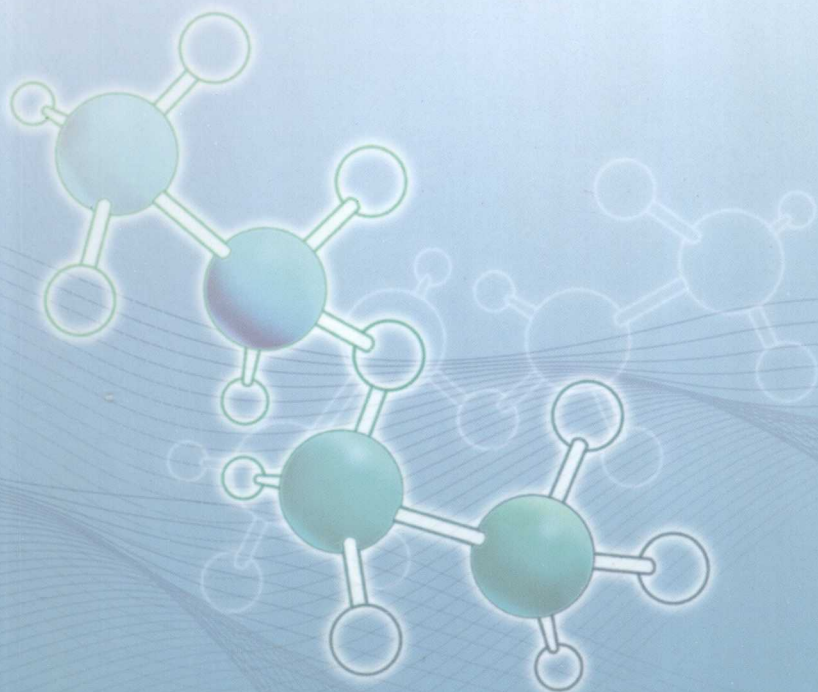



高等医学院校实验教材·供医学各专业使用

生物化学与分子生物学 实验指导

主编 翟静 张媛英



 人民卫生出版社

高等医学院校实验教材

供医学各专业使用

生物化学与分子生物学实验指导

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):

王泽平 王 涛 史仁玖 伊淑莹

刘海斌 孙凌云 张云丽 张媛英

孟 建 柏素云 郝岗平 陶 如

顾洪雁 蒋汉明 翟 静

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学与分子生物学实验指导/翟静等主编. —北京:
人民卫生出版社, 2009. 1

ISBN 978 - 7 - 117 - 11165 - 2

I. 生… II. 翟… III. ①生物化学 - 实验 - 高等学校 - 教学参考资料②分子生物学 - 实验 - 高等学校 - 教学参考资料 IV. Q5 - 33 Q7 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 209201 号

生物化学与分子生物学实验指导

主 编: 翟静 张媛英

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-67616688)

地 址: 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

邮 编: 100078

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

印 刷: 中国农业出版社印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 8

字 数: 190 千字

版 次: 2009 年 1 月第 1 版 2009 年 1 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978 - 7 - 117 - 11165 - 2/R · 11166

定 价: 18.00 元

版权所有, 侵权必究, 打击盗版举报电话: 010-87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

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而建立起来的。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。

本教材是在多版泰山医学院生物化学教研室自编教材的基础上,结合教学实践和近年来最新进展编写而成。在教材的出版过程中得到张念华老师的帮助,在此对为教材作出贡献的老教师和张念华老师表示衷心的感谢。

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优先提出宝贵意见。

编 者

2008 年 10 月

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 | 10 |
| 实验一 双缩脲法测定蛋白质浓度 | 18 |
| 实验二 Folin-酚试剂法(Lowry 法)测定蛋白质浓度 | 19 |
| 实验三 紫外分光光度法测定蛋白质浓度 | 21 |
| 实验四 考马斯(Comessie)亮蓝结合法测定蛋白质浓度 | 22 |
| 实验五 BCA 法测定蛋白质浓度 | 24 |
| 实验六 激素对血糖浓度的影响及血糖的测定 | 25 |
| 第三章 生物大分子的提取、沉淀和离心分离技术 | 30 |
| 第一节 生物材料的选取与预处理 | 30 |
| 第二节 生物大分子的沉淀分离技术 | 33 |
| 第三节 生物大分子离心分离技术 | 36 |
| 实验七 鸡血 SOD 的提取、分离及活力测定 | 40 |
| 实验八 肝细胞碱性磷酸酶的制备及活力测定 | 42 |
| 实验九 酪蛋白的制备 | 45 |
| 实验十 动物肝脏中提取 DNA | 45 |
| 实验十一 猪心肌细胞线粒体可溶性 ATP 合酶的提纯 | 47 |
| 第四章 电泳技术 | 51 |
| 实验十二 DNA 琼脂糖凝胶电泳 | 56 |
| 实验十三 血浆脂蛋白琼脂糖凝胶电泳 | 58 |
| 实验十四 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离乳酸脱氢酶同工酶 | 61 |
| 实验十五 蛋白质分子量的测定——SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 | 65 |
| 实验十六 聚丙烯酰胺等电聚焦电泳 | 67 |
| 第五章 层析技术 | 72 |
| 第一节 层析技术概述 | 72 |
| 第二节 吸附层析 | 73 |
| 第三节 分配层析 | 74 |

