

高级生物化学 与分子生物学实验教程



袁榴娣 主编

东南大学出版社

高级生物化学 与分子生物学实验教程

(适用于7年制临床医学及研究生使用)

袁榴娣 主 编

东南大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

高级生物化学与分子生物学实验教程/袁榴娣主编.
南京:东南大学出版社,2006.3
ISBN 7-5641-0293-4

I. 高... II. 袁... III. ①生物化学:实验—研究生
—教材 ②分子生物学—实验—研究生—教材
IV. ①Q5-33 ②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 016196 号

高级生物化学与分子生物学实验教程

出版发行	东南大学出版社
出 版 人	宋增民
社 址	南京市四牌楼 2 号
邮 编	210096
电 话	025-83790586(办公室)/83362442(传真)/83791830(邮购)
网 址	http://press.seu.edu.cn
印 刷	南京京新印刷厂
开 本	787mm×1092mm 1/16
印 张	11.25
字 数	280 千字
版 次	2006 年 3 月第 1 版第 1 次印刷
定 价	18.00 元

* 东大版图书若有印装质量问题,请直接与读者服务部联系,电话:025-83792328。

高级生物化学与分子生物学实验教程

主 编 袁榴娣

副主编 窦 非

编 者 (按姓氏拼音为序):

邓湘蕾 丁 洁 丁 蕾 窦 非

李新荣 邱定红 汪道涌 袁榴娣

前 言

生物化学与分子生物学是重要的实验性基础学科,是在分子水平的基础上研究生命现象的学科,是医学院校的主干与重点学科之一。近年来,随着该学科理论和技能的迅猛发展,已渗入到生物学的各个分支学科及医药农林的各个分支领域,并正在迅速改变它们的面貌,不仅为这些学科的发展提供了重要的理论依据,而且为这些学科的研究提供了新颖而先进的技术和方法。对生物化学和分子生物学实验技术的掌握已成为这些学科在新的高度和水平揭示生命功能奥妙的共同需求。

本书是在我们多年使用的研究生高级生物化学与分子生物学技术讲义的基础上,经修订和改编而成,补充和更新了原有的理论和实验内容,增加了一些反映最新进展的实验技术。内容分为前后呼应的两大部分。前一部分扼要介绍常用的生物化学与分子生物学的基本理论和实验方法,包括离心、电泳、层析、基因工程、基因文库的构建、PCR、DNA 的制备及分析、RNA 的制备及分析等,以供老师讲解及学生实验时查找。后一部分是实验部分,包括蛋白的定量、PCR、基因工程、血清白蛋白的分离纯化、酶的分离及比活的测定、Western 印迹、Southern 杂交等。

本书是我们多位老师和学生从教学和科研中总结出的经验,经不断完善并提取的精华。在编撰和修订中,由袁榴娣、窦非、汪道涌、邱定红、李新荣、邓湘蕾、丁洁、丁蕾执笔,袁榴娣统稿。

由于我们的水平有限,难免有错误及不当之处,敬请读者批评指正。

编 者

2005 年 7 月

目 录

第一篇 基础理论部分

第一章	离心技术	1
第二章	电泳技术	9
第三章	层析技术	20
第四章	蛋白质的分离纯化	32
第五章	真核生物基因文库的构建	39
第六章	核酸杂交技术	46
第七章	DNA 的制备与分析	62
第八章	聚合酶链反应	72
第九章	RNA 的制备与分析	87
第十章	基因工程	93

第二篇 实验部分

实验 1	紫外分光光度法	116
实验 2	福林-酚试剂法 (Lowry 法)	117
实验 3	考马斯亮蓝结合法	119
实验 4	葡聚糖凝胶层析法测定蛋白质的分子量	121
实验 5	聚丙烯酰胺凝胶板状电泳——血清蛋白的分离	122
实验 6	血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳	124
实验 7	聚丙烯酰胺血清蛋白等电聚焦电泳	127
实验 8	Western 印迹技术	129
实验 9	质粒 DNA 的制备	131
实验 10	真核生物基因组 DNA 的制备与提取	133
实验 11	PCR 扩增基因	136
实验 12	Southern 杂交	138

实验 13	Trizol 法提取总 RNA	141
实验 14	mRNA 的分离纯化	142
实验 15	RNA 的分子杂交技术	144
实验 16	RNA 的体外转录、末端标记和纯化	149
实验 17	脲酶的分离纯化及比活性的测定	152
实验 18	血清白蛋白、球蛋白的分离与纯化	155
实验 19	重组 pGEX-4T-1/His6-C-X 基因构建与表达	158

