

 **NPTGJC**

全国普通高等专科学校教育药学类规划教材
QUANGUO PUTONG GAODENG ZHUANKE JIAOYU YAOXUELEI GUIHUA JIAOCAI

生物化学 实验 (第二版)

**BIOCHEMISTRY
EXPERIMENT**

主编 李惠芳



中国医药科技出版社

BIOCHEMISTRY
EXPERIMENT

全国普通高等专科学校教育药学类规划教材

生物化学实验

(第二版)

主 编 李惠芳

副主编 王桂云 王振宇 陈智敏

编 者 (以姓氏笔画为序)

王祖刚 (长治医学院)

王振宇 (长春医学高等专科学校)

王桂云 (牡丹江医学院)

申梅淑 (牡丹江医学院)

吕文华 (邢台医学高等专科学校)

李惠芳 (长治医学院)

陈智敏 (井冈山学院)

武 凡 (长治医学院)

罗 辉 (井冈山学院)

赵 红 (天津医学高等专科学校)

中国医药科技出版社

内 容 提 要

本书为全国普通高等专科学校教育药学类规划教材建设委员会组织编写的第二版生物化学实验教材。全书内容共分为生物化学实验总论、常用生物化学实验技术及原理、学生实验和附录四篇。学生实验部分包括15个基础性实验、9个综合性实验和研究性实验三部分。本书内容系统全面,层次分明,实验方案可操作性强。

本书可作为药学专科与成人专科、函授、高职及相同层次教育的教材,也可供相关人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验/李惠芳主编. —2版. —北京:中国医药科技出版社, 2007. 2

全国普通高等专科学校教育药学类规划教材

ISBN 978-7-5067-3587-2

I. 生… II. 李… III. 生物化学—实验—高等学校—教材
IV. Q5-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2006)第158312号

美术编辑 陈君杞

责任校对 张学军

版式设计 郭小平

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲22号

邮编 100082

电话 010-62244206

网址 www.cspyp.cn www.mpsky.com.cn

规格 787×1092mm $\frac{1}{16}$

印张 9 $\frac{1}{4}$

字数 221千字

印数 24001—30000

版次 2007年1月第2版

印次 2007年1月第6次印刷

印刷 北京市后沙峪印刷厂

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978-7-5067-3587-2

定价 15.00元

本社图书如存在印装质量问题 请与本社联系调换

序 言

1993年,原国家医药管理局科技教育司鉴于我国药学高等专科学校教育一直没有进行全国性的教材建设,根据国家教委(1991)25号文的要求负责组织、规划高等药学专科教材的编审出版工作。在国家教委的指导下,在对全国高等药学专科教育情况调查的基础上,普通高等专科学校教育药学类教材建设委员会于1993年底正式成立,并立即制订了“八五”教材编审出版规划。1995年,经100多位专家组、编写组教师和中国医药科技出版社的团结协作、共同努力,建国以来第一套普通高等专科学校教育药学类规划教材终于面世了。其后,又根据高等药学专科教育的主要任务是为医药行业生产、流通、服务、管理第一线培养应用型技术人才的需要,立即组织编审、出版了相关的配套教材(实验指导、习题集),以加强对学生的实验教学,培养学生的实际操作能力。

该套规划教材是国家教委“八五”教材建设的一个组成部分。从当时高等药学专科教育的现实情况考虑,统筹规划、全面组织教材建设活动,为优化教材编审队伍,确保教材质量,规范教材规格,起到了至关重要的作用。也正因为如此,这套规划教材受到了药学专科教育的大多数院校的追崇及广大师生的喜爱,其使用情况一直作为全国高等药学专科教育教学质量评估的基本依据之一,可见这套教材的影响之大。

由于我国的高等教育近年进行了一系列改革,我国药学高等专科学校教育变化也较大,加之教学大纲的不断调整,这套教材已不能满足现在的教学需要,亟需进行修订。但是,因为原主管部门已不再管理我国药学高等专科学校教育,加之一些高等药学专科学校已经合并到其他院校,原普通高等专科学校教育药学类教材建设委员会已不能履行修订计划。因此,全国高等医药院校药学类教材编辑委员会接管了这项工作,组成了新的普通高等专科学校教育药学类教材建设委员会,组织了这套规划教材的修订,希望修订后的这套规划教材能够适应当前高等药学专科教育发展的需求。在修订过程中,考虑到高等专科学校教育中全日制教育、函授教育、自学考试等多种办学形式,力求使这套教材能具有通用性,以适应不同办学形式的教学要求。学术是有继承性的,虽然第一版的一些作者已经退休或因为其他原因离开了药学高等专科学校教育岗位,不能继续参加这套教材的修订工作,但是他们对这套教材做出了非常重大的贡献,在此,我们谨对他们表示衷心的感谢。

这套规划教材修订出版后,竭诚欢迎使用本教材的广大读者提出宝贵意见,以便我们进行教材评优工作,不足之处我们将在以后修订时改正。

全国普通高等专科学校教育
药学类规划教材建设委员会
2003年12月

普通高等专科学校教育药学类规划教材编委会

(第二版)

主任委员 姚文兵 (中国药科大学)

副主任委员 (按姓氏笔画排名)

尹 舫 (湖北中医学院)

王 玮 (河南大学药学院)

罗向红 (沈阳药科大学)

郭 姣 (广东药学院)

委 员 (按姓氏笔画排名)

丁 红 (山西医科大学)

于信民 (菏泽医学高等专科学校)

马祥志 (湖南长沙医学院)

王润玲 (天津医科大学)

王庸晋 (长治医学院)

刘 斌 (天津医学高等专科学校)

刘志华 (怀化医学高等专科学校)

孙 涛 (宁夏医学院)

吴琪俊 (右江民族医学院)

宋智敏 (哈尔滨医科大学大庆校区)

张德志 (广东药学院)

李淑惠 (长春医学高等专科学校)

肖孟泽 (井冈山医学高等专科学校)

陈 旭 (桂林医学院)

林 宁 (湖北中医学院)

罗载刚 (黔南医学高等专科学校)

赵冰清 (湖南师范大学药学院)

徐世义 (沈阳药科大学)

徐晓媛 (中国药科大学)

高允生 (泰山医学院)

黄林帮 (赣南医学院)

谭桂山 (中南大学药学院)

第二版前言

根据“全国普通高等专科学校教育药学类规划教材建设委员会”会议精神,修订、编写了与“全国普通高等专科学校教育药学类规划教材”《生物化学》(第二版)的配套教材《生物化学实验》(第二版)。与第一版比较,本版教材主要在以下三方面作了调整:①精简了部分与临床生化检验有关的实验,加强了对生化基本实验技能培养方面的实验;②增加了部分分子生物学方面的实验,力求适应21世纪药学教育的要求;③增加了研究性实验,为对生物化学非常感兴趣的学生根据所学的基本理论和实验技能设计实验提供参考。

本教材内容共分为生物化学实验总论、常用生物化学实验技术及原理、学生实验和附录四篇。学生实验部分包括15个基础性实验、9个综合性实验和研究性实验三部分。基础性实验重点介绍生物化学实验的基本理论和技术,强调对基本实验技能的培养,是在较少学时内可以完成的精选实验;综合性实验主要介绍蛋白质、核酸的分离、纯化、定性和定量分析及部分分子生物学实验技术,其过程相对复杂、耗时较长,可酌情选用;研究性实验类似于一项科研任务,对于药学专科教育来说,旨在培养对生物化学非常感兴趣的学生在教师指导下开展科研工作的能力。学生经过前两个阶段的训练,已经初步掌握了生物化学实验的基本知识和技能。教师根据掌握的资料文献,给出一定的选题方向或研究方向,在教师的指导下,学生自己查找资料,完成选题,参考实验教程中提供的研究大纲拟定实验方法,设计并实施实验方案,进行比较复杂的实验和探究。

本教材的特点主要体现在:①内容系统全面,层次分明。以电泳、层析、比色和离心四大生物化学技术为主体,通过基础、综合和研究性实验三个层次,针对不同层次的学生达到不同的要求。②实验方案经多年应用,可操作性强。多数实验方案是编者在多年的教学和科研中应用过的,具有很强的可操作性。③注意事项是学生把握实验成功的关键,思考题便于学生更好地理解实验原理。

编写教材是一项十分复杂而繁重的工作,尽管每位编者都为本教材的编写付出了辛勤劳动,大家在繁忙的教学工作之余,查阅资料,收集素材,撰写文稿,力求为学生提供一本与生物化学理论教学内容相匹配,难度适中,可操作性强的实验教材,但是由于编者水平有限,书中难免出现缺点和错误,敬请使用本教材的老师和同学们提出宝贵意见,以便再版时减少谬误。主编的电子邮箱是:lihuifang@czmc.com。

主编 李惠芳
2005年12月

目 录

第一篇 生物化学实验总论

一、生物化学实验的目的	1
二、生物化学实验的基本内容	1
三、生物化学实验课的要求	2
四、生物化学实验报告的书写规则	2
五、生物化学实验室规则	2

第二篇 常用生物化学实验技术及原理

第一章 电泳技术	4
一、电泳的基本原理	4
二、影响电泳的因素	5
三、电泳的分类	6
四、常用的电泳技术	7
第二章 层析技术	11
一、层析的基本原理	11
二、层析的分类	11
三、常用的层析技术	12
第三章 比色分析技术	17
一、比色分析的基本原理	17
二、影响比色分析的因素	17
三、比色分析的分类	18
四、分光光度技术的应用	19
第四章 离心技术	24
一、离心技术的基本原理	24
二、制备性离心技术的基本原理	24
三、离心机的分类	24
四、电动式离心机的使用方法	25

第三篇 学生实验

第一章 基础性实验	26
实验一 凯氏微量定氮法测定血清蛋白质含量	26
实验二 Folin-酚法测定血清蛋白质含量	32
实验三 血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳	34
实验四 酶的专一性及影响酶活性的因素	37
实验五 酵母蔗糖酶米氏常数的测定	40
实验六 2, 4-二硝基苯肼比色法测定维生素 C 含量	44
实验七 胡萝卜素的提取、纯化与定性分析	47
实验八 红细胞糖酵解的测定	49
实验九 吴宪-Folin 法测定血糖含量	52
实验十 肝中酮体生成作用	55
实验十一 LRC 改良法测定血清总胆固醇含量	57
实验十二 磷钨酸-镁沉淀法测定血清高密度脂蛋白胆固醇含量	59
实验十三 血清甘油三酯含量的测定	62
实验十四 纸层析法测定肝组织的转氨基作用	64
实验十五 二乙酰-茚显色法测定血清尿素氮	67
第二章 综合性实验	70
实验一 聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (PAGE) 分离血清蛋白质 (核黄素-TEMED 聚合系统)	70
实验二 琼脂糖凝胶电泳法分离血清脂蛋白	75
实验三 血清 γ -球蛋白的提纯与鉴定	78
实验四 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质分子量	84
实验五 琼脂糖凝胶电泳法分离血清 LDH 同工酶及 LDH 活性的测定	88
实验六 核酸的提取与鉴定	94
实验七 大肠杆菌感受态细胞的制备、转化和质粒 DNA 的提取与鉴定	101
实验八 PCR 基因扩增	108
实验九 动物肝脏细胞核的分离与鉴定	116
第三章 研究性实验	119
实验一 重组表达质粒的 PCR 鉴定	119
实验二 外源基因在大肠杆菌中诱导表达的研究	121
实验三 大肠杆菌热休克蛋白表达的临界温度研究	122
实验四 质粒纯化方法的优化	123

第四篇 附 录

一、实验报告范例	125
二、玻璃仪器的洗涤及各种洗液的配制方法	128
三、常见市售酸碱的相对密度和浓度	129
四、常用缓冲液的配制	130
五、硫酸铵饱和度的常用表	135
参考文献	137

第一篇 生物化学实验总论

生物化学实验是生物化学教学的重要组成部分，随着生物化学的迅速发展，生物化学实验方法和技术也不断更新，已成为医药学专业广泛应用的重要实验手段之一，故而生物化学实验课是医药学专业的必修课。

一、生物化学实验的目的

1. 学习生物化学实验的设计原理，掌握生物化学实验的基本操作技能。
2. 验证部分理论课的内容，巩固加深对生物化学理论的认知。
3. 培养学生严谨的科学工作作风以及独立分析问题和解决问题的能力。

二、生物化学实验的基本内容

(一) 生物分子（主要是生物大分子）的制备

生物大分子的制备过程如下：

1. 材料的选择和预处理

考虑目的、来源、工艺和成本。

2. 细胞的破碎和细胞器的分离

(1) 破碎细胞可采用机械法（捣碎、匀浆、研磨）、物理法（反复冻融、冷热交替、超声波、加压破碎）或化学生物法（自溶、溶菌酶处理、表面活性剂）。

(2) 分离细胞器可采用在适当介质中进行差速离心的方法。

3. 提取（抽提、萃取）

经过处理和破碎的细胞置于一定条件和溶剂中，让被提取的生物分子充分释放出来。

4. 分离纯化

从细胞中提取出来的生物分子还是不纯的，常含有多种同类或者异类物质，必须进一步纯化才能获得纯品。分离纯化的依据和方法包括：①依据分子大小和形状不同，可采用差速离心、超滤、分子筛或透析等方法；②依据溶解度不同，可采用盐析、溶剂抽提、层析、逆流分配或结晶等方法；③依据分子表面电荷不同，可采用电泳、电渗析、等电沉淀、离子交换或吸附层析等方法；④依据生物学功能专一性不同，可采用亲和层析来分离、纯化某一物质。

(二) 对生物大分子进行定性、定量分析（生化分析）

对生物大分子进行定性、定量分析的常用方法有：

1. 一般化学操作

包括液体的转移、混匀、过滤、蒸馏、加热、干燥、研磨和称量等。

2. 常用定性、定量分析的基本技术

包括电泳技术、层析技术、比色分析技术和离心技术等。随着分子生物学的迅猛发展，生物大分子的定性、定量分析还常采用分子杂交技术（印迹技术）、聚合酶链反应技

术(PCR)、基因芯片技术、蛋白质芯片技术等。有些物质的定性、定量分析还要采用一些其他技术,如放射性同位素技术、免疫化学技术、测压技术、电子显微镜技术等。

(三) 对生物大分子的加工和改造

对生物大分子进行加工和改造常用的方法有基因工程、蛋白质工程、酶工程和发酵工程。这一部分对于药学类专业的专科学生不作要求。

三、生物化学实验课的要求

为了达到生物化学实验的目的,要求学生要认真对待每一个实验,做到实验前预习、实验中严谨、实验后认真完成实验报告。具体要求如下:

1. 实验前的要求

要求认真预习,熟悉本次实验的目的、原理、基本操作步骤、注意事项,懂得每一步骤的意义和了解所用仪器的使用方法,否则不应该开始实验。

2. 实验过程中的要求

要求听从教师的指导,遵守实验室规则,严肃认真地按操作规程进行实验,合理安排实验器材和时间,细致观察,并把观察到的现象以及实验结果和数据及时、如实地记录在实验记录本上,文字要简练、准确。完成实验后经教师检查同意,方可离开实验室。

3. 实验后的要求

要求做好清理,并认真完成实验报告。

四、生物化学实验报告的书写规则

1. 报告格式要求

要求有实验名称、指导教师、实验操作者姓名、班级、学号、实验日期、实验目的、实验原理、实验记录、实验结果、结果分析与结论及思考题解答。

2. 报告内容要求

要求真实、完整、原始、条理。观察到的现象和结果是怎样就怎样写,真正反映客观事实;内容要完全,不要丢三落四,不要忽视偶然现象;必须记录原始的操作、数据和现象,不能主观捏造;报告语言叙述要条理有序,自己看得懂,别人也能看得懂。

五、生物化学实验室规则

1. 符合着装要求

进入实验室做实验必须穿白色工作衣。

2. 保持实验室肃静

每个同学都应该自觉遵守课堂纪律,维护课堂秩序,不迟到,不早退,不大声谈笑,严禁用试剂、器材和动物等开玩笑。

3. 保持实验室整洁

实验台面应随时保持整洁,仪器、药品摆放整齐。公用试剂用完后,应立即盖严放回原处。勿使试剂、药品洒在实验台面和地上。废液体可倒入水槽内,同时放水冲走。强酸、强碱溶液必须先用水稀释,再倒入水槽内放水冲走。废纸屑及其他固体废物和带

渣滓的废物倒入废品缸内，不能倒入水槽或到处乱扔。实验完毕，仪器洗净放好，将实验台面抹拭干净，才能离开实验室。

4. 爱护公物

使用仪器、药品、试剂和各物品必须注意节约。洗涤和使用仪器时，应小心仔细，防止损坏仪器。使用贵重精密仪器时，应严格遵守操作规程，发现故障须立即报告教师，不得擅自动手检修。要精心使用和爱护仪器，如使用分光光度计时，不能将比色杯直接置于分光光度计上，并注意拿放比色杯时，不要打碎。仪器损坏时，应如实向教师报告，并填写损坏仪器登记表，然后补领。实验室内一切物品，未经本室负责教师批准，严禁带出室外，借物必须办理登记手续。

5. 注意安全

加热用的电炉应随用随关，严格做到：人在炉火开，人走炉火关。乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热，并要远离火源操作和放置。实验完毕，应立即拔掉电炉开关和关好水龙头，拉下电闸。离开实验室以前应认真、负责地进行检查水、电、门、窗是否关好，严防发生安全事故。

6. 安排值日

每次实验课由班长或课代表负责安排值日生。值日生的职责是负责当天实验室的卫生、安全和一切服务性的工作。值日生值日完毕，并经教师检查后方可离开实验室。

(李惠芳)

第二篇 常用生物化学实验技术及原理

第一章 电泳技术

电泳是指在电场中的带电粒子向电性相反方向发生位移的现象。电泳现象早在 19 世纪初就被人们发现,到 20 世纪初 Field 及 Teague 曾用电泳技术研究白喉毒素,但未引起人们的重视。直到 1937 年瑞典生物化学家 Tiselius 制成了界面电泳仪,并对血清蛋白进行了电泳,把血清蛋白分成清蛋白及 α 、 β 、 γ 球蛋白四种。从此以后,电泳的种类和应用在深度和广度两方面均得到迅速发展,成为生物化学与分子生物学技术中分离、鉴定生物大分子的重要手段。由于电泳技术操作简单、快速、灵敏等优点,故已在生物化学、分子生物学、医学、药学、食品、农业环保等学科得到广泛应用,并成为蛋白质、核酸分析鉴定的主要技术之一。

一、电泳的基本原理

任何一种物质的颗粒,在溶液中如果含有能被解离的基团或能吸附带电的质点,该物质在溶液中就带有一定量的电荷,在电场中必然会向电性相反的电极移动,这种现象称为电泳现象。

在电场中,带电颗粒受电场作用力(F)和摩擦力(f)两种相反作用力的作用。在匀强电场中,电场作用力和摩擦力相等,带点颗粒作匀速运动,由此可求出带点颗粒的泳动速度。可用以下公式计算:

$$F = Eq$$

$$f = 6\pi r\rho V$$

$$Eq = 6\pi r\rho V$$

$$V = Eq/6\pi r\rho$$

式中, E ——电场强度 (V/cm);

q ——颗粒净电荷量;

r ——颗粒半径 (cm);

ρ ——介质黏度;

V ——泳动速度 (cm/s)。

由此可见,在同一电泳条件下,不同带电颗粒因其分子大小和带电量的不同具有不同的泳动速度。因此电泳一定时间,就能相互分开。

$$\Delta V = (q_1 - q_2)/6\pi(r_1 - r_2)$$

$$\Delta d = \Delta Vt$$

不同物质的电泳性质常用迁移率来表示。迁移率（又称泳动率）是指带电颗粒在单位电场强度下的泳动速度。可用以下公式计算：

$$U = V/E = dL/Vt$$

式中， U ——迁移率（或称泳动率）， $\text{cm}^2/(\text{V}\cdot\text{s})$ ；

V ——泳动速度， cm/s ；

E ——电场强度， V/cm ；

d ——泳动距离， cm ；

t ——电泳时间， s ；

L ——支持物长度， cm 。

不同大小的带电颗粒具有不同的迁移率，在不同的介质条件下又具有不同的分辨率。

二、影响电泳的因素

（一）样品

影响迁移率的首要因素是电泳样品的性状，包括分子大小、电荷多少、颗粒形状和空间构型。一般来说颗粒带净电荷越多，泳动速度越快；颗粒物理形状越大，与支持物介质摩擦力越大，泳动速度越小。即迁移率与颗粒的分子大小及介质黏度成反比；与颗粒所带电荷成正比。

（二）电场

带电颗粒在电场中移动可受到以下三个因素的影响。

1. 电流

电泳时必须是直流电源，且应保持恒定，如果电压固定，电流的大小是由缓冲液的离子强度和电极间的距离而决定。一般情况下，电泳速度与电流的大小成正比关系。

2. 电压

电压大小是与电流成正比。因此电泳速度与支持物介质两端的电压成正比。电压大小常用电场强度来表示，电泳场两极间单位支持物长度的电压差即为电场强度，即每厘米支持物的电位差。电泳时两端电压除以支持介质的长度为电场强度，可用以下公式计算：

$$E = U/L$$

式中， E ——电场强度， V/cm ；

U ——电压， V ；

L ——支持物长度， cm 。

3. 电阻

电阻与电泳速度成反比。电阻也与支持介质长短以及缓冲液的离子强度有关。电阻大小与支持介质的长度成正比；与支持介质的宽度和缓冲液的离子强度成反比。电泳时电流通过支持介质可以产生热量，产热对电泳技术是不利的，因为产热可促使支持介质上溶剂的蒸发，而影响缓冲溶液的离子强度。若产热温度过高可导致分离样品变性而使电泳失败（非变性电泳）。所以，在电泳技术设备中对电泳槽要求有密闭的盖子，以减少

缓冲液的水分蒸发。对高压电泳应增设冷却系统,以防样品在电泳时变性。

(三) 缓冲液

缓冲液能使电泳中的支持介质保持稳定的 pH,并通过它的组成成分、浓度等因素影响着迁移率。

1. pH

溶液的 pH 是决定物质带电质点解离程度,即该物质带净电荷多少的决定因素。对蛋白质、氨基酸、核酸等两性电解质来说,缓冲液的 pH 距等电点 (pI) 越远,质点所带净电荷越多,电泳速度也越快,反之,则越慢。

2. 成分

通常所用的是甲酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、磷酸盐、硼酸盐、巴比妥盐和三羟甲基氨基甲烷-乙二胺基四乙酸缓冲液等。要求缓冲液的物质性能稳定,不易电解。

3. 离子强度

离子强度增加,缓冲液所载的分电流也随之增加,样品所载的电流则降低。因此,样品的电泳速度减慢。但要注意的是离子强度增加使电泳时的总电流和产热也增加,对电泳是不利的。在低离子强度时缓冲液所载的电流下降,样品所载的电流增加,因此加速了样品的电泳速度,低离子强度的缓冲液降低总电流,结果减少了热量的产生。但是带电物质在支持介质上的扩散较为严重,使分辨率明显降低。

所以对缓冲液离子强度的选择,必须两者兼顾,一般是在 0.02~0.20 之间。

4. 支持介质

对支持介质的要求是具有较大惰性的材料,且不与被分离的样品或缓冲液起化学反应。此外,还要求具有一定的坚韧度,不易断裂,容易保存。由于各种介质的精确结构对一种被分离物的移动速度有很大影响,所以对支持介质的选择应取决于被分离物质的类型。

三、电泳的分类

电泳可以直接将样品放在缓冲液中进行,称为自由界面电泳。若将样品放在固体支持物上进行电泳,因待测样品各组分的泳动率不同被分离成不同的区带,称为区带电泳。区带电泳的分类如下:

(1) 根据电场强度的不同分为 高压电泳 ($>20\text{V/cm}$); 常压电泳 ($10\sim20\text{V/cm}$); 低压电泳 ($<10\text{V/cm}$)。

(2) 根据载体介质的不同分为 滤纸电泳; 醋酸纤维素薄膜电泳; 琼脂糖凝胶电泳; 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

(3) 根据支持物的形状不同分为 U 形管电泳; 柱状电泳; 垂直板电泳; 水平板电泳; 毛细管电泳。

(4) 根据原理划分为 等速电泳; 免疫电泳; 等电聚焦电泳。

(5) 根据电泳形式分为 单向电泳; 双向电泳; 电泳、层析相结合; 分析型电泳; 制备型电泳。

(6) 根据缓冲液的 pH 不同分为 连续 pH 电泳; 非连续 pH 电泳。

四、常用的电泳技术

电泳的一般操作程序包括支持介质的准备、加样、电泳、固定、染色、脱色、定性观察及定量测定等过程。

(一) 醋酸纤维素薄膜电泳

1. 原理

醋酸纤维素薄膜电泳 (cellulose acetate electrophoresis, CAE) 是以醋酸纤维素薄膜作为支持介质的一项电泳技术。醋酸纤维素分子中每个葡萄糖单位的两个游离羟基均与醋酸脱水缩合, 生成二乙酰葡萄糖。常用于血清蛋白和同工酶的分离。

血清中含有多种蛋白质, 其分子量、等电点各异, 在同一 pH 溶液中, 可解离成带有不同电荷的离子, 因而在电场作用下, 以不同的电泳速度聚集在不同的位置, 在薄膜支持介质上呈现出不同的电泳区带, 从而实现分离血清中各种不同蛋白质成分的目的。

由于蛋白质的等电点均低于 pH 8.6, 在 pH 8.6 的碱性缓冲液中均带有负电荷, 在电场中均向正极泳动。但因血清中各种蛋白质的等电点不同, 带电荷量的多少有差异, 加之各蛋白质的分子量大小也不一样, 所以在同一电场中的电泳迁移率也就不同。带电荷多、分子量小者, 泳动较快; 反之则较慢。如此可将血清蛋白按其泳动速度分成五条主要区带, 从正极端起依次为清蛋白、 α_1 球蛋白、 α_2 球蛋白、 β 球蛋白、 γ 球蛋白。

2. 优缺点

由于乙酰基不电离, 所以醋酸纤维素几乎不带电荷, 吸附作用和电渗作用都很微弱。醋酸纤维素薄膜微孔细小, 质地致密, 标本电泳速度快, 区带整齐, 分辨率高, 几乎无拖尾现象。醋酸纤维素不与染料着色, 漂洗时染料容易脱去, 背景白净, 区带易于观察。醋酸纤维素薄膜在冰醋酸/乙醇溶液中或液体石蜡中极易透明, 便于区带扫描定量。透明后的薄膜易于干燥, 电泳区带可长期保存。

醋酸纤维素薄膜的吸水性差, 电泳时水分容易蒸发。因此要求电泳槽密闭性能要好, 始终维持水蒸气饱和, 电流强度不宜过大, 一般保持在 0.4~0.6mA/cm 宽为宜。

(二) 琼脂糖凝胶电泳

1. 原理

琼脂糖凝胶电泳 (agarose gel electrophoresis, AGE) 是以琼脂糖凝胶作为支持介质的一项电泳技术。琼脂糖是由琼脂经处理去除其中的果胶成分而得, 化学组成为 $(D - \text{半乳糖} - O - 3,6 - \text{脱水} - L - \text{半乳糖})_n$ 。常用于血浆脂蛋白、免疫球蛋白、同工酶和 DNA 酶切片段的电泳分离。

血清脂蛋白, 不仅在脂类的组成和含量上不同, 其载脂蛋白部分也不相同。不同的载脂蛋白, 因其等电点、分子大小及形状均不相同, 故其在电场中的电泳行为和速度也不相同, 各种脂蛋白的迁移率也就不同, 从而得到分离。在 pH 8.6 的缓冲液中, 血清脂蛋白均带负电荷, 利用琼脂糖凝胶作支持介质进行电泳, 能将血清中脂蛋白分成四个组分。从正极到负极依次 α 脂蛋白、前 β 脂蛋白、 β 脂蛋白和乳糜微粒。除可定性外, 还可以通过洗脱法或光密度计扫描法对各种脂蛋白进行定量测定。

2. 优缺点

由于去除了含酸性基团较多的琼脂胶，琼脂糖的吸附作用和电渗作用大为降低，又由于琼脂糖凝胶理化性质稳定，具有大小不等的筛孔，可允许分子量达 100 万的大分子自由通过，因此琼脂糖凝胶是一种很好的电泳支持介质。一般琼脂糖凝胶的浓度在 0.5%~0.7% 时，电泳图谱清晰、分辨率较高、重复性好、凝胶无色透明、不吸收紫外光，故电泳后可直接用紫外分光光度法作定量分析琼脂糖。不与染料结合，染色后背景染料容易洗脱，洗脱液可用于定量检测。凝胶透明度好，便于区带扫描定量。凝胶易于干燥制成薄膜，结果可长期保存。

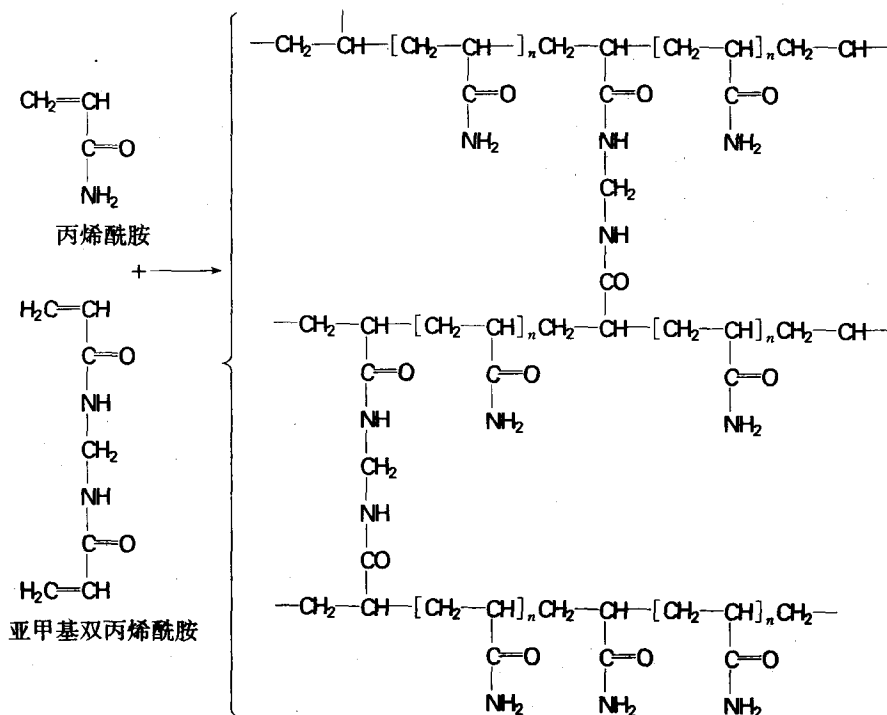
琼脂糖凝胶仅仅是琼脂糖分子间的物理交联，没有分子间的化学聚合，凝胶网络结构疏松，分辨率较聚丙烯酰胺凝胶电泳低。用于分离蛋白质时，允许分子量小的蛋白质自由通过，没有分子筛效应；用于大分子量 DNA 分离时，则具有分子筛效应。

(三) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

1. 原理

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项电泳技术。

(1) 聚丙烯酰胺凝胶的结构 聚丙烯酰胺凝胶是以丙烯酰胺作为单体，以甲叉双丙烯酰胺作为交联剂，在过硫酸铵催化剂和 TEMED 加速剂的作用下，在溶液中聚合交联而成的三维网状结构凝胶，见下式。



(2) 凝胶用量与孔径的关系 凝胶的形成是一种催化聚合过程，可以人为地控制单体浓度和聚合条件，以合成具有一定交联度的凝胶。如果凝胶的孔径大小接近于分离样