

全国高等院校医学实验教学规划教材

生物化学与分子生物学实验

第2版

主编 王顺 杨菁



科学出版社

全国高等院校医学实验教学规划教材

生物化学与分子生物学实验

第2版

主 编 王 顺 杨 菁
副主编 许珂玉 朱艳凌 张 蕾 李 宁 张秀梅
编 者 (按姓氏笔画排序)

王 顺	锦州医科大学	王翠瑶	锦州医科大学
付晶京	锦州医科大学	包晓红	锦州医科大学
朱艳凌	锦州医科大学	刘 超	锦州医科大学
许珂玉	锦州医科大学	李 宁	锦州医科大学
李宗泽	锦州医科大学	杨 菁	锦州医科大学
张 蕾	锦州医科大学	张秀梅	锦州医科大学
赵 勇	锦州医科大学	黄艳丽	锦州医科大学
崔明宇	锦州医科大学		

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

生物化学与分子生物学是生命科学的前沿学科,其理论与基本实验技术已广泛渗透并应用于生命科学的各个领域。掌握生物化学与分子生物学的基本实验技术不仅是医学生的必备能力,也是实施创新教育的重要手段。为培养学生的动手能力、独立分析问题和独立解决问题的能力,本教材在介绍生物化学与分子生物学基本实验操作和常用技术及仪器使用的基础上,根据实验内容的特点,将实验分成经典验证性实验、综合性实验、研究性实验和创新性实验,为本科生进行基本的科研训练提供帮助,并为开展创新性实验和科学研究提供思路。本教程也可供医学相关专业的本科生、研究生和科研工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验 / 王顺, 杨菁主编. —2版. —北京: 科学出版社, 2017.8

全国高等院校医学实验教学规划教材
ISBN 978-7-03-054060-7

I. ①生… II. ①王… ②杨… III. ①生物化学-实验-医学院校-教材
②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(2017)第185326号

责任编辑: 朱 华 车 艳 / 责任校对: 郭瑞芝

责任印制: 赵 博 / 封面设计: 范 唯

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>

安泰印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011年3月第一版 开本: 787×1092 1/16

2017年8月第二版 印张: 7 1/2

2017年8月第八次印刷 字数: 166 000

定价: 29.80元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

全国高等院校医学实验教学规划教材（第2版）

总编委会

主任 曲 巍

副主任 崔洪雨 肖建英 王爱梅 温有锋

贾云宏 徐 军 万义增

委员 （按姓氏笔画排序）

于 利 于秋泓 万义增 王 顺 王亚平

王昌军 左中夫 叶丽平 李华侃 杨 菁

杨春雨 张 莉 张轶博 单 颖 徐 军

高 航 阎文柱

总策划 崔洪雨

秘 书 马丽娜

总 序

医学专业教育不仅要让学生系统掌握医学理论知识，更需要关注学生实践技能、科学思维和创新能力的培养。实验教学与理论教学相辅相成，在全面提高医学教育质量方面有着理论教学不可替代的作用，是高等教育体系中的一个重要环节，是医学教育教学的重要组成部分。实验教材是体现实验教学内容和教学方法的知识载体，是指导学生动手操作、培养学生实践能力的重要工具，是做好实验教学、提高实验教学质量的重要保证，是培养创新型人才的重要手段。为顺应当代医学发展形势、满足医学教育和医学生培养需求，建立以能力培养为主线，分层次、多模块、相互衔接的实验教学体系，培养适应 21 世纪医药卫生事业发展的高素质医学人才，从实际应用性出发，构建具有自身特点的实验教学内容和建材体系。

系列实验教材第 1 版于 2011 年由科学出版社出版发行，为推动实验教学改革，整合实验教学资源，完善实验教学体系，提高实验教学水平，于 2016 年 10 月对第 1 版系列教材进行全面修订。第 2 版教材由长期工作在教学、科研、医疗第一线的具有丰富理论与实践教学经验的教师编写而成，延续上一版教材的结构框架，将实验内容分为基本实验操作及常用仪器使用、经典验证性实验、综合性实验、研究创新型实验，并依据学科特点适当调整结构比例，增加综合性、创新性实验项目，减少验证性实验。进一步整合、更新了实验项目，删减陈旧内容，纠正在使用过程中发现的问题，使实验项目设置更加科学，实验技术操作更加规范，更有利于培养和提高学生实践能力、观察能力、分析和解决问题能力。

