

全国高等医药院校实验教材



**生物化学与
分子生物学实验教程**

◇主 编 任颖 柳春

清华大学出版社

全国高等医药院校生物化学教材

生物化学与 分子生物学实验教程

第二版 供临床医学专业用

人民卫生出版社



生物化学与 分子生物学实验教程

◇主 编 任颖 柳春

清华大学出版社
北京

内 容 简 介

本书分为4部分:第1部分实验基本知识包括实验基本操作、实验样品的制备、常用的实验方法与技术(分光光度法、电泳技术、层析技术、离心技术和印迹技术);第2部分生物化学实验,包括17个实验;第3部分分子生物学基本实验方法,包括9个实验;第4部分附录介绍了实验室安全及防护知识、分子生物学实验中的常用试剂及溶液、缓冲液的配制、常用计量单位及符号和希腊字母表。

本书适用于高等医药院校临床医学、中医学、中西医结合、骨伤、针灸推拿、护理、药学、中药、制药工程、生物技术等各专业的实验教学。由于各专业的要求、学时不同,可根据实际情况选择实验项目。

版权所有,侵权必究。侵权举报电话:010-62782989 13701121933

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验教程/任颖,柳春主编. --北京:清华大学出版社,2012.3

(全国高等医药院校实验教材)

ISBN 978-7-302-28186-3

I. ①生… II. ①任… ②柳… 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(2012)第029944号

责任编辑:罗 健
封面设计:嘉玮伟业
责任校对:王淑云
责任印制:张雪娇

出版发行:清华大学出版社

网 址: <http://www.tup.com.cn>, <http://www.wqbook.com>

地 址:北京清华大学学研大厦A座 邮 编:100084

社总机:010-62770175 邮 购:010-62786544

投稿与读者服务:010-62776969, c-service@tup.tsinghua.edu.cn

质 量 反 馈:010-62772015, zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn

印 装 者:北京国马印刷厂

经 销:全国新华书店

开 本:185mm×260mm 印 张:6 字 数:158千字

版 次:2012年3月第1版 印 次:2012年3月第1次印刷

印 数:1~5000

定 价:15.00元

产品编号:045511-01

编委会名单

主 编 任 颖 柳 春

副主编 张晓薇 王艳杰 孙 聪

编 者 (以姓氏笔画为序)

王艳杰 王宏英 王卫芳 任 颖

米丽华 孙 聪 李桂兰 张晓薇

青献春 周晓晶 柳 春 赵丹玉

郭艳霞

随着生命科学的发展,生物化学与分子生物学技术已渗透到生命科学的各个领域,成为生命科学及相关学科教学与科研不可缺少的部分,也是医学、药学、生物技术等专业本科学生必修的基础实验课程。为了适应现代科学技术的发展,适应高校教学改革,提高教学质量,培养开拓、创新型高级医药人才,我们根据多年的教学经验和生命科学发展趋势,在传统生物化学与分子生物学实验的基础上,探讨新的实验教学方法,编写了本教程。本书可供高等医药院校各专业、各层次学生选用。

本实验教材由实验基本知识、生物化学实验、分子生物学基本实验方法和附录4个部分组成。在编写过程中,我们既考虑到配合课堂理论学习,又注意训练学生的基本操作技能,同时也增加了反映新技术、新方法的内容。我们力求每个实验都具有科学性、实用性和可靠性,对其中基本原理、试剂配制、实验步骤、实验器材等都做了较为详细的叙述。我们还对常用的实验仪器使用方法、样品的制备、试剂的配制等知识做了详细的介绍,使学生使用时更方便。

本书是我们在总结多年生物化学实验教学经验的基础上,不断完善并修订而成。但由于我们水平有限,分子生物学技术又发展得很迅猛,希望读者在使用本实验教材过程中发现不妥之处,不吝批评指正。

