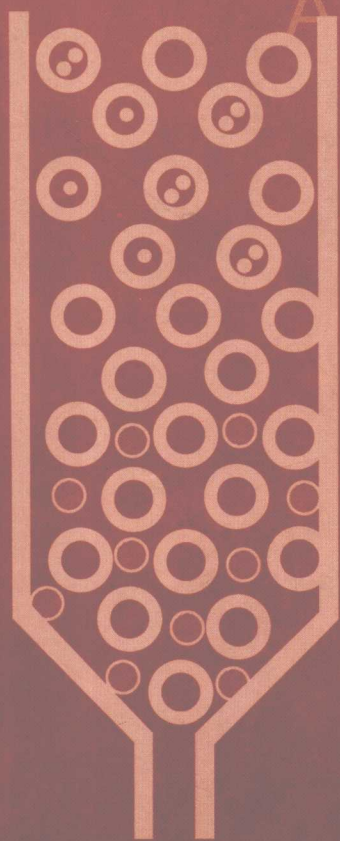


SHENGWUHUAXUESHIYANJISHU

生物化学实验技术

李巧枝 董淑丽 主 编

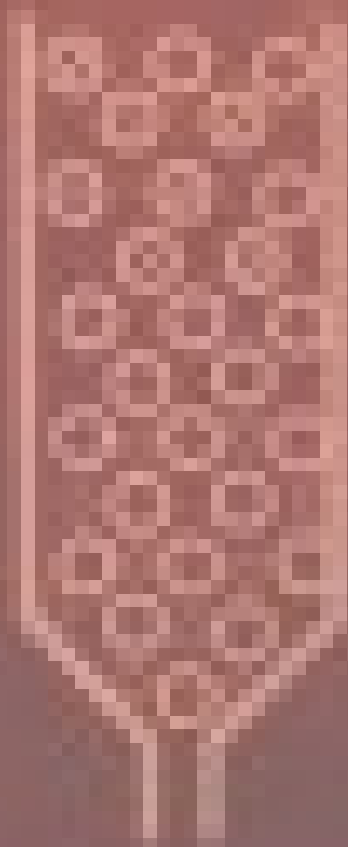


气象出版社

SHENGWUHUAXUE SHIYAN JISHU

生物化学实验技术

第二版 陈文彬 主编



科学出版社

Q5-33
114

生物化学实验技术

李巧枝 董淑丽 主编

气象出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验技术/李巧枝等主编. —北京:气象出版社, 2002. 5

ISBN 7-5029-3377-8

I. 生... II. 李... III. 生物化学—实验 IV. Q5—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 028234 号

生物化学实验技术

李巧枝等主编

责任编辑:张斌 终审:纪乃晋

气象出版社出版发行

(北京市海淀区中关村南大街 46 号 100081)

河南农业大学印刷厂印刷

* * *

开本:787×1092 1/16 印张:11 字数:258 千字

2002 年 5 月第一版 2002 年 5 月第一次印刷

印数:1~2000 册

ISBN 7-5029-3377-8/Q·0012

定价:13.80 元

《生物化学实验技术》编委会

主 编 李巧枝 董淑丽

副主编 杨保栓 彭爱娟 梁月丽 边传周 伦柏楠

编 者 (以姓氏笔画为序)

田 冰 连艳鲜 李爱江 李学红 李 旺

张晓静 俞 露 梁 华 舒友琴

前 言

进入二十一世纪,生命科学日新月异,其中生物化学是最活跃的科学之一。生化实验技术发展迅速,应用范围越来越广泛。今天,工业、农业、医学、环保等领域的科学研究无不涉及到生化实验技术。

为了满足生物化学教学、科研工作的需要,培养出基础扎实、知识面广、动手能力强,有创新意识的高素质人才,我们组织了郑州牧专、洛阳科技大学、河南职业技术学院、郑州轻工业学院等院校长期工作在教学、科研第一线的教师合编了《生物化学实验技术》一书。

