

MS 高职高专医药卫生类实训指导系列规划教材
GAOZHIGAOZHUAN YIYAOWEISHENGLEI SHIXUNZHIDAO XILIEGUIHUA JIAOCAI

生物化学 实训指导

SHENGWUHUAXUE

● 主编 陈武哲 SHIXUNZHIDAO



中南大学出版社
www.csupress.com.cn

生物化学实训指导

主 编 陈武哲

副主编 李 杰

编 者 (按姓氏笔画排序)

李 杰 李景律 杨宇虹

陈武哲 张锦辉 欧凌斌



中南大学出版社
www.csupress.com.cn

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实训指导/陈武哲主编. —长沙: 中南大学出版社, 2013. 8
ISBN 978-7-5487-0933-6

I. 生... II. 陈... III. 生物化学-高等学校-教学参考资料
IV. Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 182671 号

生物化学实训指导

主编 陈武哲

-
- | | | | |
|-------------------------------|----------------------|-------------------|--|
| ☐ 责任编辑 | 谢新元 | | |
| ☐ 责任印制 | 文桂武 | | |
| ☐ 出版发行 | 中南大学出版社 | | |
| | 社址: 长沙市麓山南路 | 邮编: 410083 | |
| | 发行科电话: 0731-88876770 | 传真: 0731-88710482 | |
| ☐ 印装 | 长沙市宏发印刷有限公司 | | |
-
- | | | | |
|-----------------------------|------------------------|--|------------------------------------|
| ☐ 开本 | 787 × 1092 1/16 | ☐ 印张 9 | ☐ 字数 224 千字 |
| ☐ 版次 | 2013 年 9 月第 1 版 | ☐ 2013 年 9 月第 1 次印刷 | |
| ☐ 书号 | ISBN 978-7-5487-0933-6 | | |
| ☐ 定价 | 22.00 元 | | |
-

图书出现印装问题, 请与经销商调换

前 言

为了提高实验教学质量，永州职业技术学校生物化学教研室根据教学大纲要求，编写了这本《生物化学实训指导》。它一方面能指导学生做好生物化学实验；另一方面，学生能在实训指导上直接填写出规范的实验报告和对某些思考题作出解答。在本书的实验章节中，我们根据多年的实验带教经验，做了适当的修改，使实验成功率有所提高。在实验分析栏目中，采用了填空、提问等形式，由浅入深逐步引导学生根据实验原理，从观察到的事实出发，分析各种实验现象，由学生自己提出正确的结论，使学生们分析问题、解决问题的能力得以提高。另外，根据实验内容及有关的理论知识，附有少量的习题，供学生们练习。

永州职业技术学院生物化学教研室
2013 年 7 月于永州

目 录

第一章 总 论	(1)
一、生物化学实验课的目的	(1)
二、实验报告书写要求	(1)
三、实验室规则	(1)
四、生物化学仪器的基本操作及原理	(1)
五、常用容量仪器的规格、使用、清洗及洗涤液的配制	(7)
六、化学试剂的规格与保管	(11)
七、实验室常用设备介绍	(12)
八、分子生物学实验中常用试剂	(14)
第二章 生物化学常用技术原理	(17)
第一节 电泳技术	(17)
一、概 述	(17)
二、电泳的基本原理	(18)
三、滤纸与醋酸纤维薄膜电泳	(23)
四、琼脂和琼脂糖凝胶电泳	(24)
五、聚丙烯酰胺凝胶电泳	(27)
六、SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质分子量	(33)
七、蛋白质、核酸及酶的染色方法	(42)
第二节 分光光度法	(46)
一、概 述	(46)
二、光吸收的基本规律	(49)
三、分光光度计的构造和类型	(51)
四、定性定量方法及其应用	(53)
五、双波长分光光度计及其测定方法	(55)
第三节 超离心技术	(59)
一、概述	(59)
二、超离心分离方法	(64)
三、密度梯度液的制备和区带收集	(68)

四、制备超离心机做沉淀分析	(74)
第三章 实验内容	(75)
实验一 酶的特异性	(75)
实验二 温度、pH、激动剂与抑制剂对酶促作用的影响	(77)
实验三 食物中维生素 C 的提取与定量	(81)
实验四 光电比色计及分光光度计的应用	(82)
实验五 血糖测定及激素对血糖浓度的影响	(85)
实验六 琥珀酸脱氢酶的作用及其抑制	(87)
实验七 肝脏中酮体的生成	(89)
实验八 转氨基作用证明	(91)
实验九 血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳	(92)
实验十 血清尿素氮的测定	(94)
实验十一 血浆二氧化碳结合力测定(滴定法)	(96)
实验十二 血清钾测定(四苯硼钠比浊法)	(98)
实验十三 血清谷丙转氨酶活性测定(赖氏法)	(100)
实验十四 尿中胆红素、尿胆素原及尿胆素检验	(102)
实验十五 尿糖定性实验	(104)
实验十六 尿酮定性实验	(105)
实验十七 尿蛋白定性实验	(106)
第四章 生化技术实验	(107)
实验一 血红蛋白及其衍生物的吸收光谱测定	(107)
实验二 核酸溶液的紫外吸收测定	(109)
实验三 蛋白质溶液的紫外吸收测定	(111)
实验四 SDS - PAGE 分离蛋白质	(114)
实验五 蛋白质定量测定(Folin - 酚试剂法)	(118)
实验六 凝胶等电聚焦分离血清蛋白质	(120)
实验七 血清脂蛋白快速超离心分离试验	(123)
实验八 DEAE 纤维素离子交换层析法分离血清蛋白质	(125)
实验九 亲和层析法纯化胰蛋白酶	(128)
实验十 血清清蛋白、 γ 球蛋白的分离纯化及鉴定	(133)
实验十一 密度梯度离心法分离肝细胞器	(137)

