

高等医药院校配套教材

医学生物化学与 分子生物学实验指南

主编 吴耀生

 人民卫生出版社

高等医药院校配套教材

医学生物化学与 分子生物学实验指南

主 编 吴耀生

副主编 周素芳

编 者 (以姓氏笔画为序)

吴耀生 张明涛 苏上贵 周素芳

林文珍 贺菽嘉 凌 敏 黄勇奇

曾麒燕 蓝秀万 蔡丹昭

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学生物化学与分子生物学实验指南/吴耀生主编.
北京:人民卫生出版社,2007.2
ISBN 978-7-117-08468-0

I. 医… II. 吴… III. ①医用化学:生物化学—化
学实验—医学院校—教学参考资料②分子生物学—实
验—医学院校—教学参考资料 IV. R313-33 Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 005795 号

医学生物化学与分子生物学实验指南

主 编:吴耀生
出版发行:人民卫生出版社(中继线 010-67616688)
地 址:北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼
邮 编:100078
网 址:<http://www.pmph.com>
E-mail: pmph@pmph.com
购书热线:010-67605754 010-65264830
印 刷:北京汇林印务有限公司
经 销:新华书店
开 本:787×1092 1/16 印张:16
字 数:375 千字
版 次:2007 年 2 月第 1 版 2007 年 2 月第 1 版第 1 次印刷
标准书号:ISBN 978-7-117-08468-0/R·8469
定 价:24.00 元

版权所有,侵权必究,打击盗版举报电话:010-87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

改 编 说 明

本实验教材是在原有《新编生物化学实验》(人民卫生出版社, 2002年3月出版)的基础上, 总结过去近5年的实验教学及使用情况, 进一步对栏目内容、编辑风格进行改编, 希望能用作本科医学生物化学与分子生物学教学改革探索的素材。主要在以下方面做了改编: ①以生物大分子, 物质代谢, 遗传信息分析技术, 疾病的分子诊断为四大模块, 进行实验内容的调整; ②增加临床典型病例, 以病例开展讨论, 从而引导学生结合所学的生物化学和分子生物学知识, 对有关病例进行讨论分析, 进一步明确疾病发生的生化机制与分子生物学机制; ③每个实验均补充完善了【实验意义】或【临床意义】, 增加【实践及思考】等栏目, 以促进学生思考及提出问题; ④增加综合性及设计性实验项目, 提出课题设计的基本原则及思路; ⑤对原有的一些错漏进行了校正。

我们希望能通过教材的改编, 适应高等医学教育改革的需要, 使学生能更早接触临床问题, 并将所学的生物化学和分子生物学知识尽早用于临床问题的分析, 扩展科研思路, 提高分析及处理问题的能力, 提高综合素质。

本教材主要作为高等医药院校本科各专业生物化学与分子生物学配套教材, 也可供其他层次学生或研究生选用, 亦可为生物化学与分子生物学教师及临床工作者参考。

尽管我们努力了, 但错误在所难免, 水平尚待提高。欢迎使用这本教材的广大师生提出宝贵意见及建议, 恳请各位专家及同道们批评指正!

吴耀生

2006-12-11

目 录

第一章 绪论	1
一、实验须知	1
二、实验记录及实验报告的书写	2
第二章 生化实验基本技术	4
一、生化实验基本操作	4
二、生化常用实验样品的制备	7
三、离心技术	9
四、分光光度法	12
五、电泳技术	17
六、层析法	22
七、生化自动分析技术	30
第三章 生物大分子实验技术	36
一、蛋白质分析技术	36
(一) 分光光度技术测定蛋白质含量	36
实验一 紫外分光光度法	36
实验二 Folin-酚试剂法 (Lowry 法)	38
实验三 双缩脲法	40
实验四 考马斯亮蓝法	41
实验五 二喹啉甲酸 (BCA) 法	43
实验六 血清总蛋白、清蛋白定量及清/球比值测定 (溴甲酚绿法)	44
(二) 电泳技术鉴定蛋白质	45
实验七 血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳 (CAME)	46
实验八 血清蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳	48
实验九 细胞蛋白质电泳鉴定	50
(三) 蛋白质分子量测定	52
实验十 SDS-PAGE 法测定蛋白质分子量	52
实验十一 梯度凝胶电泳法测定蛋白质分子量	56
实验十二 凝胶过滤法测定蛋白质分子量	58
(四) 蛋白质等电点测定	60
实验十三 沉淀法测定蛋白质等电点	61

