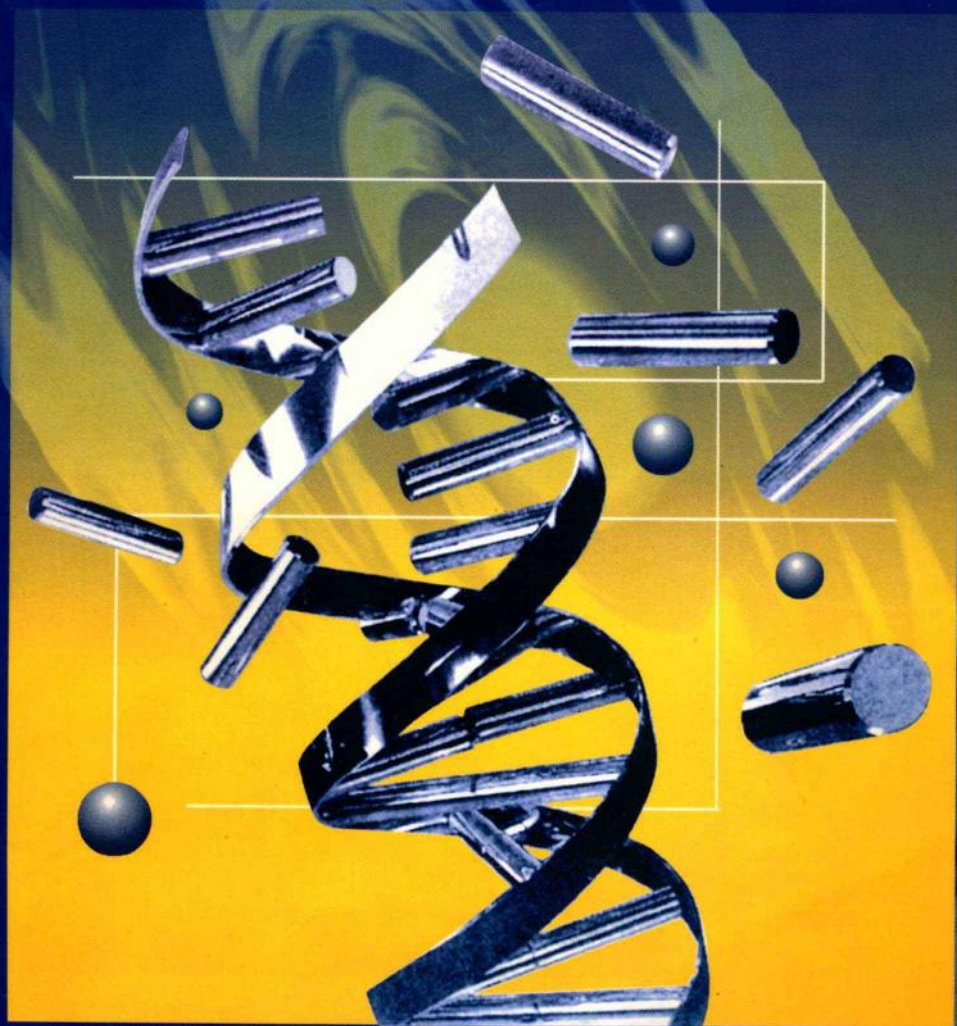


SHENGWU HUAXUE SHIYAN

生物化学实验

任颖 吴泽民 主编



吉林科学技术出版社

生物化学实验

主 编	任 颖	吴泽民
副主编	崔大明	鱼 瑛
编 者	王宏英	王秋玉
	胡智茹	郭艳霞

吉林科学技术出版社

生物化学实验

任 颖 吴泽民 主编

责任编辑：齐 郁

封面设计：吴泽民 邵 鹏

出版	吉林科学技术出版社	787×1092 毫米	16 开本	137 000 字	6 印张
发行		2001 年 8 月第 1 版	2001 年 8 月第 1 次印刷		
印刷	长 春 大 学 印 刷 厂	ISBN 7-5384-2338-9/O · 90	定价：12.00 元		

地址 长春市人民大街 124 号 邮编 130021 电话 5635177 传真 5635185
电子信箱 JLKJCBS @ public.cc.jl.cn

前 言

生物化学实验与理论紧密相连，而生物化学实验技术又相对独立于生物化学理论，它具有完整的自身理论体系和实验技术方法，它的理论和技术已应用在各个学科中。近年来，生物化学实验技术迅速更新和发展，为了适应其发展和教学的需要，我们在总结多年教学经验的基础上，编写了这本《生物化学实验》。

本实验教材由生化基本操作、实验内容和附录三部分组成，共 33 个实验。在编写过程中，我们既考虑到配合课堂理论学习，又注意训练学生的基本操作和基本技能（如离心、层析、电泳等），同时也增加了反映新技术、新方法的内容。我们力求每个实验的科学性、实用性和可靠性，对其中基本原理、试剂配制、操作步骤和注意事项等都做了较为详细的叙述。我们还把常用的生化实验仪器的使用方法、样品的制备等做了详细介绍，使读者使用时更方便。

