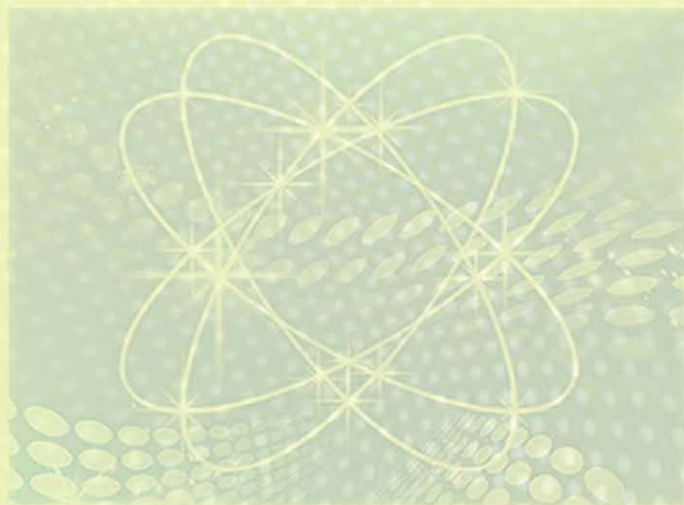


医学生物化学与分子 生物学实验技术双语教程

主 编 苏 燕 席海燕



人民军医出版社



全国高等医学院校本科教材

供临床医学、医学技术、护理、预防医学等专业使用

医学生物化学与分子生物学 实验技术双语教程

YIXUE SHENGWUHUAXUE YU FENZISHENGWUXUE
SHIYAN JISHU SHUANGYU JIAOCHENG

主 编 苏 燕 席海燕

编 者 (以姓氏笔画为序)

丁海麦	王步云	孔凡青	苏 燕
李 斌	李晓晶	李嘉欣	杨 静
杨文杰	吴 刚	张学明	张晶晶
邵 国	周立社	姜树原	席海燕
韩丽红	魏春华		



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

北 京

图书在版编目(CIP)数据

医学生物化学与分子生物学实验技术双语教程/苏 燕,席海燕主编. —北京:人民军医出版社,2013.1

全国高等医学院校本科教材

ISBN 978-7-5091-6434-1

I. ①医… II. ①苏… ②席… III. ①医用化学—生物化学—实验—双语教学—医学院校—教材②医药学—分子生物学—实验—双语教学—医学院校—教材 IV. ①Q5-33②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 023312 号

策划编辑:徐卓立 文字编辑:戴璐萍 责任审读:王三荣

出版发行:人民军医出版社 经销:新华书店

通信地址:北京市 100036 信箱 188 分箱 邮编:100036

质量反馈电话:(010)51927290;(010)51927283

邮购电话:(010)51927252

策划编辑电话:(010)51927300-8743

网址:www.pmmp.com.cn

印、装:京南印刷厂

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:11.25 字数:268千字

版、印次:2013年1月第1版第1次印刷

印数:0001—3000

定价:23.00元

版权所有 侵权必究

购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换

内容提要

本书主要介绍与医学相关的常用生物化学与分子生物学实验技术,分为概述、蛋白质的分离纯化、酶学、物质代谢、核酸的分离纯化、基因工程及特色实验七个章节,分别介绍了相关实验中常使用的一般仪器、方法及 24 项具体的实验技术,每项技术又包含目的、原理、材料、方法及注意事项等内容。为了进一步提高学生的专业外语水平,每项技术均编写了英文版以帮助大家对照学习。本书可供不同医学专业的本科、专科及研究生教学使用,也可作为本研究领域科研工作者的参考书籍。

前 言

随着生物化学与分子生物学的迅猛发展,其理论与方法已经渗透到生命科学及医学的各个研究领域并成为现代医学前进与发展的重要推动力。因此,生物化学与分子生物学成为医学生必修的基础课程之一。这门课程实验性很强,它的理论形成和发展几乎都以实验技术为基础。

在国内绝大多数医学院校中,生物化学的教学通常分为理论教学和实验教学两部分进行。在课时量有限的情况下,实验课并不能够系统讲授生物化学与分子生物学实验的主要内容与原理,只能为学生开设部分经典的验证性实验和综合实验。为了更好地培养学生的科研精神和创新意识,适应 21 世纪医学科学的发展,我院在学分制教学改革过程中,将传统生物化学与分子生物学教学中的实验课教学独立出来,成立医学生物化学与分子生物学实验技术课程进行独立授课和考核。以前编写的《生物化学实验指导》已经不能满足本课程教学的需要,为此我们启动本教材的编写。

本书分为概述、蛋白质分离纯化与鉴定、酶学实验、物质代谢、核酸的分离纯化与鉴定、基因工程及特色实验 7 个章节。概述部分综述了生物化学与分子生物学常用技术的基本原理、方法及相关仪器的使用方法和注意事项。其他章节具体介绍了蛋白质、核酸及酶的分离、纯化、定量以及活性检测的一般原则及方法;糖类、脂类、氨基酸等营养物质代谢产物的检测及其与疾病的关系;基因工程实验的基本操作;以及本教研室在科研向教学转化过程中为学生开设的与本室研究密切相关的特色实验。这些内容既与《生物化学》教材内容紧密衔接,又具有独立完整的教学体系,因此既可以作为生物化学课程的实验教程,也可以配合理论教学进行独立授课。本书相关实验后还为布置了一些小型设计性实验以进一步培养学生的逻辑思维、综合应用及动手操作能力,帮助他们形成实践技能和科研思维的正确体系。此外,为了配合双语教学的开展,本书的每一个实验均采用中英文对照的方式编写,方便学生的深入学习。

由于我们水平有限,书中难免存在错漏和不足之处,敬请广大读者和同行给予批评和指正!

包头医学院 苏 燕

2013 年 1 月

目 录

第 1 章 概论..... (1)	指标..... (20)
第一节 常用生物化学与分子生物学实验方法..... (1)	第 2 章 蛋白质的分离、纯化、定量与鉴定 (22)
一、分光光度法 (1)	总论 (22)
二、层析 (2)	一、蛋白质分离纯化的原则和策略 (22)
三、电泳 (4)	二、蛋白质分离纯化的方法..... (22)
四、离心法 (7)	三、蛋白质的定量和定性分析..... (24)
五、核酸扩增 (8)	四、蛋白质的鉴定..... (25)
六、分子杂交..... (10)	实验 1 蛋白质的分离纯化 (26)
第二节 常用生物化学与分子生物学仪器设备的基本操作..... (12)	Experiment 1 Protein separation and purification (26)
一、分光光度计..... (12)	实验 1-1 盐析法分离血浆白蛋白 (26)
二、离心机..... (13)	Experiment 1-1 The separation of plasma albumin by salt precipitation (27)
三、仪器的清洗及干燥..... (14)	实验 1-2 分子筛层析(凝胶过滤) (28)
四、吸量管和微量移液器..... (15)	Experiment 1-2 Molecular sieve chromatography (gel filtration) (30)
五、试剂混匀方法..... (16)	实验 1-3 亲和层析纯化胰蛋白酶 (31)
六、保温..... (17)	Experiment 1-3 Affinity purification of trypsin (33)
七、过滤..... (17)	实验 1-4 离子交换层析 (36)
八、烘箱和恒温箱..... (17)	Experiment 1-4 Ion exchange chromatography (37)
第三节 实验样品的制备 (17)	实验 1-5 醋酸纤维薄膜电泳分离
一、血液样品的制备..... (17)	
二、尿液样品的制备..... (18)	
三、组织样品的制备..... (18)	
附录 A 实验室规则 (19)	
附录 B 实验记录及实验报告 (19)	
附录 C 实验室用水的种类和标准 (20)	
一、实验室用水的种类..... (20)	
二、评价实验室用水质量的常用	

血浆蛋白	(40)	(64)
Experiment 1-5 Cellulose acetate membrane electrophoresis of plasma protein	(41)	实验 4-1 pH 对酶活性的影响	(64)
实验 1-6 聚丙烯酰胺凝胶电泳 分离血浆蛋白	(43)	Experiment 4-1 Effect of pH on enzyme activity	(65)
Experiment 1-6 Polyacrylamide gel electrophoresis of plasma proteins	(44)	实验 4-2 温度对酶活性的影响	(67)
实验 2 蛋白质定量	(47)	Experiment 4-2 Effect of tempera- ture on enzyme activity	(68)
Experiment 2 Protein quantification	(47)	实验 4-3 激动剂和抑制剂对酶活 性的影响	(69)
实验 2-1 考马斯亮蓝染色法测 定蛋白质含量	(47)	Experiment 4-3 Effect of agitator and inhibitor on enzyme activity	(70)
Experiment 2-1 Bradford protein assay	(48)	实验 5 米氏常数的测定	(72)
实验 2-2 双缩脲法测定蛋白质 含量	(49)	Experiment 5 Determination of the Michaelis constant	(72)
Experiment 2-2 Biuret protein assay	(51)	实验 5-1 酸性磷酸酶的提取及 K_m 测定	(72)
实验 2-3 Folin-酚试剂法(Lowry 法).....	(52)	Experiment 5-1 The extraction of acid phosphatase and dete- rmination of K_m	(73)
Experiment 2-3 Lowry protein assay	(53)	实验 5-2 碱性磷酸酶的提取及 K_m 测定	(75)
实验 2-4 紫外分光光度法	(55)	Experiment 5-2 The extraction of alkaline phosphatase and determination of K_m	(77)
Experiment 2-4 UV spectrophoto- metric method	(56)	实验 6 血清淀粉酶活性的测定	(79)
实验 3 蛋白质鉴定——蛋白质印迹法	(58)	Experiment 6 Activity assay of serum amylase	(80)
Experiment 3 Identification of protein-Western blotting	(59)	第 4 章 物质代谢	(82)
第 3 章 酶学实验	(62)	总论	(82)
总论	(62)	实验 7 血糖浓度的测定	(82)
一、酶的提取、分离纯化	(62)	Experiment 7 Determination of glucose concentration	(82)
二、酶活力测定.....	(63)	实验 7-1 邻甲苯胺法测定血糖 浓度	(82)
实验 4 影响酶促反应速度的因素	(64)	Experiment 7-1 Determination	
Experiment 4 Affecting factors of enzymatic reaction speed			

