

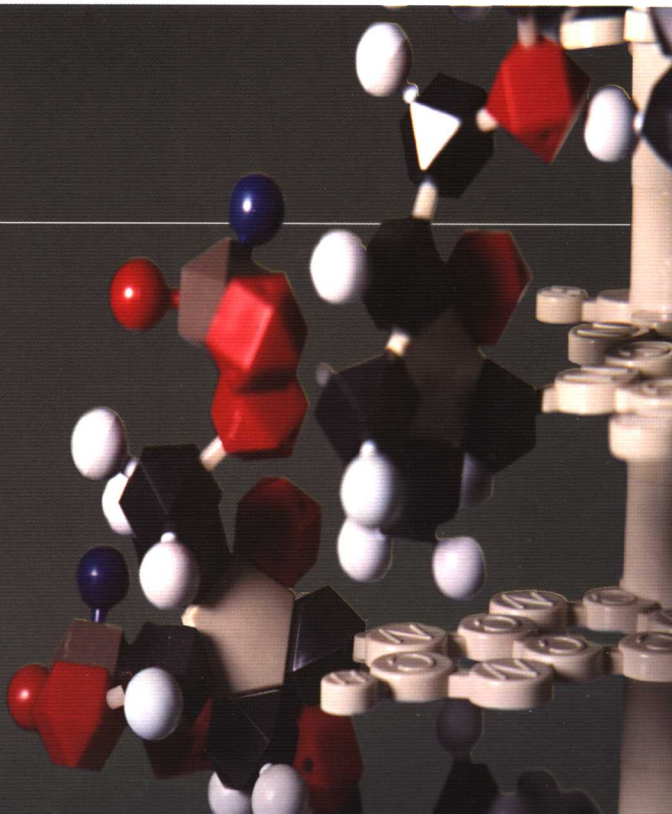
高等医药院校实验课程教材

生物化学与分子生物学 实验教程

李林 张悦红 主编



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心



高等医药院校实验课程教材

生物化学与分子生物学 实验教程

李 林 张悦红 主编



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学与分子生物学实验教程/李林, 张悦红主编.
北京: 化学工业出版社, 2006. 6

高等医药院校实验课程教材

ISBN 7-5025-9018-8

I. 生… II. ①李…②张… III. ①生物化学-实验-
教材②分子生物学-实验-教材 IV. ①Q5-33②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 071116 号

高等医药院校实验课程教材
生物化学与分子生物学实验教程

李 林 张悦红 主编

责任编辑: 李植峰

责任校对: 周梦华

封面设计: 关 飞

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京市兴顺印刷厂印装

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 9 字数 207 千字

2006 年 7 月第 1 版 2006 年 7 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-9018-8

定 价: 17.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

《生物化学与分子生物学实验教程》

编写人员

主 编 李 林 张悦红

副主编 霍 群 张晓林

编 者 (按姓氏笔画排序)

马义丽 (桂林医学院)

王玉明 (成都医学院)

王廷杰 (山西医科大学)

王惠珍 (山西医科大学)

李 林 (白求恩军医学院)

李云峰 (白求恩军医学院)

李继绸 (广西卫生管理干部学院)

刘红林 (山西医科大学)

齐新艳 (广西卫生管理干部学院)

张 栋 (山西医科大学)

张 涛 (成都医学院)

张悦红 (山西医科大学)

张晓林 (佛山科技学院医学院)

赵建滨 (山西医科大学)

郭冬招 (佛山科技学院医学院)

郭晓强 (白求恩军医学院)

常冰梅 (山西医科大学)

解 军 (山西医科大学)

霍 群 (桂林医学院)

前 言

生物化学与分子生物学是 21 世纪生命科学的领头学科，其理论与基本实验技术已广泛渗透并常规应用于生命学科各个领域。尤其是 20 世纪 70 年代以来，生命科学迅猛发展、日新月异，分子生物学技术快速普及，奇迹般地形成了一个以基因工程为核心的现代生物技术高新技术群，正以其巨大的活力推动着社会生产力的进步，展示着惊人的发展潜力和极其广阔的应用前景。

科学与技术是密不可分的。理论的突破促进了技术的发展，实验技术方法、手段的更新又为理论研究提供了必需的工具和有力保证；二者彼此促进、相互依存，共同丰富着人类的知识宝库，推动着人类文明的进步。

