

全国高等院校配套教材

生物化学与 分子生物学实验

SHENGWUHUAXUE YU
FENZI SHENGWUXUE SHIYAN



主编 翟静 张媛英



第四军医大学出版社

全国高等院校配套教材

生物化学与分子生物学实验

主编 翟 静 张媛英

第四军医大学出版社·西安

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验/翟静, 张媛英主编. —西安:
第四军医大学出版社, 2012. 9

ISBN 978 - 7 - 5662 - 0281 - 9

I. ①生… II. ①翟… ②张… III. ①生物化学 - 实
验 ②分子生物学 - 实验 IV. ①Q5 - 33 ②Q7 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 210162 号

生物化学与分子生物学实验

主 编 翟 静 张媛英

责任编辑 赵 瑜

出版发行 第四军医大学出版社

地 址 西安市长乐西路 17 号(邮编:710032)

电 话 029 - 84776765

传 真 029 - 84776764

网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>

印 刷 潍坊市广源印务有限公司

版 次 2012 年 9 月第 1 版 2012 年 9 月第 1 次印刷

开 本 787 × 1092 1/16

印 张 11.75

字 数 350 千字

书 号 ISBN 978 - 7 - 5662 - 0281 - 9/Q · 53

定 价 29.80 元

版权所有 侵权必究

购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换

《生物化学与分子生物学实验》

编写委员会

主 编 翟 静 张媛英

副主编 孙凌云 顾洪雁 蒋汉明 王泽平

编 委 (按姓氏笔画排序)

于 杨 于立娟 王 云 王 涛 王泽平

方 茜 史仁玖 伊淑莹 刘海斌 孙凌云

邴爱英 邱玉玉 张媛英 郝岗平 柏素云

顾洪雁 陶 如 蒋汉明 翟 静

前 言

21 世纪是生命科学的世纪，生物化学与分子生物学是当代生命科学领域中一门重要的基础学科，它涵盖的基础理论、基本知识、基本技术与医学研究各学科领域密切相关，其理论与技术的发展，推动了生命科学的发展，对人类的科技进步与文明产生巨大影响。生物化学实验是医学院校学生必修的一门基础实验技术课程，其研究技术的发展与应用是依据物理学、化学及生物学的基本理论和实验方法建立起来的。20 世纪 20 年代微量分析的发展、30 年代电子显微镜的出现、40 年代层析技术和电泳技术的兴起，以及同位素示踪技术、各种光谱技术、核磁共振技术的应用，激光、超导等新技术的出现，电子计算机技术的突飞猛进，使生物化学实验手段提高到一个崭新的水平，掌握生物化学实验方法和研究技术，对医学院校学生来说是十分重要的。

本门课程主要侧重于给学生以基本的实验方法和技能的训练，让学生了解并掌握生物化学的四大基本实验方法，即：分光光度法、离心法、层析法和电泳法。同时也注意引进一些新近发展起来的、重要的生物化学及分子生物学研究技术，作为学生学习其他专业课程和进入科学研究领域的准备。

由于编者水平有限，教材中可能有一些错误和不足，望同行专家和使用 者提出宝贵意见。

编 者
2012. 03

目 录

第一章 生物化学实验基本知识与操作	1
第一节 生物化学实验基本知识	1
第二节 生物化学实验基本操作	3
第二章 分光光度技术	16
实验一 双缩脲法测定蛋白质浓度	26
实验二 Folin-酚试剂法 (Lowry 法) 测定蛋白质浓度	28
实验三 紫外分光光度法测定蛋白质浓度	29
实验四 考马斯 (Comessie) 亮蓝结合法测定蛋白质浓度	31
实验五 BCA 法测定蛋白质浓度	33
实验六 激素对血糖浓度的影响及血糖的测定	34
实验七 碱性磷酸酶 (AKP) 米氏常数 (K_m) 的测定和底物浓度对酶促反应速度的影响	40
第三章 生物大分子的提取、沉淀和离心分离技术	43
第一节 生物材料的选取与预处理	43
第二节 生物大分子的沉淀分离技术	47
第三节 生物大分子离心分离技术	50
实验八 鸡血 SOD 的提取、分离及活力测定	55
实验九 碱性磷酸酶的制备及活力测定	57
实验十 酪蛋白的制备	61
实验十一 细胞核蛋白质的提取	62
实验十二 动物肝脏中提取 DNA	64
实验十三 猪心肌细胞线粒体可溶性 ATP 合酶的提纯	66
第四章 电泳技术	71
实验十四 DNA 琼脂糖凝胶电泳	77
实验十五 血浆脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	80
实验十六 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离乳酸脱氢酶同工酶	83
实验十七 蛋白质分子量的测定——SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	88
实验十八 聚丙烯酰胺等电聚焦电泳	90
实验十九 醋酸纤维素薄膜对血清蛋白质的电泳	95
实验二十 双向电泳	97

