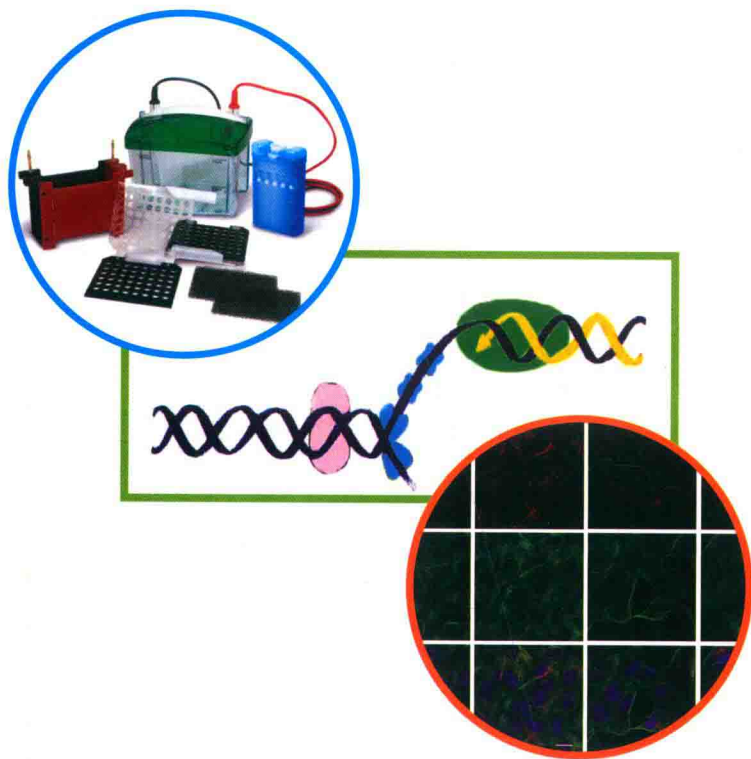


普通高等教育“十三五”规划教材
全国高等医药院校规划教材

配套实验与学习指导系列

生物化学与分子生物学 实验教程（第2版）

孙聪 柳春 主编



清华大学出版社

普通高等教育“十三五”规划教材
全国高等医药院校规划教材

配套实验与学习指导系列

生物化学与分子生物学 实验教程（第2版）

孙聪 柳春 主编



清华大学出版社
北京

内 容 简 介

本书包括4部分,第1部分为实验基本知识,包括生物化学实验室规则和实验报告的书写要求、实验基本操作、实验样品的制备、常用的实验方法与技术(分光光度法、电泳技术、层析技术、离心技术和印迹技术);第2部分为生物化学实验,包括19个实验;第3部分为分子生物学基本实验方法,包括9个实验;第4部分是附录,包括实验室安全及防护知识,分子生物学实验中的常用试剂及溶液、缓冲液的配制,常用计量单位及符号和希腊字母表。

本书适用于高等医学院校临床医学、中医学、中西医结合、骨伤、针灸推拿、护理、药学、中药、制药工程、生物制药、药剂学等各专业的实验教学。由于各专业的要求、学时不同,可根据实际情况选择实验项目。

版权所有,侵权必究。侵权举报电话: 010-62782989 13701121933

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验教程/孙聪,柳春主编. —2版. —北京:清华大学出版社,2017
(普通高等教育“十三五”规划教材. 全国高等医药院校规划教材配套实验与学习指导系列)
ISBN 978-7-302-47800-3

I. ①生… II. ①孙… ②柳… III. ①生物化学-实验-医学院校-教材 ②分子生物学-实验-医学院校-教材 IV. ①Q5-33 ②Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2017)第168948号

责任编辑:罗 健 王 华

封面设计:常雪影

责任校对:赵丽敏

责任印制:宋 林

出版发行:清华大学出版社

网 址: <http://www.tup.com.cn>, <http://www.wqbook.com>

地 址:北京清华大学学研大厦A座 邮 编:100084

社总机:010-62770175 邮 购:010-62786544

投稿与读者服务:010-62776969, c-service@tup.tsinghua.edu.cn

质量反馈:010-62772015, zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn

印 刷 者:北京富博印刷有限公司

装 订 者:北京市密云县京文制本装订厂

经 销:全国新华书店

开 本:185mm×260mm 印 张:6.75 字 数:186千字

版 次:2012年3月第1版 2017年10月第2版 印 次:2017年10月第1次印刷

印 数:1~2500

定 价:25.00元

产品编号:073730-01

编委会名单

主 审 任 颖

主 编 孙 聪 柳 春

副主编 张晓薇 王艳杰 周晓晶

编 者 (以姓氏笔画为序)