附 录

附录 1	实验室急救法	164
附录 2	常用酸碱含量	165
附录 3	常用单位及换算方法	166
附录 4	常用试剂配制	167
主要参考文献		170

第一篇 基础理论部分

第一章 离心技术

常用的将固液混合体系中的两相分离的方法有两种：其一是过滤，其二就是离心。

离心技术(centrifugation)是生物化学和分子生物学研究中的常用技术之一，而且随着离心技术的不断发展和完善，尤其是高速和超速冷冻离心机的相继问世，离心技术在生物化学、分子生物学及生物工程研究中的地位日趋重要。离心技术是物质分离的一个重要手段，它是利用物质在离心力的作用下，按其沉降系数的不同而分离。早在 19 世纪末人们就开始用手摇离心机来分离蜂蜜和牛奶，20 世纪初发明了超速离心机。由于超速离心法比较温和，分离的样品量大，应用范围广，是目前生物学、医学、制药工业等领域中最常用的技术之一。

随着科学技术的发展，许多新材料新技术的不断推出，离心机制造业有很大的发展。尤其是软件操作系统的应用，使离心机的操作性能有了很大的改变，结构更趋于安全合理。虽然离心技术始于 19 世纪末，但是，离心机的基本结构变化并不大，是一类相对比较稳定的仪器设备。超速离心技术的应用也有 80 多年的历史，其发展过程大致可以分为以下几个阶段。

① 1923 年由瑞典化学家 Svedberg 设计和制造了世界上第一台具有光学系统的分析超速离心机，最高转速可达到 45 000 rpm。1926 年 Svedberg 用自己设计的超速离心机测定了马血红蛋白的分子量，并首次证明了蛋白质是均一的生物大分子。1940 年 Svedberg 和 Pederson 撰写了世界上第一本有关离心技术的专著。

② 随着离心技术的发展，离心的基本理论和方法日趋完善。1951 年 MK Brakke 在差速离心法的基础上发展了速率梯度离心。

③ 1955 年 NG Anderson 发明了区带转头，并用区带离心法首次证明了 DNA 双螺旋结构半保留复制的假说。同时，离心机制造工艺也在不断地提高，尤其是区带转头的出现，具有高强度的钛合金的应用，半导体集成电路、计算机技术的发展以及高频调速电机的使用，使得离心机的性能有了质的飞跃，给离心机提供了广阔的应用前景和发展空间。

④ 20 世纪 90 年代中期，用新型材料制造出来的碳素转头，主要用超强超轻材料合成，其抗拉强度比钛合金还强。这对提高离心机的速度是非常有利的。

一、基本原理

一个固体物质颗粒，在一定的液相介质中做匀速圆周运动时，会受到一个离心力的作用，离心力的大小等于被旋物体的质量与离心加速度的乘积。

不同的颗粒，由于其自身的质量、密度、大小等因素的不同，在同一液相介质中做圆周运动时所受的浮力、摩擦力及离心力的大小不同，因而其沉降速度亦不相同。这样，在同一离心力场作用一定时间后，就会彼此分离开来，离心机就是根据这一原理进行工作的。

(一) 沉降现象

任何物体受地球引力的作用都具有下沉作用,称之为沉降现象。如雪花从空中轻轻地往下飘、水中的泥沙会下沉等。物体下沉的速度 v 可以用公式表示为:

$$v = gt$$

式中, g 代表重力加速度,常值是 980 cm/s^2 。

物体在沉降过程中,其下沉的力在某个时刻总会与摩擦力和浮力达到平衡,使物体的受力为 0,这时物体将做匀速运动,这一速度被称为临界速度。

(二) 颗粒在重力场的运动

一个球形颗粒在具有重力场中的液体介质内,受到地球引力、溶液浮力和溶液黏滞力的作用,出现不同的运动。

颗粒在重力场的作用下,向重力场方向的加速度只能持续一段时间。这是由于颗粒在做加速度运动的同时,受到的摩擦阻力也越来越大,阻止它在介质中的运动。

(三) 颗粒在离心场中的沉降

1. 颗粒在离心场的受力 颗粒在离心场中受到 5 种作用力,即:离心力、与离心力方向相反的向心力、重力、与重力方向相反的浮力、介质摩擦力(黏滞力)。

2. 离心力的产生 地球表面的重力加速度几乎是一个常数,依靠重力的作用使细微颗粒在液体介质中沉降是不够的。从理论上讲,只要颗粒的密度大于液体就会发生沉降。但是,对于分离生物材料的样品,如细胞、细胞器、细菌、病毒、蛋白质和核酸等生物大分子来说,由于颗粒非常细,依靠自然沉降是不能达到完全分离的,只能通过离心力的作用才能使它们沉降下来。

