

普通高等教育精品课程教材
全国高等医药院校教材

供临床、预防、基础、口腔、麻醉、影像、药学、检验、护理、法医等专业使用

医学生物化学与分子生物学 实验教程

第2版

主编 揭克敏



科学出版社

普通高等教育精品课程教材
全国高等医药院校教材

供临床、预防、基础、口腔、麻醉、影像、药学、检验、护理、法医等专业使用

医学生物化学与分子生物学 实验教程

第2版

主 编 揭克敏

副主编 罗达亚 余乐涵

编 委 (按姓氏笔画排列)

万福生 南昌大学医学院

朱伟锋 南昌大学医学院

刘丽乔 南昌大学医学院

刘卓琦 南昌大学医学院

杨晓红 南昌大学医学院

吴 剑 上饶医学分院

余乐涵 南昌大学医学院

张义平 九江学院医学院

范启兰 赣南医学院

罗达亚 南昌大学医学院

胡晓鹃 南昌大学医学院

涂 硕 南昌大学医学院

黄春洪 南昌大学医学院

彭少君 宜春学院医学院

揭克敏 南昌大学医学院

颜念龙 南昌大学医学院

潘泽政 南昌大学医学院

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本书在实验教学内容选择与安排方面,不仅能反映传统生物化学实验诊断技术的特点,也力求反映当前生物化学与分子生物学发展的新技术。首先,突出了常用生化实验技术的介绍和应用,旨在加强学生在生物化学方法和技术上的训练,以提高同学们的综合素质。其次,教材中有十五个分子生物学的实验内容。也适合分子生物学实验教学。此外,为培养学生独立思考分析与解决问题的能力,特增设了一些设计性实验。在教学方法 and 手段上,拟采取学生自己操作为主,适当给予示范操作、示教及结合多媒体课件进行教学,以期获得更好的实验教学效果。

本书适合医药院校本科生及研究生使用。

图书在版编目(CIP)数据

医学生物化学与分子生物学实验教程 / 揭克敏主编. —2版. —北京:科学出版社,2014.4

普通高等教育精品课程教材·全国高等医药院校教材

ISBN 978-7-03-040361-2

I. ①医… II. ①揭… III. ①医用化学-生物化学-实验-医学院校-教材②医药学-分子生物学-实验-医学院校-教材 IV. ①Q5-33 ②Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第066497号

责任编辑:杨鹏远 胡治国 / 责任校对:张小霞

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

文林印务有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2008年6月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2014年4月第 二 版 印张:12 1/2

2014年4月第五次印刷 字数:292 000

定价:35.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

第2版前言

自从教育部“十二五”规划颁布以来,教育部及各大院校对人才培养目标和培养模式有了更高的要求。其中一点就是要加强素质教育,大力加强学生实践能力、科学研究能力和创新精神培养。高校实验教学内容 and 模式的改革是实现上述目标的重要途径。近年来,国内有多个院校已经把实验课单独列为一门基础课程,开始重视实验课的建设和改革。在这样一个背景下,我们对“生物化学与分子生物学实验”课程也做了较大调整和改革。为了让本实验教材更好适应新时期教学要求,更好适应本科和研究生实验教学,我们对前版教材进行了增删和修改。

首先,本次修订再版,主要基于以下2个原则:①让实验项目与生物化学和分子生物学理论教学内容对应,这样利于学生加深对理论知识的掌握;②主要增加综合性和创新性实验项目,提高学生综合实验技能和创新思维。本次增删的重点是第四篇分子生物学实验,在原有的10个实验基础上增加了5个项目,此外生物化学实验增加了2个项目。这些新增的实验项目实用性和趣味性强,如肉制品的基因鉴定实验,是针对国内外市场上肉类食品的制假问题进行设计,教学生如何进行基因检测。PCR-RFLP检测*NQ01 C609T*多态性是根据目前学科热点SNP的原理设计。这些实验既利于学生学习先进的实验技术,又让学生思考基础理论和技术与人类的生活关系,达到培养学生独立思考、发现问题、分析问题与解决问题的实际工作能力。

其次,这次修改和增加的实验项目都是编者经过多年科研实践的经验总结。经过反复的实验验证,实验操作和试剂配制都是正确可信的。

第三,在实验项目的编排上,覆盖了医学本科生和硕士研究生需要掌握的生物化学与分子生物学实验技术。考虑到每个院校的实验条件不一样,为了适应各种情况,我们编排的每个实验项目可以独立开设,也可以几个项目联合作为综合性实验开设。

第四,每个实验内容都包含“示范操作和设计型实验”栏,教师可参考这些内容系统规范地演示实验技术,并帮助学生思考实验设计,后者符合院校要求开设“设计型实验”的要求和趋势。实验内容中编写的复习思考题可供学生思考和练习,扩大学生视野。

尽管我们努力做好工作,但书中定有不足之处,恳请使用本教材的广大师生提出宝贵意见,以便我们学习改进。

编 者

2014年1月于南昌

第1版前言

生物化学是一门迅猛发展的学科,对生命科学的发展具有举足轻重的作用。它作为医学的基础,从分子水平探讨病因、防治疾病,为医学的发展提供了许多新的理论和方法,大大推动了医学的发展。在生物化学实验教材中如何反映这门课程的特点,并体现在培养学生的实际工作能力这一目标中去是一个值得探索的课题。

本书是根据五年制医学本科“生物化学”和“医学分子生物学”课程内容的体系结构与培养目标,并紧密结合学科的自身特点及实验教学改革的具体情况而编写的。旨在以培养和提高学生对生物化学的基本理论和基本技能为目的,培养学生独立思考以及发现问题、分析问题与解决问题的实际工作能力和严谨的科学作风,为同学们日后学习奠定良好的基础。

本实验教程在实验教学内容选择与安排方面,不仅能反映传统生物化学实验诊断技术的特点,也力求反映当前生物化学与分子生物学发展的新技术。首先,突出了常用生化实验技术的介绍和应用,旨在加强学生在生物化学方法和技术上的训练,以提高同学们的综合素质。实验技术主要涉及光谱分析、电泳技术及层析技术等,实验内容主要包括蛋白质和核酸化学、临床生化实验等传统的生化实验等。其次,为了适应生物化学理论教材中日益增多的分子生物学内容,本书特增加了十个分子生物学的实验内容,如质粒 DNA 的提取、酶切及鉴定,感受态细胞的制备、重组 DNA 的导入和筛选等,供各学校在使用时选择。此外,为培养学生独立思考分析与解决问题的能力,特增设了一些设计性实验,旨在增加学生实验操作与动手的机会,更有利于学生对所学知识的理解与掌握。在教学方法和手段上,拟采取学生自己操作为主,适当给予示范操作、示教及结合多媒体课件进行教学,以期获得更好的实验教学效果。

参加本实验教材编写的单位有南昌大学医学院、九江学院医学院、上饶医学分院、宜春学院医学院和赣南医学院。本实验教程主要适用于本科生,也可供研究生或其他专业人员参考。

由于编写时间仓促,知识水平所限,尽管编写人员尽了最大努力,本书定有许多不足之处,特请使用本教材的广大师生多提宝贵意见。

编者

2008年3月于南昌

目 录

第一篇 概 论

第一章 实验室基本常识	(1)
第二章 生物化学实验基本操作	(5)

第二篇 常用技术

第一章 分光分析技术	(9)
第二章 电泳技术	(13)
第三章 层析技术	(27)
第四章 离心技术	(35)
第五章 聚合酶链反应技术	(39)
第六章 印迹技术	(43)
第七章 组织细胞培养技术	(48)

第三篇 生物化学实验

实验一 蛋白质定量测定	(64)
实验二 蛋白质的沉淀反应	(74)
实验三 蛋白质的两性反应和等电点测定	(75)
实验四 血清蛋白乙酸纤维素薄膜电泳	(77)
实验五 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(79)
实验六 肝染色质蛋白的提取与鉴定	(85)
实验七 凝胶层析法分离血红蛋白与 DNP-酪蛋白	(87)
实验八 DEAE-纤维素离子交换层析分离血清蛋白质	(89)
实验九 亲和层析法分离乳酸脱氢酶	(91)
实验十 影响酶活性的因素	(95)
实验十一 碱性磷酸酶 K_m 值测定	(97)
实验十二 底物浓度及抑制剂对酶活性的影响	(99)
实验十三 琥珀酸脱氢酶的作用及其竞争性抑制	(101)
实验十四 乳酸脱氢酶同工酶的测定	(103)
实验十五 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)的测定	(105)
实验十六 转氨基作用	(109)
实验十七 血糖测定及胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的影响	(110)
实验十八 糖酵解中间产物的鉴定	(116)
实验十九 血清胆固醇总量的测定	(119)
实验二十 血清尿素氮测定	(122)
实验二十一 酮体的生成与利用	(125)



实验二十二 血清(浆)过氧化脂质测定	(128)
--------------------------	-------

第四篇 分子生物学实验

实验一 酵母 RNA 的提取与成分鉴定	(133)
实验二 真核细胞 DNA 的提取与鉴定	(134)
实验三 基因的 PCR 扩增与产物鉴定	(139)
实验四 肉制品的基因鉴定	(142)
实验五 人 <i>p16</i> 基因 PCR 扩增产物的 T/A 克隆	(145)
实验六 大肠杆菌感受态细胞的制备	(146)
实验七 质粒热激法转化感受态细菌	(149)
实验八 重组克隆的筛选与扩增	(151)
实验九 转化菌的质粒提取与定量	(153)
实验十 质粒的酶切与琼脂糖凝胶电泳鉴定	(156)
实验十一 <i>pcDNA3.1(+)-EGFP</i> 质粒转染 HeLa 细胞株	(161)
实验十二 <i>pcDNA3.1(+)-EGFP</i> 质粒转染 HeLa 细胞株的 RT-PCR 分析	(162)
实验十三 <i>pcDNA3.1(+)-EGFP</i> 质粒转染 HeLa 细胞株的 Western 分析	(165)
实验十四 PCR-RFLP 检测 <i>NQO1</i> C609T 多态性	(171)
实验十五 检测人 <i>CLEC4M</i> 基因多态性	(174)

附录	(177)
一、常用缓冲液及酸碱指示剂的配制方法	(177)
二、化学试剂的规格及保管	(181)
三、几种动物生化常数	(183)
四、聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶的配制	(185)
五、细胞培养用液的配制	(186)
六、生物化学与分子生物学实验常用词的中英文对照	(190)



写出预习报告。

2. 实验过程中不做与实验无关的事情,不妨碍他人实验。
3. 加强基本技术训练,如移液、混匀、过滤等。
4. 熟悉常用仪器的使用方法,如分光光度计、离心机、电泳仪等。
5. 以实事求是的科学态度如实记录实验结果,仔细分析,做出客观结论。实验失败,须认真查找原因,不得任意涂改实验结果。
6. 及时写好实验报告并按时上交。

二、实验记录及实验报告的书写

获得了准确的实验结果还不是实验的结束,实验室工作的目的是用一种简单易懂的方式向他人传播实验结果和所引出的概念,书写实验报告是更严格地撰写科学论文的基础和极好的练习机会。书写实验报告最好用实验报告本,也可以用实验报告纸,但为避免遗失,实验课全部结束后应装订成册,以便保存。书写实验报告应包括下列内容。

1. 标题 课程和实验名称、实验者姓名、实验日期等都写在实验报告上。
2. 目的和原理 简明扼要地概括出实验的目的、原理,涉及化学反应的最好用反应式表示。
3. 方法步骤 列出简要明了的操作步骤,以便自己将来或他人能够重复,尽量用流程图或表格表示。
4. 记录 实验记录应及时、准确详尽、真实、清楚。

及时是指在实验中观察到的现象、数据要马上记录在记录本(或“实验指导”的合适位置)上,回顾性记录易造成无意或有意的失真。

准确详尽记录实验中观察到的实验现象,而不是照抄实验书上所列应观察到的实验结果,记录实验现象的所有细节。如报告一个特殊实验中生成一种黄色沉淀是不够的,要写明在什么条件下(比如加热到什么温度、保温多长时间)、什么时候(快速还是缓慢)、生成多少、什么形状(胶状还是絮状或是颗粒状)、什么颜色(亮黄、橘黄或是其他)的沉淀。在科学研究中仔细观察,特别注意未预期的实验现象是十分重要的,这些观察常常引起意外的发现,而且为了重复工作也需要准确的实验报告。使用精密仪器进行实验时,需在仪器登记册上及时记录仪器的型号及编号。

现象及数据的记录必须真实,不可掺杂任何主观因素,切忌拼凑实验数据、结果。对于“不正常”的现象和数据更应如实记录,并分析查找原因。

现象及数据的记录可以与操作步骤的表格合在一起。实验记录不能用铅笔,须用钢笔或圆珠笔记录清楚,不要擦抹及修改,但可以划去重写。

5. 数据处理及结果分析 根据实验要求,整理、归纳数据后进行计算得出结果,包括根据实验数据及计算结果作出的各种图表(如曲线图、对照表等)及从图表得出的结果。

6. 讨论 讨论部分不是对结果的重述,而是对实验结果、实验方法和实验异常结果的分析 and 探讨,以及对实验设计的认识、体会及建议。

7. 结论 结论要简明扼要,以说明本次实验所获得的结果并加以叙述验证本次实验原理。

8. 怎样画图 在许多实验中都有一个量,如浓度、pH 或温度,在系统地变化着,要测量

的是此量对另一量的影响。已知量叫做自变量,未知量叫做应变量。画图时,习惯把自变量画在横轴上,而把应变量画在纵轴上。下面列出一些作图的提示。

- (1) 每图应有简洁的标题,清楚地标明两个轴的名称及计量单位。
- (2) 两轴均要标明刻度标记,选用合适的单位,使轴上数字不要太大,且最好用简单数字标明轴上的标度。如使用 10mmol/L 就比 0.01mol/L 和 $10\,000\mu\text{mol/L}$ 要好。
- (3) 为了清楚起见,调整标度使斜度约为 45° 。
- (4) 尽可能使各点间距离相等,不要使各点挤在一起或距离太大。
- (5) 根据不同的实验用光滑连续的曲线或直线连接各点。
- (6) 若同一张图上有两条以上曲线,应用不同的符号分别标明相应的测定点。

三、实验误差与提高实验准确度的方法

生物科学研究中常需要对组成生物体的几类主要化学物质如糖、脂肪、蛋白质、核酸、维生素、酶等进行定量测定。由于受分析方法、测量仪器、所用试剂和分析工作者等方面的限制,测量值与客观存在的真实值很难完全一致,即所有的测量都可能产生误差。了解这些误差的可能来源,才能尽量减少误差、提高实验准确度。根据误差的性质和来源,一般将误差分为系统误差和偶然误差两类。

(一) 系统误差及减少的方法

1. 系统误差 系统误差是在测定过程中由某些经常发生的原因所造成的。它对测定结果的影响比较稳定,在同一条件下重复测定中常重复出现,使测定结果不是偏高就是偏低,而且大小有一定规律,它的大小与正负往往可以测定出来,至少从理论上来说是可以测定的,故又称可测误差。主要有以下4个方面的来源:

(1) 方法误差:由采用的分析方法本身造成。如重量分析中沉淀物沉淀不完全或洗涤过程中少量溶解,给分析测定结果带来负误差,或由于与杂质共沉淀以及称量时沉淀吸水,引起正误差。又如滴定分析中,剂量点和滴定终点不完全符合等。

(2) 仪器误差:由仪器本身不够精密所产生,如天平、砝码和称量器皿本身不够准确,或没有根据实验的要求选择一定精密度的仪器等。

(3) 试剂误差:来源于试剂或蒸馏水所含微量杂质。

(4) 个人操作误差:由于每个分析工作者掌握操作规程、控制条件与使用仪器常有出入而造成。如不同操作者对滴定终点颜色变化的分辨判断能力有差异,个人视觉差异也常引起不正确读数。

2. 减少系统误差常采取的对策

(1) 标准物对照:在任何测试中,甚至在使用标定仪器和基准试剂时,都应使用待测物质的标准溶液。这种做法能对方法的准确度提供一种有用的检查,因为测量所得数据必须落在真实值范围之内。标准溶液应与待测溶液用完全相同的方法处理,此时可以画出一条能够指示用浓度测量物质量变的标准曲线,从待测溶液得到的测定值应落在标准曲线范围之内,然后读出测定数值;或者取标准物某一确定浓度的溶液与待测液以同样的方法、在相同条件下平行测定(标准物的组成最好与待测物相近,含量也相近),然后求平均值。

(2) 设置试剂空白:在任何测量实验中都应设置空白溶液作为对照,以消除由于试剂中



含有干扰杂质或溶液对器皿的侵蚀等所产生的系统误差。用等体积的试剂代替待测液作为试剂空白液,并在相同条件下将试剂空白液、待测液和标准液严格按照相同方法处理后同时进行平行测定,所得结果称为试剂空白值。它是由所用的试剂而不是待测物所造成的。将待测物的分析结果扣除空白值,就可以得到比较准确的结果。

(3) 校正仪器。

(二) 偶然误差及减少的方法

偶然误差来源于某些难以预料的偶然因素,或是由于取样不随机,或是因为测定过程中某些不易控制的外界因素(如测定时环境、温度、湿度和气压的微小波动)的影响。同一实验者在同样条件下进行一系列测定时,每一次测量的结果都略有不同,这就是偶然误差。平均取样及多次取样进行平行测定,并计算平均值,可以有效地减少偶然误差。

第二章 生物化学实验基本操作

一、玻璃仪器的洗涤

生物化学实验所用玻璃仪器清洁与否,是获得准确结果的重要环节。因为玻璃仪器不清洁或被污染,会增大实验误差,得不到真实可靠的实验结果。因此,实验之前,将玻璃仪器清洗干净(以倒置时管壁上不挂水珠为准),是非常重要的准备工作。

1. 一般玻璃仪器的洗涤 凡能用毛刷刷冲洗的仪器(如试管、烧杯、量筒等),先用自来水冲洗,再用毛刷蘸取洗衣粉或去污粉将仪器内外(特别是内壁)仔细洗刷,用自来水冲洗干净后,再用蒸馏水荡洗2~3次,倒置于仪器架上晾干备用。

2. 凡不能用毛刷刷洗的量器(如刻度吸管、容量瓶等),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)。从清洁液中取出并沥干后,用自来水冲洗干净,再用蒸馏水荡洗2~3次,倒置于量器架上晾干备用。

3. 新购量器表面常附有游离的碱性物质及泥污,可先用洗衣粉洗刷再用自来水洗净,然后浸泡在1%~2%氯化氢溶液中过夜(不少于4小时),再进一步洗涤,最后再用蒸馏水荡洗2~3次,倒置于仪器架上晾干备用。

二、吸量管的选择和使用

吸量管是生物化学实验中常用的量取液体的仪器,分为奥氏吸量管、移液管和刻度吸量管这3种。我们常用到的吸量管是有不同规格,如10ml、5.0ml、2.0ml、1.0ml、0.5ml、0.25ml、0.2ml、0.1ml的刻度吸量管、奥式吸量管及移液管,可任意量取0.01~10ml的液体。其选择和使用方法如下。

1. 选择 使用前根据需要使用适当的吸量管,其总容量最好等于或稍大于取液量。临用前看清容量和刻度。

2. 执管 用右手拇指及中指(辅以无名指),拿住吸量管的上部,用食指堵住管口控制液流,刻度数字要朝向操作者,切忌用大拇指堵住管口控制液流。

3. 取液 左手捏压洗耳球,手掌握住洗耳球的柄部,以免洗耳球在吸管上口滑动。将吸量管的尖端插入所取试剂液面下,将洗耳球的下端出口对准吸量管上口,将液体轻轻吸上,至最高刻度上端1~2cm处,迅速用食指按紧管上口,使液体不会从管下口流出。

4. 调准刻度 将吸量管从溶液中取出后,如果是取黏性较大的液体,必须先用滤纸擦干管尖外壁,然后用食指控制液流使之缓慢下降至所需刻度(此时液体弯月面底部、视线和刻度应在同一水平线上),右手食指立即按紧吸量管上口,使液体不再流出。

5. 放液 将吸量管转移至盛溶液的容器内,让吸管尖端接触容器内壁,但不能插入容器原有液体中,以免污染吸管及试剂。放松食指,让液体自然流出。放液后吸管尖端残留的液体是吹出还是不吹出,视所选用的吸量管种类要求而定。需要吹的则将其吹出;如要求不吹出的则让吸量管尖端停靠内壁约15s。如奥式吸管需吹出残留在管尖的液体,而移液管不能吹出管尖残留的液体,将管尖贴靠容器内壁约15s,转动移液管,重复一次。

6. 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;

吸一般试剂的吸管可不必马上冲洗,待实验结束后再仔细清洗。

三、可调式微量加样器的使用

在生物化学与分子生物学实验中常用可调式微量加样器来精确量取实验所需试剂,其规格常用有 1~20 μ l、10~50 μ l、100~500 μ l、200~1000 μ l 等,选择相应规格的吸头(Tip),在规定的容量范围内可根据需要随意调节取液量。具体使用方法如下。

1. 吸液 根据需要吸取的试剂量调准加样器容量,用右手握住加样器外壳,套上吸头,旋紧。用拇指按下推动按钮至第一段行程,将吸头尖口插入试剂液面下几毫米处,缓缓松开拇指,让推动按钮复原。在吸取液体时要注意避免形成气泡,以保证取液的精确度。

2. 放液 重新将拇指按下推动按钮至第二段行程,完成放液,反复一次。如果发现吸头尖口处仍残留有小液滴时,则应将吸头接触受器内壁,使液滴沿壁流下,同时拇指不能松开,以免液滴倒流。

四、生化实验样品的制备

在生物化学实验中,无论是分析组织中各种物质的含量,或是探索组织中的物质代谢过程,皆需利用特定生物样品。由于实验的特殊要求,往往需要将获得之样本预先做适当处理,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,有时也采用尿液做实验,组织样品则常用肝、肾、脾、胰、胃黏膜或肌肉等组织制成组织糜、组织匀浆、组织切片或组织浸出液,以用于各种生化实验。关于这些样品的制备方法,扼要介绍如下:

(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治血液凝固。一般在血液取出后,迅速盛于含有抗凝剂的试管内,同时轻轻摇动,使血液与抗凝剂充分混合,以免形成凝血小块。全血如不立即进行试验,应储存于冰箱中。

常用的抗凝剂有草酸盐、枸橼酸盐、氟化钠和肝素等,可视实验要求而定。一般情况下,用廉价的草酸盐即可,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作用,以免血糖分解。但氟化钠也能抑制脲酶,故用尿酶测定尿素是不能用。肝素虽好,但价格较贵,尚不能普遍应用。

抗凝剂用量不能过多,以免影响实验结果,通常每毫升血液加 1~2mg 草酸盐,5mg 枸橼酸钠或 5~10mg 氟化钠,肝素仅需要 0.01~0.2mg,最好将抗凝剂制成适当浓度的水溶液,然后取 0.5ml 置于准备盛血之试管中,再横放旋转蒸干(肝素不超过 30 $^{\circ}$ C),则抗凝剂在管壁上形成一层薄膜,使用较为方便,效果也好。

2. 血浆 上述抗凝的全血在离心机中离心,则血细胞沉淀,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)皆需清洁干燥,取出血液也不能剧烈振摇。

3. 血清 收集之血液不加抗凝剂,在室温下 5~20 分钟即自行凝固,通常经 3 小时,血

块收缩而析出血清,为促使血清分出,必要时可离心分离,这样可缩短时间,并取得较多的血清。

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,应及早分离出血清,因为放置过久,血块中血球也可能溶血。

4. 无蛋白血滤液 许多生化分析要避免蛋白质的干扰,往往先将其中蛋白质沉淀而去除。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。蛋白质沉淀剂钨酸、三氯乙酸或氢氧化锌皆可用于制备无蛋白血滤液,可根据不同的需要加以选择。

(二) 尿液样品

一般定性实验只需将尿液收集一次即可,但一天之中各次排出尿液的成分随食物、饮水及昼夜内的生理变化等影响而有很大的差异,因此定量测定尿液中的各种成分皆应收集 24 小时尿混合后取样。通常在早晨一定时间排出残余尿而弃去,以后每次尿皆收集在清洁大玻璃瓶中,到第二天早晨同一时间收集最后一次尿,随即混合并用量筒量准其体积。

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时,在收集的玻璃瓶中加入防腐剂如甲苯、盐酸等,通常每升尿中约加入 5.0ml 的甲苯或盐酸即可。

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

(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,研究各种物质代谢的途径与酶系的作用,也可以从组织中提取各种代谢物质或酶进行研究。

但是各组织器官离体过久后,都会发生变化,例如组织中的酶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,利用离体组织做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,立即取出实验所需的脏器或组织,去除外层的脂肪及结缔组织后,用冰冷的生理盐水冲洗去血液,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,即可做实验之用。取出的脏器或组织,可根据不同的目的,用不同的方法制成不同的组织样品。

1. 组织糜 将组织用剪刀迅速剪碎,或用绞肉机绞成糜状即可。

2. 组织匀浆 新鲜组织称取重量后剪碎,加入适当的匀浆制备液,用高速电动匀浆器(waringlilendey)或用玻璃匀浆管打碎组织。后者是由一个特制的厚壁毛玻璃管及一端带有磨砂玻璃杵头的玻璃杵所组成。杵头的外壁必须紧靠玻璃管的内壁,应用时将玻璃杵与可以调节速度的电动马达相连接。并将匀浆管通过打洞的软木塞插入盛有冰块的广口瓶中,然后将剪碎的组织悬浮于少量匀浆制备液中,倒入匀浆管,再将玻璃杵插入管中,然后开动马达,调节其转动速度,使杵头紧靠着玻璃管内壁而旋转,小心地将套有匀浆管之广口瓶上下移动,以使杵头在玻管中上下移动,如此依靠杵头与玻璃管壁迅速研磨作用,可将组织磨碎而制成匀浆。由于匀浆器的刀片或匀浆管的杵头快速转动,摩擦生热,因此,一般在匀浆时,需要将匀浆器或匀浆管置于冰浴中。

常用的匀浆制备液有生理盐水、缓冲液、Kreb-Ringer 溶液及 0.25mol/L 蔗糖等。可根据实验之不同要求,加以选择。

3. 组织浸出液 将上法制成的组织匀浆加以离心,其上清液即为组织浸出液。

五、试管中液体的混匀法

生物化学实验常需将几种先后加入的试剂混匀,使其充分反应,因此“混匀”是生化实验中常用的基本操作技术。用于试管中液体混匀的方法主要有以下几种。

1. 甩动法 是生物化学实验中最常用的方法。适用于试管中液体较少时,具体操作为右手持管上部,将试管轻轻甩动振摇即可将管内液体混匀。

2. 弹敲法 右手持管上部,将试管的下部在左手掌心弹敲,也适用于试管中液体不多时。

3. 旋转法 右手握住试管上端,五指握紧试管,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。适用于试管中液体较多时或小口器皿,如锥形瓶。

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。适用于成倍稀释某种液体时。

5. 倒转法 以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时。

6. 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),手持容器于振荡器的工作台上即可将液体混匀。

7. 玻棒搅拌法 如用上述方法尚不能将液体混匀,可用玻棒搅拌混匀之。

第二篇 常用技术

第一章 分光分析技术

一、分光分析的基本原理

分光分析是利用物质特有的吸收光谱,对物质作定性或定量检测的一项常用技术。有色溶液对光线有选择性吸收作用,不同物质因其分子结构各异,故对不同波长光线的吸收能力也不同,因此,每种物质都有其特异的吸收光谱。光线是一种电磁波,其中可见光的波长范围大约由 760nm(红色)到 400nm(紫色);波长小于 400nm 的光线称为紫外线,波长大于 760nm 的光线称为红外线。

当光线通过某种真溶液时,其中一部分光线可以透过,另一部分光线则被溶液所吸收。该现象可用于某些物质的定性或定量分析。

分光分析法的理论依据是 Lambert 和 Beer 定律。该定律阐明了溶液对单色光吸收的多少与溶液的液层厚度和浓度之间的定量关系。

(一) Lambert 定律

当一束单色光通过某一真溶液时,由于溶液吸收一部分光能,使入射光的强度减弱。若该溶液的浓度固定不变,则溶液的厚度越大,光线强度的减弱也越显著。

设光线原来的强度(入射光强度)为 I_0 ,当其通过厚度为 L 的液层后,其强度减弱为 I (透过光强度),则表示光线透过该溶液的程度,称为透光度,以 T 表示:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

透光度的负对数($-\lg T$)与溶液液层的厚度成正比,即:

$$-\lg T = -\lg \frac{I}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I} \propto L$$

将上式写成等式,得

$$\lg \frac{I_0}{I} = K_1 L$$

式中 K_1 为比例常数,又称为吸光率,其数值决定于入射光线的波长、溶液的性质、浓度和溶液的温度等。 $\lg \frac{I_0}{I}$ 又称为光密度(D)或吸光度(A)。因此

$$D = K_1 L \quad (1)$$

式(1)表明,当溶液的浓度不变时,光密度与溶液液层的厚度成正比,这就是 Lambert 定律。

(二) Beer 定律

当一束单色光通过某一真溶液,当溶液液层的厚度相同而浓度不同时,溶液的浓度越大,则透射光的强度越弱,其定量关系如下:

$$\lg \frac{I_0}{I} = K_2 C$$

$$D = K_2 C \quad (2)$$

式(2)中 C 为溶液的浓度, K_2 为比例常数(吸光率),其数值决定于入射光的波长、溶液的性质、浓度和溶液的温度等。

式(2)表明:当溶液液层的厚度不变时,光密度与溶液的浓度成正比,此即 Beer 定律。

(三) Lambert-Beer 定律

如果同时考虑液层厚度和溶液浓度对光吸收的影响,则必须将 Lambert 定律和 Beer 定律结合起来,得到

$$\lg \frac{I_0}{I} = KLC$$

$$D = KLC \quad (3)$$

即光密度与溶液液层的厚度和溶液的浓度之乘积成正比,此即 Lambert-Beer 定律。

式(3)中 K 为比例常数。若溶液的浓度用克分子浓度表示,液层的厚度用 cm 表示,则 K 写成 E ,得到

$$D = ELC \quad (4)$$

式(4)中 E 称为克分子吸光系数,不同的物质,有不同的克分子吸光系数, E 值越大,说明溶液对光的吸收越强。

在实际工作中,待测溶液的浓度必须与已知浓度的标准溶液相比而得到。设一标准溶液浓度为 $C_{\text{标}}$,并测得光密度为 $D_{\text{标}}$,待测溶液的浓度为 $C_{\text{未}}$,测得其光密度为 $D_{\text{未}}$ 。根据 Lambert-Beer 定律:

$$D_{\text{未}} = KC_{\text{未}} L$$

$$D_{\text{标}} = KC_{\text{标}} L$$

将上述式子写成比例式:

$$\frac{D_{\text{未}}}{D_{\text{标}}} = \frac{KC_{\text{未}} L}{KC_{\text{标}} L}$$

在操作时,所用波长一样,且标准溶液与未知浓度的溶液性质完全相同,故二者的 K 值相等。又因为二溶液用相同厚度的比色杯比色,故

$$\frac{D_{\text{未}}}{D_{\text{标}}} = \frac{C_{\text{未}}}{C_{\text{标}}}$$

$$\therefore C_{\text{未}} = \frac{D_{\text{未}}}{D_{\text{标}}} \times C_{\text{标}} \quad (5)$$

$C_{\text{未}}$ 的单位随 $C_{\text{标}}$ 的单位而定。在生化分析中,最后需计算出每 100ml 血液(或 100g 组织)中某物质的含量,所以在利用(5)式计算出待测液中物质的含量后,尚需乘以 $100/V$,才能得出每 100ml 血液(或 100g 组织)中该物质的含量。 V 是制备比色待测液时生物样品(血

液、血浆、血清、组织)的净用量。得公式如下:

$$\text{每 } 100\text{ml (或 g) 样品中物质含量} = \frac{D_{\text{未}}}{D_{\text{标}}} \times C_{\text{标}} \times \frac{100}{V} \quad (6)$$

(6)式是生化实验中常用的分光分析的基本计算公式,必须熟练掌握和应用。

二、分光分析法

根据光吸收的定量定律,设计了各种吸收光谱类仪器,以利用物质吸收光谱的特性及吸收定律而进行物质定量分析。此类仪器应用范围极广,从可见光区到红外光区均有。如常见的光电比色计、可见光区、紫外光区及红外光区分光光度计、原子吸收分光光度计等。这些仪器从设计和基本结构上来看,都有光源、光线波长的选择装置、样品吸收池、光电效应器及检测器等,它们的一个共同原理是把光能最后变成电能,并采用初级的仪表直读式或荧光屏显示及数据自动打印等自动化程度不同的检测程序来显示光电能的变化。

分光光度计是一类吸收光谱分析仪器。从原理上看,它们与曾经被广泛使用过但目前已基本被淘汰了的光电比色计(如我国生产的 581-G 型光电比色计)基本相同。从结构上看,它们与光电比色计的主要区别在于此类仪器均使用了“单色器”来取代光电比色计的“滤色片”装置,因而可以从含有不同波长的光源中,分离出实验所需要的较纯的单色光。所以,与光电比色计相比,分光光度计的优点是:能提高测定的灵敏度和准确度;不仅可用于可见光,还可以用于紫外光区和红外光区;可以测定共存于同一溶液中的两种或两种以上的物质;对无色溶液也可以测定,扩大了应用范围;可以测定溶液中物质的含量,还可借助物质特异的吸收光谱以鉴定物质的种类。

分光光度计的种类很多,性能各有其异。从仪器的光源灯泡所能发射出的波长上看,有适用于可见光区的分光光度计,使用的波长范围在 400 ~ 760nm;有适用于紫外光区测定的分光光度计,使用的波长范围为 200 ~ 400nm;有可见紫外两用分光光度计,使用的波长范围为 200 ~ 760nm;还有近红外分光光度计等。从记录方式上看,分仪表直读手记式和自动记录式。从光学系统设计上看,有单光束、双光束及单波长、双波长之区别。分光光度计一般由光源、单色光器(包括分光系统、光路狭缝)、样品室、检测器(包括光电原件、读数放大系统)以及各部分的电源等部分组成。

以下介绍几种常用的分光光度计:

(一) 722s 分光光度计

722s 分光光度计是一种简捷易用的分光分析法通用仪器,能在 340 ~ 1000nm 波长范围内执行透过率、吸光度和浓度直读测定,可广泛适用于医学卫生、临床检验、生物化学、石油化工、环保监测、质量控制等部门作定性定量分析。

722s 分光光度计的基本操作方法如下:

1. 预热 仪器开机后光源及电子部分需热平衡,故开机预热 30 分钟后才能进行测定工作,如紧急应用时请注意随时调 0、调 100% T。

2. 调整波长 使用波长调节钮,调整仪器当前测试波长,具体波长由旋钮左侧的显示窗显示,读出波长时目光应垂直显示窗。

3. 调零 打开样品室盖板(关闭光门)或用不透光材料在样品室中遮断光路,然后按