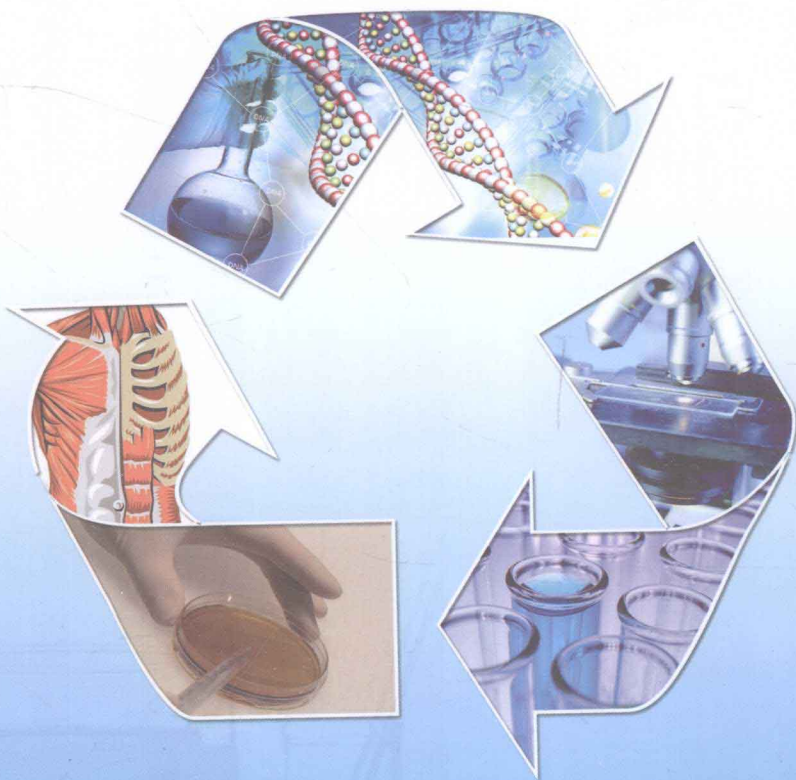


全国高等院校医学实验教学规划教材

医学细胞生物学与遗传学实验

主编 郑立红



科学出版社

中国医药生物技术协会医药生物技术专业委员会

医学细胞生物学与遗传学实验

主编 廖志群



中国医药生物技术协会医药生物技术专业委员会

全国高等院校医学实验教学规划教材

医学细胞生物学与遗传学实验

主 编 郑立红
副 主 编 陈 萍 刘 丹
编 委 (按姓氏笔画排序)
王 玉 吕艳欣 朱金玲
刘 丹 李鹏辉 张淑玲
陈 萍 岳丽玲 郑立红
徐 晋 梅庆步

科学出版社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

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

内 容 简 介

实验教学是医学教育的重要内容,是培养学生实践能力和创新精神的重要环节。掌握医学细胞生物学与医学遗传学这两门学科的实验方法与技术对于从事基础医学和临床医学工作是十分必要的。本教材是为《医学细胞生物学》和《医学遗传学》理论课配套的实验教材。内容包括:基本实验操作及常用仪器使用、经典验证性实验、综合实验与创新实验四个部分。

本书可供高等医药院校本、专科和中等卫生学校各专业学生使用,也可供广大的医务工作者学习参考。

图书在版编目(CIP)数据

医学细胞生物学与遗传学实验 / 郑立红主编. —北京:科学出版社,2011
(全国高等院校医学实验教学规划教材)

ISBN 978-7-03-028935-3

I. 医… II. 郑… III. ①人体细胞学:细胞生物学-实验-医学院校-教材 ②医学遗传学-实验-医学院校-教材 IV. ①R329.2-33 ②R394-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 175509 号

责任编辑:胡治国 周万灏 李国红 / 责任校对:朱光兰

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄 超

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>

骏杰印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011 年 1 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2011 年 1 月第一次印刷 印张.10 3/4

印数:1—4 000 字数.285 000

定价:19.80 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《全国高等院校医学实验教学规划教材》 编委会

主 编 李 涛 张淑丽
副主编 刘伯阳 刘 婷 朱坤杰 郑立红 高 音 常东胜
潘洪明
编 者 (按姓氏笔画为序)
于英君 万永刚 马 勇 王 玉 王玉春 王玉阁
王立平 王贤雅 王晓东 王海君 王 斌 仇 惠
邓凤春 邓志会 卢长柱 田 华 冯 丽 吕丽艳
吕艳新 朱坤杰 朱金玲 刘 丹 刘文庆 刘伯阳
刘 富 刘 婷 刘楠楠 许 凤 纪 亮 孙石柱
孙东升 孙 革 孙 贺 孙翠云 杨旭芳 李公启
李志勇 李建蓉 李 涛 李鹏辉 肖 宇 吴艳敏
何 军 邹朝霞 沈 雷 宋 娟 张立平 张春庆
张 威 张淑丽 张淑玲 张 鹏 陈志伟 陈 萍
林 宇 林 岩 岳丽玲 金 莉 金海峰 周 波
郑立红 官 杰 赵丽晶 赵 堃 侯魁元 逢丽红
姚立杰 姚淑娟 柴 英 钱丽丽 徐 晋 高 音
高恒宇 高 涵 郭琳娜 梅庆步 常东胜 廉 洁
潘洪明 薛茂强 薛俭雷

