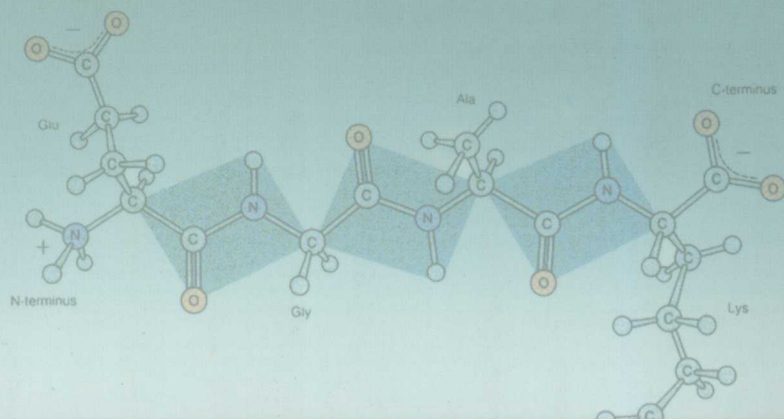


同济大学教材、学术著作出版基金委员会资助



生物化学与分子生物学 实验技术教程

主 编 李学礼 周晓霞
副主编 徐 磊 吕立夏

主 审 沈 勤



同济大学出版社
TONGJI UNIVERSITY PRESS

要 要 容 内

同济大学教材、学术著作出版基金委员会资助

生物化学与分子生物学 实验技术教程

主 编 李学礼 周晓霞

副主编 徐 磊 吕立夏

编 委 (按姓氏笔画排名)

王树强 (扬州大学医学院)

吕立夏 (同济大学医学院)

李学礼 (同济大学医学院)

李 姣 (同济大学医学院)

李静琪 (同济大学医学院)

周晓霞 (扬州大学医学院)

殷冬梅 (南通大学医学院)

顾建兰 (南通大学医学院)

徐 磊 (同济大学医学院)

高景霞 (同济大学医学院)

程 宏 (扬州大学医学院)

傅 奕 (扬州大学医学院)

主 审 沈 勤



同济大学出版社

TONGJI UNIVERSITY PRESS

定价

18.00元

18.00元

2008年3月

内 容 提 要

生物化学与分子生物学作为一门实验性学科及 21 世纪带头学科,发展迅速,受到广泛关注。本教材分为生物化学实验基本操作、生物化学实验原理与技术、分子生物学实验原理与技术三大部分,共 13 章 30 个实验课程,侧重介绍了分光光度法、层析法、电泳法和离心法四大基本实验技术,一些典型的临床生化检测实验,以及与临床相关的分子生物学实验。其中 8 个系统、连贯的基因工程实验,既可连成一个完整的综合性大实验,又可任选其中部分实验分别教学。本课程学习,有助于学生掌握基本实验操作技能,提高科研动手能力。

本教材适合高等医学院校五年制本科生和七年制、八年制本硕连读研究生使用。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验技术教程/李学礼,周晓霞主
编. —上海:同济大学出版社,2008. 5

ISBN 978-7-5608-3630-0

I. 生… II. ①李…②周… 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(2007)第 156396 号

生物化学与分子生物学实验技术教程

主 编 李学礼 周晓霞

责任编辑 沈志宏 凌 岚 责任校对 徐春莲 装帧设计 陈益平

出版发行 同济大学出版社 (www.tongjipress.com.cn)

(地址:上海市四平路 1239 号 邮编:200092 电话:021-65985622)

经 销 全国各地新华书店

印 刷 同济大学印刷厂

开 本 787 mm×1092 mm 1/16

印 张 9.5

印 数 3 100

字 数 237 000

版 次 2008 年 5 月第 1 版 2008 年 5 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-5608-3630-0/Q·6

定 价 18.00 元

本书若有印装质量问题,请向本社发行部调换 版权所有 侵权必究

目 录

前 言

第一部分 生物化学实验基本操作

生物化学与分子生物学是一门实验性学科,其涵盖的各种研究技术与实验方法是这门学科创立与发展的基础。生物化学实验的基本技术有分光光度法、电泳法、层析法和离心法等,在此基础上建立了有关核酸与蛋白质的各种研究方法,并发展成为分子生物学实验技术。分子生物学实验技术的核心是:①基因的克隆与体外表达,包括目的基因的获取,目的基因的克隆、筛选与鉴定,表达载体的构建,目的基因的体外表达等步骤,这些步骤同时也是基因工程实验技术的主要内容;②蛋白质的表达与功能研究,包括基因在 mRNA 水平的表达及蛋白质水平的表达,不同种属或组织器官中基因的差异表达,通过转基因或基因干扰等技术研究蛋白质的功能,并应用于基因治疗等;③基因序列的多态性(突变)研究,可应用于临床诊断。

