

高等医药院校基础医学实验教学系列教材

生物化学与分子生物学实验

第2版

主编 林德馨



科学出版社

高等医药院校基础医学实验教学系列教材

生物化学与分子生物学实验

第2版

主 编 林德馨

副主编 何 艳 陈 瑜

编 者 (按姓氏笔画排序)

刘晓如 齐元麟 何 艳 张春晓

陈 瑜 林 玲 林德馨 郑 敏

郑 辉 郑志竑 胡建石 段 娟

黄 山 盛 健 蔡文秀 廖之君

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

本书由十章四十三项实验组成,共分三篇:第一篇为基础性实验,共五章,包括生物化学与分子生物学实验基本操作、分光光度法、层析技术、电泳技术和印迹技术,其为生物化学与分子生物学实验中最基本的实验技能;第二篇为综合性实验,共五章,包括蛋白质定量分析方法学比较(Lowry改良法、考马斯亮蓝法等)、酶分离纯化与动力学分析、DNA提取、扩增与测序、RNA提取与鉴定以及基因克隆,通过综合性实验介绍实验技术的应用;第三篇为研究性实验,包括胰岛素和肾上腺素对血糖及肝糖原的影响、血清 γ -球蛋白的分离纯化与鉴定、青豌豆素的分离纯化与鉴定、外源基因在原核细胞的表达及蛋白质与DNA的相互作用分析。本书在阐明各类方法基本原理的同时,注重实验的具体操作和实例的应用。

本书适用于四年制、五年制临床医学及非临床医学各专业、七年制临床医学的实验教学,也可作为医学专科、硕士研究生各专业学生的实验教材,同时也供非医学专业学生学习生物化学与分子生物学技术参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验 / 林德馨主编. —2版. —北京:科学出版社,2014.1

高等医药院校基础医学实验教学系列教材

ISBN 978-7-03-039286-2

I. 生… II. 林… 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(2013)第296125号

责任编辑:胡治国 / 责任校对:张怡君

责任印制:肖 兴 / 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>

安泰印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009年8月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2014年1月第 二 版 印张:7 1/2

2014年1月第六次印刷 字数:169 000

定价:25.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

第2版前言

随着分子生物学的快速发展,生物化学与分子生物学技术日益更新,新技术、新方法不断涌现。生物化学与分子生物学技术已成为医学科学研究的重要手段,在医学、生物学各个领域广泛应用。生物化学与分子生物学实验已成为医学、生物学各专业必修的实验课程。

根据实验教学的需要,我校生物化学与分子生物学系自编《生物化学与分子生物学实验》,作为医学各专业学习“生物化学与分子生物学”的配套实验教材,经反复修改,多年使用,日益成熟。随着分子生物学的发展和实验教学模式的改变,现由我校福建省基础医学实验教学示范中心教授生物化学与分子生物学实验技术的教师,根据新的实验教学理念,在第1版的基础上重新编写。本教材将实验技术分为基础性实验、综合性实验和研究性实验三部分。

基础性实验:介绍最基本的实验操作和技能。

综合性实验:选择及重组实验,从多层次、整体介绍实验技术和方法。

研究性实验:开展以学生为主体的初步科学研究实验,将研究方法引入实验过程。本教材以培养学生的三基(基本理论,基本知识与基本技能)为基础,同时注重提高学生创新能力和综合素质。通过整合实验,开展综合性、研究性实验,扩展学生的科研思维,提高分析和处理问题的能力。

本教材涵盖了生物化学和分子生物学的基本实验方法和技术,是学习生物化学与分子生物学实验技术独立课程的一本实用教材。本教材面对医学本专科、硕士研究生各专业学生,适用于四年制、五年制临床医学及非临床医学各专业、七年制临床医学的实验教学,同时也可作为医学专业研究生学习生物化学与分子生物学实验技术的参考。

本教材在编写过程中,参编教师付出了辛勤的工作,许多实验技术人员也给予了极大的支持,尤其是胡建石高级实验师对实验操作进行认真的核对,余文明实验师在插图整理、文字录入等方面做了大量工作。因此,本书是集体的劳动成果和智慧的结晶,对所有参加和支持本书编写的人员表示真诚的谢意和崇高的敬意。

由于编者水平有限,综合性、研究性实验的编写模式又是新的尝试,书中难免存在不妥之处,殷切希望广大读者对本书提出批评和建设性建议,以便今后不断完善。

编者于福州
2013年8月10日

第1版前言

随着分子生物学的快速发展,生物化学与分子生物学技术日益更新,新技术、新方法不断涌现。生物化学与分子生物学技术已成为医学科学研究的重要手段,在医学、生物学各个领域中得到广泛应用。生物化学与分子生物学实验已成为医学、生物学各专业必修的实验课程。