实验十四 薄层等电聚焦电泳法测定蛋白质等电点	62
(五) 层析技术分离蛋白质或氨基酸	64
实验十五 分子筛层析(凝胶过滤法)	64
实验十六 CM-52 离子交换层析法分离蛇毒蛋白质	66
实验十七 DNS-氨基酸聚酰胺薄层层析	68
二、酶分析技术	70
(一) 酶活性测定	70
实验十八 碱性磷酸酶(AKP)活力测定	71
实验十九 唾液淀粉酶活性测定(碘-淀粉比色法)	74
实验二十 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性测定(连续监测法)	75
(二) 酶促反应动力学实验	78
实验二十一 酶浓度对酶促反应的影响	78
实验二十二 碱性磷酸酶 K_m 值的测定	79
实验二十三 pH 对酶促反应的影响	81
实验二十四 温度对酶促反应的影响	82
实验二十五 丙二酸对琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制	83
(三) 同工酶测定	84
实验二十六 乳酸脱氢酶同工酶的分析(琼脂糖电泳法)	85
实验二十七 乳酸脱氢酶同工酶分析(醋酸纤维电泳法)	87
实验二十八 碱性磷酸酶同工酶的电泳分离及鉴定	87
三、核酸分析技术	89
实验二十九 外周血白细胞 DNA 提取(微量法)	89
实验三十 全血 DNA 的提取与鉴定	90
实验三十一 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	91
实验三十二 真核细胞总 RNA 的制备	93
实验三十三 植物组织总 RNA 的提取(Thomas' RNA extraction)	94
实验三十四 质粒 DNA 的提取与鉴定(碱法快速小量提取)	96
第四章 物质代谢	99
一、糖代谢	99
实验三十五 总糖测定(3,5-二硝基水杨酸比色法)	99
实验三十六 血糖测定(葡萄糖氧化酶法)	100
实验三十七 胰岛素、肾上腺素对血糖浓度的影响	102
实验三十八 红细胞中糖的酵解作用	103
实验三十九 尿糖的定性检测	106
二、脂代谢	107
实验四十 血清甘油三酯测定(乙酰丙酮显色法)	107
实验四十一 血清甘油三酯测定(酶法,一步终点比色法)	109
实验四十二 总胆固醇测定(硫磷铁法)	111

实验四十三	血清总胆固醇测定(胆固醇氧化酶法)	112
实验四十四	高密度脂蛋白(HDL)的测定(酶法)	114
实验四十五	载脂蛋白 apoA ₁ 测定(免疫透射比浊法)	115
实验四十六	载脂蛋白 apoB 测定(免疫透射比浊法)	117
实验四十七	apoA ₁ 与 apoB 的同时测定(免疫火箭电泳法)	118
实验四十八	尿酮体的定性检测	120
三、蛋白质代谢		121
实验四十九	血清尿素测定(二乙酰-脲法)	121
实验五十	血清(或血浆)肌酐测定	123
实验五十一	血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)活力测定	125
实验五十二	血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST)活力测定	128
实验五十三	总胆红素及直接胆红素测定	130
实验五十四	尿胆(素)原定性检验(改良欧氏法)	132
实验五十五	尿胆素定性检验(改良许氏法)	133
实验五十六	尿胆红素定性检验	133
实验五十七	尿蛋白质定性检测	134
四、生物氧化		135
实验五十八	乳酸脱氢酶(LDH)及其辅酶的作用	135
实验五十九	细胞色素体系的作用及抑制	137
实验六十	红细胞 ATP 含量测定	138
五、维生素及核苷酸代谢		140
实验六十一	维生素 B ₁ 的测定(荧光法)	140
实验六十二	维生素 B ₁ 的测定(重氮苯磺酸法)	141
实验六十三	维生素 C 的定量	142
实验六十四	红细胞叶酸的测定(改良微生物法)	144
实验六十五	血清尿酸的检测(磷钨酸还原法)	146
实验六十六	5'-核苷酸酶活力测定	148
第五章 遗传信息传递的分析技术		152
一、PCR 基本原理及其相关技术		152
实验六十七	PCR 基本原理及实验设计	152
实验六十八	逆转录 PCR (RT-PCR)	155
实验六十九	PCR 及其产物限制性片段长度多态性分析	157
二、基因克隆及表达分析		159
实验七十	PCR 产物与 pGEM-T 重组克隆	159
实验七十一	表达载体的构建及转化	163
实验七十二	克隆基因的诱导表达及检测	167
实验七十三	RNA 电泳及 Northern Blot	169
实验七十四	生物素标记探针的杂交及检测	172