第一章 总论

一、生物化学实验课的目的

培养学生严肃认真、实事求是的科学作风，提高分析问题和解决问题的能力。通过实践验证某些理论，加深对基本理论的理解。培养学生动手能力和实际工作能力，训练学生掌握生化常用实验基本技术，为今后学习、工作、研究打下基础。总之，实验课应该成为理论联系实际的桥梁。

二、实验报告书写要求

在保证实验质量提高的前提下，制订生物化学实验报告册，学生实验报告力求删繁就简，因此，该实验报告册免除了学生抄写实验目的、原理、操作等过程，只要求学生准确、及时、真实记录实验结果并根据要求作出恰当分析，利于回答老师提问。

三、实验室规则

1. 保持实验室肃静。
2. 爱护仪器，尽量避免损坏。节约使用药品、试剂、蒸馏水、自来水，节约用电。
3. 保护实验台，不要将高温试管直接放在台面上，切勿将强酸、强碱洒在台面上。
4. 取完试剂应立刻将瓶盖盖好，放回原处，千万不要乱放，以免影响别人做实验。
5. 废弃液体可倒入水池，并放水冲走，固体废物应倒入废物缸内，实验动物应放在指定的地方。
6. 每个实验室选出负责人一名，负责实验室有关工作。于开学时排出保安卫生值日生。每次实验完毕，值日生打扫实验室，并检查门窗、水电等保安工作。

四、生物化学仪器的基本操作及原理

(一) 分光光度计

分光光度计是利用物质特有的吸收光谱，进行鉴定物质及测定其含量的一种技术。光线是一种电磁波，其中可见光波长范围约为 760nm(红色)至 400nm(紫色)，波长短于 400nm 的光线叫紫外线，长于 760nm 的叫红外线。当光线通过透明溶液介质时，其中一部分可透过，一部分光被吸收。光被溶液吸收的现象可用于某些物质的定性及定量分析。

分光光度法所依据的原理是 Lambert 氏定律和 Beer 氏定律。这两个定律阐明了溶液对单色光吸收的多少与溶液的浓度及液层厚度之间的定量关系。

1. Lambert – Beer 氏定律及其应用

(1) Lambert 氏定律: 当一束单色光通过透明溶液介质时, 由于一部分光被溶液吸收, 所以光线的强度就要减弱。当溶液浓度不变时, 透过的液层越厚, 则光线的减弱愈显著。

设光线原来的强度为 I_0 (入射光强度), 通过厚度为 L 的液层后, 其强度为 I (透光强度), 则 I/I_0 表示光线透过溶液的程度, 称为透光度, 用 T 表示:

$$T = I/I_0$$

透光度的负对数($-\lg T$) 与液层的厚度 L 成正比, 即:

$$-\lg T = -\lg I/I_0 \propto L$$

将上式写成等式, 得:

$$\lg I_0/I = K_1 L$$

式中, K_1 为吸光率, 其值决定于入射光的波长、溶液的性质、浓度以及溶液的温度等, $\lg I_0/I$ 为吸光度(A), 所以

$$A = K_1 L \quad (1)$$

式(1)表明, 当溶液的浓度不变时, 吸光度与溶液液层的厚度成正比, 这就是 Lambert 氏定律。

(2) Beer 氏定律: 当一束单色光通过透明溶液介质后, 溶液液层的厚度不变而浓度不用时, 溶液的浓度越大, 则投射光的强度越弱, 其定量关系如下:

$$\lg I_0/I = K_2 C$$

$$A = K_2 C \quad (2)$$

式(2)中 C 为溶液的浓度; K_2 为吸光率, 其值决定于入射光的波长、浓度的性质和液层厚度以及溶液温度等。式(2)说明: 当溶液液层的厚度不变时, 吸光度与溶液的浓度成正比。这就是 Beer 氏定律。

