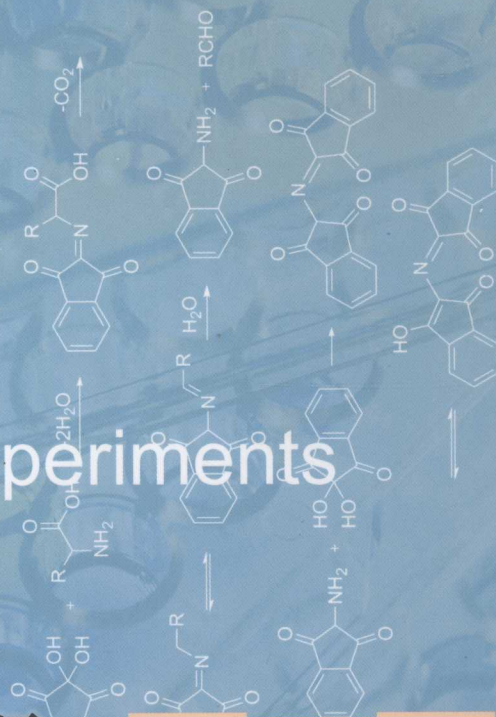


主 编 曾富华

Biochemistry Experiments

生物化学 实验技术教程



生物化学 实验技术教程

SHENGWU HUAXUE SHIYAN JISHU JIAOCHENG

主 编 曾富华

副主编 赖小玲 孙远东 丁运华
韩寒冰 韩春燕 唐建州 何丽芳

参 编 （按姓氏拼音排序）

丁运华 惠州学院
韩春燕 嘉应学院
韩寒冰 广东石油化工学院
何丽芳 衡阳师范学院
赖小玲 湛江师范学院
李仁茂 湛江师范学院
马生健 湛江师范学院
孙远东 湖南科技大学
唐建州 长沙学院
宛淑艳 湛江师范学院
曾富华 湛江师范学院



高等教育出版社·北京
HEIGHER EDUCATION PRESS · BEIJING

内容简介

《生物化学实验技术教程》是编者在多年生物化学实验教学基础上,反复摸索,以专题模块的形式编写而成。本书第一篇介绍了实验技术原理,包括离心技术、层析技术、电泳技术、光谱技术和生物大分子的分离纯化。第二篇包括糖化学实验技术、脂质化学实验技术、蛋白质化学实验技术、核酸化学实验技术、酶学及维生素实验技术、物质代谢实验技术、常见生物活性物质分离分析技术、分子生物学基础实验技术、设计性实验选题和实验论文撰写 10 个模块,共 82 项实验和 20 项选题。既有基础实验,又有综合性实验和设计性实验。附录介绍了常用试剂的配制与标定、常用酸碱指示剂以及市售酸碱试剂的介绍等。

本书内容系统、全面,有一定的深度和广度,可操作性强,重视能力培养,适用于师范院校、农林院校及综合性大学相关专业本科学生物化学实验教学,也可作为相关教学和科研人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验技术教程 / 曾富华主编. —北京: 高等教育出版社,

2011.7

ISBN 978-7-04-032698-7

I. ①生… II. ①曾… III. ①生物化学-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(2011)第 112519 号

策划编辑 吴雪梅

责任编辑 孟 丽

封面设计 张志奇

责任印制 尤 静

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
印 刷 北京泽明印刷有限责任公司
开 本 787×1092 1/16
印 张 15.75
字 数 390 000
购书热线 010-58581118

咨询电话 400-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
版 次 2011 年 7 月第 1 版
印 次 2011 年 7 月第 1 次印刷
定 价 27.20 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换

版权所有 侵权必究

物 料 号 32698-00

前 言

生物化学是一门实验性科学,是生物科学、生物技术、生物工程、食品科学与工程、应用化学,以及农、林、医等专业的重要基础课程,生物化学实验技术和方法的进展直接推动了生命科学和其他相关学科的迅猛发展。加强生物化学实验教学对培养学生观察问题、分析问题和解决问题的能力,对培养学生“求是、严谨、创新”的科学作风,对全面提高教学质量和学生的综合素质具有十分重要的意义。

为了落实教育部“高等学校教学质量与教学改革工程”、培养学生的创新思维和实践能力,我们对生物化学实验课教学进行了改革尝试,重组了实验教学内容,将实验内容整合为“基础实验”、“综合性实验”和“研究性实验”三大板块,建立了一个既突出专业特点,又能逐步提高学生基本实验技能、综合创新素养的实验教学体系。在这一思想的指导下,我们编写了这本《生物化学实验技术教程》。

该教程是编者在多年生物化学实验教学基础上,反复摸索,以专题模块的形式编写而成。内容系统、全面,有一定的深度和广度,可操作性强。教程注重实验内容的内在联系、注重反映生物化学研究热点、注重能力的培养,具有如下特点:

1. 以探讨问题为主线,将若干个相关实验内容形成独立的模块,强调了实验内容的相关性和完整性。
2. 将相同内容的不同实验方法进行归类,便于比较,有利于使用者在学习和工作中对实验方法的选择。
3. 内容均为精心选择的、有特色的、综合性较强的实验,实验结果明确,同时编写了 20 项设计性实验选题,既能满足基础训练的需要,又能满足综合训练的拓展,力争实现融基础训练和创新能力培养于一体的实验教学目标。
4. 编写了“常见生物活性物质分离分析技术”的内容,有利于学生了解常见生物活性物质及其检测方法。
5. 可以兼顾分子生物学课程的实验教学。

参加本书编写的院校有湛江师范学院、湖南科技大学、衡阳师范学院、嘉应学院、广东石油化工学院、惠州学院和长沙学院。第一篇的第 1 章由李仁茂和赖小玲执笔、第 2 章由孙远东执笔、第 3 章由唐建州执笔、第 4 章由马生健和韩寒冰执笔、第 5 章由赖小玲和丁运华执笔;第二篇第 1 模块和附录由何丽芳执笔、第 2 模块由韩寒冰执笔、第 3 模块由韩春燕和唐建州执笔、第 4 模块由宛淑艳执笔、第 5 模块由丁运华和赖小玲执笔、第 6 模块由赖小玲和曾富华执笔、第 7 模块由孙远东、赖小玲和曾富华执笔、第 8 模块由马生健执笔、第 9 模块和第 10 模块由曾富华等执笔。

全书由曾富华审查、统编和定稿。

参加编写的人员在撰稿过程中,付出了辛勤的劳动,但由于水平有限,加之生物化学技术发展较快、涉及面广等原因,教程难免存在不足和错漏,恳请专家和广大读者指正。

全书由广东医学院的黄迪南教授审校,大部分插图由徐秋园女士绘制,在此表示衷心的感谢,同时感谢高等教育出版社的大力支持。

编者

2011年2月10日

目 录

第一篇 生物化学实验技术原理

第一章 离心技术及原理	2	3.2 常用电泳技术	25
1.1 离心基本原理	2	第四章 光谱技术及原理	32
1.2 离心机的结构与分类	4	4.1 分光光度法	32
1.3 离心机的应用	5	4.2 旋光分析法	35
第二章 层析技术及原理	9	第五章 生物大分子的分离纯化	39
2.1 层析概述	9	5.1 分离纯化概述	39
2.2 常用层析技术	11	5.2 生物材料的选择和前处理	40
第三章 电泳技术及原理	22	5.3 常用生物大分子分离纯化技术	42
3.1 电泳概述	22	5.4 样品的保存	45

第二篇 生物化学模块实验

第一模块 糖化学实验技术	48	(索氏抽提法)	60
1.1 糖化学实验技术	48	实验4 血清甘油三酯含量测定	
实验1 糖的还原作用	48	(乙酰丙酮显色法)	62
实验2 糖的旋光性和变旋现象(糖含		2.2 血清胆固醇的定量测定	64
量测定)	50	实验1 磷钼铁法测定血清胆固醇	
1.2 糖的含量测定	51	含量	64
实验1 血糖浓度的测定(邻甲苯		实验2 邻苯二甲醛法测定血清	
胺法)	51	胆固醇含量	66
实验2 蒽酮比色法测定植物组织中		实验3 乙酸酐法测定血清胆固醇	
总糖含量	53	含量	67
实验3 3,5-二硝基水杨酸法测定		2.3 肝中丙二醛含量的测定	68
总糖与还原糖含量	55	第三模块 蛋白质化学实验技术	71
第二模块 脂质化学实验技术	58	3.1 蛋白质与氨基酸的性质实验	71
2.1 脂肪提取及含量和性质测定	58	实验1 蛋白质的颜色反应	71
实验1 脂肪酸价的测定	58	实验2 蛋白质的沉淀作用	74
实验2 油脂皂化值的测定	59	实验3 蛋白质的盐析和透析	75
实验3 粗脂肪提取与含量的测定		3.2 牛乳中酪蛋白的制备	77