由于我们水平有限，加上编写时间仓促，书中如有错误和不妥之处，恳请批评指正。

编 者

2001 年 6 月

目 录

第一部分 概述

一、生物化学实验的特点、目的及重要性	1
二、生物化学实验室规则	1

第二部分 生物化学实验的基本操作技能

一、生物化学实验的基本操作	3
二、天平的使用方法	7
三、比色分析法及 72-1 型分光光度计的使用	10
四、72-1 型分光光度计的结构与使用方法	11

第三部分 实验内容

实验一 糖的薄层层析	14
实验二 中药杏仁脂质成分的提取	16
实验三 油脂的化学性质	17
实验四 蛋白质的化学性质	18
实验五 蛋白质等电点的测定	20
实验六 凝胶层析法分离血红蛋白与溶菌酶	22
实验七 肝组织中核酸的分离与鉴定	24
实验八 DNA 含量测定 (改良二苯胺法)	26
实验九 RNA 的测定 (苔黑酚法 Orcinol)	29
实验十 影响酶作用的因素	30
实验十一 琥珀酸脱氢酶的作用	32
实验十二 乳酸脱氢酶及其辅酶的作用	34
实验十三 氰化物对细胞色素氧化酶的抑制作用	35
实验十四 食物中维生素 C 的提取和定量	36
实验十五 胡萝卜素柱层析分离法	38
实验十六 血糖的含量测定	40

实验十七 尿糖测定	43
实验十八 血清甘油三脂测定	45
实验十九 肝的生酮作用及酮体检出	46
实验二十 血清总胆固醇测定	48
实验二十一 血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	49
实验二十二 氨基转移作用及氨基酸的纸上层析	51
实验二十三 血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	53
实验二十四 血清尿素氮测定(二乙酰-脲法)	56
实验二十五 血清钙的测定(乙二胺四乙酸二钠滴定法)	57
实验二十六 针刺对家兔血糖浓度的双向调节作用(吴宪-Folin 测血糖法)	59
实验二十七 中药对家兔实验性高脂血症的影响	61
实验二十八 四君子汤对控制饲料小鼠胸腺核酸含量的影响	64
实验二十九 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的相对分子量	66
实验三十 组织过氧化脂质定量测定	70
实验三十一 基因组 DNA 的分离提取	72
实验三十二 质粒 DNA 的提取	74
实验三十三 质粒的酶切与鉴定	78
第四部分 附录	
附录一 实验室安全及防护知识	81
附录二 各种洗涤液的配方及使用	83
附录三 生物化学实验样品的制备	85
附录四 化学试剂的规格与保管	86
附录五 常用缓冲液的配制	88
附录六 几种常用实验动物生化指标血清值变动范围参考表	90
附录七 常用计量单位及符号	91
附录八 希腊字母表	91

第一部分 概 述

一、生物化学实验的特点、目的及重要性

1. 生物化学实验特点

生物化学实验技术是广泛应用于医学各学科教学和科研的重要手段之一，具有完整的独立的理论体系和独特的实验技巧，是生物化学理论课所不能代替的。它与形态学以及其它医学基础不尽相同。生物化学实验还具有严密科学性和微量、定量的特点，因此生物化学实验课的要求高而严格，仪器要求精密、先进，电子化的大型设备多，所以教师对实验仪器要严格管理、认真负责，按教学大纲要求带教。

2. 生物化学实验目的

- (1) 进行生物化学实验的基本技能训练，培养学生独立工作能力。
- (2) 培养学生科学的思维方法，严格的科学作风和实事求是的科学态度。
- (3) 验证某些生物化学基本理论，帮助学生对生物化学理论知识的进一步理解和掌握。
- (4) 进行一定的实验理论学习和一定的科研基本功训练。

3. 生物化学实验的重要性

医学本身是一门实验性科学。近年来，由于生物化学分离技术与分析技术的迅速发展，特别是蛋白质与核酸等生物大分子实验技术迅速发展，为生物科学、分子生物学的研究提供了有利条件，促进了近代生物科学相关各领域的发展。没有生物化学实验技术的发展，就不可能有近代生物学科特别是分子生物学的发展。近代生物学和分子生物学及生物化学实验技术对临床医学、药学、医学检验、预防医学、环境、卫生、工农业生产已产生了巨大影响。

二、生物化学实验室规则

1. 学生进入实验室必须穿白大衣、戴白帽，衣帽要求整洁，不准迟到、早退，不准大声喧哗。

2. 课前学生要认真预习，做好实验设计。在实验过程中，听从老师指导，严格按操作规程进行。完成实验后按要求书写实验报告，实验报告要真实，若实验失败，要分析原因。

3. 环境和仪器的清洁整齐是搞好实验的重要条件。实验台面、试剂药品必须保持整洁，仪器、药品要井然有序。试剂用完后立即盖严，放回原处。不要将试剂药品洒在实验台和地上，严禁向水池内丢碎纸片、棉花及实验固体废弃物等。实验完毕，将用具刷洗干净、放回原处，实验台面擦拭干净，经老师验收后方可离去。

