



“十二五”国家立项重点专业和课程规划系列教材


SHIERWU GUOJIA LIXIANG ZHONGDIAN ZHUANYE HE KECHENG GUIHUA XILIE JIAOCAI

生物工程专业类实践教学系列教材

应用生物化学 实验

张 恒 总主编

张 恒 于 鹤 鹏 主 编

 东南大学出版社
SOUTHEAST UNIVERSITY PRESS

“十二五”国家立项重点专业和课程规划系列教材
生物工程专业类实践教学系列教材

应用生物化学实验

张 恒 总主编

张 恒 于鹤鹏 主 编

东南大学出版社

· 南京 ·

内 容 提 要

生物化学是理论性与实践性并重的专业基础学科,生物化学实验方法和技术是生物化学教学的重要组成部分,生物化学实验所包含的基本技术涉及生物工程、制药工程、食品工程、环境工程、化学工程等多个领域,因此,生物化学实验理论及技术显得尤为重要。作为国家特色专业建设成果、江苏省重点专业类建设成果和江苏省高等教育教学改革重点项目研究成果,本教材以应用型人才培养为目标,以生物工程、食品工程、制药工程等工科相关专业为对象,以基本理论、知识、技能以及思想性、科学性、先进性、启发性、知识性为要求,融入了编者的教学经验和部分科研成果,突出生物化学基础理论的应用特征,力求实现教材内容的准确性、系统性、实用性和新颖性。

全书共四章,分别是第一章生物化学实验须知、第二章基础性实验、第三章综合性实验和第四章设计性实验。

本书可作为高等院校生物工程、食品工程、制药工程等相关工科专业的教材,也可供相关科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

应用生物化学实验 / 张恒,于鹤鹏主编. —南京:东南大学出版社,2013. 11

“十二五”国家立项重点专业和课程规划系列教材
生物工程专业类实践教学系列教材/张恒总主编

ISBN 978-7-5641-

I. ①应… II. ①张… ②于… III. 应用生物化学—实验—高等学校—教材 IV. Q599.33

中国版本图书馆CIP数据核字(2013)第 55860 号



应用生物化学实验

主 编	张 恒 于鹤鹏	责任编辑	陈 跃
电 话	(025)83795627/83362442(传真)	电子邮箱	chenyue58@sohu.com
出版发行	东南大学出版社	出版人	江建中
社 址	南京市四牌楼2号	邮 编	210096
销售电话	(025)83794121/83795801	电子邮箱	press@seupress.com
网 址	http://www.seupress.com		
经 销	全国各地新华书店	印 刷	江苏省测绘院印刷厂
开 本	787 mm×1092 mm 1/16	印 张	7.5
字 数	187千字		
版 印 次	2013年11月第1版 2013年11月第1次印刷		
书 号	ISBN 978-7-5641-4569-9		
定 价	17.00元		

本社图书若有印装质量问题,请直接与营销部联系。电话:025-83791830。

序

生物工程是20世纪70年代初开始兴起的一门新兴的综合性应用学科,该学科是以生物学特别是微生物学及生物化学的理论和技術为基础,结合化工、机械、电子、计算机等现代工程技术,充分运用分子生物学的最新成就,自觉地操纵遗传物质,定向地改造生物或其功能,通过合适的生物反应器对这类“工程菌”或“工程细胞株”进行大规模的培养,生产大量有用代谢产物并发挥其独特生理功能。目前,生物工程技术已广泛渗透到食品、医药、农业、环境、化工等领域,它的广泛应用使传统食品、发酵、饲料等工业领域的生产工艺与手段发生根本性变革。

根据江苏省“十二五”规划纲要以及十大战略性新兴产业重点发展要求,淮阴工学院实施建设了生物工程重点专业类。该专业是由生物工程、食品科学与工程、食品质量与安全三个专业组成。在重点专业建设中我们始终坚持以满足经济社会发展需求为导向,以提升专业人才培养质量为目的,以国家特色专业建设点、江苏省特色专业——生物工程核心专业为基础,将学科基础、知识结构体系、行业技术基础、教学资源相近的食品科学与工程、食品质量与安全专业进行深度交叉融合,作为专业类重点建设的目标,以带动相关专业整体水平的提高。

生物工程类相关专业学科基础和实践环节是在同一平台上实施的,首先,它可以起到深化专业交叉融合、拓宽专业面、增强适应性、拓展应用领域、相互促进、共同发展的作用,并使得相关专业的建设得到较快、全面的提升,形成较完整的专业类特色。其次,在搭建有效地实践教学大平台上,可实现平台资源共享。其三,注重专业间的交叉渗透融合,发挥专业类建设的优势,为区域经济建设提供强有力的人才支撑。