总 序

随着生命科学及其实验技术的飞速发展,我国高等医学教育对医学实验教学提出了更高的要求,大量先进医学实验进入实验教学课程体系将成为必然趋势,要全面推进现代医学实验教学的发展,必须加大对实验项目、实验条件、实验教学体系的改革力度,这对培养适应 21 世纪医药卫生事业发展的高素质医学人才具有重要意义。建立以能力培养为主线,分层次、多模块、相互衔接的实验教学体系,与理论教学既联系又相对独立,实现基础与前沿、经典与现代的有机结合是我们编写本系列教材的初衷。依照此要求编写的医学基础课实验系列教材,其基本理念是面向学生未来,立足创新能力教育,体现科学本质,突出科学探索,反映当代科学成果。设计思路突出“整合”和“探究”两大特点。力图从实际应用性出发构建具有自身特点的实验教学内容,进而通过实验结果的分析与思辨,期望在医学基础课实验教学体系和方法上有所继承与突破。

本系列实验教材由长期工作在教学和科研一线的教师编写而成,他们来自齐齐哈尔医学院、大连医科大学、天津医科大学、哈尔滨医科大学、牡丹江医学院、绍兴文理学院医学院、厦门大学医学院、陕西中医学院、中央民族大学、吉林医药学院、佳木斯大学、黑龙江中医药大学、华中科技大学同济医学院、北华大学等,力求做到体系创新、理念创新及编写精美。

本系列实验教材将实验内容分为基本实验操作及常用仪器使用、经典验证性实验、综合性实验和创新性实验,并将实验报告融入到实验教材中。系列教材共七本,包括《人体解剖学实验》、《医学微形态学实验》、《医学机能实验学》、《医学细胞生物学与遗传学实验》、《医学免疫学与病原生物学实验》、《医学物理学实验》和《医学化学实验》。

本系列教材读者对象以本科、专科临床医学专业为主,兼顾预防、口腔、影像、检验、护理、药学、精神医学等专业需求,涵盖医学生基础医学全部的实验教学内容。

由于水平和时间的限制,缺点和错误在所难免,恳请读者和同行专家提出宝贵意见。

李 涛 张淑丽

2010年8月19日

前 言

医学细胞生物学与医学遗传学作为生命科学的重要基础学科,近年来发展非常迅速,广泛地影响着基础医学与临床医学,已成为现代医学教育中的重要课程。本书依据高等医药院校医学生培养目标所需要的基本理论和基本技能的要求,根据本课程的教学性质和教学实践,并在我室原有的实验教学内容的基础上,加强和充实了综合实验和创新实验,以提高学生的动手能力及发现问题、分析问题、解决问题的能力,为以后从事生物学相关的科研和教学工作奠定坚实的研究基础。

本教材是为《医学细胞生物学》和《医学遗传学》理论课配套的实验教材。内容包括:基本实验操作及常用仪器使用、经典验证性实验、综合实验与创新实验四个部分。本书是由齐齐哈尔医学院、哈尔滨医科大学、佳木斯大学共同组织编写的,可供高等医药院校本、专科和中等卫生学校各专业学生学习使用,也可供广大的医务工作者学习参考。

由于编者水平和经验有限,本教材一定还有很多缺点和错误,敬请使用者批评指正。

编 者

2010年5月

目 录

第一篇 基本实验操作及常用仪器使用

第一章 基本实验操作	(1)
第一节 离心技术	(1)
第二节 电泳技术	(3)
第三节 分光光度技术	(7)
第四节 PCR 技术	(10)
第二章 常用仪器使用	(14)
第一节 常用玻璃器皿的使用方法	(14)
第二节 常用玻璃器皿的清洁方法	(15)
第三节 移液器的正确使用方法	(17)
第四节 常用天平的种类与使用方法	(19)

第二篇 经典验证性实验

第三章 医学细胞生物学实验	(22)
实验一 光学显微镜的构造和使用方法	(22)
实验二 细胞的显微测量技术	(26)
实验三 细胞器的光镜观察	(27)
实验四 细胞骨架的观察	(29)
实验五 细胞内化学成分的显示	(31)
实验六 细胞的超微结构	(34)
实验七 细胞组分的分级分离	(37)
实验八 细胞生理活动的观察	(39)
实验九 细胞融合	(42)
实验十 细胞的计数、测量与死活鉴定	(44)
实验十一 细胞有丝分裂的制片及观察	(49)
实验十二 细胞减数分裂的制片及观察	(51)
实验十三 细胞的原代培养	(53)
实验十四 细胞的传代培养	(55)
实验十五 培养细胞的冻存、复苏与运输	(56)
第四章 医学遗传学实验	(59)
第一节 细胞遗传学实验技术	(59)
实验一 小鼠骨髓细胞染色体标本制备与分析	(59)
实验二 人类外周血淋巴细胞培养及染色体标本制备与分析	(60)
实验三 人类体细胞染色体的核型分析	(63)
实验四 正常人体细胞 G 显带染色体制备与观察	(64)
实验五 正常人类体细胞 G 显带染色体的核型分析	(66)
实验六 实体瘤染色体标本的制备与观察	(67)
实验七 人类外周血淋巴细胞姐妹染色单体互换标本的制备与分析	(68)
实验八 银染核仁形成区与近端着丝粒染色体随体联合	(70)
实验九 人类性染色质的制片与观察	(71)

