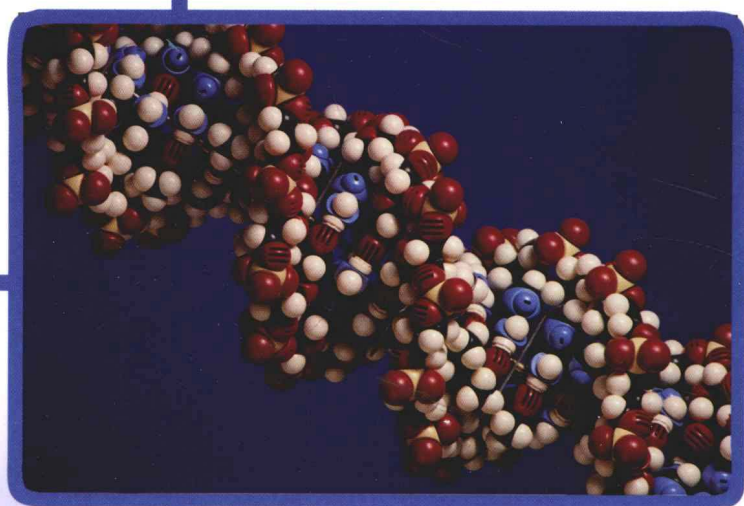


普通高等教育“十一五”国家级规划教材配套教材

# 生物化学与分子生物学 实验教程

第2版

吴士良 钱 晖 周亚军 徐 岚 主编



科学出版社  
[www.sciencep.com](http://www.sciencep.com)

普通高等教育“十一五”国家级规划教材配套教材

# 生物化学与分子生物学实验教程

第2版

|           |             |     |           |     |           |
|-----------|-------------|-----|-----------|-----|-----------|
| 主<br>编    | 副<br>主<br>编 | 吴士良 | 钱 晖       | 周亚军 | 徐 岚       |
|           |             | 王卉放 | 唐彦萍       | 殷冬梅 |           |
| (按姓氏笔画排序) |             |     |           |     |           |
|           |             | 马 洁 | 江苏大学医学院   | 马 洁 | 江苏大学医学院   |
|           |             | 王 新 | 南通大学医学院   | 王 新 | 南通大学医学院   |
|           |             | 王卉放 | 江苏大学医学院   | 王卉放 | 江苏大学医学院   |
|           |             | 仇 灏 | 苏州大学医学部   | 仇 灏 | 苏州大学医学部   |
|           |             | 史 宁 | 苏州大学医学部   | 史 宁 | 苏州大学医学部   |
|           |             | 乔 正 | 江苏大学医学院   | 乔 正 | 江苏大学医学院   |
|           |             | 吴士良 | 苏州大学医学部   | 吴士良 | 苏州大学医学部   |
|           |             | 吴亦英 | 南通大学医学院   | 吴亦英 | 南通大学医学院   |
|           |             | 张海方 | 江苏大学医学院   | 张海方 | 江苏大学医学院   |
|           |             | 张弛宇 | 江苏大学医学院   | 张弛宇 | 江苏大学医学院   |
|           |             | 张雅娟 | 江苏省苏州卫生学校 | 张雅娟 | 江苏省苏州卫生学校 |
|           |             | 范 雁 | 苏州大学医学部   | 范 雁 | 苏州大学医学部   |
|           |             | 周亚军 | 南通大学医学院   | 周亚军 | 南通大学医学院   |
|           |             | 周迎会 | 苏州大学医学部   | 周迎会 | 苏州大学医学部   |
|           |             | 赵 燕 | 江苏大学医学院   | 赵 燕 | 江苏大学医学院   |
|           |             | 姜 智 | 苏州大学医学部   | 姜 智 | 苏州大学医学部   |
|           |             | 贾 伟 | 苏州大学医学部   | 贾 伟 | 苏州大学医学部   |
|           |             | 顾建兰 | 南通大学医学院   | 顾建兰 | 南通大学医学院   |
|           |             | 顾 博 | 苏州大学医学部   | 顾 博 | 苏州大学医学部   |
|           |             | 徐 岚 | 苏州大学医学部   | 徐 岚 | 苏州大学医学部   |
|           |             | 钱 晖 | 江苏大学医学院   | 钱 晖 | 江苏大学医学院   |
|           |             | 徐银根 | 江苏省苏州卫生学校 | 徐银根 | 江苏省苏州卫生学校 |
|           |             | 殷冬梅 | 南通大学医学院   | 殷冬梅 | 南通大学医学院   |
|           |             | 唐彦萍 | 遵义医学院     | 唐彦萍 | 遵义医学院     |
|           |             | 涂应琴 | 遵义医学院     | 涂应琴 | 遵义医学院     |
|           |             | 葛锦涛 | 南通大学医学院   | 葛锦涛 | 南通大学医学院   |
|           |             | 蒋菊香 | 苏州大学医学部   | 蒋菊香 | 苏州大学医学部   |

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

本书为普通高等教育“十一五”国家级规划教材《生物化学与分子生物学》的配套教材,内容包括总论和各论,总论介绍生物化学的基本操作技术、当前生物化学与分子生物学研究常用的电泳、层析、离心分离、印迹技术和聚合酶链式反应等实验技术的原理、种类、应用和前沿;各论共有42个实验,其中蛋白质与核酸、酶学、糖、脂和生物氧化部分的实验是比较成熟的生物化学基本实验;核酸部分的实验主要是分子生物学常用技术的实验,是近几年在研究生实验课中开设并有部分实验选用到本科生实验教学中的;最后部分有8个综合性实验,在基本技能训练的基础上,对学生进行实验设计和科研入门训练。