3.3 蛋白质和氨基酸的层析分离	77	实验2 紫外分光光度法测定	
实验1 氨基酸纸层析	77	核酸含量	112
实验2 氨基酸的薄层层析	79	4.3 核酸的提取及分析	114
实验3 离子交换层析分离蛋白质	80	实验1 动物肝 DNA 的提取及含量测定	
实验4 凝胶过滤层析测定蛋白质的		(二苯胺法)	114
相对分子质量	81	实验2 酵母 RNA 的提取及组成成分	
3.4 蛋白质和氨基酸含量测定	83	鉴定	117
实验1 植物组织中赖氨酸含量的		实验3 动物肝组织中核酸的制备与	
测定	83	测定	118
实验2 考马斯亮蓝(G-250)比色法		第五模块 酶学及维生素实验技术	122
测定蛋白质含量	84	5.1 酶的性质实验	122
实验3 Folin-酚法测定蛋白质含量	86	实验1 温度与 pH 对唾液淀粉酶	
实验4 紫外分光光度法测定蛋白质		活性的影响	122
含量	87	实验2 酶的专一性	124
实验5 微量凯氏定氮法测定蛋白质		实验3 唾液淀粉酶的激活与抑制	
含量	88	作用	125
3.5 蛋白质电泳分析	91	5.2 酶促反应动力学实验	127
实验1 乙酸纤维薄膜电泳分离		实验1 影响酶活力的因素	
血清蛋白	91	——正交实验法	128
实验2 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分离		实验2 胰蛋白酶米氏常数的测定	131
血清蛋白质	93	实验3 过氧化氢酶米氏常数测定	132
实验3 SDS-PAGE 测定		5.3 酶活力的测定	134
蛋白质的相对分子质量	95	实验1 淀粉酶的活力测定	134
实验4 等电聚焦电泳法测定蛋白质的		实验2 酸性磷酸酯酶活力测定	137
等电点	98	实验3 胆碱酯酶活力测定	140
实验5 SDS-PAGE 检测植物中热激蛋白		实验4 肝丙氨酸氨基转移酶(ALT)	
(银染法)	100	活性测定	141
第四模块 核酸化学实验技术	104	实验5 血清氨基转移酶活性的测定	
4.1 核苷酸的分析测定	104	——赖氏比色法	143
实验1 纸电泳法测定腺苷三磷酸		实验6 超氧化物歧化酶(SOD)	
(ATP)含量	104	活力测定	146
实验2 薄层层析法分离核苷酸	106	实验7 溶菌酶的分离纯化和	
实验3 离子交换柱层析分离单核		活力测定	149
苷酸	107	5.4 同工酶分析	150
实验4 5'-核苷酸含量测定		实验1 琼脂糖凝胶电泳法分离	
(过碘酸氧化法)	108	LDH 同工酶及血清 LDH	
4.2 核酸含量的测定	110	总活力的测定	151
实验1 定磷法测定核酸含量	110	实验2 植物过氧化物酶同工酶测定	

(凝胶圆盘电泳)	154	实验 4 煮沸法提取质粒 DNA	189
5.5 维生素的定量测定	156	实验 5 低熔点琼脂糖法回收 DNA	191
实验 1 维生素 B ₁ 的定量测定		实验 6 透析袋法回收 DNA	192
(荧光光度法)	156	8.2 RNA 的提取及其鉴定	193
实验 2 维生素 B ₂ 的定量测定		实验 1 植物总 RNA 提取(Trizol 法)及其	
(荧光光度法)	158	电泳鉴定	193
实验 3 2,6-二氯酚靛酚法测定		实验 2 哺乳动物 mRNA 的制备和	
维生素 C 含量	159	纯化	195
实验 4 磷钼蓝法测定维生素 C		实验 3 RNA 分子杂交(Northern	
含量	161	blotting)	196
第六模块 物质代谢实验技术	164	8.3 基因扩增及扩增产物的检测	198
6.1 糖代谢实验	164	实验 1 PCR 扩增基因及	
实验 1 肌糖原酵解作用	164	扩增产物的电泳检测	198
实验 2 胰岛素、肾上腺素对血糖		实验 2 水稻 <i>Actin</i> 基因的 RT-PCR 及	
浓度的影响	166	电泳检测	203
实验 3 发酵过程无机磷的利用	168	8.4 DNA 重组、转化及原核表达	205
6.2 脂质代谢实验	169	实验 1 大肠杆菌感受态细胞的制备及	
实验 1 油料种子脂肪转化为糖的		质粒 DNA 的转化	205
定性实验	169	实验 2 禽流感病毒 <i>HAI</i> 基因原核表达	
实验 2 脂肪酸 β -氧化的测定	170	载体的构建及在大肠杆菌中的	
第七模块 常见生物活性物质		诱导表达	206
分离分析技术	172	第九模块 设计性实验选题	210
实验 1 花色素的分离、纯化与测定	172	选题 1 不同环境条件对水果维生素 C	
实验 2 熊果酸的制备和测定	174	含量的影响	210
实验 3 儿茶素的提取和测定	175	选题 2 绿色植物色素的分离与鉴定	211
实验 4 血红素的提取和测定	177	选题 3 卵磷脂的提取和鉴定	212
实验 5 番茄红素的提取和测定	179	选题 4 壳聚糖的制备及性质鉴定	212
实验 6 大豆皂苷的提取和测定	180	选题 5 食用真菌多糖的制备、纯化及	
实验 7 阿魏酸的提取和测定	181	性质鉴定	213
第八模块 分子生物学基础		选题 6 细胞膜的制备及其成分(磷脂、	
实验技术	184	胆固醇)分析	214
8.1 植物基因组 DNA 和质粒 DNA 的		选题 7 植物凝集素的提取及生物学	
提取及回收	184	活性研究	215
实验 1 SDS(十二烷基硫酸钠)法提取		选题 8 花生油是否掺杂棉子油的初步	
植物基因组 DNA	184	鉴定	216
实验 2 CTAB(十六烷基三乙基溴化铵)法		选题 9 螺旋藻藻蓝蛋白的分离、纯化与	
提取植物总 DNA	185	鉴定	216
实验 3 碱裂解法提取质粒 DNA	187	选题 10 奶粉中真实蛋白质含量测定	

方法研究	217	活力测定	222
选题 11 血清白蛋白的分离、纯化与 鉴定	217	选题 18 牛心线粒体分离、组分分离和 酶学分析	222
选题 12 植物 α -淀粉酶抑制剂的 分离及活性研究	218	选题 19 水稻某一基因的简单 克隆分析	223
选题 13 血液乙酰胆碱酯酶的分离 纯化及活力测定	219	选题 20 猪胰岛素基因的原核表达 载体的构建	223
选题 14 离子交换层析法纯化碱性 磷酸酶	219	第十模块 实验论文撰写	225
选题 15 猪胰糜蛋白酶的制备和 纯度鉴定	220	附录	
选题 16 多酚氧化酶(PPO)的制备和 活力测定	221	1 常用缓冲液的配制	227
选题 17 溶菌酶的制备及其酶		2 常用标准溶液的配制与标定	233
		3 常用酸碱指示剂	237
		4 市售酸碱试剂的浓度与比重	237
主要参考文献	239		
参考网页地址	241		

第一篇

生物化学实验技术原理

第一章

离心技术及原理

离心机存在于每个生物化学实验室。离心机有很多用途,但是它们主要用于生物样品的制备以及纯化后大分子或者细胞器的流体动力学特性(形状、体积和密度等)的分析测定,通过高速旋转使生物样品置于强大的离心力场下来完成。在一定速率下的高速离心可引起颗粒、细胞器或者生物大分子的沉淀,而离心速率取决于样品的质量、体积和密度。

本章介绍离心的基本原理,讨论离心分离技术的应用。

1.1 离心基本原理

一个颗粒不论是否下沉,当它们以较高速度旋转时,生物大分子或细胞器都受到离心力的作用。离心力可以用如下公式表示:

$$F = m\omega^2 r \quad \text{方程 1-1}$$

式中, F 为离心力强度; m 为沉淀颗粒的有效质量; ω 为每秒旋转的角速度; r 为离心轴与迁移颗粒间的距离。

沉淀颗粒的离心力随着旋转速度和颗粒与离心轴距离的增加而增加, F 的测定常用相对离心力 RCF 表示,相对于地球的重力加速度 g 。

$$RCF = 1.119 \times 10^{-5} \times n^2 r \quad \text{方程 1-2}$$

RCF 随转速 n 以及沉淀颗粒和转轴间距离 r 的变化而变化,通过使用图 1-1-1 的列线图很容易得出 RCF 。 RCF 值表示为数字乘以重力加速度 g 。如果一个样品的平均离心半径是 7 cm,离心速度是 20 000 r/min,从方程 1-2 可得出 RCF 是 $32\,000 \times g$ 。该方程阐明了离心的基本原理,但是还应该考虑其他影响颗粒沉淀的因素。沉淀颗粒迁移的速率取决于质量、形状、颗粒的密度和介质的密度,颗粒受到的离心力由方程 1-1 决定。 m 是颗粒的有效质量,即实际质量 m_0 ,减去排水质量的校正因子(浮力因子)(见方程 1-3):

$$m = m_0 - m_0 \bar{v} \rho \quad \text{方程 1-3}$$

式中, m 为沉淀颗粒的有效质量; m_0 为颗粒的实际质量; $\bar{v}$ 为当颗粒置于过量溶剂时体积变化的偏比容; ρ 为溶剂或介质的密度。

方程 1-1 和方程 1-3 可以合并描述颗粒的离心力。

$$F = m_0 (1 - \bar{v} \rho) \omega^2 r \quad \text{方程 1-4}$$

当颗粒在离心力场的影响下沉降,颗粒的运动会遇到阻力 - 摩擦力,摩擦力由方程 1-5 计算。

$$F_f = f v \quad \text{方程 1-5}$$

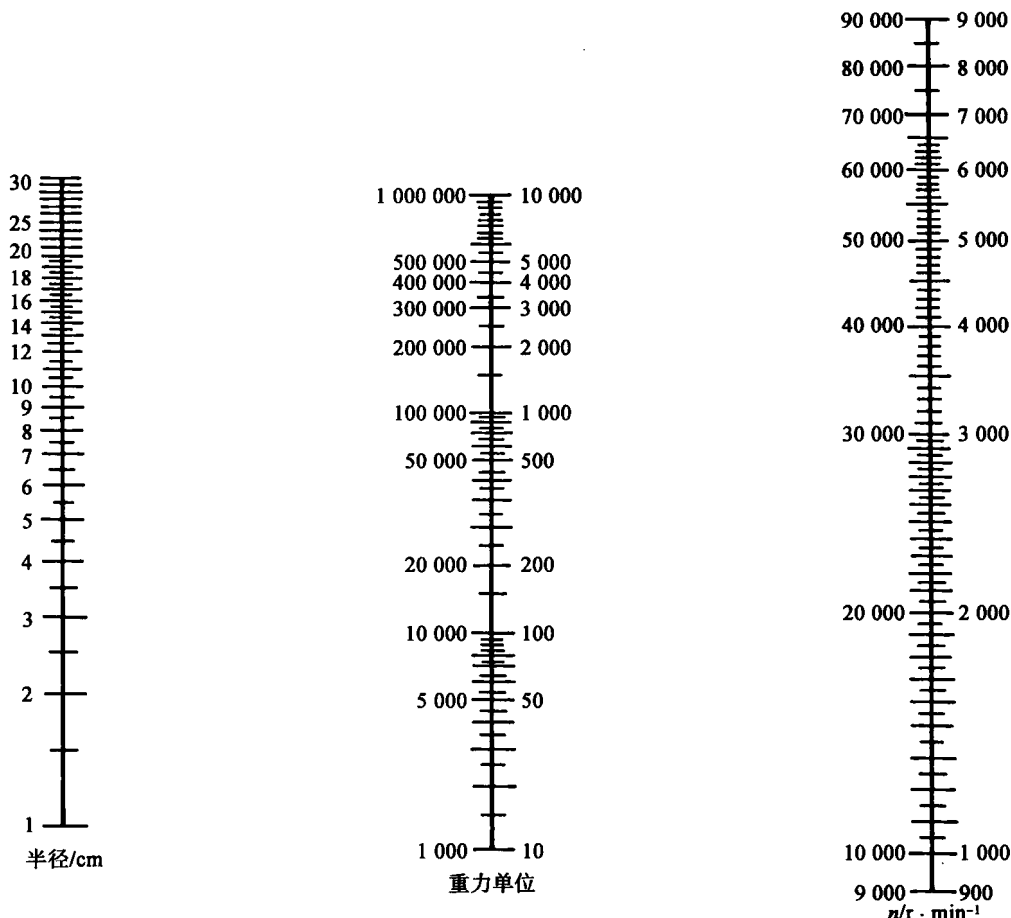


图 1-1-1 估计 RCF 的列线图

用直尺将左柱的已知离心半径值和右柱的离心转速值连接起来,得到的与中间柱的交叉值即为 RCF

式中, F_f 为摩擦力; f 为摩擦系数; v 为沉降速度。

摩擦系数 f 取决于颗粒的大小和形状,以及溶剂的黏性。摩擦力随着颗粒的速度增加直到达到一个恒定速度。这时两种力量平衡(方程 1-6):

$$m_0(1 - \bar{v}\rho)\omega^2 r = f\bar{v} = f\left(\frac{dr}{dt}\right) \quad \text{方程 1-6}$$

沉淀速度有时也称为沉降速度 v , 可由方程 1-7 表示:

$$v = \frac{dr}{dt} = \frac{m_0(1 - \bar{v}\rho)\omega^2 r}{f} \quad \text{方程 1-7}$$

该方程烦琐,有时难以用 ρ , $\bar{v}$ 和 f 计算沉降速度,因为这些因素难以测定。这时引入一个新名词,沉降系数 s (沉降速度与离心力的比值),用方程 1-8 表示:

$$s = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m_0(1 - \bar{v}\rho)}{f} \quad \text{方程 1-8}$$

式中, s 通常被定义为在标准条件下,温度为 20 °C 和水做介质时的 S 标明为 $S_{20.w}$ 。 s 值是一个物理参数,用于对生物大分子和细胞器分类,通常沉降系数 S 在 1×10^{-13} 到 1000×10^{-13} s(秒)范

围之内。为了数学上的方便,沉降系数可用单位 Svedberg(斯维得贝格)表示,1 S = 1×10^{-13} s。人血红蛋白的 s 值是 4.5×10^{-13} s 即 4.5 S。生物分子,细胞器和细胞的 s 值见图 1-1-2。值得注意的是图中 s 值和相对分子质量或颗粒体积有着正相关的关系。然而,情况不总是这样,如非球形颗粒的分子就是例外。

很多离心实验的目的就是测定 s 。 s 值可以用来计算一个分子或细胞器的体积、相对分子质量、及千碱基对 kb 等。 s 的单位与方程 1-8 的单位不一致,线性分析表明当 v 为 cm/s, ω 为弧度/s, r 为 cm, m_0 为 g, $\bar{v}$ 为 cm/g, ρ 为 g/cm³ 时, s 的单位为秒。

1.2 离心机的结构与分类

离心机的 2 个基本组件是带有驱动轴的电机和转头,转头用于容纳离心管或其他样品容器。市场有很多种离心机可选,范围从用于常规大颗粒沉淀离心的低速离心机到离心过程中进行分析测定的复杂离心机。常见的离心机有 3 种类型:低速或临床离心机、高速离心机和超速离心机。每种类型离心机的主要特点和用途见表 1-1-1。

1.2.1 低速离心机

大部分实验室都有低速离心机,它用于常规的较大颗粒的沉淀。常见的低速离心机最大转速是 4 000 ~ 5 000 r/min, RCF 可达 $3\,000 \times g$ 。这种离心机通常在室温下操作,不需要对样品温度进行控制,配有可以容纳 12 ~ 50 mL 样品的离心管或离心瓶。