实验七十五	蛋白印迹 (Western Blot)	175
第六章	疾病的分子诊断	177
实验七十六	点突变的检测——SSCP-PCR	177
实验七十七	p53 突变热点的检测	178
实验七十八	X-脆性综合征的检测	180
实验七十九	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G-6-PD) 突变热点的检测	182
实验八十	镰型红细胞贫血检测 (PCR-RFLP)	183
实验八十一	α -地中海贫血点突变的检测	185
第七章	综合实验及课题构思	187
实验八十二	血清 γ -球蛋白的提取及鉴定	187
实验八十三	质膜的提取及鉴定	189
实验八十四	多肽链 N-末端氨基酸分析 (DNFB 法)	193
实验八十五	科研课题构思	195
实验八十六	实验设计	197
第八章	有关临床疾病生化机制的探讨及分析	199
一、	生物大分子结构变化与疾病	199
实例一	蛋白质结构变化引起疾病	199
实例二	核酸结构变化引起疾病	200
实例三	酶含量变化与疾病	200
实例四	酶结构变化与疾病	201
二、	代谢异常与疾病	202
实例五	糖代谢异常与 I 型肝糖原累积症	202
实例六	糖代谢异常与糖尿病合并酮症酸中毒	203
实例七	脂代谢异常与脂肪肝	204
实例八	脂代谢异常与动脉粥样硬化	204
实例九	生物氧化异常与酶缺陷及某些重要化合物的失衡所致的线粒体病	205
实例十	生物氧化异常与呼吸链和氧化磷酸化的抑制	206
实例十一	氨基酸代谢异常与苯丙酮尿症	207
实例十二	氨基酸代谢异常与肝性脑病	208
实例十三	核苷酸代谢异常与 Lesch-Nyhan 综合征	209
三、	遗传信息表达异常与疾病	210
实例十四	DNA 修复异常与疾病	210
实例十五	RNA 转录异常与乳腺癌与基因转录表达异常	212
实例十六	蛋白质翻译修饰异常与早发性阿尔茨海默病	213
实例十七	基因表达调控异常与疾病	215
四、	其他生化异常与疾病	215

实例十八 血液生化异常与疾病	215
实例十九 肝生化异常与疾病	216
实例二十 维生素不足与佝偻病	217
实例二十一 维生素不足与坏血病	218
附录	221
附录一 缓冲溶液的配制	221
附录二 常用蛋白质分子量及等电点	228
附录三 一些常用凝胶技术数据	229
附录四 硫酸铵饱和度的常用表	232
附录五 常用酸碱指示剂	232
附录六 常用原子量表	233
附录七 试剂的配制及其分级	234
附录八 易变质及需要特殊方法保存的试剂	235
附录九 实验误差及数据处理	235
附录十 法定计量单位	241
附录十一 希腊字母表	243
附录十二 常用临床生化检验项目及正常值范围	244
主要参考书目	245

第一章 绪 论

一、实验须知

【开设生化实验课的必要性及目的】

生化实验是生物化学及一切生物学科的重要研究手段，它在对疾病的诊断，观察及发病机制的探讨方面起着越来越重要的作用。因此，生化实验课是医学生必修的一门实用基础课程。

1. 通过生化实验课使学生掌握基本的生化实验操作及技能。
2. 通过生化实验课使学生加深对生化理论知识的认识和理解。
3. 通过实验使学生增长分析问题、解决问题的能力，并培养学生实事求是的工作作风。