本书语言简练,实用性强。不仅适合医学院校5年制、7年制及8年制学生使用,也适合相关人员参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验教程 / 吴士良等主编. —2版. —北京:科学出版社,2009

普通高等教育“十一五”国家级规划教材配套教材

ISBN 978-7-03-022707-2

I. 生… II. 吴… III. ①生物化学-实验-高等学校-教材 ②分子生物学-实验-高等学校-教材 IV Q5-33 Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2008)第119365号

策划编辑:胡治国 / 责任编辑:胡治国 / 责任校对:宋玲玲

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄超

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>

铭浩彩色印装有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2004年8月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2009年2月第 二 版 印张:13

2009年2月第七次印刷 字数:301 000

印数:18 001—23 000

定价:25.00元

如有印装质量问题,我社负责调换

## 第 2 版前言

进入 21 世纪以来,生物化学及分子生物学领域发展迅速,新进展层出不穷,例如蛋白质组学、RNA 组学等新技术已广泛应用于医学领域,而它们的基础技术,仍离不开核酸、蛋白质以及糖类、脂类的研究方法。因此,为了跟上时代发展的步伐,极有必要对本教材修订再版。

《生物化学与分子生物学实验教程》作为高等医药院校主干课必修课程生物化学与分子生物学的实验教材,在各兄弟院校的支持下已走过了四个多年头,为了跟上学科发展的需要,也结合我们参加两次教学评估(2002 年,2007 年)的经验,遵科学出版社意见,我们对教材进行了适当修订,主要是增补了微量移液器使用和离心机原理等,特别对综合性创新性实验部分作了修订增加。但考虑到各兄弟院校沿用习惯,对总体框架和主要内容均未作变动。

本教材修订再版中得到科学出版社鼓励支持,参编单位苏州大学医学部生物化学与分子生物学系、南通大学医学院生物化学教研室及江苏大学医学院生物化学教研室编写教师的认真参与,特别是增补修订部分,均由从美国哈佛大学医学院进修归来的徐岚老师主持定稿,在此一并致谢。希望各位同仁应用后多提宝贵意见,以待再版时改正。

吴士良

2008 年 8 月于苏州

## 第 1 版前言

2003 年 8 月,由科学出版社出版了高等医药院校使用的《生物化学与分子生物学》教材,为使教材配套,我们现又编写出版《生物化学与分子生物学实验教程》。

生物化学与分子生物学实验技术是依靠物理、化学、生物学的原理和方法建立和发展起来的一整套亚细胞水平和分子水平的实验研究技术,它是生命科学中最富生机、最具活力、最含创造性的部分。我们在教学实践过程中体会到实验课的目的主要有:①使学生获得对于生物化学与分子生物学理论基本内容的深刻理解;②使学生熟悉生物化学与分子生物学的实验原理和得到操作技术的基本训练;③培养学生独立工作的能力;④培养学生的科学作风和科学思维方法。

本教材的第一篇是总论,在这一篇中除了介绍生物化学的基本操作技术外,还系统介绍了当前生物化学与分子生物学研究常用的电泳、层析、离心分离、印迹技术和聚合酶链式反应等实验技术的原理、种类、应用和前沿。第二篇各论共有 40 个实验,其中蛋白质与核酸、酶学、糖、脂和生物氧化部分的实验是过去常做的、比较成熟的生物化学基本实验,通过这些实验训练学生的生化基本实验操作;核酸部分的实验主要是分子生物学常用技术的实验,这些实验是近几年在研究生实验课中开设并有部分实验选用到本科生实验教学中的;最后部分有 8 个综合性实验,在基本技能训练的基础上,对学生进行实验设计和科研入门训练。

在使用本实验教程时,各院校可根据不同的专业要求、不同的教学层次和不同的实验室条件,在实验课教学中选择开设实验的内容。

本教材编写过程中得到苏州大学医学院、江苏大学医学技术学院和南通医学院领导的大力支持和具体指导,江苏省生物化学与分子生物学学会对本书的编写给予了热情关怀,在此致以诚挚的谢意。

编 者

2004 年 5 月

# 目 录

## 第1篇 总 论

|                       |      |                       |      |
|-----------------------|------|-----------------------|------|
| 实验须知 .....            | (1)  | 第5节 离子交换层析 .....      | (30) |
| 第1章 基本操作技术 .....      | (3)  | 第6节 凝胶层析 .....        | (32) |
| 第1节 玻璃器皿的清洗 .....     | (3)  | 第7节 亲和层析 .....        | (35) |
| 第2节 吸量管的种类和使用 .....   | (4)  | 第4章 离心分离技术 .....      | (36) |
| 第3节 溶液的混匀、过滤及离心 ..... | (6)  | 第1节 离心分离技术的原理 .....   | (36) |
| 第4节 实验样品的制备 .....     | (7)  | 第2节 离心机的分类与特点 .....   | (36) |
| 第5节 分光光度法 .....       | (8)  | 第5章 印迹技术 .....        | (39) |
| 第2章 电泳技术 .....        | (14) | 第1节 Southern 印迹 ..... | (39) |
| 第1节 电泳的基本原理 .....     | (14) | 第2节 Northern 印迹 ..... | (40) |
| 第2节 影响电泳的主要因素 .....   | (14) | 第3节 斑点杂交 .....        | (41) |
| 第3节 区带电泳的分类 .....     | (15) | 第4节 Western 印迹 .....  | (41) |
| 第4节 几种常见的电泳方法 .....   | (16) | 第6章 聚合酶链式反应 .....     | (43) |
| 第5节 二维电泳 .....        | (20) | 第1节 PCR 技术概述 .....    | (43) |
| 第3章 层析技术 .....        | (25) | 第2节 PCR 技术的基本原理 ..... | (43) |
| 第1节 层析技术的分类 .....     | (25) | 第3节 PCR 反应条件的优化 ..... | (46) |
| 第2节 层析中的常用术语 .....    | (26) | 第4节 PCR 技术的扩展 .....   | (48) |
| 第3节 纸层析 .....         | (28) | 第5节 PCR 中应注意的问题 ..... | (51) |
| 第4节 薄层层析 .....        | (29) | 第6节 PCR 在医学中的应用 ..... | (53) |

