

高等学校教材

生物化学实验

张彩莹 肖连冬 主编



化学工业出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

生物化学(第2版)

王镜岩 朱圣庚 孙学军 主编



高等教育出版社

高等学校教材

生物化学实验

张彩莹 肖连冬 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

内 容 提 要

本书共由五部分组成,其中基础性实验和综合性实验内容涵盖了基础生物化学研究常用的方法和技术,包含了与生物化学理论研究相对应的各类实验内容,涉及糖类、脂类、蛋白质、酶、维生素、核酸和代谢等,知识安排层次分明,由浅入深;设计性实验则是给学生一个独立完整的实际锻炼机会,培养学生分析问题、解决问题和动手操作的能力;第一篇和附录主要介绍生物化学实验基本要求、常用仪器使用以及与生物化学实验相关的常用数据资料。

本书可供高等院校的生物工程、生物科学、食品工程、医学等专业使用,也可供相关专业教师和科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验/张彩莹,肖连冬主编. —北京:化学工业出版社,2009.9

高等学校教材

ISBN 978-7-122-06461-5

I. 生… II. ①张…②肖… III. 生物化学-实验-高等学校-教材 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 135314 号

责任编辑:梁静丽 李植峰 郭庆睿

装帧设计:关 飞

责任校对:宋 玮

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:北京市彩桥印刷有限责任公司

787mm×1092mm 1/16 印张 10 $\frac{1}{4}$ 字数 288 千字 2009 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:19.80 元

版权所有 违者必究

前 言

生物化学是生物、食品、医药和农业等领域的专业基础学科，具有较强的理论性和实践性。生物化学实验是生物化学研究的重要方法和手段。学生通过生物化学实验，掌握生物化学实验的基本操作和实验技术以及一些大型仪器的使用方法，进一步巩固所学生物化学的基本理论知识，从而为以后专业课的学习以及从事生产、科研工作打下良好的基础。

本书注意编排实验内容的全面性、科学性，全书包括四篇及附录五部分。第一篇重点介绍了生物化学实验的基本要求与常用仪器的使用方法及其注意事项。第二篇生物化学基础性实验及第三篇综合性实验，广泛选取了生物化学实验中较为成熟的糖类、脂类、蛋白质、酶和维生素、核酸以及代谢等实验内容，内容设置力求层次分明、由浅入深。每个实验项目包括目的、原理、器材与试剂、操作步骤、结果处理、注意事项及思考题等。力求做到原理阐述简明扼要，方法操作具体。实验后面“注意事项”有利于学生更好地掌握实验技术的基本操作和把握实验操作中的关键因素。所设置的“思考题”也有助于学生在实验前后进行思考和总结提高。经过讲授和操作，学生将受到系统的生化实验方法和技术的基本训练，在此基础上安排了第四篇设计性实验，其目的在于使学生有一个完整的实际锻炼过程，为学生进入更高层次的学习或参加科研工作奠定基础。最后附录部分汇集了生物化学实验中常用的数据资料，以备查阅。

本教材可供高等院校生物工程、生物科学、食品工程、医学等专业使用，也可供相关专业教师和科研人员参考。

本书经过集体讨论拟定大纲、分工负责编写。参加编写的人员有南阳师范学院的张彩莹，南阳理工学院的肖连冬，商丘师范学院的吴艳丽，许昌学院的孙婷，焦作师范高等专科学校的张安世。张彩莹和肖连冬负责统编全稿。

本书在编写过程中，参考了同行专家、学者已出版的生物化学实验技术方面的书籍及一些网络资料，在此对相关作者表示衷心感谢！

鉴于编者水平有限，书中不足之处在所难免，敬请读者批评指正。

编者

2009年6月

目 录

第一篇 生物化学实验基本要求及常用仪器的使用

第一章 生物化学实验基本要求	1
一、实验室规则	1
二、实验记录及实验报告	2
三、生物化学实验课程评分与标准	3
四、实验的准确度	3
第二章 生物化学实验基本操作	4
一、配制试剂	4
二、仪器的清洗与干燥	5
三、玻璃量器的使用	6
四、混匀	9
五、离心和过滤	9
六、溶液 pH 值的测定	9
第三章 常用仪器及使用方法	10
一、电子天平	10
二、离心机	10
三、分光光度计	11
四、pHS-3C 型酸度计	16

第二篇 基础性实验

第一章 糖类	17
实验一 糖的颜色反应	17
实验二 糖的还原作用	19
实验三 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖和总糖含量	21
实验四 斐林试剂法测定还原糖含量	23
实验五 蒽酮比色法测定可溶性糖含量	26
实验六 苯酚-硫酸法测定可溶性糖含量	28
实验七 乙酸-氯化钙旋光法测定粗淀粉含量	29
实验八 酸性洗涤剂法测定粗纤维含量	31
实验九 重量法测定果胶含量	32
实验十 比色法测定果胶含量	34
实验十一 磷钼酸显色法 (Folin-Wu 法) 测定血糖含量	35
实验十二 葡萄糖氧化酶法 (GOD) 测定血糖含量	38
实验十三 邻甲苯胺法测定血糖含量	39
第二章 脂类	41
实验十四 Soxhlet 提取法测定粗脂肪含量	41