本书的内容按实验技术分类编排(如分光光度技术、电泳技术、层析技术、离心技术、生物大分子制备技术等),对每一类实验技术,先介绍其基本原理、分类、用途及发展概况,以便使学生对该项技术有较全面的了解;然后安排与该项技术相关的实验项目,进行基本技能训练。

本书共编入了五十一个实验项目,使用本教材的各兄弟院校可根据自己的实验条件和专业需要进行选择。

本书可供动物科学、动物医学、食品科学、发酵工程、卫生检验、生物技术等专业的高等院校学生、研究生使用,也可供相关专业的学生、教师和科技工作者参考。

由于我们水平所限,书中难免有疏漏之处,恳请读者提出宝贵意见。

编者

2002年5月

目 录

实验室规则.....	1
实验误差与数据处理.....	2
实验记录及实验报告.....	4
第一章 生化基本技能实验	5
实验一 血液及组织样品的制备.....	5
实验二 蛋白质的沉淀反应.....	8
实验三 蛋白质的两性反应和等电点测定.....	9
实验四 酪蛋白的制备	11
实验五 氨基氮的测定——甲醛滴定法	12
实验六 总氮量的测定—— <u>微量凯氏定氮法</u>	14
实验七 温度、pH、激活剂、抑制剂对酶活性的影响	17
实验八 琥珀酸脱氢酶的作用及其竞争性抑制	19
实验九 淀粉酶的活力及比活力测定	20
实验十 维生素 C 的定量测定	21
实验十一 费林试剂热滴定定糖法	23
实验十二 肝糖原的提取与鉴定	25
实验十三 果胶的提取	26
实验十四 粗脂肪的定量测定——索氏抽提法	28
实验十五 脂肪碘值的测定	29
实验十六 脂肪酸价的测定	31
第二章 分光光度技术	32
第一节 基本原理	32
一、光的基本知识	32
二、朗伯-比尔 (Lambert-Beer) 定律	32
第二节 分光光度计结构简介	34
一、光源	34
二、单色器	34
三、狭缝	34
四、比色杯	34
五、检测系统	35
第三节 分光光度技术的应用	35
一、测定溶液中物质的含量	35
二、用紫外光谱鉴定化合物	36

第四节 分光光度法的误差	36
第五节 常见国产分光光度计的使用	37
一、721 型分光光度计	37
二、722 型分光光度计	38
三、751 型分光光度计	38
四、使用分光光度计时的注意事项	39
实验十七 双缩脲法测定蛋白质含量	40
实验十八、Folin-酚法测定蛋白质含量	41
实验十九 紫外吸收法测定蛋白质含量	43
实验二十 蛋白酶活力测定	45
实验二十一 血清转氨酶活性测定	47
实验二十二 血糖的定量测定	49
实验二十三 总糖和还原糖测定	51
实验二十四 血清总脂测定	52
实验二十五 动物组织中核酸的提取与鉴定	54
实验二十六 酵母核糖核酸的提取及组分鉴定	57
实验二十七 紫外吸收法测定核酸的含量	59
实验二十八 二苯胺显色法测定 DNA 含量	61
实验二十九 地衣酚显色法测定 RNA 含量	62
实验三十 定磷法测定核酸含量	63
实验三十一 血清无机磷的定量测定	64
第三章 电泳技术	66
第一节 基本原理	66
第二节 醋酸纤维薄膜电泳	69
第三节 琼脂糖凝胶电泳	70
第四节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	70
第五节 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	73
第六节 免疫电泳	73
第七节 等电聚焦电泳	74
实验三十二 乙酸纤维素薄膜电泳法分离血清蛋白质	74
实验三十三 聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳法分离蛋白质	77
实验三十四 血清乳酸脱氢酶同工酶的分离与测定	80
实验三十五 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	82
实验三十六 等电聚焦法测定蛋白质等电点	84
实验三十七 对流免疫电泳	87
第四章 层析技术	90
第一节 基本原理	90
第二节 吸附层析	91
一、原理	91
二、吸附剂的选择	91