实验二十一 垂直板 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清脂蛋白蛋白质	108
第五章 层析技术	112
第一节 层析技术概述	112
第二节 吸附层析	113
第三节 分配层析	114
第四节 离子交换层析	116
第五节 凝胶层析	118
第六节 亲和层析	121
第七节 高效液相层析	123
实验二十二 氨基酸的纸上层析与氨基酸的转氨基作用	123
实验二十三 血清 γ -球蛋白的分离纯化与鉴定	125
实验二十四 亲和层析纯化胰蛋白酶	129
实验二十五 离子交换层析分离氨基酸	132
实验二十六 蛋白质分子量测定——凝胶过滤层析法	134
第六章 分子生物学基本技术	137
第一节 核酸分子杂交	137
第二节 聚合酶链反应	140
第三节 分子克隆	143
实验二十七 限制性内切酶消化 DNA 分子	146
实验二十八 核糖核酸 (RNA) 的提取	147
实验二十九 Southern 杂交分析	149
实验三十 Northern 杂交分析	152
实验三十一 PCR 基因扩增	154
实验三十二 RT-PCR 扩增目的基因 cDNA	156
实验三十三 琼脂糖凝胶中 DNA 片段的回收	157
实验三十四 质粒 DNA 的提取及酶切	158
实验三十五 质粒载体和外源 DNA 的连接反应	161
实验三十六 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化	162
实验三十七 克隆的筛选和快速鉴定	163
参考文献	165
附录一 常用缓冲液的配制方法	166
附录二 易变质及需要特殊方法保存的试剂	172
附录三 一般化学试剂的分级	173
附录四 English words in the lab	174

第一章 生物化学实验基本知识与操作

第一节 生物化学实验基本知识

一、实验课目的与要求

(一)实验课目的

1. 加深对生物化学基本理论的理解和掌握。
2. 掌握生物化学的基本实验方法和实验技术。
3. 培养学生严谨的科学态度和思维能力,以及独立分析问题和解决问题的能力。

(二)实验课要求

1. 实验前必须预习实验指导和有关理论,明确实验目的、原理、预期的结果、操作关键步骤及注意事项。
2. 实验时要严肃、认真、专心进行操作,注意观察实验过程中出现的现象和结果,结果不良时,必须重做。
3. 实验中,应及时将实验结果如实记录下来,并请老师当场审核。根据实验结果进行科学分析,按时将实验报告交教师评阅。

二、实验室规则

1. 严肃、认真、积极、主动地上好实验课。进实验室时要穿戴好隔离衣,不得穿拖鞋、背心出入实验室,以免酸碱腐蚀皮肤。
2. 进实验室前准备好实验指导、课本、笔记、实验记录本、报告本、文具等。
3. 要保持实验台整洁,试剂、仪器应整齐,按次序放置。实验完毕要按各类仪器的清洗方法和要求将仪器清洗干净。
4. 实验室是培养学生独立思考、独立工作能力及良好科学作风的重要场所,操作务必认真不得敷衍,室内应保持肃静,不得吸烟、玩闹,不得随地吐痰、乱丢纸屑。实验后要清洗打扫实验台面、地面,试剂瓶要码放整齐。
5. 要爱护仪器、节约药品。第一次实验时要按仪器清单清点仪器,负责保管,用后如数交还。在使用时如有破损,及时报告,经指导教师检查后填写破损单,按学校规定赔偿。
6. 贵重仪器如分光光度计、离心机等,要尽力爱护,使用前应熟悉使用方法,严格遵守操作规程,严禁随意开动。