编者

2011年12月

第 1 部分 实验基本知识	
一、生物化学实验室规则	1
二、实验报告的书写要求	1
第 1 章 实验基本操作	3
一、玻璃仪器的洗涤与干燥	3
二、吸量管的使用	4
三、移液器的使用	5
四、液体的混匀	8
第 2 章 实验样品的制备	9
一、血液样品的制备	9
二、尿液的收集	10
三、组织样品的制备	11
第 3 章 常用的实验方法与技术	12
第 1 节 分光光度法	12
一、分光光度技术的基本原理	12
二、分光光度法的应用	13
三、分光光度计的基本结构	14
四、常用分光光度计的使用方法	14
第 2 节 电泳技术	16
一、电泳技术的基本原理	16
二、常用的电泳方法	16
三、电泳技术的应用	17
四、电泳技术使用的相关仪器	18
五、电泳的基本操作方法	18
第 3 节 层析技术	19
一、吸附层析	19
二、分配层析	21
三、离子交换层析	21
四、凝胶过滤层析	22
五、亲和层析	23
第 4 节 离心技术	23
一、沉降系数	24
二、离心速度与离心力	24
三、制备性超速离心分离方法	24
四、普通离心机使用时的注意事项	25
第 5 节 印迹技术	26
一、生物大分子凝胶电泳分离	26
二、固相支持物的选择	26
三、转移	26
四、常用的几种印迹方法	27
第 2 部分 生物化学实验	
实验 1 蛋白质的呈色和沉淀反应	29
一、蛋白质呈色反应	29
二、蛋白质的沉淀反应	29
实验 2 蛋白质含量测定	32
一、Folin-酚试剂法 (Lowry 法)	32
二、考马斯亮蓝染色法	33
实验 3 蛋白质等电点的测定	34
实验 4 凝胶层析分离法分离血红蛋白与溶菌酶	35
实验 5 肝组织中核酸的分离与鉴定	37
实验 6 酶的特异性	39

实验 7 影响酶促反应的因素	40
一、温度对酶活性的影响	40
二、pH 对酶活性的影响	41
三、激活剂、抑制剂对酶促反应的 影响	41
实验 8 食物中维生素 C 的提取和 定量	42
实验 9 胡萝卜素柱层析分离法	43
实验 10 血糖含量的测定	44
一、邻甲苯胺改良法	44
二、葡萄糖氧化酶法	46
实验 11 胆固醇氧化酶法测定血清 总胆固醇	46
实验 12 血清尿素氮测定(二乙酰— 肟法)	47
实验 13 血清蛋白醋酸纤维素薄膜 电泳	49
实验 14 血清脂蛋白琼脂糖凝胶 电泳	51
实验 15 转氨基作用与氨基酸纸 层析	51
实验 16 血清谷丙转氨酶的活性测定 ..	53
实验 17 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测 定蛋白质的相对分子质量 ..	55

第 3 部分 分子生物学基本实验方法

实验 1 基因组 DNA 的分离提取	60
--------------------------	----

实验 2 质粒 DNA 的提取	61
实验 3 核酸浓度的测定	63
实验 4 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA ..	64
实验 5 DNA 的酶切	65
实验 6 DNA 重组、转化与鉴定	68
实验 7 Southern 印迹转移	71
实验 8 Western blot 检测蛋白质	74
实验 9 RT-PCR	76

第 4 部分 附录

附录 1 实验室安全及防护知识	79
一、实验室安全知识	79
二、实验室灭火法	79
三、实验室急救	80
附录 2 分子生物学实验中的常用试剂 及溶液、缓冲液的配制	80
一、常见市售酸碱的浓度	80
二、有机试剂的配制	81
三、细菌培养基和抗生素	81
四、常用缓冲液的配制	83
五、常见限制性内切酶酶切位点及缓 冲液	86
附录 3 常用计量单位及符号	87
附录 4 希腊字母表	87

参考文献	88
------------	----

第 1 部分 实验基本知识

一、生物化学实验室规则

(1) 实验课前要认真预习实验内容,做到熟悉本次实验的目的、原理、操作步骤,并且要了解每一操作步骤的作用及所用仪器设备的基本使用方法。

(2) 实验课上,每位同学要自觉遵守课堂时间,要做到不迟到,不早退,自觉维护课堂秩序,并且要穿白大衣进行实验,认真完成实验课内容,不要大声谈笑,实验室内严禁吸烟和吃东西。

(3) 教师讲解时要认真听讲,不要进行实验操作,待教师讲解完成后,再认真地按操作规程进行实验。

(4) 做实验时,实验台面要随时保持整洁,仪器、药品摆放整齐。使用药品、试剂和各种耗材时要注意节约。勿使试剂、药品洒在实验台面和地上。在使用公用试剂后,要立即盖严放回原处。

