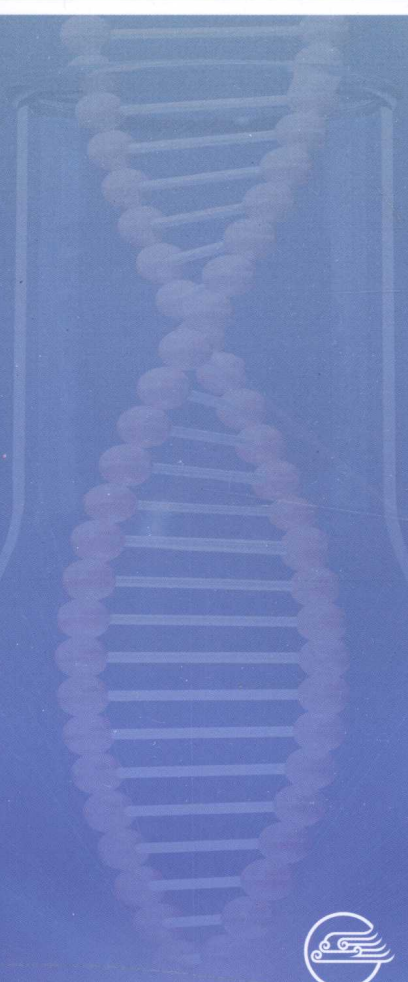


高等学校教材

供基础、临床、药学、护理、预防、检验等专业用

生物化学实验教程

主编 张向阳 李淑玲 郭子林



人民卫生出版社

高等学校教材
供基础、临床、药学、护理、预防、检验等专业用

生物化学

实验教程

主 编 张向阳 李淑玲 郭子林

副主编 马玉玲 孔庆胜 论 宁 韩晓琳 王 琳

编 者 (按姓氏汉语拼音排序)

陈玉杰 郭子林 韩晓琳 黄延红 孔庆胜

来路皓 论 宁 罗益民 李淑玲 李 雷

马玉玲 宋志刚 王 琳 王 清 王曙光

徐兴华 赵 颖 张向阳 周凤玲

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验教程/张向阳等主编. —北京: 人民卫生出版社, 2010. 8

ISBN 978-7-117-13196-4

I. ①生… II. ①张… III. ①生物化学-实验-医学院校-教材 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 122565 号

门户网: www.pmph.com	出版物查询、网上书店
卫人网: www.ipmph.com	护士、医师、药师、中医师、卫生资格考试培训

版权所有, 侵权必究!

生物化学实验教程

主 编: 张向阳 李淑玲 郭子林

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E-mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

010-59787586 010-59787592

印 刷: 北京人卫印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 15

字 数: 365 千字

版 次: 2010 年 8 月第 1 版 2010 年 8 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-13196-4/R·13197

定 价: 32.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换)

前言

生物化学是医学院校一门非常重要的医学基础课程,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。为提高教学质量,学生要通过生物化学实验,熟悉掌握一定的生物化学的基本操作和基本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。同时,对于培养学生分析问题和解决问题的能力、树立实事求是的科学态度也是必不可少的,为以后专业课的学习以及从事生产、科研工作奠定良好的基础。

生物化学实验教材是完成实验教学所必需的重要工具,是至关重要的教学基本建设。《生物化学实验教程》注意编排实验内容的全面性、科学性,共包括六章内容。第一章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常用的实验技术。第二至五章为生物化学分子生物学基础性实验及综合性实验,广泛选取了生物化学实验中较为成熟的蛋白质、酶、糖类、脂类、核酸、维生素及代谢等实验内容,内容设置力求层次分明、由浅入深。每个实验项目包括实验目的、实验原理、实验用品、实验操作、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。实验后面的“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,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。第六章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。

本教程编写原则是以加强学生的基础培养为主,侧重于生物化学分子生物学基本方法和技能的训练。可供高等院校临床医学、预防医学、护理、检验、口腔、生物科学等专业使用。

《生物化学实验教程》参加编写的人员主要为济宁医学院生物化学分子生物学教研室、机能实验室的老师,经过集体讨论拟定大纲、分工负责编写。

《生物化学实验教程》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,以求更加完善。

张向阳

2010年6月

目 录



第一章 生物化学实验基本知识

一、生物化学实验室规则	1
二、生物化学实验记录和实验报告的书写	1
(一) 实验记录	1
(二) 实验报告	2
三、生物化学实验分析方法的选择	2
(一) 方法和标准品的分级	2
(二) 方法选择的要求	3
(三) 方法选择的步骤	3
四、生物化学实验分析方法的评价	4
(一) 精密度	4
(二) 准确性和特异性	5
(三) 灵敏度	5
(四) 其他	5
五、常用实验样品的收集制备	5
(一) 血液样品	6
(二) 尿液样品	6
(三) 组织样品	6
六、生物化学实验常用仪器设备基本操作	7
(一) 玻璃仪器的洗涤及干燥	7
(二) 吸量管的种类和使用	8
(三) 微量加样器的使用	9
(四) 溶液的混匀方法	10
(五) 离心机的使用	11
(六) 分光光度计的原理及使用	13
(七) PCR 仪的原理及使用	15
七、生物化学常用实验技术	17
(一) 离心技术	17
(二) 光谱分析技术	19
(三) 电泳技术	23