物体在围绕旋转轴以角速度旋转时,就产生了离心场,物体在离心场中受到离心力的作用。

3. 沉降系数 颗粒在单位离心力作用下的沉降速度称为该颗粒的沉降系数(sedimentation coefficient, s)。以 10^{-13} 秒作为一个单位,称为斯维得贝格单位(Svedberg unit),或称沉降系数单位,用 S 表示。

沉降系数是生物大分子的特征常数,它除了与颗粒的密度、形状和大小有关外,还与介质的密度、黏度有关,因此它与温度、浓度有密切的依赖关系。同一样品在不同的温度、浓度和介质中,所测得的 S 值是不同的。为了便于比较在不同的条件下所测得的沉降系数,通常规定在温度为 20°C 、以水为介质的条件下,测得的 S 值为标准状态 S 值。非标准状态的 S 值,可以通过公式校正。对于生物材料而言,绝大多数样品是以水为介质的,所以非标准状态的 S 值校正公式在此不作详细介绍。

4. 与沉降相关的因素

(1) 离心速度:离心速度大小决定了颗粒沉降的快慢,不同大小的颗粒使用不同的离心速度。颗粒质量大,在离心场中沉降速度快,只需低速离心;反之,颗粒质量小,在离心场中沉降速度慢,需高速离心。

(2) 温度:不同温度下,离心介质的黏度不同,多数离心介质的黏度都会随着温度的变化而变化。因此,在离心时要求温度恒定,尤其梯度离心对温度较敏感,对离心环境的温度要求更严格。

(3) 离心时间:通过离心机设定和记录一个精确时间并不难,但如何控制达到最大速度离心所要的时间是很重要的。有的离心机提速较快,有的离心机提速较慢。如果设定一个同

样的离心时间,提速较快的离心机就会先达到离心所需的最大速度,提速较慢的离心机就会较迟达到离心所需的最大速度。因此,离心时间较短样品的往往与真正所需的离心时间差别较大,而对于离心时间较长的样品影响不大。

(4) 离心半径:离心机转头的半径大小会影响到离心体积和颗粒下沉的距离。尤其是在梯度离心时,距离短不易把物质分开。

二、离心技术的分类

(一) 根据离心时液相介质的密度是否均匀,可分为均匀介质离心和密度梯度离心

1. 均匀介质离心 所谓均匀介质,指在离心前后,液相介质本身的密度始终一致。可分为:

(1) 澄清性离心:是生化实验室常用的离心方法,只用于物质的分离制备和纯化,是一种制备离心技术。如要去除液相中的固体杂质,或是要将固液两相分离开来,即可采用此法。方法是将样品注入离心管中,在适当的转速条件下,离心一定时间后,固相颗粒直接沉降到管底形成沉淀,上面的液相称上清液。倾出上清液,即可将两相分离,离心分离血清就是一例。

(2) 差速离心:若需将存在于同一液相体系中的几种不同大小密度的固体颗粒彼此分离开来,就可以使用差速离心技术。先在较低的离心力场作用下,离心一段时间。此时,质量大的样品颗粒可以沉降下来,而较小的固体颗粒仍分散在液相中。分离沉淀和上清液,并将上清液移到另一只离心管中。增加离心力场强度,一定时间后,又有一类较大的样品颗粒完全沉淀下来。如此进行下去,即可将样品中大小不同的固体物质彼此一一分离。如要研究细胞的结构和功能,即可利用差速离心技术进行亚细胞组分的分离。

2. 密度梯度离心 所谓密度梯度,即离心的液相介质密度在同一离心管中是不均一的,而是自离心管上部到下部逐渐增大,形成一定的梯度。这种密度梯度可以是连续的,也可以是不连续的;可以是在离心前预先配制成的,也可以是在离心过程中逐渐形成的。

对用来配制密度梯度的物质是有一定要求的,首先这些化合物不能与样品发生化学反应;其次,对于生物样品来说,这些化合物不能影响生物样品的天然结构和生物活性;此外,这些化合物最好是无色透明的,且在介质溶剂中具有较大的溶解度。常用的有蔗糖、甘油、氯化铯、硫酸铯等。

(二) 根据密度梯度是否是预先形成,密度梯度离心技术可分为区带离心和等密度梯度离心

1. 区带离心 亦称密度梯度区带离心,指实验样品在预先形成一定梯度的液相介质中离心。在离心管中预先注入一定密度梯度的液相介质,介质密度自上而下递增。这种密度梯度可由梯度形成仪来产生,梯度介质中的最大密度一般小于样品中物质的最小密度。