(5) 使用仪器时,要严格遵守操作规程,精心使用和爱护仪器,如果发现故障和损坏须立即报告教师,并填写损坏仪器登记表,不得擅自动手检修。

(6) 实验过程中注意安全,如果使用乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热,并要远离火源操作和放置。

(7) 废液可倒入水槽内,同时放水冲走。强酸、强碱溶液必须先用水稀释。废纸屑及其他固体废物和带渣滓的废物倒入废品缸内,不能倒入水槽或到处乱扔。

(8) 实验过程中要把观察到的实验结果和数据及时、如实记录在实验记录本上,记录要简练、准确,以便实验结束后进行讨论和分析。

(9) 实验完毕后,要认真洗涤使用过的玻璃器皿,并且洗涤时应小心仔细,按照操作程序进行洗涤,防止损坏玻璃器皿。将实验台面抹拭干净,实验物品摆放整齐,经教师检查同意,方可离开实验室。

(10) 实验室内一切物品,未经本室负责教师批准,严禁带出室外,借物必须办理登记手续。

(11) 每次实验课由班长或课代表负责安排值日生。值日生的职责是负责当天实验室的卫生、安全和一切服务性的工作。值日生完成值日后,离开实验室以前,认真负责地进行实验室检查,注意检查“水、电、气”是否关好,并填写值日生记录及实验室使用记录。

二、实验报告的书写要求

实验结束后,应及时整理和总结实验结果,进行讨论和分析,并写出实验报告。完整的实验报告应包括:实验名称、实验日期、实验目的、实验原理、操作步骤、实验结果、讨论、结论等多项内容。

其中实验目的、实验原理和操作步骤等项只要求作简明扼要的叙述,不必也不应将《实验指导》原封不动地抄录一遍,可以用简单的语言进行总结概括或画出实验操作的流程图。但注意对实验的条件、操作要点等涉及实验成败的关键环节应做清楚描述。

实验结果包括如实记录实验中观察到的现象及各种原始数据,以及根据实验要求整理、归纳数据后进行计算的过程及计算结果和包括根据实验数据及计算结果做出的各种图表(如标准曲线

图等)。

讨论部分是书写实验报告的重点部分，要注意讨论不是对结果的重述，而是对实验结果、实验方法和异常现象进行探讨和评论，以及对实验设计的认识、体会及建议，注意一定要结合自己的实验结果进行讨论分析，并且要充分利用已学过的知识进行详细讨论。

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。

第 1 章 实验基本操作

大部分生物化学实验是由各种常用基本操作组成的,包括实验准备时玻璃仪器洗涤、实验过程中试剂的量取和液体的混匀等,这些操作看似简单,但是在很大程度上往往是决定实验成败的关键。因此,在进行生物化学实验前,必须有意识地加强这些实验基本操作的练习。

一、玻璃仪器的洗涤与干燥

在生化实验中,量取和盛装试剂时要使用各种玻璃仪器,所使用的玻璃仪器是否清洁和干燥是获得准确结果的重要一环。有时会因为玻璃仪器的不清洁或被污染而造成实验误差,甚至出现相反的实验结果。因此,玻璃仪器的清洁是实验准备时的重要工作之一。实验中要使用的玻璃仪器必须是清洁和干燥的,内外壁应十分明亮光洁,清洗后如将玻璃仪器倒置时,不应在器壁上挂有水珠;否则表示尚未洗净,必须重新洗涤。洗涤干净之后要进行干燥,只有干燥后的清洁玻璃仪器才能用于实验研究。一般玻璃仪器的洗涤通常包括使用自来水和去污剂常规洗涤,蒸馏水洗涤,干燥备用等基本步骤。如果是用于分子生物学和细胞培养等实验的玻璃仪器,在洗涤干燥后还要经过重铬酸钾清洁液浸泡,自来水洗涤,并用蒸馏水冲洗 2~3 次,通常还要用去离子水冲洗 2~3 次。

(一) 新购置玻璃仪器的洗涤方法

新购置玻璃仪器表面常附有游离的碱性物质及污泥,首先使用肥皂水或洗涤剂进行洗刷,再用自来水冲洗干净,干燥后浸泡在 1%~2% 的稀盐酸溶液中过夜(不少于 4h)后,再进一步洗涤,最后用蒸馏水冲洗内壁 2~3 次,然后干燥备用。