根据实验教学的需要,我校生物化学与分子生物学系自编《生物化学与分子生物学实验指导》,作为医学各专业的学习生物化学与分子生物学的配套实验教材,经反复修改,多年使用,日益成熟。随着分子生物学的发展和实验教学模式的改变,现由我校福建省基础医学实验教学示范中心教授生物化学与分子生物学实验技术的教师,根据新的实验教学理念,在原书的基础上重新编写。该书将实验技术分为基础性实验、综合性实验和研究性实验三部分。①基础性实验:介绍最基本的实验操作和技能;②综合性实验:选择及重组实验,从多层次、整体介绍实验技术和方法;③研究性实验:开展以学生为主体的初步科学研究实验,将研究方法引入实验过程。本教材以培养学生的三基为基础,同时注重提高学生的创新能力和综合素质,通过整合实验,开展综合性、研究性实验,以扩展学生的科研思维能力,提高分析和处理问题的能力。

本教材涵盖了生物化学与分子生物学的基本实验方法和技术,是学习生物化学与分子生物学实验技术独立课程的一本实用教材。本书面向医学本专科、硕士研究生各专业的学生,适用于四、五年制临床医学、非临床医学各专业、七年制临床医学的实验教学,同时也可作为医学专业研究生学习生物化学与分子生物学实验技术的参考。

本书在编写过程中,参编教师付出了辛勤的劳动,许多实验技术人员也给予了极大的支持,尤其是杨俐丽高级实验师对实验操作进行认真的核对,余文明实验师在插图整理、文字录入等方面做了大量工作。因此本书是集体的劳动成果和智慧的结晶,对所有参加和支持本书编写的人员表示真诚的谢意和崇高的敬意。

由于水平有限,综合性、研究性实验的编写模式又是新的尝试,书中难免存在不妥之处,殷切希望广大读者对本书提出批评和建设性建议,以便今后不断完善。

福建医科大学
基础医学实验教学中心
林德馨

2009年7月10日

目 录

实验室总则	(1)
-------------	-----

第一篇 基础性实验

第一章 生物化学与分子生物学实验基本操作	(3)
第二章 分光光度法	(8)
实验一 血清蛋白质含量测定	(13)
实验二 DNA 及 RNA 含量测定	(14)
实验三 血糖浓度测定	(15)
实验四 血清甘油三酯测定	(16)
实验五 血清总胆固醇含量的测定	(17)
实验六 血清丙氨酸氨基转移酶活性测定	(18)
第三章 层析技术	(20)
实验七 聚酰胺薄膜层析技术——蛋白质及肽的 N 末端氨基酸 DNS 分析法	(22)
实验八 凝胶层析(分子筛层析法)分离蛋白质	(26)
实验九 离子交换层析分离氨基酸	(29)
实验十 亲和层析纯化血清 IgG	(31)
第四章 电泳技术	(33)
实验十一 血清蛋白乙酸纤维素薄膜电泳	(35)
实验十二 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白	(36)
实验十三 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清乳酸脱氢酶	(40)
实验十四 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质相对分子质量	(43)
实验十五 等电聚焦-聚丙烯酰胺凝胶平板电泳测定蛋白质等电点	(46)
实验十六 DNA 琼脂糖凝胶电泳	(47)
第五章 印迹技术	(49)
实验十七 Southern 印迹	(49)
实验十八 Northern 印迹	(51)
实验十九 Western 印迹	(52)
实验二十 非放射性 Dig-dUTP 标记 DNA 探针及杂交检测	(54)

第二篇 综合性实验

第六章 蛋白质定量分析方法学比较	(57)
实验二十一 Lowry 改良法测定蛋白质浓度	(57)
实验二十二 考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度	(59)
实验二十三 二喹啉甲酸法测定蛋白质浓度	(60)
实验二十四 紫外分光光度法测定蛋白质浓度	(61)
第七章 酶分离纯化与动力学分析	(63)

