



全国普通高等院校工科化学规划精品教材



生物化学 实验

(第二版)

✱ 刘志国 主编

**SHENGWU HUAXUE
SHIYAN**



华中科技大学出版社
<http://www.hustp.com>

生物化学实验

(第二版)

主 编 刘志国

副主编 于建生 陈 雄 李敏康 廖贵芹
金朝霞 田光辉 夏新奎

参 编 (按姓氏笔画排序)

王 欣	王金华	王学增	车振明
刘 军	刘 杰	闫达中	李红芳
李明元	吴正奇	宋宏新	徐 宁
曾万勇			

华中科技大学出版社
中国·武汉

内 容 提 要

全书分九章,共 63 个实验项目,包括糖类物质的检测与分析、脂类物质的检测与分析、氨基酸的检测与分析、蛋白质的分离制备与分析、酶的分离制备与分析、维生素的检测分析、核酸的分离与分析、综合性与设计性实验等常用生物化学实验内容。另外还介绍了生物化学实验的基本知识与基本操作,并在最后附上生物化学实验中常用参数,供实验中参考。

本书适合作为普通高等院校各类理工科专业的生物化学实验课教材或参考书。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验/刘志国主编. —2 版. —武汉:华中科技大学出版社,2014. 5
ISBN 978-7-5680-0041-3

I. ①生… II. ①刘… III. ①生物化学-实验-高等学校-教材 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 100217 号

生物化学实验(第二版)

刘志国 主编

策划编辑:王新华

责任编辑:王新华

封面设计:秦茹

责任校对:封力煊

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)81321915

录排:华中科技大学惠友文印中心

印刷:华中理工大学印刷厂

开本:710mm×1000mm 1/16

印张:15.5

字数:329 千字

版次:2007 年 4 月第 1 版 2014 年 6 月第 2 版第 1 次印刷

定价:32.00 元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

前 言

生命科学在 20 世纪有了惊人的发展,并已经成为当今世界三大发展最快的现代科学之一。生物化学是生命科学领域中的重要组成部分,也是较为活跃的学科之一。作为一门以实验为基础的学科,生物化学实验方法和研究技术成为推动生物化学发展的重要动力。加强与提高生物化学实验技术的研究与教学,对生物化学课程的学习具有重要作用。与传统生物化学实验内容相比,当今生物化学研究更多地涉及生命现象的本质与化学基础,并广泛探讨生物分子结构与功能的关系、信息传递过程及基因表达调控的规律等,这使得现代生物化学实验研究与教学在内容上更加深入,更加广泛。

为了适应学科的发展及“十二五”期间我国高等教育改革的需要,充分体现学科发展状况,体现素质教育、创新教育及个性教育的思想,围绕“培养高素质、宽口径人才”的目标,提高教学水平和教学质量,并结合近年来生物化学实验技术和方法的发展及实验室条件,在华中科技大学出版社的协调与组织下,相关院校共同编写了适合普通院校使用的生物化学实验教材,以适应当今生物化学学科发展的需要。

全书分九章,共 63 个实验项目,包括糖类物质的检测与分析、脂类物质的检测与分析、氨基酸的检测与分析、蛋白质的分离制备与分析、酶的分离制备与分析、维生素的检测分析、核酸的分离与分析、综合性与设计性实验等常用生物化学实验内容。另外还介绍了生物化学实验的基本知识与基本操作,并在最后附上生物化学实验中常用参数,供实验中参考。

本书适合作为普通高等院校各类理工科专业的生物化学实验课教材或参考书。

本书由刘志国主编。参加本书编写的有:武汉轻工大学刘志国、刘军、闫达中、曾万勇,青岛科技大学于建生、刘杰、李红芳,湖北工业大学陈雄、王金华、吴正奇、徐宁,武汉生物工程学院廖贵芹,陕西科技大学李敏康、宋宏新,大连工业大学金朝霞,陕西理工学院田光辉,西华大学车振明、李明元,信阳农林学院夏新奎、王欣、王学增。华中科技大学出版社对本书的编写给予了大力支持与帮助,在此表示衷心的感谢。