学习和掌握生物化学与分子生物学的基本实验技术，不仅是高等医药院校学生的必备能力，更是实施创新教育的重要手段。

为了使高等医药院校学生能够系统地学习和掌握生物化学与分子生物学的基本实验技能，我们组织了几所院校中有丰富教学经验的教师们编写了这本实验教材。本教材的主要内容包括理论和实验两部分。其中理论部分系统、简要地介绍了生物化学与分子生物学的主要技术理论，包括分光光度技术、电泳技术、层析技术、离心技术、透析技术和分子生物学基本技术；实验部分由 25 个实验项目组成，根据不同的教学目标，本着“由浅入深、循序渐进”的原则，将实验内容组合为基本教学实验、基本技术实验、综合实验和分子克隆技术基础实验。实验内容可根据不同教学层次和对象酌情选用。本教材还包括几个附录内容，刊载了生物化学与分子生物学常用数据及资料，供学习工作中查阅参考。

教材的编写过程由主编拟定大纲，各编者分工编写，集中审阅、定稿，是各位同仁精诚合作、辛勤劳动的共同结果。对于教材中出现的疏漏、错误及不妥之处，敬请广大师生提出宝贵意见。

在本书的编写过程中，得到了化学工业出版社现代生物技术与医药科技出版中心的编辑们的大力支持和具体指导；在本书统稿过程中，郭晓强老师、李小毛和姚远同学在文稿校对、修订、传发及插图整理方面做了大量工作，在此一并表示我们最诚挚的谢意。

李 林 张悦红

2006 年 5 月于石家庄

目 录

第一章 生物化学实验基本方法	1
第一节 实验室规则	1
第二节 基本实验操作	1
一、玻璃仪器的清洗	1
二、玻璃仪器的干燥	2
三、刻度吸管的使用	2
四、可调式微量移液器的使用	3
五、溶液的混匀	3
第三节 常用实验仪器的使用	4
一、LD5-2A 离心机的使用	4
二、722 型分光光度计的使用方法	4
三、752 紫外光栅分光光度计的使用方法	5
第四节 常用实验标本的制备	6
一、血液样本的收集与保存	6
二、尿液样本的收集与保存	6
三、组织样品的制备	7
第五节 实验报告的书写	9
第二章 生物化学基本实验技术	10
第一节 分光光度技术	10
一、基本原理	10
二、分光光度计的结构	12
三、分光光度技术的应用	13
第二节 电泳技术	14
一、基本原理	14
二、电泳技术的分类和特点	16
三、影响电泳的因素	16
四、常用电泳技术	17
第三节 层析技术	19
一、基本原理	19
二、层析法的分类	20
三、离子交换层析	21
四、凝胶层析	25
五、亲和层析	31
六、高效液相色谱	35
七、分配层析	36
第四节 离心技术	39

一、基本原理	39
二、离心机的类型	40
三、制备性超速离心的分离方法	41
四、离心操作的注意事项	43
第五节 透析技术	43
一、透析原理及影响因素	43
二、透析技术的应用	44
三、透析操作及注意事项	44
第三章 分子生物学基本技术原理	46
第一节 核酸分子杂交	46
一、核酸分子杂交的基本理论	46
二、核酸探针	47
三、核酸探针的标记	48
四、核酸分子杂交的种类与方法	50
第二节 DNA 克隆技术基本原理	53
一、获取目的基因	53
二、构建基因载体	54
三、限制性核酸内切酶的作用	56
四、DNA 分子重组	56
五、重组 DNA 分子导入宿主细胞	57
六、阳性重组体的筛选和鉴定	58
七、克隆基因的表达	58
第三节 聚合酶链反应 (PCR)	59
一、基本原理与方法	59
二、PCR 技术的应用	61
第四章 基本教学实验	63
实验一 蛋白质的沉淀、变性及等电点的测定	63
一、蛋白质的沉淀与变性	63
二、蛋白质沉淀反应的分类	63
三、沉淀蛋白质的主要方法	63
四、蛋白质等电点的测定	66
实验二 几种理化因素对酶活性的影响	67
实验三 琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制作用	69
实验四 运动对尿中乳酸含量的影响	71
实验五 酮体的生成和利用	73
实验六 血清丙氨酸氨基转移酶活性测定 (赖氏法)	75
第五章 基本技术实验	78
实验七 蛋白质的透析	78
实验八 蛋白质的定量测定 (一): 酚试剂法 (改良 Lowry 法)	79
实验九 蛋白质的定量测定 (二): 紫外分光光度法	82
实验十 血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	83