【实验守则】

1. 实验前必先预习，预习的内容包括：
 - (1) 实验目的及实验要求。
 - (2) 实验原理。
 - (3) 基本实验程序及注意事项。
 - (4) 与实验内容有关的理论。
2. 严格遵守实验课纪律，不迟到、不早退，不在实验室内做与实验无关的事情，不妨碍他人实验。
3. 自觉加强基本技能训练，严格遵守操作规程，注意实验安全。
4. 认真做好实验记录，不许弄虚作假——实验报告应如实反映自己的实验结果。
5. 爱护公物，节约水、电、试剂。遵守“损坏仪器的登记、报告、赔偿制度”。
6. 保持实验室的整洁，遵守值日生清洁实验室的制度。
7. 赤脚、穿拖鞋者不得进入实验室。实验过程必须穿白大衣。

【实验室常识】

1. 挪动干净玻璃仪器时，切勿用手接触仪器的内部。
2. 实验完毕必须将有关仪器洗净。玻璃仪器的洗刷应包括仪器的外部及内部，不应留下任何污渍。
3. 洗净的仪器要沥干水滴后整齐放入仪器箱内，不应用抹布擦拭，更不能用抹布擦拭仪器的内部。
4. 取用试剂时必须“盖随瓶走”，用后必须立即盖好放回原处，切忌“张冠李戴”。

5. 标准试剂尽量按需取用, 未用完的标准试剂不应倒回瓶内。
6. 量瓶及量筒是量器, 不应作容器使用。刻度吸管供移液使用, 严禁用于搅拌。
7. 凡是发生烟雾、有毒气体和有臭味气体的实验, 应该在通风橱内进行。
8. 做动物实验时, 不许戏弄动物, 或用动物、手术器械开玩笑。
9. 对贵重的实验仪器(如分光光度计、离心机、电泳仪及部分收集器等)应十分重视, 倍加爱护。必须先熟知使用方法, 才能开始使用。仪器发生故障时, 应立即关闭电源并报告老师, 不得擅自拆修。
10. 实验用过的废液(如浓酸或浓碱等), 应倒入指定的容器, 不可直接倒入水槽内, 以免腐蚀水管。固体废物(如过滤残渣、滤纸、火柴梗等), 切勿倒入水槽内, 以免堵塞水管, 应倒入垃圾桶内。

【生化实验课的要求】

1. 熟悉每个做过的实验的原理、操作要点、注意事项及结果分析方法(包括计算过程, 标准曲线的制作及查阅等)。
2. 熟悉掌握基本技能。如移液、混匀、沉淀、过滤等。
3. 熟悉常用实验仪器的使用方法。如刻度吸管、离心机、分光光度计、电泳仪、部分收集器等。

二、实验记录及实验报告的书写

生化实验是在生化理论及有关理论指导下的实践。实验目的在于经过实践掌握科学观察的基本方法和技能, 培养科学思维、分析判断及解决实际问题的能力, 培养尊重科学事实和真理的学风和科学态度。当然, 通过实验还可以加深和扩大对生化理论的认识。

为了达到实验的目的, 要求学生在实验前进行预习, 通过预习对实验的内容、目的要求、基本原理、基本操作及注意事项有初步的了解; 要求学生在实验中合理组织安排时间, 严肃认真地进行操作, 细致观察各种变化并如实做好实验结果的记录; 还要求学生在操作结束后认真进行计算或分析, 写好实验报告。

(一) 实验记录

实验记录应及时、准确、如实、详尽、清楚。

“及时”是指在实验中将观察到的现象、结果、数据及时记录在记录本(或《实验指南》合适位置)上。回顾性的记录容易造成无意或有意的失真。

实验结果的记录不可掺杂任何主观因素, 不能受现成资料及他人实验结果的影响。若出现“不正常”的现象, 更应如实详尽记录。

表格式的记录方式简练而清楚, 值得提倡使用。如无专用的记录本, 可分项记录于《实验指南》中相应的操作项目之下。记录时字迹必须清楚, 不提倡使用易于涂改及消退的笔、墨做原始记录。