(四) 层析技术	27
(五) 基因工程技术	33
(六) 酶免疫技术	37
(七) 放射性同位素技术	38
(八) PCR 技术	39
(九) 杂交技术	41
(十) RNAi 技术	41

第二章 蛋白质实验

实验一 蛋白质含量的测定	43
一、双缩脲法测定血清总蛋白	43
二、紫外分光光度法测定血清蛋白质	45
三、酚试剂法测定蛋白质	46
四、溴甲酚绿法测定血清清蛋白	48
五、考马斯亮蓝法测定蛋白质	50
实验二 蛋白质的沉淀、变性反应	52
一、蛋白质的盐析	52
二、重金属沉淀蛋白质	53
三、生物碱和有机酸沉淀蛋白质	53
四、无机酸沉淀蛋白质	54
五、有机溶剂沉淀蛋白质	55
六、加热变性沉淀蛋白质	55
实验三 血清蛋白质的盐析及清 / 球比的测定	56
实验四 蛋白质等电点的测定	58
实验五 血清蛋白质的醋酸纤维素薄膜电泳	59
实验六 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白质	62
实验七 等点聚焦电泳分离血清蛋白质	65
实验八 凝胶层析法(分子筛)测定蛋白质分子量	67
实验九 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质分子量	69

第三章 酶 实 验

实验十 影响唾液淀粉酶活性的因素	72
一、温度对唾液淀粉酶活性的影响	72
二、酸碱度对唾液淀粉酶活性的影响	73
三、激活剂和抑制剂对唾液淀粉酶活性的影响	74
实验十一 作用物浓度及酶浓度对酶反应速度的影响	75
实验十二 酶的特异性与高效性	78
一、酶的特异性	78
二、酶的高效性	79

实验十三 单底物酶米氏常数 (K_m) 测定	80
一、碱性磷酸酶的 K_m 测定	80
二、蔗糖酶 K_m 测定	83
三、脲酶 K_m 值的测定	85
实验十四 丙二酸对琥珀酸脱氢酶的抑制作用	88
实验十五 血清乳酸脱氢酶同工酶的电泳分离	90
一、醋酸纤维薄膜电泳分离血清乳酸脱氢酶同工酶	90
二、琼脂糖凝胶电泳分离血清乳酸脱氢酶同工酶	92
三、聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清乳酸脱氢酶同工酶	95
实验十六 乳酸脱氢酶及辅酶的作用	97
实验十七 细胞色素体系的作用及其抑制	98
实验十八 血清谷丙转氨酶活性测定	100

第四章 物质代谢

实验十九 血糖浓度的测定	103
一、邻甲苯胺法	103
二、葡萄糖氧化酶法	105
实验二十 糖耐量试验	106
实验二十一 尿糖的定性测定	107
实验二十二 胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的影响	109
实验二十三 糖的酵解作用	111
实验二十四 饱食和饥饿对肝糖原含量的影响	113
实验二十五 剧烈运动对尿中乳酸含量的影响	115
实验二十六 酮体的生成与氧化	116
一、亚硝基铁氰化钠法	116
二、碘量法测定	118
实验二十七 血清甘油三酯的测定	120
一、乙酰丙酮显色法	120
二、磷酸甘油氧化酶法	122
实验二十八 血清胆固醇的测定	124
一、邻苯二甲醛显色法	124
二、醋酸酐 - 硫酸显色法	126
三、胆固醇氧化酶法	127
实验二十九 血清磷脂的测定	128
实验三十 血清脂蛋白的分离	130
一、琼脂糖凝胶电泳法	130
二、超速离心法	132
实验三十一 免疫透射比浊法测定脂蛋白(a)	133
实验三十二 磷钨酸 - 镁沉淀法测定血清 HDL-胆固醇	135

实验三十三	薄膜层析法分离血清脂类	137
实验三十四	血清过氧化脂质的测定	138
实验三十五	血清尿素氮的测定	140
一、二乙酰-肟法测定血清尿素		140
二、速率法测定血清尿素		142
三、血清尿素氮测定(脲酶-Berthelot 比色法)		143
实验三十六	精氨酸酶与尿素的生成	145
一、纸片法		145
二、扩散皿法		147
实验三十七	转氨基作用与氨基酸纸层析	148
实验三十八	血清尿酸测定	150
实验三十九	血清总胆红素和结合胆红素测定——改良 Jendrassik-Grof (J-G) 法	152
实验四十	胡萝卜素的柱层析分离	155
实验四十一	血红蛋白及核黄素的凝胶层析分离	156
实验四十二	维生素 C 的测定——2,6-二氯酚靛酚滴定法	159
实验四十三	血清钙的测定(甲基百酚兰比色法)	162
实验四十四	血磷的测定——还原钼蓝法	164
实验四十五	血浆二氧化碳结合力测定——酸碱滴定法	165