三、吸附能力	91
第三节 分配层析	92
一、原理	92
二、操作要点	92
第四节 离子交换层析	93
一、原理	93
二、离子交换剂的类型	93
三、离子交换层析基本操作	94
第五节 凝胶层析	95
一、原理	95
二、凝胶的种类	97
三、操作方法	100
四、应用	101
第六节 亲和层析	101
一、原理	101
二、操作方法	102
第七节 高效液相色谱法	103
一、原理	103
二、高效液相色谱仪	103
三、色谱方法的选择	104
四、操作及注意事项	105
实验三十八 纸层析法分离氨基酸	105
实验三十九 薄层层析法分离氨基酸	107
实验四十 血清脂类硅胶 G 薄层层析	108
实验四十一 葡聚糖凝胶 SephadexG-25 柱层析法脱盐和分离蛋白质	109
实验四十二 葡聚糖凝胶 SephadexG-100 柱层析法测定蛋白质相对分子质量	111
实验四十三 离子交换柱层析法分离混合氨基酸	113
实验四十四 离子交换柱层析法制备无离子水	114
第五章 离心技术	117
第一节 基本原理	117
一、相对离心力	117
二、沉降系数	118
三、沉降速度	119
四、沉降时间	119
第二节 离心机的性能及用途	119
一、低速离心机	120
二、高速离心机	120
三、超速离心机	120
第三节 离心方法	121

一、差速离心	121
二、速度区带离心	121
三、等密度梯度离心	122
四、离心操作要领	122
实验四十五 细胞核的分离和纯化	123
实验四十六 质粒 DNA 的提取	125
第六章 生物大分子制备技术	128
第一节 材料的选择和预处理	128
第二节 细胞的破碎及细胞器的分离	128
一、细胞的破碎	128
二、细胞器的分离	130
第三节 提取和纯化	130
一、蛋白质(包括酶)的提取	130
二、蛋白质的分离纯化	131
三、核酸的提取	132
四、核酸的纯化	133
五、核酸的浓缩	133
第四节 浓缩、干燥及保存	134
一、样品的浓缩	134
二、干燥	134
三、保存	135
实验四十七 动物组织 DNA 与 RNA 的分离和提纯	136
实验四十八 蛋清溶菌酶的制备及活力测定	138
实验四十九 血清免疫球蛋白 G 的分高纯化及鉴定	140
实验五十 细胞色素 c 的制备及测定	144
实验五十一 碱性磷酸酶的分离纯化	149
附 录	153
一、试剂的配制	153
(一) 常用溶液浓度的单位及计算	153
(二) 标准溶液的配制与标定	154
(三) 常用缓冲溶液的配制	155
(四) 玻璃仪器的清洗及各种洗液的配制	160
二、常用参数	162
(一) 一般化学试剂的分级	162
(二) 易变质和需要特殊方法保存的试剂	162
(三) 常用酸碱的相对密度和质量分数, 物质的量浓度的关系	163
(四) 硫酸铵饱和度常用表	163
(五) 指示剂	165
(六) 元素原子量表	167
(七) 离心机转速与相对离心力的换算	168