由于我们的水平和经验有限,本书难免存在不足之处,敬请使用本书的师生和读者批评指正。

编 者

目 录

第一章 实验基本知识与基本操作	(1)
第一节 生物化学实验室规则	(1)
第二节 实验室安全和防护知识	(2)
第三节 基础实验操作技能	(6)
第四节 实验误差与提高实验准确度的方法	(39)
第五节 实验记录与实验报告	(44)
第二章 糖类物质的检测与分析	(48)
实验 1 糖的呈色反应和还原糖的检验	(48)
实验 2 苯酚-硫酸法测定总糖浓度	(50)
实验 3 还原糖的测定——3,5-二硝基水杨酸比色法	(52)
实验 4 粗淀粉的测定——1%盐酸旋光法	(54)
实验 5 血糖的测定	(57)
I 磷钼酸比色法	(57)
II 蒽酮比色法	(59)
III 葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法(GOD-POD 法)	(61)
实验 6 糖酵解中间产物的鉴定	(63)
实验 7 可溶性糖的硅胶 G 薄层层析	(65)
第三章 脂类物质的检测与分析	(68)
实验 8 粗脂肪含量的测定——索氏抽提法	(68)
实验 9 脂肪酸值的测定——碱滴定法	(69)
实验 10 油脂皂化与皂化值的测定	(72)
实验 11 碘价的测定(Hanus 法)	(73)
实验 12 血清胆固醇的测定	(75)
I 化学比色法	(75)
II 酶法	(76)
实验 13 卵磷脂的提取与鉴定	(78)
实验 14 脂肪酸的 β -氧化	(80)
第四章 氨基酸的检测与分析	(83)
实验 15 纸层析法分离鉴定氨基酸	(83)
实验 16 甲醛滴定法测定氨基氮含量	(85)
实验 17 瓦氏呼吸仪法测定 L-谷氨酸的含量	(87)

第五章 蛋白质的分离制备与分析	(91)
实验 18 蛋白质的两性反应与等电点的测定	(91)
实验 19 蛋白质的沉淀反应、颜色反应及电荷的测定	(93)
实验 20 蛋白质含量测定(一)——微量凯氏定氮法	(97)
实验 21 蛋白质含量测定(二)	(101)
I 双缩脲法	(101)
II 考马斯亮蓝 G-250 法(Bradford 法)	(104)
III Folin 试剂法	(106)
IV BCA 法	(108)
V 紫外(UV)吸收测定法	(109)
实验 22 酪蛋白的制备	(112)
实验 23 凝胶层析法分离蛋白质	(113)
实验 24 血红蛋白的凝胶过滤	(115)
实验 25 蛋白质相对分子质量的测定——SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法	(118)
实验 26 血清蛋白质乙酸纤维素薄膜电泳	(126)
第六章 酶的分离制备与分析	(130)
实验 27 酶的特性——底物专一性	(130)
实验 28 pH 值对酶活性的影响	(132)
实验 29 温度对酶活性的影响	(133)
实验 30 脲酶米氏常数的测定	(135)
实验 31 糖化型淀粉酶活性的测定	(138)
实验 32 脂肪酶活性测定	(140)
实验 33 乳酸脱氢酶活性的测定	(142)
实验 34 大麦萌发前后淀粉酶活性的测定	(144)
实验 35 发色底物测定大曲中 α -1,4-葡萄糖苷酶活性	(147)
第七章 维生素的检测分析	(150)
实验 36 维生素 B ₁ 的荧光测定	(150)
实验 37 维生素 B ₂ 的测定	(152)
实验 38 植物中抗坏血酸含量的测定	(155)
实验 39 维生素 A 的测定	(156)
第八章 核酸的分离与分析	(160)
实验 40 哺乳动物基因组 DNA 的提取	(160)
实验 41 植物基因组 DNA 的提取	(162)
实验 42 植物总 RNA 的提取与电泳	(165)
实验 43 酵母 RNA 的分离与组分鉴定	(167)
实验 44 组织和细胞 RNA 的制备	(170)

实验 45	核苷酸的纸电泳	(172)
实验 46	紫外分光光度法测定核酸的含量	(174)
实验 47	RNA 与 DNA 的测定	(176)
实验 48	DNA 的琼脂糖凝胶电泳	(179)
实验 49	质粒 DNA 的微量制备(碱裂解法、煮沸法)	(182)
实验 50	质粒 DNA 的酶切鉴定及琼脂糖凝胶电泳	(187)
实验 51	质粒 DNA 的大量制备与纯化	(189)
实验 52	大肠杆菌感受态细胞的制备与转化	(193)
实验 53	PCR 基因扩增	(198)
第九章	综合性与设计性实验	(200)
实验 54	鸡卵类黏蛋白的分离纯化	(200)
实验 55	纤维素酶活性测定及 pH 值对其活性的影响	(205)
实验 56	酪氨酸酶的提取及其催化活性研究	(208)
实验 57	酵母蔗糖酶的纯化及性质研究	(212)
I	酵母蔗糖酶的提取与纯化	(212)
II	蔗糖酶 K_m 值测定及脲的抑制作用	(213)
III	pH 值对酶活性的影响和最适 pH 值的测定	(217)
IV	温度对酶活性的影响和反应活化能的测定	(220)
实验 58	固定化酵母细胞及蔗糖酶活性的检测	(222)
实验 59	温度、pH 值、激活剂和抑制剂对唾液淀粉酶活性的影响	(224)
实验 60	溶菌酶结晶的制备及活性测定	(226)
实验 61	转基因农产品的 PCR 检测	(230)
实验 62	橘皮果胶的提取及果冻的制备	(235)
实验 63	发酵过程中无机磷的利用和 ATP 的生成	(236)
附录	实验室中常用参数	(239)
参考文献		(240)