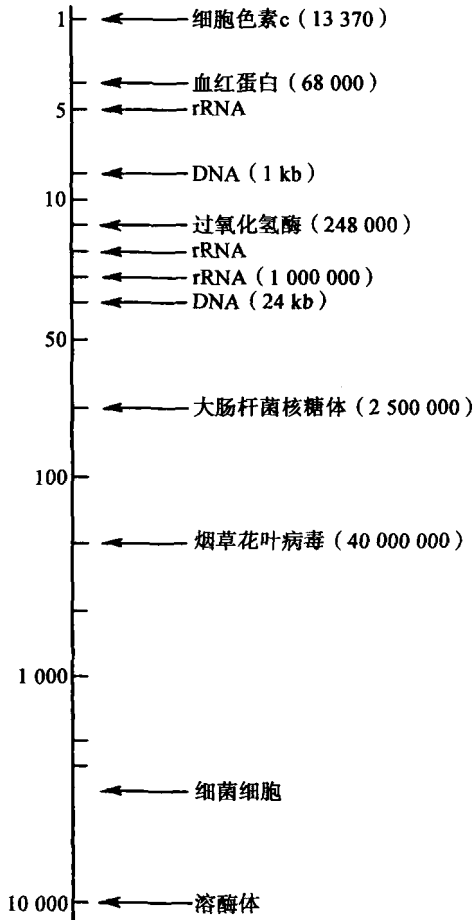


图 1-1-2 生物分子、细胞器和细胞的 s 值范围 (kb 为千碱基对,括号内的数字表示相对分子质量或 kb)

表 1-1-1 离心机类型和用途

特 性	离心机类型		
	低速	高速	超速
转速/r · min ⁻¹	1 ~ 6 000	1 000 ~ 25 000	80 000 ~ 200 000
最大相对离心力/×g	6 000	50 000	600 000
制冷	某些型号有	有	有
使用范围			
沉淀细胞	是	是	是
沉淀细胞核	是	是	是
沉淀细胞器	不	是	是
沉淀核糖体	不	不	是
沉淀生物大分子	不	不	是

低速离心机适用于红细胞或粗沉淀物的快速沉降,样品离心至颗粒在离心管底部紧密堆积成沉淀物,管的上部是液体,即上清液,随后可倒出。

1.2.2 高速离心机

对于更复杂的生物化学操作,转头内腔的速度和温度控制显得尤为重要。大部分转头的腔体温度维持在 4°C 左右,角转头、吊篮转头、垂直转头(图1-1-3)都适合高速离心。角转头适合差速离心;吊篮转头离心时,样品管移动到与离心轴垂直的位置,该转头经常用于密度梯度离心;垂直转头离心时,样品管保持垂直,该转头经常用于梯度离心。角转头可以容纳18个1.5 mL或0.5 mL的离心管,最大转速在 $12\,000\sim 15\,000\text{ r/min}$ 之间, RCF 可以达到 $11\,000\sim 12\,000\times g$ 。有些离心机可以在6 s内达到最高速度,18 s内速度减为零。大部分离心机具有可变的的速度控制以及快速离心按钮。

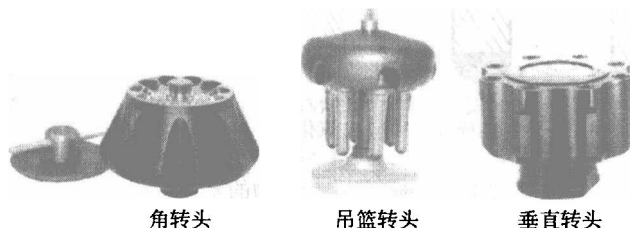


图1-1-3 离心机转头

生物样品的制备经常需要使用高速离心机,比如:① 细胞匀浆后的细胞碎片;② 蛋白质的硫酸铵沉淀;③ 微生物;④ 细胞器如叶绿体、线粒体和细胞核等。

1.2.3 超速离心机

最复杂的离心机就是超速离心机。由于离心要达到很高的速度,会在转头内产生大量的热。因此,离心室必须制冷,并且处于真空状态,减少摩擦。离心管内的样品置于转头内,然后由电机驱动。金属转头在较高离心力下裂成碎片的情况也时有发生。所有超速离心机的转头腔表面都有保护性的钢盘。有两种超速离心机可选:① 制备型,主要用于样品的分离和纯化;② 分析型,样品沉淀过程中进行物理测定。超速离心机的转速可达 $60\,000\text{ r/min}$, RCF 可达 $60\,000\times g$ 。

1.3 离心机的应用

1.3.1 制备技术

在生物化学实验室,离心机经常用于样品制备。这种技术较为简单,将样品放到离心管或者相似的容器中,再将离心管放入转头,以固定时间离心样品即可。取出样品,样品分为两相,倒出上清液(在离心管中较为明显),即和沉淀物分离。进一步的特性分析通常对某一个相进行,这种技术称为速率沉降离心,分离颗粒范围可以从粗分离到细胞器分离。较大的颗粒在低速离心机内进行,而较轻的细胞器如核糖体需要借助超速离心机的较大离心力进行分离。现在很多细胞结构和功能的知识都依赖于离心分离亚细胞组分。特定的离心方法称为差速离心,它通过不断增加转头速度连续离心进行。图1-1-4说明了某种细胞匀浆物的差速离心过程,从而达到

分离常见细胞器的目的。在离心机的使用过程中,转头腔内必须保持低温,以维持细胞器及其生物大分子的天然构象和功能。配有角转头的高速离心机最适合于 $600 \times g$ 和 $20\,000 \times g$ 的前两次分离。每次离心后,将上清液倒入另外一个离心管,随后以更高速度离心。最后在超速离心机内以 $100\,000 \times g$ 离心以沉淀微粒体和核糖体。以 $100\,000 \times g$ 离心后的上清液——细胞质,是细胞的可溶部分,由可溶性蛋白和小分子物质组成。