(3) Lambert – Beer 氏定律: 如果同时考虑液层厚度和溶液浓度这两个因素对光吸收的影响, 则必须将 Lambert 氏定律和 Beer 氏定律合并起来, 得到

$$\lg I_0/I = KLC$$

$$A = KLC \quad (3)$$

即吸光度与溶液的浓度和液层的厚度的乘积成正比。这就是 Lambert – Beer 氏定律

(4) Lambert – Beer 氏定律的应用

利用标准管计算测定物质的含量: 实际测定过程中, 用一已知浓度的测定物质按测定管同样处理显色, 读取吸光度, 再根据式(3)计算, 即:

$$A_1 = K_1 C_1 L_1$$

$$A_2 = K_2 C_2 L_2$$

以上二式中, A_1 、 A_2 分别为已知浓度标准管和未知浓度测定管吸光度, C_1 、 C_2 分别为已知浓度标准和未知浓度测定管中测定管中测定物浓度。

因标准液和测定液的比色径长相同($L_1 = L_2$), 故以上二式可写成:

$$A_1/K_1C_1 = A_2/K_2C_2 \quad (4)$$

因标准液和测定液中溶质为同一物, K 值相同即:

$$K_1 = K_2$$

(5) 式可换算成下式:

$$C_2 = A_2/A_1 \times C_1 \quad (5)$$

因测定液和标准液在处理过程中体积相同, 故式(5)可写成:

$$m_2 = A_2/A_1 \times m_1 \quad (6)$$

式(6)中 m_1 、 m_2 分别表示标准液和测定液中测定物的含量。式(6)为实验操作中常用计算式。

标准曲线进行换算: 先配制一系列已知不同浓度的测定物溶液, 按测定管同样方法处理显色, 分别读取各管吸光度, 以各管吸光度为纵轴, 各管溶液浓度为横轴, 在方格坐标纸上作图得标准曲线, 以后进行测定时, 就无需再作标准管, 以测定管吸光度从标准曲线上可求得测定物的浓度。标准曲线的浓度范围设计在被测物可能浓度的半倍到两倍之间, 并使吸光度在 0.05 ~ 1.0 范围内为宜。所作标准曲线仅供短期使用。标准曲线制作与测定管测定应在同一台仪器上进行, 若不是同一台仪器, 尽管仪器型号相同, 操作条件完全一样, 其结果也会有差异。

利用摩尔吸光率之求取测定物浓度: 式(3)中 K 为吸光率, 当浓度 C 为 1 mol/L, 浓度厚度 L 为 1 cm 时, 则称为摩尔吸光率, 以表示此时 ϵ 与 A 相等。在已知 ϵ 的情况下, 读取测定液径长为 1 cm 时的吸光度, 根据下式可求出测定液的物质浓度。

$$C = A/\epsilon$$

此计算式常用于紫外吸收法, 如蛋白质溶液含量测定, 因蛋白质在波长 280nm 下具有最大吸光峰, 利用已知蛋白质在波长 280nm 时的摩尔吸光率, 再读取待测蛋白质溶液的吸光度, 即可算出待测蛋白质的浓度, 无需显色, 操作简便。

(二) 光电比色法

利用溶液的颜色深浅来测定溶液中物质含量的方法, 称为比色法。光电比色法是利用被测物质的呈色溶液对某一特定波长光线的吸收特性, 使用光电比色计进行比色分析, 测得该溶液的透光度或吸光度, 通过计算机求得被测物质浓度的方法。

光电比色法测定的条件是: 在可见光范围, 并要求被测物质为有色物或经过一定的化学处理, 使无色的测定物转变为有色化合物。测量时, 让光线通过滤光片, 得到一束波长范围较窄的光(接近单色光), 并使它透过有色溶液, 再投射到光电池上, 光电池可将光能转变为电能, 产生电流。电流的大小与照射于光电池上的光强度成正比, 而照别光的强度又与它所透过的测定液的浓度有关。因此, 测定所产生的电流强度, 即能求出待测物质的浓度。

光电比色计种类较多, 其基本构件有光源、滤光片、比色杯、光电池和检流计五个部分。现以国产 581-C 型光电比色计为例, 介绍仪器的基本构造和使用方法。

1. 仪器介绍

(1) 光源: 最常用的是 6W12V 的钨丝灯泡。由整流变压器供给直流电或由蓄电池供电。为了得到较准确的测量结果, 电源的电压尽可能保持稳定, 因此, 一般光电比色计都附有稳压装置。

(2) 滤光片: 有色溶液对大多数波长的光线都可吸收一部分, 但对于某一波长的光线吸收特别多, 这种现象称为最大吸收。利用这种最大吸收特性来测定该物质的浓度较混合光灵敏。滤光片可除去有色溶液吸收不多的光波, 而让溶液吸收最多的光通过。操作时, 根据测定液的颜色来选择滤光片, 这是对某一物质进行测定的首要条件。选择滤光片的一般原则是: 滤光片的颜色应与沉淀液互为补色。所谓补色是指两种能合并为白色的有色光。例如, 桔红色应与蓝绿色互为补色, 青紫色和黄绿色互为补色等。当滤光片和测定液两者颜色互为补色时, 滤光片透过率最大的光波便是溶液吸收最大的光波, 这样有利于测定。