第 2 版实验系列教材共八本，包括《医用化学实验》《医用物理学实验》《医学大体形态学实验》《医学显微形态学实验》《医学机能实验学》《生物化学与分子生物学实验》《医学免疫学与病原生物学实验》《临床技能学》。其中《临床技能学》融合视频、音频等富媒体技术，使纸质教材与数字教材有机地结合，顺应教材多样化、个性化的发展需要。

本系列教材读者对象以本科、专科临床医学专业为主，兼顾预防、口腔、影像、麻醉、检验、护理、药学等专业需求，涵盖医学生基础医学全部实验教学内容。

在修订过程中，虽经全体编委努力工作及反复修改，但由于水平和时间限制，教材中难免有疏漏或缺陷，恳请读者和同行专家提出宝贵意见。

全国高等医学院校实验教学规划教材
总编委会
2017 年 7 月

前 言

生物化学与分子生物学是一门重要的实验性基础医学学科，生物化学与分子生物学的实验技术和方法不仅为生物化学与分子生物学的迅速发展创立了条件，也为其他基础医学和临床医学的研究奠定了基础。生物化学与分子生物学的理论和技术已经渗透到其他基础医学和临床医学的各个领域，产生了诸如分子遗传学、分子免疫学、分子病理学、分子药理学等交叉学科。因此，生物化学与分子生物学对医学的发展起着促进作用，成为生命科学的共同语言和前沿学科。

近年来，各高等医学院校在生物化学与分子生物学实验方面都进行了较大幅度的改革，改革的总体目标是注重培养学生的动手能力、独立思考、独立分析和独立解决问题的能力，最终使学生的创新能力和综合素质得以全面发展和提高。在这种思想指导下，我校生物化学与分子生物学实验教学在改革中不断发展、不断完善，主要经历了三个阶段：经典验证性实验阶段、部分验证性实验向综合性实验转变阶段和部分生物化学实验向分子生物学实验转变阶段。当今学科的快速发展和医学对人才的需求又促使生物化学与分子生物学实验教学进入了由综合性实验向研究性实验和创新性实验转变的关键时期，可以预见研究性、创新性实验的全面开展将对提高我校生物化学与分子生物学教学质量和学生的综合素质起到积极地推进作用。

在总结以往实验教学工作的基础上，于2011年出版了第1版实验教程，经过五年多的实践，效果很好。本次再版改编，是在第1版实验教程的基础上加以修改和完善，删除了一些应用不多、内容陈旧的验证性实验，增添了一些常用仪器的使用，并在保持原有四大版块的基础上，结合我校的大学生创新创业训练项目开展情况，甄选了两个已经发表成果的实验训练项目，构成创新性实验版块，使本实验教程在保持原有特色的基础上，为本科生开展创新性实验和科学研究提供思路，本教程也可供不同院校的使用者参考。

参加本书编写人员都是我校本科生物化学与分子生物学实验教学的一线教师和有经验的实验技术人员。在编写过程中力争博采众家之长，既注意到理论与实践相结合、重点突出，又注意到各部分之间的系统性，尽量做到教材难易适中。尽管如此，由于我们水平有限，疏漏和错误仍在所难免，肯请各位同仁指正。