7. 要节约水电,一经用完随手关闭水阀、电门。

三、值日生任务

1. 领发本次所用仪器、物品,清点、交还临时用仪器、物品,若有损坏负责追查赔偿。
2. 管理操作公用仪器,打蒸馏水。
3. 搞好实验室卫生,做到仪器、桌面、地面、水池等清洁干净。
4. 确保安全,关好仪器、门窗、水电。
5. 请任课及实验室老师检查工作,认可后方能离开实验室。

四、试剂使用规则

1. 使用试剂前应仔细辨认标签,看清名称及浓度,是否为本实验所需要。
2. 取出试剂后,立即将瓶塞盖好,切勿盖错,放回原处。试剂瓶塞、专用吸量管、滴管,不得与试剂瓶分家,以免混用而污染试剂,造成自己或他人实验的失败。未用完的试剂不得倒回瓶内。昂贵的 Sephadex、Sephadex 凝胶和 DEAE 纤维素等,用后必须及时回收,不得丢弃。
3. 使用滴管时,滴管尖端朝下,切勿倒置,勿使试剂流入橡皮帽内。
4. 使用有毒试剂及强酸强碱时,尽可能用量筒量取,若用吸管时只能用吸耳球吸取,切勿用嘴吸取,以免造成意外。

五、废弃物处理

1. 所有固体废弃物,如用过的滤纸、棉花、碎屑沉淀物和电泳后的凝胶等,必须倾弃于垃圾桶中。
2. 浓酸必须弃于小钵中,用水稀释后倒入水池中。

六、安全注意事项

1. 低沸点有机溶剂,如乙醚、石油醚、酒精等均系易燃物品,使用时应禁明火、远离火源,若需加热要用水浴加热,不可直接在火上加热。
2. 若发生酸碱灼伤事故,先用大量自来水清洗,酸灼伤者用饱和 NaHCO_3 溶液中和,碱灼伤者用饱和 H_3BO_3 溶液中和,氧化剂伤害者用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理。
3. 若发生起火事件,根据发生起火性质分别采用沙、水、 CO_2 或 CCl_4 灭火器扑灭。
4. 离开实验室必须关好窗户,切断电源、水源,以确保安全。

七、实验室意外事故的处理

实验室如遇着火、烫伤、割伤等意外事件发生,必须镇静,做紧急处理,并立即报告教员,

做如下处理:

1. 着火

如酒精灯推倒或其他原因起火,首先将一切易燃物品移至安全处,然后将火扑灭。灭火方法:可用湿布或工作服盖上扑灭,或盖上一层沙扑灭。如乙醚、油类等比水轻、易燃的物品着火时,切勿用水,火势大时速取灭火器灭之。

2. 火伤

皮肤被火灼伤,用烫伤软膏涂之,如伤势较重,即送医院。

3. 药品伤

皮肤被药品所侵蚀,应据药品的性质加以适当处理后,用单宁油膏或凡士林涂之,如是酸或碱,则先用大量水冲洗,然后用5%的小苏打液或1%醋酸分别处理。

如眼睛为药品所侵入,用水洗去后,继以5%的小苏打液或1%的硼酸液冲洗,视侵入药品的性质而定。必要时,去医院处理。

4. 割伤出血

凡遇到玻璃割伤出血,可用碘酒或红药水消毒后(切忌碘酒与红药水同时应用),再用纱布包扎。如有玻璃留在伤口,应先取出再做处理。

5. 毒物入口

有毒之物用吸管吸取时切勿直接用口吸取。如遇毒物入口,除酸、碱外,应先使之呕吐,用芥子粉或0.06g吐酒石溶于2ml水中作致吐剂,温盐水肥皂水也可用。如是腐蚀性物质,则饮鸡蛋清以作润滑剂。