实验十五	邻苯二甲醛法测定血清总胆固醇含量	43
实验十六	碘价的测定	45
实验十七	油脂酸价的测定	47
实验十八	油脂皂化值的测定	48
实验十九	卵磷脂的提取和鉴定	49
第三章	蛋白质	50
实验二十	蛋白质及氨基酸的呈色反应	50
实验二十一	蛋白质的沉淀反应	54
实验二十二	蛋白质的两性性质及等电点的测定	56
实验二十三	凯氏定氮法测定总氮含量	57
实验二十四	甲醛滴定法测定氨基氮	61
实验二十五	茚三酮显色法测定氨基酸含量	63
实验二十六	双缩脲法测定蛋白质含量	64
实验二十七	考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量	66
实验二十八	Folin-酚试剂法测定蛋白质含量	67
实验二十九	BCA 法测定蛋白质含量	69
实验三十	紫外分光光度法测定蛋白质含量	71
实验三十一	纸层析法分离氨基酸	73
实验三十二	离子交换柱层析法分离氨基酸	75
实验三十三	从牛奶中分离制备酪蛋白	77
实验三十四	醋酸纤维薄膜电泳分离血清蛋白	78
实验三十五	聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白	82
实验三十六	凝胶过滤法分离纯化蛋白质	85
第四章	酶和维生素	86
实验三十七	酶的基本性质测定	86
实验三十八	过氧化氢酶米氏常数 K_m 值的测定	91
实验三十九	脲酶 K_m 值的简易测定	92
实验四十	谷丙转氨酶活力的测定	95
实验四十一	淀粉酶活力的测定	97
实验四十二	2,6-二氯酚靛酚法测定维生素 C 含量	99
实验四十三	磷钼酸法测定维生素 C 含量	102
实验四十四	荧光法测定维生素 B ₂ 含量	103
第五章	核酸	105
实验四十五	二苯胺法测定 DNA 含量	105
实验四十六	苔黑酚显色法测定 RNA 含量	106
实验四十七	定磷法测定核酸含量	107
实验四十八	紫外分光光度法测定核酸含量	110
第六章	新陈代谢	111
实验四十九	肌糖原的酵解	111
实验五十	糖酵解中间产物的鉴定	113
实验五十一	脂肪酸的 β 氧化	115
实验五十二	丙酮酸含量的测定	117

实验五十三	胰岛素、肾上腺素对血糖浓度的影响	118
实验五十四	饥饿和饱食对肝糖原含量的影响	120

第三篇 综合性实验

实验五十五	SDS-PAGE 测定蛋白质相对分子质量	122
实验五十六	酵母蔗糖酶的提取纯化及其性质研究	125
实验五十七	酵母细胞中核糖核酸 (RNA) 的提取及鉴定	132
实验五十八	菜花 (花椰菜) 中核酸的分离和鉴定	134
实验五十九	大肠杆菌质粒 DNA 的制备及电泳鉴定	136
实验六十	发酵过程中无机磷的利用和 ATP 生成的测定	140

第四篇 设计性实验

实验六十一	动物血超氧化物歧化酶 (SOD) 的分离纯化及鉴定	144
实验六十二	溶菌酶的制备及活性测定	144

附 录

附录一	化学试剂与保存	146
一、一般化学试剂纯度分级		146
二、需要特殊方法保存的试剂		146
三、化学药品、试剂毒性分类参考类目		146
四、干燥剂		147
五、指示剂		148
附录二	常用清洗液的配制	148
附录三	溶液的配制	149
一、常用溶液浓度的表示及配制		149
二、溶液浓度的调整		150
三、标准溶液的配制和标定		151
附录四	缓冲溶液的配制方法	152
一、选用缓冲溶液的注意事项		153
二、常用缓冲溶液		153
三、标准缓冲溶液的配制		157
附录五	常用数据表	158
一、化学元素的相对原子质量表		158
二、硫酸铵饱和度常用表		159
三、实验室常用酸碱的密度及其浓度		160
四、体积分数酸、碱溶液的配制		160
五、常用固态化合物的浓度配制		161
六、离心机转数与相对离心力的换算		161
七、常用蛋白质相对分子质量标准参照物		161
八、常见蛋白质相对分子质量参考值		162

参考文献

第一篇 生物化学实验基本要求及常用仪器的使用

第一章 生物化学实验基本要求

一、实验室规则

1. 每位同学应自觉遵守课堂纪律，维护课堂秩序，不随意旷课，不迟到，不早退，不得在实验室内大声喧哗。按实验分组指定座位就坐，不得随意调换。

2. 实验前须认真预习，熟悉实验目的、原理、操作步骤及注意事项，懂得每一操作步骤的意义，并了解所用仪器的使用方法，否则不能开始实验。未经许可不能随意拆卸实验装置、仪器设备等。

3. 实验过程中要听从教师的指导，认真地按照规程进行实验，把实验现象和数据及时、如实地记录在实验记录本上。按要求完成实验报告并在教师指定的时间内上缴。

4. 保持实验台面、地面、水槽及试剂药品架整洁。勿使试剂、药品洒在实验台面和地上。实验完毕，需将药品试剂摆放整齐，玻璃器皿要洗净放置稳妥，按规定处理好废物、废液，做好清洁工作，经教师验收后，方可离开实验室。