第一章 实验基本知识与基本操作

第一节 生物化学实验室规则

(1) 生物化学实验不同于化学实验和生物学实验,而有其独特的实验技能和基本操作。实验前必须认真预习,明确实验目的、原理、操作的关键步骤及注意事项,写出预习报告。

(2) 实验时应本着认真、积极的态度,在老师的指导下完成每次实验。注意观察实验过程中出现的现象和结果,并对实验结果展开讨论。结果不良时,必须重做。

(3) 实验中,应听从老师指导,严格遵守操作规程,试剂用完后应立即将试剂瓶盖严,放回原处。并应及时将实验结果和原始数据如实记录在实验报告上,当堂写出实验报告。

(4) 实验后,必须把仪器洗净放入仪器柜内,清扫实验台面、地面,试剂瓶要摆放整齐。要长期保持实验室内清洁,不乱丢纸屑等固体废弃物。

(5) 自觉遵守课堂纪律,不迟到早退,保持室内安静,不高声谈笑。同学间应互助友爱。

(6) 爱护实验器材,非本次实验使用的仪器设备未经老师允许不得乱动。本次实验必须使用的仪器设备,在了解仪器性能和操作规程之前,不得贸然使用,更不得擅自拆卸或将部件带出室外。实验过程中,如发现设备损坏或运转异常,应立即报告老师。

(7) 实验室内严禁吸烟。对腐蚀性或易燃性试剂,操作时要格外小心。如酒精、乙醚等低沸点有机溶剂,使用时应禁明火,远离火源,若需加热要用水浴加热,不可直接在火上加热。若发生酸碱灼伤事故,应立即用大量自来水冲洗。对酸灼伤者应再用饱和 NaHCO_3 溶液中和,而碱灼伤者应用饱和 H_3BO_3 溶液中和,被氧化剂伤害者应用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液处理,严重者应马上送医院。

(8) 离开实验室前必须关好门窗,切断电源、水源,关好天然气阀门,以确保安全。

(9) 每次实验课由学生轮流值日。值日生要负责打扫实验室的卫生,检查水、电、燃气的安全状况,关好门窗,并为下一组同学打好蒸馏水,经老师检查后,方可离开实验室。

第二节 实验室安全和防护知识

在生物化学实验中难免有许多危险存在,因此每一位在生物化学实验室工作的人员都必须有充分的安全意识、严格的防范措施和丰富实用的防护救治知识,以确保发生意外时能正确地进行处置,防止事故进一步扩大。

一、着火

在生物化学实验室里经常使用大量的有机溶剂,如甲醇、乙醇、丙酮、氯仿等,而且经常使用电炉等火源,因此极易导致火灾的发生。常见有机溶剂的易燃性如表 1-1 所示。

表 1-1 常见有机溶剂的易燃性

名 称	沸点/℃	闪点 ^① /℃	自燃点 ^② /℃
乙醚	34.5	-45	180
丙酮	56	-17	465
二硫化碳	46.5	-30	100
苯	80	-11	—
乙醇(95%)	78	12	400

注:① 闪点是液体表面的蒸气和空气的混合物在遇明火或火花时着火的最低温度。

② 自燃点是液体蒸气在空气中自燃时的温度。

由表 1-1 可以看出:乙醚、丙酮、二硫化碳、苯的闪点都很低,因此不得储存在可能产生电火花的普通冰箱内。低闪点液体的蒸气只要接触红热物体的表面便会着火,其中乙醚、二硫化碳尤其危险。

为预防火灾,必须严格遵守以下操作规程:

(1) 严禁在开口容器和密闭体系中用明火加热有机溶剂,只能使用加热套或水浴加热。

(2) 废弃有机溶剂不得倒入废物桶,只能倒入回收瓶内,再集中处理;量少时,用水稀释后排入下水道。

(3) 不得在烘箱内存放、干燥、烘焙有机物。

(4) 在有明火的实验台面上不允许放置盛有有机溶剂的开口容器或倾倒有机溶剂。

一旦实验室中发生火灾,切不可惊慌失措,要保持镇静,根据具体情况正确地进行灭火或立即报火警(火警电话为 119)。具体的灭火方法分述如下:

(1) 容器中的易燃物着火时,应用灭火毯盖灭。因已确证石棉有致癌性,故改用玻璃纤维布做灭火毯。

(2) 乙醇、丙酮等可溶于水的有机溶剂着火时可以用水灭火。汽油、乙醚、甲苯等有机溶剂着火时不能用水,只能用灭火毯或沙土盖灭。

(3) 导线、电器和仪器着火时不能用水和二氧化碳灭火器灭火,应先切断电源,然后用 1211 灭火器(内装二氟-氯-溴甲烷)灭火。

(4) 个人衣物着火时,切勿慌张奔跑,以免风助火势,应迅速脱衣,用水龙头浇水灭火;火势过大时可就地卧倒打滚压灭火焰。

二、爆炸

在生物化学实验室内,防止爆炸事故的发生是极为重要的,因为一旦发生爆炸其毁坏力极大,后果将十分严重。生物化学实验室内常用的易燃物蒸气在空气中的爆炸极限(体积百分数)见表 1-2。

表 1-2 易燃物蒸气在空气中的爆炸极限

名 称	爆炸极限(体积百分数)/(%)	名 称	爆炸极限(体积百分数)/(%)
乙醚	1.9~36.5	丙酮	2.6~13
氢气	4.1~74.2	乙炔	3~82
甲醇	6.7~36.5	乙醇	3.3~19

加热时会发生爆炸的混合物包括有机化合物与氧化铜、浓硫酸与高锰酸钾、三氯甲烷与丙酮等。

常见的引起爆炸事故的原因如下所述:

- (1) 随意混合化学药品,并使其受热、受摩擦或撞击;
- (2) 在密闭的体系中进行蒸馏、回流等加热操作;
- (3) 在加压或减压实验中使用了不耐压的玻璃仪器,或因反应过于激烈而失去控制;
- (4) 易燃易爆气体大量逸至室内空气中;
- (5) 高压气瓶减压阀摔坏或失灵。

三、中毒

生物化学实验室中常见的化学致癌物有石棉、砷化物、铬酸盐、溴化乙锭等,剧毒物有氰化物、砷化物、乙腈、甲醇、氯化氢、汞及其化合物等。中毒的原因主要是不慎吸入、误食或由皮肤渗入。

中毒的预防措施如下所述:

- (1) 保护好眼睛最重要,使用有毒或有刺激性气味的气体时,必须戴防护眼镜,并应在通风橱内进行;

- (2) 取用有毒物品时必须戴橡皮手套;
- (3) 严禁用嘴吸吸量管,严禁在实验室内饮水、进食、吸烟,禁止赤膊和穿拖鞋;
- (4) 不要用乙醇等有机溶剂擦洗溅洒在皮肤上的药品。

中毒急救的方法主要有如下几种:

(1) 误食了酸或碱,不要催吐,可先立即大量饮水。误食碱者应再喝些牛奶;误食酸者,饮水后再服 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 乳剂,最后饮些牛奶。

(2) 吸入了毒气者,应立即转移到室外,并解开衣领;对休克者应施以人工呼吸,但不要对口对口法。

(3) 砷和汞中毒者应立即送医院急救。

四、外伤

1. 化学灼伤

(1) 眼睛灼伤。眼内若溅入化学药品,应立即用大量水冲洗 15 min,不可用稀酸或稀碱冲洗。

(2) 皮肤灼伤。皮肤灼伤主要包括如下三种:

① 酸灼伤:先用大量水冲洗,再用稀 NaHCO_3 溶液或稀氨水浸洗,最后再用水冲洗。

② 碱灼伤:先用大量水冲洗,再用 1% 硼酸或 2% 乙酸溶液浸洗,最后再用水冲洗。

③ 溴灼伤:比较危险,伤口不易愈合,一旦被溴水灼伤,应立即用 20% 硫代硫酸钠溶液冲洗,再用大量水冲洗,然后包上消毒纱布后就医。

2. 烫伤

使用火焰、蒸气、红热的玻璃和金属时易发生烫伤。发生烫伤后应立即用大量水冲洗和浸泡,若皮肤上起了水泡,不可挑破,包上纱布后立即就医。轻度烫伤可涂抹鱼肝油和烫伤膏等进行处理。