第二节 生物化学实验基本操作

一、玻璃仪器的清洁及使用

(一)玻璃仪器的清洁

1. 玻璃仪器的清洗

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的失败。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)是否彻底清洗干净是非常重要的。

(1)新购玻璃仪器的清洗: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4小时),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

①一般非计量玻璃仪器或粗容量仪器:如试管、烧杯、量筒等普通玻璃仪器,可直接用毛刷蘸餐洗净刷洗,然后用自来水冲洗,直至器壁内外既不聚成水滴也不成股流下即可。最后用少量蒸馏水冲洗内壁2~3次,倒置晾干即可。

②容量分析仪器:容量瓶、滴定管及吸管等容量仪器,用后用自来水多次冲洗,如能清洁(壁不挂水珠),再用蒸馏水少量冲洗2~3次晾干即可备用。若仍不干净附有油污等,则须于干后放入铬酸洗液内浸泡数小时,然后倒净(或捞出)洗液,用自来水充分冲洗至水不显黄色后再冲几次,最后用少量蒸馏水冲洗2~3次晾干备用。

(3)比色皿的清洗:决不可用强碱清洗,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。清洗干净的比色皿器壁内外应既不聚成水滴也不成股流下,切忌用刷子、粗糙的布或滤纸等擦拭。洗净后,倒置晾干备用。

2. 塑料器皿的清洗

聚乙烯、聚丙烯等制成的塑料器皿,在生物化学实验中已用的越来越多。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和无离子水清洗,然后用3~10mol/L EDTA除去金属离子的污染,最后用无离子水彻底清洗,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。

3. 洗液的配制

因已确定铬有致癌作用,因此配制和使用洗液时要极为小心,常用两种配制方法如下:

(1)取100ml工业浓硫酸置于烧杯内,小心加热,然后慢慢加入5g重铬酸钾粉末,边加边搅拌,待全部溶解并缓慢冷却后,贮存在磨口玻璃塞的细口瓶内。

(2)称取5g重铬酸钾粉末,置于250ml烧杯中,加5ml水使其溶解,然后慢慢加入100ml浓硫酸,溶液温度将达80℃,待其冷却后贮存于磨口玻璃瓶内。

4. 其他洗涤液

(1)工业浓盐酸:可洗去水垢或某些无机盐沉淀。

(2)5%草酸溶液:用数滴硫酸酸化,可洗去高锰酸钾的痕迹。

(3)5%~10%磷酸三钠($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)溶液:可洗涤油污物。

(4)30%硝酸溶液:洗涤二氧化碳测定仪及微量滴管。

(5)5%~10%乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2)溶液:加热煮沸可洗脱玻璃仪器内壁的白色沉淀物。

(6)尿素洗涤液:为蛋白质的良好溶剂,适用于洗涤盛过蛋白质制剂及血样的容器。

(7)有机溶剂:如丙酮、乙醚、乙醇等可用于洗脱油脂、脂溶性染料污痕等,二甲苯可洗脱油漆的污垢。

(8)氢氧化钾的乙醇溶液和含有高锰酸钾的氢氧化钠溶液:这是两种强碱性的洗涤液,对玻璃仪器的侵蚀性很强,可清除容器内壁污垢,洗涤时间不宜过长,使用时应小心慎重。

5. 玻璃和塑料器皿的干燥

生化实验中用到的玻璃和塑料器皿经常需要干燥,一般地说,洗净后的玻璃仪器如不急应用应倒放在晾架上令其自然干燥。若有急用可放在烘烤箱中 $110^{\circ}\text{C} \sim 120^{\circ}\text{C}$ 烤干,但容量玻璃仪器,如容量瓶、吸量管、滴定管以及烧结、结构复杂的玻璃仪器等严禁烘烤,此类仪器,如急用可采用水泵抽气法干燥。硝酸纤维素的塑料离心管加热时会发生爆炸,所以决不能放在烘箱中干燥,只能用冷风吹干。