(二) 使用过的玻璃仪器的洗涤方法

1. 一般玻璃仪器的洗涤方法 凡能用毛刷刷洗的玻璃仪器,如试管、烧杯、锥形瓶、量筒等,首先用毛刷沾取洗衣粉(洗涤剂或去污粉)将玻璃仪器内外壁(特别是内壁)仔细刷洗干净,然后用自来水冲洗干净后,再用少量蒸馏水冲洗内壁 2~3 次,最后倒置于仪器架上自然晾干后备用。

2. 不能用毛刷刷洗的精密量器的洗涤方法 凡不能用毛刷刷洗的精密量器,如容量瓶、滴定管、刻度吸管等,应首先用自来水冲洗,沥干,再用重铬酸钾清洁液浸泡 4~6h(或过夜),从清洁液中取出并沥干后,再用自来水冲洗干净,最后使用蒸馏水冲洗 2~3 次,倒置于量器架上自然干燥后备用。

3. 比色皿的洗涤方法 清洗石英和玻璃比色皿时注意不能使用强碱,因为强碱会腐蚀抛光的比色皿。首先使用 1%~2% 的去污剂浸泡,然后用自来水冲洗,如果内壁有不易清洗的污物,可以使用一支绸布包裹的小棒或棉棒刷洗,效果会更好,清洗干净的比色皿也应内外壁不挂水珠,倒置于滤纸上进行干燥。

4. 盛装过有传染性样品的玻璃仪器的洗涤方法 盛装过病毒、传染病患者血清、培养细菌等有传染性样品的玻璃仪器，在清洗之前首先要进行高温、高压消毒后，再按常规程序进行清洗。

(三) 玻璃仪器的干燥

生化实验中用到的玻璃仪器除了清洁之外还要进行干燥，通常都是用烘箱或烘干机在 110~120℃ 进行干燥。

(四) 重铬酸钾清洁液的配制

在生化实验中，清洗玻璃仪器时常用重铬酸钾清洁液浸泡玻璃仪器。由于目前已确定铬对人体具有致癌作用，因此配制和使用该清洁液时要极为小心，常用以下两种方法配制：

(1) 量取 100ml 工业浓硫酸置于烧杯内，小心加热，然后慢慢加入 5g 重铬酸钾粉末，边加边搅拌，待全部溶解并缓慢冷却后，储存在磨口玻璃瓶内备用；

(2) 称取 5g 重铬酸钾粉末，置于 250ml 烧杯中，加 5ml 水使其溶解，然后慢慢加入 100ml 浓硫酸，溶液温度将达 80℃，待其冷却后储存于磨口玻璃瓶内备用。

二、吸量管的使用

(一) 吸量管的种类

吸量管（简称吸管）是生化实验中最常用的吸量一定体积液体的玻璃量器，一般可分为单刻度吸量管（包括奥氏吸管和移液吸管）和多刻度吸量管两大类（图 1），其中第一类单刻度吸管目前不常用，因此主要学习多刻度吸管的使用。

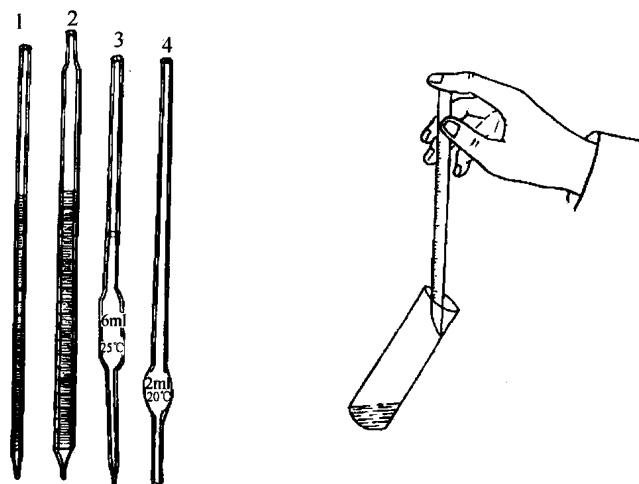


图 1 吸量管的种类和使用

1、2. 多刻度吸量管；3. 移液吸管；4. 奥氏吸管

1. 单刻度吸量管 单刻度吸量管仅在吸管的上端有一条总量的刻度线，使用时只能量取全量，该吸量管比多刻度吸量管准确度高，可供准确量取一定体积的溶液。单刻度吸量管包括奥氏吸管和移液吸管。