实验十一	血清蛋白质醋酸纤维薄膜电泳	86
实验十二	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质分子质量	88
实验十三	离子交换层析法分离氨基酸	92
实验十四	血清 HDL-胆固醇的测定	94
实验十五	胡萝卜素的柱层析分离	95
实验十六	细胞核的分离与纯化	97
第六章	综合实验	101
实验十七	激素对血糖浓度的影响	101
一、	血糖的定量测定	101
二、	胰岛素、肾上腺素对血糖浓度的影响	103
实验十八	血清 γ -球蛋白的分离、纯化及鉴定	105
实验十九	核酸的制备及测定	108
第七章	分子克隆技术基础实验	113
实验二十	DNA 的琼脂糖凝胶电泳	113
实验二十一	质粒 DNA 的提取 (碱裂解法)	114
实验二十二	限制性内切酶对质粒 DNA 的酶切作用	116
实验二十三	感受态细菌的制备及质粒 DNA 的转化	118
实验二十四	核酸的分子杂交	119
实验二十五	聚合酶链反应 (PCR) 体外扩增 DNA	121
附录	生物化学与分子生物学常用资料	124
附录 I	化学试剂分级及注意事项	124
一、	一般化学试剂的分级	124
二、	试剂配制的一般注意事项	124
附录 II	常用缓冲液配制表	125
附录 III	分子生物学实验中常用试剂的配制	127
一、	有机试剂的配制	127
二、	细菌培养基和抗生素的配制	127
三、	分子生物学实验中常用缓冲液的配制	128
四、	常用电泳缓冲液的配制	129
五、	常用凝胶加样缓冲液的配制	129
六、	常用限制性内切酶的酶切位点及其缓冲液的配制	130
附录 IV	溴化乙锭稀溶液 (如含有 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的电泳缓冲液) 的净化处理	130
附录 V	细菌的保存	130
附录 VI	重铬酸洗液的配制与再生	131
附录 VII	常用的生物化学与分子生物学相关网站	131
参考文献	133

第一章 生物化学实验基本方法

第一节 实验室规则

生物化学与分子生物学实验有着独特的实验技能和基本操作。实验的目的是：在教师的指导下，通过科学地实验加深对理论的理解，掌握常用的技术，养成良好的科学作风，培养独立分析问题及解决问题的能力。

为确保达到实验目的，必须遵守以下实验室规则。

① 穿白大衣进入实验室；不许穿拖鞋进实验室；并关闭个人娱乐、通信设备。

② 自觉遵守课堂纪律，不得迟到、早退；实验室内不得吸烟、饮食、大声喧哗；严禁用器械、试剂、动物等嬉闹。

③ 认真预习，了解实验目的及操作要点，做好实验操作设计；实验过程中听从教师的指导，严格按操作规程进行，将实验中出现的现象、结果和数据应如实、及时地做好记录；完成实验后当堂写出实验报告；每次实验结束时，在教师总结实验后方可离开实验室。

④ 保持实验室内整洁。室内地面、台面、试剂架及所用仪器器皿等要保持整洁；试剂瓶及仪器等物品要放置整齐、有序。实验结束后要对所有用过的物品进行清洁整理，摆放整齐。用过的滤纸、棉花、动物组织等固体废物切勿倒入水池，以免堵塞下水道；强酸、强碱性废液切勿倒入水池，应以大量水稀释后再排放，以免腐蚀下水道。

⑤ 爱护公物。要爱护仪器，对贵重、精密仪器，如离心机、分光光度计等，务必先了解正确使用方法，在教师指导下操作，严禁随意开、关；要节约试剂，并保持试剂纯净（如瓶盖不盖错，吸出的试剂未用完时留在吸管内的尾液不准放回原试剂瓶内等）；要节约水电，用完即随手关闭水龙头、电源。

⑥ 注意安全，严格遵守操作规程。在接通电源前要做好必要的准备（如电泳、离心等）；使用乙醇、乙醚、苯、酚等易燃有机溶剂时，务必远离火源，严禁在煤气、电炉、酒精灯上直接加热；对试管内容物加热时，管口不许对人；取强酸、强碱、血清或有毒液体时，严禁口吸、严禁乱甩，若液体滴洒在器皿外，要及时用湿布擦净。

⑦ 实验完毕，值日生除负责搞好实验室卫生外，要切实关好水、电、窗，并经教师检查后方可离去。

⑧ 第一次实验课时，要仔细清点小组实验器材，如有缺损应及时报告教师，由教师补发或调换。在以后的实验中，如有损坏，报告教师并填写登记，按规定价格赔偿。

第二节 基本实验操作

一、玻璃仪器的清洗

生化实验常用的各种玻璃仪器，其清洁程度直接影响到实验结果的准确性。因此，清

洗玻璃仪器不仅是生化实验的常规工作，而且也是一项重要的技术工作。玻璃仪器的清洗有很多方法，需根据实验要求选用合适的清洁方法。

1. 敞口玻璃仪器的洗涤

一般敞口玻璃仪器如试管、离心管、烧杯，其洗涤过程如下：用毛刷蘸取洗衣粉，将仪器内外仔细洗刷，用自来水冲洗干净后，再用蒸馏水冲洗 2~3 次，倒置于仪器架上晾干备用。

