



高等医学教育课程创新
纸数融合系列教材

生物化学与 分子生物学实验

张云武 ▶ 主审
郑红花 苏振宏 ▶ 主编

SHENGWU HUAXUE YU

FENZI SHENGWUXUE SHIYAN



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

高等医学教育课程创新纸数融合系列教材
供临床、预防、基础、急救、全科医学、口腔、麻醉、影像、
药学、检验、护理、法医、生物工程等专业使用

生物化学与分子生物学实验

主 审 张云武
主 编 郑红花 苏振宏
副主编 邓秀玲 徐世明 李华玲 吴 宁
编 者(以姓氏笔画为序)

王 凡 首都医科大学燕京医学院
邓秀玲 内蒙古医科大学
叶纪诚 内蒙古医科大学
苏振宏 湖北理工学院
李华玲 扬州大学
杨愈丰 遵义医科大学珠海校区
吴 宁 贵州医科大学
张 弦 厦门大学
郑红花 厦门大学
钟 曦 贵州医科大学
姚劲松 湖北文理学院
袁 超 湖北理工学院
徐世明 首都医科大学燕京医学院
高 蕊 石河子大学
黄小花 厦门大学
龚莎莎 台州学院
葛振英 河南大学
鄢 雯 首都医科大学燕京医学院

华中科技大学出版社
中国·武汉

内 容 简 介

本书是高等医学教育课程创新纸质融合系列教材。全书共分为四章,内容包括概述、生物化学与分子生物学实验基本理论技术、生物化学与分子生物学基础实验项目、生物化学与分子生物学综合性和创新性实验项目。

本书根据最新教学改革的要求和理念,结合我国高等医学教育发展的特点,按照相关教学大纲的要求编写而成。本书结合医学院校特色,将生物化学与分子生物学实验内容与理论知识和临床实践紧密结合,加深学生对理论知识的理解和运用。

本书可供临床、预防、基础、急救、全科医学、口腔、麻醉、影像、药学、检验、护理、法医、生物工程等专业使用。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验/郑红花,苏振宏主编. —武汉:华中科技大学出版社,2020.6
ISBN 978-7-5680-6256-5

I. ①生… II. ①郑… ②苏… 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(2020)第 094257 号

生物化学与分子生物学实验
Shengwu Huaxue yu Fenzi Shengwuxue Shiyān

郑红花 苏振宏 主编

策划编辑:周琳

责任编辑:李佩

封面设计:原色设计

责任校对:阮敏

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉) 电话:(027)81321913

武汉市东湖新技术开发区华工科技园 邮编:430223

录排:华中科技大学惠友文印中心

印刷:武汉市籍缘印刷厂

开本:880mm×1230mm 1/16

印张:11.75

字数:324千字

版次:2020年6月第1版第1次印刷

定价:32.00元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

高等医学教育课程创新纸数融合系列教材 编委会



丛书顾问 文历阳 秦晓群

委 员 (以姓氏笔画排序)

马兴铭	兰州大学	张悦	河西学院
王玉孝	厦门医学院	张云武	厦门大学
化兵	河西学院	赵玉敏	桂林医学院
尹平	华中科技大学	赵建龙	河南科技大学
卢小玲	广西医科大学	赵晋英	邵阳学院
白虹	天津医科大学	胡东生	深圳大学
刘立新	首都医科大学燕京医学院	胡煜辉	井冈山大学
刘俊荣	广州医科大学	姜文霞	同济大学
刘跃光	牡丹江医学院	姜志胜	南华大学
孙连坤	吉林大学	贺志明	邵阳学院
孙维权	湖北文理学院	秦伟	遵义医科大学
严金海	南方医科大学	钱中清	蚌埠医学院
李君	湖北文理学院	徐世明	首都医科大学燕京医学院
李梅	天津医科大学	黄涛	黄河科技学院
李文忠	荆楚理工学院	黄锁义	右江民族医学院
李洪岩	吉林大学	扈瑞平	内蒙古医科大学
吴建军	甘肃中医药大学	赖平	湖南医药学院
沙鸥	深圳大学	潘爱华	中南大学
张忠	沈阳医学院		

编写秘书 周琳 陆修文 蔡秀芳

网络增值服务使用说明

欢迎使用华中科技大学出版社医学资源网yixue.hustp.com

1. 教师使用流程

(1) 登录网址: <http://yixue.hustp.com> (注册时请选择教师用户)



(2) 审核通过后, 您可以在网站使用以下功能:



2. 学员使用流程

建议学员在PC端完成注册、登录、完善个人信息的操作。

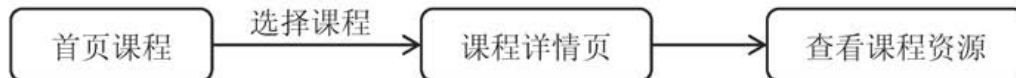
(1) PC端学员操作步骤

① 登录网址: <http://yixue.hustp.com> (注册时请选择普通用户)

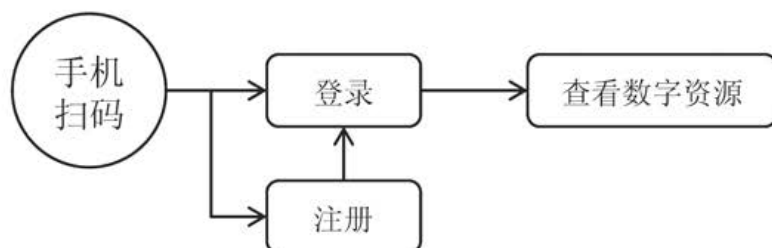


② 查看课程资源

如有学习码, 请在个人中心-学习码验证中先验证, 再进行操作。



(2) 手机端扫码操作步骤



总序

Zongxu

《国务院办公厅关于深化医教协同进一步推进医学教育改革与发展的意见》指出：“医教协同推进医学教育改革与发展，加强医学人才培养，是提高医疗卫生服务水平的基础工程，是深化医药卫生体制改革的重要任务，是推进健康中国建设的重要保障”“始终坚持把医学教育和人才培养摆在卫生与健康事业优先发展的战略地位。”我国把质量提升作为本科教育发展的核心任务，发布落实了一系列政策，有效促进了本科教育质量的持续提升。而随着健康中国战略的不断推进，我国加大了对卫生人才培养支持力度。尤其在遵循医学人才成长规律的基础上，要求不断提高医学青年人才的创新能力和实践能力。

为了更好地适应新形势下人才培养的需求，按照《国务院办公厅关于深化医教协同进一步推进医学教育改革与发展的意见》《国家中长期教育改革和发展规划纲要（2010—2020年）》《国家中长期人才发展规划纲要（2010—2020年）》等文件精神要求，进一步出版高质量教材，加强教材建设，充分发挥教材在提高人才培养质量中的基础性作用，培养医学人才。在认真、细致调研的基础上，在教育部相关医学专业专家和部分示范院校领导的指导下，我们组织了全国50多所高等医药院校的近200位老师编写了这套高等医学教育课程创新纸数融合系列教材，并得到了参编院校的大力支持。

本套教材充分反映了各院校的教学改革成果和研究成果，教材编写体系和内容均有所创新，在编写过程中重点突出以下特点。

- (1) 教材定位准确，突出实用、适用、够用和创新的“三用一新”的特点。
- (2) 教材内容反映最新教学和临床要求，紧密联系最新的教学大纲、临床执业医师资格考试的要求，整合和优化课程体系 and 内容，贴近岗位的实际需要。
- (3) 以强化医学生职业道德、医学人文素养教育和临床实践能力培养为核心，推进医学基础课程与临床课程相结合，转变重理论而轻临床实践、重医学而轻职业道德和人文素养的传统观念，注重培养学生临床思维能力和临床实践操作能力。
- (4) 问题式学习(PBL)与临床案例相结合，通过案例与提问激发学生学习的热情，以学生为中心，利于学生主动学习。

本套教材得到了专家和领导的大力支持与高度关注，我们衷心希望这套教材能在相关课程的教学中发挥积极作用，并得到读者的青睐。我们也相信这套教材在使用过程中，通过教学实践的检验和实际问题的解决，能不断得到改进、完善和提高。

高等医学教育课程创新纸数融合系列教材
编写委员会

前言

Qianyan

生物化学与分子生物学是当今进展较为迅速的学科领域,也是 21 世纪生命科学的领头学科,新的技术方法日新月异。生物化学与分子生物学运用化学、物理和生物学的理论和方法从分子水平研究生命现象和本质。生物化学与分子生物学实验技术是医学生实验技能与创新素质培养不可缺少的一个重要环节,是帮助学生掌握基本实验技能、提高学生独立思考和分析能力的重要手段,是培养学生严谨科研作风和良好科研思维的重要途径。

当前的生物化学与分子生物学实验教材多为各高校自主编写的实验教材,虽各有特色,但无法广泛在各个高校中应用。为此,借华中科技大学出版社牵头组织出版高等医学教育课程创新纸数融合系列教材之机,由厦门大学、首都医科大学燕京医学院、河南大学、内蒙古医科大学、湖北文理学院、贵州医科大学、遵义医科大学珠海校区、湖北理工学院、石河子大学、扬州大学、台州学院等全国十余所医学院校,结合生物化学与分子生物学的最新进展,共同编写了生物化学与分子生物学实验教材。本教材结合医学院校特色,将生物化学与分子生物学实验内容与理论知识和临床实践紧密结合,加深学生对理论知识的理解和记忆,同时通过对本课程的学习,使他们能够具备一定的科研能力和养成良好的科研习惯,使他们能够运用生物化学与分子生物学的理论和技术手段,联系临床实践,从分子水平上认识、诊断和治疗人类疾病。

本教材以生物化学与分子生物学的基本技术为主线,突出介绍常用基本技术、基本原理和操作,适当介绍一些与医学有关的生物化学及分子生物学新技术、新进展;同时还包含与临床检验密切相关的实验内容以及与大学生创新性实验项目相结合的课题设计。本书将适当采用二维码嵌入丰富的数字化资源,如思考题答案。通过手机扫描二维码即可展示数字化实验教学资源,可充分拓展教学内容,提供便捷的立体阅读体验以及创新实验教材模式。本书的两大亮点:其一为加入大学生创新性实验的设计与实施;其二为配备丰富的数字化资源,旨在加强学生基本技能的训练,提高学生动手能力,培养其科学思维。因此,本书除可作为本科医学专业的教学用书外,也适合医学类研究生作为基础实验操作流程参考书目。

本书内容主要包括生物化学与分子生物学实验基本要求、基本理论技术、基础实验和创新性实验共四部分。基本要求主要包括生物化学与分子生物学实验课程的性质、目的和任务,实验室规则、实验样品的制备和保存,创新性实验课题的设计等;基本理论技术主要包括分光光度技术、层析技术、电泳技术、离心技术等四大基本技术,以及印迹技术、PCR 技术、基因编辑技术、原位杂交技术、微透析技术、ELISA 技术等常用技术;教学实验主要包括基础实验与综合性和创新性实验等部分,其中基础实验分为生物大分子的提取和理化特性分析、酶动力学测定和临床生化检验三部分。

参与本书编写的均为具有丰富教学经验的一线科研教学人员,由于编者水平有限,错误之处在所难免,恳请各位读者批评指正,提出宝贵意见和建议。

本书中的原创视频由厦门大学 2016 级临床医学专业本科生杨干、黄俊洁、张梦雨等同学制作完成。该视频制作获得厦门大学创新创业训练计划项目(2019Y1209)支持,在此一并表示衷心的感谢!

编者

目录

Mulu



第一章 概述	/1
第一节 实验课程的性质、目的和任务	/1
第二节 实验室规则与基本要求	/2
第三节 常用实验用品的洗涤与使用	/4
第四节 实验样品的制备和保存与常规操作技术	/7
第五节 实验报告的书写	/10
第六节 创新性实验课题的设计	/12
第二章 生物化学与分子生物学实验基本理论技术	/14
第一节 分光光度技术	/14
第二节 层析技术	/18
第三节 电泳技术	/23
第四节 离心技术	/30
第五节 印迹技术	/34
第六节 PCR 技术	/35
第七节 基因编辑技术	/39
第八节 原位杂交技术	/44
第九节 微透析技术	/46
第十节 ELISA 技术	/51
第三章 生物化学与分子生物学基础实验项目	/54
第一节 生物大分子的提取和理化特性分析	/54
第二节 酶动力学测定	/77
第三节 临床生化检验	/96
第四章 生物化学与分子生物学综合性和创新性实验项目	/124
第一节 微透析和氨基酸薄层层析	/124
第二节 基因重组实验	/129
第三节 目的基因的诱导表达与鉴定	/152
第四节 RNA 干扰实验	/157
第五节 原位杂交实验	/161
附录 A 常用缓冲液的配制	/164
附录 B 常用生物化学与分子生物学学习和工具网站	/176
参考文献	/177

第一章 概述

| 第一节 实验课程的性质、目的和任务 |

生物化学与分子生物学是 21 世纪生命科学的领头学科,其理论与基本实验技术已广泛应用于生命科学的各个领域,通过运用化学、物理和生物学的理论和方法从分子水平研究生命现象和本质,即研究生物体的分子结构与功能、物质代谢与调节。生物化学和分子生物学所阐述的是人体化学物质组成、物质代谢及其调控过程、基因表达及其调控过程,以及代谢、表达、调控等异常情况下与疾病发生之间的关系等内容。随着现代科学的迅速发展,生物化学与分子生物学的课程已经从以物质代谢为中心的传统教学模式转移到以基因信息传递为中心的现代分子生物学的新型知识框架,为此,生物化学与分子生物学的教学除了讲解物质代谢之外,还应重点介绍分子生物学的基本知识和实验技能,介绍生物大分子的结构与功能的关系,基因信息传递。因此生物化学与分子生物学实验教学是医学生实验技能与创新素质培养不可缺少的一个重要环节,是帮助学生掌握基本实验技能,提高学生独立思考和分析能力的重要手段,也是培养学生严谨科研作风和良好科研思维的重要途径,学习和掌握生物化学与分子生物学实验技术不仅是医学生的必备能力,更是实施创新教育的重要手段。

生物化学与分子生物学实验是一门实践性与应用性很强的学科,属于医学教育的主干课程,在医学教学过程中具有重要地位,它不仅为基础医学其他学科的迅速发展创立了条件,也为临床医学的研究和进步奠定了基础。生物化学与分子生物学实验课程可帮助同学们掌握生物化学和分子生物学的基本实验技能、操作技术,如进行蛋白质、核酸等生物大分子的提取和鉴定,检测酶的活性,分、切、接、转、筛等基因工程基本技术的学习,在此过程中培养学生动手能力、科研基本技能、发现问题和解决问题能力,以及科学的思维方式。

(厦门大学 郑红花)



| 第二节 实验室规则与基本要求 |

实验室是学生进行技能训练、开展科技活动的重要场所。为保证实验教学安全有序地进行,特制订相关实验室规则与基本要求,每一位进入实验室的人员都必须严格遵守。



生化
实验须知

1.2.1 严守规范

每位进入实验室的人员均应穿实验工作服,视不同实验要求决定是否需要戴口罩和帽子;不穿高跟鞋、不穿露脚趾的鞋子进实验室;不披头散发进入实验室;自觉维护实验室秩序,保持室内安静,不高声交谈,以免影响他人;不带食物或饮料进实验室,不玩手机;不做任何与实验无关的事情。

学生在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、操作方法和步骤等详细地写在记录本中。实验过程中要认真听讲,听从教师指导,严格按操作规程进行实验。实验过程中应简要、准确地及时将实验观察到的现象、实验结果或数据记录在实验记录本上。实验结束后经教师检查同意,方可离开实验室。同时要认真写好实验报告,不得抄袭或臆造,并及时上交。

1.2.2 整洁有序

保持环境和仪器的整齐清洁是做好实验的重要条件,也是每个实验者必须养成的工作习惯。实验室地面、实验台面和试剂药品架上都必须保持干净,严禁随地吐痰、乱抛纸屑杂物等;仪器、药品摆放有序,不随意搬动实验仪器设备、器皿、药品等;不要把试剂、药品洒在实验台面和地上;不可随意丢弃废液,应倒入指定废液缸内,特别是强酸强碱等腐蚀性或挥发性液体;不可把胶、滤纸等固体或半固体物质倒进水槽内。实验完毕后需将仪器洗净收好,药品试剂按原位摆放整齐,及时清点所有物品用具。离开实验室前,要把实验台面和地面抹擦干净,将桌椅摆放整齐,确保实验室整齐清洁后才能离开。

1.2.3 药品使用

(1) 使用药品试剂必须注意节约,杜绝浪费,要特别注意保持药品和试剂的纯净。药品用后须立即将瓶盖塞紧放回原处,从瓶中取出的试剂、标准溶液等,如未用尽切勿倒回瓶内,避免混杂与污染。

(2) 任何装有化学药品的容器都必须贴上标签,注明其名称、浓度、pH(如有)、配置者及配制时间。

(3) 在使用任何化学药品前,一定要熟知该化学药品的性质。

(4) 在使用任何化学药品时,一定要穿工作服,必要时应佩戴个人防护用品,如防护服、防护手套等。使用时务必小心仔细。

1.2.4 仪器使用

各种仪器用具均应注意爱护,按操作规程细心使用,防止损坏。使用分析天平、分光光度计和电动离心机、PCR仪等贵重精密仪器时,要严格遵守操作规程,发现故障应立即报告教师,不要自己动手检修,要爱护公共财产,厉行节约。若因违反操作规程或不听从教师指导而造成损坏的,应给予一定赔偿。

1.2.5 注意安全

为了有效地维护实验室安全,保证实验正常进行,特作出以下要求。

- (1) 实验完毕后要严格做到关闭火源。
- (2) 勿使乙醚、丙酮、醇类等易燃液体接近火焰,蒸发或加热此类液体时,必须在水浴上进行,切勿用明火直接加热。
- (3) 比水轻且不与水相混溶的物质(如醚、苯、汽油等)着火时,应迅速用湿毛巾覆盖火焰,以隔绝空气使其熄灭,绝不能用水直接灭火,以免火焰蔓延;对于易与水混溶的物质(如乙醇、丙酮等)着火时,可用灭火器扑灭。
- (4) 对于有毒或有腐蚀性的药品,不可直接用手拿取,不可将试剂瓶直接对准鼻子嗅闻,更不可品尝药品味道。吸取有毒试剂、强酸和强碱时,均应用移液管及洗耳球,严禁用口吸取。
- (5) 离开实验室时,要关好水龙头,拉下电闸,锁好门窗,认真负责地进行检查,严防发生安全事故。
- (6) 每次实验课由班长安排同学轮流值日,值日生要负责当天实验室的卫生、安全和一切服务性工作。

1.2.6 意外事件处理

- (1) 发生可控制的火灾时,使用附近的灭火器,应注意灭火器的类型,按以下步骤进行操作:揭开环状保险栓,挤压杠杆,将喷嘴对火苗底部喷射。
若是衣服着火,可用湿布掩盖,以达到窒息火苗的目的;若是电线失火,应立即关闭电源,并迅速向实验室负责人报告。
- (2) 当发生无法控制的火灾时,应立即通知实验室其他人员,撤离人员、重要物资等;离开实验室时应关掉所有电源,并立即拨打火警电话。
- (3) 当发生人身意外伤害时,需要立即送医,并报告实验室安全负责人。

(厦门大学 郑红花)



| 第三节 常用实验用品的洗涤与使用 |

1.3.1 玻璃仪器的清洁

玻璃仪器的清洁与否直接影响实验结果的准确性,因此,工作室的清洁非常重要,是实验的前提和基本要求。

1. 新购买的玻璃仪器的洗涤

新购买的玻璃仪器附着有碱性物质,需先用肥皂水或去污粉等洗涤,再用自来水冲洗,然后浸泡在稀盐酸溶液中至少 4 h,再用自来水冲洗,最后用蒸馏水冲洗 2~3 次,置于烘箱内烘干备用。

2. 使用过的玻璃仪器的洗涤

1) 一般仪器

烧杯、试管、离心管等普通玻璃仪器,可直接用毛刷洗净,然后用自来水冲洗,直至容器内不挂水珠。最后用少量蒸馏水冲洗内壁 2~3 次,倒置晾干。

2) 容量分析仪器

容量瓶、滴定管及吸管等容量分析仪器,用后自来水多次冲洗,如已清洁(壁不挂水珠),再用少量蒸馏水冲洗 2~3 次晾干备用。若仍不干净附有油污等,则须干燥后放入铬酸洗液中浸泡数小时,然后倒净(或捞出)洗液,用自来水充分冲洗至不显黄色后再冲几次,最后用少量蒸馏水冲洗 2~3 次晾干备用。

在做酶学实验时,对仪器的清洁要求更高,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,仪器经上述方法洗涤后,还需用稀盐酸或稀硝酸洗涤,以除去铬及其他金属离子,然后再用蒸馏水冲洗。生化实验室常用的洗液有以下几种。

(1) 铬酸洗液:最常用的洗液,由重铬酸钾、粗硫酸及水配制而成,去污力强,清洗效果好。其配制方法有多种,可根据需要进行选择,常用的配方如下表。

重铬酸钾/g	100	60	100
水/mL	750	300	200
粗硫酸/mL	250	460	800
清洁性能	较弱	较强(常用)	最强

配制方法:先将重铬酸钾溶于水,再慢慢加入浓硫酸。因配制过程中产生大量热,容器需放入冷水中,边加硫酸边搅动混合。由于产热量很大,使用玻璃容器有破裂的危险,所以最好用耐高温的陶瓷或耐酸的搪瓷容器。洗液可多次反复使用,如效力变弱,可加入少量重铬酸钾及浓硫酸继续使用,但如果变为绿色,则不宜再用。

(2) 10% 尿素液:蛋白质的良好溶剂,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。

玻璃仪器的干燥方法可根据仪器的种类而定。一般来说,洗净后的玻璃仪器,如不急用,应倒放在晾架上令其自然干燥。若有急用,可放在烘烤箱中烘干,但容量分析仪器,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。此类仪器,如急用可采用水泵抽气法干燥。

1.3.2 常用玻璃仪器的使用

1) 吸量管

吸量管是用来测量一定容积的液体,并把它从一个器皿转移至另一个器皿中的量器。常用的吸量管有以下几种。

(1) 刻度吸量管:刻度吸量管是多刻度吸量管,有0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mL等规格。吸量管刻度所标的数字有自上而下和自下而上两种,使用之前应仔细分辨。

实验室所用的刻度吸管上端有标记“吹”字的,属于刻度到尖端的吸管,所以要用洗耳球吹出尖端留存的液体;如果所用的刻度吸管上没有标记“吹”字的,则不需将尖端残留液体吹出。

(2) 奥氏吸管:在量取黏度较大的液体如血液、血清等时,应当使用奥氏吸管。这种吸管也是单标的,并且在其下端有一个膨大部分。所以液体与吸管表面接触面积较小,当量取血液时,较其他吸管准确。奥氏吸管的容量包括遗留在尖端的液体,故在缓缓使液体流出后,需停留数秒钟,吹出最后一滴。在学生实验中常用的有1、2、5 mL等规格。

吸量管使用法:使用吸量管时,用拇指和中指靠近顶端部分。将管的下端插入液体里,用吸球吸入液体至需要刻度的标线上1~2 cm处(插入液面下的部分不可太深,以免管的外壁沾附的溶液太多;也不可太浅,防止空气突然进入管内,将溶液吸入吸球内),将已充满液体的吸量管提出液面,用小片滤纸揩去管外沾附的溶液,把吸管提到与眼睛在同一水平线上。然后小心松开上口,按所需要液体容积缓缓自由流出。最后再根据规定吹出或者不吹出尖端的一滴。

2) 微量加样器

有些实验(如酶实验)对试剂的用量要求非常严格,其正确使用和准确加样直接影响实验结果。微量移液器是一种在一定范围内可随意调节容量的精密取液装置(俗称移液枪),实验室中常用的微量移液器是空气垫加样器,其基本原理是依靠装置内活塞的上下移动,活塞的移动距离是由调节轮控制螺杆结构实现的,推动按钮带动推动杆使活塞向下移动,排除活塞腔内的气体。松手后,活塞在复位弹簧的作用下恢复原位,从而完成一次吸液过程。



微量移液器的使用方法及注意事项

(1) 微量加样器标准使用方法如下。

- ①用大拇指轻轻按到第一挡,吸头垂直浸入液面下几毫米。
- ②大拇指缓慢松开控制按钮,使液体缓慢进入吸头。
- ③吸头贴壁并有一定角度,大拇指轻轻按压打出液体,先按到第一挡,稍微停顿1 s后,待剩余液体聚集后,再按到第二挡将剩余液体全部压出。

(2) 微量加样器使用过程中的注意事项如下:

- ①勿将移液枪浸入溶液中;
- ②转移挥发性液体,如醋酸、盐酸、乙醇、电泳染色液、脱色液时,要使用移液管;
- ③不可吸取温度过高的液体(大于70 ℃),以免蒸汽浸入枪体腐蚀活塞;
- ④套有吸头的移液枪,不论吸头中是否有液体,都应保持枪体垂直,切勿倾斜、平放或倒置,谨防液体流入活塞室腐蚀活塞;
- ⑤移液枪操作时姿势要正确,不要时刻紧握移液枪;
- ⑥前进移液法中吸液时用大拇指将按钮按下至第一停点,然后轻轻松开按钮回原点,并观察液体吸取;
- ⑦移液枪使用完毕后须将量程调至最大刻度,垂直挂在枪架上;
- ⑧如果发现枪体污染,或在操作过程中出现液体进入枪体的情况,应及时报告老师。



 NOTE

3) 容量瓶及量筒

容量瓶是一个细长颈梨形的平底瓶,带有磨口塞,颈上有标线,表示在所示温度下(一般为 20°C)当液体充满到标线时,液体体积恰好与瓶下所注明的体积相等。容量瓶有10、25、50、100、200、250、500、1000、2000毫升等规格。

容量瓶是装量型的定量容器,多用作稀释溶液或配制精确试剂。当将液体加至刻度后须用瓶塞塞好,颠倒混匀数次方可使用。

容量瓶是较精确的定量容器,不得直接加热或烘烤,也不应将盛有溶液的容量瓶放入冰箱内。当配制溶液需要加热促其溶解时,必须在烧杯中加热溶解,并待溶液达到室温后,再定量地转入容量瓶内,然后稀释到刻度,并注意摇匀。

当所量取的液体量要求不十分精确时,可使用量筒,因其较使用吸管或量瓶更为简便,量筒底座及筒身是焊接在一起的,因而不能量取过热液体,更不能直接加热,以防炸裂。

4) 滴定管

滴定管可用于容量分析滴定,有带玻塞及橡皮管两种类型。前者用于量酸,后者用于量碱。

滴定管有刻度较精细的微量滴定管,有1.0、2.0、5.0、10 mL等规格。还有25、50、100 mL等规格的常量滴定管。使用滴定管应该注意以下事项。

(1) 检查是否清洁干燥,是否漏水,玻塞是否滑润,如有漏水或转动不灵,应拆下活塞重新涂抹凡士林。涂抹前要将玻塞擦干,用手指取少量凡士林在活塞两头各擦一薄层,将活塞插入槽内,然后向同一方向转动活塞,直到从外面看时,全部透明为止。油涂好后,在活塞的小头的槽上套一橡皮圈,以防活塞滑脱。

(2) 使用前必须确定每一格表示多少毫升。先用少量滴定液清洗滴定管2~3次,方可装液。装液体后,管内如有气泡必须排出。

(3) 滴定前先应读取起始点。滴定时,左手控制玻塞,右手持瓶,边滴边摇,密切注意被滴定溶液的颜色变化。

(4) 装置滴定管时,管身必须与地面垂直。读数时眼睛与溶液月形面下缘在同一水平线上,不要仰头或低头读数。

(5) 如用酸式滴定管装碱性溶液,滴定后应立即洗净,以免活塞粘连。

(厦门大学 郑红花)

| 第四节 实验样品的制备和保存与常规操作技术 |

1.4.1 实验样品的制备

在生物化学与分子生物学实验中,无论是分析组织中各种物质的含量,还是研究组织中物质代谢的过程,抑或是进行基因工程操作,皆需利用特定的生物样品。为了达到一定的实验目的,往往需要将获得的样品预先做适当的处理。掌握实验样品的正确处理方法乃是做好生物化学实验的先决条件。

基础生物化学与分子生物学实验中,最常用的动物或人体样品是全血、血清、血浆及无蛋白血滤液。组织样品则常用肝、脑、肾、胰、胃黏膜或肌肉等,实验时可制成组织匀浆、组织糜、组织切片或组织浸出液等形式。有关这些组织样品的制备方法,要点如下。

1. 全血的制备

无论是收集人还是一般动物的血液,均应注意仪器的清洁与干燥,同时也要及时加入适当的抗凝剂以防止血液的凝固。一般在血液取出后,迅速盛于含有抗凝剂的器皿中,同时轻轻摇动,使血液与抗凝剂充分混合,以免形成小凝块。取得全血如不立即进行实验,应储存于冰箱内。

各种抗凝剂都是从血液中除去 Ca^{2+} 以防止血液凝固,常用的抗凝剂有草酸盐、柠檬酸盐、氟化钠及肝素等,可视实验要求而选用。草酸盐与 Ca^{2+} 易成为草酸钙沉淀;柠檬酸与 Ca^{2+} 形成络盐;氟化钠与 Ca^{2+} 形成 CaF_2 。一般实验常用草酸盐作为抗凝剂,因为草酸盐溶解度大、用量少、性质稳定、价格低廉,但它不适用于血钙测定。由于柠檬酸盐对动物体无毒,若需将抗凝血回注动物体内时,宜用柠檬酸钠抗凝剂。氟化钠因兼有抗凝及抑制糖酵解之作用,故可用于血糖测定,但因其也能抑制脲酶,故用脲酶测定尿素时,则不能应用。肝素是生理抗凝剂,较为理想,但价格较贵。

抗凝剂的用量不应过多,否则影响实验结果。通常每毫升血液加 1~2 mg 草酸盐或 5 mg 柠檬酸钠或 5~10 mg 氟化钠,肝素仅需要 0.01~0.2 mg。通常先将抗凝剂配成水溶液,按所取血样的需要量加入试管或其他合适的容器中,一般取 0.5 mL 置于准备的器皿内,转动试管或容器使血液与抗凝剂均匀接触,在 100 °C 以下烘干(若为肝素则干燥温度在 30 °C 以下)。则抗凝剂在器皿壁上形成一层薄膜,使用时较为方便,效果较好。

2. 血浆的制备

将抗凝全血在离心机中离心,使血细胞和血小板下沉,如此所得的上清液即为血浆(plasma)。血浆制备的过程中应严格防止溶血,故要求在采取血液时所用的一切用具(注射器、针头、试管或其他盛器等)都需要清洁干燥,取得全血后要避免剧烈振摇。

3. 血清 (serum) 的制备

血清是血液凝固后所析出的草黄色液体。制备血清的方法很简单:采血后不加抗凝剂,在室温下放置 5~20 min 即自行凝固,通常约需 3 h,血块即收缩析出清亮的血清。制备血清时也要防止溶血,所需设备必须干燥;在血块收缩后应及早分离出血清。在进行酶活性测定时常用血清,以避免血浆中草酸盐或柠檬酸盐等抗凝剂对酶活性可能产生的影响。

4. 无蛋白血滤液

分析血液中许多成分时,也常除去蛋白质,制成无蛋白血滤液。如血液中的非蛋白氮、尿酸、肌酸等测定都需先把血液制成无蛋白血滤液后,再进行分析测定。蛋白质沉淀剂如钨酸、三氯醋酸或氢氧化锌皆可用于制备无蛋白血滤液,可根据不同的需要而加以选择。



NOTE

1.4.2 实验样品的保存

1. 血液样品的保存

采集的血液样品如不能及时进行实验,必须做适当的处理,防止其成分发生较大的变化。通常血清与血浆样品保存于密闭的试管中,存放于4℃冰箱内或冷冻。短时间(48 h)内全血样品应保存于4℃冰箱中,实验时,样品达到室温后颠倒数次,使血液充分混匀后,方可实验。如果样品能在24 h内送到实验室,可保存于4℃环境的保温箱中;如果样品24 h不能抵达或需送往外地实验室时,必须冷冻处理后并在低温下运送。如果长时间保存样品,应当保存于一80℃冰箱或液氮罐中。

2. 组织样品的保存

离体不久的组织在适宜的温度和pH等条件下,仍可以进行一定程度的物质代谢。因此在生物化学与分子生物学实验中,常用离体组织来研究各种物质代谢的途径与酶系的作用,也可以从组织中分离和提取DNA、RNA、酶及各种代谢物质。所以,如何处理动物组织使之符合实验要求,是生化实验中的基本操作之一。

动物各种组织器官离体过久都会发生变化,如一些酶久置后会变性失活;一些组织成分(如糖原、ATP等)在动物死亡后数分钟至十几分钟内,其含量即有明显降低。因此,利用离体组织进行代谢研究或作为提取材料时,必须迅速取出,并尽快提取和测定。宰杀动物放出血后,也可用冰冷生理盐水灌注脏器洗去血液,用滤纸吸干,即可作为实验材料。根据不同的实验目的,以不同方法,制成不同的组织样品。

不同使用目的的标本保存时间有所差异。用于科学研究的标本,在新鲜取材后,先用液氮冷冻,再置于一80℃冰箱中保存。依据不同的科研需要确定标本的保存时间。一般用于DNA和RNA提取及其他分子生物学研究的标本需要将组织切割成直径小于1 cm的组织块,然后冷冻。有条件的实验室,也可将标本置于一150℃或-196℃液氮中长期保存。用于普通染色观察的标本,以4%甲醛溶液常温固定,一般可以保存1个月。用于教学的标本,先暴露最显著病变部位,然后进行固定,可长期保存。

1.4.3 常规实验操作技术

1. 混匀法

欲使某一化学反应充分进行,必须使反应体系内各种物质迅速地相互接触,因此除特别规定外,一般都需要将反应物彻底混匀。混匀方式大致有以下几种,可根据使用器皿的液体容量而选用。

- (1) 旋转混匀法:手持容器做离心旋转,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,右手食指轻击试管下部,使管内溶液做旋转流动。
- (3) 倒转混匀法:适用于有玻璃塞的瓶子,如容量瓶等。
- (4) 弹动混匀法: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:适用于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。

2. 保温与加热

为使某一化学反应在一定的温度下进行,常需要保温;为促进或停止化学反应,有时需要加热。

- (1) 保温:常用恒温箱或恒温水浴进行,后者的温度较前者稳定。



分析天平的
使用和溶
液的配制

(2) 加热:加热常用两种方法,一是直接把试管、烧杯等器皿在酒精灯、电炉或煤气火焰上加热;二是在水浴中加热或煮沸,应根据实验目的而定。

3. 过滤

过滤的目的是将沉淀与液体分开,可用滤纸、棉花、纱布等。生化实验中所进行的过滤,为了不改变溶液的浓度,一般不要用水湿润滤纸。过滤所用的滤纸常折成多褶状,以增大过滤面积。当过滤难滤物或为了加快速度时,可采用减压抽滤法。实验室中有时用离心法代替过滤。

(厦门大学 郑红花)

华中科技大学出版社