(1) 奥氏吸管：它的中下部具有一突出的橄榄形的球泡，下端有一短小的出口。在同一容量的各种类吸量管中，奥氏吸管的内表面积最小，吸管内壁黏附的溶液也最少，故准确度高，适

用于量取黏稠度较大的液体。可供准确量取 3ml、2ml、1ml、0.5ml 等体积之用。在使用时,应注意缓慢控制液体流出速度,待液体流完后,将吸管尖端靠容器内壁,吹出残留在吸管尖端的液体。

(2) 移液吸管: 该种吸管外形与奥氏吸管相似。多用于量取用量较大的标准溶液,可供准确量取 50ml、25ml、10ml、5ml 等体积之用。放液时让管内液体自然流出,待液体流完后,将吸管尖端在容器内壁上继续停靠 5s,同时转动吸管,吸管尖端残留液体不吹出。

2. 多刻度吸量管 (简称刻度吸管) 刻度吸管是生化实验中使用最广泛的一种吸量管,其准确度较高。一般实验室常用的有 10ml、5ml、2ml、1ml、0.5ml、0.1ml 等规格,因生产厂家的不同,刻度吸管的刻度标记方法也有所不同,但一般可分为吹出式和流出式等两种类型。

(1) 吹出式: 此种刻度吸管的上端一般都标注有“吹”字,这种吸量管一般容量较小,都在 1ml 以下,在使用时必须将吸管尖端残留的液体吹入容器内。

(2) 流出式: 此种刻度吸管的刻度有两种表示方法: 一种为上有零刻度,下无总量刻度;另一种为上有总量刻度,下无零刻度。此类刻度吸管还可分为慢流速和快流速两种。慢流速吸管又可分为 A 级与 B 级,而快流速吸管只有 B 级,在吸量管上都注有 A 或 B。使用时,当刻度吸管内液体流完时,让吸管尖端紧靠在管壁上, A 级停留 5s, B 级停留 3s,同时转动吸管,最后吸管尖端残留的液体不应吹出。

(二) 刻度吸管的使用方法

上述两类吸管虽有不同之处,但其操作规程是相同的,具体使用方法如下:

1. 选择吸量管 首先要看清吸量管的刻度情况,根据要量取的液体体积选择适当容量的吸量管,一般选择最大容量等于或略大于所需要量取液体体积的吸量管。

2. 正确拿持吸量管 选择好吸量管后,要采用标准的姿势拿持吸量管。注意把标有刻度的一面朝向操作者,以便读取刻度。用右手中指和拇指拿住吸量管的上部,要保证右手食指可以按住吸量管的上管口,左手持洗耳球。

3. 量取液体 右手把吸量管尖端插入要量取的液体中,左手持洗耳球并把洗耳球内的气体排出,把洗耳球的下口堵住吸量管的上管口,缓慢松开洗耳球,把容器内液体吸入吸量管,此时要注意控制液体上升的速度,不要过快,当液面上升至所需刻度上方 2~3cm 时,立即挪开洗耳球,用右手食指按住吸量管上管口,以稳住管内的液面,把吸量管从液体中取出。用吸水纸擦干管外壁所沾液体。再以管尖端接触容器内壁,慢慢放松食指,轻轻转动拇指和中指,调整液面至所需刻度,即液面与所需刻度处于相切位置,立即用食指再次按住上管口,此时吸量管中即为所需要量取体积的液体。

4. 释放液体 将需加入液体的容器倾斜,盛有所量液体的吸量管垂直,并将吸量管管尖与容器内壁靠紧(图 1),松开食指让液体流出。放液后吸管尖端残留的液体是吹出或不吹出,视选用吸量管种类的要求而定。如果需要吹的则用洗耳球将其吹出,如果要求不吹的则让吸管尖端停靠容器内壁(吸管是 A 级停留 5s、B 级停留 3s),同时转动吸管并移开。

三、移液器的使用

在生化实验中,经常要量取和转移一定体积的液体,有时甚至是需要重复量取和转移非常微量的液体,这时再使用传统的刻度吸管就显得比较笨拙了,效率也比较低。而移液器的使用使微量液体的量取和转移操作变得轻松、快速和准确。移液器主要用于多次重复的快速定量移取液体,