3. 割伤

这是生物化学实验室内常见的伤害,要特别注意预防,尤其是在向橡皮塞中插入温度计、玻璃管时应特别注意,一定要用水或甘油对其进行润滑,用布包住轻轻旋入,切不可用力过猛。当发生严重割伤时应立即包扎止血,就医时务必检查受伤部位神经是否被切断。若有玻璃碎片进入眼内,必须十分小心谨慎,不可自取,不可转动眼球,可任其流泪,若碎片不出,则用纱布轻轻包住眼睛急送医院处理。若有木屑、尘粒等异物进入眼内,可由他人翻开眼睑,用消毒棉签轻轻取出或任其流泪,待异物排出后再滴几滴鱼肝油。

在实验室里应准备一个完备的小药箱,专供急救时使用。药箱内应备有医用酒精、红药水、紫药水、止血粉、创可贴、烫伤油膏(或万花油)、鱼肝油、1% 硼酸溶液或 2% 乙酸溶液、1% 碳酸氢钠溶液、20% 硫代硫酸钠溶液、医用镊子和剪刀、纱布、药棉、

棉签、绷带等。

五、触电

在生物化学实验中要使用大量的电器,因此每位实验人员都必须掌握安全用电的常识,避免发生一切用电事故。一般情况下,当 50 Hz、25 mA 的电流通过人体时,人的呼吸会发生困难,而 50 Hz、100 mA 以上的电流通过时则会致人死亡。为防止触电事故的发生,需注意以下几点:

- (1) 不能用湿手接触电器;
- (2) 电源裸露部分均应绝缘;
- (3) 坏的接头、插头、插座和不良导线应及时更换;
- (4) 先接好线路再插接电源,先关电源再拆线路;
- (5) 仪器使用前要先检查外壳是否带电;
- (6) 如遇有人触电,要先切断电源再救人。

六、预防生物危害

(1) 生物材料如微生物或动物的组织、细胞培养液、血液、分泌物都可能存在细菌和病毒感染的潜在性危险,这虽不如上述伤害明显,但也绝不能忽视。如通过血液感染的血清性肝炎(澳大利亚抗原)就是最大的生物危害之一,感染途径除通过血液外,也能通过其他体液传播病毒,因此在处理各种生物材料时必须谨慎、小心,做完实验后必须用肥皂、洗涤剂或消毒液充分洗净双手。

(2) 使用微生物作为实验材料,特别是使用和接触含病原的生物材料时,尤其要注意安全和清洁卫生。被污染的物品必须进行高压消毒或烧成灰烬,被污染的玻璃用具应立即浸泡在适当的消毒液中,再清洗和高压灭菌。

(3) 在进行遗传重组的实验室中更应根据有关规定加强生物伤害的防范措施。

七、警惕放射性伤害

放射性同位素在生物化学实验中应用得愈来愈普遍,放射性伤害也应引起实验者的高度警惕。放射性同位素的使用必须在指定的具有放射性标志的专用实验室中进行,切忌在普通实验室中操作和存放带有放射性同位素的材料。

八、溴化乙锭溶液的净化处理

溴化乙锭是强诱变剂,具有中度毒性,取用含有这一染料的溶液时务必戴手套。该溶液经使用后应按下面介绍的方法进行净化处理。

1. 溴化乙锭浓溶液(即浓度大于 0.5 mg/mL 的溴化乙锭溶液)的净化处理

- (1) 加入足量的水使溴化乙锭的浓度降低至 0.5 mg/mL 以下。
- (2) 加入 1 倍体积的 0.5 mol/L 高锰酸钾溶液,小心混匀后再加 1 倍体积的

2.5 mol/L 盐酸。小心混匀后,于室温放置数小时。

(3) 加入 1 倍体积的 2.5 mol/L 氢氧化钠溶液,小心混匀后可丢弃该溶液。

2. 溴化乙锭稀溶液(如含有 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭的电泳缓冲液)的净化处理

(1) 每 100 mL 溴化乙锭溶液中加入 100 mg 粉状活性炭。

(2) 于室温放置 1 h,不时摇动,或加入 2.9 g Amberlit XAD-16 吸附剂,于室温放置 12 h,不时摇动。

(3) 用 Whatman 1 号滤纸过滤溶液,丢弃滤液。

(4) 用塑料袋封装滤纸和活性炭,作为有害废物予以丢弃。

第三节 基础实验操作技能

一、玻璃器皿的清洗

清洗玻璃器皿的方法有很多,一般根据实验的要求、污物的性质和污染的程度来选用清洗方法。通常黏附在器皿上的污物,有可溶性物质,也有不溶性物质,如尘土、油污等。针对各种情况,可以分别采用下列洗涤方法。

(一) 能用毛刷刷洗的玻璃器皿的清洗方法

能用毛刷刷洗的玻璃器皿有试管、烧杯、试剂瓶、锥形瓶、量筒等广口玻璃器皿,其清洗方法如下:

(1) 用水刷洗。根据要洗涤的玻璃器皿的形状选择合适的毛刷,如试管刷、烧杯刷、瓶刷、滴定管刷等。用毛刷蘸水刷洗,可使可溶性物质溶去,也可使附着在玻璃器皿上的尘土等不溶物脱落下来,但往往洗不掉油污和其他有机物质。

(2) 用洗涤剂刷洗。蘸取洗涤剂,仔细刷洗玻璃器皿的内壁(特别是内壁)。为了提高洗涤效率,可将洗涤剂配成 2%~5% 的水溶液,加温浸泡要洗的玻璃器皿片刻后,再用毛刷反复刷洗。对污物黏附较紧的玻璃器皿,可在上述洗涤液中加入适量去污粉,刷洗后用自来水冲洗干净。若仍有油污,可用铬酸洗液浸泡,使用时应先将要洗涤的玻璃器皿内的水液倒尽,再将铬酸洗液倒入欲洗涤的玻璃器皿中浸泡数分钟至数十分钟,如将洗液预先加至温热,则效果更好。刷洗后的玻璃器皿和经铬酸洗液浸泡后的玻璃器皿用自来水反复冲洗,将洗涤剂彻底冲洗干净(如果洗涤剂没有洗净,装水后弯月面变平)后,再用蒸馏水或去离子水清洗 2~3 次。将清洗后的玻璃器皿置于器具架上自然沥干,或置于 100~130℃ 的烤箱中烘干。

(二) 不能用毛刷刷洗的玻璃器皿的清洗方法

(1) 吸量管、容量瓶等小口玻璃量器,使用后应立即浸泡于凉水中,勿使残留物质干涸。工作完毕后应用流水冲洗玻璃量器,初步除去附着的试剂、蛋白质等物质。

量器晾干后浸泡于铬酸溶液中 4~6 h 或过夜,然后用自来水充分冲洗干净,再用蒸馏水或去离子水清洗 2~3 次,置于量器架上自然干燥。急用时可置于烤箱中烘干,温度应低于 80 °C,或在量器中加入少量无水乙醇或甲醇、乙醚之类的溶剂,慢慢转动使其布满整个容器内壁,然后倒出,再吹干或加负压抽干,即可达到快速干燥的目的。

(2) 分光光度计用的比色皿,用完后应立即用自来水反复冲洗干净。当洗不净时可采取以下任何一种方法处理:

① 可用 3.5 mol/L HNO_3 溶液或稀盐酸冲洗,再用自来水、蒸馏水冲洗干净;

② 浸泡于溶液 I (0.2 mol/L Na_2CO_3 溶液+少量阴离子表面活性剂),然后水洗,再浸泡于溶液 II (体积比为 1:5 的 HNO_3 溶液+少许 H_2O_2),并用自来水、蒸馏水冲洗干净;

③ 当容器被带有颜色的有机物质沾污时,浸泡于盐酸-乙醇溶液(浓盐酸与 95% 乙醇的体积比为 1:2)后,用自来水或蒸馏水冲洗干净。

切忌用毛刷刷洗,或用粗糙的布或纸擦拭,以免损坏比色皿的透光面,亦应避免用较强的碱液或强氧化剂清洗。洗净后倒置晾干备用。

(3) 可调定量的加液器使用完毕后,如长期不使用,必须把加液器放在蒸馏水内连续抽打数次,把管内活塞洗净,以免活塞卡死,特别是使用容易结晶的碱性液体后,除了要在自来水、蒸馏水内清洗外,还要将活塞抽出进行清洗,然后自然晾干或置于烤箱内在 80 °C 以下烘干,装好保存。

(三) 新玻璃器皿的清洗

新玻璃器皿的表面常附着有游离的碱性物质,可先用热的洗液或肥皂水刷洗,然后流水冲洗,再用 0.3~0.6 mol/L 盐酸浸泡 4 h 以上,以除去游离碱,再用流水冲洗干净。对容量较大的容器,洗净后,注入少量浓盐酸,慢慢转动,使浓盐酸布满整个容器内壁,数分钟后倾倒入浓盐酸,用流水冲洗干净,然后用蒸馏水清洗 2~3 次,自然晾干或置于烤箱内烘干备用。

(四) 油污玻璃器皿的清洗

被石蜡、凡士林或其他油脂类沾污的玻璃器皿,要单独洗涤,以防止油脂污染其他玻璃器皿,增加洗涤难度。洗涤时,首先要除去油脂,将油污玻璃器皿倒立于铺有吸水力强的厚纸的铁丝管内,置于 100 °C 的烤箱中烘烤半小时(小心失火),使油脂熔化并被厚纸吸收,再将其置于碱性洗液中煮沸,趁热洗刷,可除去油脂。然后按上述(一)或(二)的方法清洗。

