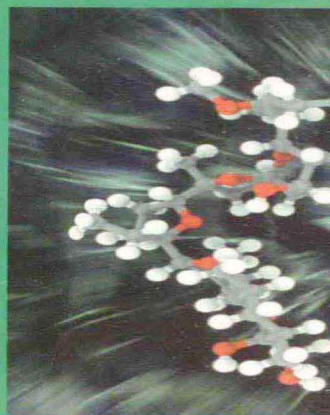


普通高等教育“十二五”规划教材
全国高等院校规划教材

动物生物化学 实验指导

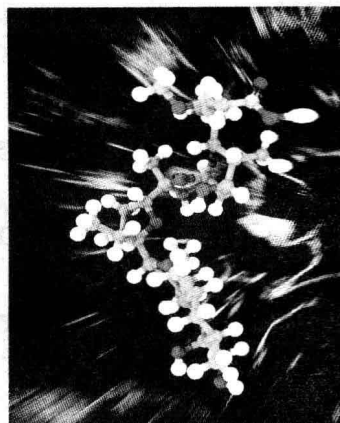


主编 李留安 袁学军

清华大学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材
全国高等院校规划教材

动物生物化学 实验指导



主编 李留安 袁学军

清华大学出版社
北京

内 容 简 介

动物生物化学实验是高等农林院校中动物科学、动物医学等专业必修课,在培养学生基本实验技能等方面具有重要作用。本教材共分8章,包括41个实验。第1章介绍动物生物化学实验基本知识;第2章介绍动物生物化学常用实验技术原理;第3章至第8章依次介绍蛋白质实验、酶学实验、维生素实验、核酸实验、糖类实验和脂类实验。本教材详略得当,脉络清晰,有利于学生掌握实验基本理论和技能。

版权所有,侵权必究。侵权举报电话:010-62782989 13701121933

图书在版编目(CIP)数据

动物生物化学实验指导/李留安,袁学军主编. —北京:清华大学出版社,2013

普通高等教育“十二五”规划教材 全国高等院校规划教材

ISBN 978-7-302-32431-7

I. ①动… II. ①李… ②袁… III. ①动物学—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(2013)第105252号

责任编辑:罗 健 王 华

封面设计:戴国印

责任校对:刘玉霞

责任印制:宋 林

出版发行:清华大学出版社

网 址: <http://www.tup.com.cn>, <http://www.wqbook.com>

地 址:北京清华大学学研大厦A座 邮 编:100084

社总机:010-62770175 邮 购:010-62786544

投稿与读者服务:010-62776969, c-service@tup.tsinghua.edu.cn

质 量 反 馈:010-62772015, zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn

印 装 者:北京鑫海金澳胶印有限公司

经 销:全国新华书店

开 本:185mm×260mm 印 张:9.25 字 数:230千字

版 次:2013年7月第1版 印 次:2013年7月第1次印刷

印 数:1~3000

定 价:19.80元

产品编号:051045-01

前言

动物生物化学实验是高等农林院校中动物科学、动物医学、动物药学、动植物检疫、水产养殖等相关专业的必修课程，在培养学生的基本实验技能和生物学素养方面具有重要作用。本教材共分8章，包括41个具体实验。第1章介绍动物生物化学实验基本知识；第2章介绍动物生物化学常用实验技术原理；第3章至第8章依次介绍蛋白质实验、酶学实验、维生素实验、核酸实验、糖类实验和脂类实验。教材在编写过程中着重体现以下特色：

(1) 详略得当，脉络清晰，有利于学生掌握实验基本理论和技能。

(2) 先介绍相关动物生物化学实验的基本知识和技术原理，再按照生物高分子的分类逐一介绍每个实验，利于学生理解和学习。

(3) 教材结合全国10多所农林院校动物生物化学实验课程的具体开设情况，合理组织编写内容，利于各高校相关专业的使用。

本教材编写的具体分工为：李留安（第1章、第2章、附录）、袁学军（实验14、15、17、27、30）、杨文（实验11、12、13）、葛亚明（实验20、21、22、24）、王俊斌（实验2、6、7、23、33）、万善霞（实验8、28）、马盛群（实验9、19）、庞坤（实验1、10）、崔明勋（实验4、40、41）、邝雪梅（实验25、31、39）、杜改梅（实验34、35、36）、白靓（实验3、5、32）、李淑梅（实验16、37、38）、赵素梅（实验18）、张永云（实验26）、李卫真（实验29）。