实验二十五 碱性磷酸酶分离纯化及比活性测定	(65)
实验二十六 碱性磷酸酶初速度的测定	(69)
实验二十七 碱性磷酸酶 K_m 值测定	(70)
实验二十八 pH、温度及抑制剂对碱性磷酸酶活性的影响	(73)
第八章 DNA 提取、扩增与测序	(78)
实验二十九 质粒 DNA 的提取	(78)
实验三十 基因组 DNA 的提取	(79)
实验三十一 聚合酶链反应	(81)
实验三十二 DNA 序列测定	(82)
第九章 RNA 提取与鉴定	(86)
实验三十三 细胞 RNA 的提取	(86)
实验三十四 逆转录-聚合酶链反应	(88)
实验三十五 荧光定量 PCR	(89)
第十章 基因克隆	(91)
实验三十六 目的基因与质粒的限制性内切酶消化	(91)
实验三十七 目的基因与质粒 DNA 的连接	(92)
实验三十八 质粒 DNA 的转化和筛选	(93)
第三篇 研究性实验	
实验三十九 胰岛素和肾上腺素对血糖及肝糖原的影响	(95)
实验四十 血清 γ -球蛋白的分离纯化与鉴定	(97)
实验四十一 青豌豆素的分离纯化及其鉴定	(101)
实验四十二 外源基因在原核细胞的表达	(102)
实验四十三 蛋白质与 DNA 的相互作用分析	(105)
主要参考文献	(108)
附录	(109)

实验室总则

一、实验特点

生物化学与分子生物学是一门重要的实验性基础学科,其理论与实验技术相辅相成,在整个生物化学及相关学科的发展上,都起着决定性的作用。生物化学与分子生物学实验是实验性科学的重要组成,归纳起来,有如下特点:

(1) 生物化学与分子生物学实验与其他学科互相渗透,在渗入其他学科的同时,也渗进相关学科的理论知识和实验方法。

(2) 微量和定量是一大特点,因此要求有严格的条件,实验者必须有严谨的实验态度。

(3) 实验涉及生物大分子和生物材料的检测。

(4) 新技术手段的不断涌现,使生物化学与分子生物学实验方法不断发展,并得到广泛的应用,推动生物化学与分子生物学理论的发展。

(5) 与临床密切联系,为临床检测提供实验技术手段。

二、实验须知

(1) 生物化学与分子生物学实验有着独特的实验技能和基本操作。学生应本着认真、积极的态度,在教师的指导下,完成每次实验。不仅要明白实验的原理、步骤和关键所在,还要能发现问题,积累经验,并对实验结果展开讨论。

(2) 课前认真预习,实验过程中,严格遵守操作规范。实验结果和数据应如实、及时记录,并当场写出实验记录,经教师检查同意并签字后,方可离开。实验报告应在实验后一天内完成并交到指定地点。

(3) 遵守课堂纪律,不得迟到早退,实验室内不得吸烟、饮食、大声喧哗,学生之间应互助友爱。

(4) 爱护实验器材。在了解仪器性能和操作规程之前,不得冒然使用,更不可擅自拆卸或将部件带出室外。实验过程中,如发现仪器损坏或运转异常,应立即妥善处理。

(5) 注意安全。对腐蚀性试剂或易燃有机溶剂的操作应格外小心;水电煤气在停用时应及时关闭。

(6) 保持室内整洁,公用试剂用毕应立即盖好,放回原处,实验中应注意节约。

(7) 学生应轮流值日,负责实验室的卫生和安全,并协助教师从事一些实验前的准备工作。

三、实验记录及实验报告的书写

生物化学与分子生物学实验是生物化学与分子生物学及其他生物学科的重要研究手

段,是在生物化学与分子生物学理论及其他相关理论指导下的实践。经过实践,掌握科学观察的基本方法和技能;培养科学思维、分析判断及解决问题的能力;培养实事求是的工作作风。为达到实验目的,要求在实验中严肃认真地进行操作,细致观察各种变化并如实做好实验结果的记录,要求在操作结束后认真进行计算或分析,写好实验报告。

(一) 实验记录

实验记录是指在实验中将观察到的现象、结果、数据及时、准确、如实、详尽、清楚地记录在记录本上。实验结果的记录不可掺杂任何主观因素,不能受现成资料及他人实验结果的影响,若出现“不正常”的现象,更应如实详尽记录。

完整的实验记录应包括日期、题目(内容)、现象及结果,使用精密仪器进行实验时还应记录仪器的型号及编号。一般采用表格式的记录方式,简练而清楚,不提倡使用易于涂改及消退的笔做原始记录。

(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。完整的实验报告应包括实验名称、日期、目的要求、实验原理、操作方法、试剂、仪器设备、实验结果、讨论等内容。其中目的要求、原理、操作方法、试剂、设备等项目只要求进行简明扼要的叙述,不应将讲义内容原版抄录一遍,但对实验的条件、操作要点等实验成败的关键环节应做描述。