第五章 核酸分子生物学实验

实验四十六	动物组织中核酸的提取与鉴定	167
实验四十七	组织 DNA、RNA 分离、提纯及鉴定	170
实验四十八	核酸的增色效应	172
实验四十九	核酸的定量测定	173
一、定磷法		173
二、紫外分光光度法		175
三、RNA 的定量测定(苔黑酚法)		177
四、DNA 的定量测定(二苯胺法)		178
实验五十	质粒 DNA 的提取与琼脂糖凝胶电泳鉴定	180
实验五十一	质粒 DNA 的酶切与鉴定	184
实验五十二	质粒 DNA 的转化	186
实验五十三	聚合酶链反应(PCR)技术	188
实验五十四	Southern 杂交	190
实验五十五	Northern 杂交	194
实验五十六	Western 杂交	197
实验五十七	聚丙烯酰胺凝胶电泳银染色分析 DNA	199
实验五十八	从琼脂糖凝胶中分离回收 DNA 片段	201
实验五十九	DNA 片段的连接反应	203

实验六十 外源基因在大肠杆菌中的诱导表达	205
----------------------	-----

第六章 生物化学实验附录

一、实验基础知识	208
(一) 元素相对原子量表	208
(二) 实验室常识	209
(三) 实验误差的产生与处理	210
(四) 离心机转速与相对离心力(RCF)的换算	210
二、试剂的配制	211
(一) 配制试剂注意事项	211
(二) 化学药品的分类、分级	212
(三) 易变质及需要特殊方法保存的试剂	212
(四) 纯水的制备和检验	213
(五) 常用酸碱试剂的比重和浓度	213
(六) 常用洗液的配制及应用	214
(七) 常用标准溶液的配制	214
(八) 常用酸碱指示剂的选择及运用	215
(九) 常用缓冲液的配制	216
(十) 饱和硫酸铵的配制	220
(十一) 一些常用化合物的溶解度	221
(十二) 聚丙烯酰胺凝胶电泳常用染色法	222
三、常用层析基质	222
(一) 离子交换纤维素	222
(二) 聚丙烯酰胺凝胶的技术数据	223
(三) 琼脂糖凝胶的技术数据	223
(四) 凝胶过滤层析介质的技术数据	224
(五) 离子交换层析介质的技术数据	226
四、常用缓冲液及培养基的配制	227
(一) 常用缓冲液	227
(二) 电泳缓冲液及凝胶加样缓冲液	227
(三) 储备液的配制	229
(四) 常用培养基的配制	230
五、生化与分子生物学常用数据库及网址	232



第一章

1

生物化学实验基本知识

一、生物化学实验室规则

1. 每个同学都应该自觉遵守课堂纪律,维护课堂秩序,不迟到,不早退。实验室内不得吸烟、饮食、大声喧哗。
2. 实验前必须认真预习,熟悉本次实验的目的、原理、操作步骤,懂得每一操作步骤的意义和了解所用仪器的使用方法。
3. 实验过程中要听从教员的指导,严肃认真地按操作规程进行实验,如实记录实验中的现象、结果和数据,并认真写出实验报告。
4. 实验台面应随时保持整洁,仪器、药品摆放整齐。公用试剂用毕,应立即盖严放回原处。勿使试剂、药品洒在实验台面和地上。实验完毕,仪器洗净放好,将实验台面抹拭干净,才能离开实验室。
5. 使用仪器、药品、试剂和各种物品必须注意节约。洗涤和使用仪器时应小心仔细,防止损坏仪器。使用贵重精密仪器时,应严格遵守操作规程,发现故障须立即报告教师,不得擅自动手检修。
6. 实验过程中,废液倒入专门的废液桶,固体废物和带残渣的废物不得倒入水槽或到处乱扔。注意水电安全,离开实验室前,必须关好水龙头,拉下电闸,严防发生事故!
7. 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。实验室内一切物品,未经本室负责教师批准,严禁携带出室外,借物必须办理登记手续。
8. 每次实验课由班长负责安排值日生。值日生的职责是负责当天实验室的安全、卫生和一切服务性的工作。

二、生物化学实验记录和实验报告的书写

实验是在理论指导下的科学实践,目的在于经过实践掌握科学观察的基本方法和技能,培养学生科学思维、分析判断和解决实际问题的能力,也是培养探求真知、尊重科学事实和真理的学风,培养科学态度的重要环节。