王卫芳 长春中医药大学

王宏英 长春中医药大学

王艳杰 辽宁中医药大学

从培玮 辽宁中医药大学

冯晓帆 辽宁中医药大学

任 颖 长春中医药大学

孙 聪 长春中医药大学

李保坤 辽宁中医药大学

李桂兰 山西中医药大学

张 林 辽宁中医药大学

张晓薇 山西中医药大学

周晓晶 长春中医药大学

柳 春 辽宁中医药大学

胡丽丽 山西中医药大学

赵丹玉 辽宁中医药大学

郭艳霞 长春中医药大学

郭隽馥 辽宁中医药大学

郭寰宇 长春中医药大学

阎 慧 长春中医药大学

窦 瑶 长春中医药大学

PREFACE

前言

21 世纪是生命科学迅猛发展的时期,生物化学与分子生物学技术已经渗透到生命科学的各个领域,成为生命科学及相关领域教学科研不可缺少的部分,也是医学、药学、生物技术等专业本科学生必修的基础实验课程。为了适应现代科学技术的发展,适应高校教学改革,提高教学质量,培养开拓、创新型高级医药人才,我们根据多年的教学经验和生物科学发展趋势,在传统生物化学与分子生物学实验的基础上,探讨新的实验教学方法,编写了本教程。本书可作为高等医药院校各专业、各层次学生选用。

本实验教材由实验基本知识、生物化学实验、分子生物学基本实验方法和附录 4 个部分组成。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,同时,还增加了新技术和新方法。我们力求实验的科学性、实用性和可靠性,详细介绍实验的基本原理、实验步骤、实验器材、实验仪器使用方法、样品的制备、试剂的配制等,使学生使用时更方便、易懂。

本书是我们在总结多年生物化学和分子生物学实验教学经验的基础上,不断完善而成。由于编者的水平有限,如果读者在使用过程中发现不妥之处,敬请批评指正。

编者

2017 年 3 月

第 1 部分 实验基本知识

第 1 章 生物化学实验室规则和实验报告的书写要求	2
第 2 章 实验基本操作	4
第 3 章 实验样品的制备	10
第 4 章 常用的实验方法与技术	13

第 2 部分 生物化学实验

实验 1 蛋白质的呈色反应和沉淀反应	32
实验 2 蛋白质含量测定	35
实验 3 蛋白质等电点的测定	37
实验 4 凝胶层析分离法分离血红蛋白与溶菌酶	38
实验 5 肝组织中核酸的分离与鉴定	40
实验 6 酶的特异性	42
实验 7 影响酶促反应的因素	43
实验 8 食物中维生素 C 的提取和定量	45
实验 9 胡萝卜素柱层析分离法	47
实验 10 血糖含量的测定	48
实验 11 饱食和饥饿小白鼠肝糖原含量的比较	50
实验 12 胆固醇氧化酶法测定血清总胆固醇	51
实验 13 血清尿素氮测定(二乙酰-肟法)	52
实验 14 血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	53
实验 15 血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	55
实验 16 转氨基作用与氨基酸纸层析	56
实验 17 血清谷丙转氨酶的活性测定	58
实验 18 血清 γ -球蛋白的提纯	60
实验 19 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的相对分子质量	62

第3部分 分子生物学基本实验方法

实验1 基因组DNA的分离提取.....	68
实验2 质粒DNA的提取.....	69
实验3 核酸浓度的测定.....	70
实验4 琼脂糖凝胶电泳检测DNA.....	71
实验5 DNA的酶切.....	73
实验6 DNA重组、转化与鉴定.....	76
实验7 Southern印迹转移.....	78
实验8 Western Blot检测蛋白质.....	81
实验9 RT-PCR.....	84