## 第2篇 各 论

|                     |      |                    |      |
|---------------------|------|--------------------|------|
| 第7章 蛋白质与氨基酸 .....   | (55) | 实验7 氨基酸的薄层层析 ..... | (75) |
| 实验1 蛋白质含量的测定 .....  | (55) | 实验8 DNS-氨基酸聚酰胺薄膜双向 |      |
| 实验2 血清蛋白醋酸纤维素薄膜     |      | 层析 .....           | (77) |
| 电泳定量测定 .....        | (59) | 第8章 酶学 .....       | (80) |
| 实验3 凝胶层析法分离血红蛋白和    |      | 实验9 影响酶活性的因素 ..... | (80) |
| DNP-鱼精蛋白(或 DNP-酪蛋   |      | 实验10 蔗糖酶的专一性 ..... | (81) |
| 白) .....            | (64) | 实验11 丙氨酸转氨酶活性的测定   |      |
| 实验4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测 |      | .....              | (83) |
| 定蛋白质相对分子质量 .....    | (66) | 实验12 乳酸脱氢酶同工酶的分离   |      |
| 实验5 蛋白质的沉淀反应 .....  | (71) | .....              | (85) |
| 实验6 酪蛋白等电点的测定 ..... | (74) | 实验13 转氨基反应 .....   | (87) |

|                                          |                                                               |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 实验 14 琥珀酸脱氢酶的作用及<br>竞争性抑制 ..... (90)     | 实验 28 DNA 的限制性酶切反应<br>..... (129)                             |
| 实验 15 米氏常数的测定 ..... (91)                 | 实验 29 Southern 印迹 ..... (131)                                 |
| 第 9 章 糖、脂和生物氧化 ..... (100)               | 实验 30 Northern 印迹 ..... (137)                                 |
| 实验 16 饥饿和饱食对肝糖原<br>含量的影响 ..... (100)     | 实验 31 PCR 扩增技术 ..... (140)                                    |
| 实验 17 脂蛋白的分离和提纯 ... (101)                | 实验 32 随机扩增多态性 DNA 技术<br>..... (142)                           |
| 实验 18 血清脂蛋白琼脂糖凝胶<br>电泳 ..... (104)       | 第 11 章 综合性实验 ..... (144)                                      |
| 实验 19 血清三酰甘油测定 ..... (105)               | 实验 33 家兔免疫血清 $\gamma$ -球蛋白的<br>分离与纯度鉴定 ..... (144)            |
| 实验 20 高密度脂蛋白中胆固醇<br>含量测定 ..... (108)     | 实验 34 蛋白质的分离、提取、SDS-聚<br>丙烯酰胺凝胶电泳及 Western<br>印迹 ..... (146)  |
| 实验 21 血清总胆固醇含量测定<br>..... (109)          | 实验 35 脂蛋白的分离、提纯和电泳<br>鉴定 ..... (155)                          |
| 实验 22 乳酸测定 ..... (111)                   | 实验 36 大肠埃希菌感受态细胞的制<br>备及质粒 DNA 分子导入原<br>核细胞、提取、纯化鉴定 ... (159) |
| 实验 23 血中葡萄糖含量的测定<br>..... (116)          | 实验 37 碱性磷酸酶的提取、比活<br>性及 $K_m$ 值的测定 ..... (165)                |
| 第 10 章 核酸 ..... (120)                    | 实验 38 RT-PCR ..... (169)                                      |
| 实验 24 细胞核的分离和纯化 ... (120)                | 实验 39 细菌双杂交质粒 DNA 的<br>提取、纯化及鉴定 ..... (173)                   |
| 实验 25 核酸含量的测定 ..... (122)                | 实验 40 <i>apoE</i> 基因多态性分析 ... (177)                           |
| 实验 26 酵母 RNA 的提取及组分<br>鉴定 ..... (126)    |                                                               |
| 实验 27 真核细胞基因组 DNA 的<br>制备与定量 ..... (128) |                                                               |
| 主要参考资料 ..... (181)                       |                                                               |
| 附录 ..... (182)                           |                                                               |

# 第1篇 总 论

## 实验须知

生物化学与分子生物学实验课是教学的重要环节。通过实验教学,观察某些生化与分子生物学反应现象,联系并加深对理论内容的理解,验证和巩固理论知识;掌握生化与分子生物学实验的基本操作、实验原理和一般仪器的使用;培养科学实验技能和严谨的科学态度,准确记录,科学分析并做出实事求是的实验报告,逐步提高观察问题、分析问题和解决问题的能力,为今后学习生物医学专业后续课程打好必要的基础。

### [实验要求]

1. 实验前必须预习,明确实验目的,了解基本原理、主要操作、注意事项及预期结果。
2. 实验中操作应严肃认真,注意观察,如实记录实验过程中出现的现象、数据与结果。
3. 实验后及时整理总结,根据实验结果进行科学分析,按时书写并提交实验报告。