4. 使用实验器材应备加爱护，精密仪器必须按操作规程使用，服从老师指导，试剂、水、电、肥皂等消耗品要厉行节约，应特别注意药品和试剂的纯净，严防混杂。

5. 注意安全。实验室内严禁吸烟！乙醚、乙醇、丙酮等易燃物品，使用时必须远离火源，蒸馏时用水浴或蒸气浴，不可直接加热。剧毒物品要严格管理、小心使用，切勿触及伤

口或误入口内。操作结束后，必须仔细洗手。对剧毒药品、试剂要认真清点及时回收妥善保管。凡参加实验操作人员，消毒后方可离开实验室。

6. 器材损坏时，应如实向教师报告，并填写损坏器材登记表，然后方可补领。

7. 实验室内的一切物品不得私自带出实验室；不得存放与实验无关的物品。

8. 每次实验课由学生轮流值日，值日生要负责当天实验室的卫生、安全及一些服务性工作。

第二部分 生物化学实验的基本操作技能

一、生物化学实验的基本操作

1. 玻璃仪器的洗涤

在生化实验中, 玻璃仪器清洁与否是获得准确结果的重要一环。清洁的玻璃仪器内壁应十分明亮光洁, 无水珠附着在玻璃壁上。下面介绍一些常用的洗涤方法

(1) 一般仪器, 例如烧杯、试管等可用肥皂、合成洗涤剂、去污粉等以毛刷仔细洗后, 再用自来水冲干净。最后用少量蒸馏水冲洗 2~3 次, 倒置晾干或置烤箱烤干后备用。

(2) 容量分析仪器如吸量管、容量瓶、滴定管等不能用毛刷刷洗, 可在用毕后, 即用自来水冲洗、直至不挂水珠, 再用少量蒸馏水冲洗 2~3 次即可备用。若冲洗后的仪器仍挂水珠, 则应将其沥干后, 再用重铬酸钾洗液浸泡 4~6 小时, 然后用自来水冲洗干净, 再用少量蒸馏水冲洗 2~3 次。

(3) 粘附有血浆的刻度吸量管, 可先用 45% 尿素溶液浸泡, 使血浆蛋白溶解, 然后用自来水冲洗干净。如尚不能达到清洁要求, 则可浸泡于重铬酸钾洗液中 4~6 小时, 再用大量自来水冲洗。最后用蒸馏水冲洗 2~3 次。也可用 1% 氨水浸泡, 使血浆溶解, 然后再依次用 1% 稀盐酸溶液、水、蒸馏水冲洗。

(4) 新购置的玻璃仪器有游离碱存在, 须置 1%~2% 稀盐酸中浸泡 2~6 小时, 除去游离碱质, 再用自来水冲洗干净, 最后用蒸馏水冲洗 2~3 次。

(5) 使用重铬酸钾洗液时应注意以下几点: ①需用重铬酸钾洗液(以下简称洗液)浸泡的容器, 在浸泡前尽量沥干, 再用洗液浸泡。否则洗液被稀释而降低其氧化力, 甚至失效。② Hg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Pb^{2+} 等离子能与重铬酸钾洗液作用, 可生成不溶性的化合物而沉积在容器壁上, 因此凡接触过含有此类离子的容器, 应先除去这些离子(可用稀硝酸或 5%~10% EDTA 钠等先行清除), 用水冲洗后、沥干, 再用洗液浸泡。③有机化合物、油类、有机溶剂均可使洗液还原失效, 因此容器壁上如附有大量油类、有机物等, 应先除去, 然后再用洗液浸泡。④洗液有很强的酸性和氧化性, 使用时应注意千万不要滴落在皮肤或衣物上, 以免被烧伤或烧坏。⑤重铬酸还原为硫酸铬时, 洗液由原来的深棕色变为绿色, 此时洗液就不具有氧化性了, 不能继续使用。

2. 吸量管的使用

吸量管是用来转移一定体积溶液的量器, 生化实验中常用的吸量管有 3 种。如图 1。

(1) 刻度吸量管: 刻度吸量管有刻度刻到尖端的及不刻到尖端的两种。使用前要仔细辨认。如使用刻度刻到尖端者, 将液体放出后, 应吹出最后留在管内的少量液体。

(2) 移液吸量管: 一般只在上端有一个刻度, 将所量取的液体放出后, 只需将吸量管的尖端触及受器壁约半分钟即可, 不得吹出尖端的液体。有的移液管在下端狭窄处也有一刻度线, 则两刻度线间的体积才代表该移液管上所注明的体积。

