

高等院校医学与生命科学系列实验教材

生物化学实验

EXPERIMENTS IN BIOCHEMISTRY

主 编 阮 红
副主编 张 薇 陈伟平

 ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

高等院校医学与生命科学系列实验教材

生物化学实验

EXPERIMENTS IN BIOCHEMISTRY

主 编 阮 红
副主编 张 薇 陈伟平



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学实验 / 阮红主编. —杭州: 浙江大学出版社, 2012.8

ISBN 978-7-308-09918-9

I. ①生… II. ①阮… 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 (2012) 第 081343 号

生物化学实验

阮 红 主编

责任编辑 季峥 (really @zju.edu.cn)

封面设计 林智广告

出版发行 浙江大学出版社

(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310007)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 杭州大漠照排印刷有限公司

印 刷 浙江省良渚印刷厂

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 9

字 数 225 千

版 印 次 2012 年 8 月第 1 版 2012 年 8 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-09918-9

定 价 22.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部邮购电话 (0571)88925591

前 言

生命科学在 20 世纪有了惊人的发展,其中生物化学是最活跃的分支学科之一。由于生物化学是以实验为基础的学科,因此生物化学实验技术是生命科学研究领域和临床诊疗应用领域中一项非常重要的技术,它推动了生物化学学科的迅猛发展。近几年来,我国高等教育的步伐不断地加快,不少高等院校组建了医药类学院,并强调以高素质应用型的人才培养作为目标。我们清楚地看到,医药类专业的学生必需掌握基本的生物化学实验技能,了解生物体内基本物质成分的分离、分析和鉴定的常用方法,以及物质代谢的研究方法,并通过实验技术加深对日常生活和临床实践中生物化学知识的理解与运用,提高观察、分析和解决问题的能力,为深入学习和日后从事相关工作打下扎实的基础。

为此,我们结合多年高等院校基础生物化学教学实践之经验,参考国内外教材,编写了这本《生物化学实验》教材。本书系统、全面地介绍了生物化学常用实验技术与方法,共分五部分。第一部分为生物化学实验基本常识。第二部分为生物化学基础性实验,共分四章,介绍经典的生物化学实验内容,使学生学习氨基酸及蛋白质类、核酸类、酶类、脂类等生物分子鉴定的实验原理和方法,其中分光光度法、电泳技术、层析技术、离心技术四大生物化学基本技术穿插在相应的实验内容中运用。在第三、四、五部分中分别设置了生物化学综合性实验、设计性实验和病例讨论内容。其中,综合性实验是基于生物代谢的原理和知识的综合应用;而设计性实验是在尽可能创造条件,在现有的实验条件下,最大可能地让学生动手动脑,培养学生独立思考、勇于创新的实践能力,我们提供了难易程度不一的自主选择性实验题目,供学生们参考;病例讨论是结合新型 PBL 基于问题的医学学习模式,强调以学生为主体,用问题情景引导学生主动思考、分析,获得需要的知识并最终解决问题,提升学生的学习积极性和能动性。

本书的主要编者有浙江大学城市学院的阮红、张薇、陈伟平,浙江大学生命科学学院的丁鸣、杨歧生,绍兴文理学院的倪坚,浙江大学城市学院的范立梅、陈泽华、蒋立娣和杜阳龙也参与了部分章节的编写。南京大学生命科学学院的杨荣武教授和浙江大学医学院詹金彪教授对本书的编写提供了大量指导性的建议,在这里一并表示感谢。编者长期工作在教学和科研的第一线,有多年的教学和科研经验,深受学生们的喜爱,现将大家多年实验教学经验整理成书,奉献给喜爱生物化学实验的莘莘学子。

本书适用于高等院校的生物化学实验教学,可供临床医学、药学、医学检验、预防医学、护理学等专业使用,也可供生物技术、生物制药、生物工程类专业根据要求选择使用。由于编者能力有限,不免有许多不足与疏漏之处,谨望广大师生朋友们多提宝贵意见,以便我们完善教材,更好地为师生们服务。