实验结果应如实记录实验中观察到的现象及各种原始数据,要求记录数据的计算过程及计算结果,包括根据实验数据及计算做出的各种图表(如曲线图、对照表等)。

讨论部分不是对结果的重述,而是对实验结果、方法和异常现象进行的探讨和评论,以及对实验设计的认识、体会及建议。一般要有实验结论,简单扼要的说明本次实验所获得的结果。

四、安全措施

(1) 进入实验室必须穿实验工作服。

(2) 实验室内严禁吸烟,易燃易爆物品应远离火源。低沸点的有机溶剂不得在火焰上直接加热;必须加热时,可在水浴进行。

(3) 使用电器设备要严防触电。切忌用湿手触摸电器。发现仪器漏电时,立即报告并停止使用。一旦发生触电事故,应立即关闭电源,并用干木棍将导线挑离被电者身体;对呼吸停止者,应立即进行人工呼吸,并及时送医院抢救。

(4) 强酸、强碱液体或剧毒液体,不得用口经吸量管吸取,必须使用吸耳球,如不慎吸入口内或沾及皮肤,应立即用清水多次漱口或局部冲洗。若为强碱灼伤,清洗后可用5%硼酸溶液清洗;若为强酸灼伤,水洗后可用5%碳酸氢钠溶液清洗。严重灼伤者,应立即将残留在身体上的液体轻轻冲洗后,送医务部门处理。

(5) 用后的浓酸、浓碱残液,应倒入指定的容器。不要直接倒入水池内,以免蚀损水管;若少量残液已倒入池内,应立即放水稀释冲走。

(6) 有毒试剂应集中处理,实验动物尸体不得随意丢弃,应集中统一处理在实验过程中要注意生物安全问题。

(7) 万一着火,不要惊慌失措,要立即切断火源和电源,移走易燃物品,同时立即报告指导老师进行紧急处理,严防火势蔓延;若火势蔓延,应立即报警。万一衣服着火,切忌惊慌奔跑,可用衣服包裹身体或就地翻滚,借以绝氧灭火。

第一篇 基础性实验

第一章 生物化学与分子生物学实验基本操作

一、玻璃器皿的洗涤与干燥

生物化学与分子生物学实验常用各种玻璃仪器,其清洁程度直接影响实验结果的准确性。因此,清洁玻璃仪器不仅是实验前后的常规工作,也是一项重要的技术性工作。清洗玻璃仪器的方法很多,需根据实验要求、污物的性质和沾污程度选用合适的清洁方法。

(一) 玻璃器皿的洗涤

1. 新购玻璃仪器的清洗 新购玻璃仪器,其表面附有碱质,可先用肥皂水刷洗,再用流水冲净,浸泡于1%~2%盐酸中过夜,再用流水冲洗,最后用蒸馏水冲洗2~3次,干燥备用。

2. 使用过的玻璃仪器的清洗

(1) 一般玻璃仪器:如试管、烧杯、锥形瓶等,先用自来水刷洗后,再用肥皂水或去污粉刷洗,然后用自来水反复冲洗,去尽肥皂水或去污粉,最后用蒸馏水淋洗2~3次,干燥备用。

(2) 容量分析仪器:如吸量管、滴定管、容量瓶等,先用自来水冲洗,待晾干后,再用铬酸洗液浸泡数小时,然后用自来水充分冲洗,最后用蒸馏水淋洗2~3次。干燥备用。

(3) 比色杯:用毕立即用自来水反复冲洗。洗不净时,用盐酸或适当溶剂冲洗,再用自来水冲洗。避免用碱液或强氧化剂清洗,切忌用试管刷或粗糙布(纸)擦拭。

(二) 玻璃器皿的干燥

上述所有玻璃器皿洗净(以倒置后器壁不挂水珠为干净的标准)后,根据需要晾干或烘干。

1. 晾干 不急用的玻璃仪器洗净后,可沥尽水分,倒置于无尘的干燥处,让其自然风干。

2. 加热烘干 一般玻璃仪器洗净并沥尽水分后,可置于电烘箱中烘烤,温度控制在105~110℃,烘1小时左右。但带有刻度的量器不宜在高温下烘烤。有盖(塞)的玻璃仪器,如容量瓶、称量瓶等,应去盖(塞)后烘烤。