实验室规则

一、实验要求

1. 实验前必须预习实验指导和有关理论,明确实验目的、原理、预期的结果,操作关键步骤及注意事项。

2. 实验时要严肃认真专心进行操作,注意观察实验过程中出现的现象和结果,结果不良时,必须重做。

3. 实验中,应及时将实验结果如实记录下来,根据实验结果进行科学分析。

二、仪器保管及清洁

1. 实验前要对所用仪器进行清点,实验中如有仪器破损必须登记。

2. 贵重仪器尤其要尽力爱护,在使用前要了解使用方法,严格遵守操作规程。

三、试剂使用规则

1. 使用试剂前应仔细辨认标签,看清名称及浓度,是否为本实验所需要。

2. 取出试剂后,立即将瓶塞盖好,切勿盖错,放回原处,未用完的试剂不得倒回瓶内。

3. 取标准溶液时,应先将标准液倒入干净试管中,再用清洁吸管吸取,以免污染。

4. 使用有毒试剂及强酸强碱时,尽可能用量筒量取,若用吸管时只能用洗耳球吸取,切勿用嘴吸取,以免造成意外。

四、安全注意事项

1. 低沸点有机溶剂,如乙醚、石油醚、酒精等均系易燃物品,使用时应严禁明火,远离火源,若须加热要用水浴加热,不可直接在火上加热。

2. 凡属发烟或产生有毒气体的实验,均应在通风柜内进行,以免对人体造成危害。

3. 若发生酸碱灼烧事故,先用大量自来水冲洗,酸灼伤者用饱和 NaHCO_3 溶液中和,碱灼烧者用饱和 H_3BO_3 溶液中和,氧化剂伤害者用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理。

4. 若发生起火事件,根据发生起火性质分别采用砂、水、 CO_2 或 CCl_4 灭火器扑灭。

5. 离开实验室时必须关好门窗,切断电源、水源,以确保安全。

五、废弃物处理

1. 所有固体废弃物如:用过的滤纸、碎屑沉淀物等,不得弃于水池内。

2. 浓酸必须弃于小钵中,用水冲淡,然后倒入水槽中。

六、实验室清洁

1. 实验室必须经常保持清洁,不得随地吐痰,乱丢纸屑。

2. 实验后,必须把仪器洗净,按次序放置好,试剂瓶要摆放整齐。

3. 清理实验台面、地面,经老师检查后,方能离开实验室。

实验误差与数据处理

一、误差

在进行定量分析实验测定的过程中,很难使测量出来的数值与客观存在的真实值完全相同。误差是指测量值与真实值之差。根据误差产生的原因,可将误差分为以下三种:

1. 系统误差或恒定误差 恒定误差是指在测定中未发觉的因素所引起的误差。这些因素影响结果永远朝一个方向偏,其大小及符号在同一实验中完全相同。检查或改正的方法是扩大实验范围,采用不同的方法选取样品,用不同方法分离和提纯样品等。

系统误差是指因为:①仪器不良,如刻度不准;②试剂不纯;③周围环境的改变,如外界温度、压力、湿度变化;④个人的习惯和偏向,如读数偏高或偏低等所引起的误差。为了减少系统误差常采用下列措施:

(1) 空白试验 为了消除由试剂等因素引起的误差,可在测定时不加样品的情况下,按照与样品测定完全相同的操作手续进行分析,得到的结果为空白值,将样品分析得到的结果扣除空白值,可以得到比较准确的结果。

(2) 回收率测定 取一标准物质与待测的未知样品同时做平行测定。测得的量与所取的量之比的百分率就称回收率。这种由标准样品测得的回收率可以用来检验、表达某些分析过程的系统误差,因为系统误差越大,回收率越低。

(3) 仪器校正 对所用仪器进行校正,以减少误差。

2. 偶然误差 在测量中,当已经消除引起系统误差的一切因素后,所测数据仍在末一位或末二位数字上有差别,这类误差称为偶然误差。

偶然误差有时大,有时小,有时正,有时负,方向不一定,似乎没有规律性,但如果测量次数足够多,便可发现①正误差与负误差出现的几率相等。②出现小误差次数多,大误差次数少。减少偶然误差可采取下列措施:

(1) 平均取样 动植物新鲜组织可制成匀浆后取样,固体样品可先进行粉碎、混匀后取样;细菌制成悬液,充分打散摇匀后取样。

(2) 多次取样 根据误差出现的规律,进行多次平行测定,取其算术平均值,可以减少偶然误差。平行测定的次数愈多,其偶然误差就愈小。

3. 过失误差 过失误差是一种显然与事实不符的误差,它主要是由于粗枝大叶、过度疲劳、操作不正确等引起。例如读错刻度值,反读游标尺,加错试剂,记录错误,计算错误等。此类误差无规则可循,只要细心操作,多方警惕即可避免。