第4部分 附 录

附录1 实验室安全及防护知识.....	88
附录2 分子生物学实验中的常用试剂及溶液、缓冲液的配制.....	89
附录3 常用计量单位及符号(十位数量词首的名称及符号).....	95
附录4 希腊字母表.....	96
参考文献.....	97

第 1 部分 实验基本知识

第1章 生物化学实验室 规则和实验报告的书写要求

一、生物化学实验室规则

1. 实验课前要认真预习实验内容,熟悉本次实验的目的、原理、操作步骤,了解每一操作步骤的作用及所用仪器设备的基本使用方法,做好实验设计。

2. 实验课上,自觉遵守课堂时间,不迟到,不早退,自觉维护课堂秩序,必须穿白大衣进行实验,认真完成实验课内容,禁止大声谈笑,实验室内严禁吸烟和吃东西。

3. 教师讲解时要认真听讲,不要提前进行实验操作,待教师讲解完后,严格地按操作规程完成实验。

4. 实验过程中,实验台面必须保持整洁,仪器、药品摆放要井然有序;使用药品、试剂和各种耗材时注意节约;勿使试剂、药品洒在实验台面和地上;应特别注意药品的纯净,严防混杂;在使用公用试剂后,应立即盖严放回原处。

5. 使用仪器时,必须严格遵守操作规程,精心使用和爱护仪器,服从教师指导。如果发现故障和损坏须立即报告教师,并填写损坏仪器登记表,不得擅自动手检修。

6. 实验过程中要注意安全,使用乙醇、丙酮、乙醚等易燃品时不能直接加热,必须远离火源操作和放置。实验完毕,应立即关好煤气阀和水龙头,离开实验室前必须认真进行检查,以防发生事故。

7. 废液可倒入水槽内,同时放水冲走。强酸、强碱溶液必须先用水稀释。废纸屑及其他固体废物和带渣滓的废物应倒入废品缸内,严禁倒入水槽或到处乱扔。

8. 实验过程中应把观察到的实验结果和数据及时、准确、简要地记录在实验记录本上,以便实验结束后进行讨论和分析,并完成实验报告。

9. 实验完毕后,应认真洗涤使用过的玻璃器皿。洗涤时要小心仔细,严格按照操作程序进行,防止损坏。实验台面要擦拭干净,实验物品要摆放整齐,经教师检查同意后,方可离开实验室。

10. 实验室内的一切物品,未经责任教师批准,严禁带出室外,借物必须办理登记手续。

11. 每次实验课由班长或课代表负责安排值日生轮流值日。值日生应负责当天实验室的卫生、安全和一切服务性的工作。值日生完成值日后,离开实验室以前,要认真进行检查,注意检查“水、电、气”是否关好,填写值日生记录、仪器使用记录及实验室使用记录。

二、实验报告的书写要求

实验结束后,应及时整理和总结实验结果,进行讨论和分析,并完成实验报告。完整的实验报告应包括实验名称、实验日期、实验目的、实验原理、操作步骤、实验结果、讨论、结论等。

实验目的、实验原理和操作步骤等项只要求作简明扼要的叙述,不必也不应将《实验指导》原封不动地抄录一遍,可用简单的语言进行总结概括或画出实验操作的流程图。但注意对实验条

件、操作要点等涉及实验成败的关键环节做清楚描述。

实验结果包括记录实验中观察到的现象、原始数据及根据实验要求整理、归纳数据后进行计算的过程及结果。原始数据应准确、简练、详尽、清楚，不能夹杂主观因素，在定量实验中观测的数据，如称量物的质量、滴定管的读数、光密度值等，应设计一定的表格，依据仪器的精确度记录有效数字。实验结果可以各种图表（如标准曲线图等）来呈现。

讨论部分是书写实验报告的重点部分，要注意讨论不是对结果的重述，而是对实验结果、实验方法和异常现象进行探讨和评论，以及对实验设计的认识、体会及建议，注意一定要结合自己的实验结果进行讨论分析，并且要充分利用已学过的知识进行详细分析。

实验报告一般要有实验结论。结论要简单扼要，以说明本次实验所获得的结果。

第2章 实验基本操作

大部分生物化学实验是由各种常用基本操作组成的,包括实验准备时玻璃仪器洗涤、实验过程中试剂的量取和液体的混匀等。这些操作虽然看似简单,但在很大程度上是决定实验成败的关键。因此,在进行生物化学实验前,必须有意识地加强这些实验基本操作的练习。