### [试剂使用]

1. 仔细辨认试剂标签,看清名称及浓度,切勿用错。
2. 使用滴管时,滴管尖端朝下,不可倒置,以免试剂流入橡皮帽。
3. 用吸量管取液体时,应该用吸耳球吸,不能用嘴吸。
4. 取出试剂后,立即盖好瓶塞并将试剂瓶放回原处,瓶塞不要盖错。
5. 吸标准溶液时,应先将标准液倒入干净试管中,再用吸量管吸,以防污染瓶中标准溶液。

### [实验报告]

包括实验名称、日期、目的、要求、原理、操作、结果、分析、讨论等。

1. 目的要求、原理及操作,应简单扼要的叙述,但必须写清楚操作的关键环节。
2. 一般实验要有结论,扼要简单的说明本次实验获得的结果。
3. 实验数据结果,应归纳整理成各种图表(如标准曲线图、对照与实验组的比较表等)。
4. 分析讨论是对实验方法、结果、异常现象的探讨和评论及对实验设计的认识、体会、建议,不是对结果的重述。
5. 书写报告时应实事求是,字迹清楚、工整,杜绝抄袭。

### [实验室清洁]

1. 保持实验室的安静与整洁,不随地吐痰及乱丢纸屑;注意卫生,不在实验室里吃食物。
2. 所有固体废弃物(棉花、纱布、滤纸等),须丢入垃圾筒中,不可弃于桌上及水池里。
3. 浓酸应倒入专用小钵中,用水稀释冲淡后再用流水冲洗。

4. 有毒及有害物不能扔在簸箕里,应专门收集并无害化处理。
5. 实验完毕,所有公用物品应摆放整齐,各自清理自己的实验桌面,清洗所用器材。
6. 实验室由值日小组(依次以实验桌为单位)轮流负责打扫,关好水、电及门窗。

**[安全注意事项]**

1. 易燃易爆试剂应远离火源,低沸点有机溶剂如需加热定要用水浴。
2. 发烟或产生有毒气体的实验应在通风橱内进行。
3. 实验室若起火应根据起火性质分别采用沙子、水、四氯化碳灭火器等扑救。
4. 如遇酸碱灼伤皮肤应先及时用水冲洗,酸灼者再用饱和  $\text{NaHCO}_3$  液中和;碱灼者再用饱和  $\text{H}_3\text{BO}_3$  液中和;氧化剂伤害者用  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  处理。

(王卉放 钱 晖)

# 第1章 基本操作技术

## 第1节 玻璃器皿的清洗

生物化学与分子生物学实验常用各种玻璃器皿,其清洁程度直接影响测量样品的可靠性和反应的准确性。因此玻璃器皿的清洁不仅是实验前后的常规工作,而且是一项重要的基本技术。玻璃器皿的清洗方法很多,需要根据实验的要求以及污物性质,选用不同的方法。洗涤的玻璃器皿要求清洁透明,玻璃表面不含可溶解的物质,水沿器壁自然下流时不挂水珠。

### 一、新购器皿的清洗

新购器皿表面附着油污和灰尘,特别是附着可游离的金属离子。因此,新购器皿需要用肥皂水刷洗,流水冲净后,浸于  $0.93\text{mol/L Na}_2\text{CO}_3$  溶液中煮沸。用流水冲净后,再浸泡于  $0.3 \sim 0.6\text{mol/L HCl}$  溶液中过夜。流水洗净酸液,用蒸馏水少量多次荡洗后,干燥备用。

### 二、用过玻璃器皿的清洗

1. 一般非计量玻璃器皿或粗容量器皿(如试管、烧杯、量筒等) 先用肥皂水刷洗,再用自来水冲洗干净,最后用蒸馏水荡洗 2~3 次后,倒置于清洁处晾干。

2. 容量分析器皿(如吸量管、滴定管、容量瓶等) 先用自来水冲洗,晾干后浸于铬酸洗液中浸泡数小时,然后用自来水和蒸馏水冲洗干净并干燥备用。

3. 比色杯 用毕立即用自来水反复冲洗,如有污物黏附于杯壁,宜用盐酸或适当溶剂清洗。然后用自来水、蒸馏水冲洗干净。切忌用刷子、粗糙的布或滤纸等擦拭。洗净后,倒置晾干备用。

### 三、清洗液的种类及配制

1. 肥皂水和洗衣粉溶液 这是最常用的洗涤剂,主要是利用其乳化作用除去污垢,一般玻璃器皿均可用其刷洗。

2. 铬酸洗液 广泛用于玻璃器皿的洗涤,其清洁效力来自于它的强氧化性和强酸性。由重铬酸钾( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )和浓硫酸配制而成,硫酸越浓,铬酸越多,其清洁效力越强。洗液具有强腐蚀性,使用时必须注意安全。当洗液由棕红色变为绿色时则不宜再用。

主要有下列 3 种配制方法:

(1) 常用铬酸洗液的浓度为 3%~5%。方法是:重铬酸钾 5g 置 250ml 烧杯中,加入热水 5ml 搅拌。为使其尽量溶解,在烧杯下放一石棉网,向烧杯中缓慢加入工业用浓硫酸 100ml,随加随搅拌。硫酸不宜加入过快,注意不要溅出来。此时溶液由红黄色变为黑褐色。冷却后装瓶备用并盖严,以防吸水。

(2) 取 100ml 工业用浓硫酸置烧杯中,小心加热,然后慢慢加入 5g 重铬酸钾粉,边加边

搅拌,待全部溶解后冷却,贮于具塞的细口瓶中。

(3) 取 80g 重铬酸钾溶于 1000ml 水中,慢慢加入工业用硫酸,边加边搅拌,冷却后备用。

3. 乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $\text{Na}_2$ )洗液 浓度为 5%~10% 的 EDTA- $\text{Na}_2$  洗液加热煮沸,可去除玻璃器皿内部钙镁盐类的白色沉淀和不易溶解的重金属盐类。

