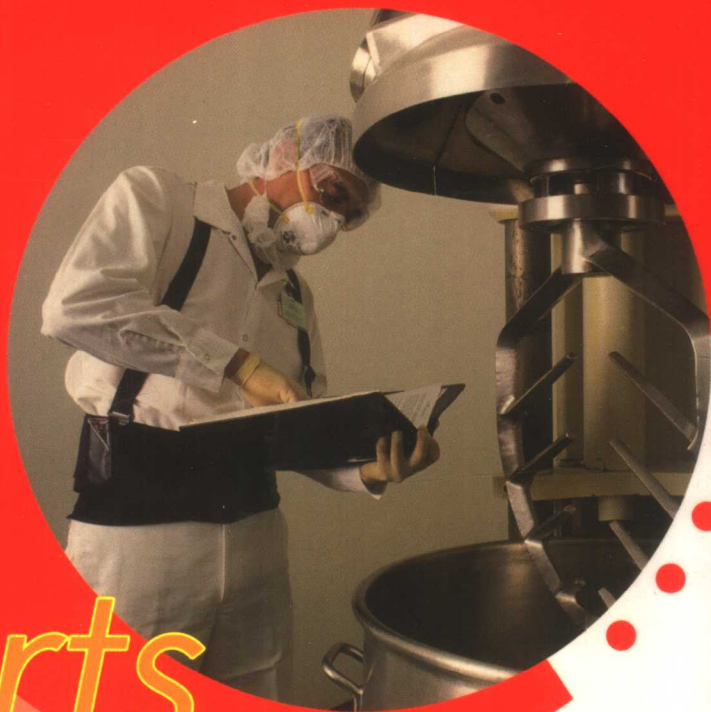


普通高等学校体育教育专业主干课配套教材


高等学校教材



sports

运动生物化学实验

张蕴琨 丁树哲 主编

 高等教育出版社

普通高等学校体育教育专业主干课配套教材

高等学校教材

运动生物化学实验

张蕴琨 丁树哲 主编

高等教育出版社

图书在版编目(CIP)数据

运动生物化学实验/张蕴琨,丁树哲主编. —北京:
高等教育出版社,2006.7

ISBN 7-04-019676-X

I. 运... II. ①张...②丁... III. 运动生物
化学-实验-高等学校-教材 IV. G804.7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2006)第064201号

策划编辑	尤超英	责任编辑	尤超英	封面设计	刘晓翔
版式设计	范晓红	责任校对	王雨	责任印制	韩刚

出版发行	高等教育出版社	购书热线	010-58581118
社 址	北京市西城区德外大街4号	免费咨询	800-810-0598
邮政编码	100011	网 址	http://www.hep.edu.cn
总 机	010-58581000		http://www.hep.com.cn
		网上订购	http://www.landaco.com
经 销	蓝色畅想图书发行有限公司		http://www.landaco.com.cn
印 刷	北京市鑫霸印务有限公司	畅想教育	http://www.widedu.com
开 本	787×960 1/16	版 次	2006年7月第1版
印 张	12	印 次	2006年7月第1次印刷
字 数	220 000	定 价	15.50元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 19676-00

郑重声明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话：(010) 58581897/58581896/58581879

传 真：(010) 82086060

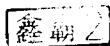
E - mail：dd@hep.com.cn

通信地址：北京市西城区德外大街4号

高等教育出版社打击盗版办公室

邮 编：100011

购书请拨打电话：(010)58581118



编写人员

主 编 张蕴琨 丁树哲
副主编 张 林 徐晓阳 林文弢
编写成员 (以姓氏笔画为序)
丁树哲 王 斌 刘丽萍
李宁川 林文弢 张 林
张蕴琨 张 纓 金其贯
徐 明 徐国琴 徐晓阳
阎守扶 常 波 蒋晓玲
熊正英

前 言

运动生物化学是高等学校体育专业一门重要的专业基础课程。实验教学是运动生物化学教学的重要组成部分,它既与理论教学有联系,又是一个相对独立的部分,有其自身的体系和规律。运动生物化学实验的原理、方法和技术是运动人体科学重要的研究手段,并已在运动实际中得到广泛的应用,在推进竞技体育和大众健身的科学化进程中有着不可替代的作用。

