



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

动物生物化学实验教程

胡 兰 主编

**DONGWUSHENGWUHUAXUE
SHIYANJIAOCHENG**



中国农业大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

动物生物化学实验教程/胡兰主编. —北京:中国农业大学出版社,2006.9

(普通高等教育“十一五”国家级规划教材)

ISBN 7-81117-062-0

I. 动… II. 胡… III. 动物学: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(2006)第 082728 号

书 名 动物生物化学实验教程

作 者 胡 兰 主编

策划编辑 潘晓丽

责任编辑 孟 梅

封面设计 郑 川

责任校对 王晓凤 陈 莹

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路 2 号

邮政编码 100094

电 话 发行部 010-62731190,2620

读者服务部 010-62732336

编辑部 010-62732617,2618

出 版 部 010-62733440

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

E-mail caup @ public. bta. net. cn

经 销 新华书店

印 刷 北京鑫丰华彩印有限公司

版 次 2006 年 8 月第 1 版 2006 年 8 月第 1 次印刷

规 格 787×1 092 16 开本 8.875 印张 216 千字

印 数 1~4 000

定 价 13.00 元

图书如有质量问题本社发行部负责调换

主 编 胡 兰 沈阳农业大学

副主编 刘湘新 湖南农业大学
张 映 山西农业大学
刘 丽 华南农业大学

参 编 刘桂林 陈书明 山西农业大学
孙际佳 华南农业大学
罗淑萍 新疆农业大学
刘 梅 沈阳农业大学
张正珊 河北农业大学
朱素娟 扬州大学

前 言

动物生物化学实验课是动物科学和动物医学等专业学生的必修课之一,是培养相关专业大学生实验技能的重要课程之一。近年来,随着生物技术的迅猛发展、教学评估要求条件的变化,各高校动物生物化学实验课程的教学均进行了一定程度的调整。在这种情况下,本着内容适合现今教学、满足课程建设、人才培养需要的宗旨,我们着手编写了这本实验教材。

该教材共九章,第一章为学生应该了解的动物生物化学实验常识。第二章为生物化学常用技术的原理和应用,包括离心技术、电泳技术、分光光度技术、层析技术。介绍过程中,我们力求语言精练,容易理解。同时我们还介绍了一些新的仪器和方法,如自动生化分析仪、核酸重组技术等。其他章节均为具体的实验项目,所选大部分实验内容是目前多所农业高校开设的实验,剪表性剪、经费使用较少、涉及范围较宽。

该教材编写主要特点是:

(1)定位明确,主要针对动物科学、动物医学专业的本科生编写。实验设计均以动物为试材,而且涵盖了全国大多数农业院校动物科学、动物医学专业开设动物生物化学实验内容,针对性较强、内容相对集中。

(2)紧密与理论教材配套,根据理论内容的讲授顺序安排实验内容,让学生易学好用。该书共选择了 25 个实验项目,分为酶学、糖类、脂类、蛋白质、核酸、维生素和综合性实验,学生更容易理解。

(3)既有验证性实验项目,也有综合性实验内容,能够满足各校教改和教学评估的要求。综合性实验将蛋白质、酶等生物活性分子的初级制备、分离纯化和系统的分析鉴定方法有机地结合起来,体现了生物化学实验技术的特点。

(4)强调了关键技术及容易失败的地方,便于学生自己独立完成实验。

(5)有选择的空简,大部分综合性实验项目均包含了相关的系列内容,教师可以根据不同实验室的条件进行选择,也可以让学生自行设计、综合,便于发挥学生能动性剪创造性。

由于编写时间比较仓促,能力有限,错误之处在所难免,竭诚希望广大读者不吝赐教,非常感谢!

编 者

2006 年 7 月

目 录

第一章 动物生物化学实验常识	(1)
第一节 动物生化实验技术发展简史.....	(1)
第二节 动物生化实验室常识与规则.....	(2)
一、实验室规则	(2)
二、实验室安全及防护知识	(2)
第三节 生化实验基本操作.....	(3)
一、玻璃仪器的洗涤	(3)
二、刻度吸管的使用	(4)
三、微量移液器的使用	(5)
四、试管中液体的混匀法	(5)
第四节 常用实验样品的处理.....	(6)
一、血液样品的采集	(6)
二、血清的制备	(6)
三、全血及血浆的制备	(7)
四、无蛋白血滤液的制备	(8)
五、生物大分子的基本制备技术	(9)
第五节 实验报告的撰写规范.....	(15)
一、实验记录	(15)
二、定性实验报告书写格式	(16)
三、定量实验报告书写格式	(16)
第二章 常用生化实验技术原理及应用	(17)
第一节 离心技术的原理及应用.....	(17)
一、离心技术的基本原理	(17)
二、离心机的主要类型	(17)
三、常用的离心分离方法	(18)
四、离心操作的注意事项	(20)
第二节 光度测定法的原理及应用.....	(21)
一、分光光度法的基本原理	(21)
二、光度法的计算	(22)
三、使用分光光度计的注意事项	(24)
四、自动生化分析技术	(24)
第三节 电泳技术的原理及应用.....	(25)
一、影响电泳迁移率的因素	(25)
二、几种常用的电泳法	(26)
第四节 层析技术的原理及应用.....	(32)
一、层析技术的常用术语	(32)

二、层析技术的分类	(33)
三、常用的层析方法	(33)
四、柱层析的基本装置	(34)
五、柱层析的基本操作	(34)
第五节 DNA 重组技术	(37)
一、多聚酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)的基本过程	(37)
二、DNA 重组技术(Recombinant DNA Technology)	(38)
三、DNA 重组技术的基本步骤	(38)
第三章 酶学实验内容	(40)
实验一 唾液淀粉酶活性观察	(40)
实验二 转氨酶活性测定——King 氏法	(43)
实验三 琥珀酸脱氢酶的作用及竞争性抑制的观察	(46)
第四章 糖类实验内容	(48)
实验四 血糖的测定	(48)
I. 福林-吴宪氏法	(48)
II. 葡萄糖氧化酶法	(50)
实验五 肝糖原的提取和鉴定	(52)
第五章 脂类实验内容	(54)
实验六 血清总脂含量测定(香草醛法)	(54)
实验七 肝组织的生酮作用	(56)
实验八 血清游离脂肪酸测定(一次提取比色法)	(59)
实验九 血清总胆固醇测定(胆固醇氧化酶法)	(61)
第六章 蛋白质实验内容	(63)
实验十 醋酸纤维薄膜电泳法分离血清蛋白质	(63)
实验十一 蛋白质的含量测定	(66)
I. 双缩脲法	(66)
II. Folin-酚试剂法	(67)
III. 紫外光吸收法	(68)
IV. 考马斯亮蓝结合法	(69)
实验十二 血清尿素氮(BUN)的测定(二乙酰-肟法)	(70)
实验十三 氨基酸纸上层析	(72)
第七章 核酸实验内容	(75)
实验十四 动物组织 DNA 提取	(75)
实验十五 DNA 的定量测定(二苯胺法)	(77)
实验十六 动物肝脏总 RNA 的制备	(79)
实验十七 RNA 的定量测定(地衣酚法)	(81)
实验十八 紫外吸收法测定核酸的含量	(83)
第八章 维生素实验内容	(85)
实验十九 维生素 B ₂ 的定量测定(荧光法)	(85)

实验二十 维生素 C 的提取和含量测定	(87)
第九章 综合性实验内容	(89)
实验二十一 琼脂糖凝胶电泳法分离乳酸脱氢酶同工酶	(89)
实验二十二 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质相对分子质量	(92)
实验二十三 碱性磷酸酶的分离制备及活性检测	(97)
I. 碱性磷酸酶的有机溶剂分级沉淀	(97)
II. 碱性磷酸酶的活性与比活性测定	(99)
实验二十四 血浆 IgG 的分离、纯化及鉴定	(104)
I. 盐析法分离制备血浆 IgG	(104)
II. 凝胶过滤法脱盐和分离 IgG	(106)
III. DEAE-离子交换剂纯化血浆 IgG	(108)
IV. 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定 IgG 纯度	(110)
实验二十五 细胞色素 C 的制备及其测定	(115)
实验二十六 目的基因的 PCR 扩增及产物的电泳检测	(117)
I. 目的基因的 PCR 扩增	(117)
II. 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳	(118)
附录	(121)
附录 1 常用缓冲溶液的配制方法	(121)
附录 2 实验室中常用酸碱密度和浓度的关系	(126)
附录 3 常用洗液的配制	(127)
附录 4 层析法常用数据表及性质	(127)
附录 5 硫酸铵溶液饱和度计算表	(129)
附录 6 生物化学相关专业部分因特网网址	(130)
参考文献	(131)

第一章 动物生物化学实验常识

第一节 动物生化实验技术发展简史

生物化学是一门实验性科学,每一项生化知识的发现与研究都离不开实验技术。虽然人类早已在生产实践中应用了各种生物化学技术,如酿酒、制酱等,但是第一个真正的生物化学实验是在1896年进行的,Eduard Buchner用不含细胞的酵母菌提取液成功地在活的生物体外实现了糖转化为酒精的发酵过程。在20世纪,生化实验技术进入了快速发展阶段。20世纪初,利用微量分析技术发现了维生素、激素和辅酶等。1924年,T. Svedberg创建的“超离心技术”实现了对生化物质进行离心分离,并准确测定了血红蛋白等复杂蛋白质的相对分子质量。1935年,Schoenheimer和Rittenberg将放射性同位素示踪用于碳水化合物及类脂物质的中间代谢的研究。1937年,瑞典的化学家Tiselius研制了电泳仪,建立了研究蛋白质的移动界面电泳方法。1941年Martin和Synge建立了分配层析技术,利用柱层析使混合液中的氨基酸得到分离。在20世纪50年代后,由于各种仪器分析方法用于生物化学研究,如HPLC技术、红外、紫外、圆二色等光谱技术、NMR核磁共振技术等,使生化实验技术取得了很大的发展。Wilkins通过对DNA分子的X-射线衍射研究证实了Watson和Crick的DNA模型,Kendrew和Perutz先后对肌红蛋白和血红蛋白的结构进行X-射线结构分析,成为研究生物大分子空间立体结构的先驱。1953年,Sanger确定了胰岛素分子的氨基酸序列,1958年Stem,Moore和Spackman设计出氨基酸自动分析仪,1967年Edman和Begg制成了多肽氨基酸序列分析仪,1973年Moore和Stein设计出氨基酸序列自动测定仪,大大加快了蛋白质的分析工作。1965年我国化学和生物化学家用化学方法在世界上首次人工合成了具有生物活性的结晶牛胰岛素。此外,层析和电泳技术也取得重大的进展,1969年Weber应用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术测定了蛋白质的相对分子质量,在1968—1972年Anfinsen创建了亲和层析技术。

20世纪70年代,核酸研究的开展将生化实验技术推入了辉煌发展的时期。1972年,Berg等人首次用限制性内切酶切割了DNA分子,并实现了DNA分子的重组。1973年,Cohen等人第一次完成了DNA重组体的转化技术。与此同时,各种仪器分析手段进一步发展,制成了DNA序列测定仪、DNA合成仪等。1980年,英国剑桥大学的生物化学家Sanger和美国哈佛大学的Gilbert分别设计出两种测定DNA分子内核苷酸序列的方法,从此,DNA序列分析法成为生物化学与分子生物学最重要的研究手段之一。1981年,由Jorgenson和Lukacs提出的高效毛细管电泳技术(HPCE)是生化实验技术和仪器分析领域的重大突破。1984年,Kohler、Milstein和Jerne发展了单克隆抗体技术,完善了极微量蛋白质的检测技术。1985年,Mullis等发明了PCR技术(即聚合酶链式反应的DNA扩增技术),对于生物化学和分子生物学的研究工作具有划时代的意义。在20世纪90年代后,各种生化实验技术得到了进一步的发展和完善,并不断涌现新的技术手段,如基因芯片、蛋白质芯片等,有力地推动基因组、后基因组及蛋白质组学的研究。

第二节 动物生化实验室常识与规则

一、实验室规则

(1) 实验前必须认真预习实验内容,明确本次实验的目的和要求,掌握实验原理。

(2) 实验时自觉遵守实验室纪律,保持室内安静,不大声说笑和喧哗。

(3) 实验过程中要听从教师指导,认真按照实验步骤和操作规程进行实验。实验时如实进行实验记录,实验完毕及时整理数据,按时上交实验报告。

(4) 配制的试剂和实验过程中的样品,必须贴上标签、写上品名、浓度、姓名和日期等,放在冰箱中的易挥发溶液和酸性溶液,必须严密封口。

(5) 配制和使用溶液必须极为小心,强酸强碱必须倒入废液缸或冲稀后排放。电泳后的凝胶和各种废物不得倒入水池,只能倒入废物桶。

(6) 使用各类仪器应严格遵守操作规程。仪器发生故障应立即报告教师,未经许可不得自己随意检修。

(7) 实验室内严禁吸烟、饮水和进食,严禁用嘴吸移液管和虹吸管。易燃液体不得接近明火和电炉,凡产生烟雾、有害气体和不良气味的实验,均应在通风条件下进行。

(8) 进行动物实验时,必须在取材结束后立即对实验动物进行妥善处理,并及时清洗场地,严禁将实验动物或组织器官丢弃在水池内。

(9) 实验完毕必须及时洗净并放好各种玻璃仪器,保持实验台面、称量台、药品架、水池以及各种实验仪器内外的清洁及整齐。

(10) 爱护并保管好每组的仪器和玻璃器皿,打破了玻璃仪器要及时向教师报告,并自觉登记,学期结束时按规定进行处理。

(11) 严格遵守实验室安全用电规则和其他安全规则。

(12) 每日实验完毕,值日生要认真做好实验室的卫生值日工作。最后离开实验室的实验人员,必须检查并关好水、电、门、窗。

二、实验室安全及防护知识

每一位在生化实验室工作的人员都必须有充分的安全意识,严格的防范措施和防护救治知识,一旦发生意外要正确地进行处置,以防事故进一步扩大。

(一) 爆炸

由于在实验过程中涉及各种化学反应,所以生物化学实验室防止爆炸事故是极为重要的。如,加热时会发生爆炸的混合物有:有机化合物与氧化铜、浓硫酸与高锰酸钾、三氯甲烷与丙酮等。

常见的引起爆炸事故的原因有:①随意混合化学药品,并使其受热、受摩擦和撞击。②在密闭的体系中进行蒸馏、回流等加热操作。③在加压或减压实验中使用了不耐压的玻璃仪器,或反应过于激烈而失去控制。④易燃易爆气体大量逸入室内。

(二) 中毒

在生化实验室常见的化学致癌物有:石棉、砷化物、铬酸盐、溴乙锭等。剧毒物有:氰化物、

砷化物、乙腈、甲醇、氯化氢、汞及其化合物等。中毒的原因主要是由于不慎吸入、误食或由皮肤渗入。

为预防中毒,在实验中要注意以下事项:①使用有毒或有刺激性气体时,必须佩戴防护眼镜,并应在通风橱内进行。②取用毒品时必须佩戴橡皮手套。③严禁用嘴吸移液管,严禁在实验室内饮水、进食、吸烟,禁止赤膊和穿拖鞋。④禁止用乙醇等有机溶剂擦洗溅洒在皮肤上的药品。

(三)伤害

在生物化学实验室常见的是割伤,要特别注意预防,尤其是在向橡皮塞中插入温度计、玻璃管时一定要先用水或甘油润滑,再用布包住玻璃管轻轻旋入,切不可用力过猛,若发生严重割伤时要立即包扎止血,就医时务必检查伤部神经是否被切断。

其他的伤害包括化学灼伤或皮肤灼伤等。因此建议在实验室准备一个完备的小药箱,专供急救时使用。药箱内备有:医用酒精、红药水、紫药水、止血粉、创可贴、烫伤油膏(或万花油)、鱼肝油、1%硼酸溶液或2%醋酸溶液、1%碳酸氢钠溶液、20%硫代硫酸钠溶液、医用镊子和剪刀、纱布、药棉、棉签、绷带等。

(四)触电与着火

生物化学实验室要使用大量的仪器、烘箱和电炉等,因此每位实验人员都必须能熟练地安全用电,防止一切用电事故(包括实验人员不慎触电和电器着火)的发生。此外,生化实验室经常使用大量的有机溶剂,如甲醇、乙醇、丙酮、氯仿等,而实验室又经常使用电炉、酒精灯等火源,因此极易发生着火事故。如乙醚、二硫化碳、丙酮和苯的燃点都很低,因此不得存放于可能会产生电火花的普通冰箱内。

预防火灾必须严格遵守以下操作规程:①严禁在开口容器和密闭体系中用明火加热有机溶剂,只能使用加热套或水浴加热。②废有机溶剂不得倒入废物桶,只能倒入回收瓶,以后再集中处理。量少时用水稀释后排入下水道。③不得在烘箱内存放、干燥、烘焙有机物。④在有明火的实验台面上不允许放置开口的有机溶剂或倾倒有机溶剂。

实验室中一旦发生火灾切不可惊慌失措,要保持镇静,根据具体情况正确地进行灭火或立即报火警。

第三节 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,否则表示尚未洗净,必须重新洗涤。

(一)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。

(二)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4~6h(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。

(三)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4h)后,再进一步洗涤,最后用蒸馏水冲洗2~3次。

(四)窄口仪器的洗涤(容量瓶、试剂瓶)

使用后立即在洗涤剂溶液或清水中浸泡过夜,洗涤剂溶液倒入容器内(约1/4),小心转动或摇动仪器,自来水冲洗,最后用蒸馏水冲洗2~3次。

(五)判断洗净的标准

洗净的玻璃仪器管壁光洁、清亮,无污渍;被水湿润后,管壁呈现均匀水膜,无挂水珠。

(六)干燥方法

1. 晾干 仪器倒立放在特制架子上,自然晾干。
2. 烘干 尽量倒净仪器内部的水,将其倒立放在托盘上,放入烘箱烘干。普通仪器用80~100℃,容量分析仪器用37~40℃。
3. 有机溶剂干燥 体积小的容器急需干燥时,可用此法。洗净的仪器先用少量酒精洗一次,再用少量丙酮或乙醚洗涤,吹干(不必加热)。

二、刻度吸管的使用

刻度吸管是使用广泛的一种小容量吸管,其准确度较高,常用的有10 mL、5 mL、2 mL、1 mL、0.5 mL、0.1 mL等几种。因生产厂家的不同,其刻度方法也有所不同,一般可分为吹出式和流出式等形式。

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

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1 mL以上(包括1 mL)吸管尖端残留液体,让吸管尖端紧靠在管壁上,A级停留5 s,B级停留3 s,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:

(一)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。

(二) 执管

用右手拇指及中指持住吸量管的上部,用食指堵住管口及控制流量,刻度数字要向着自己。切忌用大拇指堵住管口,控制流量。

(三) 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 1 cm 处。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。

(四) 调准刻度

用食指控制流量,使液面缓慢下降至所需刻度,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。如吸取的溶液黏度较大,则必须用小滤纸片将吸管尖端外部溶液擦干。

(五) 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,同时转动吸管。

(六) 洗涤

吸取血液、尿、组织样品及黏稠样品的吸管,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、微量移液器的使用

微量移液器是用于准确移取一定体积溶液,尤其是较小体积溶液($<100 \mu\text{L}$)的一种量器。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 $0.1 \mu\text{L} \sim 10 \text{ mL}$ 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止,才能将全部液体放出。

四、试管中液体的混匀法

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。常用于试管中液体混匀的方法有下列几种:

(一) 甩动法

右手持管上部,将试管轻轻甩动振摇即可混匀。此法适用于液体较少时。

(二) 弹敲法

右手持管上部,将试管的下部在左手掌心弹敲。亦适用于管内液体不多时。

(三) 旋转法

右手掌心顶住试管上口,五指拿紧试管,利用腕力使管向一个方向作圆周运动,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。

(四) 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。

(五)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。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。

第四节 常用实验样品的处理

一、血液样品的采集

血液是生化分析中十分重要的样品之一。血液中各成分的生化分析结果是了解机体代谢变化的重要指标,因此必需掌握正确的血液样品的采集及处理的方法。

(一)采血前准备

1. 实验动物的准备 血液中有些化学成分有明显的昼夜波动,如血浆皮质醇在早晨高而傍晚低,至午夜降到最低水平;血清铁也有类似的波动;有些成分在动物进食前后有所改变且进餐后血清容易出现浑浊,影响和干扰结果的准确性,如血糖(GLU)、总胆固醇(TC),碱性磷酸酶(ALP)等。因此采血应在禁食 12 h 后进行,这样可以将食物对血液各种成分浓度的影响减少到最低程度。

2. 采血器具的准备 采血器皿及样品容器都必须清洁,充分干燥和冷却后才能使用。抽取血液时,动作不宜太快,采出的血液要沿管壁慢慢注入盛血容器内。若用注射器取血时,采血后应先取下针头,再慢慢注入容器内。推动注射器时速度也不可太快,以免吹起气泡造成溶血。盛血的容器不能用力摇动以免溶血。为防止犬病的产生和蔓延,必须做到一犬一针,或使用一次性消毒采血针头。

3. 对采血操作人员的要求 实验动物在出现兴奋、恐惧等状态时,某些生化指标会发生变化,影响实验结果的准确性,例如,实验操作过程中动作的简单粗暴,会使实验动物体内血液循环加快,糖消耗加快,使血糖结果偏低,因此要求实验操作人员对待实验动物必须要有爱心,动作要轻柔。

(二)采血部位的确定

各种实验动物的采血部位和方法需视动物的种类、检验项目、试验方法及所需血量而定。一般较大动物如马、牛、猪等多由颈静脉采取;小动物如兔常由耳静脉采取,也可从颈静脉及心脏采血。犬由隐静脉,天竺鼠和大白鼠则由心脏采取,家禽由翼静脉和隐静脉及心脏采取。

(三)血液采集的注意事项

1. 在采血时要避免溶血 溶血将造成成分混杂,引起测定误差。
2. 动脉血和静脉血的化学成分略有差异 除血氧饱和度、二氧化碳分压等有明显不同以外,静脉血中乳酸的浓度比动脉血中的略高。

3. 整个试验期间,采取的血液样品必须保持时间一致 在昼夜之间,或动物在饥饿与饱食的不同状态时,血液成分往往有很大不同,所以整个试验期间,选择采取血液样品的时间必须一致。

二、血清的制备

血清是全血不加抗凝剂自然凝固后析出的淡黄清亮液体。其所含成分接近于组织间液,

代表着机体内环境的物理化学性状,比全血更能反映机体的状态,是常用的血液样品。

操作过程如下:将刚采集的血液直接注入试管,将试管倾斜放置,使血液形成一斜面。夏季于室温下放置,待血液凝固后,即有血清析出;冬季,室温较低,不易析出血清,故需将血液置于37℃水浴或温箱中促进血清析出。另外,也可将刚采集的血液注入洁净的离心管中,待血液凝固后,以钝头玻璃棒将血块与管壁轻轻剥离,2 000~2 500 r/min离心15 min便有血清析出。析出的血清应及时用吸管吸出、备用,若不清亮或带有血细胞,应离心;制备好的血清,应及时进行实验测定,否则应加盖冷藏备用。

三、全血及血浆的制备

若要用全血或血浆作样品,必须在血液凝固前用抗凝剂处理血液。

(一)抗凝剂种类

实验室常用的抗凝剂有如下几种,可根据情况选择使用。

1. 草酸钾(钠) 此抗凝剂优点是溶解度大,可迅速与血中钙离子结合,形成不溶性草酸钙,使血液不凝固。每毫升血液用1~2 mg即可。

操作:配制10%草酸钾(钠)水溶液。吸取此液0.1 mL放入试管中,慢慢转动试管,使溶液尽量铺散在试管壁上,置80℃烘箱烤干(若超过150℃则分解),管壁即呈一薄层白色粉末,加塞备用。可抗凝血液5 mL。

此抗凝血,常用于非蛋白氮等多种测定项目。不适用于钾、钙的测定。对乳酸脱氢酶、酸性磷酸酶和淀粉酶具有抑制作用,使用时应注意。

2. 草酸钾-氟化钠 氟化钠是一种弱抗凝剂。但浓度2 mg/mL时能抑制血液内葡萄糖的分解,因此在测定血糖时常与草酸钾混合使用。

操作:草酸钾6 g、氟化钠3 g,溶于100 mL蒸馏水中。每个试管加入0.25 mL,于80℃烘干备用,每管可抗凝5 mL血液。

此抗凝血,因氟化钠抑制脲酶,所以不能用于脲酶法的尿素氮测定,也不能用于淀粉酶及磷酸酶的测定。

3. 乙二胺四乙酸二钠盐(简称EDTANa₂) EDTANa₂,易与钙离子络合而使血液不凝。有效浓度为0.8 mg可抗凝1 mL血液。

操作:配成4%EDTANa₂水溶液。每管装0.1 mL,80℃烘干。可抗凝5 mL血液。

此抗凝血适用于多种生化分析。但不能用于血浆中含氮物质、钙及钠的测定。

4. 肝素 最佳抗凝剂,主要抑制凝血酶原转变为凝血酶,从而抑制纤维蛋白原形成纤维蛋白而凝血。0.1~0.2 mg或20 U可抗凝1 mL血液。

除上述抗凝剂外,还有柠檬酸钠(枸橼酸钠)、草酸铵等,因不常用于生化分析,故不作介绍。

配成10 mg/mL的水溶液。每管加0.1 mL于37~56℃烘干,可抗凝5~10 mL血液(市售品为肝素钠溶液,每毫升含12 500 IU,相当于100 mg,故每125 IU相当于1 mg)。

注意:抗凝剂用量不可过多,如草酸盐过多,将造成钨酸法制备血滤液时蛋白质沉淀不完全,测氮时加奈氏试剂后易产生浑浊等现象。

(二)全血的制备

全血是指抗凝的血液,即在血液取出后立即与适量的抗凝剂充分混合,以免血液凝固。抗凝剂预加于准备承接血液的容器中。抗凝剂的种类可以根据实验的需要进行选择。

将刚采取的血液注入预先加有适合要求的抗凝剂试管中,轻轻摇动,使抗凝剂完全溶解并分布于血液中。

(三)血浆的制备

血浆是指抗凝血浆。游离血红蛋白、变性血红蛋白、纤维蛋白原的测定须用血浆。

将已抗凝的全血放置一段时间或于 2 000 r/min 离心 10 min,沉降血细胞,上层清液即为血浆。分离较好的血浆应为淡黄色。

为避免产生溶血,必须采用干燥清洁的采血器具和容器,尽量少振荡。

血浆比血清分离的快而且量多。两者的差别,主要是血浆比血清多含一种纤维蛋白原,其他成分基本相同。

(四)血液的量取

已制备好的抗凝血液放置后红血细胞将自然下沉,往往造成量取全血时的误差。因此量取全血时,血液必须充分混合,以保证血细胞和血浆分布均匀。其操作如下:

1. 血液混匀法 若血液装在试管中,可用玻璃塞或洁净干燥的橡皮塞,塞严管口。缓慢上下颠倒数次,使血细胞、血浆均匀混合。颠倒时切不可用力过猛,以免溶血。也可用一弯成脚形的小玻璃棒插入管内,上下移动若干次,使完全混匀。血液混匀后应立即量取,且每次量取前都必须重复此操作。

2. 准确量取法 用吸管量取血液时,要将已充分混匀的血液吸至需要量取血液容量的稍上方处,用滤纸片擦净吸管外壁黏着的血液,而后使血液慢慢流至刻度,放出多余血液。再次擦净管尖血液。然后运用食指压力控制着流出速度,慢慢把血液放入容器内,将最后一滴吹入容器内(若是不应吹的吸管,则将管尖贴在接收容器的壁上转动几秒钟,使液体尽量流出即可)。血液流出后,管壁应清明而看不到血液薄层附着。

四、无蛋白血滤液的制备

测定血液或其他体液的化学成分时,样品内蛋白质的存在常常干扰测定。因此,需要先做成无蛋白血滤液再行测定。

无蛋白血滤液制备的基本原理是以蛋白质沉淀剂沉淀蛋白,用过滤法或离心法除去沉淀的蛋白。常用的方法有:

(一)福林-吴宪(Folin-Wu)氏法(钨酸法)

1. 原理

钨酸钠与硫酸混合,生成钨酸: $\text{Na}_2\text{WO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{H}_2\text{WO}_4 + \text{Na}_2\text{SO}_4$ 。

血液中蛋白质在 pH 值小于等电点的溶液中可被钨酸沉淀。沉淀液过滤或离心,上清液即为无色而透明、pH 约等于 6 的无蛋白滤液。可供非蛋白氮,血糖、氨基酸、尿素、尿酸及氯化物等项测定使用。

2. 试剂

(1)10%钨酸钠:称取钨酸钠($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)100 g 溶于少量蒸馏水,最后加蒸馏水至 1 000 mL。此液以 1%酚酞为指示剂试之应为中性(无色)或微碱性(呈粉红色)。

(2) 1/3 mol/L 硫酸溶液。

3. 操作

(1) 取 50 mL 锥形瓶或大试管 1 支；

(2) 吸取充分混匀之抗凝血 1 份，擦净管外血液，缓慢放入锥形瓶或试管底部；

(3) 准确加入蒸馏水 7 份，混匀，使完全溶血；

(4) 加入 1/3 mol/L 硫酸溶液 1 份，随加随摇；

(5) 加入 10% 钨酸钠 1 份，随加随摇；

(6) 放置约 5 min 后，如振摇亦不再发生泡沫，说明蛋白质已完全变性沉淀。用定量滤纸过滤或离心 (2 500 r/min, 10 min)，即得完全澄清无色之无蛋白滤液。

制备血浆或血清的无蛋白滤液与上述方法相似。不同点是加水 8 份，而钨酸钠和硫酸各加 1/2 份。

(二) 黑登 (Haden) 改良法

取血液 1 份加入锥形瓶或大试管中，加入 8 份 1/24 mol/L 硫酸溶液，此时血细胞迅速破裂，颜色变黑 (若反应进行较慢，可振摇容器以加速反应进行)，再加入 10% 钨酸钠 1 份，摇匀，过滤或离心即可。以此方法准备无蛋白滤液优点是产生的滤液较多。

用上述任何方法制得的血滤液，都是将原来样品稀释 10 倍 (1:10)。所以 1 mL 无蛋白滤液相当于 0.1 mL 的全血、血浆或血清。

(三) 氢氧化锌法

1. 原理 血液中蛋白质在 pH 值大于等电点的溶液中可用 Zn^{2+} 来沉淀。生成的氢氧化锌本身为胶体，可将血中葡萄糖以外的许多还原性物质吸附而沉淀。所以，此法所得滤液最适作血液葡萄糖的测定 (因为葡萄糖多是利用它的还原性来定量的)。但测定尿酸和非蛋白氮时含量降低，不宜使用此滤液。

2. 试剂

(1) 10% 硫酸锌溶液：称取硫酸锌 ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) 10 g 溶于蒸馏水并定容至 100 mL。

(2) 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液。

3. 操作

(1) 取干燥洁净 50 mL 锥形瓶或大试管 1 支，准确加入 7 份水。

(2) 准确加入混匀的抗凝血 1 份，摇匀。

(3) 加入 10% 硫酸锌溶液 1 份，摇匀。

(4) 慢慢加入 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液 1 份，边加边摇。放置 5 min，用定量滤纸过滤或离心 (2 500 r/min, 10 min)。得清明透亮之滤液，此滤液稀释 10 倍。

(四) 三氯醋酸法

1. 原理 三氯醋酸为一有机强酸，能使蛋白质变性而沉淀。

2. 试剂 10% 三氯醋酸溶液。

3. 操作 取 10% 三氯醋酸 9 份置于锥形瓶或大试管中，加 1 份已充分混匀的抗凝血。加时要不断摇动，使其均匀。静置 5 min，过滤或 2 500 r/min，离心 10 min。即得 10 倍稀释之清明透亮的滤液。

五、生物大分子的基本制备技术

研究蛋白质、酶和核酸等生物大分子的结构与功能，必须首先解决生物大分子的制备问

题,而生物大分子的分离纯化与制备是一件十分细致而困难的工作。与化学产品的分离制备相比较,生物大分子的制备有以下主要特点:

(1)生物材料的组成极其复杂,常常包含有数百种乃至几千种化合物。

(2)许多生物大分子在生物材料中的含量极微,分离纯化的步骤繁多,流程长。

(3)许多生物大分子一旦离开了生物体内的环境时就极易失活,因此分离过程中如何防止其失活,就是生物大分子提取制备最困难之处。

(4)生物大分子的制备几乎都是在溶液中进行的,温度、pH 值、离子强度等各种参数对溶液中各种组成的综合影响,很难准确估计和判断。

制备生物大分子的分离纯化方法多种多样,主要是利用它们之间性质的差异。根据分子大小和形态不同建立的方法有差速离心、超滤、分子筛、透析等;根据分子溶解度不同建立的方法有盐析、萃取、有机溶剂沉淀、分配层析和结晶等;根据分子电荷差异不同建立的方法有电泳、等电聚焦电泳、离子交换层析等;根据分子生物功能专一性不同建立的方法有亲和层析。

(一)生物大分子制备的前处理

1. 生物材料的选择 制备生物大分子,首先要选择适当的生物材料。选择的材料应含量高、来源丰富、制备工艺简单、成本低,尽可能保持新鲜,尽快加工处理。如暂不提取,动物材料则需深度冷冻保存。

动物组织要先除去结缔组织、脂肪等非活性部分。如果所要求的成分在细胞内,则要先破碎细胞,然后用适当的溶剂提取。

2. 细胞的破碎 对于细胞中大多数成分如 DNA、RNA、蛋白质和酶等,都需要首先破碎细胞、做成组织匀浆后才能进行分离和提取。所以生化实验中,破碎组织细胞使细胞内容物悬浮于缓冲液中形成的混悬液是重要的操作之一。

不同的生物体或同一生物体的不同部位的组织,其细胞破碎的难易不一,使用的方法也不相同。常用的方法有以下几种。

(1)研磨法:将新鲜离体的组织器官洗去血污,弃除其他组织,加入适当的溶液,直接用玻璃匀浆器磨成匀浆,或加入少量石英砂研磨成匀浆。此法多用于肝脏等柔软组织。

制作组织匀浆需要在低温下进行。组织器官离体后就应放置于冰冷溶液中处理,匀浆时,匀浆器相互摩擦而产生高热,易使酶变性,所以在匀浆器轴的中空部要放入冰盐溶液,匀浆器外套管也应用冰盐溶液冷却。

(2)组织捣碎器法:这是一种用组织捣碎机(即高速分散器)破碎细胞的方法,该法的优点是快速,但应注意由于瞬间高温可能会引起蛋白质的变性。多用于心脏等坚实组织。操作时亦可用组织捣碎机捣成粗组织糜,而后再用玻璃匀浆器磨碎。

(3)反复冻融法:将待破碎的细胞冷至 $-15\sim-20^{\circ}\text{C}$,然后放于室温(或 40°C)迅速融化,如此反复多次,由于细胞内形成冰粒使剩余胞液的盐浓度增高而引起细胞溶胀破碎。多用于红细胞的破碎。

(4)超声波法:此法是借助超声波的振动力破碎细胞壁和细胞器。破碎微生物细菌和酵母菌时,时间要长一些。

(5)溶胀法:细胞膜为天然的半透膜,在低渗溶液和低浓度的稀盐溶液中,由于存在渗透压差,溶剂分子大量进入细胞,将细胞膜胀破释放出细胞内含物。

(6)有机溶剂处理法:利用氯仿、甲苯、丙酮等脂溶性溶剂或 SDS(十二烷基硫酸钠)等表面