

国家级实验教学示范中心

高等医药院校基础医学实验教学系列教材

总主编 徐 晨

生物化学与分子生物学实验

第2版

宋方洲 主编



科学出版社

国家级实验教学示范中心
高等医药院校基础医学实验教学系列教材

总主编 徐 晨

生物化学与分子 生物学实验

第2版

主 编 宋方洲
副主编 卜友泉 马永平 冯 涛
编 委 (按姓氏笔画排序)

卜友泉(重庆医科大学)

王继红(重庆医科大学)

朱慧芳(重庆医科大学)

刘智敏(重庆医科大学)

李 轶(重庆医科大学)

何凤田(第三军医大学)

张 莹(重庆医科大学)

易发平

曾昭淳

马永平(重庆医科大学)

冯 涛(重庆医科大学)

刘先俊(重庆医科大学)

江 渝(第三军医大学)

李 梨(重庆医科大学)

宋方洲(重庆医科大学)

张春冬(重庆医科大学)

予朝忠(重庆医科大学)

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

本教材是为适应高等医学院校基础医学实验教学改革和发展的需要而编写的一本生物化学与分子生物学实验教材。本教材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共四篇。在基础理论知识方面,对生物化学与分子生物学的经典研究技术、基本实验操作和常用仪器使用均进行了详细介绍。在实验项目设置上,包括蛋白质定量、层析、电泳、酶学、糖类与脂类、核酸分离纯化、PCR、分子克隆、分子杂交以及RNA干扰、双向电泳、EMSA和ChIP等经典验证性实验、综合性实验和创新性实验。教材内容新颖,体系完整,有所侧重,便于选择。

本教材可供医学院校临床医学等各专业五年制、七年制和研究生学生使用,也可供相关专业的科研、教学和技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验 / 宋方洲主编. —2版. —北京:科学出版社,2013.1

高等医药院校基础医学实验教学系列教材

ISBN 978-7-03-036322-0

I. 生… II. 宋… III. ①生物化学-实验-医学院校-教材②分子生物学-实验-医学院校-教材 IV. ①Q5-33 ②Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2013)第001288号

责任编辑:邹梦娜 / 责任校对:李 影

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>

新科印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2008年6月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2013年1月第 二 版 印张:16 3/4

2013年1月第六次印刷 字数:394 000

定价:39.80元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《高等医药院校基础医学实验教学 系列教材》编写指导委员会

主 任	雷 寒(重庆医科大学)
副主任	董 志(重庆医科大学)
	张绍祥(第三军医大学)
委 员	王亚平(重庆医科大学)
	李 和(华中科技大学同济医学院)
	侯一平(四川大学华西基础医学与法医学院)
	文 斌(川北医学院)
	梁文妹(贵阳医学院)
	李著华(泸州医学院)
	范奇元(遵义医学院)
	王燕蓉(宁夏医科大学)
	罗殿中(广西医科大学)
总主编	徐 晨(重庆医科大学)

总 序

传统医学实验教学的主要任务是让学生验证理论知识、增加感性认识,但缺乏对学生创新能力的培养,因而实验难度不高,实验条件比较简单。现代高等医学教育更加强调培养学生的探索精神、科学思维、实践能力和创新能力。这就要求从根本上改变实验教学依附于理论教学的传统观念,充分认识并落实实验教学在学校人才培养和教学工作中的地位,形成理论教学与实验教学统筹协调的理念和氛围。要从人才培养体系的整体出发,建立以能力培养为主线,分层次、多模块、相互衔接的科学实验教学体系,使实验教学与理论教学既有机结合又相对独立。要把学生从二级学科狭隘的“项目”实验教学提高到基于一级学科平台的“方法”实验教学,最大限度地拓展学生的专业视野。随着现代生命科学及其各种实验技术的飞速发展,必将对现代医学实验教学提出更高的要求,大量先进医学实验进入实验教学课程体系将成为必然的趋势,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、实验教学体系改革力度,改革传统的以教研室为单位的教学实验室模式,整合完善现代医学实验室功能和管理是提高医学实验教学质量的重要环节。这对培养适应 21 世纪医学卫生事业发展的高素质医学人才有重要意义。

围绕现代医学生的培养目标,转变旧的传统观念,打破现行课程框架,重新构建新型基础医学实验教学体系的改革势在必行。要实现以上目标,除了对实验室进行整合外,其核心内容就是实验教学教材。为了能够编写出一套适合中西部地区高等医学院校医学教育现状的实验教学教材,2008 年,在科学出版社的大力支持下,《高等医药院校基础医学实验教学系列教材》编委会以重庆医科大学为主体,协同全国 26 所高等医学院相关专业的专家教授共同编写了这一套实验教学系列教材。时隔 4 年,为了进一步完善本套实验教材,我们对本套教材进行修订再版,全套共八本,包括《人体大体形态学实验(系统解剖学分册)》、《人体大体形态学实验(局部解剖学分册)》、《人体显微形态学实验》、《人体机能学实验》、《病原生物学与免疫学实验》、《生物化学与分子生物学实验》、《医用化学实验》、《医用物理学实验》。

本系列实验教材的编写理念是将实验教学按照建设国家级实验教学示范中心要求的实验教学模式,借鉴国外同类实验教材的编写模式,力求做到体系创新、理念创新及编写精美。内容上将基础医学实验教学按照基础医学实验体系进行重组和有机融合,按照基础医学实验教学逻辑和规律,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等板块进行编写。

本系列教材编写对象以本科、专科临床医学专业为主,兼顾预防、基础、口腔、麻醉、影像、药学、检验、护理、法医、卫生管理、医学信息等专业需求,涵盖全部医学生的基础医学实验教学。各层次学生可按照本专业培养特点和要求,通过对不同板块的必选实验项目和自选实验项目相结合选修实验课程学分。