(3) 奥氏吸量管：准确度最高，使用时必须吹出留在尖端的液体。

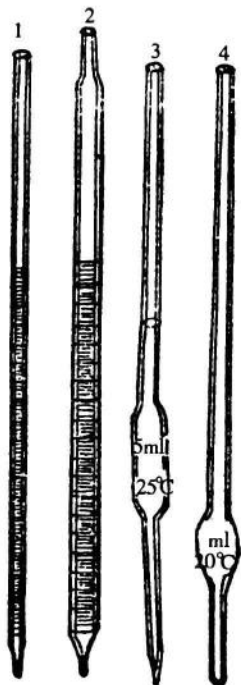


图1 各种吸量管

1, 2. 刻度吸量管;
3. 移液吸量管; 4. 奥氏吸量管

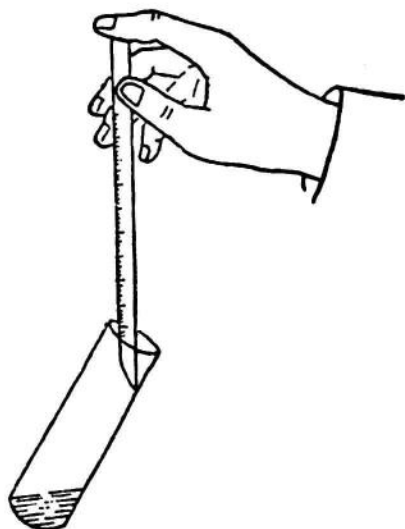


图2 使用吸量管的姿势

正确的使用方法：使用吸量管时先要看清楚刻度情况，选择适当容量的吸量管（等于或略大于需要的 ml 数）。拿吸量管时，标有刻度的一面要向着自己侧，以便于读取刻度。用右手手中指和拇指拿住吸量管上部，把管的尖端插入要取的液体中。左手持洗耳球把容器内液体吸至刻度上方时，立即用右手食指按住吸量管管口，以稳住吸量管内的液面。提起吸量管离开容器，用滤纸片擦干吸量管外壁所沾液体，再以管尖端接触容器内壁，慢慢放松食指，使吸量管内液面的月弯面的最低点下降至所需的刻度处（眼睛与刻度线要处于同一水平面上），立即用食指堵紧。然后将吸量管插到需加液体的容器中，让其尖端与容器内壁靠紧，松开食指让液体流出。液体流完后再等 15 秒钟，捻动一下吸量管后移去（如需吹的吸量管，则吹出尖端的液体后再捻转一下吸量管移去）。吸量管的正确持法见图 2。

定量吸（移）液器的使用：定量吸液器是吸量管的革新产品。由塑料制成。它具有使用方便，取、加样迅速，计量准确，不易破损，能吸取多种样品（只换吸嘴即可）。定量吸液器有两种类型：①固定式：只能取加一定容量，不能调节。其规格有 $10\mu\text{l}$ 、 $20\mu\text{l}$ 、 $25\mu\text{l}$ 、 $30\mu\text{l}$ 、 $50\mu\text{l}$ 、 $100\mu\text{l}$ 、 $200\mu\text{l}$ 、 $250\mu\text{l}$ 、 $300\mu\text{l}$ 、 $400\mu\text{l}$ 、 $500\mu\text{l}$ 、 $1000\mu\text{l}$ 等。②可调式：在一定容量范围内可根据需要调节取、加量。例如 $0 \sim 200\mu\text{l}$ 等。

定量吸液器的结构如图 3。

使用方法：吸液前先把吸嘴套在吸引管上，套上后要轻轻地旋紧一下，以保证接合严密。持法如图 4。用大拇指按下按钮到第一停止点，以排出一定容积空气，此时已可吸液。

吸液时把吸嘴尖浸入取样液内几毫米处，徐徐松开大拇指，让按钮慢慢自行复原，即完成取样。

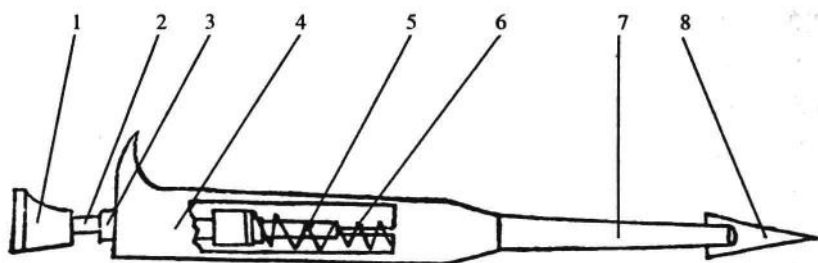


图3 定量吸(移)液器的结构

1. 按钮 2. 推杆 3. 压盘 4. 外壳 5. 柱塞 6. 弹簧 7. 吸吸管 8. 吸嘴

排液，将吸液器的吸嘴尖置于加样容器壁上，用拇指慢慢地将按钮按下到第一停止点，停留1秒钟（黏性较高的溶液停留时间长些）。然后把按钮按到第二停止点，再让吸嘴沿着容器向上滑动。当吸嘴尖与容器壁或溶液不接触时释放按钮，使其返回到初始位置。

3. 溶液的混匀

欲使一反应充分进行，必须使反应体系内各种物质分子很好地互相接触。因此，每加一种试剂后，都必须充分混匀。当溶液稀释时，亦需充分混匀，才能获得浓度均一的溶液。

混匀的方法通常有以下几种：

- (1) 使盛器做离心运动。
- (2) 左手持试管上端，以右手指轻击试管下半部，使管内溶液做旋转运动。
- (3) 利用旋涡混合器混匀。
- (4) 不得已时可于干燥清洁的玻璃棒搅匀。

无论用何种方法混匀，均需防止盛器内液体溅出或被污染，严禁用手指堵塞管口或瓶口震荡混匀。

4. 溶液的过滤

为了要将液体中的固体微粒与液体分离，我们常采用过滤的方法。过滤有普通过滤、减压过滤及保温过滤等。在此仅介绍普通过滤。

过滤前的准备：取一张圆形的滤纸，对折两次，打开（一边为三层，一边为一层）得一圆锥体，把它放入干燥的漏斗中。漏斗的边缘要比滤纸边缘高出大约0.5~1cm。漏斗壁与滤纸应完全密合。可用欲过滤的液体润湿一下滤纸，并用玻璃棒小心地按压滤纸，使滤纸各处紧密地贴在漏斗壁上。特别注意把滤纸的双摺部分按平，不要让其留有气泡，否则过滤时就会被冲开。

