

北京高等教育精品教材建设立项项目

国家示范性高职院校建设项目成果系列教材

生物技术综合实训指导

辛秀兰

主编

.....

SHENGWU
JISHU ZONGHE
SHIXUN ZHIDAO



化学工业出版社

· 北京 ·

本书为国家示范性高职院校一线教师和企业专家共同开发的教改成果教材。本教材围绕高职高专生物技术相关专业的培养目标,在能力本位、就业导向、任务驱动、工学结合等职业教育新理念的指导下,阐述了生物相关技术应用的基础原理与实践操作技术,共十五章,包括无机化学、有机化学、分析化学、生物化学、微生物学、仪器分析、食品分析、药物分析、生物分离、细胞工程、基因工程、发酵工程、酶工程、生物制药等的实训技能操作项目。

本书可作为高职高专生物技术相关专业的教材,也可供相关技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物技术综合实训指导/辛秀兰主编. —北京:化学工业出版社, 2011. 8
国家示范性高职院校建设项目成果系列教材
ISBN 978-7-122-07870-4

I. 生… II. 辛… III. 生物技术-高等职业教育-教材
IV. Q81

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 110826 号

责任编辑:李植峰 梁静丽

文字编辑:周 侗

责任校对:顾叔云

装帧设计:张 辉

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装:大厂聚鑫印刷有限责任公司

787mm×1092mm 1/16 印张 15 $\frac{3}{4}$ 字数 445 千字 2011 年 8 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询:010-64518888 (传真:010-64519686)

售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价: 32.00 元

版权所有 违者必究

“国家示范性高职院校建设项目成果系列教材”

建设委员会成员名单

主任委员 安江英

副主任委员 么居标

委 员 (按姓名汉语拼音排列)

安江英 陈洪华 陈淦漪 龚戈淬 马 越
苏东海 王利明 辛秀兰 么居标 张俊茹
钟桂英 周国烛

“国家示范性高职院校建设项目成果系列教材”

编审委员会成员名单

主任委员 辛秀兰

副主任委员 马 越

委 员 (按姓名汉语拼音排列)

曹奇光 陈红梅 陈禹保 高春荣 兰 蓉
李 淳 李双石 李晓燕 刘俊英 刘 玮
刘亚红 鲁 绯 马长路 马 越 师艳秋
苏东海 王晓杰 王维彬 危 晴 吴清法
吴志明 谢国莉 辛秀兰 杨春花 杨国伟
苑 函 张虎成 张晓辉

《生物技术综合实训指导》编写人员

主 编 辛秀兰

副 主 编 李 晔（北京电子科技职业学院）

编写人员（按姓名汉语拼音排列）

安明显（黑龙江农业职业技术学院）

杜雪岭（中国石化润滑油公司）

李 楠（黑龙江农业职业技术学院）

李 晔（北京电子科技职业学院）

刘 玮（北京电子科技职业学院）

王 涛（黑龙江农业职业技术学院）

吴志明（北京电子科技职业学院）

辛秀兰（北京电子科技职业学院）

前 言

本书围绕高职高专相关专业的培养目标，在能力本位、就业导向、任务驱动、工学结合等职业教育新理念的指导下，阐述了生物相关技术应用的基础原理与实践操作技术，共十五章，内容涉及与生物、化学及制药相关的各种具体实训，包括无机化学、有机化学、分析化学、生物化学、微生物学、仪器分析、食品分析、药物分析、生物分离、细胞工程、基因工程、发酵工程、酶工程、生物制药等的实训技能操作项目。本书突出了以下特点。

第一，突出工学结合与校企合作。本书在内容上，力求学校教学与现场操作相结合；在编写队伍上，由优秀教师与企业优秀人才精诚合作，共同完成，确保了本书的实用性。

第二，实践为主，理论联系实际。理论教学以“必需、够用”为度，同时也是为实训做准备，整体教与学的过程是在一个实践的大平台上完成的，核心目标是培养学生实际动手操作的能力。

第三，依循职业教育特点，满足职业发展需要。本书的编写主要针对从事职业教育学习的学生，让学生从易到难、由浅入深地进行理解和学习，并一步步成长为职业能手。

为了使本书适应行业发展及高职教育的需要，我们参考了大量的国内外有关文献，并结合自己的教学经验和实验经验进行了编撰，但由于作者水平有限，难免会有疏漏与不妥之处，敬请广大读者与同仁批评指正。