由于基础医学实验教学模式尚存在地区和校际间的差异,加上我们的认识深度和编写水平有限,本系列教材在编写过程中可能存在偏颇之处,请广大医学教育专家谅解,欢迎同行们提出宝贵意见。

《高等医药院校基础医学实验教学系列教材》编委会

2012 年 10 月

前言

实验教学是高等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。生物化学与分子生物学实验技术是生物医学诸多学科的重要研究手段,也是医学类各专业、各层次学生必修的一门基础实验课程。为适应高等医学院校基础医学实验教学改革和发展的形势,我们按照重庆医科大学基础医学实验教学改革统一部署和要求,编写了这本实验教材。

本教材一共分为四篇。第一篇是基本实验操作及常用仪器使用,重点介绍了一些目前常用的生物化学与分子生物学研究技术和常用仪器的使用方法以及基本的实验操作要求,目的在于使学生对生物化学与分子生物学的研究技术有一个系统的认识。第二篇是经典验证性实验,开设了一些经典的生物化学与分子生物学实验,这些实验均经过长期的实验教学实践,证明有助于学生巩固理论知识和培养学生基本的实验操作能力。第三篇是综合性实验,每个实验均涉及多种实验技术的使用,通过相对系统地使用多种实验技术来解决一个问题或达到一个研究目的,以培养学生的综合性逻辑思维能力,对科学研究有一个初步的认识。第四篇是创新性实验,通过由学生自己提出问题、解决问题的方式,以培养学生独立思考和基本的科研能力。

本教材各部分实验的编写均由多年从事生物化学与分子生物学教学及科研的学术带头人和中青年骨干教师执笔。另外,在实验项目的设置上,我们也选取了一部分目前科学研究中经常使用的实验技术,如功能基因组学研究中常用的 RNA 干扰实验、蛋白质组学研究中常用的双向电泳实验以及转录调控研究中常用的启动子活性分析实验、EMSA 实验和 ChIP 实验等,并注重实验的可操作性与实用性。

本教材不仅适合医学院校临床医学等各专业五年制、七年制和研究生学生使用,而且也可供相关专业的科研、教学和技术人员参考。

由于编者水平有限,时间仓促,教材中不当或错误之处在所难免,恳请同行专家和同学们批评指正,以便再版时修正完善。

编者

2012 年 10 月于重庆

目 录

第一篇 基本实验操作及常用仪器使用

第 1 章 生物化学常用研究技术	(1)
第 2 章 分子生物学常用研究技术	(18)
第 3 章 基本实验操作	(23)
第 4 章 常用仪器使用	(34)
第 5 章 实验室规则及安全防护	(46)
第 6 章 如何撰写实验报告	(48)

第二篇 经典验证性实验

第 1 章 蛋白质定量实验	(49)
实验一 双缩脲法测定血清蛋白质含量	(50)
实验二 Folin-酚试剂法测定蛋白质含量	(52)
实验三 紫外分光光度法测定蛋白质含量	(54)
实验四 考马斯亮蓝结合法测定蛋白质含量	(57)
实验五 BCA 法测定蛋白质含量	(59)
第 2 章 层析实验	(61)
实验六 纸层析法观察转氨基作用	(61)
实验七 葡聚糖凝胶柱层析分离血红蛋白与鱼精蛋白	(63)
实验八 离子交换层析分离混合氨基酸	(66)
实验九 薄层层析分离鉴定氨基酸	(68)
第 3 章 电泳实验	(72)
实验十 血清醋酸纤维薄膜电泳	(72)
实验十一 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清 LDH 同工酶	(76)
实验十二 SDS-PAGE 测定蛋白质的分子量	(81)
第 4 章 酶学实验	(86)
实验十三 血清碱性磷酸酶活性测定	(86)
实验十四 血清丙氨酸氨基转移酶活性测定	(89)
实验十五 影响胰蛋白酶作用的因素	(92)
实验十六 丙二酸对琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制作用	(95)
实验十七 酶的非竞争性抑制作用	(98)
实验十八 酶米氏常数的测定	(100)
第 5 章 糖类与脂类	(103)
实验十九 血糖浓度的测定	(103)
实验二十 肾上腺素对血糖浓度的影响	(106)
实验二十一 血清甘油三酯浓度测定	(108)
实验二十二 血清总胆固醇浓度测定	(112)
实验二十三 血清载脂蛋白 apo A1 的测定	(117)
第 6 章 核酸分离纯化技术	(120)
实验二十四 基因组 DNA 的提取制备与检测	(120)

实验二十五	全血基因组 DNA 的试剂盒法提取制备与检测	(124)
实验二十六	总 RNA 的提取制备与检测	(124)
实验二十七	质粒 DNA 的提取制备与检测	(131)
实验二十八	动物组织核酸的提取及成分鉴定	(137)
第 7 章 PCR 技术		(140)
实验二十九	常规 PCR 技术	(140)
实验三十	定量 PCR 技术	(144)
第 8 章 分子克隆技术		(148)
实验三十一	DNA 的限制性酶切与电泳检测	(148)
实验三十二	凝胶中 DNA 片断的纯化回收	(151)
实验三十三	DNA 连接实验	(153)
实验三十四	感受态细胞的制备	(157)
实验三十五	重组 DNA 转化与蓝白斑筛选	(159)
第 9 章 分子杂交技术		(162)
实验三十六	Southern 印迹杂交	(162)
实验三十七	Northern 印迹杂交	(166)
实验三十八	Western 印迹	(169)
实验三十九	核酸原位杂交	(172)
附	核酸分子探针的标记	(177)

