

● 高等医药院校改革创新教材

# 生物化学与分子生物学

## 实验教程

主编 常晓彤

 人民卫生出版社

高等医药院校改革创新教材

# 生物化学与分子生物学 实验教程

主 编 常晓彤

副主编 李彪英 闫智宏 侯丽娟

编 者 (以姓氏笔画为序)

孙 敏	朱晓波	刘 洁	闫智宏
李彪英	宋桂芹	张效云	郝 敏
侯丽娟	徐志伟	常晓彤	韩 瑞

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教程/常晓彤主编. —北京:  
人民卫生出版社, 2007. 9

ISBN 978-7-117-09223-4

I. 生… II. 常… III. ①生物化学-实验-教材②分子  
生物学-实验-教材 IV. Q5-33 Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 139516 号

### 生物化学与分子生物学实验教程

---

主 编: 常晓彤

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](mailto:pmph@pmph.com)

购书热线: 010-67605754 010-65264830

印 刷: 北京人卫印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 11.5

字 数: 273 千字

版 次: 2007 年 9 月第 1 版 2007 年 9 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-09223-4/R·9224

定 价: 25.00 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

---

生物化学与分子生物学是生命科学的重要组成部分,由于其理论的日臻完善及技术的迅猛发展,使其越来越成为作为生命科学重要组成部分的医学领域的共同语言和现代医学诊疗技术发展的重要载体。为了适应新世纪医学教育的要求,我们根据多年的实验教学经验和科研经历,在历年编写和使用的实验教材的基础上,结合近年来生物化学与分子生物学实验方法和技术的发展以及实验室条件、仪器设备现状,编写了这本《生物化学与分子生物学实验教程》。

该教程遵循医学生的培养目标,注重基本知识和基本技能的培养,强调综合素质和综合能力的提高。全书共 16 章,分上、下两篇。上篇为生物化学与分子生物学基本理论,阐释了生物化学实验室基本知识、光谱分析技术、电泳技术、层析技术和分子生物学基本技术;下篇为生物化学与分子生物学实验部分,共计 42 个实验,其中包括 6 个综合性实验,内容涵盖蛋白质、酶、糖、脂、维生素和核酸的分离、制备、性质功能及定性定量分析。为了便于教和学,书末附有常用单位换算方法、实验室常用酸碱的密度和浓度、常用蛋白质分子量标准参照物、常用 DNA 分子量标准参照物及常用贮存液的配制等,增添了该书的可读性和实用性。

本教程的实验方法严谨可靠、可操作性强,教材编写考虑了多层次教学的要求,适合于高等医学院校各专业本、专科学生使用,也可供从事医学研究的工作者参考使用。

本教程是在河北北方学院生物化学教研室全体老师的精诚合作下完成的,同时得到了学院各级领导和人民卫生出版社的大力支持,在此致以诚挚的谢意。编写过程中,我们参考了已出版的国内外生物化学和分子生物学实验技术方面的书籍,谨向这些作者们表示衷心的感谢。

限于编者水平,加之时间仓促,本教程难免有错误和不妥之处,敬请各位读者批评指正。

编 者

2007 年 5 月

# 目 录

## 上篇 生物化学与分子生物学基本理论

第一章 实验室基本知识	1
第一节 实验室规则	1
第二节 实验记录与实验报告	2
第三节 实验用纯水的制备	3
第四节 实验样品的制备	6
第五节 实验室基本操作技术	7
第二章 光谱分析技术	12
第一节 吸收光谱分析技术	12
第二节 发射光谱分析技术	15
第三节 散射光谱分析技术	17
第三章 电泳技术	18
第一节 电泳的基本原理	18
第二节 影响电泳的因素	19
第三节 电泳技术的分类	21
第四节 几种常用电泳技术	22
第四章 层析技术	27
第一节 层析技术的原理与分类	27
第二节 常用的层析技术	30
第三节 高效液相层析法	33
第五章 离心技术	35
第一节 离心技术的基本原理和分类	35
第二节 离心分离方法	37
第三节 离心机的结构与分类	38
第六章 分子生物学基本技术	41
第一节 核酸分子杂交技术	41

