



全国高等农业院校教材
全国高等农业院校教学指导委员会审定

生物化学 实验技术原理和方法

王宪泽 主编



中国农业出版社

全国高等农业院校教材
全国高等农业院校教学指导委员会审定

生物化学 实验技术原理和方法

王宪泽 主编

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学实验技术原理和方法/王宪泽主编. —北京:
中国农业出版社, 2002.8
全国高等农业院校教材
ISBN 7-109-07809-4

I. 生 ... II. 王 ... III. 生物化学—实验—高等学校—教材 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 052695 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

出版人: 傅玉祥

责任编辑 毛志强

北京忠信诚胶印厂印刷 新华书店北京发行所发行
2002 年 9 月第 1 版 2002 年 9 月北京第 1 次印刷

开本: 787mm×960mm 1/16 印张: 16.5

字数: 295 千字

定价: 22.30 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

主 编 王宪泽

副主编 王保莉 冯 炘

参加编写人员及其分工 (以姓氏笔画为序):

王宪泽(实验技术: 实验 5、19、22、25、30、
33、47~51)

王保莉(实验原理: 第八章; 实验技术: 实验 4、
12、20、21、27)

王晓云(实验技术: 实验 1、2、3、35)

冯 炘(实验原理: 第三章; 实验技术: 实验 8、
38、44)

李 菡(实验原理: 第四章; 实验技术: 实验 13、
14、15、17、41、46)

李新征(实验原理: 第五章; 实验技术: 实验 23、
26、28)

杨景芝(实验原理: 第六章; 实验技术: 实验 16、
31、36、37)

陈 鹏(实验原理: 第七章; 实验技术: 实验 18、
34、39、40)

盖英萍(实验原理: 第一章; 实验技术: 实验 9、
10、24)

郭恒俊(实验 32、42、43、45; 附录一、二)

韩洪岩(实验原理: 第二章; 实验技术: 实验 6、
7、11、29)

主 审 文树基 孙存孝

前 言

生物化学实验技术的发展,使生物化学的理论研究和实际应用得到了快速发展,不仅进一步大大推动了生命科学研究的迅猛发展,同时为工业、农业、食品、医药、环保等科学的发展提供了重要的理论基础和实验手段。因此,生物化学实验技术是推动生物化学及其他相关学科发展的重要工具,成为生物科学工作者必须掌握的知识与技能。

本教材是为配合生物化学基础理论课学习而编写的一本实验课教材。全书分为两篇,第一篇为实验技术原理,包括生物化学实验样品制备技术、离心技术、层析技术、电泳技术、分光光度法、酶的分离纯化及活力测定、放射性同位素技术和免疫化学技术;第二篇为实验方法部分,共选编了51个实验项目,内容包括糖类化学、脂类化学、蛋白质化学、核酸化学、酶化学、维生素、新陈代谢和免疫化学等。本教材所选的实验均系编者所在单位多年来在教学和科研中反复验证的比较成熟的实验方法,大多数实验项目可在2~3学时内完成,使用者可根据专业性质和教学条件选择适当的内容。

本教材与以往农业院校生物化学实验教材相比,突出了以下几点:

(1) 本教材分为实验技术原理和实验方法两部分,理论部分比较系统地介绍了生物化学研究基本技术的原理及其最新进展,以加强学生对实验技术操作的宏观理解;实验方法部分详细具体,便于操作。

(2) 鉴于目前大多数院校的实验设备条件已有较大更新,因此实验方法部分删掉了个别陈旧实验,增添了一些现代实验分析技术。

(3) 为了使学生毕业后还能以本教材作为实验操作指导书,因此某些项目同时列出几种不同的方法,便于在不同条件下,对不同的研究材料选择使用。

前 言

(4) 本着面向 21 世纪课程体系改革精神, 为了与生物化学基础理论教材配套, 将动物生物化学实验与植物生物化学实验合并, 实验材料与内容覆盖动物、植物、微生物三大类别。

