

全国高等院校实验教学系列规划教材

生命科学实验

主 编 乔新惠 李斌元 李邦良



科学出版社
www.sciencep.com

全国高等院校实验教学系列规划教材

生命科学实验

主 编	乔新惠	李斌元	李邦良
副主编	田 英	张秋菊	何淑雅
	林国平	龙石银	曹朝晖
	马 云	许金华	

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

本书为全国高等院校实验教学系列规划教材。全书分生命科学实验技术原理、实验内容及附录三个部分。第一部分共十章,较系统介绍了电泳、层析、分光、离心、同位素示踪技术和分子生物学几项常规技术,包括酵母双杂交、DNA重组、核酸分子杂交、聚合酶链式反应技术的基本理论,简要介绍了生物大分子分离纯化的一般原则。第二部分包括生物化学、分子生物学、基因工程、生化技术、酶工程等56个实验,涉及普通生物化学实验与蛋白质、酶、核酸等生物分子的分离、制备、纯化及分析鉴定技术。附录部分包括实验室的基本操作、试剂的配制与保存、常用仪器的使用方法等,供读者查阅和参考。

本书可供开设相应实验课程的医学、生物科学、生物技术、药学、医学检验、卫生检验等专业本科生及有关专业硕士生使用,也可供相关科技工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

生命科学实验/乔新惠,李斌元,李邦良主编. —北京:科学出版社,2010.7
(全国高等院校实验教学系列规划教材)

ISBN 978-7-03-028336-8

I. 生… II. ①乔… ②杨… ③李… III. 生命科学-实验-高等学校-教材 IV. Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第138110号

策划编辑:邹梦娜 李国红 / 责任编辑:邹梦娜 / 责任校对:陈玉凤

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄 超

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>

骏杰印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010年7月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2010年7月第一次印刷 印张:15 3/4

印数:1—4 000 字数:373 000

定价:29.80元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

随着生命科学的迅速发展,人们在科研和实践中对实验技术的需求越来越迫切。生命科学实验技术是发展生命科学的主要技术工具,是生物技术和生物工程技术的核心。在工业、农业、医药卫生、环境科学等研究领域和生产实践中,以生命科学理论为基础,以其实验技术方法为手段,取得了令人瞩目的成就,产生了巨大的社会效益和经济效益。生命科学实验技术作为高等学校某些新的相关专业的必修课程,一直希望有一本合适的教材。

我们在总结过去教学经验的基础上,结合已出版的几本实验指导,借鉴兄弟院校的教学内容和方法,组织编写了这本教材。

全书分生命科学实验技术原理、实验内容及附录三个部分。技术原理部分较系统介绍了电泳、层析、分光、离心、同位素技术和分子生物学几项常规技术的基本理论,简要介绍了生物大分子分离纯化的一般原则。实验内容编者本着简便、实用、可操作性强、便于教学安排的原则,共选编了50余个实验,涉及普通生化实验与分子生物学及基因工程、酶工程、蛋白质、酶、核酸等生物分子的分离、制备、纯化及分析鉴定技术。既注重学生的基本功训练,又注意引进一些新的、反映现代生命科学发展前沿的技术方法。其中,大部分实验是本校生物技术、医学检验、卫生检验、临床医学等专业和硕士生所做过的。一般在4~16学时内可以完成。某些章节后附有思考题供学生深入学习理解。附录部分包括实验室的基本操作、试剂的配制与保存、常用仪器的使用方法等,供读者查阅和参考。

本书主要为开设相应实验课程医学、生物技术、生物科学、药学、医学检验、卫生检验、护理等专业本科生及有关专业硕士生所编写,也可供从事生命科学实验技术的科技工作者参考。

在本书的编写出版过程中,许多同仁付出了辛勤的工作,编者在此一并致以诚挚的谢意。

由于编者水平有限,错误和疏漏之处恳请使用本书的师生批评指正。

编 者

2010年1月

目 录

第一部分 生命科学实验技术原理

第一章 电泳技术	(1)
第一节 概述	(1)
第二节 电泳的基本原理	(2)
第三节 区带电泳技术	(7)
第四节 染色方法	(23)
第二章 层析技术	(29)
第一节 概述	(29)
第二节 层析技术的基本理论	(31)
第三节 层析定性与定量分析	(38)
第四节 常用的层析方法	(41)
第三章 分光光度法	(54)
第一节 概述	(54)
第二节 光吸收的基本规律	(57)
第三节 分光光度计的构造和类型	(58)
第四节 定性、定量方法及其应用	(61)
第五节 双波长分光光度计及其测定方法	(62)
第四章 超离心技术	(66)
第一节 概述	(66)
第二节 超离心分离方法	(70)
第三节 密度梯度液的制备和区带收集	(75)
第四节 制备超离心机做沉淀分析	(79)
第五章 生物大分子的分离纯化与鉴定	(80)
第一节 生物大分子制备的前处理	(80)
第二节 分离纯化	(82)
第三节 生物大分子的浓缩、干燥和保存	(83)
第四节 生物大分子含量的测定和纯度鉴定	(85)
第六章 放射性同位素示踪技术	(87)
第七章 酵母双杂交技术	(96)
第八章 DNA 重组技术	(100)
第九章 核酸分子杂交技术	(110)
第十章 聚合酶链反应技术	(122)