二、精确度与准确度

1. 精确度 精确度是指在测量中所测数值重复性的。精确度常用偏差来表示:

绝对偏差 = 个别测定值 - 算术平均值(不算正负号)

$$\text{相对偏差} = \frac{\text{绝对偏差}}{\text{算术平均值}} \times 100\%$$

2. 准确度 准确度是指所测数值与真实值符合程度,通常用误差来表示。误差越小,准确度愈高。误差分绝对误差和相对误差,可用下式表示:

$$\text{绝对误差} = \text{测定值} - \text{真实值}$$

$$\text{相对误差}(\%) = \frac{\text{绝对误差}}{\text{真实值}} \times 100\%$$

在实验中,通常真实值并不知道,因此在实际工作中无法求出分析的准确度,只能用精确度来评价分析结果。

在一组测量中,尽管精确度很高,但准确度不一定很好;反之,若准确度好,精确度也一定高。因此用精确度来评价分析的结果具有一定的局限性。

三、有效数字

有效数字就是在表示测量的精确度上有意义的数字。应该选取几位有效数字,取决于实验方法与所用仪器的精确程度。认为在一个数值中小数点后的位数愈多,或在计算中,保留位数愈多准确度就愈大都是错误的。

有效数字包括所有准确的数字和第一位可疑数字。例如用量筒量取 25ml 的溶液,应该写成 25 ml(两位有效数字),因为量筒测量体积时可发生 $\pm 1\text{ml}$ 的误差,故 25ml 的最后—位数字“5”是可疑的。应用校正过的移液管取 25ml 的溶液,因为移液管测量体积只发生 $\pm 0.01\text{ml}$ 的误差,故应写成 25.00ml。可见有效数字的位数与所用仪器精密度关系很大。从 0 到 9 的十个数字中,0 具有双重意义。它可以用作有效数字,也可以用来表示单位。例如在 0.06050g 这个数字中,“6”后面两个 0 都是有效数字,而“6”前的两个“0”就不是有效数字,很大或很小的数目用 0 表示单位不方便,可以用幂次表示,例如 0.00006050g 可以写成 $6.050 \times 10^{-5}\text{g}$ 。用幂次表示很大或很小数目时,习惯上总是在小数点前面留一位整数。

在实际工作中可用下列法则进行计算

1. 当弃去不要的可疑数字时,采取四舍五入的原则。
2. 许多数值相加时,所得结果的误差较任何一个数的误差为大。所以结果中的可疑数字应以具有最大可疑位数的某一数值为准。例如在计算 0.0121、25.64 及 1.05782 三数之和时,25.64 的误差最大,应以 25.64 为准,故其和应是 $0.01 + 25.64 + 1.06 = 26.71$
3. 许多数值相乘时,所得结果较任何一数的百分误差为大。所以结果中的有效数字应以各数中含有效数字位数最少的为准。例如求 11.62、0.0112 及 1.672 三个数之积时,其中有效数字位数最小的是 0.0112,故其乘积应是 $11.6 \times 0.0112 \times 1.672 = 0.217$
4. 若一数值的首位数大于 8,则有效数字可多算一位,例如 9.14 虽只有三位有效数字,但首位大于 8,在运算时可看成四位有效数字。
5. 在平方与立方时,底数有几位有效数字结果中就只保留几位。

然而,有的数字是绝对的,不能运用上述计算法则。例如计算相对分子质量时,各相对原子质量是绝对量,一点误差也没有。一个氯原子重 35.457,三个氯原子重为 $35.457 \times 3 = 106.371$,不能写成 1×10^2 。