第三篇 综合性实验

实验一	血清 γ 球蛋白的分离纯化与鉴定	(180)
实验二	碱性磷酸酶的分离纯化与动力学研究	(186)
实验三	β 肌动蛋白基因的克隆	(193)
实验四	hCS 在大肠埃希菌中的表达、纯化与鉴定	(200)
实验五	hCS 基因在毕赤酵母中的表达及鉴定	(206)
实验六	荧光原位杂交实验	(210)
实验七	双脱氧链末端合成终止法测定 DNA 序列	(213)
实验八	肽或蛋白质 N-端氨基酸序列测定	(219)
实验九	用双荧光素酶报告基因检测启动子活性	(228)
实验十	电泳迁移阻滞实验	(232)
实验十一	染色质免疫沉淀	(237)
实验十二	蛋白质双向电泳	(242)
实验十三	酵母双杂交实验	(247)
实验十四	RNA 干扰实验	(250)

第四篇 创新性实验

实验一	重要蛋白质或酶的分离纯化	(255)
实验二	糖尿病的生化及遗传检测分析实验	(255)
实验三	家族性高胆固醇血症的诊断	(256)
实验四	血友病的分子诊断	(258)
实验五	RNA 干扰技术靶向沉默目的基因	(259)

第一篇

基本实验操作 及常用仪器使用

第1章 生物化学常用研究技术

一、分光光度技术

每种物质均具有特异性的吸收光谱,不同物质由于分子结构的差异,对不同波长线的吸收能力也不同。凡是以光吸收、发射和散射等作用而建立起来的光分析方法,称为光谱分析法。分光光度技术就是一种常见的光谱分析方法,它利用物质特有的吸收光谱,对物质进行定性及定量的鉴定分析。它不仅应用于可见光,还扩展到紫外和红外光谱。对于未经分离纯化的复杂样品,分光光度技术可直接检测出其中极少量的物质成分,体现出高灵敏度、高精确度和快速简便的特点。目前,分光光度技术已经成为生物化学工作中不可或缺的常用技术之一。

(一) 基本原理

光由光子组成,具有波-粒二相性,即不连续的微粒和连续的波动性。光的本质就是电磁波,分光光度法所使用的光谱范围在 200~10 000nm 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。分光光度技术的定量依据是比尔-朗伯(Beer-Lambert)定律,简称比尔定律,也称为光吸收定律。当一束平行单色光通过一定液层厚度的有色溶液时,由于溶质吸收了光能,光的强度就会减弱。溶液浓度越大,液层厚度越大,入射光越强,则光被吸收的就越多,光强度的减弱现象越明显。比尔定律正好描述了有色溶液对单色光的吸收程度与溶液及液层厚度间的定量关系,即溶液的吸光度与溶液的浓度和液层厚度的乘积成正比。用公式表示:

$$A=E\times C\times L \quad (1-1)$$

式中: A 为吸光度; E 为吸光系数; C 为溶液浓度; L 为液层厚度。

E 是各物质在一定波长下的特征常数, 可反映物质对光吸收的灵敏程度。 E 值越大, 表示该物质对此波长的光吸收能力越强。

比尔定律适用于有色溶液和均匀非散射的吸光物质(包括液体、气体和固体), 是各类分光光度法的定量依据。

(二) 分光光度计基本结构

从含有各种波长的混合光中分离并测量单色光强度的仪器称为分光光度计。由于分光光度计采用具有辐射连续光谱的光源, 不同波长的分子吸收光谱的强弱存在差异, 因此, 根据不同波长设计的分光光度计具有各自的用途和测定范围。常用于测定分子光谱的分光光度计有三大类, 即紫外分光光度计, 可见光分光光度计和红外分光光度计。另外, 还有万用(全波段)分光光度计。分光光度计由下列五部分组成, 包括光源、单色器、狭缝、样品池、检测器和显示器。

1. 光源 光谱仪器使用的光源配置的光源, 必须提供所需波长范围的连续光谱, 并具备足够的输出功率和良好的稳定性。

常用的紫外光源有氢灯和氘灯, 分别发射波长在 $190 \sim 360\text{nm}$ 和 $180 \sim 500\text{nm}$ 之间的光谱。由于氘灯辐射能量比氢灯大约 4 倍, 使用寿命也比氢灯长, 目前大多数紫外分光光度计都使用氘灯。

常用的可见光光源有碘钨灯、钠灯和氙灯等。钨灯发射连续波长的范围在 $320 \sim 2500\text{nm}$ 之间; 钠灯发射连续波长的范围在 $400 \sim 10\,000\text{nm}$ 之间; 氙灯发射连续波长的范围在 $250 \sim 700\text{nm}$ 之间。

常用的红外光光源有纳恩斯特(Nernst)棒, 这是一种通过电加热使温度达到 $1500 \sim 2000^\circ\text{C}$ 之间的惰性材料。它的检测波长范围在 $750 \sim 1\,000\,000\text{nm}$ 之间。

2. 单色器 能将连续复合光源分解成单一波长的单色光或者具有一定宽度谱带的分光器, 称为单色器。单色器由分光器和狭缝等色散元件组成。

单色器由棱镜或者光栅构成。棱镜的分光原理是, 当一束平行光进入棱镜散射器后就会按波长顺序分解成单一波长的单色光。经聚焦镜聚焦后, 在聚焦面的不同位置上成像, 就得到按波长展开的光谱。光学玻璃棱镜, 主要用于可见分光光度计或红外分光光度计; 石英玻璃棱镜主要用于紫外分光光度计; 人造蓝宝石棱镜, 其用途与石英玻璃棱镜相同。棱镜的特点是波长越短, 色散程度越好。所以用棱镜的分光光度计, 其波长刻度在紫外区可达 0.2nm , 而在长波段只能达到 5nm 。光栅利用光的衍射和干涉原理进行分光, 即在石英或玻璃的表面上刻划许多平行线, 刻线处不透光, 于是通过光的干涉和衍射现象, 较长的光波偏折的角度大, 较短的光波偏折的角度小, 因而形成光谱。光栅单色器的性能优劣取决于光栅的材料和单位面积上刻的条纹数量, 刻得越多则分辨率越高。

3. 狭缝 狭缝是单色器的重要组成部分, 直接影响仪器的分辨率。狭缝由两块锋利金属刀片(一块弧形, 一块直形)组成, 两刀片之间严格平行。由此在光通路上形成狭隙, 将来自单色器的散射光切割成单色光, 调节入射单色光的纯度和强度。狭缝越大, 采集光的面积越大, 光的单色性越差。反之, 则光的单色性越好。狭缝可在 $0 \sim 2\text{mm}$ 宽度内调节, 较先进的分光光度计的狭缝宽度可随波长一起调节。

4. 样品池 样品池也叫做比色杯或比色皿,由透明材料制成,比如硅酸盐玻璃、有机玻璃、石英玻璃或其他晶体材料。不同的检测波长可选用不同材料制成的比色杯,例如在紫外光波区检测可选用石英玻璃比色杯,在可见光波区可选用普通光学玻璃比色杯,在中红外和远红外光波区可选用无机盐晶体材料制成的比色杯。样品池用来盛放溶液,每个样品池壁厚厚度等规格应尽可能完全相同,否则将产生测量误差。

5. 检测器 检测器也被称为光电转换器,主要功能是将光信号转变为电信号,再通过放大器把信号输送给显示器。检测器必须在一个较广的波长范围内对辐射信号都有响应,尤其在低功率辐射时对辐射能的吸收要更敏感,对辐射的响应更快,转换的电信号容易放大,产生的噪声要小,生成的信号与入射光强度成正比。

光子响应检测器又分为光电管检测器、光电倍增管检测器、二极管阵列检测器。其中,光电管是由密封在玻璃管或石英玻璃管内的两个金属电极组成,包括一个阴极和一个阳极。光电管的光谱响应特性取决于阴极上的涂层材料,不同阴极材料制成的光电管使用光谱范围不同,在不同的波区测定光谱辐射,需选择不同的光电管。阴极是用对光敏感的金属(比如碱土金属的氧化物)制成。光越强,电子放出越多,由于电子带负电,被吸引到阳极上而产生电流。光电管产生电流很小,需要放大。分光光度计产用电子倍增光电管,在光电管的阴极和阳极之间增加了若干倍增电极,故在光照射下产生的电流比其他光电管要大很多,因此可提高测定的灵敏度。

6. 显示器 显示器是将检测器产生的光电流以某种方式转变成模拟数字结果,再以一定方式显示出来。模拟输出装置包括电流表、电压表、记录器、示波器、计算机联用等。一般多功能的精密分光光度计大多数采用软件配套的计算机显示。

(三) 分光光度计的基本应用

1. 利用标准管测定溶液物质的含量 可见和紫外分光光度法都可用于测定溶液中物质的含量。含量测定时所用波长通常要选择被测物质的最大吸收波长。这样做的好处是检测灵敏度大,物质在含量上的细微变化都将引起吸光度的明显改变,并且可避免其他物质的干扰。

对已知浓度的标准管和测定管进行同样的处理和显色,分别读取吸光度,再根据公式 1-1 计算测定管中物质的含量,计算过程如下:

$$A_1 = E_1 C_1 L_1 \quad A_2 = E_2 C_2 L_2$$

其中 A_1 和 A_2 分别表示标准溶液和未知浓度溶液的吸光度, C_1 和 C_2 分别表示标准溶液和未知浓度溶液的物质浓度, L_1 和 L_2 分别表示盛放标准溶液和未知浓度溶液比色杯的内径长度。其中 $L_1 = L_2$, 故将上述两个公式改写为:

$$A_1 / (E_1 C_1) = A_2 / (E_2 C_2) \quad (1-2)$$

鉴于标准溶液和待测溶液中的物质相同,故 $E_1 = E_2$, 将公式 1-2 简写为:

$$C_2 = (A_2 / A_1) \times C_1 \quad (1-3)$$

考虑到标准溶液和待测溶液的体积相同,将公式 1-3 简写为:

$$m_2 = (A_2 / A_1) \times m_1 \quad (1-4)$$

其中 m_1 和 m_2 分别表示标准溶液和待测溶液中物质的含量,应用公式 1-4 可计算出待测溶液中物质的含量 m_2 。

2. 绘制标准曲线测定溶液物质的含量 对一组梯度浓度的标准管处理显色后,读取每管吸光度。以溶液浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,在选定浓度范围内标准曲线应为直线。然后,在与标准管相同处理的条件下,测定未知浓度溶液的吸光度,即可从标准曲线上查到与其对应的浓度。

一般而言,标准曲线的浓度范围在待测物质浓度的 0.5~2 倍之间,对应的吸光度应在 0.05~1.00 之间。另外,应在同一台仪器上进行标准曲线的绘制与应用,绘制的标准曲线仅供短期使用,否则结果存在误差。

3. 通过摩尔吸光率推算溶液物质的浓度 比尔定律公式中的 E 为吸光系数,当溶液浓度 C 为 1mol/L ,液层厚度 L 为 1cm 时, E 值等于摩尔消光率,用 ϵ 表示,单位为 $L/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。 ϵ 是物质的特征常数之一,由物质的性质与光波长决定。同一物质在不同的波长所测得的 ϵ 值不同,一般采用 ϵ 值最大的波长进行比色测定。