本实验教材分为三部分。第一部分是实验室基本技能,让学生自学,预先了解实验室基本操作程序及工作规范。第二部分是生物化学的四大基本技术,与理论结合的设计性、综合性实验以及临床检验相关实验。第三部分是分子生物学和基因工程技术,包括 8 个系统连贯的实验课程,以及基因表达,功能研究及临床相关的分子生物学实验。掌握这些技术,可以应用于生命科学相关领域的研究工作。

鉴于生物化学及分子生物学实验技术的实用性及应用的广泛性,越来越多从事生命科学研究的工作者都采用这门技术来扩展和深化自己的研究领域,以便从分子水平解释生命现象,在纵深研究中获得重大技术性突破。

作为一名合格的医学生,毕业后应成为具备一定科研能力的医务工作者。开设生物化学与分子生物学实验技术,有助于学生在实验过程中进一步理解其原理,掌握实验操作技能,培养和提高科研动手能力,成为一名适应现代发展要求的合格的医学工作者。

为完成这本实验教材,全体参编老师付出了辛勤的劳动,每一实验步骤都亲力亲为,保证了实验过程及操作步骤的准确性。因为时间有限、仪器经费有限,编写中难免存在不周全、不完善之处,敬请同行专家和各位同学多提宝贵意见。我们将不断改进,使其成为精炼、成熟的实验教材。

本教材的出版获得同济大学教材、学术著作出版基金委员会资助,特此感谢!

主编

2008 年 3 月

目 录

前 言

第一部分 生物化学实验基本操作	1
第一章 玻璃仪器洗涤与清洁	3
第二章 吸量器的选择与使用	5
第三章 溶液的处理	9
第四章 实验样品的制备	11
附录 1 实验操作规则	13
第二部分 生物化学实验原理与技术	15
第五章 分光光度法	17
实验 1 紫外分光光度法测定核酸与蛋白质含量	20
实验 2 Folin-酚试剂法测定蛋白质含量(Lowry 基本法)	22
实验 3 血清蛋白的盐析与定量	25
第六章 层析法	28
实验 4 凝胶层析分离血红蛋白与鱼精蛋白	37
实验 5 离子交换层析分离混合氨基酸	39
实验 6 纸层析法分析转氨基反应	40
第七章 电泳法	44
实验 7 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离混合蛋白质	50
实验 8 血清蛋白的醋酸纤维素膜电泳	56
第八章 离心分离技术	58
实验 9 细胞核分离和核酸、蛋白质含量的测定	59
第九章 蛋白质、酶	67
实验 10 影响酶作用的因素	67
实验 11 碱性磷酸酶米氏常数的测定	71

实验 12 血清蛋白的分离、纯化及鉴定	75
第十章 临床生化实验	79
实验 13 饮食和激素对家兔血糖浓度的影响	79
实验 14 饮食对家兔血浆脂蛋白影响的探讨	81
实验 15 过氧化脂质测定	82
实验 16 改良 Mohun 法测定血清谷-丙转氨酶活性	84
第三部分 分子生物学实验原理与技术	87
第十一章 基因工程基本技术	89
实验 17 质粒 DNA 的抽提纯化与鉴定	89
实验 18 小鼠肝脏 RNA 的抽提纯化与鉴定	94
实验 19 逆转录 PCR 扩增基因	98
实验 20 基因的酶切、连接与转化	102
实验 21 重组质粒的筛选与鉴定	107
实验 22 重组体 DNA 序列测定	110
实验 23 表达载体的构建与筛选	114
实验 24 基因的诱导表达与融合蛋白的纯化	118
第十二章 基因表达与功能分析的基本方法	123
实验 25 外源基因在真核细胞中的导入和表达	123
实验 26 实时定量 PCR	125
实验 27 Western Blot 检测蛋白质的表达及含量	128
第十三章 临床分子生物学实验	135
实验 28 颊黏膜上皮细胞基因组 DNA 的抽提及 ACE 基因多态性的检测	135
实验 29 PCR-RFLP 分析中国人群 CETP 基因的多态性	137
实验 30 基于反向点杂交的膜法检测核酸突变	140
参考文献	144