编者

2012年5月

目 录

Contents

第一部分 生物化学实验基本常识	1
第一章 实验室规则	1
第二章 生物化学实验常用仪器基本操作	3
第三章 实验记录、实验报告及实验要求	12
第二部分 生物化学基础性实验	14
第一章 氨基酸及蛋白质类实验	14
实验 1 氨基酸双向纸层析	14
实验 2 蛋白质的两性反应和等电点的测定	17
实验 3 蛋白质的沉淀及变性反应	19
实验 4 紫外分光光度法测定蛋白质含量	22
实验 5 双缩脲法测定蛋白质含量	24
实验 6 福林-酚试剂法测定蛋白质含量	25
实验 7 考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量	27
实验 8 乙酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白	28
实验 9 离子交换层析分离混合氨基酸	33
实验 10 凝胶层析	35
实验 11 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质的相对分子质量	37
实验 12 蛋白质印迹免疫技术	42
第二章 核酸类实验	46
实验 13 紫外分光光度法测定核酸含量	46
实验 14 DNA 琼脂糖凝胶电泳	48
实验 15 动物组织 DNA 的提取和鉴定	50
实验 16 动物组织 RNA 的提取和鉴定	52
实验 17 质粒 DNA 的微量快速提取	55
实验 18 PCR 基因扩增技术	58
实验 19 Southern 印迹杂交	61
实验 20 Northern 印迹杂交	65

第三章 酶类实验	69
实验 21 影响酶活性的因素	69
实验 22 酶的竞争性抑制作用	72
实验 23 血清丙氨酸氨基转移酶活性的测定	73
实验 24 血清乳酸脱氢酶活性的测定	78
实验 25 血清淀粉酶活性的测定(碘淀粉比色法)	82
实验 26 血清碱性磷酸酶活性的测定(氨基安替比林比色法)	84
实验 27 血清肌酸激酶活性的测定(肌酸显色法)	86
实验 28 血清乳酸脱氢酶同工酶活性的测定(琼脂糖电泳法)	89
实验 29 血清肌酸激酶同工酶活性的测定(琼脂糖电泳法)	92
第四章 脂类实验	96
实验 30 血清总胆固醇含量的测定	96
实验 31 酮体的鉴定	98
实验 32 血清甘油三酯含量的测定(GPO-PAP 法)	100
实验 33 血清高密度脂蛋白胆固醇含量的测定(化学修饰酶法)	102
实验 34 血清低密度脂蛋白胆固醇含量的测定(化学修饰酶法)	103
实验 35 薄层层析	104
第三部分 生物化学综合性实验	106
实验 36 肝糖原的提取与鉴定	106
实验 37 肌糖原的酵解作用	107
实验 38 血清尿素氮含量的测定	110
实验 39 血清蛋白的分离、纯化与鉴定	111
实验 40 蔬菜上有机磷和氨基甲酸酯类农药残留的快速检测	115
实验 41 从动物毛囊中抽提 DNA	117
实验 42 DNA 指纹图谱	119
第四部分 生物化学设计性实验	122
第五部分 病例讨论	124
附 录	127
附录一 常用缓冲溶液的配制	127
附录二 玻璃仪器的洗涤及各种洗涤液的配制	133
附录三 实验安全防患的应急处理	136
参考文献	138

第一部分 生物化学实验基本常识

第一章 实验室规则

生物化学实验室是从事生物化学实验教学和科学研究的主要场所。为了让学生能在实验室中更好地学习生物化学实验的各项实验技能,掌握规范的实验操作和养成良好的实验习惯,同时为了保证生物化学实验正常、安全、有序地开展,生物化学实验室需要相应的实验室管理办法与规则,学生应该自觉地遵照生物化学实验室规则和实验注意事项进行实验。

1. 实验器材的使用

实验室一般为每人/组配备一套实验常用的实验器材,包括玻璃器皿(如量筒、烧杯、试管、玻棒等)和其他器材(如研钵、剪刀、镊子、滤纸、纱布等)。学生实验前应根据“器材清单”清点有无缺损,如有缺损请及时向老师报告并补足。

在实验过程中,应按要求正确使用这些器材;实验结束后,应把使用过的玻璃仪器清洗干净(玻璃仪器的清洗详见附录二),并放回自己的器材柜中以备下次使用。

对于公用实验器材,使用时要倍加爱护和珍惜,使用后也要保持清洁,清洗干净后放回原处。

2. 实验仪器的使用

使用实验仪器前,应在了解每台生物化学仪器的操作方法后,或在已掌握如何使用的前提下,方可自己单独操作有关仪器。若违反操作规程,将仪器损坏,应按有关规定进行赔偿。

仪器使用结束后,应及时清理并关闭电源;使用人需要在仪器登记本上记录仪器使用情况,如仪器在使用过程中有问题,应登记并马上向实验室老师报告。

3. 实验材料和试剂的安全使用

在实验过程中如果涉及实验材料,包括动植物活体及其组织、器官、标本材料等,需注意安全,小心操作,以免被动物咬伤或与材料接触时感染。

当接触有毒、有害、腐蚀性和挥发刺激性试剂时,需谨慎操作,一定要做好防护措施,如戴口罩、手套,使用通风柜等。

在实验中若接触易燃易爆试剂、带有微生物的器皿和放射性同位素时,应严格遵照安全规定进行操作和处理。

药品取用时必须用干净药匙,取用不同药品时必须更换药匙。公用药品、试剂取用后,必须“盖随瓶走”,用后需立即将瓶盖盖严并放回原处,切忌张冠李戴;取出的试剂或标准溶液如未用尽,切勿倒回试剂瓶;特殊药品、试剂应按要求存放;专用药品、试剂应做好妥善保管工作;使用后的试剂不可随意倒弃,要及时按不同要求做好安全处理工作。