王 顺 杨 菁

2016年12月

目 录

前言	
概述	1
一、生物化学与分子生物学实验课的性质、任务与目的	1
二、生物化学与分子生物学实验室安全与规则	1
三、实验报告书写	2
第一章 基本实验操作与常用技术及仪器的使用	3
第一节 基本实验操作	3
一、玻璃器皿的洗涤与干燥	3
二、移液器的使用	4
三、液体的混匀	6
四、沉淀的分离	6
五、常用生物材料的处理	7
第二节 常用技术及仪器的使用	9
一、离心技术与离心机	9
二、分光光度分析技术与分光光度计及酶标仪	10
三、电泳技术与电泳仪	12
四、层析技术与层析柱	16
五、体外 DNA 扩增技术与 PCR 仪	20
第二章 经典验证性实验	26
实验一 蛋白质的盐析作用	26
实验二 乳酸脱氢酶及其辅酶 I 的作用	27
实验三 血清谷丙转氨酶活性的测定	29
实验四 血糖浓度测定	32
一、Folin-吴氏法	32
二、葡萄糖氧化酶偶联法 (GOD-POD 法)	34
实验五 胰岛素及肾上腺素对血糖浓度的影响	36
实验六 运动对尿中乳酸含量的影响	37
实验七 酮体的生成和利用	39
实验八 胆固醇提取定性	40
实验九 血清总胆固醇的测定	42
一、醋酐-硫酸单一试剂显色法测定总胆固醇	42
二、氧化酶法测定血清总胆固醇	43
第三章 综合性实验	45
实验十 蛋白质含量的测定	45
一、紫外分光测定法	45
二、Lowry 法测定蛋白质含量	46
三、考马斯亮蓝法	48
实验十一 血清 LDH 同工酶谱分析	49
一、乙酸钠纤维素薄膜电泳法	50
二、琼脂糖凝胶电泳法	52
实验十二 碱性磷酸酶 K_m 值的测定	55
实验十三 碱性磷酸酶分离纯化及活性的测定	57
一、碱性磷酸酶的提取分离和纯化	58
二、碱性磷酸酶比活性的测定	60
实验十四 DNA 琼脂糖凝胶电泳	63
实验十五 聚合酶链式反应技术 (PCR) 体外扩增 DNA	64
实验十六 质粒 DNA 的制备 (碱变性法)	66
实验十七 血清蛋白质的电泳分离	69
一、血清蛋白质乙酸钠纤维素薄膜电泳	69
二、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (圆盘电泳)	71
实验十八 SDS-PAGE 电泳测定蛋白质的相对分子量	75
实验十九 蛋白质印迹	79
第四章 研究性实验	82
实验二十 凝胶过滤层析法分离纯化脲酶	82
实验二十一 离子交换层析法分离血清蛋白质	86
实验二十二 RT-PCR 技术	87
一、总 RNA 的提取	87

二、RT-PCR·····	89	实验二十六 支架蛋白 RACK1 小干扰	
实验二十三 真核生物基因组 DNA 的		RNA 抑制卵巢癌细胞 CAOV3	
提取与鉴定·····	90	的增殖、迁移和侵袭·····	102
实验二十四 基因克隆及蛋白原核表达·····	92	附录·····	106
第五章 创新性实验·····	96	附录 1 常用溶液的配制·····	106
实验二十五 食管癌 <i>PAX9</i> 基因的克隆		附录 2 常用培养基的配制·····	111
及重组载体构建·····	96	彩图	

(二) 实验室规则

生物化学与分子生物学实验的很多试剂都具有强烈的腐蚀性和剧毒性,因此,在实验操作过程中要严格遵守操作规程,小心操作。

1. 生物化学与分子生物学实验具有独特的实验技能,在教师的指导下,学生应认真完成每次实验内容。

2. 实验前认真预习实验内容,明确实验目的,理解实验基本原理及大体操作步骤。

3. 实验中正规操作,掌握关键环节,认真观察,做好实验记录,数据和结果真实。

4. 实验后及时总结,并对实验结果进行综合分析,展开讨论,按时完成实验报告。

5. 遵守实验室各项规章制度,爱护仪器。节约使用试剂、煤气、水、电等,保持室内卫生。

6. 遵守课堂纪律,不迟到不早退,实验室内严禁吸烟、饮食、大声喧哗,同学之间应互助友爱。

7. 实验完毕后,要按照各种器材(如试管、比色杯等)的清洗方法进行清洗;要关闭仪器设备的开关和电源,并将仪器整理好;打扫卫生并关好实验室门窗,经实验室工作人员检查合格后方可离开。

三、实验报告书写

生物化学与分子生物学实验课要求同学们在实验中严肃认真地进行操作,如实记录所观察到的各种现象和得到的实验数据,并要求实验后认真总结和分析,完成实验报告。

(一) 实验记录

实验记录是指在实验中将观察到的现象和测量的数据及时、准确、翔实记录在记录本上。此记录必须客观,不可掺杂任何主观因素,不受已有资料及他人实验结果的影响。每个结果尽可能观测2次以上。