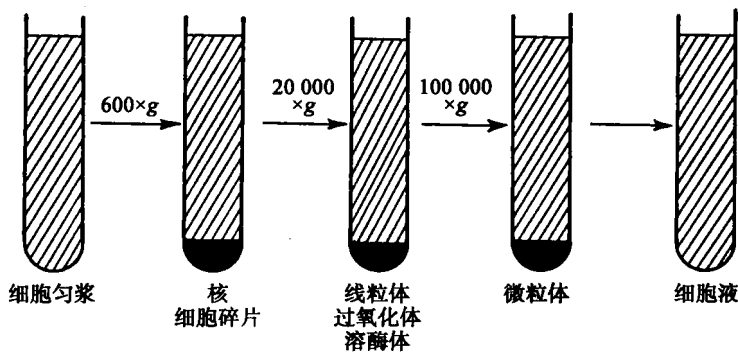


图 1-1-4 细胞匀浆物的差速离心

1.3.2 分析测定

生物样品的很多分析测定都可以在离心时和离心后进行。最常见的分析是测定生物样品的相对分子质量、密度和纯度。所有的分析技术都需要使用超速离心机,可以分为差速离心(differential centrifugation)和密度梯度离心(density gradient centrifugation)。

1. 差速离心 差速离心方法使颗粒在均一的介质中沉淀。尽管该技术类似于前面讨论过的制备差速离心,但是该方法的目的是测定颗粒的沉降系数,其原理在图 1-1-5 中描述。在离心中,溶剂和沉淀颗粒间产生了移动边界,分析型离心能够检测和测定边界的移动速率。因此,沉降速度 v 可测出。通过方程 1-8,沉降系数 S 可以计算出来。沉淀颗粒的 S 值在斯维得贝格方程中与颗粒的相对分子质量有关。斯维得贝格方程中的摩擦力 f 可以用方程 1-9 表示。

$$f = \frac{RT}{ND} \tag{方程 1-9}$$

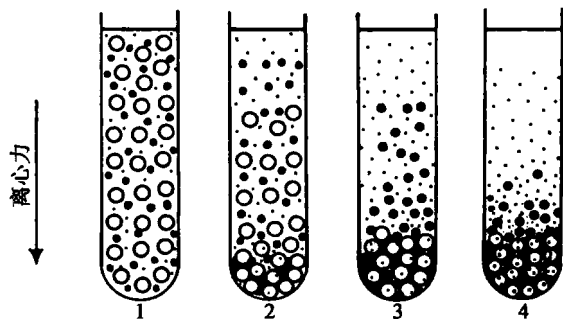


图 1-1-5 差速离心原理示意图

1. 离心前样品;2. 选用较小 RCF 得到较大沉降系数样品沉淀物;
3. 选用较大 RCF 得到较小沉降系数样品沉淀物;4. 选用最大 RCF 得到最小沉降系数样品沉淀物

式中, R 为摩尔气体常数 ($8.314 \text{ J/k} \cdot \text{mol}$); T 为热力学温度 (绝对温度); D 为扩散系数 (cm^2/s), N 为阿伏伽德罗常数。因此, 方程 1-8 可以转换成方程 1-10。

$$s = \frac{m_0(1 - \bar{v}\rho)}{RT/ND} \quad \text{方程 1-10}$$

$$RTs = m_0ND(1 - \bar{v}\rho)$$

由于相对分子质量 M_r 等于 m_0N , 方程 1-1 转换成方程 1-11, 斯维得贝格方程 1-11。

$$M_r = \frac{RTs}{D(1 - \bar{v}\rho)} \quad \text{方程 1-11}$$

该方程提供了相对分子质量的精确计算, 可应用于生物大分子如蛋白质和核酸的相对分子质量计算。然而, 它的用途受到限制, 因为扩散系数难于测定, 并且有关扩散系数的文献也难以查到。

有时可以用另外一种方法测定生物大分子的相对分子质量, 即沉降平衡。在前面的例子中, 样品以足够高的速度离心沉降颗粒, 这时可以使用斯维得贝格方程。当样品以较低速度离心时, 颗粒沉降达到一个平衡点, 在这个平衡点离心力等于和离心方向相反的摩擦力。这时用方程 1-12 计算相对分子质量。

$$M_r = \frac{RT}{(1 - \bar{v}\rho)\omega^2} \left(\frac{1}{rc} \right) \left(\frac{dc}{dr} \right) \quad \text{方程 1-12}$$

$$\frac{dc}{dr} = \text{颗粒浓度随离心中心距离的变化值}$$

M_r 、 R 、 T 、 $\bar{v}$ 、 ρ 、 ω 和 r 的定义见前述。

该技术耗时, 因为离心系统需要 1~2 天才能达到平衡。方程 1-12 的使用也较为烦琐, 因为在超速离心机中测定浓度较难。差速离心也许可以用到生物大分子纯度方面的分析。如果在离心室内可以观察到明显的移动界面, 那就说明样品只有一个组分, 且样品是纯的。对于不纯的样品, 每个组分可形成一个单独的移动界面。