本教材是《运动生物化学》主干课程的配套实验教材。本教材共四个部分,第一部分为基础性实验,介绍了运动生物化学的一些实用性强的经典实验,使学生对运动生物化学基本实验方法有一个比较系统和完整的认识和了解,有利于学生基本技能的训练;在介绍基本原理、操作方法的同时,还阐述了在运动中测定的意义,与运动紧密结合。第二部分为综合性、设计性实验,将运动生化常用指标与方法融会贯通,具体应用于体育运动的实际中,改变过去大多数实验为验证性实验的现象,体现了实验教学的改革与创新,促进学生科学思维的形成,提高学生发现问题、分析问题和解决问题的能力。第三部分为拓展性实验,围绕运动人体机能生化评定的重点问题,系统介绍了相关的多个指标、多种方法,在指标、方法选择上的体现了先进性,有利于学生扩大知识面,开阔视野,为高年级的毕业论文研究和研究生从事运动人体科学的研究提供参考。第四部分介绍了运动生物化学的常用仪器,与第一、二、三部分实验紧密配套,前后呼应,且符合《普通高等学校体育教育专业本科专业各类主干课程教学指导纲要》所要求的仪器配备,也可促进各院校的实验室建设。

本教材力求反映体育专业运动生物化学实验的特色,进一步体现科学性、实用性、可操作性和拓展性。各院校可根据自身的条件和课程安排,有选择地开展相关实验。由于我们的水平有限,疏漏或错误之处在所难免,希望在使用过程中不断得到各方面的反馈信息,以利于进一步修改和完善。

编者

2006年6月

目 录

第 1 部分 运动生物化学基础实验	1
实验一 运动生物化学实验基本技术操作	2
实验二 温度和 pH 对酶活性的影响	10
实验三 血红蛋白的测定(氰化高铁血红蛋白法)	13
实验四 尿蛋白的测定	15
实验五 尿肌酐的测定(碱性苦味酸法——jaffe 反应法)	18
实验六 尿蛋白的测定	21
实验七 血尿素氮的测定(二乙酰一胍法)	23
实验八 血糖的测定(葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法)	25
实验九 血乳酸的测定	27
实验十 血氨的测定	30
实验十一 血脂的测定	33
实验十二 肝糖原的提取和测定	38
第 2 部分 运动生物化学综合性、设计性实验	41
一、综合性实验	42
二、设计性实验	53
第 3 部分 运动生物化学拓展性实验	57
一、骨代谢生化标志物指标的测试	58
二、肌损伤生化指标的测试	66
三、肝肾功能生化指标的测试	76
四、内分泌机能生化指标的测试	84
五、自由基代谢生化指标的测试	91
六、铁代谢生化指标的测试	98
第 4 部分 运动生物化学常用仪器	107
一、常用玻璃仪器的使用	108
二、721、722、752 分光光度计	116
三、尿液分析仪	124
四、酶标仪	131

运动生物化学 实验

五、荧光分光光度计	140
六、血乳酸自动分析仪	146
七、自动生化分析仪	148
八、电泳仪	155
九、离心机	162
十、 γ 放射免疫计数器.....	172
主要参考文献	181

第 **1** 部分

运动生物化学基础实验

实验一 运动生物化学实验基本技术操作

一、实验目的

- (1) 了解实验室规则及注意事项。
- (2) 学习运动生物化学实验常用仪器的使用及清洗方法。
- (3) 掌握常用生物化学分析方法——分光光度法。
- (4) 学习运动生物化学实验样品的采集与处理方法。
- (5) 学习记录实验结果和书写实验报告。

二、实验室规则及注意事项

- (1) 课前应结合相关理论预习实验指导,有问题及时提出,准备充分后开始实验。
- (2) 严格按照操作规程进行实验,随时记录所观察到的现象及实验数据。课后进行整理、分析,并写出实验报告。
- (3) 严禁在实验室内嬉戏打闹,大声喧哗。
- (4) 保持药品架及实验室的整洁,保证试剂药品的纯净,试剂用后立即盖好放回原处。注意移液管不能混用,试剂瓶盖不能盖错。
- (5) 爱护仪器设备,注意安全操作,若有仪器损坏或意外事故发生应立即报告老师。
- (6) 实验完毕后,将废纸、火柴棒、碎玻璃等杂物倒入污物桶,废液收集到废液缸内统一处理,清洗、整理实验用品,检查水源、电源,搞好室内卫生。