工科专业实践性很强,实践教学占有相当重要的地位。按照人才培养要求,除了在办学定位、人才培养模式、实践教学平台构建等方面凸显工程特色以外,与之匹配的工程类系列教材是不可缺少的。现有的课程实验教材基本沿用传统的课程理论教学体系,工程特色不明显,尚缺乏能覆盖专业所有实践环节、知识点全面、规范性、凸显应用型的实践教学系列教材,且适合于认识实习、生产实习等实践环节的教材则很难寻觅。建设与工程实践环节匹配的系列教材,是解决上述矛

盾的有效途径。

《生物工程专业类实践教学系列教材》是由《应用生物化学实验》、《应用微生物学实验》、《生物工程专业类实习指导书》和《生物工程专业类专业实验》等四册教材构成,涵盖专业基础课、专业课、工程实习、综合训练、毕业设计等专业实践教学各环节,是国家特色专业建设成果、江苏省重点专业类建设成果和江苏省高等教育教学改革重点项目研究成果。本系列教材以应用型人才培养为目标,以生物工程、食品工程、制药工程、环境工程、新能源科学与工程(生物质能)等工科相关专业为对象,以基本理论、知识、技能以及思想性、科学性、先进性、启发性、知识性为要求,融入了编者的教学经验和部分科研成果,突出地方本科院校的应用特征,力求实现教材内容的准确性、系统性、实用性和新颖性。

本系列教材的编写和出版是一次尝试,难免会出现疏漏和错误,恳请读者提出批评意见,以便今后修改和订正。

总主编 张恒

2013年10月

前 言

生物化学是理论性与实践性并重的专业基础学科,生物化学实验方法和技术是生物化学教学的重要组成部分。生物化学实验所包含的基本技术涉及到生命科学的多个领域,其中实验教学可以引导学生深入理解和掌握理论知识,加深对生物化学理论知识的理解,加强动手能力和实践能力的培养,提升实验操作能力、观察分析能力、书写表达能力、独立分析和解决问题的能力。对于生物工程、食品科学与工程、食品质量安全、制药工程、环境工程等相关专业的学生来说,掌握生物化学实验的基本原理和操作技能是不可缺少的。

现代生物化学是生命科学领域高新技术开发与应用的基础,生物工程、制药工程、食品工程、化学工程等学科涉及大量的新型生化产品及生物材料。而应用型人才的培养需要与之匹配的教材,更需要适用于面向工程一线人才培养的教材教学体系,本教材是国家特色专业建设成果、江苏省重点专业类建设成果和江苏省高等教育教学改革重点项目研究成果。

本教材以本科应用型学历教育为特定目标,以生物工程、食品科学与工程、食品质量安全、制药工程等工科相关专业为特定对象,以基本理论、知识、技能以及思想性、科学性、先进性、启发性、知识性为特定要求,融入了编者的教学经验和部分科研成果,突出生物化学基础理论的应用特征,力求实现教材内容的准确性、系统性、实用性和新颖性。目的在于编出适合现在教学改革特点,适合现代教学方式与学习方法,给学生提供高水平知识源泉的体例新颖的教材。

全书共分四章,分别是第一章生物化学实验须知,第二章基础性实验,第三章综合性实验和第四章设计性实验。

本教材编写人员多年从事生物化学理论与实验一线教学,具有丰富的工作经验。全书由张恒和于鹤鹏编写,张恒统稿。在本书的编写过程中,参考了许多国内出版的书籍、网站的相关内容,得到了淮阴工学院生命科学与化学工程学院孙