5. 使用仪器、药品、试剂和各种物品必须注意节约，取用试剂和标准溶液后，需立即将瓶塞盖严，放回原处。取出的试剂和标准溶液，如未用尽，切勿倒回瓶内，以免带入杂质。严禁用口吸或用皮肤接触有毒药品与试剂。

6. 洗涤和使用仪器时，应小心谨慎，防止损坏仪器。使用贵重精密仪器时，应十分重视，加倍爱护。使用前，应熟知使用方法，严格遵守操作规程，若有问题，随时请指导教师解答。发现故障应立即关闭仪器并报告教师，不得擅自拆修。仪器损坏时，应如实向教师报告，填写损坏仪器登记表，然后补领。并按学校规定进行适当比例的赔偿。

7. 实验室内严禁吸烟！乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热，并要远离火源操作和放置。实验完毕，应关好水龙头并拉下电闸。

8. 无毒的、无腐蚀性的和对环境无严重污染的废液可倒入水槽内，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倒入废品缸内，不可倒入水槽或到处乱扔。对环境有严重污染的和有毒的废弃物应统一放置并进行特殊处理。

9. 实验室内一切物品，未经负责教师批准，严禁带出室外，借还物品必须办理登记手续。

10. 不能将食品和饮料带入实验室，杜绝在实验室内吃零食。

11. 每次实验课由课代表负责安排值日生。值日生的职责是负责当天实验室的卫生、安全，组织同学填写实验室登记本等服务性的工作。离开实验室前一定要检查水、电、门、窗是否关好。

12. 对实验内容和安排不合理的地方可提出改进意见。对实验中出现的一切反常现象应进行讨论，并大胆地提出自己的看法，做到主动学习。

二、实验记录及实验报告

1. 实验记录

每次实验课前要认真预习，将实验名称、目的和要求、实验内容与原理、操作方法和步骤等简单扼要地写在记录本中，做到心中有数。

从实验课开始就要培养严谨科学作风，养成良好习惯。

实验过程中观察到的现象应仔细地记录下来，实验中观测的每个结果和数据都应及时如实地直接记在记录本上，记录时必须使用钢笔或圆珠笔，并做到原始记录准确、简练、详尽、清楚。如称量试验样品的质量、滴定管的读数、分光光度计的读数等，都应设计一定的表格准确记下正确的读数，并根据仪器的精确度准确记录有效数字。例如，光密度值为 0.050，不应写成 0.05。每一个结果至少要重复观测两次以上，当符合实验要求并确知仪器工作正常后再写在记录本上。

另外，实验中使用仪器的类型、编号以及试剂的规格、化学式、分子量、准确的浓度等，都应记录清楚，以便总结实验完成报告时进行核对和作为查找成败原因的参考依据。多人一组的实验，必须每人都作记录。如果发现记录的结果有怀疑、遗漏、丢失等，都必须重做实验。

2. 实验报告

实验结束后，应及时整理和总结实验结果，写出实验报告。实验报告是实验的总结和汇报，通过实验报告的写作可以分析总结实验的经验和存在的问题，学会处理各种实验数据的方法，加深对有关理论和技术的理解与掌握，同时也是学习撰写科学研究论文的过程。实验报告必须独立完成，严禁抄袭。写实验报告要用实验报告专用纸（本），以便教师批阅，不要用练习本和其他片页纸。

(1) 实验报告的格式

实验编号、名称	年级	专业	姓名	日期
---------	----	----	----	----

一、实验目的与要求

二、实验原理

三、仪器、试剂和材料

四、操作方法

五、结果与分析

(2) 实验报告的内容

实验报告使用的语言要简明清楚，抓住关键。

明确实验的目的与要求，简明扼要地概括出实验的原理，涉及的化学反应最好用化学反应式表示。列出所用的试剂和主要仪器，实验中用到的特殊试剂要说明配制方法，特殊的仪器要画出简图并有合适的图解。

实验方法步骤的描述要简洁，不要照抄实验指导书，但要写得明白，以便他人能够重复。

如实记录实验观察到的实验现象和实验数据。

对于定量实验，应根据实验课的要求将一定实验条件下获得的实验结果和数据进行整理归纳、分析和对比，并尽量总结成各种图表，一目了然。实验作图严格要求，一般要使用坐标纸，或者把实验数据利用计算机处理成图表，打印出来粘在实验报告上。每个图都要有明显的标题，坐标轴的名称要清楚完整，注明合适的单位，坐标轴的分度数字要与有效数字相

符,并尽可能简明,若数字太大,可以化简,并在坐标轴的单位上乘以10的方次。实验点要使用专门设计的符号,如○、●、□、■、△、▲等,符号的大小要与实验数据的误差相符。不要用“×”、“+”和“*”小圆点。有时也可用两端有小横线的垂直线段来表示实验点,其线段的长度与实验误差相符。通常横轴是自变量,为已知数据,纵轴是应变变量,是测量的数据。曲线要用曲线板或曲线尺画成光滑连续的曲线,各实验点均匀分布在曲线上和曲线两边,且曲线不可超越最后一个实验点。两条以上的曲线和符号应有说明。