本教材初稿完成后由西北农林科技大学文树基教授和山东农业大学孙存孝教授详细审阅, 提出了详尽的修改方案和具体意见, 值此本教材出版之际, 谨表示衷心的感谢。

由于编写时间比较仓促, 加之水平有限, 不足及错误之处在所难免, 竭诚希望读者不吝赐教。

编 者

2002 年 6 月

目 录

前言

上 篇 生物化学实验技术原理

第一章 生物化学实验样品制备技术	1
1.1 植物样品的制备	1
1.2 动物样品的制备	4
1.3 微生物样品的制备	6
第二章 离心技术	9
2.1 基本原理	9
2.2 离心机的种类和基本结构	11
2.3 常用离心技术	13
2.4 离心技术在生物学研究中的应用	16
第三章 层析技术	17
3.1 基本原理	17
3.2 几种常用的层析法	18
第四章 电泳技术	29
4.1 基本原理	29
4.2 电泳的分类	32
4.3 醋酸纤维素薄膜电泳	33
4.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳	34
4.5 琼脂(糖)凝胶电泳	38
第五章 分光光度法	41
5.1 基本原理	41
5.2 分光光度计	42
5.3 分光光度技术应用	45
第六章 酶的分离纯化及活力测定	48
6.1 选择材料和预处理	48
6.2 分离纯化	48
6.3 酶活力的测定	51

第七章 放射性同位素技术	56
7.1 基本知识	56
7.2 放射性的测量	57
7.3 放射防护	60
7.4 放射性同位素技术在生物化学研究中的应用	63
第八章 免疫化学技术	65
8.1 抗原和抗血清的制备	65
8.2 酶联免疫吸附法原理	68
8.3 免疫化学技术的应用	74

下 篇 生物化学实验方法

第九章 糖类化学	75
实验 1 糖的定量测定——蒽酮法	75
实验 2 还原糖和总糖的测定——3, 5-二硝基水杨酸比色法	77
实验 3 还原糖的测定——Somogyi 法	80
实验 4 血糖的定量测定——GOD-PAP 法	83
实验 5 直链淀粉和支链淀粉含量的测定——碘比色法	85
实验 6 可溶性糖的硅胶 G 薄层层析	88
第十章 脂类化学	91
实验 7 粗脂肪的提取和定量测定——索氏抽提法	91
实验 8 不饱和脂肪酸的反相纸层析	93
实验 9 血清总脂的测定	95
实验 10 血清总胆固醇含量的测定	97
I 磷硫铁法	98
II 邻苯二甲醛法	99
第十一章 蛋白质化学	102
实验 11 总氮量的测定——微量凯氏定氮法	102
实验 12 蛋白质含量的测定	106
I 双缩脲法	106
II Folin-酚法	107
III 考马斯亮蓝 G-250 法	110
IV 紫外吸收法	111
实验 13 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质分子量	113

目 录

实验 14	凝胶过滤法测定蛋白质相对分子量	118
实验 15	血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	123
实验 16	血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	126
实验 17	小麦高分子量麦谷蛋白亚基聚丙烯酰胺凝胶电泳	129
实验 18	氨基酸双向纸层析	131
实验 19	谷物种子蛋白质组分的分离提取	133
实验 20	谷物种子中赖氨酸含量的测定	135
实验 21	种子蛋白质氨基酸组分分析——氨基酸自动分析仪法	137
实验 22	Edman 法分析蛋白质及多肽的 N-末端氨基酸	138
第十二章	核酸化学	144
实验 23	酵母 RNA 的分离及组分鉴定	144
实验 24	肝细胞中核酸的提取与测定	146
I	动物肝脏中提取 DNA	146
II	动物肝脏中总 RNA 的制备	148
III	定磷法测定核酸含量	149
实验 25	荧光素酶法测定三磷酸腺苷 (ATP)	152
实验 26	植物总 DNA 的提取	153
I	SDS 法	154
II	CTAB 法	156
实验 27	核酸琼脂糖凝胶电泳	158
实验 28	紫外吸收法测定核酸含量	161
实验 29	质粒 DNA 的提取与鉴定	163
实验 30	植物 DNA 的简易大量提取和 PCR 分析	167
第十三章	酶化学	170
实验 31	枯草杆菌蛋白酶活力测定	170
实验 32	淀粉酶活性的测定	172
实验 33	硝酸还原酶活性的测定	175
实验 34	胰凝乳蛋白酶的制备及活力测定	178
实验 35	影响酶活力的因素	182
实验 36	NBT 法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活力	186
I	电泳法	186
II	分光光度法	188
实验 37	底物浓度对酶促反应速度的影响—— K_m 的测定	190
I	胰蛋白酶 K_m 值的测定	190