完整的实验记录应包括日期、题目(内容)、目的、操作步骤, 现象及结果(包括计算结果及各种图表)。使用精密仪器进行实验时还应记录仪器的型号及编号。

(二) 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。

完整的实验报告应包括实验名称、实验日期、目的要求、实验原理、试剂、仪器设备、操作方法、实验结果、讨论等内容。

其中,目的要求、原理、试剂、设备及操作方法等项只要求作简明扼要的叙述,不必也不应将《实验指南》原版抄录一遍。但对实验的条件,操作要点等实验成败的关键环节应作清楚描述。

实验结果首先是如实记录实验中观察到的现象及各种原始数据,还应包括根据实验要求整理、归纳数据后进行计算的过程及计算结果,包括根据实验数据及计算做出的各种图表(如曲线图,对照表等)。

讨论部分不是对结果的重述,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。

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。如在临床生化检验项目中,可评价样本检出值与相应正常值之间的异同及其临床意义。

第二章 生化实验基本技术

一、生化实验基本操作

生物化学实验中除了有些特殊的操作和方法使用某些特殊仪器外，整个实验的绝大部分是由各种常用基本操作组成的。而基本操作的掌握是否正确和熟练程度往往是决定实验成败的关键。因此，必须有意识地加强基本操作的练习。本章介绍生化实验中常用的一些基本操作。

(一) 玻璃仪器的洗涤

在生化实验中，所用的玻璃仪器清洁与否，是获得准确结果的重要一环。往往由于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，玻璃仪器的清洁是非常重要的。清洁的玻璃仪器，应十分明亮光洁，如将洗干净的玻璃仪器倒置时，不应在器壁上挂有水珠，则表示尚未洗净，必须重新洗涤。

1. 一般玻璃仪器的洗涤 凡能用毛刷刷洗的仪器（如试管、烧杯、锥形瓶、量筒等），先用自来水洗刷，再用毛刷蘸取适量洗衣粉（肥皂或去污粉）将仪器内、外部（特别是内壁）细心刷洗，用自来水冲洗干净后，再用少量蒸馏水冲洗2~3次倒置于仪器架上自然晾干后备用。

2. 不能用毛刷刷洗的量器洗涤 凡不能用毛刷刷洗的量器（如：容量瓶、滴定管、刻度吸管等），应先用自来水冲洗，沥干，再用重铬酸钾清洁液浸泡4~6小时（或过夜），自清洁液中取出并沥干后，用自来水冲洗干净，再用蒸馏水冲洗2~3次，倒置于量器架上自然干燥。

3. 新购量器的洗涤 新购量器表面常附有游离的碱性物质及污泥，可先用肥皂水洗刷再用自来水洗净，然后浸泡在1%~2%盐酸溶液中过夜（不少于4小时）后，再进一步洗涤，最后用蒸馏水冲洗2~3次。

4. 其他容器的洗涤 具有传染性样品的容器，如病毒、传染病患者的血清等污染过的容器，应先进行消毒后再进一步清洗。

5. 铬酸洗液 铬酸洗液（重铬酸钾-硫酸洗液，简称为洗液）广泛用于玻璃仪器的洗涤，可按重铬酸钾：水：浓硫酸的常用配比0.6：1：10或1：1：10配制而成。

(二) 吸量管的使用

吸量管（简称吸管）是生化实验中最常用的量取容器，可分为两类：

1. 单刻度吸量管 一般仅在吸管的上端有一条总量刻度线，只能量取全量，该吸

量管比多刻度吸量管准确度大，可供准确量取一定体积的溶液。

(1) 奥氏吸管：它的中部具有一橄榄形的球泡及一短小的出口。在同一容量的各类吸管中，其容量的内表面积最小，吸管内壁粘附的溶液也最少，故准确度高，适用于量取粘稠度较大的液体。可供准确量取 3ml、2ml、1ml、0.5ml 等体积之用。放液时应注意缓慢，液体流完后，将吸管尖端靠容器内壁，吹出残留在吸管尖端的液体。(图 2-1B)。

(2) 移液吸管：此吸管造型略似奥氏吸管，多用于吸取用量较大的标准溶液，可供准确量取 50ml、25ml、10ml、5ml 等体积之用。放液时让管内液体自然流出，待液体流出完后，将吸管尖在容器内壁上继续停靠 5 秒，同时转动吸管，最后管尖残留液体不吹出。(图 2-1A)。