第二节	聚合酶链反应技术	45
第三节	基因克隆技术	50
第四节	其他分子生物学技术	55

## 下篇 生物化学与分子生物学实验

第七章	蛋白质	61
实验一	双缩脲法测定血清总蛋白	61
实验二	考马斯亮蓝染色法测定蛋白质浓度	63
实验三	紫外分光光度法测定总蛋白	65
实验四	溴甲酚绿法测定血清清蛋白	67
实验五	血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	69
实验六	蛋白质的盐析	73
实验七	蛋白质的两性解离和等电点的测定	74
实验八	氨基酸的薄层层析	76
实验九	凝胶层析法脱盐和分离蛋白质	78
实验十	SDS-PAGE 法测定蛋白质相对分子质量	80
第八章	酶学	85
实验一	影响酶活性的因素	85
实验二	蔗糖酶的专一性	88
实验三	血清乳酸脱氢酶同工酶的分离	90
实验四	赖氏法测定血清丙氨酸氨基转移酶	92
实验五	琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制作用	95
实验六	精氨酸酶的作用	96
第九章	糖代谢	98
实验一	葡萄糖氧化酶法测定血清葡萄糖	98
实验二	饱食和饥饿对肝糖原含量的影响	100
实验三	肌乳酸测定	101
第十章	脂类代谢	103
实验一	磷酸甘油氧化酶法测定血清甘油三酯	103
实验二	胆固醇氧化酶法测定血清总胆固醇	105
实验三	磷钨酸-镁沉淀法测定血清高密度脂蛋白-胆固醇	107
实验四	免疫透射比浊法测定血清载脂蛋白 B <sub>100</sub>	109
实验五	血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	110
第十一章	维生素	113
实验一	维生素 B <sub>1</sub> 的荧光测定法	113

----- 目 录 -----	
实验二	维生素 B <sub>2</sub> 的荧光测定法 ..... 114
实验三	2,6-二氯酚靛酚法测定维生素 C 的含量 ..... 116
<b>第十二章</b>	<b>核酸</b> ..... 118
实验一	酵母 RNA 的提取及组分鉴定 ..... 118
实验二	真核细胞基因组 DNA 的提取与鉴定 ..... 120
实验三	质粒 DNA 的提取、纯化和鉴定 ..... 122
实验四	从组织或培养的细胞中分离总 RNA ..... 125
实验五	DNA 的限制性内切酶消化 ..... 127
实验六	大肠杆菌感受态细胞的制备和转化 ..... 129
实验七	聚合酶链反应技术体外扩增 DNA ..... 131
实验八	DNA 的 Southern 印迹杂交技术 ..... 133
实验九	RNA 的 Northern 印迹杂交技术 ..... 137
<b>第十三章</b>	<b>综合性实验</b> ..... 141
实验一	碱性磷酸酶的提取、比活性及 K <sub>m</sub> 值的测定 ..... 141
实验二	血清 $\gamma$ -球蛋白的分离与纯化 ..... 146
实验三	逆转录 PCR 技术 ..... 148
实验四	蛋白质印迹 ..... 151
实验五	ApoE 基因多态性分析 ..... 154
	附: FABP2 基因多态性分析 ..... 158
实验六	DNA 的重组技术 ..... 160
附录 1	常用单位换算法 ..... 165
附录 2	实验室常用酸碱的密度和浓度 ..... 167
附录 3	化学试剂纯度分级表 ..... 168
附录 4	酸碱指示剂 ..... 169
附录 5	待测溶液的颜色和选用滤光片的对应关系 ..... 170
附录 6	常用蛋白质分子量标准参照物 ..... 171
附录 7	常用 DNA 分子量标准参照物 ..... 172
附录 8	常用的电泳缓冲液 ..... 173
附录 9	常用贮存液的配制 ..... 174

# 上篇 生物化学与分子生物学基本理论

## 第一章 实验室基本知识

---

实验室基本知识是生物化学与分子生物学实验的重要基础。本章涉及的实验室基本知识主要包括实验室规则、实验记录和实验报告的书写、实验用纯水的制备、实验样品的制备和实验室基本操作技术。

### 第一节 实验室规则

实验前根据实验教材必须预习实验内容,明确实验目的,掌握实验设计的基本原理,熟悉实验操作步骤和注意事项,分析预期实验结果。复习课堂讲授的与实验有关的理论知识。在预习操作步骤时,一定要认真仔细,必要时应当明白每一个步骤的意义,了解所用仪器的使用方法。

