



中国科学院教材建设专家委员会规划教材
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

主 编 李 荷 何凤田



科学出版社

中国科学院教材建设专家委员会规划教材
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

主 编 李 荷 何凤田

副主编 罗少洪 何震宇 李春梅 崔炳权

编 委 (按姓氏汉语拼音排序)

崔炳权 (广东药科大学)

高 蓝 (广东药科大学)

顾取良 (广东药科大学)

何凤田 (第三军医大学)

何震宇 (广东药科大学)

李 荷 (广东药科大学)

李春梅 (广东药科大学)

罗少洪 (广东药科大学)

梅寒芳 (广东药科大学)

杨泽民 (广东药科大学)

游 娟 (广东药科大学)



科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书是《生物化学与分子生物学》案例版配套教材。全书共两篇,第一篇为生物化学与分子生物学实验基本操作、基本技术及原理,包括生物化学与分子生物学实验的基本操作,常用实验技术和原理,实验记录和实验报告书写要求等内容。第二篇为生物化学与分子生物学实验,参照理论课章节编排设计了蛋白质化学、核酸化学、酶学实验、生物大分子的分离实验、分子生物学实验、生化指标检测、综合性实验等7个单元,共35个实验。

本书既可供医药领域院校本科各专业教学使用,也可作为研究生及从事相关专业研究人员的技术参考书,还可作为医学生完成学业、考研和医师资格考试的参考书籍。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验 / 李荷, 何凤田主编. —北京: 科学出版社, 2016.6

中国科学院教材建设专家委员会规划教材·全国高等院校医学实验教学改革规划教材

ISBN 978-7-03-048890-9

I. ①生… II. ①李… ②何… 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. ①Q5-33②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 136597 号

责任编辑: 赵炜炜 胡治国 / 责任校对: 蒋 萍

责任印制: 赵 博 / 封面设计: 陈 敬

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>

保定市中华美凯印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016年6月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2016年6月第一次印刷 印张: 9 1/4

字数: 178 000

定价: 29.80 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

生物化学与分子生物学作为生命科学的核心，其理论、方法、技术在医药领域广泛应用，因此，也早已成为许多相关学科各层次学生的必修课程。对于药学院校各专业学生而言，生物化学与分子生物学是一门非常重要的专业基础课，而生物化学与分子生物学实验课是对其理论课进一步的完善和补充。

根据几十年来开设的生物化学与分子生物学实验课的经验和体会，同时基于与时俱进地将近年来相关新方法、新技术尽快地传授给学生的目的，我们在原有的并已使用多年的生物化学实验教材的基础上，对其具体的内容进行了适度的修改、调整和补充，编写了这本《生物化学与分子生物学实验》。本实验教材的编写，在于初步培养学生独立分析问题和解决问题的能力，在了解、掌握生物化学和分子生物学理论、基本实验技能的基础上，将所学知识有机地运用到将要开展的药学、医学科研和教学工作以及生产实践中，同时，培养学生在实际工作中的协作精神和严谨、求实、勤俭、高效的作风。

全书共分两篇。第一篇为生物化学与分子生物学实验基本操作、基本技术及原理，包括生物化学与分子生物学实验的基本操作，常用实验技术和原理，实验记录和实验报告书写要求等内容。第二篇为生物化学与分子生物学实验，参照理论课章节编排设计了蛋白质化学、核酸化学、酶学实验、生物大分子的分离实验、分子生物学实验、生化指标检测、综合性实验等7个单元，共35个实验。

《生物化学与分子生物学实验》既可供医药院校本科各专业教学使用，也可作为研究生及从事相关专业研究人员的技术参考书，还可作为医学生完成学业、考研和医师资格考试的参考书籍。