使用时只需一只手操作，十分简便。

(一) 移液器的种类

目前，移液器的主要发展趋势为精确度越来越高，种类越来越多。移液器根据其量程是否可调分为固定量程移液器和可调量程移液器。固定量程移液器量程不可调节，是一种量取固定容量液体的移液器，多用于要求较高的比较精确的微量化学分析，常用的有 $100\mu\text{l}$ 、 $200\mu\text{l}$ 和 $1000\mu\text{l}$ 等几种规格；而可调量程移液器的移液量程是可以调节的，一般包括 $0.1\sim 1\mu\text{l}$ 、 $0.2\sim 20\mu\text{l}$ 、 $10\sim 100\mu\text{l}$ 、 $20\sim 200\mu\text{l}$ 、 $100\sim 1000\mu\text{l}$ 等多种规格。另外，移液器还可以根据量取液体的通道数量分为单道移液器和多道移液器，多道移液器又分为 8 道和 12 道等，多道移液器经常被用于酶联免疫分析 (ELISA) 实验的液体量取。而且目前除了传统的手动移液器外，还有电动移液器。

(二) 移液器的基本原理

移液器的设计原理是依据胡克定律，该定律指在一定限度内弹簧的伸展长度与其弹力成正比，因此移液器内的液体体积与移液器内的弹簧弹力是成正比的。移液器在工作时是通过按动活塞来推动弹簧的伸缩以实现吸液和放液的。使用移液器时，首先通过活塞的推动，排出内部部分空气，然后在大气压作用下吸入液体，最后再由活塞推动空气排出液体。由于移液器中的弹簧具有伸缩性，因此在移液器使用时要配合弹簧的这个特点来进行操作，这样才能很好地控制移液的速度和力度。

(三) 移液器的基本结构

虽然移液器的种类有很多，但是生物化学实验中最常用的是可调量程移液器，因此主要介绍这种移液器的结构和配件 (图 2)。移液器主要是由移液控制按钮、手柄和移液杆三部分构成，在手柄上还有容量显示窗、容量调节旋钮、卸吸头按钮和指托等。有的移液器的移液控制按钮兼

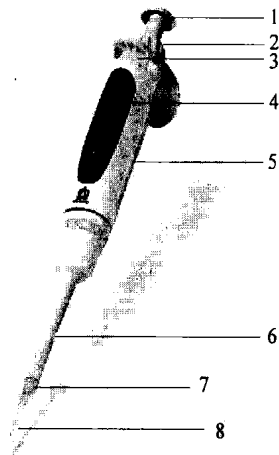


图 2 移液器的结构

1. 移液控制按钮；
2. 容量调节旋钮；
3. 卸吸头按钮；
4. 容量显示窗；
5. 手柄；
6. 移液杆；
7. 吸头接嘴；
8. 吸头

具有容量调节旋钮的作用。手柄上一般还标有该移液器的量程范围。移液杆的下端有吸头接嘴，使用时插入吸头。

移液器在使用时还需要一些配套的配件，如移液器架、吸头和吸头盒等。其中吸头是移液器最重要配件之一，可以说是移液器的重要组成部分，每种移液器在使用时，都配有其专用的聚丙烯塑料吸头，吸头一般分为三种类型： $100\sim 1000\mu\text{l}$ (蓝色)、 $20\sim 200\mu\text{l}$ (黄色)、 $0.1\sim 10\mu\text{l}$ (无色)。吸头必须具有热力学和化学稳定性、无有机或化学物质和重金属污染。一般吸头在使用前应在 121°C 下消毒 20min。吸头通常是一次性使用，当然也可以超声清洗后重复使用。

(四) 移液器的使用方法

在使用移液器移取水、缓冲液、稀释的盐溶液和酸碱等溶液时，一般可以按照以下标准操作步骤进行。

1. 选择合适量程移液器 根据所量取的液体体积，选取一支合适量程的移液器。选择时要注意量程范围，不要用较大量程的移液器移取较小体积的液体，以免影响准确度，例如需要量取 $0.5\mu\text{l}$ 的液体，有 $0.1\sim 1\mu\text{l}$ 和 $0.2\sim 20\mu\text{l}$ 两种量程的移液器，应首先选择前者。

2. 设定移液体积 转动移液器的容量调节旋钮(有的移液器顶部的移液控制按钮兼有该作用),并注意观察容量显示窗的数值,进行移液体积的设定。顺时针方向转动该旋钮可增加移液体积,逆时针方向转动旋钮可减少移液体积。当从大体积调至小体积时,只需逆时针旋转至所需刻度即可,但是从小体积调至大体积时,需要先顺时针调至超过设定体积的刻度,再回调至设定体积,这样可保证最佳的精确度。