实验十 动物细胞微核测定技术	(73)
实验十一 皮纹分析与 PTC 尝味	(74)
实验十二 遗传咨询	(78)
第二节 分子遗传学实验技术	(79)
实验十三 人类基因组 DNA 的提取	(79)
实验十四 DNA 限制性内切酶酶解及酶解片段的电泳分离	(81)
实验十五 DNA 分子杂交	(82)
实验十六 荧光原位杂交技术	(83)
实验十七 Y-染色体短串联重复序列的多态性分析	(85)
实验十八 表达蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析	(88)

第三篇 综合实验

第五章 综合实验项目	(90)
实验一 应用细胞融合技术制备染色体提前凝集标本	(90)
实验二 培养细胞的分裂指数和集落形成率的测定	(91)
实验三 细胞克隆形成实验	(93)
实验四 肿瘤细胞侵袭实验	(94)
实验五 肿瘤细胞对 HUVECs 的黏附实验	(95)
实验六 体外培养细胞的转化	(95)
实验七 大肠埃希菌(<i>E. coli</i>)感受态细胞的制备和转化	(98)
实验八 培养细胞的凋亡检测	(99)
实验九 总 RNA 的提取及 RT-PCR 扩增目的基因	(102)
实验十 产前基因诊断的技术	(106)
实验十一 PCR 技术的应用	(107)
实验十二 PCR-ELISA 端粒酶检测法	(114)
实验十三 增强型绿色荧光蛋白的转染及鉴定	(117)

第四篇 创新实验

第六章 创新实验项目	(119)
实验一 假性肥大型肌营养不良症的诊断	(119)
实验二 细胞遗传物质损伤检测实验设计	(119)
实验三 紫杉醇诱导 HL-60 细胞凋亡的检测	(120)
实验四 绿色荧光蛋白标记的融合蛋白在细胞内的动态分布观察	(120)
实验五 地中海贫血的基因诊断	(121)
实验六 天然药物抗肿瘤作用实验设计	(121)
实验七 MTHFR 基因与糖尿病肾病相关性研究	(122)
实验八 细胞内 GADPH 的表达和检测	(122)
实验九 利用 Y-STR 进行群体遗传结构分析实验设计	(123)
实验十 肿瘤基因治疗实验设计	(124)
参考文献	(125)
附录	(126)
附录一 实验室规则	(126)
附录二 医学细胞生物学与遗传学实验报告的书写	(126)
附录三 常用溶液的配制	(127)
医学细胞生物学与遗传学实验报告	(135)

第一篇 基本实验操作及常用 仪器使用

第一章 基本实验操作

第一节 离心技术

离心技术在生物科学,特别是在生物化学和分子生物学研究领域中,已得到十分广泛的应用。该技术是蛋白质、酶、核酸及细胞亚显微结构分离的最常用的方法之一,也是生物实验室中常用的分离和纯化的主要手段。离心技术主要用于各种生物样品的分离和制备,生物样品悬浮液在高速旋转下,由于巨大的离心力作用,使悬浮的微小颗粒(细胞器、生物大分子的沉淀、微生物菌体、大分子蛋白质、酶反应液、各种提取液或由液-固和液-液组成的悬浮液等)以一定的速度沉降,从而与溶液得以分离,而沉降速度取决于颗粒的质量、大小和密度。

离心机(centrifuge)是实施离心技术的装置,各实验室都配备有多种类型和功能的离心机。它利用不同物质在离心力场中沉降速度的差异,实现样品的分离。

一、基本原理

当含有细小颗粒的悬浮液静置不动时,由于重力场的作用使得悬浮的颗粒逐渐下沉。粒子越重下沉越快,反之,密度比液体小的粒子就会上浮。微粒在重力场下移动的速度与微粒的大小、形态和密度有关,并且又与重力场的强度及液体的黏度有关,如:红血细胞大小的颗粒,直径为数微米,就可以在通常重力作用下观察到它们的沉降过程。此外,物质在介质中沉降时还伴随有扩散现象,扩散是无条件的绝对的。扩散与物质的质量成反比,颗粒越小扩散越严重。而沉降是相对的,有条件的,要受到外力才能运动。沉降与物体重量成正比,颗粒越大沉降越快。对小于几微米的微粒如病毒或蛋白质等,它们在溶液中成胶体或半胶体状态,仅仅利用重力是不可能观察到沉降过程的。因为颗粒越小沉降越慢,而扩散现象则越严重。所以需要利用离心机产生强大的离心力,才能迫使这些微粒克服扩散产生沉降运动。

离心机就是利用转子高速旋转产生的强大的离心力,加快液体中颗粒的沉降速度,把样品中不同沉降系数和浮力密度的物质分离开。

二、离心机分类

实验用离心机分为制备性离心机和 Analytical 离心机,制备性离心机主要用于分离各种生物材料,每次分离的样品容量比较大, Analytical 离心机一般都带有光学系统,主要用于研究纯的生物大分子和颗粒的理化性质,依据待测物质在离心场中的行为(用离心机中的光学系统连续监测),能推断物质的纯度、形状和分子量等。 Analytical 离心机都是超速离心机。