学生进入实验室必须穿戴好实验服,保持室内安静,禁止在室内大声喧哗和随意走动。

实验过程中,严格按操作规程严肃认真地进行操作,注意观察实验现象,真实记录实验现象和实验结果。实验完成后,根据原始记录分析与整理,按要求书写实验报告并及时提交。

严格按照操作规程精心使用和爱护仪器,用毕及时关机。节约使用试剂、药品、水、电和其他物品。

取完试剂后,应及时将瓶盖盖好,切勿盖错,公用试剂用完后放回原处。吸取试剂、标准液和样品时,使用洁净的吸量管和微量移液器吸头,以避免对试剂、标准液和样品的污染。

保护实验台,不得将高温物品放在台面上,勿使试剂和药品倾洒于实验台面和地面上。

器材损坏时,需及时向老师报告,并填写器材损坏登记表,学期结束时按有关规定进行处理。

严禁拿其他组器材,实验室内的物品不得带出实验室,不得在实验室内存放与实验无关的物品。

加热、用电、使用剧毒腐蚀试剂等应注意操作安全,避免事故的发生。

实验完毕,须将公用物品摆放整齐,清理自己的实验台面,清洗并保管好自己所用的



器材。值日生负责打扫实验室的卫生和水、电等的安全检查工作。值日完毕后,请老师检查许可后方可离开。

## 第二节 实验记录与实验报告

### 一、实验记录

实验记录是指在实验过程中对实验名称、目的、原理、操作步骤、实验现象和数据等的原始记录,是撰写实验报告的依据,也是培养学生进行科学思维和严谨的科学作风的一个重要方面。

1. 每个学生均应准备一个实验记录本,实验课前在记录本上写好实验预习报告,重点是详细的实验操作步骤和数据记录表格。

2. 实验过程中的记录应遵循以下原则:

(1) 记录的及时性:实验过程中,应对所发生的实验现象和测得的实验数据立即进行记录,不可过后凭回忆作记录,以免发生漏记和错记。

(2) 记录的原始性:实验内容一旦记录,不允许再作改动。若要修改须请示老师,并在原始记录上注明修改的原因。对重复实验所获得的新数据应重新记录,不得对上次实验的结果进行修改。

(3) 记录的完整性:进行实验记录时,要求把实验的条件、实验的过程、观察到的现象、测量到的数据等等,完整地记录下来。有时还要把各种可能的干扰、相关的影响因素等记录下来。一些同学在做实验时,往往不能做到实验记录的完整性,只注意记录测量的数据,而不记录现象、实验条件和过程等内容,以至到最后进行实验分析时存在困难。

(4) 记录的客观性:实验过程中对观察和测量的结果进行客观公正的记录,杜绝主观臆测和假造数据,对实验现象和数据不作任何解释和评论,解释和评论是实验报告的内容。

(5) 记录的系统性:对于持续时间较长的实验,要坚持连续观察和连续记录。有时经过长时间的连续观察和记录可以获得仅通过一两次实验记录而看不出的结论。

### 二、实验报告

一个实验的全过程应包括:明确实验目的,进行实验操作,观察和分析实验现象及数据,得出实验结论。所以学生在经过动手操作、观察现象、分析思考之后将实验的目的、方法、过程、结果等记录下来,对整个实验过程进行全面总结,提炼出一个客观的、概括的、能反映全过程及其结果的书面材料,这个书面材料,就是实验报告。实验报告的书写是一项重要的基本技能训练。它不仅是对每次实验的总结,还可以使学生熟悉撰写科研论文的基本格式,学会绘图、制表的方法,更为重要的是通过书写实验报告还可以初步培养和训练学生的逻辑归纳能力、综合分析能力和文字表达能力,培养学生独立思考、严谨求实的科学作风,为今后进行科学研究和撰写科研论文奠定良好的基础。因此,参加实验的每位学生,均应及时认真地书写实验报告。实验报告的书写应注意内容真实准确,文字简练、通顺,书写整洁,标点符号、外文缩写、单位度量等书写准确、规范。

### (一) 实验报告书写的一般格式

1. 姓名、系别、班级、实验日期。
2. 实验名称。
3. 实验目的与要求。
4. 实验原理。
5. 实验试剂与器材。
6. 操作步骤。
7. 实验结果。
8. 讨论与分析。
9. 结论。

### (二) 实验报告书写的内容与基本要求

1. 实验目的与要求 说明为什么要进行该项实验,拟解决什么问题,具有什么意义等。

2. 实验原理 应简明扼要地描述本实验的理论和依据。可用精炼的语言进行归纳,也可采用化学反应式表达,不要简单的照抄教材。

3. 实验试剂与器材 试剂应注明配制方法或试剂的生产厂家;器材应包括名称、规格、型号等。

4. 实验操作步骤 应按实际的操作进行叙述,方式可采用实验流程图或自行设计的表格,要简明扼要,不要照抄实验指导。

5. 实验结果 实验结果是指对实验现象的描述、实验数据的准确记录及根据实验数据和公式进行计算得出的最终结果。用文字描述实验结果时,应使用科学而精炼的语言,不要口语化;以图形表示实验结果时,要求具有高度的科学性、图形比例适当、绘图的线条光滑、匀称、精细和美观,图注要完善;实验数据较多时,可用表格的形式给出实验结果。