4. 实验室安全与卫生

对于污染过有毒、有害、腐蚀性试剂的实验器材和仪器,应及时按要求清洗处理,不要影响后序的实验安全。

实验时如不慎将有毒、有害、腐蚀性试剂洒在实验台或地上,应及时处理好桌面及地面,以免影响自身和他人的安全。

使用实验仪器时,应注意用电安全;使用结束后,应及时关闭电源。

禁止在实验室内使用电炉或明火。

严禁在实验室内吸烟。

若在实验过程中不慎发生意外,如毒物吸入、化学灼伤、机械损伤、触电、局部失火等,相应的应急处理方法请见附录三。

在每次实验结束后,应自觉完成以下工作:① 整理实验用试剂、器材和仪器。② 将实验台上的废液缸中的废物按规定处理,洗净废液缸,并把台面擦干净。③ 把使用过的仪器及仪器台面擦拭干净。④ 将实验室产生的实验废物和垃圾按规定分类处理,并把实验室的地面扫清拖净。⑤ 关掉与实验无关的水龙头及电源开关,经检查无安全问题后才可离开实验室。

5. 其他实验室管理事项

学生进入实验室做实验,应严格遵守实验室各项规章制度,做到不迟到,不早退;不准在实验室吃零食或用膳;必须穿实验服做实验,不准穿拖鞋进实验室;严格服从指导教师的管理。

实验过程中要保持安静,不要喧哗;不要做与实验无关的事,如玩手机、电脑游戏,看影视片,收听音乐,打牌等。

第二章 生物化学实验常用仪器基本操作

1. 移液器

在生物化学与分子生物学实验中,常用移液器(又称移液枪)来精确地量取实验所需试剂,它是生物化学实验中常用的小件精密设备。能否正确使用移液器,关系到它的使用寿命,关系到实验数据的准确性与重复性。移液器的结构如图 1-1 所示。

移液器由连续可调的机械装置和可替换的吸头(又称枪头)组成。不同型号的移液器吸头有所不同,实验室常用的有 $2\mu\text{l}$ 、 $10\mu\text{l}$ 、 $20\mu\text{l}$ 、 $100\mu\text{l}$ 、 $200\mu\text{l}$ 、 1ml 、 5ml 、 10ml 等不同规格。在规定的量程范围内可根据需要调节取液的容量。

具体使用方法如下:

(1) 选择移液器

根据实验精度选用正确量程的移液器(使用者可根据移液器生产厂家提供的吸量误差表确定)。当取用体积与量程不一致时,可通过稀释液体、增加吸取体积来减少误差。

(2) 吸液(取液)

方法如图 1-2 所示。根据需要吸取的试剂量慢慢调准移液器容量,切勿超过最大或低于最小量程;用右手握住移液器外壳,将吸头套在移液器的活塞杆上,左右微微转动,上紧即可,必要时可用手辅助套紧,但要防止由此带来的污染,然后用拇指按下控制按钮至第 1 挡,将吸头嘴竖直插入待取液体中,深度以刚浸没吸头尖端为宜,然后缓缓松开拇指慢慢吸取液体,让控制按钮复原。移液器吸量液体时,动作要轻缓,要注意避免形成空气泡,以保证取液的精确度。

(3) 放液(加液)

放液方法如图 1-3 所示。排出所吸液体时,先将吸头尖端靠在容器内壁上,慢慢按压

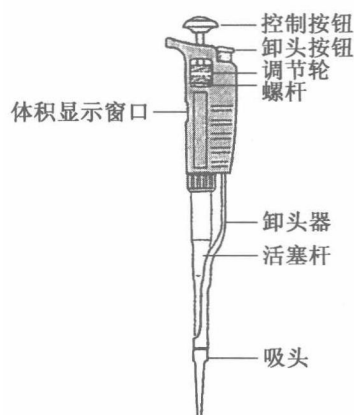


图 1-1 移液器结构示意图

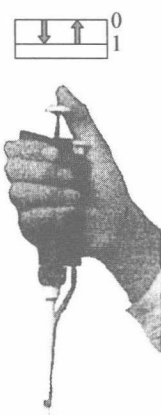


图 1-2 吸液操作示意图



图 1-3 放液操作示意图

控制按钮至第1挡,停留1~2s后,按至第2挡以排出所有液体。反复一次。如果发现吸头嘴尖口处仍有残留小液滴时,则应将吸头接触容器内壁,使液滴沿壁流下,同时拇指不能松开,以免液滴倒吸。