2. 容量分析仪器的洗涤

容量分析仪器（如吸量管、容量瓶）的洗涤过程如下：新购容量仪器的表面附有游离的碱性物质和泥污，应先用洗衣粉洗刷，再用自来水冲洗，晾干后，浸泡在重铬酸钾-硫酸溶液中过夜（不少于 4h），再用自来水冲洗，最后用蒸馏水冲洗 2~3 次，倒置于仪器架上晾干备用。

上述所有玻璃器材洗涤的效果，以倒置后玻璃器皿内壁不挂水珠为干净的标准。

二、玻璃仪器的干燥

所有的玻璃仪器洗净后均可倒置在架上，使其自然干燥。若需迅速干燥，可采用烤箱（100~105℃）烘烤或在电炉和酒精灯上烘烤。但对容量仪器（如吸管、容量瓶、比色杯）严禁使用烘烤干燥，可使用乙醇、乙醚等有机溶剂去除容器表面的水分，晾干。

三、刻度吸管的使用

1. 刻度吸管的种类

生化常用的刻度吸管有两种类型。一种是完全流出式吸管。此吸管刻度标至尖端，容量包括液体全部，放液时需将管尖残留液体吹出。这种吸管在管的上端标有“吹”字。另一种是不完全流出式吸管。此类吸管在放液时，让液体自然流出，尖端在试管内壁停留几秒钟，所余液体不得吹出。这种吸管在管的上端标有“快”字，表明此吸管已校正过尖端残留液的误差，故不能吹出管尖残留液体。

为了便于准确、快速地选取所需的吸管，国际标准化组织统一规定，在刻度吸管的上方要印有各种彩色环，以示容积区别，见表 1-1。

表 1-1 刻度吸管上的彩色环标记

标 记	标 准 容 量/ml						
	10	0.1	0.2	0.5	1	2	5
色 标	红	黑	红、绿	黄	黑	红	橘红
环 数	单	单	双、单	单	单	单	单

2. 刻度吸管的使用

① 根据需要选择适合的吸管，其容量最好等于或稍大于取液量。用前需看清容量和刻度。

② 用右手拇指及中指（辅以无名指），拿住吸管上端。

③ 左手捏压洗耳球，将吸管伸入所取试剂液面下，将洗耳球的下端出口对准吸管上口，将液体轻轻吸上，至高于刻度线上端 1~2cm 处，迅速用食指按紧管口，使液体不会

从管下口流出。

④ 将吸管从溶液中取出后，如果是黏性较大的液体，如血清，必须先用滤纸擦干净管尖外壁上的液体，然后用食指控制使液体缓慢流出，直至所需刻度。

⑤ 调好刻度，目测观察时要求三点一线，即视线、液体凹面、刻度线在同一水平面。

⑥ 将吸好的液体移入所用容器内，将吸管尖靠在容器壁上，松开右手食指让溶液自然流下，如图 1-1 所示。放液后吸管尖端残留的液体，应视所选用的吸管要求而定，需要吹的（完全流出式吸管）则将其吹出；如果要求不吹（不完全流出式吸管），则让吸管尖端靠内壁停留几秒钟，同时转动吸管，重复一次。

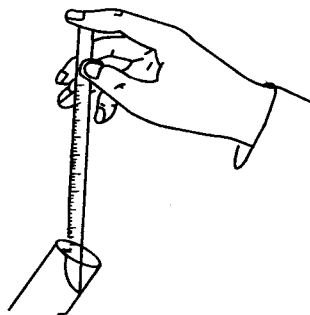


图 1-1 刻度吸管的使用

四、可调式微量移液器的使用

可调式微量移液器是精确量取微量液体的仪器。一般分为 $1\sim 5\mu\text{l}$ 、 $5\mu\text{l}$ 、 $10\mu\text{l}$ 、 $20\mu\text{l}$ 、 $25\mu\text{l}$ 、 $50\mu\text{l}$ ，最大到 $1000\mu\text{l}$ 。可根据需要选择合适体积。

