

临床医学“5+3”及卓越医生教育培养计划
医学整合课程实验系列教材

医学整合课程基础实验 (分子与细胞分册)

主编 王应雄 卜友泉



科学出版社

临床医学“5+3”及卓越医生教育培养计划
医学整合课程实验系列教材

医学整合课程基础实验
(分子与细胞分册)

主 编 王应雄 卜友泉

副主编 刘先俊 郭风劲 易发平 张 政

编 委 (按姓氏拼音排序)

卜友泉(重庆医科大学)

陈俊霞(重庆医科大学)

陈全梅(重庆医科大学)

程 志(重庆医科大学)

崔艳艳(重庆医科大学)

邓小燕(重庆医科大学)

郭风劲(重庆医科大学)

蒋 雪(重庆医科大学)

雷云龙(重庆医科大学)

李 梨(重庆医科大学)

李 轶(重庆医科大学)

刘先俊(重庆医科大学)

蒲淑萍(重庆医科大学)

汪长东(重庆医科大学)

王继红(重庆医科大学)

王应雄(重庆医科大学)

杨生永(重庆医科大学)

易发平(重庆医科大学)

张 莹(重庆医科大学)

张 政(重庆医科大学)

张春冬(重庆医科大学)

朱慧芳(重庆医科大学)

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书是“以器官-系统为主线”的高等医学院校：“5+3”临床医学专业医学整合课程实验系列教材的一部分，对传统开设的生物化学、分子生物学、细胞生物学和医学遗传学四门课程的实验内容进行了有机整合。全书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章。教材内容新颖，体系完整，有所侧重，便于选择。

本书适合“以器官-系统为主线”的“5+3”一体化培养临床医学专业学生使用，也可用于医学院校临床医学等各专业学生相关课程的实验教学，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

医学整合课程基础实验. 分子与细胞分册 / 王应雄, 卜友泉主编.
—北京: 科学出版社, 2016.8

临床医学“5+3”及卓越医生教育培养计划·医学整合课程实验系列教材

ISBN 978-7-03-049612-6

I. ①医… II. ①王… ②卜… III. ①基础医学-医学院校-教材 ②分子生物学-医学院校-教材③细胞生物学-医学院校-教材 IV. ①R3②Q7③Q2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 197886 号

责任编辑: 王 颖 / 责任校对: 钟 洋

责任印制: 徐晓晨 / 封面设计: 陈 敬

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>

北京九州迅驰传媒文化有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 8 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2017 年 1 月第二次印刷 印张: 15 1/4

字数: 360 000

定价: 69.80 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

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。本实验教材是重庆医科大学立项建设的“以器官-系统为主线”的高等医学院校“5+3”临床医学专业医学整合课程系列教材的一部分，是整合课程“分子与细胞”的配套实验教材。

本教材共四章。第一章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分子与细胞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，目的在于使学生对分子与细胞相关研究技术有一个系统的认识。第二章是经典验证性实验，开设了一些经典的分子与细胞相关实验，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。第三章是综合性实验，每个实验均涉及多个实验技术的使用，通过相对系统的使用多个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。第四章是创新性实验，主要通过由学生自己提出问题、解决问题等方式，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分子与细胞相关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。

本教材适合“以器官-系统为主线”的“5+3”一体化培养临床医学专业学生使用，也可用于医学院校临床医学等各专业学生相关课程的实验教学，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，教材中不当之处在所难免，恳请同行专家和同学们批评指正。

编 者

2016年5月于重庆

目 录

第一章 基本实验操作及常用仪器使用..... 1	实验十六 丙二酸对琥珀酸脱氢酶
第一节 常用研究技术..... 1	的竞争性抑制作用..... 82
第二节 基本实验操作..... 24	实验十七 Hg^{2+} 对脲酶的抑制作用... 84
第三节 常用仪器使用..... 32	实验十八 酶米氏常数的测定..... 86
第四节 实验室规则及安全防护..... 43	第五节 糖与脂质..... 87
第五节 如何撰写实验报告..... 44	实验十九 血糖浓度的测定..... 88
第二章 经典验证性实验..... 46	实验二十 肾上腺素对血糖浓度的
第一节 蛋白质定量分析实验..... 46	影响..... 90
实验一 微量凯氏定氮法测定蛋白	实验二十一 血清三酰甘油浓度
质含量..... 46	测定..... 91
实验二 双缩脲法测定血清蛋白质	实验二十二 血清总胆固醇浓度
含量..... 49	测定..... 94
实验三 Folin-酚试剂法测定蛋白	实验二十三 血清载脂蛋白 apoA1
质含量..... 50	的测定..... 98
实验四 紫外分光光度法测定蛋白质	实验二十四 血清过氧化脂质的
浓度..... 52	测定..... 99
实验五 BCA 法测定蛋白质浓度..... 54	实验二十五 血清脂蛋白琼脂糖凝
第二节 层析实验..... 56	胶电泳..... 101
实验六 纸层析法观察转氨基作用... 56	第六节 核酸分离纯化技术..... 102
实验七 葡聚糖凝胶柱层析分离血红	实验二十六 基因组 DNA 的提取
蛋白与鱼精蛋白..... 58	制备与检测..... 102
实验八 离子交换层析分离混合氨	实验二十七 全血基因组 DNA 的
基酸..... 60	试剂盒法提取制备与
实验九 薄层层析分离鉴定氨基酸... 61	检测..... 106
第三节 电泳实验..... 64	实验二十八 总 RNA 的提取制备
实验十 血清醋酸纤维薄膜电泳..... 64	与检测..... 108
实验十一 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离	实验二十九 质粒 DNA 的提取制备
血清 LDH 同工酶..... 67	与检测..... 111
实验十二 SDS-PAGE 测定蛋白质	实验三十 动物组织核酸的提取及
的相对分子量..... 72	成分鉴定..... 115
第四节 酶学实验..... 74	第七节 PCR 技术..... 117
实验十三 血清碱性磷酸酶活性	实验三十一 常规 PCR 技术..... 117
测定..... 75	实验三十二 定量 PCR 技术..... 120
实验十四 血清丙氨酸氨基转移酶	第八节 基因克隆技术..... 123
活性测定..... 77	实验三十三 凝胶中 DNA 片断的
实验十五 胰酶对蛋白质的消化和	纯化回收..... 123
影响酶作用的因素..... 79	实验三十四 DNA 的限制性酶切

与电泳	124	第三章 综合性实验	178
实验三十五 DNA 连接实验	127	实验一 血清 γ -球蛋白的分离纯化及鉴定	178
实验三十六 感受态细胞的制备	130	实验二 碱性磷酸酶的分离纯化与动力学研究	183
实验三十七 重组 DNA 转化与蓝白斑筛选	131	实验三 hCS 基因在大肠埃希菌中的表达、纯化及鉴定	187
第九节 分子杂交与印迹技术	133	实验四 hCS 基因在毕赤酵母中的表达及鉴定	192
实验三十八 核酸原位杂交	133	实验五 荧光原位杂交实验	195
实验三十九 Southern 印迹杂交	139	实验六 用双荧光素酶报告基因检测启动子活性	198
实验四十 Northern 印迹杂交	142	实验七 电泳迁移阻滞实验	201
实验四十一 Western 印迹	145	实验八 染色质免疫沉淀	205
第十节 细胞结构	147	实验九 蛋白质双向电泳	209
实验四十二 动植物细胞的基本形态与结构及细胞显微测量	147	实验十 肝癌组织的代谢组学分析	214
实验四十三 细胞内几种细胞器的观察	151	实验十一 酵母双杂交实验	218
实验四十四 小白鼠巨噬细胞吞噬实验	152	实验十二 RNA 干扰实验	220
实验四十五 细胞内几种化学成分的显示	153	实验十三 人类外周血染色体标本的制备观察	224
实验四十六 细胞骨架系统的显示与观察	155	实验十四 人类恶性肿瘤染色体标本的制备观察	225
实验四十七 细胞膜的通透性的观察	157	实验十五 羊水细胞培养及染色体标本的制备观察	226
第十一节 细胞增殖	158	实验十六 人精子染色体标本制备	228
实验四十八 细胞融合实验	158	实验十七 绿色荧光蛋白标记的融合蛋白转染及观察	230
实验四十九 细胞有丝分裂观察	159	第四章 创新性实验	231
实验五十 细胞原代培养	161	实验一 重要蛋白质或酶的分离纯化	231
实验五十一 细胞传代培养	163	实验二 家族性高胆固醇血症的诊断	231
实验五十二 培养细胞的冻存、复苏与运输	163	实验三 血友病的分子诊断	233
第十二节 医学遗传	164	实验四 RNA 干扰技术靶向沉默目的基因	233
实验五十三 人类某些遗传性状的观察及皮肤纹理分析	165	实验五 家系调查和遗传病的系谱分析	234
实验五十四 人类染色体照片核型分析	171	实验六 药物诱导肿瘤细胞凋亡的检测实验	236
实验五十五 染色体 G 显带染色体的核型分析	173	主要参考文献	237
实验五十六 人类染色体镜下核型分析	176		

第一章 基本实验操作及常用仪器使用

第一节 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,对不同波长光线的吸收能力不同。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。它不仅可应用于可见光,还可以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、高精度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

光由光量子组成,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 190~360nm 和 180~500nm 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、钠灯和疝灯等。钨灯发射连续波长的范围在 320~2500nm 之间;钠灯发射连续波长的范围在 400~10 000nm 之间;疝灯发射连续波长的范围在 250~700nm 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 1500~2000℃之间的惰性材料。它的检测波长范围在 750~1 000 000nm 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 0~2mm 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光检测器、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。分光光度计采用电子倍增光电管,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高,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:

$$A_1 = E_1 C_1 L_1 \quad A_2 = E_2 C_2 L_2 \quad (1-1)$$

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:

$$A_1/(E_1C_1) = A_2/(E_2C_2) \quad (1-2)$$

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其相对应的浓度。

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 $\text{L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 。 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:

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

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, 吸收高峰和低谷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)。紫外线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。

(张莹)

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,在溶液中所受到的阻力 F' 服从 Stock 定律:

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

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:

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

由公式(2-3)可知,相同带电颗粒在不同强度的电场里泳动速度是不同的,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:

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

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:

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

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 $0.02 \sim 0.20 mol/L$ 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分子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,使其扩散变性。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、乙酸纤维素薄膜、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 μ 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-D 吡喃半乳糖和 1, 4 连接的 3, 6-脱水 α -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锭(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法。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' -tetramethylethylenediamine, 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 链间产生交叉键交联,从而形成三维网状结构。光聚合法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7mm、长约10cm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、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1h左右,而圆盘电泳和垂直平板电泳一般需要3~4h。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20世纪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1cm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中被分离,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。①在分离蛋白质组成时具有高分辨率,可分离 pI 相差 $0.01 \sim 0.02$ 单位的蛋白质。比如可将人血清分出 $40 \sim 50$ 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。②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 $5000 \sim 10\,000$ 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),依据样品各组分间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,CE也将向微型化(芯片化)和集成化的方向发展。

9. 脉冲凝胶电泳 脉冲凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)是在琼脂糖凝胶上外加正交的交变脉冲电场,其方向、时间与电流大小交替改变。每当电场方向发生改变,大分子的DNA便滞留在爬行管内,直至沿新的电场轴重新定向后,才能继续向前移动。DNA分子越大,重排所需时间越长。

普通琼脂糖凝胶电泳,很难分离大于50kb的DNA分子,所以很难进行超大DNA研究。而PFGE正好用于分离超大分子量DNA(有时甚至是整条染色体)。近年来,以PFGE为代表的分子生物学分型方法颇受青睐,利用PFGE可间接或直接反映病原体变异分化的本质即DNA序列的改变,从而做到微观变化的宏观显示。电泳结果通常是条带图谱,该方法的发展为监测控制细菌的流行提供了广阔前景。通过PFGE的分型分析可鉴定比较菌株是否一致,对细菌性传染病监测、传染源追踪、传播途径调查和识别等暴发调查有非常重要的意义。

10. 蛋白质印迹 蛋白质印迹(protein blotting)是将电泳分离后的蛋白质转移到固定基质上,再对其作进一步分析的方法,适用于复杂混合样品中某些特定蛋白质的鉴定和定量。实验室普遍使用的蛋白质印迹方法是Western blot。蛋白质印迹将高分辨率电泳技术与灵敏专一的免疫技术结合起来,用针对蛋白质特定氨基酸序列的特异性试剂作为探针进行检测。对于蛋白质而言,通常使用的探针是抗体,它与附着于固定基质上的靶蛋白发生特异性结合反应,这种依靠抗体的印迹方法称为免疫印迹。

蛋白印迹法的基本步骤依次是蛋白质凝胶电泳、蛋白质转移、封闭、免疫检测。蛋白质

印迹的基础是蛋白质在凝胶电泳中的分离。蛋白质电泳一般采用SDS-PAGE,也有用尿素-PAGE。对凝胶电泳分离系统的选择首先考虑其分辨率,其次考虑被分离组分的生物活性,比如含SDS和其他蛋白变形剂的凝胶电泳就不适合酶的分离,因为会导致酶失活。蛋白质样品通过凝胶电泳实现各组分分离后,采用主动或被动方式将被分离的蛋白质条带从凝胶转移到固定基质上,比如转移到醋酸纤维素膜上。随后,用非特异性、非反应活性分子封闭固定基质上未吸附蛋白质的区域,也确保后续特异性探针只与固定基质上的蛋白质反应。通常用牛血清白蛋白或脱脂奶粉作为封闭剂,也可使用无离子去污剂吐温-20。最后,用探针特异性地检出固定基质上的靶蛋白。这个过程一般包括多个反应过程,比如Western blot采用间接检测法,先用抗靶蛋白的第一抗体和靶蛋白结合,再用标记的第二抗体与第一抗体结合,第二抗体一般携带酶标记,加入酶催化的反应底物将发生显色反应,最后经曝光洗片或拍照保存实验结果。

(张莹)

三、层析技术

层析技术(chromatography techniques),也称色谱技术或层离技术,被广泛用于物质的分离纯化和分析鉴定,已经成为分离无机化合物、有机化合物及生物大分子等不可缺少的重要技术。层析技术是一类物理分离方法,根据分离混合物中各组分物理化学性质的差别,使各组分以不同程度分布在固定相和流动相两相中,由于各组分随流动相前进的速度不同,从而得到有效分离。

(一)基本原理

所有的层析系统都由两个相组成,即固定相和流动相。固定相或者是固体物质或者是固定于固体物质上的某些成分,而流动相指的是可以流动的物质,既可以是水或各种有机溶媒及其混合物,也可以是各种气体。待分离的混合物进入层析系统时,混合物各组分随着流动

相通过固定相,由于混合物各组分的理化性质存在差异,与两相的相互作用(吸附、溶解、结合等)的能力不同,导致它们在两相中的分配比不同。各组分随着流动相不断向前移动,实现在两相中的再分配。与固定相相互作用力较弱的组分,随流动相移动时受到的阻力较小,向前移动的速度较快,优先流出层析系统。反之,与固定相相互作用力较强的组分,向前移动的速度较慢,流出层析系统的时间晚。然后分别收集代表各单一组分的流出液,实现组分分离。

(二) 层析技术分类与应用

按照层析的分离相状态分类,可以分为气相层析、液相层析和超临界层析。气相层析是以气体为流动相的层析方法,根据固定相的性质不同又可分为气-固层析和气-液层析。前者是指载体表面含有许多吸附基团的固体吸附介质,后者是指载体表面涂有一层液体分子制成的介质。液相层析是以液体为流动相的层析方法,同样可根据固定相的性质不同把液相层析分为液-固层析和液-液层析。超临界层析是以流体为流动相的层析方式,它是利用流动相溶剂分子的气态和液态临界点的条件下进行分离的,这种分离方法更具专一性。

按照层析操作形式分类,可以分为柱层析、薄层层析、纸层析、薄膜层析等。例如,薄层层析是在玻璃板上涂布一层支持剂,待分离样品点在薄层板一端,然后让推动剂从上流过,从而使各组分得到分离的物理方法。薄层层析设备简单,操作简便,快速灵敏。改变薄层厚度,既可作分析鉴定,又能作少量制备。配合薄层扫描仪,可同时做到定性定量分析,在生物化学、植物化学等领域是一类广泛应用的物质分离方法。

按照层析的分离原理分类,可分为吸附层析、分配层析、凝胶层析、离子交换层析、亲和层析、金属螯合层析、疏水层析、反向层析、聚焦层析、灌注层析等。

各种层析技术的基本操作步骤都包括选择适当吸附剂、加样、展开和检出鉴定四个环节。液相层析仪器主要包括储液器、层析柱、检测器和记录器等,其中核心结构是层析柱和检测器。本节重点介绍生物化学分离中常用的几种

层析方法。

1. 吸附层析 吸附层析是利用固定相表面的活性基团来吸附流动相中溶质而进行分离的方法。溶液中的溶质随流动相通过吸附层析介质时,柱内的吸附介质表面的吸附基团对溶质发生吸附作用,某些溶质就会被吸附在介质上。介质表面的活性基团不同对溶质产生的吸附能力的强弱有较大的差异。因此,可以利用介质对溶质吸附能力的强弱,通过吸附层析将不同溶质分开。

吸附层析在常规层析分离中的应用很广,在微量分析方面也有发展,对于生物大分子的分离纯化具有重要作用。

2. 凝胶层析 凝胶层析又称凝胶过滤,是一种柱层析方法。层析柱中装着水不溶凝胶常用的材料,比如交联葡聚糖、交联琼脂糖、聚丙烯酰胺凝胶、多孔玻璃、聚苯乙烯等。这些材料制成凝胶颗粒,颗粒内部形成多孔的三维网状结构。当在胶床表面加上分子大小不同的样品混合物并用洗脱液洗脱时,直径小于网孔直径的分子可以进行胶粒内部,需层层扩散,经过很长过程才能出柱。而直径大于网孔直径受排阻的大分子不能进入胶粒内部,沿着胶粒之间的间隙向下流动,所经路程短最先流出。通透性居中的分子则后于大分子而先于小分子流出,从而按由大到小的顺序实现大中小分子的分离。

凝胶层析操作条件温和,适于分离不稳定的化合物。凝胶材料本身不带电荷,不会与被分离分子相互作用,因而溶质的回收率接近100%。分离效果好,重复性好,耗时短。每个样品洗脱完毕,柱已经再生,可反复使用。凝胶层析已广泛用于生物物质的分离、脱盐、制备、分子量测定等。

3. 离子交换层析 离子交换层析是根据物质的酸碱性、极性和分子大小的差异而予以分离的柱层析技术,将具有交换能力的离子基团连接在固定相上面,这些离子基团可以与流动相中离子发生可逆性离子交换反应而进行分离。可用于离子交换层析的介质材料很多,应用得最普遍的是阳离子交换树脂和阴离子交换树脂,它们属于人工合成的难溶于一般溶剂的

高分子聚合物类。带有酸性可电离基团的以 $-\text{SO}_3\text{H}$ 表示,称为阳离子交换树脂。带有碱性可电离基团的以 R_4NOH 表示,称为阴离子交换树脂。另外,纤维素衍生物作为离子交换层析的介质,在生化分离方面也很常用。常见的阴离子交换纤维素有磺酸甲基纤维素(SMC)、羧甲基纤维素(CMC)、磷酸基纤维素(PC)等,阳离子交换纤维素有二乙基胺乙基纤维素(DEAEC)、三乙基胺乙基纤维素(TEAEC)等。根据离子交换层析原理设计的氨基酸自动分析仪在生化分离中是非常有用的工具。

离子交换层析广泛地用于各种无机离子和有机离子,以及核酸、多糖、蛋白质等大分子离子的分离分析。但鉴于离子交换树脂在蛋白质层析分析中交换容量低,易导致大分子蛋白变性,且对各蛋白质组分的分辨率不太高,所以目前仅用于分子量相对较小的球状蛋白的分离纯化。

4. 亲和层析 亲和层析是利用某些生物分子之间专一可逆结合特性的分离方法。其具体操作过程是:首先寻找能被分离分子(称配体)识别和可逆结合的专一性物质,即配基;然后,把配基共价结合到层析介质(载体)上,即把配基固定化;随后,把载体-配基复合物灌装在层析柱内做成亲和柱;最后,经历上样亲和、洗涤杂质、洗脱收集亲和分子(配体)和亲和柱再生的过程。

在亲和层析中可用琼脂糖、聚丙烯酰胺凝胶和多孔玻璃球做层析介质,以琼脂糖最为常用。用琼脂糖做载体,非特异性吸附低,与被分离分子作用微弱。多孔结构具有很好的液体流动性。在较宽的 pH、离子强度和变性剂浓度范围内具有化学和机械稳定性。根据需要对其进行不同程度活化处理,可以很好地与配基共价结合。配基是发生亲和反应的功能部位,也是载体和被亲和分子之间的桥梁。配基本身必须具备两个基团,一个能与载体共价结合,一个能与被亲和分子结合。可作为配基的物质有酶底物的类似物、效应物、酶的辅助因子。有亲和分子的物质,原则上都可设法作配基使用,如固定化抗体可分离抗原,固定化抗原可分离抗体,固定化寡聚脱氧胸腺嘧啶核苷酸(oligo

dT)可以亲和分离 mRNA 等。亲和层析中常用小分子化合物作配基去亲和吸附与其相配的大分子物质。

亲和层析是利用配基-配体之间专一可逆结合性质进行物质分离的方法,因此其专一性、选择性是极高的,往往通过一次亲和操作,就可把目的物从混合物中分离出来,对含量甚微的组分分离具有特殊的效果。

5. 气相色谱 气相色谱是柱色谱的一种,气相色谱仪的结构示意图如图 1-1。填充柱是其核心部分,在填充柱里装有层析介质俗称担体,它可以是一种固体吸附剂,也可以是表面涂有耐高温液体(称固定相)的物质构成的固定相。在柱子进口端注入待分离样品,在载气(称流动相,常用氮气、氦气、氩气等惰性气体)推动下,样品进入层析柱,在一定高温条件下,样品中各种组分气化并以不同的速率前进,从而逐渐分离开来。不容易被担体吸附或在固定相里分配系数小的组分,在柱中停留的时间较短首先从柱后流出。而容易被吸附或在固定相中分配系数大的组分,在柱中保留时间较长而后从柱后流出。不同时间流出的组分被柱后检测器检出,检出信号经放大后由数据处理机记录下各组分出峰图谱。根据各组分的保留时间与标准物质比较,实现定性和定量分析。增加层析柱的长度,能显著提高分辨率。气体组分的检出比液体容易,氢火焰离子化检测器(FID)、火焰光度检测器(FPD)、电子捕获检测器(ECD)、化学发光检测器(CLD)等多种柱后检测器的使用,实现了组分检出的高度自动化。

气相色谱早已成为物质分离的现代方法。把气相色谱仪作为分离工具,与红外、紫外、质谱仪等联合使用在生化研究中发挥了重要作用。

6. 高效液相色谱 高效液相色谱是另一种柱色谱,由于它具有气相色谱的所有优点,又不要求样品是可挥发物质,凡是能用溶剂溶解的组分原则上都可以用高效液相色谱分离,在完成柱后检测的同时,样品可用部分收集器回收,因此,高效液相色谱是生化研究中的重要技术支持。

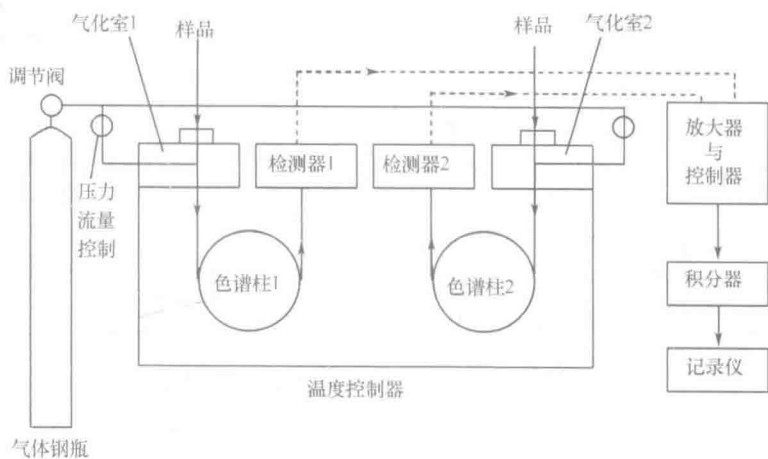


图 1-1 气相色谱仪的结构示意图

高效液相色谱仪的结构示意图见图 1-2，一般由溶剂槽、高压泵、分析柱、进样器(手动或自动两类)、检测器(常见的有紫外检测器、折光检测器、荧光检测器等)、数据处理机或色谱工作站等组成。高效液相色谱仪的核心部件是耐高压的细目柱。柱中装有粒径极小的担体。当样品进入分析柱后，其中的各种组分随流动相前进的速率不同，从而实现有效的分离。柱

中担体有不同的类型，分离的原理视担体种类不同而分为液-液分配层析、液-固吸附层析、离子交换层析、凝胶渗透层析等多种。高效液相色谱可以完成定性和定量分析，还可以用制备型色谱做一定量的制备。与气相色谱相配合，可以完成绝大多数生物物质的分离和分析。

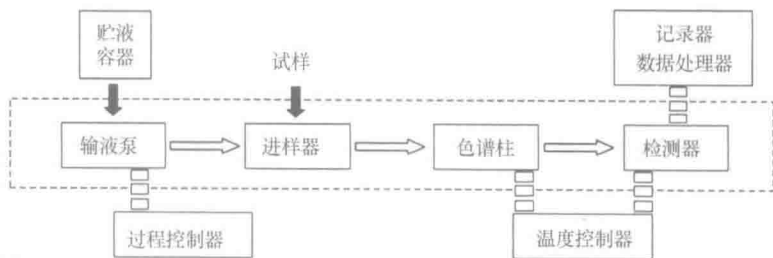


图 1-2 高效液相色谱仪的结构示意图

四、离心技术

如果装有悬浮液或高分子溶液的容器进行高速水平旋转，强大的离心力作用于溶剂中的悬浮颗粒或高分子，会使其沿着离心力的方向运动而逐渐背离中心轴。在相同转速条件下，容器中不同大小的悬浮颗粒或高分子溶质会以不同的速率沉降。经过一定时间的离心操作，就可能实现不同悬浮颗粒或高分子溶质的有效分离。在生命科学研究中广泛使用的离心机，

就是基于上述基本原理设计的。

(张 莹)

(一) 基本原理

1. 离心力及沉降系数 颗粒在离心力场的介质中受到多方面的力，其中有离心力、浮力、重力的作用。由于重力远远小于离心力，一般转速在 880r/min 以上时就可以忽略不计。因此，颗粒的运动轨迹在不考虑扩散等影响下取决于所受合力的方向。根据物理学原理推导可知：