(4) 吸头的更换

性能优良的移液器还专门配有卸载吸头的机械装置,轻按卸头按钮,吸头会自动脱落。

(5) 注意事项

- ① 在移液器吸头中含有液体时,禁止将移液器水平放置,不用时最好置于移液器架上。
- ② 吸取液体时动作应轻缓,防止液体随气流进入移液器的上部。
- ③ 在吸取不同的液体时,要更换移液器吸头。
- ④ 移液器要进行定期校准,一般由厂方专业人员负责。

2. 可见分光光度计

可见分光光度计的测试波长范围在325~1100nm,能在近紫外、可见光光谱区域内对样品物质做定性和定量的分析。722E型分光光度计是在保持722标准型基本性能的基础上,将仪器的部分功能进行优化,是一款经济型的分光光度计,在同类产品中性价比高,使用简单,是目前高校实验室常用分析仪器之一。下面以722E型分光光度计为例,介绍其使用方法。

(1) 使用方法

① 使用仪器前,使用者应熟悉仪器的构造和工作原理,了解各个操作旋钮的功能。在接通电源前,对仪器进行检查,要求平稳放置、正确接线,最后再接通电源开关。

② 开启电源,指示灯亮,仪器预热20min。

③ 按动“MODE”按钮,选择开关置于“T”。旋转波长旋钮,调至测试用波长。

④ 打开样品室盖,将样品和参比液分别装入比色皿中,将参比液置于第一挡,测试样品液分别置于其他挡位,盖上样品室盖,拉动比色皿架拉杆,置参比于光路,按“100%T/OA”按钮,调节100%透光率,使数字显示为“100.0”满度字样。

⑤ 向外拉动比色皿架拉杆半挡,调节“0T”旋钮,使数字显示为“00.0”字样。

⑥ 重复调零和满度,直到“100.0”和“00.0”保持稳定不变,即可启动测定工作。

⑦ 拉动比色皿架拉杆,置参比于光路,按动“MODE”按钮,选择开关置于“A”,按“100%T/OA”按钮,使数字显示为“00.0”字样。

⑧ 拉动比色皿架拉杆,置样品于光路,按“100%T/OA”按钮,数字显示值即为被测样品的吸光度。依次拉动拉杆,测定其他比色皿样品的吸光度值。

⑨ 如需测定其他波长下的吸光度值,必须重复步骤③~⑧,重新调整后使用。

⑩ 测定完毕后,先打开样品室盖,再断电源。比色皿清洗干净后,晾干保存。

(2) 注意事项

① 分光光度计必须放置在固定的仪器台或实验台上,不要随意搬动,严防振动、潮湿和强光照射。

② 仪器必需预热20min,待机器稳定后方可使用。

③ 实验中如果需要改变测试波长,必须对仪器进行重新调整。如果大幅度改变测试波长,需等数分钟后才能正常工作,否则光能量变化急剧,会影响光电管受光后的响应速度。

④ 注意比色皿的选择使用,如用于紫外检测,需要用石英比色皿,如用于可见光检测,则用玻璃比色皿。比色皿盛液量以达到容积的2/3左右为宜。若不慎将溶液流到比色皿的

外表面,则必须先用滤纸吸干,再用擦镜纸擦净。

⑤ 拿比色皿时,手指只能捏住比色皿的毛玻璃面,不可用手拿比色皿的光滑面,以免污染和磨损比色皿透光面。每次用完比色皿,应立即用自来水冲洗,再用蒸馏水洗净。若比色皿被有机物沾污,可选用 0.1mol/L 盐酸-乙醇溶液(1:2)浸泡,或 5% 的中性皂溶液或洗衣粉液稀释浸泡,或新配制的重铬酸钾-硫酸洗液短时间浸泡之后,立即用水冲洗干净。不能用碱溶液或氧化性强的洗涤液来洗比色皿,以免损坏,也不能用毛刷清洗比色皿,以免损伤它的透光面。洗涤后倒置晾干或用滤纸将水吸去,再用擦镜纸轻轻揩干。