编者

2011年2月

目 录

第一章 绪论	1	一、生物化学实验室的一般知识	54
第一节 生物技术相关学科概述	1	二、生化玻璃仪器的洗涤及各种洗液的配制法	56
第二节 基础实验技术简介	3	三、植物样品的采集、处理与保存	57
一、蒸馏	3	四、生物化学实验室常用仪器	58
二、分馏	4	第二节 生物化学综合实训项目	63
三、高效液相色谱	4	实训 5-1 植物体内可溶性蛋白质含量的测定	63
四、气相色谱	5	实训 5-2 菜花中核酸的分离和鉴定	66
五、滴定分析	6	第六章 微生物学综合实训	70
六、分光光度分析	7	第一节 微生物学实验基础	70
七、发酵罐的使用	7	一、微生物实验室的一般知识	70
八、PCR 技术	9	二、微生物实验常用玻璃器皿的清洁方法	70
九、转化	10	三、微生物实验基本操作技术	72
十、细胞培养	11	四、微生物实验室的主要设备	77
十一、酶的固定化	13	第二节 微生物学综合实训项目	81
第二章 无机化学综合实训	14	实训 6-1 空气中微生物的检测和计数	81
第一节 无机化学实验基础	14	实训 6-2 食品中细菌总数和大肠杆菌总数的测定	83
一、无机化学实验室的一般知识	14	第七章 仪器分析综合实训	89
二、无机化学实验常用仪器	15	第一节 仪器分析实验基础	89
三、无机化学实验基本操作	19	一、仪器分析与化学分析的关系	89
第二节 无机化学综合实训项目	20	二、常用仪器分析方法	90
实训 2-1 缓冲溶液的配制及 pH 计的用法	20	第二节 仪器分析综合实训项目	96
实训 2-2 茶叶中一些元素的分离和鉴定	23	实训 7-1 高效液相色谱法检测食品中的糖精钠	96
第三章 有机化学综合实训	25	实训 7-2 食用植物油中叔丁基对苯二酚的测定	99
第一节 有机化学实验基础	25	第八章 食品分析综合实训	104
一、有机化学实验室的一般知识	25	第一节 食品分析实验基础	104
二、常用的仪器和实验装置	27	一、食品检验样品的采集与处理	104
三、有机化学反应的实施方法	30	二、食品品质指标检测技术	107
第二节 有机化学综合实训项目	33	第二节 食品分析综合实训项目	112
实训 3-1 工业乙醇的蒸馏与分馏	33	实训 8-1 午餐肉中脂肪含量的测定——重量分析法	112
实训 3-2 阿司匹林的制备	36	实训 8-2 方便面中铅含量的测定——二硫腈比色法	114
第四章 分析化学综合实训	39	第九章 药物分析综合实训	119
第一节 分析化学实验基础	39	第一节 药物分析实验基础	119
一、分析化学实验室的一般知识	39	一、药物分析的基础知识	119
二、分析化学中的误差及分析数据的处理	40	二、药物的杂质检查	120
三、滴定分析法	44	三、各类药物的分析	121
四、重量分析法	45	四、药物制剂分析	126
五、比色分析法	47		
第二节 分析化学综合实训项目	48		
实训 4-1 水样中化学需氧量的测定	48		
实训 4-2 水硬度的测定	50		
第五章 生物化学综合实训	54		
第一节 生物化学实验基础	54		

第二节 药物分析综合实训项目	127	三、基因工程常用仪器	201
实训 9-1 头孢氨苄的质量检验	127	第二节 基因工程综合实训项目	204
实训 9-2 阿司匹林肠溶片的质量检验	129	实训 12-1 大肠杆菌感受态细胞的制备和 转化	204
第十章 生物分离综合实训	134	实训 12-2 PCR 反应及其产物检测	207
第一节 生物分离实验基础	134	第十三章 发酵工程综合实训	214
一、生物分离概述	134	第一节 发酵工程实验基础	214
二、细胞破碎与固液初级分离技术	135	一、发酵工程实验室的一般知识	214
三、萃取分离技术	137	二、发酵工程基本操作	214
四、沉析分离技术	140	第二节 发酵工程综合实训项目	218
五、膜分离技术	147	实训 13-1 黑曲霉发酵生产柠檬酸	218
六、静态吸附与离子交换分离技术	153	实训 13-2 葡萄酒的酿制	221
七、色谱分离技术	157	第十四章 酶工程综合实训	225
八、电泳分离技术	172	第一节 酶工程实验基础	225
九、浓缩、结晶与干燥	175	一、酶工程实验室的一般知识	225
第二节 生物分离综合实训项目	176	二、酶工程基本知识	225
实训 10-1 钙盐-离子交换法提取(分离 提纯)柠檬酸	176	第二节 酶工程综合实训项目	228
实训 10-2 从肉桂皮中提取肉桂油及其主要 成分的鉴定	179	实训 14-1 蛋清溶菌酶的制备及活力 测定	228
第十一章 细胞工程综合实训	182	实训 14-2 果胶酶的固定化及其活力 测定	230
第一节 细胞工程实验基础	182	第十五章 生物制药综合实训	234
一、细胞工程实验室的一般知识	182	第一节 生物制药实验基础	234
二、细胞工程实验基本操作	183	一、生物制药实验室的一般知识	234
三、培养基的成分及其配制	185	二、生物制药概述	234
四、培养条件的选择	189	第二节 生物制药综合实训项目	235
第二节 细胞工程综合实训项目	190	实训 15-1 发酵法制备 L-天冬酰胺酶	235
实训 11-1 小鼠肝细胞的原代培养	190	实训 15-2 槐米中芦丁及槲皮素的提取分离 及鉴定	237
实训 11-2 植物愈伤组织培养	194	参考文献	241
第十二章 基因工程综合实训	198		
第一节 基因工程实验基础	198		
一、基因工程实验室的一般知识	198		
二、基因工程的基本知识	198		

第一章

绪论

第一节 生物技术相关学科概述

本书是为生物制药技术专业、生物技术及应用专业和化学工程与工艺专业生物化工方向编写的一本实训教材。目前,高职院校生物制药、生物技术和生物化工专业使用的实训教材比较短缺,大部分还是用本科教材。高等职业教育不同于普通高等教育,它是面向实际、面向社会、适应具体职业的高等教育。高等职业教育要让学生获得从事某个职业或行业所需的实际技能和知识,以培养实用型、动手能力强的专业人才为根本目标,注意对学生专业实践能力的培养。社会对人才的需要方向就是高等职业教育的目标。所以,根据充分体现高职教育特色的人才培养计划和目标,特编写本教材。

考虑到生物技术专业的高度学科交叉性,本书在内容安排上共设计了15章,内容涉及与生物、化学及制药相关的各种具体实训,包括无机化学、有机化学、分析化学、生物化学、微生物学、仪器分析、食品分析、药物分析、生物分离、细胞工程、基因工程、发酵工程、酶工程、生物制药等的实训技能操作训练。