4. 草酸洗液 草酸 5~10g,溶于 100ml 水中,加入少量硫酸或浓盐酸,可洗脱高锰酸钾的痕迹。

5. 尿素洗液 45% 的尿素溶液是清洗血污和蛋白质的良好溶剂。

6. 盐酸-乙醇洗液 3% 的盐酸-乙醇洗液可以除去玻璃器皿上附着的染料。

7. 乙酸-硝酸混合液 用于清洗一般方法难以洗净的有机物,最适于清洗滴定管。

8. 50g/L  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  水溶液 碱性液体可用于洗涤油污,所洗器皿不可用于磷的测定。

## 第 2 节 吸量管的种类和使用

吸量管是生化实验中最常用的仪器之一,微量移液器则是分子生物学实验必用之器材,测定的准确度与吸量管及微量移液器的正确选择和使用密切相关。

### 一、吸量管的种类

常用的吸量管可以分为 5 种:

1. 移液管 常量取 50.0ml、25.0ml、10.0ml、5.0ml、2.0ml、1.0ml 的液体。这种吸量管只有 1 个刻度,放液时,量取的液体自然流出后,管尖需在盛器内壁停留 15s。注意管尖残留液体不要吹出。

2. 奥氏吸管 供准确量取 0.5ml、1.0ml、2.0ml、3.0ml 液体用。此吸量管只有 1 个刻度,当放出所量取的液体时,管尖余留的液体必须吹入盛器内。

3. 刻度吸管 供量取 10ml 以下任意体积的液体。一般刻度包括尖端部分。将所量液体全部放出后,还需要吹出残留于管尖的溶液。此类吸管为“吹出式”,吸管上端标有“吹”或“快”字。未标“吹”或“快”字的吸管,则不必吹出管尖的残留液体。

4. 微量进样器 微量进样器常用作气相和液相色谱仪的进样器,在生化实验中主要是用作电泳实验的加样器,通常可分为无存液和有存液两种。

(1) 10 $\mu\text{l}$  以下的极微量液体进样无存液微量进样器:进样器的不锈钢芯子直接通到针尖端处,不会出现存液。

(2) 10~100 $\mu\text{l}$  有存液微量进样器:不锈钢的针尖管部分是空管,进样器的柱塞不能到达,因而管内会存有空气或液体,其使用注意事项是:①不可吸取浓碱溶液,以免腐蚀玻璃和不锈钢零件;②因为有存液,所以吸液时要来回多拉几次,将针尖管内的气泡全部排尽;③针尖管内孔极小,使用后尤其是吸取过蛋白质溶液后,必须立即清洗针尖管,防止堵塞。若遇针尖管堵塞,不可用火烧,只能用  $\phi 0.1\text{mm}$  的不锈钢丝耐心串通;④进样器未润湿时不可来回干拉芯子,以免磨损而漏气;⑤若进样器内发黑,有不锈钢氧化物,可用芯子蘸少量肥皂水,来回拉几次即可除之。

5. 自动取液器 这种取液器在生化实验中大量地使用,它们主要用于多次重复的快速定

量移液,可以只用一只手操作,十分方便。移液的准确度(即容量误差)为 $\pm(0.5\%\sim 1.5\%)$ ,移液的精密度(即重复性误差)更小些,为 $\leq 0.5\%$ 。取液器可分为两种:一种是固定容量的,常用的有 $100\mu\text{l}$ 等多种规格。每种取液器都有其专用的聚丙烯塑料吸头,吸头通常是一次性使用,当然也可以超声清洗后重复使用,而且此种吸头还可以进行 $120^\circ\text{C}$ 高压灭菌;另一种是可调容量的取液器,常用的有 $20\mu\text{l}$ 、 $50\mu\text{l}$ 、 $200\mu\text{l}$ 、 $500\mu\text{l}$ 和 $1000\mu\text{l}$ 等几种。

## 二、吸量管的使用

1. 选用原则 量取整数量体积液体并且取量要求准确时,应选用奥氏吸管;量取大体积液体时,要用移液管;量取任意体积( $10\text{ml}$ 以下)的液体时,应选用与取液量最接近的刻度吸管。如取 $0.15\text{ml}$ 液体,应选用 $0.2\text{ml}$ 的刻度吸管。同一定量实验中,要加同种试剂于不同试管中且取量不同时,应选择与最大取液量接近的1支刻度吸管。如各试管应加液体量为 $0.3\text{ml}$ 、 $0.5\text{ml}$ 、 $0.7\text{ml}$ 、 $0.9\text{ml}$ 时应选用1支 $1.0\text{ml}$ 的刻度吸管。

2. 使用 中指和拇指拿住吸管上端,食指置吸管上端旁;用橡皮球吸液体至刻度上,眼睛看着液面上升;吸完后用食指顶住吸管顶端,用滤纸擦干其外壁;吸管保持垂直,尖端与试剂瓶接触,用食指控制液体下降至所需体积的刻度处,液体凹面、刻度和视线应在同一水平面上;吸管移入准备接受溶液的盛器中,其出口尖端接触器壁并成一角度,吸管仍保持垂直;放开食指,使液体自动流出。

## 三、自动取液器的使用

可调式自动取液器的操作方法是:用拇指和食指旋转取液器上部的旋钮,使数字窗口出现所需容量体积的数字,在取液器下端插上一个塑料吸头,并旋紧以保证气密,然后四指并拢握住取液器上部,用拇指按住柱塞杆顶端的按钮,向下按到第一停点,将取液器的吸头插入待取的溶液中,缓慢松开按钮,吸上液体,并停留 $1\sim 2$ 秒钟(黏性大的溶液可加长停留时间),将吸头沿器壁滑出容器,用吸水纸擦去吸头表面可能附着的液体,排液时吸头接触倾斜的器壁,先将按钮按到第一停点,停留一秒钟(黏性大的液体要加长停留时间),再按压到第二停点,吹出吸头尖部的剩余溶液,如果不便于用手取下吸头,可按下除吸头推杆,将吸头推入废物缸,如图1-1和图1-2。