2. 密度梯度离心 在差速离心中, 样品在离心前不均一分布在离心池中, 样品的起始浓度在整个离心池中是一样的。尽管可以用这一技术进行分析测定, 但是当用到不纯样品或多个样品组分时就有缺点。大颗粒穿过离心介质 (由溶剂组成) 和较小的颗粒, 沉淀较快。因此, 用这种方法生物大分子很少能达到有效分离。该缺点可以通过将样品置于液体介质中, 且介质密度从上到下逐步增加的方法避免, 这种技术称为密度梯度离心。它可以进行生物大分子的多组分混合物分析和测定沉降系数。该技术包括区带离心和等密度区带离心, 区带离心是将样品放于预先形成的梯度中离心, 后者则是在离心过程中自动形成梯度。

(1) 区带离心 图 1-1-6 概括了生物大分子混合物区带离心的步骤。在离心前先在离心管内制备密度梯度, 该密度梯度使用自动梯度混合器完成。低分子量的溶质如蔗糖和甘油溶液加入到离心池内, 样品加到梯度的上层, 放到吊篮式转头内, 然后离心。超速离心的沉降导致样品颗粒以一定的速率移动, 其速率取决于样品颗粒各自的 s 值。如图 1-6 表示, 不同类型的颗粒以区带形式沉降, 并和其他的组分处于分离的状态, 在颗粒到达梯度底部时离心结束。离心管内的不同区带通过管底收集达到分离效果, 然后分析存在的生物大分子。分离后的大分子区带在梯度中比较稳定, 这是因为颗粒扩散和对流慢。梯度随着加入不同浓度的蔗糖而发生变化, 蔗

糖最高可以使用 60% 的浓度,密度可以达到 1.28 g/cm^3 。区带离心技术可以运用到生物大分子的分离(制备性超速离心)和测定 s (分析性超速离心)。

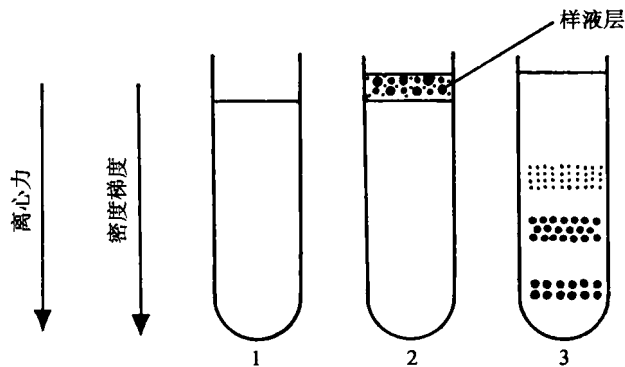


图 1-1-6 区带离心示意图

1. 装有密度梯度溶液的离心管;2. 样液加在密度梯度溶液的顶部;3. 在离心力作用下样品位于不同密度介质的部位

(2) 等密度离心 在等密度离心技术中,密度梯度在离心过程中形成,图 1-1-7 说明了等密度离心的操作。样品溶解在较浓的盐溶液中,如氯化铯或硫酸铯。铯盐可以用来建立梯度,梯度可达 1.8 g/cm^3 。生物样品溶液和铯盐均匀分布在离心管中,然后放到超速离心机中离心。在离心力作用下,铯盐再次分配形成从上到下连续增加的密度梯度。离心管中生物样品的大分子移动到某一个区域,这个区域的密度等于它们各自的密度,即大分子移动的力(离心和摩擦力)的总和是零的区域,大分子沉降或者漂浮在这个等密度的区域。单个组分的稳定区带在梯度内形成(图 1-1-7)。这些区带用前面叙述的办法分离,铯盐梯度特别适合于核酸的分离。

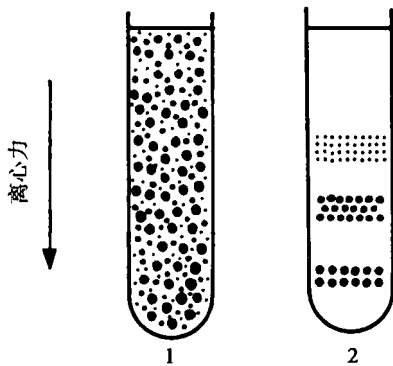


图 1-1-7 等密度区带离心示意图

1. 样品和梯度滤液的均匀混合液;2. 在离心力作用下,梯度重新分配,样品区带处于各自的等密度位置

密度梯度广泛运用于生物样品的分离和纯化。该方法除用于样品制备外,也可用于测定 s 。梯度技术已经用于分离和纯化亚细胞组分,如微粒体、核糖体、溶酶体、线粒体、过氧化物酶体、叶绿体等。分离后,可用于研究蛋白质、核酸和酶的生物化学性质。利用密度梯度技术已经对核酸进行了广泛的研究。根据 s 值可对 DNA 和 RNA 进行分类。DNA 的不同结构也可以用密度梯度离心测定,质粒 DNA 可以通过氯化铯梯度离心纯化。梯度中的 DNA 用溴化乙锭检测。