观察容量显示窗时,要注意数值的位数和小数点的位置,有的移液器手柄上有小数点标志或用短线进行标志,有的用红色数字表述小数点后数值。确认所要求的移液体积调整到位,并完全显示在手柄的容量显示窗内的可见位置。不能将设定的移液体积超出该移液器标定的移液范围,过度用力把按钮转至额定范围之外将造成机械件卡死,最终导致移液器的损坏。

3. 装配移液器吸头 在装配吸头时,注意选择与移液器匹配的吸头。对于单道移液器,将移液器吸头接嘴尖端垂直插入吸头盒内的吸头,左右微微转动,上紧即可;多道移液器在装配吸头时,要将移液器的第一道对准第一个吸头,逐渐倾斜插入,前后轻轻摇动上紧,注意吸头插入后略超过O形环即可,并可以看到连接部分形成清晰的密封圈。严禁在使用移液器时,用力撞击吸头,如果用力过猛,将导致吸头难以脱卸,而且如果长期这样操作会导致移液器的零件损坏。

4. 吸取液体 右手握住移液器手柄(图3),拇指按下移液控制按钮,把按钮压到第一停点位置,将移液器吸头置于液面下1cm左右的深度,并慢慢松开按钮,控制好弹簧的伸缩速度,吸入液体,注意速度要慢,防止有气泡产生。在正式吸液之前,可以先吸放几次液体以润湿吸头。待吸头吸入溶液后,将吸头撤出液面并倾斜贴在试剂瓶壁上淌走多余的液体。在量取体积较少的液体时,例如:做PCR实验时,试剂盒中DNA聚合酶的总体积不过 $50\mu\text{l}$,需要量取的体积有时只有 $0.25\mu\text{l}$,这时吸头不要插入过深,浸入过深的话,液压会对吸液的精确度产生一定的影响。并且因为酶的制剂比较黏稠,会黏到吸头外部,影响量取液体体积的准确性,而且也会造成试剂的浪费。因此只需把吸头接触到液面,进行吸取即可。

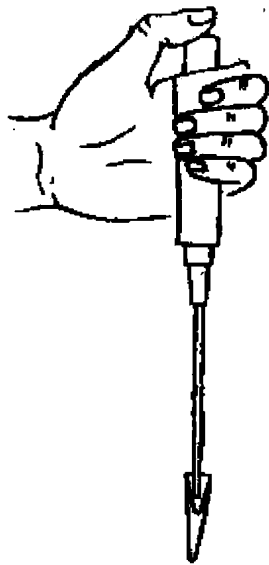


图3 移液器的使用

如果要量取黏稠或易挥发液体时,按照上述操作方法容易导致体积误差较大。因此为了提高移液的准确性,可以在移液前先反复吸入释放要移取的液体几次,预湿吸头内部,并且吸入液体或释放液体时最好多停留几秒。也可以采用反相移液法:吸液时先将移液控制按钮按到第二停点位置,然后缓慢松开移液控制按钮,释放液时按到第一停点位置,部分液体残留在吸头内。

5. 释放液体 左手拿住盛装液体的容器,略倾斜 $10^{\circ}\sim 20^{\circ}$,移液器吸头尖端靠在容器内壁上,拇指缓慢按动移液控制按钮到第一停点位置,停止 $1\sim 2\text{s}$,然后继续按动移液按钮到第二停点位置,把吸头中的全部液体排入到容器中,一直按住移液控制按钮取出移液器。松开按钮使之返回起始点位置。

6. 退出吸头 把移液杆正对着废物接收容器,然后用大拇指按住卸吸头推杆,即可安全推出吸头。

7. 把移液器容量调节到最大容量,挂在移液器架上。

(五) 移液器使用注意事项

(1) 按下和松开移液控制按钮时要循序渐进,尤其是在移取高黏度的液体时,决不允许让移



液控制按钮急速弹回，以防将溶液吸入过快而冲入移液器内，腐蚀柱塞而造成漏气。

(2) 移液前应确保洁净的吸头牢固地装进移液器的吸头接嘴上，并且吸头内无外来颗粒。

(3) 当移液器不用时，调至最大容量，应竖直搁置，也可以放在移液器架上。

(4) 每天工作前应检查移液器外表面是否有灰尘和污物，特别需注意移液器吸头接嘴处，除使用 70% 乙醇溶液外，不应用其他溶剂清洁移液器。

四、液体的混匀

在生物化学实验中，在配制试剂或建立化学反应时，经常要把多种试剂混合到一起，因此容器中先后加入的几种试剂能否被充分混匀往往是实验成败的关键之一。一般液体的混匀可以采用以下五种方法。