完整的实验记录应包括日期、实验内容、现象及结果,使用仪器的型号及生产厂家;生物材料的来源、选用的组织及其重量;试剂的规格和浓度等。

(二) 实验报告

实验报告是实验的总结和综合分析,通过实验报告的写作可以学会实验数据的处理方法,加深对实验理论和实验技术的理解和掌握,同时也是学习撰写科学研究论文的过程。

完整实验报告的内容包括实验名称、实验目的、实验原理、实验操作、实验结果、讨论、结论、实验者和实验日期等。

(王 顺)

第一章 基本实验操作与常用技术及仪器的使用

第一节 基本实验操作

一、玻璃器皿的洗涤与干燥

生物化学与分子生物学实验所用器材必须清洁，以免杂质污染，影响实验结果。在定量分析实验中要求更加严格。

(一) 可用毛刷刷洗的玻璃器皿清洗方法

一般容器如烧杯、试管、三角瓶等先用自来水冲洗，用毛刷蘸肥皂粉或去污粉刷洗，然后用自来水冲洗，至器壁光洁不挂水珠，最后以少量蒸馏水冲洗3次，倒置晾干即可。

(二) 不能用毛刷刷洗的玻璃器皿清洗方法

吸管、容量瓶等不能用毛刷刷洗，先用自来水冲洗，然后用洗液浸泡数小时，捞出并倒净洗液，用自来水充分冲洗至水不显黄色后再冲几次，最后用少量蒸馏水冲洗2~3次晾干备用。

在做酶学实验时，对器材的清洁要求更高，因如有极微量的污物（如重金属离子）即可导致整个实验失败。因此，必要时，器皿经上述方法洗涤后，还需用稀盐酸或稀硝酸洗涤，以除去铬及其他金属离子，然后再用自来水、蒸馏水冲洗。

(三) 生化实验室常用的洗液

1. 铬硫酸液 浓度一般为5%或10%。

(1) 5%铬硫酸液的配制方法：取重铬酸钾粉末5g，放烧杯中，加水5ml，搅拌使其尽量溶解（可小火加热），然后缓缓加入粗浓硫酸100ml，边加边摇匀。溶液由红色变成棕红色，冷却后倒入有盖的容器内保存。

铬硫酸液清洁效力主要利用其强氧化性。当遇有被氧化物存在时，发生氧化还原反应，氧化作用很强，可以使有机物炭化，进一步氧化分解。硫酸越浓，铬酐越多，则清洁效力越强。当洗液变成绿色时，即失去氧化能力。

(2) 铬硫酸液配制注意事项：①重铬酸钾有毒，配制和使用时一定要注意，小心操作；②配制铬硫酸液时注意安全，要把硫酸缓慢地加到水里；③使用铬硫酸液时要小心，不要溅到眼、皮肤和衣服上；④用铬硫酸液浸泡仪器时，尽量把仪器先用水冲洗干净，并使其干燥，再浸入洗液内，以防吸水，可以较长时间使用。

2. 10%尿素液 为蛋白质良好溶剂，适用于洗涤盛血的容器。

3. 草酸盐液 用于清洗过锰酸钾的痕迹。

4. 硝酸液 用1:1的硝酸水溶液，用于清洗CO₂测定器及微量滴定管。

5. 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA- Na_2) 液 5%~10%的 EDTA- Na_2 液可用于洗涤器皿内无机盐类。

(四) 玻璃器皿的干燥

玻璃器皿的干燥方法可根据不同仪器种类而定。一般地说洗净后的玻璃仪器,如不急用应倒置放在晾架上令其自然干燥,若有急用可放在烘烤箱中烤干(105~110℃, 1h)。但容量玻璃仪器,如容量瓶、吸量管、滴定管以及烧结、结构复杂的玻璃仪器等,严禁烘烤。此类玻璃仪器,如急用可采用水泵抽气法干燥。

二、移液器的使用

(一) 刻度吸量管

吸量管是生物化学与分子生物学实验中最常用的量器,实验结果的准确程度与能否正确使用吸量管有密切关系。因此必须熟悉各种吸量管的规格,掌握正确使用方法。

1. 吸量管规格 常用的吸量管包括:①刻度吸管,如1ml、2ml、5ml、10ml等规格;②微量吸量管,如0.05ml、0.1ml、0.2ml、0.5ml等规格,使用时要根据实际需求选用合适规格的吸量管。

