碳酸氢钠溶液漱口,不可进行人工呼吸。

(5) 火灾 实验室一旦起火,一方面立即灭火,一方面防止火势蔓延(切断电源、移走易燃物品)。灭火的方法要针对起因选用合适的方法。一般小火可用湿布、石棉布或沙子覆盖燃烧物即可灭火。火势较大可用灭火器。但电器设备所引起的火灾,只能用二氧化碳或四氯化碳灭火,不能用泡沫灭火器或水灭火,以免触电。衣服着火时,切勿奔跑,应就地打滚,其他人员迅速帮其灭火。

(6) 触电 发生触电时,迅速切断电源,将触电者上衣解开,取出口中异物,然后进行人工呼吸,患者恢复呼吸后,立即送医院。

以上方法仅为急救措施,若伤势严重,应速送医院诊治。

(三) 实验室废液处理常识

1. 由于废液的组成不同,在处理过程中,往往伴随产生有毒气体以及发热、爆炸等危险。因此,处理前必须充分了解废液的性质,然后加入少量所需添加的药品。同时必须边注意观察边进行操作。

2. 含有络离子、螯合物之类物质的废液,只加入一种消除药品有时不能把它处理完全。因此,要采取适当的措施防止一部分还未处理的有害物质直接排放出去。

3. 对于为了分解氰基而加入次氯酸钠,以致产生游离氯,以及由于用硫化物沉淀法处理废液而生成水溶性的硫化物等情况,其处理后的废水往往有害。因此,必须把它们再加以处理。

4. 粘附有害物质的滤纸、包药纸、棉纸、废活性炭及塑料容器等东西，不要丢入垃圾箱内。要分类收集，加以焚烧或其他适当的处理，然后保管好残渣。

5. 处理废液时，为了节约处理所用的药品，如可将废铬酸混合液用于分解有机物，以及将废酸、废碱互相中和。要积极考虑废液的利用。

6. 尽量利用无害或易于处理的代用品，代替铬酸混合液之类会排出有害废液的药品。

7. 对甲醇、乙醇、丙酮及苯之类用量较大的溶剂，原则上要把它回收利用，而将其残渣加以处理。

三、实验记录与实验报告

(一) 实验记录

实验记录是培养学生良好科学素养的开端，是具备检验岗位基本素质的训练。

1. 实验课前应认真预习，将实验名称，实验目的和要求，实验原理，实验内容，操作方法与步骤等简单扼要地写在记录本上。

2. 实验记录本应标上页数，不要撕去任何一页，更不要擦抹及涂改，写错时可划去重写，并签上本人姓名。记录须用钢笔或圆珠笔。

3. 实验中观察到的现象，结果和数据，应及时直接记录在记录本上，绝对不可用单片纸做记录或草稿。原始记录必须准确，简练，详尽，清楚。

4. 记录时，应做到正确记录实验结果，切忌夹杂主观因素。在实验条件下观察到的现象，应如实仔细地记录下来。在定量实验中观测的数据，应设计一定的表格(简易形式)准确记录下正确的数据，并根据仪器的精确度准确记录有效数字。每一结果至少重复观察两次，当符合实验要求并确定仪器正常工作后再写在记录本上。实验记录上的每一个数字，都反映每一次的测量结果，所以，重复观测时即使数据完全与前一次相同也应如实记录下来。数据的计算也应写在记录本上，一般在正式记录的左边一页，总之，实验的每个结果都应正确无遗漏地做好记录。

5. 实验中使用仪器的类型、编号以及试剂的规格、化学式，相对分子质量、准确的浓度等，都应该记录清楚，以便总结实验时进行核对和作为查找成败原因的参考依据。

6. 如发现实验记录的结果有疑问、遗漏、丢失等，必须重做实验。因为，将不可靠的结果当作正确的记录，在实际工作中可能造成难于估计的损失。所以在学习期间就应该一丝不苟，努力培养严谨的科学作风。

(二) 实验报告

实验报告是做完每个实验后的总结，应及时整理和总结实验结果，写出实验报告。按照实验内容可将实验分为定性实验和定量实验两大类，这两类实验报告均包括实验目的、实验内容、实验原理、实验试剂与仪器、操作方法与步骤、结果与讨论。定量实验还包括实验结果与数据处理。书写实验报告应包括以下几点：