一、玻璃仪器的洗涤与干燥

在生化实验中,量取和盛装试剂时要使用到各种玻璃仪器,所使用的玻璃仪器是否清洁和干燥是获得准确结果的重要一环。有时会因为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,玻璃仪器的清洁是实验准备时的重要工作之一。实验中要使用的玻璃仪器必须是清洁和干燥的,内外壁应十分明亮光洁,清洗后将玻璃仪器倒置,不应在器壁上挂有水珠,否则表示尚未洗净,必须重新洗涤。洗涤干净之后要进行干燥,只有干燥后的清洁玻璃仪器才能用于实验研究。一般玻璃仪器的洗涤通常包括使用自来水和去污剂常规洗涤、蒸馏水洗涤、干燥备用等基本步骤。如果是用于分子生物学和细胞培养等实验的玻璃仪器,在洗涤干燥后还要经过重铬酸钾-浓硫酸清洁液浸泡,自来水洗涤10次以上,蒸馏水冲洗2~3次,通常还要用去离子水冲洗2~3次。

(一) 新购置玻璃仪器的洗涤方法

新购置玻璃仪器表面常附有游离的碱性物质及污泥,首先使用肥皂水或洗涤剂进行洗刷,再用自来水冲洗干净,干燥后浸泡在1%~2%的稀盐酸溶液中过夜(不少于4h)后,再进一步洗涤,最后用蒸馏水冲洗内壁2~3次,进行干燥备用。注意:浸泡时要把器皿完全浸入,器皿内不能留存空气。

(二) 使用过的玻璃仪器的洗涤方法

1. 一般玻璃仪器的洗涤方法

凡能用毛刷刷洗的玻璃仪器(如试管、烧杯、锥形瓶、量筒等),首先使用自来水洗刷,用毛刷蘸取洗衣粉(洗涤剂或去污粉)将玻璃仪器内外壁(特别是内壁)仔细刷洗干净,不留死角,刷洗时用力要轻,忌用粗糙的工具抠、刮,防止损伤玻璃仪器。然后用自来水冲洗干净,再用蒸馏水冲洗内壁2~3次,最后倒置于仪器架上自然晾干后备用。

2. 不能用毛刷刷洗的精密量器的洗涤方法

凡不能用毛刷刷洗的精密量器(如容量瓶、滴定管、刻度吸管等),应先用自来水冲洗,沥干,再用重铬酸钾-浓硫酸清洁液浸泡4~6h(或过夜),从清洁液中取出沥干后,用自来水冲洗干净,最后使用蒸馏水冲洗2~3次,倒置于量器架上自然干燥后备用。

3. 比色皿的洗涤方法

清洗石英和玻璃比色皿时应注意不能使用强碱,因为强碱会腐蚀抛光的比色皿。首先使用1%~2%的去污剂浸泡,然后用自来水冲洗,如果内壁有不易清洗的污物,可以使用一支绸布包裹的小棒或棉棒刷洗,这样效果会更好,清洗干净的比色皿也应内外壁不挂水珠,倒置于滤纸上

进行干燥。

4. 盛装过有传染性样品的玻璃仪器的洗涤方法

盛装过病毒、传染病患者血清、培养细菌等有传染性样品的玻璃仪器，在清洗之前要进行高温高压消毒，再按常规程序进行清洗。

(三) 玻璃仪器的干燥

生化实验中用到的玻璃仪器清洁后，通常置于 $110\sim 120^{\circ}\text{C}$ 烘箱或烘干机中进行干燥。

(四) 重铬酸钾 - 浓硫酸清洁液的配制

生化实验清洗玻璃仪器时常用重铬酸钾 - 浓硫酸清洁液浸泡玻璃仪器。目前已确定铬对人体具有致癌作用，因此配制和使用该清洁液时要极为小心。

(1) 配方

强酸（浓液）配方：

重铬酸钾（化学纯）63 g 双蒸水 200 mL 浓硫酸（化学纯）1000 mL

中强液配方：

重铬酸钾（化学纯）120 g 双蒸水 1000 mL 浓硫酸（化学纯）200 mL

弱酸（稀液）配方：

重铬酸钾（化学纯）100 g 双蒸水 1000 mL 浓硫酸（化学纯）100 mL

(2) 最常用的是中强液。将重铬酸钾溶解在双蒸水中，慢慢加入浓硫酸，边加边搅拌，配好后，储存于广口的玻璃瓶内，盖紧塞子备用。应用此液时，器皿必须干燥，切忌带入大量还原物质，这样可应用多次，直至溶液呈绿色时，表明其失效。