2. 吸量管的使用方法 取液时,用右手拇指和中指夹住管身上端,使食指能自由按住上口,用左手拿洗耳球。吸取液体时,待液面上升到所需刻度线的上方,迅速用右手食指按住上口,用滤纸擦去管身下端外壁吸附的多余液体,然后稍松食指,调整液面下降到所需刻度。调整刻度时,吸管垂直,液面与眼同高,视线、液面凹面底部与所需刻度在同一水平。放液时,把吸管插进受器,使吸管尖端接触管壁,与受器成一定角度,使液体自然流出,或根据食指与上口接触松紧程度来控制流出速度。在使用吸量管量取总量或用下段时,必须在液体流出后,停留10~15秒,转动吸管,使尖端内部液体流出。使用微量吸管时,放出液体后,吸管尖端靠壁停留10~15秒,然后用洗耳球把吸管尖端液体吹出。

(二) 可调式移液器

1. 移液器规格与种类 移液器是分子生物学实验中常用的微量移液装置,常用的有0.1~2.5 μl 、0.5~10 μl 、2~20 μl 、5~50 μl 、10~100 μl 、20~200 μl 、50~200 μl 、100~1000 μl 等不同规格,使用时注意根据实际需求选用合适的移液器。

可调式移液器有单道和多道(如8道、12道等)等不同种类,可根据具体的实验来进行适当的选择。

2. 移液器使用方法

(1) 做好移液前准备,戴好手套,根据实验所需,选择相应规格的移液器及枪头(图1-1a)。

(2) 旋转移液器量程按钮,设定移液量(图1-1b)。

(3) 安装枪头(图1-1c),并用拇指把按钮压至第一挡(图1-1d)。

(4) 吸液:垂直握持加样器,使枪头浸入液面下2~3mm处,然后缓慢平稳地松开按钮,使其复原,吸入液体,停留片刻,然后将枪头提离液面,贴壁停留2~3秒,使管尖

外侧的液滴滑落(图 1-1 e)。

(5) 放液: 枪头贴到受器内壁底部, 平稳地把按钮压到第一挡后, 再把按钮压到第二挡, 排尽液体(图 1-1 f)。

(6) 松开按钮, 恢复至原来的位置(图 1-1 g)。

(7) 按枪头弹射器弃去枪头(图 1-1 h), 旋转移液器量程按钮, 恢复至最大量程, 将移液器放回移液器支架。



a. 移液前准备

b. 设定移液量

c. 安装枪头

d. 按钮按压至第一挡位置

e. 吸液, 枪头尖端插入液面下, 轻抬拇指吸取液体

f. 放液, 按压至第一挡后, 再按压第二挡, 排尽液体

g. 松开按钮, 恢复至原来的位置

h. 按枪头弹射器弃去枪头

图 1-1 可调式移液器的使用方法

3. 移液器使用注意事项

(1) 每天开始工作之前应检查移液器的外表面是否有灰尘或污物; 若有, 则小心抹去。

(2) 吸取液体时应缓慢均匀吸取, 避免液体溅到移液器头上; 排出液体后拇指不应松开按钮, 枪头离开液面后再将拇指松开, 避免液体回吸。

(3) 在调整取液量的旋钮时, 不要用力过猛, 并应注意计数器显示的数字不要超过其可调范围。

(4) 连续可调式移液器在取样加样过程中应注意枪头不能触及其他物品, 以免被污染; 枪头盒、废液瓶、所取试剂及加样的样品管应按规定摆放, 以方便操作和避免污染。

(5) 可调式移液器在使用完毕后应放置于移液器支架上, 远离潮湿及腐蚀性物质。

(6) 在移液操作过程中, 为防止液体进入加样器套筒内, 必须注意: ①压放按钮时保持平稳; ②加样器不得倒转; ③枪头中有液体时不可将加样器平放。

(7) 移液器应根据使用频率进行维护, 但至少应每 3 个月进行一次, 具体方法如下: 一般维护可用中性洗涤剂清洁, 或者用 60% 的异丙醇, 然后用蒸馏水反复洗涤, 去除洗涤剂或异丙醇, 晾干。清洁后, 在活塞处可使用一定量的润滑剂。如果有液体进入加样器内的严重污染, 可将加样器拆开后进行清洁, 具体拆开步骤可参照可调式移液器说明书操作。

三、液体的混匀

在生物化学与分子生物学实验中, 除特殊情况外, 一般每加一个试剂后, 都要随时混匀, 以保证反应充分进行, 不混匀则往往影响实验结果。下面简单介绍几种混匀液体的方法, 可根据使用器皿的液体容量而选用。

