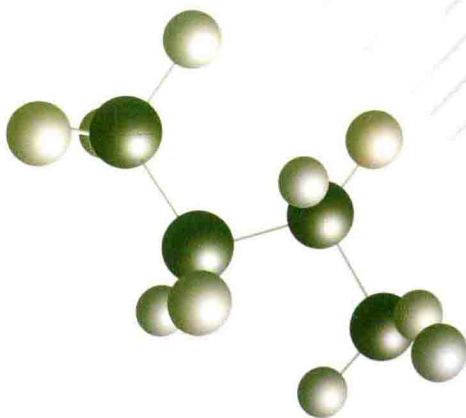


**Guide to Biochemical
Experiments**

生物化学 实验指导

(第2版)

袁榴娣 主编



东南大学出版社
SOUTHEAST UNIVERSITY PRESS

生物化学实验指导

(第2版)

主 编 袁榴娣
副主编 汪道涌 李淑锋
编 者 (按姓氏拼音为序)

孔 岩 李淑锋 毛晓华
苏根毅 汪道涌 于晓明
袁榴娣 赵 晟

东南大学出版社

南京

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验指导 / 袁榴娣主编. —2 版. —南京:
东南大学出版社, 2014. 8

ISBN 978-7-5641-5070-9

I. 生… II. 袁… III. 生物化学—实验—高等
学校—教学参考资料 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 161634 号

生物化学实验指导(第2版)

出版发行 东南大学出版社

出版人 江建中

社 址 南京市四牌楼 2 号(210096)

电 话 025—83793681

经 销 江苏省新华书店

印 刷 兴化印刷有限责任公司

开 本 700mm×1000mm 1/16

印 张 9.25

字 数 148 千字

版 次 2007 年 8 月第 1 版 2014 年 8 月第 2 版第 2 次印刷

印 数 4001—7000

书 号 ISBN 978-7-5641-5070-9

定 价 24.00 元

凡因印装质量问题, 请直接向东南大学出版社营销部调换。电话: 025—83791830。

再版前言

生物化学与分子生物学是一门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本科生物化学实验讲义的基础上,紧扣理论教学大纲的内容,经修订和改编而成。作为一本面向生物学、临床医学及相关专业本科生的实验教材,自2007年出版以来,受到广大师生的好评与欢迎。本次修订进行了数据更新和内容完善。内容分为两大部分,前一部分简要介绍了常用的生物化学基本理论和实验方法,包括生物化学实验中的基本操作、分光光度法、离心、电泳、层析、蛋白质的分离纯化、核酸的分离纯化技术、PCR等,以供学生实验时查找及老师讲解。后一部分是根据理论教学大纲,每一部分理论内容均安排了相应的实验,同时还有几个综合性大实验。目的是培养学生动手能力和良好的科研素质,可为相关专业学生提供全面的生物化学实验理论和具体实验操作的指导。

在本书的编撰和修订中,由袁榴娣、汪道涌、李淑锋、于晓明、赵晟、毛晓华、孔岩、苏振毅执笔,袁榴娣统稿。

由于编者水平有限,有错误的地方,敬请同仁们批评指正。

编者

2014年7月

目 录

第一篇 基础理论部分

第一章 生物化学实验中的基本操作	(1)
第二章 分光光度技术	(5)
第三章 离心技术	(11)
第四章 电泳技术	(19)
第五章 层析技术	(29)
第六章 蛋白质的分离纯化技术	(44)
第七章 核酸的分离纯化技术	(52)
第八章 聚合酶链反应技术	(57)

第二篇 实验部分

第九章 蛋白质和酶的分离分析技术	(64)
实验 1 蛋白质的盐析及透析	(64)
实验 2 凝胶过滤法分离血红蛋白与鱼精蛋白	(66)
实验 3 血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳	(68)
实验 4 聚丙烯酰胺凝胶板状电泳法分离血清蛋白	(71)
实验 5 蛋白定量法	(74)