二、吸量管的使用

(一) 吸量管的种类

吸量管（简称吸管）是生化实验中最常用的吸量一定体积液体的玻璃量器，一般可分为单刻度吸量管（包括奥氏吸管和移液吸管）和多刻度吸量管两大类（图1），其中第一类单刻度吸量管目前不常用，因此主要学习多刻度吸量管的使用。

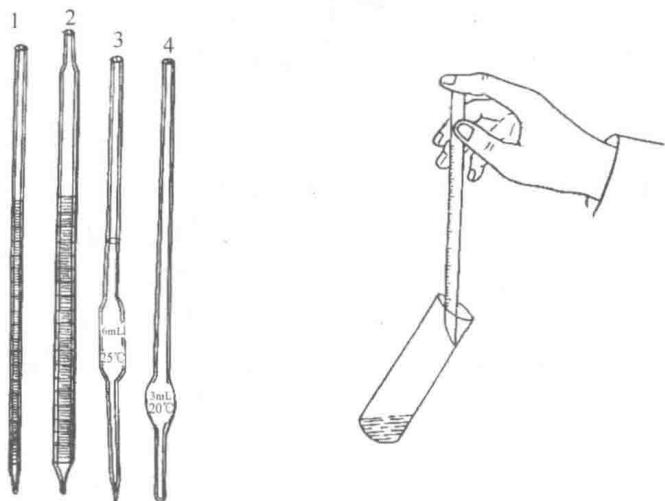


图1 吸量管的种类和使用

1 和 2. 多刻度吸量管；3. 移液吸管；4. 奥氏吸管

1. 单刻度吸量管

单刻度吸量管仅在吸管的上端有一条总量的刻度线,使用时只能量取全量。该吸量管比多刻度吸量管准确度高,可供准确量取一定体积的溶液。单刻度吸量管包括奥氏吸管和移液吸管。

(1) 奥氏吸管:它的中下部有一突出的橄榄形的球泡,下端有一短小的出口。在同一容量的各种类吸量管中,奥氏吸管的内表面积最小,吸管内壁黏附的溶液也最少,故准确度高,适用于量取黏稠度较大的液体。可准确量取 3 mL、2 mL、1 mL、0.5 mL 等体积。在使用时,应注意缓慢控制液体的流出速度,待液体流完后,将奥氏吸管尖端靠容器内壁,吹出残留在其尖端的液体。

(2) 移液吸管:该种吸管外形与奥氏吸管相似。多用于量取用量较大的标准溶液,可准确量取 50 mL、25 mL、10 mL、5 mL 等体积。放液时让管内液体自然流出,待液体流完后,将移液吸管尖端在容器内壁上继续停靠 5 s,同时转动吸管,不吹出其尖端残留液体。

2. 多刻度吸量管(简称刻度吸管)

多刻度吸量管是生化实验中使用最广泛的一种吸量管,其准确度高。常用的有 10 mL、5 mL、2 mL、1 mL、0.5 mL、0.1 mL 等规格,因生产厂家的不同,刻度吸管的刻度标记方法也有所不同,但一般可分为吹出式和流出式两种类型。

(1) 吹出式:此种刻度吸管的上端一般都标注有“吹”字,一般容量较小,都在 1 mL 以下,在使用时必须将刻度吸管尖端残留的液体吹入容器内。

(2) 流出式:此种刻度吸管的刻度有两种表示方法:一种为上有零刻度,下无总量刻度;另一种为上有总量刻度,下无零刻度。此类刻度吸管分为慢流速和快流速两种。慢流速吸管分为 A 级与 B 级,而快流速吸管只有 B 级,在吸量管上都注有 A 或 B。使用时,当刻度吸管内液体流完时,让吸管尖端紧靠在管壁上,A 级停留 5 s,B 级停留 3 s,同时转动吸管,最后吸管尖端残留的液体不应吹出。