⑥ 每台仪器所配比色皿必须成套,不能与其他仪器的比色皿互换使用。

⑦ 在测定一系列溶液的吸光度时,需按溶液浓度由低到高的顺序测定,以减小测量误差。

⑧ 一般应把待测溶液浓度尽量控制在吸光度值 0.1~0.7 的范围内进行测定。

3. 电泳仪

电泳仪电源电压 U 分为高压 1500~5000V、中压 500~1500V、低压 500V 以下三种;电流 I 分为大电流 500~2000mA、中电流 100~500mA、小电流 100mA 以下三种;功率 P 分为大功率 200~400W、中功率 60~200W、小功率 60W 以下三种。

一般电泳仪电源输出量的三个参数 U 、 I 、 P 在预置时都可以直接输入或连续调整,启动后还可以对任一参数进行微调。

① 首先要确定仪器电源开关应处于关闭状态。

② 连接电源线,确定电源插座是否有接地保护。

③ 常用电泳仪一般均有两组或四组并联输出插口,可以同时接两个或四个电泳槽,但要求这两组或四组电流之和不超过电泳仪的最大值,此时最好采用稳压输出,以减少几个电泳槽之间的相互影响。

④ 电泳前,确定凝胶和电泳缓冲液试剂配制是否符合要求,并将凝胶和电泳缓冲液放入电泳槽中。

⑤ 用电压调节旋钮或电流调节旋钮调到所需电压或电流。首先确定是恒压输出,还是恒流输出。如果是恒流输出,则将电流调节为 0,将电压调至最大,然后开机,此时缓缓调节电流调节旋钮直到所需电流值。如果是恒压输出,则将电压调为 0,将电流调为最大,然后开机,缓缓调节电压旋钮至所需电压值。电源在任何情况下只能稳定电压或电流中的一种参数,电压与电流之间的关系符合欧姆定律。

⑥ 连接电泳仪电源与电泳槽之间的电泳导线。将黑、红两种颜色的电极线对应插入电泳仪输出插口,并与电泳槽相对应插口连接好,注意不要接错正、负极,检查无误后接通电泳仪电源。根据实际情况选择适宜的电压进行电泳,一般电压为 200~250V,电压过高会导致液体过热,会影响电泳结果。

⑦ 电泳实验结束后,先关闭电泳仪电源,随之拔除电泳槽导线,然后打开电泳槽上盖,取出凝胶,进行染色或直接拍照。

⑧ 使用过程中发现异常情况应立即关机,如发现只有电压显示而电流输出为零,应检查输出端到电泳槽之间是否断路。如果是仪器故障,应请维修人员负责检修。

⑨ 平时要注意保持电泳仪清洁。使用后要彻底清洗,可用少许洗衣粉、洗涤剂清洗,用去离子水冲洗干净,晾干备用。

4. 凝胶电泳系统

凝胶电泳系统集电泳仪和电泳槽为一体,具有体积小、重量轻、操作简便等特点。

(1) 结构示意图

电泳仪结构如图 1-4 所示。

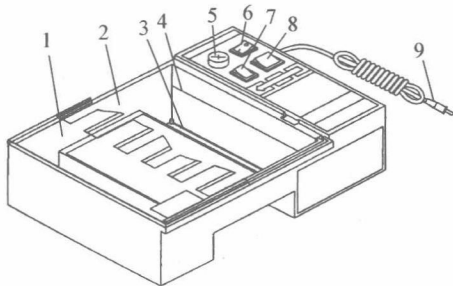


图 1-4 电泳仪结构示意图

- 1—盖子;2—电泳槽;3—铂电极;4—刻度线;5—熔断器;6—电源开关;
7—电压选择开关;8—极性转换开关;9—电源插头

(2) 制作凝胶体

先将移胶板放入制胶槽中,然后将样品梳垂直安插在移胶板的上方;倒入熔化的凝胶,等待凝胶冷却凝固;拔出样品梳,凝胶体制作完成;用拇指和食指轻捏住移胶板两侧,可挪动凝胶体。

(3) 电泳仪操作

先在电泳槽中加入 250ml 电泳缓冲液,液面与槽内刻度线齐平。将制作好的凝胶体用移胶板转移到电泳槽中,盖好电泳槽盖子。根据需要,按电压选择开关选择电泳电压(50V 或 100V);按极性转换开关选择电泳方向,开关置于“+”位置时,电泳方向与电泳仪面板上的箭头方向一致。将电源输入插头插入电源插座中,注意输出电压应为 110V(若输入电压为 220V,则应采用转换变压器进行电压转换)。最后打开电源开关,开始电泳。

(4) 注意事项

电泳仪和转换变压器表面如有污迹,应用干净的湿布擦洗表面。切勿用腐蚀性清洗剂清洗。清洗时务必断开电源。制胶槽、样品梳和移胶板可用清水或中性清洗剂清洗。清洗电泳槽时,注意不要让清洗液流入电器盒中。