第一章 玻璃仪器洗涤与清洁

一、玻璃仪器的洗涤与清洁

第一部分

生物化学实验基本操作

从事生物化学与分子生物学实验工作,除必须配备实验室、实验仪器等硬件外,还需懂得实验室的日常工作规范、实验准备等工作,才能保证实验结果的准确性和可靠性。

二、清洁液的制作方法

1. 铬酸洗液 铬酸洗液广泛用于玻璃仪器的洗涤,其洗涤能力来自于它的强氧化性和强酸性。由重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$)和浓硫酸配制而成,二者反应生成具有强氧化性的铬酐(CrO_3)。重铬酸钾为红色,还原后成为绿色的三价铬(Cr^{3+})。

铬酸洗液对有机物、无机物、油污等有很强的洗涤能力。因洗液具有强氧化性,所以使用时必须严格保证安全。当洗液由红色变为绿色时,其洗涤效力降低,不宜再用。

常用的铬酸洗液浓度为 3%~5%,有如下 3 种配制方法:

(1) 称取重铬酸钾 5 g 置于 250 ml 烧杯中,加入热水 5 ml 搅拌,使其尽量溶解。为防止发热,在烧杯下放置一个石棉网。向烧杯中缓慢注入工业用浓硫酸 100 ml,同时搅拌,注意防

实验 12 血清蛋白的分离、纯化及鉴定	75
第十章 临床生化实验	79
实验 13 饮食和激素对家兔血糖浓度的影响	79
实验 14 饮食对家兔血浆脂蛋白影响的探讨	81
实验 15 过氧化脂质测定	82
实验 16 改良 Mohr 法测定血清谷-丙转氨酶活性	84
第三部分 分子生物学实验原理与技术	87
第十一章 基因工程基本技术	89
实验 17 质粒 DNA 的抽提纯化与鉴定	89
实验 18 小鼠肝基因组 DNA 的提取	94
实验 19 逆转录 RNA 病毒基因组	96
实验 20 基因的特切、连接与转化	102
实验 21 重组质粒的筛选与鉴定	107
实验 22 重组质粒的转化与鉴定	110
实验 23 表达载体的构建与筛选	114
实验 24 基因的诱导表达与融合蛋白的纯化	118
第十二章 基因表达与功能分析的基本方法	123
实验 25 外源基因在真核细胞中的导入与表达	123
实验 26 实时定量 PCR	125
实验 27 Western Blot 检测蛋白质的表达及含量	128
第十三章 临床分子生物学实验	135
实验 28 颊黏膜上皮细胞基因组 DNA 的抽提及 ACE 基因多态性的检测	135
实验 29 PCR-RFLP 分析中国人群 CETP 基因的多态性	137
实验 30 基于反向点杂交的膜法检测核酸杂交	140
参考文献	144

第一章 玻璃仪器洗涤与清洁

一、玻璃仪器的洗涤与清洁

生物化学实验经常要使用各种玻璃仪器,其清洁程度将直接影响到待测样品的可靠性和准确性。因此,玻璃仪器的清洁工作不仅是实验室的常规工作,同时也是一项关系到实验成败的基本技术。

经过洗涤的玻璃仪器要求清洁透明,玻璃表面不含可溶解性物质。水沿器皿壁自然下流时不挂水珠。

玻璃器皿的清洁方法很多,根据实验要求的清洁程度和污物的不同性质可以选择不同的清洁方法。

1. 新购置玻璃仪器的清洗 新购买的仪器表面附着油污和灰尘,特别是附着有可溶解的金属离子。因此,新购买的仪器需要用洗洁精等浸泡或刷洗,流水冲洗干净。必要时可进一步浸于 10% Na_2CO_3 溶液中煮沸,流水冲洗干净后,再浸泡于 1%~2% HCl 溶液中过夜,流水冲洗去除残余的酸液。最后需用蒸馏水冲洗至少 3 次,干燥后备用。

2. 使用过玻璃仪器的清洗 一般的非计量用玻璃仪器或粗容量仪器,如试管、烧杯、量筒等先用洗洁精等浸泡或刷洗,再用自来水冲洗干净,最后用蒸馏水冲洗 3 次后,倒置晾干。

容量分析仪器,如吸量管、滴定管、容量瓶等,先用自来水冲洗后沥干,浸泡于铬酸洗液中数小时,然后用自来水和蒸馏水依次冲洗干净,干燥备用。

比色杯需要保证表面的光洁。用毕立即用自来水反复冲洗。如有污物附着于杯壁,需用稀盐酸或其他适当溶液清洗。然后依次用自来水和蒸馏水冲洗干净。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、清洁液的清洁原理与配制方法

1. 铬酸洗液 铬酸洗液广泛用于玻璃仪器的洗涤,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,二者反应形成具有强氧化性的铬酐。铬酐(CrO_3)呈红色,还原后成为绿色的氧化铬(Cr_2O_3)。

硫酸越浓,铬酐越多,其清洁效力越强。因洗液具有强腐蚀性,所以使用时必须严格保证安全。当洗液由棕红色变为绿色时,其清洁效力降低,不宜再用。

常用的铬酸洗液浓度为 3%~5%,有如下 3 种配制方法:

(1) 称取重铬酸钾 5 g 置于 250 ml 烧杯中,加入热水 5 ml 搅拌,以使其尽量溶解。为防止发热,在烧杯下放置一个石棉网。向烧杯中缓慢注入工业用浓硫酸 100 ml,同时搅拌,注意防

止溅出。因为放热较多,硫酸的加入不宜过快。此时溶液由红黄色变为黑褐色。冷却后装瓶备用,密封以防吸水。

(2) 取 100 ml 工业用浓硫酸置于烧杯中,小心加热,然后缓慢加入 5 g 重铬酸钾粉末,边加边搅拌。待全部溶解后冷却,储存于密闭的容器中。

(3) 取 80 g 重铬酸钾溶解于 1 000 ml 水中,缓慢加入工业用浓硫酸 100~200 ml,边加边搅拌,冷却后备用。

2. 洗洁精或洗衣粉溶液 最常用的洗涤剂,配制的浓度因需要调整。主要是利用其乳化作用去除污垢,一般的玻璃仪器均可用其浸泡或刷洗。

3. 磷酸钠溶液 以 $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 配制,浓度为 5%。主要是利用其碱性去除油污。所洗器皿不可用于磷的测定。

4. 乙二胺四乙酸(EDTA)二钠溶液 以 EDTA 二钠盐配制,浓度为 5%~10%。加热煮沸,可去除玻璃器皿内部的钙镁盐类的白色沉淀物和不易溶解的重金属盐类。

5. 尿素溶液 45% 的尿素溶液是清洗血污和蛋白质的良好溶剂。

6. 草酸洗液 称取 5~10 g 草酸,溶解于 100 ml 水中,加入少量浓硫酸或浓盐酸,可洗脱高锰酸钾留下的污迹。

7. 盐酸-乙醇洗液 3% 的盐酸-乙醇可以去除玻璃器皿上的燃料附着物。

8. 乙醇硝酸混合液 用于清洗一般方法难以去除的有机物,最适合于清洗滴定管。

(徐磊 李学礼)

第二章 吸量器的选择与使用

一、吸量管的分类和使用

吸量管是生化实验中最常用的器皿之一,吸量管的正确选择和使用对于实验的成功和测定的准确性至关重要。

1. 吸量管的分类 常用的吸量管可以分为3类:奥氏吸量管、移液管和刻度吸量管。

奥氏吸量管供准确量取0.5,1.0,2.0,3.0 ml液体所用。此种吸量管只有1个刻度,不能用于准确量取其他体积的溶液。当挤出所量取的液体时,管尖的残留液体必须吹入容器内。

移液管常用于量取50.0,25.0,10.0,5.0,2.0,1.0 ml液体,这种吸量管也只有一个刻度。放液时,量取的液体自然流出后,管尖需要在容器内壁停留15 s。注意管尖的残留液体不要吹出。

刻度吸量管是最常用的吸量工具,一般供量取10.0 ml以内任意体积的液体。刻度可包括或不包括管尖残留液体。在吸量管的上端标有“吹”字的吸量管为“吹出式”,将所量液体全部放出后,还需要吹出管尖的残留液体。未标有“吹”字的吸量管,则不需要吹出管尖的残留液体。

刻度吸量管的上方有一彩色的标志环,标志着吸量管的量程,如表2-1所示。

表2-1

刻度吸管的量程标志

标准容量/ml	0.1	0.2	0.25	0.5	1	2	5	10	25	50
色 标	红	黑	白	红	黄	黑	红	桔红	白	黑
环 数	单	单	双	双	单	单	单	单	单	单

2. 吸量管的选用原则与方法

(1) 吸量管的选用原则 量取整数量液体,并且取量要求准确时,应尽可能选用奥氏吸量管。量取大体积液体时可用移液管。量取非整数体积液体时,应选用取液量最接近的刻度吸量管。例如量取0.15 ml液体,应选用0.2 ml的刻度吸量管,而不应选用2.0,5.0 ml等刻度吸量管。

同一定量试验中,如果需加同种试剂于不同管中,并且取量不同,应选择一支与最大取液量接近的刻度吸量管。如各试管应加的试剂量为0.30,0.50,0.70,0.90 ml时,应选用一支1.0 ml刻度的吸量管。

(2) 吸量管的使用方法 见表2-2。

表 2-2

吸量管的使用方法

方 法	正 确	错 误
拿法	示指盖住吸量管顶端,中指和其他指拿住吸量管上端	用拇指顶住吸量管顶端,其余 4 指拿住吸量管
取液	用吸耳球吸液体至刻度上,注视液面上升,到达刻度后用示指顶住吸量管上端	不看液面
调刻度	吸量管与地面垂直,下口与试剂瓶接触并成一定角度;示指控制液体下降至所需刻度,液体凹面与刻度线呈切线	吸量管倾斜,或悬空调刻度;观察时液体的凹面、刻度线和视线不在同一平面
放液	吸量管移入接收容器,尖端接触容器并成一定角度;吸量管保持垂直,放开示指,使液体自动流出;注意不同吸量管的使用方式	吸量管倾斜,尖端不与容器接触;应吹而不吹或不应吹而吹

二、加样器的种类和使用

1. 常用加样器的分类 常用加样器大致分为以下 3 类。

(1) 多通道加样器 常备有 8,12,24 通道,与普通加样器一样,有多种容积范围可选择,可同时向 8,12,24 份样品中加入同一试剂,方便快捷,主要用于酶标检测,细胞活性(或毒性)检测等。

(2) 电动加样器 电动加样器配有微小马达及充电电池,每次充电后可连续使用几小时,方便省力。其中,微控电动加样器与连续可调式微量加样器规格类似,但价格昂贵;而大容量电动加样器有一个标准吸口,可配任何市售标准刻度吸管,4 秒钟内充满 25 ml 体积,且可单手使用,操作简便快捷,主要用于细胞培养。

(3) 普通加样器 根据容量大小可分为微量加样器和大容量加样器,又根据其移液量是否可变分为连续可调式和固定式。连续可调式微量加样器规格有:0.2~2 μl ,1~10 μl ,2~20 μl ,10~100 μl ,20~200 μl ,100~1 000 μl 等规格,另有 1~5 ml,1~10 ml 等大容量加样器。微量加样器是分子生物学最常用的加样器(图 2-1)。

2. 连续可调式微量加样器的使用

(1) 选择原则 首先认清各微量加样器的最大容量,其容量标识一般都在加样器的弹簧按钮上。不同规格加样器配不同的加样枪头,一般 100~1 000 μl 的加样器配蓝色大枪头,10~100 μl ,20~200 μl 配黄色中枪头,1~10 μl ,2~20 μl 的加样器配白色小枪头。根据需量取的液体体积选用合适的微量加样器,应用与取液量最接近的吸量管,如欲取 5 μl 液体,应选用 1~10 μl 的加样器。

(2) 使用方法 取液:根据取样量选择好合适的加样器后,看清数字标记方式,小心旋转螺旋调节器调至取量刻度,套上合适的加样枪头。手握加样器,大拇指按压弹簧按钮至第一着力点,然后将带有加样枪头的加样器插入液体中,注意液体平面不应超出加样枪头的上缘,轻放