二、移液器的使用

(一) 刻度吸量管的使用方法

刻度吸量管的规格有0.1ml、0.2ml、0.5ml、1ml、2ml、5ml及10ml等,供量取10ml及以下任意体积的液体用。

1. **执管** 将中指和拇指拿住吸量管上口以示指控制流速;刻度数字应朝向操作者。
2. **取液** 把吸量管插入液体内(切忌悬空,以免液体吸入洗耳球内),用洗耳球吸取液体至所取液量的刻度上端1~2cm处,然后迅速用示指按紧吸量管上口,使管内液体不再流出。
3. **调准刻度** 将含有充足液体的吸量管提出液面,用滤纸片抹干管尖外壁液体,然后垂直提起吸量管于供器内口(管尖悬离供器内液面)。用示指控制流至所需刻度,此时液体凹面、视线和刻度应在同一水平面上,并立即按紧吸量管上口。
4. **放液** 放松示指,让液体自然流入受器内(如移液管标有“吹”字,则应将管口残余液滴吹入受器内)。此时,管尖应接触受器内壁,但不应插入受器内的原有液体中,以免污染吸量管及试剂。
5. **洗涤** 吸取血液、尿、组织样品及黏稠试剂的吸量管,用后应及时用自来水冲洗干净。如果吸取一般试剂的吸量管可不必马上冲洗,待实验完毕后,用自来水冲洗干净。晾干水分,再浸泡于铬酸洗液中,数小时后再用流水冲净,最后用蒸馏水冲洗。晾干备用。

(二) 枪式移液器的使用

枪式移液器的使用见图1-1-1。

- (1) 调体积,选取钮至所需值。
 - (2) 套上枪头。
 - (3) 垂直持握枪式移液器外壳,按下拇指至第一挡。
 - (4) 将枪头插入溶液,徐徐松开拇指,使其复原。
 - (5) 排放时,重新将拇指按下,至第一挡后,继续按至第二挡排空。
- 注意:移液过程应控制速度、力度。

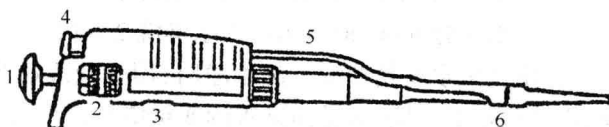


图1-1-1 枪式移液器

1. 液体吸收钮;2. 体积选取钮;3. 体积显示;4. 枪头排放钮;
5. 枪头排放器;6. 枪头接嘴

三、溶液的混匀

样品与试剂的混匀是保证化学反应充分进行的一种有效措施。为使反应体系内各物质迅速地互相接触,必须借助于外加的机械作用,混匀时须防止容器内液体溅出或被污染,严禁用手指直接堵塞试管口或锥形瓶口振荡。混匀的方式大致有下面几种,可随使用的器皿和液体容量而选用。

1. **旋转混匀法** 用手持容器,使溶液做离心旋转。该法适用于未盛满液体试管或小口器皿(如锥形瓶),旋转试管时宜用手腕旋转。
2. **指弹混匀法** 用于持容器,手腕用力前后摇动使内容物混匀。还可用于左手持试管上端,用右手手指轻轻弹动试管下部,使管内溶液做旋涡运动;或用右手持试管上端,在左手

掌上打击的方法混匀内容物。

3. 颠倒混匀法 适用于有塞的容量瓶及有塞试管内容物的混匀。一般试管内容物混匀时可用聚乙烯等薄膜封口,再用手按住管口颠倒混匀。

4. 吸量混匀法 用吸量管将溶液反复吸放数次,使溶液充分混匀。

5. 玻棒搅动法 适用于烧杯、量筒内容物的混匀,如固体试剂的溶解和混匀。

其他,还有电磁搅拌混匀法和振荡器混匀法等。

四、常用生物材料的处理

(一) 抗凝全血的制备

全血是在取出的血液与适量的抗凝剂充分混合所得的抗凝血。保存时,应放入冰箱。

每毫升血液需加抗凝剂的量为:草酸钾或草酸钠 1 ~ 2mg;枸橼酸钠 5mg;肝素 0.1 ~ 0.2mg。根据实验目的不同要对抗凝剂加以选择,如血糖定量可用氟化钠以防止糖的分解,最好与草酸盐并用;肝素抗凝效果好,适用于各种分析。

采血一般应在早晨空腹或禁食 6 小时以上安静条件下采血。避免因饮食及其他生理情况常使血液成分发生变动。主要途径有耳垂或指尖采毛细血管血(仅在用血量较少用)以及静脉采血。