金凤、方芳、陈军及其他同事和领导的大力支持,提出了许多宝贵意见和建议,使得编写工作得以顺利完成并在内容编写上更加新颖、丰富,在此一并表示感谢。

限于编者水平有限,书中难免有错误和不足之处,敬请读者批评指正,以便今后进一步完善。

编者

2013年10月

目 录

前言	1
第一章 生物化学实验须知	1
第二章 基础性实验	19
第一节 糖组分鉴定及糖定量分析	19
实验一 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖和总糖含量	19
实验二 蒽酮比色法测定总糖	22
实验三 葡萄糖氧化酶法测定血糖含量	24
实验四 纸上色谱法鉴定多糖的单糖组成	26
第二节 脂质分离及定量分析	27
实验五 索氏提取法测定芝麻中粗脂肪的含量	27
实验六 邻苯二甲醛法测定血清总胆固醇的含量	30
实验七 脂质体的制备	32
第三节 蛋白质分离及定量分析	33
实验八 氨基酸纤维素薄层层析	33
实验九 氨基酸纸层析	35
实验十 总氮量的测定——微量凯氏(Mirco-Kjeldahl)定氮法	37
实验十一 茚三酮显色法测定氨基酸含量	41
实验十二 Folin-酚法测定蛋白质含量	43
实验十三 紫外吸收法测定蛋白质含量	45
实验十四 考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量	47
实验十五 小麦蛋白质组分的分离提取	50
实验十六 细胞色素 C 的制备及其测定	51
第四节 酶的制备及活力测定	54
实验十七 淀粉酶活力测定	54
实验十八 纤维素酶活力测定	57
实验十九 超氧化物歧化酶活力测定	62
实验二十 过氧化物酶活性的测定	66
实验二十一 固定化木瓜蛋白酶的制备	67
第五节 核酸分离及定量分析	70

实验二十二	酵母 RNA 的分离与纯化	70
实验二十三	酵母 RNA 的分离及组分鉴定	72
实验二十四	地衣酚显色法测定 RNA 含量	73
实验二十五	醋酸纤维素薄膜电泳法分离鉴定三种腺苷酸	75
实验二十六	植物 DNA 的提取与测定	77
实验二十七	紫外吸收法测定核酸的含量	80
实验二十八	核酸的琼脂糖凝胶电泳	82
第三章 综合性实验		85
实验二十九	真菌多糖的分离、纯化及鉴定	85
实验三十	红细胞膜的制备及其膜磷脂分析	88
实验三十一	聚丙烯酰胺凝胶电泳分离过氧化物同工酶	91
实验三十二	质粒 DNA 的提取、酶切与鉴定	95
实验三十三	植物 DNA 提取及 PCR 分析	98
实验三十四	小麦胚芽油的制备及维生素 E 含量的测定	100
第四章 设计性实验		103
实验三十五	α -淀粉酶最适催化条件选择	103
实验三十六	维生素 C 含量的测定及主要生物学功能评判	104
实验三十七	生物膜组分鉴定及生物膜技术应用	106
实验三十八	鉴别地沟油	107
实验三十九	蛋白氮与非蛋白氮的定量分析	108
实验四十	蛋白质分离纯化方法的选择与比较	109
实验四十一	用正交试验法设计实验方案	110
参考文献		112

第一章 生物化学实验须知

一、生物化学实验目的

生物化学是一门理论与实验紧密结合的应用学科,生物化学实验方法和技术是生物化学教学的重要组成部分,对于生物工程、食品科学与工程、食品质量安全、制药工程、环境工程、农业工程等相关专业的学生来说,掌握生物化学实验的基本原理和操作技能是不可缺少的。生物化学实验所包含的基本技术涉及生命科学的多个领域,实验教学可以引导学生深入理解和掌握理论知识,加深对生物化学理论知识的理解,加强动手能力和实践能力的培养,提升实验操作能力、观察分析能力、书写表达能力、独立分析和解决问题的能力。

生物化学实验的目的有以下几点:

(1) 掌握基本的生物化学实验操作技能,如常见仪器的使用、试剂的配制、生命物质分离、纯化及分析的技术等,为学习后续课程、完成毕业论文、胜任实际生产与科研等工作奠定基础。

(2) 通过生物化学实验进行验证、运用、总结和延伸,最终达到理解并掌握生物化学的基本理论和基本知识的目的。通过基础性实验、综合性实验、设计性实验三个不同层次的实验教学,学生在掌握了基本知识的基础上,尝试自行设计实验方案,分析处理实验数据,得出合理的实验结果,可以进一步提升综合应用能力、分析设计能力、逻辑思维能力、解决问题的能力,以及创新求实的工作作风。

(3) 培养工程意识和工程能力,当生化产品实际生产和科学研究中遇到问题时,如产品开发、质量控制、安全保障、绿色生产等涉及的方方面面,能够利用已掌握的生物化学基础知识和实验技能,采用科学方法,迅速响应,及时给出应对措施,正确解决问题,稳定生产秩序。

二、生物化学实验室规则及常识

(1) 严格遵守纪律,不迟到,不早退。进入实验室必须穿好实验工作服。

(2) 实验前清点好仪器、用具与试剂,实验台面应随时保持整洁,仪器、药品摆放整齐。

(3) 试剂取用后立即盖好放回原处,切忌“张冠李戴”。公用试剂用毕,应立即盖严放回原处。勿使试剂、药品洒在实验台面和地面上。

(4) 废液废纸倒入指定容器内。

(5) 爱护公物,节约水、电、试剂,遵守损坏仪器报告、登记、赔偿制度。

(6) 严格按照操作规程使用仪器,凡不熟悉操作方法的仪器不得随意动用。对贵重仪器必须先熟知使用方法,才能开始使用;仪器发生故障,应立即关闭电源并报告老师,不得擅自拆修。

(7) 实验完毕,将有关仪器和器材洗净归置好,值日生负责整个实验室的清洁和整理,保

持实验室整洁卫生。

(8) 实验室内应保持安静,不得嬉戏打闹。

(9) 我国实验室化学试剂分级及用途

表 1-1 我国化学试剂分级及用途

	一级试剂	二级试剂	三级试剂	四级试剂	生物试剂
级别	保证试剂 G. R	分析纯 A. R	化学纯 C. R	实验试剂 L. R	B. R 或 C. R
	绿色标签	红色标签	蓝色标签	化学用	
用途	适用于最精确的 分析及研究	适用于精确地微 量分析	适用于一般的微 量分析	适用于一般定性 检测	根据说明使用

三、生物化学实验课教学要求

(1) 实验课前认真预习实验内容,了解实验原理和基本操作过程,明确实验目的、原理、操作步骤及注意事项等,写出预习报告。

(2) 实验过程中不做与实验无关的事情,不妨碍他人实验。

(3) 加强移液、混匀、过滤等基本技能训练,熟悉分光光度计、离心机等常用仪器的使用方法。

(4) 如实记录实验数据,仔细分析,得到客观结论。若实验失败,应认真查找原因,不得任意涂改实验结果。

(5) 按要求及时写好实验报告并按时上交。

四、实验报告书写要求

用专用的实验报告手册(或报告纸)书写,内容包括以下几方面。

1. 标题

包括课程和实验名称、实验者姓名、实验日期。

2. 目的和原理

以文字或反应方程式的形式,简明扼要地概括实验目的和原理。

3. 方法与步骤

尽量以流程图或表格的形式呈现,简要表示操作步骤和操作方法。

4. 记录

实验现象和实验数据的记录要做到及时、准确、详尽、真实、清楚。

避免回顾性记录,以免造成无意或有意的失真。准确、真实地记录实验现象,不能照搬教材等资料文献中的描述,实验中可能会遇到实际现象和数据与教材不一致的情况;不可掺杂任何主观因素,切忌拼凑实验数据和结果,对于一些异常的现象和数据更要如实记录。

具体记录实验现象的所有细节,包括速度、颜色、大小、形状、多少,以及仪器的型号、生产厂家、生产日期、实验室编号等。

5. 数据处理及结果分析

根据实验要求,整理、归纳数据,计算得出结果,包括根据实验数据及计算结果作出的各种

图表及从图表得出的结果。对于一些与书本资料不一致或者异常的现象和数据,更应该分析查找原因。简要说明本次实验的结果和结论,亦可阐述对实验设计的认识、体会及建议。

五、实验误差的来源与提高准确度的方法

生命物质定量分析的结果,受分析方法、测量仪器、所用试剂和分析工作者等方面的限制,测量值与客观存在的真实值相比或多或少存在误差。这些误差一般分为系统误差和偶然误差两类,了解这些误差的可能来源,可以尽量减少误差、提高实验准确度。

1. 系统误差

测定过程中某些经常发生的原因产生系统误差,此类误差对测定结果的影响比较稳定,在同一条件下重复测定中常重复出现,使测定结果偏高或偏低,而且大小有一定规律,往往可以测定出大小与正负,主要来源于方法误差、仪器误差、试剂误差和个人操作误差 4 个方面。

此类误差可以通过标准物对照、设置空白试验、校正仪器等手段减少或消除。

2. 偶然误差

偶然误差来源于某些难以预料的偶然因素,造成同一实验者在同样条件下进行一系列测定时,每一次测量的结果都略有不同。造成此类误差的原因可能与取样的随机性是否充分、测定过程中是否有不易控制的外界因素(如环境、温度、湿度和气压的微小波动等)的影响有关。

通过平均取样及多次取样进行平行测定,并计算平均值,可以有效地减少偶然误差。

六、生物化学实验基本操作

1. 玻璃仪器的洗涤

(1) 洗涤

玻璃仪器清洁与否与实验结果的准确程度及误差大小密切相关。玻璃仪器是否清洗干净,以倒置时壁上不挂水珠为准。

一般的玻璃仪器,如试管、烧杯、量筒等,用毛刷刷洗,刷洗程序为先用自来水刷洗,再用毛刷蘸取洗衣粉或去污粉将仪器内外仔细洗刷,重点是内壁,用自来水冲洗干净后,再用蒸馏水刷洗 2~3 次,倒置于仪器架上晾干备用。