本教材的编写得到了天津农学院、山东农业大学、清华大学出版社等单位的大力支持，在此一并表示衷心的感谢！

在编写过程中，尽管各位编者都高度负责，对稿件进行了多次修改和检查，主编对全部章节逐一进行了多次校对，但由于生物化学实验学科发展迅速，加之我们经验不足，书中错误之处在所难免，敬请同行和使用者不吝赐教，以便再版修订。

李留安

2013年5月28日于天津

目录

第1章 动物生物化学实验基本知识	1
第1节 动物生物化学实验室规则及安全防护常识	1
一、实验室规则	1
二、安全防护常识	2
第2节 动物生物化学实验基本操作技术	4
一、玻璃仪器的洗涤	4
二、吸量管的选择使用	5
三、可调式微量加样器的使用	5
四、试管中液体的混匀法	6
第3节 常规实验样品的处理	6
一、血液样品的制备	6
二、组织样品的制备	10
三、生物高分子的制备	11
第4节 实验报告的撰写要求	15
一、实验记录	15
二、定性实验报告的书写格式	15
三、定量实验报告的书写格式	16
第2章 动物生物化学常用实验技术原理	17
第1节 离心技术	17
一、离心技术的基本原理	17
二、离心机的主要类型和构造	18
三、常用的离心方法	20
四、离心操作的注意事项	21
第2节 分光光度技术	22
一、分光光度技术的原理	22

二、分光光度计的组成和构造	22
三、分光光度技术的应用	24
四、其他光谱分析技术	24
第3节 电泳技术	25
一、影响电泳的因素	25
二、电泳的分类	26
三、电泳所需的仪器	27
四、电泳分析常用的方法	28
五、电泳技术的应用领域	31
第4节 层析技术	32
一、吸附层析	32
二、分配层析	33
三、离子交换层析	34
四、凝胶层析	35
五、亲和层析	36
第3章 蛋白质实验	37
实验1 蛋白质含量的测定	37
实验2 蛋白质的两性反应及等电点的测定	44
实验3 醋酸纤维素薄膜电泳法分离动物血清蛋白质	45
实验4 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白	47
实验5 蛋白质相对分子质量的测定——SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	50
实验6 血清乳酸脱氢酶同工酶的分离与鉴定——聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳法	52
实验7 血清 γ 球蛋白的分离——分子筛凝胶层析法	55
实验8 凝胶过滤层析法分离血红蛋白	58
实验9 氨基酸纸层析	60
实验10 牛乳中酪蛋白的提取和性质鉴定	62
第4章 酶学实验	64
实验11 唾液淀粉酶活性的观察	64
实验12 碱性磷酸酶的分离制备及活性测定	67
实验13 应用纸层析法鉴定酶促转氨基作用	71
实验14 精氨酸激酶的分离纯化及活力测定	74
实验15 过氧化氢酶 K_m 值的测定	76
实验16 血清中谷丙转氨酶活性的测定	78
实验17 糖酵解中间产物的鉴定	80
实验18 琥珀酸脱氢酶的作用及其竞争性抑制的观察	82
实验19 大豆制品中脲酶活性的检测	84

第 5 章 维生素实验	87
实验 20 维生素 B ₁ 含量测定	87
实验 21 维生素 B ₂ 含量测定	88
实验 22 维生素 A 含量测定	89
实验 23 维生素 C 含量测定——2,6-二氯酚靛酚法	91
实验 24 维生素 D 含量测定	93
第 6 章 核酸实验	96
实验 25 动物肝脏中 DNA 的提取	96
实验 26 全血基因组 DNA 的提取——离心柱型试剂盒提取法	98
实验 27 酵母 RNA 的提取、组分鉴定及含量测定	99
实验 28 紫外吸收法测定核酸含量	101
实验 29 用琼脂糖凝胶电泳法鉴定核酸	103
实验 30 聚合酶链式反应实验技术应用	106
第 7 章 糖类实验	108
实验 31 血糖的测定	108
实验 32 动物肝糖原的提取与鉴定	111
实验 33 还原糖含量的测定——3,5-二硝基水杨酸比色法	113
第 8 章 脂类实验	115
实验 34 粗脂肪的索氏提取	115
实验 35 血清总脂含量的测定	117
实验 36 血清游离脂肪酸含量的测定	118
实验 37 血清总胆固醇含量的测定——磷硫铁法	120
实验 38 卵磷脂的提取与鉴定	121
实验 39 肝组织的生酮作用	122
实验 40 脂肪酸的 β -氧化	124
实验 41 脂类的提取和薄层层析分离	126
附录	128
附录 1 实验室常用液体的配制	128
附录 2 常用酸碱的一般参数	130
附录 3 常用凝胶的技术参数	130
附录 4 常用核酸和蛋白质相对分子质量标准	132
附录 5 常用储存液的配制	133
参考文献	137