2. 多刻度吸量管(刻度吸管) 刻度吸管是使用广泛的一种小容量吸管，其准确度较高，选用不同规格的吸管，可任意量取 0.01ml 至 10ml 的液体，常用的有 10ml、5ml、2ml、1ml、0.5ml、0.1ml 等几种，为直形，管上有许多等分刻度。因生产厂家的不同，其刻度方法也有所不同，虽有多种型式的吸管，但一般刻度吸管可分为吹出式和流出式等型式。

(1) 吹出式：此种吸管一般都注有“吹”字，使用 1ml 以下(不包括 1ml)的吸量管，必须将管尖端残留的液体吹入受器内。

(2) 流出式：此类吸管的刻度上有零刻度，下无总量刻度或上有总量刻度，下无零刻度(如图 2-1C)的为流出式。这类吸管又可分为慢流速、快流速两种，按其容量和精密度不同，慢流速吸管又可分为 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。若使用 1ml 以上(包括 1ml)吸管尖端残留液体，让吸管尖端紧靠在管壁上，A 级停留 5 秒，B 级停留 3 秒，同时转动吸管，最后吸管尖端残留的液体不应吹出。

上述两类吸管虽有不同之处，但其操作规程是相同的，现将其使用方法一并介绍如下：

(1) 选择：使用前应根据需要选择适当的吸量管，其总容量最好等于或稍大于取液量，同时必须看清楚吸量管的刻度读数，以免弄错。

(2) 持管：用右手拇指及中指持住吸量管的上部，用食指堵住管口并控制流量，刻度数字要向着自己。切忌用大拇指堵住管口控制流量(图 2-1D)。

(3) 量取溶液：左手持洗耳球，将吸量管的尖端插入所量取试剂液面下 1cm 处。

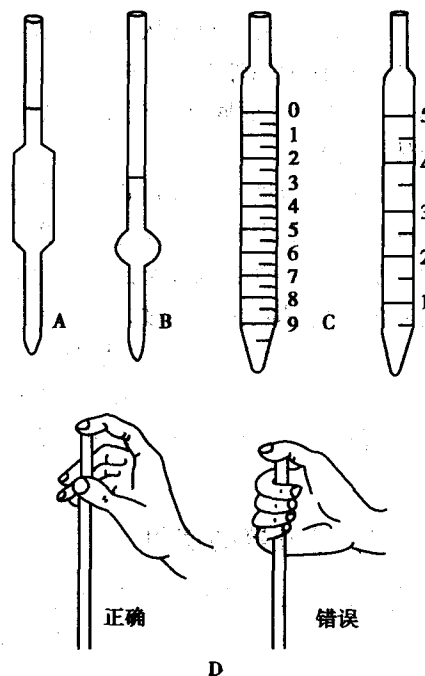


图 2-1 吸管及其持法
A. 移液吸管 B. 奥氏吸管 C. 两种
刻度吸管 D. 吸管的持法

● 用洗耳球的下端出口对准吸量管上口，将液体轻轻吸上，眼睛注视上升液面，当液面上升至所需取量稍高一些刻度时，立即用右手食指按紧管口。

(4) 调准刻度：吸管从溶液中取出后（如标准溶液或粘性较大的液体）都必须用小滤纸片将吸管尖端外部溶液擦干。然后用食指控制流量，使液面缓慢下降至所需刻度时（此时，液体弯月面底部、刻度和视线同在一水平线上），右手食指立即按紧吸管上口，使液体不再流出。

(5) 放出溶液：将吸量管转移至盛所取溶液的容器内，让吸管尖端接触受器内壁，但不能插入受器内原有液体之中，以免污染吸管及试剂。稍松动右手食指，使液体自然流出。放液后吸管尖端残留的液体是吹出或不吹出，则视选用吸量管种类要求而定，若需要吹的则将其吹出，如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 秒、B 级停留 3 秒），同时转动吸管。