1. 制备性离心机可分为三类

(1) 低速离心机:低速离心机额定转速一般为 4000r/min,且连续可调,相对离心力最大可达 5000~6000g。适用于医院化验室、生化及分子生物学实验室进行定性分析;血浆、血清、尿素、疫

苗制造等。由于此类离心机有大容量的水平及角转子,并配备强大的可调冷冻系统,使得它对于如:病毒、核酸、蛋白、激素及血液组分的分离特别有效和必不可少。同时还可用于瓶装和袋装样品的离心。低速离心机可用于各种细菌、细胞、细胞核等分离,是最广泛使用的一类离心机。

(2) 高速离心机:高速离心机最大额定转速为 20 000r/min 左右,最大相对离心力可达 45 000g。由于运转速度快,一般配备冷冻控温装置。高速离心机适用于各种生物细胞、病毒、血清蛋白等有机物、无机物溶液、悬浮液及胶体溶液等样品的分离、浓缩、提取等制备工作。是细胞和分子水平研究工作的基本工具。

(3) 超速离心机:可分为制备与分析两种。制备的最高额定转速为 55 000~83 000r/min,目前已经达到 120 000r/min,最大相对离心力在 $6 \times 10^5 g$ 以上。超速离心机是医学、检验学、生物学、生物化学、分子生物学、农业等各领域和专业的重要仪器之一。由于其转速极高、相对离心力极大,所以对离心机、转子和离心管等材料和质量要求极高。超速离心机的出现,使生物科学的研究领域有了新的扩展,它能使过去仅仅在电子显微镜下观察到的亚细胞器得到分级分离,还可以分离细胞器、病毒、核酸、蛋白质和多糖等。

2. 分析性离心机 分析性离心机使用了特殊设计的转头和光学检测系统,以便连续地监视物质在一个离心场中的沉降过程。从而确定其物理性质。

分析性超速离心机的主要特点就是能在短时间内,用少量样品就可以得到一些重要信息,能够确定生物大分子是否存在,其大致的含量,计算生物大分子的沉降系数,结合界面扩散,估计分子的大小,检测分子的不均一性及混合物中各组分的比例,测定生物大分子的分子量,还可以检测生物大分子的构象变化等。

三、操作方法

(1) 检查离心机调速旋钮是否处在零位,外套管是否完整无损和垫有橡皮垫。

(2) 接通离心机电源,打开机器开关,等待机器自检完毕。

(3) 离心前,先将离心的物质转移入合适的离心管中,其量以距离心管口 1~2cm 为宜,以免在离心时甩出。将离心管放入外套管中,在外套管与离心管间注入缓冲水,使离心管不易破损。

(4) 根据转子选择适合的离心管,将样品装入一对离心管后,在托盘天平上调节使它们质量相等,然后对称的放入转子中,先将转子的盖子旋紧,然后盖上机器盖。

(5) 根据需要依次设置离心所需要的温度、运行程序(可不选择)、转速、离心时间(当触及某一项的按键时,显示屏上相对应的值会闪烁,设完一个参数可直接触及下一个按键,继续设定所需数值),设置结束后按“start/stop”开始运行机器。

(6) 离心完毕,将手柄慢慢地调回零位。关闭开关。切断电源。

(7) 待离心机自行停止转动时,才可打开机盖,取出离心样品。

(8) 将离心管处理干净,倒置在小张滤纸上使其干燥,以便下次使用。旋上转子盖,关上机盖。若离心室内壁有冰霜待其化净干燥后,再旋上转子盖,关上机盖。

四、注意事项

实验室常用的是电动离心机,电动离心机转动速度快,要注意安全,特别要防止在离心机运转期间,因不平衡或试管垫老化,而使离心机边工作边移动,以致从实验台上掉下来,或因盖子未盖,离心管因振动而破裂后,玻璃碎片旋转飞出,造成事故。因此,使用离心机时,必须注意以下操作。

- (1) 离心机要放在平坦和结实的地面或实验台上,不允许倾斜。
- (2) 离心机应接地线,以确保安全。
- (3) 离心机外套管底部要垫棉花或试管垫。
- (4) 使用各种离心机时,必须事先在天平上精密地平衡离心管和其内容物,平衡时重量之差不得超过各个离心机说明书上所规定的范围。
- (5) 启动离心机时,应盖上离心机顶盖后,方可慢慢启动。
- (6) 离心机启动后,如有不正常的噪音及振动时,可能离心管破碎或相对位置上的两管重量不平衡,应立即关机处理。
- (7) 每个转头各有其最高允许转速和使用累积限时,使用转头时要查阅说明书,不得超速使用。
- (8) 离心过程中不得随意离开,应随时观察离心机上的仪表是否正常工作,如有异常的声音应立即停机检查,及时排除故障。
- (9) 分离结束后,先关闭离心机,在离心机停止转动后,方可打开离心机盖,取出样品,不可用外力强制其停止运动。
- (10) 一年检查一次电动机的电刷及轴承磨损情况,必要时更换电刷或轴承。
- (11) 离心机移动后,最好4小时后再使用。转子长期不使用,应取出。使用时在旋转上涂抹润滑油。
- (12) 离心管的选用:离心管主要用塑料和不锈钢制成,塑料离心管常用材料有聚乙烯(PE),聚碳酸酯(PC),聚丙烯(PP)等,其中PP管性能较好。塑料离心管的优点是透明或半透明,硬度小,可用穿刺法取出梯度。缺点是易变形,抗有机溶剂腐蚀性差,使用寿命短。不锈钢管强度大,不变形,能抗热,抗冻,抗化学腐蚀。但用时也应避免接触强腐蚀性的化学药品,如强酸、强碱等。