过滤时漏斗必须放正，它的边缘应处于水平面上。漏斗下部的尖端应与接受溶液的容器的内壁接触，这样可避免溶液流下时飞溅。向漏斗内倾注液体时，用一只手拿着玻棒（通常是左手），让玻棒差不多与滤纸垂直。液体一定要顺着玻棒往下流注。液体最多允许加到距滤纸边缘5mm处，液体加得过高，沉淀物则会随溶液浮起沾附于漏斗壁而混入滤液中。向



图4 吸(移)液器的持法

漏斗内加完液体后,要把盛有待滤液体的容器沿着玻棒向上滑动一下,以免待滤液体流到容器外面。

5. 离心机的使用

离心法也是分离沉淀物的一种方法。它是利用离心机转动的离心力,使密度较大的沉淀物沉积在管底部,以达到分离的目的。其上层的液体称为上清液。

电动离心机的使用方法:

(1) 将待离心的液体置于离心管或小试管中,并检查离心管(或小试管)的大小与离心机的套管是否相匹配。

(2) 取出离心机中的全部套管,并检查底部是否铺好软垫,套管底部有无碎玻片或漏孔(有碎玻片必须取出,漏孔应用蜡封住)检查合格后,将盛有离心液的两离心管分别放入套管中,然后连套管一起分置于粗天平两侧,通过往离心管与套管之间滴加水来调节两边重量使之达到平衡。

(3) 将已平衡的两只装有离心管的套管分别放入离心机相互对应的两插孔内。盖上离心机盖。打开电源开关。逐步扭动转速旋钮。缓慢增加离心机转速,直至所需的转速。达到离心所需的时间后,将转速旋钮逐步回零,关闭电源,让离心机自然停止转动后(注意不可强迫停转),取出离心管。

6. 滴定管的使用

滴定管是容量分析中最基本的一种量器,一般常用的滴定管的容量为 25ml、50ml 等。

滴定管有两种:①碱式滴定管(即下端装有橡皮管的),此种滴定管一般装碱液及不与橡皮起作用的溶液,如 KCN、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 等。②酸式滴定管(其下端为玻璃活塞者),此种滴定管一般盛酸及氧化性物质的溶液,以及会与橡皮起作用的溶液,如 KMnO_4 、 I_2 等。

滴定管的使用方法:

(1) 滴定管在使用前都必须洗净。滴定管的洗涤一般用洗液,也可用热肥皂或 Na_2CO_3 溶液洗涤,再用自来水冲洗,然后再用蒸馏水冲洗 2~3 次。

(2) 滴定管在使用前须检查其是否漏水,且转动是否灵活,否则要重新进行安装。安装方法为:先把滴定管的玻璃活塞取出,用滤纸将活塞内外擦干,然后在活塞小孔的两旁抹上薄薄的一层凡士林。凡士林用量要适宜,不宜过多,以免将孔塞住,并且凡士林要涂得均匀。安装好后,再用橡皮圈将其扎好。

(3) 在装溶液之前,需用少量溶液刷洗滴定管内壁 2 次(每次约 10ml 左右)。溶液应从试剂瓶直接倒入滴定管。装溶液于滴定管内时要高于零点,然后再放至零点,要注意滴定管尖端处不能留有气泡。如有气泡,则必须排除。排除气泡的方法为:若为酸式滴定管,可让溶液

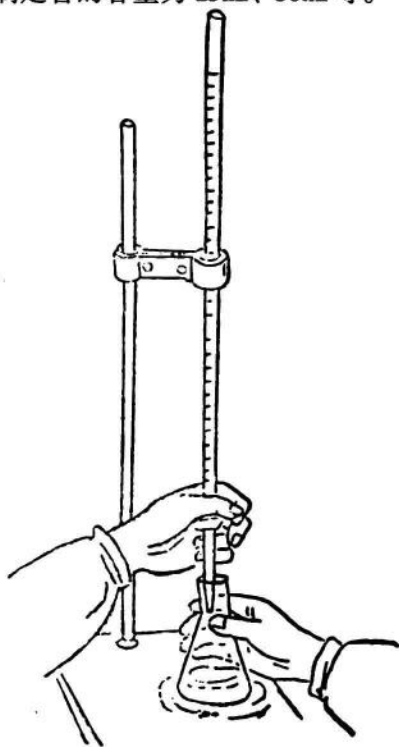


图 5 滴定的姿势

急流过尖端。若为橡皮头的碱式滴定管，则可用手指挤捏橡皮管中的玻璃小球，并将尖端稍向上倾斜，即可排出气泡。

(4) 每次滴定必须从零点开始，这样可以得到较好的精密度。滴定管装置务必垂直。

(5) 滴定时的正确姿势如图 5。活塞在右侧，用左手的食、中、拇三指扭转活塞。右手拿锥形瓶时时震摇，而震摇须向一个方向转动，不得左右摇动。在滴定时，溶液从管内滴下的速度在开始可稍快（但不得快于每秒 3~4 滴）。当接近终点前的 2~3ml，滴的速度应放慢，并时时观察终点的改变。

(6) 滴定完毕后，必须持 1~2 分钟后再读刻度读数。读刻度时手指不要接触滴定管，通常将白纸片放在管后，以便观察。溶液在滴定管内的液面呈弯月形，读数时应读取与弯月面相切之点。

