



# 生化检测常见样本的收集及处理方法

## (方法仅供参考)

### 一、液体样本的处理

#### 1. 血清样本

取新鲜血液，在 25°C 条件下静置 30 min 使血液凝结。4°C，2000×g 离心 15 min，取上层淡黄色澄清液体即为血清。血清置于冰上待测，若不能当天检测，于 -80°C 保存，可储存一个月。

#### 2. 血浆及红细胞样本

取新鲜血液加入含有抗凝剂的试管中，颠倒混匀，4°C，700-1000×g 离心 10 min，取上层淡黄色透明液体即为血浆，不能吸取中间白色干扰层（白细胞和血小板）。将血浆置于冰上待测，若不能当天检测，于 -80°C 保存，可储存一个月。

将中间白色干扰层舍去，将下层红细胞沉淀，用 4 倍体积 2-8°C 的超纯水裂解，于 4°C，10000×g 离心 15 min，上清液即为红细胞溶解物。

#### 3. 全血样本

取新鲜血液加入到盛有抗凝剂的管中，轻轻颠倒混匀，置于冰上待测。若不能当天检测，4°C 保存 2 天。

#### 4. 尿液样本

收集新鲜尿液，4°C，10000×g 离心 15 min，取上清于冰上待测。若不能当天测，放入 -80°C 保存，可储存一个月。

#### 5. 胸水样本

收集新鲜胸水，加入含有抗凝剂的试管中，4°C，1500×g 离心 10 min，取上清于冰上待测，若不能当天测，保存在 -80°C 中，可储存一个月。

#### 6. 脑脊液样本

将收集的脑脊液，4°C，1500×g 离心 10 min，取上清于冰上待测，若不能当天测，保存在 -80°C 中，可储存一个月。

#### 7. 脑脊液样本

##### ① 高速离心法：

于 4°C，10000×g 离心 15 min 后，用棉签吸弃上层乳白色液体，吸取中层澄清血清于冰上待测。

##### ② 乙醚萃取法：

取血清与乙醚 1:1 混合，涡旋混匀仪震荡 30 秒，室温静置 5 分钟，4°C，1500×g 离心 5 min，枪头穿过乙醚层，取下层清亮血清进行测量。[1]

##### ③ 生理盐水稀释法：

将血清与生理盐水按照 1:4（具体稀释倍数按照指标确定）稀释后混匀待测（适用于轻度高脂样本）。

##### ④ 沉淀分离法：

将血清用联合沉淀剂磷酸-镁沉淀剂或者聚乙二醇-硫酸葡聚糖沉淀剂沉淀 [2]，4°C，1500×g 离心 10 min 后，取上清待测。（具体沉淀剂的种类及浓度需要按指标确定）。

### 二、细胞、组织及菌类等需匀浆处理的样本的处理

#### 细胞样本

##### 悬浮细胞：

4°C，1000-2000×g 离心 10 min 收集细胞，按照 10<sup>6</sup> 个细胞加入 300-500 μL 匀浆介质的比例加入匀浆介质，进行机械匀浆，充分破碎（无明显的细胞沉淀，可在显微镜下观察），4°C，10000×g 离心 10 min，取上清置于冰上待测，若不能当天检测，于 -80°C 保存，可保存一个月。

##### 贴壁细胞：

吸弃培养液，用 PBS (0.01 M, pH 7.4) 将细胞洗一遍。用细胞刮刮下细胞（不能用胰酶和 EDTA 处理），加入 2-5 mL PBS (0.01 M, pH 7.4)，收集细胞悬液，后处理方法见悬浮细胞处理方法。



## 10% 组织匀浆

取 0.020-1.0 g 新鲜组织块，用 2-8°C 的 PBS (0.01 M, pH 7.4) 漂洗，去除血液，滤纸吸干，称重，放入匀浆容器中，按照重量 (g) : 体积 (mL) =1:9 的比例加入 2-8°C 的匀浆介质，进行匀浆，4°C，10000×g 离心 10 min，取上清置于冰上待测，若不能当天检测，于 -80°C 保存，

## 线粒体样本

将 10% 组织匀浆，4°C，1500×g 离心 10 min，将上清液 4°C，10000×g 离心 15 min，弃去上清，沉淀即为线粒体。加入匀浆介质溶解后待测。

## 脂肪组织

取新鲜组织块 (20 mg-1.0g)，按照重量 (g) : 体积 (mL) =1:9 的比例加入 2-8°C 的匀浆介质，进行匀浆，4°C，1500×g 离心 10 min，用棉签吸弃上层乳白色液体，吸取中层澄清液体待测。

## 微生物样本

将菌液于 4°C、1000-2000×g 离心 10 min 收集细菌，用 PBS (0.01 M, pH 7.4) 将菌沉淀洗 2-3 遍，然后按照原菌液体积的 1/5-1/10 加入裂解液 (一般为 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2mM EDTA, 100 mM NaCl, 加溶菌酶至 100 ug/ml, 0.1% Triton X-100, 具体情况根据所测指标选择) 重悬菌体，在冰水浴条件下，超声破碎 (条件一般是 300w, 超声 10s 间隔 10s, 总时间 10 分钟，具体条件可根据自身情况而定)。

### 如何判断是否超声完全：

- ① **外观判断：**超声前菌悬液是浑浊的，超声完全后变的透明、清澈。
- ② **液体的粘滞性：**超声后菌液从枪头滴下不粘连。
- ③ **高速离心：**有用高速离心检测超声破碎程度的 (一般用 6000×g 离心 10 min，比一般离心收集菌体的转速高一点)。沉淀是未破碎或破碎不完全的菌体。

### 一些需要注意的问题：

- ① 如果超声时出现黑色沉淀，说明超声功率太强。
- ② 超声时间太长、功率太高对蛋白活性肯定有影响。
- ③ 尽量防止泡沫的产生。



## 附录

### 一、匀浆方式

#### 1. 手工匀浆

将组织称重，剪碎呈 1 cm<sup>3</sup> 大小，倒入玻璃匀浆管中，加入匀浆介质，左手持匀浆管将下端置于冰浴中，右手将捣杆垂直插入套管中，上下转动研磨数十次（6 ~ 8 min），组织充分匀浆；或者倒入研钵中，加入液氮进行研磨，充分研磨后，加入匀浆介质，再将制好的组织匀浆吸取到 EP 管中备用。

#### 2. 机械匀浆

将称重的组织装入 EP 管，加入匀浆介质，用组织匀浆机，在冰水浴，60Hz，90s 条件下研磨制成组织匀浆，皮肤、肌肉组织及植物组织等可适当延长匀浆时间。

#### 3. 超声波破碎

用超声波发生器以振幅 14 μm 超声处理 30 s，破碎细胞；或者用超声波破碎仪，200 W，2 s/ 次，间隙 3 s，总时间 5 min。

#### 4. 反复冻融

将细胞在 -20℃ 以下冰冻，室温融解，反复几次（至少 3 次）。此方法不适用于酶活检测试剂盒。

### 二、实验室常见抗凝剂的种类

#### 1. 肝素

常用的肝素抗凝剂是肝素的钠、钾、锂、铵盐，其中以肝素锂最好。通常肝素抗凝剂量为 10.0-12.5 IU/mL 血液。

#### 2. 草酸盐

常用的草酸盐有草酸钠、草酸钾、草酸铵，通常为 0.1 M 与血液按照 1:9 的体积比混合抗凝。

#### 3. 枸橼酸盐

主要是枸橼酸钠，通常以二水合枸橼酸钠配置成 3.8% 或者 3.2% 的水溶液，与血液按照 1:9 的体积比混合抗凝。

#### 4. 乙二胺四乙酸盐（EDTA 盐）

常用的 EDTA 盐有钾、钠、锂盐，推荐使用 EDTA 钾盐（溶解度最高、抗凝速度最快），通常配成 15% 的水溶液（质量分数），每 5 mL 血液加 0.04mL 15% EDTA 溶液抗凝。

### 三、常见匀浆介质配方

| 匀浆介质种类             | 配方  |
|--------------------|---|
| 生理盐水               | 0.9% NaCl   |
| 0.01 M PBS (pH7.4) | 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 、136mM NaCl、2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 、2.6mM KCl |
| 生物匀浆液              | 20 mM HEPES-KOH (pH7.2)、210 mM 甘露醇、70 mM 蔗糖、1 mM EGTA   |
| NP-40 细胞 / 组织裂解液   | 10 mM Tris-HCl (pH7.4)、10 mM NaCl、15 mM MgCl <sub>2</sub> 、250 mM 蔗糖、0.01 mM EGTA、0.5% NP-40      |



#### 四、参考文献

1. 杨培珂. 消除高脂血对临床生化测定结果影响的方法分析. 中华卫生应急电子杂志, 2015, 1(4):283-284.
2. 朱征, 丁显平, 杨敏等. 消除高脂血对临床生化测定影响的方法研究. 西南军医, 2013, 15(2):147-148.