读取液层厚度为 1cm 时的溶液吸光度,结合已知的 ϵ 值,根据公式 1-5 推算出待测溶液的物质浓度:

$$C = A / \epsilon \quad (1-5)$$

该方式是紫外吸收法测定蛋白质溶液含量的基础。蛋白质在 280nm 波长处有最大吸光值,其高低与蛋白质中赖氨酸和色氨酸的含量有关,故同样浓度不同类型的蛋白质在 280nm 波长处具有不同的吸光值。在一定条件下,蛋白质的摩尔吸光率是一个恒定值。测出待测蛋白质溶液的吸光值,即可根据公式 1-5 推算出待测蛋白的浓度。

紫外分光光度计适用于单一组分的物质或两个组分组成的混合物(两者的吸收峰完全独立)的定量分析,但对于存在某些干扰杂质的样品,则需进行校正。例如,蛋白溶液中若混有核酸成分,则需采用 $280\text{nm}/260\text{nm}$ 的吸光度比值校正,才能确定溶液中蛋白质的实际含量。

4. 测定混合物中各组分的浓度 面对含有 2 种或 2 种以上组分的待测溶液,根据各组分吸收光谱的重叠程度,选择不同的测定方法。例如,待测溶液各组分的吸收峰互不干扰,则可按照单一组分测定方法分别测定各组分的浓度;各组分的吸收峰相互重叠,则可在多波长的光照射下,分别测定其波长处溶液的表观吸光度,然后建立联合方程式,通过解方程获得各组分的浓度。

5. 鉴定化合物的种类 使用分光光度计可绘制吸收光谱曲线。方式是采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,即吸收光谱曲线。各种物质具有特定的吸收光谱曲线,因此可通过吸收光谱曲线图鉴定化合物。特定化合物在不同浓度时,其吸收光谱曲线中,峰值的大小不同,但形状相似,吸收高峰和低峰的波长是固定不变的。

紫外吸收光谱分析主要用于已知物质的定量分析和纯度分析,比如用于蛋白质的定量分析(如前所述)。紫外吸收是由化合物中的不饱和结构造成的,含有双键的化合物表现出吸收峰。紫外吸收光谱比较简单,同一化合物的紫外吸收光谱应完全一致。值得注意的是,具有相同吸收光谱的化合物其结构不一定相同。因此紫外吸收光谱分析需和其他方法结合起来确定化合物的种类。

二、电泳技术

在电场作用下,带电颗粒向着与其电性相反的电极方向以一定的速度进行泳动,使组分分离成狭窄的区带,称为电泳。在一定条件下,混合物中各组分的大小、携带电荷等不同,在同一电场下经过一段时间的泳动,就可有效的分离各组分。电泳技术就是由各种带电颗粒在电场中迁移率不同而进行分离的一种技术。生物大分子如蛋白质、核苷酸、多糖等常以颗粒分散于溶液中,它们所携带的静电荷主要取决于基质的 H^+ 浓度。以蛋白质分子为例,蛋白质分子具有许多可解离的酸性基团和碱性基团,在一定非等电点条件下,就会解离带电,蛋白质分子的性质和溶液的 pH 及离子强度共同决定了它的带电的性质和电荷量。带电的蛋白质分子在电场中就会朝着其所带电荷相反的方向移动,根据各种蛋白质分子的迁移速度差异,对各种蛋白质分子进行分离。

(一) 基本原理

如果将带静电荷 Q 的离子置于电场中,它受到的电荷牵引力 F 为:

$$F = EQ \quad (2-1)$$

式中 E 为电场强度,单位为 V/cm ,表示电场中单位距离上的电位差。

带电颗粒在溶液中的迁移受到来自于介质的摩擦力 F' ,对于球形颗粒来说,在溶液中受到的阻力 F' 服从 Stock 定律:

$$F = 6\pi r \eta v \quad (2-2)$$

式中: r 为球形颗粒的半径; η 为溶液的黏度系数; v 为带电颗粒的运动速度。

在溶液中,带电颗粒达到动态平衡时, $F = F'$,整理后得到:

$$v = EQ / (6\pi r \eta) \quad (2-3)$$

由公式 2-3 可知,相同带电颗粒在不同强度的电场中泳动速度是不同的,为方便比较,常用迁移率 m 来替代迁移速度表示粒子的迁移情况,即 $m = v/E$,整理后得到:

$$m = Q / (6\pi r \eta) \quad (2-4)$$

由公式 2-4 可知,迁移率与球形分子、介质黏度和颗粒所带电荷有关。在确定的条件下,某带电颗粒的迁移率为常数,属于其物化特性常数。迁移率的单位为 $cm^2/(s \cdot V)$ 。能否分离不同物质取决于它们之间的迁移率,有差别则能通过电泳分离。

由于蛋白质、氨基酸的电离度 α 受溶液 pH 的影响,所以常用有效迁移率 U 来表示其迁移情况:

$$U = m \cdot \alpha \quad (2-5)$$

结合公式 2-4 和 2-5 得到:

$$U = Q\alpha / (6\pi r \eta) \quad (2-6)$$

由公式 2-6 可知,影响分子带电量 Q 、电离度 α 、和溶液黏度系数 η 的因素和分子半径都会影响有效迁移率,比如溶液的 pH 和温度。因此电泳应尽可能在恒温条件下进行,并选择一定 pH 的缓冲液。所选择的 pH 以能扩大各种被分离组分所带电荷量的差异为宜,利于各组分的分离。