自动取液器的使用注意事项是:

(1) 吸取液体时一定要缓慢平稳地松开拇指,绝不允许突然松开,以防将溶液吸入过快而冲入取液器内腐蚀柱塞而造成漏气。

(2) 为获得较高的精度,吸头需预先吸取一次样品溶液,然后再正式移液,因为吸取血清蛋白质溶液或有机溶剂时,吸头内壁会残留一层“液膜”,造成排液量偏小而产生误差。

(3) 浓度和黏度大的液体,会产生误差,为消除其误差的补偿量,可由试验确定,补偿量可用调节旋钮改变读数窗的读数来进行设定。

(4) 可用分析天平称量所取纯水的重量并进行计算的方法,来校正取液器, $1\text{ml}$ 蒸馏水 $20^\circ\text{C}$ 时重 $0.9982\text{g}$ 。

(5) 注意不要接触会损害吸嘴的硝酸或硫酸溶液,吸取过冷、较热的样品时,应使吸嘴温度与样品温度接近,以免样品热胀冷缩。

(6) 移液器不能高压消毒,吸嘴可以。

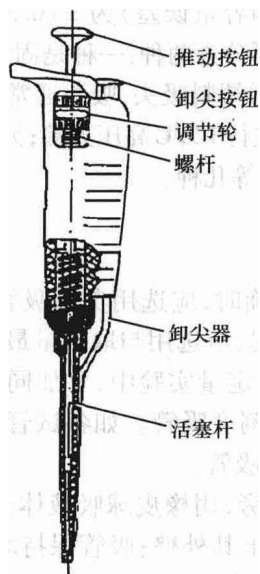


图 1-1 自动取液器的构造

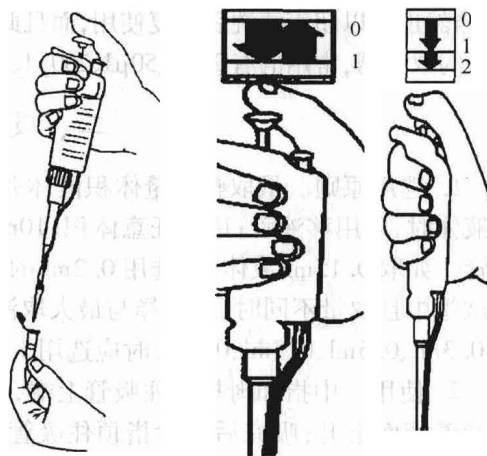


图 1-2 自动取液器的使用

### 第 3 节 溶液的混匀、过滤及离心

#### 一、溶液的混匀

生物化学及分子生物学实验中,为使化学反应充分进行,加入试剂后的充分混匀,是保证实验成功的又一关键。一般有以下几种混匀方式:

1. 腕混匀 右手持试管上端,利用手腕的旋转,使试管做圆周运动,使液体混匀。
2. 指弹混匀 左手持试管上部,试管与地面垂直。右手手指呈切线方向快拨试管下部,使管内液体呈涡状转动。
3. 吹吸混匀 用吸管、滴管或移液器将溶液反复吹吸数次,使溶液混匀。
4. 搅动混匀 用细玻璃棒搅动大试管或烧杯内容物(如固体试剂)使之混匀。
5. 甩动混匀 试管内液体较少时可采用。
6. 磁搅拌混匀 一般用于烧杯内容物的混匀。
7. 漩涡器混匀 所有混匀操作都应防止管内液体溅出,以免造成液体流失。严禁用手指堵住试管口混匀液体,防止污染和样品的损失。

#### 二、过 滤

过滤用于收集滤液、沉淀或洗涤沉淀。在生化实验中如用于收集滤液,应选用干滤纸,不应将滤纸先弄湿,湿滤纸将影响滤液的稀释比例。滤纸过滤一般采用平折法(即对折后再对折),且使滤纸上缘与漏斗壁完全吻合不留缝隙。向漏斗内加液时,要用玻棒引流而且不应倒入过快,勿使液面超过滤纸上缘。较粗的过滤可用纱布或脱脂棉代替滤纸。要将沉

淀与母液分开,过滤和离心都可以。当沉淀黏稠或颗粒小得可以通过滤纸时,应选用离心法。溶液量小又需定量测定时,离心分离更有优越性。

### 三、离 心

离心机种类很多,一般实验室具备的离心机是最大转速为 4000r/min 的普通台式或落地式离心机。现简要叙述一般离心机的使用方法(特殊用途的离心机请参阅相关的说明书)。

1. 装液 将待离心的液体置于玻璃离心管(刻度离心管)或短试管中。
2. 平衡 两只装有待离心液体的离心管分别放入两个完整的并且配备了橡皮软垫的离心套管之中,置天平两侧配平,用滴管在较轻一侧离心管和套管之间加水,直到平衡。
3. 放置 检查离心机,机内应无异物和无用的套管,并且运转平稳。将已配平的两管对称地放入离心机的离心孔内,做好标记,盖好上盖,开启电源。
4. 离心 顺时针慢慢旋动转速调节钮,增加离心机转速。当离心机转速达到要求时,记录离心时间。
5. 停止 到达离心时间后,逐渐减速并切断电源。当离心机停止转动后,取出离心管和离心套管,倒去离心套管内的平衡用水,倒置于干燥处晾干。

