

高等医药院校基础医学实验教学系列教材

医学生物化学与分子 生物学实验教程

张胜权 主编



科学出版社

www.sciencep.com

高等医药院校基础医学实验教学系列教材

医学生物化学与分子生物学实验教程

主 编 张胜权

副主编 汪 渊 陈治文 秦宜德 陈昌杰

编 委 (按姓氏笔画排序)

左 莉 安徽医科大学

汪 渊 安徽医科大学

张素梅 安徽医科大学

陈昌杰 蚌埠医学院

周海胜 安徽医科大学

秦宜德 安徽医科大学

夏 俊 蚌埠医学院

储 兵 安徽医科大学

熊江霞 暨南大学

杨清玲 蚌埠医学院

张胜权 安徽医科大学

陈 兵 安徽医科大学

陈治文 蚌埠医学院

胡若磊 安徽医科大学

都 建 安徽医科大学

程筱雯 安徽医科大学

鲁云霞 安徽医科大学

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

实验教学是医学教育的重要组成部分,是培养学生创新能力的主要部分。生物化学与分子生物学是生物医学的前沿学科也是各医学专业的基础,因此,我们结合现代生物医学的发展和医学教育的特点编写了这本教材。本教材分为四篇,第一篇医学生物化学与分子生物学实验基础知识,共分为三章;第二篇是医学生物化学与分子生物学基本技术原理,共分为八章;第三篇为医学生物化学与分子生物学基础实验,共分为六章;第四篇是医学生物化学与分子生物学综合设计实验,主要通过循序渐进的方式,培养学生的综合创新能力和创新思维。

本教材适合医药院校各专业的本专科学生及研究生的实验教学,同时也可以作为青年教师的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

医学生物化学与分子生物学实验教程 / 张胜权主编. —北京:科学出版社,2009

(高等医药院校基础医学实验教学系列教材)

ISBN 978-7-03-025128-2

I. 医… II. 张… III. ①医用化学:生物化学-实验-医学院校-教材 ②药
学:分子生物学-实验-医学院校-教材 IV. Q5-33 Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 132944 号

策划编辑:胡治国 / 责任编辑:胡治国 / 责任校对:李奕莹

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄 超

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新蕾印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009年8月第一版 开本:787×1092 1/16

2009年8月第一次印刷 印张:13

印数:1—5 000 字数:301 000

定价:24.80元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

医学是一门实践性很强的科学,实验教学是高等医学教育的重要内容。通过实验,可以培养学生认真的观察与深入的思考以及提出问题、分析问题、解决问题的能力,在培养学生动手能力的同时也可进一步的启发和培养学生的创新思维与综合素质。而生物化学与分子生物学实验技术是医学各专业的学生必修的课程之一,也是医学许多学科进行科学研究的重要手段。

随着科学技术的进步与发展,生物化学特别是分子生物学实验技术的发展更是突飞猛进。我们在实验教学中越来越感到原有的实验教材有待进一步的更新与完善。因此,我们在总结了多年实验教学的基础上,参照现有的教学大纲,联合编写了这本生物化学与分子生物学实验教材。

本教材内容主要有以下几个方面。

(1) 医学生物化学与分子生物学实验基础知识,这部分内容除了介绍一些基本实验室规则外,主要介绍本学科的基本技术和一些常用的仪器设备。

(2) 医学生物化学与分子生物学基本技术原理,本篇介绍了生物化学的四大基本技术:分光光度技术、离心技术、电泳技术及层析技术;分子生物学的基本技术:核酸分离纯化技术、PCR 技术、转移印迹和分子杂交技术及基因工程技术等基本原理。

(3) 医学生物化学与分子生物学基础实验,主要以验证性实验为主,以掌握实验基本技术和验证现有理论为目的。

(4) 医学生物化学与分子生物学综合设计实验,这篇有两部分构成:①综合实验,主要综合运用所学习多种知识解决一个相对较为复杂的问题;②设计性实验,主要通过提出问题、解决问题培养学生的创新思维。