| | | |
|------------|---------------------------------------|------------|
| 第四节 | 离子交换层析 | 76 |
| 第五节 | 凝胶层析 | 77 |
| 第六节 | 亲和层析 | 81 |
| 第七节 | 高效液相层析 | 82 |
| | 实验十七 氨基酸的纸上层析与氨基酸的转氨基作用 | 82 |
| | 实验十八 血清 γ -球蛋白的分离纯化与鉴定 | 84 |
| | 实验十九 亲和层析纯化胰蛋白酶 | 87 |
| | 实验二十 离子交换层析分离氨基酸 | 89 |
| | 实验二十一 蛋白质分子量测定——凝胶过滤层析法 | 91 |
| 第六章 | 分子生物学基本技术 | 94 |
| 第一节 | 核酸分子杂交 | 94 |
| 第二节 | 聚合酶链反应 | 97 |
| 第三节 | 分子克隆 | 99 |
| | 实验二十二 Southern 杂交分析 | 102 |
| | 实验二十三 Northern 杂交分析 | 104 |
| | 实验二十四 PCR 基因扩增 | 105 |
| | 实验二十五 质粒 DNA 的提取及酶切 | 107 |
| | 实验二十六 DNA 重组实验 | 108 |
| | 实验二十七 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化 | 108 |
| 附录一 | 常用缓冲液的配制方法 | 110 |
| 附录二 | 易变质及需要特殊方法保存的试剂 | 115 |
| 附录三 | 一般化学试剂的分级 | 116 |
| 附录四 | English words in the lab | 117 |
| 参考资料 | | 120 |

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门、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……全干净。
4. 确保安全:管好仪器、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,以免错用而污染试剂,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、Sepharose 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砂、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,作紧急处理,并立即报告教员,作如下处理:

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),用纱布包扎。如有玻璃留在伤口,应先取出再作处理。

5. 毒物入口 有毒之物切勿用吸管直接用口吸取。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,温盐水电肥皂水也可用。如是腐蚀性物质,则饮以鸡蛋清作润滑剂。

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(不可少于四小时),再用自来水冲洗,最后用无离子水冲洗两次,在100℃~120℃烘箱内烘干备用。

(2)使用过的玻璃仪器的清洗

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,直至容器内不挂水珠即可。最后用少量蒸馏水冲洗内壁2~3次,倒置晾干即可。

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,清洗干净的比色皿也应内外壁不挂水珠。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,接着依次用无离子水、1mol/L KOH和无离子水清洗,然后用10~3mol/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,然后用自来水和无离子水洗净即可。

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,一般来说洗净后的玻璃仪器,如不急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110~120℃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0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0毫升等规格。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

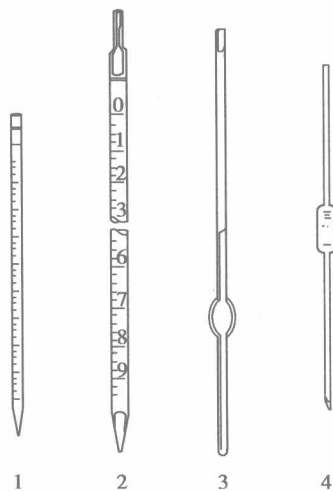


图1-1 三类吸量管简图

1、2. 刻度吸量管 3. 奥氏吸量管 4. 移液管

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 its 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 0.5、1.0、2.0、3.0ml 等规格。

【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 的刻度吸量管。同一定量试验中,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 0.30、0.50、0.70、0.90ml 时,应选用一支 1.0ml 刻度吸量管。

(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:把吸量管插入液体中(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。

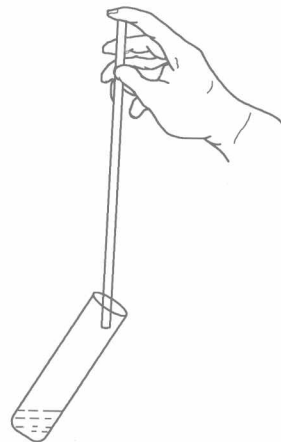


图 1-2 放液体时的姿势

2. 微量移液器 微量移液器在生化实验中大量地使用,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。

移液器可分为二种: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

见图 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 1 挡为吸液,第 2 挡为放液。

(2) 微量移液器的操作(图 1-4)

