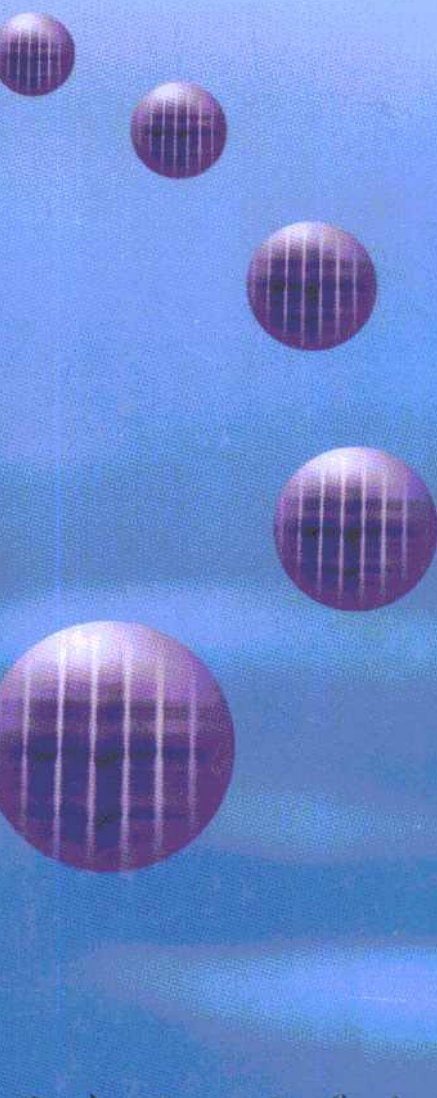




生物化学 实验技术教程

主 编 赵亚华

副主编 高向阳



华南理工大学出版社

生物科学与工程系列教材

生物化学实验技术教程

主 编 赵亚华

副主编 高向阳

华南理工大学出版社

·广州·

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验技术教程/赵亚华主编,高向阳副主编.—广州:华南理工大学出版社, 2000.8

生物科学与工程系列教材

ISBN 7-5623-1560-4

I. 生…

II. ①赵…②高…

III. 生物化学-实验-高等学校-教材

IV. Q5-33

华南理工大学出版社出版发行

(广州五山 邮编 510640)

责任编辑 胡 元

各地新华书店经销

广州市新明光印刷有限公司印装

*

2000年8月第1版 2000年8月第1次印刷

开本: 787×1092 1/16 印张: 15.5 字数: 378千

印数: 1—3500册

定价: 25.00元

前 言

生物化学实验原理、方法和技术是生命科学等诸多学科的重要研究手段，也是生物技术、农学类本专科学生必修的基础实验课程。它不仅是生物化学课程教学重要的组成部分，而且在培养学生分析和解决问题的能力、严谨的科学态度和独立工作的能力方面，有着不可替代的作用。为适应我国高等农业院校生物类教育改革和发展的需要，我们教研室根据多年来生化实验的教学经验和生化学科发展的趋势，在原有校内使用教材的基础上组织力量编写了这本教材。

按照农业院校所设专业教学计划的安排，并充分考虑各个实验室实验设备的现状以及学科发展的需要，本书主要以容易采摘及获得的动、植物材料为研究对象，围绕各类生物大分子的分离和测定，安排了一系列不同层次的实验项目，重点突出层析、电泳、比色等常用的生化实验技术，所用的多为普通生化实验设备，一般无需大型精密仪器。所选实验均系多年来在教学和科研中较为成熟的实验方法，适合初学者使用。同时在实验选择上充分考虑到农业院校不同层次学习者的需要，安排了一定比例的提高型实验，供高年级本科生和硕士研究生使用。

本书主要内容包括四大部分：①生化实验原理与方法概论，概述生化实验原理与方法的基本内容；②基础生化实验部分，汇编了 31 个基础生化实验，主要作为基础生化实验课的教材；③高级生化实验部分，包括蛋白质、核酸、酶等生物大分子的分离纯化、鉴定以及部分分子生物学基本实验，这一部分主要是为学习生物化学与分子生物学研究技术与方法的学生编写的；④附录部分，汇集了生化与分子生物学实验中经常遇到的各类数据资料，以备查阅。

本书基础生化实验部分，以动物组织为实验材料的实验由巫光宏编写，以植物组织为实验材料的部分由何平编写；第三部分生物大分子物质分离、纯化部分由高向阳编写；第一部分的绪论和第三部分的分子生物学实验由赵亚华编写；最后由赵亚华进行全书的统稿以及附录的编辑工作。为了减少不必要的重复，凡是相同的实验原理、操作等，力争集中在一个实验中叙述清楚，其余实验中只注明参阅该实验。为了方便教辅人员准备实验，在每个实验中较详细地列出了实验所需试剂及其配制，并按实验小组列出所需各类仪器。

本书在编写过程中，得到了本教研室徐风彩教授、黄卓烈教授、赵赣老师的大力支持与指导，詹福建老师参与了部分电脑处理工作，一并表示衷心的感谢。

尽管我们主观上希望本书能够较好地体现农科院校的特色，满足教学之需，但由于时间仓促，加之水平有限，书中不足之处在所难免，竭诚希望读者不吝赐教。

编 者

2000 年 8 月

第1章 生物化学实验原理与方法概论

生物化学的实验研究基于千差万别的生物在分子水平上的统一性。细胞是生物的基本结构单位和功能单位，各种生物的细胞含有许多共同的化学组成、共同的代谢途径和共同的细胞调控机制，如不同来源的蛋白质由20种基本氨基酸组成，DNA由4种脱氧核苷酸组成，生物大分子（核酸、蛋白质、酶、糖类、脂类的统称）合成和降解途径中中间产物和酶的功能都极其相似。因此，用一种生物材料进行生物化学实验所获得的知识，可以推知其他生物（包括人）体内的分子机理。

对上述细胞组分、中间产物和调控因子进行生物化学研究的第一步一般是选取合适的生物材料、破碎细胞，将目的物提取、分离和纯化出来，然后再根据实验目的，综合利用各种生物化学分析技术和检测方法研究其化学性质和生物学特性。本章将主要从分离纯化的角度简要介绍这些生物化学分析技术，并对实验材料的准备、目的物提取和分离纯化技术以及生物化学检测技术等几个方面作简单的介绍。

一、生物化学实验常用的生物材料

1. 一般材料

生物化学实验常用的生物材料分为天然生物材料和人工生物材料两大类。天然生物材料一般是在自然界易采集的、目的物含量较高的生物个体、器官或组织。如禾本科作物种子萌发期间，淀粉大量水解，淀粉酶含量丰富，可作为提取淀粉酶、进行生物化学实验的材料。再如小麦黄化幼苗细胞分裂旺盛，DNA容易提取和纯化，且不受叶绿素的干扰，适宜用作核酸生物化学与分子生物学实验的材料。

人工生物材料种类繁多。生物科学从群体、个体到分子水平有很多分支，生态学、植物分类学、动植物育种学和发酵工程学等细胞水平以上的科学领域的研究工作，为以破碎细胞在分子水平上进行深入研究为特点的生物化学实验准备了大量的基础性实验材料。

2. 新品种材料

遗传变异和自然选择使生物具有高度的多样性。分类学家发现的新物种和育种学家培育和找到的具有优良性状的新品种和野生种，不断为包括生物化学在内的整个生命科学提供新的生物实验材料。

随着生物技术的发展，分子育种技术和经典育种技术相结合将产生越来越多的自然界并不存在的新物种。生物化学实验技术将成为在分子水平上研究这些新物种材料的主导研究方法。

3. 组织培养

植物细胞全能性的发现和组织培养技术的发展，使植物器官、组织和细胞的离体培养繁殖在越来越多的物种中获得成功。特别是植物细胞培养，由于广泛采用了微生物遗传学的方法进行操作，产生了大量生化突变型细胞，这些细胞及其愈创组织，甚至由其繁育成

功的植株个体，是生物化学研究不可缺少的新型材料。

4. 血液样品

收集动物或人的血液是动物生化最常用的实验材料。在收集时应使用干燥、洁净的器皿，以防溶血。

(1) 全血：取出血液后，迅速盛于含有抗凝剂的干燥试管内混匀（注意避免激烈振荡），即得全血。

常用的抗凝剂有草酸盐、柠檬酸盐、氟化钠、肝素等，需根据实验的要求而定，一般情况下使用廉价的草酸盐。抗凝剂的使用量不宜过多，通常每毫升血液加 1~2mg 草酸盐、或 5mg 柠檬酸盐、或 5~10mg 氟化钠、或 0.01~0.2mg 肝素。可将抗凝剂配成适当浓度的水溶液，然后取 0.5mL 放在收集血的小试管中，横放蒸干（用肝素为抗凝剂时，蒸干温度不超过 30℃），备用。

(2) 血浆：全血离心后的上清液即为血浆。

(3) 血清：不加抗凝剂的血液在室温下自行凝固后，约需 3h 可分离出血清，也可离心分离以缩短时间。应及早分离血清以避免溶血。

(4) 无蛋白血滤液：分析血液中某些成分时，要避免蛋白质的干扰，故需预先除去血中的蛋白质成分，制成无蛋白滤液。可以根据实验的特殊要求选用不同的蛋白沉降剂，常用的蛋白沉降剂有钨酸、三氯乙酸和氢氧化锌。

动物生化实验材料常见的还有肝脏、肌肉、尿液等，可根据不同的实验要求进行不同的处理。

5. 丙酮干粉的准备

在分离、提纯或测定某种酶的活力时，丙酮干粉法是常用的有效方法之一。将新鲜材料打成匀浆，放入布氏漏斗，按匀浆质量缓慢加入 10 倍在低温冰箱内冷却到 -15~-20℃ 的丙酮，迅速抽气过滤，再用 5 倍冷丙酮洗 3 次，在室温下放置 1h 左右至无丙酮气味，然后移至盛五氧化二磷的真空干燥器内干燥。丙酮干粉的制备一般要求在低温下完成，所提丙酮干粉可长期保存在低温冰箱。用这种方法能有效地抽提出细胞中的物质，还能除掉脂类物质，免除脂类干扰，而且使得某些原先难溶的酶变得溶解于水。

二、生物分子提取的一般原则

提取是在分离纯化前期，将样品研磨（样品可以是新鲜的、冰冻的或 80℃ 烘干粉碎的材料），把破碎的细胞置于一定的溶剂（提取液）中，使某一类待提取目的物释放到提取液中的过程。提取的难易程度决定于目的物与其他细胞组分的结合强度及其在提取液中的溶解程度。

生物分子可分为生物小分子类物质（如氨基酸、丙酮酸等）和生物大分子（如蛋白质、核酸等）。前者的结构由较强的共价键决定；而后的结构（特别是功能结构）中除较强的共价键外，还含有较弱的共价键和次级键（氢键、离子键和疏水键的统称），故需要温和的条件才能保证生物大分子的活性不被破坏。因此，这两类生物分子的提取液成分和操作条件差别很大。

1. 破碎细胞

如果所需目的物存在于细胞内，就必须破碎细胞，使目的物从细胞中全部释放出来。

破碎细胞的方法很多，如表 1-1 所示。

表 1-1 破碎细胞的方法

方法/设备	举例	原理
温和方法		
细胞溶解	红细胞	渗透破碎细胞
酶降解	溶菌酶处理细菌	消化细胞壁
化学溶解/自溶	甲苯抽提酵母	部分化学溶解细胞壁
手动匀浆器	肝组织	迫使细胞通过窄缝撕开细胞膜
研磨	肌肉组织	研磨产生的剪切力破坏细胞
较剧烈方法		
韦林氏捣切器 (Waring 型)	大多数动物组织和植物组织	切削作用和剪切力破坏细胞
用磨料研磨(砂、氧化铝)	植物组织和细菌	微小粗糙表面化破坏细胞壁
剧烈方法		
压榨机 (French press)	细菌和植物细胞	迫使细胞在高压下通过小孔，剪切力破坏细胞
超声作用	细胞悬浮液	剪切力和空化作用破碎细胞
振动玻璃球	细胞悬浮液	与玻璃球一起迅速振动，撕开细胞壁
Manton-Gaulin 匀浆器	细胞悬浮液	原理与 French press 一样，可用于大规模操作

根据实验材料的性质，选择适当的细胞破碎的方法。例如：肝、脑、肾、脾等软组织，容易破碎，可以用匀浆机研磨；肌肉不易破碎，可以先用绞肉机绞碎，然后用组织捣碎机粉碎；血细胞、细胞膜脆弱，可以用低压渗透法破碎。

完全破碎酵母和细菌细胞，应用法兰西压榨机 (French press)，此仪器适用于少量细胞的破碎；破碎大量细胞可用 Manton-Gaulin 匀浆器，每千克细胞加 2L 缓冲液。这两种设备可使细胞在非常高的压力（约 800Pa）下通过一小孔，利用产生的机械剪切力破碎细胞。另一种方法是用振动研磨机，细胞与直径 0.5~1mm 的玻璃球一起剧烈振荡，此法非常迅速有效。对少量生物细胞（几百毫升）可用超声波破碎细胞。革兰氏阳性菌细胞壁易被溶菌酶消化，在 37℃ 短时间（如 15min）即可溶解细胞壁。对革兰氏阴性菌，则预先用非离子型去污剂（如 Triton X-100）、巯基乙醇和甘油处理细胞，可加强溶菌酶作用的有效性。如果同时加入脱氧核酸酶 I（10 μ g/mL），可使溶液粘度降低，从而提高抽提液的质量。

细胞的破碎程度如何，可以用下列方法检查：

- (1) 用显微镜直接观察细胞破碎的数目；
- (2) 用分度管检查，将破碎细胞的悬浮液装于分度管中，离心 3min，未碎的完整细胞首先沉降，在它上面是细胞碎片，再上面是细胞质部分。每一层的相对含量即表示细胞的破碎程度。

2. 生物小分子类物质的提取

为了使目的物充分地从其细胞组分中释放出来,可采用较剧烈的条件,如转移到烧杯中直接煮沸,或转移到三角瓶中热水浴加温,或剧烈搅拌等。为了增加目的物在提取液中的溶解度,可以改变提取液的组成。

考虑提取液的组成时首先要遵从相似相溶原理。一般来说,极性目的物易溶于极性提取液中,非极性目的物易溶于非极性提取液中。其次,pH值影响目的物的解离状态,离子化合物都溶于水,非解离的分子状态的目的物易溶于有机溶剂,所以,当酸性物质处于低pH值或碱性物质处于高pH值时,都可以转溶于有机溶剂。但两性物质氨基酸在等电点以外的任何pH值处均呈解离态,故氨基酸一般不用有机溶剂提取。目的物与提取液组成之间的关系见表1-2。

表 1-2 目的物与提取液组成之间的关系

目的物	生物材料	提取液组成
游离氨基酸	绿豆芽下胚轴	80%乙醇溶液
还原糖	面粉	蒸馏水
总糖	面粉	6mol/L HCl 溶液
可溶性糖	苹果	80%乙醇溶液
维生素 A	植物鲜样品	乙醚溶液或乙醇溶液
维生素 C	植物鲜样品	2%草酸溶液
淀粉	面粉	醋酸氯化钙溶液
总蛋白	面粉	0.4mol/L NaOH 溶液

经过上述破碎细胞、提取液溶解和促进释放的操作后,生物小分子目的物便可最大限度地存在于提取液中,最后经过滤或离心除去残渣,得到含目的物的粗提液。

在分析性生化实验中,如果目的物与后续生化分析中所用分析试剂(如显色剂)反应的专一性程度高,受其他杂质的干扰少,则不需进一步纯化,便可直接用粗提液进行生化分析。在制备性生化实验中,必须将粗提液用抽提、浓缩和沉淀的方法处理,必要时综合利用其他有机化学的方法才能制成高纯度的样品。

3. 生物大分子的提取

(1) 蛋白质和酶的提取

蛋白质在不同提取液中的溶解度差异主要取决于蛋白质分子中极性基团和非极性基团的比例,其次取决于氨基酸的顺序,故在一定的外界条件下,蛋白质分子的结构特性决定了它在一定溶剂中的溶解度。表1-3列举了一些蛋白质的溶解性质,这对配制特定蛋白质的提取液具有一定的指导意义。

由表1-3可见,大部分蛋白质都能溶于水、稀盐、稀酸和稀碱溶液,故蛋白质的提取液一般以水为主,再加上少量酸、碱或盐。这是因为少量离子的作用,可以减少蛋白质分子极性基团之间的静电引力,加强蛋白质与提取液之间的相互作用,从而促进溶解。常用的酸、碱、盐有磷酸缓冲液、碳酸缓冲液和NaCl溶液。缓冲液pH值的选择应首先保证在蛋白质的稳定范围之内,选择在偏离等电点的两侧,使蛋白质分子带上净电荷,以增大其溶解度。用盐提取时,常用NaCl的等渗溶液。

表 1-3 不同结构的蛋白质及其溶解性质

蛋白质类别	溶解性质
简单蛋白质 白蛋白 球蛋白 真球蛋白 拟球蛋白 醇溶蛋白 壳蛋白 精蛋白 组蛋白 复合蛋白质 (包括糖蛋白、核蛋白、脂蛋白、血红蛋白、金属蛋白、黄素蛋白)	溶于水及稀盐、稀酸、稀碱溶液，可被 50% 饱和度的硫酸铵析出 一般在等电点时不溶于水，但加入少量的盐、酸或碱则可溶解 溶于水，可被 50% 饱和度的硫酸铵析出 溶于 70%~80% 乙醇溶液中，但不溶于水及无水乙醇中 在等电点时不溶于水，也不溶于稀盐液，易溶于稀酸、稀碱溶液 溶于水和稀酸，易在稀氨水中沉淀 溶于水和稀酸，易在稀氨水中沉淀 此类蛋白质的溶解度性质随蛋白质与非蛋白质部分的不同而异。 除脂蛋白外，一般可溶于稀酸、稀碱及盐溶液中。脂蛋白如脂肪部分露于外，则脂溶性占优势；如脂肪部分被包围于分子中，则水溶性占优势

少部分和脂质结合得比较牢固的蛋白质或含脂肪族氨基酸较多的蛋白质，难溶于水，常用高浓度的有机溶剂（如 70%~80% 乙醇溶液）提取。有时也用一定浓度的表面活性剂提取这类蛋白质，但效果有限。

酶是一种蛋白质，可参照上述原则提取。但在酶活性的生化分析实验中，提取液成分和操作条件两方面都必须保证酶功能机构的稳定。首先，提取液应为偏离等电点的 pH 缓冲液，其中的离子强度必须适中，以维持酶结构的稳定；同时应加入少量巯基乙醇（有时可用半胱氨酸或谷胱甘肽代替），以防止酶分子中的巯基氧化和植物材料中的酚氧化；必要时还应加入 EDTA 以络合使酶失活的重金属离子。其次，整个操作过程一般应在 0~4℃ 下进行；搅拌速度应缓慢，以免产生气泡，导致酶失活。

(2) 核酸的提取

核酸分为 DNA 和 RNA 两类。DNA 是细胞内最重要的生物大分子，提取、分离纯化 DNA 是研究基因结构与功能的前提。DNA 的提取方法很多，目前一般是先把细胞破碎（植物细胞可先用液氮冻融，以改善匀浆效果），将 DNA 核蛋白（在细胞内，DNA 与蛋白质结合在一起以核蛋白的形式存在）及其他物质释放出来，再根据 DNA 核蛋白溶于高盐（1~2mol/L NaCl 溶液）、难溶于低盐（0.14mol/L NaCl 溶液）溶液，而 RNA 核蛋白易溶于 0.4mol/L NaCl 溶液这一原理进行提取。先用 0.14mol/L NaCl 溶液除去 RNA 核蛋白，再用 SDS（十二烷基硫酸钠）处理，使 DNA 与蛋白质分离，并用浓 NaCl 溶液溶解 DNA，再用酚、氯仿、异戊醇的混合液（体积比 25:24:1）将蛋白质除去，最后向 DNA 溶液中加入乙醇溶液，便沉淀出 DNA 丝状物。

RNA 的提取方法也有多种。实验室常用乙醇提取法：将组织匀浆后用苯酚处理并离心，RNA 即溶于上层被苯酚饱和的水层中，而 DNA 和已凝固的蛋白质则分布于下层为水饱和的苯酚中，将上清液吸出，加入乙醇溶液，RNA 呈白色絮状沉淀析出。

另外，在工业上提取酵母 RNA 时，常用碱液提取或盐液提取。

三、生物化学的分离、纯化、分析技术概述

上述从细胞中提取出来的目的物是不够纯的，必须经过进一步分离纯化才能获得高纯度样品。生物小分子目的物粗提液含有多种异类物质，可综合利用有机化学的方法加以纯

化。蛋白质和核酸等生物大分子本身种类繁多，在其粗提液的杂质中不仅含有异类物质，而且还含有同类物质。对于异类物质，如提取蛋白质时含有核酸，或提取核酸时含有蛋白质，一般可用专一性酶水解、有机溶剂抽提或选择性沉淀等方法加以除去；而对于同类物质，如酶中的杂蛋白、RNA 中的 DNA，以及不同结构和构象的蛋白质、酶和核酸之间的分离纯化，则要复杂得多，涉及一系列生化分离纯化技术。这里概要介绍基础生物化学实验中常用的分离纯化技术原理。特别值得注意的是，除盐析和透析外，这些分离纯化技术同时也是常用的生化分析技术。

1. 盐析和透析

盐析和透析是蛋白质或酶分离纯化前期常用的方法，是一种由提取到分离纯化的衔接技术。

向蛋白质提取液中加入中性盐，达到一定的饱和度，使目的蛋白质析出的方法称为盐析。其原理是高浓度盐离子的存在降低了水的活度，中和了蛋白质表面的电荷，破坏了包围蛋白质分子的水膜，导致蛋白质溶解度降低而析出。最常用的中性盐为硫酸铵，其价格低廉，溶解度大，不易引起蛋白质变性。在一定 pH 值和温度条件下改变硫酸铵浓度，可将不同结构的蛋白质盐析出来，从而实现不同蛋白质之间的初步分离纯化。

盐析出来的蛋白质，需通过脱盐以除去硫酸铵等盐类物质。最常用的脱盐方法是透析。透析时，先把蛋白质溶液装入透析袋中，系紧两端后放入装有蒸馏水或缓冲液的透析缸内。由于透析袋只能透过小分子物质，而把蛋白质或酶等大分子物质滞留在内，故不断更换蒸馏水或缓冲液可将盐类等小分子杂质透析掉。

2. 离心技术

离心是指将悬浮于溶剂中的样品装入离心管中，施加一定的离心力，样品中的各溶质颗粒由于大小、形状和密度的差异而彼此分离。它分为制备性离心和分析性离心两类。生化实验中的制备性离心主要用于后续研究制备特定的细胞内容物样品，而分析性离心主要用于检测生物大分子的纯度，以及分析它们的化学性质和生物学特性。基础生化实验主要使用制备性离心技术。几种常见制备性离心技术的一些性质列于表 1-4。

表 1-4 几种常见的制备性离心技术及其性质

名称	最大转速 (r/min)	最大离心 场强 ($\times g$)	转子的温度控制	沉降分离物	注意事项
低速离心	4 000~6 000	3 000~7 000	室温，但长时间离心温度升高	快速沉降物如酵母、真核细胞、细胞壁碎片和粗沉物等	注意样品热变性和离心管平衡
低速冷冻离心	6 000	6 500	转子位于冷冻室中		
高速冷冻离心	25 000	60 000	转子位于冰冻室中	微生物、较大细胞器（如叶绿体）和硫酸铵沉淀等	离心管的精确平衡
制备性超速离心	80 000	600 000	转子位于真空密闭冷冻室内，以避免相对空气流的升温作用	病毒、小细胞器（如核糖体）等	离心管的精确平衡

由表 1-4 可见，随着离心场场强的增加，被分离的溶质颗粒越来越小。因此，一方面可综合应用这几种离心技术，通过分级差速离心将样品中的各个溶质组分离心出来。例如，将植物组织匀浆后，用尼龙纱布过滤，滤液在 $200\times g$ 下离心 5min，弃沉淀，上清液

再在 $1000 \times g$ 下离心 10min, 可获得叶绿体沉淀; 上清液再在 $10\,000 \times g$ 下离心 20min, 可获得线粒体沉淀; 上清液再在 $10\,000 \times g$ 下离心 10h, 可获得核糖体沉淀。更小的溶质颗粒则要冰冻超速离心或加大离心介质的密度才能制得。

另一方面, 在每一级离心中, 要获得较纯的目的物沉淀, 需反复进行悬浮离心。第一次离心时, 由于物质之间的吸附作用, 一部分较小的溶质会同该级离心的目的物一起沉淀。这样既影响了目的物的纯度, 又影响了下一级离心组分的得率。但反复悬浮离心的次数不能太多, 太多了影响本次离心目的物的得率, 一般 2~3 次即可。

用密度更大的介质代替溶剂作离心介质, 可大大提高离心技术对溶质的分离纯化能力, 甚至可以用于直接分离纯化和分析生物大分子。常见的有沉降平衡法和沉降速度法。前者主要用于大小相近、密度差别较大的生物大分子之间的分离和分析; 后者主要用于密度相近、大小差别较大的生物大分子之间的分离和分析。这两种方法都需要先用介质 (如蔗糖和氯化铯) 在离心管中制备一个连续的密度梯度溶剂。

(1) 沉降速度法

沉降速度法又叫速度-区带离心法。在待沉降分离的样品中, 各种分子密度相近而大小不等时, 它们在密度梯度的介质中离心, 将按自身大小所决定的沉降速度下沉。所谓沉降速度是指单位时间内样品分子在管中下降的距离, 大小相同的分子以相同的沉降速度下沉, 形成清楚的沉淀界面。当离心样品中含有几种大小不同的颗粒时, 就会出现几个沉降界面, 用特殊的光学系统可以观测这些沉降界面的沉降速度。

单位离心场中的沉降速度叫沉降系数, 单位用 s 表示。沉降系数常用来表示生物大分子及生物超分子复合物的大小。核酸、核糖体、病毒等的沉降系数通常介于 $1 \times 10^{-13} \sim 200 \times 10^{-13}s$ 之间。为方便使用, 将 $10^{-13}s$ 作为一个单位, 用 S 表示, 以纪念对超速离心技术作出重大贡献的科学家 T.Svedberg。因此, $10^{-13}s$ 称做斯维得贝格 (Svedberg) 单位。例如 tRNA 分子的大小约为 $4S$, 即沉降系数约为 $4 \times 10^{-13}s$ 。

(2) 沉降平衡法

此法又叫等密度梯度离心法, 其中常用的 CsCl 密度梯度平衡离心法主要用于分子大小相同而密度不同的核酸的分离、纯化和研究。各待分离的核酸成分在离心过程中分别漂浮于与自身密度相等的某一 CsCl 溶液密度层中, 此密度层称做该组分的浮力密度。例如用此法很容易将不同构象的质粒 DNA、RNA 及蛋白质分开: 蛋白质漂浮在最上面, RNA 沉于管底, 超螺旋质粒 DNA 沉降较快, 开环或线形 DNA 沉降较慢, 如图 1-1 所示。收集各区带的 DNA, 经抽提、沉淀, 可得到纯度较高的 DNA。

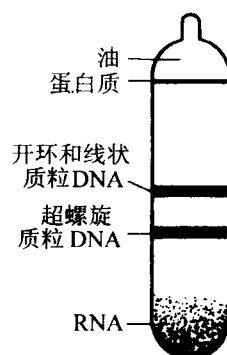


图 1-1 经超速离心后质粒 DNA 在管中的分布

3. 层析技术

层析技术利用混合物中各组分物理化学性质 (如吸附力、分子形状与大小、分子极性、分子亲和力、分配系数等) 的差别, 使各组分不同程度地分布在两相中。其中一个相被固定在一定的支持介质上, 叫做固定相; 另一个是流动相。当流动相通过固定相时, 各组分便以不同的速度移动, 从而达到分离的目的。这种技术的分辨率很高, 可以实现组成、结构和性质很相似的物质之间的分离。

生化实验中常用的层析技术有纸层析、吸附层析、离子交换层析和分子排阻层析等。前一种层析在纸上进行；后三种层析有两种方式：直接将固定相均匀地铺在玻璃板上的叫薄层层析，直接将固定相装入层析柱中的叫柱层析。纸层析、薄层层析和柱层析的操作步骤相似，包括以下3个基本步骤：①加样于选定的固定相上；②展开（纸层析和薄层层析中称为展层，在柱层析中称为洗脱）；③结果的检出和鉴定。

（1）纸层析的基本原理

纸层析常用于一些生物小分子类物质的分离和纯化。它以滤纸上的纤维及其结合水为固定相，以有机溶剂为流动相。当流动相流经滤纸上的样品原点时，样品中各溶质组分在两相中进行分配，一部分溶质离开原点随流动相移动，进入固定相的无溶质区，这种分配不断进行，直到层析结束。由于各溶剂组分和分配系数（分配系数指溶质在两相中的浓度之比）不同，其迁移率 R_f （ R_f 为原点到该溶质层析点中心距离与原点到流动相前沿距离之间的比值）也不同，从而使每种溶质得到分离和纯化。

植物色素的纸层析结果可用肉眼观察，其他生物小分子类物质的层析结果可以用特定的试剂显色鉴定。

（2）薄层层析与柱层析的基本原理

薄层层析也是一种主要用于分离和分析生物小分子类物质的方法。该技术将固体支持物均匀地涂于玻璃板上而成为一薄层固定相，以后的步骤与纸层析的操作相似：把样品点到薄层固定相上，用适当的流动相展开，使样品中的混合溶质分离，最后显色鉴定。但由于有些薄层层析可用浓 H_2SO_4 和浓 HNO_3 等腐蚀性显色剂，故比纸层析分析样品的灵敏度要高出 10~100 倍。

可作薄层层析固定相的物质种类繁多，生化实验中常用的有硅胶、聚酰胺、DEAE-纤维素和葡聚糖凝胶等。硅胶和聚酰胺主要表现出对各种溶质有不同的亲和力，从而实现样品中各种溶质之间的分离纯化，这两种层析可普遍适用于多种小分子的分离；DEAE-纤维素则对偏离等电点的核苷酸和氨基酸等带电分子表现出不同的离子交换能力；葡聚糖凝胶则可以滤过大小不同的溶质分子。由于这些差别，用特定的流动相展层，流动相通过原点时，便把各种溶质带到不同的固定相位置上。

在分离纯化各种生物大分子时，以上述三类物质为代表的固定相通常装入层析柱中，成为吸附柱层析、离子交换柱层析和凝胶过滤柱层析。其基本原理与相应的薄层层析相同，只是流动相的流动不是主要靠毛细管，而是主要靠重力或压力由上而下流动。样品中不同的溶质按不同的速度通过层析柱而流出，流出液用部分收集器收集，各种溶质组分被收集在不同的收集管中，用于分析检测。

随着科学技术的发展，作为固定相的各种支持物及其化学衍生物的种类越来越多，对溶质的分辨能力和分辨速度将越来越高。如以纤维素为骨架的离子交换剂不仅已有 DEAE-纤维素，而且还有 CM-纤维素和 P-纤维素等。这些物质都可以作为薄层层析和柱层析的固定相，因此薄层层析和柱层析的亚种类是很多的，可以分别适用于不同物质的高效分离纯化。各种层析都已成为专门技术在向前发展。

另外，亲和层析也是一种柱层析，它是根据蛋白质与其相应的配基进行特异性非共价结合而设计的，故其纯化效率很高，可直接从粗提物中将目的蛋白纯化。例如，某些酶蛋白（A）的活性中心或变构中心能和专一性的配基（B）（这些配基可以是底物、抑制剂、

辅酶或变构因子)在一定条件下特异性结合,在另一条件下又能解离。我们可以将配基(B)共价连接到惰性固定相(R)(如琼脂糖凝胶)上,形成不溶性的带有配基的固定相R-B,将其装入层析柱,当含目的蛋白的粗提液流经层析柱时,即形成R-B-A,最后改变洗脱液条件,使A从柱中流出,从而达到分离纯化酶和蛋白质的目的。

气相色谱分析和高压液相色谱分析也属层析技术,它们在高级生化实验中是很重要的分析技术。

4. 电泳技术

电泳技术是进一步分离纯化核酸和蛋白质等溶质的基本方法。当外界缓冲液的pH值偏离溶质的等电点时,点样到惰性支持物上的样品中的溶质组分在电场中便会向其带电方向相反的电极移动,在一定的外界条件(主要指电场强度、缓冲液pH值和离子强度)下,不同溶质分子由于所带电荷性质、数量以及分子大小、形状不同,在电场中的泳动方向和速度不同而被分离。

(1) 纸电泳

纸电泳的电泳室可根据不同目的自制,其要求是:能控制溶液流动,防止滤纸中的液体由于通电发热而蒸发等。通常有3种类型:①水平式,如图1-2所示,将滤纸条水平地架在两个装有缓冲液的容器之间,样品点于滤纸条中央,用缓冲液润湿纸条后盖上密封罩,即可在直流电压100~1000V下进行电泳。当外加电压超过500V时通常在滤纸条下面放一盛有冰块的容器,用以散热。②悬架式,如图1-3所示,将滤纸架呈倒V形,样品点于A型纸条的尖端,其他操作同水平式。③二元式,也称连续式,将滤纸剪成长方形,一端浸入盛有缓冲液的槽中,另一端剪成45°的许多小三角。将铂丝电极紧贴在滤纸上,滤纸上端的中央放一装样品的容器,通电后样品中各物质一方面受电场作用向电极方向移动,另一方面在缓冲液推动下垂直向下移动,两种因素共同作用(故称二元式)使各种物质在滤纸上呈辐射状,各自沿着其理化性质决定的特定方向顺小三角流入分步收集的试管中。此装置可用于物质的分离和制备。

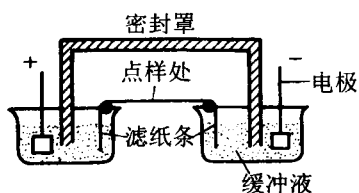


图 1-2 水平式电泳示意图

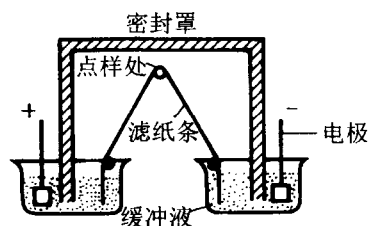


图 1-3 悬架式电泳示意图

(2) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺是丙烯酰胺单体(Acr)和交联剂甲叉双丙烯酰胺(Bis)在催化剂作用下,聚合而成的固型网络结构,既可制成柱状凝胶用于圆盘电泳中,又可制成板状凝胶用于垂直板电泳中。凝胶孔径的大小可随Acr或Bis的浓度大小而变化,故可用于多种不同大小的带电分子的分离。

聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)通常由两种孔径的凝胶组成,位于上面的大孔径胶叫浓缩胶,它主要对样品起浓缩作用,再加上缓冲液离子

强度的不连续性和 pH 值不连续性的作用，使得样品中的各溶质按其上面规定的顺序，在与位于其下的分离胶接触面上积压成薄层（浓缩效应），这层样品薄层便是在分离胶中进行电泳的起始区带。下面的小孔径胶叫分离胶，它的主要作用是对起始区带中的各溶质组分进行电泳和分子筛分离（分子筛效应）。浓缩效应、分子筛效应以及电泳系统中固有的电荷效应统称为 PAGE 电泳三效应。这三种物理效应共同作用，将样品中的各种带电溶质快速、高效地分离。

除了受到上述三种物理效应的作用外，溶质本身的物理性质也决定着其自身的电泳方向和速度。在中性 pH 值缓冲液中，核酸分子都带负电荷，电泳时都向正极泳动。而各种蛋白质组分在电性、电荷数和分子大小、形状上差别较大，这些因素都和电泳速度有关，因此，常在电泳系统中加入十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulfate, SDS），这种电泳称为 SDS-PAGE 电泳。SDS 这种阴离子去污剂能破坏蛋白质分子之间以及与其他物质分子之间的非共价键，使蛋白质变性而改变原有的空间构象，当 SDS 与蛋白质充分结合后，使蛋白质变成带负电荷的 SDS-蛋白质复合物。这些复合物所带的负电荷之大，足以使各种蛋白质本身的电荷忽略不计，故 SDS 消除了蛋白质电荷差异对电泳速度的影响；而且这些复合物呈棒状，棒的短轴与蛋白质种类无关，长轴与蛋白质相对分子质量成正比，故 SDS 又消除了蛋白质形状差异对电泳速度的影响。在一定外界条件下，只有蛋白质（或寡聚蛋白质的亚基）的相对分子质量大小决定着 SDS-PAGE 的电泳速度。

常见的电泳形式有圆盘电泳和垂直板电泳。前者用柱状凝胶，后者用板状凝胶，原理相同；前者常用于分离纯化，后者则用于生化分析。

（3）琼脂糖凝胶电泳

将一定量的琼脂糖置于三角瓶中，加入适量的缓冲液，在高压锅或微波炉内加热熔化，摇匀，即制成一定浓度的胶液。降低温度，趁胶液的凝固过程，可根据需要制成柱状凝胶或板状凝胶。在胶凝范围内，琼脂糖凝胶的孔径范围比聚丙烯酰胺大，且制胶更简便，支持性能更强，故琼脂糖凝胶更适合于较大的 DNA 片段的分离纯化。

DNA 的等电点较低，在中性或偏碱性的 pH 值缓冲液中带负电，在电场中移向阳极。在未加入变性剂（如尿素）的琼脂糖凝胶体系中，DNA 片段的泳动速度，除受到电荷效应的影响外，由于凝胶介质对其还有分子筛效应，还与 DNA 片段的大小和构象有关，故使用该体系可分离纯化到具相近相对分子质量的不同构象的 DNA 分子，或分离纯化到具相同构象的不同相对分子质量的 DNA 分子。溴化乙啶（EB）可插入到双螺旋的两个碱基对之间，形成发橙黄色荧光的络合物，从而检出 DNA 电泳分离带。

在变性琼脂糖凝胶体系中，变性条件使 DNA 变性为单链，DNA 片段的泳动速度只与其大小有关，而与其碱基顺序无关。故在变性凝胶体系中可分离纯化到不同长度的 DNA 单链片段。

四、生物化学实验中常用的检测技术

经过上述离心、层析和电泳等技术所获得的分离纯化物，需要应用一定的检测方法才能进行定性和定量分析。基础生化实验中最常用的检测方法有分光光度法和显色法。

1. 分光光度法

根据物质的吸收光谱进行定性或定量分析的方法称为吸收光谱法或分光光度法。吸收

光谱是以波长为横坐标，以相应的波长处的消光值（消光值为物质溶液透光率的负对数）为纵坐标所绘的图谱，常用吸收光谱的波长范围一般为 200~800nm，包括大部分紫外光区和可见光区。对同一物质溶液，从 200~800nm 变换波长，相应的消光值也在变化，由此得到的吸收光谱称紫外-可见吸收光谱。

(1) 朗伯-比尔定律

①朗伯 (Lambert) 定律

当单色光通过一吸收光的物质时，其光强度随吸收光介质的厚度增加而呈指数减小。

$$I/I_0 = e^{-k_1 l}$$

②比尔 (Beer) 定律

单色光通过一光吸收介质时，光强度随该物质浓度 c (mol/L) 增加呈指数减小。

$$I/I_0 = e^{-k_2 c}$$

两者结合在一起即为朗伯-比尔 (Lambert-Beer) 定律：

$$I/I_0 = e^{-\epsilon cl}$$

式中， ϵ [单位：L/(mol·cm)] 系一常数，称为摩尔吸收系数 (molar absorptivity)，也叫消光系数，透光度 T 为 I/I_0 ，通常以百分率表示。

$$T = (I/I_0) \times 100\% = e^{-\epsilon cl} \times 100\%$$

取对数

$$-\ln(I/I_0) = -\ln T = A = \epsilon cl$$

$-\ln(I/I_0)$ 称为光吸收 (A)。

若遵循朗伯-比尔定律，且 l 为一常数，光吸收对浓度绘图，得一通过零点的直线；若透光度对浓度绘图，得一负指数曲线，如图 1-4 所示。

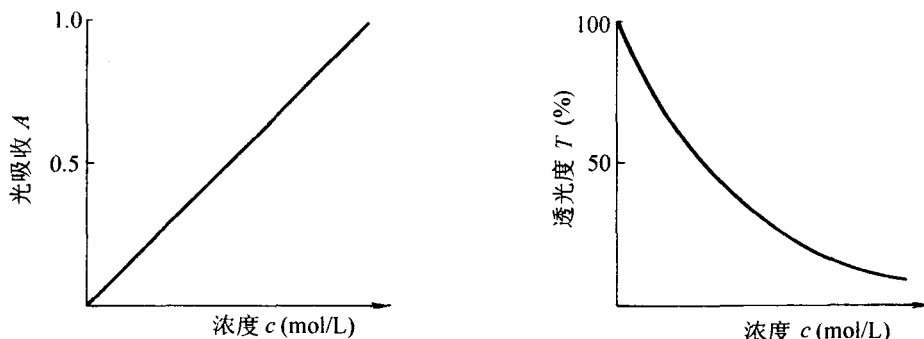


图 1-4 光吸收和光吸收溶液浓度间的关系

某些比色计或分光光度计有两种标尺，线性关系为透光度 (%), 光吸收呈对数关系，如图 1-5 所示。根据朗伯-比尔定律，作出标准物光吸收对浓度的标准曲线，借助于这样的标准曲线，很容易通过测定其光吸收得知一未知溶液的浓度。

在紫外区有吸收峰的分离纯化物可直接用紫外吸收光谱进行定量分析。蛋白质有三种芳香族氨基酸（色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸）在 280nm 附近有最大吸收峰；核酸、核苷酸和碱基在 260nm 附近有最大吸收峰。因此，可分别在 280nm 和 260nm 处进行测定。但由于两个吸收峰的峰尾可能相互交叠影响，所以待测物应达到相当的纯度，否则，应作修

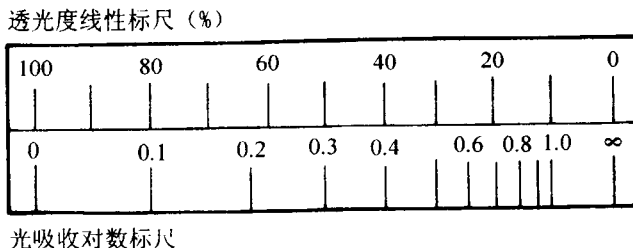


图 1-5 透光度和光吸收间的关系

正处理才能准确地对待测物进行定量分析。另外，许多维生素与辅酶也可以直接用紫外吸收光谱进行测定。如维生素 A 的乙醇溶液的吸收峰在 324nm；维生素 C 的水溶液的吸收峰在 265nm；NAD 和 NADP 水溶液的氧化型只在波长 259nm 处有一个吸收峰，其相应的还原型在 259nm 和 339nm 处有两个吸收峰。

生物色素，如叶绿素 a、叶绿素 b 和叶黄素等天然呈色物质的提取液可直接用可见吸收光谱法进行定量分析。而天然非呈色物质（包括可用紫外吸收光谱测定的物质），必须同特定的称为显色剂的化合物反应之后，才能用可见吸收光谱法进行定量分析。

(2) 使用分光光度法测定样品液浓度的计算方法

①标准管法（即标准比较法）

在相同的条件下，配制标准溶液和待测样品溶液，并测定它们的光吸收。由两者光吸收的比较，可以求出待测样品溶液的浓度。

$$\text{待测样品溶液的浓度} = \frac{\text{标准溶液的浓度} \times \text{待测样品溶液的光吸收}}{\text{标准溶液的光吸收}}$$

②标准曲线法

分析大批样品时，采用此法比较方便，但需要事先绘制一条标准曲线（或称工作曲线），以供一段时间使用。

配制一系列浓度由小到大的标准溶液，测出它们的光吸收。在标准溶液的一定浓度范围内，溶液的浓度与其光吸收之间呈直线关系。以各标准溶液的浓度为横坐标，相应的光吸收为纵坐标，在方格坐标纸上绘出标准曲线。绘制标准曲线时要选 5 种浓度递增的标准溶液，测出的数据至少要有 3 个落在直线上，这样的标准曲线方可使用。

比色测定待测样品时，操作条件应与绘制标准曲线时相同。测出光吸收后，从标准曲线上可以直接查出它的浓度，并计算出待测物质的含量。

③标准系数法（即计算因数法）

此法较上述两法更为简便。将多次测定标准溶液的光吸收算出平均值后，按下式求出标准系数。

$$\text{标准系数} = \frac{\text{标准液浓度}}{\text{标准液平均光吸收}}$$

用同样方法测出待测液的光吸收，代入下式即可。

$$\text{待测液的光吸收} \times \text{标准系数} = \text{待测液浓度}$$

另外，在绘制标准曲线后，再采用该法求出标准曲线的标准系数，可以显著提高分析大批样品的工作效率。

(3) 比色杯的正确使用和清洗

尽管分光光度计比色杯类型有多种,但最常用的是光程 1cm 的立方体杯。330nm 以下的光不能透过玻璃,故 UV 区测量用石英比色杯。两个比色杯必须配套,以装有纯溶剂的两个比色杯在试验波长下,测定光吸收是否一致的方法进行挑选、配对。

比色杯四面仅有两面光滑透明,具有光学性质,另两面则无,它们常以磨砂玻璃为材料,以示区别。比色杯光学表面不能有任何污损,否则会引起光吸收的增加,如小的缺陷能引起 0.15 的光吸收;比色杯上看不出的指纹或残迹能引起 UV 区高达 1.0 的光吸收。

每次使用后,应立即倒空或用吸液泵吸干。然后,以溶剂(常用水)冲洗比色杯 3~4 次,最后可用甲醇冲洗,在倒去甲醇后,以洁净空气吹干。用沾有洗涤剂的泡沫海绵清洗,效果也较好。比色杯的外表面应以高质量的柔软擦镜纸擦干净,不能使用易磨损比色杯的普通纱布。有时,上述的清洗步骤无效时,可试用其他更有效的方法,如将比色杯在铬酸或 50% 硝酸溶液中短时间浸泡,用水充分冲洗。

(4) 朗伯-比尔定律的局限性

有时获得的光吸收与浓度之间不呈现图 1-4 所示的直线关系,这时应注意选择合适的分光比色条件,才能得到准确的结果。

①选择最适合的滤光片或入射光波长,使溶液对这种波长范围的光有最大量的吸收,这样才能达到较高的灵敏度。同时,单色光的波长范围应该较窄,即单色光的纯度较高,这样才能较好地符合朗伯-比尔定律(严格地说,朗伯-比尔定律只适用于单色光)。

②测量时光吸收的大小应适当,过大、过小均会带来较大的测量误差。通常光吸收的数值应控制在 0.05~1.0 的范围内,为此可调节溶液浓度和使用不同厚度的比色皿。

③测量时,根据不同的情况选用不同的对照溶液,当显色剂及其他试剂均无色,而被测溶液中又无其他离子时,可用蒸馏水作对照溶液;如显色剂本身有颜色,用显色剂作对照;如显色剂本身无色,而被测溶液中有其他有色离子时,则用不加显色剂的被测溶液对照。

2. 显色法

待测物(即分离纯化物)与显色剂反应的专一性越高,对待测物的纯化程度的要求就越低。高专一性显色反应如 3,5-二硝基水杨酸与还原糖之间的显色反应,可直接用还原糖的提取液进行定量显色分析,而不必将还原糖高度纯化。特别是酶催化的代谢中间物的测定更是如此。无专一的显色反应,如浓硫酸对有机物都能显色,常用于抗腐蚀性层析固定相上展开的待测物的显色检测。专一性介于这两个极端之间的显色反应,定量分析结果的准确度决定于参比实验对待测物中所含杂质的抵消程度。表 1-5 列举了一些待测物的显色测定原理。在进行层析和电泳结果的显色分析中,应选用灵敏度高、专一性好且不与支持介质起反应的显色剂。如氨基酸纸层析用茚三酮显色;DNA 琼脂糖电泳谱带常用 EB 显色;蛋白质 PAGE 谱带常用考马斯亮蓝显色;各种同工酶电泳谱带可根据其酶的活性进行特异显色;RNA 电泳谱带可用次甲基蓝(亚甲基蓝)显色。

值得注意的是,电泳谱带的显示技术正朝两个方面迅速发展。其一,各种原位扫描仪的发展,使得那些不能被上述显色方法显示的痕量谱带的检出成为现实,凝胶上的谱带经原位扫描后可进行精确的定性、定量分析。其二,各种印迹技术的发展使我们在众多的电泳谱带中检出某一特异谱带成为现实,常见的有 Southern 印迹术、Northern 印迹术和