这种离心的特点是物质的分离主要取决于样品颗粒的沉降系数,适于分离密度相近但大小不同的固体物质。将样品物质轻轻铺于密度梯度介质的液面上,起动离心机,在离心力的作用下,一定时间后,不同的物质沉降形成不同的区带。在沉降最快的区带到达管底以前,停止离心,分部收集不同区带即得不同组分的物质。

从离心结果来看,这种离心还有两个特点:一个是区带内固相物质颗粒的密度大于该处液相介质的密度;另一个是密度相同、大小不同的颗粒位于不同区带。该方法与等密度梯度离心的最大差别在于离心时间的长短需严格控制,如果离心时间过长则所有样品颗粒均沉降到离心管底部,达不到分离的目的。

2. 等密度梯度离心 又称沉降平衡。所谓等密度梯度,并不是说密度梯度相同,而是指样品物质沉降在与其自身密度相等的液相介质区域内形成区带。这种离心方法中,介质的密度梯度不是预先形成,而是在离心过程中,由于离心力的作用而逐渐形成的。

其特点是:沉降分离与样品物质的大小和形状无关,而取决于样品物质的密度。梯度介质的最大密度大于样品物质的最大密度。从离心结果来看,这种离心技术亦有两个特点:其一是,大小不同密度相同的样品分布于同一区带;其二是,同一区带内的样品物质密度等于该处介质密度。

方法是:将样品物质与氯化铯或硫酸铯的浓溶液充分混匀,而后在离心机中离心,铯盐由于离心力的作用,从离心管口至管底形成连续的密度梯度。样品物质中不同组分在离心力的作用下,或上浮或下沉,最终分布在其自身密度相等的液相介质处,形成区带。不同密度的物质分布于不同的区带,从而彼此分离。然后分部收集不同区带内的样品物质,即得到纯的单一物质组分。由于区带内样品物质的密度与该处的液相介质密度相等,因而这样的区带是稳定的,其位置不随离心力场强度的增加而改变,也不随离心时间的延长而改变。

三、离心机的类型及相对离心力(RCF)

离心机从19世纪末就开始在实验室使用,最初是以手摇为驱动力,到了1912年开始使用电机驱动,并作为商品进行规模生产。如今离心机已被广泛应用于工业生产和科学研究之中。现在可以根据不同要求制造出不同用途的离心机,随着离心速度的提高其构造也越来越复杂,科技含量、自动化程度也在不断地提高。最早最简单的离心机是由一个电机和一组管架组成的,直径不过十几厘米,高6~7 cm,重约1 kg,转速为200 rpm。而现在制造的离心机不仅具有很高的离心力,而且还具有性能稳定、容量大、恒温、恒压等优点。一台高性能的制备型离心机,机身的重量就达数百千克乃至近千千克。而超速离心机要在强大的离心力场中工作,还需要有很高的安全系数和高精确度的自控能力。离心机的精密构件和复杂程度给离心机的制造带来了一系列的技术难题,包括制造工艺、精密仪器、自动控制、真空技术和制冷技术等方面。此外,还涉及光学、电学、力学、材料科学、机械学、计算机科学等学科。一台高性能的超速离心机体现了科学技术的综合水平,目前只有少数几个国家能够生产。

(一) 按转速分类

按转速不同,可将离心机分为:普通离心机(转速低于6 000 rpm),高速离心机(转速可达25 000 rpm)和超速离心机(转速大于25 000 rpm)。

由于转速太高会产生大量的热量,因而高速及超速离心机都附有制冷装置,以降低转子室温度;同时为减少摩擦,还附有抽真空装置,使转子在真空条件下运转。

(二) 按离心机的用途分类

(1) 小型离心机:小型离心机一般是指体积较小的台式离心机,转速可以从每分钟数千转到每分钟数万转,相对离心力由数千到数十万,离心管的容量由数百微升到数十毫升。小型离心机多用于小量快速的离心。为适应目前分子生物学研究的需要,有的厂商又推出了带有制冷装置的小型离心机。

(2) 制备型大容量低速离心机:制备型离心机一般是离心的体积较多,机型体积较大的落地式离心机。最大转速为6 000 rpm左右,最大离心力在 $6\,000\times g$ 左右,最大容量可达数千毫升。大多数离心机均设有制冷系统。

(3) 高速冷冻离心机:高速冷冻离心机与大容量低速离心机相近,二者之间的主要差异

在于前者的离心速度比后者高,并设有制冷系统。高速冷冻离心机的最大速度在 18 000~21 000 rpm,最大离心力在 $50\,000\times g$ 左右,可以更换转头调整离心容量。

(4) 超速离心机:超速离心机具有很大的离心力,最大速度可达 100 000 rpm,最大离心力可达 $800\,000\times g$,超速离心机可以进行小量制备,最大容量可达数百毫升。适用于蛋白质、核酸和多糖等生物大分子的制备。