三、常用玻璃器皿的使用及清洗

1. 常用玻璃仪器的使用(详见本书第四部分)
2. 常用玻璃仪器的清洗

(1) 一般非计量玻璃仪器或粗容量仪器的洗涤可先用刷子蘸取肥皂水及去污粉进行刷洗,再用自来水冲净至管壁不挂水珠,然后用去离子水或蒸馏水洗3遍,倒置在试管架上自然干燥或热风烘干。

(2) 精密量器不能用去污粉或肥皂洗刷,用后应立即用自来水冲洗,沥干后,浸于铬酸洗液中浸泡数小时,再分别用自来水及蒸馏水冲洗,干燥备用。

(3) 过脏的器皿可先用重铬酸钾等洗液浸泡 10 min 后,取出用大量自来水洗净,再用蒸馏水冲洗。蒸馏水的使用应遵循少量多次原则。

四、常用生物化学分析方法——分光光度法

1. 分光光度法基本原理及分光光度计使用方法(详见本书第四部分)

2. 样品浓度计算方法

(1) 标准曲线法:配制一系列浓度递增的标准品溶液,按照与被测品同样的操作过程处理后,分别测出它们的光密度。以光密度为纵坐标,浓度为横坐标,将不同浓度的标准管对应的光密度值分别点在坐标纸上,通过各点作一平滑直线即标准曲线,然后在相同条件下测出待测样品的光密度,从标准曲线上直接查出相对应的浓度值。

(2) 标准管对照法:配制已知浓度的标准溶液,与待测样品在相同条件下进行操作,分别测出相应光密度,根据下列公式,即可测出待测样品的浓度:

$$C_x = \frac{OD_x}{OD_s} \times C_s$$

式中 C_x = 待测样品浓度, OD_x = 待测样品吸光度,

C_s = 标准溶液浓度, OD_s = 标准溶液吸光度。

(3) 操作练习:

① 绘制标准曲线。取 7 只大试管,编号,按表 1-1 操作:

表 1-1 高锰酸钾溶液浓度的测量

	0	1	2	3	4	5	x
高锰酸钾储备液(50 p. p. m)(ml)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	—
蒸馏水(ml)	5.0	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	—
高锰酸钾待测液(ml)	—	—	—	—	—	—	5.0
充分混匀后,以 0 号管为空白管调零,500 nm 波长比色,读取 1~x 各管 OD 值							
标准管相应浓度(p. p. m)	0	5	10	15	20	25	—

以光密度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线,并在标准曲线上查出待测高锰酸钾溶液的浓度。

(50 p. p. m 高锰酸钾储备液的配制:取 0.007 2 g 高锰酸钾加水至 100 ml。)

② 标准管对照法。以上述“0”管为空白管调零,在 1~5 号标准管中任取一只为标准对照管,利用标准管对照法中所列公式计算出待测液的浓度。

五、实验样品的采集与制备方法

在运动生物化学实验中,常使用人或动物的全血、血清、血浆或无蛋白滤液、尿液、胃液等作为实验样品,有时选用动物的肌肉、肝、肾、脑、黏膜等组织。掌握这些实验样品的正确采集和制备方法是保证生物化学实验顺利进行的关键。

1. 尿液标本

尿液标本的采集容器最好采用一次性的塑料杯,用后即弃。

(1) 新鲜尿液:采集晨尿 100 ml 左右,置于清洁容器中,应尽快检测(0.5 h 内检测,最多不超过 2 h)。如不能及时检测,应防腐保存。

(2) 24 h 尿液:如作定量检查,应收集 24 h 尿,其方法如下:上午 7:00,让被测人排尽尿,弃去。从 7:00 到次日上午 7:00 整,让被测人将每次排出的尿液全部收集于一个含防腐剂的清洁大容器中,然后将尿充分混匀后,用量筒量尿,记下总量,从中取尿 100~200 ml 置于清洁容器内待检。