塑料离心管都有管盖,离心前管盖必须盖严,倒置不漏液。管盖有三种作用:①防止样品外泄。用于有放射性或强腐蚀性的样品时,这点尤其重要。②防止样品挥发。③支持离心管,防止离心管变形。

(刘 丹)

第二节 电泳技术

一、电泳的基本原理

电泳是指带电颗粒在电场的作用下发生迁移的过程。许多重要的生物分子,如氨基酸、多肽、蛋白质、核苷酸、核酸等都具有可电离基团,它们在某个特定的pH下可以带正电或负电,在电场的作用下,这些带电分子会向着与其所带电荷极性相反的电极方向移动。电泳技术就是利用在电场的作用下,由于待分离样品中各种分子带电性质以及分子本身大小、形状等性质的差异,使带电分子产生不同的迁移速度,从而对样品进行分离、鉴定或提纯的技术。

目前使用得最多的是琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶。蛋白质电泳主要使用聚丙烯酰胺凝胶。

二、电泳的分类

电泳按支持介质的不同可分为:

- (1) 纸电泳(paper electrophoresis)。
- (2) 醋酸纤维薄膜电泳(cellulose acetate electrophoresis)。
- (3) 琼脂糖凝胶电泳(agar gel electrophoresis)。
- (4) 聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis)。
- (5) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。

(一) 纸电泳

纸电泳(paper electrophoresis)是用滤纸作支持介质的一种早期电泳技术。其优点在于或采用滤纸与色素结合的直接电泳图,或剪下滤纸的任何部分来抽提其中的物质。尽管分辨率比凝胶介质要差,但由于其操作简单,所以仍有很多应用,特别是在血清样品的临床检测和病毒分析等方面有重要用途。

纸电泳使用水平电泳槽。分离氨基酸和核苷酸时常用 pH 2~3.5 的酸性缓冲液,分离蛋白质时常用碱性缓冲液。选用的滤纸必须厚度均匀。点样位置是在滤纸的一端距纸边 5~10cm 处。样品可点成圆形或长条形,长条形的分离效果较好。点样量为 5~100mg 和 5~10ml。

由于纸电泳时间长,分辨率较差,近年来逐渐被其他快速、简便、分辨率高的电泳技术所代替。

(二) 醋酸纤维薄膜电泳

醋酸纤维薄膜电泳与纸电泳相似,只是换用了醋酸纤维薄膜作为支持介质。将纤维素的羟基乙酰化为乙酸酯,溶于丙酮后涂布成有均一细密微孔的薄膜,其厚度为 0.1~0.15mm。

醋酸纤维薄膜电泳(cellulose acetate electrophoresis)与纸电泳相比有以下优点:①醋酸纤维薄膜对蛋白质样品吸附极少,无“拖尾”现象,染色后蛋白质区带更清晰。②快速省时。由于醋酸纤维薄膜亲水性比滤纸小,吸水少,电渗作用小,电泳时大部分电流由样品传导,所以分离速度快,电泳时间短,完成全部电泳操作只需 90 分钟左右。③灵敏度高,样品用量少。血清蛋白电泳仅需 2ml 血清,点样量甚至至少到 0.1ml,仅含 5mg 的蛋白样品也可以得到清晰的电泳区带。临床医学用于检测微量异常蛋白的改变。④应用面广。可用于那些纸电泳不易分离的样品,如胎儿甲种球蛋白、溶菌酶、胰岛素、组蛋白等。⑤醋酸纤维薄膜电泳染色后,用乙酸、乙醇混合液浸泡后可制成透明的干板,有利于光密度计和分光光度计扫描定量及长期保存。

由于醋酸纤维薄膜电泳操作简单、快速、价廉,目前已广泛用于分析检测血浆蛋白、脂蛋白、糖蛋白、胎儿甲种球蛋白、体液、脊髓液、脱氢酶、多肽、核酸及其他生物大分子,为心血管疾病、肝硬化及某些癌症鉴别诊断提供了可靠的依据,因而已成为医学和临床检验的常规技术。

电泳时先将滤膜剪成一定长度和宽度的纸条,在欲点样的位置用铅笔做上记号,点上样品,在一定的电压、电流下电泳一定时间,取下滤膜,进行染色。不同物质需采用不同的显色方法,如核苷酸等物质可在紫外分析灯下观察定位,但许多物质必须经染色剂显色。醋酸纤维素薄膜电泳染色后区带可剪下,溶于一定的溶剂中进行光密度测定。也可以浸于折射率为 1.474 的油中或其他透明液中使之透明,然后直接用光密度计测定。

醋酸纤维薄膜电泳的缺点是厚度小,样品用量很小,不适于制备。

(三) 琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖是从琼脂中提纯出来的,主要是由 D-半乳糖和 3,6-脱水-L-半乳糖连接而成的一种线性多糖。