除了以上因素影响电泳结果,离子强度和电渗现象也会影响电泳。一般最适的离子强

度在 $0.02 \sim 0.20 \text{ mol/L}$ 之间。离子强度过小会降低带电颗粒的溶解度,离子强度过大会降低组分的迁移速度并增加电泳过程中的散热量,使条带扩散变形。在电场中,由于多孔支持物吸附水中的离子使支持物表面相对带电,因此溶液对于支持物就发生相对移动,即电渗现象。电渗液常会破坏电泳中已形成的条带,使其扩散变形。故当电泳不是在溶液中而是在支持介质中进行,还要注意选用无电渗或低电渗物质作为支持物。

(二) 电泳分类与应用

任何电泳设备均由三部分组成,阳极、阴极和实现带电颗粒分离的电泳室。依据不同原则,可对电泳进行不同类型的分类。

根据有无固体支持物,可将电泳分为:自由电泳和区带电泳(支持物电泳)。自由电泳是在溶液中进行的电泳,包括显微电泳(在显微镜下直接观察细胞或细菌等的电泳行为)、移界电泳、柱电泳(在层析柱中进行的电泳)、自由流动幕电泳(用于制备的连续电泳)、等速电泳等。自由电泳的劣势在于电泳过程中的热效应和扩散作用造成液柱的对流和蛋白区带加快,降低了电泳的分辨率。区带电泳是在固体支持物上进行的电泳,支持物的作用主要是防止电泳过程中的机械干扰、温度变化以及大分子溶液高密度而产生的对流。可选择无阻滞的材料作为支持物,包括滤纸、醋酸纤维素薄膜、淀粉、聚酰胺粉末、凝胶微粒、海绵等。或选择高密度凝胶作为支持物,比如淀粉凝胶、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶。

根据操作方法,将电泳分为二维电泳、交叉电泳、连续或不连续电泳、电泳-层析相结合技术等。本节重点介绍生物化学中分离常用的几种电泳技术。

1. 醋酸纤维薄膜电泳 醋酸纤维薄膜电泳是医学临床检验的常规技术,是在纸电泳基础上发展起来的一种电泳方法。它用醋酸纤维薄膜取代滤纸作为支持介质。醋酸纤维薄膜电泳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,染色后蛋白质区带清晰。②快速省时。醋酸纤维薄膜亲水性小,吸水少,电渗作用小,因此分离速度快,一次操作耗时约 90 min。③灵敏度高,样品用量少。血清蛋白电泳仅需 2ml 血清,甚至只有 $0.1 \mu\text{l}$ 蛋白上样量也可得到清晰的电泳区带,故常用于临床,检测微量异常蛋白的改变。④应用面广。可用于分离不易分离的样品,比如胎儿甲种球蛋白、溶菌酶、胰岛素等。⑤染色后,用乙酸或乙醇混合液浸泡后可制成透明薄膜,利于后续的光密度计和分光光度计扫描定量及长期保存。

2. 琼脂糖凝胶电泳 琼脂糖凝胶电泳是以琼脂糖作为支持介质的一种电泳技术。琼脂糖是从琼脂中精制出来的线性胶状多糖,其分子结构大部分是由 1, 3 连接的 $\beta\text{-D}$ 吡喃半乳糖和 1, 4 连接的 3, 6-脱水 $\alpha\text{-D}$ 吡喃半乳糖交替而成。将一定量琼脂糖加入缓冲液中,加热溶解,冷却后靠糖链间氢键作用形成琼脂糖凝胶。琼脂糖凝胶的孔径由制胶时琼脂糖的浓度决定,低浓度琼脂糖形成的孔径较大,而高浓度琼脂糖形成的孔径较小。由于琼脂糖具有亲水性及不含带电荷的基团,因此几乎不会引起敏感生物分子的变性和吸附,是分离生物高分子尤其是核酸的优良电泳介质。

由于琼脂糖凝胶孔径较大,对大多数蛋白质来说,其分子筛效应并不明显。琼脂糖凝胶电泳更广泛地应用于核酸研究中,为 DNA 分子及其片段的相对分子量测定和 DNA 分子构象的分析提供了重要手段。用不同浓度的琼脂糖凝胶可分离长度为 200bp 至 50kb 的 DNA 分子。

琼脂糖凝胶透明无紫外吸收,核酸电泳结果用荧光染料溴乙啶(ethidium bromide,EB)染色后可直接在紫外灯下观察和拍照。也可在制备凝胶前将 EB 预先添加到凝胶液中,即可在电泳过程中随时观察核酸的迁移情况。

3. 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电泳技术。聚丙烯酰胺凝胶(polyacrylamide gel, PAG)由单体丙烯酰胺(acrylamide, Acr)和交联剂 N, N'-亚甲基双丙烯酰胺(N, N'-methylenebisacrylamide, Bis)在催化剂和加速剂作用下聚合交联而成的三维网状结构的凝胶。催化聚合的常用方法有两种:化学聚合法和光聚合。前者以过硫酸铵(ammonium persulfate, APS)为催化剂,以四甲基乙二胺(N, N, N', N'-tetramethyl ethylenediamine, TEMED)为加速剂。聚合过程中,TEMED 催化 APS 产生自由基,后者引发 Acr 单体聚合,同时 Bis 与 Acr 链间产生甲叉键交联,从而形成三维网状结构。光聚合是以核黄素为催化剂,核黄素经紫外线光解形成无色基,再被痕量氧化形成自由基,引发聚合反应。本催化系统主要配制大孔浓缩胶。