(3) 尿液的防腐与保存:尿液如不能及时检验,需要加入防腐剂保存,常用防腐剂有 40% 甲醛溶液、甲苯等。

① 40% 甲醛溶液。每 100 ml 尿内加入 40% 甲醛溶液 0.5 ml,对细胞、管型等有形成分保存较好,但对尿蛋白、糖的测定有干扰。

② 甲苯。定量检查一般用甲苯比较好。先加少量甲苯(每 100 ml 尿液加 0.5~1 ml 甲苯)于一经消毒液浸泡后用开水清洗过的清洁容器内,在留尿过程中,甲苯会在尿面形成一薄层,防止微生物进入尿液中,但如容器本来不清洁,或在留完标本后再加甲苯则无效。

③ 冰箱冷藏。将新鲜尿液立即置于冰箱(可冰冻)保存。但在低温保存时,有些成分(如尿酸盐)会沉淀析出,影响其化学成分的测定。

2. 血液标本

(1) 末梢血的采集:一般采用指尖血或耳垂血。用 75% 乙醇消毒手指(一般用左手无名指)或耳垂皮肤,待干后,用一次性专用采血针刺一深浅适度的切口,使血自然流出,或在距切口远处稍加挤压,擦去第 1 滴血,用经校准过的微量吸血管准确吸血至所需要刻度,擦去管尖周围的血后迅速吹入试管中。采血完毕后,针刺处应用消毒干棉球压迫止血。

(2) 静脉血的采集:凡需要作准确的测定或作需要量较多的检验时,均需由专业人员采集静脉血。

(3) 血清的制备:制备血清标本时,关键在采血及分离过程中防止溶血,注射器及针头应十分干燥、清洁。抽血后应将针头取下,将血液沿试管壁或小瓶壁慢慢注入试管或小瓶(气泡不可注入),静置 30 min 后血液凝固,可待血清自然

析出,也可经低速离心分离血清。如需保存,应及时将血清分离出来,切不可全血冰冻。

(4) 血浆的制备:将所采的血样注入含有适量抗凝剂的试管或小瓶内,加塞后立即轻轻摇匀,此为全血。全血经离心分离后,上清液为血浆。若需血清标本,则直接将血液注入清洁的试管或小瓶内,待其凝固后分离血清。

(5) 抗凝剂:

① 枸橼酸钠(0.109 mol/L)。枸橼酸钠能与血液中的钙离子形成可溶性的络合物,从而阻止血液凝固,抗凝剂与血液之比通常为1:9。因枸橼酸钠溶解慢,故只能配成溶液,不能用粉剂。

② 草酸钾。草酸钾是最常用的抗凝剂,其溶解度大,与血液混合后可迅速与血液中的钙离子结合,形成不溶解的草酸钙,使血液不再凝固。常用于非蛋白氮等测定,但不适用于钾和钙的测定。通常是先配成10%草酸钾溶液,分装于小瓶或试管内,每瓶0.2 ml,在80℃以下烘干后加塞备用。每瓶含草酸钾20 mg,可使10 ml血液不凝固。如抽血不超过5 ml,每瓶加10%草酸钾0.1 ml即可,不宜过多。

③ 草酸钾-氟化钠混合剂。血液内若干化学成分(如血糖)离体后容易被活细胞分解,影响测定结果。草酸钾-氟化钠混合剂可抑制糖酵解中烯醇化酶的活力,常用于血糖等测定。配制方法:草酸钾6 g,氟化钠3 g,加蒸馏水至100 ml。分装于小瓶或试管内,每瓶0.25 ml,置80℃以下烘干,可使5 ml血液不凝。

④ 乙二胺四乙酸(EDTA)。EDTA是一种钙络合剂,常用的是其二钠盐(EDTA-Na₂),其有效抗凝浓度为1~2 mg/ml血液,适用于一般血液学检验。

⑤ 肝素。肝素是含有许多硫酸基因的黏多糖,它是一种天然抗凝剂,每管加含肝素1 mg的溶液,在60℃以下烘干备用,可使5~10 ml血液不凝固。

3. 无蛋白滤液

血液内蛋白质往往干扰某些血液化学成分的测定,因此需要先制成无蛋白滤液后再进行检验,通常用钨酸除蛋白法来制备。此沉淀剂用10%钨酸钠50 ml,2/3N硫酸50 ml,85%磷酸0.05 ml,加蒸馏水800 ml配制而成。一般可用2个月左右,如出现浑浊即失效。在试验时以此液与全血或血浆、血清以10:1或者20:1稀释即可。用吸管吸血时放血要慢,加入试剂后充分混匀。静置10 min后离心沉淀,取上清液备用。此滤液适用于葡萄糖、非蛋白氮、肌酸、肌酐及尿酸等测定。

有时也可用10%三氯乙酸作蛋白沉淀剂,所得的滤液呈酸性,利于钙磷的溶解,因此在测定血清离子时宜采用。

4. 组织标本

在生物化学实验中,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。但

是,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将发生变化。

一般采用断头法处死动物后,放出血液,立即取出所需脏器或组织,除去脂肪和结缔组织后,用冰冷生理盐水洗去血液,再用滤纸吸干,称重后,按实验要求制成匀浆或组织糜。

(1) 组织糜:迅速将组织剪碎,用捣碎机绞成糜状,或者加入少量黄沙于研钵中,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(常用的匀浆制备液有生理盐水、缓冲液和0.25 mol/L的蔗糖溶液等),用高速电动匀浆器或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。

(3) 组织浸出液:上述组织匀浆液经离心分离出的上清液就是组织浸出液。

六、实验报告的书写

1. 意义

撰写实验报告是一项非常重要的技能训练。因为撰写实验报告不仅是对每次实验的总结,而且可以培养和训练学生的逻辑归纳能力、综合分析能力以及文字表达能力,还可以为未来撰写科研论文奠定基础。所以,参加实验的每位学生,应当及时、认真地书写实验报告。努力做到内容实事求是,分析全面具体,文字简练通顺,誊写清楚整洁。

2. 实验报告的内容与要求

- (1) 实验名称:用最简练的语言反映实验的内容。
- (2) 所属课程名称。
- (3) 学生姓名、学号及合作者。
- (4) 实验日期和地点(年、月、日)。
- (5) 实验目的。

目的要明确,在理论上验证书本所述现象,并使实验者获得比较深刻和系统的理解;在实践上,掌握使用实验设备的技能技巧。一般需说明是验证型实验还是设计型实验,是创新型实验还是综合型实验。

(6) 实验内容与原理:可以从理论和实践两个方面考虑,要写明依据何种原理或操作方法进行实验。

(7) 实验环境:实验用的软硬件环境,例如使用的仪器设备、试剂、气温、湿度等。

(8) 实验步骤:写明主要操作步骤,不要照抄实习指导,要简明扼要。可用实验流程图(实验装置的结构示意图)再配以相应的文字说明。

(9) 实验结果:主要包括实验现象的描述、原始数据的记录、实验数据的处理等。实验结果的表述,一般有两种方法:一种是文字叙述:根据实验目的将原始资料系统化、条理化,用准确的专业术语客观地描述实验现象和结果,要有时间顺序以及各项指标在时间上的关系;另一种是利用图表:用表格或坐标图的方式使实验结果突出、清晰,便于相互比较,尤其适合于分组较多,且各组观察指标一致的实验,使组间异同一目了然。每一个图表应有表目和计量单位,应说明一定的中心问题。此外,有些时候还可以应用仪器记录仪描记出的曲线图,这些图可以使指标的变化趋势形象生动和直观明了。在实验报告中,可任选其中一种或几种方法并用,以获得最佳效果。

(10) 讨论:根据相关的理论知识对所得到的实验结果进行解释和分析。如果所得到的实验结果和预期的结果一致,那么它可以验证什么理论?实验结果有什么意义?说明了什么问题?但是,不能用已知的理论或生活经验硬套在实验结果上;更不能由于所得到的实验结果与预期的结果或理论不符而随意取舍甚至修改实验结果,这时应该分析其异常的可能原因。如果本次实验失败了,应找出失败的原因及以后实验应注意的事项。不要简单地复述课本上的理论而缺乏自己主动思考的内容。另外,还可以写一些本次实验的心得以及提出一些问题或建议等。

(11) 小结:小结不是具体实验结果的再次罗列,也不是对今后研究的展望,而是针对这一实验所能验证的概念、原则或理论的简明总结,是从实验结果中归纳出的一般性、概括性的判断,要简练、准确、严谨、客观。

(12) 教师批语。

附:实验报告格式

《运动生物化学》实验报告

200 ~ 200 学年 第 学 期

实验名称		姓名		学号	
合作者		日期	月 日 节	地点	
实验目的:					

实验内容与原理：
实验环境：
实验步骤：
实验结果：
讨论：

续表

小结：
教师批语：
批改日期 年 月 日