电泳仪常见故障和排除方法见表 1-1。

表 1-1 常见故障及排除方法

故障现象	故障原因	排除方法
指示灯不亮	电源未接 熔断器损坏	接输入电源 更换熔断器
无电泳现象	电源开关未打开 电泳槽盖子未盖	打开电源 盖好盖子
电泳方向相反	直流电极性相反	切换极性转换开关
电泳距离异常	输入电源电压不符 电压选择不正确	检查输入电源电压 检查电压选择开关

5. 离心机

离心技术在生命科学的诸多领域都已得到广泛的应用,主要用于各种生物样品的分离和制备。生物样品悬浮液在高速旋转下,由于巨大的离心力作用,悬浮的微小颗粒(细胞器、生物大分子的沉淀等)以一定的速度沉降,从而与溶液得以分离,而沉降速度取决于颗粒的质量、大小和密度。离心机是利用离心技术对混合溶液进行分离和沉淀的一种专门的仪器。采用离心机可使混合溶液中的悬浮颗粒快速沉淀,借以分离密度不同的各种物质。目前医药行业、食品化工等企业都配备多种型号的离心机。

通常离心力常用地球引力的倍数来表示,因而称为相对离心力“RCF”,或者用数字乘“ g ”来表示,例如 $25000 \times g$,则表示相对离心力为 25000。相对离心力是指在离心场中,作用于颗粒的离心力相当于地球重力的倍数,单位是重力加速度通常作为单位“ g ”(980cm/s²),此时“RCF”相对离心力与离心机转速可用以下公式换算:

$$RCF = 1.119 \times 10^{-5} \times n^2 r$$

式中: r 为粒子的旋转半径,单位为 cm; n 为每分钟转数,单位为 r/min。

由上式可见,只要给出旋转半径 r ,则 RCF 和 n 之间可以相互换算,具体换算见图 1-5。

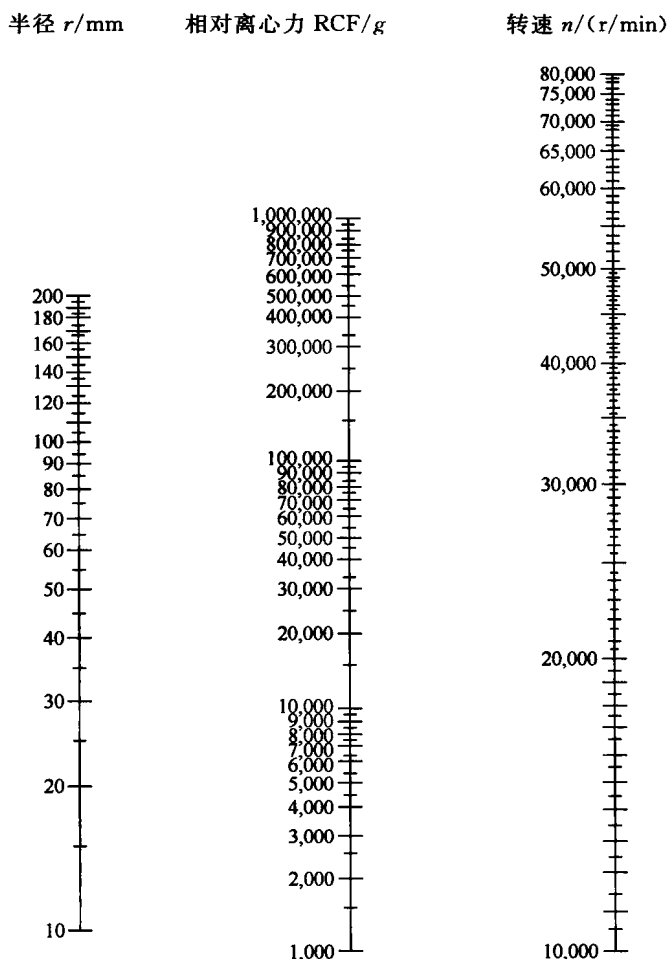


图 1-5 离心机转速与相对离心力换算图

离心机通常可分为普通离心机(转速一般为 5000r/min)、高速离心机(转速达 25000r/min)和超速离心机(转速可达 70000r/min 以上)。下面主要介绍前两类常用离心机的操作方法。