(二)常用玻璃仪器的使用

1. 吸量管

吸量管是生化实验最常用的仪器之一,测定的准确度和吸量管的正确选择和使用有密切关系。常用的吸量管可以分为三类(图 1-1):

(1)刻度吸量管:刻度吸量管是多刻度吸量管,供量取 10ml 以下任意体积的溶液,有 0.1ml、0.2ml、0.5ml、1.0ml、2.0ml、5.0ml、10.0ml 等规格。吸量管刻度所标的数字有自上而下和自下而上两种,使用之前应仔细分辨。有“快”字则为快流式,有“吹”字则为吹出式,无“吹”字的吸管不可将管尖的残留液吹出。吸、放溶液前要用吸水纸擦拭管尖。

(2)移液管:常用来量取 50ml、25ml、10ml、5ml、2ml、1ml 的液体,这种吸量管只有一个刻度,放液时,量取的液体自然流出后,管尖需在盛器内壁停留 15 秒钟,注意管尖残留液体不要吹出。

(3)奥氏吸量管:在量取黏度较大的液体如血液、血清等时,应当使用奥氏吸管。这种吸管也是单标的,并且在其下端有一个膨大部分。所以液体与吸管表面接触面积较小,当量取血液时,较他种吸管准确。奥氏吸管的容量包括遗留在尖端的液体,故在缓缓使液体流出后,再停留数秒钟,吹出最后一滴。在学生实验中常用的有 0.5ml、1.0ml、2.0ml、3.0ml 等规格。

(4)吸量管的使用

1)选用原则:准确量取整数量液体,应选用奥氏吸量管,量取大体积时要用移液管。量取任意体积的液体时,应选用取液量最接近的吸量管。如欲取 0.15ml 液体,应选用 0.2ml 刻度的吸量管。同

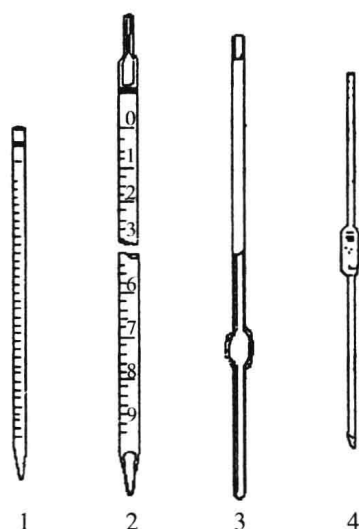


图 1-1 三类吸量管简图

1、2. 刻度吸量管 3. 奥氏吸量管 4. 移液管

一定量试验中,如欲加同种试剂于不同管中,并且取量不同时,应选择一支与最大取液量接近的刻度吸量管。如各试管应加的试剂量为 0.3ml、0.5ml、0.7ml、0.9ml 时,应选用一支 1.0ml 刻度的吸量管。

2)吸量管的使用

①执管:将中指和拇指拿住吸量管上口以食指控制流速,刻度数字应朝向操作者。

②取液:把吸量管插入液体内(切忌悬空,以免液体吸入洗耳球内),用洗耳球吸取液体至所取液量的刻度上端 1~2cm 处,然后迅速用食指按紧吸量管上口,使管内液体不再流出。

③调准刻度:将已吸足液体的吸量管提出液面,用滤纸片抹干管尖外壁液体,然后垂直提起吸量管于供器内口(管尖悬离供器内液面)。用食指控制液流至所需刻度,此时液体凹面、视线和刻度应在同一水平面上,并立即按紧吸量管上口。

④放液:放松食指,让液体自然流入受器内(如移液管标有“吹”字,则应将管口残余液滴吹入受器内),此时管尖应接触受器内壁,但不应插入受器内的原有液体之中,以免污染吸量管及试剂(图 1-2)。

⑤洗涤:吸取血液、尿、组织样品及黏稠试剂的吸量管,用后应及时用自来水冲洗干净。如果吸取一般试剂的吸量管可不必马上冲洗,待实验完毕后,用自来水冲洗干净。晾干水分,再浸泡于铬酸洗液中,数小时后,再用流水冲净,最后用蒸馏水冲洗。晾干备用。