(二) 血清的制备

把新采的不加抗凝剂血于试管或离心管中,倾斜放置,任其自然凝固,然后移放冰箱或室温放置等待析出血清,移取血清于另外小试管中。保存时,应放入冰箱。

(三) 血浆的制备

采血后经与抗凝剂混匀得到抗凝血液经离心(2000 ~ 3000r/min, 5 ~ 10 分钟),使有形成成分下沉,上层即为血浆。注意吸取血浆,移放另外试管中备用。保存时,应放入冰箱。

注意:血液加入抗凝剂后,要及时轻轻摇动使抗凝剂溶解并混匀,不可强力振荡,避免溶血。

(四) 无蛋白血滤液的制备

血液中所含的蛋白质,常影响其他成分的测定。故检测非蛋白质的各种成分时,须先将其中的蛋白质除去,制成无蛋白血滤液,再进行分析测定。常用的蛋白沉淀剂有三氯乙酸、钨酸、有机溶剂、中性盐等,血液中加入蛋白质沉淀剂后离心或过滤所得的上清液或滤液,即无蛋白血滤液。

除去蛋白质的方法可分成两类:一类是使蛋白质脱水沉淀,如有机溶剂(甲醇、乙醇、丙酮等)及中性盐[(NH₄)₂SO₄、Na₂SO₄、NaCl 等]沉淀法;另一类是使蛋白质形成不溶性的盐而沉淀,常用有两种方法,一种是酸性沉淀剂法(如三氯乙酸、钨酸、苦味酸、钼酸等),其原理是酸性沉淀剂与蛋白质分子的阳离子形成不溶性的蛋白盐沉淀,必要条件是溶液 pH 要低于蛋白质的等电点(pI);另一种是重金属离子法(如 Zn²⁺、Cu²⁺、Hg²⁺、Ca²⁺、Pb²⁺等),其原理是重金属离子与蛋白质分子的阴离子形成不溶性的蛋白盐沉淀,必要条件是溶液 pH 要高于蛋白质的等电点(pI)。

(五) 尿液的制备

尿液成分及浓度生理变动较大。实验目的不同,可用不同的尿液。许多定性实验可用随时采取的一次尿样。清晨第一次尿样,比较稳定,也常采用。定量实验常需采用全日尿样。为防止采尿过程中及暂时保存中尿液成分发生变化,需要加适当的防腐剂,常用的有甲苯。

(六) 组织材料的处理

1. 动物的处理 一般常用打击头部使之急速死亡,鼠亦用脱颈椎法致死,必要时立即断头放血。致死后迅速取出所需组织,冰浴条件下做进一步处理。

2. 匀浆的制备 进行组织或细胞内酶活性的测定或某些成分的定量时多使用组织匀浆,常用研钵或电动匀浆器研磨。制备匀浆并提取组织成分常用的溶液有生理盐水、缓冲液等。在分析酶活性或某些易变物质(如 ATP 等)或分离细胞内各组分进行研究时,特别要注意保持冰浴条件,迅速处理。

3. 沉淀的分离 常用过滤法和离心法。

五、台式离心机的使用

(一) 离心分离物质的原理

利用物质的质量、密度形状等物理性状的差异,在一定介质中,通过离心力场作用使物质沉降的过程称为离心。

离心力(G):是离心场中某一点的角速度(ω ,弧度/秒)平方与该点到转轴之间距离(半径 r ,cm)的乘积:

$$G = \omega^2 r$$

其中,角速度 ω 可以每分钟的旋转次数表示,简称为 $r/\min$ (转数/分)或者 rpm ,每转一周的弧度为 2π ,即:

$$\omega = 2\pi \times \text{rpm} / 60$$

那么

$$G = (2\pi \times \text{rpm})^2 \times r / 3600$$

一般离心力的大小以相对于重力常数 $g(980\text{cm/s}^2)$ 的倍数表示,称为相对离心力(RCF),单位为 g ,即:

$$\begin{aligned} \text{RCF} &= (2\pi \times \text{rpm})^2 / (3600 \times 980) \times r \\ &= 1.12 \times 10^{-5} \times (\text{rpm})^2 \times r \end{aligned}$$

对于在离心转头中旋转的样品,估算其所受到的相对离心力需要考虑样品到旋转中心和固定距离(r)。由于转头的形状及设计,离心管中从管顶至管底各点到旋转中心的距离是不同的,为了计算,相对离心力的数值可用平均相对离心力(RCF 平均)来表示,即同一离心转头顶部和底部所受离心力的平均值。因此,最重要的将是确定半径(r)的数值。