对于定性实验,在分析实验结果基础上应有一简短而中肯的结论。实验结果的分析讨论要充分,尽可能多查阅一些有关的文献和教科书,充分运用已学过的知识和生物化学原理,对观察到的现象、实验课遇到的问题和思考题进行深入的探讨,勇于提出自己独到的分析和见解,并对实验提出改进意见。

三、生物化学实验课程评分与标准

1. 生物化学实验课期末总成绩按百分制计算,平时实验课成绩60分,实验课技能测试40分。

2. 平时实验课成绩由任课教师评定,为每次实验课成绩的平均值。

每次实验课成绩评定包括以下几部分:

(1) 学习态度端正,按时上课,不迟到,不早退(迟到或早退一次扣2分)。实验兴趣浓厚,课前预习实验讲义。(10分)

(2) 实验中团结协作,主动积极,规范使用仪器,准确熟练,无器材损坏,善于观察分析,实验现象及数据记录完善,按时完成实验内容。(30分)

(3) 独立完成实验报告,报告书写规范,对实验结果分析有理有据,不抄袭他人报告,按时交实验报告。(20分)

无故缺实验课一次扣平时实验课成绩10分,缺三次者该门课重修。

3. 实验课技能测试成绩由实验课考核小组评定,一般由3~5名生物化学实验课教师组成考核小组。实验课结束后,组织学生进行实验技能测试,现场操作,口头回答教师的提问,教师综合评定。

四、实验的准确度

准确度表示实验分析测定值与真实值相接近的程度。在生化实验中常需要对组成生物机体的几类主要化学物质如糖类、脂类、蛋白质、核酸、酶等进行定量测定,测定值与真实值之间存有误差,误差愈小,测定值愈准确,即准确度愈高。分析过程中误差是客观存在的,分析工作者应尽可能减少误差,使所得的结果尽可能准确地反映试样中待测组分的真实含量。

1. 实验误差

误差根据其性质和来源可分为系统误差(可测误差)和偶然误差(随机误差)两类。

系统误差是在测定过程中,由于操作方法、仪器精密性、试剂纯度及个人操作等原因所造成的,对测定结果的影响比较稳定,在同一条件下重复测定中重复出现,使测定结果不是偏高,就是偏低,而且大小有一定规律,它的大小与正负往往可以测定出来,至少从理论上说是可以测定的,故又称可测误差。

偶然误差来源于某些难以预料的偶然因素,可能由于取样不随机,或是在测定过程中受到某些不易控制的外界因素(如测定时环境、温度、湿度和气压的微小波动)的影响。尤其在生物测定中,由于影响因素是多方面的,例如动物的健康状态、饲养条件、生物材料的新鲜程度、微生物的菌种和培养基的条件等,往往造成较大的偶然误差。这种误差是由某些偶

然因素造成的, 它的数值有时大, 有时小, 有时正, 有时负, 所以偶然误差又称不定误差。

2. 提高实验准确度的方法

要提高分析结果的准确度的就必须减少测定中的系统误差和偶然误差。

(1) 减少系统误差

① 标准物对照: 在任何测试中, 甚至在使用标定仪器和基准试剂时, 都应使用待测物质的标准溶液。这种做法能为方法的准确度的提供一种有用的检查, 因为测量所得的数据必须落在真实值范围之内。标准溶液应与待测溶液用完全相同的方法处理, 此时可以画出一条能够指示浓度测量物质量变的标准曲线, 对待测溶液得到的测定值应落在标准曲线范围之内。或者取标准物某一确定浓度的溶液与待测液以同样的方法, 在相同条件下平行测定 (标准物的组成最好与待测液相似, 含量也相近), 得平均值 $\bar{x}_{\text{标}}$ 。

标准物的已知浓度常视为真实值 μ , 用 t -检验法检验 $\bar{x}_{\text{标}}$ 与 μ 之间是否有显著性差异, 即检验所采用的测定方法是否有系统误差。如果有系统误差, 需对待测液的测定值加以校正。计算方法如下:

$$\frac{\bar{x}_{\text{标}}}{\mu} = \frac{\bar{x}_{\text{未}}}{x_{\text{未}}} \quad \text{则} \quad x_{\text{未}} = \frac{\mu}{\bar{x}_{\text{标}}} \bar{x}_{\text{未}}$$

式中, $\bar{x}_{\text{未}}$ 为待测液测定值的平均值; $\mu/\bar{x}_{\text{标}}$ 为校正系数。测定值经校正, 即可消除测定中的系统误差。

② 设置空白试验: 在任何测量实验中, 都应设置空白溶液作为对照, 以消除由于试剂中含有干扰杂质或溶液对器皿的侵蚀等所产生的系统误差。用等体积的蒸馏水代替待测液, 并严格按照待测液和标准液相同的方法及条件同时进行平行测定, 所得结果称为空白值, 它是由所用的试剂而不是待测物质所造成的。将待测物的分析结果扣除空白值, 就可以得到比较准确的结果。空白值一般不应过大, 特别是在微量分析测定时, 如果空白值太大, 应将试剂加以纯化或改用其他适当的器皿。