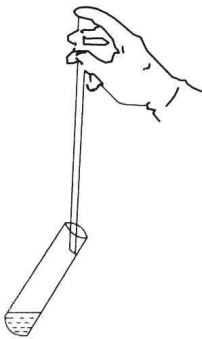


图 1-2 放液体时的姿势

2. 微量移液器

微量移液器在生化实验中大量使用,它们主要用于多次重复的快速定量移液,可以只用一只手操作,十分方便。

移液器可分为两种:一种是固定容量的,常用的有 10 μ l、100 μ l 和 1000 μ l 等多种规格。另一种是可调容量的移液器,常用的有 100 μ l、200 μ l、500 μ l 和 1000 μ l 等几种。每种移液器都有其专用的聚丙烯塑料吸头,吸头通常是一次性使用,当然也可以清洗后重复使用,而且此种吸头还可以进行 120 $^{\circ}$ C 高压灭菌。

(1)微量移液器的结构(图 1-3):①液体吸收钮。②体积选取钮。③体积显示。④枪头排放钮。⑤枪头排放器。⑥枪头接嘴。其内部柱塞分 2 段行程,第一档为吸液,第二档为放液。

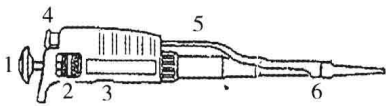


图 1-3 微量移液器的结构

(2)微量移液器的操作(图 1-4)

- ①调体积选取钮至所需体积值;
- ②套上枪头,旋紧;
- ③垂直持握微量移液器用大拇指按至第一档;

④将枪头插入溶液,徐徐松开大拇指,使其复原;

⑤将微量移液器移出液面,必要时可用纱布或滤纸拭去附于枪头表面的液体(注意:不要接触吸头孔口);

⑥排放时,重新将大拇指按下,至第一档后,继续按至第二档以排空液体。

注意:移取另一样品时,按枪头排放钮弃掉枪头并更换新枪头。使用完毕,将体积选取钮调至最大值。



图 1-4 持移液器的姿势

注:推动按钮内部的活塞分 2 段行程,第一档为吸液,第二档为放液,手感十分清楚

3. 容量瓶及量筒

容量瓶是一个细长颈梨形的平底瓶,具有磨口塞,颈上有标线,表示在所示温度下(一般为 20°C)当液体充满到标线时,液体体积恰好与瓶下所注明的体积相等。容量瓶有 10ml、25ml、50ml、100ml、200ml、250ml、500ml、1000ml、2000ml 等规格。

容量瓶是装量型的定量容器,多用作稀释溶液或配制精确试剂。当将液体加至刻度后须用瓶塞塞好,颠倒混匀数次方可使用。

容量瓶是较精确的定量容器,不得直接加热或烘烤,也不应将盛有溶液的容量瓶放入冰箱内。当配制溶液需要加热促其溶解时,必须在烧杯中加热溶解,并待溶液达到室温后,再定量地转入容量瓶内,然后稀释到刻度,并要注意摇匀。

当所量取的液体量要求不十分准确时,可使用量筒,因其较使用吸管或量瓶更为简便,量筒之底座及筒身是焊接一起的,因而不能量取过热液体,更不能直接加热,以防炸裂。

4. 滴定管

滴定管是供容量分析滴定之用,有带玻塞及橡皮管的两种类型。前者用以量酸,后者用以量碱。

滴定管有刻度较精细的微量滴定管,有 1.0ml、2.0ml、5.0ml、10ml 等规格。还有 25ml、50ml、100ml 等规格的常量滴定管。使用滴定管应该注意以下事项:

(1)检查是否清洁干燥、是否漏水、玻塞是否滑润,如有漏水或转动不灵,应拆下活塞重新涂抹凡士林。涂抹前要将玻塞擦干,用手指沾少量凡士林在活塞两头各擦一薄层,将活塞插入槽内,然后向同一方向转动活塞,直到从外面看时,全部透明为止。油涂好后,在活塞的小头的槽上套一橡皮圈,以防活塞滑脱。