由于编者水平有限，本教材难免存在一些不足，恳请谅解并衷心希望提出宝贵的意见和建议。

编 者
2016年5月

目 录

总论	1
----------	---

第一篇 生物化学与分子生物学实验基本操作、基本技术及原理

第一章 生物化学与分子生物学实验基本操作	4
第二章 实验样品的制备与保存	9
第三章 分光光度法	12
第四章 层析法	16
第五章 电泳法	22

第二篇 生物化学与分子生物学实验

第一章 蛋白质化学	30
实验一 Folin 酚试剂法测定蛋白质含量	30
实验二 BCA 法测定蛋白质浓度	32
实验三 双缩脲法测定蛋白质含量	34
实验四 蛋白质的两性反应与等电点测定	35
实验五 蛋白质的沉淀反应	38
第二章 核酸化学	43
实验六 紫外吸收法测定核酸含量	43
实验七 定磷法测定核酸含量	45
实验八 地衣酚法测定 RNA 含量	47
第三章 酶学实验	50
实验九 温度对酶活性的影响	50
实验十 酸碱度对酶活性的影响	51
实验十一 琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制	52
实验十二 酶的性质——酶的特异性	54
实验十三 碱性磷酸酶 K_m 值测定	56
实验十四 乳酸脱氢酶同工酶琼脂糖电泳法测定	58
实验十五 氨基移换作用（纸层析法）	61
实验十六 血清丙氨酸氨基转移酶活性测定	64

第四章 生物大分子的分离实验	68
实验十七 分子筛柱层析(葡聚糖凝胶过滤)	68
实验十八 血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	70
实验十九 血清蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳	72
实验二十 蛋白质的分子量测定——SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法	75
第五章 其他生化指标的检测	81
实验二十一 食物中还原糖和总糖含量测定	81
实验二十二 茶中总游离氨基酸含量测定	85
实验二十三 维生素 C 含量测定——2,6-二氯酚靛酚滴定法	87
实验二十四 血糖含量的测定	90
第六章 分子生物学实验	94
实验二十五 聚合酶链式反应及产物鉴定(PCR)	94
实验二十六 RT-PCR	96
实验二十七 DNA 的回收(琼脂糖凝胶法)	99
实验二十八 大肠杆菌感受态细胞的制备——氯化钙法	104
实验二十九 酵母双杂交实验	105
实验三十 RNA 干扰实验	110
实验三十一 蛋白质免疫共沉淀	117
第七章 综合性实验	122
实验三十二 血清 γ -球蛋白的分离与纯化	122
实验三十三 动物组织核酸的提取和含量测定	126
实验三十四 基因组 DNA 的提取与电泳检测	131
实验三十五 质粒 DNA 的快速提取制备及酶切鉴定	136
参考文献	141



总 论

生物化学与分子生物学是当代生命科学领域中一门重要的基础学科，它涵盖的基础理论、基本知识、基本技术与医学研究各学科领域密切相关，其理论与技术的发展，推动了生命科学的发展，对人类的科技进步与文明产生巨大影响。生物化学实验是生命科学相关专业学生必修的一门独立的基础实验技术课程，其研究技术的发展与应用是依据物理学、化学及生物学的基本理论和实验方法而建立起来的。20 世纪 20 年代微量分析的发展，30 年代电子显微镜的出现，40 年代层析技术和电泳技术的兴起，以及同位素示踪技术、各种光谱技术、核磁共振技术的应用，激光、超导等新技术的出现，电子计算机技术的突飞猛进，使生物化学实验手段提高到一个崭新的水平，掌握生物化学实验方法和研究技术，对生命科学相关专业学生来说是十分重要的。

本课程主要侧重于给学生以基本实验方法和基本实验技能的训练，让学生了解并掌握生物化学的四大基本实验方法，即：分光光度法、离心法、层析法和电泳法。同时也注意引进一些新近发展起来的生物化学及分子生物学重要研究技术，作为学生学习其他专业课程和进入科学研究领域的准备。

一、实验要求

1. 实验前必须预习实验指导和相关理论，明确实验目的、原理、预期的结果、操作关键步骤及注意事项。
2. 实验时要严肃认真专心进行操作，注意观察实验过程中出现的现象和结果，结果不良时，必须重做。
3. 实验中，应及时将实验结果如实记录下来，并请老师当场审核。根据实验结果进行科学分析，按时将实验报告交教师评阅。