生物化学实验中玻璃器皿清洁的要求是以化学清洁的标准来衡量的,即玻璃器皿表面不应黏附任何杂质。经自来水洗净的玻璃仪器,其表面往往还留有 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cl^- 等离子,所以应用蒸馏水或去离子水清洗 2~3 次,将它们洗去。使用蒸馏水或去离子水的目的,只是洗去附着在仪器表面上的自来水,所以应采用“少量多次”

的原则。清洁的玻璃器皿用蒸馏水清洗后,其内壁应能被水均匀湿润且无条纹及水珠,十分明亮光洁。

二、常用洗液及其配制

(1) 铬酸洗液。铬酸洗液是浓硫酸和饱和重铬酸钾溶液的混合液,具有很强的氧化性、腐蚀性、酸性和去污能力,是实验室中最常用的洗涤液。在配制铬酸洗液时,务必记住应把浓硫酸加到重铬酸钾溶液中!把水溶液加到浓硫酸中是极其危险的,因为会发生迸溅。切勿让洗涤液接触皮肤或衣服,一旦溅出,应马上用大量自来水冲洗。洗液用后收回,可反复使用。若已变为暗绿色,表示已失效,无氧化性,不能继续再用,可倒入下水道,注意边倒边用大量自来水冲洗。常用洗液有下列三种:

① 称取 10 g 重铬酸钾,置于 500 mL 烧杯中,加 100 mL 自来水,搅拌下促溶,缓缓加入 200 mL 浓硫酸,边加边搅拌;

② 称取 80 g 重铬酸钾,溶于 1 000 mL 自来水中,慢慢加入 100 mL 浓硫酸(边加边用玻棒搅拌);

③ 称取 200 g 重铬酸钾,溶于 500 mL 自来水中,慢慢加入 500 mL 浓硫酸(边加边用玻棒搅拌)。

(2) 浓盐酸(工业用)。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($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)溶液。可洗涤油污物。

(5) 5%~10% 硝酸溶液。洗涤铝制品和搪瓷器皿中的污垢。30% 硝酸溶液可用于洗涤 CO_2 测定仪器及微量滴管。

(6) 5%~10% 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。

(7) 尿素洗涤液。此溶液为蛋白质的良好溶剂,适用于洗涤盛蛋白质制剂及血样的容器。

(8) 酒精与浓硝酸混合液。此溶液最适合于洗净滴定管,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(相对密度为 1.4),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。如丙酮、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。

上述洗涤液可多次使用,但是使用前必须将待洗涤的玻璃仪器先用水冲洗多次,除去肥皂、去污粉或各种废液。若仪器上有凡士林或羊毛脂,应先用软纸擦去,然后用乙醇或乙醚擦净后才能使用上述洗涤液,否则会使洗涤液迅速失效。例如,肥皂水、有机溶剂(乙醇、甲醛等)及少量油污皆会使重铬酸钾-硫酸洗液变绿,降低洗涤能力。

三、塑料器皿的使用

应用塑料器皿是为了避免玻璃对微量大分子的吸附,使用塑料器皿时,应了解塑料器皿对化学试剂和灭菌方法的耐受性。

四、玻璃和塑料器皿的硅烷化处理

核酸生化实验中,样品通常是很少量的,为防止器皿表面吸附使样品明显损失,对所用器皿应进行硅烷化处理。其方法如下:

- (1) 把待处理器皿置于玻璃干燥器内,瓷板下层放小烧杯,内加二氯二甲基硅烷 1~2 mL;
- (2) 通过安全瓶连接干燥器与真空泵,抽气至干燥器内的硅烷化剂沸腾(约 5 min),然后关闭真空泵,让空气立即进入干燥器,使气态二氯二甲基硅烷均匀扩散,直至容器内的硅烷化剂全部挥发;
- (3) 打开干燥器盖,让剩余的硅烷化剂气体完全挥发;
- (4) 使用前玻璃器皿于 180℃ 下至少烘干 2 h,塑料器皿应用水反复冲洗;
- (5) 二氯二甲基硅烷有剧毒,易挥发,故硅烷化处理必须在高效的通风橱内进行。

五、溶液的混匀

欲使一化学反应充分进行,必须使参与反应各物质迅速地相互接触;常常需要利用机械的方法使参与反应各物质充分混匀,以增加它们接触的机会。将溶液混匀不仅是提高化学反应速率的一个重要环节,也是物质溶解和溶液稀释过程中的必经操作步骤。混匀操作必须根据容器的大小和形状以及所盛溶液的多少和性质的不同而采用不同的方法。