(5) 分析型离心机:分析型离心机是主要用于生物大分子的定性、定量分析的超速离心机。最大转速在 80 000 rpm,最大离心力可达 $800\,000\times g$ 以上。

(6) 连续流离心机:连续流离心机主要用于处理类似于发酵液等特大体积、浓度较稀的样液。最大离心速度与高速冷冻离心机相近。

注:本书中在描述离心条件及离心力的大小时,常不用实际离心力的大小,而采用相对离心力(RCF),即离心加速度相当于重力加速度 g 的倍数,用 $\times g$ 来表示。

离心机的种类较多,此处选择在科研工作中常用的高速冷冻离心机和制备型超速离心机的组成及应用进行简单的介绍。

1. 高速离心机 高速离心机可以达到 25 000 rpm 的最高速度和 $89\,000\times g$ 的最大离心力。这类离心机通常带有冷却离心腔的制冷设备,温度控制由装在离心腔(室)内的热电偶监测离心腔的温度。

大容量连续流动离心机的主要用途是从大量培养物(5~500 L)中收集酵母及细菌等。

另一类是低容量冷冻离心机,型号甚多。某些型号的冷冻离心机,其最大容量可达 3 L。这类离心机可变换角式和水平(甩平)式转头。它们多用于收集微生物、细胞碎片、细胞、大的细胞器、硫酸铵沉淀物以及免疫沉淀物等。

2. 制备型超速离心机 此种超速离心机具有超过 $500\,000\times g$ 的离心力,能使亚细胞器分级分离,可纯化生物大分子物质,并可用于测定蛋白质、核酸的分子量等。

3. 分析型超速离心机 分析型超速离心机主要是为了研究生物大分子物质的沉降特征和结构。因此,它使用了特殊设计的转头和检测系统,以便连续地监测样品物质在一个离心场中的沉降过程。

分析型超速离心机的转头是椭圆形的,此转头通过一个有柔性的轴连接到一个超速的驱动装置上。转头在冷冻而真空的腔中旋转。转头上有 2~6 个装离心杯的小室,扇形的离心杯可以上下透光。离心机中装有一个光学系统,在整个离心期间都能通过紫外吸收或折射率的变化监测离心杯中沉降着的物质。在预定的时间可以拍摄沉降物质的照片。在分析室中物质沉降的情况下,在重颗粒和轻颗粒之间形成的界面就像一个折射的透镜,结果在检测系统的照相底板上产生了一个“峰”,由于沉降不断进行,界面向前推进,因此峰也随之移动。从峰移动的速度可以得到有关物质沉降速度的指标。

分析型超速离心机在生物学方面的应用,还包括测定生物大分子的分子量、估计样品的纯度和检测生物大分子构象的变化等。

四、离心方法

(一) 沉淀离心

沉淀离心(pelleting)技术是目前应用最广的一种离心方法。一般是指介质密度约 1 g/mL,选择一种离心速度,使悬浮溶液中的悬浮颗粒在离心力的作用下完全沉淀下来,这种离心方式称之为沉淀离心。根据颗粒大小来确定沉降所需要的离心力。主要适宜于细菌等微

生物、细胞和细胞器等生物材料,离心密度在 1.08~1.12 g/mL 左右;病毒和染色体 DNA 等,离心密度在 1.18~1.31 g/mL 左右。沉降速度与离心力和颗粒大小有关。

(二) 差速分级离心

差速离心(differential pelleting)是建立在颗粒的大小、密度和形状有明显的不同,沉降系数存在较大差异的基础上进行分离的方法。凡是利用颗粒在离心场中的沉降系数差异进行逐级分离的离心方法,称之为差速分级离心。

差速离心操作比较麻烦,其得率和纯度不可能做到二者兼得。这是因为 S 值小的物质是均匀分布在溶液中的,在 S 值大的物质沉淀的过程中位于离心管底部的 S 值小的物质被埋在 S 值大的物质下面。所以每次得到的沉淀物都不是纯品,但其纯度随着离心次数的增加而提高,得率随着离心次数的增加而降低。所以差速离心一般用于粗级分离,而不适用于精细分离。

(三) 密度梯度离心

凡是使用密度梯度介质离心的方法均称之为密度梯度离心(density gradient centrifugation)或称为区带离心。自从瑞典化学家 Svedberg 建立了超速离心技术,密度梯度溶液被引入到离心方法中,并逐步得到广泛推广。