本教材适用于医学,卫生,药学口腔检验,生物技术,法医学等专业五年制,七年制本科和研究生实验教学使用,也可供相关专业的科研人员和研究生使用。

本教材的编写大多是由有着多年生物化学与分子生物学教学经验的老师亲自执笔编写的,字里行间凝聚了他们对教学事业的热爱和热情,也是对多年实验教学经验的总结和积累。在本教材的编写过程中还得到了各级领导和相关部门的大力支持与帮助,在此表示由衷的感谢。此外,安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室的罗欣、顾芳、黄海良老师除了参与部分内容的编写,在校对及插图等方面做了大量的工作、在此一并表示感谢。

由于编写的时间仓促,编者的水平有限,本教材有可能还存在着一些不足之处甚至错误,恳请同行专家和读者批评、指正,以便于我们今后进一步的提高和完善。

编 者

2009年5月于合肥

目 录

第一篇 医学生物化学与分子生物学实验基础知识

第一章 医学生物化学与分子生物学实验	第一节 分光光度计	(9)
一般知识	第二节 离心机	(10)
第一节 医学生物化学与分子生物学实验的基本特点	第三节 高效液相色谱仪	(11)
第二节 实验室安全及规则	第四节 电泳仪	(13)
第三节 实验报告书写	第五节 PCR 仪	(14)
第二章 基本实验操作	第六节 真空冷冻干燥机	(16)
第一节 洗涤和干燥	第七节 高压蒸汽灭菌锅	(17)
第二节 常用的实验操作技术	第八节 恒温培养箱	(18)
第三章 实验仪器简介	第九节 生物安全柜	(21)

第二篇 医学生物化学与分子生物学基本技术原理

第四章 分光光度技术	第一节 层析方法的一般原理	(22)	(45)
第一节 分光光度技术基本原理	第二节 常见的层析技术	(22)	(46)
第二节 (722 型)分光光度计的简介	第八章 核酸的分离与纯化	(24)	(54)
第五章 离心技术	第一节 核酸分离的原则	(25)	(54)
第一节 离心技术基本原理	第二节 核酸分离的主要步骤	(25)	(55)
第二节 离心机的组成	第三节 核酸的纯化	(27)	(55)
第三节 离心方法	第四节 核酸浓度的测定	(30)	(55)
第六章 电泳技术	第五节 核酸的保存	(35)	(56)
第一节 电泳技术发展简史	第九章 聚合酶链反应(PCR)	(35)	(57)
第二节 电泳基本原理	第一节 PCR 的基本原理	(35)	(57)
第三节 影响电泳分离的主要因素	第二节 PCR 反应条件	(36)	(58)
第四节 电泳分类	第三节 常见的几种 PCR 技术	(38)	(59)
第五节 常见电泳技术	第四节 PCR 技术的应用及其注意	(39)	事项
第七章 层析(色谱)技术	(62)	(44)	(64)
第一节 层析(色谱)技术发展简史	第十章 印迹技术	(44)	(64)
第二节 层析的分类	第十一章 基因工程	(44)	(66)
	第一节 基因工程发展简史	(44)	(66)
	第二节 基因工程基本原理	(44)	(66)
	第三节 基因工程的基本过程	(44)	(71)