其操作方法如下（图 1-2）。

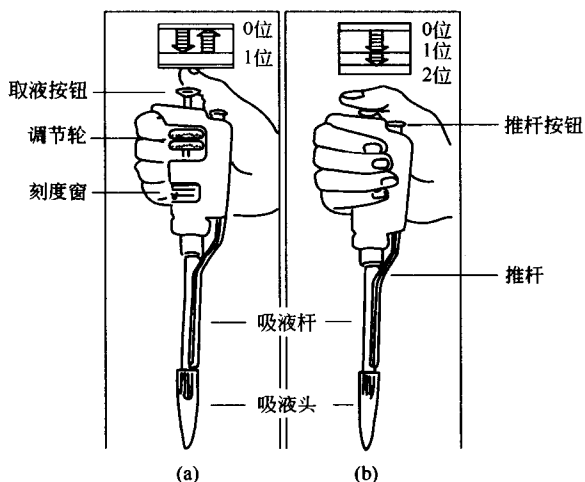


图 1-2 微量移液器的使用

(a) 吸取液体；(b) 放出液体

0 位，取液按钮复位位置；1 位，第一档（吸液）位置；2 位，第二档（放液）位置

① 将吸液头套在移液器管头上，轻轻转动，以保证密封。

② 垂直地握住移液器，用拇指将取液按钮按到第一挡位置，并把吸液头浸入到液面下几毫米处，再缓慢地放松取液按钮，使之复位，等待 $1\sim 2$ 秒钟后从液体中取出。

③ 将吸液头移至加样容器壁上，缓慢地把取液按钮按到第一挡位置，等待 $1\sim 2$ 秒钟，再把取液按钮完全按下，即按到第二挡位置，排尽全部液体后，吸液头应沿容器壁向上滑动取出，再放松取液按钮，使之复位，即完成一次操作过程。如果发现吸液头尖

口处仍残留液体时，则应将吸液头接触受器内壁，使液体沿壁流下，同时拇指不能松开。

五、溶液的混匀

常用的溶液混匀方法有以下几种。

1. 甩动法

为常用方法，适用于试管中液体较少时。用右手持试管上部，轻轻甩动、振摇，可以将液体混匀。

2. 弹敲法

右手持管上部，将试管的下部在左手掌心弹敲。适用于试管中微量液体的混匀。

3. 旋转法

右手反向握住试管上端，五指紧握试管，利用腕力使试管向一个方向做圆周运动，使管内液体旋转而混匀。适用于试管中液体较多时或小口器皿。

4. 吸管混匀法

用清洁的吸管将溶液反复吸放多次，使溶液混匀。适用于成倍稀释液体时。

5. 倒转法

用大拇指隔着干净玻璃纸堵住管口，上下倒转数次，就可使液体充分混匀。适用于液体较多且损失少量液体不影响结果的情况。

6. 旋涡混悬器法

手持容器上端于旋涡混悬器上，振荡混匀。适用于量大或要求混匀时间较长的溶液。

7. 玻璃棒搅匀法

如用上述方法不能使液体混匀，可用玻璃棒混匀。

8. 磁力搅拌器法

适用于酸碱自动滴定等。

第三节 常用实验仪器的使用

一、LD5-2A 离心机的使用

1. 转速范围

0~3800r/min。

2. 可控时间

0~60min。

3. 使用方法

- ① 将所离心的液体移入离心管中，把离心管插入离心桶内。
- ② 用天平调节离心桶平衡。
- ③ 将平衡后的两个离心桶对称插入离心机托架上，盖好仪器盖。
- ④ 开启电源 POWER 按钮，指示灯亮。
- ⑤ 设定时间 TIME 旋钮 0~60min。
- ⑥ 按 START 按钮后，缓慢调 SPEED 旋钮至所需转速。
- ⑦ 离心结束后，使 SPEED 旋钮还原到 0 位置，取出离心桶。
- ⑧ 盖好仪器盖，关闭电源 POWER 按钮，把离心桶倒置在桌面上。

4. 注意事项

- ① 此离心机的最高转速为 4000r/min，通常使用最高转速为 3800r/min。
- ② 平衡后的两个离心桶必须对称插入离心机托架上，并盖好仪器盖。
- ③ 调转速应平稳缓慢，即缓慢顺时针调 SPEED 旋钮至所需转速。
- ④ 离心结束后，使 SPEED 旋钮还原，取出离心桶，并倒置于桌面上。
- ⑤ 将使用时间、转速及使用状况登记在使用记录本上。

二、722 型分光光度计的使用方法

- ① 开启电源，指示灯亮，选择开关置于“T”，选择所需波长，仪器预热 20min。

- ② 打开比色室盖子，调节透光度“0”旋钮，使数字显示“000.0”。
- ③ 将待测溶液倒入比色皿中（约为皿高的2/3），并插入比色皿架上（依次为空白管、标准管、样品管），放入比色室内托架上，使空白管对准光路。
- ④ 盖上比色室盖，调节透光度“100%”旋钮，使数字显示为“100.0”。
- ⑤ 重复第②、④步骤一次，仪器即可进行测定工作。
- ⑥ 吸光度A的测定：将选择开关置于“A”，调节吸光度调零旋钮，使数字显示为“000.0”，然后依次将被测样品移入光路，显示值即为被测样品的吸光度值。
- ⑦ 浓度c的测量：选择开关由“A”旋至“C”，将已标定浓度的样品放入光路，调节浓度旋钮，使数字显示为标定值；将被测样品移入光路，显示值即为被测样品的浓度。
- ⑧ 比色完毕，将选择开关置于“T”，打开盖，取出比色皿，倒出液体，洗净比色皿。最后操作的同学关掉电源。