1. 旋转混匀法 手持容器作离心旋转, 适用于未盛满液体的试管或小口器皿, 如三角瓶等。

2. 弹指混匀法 左手持试管使之直立, 以右手食指轻击试管之下部, 使管内溶液作旋转流动。

3. 倒转混匀法 适用于有玻璃塞的瓶子, 颠倒数次使液体混匀, 如容量瓶等。

4. 弹动混匀法 以右手大拇指、食指、中指握住试管上部, 将试管放平, 于左手掌中弹动。

5. 吸管混匀法 用吸管将溶液反复吸放数次, 适用于量少而无沉淀的液体。

6. 搅拌混匀法 适应烧杯等大口容器所盛之溶液的混匀, 一般在配制混合试剂时, 用玻棒搅拌以助溶, 或混匀大量的溶液。

四、沉淀的分离

1. 过滤 一般生物化学与分子生物学实验中, 常用过滤法分离沉淀, 滤液用于各种分析。过滤用优质滤纸和小漏斗进行。先把圆形滤纸对折两次成圆锥体与漏斗内壁靠紧, 滤纸与漏斗壁之间无气泡, 使过滤速度加快, 向滤纸上倾注液体, 沿玻璃棒加于中央, 加液量不要过多。

2. 离心分离 被分离的液体量过少或黏稠, 难以过滤或不适于长时间过滤者, 可离心分离 (参见第一章第二节离心技术)。目前常用的电动离心机转速快, 分离效果较好, 能迅速地使溶液中的悬浮物沉淀下来, 使上清液和沉淀物分离, 用于进一步分析。

五、常用生物材料的处理

测定组织中某种物质的含量、分析研究物质代谢的过程和规律，经常使用动物的肝、肾、脑、黏膜和肌肉等组织，也选用全血、血浆、血清或者无蛋白血滤液等血液样品，有时也采用尿液、胃液等完成各种实验测试。掌握以上各种实验样品的正确处理和制备方法 是保证实验顺利进行的关键。

测定用的血液，多由静脉采集。一般在空腹时采取，因为空腹时血液中化学成分含量比较稳定。采血时所用的针头、注射器，盛血容器要清洁干净。接血时应让血液沿着容器壁慢慢注入，以防溶血和产生泡沫。

(一) 血浆的制备

在盛血的容器中先加入一定比例的抗凝剂（抗凝剂：血液 = 1 : 9），将血液加到一定量后颠倒混匀，离心（一般为 3000rpm，离心 5~10min）后所得的上清液即为血浆。初用者最好将上清移至另一清洁容器，吸出血浆时用毛细吸管贴着液面逐渐往下吸，切忌不能吸起细胞成分。

富含血小板血浆制备：将获得的血液经 800rpm，离心 5min，其上清即为富含血小板血浆。

(二) 血清的制备

获得的血液不能抗凝，盛于离心管或可以离心的器皿中，静置或置 37℃ 环境中促其凝固，待血液凝固后，将其平衡后离心（一般为 3000rpm，离心 5~10min），得到的上清液即为血清，可小心将上清吸出（注意切勿吸出细胞成分），分装备用。

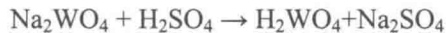
(三) 无蛋白血滤液的制备

测定血液或体液其他化学成分时，样品内蛋白质的存在常常干扰测定结果。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。现介绍几种常用的方法：

1. 钨酸法

(1) 原理：钨酸钠与硫酸混合，生成钨酸。



血液中蛋白质在 pH 小于等电点的溶液中可被钨酸沉淀，悬浮液过滤或离心，上清液 即为无色透明、pH 约等于 6 的无蛋白滤液。可供测定非蛋白氮、血糖、氨基酸、尿素、 尿酸及氯化物等使用。

(2) 制备方法：①取 50ml 锥形瓶 1 只，加入蒸馏水 7 份；②用奥氏吸管吸取抗凝血 1 份，擦去管壁外血液，将吸管插入锥形瓶底部，缓缓放出血液。放完血液后，将吸管提高 吸取上清液再吹入，反复洗管 3 次。充分混合，使红细胞完全溶解；③加入 0.333mol/L 硫 酸溶液 1 份，随加随摇，充分混匀，此时血液由鲜红变成棕色，静置 5~10min，使其酸化 完全；④加入 10%钨酸钠 1 份，随加随摇；⑤放置约 5min 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（2500rpm，10min），即得完全澄清 无色的无蛋白血滤液。