1. 实验报告可用专用实验报告纸。为避免遗失，所有的实验结束后装订成册。

2. 实验原理应简明扼要的写出。

3. 应列出所用的试剂和主要仪器。说明化学试剂时要避免使用未被普遍接收的商品名和俗名。

4. 实验步骤的描述要简洁,不能照抄讲义。

5. 记录实验现象的所有细节,最好用图表的形式概括实验结果。

6. 讨论不是实验结果的重述,而是以结果为基础的逻辑推论。包括关于实验方法,操作技术及其他有关实验的一些问题,如实验的正常结果和异常结果以及思考题等;另外也包括对于实验设计的认识、体会和建议,对实验课的改进意见等。

第二节 基本技能

检验工作者除必须具备基本实验知识外,首先要掌握基本实验技能,如实验用水的制备方法与质量要求、玻璃仪器的清洗与使用、常用量器的校正与正确使用、常用仪器的检定与正确使用等。

一、实验用水质量要求与制备

水是常用的溶剂,天然水中含有许多杂质,经简单的物理、化学方法处理,除去悬浮物质和部分无机盐即得到自来水。天然水和自来水经蒸馏、电渗析等方法处理,除去杂质,即成实验用纯水。实验用纯水并非不含任何杂质,其质量高低直接影响到所配试剂的质量,影响实验结果的准确度和精密度。纯水的分类及制备方法如下。

1. 蒸馏水(distilled water)

实验室最常用的一种纯水,虽然制备所需的仪器便宜,但极其耗能和费水且速度慢,应用会逐渐减少。蒸馏水能去除自来水内大部分的污染物,但挥发性的杂质无法去除,如二氧化碳、氨、二氧化硅以及一些有机物。新鲜的蒸馏水是无菌的,但储存后细菌易繁殖;此外,储存的容器也很讲究,若蒸馏水中含有非惰性的物质,离子和容器的塑性物质会析出造成二次污染。采用蒸馏法制备,即将自来水在蒸馏器中加热汽化,然后冷凝水蒸气即得蒸馏水。

2. 去离子水(deionized water)

用离子交换法制备的纯水称为去离子水,是目前用的比较多的一种方法,一般采用阴、阳离子交换树脂的混合床装置。由于树脂是多孔网状结构,具有很强的吸附能力,可以同时除去电中性杂质,又因交换柱本身是一个很好的过滤器,所以颗粒杂质可以一同除去。本法得到的去离子水纯度较高。但去离子水中仍然存在可溶性的有机物,可以污染离子交换柱从而降低其功效,去离子水存放后也容易引起细菌的繁殖。

3. 反渗透水(reverse osmosis water)

采用渗透法制备,其制备的原理是水分子在压力的作用下,通过反渗透膜成为纯水,水中的杂质被反渗透膜截留排出。反渗透水克服了蒸馏水和去离子水的许多缺点,利用反渗透技术可以有效的去除水中的盐类、胶体、细菌、病毒、细菌内毒素和大部分有机物等杂质,但不同厂家生产的反渗透膜对反渗透水的质量影响很大。反渗透水常用于实验室器皿的最后清洗,缓冲液、化学试剂配制用水,微生物培养基制备用水,人或实验动物饮用水等。

4. 超纯水(ultra-pure grade water)

超纯水所使用的纯化技术和过程就是渗析和去离子的一个过程,先采用离子交换,再采用活性炭过滤(用化学吸附去除氯,有机吸附除去可溶性有机物)、微孔过滤(或称亚微米过滤,用一个 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 孔径的膜或者中空纤维滤膜,滤除大于 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 的污染物,包括来自碳柱的碳微粒、离子树脂碎片和任何可能进入纯化水系统的细菌和超滤(用来除去纯化水中所有直径大于 $0.01\text{ }\mu\text{m}$ 的微粒、热源和微生物)等技术。还有一些特别手段,如紫外氧化或光氧化(采用 254 nm 的紫外光除去系统中的细菌)等。超纯水适用范围较广:分析试剂及药品配制稀释用水,生物学、电化学及界面研究用水,微生物、生物发酵培养用水,动、植物细胞培养用水,生物工程培养基用水,有机物分析用水,各种高效液相色谱、离子色谱、原子吸收光谱用水,各种医疗用生化仪、分析仪、血液透析仪用水,生理、病理、毒理学实验用水,医院、医药制剂室及中心实验室用纯化水和高纯水,高精密光学镜片冲洗用水。

二、实验用玻璃器皿的清洗、使用和校正

实验中常用的玻璃仪器,其清洁程度、使用方法以及准确度直接影响实验结果。因此,玻璃器皿的清洗、使用和校正是极其重要的技术工作。

(一) 玻璃器皿的清洗

1. 初用玻璃仪器的清洗

新的玻璃仪器表面常附着有游离的碱性物质,可先用肥皂水(或去污粉)洗刷再用自来水洗净,然后浸泡在 $1\%\sim 2\%$ 盐酸溶液中过夜(不少于 4 h),再用自来水冲洗,最后用蒸馏水冲洗 $2\sim 3$ 次,在 $100\sim 130\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱内烘干备用。

2. 使用过的玻璃仪器的清洗

(1) 容器类玻璃仪器 如试管、烧杯、锥形瓶等。先用自来水洗刷干净,再选用大小合适的毛刷蘸取去污粉(掺入肥皂粉)或浸入肥皂水内。将器皿内外(特别是内壁)细心刷洗,用自来水冲洗干净后,蒸馏水冲洗 $2\sim 3$ 次,烤干或倒置在清洁处晾干,备用。

(2) 量器类玻璃仪器 如吸量管、滴定管、容量瓶等。使用后应立即浸泡于自来水中,勿使物质干涸;然后用流水冲洗,除去附着的试剂、蛋白质等物质。晾干后浸泡在铬酸洗液中 $4\sim 6\text{ h}$ (或过夜),再用自来水充分冲洗,最后用蒸馏水冲洗 $2\sim 4$ 次,晾干备用。表1-1列出了各种清洁液的配方。

表1-1 清洁液配方(引自生物秀 www.bb100.com)

名 称	清洁液浓度		
	25% (弱液)	50% (次强液)	75% (强液)
重铬酸钾	1 000 g	1 000 g	1 000 g
浓硫酸	2 500 ml	5 000 ml	7 500 ml
蒸馏水(或废液)	7 500 ml	5 000 ml	2 500 ml

清洁液具有高度腐蚀性,操作时必须穿长统胶靴,戴防酸橡皮手套、围裙和眼镜,以防清洁液溅出而灼伤。在配液时还应注意将酸缓慢放入水中,以防酸遇水放热溅出或使玻璃及陶制容器裂开而使清洁液外泄。切勿将水加入酸中,以防酸溅出。常用清洁液为75%和50%两种。

(3) 其他 存储过具有传染性标本的容器, 如病毒、传染病患者的血清等沾污过的容器, 应浸泡在杀菌剂(5% 煤酚皂溶液)中过夜, 进行消毒后再清洗。

3. 对于分子生物学及细胞生物学实验所用的器皿, 清洗过程还有如下要求:

(1) 刷洗时注意不要用力过重, 以防损坏器皿内表面光洁度, 影响细胞生长; 也不能留有死角。器皿数量大时, 可使用超声波清洁装置, 冲洗干净后晾干。

(2) 在清洁液中浸泡 12~24 h 后取出, 取出的器皿先用自来水冲洗 10 次以上, 再用单蒸水冲洗三次以上, 最后用双蒸水(或去离子水)冲洗 1~2 次, 晾干, 包装杀菌。一般用 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

(3) 对于塑料器材, 多为一次性使用的, 也有反复使用的。若使用后, 先用自来水浸泡冲洗、晾干, 再用 3% HCl 或 2% NaOH 溶液浸泡过夜, 用自来水充分冲洗, 或先用 2% NaOH 处理之后再用 3% HCl 浸泡 30 min, 最后用自来水冲洗干净, 并用双蒸水冲洗 3 次以上, 晾干。消毒采用紫外线直接照射或辐照灭菌办法。

(4) 对于橡皮器材, 如各种瓶子或试管的塞子、盖子。初次使用的用自来水冲洗去除其表面粉粒和污物。先用 5% 氢氧化钠煮沸 15 min, 用自来水冲洗 8 次, 再用 4% 盐酸煮沸 15 min, 用自来水冲洗 8 次, 单蒸水冲洗 3 次, 双蒸水(或去离子水)冲洗一次, 晾干后包装或置于铝盒内, 用 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min; 已用过的橡皮制品, 先用自来水冲洗干净, 然后用洗衣粉加热煮沸 10 min 后, 用自来水边冲边用力搅动, 以充分洗净残余洗衣粉, 然后用蒸馏水煮沸 2 次, 每次 15 min, 再用单蒸水冲洗 2 次, 其余同上。

(二) 普通玻璃仪器的使用

1. 量筒

量筒是实验中常用的度量液体的量器, 用于不太精密的液体计量。根据需要选用各种不同容量规格的量筒。例如量取 8.0 ml 液体时, 应选用 10 ml 量筒, 测量误差为 ± 0.1 ml; 如果选用 100 ml 量筒量取 8.0 ml 液体体积, 则至少有 ± 1 ml 的误差。注意量筒不能用作反应容器, 不能装热的液体, 更不可加热。读取量筒的刻度值, 一定要使视线与量筒内液面(半月形弯曲面)的最低点处于同一水平线上, 否则会增加体积的测量误差。

2. 容量瓶

容量瓶主要是用于准确浓度溶液的配制或是溶液的稀释。容量瓶与瓶塞要配套使用, 使用前应检查是否漏水。不宜用容量瓶长期存放溶液。另外, 容量瓶不能在烘箱中烘烤, 不许以任何形式对其加热。

3. 移液管、吸量管

移液管和吸量管是用于准确量取一定体积液体的量出式的玻璃量器。用移液管(吸量管)移取溶液前, 应保证其清洁干燥, 并用欲移取的溶液涮洗 2~3 次, 以确保所移取溶液的浓度不变。移取溶液时, 用右手的大拇指和中指拿住管上方, 下端插入溶液中 1~2 cm, 左手用洗耳球慢慢将溶液吸入管内。当液面升高到刻度以上时, 立即用右手的食指按住管口, 将移液管(吸量管)下口提出液面, 管的末端靠在盛溶液器皿的内壁上, 略为放松食指, 使液面平稳下降, 直到溶液的弯月面与标线相切时, 立即用食指压紧管口, 使液体不再流出。取出移液管(吸量管), 用干净滤纸片擦去移液管(吸量管)末端外部的溶液, 然后插入承接溶液的器皿中, 使管的末端靠在器皿内壁上。此时移液管(吸量管)应垂直, 倾斜盛接的器皿, 松开食指, 让

管内溶液自然地沿器壁流下,加入所需量溶液,等待10~15 s后,拿出移液管(吸量管)。管口上未标“吹”字,残留在移液管(吸量管)末端的溶液,不可用外力使其流出;管口上刻有“吹”字,使用时末端的溶液必须吹出。

4. 试管

试管规格和质量的选择应该按照实验要求而定。分子生物学及细胞生物学实验中要使用清洁、一次性试管,以保证实验的质量。

5. 烧杯

用于盛液、加热、溶解和配制试剂,常与容量瓶配合使用。使用时切勿用手接触其内壁,溶解或混匀试剂时可用玻璃棒搅拌助溶或助匀。烧杯内试剂倾入容量瓶时,注意多次冲洗烧杯,一并倒入容量瓶内。

6. 培养皿

用于培养微生物或动植物细胞的一种容器,由玻璃或塑料制成。它有大小不同的规格,培养微生物时一般用直径100 mm的,盛取组织和分离组织时可采用直径60 mm或较大一些的培养皿。较小一些的培养皿,如直径30 mm或15 mm,适用于在CO₂培养箱中培养细胞。市售的培养皿有一次性和反复使用型的,一次性的常为塑料制品,已灭菌,切忌高压灭菌。玻璃制品的培养皿可反复使用,使用前清洗同前玻璃器皿的洗涤,烘干后,包扎高压灭菌。

(三) 常用玻璃量器的校正

在校正量器之前,必须先熟悉玻璃容量仪器的正确使用方法,校正时的使用方法必须和实际工作中的使用方法一致。

校正量器的方法是从量器在某温度时所容纳的水质量,来推算其体积。由于量器的容积随温度而变化,所以,必须确定温度,校正量器才有其意义。温度的选择以接近实验室全年平均温度为佳,一般采用20℃。例如,20℃ 1 000 ml的容量瓶,是指在20℃时,它的容积为1 000 ml;如果温度超过20℃,显然它的容积大于1 000 ml;低于20℃,它的容积就不足1 000 ml。因此,校正时必须考虑三个因素:①温度对容量仪器的影响;②温度对水(或水银)密度的影响;③空气浮力对所称水的质量的影响。其中影响最大的是温度对水密度的影响,校正时的温度应尽可能选择靠近20℃。

三、试剂配制、灭菌与保存

化学试剂有不同的品级规格,如果在实验中选用了低品级的试剂,一般而言会引入一个恒定的系统误差,有时会导致误差太大甚至实验失败。但盲目地选择高品级试剂,则导致不必要的浪费。生物检测实验中,使用目的不同对化学试剂的质量要求也不同,检验工作者应熟悉化学试剂的品级规格及其用途,以便根据不同的使用目的正确选用。

(一) 试剂规格与选用原则

我国参照进口化学试剂的质量标准,对通用试剂制定四种常用规格。即一级GR(Guarantee reagent)保证试剂;二级AR(analytical reagent)分析纯试剂;三级CP(chemical pure reagent)化学纯试剂;四级LR(laboratory reagent)实验试剂。化学试剂的品级、纯度和用途见表1-2。