1. 旋转法 用右手的掌心顶住试管口，五指拿紧试管，利用腕力使试管向同一方向做圆周运动，使管内液体形成旋涡，从而使其混匀。这种方法一般在试管中液体较多或使用小口器皿盛装液体时使用。

2. 甩动法 右手持住试管上部，将试管轻轻甩动振摇进行混匀。这种方法适用于试管中液体较少时。

3. 弹敲法 右手持住试管上部，将试管的下部在左手掌心上轻轻进行弹敲，使液体混匀。如果使用的是微量离心管，把离心管管盖盖紧，左手持住离心管的管盖与管体连接处，右手轻轻敲弹管壁，使液体混匀。如有液体黏到管壁上，可以进行短时间离心使其集中到管底。

4. 吸管混匀法 使用清洁的吸管将溶液反复吸放数次，使溶液充分混匀。也可以使用移液器反复吸放数次进行混匀。成倍稀释某种液体往往采取此法。

5. 旋涡混匀器混匀法 将需要混合的液体装入容器内，盖紧盖子，手持容器放在旋涡混匀器的工作台上，打开开关即可混匀。

第2章 实验样品的制备

在生物化学实验中,无论是进行物质含量的分析还是探索物质代谢的过程,皆需利用特定的生物样品。而且由于不同实验的具体要求,往往需要将获得的样品预先做适当处理。在实验样品采集、处理和制备过程中多方面影响因素直接决定了实验结果的可靠性,因此掌握实验样品的正确处理 and 制备方法是保证生物化学实验顺利进行的先决条件。

可用于生物化学检测的实验样品很多,常用的有血液、尿液和组织样品等。此外,脑脊液、组织液、羊水、细胞等也可以作为生物化学标本进行检测分析。以下介绍几种常见实验样品的制备方法。

一、血液样品的制备

血液中某些化学成分容易受到饮食成分和药物的干扰,有些成分在不同的时间含量可能有较大变化,因此血液标本的采集应根据具体实验的需要,考虑饮食、药物和采集时间等因素。另外,取血液样本时,应避免溶血;当肢体正进行静脉输液时,不宜由同一静脉采集标本;收集完毕的标本,应及时进行检测以避免某些化学成分发生变化,有时可能需要加特殊的保存剂或需置冰箱保存。

常见的血液样品包括全血、血浆、血清和无蛋白血液。以下分别对其制备进行简要介绍。

(一) 全血

动物或人体血液的收集需注意两点:一是采血的器具必须是清洁干燥的;二是要加入适当的抗凝剂,并及时将血液与其充分混匀,以防止血液凝固。采集到的全血如不能立即用于实验,立即置4℃冰箱中保存。

常用的抗凝剂有草酸钠、柠檬酸钠、氟化钠或肝素等,可根据实验需要进行选择。一般情况下,使用草酸盐即可,价格便宜,但是在血钙浓度的检测中不宜使用;进行血糖浓度测定时往往使用氟化钠,因为氟化钠除具有良好的抗凝效果外,兼有对酶的抑制作用,抑制血糖分解,保证检测结果的准确。但是不适用于淀粉酶、转氨酶、磷酸酶等酶活性的测定。肝素是非常有效的抗凝剂,可以抑制整个凝血过程,防止血小板的破坏,阻止血液凝固,常用于血气分析时全血的收集,但是由于价格较贵,尚不能普遍应用。

抗凝剂用量不宜过多,通常用量如表1所示。

表1 常用抗凝剂及其用量

抗凝剂种类	每毫升血液抗凝剂用量(mg)	抗凝剂种类	每毫升血液抗凝剂用量(mg)
草酸盐	1~2	氟化钠	5~10
柠檬酸钠	5	肝素	0.1~0.2

抗凝剂使用前最好先配成适当浓度的水溶液,按需要量加到待盛血的容器中,将容器横放蒸干(肝素不宜超过30℃),使之在容器内壁形成一层薄膜,使用时较为方便,效果也好。