无机化学是研究无机物质的组成、性质、结构和反应的科学,它是化学中最古老的分支学科。无机物质包括所有化学元素和它们的化合物,不过大部分的碳化合物除外(除二氧化碳、一氧化碳、二硫化碳、碳酸盐等简单的碳化合物仍属无机物质外,其余均属于有机物质)。它对于矿物资源的综合利用,近代技术中无机原材料及功能材料的生产和研究等都具有重大的意义。当前无机化学正处在蓬勃发展的新时期,许多边缘领域迅速崛起,研究范围不断扩大,已形成无机合成、丰产元素化学、配位化学、有机金属化学、无机固体化学、生物无机化学和同位素化学等领域。

有机化学是研究有机化合物的来源、制备、结构、性质、应用以及有关理论的科学,又称碳化合物的化学。有机化合物和无机化合物之间没有绝对的分界。有机化学之所以成为化学中的一个独立学科,是因为有机化合物确有其内在的联系和特性。有机化学主要是介绍化学物质的科学(高中化学学习当中也会涉及部分有机化学的课程)。目前有机化学物质的分类主要是按照其决定性作用,能代表化学物质的基团也就是官能团的不同来进行分类的。可分为:烷烃,烯烃,炔烃,芳香烃(以上为烃类);卤代烃,醇,酚,醚,醛,酮,羧酸,羧酸衍生物,胺类,硝基化合物,腈类,含硫有机化合物(如硫醇、硫醚、硫酚、磺酸、砒与亚砒等),含磷有机化合物,杂环化合物等(以上为烃衍生物)。具体内容主要是介绍这些化学物质的系统命名、化学反应、反应机理、制备方法。其中化学反应基本上为基团的取代,能否进行一个反应,取决于热力学和动力学两个方面的因素。而制备方法主要是通过无机物、石油提取物以及容易制备或成本低的物质制得难以得到的物质。反应机理为基团之间的进攻和离去倾向之间的竞争。

分析化学是研究获取物质化学组成和结构信息的分析方法及相关理论的科学,是化学学科的一个重要分支。分析化学以化学基本理论和实验技术为基础,并吸收物理、生物、统计、电子计算机、自动化等方面的知识以充实本身的内容,从而解决科学、技术所提出的各种分析问题。分析化学开发分析物质成分、结构的方法,使化学成分得以定性和定量测定,化学结构得以确定。分析化学是化学家最基础的训练之一,化学家在实验技术和基础知识上的训练,皆得力于分析化学。

生物化学是生物学的分支学科。它是研究生命物质的化学组成、结构及生命活动过程中各种

化学变化的基础生命科学。生物化学对其他生物学科的深刻影响首先反映在与其关系比较密切的细胞学、微生物学、遗传学、生理学等领域。通过对生物高分子结构与功能进行的深入研究,揭示了生物体物质代谢、能量转换、遗传信息传递、光合作用、神经传导、肌肉收缩、激素作用、免疫和细胞间通信等许多奥秘,使人们对生命本质的认识跃进到一个崭新的阶段。生物化学是在医学、农业、某些工业和国防部门的生产实践的推动下成长起来的,反过来,它又促进了这些部门生产实践的发展。

微生物学是生物学的分支学科之一。它是研究各类微小生物(细菌、放线菌、真菌、病毒、立克次体、支原体、衣原体、螺旋体、原生动物以及单细胞藻类)的形态、生理、生物化学、分类和生态的科学。

仪器分析是指采用比较复杂或特殊的仪器设备,通过测量物质的某些物理或物理化学性质的参数及其变化来获取物质的化学组成、成分含量及化学结构等信息的一类方法。仪器分析大致可以分为:电化学分析法、核磁共振波谱法、原子发射光谱法、气相色谱法、原子吸收光谱法、高效液相色谱法、紫外-可见光谱法、质谱分析法、红外光谱法、其他仪器分析法等。

食品分析是阐述各类食品中化学组成成分的检测原理和方法的一门技术性专业课程。本课程的任务是通过阐述如何根据分析目的,运用物理、化学或者生物化学等方法对食品样品进行检测和分析。

药物分析(习惯上称为药品检验)是运用化学的、物理学的、生物学的以及微生物学的方法和技术来研究化学结构已经明确的合成药物或天然药物及其制剂质量的一门学科。它包括药物成品的化学检验、药物生产过程的质量控制、药物贮存过程的质量考察、临床药物分析、体内药物分析等。药物分析是分析化学中的一个重要分支,它随着药物化学的发展逐渐成为分析化学中相对独立的一门学科,在药物的质量控制、新药研究、药物代谢、手性药物分析等方面均有广泛应用。随着生命科学、环境科学、新材料科学的发展,生物学、信息科学、计算机技术的引入,分析化学迅猛发展并已经进入分析科学这一崭新的领域,药物分析也正发挥着越来越重要的作用,在科研、生产和生活中无处不在,尤其在新药研发以及药品生产等方面扮演着重要的角色。

生物分离工程是研究生化工业中生物制品分离和纯化的工程技术学科,课程主要讲授传质与生化分离工程的原理和应用,以及生化分离过程中一些主要的分离单元操作和分离工程领域的研究进展及其动态;课程重点讲授发酵液的预处理、细胞破碎、溶剂萃取法、双水相萃取法、反胶束萃取法、凝胶萃取法、超临界流体萃取法、离子交换法、色谱分离法、膜分离法、蒸发、结晶和干燥等单元操作原理及其在生物工程技术领域的应用,是生物工程专业主要专业基础课程之一。

细胞工程是指应用细胞生物学和分子生物学的方法,通过某种工程学手段,在细胞水平或细胞器水平上,按照人们的意愿来改变细胞内的遗传物质,从而获得新型生物或特种细胞产品或产物的一门综合性科学技术。细胞工程与基因工程一起代表着生物技术最新的发展前沿,伴随着试管植物、试管动物、转基因生物反应器等相继问世,细胞工程在生命科学、农业、医药、食品、环境保护等领域发挥着越来越重要的作用。

基因工程是在分子生物学和分子遗传学综合发展基础上于20世纪70年代诞生的一门崭新的生物技术科学。基因工程是生物工程的一个重要分支,它和细胞工程、酶工程、蛋白质工程和微生物工程共同组成了生物工程。所谓基因工程是在分子水平上对基因进行操作的复杂技术,是将外源基因通过体外重组后导入受体细胞内,使这个基因能在受体细胞内复制、转录、翻译表达的操作。它是用人为的方法将所需要的某一供体生物的遗传物质——DNA大分子提取出来,在离体条件下用适当的工具酶进行切割后,把它与作为载体的DNA分子连接起来,然后与载体一起导入某一更易生长、繁殖的受体细胞中,以让外源物质在其中“安家落户”,进行正常的复制和表达,从而获得新物种的一种崭新技术。基因工程具有以下重要特征:首先,外源核酸分子在不同的寄主生物中进行繁殖,能够跨越天然物种屏障,把来自任何一种生物的基因放置到新的生物

中,而这种生物可以与原来生物毫无亲缘关系,这种能力是基因工程的第一个重要特征;第二个特征是,一种确定的 DNA 小片段在新的寄主细胞中进行扩增,这样实现很少量 DNA 样品“拷贝”出大量的 DNA,而且是大量没有污染任何其他 DNA 序列的、绝对纯净的 DNA 分子群体。科学家将改变人类生殖细胞 DNA 的技术称为“基因系治疗”,通常所说的“基因工程”则是针对改变动植物生殖细胞的。无论称谓如何,改变个体生殖细胞的 DNA 都将可能使其后代发生同样的改变。

发酵工程是指采用现代工程技术手段,利用微生物的某些特定功能,为人类生产有用的产品,或直接把微生物应用于工业生产过程的一种新技术。发酵工程的内容包括菌种的选育、培养基的配制、灭菌、扩大培养和接种、发酵过程和产品的分离提纯等方面。发酵工程发源于家庭或作坊式的发酵制作(农产品手工加工),后来借鉴化学工程实现了工业化生产(近代发酵工程),最后返璞归真以微生物生命活动为中心研究、设计和指导工业发酵生产(现代发酵工程),跨入生物工程的行列。

酶工程是将酶或者微生物细胞、动植物细胞、细胞器等在一定的生物反应装置中,利用酶所具有的生物催化功能,借助工程手段将相应的原料转化成有用物质并应用于社会生活的一门科学技术。它包括酶制剂的制备、酶的固定化、酶的修饰与改造及酶反应器等方面内容。酶工程的应用,主要集中于食品工业、轻工业以及医药工业。

生物制药是指运用微生物学、生物学、医学、生物化学等的研究成果,从生物体、生物组织、细胞、体液等,综合利用微生物学、化学、生物化学、生物技术、药学等科学的原理和方法制造的一类用于预防、治疗和诊断的制品。生物药物原料以天然的生物材料为主,包括微生物、人体、动物、植物、海洋生物等。随着生物技术的发展,有目的人工制得的生物原料成为当前生物制药原料的主要来源。如用免疫法制得的动物原料、改变基因结构制得的微生物或其他细胞原料等。生物药物的特点是药理活性高、毒副作用小、营养价值高。生物药物主要有蛋白质、核酸、糖类、脂类等。这些物质的组成单元为氨基酸、核苷酸、单糖、脂肪酸等,对人体不仅无害而且还是重要的营养物质。生物药物的阵营很庞大,发展也很快。目前全世界的医药品已有一半是生物合成的,特别是合成分子结构复杂的药物时,它不仅比化学合成法简便,而且有更高的经济效益。预测生物制药的研究进展,它将广泛用于治疗癌症、艾滋病、冠心病、贫血、发育不良、糖尿病等多种疾病。

第二节 基础实验技术简介

本书十五章中主要涉及一些基础实验技术,主要包括:有机化学常用的实验技术(如蒸馏和分馏),分析常用的实验技术(如高效液相色谱、气相色谱、滴定分析和分光光度分析等),发酵工程常用的实验技术(如无菌操作、发酵罐的使用以及发酵过程中参数控制等),基因工程常用的实验技术[如聚合酶链反应(PCR)、感受态细胞的制备和转化等],细胞工程常用的实验技术(如动植物细胞培养和愈伤组织的培养与诱导等),酶工程常用的实验技术(如酶的固定化等)。这些技术综合起来基本涵盖了生物化工领域的常用技术。

一、蒸馏

1. 蒸馏的定义

蒸馏指利用液体混合物中各组分挥发性的差异而将组分分离的传质过程。将液体沸腾产生的蒸气导入冷凝管,使之冷却凝结成液体的一种蒸发、冷凝的过程。蒸馏是分离混合物的一种重要的操作技术,尤其是对于液体混合物的分离有重要的实用意义。其原理在于利用液体混合物中各组分挥发度的差别,使液体混合物部分气化并随之使蒸气部分冷凝,从而实现其所含组分的分

离。是一种属于传质分离的单元操作。广泛应用于炼油、化工、轻工等领域。

2. 蒸馏的特点

① 通过蒸馏操作，可以直接获得所需要的产品。

② 蒸馏分离应用较广泛，历史悠久。

③ 能耗大，在生产过程中产生大量的气相或液相。

3. 蒸馏的分类

(1) 按方式分 简单蒸馏、平衡蒸馏、精馏、特殊精馏。

(2) 按操作压强分 常压、加压、减压。

(3) 按混合物中组分分 双组分蒸馏、多组分蒸馏。

(4) 按操作方式分 间歇蒸馏、连续蒸馏。

4. 蒸馏装置

蒸馏的主要仪器有蒸馏烧瓶、温度计、冷凝管、牛角管、酒精灯、石棉网、铁架台、锥形瓶、橡胶塞。蒸馏装置见图 1-1。

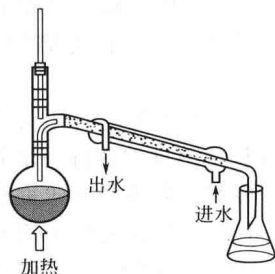


图 1-1 蒸馏装置

二、分馏

分馏是利用分馏柱将多次气化-冷凝过程在一次操作中完成的方法。因此，分馏实际上是多次蒸馏。它更适合于分离提纯沸点相差不大的液体有机混合物。进行分馏的必要性：①蒸馏分离不彻底；②多次蒸馏操作繁琐，费时，浪费极大。

混合液沸腾后蒸气进入分馏柱中被部分冷凝，冷凝液在下降途中与继续上升的蒸气接触，二者进行热交换，蒸气中高沸点组分被冷凝，低沸点组分仍呈蒸气上升，而冷凝液中低沸点组分受热气化，高沸点组分仍呈液态下降。结果是上升的蒸气中低沸点组分增多，下降的冷凝液中高沸点组分增多。如此经过多次热交换，就相当于连续多次的普通蒸馏。以致低沸点组分的蒸气不断上升，而被蒸馏出来；高沸点组分则不断流回蒸馏瓶中，从而将它们分离。

三、高效液相色谱

1. 简要介绍

高效液相色谱又称高压液相色谱、高速液相色谱、高分离度液相色谱、近代柱色谱等。高效液相色谱是色谱法的一个重要分支，以液体为流动相，采用高压输液系统。

高效液相色谱用高压输液泵将具有不同极性的单一溶剂或不同比例的混合溶剂、缓冲液等流动相泵入装有固定相的色谱柱，经进样阀注入待测样品，由流动相带入柱内，在柱内各成分被分离后，依次进入检测器进行检测，从而实现对待样品的分析。这种方法已成为化学、生化、医学、工业、农业、环保、商检和法检等学科领域中重要的分离分析技术，是分析化学、生物化学和环境化学工作者必不可少的工具。

2. 特点

高效液相色谱法有“三高一广一快”的特点。

① 高压：流动相为液体，流经色谱柱时，受到的阻力较大，为了能迅速通过色谱柱，必须对载液加高压。

② 高效：分离效能高。可选择固定相和流动相以达到最佳分离效果，比工业精馏塔和气相色谱的分离效能高出许多倍。

③ 高灵敏度：紫外吸收检测器可达 0.01ng，进样量在微升数量级。

④ 应用范围广：70%以上的有机化合物可用高效液相色谱分析，特别是高沸点、大分子、强极性、热稳定性差化合物的分离分析，显示出优势。

⑤ 分析速度快、载液流速快：较经典液体色谱法速度快得多，通常分析一个样品在 15~30min，有些样品甚至在 5min 内即可完成，一般小于 1h。

此外高效液相色谱还有色谱柱可反复使用、样品不被破坏、易回收等优点。但也有缺点，与气相色谱相比各有所长，相互补充。高效液相色谱的缺点是有“柱外效应”。在从进样到检测器之间，除了柱子以外的任何死空间（进样器、柱接头、连接管和检测池等）中，如果流动相的流型有变化，被分离物质的任何扩散和滞留都会显著地导致色谱峰的加宽，柱效率降低。

3. 结构组成

高效液相色谱仪可分为“高压输液泵”、“色谱柱”、“进样器”、“检测器”、“流分收集器”以及“数据获取与处理系统”等部分。

4. 使用方法

色谱柱的填料和流动相的组分应按各品种项下的规定。常用的色谱柱填料有硅胶和化学键合硅胶，化学键合硅胶以十八烷基硅烷键合硅胶最为常用，辛基键合硅胶次之，氰基或氨基键合硅胶也有使用；离子交换填料，用于离子交换色谱；凝胶或玻璃微球等，用于分子排阻色谱等。注样量一般为数微升。除另有规定外，柱温为室温，检测器为紫外吸收检测器。

在用紫外吸收检测器时，所用流动相应符合紫外分光光度法项下对溶剂的要求。

各品种项下规定的条件除固定相种类、流动相组分、检测器类型不得任意改变外，其余如色谱柱内径、长度、固定相牌号、载体粒度、流动相流速、混合流动相各组分的比例、柱温、进样量、检测器的灵敏度等，均可适当改变，以适应具体品种并达到系统适用性试验的要求。一般色谱图约于 20min 内记录完毕。

系统适用性试验：按各品种项下要求对仪器进行适用性试验，即用规定的对照品对仪器进行试验和调整，应达到规定的要求；或规定分析状态下色谱柱的最小理论板数、分离度和拖尾因子。

四、气相色谱

1. 简要介绍

气相色谱是一种以气体为流动相的柱色谱法，根据所用固定相状态的不同可分为气固色谱（GSC）和气液色谱（GLC）。

气相色谱法是 20 世纪 50 年代出现的一项重大科学技术成就。这是一种新的分离、分析技术，它在工业、农业、国防、建设、科学研究中都得到了广泛应用。气相色谱可分为气固色谱和气液色谱。气固色谱的“气”指流动相是气体，“固”指固定相是固体物质，例如活性炭、硅胶等。气液色谱的“气”指流动相是气体，“液”指固定相是液体，例如在惰性材料硅藻土上涂一层角鲨烷，可以分离、测定纯乙烯中的微量甲烷、乙炔、丙烯、丙烷等杂质。

2. 气相色谱原理

气相色谱的流动相为惰性气体，气固色谱法中以表面积大且具有一定活性的吸附剂作为固定相。当多组分的混合样品进入色谱柱后，由于吸附剂对每个组分的吸附力不同，经过一定时间后，各组分在色谱柱中的运行速度也就不同。吸附力弱的组分容易被解吸下来，最先离开色谱柱进入检测器，而吸附力最强的组分最不容易被解吸下来，因此最后离开色谱柱。如此，各组分得以在色谱柱中彼此分离，顺序进入检测器中被检测、记录下来。

3. 气相色谱流程

载气由高压钢瓶中流出，经减压阀降压到所需压力后，通过净化干燥管使载气净化，再经稳压阀和转子流量计后，以稳定的压力、恒定的速度流经气化室与气化的样品混合，将样品气体带入色谱柱中进行分离。分离后的各组分随着载气先后流入检测器，然后载气放空。检测器将物质的浓度或质量的变化转变为一定的电信号，经放大后在记录仪上记录下来，就得到色谱流出

曲线。

根据色谱流出曲线上得到的每个峰的保留时间,可以进行定性分析;根据峰面积或峰高的大小,可以进行定量分析。

4. 气相色谱仪

由五大系统组成:气路系统、进样系统、分离系统、温控系统、检测记录系统。

组分能否分开,关键在于色谱柱;分离后组分能否鉴定出来则在于检测器,所以分离系统和检测系统是仪器的核心。

目前有很多种检测器,其中常用的检测器是:氢火焰离子化检测器(FID)、热导检测器(TCD)、氮磷检测器(NPD)、火焰光度检测器(FPD)、电子捕获检测器(ECD)等类型。

5. 气相色谱法的特点

气相色谱法是指用气体作为流动相的色谱法。由于样品在气相中传递速度快,因此样品组分在流动相和固定相之间可以瞬间达到平衡。另外加上可选作固定相的物质很多,因此气相色谱法是一种分析速度快和分离效率高的分离分析方法。近年来采用高灵敏选择性检测器,使得它又具有分析灵敏度高、应用范围广等优点。

6. 气相色谱法的应用

在石油化学工业中大部分的原料和产品都可采用气相色谱法来分析;在电力部门中可用来检查变压器的潜伏性故障;在环境保护工作中可用来监测城市大气和水的质量;在农业上可用来监测农作物中残留的农药;在商业部门可用来检验及鉴定食品质量;在医学上可用来研究人体新陈代谢、生理机能;在临床上用于鉴别药物中毒或疾病类型;在宇宙飞船中可用来自动监测飞船密封仓内的气体等。

五、滴定分析

1. 定义

滴定分析是将已知准确浓度的标准溶液滴加到被测物质的溶液中直至所加溶液物质的量按化学计量关系恰好反应完全,然后根据所加标准溶液的浓度和所消耗的体积,计算出被测物质含量的分析方法。由于这种测定方法是以测量溶液体积为基础,故又称为容量分析。

2. 滴定分析法的分类

(1) 酸碱滴定法 它是以酸、碱之间质子传递反应为基础的一种滴定分析法。可用于测定酸、碱和两性物质。

(2) 配位滴定法(络合滴定分析) 它是以配位反应为基础的一种滴定分析法。可用于对金属离子进行测定。

(3) 氧化还原滴定法 它是以氧化还原反应为基础的一种滴定分析法。可用于对具有氧化还原性质的物质或某些不具有氧化还原性质的物质进行测定。

(4) 沉淀滴定法 它是以沉淀生成反应为基础的一种滴定分析法。可用于对 Ag^+ 、 CN^- 、 SCN^- 及类卤素等离子进行测定。

3. 滴定分析法对滴定反应的要求和滴定方式

(1) 滴定分析法对滴定反应的要求

- ① 反应要按一定的化学反应式进行,即反应应具有确定的化学计量关系,不发生副反应。
- ② 反应必须定量进行,通常要求反应完全程度 $\geq 99.9\%$ 。
- ③ 反应速度要快。对于速度较慢的反应,可以通过加热、增加反应物浓度、加入催化剂等措施来加快反应速度。

④ 有适当的方法确定滴定的终点。

(2) 滴定方式

① 直接滴定法：凡能满足滴定分析要求的反应都可用标准滴定溶液直接滴定被测物质。例如用 NaOH 标准滴定溶液可直接滴定 HCl、 H_2SO_4 等试样。

② 返滴定法：返滴定法（又称回滴法）是在待测试液中准确加入适当过量的标准溶液，待反应完全后，再用另一种标准溶液返滴剩余的第一种标准溶液，从而测定待测组分的含量。

这种滴定方式主要用于滴定反应速度较慢或反应物是固体，加入符合计量关系的标准滴定溶液后，反应常常不能立即完成的情况。例如， Al^{3+} 与 EDTA（一种配位剂）溶液反应速度慢，不能直接滴定，可采用返滴定法。