## 第4节 实验样品的制备

许多定量的实验采用血液为样品,其次为尿液,其他可作为生化检测的样品有脑脊液、组织液、羊水等,有时用生物组织或细胞进行化学分析。

为了获得实验的可靠结果,应注意实验样品采集、处理和制备中多方面的影响因素,样品收集前应考虑的因素主要有饮食、药物和采集时间等等。有些化学组成容易受到饮食成分的干扰,有时还可受到近期食谱和药物的影响,对于在不同时间其含量可能有较大变化的物质(如铁及皮质醇),应规定恰当的时间采集样品。取血样时,应避免溶血,当肢体正在进行静脉输液时,不宜由同一静脉采集。收集的样品要及时送实验室,防止某些化学成分发生变化,有时需加特殊的保存剂或放置冰箱内保存。

### 一、血液样品

1. 全血 取清洁干燥的试管或其他容器,收集人或动物的新鲜血液,立即与适量的抗凝剂充分混合,所得到的抗凝血为全血。每毫升血液中加入抗凝剂的种类可以根据实验的需要选择,但是用量不宜过大,否则会影响实验的结果。抗凝剂宜先配成水溶液,按取血量的需要加入试管或适当容器内,横放,再烘干水分(肝素不宜超过 30℃),使抗凝剂在容器内形成薄层,利于血液与抗凝剂的均匀接触。常用剂量为草酸钾或草酸钠 1~2mg;枸橼酸钠 5mg;氟化钠 5~10mg;肝素 0.1~0.2mg。得到的全血如果不立即使用,应贮于 4℃ 冰箱内。

2. 血浆 抗凝之全血在离心机中离心,使血细胞下沉,得到的上清液即为血浆。质量上乘的血浆应为淡黄色。为避免溶血,必须采用干燥清洁的采血器具和容器,并尽可能少振摇。

3. 血清 收集不加抗凝剂的血液,室温下自然凝固,所析出的草黄色液体即为血清。制备血清时,血凝块收缩析出血清约需 3h。为使血清尽快析出,可用离心方法缩短分离时间且可得到较多的血清。制备血清同样要防止溶血,所用的器具应当干燥清洁。血清析出后,宜轻轻分开血凝块与容器壁的粘连,及时吸出析出的血清。

4. 无蛋白质血滤液 血液中含有丰富的蛋白质,它的存在会干扰测定的结果,所以通常需将其除去,制成无蛋白质血滤液,再进行分析。常用的蛋白质沉淀剂有钨酸、三氯乙酸、氢氧化锌等。血液加入蛋白质沉淀剂后,离心或过滤所得的上清液或滤液,就是无蛋白质血滤液。以钨酸为蛋白质沉淀剂的无蛋白质血滤液,常用于血糖、肌酐、非蛋白氮等成分的测定;用三氯乙酸沉淀蛋白质,所得的血滤液呈酸性,利于钙磷的溶解,在测定血清离子含量时多采用。

## 二、尿液样品

尿液中含有多种代谢产物,但昼夜之中尿液里的化学物质含量往往随着进食、饮水、运动及其他情况而变动。一般定性实验,收集 1 次尿液即可;若做定量测定,则需收集 24h 尿液(收集的方法是:排掉体内残余尿液并记录时间,收集至次日同一时间的全部尿液,盛入有盖的清洁容器中,量出尿液总量,并做记录,测定时可混合后取出适量尿液)。为防止尿液变质,可适当加入防腐剂。若测定含氮物质,每升尿液加 5ml 甲苯;测定激素时,每升尿液加入 5ml 浓盐酸。如果做某种试验性测定(如维生素排出测定),宜在服药后数小时采集尿液。

收集动物的尿液时,可将动物养到代谢笼中,排出的尿液可经笼下漏斗收集。

## 三、组织样品

在生化实验中,经常利用离体组织来研究各种物质代谢途径及酶系的作用,或从组织中分离纯化核酸、酶以及某些有意义的代谢物质来进行研究。在生物组织中,因含有大量的催化活性物质,离体组织的采集必须在冰冻条件下进行,并且尽快完成测定,否则其所含物质的量和生物活性物质的活性都将发生变化。

一般采用断头或颈椎脱位法处死动物,放出血液,立即取得所需脏器或组织,除去脂肪和结缔组织之后,用冰冷生理盐水洗去血液,再用滤纸吸干,称重后,按实验要求制成组织糜或组织匀浆。

1. 组织糜 迅速将组织剪碎,用捣碎机绞成糜状,或者加入少许净砂在研钵中研磨成糊状。

2. 组织匀浆 取一定量新鲜组织剪碎,加入适量匀浆制备液,用高速电动匀浆器或者玻璃匀浆器磨碎组织。因匀浆器的杵在高速运转中会产生热量,制备匀浆时,必须将匀浆器置于冰水中。常用的匀浆制备液有生理盐水、缓冲液、0.25mol/L 的蔗糖液等,应根据实验的要求加以选择。

3. 组织浸出液 上述组织匀浆再经过离心,分离出的上清液就是组织浸出液。

## 第 5 节 分光光度法

分光光度法是利用物质特有的吸收光谱,对物质进行鉴定和测定其含量的技术。光是由光子所组成的,光线就是高速向前运动的光子流,光的本质是一种电磁波,传播过程呈波

动性,具有波长和频率的特征。

人肉眼可见的光线称为可见光,波长范围为 400 ~ 760nm。波长小于 400nm 的光线叫紫外线,波长大于 760nm 的叫红外线。可见光区的电磁波因波长不同而呈现不同的颜色,这些不同颜色的电磁波称为单色光。太阳及钨灯发出的白光,是各种单色光的混合光(复合光),利用棱镜可将白光分成按波长顺序排列的各种单色光,即红、橙、黄、绿、青、蓝、紫等,这就是光谱。将电磁波按波长(或频率)顺序排列起来,即得

|      |      |     |     |     |         |
|------|------|-----|-----|-----|---------|
| γ 射线 | X 射线 | 紫外线 | 可见光 | 红外线 | 无线电用电磁波 |
|------|------|-----|-----|-----|---------|