(7) 滴定完毕之后，滴定管内的溶液不得倒回原试剂瓶内。倒掉滴定管内溶液，并立刻洗涤清洁后，倒置于滴定管架上，以备下次再用。

二、天平的使用方法

原理

称量是生物化学实验的基本操作方法。实验室常用的称量仪器是台式天平、扭力天平和分析天平等。它们都是根据杠杆原理设计而成的。一般来说，台式天平的感量为 0.1g；扭力天平的感量为 0.01g；而分析天平的感量为 0.0001g。根据对称量的准确度要求不同，选用不同类型的天平，这样既能达到实验对准确度的要求，又能节省称量时间，减少不必要的烦琐，也延长分析天平的寿命。

台式天平的结构见图 6。

分析天平根据其称量的灵敏度和准确度，可分为不同的等级与型号。下面介绍阻尼天平和电光天平的构造，见图 7 和图 8。

一般普通分析天平的主要部件是铝合金制成的三角形梁，梁的中间固定着一个玛瑙三棱柱，刀口向下，它架在一块玛瑙平板上。在梁的两端有两个相同的玛瑙三棱柱，刀口向上，两个挂钩分别架在上面，秤盘就挂在这个挂钩上。天平的灵敏性和玛瑙三棱柱刀口的锐利程度以及玛瑙平板的光滑情况有极大的关系。为了保护玛瑙、三棱柱刀口和玛瑙平板，分析天平装有旋钮控制的升降枢，在不使用天平或称物中加减砝码时，都要旋好升降枢钮，把天平梁托起，使玛瑙三棱柱和玛瑙平板分开，避免它们的磨损。

在天平梁上面的前端装有一个游码标尺，其中间刻度为零，正好处于天平的支点位置上，游码的重量为 10mg，游码标尺左右两端刻度各为 10，每一大格相当于 1mg，每一大格又为 10 小格，每一小格相当于 0.1mg，当游码放在 5 上时，相当于加一个 5mg 的砝码。

空气阻尼天平具有两个空气制摆装置，称阻尼器。由于阻尼器的作用使天平的指针在摆动两三次后很快地停止在平衡点上。阻尼天平一般能称准 0.1~0.2mg，最大称量为 100g 或

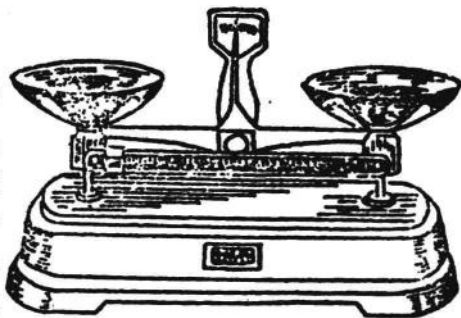


图 6 台式天平

200g。每台阻尼天平都有一盒砝码与天平配套使用。

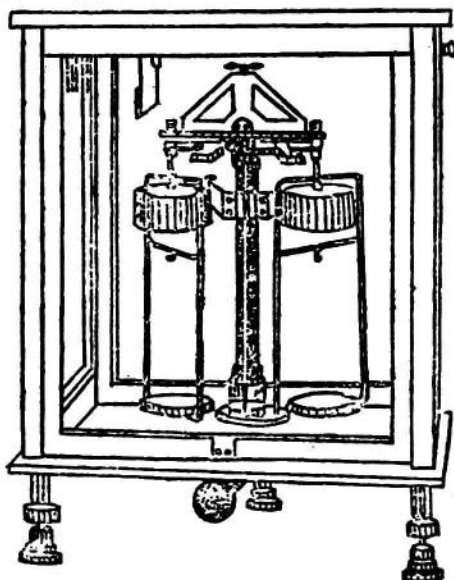


图7 空气阻尼天平

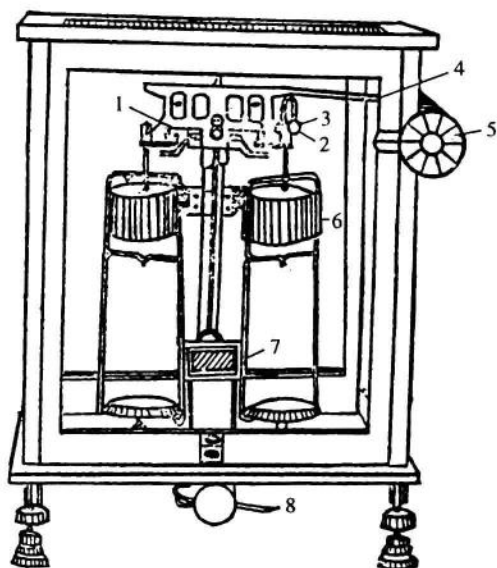


图8 部分机械加码双盘电光天平

1. 天平横梁; 2. 骑放环码横杆; 3. 环码;
4. 5. 加放环码的旋转器; 6. 空气阻尼器
7. 光幕 8. 微调零

电光天平是在阻尼天平的基础上改进而成的, 但增加两个装置, 一是机械加码装置, 二是光学读数装置。砝码由旋转器 5 操纵自动加取, 大小砝码全部由旋转器操作操纵的称为全自动电光分析天平, 1g 以下的砝码由旋转器操纵的称为半自动电光分析天平。在光幕上能直接读出 10mg 以下的重量。电光分析天平一般准确称量至 0.1mg, 最大称量为 100mg 或 200mg。

