



21世纪高等教育精品教材

生物化学与分子 生物学实验

主 编 杨桂姣 单志强
副主编 马 丽 郭文婕
参 编 李斯琪 苗艳艳

汕头大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验 / 杨桂姣, 单志强主编

· 一 汕头: 汕头大学出版社, 2021. 1

ISBN 978-7-5658-4307-5

I. ①生… II. ①杨… ②单… III. ①生物化学—实验②分子生物学—实验 IV. ①Q5—33②Q7—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2021)第 021412 号

生物化学与分子生物学实验

SHENGWU HUAXUE YU FENZI SHENGWUXUE SHIYAN

主 编: 杨桂姣 单志强

责任编辑: 汪艳蕾

责任技编: 黄东生

封面设计: 易 帅

出版发行: 汕头大学出版社

广东省汕头市大学路 243 号汕头大学校园内 邮政编码: 515063

电 话: 0754-82904613

印 刷: 天津市蓟县宏图印务有限公司

开 本: 787mm×1092mm 1/16

印 张: 10.5

字 数: 223 千字

版 次: 2021 年 1 月第 1 版

印 次: 2021 年 1 月第 1 次印刷

定 价: 29.80 元

ISBN 978-7-5658-4307-5

版权所有, 翻版必究

如发现印装质量问题, 请与承印厂联系退换

P

REFACE

前言

生物化学与分子生物学在分子水平探讨生命的本质,即研究生物体的分子结构与功能、物质代谢与调节,是目前自然科学中进展最迅速、最具活力的领域,既是生命科学的基础,又是生命科学的前沿。作为生命存在的基础,生物分子的结构、功能、数量及存在部位的异常和一些重要的生化反应或过程紊乱均可导致疾病的发生。随着现代科学的迅速发展,生物化学与分子生物学课程已经从以物质代谢为中心的传统教学模式转变成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。

本书共分为以下 6 个部分。

第一章为总论,首先介绍生物化学与分子生物学的实验基本操作、常用实验仪器及使用方法、常用实验标本的制备过程和注意事项,然后介绍实验报告书写格式和实验室规则。

第二章为生物化学与分子生物学基础实验,包括 10 个经典生化实验。目的是通过实验操作,使学生能掌握基本的实验技能;通过实验教学,验证学科理论的教学内容,加深学生对理论知识的理解。

第三章为临床分子生物学检验技术实验,包括 10 个实验,涉及核酸的分离与纯化、核酸扩增技术、分子克隆技术和其他分子检验技术,是临床检验专业学生必须掌握的技术实验。

第四章为临床生物化学检验技术实验,包括 13 个实验。各实验项目与理论知识紧密结合,均具有一定的代表性。

第五章为设计性实验,目的是训练学生的基本科研能力,鼓励学生参与科研活动和创业。

第六章为常用试剂及其配制,介绍一般化学试剂的分级、试剂配制的注意事项和生物化学与分子生物学实验中常用试剂的配制方法。

书中每个实验内容包括实验目的、实验原理、试剂仪器、操作步骤、结果处理和临床意义等内容。在编写过程中,编者努力遵循临床医学、护理学和医学检验技术专业的培养目标,注重基础知识和技能的训练,加强有临床应用价值或应用前景的技术介绍。

本书由从事基础和临床生物化学和分子生物学检验技术教学的教师完成,他们以高度的责任感完成了各自的编写任务。由于医学检验学科发展迅速,分子生物学技术发展也非常快,加之编者水平有限,书中不足之处请广大读者批评指正。

编者

Contents 目录

第一章 总论	1
第一节 生物化学与分子生物学的实验基本操作	1
第二节 常用实验标本的制备	12
第三节 实验报告的书写	19
第二章 生物化学与分子生物学基础实验	21
实验一 理化因素对唾液淀粉酶活性的影响	21
实验二 脂肪酸的 β -氧化作用——酮体的生成和利用	24
实验三 血清丙氨酸氨基转移酶活性测定(赖氏法)	27
实验四 蛋白质的定量测定(改良 Lowry 法)	30
实验五 血清蛋白质醋酸纤维素薄膜电泳	33
实验六 肌肉组织氨基移换作用(纸层析法)	36
实验七 胡萝卜素的柱层析分离	39
实验八 激素对血糖浓度的影响	42
实验九 SDS-PAGE 测定蛋白质分子量	46
实验十 血清 γ -球蛋白的分离、纯化及鉴定	49
第三章 临床分子生物学检验技术实验	55
实验一 DNA 的限制性核酸内切酶酶切反应	55
实验二 目的片段的连接	57
实验三 感受态细胞的制备及重组子转化	60
实验四 重组子的鉴定	63
实验五 质粒 DNA 的提取	68
实验六 聚合酶链反应	72
实验七 核酸的鉴定	77
实验八 真核细胞 mRNA 的分离与纯化	81

实验九	逆转录-聚合酶链反应检测甘油醛-3-磷酸脱氢酶 mRNA	87
实验十	Western 印迹	91
第四章 临床生物化学检验技术实验		97
实验一	琼脂糖凝胶电泳法测定乳酸脱氢酶同工酶	97
实验二	糖化血红蛋白测定	99
实验三	胆固醇氧化酶法测定血清(浆)总胆固醇	103
实验四	血清(浆)高密度脂蛋白测定(磷钨酸-镁沉淀法)	105
实验五	免疫透射比浊法测定 C-反应蛋白	107
实验六	钾、钠离子的测定	109
实验七	血清总钙测定	115
实验八	血清碱性磷酸酶活性测定	118
实验九	血清总胆红素和结合胆红素测定	122
实验十	血清肌酐测定	126
实验十一	血清尿酸测定	130
实验十二	回收试验	134
实验十三	批内重复性试验	135
第五章 设计性实验		139
第一节	总论	139
第二节	设计性实验的选题和设计	140
第三节	数据的记录与处理	145
第四节	实验报告的撰写	146
第五节	设计性实验案例	149
第六章 常用试剂及其配制		151
第一节	一般化学试剂的分级和保存	151
第二节	常用试剂的配制	153
第三节	重铬酸钾洗液的配制与再生	160
参考文献		161

第一章

总论

第一节 生物化学与分子生物学的实验基本操作

一、实验室规则

- (1) 穿白大衣进入实验室，关闭手机；将书包、外衣等放入各实验室的储藏柜内。
- (2) 自觉遵守课堂纪律，不迟到、早退；不能在实验室内吸烟、饮食和大声喧哗。
- (3) 课前预习，了解实验目的及操作要点；实验过程中要听从教师的指导，严格按照操作规程进行，如实记录实验中出现的现象、结果和数据。
- (4) 保持实验室内整洁。试剂瓶及仪器等物品要放置整齐、有序；实验结束后要对所有用过的物品进行清洁整理；用过的滤纸、棉花、动物组织等固体废物切勿倒入水池；强酸、强碱性废液应以大量水稀释后倒入水池。
- (5) 爱护公物。对贵重、精密仪器，如离心机、分光光度计、电泳仪、微量加样器等，应先了解正确使用方法，并在教师指导下操作。
- (6) 注意安全。在使用乙醇、乙醚、苯、酚等易燃的有机溶剂时，务必远离火源，严禁在煤气、电炉、酒精灯上直接加热；对试管内容物加热时，管口不许对人；取强酸、强碱、血清或有毒液体时，严禁口吸、乱甩，若滴洒在器皿外，要及时用湿布擦净。
- (7) 实验完毕，值日生除负责做好实验室卫生外，切记关好水、电、窗，并经教师检查后方可离去。
- (8) 第一次实验课时，要仔细清点小组实验器材，若有缺损由教师补发或调换。在以后的实验中，若有损坏，报告教师并填写、登记，按规定价格赔偿。

二、基本实验操作

1. 玻璃仪器的清洗

生物化学实验所使用的玻璃仪器，其清洁程度直接影响实验结果的准确性。玻璃仪器不洁净，会造成实验误差。玻璃仪器的清洁方法有很多，可根据实验要求选用合适的清洁方法。

- (1) 一般敞口玻璃仪器，如试管、离心管、烧杯，其洗涤过程如下：用毛刷蘸取洗衣粉，将仪器内外仔细洗刷，用自来水冲洗干净后，再用蒸馏水先内后外冲洗 2 次，倒置于

仪器架上晾干备用。

(2) 容量分析仪器，如刻度吸管、容量瓶，其洗涤过程如下：新购容量仪器的表面附有游离的碱性物质和泥污，应先用洗衣粉洗刷，再用自来水冲洗，晾干后，浸泡在重铬酸钾硫酸溶液中过夜（不少于 4 h），再用自来水冲洗，最后用蒸馏水冲洗 2 次，倒置于仪器架上晾干备用。

上述所有玻璃器材以倒置后玻璃器皿内壁不挂水珠为洁净的标准。

注：使用高锰酸钾乙醇溶液和高锰酸钾氢氧化钠溶液需注意，此溶液为强碱性洗涤液，对玻璃仪器的侵蚀性很强，在清除容器内壁污垢时，洗涤时间不宜过长，使用时应小心防护。

2. 玻璃仪器的干燥

所有的玻璃仪器洗净后均可倒置在架上，自然干燥。若需迅速干燥可采用烘干箱（100~105℃）烘烤或在电炉和酒精灯上烘烤。但对容量仪器，如吸管、容量瓶、比色杯，严禁高温干燥，可使用酒精、乙醚等有机溶剂去除容器表面的水分，晾干。

3. 特殊污物的清洗

(1) 蛋白质污物。45%~50%尿素为去除蛋白质的良好溶剂，10%NaOH 热溶液也可去除蛋白质。

(2) KMnO_4 痕迹。加几滴浓硫酸后，加 5%草酸溶液。

(3) 油脂类污物。有机溶剂如丙酮、乙醇、乙醚等，可用于洗脱油脂、脂溶性染料等污痕；也可用 5%~10%磷酸钠溶液对油脂类污物进行处理。

(4) 金属污物。5% HNO_3 和稀 HCl 溶液去除金属和金属氧化物效果较好，适合对仪器清洁度要求很高的生化酶学实验。

4. 塑料器皿的清洗

实验常用的塑料器皿，如微量离心管、吸头等，不易清洗，而且成本低廉，因此多为一次性物品，用完即可丢弃。组织培养使用的塑料器皿，若需重复使用，可在用后立即浸入水中，用脱脂棉擦去附着物，自来水冲洗干净后，再用 2%NaOH 溶液浸泡过夜；自来水充分冲洗，然后用 5%HCl 溶液浸泡 30 min，再用自来水冲洗和蒸馏水冲洗干净。塑料器皿不能用高压消毒，可用 75%乙醇冲洗后，放置于超净台中，紫外灯照射下晾干备用。

5. 刻度吸管的使用

生化常用的刻度吸管有两种类型：一种是全流出式吸管，吸管刻度标至尖端，容量包括液体全部，放液时需将管尖残留液体吹出。这种吸管在管的上端标有“吹”字。另一种是完全流出式的刻度吸管，此管在放液时让液体自然流出，尖端在试管内壁停留几秒钟，所余液体不得吹出。这种吸管在管的上端标有“快”字，表明此吸管已校正过尖端残留液的误差，故不能吹出管尖残留液体。

为了便于准确、快速选取所需的吸管，国际标准化组织统一规定，在刻度吸管的上方要印有各种彩色环，以示容积区别，如表 1-1 所示。

表 1-1 刻度吸管的标准容量 (mL)

项目	标准容量 (mL)						
	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10
色 标	红	黑	红、绿	黄	黑	红	橘红
环 数	单	单	双、单	单	单	单	单

刻度吸管的使用方法如下。

(1) 根据需要使用适合的吸管，其容量最好等于或稍大于取液量。使用前须看清容量和刻度。

(2) 用右手拇指及中指（辅以无名指），拿住吸管上端，如图 1-1 所示。

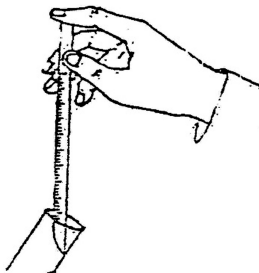


图 1-1 刻度吸管的使用

(3) 左手捏压洗耳球，将吸管伸入所取试剂液面下，将洗耳球的下端出口对准吸管上口，将液体轻轻吸上，至高于刻度线上端 1~2 cm 处，迅速用食指按紧管口，使液体不会从管下口流出。

(4) 将吸管从溶液中取出后，如果是黏性较大的液体（如血清），必须先用滤纸擦干净管尖外壁上的液体，然后用食指控制使液体至所需刻度。

(5) 调好刻度，要求三点一线，即视线、液体凹面、刻度线在同一水平面。

(6) 将吸好的液体移入所用容器内，将吸管尖靠在容器内壁上，松开右手食指让溶液自然流下，放液后吸管尖端残留的液体，应视所选用的吸管要求而定。需要吹的则将其吹出；不需要吹的则让吸管尖端靠内壁停留几秒钟，同时转动吸管，重复 1 次。

6. 可调式微量移液器的使用

可调式微量移液器是精确量取微量液体（一般量取 μL 级别）的仪器。根据不同量程分为不同规格，可根据需要选择合适体积的仪器。其基本结构和原理：通过按动芯轴排出空气，将前端安装的吸头置于液体中，放松对芯轴的按压，靠内置弹簧机械力，芯轴复原，形成负压，吸引液体。

(1) 可调式微量移液器的操作方法。

① 将吸头套在移液器尖头上，轻轻转动，以保证密封。

② 垂直地握住移液器，用拇指将按钮按到第 1 挡位置（见图 1-2），并把吸头浸入液面下几毫米处，再缓慢地放松按钮，使其复位，等待 1~2 s 后从液体中取出。

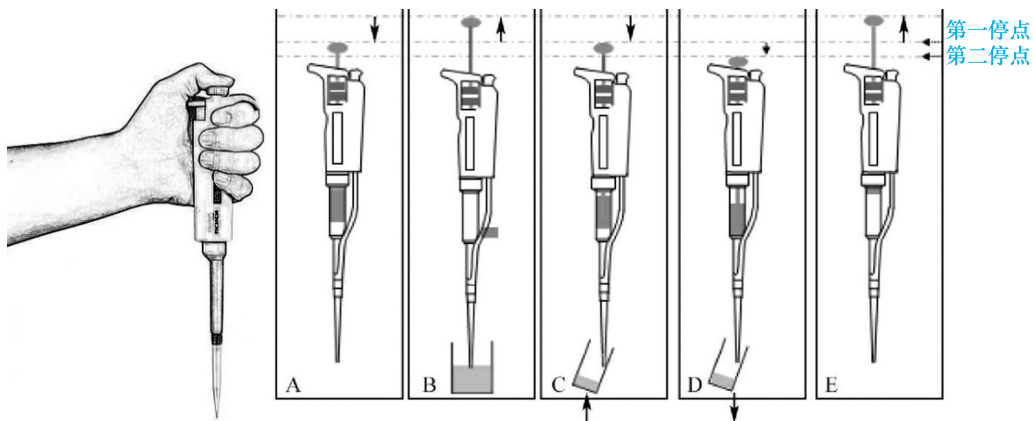


图 1-2 微量移液器的使用

③将吸头移至加样容器壁上，缓慢地把按钮按到第 1 挡位置，等待 1~2 s，再把按钮完全按下（即按到第 2 挡位置），排尽全部液体后，吸头应沿容器壁向上滑动取出，再放松按钮，使其复位，即完成一次操作过程。如果发现吸液嘴尖口处仍残留液体，则应将吸液嘴接触受器内壁，使液体沿壁流下，同时拇指不能松开。

(2) 可调式微量移液器的使用注意事项。

①选择适宜的吸头：吸头有很多规格，使用前要插紧，吸出液体后，吸头内的液体不应自动流出，否则说明吸头不合适或移液器出现故障。

②轴芯移动速度过快：造成吸头内形成气涡，影响吸入液体的量，有时会使液体冲入移液器内，腐蚀内部垫圈或弹簧，影响吸液精度，严重时不能吸入液体。

7. 溶液的混匀、加热、保温及冷却

(1) 溶液的混匀方法。

①甩动法：适用于试管中液体较少时，用右手持试管上部，轻轻甩动、振摇可将液体混匀。

②敲法：右手持试管上部，将试管的下部在左手掌心弹敲。适用于少量试管液体的混匀。

③转法：右手反向握住试管上端，五指紧握试管，利用腕力使试管向一个方向做圆周运动，使管内液体旋转而混匀。适用于试管中液体较多时或小口器皿。

④吸附管混匀法：用清洁的吸管将溶液反复吸放多次，使溶液混匀。适用于成倍稀释液体时。

⑤倒转法：用大拇指隔着干净玻璃纸堵住管口，上下倒转数次，就可使液体充分混匀。适用于液体较多，且损失少量液体不影响结果。

⑥旋涡混旋器混匀法：手持容器上端于混旋器上，振荡混匀。适用于量大或要求混匀时间较长的溶液。

⑦玻璃棒搅匀法：若用上述方法不能使液体混匀，可用玻璃棒混匀。

⑧磁力搅拌器混匀法：适用于酸碱自动滴定等。

(2) 溶液的加热、保温方法。

①水浴箱：通过调节水浴箱内水的温度，将样品放置其中以达到实验所需温度。这种将样品直接浸在水中，使样品的温度很容易达到设定的温度。不适宜过夜等长时间连续使用。

②空气恒温箱：恒温箱的空气温度可以调节，样品放置在一定温度的空气中，由空气传导温度，样品达到设定温度所需时间较长，适用于需要长时间保温的样品，如大肠杆菌的培养。

③恒温摇床（恒温振荡器）：水平旋转式振荡器多用于菌的扩增。跷板式振荡器多用于染色和脱色。

三、常用实验仪器的使用

1. 离心机

离心机是一种机械，可借助于电动机或其他机械的带动而高速转动，产生数千倍于重力的离心力，以加快液体中颗粒的沉降速度，把样品中不同沉降系数和密度质量的物质分离。

(1) 具体操作。

- ①将所离心的液体移入离心管中，把离心管插入离心桶内。
- ②将天平调节平衡。
- ③将平衡后的两个离心桶对称插入离心机托架上，盖好仪器盖。
- ④开启电源 POWER 按钮，指示灯亮。
- ⑤设定时间，TIME 旋钮 0~60 min。
- ⑥按 START 按钮后，缓慢调 SPEED 旋钮至所需转速。
- ⑦离心结束后，使 SPEED 还原到 0 位置，取出离心桶。
- ⑧盖好仪器盖，关闭电源 POWER 按钮，把离心桶倒置在桌面上。

(2) 注意事项。

- ①最高转速为 4 000 rpm，通常使用最高转速为 3 800 rpm。
- ②平衡后的 2 个离心桶必须对称插入离心机托架上，并盖好仪器盖。
- ③调转速应平稳缓慢，即缓慢顺时针调 SPEED 旋钮至所需转速。
- ④离心结束后，使 SPEED 还原，取出离心桶，并倒置于桌面上。
- ⑤将使用时间、转速及使用状况登记在使用记录本上。

2. 分光光度计

分光光度计又称光谱仪，是将复杂的光分解为光谱线的科学仪器，是一种分析光强度的物理实验室设备，可以测量不同波长的光强度，分析波长与光强度的关系，也可以测量特定物质的吸光度或透光度。测量范围一般包括波长范围为 380~780 nm 的可见光区和波长范围为 200~380 nm 的紫外光区。

具体操作如下。

- (1) 开启电源，指示灯亮，选择开关置于“T”，选择所需波长，打开比色室盖，仪

器预热 20 min。

(2) 调节“O”旋钮，使数字显示“00.00”。

(3) 将待测溶液倒入比色皿中（约皿高的 2/3），并插入比色皿架上（依次为空白管、标准管、样品管），放入比色室内托架上，使空白管对准光路。

(4) 盖上比色室盖，调节透光度“100%”旋钮，使数字显示为“100.0”。

(5) 重复步骤（2）～（4）一次，仪器即可进行测定工作。

(6) 吸光度 A 的测定。将选择开关置于“A”，调节消光零旋钮，使数字显示为“0.000”，然后依次将被测样品移入光路，显示值即为被测样品的吸光度。

(7) 浓度 C 的测量。选择开关由“A”旋至“C”，将已标定浓度的样品放入光路，调节浓度旋钮，使数字显示为标定值，将被测样品移入光路，显示值即为被测样品的浓度。

(8) 比色完毕，将选择开关置于“T”，开盖取出比色皿，倒出液体，洗净比色皿，最后操作的同学关掉电源。

3. 紫外分光光度计

紫外分光光度计是分光度计的一种，是以紫外线—可见光区域电磁波连续光谱作为光源照射样品，依据朗伯-比尔定律进行定量测定。

具体操作如下。

(1) 将灵敏度旋钮调至“1”挡（放大倍率最小）。

(2) 按电源开关（开关内 2 只指示灯亮）。钨灯点亮，按“氢灯”开关（开关内左侧指示灯亮）；氢灯电源接通，再按“氢灯触发”按钮（开关内右侧指示灯亮）；氢灯点亮。仪器预热 30 min。

注：仪器后背部有一只“钨灯”开关，若不需要用钨灯时，可将其关闭。

(3) 选择开关置于“T”。

(4) 打开试样室盖（光门自动关闭），调节“0%”（T）旋钮，使数字为“000.0”。

(5) 将波长置于所需要测定的波长。

(6) 将装有溶液的比色皿放置于比色皿架中。

注：波长在 360 nm 以上时，可以用玻璃比色皿；波长在 360 nm 以下时，用石英比色皿。

(7) 盖上样品室盖，将参比溶液比色皿置于光路，调节透过率“100”旋钮，使数字显示为 100.0%（T），如果不到 100.0%（T），则可适当增加灵敏度的挡数，同时应重复第（4）步，调整仪器的“000.0”。

(8) 将被测溶液置于光路中，数字显示器上直接读出被测溶液的透过率（T）值。

(9) 吸光度 A 的测量。参照（4）和（7），调整仪器的“000.0”和“100.0”。将选择开关置于“A”。旋动吸光度调整旋钮，使得数字显示为“000.0”，然后移入被测溶液，显示值即为试样的吸光度 A 值。

(10) 浓度 C 的测量。选择开关由“A”旋至“C”，将已标定浓度的溶液移入光路，调节“C”旋钮使得数字显示为标定值。将被测溶液移入光路，即可读出相应的浓度。

(11) 如果大幅度改变测试波长时，需要等数分钟后，才能正常工作。因波长由长波向短波或短波向长波移动时，光能量急剧变化，使光电管受光后响应缓慢，需一段移光响

应平衡的时间。

(12) 仪器在使用时, 应常参照操作方法中(4)和(7)进行“000.0”和“100.0”的工作。

(13) 每台仪器配套的比色皿不能与其他仪器上的比色皿单个调换。

(14) 本台数字显示后背部带有外接插座, 可输出模拟信号。插座1脚为正, 2脚为负接地线。

(15) 对由于在运输过程中引起光源偏移和吸光度斜率的偏移, 可按说明书所示调整。

4. 灭菌设备

细菌、细胞培养以及核酸等相关实验所用的培养基、试剂、器皿及耗材等, 都需要严格灭菌。在分子生物学实验中常用高压蒸汽灭菌, 操作方法如下。

(1) 准备。

①将电源接通, 打开电源断路开关。

②打开容器盖, 取出灭菌内胆, 手工加水(选用蒸馏水)超过水位器顶端。

③待机指示灯亮, 观察高水位灯亮即可。

④向灭菌内胆放置待灭菌物品。待灭菌物包扎好后, 有序放在灭菌内胆内的筛板上, 包与包之间必须留有适当的空隙, 敷料包体一般以20 cm×20 cm×10 cm为宜。灭菌包内放置适当的灭菌指示物。

⑤灭菌内胆放入容器后, 将容器盖盖好, 将手轮按顺时针方向旋紧, 使盖与容器密合, 不宜旋得太紧, 以免损坏橡胶密封垫圈。

⑥设置灭菌工作参数, 按照不同灭菌物品所需的灭菌时间设置灭菌温度/灭菌时间。

(2) 升温。按“启动”键, 灭菌器进入“升温”状态。

(3) 灭菌。温度调至设置的数值, 进行倒计时。

(4) 干燥。灭菌结束, 温度低于100℃时开盖进入干燥倒计时。

(5) 结束。干燥结束, 可过20~30 min取灭菌物。

5. 超净工作台

超净工作台一般简称为净化台, 是目前普遍应用的无菌操作装置。其工作原理是利用鼓风机驱动空气通过高效空气微柱滤层净化后, 徐徐通过工作台面, 使操作区域形成无菌环境。超净工作台按气流方向的不同可分为外流式和侧流式两种类型。

其操作方法如下。

(1) 使用工作台时, 先用经过清洁液浸泡的纱布擦拭台面, 然后用消毒剂擦拭消毒。

(2) 接通电源, 提前50 min打开紫外灯照射消毒, 处理净化工作区内工作台表面积累的微生物, 30 min后, 关闭紫外灯, 开启送风机。

(3) 超净工作台面上不要存放不必要的物品, 以保持工作区内的洁净气流不受干扰。

(4) 操作结束后, 清理工作台面, 收集各废弃物, 关闭送风机及照明开关, 用清洁剂及消毒剂擦拭消毒。

6. PCR 仪

PCR仪是分子克隆技术中最常用的设备, 主要由机械自动装置、温度循环系统及附属

设备等构成。PCR 仪根据用途不同有不同的类型，常用的有普通 PCR 仪和荧光定量 PCR 仪。荧光定量 PCR 仪不仅可对核酸进行扩增，还可通过 TaqMan 荧光探针、SYBR Green 荧光染料等方法对扩增后的样品进行定量测定，一次可同时检测的样品量达数百个，是一种高通量型仪器。其操作方法如下。

(1) 打开 PCR 仪的热盖，插入样品管，盖好热盖。打开 PCR 仪的电源，仪器程序开始初始化，等待几分钟。初始化完成后，显示主菜单，点击“Browse/New Methods”，进入 PCR 程序列表。

(2) 选择“Start Run”运行，点击“New”，出现 PCR 程序。

(3) 点击“Stage”位置，修改循环数、温度、时间，点击“Done”确定。

(4) 建立梯度模式。选择一个步骤，再点击“Option”键，点击“VeriFlex step”，出现梯度创建窗口：输入几个梯度温度，点击“Done”确定。注意相邻的两个梯度温度之差不能超过 5 °C。

(5) 建立渐变模式。选择一个步骤，点击“Option”键，再点击“Auto Delta”，出现渐变模式创建窗口，设置起始循环数、温度变化值、时间变化值。

(6) 点击“Save”保存，输入 PCR 程序名称，再输入反应体积和热盖温度，点击“Save Exit”确定。

(7) 点击“Start Run”，出现运行参数设置窗口，输入反应体积和热盖温度，点击“Start Run Now”，开始运行 PCR 程序。

(8) 暂停。点击“Pause Run”，仪器暂停；点击“Resume Run”，结束暂停。

(9) 终止。点击“Stop”，终止整个 PCR 程序。

(10) PCR 程序结束后，仪器会自动生成反应报告。

(11) PCR 反应结束后，打开热盖，取出样品，关闭仪器电源，并开盖放置，使热盖和加热模块正常降温。

7. 电泳装置

电泳装置主要由电泳仪和电泳槽两部分组成，主要用于检测、鉴定各种生物大分子的纯度、浓度等，同时它还可以对样品进行分离、纯化、回收和浓缩，是分子生物学研究中的一个常用仪器。

电泳仪作为电泳时的外加电源设备，将 220 V 交流电整流后通过稳压器，它既能输出稳定的电流，又能输出稳定的电压，起到在被分离样品两端加外接电场的作用。除一些常用电泳仪外，还有一些特殊的电泳仪，如毛细管电泳仪、脉冲电场凝胶电泳仪、转移电泳仪等。

电泳槽作为电泳的主要部件，是样品分离的场所。槽内装有电极、缓冲液槽、电泳支持架等，有的还装有散热装置等。在分子生物学中常用的电泳槽有水平电泳槽、垂直电泳槽、转移电泳槽、等电聚焦电泳槽等。

操作方法如下。

(1) 用导线将电泳槽的两个电极与电泳仪的直流输出端联接，注意极性不要接反。

(2) 电泳仪电源开关调至“关”的位置，电压旋钮转到最小，根据工作需要选择稳压稳流方式及电压电流范围。

(3) 接通电源, 缓缓旋转电压调节钮直到达到所需电压为止, 设定电泳终止时间, 此时电泳即开始进行。

(4) 工作完毕后, 应将各旋钮、开关旋至零位或关闭状态, 并拔出电泳插头。

8. 紫外分析仪及照相器材

紫外分析仪及照相器材主要用于琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶电泳后结果的观察及记录。

(1) 紫外分析仪。电泳结束后的 DNA 肉眼观察不到, 它必须与溴化乙锭 (EB) 结合, 在紫外灯的照射下才能产生荧光以便观察。用于核酸分析的紫外分析仪常采用 254 nm、300 nm 和 365 nm 等几个波长, 在此波长范围内, DNA 与 EB 结合物对紫外光吸收较强, 从而诱导产生 590 nm 波长的橙红色荧光, 且产生荧光的强度与 DNA 量成正相关。其操作方法如下。

① 用定量取样器裁取 100 cm² 的标准圆形试样, 将试样放置在工作台上。

② 打开点样灯开关, 开启底面透射灯光, 便于观察。

③ 分别打开 254 nm 或 365 nm 波长的紫外灯进行观察, 并用面积比对胶片进行比对, 在任何一种波长照射下, 若荧光部分面积超过产品相关标准中规定面积 (一般为 5 cm²), 则判定该产品不合格; 在任何一种波长照射下, 若荧光部分面积小于产品相关标准中规定面积, 则判定该产品合格。

④ 紫外分析仪使用完毕后, 关闭全部灯光开关, 进行整理。

(2) 记录核酸凝胶电泳图谱。通过紫外分析仪只能对核酸凝胶电泳图谱进行观察, 若需将结果记录下来, 还需拍摄成像。一般采用凝胶成像分析系统, 其优点是具有强大的图像采集、分析能力, 可以对 DNA、RNA、蛋白质电泳凝胶以及各类杂交、放射自显影结果进行拍摄、处理、分析和保存。其操作方法如下。

① 打开总电源开关, 电源指示灯亮。

② 将染色后的凝胶用水冲洗后, 放在透射样品台正中, 并关严暗箱抽屉。

③ 双击电脑桌面上的快捷方式, 录入信息或者直接点击“确认”进入软件。

④ 点击打开拍摄程序。

⑤ 凝胶成像系统出现以下界面表示安装成功, 可以开始成像操作。参数设置: 对比度 0; 对核酸成像的曝光时间 1 000~1 500, 增益 20~30; 对蛋白成像的曝光时间 500~800, 增益 20~30。

a. 打开反射白灯的开关, 调节光圈大小, 使画面内能观察到图像。在计算机显示屏上观察凝胶是否已全部在显示区域内, 若凝胶位置不在画面中央, 请重新移动凝胶位置; 若画面内未能将凝胶拍全, 请调节变焦。

b. 关闭反射灯开关, 打开透射灯开关。

⑥ 观察计算机上显示的图像, 重新调节光圈大小, 注意避免图像过亮出现光晕。调节焦距, 使图像清晰。

⑦ 点击扫描形成文件, 退出扫描对话框, 将直接进入软件分析, 凝胶成像系统自动关闭所有光源, 退出拍摄程序。

9. 分立式自动生化分析仪

分立式自动生化分析仪是指按人工操作的方式编排程序，并以有序的机械操作代替手工操作，按程序依次完成加样、加试剂、搅拌、反应杯保温孵育、吸光度检测等各项操作。仪器由样本和试剂处理系统、反应系统、测定系统、清洗系统和计算机控制系统组成。其操作程序如下。

(1) 开机前准备。检查电源排插，确认电源输入开关打开；检查废液瓶是否已满，若已满，必要时请清空；检查清洗液和蒸馏水是否足够，若不够，请添加；检查打印纸是否足够，若不够，添加打印纸；确认试剂盘 39 号位置已经放置稀释液，40 号位置已经放置去离子水，若未放置，请添加；确认样本盘 40 号位置已经放置去离子水，若没有放置，请添加；检查加样针，确认无污染、无弯折，若有污染请擦洗加样针，若有弯折请更换加样针。

(2) 开机。系统通上电后，按以下顺序依次打开电源：生化主机电源、显示器电源、电脑主机电源、打印机电源。

(3) 启动控制软件。电脑启动后，会自动进入登录界面。输入用户名和密码，按照提示检查是否有不合法测试杯，给仪器更换新的测试杯（自动清洗仪器无需此操作）。

(4) 设置参数。申请测试前，必须至少设置完成下列参数。

① 点击“参数设置”，点击“项目设置”，按试剂说明书输入项目的参数，点击“参考范围”，输入参考范围。

② 点击“参考范围”，点击“标准设置”，按照试剂说明书输入需定标项目的参数。

③ 点击“参数设置”，点击“质控设置”，按质控说明书设置各项的靶值和 SD。

④ 点击“试剂设置”，设置试剂信息和试剂位。

⑤ 点击“系统设置”，点击“系统控制参数”，设置系统温度和测试模式。

⑥ 点击“系统设置”，点击“打印设置”，设置打印信息。

⑦ 点击“系统设置”，点击“科室设置”，设置科室。

(5) 放置试剂。在试剂盘上设定的试剂位置放置相应的试剂，打开试剂瓶盖，在使用试剂瓶时，请选用与试剂位置设置的容量一致的试剂瓶，以确保正确的余量检测。

(6) 定标。使用前进行定标测试。

① 点击“样本申请”，点击“标准申请”，申请定标测试项目。

② 申请定标后，在样本盘上设定位置放置该项目的定标液。

③ 点击开始，进行质控测试。

④ 点击“结果查询”，点击“标准查询”，查看定标结果。

(7) 质控。定标完成后进行质控测试。

① 点击“样本申请”，点击“质控申请”，申请质控测试项目。

② 申请质控后，在样本盘上设定位置放置该项目的质控液。

③ 点击“开始”，进行质控测试。

④ 点击“结果查询”，点击“质控查询”，查看质控结果。

(8) 样本分析。

① 申请样本测试。

a. 单独申请样本测试（任何情况下都可使用）：点击“样本申请”，申请样本测试；申请样本后，在样本盘上设定位置放置相应的样本。

b. 批量申请样本测试（体检的情况下可使用）：点击“样本申请”，编辑测试项目后，点击“批量保存”，输入起始样本位和结束样本位，点击“确定”；申请样本后，在样本盘上设定位置放置相应的样本。

② 点击“开始”，进行样本测试。

③ 点击“测试状态”，点击“测试列表”，查看样本实时结果；点击“结果查询”，点击“病人记录”，查看样本测试结果。

(9) 急诊测试。

① 申请急诊测试。

a. 快速急诊样本申请：点击“暂停”，点击“样本申请”，在样本申请表中选择样本测试项目，同时在“样本类型”单选框中选择“急诊”，保存；申请样本后，在样本盘上设定位置放置相应的急诊样本；点击“开始”，进行急诊样本测试。

b. 一般急诊样本申请：点击“样本申请”，在样本申请表中选择样本测试项目，同时在“样本类型”单选框中选择“急诊”，保存；申请样本后，在样本盘上设定位置放置相应的急诊样本；点击“开始”，进行急诊样本测试。

② 点击“测试状态”，点击“测试列表”，查看样本实时结果。

③ 点击“结果查询”，点击“病人记录”，查看样本测试结果。

(10) 追加样本测试。

① 点击“暂停”，点击“样本申请”，申请新样本测试。

② 申请样本后，在样本盘上设定位置放置相应的样本。

③ 点击“开始”，进行样本测试。

(11) 样本重测。点击“测试状态”，点击“测试列表”，在当前列表中选择要重测的样本项目，点击“重新测试”，点击“开始”，运行重测。

(12) 编辑样本结果。

(13) 退出操作软件。所有测试完毕，系统处于待机状态时，可点击“关机”，选择“退出”，点击“确定”，退出操作软件。

(14) 关机。退出 Windows 操作系统后，按下面顺序关掉各部分电源：打印机电源、显示器电源、生化主机电源。

(15) 关机后操作。盖上试剂盘里每个试剂瓶的盖子；取走样本盘里的定标液、质控液和样本；分析仪台面若有污染，用干净软布将污渍擦拭掉；检查废液桶，如有需要，请将废液桶清空。

第二节 常用实验标本的制备

一、血液样本的收集

1. 收集时间

因为饮食、活动、情绪、语言波动等因素会使血液中生化成分有所改变，影响结果的正确判断，所以常在早晨空腹或禁食 6 h 以上收集血液，测定血脂必须空腹 12 h，这样分析结果才具有较真实代表性。

2. 收集方法

(1) 血清。静脉抽血，采血后注入洁净干燥试管中，一般放置 3 h 血块会自然收缩分出血清，经离心（2 500 rpm，5 min）后分离效果更好。

(2) 血浆。静脉抽血，采血后注入加有适当抗凝剂的试管中，轻轻倒转试管，使血液与抗凝剂混匀，室温下放置或离心，血细胞下沉，上清液即为血浆。

3. 常用抗凝剂

(1) 草酸钾。草酸钾为钙的螯合剂，用量为 1~2 mg/mL，它能使红细胞缩小，水分从红细胞渗入血浆，使血浆成分浓度相应偏低。草酸钾不能用于测定钙离子。

(2) 肝素。肝素的作用机制主要是抑制凝血酶原转化为凝血酶，使纤维蛋白原不能转化为纤维蛋白。肝素不影响红细胞体积，可用于生化及血液学检验，但不能用于筛选弥散性血管内凝血（DIC）的 3P 和 TT 试验。因为肝素与鱼精蛋白作用可发生沉淀，使 3P 出现假阳性，以及肝素与抗凝血酶作用会产生干扰。使用时可配成 1 mg/mL（每毫克含 100~125 U）肝素溶液，取 0.5 mL 置小瓶中，于 37~50 °C 烘箱中烤干后，可抗凝血液 5 mL。

(3) 乙二胺四乙酸二钠盐（EDTA·Na₂）。EDTA·Na₂与钙螯合抗凝，1.4~1.6 mg 可抗凝血液 1 mL，不适用于血钙、血钠及含氮物的测定。

(4) 3.8%枸橼酸钠。使用时取 0.5 mL，可抗凝全血 5 mL。

(5) ACD 抗凝剂。ACD 抗凝剂的成分为枸橼酸钠 1.32%、柠檬酸 0.48%、葡萄糖 1.47%。使用时，每 20 mL 血液加入 3.5 mL ACD 抗凝剂。ACD 抗凝剂用于提取全血中 DNA，效果最好。全血 DNA 提取时不能采用肝素抗凝，因为肝素是聚合酶链式反应的抑制剂。

抗凝剂与血液的量应比例恰当，抗凝剂不足时，部分血细胞凝集；反之血细胞破裂，引起溶血或血细胞与血浆间电解质分布的改变，影响血液分析。

4. 样本保存

血液可以在 0 °C 条件下保存数天，-70 °C 条件下无限期保存。取样后最好立即分析测定，应尽快从全血中离心分离，一般不超过 4 h，分离后放置于 -20 °C 保存。

5. 毛细血管采血法

用一次性采血针刺破毛细血管，待血液自然流出后，用微量吸管吸取所需量的血液。毛细血管采血法获得的血液标本是微动脉血、微静脉血和毛细血管血混合的末梢全血，主要用于需要微量血液的检验项目。

(1) 物品准备：75%酒精棉球、无菌干棉球、一次性消毒采血针，20 μ L 微量吸管（校正后使用）。

(2) 具体操作。

①准备：对接微量吸管和乳胶吸头，并检查连接处是否漏气。

②按摩：轻轻按摩受检者采血部位（通常选择左手无名指指腹内侧或耳垂），使局部组织自然充血。

③消毒：用75%酒精棉球消毒采血部位皮肤，待干。

④穿刺：用左手拇指和食指捏紧采血部位使采血部位的皮肤和皮下组织绷紧，右手持一次性消毒采血针，自指尖腹内侧迅速刺入（深度以2~3 mm为宜），立即出针。

⑤拭血：第一滴血液因混入组织液，一般弃之不用，待血液自然流出或稍加挤压流出后，用消毒干棉球擦去第一滴血。

⑥采血：待血液流出后，用微量吸管采集所需血液标本至刻度。

⑦止血：采血结束后，用无菌干棉球压住采血部位以止血。

(3) 质量控制。

①所选择的采血部位皮肤应完整，避开烧伤、冻疮、发绀、水肿或炎症等部位。除特殊情况外，不要在耳垂采血。半岁以下婴幼儿由于手指小，可自拇指、脚趾或足跟内、外侧缘采血。严重烧伤者可选皮肤完整处采血。

②本试验是有创性检查，故要严格按无菌技术操作，防止采血部位感染。做到一人一针一管，避免交叉感染。采血时必须注意严格消毒和生物安全防范，采血针为一次性使用。

③消毒皮肤后，应待酒精挥发后采血，否则流出的血液会四处扩散而不成滴。

④进出针要迅速，且有足够深度（2~3 mm），稍加挤压以血液能流出为宜。

⑤如血流不畅，可以用左手自采血部位远端向指尖稍施压使血液流出，但切忌用力过大，以免使过多组织液混入血液中，影响结果准确性。

⑥应使用经过校正或由临床检验中心核准的一次性血红蛋白吸管（误差 \leq 1%）吸取血液。

⑦采血要迅速，防止流出的血液发生凝固。

6. 静脉采血法

注射器针头刺入浅静脉后，利用往后拉动针栓时形成的负压，采集静脉血液。

(1) 物品准备：30 g/L 碘酊、75%酒精、棉签、一次性消毒注射器、压脉带、垫枕、试管。

(2) 具体操作。

①准备：取试管1支（根据需要加相应抗凝剂）。

②检查注射器：打开一次性注射器包装，将针头和针筒紧密连接，并使针头斜面对准针筒刻度，抽拉针栓检查有无阻塞和漏气，最后排尽注射器中的空气，备用。

③选择静脉：受检者取坐位，前臂水平伸直置于桌面垫枕上，暴露穿刺部位，选择容易固定、明显可见的肘正中静脉。

④消毒：先用 30 g/L 碘酊棉签自所选静脉穿刺处从内向外沿顺时针方向消毒皮肤，待碘酊挥发后，再用 75% 酒精棉签以同样方式拭去碘迹，待干。

⑤扎压脉带：在采血部位上端约 6 cm 处扎紧压脉带（松紧适度），并嘱患者反复握拳几次后紧握拳头，使静脉充盈显露。

⑥穿刺：取下针头无菌帽，以左手拇指绷紧皮肤并固定静脉穿刺部位下端，右手拇指和中指持注射器针筒，食指固定针头下座，使针头斜面和针筒刻度向上，沿静脉走向使针头与皮肤成 30° 斜行快速刺入皮肤，然后成 5° 向前穿破静脉进入静脉腔。见回血后，再将针头顺势沿血管方向前进少许，以免采血针头滑出，但不可用力深刺，防止穿透血管壁而造成血肿。

⑦抽血：穿刺成功后右手固定注射器，左手松压脉带后，再缓缓抽动注射器针栓至所需血量。嘱受检者放松拳头，用消毒干棉签压住穿刺点，迅速拔出针头。嘱受检者继续按压穿刺点数分钟。

⑧加样：取下注射器针头，将所采血液沿管壁准确而缓缓注入事先准备好的容器中，若有抗凝剂，则需要立即充分颠倒混匀，盖紧试管塞备用。

(3) 质量控制。

①在采集血液标本前，受检者应尽量保持平静，减少运动，应向受检者耐心解释，以消除不必要的疑虑和恐惧心理。若遇个别受检者进针或采血后发生眩晕，应立即拔出针头，让其平卧休息片刻；必要时可嗅吸芳香酊、针刺（或拇指压掐）人中 and 合谷等穴位。若因低血糖诱发眩晕，可立即静脉注射葡萄糖或口服糖水。若有其他情况，应立即找医生共同处理。

②采血一般选择肘前静脉，若此处静脉不明显，可采用手背、手腕、腘窝和外踝部静脉。幼儿可选择颈外静脉。

③根据检验项目、所需采血量，可选用 2 mL、5 mL、10 mL 等不同刻度的一次性注射器，严格执行无菌操作。

④静脉采血前要仔细检查针头是否安装牢固，针筒内是否有空气和水分。所用针头应锐利、光滑、通气，针筒不漏气。

⑤抽血时切记针栓只能向外抽，不能向静脉内推，以免空气注入静脉形成气栓，造成严重后果。

⑥止血带压迫静脉时间不能超过 1 min，绑扎不能过紧，以免淤血和血液浓缩，使血液成分、浓度发生改变。

⑦血液注入试管前应先取下注射器针头，然后将血液沿试管壁缓缓注入试管中，防止溶血和泡沫产生，需要抗凝时应与抗凝剂轻轻充分混匀，切忌用力振荡试管。

(4) 临床应用。

静脉采血法适用于用血量较多 (>2 mL) 的检验项目。静脉血标本代表性大, 且各项成分相对恒定, 可反映患者整体状态, 是临床最常用的检验标本, 广泛用于各项生化、血液、免疫、微生物学检查。

7. 真空采血法

一次性真空采血器采用特制的一次性双针头采血针, 一端针头刺入血管, 另一端针头刺透管盖进入真空采血管, 血液即可因采血管内真空负压而流入管内。

(1) 物品准备: 30 g/L 碘酊、75% 酒精、棉签、压脉带、垫枕、真空静脉采血针 (软接式双向采血针系统)、真空负压管 (采用国际通用的头盖颜色标记)。

采血管标记鲜明, 极易分辨, 避免采血时用错添加剂或送检标本与检测项目不符, 如表 1-2 所示。

表 1-2 真空负压管头盖的颜色、添加成分及用途

颜色	添加成分	用途
蓝	3.2% 柠檬酸钠	用于凝血四项检验
黑	3.8% 柠檬酸钠	用于血沉检验
绿	肝素锂	用于快速血浆生化、血流变检验
红	无添加剂	用于血清生化、免疫、血库检验
紫	乙二胺四乙酸钾盐 (EDTA-K ₂)	用于血细胞分析
黄	促凝剂/惰性分离胶	用于快速血清生化、药物动力学实验
灰	氟化钠、草酸钾	用于血糖测定

(2) 具体操作。

①选择静脉、消毒、扎压脉带方法同静脉采血。

②穿刺: 拔除采血穿刺针的护套, 手持采血针沿静脉方向成 30° 刺入皮肤, 然后成 5° 向前刺破静脉壁进入静脉腔。

③采血: 见回血后, 用输液贴固定针头, 左手持真空采血管, 右手将胶塞穿刺针垂直刺入采血管的胶塞头盖的中央, 在负压的作用下, 血液被吸入采血管内, 同时松解压脉带。如需多管血样, 将刺塞针拔出后再刺入另一采血管。

④拔针: 在采血量还差 $0.3\sim 0.5$ mL 时松止血带, 待软管内的血液全部流入采血管后拔除穿刺针。

⑤止血: 采血完毕, 嘱咐受检者松开握紧的拳头, 并用消毒干棉签按压穿刺点止血。

⑥混匀标本: 加有抗凝剂的采血管需要立即颠倒混匀 8 次, 含有分离胶或促凝剂的采血管需要颠倒混匀至少 5~8 次。

⑦采血后处理: 根据生物安全原则及负压采血系统的特点, 处理废弃的采血针, 以避免误伤或污染环境。

(3) 质量控制。

①使用真空采血器前应仔细检查胶塞头盖, 切勿松动采血管的胶塞头盖, 以免改变采

血管的负压，使采血量不准确。

②该方法针头较普通注射器针头略粗，穿刺口锋利，尽量选择粗大的静脉穿刺。

③胶塞穿刺针上的乳胶套的作用是包裹、封闭刺塞针头，能防止滴血，采血时不能取下。当针头刺入采血管后，乳胶套卷起，采血完毕，去除采血管，乳胶套弹性恢复，封闭刺塞针头，防止导管内血液继续流出而污染环境。整个过程持针器应把稳，防止针刺损伤。

④应按以下顺序采血：血培养管、无抗凝剂管、凝血检查管、其他有抗凝剂管。

(4) 优点。

①预先添加各种添加剂，无需临时配制，满足临床多种试验所需。一针多管，减少重复操作，减轻患者痛苦。实现采血与检验一管操作，直接上机，节省检验操作时间，同时避免了对检测人员的感染和血标本间的交叉污染。

②无菌程度高，血液污染概率小，对检验结果的干扰小。

③对于需用血清检验的项目，可采用带有分离胶的真空采血管，能快速分离血清，缩短检验周期。

④直接将血液注入采血管，避免了传统方法中注射器将血液打入采血管所引起的血液有形成分的改变。标本留取快，减少了由于血液的反复挤压，血细胞破坏所致的溶血，检验结果更为真实可靠。

⑤真空度的准确设定使实际采血量误差值为 $\pm 5\%$ ，主要误差来源于血液黏度变化及试管内径的微细差别。

二、尿液样本的收集与保存

1. 尿液分类

尿液根据采集时间可分为晨尿、随机尿、餐后尿、计时尿、24 h 尿等。

(1) 晨尿。为住院患者留尿的主要方法，早晨起床后收集第一次尿，用于尿常规检验。

(2) 随机尿。多为门诊就诊患者的留尿检验方法。

(3) 餐后尿。收集进餐后 24 h 尿，主要了解糖代谢情况，用以筛查隐性糖尿病或轻症糖尿病。

(4) 计时尿。于计时开始时排空尿，然后在规定时间至截止时间内留尿，用于肾功能和有形成分排出率的评估，以及计算淀粉酶或肌酐的排出率。

(5) 24 h 尿。多用于化学组分的测定，以及泌尿道抗酸杆菌的检查。

2. 尿液保存

收集的尿液原则上以不加防腐剂为好，若不能立即进行实验，则应置于冰箱内保存，也可根据不同的检验目的加入合适的防腐剂。如 40% 甲醛 1 滴加入 30 mL 尿液中，适用于细胞及管型等有形成分的检查；激素检查常以盐酸 10 mL 作为 24 h 尿的防腐剂，或硼酸 1 g 于尿液 100 mL 中；麝香草酚 0.1 g 加入尿液 100 mL，供抗酸杆菌检查。

三、组织样品的制备

1. 细胞裂解液成分

(1) 缓冲液。常用 Tris 和磷酸盐缓冲液，离子强度为 0.1~0.2 mol/L，pH 为 7.0~8.0，与细胞内相一致。

(2) 抗氧化剂。二硫苏糖醇 (DTT)、 β -巯基乙醇、半胱氨酸和还原性谷胱甘肽。其作用是防止蛋白质分子的游离巯基在分子间和分子内生成二硫键。

(3) 蛋白酶抑制剂。常用的有苯甲磺酰氟化物 (PMSF)、二异丙基氟磷酸 (DFP) 和色氨酸蛋白酶抑制剂 (TPCK)；碘乙酸和 Cystatin 是半胱氨酸蛋白酶抑制剂；Pepstatin 是天冬氨酸蛋白酶抑制剂；EDTA 和 10-邻二氮杂菲是金属蛋白酶抑制剂；Amastatin 和 Bestatin 是肽链外切酶抑制剂。细胞破裂后，蛋白质水解酶就会释放出来，它能降解提取物中的蛋白质，因此为了减少蛋白质的水解，应在提取缓冲液中加入蛋白酶抑制剂。每一种抑制剂都特异性地针对一类蛋白酶。

(4) 抑菌剂。常用的抑菌剂是叠氮钠。

(5) 去污剂。离子性去污剂如 SDS 和脱氧胆酸钠；非离子性去污剂如 Triton X-100 和 Nonidet P-40。细胞膜内蛋白质都具有一些疏水氨基酸结构域，在水溶液中溶解度低，去污剂的作用就是保持这些蛋白质的溶解度。

(6) 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。PVP 多用于植物组织的裂解，因其含有大量的酚类化合物 (单体化合物如对-羟基丁酸，多聚化合物如鞣酸)，这些酚类化合物以非共价键与酶及其蛋白质结合，使蛋白质沉淀。酚类化合物易被氧化，主要是被内源性的酚氧化剂氧化，生成苯醌，这种物质很活跃，能结合蛋白质的活性基团，引起蛋白质交联、聚合并沉淀。不溶性的 PVP 类似于多肽链骨架，加入缓冲液中可以吸收酚类化合物，然后离心将其除去。缓冲液中的含巯基化合物，能最大程度地降低酚氧化的活性，以阻止苯醌的形成。

2. 细胞分类

(1) 哺乳动物细胞。其直径约为 10 μm ，外有细胞膜，这样的细胞没有太大的刚性，很容易被剪切力裂解。

(2) 细菌。其直径为 1~4 μm ，细胞壁特别硬。革兰阳性菌的细胞质膜由一层厚的肽聚糖衣壳构成，20~50 nm 包被；革兰阴性菌的细胞质膜由一层薄的肽聚糖构成，2~3 nm 包被，肽聚糖的外面还有一层脂多糖膜。带负电荷的脂多糖多聚物相互作用，并能与二价的阳离子 (如 Mg^{2+}) 发生交联。许多革兰阴性菌将蛋白质分泌到细胞质膜和细胞壁之间的外周胞质间隙。丝状真菌和酵母菌有一层坚硬的细胞壁，主要由 80%~90% 多聚糖组成。低级真菌和酵母菌，多聚糖是甘露糖和葡萄糖；丝状真菌，多聚糖是壳多糖和葡聚糖的交联物。酵母菌的细胞壁上也有少量的糖蛋白，在细胞壁和细胞膜之间是外周胞质间隙。

(3) 植物细胞。直径大约是 100 μm ，有一层相当硬的细胞壁，由碳水化合物和木质素或蜡组成，环绕在细胞膜的周围。虽然细胞膜外有细胞壁包裹起来，但植物细胞的体积大，仍然适合剪切力裂解。

3. 细胞裂解方法

细胞裂解方法可以分为两大类：机械法和非机械法。机械法包括匀浆、研磨、压榨、超声破碎等；常见的非机械法包括渗透、酶溶、冻融、化学等。每一种方法有其适用范围及优缺点，选择的标准要依靠经验与实践的比较。选择的原则是此方法不影响目的蛋白质或其产物的结构，避免其变性及降解。

(1) 匀浆法。匀浆法是机体软组织破碎常用的方法之一。其工作原理是通过固体剪切力破坏组织和细胞，释放蛋白进入溶液。匀浆器有4类：刀片式匀浆器、内切式匀浆器、玻璃匀浆器和用于大规模生产的高压式匀浆器。玻璃匀浆器的杵有玻璃制的也有特氟隆制的，既可以手动也可以电动。由于匀浆过程中蛋白质被蛋白酶降解的可能性较小，所以匀浆是简便、迅速和风险小的破碎方法，是实验首先考虑的方法之一。匀浆过程中应注意保持低温，在玻璃匀浆器外可置冰水浴，也可预冷或在冷室内匀浆。匀浆时所需缓冲液的体积可为湿重组织的9~10倍。

(2) 超声波法。高能超声波可以破碎细胞，其原理是超声波作用于溶液时，气泡产生、长大和破碎与空化现象有关。空化现象引起的冲击波和剪切力使细胞破裂。超声破碎的效率取决于声频、声能、处理时间、细胞浓度及细胞类型。

使用超声破碎必须注意的是控制强度在一定范围，即刚好低于溶液产生泡沫的水平，因为产生泡沫会导致蛋白质变性；过低的强度将降低破碎效率。最好在正式实验前用多余的样品试超，调校超声波发生器的强度。正式超声样品时强度只能在预定设置附近做小的调整。

超声破碎在处理少量样品时操作简便，溶液损失少，此法适用于微生物材料和脑组织匀浆。用大肠杆菌制备各种酶，常选用质量浓度为50~100 mg的菌体，在10~100 kHz频率下处理10~15 min。此法的缺点是超声波产生的化学自由基团能使敏感的活性物质变性失活，对超声波敏感的酶和核酸应慎用；噪声令人难以忍受；大容量装置声能传递、散热均有困难，在处理过程中会产生大量的热，须采取相应降温措施。

(3) 研磨法。本法是破碎单一细胞的有效措施。借助研磨中磨料和细胞间的剪切及碰撞作用破碎细胞。常用的磨料为石英砂、氧化铝，用前做清洁处理。在研钵内样品与磨料被研磨成厚糊状，主要用于细菌、酵母和一些植物组织。研磨操作一般不超过15 min。

(4) 酶溶法。酶溶法是用生物酶将细胞壁和细胞膜消化溶解的方法。常用的有溶菌酶、蛋白酶、糖苷酶、肽链内切酶、壳多糖等。虽然酶溶法有选择性释放产物、核酸泄出量少、细胞外形完整等优点，但也存在不足，如酶价格高、通用性差、有时存在产物抑制。

(5) 化学溶解法。有机溶剂（苯、甲苯）、抗生素、表面活性剂（SDS、NP-40、Triton X-100）、金属螯合剂（EDTA）、变性剂（盐酸胍、脲）等化学试剂都可以改变细胞膜的通透性，使内含物有选择地渗透出来。此法主要用于培养的动物细胞。低浓度表面活性剂处理，如充分溶解细胞，则它是很温和的方法。裂解液中加入50%甘油可以稳定目的蛋白。

(6) 反复冻融法。将细胞在-20℃以下冰冻，室温融解，反复几次，由于细胞内冰粒形成和剩余细胞液的盐浓度增高引起溶胀，使细胞膜破碎。它适用提取非常稳定的蛋白。对于韧性强的组织，可用液氮冻硬变脆，敲碎成小块后，在研钵中加液氮研成粉，再加缓冲液溶解。

(7) 低渗裂解法。细胞在低渗溶液中通过渗透张力作用裂解的方法，常用于红细胞的裂解。

第三节 实验报告的书写

实验报告是做完每个实验后的总结。通过向老师汇报实验的过程和结果，分析总结实验的结果和问题，加深对有关理论和技术的理解与掌握，同时也是学习撰写研究论文的过程。

一、实验报告基本格式

实验名称	班级	姓名	日期	页数
一、目的要求				
二、原理				
三、试剂和仪器				
四、操作方法				
五、实验结果				
六、讨论				

二、书写实验报告应注意事项

(1) 书写实验报告要写在专用报告纸上，为避免遗失，实验课全部结束后可装订成册，以便保存。

(2) 简明扼要地写出实验的原理，涉及化学反应的，可用化学反应方程式表示。

(3) 应列出所用的试剂和主要仪器，说明化学试剂时要避免使用未被普遍接受的商品名和俗名。

(4) 实验方法步骤的描述要简洁，不能照抄实验讲义，但要写清楚，以便他人重复。

(5) 记录实验现象的所有细节，最好用图表的形式概括实验的结果。

(6) 讨论不应是实验结果的重述，而是以结果为基础的逻辑推论，如对定性实验，在分析实验结果的基础上应有中肯的结论；还可以包括关于实验方法、操作技术和有关实验的一些问题，对实验异常结果的分析 and 评论，对于实验设计的认识、体会和建议，对实验课的改进意见等。

(7) 完整的实验记录包括实验日期、实验名称、目的要求、操作方法、实验结果等。