二、实验记录要求

实验记录应及时、准确、如实、详尽、清楚。

“及时”是指在实验中将观察到的现象、结果、数据及时记录在实验报告本上(每个实验报告前一页作为实验记录专用页)。回顾性的记录容易造成无意或有意失真。

实验结果的记录不可掺杂任何主观因素，不能受现成资料及他人实验结果的影响。若出现“不正常”的现象，更应如实详尽记录。

表格式的记录方式简练而清楚，值得提倡使用。记录时字迹必须清楚，不提

倡使用易于涂改及消退的笔墨做原始记录。

简单的实验记录应包括日期、题目(内容)、现象及结果(包括计算结果及各种图表)。使用精密仪器进行实验时还应记录仪器的型号及编号。

实验结束后,应及时整理和总结实验结果,写出实验报告。

三、实验报告要求

完整的实验报告应包括实验名称、实验日期、目的要求、实验原理、试剂、仪器设备、操作方法、实验结果、讨论、实验结论等多项内容。

其中,目的要求、原理、设备、试剂及操作方法等项只要求作简明扼要的叙述,不必也不应将《实验指导》原版抄录一遍。但对实验的条件、操作要点等实验成败的关键环节应作清楚描述。

实验结果首先是如实记录实验中观察到的现象及各种原始数据,还应包括根据实验要求整理、归纳数据后进行计算的过程及计算结果,根据实验数据及计算做出的各种图表(如曲线图、对照表等)。

讨论部分不是对结果的重述,而是对实验结果、实验方法和异常现象进行解析和评论,以及对实验设计的认识、体会及建议。

一般要有实验结论。结论要简单扼要,以说明本次实验所获得的结果。如在临床生化检验项目中,可评价样本检出值与相应正常值之间的异同及其临床意义。

四、实验时注意事项

1. 进实验室要穿好实验服,以避免给实验带来不可预知的结果,或造成酸碱腐蚀衣服。

2. 进实验室前准备好实验指导、课本、笔记、实验记录本、报告本、文具等。其他非实验所需物品严禁带入实验室。

3. 保持实验台整洁,试剂、仪器应整齐,按次序放置。实验完毕要按各类仪器的清洗方法和要求将仪器清洗干净。

4. 实验室是培养学生独立思考、独立工作能力及良好科学作风的重要场所,操作务必认真,不得敷衍,室内应保持肃静,不得吸烟、玩闹,不得随地吐痰,不得乱丢纸屑。实验后要清扫实验台面、地面、试剂瓶要码放整齐。

5. 爱护仪器、节约药品。第一次实验时要按仪器清单清点仪器,负责保管,用后如数交还。在使用时如有破损,及时报告,经指导教师检查后填写破损单,按学校规定赔偿。

6. 贵重仪器,如分光光度计、离心机等,应当爱护,使用前应熟悉使用方法,严格遵守操作规程,严禁随意开动。

7. 节约水电,一经用完随手关闭水龙头、电闸。

五、值日生任务

1. 领发本次所用仪器、物品，清点、交还临时用仪器、物品，若有损坏负责追查赔偿。
2. 管理操作公用仪器，打蒸馏水。
3. 搞好实验室卫生，做到仪器、桌面、地面、水池等干净、整齐。
4. 确保安全，管好仪器、门窗、水电。
5. 请任课及技术室老师检查工作，认可后方能离开实验室。

六、试剂使用规则

1. 使用试剂前应仔细辨认标签，看清名称及浓度，是否为本实验所需要。
2. 取出试剂后，立即将瓶塞盖好，切勿盖错，放回原处。试剂瓶塞、专用吸量管、滴管不得与试剂瓶分家，以免错用而污染试剂，造成自己或他人实验的失败。未用完的试剂不得倒回瓶内。
3. 取标准溶液时，应先将标准液倒入干净试管中，再用清洁吸管吸取标准液，以免污染瓶中的标准溶液。
4. 使用滴管时，滴管尖端朝下，切勿倒置，勿使试剂流入橡皮帽内。
5. 使用有毒试剂及强酸强碱时，尽可能用量筒量取，若用吸管时只能用洗耳球吸取，切勿用嘴吸取，以免造成意外。