用此法制得的无蛋白血滤液为 10 倍稀释的血滤液。即每毫升血滤液相当于 0.1ml 全血。

2. 氢氧化锌法

(1) 原理：血液中蛋白质在 pH 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于血液葡萄糖的测定（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) 制备方法：①取干燥、洁净的 50ml 锥形瓶或大试管 1 支，准确加入 7 份水；②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 0.5mol/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（2500rpm，10min），除去沉淀，便得到完全澄清的无蛋白血滤液。此滤液亦为稀释 10 倍之血滤液。

3. 三氯乙酸法

(1) 原理：三氯乙酸为有机强酸，能使蛋白质变性而沉淀。

(2) 制备方法：取 10% 三氯乙酸 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，过滤或离心。即得 10 倍稀释之清明透亮的滤液。

(四) 尿液样品的处理

一般定性实验只需将尿收集一次即可，但一天之中各次排出尿液的成分随食物、饮水及一昼夜的内生理变化等影响而有很大的差异，因此定量测定尿液中各种成分皆应收集 24h 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，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。必要时可在收集尿时在收集的玻瓶中加入防腐剂如甲苯、盐酸等，通常每升尿中约加入 5ml 甲苯或 5ml 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。

(五) 组织材料的处理

在生物化学与分子生物学实验中，经常利用离体组织研究各种物质代谢途径和酶系的作用，或者从组织中分离、纯化核酸、酶以及某些有意义的代谢物质进行研究。

1. 动物的处死 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冷条件下进行，并尽快完成测定，否则其所含物质的量和生物活性都将发生变化。一般采用断头法处死动物，放出血液，立即取出所需脏器或组织，除去脂肪和结缔组织，用冰冷生理盐水洗去血液，再用滤纸吸干，称重后，按实验要求制成匀浆或者组织糜。

2. 匀浆的制备

(1) 组织糜：迅速将组织剪碎，用捣碎机绞成糜状，或加入少量砂于乳钵中，研磨至糊状。

(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。由于匀浆器的杵头在高速运转中会产生热量，因此在制备匀浆时，需将匀浆器置于冰水中。

常用的匀浆制备液有生理盐水、PBS 缓冲液和 0.25mol/L 的蔗糖液等，可根据实验的要求加以选择。

(3) 组织浸出液：上述组织匀浆液再经过离心，分离出的上清液就是组织浸出液。

(王 顺)

第二节 常用技术及仪器的使用

一、离心技术与离心机

离心技术是借助于离心机旋转所产生的离心力，依据物质质量、密度、形状等物理性状不同而进行物质的分离、浓缩和分析的一项技术，广泛应用于生物制品、生物工程、食品科学、生物化学与分子生物学及医学等领域。

离心力 (centrifugal force, F) 与角速度的平方、颗粒到旋转中心轴距离成正比。公式为： $F=m\omega^2r$

式中 m ：沉降颗粒的有效质量 (g)， ω ：颗粒旋转的角速度 (弧度/秒, rad/s)； r ：颗粒的旋转半径 (cm)，即颗粒到旋转中心轴的距离。

由于不同离心机转子的半径或离心管到旋转中心轴的距离不同，即使相同转速情况下，产生的离心力不同，因此通常我们用相对离心力来反映颗粒在离心管中不同位置的离心力及其动态变化。相对离心力 (relative centrifugal force, RCF) 是指在离心场中，作用于颗粒的离心力相当于地球重力的倍数，单位是重力加速度“g”。只要 RCF 值相同，一个样品可以在不同的离心机上获得相同的结果。

$$RCF = m\omega^2r/mg = \omega^2r/g = 1.118 \times 10^{-5} \times n^2 \times r$$

式中 m ：沉降颗粒的有效质量 (g)， ω ：颗粒旋转的角速度 (弧度/秒, rad/s)； r ：颗粒的旋转半径 (cm)，即颗粒到旋转中心轴的距离； g ：重力加速度 (980cm/s)； n ：为转子每分钟的转速 (rpm)。