大拇指至弹簧按钮完全松弛,枪头内所含液体即为应备体积。

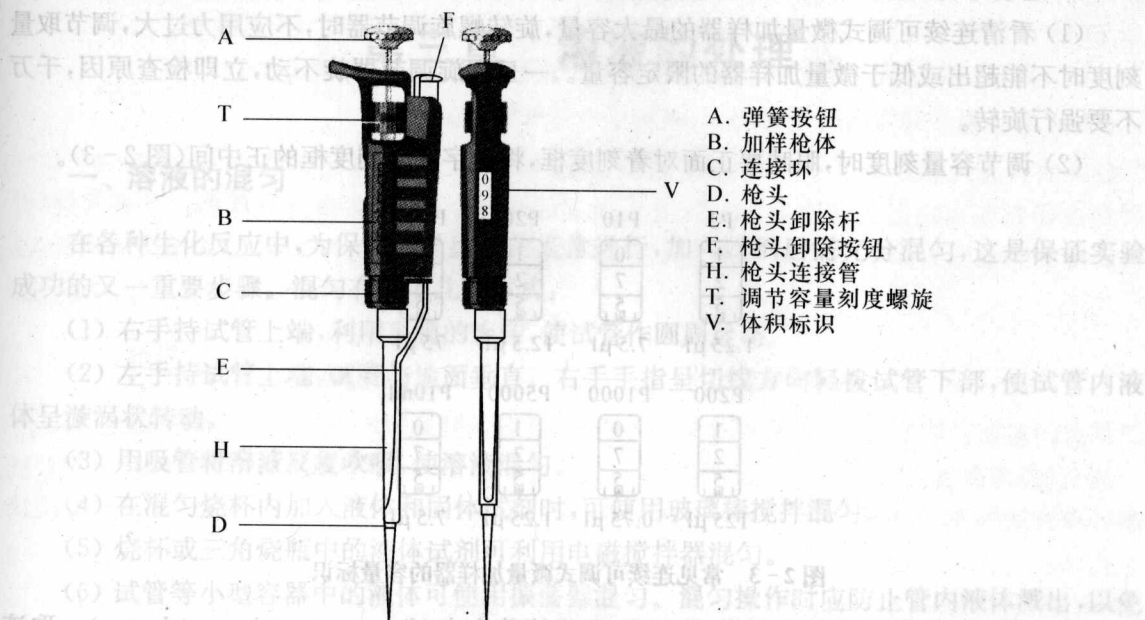


图 2-1 连续可调式微量加样器简介

放液:加样器移入准备接受溶液的容器中,大拇指按压弹簧按钮至第二着力点,需要时可
使枪头尖端轻靠管壁,待液体完全进入容器,将加样器向上提至加样枪头离开液面,然后松开
拇指(图 2-2)。