③ 校正仪器: 仪器不准确引起的系统误差可以通过校正仪器来减小。为此, 应该经常对测量仪器 (如砝码、天平、容器等) 进行预先的校正, 以减小误差, 并在计算实验结果时用校正值。

总之, 在分析测定工作中, 应该合理安排实验, 以尽量减少系统误差或使系统误差在测定中不起主要作用。

(2) 减少偶然误差

① 平均取样: 根据实验要求并考虑生物材料的特殊性如动物的种属、年龄、性别、生长状态及饲养条件, 选取动、植物某一新鲜组织制成匀浆后取样, 细菌通常制成悬浮液, 经玻璃珠打散摇匀后, 再量取一定体积的菌体样品。固体样品先进行粉碎、混匀后取样。

② 多次取样: 根据偶然误差出现的规律, 进行多次平行测定, 并计算平均值, 可以有效地减少偶然误差。除去以上两类误差之外, 还有因分析人员工作中的粗心大意, 操作不正确引起的“过失误差”, 如读错刻度读数, 溶液溅出, 加错试剂等, 这时可能出现一个很大的“误差值”, 在计算算术平均值时, 应舍去这样的数值。

第二章 生物化学实验基本操作

一、配制试剂

在进行生物化学实验时, 配制各种试剂是关键步骤, 配制时特别要注意以下几个方面。

1. 称量要精确，特别是在配制标准溶液、缓冲溶液时，更应注意严格称量。有特殊要求的，要按规定进行干燥、提纯等。
2. 一般溶液都应用蒸馏水或去离子水配制，有特殊要求的除外。
3. 配制溶液时，应根据实验要求选择不同规格的试剂。化学试剂根据其质量分为各种规格（品级），一般化学试剂的分级见附录一。
4. 应根据需要量配制试剂，一般不宜过多，以免积压浪费，过期失效。
5. 试剂（特别是液体）一经取出，不得放回原瓶，以免因量器或药勺不清洁而沾污整瓶试剂。取固体试剂时，必须使用洁净干燥的药勺，试剂不能与手接触。试剂用后要用原瓶塞塞紧，瓶塞不得沾染其他污物或沾污桌面。用完后将瓶放回原处。
6. 从试剂瓶中取液体试剂，用倾注法。取下瓶盖仰放桌面，手握住试剂瓶上贴标签的一面，倾斜瓶子，让试剂慢慢倒出，沿着洁净的试管壁流入试管或沿洁净的玻璃棒注入烧杯中，然后将试剂瓶边缘在容器壁上靠一下，再加盖放回原处。
7. 从滴瓶中取用液体试剂，要用滴瓶中的滴管。使用时，提出滴管，使管口离开液面，用手指紧捏滴管上部橡皮头，赶出空气，然后伸入滴瓶中，放开手指，吸入试剂；当用滴管从试剂瓶中取少量试剂时，则需用附置于试剂瓶旁的专用滴管取用。将试剂滴入试管中时，必须将它悬空地放在靠近试管口的上方，然后挤捏橡皮奶头，使试剂滴入管中。不得将滴管伸入试管中。定量取用液体试剂时，用量筒或移液管。
8. 配制溶液时，必须充分搅拌或振荡混匀。
9. 配制试剂所用的玻璃器皿，都要清洁干净。存放试剂的试剂瓶应清洁干燥。试剂瓶上应贴标签。写明试剂名称、浓度、配制日期及配制人。
10. 有些化学试剂极易变质，变质后不能继续使用。易变质和需要特殊方法保存的常用试剂见附录一。

二、仪器的清洗与干燥

生物化学实验中，如用不干净的玻璃仪器进行实验，往往由于污物和杂质的存在而造成较大的实验误差，甚至导致实验失败，因此必须注意玻璃仪器的清洗。玻璃仪器洗净的标志是水沿内壁能自然流下，器壁均匀湿润且无水条纹，不挂水珠，否则重洗。若重洗后仍挂有水珠，则需选用不同洗液（附录二）重新清洗。

1. 初用玻璃仪器的清洗

新购买的玻璃仪器表面常附着有游离的碱性物质，可先用洗涤剂稀释液、肥皂水或去污粉洗刷，再用自来水洗净，然后浸泡在1%~2%盐酸溶液中过夜（不可少于4h），再用自来水充分冲洗，最后再用蒸馏水冲洗2~3次，置烘箱内烘干或倒置晾干备用。

2. 使用过的玻璃仪器的清洗

做完实验，应立即把用过的玻璃仪器洗刷干净。通常情况下先用自来水冲洗至无污物，再用去垢剂洗涤或浸泡于0.5%去垢剂水溶液中，将器皿内外（特别是内壁）仔细刷洗后，用自来水充分洗净，最后用蒸馏水漂洗数次，或浸泡在0.5%的清洗剂中超声清洗（比色皿决不可超声），然后用自来水彻底洗净去污剂，再用蒸馏水水洗两次。