目 录

II 过氧化氢酶 K_m 值的测定	192
实验 38 酶浓度对酶促反应速度的影响——碱性磷酸酶活性测定	194
实验 39 有机磷农药对胆碱酯酶的抑制作用	197
实验 40 碱性磷酸酶的比活性测定	199
实验 41 过氧化物同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳	201
第十四章 维生素	204
实验 42 维生素 A 的比色测定	204
实验 43 维生素 C 含量的测定	206
I 滴定法测定维生素 C 的含量——2, 6-二氯酚靛酚法	207
II 紫外比色法测定维生素 C 的含量	209
实验 44 维生素 B_1 和 B_2 的定性测定	211
第十五章 新陈代谢	214
实验 45 糖酵解中间产物的鉴定	214
实验 46 氨基转换反应——谷丙转氨酶活性测定	216
实验 47 脂肪酸的 β -氧化	218
第十六章 免疫化学	221
实验 48 抗血清的制备及双向免疫扩散测定法	221
实验 49 微量免疫电泳法	224
实验 50 单向定量免疫电泳 (火箭电泳)	226
实验 51 酶联免疫吸附测定法 (ELISA)	227
附 录	230
一、生物化学实验室规则	230
二、实验室安全及防护知识	231
三、常用仪器的使用方法	233
四、常用缓冲溶液的配制	241
五、常用酸碱指示剂	246
六、常用酸碱试剂的浓度及相对密度	247
七、标准溶液的配制和标定	247
八、元素的相对原子质量表	249
九、数据处理	250
主要参考文献	255

第一章 生物化学实验样品 制备技术

生物化学实验中常常涉及生物样品的制备。生物样品包括植物样品（如植株组织样品、子粒样品、瓜果样品等）、动物样品（如血液样品、组织样品、尿液样品等）及微生物样品，它们的采取、制备方法是否得当对生物化学分析的准确性起着至关重要的作用。以下将分别说明各类样品的采集和处理的一般原则和方法。

1.1 植物样品的制备

1.1.1 植株组织样品的采集、制备和保存

植株组织样品多用于诊断分析。采集植株组织样品首先要选定样株，样株必须有充分的代表性，通常按照一定路线多点采取，组成平均样品。样株数目须视作物种类、种植密度、株形大小、株龄或生育期以及要求的准确度而定。样株选定后还要决定取样的部位和组织器官，原则是所选部位的组织器官要具有最大的指示意义，也就是植株在该生育期对该养分的丰歉最敏感的组织器官，如大田作物在生殖生长开始时期常采取主茎或主枝顶部新成熟的健壮叶或功能叶，幼嫩组织的养分组成变化很快，一般不宜采样。分期采样时，取样的时间应当一致，通常以上午 8:00~10:00 为宜，因为这时植物的生理活动已趋活跃，地下部的根系吸收速率与地上部正趋于上升的光合作用强度接近动态平衡。此时，植物组织中的养料贮量最能反映根系养料吸收与植物同化需要的相对关系，因此最具有营养诊断的意义。另外，诊断作物氮、磷、钾、钙、镁等元素营养状况的采样还应考虑各元素在植物营养中的特殊性。

采集的植株样品如需要分不同器官（例如叶片、叶鞘或叶柄、茎、果实等部分）测定，需立即将其剪开，以免养分运转。剪碎的样品太多时，可在混匀后用四分法缩分至所需的量。

植株组织样品一般需要洗涤，但应在尚未萎蔫时洗涤，洗涤方法一般可用

湿布仔细擦净表面的沾污物；微量元素分析用的样品须用 0.1%~0.3% 洗衣粉之类的去垢剂溶液洗涤，再用纯水淋净，但不能用过量的水长时间浸洗。

测定易起变化的成分（如硝态氮、氨基态氮、水溶性糖、维生素等）必须用新鲜样品。鲜样如需短期保存，必须在冰箱中冷藏，以抑制其变化。分析时将洗净的鲜样剪碎混匀后立即用称量瓶或铝盒等称样，放在研钵中与适当溶剂（或再加石英）共研磨，取浸提液测定。