(6) 洗涤：吸取血液、尿、组织样品及粘稠样品的吸管，用后应及时用自来水冲洗干净。若吸取一般试剂的吸管可不必马上冲洗，暂时放在吸量管架上，待实验做完后再清洗。

(三) 移液器的使用

目前，已有多种型号、多种规格的移液器可供应用。有可调式、单刻度式，转移体积从 $0.1\mu\text{l}$ ~10ml 不等。可更换取样滴头 (Tip) 移取不同种类、不同体积的液体。使用时注意用拇指控制管腔压力。一般有两个档位，拇指压下的第一档松开后所取得的液体为标示体积；放出液体时，要用拇指压下至第二档上，才能将全部液体放出。

(四) 试管中液体的混匀

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。“混匀”是生化实验中常用的基本操作，常用于试管中液体混匀的方法有下列几种：

1. 旋转法 右手掌心顶住试管上口，五指拿紧试管，利用腕力使试管向一个方向做圆周运动，使管内液体造成漩涡而混匀之。该法适用于试管中液体较多或小口器皿，如锥形瓶。

2. 甩动法 右手持试管上部，将试管轻轻甩动振摇即可混匀。此法适用于液体较少时。

3. 弹敲法 右手持试管上部，将试管的下部在左手掌心弹敲。亦适用于管内液体不多时。

4. 吸管混匀法 用清洁吸管将溶液反复吸放数次，使溶液充分混匀。成倍稀释某种液体往往采用此法。

5. 用振荡器混匀 将需要混合的液体装入容器内（液体约占容器的 $1/3$ ），手持容器放在振荡器的工作台上（或用附件固定）即可混匀。混匀速度视需要可进行调整。市售振荡型号很多，如 GZ-1 型等。

如用烧杯或三角烧瓶配制溶液时，一般可用玻棒搅拌或用磁力搅拌器搅拌溶解及混匀。

(五) 过滤法

过滤是用于分离沉淀和上清液的一种方法。可用于收集滤液、沉淀或洗涤沉淀物。生化实验中所做的过滤操作与定量分析化学操作基本相同，但应注意以下几点：

1. 在许多定量或半定量的生化实验中，过滤往往因不可使滤液稀释而使用干滤纸过滤，不能用水把滤纸先弄湿。
2. 滤纸折叠一般采用平折法（即对折再对折，折叠滤纸应先整齐的对折，再对折，打开后形成一边一层，一边三层的圆锥体）。滤纸放入漏斗时，滤纸边缘与漏斗壁应完全吻合。滤纸上缘一般应低于漏斗口边缘 0.5~1cm，不能超出漏斗边缘。
3. 若撕去三层一边的外面两层部分的尖端，使滤纸上缘能更好地贴在漏斗壁上，不留缝隙。而下面部分则有空隙以利于提高过滤速度。如需加快过滤，常把滤纸折成“菊花形”以增大过滤表面。
4. 过滤时，将玻璃棒压住三层滤纸的中间部分，使液体顺玻璃棒流入漏斗，倒入速度不要太快，不得使液面超过滤纸上缘下 0.5cm。注意引流时勿使玻璃棒穿透滤纸。
5. 除了用滤纸过滤之外，对于粗的过滤可用脱脂棉替代滤纸。有些实验可改用离心沉淀法代替过滤，可节省时间。

二、生化常用实验样品的制备

在生物化学实验中，为了分析组织中各种物质的含量，或探索组织中的物质代谢过程，都需采集特定的生物样品，如血液、尿液、组织样品（肝、肾、心肌、胰、肌肉）等。由于不同的实验有不同的要求，因此对采集到的生物样品又往往需要预先做适当处理。掌握此种实验样品的正确处理与制备方法是做好生化实验的先决条件。

基础生化实验中，最常用的人体或动物样品是全血、血清、血浆及无蛋白血滤液，有时也采集尿液。而组织样品则可制成组织匀浆，组织切片或组织浸出液等。现将这些样品的制备方法做扼要介绍。

(一) 血液样品

1. 全血 无论收集动物或人体血液时，一方面要注意仪器的清洁与干燥，另一方面要及时加入适当的抗凝剂以防止血液凝固。一般在血液取出后，迅速盛于含有抗凝剂的容器内，同时轻轻摇动，使血液与抗凝剂充分混合，避免发生凝血。取得之全血如不立即进行试验，应贮存于冰箱中。

