

高等医药院校基础医学实验教学系列教材

# 生物化学与分子生物学实验

宋方洲 何凤田 主编



科学出版社

[www.sciencep.com](http://www.sciencep.com)

教育部高等学校生物类专业教学指导委员会 生物化学与分子生物学专业教学指导委员会 推荐教材

# 生物化学与分子生物学实验

王德明 杨文忠 主编



科学出版社

【思考题】

## 高等医药院校基础医学实验教学系列教材

内容简介

# 生物化学与分子生物学实验

主编 宋方洲 何凤田  
 副主编 马永平 冯涛 江渝  
 编委 (按姓氏笔画排序)

卜友泉(重庆医科大学)	马永平(重庆医科大学)
王继红(重庆医科大学)	冯涛(重庆医科大学)
朱彦雨(川北医学院)	刘先俊(重庆医科大学)
刘智敏(重庆医科大学)	江渝(第三军医大学)
李梨(重庆医科大学)	何凤田(第三军医大学)
宋方洲(重庆医科大学)	易发平(重庆医科大学)
钱民章(遵义医学院)	唐彦萍(遵义医学院)
曾昭淳(重庆医科大学)	

### 科学出版社

元 00.05: 价实

(《林文》) 北京

## 内 容 简 介

本教材是为适应高等医学院校基础医学实验教学改革和发展的需要而编写的一本生物化学与分子生物学实验教材。本教材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篇。在基础理论知识方面,对生物化学与分子生物学的经典研究技术、基本实验操作和常用仪器使用均进行了详细介绍。在实验项目设置上,包括蛋白质定量、层析、电泳、酶学、糖类与脂类、核酸分离纯化、PCR、分子克隆、分子杂交以及RNA干扰、双向电泳、EMSA和ChIP等经典验证性实验、综合性实验和创新性实验。教材内容新颖,体系完整,有所侧重,便于选择。

本教材可供医学院校临床医学等各专业五年制、七年制和研究生学生使用,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

生物化学与分子生物学实验 / 宋方洲,何凤田主编. —北京:科学出版社,2008

(高等医药院校基础医学实验教学系列教材)

ISBN 978-7-03-021941-1

I. 生… II. ①宋…②何… III. ①生物化学-实验-医学院校-教材②分子生物学-实验-医学院校-教材 IV. Q5-33 Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2008)第067910号

策划编辑:李国红 / 责任编辑:邹梦娜 李国红 / 责任校对:钟 洋

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄 超

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>

北京市文林印务有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2008年6月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2008年6月第一次印刷 印张:16 1/2

印数:1—5 000 字数:375 000

定价:29.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换(文林))

# 《高等医药院校基础医学实验教学 系列教材》编写指导委员会

**主 任** 雷 寒(重庆医科大学)  
**副主任** 董 志(重庆医科大学)  
张绍祥(第三军医大学)  
**委 员** 王亚平(重庆医科大学)  
李 和(华中科技大学同济医学院)  
侯一平(四川大学华西基础医学与法医学院)  
文 斌(川北医学院)  
梁文妹(贵阳医学院)  
李著华(泸州医学院)  
范奇元(遵义医学院)  
王燕蓉(宁夏医学院)  
罗殿中(广西医科大学)

**系列教材总策划** 徐 晨(重庆医科大学)

# 总 序

医学是一门实践性极强的科学,医学实验教学在整个医学教育中占有极为重要的地位,因此,提高医学实验教学的质量将有助于提高整体医学教育水平。改革传统的以教研室为单位的教学实验室模式,整合完善现代医学实验室功能和管理是提高医学实验教学质量的重要环节。传统医学实验教学的主要任务是让学生验证理论知识、增加感性认识,但缺乏对学生创新能力的培养,因而实验难度不高,实验条件比较简单。随着现代生命科学及其各种实验技术的飞速发展,必将对现代医学实验教学提出更高的要求,大量先进医学实验进入实验教学课程体系将成为必然的趋势,要全面推进现代医学实验教学的发展,必须加大对实验项目、实验条件、实验教学体系改革力度,这对培养适应 21 世纪医学卫生事业发展的高素质医学人才有重要意义。近年来,国内很多医科院校对传统医学教学实验建设模式进行较大力度的改革,积累了不少经验,很多经验值得借鉴。

围绕跨世纪医学生的培养目标,转变旧的传统观念,打破现行课程框架,重新构建新型基础医学实验教学体系的改革势在必行。现代高等医药院校实验教学强调培养学生的探索精神、科学思维、实践能力和创新能力。这就要求从根本上改变实验教学依附于理论教学的传统观念,充分认识并落实实验教学在学校人才培养和教学工作中的地位,形成理论教学与实验教学统筹协调的理念和氛围。要从人才培养体系的整体出发,建立以能力培养为主线,分层次、多模块、相互衔接的科学实验教学体系,使实验教学与理论教学既有机结合又相对独立。要把学生从二级学科狭隘的“项目”实验教学提高到基于一级学科平台的“方法”实验教学,最大限度地拓展学生的专业视野。要实现以上目标,除了对实验室进行整合外,其核心内容就是实验教学教材。为了能够编写出一套适合中西部地区高等医药院校医学教育现状的实验教学教材,在科学出版社的大力支持下,《高等医药院校基础医学实验教学系列教材》编委会以重庆医科大学为主体,协同全国 26 所高等医药院校相关专业的专家教授共同编写了这套实验教学系列教材。全套共十本,包括《人体大体形态学实验》、《人体显微形态学实验》、《人体机能学实验》、《病原生物学实验》、《免疫学实验》、《生物化学与分子生物学实验》、《医用化学实验》、《医学物理学实验》、《法医学实验》和《核医学实验》。

本系列实验教材的编写理念是将实验教学按照建设国家实验教学示范中心要求的实验教学模式,借鉴国外同类实验教材的编写模式,力求做到体系创新、理念创新及编写精美。内容上将基础医学实验教学按照基础医学实验体系进行重组和有机融合,按照基础医学实验教学逻辑和规律,将实验内容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等板块进行编写。

本系列教材编写对象以本科、专科临床医学专业为主,兼顾预防、基础、口腔、麻醉、影

像、药学、检验、护理、法医、生物医学工程、卫生管理、医学信息等专业需求,涵盖全部医学生的基础医学实验教学。各层次学生可按照本专业培养特点和要求,通过对不同板块的必选实验项目和自选实验项目相结合修选实验课程学分。

由于基础医学实验教学模式尚存在地区和校际间的差异,加上我们的认识深度和编写水平有限,本系列教材在编写过程中可能存在偏颇之处,请广大医学教育专家谅解,欢迎同行们提出宝贵意见。

《高等医药院校基础医学实验教学系列教材》编委会

2008年3月

# 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。生物化学与分子生物学实验技术是生物医学诸多学科的重要研究手段,也是医学类各专业、各层次学生必修的一门基础实验课程。为适应高等医学院校基础医学实验教学改革和发展的形势,我们按照重庆医科大学基础医学实验教学改革统一部署和要求,编写了这本实验教材。

本教材一共分为四篇。第一篇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生物化学与分子生物学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,目的在于使学生对生物化学与分子生物学的研究技术有一个系统的认识。第二篇是经典验证性实验,开设了一些经典的生物化学与分子生物学实验,这些实验均经过长期的实验教学实践,证明有助于学生巩固理论知识和培养学生基本的实验操作能力。第三篇是综合性实验,每个实验均涉及多种实验技术的使用,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。第四篇是创新性实验,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 and 基本的科研能力。

本教材各部分实验的编写均由多年从事生物化学与分子生物学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。

本教材不仅适合医学院校临床医学等各专业五年制、七年制和研究生学生使用,而且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,时间仓促,教材中不当或错误之处在所难免,恳请同行专家和同学们批评指正,以便再版时修正完善。

宋方洲 何凤田  
2008年3月于重庆



# 目 录

## 第一篇 基本实验操作及常用仪器使用

第1章 生物化学常用研究技术	(1)
第2章 分子生物学常用研究技术	(20)
第3章 基本实验操作	(25)
第4章 常用仪器使用	(36)
第5章 实验室规则及安全防护	(48)
第6章 如何撰写实验报告	(50)

## 第二篇 经典验证性实验

第1章 蛋白质定量分析实验	(51)
实验一 双缩脲法测定血清蛋白质含量	(52)
实验二 Folin-酚试剂法测定蛋白质含量	(54)
实验三 紫外分光光度法测定蛋白质浓度	(56)
实验四 考马斯亮蓝结合法测定蛋白质浓度	(59)
实验五 BCA法测定蛋白质浓度	(61)
第2章 层析实验	(63)
实验六 纸层析法观察转氨基作用	(63)
实验七 葡聚糖凝胶柱层析分离血红蛋白与鱼精蛋白	(65)
实验八 离子交换层析分离混合氨基酸	(68)
实验九 薄层层析分离鉴定氨基酸	(70)
第3章 电泳实验	(74)
实验十 血清醋酸纤维薄膜电泳	(74)
实验十一 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清LDH同工酶	(78)
实验十二 SDS-PAGE测定蛋白质的分子量	(83)
第4章 酶学实验	(88)
实验十三 血清碱性磷酸酶活性测定	(88)
实验十四 血清丙氨酸氨基转移酶活性测定	(91)
实验十五 胰酶对蛋白质的消化和影响酶作用的因素	(94)
实验十六 丙二酸对琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制作用	(97)
实验十七 酶的非竞争性抑制作用	(100)
实验十八 酶米氏常数的测定	(102)
第5章 糖类与脂类	(105)
实验十九 血糖浓度的测定	(105)
实验二十 肾上腺素对血糖浓度的影响	(108)
实验二十一 血清三酰甘油浓度测定	(109)
实验二十二 血清总胆固醇浓度测定	(114)

实验二十三 血清载脂蛋白 apo A1 的测定 .....	(119)
<b>第 6 章 核酸分离纯化技术</b> .....	(122)
实验二十四 基因组 DNA 的提取制备与检测 .....	(122)
实验二十五 总 RNA 的提取制备与检测 .....	(126)
实验二十六 质粒 DNA 的提取制备与检测 .....	(131)
<b>第 7 章 PCR 技术</b> .....	(135)
实验二十七 常规 PCR 技术 .....	(135)
实验二十八 定量 PCR 技术 .....	(138)
<b>第 8 章 分子克隆技术</b> .....	(143)
实验二十九 DNA 的限制性酶切与电泳 .....	(143)
实验三十 凝胶中 DNA 片断的纯化回收 .....	(151)
实验三十一 DNA 连接实验 .....	(153)
实验三十二 感受态细胞的制备 .....	(157)
实验三十三 重组 DNA 转化与蓝白斑筛选 .....	(159)
<b>第 9 章 分子杂交技术</b> .....	(162)
实验三十四 Southern 印迹杂交 .....	(162)
实验三十五 Northern 印迹杂交 .....	(166)
实验三十六 Western 印迹 .....	(169)
实验三十七 核酸原位杂交 .....	(172)
附 核酸分子探针的标记 .....	(177)
<b>第三篇 综合性实验</b>	
实验一 血清 $\gamma$ 球蛋白的分离纯化与鉴定 .....	(180)
实验二 碱性磷酸酶的分离纯化与动力学研究 .....	(186)
实验三 hCS 在大肠埃希菌中的表达、纯化与鉴定 .....	(194)
实验四 hCS 基因在毕赤酵母中的表达及鉴定 .....	(200)
实验五 荧光原位杂交实验 .....	(204)
实验六 双脱氧链末端合成终止法测定 DNA 序列 .....	(207)
实验七 肽或蛋白质 N-端氨基酸序列测定 .....	(213)
实验八 用双荧光素酶报告基因检测启动子活性 .....	(222)
实验九 电泳迁移阻滞实验 .....	(226)
实验十 染色质免疫沉淀 .....	(231)
实验十一 蛋白质双向电泳 .....	(236)
实验十二 酵母双杂交实验 .....	(241)
实验十三 RNA 干扰实验 .....	(244)
<b>第四篇 创新性实验</b>	
实验一 重要蛋白质或酶的分离纯化 .....	(249)
实验二 糖尿病的生化及遗传检测分析实验 .....	(249)
实验三 家族性高胆固醇血症的诊断 .....	(250)
实验四 血友病的分子诊断 .....	(252)
实验五 RNA 干扰技术靶向沉默目的基因 .....	(253)

# 第一篇

## 基本实验操作及 常用仪器使用

### 第1章 生物化学常用研究技术

#### 一、分光光度技术

分光光度技术就是利用物质具有对光的选择性吸收特征而建立起来的一种定量、定性分析方法。分光光度技术作为一种最常见的仪器分析方法,以其操作简便、准确快速、灵敏稳定和用样量少等优点而被广泛地应用于化学化工、医药卫生、机械电子、地质冶金、农林牧渔、能源环保、食品饮料等多个领域,并已成为这些领域实验室分析测试的主要手段。

#### 【基本原理】

光的本质是一种电磁波,具有波-粒二相性。人肉眼可见的光线称为可见光,波长范围400~760nm。波长小于400nm的光线称紫外线,而大于760nm的光线称红外线。一切物质因其物质结构的差异而对特定波长的光线进行选择吸收,产生其特征性吸收光谱。

光线通过透明溶液介质时,一部分被吸收,一部分被透过,因此光线射出溶液后光波强度部分减少。这种光波的吸收和透过可用于物质的定性与定量分析,其理论依据是 Lambert 和 Beer 定律。

1. Lambert 定律 一束单色光通过透明溶液时,一部分的光波被吸收,被吸收光波的量与溶液厚度有一定比例关系,即

$$I = I_0 e^{-AL} \quad (1-1)$$

式中: $I_0$  为入射光强度; $I$  为通过溶液后的出射光强度; $L$  为光径上溶液的厚度; $e$  为自然对数的底,即 2.718; $A$  为溶液的吸光率。

式(1-1)可改写为:

$$\ln(I_0/I) = AL \quad (1-2)$$

将式(1-2)换算成常用对数式,即

$$\lg(I_0/I) = 0.4343 \cdot AL$$

令  $K = 0.4343 \cdot A$

则 
$$\lg(I_0/I) = KL \quad (1-3)$$

此处  $K$  为吸光率。

2. Beer 定律 以溶液中溶质浓度变化代替溶液厚度的改变,光波的吸收与溶质浓度的改变有类同的关系。即一束单色光通过溶液时,光波被溶液吸收一部分,吸收多少与溶液中溶质浓度有一定比例关系。依据 Lambert 定律中同样的推导,可得出下式:

$$\lg(I_0/I) = Kc \quad (1-4)$$

式中:  $c$  为溶液中溶质的浓度。

Lambert 定律和 Beer 定律合并,即式(1-3)和式(1-4)合并为

$$\lg(I_0/I) = KcL \quad (1-5)$$

令  $T = (I/I_0)$   $A = \lg(I_0/I)$

则 
$$A = KcL \quad (1-6)$$

式中:  $T$  为透光度,  $A$  为吸光度。

式(1-6)为 Lambert-Beer 定律的物理表示式,其含义为:一束单色光通过溶液后,光波被吸收一部分,吸收多少与溶液中的溶质的浓度和溶液厚度成正比。此式为分光光度技术的基本计算式。

### 3. Lambert-Beer 定律的应用

(1) 利用标准管计算测定物含量:实际测定过程中,用一已知浓度的标准管与测定管同样处理、显色,分别读取吸光度,再根据式(1-6)计算,即

$$A_1 = K_1 c_1 L_1 \quad A_2 = K_2 c_2 L_2$$

式中:  $A_1$ 、 $A_2$  分别为已知浓度标准和未知浓度测定吸光度;  $c_1$ 、 $c_2$  分别为已知浓度标准管和未知浓度测定管中测定物浓度。

因盛标准液和测定液的比色杯径长相同( $L_1 = L_2$ ),故上二式可写成:

$$A_1 / K_1 c_1 = A_2 / K_2 c_2$$

因标准液和测定液中溶质为同一物,  $K$  值相同,即:

$$c_2 = (A_2 / A_1) \times c_1$$

因测定液和标准液在处理过程中体积相同,故:

$$m_2 = (A_2 / A_1) \times m_1 \quad (1-7)$$

式中:  $m_1$ 、 $m_2$  分别表示标准液和测定液中待测物的含量。

(2) 利用标准曲线进行换算:先配制一系列已知不同浓度的测定物溶液,按测定管同样

方法处理显色,分别读取各管吸光度,以各管吸光度为纵轴,各管溶液浓度为横轴,在方格坐标纸上作图得标准曲线。以后进行测定时,就无需再做标准管,以测定管吸光度从标准曲线上可求得测定物的浓度。

一般认为,标准曲线范围在标准管测定物浓度的一半到二倍之间,并使吸光度在 0.05~1.0 范围内为宜。所作标准曲线仅供短期使用。标准曲线的制作应在同一台仪器上进行,因为有时尽管型号相同,操作条件完全一样,不是同一台仪器,其结果会有一定误差。

(3) 利用摩尔吸光率  $\epsilon$  求测定物浓度: Lambert-Beer 定律中  $K$  为吸光率,当浓度  $c$  为  $1\text{mol/L}$ ,溶液厚度  $L$  为  $1\text{cm}$  时,则称为摩尔吸光率,以  $\epsilon$  表示,此时  $\epsilon$  与  $A$  相等。实际应用中测定物常以  $\text{g/ml}$  作浓度单位。

已知  $\epsilon$  情况下,读取测定液径长为  $1\text{cm}$  时的吸光度,根据下式可求出测定液的物质浓度。

$$c = A/\epsilon$$

此计算式常用于紫外吸收法,如蛋白质溶液含量测定,因蛋白质在波长  $280\text{nm}$  下具有最大吸收峰,利用已知蛋白质在波长  $280\text{nm}$  时的摩尔吸光率,再读取待测蛋白质溶液的吸光度,即可算出待测蛋白质的浓度,无需显色,操作简便。

(4) 利用差示分析测定待测液的溶液浓度:如果待测液中浓度太浓或太稀,用一般方法,其测定结果会产生较大误差,此时可采用差示分光光度法。如高浓度样液的差示法就是用标准品制备浓度略低于待测液浓度的参比溶液,先将仪器光门关闭,调节透光度为“0”,再将参比溶液置于光路,打开光门使透光度为“100%”,进一步检测待测液的透光度即可。如果有一待测样品溶液原来透光度读数为 4%,改用差示法后读数为 40%,则实质是透光度标尺的灵敏度被提高 10 倍,从而减少了测定误差。

(5) 多组分混合物的测定:当待测液中含有两种或两种以上的组分时,应根据各组分吸收光谱的重叠程度,选用不同测定方法。如待测物各组分的吸收峰互不干扰,可按单组分测定方法进行,分别测定各组分的浓度;如各组分的吸收峰相互重叠,可在双波长或多波长的光照射下,分别测定其波长处溶液的表观吸光度,然后设立联立方程组,最后解联立方程组即可。

### 【技术分类】

有多种分类方法,如按其研究对象的不同,可分为分子吸收和原子吸收二类分光光度法;按其选光性质的不同,可分为可见光、紫外光和红外光三种分光光度法。

### 【发展与应用】

不同的光度分析技术依靠不同的分光光度计来实现。分光光度计的产生与溶液的比色分析有密切关系。早在 1729 年 M. Bouger 就提出,当溶液浓度不变时,一定条件下,入射光被溶液吸收的程度( $A$ )与光径上溶液的厚度( $L$ )呈正相关,1760 年 H. Lambert 系统研究后发现,只有当一定的单色光穿过玻璃片或有色溶液时,该单色光被吸收的程度与玻璃片或有色溶液的厚度成正比,即  $A = KL$ ,  $K$  表示物质或溶液的吸光系数,此为 Lambert 定律。1852 年 A. Beer 在研究无机盐水溶液对红光的吸收时,观察到物质的吸光度与物质的吸光系数和浓度的乘积成正比,即  $A = Kc$ ,此为 Beer 定律。此后,将两个定律合并成:  $A = KcL$ ,此即 Lambert-beer 定律,奠定了光度分析技术的定量分析基础。按此原理 1870 年 J. Duboscq 制造了世界上第一台光电比色计,开创了光电比色分析时代,持续达 70 余年。

但光电比色计由于采用滤光片获得单色光,杂光干扰大,单色效应差;又由于采用光电池充当光电转换器,灵敏度低,稳定性差,且只适合有色溶液的定量分析,故其应用范围受限。随着光学及光电技术的发展,人们发现通过棱镜色散的光谱可被光栅严格选择,通过光电管产生的光电流可被光电倍增管放大,且易被稳定。1918年美国国家标准局利用这些技术成果试制出第一台主要适用于有色溶液的可见光分光光度计,从而开始了光度分析技术的新时代。分光光度法由于快速准确、灵敏度高、稳定性好,很快取代了比色分析法的地位和作用。1941年,Beckman公司试制了世界上第一台商业用紫外-可见-近红外单光束分光光度计,扩展了分光光度法定量测试的范围。20世纪80年代由于计算机技术渗入,使单光束分光光度计技术克服了不能连续扫描的缺点,而能通过扫描样品获得其连续的吸收光谱,进而开始进行物质的定性分析。近年来应用光电二极管矩阵作检测器的单光束分光光度计具有快速扫描的独特优点,为追踪化学反应过程提供了极为方便的手段。20世纪60年代后期,双光束分光光度计得到发展,由于它能简化测定程序(既能直读,又能扫描),排除光源干扰而得到普遍使用。现代的双光束分光光度计都采用微机控制操作、测试和处理,不但操作简便,而且各项性能指标也大大提高。1951年美国Chance实验室利用样品在吸收峰与峰谷的吸光度差来准确测定样品的真实吸光度,设计制作了主要用于测定混浊样品的双波长分光光度计,大大拓宽了可见-紫外分光光度法的应用范围。在可见-紫外分光光度计不断发展和更新的同时,有关光度分析的实验技术也有很大进展,如采用差示分光光度法可将光度分析相对误差较大(一般为百分之几)的缺点得到较好的克服(可降至千分之几),从而使其在常量分析中可与重量分析法、容量分析法相提并论;采用浮选光度法、固相光度法、长光路毛细吸收管法、差示光度法以及萃取光度法等都能进一步提高其分析的灵敏度,使其进入超微量分析的领域。

现在可见-紫外分光光度技术与其他技术的渗透及联用非常普遍,提高了它的使用价值,如与滴定分析法联用以指导滴定终点分析的光度滴定法;与层析分离技术联用以及时观察和指导其洗涤、洗脱过程及其效果;与20世纪80年代出现的流动注射分析技术联用,成为一种快速、高效,且操作简单的自动技术,被认为是溶液分析化学中的一个质的飞跃。

红外分光光度法是近年应用较多,发展较快的另一类分子吸收光谱分析技术。由于物质分子吸收红外光辐射后,只能引起分子振动能级和转动能级的跃迁,而不像吸收可见或紫外光后还可引起电子能级的跃迁,故红外吸收光谱是分子的振动-转动光谱,只与物质分子的种类和结构有关,因而有时被称为“分子的指纹”,常被用于有机物的成分分析和结构分析。

原子吸收分光光度计几乎是所有光谱仪器中问世最晚的产品系列,它是基于从光源辐射出待测元素的特征辐射光,通过样品蒸气时被蒸气中待测元素的基态原子所吸收,从而从辐射光强度减弱的程度来求出待测元素的含量。原子吸收光谱法以其快速、灵敏、准确和操作方便等特征而得到广泛地应用,目前通过此法能测定近百种元素的含量,尤其是在微量元素与人体健康的关系的研究中发挥了极其重要的作用。在原子吸收分光光度计的发展中,光源(空心阴极灯)和原子化器的发展处于中心地位,从测定单元素的空心阴极灯到同时测定多元素的空心阴极灯,从火焰原子化器到非火焰原子化器(包括高温石墨炉和金属原子化器)和氢化物原子化器的发展中不难预测,未来的原子吸收分光光度计将会朝着操作简单性,测定灵敏性,功能多样性和控制自动化方向发展。

## 二、电泳技术

电泳是指带电颗粒在电场力作用下向所带电荷相反电极方向移动的现象。许多重要的生物分子如氨基酸、多肽、蛋白质、核苷酸、核酸等都含有可电离基团,在非等电点条件下均带有净电荷,在电场力的作用下,它们将向着与其所带电荷相反的电极方向移动。电泳技术就是利用样品中各种分子(带电粒子)的带电性质、分子大小、形状等的差异,在电场中的迁移速度不同,从而对样品分子进行分离、鉴定、纯化和制备的一种技术。

### 【基本原理】

设一带电粒子在电场中所受的力为  $F$ ,  $F$  大小取决于粒子所带电荷  $Q$  和电场强度  $X$ , 即

$$F = QX$$

按 Stoke 定律,球形粒子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  $\eta$  的关系为

$$f = 6\pi r\eta v$$

当  $F = f$  时,达到动态平衡

$$QX = 6\pi r\eta v$$

移项得

$$v/X = Q/6\pi r\eta \quad (1-7)$$

$v/X$  表示单位电场强度时粒子运动的速度,称为迁移率(mobility),也称为电泳速度,以  $\mu$  表示,即

$$\mu = Q/6\pi r\eta \quad (1-8)$$

由式(1-8)可见,粒子的迁移率在一定条件下取决于粒子本身的性质,即其所带电荷多少及分子大小与形状,也就是取决于粒子的电荷密度;不同的粒子一般有不同的迁移率。在具体实验中,移动速度  $v$  为单位时间  $t$  (以 s 计)内移动的距离  $d$  (以 cm 计),即

$$v = d/t$$

又电场强度  $X$  为单位距离(以 cm 计)内的电势差(以 V 计),当距离为 1cm 时,电势差为  $E$ , 则

$$X = E/L$$

以  $v = d/t$ ,  $X = E/L$  代入式(1-8), 即得

$$\mu = v/X = (d/t)/(E/L) = dL/Et$$

故电泳迁移率  $\mu$  的单位为  $\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$ 。

某物质(A)在电场中移动的距离为

$$d_A = Et\mu_A/L$$

另物质(B)在电场中移动的距离为

$$d_B = Et\mu_B/L$$

两物质移动距离的差为:

$$\Delta d = d_A - d_B = (\mu_A - \mu_B)Et/L \quad (1-9)$$

式(1-9)指出,物质 A、B 能否分离取决于两者迁移率。如两者的迁移率相同,则不能分离,有差别则能分离。实验所选的条件如电压和电泳时间与两物质的分离距离成正比,电场的距离(如滤纸长度)与分离距离成反比。

影响电泳的因素有很多,下面将影响颗粒泳动速度的外界因素讨论如下:

1. 电泳介质 pH 不同的被分离物质由于所含可电离基团的种类和数量不同,因此具有不同的等电点。若介质的 pH 小于等电点时,带电粒子呈阳离子状态,向负极移动;反之当介质 pH 大于等电点时,带电粒子呈阴离子状态,向正极移动。为保持介质 pH 的稳定性,常用一定 pH 的缓冲液,如分离血清蛋白质常用 pH8.6 的巴比妥或三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲液。

2. 缓冲液的离子强度 离子强度如果过低,缓冲液的缓冲容量小,不易维持 pH 恒定;离子强度过高,则降低蛋白质的带电量(压缩双电层,降低 Zeta 电势),使电泳速度减慢,所以常用离子强度在 0.02~0.2 之间。

溶液离子强度的计算公式为:

$$I = 1/2 \sum C_i Z_i^2$$

式中:  $I$  为离子强度,  $C_i$  为离子的物质的量浓度,  $Z_i$  为离子的价数。

由上述计算式可知,多价离子将使缓冲液离子强度增高,所以电泳缓冲液常用单价离子的化合物配制。

3. 电场强度 实验所用电场强度与移动距离成正比。电场强度以每一厘米距离的电势差计算,也称电势梯度。以滤纸电泳为例,滤纸长 15cm,两端电势差为 150V,则电场强度为  $150/15=10V/cm$ 。电场强度愈高,则带电粒子的移动愈快。但电压愈高,产生的热量也增加,所以高压电泳(电场强度大于  $50V/cm$ )常需加用冷却装置,否则热量可引起蛋白质等物质的变性而不能分离,还因发热引起缓冲液中水分蒸发过多,使支持物(滤纸、薄膜或凝胶等)上离子强度增加,以及毛细现象(电泳缸内液被吸到支持物上)等,都会影响物质的分离。

4. 电渗 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,在电场作用下,溶液就向一定方向移动,此种现象称为电渗。如滤纸中含有羟基而带负电荷,与纸相接触的水溶液带正电荷,液体向负极移动。由于电渗现象往往与电泳同时存在,所以带电粒子的移动距离也受电渗影响。当电泳方向与电渗相反,则实际电泳的距离等于电泳距离减去电渗的距离;当两者方向相同,则实际电泳距离等于电泳距离加上电渗的距离。电渗所造成的移动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,以观察电渗的方向和距离。

#### 【技术分类】

主要包括:



1. 根据工作目的和分离样品的数量多少分为分析电泳和制备电泳两大类。
2. 根据电泳时电压的高低分为高压电泳和常压电泳。  
 高压电泳使用的电压在 500~1000V, 电位梯度可高达 50~200V/cm。这类电泳分离速度快, 但热效应较大, 必须具备冷却装置, 主要适用于小分子化合物的快速分离。  
 常压电泳使用的电压在 500V 以下, 电位梯度为 2~10V/cm。这类电泳的分离速度较慢, 但对电泳设备要求简单。医学检验上使用的电泳分析大都属于常压电泳。
3. 根据电泳中是否使用支持介质分为自由电泳和区带电泳。  
 自由电泳不使用支持介质, 电泳在溶液中进行。这类电泳又分为非自由界面电泳和自由界面电泳两类。非自由界面电泳指悬浮在溶液中的带电粒子(如各种细胞)通电后全部移动, 不出现界面, 如显微电泳等。自由界面电泳中被分离物质集中在某一层, 形成各自的界面而进行定性或定量分析。自由界面电泳需要昂贵精密的电流仪器, 仅在少数特殊电泳如等电聚焦电泳和等速电泳中使用。  
 区带电泳都使用支持介质, 根据支持介质不同分为滤纸电泳、醋酸纤维薄膜电泳、薄层电泳和凝胶电泳等。此外, 根据支持介质的装置形式不同又可分为水平板式电泳、垂直板式电泳、垂直盘状电泳、毛细管电泳、桥形电泳和连续流动电泳等。
4. 根据电泳系统 pH 是否连续分为连续 pH 电泳和不连续 pH 电泳。  
 连续 pH 电泳是指电泳全过程中 pH 保持不变, 如纸电泳和醋酸纤维薄膜电泳等。不连续 pH 电泳是指缓冲液和电泳支持介质的 pH 不同, 甚至电泳支持介质不同区段的 pH 也不相同, 如聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦电泳和等速电泳等。
5. 根据结合配套的技术种类不同, 分为免疫电泳、层析电泳、等电聚焦电泳、转移电泳、双相电泳、脉冲梯度电场凝胶电泳和相互垂直交替电场凝胶电泳等。
6. 根据电泳物质类别不同, 分为细胞电泳、核酸电泳、蛋白质电泳等。

### 【发展与应用】

电泳技术是人们在研究电泳现象基础上建立和发展起来的。1937 年, 瑞典生化学家 Tiselius 在前人百余年探索电泳现象的基础上发明了 Tiselius 电泳仪, 在此基础上建立了研究蛋白质的自由界面电泳方法, 利用该法首次证明人血清蛋白是由白蛋白(A)、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  球蛋白等组成, 并因此于 1948 年获得诺贝尔奖。随后电泳技术的发展突飞猛进, 1949 年, Ricketts Marrack 等人证明人血清蛋白质经电泳分离可依次分为白蛋白、 $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  球蛋白五个组分, 1957 年, Reiner 对人血清五个组分蛋白进行了定量分析。但自由界面电泳没有固定支持介质, 扩散和对流作用较强, 影响分离效果, 于是在 20 世纪 50 年代相继出现了固相支持介质电泳。最初的支持介质是滤纸和醋酸纤维素膜, 目前这些介质在实验室已经应用较少。在很长一段时间里, 小分子物质如氨基酸、多肽、糖等通常用滤纸、纤维素或硅胶薄层平板作为介质进行电泳分离、分析, 但目前一般使用灵敏度更高的技术如高效液相色谱法(HPLC)等来进行分析。而对于复杂的生物大分子, 以滤纸、硅胶或醋酸纤维素膜等作为支持介质进行电泳, 其分离效果并不理想。于是 1959 年, Raymond 和 Weintraub, Davis 和 Ornstein 先后利用人工合成凝胶作支持介质建立了聚丙烯酰胺凝胶电泳, 从而大大提高了电泳的分辨率和分离效果, 增强了电泳技术的发展、渗透及与其他技术结合配套的能力。致使各式各样的电泳技术和电泳材料如雨后春笋、竞相争荣, 成为当代实验科学技术中品种繁多、应用广泛、基础与尖端技术皆备的大技术。