二、安全防护常识

在生物化学实验室里，失火、触电、中毒、爆炸、外伤、生物伤害的危险时刻存在，因此，每一位工作人员及学生都必须有高度的安全意识、严格的防范措施和丰富的防护救治知识。一旦发生意外能够迅速进行正确的处置，以防事故进一步扩大。

(一) 失火

生物化学实验室经常使用一些有机溶剂，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，因此容易发生失火事故。常用有机溶剂及其易燃特性见表 1-1。

表 1-1 常用有机溶剂及其易燃特性

℃

名称	沸点	闪点	自燃点
乙醇 (95%)	78	12	400
乙醚	34.5	-40	180
苯	80	-11	550
丙酮	56	-17	538
二硫化碳	46	-30	100

注：闪点指液体表面的蒸汽和空气混合物遇到明火或火花时着火的最低温度；自燃点指液体蒸汽在空气中自燃的温度。

由表 1-1 可以看出，乙醚、二硫化碳、丙酮和苯的闪点都很低，因此不能存放于可能会产生电火花的普通冰箱内。低闪点液体的蒸汽只需接触红热物体的表面便会起火，其中二硫化碳尤其危险。预防火灾必须严格遵守以下操作规程：

(1) 不得在烘箱内存放、烘焙有机物。

(2) 废弃有机溶剂不得倒入废物桶，只能倒入回收瓶，以便集中处理；量少时用水稀释后排入下水道。

(3) 严禁在密闭体系和开口容器中用明火或微波炉加热有机溶剂，只能使用加热套或水浴加热。

(4) 在有明火的实验台面上，严禁放置开口的有机溶剂或倾倒有机溶剂。

实验室一旦发生火灾切不可惊慌失措，要保持冷静，根据具体情况采取正确的灭火措施，情况严重时，需立即拨打火警电话 119。常用的灭火方法如下：

(1) 乙醇、丙酮等可溶于水的有机溶剂着火时，可以用水灭火；乙醚、汽油、甲苯等有机溶剂着火时，不能用水灭火，只能用沙土或灭火毯盖灭。

(2) 容器中的易燃物起火时，用灭火毯盖灭。因石棉有致癌性，故常用玻璃纤维布做灭火毯。

(3) 导线、电器和仪器着火时，不能用水和二氧化碳灭火器灭火，应先切断电源，然后用 1211 灭火器（内装二氟一氯一溴甲烷）灭火。

(4) 个人衣物着火时，切勿慌张奔跑，以免火势变大，应迅速脱掉着火衣物，用水龙头浇水灭火，火势过大时可就地打滚压灭火焰。

(二) 触电

当 50Hz 的电流通过人体，电流强度达到 25mA 时，会使人体发生呼吸困难，电流强度

达到 100mA 以上时会使人致死。生化实验室经常使用烘箱和电炉等大功率用电设备,因此每位实验人员都必须熟练掌握安全用电常识,避免发生用电事故。

1. 防止触电 ① 不能用湿手接触电器;② 电源裸露部分都应绝缘处理;③ 仪器使用前先要检查外壳是否带电;④ 破损的接头、插头、插座和不良导线应及时更换;⑤ 先接好线路再插接电源,反之先关电源再拆线路;⑥ 如有人触电,先要切断电源再救人。

2. 防止电器着火 ① 电源线、保险丝的截面积、插头和插座都要与使用的额定电流相匹配;② 3 条相线要平均用电;③ 生锈的电器、接触不良的导线要及时处理;④ 电炉、烘箱等电热设备不可过夜使用;⑤ 仪器长时间不用时,须拔下插头并及时拉闸;⑥ 电器电线着火时,不可用泡沫灭火器灭火。

(三) 爆炸

生化实验室防止爆炸事故发生是极其重要的,因为一旦爆炸,后果十分严重。常见的易燃物质蒸汽在空气中的爆炸极限见表 1-2。

表 1-2 易燃物质蒸汽在空气中的爆炸极限

名 称	爆炸极限 (体积分数) (%)	名 称	爆炸极限 (体积分数) (%)
丙酮	2.6~13	乙醚	1.9~36.5
乙醇	3.3~19	甲醇	6.7~36.5
乙炔	3.0~82	氢气	4.1~74.2