琼脂糖凝胶电泳(agar gel electrophoresis)具有下列优点:①琼脂含液体量大,可达 98%~

99%，近似自由电泳，但是样品的扩散度比自由电泳小，对蛋白质的吸附极微。②琼脂作为支持体有均匀、区带整齐、分辨率高、重复性好等优点。③电泳速度快。④透明而不吸收紫外线，可以直接用紫外检测仪作定量测定。⑤区带易染色，样品易回收，有利于制备。

琼脂糖凝胶可以用于蛋白质和核酸的电泳支持介质，尤其适合于核酸的提纯、分析。如浓度为1%的琼脂糖凝胶的孔径对于蛋白质来说是比较大的，对蛋白质的阻碍作用较小，这时蛋白质分子大小对电泳迁移率的影响相对较小，所以适用于一些忽略蛋白质大小而只根据蛋白质天然电荷来进行分离的电泳技术，如免疫电泳、平板等电聚焦电泳等。琼脂糖也适合于DNA、RNA分子的分离、分析，由于DNA、RNA分子通常较大，所以在分离过程中会存在一定的摩擦阻碍作用，这时分子的大小会对电泳迁移率产生明显影响。例如对于双链DNA，电泳迁移率的大小主要与DNA分子大小有关，而与碱基排列及组成无关。另外，一些低熔点的琼脂糖(62~65℃)可以在65℃时熔化，因此其中的样品如DNA可以重新溶解到溶液中而回收。

琼脂糖凝胶电泳分为垂直及水平型两种。其中水平型可制备低浓度琼脂糖凝胶，而且制胶与加样都比较方便，故应用比较广泛，垂直式电泳应用得相对较少。

核酸分离一般用连续缓冲体系，常用的有TBE和THE。用上述缓冲液配制琼脂糖凝胶溶液，对于琼脂糖凝胶电泳，浓度通常在0.5%~2%之间，低浓度的用来进行大片段核酸的电泳，高浓度的用来进行小片段分析。低浓度胶易碎，小心操作和使用质量好的琼脂糖是解决办法。注意高浓度的胶可能使分子大小相近的DNA带不易分辨，造成条带缺失现象。沸水浴或微波炉加热使之融化，冷至55℃时加入溴化乙锭(EB)至终浓度为0.5μg/ml，然后将其注入玻璃板或有机玻璃板组装好的模子中，厚度依样品浓度而定。注胶时，梳齿下端距玻璃板0.5~1.0mm，待胶凝固后，取出梳子，加入适量电极缓冲液使板胶浸没在缓冲液下1mm处。溶解于TBE或THE内的样品应含指示染料(0.025%溴酚蓝溶液或橘黄橙溶液、10%~15%蔗糖溶液或5%~10%甘油溶液等)，也可使用2.5%Fico II溶液增加比重，使样品集中，每齿孔可加样5~10μg。电泳时电压一般为5~15V/cm，对大分子的分离可用电压5V/cm，电泳过程最好在低温条件下进行。电泳结束后在紫外灯下观察样品的分离情况。

由于琼脂糖凝胶的弹性较差，难以从小管中取出，所以一般琼脂糖凝胶不适合于管状电泳，管状电泳通常采用聚丙烯酰胺凝胶。

(四) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)是以聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质的一种常用电泳技术。聚丙烯酰胺凝胶由单体丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺聚合而成，聚合过程由自由基催化完成。催化聚合的常用方法有两种：化学聚合法和光聚合法。化学聚合法以过硫酸铵(AP)为催化剂，以四甲基乙二胺(TEMED)为加速剂。在聚合过程中，TEMED催化过硫酸铵产生自由基，后者引发丙烯酰胺单体聚合，同时甲叉双丙烯酰胺与丙烯酰胺链间产生甲叉键交联，从而形成三维网状结构。

聚丙烯酰胺凝胶有以下优点：

(1) 聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺和N,N'甲叉双丙烯酰胺聚合而成的大分子。凝胶有格子是带有酰胺侧链的碳-碳聚合物，没有或很少带有离子的侧基，因而电渗作用比较小，不易和样品相互作用。

(2) 由于聚丙烯酰胺凝胶是一种人工合成的物质，在聚合前可调节单体的浓度比，形成不同程度交链结构，其空隙度可在一个较广的范围内变化，可以根据要分离物质分子的大小，选择合适的凝胶成分，使之既有适宜的空隙度，又有比较好的机械性质。

(3) 在一定浓度范围聚丙烯酰胺对热稳定。凝胶无色透明，易观察，可用检测仪直接测定。

(4) 丙烯酰胺是比较纯的化合物,可以精制,减少污染。

聚丙烯酰胺凝胶有突出的优点,因而已广泛应用于蛋白质、核酸等物质的分离分析,目前尚无更好的支持介质能够取代它。

PAGE 根据其有无浓缩效应,分为连续系统和不连续系统两大类,连续系统电泳体系中缓冲液 pH 及凝胶浓度相同,带电颗粒在电场作用下,主要靠电荷和分子筛效应。不连续系统中由于缓冲液离子成分、pH、凝胶浓度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,因而其分离条带清晰度及分辨率均较前者佳。不连续体系由电极缓冲液、浓缩胶及分离胶所组成。浓缩胶是由 AP 催化聚合而成的大孔胶,凝胶缓冲液为 pH6.7 的 Tris-HCl。分离胶是由 AP 催化聚合而成的小孔胶,凝胶缓冲液为 pH8.9 Tris-HCl。电极缓冲液是 pH8.3 Tris-甘氨酸缓冲液。2 种孔径的凝胶、2 种缓冲体系、3 种 pH 使不连续体系形成了凝胶孔径、pH、缓冲液离子成分的不连续性,这是样品浓缩的主要因素。