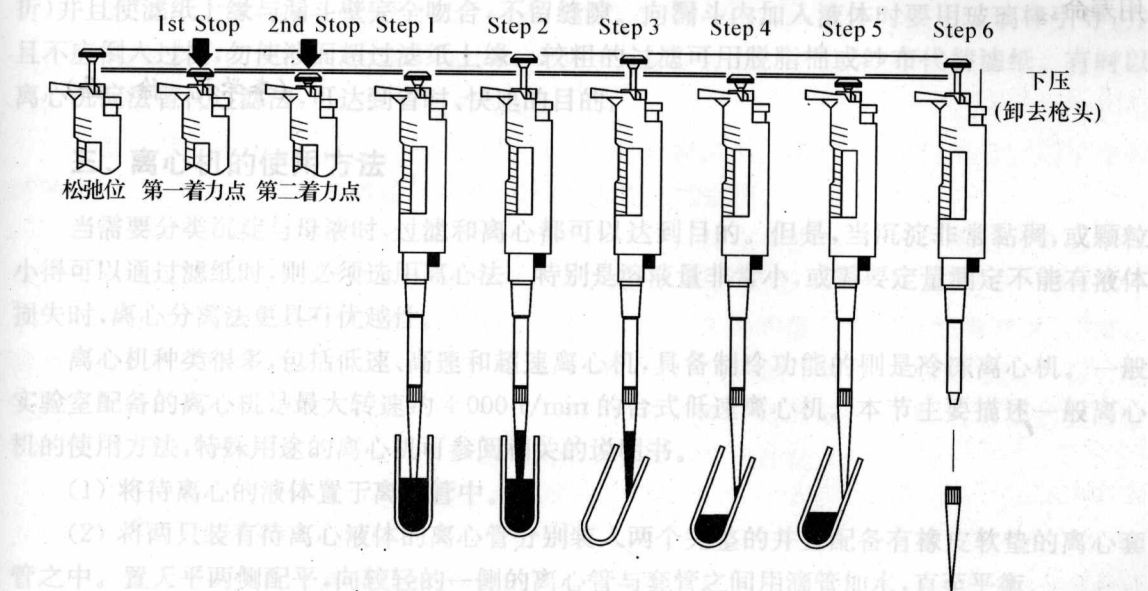


图 2-2 加样器的使用步骤

3. 连续可调式微量加样器使用注意事项

(1) 看清连续可调式微量加样器的最大容量, 旋转螺旋调节器时, 不应用力过大, 调节取量刻度时不能超出或低于微量加样器的限定容量。一旦螺旋调节器旋不动, 立即检查原因, 千万不要强行旋转。

(2) 调节容量刻度时, 眼睛要正对着刻度框, 将数字调至刻度框的正中间(图 2-3)。

P2	P10	P20	P100
1 2 5	0 7 5	1 2 5	0 7 5
1.25 μl	7.5 μl	12.5 μl	75 μl
P200	P1000	P5000	P10ml
1 2 5	0 7 5	1 2 5	0 7 5
125 μl	0.75 μl	1.25 μl	7.5 μl

图 2-3 常见连续可调式微量加样器的容量标识

(3) 微量加样器的弹簧按钮被下压时, 有两档着力点(first stop and second stop)。取液时, 按至第一着力点; 放液时, 按至第二着力点。

(4) 取液时, 先应看清液面高度。不要让液面漫过加样枪头, 造成加样器污染。

(5) 取液和放液时, 尽量着力一致, 不要过快。尤其取液时过快, 会出现气泡, 影响液体体积。实验结束后, 将加样器的刻度调至最大容量刻度, 使加样器弹簧处于松弛状态, 可延长使用寿命。

(李学礼 徐 磊)



2. 连续可调式微量加样器的使用

(1) 选择原则: 首先认清各微量加样器的最大容量, 其容量标识一般都在加样器的弹簧按钮上。不同规格加样器配不同的加样枪头, 一般 100~1000 μl 的加样器配蓝色大枪头, 10~100 μl , 20~200 μl 配黄色中枪头, 1~10 μl , 2~20 μl 的加样器配红色小枪头。根据需量取的液体体积选用合适的微量加样器, 应用与取液量最接近的吸量值, 如欲取 5 μl 液体, 应选用 1~10 μl 的加样器。

(2) 使用方法: 取液时, 根据取液量选择合适规格的加样器, 看清数字标记方式, 小心旋转螺旋调节器调至取量刻度, 套上合适的加样枪头。手握加样器, 大拇指按压弹簧按钮至第一着力点, 然后将带有加样枪头的加样器插入液面中, 注意液体液面不应超出加样枪头的上缘, 轻放

第三章 溶液的处理

一、溶液的混匀

在各种生化反应中,为保证化学反应的正常进行,加入试剂后需充分混匀,这是保证实验成功的又一重要步骤。混匀有如下几种方式:

- (1) 右手持试管上端,利用手腕的旋转,使试管作圆周运动。
- (2) 左手持试管上端,试管与地面垂直。右手手指呈切线方向轻拨试管下部,使试管内液体呈漩涡状转动。
- (3) 用吸管将溶液反复吹吸,使溶液混匀。
- (4) 在混匀烧杯内加入液体和固体试剂时,可使用玻璃棒搅拌混匀。
- (5) 烧杯或三角烧瓶中的液体试剂可利用电磁搅拌器混匀。
- (6) 试管等小型容器中的液体可使用振荡器混匀。混匀操作时应防止管内液体溅出,以免造成液体损失。同时严禁用手指堵塞试管口混匀液体,防止污染和伤害。