加热时会发生爆炸的混合物:浓硫酸和高锰酸钾、有机化合物和氧化铜、三氯甲烷和丙酮等。

引起爆炸事故的常见原因:① 随意混合化学药品,并使其受热、摩擦和撞击;② 在密闭体系中进行蒸馏、回流等加热操作;③ 易燃易爆气体大量溢入室内;④ 在加压或减压实验中使用不耐压的玻璃仪器,或反应过于激烈而失去控制;⑤ 高压气瓶减压阀摔坏或失灵;⑥ 使用微波炉加热金属物品。

(四) 外伤

1. 化学灼伤

(1) 酸灼伤:先用大量水冲洗,再用稀碱液或稀氨水浸洗,最后再用水冲洗。

(2) 碱灼伤:先用大量水冲洗,再用 1% 硼酸或 2% 醋酸浸洗,最后再用水冲洗。

(3) 溴灼伤:这种灼伤的伤口不易愈合,须立即用 20% 的硫代硫酸钠冲洗,再用大量水冲洗,包上消毒纱布后就医。

(4) 眼睛灼伤:眼内若溅入任何化学药品,应立即用大量清水冲洗 15min,不可用稀酸或稀碱冲洗。

2. 割伤 这是生化实验室中常见的伤害,要特别注意预防,尤其是在向橡皮塞中插入温度计或玻璃管时一定要用甘油或水润滑,用布包住玻璃管轻轻旋入,切不可用力过猛,若发生严重割伤时应立即包扎止血,并迅速就医处理。

3. 烫伤 使用蒸汽、火焰、红热的玻璃和金属时易发生烫伤,应立即用大量水冲洗和浸泡,若已起水泡,不可挑破,包上纱布后就医,轻度烫伤可涂抹鱼肝油和烫伤膏等。

4. 眼睛掉入异物 若有玻璃碎片进入眼内,必须十分小心谨慎,不可自取,不可转动眼

球，可任其流泪，若碎片不能排出，则用纱布轻轻包住眼睛，急送医院处理。若有木屑、尘粒等异物进入眼中，可由他人翻开眼睑，用消毒棉签轻轻取出或任其流泪，待异物排出后再滴几滴鱼肝油。

实验室应准备一个小药箱，专供急救时使用。药箱内需备物品：医用酒精、紫药水、红药水、创可贴、止血粉、鱼肝油、烫伤油膏（或万花油）、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、纱布、医用镊子和剪刀、棉签、药棉、绷带等。

（五）中毒

生化实验室常见的有毒物：砷化物、氰化物、甲醇、乙腈、氯化氢、汞及其化合物等。常见的致癌物质：砷化物、石棉、溴化乙锭、铬酸盐、丙烯酰胺和芳香化合物等。中毒主要由不慎吸入、误食或由皮肤渗入等原因造成。

中毒的预防：①使用有毒或有刺激性气体时，必须戴防护眼镜，并应在通风橱内进行；②取用有毒物品时必须戴橡皮手套；③严禁在实验室内饮水、进食、吸烟，严禁用嘴吸移液管，禁止赤膊和穿拖鞋；④不能用乙醇等有机溶剂擦洗溅洒在皮肤上的药品。

中毒急救的主要方法：①误食酸或碱，不要催吐，可立即大量饮水。误食酸者，饮水后再服氢氧化镁乳剂，最后喝些牛奶；误食碱者饮水后再喝些牛奶；②误吸入毒气后，应立即转移到室外，对休克者应施以人工呼吸，但不要对口对法；③砷和汞中毒者应立即送医院急救。

（六）生物伤害

生物材料如微生物或动物的组织、细胞培养液、血液、分泌物都可能存在细菌和病毒感染的潜在危险，这虽不如上述伤害明显，但也绝不可忽视。如通过血液感染的多种传染性疾病就是常见的生物伤害，感染途径除通过血液外，也能通过其他体液传播，因此在处理各种生物材料时必须谨慎、小心，做完实验后须用肥皂、洗涤剂或消毒液充分清洗双手。

使用微生物作为实验材料，特别是使用和接触含病原的生物材料时，尤其要注意安全和清洁卫生。被污染的物品必须进行高压消毒或烧成灰烬，被污染的玻璃用具应在清洗和高压灭菌之前立即浸泡在适当的消毒液中。

（七）放射性伤害

放射性核素在生化实验中应用越来越普遍，放射性伤害也应引起实验者的高度警惕。放射性核素的使用须在指定的具有放射性标志的专用实验室中进行，切忌在普通实验室中操作和存放带有放射性核素的材料。