实验记录及实验报告

一、实验记录

实验课前应认真预习,将实验名称、目的和要求、原理、实验内容、操作方法和步骤等简单扼要地写在记录本中。实验中观察到的现象、结果和数据,应如实仔细地记录下来。在定量实验中观测的数据,如称量物的重量、滴定管的读数、分光光度计的读数等,都应设计一定的表格准确记下正确的读数,并根据仪器的精确度准确记录有效数字。例如,光密度值为 0.050 不应写成 0.05。每一个结果最少要重复观测两次以上,当符合实验要求并确知仪器工作正常后再写在记录本上。实验记录上的每一个数字,都是反映每一次的测量结果,所以,重复观测时即使数据完全相同也应如实记录下来。总之,实验的每个结果都应正确无遗漏地做好记录。

实验中使用仪器的类型、编号以及试剂的规格、化学式、分子量、准确的浓度等,都应记录清楚,以便总结实验时进行核对和作为查找成败原因的参考依据。

如果发现记录的结果有怀疑、遗漏、丢失等,都必须重做实验。因为,将不可靠的结果当做正确的记录,在实际工作中可能造成难于估计的损失。所以,在学习期间就应一丝不苟,努力培养严谨的科学作风。

二、实验报告

实验结束后,应及时整理和总结实验结果,写出实验报告。下面列举实验报告的格式,仅供参考。

实验(编号) (实验名称)

一、目的和要求

二、原理

三、试剂配制及所需仪器

四、操作方法

五、实验结果

六、讨论

通常每次实验课只做一个定量实验,在实验报告中,目的和要求、原理以及操作方法部分应简单扼要的叙述,但是对于实验条件(试剂配制及仪器)和操作的关键环节必须写清楚。对于实验结果部分,应根据实验课的要求将一定实验条件下获得的实验结果和数据进行整理、归纳、分析和对比,并尽量总结成各种图表,如原始数据及其处理的表格、标准曲线图以及比较实验组与对照组实验结果的图表等。另外,还应针对实验结果进行必要的说明和分析。讨论部分可以包括:关于实验方法(或操作技术)和有关实验的一些问题,如对实验的正常结果和异常现象以及思考题进行探讨;对于实验设计的认识、体会、建议和对实验课的改进意见等。

第一章 生化基本技能实验

实验一 血液及组织样品的制备

分析组织中某种物质的含量、探索物质代谢的过程和规律,经常使用动物的肝、肾、脑、粘膜和肌肉等组织,也选用全血、血浆、血清或者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

(一) 采血 测定用的血液,多由静脉采集。一般在饲喂前空腹采取,因此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,盛血容器要清洗干净;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。

(二) 血清、全血及血浆的制备

1. 血清的制备 血清是全血不加抗凝剂自然凝固后析出的淡黄清亮液体。制备方法是:将刚采集的血液直接注入试管或离心管中。将试管放成斜面,让其自然凝固,一般经 3h 血块自然收缩而析出血清;也可将血样放入 37℃ 恒温箱内,促使血块收缩,能较快的析出血清。为了缩短时间,也可用离心机分离(未凝或凝固的均可离心),分离出的血清,用吸管吸出置于另一试管中,若不清亮或带有血细胞,应重离心,加盖冷藏备用。

2. 全血及血浆的制备 取清洁干燥的试管或其它容器,收集动物的新鲜血液,立即与适量的抗凝剂充分混合,所得到的抗凝血为全血。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。将已抗凝的全血于 2,000r/min 离心 10min,沉降血细胞,取上层清液即为血浆。

血浆比血清分离得快而且量多。两者的差别,主要是血浆比血清多含一种纤维蛋白原,其它成分基本相同。

3. 抗凝剂 凡能够抑制血液凝固反应进行的化合物称为抗凝剂。抗凝剂种类甚多,实验室常用的有如下几种,可根据情况选择使用。

(1) 草酸钾(钠) 优点是溶解度大,可迅速与血中钙离子结合,形成不溶性草酸钙,使血液不凝固。每毫升血液用 1~2mg 即可。

配制方法:配制 10% 草酸钾水溶液。吸取此液 0.1ml 放入一试管中,慢慢转动试管,使草酸钾尽量铺散在试管壁上,置 80℃ 烘箱烤干(若超过 150℃ 则分解),管壁即呈一薄层白色粉末,加塞备用。可抗凝血液 5ml。