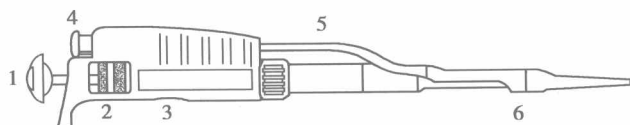


图 1-3 微量移液器的结构

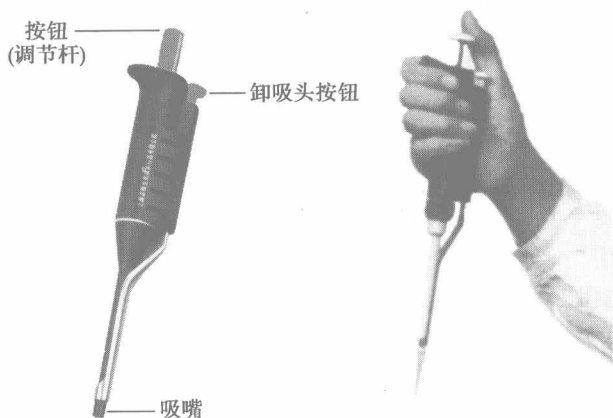


图 1-4 持移液器的姿势

注:推动按钮内部的活塞分 2 段行程,第一挡为吸液,第二挡为放液,手感十分清楚。

- 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挡;
- 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,至第一挡后,继续按至第二挡以排空液体。

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。

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℃)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 10、25、50、100、200、250、500、1000、2000 毫升等规格。

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,因其较使用吸管或容量瓶更为简便,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 1.0、2.0、5.0、10 毫升等规格。还有 25、50、100 毫升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,以免活塞黏连。

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,可随使用的器皿的液体容量而选用。

(1) 旋转混匀法:手持容器作离心旋转,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,使管内溶液作旋转流动。

(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。把某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 pH7 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 pH7 处,如有变动,则重复⑤、⑥操作至数值稳定为止。

8)为了更好地校准,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 pH7 处,否则,应旋转零位调节器至 pH7 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一星期,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,因此勿与玻璃杯与硬物相碰,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加钾溶液,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,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月,它们的pH值随温度不同稍有差异,见表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 $^{\circ}\text{C}$ | 酸性酒石酸钾 (25 $^{\circ}\text{C}$ 时饱和) | 0.05M 邻苯 二甲酸氢钾 | 0.025M KH_2PO_4 0.025M Na_2HPO_4 | 0.0087M KH_2PO_4 0.0302M Na_2HPO_4 | 0.01M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ |
|-----------------------|---------------------------------------|-------------------|---|---|--|
| 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 |

(1) $\text{pH} = 4.00$ (10~20 $^{\circ}\text{C}$): 将邻苯二甲酸氢钾在105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥1小时后,称取5.07g加重蒸馏水溶解至500ml。

(2) $\text{pH} = 6.88$ (20 $^{\circ}\text{C}$): 称取在130 $^{\circ}\text{C}$ 干燥2小时的3.401g磷酸二氢钾(KH_2PO_4), 8.95g磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)或3.549g无水磷酸氢二钠(Na_2HPO_4),加重蒸馏水溶解至500ml。

(3) $\text{pH} = 9.18$ (25 $^{\circ}\text{C}$): 称取3.8144g四硼酸钠($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)或2.20g无水四硼酸钠($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$),加重蒸馏水溶解至100ml。

(张媛英 王泽平)

第二章

分光光度技术

分光光度法是利用物质特有的吸收光谱来鉴别物质或测定其含量的一项技术,该技术灵敏度强,精确度高,操作简便,快速;对于复杂的组分系统,无需分离即可检测出其中的微量组分,因此分光光度法已成为生物化学研究中广泛使用的方法。

人肉眼可见的光线称可见光,波长范围在400~760nm,波长范围在200~400nm为紫外光区(波长<400nm的光线),波长范围在760~500000nm为红外区(波长>760nm……)。可见光区的电磁波,因波长不同而呈现不同的颜色,这些不同颜色的电磁波称单色光,单色光并非单一波长的光,而是一定波长范围内的光,太阳及钨丝灯发出的白光,是各种单色光的混合光(复合光),利用棱镜可将白光分成按波长顺序排列的各种单色光,即红、橙、黄、绿、青、蓝、紫等,这就是光谱。