二、过滤

用于收集滤液,收集沉淀或洗涤沉淀。在生化实验中,如需要收集滤液应选用干滤纸,不应将滤纸先浸湿,因为湿滤纸会影响滤液的浓度。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。向漏斗内加入液体时要用玻璃棒引导,并且不应倒入过快,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。有时以离心沉淀法替代过滤法,可达到省时、快速的目的。

三、离心机的使用方法

当需要分类沉淀与母液时,过滤和离心都可以达到目的。但是,当沉淀非常黏稠,或颗粒小得可以通过滤纸时,则必须选用离心法。特别是溶液量非常小,或需要定量测定不能有液体损失时,离心分离法更具有优越性。

离心机种类很多,包括低速、高速和超速离心机,具备制冷功能的则是冷冻离心机。一般实验室配备的离心机是最大转速约 4 000 r/min 的台式低速离心机。本节主要描述一般离心机的使用方法,特殊用途的离心机可参阅相关的说明书。

- (1) 将待离心的液体置于离心管中。
- (2) 将两只装有待离心液体的离心管分别装入两个完整的并且配备有橡皮软垫的离心套管之中。置天平两侧配平,向较轻的一侧的离心管与套管之间用滴管加水,直至平衡。
- (3) 检查离心机内有无异物和空置的套管,是否运转平稳。将经配平的两个套管对称地放

置在离心机的转子中。盖好上盖,开启电源。

(4) 设定离心时间后启动离心, 旋转控制旋钮慢慢提高离心速度至所需转速。

(5) 离心结束后停止离心。当离心机自然停止后取出离心管和离心套管。

(6) 倒出离心套管内的平衡用水,倒置于干燥处晾干。

(李学礼 吕立夏)

第四章 实验样品的制备

分析组织中某种物质的含量,探索物质代谢的过程和规律,经常需要处理人或各种实验动物的肝、肾、脑、黏膜和肌肉等组织,有时需要处理全血、血浆、血清或无蛋白血滤液等血液样品,有时也采用尿液、胃液等完成各种生化实验。掌握以上各种实验样品的正确处理和制备方法是保证生化实验顺利进行的关键。

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。血液中加入的抗凝剂种类可以根据实验的要求进行选择,但用量要适当,以避免对实验结果造成影响。常用抗凝剂的种类和用量如下:草酸钾或草酸钠 1~2 mg/ml;柠檬酸钠 5 mg/ml;氟化钠 5~10 mg/ml;肝素 0.1~0.2 mg/ml。

抗凝剂宜先配制成水溶液,按照血量的需要加入试管或适当的容器中,平放后蒸干水分,使抗凝剂在容器内形成薄层,利于血液与抗凝剂充分接触。在使用肝素时,加热温度不宜超过 30℃。取得的全血如不立即使用应贮存于 4℃ 冰箱之中。

2. 血浆 抗凝血在离心机中离心,使血细胞下沉,如此得到的上清液即为血浆。质量上乘的血浆应为淡黄色的。为避免产生溶血,采血的容器和器具必须干燥清洁,在采血与贮存过程中应尽量减少振摇。

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,凝血块收缩析出血清,大约需要 3 小时。为促进血清尽快析出,必要时可以采用离心的方法缩短分离时间,并且可得到较多的血清。

制备血清同样要防止溶血。所以使用的器具应干燥清洁。而且,血清析出后宜用干净的玻璃棒轻轻分离凝血块与容器壁的粘连,及时吸取析出的血清。

4. 无蛋白血滤液 血液中含有丰富的蛋白质。在许多生化实验中,蛋白质的存在会干扰测定的结果。所以通常需要将血液中的蛋白成分除去,制成无蛋白血滤液,再进行分析测定。最简单的蛋白质去除方法是利用沉淀剂使蛋白质沉淀。常用的蛋白质沉淀剂有钨酸、三氯乙酸或氢氧化锌。血液加入蛋白质沉淀剂后,离心或过滤所得到的上清液或滤液,就是无蛋白血滤液。可用于血糖、肌酐、非蛋白氮等成分的测定。用三氯乙酸沉淀蛋白质,所得到的血滤液呈酸性,利于钙磷的溶解。因此在测定血清离子含量时多采用此法。

二、尿液样品

尿液中含有多种代谢产物。但是,昼夜之间尿液中各代谢物(排泄物)的含量,往往随着进食、饮水、运动或其他情况而有所变动。一般的定性实验,收集一次尿液即可。若进行定量测