

普通高等教育“十一五”国家级规划教材配套教材

生物化学与分子生物学 实验教程

第 3 版

主 编 徐 岚 钱 晖



科学出版社

• 版权所有 侵权必究 •

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本实验教程内容包括总论和各论,总论介绍生物化学的基本操作技术,当前生物化学与分子生物学研究常用的电泳、层析、离心技术、印迹技术和聚合酶链式反应等实验技术的原理、种类、应用和前沿;各论共有26个实验,其中蛋白质与核酸、酶学、糖、脂和生物氧化部分的实验是比较成熟的生物化学基本实验;核酸部分的实验主要是分子生物学常用技术的实验,是近几年在研究生实验课中开设并有部分实验选用到本科生实验教学中的;最后部分有6个综合性实验,在基本技能训练的基础上,对学生进行实验设计和科研入门训练。

本书语言简练,实用性强。不仅适合医学院校5年制、7年制及8年制学生使用,也适合相关人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验教程 / 徐岚,钱晖主编. —3版. —北京:科学出版社,2014.6

普通高等教育“十一五”国家级规划教材配套教材

ISBN 978-7-03-040390-2

I. ①生… II. ①徐… ②钱… 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(2014)第070596号

责任编辑:杨鹏远 胡治国 / 责任校对:韩 杨
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>

文林印务有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2004年8月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2014年6月第 三 版 印张:11

2014年6月第十三次印刷 字数:259 000

定价:35.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

第3版前言

自2004年8月第一版出版以来,随着生物化学与分子生物学的迅速发展,新进展层出不穷,例如蛋白组系、RNA组系、糖组系等新技术已广泛应用于医学领域,而它们的基础技术,仍离不开核酸、蛋白质以及脂类的研究方法。因此,为了跟上时代发展的步伐,极有必要对本教材进行修订再版。

《生物化学与分子生物学实验教程》作为高等医药院校主干和必修课程生物化学与分子生物学的实验教材,在各兄弟院校的支持下已走过了十个多年头,为了满足学科发展的需要,也结合我们参加两次教学评估(2002年,2007年)的经验,遵科学出版社的意见,我们对教材进行了适当修订,主要是减少了各论实验和增补了综合性实验,特别对综合创新性实验部分作了修订增加,但考虑到各兄弟院校沿用习惯,对总体框架和主要内容均未作大变动。

本教材修订再版中得到科学出版社鼓励支持,参编单位苏州大学医学部生物化学与分子生物学系、江南大学生物化学教研室及江苏大学医学技术学院生物化学教研室编写教师的认真参与,在此一并致谢。希望各位同仁应用后多提宝贵意见,以待再版时改正。

编者

2014年5月

第 1 版前言

2003 年 8 月,由科学出版社出版了高等医药院校使用的《生物化学与分子生物学》教材,为使教材配套,我们现又编写出版《生物化学与分子生物学实验教程》。

生物化学与分子生物学实验技术是依靠物理、化学、生物学的原理和方法建立和发展起来的一整套亚细胞水平和分子水平的实验研究技术,它是生命科学中最富生机、最具活力、最含创造性的部分。我们在教学实践过程中体会到实验课的目的主要有:①使学生获得对于生物化学与分子生物学理论基本内容的深刻理解;②使学生熟悉生物化学与分子生物学的实验原理和得到操作技术的基本训练;③培养学生独立工作的能力;④培养学生的科学作风和科学思维方法。

本教材的第一篇是总论,在这一篇中除了介绍生物化学的基本操作技术外,还系统介绍了当前生物化学与分子生物学研究常用的电泳、层析、离心分离、印迹技术和聚合酶链式反应等实验技术的原理、种类、应用和前沿。第二篇各论共有 40 个实验,其中蛋白质与核酸、酶学、糖、脂和生物氧化部分的实验是过去常做的、比较成熟的生物化学基本实验,通过这些实验训练学生的生化基本实验操作;核酸部分的实验主要是分子生物学常用技术的实验,这些实验是近几年在研究生实验课中开设并有部分实验选用到本科生实验教学中的;最后部分有 8 个综合性实验,在基本技能训练的基础上,对学生进行实验设计和科研入门训练。

在使用本实验教程时,各院校可根据不同的专业要求、不同的教学层次和不同的实验室条件,在实验课教学中选择开设实验的内容。

本教材编写过程中得到苏州大学医学院、江苏大学医学技术学院和南通医学院领导的大力支持和具体指导,江苏省生物化学与分子生物学学会对本书的编写给予了热情关怀,在此致以诚挚的谢意。

编者

2004 年 5 月

目 录

第1篇 总 论

实验须知	(1)	第7节 亲和层析	(33)
第1章 基本操作技术	(3)	第4章 离心分离技术	(34)
第1节 玻璃器皿的清洗	(3)	第1节 离心分离技术的原理	(34)
第2节 吸量管的种类和使用	(4)	第2节 离心机的使用方法与维护	(35)
第3节 溶液的混匀、过滤及离心	(5)	第3节 离心技术的分类与选择	(36)
第4节 实验样品的制备	(6)	第4节 离心机转子的种类与应用	(38)
第5节 分光光度法	(8)	第5章 印迹技术	(40)
第2章 电泳技术	(13)	第1节 Southern 印迹杂交	(40)
第1节 电泳的基本原理	(13)	第2节 Northern 印迹杂交	(41)
第2节 影响电泳的主要因素	(13)	第3节 斑点杂交	(42)
第3节 区带电泳的分类	(14)	第4节 Western 印迹杂交	(42)
第4节 几种常见的电泳方法	(15)	第6章 聚合酶链式反应	(44)
第5节 二维电泳	(19)	第1节 PCR 技术概述	(44)
第3章 层析技术	(24)	第2节 PCR 技术的基本原理	(44)
第1节 层析技术的分类	(24)	第3节 PCR 反应条件的优化	(46)
第2节 层析中的常用术语	(24)	第4节 PCR 技术的扩展	(49)
第3节 纸层析	(27)	第5节 PCR 中应注意的问题	(52)
第4节 薄层层析	(28)	第6节 PCR 在医学中的应用	(54)
第5节 离子交换层析	(28)		
第6节 凝胶层析	(30)		

第2篇 各 论

第7章 蛋白质与氨基酸	(55)	实验5 DNS-氨基酸聚酰胺薄膜双向层析	(65)
实验1 蛋白质含量的测定	(55)	第8章 酶学	(68)
实验2 凝胶层析法分离血红蛋白和DNP-鱼精蛋白(或DNP-酪蛋白)	(59)	实验6 影响酶活性的因素	(68)
实验3 酪蛋白等电点的测定	(62)	实验7 蔗糖酶的专一性	(69)
实验4 氨基酸的薄层层析	(63)	实验8 丙氨酸转氨酶活性的测定	(72)

实验 9 乳酸脱氢酶同工酶的分离 (74)	实验 22 真核细胞基因组 DNA 的 制备与定量 (110)
实验 10 转氨基反应 (76)	实验 23 Southern 印迹杂交 (111)
实验 11 琥珀酸脱氢酶的作用及竞争 性抑制 (78)	实验 24 Northern 印迹杂交 (117)
实验 12 米氏常数的测定 (80)	实验 25 PCR 扩增技术 (120)
第 9 章 糖、脂和生物氧化 (88)	实验 26 随机扩增多态性 DNA 技术 (122)
实验 13 饥饿和饱食对肝糖原含量的 影响 (88)	第 11 章 综合性实验 (124)
实验 14 血清甘油三酯测定 (89)	实验 27 血清 γ -球蛋白分离与纯度 鉴定 (124)
实验 15 高密度脂蛋白中胆固醇含量 测定 (91)	实验 28 蛋白质的分离、提取、SDS-聚 丙烯酰胺凝胶电泳及 Western 印迹 (127)
实验 16 血清总胆固醇含量测定 (93)	实验 29 脂蛋白的分离、提纯和电泳 鉴定 (136)
实验 17 乳酸测定 (95)	实验 30 大肠杆菌感受态细胞的制备 及质粒 DNA 分子导入原核 细胞、提取、纯化鉴定 ... (140)
实验 18 血中葡萄糖含量的测定 (99)	实验 31 碱性磷酸酶的纯化及比活 性和 K_m 值的测定 (146)
第 10 章 核酸 (103)	实验 32 血清中鞘糖脂的分离与 质谱分析 (150)
实验 19 细胞核的分离和纯化 ... (103)	
实验 20 核酸含量的测定 (105)	
实验 21 酵母 RNA 的提取及组分鉴定 (108)	
参考文献 (154)	
附录一 (155)	
附录二 (169)	

(6) 实验室由值日小组(依次以实验桌为单位)轮流负责打扫,关好水电及门窗。

[安全注意事项]

- (1) 易燃易爆试剂应远离火源,低沸点有机溶剂如需加热定要用水浴。
- (2) 发烟或产生有毒气体的实验应在通风橱内进行。
- (3) 实验室若起火应根据起火性质分别采用沙子、水、四氯化碳灭火器等扑救。
- (4) 如遇酸碱灼伤皮肤应先及时用水冲洗,酸灼者再用饱和 NaHCO_3 液中和;碱灼者再用饱和 H_3BO_3 液中和;氧化剂伤害者用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 处理。

(王卉放 钱 晖)

第 1 章 基本操作技术

第 1 节 玻璃器皿的清洗

生物化学与分子生物学实验常用各种玻璃器皿,其清洁程度直接影响测量样品的可靠性和反应的准确性。因此玻璃器皿的清洁不仅是实验前后的常规工作,而且是一项重要的基本技术。玻璃器皿的清洗方法很多,需要根据实验的要求以及污物性质,选用不同的方法。洗涤的玻璃器皿要求清洁透明,玻璃表面不含可溶解的物质,水沿器壁自然下流时不挂水珠。

一、新购器皿的清洗

新购器皿表面附着油污和灰尘,特别是附着可游离的金属离子。因此,新购器皿需要用肥皂水刷洗,流水冲净后,浸于 $0.93 \text{ mol/L Na}_2\text{CO}_3$ 溶液中煮沸。用流水冲净后,再浸泡于 $0.3\sim 0.6 \text{ mol/L HCl}$ 溶液中过夜。流水洗净酸液,用蒸馏水少量多次荡洗后,干燥备用。

二、用过玻璃器皿的清洗

1. 一般非计量玻璃器皿或粗容量器皿(如试管、烧杯、量筒等) 先用肥皂水刷洗,再用自来水冲洗干净,最后用蒸馏水荡洗 2~3 次后,倒置于清洁处晾干。

2. 容量分析器皿(如吸量管、滴定管、容量瓶等) 先用自来水冲洗,晾干后浸于铬酸洗液中浸泡数小时,然后用自来水和蒸馏水冲洗干净并干燥备用。

3. 比色杯 用毕立即用自来水反复冲洗,如有污物黏附于杯壁,宜用盐酸或适当溶剂清洗。然后用自来水、蒸馏水冲洗干净。切忌用刷子、粗糙的布或滤纸等擦拭。洗净后,倒置晾干备用。

三、清洗液的种类及配制

1. 肥皂水和洗衣粉溶液 这是最常用的洗涤剂,主要是利用其乳化作用除去污垢,一般玻璃器皿均可用其刷洗。

2. 铬酸洗液 广泛用于玻璃器皿的洗涤,其清洁效力来自于它的强氧化性和强酸性。由重铬酸钾($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)和浓硫酸配制而成,硫酸越浓,铬酸越多,其清洁效力越强。洗液具有强腐蚀性,使用时必须注意安全。当洗液由棕红色变为绿色时则不宜再用。

主要有下列 3 种配制方法:

(1) 常用铬酸洗液的浓度为 3%~5%。方法是:重铬酸钾 5g 置 250ml 烧杯中,加入热水 5ml 搅拌。为使其尽量溶解,在烧杯下放一石棉网,向烧杯中缓慢加入工业用浓硫酸 100ml,随加随搅拌。硫酸不宜加入过快,注意不要溅出来。此时溶液由红黄色变为黑褐色。冷却后装瓶备用并盖严以防吸水。

(2) 取 100ml 工业用浓硫酸置烧杯中,小心加热,然后慢慢加入 5g 重铬酸钾粉,边加边搅拌,待全部溶解后冷却,贮于具塞的细口瓶中。

(3) 取 80g 重铬酸钾溶于 1000 ml 水中,慢慢加入工业用硫酸,边加边搅拌,冷却后备用。

3. 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA- Na_2) 洗液 浓度为 5%~10% 的 EDTA- Na_2 洗液加热煮沸,可去除玻璃器皿内部钙镁盐类的白色沉淀和不易溶解的重金属盐类。

4. 草酸洗液 草酸 5~10g,溶于 100ml 水中,加入少量硫酸或浓盐酸,可洗脱高锰酸钾的痕迹。

5. 尿素洗液 45% 的尿素溶液是清洗血污和蛋白质的良好溶剂。

6. 盐酸-乙醇洗液 3% 的盐酸-乙醇洗液可以除去玻璃器皿上附着的染料。

7. 乙酸-硝酸混合液 用于清洗一般方法难以洗净的有机物,最适于清洗滴定管。

8. 50g/L $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 碱性液体可用于洗涤油污,所洗器皿不可用于磷的测定。

第 2 节 吸量管的种类和使用

吸量管是生化实验最常用的仪器之一,微量移液器则是分子生物学实验必用之器材,测定的准确度与吸量管及微量移液器的正确选择和使用密切相关。

一、吸量管的种类

常用的吸量管可以分为 3 种:

1. 移液管 常量取 50.0ml、25.0ml、10.0 ml、5.0ml、2.0ml、1.0ml 的液体。这种吸量管只有 1 个刻度,放液时,量取的液体自然流出后,管尖需在盛器内壁停留 15s。注意管尖残留液体不要吹出。

2. 奥氏吸管 供准确量取 0.5 ml、1.0 ml、2.0 ml、3.0 ml 液体用。此吸量管只有 1 个刻度,当放出所量取的液体时,管尖余留的液体必须吹入盛器内。

3. 刻度吸管 供量取 10ml 以下任意体积的液体。一般刻度包括尖端部分。将所量液体全部放出后,还需要吹出残留于管尖的溶液。此类吸管为“吹出式”,吸管上端标有“吹”或“快”字。未标“吹”或“快”字的吸管,则不必吹出管尖的残留液体。

二、吸量管的使用

1. 选用原则 量取整数量体积液体并且取量要求准确时,应选用奥氏吸管;量取大体积液体时,要用移液管;量取任意体积(10ml 以下)的液体时,应选用取液量最接近的刻度吸管。如取 0.15ml 液体,应选用 0.2ml 的刻度吸管。同一定量实验中,要加同种试剂于不同试管中且取量不同时,应选择与最大取液量接近的 1 支刻度吸管。如各试管应加液体量为 0.3ml、0.5ml、0.7ml、0.9ml 时应选用 1 支 1.0ml 的刻度吸管。

2. 使用 中指和拇指拿住吸管上端,食指置吸管上端旁;用橡皮球吸液体至刻度上,眼睛看着液面上升;吸完后用食指顶住吸管顶端,用滤纸擦干其外壁;吸管保持垂直,尖端与试剂瓶接触,用食指控制液体下降至所需体积的刻度处,液体凹面、刻度和视线应在同一水平面上;吸管移入准备接受溶液的盛器中,其出口尖端接触器壁并成一角度,吸管仍保持垂直;放开食指,使液体自动流出。

三、自动移液器的使用

1. 操作 将吸嘴牢固地装在吸引杆上,装上后轻轻地旋转一下以保证气密;掀按钮到第一停止点(A),把吸嘴头尖浸入取样液内2~5mm,释放按钮,使之慢慢返回到初始位置,停留1s;把吸嘴沿取样容器壁滑动从取样液内取出,用滤纸擦去吸嘴外面的液体,注意不要接触到吸嘴头尖孔;把移液器的吸嘴头尖置于加样容器壁上,用拇指慢慢地将按钮掀到第一停止点,停留1s(黏性较高的溶液停留时间长些);然后掀到第二停止点(B),再让吸嘴沿着容器壁向上滑动,当吸嘴头尖与容器壁或溶液不接触时释放按钮,使其返回到初始位置(0),如图1-1和图1-2。

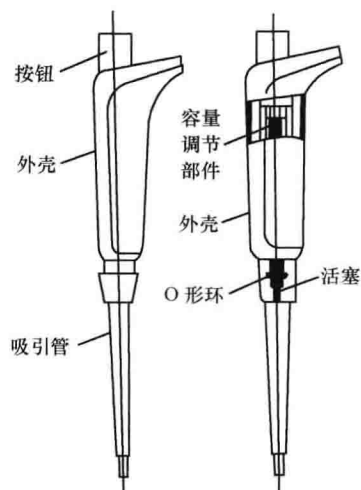


图 1-1 自动移液器的构造

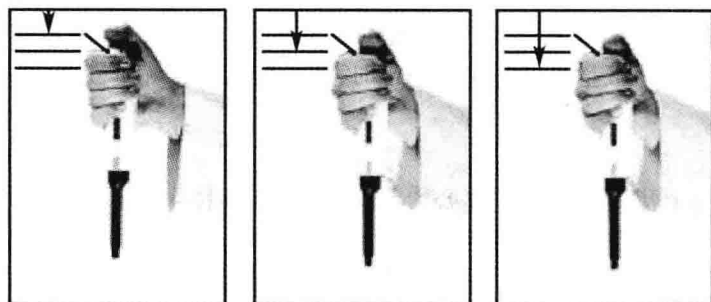


图 1-2 自动移液器的使用

2. 注意事项

(1) 当移液器吸取溶液时(尤其是血清、蛋白质和有机溶液),在吸嘴的内壁将会有一薄膜形成,如果吸嘴仅填充1次会导致比规定值大的误差。因为此薄膜在同一吸嘴连续取溶液时能保持相对的常量,则在以后重复填充该吸嘴时能获得较高的精度。所以取样之前通过该溶液预先润洗吸嘴对获得较好的精度是很重要的。

(2) 提高移液精度的要点是吸液和排液的速度尽可能一致,切忌“啪”地一下释放按钮;取样时每次浸入相同的液体深度(不得超过5mm)并保持移液器垂直向下;吸取过冷、较热的样品时,应使吸嘴温度与样品温度接近,以免样品热胀冷缩。

(3) 注意不要接触会损害吸嘴的硝酸或硫酸溶液。

(4) 移液器不能高压消毒,吸嘴可以。

第3节 溶液的混匀、过滤及离心

一、溶液的混匀

生物化学及分子生物学实验中,为使化学反应充分进行,加入试剂后的充分混匀是保证实验成功的又一关键。一般有以下几种混匀方式:

1. 腕混匀 右手持试管上端,利用手腕的旋转,使试管作圆周运动,使液体混匀。

2. **指弹混匀** 左手持试管上部,试管与地面垂直。右手手指呈切线方向快拨试管下部,使管内液体呈涡状转动。

3. **吹吸混匀** 用吸管、滴管或移液器将溶液反复吹吸数次,使溶液混匀。

4. **搅动混匀** 用细玻璃棒搅动大试管或烧杯内容物(如固体试剂)使之混匀。

5. **甩动混匀** 试管内液体较少时可采用。

6. **磁搅拌混匀** 一般用于烧杯内容物的混匀。

7. **旋涡器混匀** 所有混匀操作都应防止管内液体溅出,以免造成液体流失。严禁用手指堵住试管口混匀液体,防止污染和样品的损失。

二、过 滤

过滤用于收集滤液、沉淀或洗涤沉淀。在生化实验中如用于收集滤液,应选用干滤纸,不应将滤纸先弄湿,湿滤纸将影响滤液的稀释比例。滤纸过滤一般采用平折法(即对折后再对折),且使滤纸上缘与漏斗壁完全吻合不留缝隙。向漏斗内加液时,要用玻棒引流而且不应倒入过快,勿使液面超过滤纸上缘。较粗的过滤可用纱布或脱脂棉代替滤纸。要将沉淀与母液分开,过滤和离心都可以。当沉淀黏稠或颗粒小得可以通过滤纸时,应选用离心法。溶液量小又需定量测定时,离心分离更有优越性。

三、离 心

离心机是利用离心力,分离液体与固体颗粒或液体与液体的混合物中各组分的机械。离心机主要用于将悬浮液中的固体颗粒与液体分开,或将乳浊液中两种密度不同,又互不相溶的液体分开,它也可用于排除湿固体中的液体。离心机种类很多,按离心力来分可将离心机分为常速离心机(600~1200r/min)、高速离心机(3500~50 000r/min)、超高速离心机(>50 000r/min)。现简要叙述生物化学实验教学中常用的最大转速为4000r/min普通台式离心机的使用方法(特殊用途的离心机请参阅相关的说明书)。

1. **装液** 将待离心的液体置于适用于相应离心机的离心管中(玻璃或塑料离心管)。

2. **平衡** 两只装有待离心液体的离心管分别放入两个完整的并且配备了橡皮软垫的离心套管之中,置天平两侧配平,用滴管在较轻一侧离心管和套管之间加水,直到平衡。

3. **放置** 检查离心机,机内应无异物和无用的套管,并且运转平稳。将已配平的两管对称地放入离心机的离心孔内,做好标记,盖好上盖,开启电源。

4. **离心** 顺时针慢慢旋动转速调节钮,增加离心机转速。当离心机转速达到要求时,记录离心时间。

5. **停止** 到达离心时间后,逐渐减速并切断电源。当离心机停止转动后,取出离心管和离心套管,倒去离心套管内的平衡用水,倒置于干燥处晾干。

第 4 节 实验样品的制备

许多定量的实验采用血液为样品,其次为尿液,其他可作为生化检测的样品有脑脊液、组织液、羊水等,有时用生物组织或细胞进行化学分析。

为了获得实验的可靠结果,应注意实验样品采集、处理和制备中多方面的影响因素,样品收集前应考虑的因素主要有饮食、药物和采集时间等等。有些化学组成容易受到饮食成

分的干扰,有时还可受到近期食谱和药物的影响,对于在不同时间其含量可能有较大变化的物质(如铁及皮质醇),应规定恰当的时间采集样品。取血样时,应避免溶血,当肢体正在进行静脉输液时,不宜由同一静脉采集。收集的样品要及时送实验室,防止某些化学成分发生变化,有时需加特殊的保存剂或放置冰箱内保存。

一、血液样品

1. 全血 取清洁干燥的试管或其他容器,收集人或动物的新鲜血液,立即与适量的抗凝剂充分混合,所得到的抗凝血为全血。每毫升血液中加入抗凝剂的种类可以根据实验的需要选择,但是用量不宜过大,否则会影响实验的结果。抗凝剂宜先配成水溶液,按取血量的需要加入试管或适当容器内,横放,再烘干水分(肝素不宜超过 30°C),使抗凝剂在容器内形成薄层,利于血液与抗凝剂的均匀接触。常用剂量为草酸钾或草酸钠 $1\sim 2\text{mg}$;柠檬酸钠 5mg ;氟化钠 $5\sim 10\text{mg}$;肝素 $0.1\sim 0.2\text{mg}$ 。得到的全血如果不立即使用,应贮于 4°C 冰箱内。

2. 血浆 抗凝之全血在离心机中离心,使血细胞下沉得到的上清液即为血浆。质量上乘的血浆应为淡黄色。为避免溶血,必须采用干燥清洁的采血器具和容器,并尽可能少振摇。

3. 血清 收集不加抗凝剂的血液,室温下自然凝固,所析出的草黄色液体即为血清。制备血清时,血凝块收缩析出血清约需 3h 。为使血清尽快析出,可用离心的方法缩短分离时间且可得到较多的血清。制备血清同样要防止溶血,所用的器具应当干燥清洁。血清析出后宜轻轻分开血凝块与容器壁的粘连,及时吸出析出的血清。

4. 无蛋白血滤液 血液中含有丰富的蛋白质,它的存在会干扰测定的结果,所以通常需将其除去,制成无蛋白血滤液,再进行分析。常用的蛋白沉淀剂有钨酸、三氯乙酸、氢氧化锌等。血液加入蛋白沉淀剂后,离心或过滤所得的上清液或滤液,就是无蛋白血滤液。以钨酸为蛋白沉淀剂的无蛋白血滤液,常用于血糖、肌酐、非蛋白氮等成分的测定;用三氯乙酸沉淀蛋白质,所得的血滤液呈酸性,利于钙磷的溶解,在测定血清离子含量时多采用。

二、尿液样品

尿液中含有多种代谢产物,但昼夜之中尿液里的化学物质含量往往随着进食、饮水、运动及其他情况而变动。一般定性实验,收集1次尿液即可;若作定量测定,则需收集 24h 尿液(收集的方法是:排掉体内残余尿液并记录时间,收集至次日同一时间的全部尿液,盛入有盖的清洁容器中,量出尿液总量,并作记录,测定时可混合后取出适量)。为防止尿液变质,可适当加入防腐剂。若测定含氮物质,每升尿液加 5ml 甲苯;测定激素时,每升尿液加入 5ml 浓盐酸。如果作某种试验性测定(如维生素排出测定),宜在服药后数小时采集尿液。

收集动物的尿液时,可将动物养到代谢笼中,排出的尿液可经笼下漏斗收集。

三、组织样品

在生化实验中,经常利用离体组织来研究各种物质代谢途径及酶系的作用,或从组织中分离纯化核酸、酶以及某些有意义的代谢物质来进行研究。在生物组织中,因含有大量的催化活性物质,离体组织的采集必须在冰冻条件下进行,并且尽快完成测定,否则其所含物质的量和生物活性物质的活性都将发生变化。

一般采用断头或颈椎脱位法处死动物,放出血液,立即取得所需脏器或组织,除去脂肪

和结缔组织之后,用冰冷生理盐水洗去血液,再用滤纸吸干,称重后,按实验要求制成组织糜或组织匀浆。

1. 组织糜 迅速将组织剪碎,用捣碎机绞成糜状,或者加入少许净砂在研钵中研磨成糊状。

2. 组织匀浆 取一定量新鲜组织剪碎,加入适量匀浆制备液,用高速电动匀浆器或者玻璃匀浆器磨碎组织。因匀浆器的杵在高速运转中会产生热量,制备匀浆时,必须将匀浆器置于冰水中。常用的匀浆制备液有生理盐水、缓冲液、0.25mol/L的蔗糖液等,应根据实验的要求加以选择。

3. 组织浸出液 上述组织匀浆再经过离心,分离出的上清液就是组织浸出液。

第5节 分光光度法

分光光度法是利用物质特有的吸收光谱,对物质进行鉴定和测定其含量的技术。光是由光子所组成的,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,具有波长和频率的特征。

人肉眼可见的光线称为可见光,波长范围为400~760nm。波长小于400nm的光线叫紫外线,波长大于760nm的光线叫红外线。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。太阳及钨灯发出的白光,是各种单色光的混合光(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。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
-----	-----	-----	-----	-----	---------

一切物质都会对某些波长的光进行选择性的吸收,有色溶液之所以呈现不同的颜色,就是由于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,但能选择性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。每种物质都具有特异的吸收光谱,在一定条件下,其吸收程度与该物质浓度成正比,因此可利用各种物质不同的吸收光谱及其强度,对不同物质进行定性和定量的分析。

分光光度法依据的原理是 Lambert-Beer 定律。该定律阐明了溶液对单色光吸收的多少与溶液浓度及溶液厚度之间的关系。

一、Lambert 定律

当一束单色光垂直通过一均匀的溶液时,一部分光会被溶液吸收,因此光线的强度会减弱。设:入射光强度为 I_0 ,溶液的厚度为 L ,出射光即透过光强度为 I ,则 I/I_0 表示光线透过溶液的程度,称为透过光(T)。若溶液的浓度不变,则透过溶液的厚度愈大,光线强度的减弱愈显著:

$$\lg \frac{I_0}{I} = K_1 L \quad (1)$$

K_1 是常数, L 为溶液的厚度(光径)。

二、Beer 定律

当一束单色光通过溶液介质时,若溶液的厚度不变而浓度不同时,溶液的浓度愈大,则光吸收愈大,透过光的强度愈弱:

$$\lg \frac{I_0}{I} = K_2 C \quad (2)$$

K_2 是常数, C 为溶液的浓度。

三、Lambert-Beer 定律

将(1)式与(2)式合并,则:

$$\lg \frac{I_0}{I} = KCL \quad (3)$$

$$\text{因 } T = \frac{I_0}{I} \quad -\lg T = \frac{I_0}{I}$$

$$\text{令 } A = \lg \frac{I_0}{I} \quad \text{则 } A = -\lg T = KCL$$

T 为透光度; A 为吸光度(光密度、消光度); K 为常数(消光系数),表示物质对光线吸收的能力,受物质种类和光线波长的影响,对于相同物质和相同波长的单色光则消光系数不变。

四、Lambert-Beer 定律的应用

1. 用标准管计算待测液含量 实际测量过程中,用一已知浓度的标准液和一未知浓度的待测液同样处理显色,读取吸光度,就可以得出下列算式:

$$A_{\text{标}} = KC_{\text{标}} L, A_{\text{样}} = KC_{\text{样}} L$$

$$\text{由于是同一类物质及相同光径,故 } \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} = \frac{KC_{\text{样}} L}{KC_{\text{标}} L} = \frac{C_{\text{样}}}{C_{\text{标}}}$$

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

式中, $C_{\text{标}}$: 标准液浓度, $A_{\text{标}}$: 标准液吸光度, $C_{\text{样}}$: 待测液浓度, $A_{\text{样}}$: 待测液吸光度。

根据上式可知,对于相同物质和相同波长的单色光来说,溶液的吸光度和溶液的浓度呈正比。用已知标准液的浓度及吸光度就可按公式算出待测液的浓度。

2. 用标准曲线进行换算 先配置一系列不同浓度的标准溶液,按测定管同样方法处理显色,在最大吸收波长(λ_{max})处读取各管吸光度,以各管吸光度 A 为纵轴,各管溶液浓度为横轴,在方格坐标纸上作图得标准曲线。以后进行测定时,只要待测液以相同条件在 λ_{max} 处读取吸光度 A ,就可从标准曲线上查得该待测液的相应浓度。

标准曲线范围选择在待测浓度 0.5~2 倍之间较好,并使吸光度在 0.05~1.00 范围为宜,所作标准曲线仅供短期使用。标准曲线制作与待测液测定应在同一台仪器上进行,有时尽管型号相同,操作条件完全一样,因不是同一台仪器,其结果会有一定误差。

3. 利用摩尔消光系数 ϵ 计算待测液浓度 当溶液浓度为 1mol/L、溶液厚度为 1cm 时的吸光度值为摩尔消光系数,以 ϵ 表示,此时 ϵ 与 A 相等。

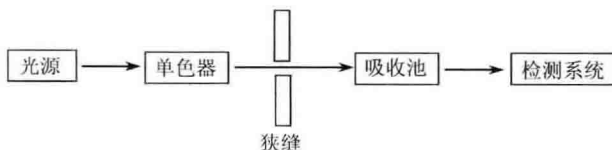
已知 ϵ 情况下,读取待测液径长为 1cm 时的吸光度 A ,根据下式可求出待测液浓度:

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

此计算式常用于紫外吸收法,如蛋白质溶液含量测定,因蛋白质在波长 280nm 下具有最大吸收峰,利用已知蛋白质在波长 280nm 时的摩尔消光系数,在读取待测蛋白质溶液的吸光度,即可算出待测蛋白质的浓度,无需显色,操作简便。

五、仪器的结构

分光光度计的种类很多,其原理和结构基本相似,一般都包括以下几个部件:



1. **光源** 有钨灯和氘灯,前者适用于 340~900nm 波长范围,后者适用于 200~360nm 的紫外光区。光源的供电常需由稳压电源供给,以保证发出的光线稳定。

2. **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原件,通过色散系统可根据需要选择一定波长范围的单色光。单色光波长范围愈狭,仪器的敏感性愈高,测定结果愈可靠。

3. **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,适应检测的需要。

4. **吸收池** 即比色杯(比色皿),一般由玻璃或石英制成。在可见光范围内测量时,选用光学玻璃吸收池;在紫外线范围内测量时必须用石英池。

5. **检测系统** 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。它们可将接收到的光能转变为电能,并应用放大装置将弱电流放大,提高灵敏度,通过电流计显示出电流的大小,在仪表上可直接读得 A 值、 T 值。

六、几种常用分光光度计的使用

(一) 721 型分光光度计

波长范围 360~800nm,在 410~710nm 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。其操作方法如下:

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

(2) 接通 220V 电源,打开样品室的盖板,使电表指针指示“0”位,预热 20min,转动波长选择按钮,选择所需波长。用灵敏度选择钮选取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),调节“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”点位钮,使电表指针准确指向 T 为 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,读记吸光度值。每次测定完毕或换盛比色液时,必须打开样品室盖板,以免光电管持续曝光。

(二) 722 型分光光度计

722 型分光光度计的特点是用液晶板直接显示透光度和吸光度,用光栅做单色器,使用方便,稳定性更高。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”,灵敏度钮置 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),开启电源开关,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,使空白液对准光路。

(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),调节透过率“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,可调节消光零旋钮,使其达到要求。再移动拉杆,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,取出比色杯,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) 关闭电源开关,拔去电源插头,取出比色杯架,检查检测室内是否有液体溅出并擦净。

(10) 检测室内放入干硅胶袋,盖上盖后套上仪器布罩。

(三) UV755B 型紫外分光光度计

(1) 开机前的检查:比色皿是否有杂物;电源开关是否在关的位置。

(2) 开机:打开样品池盖子,插上电源,打开仪器后的电源开关,仪器显示“F755B”;检查仪器后的反射镜的位置是否处于所需的灯源位置。200~300nm 范围内用氘灯 D,300~1000nm 范围内用钨灯 W。将左侧的波长调节按钮拉出,调节波长至所需之处。仪器预热 30min。

(3) 比色液的准备:将参比样品与三份待测样品分别倒入比色皿中(约为比色皿的3/4),然后将比色皿垂直放入比色皿架,夹子夹紧,盖上样品池盖子。

(4) 检测:将参比样品推入光路,按“MODE”键使仪器显示“T”或“A”;按“100% (ABS. 0)”仪器显示“T100.0”或“A0.000”;打开样品池盖子,按“0%”仪器显示“T0.0”或“AE1”;盖上盖子,按“100% (ABS. 0)”仪器显示“T100.0”或“A0.000”;将待测样品依次推入光路,显示样品的 T 值或 A 值,按“PRINT”键打印数据,更换三个样品重复步骤 4。

(5) 关机:检测完毕,取出比色皿,将干燥剂放入比色架上,关掉电源,盖上样品池盖子。

(四) 752 型紫外光栅分光光度计

(1) 接通电源预热 10min,将选择开关置于“T”档。

(2) 选择所需波长,打开样品室盖,空白液置于光路上。

- (3) 将灵敏度转盘由低到高逐步增加,每次均调节“0”旋钮,使数字显示 0。
- (4) 盖上样品室盖,调节“100”旋钮,使数字显示为透光度 100。
- (5) 将待测样品推进光路,从数字表上读出样品液的透光度。
- (6) 如果选择开关置于“A”档(空白液时,调节消光“0”钮为吸光度 0)可从数字表上读出吸光度 A 值。
- (7) 如将开关置于浓度旋钮“C”(标准液移入光路),数字表上显示相应的标准值,再将待测样品推进光路,即可读出其浓度值。

七、注意事项

- (1) 仪器须安装在稳固的工作台上,不可随意搬动。严防震动、潮湿和强光直射。
- (2) 手持比色杯的毛面(粗糙面),不可用手或滤纸等摩擦比色杯的透光面。
- (3) 比色杯先用蒸馏水冲洗后,再用比色液润洗后才能装比色液。盛装比色液时,约达比色杯 2/3 体积,不宜过多或过少。若不慎使溶液流至比色杯外,须用棉花或擦镜纸吸干,才能放入比色架。拉比色杆时要轻,以防溶液溅出,腐蚀机件。
- (4) 比色杯用后应立即用自来水冲洗干净。若不能洗净,用 5% 中性皂溶液或洗洁精稀释溶液浸泡,也可用新鲜配制的重铬酸钾洗液短时间浸泡,然后用水冲净倒置晾干。
- (5) 每套分光光度计上的比色杯和比色架不得随意更换。
- (6) 试管架或试剂瓶不得放置于仪器上,以防试剂溅出腐蚀机壳。
- (7) 若不慎将试剂溅在仪器上,应立即用棉花或纱布擦干净。
- (8) 测定溶液浓度的吸光度值在 0.1~0.7 之间最符合光吸收定律。线性好、读数误差较小。如吸光度不在 0.1~1.0 范围内,可适当稀释或加浓比色液再进行比色。
- (9) 盖上检测室盖连续工作时间不宜过长,每次读完比色架内的一组读数后,立即打开检测室盖,以防光电管疲乏。
- (10) 仪器连续使用不应超过 2h,必要时可间歇半小时再用。
- (11) 仪器用完之后,须切断电源,套上干净的布罩。
- (12) 仪器较长时间不使用,应定期通电,使用前预热。
- (13) 722 型分光光度计的左侧下角有一干燥剂筒,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。

思考题

1. 有哪几种常用清洁液? 如何配制?
2. 吸量管及微量移液器使用需注意些什么?
3. 离心机使用时应强调什么?
4. 实验样品的制备有哪些影响因素?
5. 分光光度计的原理依据的是什么定律?
6. 使用分光光度计应注意些什么?

(吴艳 徐岚)