密度梯度离心比差速分级离心的分辨率高。可以同时使混合样品中沉降系数相差在 10%~20%的几个组分分开,得到的产品纯度也较高。

由于密度梯度本身具有很好的抗对流、抗扰动作用。在密度梯度离心中,由于梯度的存在,沉淀的样品会被压实,对物质样品的结构和形状起到了保护作用。

密度梯度离心主要有两种类型,一种是根据颗粒的不同沉降速度而分层的,称之为速率区带离心;另一种是根据颗粒不同密度而分层的,称之为等密度区带离心。

1. 速率区带离心(rate zonal centrifugation) 速率区带离心是根据大小不同、形状不同的颗粒在梯度介质中沉降速度不同建立起来的分离方法。离心前预先在离心管内装入密度梯度介质(如蔗糖、CsCl),被分离物质的样品溶液位于梯度介质的上面,在离心力的作用下样品中的各组分以不同的沉降速度沉降,当颗粒的沉降力与某一密度区域的浮力相等时,颗粒就停留在该密度区域内,使各组分达到分离的目的。此法特别适宜于 S 值相近、颗粒的直径和形状不同的组分分离。

要使密度梯度离心获得较满意的效果,在密度梯度离心时必须注意两点:第一,在制备梯度介质时,必须考虑颗粒的密度必须大于介质密度的最大值;第二,必须控制好离心时间,要在所需样品到达管底之前停止离心。

该方法可用于分离与介质密度相当的细胞、细胞器、DNA 和蛋白质。分离效果只与被分离物质的大小有关,与介质的密度无关。

2. 等密度区带离心(isopycnic centrifugation) 等密度区带离心是根据颗粒密度的差异进行分离的。因此选择相应的介质密度和使用合适的密度范围是非常重要的。等密度区带离心中介质的密度范围正好包括所有待分离颗粒的密度。样品可以加在制成的密度梯度介质的上面,也可以与密度梯度介质混合在一起,待离心后自然形成梯度。样品中组分在这种梯度介质中,经过离心,最终将停留在与其浮力密度相等的区域内,形成一个区带。颗粒密度和介质密度达到平衡时,所形成的颗粒区带就停止运动,延长离心时间对离心效果无明显影响。等密度离心对颗粒的分离完全是由颗粒的密度所决定的。另外,等密度区带离心也可以使用不连续梯度,通常是样品的密度介于任两层梯度之间,或使其与某层的密度梯度相同。这样,在离心之后可以在两层之间或某层梯度介质中分离样品。不连续梯度可以缩短离心时间。

(四) 连续流离心

连续流离心(continuous flow centrifugation)是在离心力的作用下,连续向连续流转头内加入样品溶液,颗粒在离心力的作用下发生沉降,上清液受注入样品溶液的压力不断溢出,最终获得所需颗粒。此法适用于溶液稀、体积大的样品溶液离心,这样可以减少开机时间,提高效率。可用于发酵工业化规模生产的细胞和培养液的分离,也可用于分离不同生长周期的细胞。

五、超速离心在生物学中的应用

根据物质的沉降系数、质量、浮力因子等不同,应用强大的离心力使物质分离、浓缩、提纯的方法称为超速离心技术,它是细胞生物学、生物化学、分子生物学常用的重要技术。离心分离是制备生物样品广泛应用的重要手段,如分离活体生物(细胞、微生物、病毒)、细胞器(细胞核、细胞膜、线粒体)、生物大分子(核酸、蛋白质、酶)、小分子聚合物等。对于生物样品的离心分离方法,主要是根据样品的不同来源和不同的性质采取不同的离心方法。可以将来源于培养液的细胞和细胞培养液分离或组织提取液中的细胞和提取组分分离,也可以将 DNA、RNA、蛋白质、多糖等生物大分子进行分离。因此,应根据不同的离心目的,选用不同的离心方法。

1. 分子量的测定 分子量由沉降系数根据 Svedberg 公式可以计算出物质的分子质量。

2. 未知 DNA 样品密度的测定 借助于已知密度的 DNA 样品,通过作图的方法,可以求出未知 DNA 样品的密度。

3. 从密度推算出 DNA 的 G-C 碱基含量 G-C 为 DNA 总碱基含量中鸟嘌呤和胞嘧啶的含量,以 mol% 表示。

利用 CsCl 密度梯度离心以及由此测出的 DNA 样品的密度推算。

4. 检测生物分子中构象的变化 分析型超速离心机已成功地用于检测大分子构象的变化。例如 DNA 可能以单股或双股出现,对于每一股可能是线性的,也可能是环状的。如果遇到某些因素, DNA 分子可能发生一些构象的变化。这些变化也许是可逆的,也许是不可逆的。构象上的变化可以通过检查样品在沉降速度中的差异来证实。分子越是紧密,在溶剂中的摩擦阻力越小,沉降越快;分子越是不规则,摩擦阻力就越大,沉降就越慢。因此,通过样品在处理前后沉降速度的差异就可以检测它在构象上的变化。