of blood glucose by o-toluidine method	(84)	(107)
实验 7-2 葡萄糖氧化酶法测定 血糖浓度	(85)	实验 12-1 应用 PCR 技术扩增血 红蛋白 β 基因	(107)
Experiment 7-2 Determination of blood glucose by GOD-POD	(87)	Experiment 12-1 Amplify Hb- β gene by PCR	(108)
实验 8 血清脂蛋白琼脂糖凝胶 电泳	(89)	实验 12-2 从总 RNA 中采用反 转录 PCR 扩增 GAPDH	(110)
Experiment 8 Measurement of serum lipoproteins by agarose gel electrophoresis	(90)	Experiment 12-2 Amplify GAPDH from total RNA by RT-PCR	(111)
实验 9 转氨基作用(纸层析法)	(92)	实验 13 核酸凝胶电泳	(113)
Experiment 9 Transamination (paper chromatography)	(94)	Experiment 13 Nucleic acid gel electrophoresis	(113)
实验 10 血尿素氮测定	(96)	实验 13-1 核酸琼脂糖凝胶电泳	(113)
Experiment 10 Determination of urea nitrogen in serum	(98)	Experiment 13-1 Agarose gel electrophoresis	(114)
第 5 章 核酸的分离、纯化、定量与 鉴定	(100)	实验 13-2 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(115)
总论.....	(100)	Experiment 13-2 Polyacrylamide gel electrophoresis	(118)
一、核酸的分离、提取和纯化.....	(100)	实验 14 核酸杂交	(120)
二、核酸的定量	(102)	Experimental 14 Nucleic acid hyb- ridization	(120)
三、核酸的保存	(102)	实验 14-1 Southern 印迹杂交	(120)
实验 11 核酸提取	(103)	Experimental 14-1 Southern blot hybridization	(123)
Experiment 11 Nucleic acid extraction	(103)	实验 14-2 Northern 印迹杂交	(126)
实验 11-1 血液基因组 DNA 的 提取.....	(103)	Experiment 14-2 Northern blot hybridization	(127)
Experiment 11-1 Preparation of genome DNA from blood	(104)	第 6 章 基因工程	(131)
实验 11-2 大鼠肝脏 RNA 的 提取.....	(104)	总论.....	(131)
Experiment 11-2 Preparation of total RNA from rat livers	(105)	一、基因工程的概念	(131)
实验 12 基因扩增	(107)	二、基因工程的基本要素	(131)
Experiment 12 Gene amplification		三、基因工程的基本流程	(133)
		四、基因工程的支撑技术	(135)
		实验 15 大肠杆菌的培养及感受	