七、安全注意事项

1. 低沸点有机溶剂，如乙醚、石油醚、酒精等均系易燃物品，使用时应禁明火、远离火源，若需加热要用水浴加热，不可直接在火上加热。
2. 凡属发烟或产生有毒气体的化学实验，均应在通风橱内进行，以免对人体造成危害。
3. 若发生酸碱灼伤事故，先用大量自来水清洗，酸灼伤者用饱和 NaHCO_3 溶液中和，碱灼伤者用饱和 H_3BO_3 溶液中和，氧化剂伤害者用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理。
4. 若发生起火事件，根据发生起火性质分别采用砂、水、 CO_2 或 CCl_4 灭火器扑灭。
5. 离开实验室必须关好窗户，切断电源、水源，以确保安全。

八、废弃物处理

1. 所有固体废弃物如：用过的滤纸、棉花、碎屑沉淀物等必须倾弃于垃圾筒中。
2. 浓酸必须弃于小钵中，用水稀释后倒入水池中。
3. 实验完成后之沉淀或混合物含有可提取之贵重药品者不可随意舍弃，应交教师保存。

第一篇 生物化学与分子生物学 实验基本操作、基本技术及原理

第一章 生物化学与分子生物学实验 基本操作

一、玻璃仪器的洗涤与清洗

生物化学实验常用各种玻璃仪器，其清洁程度将直接影响实验结果的可靠性。因此，玻璃仪器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。

玻璃仪器的清洗方法很多，需要根据实验的要求，以及污物性质选用不同的清洁方法。

1. 新购仪器的清洗 新购仪器表面附着油污和灰尘，特别是附着有可游离的金属离子。因此，新购仪器需要用肥皂水刷洗，流水冲净后，浸于 10% Na_2CO_3 溶液中煮沸。用流水冲净后，再浸泡于 1%~2% HCl 溶液中过夜。流水洗净酸液，用蒸馏水少量多次冲洗后，干燥备用。

2. 使用过的玻璃仪器的清洗

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

(2) 容量分析仪器，如吸量管、滴定管、容量瓶等，先用自来水冲洗，沥干后，浸于铬酸洗液浸泡数小时。然后用自来水和蒸馏水冲洗干净，干燥备用。

(3) 比色杯，用毕立即用自来水反复冲洗，如有污物粘附于杯壁，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。

二、吸量管的种类和使用

吸量管是生化实验最常用的仪器之一，测定的准确度与吸量管的正确选择和使用有密切关系。

1. 吸量管的分类 常用的吸量管可以分为三类，见图 1-1-1。

(1) 奥氏吸量管：供准确量取 0.5、1.0、2.0、3.0ml 液体所用。此种吸量管只有一个刻度，当放出所量取的液体时，管尖余留的液体必须吹入容器内。

(2) 移液管: 常用来量取 50、25、10、5、2、1ml 的液体, 这种吸量管只有一个刻度, 放液时, 量取的液体自然流出后, 管尖需在容器内壁停留 15 秒钟, 注意管尖残留液体不要吹出。

(3) 刻度吸量管: 供量取 10ml 以下体积的溶液。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。此类吸量管为“吹出式”, 吸量管上端标有“吹”字。未标“吹”字的吸量管, 则不必吹出管尖的残留液体。

2. 吸量管的使用

(1) 选用原则: 准确量取整数量液体, 应选用奥氏吸量管。量取大体积时要用移液管。量取任意体积的液体时, 应选用量程与取液量最接近的吸量管。如欲取 0.15ml 液体, 应选用 0.2ml 的刻度吸量管。同一定量试验中, 如欲加同种试剂于不同管中, 并且取量不同时, 应选择一支量程与最大取液量最接近的刻度吸量管。如各试管应加的试剂量为 0.30、0.50、0.70、0.90ml 时, 应选用一支量程为 1.0ml 的刻度吸量管。

(2) 吸量管的使用: 使用吸量管时, 用拇指和中指夹住近顶端部分, 将管的下端插入液体, 用洗耳球吸入液体到需要刻度标线上 1~2cm 处(插入液面下的部分不可太深, 也不可太浅, 防止空气突然进入管内, 将溶液吸入洗耳球内), 用食指封闭上口将已充满液体的吸量管提出液面, 把吸量管提到与眼睛同一水平线上, 然后小心松开上口, 调节液面至需要的刻度处。将吸量管移到另一容器, 松开上口, 使液体自由流出。最后再根据规定吹出或不吹出尖端的液体, 见图 1-1-2。