一切物质都会对某些波长的光进行选择性的吸收,有色溶液之所以呈现不同颜色,就是由于这种对光的选择性吸收所致。某些无色物质虽对可见光无吸收作用,但能选择性吸收特定波长的紫外线或红外线。物质的吸收光谱与它们本身的分子结构有关,不同物质由于其分子结构不同,对不同波长光线的吸收能力也不同。每种物质都具有特异的吸收光谱,在一定条件下,其吸收程度与该物质浓度成正比,因此可利用各种物质不同的吸收光谱及其强度,对不同物质进行定性和定量的分析。

分光光度法依据的原理是 Lambert-Beer 定律。该定律阐明了溶液对单色光吸收的多少与溶液浓度及溶液厚度之间的关系。

### 一、Lambert 定律

当一束单色光垂直通过一均匀的溶液时,一部分光会被溶液吸收,因此光线的强度会减弱。设:入射光强度为  $I_0$ ,溶液的厚度为  $L$ ,出射光即透过光强度为  $I$ ,则  $I/I_0$  表示光线透过溶液的程度,称为透光度( $T$ )。若溶液的浓度不变,则透过溶液的厚度愈大,光线强度的减弱愈显著:

$$\lg \frac{I_0}{I} = K_1 L \quad (1)$$

$K_1$  是常数, $L$  为溶液的厚度(光径)。

### 二、Beer 定律

当一束单色光通过溶液介质时,若溶液的厚度不变而浓度不同时,溶液的浓度愈大,则光吸收愈大,透过光的强度愈弱:

$$\lg \frac{I_0}{I} = K_2 C \quad (2)$$

$K_2$  是常数, $C$  为溶液的浓度。

### 三、Lambert-Beer 定律

将(1)式与(2)式合并,则:

$$\lg \frac{I_0}{I} = KCL \quad (3)$$

$$\text{因 } T = \frac{I}{I_0} \quad -\lg T = \lg \frac{I_0}{I}$$

$$\text{令 } A = \lg \frac{I_0}{I} \quad \text{则 } A = -\lg T = KCL$$

$T$  为透光度;  $A$  为吸光度(光密度、消光度);  $K$  为常数(消光系数), 表示物质对光线吸收的能力, 受物质种类和光线波长的影响, 对于相同物质和相同波长的单色光则消光系数不变。

#### 四、Lambert-Beer 定律的应用

1. 用标准管计算待测液含量 实际测量过程中, 用一已知浓度的标准液和一未知浓度的待测液同样处理显色, 读取吸光度, 就可以得出下列算式:

$$A_{\text{标}} = KC_{\text{标}}L, A_{\text{样}} = KC_{\text{样}}L$$

由于是同一类物质及相同光径, 故  $\frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} = \frac{KC_{\text{样}}L}{KC_{\text{标}}L} = \frac{C_{\text{样}}}{C_{\text{标}}}$

$$C_{\text{样}} = \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \cdot C_{\text{标}}$$

式中,  $C_{\text{标}}$  = 标准液浓度,  $A_{\text{标}}$  = 标准液吸光度,  $C_{\text{样}}$  = 待测液浓度,  $A_{\text{样}}$  = 待测液吸光度。

根据上式可知, 对于相同物质和相同波长的单色光来说, 溶液的吸光度和溶液的浓度呈正比。用已知标准液的浓度及吸光度就可按公式算出待测液的浓度。

2. 用标准曲线进行换算 先配制一系列不同浓度的标准溶液, 按测定管同样方法处理显色, 在最大吸收波长( $\lambda_{\text{max}}$ )处读取各管吸光度, 以各管吸光度  $A$  为纵轴, 各管溶液浓度为横轴, 在方格坐标纸上作图得标准曲线。以后进行测定时, 只要待测液以相同条件在  $\lambda_{\text{max}}$  处读取吸光度  $A$ , 就可从标准曲线上查得该待测液的相应浓度。

标准曲线范围选择在待测物浓度 0.5 ~ 2 倍之间较好, 并使吸光度在 0.05 ~ 1.00 范围为宜, 所作标准曲线仅供短期使用。标准曲线制作与待测液测定应在同一台仪器上进行, 有时尽管型号相同, 操作条件完全一样, 因不是同一台仪器, 其结果会有一定误差。

3. 利用摩尔消光系数  $\epsilon$  待测液浓度 当溶液浓度为 1mol/L、溶液厚度为 1cm 时的吸光度值称为摩尔消光系数, 以  $\epsilon$  表示, 此时  $\epsilon$  与  $A$  相等。

已知  $\epsilon$  情况下, 读取待测液径长为 1cm 时的吸光度  $A$ , 根据下式可求出待测液浓度:

$$C = \frac{A}{\epsilon}$$

此计算式常用于紫外吸收法, 如蛋白质溶液含量测定, 因蛋白质在波长 280nm 下具有最大吸收峰, 利用已知蛋白质在波长 280nm 时的摩尔消光系数, 再读取待测蛋白质溶液的吸光度, 即可算出待测蛋白质的浓度, 无需显色, 操作简便。

#### 五、仪器的结构

分光光度计的种类很多, 其原理和结构基本相似, 一般都包括以下几个部件:

