

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

肖建英 李 红 主编



科学出版社

全国高等医药院校医学影像学专业教材

生物化学与分子生物学实验

肖定涛 李 江 主编

人民卫生出版社

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

主 编 肖建英 李 红
副主编 许珂玉 朱艳凌 王 顺
张 蕾 李东华

编 者 (按姓氏笔画排序)

王 顺	辽宁医学院	王翠瑶	辽宁医学院
田余祥	大连医科大学	付晶京	辽宁医学院
朱艳凌	辽宁医学院	刘 超	辽宁医学院
许珂玉	辽宁医学院	苏 燕	包头医学院
杨 菁	辽宁医学院	李东华	辽宁医学院
李 宁	辽宁医学院	李 红	辽宁医学院
肖建英	辽宁医学院	张尤新	辽宁医学院
张志珍	广东医学院	张秀梅	辽宁医学院
张 蕾	辽宁医学院	黄艳丽	辽宁医学院
崔明宇	辽宁医学院	屠宴会	辽宁医学院

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

《生物化学与分子生物学实验》主要内容分为四章。第一章介绍了生物化学基本实验操作与常用技术及仪器的使用,主要包括离心技术、分光光度分析技术、电泳技术、层析技术、PCR技术;第二章是经典验证性实验;第三章是综合性实验;第四章是研究性实验。本教材共编写了25个医学院校常开设的实验。每个实验包括实验目的、实验原理、实验操作、试剂配制与实验仪器、注意事项及思考题等。最后附录部分介绍了常用溶液和培养基的配制。

本教程内容系统,阐述简明,主要供高等医学院校相关专业实验教学之用,也可供研究生和相关科研人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验 / 肖建英, 李红主编. — 北京: 科学出版社, 2011
(全国高等院校医学实验教学规划教材)

ISBN 978-7-03-030450-6

I. 生… II. ①肖… ②李… 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(2011)第 034094 号

责任编辑:周万灏 / 责任校对:李 影

责任印制:刘士平 / 封面设计:范璧合

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>

骏杰印刷厂印刷

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

2011年3月第一次印刷 印张:7

印数:1—5 000 字数:155 000

定价:18.00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》 总编委会

主任 刘学政
副主任 曲巍 孙洞箫 肖建英 罗俊生 梁宇恒
贾云宏
委员 (按姓氏笔画排序)
万义增 王冰 王万旗 王云飞 王亚平
王爱梅 艾浩 朱艳 刘丹 刘卫党
严宁生 李红 李尘远 李华侃 李德华
肖马 吴学敏 谷京城 闵连秋 张佩
张辉 张春阳 张祥林 张筠莉 张蕴莉
金英 郝春艳 高志安 郭敏 陶贵周
谢志明 穆殿超
总策划 曲巍
秘书 崔洪雨

总 序

随着生命科学及其实验技术的飞速发展,我国高等医学教育对医学实验教学提出了更高的要求,大量先进医学实验进入实验教学课程体系将成为必然趋势,要全面推进现代医学实验教学的发展,必须加大对实验项目、实验条件、实验教学体系的改革力度,这对培养适应 21 世纪医药卫生事业发展的高素质医学人才具有重要意义。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,与理论教学既联系又相对独立,实现基础与前沿、经典与现代的有机结合是我们编写本系列教材的初衷。依照此要求编写的医学基础课实验系列教材,其基本理念是面向学生未来,立足创新能力教育,体现科学本质,突出科学探索,反映当代科学成果。设计思路突出“整合”和“探究”两大特点。力图从实际应用性出发构建具有自身特点的实验教学内容,进而通过实验结果的分析与思辨,期望在医学基础课实验教学体系和方法上有所继承与突破。

本系列实验教材由长期工作在教学和科研一线的教师编写而成,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、综合性实验和创新性实验,并将实验报告融入到实验教材中。系列教材共九本,包括《大学计算机基础实践教程》、《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》、《医用物理学实验》、《医用化学实验》和《临床技能学》。

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的实验教学内容。

由于水平和时间的限制,缺点和错误在所难免,恳请读者和同行专家提出宝贵意见。

《全国高等院校医学实验教学规划教材》

总编委会

2011.1

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,生物化学的实验技术和方法不仅为生物化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,使之产生了许多新兴的交叉学科,如分子遗传学、分子免疫学、分子病理学、分子药理学等。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,我院生化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化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迫使生化实验教学进入了由综合性实验向研究性实验转变的关键时期。可以预见研究创新性实验的全面开展将对提高我院生化教学质量和学生的综合素质起到积极地推进作用。

我们学院从1983年开始,随着本科生物化学实验教学改革的不断深入和人才培养的需要,先后编写了五版生物化学实验指导,经过二十多年的实践,效果很好。这次实验指导的改编,是在原版实验教材的基础上加以修改和完善,删除了一些内容相似、应用不多的验证性实验,增加了更有意义的综合性实验、分子生物学实验及研究性实验内容。并根据实验内容和培养目标的不同,将本教材分成四大板块编写:第一章基本实验操作与常用技术及仪器的使用;第二章经典验证性实验;第三章综合性实验;第四章研究性实验,使本实验教材可读性、实用性、针对性更强,适合于不同院校及使用者的选择和参考。

参加本书编写人员都是我院本科生化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,同时适当吸纳相关实验技术的最新进展,使教材难易适中。尽管如此,由于我们水平有限,缺点和错误在所难免,欢迎生化同仁批评指正。

肖建英 李 红

2011年2月

目 录

总序	
前言	
概述	(1)
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)
第二节 常用技术及仪器的使用	(9)
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 酶的特异性、激活剂及抑制剂	(27)
实验三 乳酸脱氢酶及其辅酶 I 的作用	(28)
实验四 血清谷丙转氨酶活性的测定	(30)
实验五 血糖浓度测定	(33)
实验六 胰岛素及肾上腺素对血糖浓度的影响	(37)
实验七 运动对尿中乳酸含量的影响	(39)
实验八 酮体的生成和利用	(40)
实验九 胆固醇提取定性	(42)
实验十 血清总胆固醇的测定	(43)
第三章 综合性实验	(46)
实验十一 蛋白质含量的测定	(46)
实验十二 血清 LDH 同工酶谱分析	(50)
实验十三 碱性磷酸酶 K_m 值的测定	(56)
实验十四 碱性磷酸酶分离纯化及比活性的测定	(58)
实验十五 DNA 琼脂糖凝胶电泳	(64)
实验十六 聚合酶链反应技术体外扩增 DNA	(66)
实验十七 质粒 DNA 的制备(碱变性法)	(67)
实验十八 血清蛋白质的电泳分离	(69)
实验十九 SDS-PAGE 电泳测定蛋白质的相对分子量	(75)
实验二十 蛋白质印迹(Western-Blotting)	(79)
第四章 研究性实验	(82)
实验二十一 凝胶过滤层析法分离纯化脲酶	(82)
实验二十二 离子交换层析法分离血清蛋白质	(86)
实验二十三 RT-PCR 技术	(87)
实验二十四 真核生物基因组 DNA 的提取与鉴定	(90)
实验二十五 基因克隆及蛋白原核表达	(92)
附录	(96)
附录 1 常用溶液的配制	(96)
附录 2 常用培养基的配制	(101)

概 述

一、生物化学与分子生物学实验课的性质、任务与目的

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。生物化学的实验技术和方法不仅为生物化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。生物化学实验课是帮助同学掌握基本实验技能、基本实验操作技术,提高独立思考、独立分析和独立解决问题的能力,学会正确的科研思维方法,养成严谨的科学作风,把同学们所学得生化理论知识和实验内容相结合的重要手段。

近代医学的发展经常运用生物化学理论与技术诊断、治疗和预防疾病,许多疾病的发病机制也需要从分子水平加以探讨。特别是近年来,随着生物化学与分子生物学的迅速发展促进了人们对许多疾病如恶性肿瘤、心血管疾病、神经系统疾病、免疫系统疾病等重大疾病的认识,随之出现了基因诊断和基因治疗的方法。由于生化理论是在科学研究实验基础上高度总结的结论性观点,所以,生化实验课一方面使学生在实验中验证理论的来源与正确性、加深对理论的理解;另一方面,生物化学实验手段又是生命科学发展的必用手段,生化实验课是培养学生科研能力和素质的必要和重要过程。

