

国家级实验教学示范中心
全国高等院校医学实验教学规划教材

供临床、预防、基础、口腔、麻醉、影像、药学、检验、护理、法医、中医等专业使用

生物化学实验指导

主编 孙玉宁



科学出版社

国家级实验教学示范中心
全国高等院校医学实验教学规划教材

供临床、预防、基础、口腔、麻醉、影像、药学、检验、护理、法医、中医等专业使用

生物化学实验指导

主 编 孙玉宁

副主编 姚 青 张 茜

编 委 (按姓氏笔画排序)

孙玉宁	芦晓红	杨 怡	李 岩
李 燕	李建宁	张 茜	张继荣
张淑雅	赵 薇	姚 青	顾银霞
高玉婧	黄卫东	裴秀英	

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

本书是按照五年制医学院校实用性人才培养要求编写的实验教材。全书共分两篇。第一篇为生物化学实验基础,包括生物化学实验的基本操作,常用实验技术,实验记录和实验报告书写要求等内容。第二篇为实验与学习指导,按照理论课章节进行编排,每一章由实验预习、知识链接与拓展、实验、复习与实践四个环节组成,将实验内容和理论紧密结合在一起。本教材实验内容不仅编入了生物化学教学中的经典实验,而且编入了一些综合性、设计性实验、分子生物学实验及科研成果的应用。既强调基本技能的锻炼,又突出科研能力的培养。

本书既可供医学院校本科各专业教学使用,也可作为研究生及从事相关专业研究人员技术参考书,作为医学生完成学业、考研和医师资格考试的参考书籍。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验指导 / 孙玉宁主编. —北京:科学出版社,2013.6
国家级实验教学示范中心·全国高等院校医学实验教学规划教材
ISBN 978-7-03-037635-0

I. 生… II. 孙… III. 生物化学—化学实验—医学院校—教学参考资料
IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 116138 号

责任编辑:王 颖 / 责任校对:郑金红

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

*

2013 年 6 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2013 年 6 月第一次印刷 印张:14 1/4

字数:336 000

定价:32.80 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

生物化学,即生命的化学,是一门从分子水平阐释生命现象与规律,揭示生命奥秘的科学。它是一门实验性很强的基础医学学科,是进一步学习其他基础医学课程和临床医学课程的必备基础知识。理论知识源于实验研究,生物化学实验是生物化学教学的重要组成部分。通过实验,可以让学生巩固和加深对生物化学基本理论的理解和记忆,掌握基本技术、基本技能,培养他们基本的科研思维以及分析问题、解决问题的能力。为适应教育部倡导的以科学发展观统领教育全局,进一步提高教学质量,培养符合现代医学模式和适应我国医疗、卫生发展需求的医学人才,建立以学生为中心的自主学习模式、加强终身学习能力和创新能力的培养,我们近几年对生物化学课程的理论及实验体系进行了改革,理论教学中开展案例式教学,加强与临床知识的衔接;实验教学方面,在原有实验教材的基础上,逐步开展现代分子生物学实验、加强科研成果在本科生实验中的应用与结合,为此编写《生物化学实验指导》。该教材中除了经典实验之外,增加了常用的分子生物学实验内容;同时增添了实验预习、知识链接与拓展、复习与实践等内容。

《生物化学实验指导》教材有两个方面的突出特点:首先,实验内容系统、全面,融合科研成果的应用。教材不仅编入生物化学教学中的经典实验,而且编入一些综合性、设计性实验以及分子生物学实验;同时还将我们科研中的一些研究成果应用在实验教学中。如重组基因克隆鉴定、重组蛋白的诱导表达等试验都渗入了我们科研中的一些研究成果。经过5年多的实践,我们体会到在实验教学改革和探索中,不仅在培养学生实验兴趣、动手操作的能力有很大程度的提高,而且在科研思维、科研能力的培养上也取得了非常满意的效果。其次,实验内容按照理论章节进行编排,将实验内容和理论紧密结合在一起。每一章由四个环节组成:即实验预习、知识链接与拓展、实验、复习与实践。实验预习环节是本章理论知识的高度凝练、概括和综合,便于学生复习和记忆,更重要的是有利于学生将理论和实验紧密结合,加深对具体实验原理的理解。知识链接与拓展环节融入了与本章有关的临床知识、案例以及现实生活中与生物化学知识相关的实例。针对临床病例,从生化知识的角度分析疾病发生的生化机制,并通过具体案例资料作为学生实践分析的材料,以达到学以用,基础与临床的早期结合。现实生活中的相关实例,如三聚氰胺的“毒奶粉事件”、“太空作物”、“转基因食品”等实例的介绍,以此加深学生对生化知识的理解、拓宽生化知识面,真正做到从课堂到临床,从课堂到现实生活等多方面对生物化学知识的理解和掌握。复习与实践环节编选了一些试题,包括选择题、名词解释、简答题和论述题,并给出了参考答案,便于学生复习和对知识的融会贯通。

本教材适用于临床、预防、基础、口腔、麻醉、影像、药学、检验、护理、法医、中医等本科及专科的生物化学实验教学;也可供医学院校生物化学教师、科研人员及研究生参考。本教材也可作为医学生完成学业、考研和医师资格考试的参考书籍。

衷心感谢所有参编人员为本教材编写付出的艰辛努力,以及所在单位的各级领导和有关部门热情鼓励和支持。

由于生物化学及技术发展迅速,内容涉及广泛,加之编者水平有限,书中有不足甚至错误之处,恳请广大读者批评、指正。

孙玉宁
2013 年 3 月

目 录

前言

第一篇 生物化学实验基础

第一章 概述	(1)	第三章 生物化学实验的基本操作 ...	(5)
第二章 生物化学实验常用标本的 制备	(3)	第四章 常用生物化学实验技术	(9)

第二篇 实验与学习指导

第五章 蛋白质的结构与功能	(16)	第二部分 知识拓展与链接	(100)
第一部分 实验预习	(16)	第三部分 实验	(103)
第二部分 知识链接与拓展	(19)	第四部分 复习与实践	(109)
第三部分 实验	(21)	第十一章 氨基酸代谢	(115)
第四部分 复习与实践	(34)	第一部分 实验预习	(115)
第六章 核酸的结构与功能	(39)	第二部分 知识链接与拓展	(116)
第一部分 实验预习	(39)	第三部分 实验	(119)
第二部分 知识链接与拓展	(41)	第四部分 复习与实践	(121)
第三部分 实验	(43)	第十二章 核苷酸代谢	(127)
第四部分 复习与实践	(48)	第一部分 实验预习	(127)
第七章 酶	(51)	第二部分 知识链接与拓展	(128)
第一部分 实验预习	(51)	第三部分 复习与实践	(129)
第二部分 知识链接与拓展	(53)	第十三章 物质代谢的联系与调节	(133)
第三部分 实验	(55)	第一部分 实验预习	(133)
第四部分 复习与实践	(62)	第二部分 知识链接与拓展	(136)
第八章 糖代谢	(69)	第三部分 复习与实践	(136)
第一部分 实验预习	(69)	第十四章 DNA 的生物合成	(142)
第二部分 知识链接与拓展	(72)	第一部分 实验预习	(142)
第三部分 实验	(74)	第二部分 知识链接与拓展	(144)
第四部分 复习与实践	(80)	第三部分 复习与实践	(146)
第九章 生物氧化	(87)	第十五章 RNA 的生物合成	(151)
第一部分 实验预习	(87)	第一部分 实验预习	(151)
第二部分 知识链接与拓展	(90)	第二部分 知识链接与拓展	(153)
第三部分 实验	(92)	第三部分 实验	(153)
第四部分 复习与实践	(94)	第四部分 复习与实践	(155)
第十章 脂类代谢	(98)	第十六章 蛋白质的生物合成	(160)
第一部分 实验预习	(98)		

第一部分 实验预习	(160)	第四部分 复习与实践	(189)
第二部分 知识链接与拓展	(161)	第二十章 血液的生物化学	(191)
第三部分 复习与实践	(162)	第一部分 实验预习	(191)
第十七章 基因表达调控	(167)	第二部分 复习与实践	(192)
第一部分 实验预习	(167)	第二十一章 肝的生物化学	(195)
第二部分 知识链接与拓展	(171)	第一部分 实验预习	(195)
第三部分 复习与实践	(171)	第二部分 知识链接与拓展	(196)
第十八章 细胞信号转导	(177)	第三部分 复习与实践	(197)
第一部分 实验预习	(177)	第二十二章 基因工程	(201)
第二部分 细胞信号转导相关知识 链接与拓展	(180)	第一部分 实验预习	(201)
第三部分 复习与实践	(181)	第二部分 知识链接与拓展	(201)
第十九章 癌基因、抑癌基因与生长 因子	(186)	第三部分 实验	(202)
第一部分 实验预习	(186)	第四部分 复习与实践	(212)
第二部分 知识链接与拓展	(187)	第二十三章 常用分子生物学技术 原理及其应用	(215)
第三部分 实验	(188)	第一部分 实验预习	(215)
		第二部分 复习与实践	(217)

二、生物化学实验记录和实验报告的书写

学生在进入实验室之前必须认真阅读实验指导,预习实验内容,熟悉实验原理所涉及的相关理论知识。实验课上要认真听老师讲解实验要求,独立或与实验小组其他成员协作完成实验内容,如实记录实验数据和现象,并独立完成实验报告。

实验报告是科学实验的忠实记录和总结,是锻炼学生分析问题能力的有效途径。也是对学生实验课学习成绩考查的参考。所以每次实验结束,应认真作好实验报告。

1. 实验记录 实验记录是实验过程的原始资料,也是书写实验报告的依据。实验者必须实事求是地记录实验过程中所观察到的真实结果和出现的问题。在判断所出现的结果时,务必客观,切忌掺入主观因素。不准无根据地涂改原始记录,确因记错而需纠正时,可将原错处轻轻划掉(不要涂抹,要使被划处仍可看清),然后加写正确的记录;也可保留原错处,而在其后或最后加以说明。

2. 实验报告 书写实验报告应字体端正,清楚易认。内容包括:实验题目,实验日期,基本原理,主要操作,实验结果(定量实验应包括计算公式及计算数据;对定性实验应有结论),讨论等。如实验中出现某些问题,应尽可能对出现的原因进行分析。

(裴秀英 孙玉宁)

第二章 生物化学实验常用标本的制备

一、全 血

全血是在取出人或动物的血液后,立即与适量的抗凝剂充分混合所得的抗凝血。每毫升血液需加抗凝剂的量如下:草酸钾或草酸钠 1 ~ 2mg;柠檬酸钠 5mg;氟化钠 5 ~ 10mg;肝素 0.1 ~ 0.2mg。通常先将抗凝剂配成水溶液,按所取血量的需要加于试管或其他合适的容器中,转动试管容器使成一薄层以使血液均匀的与抗凝剂接触,在 100℃ 以下烘干(若用肝素则干燥温度在 30℃ 以下)。

选择抗凝剂的种类视血液的不同用途而定。实验室中常用草酸盐作为抗凝剂,因为草酸盐溶解度大,用量少,性质稳定,价格低廉。柠檬酸盐对动物体无毒,故若需将抗凝血回注入动物体时,宜用柠檬酸钠抗凝。氟化物有抑制糖酵解作用,故测定血糖时可用氟化钠抗凝。但氟化钠也能抑制脲酶活性,故用脲酶测定尿素时不能用氟化钠抗凝。肝素是生理抗凝剂,较为理想,但价格较贵。抗凝的机理是从血中除去 Ca^{2+} 而防止血液凝固。

二、血 浆

血浆是指除血细胞之外的血液成分。制备血浆的方法是将抗凝全血在离心机中离心,使血细胞下沉,所得之上清液即为血浆。血浆制备的过程中应防止溶血,故要求在采取血液时所用的注射器、针头及试管或其他盛器等皆需清洁干燥,取得全血后也要避免剧烈振荡。

三、血 清

血清是血液凝固后所析出的草黄色液体。制备血清的方法是:采血后不加抗凝剂,在室温下使其凝固,通常经过 3h 血块即收缩析出血清。制备血清也要防止溶血,故所用设备必须干燥,且在血块收缩后及早分出血清。酶活性测定时常用血清而不用草酸盐或柠檬酸盐抗凝,可以避免这些物质对酶活性可能产生的影响。

四、无蛋白血滤液

在生物化学分析中,有时须避免蛋白质的干扰,常用蛋白质沉淀剂除去血液中的蛋白质。血液在加沉淀剂后离心或过滤所得的上清液或滤液即为无蛋白血滤液。常用的蛋白质沉淀剂有:钨酸、三氯乙酸等。实验室中以硫酸和钨酸钠作为蛋白沉淀剂,所得之血滤液常用于血糖、肌苷、非蛋白氮等成分的测定。用三氯乙酸作为蛋白沉淀剂制得的血滤液,酸性较强,利于磷、钙等溶解,常用于测定血清无机离子含量。

五、尿 液

尿液中含有肾脏排泄代谢的多种代谢产物。故一昼夜中尿液所含的化学物质的含量,往往随进食、进水、运动及其他情况而有所波动,所以若做定量测定时,应收集 24h 尿液。

收集的方法是:嘱患者排去尿液,记录时间,以此时间算起,收集至次日同一时间(即 24h)内的全部尿液。尿液应倒入有盖的清洁盛器中。收集完毕后,立即量出总量并记录,以便计算待测物质 24h 尿液的含量。临检测时,应将尿液混摇。然后取适量尿液测定。

视测定项目的需要,有时需收集定时尿液,即一天中某一时间的尿液。如早晨空腹排的晨尿,或作某种试验性测定时(如维生素排出测定),要在服药后数小时采集尿。为防尿液腐败变质,影响测定结果,应加适当的防腐剂。通常在测定含氮物质时,用甲苯做防腐剂,用量约为 5ml/L 尿液;而做激素的代谢产物及无机盐测定时,宜采用浓盐酸(5ml/L 尿液)做防腐剂。

(裴秀英 孙玉宁)

第三章 生物化学实验的基本操作

一、玻璃仪器的清洗

生化实验常用各种玻璃仪器,其清洁程度直接影响实验结果的准确性。因此,清洗玻璃仪器不仅是实验前后的常规工作,也是一项重要的技术性工作。清洗玻璃仪器的方法很多,需根据实验要求、污物的性质和沾污程度选用合适的清洁方法。

(一) 新购玻璃仪器的清洗

新购玻璃仪器,其表面附有碱质,可先用肥皂水刷洗,再用流水冲净后,浸泡于1%~2%盐酸中过夜;再用流水冲洗,最后用蒸馏水冲洗2~3次,干燥备用。

(二) 使用过的玻璃仪器的清洗

1. 一般玻璃仪器 如试管、烧杯、锥形瓶等,先用自来水冲洗后,用肥皂水或去污粉刷洗,再用自来水反复冲洗,去尽肥皂水或去污粉,最后用蒸馏水淋洗2~3次,干燥备用。

2. 容量分析仪器 吸量管、滴定管、容量瓶等,先用自来水冲洗,待沥干后,再用铬酸洗液浸泡数小时,然后用自来水充分冲洗,最后用蒸馏水淋洗2~3次,干燥备用。

3. 比色杯 用毕立即用自来水反复冲洗。洗不净时,用盐酸或适当溶剂冲洗,再用自来水冲洗。避免用碱液或强氧化剂清洗,切忌用试管刷或粗糙布(纸)擦拭。

上述所有玻璃器材洗净后,以倒置后器壁不挂水珠为干净的标准。

二、玻璃仪器的干燥

(一) 晾干

不急用的玻璃仪器洗净后,可沥尽水分,倒置于无尘的干燥处,让其自然风干。

(二) 加热烘干

一般玻璃仪器洗净并沥尽水分后,可置于电烘箱中烘烤,温度控制在105~110℃,烘烤1h左右。但带有刻度的量器不宜在高温下烘烤,有盖(塞)的玻璃仪器,如容量瓶、称量瓶等,应去盖(塞)后烘烤。

三、吸量管的种类及使用

(一) 吸量管的种类及用途

1. 奥氏吸量管 这类吸量管的特点是在同一容量的各类吸量管中,其容量表面积最小,故准确性最高。奥氏吸量管上只有一个刻度(图3-1),放液时残留于管尖的液体必须吹出。它常用于量取黏度较大的液体(如血液等),其规格有0.5ml、1ml、2ml、3ml、5ml等。

2. 移液管 又称移液吸量管。每根移液管上只有一个刻度(图 3-1),放液时任其自然流出后,让管尖接触容器内壁 15 ~ 30s,管尖残留液体不得吹出。其规格有 10ml、20ml、25ml、50ml 等。

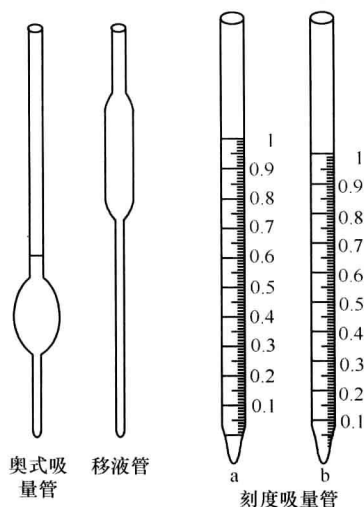


图 3-1 三类吸量管

a. 刻度不到尖端的吸量管; b. 刻度到尖端的吸量管

3. 刻度吸量管 这类吸量管带有许多分刻度,刻度标记有自下而上和自上而下两种,供量取 10ml 以下的任意体积的液体之用。其规格有 0.1ml、0.2ml、0.25ml、0.5ml、1ml、2ml、5ml 及 10ml。

刻度吸量管有两种类型(图 3-1):①全流出式刻度吸量管。此吸量管刻度标至尖端刻度容量包括液体流出的全部,放液时需将管尖残留液体吹出。这种吸量管上端有些标有“吹”字,有些则无。值得注意的是有些标有“快”字,表明此吸量管检校时,已校正过尖端残留液的误差,故不能吹出管尖残留液体。②不完全流出式刻度吸量管。此种吸量管上有零刻度,又有总刻度。使用时,以刻度为准,不能放液至最后的刻度线以下。

为了便于准确、快速地选取所需的吸量管,国际标准化组织统一规定,在刻度吸量管上方印有各种彩色环,以示容积区别(表 3-1)。

表 3-1 各标准刻度吸量管的色标和环数

	标准容量 (ml)									
	0.1	0.2	0.25	0.5	1	2	5	10	25	50
色标	红	黑	白	红	黄	黑	红	橘红	白	黑
环数	单	单	双	双	单	单	单	单	单	单

此外,不完全流出式吸量管还在单环或双环上方再加印一条宽 1 ~ 1.5mm 的同色彩环,以与完全流出式刻度吸量管相区别。

(二) 吸量管的使用方法

1. 执管 用中指和拇指拿住吸量管上部,食指按住吸量管上口以控制流速;刻度数字应对向操作者(图 3-2)。

2. 取液 将吸量管插入液体内(切忌悬空,以免液体吸入吸耳球内),用吸耳球吸取液体至所取液量的刻度上端 1 ~ 2cm 处,然后迅速用食指按紧吸量管上口,使管内液体不再流出。

3. 调准刻度 将已充满液体的吸量管提出液面,用滤纸片抹干管尖外壁液体,然后垂直提吸量管于供器内(管尖悬离供器内液面)。用食指控制溶液流至所需刻度,此时液体凹面、视线和刻度线应在同一水平面上,并立即按紧吸量管上口。

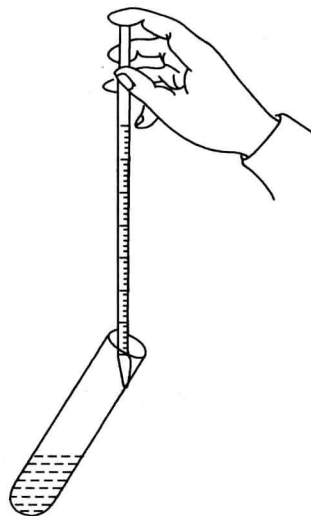


图 3-2 使用吸管的手势

4. 放液 放松食指,让液体自然流入受器内。此时,管尖应接触受器内壁,但不应插入受器内的原有液体之中,以免污染吸量管及试剂。

5. 洗涤 吸取血液、尿、组织样品及黏稠试剂的吸量管,用后应及时用自来水冲洗干净。如果吸取一般试剂的吸量管可不必马上冲洗,待实验完毕后,用自来水冲洗干净,晾干水分,再浸泡于铬酸洗液中。数小时后,再用流水冲净,最后用蒸馏水冲洗,晾干备用。

四、可调式移液器的使用

(一) 可调式移液器的结构

可调式移液器的结构见图 3-3。

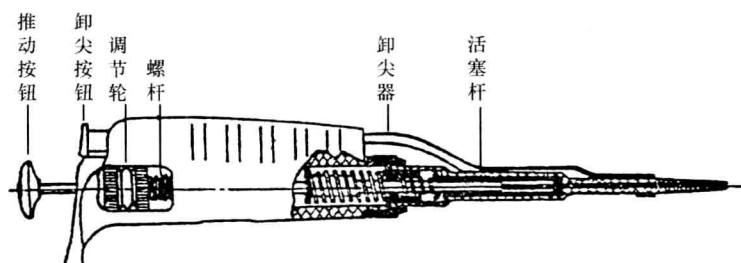


图 3-3 可调式移液器的结构

注意:推动按钮内部的活塞分 2 段行程,第一挡为吸液,第二挡为放液,手感十分清楚

(二) 操作

1. **调** 调整调节轮至所需体积值。
 2. **套** 套上枪头,旋紧。
 3. **握** 垂直持握可调式移液器,用大拇指按至第一挡。
 4. **插** 将枪头插入溶液,徐徐松开大拇指,使其复原。
 5. **擦** 将可调式移液器移出液面,必要时可用纱布或滤纸拭去附于枪头表面的液体,注意不要接触枪头孔口。
 6. **排** 排放时,重新将大拇指按下,至第一挡后,继续按至第二挡以排空液体。
- 注意:移取另一样品时,按卸尖按钮弃掉枪头并更换新枪头。

五、722 型分光光度计的使用

1. **预热** 打开电源开关,使仪器预热 20min。为了防止光电管疲劳,预热仪器时应将试样室盖打开,使光路断开。
2. **选定波长** 根据实验要求,转动波长手轮,调至所需要的波长。
3. **固定灵敏度挡** 在能使空白溶液很好地调到“100%”的情况下,尽可能采用灵敏度较低的挡,使用时,首先调到“1”挡,灵敏度不够时再逐渐升高。
4. **调节 T=0** 打开试样室盖,点击“0”旋钮,使数字显示为“00.0”。
5. **调节 T=100%** 将盛蒸馏水(或空白溶液)的比色皿放入比色皿座架中,对准光路,把试样室盖子轻轻盖上,点击透过率“100%”按钮,使数字显示正好为“100.0”。

6. 吸光度的测定 将盛有待测溶液的比色皿放入比色皿座架中的其他格内,盖上试样室盖,轻轻拉动试样架拉手,使待测溶液进入光路,此时数字显示值即为该待测溶液的吸光度值。读数后,打开试样室盖,切断光路。重复上述测定操作 1~2 次,读取相应的吸光度值,取平均值。

7. 关机 实验完毕,切断电源,将比色皿取出洗净,并将比色皿座架用软纸擦净。

六、离心机的使用

离心机种类很多。一般实验室具备的离心机是最大转速在 4000~5000r/min 台式或落地式离心机。本节主要介绍本实验室的 TGL-16G 高速台式离心机和 TDL-5-A 型台式离心机的使用。

(一) TGL-16G 高速台式离心机

(1) 将样品等量放置在试管内,并将其对称放入转头。

(2) 拧紧转轴螺母,盖好盖门,将仪器按上电源后,打开仪器后面的电源开关,此时数码管显示“0000”,表示仪器已接通电源。

(3) 如需调整仪器运行参数(运转时间和运转速度),可按功能键,使相应的指示灯亮,数码管即显示该参数值,此时可用“▲”及“▼”键相结合调整该参数至需要的值,并按记忆键确认储存。

(4) 按开始键启动仪器。仪器运行过程中数码管显示转速,当需要查看其他参数时,可按功能键,使该参数对应的指示灯点亮,数码管即显示该参数值。当仪器到达设定的时间或中途停机,停机过程中数码管闪烁显示转速,属正常现象。

(5) 设定最高转速:1 号转 16000r/min;2 号转 12000r/min。

(二) TDL-5-A 型台式离心机的使用

(1) 将离心管对称放置于编号相同模子内。

(2) 准确平衡。

(3) 对称放置、卡好。

(4) 盖好风罩、盖门。

(5) 按控制板面上的运转键,开始运转。待到设定时间后,离心机自动停止。运转过程中或转子未停稳的情况下禁止打开盖门,以免发生事故。

(6) 离心机一次运转时间不应超过 60min。

【思考题】

(1) 离心操作的关键是什么?如何才能做到?

(2) 若量取 5.15ml 液体,应选取哪种规格的刻度吸量管?

(裴秀英 李 燕)

第四章 常用生物化学实验技术

一、分光分析技术

分光光度法是利用物质在紫外或可见光区的分子吸收光谱,对物质进行定性分析、定量分析及结构分析的方法。按所吸收光的波长区域不同,分为紫外分光光度法(60 ~ 400nm)和可见分光光度法(400 ~ 750nm)。

用不同波长的光依次透过待测物质,并测量物质对不同波长的光的吸收程度(吸光度),以波长为横坐标,吸光度为纵坐标作图,就可以得到该物质在测量波长范围内的吸收曲线。这种曲线体现了物质对不同波长的光的吸收能力,也称为吸收光谱。吸收光谱通常由一个或几个宽吸收谱带组成。最大吸收波长($\lambda_{\max}$)表示物质对辐射的特征吸收或选择吸收,它与分子中外层电子或价电子的结构(或成键、非键和反键电子)有关。朗伯-比尔定律是分光光度法和比色法的基础。这个定律表示:当一束单色光穿过透明介质时,光强度的降低同入射光的强度、吸收介质的厚度及溶液的浓度成正比。用数学公式表达为:

$$A = \lg I_0/I = \varepsilon bC$$

式中的 A 叫做吸光度; I_0 为入射辐射强度; I 为透过吸收层的辐射强度; (I/I_0) 称为透射率 T ;式中 b 的单位为 cm , C 为物质的量浓度(mol/L), ε 是一个常数,叫做摩尔吸光系数,单位为 $\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。 ε 值越大,分光光度法测定的灵敏度越高。

分光光度计由 5 个部件组成(图 4-1):①光源。必须具有稳定的、有足够输出功率的、能提供仪器使用波段的连续光谱,如钨灯、卤钨灯(波长范围 350 ~ 2500nm),氘灯或氢灯(180 ~ 460nm),或可调谐染料激光光源等。②单色器。由入射、出射狭缝、透镜系统和色散元件(棱镜或光栅)组成,是用以产生高纯度单色光束的装置,其功能包括将光源产生的复合光分解为单色光和分出所需的单色光束。③样品室。供盛放溶液进行吸光度测量之用,分为石英池和玻璃池两种,前者适用于紫外到可见区,后者只适用于可见区。容器的光程一般为 0.5 ~ 10cm。④检测器,又称光电转换器。常用的有光电管或光电倍增管,后者较前者更灵敏,特别适用于检测较弱的辐射。近年来还使用光导摄像管或光电二极管矩阵作检测器,具有快速扫描的特点。⑤显示装置。这部分装置发展较快。较高级的光度计,常备有微处理机、荧光屏显示和记录仪等,可将图谱、数据和操作条件都显示出来。

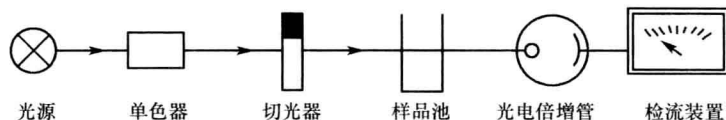


图 4-1 分光光度计的组成

分光光度法的应用范围包括:①定量分析,广泛用于各种物料中微量、超微量和常量的无机和有机物质的测定。②定性和结构分析,紫外吸收光谱还可用于推断空间阻碍效应、氢键的强度、互变异构、几何异构现象等。③反应动力学研究,即研究反应物浓度随时间而

变化的函数关系,测定反应速度和反应级数,探讨反应机理。④研究溶液平衡,如测定络合物的组成、稳定常数、酸碱离解常数等。

二、离心分离技术

离心分离技术是最常用的分离细胞组分和生物分子的方法,因为不同的细胞器和分子有不同的体积和密度,可在不同离心力的作用下沉降分离。离心力是指物体做圆周运动时形成的一种迫使物体脱离圆周运动中心的力。离心力的单位是 g , 即重力加速度 (980.66cm/s^2), 离心力的大小可根据离心时的旋转速度 V (r/min 每分钟转速, revolution per minute) 和物体离旋转轴中心的距离 r (cm) 按下式(1)计算:

$$g = r \times V^2 \times 1.118 \times 10^{-5} \quad (1)$$

或按式(2)计算所需的转速

$$V = (g \times 89\,445) / r \quad (2)$$

在离心场中物体所受离心力的大小,与物体离旋转轴中心的距离有关,离轴心越远,所受到的离心力越大,计算时通常采用平均距离。

根据离心机转速的不同常将离心机分为普通离心机(最高转速 4000r/min), 高速离心机(最高转速 20000r/min) 和超速离心机(最高转速 60000r/min 以上)。

制备离心技术包括两种方法:一种是分级离心法;另一种是密度梯度离心法。

(一) 分级离心法

分级离心法是基于粒子沉降速度不同而分离的方法。非均一的粒子悬浮液在离心机中离心时,各种粒子以各自的沉降速度移向离心管底部,逐步在底部形成一层沉淀物质。为了分出某一特定组分,需要进行一系列离心。通常先选择一个离心速度和离心时间,进行第一次离心,把大组分不需要的大粒子沉降去掉。这时所需要的组分大部分仍留在上清里,然后将收集到的上清液用更高的转速离心,把需要的粒子沉积下来。倾去上清,再把沉淀悬浮起来,用较低转速离心。如此反复高速、低速离心,直至达到所需粒子的纯度为止。

(二) 密度梯度离心法

密度梯度离心可以同时使样品中几个或全部组分分离,具有很好的分辨能力。这种方法是把样品粒子在一个密度梯度介质中离心。这个介质由一适合的小分子和样品粒子可在其中悬浮的溶剂组成。离心时,离轴心越远介质密度越大。密度梯度离心法可分为速率区带离心技术和等比重技术。

三、层析技术

层析技术是利用待分离的混合物中不同组分的理化性质及生物学性质的差异将各组分分离的一种物理学方法。在层析分离系统中有两个相:一个是固定不动的,称为固定相;另一个是沿着固定相流动的,称为流动相。待分离的混合物中,不同组分在两个相的分布不同,它们以不同速度在各个相移动,如此则可把各组分分开。

层析也称色谱分离或色层析。层析分离有多种方法,根据工作原理的不同,可分为吸附层析、分配层析、分子筛层析、离子交换层析及亲和层析等;也可根据支持物的不同,分为

氧化铝吸附层析、纸层析、薄层层析、凝胶层析等。层析技术由于设备简单,既可分离大样品,也可分离实验室规模的小样品,而且具有满意的分离效果,因此在生产和实验研究中应用很广。这里只着重介绍凝胶层析和离子交换层析的基本原理。

(一) 凝胶层析

当用洗脱液(流动相)对装填着凝胶(固定相)的层析柱进行洗脱时,样品混合物即随洗脱剂流经固定相。此时其中的物质由于分子大小不同,在固定相上的阻滞作用也将有所差异,因而流出层析柱的速度各不相同,混合物中各物质随即被分离。这种分离物质的手段称为凝胶层析(gel chromatography)。

凝胶类物质的特点是具有水不溶性,同时具有多孔的网状结构。在实际操作中,把合适的凝胶颗粒装填在层析柱内(玻璃或塑料制品),再把待分离的混合物自柱顶加入,然后用合适的洗脱液进行洗脱。在洗脱过程中,混合物中各物质主要依据分子的大小进行层析分配。分子量大的物质,因分子的直径较大,不能进入凝胶颗粒的网孔内,而被排阻在凝胶颗粒外部,即只分布在凝胶颗粒的间隙中,沿着这些间隙流动。这样,它们流速较快,在洗脱液的“冲洗”下,先被洗出柱外。那些分子量小的物质,因分子的直径较小,能够进入凝胶颗粒的网孔,即被滞留在凝胶颗粒内部。在洗脱过程中,这些较小分子的洗脱行为是先在孔隙中间扩散,然后进入凝胶颗粒内部,再被洗出至孔隙,再进入颗粒内部。如此不断的出入和出入,直到这些物质被洗出柱外。由于洗脱的“路径”较长,因而它们被后洗脱出来。总之在洗脱液的洗脱下,混合物中分子量最大的物质最先出柱,分子量最小的物质最后出柱;介乎中间的物质,则分子量越大洗出越快,分子量越小洗出越慢。这样,不同的物质就被分离。这种分离过程,有如筛孔过滤,所以被称为凝胶过滤或分子筛层析。

葡聚糖凝胶层析过程见图 4-2。

在实际工作中,应用较广的是天然琼脂糖凝胶和人工合成的交联葡聚糖凝胶。前者的商品名为 Sepharose,后者为 Sephadex,均为瑞典产品。目前我国已有部分类似产品供应。

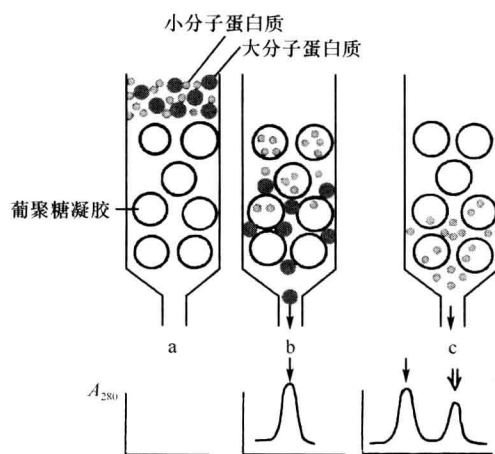


图 4-2 葡聚糖凝胶层析过程示意图

(二) 离子交换层析

离子交换层析(ion exchange chromatography)是溶液中待分离的离子,与静电结合在不溶性支持介质(离子交换剂)的离子进行可逆交换,从而把不同的物质分离开来的层析方法。离子交换层析通常是在层析柱上进行。离子交换层析分离物质的基本原理是:不同物质的极性不一,混合物中各离子和离子交换剂功能基团(活性基团)的亲合力各异,因此与洗脱液中带有同样电荷的离子的交换速度不同,被洗脱下来的速度也就有所差异,从而被相互分离开来(图 4-3)。

离子交换剂现今多采用人工合成树脂。树脂为一类水不溶的高分子聚合物,具有多孔网状结构,便于离子进出(吸附和解吸)而进行交换。用于蛋白质等生物大分子的离子交换