(二) 台式离心机使用的规程

(1) 离心前先将盛有样品的离心管(或试管)和套管在台秤上平衡,调节双方重量相等,否则当离心机转动时容易受损。

(2) 双方平衡后,分别放在离心机转盘的对称两孔洞内。

(3) 检查电源的电压,插好插头,开动开关,然后转动速度调节器,逐步缓慢地增加转速以达到所需要的速度。在转动时,离心机机身应稳,声音均匀,如有机身不稳或声音异常,表示对称两管的重量不等,应立即停止离心。

(4) 离心时间到时,先逐步减慢速度,转动调节器到“停”或“0”,然后关闭开关,让其自行停止,严禁用手强制使其转动停止(能自动控制工作时间的台式电动离心机,工作到预定时间并发出讯响后,离心机自动地停止运转)。

(5) 最后将离心管取出,离心套管倒置于固定架内。

第二章 分光光度法

根据物质对光的吸收特性和吸收强度,对物质进行定性和定量的分析方法,称为分光光度法(spectrophotometry)。分光光度法和比色分析法都是光吸收方法。比色分析法用光电比色计进行测定,由滤光板来获得近似的单色光,波长范围宽达 30 ~ 50nm。分光光度法用分光光度计进行测定,以棱镜或光栅为分光器,获得单色光的波长范围一般都在 5nm 左右,因而测定的灵敏度、选择性和准确度都比光电比色法高。分光光度法根据光源和测定原理分为紫外分光光度法、可见光光度法和红外分光光度法等。在本章我们仅介绍分光光度法。

一、基本原理

分光光度法是利用物质对某种波长的光具有选择性吸收的特性建立起来的鉴别物质或测定其含量的一项技术。当一束单色光通过溶液时,一部分被吸收,另一部分则透过溶液。设入射光强度为 I_0 ,透射光强度为 I_t ,则透光度 $T = I_t/I_0$,吸光度(A)或光密度($O.D$)或称消光度(E)则可表示为 $A = -\lg T$ 。根据 Lambert-Beer 定律,吸光度与溶液的浓度成正比,与光束通过溶液的距离(即光程)成正比,用数学表达式表示为:

$$A = KLC$$

式中 C 代表该物质的浓度, L 代表光程,一般以 cm 表示, K 为消光系数或吸光系数,在一定温度下,对于同一物质和一定波长的入射光而言,是一个常数。当 C 以 mol/L 表示时, K 为摩尔消光系数或摩尔吸光系数,用 ϵ 表示,即当溶液浓度为 1mol/L,光程为 1cm 时所测得的一定波长下的吸光度,其单位是 $L/(\text{mol} \cdot \text{cm})$;当 C 以质量体积浓度(g/100ml)表示时,吸光系数称为百分吸光系数,用 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 表示,单位是 $\text{ml}/(\text{g} \cdot \text{cm})$ 。

由于单色光透过溶液时,不仅被待测物质所吸收,而且还被比色容器与溶剂以及其他试剂吸收一部分,这部分需用空白管消除(空白液的做法即用与样本相同的一切试剂,而不含被测定的物质)。

二、波长的选择

波长的选择一般是选择待测物质最大吸收峰的波长($\lambda_{\max}$)。因在 $\lambda_{\max}$ 测定吸光度,敏感度最高(图 1-2-1)。在吸收峰波长处测吸光度,波长变化影响最小(图 1-2-1, A 带);而在其他波长处(图 1-2-1, B 带),波长变化对吸光度影响大,甚至测得浓度-吸光度曲线不呈直线。

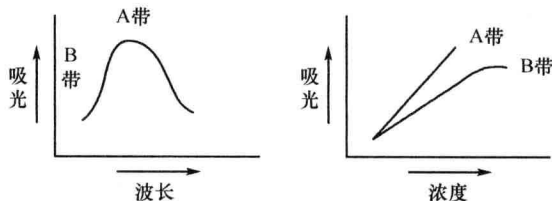


图 1-2-1 波长与吸光度的关系

选择测定某一溶液所需的波长,是可以利用不同的波长做该溶液的吸收光谱曲线,从曲线上选择最适当的波长来进行这一溶液的测定工作。但是,在分析工作中,尚有个别情况,不能单凭此一原则,而应根据下列三个原则,进行实际试测,然后全面考虑利弊,再行选定。

(1) 应使被测溶液有适当的光密度。一般而言,适当的光密度为 $0.1 \sim 0.7$,而以 $0.2 \sim 0.6$ 最理想。过低的光密度因仪器的读数误差而产生很大的相对误差;反之,过高的光密度则往往已超过直线范围而引入误差。