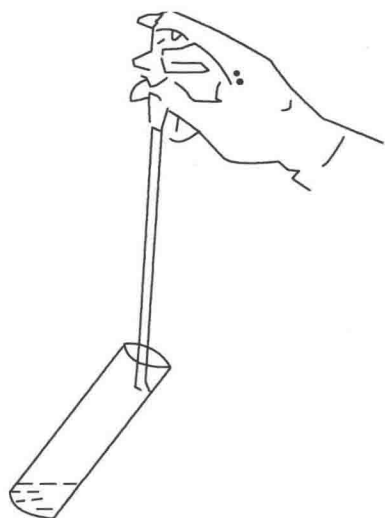


图 1-1-2 放液体时的姿势

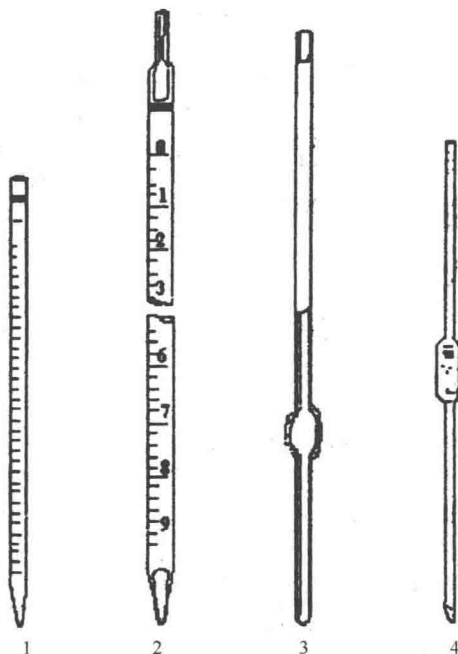


图 1-1-1 三类吸量管简图

1、2: 刻度吸量管 3: 奥氏吸量管 4: 移液管

下端插入液体, 用洗耳球吸入液体到需要刻度标线上 1~2cm 处(插入液面下的部分不可太深, 也不可太浅, 防止空气突然进入管内, 将溶液吸入洗耳球内), 用食指封闭上口将已充满液体的吸量管提出液面, 把吸量管提到与眼睛同一水平线上, 然后小心松开上口, 调节液面至需要的刻度处。将吸量管移到另一容器, 松开上口, 使液体自由流出。最后再根据规定吹出或不吹出尖端的液体, 见图 1-1-2。

3. 可调式移液器的使用

(1) 可调式移液器的结构, 见图 1-1-3。

(2) 可调式移液器的操作, 见图 1-1-4。

1) 旋转调节轮至所需体积值。

- 2) 套上吸头，旋紧。
- 3) 垂直持握可调式移液器用大拇指按至第一档。
- 4) 将吸头插入溶液，徐徐松开大拇指，使其复原。



图 1-1-3 可调式移液器的结构



图 1-1-4 持移液器的姿势

注：推动按钮内部的活塞分 2 段行程，第一档为吸液，第二档为放液，手感十分清楚

5) 将可调式移液器移出液面，必要时可用纱布或滤纸拭去附于吸头表面的液体(注意：不要接触吸头孔口)。

6) 排放时，重新将大拇指按下，至第一档后，继续按至第二档以排空液体。

注：移取另一样品时，按卸尖按钮弃掉吸头并更换新吸头。

三、混 匀

样品和试剂的混匀是保证化学反应充分进行的一种有效措施。为使反应体系内各物质迅速地接触，必须借助于外力的机械作用。常用的混匀方法有以下几种：

1. 旋转法 手持容器，使溶液作离心旋转。适用于未盛满液体的试管或小口器皿，如锥形瓶。

2. 指弹法 一手执试管上端，另一只手轻弹试管下部，使管内溶液作漩涡运动。

3. 搅动法 使用玻璃棒搅匀，多用于溶解烧杯中的固体。

4. 电磁搅拌混匀

5. 混匀器法 将容器置于混匀器的振动盘上，逐渐用力下压，使内容物旋转。

注：混匀时谨防容器内液体溅出或被污染；严禁用手堵塞管口或瓶口振摇。

四、保 温

将容器放入恒温水浴箱,调节温度设定钮至所需温度。水浴箱中水分要充足,实验过程中要随时监测温度,并及时调节。

五、过 滤

用于收集滤液、收集沉淀或洗涤沉淀。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)并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,要用玻棒引导而且不应倒入过快,勿使液面超过滤纸上缘。较粗的过滤可用脱脂棉或纱布代替滤纸。有时以离心沉淀法代替过滤法可达到省时、快捷的目的。