此抗凝血,常用于非蛋白氮等多种测定项目,但不适用于钾、钙的测定。对乳酸脱氢酶、酸性磷酸酶和淀粉酶具有抑制作用,使用时应注意。

(2) 草酸钾—氟化钠 氟化钠是一种弱抗凝剂。但浓度 2mg/ml 时能抑制血液内葡萄糖的分解,因此在测定血糖时常与草酸钾混合使用。

配制方法:草酸钾 6g、氟化钠 3g,溶于 100ml 蒸馏水中。每个试管加入 0.25ml,于 80℃ 烘干备用。每管含混合剂 22.5mg,可抗凝 5ml 血液。

此抗凝血,因氟化钠抑制脲酶,所以不能用于脲酶法的尿素氮测定;也不能用于淀粉酶及磷酸酶的测定。

(3) 乙二胺四乙酸二钠盐(简称 EDTANa₂) EDTANa₂ 易与钙离子络合而使血液不凝。有效浓度为 0.8mg 可抗凝 1ml 血液。

配制方法:配成 4% EDTANa₂ 水溶液。每管装 0.1ml,80℃ 烘干,可抗凝 5ml 血液。

此抗凝血液适用于多种生化分析。但不能用于血浆中含氮物质、钙及钠的测定。

(4) 肝素(Heparin) 最佳抗凝剂,主要抑制凝血酶原转变为凝血酶,从而抑制纤维蛋白原形成纤维蛋白而凝血。0.1~0.2mg 或 20 单位可抗凝 1ml 血液。

配制方法:配成 10mg/ml 的水溶液。每管加 0.1ml 于 37~56℃ 烘干,可抗凝 5~10ml 血液(市售品为肝素钠溶液,每毫升含 12,500 国际单位,相当于 100mg,故每 125 国际单位相当于 1mg)。

除上述抗凝剂外,还有柠檬酸钠(枸橼酸钠)、草酸铵等,因不常用,故不作介绍。

(三) 无蛋白血滤液的制备

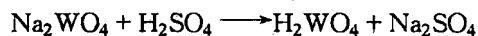
测定血液或其它体液的化学成分时,样品内蛋白质的存在常常干扰测定。因此,需要先做成无蛋白血滤液再行测定。

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

原理

钨酸钠与硫酸混合,生成钨酸:



血液中蛋白质在 pH 值小于等电点的溶液中可被钨酸沉淀。沉淀液过滤或离心,上清液即为无色而透明、pH 约等于 6 的无蛋白滤液。可供非蛋白氮、血糖、氨基酸、尿素、尿酸及氯化物等项测定使用。

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 5~10min,使其酸化完全;(4) 加入 10% 钨酸钠 1 份,随加随摇;(5) 放置约 5min 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(2,500r/min, 10min),即得完全澄清无色之无蛋白血滤液。

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。

试剂

(1) 10% 钨酸钠溶液 (2) 0.333mol/L 硫酸溶液

2. 氢氧化锌法

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作血液葡萄糖的测定(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。

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 5min, 用定量滤纸过滤或离心(2, 500r/min, 10min), 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。

试剂

(1) 10% 硫酸锌溶液 (2) 0.5mol/L 氢氧化钠溶液

3. 三氯醋酸法

原理

三氯醋酸为一有机强酸, 能使蛋白质变性而沉淀。

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 5min, 过滤或离心。即得 10 倍稀释之清明透亮的滤液。

二、组织样品

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。

但是, 在生物组织中, 因含有大量的催化活性物质, 离体组织的采集必需在冰冷条件下进行, 并且需尽快完成测定。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, 按试验要求制成匀浆或者组织糜。

组织糜: 迅速将组织剪碎, 用捣碎机绞成糜状, 或加入少量砂于钵中, 研磨至糊状。

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。

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。