(1) 普通离心机

① 使用前检查离心机各旋钮是否在零位或关的位置上。

② 离心前先待离心的样品溶液转移到大小合适的离心管内,盛量不宜过多(一般以离心管体积的 2/3 为宜)。

③ 将上述盛有液体的一对离心管连同套管放在电子天平上,通过调整离心管内液体或缓冲水的量使之达到平衡。然后将每对离心管对称地放置于离心机的转头中,盖好离心机盖。

④ 开动离心机时,先打开电源开关,然后慢慢转动调速旋钮,使速度逐渐加快,直到加快到所需转速时,调节定时旋钮,设定离心时间。

⑤ 当达到离心时间后,机器自动关闭启动开关,最后离心机减速自动停止,机器停止后方可打开离心机盖,取出样品离心管。

⑥ 使用完毕,将套管中的橡皮垫洗净,并冲洗外套管和离心管,倒立放置,待其干燥备用。

(2) 高速离心机

① 打开离心机电源开关,进入待机状态。

② 选择合适的转头。离心时离心管所盛液体不能超过总容量的 2/3,否则液体易溢出;使用前后应注意转头内有无漏出液体残余,应使之保持干燥。转换转头时应注意使离心机转轴和转头的卡口卡紧。每对离心管平衡误差应在 0.1g 以内。

③ 选择离心参数:按温度设置按钮,再用数字键设置离心温度,回车确定;按速度设置按钮,可在“RPM/RCF”设置挡之间切换,用数字键设置离心速度,回车确定;按转头设置按钮,再用数字键设置转头型号,回车确定;按时间设置按钮,再用数字键设置离心时间,回车确定;离心机刹车或加速速度一般设置在 0~4,不宜经常调整。

④ 将平衡好的离心管对称放入转头内。盖好转头盖子,拧紧。

⑤ 按下离心机盖门,如盖门未盖好,离心机将不能启动。

⑥ 按“START/启动”键,开始离心。离心开始后应等离心速度达到所设的速度时才能离开,一旦发现离心机有异常(如不平衡,会导致机身明显震动或噪音很大),应立即按“STOP/停止”键,必要时直接按电源开关切断电源,停止离心,并找出原因。

⑦ 如发现机器故障,请及时与厂家维修人员联系。

⑧ 使用结束后及时清洁转头和离心机腔,不要关闭离心机盖,以利于湿气蒸发。

⑨ 使用结束后必须登记使用情况。

(3) 注意事项

① 使用各种离心机时,必须事先在电子天平上精确地平衡离心管和其内容物,平衡时重量之差不得超过各台离心机说明书上所规定的范围,每台离心机不同的转头有各自的允许差值,转头中绝对不能装载单数的管子,当转头只是部分装载时,离心管必须互相对称地放在转头中,以便使负载均匀地分布在转头的周围。

② 装载溶液时,要根据各种离心机的具体操作说明进行。根据待离心液体的性质及体

积选用适合的离心管：有的离心管无盖，液体不得装得过多，以防离心时甩出，造成转头不平衡、生锈或被腐蚀；而制备性超速离心机的离心管，则常常要求必须将液体装满，以免离心时塑料离心管的上部凹陷变形。严禁使用显著变形、损伤或老化的离心管。

③ 若要在低于室温的温度下离心，转头在使用前应放置在冰箱或离心机的转头室内预冷。离心机在预冷状态时，离心机盖必须关闭，离心结束后取出转头，将其倒置于实验台上，擦干腔内水，离心机盖处于打开状态。

④ 离心过程中不得随意离开，应随时观察离心机上的仪表是否正常工作，如有异常的声音应立即停机检查，及时排除故障。

⑤ 每个转头各有其最高允许转速和使用累积限时，使用转头时要查阅说明书，不得超速使用。每一转头都要有一份使用档案，记录累积的使用时间，若超过了该转头的最高使用限时，须按规定降速使用。

⑥ 每次使用后，需做好离心机使用记录。必须仔细检查转头，及时清洗、擦干。转头是离心机中需要重点保护的部件，搬动时要小心，不能碰撞，避免造成伤痕，转头长时间不用时，要涂上一层上光蜡保护。

6. PCR 仪

运用 PCR (polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应) 技术的主要仪器为 PCR 仪。根据 DNA 扩增的目的和检测的标准，可以将其分为普通 PCR 仪、梯度 PCR 仪、原位 PCR 仪和荧光定量 PCR 仪四类。

(1) 普通 PCR 仪

将一次 PCR 扩增过程运行一个特定退火温度的 PCR 仪，叫普通 PCR 仪。它是实验室传统的 PCR 仪。

(2) 梯度 PCR 仪

在一次 PCR 过程中可以设置一系列不同的退火温度条件(如通常设置 12 种温度梯度)，这样的仪器就叫梯度 PCR 仪。因为被扩增的不同 DNA 片段，其最适退火温度不同，通过设置一系列的梯度退火温度进行 DNA 扩增，从而通过一次性 PCR 扩增，就可以筛选出表达量高的最适退火温度，并获得有效的 DNA 扩增。该仪器主要用于研究未知 DNA 退火温度的扩增，这样既减少成本，也节约时间。梯度 PCR 仪在不设置梯度的情况下也可以作为普通 PCR 仪来扩增 DNA。

(3) 原位 PCR 仪

能在组织、细胞内进行 PCR 反应的仪器称为原位 PCR 仪。它能帮助查找病源基因在细胞中的位置或目的基因在细胞内的作用位点等。需保持组织或细胞的完整性，使 PCR 反应体系渗透到组织和细胞中，并在细胞内的靶 DNA 所在的位置上进行基因扩增。利用该仪器，不但可以检测到靶 DNA，又能标出靶序列在细胞内的位置，对于从分子和细胞水平上研究疾病的发病机理、探究临床发病过程及病理转变机理，具有重要的实用价值。

(4) 荧光定量 PCR 仪

在普通 PCR 仪的基础上，增加荧光信号采集系统和计算机分析处理系统，构成荧光定量 PCR 仪。其扩增原理和普通 PCR 仪相同，不同点是加入的引物需标记同位素或荧光素等，使用引物和荧光探针同时与 DNA 模板特异性结合并扩增。扩增的结果可以通过荧光信号采集系统实时采集，到计算机分析处理系统得出量化的实时结果输出，这种 PCR 仪又

称实时荧光定量 PCR 仪。荧光定量 PCR 仪有单通道、双通道和多通道。当只用一种荧光探针标记的时候,选用单通道,有多荧光标记的时候用多通道。单通道也可以检测多荧光标记的目的基因表达产物,但因为一次只能检测一种目的基因的扩增量,需多次扩增才能检测到不同的目的基因片段的扩增量。

(5) 操作实例

下面以东胜龙 EDC-810 型基因扩增仪的使用为例进行介绍。图 1-6 为其结构示意图。

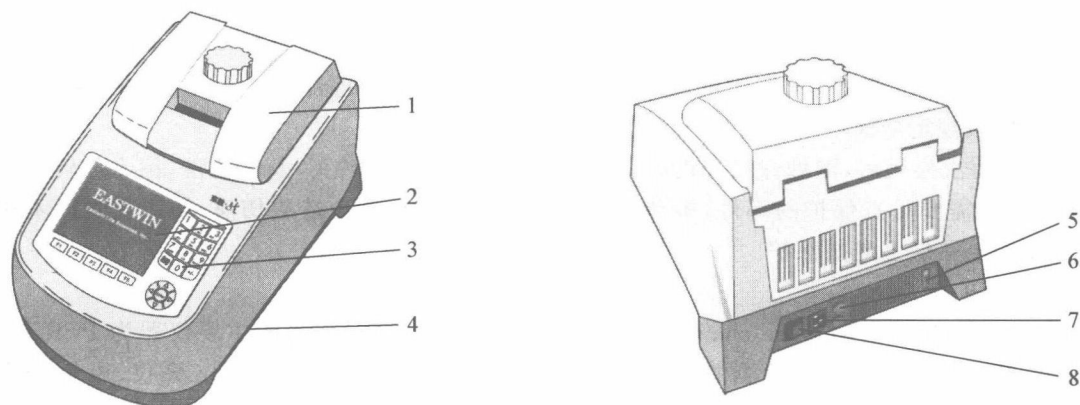


图 1-6 PCR 仪结构示意图

1—模块;2—液晶显示屏;3—操作键盘;4—通风孔;5—熔断器座;
6—RS232 接口;7—电源插座;8—电源开关

1) PCR 仪的功能

包括文件编辑、储存、查看、修改和删除功能,升降温速率调整功能,循环过程温度和时间自动修饰功能,文件运行的各阶段数据的显示功能,暂停文件运行、停止文件运行功能,断电后自动恢复功能,软件升级(标准 RS232 接口)功能,声音提示功能,文件运行总时间和剩余时间估计功能,时间(年、月、日、时、分、秒)显示和校准功能,故障保护和报警功能等。

2) 基本使用方法

① 开机自检,放入样品。

打开电源开关,扩增仪会发出“嘟、嘟”两声,表明电源已接通。此时屏幕将显示“Self testing……”,仪器将进行自检。若自检没有发现问题,屏幕将出现主界面。打开热盖,放入样品,合上热盖,拧紧旋钮。

② 编写程序。

首先进入主界面:

- * 按“File”键进入文件列表界面。
- * 按“System”键进入系统参数设置界面。

如果当前 Control Mode 为 Block 模式,按“Run”键进入文件运行界面。

编辑 PCR 程序:

- * 在主界面中按“File”键进入文件列表界面。
- * 按“Edit”键可编辑光标所指的文件。