六、离心沉淀法

欲使沉淀与母液分开,过滤和离心都可以达到目的,但是当样品沉淀黏稠,或颗粒小得可以通过滤纸时,则需选用离心法。特别是溶液量少又需定量测定时,离心分离法更具优越性。离心分离是利用离心力将悬浮液中的悬浮微粒快速沉降,借以分离比重不同的各种物质成分的方法,是实验室常规采用的技术。

离心机种类很多,转速少于 6000 转/分的为低速离心机;转速介于 6000~25 000 转/分之间的为高速离心机;转速超过 30 000 转/分的为超速离心机。根据离心机的用途不同,还可以将离心机分为分析离心机和制备离心机。其中制备离心技术又分为分级离心技术和密度梯度离心技术。本节将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)。

低速离心机的使用:

1. 离心前检查 取出所有套管,启动空载的离心机,观察是否转动平稳;检查套管有无软垫,是否完好,内部有无异物;离心管与套管是否匹配。

2. 离心原则

(1) 平衡:将一对离心管放入一对套管中,置于天平两侧,用滴管向较轻一侧的离心管与套管之间滴水至两侧平衡。

(2) 对称:将已平衡好的一对套管置于离心机中的对称位置。

3. 离心操作

(1) 对称放置配平的一对套管后,扣严离心机盖,开启电源。

(2) 调节转速调节钮,逐渐增加转速至所需值,当离心机转速达到要求时,开始计时。

(3) 达到离心时间后,缓慢将转速调回零。断开电源,当离心机自然停止后,

取出离心管和离心套管。

(4) 倒去离心套管内的平衡用水，倒置于干燥处晾干。

4. 注意事项

(1) 离心机的启动、停止都要慢，否则离心管易破碎或造成液体从离心管中溅出。

(2) 离心过程中，若听到特殊响声，应立即停止离心，检查离心管。若离心管已碎，应清除并更换新管；若管未碎，应重新平衡。

(李 荷)



第二章 实验样品的制备与保存

一、血液样品的制备与保存

1. 全血的制备 取清洁干燥的试管或其他容器收集人或动物的新鲜血液后,立即与适量的抗凝剂充分混合,所得到的抗凝血即为全血。抗凝剂从血液中除去 Ca^{2+} 以防血液凝固,草酸盐与 Ca^{2+} 已形成草酸盐沉淀, NaF 与 Ca^{2+} 形成 CaF_2 ,柠檬酸与 Ca^{2+} 形成络盐。抗凝剂宜先配成水溶液,然后按取血量的需要加于试管或适当容器内,将其横放并转动,再蒸干水分(如加入肝素,样品温度不适宜超过 30°C),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。

血液中加入抗凝剂的种类可以根据实验的需要进行选择:由于草酸盐溶解度大、用量少、性质稳定、价格低廉,所以实验室中常用草酸盐作为抗凝剂;柠檬酸盐对动物体无毒,若需将抗凝血回注动物体内时,宜用柠檬酸钠抗凝剂;氟化钠能抑制脲酶活性,因此用脲酶测定尿素时不宜用氟化钠作为抗凝剂;肝素是生理抗凝剂,效果较理想,但是价格比较贵。另外,抗凝剂的用量不宜过大,否则将影响实验的结果。针对 1ml 血液,常用抗凝剂的使用剂量如下:草酸钾或草酸钠 1~2mg、柠檬酸盐 5mg、氟化钠 5~10mg、肝素 0.1~0.2mg。

2. 血浆的制备 将抗凝血置于离心机中离心,使血细胞与血小板下沉,得到的上清液即为血浆,质量上乘的血浆应为淡黄色。血浆制备的过程中应避免产生溶血,所以采血必须采用干燥清洁的注射器、针头、试管或其他容器,取得全血后也要尽可能地避免剧烈振摇。