通过生物化学与分子生物学实验课,可以使同学们掌握生物化学与分子生物的基本操作技术,培养学生独立思考和实事求是的科学态度,为今后从事科研工作和临床实践奠定基础。

二、生物化学与分子生物学实验室安全与规则

(一) 实验室安全

1. 实验室建立安全责任人制度,由实验室主任全面负责实验室的安全工作。
2. 定期进行实验室安全知识教育,增强安全意识,严格管理,预防和避免各类事故的发生。
3. 定期检查实验室水、电、煤气线路,发现隐患及时解决。消防器材专人管理,位置固定,工作人员熟练使用,能应对紧急情况发生。
4. 保持实验室内空气流通。凡对身体有害气体的实验及试剂的配制要求在通风橱内操作,并佩戴好相应的保护物品。
5. 实验室中易燃易爆和剧毒物品必须妥善保管,统一存放,设立危险品标志。使用时注意规范操作。
6. 凡涉及使用毒麻药品和危险试剂时,遵照《危险性试剂及毒麻药品使用管理规定》执行。
7. 对参加使用操作的人员要进行安全知识及相关仪器设备使用的指导,对于大型仪器设备要有专人负责操作。

(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、详实记录在记录本上。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。

(李 红)

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

生化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次后晾干备用。

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。当遇有被氧化物质存在时,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-Na₂)液 5%~10%的EDTA-Na₂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烘干($105\sim 110^{\circ}\text{C}$,1小时)。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

吸量管是生化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 秒钟,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 秒钟,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)。