凝胶孔径大小主要受凝胶浓度的影响,浓度越大,孔径越小。凝胶浓度过大,胶硬而脆。浓度太小,凝胶稀软,不易操作。通常把 7.5% 的凝胶称为标准凝胶。当在标准凝胶上分离效果不理想时,可以适当调整凝胶浓度。3% 的聚丙烯酰胺凝胶孔径较大,对蛋白质没有明显的阻碍作用,可用于平板等电聚焦、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳的浓缩胶或用于 DNA 分离。高浓度凝胶孔径较小,对蛋白质具有分子筛作用,一般用于不同分子量蛋白质的电泳分离。聚丙烯酰胺凝胶浓度一般取 2.4%~20%,在此范围内可分离 $1.0 \times 10^6 \sim 330$ Da 分子量的蛋白质分子。在以上范围内,电泳的相对迁移率与分子量的对数呈线性关系。

非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳可以使生物大分子在电泳过程中保持天然形状、电荷和生物活性,对于生物大分子的鉴定具有十分重要的意义。此外,聚丙烯酰胺凝胶还具有以下突出优点:① 可以随意控制胶浓度“T”和交联度“C”,从而获得不同有效孔径的凝胶,用于分离不同分子量的生物大分子。② 能把分子筛作用和电荷效应有机结合,提高分离的灵敏度。③ 聚丙烯酰胺凝胶不含带电基团,化学惰性好,电泳时不会产生“电渗”作用。④ 透明度好,便于照相和复印。⑤ 机械强度好,有弹性,不易碎,便于操作和保存。⑥ 无紫外吸收,可用紫外分析仪对凝胶进行定量分析。⑦ 可作为固定化酶的惰性载体。

聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质最初是在直径约 7 mm、长约 10 cm 的玻璃管中进行,产生的区带像圆盘,故称为圆盘电泳。但由于玻璃管间的差异、灌胶时的差异导致各玻璃管间分离条件不一致,所以对各管样品进行比较时会出现较大误差。为了克服这种差异性,后来发明了垂直平板电泳。垂直平板电泳一次可以容纳 20 余个样品,电泳过程中各样品所处的条件相对一致,样品间便于比较,重复性好。因而,垂直平板电泳很快得到广泛应用,常用于蛋白质和核酸的分离、鉴定及序列分析。

水平平板电泳是近年来发展很快的一种凝胶电泳方法,与垂直平板电泳相比有很多相似之处,也有独特的优点,表现在:① 凝胶可以直接平铺在冷却板上,容易使凝胶冷却,可以加高电压以提高分辨率。② 电泳速度快,通常只需 1 小时左右,而圆盘电泳和垂直平板电泳一般需要 3~4 小时。③ 可以使用薄胶,加样少,染色快,灵敏度高,易保存,只要用甘油浸泡后自然干燥,即可长期保存不会龟裂。④ 适用各种电泳方式,用途广泛,可以使用 90 年代才发展起来的半干式电泳新技术,从而大大节约了试剂,简化了操作,提高了电泳速度。

4. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 在聚丙烯酰胺凝胶电泳中,蛋白质的迁移率取决于它所带净电荷的量、分子大小及分子形状。如果用还原剂(如巯基乙醇或二硫苏糖醇)和十二烷基硫酸钠(sodium-dodecyl sulphate, SDS)加热处理蛋白质样品,蛋白质分子中的二硫键被还原,并且由于蛋白质结合的 SDS 呈解离状态,使蛋白质亚基带上大量负电荷,其数值远远超过蛋白质原有的电荷量,因此掩盖了不同亚基间原有电荷的差异。这种情况下,各种蛋白质-SDS 复合物具有相同的电荷密度,电泳时纯粹按亚基大小靠凝胶的分子筛效应进行分离,有效迁移率与分子量的对数呈现很好的线性关系。所以,SDS-PAGE 不仅是一种很好的蛋白质分离方法,也是一种有效的测定蛋白质分子量的方法。

制胶时首先根据样品中的目的蛋白分子量大小配制合适的分离胶浓度,一般采用较低浓度的分离胶分离大分子量蛋白质,采用较高浓度的分离胶分离小分子量蛋白质。当分离胶聚合以后,通常要在凝胶上面加上一层约 1 cm 厚的浓缩胶。与分离胶相比,浓缩胶的 pH 较低(通常为 pH6.8)、浓度较低(通常为 3%~5%),形成的孔径大,各种蛋白质均可自由通过,作用是使样品在进入分离胶前浓缩成很窄的区带。随即在浓缩胶上插入样品梳,形成上样凹槽。浓缩胶聚合后取出样品梳,上样后通电即可电泳。通常往样品中加入溴酚蓝染料,控制电泳过程。此外,样品处理液中还可加入适量蔗糖或甘油来增大溶液密度,便于加样时样品沉入样品凹槽底部。

SDS-PAGE 有两种系统,即连续系统与不连续系统。不连续系统中存在 3 种不连续性,包括 pH 不连续、凝胶不连续、溶液离子组成不连续。值得注意的是,SDS-PAGE 测得的是蛋白质亚基的分子质量。对于寡聚蛋白而言,为了正确反映其完整的分子结构,应该用连续密度梯度电泳或凝胶过滤等方法测定天然构象状态下的分子质量及分子中肽链(亚基)的数目。

5. 连续密度梯度电泳 连续密度梯度电泳通常采用梯度聚丙烯酰胺凝胶为介质,从凝胶顶部到底部丙烯酰胺的浓度呈梯度递增,因此在凝胶的顶部孔径较大,在凝胶的底部孔径较小。点在凝胶顶部的样品在电场中向着凝胶浓度逐渐增高的方向即孔径逐渐减小的方向迁移,其分子筛效应体现得更为明显。

连续密度梯度电泳与 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳类似,但具有以下突出特点:①具有使样品中各个组分浓缩的作用,稀释的样品可分次上样,不会影响最终分离效果;②分辨率更高,可提供更清晰的谱带,适于纯度鉴定;③分离范围更宽,因为梯度凝胶的孔径范围比单一凝胶大,分子量较大的蛋白质可以在凝胶顶部大孔径部分得到分离,而分子量较小的蛋白质可以在凝胶底部小孔径部分得到分离,可在一张胶片上同时测定分子质量分布范围相当大的多种蛋白质的分子量;④可测定天然状态蛋白质的分子量,对于研究寡聚蛋白非常有用。

6. 等电聚焦电泳 等电聚焦电泳是根据两性物质等电点(isoelectric point, pI)不同而进行分离的一种电泳技术,是分离蛋白质等两性物质的一种理想方法。等电聚焦的分离原理是往聚丙烯酰胺凝胶中加入一种合成的两性电解质(多氨基-多羧基混合物),在电场作用下会自发形成一个连续的 pH 梯度。蛋白质等两性分子在电泳上被分离,运动到 pI 胶层时就失去所带电荷而稳定停留在该处。样品中不同蛋白质 pI 不同,因此它们在等电聚焦电泳中实现有效分离。

在等电聚焦电泳中,利用各蛋白质 pI 的差异,并不利用凝胶的分子筛作用。特点一,在分离蛋白质组成时具有高分辨率,可分离 pI 相差 0.01~0.02 单位的蛋白质。比如可将人

血清分出 40~50 条清晰的区带,特别适合于研究蛋白质微观不均一性。若某种蛋白质在 SDS-PAGE 中表现单一区带,而在等电聚焦电泳中表现三条带,这可能由于蛋白质存在单磷酸化、双磷酸化和三磷酸化形式。由于几个磷酸基团不会对蛋白质的分子量产生明显影响,因此在 SDS-PAGE 中表现单一区带,但由于它们所带的电荷有差异,所以在等电聚焦中可以被分离检测到。特点二,在测定未知蛋白质 pI 时具有高精度,精确度可达 0.01pH 单位。将一系列已知 pI 的标准蛋白及待测蛋白同时进行等电聚焦。测定各个标准蛋白电泳区带到凝胶某一侧的距离对各自的 pI 作图,绘制出标准曲线。在根据待测蛋白的距离,带入标准曲线即可推算出待测蛋白 pI。

7. 双向凝胶电泳 双向凝胶电泳是指利用蛋白质的带电性和分子量大小的差异,通过两次凝胶电泳达到分离蛋白质群的技术。第一向电泳是等电聚焦,混合物在一个直径 1mm 的玻管凝胶中根据等电点不同进行聚焦分离。聚焦后将凝胶条小心地从毛细管中取出,进行第二向电泳。第二向电泳是 SDS-PAGE,将之前的胶条放到另一平板凝胶的顶部(垂直板)或一端(水平板),蛋白质依据其分子量大小进行分离。这样,各蛋白质根据等电点和分子量差异而被分离。最后,凝胶上的蛋白点可以通过放射性标记或各种染色方法染色观察。这些染色方法包括考马斯亮蓝染色、银染和荧光染色。一般而言,如果之后要进行质谱检测,则应该采用考马斯亮蓝染色,但这种方法灵敏度不高;而采用银染法可以提高灵敏度。灵敏度最高的是放射自显影和荧光成像,这两种方法的检测限低至 200fg。可选择图像扫描装置扫描凝胶后获得双向电泳图谱,随后使用双向凝胶图像分析软件,比如 ImageMaster 进行分析。由于蛋白质等电点和分子量之间没有必然联系,因此双向凝胶电泳具有极高的分辨率。比如,细胞提取液的双向电泳可以分辨出 5000~10000 个斑点,这个数值接近于细胞总蛋白质数量。

双向凝胶电泳是获得细胞、组织或器官等蛋白表达图谱的主要手段,是蛋白质组学研究的核心技术之一。

8. 毛细管电泳 毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE),又叫高效毛细管电泳(high-performance capillary electrophoresis, HPCE),是近年来发展的新电泳方法。首批毛细管电泳仪于 20 世纪 80 年代末问世,至今不过十几年历史。它以高压电场为驱动力,以毛细管为分离通道(毛细管内可以是凝胶,也可是溶液),依据样品各组分淌度和分配行为上的差异来分离的一种分离技术。在电解质溶液中,带电颗粒在电场作用下,以不同速度向其所带电荷相反方向迁移。而此时双电层中的水合阴离子引起流体整体朝负极方向移动的电渗流。带电颗粒在电解质中的迁移速度等于电泳和电渗两种速度的矢量和。阳离子的移动方向和电渗流一致,最先流出;中性粒子的电流速度为零,其迁移速度等于电渗流速度;阴离子的移动方向和电渗流相反,但因电渗流速度一般都大于电泳速度,它将在中性粒子之后流出,从而实现分离。毛细管电泳兼有电泳和高效液相色谱两类分离技术的原理。毛细管电泳和一般电泳的区别是可以分离各种成分(带电与不带电),同时,在普通电泳中起破坏作用的电渗流在毛细管电泳中却变成了有效的驱动力之一。毛细管电泳与高效液相色谱的区别在于用高压电源取代了高压泵,改善了流动相在毛细管中的流型,用塞式流型替代了分析柱中的抛物线流型,使得各组分峰宽变窄(近似谱线),提高了分辨率。

毛细管电泳是一种高效、快速、微量、高灵敏度和可以自动化的新颖分离分析技术,极有发展前景,被广泛用于食品添加剂分析。随着不同领域研究的发展,尤其是生命科学的发展