(3) 比色杯: 比色杯用来盛待测溶液, 一般比色仪都配有不同规格比色杯供选用, 如果同时使用几个比色杯, 它们的规格必须相同。

(4) 光电池: 光电池能将照射于其上的光能转变为电能。有些物质光照射可产生电流。这一现象称为光电效应, 这些物质称为光敏物质。半导体硒就是一种光敏物质。光电比色计中的光电池就是硒光电池。光电池受照射产生的光电流的强度与照射光的强度成正比。硒光电池对 400 ~ 650nm 之间的光敏感, 对红外线和紫外线不敏感, 所以光电池仅用于可见光范围。

(5) 电流计: 是用来测定光电流的, 灵敏度很高, 应避免振动。读书盘上直接标出透光度和吸光度。

2. 操作方法

将光电比色计置于背光而平稳之台面上, 按规定电压接上电源, 拨开关使其指间“1”, 预热 10 分钟, 旋转零点调节器, 使读书盘上亮圈中的黑线位于透光度“0”或吸光度“ ∞ ”处, 然后选择合适的滤光片插入滤光片插座中。

取洁净比色杯(手只能拿其毛玻璃面)分别定为空白液杯、标准液杯及盛有测定液杯, 各溶液只盛满比色杯的 3/4 体积, 杯外壁如有水珠, 必须用软绸布擦干, 分别放入比色槽内。

将空白液置于光路上, 再将开关拨到“2”的位置, 依次用粗调节和细调节改变电阻, 使读数盘上亮圈中黑线恰好位于透光度“100”或吸光度“0”处。移动比色槽使测定液置于光路上, 这时读书盘上亮圈发生移动, 等亮圈稳定后, 读记亮圈中黑线所指示的吸光度。然后重测一次, 以求准确。再换置另一测定液于光路上, 按上述步骤继续测定。在取比色杯时, 应先将开关拨回“1”。

操作完毕, 将开关拨回到“0”, 拔去电源插头, 取出比色杯及时清洗, 晾干。切忌用毛刷刷洗, 以免损坏光学玻璃透光性。

(三) 分光光度法

1. 分光光度法的特点

分光光度法用于物质的定量分析时,其基本原理和光电比色法相同,但具有以下特点:

(1) 光电比色法由滤光片获得的是近似单色光,分光光度法则是利用棱镜或光栅得到单色光。而 Lambert-Beer 氏定律,严格地说来,只适用于单色光。因此,分光光度法比光电比色法的灵敏度、准确度和选择性都高。

(2) 光电比色法只限于利用可见光范围的光波进行分析,分光光度法不仅可用于可见光,还可利用紫外光区($<400\text{ nm}$)和红外光区($>750\text{ nm}$)的光波进行分析,对五色溶液也可以测定,因而扩大应用范围。

(3) 利用分光光度法可以测定共存于同一溶液中的两种或两种以上的物质。这是由于不同的物质对光有不同的最大吸收波长,分光光度计能从混合光中细分出各种不同波长的光,根据溶液中所含物质的种类选择各物质吸收最大的波长即可测定两种以上的不同物质。

(4) 分光光度法不仅可以测定溶液中物质的含量,还可借助测定物质的吸收光谱以鉴定物质的种类。调节分光棱镜能使不同波长的光分别通过被测溶液,记录被测溶液对每一波长的吸光度,便可绘制吸收光谱曲线。不同的物质有不同的吸收光谱曲线。所以,目前有很多实验室已将 581-C 型光电比色计淘汰而选用各种型号的分光光度计。

2. 介绍几种常用的分光光度仪

(1) 721 型分光光度计: 光谱范围 $360\sim800\text{ nm}$, 在 $410\sim710\text{ nm}$ 之间灵敏度较好。该仪器系棱镜分光,用光电管作检测器,当电流放大后,用一高阻毫伏计直接指示读数。

721 型分光光度计以 12V25W 白炽钨丝灯泡为光源,经透镜聚光后射入单色光器内,经棱镜色散,穿过狭缝得到波长范围更窄的光进入比色杯,透出的光由光电管接收,产生光电流,再经放大,然后由微安表测定电流强度,并直接读出吸光度。

721 型分光光度计的操作方法: 仪器未接电源时,电表指针须位于刻度“0”上,否则需用电表上的校正螺丝进行调节。

①接通电源(220V),打开样品室的盖板,使电表指针指示“0位”,预热约 20 分钟转动波长选择键钮,选择所需波长。用灵敏度选择键钮选用相应的放大灵敏度档(其灵敏度范围是:第一挡 $\times 1$ 倍,第二挡 $\times 10$ 倍,第三挡 $\times 20$ 倍),调节“0”电位器校正“0”位。