常用的抗凝剂有草酸盐、柠檬酸盐、氟化钠或肝素等，可视实验要求而定。一般情况下，用廉价之草酸盐即可，但在测定血钙时不适用。氟化钠可作为测定血糖时的良好抗凝剂，因其兼有抑制糖酵解之作用，可避免血糖分解。不过氟化钠能抑制脲酶，故用脲酶法测定尿素时不宜用氟化钠抗凝。肝素是较好的抗凝剂，现较常用。

抗凝剂用量不宜过多，否则会影响实验结果。通常每毫升血液加草酸盐 1~2mg、柠檬酸钠 5mg、氟化钠 10mg，而肝素仅需要 0.1~0.2mg。最好将抗凝剂配成适当浓度的水溶液，然后取含有一定量的抗凝剂置于准备盛血之容器中，转动容器使容器中的

● 抗凝剂附着在容器内壁周围，然后蒸干（肝素不宜超过 30°C ）在容器内壁上形成一薄层的抗凝剂，这样抗凝效果较好。

2. 血浆 上述经抗凝的全血在离心机中离心，则血球下沉，上清液即为血浆。如需应用血浆分析，必须严格防止溶血。故要求采取血液时一切用具（注射器、针头、试管等）必须清洁干燥，取出血液也不能剧烈振荡。

3. 血清 收集全血时不加抗凝剂，在室温下约 $5\sim 20$ 分钟即可自行凝固，通常经过 3 小时，血块收缩而析出血清。为了促使血清析出，必要时可进行离心分离，这样可缩短时间，并取得较多的血清。置冰箱 -20°C 保存。制备血清也要防止溶血，一方面仪器要干燥，另一方面，血块收缩后，及时分离出血清。因为放置过久，血块中血球也可能破裂。

4. 无蛋白血滤液 许多生化分析要避免蛋白质的干扰，往往需先将其中蛋白质沉淀并除去。分析血液中许多成分时，也常除去蛋白质，制成无蛋白血滤液。如血液中的非蛋白氮、尿酸、肌酸等测定，皆需先把血液制成无蛋白血滤液后，再进行分析测定。蛋白质沉淀剂如钨酸、三氯乙酸或氢氧化锌都可用于制备无蛋白血滤液，可根据不同需要加以选择。

（二）尿液样品

一般定性实验只需收集一次尿液即可。但一天之中各次排出尿液的成分随食物、饮水及一昼夜体内生理变化等的影响而有很大的差异，因此定量测定尿液中各种成分时，应收集 24 小时尿液混合后取样。通常在早晨一定时间排出残余尿而弃去，以后每次将尿液收集于清洁大玻瓶中，到第二天早晨同一时间收集最后一次尿液即可，随即混合并用量筒量取其体积。

收集的尿液如不能立即进行实验，则应置于冷处保存。必要时可在收集尿液的玻璃瓶中加入防腐剂（如甲苯、盐酸等），通常每 1 000ml 尿中约加入 5ml 甲苯或盐酸即可。

如需收集动物尿液，可将动物置于代谢笼中，其排出尿液经笼下漏斗流入瓶中而收集。

（三）组织样品

离体不久的组织，在适宜的温度及 pH 等条件下，可以进行一定程度的物质代谢。因此，在生物化学实验中，常利用离体组织来研究各种物质代谢的途径与酶系作用，也可以从组织中提取各种代谢物质或酶进行研究。

但是，各种组织器官离体过久，都要发生变化。例如，组织中的某些酶在久置后会发生变性而失活；有些组织成分如糖原、ATP 等，甚至在动物死亡数分钟至十几分钟内，其含量即有明显的降低。因此，利用离体组织作代谢研究或作为提取材料时，都必须迅速将它取出，并尽快地进行提取或测定。一般采用断头法处死动物，放出血液，立即取出实验所需脏器或组织，除去外层的脂肪及结缔组织后，用冰冷之生理盐水洗去血液（必要时可用冰冷之生理盐水灌注脏器以洗去血液），再用滤纸吸干，即可用于实验。取出的脏器或组织，可根据不同的方法制成不同的组织样品。

1. 组织匀浆 按需要准确称取新鲜组织后，剪碎、加入适当的匀浆制备液，用高