测定不易变化的成分则常用干燥样品。洗净的鲜样必须尽快干燥，以减少化学和生物学变化。一般分析用的植物鲜样要分两步干燥，通常先将鲜样在 80~90℃ 烘箱（最好有鼓风机）中烘 15~30min（松软组织烘 15min，致密坚实的组织烘 30min），然后降温至 65℃，除尽水分，时间视鲜样水分含量而定，大约 12~24h。

干燥后的样品可用研钵或带刀片的（用于茎叶样品）或齿状的（用于种子样品）粉碎机粉碎，并全部过筛，分析样品的细度视称样的大小而定，通常可用圆孔直径为 1mm 的筛；如称样仅 1~2g 者，宜用 0.5mm 筛；称样小于 1g 者，须用 0.25mm 或 0.1mm 筛。磨样和过筛都必须考虑到样品玷污的可能性，特别是微量元素分析时。测定铁锰用的样品不能接触铁器，测定铜、锌用的样品不能接触黄铜器械。样品过筛后需充分混匀，保存于磨口的广口瓶中，内外各贴放一样品标签。

样品在粉碎和贮存过程中又将吸收一些空气中的水分，所以在精密分析工作中，称样前还需将粉状样品在 65℃（12~24h）或 90℃（2h）再次烘干；一般常规分析则不必。干燥的磨细样品必须保存在密封的玻璃瓶内，称样时应充分混匀多点勺取。

1.1.2 子粒样品的采集、制备和保存

子粒样品多用于品质分析。子粒样品有的采自个别植株，有的采自试验小区或大田地块，有的采自大批收获物。从试验区或大田采样时，可按组织样品的采法，选定样株后脱粒。也可用混合取样法，即将全区或地块脱粒的种子混匀、铺平，再按对角线把样品分成四个三角形，取两个相对的三角形的样品，而将另外两个三角形的样品淘汰。如此操作，一直淘汰到所要求的数量为止，这种取样法称四分法。从成批粮食取样时，在保证样品有代表性的原则下，可在散装堆中设点取样，或可从包装中扞取原始样品，再用四分法或分析器缩分至所要求的数量。

样品风干后，除去杂质和不完整粒，用电动样品粉碎机粉碎。事先要把机器内收拾干净，最初粉碎出的少量样品可弃去不用，然后正式粉碎，使全部样

品通过一定筛孔的筛子，混合均匀，按四分法取出一定数量的样品细粉作为分析样品，贮存于干燥的磨口广口瓶中，同时贴上标签，注明样品的名称、编号、采取地点、处理方式、采样日期及采样人姓名等。长期保存时，标签应涂石蜡，并在样品中加适当的防腐剂。蓖麻、芝麻等油料种子应取少量样品在研钵内研碎，以免脂类损失。

1.1.3 瓜果样品的采集、制备和保存

瓜果样品多用于品质分析。瓜果蔬菜类的成熟期延续很短，一般在主要成熟期采样，必要时也可在成熟过程中采二、三次样。每次应在试验区或地块中不少于10个样株上采取簇位相同、成熟度一致的果实（或块根茎）若干个组成平均样品。果树的果实采样要选品种特征典型的样株才能比较各品种的品质。样株要注意挑选树龄、株型、生长势、载果量等一致的正常株，幼、老和旺长的都缺乏代表性。

采得的瓜果样品要刷洗、擦干。瓜果和蔬菜分析通常都用新鲜样品，有的分析样品全部，有的只分析可食部分，随分析目的要求而定。大的瓜果或数量多时，可均匀地切取其中一部分，但要使所取部分中各种组织的比例与全部样品的相当。分析用的样品切碎后用高速植物组织粉碎机或研钵打碎成浆状，从混匀的材料中多点勺取称样。如果所测物质不稳定（如某些维生素和酶等），则上述操作均应在低温下进行，样品匀浆如来不及测定，可暂存冰箱内，或灭菌后密封保存。