(一) 离心机的分类

离心机依据转子能达到的最高转速可分为三种：

1. **低速离心机** 转速为 10 000rpm 以下，RCF 在 11 000×g 以下。低速离心机主要用于快速收集易沉降的物质、分离细胞、细胞碎片等颗粒物质及粗提的大颗粒。
2. **高速离心机** 转速在 10 000rpm~30 000rpm，最大 RCF 为 90 000×g。高速离心机主要用于微生物、较大的细胞器、生物大分子等的分离、纯化和浓缩。
3. **超速离心机** 转速大于 30 000rpm。超速离心机可用于亚细胞器的分级分离，病毒、蛋白质、核酸和多糖等生物大分子的分离和分子量的测定。

为防止生物大分子在高速离心过程中由于温度升高而失活，高速和超速离心机设有冷冻装置，可使温度控制在 0~4℃。

(二) 离心机的组成

离心机主要由驱动电机、制冷系统 (高速和超速离心机)、真空系统 (超速离心机)、显示系统、自动保护系统和控制系统组成，配件有离心转子和离心管 (图 1-2)。

离心转子分为角式转子和水平转子、垂直转子等。角式转子是指转子的离心管腔与转轴保持 20°~30°的固定角度。由于结构稳定，可装载较多的样品和使用较高的转速。水平

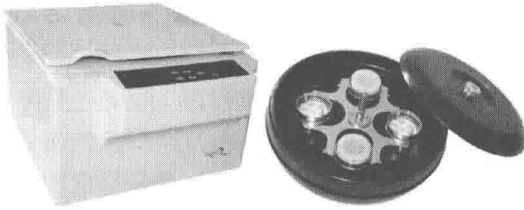


图 1-2 离心机与离心转子

转子也称吊篮式转子。静止时离心管垂直挂在转头上,当转子转速达 600rpm 后达到水平位置,通常一个转子挂 3 个或 6 个吊篮。用水平转子离心时,样品沉降方向是顺管子的轴向移动的,最后沉降在管底。便于收集,但由于转头结构复杂,最高转速相对要低,容量也小一些。

离心管主要有玻璃、塑料和不锈钢离心管。

(三) 离心机的使用

1. **平衡** 将装有待离心样品的离心管放入天平的一侧,用相同的离心管加水放入天平的另一侧配平。
2. **对称** 将已平衡好的离心管放入离心机的对称位置,盖好离心机盖。
3. **启动** 选择离心机上面的“选择”按钮,进行转速和时间的设定,然后按“开始”按钮。在使用冷冻离心机前要先预冷,当达到所设温度时选择“开始”按钮,启动离心机。
4. **结束** 当离心结束后,离心机显示转速为“0”时,取出离心管,关闭离心机。

(四) 离心机使用注意事项

1. 离心机需放在牢固平稳的平面上,保持水平位置。
2. 使用离心机,关键问题是对称位置离心力平衡,不仅对称位置上的总重量相等,而且重心所在位置也应对称,只有这样才能保证仪器正常运转和得到较好的离心效果。
3. 启动或离心过程中出现异常响声时,要及时停机进行检查。
4. 离心过程中勿使液体溅出腐蚀机体,机腔内保持干燥清洁。
5. 离心机要经常检查和维修。

(杨菁)

二、分光光度分析技术与分光光度计及酶标仪

(一) 分光光度分析技术的基本原理

分光光度分析技术是利用物质对某种波长的光具有选择性吸收的特性建立起来的物质定性或定量的一项技术。分光光度分析技术用分光光度计进行测定,以棱镜或光栅为分光器,获得单色光。分光光度分析技术根据光源和测定原理分为紫外分光光度法、可见分光光度法和红外分光光度法。当一束单色光通过溶液时,一部分被吸收,一部分则透过溶液。设入射光强度为 I_0 ,透射光强度为 I_t ,则透光度 T 为 I_t/I_0 ,光吸收值 A 可表示为 $A = -\lg T$ 。根据 Lambert-Beer 定律,当一束单色光通过均一溶液时,该溶液对光的吸收的程度与溶液的浓度和溶液的厚度的乘积成正比。其关系式为:

$$A = -\lg T = KCL$$

式中 T : 透光度, C : 溶液浓度, L : 溶液厚度 (cm), K : 消光系数 (常数,与物质种类、光线波长和溶液温度有关)。