无法用毛刷刷洗的量器,如刻度吸管、容量瓶等,应先用自来水冲洗、沥干,再用洗液浸泡 4~6 h,取出并沥干后,用自来水冲洗干净,再用蒸馏水刷洗 2~3 次,倒置于量器架上晾干备用。

新购量器表面常附有游离的碱性物质及泥污,先用洗衣粉或去污粉洗刷再用自来水洗净,然后浸泡在 1%~2% 盐酸溶液中至少 4 h,自来水冲洗干净,最后再用蒸馏水刷洗 2~3 次,倒置于仪器架上晾干或置于 80~100 °C 烘箱内烘干备用。

(2) 洗液的种类和用途

各种洗液均可反复使用,但是使用前必须将待洗涤的玻璃仪器先用水冲洗多次,除去洗衣粉、去污粉或各种废液。若仪器上有凡士林或羊毛脂时,应先用软纸擦去,然后用乙醇或乙醚擦净后才能使用洗液,否则会使洗液迅速失效。

① 铬酸洗液:广泛用于玻璃仪器的洗涤。肥皂水、乙醇、甲醛等有机溶剂及少量油污都会使洗液变绿,降低洗涤能力。

称取 5 g 重铬酸钾粉末置于 250 mL 烧杯中,加水 5 mL 尽量使其溶解。慢慢加入浓硫酸 100 mL,随加随搅拌。冷却后贮存备用。

亦可称取 200 g 重铬酸钾,溶于 500 mL 水,慢慢加入工业硫酸 500 mL,边加边搅拌。

② 浓盐酸:可洗去水垢或某些无机盐沉淀。

③ 5%草酸溶液:用数滴硫酸酸化,可洗去高锰酸钾的痕迹。

④ 5%~10%磷酸三钠溶液:可洗涤油污。

⑤ 30%硝酸溶液:洗涤 CO_2 测定仪器及微量滴管。

⑥ 5%~10%乙二胺四乙酸二钠($\text{EDTA}-\text{Na}_2$)溶液:加热煮沸可洗脱玻璃仪器内壁的白色沉淀物。

⑦ 尿素洗液:该洗液为蛋白质的良好溶剂,适用于洗涤蛋白质制剂及血样的容器。

⑧ 酒精与浓硝酸混合液:适合于洗净滴定管,在滴定管中加入 3 mL 酒精,然后沿管壁慢慢加入 4 mL 浓硝酸,盖住滴定管管口,利用所产生的氧化氮洗净滴定管。

⑨ 有机溶剂:丙酮、乙醇、乙醚等可用于洗脱油脂、脂溶性染料等污痕。二甲苯可洗脱油漆的污垢。

⑩ 氢氧化钾的乙醇溶液和含有高锰酸钾的氢氧化钠溶液:用于清除容器内壁污垢。这是两种强碱性的洗液,对玻璃仪器的侵蚀性很强,洗涤时间不宜过长。使用时应小心慎重。

2. 吸量管的选择和使用

(1) 选择

吸量管是生物化学实验中必备的量取液体的仪器,常用的刻度吸量管有 10 mL、5 mL、2 mL、1 mL、0.5 mL、0.1 mL 等不同的规格,可任意量取 0.01~10 mL 的液体。使用前根据需要选择适当的吸量管,其总容量最好等于或稍大于取液量。临用前看清容量和刻度。

(2) 使用

采用正确的执管方法,用右手拇指、中指及无名指掌控吸量管的上部,用食指堵住管口控制液体流速及流量,切忌用大拇指堵住管口,面向刻度数字,便于操作。左手捏压洗耳球,将吸量管的尖端插入所取试剂液面下,将洗耳球的下端出口对准吸量管上口,使液体缓缓上移至最高刻度上端 1~2 cm 处,迅速用食指堵住管口,阻止管中液体流出。利用食指的压紧程度调节管中液体高度直至达到所需刻度,注意观察刻度读数应保持管中液面、视线和刻度在同一水平线上。将吸量管转移至指定的容器内,吸管尖端接触容器内壁,但不能插入容器原有液体中,以免污染吸管及试剂。放松食指,让液体自然流出。放液后吸管尖端残留的液体是否吹出,视所选用的吸量管种类要求而定。若管壁有“吹”的字样则需要吹出,若无需吹出,则让吸量管尖端停靠内壁约 15 s,同时转动吸管,重复一次。用后及时清洗。

3. 可调式微量移液器的使用

可调式移液器是连续可调的通用微量移液器,适用于液体的精确取样和转移。常见的有手动单道、手动多道、电动单道、电动多道等几种类型。微量移液器习惯上称为移液枪,是一活塞式吸管,利用空气排放原理进行工作,以活塞在活塞套内移动的距离确定移液器的容量,用于量取少量或微量液体。移液器由定位部件、容量调节指示部分、推顶装置、活塞套和吸液嘴等组成。采用高强度、无污染、抗化学腐蚀的高分子材料制成。

使用移液器应先设定容量值即移液量,可调式移液器应在允许容量范围内调节。连续可

调式移液器容量计读数由三位有效数字组成(显示所转移液体容量),从上(最大有效数字)到下(最小有效数字)读取,利用底部刻度可将容量刻度调节到更精确的分度。容量范围自 $0.5\sim 1\,000\ \mu\text{L}$ 不等。

移液器移放液操作包括吸液和放液两个步骤。垂直地握住移液器,将按钮掀到第一停止点,并把吸液嘴浸入到液面下 $2\sim 3\ \text{mm}$ 处,缓慢平稳地松开按钮,吸取液样,待移液器吸满液体后等待 $1\sim 2\ \text{s}$,然后将吸嘴脱离液面,贴壁停留 $2\sim 3\ \text{s}$,使管尖外侧的液滴滑落。然后将吸液嘴移至加样容器内壁上,缓慢地把按钮掀到第一停止点,等待 $1\sim 2\ \text{s}$,再把按钮压到第二停止点,停留 $1\sim 2\ \text{s}$ 以排出剩余液体。若吸取不同液体时需更换吸液嘴。

为了保证吸液的精密度和准确度,装上新吸嘴或改变吸取的容量值时应先吸入一次液样并将之排回原容器中,反复 $2\sim 3$ 次,达到预洗吸嘴的目的。第一次吸取的液体会在吸嘴内壁形成液膜,导致计量误差。同一吸嘴在连续操作时液膜相对保持不变,故第二次吸液可消除误差。

使用移液器应注意以下几点:(1) 取液前所取液体应在 $15\sim 25\ ^\circ\text{C}$ 下,与室温平衡,若吸液温度与室温有差异时将吸头预洗多次再用。移液温度不得超过 $70\ ^\circ\text{C}$ 。(2) 吸嘴浸入液体的深度要合适,吸液过程尽量保持不变。吸取液体时应缓慢匀速吸取,避免液体溅到移液器头上。(3) 调整取液量的旋钮时,不要用力过猛,并注意计数器显示的数值不要超过其可调范围。(4) 连续可调式移液器在取样加样过程中应注意吸嘴不能触及其他物品,以免被污染;吸嘴盒(架子)、废液瓶、所取试剂及加样的样品管应摆放合理,以方便操作过程、避免污染为原则。(5) 改吸不同液体、样品或试剂前要换新吸嘴;发现吸嘴内有残液时要换新吸嘴。新吸嘴使用前要预洗。(6) 当吸嘴内有液体时不可将移液器平放、倒转,以防液体进入移液器套筒内。(7) 使用了酸或有腐蚀蒸汽的溶液后,最好拆下套筒,用蒸馏水清洗活塞及密封圈;切勿用油脂等润滑活塞及密封圈。拆洗后的移液器要经校准后方可使用。(8) 连续可调式移液器在使用完毕后应置于移液器架上,远离潮湿及腐蚀性物质。应定期校准、调试,不要自行拆开。

微量移液器的标定通常采用蒸馏水称量法。

4. 测量 pH

pH 是溶液酸碱度的表示方法,是液体介质酸碱度的量化形式,应用范围在 $1\sim 14$ 之间,pH=7 呈中性,pH<7 呈酸性,pH>7 呈碱性。适用于不大于 $0.1\ \text{mol/L}$ 的酸度($[\text{H}^+]$)或碱度($[\text{OH}^-]$)浓度范围。常用的 pH 测量方法有 pH 指示剂法、pH 试纸法和酸度计(pH 计)法。前两者因观测者对颜色的判断存在个体差异,导致测定结果有较大的不一致性,而酸度计法则可避免这种误差。

(1) pH 指示剂法

根据待测溶液 pH 指示剂的颜色变化,判断溶液的 pH,变色点 pH 及颜色变化随着指示剂的不同而不同。

(2) pH 试纸法

pH 试纸分为广泛试纸和精密试纸,根据需要选择试纸类型,通过试纸的对照比色卡判断溶液的 pH。

(3) pH 计(酸度计)法

pH 计又称为酸度计,应用“电位法”测量溶液 pH,属于电化学式分析仪器,广泛应用于工业、电力、农业、医药、食品、科研和环保等领域。pH 计是一种常用的小型仪器,主要用来精密

测量液体介质的酸碱度值,配上相应的离子选择电极也可以测量离子电极电位 mV 值。pH 计有笔式(迷你型)、便携式、台式、在线式等多种类型。

pH 计由参比电极、指示电极和电流计三个部件构成,通过测量电池的电动势获得 pH。常用 pH 计的电池通常由饱和甘汞电极为参比电极,玻璃电极为指示电极。在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,溶液 pH 每变化 1 个单位,对应于电位差改变 59.16 mV ,在仪器上直接以 pH 的读数表示,其读数可以精确到小数点后两位。仪器上有温度差异补偿装置。

测定 pH 时,应严格按仪器的使用说明书操作,并注意下列事项:

① 通常采用二点法校准。测定前,按各品种项下的规定,选择两种 pH 约相差 3 个 pH 单位的标准缓冲液,并使供试液的 pH 处于两者之间。

② 取与供试液 pH 较接近的第一种标准缓冲液对仪器进行校正(定位),使仪器示值与表列数值一致。

③ 仪器定位后,再用第二种标准缓冲液核对仪器示值,误差应不大于 ± 0.02 pH 单位。若大于此偏差,则应小心调节斜率,使示值与第二种标准缓冲液的表列数值相符。重复上述定位与斜率调节操作,至仪器示值与标准缓冲液的规定数值相差不大于 0.02 pH 单位。否则,需检查仪器或更换电极后,再进行校正至符合要求。

④ 每次更换标准缓冲液或供试液前,应用纯化水充分洗涤电极,然后将水吸尽,也可用所换的标准缓冲液或供试液洗涤。

⑤ 在测定高 pH 的供试品和标准缓冲液时,应注意碱误差的问题,必要时选用适当的玻璃电极测定。

⑥ 对弱缓冲或无缓冲作用溶液的 pH 测定,先用邻苯二甲酸氢钾标准缓冲液校正仪器后测定供试液,并重取供试液再测,直至 pH 的读数在 1 min 内改变不超过 ± 0.05 ;然后再用硼砂标准缓冲液校正仪器,再如上法测定;二次 pH 的读数相差应不超过 0.1 ,取两次读数的平均值为其 pH。

5. 比色

生物组分的定量分析,常常采用比色法。应根据需要选择可见光或紫外光分光光度计,不同厂家生产的光度计其种类和型号有差异,但操作基本相当。操作步骤一般如下:

(1) 打开暗箱盒盖子,开机预热 $15\sim 20\text{ min}$ 。

(2) 选择适宜的波长 λ 和相应的灵敏度档。

(3) 开盖状态下,调节 $T=0$;以参比液作为基准,调节 $T=100\%$,则将参数调节至吸光度, $A=0$ (调零)。或者直接开盖调 $T=0$,关盖调 $T=100\%$,则测定空白液,也将得到一吸光度值的数据,作标准曲线时可以在测定数据中扣除该数值,或者以该数值为起点,则标准曲线上移一定距离。

(4) 拖动拉杆,使待测液处于光路中,读数。读数完毕,应立即打开比色槽暗箱盖子。每个样品最好反复读数 3 次左右。

(5) 测定完毕,拔下插头。

(6) 使用比色皿的注意事项

操作时应该小心取放比色皿;紫外区测定时需用石英比色皿;切勿用手接触比色皿的透光

面;应用擦镜纸或软的吸水纸擦拭比色皿外壁;皿内被测液以皿高的 $\frac{3}{4}$ 为宜;测定前先用待测液浸润比色皿内壁2~3次;若被测液有浓度梯度则应按照从稀到浓的原则依次测定;清洗比色皿一般用水冲洗,若被有机物污染,宜用1:2盐酸-乙醇混合液浸泡后再冲洗,切勿用碱液或强氧化性洗涤液清洗,不能用毛刷刷洗,以免比色皿表面受损。

6. 过滤和离心

过滤和离心都可以使沉淀与母液分开。生物化学实验中常采用过滤的方法收集滤液、收集沉淀和洗涤沉淀。收集滤液应选用干滤纸,避免湿滤纸影响滤液的稀释比例。当沉淀黏稠、沉淀颗粒过小或者与滤纸发生反应而无法过滤时,则需选用离心法。

离心机种类很多,操作中应注意以下几点:

(1) 将离心机置于平坦和结实的地面或实验台面上。

(2) 装入待离心液体,处于对角线位置的对称离心管(包括其外套管),应放在托盘天平上平衡。装入离心管中的液体量以距管口1~2 cm为宜;挥发性溶液或离心管无盖的情况下,所装溶液的体积不应超过总体积的 $\frac{2}{3}$,以免在离心时液体甩出,失去平衡。将离心管和外套管紧固在对角线的位置,并确认安装正确。

(3) 根据要求设置转速和时间。

(4) 离心完毕,关闭电源开关,待惯性转动停止后按动开锁钮,开盖取样。使用后应擦拭污物。运转中严禁开盖,严禁用手或其他物件迫使离心机转头停转。

(5) 离心机启动后,如有不正常的噪音或振动,应立即切断电源,关机处理。

7. 恒温摇床的使用

恒温摇床也称为振荡器,是常用的实验室生化仪器设备,用于液体培养和制备生物样品,是生命科学领域科研、教育和生产部门作精密培养制备不可缺少的。摇床一般具有控温、调速、定时等功能,培养箱、振荡器于一体。常用的摇床有水浴摇床和气浴摇床两大类。由于水在100℃沸腾汽化,水浴摇床的最大控温点在100℃以下,气浴摇床的控温范围比水浴摇床大得多,控温点超过100℃则需使用气浴摇床。

摇床的型号规格有多种多样,应严格按仪器的使用说明书操作,其操作内容基本包括如下几点。

(1) 接通电源。

(2) 设定工作时间,如需长时间工作,将定时器调至“常开”位置。

(3) 设定恒温温度。

(4) 设定振荡或回旋方式。

(5) 装瓶,为使仪器工作时有较好的平衡性能,避免产生较大的振动,装瓶时应将所有的瓶位布满,各瓶的装液量应大致相等,其装液量不得超过容器总体积的 $\frac{2}{3}$ 。若培养瓶数量不足,可对称放置。

(6) 开启恒温摇床装置。

(7) 调节振荡速度旋钮至所需的振荡频率,有些仪器有回旋、多向振荡等功能,根据需要

选择。

(8) 工作完毕将转速调至最低点,关闭所有按钮,切断电源。

(9) 清洁机器,保持干净。

七、常用酸碱指示剂的配制

配制指示剂通常用 0.1 mol/L NaOH 或 0.1 mol/L HCl 调节至中间色调。

表 1-2 常用酸碱指示剂配制

指示剂名称	变色 pH 范围	配制方法
甲酚红(酸)	0.2~1.8 红↔黄	0.1 g 溶于 2.62 mL 0.1 mol/L NaOH,蒸馏水稀释至 250 mL
百里酚蓝 (麝香草芬兰)	1.2~2.8 红↔黄	0.1 g 溶于 2.15 mL 0.1 mol/L NaOH,蒸馏水稀释至 250 mL
甲基黄	2.0~4.0 红↔黄	0.1 g 溶于 250 mL 95%乙醇
甲基橙	3.1~4.4 红↔橙黄	0.1 g 溶于 3 mL 0.1 mol/L NaOH,蒸馏水稀释至 250 mL
溴酚蓝	2.8~4.6 黄↔蓝紫	0.1 g 溶于 1.49 mL 0.1 mol/L NaOH,蒸馏水或 20%乙醇稀释至 250 mL
溴甲酚绿 (溴甲酚蓝)	3.8~5.4 黄↔蓝	0.1 g 溶于 1.43 mL 0.1 mol/L NaOH,蒸馏水稀释至 250 mL
甲基红	4.3~6.1 红↔黄	0.1 g 溶于 250 mL 水(钠盐)或 60%乙醇(游离酸)
溴甲酚紫	5.2~6.8 黄↔红紫	0.1 g 溶于 1.85 mL 0.1 mol/L NaOH,蒸馏水或 20%乙醇稀释至 250 mL
石蕊	5.0~8.9 红↔蓝	0.1 g 溶于 250 mL 蒸馏水
中性红	6.8~8.0 红↔橙棕	0.1 g 溶于 250 mL 70%乙醇
酚酞	8.3~10.0 无色↔粉红	0.1 g 溶于 250 mL 70%乙醇
混合指示剂	3.2~3.4 蓝紫↔绿	1份 0.1%甲基黄乙醇溶液 1份 0.1%甲烯蓝乙醇溶液
	5.2~5.6 红紫↔绿	4份 0.1%甲基红乙醇溶液 1份 0.1%甲烯蓝乙醇溶液
	7.0 蓝紫↔绿	1份 0.1%中性红乙醇溶液 1份 0.1%甲烯蓝乙醇溶液,贮于深色瓶中
	8.6~9.0 浅绿↔紫	1份 0.1%α-萘酚乙醇溶液 3份 0.1%酚酞乙醇溶液