瓜果样品如需干燥，则必须力求快速，以保存样品的成分不变。加速干燥的主要方法是将样品磨碎后高温通风干燥；打碎的鲜样先在110~120℃鼓风烘箱中经100~105℃烘20~30min，然后降温，在60~70℃烘至变脆易压成粉末为止。烘的时间不宜太长，一般短则4~5h，长则8~10h。如无鼓风烘箱，可用普通烘箱代替，初期把门打开，以利水分逸出。如能真空干燥则更好。

1.1.4 丙酮干粉的制备

在分离、提纯或测定某种酶的活力时，丙酮干粉法是常用的有效方法之一。将新鲜材料打成匀浆，放入布氏漏斗，按匀浆重量缓缓加入10倍在低温冰箱内冷却到-15~-20℃的丙酮，迅速抽气过滤，再用5倍冷丙酮洗3次，在室温下通风处放置1h左右至无丙酮气味，然后移至盛五氧化二磷的真空干燥器内干燥。丙酮干粉的制备在低温下完成，所得丙酮干粉可长期保存于低温冰箱。用这种方法能有效地抽提出细胞中的物质，还能除掉脂类物质，免除脂类干扰，而且使得某些原先难溶的酶变得易溶解于水。

1.2 动物样品的制备

1.2.1 血液样品

1.2.1.1 血液标本的采取 各种实验动物的采血部位和方法需视动物的种类、检验项目、试验方法及所需血量而定。一般较大动物如马、牛、猪等多由颈静脉采取，小动物如兔常由耳静脉采取，也可从颈静脉采血。必须把采血部位的毛拔掉或剪掉，用手指压迫颈静脉使其怒张，然后用细针尖刺入；穿刺心脏可采集到多量的血液，穿刺部位在左侧第三肋间距胸骨 4mm 处。鼠则由心脏采取。鸡采少量血液可用针穿刺内冠部或用剪刀剪去肉冠的尖顶部采取；需要多量的血液，可由肘关节内侧的翅静脉采取。

严格控制血液样品的变异因素，是使检测结果尽可能符合客观情况的重要环节。因此，在采血过程中应注意下列问题：

(1) 规定动物的采血时间。因为有些血液化学成分有明显的昼夜波动，如血浆皮质醇在早晨高而傍晚低，至午夜降到最低水平；血清铁也有类似的波动。对于单胃动物，应在禁食 12h 后采血，这样可以将食物对血液各种成分浓度的影响减少到最低程度。

(2) 血液样品来源应一致。动脉血和静脉血的化学成分略有差异，除血氧饱和度、二氧化碳分压等有明显不同以外，静脉血中乳酸的浓度比动脉血中的略高，在饥饿时，毛细血管血中的葡萄糖比静脉血每 10mL 血中高 5mg。为此，整个试验期间，采取的血液样品必须一致。

(3) 防止分解。血液内若干化学成分，离体后由于氧化酶或细菌的作用，极易分解，因此血液样品被采集后应立即按规定处理，及时检测或加入适当的保存剂按规定保存。

(4) 防止污染。采血器皿及样品容器都必须清洁，尤其是测定蛋白结合碘、血氨及血清中微量元素如铜、铁等，均需用化学法处理并用重蒸馏水冲洗过的器材，以防污染而影响结果。

(5) 防止溶血。由于红细胞内和血浆中有许多成分的浓度是不一样的，因此，溶血可以影响许多生化检测项目的结果，应予防止。防止溶血的方法如下：采血用的注射器、针头、试管等器具必须清洁干燥；采血后卸下针头再将血液沿管壁徐徐注入试管内，轻轻倒转试管使血液与抗凝剂混合，切忌强力振荡；不要过多过早剥动血凝块；低温能使红细胞脆性增大，应将血液放于 37℃ 中预温 0.5h 后再用竹签将血凝块从管壁剥离，并继续加温，使血清析出；如果不能及时检测，血液应放于 4℃ 保存。

1.2.1.2 血液样品的制备

(1) 全血。全血是指抗凝的血液，即在取出血液后必须立即与适量的抗凝剂充分混合，以免血液凝固。抗凝剂预加于准备承接血液的容器中。每毫升血液中加入抗凝剂的种类可以根据实验的需要进行选择，但是用量不宜过大，否则将影响实验的结果。常用剂量如下：草酸钾或草酸钠 1~2mg；柠檬酸钠 5mg；氟化钠 5~10mg；肝素 0.01~0.2mg。

通常先将抗凝剂配成水溶液，按所取血量的需要加于试管或其他合适的容器中，转动试管或容器使成一薄层，在 100℃ 以下烘干（肝素干燥温度应在 30℃ 以内）。烘干时要转动容器使抗凝剂形成薄层，利于血液与抗凝剂的均匀接触。取得的全血如不立即使用，应贮存于 4℃ 冰箱中。

(2) 血浆。血浆是指抗凝血浆。游离血红蛋白、变性血红蛋白、纤维蛋白原的测定须用血浆。制备方法是抗凝全血在离心机中离心，使血细胞下沉，如此所得之上清液即为血浆。分离较好的血浆应为淡黄色。为避免产生溶血，必须采用干燥清洁的采血器具和容器，尽量少振荡。

(3) 血清。不加抗凝剂的血液在室温下自行凝固，所析出的淡黄色液体即为血清。血清成分更接近于组织液的化学组成，测定血清成分的含量，比用全血样品更能反映机体的客观情况；另外，血清中葡萄糖、多数酶比较稳定；血清中无机离子在室温下至少可稳定 8h，在冰箱中可稳定若干天；血清电泳分析，可不受纤维蛋白原的干扰，比血浆作电泳更易掌握。为使血清尽快析出，可以采用离心法缩短分离时间，但离心转速不宜过高。制备血清也要防止溶血，故所用设备必须干燥，且在血块收缩后及早分出血清。

(4) 无蛋白血液的制备。在测定某些血液化学成分时，标本内蛋白质的存在，常与试剂发生浑浊或沉淀，往往可影响若干化学成分的测定。因此，必须先除去血液标本中的蛋白质，且保留应测的化学成分，这个操作过程，称无蛋白血液制备。制备方法甚多，常用的方法有：

① 钨酸钠-硫酸法：取全血（加抗凝剂）1mL 于 20mL 三角瓶中，加蒸馏水 7mL，摇匀后使溶血，加入 10% 钨酸钠 1mL 并摇匀，然后加入 0.4 mol/L H_2SO_4 溶液 1mL，随加随摇，加完后充分振荡，放置 5~15min，当沉淀变为暗棕色时，用干滤纸过滤，每毫升滤液相当于 1/10 全血。

② 硫酸锌法：

a. 0.45% $ZnSO_4$ 溶液 5mL 和 0.1mol/L NaOH 溶液 1mL 混合成胶体溶液，然后加入血液 0.1mL，在沸水浴中加热 4min，冷却后用棉花过滤，滤液可直接用于测定糖含量，尤其是滴定法。

b. 向试管中加入 0.3mol/L $Ba(OH)_2$ 溶液 1mL，蒸馏水 7.5mL，混匀后

加0.5mL全血、血清或血浆，混合后放置0.5min，再加入5% ZnSO₄溶液1mL，混匀后放置2min，过滤或离心，滤液为1:20的无蛋白血滤液。

③硫酸钠-硫酸锌试剂法：此法用于制备不溶血的无蛋白血滤液。取血液0.1mL，加1.8mL硫酸钠-硫酸锌试剂和0.5mol/L NaOH溶液0.1mL，混匀后离心，上清液为1/20全血浓度。

1.2.2 组织样品

在生化实验中，常利用动物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、酶以及对某些具有生物活性的代谢物质进行研究。离体组织的采集必须在低温条件下进行，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之后，用预冷的生理盐水洗去血液，按实验要求制成匀浆或者组织糜。