制备凝胶时首先要根据待分离样品的情况选择适当的分离胶浓度,例如通常使用的 15% 的聚丙烯酰胺凝胶的分离范围是 $10^4 \sim 10^5$,即分子量小于 10^4 的蛋白质可以不受孔径的阻碍而通过凝胶,而分子量大于 10^5 的蛋白质则难以通过凝胶孔径,这两种情况的蛋白质都不能得到分离。所以如果要分离较大的蛋白质,需要使用低浓度如 10% 或 7.5% 的凝胶(孔径较大);而对于分离较小的蛋白质,使用的较高浓度凝胶(孔径较小)可以得到更好的分离效果。分离胶聚合后,通常在上面加上一层浓缩胶(约 1cm),并在浓缩胶上插入样品梳,形成上样凹槽。浓缩胶是低浓度的聚丙烯酰胺凝胶,由于浓缩胶具有较大的孔径(丙烯酰胺浓度通常为 3%~5%),各种蛋白质都可以不受凝胶孔径阻碍而自由通过。浓缩胶 pH 较低(通常 pH=6.8),用于样品进入分离胶前将样品浓缩成很窄的区带。浓缩胶聚合后取出样品梳,上样后即可通电开始电泳。样品在电泳过程中首先通过浓缩胶,在进入分离胶前由于等速电泳现象而被浓缩。当到达分离胶后,根据电荷多少及分子大小,即电荷效应和分子筛效应使样品得到分离。

溴酚蓝指示剂是一个较小的分子,可以自由通过凝胶孔径,所以它显示着电泳的前沿位置。当指示剂到达凝胶底部时,停止电泳,从平板中取出凝胶,在适当的染色液中(如通常使用的考马斯亮蓝)染色几个小时,而后过夜脱色。脱色液去除凝胶中未与蛋白质结合的背底染料,这时就可以清晰地观察到凝胶中被染色的蛋白质区带。通常凝胶制备需要 1~1.5 小时,电泳在 25~30mA 下需要 3 小时,染色 2~3 小时,过夜脱色。通常使用的垂直平板电泳可以同时进行多个样品的电泳。

(五) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)是阴离子表面活性剂,它能以一定比例和蛋白质结合,形成一种 SDS-蛋白质复合物。此复合物可用聚丙烯酰胺凝胶(包括连续的和间断的系统)电泳进行分离,通常把这种电泳称为 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(简称 SDS-PAGE)。

此电泳可用于单链 DNA、寡核苷酸片段以及蛋白质亚基、膜蛋白、肽类等物质的分析,还用于大分子物质的折叠结构等方面。它的主要用途是分离蛋白质和测定其亚基的分子量。SDS 与蛋白质结合后,还可引起构象改变,蛋白质-SDS 复合物形成近似“雪茄烟”形的长椭圆棒,不同蛋白质的 SDS 复合物的短轴长度都一样,约为 18A,这样的蛋白质-SDS 复合物,在凝胶中的迁移率不再受蛋白质原有的电荷和形状的影响,而取决于分子量的大小。由于蛋白质-SDS 复合物在单位长度上带有相等的电荷,所以它们以相等的迁移速度从浓缩胶进入分离胶,进入分离胶后,由于聚丙烯酰胺的分子筛作用,小分子的蛋白质可以容易的通过凝胶孔径,阻力小,迁移速度快;大分子蛋白质则受到较大的阻力而被滞后,这样蛋白质在电泳过程中就会根据其各自分子量的大小而被分离。因而 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳可以用于测定蛋白质的分子量,当分子量

在 15~200kD 之间时,蛋白质的迁移率和分子量的对数呈线性关系,符合下式: $\log MW = K - bX$, 式中: MW 为分子量, X 为迁移率, K 、 b 均为常数, 若将已知分子量的标准蛋白质的迁移率对分子量对数作图, 可获得一条标准曲线, 未知蛋白质在相同条件下进行电泳, 根据它的电泳迁移率即可在标准曲线上求得分子量。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳还经常用于提纯过程中纯度的检测, 纯化的蛋白质通常在 SDS 电泳上只有一条带, 但如果蛋白质是由不同的亚基组成的, 它在电泳中可能会形成分别对应于各个亚基的几条带。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳具有较高的灵敏度, 一般只需要不到微克量级的蛋白质, 而且通过电泳还可以同时得到关于分子量的情况, 这些信息对于了解未知蛋白及设计提纯过程都是非常重要的。

(陈 萍)

第三节 分光光度技术

分光光度技术(spectrophotography)主要是利用物质特有的吸收光谱来鉴定物质性质及含量的技术, 该技术操作简便、快速, 灵敏度高, 精确度高; 对于复杂的组分系统, 无需分离即可检测出其中的微量组分, 因此分光光度技术已成为生物学研究领域广泛使用的方法之一。