(二) 刻度吸管的使用方法

上述两类吸管虽有不同之处,但其操作规程是相同的,具体使用方法如下。

1. 选择吸量管

首先要看清吸量管的刻度情况,然后再根据要量取的液体体积选择适当容量的吸量管,一般选择最大容量等于或略大于所需要量取液体体积的吸量管。

2. 正确拿持吸量管

选择好吸量管后,要采用标准的姿势拿持吸量管。注意把标有刻度的一面朝向操作者,以便读取刻度。用右手中指和拇指拿住吸量管的上部,要保证右手食指可以按住吸量管的上口,左手持洗耳球。

3. 量取液体

右手把吸量管尖端插入要量取的液体中,左手持洗耳球并把洗耳球内的气体排出,把洗耳球的下口堵住吸量管的上口,缓慢松开洗耳球,把容器内液体吸入吸量管,此时要注意控制液体上升的速度,不要过快,当液面上升至所需刻度上方 2~3 cm 时,立即挪开洗耳球,用右手食指按住吸量管上口,以稳住管内的液面,把吸量管从液体中取出。用吸水纸擦干管外壁所附着液体。再以管尖端接触容器内壁,慢慢放松食指,轻轻转动拇指和中指,调整液面至所需刻度,即液面与所需刻度处于相切位置,立即用食指再次按住上口,此时吸量管中即为所需要量取体积的液体。

4. 释放液体

将需加入液体的容器倾斜、盛有所量液体的吸量管垂直,并将吸量管管尖与容器内壁靠紧(图 1),松开食指让液体流出。放液后吸管尖端残留的液体是吹出或不吹出,视选用吸量管种类的要求而定。如果需要吹的则用洗耳球将其吹出,如果要求不吹的则让吸管尖端停靠容器内壁

(吸管是A级停留5 s、B级停留3 s),同时转动吸管并移开。

三、移液器的使用

在生化实验中,有时需要重复量取和转移微量液体,这时再使用传统刻度吸管比较笨拙,效率也低。而移液器使微量液体的量取和转移操作轻松、快速和准确。移液器主要用于多次重复的快速定量移取微量液体,使用时只需一手操作,十分简便。

(一) 移液器的种类

目前,移液器的主要发展趋势为精确度越来越高,种类越来越多。移液器根据其量程是否可调分为:固定量程移液器和可调量程移液器。固定量程移液器是指量程不可调节且用于量取固定容量液体的移液器,多用于要求较高的比较精确的微量化学分析,常用的有100 μL 、200 μL 和1000 μL 等几种规格;而可调量程移液器的移液量程是可以调节的,一般包括0.1~1 μL 、0.2~20 μL 、10~100 μL 、20~200 μL 、100~1000 μL 等多种规格。另外,移液器还可以根据量取液体的通道数量分为:单道移液器和多道移液器,多道移液器又分为8道和12道等,多道移液器常用于酶联免疫分析(ELISA)实验的液体量取。目前除传统的手动移液器外,还有电动移液器。

(二) 移液器的基本原理

移液器的设计依据的是胡克定律,该定律是指在一定限度内弹簧的伸展长度与其弹力成正比,因此移液器内的液体体积与移液器内的弹簧弹力是成正比的。移液器在工作时是通过按动活塞来推动弹簧的伸缩以实现吸液和放液的。使用移液器时,首先通过活塞的推动,排出内部部分空气,然后在大气压作用下吸入液体,最后再由活塞推动空气排出液体。移液器中的弹簧具有伸缩性,因此在移液器使用时要配合弹簧的这个特点来进行操作,这样才能很好地控制移液的速度和力度。

(三) 移液器的基本结构

虽然移液器的种类有很多,但是生化实验中最常用的是可调量程移液器,在此主要介绍这种移液器的结构和配件(图2)。移液器主要是由移液控制按钮、手柄和移液杆3部分构成,在手柄上还有容量显示窗、容量调节旋钮、卸吸头按钮和指托等。有的移液器的移液控制按钮兼具容量调节旋钮的作用。手柄上一般还标有该移液器的量程范围。移液杆的下端有吸头接嘴,使用时插入吸头。