对于进行高灵敏度的分析及检测实验所用的器皿，除用上述方法清洗外，还需采用其他特殊洗涤方法彻底清除污染物，使器皿洗得十分洁净是非常必要的。一般是把玻璃器皿浸泡于铬酸洗液中4~6h或过夜，再分别用自来水充分冲洗和蒸馏水漂洗，烘干或晾干备用。如有必要还可用浓HNO₃洗涤及处理玻璃器皿，最后用双蒸馏水充分漂洗，这样将使器壁上

污染的金属离子得以清除。

具有传染性样品的容器，如病毒、传染病患者的血清等沾污的容器，应先进行消毒处理后再进行清洗。盛过毒物的容器，特别是剧毒药品和放射性同位素物质的容器，必须经过专门处理，确知没有残余毒物或放射性存在方可进行清洗。

光度法中所用的比色皿使用后应立即用蒸馏水充分冲洗，不能用毛刷刷洗，可用 0.5% 去垢剂溶液洗涤，用脱脂棉小心地清洗，然后用大量蒸馏水充分漂洗干净。如果染有带色的有机物，通常用 HCl-乙醇（体积比 1:2）混合液洗涤后，用自来水冲洗，再用蒸馏水润洗几次。比色皿的四壁是用特殊胶水黏合一起而成，受热后会散架，因此不能烘干。同时也不能用氢氧化钾的乙醇溶液及其他强碱洗涤液清洗比色皿，因这样导致比色皿的严重腐蚀。

聚乙烯、聚丙烯等制成的塑料器皿，在生物化学实验中已用的越来越多。第一次使用塑料器皿时，可先用 8mol/L 尿素（用浓盐酸调 pH=1）清洗，接着依次用蒸馏水、1mol/L KOH 和蒸馏水清洗，然后用 1~3mol/L EDTA 除去金属离子的污染，最后用蒸馏水彻底清洗，以后每次使用时，可只用 0.5% 的去污剂清洗，然后用自来水和蒸馏水洗净即可。

3. 干燥

生化实验中用到的玻璃和塑料器皿经常需要干燥，通常都是用电烘箱（温度一般控制在 105℃ 左右）或红外灯干燥器中烘干。定量的玻璃仪器不能用加热烘干的方法干燥，一般采用控干或依次用少量酒精、乙醚刷洗后用温热的气流吹干。硝酸纤维素的塑料离心管加热时会发生爆炸，所以决不能放在烘箱中干燥，只能用冷风吹干。对于不急用的仪器，洗净后放在通风干燥处自然晾干。

三、玻璃量器的使用

1. 量筒、量杯

量筒呈圆柱形，分有嘴和无嘴具塞两种类型。量杯呈圆锥形，带倾液嘴。量筒和量杯为粗量具，常用于量取体积要求不大精确的液体，其允许误差与量器的最小分度值相当。量筒的精确度高于量杯，其规格有 5ml、10ml、25ml、50ml、100ml、250ml、500ml、1000ml、2000ml 等数种。用量筒或量杯量取溶液体积时，应根据所量溶液的多少来选择，不可使用过大量筒量取较小体积的液体。读数时，视线必须和溶液的凹液面成一水平面，不可过高或过低。

2. 容量瓶

为细颈梨形的平底瓶，带有磨口塞，瓶颈上的刻度表示 20℃ 时瓶颈以下所盛的溶液的体积，即容量瓶所标明的体积。容量瓶的容积有 2000ml、1000ml、500ml、250ml、100ml、50ml、25ml、10ml、5ml 等。

容量瓶用于配制标准溶液或稀释溶液，是一种量入式仪器。使用容量瓶配制溶液时，一般是先将固（液）体物质在洁净小烧杯中用少量溶剂溶解，然后将溶液沿玻棒转移到容量瓶中，烧杯用少量溶剂冲洗 2~3 次，一并倒入量瓶中，再一边加溶剂并不时摇动量瓶使溶液均匀稀释，以避免混合后溶液体积发生变化。当稀释至液面接近标线时，应等待 30~60s，待附着在量瓶颈内壁的液体流下，及液面气泡消失后，再小心逐滴地加入溶剂，直至溶液的凹液面的最低点恰好与标线相切。将量瓶反复倒转摇动，至溶液充分混匀。

注意，容量瓶与其磨口玻塞是密闭配套的，在使用前还应检查瓶塞是否严密，防止在配制溶液过程中漏水，玻塞不能混用，以防量瓶倒转混匀时液体流出。玻璃容量瓶不能用来贮存强碱溶液（强碱溶液能严重腐蚀玻璃）。洗净后的容量瓶不能直接用火焰或在烘箱中用高

温烘烤，否则玻璃受高热致其容积发生改变。

3. 移液管

移液管是用来准确移取一定体积的溶液的一种量出式仪器，是生物化学实验中最常用的量器，常用的规格有 50ml、25ml、10ml、5ml、1ml。移液管分为两种，一种是无分度的，称为大肚移液管，精确度较高，其相对误差 A 级为 0.7%~0.8%，B 级为 1.5%~0.16%，液体自标线流至口端（留有残液），A 级等待 15s，B 级等待 3s。另一种移液管为分度移液管，管身为一粗细均匀的玻璃管，上面均匀刻有表示容积的分度线，其准确度低于胖肚移液管，相对误差 A 级为 0.8%~0.2%，B 级为 1.6%~0.4%，A 级、B 级在吸管身上有 A、B 字样，有“快”字则为快流式，有“吹”字则为吹出式，无“吹”字的移液管不可将管尖的残留液吹出。

用移液管移取溶液时，如移液管不干燥，应预先用所吸取的溶液将移液管冲洗 2~3 次，以确保所吸取的溶液浓度不变。一般用右手的中指和拇指拿住管颈刻度线上方，左手拿吸耳球，把管尖插入溶液内大约 1cm 处，不得过深与过浅。用吸耳球吸液体至所需刻度上，立即用右手食指按住管口，提升吸管离开液面，使吸管末端靠在盛溶液器皿的内壁上，略有放松食指，使液面平稳下降，直至溶液的弯月面与刻度标线相切（注意，此对溶液凹液面，刻度和视线应在一个水平面上），立即用右手食指压紧移液管，取出移液管，插入接受容器中，移液管垂直，管尖靠在接受器内壁，接受器约呈 15°夹角，松开食指，使液体自然流出。标有“吹”字的刻度移液管以及奥氏移液管应吹出尖端残留液体，其他移液管则不必吸出尖端残留液体。吸、放溶液前要用吸水纸擦拭管尖。

移液管使用前应洗至内壁不挂水珠，1ml 以上的移液管用移液管专用刷刷洗，0.1ml、0.2ml 和 0.5ml 的移液管可用洗涤剂浸泡，必要时可以用超声清洗器清洗。由于铬酸洗液致癌，应尽量避免使用。若有大量成批的移液管洗后冲洗，可使用冲洗桶，将移液管尖端向上置于桶内，用自来水多次冲洗后再用蒸馏水或无离子水冲洗。

4. 滴定管

滴定管是用来测量所加滴定剂的体积的容量仪器，它是细长、均匀并有精细刻度的玻璃管，下端呈尖嘴状，并有截门用以控制滴加溶液的速率。按截门构造的不同，可分为酸式和碱式两种。酸式滴定管用玻璃活塞作截门，为防止漏水和便于控制，要在活塞表面涂一薄层凡士林。碱式滴定管采用一段橡皮管作截门，管中置一合适的玻璃球。碱性溶液会腐蚀玻璃活塞，最终使活塞无法转动，因此碱性溶液必须放在碱性滴定管中，具有氧化性的溶液（如高锰酸钾溶液）会侵蚀橡胶，必须放在酸式滴定管中。

常量滴定管的体积多为 50ml 或 25ml，最小刻度为 0.1ml，可读至 0.01ml。半微量滴定管的容积有 10ml、5ml、2ml、1ml，最小刻度为 0.01ml。

滴定管是一种量出式仪器，用来测量容器放出的溶液的体积。为使测量准确，必须注意以下几方面：①使用前应将滴定管洗净至管壁不挂水珠，为此要先用铬酸洗液浸泡，再用自来水冲洗，然后用蒸馏水或去离子水洗，在灌入标准溶液之前，还要用少量标准溶液荡洗 2~3 次，以防止溶液变稀；②为使读数准确，视线应与溶液凹液面下缘最低处保持同一水平，深色溶液的凹液面不易看清，可读液面的最上沿；③滴加溶液不宜过快，否则管壁上附着的溶液过多，使体积测量不准。

5. 微量进样器

微量进样器常用作气相和液相色谱仪的进样器，在生化实验中主要是用作电泳实验的加样器，通常可分为无存液和有存液两种。

① $10\mu\text{l}$ 以下的无存液极微量液体进样器：进样器的不锈钢芯子直接通到针尖端处，不会出现存液。

② $10\sim 100\mu\text{l}$ 有存液微量进样器：不锈钢的针尖管部分是空管，进样器的柱塞不能到达，因而管内会存有空气或液体，其使用注意事项是：不可吸取浓碱溶液，以免腐蚀玻璃和不锈钢零件；因为有存液，所以吸液时要来回多拉几次，将针尖管内的气泡全部排尽；针尖管内孔极小，使用后尤其是吸取过蛋白质溶液后，必须立即清洗针尖管，防止堵塞。若遇针尖管堵塞，不可用火烧，只能用 $\phi 0.1\text{mm}$ 的不锈钢丝耐心串通；进样器未润湿时不可来回干拉芯子，以免磨损而漏气；若进样器内发黑，有不锈钢氧化物，可用芯子蘸少量肥皂水，来回拉几次即可除。

6. 移液器

目前移液器（如图 1-1 所示，亦称移液枪）在生化实验中大量地使用，它们主要用于多次重复的快速定量移液，可以用一只手操作，十分方便。移液的准确度（即容量误差）为 $\pm(0.5\%\sim 1.5\%)$ ，移液的精密性（即重复性误差）更小些，为 $\leq 0.5\%$ 。

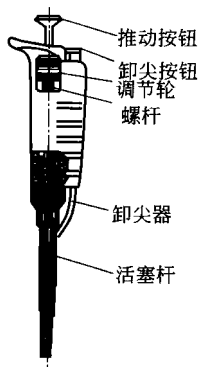


图 1-1 移液器的构造

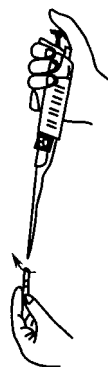


图 1-2 移液器的使用

移液器由连续可调的机械装置和可替换的吸头组成，不同型号的移液器吸头有所不同。实验室常用的移液器根据最大吸用量有 $2\mu\text{l}$ 、 $10\mu\text{l}$ 、 $20\mu\text{l}$ 、 $100\mu\text{l}$ 、 $200\mu\text{l}$ 、 $1000\mu\text{l}$ 、 5ml 等规格。每种移液器都有其专用的聚丙烯塑料吸头，吸头通常是一次性使用，当然也可以超声清洗后重复使用，而且此种吸头还可以进行 120°C 高压灭菌。

移液器的操作方法是：用拇指和食指旋转移液器上部的旋钮，使数字窗口出现所需容量体积的数字，在移液器下端插上一个塑料吸头，必要时可用手辅助套紧，但要防止由此带来的污染，并旋紧以保证气密，然后四指并拢握住移液器上部，用拇指按住柱塞杆顶端的按钮，向下按到第一停点，将移液器的吸头插入待取的溶液中，缓慢松开按钮，吸上液体，并停留 $1\sim 2\text{s}$ （黏性大的溶液可加长停留时间），将吸头沿器壁滑出容器，用吸水纸擦去吸头表面可能附着的液体，排液时吸头接触倾斜的器壁，先将按钮按到第一停点，停留一秒钟（黏性大的液体要加长停留时间），再按压到第二停点，吹出吸头尖部的剩余溶液，如果不便于用手取下吸头，可按下除吸头推杆，将吸头推入废物缸，如图 1-2、图 1-3 和图 1-4 所示。

移液器的使用注意事项如下。

① 移液器属于精密仪器，取液前应先调好调节轮，调节要轻缓，严禁超过最大或最小量程。吸取少量液体时最好不要用大体积的移液器。

② 吸取液体时一定要缓慢平稳地松开拇指，绝不允许突然松开，以防将溶液吸入过快

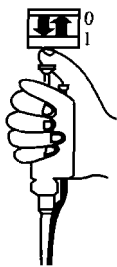


图 1-3 吸入溶液



图 1-4 排出溶液

而冲入移液器内腐蚀柱塞而造成漏气。

③ 为获得较高的精度，吸头需预先吸取一次样品溶液，然后再正式移液，因为吸取血清蛋白质溶液或有机溶剂时，吸头内壁会残留一层“液膜”，造成排液量偏小而产生误差。

④ 浓度和黏度大的液体，会产生误差，为消除其误差的补偿量，可由试验确定，补偿量可用调节旋钮改变读数窗的读数来进行设定。

⑤ 当移液器吸头中有溶剂时，移液器不准放倒，防止残留液体倒流。

⑥ 可用分析天平称量所取纯水的重量并进行计算的方法，来校正移液器，1ml 蒸馏水 20℃ 时质量为 0.9982g。

四、混匀

在生化实验中为了生化反应充分进行，必须使反应体系内各种物质迅速相互接触，因此除特殊要求外，一般需要将反应物彻底混匀，根据所使用器皿的形状和液体容量的不同可选用不同的混匀方法。

如试管、三角瓶和离心管等小口器皿可以用旋转混匀法，手持容器做离心旋转，也可以借助旋涡混合器进行混匀。

搅拌适用于烧杯内溶液混匀：① 搅拌使用的玻璃棒必须两头都烧得圆滑；② 搅拌棒的粗细长短，必须与容器的大小和所配制的溶液的多少呈适当比例关系；③ 搅拌时，尽量使搅拌棒沿着器壁运动，不搅入空气，不使溶液飞溅；④ 倾入液体时，必须沿器壁慢慢倾入，以免有大量空气混入。倾倒表面张力低的液体（如蛋白质溶液）时，更需缓慢仔细；⑤ 研磨配制胶体溶液时，要使杵棒沿着研钵的一个方向进行，不要来回研磨。

振荡溶液时，手握住容器后以手腕、肘或肩作轴旋转容器，不应上下振荡。

五、离心和过滤

欲使沉淀与母液分开，离心和过滤都可以达到目的，但当沉淀黏稠、颗粒过小或者与滤纸发生反应而无法过滤时，则需要借助离心机利用离心力分离。

在生化实验中过滤一般使用滤纸，过滤的作用主要有三方面：收集滤液、收集沉淀、洗涤沉淀。如果收集滤液应选用干滤纸，以免影响滤液的浓度。在酵母 RNA 的提取中用有机溶剂洗涤收集沉淀时，也不能用水将滤纸湿润。较粗的过滤有时可以用脱脂棉或纱布代替滤纸。有时为了加快过滤速率可采用减压抽滤法。

六、溶液 pH 值的测定

测定溶液 pH 值通常有两种方法，最简便的方法是选用 pH 试纸。pH 试纸有广泛和精密 pH 试纸两种。根据待测溶液的酸、碱性选用某一范围的试纸。测定的方法是将试纸纸条剪成小块，用镊子夹一小块试纸（不可用手拿，以免污染试纸），用玻璃棒蘸少许溶液与试