一、基本原理

物质对光线有选择性的吸收作用, 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, 就是由于这种对光的选择性吸收所致。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。某些物质可吸收特定波长的紫外线或红外线。分光光度法所使用的光谱范围在 200nm 至 10 μ m 之间。其中 200~400nm 为紫外光区, 400~760nm 为可见光区, 760~10 000nm 为红外光区。在一定条件下, 其吸收程度与该物质浓度成正比, 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。

1. 朗伯-比尔定律是分光光度技术的基本原理 朗伯-比尔定律主要阐明了有色溶液对单色光的吸收程度与溶液的浓度及液层厚度间的定量关系。一束单色光通过溶液后, 由于溶液吸收了一部分光能, 光的强度就要减弱, 若溶液浓度不变, 则溶液的厚度愈大(即光在溶液中所经过的途径愈长), 光的强度减低也愈显著。即吸光度与溶液层的厚度成正比。

2. 比尔定律 当一束单色光通过有色溶液后, 溶液液层的厚度不变而浓度不同时, 溶液的浓度愈大, 则透射光的强度愈弱, 即吸光度与溶液的浓度成正比。

3. 朗伯-比尔定律 同时考虑吸收层的厚度和溶液浓度对光吸收的影响, 必须将朗伯定律和比尔定律合并起来, 即吸光度与溶液的浓度和液层的厚度的乘积成正比。不同的物质可能会有相同的最大吸收波长, 但其摩尔吸光系数不一定相同。值愈大, 说明该物质溶液对光吸收愈强烈, 比色测定的灵敏度愈高。

二、分光光度计结构

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。分光光度计由下列五部分组成, 即光源、单色器、狭缝、样品池、检测系统。

1. 光源 分光光度计上常用的光源有氢灯(或氘灯)和钨灯, 前者适用于 200~360nm 的紫

外光区,后者适宜于 340~900nm 范围的光源。

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元件。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狭,仪器的灵敏性愈高,测量的结果愈可靠。

3. 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,以适应检测器的需要。分光光度计的缝隙大小是可调的。

4. 样品池(比色杯、比色池) 用来盛测定溶液,各个杯子壁厚度等规格应尽可能完全相等,否则将产生测定误差。玻璃比色杯只适用于可见光区,在紫外光区测定时要用石英比色杯。

5. 检测系统 检测器产生的光电流以某种方式转变成模拟的或数字的结果,模拟输出装置包括电流表、电压表、记录器、示波器及与计算机联用等,数字输出则通过模拟数字转换装置如数字式电压表等进行。现代仪器常附有自动记录器,可自动描出记录曲线。

三、分光光度技术的基本应用

(一) 测定溶液中物质的含量

利用分光光度法对物质进行定量测定的方法,主要有以下几种:

1. 标准管法 可见或紫外分光光度法都可用于测定溶液中物质的含量。这需要测定标准溶液(浓度已知的溶液)和未知液(浓度待测定的溶液)的吸光度,将两者进行比较。由于所用的吸收池的厚度是相同的,可用下式进行计算。

$$C_{\text{测}} = A_{\text{测}} / A_{\text{标}} \times C_{\text{标}}$$

式中: $C_{\text{测}}$ 代表未知液的浓度, $C_{\text{标}}$ 代表标准液的浓度, $A_{\text{测}}$ 和 $A_{\text{标}}$ 分别代表未知液和标准液所测得的吸光度值,式中只有 $C_{\text{测}}$ 是未知的,可由上式计算得之。含量测定时通常要选择被测物质的最大吸收波长,这样做有两个好处:①灵敏度大,物质在含量上的稍许变化将引起较大的吸光度差异;②可以避免其他物质的干扰。

2. 标准曲线法 用已知浓度的标准溶液,先配制成一系列不同浓度的标准溶液,在最大吸收波长(λ_{max})处测得各个吸光度(A值),以 A 为纵坐标,浓度为横坐标,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 λ_{max} 处测定 A 值,再从标准曲线上查得该样品的相应浓度。

标准曲线制作与样品管的测定,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) 用紫外光谱鉴定化合物

使用分光光度计可以绘制吸收光谱曲线。方法是用各种波长不同的单色光分别通过某一浓度的溶液,测定此溶液对每一种单色光的吸光度,然后以波长为横坐标,以吸光度为纵坐标绘制吸光度-波长曲线,此曲线即吸收光谱曲线。由于各种物质有一定的吸收光谱曲线,因此用吸收光谱曲线图可以进行物质种类的鉴定。当一种未知物质的吸收光谱曲线和某一已知物质的吸收光谱曲线形状一样时,则很可能它们是同一物质。一定物质在不同浓度时,其吸收光谱曲线中峰值的大小不同,但形状相似,即吸收高峰和低谷的波长是不变的。紫外光吸收是由不饱和的结构造成的,含有双键的化合物能表现出吸收峰。同一种物质的紫外光吸收光谱应完全一致,但具有相同吸收光谱的化合物其结构不一定相同。除特殊情况处,单独依靠紫外光吸收光谱不能决定一个未知物的结构,必须与其他方法配合。紫外光吸收光谱分析主要用于已知物质的定量分析和纯度分析。