操作

1. 台式天平的使用方法

(1) 使用前需先把游码放在刻度尺的零处, 检查天平的摆动是否平衡。如果平衡, 则指针摆动时所指示的标尺上的左右格数应相等, 当指针静止时应指在标尺的中线。如果不平衡, 可以调节螺旋, 使之平衡。未载重天平的平衡点称“零点”

(2) 称重时, 将要称量的物品放在左盘内, 然后在右盘内添加砝码。砝码通常以大的加起, 如果偏重, 就调换小的砝码, 10g 以下的砝码用游码代替, 移动游码位置直至天平平衡为止, 载重天平的平衡点称“停点”。这时砝码和游码所示的质量就是称量物的质量。

(3) 称固体药品时, 应在两盘内各放一张质量相均衡的蜡光纸, 然后用药匙将药品放在左盘的纸上, 如称 NaOH、KOH 等易潮解或具有腐蚀性的固体时, 应衬以表面皿。称液体药品时, 要用已称过质量的容器盛放药品, 称法同前。

2. 分析的使用方法

(1) 零点的测定: 每次称量前首先要测定其零点, 即天平在不载重的情况下处于平衡状

态时指针在读数标尺上所指的位置。

阻尼天平零点测定：慢慢地旋动旋钮，开动天平，待天平停止摆动后，观察并记录指针在标牌上所处的格数，读至小数点后一位（如 9.7）。然后缓缓地关上天平，再测定一次，其变动应不大。为了便于称量，零点最好恰在正中 10 处（有的天平标尺中间为 0，则零点最好在 0 处），如差别太大可以轻轻地旋动天平调节螺丝。

电光天平零点测定：接通电源，慢慢地旋动旋钮，在不载重的情况下，检查光幕标尺位置，如零点与光幕上的标线不重合，可拨动微调零，挪动一下光幕的位置使其重合，若相差较大时，则可旋动平衡螺丝以调节空盘零点的位置。

（2）物体的称量：可直接称量，即先称取空称量瓶的重量，再将要称的样品放入称量瓶内，再称取重量，以后者重量减去前者即为样品实重。也可用减重法称量，即先称取盛有样品的称量瓶的重量，而后从量瓶中取出部分样品，再称取称量瓶的重量，以前者的重量减去后者的重量就是样品的实重。

称量方法：一般先将称量物体放在台式天平中称其粗略量，然后置于分析天平左盘中央，右盘加上粗略量砝码，关好侧门，小心放下升降枢，观察天平梁上指针的移动方向，如果指针向右偏移，这就表示所用砝码太轻，应升起升降枢，架稳天平梁，然后在右盘上增加一个砝码，再放下升降枢。如果这次指针向左偏斜，表示已加砝码重了些，此时再架稳天平梁，取下前面所加的砝码放回砝码盒中原来的位置内，换上稍轻的砝码，如此依照砝码由大到小的顺序，直至加入砝码已接近物品的重量。当调节到相差 10mg 砝码而仍造成过重或过轻的情况下，那就要用游码来调节。调节时可把游码在由小到大的刻度标尺位置上顺次移动，直到指针在天平载重的停点和天平不载重时零点相一致为止。这样盘中砝码和游码的总重量就是被称物品的重量。若用全自动电光天平，则大小砝码全部可由旋转器操纵。半自动电光天平 1g 以下的砝码由旋转器操纵；10mg 以下的尾数可全部从光幕上读出。其他方法同上。

（3）记录结果：若用阻尼天平，应先从砝码盒中的空位置及游码所在的位置，由大至小依次记录其重量，然后将砝码依次放回砝码盒的原来位置中，将旋转器回复零点，并再一次核对所记录的数字。

注意事项

1. 不得将称量的化学试剂直接放在天平盘上。
2. 过冷过热的物品都不能在天平上称量（会使水汽凝集在物品上，或引起天平箱内空气对流，影响准确称量）。凡经过干燥或烧灼的物品，必须先放在干燥器内在天平室中冷却至室温后方可称量。
3. 称量能吸收或放出水分和其他挥发性物品时，必须放在严密盖好的称量瓶中，以尽快速度进行称量。
4. 无论取放砝码或称量物品时，都必须关好升降枢钮，使天平梁升起固定，否则会使吊耳或横梁掉落或移位，损坏玛瑙刀口。
5. 天平各部尽可能不要用手接触，如必须接触时（旋转调节螺丝等），应将手指擦干净，最好是戴手套或手指套进行。
6. 砝码只能放在天平盘和砝码盒内，不得任意放在其他地方。

7. 取放物品和砝码时, 利用天平两侧的门, 读数时, 一定要关上天平的门。天平正面的门是为了装卸、修理和清扫天平内部时使用, 称量时不要开动。

8. 保持干燥, 天平箱内放有硅胶吸潮, 并及时烘烤除水, 保证其吸潮性能。

三、比色分析法及 72-1 型分光光度计的使用

重量分析法和容量分析法往往不能测定极微量的物质, 而比色分析法则能胜任。此外, 比色分析法操作过程亦较简便, 所以它是生物化学实验中最常用的一种定量方法, 也是目前临床生化检验中常用的定量方法。

原理

比色分析法是通过比较有色物质溶液颜色的深浅, 来测知该物质浓度的方法。有些被检测的物质溶液本身就具有颜色, 而有些物质虽不具有颜色, 但可于试样中加入某种适宜的试剂, 使其产生有色化合物。其颜色的深浅与试样中该化学成分的含量成正比。借助于光电比色计或分光光度计将未知含量的有色溶液与已知含量的有色标准液进行比色, 通过计算就可求出未知溶液的含量。其基本原理即根据 Lambert 定律和 Beer 定律, 比色分析法的计算公式亦根据此二定律导衍而得。

Lambert 定律: 一束单色光线通过一有色溶液后, 由于溶液吸收了一部分光, 所以光线的强度就要减弱。当溶液浓度 (C) 不变时, 光透过的液层愈厚, 则光线强度的减弱就愈显著。见图 9。

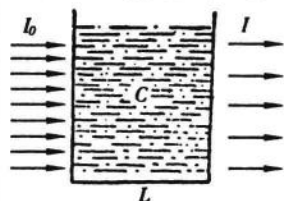


图 9 光的吸收示意图

若 I_0 = 光线通过溶液前的强度 (入射光强度)

I = 光线通过溶液后的强度 (透过光强度)

L = 溶液的厚度

而 $\frac{I}{I_0}$ 表示光线透过溶液的程度, 称为透光度用 T 表示。则 $T = \frac{I}{I_0}$

Lambert 定律证明 $-\lg \frac{I}{I_0} \propto L$, 即 $-\lg T \propto L$

写成等式为 $-\lg \frac{I}{I_0} = K_1 L$

$-\lg \frac{I}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I}$, 故上式可写成 $\lg \frac{I_0}{I} = KL$

令 $\lg \frac{I_0}{I}$ 为吸光度 (A), 或称为消光度 (E), 或称光密度 (OD 或 D),

所以 $A = K_1 L$

(1)

由 (1) 式可知, 当溶液的浓度不变, 溶液的吸光度 (A) 与溶液液层的厚度成正比, 这就是 Lambert 定律。

上式中的 K_1 为常数, 其数值与入射光的波长和溶液的性质有关。

Beer 定律: 一束单色光线通过一有色溶液后, 若溶液的厚度不变, 其透过光的强度与

溶液的浓度 (C) 有关, 溶液的浓度愈大, 则透过光的强度愈弱, 它们的关系为

$$-\lg \frac{I}{I_0} \propto C, \quad -\lg \frac{I}{I_0} = -\lg T = \lg \frac{I_0}{I} = A$$

故 $A \propto C$, 写成等式为 $A = K_2 C$ (2)

故 K_2 亦是常数, 其数值随入射光的波长和溶液的性质而改变。

合并上述 (1), (2) 两式, 得 $A = KCL$ (3)

这就是 Lambert-Beer 定律。即溶液的吸光度与溶液的浓度和液层厚度的乘积成正比。

在比色分析中, 在相同条件下对两个性质相同而浓度不同的溶液进行测定, 一个为已知浓度的标准溶液, 一个为未知浓度的溶液。

设 C_1 为标准溶液的浓度

C_2 为未知液的浓度

A_1 为测得的标准液的吸光度

A_2 为测得的未知液的吸光度

按 (3) 式, 则 $A_1 = KC_1 L_1$; $A_2 = KC_2 L_2$

$$\text{移项得 } \frac{A_1}{C_1} = KL_1; \quad \frac{A_2}{C_2} = KL_2$$

在使用光电比色计或分光光度计时, 溶液放在固定的比色杯中进行比色, 故 $L_1 = L_2$, 又因是同一种溶液, K 值相同, 上两式的左侧相等, 故

$$\frac{A_1}{C_1} = \frac{A_2}{C_2} \quad \text{移项得} \quad C_2 = \frac{A_2}{A_1} \times C_1 \quad (4)$$

(4) 式是比色分析中常用的重要公式, 只要再乘以样品的稀释倍数, 就可求得该物质的含量。在以后的实验中要经常用到它, 须牢记。

四、72-1 型分光光度计的结构与使用方法

1. 仪器简介

72-1 型分光光度计的设计原理及仪器的外形如图 10 所示。

分光光度计的基本原理与光电比色计的基本原理相同。所不同之处, 一是以棱镜和光栅来代替滤光片, 这样可在 420~700nm 波长范围内任意选择测定所需的波长, 并且可以得到很狭的波长范围的光 (接近单色光), 这样就提高了仪器的灵敏度, 使测定的结果更精确。二是以真空光电管或光电倍增管替代了硒光电池, 并应用放大装置以提高灵敏度。

2. 72-1 型分光光度计的使用方法

(1) 使用前应检查仪器各部件是否正常, 各旋钮应位于起始位置。

(2) 检查电源电压是否与仪器要求相符。

(3) 接通电源, 打开比色槽暗箱盖“8”, 调节 0 电位钮, 使电表指针位于透光度 (T) 于 0 处, 预热 10 分钟。

(4) 旋动波长选择钮“1”, 选择适当波长。用灵敏选择钮“6”选择相应的放大灵敏度 (灵敏度选择钮先调 1 档, 如调不到 0, 则再逐步增加高档)。

(5) 取三只比色杯, 分别装入空白液, 标准液和测定液, 依次放入比色槽内。