6. 讨论与分析 该项是充分利用已学过的知识和生物化学与分子生物学的理论对本实验结果进行实事求是、符合逻辑的分析推理,最好能提出实验结果的理论意义和应用价值。如果实验出现非预期的结果,绝对不能随意舍弃或修改。要对“异常”的结果进行分析研究,找出出现“异常”结果的原因。有时,正是从某种“异常”的结果中发现新的有价值的东西,从而实现新理论的建立,或者实验技术的改进。此外,还可就操作的关键环节及实验结果中的难点和关键问题等进行分析讨论。在分析和讨论中,学生应勇于提出自己独到的见解。

7. 结论 一般实验要有结论。结论是从实验结果和讨论中归纳出概括性的判断,即是本次实验所能验证理论的简明总结。实验结论不是实验结果的简单重复,不应罗列具体的结果,也不能随意推断和引申。如果实验结果未能说明问题,就不应勉强下结论。结论要求简练、中肯和准确。

书写报告时,字迹应清楚、工整,杜绝抄袭他人实验报告。

## 第三节 实验用纯水的制备

实验室内使用最多的溶剂是水,但是不论是天然水,还是自来水均含有多种杂质,而

生物化学和分子生物学实验对水中的多种杂质,尤其是重金属和可溶性有机物十分敏感,因此生物化学和分子生物学实验对水的要求较高,即所用的水通常是将自来水经物理、化学方法处理,除去杂质后所制备的实验用纯水。杂质除去的越彻底,水的纯度越高,质量就越好。一般认为,实验用水纯度越高,实验结果越真实可靠,因此,必须保证实验用水的质量。

## 一、实验用纯水的制备方法

### (一) 蒸馏法

自来水(或去离子水)在蒸馏器中加热气化后,将水蒸气冷凝得到的冷凝水即为蒸馏水。制备蒸馏水时,最好用去离子水作为水源,因为以自来水作为水源可产生水垢。蒸馏水是实验室中最常用的洗涤用水和溶剂,但蒸馏水并非绝对的纯水,因为蒸馏法只能除去水中非挥发性的物质,并不能除去溶解于水中的气体,而且在蒸馏的过程中,一些杂质会不可避免地进入蒸气中。蒸馏水的纯度标准是  $1 \times 10^5 \Omega/\text{cm}$  左右。为了提高水的纯度,可进行二次或多次蒸馏,故蒸馏水按蒸馏次数可分为一蒸水、二(双)蒸水和三蒸水等。从经济角度讲,该法存在耗水量大,用电成本高等弊端。

### (二) 离子交换法

离子交换法是将自来水通过离子交换柱以除去水中阴、阳离子的方法。该法制备的纯水称为去离子水。离子交换柱内装有离子交换树脂,根据树脂可交换基团的不同,离子交换树脂可分为阳离子交换树脂和阴离子交换树脂。当水通过阳离子交换树脂时,水中的阳离子可与树脂中的酸性基团进行交换;当水通过阴离子交换树脂时,水中的阴离子可与树脂中的碱性基团进行交换。本法一般采用阴、阳离子交换树脂的混合床装置。该法去离子能力强,制备的纯水阴、阳离子浓度可以很低,25℃时的电阻率可达  $5 \times 10^6 \Omega/\text{cm}$  以上,但该法不能除去有机物等非电解质杂质。有机物杂质可能干扰生化实验中的某些反应,也会使水的紫外吸收值增加,所以该法制备的纯水不适于通过紫外吸收法进行测定的实验。

### (三) 电渗析法

电渗析法也称电渗透法,是在外电场的作用下,利用阴、阳离子交换膜对溶液中的离子选择性透过而使杂质离子从水中分离出来。该法除去杂质的效率比较低,制备纯水的电阻率一般在  $10^4 \sim 10^5 \Omega/\text{cm}$ ,常作为一种预处理手段。

### (四) 超滤膜法

该法是采用超滤膜以除去水中悬浮物的方法,此法制备的水须进一步纯化。

### (五) 活性炭吸附法

活性炭是广谱吸附剂,可吸附水中的气体成分、细菌、有机物和某些金属等。活性炭吸附法可作为各种制备纯水配套的一种预处理方法。

### (六) 混合纯化系统制备法

目前大多采用本法制备纯水,其基本方法是采用滤膜预处理天然水或自来水、结合活性炭吸附和离子交换剂处理,最后以孔径  $0.45 \mu\text{m}$  的滤膜除去微生物。该方法可获得高纯度的纯水。