(1) 用玻棒搅拌混匀,适用于烧杯中内容物的混匀,如固体试剂的溶解和混匀。搅拌使用的玻棒,必须两头都很圆滑,其粗细、长短必须与容器的大小和所配制溶液量的多少成适当比例关系,不能用长而粗的玻棒去搅拌小离心管中的少量溶液。

(2) 旋转混匀,适用于未盛满溶液的锥形瓶、试管和小口容器等中内容物的混匀。操作方法是手持容器上端,以手腕、肘或肩为轴旋转容器底部,不应上下振动。

(3) 弹打混匀,适用于锥形离心管、小试管和小塑料离心管等中内容物的混匀。操作方法是手持容器上端,用右手指弹动或拨动容器下部,使溶液在容器内做旋涡状运动。

(4) 倒转混匀,适用于具塞的容器,如容量瓶、具塞量筒和具塞离心管等中内容物的混匀。操作方法是将容器反复倒转。如是容量瓶,由于瓶颈细小,液量太多,不容易混匀,每倒转一次,还要将容量瓶底部旋转摇动数次;如不是具塞试管,并且液量较多,可用聚乙烯薄膜封口,再用大拇指按住管口反复倒转混匀。

(5) 吸量管混匀,适用于不同浓度样品的混匀。操作方法是先用吸量管吸取溶液,将吸量管嘴提离液面少许,再把吸量管中的液体用劲吹回溶液。反复吸、吹数次,可使溶液充分混匀。

(6) 转动混匀,适用于黏稠性大的溶液的混匀,但液量不可太满,以占容器容积的 $1/3 \sim 2/3$ 为宜。操作方法是手持容器上部,使容器底部在桌面上做快速圆周运动。

(7) 倾倒混匀,适用于液量多、内径小的容器中溶液的混匀。操作方法是两个洁净的容器,将溶液来回倾倒数次,以达到混匀的目的。

(8) 甩动混匀,右手持试管上部,轻轻甩动振摇,即可混匀。

(9) 振荡器混匀,利用振荡器使容器中的内容物振荡,达到混匀的目的。

(10) 电磁搅拌混匀,适用于酸碱自动滴定、pH 梯度滴定等。操作方法是把装有待混匀溶液的烧杯放在电磁搅拌器上,在烧杯内放入封闭于玻璃或塑料管中的小铁棒,利用电磁力使小铁棒旋转,以达到混匀烧杯中溶液的目的。

六、过滤

过滤的目的是使沉淀与液体分离。在试管内生成的沉淀,通常利用离心法将其分离出来,但有大量的沉淀生成时,小型离心机就不能达到分离沉淀的目的。因此,有大量的沉淀产生时多采用过滤分离法。

1. 常压过滤

常压过滤就是不外加任何压力,滤液在自然条件下通过介质进行过滤的一种方法,适用于滤液黏度小、沉淀颗粒粗、过滤速度快的样品,过滤介质可选用孔隙较大的滤纸、脱脂棉和纱布等。

(1) 滤纸的选择。滤纸有定量滤纸和定性滤纸两种。定量滤纸已经盐酸去灰处理,以尽量除去滤纸中的矿物质。当过滤酸性溶液时,很少有灰质从滤纸中流出。由于这种滤纸在制造过程中,曾用氨中和去灰处理的酸,因而滤纸上留有一定的铵盐,所以不适合用于过滤含氮的溶液。定性滤纸灼烧后会留下相当多的灰分,因此不适合用于质量分析。因此,定性滤纸一般用于普通过滤,定量滤纸多用在质量分析中。滤纸大小的选择可根据沉淀的多少来决定,至于漏斗的大小,应以滤纸放入漏斗后,滤纸的边缘低于漏斗边缘 $5 \sim 10 \text{ mm}$ 为宜。

(2) 滤纸的折叠。折叠滤纸一般用两次对叠法。先通过滤纸圆心对叠一次,再与第一次成垂直方向对叠一次,展开上部即成 60° 圆锥形,恰与漏斗壁密合。如果漏斗不成 60° ,则第二次对叠时应适当地改变角度,使滤纸较大或较小的一半展开后刚好与漏斗壁密合。

(3) 混悬液的加入。向漏斗中加入待过滤的混悬液时用玻棒引流,玻棒应倾斜约 20° ,其下端靠近三层滤纸一侧,但不要触及滤纸,且混悬液沿玻棒流入漏斗时的速度不要太快,不得使混悬液超过滤纸上缘。