(2) 应使干扰影响降低至最低限度。在反应中,如遇不易去除的干扰色泽,应选用对此干扰色泽最不灵敏的波长。

(3) 应使标准曲线在尽可能大的范围内接近直线。

三、标准曲线的绘制

(一) 标准曲线的作用

(1) 标准曲线又称校正曲线或工作曲线,它是比色分析法中不可缺少的步骤。从浓度-光密度直线的直线特性,可以判断所采用方法的呈色反应是否符合 Lambert-Beer 定律。

(2) 做多次平行测定绘制标准曲线,可判断在整个测定过程中操作、仪器等误差的大小,从而确定该测定方法的可靠性。

(3) 从绘制标准曲线的斜率可以比较各种方法的灵敏度。

(4) 当进行大批样品分析时,可省略多次计算,从光密度值直接查阅标准曲线而求得被测物质的浓度。

(二) 标准曲线的作法

(1) 标准液浓度的选择:在制备标准曲线时,标准液浓度选择一般应能包括待测样品的可能变异最低与最高值,一般可选择 5 种浓度。浓度差距最好是成倍增加或等级增加,并应与被测液同样条件下显色测定。

(2) 标准液的测定:在比色时,读取光密度至少读 $2 \sim 3$ 次,求其平均值,以减少仪器不稳定而产生的误差。

(三) 标准曲线图的绘制

一般常用的是光密度-浓度标准曲线。

(1) 用普通方格纸作图。图纸最好是正方形(长:宽=1:1)或长方形(长:宽=3:2),以横轴为浓度,纵轴为光密度。一般浓度的全距占用了多少格,光密度的全距也应占用相同的格数。

(2) 绘制标准曲线时,以浓度位置向上延长,光密度位置向右延长、交点即为此坐标标点。然后,将各坐标点和原点联成一条线,若符合 Lambert-Beer 定律,则系通过原点的直线。

(3) 若各点不在一直线,则可通过原点,尽可能使直线通过更多点,使不在直线上的点尽量均匀地分布在直线的两边。

(4) 标准曲线绘制完毕以后,应在坐标纸上注明实验项目的名称,所使用比色计的型号和仪器编号、滤光片号码或单色光波长以及绘制的日期、室温。

(5) 绘制标准曲线:一般应进行 2 次或 3 次以上的平行测定,重复性良好曲线方可

应用。

(6) 绘制好的标准曲线只能供以后在相同条件下操作测定相同物质时使用。更换仪器、移动仪器位置、调换试剂及室温有明显改变时,标准曲线需重新绘制。

四、待测溶液浓度的计算

(一) 利用标准管法计算待测溶液的浓度

在同样实验条件下,同时测得标准管和待测管的吸光度值,然后进行计算。根据 Lambert-beer 定律。

标准管:

$$A_s = KC_s L (s: \text{标准液})$$

待测管:

$$A_x = KC_x L (x: \text{待测液})$$

两种溶液的液层厚度相等,温度相同,测定同一物质,所用单色光相同, K 值相同,则两式相比得:

$$\frac{A_s}{A_x} = \frac{C_s}{C_x}$$

即:

$$C_x = \frac{A_x}{A_s} \cdot C_s$$

在实际操作中,有时需要求待测液的含量,为计算简便,常使待测管体积与标准管体积相等(以 X 代表测定管含量, S 代表标准管含量)则:

$$X = \frac{A_x}{A_s} \cdot S$$

计算待测溶液浓度时,可根据测定时实际吸取的标准液的体积(V_s)和待测样品的体积(V_x)。

待测溶液浓度:

$$C_x = \frac{A_x}{A_s} \cdot C_s \cdot \frac{V_s}{V_x}$$

(二) 利用标准曲线进行换算

先配制一系列已知不同浓度的标准溶液。按测定管同样方法处理显色,分别读取各管光密度,以各管光密度为纵轴,各管浓度为横轴,在方格坐标纸上作图得标准曲线,以测定管光密度,从标准曲线上可求得测定物的浓度。

(三) 利用吸光系数(消光系数)求出待测溶液的浓度

根据 Lambert-Beer 定律:

$$A = KLC$$

K 是比例常数,又称为吸光系数或消光系数,其值取决于入射光的波长,溶液的性质和液层的厚度以及溶液的温度等有关。

K 的单位随 L 、 C 所用的单位不同而不同:若 C 为 1% (g/ml), L 为 1cm,此时的 K 值称为百分吸光系数用 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 表示,即: