



普通高等教育“十三五”规划教材
全国高等院校医学实验教学规划教材

编审委员会主任委员 文格波
编写委员会总主编 姜志胜

生物化学实验与技术

主编 田英 乔新惠



科学出版社

普通高等教育“十三五”规划教材
全国高等院校医学实验教学规划教材

编审委员会主任委员 文格波

编写委员会总主编 姜志胜

生物化学实验与技术

主 编 田 英 乔新惠

副主编 曹朝晖 胡小波 刘 皓

编 委 (按姓氏笔画排序)

曹朝晖 曹运长 陈万群 (暨南大学) 付明德 (四川大学)
何芳丽 何淑雅 胡小波 黄春林 贾连群 (辽宁中医药大学)
蒋建伟 (暨南大学) 李斌元 李俐娟 李亚林 林国平
刘 皓 (四川大学) 龙石银 罗 应 马 云 乔新惠
余美华 苏泽红 唐 旻 田 英 王五洲
文红波 吴颜晖 (暨南大学) 严丽梅 杨 霞 (中山大学)
尹卫东 宇 丽 (暨南大学) 张 敏 张彩平

秘 书 张 敏

科 学 出 版 社

北 京



内 容 简 介

本书为全国高等院校基础医学实验教学规划教材。全书分生物化学实验技术原理、基础验证性实验、综合性实验、创新性实验及附录五个部分。第一部分共五章,较系统介绍了电泳、层析、分光、超离心技术和生物大分子分离纯化的一般原则;第二部分为27个基础验证性实验,涉及蛋白质、核酸、酶等生物分子的分离、纯化、鉴定等;第三部分为6个综合性实验,以强化训练综合实验技能;第四部分为5个创新性实验,以培养和增强创新能力。附录部分包括实验室的基本操作、试剂的配制与保管、常用仪器的使用方法等,供读者查阅和参考。

本书可供开设相应实验课程的医学、生物技术、生物科学、药学、医学检验、卫生检验、护理、妇幼等专业的本科生及相关专业的硕士研究生使用,也可供相关科技工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验与技术 / 田英, 乔新惠主编. —北京: 科学出版社, 2016.6

普通高等教育“十三五”规划教材·全国高等院校医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-048494-9

I. ①生… II. ①田… ②乔… III. ①生物化学-化学实验-高等学校-教材 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2016)第121619号

责任编辑: 李 植 / 责任校对: 李 影
责任印制: 赵 博 / 封面设计: 陈 敬

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>

大厂书文印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016年6月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2016年6月第一次印刷 印张: 12 1/2

字数: 291 000

定价: 38.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

全国高等院校医学实验教学规划教材

编审委员会

主任委员 文格波

副主任委员 姜志胜 吴移谋 廖端芳

委员 (以姓氏笔画排序)

王 韵	王宗保	牛亦农	龙双涟
田 英	刘贻尧	刘艳平	宇 丽
严 杰	李 和	肖建华	肖献忠
何庆南	余 平	宋 健	张新华
陈 熙	罗学港	周国民	贺修胜
秦晓群	龚永生	傅松滨	管又飞

编写委员会

总 主 编 姜志胜

副总主编 田 英 陈 熙 贺修胜

编 委 (以姓氏笔画排序)

万 炜	王汉群	尹 凯	甘润良
龙石银	乔新惠	刘 俊	刘录山
向宇燕	李严兵	李国庆	李忠玉
李美香	杨秋林	张 艳	屈丽华
易 岚	易光辉	胡四海	赵飞骏
桂庆军	凌 晖	唐志晗	梁 瑜
彭翠英	谭健苗		

秘 书 梁 瑜 唐志晗

序 一

近年来,教育部卫生部等多部委紧密部署实施本科教学工程、专业综合改革试点、实践育人和卓越医生教育培养计划,把强化实践教学环节作为重要内容和重点要求,进一步凸显了医学实践性很强的属性,对切实加强医学实验教学提出了更高要求,指引着我国医学实验教学进入全面深化改革阶段。

高校牢固树立以学生为本、目标导向和持续改进的教育理念,积极创新和完善更加有利于培养学生实践能力和创新能力的实验教学体系,建设高素质实验教学队伍和高水平实验教学平台,以促进和保证实验教学水平全面提高。为此,南华大学医学院协同国内多所高校对第一版《全国高等院校基础医学实验教学系列规划教材》进行了修订和拓展。第二版教材涵盖了解剖学、显微形态学、医学免疫学、病原生物学、机能学、临床技能学、生物化学、分子生物学、医学细胞生物学、医学遗传学的实验教学内容,贯彻了先进的教育理念和教学指导思想,把握了各学科的总体框架和发展趋势,坚持了理论与实验结合、基础与临床结合、经典与现代结合、教学与科研结合,注重对学生探索精神、科学思维、实践能力、创新能力的全面培养,不失为一套高质量的精品教材。

愿《全国高等院校医学实验教学规划教材》的出版为推动我国医学实验教学的深化改革和持续发展发挥重要作用。

教育部高等学校基础医学类专业教学指导委员会主任委员
中国高等教育学会基础医学教育分会理事长

2015年12月



序 二

随着本科教学工程、专业综合改革试点、实践育人和卓越医生教育培养计划的实施,高等医学院校迎来了进一步加强医学实验教学、提高医学实验教学质量的大好时机,必须积极更新医学实验教学理念,创新实验教学体系、教学模式和教学方法,整合实验教学内容,应用实验教学新技术新手段,促进医学人才知识、技能和素质全面协调发展。

《全国高等院校医学实验教学规划教材》编审委员会和编写委员会与时俱进,积极推进实验教学改革的深化,组织相关学科专业的专家教授,在第一版的基础上,吸收了南华大学等多个高校近年来在医学实验教学方面的改革新成果,强调对学生基本理论、基础知识、基本技能以及创新能力的培养,打破现行课程框架,构建以综合能力培养为目标的新型医学实验教学体系,修订并拓展了这套实验教学规划教材。第二版教材共十四本,包括:《系统解剖学实验》《局部解剖学实验》《显微形态学实验(组织与胚胎学分册)》《显微形态学实验(病理学分册)》《病原生物学实验(医学微生物学分册)》《病原生物学实验(人体寄生虫学分册)》《医学免疫学实验》《机能实验学》《临床基本技能学(诊断技能分册)》《临床基本技能学(外科基本技能分册)》《生物化学实验与技术》《分子生物学实验》《医学细胞生物学实验》《医学遗传学实验》。

本套规划教材的编写,借鉴国内外同类实验教材的编写模式,内容上依据医学实验体系进行重组和有机融合,按照医学实验教学的逻辑和规律进行编写,并注重知识的更新,反映学科的前沿动态,体现教材的思想性、科学性、启发性、先进性和实用性。

本套规划教材适用对象以本科临床医学专业为主,兼顾麻醉学、口腔医学、医学影像、护理学、预防医学、医学检验、卫生检验、药学、药物制剂、生物科学、生物技术等专业实验教学需求,各层次各专业学生可按照其专业培养特点和要求,选用相应的实验项目进行教学与学习。

本套规划教材的编写出版,得到了科学出版社和南华大学以及有关兄弟院校的大力支持,凝聚了各位主编和全体编写、编审人员的心血和智慧,在此,一并表示衷心感谢。

由于医学实验教学模式尚存差异,加上我们的水平有限,本套规划教材难免存在缺点和不当之处,敬请读者批评指正。

总主编
2015年12月



前 言

生物化学是一门实践性极强的科学，实验教学在生物化学教学中占有重要地位，生物化学实验技术已广泛渗透并常规应用于生命学科各个领域，是医学等诸多学科的重要研究手段，也是培养学生实践能力和创新精神的重要环节。生物化学实验与技术是医学类各专业、各层次学生必修的一门基础实验课程。为了使医学生不仅能够系统地学习和掌握生物化学基本实验技能，而且能够通过实验教学达到创新性教育的目的，我们组织了教学经验丰富并热心于教学改革教师们编写了生物化学实验与技术教材。根据不同的教学目标，对基本实验内容进行了精心选择和取舍，既力求体现其基本原理、基础知识、基本技能，又尽力融入具有科学性、先进性、启发性的实用新技术。根据时代发展对专业技术人才的需求，把生物化学知识和技能作为模块构建教材内容，搭建培养平台。通过实验，了解各类生物大分子的生物学特性、仪器的工作原理和使用范围及化学试剂的理化性质，结合模块分析介绍，学会对各类生物化学实验进行设计。培养学生实验设计、综合运用、宏观思维和辩证分析问题的基本技术素质和工作技能，学习如何通过实验及实验中发生的现象来发现问题、提出问题，并学会怎样解决问题。

本教材书分四篇，共包含五章技术理论、二十七个基础性实验、六个综合性实验及五个创新性实验。其中第一篇主要讲述电泳、层析、分光、离心等四大技术的相关理论，并简要介绍了生物大分子分离纯化的一般原则及基本的实验操作要求，目的在于使学生对生物化学实验与研究技术有一个系统的认识。第二篇是基础验证性实验，着重验证学科理论教学内容，突出实验教学与理论知识的密切联系，加深对理论知识的理解，阐述生物化学基本实验的方法和过程，开设了一些经典的生物化学实验，这些实验均经过长期的实验教学实践，证明有助于学生加深对理论知识的理解，培养学生基本的实验操作能力及分析问题和解决问题的能力。第三篇是结合生物化学相关知识，启发、指导学生完成综合性实验，即一个实验中包含着几个内容，每个实验均涉及多种实验技术的使用，才能完成一个完整的实验，以此来进一步强化训练学生的综合实验技能。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。第四篇通过模块剖析，指导学生通过实践完成相关创新性实验，增强学习自然科学的能力和创新意识。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。

本教材的特点是由浅入深、循序渐进、由基础到综合启发学生掌握生物化学实验方法与过程，并强调学生创新能力的挖掘，虽然也引用了基础生物化学实验供各层次学生参考学习，但不是完全搬用或移植，其目的是使学生通过对这些经典实验过程的剖析，逐步完成综合性、创新性实验，这是和过去类似教材的显著不同之处。

本教材主要为开设相应实验课程的医学、生物技术、生物科学、药学、医学检验、卫生检验、护理、妇幼等专业的本科生及相关专业的硕士研究生使用,根据不同专业学生培养特点和要求,选择相应的实验项目。

在本书编写和出版的过程中,感谢各位领导的指导帮助,感谢各位参与者的辛勤劳动,在此表示诚挚的谢意。由于编写本书的时间仓促,加之深入探索还不够,难免存在错误和不当,恳请使用本教材的师生和读者不吝赐教,以便再版时修改。

田 英 乔新惠

2015 年 11 月

目 录

第一篇 生物化学实验技术原理

第一章 电泳技术	1
第一节 概述	1
第二节 电泳的基本原理	2
第三节 区带电泳技术	7
第四节 染色方法	26
第二章 层析技术	31
第一节 概述	31
第二节 层析技术的基本理论	33
第三节 层析定性定量分析	41
第四节 常用的层析方法	44
第三章 分光光度法	57
第一节 概述	57
第二节 光吸收的基本规律	60
第三节 分光光度计的构造和类型	61
第四节 定性、定量方法及其应用	64
第五节 双波长分光光度计及其测定方法	66
第四章 超离心技术	70
第一节 概述	70
第二节 超离心分离方法	75
第三节 密度梯度液的制备和区带收集	79
第四节 制备超离心机作沉淀分析	84
第五章 生物大分子的分离纯化与鉴定	85
第一节 生物大分子制备的前处理	85
第二节 分离纯化	87
第三节 生物大分子的浓缩、干燥和保存	88
第四节 生物大分子含量的测定和纯度鉴定	90

第二篇 基础验证性实验

实验一 血浆蛋白质乙酸纤维薄膜电泳	92
实验二 血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	94
实验三 血清总蛋白的测定及标准曲线的制作(双缩脲法)	95
实验四 蛋白质定量测定 Folin-酚试剂法	97
实验五 血清丙氨酸氨基转移酶(S-ALT)活性测定	99
实验六 动物组织 DNA 的提取和鉴定	102
实验七 肝糖原的提取鉴定与定量	104

实验八	运动后血中乳酸含量的变化	105
实验九	血清总胆固醇测定(磷钼铁法)	108
实验十	琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制	109
实验十一	氨基酸的薄层层析	110
实验十二	氨基酸双向纸层析	111
实验十三	凝胶层析分离血红蛋白与 CuSO_4	114
实验十四	胡萝卜素的柱层析分离	115
实验十五	血清尿素氮的测定	116
实验十六	^3H -胸苷掺入 DNA 的实验	118
实验十七	^{32}P 掺入磷脂的实验	119
实验十八	血红蛋白及其衍生物的吸收光谱测定	121
实验十九	核酸溶液的紫外吸收测定	122
实验二十	蛋白质溶液的紫外吸收测定	123
实验二十一	聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦分离血清蛋白质	125
实验二十二	血清脂蛋白快速超离心分离实验	127
实验二十三	密度梯度离心法分离肝细胞器	128
实验二十四	细胞色素 c 的制备和含量测定	130
实验二十五	固定化具有葡萄糖异构酶活性菌体的制备	132
实验二十六	亲和层析法纯化胰蛋白酶	133
实验二十七	胰酶的活性测定	136

第三篇 综合性实验

综合性实验一	影响酶活性的因素及酶促反应速度与时间的关系	138
综合性实验二	血清白蛋白、 γ -球蛋白的分离纯化及鉴定	146
综合性实验三	Cu-Zn 超氧化物歧化酶的分离、纯化及活性、稳定性测定	149
综合性实验四	SDS-PAGE 分离蛋白质、血清蛋白聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳	154
综合性实验五	动物组织 RNA 的提取和鉴定	160
综合性实验六	聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清乳酸脱氢酶(LDH)同工酶	163

第四篇 创新性实验

创新性实验一	外周血 DNA 的提取和鉴定	168
创新性实验二	凝血酶的固定化及其稳定性测定	171
创新性实验三	糖尿病的生化检测分析及胰岛素、肾上腺素对血糖浓度的影响	172
创新性实验四	DEAE 纤维素离子交换层析法分离血清蛋白质	175
创新性实验五	PBL 教学法在《生物化学》课堂教学中的运用	178

附录		179
----	--	-----

附录 1	生物化学实验的基本操作及原理	179
附录 2	常用容量仪器的规格、使用、清洗及洗液的配制	183
附录 3	化学试剂的规格与保管	187
附录 4	实验室常用设备介绍	188

第一篇 生物化学实验技术原理

第一章 电泳技术

第一节 概述

一、电泳的概念与电泳技术发展简史

电泳 (electrophoresis) 是指带电粒子在直流电场中向着与其自身电性相反电极方向移动的现象。电泳现象由俄国物理学家 Reuss 于 1809 年首先发现, 但是电泳的实际应用则是一百多年以后的事情。1937 年, Tiselius 利用 U 形管制成界面电泳仪, 首次成功地对血清蛋白质进行了分离因而获得诺贝尔奖; 1948 年, Wieland 等发明用滤纸作支持物的区带电泳; 1950 年出现琼脂凝胶电泳; 1953 年又发展为免疫电泳; 1955 年, Smithies 以淀粉胶为支持物将血清蛋白质分离为十余条区带; 1957 年, Kohn 首先使用乙酸纤维素薄膜作为电泳支持物; 1959 年, Davis 发明聚丙烯酰胺凝胶电泳。在此基础上, 电泳技术不断发展, 相继出现等电聚焦电泳、等速电泳、双向电泳、印迹转移电泳和毛细管电泳等技术。并且, 电泳技术与其他技术如层析、扩散、免疫、放射性同位素技术、质谱技术等联用, 使电泳技术的应用范围得以扩大。电泳技术以设备简单, 操作方便, 分辨率高等优点, 目前已成为生物化学、分子生物学、免疫学、生物技术等学科和专业的常用研究工具, 也是医学、药学、工农业生产等各领域的重要分析手段。

二、电泳的分类

根据有无固体支持物, 将电泳分为自由电泳和区带电泳。

(一) 自由电泳

自由电泳又称界面电泳 (moving boundary electrophoresis), 即在溶液中进行电泳。当溶液中有几个组分时, 通电后, 由于组分在电场中移动快慢不同而形成若干个界面。然后采用折光率测定装置对不同界面的折光率进行测定分析, 分部分离收集样品。此法是 1937 年瑞典科学家 Tiselius 创立的最早具有应用价值的电泳装置 (U 形电泳装置), 可用于制备性分离。但有较多缺点: 界面形成不完全, 有重叠, 不易得到纯品; 分离后或停电后极易扩散, 不易分离收集; 利用折光率的改变进行结果测定, 操作繁琐, 需特殊设备, 已很少有人采用。

属于自由电泳的还有显微电泳, 它将一种大的胶体颗粒或细胞置于显微镜下的电泳池

中进行电泳, 可用来直接测定电泳迁移率; 密度梯度和 pH 梯度并存的柱状等电聚焦电泳; 等速电泳等。

(二) 区带电泳

电泳在固相支持物上进行。此支持物将溶液包绕在其网孔中, 避免了溶液中的物质自由移动的弊端, 使混合物的各组分在支持物上分离为区域带。是目前应用最多的电泳方法。

区带电泳 (zone electrophoresis) 又可根据支持物的类型、理化性质、电压、电泳方式等进一步分类。

1. 按支持物的物理性状分类

(1) 滤纸及其他纤维薄膜 (如乙酸纤维薄膜、聚氯乙烯膜、赛璐玢薄膜) 电泳: 适用于小量样品的分析鉴定。

(2) 粉末电泳: 如淀粉、纤维素粉、玻璃粉调制成平板。

(3) 凝胶电泳: 如琼脂胶、琼脂糖凝胶、淀粉胶、聚丙烯酰胺凝胶等为支持物的电泳。

(4) 缘线电泳: 如尼龙丝、人造丝电泳。

2. 按支持物的装置形式分类

(1) 平板式电泳: 支持物水平放置于左右电极槽之间。

(2) 垂直板式电泳: 支持物垂直放置于上下电极槽之间。

(3) 垂直柱式电泳: 支持物制成柱状垂直放置于上下电极槽之间。

(4) 连续液动电泳 (幕状电泳): 首先应用于纸电泳, 将滤纸垂直, 两边各放一电极, 溶液自上向下流, 与电泳方向垂直, 可用于物质的分离与制备。

3. 按电泳系统条件的连续性分类

(1) 连续电泳: 整个电泳系统 pH、离子强度、支持物性质等一致。

(2) 不连续电泳: 缓冲液和支持物间或支持物内 pH、离子强度、介质种类和密度等一种或多种条件不同, 如等电聚焦电泳、聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳。

4. 按电场强度大小分类

(1) 常压电泳: 电场强度通常为 $2 \sim 20 \text{ V/cm}$, 总电压 $< 500 \text{ V}$, 常用于分离高分子化合物, 如蛋白质、核酸。

(2) 高压电泳: 电场强度 $> 20 \text{ V/cm}$, 总电压 $> 500 \text{ V}$, 常用于低分子离子分离, 如氨基酸、核苷酸电泳。

区带电泳还可按操作手段、方法、目的等分类, 如双向电泳、免疫电泳等。

第二节 电泳的基本原理

一、动力和方向

带电粒子在电场中为什么能移动? 是因为带电粒子在电场中受到电场引力 (F) 的作用, F 的大小取决于粒子所带电荷量 Q 及电场强度 E , 即

$$F = QE \quad (1-1-1)$$

粒子在电场中移动的方向由粒子本身所带电荷的性质决定, 带正电荷向负极移动, 带

负电荷向正极移动。

二、迁 移 率

带电粒子在电场中的泳动速率 (migration velocity) 用迁移率 (或泳动率 mobility, M) 来表示。即: 从原点起, 在电场强度为 1V/cm 时, 每秒钟的泳动距离。也就是单位电场强度下的泳动速率。

$$M = \frac{V}{E} = \frac{\frac{d}{t}}{\frac{V}{l}} = dl/vt \quad (\text{cm}^2/\text{V} \cdot \text{s}) \quad (1-1-2)$$

注: M 迁移率; V 泳动速率 (cm/s); E 电场强度 (V/cm); d 泳动距离 (cm); l 支持物有效长度 (cm); V 支持物有效电压 (V); t 通电时间 (s)。

三、影响电泳的因素

对电泳的影响包括对速度的影响和效果的影响。影响电泳的因素很多, 如样品颗粒本身所带电荷的种类、数量、粒子大小、形状; 支持物化学性质、带电状况、有无分子筛作用; 缓冲液的 pH 、离子强度、缓冲容量、黏度、化学成分; 电场电压、电流、热效应与水分蒸发、水的电解等。

(一) 样品粒子

已知带电粒子在电场中所受的作用力 $F = EQ$, 根据 Stokes 定律, 球形粒子在液体中运动时所受到的阻力 F' , 与粒子运动的速度 V , 粒子的半径 r , 介质的黏度 η 的关系为

$$F' = 6\pi r\eta V \quad (1-1-3)$$

当电泳达到平衡, 粒子在电场中做匀速运动时 $F = F'$, 即

$$EQ = 6\pi r\eta V \quad (1-1-4)$$

$$\therefore V = EQ/6\pi r\eta \quad (1-1-5)$$

也即电泳速度与电场强度、粒子带电量成正比, 与粒子的半径、介质的黏度成反比。

又 $M = V/E$, 以 (1-1-5) 代入得

$$M = EQ/6\pi r\eta / E$$

整理, 得

$$M = Q/6\pi r\eta \quad (1-1-6)$$

式中, 6π 是适用于球形带电粒子的经验数值, 对椭圆形或半径 r 很大的粒子则数值有所不同。

由式 (1-1-6) 可知, 迁移率与粒子所带电荷量成正比, 与粒子的半径、介质的黏度成反比。粒子荷电量越多, r 越小, 越近球形, 泳动越快; 反之越慢。

在相同条件下 (E 、介质性质如 η 等相同), 不同种类的带电物质由于其 Q/r (球形分子也即电荷/质量比) 各不相同而具有不同的泳动率。这种移动速度的差异就是电泳技术的基本依据。

(二) 支持物因素

对支持物的一般要求是质地均匀, 吸附力小, 惰性, 不与被分离的样品或缓冲液起化学反应。并具有一定坚韧度, 不易断裂, 容易保存。

1. 支持物类型 根据支持物对电泳的影响分为两大类。

(1) 单纯支持物: 支持物相对惰性, 对被分离物几乎无作用。分离作用取决于待分离物的 Q/r 。荷质比相同的不同粒子 M 相等而不能分离。属于这类支持物的有: 滤纸、醋酸纤维薄膜、玻璃纤维纸、薄层物质、琼脂及琼脂糖凝胶、单纯纤维素纤维等(可用于分析和制备目的); 淀粉和石膏、海绵橡皮(仅用于制备目的)。

(2) 分子筛支持物: 多孔网状结构的凝胶具有分子筛作用。 Q/r (荷质比)相同而分子量不同的混合物粒子, 可用此法进行分离。属于这类支持物的有: 淀粉凝胶、聚丙烯酰胺凝胶。

2. 电渗现象 电场中液体对于固体支持物的相对移动称为电渗(electro-osmosis)(图 1-1-1)。它是由缓冲液的水分子和支持物表面之间所产生的一种相关电荷所引起。

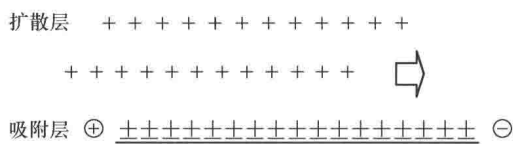


图 1-1-1 电渗现象示意图

某些支持物表面带有电荷, 如滤纸纤维素带有负电性($-\text{OH} \rightarrow -\text{O}^{\delta-}-\text{H}$ 或 $-\text{O}^- + \text{H}^+$), 琼脂多糖含有大量硫酸根($-\text{SO}_4^-$)。这些支持物可以使水感应产生正电离子(H_3^+O)。在电场中由于支持物固定, H_3^+O (水合质子)向阴极移动, 并带着缓冲液中的盐类和一些待分离物质一起移向负极。如果物质原来是向负极移动, 那么移动速度会更快; 如果是向正极移动(如血清蛋白质电泳), 则 H_3^+O 的泳动方向与蛋白质的泳动方向相反, 影响蛋白质的泳动速度, 甚至将泳动最慢的 γ -球蛋白带到相反方向(这个原理是对流免疫电泳的理论依据)。因此, 实际泳动速度由颗粒本身的泳动速度和电渗作用所决定。

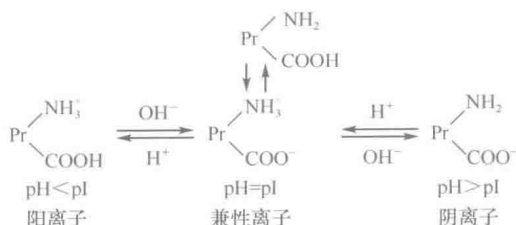
在电泳支持物的选择上, 应根据具体需要来选择具有不同电渗作用的支持物, 如一般分离宜用电渗作用小的支持物, 而对流免疫电泳则需电渗作用大的琼脂。

琼脂中的琼脂果胶(agaropectin)含有较多 $-\text{SO}_4^-$, 除去了琼脂果胶后的琼脂糖则电渗作用大为减弱。

电渗现象及其所造成的移动方向和距离可用不带电的有色染料或有色葡聚糖点在支持物的中心加以观察确定。

(三) 介质因素

1. 缓冲液的 pH 电极缓冲液的 pH 决定了待分离物的带电性质与荷电量。对于蛋白质和氨基酸等两性电解质, pH 大于等电点, 分子带负电荷, 移向正极; pH 小于等电点, 分子带正电荷, 移向负极; pH 等于等电点, 分子净电荷为零, 在电场中不泳动。例如:



溶液 pH 偏离等电点越远, 分子解离程度越大, 带电量越多, 电泳移动速度越快; 反之则越慢。不同物质等电点不同, 在同一 pH 时, 分子解离程度不同, 带电量不同, 泳动率也就有差异。因此, 分离蛋白质类混合物时, 选择一个合适的 pH, 使各种蛋白质所带静电电荷量差异增大, 以利于分离。

恒定的 pH 环境使被分离物带电量不变, 故电泳速度不变。缓冲溶液尚有对蛋白质的保护作用, 使蛋白质处于溶解状态, 不致沉淀、变性。

2. 缓冲液的离子强度 离子强度是表示系统中电荷数量的一个数值, 是溶液中离子产生的电场强度的量度。离子强度对电泳的影响是显著的。离子强度越高, 质点泳动越慢, 但区带分离度较清晰。离子强度过高, 可降低胶粒 (如蛋白质) 的带电量 (压缩双电层, 降低 ζ 电位), 使电泳速度减慢, 甚至破坏胶体, 使之不能泳动; 离子强度过低, 虽电位大, 泳动速度加快, 但缓冲液的容量小, 不易维持 pH 恒定。电极缓冲液的常用离子强度为 0.02~0.2。

溶液的离子强度可根据公式 $I = \frac{1}{2} \sum CZ^2$ 计算, 其中 I 为离子强度, C 为离子的摩尔浓度, Z 为离子的电荷数 (价数)。溶液的离子强度与离子浓度有关, 但数值上不一定相等。

3. 介质中化学物质对粒子泳动的影响 若其他条件相同, 电泳速度取决于粒子的 Q/r 值。如果向介质中加入某些化学试剂, 设法改变粒子的带电状态, 也可影响电泳的特性。例如, 十二烷基硫酸钠 {SDS, $[\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_{10} \cdot \text{CH}_2\text{-SO}_3]^- \text{Na}^+$ } 是一种阴离子去污剂, 可以与蛋白质分子成比例地结合, 使蛋白质分子带有与其分子量成比例的大量负电荷, 消除蛋白质分子本身电荷对泳动速率的影响, 可以靠分子筛作用, 依据分子的不同质量, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳予以分离。如有已知分子量的标准蛋白质作对照, 便可测定未知蛋白质的分子量。

4. 其他介质因素的影响 泳动速率与介质黏度 η 成反比; 与介电常数 D 成正比。

$$M = \frac{\zeta D}{6\pi \eta}$$

(此公式适用于小分子)

$$M = \frac{\zeta D}{4\pi \eta}$$

(此公式适用于大分子)

(四) 电场因素

电场因素包括电压、电流的作用及可能带来的热效应和水分的蒸发等。

1. 电场强度 电场强度是指每厘米支持物 (长度) 的电位降, 亦即电势梯度。例如, 醋酸纤维薄膜有效长度为 8cm, 两端测得电位降为 120 V, 则电场强度为 15 V/cm。电场强度越大, 带电颗粒移动速度越快。但电压越高, 电流也会随之增高 ($I = V/R$), 产生的热量也会增多。所以, 在高压电泳时, 常采用冷却装置, 以控制温度。

2. 热效应 通电以后便有一定的电流 I 通过介质 (电阻 R) 产生一定的热量 C , 消耗一定的电功 W 。其关系如下。

$$V = IR; W = IV; C = Wt/4.18 = I^2Rt/4.18$$

热效应对电泳的影响可以通过以下几方面表现出来。

(1) 热效应使介质黏度发生改变： η 是 $1/T$ 的指数函数，温度 T 升高， η 降低；而 η 与 M 成反比关系。例如，自由电泳，温度从 0°C 增加到 25°C ， η 减半，泳动速率 M 加倍。

(2) 热效应使导电性发生改变：温度和导电性的关系也是指数关系。提高温度则电流增加，泳动速率加快，出现电流、电压的改变。

(3) 热效应使扩散速度增加：温度升高，介质黏度降低，且分子热运动增加，使扩散速度加快。

(4) 热效应使介质密度不均一，甚至破坏凝胶，使实验失败。

(5) 热效应引起水分蒸发，水分蒸发又可引起 pH、离子强度、导电性、电场均一性的改变。故应保持电泳槽内的温度，减小热效应的影响。由于支持介质水分蒸发而干燥，就会从电极液中吸水。这种水流不均一，即电泳带两端水流多于中间，造成缓冲液盐浓度不一致，电场电流也不均一。

(6) 热效应改变介质 pH：温度能改变缓冲剂的平衡常数。各种缓冲液的 pH-温度系数不一致。所谓 pH-温度系数是指温度变化 1°C ，其 pH 的改变数值。碱性缓冲液对温度更为敏感，这主要是 pK_a 值易受温度的影响。

值得注意的是 Tris-HCl 缓冲液 pK_a 受温度的影响较大，其系数 ($\Delta\text{pK}_a/^{\circ}\text{C}$) 为 0.03。表 1-1-1 列出在 25°C 时配置的该缓冲液在 5°C 和 37°C 时的 pH 变化情况。

表 1-1-1 温度对 Tris-HCl 缓冲液 pH 的影响

5°C	25°C	37°C	5°C	25°C	37°C	5°C	25°C	37°C
7.76	7.20	6.91	8.48	7.90	7.62	9.18	8.60	8.31
7.89	7.30	7.02	8.58	8.00	7.71	9.28	8.70	8.42
7.91	7.40	7.14	8.68	8.10	7.80	9.36	8.80	8.51
8.07	7.50	7.22	8.78	8.20	7.91	9.47	8.90	8.62
8.18	7.60	7.30	8.88	8.30	8.01	9.56	9.00	8.70
8.26	7.70	7.40	8.98	8.40	8.10			
8.37	7.80	7.52	9.08	8.50	8.22			

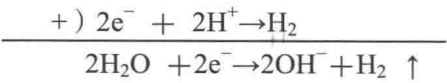
3. 恒电流对电泳的影响 电泳过程中由于热效应使电阻降低，电泳速度加快；但同时电阻的降低又使电压不断降低 ($V=IR$)，使电泳速度下降，这样热效应得以补偿，电泳速度基本恒定。同时蒸发现象也得到改善。所以，无条件控制电泳温度时，最好采用恒电流方式进行电泳。

电流、电压的控制：调节电压时，按电场强度调，不必考虑支持物及宽度。例如，醋酸纤维薄膜电泳，膜长 8 cm，电场强度 10 V/cm，应调节电压为：10 V/cm $\times$ 8 cm = 80 V；调节电流时，总电流应调节为： $I = \text{mA/cm 宽} \times \text{宽 (cm)} / \text{条} \times n$ (条或管数)。

4. 电极反应与缓冲

(1) 电极反应：电泳时电极反应主要是水的电解。阴极产生 H_2 ，阳极产生 O_2 。

(2) 阴极反应： $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{OH}^-$



(3) 缓冲: $\text{HA} + \text{OH}^- \rightarrow \text{A}^- + \text{H}_2\text{O}$ 。

(4) 阳极反应: $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{OH}^-$
 $+) 2\text{OH}^- \rightarrow 4\text{e}^- + 2\text{H}^+ + \text{O}_2\uparrow$

 $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}^+ + \frac{1}{2}\text{O}_2 + 2\text{e}^-$

(5) 缓冲: $\text{A}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HA}$ 。

由上可知,电泳时每摩尔电子在流经此系统时,分别在阴极产生 1mol OH^- ,在阳极产生 1mol H^+ 。缓冲液的缓冲能力会不断消耗。所以需要相当高的缓冲容量才行。如长时间电泳,两端电极液可用泵慢慢混合,以防缓冲能力耗竭和 pH 改变。

由上并可知,每生成 1mol 的 H_2 ,仅生成 $1/2\text{mol}$ 的 O_2 。这就提供了一个简便的方法以检查电极是否接正确。阳极所产生的气泡数约为阴极的一半。无电流通过时,两极均无气泡产生。

第三节 区带电泳技术

一、滤纸与醋酸纤维薄膜电泳

纸上电泳与醋酸纤维薄膜电泳 (cellulose acetate membrane electrophoresis) 分别以滤纸和醋酸纤维薄膜为支持物。滤纸是纤维素,醋酸纤维薄膜是纤维素的乙酸酯,由纤维素的羟基经乙酰化而成。它溶于丙酮等有机溶液中,即可涂布成均一细密的微孔薄膜,厚度 $0.1 \sim 0.15\text{mm}$ 为宜。太厚吸水性差,分离效果不好;太薄则膜片缺少应有的机械强度则易碎。目前,国内有醋酸纤维薄膜商品出售,不同厂家生产的薄膜主要在乙酰化、厚度、孔径、网状结构等方面有所不同,但分离效果基本一致。

纸上电泳是在 20 世纪 40 年代与纸层析一道发展起来的分离技术。由于具有简便、迅速等优点,在实验室和临床检验中广泛应用。自 1957 年 Kohn 首先将醋酸纤维薄膜用作电泳支持物以来,纸上电泳已被醋酸纤维薄膜电泳所取代。因为,后者具有比纸上电泳电渗小,分离速度快,分离清晰,血清用量少,操作简便,电泳染色后,经冰乙酸、乙醇混合液或其他溶液浸泡后可制成透明的干板,有利于扫描定量及长期保存等优点。

由于醋酸纤维薄膜电泳操作简单、快速、价廉。已广泛用于分析检测血浆蛋白、脂蛋白、糖蛋白、胎儿甲种球蛋白、体液、脑脊液、脱氢酶、多肽、核酸及其他生物大分子,为心血管疾病、肝硬化及某些癌症鉴别诊断提供了可靠的依据,因而已成为医学和临床检验的常规技术。

(一) 仪器设备

电泳仪:供给稳压直流电源;有机玻璃电泳槽:常为水平式,内部有两个分隔的缓冲液槽,分别装有铂金丝电极。两液槽上部有支架,供放置滤纸、醋酸纤维薄膜等用。支持物两端以滤纸与缓冲液相连。顶部有盖,以减少液体蒸发。有的还有回流水冷却装置。

(二) 缓冲液

电极缓冲液多采用 pH 8.6 的巴比妥缓冲液以分离蛋白质。