三、752 紫外光栅分光光度计的使用方法

- ① 将灵敏度旋钮调至“1”挡（放大倍率最小）。
- ② 打开电源开关（开关内有2只指示灯），钨灯点亮；按“氢灯”开关（开关内左侧指示灯亮），氢灯电源接通；再按“氢灯触发”按钮（开关内右侧指示灯亮），氢灯点亮。仪器预热30min（注：仪器后背部有1个“钨灯”开关，如不需要用钨灯时，可将它关闭）。
- ③ 开关置于“T”。
- ④ 打开试样室盖（光门自动关闭），调节“0%”（T）旋钮，使数字为“000.0”。
- ⑤ 将波长置于所需要测定的波长。
- ⑥ 将装有溶液的比色皿（波长在360nm以上时，用玻璃比色皿；波长在360nm以下时，用石英比色皿）放置于比色皿架中。
- ⑦ 盖上样品室盖，将参比溶液比色皿置于光路，调节透光度“100%”旋钮，使数字显示为“100.0”（如果不到“100.0”，则可适当增加灵敏度的挡数，同时应重复步骤④，调整仪器的“000.0”）。
- ⑧ 将被测溶液置于光路中，数字显示器上直接读出被测溶液的透光度（T）值。
- ⑨ 吸光度A的测量：参照步骤④和⑦，调整仪器的“000.0”和“100.0”。将选择开关置于“A”。旋动吸光度调整旋钮，使得数字显示为“000.0”，然后移入被测溶液，显示值即为试样的吸光度A值。
- ⑩ 浓度c的测量：选择开关由“A”旋至“C”，将已标定浓度的溶液移入光路，调节“C”旋钮使得数字显示为标定值。将被测溶液移入光路，即可读出相应的浓度。
- ⑪ 如果大幅度改变测试波长时，需要等数分钟后，才能正常工作。（因波长由长波向短波或短波向长波移动时，光能量急剧变化，使光电管受光后响应缓慢，需要有一个移光响应平衡时间）。
- ⑫ 仪器在使用时，应常参照操作步骤④和⑦进行调节“000.0”和“100.0”的工作。
- ⑬ 每台仪器所配套的比色皿不能与其他仪器上的比色皿单个调换。
- ⑭ 本台数字显示器后部带有外接插座，可输出模拟信号。
- ⑮ 对由于在运输过程中引起光源偏移和吸光度斜率的偏移，可按说明书所示调整。

第四节 常用实验标本的制备

一、血液样本的收集与保存

1. 收集时间

因为饮食、活动、情绪波动等因素可使血液中生化成分有所改变，影响结果的正确判断。所以生化检验收集血液样本常在早晨空腹或禁食 6h 以上采取血液。测定血脂必须空腹 12h，其分析结果才具有较真实代表性。

2. 收集方法

(1) 血清的收集 静脉抽血，采血后注入洁净干燥试管中，一般放置 3h 血块会自然收缩分出血清，再经离心 (2500r/min, 5min) 分离，效果更好。

(2) 血浆的收集 静脉抽血，采血后注入加有适当抗凝剂的试管中，轻轻倒转试管使血液与抗凝剂混匀，室温下放置或离心，血细胞下沉，上清即为血浆。

3. 常用抗凝剂

(1) 10%草酸钾 一般将 10%草酸钾分装后，置于 80℃左右烘箱内烤干。0.1ml 此抗凝剂可抗凝血液 5ml。草酸钾与血液中钙离子形成草酸钙，使血液不能凝固。但此抗凝剂不适于血钾和血钙的测定。

(2) 肝素 作用机制主要是抑制凝血酶原转化为凝血酶，抑制血小板凝集。使用时配成 1mg/ml (每毫克含 100~125U) 肝素溶液，取 0.5ml 使用液置小瓶中，于 37~50℃烘箱中烤干后，可抗凝血液 5ml。

(3) 乙二胺四乙酸二钠盐 (EDTA·Na₂) EDTA·Na₂ 能与血液中的钙离子形成络合物，减少血中的离子钙含量，从而抑制血液凝固，1.4~1.6mg EDTA·Na₂ 可使 1ml 血液抗凝。EDTA·Na₂ 不适于血钙、血钠及含氮物的测定。

其他抗凝剂还有 3.8%枸橼酸钠等。抗凝剂与血液的量应比例恰当，抗凝剂不足时部分血细胞凝集；反之可引起血细胞破裂，引起溶血或血细胞与血浆间电解质分布改变，影响生化分析。