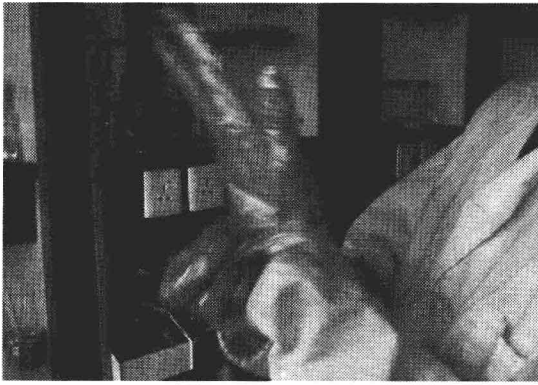
(3) 安装枪头(图 1-1c),并用拇指把按钮压至第一档(图 1-1d)。

(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 秒钟,使管尖外侧的液滴滑落(图 1-1e)。

(5) 放液:枪头贴到受器内壁底部,平稳地把按钮压到第一档后,再把按钮压到第二档,排尽液体(图 1-1f)。

(6) 松开按钮,恢复至原来的位置(图 1-1g)。

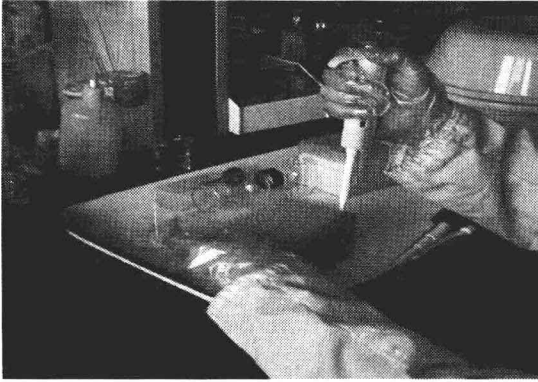
(7) 按枪头弹射器弃去枪头(图 1-1h),将移液器放回移液器支架。



a. 移液前准备



b. 设定移液量



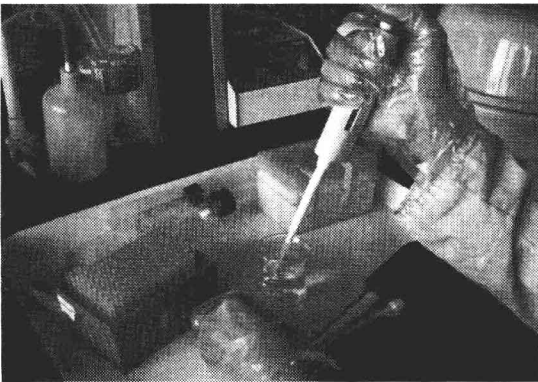
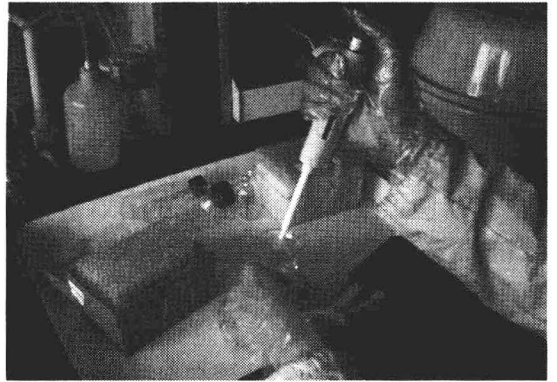
c. 安装枪头



d. 按钮按压至第一档位置



e. 吸液, 枪头尖端插入液面下, 轻拍拇指吸取液体

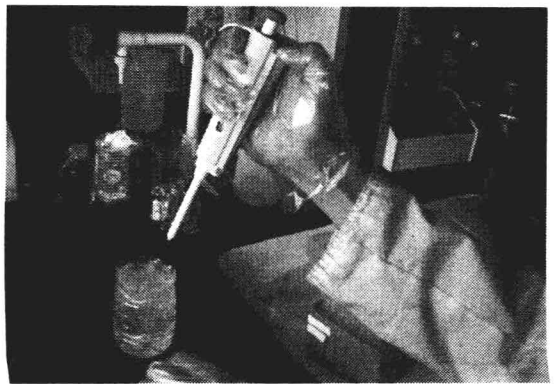
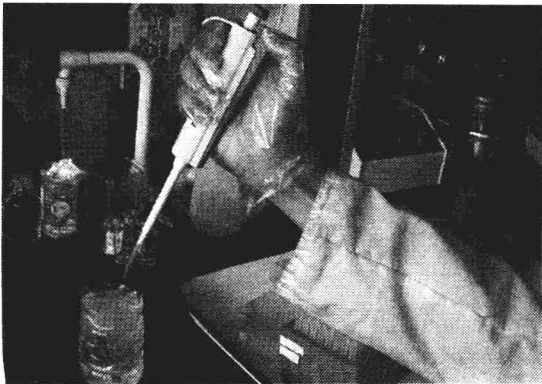


f. 放液, 按压至第一档后, 再按压第二档, 排尽液体

图 1-1 可调式移液器的使用方法



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(续)

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% 的异丙醇溶液,然后用蒸馏水反复洗涤,去除洗涤剂或异丙醇溶液,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

在生化实验中,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 适用烧杯等大口容器所盛溶液的混匀,一般在配制混合试剂时,用玻璃棒搅拌以助溶,或混匀大量的溶液。

四、沉淀的分离

1. 过滤 一般生化实验中,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。

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3000转/分,离心5~10分钟)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800转/分,离心5分钟,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 3000 转/分,离心 5~10 分钟),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 5~10 分钟,使其酸化完全。

4) 加入 10% 钨酸钠 1 份,随加随摇。

5) 放置约 5 分钟后,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(2500 转/分,10 分钟),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 5 分钟,用定量滤纸过滤或离心(2500 转/分,10 分钟),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. 三氯醋酸法

(1) 原理:三氯醋酸为一有机强酸,能使蛋白质变性而沉淀。

(2) 制备方法:取 10%三氯醋酸 9 份置于锥形瓶或大试管中,加 1 份已充分混匀的抗凝血液。加时要不断摇动,使其均匀,静置 5 分钟,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 24 小时尿混合后取样。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璃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

在生化实验中,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,研磨至糜糊状。

(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、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