一、基本原理

有色物质的显色,是由于它对光线的吸收具有选择性。白光是波长在400~750nm的电磁波,它是由各种波长不同,颜色不同;如果溶液对某些波长的光吸收较少而对其他波长的光吸收较多,则溶液呈现这种吸收较少而透过较多的光的颜色,例如溶液吸收了红光,透过蓝绿色光较多,则溶液呈现绿色。当然一些物质的最大吸收波长在可见光波长以外,如蛋白质的吸收波长为280nm,核酸的最大吸收波长为260nm。当光线通过透明介质时,某波长的光有一部分被吸收,一部分透过,因此当光透射出溶液之后,光强度减少。Lambert-Beer定律是利用分光光度计进行比色分析的基本原理,这个定律是讨论有色溶液对单色光的吸收程度与溶液的浓度及液层厚度间的定量关系。(图2-1)

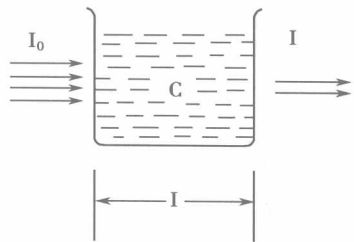


图2-1 光线通过溶液介质示意图

1. 朗伯(Lambert)定律 当单色光通过一吸收光的介质时,其光强度随吸收光介质的厚度增长而呈指数减少,即

$$I/I_0 = e^{-k_1 L} \quad (k_1 \text{ 为吸光系数(absorption coefficient) } (g \cdot \text{cm}^{-1}))$$

(I_0 :入射光强度; I :透射光强度; L :介质的厚度)

2. 比尔(Beer)定律 单色光通过一光吸收介质时,光强度随介质浓度增长而呈指数减少。即

$$I/I_0 = e^{-k_2 C} \quad (C \text{ 为溶液浓度 (Concentration) } (g \cdot L^{-1}))$$

两者结合在一起为朗伯-比尔(Lambert-Beer)定律。即

$$I/I_0 = e^{-\epsilon CL}$$

式中 ϵ (epsilon) 称之摩尔吸光率 (Molar absorptivity) ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) 系一常数, 也叫消光系数; 透光度 T (Transmittance) 为 I/I_0 , 通常以百分率表示。

取对数: $-\log T = -\log I/I_0 = -\log e^{-\epsilon CL}$ 令 $A = -\log T$

得: $A = \epsilon CL$ 式为 Lambert-Beer 定律的物理表示式, 其含义为一束单色光通过溶液介质后, 光能被吸收一部分, 吸收多少与溶液的浓度和厚度成正比。此式为分光分析法的基本计算式。

式中 A (Absorbance) 为吸光度, C (concentration) 浓度 (mol/L), L 为溶液样品的长度 cm (或比色皿内径长 cm)。

采用适当的光源、棱镜和适当的光源接收器, 让某一波长的光透过某一溶液, 通过仪器的测定, 定性鉴别物质或定量测定某一组分含量的方法即为分光光度法。通过光波长的调整, 可使溶质浓度的测定范围不仅仅局限于可见光, 尚可扩大到紫外光区和红外光区。经单色器 (棱镜) 得到的光源虽然不是纯的单色光, 但波长范围更狭窄, 更符合 Lambert-Beer 定律, 其灵敏度大为提高。

二、分光光度法的定量分析

许多对光有吸收的物质可以直接用分光光度法进行定量分析: 一些对光, 包括紫外、可见或近红外都无吸收的物质亦可通过和某些化学试剂作用而呈色, 在一定的反应条件下和一定的浓度范围内, 溶液颜色的深浅 (对光吸收的程度) 和该溶液中显色物质的浓度呈正比。

(一) 测定波长的选择 (表 2-1)

表 2-1 测定波长的选择

| 待测溶液颜色 | 选用分光波长范围 (nm) | 待测溶液颜色 | 选用分光波长范围 (nm) |
|--------|---------------|--------|---------------|
| 绿 | 400 ~ 420 | 紫青 | 540 ~ 560 |
| 绿带黄 | 430 ~ 440 | 蓝 | 570 ~ 600 |
| 黄 | 440 ~ 450 | 蓝带绿 | 600 ~ 630 |
| 橙红 | 450 ~ 480 | 绿带蓝 | 630 ~ 760 |
| 红 | 490 ~ 530 | | |

波长的选择一般是选择待测物质最大吸收峰的波长 (λ_{max})。因在 λ_{max} 测定吸光度, 敏感度最高 (图 2-2)。在吸收峰波长处测吸光度, 波长变化影响最小 (如图 2-2 (a, b), A 带); 而在其他波长处 (如图 2-2 (a, b) B 带), 波长变化对吸光度影响大, 甚至测得浓度—吸光度曲线不呈直线。

选择测定某一溶液所需的波长, 是可以不用不同的波长作该溶液的吸收光谱曲线, 从曲线上选择最适当的波长来进行这一溶液的测定工作, 但是, 在分析工作中, 尚有个别情况, 不能