②将比色杯分别盛空白液、标准液和待测液。放入暗箱中的比色杯架,先置空白液于光路上,打开光门,旋转“100”电位键钮,使电表指针准确指向 100%。反复几次调整“0”及“100%”透光度。

③将比色杯架依次拉出,使标准液和待测液分别进入光路,读记吸光度值。每次测定完毕或换盛比色液时,必须打开样品室的盖板,以免光电管持续曝光。

(2) 722 型分光光度计: 我国在 721 型的基础上新生产出 721-A 型和 722 型等新型号

分光光度计,其特点是用液晶板直接显示透光度、吸光度直至浓度的读数。722 型用光栅作单色器。改进方法与 721 型基本相同,详见仪器的使用说明书。

(3) 751 型可见紫外分光光度计: 国产 751 型分光光度计的光谱范围 200 ~ 1000 nm, 包括紫外区、可见光区和近红外区的光波。

751 型分光光度计的操作方法:

①开启稳定电源。按所用波段接通所需光源(波长在 320 ~ 1000 nm 范围内,用钨丝白炽灯泡作光源;波长在 200 ~ 320 nm 范围内,用氢弧灯作光源),同时将灯罩上放射镜转动手柄板在“钨灯”或“氢弧灯”位置,预热 20 分钟。

②将关门拉杆推入关闭关门,选择开关拨在“校正”位置上。

③调暗电流旋转使电流表指针指到“0”位,旋转读数键钮,使读数盘指到透光度 100% 处。

④将灵敏度调节钮从左面“停止”位置顺时针方向旋转 3 ~ 5 圈,并选择所需波长。

⑤选择适当波长的光电管:手柄推入为紫敏光电管(200 ~ 625 nm),手柄拉出为红敏光电管(625 ~ 1000 nm)。

⑥根据波长选用比色杯,波长在 350 nm 以上,可用玻璃比色杯,波长在 350 nm 以下,一定要用石英比色杯。

⑦将盛好测定液的比色杯置于托架内,盖好盖子。先使空白液对准光路,扳动选择开关到“ $\times 1$ ”,拉开光门,则单色光射入光电管。调节狭缝,使电流表指针回到“0”位,必要时用灵敏度钮调节。

⑧拉动换样拉杆,使其他比色杯依次位于光路上。每次皆旋转读数钮,使电流表指针回到“0”位,同时从读数盘上读取吸光度。随即关闭光门,以保护光电管。

⑨若透光度 $< 10\%$, 吸光度 > 1 时,将选择开关扳到“ $\times 0.1$ ”位置,此时测得的吸光度值要加上 1。

⑩测定完毕,切断电源,将选择开关旋至“关”位,取出比色杯洗净,最后罩好仪器。

(4) 752 型紫外光栅分光光度计光谱范围 220 ~ 800 nm。光源由钨卤素灯(W)和氢灯(H)组成,在旋转单色光器波长手轮时,可自动切换光源,不必再分别拉用蓝敏或红敏光电管。单色光器利用平面光栅(1200 线/mm)作为色散元件以代替棱镜,克服了非线性色散检流计的微弱光电流通过放大器放大后用数字显示器表示吸光度或透光度,乃至直接读出物质浓度。使用比较方便,整个仪器体积也较小,可参考仪器说明书。

使用时,接通电源预热 10 分钟后,将选择开关置于“T”挡,打开样品室盖,以空白液置于光路上,选择所需波长,再将样品室盖上,调节“100”旋钮,使数字显示透光度为 100。将待测样品移进光路,即可从数字表上读出样品液的透光度。如将选择开关置于“A 挡”(空白液时调节消光“0”旋钮为吸光度 0)即可从数字上读出吸光度 A。

如要测定样品浓度,可将标准液移入光路,调节浓度旋钮“C”使数字表上显示出相应的标准值;再将待测样品移入光路,即可从数字表上读出样品的浓度。

五、常用容量仪器的规格、使用、清洗及洗涤液的配制

(一) 容量仪器的规格和使用

1. 量筒

量筒为粗量器,用以量取不需精密计量的液体,不能用来配制标准溶液,常用的量筒有 1000 mL、500 mL、250 mL、100 mL、50 mL、25 mL 等,量取时视线与量筒内液体凹面的最低点在同一水平上,偏高或偏低都会造成较大的误差。

2. 量瓶

量瓶用于制备一定浓度的标准溶液,常用的量瓶有 1000 mL、500 mL、250 mL、100 mL、50 mL、25 mL 等,颈上有环形容积标线,使用量瓶配液时,不要把溶质直接加入量瓶内溶解,须先在烧杯中溶解后借助玻璃棒的引导转入量瓶,烧杯用少量蒸馏水荡洗 3~4 次,将每次荡洗液倾入量瓶内。再加蒸馏水至其液面接近标线时,停 1~2 分钟,换用滴管将蒸馏水加至与标线相切。标线和液体凹面成一水平,然后盖上瓶塞,将量瓶倒转数次,使溶液混匀。量瓶的使用注意事项:

- (1) 量瓶(包括量筒)不可作为加热容器使用。
- (2) 放热或吸热的溶液须待与室温平衡后再转入量瓶内。
- (3) 量瓶用完后立即洗净晾干(不必烘干),不准用量瓶储存溶液。

3. 滴定管

滴定管按其容量大小可分为常量滴定管和微量滴定管两种。

(1) 常量滴定管:常用的滴定管有容积为 50 mL 和 25 mL,按其用途分为酸式滴定管和碱式滴定管两种。

①酸式滴定管附有玻璃活塞:可盛酸性、中性及氧化性(如 KMnO_4 、 I_2 和 AgNO_3) 等溶液,不宜盛碱性溶液,因为碱常使活塞与活塞套粘合,难以转动。

②碱式滴定管:碱式滴定管下端套一段约 10 cm 长的橡皮管(内装玻璃珠)接尖嘴玻璃管,可盛碱性溶液,不宜盛氧化性溶液,因为氧化性物质易与橡皮起作用。

(2) 微量滴定管:总容积分别有 1 mL、2 mL、5 mL 的滴定管,最小刻度的有 0.05 mL 或 0.01 mL,有的附有自动加液装置,微量滴定管尖的口径小,故流出的液滴细小。

滴定管在使用前要检查是否漏水,然后垂直固定于滴定台上。活塞用吸水纸抹干,涂一薄层凡士林油膏并转动。滴定管用蒸馏水洗 2 次,再用滴定液洗 2~3 次,然后盛入滴定液,液面稍高于零,把这一部分溶液放出借以逐出活垫(或橡皮管)中的气泡。为了滴定的准确性,必须熟练掌握旋转活塞的方法,按需要控制流速,严格掌握滴定终点。滴定管的使用注意事项:

①滴定液要缓缓流出,每秒 1~2 滴,微量滴定管 3~5 秒钟 1 滴。不能太快,否则管壁留有液体影响读数的准确性。

②读数时视线与液面成一水平线,数读到最小的一格以内,应尽量估计一格的几分之

几,如最小的一格为 0.1 mL,读数应估计至 0.01 mL 的程度。滴定管按消耗液量的多少作适当选择,如果用大滴管去滴定消耗很少的溶液,误差很大。反之,如果用小滴定管滴定消耗较多的溶液,由于多次添液不仅麻烦而且增加误差。

③操作完毕应将滴定管活塞的凡士林油膏擦去并清洗(见洗涤章节内容)。

4. 吸量管

吸量管是精密的卸量容器,在生化实验中最为常用,分为以下两类:

(1) 单刻度吸量管

①移液管:常用的移液管有 50 mL、25 mL、10 mL、2 mL、1 mL 几种,移液管中间有膨大部分,只能量取全量,该吸量管比多刻度吸量管准确度大,用于准确转移一定体积的溶液。量取时,当量取的溶液自行流出后,使管尖在盛器内壁停留 10~15 秒钟,所余少量液体不可吹出,因为其固定倾出容量已经检定。

②奥氏吸管:常用的奥氏吸管有 3 mL、2 mL、1 mL、0.5 mL 等容量的吸管,它具有球形(或卵圆形)空间。当放出所量取的液体时,管尖余留的液体要吹入盛器内,奥氏吸管的准确度也大于多刻度吸管。

(2) 多刻度吸量管(又称刻度吸管):通常有 10 mL、5 mL、2 mL、1 mL、0.5 mL、0.1 mL 等几种,为直形,管上分有刻度。根据所需取溶液的体积选择其量积大小的刻度吸管。使用多刻度吸量管时,用洗耳球抽气将溶液吸至标线以上,用示(食)指按紧取出,徐徐放出溶液至液面与标线相切为止。将吸量管垂直置于溶液的盛器中。刻度吸管分为“吹出式”和“流出式”,通常 1 mL 以下的刻度吸管为“吹出式”,往往在吸管上端标有“吹”字。其他一般为“流出式”。凡“吹出式”吸管必须将管尖剩余液体吹出。凡“流出式”吸管管尖剩余液体不可吹出。多刻度吸量管使用注意事项:

①多刻度吸量管有的读数自上而下,有的读数自下而上,用时必须看清楚,以免弄错。

②执管时要尽量拿上部,以示指堵住管口,控制流量,刻度数字面要向着自己。

③量取时,吸量管从溶液中取出后(标准液或黏性大的液体)都必须先用滤纸将管的外壁擦干,缓慢放液,使管轻轻接触盛器内壁。

④吸取浓酸或浓碱液以及有毒物质时禁止用口吸。

⑤根据不同的需要使用适当的吸量管,如吸 1.5 mL 溶液选用 2 mL 吸量管为宜,假如选用 1 mL 吸量管则需取 2 次,造成误差机会多。

⑥读数时吸管要垂直,背对光线,视线与标线应在同一水平线上。

⑦多刻度吸量管用完后应立即冲洗(参见洗涤章节),晾干或烘干。

(二) 玻璃仪器的洗涤及各种洗涤液的配制方法

实验中所使用的玻璃仪器清洁与否,直接影响实验结果,往往由于玻璃仪器的不清洁或被污染而造成实验误差,甚至出现相反的实验结果。因此,玻璃仪器的清洗是非常重要的。

1. 初用玻璃仪器的清洗

新购买的玻璃仪器表面常附有游离的碱性物质,可先用肥皂水洗刷再用自来水洗净,

然后浸泡在 1% ~ 2% 盐酸溶液中过夜(不少于 4 小时),再用自来水冲洗,然后用蒸馏水冲洗 2 ~ 3 次。

2. 使用过的玻璃仪器的清洗

(1) 一般玻璃仪器: 如试管、烧杯、锥形瓶、量筒等,先用自来水洗刷至无污物,再选用大小合适的毛刷沾去污粉(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 ~ 3 次,烤干或倒置在清洁处,干后备用。凡洗净的玻璃器皿,不应在器壁上挂有水珠,否则表示尚未洗净,应按上述方法重新洗涤。若发现内壁有难以去掉的污迹,应分别使用下述各种洗涤剂予以清除,再重新冲洗。

(2) 量器: 如吸量器、滴定器、量瓶等。使用后应立即浸泡于凉水中,勿使物质干涸,待工作完毕后用流水冲洗,以除去附着的试剂、蛋白质等物质,晾干后浸泡在铬酸洗液中 4 ~ 6 小时(或过夜),再用自来水冲洗干净,最后用蒸馏水冲洗 2 ~ 3 次,烘干备用。

(3) 比色杯: 用毕反复用自来水冲洗干净,如洗不干净时,可用盐酸或适当的溶剂冲洗,再用自来水冲洗干净。切忌使用管刷或粗的布或纸擦洗,以免损伤比色杯透光度,也应避免用较强的碱或强氧化剂清洗,洗净后倒置晾干备用。

(4) 其他: 盛过有传染性样品的容器,如病毒、传染病患者的血清等沾污过的容器应先进行消毒后再进行清洗。盛过各种毒品,特别是剧毒药品和放射性核素物质的容器,必须经过专门处理,确知没有残余毒物质存在方可进行清洗。

(三) 各种洗涤液的配方及使用

针对仪器沾污物及使用的需要采用不同的洗涤液能有效地洗净仪器。下面介绍几种常用的洗涤液的配方及使用方法。

1. 铬酸洗液

铬酸洗液(重铬酸钾-硫酸洗液,简称为洗液)广泛用于玻璃仪器的洗涤,常用的配制方法有下列 3 种:

(1) 取 100 mL 工业浓硫酸置于烧杯内,小心加热,然后小心慢慢加入 5 g 重铬酸钾粉末,边加边搅拌,待全部溶解后冷却,储于有玻璃塞的细口瓶内。

(2) 常用的铬酸洗液,浓度一般为 3% ~ 5%,配制方法如下: 称取研细的工业品 $K_2Cr_2O_7$ 置于 40 mL 水中加热溶解,冷后,徐徐加入 360 mL 工业用浓 H_2SO_4 (千万不能将水或 $K_2Cr_2O_7$ 溶液加入 H_2SO_4 中),边加边用玻璃棒小心搅拌,并注意不要溅出,因为放热较多, H_2SO_4 不要加得过快,配好后待冷置,装瓶备用。新配制的铬酸洗液为红褐色,氧化能力很强,当铬酸洗液用久后变为绿色即说明洗液已无氧化洗涤能力。洗涤液瓶要加盖,避免硫酸吸水减弱洗涤能力。

(3) 称取 80 g 重铬酸钾,溶于 1000 mL 自来水中,慢慢加入工业用 H_2SO_4 100 mL(边加边用玻璃棒搅动)。

2. 浓盐酸或 1:1 盐酸洗液

用于洗去碱性物质及大多数无机物残渣、水垢等。

3. 碱性洗液

10% 氢氧化钠 (NaOH) 水溶液或乙醇溶液。使用时注意: ①10% 氢氧化钠水溶液加热 (可煮沸) 使用, 其去油污效果较好, 但煮的时间不宜过长, 否则会腐蚀玻璃; ②乙醇溶液不要加热; ③玻璃仪器不可长时间 (24 小时以上) 浸泡; ④从碱性溶液中捞出仪器时, 切忌用手直接取拿, 要戴医用乳胶手套或用镊子夹取, 以免灼伤皮肤。

4. 碱性高锰酸钾洗液

称取 4 g 高锰酸钾, 溶于少量水中, 加入 10% 氢氧化钠溶液 100 mL, 用水稀释至 1000 mL。清洗油污或其他有机物质, 洗后容器沾污处有褐色二氧化锰析出, 再用浓盐酸或草酸洗液将硫酸亚铁、亚硫酸钠等还原剂去除。