③ 置换滴定法：置换滴定法是先加入适当的试剂与待测组分定量反应，生成另一种可滴定的物质，再利用标准溶液滴定反应产物，然后由滴定剂的消耗量、反应生成的物质与待测组分等物质的量的关系计算出待测组分的含量。

这种滴定方式主要用于因滴定反应没有定量关系或伴有副反应而无法直接滴定的测定。例如，用 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 标定 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液的浓度时，就是以一定量的 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 在酸性溶液中与过量的 KI 作用，析出相当量的 I_2 ，以淀粉为指示剂，用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液滴定析出的 I_2 ，进而求得 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液的浓度。

④ 间接滴定法：某些待测组分不能直接与滴定剂反应，但可通过其他的化学反应，间接测定其含量。例如，溶液中 Ca^{2+} 几乎不发生氧化还原反应，但利用它与 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 作用形成 CaC_2O_4 沉淀，过滤洗净后，加入 H_2SO_4 使其溶解，用 KMnO_4 标准滴定溶液滴定 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ ，就可间接测定 Ca^{2+} 含量。

六、分光光度分析

分光光度分析是光学分析的一种。测量一束单色光通过溶液后的吸光度的分析方法。将含有各种波长的混合光色散为各种单色光，使每种单色光依次通过各种物质的某一浓度的溶液，测定溶液对每种光波的透射比或吸光度，可绘出相应的吸收光谱曲线。根据各种物质所特有的吸收光谱，可进行定性分析和定量分析。用于进行分光光度分析的仪器称分光光度计。

七、发酵罐的使用

1. 概述

发酵罐指工业上用来进行微生物发酵的装置。其主体一般为不锈钢板制成的柱式圆筒，其容积在 1m^3 至数百立方米。在设计和加工中应注意结构严密、合理，能耐受蒸汽灭菌，有一定操作弹性，内部附件尽量减少（避免死角），物料与能量传递性能强，并可进行一定调节以便于清洗、减少污染，适合于多种产品的生产以及减少能量消耗。

用于厌氧发酵（如生产酒精、溶剂）的发酵罐结构可以较简单。用于好氧发酵（如生产抗生素、氨基酸、有机酸、维生素等）的发酵罐因需向罐中连续通入大量无菌空气，并要考虑通入空气的利用率，故发酵罐结构较为复杂，常用的有机械搅拌式发酵罐、鼓泡式发酵罐和气升式发酵罐。

乳制品、酒类发酵过程是一个无菌、无污染的过程，发酵罐采用了无菌系统，避免和防止了空气中微生物的污染，大大延长了产品的保质期和产品的纯正，罐体上特别设计安装了无菌呼吸气孔或无菌正压发酵系统。罐体上设有米洛板或迷宫式夹套，可通入加热或冷却介质来进行循环加热或冷却。发酵罐的容量有 $300\sim 15000\text{L}$ 多种不同规格。发酵罐按使用范围可分为生物发酵罐、啤酒发酵罐、葡萄酒发酵罐等。

发酵罐广泛应用于乳制品、饮料、生物工程、制药、精细化工等行业，罐体设有夹层、保温层，可加热、冷却、保温。罐体与上下填充头均采用旋压 R 角加工，罐内壁经镜面抛光处理，

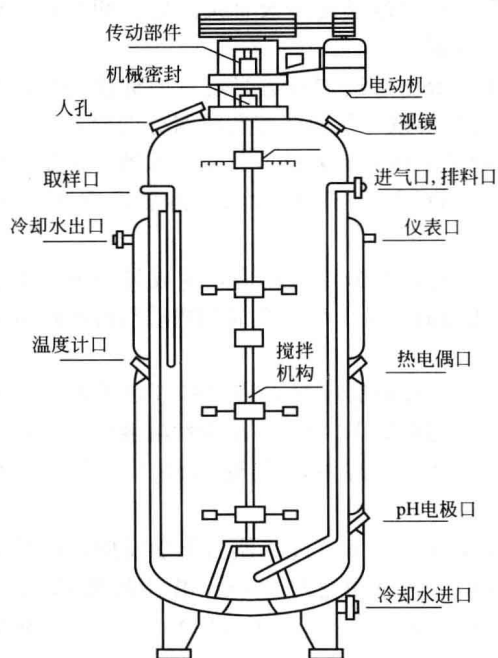


图 1-2 发酵罐截面图

无卫生死角，而全封闭设计确保物料始终处于无污染的状态下混合、发酵，设备配备空气呼吸孔、CIP 清洗喷头、人孔等装置。发酵罐截面图见图 1-2。

发酵罐的分类：按照发酵罐的设备，分为机械搅拌通风发酵罐和非机械搅拌通风发酵罐；按照微生物的生长代谢需要，分为好氧型发酵罐和厌氧型发酵罐。

2. 发酵罐的主要部件

罐体：主要用来培养发酵各种菌体，密封性要好（防止菌体被污染）。

罐体当中有搅拌桨，用于发酵过程中不停地搅拌。

底部通气孔，用来通入菌体生长所需要的空气或氧气。

罐体的顶盘上有控制传感器，最常用的有 pH 电极和溶氧电极，用来监测发酵过程中发酵液 pH 和溶氧的变化，用来显示和控制发酵条件等。

3. 发酵罐的使用方法

① 校正 pH 电极和溶氧电极。

② 罐体灭菌。根据需要将培养基配入罐体，按要求封好后将罐体放入大灭菌锅灭菌（115℃，30min）。

③ 待罐体冷却后，将其置于发酵台上，安装完好；打开冷却水，打开气泵电源，连接通气管道开始通气，调节进气旋钮使通气量适当；打开发酵罐电源，设置温度、pH、搅拌速度等，640r/min 下开机转动 30min，设定溶氧电极为 100。