## 二、水纯度的检测

衡量水纯度的指标一般有电阻率、总有机碳、硅酸盐、重金属、颗粒、细菌等。其中最重要的指标是电阻率和总有机碳。

### (一) 电阻率

水的电阻率大小,与水中含盐量的多少、水中离子浓度、离子的电荷数以及离子的运动速度有关。水越纯,电阻率越大。因此,纯净的水电阻率很大,超纯水电阻率就更大。电阻率可用电导仪或兆欧表测定。通过电导仪测得的电导率可与电阻率进行换算。

### (二) 总有机碳

是指水中全部有机物含碳的量。它只能表示水中有机物的相对含量,不能反映水中有机物的种类与组成。

实验室纯水在生物化学与分子生物学实验和科研领域起着举足轻重的作用。美国病理学会(CAP)于1976年、美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)于1985年分别提出了实验用水的标准。见表1-1和表1-2。

表 1-1 生物化学试剂及生物化学检验用水标准(CAP, 1976)

特性指标	I级	II级	III级
pH	6.0~7.0	6.0~7.0	6.0~7.0
电导率( $\mu\text{s}/\text{cm}$ , 25 $^{\circ}\text{C}$ )	<0.1	<2.0	<5.0
电阻率( $\text{M}\Omega/\text{cm}$ , 25 $^{\circ}\text{C}$ )	>10	>0.5	>0.2
硅酸盐( $\text{mg}/\text{L}$ )	<0.01	<0.01	<0.01
重金属( $\text{mg}/\text{L}$ )	<0.01	<0.01	<0.01

表 1-2 美国 NCCLS 等级纯水标准

特性指标	I级	II级	III级
微生物含量(每毫升最多菌落数)	<10	<10 <sup>3</sup>	未定
pH	未定	未定	5.0~8.0
电阻率( $\text{M}\Omega/\text{cm}$ , 25 $^{\circ}\text{C}$ )	10	2.0	1.0
硅( $\text{mgSiO}_2/\text{L}$ , 最大量)	0.05	0.1	1.0
微粒	0.2 $\mu\text{m}$ 微孔膜过滤	未定	未定
有机物质	活性炭过滤	未定	未定

实验中不应盲目追求水的纯度,水的纯度越高,价格也就越高,因此应根据实际需要选用相应级别的纯水。另外,在实际工作中,除应注意纯水制备时的质量外,还应注意纯水在运输、储存和使用过程中的污染问题。塑料容器可产生有紫外吸收的有机物质;玻璃和金属容器会产生金属离子的污染;长时间放置会长细菌。一般采用聚乙烯或聚丙烯容器储存蒸馏水,但储存时间不宜过长,使用时应避免一切可能的污染。

## 第四节 实验样品的制备

生物化学与分子生物学实验采用的样品种类较多,有生物组织、细胞、血液、尿液、脑脊液、羊水等。实验样品的采集与处理是影响实验结果准确与否的一个重要环节,也是容易被忽视的一个环节。本节重点介绍组织样品、血液样品和尿液样品的采集、处理与制备。

### 一、组织样品的制备

生物化学与分子生物学实验中,经常以离体组织为对象来研究各种物质代谢途径或从离体组织中提取核酸、酶、蛋白质及某些有意义的代谢物进行研究。

一般采用断头法处死动物,放出血液,然后立即取出所需组织或脏器,除去脂肪和结缔组织后,用冰冷生理盐水洗去血液,再用滤纸吸干,称重后,按实验要求制成组织匀浆、组织糜、组织浸出液等。

#### (一) 组织匀浆

取一定量新鲜组织剪碎,加入适量匀浆制备液,用匀浆器磨碎组织。常用的匀浆制备液有生理盐水、缓冲液和 0.25mol/L 的蔗糖液等,应根据实验要求进行选择。

#### (二) 组织糜

将新鲜组织迅速剪碎,用捣碎机绞成糜状,或加入少许净砂在研钵中研磨成糊状。

#### (三) 组织浸出液

组织匀浆经过离心后得到的上清液即为组织浸出液。

在生物组织中,因含有大量的具有催化活性的物质,采集离体组织时须在冰冻条件下进行,并且应尽快完成测定,否则其所含物质的量及生物活性将发生改变。

### 二、血液样品的制备

#### (一) 全血

将采集的人或动物的新鲜血液,立即放入含有适量抗凝剂的试管或其他容器中,充分混匀后得到的抗凝血即为全血。常用的抗凝剂有草酸钾、草酸钠、EDTA、枸橼酸钠、肝素等。加入抗凝剂的种类依实验而定。

