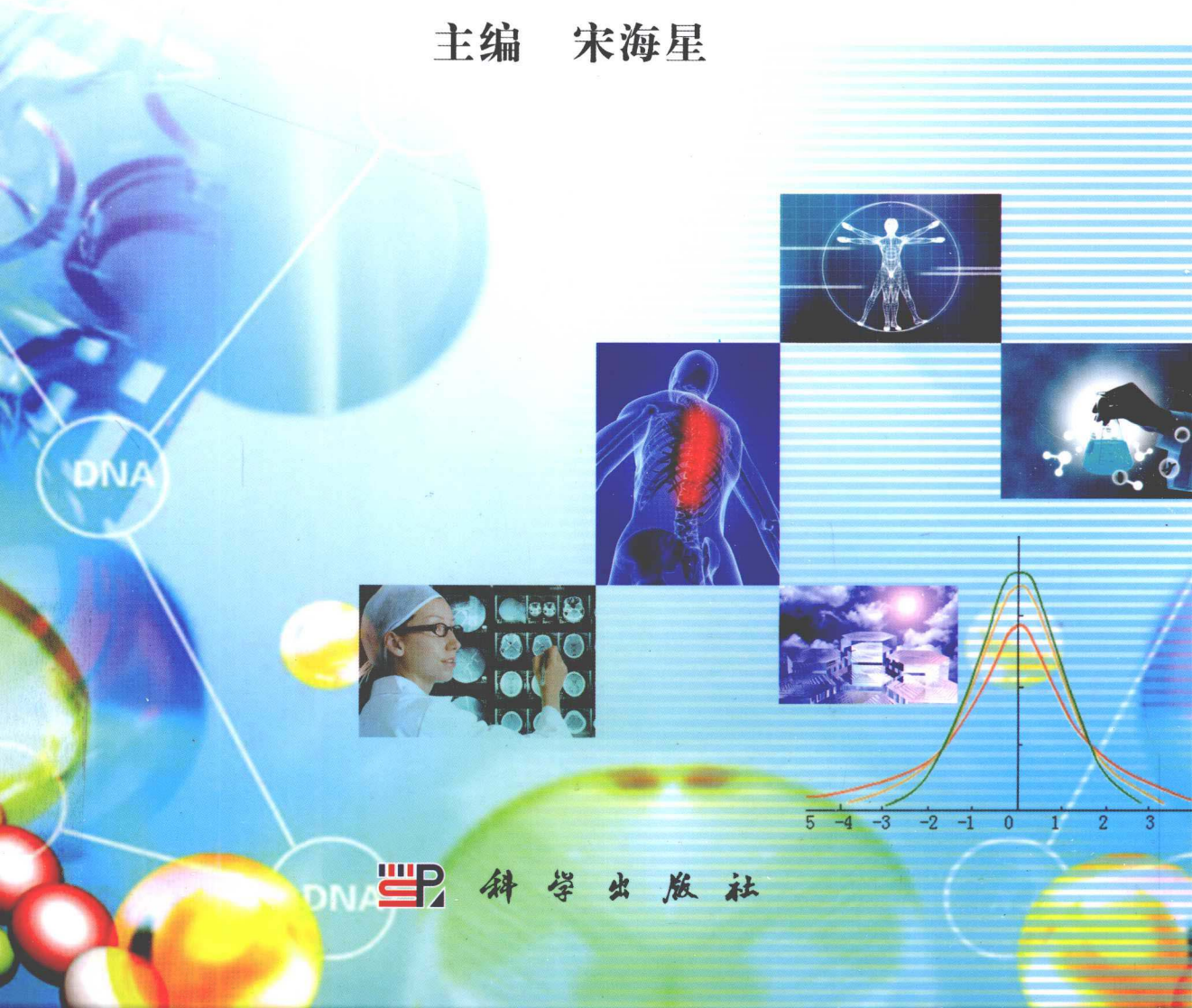


全国高等院校医学实验教学改革教材

供临床、预防、基础、口腔、药学、检验、麻醉、影像、护理等专业使用

生物化学与分子 生物实验学

主编 宋海星



DNA



科学出版社

全国高等医药院校生物化学与分子生物学教材

第2版 2008年12月第1次印刷 32开 160页 25.00元

生物化学与分子 生物实验学

主编 王德明



全国高等院校医学实验教学改革教材

供临床、预防、基础、口腔、药学、检验、麻醉、影像、护理等专业使用

生物化学与分子 生物实验学

主 编 宋海星

副主编 (按拼音顺序排列)

何 浪 王 丹

编 委 (按拼音顺序排列)

邓 緬 何 浪 刘 桦

蒲玲玲 宋海星 王 丹

王元元 曾莉萍 张 涛

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

本书共三篇十二章,内容涵盖生物化学有关糖类、脂类、酶、氨基酸以及分子生物学有关蛋白质与核酸的理化理论与实验内容,针对大学本科相关实验涉及常用仪器及实验技术方法进行详细讲解和阐述。为提高学生创新能力和综合实验技能,本书安排了综合性、探索性实验部分并对设计原则与方法进行介绍。同时结合当今生物化学与分子生物学实验技术前沿,对应用较多较广的生物芯片实验技术和蛋白质组学实验技术进行补充和讲解;结合生物信息学应用,本书增加数据库的使用。本书具有完整系统的知识体系,实验理论详尽充分,可以应用为独立设置实验课程的实验教材。

本书适合作为本科生或硕士研究生实验技术课的教材使用,也可供有关科技人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物实验学 / 宋海星主编. —北京:科学出版社,2012.9
全国高等院校医学实验教学改革教材
ISBN 978-7-03-035480-8

I. 生… II. 宋… III. ①生物化学-实验-高等学校-教材 ②分子生物学-实验-高等学校-教材 IV. ①Q5-33 ②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 206944 号

责任编辑:王 颖 李国红 / 责任校对:刘小梅

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>

装 订 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012年9月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2012年9月第一次印刷 印张:13

字数:303 000

定价:32.80 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

生物化学与分子生物学课程经过国内各医药院校多年的改革和完善,充分体现出实验技术在该课程中的重要地位和作用。以往实验项目常附在理论课程之后作为知识补充和实践学习,在教学过程中经常遇到实验相关知识在理论课程教学中相对独立,涉及很少,而实验教学安排往往没有足够时间讲授相关理论内容等问题。生物化学与分子生物实验学具有完整而系统的知识体系,实验理论详尽充分,可以构成独立设置的课程,便于学生进行实验技术的系统培训。本书按实验不同层面类别分列于三篇中,从基本实验操作到综合设计性实验延伸,可供不同条件的学校选做。特别是一些实验设备和经费有限的院校,可以让学生做一些基本实验。同时,我们添加了生物化学与分子生物学常用软件和网站的介绍,可以通过教师的讲授和演示,适当配合音像和网络等手段,来提高实验技术的教学层次。书中一些难度较大的实验,可供条件较好的院校选做。希望本书的出版,能够促进生物化学与分子生物实验学独立设课,并有利于提高学生的技术水平和创新能力,也希望本书的出版能通过讲做结合的教学模式,大范围提高生物化学与分子生物实验学教学水平。

本书将生物化学与分子生物学实验的理论与技术融为一体,是由于相关理论知识涉及有机化学、物理化学、生物化学以及分子生物学等学科,单从生物化学与分子生物学方面的理论难以支撑。特别是实验中各实验试剂的作用及功能、质与量对实验的影响等方面,在以往教学中有所偏缺,因此本书对实验原理及实验相关理论进行了补充和完善,有利于提高教学效率。另外,由于不少院校的相关课程学时较少,附属实验项目和实践更为简略,故本书作为独立系统的一门课程引导教材,对于单独开设实验学课程具有一定的支撑意义。我们认为将生物化学与分子生物实验学作为一门课来开设,对于培养学生动手能力、加深理论知识掌握,显然是有利的。

本书力求全面系统、深入浅出、注重实用,技术原理的叙述避免与理论课的重复。书中对于每一种生物大分子都从定量到定性进行实验讲解和操作,并在综合篇中进行综合性、探索性实验思维的培养和实验操作,提高学生对理论和实验的掌握能力。同时补充了部分最新实验技术,如生物芯片和蛋白质组学涉及的相关实验,以增加学生对前沿知识领域的了解和掌握。

本书适合作为本科生或硕士研究生实验技术课的教材使用,也可供有关科技人员参考。

由于作者水平有限,本书难免会有差错和不足之处,敬请有关专家和广大读者批评指正。

宋海星

2012年6月6日

目 录

前言

第一篇 基本原理与实验

第一章 常用基本仪器的使用	(1)
第一节 分光光度计的使用	(1)
第二节 离心机的使用	(4)
第三节 电泳仪的使用	(8)
第四节 PCR 仪的使用	(15)
第二章 基本实验技术	(20)
第一节 层析技术	(20)
第二节 分光光度技术	(24)
第三节 离心技术	(26)
第四节 透析超滤沉淀法	(30)
第三章 糖分子	(35)
第一节 糖的分子结构	(35)
第二节 糖分子的理化性质	(36)
第三节 实验内容	(37)
第四章 脂分子	(44)
第一节 血脂的组成和理化特性	(44)
第二节 脂类的氧化分解	(45)
第三节 实验内容	(46)
第五章 酶分子	(52)
第一节 酶的分子结构	(52)
第二节 酶的理化性质	(53)
第三节 影响酶活性的因素	(53)
第四节 实验内容	(55)
第六章 氨基酸分子	(67)
第一节 氨基酸的分子结构	(67)
第二节 氨基酸的理化性质	(67)
第三节 实验内容	(70)
第七章 蛋白质化学	(74)
第一节 蛋白质物理化学性质	(74)
第二节 蛋白质的分离纯化	(77)
第三节 实验内容	(84)

第八章 核酸分子	(99)
第一节 核酸的性质	(99)
第二节 PCR 技术	(101)
第三节 DNA 重组	(105)
第四节 实验内容	(107)

第二篇 综合性、探索性实验

第九章 探索性实验设计	(117)
第一节 实验设计的选题	(117)
第二节 医学分子实验设计的原理与方法	(119)
第三节 数据的记录与处理	(120)
第四节 设计性实验的指导与考核	(122)
第五节 实验报告和论文的撰写	(123)
第六节 实验内容	(127)
第十章 生物芯片实验	(148)
第一节 生物芯片实验原理	(148)
第二节 生物芯片实验方法	(151)
第十一章 蛋白质组学实验	(159)
第一节 蛋白组学研究策略和内容	(159)
第二节 蛋白质组学研究技术	(161)
第三节 蛋白质组实验准备	(165)
第四节 蛋白质组实验操作	(166)
第五节 数据库搜索(Databases search)	(168)
第六节 蛋白质组实验数据库及实验试剂配制	(169)

第三篇 实验数据库的使用及实验室管理

第十二章 生物医学文献数据库	(175)
第一节 中文文献数据库	(175)
第二节 外文文献数据库	(180)
第三节 部分常用专业网站	(186)
附录一 实验室日常管理规定	(190)
附录二 常用缓冲液的配制	(195)

第一篇 基本原理与实验

第一章 常用基本仪器的使用

第一节 分光光度计的使用

一、分光光度计基本结构简介

能从含有各种波长的混合光中将每一单色光分离出来并测量其强度的仪器称为分光光度计。分光光度计因使用的波长范围不同而分为紫外光区、可见光区、红外光区以及万用(全波段)分光光度计等。无论哪一类分光光度计都由下列五部分组成,即光源、单色器、狭缝、样品池、检测器系统(图 1-1)。

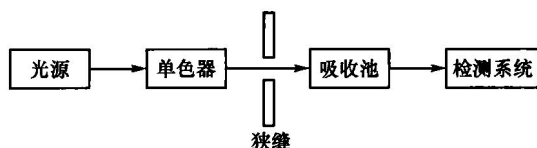


图 1-1 分光光度计的组成部分

1. 光源 要求能提供所需波长范围的连续光谱,稳定而有足够的强度。常用的有白炽灯(钨灯、卤钨灯等),气体放电灯(氢灯、氘灯及氙灯等),金属弧灯(各种汞灯)等多种。

钨灯和卤钨灯发射 320~2000nm 连续光谱,最适宜工作范围为 360~1000nm,稳定性好,用作可见光分光光度计的光源。氢灯和氘灯能发射 150~400nm 的紫外光,可用作紫外光区分光光度计的光源。红外线光源则由纳恩斯特(Nernst)棒产生,此棒由 $\text{ZrO}_3 : \text{Y}_2\text{O}_3 = 17 : 3$ (Zr 为锆,Y 为钇)或 $\text{Y}_2\text{O}_3, \text{GeO}_2$ (Ge 为锗)及 ThO_2 (Th 为钍)的混合物制成。汞灯发射的不是连续光谱,能量绝大部分集中在 253.6nm 波长外,一般作波长校正用。钨灯在出现灯管发黑时应及更换,如换用的灯型号不同,还需要调节灯座的位置的焦距。氢灯及氘灯的灯管或窗口是石英的,且有固定的发射方向,安装时必须仔细校正接触灯管时应戴手套以防留下污迹。

2. 分光系统(单色器) 单色器是指能从混合光波中分解出来所需单一波长光的装置,由棱镜或光栅构成。用玻璃制成的棱镜色散力强,但只能在可见光区工作,石英棱镜工作波长范围为 185~4000nm,在紫外光区有较好的分辨力而且也适用于可见光区和近红外区。棱镜的特点是波长越短,色散程度越好,越向长波一侧越差。所以用棱镜的分光光度计,其波长刻度在紫外光区可达到 0.2nm,而在长波段只能达到 5nm。有的分光光系统是衍射光栅,即在石英或玻璃的表面上刻画许多平行线,刻线处不透光,于是通过光的干涉和衍射现象,较长的光波偏折的角度大,较短的光波偏折的角度小,因而形成光谱。

3. 狭缝 狭缝是指由一对隔板在光通路上形成的缝隙,用来调节入射单色光的纯度和强度,也直接影响分辨力。狭缝可在 0~2mm 宽度内调节,由于棱镜色散力随波长不同而变化,较先进的分光光度计的狭缝宽度可随波长一起调节。

4. 样品池 样品池也叫比色杯,吸收器或比色皿,用来盛溶液,各个杯子壁厚度等规格应尽可能完全相等,否则将产生测定误差。玻璃比色杯只适用于可见光区,在紫外光区测定时要石英比色杯。不能用手指拿比色杯的光学面,用后要及时洗涤,可用温水或稀盐酸、乙醇以至铬酸洗液(浓酸中浸泡不要超过 15min),表面只能用柔软的绒布或拭镜头纸擦净。

5. 检测器系统 有许多金属能在光的照射下产生电流,光愈强电流愈大,此即光电效应。因光照射而产生的电流叫做光电流。受光器有两种,一是光电池,二是光电管。光电池的组成种类繁多,最常见的是硒光电池。光电池受光照射产生的电流颇大,可直接用微电流计量出。但是,当连续照射一段时间会产生疲劳现象而使光电流下降,要在暗中放置一些时候才能恢复。因此使用时不宜长期照射,随用随关,以防止光电池因疲劳而产生误差。

光电管装有一个阴极和一个阳极,阴极是用对光敏感的金属(多为碱土金属的氧化物)做成,当光射到阴极且达到一定能量时,金属原子中电子发射出来。光愈强,光波的振幅越大,电子放出越多。电子是带负电的,被吸引到阳极上而产生电流。光电管产生电流很小,需要放大。分光光度计中常用电子倍增光电管,在光照射下所产生的电流比其他光电管要大得多,这就提高了测定的灵敏度。

检测器产生的光电流以某种方式转变成模拟的或数字的结果,模拟输出装置包括电流表、电压表、记录器、示波器及与计算机联用等,数字输出则通过模拟/数字转换装置如数字式电压表等。

二、分光光度计的使用

1. 721 型分光光度计 波长范围 360~1800nm,在 410~700nm 灵敏度较好。该仪器用棱镜分光,光电管作检测器,光电流放大后,用一高阻毫伏计直接指示读数。如图 1-2 所示。



图 1-2 721 型分光光度计

721 型分光光度计的操作方法如下:

(1) 仪器未接电源时电表指针必须位于刻度“0”上,否则可用电表上的校正螺丝进行调节。

(2) 接通电源(220V),打开样品室的盖板,使电表指针指示“0”位,预热 20min,转动波长选择钮,选择所需波长,用灵敏度选择钮选用相应的放大灵敏度档(其灵敏度范围是:第一档 1 倍;第二档 2 倍;第三档 20 倍),调

整“0”电位器校正“0”位。

(3) 将比色杯分别盛空白液、标准液和待测液,放入暗箱中的比色杯架,先置空白液于光路上,打开光门,旋转“100”电钮位,使电表指针准确指向 T 100%。反复几次调整“0”及 100%透光度。

(4) 将比色杯架依次拉出,使标准液和待测液分别进入光路,读取吸光度值。每次测定完毕或换盛比色液时,必须打开样品室的盖板,以免光电管持续曝光。

2. 722 型分光光度计 近年我国在 721 型基础上新生产的 722 型分光光度计,其特点是用液晶板直接显示透光度和吸光度,用光栅作单色器,使用方便,稳定性提高。如图 1-3 所示。

722 型分光光度计操作方法如下:

(1) 检查 722 型分光光度计的旋钮,使选择钮指向透光度“T”,灵敏度钮至 1 档(此时放大倍率最小)。

(2) 接通电源,打开检测室盖(此时光门自动关闭),打开电源开关,指示灯亮,预热 20min。

(3) 调节波长旋钮至所需波长。

(4) 比色杯分别盛装空白液、标准液和待测液,依次放入检测室比色杯架内,使空白管对准光路。

(5) 打开检测室盖,调节“0”旋钮,使数字显示为“0.00”,盖上检测室盖(光门打开),调节透光度“100”旋钮,使数字显示为“100.0”,重复数次,直至达到稳定。

(6) 吸光度 A 的测量:选择钮拨向“A”,显示为“.000”。如果不是此值,可调节消光零钮,使其达到要求。在移动拉杆,使标准液和待测液分别置于光路,读取“A”值,然后再使空白液对准光路,如 A 值仍为“.000”,则以上标准液与待测液读数有效。

(7) 打开检测室盖,取出比色皿,倾去比色液,用水冲洗干净,倒置于铺有滤纸的平皿中。

(8) 浓度 C 的测定:选择开关由“A”旋至“C”,将已标定浓度的标准液放入光路,调节浓度旋钮,使数字显示为标定值,再将待测液放入光路,即可读出待测液的浓度值。

(9) 关上电源开关,拔出电源插头,取出比色皿架,检查检测室内是否有液体溅出并擦净。检测室内放入硅胶袋,盖上盖后套上仪器布罩。



图 1-3 722 型分光光度计



图 1-4 UV 1102 紫外分光光度计

3. UV 1102 紫外分光光度计 如图 1-4 所示。常用氢灯作为光源,其发射波长的范围为 150~400nm,简易操作如下:

(1) 启动电源开关后,仪器会自动进行质检测试,待每项指标测试完后(大约需要 1min)。

(2) 质检完后,仪器会制动进入 %T/ABS 画面,此画面有 4 个选项,即 NUM WL、WL Setting、Date Mode、End Setting。

(3) 首先,用 NUM WL 来测试波长的数目,按[1]键进入 NUM WL 子菜单,用于设定测试波长的数目。设置完后按[Enter]键

进行确定。然后,按[2]键进入 WL Setting,用于显示 NUM WL 设定的波长数,设置完后按[Enter]键进行确定。按[3]键进入 Date Mode,选择要使用的数据模式%T/ABS。各种条件设定完成后,最后按[0]键选择 End Setting。按[0]键后,仪器进入%T/ABS Autozero 画面,此时将装有空白样品的比色皿放入样品室中,再按[START/STOP]键,可进行零点的自动调整。自动调整后,将装有空白样品的比色皿取出,换成装有被测样品的比色皿,再按[START/STOP]键进行测量。完毕后,若要进行其他测量。

三、注意事项

(1) 仪器需安装在稳固不受震动的工作台上,不能随意搬动。严防震动、潮湿和强光直射。

(2) 比色皿先用蒸馏水洗后,再用比色液润洗才能装比色液。盛装比色液时,约达比色皿 2/3 体积,不宜过多或过少。若不慎使溶液流至比色皿外面,须用棉花或拭镜纸擦干,才能放入比色架。拉比色杆时要轻,以防溶液溅出,腐蚀机件。

(3) 千万不可用手或滤纸等摩擦比色皿的透光面。

(4) 比色皿用后应立即用自来水冲洗干净,若不能洗净,用 5% 中性皂溶液或洗衣粉稀溶液浸泡,也可用新鲜配制的重铬酸钾洗液短时间浸泡,然后用水冲洗干净,倒置晾干。

(5) 每套分光光度计上的比色皿和比色皿架不得随意更换。

(6) 试管架或试剂不得放置于仪器上,以防试剂溅出腐蚀机壳。

(7) 如果试剂溅在仪器上,应立即用棉花或纱布擦干。

(8) 测定溶液浓度的光密度值在 0.1~0.7 之间最符合吸收定律,线性好,读数误差较小。如光密度超过 0.1~1.0 范围,可调节比色液浓度,适当稀释或加浓,再进行比色。

(9) 合上检测室连续工作时间不宜过长,以防光电管疲乏。每次读完比色架内的一组读数后,立即打开检测室盖。

(10) 仪器连续使用不应超过 2 h,必要时间歇 0.5 h 再用。

(11) 测定未知待测液时,先作该溶液的吸收光谱曲线,再选择最大吸收峰的波长作为测定波长。

(12) 722 型分光光度计的左侧下角有一个干燥剂筒,检测室内放硅胶袋,应经常检查,发现硅胶变色,应更换新硅胶或烘干再用。

(13) 仪器较长时间不使用,应定期通电,使用前预热。

第二节 离心机的使用

当物体围绕一个中心轴做圆周运动时,运动物体就会受到离心力的作用,旋转速度越快,运动物体所受到的离心力越大。将装有悬浮液或高分子溶液的容器放在离心机内,使之绕离心机中心轴高速旋转,就会产生离心力场,强大的离心力作用于溶剂中的悬浮颗粒或高分子,会使其沿着离心力的方向运动而逐渐背离中心轴。在相同转速条件下,容器中不同大小的悬浮颗粒或高分子溶质会以不同的速率沉降。经过一定时间的离心,就能实现不同悬浮颗粒或高分子溶质的有效分离。

离心机的主要用途是分离溶液中的物质,如分离蛋白质、DNA、细胞等。离心机使用不当会毁坏样品,甚至造成人员伤亡。通常用各种专门的离心机、转子、离心管来完成不同的

实验,离心机提供驱动力,而转子决定细化的离心功能。通过仔细选用离心机、转子和离心管,可以达到预期的目的。

一、离心机的基本类型

离心机的用途广泛,机型种类繁多,各生产厂家的离心机都有自己的特色。因此,目前对离心机还没有一个严格的分类标准或规定。通常按用途、转速进行分类。

(一) 按用途分类

离心机按用途可分为制备性离心机和分析性离心机两大类。

1. 制备性离心机 制备性离心机主要用于分离提纯不同密度、不同形态的生物材料微粒。
2. 分析性离心机 分析性离心机一般都带有光学系统,主要用于研究纯的生物大分子和颗粒的理化性推断物质的纯度、形状和分子质量等。

(二) 按转速分类

离心机按机器额定的最高转速高低可分为低速离心机、高速离心机、超速离心机三种类型。

1. 低速离心机 离心机最大转速不超过 6000r/min,最大相对离心力可达 6000g。主要用于血液或细胞制备,蛋白质和酶沉淀物的分离。

2. 高速离心机 离心机最大转速可达 25 000r/min,最大相对离心力可达 89 000g。主要用于病毒、细菌、细胞核、线粒体等,可用于 DNA 制备。

3. 超速离心机 离心机最大转速可超过 30 000r/min,最大相对离心力可达 510 000g。目前销售的最高转速已达到 100 000r/min,其最大相对离心力 1 000 000g。配合光学仪器,可用于分子质量测定、蛋白质结构及凝集状态分析、化合物纯度测定等。

二、离心机的基本构造

离心机有各种各样的类型,结构也越来越复杂,但基本结构大同小异。一般都由驱动系统、离心室和离心转头组成。高速离心机和超速离心机都带有制冷系统(以消除高速旋转转头与空气之间摩擦而产生的热量)、控制系统、防护系统等。超速离心机还装有真空系统(图 1-5)。

(一) 驱动系统

驱动系统是离心机的心脏,包含电动机,是提供离心机动力的重要组成部分。不同类型驱动系统均有不同寿命限制,在使用时应注意使用年限或累积的总转数。驱动系统的类型主要分为电机驱动、油轮驱动、空气旋涡驱动和磁悬浮驱动系统。

(二) 离心室

老式离心机的离心室上盖装有电源开关,当盖上离心室盖后电机才能启动,可以确保安全。新式离心机的离心室都装有电磁锁,在电机运行前将上



图 1-5 离心机

盖锁住,离心结束转头停稳后,将室内压力降到大气压时,才能将盖打开。

(三) 转头

1. 转头的类型 根据转头的结构和用途大致可以分为固定角转头、水平转头、垂直转头、近垂直转头、区带转头、连续流转头和酶标板转头等。

2. 离心管 离心管及其管帽是转头的重要附件。制造离心管的材料主要有塑料和不锈钢。塑料离心管常用材料有聚乙烯(PE)、聚碳酸酯(PC)、聚丙烯(PP)等。塑料离心管都有盖,离心前管盖必须盖严,倒置不漏液。塑料离心管的优点是透明或半透明,硬度小。缺点是易变形,抗有机溶剂的腐蚀性差,使用寿命短。不锈钢离心管强度大,不变形,能抗热、抗冻、抗化学腐蚀。但用时也应避免接触强腐蚀性的化学药品。

(四) 制冷系统

高速离心机和超速离心机都带有制冷系统,以冷却离心腔,保持在较低的温度下离心。制冷系统主要由温度传感器和制冷器组成,以前多采用 CFC 制冷,现在主要采用具氧制冷和半导体固态制冷。

(五) 真空系统

超速离心机通过制冷系统还不足以抵消转头与空气摩擦产生的大量热量,因此设计了真空系统。一般在 60 000r/min 以下的超速离心机,只使用简单的机械油泵来抽真空,在 60 000r/min 以上的超速离心机,要使用机械油泵加油扩散二级真空系统。真空系统给操作、维修保养带来许多不便,因此,高速离心机和低速离心机中均不使用真空系统。

(六) 控制系统

控制系统是离心机的指挥中心,各种设定的参数通过控制系统来执行。主要有速度控制、温度控制和真空度控制。

三、离心机的主要技术指标

反映离心机性能的主要技术指标有离心机转速和相对离心力及最大容量。

(一) 离心机转速

离心机转速是指离心时每分钟旋转次数,单位符号用“r/min”表示,取决于所用离心机的型号和转子。转速一般有最低转速和最高转速,多数情况下,主要标明最高转速。

(二) 相对离心力(RCF)

通常离心力常用地球引力的倍数来表示,因而称为相对离心力。相对离心力是指在离心场中,作用于颗粒的离心力相当于地球引力的倍数,单位是重力加速度“ g ”(980cm/s²)。相对离心力与转速、离心半径有关。一般情况下,低速离心时,常以转速(r/min)来表示,高速离心机则以相对离心力表示(图 1-6)。

(三) 最大容量

最大容量是指离心机转头最多能容纳悬浮液的容积数,单位用“ml”表示。一般都用转头最多能装载的离心管数与每个离心管能盛装的悬浮液容积表示。

例如,4×100ml 指转头能装载 4 个离心管,每个离心管最多能盛装 100ml 的悬浮液,其最大容量为 400ml。

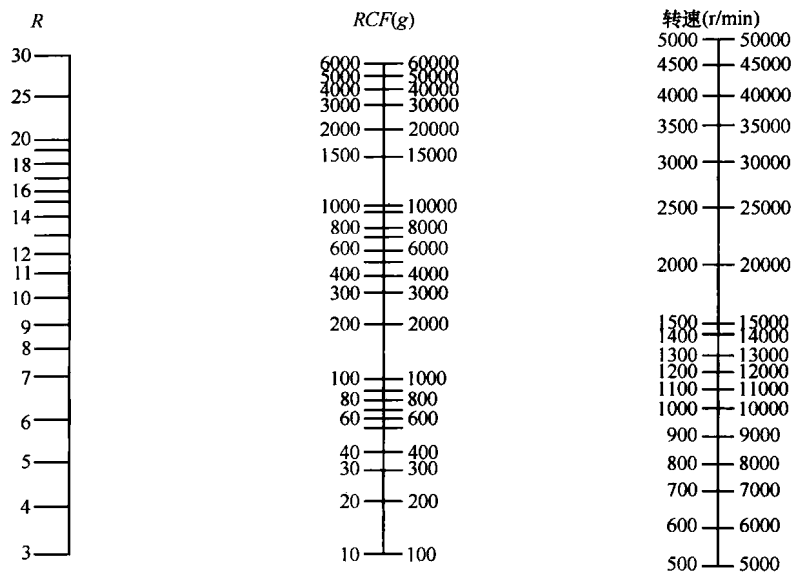


图 1-6 半径、相对离心力与转速

四、离心机的使用及修护

(一) 合理使用转头

1. 选用与离心机配套的转头 每种型号的离心机都有配套的转头,不同型号离心机的转头不能混用。

2. 根据转数要求选用合适的转头 每个转头各有其最高允许的转速,绝对不允许超过规定转速使用。

3. 建立转头使用档案 每个转头各有其最高允许的使用累积限时,每一个转头都应建立一份使用档案,记录累积的使用时间,如果超过了该转头的最高使用极限时,必须按规定减速使用。

4. 预冷转头 如果在低于室温的温度下离心时,转头在使用前应放置在冰箱或置于离心机的转头室内预冷。

5. 不使用带伤的转头 使用前应认真检查转头是否有划痕或被腐蚀,必须保证所用的转头完好无损。

6. 准确组装转头 转头与轴承固定于一体,防止转头在高速运转时与轴承发生松动,导致转头飞溅出来。

(二) 精密地平衡离心管及其内容物

1. 平衡离心管及内容物 使用各种离心机时,必须事先在天平上精密地平衡所有的离心管、离心管载具、帽子及顶盖、护罩和管套等。平衡时重量之差不得超过各个离心机说明书上所规定的范围。管套与护罩通常都标有重量,注意平衡过程中不要混淆配套的管套、护罩。平衡管内必须用与要离心的材料相似的材料来填充,例如,从培养基中离心细菌,可以用水平衡。但不可以用水来平衡氯化铯。

2. 离心管对称装载 转头中绝对不允许装载单数的离心管,当转头只是部分装载时,放在转头中,以便使负载均匀地分布在转头的周围。

(三) 装载溶液适量离心管必须对称

装载溶液时,要根据各种离心机的具体操作说明进行,根据将要离心溶液的性质及体积选用适合的离心管,有的离心管无盖,液体不能装得过多,以免离心时甩出,造成转头不平衡、生锈或被腐蚀。制备性超速离心机的离心管常常要求必须将液体装满,以防止离心时塑料离心管的上部凹陷变形。

(四) 关紧盖于后开启启动

开始启动前,切记将离心机腔门或盖子及转头盖子关紧。启动后,当转速还未达到预置的转速时,操作者不能离开离心机,直到运转正常,方可离开,不过仍要随时观察运行情况。

运行过程中,如果出现异常情况,应立即停机,进行适当处理。

运行过程中突然停电,必须将电源切断,等待转头慢慢靠惯性减速,停止后,手动打开离心机腔门,取出样品和转头。直到确定已经停止后,手动打开离心机腔门,取出样品和转头。

(五) 及时取出离心管

离心结束,立即从离心机内取出离心管,并使离心管自然干燥。

(六) 及时清洗转头

将离心管中内容物取出后,立即清洗。当离心结束后,转头应用温水洗涤并干燥,一般用水洗就足够了,切勿将转头浸泡在去污剂中。洗净的转头擦干后放在室温中干燥。转头长时间不用时应涂一层上光蜡保护。

第三节 电泳仪的使用

一、电泳的类型

电泳类型目前还没有统一的划分标准,不同的划分依据所分类型也不同,见表 1-1。

表 1-1 电泳的类型

划分依据	类型
支持介质种类	纸电泳、醋酸纤维薄膜电泳、琼脂凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
支持介质	U 型管电泳、薄层电泳、板状电泳(又分为垂直板状电泳和水平板状电泳)、柱状电泳、毛细管电泳
用途	分析电泳、制备电泳、定量免疫电泳、连续制备电泳
电压	常压电泳、高压电泳
原理	等速电泳、免疫电泳、等电聚焦电泳
电泳形式	单向电泳、双向电泳

二、电泳装置的基本结构

电泳仪实际是一套电泳装置,主要包括电泳仪和电泳槽两个部分。

(一) 电泳仪

电泳仪是电泳装置的电源,它提供直流电源的装置,驱动带电物质的迁移,它能控制电压和电流的输出。一般根据电泳仪所使用的电压范围分为常压电泳仪(600V)、高压电泳仪(3000V)和超高压电泳仪(3000~5000V)。电泳仪基本结构一般包括电路系统、显示系统

和控制系统。

(二) 电泳槽

电泳槽是电泳装置的关键部件,它是凝胶分离样品的工作场所,用于生化分析研究中对电荷粒子进行分离、提纯或制备。目前在生物实验室中最常用的是凝胶电泳,其组成部件一般包括连接电源的正负电极、盛放缓冲液的缓冲液槽、支持凝胶的管状或板状玻璃,以及冷却装置。在凝胶一端的加样孔内点上样品后,将凝胶直接(如垂直板状或管状电泳)或间接(如水平板状电泳)与缓冲液接触,再接通电源,即可进行电泳操作。电泳槽可以分为水平式和垂直式两类。

1. 水平式电泳槽 水平式电泳槽种类很多,形状各异,一般包括水平放置的电泳槽、凝胶板(冷却板)和电极。常用水平式电泳槽,其装置如图 1-7 所示,包括两个缓冲液槽和一个可以密封的玻璃盖。两侧的缓冲液槽均用有机玻璃(或相应的材料)板分隔成两个部分:外格装有电极(直径 0.5~0.8cm),里格为可放支持介质的有机玻璃电泳槽架,此架可以从槽中取出。两侧缓冲液槽内的电极经隔离导线穿过槽壁与外接电泳仪电源相连。

在水平式电泳槽中,水平板电泳槽由于具有较多的优点而越来越受到重视。一般由装有铂丝电极的主槽、装有电源线的上盖、制胶架、凝胶托盘、试样格组成。凝胶铺在水平的玻璃或塑料板上并将凝胶直接浸入缓冲液中(图 1-8,图 1-9)。

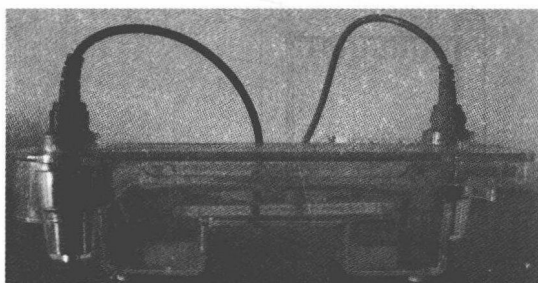


图 1-7 水平式电泳槽

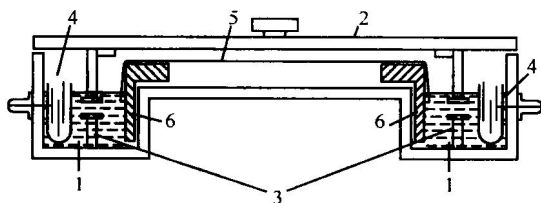


图 1-8 水平式电泳槽模式图

1. 缓冲液槽;2. 可密封玻璃盖;3. 分隔板;4. 电极;5. 电泳介质;6. 电泳槽架

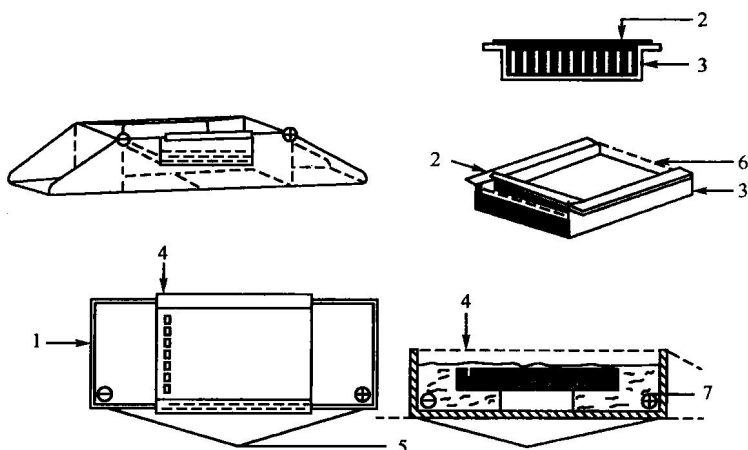


图 1-9 水平式电泳槽组成部件

1. 电泳缓冲液储存槽;2. 梳齿;3. 制胶槽;4. 加样槽;5. 电极;6. 制胶槽两端封条;7. 电泳缓冲液

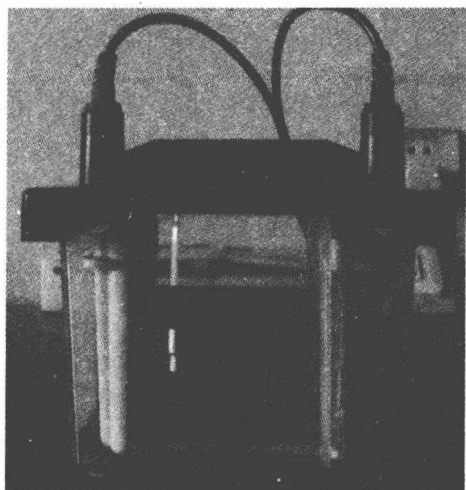


图 1-10 垂直平板电泳槽

2. 垂直式电泳槽

(1) 垂直平板电泳槽: 垂直式电泳槽通常指垂直平板电泳槽。它采用两片垂直放置的平行玻璃板以夹住凝胶, 设置有上、下缓冲液槽各一个, 其中下槽还配有冷却系统以保证电泳中的凝胶维持在一定温度范围内。中间是由塑料隔条将两块玻璃板隔开, 在玻璃平板中间制胶, 凝胶的大小通常是 12~14cm, 厚度为 1~2mm。电泳槽设有铂金丝制成的正、负电极, 通过接头与电源连接。制胶时在凝胶溶液中插入梳子, 在胶聚合后移去, 形成上样品的凹槽(图 1-10~图 1-12)。

(2) 管状电泳: 又称圆盘电泳、柱状电泳。电泳槽有上、下两个电泳槽和带有铂金电极的盖, 上电泳槽内具有若干个孔洞, 以供穿插电泳管, 电泳管直径一般为 3~8cm, 长度为 9~23cm。凝胶在电泳管中聚合成柱状胶条, 样品经电泳分离, 蛋白质区带染色后呈圆盘状, 因而称圆盘电泳。它的缺点是由于聚合效率、凝胶长度和

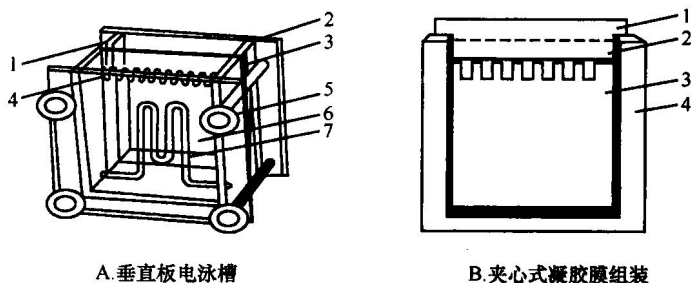


图 1-11 垂直平板电泳槽模式图

1. 导线接头; 2. 下液槽; 3. 样品槽模板; 4. 凹形橡胶框; 5. 固定螺丝; 6. 上液槽; 7. 冷却系统

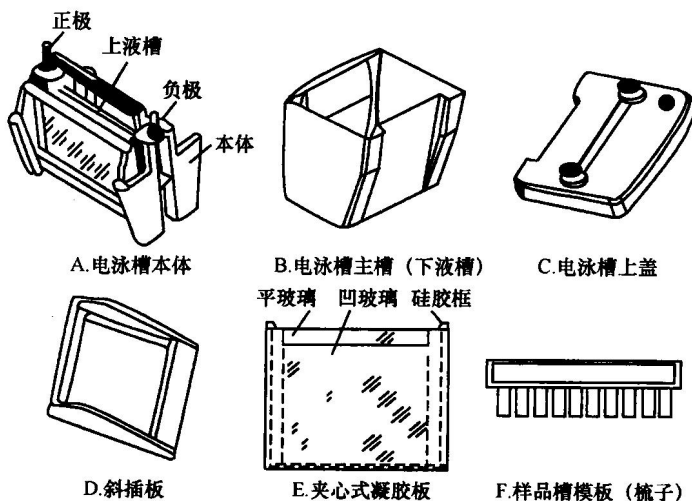


图 1-12 垂直平板电泳槽组成部件