4. 血液样本的保存

取样后最好立即分析测定，应尽快对全血进行离心分离，一般不超过 24h，分离后放置于 -20℃保存。

二、尿液样本的收集与保存

进行定性实验可以用新鲜收集的尿液。定量测定尿液中各种成分时应收集 24h 的尿液，混合后再取样。因为一天之中每次排出尿液的成分随食物、饮水以及昼夜体内生理变化等的影响而有很大的差异。

一般在早晨一定时间排出残余尿，弃去，以后每次尿均收集于清洁大玻璃瓶中，到第二天早晨同一时间收集最后一次尿即可。把收集的 24h 尿液充分混合后用量筒量其总体积，然后取样分析。

收集的尿液如不能立即进行实验，则应置于冷处保存。必要时在收集尿的瓶中预先放入防腐剂，通常每升尿液中约加入 10ml 甲苯或 10ml 浓盐酸。

收集实验动物的尿液时，可将动物置于代谢笼中，按以上方法通过笼下的漏斗收集动物 24h 的尿液。

三、组织样品的制备

在生物化学实验中，经常利用离体组织研究各种物质代谢的途径与酶蛋白之间的作用，也可以从组织中提取各种代谢物质或酶蛋白进行研究。但是生物组织离体时间过久，其所含物质的量和生物活性都将发生变化。因此，利用离体组织作为提取材料和代谢研究材料时，应在冰冷条件下迅速取出所需组织，并尽快进行提取或测定。

根据作用方式不同，制备方法基本可以分为两大类：机械法和非机械法。机械法包括匀浆、研磨、压榨、超声破碎等；常用的非机械法包括渗透法、酶溶法、反复冻融法、化学溶解法和低渗裂解法等。每一种方法有它的适用范围及优缺点，选择的标准常要依靠过去的经验与实践的比较。选择的原则是此方法不影响所研究的蛋白质或其产物的结构和功能，或者说采用的方法可以避免蛋白质的变性及降解。

一般采用断头法或空气栓塞法处死动物，放出血液，立即取出实验所需脏器或组织，去除外层的脂肪及结缔组织，用冰冷的生理盐水洗去血液，必要时也可用冰冷的生理盐水灌注脏器以洗去血液，再用滤纸吸干。迅速称重后，根据实验的不同要求，用以下不同的方法制成不同的组织样品。

1. 匀浆法

机体软组织破碎常用的方法之一。其工作原理是通过机械剪切力破坏组织和细胞，释放蛋白进入溶液。匀浆器有四类：刀片式匀浆器、内切式匀浆器、玻璃式匀浆器和用于大规模生产的高压式匀浆器。玻璃匀浆器的杵有玻璃制的，有特氟隆（Teflon[®]，聚四氟乙烯）制的。匀浆操作既可以手动，也可以电动。由于匀浆过程中蛋白质被蛋白酶降解的可能性较小，所以匀浆是简便、迅速和风险小的破碎方法，是实验优先考虑的方法之一。匀浆过程中应注意保持低温，在玻璃匀浆器外可置冰水浴，也可预冷或在冷室内匀浆。匀浆时所需缓冲液的体积可为湿重组织的 9~10 倍。

(1) 杵状玻璃匀浆器法 该匀浆器由一根一端表面磨砂的玻璃杵和一个内壁磨砂的玻璃管组成。使用前先把组织切碎，然后放入玻璃套管中，手工或用电动搅拌机旋转研磨，玻璃杵在套管中上下移动时产生机械剪切力使细胞破碎。这种方法对生物大分子破坏最小，是目前广泛使用的一种细胞破碎方法。

(2) 高速组织匀浆法 匀浆器由调速器、支架、马达、带杆叶片刀和梅花玻璃杯组成。使用时先将 4℃ 预冷的组织碎块或细胞悬液加入玻璃杯中，至杯体积的 1/3 处，盖好玻璃杯盖，固定好带杆叶片刀，缓慢调节旋转速度。一般开机 10s 后，组织细胞即可破碎。组织捣碎机高速转动时易产热，可导致分离物的降解，因此注意不能持续时间过长，必要时使用循环冷却水降温。

2. 超声波法

高能超声波可以破碎细胞，其原理是超声波作用于溶液时，形成的气泡及其大小与空化现象的破坏程度有关。空化现象引起的冲击波和剪切力使细胞破裂。超声波破碎的效率取决于声频、声能、处理时间、细胞浓度及细胞类型。

使用超声波破碎必须注意的是控制强度在一定范围，即刚好低于溶液产生泡沫的水

平。因为产生泡沫会导致蛋白质变性。过低的强度将降低破碎效率。最好在正式实验前用多余的样品试验，调校超声波发生器至稍低于产生泡沫的强度。正式处理样品时强度只能在预定设置附近做小的调整。