实验 6	离子交换层析分离混合氨基酸	(83)
实验 7	影响酶作用的因素	(85)
实验 8	酶促反应动力学	(88)
第十章	核酸的分离分析技术	(98)
实验 9	酵母细胞中核糖核酸(RNA)的提取及鉴定	(98)
实验 10	基因组 DNA 的制备	(100)
实验 11	DNA 及 RNA 含量测定	(105)
第十一章	物质代谢及调控	(107)
实验 12	肝糖原的提取与定性	(107)
实验 13	血糖浓度的测定	(109)
实验 14	脂肪酸 β -氧化	(114)
实验 15	转氨基作用	(116)
第十二章	基因克隆相关技术	(119)
实验 16	质粒 DNA 的小量制备	(119)
实验 17	质粒 DNA 的酶切及电泳鉴定	(121)
实验 18	PCR 技术	(123)
第十三章	临床生化	(125)
实验 19	抽提血清甘油三酯	(125)
实验 20	血清谷丙转氨酶测定	(128)
第十四章	综合实验	(130)
实验 21	碱性磷酸酶的分离纯化及比活性测定	(130)
实验 22	胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的影响	(136)
实验 23	Southern 印迹技术	(138)
实验 24	Western 印迹技术	(141)

第一篇 基础理论部分

第一章 生物化学实验中的基本操作

一、玻璃器皿的洗涤与干燥

生化实验常用各种玻璃仪器,其清洁程度直接影响实验结果的准确性。因此,清洁玻璃仪器不仅是实验前后的常规工作,也是一项重要的技术性工作。清洗玻璃仪器的方法很多,需根据实验要求、污物的性质和沾污程度选用合适的清洁方法。

1. 新购玻璃仪器的清洗 新购玻璃仪器,其表面附有碱质,可先用肥皂水刷洗,再用流水冲净,浸泡于1%~2%盐酸中过夜,再用流水冲洗,最后用蒸馏水冲洗2~3次,干燥备用。

2. 使用过的玻璃仪器的清洗

(1) 一般玻璃仪器:如试管、烧杯、锥形瓶等,先用自来水洗刷后,用肥皂水或去污粉刷洗,再用自来水反复冲洗,去尽肥皂水或去污粉,最后用蒸馏水淋洗2~3次,干燥备用。

(2) 容量分析仪器:吸量管、滴定管、容量瓶等,先用自来水冲洗,待晾干后,再用铬酸洗液浸泡数小时,然后用自来水充分冲洗,最后用蒸馏水淋洗2~3次,干燥备用。

(3) 比色杯:用毕立即用自来水反复冲洗。洗不净时,用盐酸或适当溶剂冲洗,再用自来水冲洗。避免用碱液或强氧化剂清洗,切忌用试管刷或粗糙布(纸)擦洗。

上述所有玻璃器材洗净(以倒置后器壁不挂水珠为干净的标准)后,根据需要晾干或烘干。

3. 玻璃仪器的干燥 玻璃仪器有时还需要干燥。一般将洗净的仪器倒置一段时间,晾干后即可使用。有些实验须严格要求无水,这时,可将洗净并将水倒干后的仪器放在烘箱中烘干(但容量器皿不能在烘箱中烘,以免影响体积准确

度)。有盖(塞)的玻璃仪器,如试剂瓶等,应去盖(塞)后烘烤。较大的仪器或者在洗涤后立即使用的仪器,为了节省时间,可先将水尽量沥干后,加入少量丙酮或乙醇摇洗(使用后的丙酮或乙醇应倒回专用的回收瓶中),再用电风吹干。先吹冷风1~2分钟,当大部分溶剂挥发后,再吹入热风使干燥完全(有机溶剂蒸气易燃、易爆,故不宜先用热风吹),吹干后再吹冷风使仪器逐渐冷却。

二、移液器的使用

1. 刻度吸量管的使用方法(图1-1) 刻度吸量管的规格有0.1 ml、0.2 ml、0.5 ml、1 ml、2 ml、5 ml及10 ml等,供量取10 ml以下任意体积的液体之用。