第二部分 实验内容

第十一章 生物化学实验	(124)
实验一 血清蛋白质醋酸纤维薄膜电泳	(124)
实验二 血清蛋白聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳	(126)
实验三 圆盘电泳分离 LDH 同工酶	(129)
实验四 氨基酸双向纸层析	(132)
实验五 动物组织 DNA 的提取和鉴定	(134)
实验六 动物组织 RNA 的提取和鉴定	(136)
实验七 影响酶活性的因素	(137)
实验八 胡萝卜素的柱层析分离	(144)
实验九 肝糖原的提取鉴定与定量	(145)
实验十 血糖浓度的测定与胰岛素、肾上腺素对血糖浓度影响	(147)
实验十一 运动后血中乳酸含量的变化	(149)
实验十二 血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	(151)
实验十三 血清总胆固醇测定(磷硫铁法)	(152)
实验十四 琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制	(153)
实验十五 氨基酸的薄层层析	(154)
实验十六 血清丙氨酸氨基转移酶活性测定	(155)
实验十七 凝胶层析分离血红蛋白与 CuSO_4	(159)
实验十八 血清总蛋白的测定及标准曲线的制作(双缩脲法)	(160)
实验十九 血清尿素氮的测定	(162)
实验二十 ^3H -胸苷掺入 DNA 的试验	(163)
实验二十一 ^{32}P 掺入磷脂的试验	(164)
第十二章 分子生物学与基因工程实验	(167)
实验一 质粒 DNA 的微量快速提取	(167)
实验二 质粒 DNA 的酶切与鉴定	(169)
实验三 聚合酶链反应技术(PCR)	(170)
实验四 DNA 重组与鉴定	(173)
实验五 DNA 印迹杂交技术	(175)
实验六 肝总 RNA 的制备	(179)
实验七 克隆化基因在大肠埃希菌的诱导表达	(182)
实验八 哺乳动物细胞的转染	(183)
实验九 蛋白质印迹免疫分析	(185)
实验十 DNA 的提取	(188)
实验十一 细胞培养实验	(189)
实验十二 细胞凋亡检测	(190)
实验十三 用电穿孔方法将重组质粒转化细菌	(192)
实验十四 Northern 杂交技术	(193)

第十三章 生化技术实验	(196)
实验一 血红蛋白及其衍生物的吸收光谱测定	(196)
实验二 核酸溶液的紫外吸收测定	(197)
实验三 蛋白质溶液的紫外吸收测定	(198)
实验四 SDS-PAGE 分离蛋白质	(200)
实验五 蛋白质定量测定 Folin-酚试剂法(Lowry 法)	(203)
实验六 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦分离血清蛋白质	(204)
实验七 血清脂蛋白快速超离心分离实验	(206)
实验八 DEAE 纤维素离子交换层析法分离血清蛋白质	(206)
实验九 亲和层析法纯化胰蛋白酶	(208)
实验十 血清白蛋白、 γ 球蛋白的分离纯化及鉴定	(211)
实验十一 密度梯度离心法分离肝细胞器	(215)
实验十二 外周血 DNA 的快速提取	(216)
第十四章 酶工程实验	(218)
实验一 凝血酶的固定化及固定化凝血酶的稳定性测定	(218)
实验二 固定化具有葡萄糖异构酶活性菌体的制备	(219)
实验三 $\text{Cu} \cdot \text{Zn}$ 超氧化物歧化酶的分离与纯化	(219)
实验四 细胞色素 c 的制备和含量测定	(222)
实验五 绿豆芽中酸性磷酸酯酶的提取	(224)
实验六 pH 对酶活力的影响——最适 pH 的测定	(225)
实验七 温度对酶活力的影响——最适温度的测定	(226)
实验八 底物浓度和抑制剂对酶活力的影响—— K_m 和 K_i 的测定	(227)
实验九 酶促反应速度与时间的关系——初速度时间范围的测定	(229)
附录	(231)
附录 1 生物化学实验的基本操作及原理	(231)
附录 2 常用容量仪器的规格、使用、清洗及洗液的配制	(235)
附录 3 化学试剂的规格与保管	(239)
附录 4 实验室常用设备介绍	(240)
附录 5 分子生物学常用试剂	(242)

第一部分 生命科学实验技术原理

第一章 电泳技术

第一节 概述

一、电泳的概念与电泳技术发展简史

电泳(electrophoresis)是指带电粒子在直流电场中向着与其自身电性相反电极方向移动的现象。电泳现象由俄国物理学家 Reuss 于 1809 年首先发现。但是电泳的实际应用则是一百多年以后的事情。1937 年, Tiselius 利用“U”形管制成界面电泳仪, 首次成功地对血清蛋白质进行了分离因而获得诺贝尔奖; 1948 年, Wieland 等发明用滤纸作支持物的区带电泳; 1950 年出现琼脂凝胶电泳; 1953 年又发展为免疫电泳; 1955 年, Smithies 以淀粉胶为支持物将血清蛋白质分离为十余条区带; 1957 年, Kohn 首先使用醋酸纤维薄膜作为电泳支持物; 1959 年, Davis 发明聚丙烯酰胺凝胶电泳。在此基础上, 电泳技术不断发展, 相继出现等电聚焦电泳、等速电泳、双向电泳、印迹转移电泳和毛细管电泳等技术; 并且, 电泳技术与其他技术如层析、扩散、免疫、放射性同位素技术、质谱技术等联用, 使电泳技术的应用范围得以扩大。电泳技术以设备简单、操作方便、分辨率高等优点, 目前已成为生物化学、分子生物学、免疫学、生物技术等学科和专业的常用研究工具, 也是医学、药学、工农业生产等各领域的重要分析手段。

二、电泳的分类

根据有无固体支持物分为自由电泳和区带电泳。

(一) 自由电泳

自由电泳又称界面电泳(moving boundary electrophoresis), 即在溶液中进行电泳。当溶液中有几个组分时, 通电后, 由于组分在电场中移动快慢不同而形成若干个界面。然后采用折光率测定装置对不同界面的折光率进行测定分析, 分部分离收集样品。此法是 1937 年瑞典科学家 Tiselius 创立的最早具有应用价值的电泳装置(“U”形电泳装置), 可用于制备性分离。但有较多缺点: 界面形成不完全, 有重叠, 不易得到纯品; 分离后或停电后极易扩散, 不易分离收集; 利用折光率的改变进行结果测定, 操作繁琐, 需特殊设备, 已很少有人采用。

属自由电泳的还有: 显微电泳, 将一种大的胶体颗粒或细胞置于显微镜下的电泳池中进行电泳, 可用来直接测定电泳迁移率; 密度梯度和 pH 梯度并存的柱状等电聚焦电泳; 等速电泳等。

(二) 区带电泳(zone electrophoresis)

电泳在固相支持物上进行。此支持物将溶液包绕在其网孔中,避免了溶液中的物质自由移动的弊端,使混合物的各组分在支持物上分离为区或带。是目前应用最多的电泳方法。

区带电泳又可根据支持物的类型、理化性质、电压、电泳方式等进一步分类。

1. 按支持物的物理性状分类

(1) 滤纸及其他纤维薄膜(如醋酸纤维薄膜、聚氯乙烯膜、赛璐玢薄膜)电泳:适用于少量样品的分析鉴定。

(2) 粉末电泳:如淀粉、纤维素粉、玻璃粉调制成平板。

(3) 凝胶电泳:如琼脂胶、琼脂糖凝胶、淀粉胶、聚丙烯酰胺凝胶等为支持物的电泳。

(4) 缘线电泳:如尼龙丝、人造丝电泳。

2. 按支持物的装置形式分类

(1) 平板式电泳:支持物水平放置于左右电极槽之间。

(2) 垂直板式电泳:支持物垂直放置于上下电极槽之间。

(3) 垂直柱式电泳:支持物制成柱状垂直放置于上下电极槽之间。

(4) 连续液动电泳(幕状电泳):首先应用于纸电泳,将滤纸垂直,两边各放一电极,溶液自上向下流,与电泳方向垂直,可用于物质的分离与制备。

3. 按电泳系统条件的连续性分类

(1) 连续电泳:整个电泳系统 pH、离子强度、支持物性质等一致。

(2) 不连续电泳:缓冲液和支持物间或支持物内 pH、离子强度、介质种类和密度等一种或多种条件不同。如等电聚焦电泳、聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳。

4. 按电场强度大小分类

(1) 常压电泳:电场强度通常在 $2\sim 20\text{V/cm}$ 间,总电压 $< 500\text{V}$ 。常用于分离高分子化合物,如蛋白质、核酸。

(2) 高压电泳:电场强度 $> 20\text{V/cm}$,总电压 $> 500\text{V}$ 。常用于低分子离子分离。如氨基酸、核苷酸电泳。

区带电源还可按操作手段、方法、目的等分类。如双向电泳、免疫电泳等。

第二节 电泳的基本原理

一、动力和方向

带电粒子在电场中为什么能移动?是因为带电粒子在电场中受到电场引力(F)的作用, F 的大小取决于粒子所带电荷量 Q 及电场强度 E ,即:

$$F = QE \quad (1-1)$$

粒子在电场中移动的方向由粒子本身所带电荷的性质决定,带正电荷向负极移动,带负电荷向正极移动。

二、迁移率

带电粒子在电场中的泳动速度(migration velocity)用迁移率(或泳动率 mobility, M)来

表示。即：从原点起，在电场强度为 1V/cm 时，每秒钟的泳动距离。也就是单位电场强度下的泳动速度。

$$M = \frac{v}{E} = \frac{\frac{d}{t}}{\frac{V}{l}} = dl/Vt (\text{cm}^2/\text{V} \cdot \text{s}) \quad (1-2)$$

式中， M 迁移率； v 泳动速度 (cm/s)； E 电场强度 (V/cm)； d 泳动距离 (cm)； l 支持物有效长度 (cm)； V 支持物有效电压 (V)； t 通电时间 (s)。

三、影响电泳的因素

对电泳的影响包括对速度的影响和效果的影响。影响电泳的因素很多，如样品颗粒本身所带电荷的种类、数量、粒子大小、形状；支持物化学性质、带电状况、有无分子筛作用；缓冲液的 pH 、离子强度、缓冲容量、黏度、化学成分；电场电压、电流、热效应与水分蒸发、水的电解等。

(一) 样品粒子

已知带电粒子在电场中所受的作用力 $F = EQ$ ，根据 Stokes 定律，球形粒子在液体中运动时所受到的阻力 F' ，与粒子运动的速度 v ，粒子的半径 r ，介质的黏度 η 的关系为：

$$F' = 6\pi r\eta v \quad (1-3)$$

当电泳达到平衡，粒子在电场中做匀速运动时 $F = F'$ ，即：

$$EQ = 6\pi r\eta v \quad (1-4)$$

$$\therefore v = EQ/6\pi r\eta \quad (1-5)$$

也即电泳速度与电场强度、粒子带电量成正比，与粒子的半径、介质的黏度成反比。

又 $M = v/E$ ，以式 (1-5) 代入得：

$$M = EQ/6\pi r\eta/E$$

整理，得：

$$M = Q/6\pi r\eta \quad (1-6)$$

式中 6π 是适用于球形带电粒子的经验数值，对椭圆形或半径 r 很大的粒子则数值有所不同。

由式 (1-6) 可知，迁移率与粒子所带电荷量成正比，与粒子的半径、介质的黏度成反比。粒子荷电量越多， r 越小，越近球形，泳动越快；反之越慢。

在相同条件下 (E 、介质性质如 η 等相同)，不同种类的带电物质由于其 Q/r (球形分子也即电荷/质量比) 各不相同而具有不同的泳动率。这种移动速度的差异就是电泳技术的基本依据。

(二) 支持物因素

对支持物的一般要求是质地均匀，吸附力小，惰性，不与被分离的样品或缓冲液起化学反应。并具有一定坚韧度，不易断裂，容易保存。

1. 支持物类型 根据支持物对电泳的影响分为两大类：

(1) 单纯支持物：支持物相对惰性，对被分离物几乎无作用。分离作用取决于待分离物的 Q/r 。荷质比相同的不同粒子 M 相等而不能分离。属于这类支持物的有：滤纸、醋酸纤

维薄膜、玻璃纤维纸、薄层物质、琼脂及琼脂糖凝胶、单纯纤维素纤维等(可用于分析和制备目的);淀粉和石膏、海绵橡皮(仅用于制备目的)。

(2) 分子筛支持物:多孔网状结构的凝胶具有分子筛作用。 Q/r (荷质比)相同而分子量不同的混合物粒子,可用此法进行分离。属于这类支持物的有:淀粉凝胶、聚丙烯酰胺凝胶。

2. 电渗(electro-osmosis)现象 电场中液体对于固体支持物的相对移动称为电渗(图1-1)。它是由缓冲液的水分子和支持物表面之间所产生的一种相关电荷所引起。

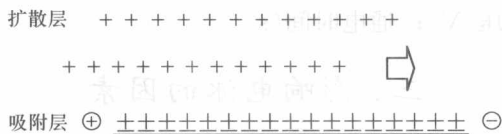


图 1-1 电渗现象示意图

某些支持物表面带有电荷,如滤纸纤维素带有负电性($\text{—OH} \rightarrow \text{—O}^- \text{—H}$ 或 $\text{—O}^- + \text{H}^+$),琼脂多糖含有大量硫酸根(—SO_4^-)。这些支持物可以使水感应产生正电离子(H_3O^+)。在电场中由于支持物固定, H_3O^+ (水合质子)向阴极移动,并且带着缓冲液中的盐类和一些待分离物质一起移向负极。如果物质原来是向负极移动,那么移动速度会更快;如果是向正极移动(如血清蛋白质电泳),则 H_3O^+ 的泳动方向与蛋白质泳动方向相反,影响蛋白质的泳动速度,甚至将泳动最慢的 γ 球蛋白带到相反方向(这个原理是对流免疫电泳的理论依据)。因此,实际泳动速度由颗粒本身的泳动速度和电渗作用所决定。

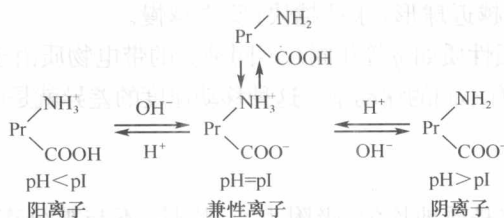
在电泳支持物的选择上,应根据具体需要来选择具有不同电渗作用的支持物,如一般分离宜用电渗作用小的支持物,而对流免疫电泳则需电渗作用大的琼脂。

琼脂中的琼脂果胶(agarpectin)含有较多 —SO_4^- ,除去了琼脂果胶后的琼脂糖则电渗作用大为减弱。

电渗现象及其所造成的移动方向和距离可用不带电的有色染料或有色葡聚糖点在支持物的中心加以观察确定。

(三) 介质因素

1. 缓冲液的 pH 电极缓冲液的 pH 决定了待分离物的带电性质与荷电量。对于蛋白质和氨基酸等两性电解质,pH 大于等电点,分子带负电荷,移向正极;pH 小于等电点,分子带正电荷,移向负极;pH 等于等电点,分子净电荷为 0,在电场中不泳动。如:



溶液 pH 偏离等电点越远,分子解离程度越大,带电量越多,电泳移动速度越快;反之则越慢。不同物质等电点不同,在同一 pH 时,分子解离程度不同,带电量不同,泳动速度也就有差异。因此,分离蛋白质类混合物时,选择一个合适的 pH,使各种蛋白质所带电净电荷量差异增大,以利于分离。

恒定的 pH 环境使被分离物带电量不变,故电泳速度不变。缓冲溶液尚有对蛋白质的保护作用,使蛋白质处于溶解状态,不致沉淀、变性。

2. 缓冲液的离子强度 离子强度是表示系统中电荷数量的一个数值,是溶液中离子产生的电场强度的量度。离子强度对电泳的影响是显著的。离子强度越高,质点泳动越慢,但区带分离度较清晰。离子强度过高,可降低胶粒(如蛋白质)的带电量(压缩双电层,降低 ζ 电位),使电泳速度减慢,甚至破坏胶体,使之不能泳动;离子强度过低,虽电位大,泳动速度加快,但缓冲液的容量小,不易维持 pH 恒定。电极缓冲液的常用离子强度为 0.02~0.2 之间。

溶液的离子强度可根据公式 $I = \frac{1}{2} \sum CZ^2$ 计算,其中 I 为离子强度, C 为离子的摩尔浓度, Z 为离子的电荷数(价数)。溶液的离子强度与离子浓度有关,但数值上不一定相等。

3. 介质中化学物质对粒子泳动的影响 若其他条件相同,电泳速度取决于粒子的 Q/r 比值。如果向介质中加入某些化学试剂,设法改变粒子的带电状态,也可影响电泳的特性。如 SDS(十二烷基硫酸钠, $[\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_{10} \cdot \text{CH}_2 - \text{SO}_4]^- \text{Na}^+$) 是一种阴离子去污剂,可以与蛋白质分子成比例地结合,使蛋白质分子带有与其分子量成比例的大量负电荷,消除蛋白质分子本身电荷对泳动率的影响,可以靠分子筛作用,依据分子的不同质量,用聚丙烯酰胺凝胶电泳予以分离。如有已知分子量的标准蛋白质做对照,便可测定未知蛋白质的分子量。

4. 其他介质因素的影响 泳动率与介质黏度 η 成反比;与介电常数 D 成正比。

$$M = \frac{\zeta D}{6\pi\eta} \quad M = \frac{\zeta D}{4\pi\eta}$$

(此公式适用于小分子) (此公式适用于大分子)

(四) 电场因素

电场因素包括电压、电流的作用以及可能带来的热效应和水分的蒸发等。

1. 电场强度 电场强度是指每厘米支持物(长度)的电位降,亦即电势梯度。例如醋酸纤维薄膜有效长度为 8cm,两端测得电位降为 120V,则电场强度为 15V/cm。电场强度越大,带电颗粒移动速度越快。但电压越高,电流也会随之增高($I=V/R$),产生的热量也会增多。所以,在高压电泳时,常采用冷却装置,以控制温度。

2. 热效应 通电以后便有一定的电流 I 通过介质(电阻 R)产生一定的热量 C ,消耗一定的电功 W 。其关系如下:

$$V=IR; \quad W=IV; \quad C=Wt/4.18=I^2Rt/4.18$$

热效应对电泳的影响可以通过以下几方面表现出来:

(1) 热效应使介质黏度发生改变: η 是 $1/T$ 的指数函数,温度 T 升高, η 降低;而 η 与 M 成反比关系。例如,自由电泳,温度从 0℃ 增加到 25℃, η 值减半,泳动率 M 加倍。

(2) 热效应使导电性发生改变:温度和导电性的关系也是指数关系。提高温度则电流增加,泳动速度加快,出现电流、电压的改变。

(3) 热效应使扩散速度增加:温度升高,介质黏度降低,且分子热运动增加,使扩散速度加快。

(4) 热效应使介质密度不均一,甚至破坏凝胶,使实验失败。

(5) 热效应引起水分蒸发:水分蒸发又可引起 pH、离子强度、导电性、电场均一性的改变。故应保持电泳槽内的温度,减小热效应的影响。由于支持介质水分蒸发而干燥,就会从

电极液中吸水。这种水流不均一,即电泳带两端水流多于中间,造成缓冲液盐浓度不一致,电场电流也不均一。

(6) 热效应改变介质 pH: 温度能改变缓冲剂的平衡常数。各种缓冲液的 pH-温度系数不一致。所谓 pH-温度系数是指温度变化 1℃, 其 pH 的改变数值。碱性缓冲液对温度更为敏感, 这主要是 pK_a 值易受温度的影响。

值得注意的是 Tris-HCl 缓冲液 pK_a 受温度的影响较大, 其系数 ($\Delta pK_a/^\circ\text{C}$) 为 0.03。表 1-1 列出在 25℃ 时配置的该缓冲液在 5℃ 和 37℃ 时的 pH 变化情况。

表 1-1 温度对 Tris-HCl 缓冲液 pH 的影响

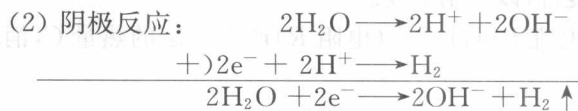
5℃	25℃	37℃	5℃	25℃	37℃	5℃	25℃	37℃
7.76	7.20	6.91	8.48	7.90	7.62	9.08	8.50	8.22
7.89	7.30	7.02	8.58	8.00	7.71	9.18	8.60	8.31
7.91	7.40	7.14	8.68	8.10	7.80	9.28	8.70	8.42
8.07	7.50	7.22	8.78	8.20	7.91	9.36	8.80	8.51
8.18	7.60	7.30	8.88	8.30	8.01	9.47	8.90	8.62
8.26	7.70	7.40	8.98	8.40	8.10	9.56	9.00	8.70
8.37	7.80	7.52						

3. 恒电流对电泳的影响 电泳过程中由于热效应使电阻降低, 电泳速度加快; 但同时电阻的降低又使电压不断降低 ($V=IR$), 使电泳速度下降, 这样热效应得以补偿, 电泳速度基本恒定。同时蒸发现象也得到改善。所以, 无条件控制电泳温度时, 最好采用恒电流方式进行电泳。

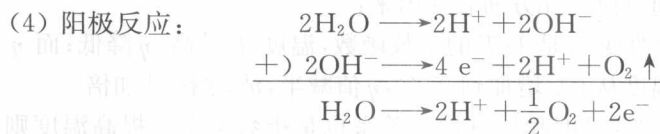
电流、电压的控制: 调节电压时, 按电场强度调, 不必考虑支持物及宽度。如醋酸纤维薄膜电泳, 膜长 8cm, 电场强度 10V/cm, 应调节电压为: $10\text{V/cm} \times 8\text{cm} = 80\text{V}$; 调节电流时, 总电流应调节为: $I = \text{mA/cm 宽} \times \text{宽}(\text{cm}) / \text{条} \times n$ (条或管数)。

4. 电极反应与缓冲

(1) 电极反应: 电泳时电极反应主要是水的电解。阴极产生 H_2 , 阳极产生 O_2 :



(3) 缓冲: $\text{HA} + \text{OH}^- \longrightarrow \text{A}^- + \text{H}_2\text{O}$



(5) 缓冲: $\text{A}^- + \text{H}^+ \longrightarrow \text{HA}$

由上可知, 电泳时每摩尔电子在流经此系统时, 分别在阴极产生 1mol OH^- , 在阳极产生 1mol H^+ 。缓冲液对其缓冲会不断消耗。所以需要有相当高的缓冲容量才行。如长时间电泳, 两端电极液可用泵慢慢混合, 以防缓冲能力耗竭和 pH 改变。

由上并可知, 每生成 1mol 的 H_2 , 仅生成 1/2mol 的 O_2 。这就提供了一个简便的方法以检查电极是否接正确。阳极所产生的气泡数约为阴极的一半。无电流通过时, 两极均无气泡产生。

第三节 区带电泳技术

一、滤纸与醋酸纤维薄膜电泳

纸上电泳与醋酸纤维薄膜电泳 (cellulose acetate membrane electrophoresis) 分别以滤纸和醋酸纤维薄膜为支持物。滤纸是纤维素, 醋酸纤维薄膜是纤维素的醋酸酯, 由纤维素的羟基经乙酰化而成。它溶于丙酮等有机溶液中, 即可涂布成均一细密的微孔薄膜, 厚度约以 0.1~0.15mm 为宜。太厚吸水性差, 分离效果不好; 太薄则膜片缺少应有的机械强度则易碎。目前, 国内有醋酸纤维薄膜商品出售, 不同厂家生产的薄膜主要在乙酰化、厚度、孔径、网状结构等方面有所不同, 但分离效果基本一致。

纸上电泳是在 20 世纪 40 年代与纸层析一道发展起来的分离技术。由于具有简便、迅速等优点, 在实验室和临床检验中广泛应用。自 1957 年 Kohn 首先将醋酸纤维薄膜用作为电泳支持物以来, 纸上电泳已被醋酸纤维薄膜电泳所取代。因为, 后者具有比纸上电泳电渗小, 分离速度快, 分离清晰, 血清用量少, 操作简便, 电泳染色后, 经冰乙酸、乙醇混合液或其他溶液浸泡后可制成透明的干板, 有利于扫描定量及长期保存等优点。

由于醋酸纤维薄膜电泳操作简单、快速、价廉。已广泛用于分析检测血浆蛋白、脂蛋白、糖蛋白, 胎儿甲种球蛋白, 体液、脑脊液、脱氢酶、多肽, 核酸及其他生物大分子, 为心血管疾病、肝硬化及某些癌症鉴别诊断提供了可靠的依据, 因而已成为医学和临床检验的常规技术。

(一) 仪器设备

电泳仪: 供给稳压直流电源。有机玻璃电泳槽: 常为水平式, 内部有两个分隔的缓冲液槽, 分别装有铂金丝电极。两液槽上部有支架, 供放置滤纸、醋酸纤维薄膜等用。支持物两端以滤纸与缓冲液相连。顶部有盖, 以减少液体蒸发。有的还有回流水冷却装置。

(二) 缓冲液

电极缓冲液多采用 pH8.6 的巴比妥缓冲液以分离蛋白质。

(三) 基本步骤

1. 准备 将缓冲液注入槽内, 两槽液面等高, 将支持物滤纸或醋酸纤维薄膜以缓冲液浸泡饱和。盐桥支架铺上滤纸, 一端浸泡在缓冲液中。

2. 点样 用点样器将适量样品点在起点线上, 并置于电泳槽支架上。

3. 通电 打开电泳仪电源开关, 调节电压(或电流)至所要求数值。醋酸纤维薄膜电泳电场强度 10~15V/cm 长, 或电流 0.2~2.0/cm 宽。通电约 30~60 分钟。

4. 染色与洗脱 染色剂种类可根据实验材料及目的选择。如蛋白质常用氨基黑 10B、考马斯亮蓝和丽春红。染色后通常要用适当漂洗液漂洗至背景清晰无色为止。

5. 定量 比色法, 区带剪成条以碱洗脱比色; 扫描, 透明处理的醋酸纤维薄膜通过扫描仪可确定相对百分含量并可打印结果。

二、琼脂和琼脂糖凝胶电泳

(一) 琼脂与琼脂糖的化学本质及凝胶特性

天然琼脂(agar)是从名叫石花菜的一种红色海藻中提取出来多聚糖混合物,主要由琼脂糖(agarose,约占 80%)及琼脂胶(agarpectin)组成。琼脂糖是由半乳糖及其衍生物构成的中性物质,不带电荷。而琼脂胶是一种含硫酸根和羧基的强酸性多糖。由于这些基团带有电荷,在电场作用下能产生较强的电渗现象。加之硫酸根可与某些蛋白质作用而影响电泳速度及分离效果。因此,目前多用琼脂糖为电泳支持物进行平板电泳,其优点如下:

- (1) 琼脂糖凝胶电泳操作简单,电泳速度快,样品不需事先处理就可进行电泳。
- (2) 琼脂糖凝胶结构均匀,含水量大(约占 98%~99%),近似自由电泳,样品扩散度较自由电泳小,对样品吸附极微,因此电泳图谱清晰,分辨率高,重复性好。
- (3) 琼脂糖凝胶透明无紫外吸收,电泳过程和结果可直接用紫外监测及定量测定。
- (4) 电泳后区带易染色,样品易洗脱,便于定量测定,制成干膜可长期保存。
- (5) 价廉,无毒性。

目前,常用 1%琼脂糖作为电泳支持物,用于分离血清蛋白、血红蛋白、脂蛋白、糖蛋白、乳酸脱氢酶、碱性磷酸酶等同工酶的分离和鉴定,为临床某些疾病的鉴别诊断提供可靠的依据。将琼脂糖凝胶电泳与免疫化学相结合,发展成免疫电泳技术,能鉴别其他方法不能鉴别的复杂体系,由于建立了超微量技术,0.1 μ g 蛋白质就可检出。

琼脂糖凝胶电泳也常用于分离、鉴定核酸,如 DNA 鉴定、DNA 限制性内切酶图谱制作等,为 DNA 分子及其片段分子量测定和 DNA 分子构象的分析提供了重要手段。由于这种方法具有操作方便,设备简单,需样品量少,分辨能力高的优点,已成为基因工程研究中常用实验方法之一。

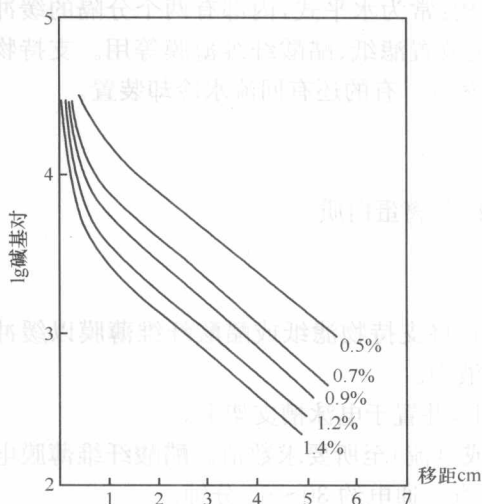


图 1-2 移动距离与碱基对的相应关系

缓冲液:0.5 $\times$ TBE,0.5 μ g/ml 溴乙锭,电泳条件:1V/cm,16h
分子大小不宜超过此值。

(二) DNA 的琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖凝胶电泳对核酸的分离作用主要依据它们的分子量及分子构象,同时与凝胶的浓度也有密切关系。

1. 核酸分子大小与琼脂糖浓度的关系

(1) DNA 分子的大小:在凝胶中,较小的 DNA 片段迁移比较大的片段快。DNA 片段迁移距离(迁移率)与其分子量的对数成反比。因此通过已知大小的标准物移动的距离与未知片段的移动距离进行比较,便可测出未知片段的大小。但是当 DNA 分子大小超过 20kb 时,普通琼脂糖凝胶就很难将它们分开。此时电泳的迁移率不再依赖于分子大小,因此,应用琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 时,

(2) 琼脂糖的浓度:一定大小的 DNA 片段在不同浓度的琼脂糖凝胶中,电泳迁移率不相同(图 1-2)。不同浓度的琼脂糖凝胶适宜分离 DNA 片段大小范围详见表 1-2。因而要有

效地分离大小不同的 DNA 片段,主要是选 表 1-2 琼脂糖凝胶浓度与分辨 DNA 大小范围的关系
用适当的琼脂糖凝胶浓度。

2. 核酸构象与琼脂糖凝胶电泳分离的关系

不同构象的 DNA 在琼脂糖凝胶中的电泳速度差别较大。根据 Aaij 和 Borst 研究表明,在分子量相当的情况下,不同构象的 DNA 的移动速度次序如下:共价闭环 DNA(covalent closed circular, cccDNA) > 直线 DNA > 开环的双链环状 DNA。当琼脂糖浓度太高时,环状 DNA(一般为球形)不能进入胶中,相对迁移率为 0 ($R_m=0$),而同等大小的直线双链 DNA(刚性棒状)则可以长轴方向前进($R_m>0$),由此可见,这 3 种构象的相对迁移率主要取决于凝胶浓度。但同时,也受到电流强度,缓冲液离子强度等的影响。

琼脂糖凝胶电泳基本方法简要介绍如下:

(1) 凝胶电泳类型:用于分离核酸的琼脂糖凝胶电泳也可分为垂直型及水平型(平板型)。水平型电泳时,凝胶板完全浸泡在电极缓冲液下 1~2mm,故又称为潜水式。目前更多用的是水平型,因为它制胶和加样比较方便,电泳槽简单,易于制作,又可以根据需要制备不同规格的凝胶板,节约凝胶,因而受到人们的欢迎。

(2) 缓冲液系统:DNA 的电泳迁移率受到电泳缓冲液的成分和离子强度的影响,当缺少离子时,电流传导很少, DNA 迁移非常慢;相反,高离子强度的缓冲液由于电流传导非常有效,导致大量热量产生,严重时,会造成胶熔化和 DNA 的变性。

常用的电泳缓冲液有 EDTA(pH8.0)和 Tris-乙酸(TAE), Tris-硼酸(TBE)或 Tris-磷酸(TPE)等,浓度约为 50mmol/L(pH7.5~7.8),详细配制见表 1-3。电泳缓冲液一般都配制成浓的储备液,临用时稀释到所需倍数。

TAE 缓冲能力较低,后两者有足够高的缓冲能力,因此更常用。TBE 浓溶液储存长时间会出现沉淀,为避免此缺点,室温下储存 5×溶液,用时稀释 10 倍。0.5×工作溶液即能提供足够缓冲能力。

表 1-3 常用琼脂糖凝胶电泳缓冲液

缓冲液	工作溶液	储存液(1000ml)
Tris-乙酸 (TAE)	1×:0.04mol/L Tris-乙酸	50×:242g Tris
	0.001 mol/L EDTA	57.1ml 冰乙酸
		100ml 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)
Tris-磷酸 (TPE)	1×:0.09 mol/L Tris-磷酸	10×:108 g Tris
	0.002 mol/L EDTA	15.5ml 85%磷酸(1.679g/ml)
		40ml 0.5mol/L EDTA(pH8.0)
Tris-硼酸 (TBE)	0.5×:0.045mol/L Tris-硼酸	5×:54g Tris
	0.001 mol/L EDTA	27.5g 硼酸
		20ml 0.5mol/L EDTA(pH8.0)

(3) 琼脂糖凝胶的制备

1) 水平型:以稀释的工作电泳缓冲液配制所需的凝胶浓度。

2) 垂直型:同样以稀释的电泳缓冲液配胶,然后将熔化好的胶液灌入两块垂直放置的玻璃板间的窄缝内。具体操作类同于聚丙烯酰胺垂直板电泳。

(4) 样品配制与加样:DNA 样品用适量 Tris-EDTA 缓冲液溶解,缓冲溶解液内含有 0.25% 溴酚蓝或其他指示染料与 10%~15% 蔗糖或 5%~10% 甘油,以增加其比重,使样品集中。为避免蔗糖或甘油可能使电泳结果产生“U”形条带,可改用 2.5% Ficoll(聚蔗糖)代替蔗糖或甘油。

(5) 电泳:琼脂糖凝胶分离大分子 DNA 实验条件的研究表明:在低浓度,低电压下,分离效果好。在低电压条件下,线性 DNA 分子的电泳迁移率与所用的电压呈正比。但是,在电场强度增加时,分子量高的 DNA 片段迁移率的增加是有差别的。因此随着电压的增高,电泳分辨率反而下降,分子量与迁移率之间就可能偏离线性关系。为了获得电泳分离 DNA 片段的最大分辨率,电场强度不宜高于 5V/cm。

电泳系统的温度对于 DNA 在琼脂糖凝胶中的电泳行为没有显著的影响。通常在室温进行电泳,只有当凝胶浓度低于 0.5% 时,为增加凝胶硬度,可在 4℃ 低温下进行电泳。

(6) 染色:常用荧光染料溴乙锭(EB)进行染色以观察琼脂糖凝胶内的 DNA 条带。详见本章第四节(核酸的染色)。

琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 具体实验操作见(第二部分)。

(三) 免疫电泳

免疫电泳是以琼脂(糖)为支持物,在免疫的基础上,将琼脂(糖)区带电泳与免疫扩散相结合产生特异性的沉淀线、弧或峰。此技术的特点是样品用量极少,免疫识别具有专一性,分辨率高。在琼脂(糖)双扩散的基础上发展了多种免疫电泳,如微量免疫电泳、对流免疫电泳、单向定量免疫电泳(火箭电泳)、放射免疫电泳及双向定量免疫等,上述各种电泳有其共性,但又有不同的操作方法及原理。

三、聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶是由单体(monomer)丙烯酰胺(acrylamide, Acr)和交联剂(cross linker)又称为共聚体的 N,N-甲叉双丙烯酰胺(methylene-bisacrylamide, Bis)在加速剂和催化剂的作用下聚合交联成三维网状结构的凝胶,以此凝胶为支持物的电泳称为聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)。与其他凝胶相比,聚丙烯酰胺凝胶有下列优点:

- (1) 在一定浓度时,凝胶透明,有弹性,机械性能好。
- (2) 化学性能稳定,与被分离物不起化学反应。
- (3) 对 pH 和温度变化较稳定。
- (4) 几乎无电渗作用,只要 Acr 纯度高,操作条件一致,则样品分离重复性好。
- (5) 样品不易扩散,且用量少,其灵敏度可达 10^{-6} g。
- (6) 凝胶孔径可调节,根据被分离物的分子量选择合适的浓度,通过改变单体及交联剂的浓度调节凝胶的孔径。

(7) 分辨率高,尤其在不连续凝胶电泳中,集浓缩、分子筛和电荷效应为一体,因而较醋酸纤维薄膜电泳、琼脂糖电泳等有更高的分辨率。

PAGE 应用范围广,可用于蛋白质、酶、核酸等生物分子的分离、定性、定量及少量的制