第2节 动物生物化学实验基本操作技术

一、玻璃仪器的洗涤

生物化学实验中所用玻璃仪器清洁与否，是获取准确结果的重要环节。因为玻璃仪器不清洁或被污染，会造成实验误差，得不到正确的实验结果。因此，在实验之前，将玻璃仪器

清洗干净（以倒置时玻璃管壁不挂水珠为准）是非常重要的准备工作。

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

2. 不能用毛刷刷洗的量器的洗涤 如容量瓶、刻度吸管等，应先用自来水冲洗、沥干，再用重铬酸钾清洗液浸泡4~6h（或过夜），从清洗液中取出并沥干后，用自来水冲洗干净，再用蒸馏水刷洗2~3次，倒置于仪器架上晾干备用。

3. 新购量器的洗涤 新购量器表面常附有碱性物质及泥污，可先用洗衣粉洗刷再用自来水洗净，然后浸泡在1%~2%的盐酸溶液中过夜（不少于4h），再进一步洗涤，最后再用蒸馏水刷洗2~3次，倒置于仪器架上晾干备用。

二、吸量管的选择使用

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3种。常用的是刻度吸量管，有不同的规格，如0.1ml、0.5ml、1ml、2ml、5ml、10ml等几种，可任意量取0.01~10ml的液体。其选择和使用方法具体如下。

1. 选择 使用前根据需要选择合适的吸量管，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. 持管 用右手拇指及中指（辅以无名指）拿住吸量管上部，用示指堵住上管口控制液流，刻度数字要向着自己，切忌用大拇指堵住管口控制液流。

3. 取液 左手捏压洗耳球，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，然后用示指控制液流使之缓慢降至所需刻度（此时液体凹面底部、视线和刻度应在同一水平线上），右手示指立即按紧吸量管上口，使液体不再流出。

5. 放液 将吸量管转移至盛有所取溶液的容器内，让吸量管尖端接触容器内壁，但不能插入容器原有液体中，以免污染吸量管及试剂。放松示指让液体自然流出。放液后吸量管尖端残留的液体吹出与否，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，同时转动吸管，重复1次。

6. 洗涤 吸取血液、尿、组织样品及黏稠样品的吸量管，用后应及时用自来水冲洗干净；吸一般试剂的吸量管可不必马上冲洗，待实验结束后再仔细清洗。

三、可调式微量加样器的使用

在生化实验中，常用可调式微量加样器来精确量取实验所需试剂，其规格有2.5 μ l、10 μ l、20 μ l、100 μ l、200 μ l、1000 μ l及5000 μ l等，选择相应规格的吸头，在规定的容量范围内可根据需要随意调节取液量。可调式微量加样器的具体使用方法如下。

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1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2段行程,完成放液,反复1次。如果发现吸头尖口处仍残留有液滴时,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,以免液滴倒流。

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常常是实验成败的关键环节。常用于试管中液体混匀的方法有下列几种。

1. 弹敲法 右手持管上部,将试管的下部在左手掌心弹敲。此法适用于液体较少时。
2. 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。
3. 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。成倍稀释某种液体时往往采用此法。
4. 旋转法 右手掌心顶住试管上口,五指捏紧试管,利用腕力使管向一个方向作圆周运动,使管内液体造成旋涡而混匀。该法适用于试管中液体较多或小口器皿,如锥形瓶等。
5. 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,一般可用玻璃棒搅拌或用磁力搅拌器搅拌混匀。

第3节 常规实验样品的处理

在动物生物化学实验中,无论是分析组织中各种物质的含量,还是研究组织中物质代谢的过程,皆需利用特定的生物样品。为了达到一定的实验目的,往往需要将获得的样品预先进行适当的处理。掌握实验样品的正确处理方法是做好动物生物化学实验的先决条件。

最常用的动物样品有全血、血清、血浆及无蛋白血滤液等。组织样品则常用肝、肾、胰、胃黏膜或肌肉等,实验时可制成组织匀浆、组织糜、组织切片或组织浸出液等形式。有关这些血液或组织样品的制备方法,扼要介绍如下。

一、血液样品的制备

血液是生化分析中重要的样品之一。血液中各成分的分析结果是了解机体代谢变化的重要指标,因此必须掌握正确的血液样品的采集、处理及其制备方法。

(一) 采血前的准备工作

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,如血浆皮质醇的含量在早晨较高而在傍晚较低,至午夜降到最低水平;血清中铁的含量也有类似的波动;有些成分在动物进食前后有所改变,且进食后血清容易出现浑浊,影响和干扰结果的准确性,如血糖、血脂、总胆固醇、肝功能指标等。因此采血应在空腹或禁食一定时间后进行,这样可以将食物对血液中各种成分浓度的影响减小到最低限度。

2. 采血器具的准备 采血器皿及容器都必须清洁,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缓缓注入盛血容器内。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。为防止传染性疾病的产生和蔓延，尽量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，进而影响实验结果的准确性。例如，实验操作过程中动作简单粗暴，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要有爱心，动作要轻柔。

(二) 常用实验动物的采血部位及采血量

各种实验动物的采血部位与方法，与动物种类、检测目的、实验方法以及所需血量有关。常用的采血部位有眼眶静脉丛采血、尾静脉采血、断头采血、心脏采血、腋下静脉采血、颈静脉（动脉）采血、腹主动脉采血、股动脉采血、耳静脉采血、后肢外侧皮下小隐静脉和前肢内侧皮下头静脉采血等。

采血时要注意采血场所要有充足的光线，夏季室温最好保持在 25~28℃，冬季 20~25℃ 为宜，采血用具和采血部位要消毒。若需抗凝血，应在注射器或试管内预先加入抗凝剂。所需采血量应控制在动物的最大安全采血量范围内。不同动物采血部位和采血量的关系见表 1-3。

表 1-3 不同动物的采血部位和采血量

采血量	采血部位	动物品种	
取少量血	尾静脉	大鼠、小鼠	
	耳静脉	兔、犬、猫、猪、山羊、绵羊	
	眼眶静脉丛	兔、大鼠、小鼠	
	舌下静脉	犬	
	腹壁静脉	青蛙、蟾蜍	
取中量血	后肢外侧皮下小隐静脉	犬、猴、猫	
	前肢内侧皮下头静脉	犬、猴、猫	
	耳中央动脉	兔	
	颈静脉	犬、猫、兔	
	心脏	豚鼠、大鼠、小鼠	
	断头	大鼠、小鼠	
	翼下静脉	鸡、鸭、鹅、鸽	
	颈动脉	鸡、鸭、鹅、鸽	
	取大量血	股动脉、颈动脉	犬、猴、猫、兔
		心脏	犬、猴、猫、兔
颈动脉		马、牛、山羊、绵羊	
摘眼球		大鼠、小鼠	

实验动物的采血量、血量占体重的百分比、血浆量、最大安全采血量和最小致死采血量见表 1-4。

表 1-4 常用实验动物的血容量和采血量

动 物	全血量 (ml/kg)	血量占体重 (%)	血浆量 (ml/kg)	常规采血量 (ml)	最大安全采血量 (ml/kg 或 ml)	最小致死采血量 (ml)
小鼠	74.5±17.0	6.0~7.0	48.8±17.0	0.10	7.7 0.1	>0.3
大鼠	58.0±14.0	6.0~7.0	31.3±12.0	0.50	5.5 1.0	>2.0
豚鼠	74.0±7.0	6.0~7.0	38.8±4.5	1.0	7.7 5.0	>10.0
家兔	69.4±12.0	6.0~7.0	43.5±9.1	1.0	7.7 10.0	>4.0
猫	84.6±14.5	6.0~7.0	47.7±12.0	1.0	7.7	
鸡	95.5±24.0	8.8~10.0	65.6±12.5	1.0	9.9 15.0	>30.0
犬	92.6±24.0	8.0~9.0	53.8±20.1	3.00~5.00	9.9 50.0	200
猴	75.0±14.0	6.0~7.0	47.7±13.0	2.00	6.6 15.0	>60.0
猪	69.4±11.5	5.0~6.0	41.9±8.9	5.00~10.00	6.6	
绵羊	58.0±8.5	6.0~7.0	41.9±12.0	5.00~20.00	6.6 300.0	>1500
乳牛	57.4±5.5	6.0~7.0	38.8±2.51	0.00~20.00	7.7	
马	72.0±15.0	6.0~11.0	51.5±12.0	10.0~20.00	8.8	

(三) 血液采集时的注意事项

1. 在采血时要避免溶血 溶血将造成成分混杂，引起测量误差。
2. 静脉血和动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外，静脉血中乳酸含量比动脉血中略高。
3. 整个试验期间，采取的血液样品须保持时间一致 在昼夜之间，或动物在饥饿与饱食的不同状态下，血液成分往往有较大不同。因此整个试验期间，选择采取血液样品的时间必须一致。另外，也应注意多次采血检测结果时，采血后测定时间、室温、试剂盒批号（或用主要试剂）等也应尽可能一致。
4. 采血时应注意不宜一次采血量过多或采血过于频繁 采血量过多或过于频繁会影响动物健康，造成贫血，甚至死亡。

(四) 血清的制备

血清是全血中不加抗凝剂自然凝固后析出的淡黄色清亮液体。其所含成分接近于组织间液，代表着机体内环境的理化性状，比全血更能反映机体的状态，是常用的血液样品。

血清制备过程：将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，需将血液置于 37℃ 水浴或温箱中保温，以促进血清析出。另外，也可将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，2000~2500r/min 离心 15min 使血清析出。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，应再次离心；制备

好的血清，应及时进行实验测定，否则应加盖冷藏备用。

(五) 全血及血浆的制备

若要用血浆或全血样品，须在血液凝固前用抗凝剂处理。

1. 抗凝剂的种类 实验室常用的抗凝剂有如下几种，可根据情况选择使用。

(1) 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抗凝。0.1~0.2mg 或 20IU 可抗凝 1ml 血液。

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

(2) 乙二胺四乙酸二钠盐（简称 EDTA_{N_a2}）：EDTA_{N_a2} 易与钙离子络合而使血液不凝。0.8g 该钠盐可抗凝 1ml 血液。

配成 4% EDTA_{N_a2} 水溶液。每管装 0.1ml，80℃ 烘干。可抗凝 5ml 血液。此抗凝血液常用于多种生化分析。但不能用于血浆中含氮物质、钙及钠的测定。

(3) 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 1~2mg 即可。

配制 10% 草酸钾（钠）水溶液。吸取此液 0.1ml 放入试管中，缓慢转动试管，使溶液尽量分散在试管壁上，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 5ml。此抗凝血剂常用于非蛋白氮等多种测定项目。不适用于钾、钙的测定。

(4) 草酸钾-氟化钠：氟化钠是一种弱抗凝剂。但浓度为 2mg/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。

取草酸钾 6g、氟化钠 3g，溶于 100ml 蒸馏水中。每支试管加入 0.25ml，于 80℃ 烘干备用，每管可抗凝 5ml 血液。因氟化钠抑制脲酶活性，所以此抗凝血剂不能用于脲酶法中尿素氮的测定，也不能用于淀粉酶及磷酸酶的测定。

除上述抗凝剂外，还有柠檬酸钠（枸橼酸钠）、草酸铵等，这些抗凝剂不常用于生化分析。

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，测氯时加奈氏试剂后易产生浑浊等现象。

2. 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。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。

3. 血浆的制备 将已抗凝的全血放置一段时间或于 3000r/min 离心 10min，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，尽量减少振荡。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。

(六) 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，需要先把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。常用的方法如下。



1. 三氯醋酸法

(1) 原理: 三氯醋酸为有机强酸, 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 5min, 过滤或 2500r/min 离心 10min。即得 10 倍稀释的清明透亮无蛋白血滤液。

2. 福林-吴宪法 (钨酸法)

(1) 原理: 钨酸钠与硫酸混合, 生成钨酸。血液中的蛋白质在 pH 小于其等电点的溶液中时, 可被钨酸沉淀。沉淀液过滤或离心, 上清液即为无色、透明、pH 约为 6 的无蛋白血滤液。可供非蛋白氮、血糖、氨基酸、尿素、尿酸及氯化物等项目测定使用。

(2) 试剂: 10%钨酸钠溶液: 称取钨酸钠 100g 溶于少量蒸馏水中, 最后加蒸馏水至 1000ml。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); 1/3mol/L 硫酸溶液。

(3) 操作: 取 50ml 锥形瓶或大试管 1 支; 吸取充分混匀的抗凝血 1 份, 擦净管外血液, 缓慢放入锥形瓶或试管底部; 准确加入蒸馏水 7 份, 混匀, 使之完全溶血; 加入 1/3mol/L 硫酸溶液 1 份, 随加随摇; 加入 10%钨酸钠 1 份, 随加随摇; 放置约 5min 后, 若振摇亦不再发生泡沫, 说明蛋白质已完全变性沉淀。过滤或离心 (2500r/min, 10min) 即得完全澄清无色的无蛋白血滤液。

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

3. 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沉淀。所以, 此法所得滤液适合血液中葡萄糖的测定。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: 10%硫酸锌溶液; 0.5mol/L 氢氧化钠溶液。

(3) 操作: 取干燥洁净 50ml 锥形瓶或大试管 1 支, 准确加入 7 份水; 准确加入混匀的抗凝血 1 份, 摇匀; 加入 10%硫酸锌溶液 1 份, 摇匀; 慢慢加入 0.5mol/L 氢氧化钠溶液 1 份, 边加边摇。放置 5min, 用定量滤纸过滤或离心 (2500r/min, 10min)。即得 10 倍稀释的清明透亮滤液。

4. 黑登改良法 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%钨酸钠溶液 1 份。摇匀, 过滤或离心即可。此方法的优点是产生的滤液较多。

二、组织样品的制备

离体组织在适宜的温度和 pH 等条件下, 可以进行一定程度的物质代谢。因此, 在动物生物化学实验中, 常利用离体组织研究各种物质代谢的途径与酶系的作用, 也可从组织中提取各种代谢物质或酶进行实验研究。

但各种组织离体时间过长后, 组织内部要发生相应变化。如组织中的某些酶在久置后发生变性而失活。有些组织成分如糖原、ATP 等在动物死亡数分钟至十几分钟内, 其含量即有明显降低。因此, 利用离体组织进行代谢研究或作为实验材料时, 必须迅速将其取出, 并尽

快进行提取或测定。一般采用断头法处死动物，放出血液后立即取出所需的脏器或相应组织，去除外层脂肪及结缔组织后，用冰冷生理盐水洗去血液，必要时也可用冰冷生理盐水灌注脏器以洗去血液，再用滤纸吸干，则可作为实验材料。取出的脏器或组织，可根据不同目的，用以下方法分别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，用高速电动匀浆器将组织研磨成匀浆。为了降低研磨产生的热量，使组织及酶不致变性，制备匀浆时一般应将玻璃匀浆管插入冰水浴中，适当控制研磨的速度。常用的玻璃匀浆管由一种特制的厚壁毛玻璃管和一个一端带有磨砂玻璃杵头的研磨杆组成。规格大小不一，使用时可根据需要进行选择。

三、生物高分子的制备

研究酶、蛋白质和核酸等生物高分子的结构与功能，须首先解决生物高分子的制备问题，而生物高分子的分离、纯化与制备是一件十分细致的工作。生物高分子的制备主要有以下特点：生物材料的组成十分复杂，常包含数百种甚至数千种物质；多数生物高分子在组织样品中的含量极少，分离纯化的步骤烦琐，流程长；多数生物高分子一旦离开了生物体内的环境就容易失活，分离过程中如何防止生物高分子物质失活是提取制备的关键；制备过程几乎都是在溶液中进行的，pH值、温度、离子强度等参数对溶液中各种物质的综合影响有时很难准确估计和判断。

(一) 生物材料的前处理

1. 生物材料的选择 制备生物高分子，首先要选择适宜的生物材料。选择的材料应来源丰富、目的物质含量高、制备工艺简单、成本低等。另外，材料应尽可能新鲜，尽快提取处理。如暂不提取，材料则需低温冷冻保存。动物组织要先去除结缔组织、脂肪等成分。如果所要提取的物质在细胞内，则须先破碎细胞，然后用适当的溶剂提取。

2. 细胞破碎 对于细胞中大多数成分，如DNA、RNA、酶和蛋白质等都需首先破碎细胞，做成组织匀浆后再进行分离和提取。因此动物生化实验中，破碎组织细胞是重要的操作之一。不同生物体或同一生物体不同部位的组织，其细胞破碎的难易程度不一，使用的方法也不相同。常用的方法具体介绍如下。

(1) 研磨法：将新鲜的组织器官去除血污和其他组织后，加入适当的溶液，直接用玻璃匀浆器磨成匀浆，或加入石英砂研磨成匀浆。此法多用于肝脏、肾脏等组织的处理。组织匀浆需在低温下进行。组织离体后应置于冰冷溶液中，匀浆时匀浆器相互摩擦会产生大量热量，易使酶或蛋白质变性，所以在匀浆器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) 组织捣碎法：这是一种用组织捣碎机破碎细胞的方法，该法的优点是快速，但应注意由于瞬间高温可能引起蛋白质变性。多用于心脏等坚实组织的提取。操作时亦可先用组织捣碎机捣成组织糜，然后再用玻璃匀浆器研磨。

(3) 溶胀法：细胞膜为天然的半透膜，在低渗溶液中，由于存在渗透压差，溶剂分子大量进入细胞内，将细胞膜胀破释放出细胞内容物。

(4) 超声波法：此法是借助超声波的振动使细胞膜和细胞器破碎。破碎细菌和酵母菌时，