移液器在使用时还需要一些配套的配件,如移液器架、吸头和吸头盒等。其中,吸头是移液器非常重要的配件之一,可以说是移液器的重要组成部分,每种移液器在使用时,都配有专用的聚丙烯塑料吸头。吸头一般分为三种类型:100~1000 μL (蓝色)、20~200 μL (黄色)、0.1~10 μL (无色)。吸头必须具有热力学和化学稳定性,无污染的特点。一般吸头在使用前应在121 $^{\circ}\text{C}$ 下消毒20 min。吸头通常是一次性使用,也可以经过超声清洗后重复使用。

(四) 移液器的使用方法

在使用移液器移取水、缓冲液、稀释的盐溶液和酸碱等溶液时,一般应按照以下标准操作步骤进行。

1. 选择合适量程的移液器

根据所量取的液体体积,选取1支合适量程的移液器。选择时要注

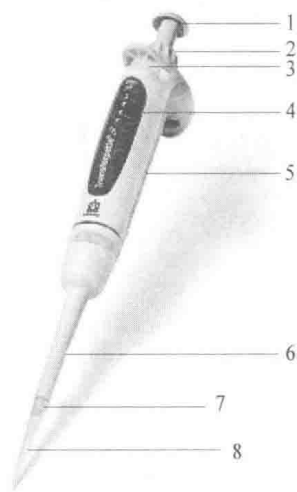


图2 移液器的结构

1. 移液控制按钮; 2. 容量调节旋钮; 3. 卸吸头按钮;
4. 容量显示窗; 5. 手柄;
6. 移液杆; 7. 吸头接嘴;
8. 吸头

意量程范围,不要用较大量程的移液器移取较小体积的液体,以免影响准确度。例如,需要量取 $0.5\ \mu\text{L}$ 的液体时,有 $0.1\sim 1\ \mu\text{L}$ 和 $0.2\sim 20\ \mu\text{L}$ 两种量程的移液器,应首先选择前者。

2. 设定移液体积

转动移液器的容量调节旋钮(有的移液器顶部的移液控制按钮兼有该作用),并注意观察容量显示窗的数值,进行移液体积的设定。顺时针方向转动该旋钮可增加移液体积,逆时针方向转动旋钮可减少移液体积。当从大体积调节至小体积时,只需逆时针旋转至所需刻度即可,但是从小体积调节至大体积时,需要先顺时针调至超过设定体积的刻度,再回调至设定体积,这样可保证最佳的精确度。

观察容量显示窗时,要注意数值的位数和小数点的位置,有的移液器手柄上有小数点标记或用短线进行标记,有的用红色数字表述小数点后数值。确认所要求的移液体积调整到位,并完全显示在手柄的容量显示窗内的可见位置。不能将设定的移液体积超出该移液器标定的移液范围,过度用力试图把按钮转至额定范围之外将造成机械件卡死,最终导致移液器的损坏。

3. 装配移液器吸头

在装配吸头时,注意选择与移液器匹配的吸头。对于单道移液器,将移液器吸头接嘴尖端垂直插入吸头盒内的吸头,左右微微转动,上紧即可;多道移液器在装配吸头时,要将移液器的第一道对准第一个吸头,逐渐倾斜插入,前后轻轻摇动上紧。注意吸头插入后略超过 O 形环即可,并可以看到连接部分形成清晰的密封圈。严禁在使用移液器时,用力撞击吸头,如果用力过猛,将导致吸头难以脱卸,而且如果长期这样操作会导致移液器的零件损坏。

4. 吸取液体

右手握住移液器手柄(图 3),拇指按下移液控制按钮,把按钮压到第一停点位置,将移液器吸头置于液面下 $1\ \text{cm}$ 左右,并慢慢松开按钮,控制好弹簧的伸缩速度,吸入液体,注意速度要慢,防止有气泡产生。在正式吸液之前,可以先吸放几次液体以润湿吸头。待吸头吸入溶液后,将吸头撤出液面并倾斜贴在试剂瓶壁上淌走多余的液体。当量取液体体积较少时,如做 PCR 实验时,试剂盒中 DNA 聚合酶的总体积不超过 $50\ \mu\text{L}$,需要量取的体积有时只有 $0.25\ \mu\text{L}$,这时吸头不要插入过深,浸入过深的话,液压会对吸液的精确度产生一定的影响;并且因为酶的制剂比较黏稠,会附着在吸头外部,影响量取液体体积的准确性,同时也会造成试剂的浪费。因此只需把吸头接触到液面,进行吸取即可。

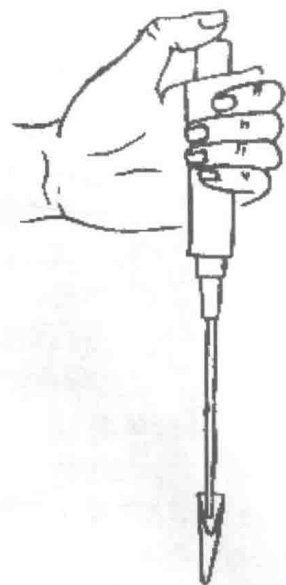


图 3 移液器的使用

在量取黏稠或易挥发液体时,按照上述操作方法容易导致体积误差较大。因此为了提高移液的准确性,可以在移液前先反复吸入释放要移取的液体几次,预湿吸头内部,并且吸入液体或释放液体时最好多停留几秒。也可以采用反相移液法:吸液时先将移液控制按钮按到第二停点位置,然后缓慢松开移液控制按钮,释放液体时按到第一停点位置,部分液体残留在吸头内。

5. 释放液体

左手拿住盛装液体的容器,略倾斜 $10^{\circ}\sim 20^{\circ}$,移液器吸头尖端靠在容器内壁上,拇指缓慢按动移液控制按钮到第一停点位置,停止 $1\sim 2\ \text{s}$,然后继续按动移液按钮到第二停点位置,把吸头中的全部液体排入容器中,一直按住移液控制按钮取出移液器。松开按钮使之返回起始点位置。

6. 退出吸头

把移液杆正对着废物接收容器,然后用大拇指按住卸吸头推杆,即可安全推出吸头。

7. 收放

把移液器容量调节到最大容量，挂在移液器架上。

(五) 移液器使用注意事项

(1) 按下和松开移液控制按钮时要循序渐进，尤其是在移取高黏度的液体时，决不允许让移液控制按钮急速弹回，以防将溶液吸入过快而冲入移液器内，腐蚀柱塞而造成漏气。

(2) 移液前应确保洁净的吸头牢固地装进移液器的吸头接嘴上，并且吸头内无外来颗粒。

(3) 当移液器不用时，调至最大容量，应竖直搁置，也可以放在移液器架上。

(4) 每天工作前应检查移液器外表面是否有灰尘和污物，特别需注意移液器吸头接嘴处，除使用 70% 乙醇溶液外，不应用其他溶剂清洁移液器。

四、液体的混匀

在生化实验中，在配制试剂或建立化学反应时，经常要把多种试剂混合到一起，因此容器中先后加入的几种试剂能否充分混匀往往是实验成败的关键之一。一般液体的混匀可以采用以下几种方法。

1. 旋转法

用右手的掌心顶住试管口，五指拿紧试管，利用腕力使试管向同一方向做圆周运动，使管内液体形成旋涡，从而混匀。这种方法一般在试管中液体较多或使用小口器皿盛装液体时使用。

2. 甩动法

右手持住试管上部，将试管轻轻甩动振摇进行混匀。这种方法适用于试管中液体较少时。

3. 弹敲法

右手持住试管上部，将试管的下部在左手掌心上轻轻进行弹敲，进行混匀。如果使用的是微量离心管，把离心管管盖盖紧，左手持住离心管的管盖与管体连接处，右手轻轻敲弹管壁，进行混匀。如有液体粘到管壁上，可以进行短时间离心使其集中到管底。

4. 吸管混匀法

使用清洁的吸管将溶液反复吸放数次，使溶液充分混匀。也可以使用移液器反复吸放数次进行混匀。成倍稀释某种液体往往采取此法。

5. 旋涡混匀器混匀法

将需要混合的液体装入容器内，盖紧盖子，手持容器放在旋涡混匀器的工作台上，打开开关即可混匀。