(一) 实验记录

1. 实验记录是科学实验工作的原始资料,应直接写在实验记录本上,严禁用零散纸片记录。记录应做到条理分明、文字简练、字迹清楚,不得涂改、擦抹。写错之处可以划去重写。从实验课开始应养成认真写好实验记录的良好习惯。
2. 实验课前应认真预习,将实验名称、原理、操作方法和步骤等简明扼要地写在记录本上。

3. 实验中观察要仔细,记录应如实、客观、详细、准确。记录内容包括:试剂名称、规格、用量,实验方法和具体条件(温度、时间、仪器名称型号、电流、电压等),操作关键及注意事项,现象(正常的和异常的)、数据和结果等。记录时不能夹杂主观因素。

4. 记录的形式可根据实验内容和要求,在预习时事先设计好表格或流程图,实验中边观察边填写,应做到条理分明、整洁清楚,便于整理总结。

5. 实验中如发生错误或对实验结果有怀疑,应如实说明,必要时重做,不应将不可靠的结果当作正确结果。应培养一丝不苟和严谨的科学作风。

6. 完整的实验记录包括实验日期、实验题目、目的、操作、结果。

(二) 实验报告

实验结束后,应及时整理和总结实验结果及记录,按照下列顺序写出实验报告:

1. 实验名称(title of experiment)

2. 实验目的(objective)

3. 实验原理(principle) 最好使用简式。

4. 实验操作(operational procedure)

5. 结果与计算(results and calculation) 实验结果包括实验数据的实验记录,应根据实验要求,将数据整理归纳、分析对比、计算,并尽量总结成图表,如标准曲线图、实验组和对照组结果比较表等。

6. 实验讨论(discussion) 针对实验方法、实验结果和异常现象进行必要的说明、分析。讨论部分可以包括对实验方法、结果、现象、误差等进行探讨、评论和分析,对实验设计的认识、体会和建议,对实验课的改进意见等。

7. 实验结论(conclusion) 是该实验所能说明的问题,是对实验的总结。

三、生物化学实验分析方法的选择

生物化学实验分为两大项:一项是制备;另一项是分析。实验工作的分析常常占较大比例,而分析方面又以定量分析较为重要。这里就着重讨论生物化学定量分析方法的选择和评价的问题。

(一) 方法和标准品的分级

1. 方法的分级 生化成分的测定方法很多,根据其准确度与精密度的不同可以分为三级。

(1) 决定性方法(definitive method)指准确度最高,系统误差最小,经过详细的研究,没有发现产生误差的原因或在某些方面不够明确的方法,测定结果为“确定值”,与“真值”最接近。由于技术要求太高,费用昂贵,不直接用于鉴定常规方法的准确性,只用于发展及评价参考方法和标准品。

(2) 参考方法(reference method)指准确度与精密度已经充分证实的分析方法,干扰因素少,系统误差很小,与重复测定的随机误差相比可以忽略不计,有适当的灵敏度、特异性、直线性及较宽的分析范围。这类方法在条件优越的实验室中应经常使用。但它主要应用于鉴定常规方法,评价其误差大小、干扰因素,并决定其是否可以被接受。它也用于鉴定二级标准品,为质控血清定值,也可用于评价商品试剂盒等。

(3) 常规方法(routine method)的性能指标符合临床或其他目的需要,有适当的分析

范围,而且经济实用。所谓偏差已知的方法是指准确度已经确定的方法,其准确度不明者称为偏差未知的方法。常规方法在作出评价以后,经有关学术组织认可,可以作为推荐方法。

2. 标准品的分级 国际标准化委员会将标准品(参考物)的定义暂定为:它的一种或几种物理或化学性质已经充分确定,被用于校正仪器或证实一种测定方法的物质,并将其分成三级。

(1) 一级标准品:一级标准品(原级参考物)为已经确定的稳定而均一的物质,它的数值已由决定性方法确定,或由高度准确的若干方法确定,所含杂质也已经定量。它可用于校正决定性方法,评价及校正参考方法以及为“二级标准品”定值。一级标准品都有证书,在美国由国家标准局(National Bureau of Standards, NBS)发给合格证书,并指明它的性质和有关数据。

(2) 二级标准品:二级标准品(次级标准品)或是纯溶液(水或有机溶剂的溶液),或存在于相似基质中。这类标准品可由实验室自己配制或为商品,其中有关物质的量由参考方法定值或用一级标准品比较而确定,主要用于常规方法的标化或为控制物定值。

(3) 控制物:控制物有冻干的或溶液的,可以用适当的标准品(一级或二级)以参考方法定值,用于质量控制,不用于标化(除经准确定值者)。

(二) 方法选择的要求

国际临床化学协会(International Federation of Clinical Chemistry, IFCC)提出:常规方法应具有实用性和可靠性两方面的性能指标,至于某一项具体分析方法所应具有的性能标准,可根据采用这一试验的目的决定。

1. 实用性 一般应具备:①微量快速能便于急诊,适合成套项目分析;②费用低廉,包括劳动力与试剂、设备及一般管理费用等;③方法简便;④应用安全可靠。

2. 可靠性 一般具有较高的精密度和准确度,以及较大的检测能力。①精密性,变异系数(CV)一般应小于5%。②准确度与特异性,准确度是指测定值与“真值”的符合程度。一般偏差系数(CB)应小于5%。特异性是指只对待测物质起化学反应,不与其他结构类似的化合物发生反应。③检测能力,即“检测限度”,或“检出限”。检出限通常是指能与适当的“空白”读数相区别的待测物的最小值。

(三) 方法选择的步骤

1. 广泛查阅文献 根据方法选择的要求对已发表的各种方法进行比较与检验,确定哪些方法有充分的科学根据及真实的使用价值。必须仔细分析各种方法的特点,选择适合于本实验室具体条件的方法,并且要判断所选方法能否满足本室工作的需要。如果文章中没有写上方法的有关性能资料或引用文献中的有关论述,则不应轻易采用。

2. 选定候选方法 经初步选定的方法称为候选方法。候选方法确定后,应该写出该法的原理与参考文献,所用仪器、试剂的来源、牌号、纯度(或配套试剂盒),标本收集要求,详细的操作步骤,标准曲线和结果计算,文献中列出的性能指标,参考值与参考范围,以及其他应注意的事项与安全防护措施等。

3. 进行初步试验 为了实用的目的,初试应该包括:①标准曲线及其重复性;②质控血清或新鲜标本的重复试验;③分析待测物浓度不同的标本,与公认的参考方法的测定值作对比;④要有足够的试验证明仪器与试剂能符合要求。这些初试工作有望揭

露明显的问题,例如未曾预料的困难或误差来源等。初试的特殊目的是:使分析工作者熟悉有关技术;掌握各分析步骤的特性;操作是否可以改进或简化。初试所得到的资料用于确定是否有必要作进一步研究,如需要作技术上的某些修改,应在评价实验之前作好。

四、生物化学实验分析方法的评价

一般来说,评价一种定量分析方法应该注意其是否具备下列条件:

(一) 精密度

精密度(precision)是指多次重复测定同一量时各测定值之间彼此相符合的程度,表征测定过程中随机误差的大小。化学分析中,精密度是指使用特定的分析程序,在受控条件下重复分析测定均一样品所获得测定值之间的一致性程度。重现性是精密度的同义语,精密度高也即重现性好。

精密度是表示测量的再现性,好的精密度是保证获得良好准确度的先决条件。一般说来,测量精密度不好,就不可能有良好的准确度。反之,测量精密度好,准确度不一定好,这种情况表明测定中随机误差小,但系统误差较大。

精密度通常以算术平均差、极差、标准差或方差来量度。精密度同被测定的量值大小和浓度有关。因此,在报告精密度时,应该指明获得该精密度的被测定的量值大小和浓度。

例如:某方法4次测定一血样品中所含的尿酸量为4.0mg%、4.1mg%、4.2mg%、4.3mg%;而用另一种方法测定同一样品,其值为3.8mg%、3.0mg%、3.6mg%、4.0mg%,则第一种方法较为精密。

精密度降低的主要原因是由于方法中存在着某些易变因素或不易控制的环节,造成偶然的误差。如比色测定中,呈色不稳定,呈色强度随时间或温度改变而急剧变化,遇光颜色迅速消退等;又如酶活力测定时,由于酶极不稳定,或对抑制物的污染过于敏感等,也可导致精密度的下降。

衡量精密度有以下几种方法:

(1) 相对偏差或标准差的求取:相对偏差的优点是不需要经过复杂的演算即可求得,但是不能完善地反映实验总体的状况,这是最突出的缺点。标准差的演算稍微复杂,但可准确地反映实验总体的精密度。

(2) 制作标准曲线:以被测物纯溶液的浓度为横坐标,以不同浓度的测得值为纵坐标,制定标准曲线。各测得值间的线性关系,说明在不同浓度时这一方法重现性的良好与否。

欲作偏离各点(测得值)最近的近似直线,可根据以下公式求出该直线的斜率(m):

$$M = \frac{\sum Y}{\sum X}$$

Y 为各测得值(或读数),X 为各被测管的浓度。

根据斜率(m)通过零点即可作一直线。

用此法求近似直线,其优点在于简单易行,不必经过复杂的数学演算,缺点在于不能严格地反映客观情况。

所以,欲作一位置合理的直线,最后应根据以下公式计算并绘制:

$$Y = mX + b$$

Y 为测得值(或读数);X 为浓度;m 为直线斜率;b 为直线在纵坐标上的截距。

(3) 回收率的测定:在纯溶液中进行的测定重现性良好,并不意味着在复杂体系中的测定重现性同样良好。生物化学的研究对象多系包含成千上万种物质的生物液(血、尿、组织匀浆……),这些物质可能起干扰作用,所以要检验某一方法的可靠与否,应进行回收率的测定。

$$\text{百分回收率} = \frac{\text{测得量} - \text{原含量}}{\text{加入量}} \times 100\%$$

百分回收率以在 $100\% \pm 3\%$ 范围内为佳。

回收率好意味着方法的精密度高,在迫不得已采用回收率较差的方法时,必须肯定一样品的回收试验尚能得到稳定的回收率。此时可用回收率来校正测得值,由此可得到较近于真实的校正值。

(二) 准确性和特异性

准确性(accuracy)是指测定值与真实值之间的符合程度。特异性(specificity)是指测定的所得结果,必须是被测物的含量,而不包含任何被测物以外的其他物质的含量。所以特异性是准确性的表现之一,也是影响方法准确性的一个重要因素。除特异性外,准确性还与方法的精密度有关。精密度差时表现为重复实验各测得值很分散,导致大多数测得值偏离真实值。此外,还取决于方法中的其他因素。

理想的方法应该是准确性高,对其被测物是特异的,而且其测定结果又是可重复的,通常用“精确”来概括。

(三) 灵敏度

对于一方法,灵敏度(sensitivity)的要求取决于被测物的对象。例如测定血中非蛋白氮(non-protein nitrogen, NPN)(每毫升血含 NPN 为 0.2~0.4mg),用奈氏试剂测消化后的铵盐已足够灵敏。而血氨含量(每毫升含氮量正常值低于 0.002mg)远低于 NPN 含量,如用该法则嫌不够灵敏,所以需要另选更灵敏的方法,如次氯酸钠比色法。

不灵敏的方法,有碍于低含量样品的测定。而且,有些不灵敏的方法往往不能因使用更多的原材料而提高灵敏度,因为这样会导入更多的干扰物质。但是方法亦不必过于灵敏,过于灵敏的方法,常常对器皿的洁净程度或试剂的纯度要求甚高,对器皿或试剂中存在的微量杂质太敏感,容易出现误差,而影响重现性。

(四) 其他

评价一种生物化学分析方法还要考虑它是否快速、简便、经济。所以,在众多的实验方法中寻找一种特异而准确、操作简单、快速、经济实用的实验方法,是一重要课题。不但要考虑以上的准则,还要结合自己实验室的具体条件来选择。

五、常用实验样品的收集制备

分析组织中某种物质的含量,探索物质代谢的过程和规律,经常使用人或动物的肝、肾、脑、黏膜以及肌肉等组织,也选用全血、血浆、血清或者无蛋白血滤液等血液样品。有时也采用尿液、胃液等完成各种生化实验。掌握以上各种实验样品的正确处理和制备方法是保证生化实验顺利进行的关键。

最常用的实验样品是人或动物的血、尿和组织等。现将动物或人的这些样品制备的方

法扼要介绍如下:

(一) 血液样品

1. 全血 取清洁干燥的试管或其他容器,收集人或动物的新鲜血液,立即与适量的抗凝剂充分混合,所得到的抗凝血为全血。血液中加入抗凝剂的种类可以根据实验的需要进行选择,但是用量不宜过大,否则将影响实验的结果,常用剂量如下:宁酸钾或草酸钠,1~2mg;枸橼酸钠,5mg;氯化钠,5~10mg;肝素,0.1~0.2mg。

抗凝剂宜先配成水溶液,按取血量的需要加于试管或适当容器内,横放,再蒸干水分(肝素不宜超过30℃),使抗凝剂在容器内形成薄层,利于血液与抗凝剂的均匀接触。取得的全血如不立即使用,应贮于4℃冰箱之中。

2. 血浆 抗凝之全血在离心机中离心,使血球下沉,如此得到的上清液即为血浆。质量上乘的血浆应为淡黄色。为避免产生溶血,必须采用干燥、清洁的采血器具和容器,并尽可能地少振摇。

3. 血清 收集不加抗凝剂的血液,室温下自然凝固,所析出的草黄色液体,即为血清。制备血清时,血凝块收缩析出血清,大约需要3小时。为促使血清尽快析出,必要时可以采用离心的方法缩短分离时间,并且可得到较多的血清。

制备血清同样要防止溶血。所以,应用的器具应当干燥、清洁。而且,血清析出后宜用干净的玻棒轻轻分离血凝块与容器壁的粘连,及时吸出析出的血清。

4. 无蛋白血滤液 血液中含有丰富的蛋白质。在许多生化实验(如血糖测定等)中,蛋白质的存在会干扰测定的结果,所以通常需要将其中的蛋白质除去,制成无蛋白血滤液,再进行分析测定。常用的蛋白沉淀剂有钨酸、三氯乙酸或氢氧化锌。血液加入蛋白质沉淀剂之后离心或过滤所得的上清液或滤液,就是无蛋白血滤液。以钨酸为蛋白沉淀剂的无蛋白血滤液,常用于血糖、肌酐、NPN等成分的测定。用三氯乙酸沉淀蛋白质,所得的血滤液呈酸性,利于钙磷的溶解,因此在测定血清离子含量时多宜采用。

(二) 尿液样品

尿液中含有多种代谢产物。但是,昼夜之中尿液中的化学物质含量往往随着进食、饮水、运动及其他情况有所变动。一般定性实验,收集一次尿液即可;若作定量测定,则需收集24小时尿液。收集方法是,排除体内残余尿液,记录时间。收集到次日同一时间的全部尿液,盛入有盖的清洁容器内,混合后,量出尿液总量,并作记录,尔后取适量尿液测定。

收集的尿液如不能立即进行实验,为防止尿液变质,则应置于冷处保存。必要时收集尿瓶中应预先放入防腐剂,通常为甲苯(约10ml/L尿)或浓硫酸(10ml/L尿)。

如果作某种试验性测定时(如维生素排出测定),宜在服药后数小时采集尿液。动物尿液的采集,可将动物饲养于代谢笼中,其排出尿液经笼下漏斗收集。

(三) 组织样品

在生化实验中,经常利用离体组织研究各种物质代谢途径和酶系的作用,或者从组织中分离、纯化核酸、酶以及某些有意义的代谢物质进行研究。但是,在生物组织中因含有大量的催化活性物质,离体组织的采集必须在冰冷条件下进行,并且尽快完成测定。否则,其所含物质的量和生物活性物质的活性都将发生变化。

一般采用断头法处死动物,放出血液,立即取出所需脏器或组织,除去脂肪和结缔组织之后,用冰冷生理盐水洗去血液,再用滤纸吸干,称重后按试验要求制成匀浆或者组织糜。

(1) 组织糜:迅速将组织剪碎,用捣碎机绞成糜状,或者加入少量黄沙于乳钵中,研磨至糊状。

(2) 组织匀浆:取一定量新鲜组织剪碎,加入适量匀浆制备液,用高速电动匀浆器或者玻璃匀浆器磨碎组织。由于匀浆器的转头在高速运转中会产生热量,因此在制备匀浆时,需将匀浆器置于冰水中。

常用的匀浆制备液有生理盐水、缓冲液和 0.25mol/L 的蔗糖液等,可根据实验的要求,加以选择。

(3) 组织浸出液:上述组织匀浆液再经过离心分离出的上清液就是组织浸出液。

六、生物化学实验常用仪器设备基本操作

(一) 玻璃仪器的洗涤及干燥

玻璃仪器的洗涤与清洁直接影响实验结果的准确性,因此玻璃仪器的洗涤工作是很重要的。由于不同种类的玻璃仪器洗涤方法不同,所以应首先了解玻璃仪器的分类。

1. 常用玻璃仪器的分类 分为:①一般玻璃仪器,这里指的是无刻度(如试管)或无精确刻度的仪器,如烧杯、三角烧杯、试剂瓶、试管等。即使有刻度也不精确,只能大体量取。②容量分析玻璃仪器(有精确刻度),如吸量管,容量瓶等;③特殊玻璃仪器,指在固定试验仪器中使用的玻璃仪器,如比色皿,指在分光光度计中使用的玻璃仪器。

2. 洗涤的方法

(1) 新购置玻璃仪器的清洗:新购置来的玻璃仪器表面附着有游离碱质,应先用肥皂水洗刷后再用流水冲洗,浸泡于 1%~2% HCl 中过夜,取出后再用流水冲洗,最后用蒸馏水冲洗 3 次,在干燥箱中烤干或自然晾干,备用。

(2) 使用过的玻璃仪器的洗涤

1) 一般的玻璃仪器:先用毛刷蘸取少量的洗涤剂(如洗衣粉),刷洗,再用自来水冲洗,当冲洗至管壁不再挂水珠时,再用蒸馏水少量多次冲洗(一般实验要求 3 次),如果仪器还不干净,则用洗液浸泡 2 小时以上,这里的洗液一般选用浓硫酸(强酸性,强氧化性)或重铬酸钾(强氧化性)。

2) 容量分析玻璃仪器:带刻度的容量仪器的洗涤,则不能用毛刷刷,因摩擦会产生划痕使得容积不再准确,再者藏垢纳污。对于这样的玻璃仪器,我们一般是用完后立即用自来水冲洗,最后再用蒸馏水冲洗一次。如果这样还是不干净,则应选用洗液浸泡的方法。