(1) 组织糜制备：迅速将组织剪碎，用组织捣碎机绞成糜状，或者加入少量石英砂于研钵中，研磨至糊状。

(2) 组织匀浆：取新鲜的组织迅速剪碎，加入适量匀浆制备液（如生理盐水、缓冲液和0.25mol/L的蔗糖溶液等），用高速电动匀浆器或者玻璃匀浆器磨碎组织。由于匀浆器杵头在高速运转中会产生热量，因此在制备匀浆时，需将匀浆器置于冰浴中。

(3) 组织浸出液：组织匀浆液再经过离心分离出的上清液即为组织浸出液。

1.2.3 尿液样品

尿液中化学物质含量随食物、饮水和昼夜生理变化的影响而有很大差异，因此应根据实验的不同需要采集尿液。一般定性实验只收集一次尿即可，若立即用于分析不必加防腐剂。若作定量测定，则需收集24h尿液。通常晨起后第一次尿不收集，以后每次排出的尿均收集于清洁的大玻璃瓶中，直到第二天早晨同一时间收集最后一次尿，随即混匀，用量筒量出24h尿的总量。收集24h尿必须防腐，常用的防腐剂有甲苯(5mL/L尿)或盐酸(浓盐酸5mL/L尿)。有的实验需要采集晨起第一次尿，此尿一般较浓，称为晨尿。也有采集定时尿的。

1.3 微生物样品的制备

研究微生物的生理生化或代谢活动，需要收集完整的细胞，有时还要对细

胞进行适当的处理，如将细胞破碎抽取其内含物，制备无细胞制剂等。

1.3.1 微生物细胞的收集方法

1.3.1.1 固体培养刮取法 从大号培养皿和克氏瓶的固体培养基上收集细胞时，需采用刮取法。首先用少量的无菌生理盐水，倾注到固体培养物的表面，把琼脂盖起来，然后以无菌的玻璃刮刀（弯玻璃棒）由琼脂表面上刮取培养物，以获得浓的菌细胞悬浮液。刮取时尽量不要把培养基带入菌悬液中，必要时可用粗布过滤除去琼脂小凝块。

1.3.1.2 液体培养离心沉淀法 从微生物的液体培养液中收集微生物细胞，常用离心沉淀法。根据微生物细胞的大小范围，可以选用不同类型的离心机。一般情况下用4 000r/min离心沉淀10min，就可从培养液中收集得到细菌、放线菌和酵母菌的细胞。

此外，还可采用过滤（如用板框压滤机）等方法收集。

1.3.2 干细胞制剂

干细胞制剂通常有两种类型：一种是丙酮细胞干粉法；另一种是真空干燥细胞制剂。

1.3.2.1 丙酮细胞干粉的制备 培养收集微生物菌体细胞，经离心洗涤，制成较浓的菌体细胞悬浮液，逐滴加入约为细胞悬浮液10倍体积的冰冷丙酮，使之脱水，剧烈搅拌。当出现细胞沉淀时，过滤，取其细胞滤饼，干燥粉碎，即得丙酮细胞干粉，装入密封瓶内，置4℃冰箱中保存，其有效期为6个月。

1.3.2.2 真空干燥细胞制剂 这是另一种类型的干细胞制剂。先将细胞制成较浓的细菌悬浮液，此悬浮液应含有足量的水能使细胞自由活动。然后，把悬浮液放至一扁平皿中，将皿置于装有干燥剂（ P_2O_5 或 $CaCl_2$ 等）的真空干燥器中，接真空油泵抽气，水分则迅速逸出。经5~10min细胞即行冻结，接着由冰冻状态变成干燥的细胞制剂。

1.3.3 破碎细胞的方法

在微生物生理代谢机制的研究中，为了除去细胞壁的影响，研究单一酶系统的作用，提取、分析菌体细胞内的化学成分，研究某一细胞器或生物大分子的结构与功能等，就要把细胞破碎，制成无细胞制剂。破碎细胞的方法很多，常用的主要有以下几种：

1.3.3.1 研磨法 利用机械的方法，使细胞破碎。常用的是由硬质玻璃制造的组织细胞研磨器，使用方法是将微生物细胞和磨料颗粒（如氧化铝、玻璃