5. 草酸洗液

称取 5 ~ 10 g 草酸, 溶于 100 mL 水中, 加入少量浓盐酸。洗涤高锰酸钾洗液洗后产生的二氧化锰, 必要时加热使用。

6. 碘 - 碘化钾溶液

称取 1 g 碘和 2 g 碘化钾, 溶于水中, 用水稀释至 100 mL。用于洗涤盛装硝酸银滴定液后留下的黑褐色沾污物, 也可用于擦洗沾过硝酸银的白瓷水槽。

7. 有机溶剂

苯、乙醚、丙酮、二氯乙烷等, 可洗去油污或可溶于该液剂的有机物质, 用时要注意其毒性及可燃性。用乙醇配制的指示剂溶液的干渣, 可用盐酸 - 乙醇 (1:2) 洗液洗涤。

8. 乙醇 - 浓硝酸混合液 (不可事先混合)

用一般方法很难洗净的有机物可用此混合液清洗。于容器内加入不多于 2 mL 的乙醇, 加入 10 mL 浓硝酸, 静置片刻, 立即发生激烈反应, 放出大量热及二氧化氮, 反应停止后再用水冲洗, 操作应在通风柜中进行, 不可塞住容器, 并做好防护。此种方法的混合液最适合于洗净滴定管, 在滴定管中加入 3 mL 乙醇, 然后沿管壁慢慢加入 4 mL 浓硝酸 (比重 1.4), 盖住滴定管口, 利用所产生的二氧化氮洗净滴定管。

9. 5% ~ 10% 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA - 2Na) 溶液

将已配置好的 5% 乙二胺四乙酸二钠溶液加热煮沸可洗脱玻璃仪器内壁的白色沉淀物。

10. 45% 尿素洗涤液

45% 尿素洗涤液为蛋白质制剂的良好溶剂, 适用于洗涤盛蛋白质制剂及血样的容器。

11. 30% 硝酸溶液

30% 硝酸溶液适宜洗涤 CO₂ 测定仪器及微量滴管。

12. 纯酸、纯碱洗液

(1) 纯酸洗液有: ①浓盐酸; ②浓硫酸; ③浓硝酸。使用时可用浸泡法和浸煮法 (温度不宜太高, 否则浓酸挥发可刺激人)。

(2) 纯碱洗液有: ①10% 以上浓氢氧化钾; ②10% 以上浓氢氧化钾 KOH; ③10% 碳酸

二钠(Na_2CO_3)；使用时可用浸泡法及浸煮法去污(可以煮沸)。

以上这些洗涤方法都是应用物质的物理互溶性及化学性质达到洗净玻璃仪器的目的。在化验室中可以把废酸、回收的有机溶剂等分别收集起来备用。

六、化学试剂的规格与保管

(一) 化学试剂的规格

化学试剂根据其质量分有各种规格品种(品级)，一般化学试剂的分级见表1-1。

表1-1 一般化学试剂的分级

级别	名称	简写	纯度和用途
1	优级纯，保证纯	GR	纯度高，杂质含量低，适用于研究和配制标准液
2	分析纯	AR	纯度较高，杂质含量较低，适用于定性定量分析
3	化学纯	CP	质量略低于2级，用途同上
4	试验试剂 生物试剂 生物染色素	LR BR BS	质量较低，比工业用的高，用于一般定性实验 用于生物化学研究和检验 主要用于生物组织学、细胞学和微生物染色，供显微镜检查

其他还有一些不属于表中规格的试剂，如纯度很高的光谱纯、层析纯、电泳纯及纯度较低的工业用、药典纯等。

实验的试剂需按试验要求的一定规格进行选择，如用于精确的定量分析或配制标准液，需用品级2级以上。有的实验不用更高级的试剂也可达到要求，应尽量不用，如配清洁液只需要粗硫酸。

(二) 化学试剂的保管

化学试剂一般应按其性质分别存放于阴凉、避光、通风的干燥处。某些特殊的化学试剂须用特殊的保管方法。

1. 常用试剂的保管方法

表1-2例出了常用试剂的保管方法。

表1-2 常用试剂的保管方法

保管要求	试 剂
需要密封	
防止潮湿吸湿	氧化钙、氯化钙、氢氧化钠、氢氧化钾、碘化钾、三氯化铁、三氯醋
防止失水风化	酸、浓硫酸结晶硫酸钠、硫酸亚铁、含水磷酸氢二钠、硫代硫酸钠
防止挥发	氨水、氯仿、醚、碘、麝香草酚、甲醇、丙酮
防止吸收 CO_2	氢氧化钠、氢氧化钾
防止氧化	硫酸亚铁、醚、酚、醛类、抗坏血酸和一切还原剂
防止变质	四苯硼钠、丙酮酸钠、乙醚
需要避光	
防止见光变色	硝酸银(变黑)、酚(变淡红)、茚三酮(变淡红)