六、离心操作中的注意事项

离心设备,尤其是大型离心机是实验室耗资较大的一项仪器。若使用不当,不仅会损坏仪器,造成财产损失,而且还可能会造成安全事故。因此,使用时必须小心谨慎,并注意正确操作。现将离心过程中需注意的一些共同问题简述如下:

1. 使用前详细参阅说明书,注意正确的操作方法。
2. 选择适当的离心条件,如转速、温度及合适的转子。
3. 检查转子室及转子是否清洁或损坏,必要时用肥皂水擦洗干净。
4. 样品及离心管必须称重,对称放在转子内,确保对称位置重量平衡。
5. 运转速度绝不能超过所允许的最大速度。
6. 离心过程中发现不正常噪音或振动,应立即停止离心,切断电源。
7. 离心后应小心清洗转子室及转子。

附：高速冷冻离心机的一般操作规程

(1) 选择合适的转子, 安装到离心腔内承载转子的轴上。

(2) 接通电源, 打开电源开关, 调温度控制钮, 指向所需温度, 待离心室冷却至所需温度时, 方可离心。

(3) 离心管要精密地平衡, 并对称地放入转头中, 调节速度钮和定时钮, 使指向所需时间和速度(速度也可由小至大逐步调节), 高速离心机的转头是镶置在一个较细的轴上, 因此, 精密地平衡离心管和它们的内含物是十分重要的。转头中绝对不能装载单数的离心管, 离心管必须互相对称地放在转头中, 以便使负载均匀地分布在转头的周围。

(4) 打开启动开关, 观察离心机上的各种仪表是否正常工作。

(5) 在自动关机或手控关机后, 可开启制动开关, 使离心机较快地停止转动。

(6) 全部离心工作完成后, 关闭冷冻开关, 调节速度钮回到零位, 并关闭电源开关, 切断电源。将转头取出, 用纱布擦拭干净, 将离心机的盖子敞开放置, 使冷凝的水汽蒸发至干。转头是离心机中须重点保护的部件, 搬动时不能碰撞, 避免造成伤痕。转头长时间不用时, 要涂上一层上光蜡保护。

第二章 电泳技术

电泳是带电颗粒在电场作用下,向着与其所带电荷相反的电极移动的现象。这一现象在1808年就已发现,但是作为一项应用于生物化学研究的实验方法却是在1937年后,随着电泳仪器等装置的改进才有了较大的进展。然而,电泳真正在生物化学和其他领域的研究中得到广泛的应用,是在用滤纸作为支持物的纸电泳问世之后。20世纪60年代以来,由于采用了新型的支持物和先进的仪器设备,所以适合于各种目的的电泳便应时而生。

尽管电泳的种类繁多,但其基本原理却是一致的。归纳起来,电泳可分为三大类:

1. 显微电泳 是用显微镜直接观察细胞等大颗粒物质电泳行为的过程。目前此法已用于研究膜结构以及癌细胞和正常细胞的差异性等方

2. 自由界面电泳 是胶体溶液的溶质颗粒经过电泳后,在胶体溶液和溶剂之间形成界面的电泳过程。最简单的界面电泳是在一“U”形管中装入一定量的带色胶体溶液如黄色硫化砷胶体溶液或血红蛋白溶液,然后小心地分别在“U”形管两端注入等量的稀电解质溶液(NaCl溶液或一定pH的缓冲液),使其与胶体溶液之间有明显的界面,接着在此管两端放入铂电极,通直流电,过一段时间即可看到一边胶体溶液界面上升,另一边则下降,这是胶体颗粒产生泳动的结果。由于该电泳不受支持物的影响,所以分离效果较好,一般适用于胶体物质的纯度鉴定及电泳速度的测定。为了得到很好的界面,以及使界面移动能用光学系统反映出来,通常需要一套复杂的电泳仪装置,这就使自由界面电泳的广泛应用受到了限制。

3. 区带电泳 是样品物质在一惰性支持物上进行电泳的过程。因电泳后,样品的不同组分可形成带状的区间,故称区带电泳,亦称区域电泳。采用不同类型的支持物进行该电泳时,能分离鉴定小分子物质(如核苷酸、氨基酸和肽类等)和大分子物质(如核酸、蛋白质以及病毒颗粒等)。由于区带电泳有支持物存在,所以减少了界面之间的扩散和异常现象的干扰。加之某些支持物如聚丙烯酰胺凝胶同时具有分子筛的效能,因此,区带电泳的灵敏度和分辨率较高。另外,区带电泳还有设备简单、操作方便的优点,故在生物化学、医学临床等方面的应用十分广泛。目前,该电泳法已成为开展生物化学和分子生物学等研究工作的一种不可缺少的方法。本章将重点讲述一些常见的区带电泳方法。