(1) 执管:将中指和拇指拿住吸量管上口,以食指控制流速。刻度数字应朝向操作者。

(2) 取液:把吸量管插入液体内(切忌悬空,以免液体吸入洗耳球内),用洗耳球吸取液体至所取液量的刻度上端1~2 cm处,眼睛看着液面上升;然后迅速用食指按紧吸量管上口,使管内液体不再流出。

(3) 调准刻度:将已吸足液体的吸量管提出液面,用滤纸片抹干管尖外壁液体,然后垂直提起吸量管于供器内口(管尖悬离供器内液面),下口与试剂瓶接触,并成一个角度;用食指控制液体流至所需刻度,此时液体凹面、视线和刻度应在同一水平面上,并立即按紧吸量管上口。

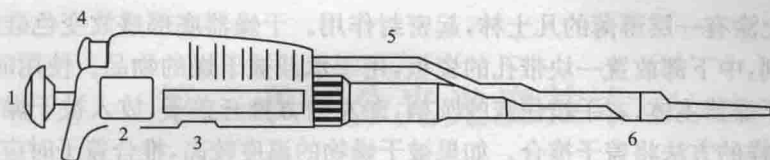
(4) 放液:吸量管移入准备接受溶液的容器中,仍使其出口尖端接触器壁(管尖应接触受器内壁,但不应插入受器内的原有液体之中,以免污染吸量管及试剂),并成一个角度,吸量管仍保持垂直。放松食指,让液体自然流出(如移液管标有“吹”字,则应将管口残余液滴吹入受器内)。移液管应最后靠壁15秒。

(5) 洗涤:吸取血液、尿、组织样品及黏稠试剂的吸量管,用后应及时用自来水冲洗干净。如果吸取一般试剂的吸量管可不必马上冲洗,待实验完毕后,用自来水冲洗干净。晾干水分,再浸泡于铬酸洗液中。

2. 枪式移液器的使用 枪式移液器主要有:5 000 μl 、1 000 μl 、200 μl 、20 μl 、10 μl 等,供量取10 ml以下任意体积的液体之用。结构见图1-2,其内部柱塞分2段行程,第1挡为吸液,第2挡为放液。



图1-1 刻度吸量管的使用方法



1. 液体吸取钮; 2. 体积选取钮; 3. 体积显示;
4. 枪头排放钮; 5. 枪头排放器; 6. 枪头接嘴

图 1-2 枪式移液器的使用方法

使用步骤如下:

- (1) 调体积选取旋钮至所需值;
- (2) 套上枪头;
- (3) 垂直持握枪式移液器外壳, 按下拇指至第一挡;
- (4) 将枪头插入溶液, 徐徐松开大拇指, 使其复原;
- (5) 排放时, 重新将大拇指按下, 至第一挡后, 继续按至第二档排空。

注: 移液过程应控制速度、力度。

三、溶液的混匀

样品与试剂的混匀是保证化学反应充分进行的一种有效措施。为使反应体系内各物质迅速地互相接触, 必须借助于外加的机械作用, 混匀时须防止容器内液体溅出或被污染, 严禁用手指直接堵塞试管口或锥形瓶口振荡。混匀的方式大致有下面几种, 可随使用的器皿和液体容量而选用。

1. 旋转混匀法 用手持容器, 使溶液作离心旋转。该法适用于未盛满液体的试管或小口径器皿, 如锥形瓶, 旋转试管时宜用手腕旋转。

2. 指弹混匀法 此法多用于试管内溶液的混匀。用左手持试管上端, 用右手手指轻轻弹动试管下部, 使管内溶液作漩涡运动; 或用右手持试管上端, 在左手掌上打击的方法混匀内容物。

3. 颠倒混匀法 适用于有塞的容量瓶及有塞试管内容物的混匀。一般试管内容物混匀时可用聚乙烯等薄膜封口, 再用手按住管口颠倒混匀。

4. 吸量混匀法 用吸量管将溶液反复吸放数次, 使溶液充分混匀。

5. 玻棒搅动法 适用于烧杯、量筒内容物的混匀。如固体试剂的溶解和混匀。

其他尚有电磁搅拌混匀法和振荡器混匀法等。

四、干燥器的使用

实验过程中, 一些易吸潮的固体、灼烧后的坩埚或需较长时间保持干燥的实验样品等应放在干燥器内, 以防吸收空气中的水分。干燥器由厚质玻璃制成, 其

磨口盖上涂有一层薄薄的凡士林,起密封作用。干燥器底部盛放变色硅胶之类的干燥剂,中下部放置一块带孔的瓷板,用于承载被干燥的物品。使用时,用左手按住干燥器主体,右手按住盖的圆柄,向左前方推开盖子,放入被干燥的物品后,用同样的方法将盖子推合。如果被干燥物的温度较高,推合盖子时应留一条很小的缝隙,待其冷却后再盖严。以防内部热空气冲开盖子打碎,或因冷却后的负压使盖子难以推开。移动干燥器时,应用双手拇指同时按住盖子,避免盖子滑落。

五、台式离心机的使用

利用离心机转动的离心力,使比重较重的沉淀物沉积在管底部,上层液体为“上清液”,使用电动离心机时应严格遵守下列操作规程。

1. 离心前先将盛有样品的离心管(或试管)和套管在台秤上平衡,调节双方重量相等,否则当离心机转动时容易受损。
2. 双方平衡后,分别放在离心机转盘的对称两孔洞内。
3. 检查电源的电压,插好插头,开动开关,然后转动速度调节器,缓慢地逐步增加转速以达到所需要的速度。在转动中,离心机机身应稳,声音均匀,如有机身不稳或声音异常,表示对称两管的重量不等,应立即停止离心。
4. 离心时间到时,先逐步减慢速度,转动调节器到“停”或“0”,然后关闭开关,让它自行停止,严禁用手强制使其转动停止。
5. 最后将离心管取出,离心套管倒置于固定架内。

六、水浴箱的使用

水浴箱是利用电加热使水箱内温度保持恒定的仪器,是生物化学实验的常用设备。

1. 使用前应加入蒸馏水,并插好温度计。
2. 通电后红色指示灯亮,表示电热管已加热,观察温度计到达所需温度时,微微转动控制器旋钮,到达指示灯忽明忽暗之点,稍待数分钟后,即能自动保持箱内温度恒定。
3. 经常注意箱内外整洁,箱内水至少每2周更换及洗刷一次。

第二章 分光光度技术

光是由光子所组成,光线就是高速向前运动的光子流,光的本质是一种电磁波,传播过程呈波动性质,具有波长和频率的特征。

将电磁波按波长(或频率)顺序排列起来,即得:

γ 射线	X射线	紫外线	可见光	红外线	无线电用电磁波
-------------	-----	-----	-----	-----	---------

人肉眼可见的光线称可见光,波长范围在 $400 \sim 760 \text{ nm}$;

$200 \sim 400 \text{ nm}$ 为紫外光区;

$760 \sim 50\,000 \text{ nm}$ 为红外区($1 \text{ nm} = 10^{-3} \mu\text{m} = 10 \text{ \AA}$, 即 $1 \text{ \AA} = 10^{-8} \text{ cm}$)。

可见光区的电磁波,因波长不同而呈现不同的颜色,这些不同颜色的电磁波称为单色光,单色光并非单一波长的光,而是一定波长范围内的光,太阳及钨丝灯发出的白光,是各种单色光混合而成(复合光),利用棱镜可将白光分成按波长顺序排列的各种单色光,即红、橙、黄、绿、青、蓝、紫等,这就是光谱。

一切物质都会对某些波长的光进行吸收,而物质对不同波长的射线,表现为不同的吸收现象,这一性质称为选择性吸收。有色溶液之所以呈现不同颜色,是因为这种对光的选择性吸收所致。某些无色物质虽对可见光无吸收作用,但也能选择性地吸收在可见光范围外的部分光能,即可吸收特定波长的紫外线或红外线。物质的吸收光谱与它们本身的分子结构有关,不同物质由于其分子结构不同,对不同波长光线的吸收能力也不同,因此每种物质都具有其特异的吸收光谱,在一定条件下,其吸收程度与物质浓度成正比,故可利用各种物质的不同的吸收光谱特征及其强度对不同物质进行定性和定量的分析。吸收光谱的测定可用来检测各种不同的物质。

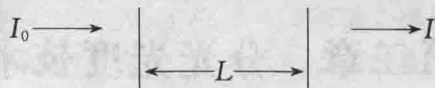
一、分光光度法的基本原理

分光光度法,常被用来测定溶液中存在的光吸收物质的浓度,其基本原理是根据 Lambert 和 Beer 定律。

(一) Lambert 定律

一束平行单色光垂直照射于一均匀物质(溶液)时,由于溶液吸收一部分光能,使光的强度减弱,若溶液的浓度不变,则溶液的厚度愈大,光线强度的减弱也愈显著。

设:入射光强度为 I_0 , L 表示溶液的厚度(即光程),出射光(透过光)强度为 I :



根据辐射能理论推导, I_0 与 I 之间关系为:

$$\lg(I_0/I) = K_1 L \quad (1)$$

式中, K_1 是常数,受光线波长、溶液性质、溶液浓度的影响。

(二) Beer 定律

当一束单色光通过一溶液时,光能被溶液介质吸收一部分,若溶液的厚度不变,则溶液浓度 C 愈大,光吸收愈大,透射光线强度的减弱也愈显著,光强度减弱的量与溶液浓度增加量成正比。

$$\lg(I_0/I) = K_2 C \quad (2)$$

式中, K_2 为吸收系数,是常数,溶液对光吸收的大小与溶液浓度 C 成正比。

(三) Lambert-Beer 定律

式(1)与式(2)合并

$$\lg I_0/I = KCL$$

$$\text{令 } A = \lg I_0/I$$

$$\text{则 } A = KCL$$

$$T = I/I_0$$

$$A = -\lg T$$

其中, T 为透光度; A 为吸光度(光密度,消光度); K 为常数,又称消光系数(extinction coefficient),表示物质对光线吸收的本领,其值因物质种类和光线波长而异。对于相同物质和相同波长的单色光则消光系数不变。

(四) 计算

根据 Lambert-Beer 定律,如果单色光的波长、溶液的性质和溶液的厚度一定时,用一个已知浓度的标准液和一个未知浓度的待测液进行比色分析就可以得出以下运算公式:

$$A_{\text{标}} = KC_{\text{标}} L$$

$$A_{\text{样}} = KC_{\text{样}} L$$

由于是同一类物质和相同光径,故:

$$\frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} = \frac{KC_{\text{样}} L}{KC_{\text{标}} L} = \frac{C_{\text{样}}}{C_{\text{标}}}$$

$$C_{\text{样}} = \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \cdot C_{\text{标}}$$

式中, $C_{\text{样}}$ = 待测样品浓度, $A_{\text{样}}$ = 待测样品吸光度。

$C_{\text{标}}$ = 标准溶液浓度, $A_{\text{标}}$ = 标准溶液吸光度。

根据上式可知,对于相同物质和相同波长的单色光(消光系数不变)来说,溶液的吸光度和溶液的浓度成正比。故已知标准溶液的浓度及吸光度按公式可算

出待测样品溶液的浓度。

二、分光光度法在生物化学中的应用

利用分光光度法对物质进行定量测定,主要有如下几种方法:

(一) 标准曲线法

用已知浓度的标准溶液,配制成一系列不同浓度的标准溶液,在最大吸收波长($\lambda_{\max}$)处测得各个吸光度(A 值),以吸光度 A 为纵坐标,浓度 C 为横坐标,作标准曲线(绘制 $A-C$ 曲线),取其直线部分作定量依据。

在测定被测样品时,以相同条件在 $\lambda_{\max}$ 处测定 A 值,再从标准曲线上查得该样品的相应浓度。

标准曲线制作与测定管的测定,应在同一仪器上进行,在配制样品时,一般选择其浓度相当于标准曲线中部的浓度较好。

(二) 直接比较法(标准管法)

将样品溶液与已知浓度的标准溶液浓度在相同条件下在 $\lambda_{\max}$ 处分别测定 A 值(因为在此条件下,两者 K 值相等),然后可根据下列公式,求得样品溶液的浓度含量:

$$\frac{A_{\text{标}}}{C_{\text{标}}} = \frac{A_{\text{样}}}{C_{\text{样}}}, \text{ 则}$$

$$C_{\text{样}} = \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \cdot C_{\text{标}}$$