3. 血清的制备 制备血清的方法很简单:收集不加抗凝剂的血液,在室温下使其自然凝固(约需 3h),此时析出的草黄色液体即为血清。为促进血清尽快析出,必要时可以采用低温低速离心的方法缩短分离时间,此方法也可得到较多的血清。

制备血清同样要防止溶血,所以应当使用干燥清洁的器具,而且血清析出后宜用干净的玻璃棒轻轻分离血凝块与容器壁的黏连,及时吸取析出的血清。

4. 无蛋白血滤液的制备 在某些生物化学与分子生物学分析时,为避免蛋白质的干扰,常需用沉淀剂除去血液中的蛋白质,再离心或过滤,所得的上清或滤液即为无蛋白血滤液。实验室中常用福林-吴宪法制备无蛋白血滤液,此法以硫酸作为蛋白质沉淀剂,所得的血滤液常用于血糖、肌酐、非蛋白氮等成分的测定。另外,三氯乙酸也可以作为蛋白质沉淀剂,制得的血滤液酸性强,磷、钙等溶解,所以常用于测定血清中无机离子的含量。

5. 血液样品的保存 采集的血液样品如不能及时进行实验,必须进行适当的

处理和保存,以防止其成分的改变。通常血液样品要保存于密闭的试管中,短时间(48h)内保存应置于4℃冰箱内,若需长时间保存则于-80℃冰箱中冻存。实验前应使样品解冻至室温,然后颠倒数次使血液充分混匀后方可进行实验。如需运输,短时运输(24h内)可置于4℃环境的保温箱内;若需较长时间(大于24h)的运输,需将样品冷冻处理后低温运输。

二、组织样品的制备与保存

离体不久的组织在适宜的温度和 pH 等条件下仍可以进行一定程度的物质代谢。因此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。另外,还可以从组织中分离和提取核酸、酶以及某些有意义的代谢物质。所以,如何处理动物组织是生物化学与分子生物学实验中的基本操作之一。

由于动物各种组织器官离体过久后会导致很多生理活性物质发生变化:如一些酶在久置后会变性失活;一些组织成分(如 ATP、糖原等)的含量会明显降低。因此,离体组织的采集必须快速,并且尽快提取和测定。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,去除外层的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,最后根据不同的实验目的用不同的方法制备不同的组织样品。

1. 组织糜的制备 迅速将组织剪碎,用捣碎机绞成糜状,或者加入少量黄砂于乳钵中,研磨至糊状。

2. 组织匀浆的制备 取一定量新鲜的组织剪碎,加入适量匀浆制备液(如生理盐水、缓冲液和 0.25mol/L 的蔗糖液等),用高速电动匀浆器或者玻璃匀浆器捣碎组织。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。

3. 组织浸出液的制备 上述组织匀浆液再经过 3000 转/分离心 15min,分离得到的上清液即为组织浸出液。

4. 组织样品的保存 不同使用目的样品,保存方式和时间有所差异。用于科学研究的标本,在新鲜取材后,先用液氮冷冻,最后置于-80℃冰箱保存。用于普通染色观察的标本,可用 4%甲醛常温固定,一般可以保存 1 个月。用于教学的标本,先暴露最显著病变部位,然后进行固定,可长期保存。

三、尿液的制备与保存

尿液中含有多种代谢产物,因此是生物化学实验特别是代谢组学研究中常用的实验材料。由于尿液所含化学物质的量往往随进食、进水、运动等很多情况而变化,所以做定量测定是常常需要收集 24h 的尿液。尿液应倒入有盖的清洁容器内,量出并记录尿液的总量,以便计算待测物质在尿液中的含量。临检时,尿液

要摇匀，然后取出适量进行测定即可。

收集的尿液如不能立即进行实验，应采用 -20°C 冰箱保存。为防止尿液腐败变质而影响实验结果，可加入适当的防腐剂：通常在测定含氮物质时，用甲苯(5ml/L 尿液)作防腐剂；而做激素的代谢物及无机盐测定时，应采用浓盐酸(5ml/L 尿液)作防腐剂。

(李春梅)