第三篇 医学生物化学与分子生物学基础实验

- 第十二章 蛋白质** (75)
- 实验一 蛋白质的定性试验 (75)
- 实验二 离子交换层析分离氨基酸
 (80)
- 实验三 凝胶层析法分离蛋白 (82)
- 实验四 蛋白质定量分析 (83)
- 实验五 血清蛋白的乙酸纤维薄膜
 电泳 (90)
- 第十三章 酶学** (93)
- 实验一 酶定性 (93)
- 实验二 丙二酸抑制琥珀酸脱氢酶
 实验 (97)
- 实验三 琼脂糖凝胶电泳法分离乳酸
 脱氢酶同工酶 (99)
- 实验四 碱性磷酸酶 K_m 测定 ... (101)
- 实验五 3-磷酸甘油醛脱氢酶偶联法
 测定血清醛缩酶活性 ... (103)
- 第十四章 糖代谢** (107)
- 实验一 运动对骨骼肌糖代谢的影
 响 (107)
- 实验二 血糖浓度测定 (109)
- 实验三 肾上腺素和胰岛素对家兔
 血糖浓度的影响 (112)
- 实验四 肝糖原的提取和鉴定 ... (112)
- 第十五章 脂代谢** (114)
- 实验一 磷酸甘油氧化酶法测定
 血清甘油三酯测定 (114)
- 实验二 血清总胆固醇氧化酶法
 测定血清总胆固醇 (115)
- 实验三 血清总胆固醇的测定——
 邻苯二甲醛直接显色法
 (116)
- 实验四 酮体的生成及鉴定 (117)
- 实验五 琼脂糖凝胶电泳分离血清
 脂蛋白 (119)
- 第十六章 氨基酸代谢** (121)
- 实验一 血清丙氨酸氨基转移酶
 活性测定 (121)
- 实验二 氨基移换及精氨酸酶在
 尿素形成中的作用 (123)
- 第十七章 分子生物学基础实验** ... (127)
- 实验一 细菌质粒 DNA 的提取及紫
 外吸收法测定核酸的含量
 (127)
- 实验二 质粒 DNA 提取(质粒小量
 提取试剂盒) (129)
- 实验三 PCR 扩增 (130)
- 实验四 琼脂糖凝胶电泳分离 DNA
 (131)
- 实验五 肝组织中核酸的提取和核
 酸组分的鉴定 (133)
- 实验六 真核基因组 DNA 的提取
 (137)
- 实验七 真核细胞 RNA 提取 (139)
- 实验八 RT-PCR 方法 (141)
- 实验九 荧光定量 PCR 测定培养
 Hela 细胞中 GAPDH 的含量
 (142)

第四篇 医学生物化学与分子生物学综合设计实验

- 第十八章 蛋白质和酶的纯化** (150)
- 实验一 血清中 IgG 的分离纯化
 (150)
- 实验二 红细胞中 SOD 分离纯化
 及活性鉴定 (155)
- 第十九章 IL-29 基因亚克隆及其在
大肠埃希菌中表达** (159)
- 实验一 PCR 扩增目的基因及其
 琼脂糖凝胶电泳回收 ... (159)
- 实验二 质粒 DNA 及目的基因的

限制性内切酶酶切 (162)	第二十一章 IL-29 复性及活性鉴定
实验三 质粒 DNA 与目的基因的连接 (180)
..... (163)	实验一 纯化蛋白的复性 (180)
实验四 感受态细胞的制备及转化	实验二 IL-29 诱导 Hela 细胞中 2'5'-
..... (164)	寡聚腺苷酸合成酶(2'5'-OAS)
实验五 阳性克隆的筛选 (167)	的荧光定量 PCR 分析 ... (181)
实验六 克隆基因的诱导表达 ... (170)	第二十二章 自主设计实验 (184)
第二十章 原核表达 IL-29 分离纯化	实验一 凋亡细胞 DNA 片断的琼脂
..... (172)	糖电泳分析 (184)
实验一 包涵体的制备、洗涤 (172)	实验二 酪蛋白等电点的测定 ... (185)
实验二 包涵体的裂解和洗涤 ... (174)	实验三 双荧光报告基因重组体的转
实验三 目的蛋白质 Ni ²⁺ 金属离子	染及荧光显微镜观察 ... (187)
整合层析分离纯化 (175)	实验四 牛血清白蛋白聚丙烯酰胺
实验四 Western-blot 鉴定 (177)	凝胶等电聚焦电泳 (188)
	实验五 完全自主设计实验 (188)
附录 (190)	
附一 常用缓冲溶液的配制..... (190)	
附二 常用酸碱摩尔溶液的配制 (196)	
附三 常用酸碱指示剂的配制..... (197)	
附四 常用抗凝试剂的配制..... (197)	
附五 国际单位制的基本单位..... (198)	

第一篇

医学生物化学与分子生物学 实验基础知识

第一章

医学生物化学与分子生物学实验一般知识

第一节 医学生物化学与分子生物学 实验的基本特点

生命科学是一门以实验为基础的学科,生物化学与分子生物学实验技术是生命科学各学科重要的研究工具。当代生物化学与分子生物学实验涉及广阔、内涵丰富,包括分光光度技术、离心技术、层析技术、电泳技术、核酸的分离纯化技术、PCR 技术、蛋白质的分离纯化技术、分子印迹技术等,其中部分实验技术与化学、微生物学、生物物理学、生理学、病理生理学、免疫学等学科交叉。然而生物化学与分子生物学是从化学角度和分子水平来解释复杂的生命现象的科学,因此其实验又具有鲜明的特点。

- (1) 以核酸和蛋白质等生物分子的组成、结构及其在遗传信息、细胞信息传递中的作用为研究对象。
- (2) 以体外模拟活体内环境并改变某一种或几种条件而观察其变化为研究平台。
- (3) 以经典的实验体系为基础,并结合新兴的方法和技术为研究手段。
- (4) 以阐明生命现象的正常机制和病理机制,维持人类身心健康为研究目的。

第二节 实验室安全及规则



一、实验室工作管理人员规则

(1) 实验室建立安全员制度,安全员由负责人兼任。安全员全面负责本中心的安全工作,如发现安全隐患,安全员有权随时终止实验。

(2) 定期对全体工作人员进行实验室安全知识教育,增强安全意识,严格进行管理,预防和避免各类事故的发生。

(3) 定期检查实验室水管、电路、气体管路等,发现后及时向有关部门反映,积极采取措施解决。对长期不用的管路和电源要采取可靠的安全措施。消防器材应置于固定位置,由专人管理。工作人员应熟悉和掌握其特性和正确使用方法,发生意外情况能进行紧急处理。

(4) 保持实验室内空气流通。凡对人体有害气体的实验均应要求在通风橱内操作,并根据其特性戴上眼镜、手套或防护面罩等,操作后及时清理实验台面。

(5) 实验室内仪器和药品应分类登记保管,特别是易燃易爆和剧毒药品必须妥善保管,设立危险品标志,统一张贴或此类药品集中存放,使用时应注意规范操作。

(6) 凡涉及使用毒麻药品和危险性试剂时,遵照《危险性试剂及毒麻药品使用管理规定》执行。

(7) 对参加实验操作的人员要进行安全知识及相关仪器设备使用的指导,对于大型仪器设备要有专人负责操作。



二、实验室操作人员及学生规则

生物化学与分子生物学实验的很多试剂(如强酸强碱、有机试剂等)都具有强烈腐蚀性和剧毒性,因此,实验操作人员及学生在操作过程中要格外小心,严格遵守各项实验操作规程。

(1) 实验前需认真预习实验内容,明确实验目的、原理以及步骤,实验过程中要认真思考、安全操作。

(2) 在实验中,要保持实验室和仪器设备的整齐清洁。爱护实验室仪器设备,使用前详细检查,使用后要就位,发现问题应立即报告。

(3) 实验过程中注意听教师讲解,认真按照实验步骤和操作规程进行实验,注意观察实验过程中出现的现象和结果,并认真进行实验记录。

(4) 实验完毕后,要按照各种仪器(如试管、比色杯等)的清洗方法进行清洗;要关闭设备的电源、整理好仪器设备,打扫卫生并关好实验室的门窗,经实验室工作人员检查仪器及使用记录后方可离开。

第三节 实验报告书写



一、实验记录

实验记录是实验过程的原始资料,也是书写实验报告的依据。因此,准确如实地记录实验过程中所观察到的真实结果和出现的问题是极为重要的。如果实验记录有误,就会导致整个实验结果错误。如实做好实验记录,这也是培养学生实验能力和严谨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,总结简要的实验流程图和数据记录表格等。

(2) 实验中应及时准确地记录所观察到的现象和测量的数据。

(3) 实验记录必须客观。

(4) 实验记录要注意有效数字,如吸光度值应为“0.010”,而不能记成“0.01”。

(5) 每个结果都要尽可能重复观测 2 次以上,如实记录实验结果。

(6) 实验中要详细记录实验条件,如使用的仪器型号、编号、生产厂家等;生物材料的来源、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。



二、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,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。

实验报告的内容应包括:①实验题目;②实验目的;③实验原理;④实验试剂和仪器;⑤实验步骤;⑥实验结果;⑦实验结论;⑧实验讨论;⑨实验者和实验日期。

生物化学与分子生物学的实验报告分为定性报告和定量报告两种,下面的实验报告格式可供参考。

1. 定性实验报告

实验** * * * * * (实验题目)

一、实验目的

二、实验原理

三、实验试剂和仪器

四、实验步骤

五、实验结果

六、讨论

七、结论

实验者

年 月 日

2. 定量实验报告

实验 * * * * * * * * * * (实验题目)

一、实验目的

二、实验原理

三、实验试剂和仪器

四、实验步骤(表格式或条文式)

五、结果与计算

六、讨 论

七、结 论

实验者

年 月 日

实验报告必须独立完成,严禁抄袭。实验报告要语言简洁,重点突出,各种实验数据都要尽可能整理成表格(三线表)并作图表示之,以便形象的比较。通常利用 Excel 或 SPSS 软件作图,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。另外,实验结果、结论和讨论是实验报告书写的重中之重,要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,进行深入的探讨,勇于提出自己独到的分析和见解。

(张胜权 黄海良)

基本实验操作

第一节 洗涤和干燥



一、玻璃仪器的清洗

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,可先用洗衣粉洗刷,再用自来水洗净,然后浸泡在1%~2%(体积分数)盐酸溶液中过夜(时间不少于4小时),再用自来水冲洗,最后用蒸馏水洗2~3次,晾干或在105~110℃烘箱内烘干备用。

2. 使用过的玻璃仪器的清洗

(1) 一般玻璃仪器的清洗:试管、烧杯、锥形瓶等一般玻璃仪器,先用自来水洗刷至无污物,再用合适的毛刷蘸洗衣粉洗刷,或超声清洗(比色皿不可超声),然后用自来水彻底洗净去污剂,用蒸馏水洗两次,烘干备用(计量仪器不可烘干)。清洗标准是玻璃仪器洗净后倒置内壁不挂有水珠。

(2) 容量分析仪器的清洗:吸量管、滴定管、容量瓶等,先用自来水冲洗,晾干后,用铬酸洗液浸泡数小时,然后用自来水冲洗干净,最后用蒸馏水再冲洗2~3次,干燥后备用。

(3) 石英和玻璃比色皿的清洗:比色皿用毕后立即用自来水冲洗干净,再用蒸馏水反复冲洗,不可用强碱清洗,因为强碱会腐蚀抛光的比色皿,也不可试管刷或粗布擦拭。



二、塑料器皿的清洗

第一次使用塑料器皿时,可先用8mol/L尿素(用浓盐酸调pH为1)清洗,接着依次用自来水、1mol/L KOH和蒸馏水清洗,然后用 10^{-3} mol/L的EDTA除去金属离子的污染,最后用蒸馏水彻底清洗,以后每次使用时,可直接用洗衣粉清洗,然后用自来水和蒸馏水冲洗干净。



三、玻璃仪器的干燥

1. 晾干 一般地说,洗净后的玻璃仪器如不急用可倒置于无尘的干燥处,让其自然风干。

2. 加热烘干 一般玻璃仪器洗净并沥尽水后,可放置于电烘箱中烘烤,温度控制在 $105\sim 110^{\circ}\text{C}$,约1小时,但有刻度的量器不宜在高温下烘烤。而对于有盖或塞的,应去盖或塞后再烘烤。

第二节 常用的实验操作技术



一、试剂的混匀方法

样品和试剂的混匀是保证化学反应充分进行的一种有效措施。为使反应体系内各物质迅速地接触,必须借助于外力的机械作用。常用的混匀方法有以下几种:

1. 旋转法 手持容器,使溶液作离心旋转。适用于未盛满液体的试管或小口器皿如锥形瓶等。

2. 指弹法 一手执试管上端,另一只手轻弹试管下部,使管内溶液作旋涡运动。

3. 搅拌法 使用玻璃棒搅拌混匀,多用于溶解烧杯中的固体。

4. 倒置法 使用于有玻璃塞的瓶子,如容量瓶等。

5. 吸管法 用吸管将溶液反复吹打数次,适用于量少而无沉淀的溶液。

注意事项:根据不同的样品选择一种合适的混匀方法,但是在混匀时要谨防容器内液体溅出或被污染,严禁用手堵塞管口或瓶口振荡。



二、水浴保温

打开水浴箱开关,调节温度设定钮至所需温度,指示灯显示恒温后将容器放入恒温水浴箱。水浴箱中水分要充足,实验过程中要随时监测温度,并及时调节。



三、移液器的操作

1. 刻度吸量管的使用

(1) 选取原则:每根吸量管上有许多等分的刻度,在刻度标记有自上而下和自下而上两种。其规格为0.1ml,0.2ml,0.5ml,1ml,2ml,5ml,10ml等。在一次能够完成移液的前提下,应选用容积较小的吸量管;对于同一次实验中同一种试剂的移取,应选用同一支吸量管。

(2) 操作过程

1) 执管:拇指执吸量管上部,使吸量管保持垂直,食指按在管口上调节流速,刻度朝向操作者。

2) 取液:把吸量管插入液面下约1cm,用洗耳球吸取液体至所需刻度上方,移开洗耳球,迅速用食指压紧管口,然后抽离液面。

3) 调准刻度:用食指控制液体流动(通常旋转吸量管来实现)至所需刻度(此时液体凹面、视线和刻度应在同一水平线上)。

4) 放液: 移开食指, 让液体自然流入容器内。此时, 管尖应接触容器内壁, 但不应插入容器的原有液体中(否则管尖会沾上容器内试剂, 再移液时致使试剂交叉污染)。待液体流尽, 将最后液滴吹出或转动吸量管使其沿容器内壁流出。

5) 洗涤: 吸取血浆, 尿液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, 可待实验完毕后再洗。

注意事项: ①对于刻度由上至下的吸量管应尽量使用上端刻度。②管尖残液是否需要吹, 视具体情况而定。一般来说, 1ml 及 1ml 以下的均需吹出; 大于 1ml 的视标记而行。如吸量管上方标有“吹”或“◇”形符号, 则残液需吹出; 标有“快”字, 应使残液自然流下。

2. 可调式移液器的使用 选取与量取液体体积最接近的移液器, 调节至所需体积值→套上枪头、旋紧→垂直持握可调式移液器并用大拇指按至第一档→将枪头插入溶液, 徐徐松开大拇指, 使其复原, 将可调式移液器移出液面(必要时可用纱布或滤纸拭去附于枪头表面的液体, 但注意不要接触枪头孔口)→排放时, 重新将大拇指按下, 至第一档后, 继续按至第二档直至排空液体。至此完成一次操作, 如需移取另一样品时, 按卸尖按钮弃掉枪头并更换新枪头。



四、溶液 pH 的测定

生物体内进行的各种生物化学过程都是在精确的 pH 下进行的, 因此, 缓冲溶液的正确配制和 pH 的准确测定, 在生物化学的研究工作中具有极为重要的意义。

1. pH 试纸法 pH 试纸法是最简便但较粗略的方法, 其分为广泛和精密 pH 试纸法两种。广泛 pH 试纸的变色范围是 pH 为 1~14, 只能粗略确定溶液的 pH。精密 pH 试纸, 可以较精确地测定溶液的 pH, 其变色范围是 2~3 个 pH 单位并可以通过不同指示剂进行比对, 例如有 pH 为 4.0~7.0、8.0~10.0 等多种, 可根据待测溶液的酸、碱性选用某一范围的试纸。测定的方法是将试纸条剪成小块, 用镊子夹一小块试纸, 用玻璃棒蘸少许溶液与试纸接触, 试纸变色后与色阶板对照, 估读出所测 pH。严禁将试纸直接放入溶液中, 以免污染样品溶液。试纸要存放在有盖的容器中, 以免受到实验室内各种气体的污染。

2. pH 计法 精确测定溶液 pH 要使用 pH 计, 其精确度可达 0.005 个 pH 单位, 关键是要正确选用和校对 pH 电极。

(1) pH 计的校准: 取下电极头部小瓶, 用蒸馏水冲洗电极头并用吸水纸吸干。用少量 pH6.88 的标准缓冲液润洗电极头, 然后将电极浸入标准液中, 用 pH 计上的“标准”旋钮校正 pH 读数, 然后取出电极洗净, 再放入 pH 为 4.00 或 9.23(根据待测溶液的 pH, 若为酸性选择 pH4.00; 若为碱性则选择 pH9.23) 的标准缓冲液中, 用“斜率”旋钮校正 pH 读数, 如此反复多次, 直至二点校正正确。

(2) pH 计的使用: 仪器校正后, 用蒸馏水冲洗电极头, 用吸水纸吸干, 将温度补偿旋至与待测液的温度一致。用少量被测样品润洗电极头, 然后将电极浸入样品中, 显示数值稳定后即样品 pH。完毕后, 关上测量开关, 将电极洗净并浸泡在洁净蒸馏水中或饱和 KCl 溶液中。

注意事项:

- 1) 经常检查电极内的 KCl 溶液的液面,如液面过低则应补充。
- 2) 玻璃泡极易破碎,使用时必须极为小心。严禁接触强氧化性、强腐蚀性的试剂。
- 3) 使用时复合电极的玻璃泡和半透膜小孔要浸入到溶液中。
- 4) 标准缓冲液不用时应冷藏。
- 5) 电极的玻璃泡容易被污染。若测定浓蛋白质溶液的 pH 时,玻璃泡表面会覆盖一层蛋白质膜,不易洗净而干扰测定,此时可用 0.1mol/L 的 HCl 溶液和 1mg/ml 蛋白酶溶液浸泡过夜。若被油脂污染,可用丙酮浸泡。
- 6) 若电极保存时间过长,校正数值不准时,可将电极放入 2mol/L 的 KCl 溶液中,40℃ 加热 1 小时以上,进行电极活化。
- 7) 溶液 pH 取决于溶液中的离子活度而不是浓度,只有在很稀的溶液中,离子的活度才与其浓度相等。生化实验中经常配制比使用浓度高 10 倍的“储存液”,使用时再稀释到所需浓度,由于浓度变化很大,溶液 pH 会有变化,因而,稀释后仍需对其 pH 进行调整。
- 8) 有的缓冲液(如“Tris”)pH 受温度影响很大,所以配制和使用都要在同一温度下进行。

(张胜权)

实验仪器简介

第一节 分光光度计



一、分光光度计简介

分光光度计是现代分子生物实验室常规仪器。常用于核酸、蛋白定量以及细菌生长浓度的定量分析。分光光度计采用一个可以产生多个波长的光源,通过系列分光装置,从而产生特定波长的光源,光源透过测试的样品后,部分光源被吸收,计算样品的吸光值。根据郎伯-比尔定律,在一定条件下,吸光度 A 与待测物质的浓度 C 及吸收地长度 L 的乘积成正比,即 $A=KCL$,在测得吸光度 A 后,可采用标准曲线法、比较法以及标准加入法等方法进行定量分析,从而转化成样品的浓度。分光光度计按波长,可以分为紫外、可见分光光度计。按自动化程度,可分为手动、半自动和自动紫外可见分光光度计。



二、分光光度计的结构 (722 型为例)

722 型光栅分光光度计(图 3-1),采用自准式色散系统和单光束结构,色散元件为衍射光栅,使用波长为 330~800nm,数字显示读数还可以直接测定溶液的浓度。其外部结构可

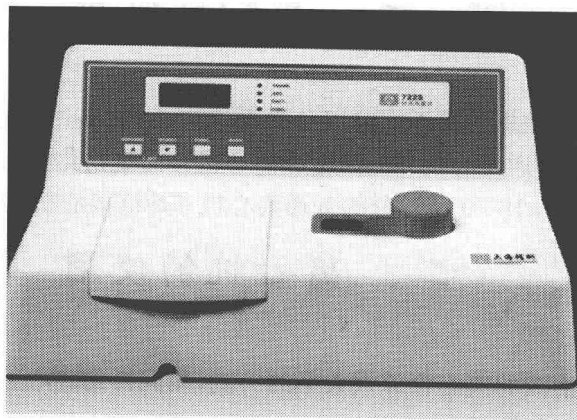


图 3-1 722 型光栅分光光度计

以分为：①电源开关；②选择开关；③吸光度调零旋钮；④数字显示器；⑤波长手轮；⑥试样架拉手；⑦100%T旋钮。



三、分光光度计的使用 (722 型为例)

1. **预热** 打开样品槽盖,打开电源,预热 20 分钟。
2. **调整波长** 使用波长调节按钮,具体波长可以从显示窗显示。
3. **调零** 选择开关置于“T”,调节透光度“100%”旋钮,使数字显示“100.0”,或选择开关置于“A”,调节透光度“0%”旋钮,使数字显示“0.00”。
4. **样品液准备** 将空白对照和样品液分别装入比色杯中。比色杯有光面和毛面之分,手握毛面,如有液体漏到比色皿外面,应用擦镜纸轻轻拭去。
5. **上样** 将比色皿的光面对准光路,放入仪器。
6. **调整** 将用作背景的空白样品放入样品室光路中,盖上试样盖。选择开关设置为“T”,调整吸光度“100%”旋钮,使数字显示“100.00”;选择开关置为“A”,调节透光度“0%”旋钮,使数字显示“0.00”。
7. **测量** 拉动比色杯座的拉杆,使测定管的比色杯依次进入光路,显示值即为被测样品的吸光度值,并作记录。
8. **清洁** 测量完毕,速将暗盒盖打开,关闭电源开关,将灵敏度旋钮调至最低档,取出比色皿,关上盖子,将比色皿中的溶液倒入烧杯中,清洁比色杯。
9. **注意事项**
 - (1) 当仪器停止工作时,切断电源,并罩好仪器。
 - (2) 应将仪器放置于干燥的室内,光线不宜过强。
 - (3) 仪器应置于牢固平稳的台面上,避免发生震动。

第二节 离心机



一、离心机简介

离心机的种类很多,根据转速不同可以分为低速离心机、高速离心机和超速离心机;根据离心温度又可以分为普通离心机和低温冷冻离心机。而生物化学与分子生物学实验当中经常用到的是最大转速为 16 000 转/分的普通离心机和冷冻离心机(图 3-2)。



二、离心机的使用

1. **平衡** 将待装溶液的离心管放入天平的一侧,用同样的离心管加水置于天平的另一侧配平,并做好标记。
2. **对称** 将已平衡好的一对离心管置于离心机中的对称位置,盖严离心机盖。