(2)使用前必须认出每一格表示多少毫升。先用少量滴定液清洗滴定管 2~3 次,然后方可装液。装液体后,管内如有气泡必须排出。

(3)滴定前先应读取起始点。滴定时,左手控制玻塞,右手持瓶,边滴边摇,密切注意被滴定溶液的颜色变化。

(4)装置滴定管时,管身必须与地面垂直。读数时眼睛与溶液月形面下缘在同一水平线上,不要仰头或低头读数。

(5)如用酸式滴定管装碱性溶液,滴定后应立即洗净,以免活塞粘连。

二、一般操作技术

1. 混匀法

欲使一化学反应充分进行,必须使反应体系内各种物质迅速地相互接触,因此除特别规定外,一般都需要将反应物彻底混匀。混匀方式大致有以下几种,可随使用器皿的液体容量而选用。

(1)旋转混匀法:手持容器做离心旋转。适用以未盛满液体的试管或小口器皿,如三角瓶等。

(2)弹指混匀法:左手持试管使之直立,以右手食指轻击试管之下部,使管内溶液做旋转流动。

(3)倒转混匀法:适用于有玻璃塞的瓶子,如容量瓶等。

(4)弹动混匀法:以右手大拇指、食指、中指握住试管上部,将试管放平,于左手掌中弹动。

(5)吸管混匀法:用吸管将溶液反复吸放数次,适用于量少而无沉淀的液体。

(6)搅拌混匀法:适应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,用玻璃棒搅拌以助溶,或混匀大量的溶液。

2. 保温与加热

为使某一化学反应在一定的温度下进行,常需要保温;为促进或停止化学反应,有时需要加热。实验过程中要随时监测温度,并及时调节。

(1)保温:常用恒温箱或恒温水浴进行,后者的温度较前者稳定。

(2)加热:加热常用两种方法,一是直接把试管、烧杯等器皿在酒精灯、电炉或煤气火焰上加热;二是在水浴中加热或煮沸,应根据实验的目的而定。

3. 过滤

过滤的目的是将沉淀与液体分开,用于收集滤液,收集沉淀或洗涤沉淀。在生化实验中如用于收集滤液应选用干滤纸,不应将滤纸先弄湿,湿滤纸将影响滤液的稀释比例。滤纸过滤一般采用平析法(即对折后,再对折),并且使滤纸上缘与漏斗壁完全吻合,不留缝隙。向漏斗内加液时,要用玻棒引导而且不应倒入过快,勿使液面超过滤纸上缘。较粗的过滤可用脱脂棉或纱布代替滤纸。有时以离心沉淀法代替过滤法可达到省时、快捷的目的。

三、酸度计的使用方法(以雷磁 25 型酸度计为例)

酸度计是测定溶液 pH 值的重要精密仪器。实验室常用的是国产雷磁 25 型酸度计(最小分度 0.1pH)和 pHs-2 型酸度计(最小分度 0.02pH),可用于 pH 测定和电动势测定。

1. 使用方法

(1)安装电极:仪器配备 221 型玻璃电极和 222 型甘汞电极。把玻璃电极的塑料帽夹在电极夹的夹子上,插头插在插孔内。把甘汞电极的金属帽夹在电极夹的另一夹子上,由于它具有金属的帽子,可直接与仪器内部形成回路。两个电极的高度,可利用电极夹上的支头螺丝调节。

(2)校正

①首先,将“pH-mv”开关拨到“pH”位置。然后,打开电源开关,指示灯亮后,应预热 5 分钟。最好预热时间在半小时以上,以使零点有较好的稳定性。

②在小烧杯中加入已知 pH 值的标准缓冲溶液,将电极浸入,应使玻璃电极的球状体和甘汞电极的毛细孔完全浸入溶液。再轻轻摇动烧杯,使电极所接触的溶液均匀。

③调节温度补偿器使旋钮指示的温度与杯内溶液(或室温)的温度相同。

④根据标准缓冲液的 pH 值,将量程选择开关拨至 0~7 或 7~14(pHs-2 型酸度计为分挡开关)。

⑤旋转零点调节器,使指针指在 pH 7 处。

⑥按下读数开关,转动定位调节器,使指针恰好指在标准缓冲液的 pH 处。

⑦放开读数开关,指针应指在 pH 7 处,如有变动,则重复⑤、⑥操作至数值稳定为止。

⑧为了更好的校准,可分别采用两种 pH 范围(0~7 或 7~14)的已知 pH 的缓冲液进行校正。

⑨校正完毕,用蒸馏水冲洗电极与烧杯。校正后,切勿再旋转定位调节器,否则必须重新校正。

(3)测量

①用滤纸轻轻触及两个电极以吸干剩余的溶液,或用待测液洗电极。然后,将电极浸入盛有待测液的烧杯中,轻轻摇动烧杯使溶液均匀。

②被测溶液的温度应与标准缓冲液的温度相同。

③按下读数开关,指针所指的 pH 值即为待测液的值(pHs-2 型酸度计所测读数应为分

挡开关上的指示数加表头上指示值)。重复几次,直至数值不变为准。

④在放开读数开关后,指针必须指在 pH 7 处,否则,应旋转零位调节器至 pH 7 处以后,重测待测液的 pH 值。

⑤若在量程 0~7 范围测量时,指针读数超出刻度范围,应将量程开关拨至 7~14 的位置,再重复③、④的操作。

⑥测量完放开读数开关,关闭电源开关。然后冲洗干净,玻璃电极可浸泡在蒸馏水中,而将甘汞电极离开蒸馏水并戴上橡皮帽。

2. 注意事项

(1)玻璃电极在初次使用前,必须在蒸馏水中浸泡数日至 1 周,至少泡一昼夜。平时,应经常浸泡在蒸馏水中,以备随时可用。

(2)玻璃电极不要与强烈吸水的溶剂接触太久。在强碱溶液中使用应尽快操作,用毕立即用水洗净。

(3)玻璃电极球泡的玻璃膜很薄,因此勿与玻璃杯及硬物相碰,防止球泡破碎。一般安装时甘汞电极头应长出球泡头部,使在摇动时不会碰到杯底。

(4)玻璃电极的玻璃膜不要沾上油污。若不慎沾上油污应先用酒精再用四氯化碳或乙醚,最后用酒精浸洗,再用水洗净。洗净后只能用滤纸轻轻吸干,千万不要揩擦,以免破碎玻璃膜。

(5)甘汞电极在使用时,要注意电极内充满氯化钾溶液,里面应无气泡,防止断路。并且要用少许氯化钾结晶存在,以使溶液保持饱和状态。在使用时应将该电极上部的小橡皮塞拔去,让极少量的氯化钾溶液从毛细管中流出,使测定结果可靠。

(6)首次使用时,应检查电源是否与仪器要求相符。仪器的电源必须要有地线,以使指针稳定。

3. 标准缓冲液的配制

酸度计用的标准缓冲液要求:有较大的稳定性、较小的温度依赖性、其试剂易于提纯。将标准缓冲液储于硬质玻璃瓶或塑料瓶中,能稳定 1~2 个月,它们的 pH 值随温度不同稍有差异(表 1-1)。常用标准缓冲液的配制方法如下:

表 1-1 不同温度时标准缓冲液的 pH 值

温度 ℃	酸性酒石酸钾 (25℃时饱和)	0.05M 邻苯 二甲酸氢钾	0.025M KH ₂ PO ₄ 0.025M Na ₂ HPO ₄	0.0087M KH ₂ PO ₄ 0.0302M Na ₂ HPO ₄	0.01M Na ₂ B ₄ O ₇
0	—	4.01	6.98	7.53	9.46
10	—	4.00	6.92	7.47	9.33
15	—	4.00	6.90	7.45	9.27
20	—	4.00	6.88	7.43	9.23
25	3.56	4.01	6.80	7.41	9.18
30	3.55	4.02	6.85	7.40	9.14
38	3.55	4.03	6.84	7.38	9.08
40	3.55	4.01	6.84	7.38	9.07
50	3.55	4.06	6.83	7.37	9.01