一、电泳的基本原理

当把一个带净电荷(q)的颗粒放入电场时,便有一个力(F)作用其上。 F 的大小取决于颗粒所带净电荷量及其所处的电场强度(E),它们之间的关系可用下式表示:

$$F = E \cdot q$$

由于 F 的作用,使带电颗粒在电场中向一定方向泳动。此颗粒在泳动过程中还受到一个相反方向的摩擦力(f_v)阻挡。当这两种力相等时,颗粒则以匀速度(v)向前泳动。根据Stoke公式,阻力大小取决于带电颗粒的大小、形状以及所处介质的黏度,即

$$v = Eq / 6r\pi\eta$$

式中, r 为颗粒半径, η 为介质黏度。带电颗粒在单位电场中泳动的速度常用泳动度或迁移率表示。

从公式看出,带电颗粒在电场中泳动的速度与电场强度、颗粒所带的净电荷量成正比,而

与颗粒半径和介质黏度成反比。若颗粒是具有两性电介质性质的蛋白质分子时,它在一定 pH 溶液中的电荷性质是独特的。这种物质在电场中泳动一段时间后,便会集中到确定的位置上呈一条致密区带。若样品为混合的蛋白质溶液时,由于不同蛋白质的等电点和分子量是不同的,因此经电泳后,就形成了泳动度不同的区带。利用此性质,便可把混合液中不同的蛋白质(或其他物质)分离开,也可用其对样品的纯度进行鉴定。

二、影响泳动速度的因素

在一定的条件下,任何带电颗粒都具有自己的特定泳动度。它是胶体颗粒的一个物理常数,可用其分离蛋白质等物质,还可用于研究蛋白质、核酸等物质的一些化学性质。影响泳动速度的因子有颗粒的性质、电场强度和溶液的性质等。

(一) 颗粒性质

颗粒直径、形状以及所带的净电荷量对泳动速度有较大影响。一般来说,颗粒带净电荷量越大,或其直径越小,或其形状越接近球形,在电场中的泳动速度就越快。反之,则越慢。

(二) 电场强度

电场强度对泳动速度起着十分重要的作用。电场强度越高,带电颗粒的泳动速度越快。反之,则越慢。根据电场强度大小,又将电泳分为常压电泳和高压电泳。前者电场强度为 $2 \sim 10 \text{ V/cm}$,后者为 $70 \sim 200 \text{ V/cm}$ 。用高压电泳分离样品需要的时间比常压电泳短,但往往产生很高的热量。

(三) 溶液性质

溶液性质主要是指电极溶液和蛋白质样品溶液的 pH、离子强度和黏度等。

1. pH 溶液 pH 决定带电颗粒的解离程度,也即决定其带净电荷的量。对蛋白质而言,溶液的 pH 离其等电点愈远,则其所带净电荷量就愈大,从而泳动速度就越快。反之,则越慢。

2. 离子强度 溶液的离子强度一般在 $0.02 \sim 0.2 \text{ mol/L}$ 时,电泳较合适。若离子强度过高,则会降低颗粒的泳动度。其原因是,带电颗粒能把溶液中与它电荷相反的离子吸引在自己周围形成离子扩散层。这种静电引力作用的结果,导致颗粒泳动度降低。若离子强度过低,则缓冲能力差,往往会因溶液 pH 的变化而影响泳动度的速率。

3. 溶液黏度 上面提到泳动度与溶液黏度是成反比例关系的。因此,黏度过大或过小,必然会影响泳动度。

(四) 电渗

当支持物不是绝对惰性物质时,常常会有一些离子基团如羧基、磺酸基、羟基等吸附溶液中的正离子,使靠近支持物的溶液相对带电。在电场作用下,此溶液层会向负极移动。反之,若支持物的离子基团吸附溶液中的负离子,则溶液层会向正极移动。溶液的这种泳动现象称为电渗。因此,当颗粒的泳动方向与电渗方向一致时,则加快颗粒的泳动速度;当颗粒的泳动方向与电渗方向相反时,则降低颗粒的泳动速度。

(五) 筛孔

支持物琼脂和聚丙烯酰胺凝胶都有大小不等的筛孔,在筛孔大的凝胶中溶质颗粒泳动速度快。反之,则泳动速度慢。

除上述影响泳动速度的因素外,温度和仪器装置等因素的影响也应考虑。