(三) 吸收系数法

1. 摩尔消光系数(ϵ) 又称克分子消光系数。即溶液浓度为 1 mol/L , 溶液厚度为 1 cm 时的吸光度值(光密度值)。 ϵ 值在 $\lambda_{\max}$ 时可在一定实验条件下测得或药典手册中查出。

在已知 ϵ 的条件下,可将样品在同样条件测定其 A 值,再根据下式求得样品溶液的浓度。

$$C = \frac{A}{\epsilon}$$

2. 百分消光系数($E_{1\%}^{1\text{cm}}$) 即浓度以百分浓度($\text{g}/100 \text{ ml}$)来表示的消光系数,实际上即溶液浓度为 1% 及厚度为 1 cm 时的光密度值。

$$C = \frac{A}{E_{1\%}^{1\text{cm}}}$$

用不同波长的单色光作为入射光,分别通过被测溶液,并记录被测溶液对每一波长的吸光度(A),然后以波长(λ)为横坐标,相应的吸光度(A)为纵坐标作图,可得到某种物质的特征性的吸收光谱曲线。在吸收光谱中,往往可以找到一个或几个大的吸收值。其中最大吸收峰处波长称为最大吸收波长($\lambda_{\max}$)。物质

不同,它们的最大吸收波长也往往不同。图 2-1 为维生素 B₁₂ 的吸收光谱曲线。

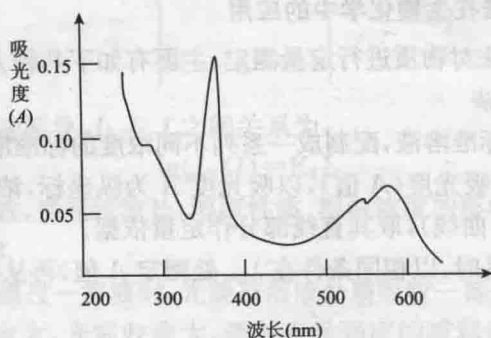


图 2-1 维生素 B₁₂ 水溶液的吸收光谱

三、分光光度计的结构与使用

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、吸收池、检测系统。如图 2-2 所示。

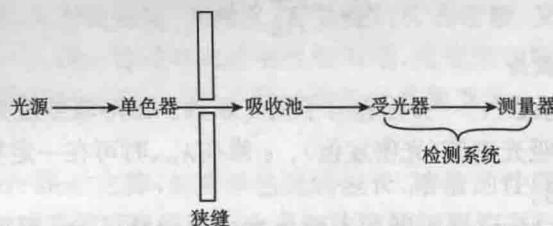


图 2-2 分光光度计的结构图

(一) 光源

一个好的光源要求具备发光强度高,光亮稳定,光谱范围宽和使用寿命长等特点。

分光光度计上常用的有白炽灯(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。有钨灯和氢灯(或氘灯)的分光光度计,光源的供电需要由稳压电源供给。钨灯在出现灯管发黑时应及时更换,如换用的灯型号不同,还需要调节灯座的位置和焦距。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。

(二) 单色器

单色器是将混合光波分解为单一波长光的装置,多用棱镜或光栅作为色散元件,它们能在较宽光谱范围内分解出相对纯波长的光线,通过此色散系统可根据需要选择一定波长范围的单色光,单色光的波长范围愈窄,仪器的敏感性愈高,测量的结果愈可靠。

(三) 狭缝

狭缝是由一对隔板在光通路上形成的缝隙,通过调节缝隙的大小调节入射光的强度,并使入射光形成平行光线,以适应检测器的要求,分光光度计的狭缝可在 $0\sim 2\text{ mm}$ 宽度内调节。

(四) 吸收池

吸收池也叫比色杯、比色皿或比色池。一般由玻璃或石英制成。在可见光范围内测定时选用光学玻璃吸收池,在紫外线范围内测定时必须用石英池。

注意保持比色杯的清洁是取得良好分析结果的重要条件之一,吸收池上的指纹、油渍或壁上的一些沉积物,都会显著地影响其透光性,因此务必注意仔细操作和及时清洗并保持清洁。

(五) 检测系统

主要是由受光器和测量器两部分组成,常用的受光器有光电池、真空光电管或光电倍增管等。它们可将接受到的光能转变为电能,并应用高灵敏度放大装置,将弱电流放大,提高敏感度。通过测量所产生的电能,由电流计显示出电流的大小,在仪表上可直接读得 A 值、 T 值。较高级的现代仪器,还常附有电子计算及自动记录器,可自动描出吸收曲线。

四、常见的 722 型分光光度计

光谱范围在 $360\sim 800\text{ nm}$,所有部件在一部主机里,操作方便,灵敏度高,图 2-3 为结构示意图。

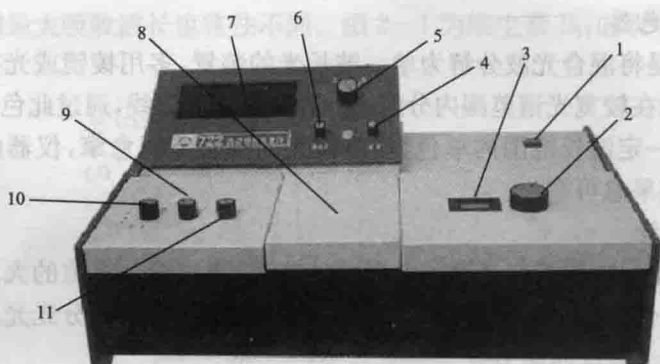
此仪器的最大特点为受光器不是光电池,而是光电管。光电管的阴极表面(光表面)有一层对光灵敏的物质,当光照射到光电管后,会发射出光电子,此光电子向阳极运动,形成光电流。

操作方法:

(1) 接上电源,打开比色室暗箱盖(光门挡板自动遮住光道),打开电源开关,将仪器预热约 20 分钟。旋转波长旋钮见选择所需波长。

(2) 将灵敏度选择开关放在“1”挡,将旋钮“5”置于“T”挡,然后旋转“0”调节旋钮(图中“9”),使读数窗口显示值为零。

(3) 将空白、标准及测定溶液分别放入干净的比色杯中,依次放在比色杯架中。



1. 电源开关; 2. 波长调节旋钮; 3. 波长指示窗口; 4. 浓度调节旋钮;
5. 透光率/吸光度/浓度选择钮; 6. 消光零调节钮; 7. 测定值显示屏;
8. 比色室; 9. “0”调节旋钮; 10. 灵敏度选择旋钮; 11. “100%”调节旋钮

图 2-3 722 型分光光度计外观图

(4) 将暗箱门盖上,并将空白置于光路上,调节“100%”旋钮使读数窗口显示值为“100.00”。将旋钮“5”置于“A”挡,看显示的吸光度是否为零。若为零则继续下面的步骤;若不为零则可用图中“6”(消光零调节钮),使之为零,同时需将旋钮“5”重置于“T”挡,重复本步开始调节操作。以确保在“T”挡,暗箱盖打开时为零,合上时为 100;调至“A”挡后,吸光度亦为零。

注:若空白液对光线吸收能力过强,仪器灵敏度不够,导致调不到 100%时,可将灵敏选择开关拨到较高(2~3 挡),至足以调到 100%为度,但改变灵敏度选择开关以后,须要重复(3)及(5)步骤重新校正“0”旋钮及 100%旋钮。

(5) 将标准液及待测液的比色杯依次推入光道,即可从自动电流计直接读出吸光度值。

(6) 使用完毕后,将开关放回到“关”位,切断电源。将比色杯取出,用蒸馏水充分洗涤干净。

第三章 离心技术

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,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。超速离心技术的应用已有 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相对分子质量,并首次证明了蛋白质是均一的生物大分子。1940 年他和 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区带离心。

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,给离心技术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,在同一离心力场作用一定时间后,就能彼此分离开来,离心机就是根据这一原理进行工作的。