超声波破碎在处理少量样品时操作简便，溶液损失少，此法适用于微生物材料和脑组织匀浆。用大肠杆菌制备各种酶时，常选用菌体质量浓度为 50~100mg/ml，在 10~100kHz 频率下处理 10~15min。但是此法的缺点是超声波产生的化学自由基团能使敏感的活性物质变性失活，噪声令人难以忍受，大容量装置的声能传递、散热均有困难，在处理过程中会产生大量的热，应采取相应降温措施。提取对超声波敏感的酶和核酸时应慎用。

3. 高压匀浆法

细胞悬液从高压室的环状缝隙高速喷射到静止的撞击环上，被迫改变方向经出口管流出。此过程中细胞经历了高速造成的剪切、碰撞及高压到常压的变化，从而破碎并释放内容物。

4. 研磨法

本法是破碎单一细胞的有效措施。借助研磨中磨料和细胞间的剪切及碰撞作用破碎细胞。常使用的磨料为石英砂、氧化铝。在研钵内样品与磨料被研磨成厚糊状。此法主要适用于细菌、酵母和一些植物组织。研磨操作一般不超过 15min。石英砂或氧化铝用前应做清洁处理。

5. 酶溶法

用生物酶将细胞壁和细胞膜消化溶解的方法。常用的酶有溶菌酶、蛋白酶、糖苷酶、肽链内切酶、壳多糖酶等。虽然酶法有选择性释放产物、核酸泄出量少、细胞外形完整等优点，但也存在不足，如酶价格高、通用性差，有时存在产物抑制。

6. 化学溶解法

有些有机溶剂（如苯、甲苯）、抗生素、表面活性剂（如 SDS、NP-40、Triton X-100）、金属螯合剂（EDTA）、变性剂（盐酸胍、脲）等化学试剂都可以改变细胞膜的通透性，使内含物有选择地渗透出来。此法主要适用于培养的动物细胞。低浓度表面活性剂处理，如能充分溶解细胞，则是很温和的方法。裂解液中加入 50% 甘油可以稳定目的蛋白。

7. 反复冻融法

将细胞在 -20℃ 以下冰冻，室温融解，反复几次，由于细胞内冰粒的形成和剩余细胞液的盐浓度增高引起细胞融胀，使细胞膜破碎。它适用提取非常稳定的蛋白。对于韧性强的组织，可用液氮冻硬、变脆，敲碎成小块后，在研钵中加液氮研成粉，再加缓冲液溶解。

8. 低渗裂解法

细胞在低渗溶液中通过渗透张力作用裂解的方法，常用于红细胞的裂解。

无论用哪一种方法破碎组织细胞，都会使细胞内蛋白质或核酸水解酶释放到溶液中，使大分子物质降解。加入二异丙基氟磷酸（DFP）可以抑制自溶作用；加入碘乙酸可以抑制活性中心需要有疏水基的蛋白水解酶的活性；加入苯甲磺酰氟化物（PMSF）能消除蛋白水解酶的活力；还可以通过选择 pH 值、温度和溶液离子强度等，使这些条件适用于目的物质的提取。

第五节 实验报告的书写

实验报告是做完每个实验后的总结。通过报告向老师汇报实验的过程和结果，分析、总结实验的结果和问题，加深对有关理论和技术的理解与掌握，同时，书写实验报告也是学习撰写研究论文的过程。

实验报告的基本格式如表 1-2。

表 1-2 实验报告的基本格式

实验	实验名称	姓名	日期	页数
一、目的和要求				
二、原理				
三、试剂和仪器				
四、操作方法				
五、实验结果				
六、讨论				

书写实验报告应注意以下几点。

① 写实验报告最好用练习本，也可以用单页报告纸。为避免遗失，实验课全部结束后可将全部实验报告装订成册，以便保存。

② 简明扼要地写出实验的原理，如涉及化学反应，可用化学反应方程式表示。

③ 应列出所用的试剂和主要仪器。说明化学试剂时要避免使用未被普遍接受的商品名和俗名。

④ 实验方法步骤的描述要简洁，不能照抄实验讲义，但要写清楚，以便他人重复。

⑤ 记录实验现象的所有细节。最好用图表的形式概括实验结果。

⑥ 讨论不应是实验结果的重述，而是以结果为基础的逻辑推论。如对定性实验，在分析实验结果的基础上应有中肯的结论。还可以包括关于实验方法、操作技术和有关实验的一些问题讨论，对实验异常结果的分析，对于实验设计的认识、体会和建议，对实验课的改进意见等。

(张悦红)