#### (二) 血浆

抗凝全血离心后得到的上清液即为血浆。

#### (三) 血清

将采集的新鲜血液,放入干燥、洁净的试管或其他容器中,室温放置,血液自然凝固后析出的上清液即为血清。为使血清尽快析出,用离心的方法可缩短分离时间,且可得到较多的血清。

制备血浆和血清时务必注意不能溶血,因为某些成分,如钾、乳酸脱氢酶、酸性磷酸酶、天冬氨酸氨基转移酶等在红细胞中的含量明显高于血浆或血清中的含量,使用溶血的血浆或血清测定这些指标可造成结果的假性升高。

#### (四) 无蛋白血滤液

血液中丰富的蛋白质有时会干扰测定的结果,所以通常须将蛋白质除去,制成无蛋白血滤液后再分析测定。常用的蛋白质沉淀剂有钨酸、三氯乙酸等。血液加入蛋白质沉淀剂后,立即混匀,离心得到的上清液即为无蛋白血滤液。

### 三、尿液样品的制备

机体内的多种代谢产物可从尿液中排泄,所以通过对尿液中某些成分的测定也可以了解体内的代谢情况。尿液标本有随机新鲜尿、定时尿(如晨尿)、24小时尿。根据实验项目选择标本的采集类型。一般定性实验,可用随机新鲜尿;常规定性实验多采用晨尿;定量的生物化学分析常采用24小时尿。收集尿液的容器应清洁、干燥。留取24小时尿液时,应注意防腐。常用的防腐剂有浓盐酸(0.5ml~0.7ml浓盐酸/100ml尿液)、甲苯(1.0ml~2.0ml甲苯/100ml尿液)、冰醋酸(5ml~10ml冰醋酸/24小时尿液)和麝香草酚(0.1g麝香草酚/100ml尿液)。

## 第五节 实验室基本操作技术

实验室基本操作是提高实验技能的重要环节。严格而规范的基本操作,是得到鲜明的实验现象和准确的实验结果的前提,也是避免一切意外事故发生的保证。因此,学生要努力训练好实验操作的基本功。

### 一、常用玻璃器皿的洗涤

生物化学与分子生物学实验中常使用各种玻璃器皿,玻璃器皿清洁与否,直接影响实验结果的准确,实验中往往由于器皿的不清洁或被污染而导致较大的误差,甚至会出现相反的实验结果。因此,玻璃器皿洗涤清洁工作是十分重要的基本操作,也是做好实验的前提及实验成败的关键之一。

#### (一) 洗涤液的种类及配制

1. 肥皂水、洗衣粉溶液和去污粉 是最常用的洗涤剂,一般玻璃器皿均可选用。

2. 铬酸洗液 由重铬酸钾和浓硫酸配制而成,常用配制方法如下:

(1) 取100ml工业用浓硫酸置于烧杯内,小心加热,然后缓慢加入5g重铬酸钾粉末,边加边搅拌,待全部溶解并缓慢冷却后,储存于磨口玻璃瓶内备用。

(2) 称取5g重铬酸钾粉末,置于250ml烧杯中,加热水5ml使其溶解,然后缓慢加入100ml浓硫酸,待其冷却后储存于磨口玻璃瓶内备用。

由于铬酸洗液具有强氧化性和强酸性,因而具有很强的清洁能力,被广泛应用于玻璃仪器的洗涤。新配制的洗液为红褐色,洗液用久后变为黑绿色,即说明洗液已变质,不宜再用。另外该洗液具有很强的腐蚀性,并且铬有致癌作用,因此配制和使用该洗液时要极为小心。

3. 5%~10%乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na<sub>2</sub>)溶液 加热煮沸可洗脱玻璃仪器内壁的钙、镁盐类和不易溶解的重金属盐类所产生的白色沉淀物。

4. 45%尿素洗液 为蛋白质的良好溶剂,适用于洗涤盛放过蛋白质制剂及血样的

容器。

5. 5%草酸溶液 用数滴硫酸酸化,可洗去高锰酸钾的痕迹。

6. 硝酸-过氧化氢洗液 15%~20%硝酸和5%过氧化氢混合。可用于洗涤特别顽固的化学污物。储于棕色瓶中,现用现配,久存易分解。

7. 强碱洗液 5%~10%的NaOH溶液(或 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{Na}_3\text{PO}_4$ 溶液),常用以浸洗除去普通油污,通常需要用热的溶液。

8. 有机溶剂 带有脂类污物的器皿,可以用汽油、甲苯、二甲苯、丙酮、酒精、三氯甲烷、乙醚等有机溶剂擦洗或浸泡,但此类洗液成本高,一般不宜使用。

9. 盐酸 浓盐酸可洗去水垢和某些无机盐沉淀;稀盐酸浸洗可除去碱性物质、铁锈、二氧化锰、碳酸钙等。

洗涤器皿时,应根据需要选用不同的洗液。

### (二) 新购玻璃仪器的清洗

新购玻璃仪器,其表面附有碱质,可先用肥皂水刷洗,再用流水冲净,然后浸泡于1%~2%盐酸中过夜,再用流水冲洗,最后用蒸馏水冲洗2~3次,干燥备用。

### (三) 使用过的玻璃仪器的清洗

1. 一般玻璃仪器 试管、烧杯、锥形瓶等,先用自来水洗刷后,用肥皂水或洗衣粉水刷洗,再用自来水反复冲洗,最后用蒸馏水淋洗2~3次。

2. 容量分析仪器 吸量管、滴定管、容量瓶等,先用自来水冲洗,待晾干后,再用铬酸洗液浸泡数小时,然后用自来水充分冲洗,最后用蒸馏水淋洗2~3次。

3. 比色杯 用毕立即用自来水反复冲洗。洗不净时,用盐酸或适当溶剂冲洗,再用自来水冲洗。避免用碱液或强氧化剂清洗,切忌用试管刷或粗糙布(纸)擦拭,以保护比色杯的透光性,冲洗后倒置晾干备用。

上述所有玻璃器材以倒置后器壁不挂水珠为洁净的标准。

## 二、量器类的使用方法

量器是指对液体体积进行计量的器皿,如:量筒、容量瓶、滴定管、移液管、刻度吸量管及微量加样器等。

### (一) 量筒

量筒是实验室中常用的度量液体体积的量器,用于不太精密的液体计量。应根据需要选用各种不同容量规格的量筒。例如量取9.0ml液体时,应选用10ml量筒(测量误差为 $\pm 0.1\text{ml}$ );如果选用100ml量筒量取9.0ml液体体积,则至少有 $\pm 1\text{ml}$ 的误差。量筒不能用作反应容器,不能装热的液体,更不可对其加热。读取量筒的刻度值,一定要使视线与量筒内液面的最低点(半月形弯曲面)处于同一水平线上,否则会增加体积的测量误差。

### (二) 容量瓶

容量瓶是一种细颈梨形的平底瓶,瓶颈上有环形标线,表示在所指温度下(一般为 $20^\circ\text{C}$ )液体充满至标线时的容积,是常用的测量液体体积的一种量入式量器,主要用途是配制准确浓度的溶液或定量地稀释溶液。容量瓶与瓶塞要配套使用,使用前应检查是否漏水。另外,容量瓶不能在烘箱中烘烤,不许以任何形式对其加热。

### (三) 吸量管

吸量管是生物化学和分子生物学实验中常用的器材,测定的准确度与吸量管的使用密切相关。

#### 1. 吸量管的种类 常分三类:

(1) 奥氏吸管:供准确量取 0.5ml、1ml、2ml、3ml、4ml、5ml、10ml 等固定量的溶液。这种吸量管中间膨大部分呈球形或橄榄形,只有一个总量标线,放液时必须吹出残留在吸量管尖端的液体。

(2) 移液管:供准确量取 5ml、10ml、25ml、50ml 等固定量的溶液。与奥氏吸管一样,此吸量管上也只有一个总量标线,但放液后,将吸量管尖在容器内壁上继续停留 15 秒,注意不要吹出尖端最后的部分。它的造型类似于奥氏吸量管,但中间膨大部分呈长圆柱形,也是一种准确度较高的吸量管。

(3) 刻度吸管:是具有分刻度的吸量管,准确度较奥氏吸管和移液管略低。常用的有 10ml、5.0ml、2.0ml、1.0ml、0.5ml 等几种规格。一般刻度吸管可分为吹出式和流出式等类型。上端注有“吹”字的吸管,一般刻度包括尖端部分,将所量液体全部放出后,必须将管尖端残留的液体吹入受器内。未标有“吹”字的吸管,只需将管内液体自然放出,不必吹出管尖的残留液体。

#### 2. 吸量管的使用

(1) 选择:使用前先根据根据需要选择适当规格的吸量管,刻度吸量管的总容量最好等于或稍大于取液量。临用前要看清容量和刻度。

(2) 执管:用拇指和中指(辅以无名指)持吸量管上部,用食指堵住上口并控制液体流速,刻度数字要对准自己。

(3) 取液:用另一只手捏压橡皮球,将吸量管插入液体内(不得悬空,以免液体吸入球内),用橡皮球将液体吸至最高刻度上端 1~2cm 处,然后迅速用食指按紧管上口,使液体不至于从管下口流出。

(4) 调准刻度:将吸量管提出液面,吸粘性较大的液体(如:全血、血清、血浆)时,先用滤纸擦干管尖外壁,然后用食指控制液体缓慢下降至所需刻度(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。

(5) 放液:放松食指,使液体自然流入受器内,放液时管尖最好接触受器内壁,但不要插入受器内原有的液体中,以免污染吸量管和试剂。

(6) 洗涤:吸血液、血清等粘稠液体的吸量管,使用后要及时用自来水冲洗干净,最后用蒸馏水冲洗,晾干备用。

### (四) 微量加样器

微量加样器作为一种简便、快捷的移液量具,目前在实验室被广泛使用。其吸入量是否准确和使用方法是否得当,可直接影响测定结果的准确性。

1. 使用方法 微量加样器有固定式和可调式两种。在使用加样器时,如为可调式则先将容量调至所需容量上,在下端装上吸液嘴,并旋紧以保证气密性,然后四指并拢握住加样器上半部,用拇指把顶端的“推进按钮”向下按到第一静止点(第一档位),将吸液嘴尖头浸入样品或溶液中 1~3mm 深度,再缓缓放开“推进按钮”,使返回原处,停留 1~2s 后,将吸液嘴离开标本或溶液,拭干吸液嘴外部残液,然后将吸液嘴尖头轻轻地接触受器内



壁,将“推进按钮”向下按到第一静止点(第一档位),停留 1~2s,再将“推进按钮”向下按到第二静止点(第二档位),排出尖头中的残液。

## 2. 加样器使用时的注意事项

(1) 加样器是精密量器,不允许将加样器直接与液体接触,不使用时,也应插上洁净的塑料吸液嘴,以免流体或杂质吸入管内,导致阻塞。吸液嘴与吸液杆的连接必须密合,以免液体漏出或取液不准。

(2) 吸液嘴在使用前须经湿化,即在正式吸液前将所吸溶液吸放 2~3 次。湿化前后实际容量和排出量均有显著差异。另外,有些新购的吸液嘴是经过硅化的,这有利于减少液体的吸附。对使用时间较长、外观有明显“花纹”或透明度降低者应弃掉不用。

(3) 要保证在整个吸液过程中,吸头尖端要一直处于液面之下,以防止吸空造成吸样不准确。

(4) 吸取液体完成后至排出液体之前,一定要擦去吸头四周的液体,特别是在取液量少时尤其要注意这一点。但要防止接触吸头尖端。

(5) 吸取液体和排出液体的动作一定要慢,因为动作过快时,液体因表面张力吸附在吸头壁上,造成移液不准。所取液体的粘度越高,越应该注意这个问题。

(6) 排出液体时,在液体将排尽时,要轻轻让吸头尖端接触容器壁,以免在加样的容器中形成气泡,影响后续反应。

(7) 加样完成后,应在弃去使用过的吸头后,方才松开按钮至起始位置,以免吸头内的残留液体回吸到枪头,造成交叉污染。特别是在进行分子生物学的有关实验,如进行 PCR 的加样操作时,由于 PCR 具有极强的放大能力,如果操作不当使含有 DNA 的液体标本产生气溶胶吸附在枪头上,则很容易造成实验中的假阳性。

3. 加样器的校正 目前,许多实验室都已经使用国产或进口的加样器,尽管进口加样器在准确度、精密性、性能和使用寿命等方面优于国产加样器,但在这类量器的使用中,每年至少也应检验校正 2~3 次。其校正方法如下:校正时要求室温 20℃,按正规操作吸取蒸馏水,并称其蒸馏水质量,同时记下蒸馏水质量及水温。计算出容积及校正值,如果相对百分误差大于±2%时,应进行调整。调整后,必须再进行检测,直至合格。

## 三、分光光度计的使用方法

分光光度计是生物化学实验中最常用的仪器之一,关于分光光度计的结构和原理见“光谱技术”一章,下面以 721 型分光光度计为例介绍其使用方法及注意事项。

### (一) 使用方法

1. 预热仪器 接通电源,打开电源开关,指示灯亮,打开比色皿暗箱盖使仪器预热约 20min。

2. 选择波长 根据实验要求选择所需的波长。

3. 选择灵敏度档 根据单色光波长和有色溶液对光的吸收情况,选择合适的灵敏度档。一般选择“1”档(如空白管的透光度 T 调不到“100%”时,再选用较高的档)。

4. 放入比色皿 将盛空白液的比色皿放入比色皿座架中的第一格内,盛有色溶液的比色皿依次放入其他格内。

5. 调“0”和“100%” 比色皿暗箱盖打开,旋转调“0”电位器(0 位钮),使透光度为