



全国高等农林院校“十二五”规划教材

生物化学实验指导

第五版

SHENGWU HUAXUE
SHIYAN ZHIDAO

张云贵 王俊斌 李天俊·主编

 中国农业出版社

Q5-33
108-5

014038114

全国高等农林院校“十二五”规划教材

内
容
要
要

生物化学实验指导

第五版

张云贵 王俊斌 李天俊 主编



中国农业大学出版社

Q5-33
108-5



北航

C1723805

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验指导 / 张云贵, 王俊斌, 李天俊主编

—5版.—北京: 中国农业出版社, 2013.7

全国高等农林院校“十二五”规划教材

ISBN 978-7-109-17877-9

I. ①生… II. ①张… ②王… ③李… III. ①生物化学-实验-高等学校-教材 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 095941 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100125)

策划编辑 刘 梁

文字编辑 田彬彬

人民教育出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2007 年 12 月第 4 版 2013 年 7 月第 5 版

2013 年 7 月第 5 版北京第 1 次印刷

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 14.25

字数: 338 千字

定价: 26.50 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)



北航

C1723805

内 容 提 要

本教材参照农业部“基础生物化学教学大纲”中基础生物化学实验内容,结合编者多年教学实践编写而成。全书涉及生物化学实验技术原理、生物大分子的分离纯化、糖类、脂类、蛋白质及氨基酸、核酸、酶、维生素、代谢、分子生物学等方面内容,共72个实验,包含质量法、分光光度法、荧光法、层析技术、电泳技术、免疫技术及分子生物学操作技术。一些实验还同时编入了动物和植物实验材料操作内容,可供不同专业选用。本教材的突出特点是适用面宽,可作为农学、园艺、植保、农副产品加工、畜牧、兽医、水产养殖及食品加工等专业本科、专科学生及硕士研究生的实验教材,也可供有关科研人员参考。

第五版编者名单

主 编 张云贵 王俊斌 李天俊

副主编 刘祥云 丛方地

编 者 (按姓名笔画排序)

王英超 (天津农学院)

王俊斌 (天津农学院)

区炳庆 (佛山科学技术学院)

卢绍娟 (天津农学院)

丛方地 (天津农学院)

任 健 (天津农学院)

刘祥云 (天津农学院)

李天俊 (天津农学院)

张云贵 (天津农学院)

覃广泉 (仲恺农业工程学院)

蔡 马 (仲恺农业工程学院)

第四版编者名单

主 编 张云贵 刘祥云 李天俊 主

编 者 (按姓名笔画排序) 编主编

王英超 (天津农学院) 编

(区炳庆 (佛山科学技术学院)

(卢绍娟 (天津农学院)

(刘学东 任 健 (天津农学院)

(刘祥云 (天津农学院)

(李天俊 (天津农学院)

(张云贵 (天津农学院) 编主编 林昌贵 (南京林业大学)

(张孝义 (天津农学院)

(覃广泉 (仲恺农业技术学院)

(蔡 马 (仲恺农业技术学院)

(刘学东 工业类教材) 编主编

(刘学东 工业类教材) 编主编

第五版前言

生物化学实验是生物化学与分子生物学理论课的实验技术学科。通过生物化学与分子生物学实验技能的学习,使学生在理论知识学习的同时,由浅入深、由简而繁地学习、掌握生物化学实验技术,为今后参加生产实践打下坚实的基础。本教材是《生物化学》第三版(刘祥云、蔡马主编)的配套教材。全书力求以最简洁的语言、最形象的图表,为学生介绍生物化学及分子生物学的最基础、最经典的实验技术,使学生能在最短的时间内获取本学科的精髓和精要。本教材在前4版的基础上,增加了生物化学实验技术原理与生物大分子的分离纯化内容。

全书包括生物化学实验技术原理与生物大分子的分离纯化、生物化学及分子生物学实验两部分。生物化学实验技术原理,对一些重要的常用生物化学实验技术的原理做了较全面、系统的阐述。实验部分选编了72个实验,包括分离制备、分析和鉴定技术(如纸层析、薄层层析、凝胶层析、离子交换层析等)、电泳技术(包括醋酸纤维素薄膜电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、等点聚焦电泳、免疫印迹、脉冲凝胶电泳等)及一些分子生物学实验技术(如质粒及质粒DNA的提取、质粒DNA的限制性核酸内切酶酶切、聚合酶链式反应、逆转录聚合酶链式反应、感受态细胞的制备等)。

本教材由多年从事生物化学教学的一线教师编写。其中,第一部分的一、二、五由王俊斌编写,三、四由丛方地编写;第二部分实验1、2、11、12、17、19、21、22、29、43、49、50、52、54、57、68由李天俊编写,实验3、16、18、20、24、30、33~36、41、53、59、61、63、64、67、71由刘祥云编写,实验4、5、10、13、14、23、25、26、44、51、56、58、60由张云贵编写,实验6、9、69由覃广泉编写,实验7、27、28、32、39、40、42、48由王英超编写,实验8由蔡马编写,实验15、62、66、72由卢绍娟编写,实验31、70由区炳庆编写,实验37、38、45~47、55、65由任健编写;附录由张云贵编写。张云贵、刘祥云负责全书的统稿和审查。本书在出版过程中得到了各编者所在单位教务处的的大力支持,在此一并表示谢意。

由于编者的水平所限,难免有错误和不当之处,敬请有关专家和读者批评指正。

编 者

第四版前言

自 20 世纪末到 21 世纪初的近 20 年,生物化学与分子生物学的研究取得了迅猛的发展。之所以如此,与生物化学与分子生物学实验技术和方法的不断进步密切相关。为此,我们在 1993 年天津农学院、广州仲恺农业技术学院、北京农学院合编《生物化学实验指导》(第一版);2001 年张云贵、覃广泉和刘祥云主编的《生物化学实验指导》(第二版);2005 年张云贵、刘祥云和李天俊主编的《生物化学实验指导》(第三版)的基础上,补充和更新了原有的实验内容,增加了一些反映最新进展的实验技术编写了本教材。全书包括生物化学实验和附录两部分。实验部分共有 72 个实验,包括生物化学实验中的分离、制备、分析和鉴定技术,如滴定、光谱、层析(包括纸层析、薄层层析、凝胶柱层析、离子交换层析)、电泳(包括醋酸纤维薄膜电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦电泳、免疫印迹、脉冲凝胶电泳、甲醛变性凝胶电泳等)、分子生物学实验技术(质粒 DNA 提取、限制性酶切、PCR 技术、RT-PCR、感受态细胞的制备等)等,基本反映了现代生物化学实验技术的成果和发展的特点,可满足培养学生的需要,除可作为本科生、硕士研究生的教材外,也可供有关科研人员参考。

各实验的编写分工为:实验 4、5、10、13、14、23、25、44、51、56、58 和 60 及附录中的结果分析与数理由张云贵编写;实验 3、16、18、20、24、30、33~36、41、61、63、64 和 71 由刘祥云编写;实验 1、2、11、12、17、19、21、22、29、43、49、50、52、54、57 和 68 由李天俊编写;实验 6、9 和 69 由覃广泉编写;实验 7、27、28、32、39、40、42 和 48 由王英超编写;实验 37、38、45~47、55 和 65 由任健编写;实验 8 由蔡马编写;实验 31 和 70 由区炳庆编写;实验 26、53、59 和 67 由张孝义编写;实验 15、62、66 和 72 由卢绍娟编写。张云贵和刘祥云负责全书的统稿。本书在出版过程中得到了各编者所在单位教务处的大力支持,在此一并表示谢意。

由于编者的水平所限,难免有错误和不当之处,敬请有关专家和读者批评指正。

编 者

Contents | 目 录

第五版前言

第四版前言

实验室规则及安全守则 1

实验记录和实验报告 2

第一部分 生物化学实验技术原理与生物大分子的分离纯化 3

一、电泳技术 3

二、离心技术 8

三、层析技术 13

四、紫外可见分光光度技术 19

五、生物大分子的分离纯化 23

第二部分 生物化学及分子生物学实验 30

实验 1 可溶性总糖的测定——地衣酚-硫酸法 30

实验 2 还原糖含量的测定——3,5-二硝基水杨酸比色法 32

实验 3 可溶性糖的硅胶 G 薄层层析 34

实验 4 Teles 微量快速乳糖测定法 36

实验 5 血糖含量测定——邻甲苯胺法 38

实验 6 粗脂肪的索氏提取 40

实验 7 甲醛滴定法测定氨基氮 42

实验 8 植物水溶性氨基酸测定——茚三酮法测定氨基酸总量 44

实验 9 植物水溶性氨基酸的薄层层析 46

实验 10 动物蛋白质的水解及纸层析法分离氨基酸 48

实验 11 谷物种子中赖氨酸含量的测定 51

实验 12 玉米种子中色氨酸含量的测定 54

实验 13 植物游离脯氨酸含量的测定 55

实验 14 动物材料赖氨酸、色氨酸、甲硫氨酸含量的测定 57

实验 15 牛乳中酪蛋白的提取 62

实验 16 蛋白质的两性反应及等电点的测定 63

实验 17 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳测定蛋白质等电点 65

实验 18 蛋白质含量的测定——凯氏定氮法 68

实验 19 蛋白质含量的测定——考马斯亮蓝 G-250 法 72

实验 20 蛋白质含量的测定——紫外吸收法 74

实验 21	蛋白质含量的测定——双缩脲法	76
实验 22	蛋白质含量的测定——Folin 酚法	78
实验 23	血清 γ 球蛋白的分离——分子筛凝胶层析法	80
实验 24	醋酸纤维薄膜电泳法分离动物血清蛋白质	84
实验 25	蛋白质相对分子质量的测定——SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法	87
实验 26	蛋白质相对分子质量的测定——葡聚糖凝胶层析法	90
实验 27	免疫印迹法鉴定未知蛋白质	92
实验 28	植物核 DNA 的提取和检测	95
实验 29	酵母 RNA 的制备、鉴定及含量测定	97
实验 30	动物肝脏 DNA 的提取	100
实验 31	动物组织 RNA 的提取及鉴定	102
实验 32	豌豆叶片中总 RNA 的提取及 mRNA 的分离	105
实验 33	紫外吸收法测定核酸含量	108
实验 34	定磷法测定核酸含量	110
实验 35	地衣酚法测定 RNA 含量	112
实验 36	二苯胺显色法测定 DNA 含量	113
实验 37	从聚丙烯酰胺凝胶中回收 DNA	114
实验 38	脉冲电场凝胶电泳	116
实验 39	RNA 甲醛变性凝胶电泳	118
实验 40	低熔点琼脂糖凝胶电泳破碎法回收 DNA 片段	120
实验 41	大肠杆菌质粒 DNA 的提取和鉴定	122
实验 42	质粒 DNA 的限制性核酸内切酶酶切	125
实验 43	琼脂糖凝胶电泳法分离鉴定质粒 DNA 的限制性核酸内切酶酶切片段	127
实验 44	聚合酶链式反应实验技术	130
实验 45	菌落聚合酶链式反应	132
实验 46	逆转录聚合酶链式反应	134
实验 47	微卫星标记	136
实验 48	大肠杆菌感受态细胞的制备——氯化钙法	138
实验 49	淀粉酶活力的测定	140
实验 50	谷丙转氨酶和谷草转氨酶活力的测定	142
实验 51	超氧化物歧化酶的提取和活力测定	144
实验 52	菠萝蛋白酶的动力学测定	148
实验 53	底物浓度对酶促反应速度的影响——米氏常数的测定	152
实验 54	胰蛋白酶及其抑制剂的制备和活力测定	154
实验 55	多酚氧化酶的制备和化学性质	156
实验 56	血清乳酸脱氢酶同工酶的分离与测定——聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳法	158
实验 57	酯酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳	163
实验 58	过氧化物酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳	166
实验 59	大蒜细胞超氧化物歧化酶的提取与分离	168

实验 60	结晶乳酸脱氢酶的制备	170
实验 61	维生素 A 的提取和含量测定——三氯化锑比色法	174
实验 62	动物组织维生素 D 的提取和含量测定——三氯化锑比色法	177
实验 63	维生素 B ₁ 含量的测定——荧光法	180
实验 64	维生素 B ₁ 含量的测定——质量法	183
实验 65	维生素 C 含量的测定——2,6-二氯酚靛酚法	184
实验 66	叶酸的提取和含量测定——茚三酮比色法	187
实验 67	植物总黄酮的提取和含量测定	189
实验 68	丙酮酸含量的测定	191
实验 69	糖酵解中间产物的鉴定	193
实验 70	脂肪酸的 β -氧化——酮体的生成及其测定	195
实验 71	应用纸层析法鉴定酶促转氨基作用	197
实验 72	发酵过程中无机磷的利用	199
附录		201
一、结果分析与数据处理		201
二、标定摩尔浓度酸、碱溶液的配制		205
三、常用数据表		207
四、常用缓冲液的配制方法		210
主要参考文献		217

实验室规则及安全守则

1. 实验室是进行科学实验的场所，在实验室工作时，要遵守纪律，不迟到，不早退，保持室内有一良好的实验环境。

2. 课前要预习实验指导，课上注意听讲，按指导要求严格操作，实验中注意做好记录，培养科学的工作态度。

3. 实验前要了解电源开关、消防栓、灭火器、紧急洗眼器的位置及正确的使用方法，了解实验室的安全出口和紧急情况时的逃生路线。

4. 实验时要身着长袖、过膝的实验服，不准穿拖鞋或凉鞋。长发必须束起或藏于帽内。实验室内严禁饮食、吸烟、打闹。一切化学药品严禁入口。水、电、煤气使用完毕后，应立即关闭。

5. 保持实验环境和仪器的整洁，试剂、仪器排列有序，严格按操作规程洗刷仪器和量取试剂，注意节约，不要浪费药品及试剂。

6. 爱护仪器，细心操作，发现损坏要及时报告教师，并按有关规定处理。

7. 室内一切物品未经教师许可，不准私自携出室外。需按手续办理借物登记。

8. 洗液、浓酸、浓碱具有强腐蚀性，应避免溅落在皮肤、衣服、书本上，更应防止溅落到眼睛里。

9. 操作者必须认真学习仪器设备的有关安全操作规程，了解操作中可能发生事故的原因，确保安全后再操作。

10. 使用电器设备时，应特别细心，切忌用湿润的手开启电闸和电器开关。凡是漏电或出现故障的仪器不要使用，以免触电或发生伤害事故。

11. 不允许随意混合各种药品，以免发生意外。

12. 下列操作应在通风橱内进行：配制试剂或实验操作中会产生有刺激性或有毒气体的，具有易挥发和易燃物质的实验，打开浓硫酸、浓硝酸、浓氨水试剂瓶塞时。必要时，还应带防护用具。

13. 加热试管时，不要将试管口对着自己和别人，也不要俯视正在加热的液体，以免液体溅出造成伤害。

14. 所有实验材料及废弃物不得随意丢弃。有毒试剂、强腐蚀性试剂及实验废弃的有害药品严禁倒入下水道或生活垃圾处，必须经分类回收后统一处理。

15. 玻璃管与胶管、胶塞等拆装时，应先用水润湿，手上垫棉布，以免玻璃管折断扎伤。

16. 蒸馏易燃液体严禁用明火。蒸馏过程不得无人，以防温度过高或冷却水突然中断。易燃溶剂加热时，必须在水浴或沙浴中进行，避免明火。

17. 装过强腐蚀性、可燃性、有毒或易爆物品的器皿，应由操作者亲自洗涤。

18. 在使用一种不了解的化学药品前应做好的准备：明确这种药品在实验中的作用，掌握这种药品的物理性质（如熔点、沸点、密度等）和化学性质；了解这种药品的毒性；了解这种药品对人体的侵入途径和危险特性；了解中毒后的急救措施。

19. 实验完毕应将实验台整理干净，洗净双手，关闭水、电、煤气等的开关后才能离开实验室。

20. 实验完毕班长安排值日人员打扫实验室卫生，经教师验收合格后值日人员方可离室。

实验记录和实验报告

一、实验记录

为了获得准确的实验结果,实验前一定要认真预习,并写出预习报告,其内容包括日期、实验名称、目的、原理、操作步骤及预料中的现象,做到心中有数。

记录一定是实际观察到的现象,而不是照抄书本上写着的那些现象。记录要详细、具体。如沉淀的生成,是立即生成,还是缓慢生成;是加热后生成,还是低温下生成。对试剂、样品、个别仪器(称量瓶)的质量,在准确称量的基础上记录要表示出准确度。如样品称量要求 3 mg,那么应写成 0.003 0 g,而不应写成 0.003 g。对于没有预见到的实验现象的记录更是十分重要的,绝不可以忽视。为了重复已做过的实验和今后进行重复实验,准确的实验记录是非常重要的,对学生也是重要的科学研究训练。

记录的方式可以用表格或图解。用表格要注明表格题目、栏目、单位、数值。用图解可记录层析或电泳的图谱、纯化的流程及结果。用此种方式可简明扼要地描述实验结果,省略大量文字叙述。

二、实验报告

写实验报告的目的是向人们说明实验的方法、结果及实验者得出的结论。写好实验报告也是加强学生写好科学论文的基础训练。

实验报告应包括日期、题目、实验目的、原理、仪器及试剂(列出所用仪器及试剂,重点试剂的配制和特殊仪器的图解)、材料、实验步骤(简明如实写出实际操作方法,以使其他人能重复操作)、结果与计算(参考数据处理)和讨论或结论。要注意讨论或结论不是结果的重复,而是在结果的基础上根据实验中每一步骤的真实操作、产生的现象、得到的数据等进行综合分析后得出的合理结论。讨论中还包括对实验方法的改进及建议,对特殊现象的分析及讨论。

实验结束后,应及时整理和总结实验结果,写出实验报告。

生物化学实验技术原理与 生物大分子的分离纯化

一、电泳技术

带电颗粒在电场作用下向着与其电性相反的电极移动的现象称为电泳 (electrophoresis)。如带正电荷的颗粒向负极移动, 带负电荷的颗粒向正极移动。不同的带电颗粒在同一电场中泳动的速度不同, 常用泳动度 (或迁移率) 来表示。电泳技术是生物化学与分子生物学中的重要研究方法之一, 利用电泳技术可分离许多生物物质, 包括氨基酸、多肽、蛋白质、脂类、核苷、核苷酸及核酸等, 并可用于分析和测定物质的纯度和相对分子量等。

(一) 电泳技术的基本原理

许多生物分子都带有电荷, 在电场作用下可发生移动。由于混合物中各组分所带电荷性质、数量以及相对分子量各不相同, 在同一电场作用下, 各组分的泳动方向和速度也有所差异, 所以在一定时间内, 它们移动的距离不同, 从而可达到分离鉴定的目的。

在电场中, 推动带电质点运动的力 (F) 等于质点所带净电荷量 (Q) 与电场强度 (E) 的乘积。

$$F = QE$$

质点的前移同样要受到阻力 (F') 的影响, 对于一个球形质点, 服从斯托克 (Stoke) 定律, 即:

$$F' = 6\pi r\eta v$$

式中: r ——质点半径;

η ——介质黏度;

v ——质点移动速度。

当质点在电场中作匀速运动时, $F = F'$, 即: $QE = 6\pi r\eta v$ 。

上式变换后可写成 $v/E = Q/6\pi r\eta$ 。

v/E 的含意为单位电场强度下的泳动速度, 也称泳动度, 可用迁移率 μ 表示, 即: $\mu = Q/6\pi r\eta$ 。

可见, 带电颗粒的迁移率与本身所带净电荷的数量、颗粒大小、形状和介质的黏度等多种因素有关。一般来说, 所带的净电荷数量越多、颗粒越小、越接近球形, 则在电场中的泳动速度越快, 反之则慢。

两种不同的粒子一般有不同的迁移率, 在具体实验中, 泳动速度 v 为单位时间 t 内泳动的距离 d , 即: $v = d/t$; 电场强度 E 为单位距离内电势差 U (以伏特计), L 为支持物的有效长度, 即: $E = U/L$ 。

以 $v = d/t$, $E = U/L$ 代入 $\mu = Q/6\pi r\eta$, 即得:

$$\mu = Q/6\pi r\eta = v/E = dL/tU$$

式中： v ——粒子的泳动速度 (cm/s 或 cm/min)；

E ——电场强度或电势梯度 (V/cm)；

d ——粒子泳动距离 (cm)；

L ——支持物的有效长度 (cm)；

U ——加在支持物两端的实际电压 (V)；

t ——通电时间 (s 或 min)。故迁移率 (或泳动度) 的单位为 $\text{cm}^2/(\text{s} \cdot \text{V})$ 。

某物质 (A) 在电场中的移动距离为 $d_A = \mu_A t U/L$ ；另一物质 (B) 在电场中的移动距离为 $d_B = \mu_B t U/L$ ，两物质的移动距离差为 $d_A - d_B = (\mu_A - \mu_B) t U/L$ 。该式指出物质 A、B 能否分离决定于两者的迁移率。若它们的迁移率相同则不能分离，有差别才能分离，差别越大，分离越好。当然，分离情况也与其他实验条件有关。

(二) 影响电泳的因素

电泳结果可受到多种因素的影响，主要包括以下几个方面：

1. 电场强度 电场强度与电泳速度成正比关系。电场强度越高，则带电粒子的移动速度越快。电场强度以每厘米的电势差计算，也称电势梯度。根据电场强度的大小，可将电泳分为常压电泳和高压电泳。前者电场强度一般为 $2 \sim 10 \text{ V/cm}$ ，电泳时间较长；后者电场强度为 $20 \sim 200 \text{ V/cm}$ ，电泳速度较快。但电压增加，相应电流也增大，电流过大时易产生热效应，可使蛋白质变性，必须有散热措施，才能得到好的效果。

2. 介质的 pH 介质的 pH 决定了带电粒子解离的程度，也决定了该物质所带净电荷的性质和多少。对两性电解质如蛋白质，介质的 pH 离开等电点越远，所带净电荷越多，则泳动速度亦越快，反之之越慢。若在等电点 pH 介质中，则不能移动。因此，当分离某一蛋白质混合物时，应选择一个合适的 pH，使各种蛋白质所带的电荷量差别较大，以利于彼此分开。为保持介质 pH 的稳定性，电泳都在一定的缓冲液中进行。

3. 缓冲液的离子强度 缓冲液的离子强度低，电泳速度快，但区带分离不清晰；离子强度高，电泳速度慢，但分离区带清晰。如果离子强度过低，缓冲液的缓冲量小，难维持 pH 的恒定；离子强度过高，带电粒子能把溶液中带与其相反电荷的离子吸附在自己周围形成离子扩散层，导致带电粒子所带净电荷减少，电泳速度减慢。所以最适离子强度一般在 $0.05 \sim 0.1 \text{ mol/L}$ 之间。溶液离子强度的计算：

$$I = 0.5 \sum C_i Z_i^2$$

式中： I ——离子强度；

C_i ——离子的摩尔浓度；

Z_i ——离子的价数。

4. 电渗作用 在电场中，液体对于固体支持物的相对移动称为电渗。如在纸电泳中，滤纸中含有表面带负电荷的羟基，因感应相吸而使与纸相接触的水溶液带正电荷，在电场中液体向负极移动，并带动着物质移动。由于电渗作用与电泳同时存在，所以粒子电泳的移动距离也受到电渗影响，如果物质原来向负极移动，则移动更快，反之则慢，所以电泳时粒子表观速度是其本身泳动速度与由于电渗而被携带的移动速度两者的加和。例如，在 pH 8.6 巴比妥缓冲液中进行血清蛋白电泳时， γ 球蛋白虽然也同其他主要血清蛋白一样带有负电荷，应向正极移动，但它却向负极移动，这一结果是由电渗作用引起的。选择电泳支持物

时,以电渗作用小或几乎无电渗作用的为宜(图1-1)。

5. 带电颗粒的性质 带电颗粒的性质即颗粒所带净电荷的数量、大小及形状。一般说来,颗粒带净电荷多、直径小而接近于球形,则在电场中泳动速度快,反之则慢。泳动速度还与分子的形状、介质黏度、颗粒所带电荷有关,泳动速度与颗粒所带电荷成正比,与介质黏度及颗粒半径成反比。带电荷的大分子

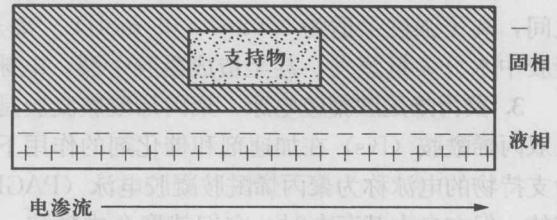


图1-1 电渗示意图

子在电解质溶液中把一些带有相反电荷的离子吸引在其周围,形成一个离子扩散层,加以电场时,颗粒向相反的电极移动,即带正电荷颗粒移向负极,带负电荷颗粒移向正极;离子扩散层由于带有过剩的与颗粒相反的电荷,可以向相反方向移动,结果颗粒与离子扩散层之间的静电引力使颗粒的泳动速度减慢。另外,大分子颗粒表面有一层水,在电场影响下,它与颗粒一起移动,可以认为是颗粒的一部分。

6. 支持介质的筛孔 支持介质的筛孔大小对被分离生物大分子的电泳迁移速度有明显的影响。在筛孔大的介质中泳动速度快,反之,则泳动速度慢。电泳的支持介质要求是具有较大惰性的材料,且不与被分离的样品或缓冲液发生化学反应。此外,还要求具有一定的坚韧度,不易断裂,容易保存。由于支持介质的结构对分离物的移动速度有很大影响,所以对介质的选择应取决于被分离物质的类型。

(三) 常见电泳分析方法

1. 醋酸纤维素薄膜电泳 以醋酸纤维素薄膜作为支持介质的区带电泳法称为醋酸纤维素薄膜电泳。醋酸纤维素是纤维素的羟基乙酰化形成的纤维素乙酸酯。由该物质制成的薄膜称为醋酸纤维素薄膜。这种薄膜电泳分离速度快,电泳时间短,样品用量少。醋酸纤维素薄膜经过冰醋酸乙醇透明液或其他透明液处理后可使薄膜透明化,有利于对电泳图谱的光吸收扫描测定和薄膜的长期保存。

2. 琼脂糖凝胶电泳 琼脂糖凝胶电泳是一种以琼脂糖凝胶为支持物的凝胶电泳,兼有“分子筛”和“电泳”的双重作用。琼脂糖系天然的琼脂加工制得,天然琼脂是一种多聚糖,主要由琼脂糖(约占80%)及琼脂胶组成。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。使用琼脂糖凝胶为支持物进行电泳时可以克服琼脂不足之处,其优点有: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(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,电泳图谱清晰,分辨率高,重复性好。③琼脂糖透明,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。

琼脂糖凝胶具有网络结构,直接参与带电颗粒的分离过程,在电泳中,物质分子通过空隙时会受到阻力,大分子物质在泳动时受到的阻力比小分子大,因此在凝胶电泳中,带电颗粒的分离不仅依赖于净电荷的性质和数量,而且还取决于分子大小,这就大大地提高了分辨能力。琼脂糖凝胶电泳时,DNA分子的电泳迁移率与其相对分子质量的常用对数成反比;

分子构型也对迁移率有影响, 如共价闭环 DNA > 直线 DNA > 开环双链 DNA。

琼脂糖凝胶通常制成板状, 常用 1% 琼脂糖作为电泳支持物。电泳缓冲液的 pH 在 6~9 之间, 离子强度最适为 0.02~0.05 mol/L。离子强度过高时, 将有大量电流通过凝胶, 使凝胶中水分大量蒸发, 甚至造成凝胶干裂, 电泳中应加以避免。

3. 聚丙烯酰胺凝胶电泳 聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺单体 (Acr) 和交联剂 N, N'-甲叉双丙烯酰胺 (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 (PAGE)。Acr 和 Bis 单独存在或混合在一起时是稳定的, 但在自由基存在时, 它们就聚合成凝胶。引发产生自由基的方法有化学法和光学法两种。聚丙烯酰胺凝胶电泳根据其有无浓缩效应, 分为连续系统和不连续系统两大类。前者电泳体系中缓冲液 pH 及凝胶浓度相同, 带电颗粒在电场作用下, 主要靠电荷效应及分子筛效应; 后者电泳体系中由于缓冲液离子成分、带电颗粒在电场作用下, 主要靠电荷及电位梯度的不连续性, 带电颗粒在电场中泳动不仅有电荷效应、分子筛效应, 还具有浓缩效应, 因此具有很高的分辨率。聚丙烯酰胺凝胶所具有的优点: ①机械强度高, 弹性好, 透明, 无电渗作用, 吸附作用极小。②化学性能稳定, 与待分离物质不起任何化学反应。③样品不易扩散, 用量少, 其灵敏度可达 10^{-6} g。④凝胶孔径可调节, 根据被分离物的相对分子质量选择合适的浓度, 通过改变单体及交联剂的浓度调节凝胶的孔径。⑤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, 因而较醋酸纤维素薄膜电泳、琼脂糖凝胶电泳等有更高的分辨率。

聚丙烯酰胺凝胶电泳可分为圆盘电泳、垂直板型电泳、梯度凝胶电泳、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳及双向电泳等技术。圆盘电泳是在垂直的玻璃管内, 利用不连续的缓冲液、pH 和凝胶孔径进行电泳而命名的。垂直板型电泳是将聚丙烯酰胺凝胶聚合成薄板状凝胶, 竖直进行电泳, 其优点是: 在同一条件下可电泳多个样品, 重复性好。在聚丙烯酰胺凝胶体系中加入十二烷基硫酸钠 (SDS), 十二烷基硫酸钠带有大量负电荷, 当其与蛋白质结合时, 所带的负电荷大大超过了天然蛋白质原有的电荷, 从而消除和遮盖了不同种类蛋白质间原有电荷的差异, 均带有相同电荷, 因而可利用相对分子质量差异将各种蛋白质分开。十二烷基硫酸钠可使蛋白质的氢键、疏水键打开, 因此它与蛋白质结合后, 还可引起蛋白质构象的改变。基于此, 蛋白质-SDS 复合物在凝胶电泳中的迁移率不再受蛋白质原有电荷和形状的影响, 而只与蛋白质的相对分子质量有关, 可用于蛋白质相对分子质量的测定。

凝胶孔径、机械强度 (弹性)、透明度等在很大程度上取决于 Acr 和 Bis 二者的总浓度 (T)。总浓度越大, 孔径越小, 机械强度则增加。凝胶的特性是分子筛效应。在聚合前调节单体的浓度来控制凝胶孔径大小, 有利于针对样品分子大小, 增加分辨力。为此可以根据分离样品分子大小配制不同孔径的凝胶。一般大孔胶易碎, 小孔胶难以取出。另外, 考虑选择适宜的缓冲液。缓冲液的作用一是用来维持容器内和凝胶外的 pH 恒定, 二是作为在电场中传导电流的电解质。要使缓冲液很好地完成这些作用, 必须注意 3 个条件: 第一, 缓冲液不与被分离的物质相互作用; 第二, 缓冲液 pH 不能使蛋白质变性, 对于被分离蛋白质的最大 pH 限度通常是 pH 4.5~9.0; 第三, 还要考虑到缓冲液的离子强度。

4. 等电聚焦电泳技术 等电聚焦 (IEF) 是利用有 pH 梯度的介质分离等电点不同的蛋白质的电泳技术。其基本原理: 在等电聚焦电泳中, 具有 pH 梯度的介质其分布是从正极到负极 pH 逐渐增大。如前所述, 蛋白质分子具有两性解离及等电点的特征, 这样在大于等电点区域的蛋白质分子带负电荷向正极移动, 直至某一 pH 位点时失去电荷而停止移动, 此处介质的 pH 恰好等于聚焦蛋白质分子的等电点 (pI)。同理, 位于小于等电点区域的蛋白质分子带正电