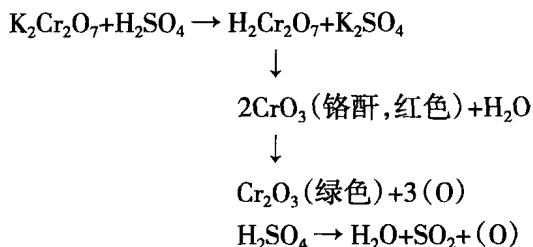
3) 特殊玻璃仪器:特殊玻璃仪器的洗涤,一般是既不能用毛刷刷,也不能用洗液浸泡。如比色皿,要保持光滑面的光滑度,如果用了毛刷,则使光滑面变得粗糙,影响了光的透射;再有,比色皿为 5 块玻璃粘贴在一起,如果用强酸强氧化性的洗液浸泡后,很容易使它们四分五裂。所以,对于特殊玻璃仪器的洗涤,我们一般采用立即倒掉溶液,自来水即时冲洗的方法,如果还有污物附着,根据其特殊性选择其他的进一步洗涤方式,如短时间的浸泡清洗(如酒精、各种常用有机溶剂、稀盐酸等)。

(3) 清洗液的原理与配制

1) 肥皂水、洗衣粉溶液和去污粉:是常用的洗涤剂,有乳化作用,可除去污垢,能使脂肪、蛋白质及其他黏着性物质溶解或松弛,一般玻璃仪器可直接用肥皂水浸泡或刷洗。

2) 铬酸洗液:

原理:铬酸洗液由重铬酸钾(或重铬酸钠)和浓硫酸配制而成,其清洁效力主要源于其强氧化性和强酸性。



铬酐越多、硫酸越浓,其清洁效力也就越强,当洗液变绿色后则不宜应用。

洗液的配制:称取重铬酸钾 5g 放于 250ml 烧杯中,加热水 5ml 搅拌,使其尽量溶解,烧杯下垫一石棉网以防过热,然后慢慢加入工业用浓硫酸 100ml,随加随搅拌,尽量避免红色铬酐沉淀析出。此时洗液由红黄色转为黑褐色,冷却后储存于指定容器内,盖紧以防吸水,贴上标签(洗液变绿后不宜使用)。

使用:使用洗液前需将玻璃仪器用自来水冲洗数次,并将仪器上的水分尽量除去再放洗液中浸泡,数小时后取出仪器,用自来水充分清洗至无水分止。冲洗时注意勿将洗液溅出水槽。再用少量蒸馏水冲洗数次,晾干备用。

上述两种洗液最常用。实验中遇到特殊污染物,需用针对性强的洗涤液。

3. 玻璃仪器的干燥 一般采用自然控干和烘干两种方法。自然控干利用的是重力的作用(和风吹带走水分),因此比较慢,但其优点是适用范围广。而烘干,其原则是对容量分析仪器禁用,避免由于热胀冷缩,对容积的准确性有影响。但在实际操作中,准确度要求不太高时,也将其在烘箱中,于温度 40~50℃ 下进行烘干。烤干试管时,应将管口向下倾斜约成 45° 角,由上往下,先烤管底,最后将管口的水分烤干。烤干时须经常移动,以免炸裂。烘干后,降至室温使用。

(二) 吸量管的种类和使用

1. 吸量管的分类 常用吸量管分三类(图 1-1):

(1) 奥氏吸量管:管身有一橄榄球形的膨大,在各种类型的同一容量的吸量管中其内表面积最小,因此该吸量管内壁黏附的液体也最少,准确性高。吸量管上只有一个刻度,供准确量取 0.5ml、1ml、2ml 液体时用。放液时,必须吹出量后残留在吸量管尖端的液体。主要用于量取黏滞系数大的液体。

(2) 移液管:中部膨大呈柱状。每根吸量管上只有一个刻度,供准确量取 5ml、10ml、25ml、50ml 等较多体积液体时用。放出液体流毕后,将吸量管尖在容器内壁上继续停留 15 秒,注意不要吹出尖端最后的部分。

(3) 刻度吸量管:首先看一下刻度吸量管上部标有的最大容量,在哪个温度下量得的体积最准,以及

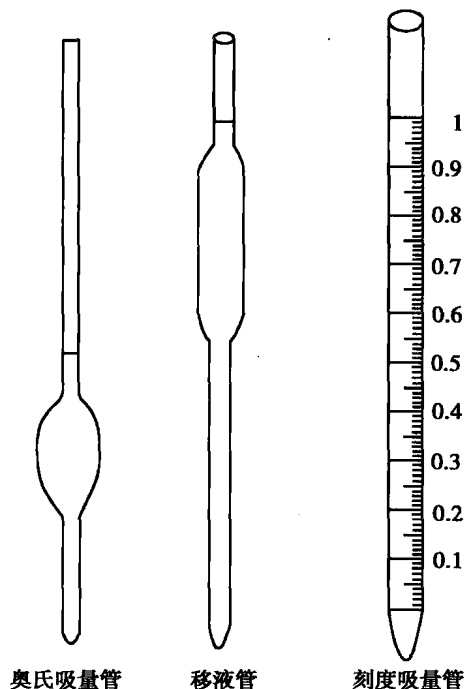


图 1-1 常用吸量管