④ 待温度稳定，各项参数都正确后，将种子接入，开始发酵计时，并开始记录各种参数。

⑤ 发酵完毕后清洗罐体和电极，将电极插入 4mol/L 氯化钾的三角瓶中待用。

4. 发酵罐附加装置

搅拌机（多级或无级变速）、无菌呼吸气孔（或无菌正压器）、进料口、出料口、无菌采样口、人孔、冷水进出口、热水进出口、温度计、CIP 清洗喷淋头。

5. 发酵罐的维护保养

① 如进气管与出水管接头漏气，当旋紧接头不解决问题时，应添加或更换填料。

② 压力表与安全阀应定期检查，如有故障要及时调换或修理。

③ 清洗发酵罐时，用软毛刷进行刷洗，不要用硬器刮擦，以免损伤发酵罐表面。

④ 配套仪表应每年校验一次，以确保正常使用。

⑤ 电器、仪表、传感器等电气设备严禁直接与水、汽接触，防止受潮。

⑥ 设备停止使用时，应及时清洗干净，排尽发酵罐及各管道中的余水；松开发酵罐罐盖及手孔螺丝，防止密封圈产生永久变形。

⑦ 操作平台、恒温水箱等碳钢设备应定期（一年一次）刷油漆，防止锈蚀。

⑧ 经常检查减速器油位，如润滑油不够，需及时增加。

⑨ 定期更换减速器润滑油，以延长其使用寿命。

⑩ 如果发酵罐暂时不用，则需对发酵罐进行空消，并排尽罐内及各管道内的余水。

6. 注意事项

- ① 罐体灭菌前务必检查其中液面高度, 要求所有的电极都浸于液面以下。
- ② 打开发酵罐电源前务必检查冷却水是否已打开, 温度探头是否已插入槽中, 否则会烧坏加热电路。
- ③ 发酵过程中一定要保持工作台的清洁, 用过的培养瓶及其他物品及时清理, 溅出的酸碱液或水应立即擦干。
- ④ 对罐体安装、拆卸和灭菌时要特别小心 pH 电极和罐体的易损又昂贵部件。

八、PCR 技术

1. 概述

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是一种分子生物学技术, 用于放大特定的 DNA 片段。可看作生物体外的特殊 DNA 复制。PCR 最初的原始雏形概念是类似基因修复复制, 它是于 1971 年由 Dr. Kjell Kleppe 提出。他发表了第一个单纯且短暂性基因复制 (类似 PCR 前两个周期反应) 的实验。而现今的 PCR 则于 1983 年由 Dr. Mullis 发展来的。Dr. Mullis 当年服务于 PE 公司, 因此 PE 公司在 PCR 界有着特殊的地位。Dr. Mullis 于 1985 年与 Saiki 等人正式发表了第一篇有关 PCR 的论文。随后 PCR 技术在生物科研和临床应用中得以广泛应用, 成为分子生物学研究的最重要技术。Dr. Mullis 也因此获得了 1993 年诺贝尔化学奖。

2. PCR 原理

DNA 的半保留复制是生物进化和传代的重要途径。双链 DNA 在多种酶的作用下可以变性解链成单链, 在 DNA 聚合酶的参与下, 根据碱基互补配对原则复制成同样的两分子拷贝。在实验中发现, DNA 在高温时也可以发生变性解链, 当温度降低后又可以复性成为双链。因此, 通过温度变化控制 DNA 的变性和复性, 加入设计引物、DNA 聚合酶、dNTP 就可以完成特定基因的体外复制。

但是, DNA 聚合酶在高温时会失活, 因此, 每次循环都得加入新的 DNA 聚合酶, 不仅操作繁琐, 而且价格昂贵, 制约了 PCR 技术的应用和发展。发现耐热 DNA 聚合酶——*Taq* 酶对于 PCR 的应用有里程碑的意义, 该酶可以耐受 90℃ 以上的高温而不失活, 不需要每个循环加酶, 使 PCR 技术变得非常简捷, 同时也大大降低了成本, PCR 技术得以大量应用, 并逐步应用于临床。

3. PCR 反应体系

PCR 反应五要素: 参加 PCR 反应的物质主要有五种, 即引物 (PCR 引物为 DNA 片段, 细胞内 DNA 复制的引物为一段 RNA 链)、酶、dNTP、模板和缓冲液 (其中需要 Mg^{2+})。

4. PCR 步骤

标准的 PCR 过程分为如下三步。

- ① DNA 变性 (90~96℃): 双链 DNA 模板在热作用下, 氢键断裂, 形成单链 DNA。
- ② 退火 (25~65℃): 系统温度降低, 引物与 DNA 模板结合, 形成局部双链。
- ③ 延伸 (70~75℃): 在 *Taq* 酶 (在 72℃ 左右, 活性最佳) 的作用下, 以 dNTP 为原料, 从引物的 5' 端→3' 端延伸, 合成与模板互补的 DNA 链。

每一循环经过变性、退火和延伸, DNA 含量即增加一倍。

现在有些 PCR 因为扩增区很短, 即使 *Taq* 酶活性不是最佳也能在很短的时间内复制完成, 因此可以改为两步法, 即退火和延伸同时在 60~65℃ 进行, 以减少一次升降温过程, 提高了反应速度。

5. PCR 的循环参数

- ① 预变性。模板 DNA 完全变性对 PCR 能否成功至关重要, 一般 95℃ 加热 3~5min。