态细胞的制备····· (136)	from agarose electrophoretic
Experiment 15 Preparation of	gels ····· (150)
competent <i>E. coli</i> DH5 α by	实验 19 目的基因与载体的连接
using calcium chloride method	····· (152)
····· (137)	Experiment 19 Ligation of the
实验 16 质粒提取 ····· (139)	target gene and vector ····· (153)
Experiment 16 Preparation of	实验 20 电转化法制备感受态细胞
plasmid DNA ····· (139)	····· (154)
实验 16-1 碱裂解法小量提取	Experiment 20 Transformation
质粒 DNA ····· (139)	of <i>E. coli</i> by electroporation ··· (155)
Experiment 16-1 Mini prepara-	实验 21 转化子的鉴定 ····· (156)
tion of plasmid DNA by alkaline	Experiment 21 Screening Bacterial
lysis ····· (140)	Colonies ····· (157)
实验 16-2 碱裂解法大量提取	实验 22 质粒 DNA 的酶切鉴定
质粒 DNA ····· (143)	····· (158)
Experiment 16-2 Maxi prepara-	Experiment 22 Restriction enzyme
tion of plasmid DNA by alkaline	digestion of plasmid DNA ····· (160)
lysis ····· (144)	第 7 章 特色创新实验····· (162)
实验 17 聚乙二醇沉淀法纯化质粒	实验 23 异常血红蛋白的筛查 ··· (162)
DNA ····· (146)	Experiment 23 Abnormal hemoglo-
Experiment 17 Purification of plas-	bin screening ····· (164)
mid DNA by precipitation with	实验 24 血红蛋白电泳释放实验
polyethylene glycol(PEG) ····· (147)	····· (166)
实验 18 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	Experiment 24 Electrophoresis
回收····· (149)	release test of hemoglobin ····· (168)
Experiment 18 Recovery of DNA	

第 1 章 概 论

chapter 1

生物化学与分子生物学(biochemistry and molecular biology)是医学生的一门极为重要基础课程之一,是生命科学共同语言。目前生物化学与分子生物学的理论与技术方法已经渗透到生物学乃至基础医学与临床医学的各个学科,并越来越多地被应用于临床疾病的诊断、治疗和预防,成为医学生步入 21 世纪医学殿堂的必备条件。

第一节 常用生物化学与分子生物学实验方法

一、分光光度法

分光光度法(spectrophotometry)是利用物质所特有的吸收光谱来鉴别物质或测定其含量的一项技术,此技术灵敏、精确、快速和简便,为生物化学研究中广泛使用的方法。

1. 基本原理——朗伯-比尔定律(Lambert-Beer's Law) 又称吸收定律,即当一束平行单色光垂直通过某一均匀非散射的吸光物质时,其吸光度(absorbance, A)与吸光物质的浓度(concentration, C)及吸收层厚度(length, L)成正比,用公式表示为

$$A = \epsilon CL$$

其中 A 为吸光度, ϵ 为摩尔吸光系数, C 为吸光物质浓度, L 为吸光溶液的厚度。

2. 待测样品浓度的测定 在实际工作中,由于盛放溶液的比色杯厚度是一致的,待测物质的浓度可通过以下几种方法测得:

(1) 标准比较法(standard comparative method):在相同条件下,配制标准溶液和待测样品溶液,测定它们的吸光度。比较两者的吸光度,即可求出待测样品溶液的浓度。

$$C_{\text{待测}} = \frac{A_{\text{待测}}}{A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}}$$

(2) 标准曲线法(standard curve method):配制一系列浓度由小到大的标准溶液,测出其吸光度。以各标准溶液的浓度为横坐标,相应的吸光度为纵坐标,在方格坐标纸上绘出标准曲线。在相同条件下测出待测样品的吸光度后,从标准曲线上可以直接查出其浓度。此法通常适用于大批样品的分析。

(3) 标准系数法(standard coefficient method):多次测定标准液的吸光度后,按下式求出标准系数。

标准系数 = 标准液浓度 / 标准液平均吸光度

也可从标准曲线上求出标准系数,再用同样方法测定待测溶液的吸光度,并代入下式求出待测物质的浓度。

$$C_{\text{待测}} = A_{\text{待测}} \times \text{标准系数}$$

(4) 回归分析法(regression analysis): 将制作标准曲线的各种标准液浓度,与其相应的吸光度,用回归分析法求出一个回归方程式。以后,只要测定条件不变,将样品液吸光度值代入该方程式,则可算出样品液的浓度。

二、层析

层析法(chromatography)是利用混合物中各组分物理化学性质,如吸附力(adsorbability)、溶解度(solubility)、分子形状(molecular shape)、分子大小(molecular size)以及分子极性(molecular polarity)等差异,使各组分不同程度地分布于两相中,从而使各组分以不同的速度随流动相向前移动而达到分离的目的。固定不动的相称为固定相(stationary phase),流过固定相的液体或气体称为流动相(mobile phase)。此法最初用于各种植物色素的分离,因其在吸附柱上形成色谱,故又称为色谱层析法或色谱法。层析法根据分离原理不同分为以下几种:

1. 分配层析(partition chromatography) 是利用混合物在两种或两种以上的不同溶剂(solvent)中的分配系数(partition coefficient)不同而使物质分离的方法,相当于一种连续性的溶剂抽提(extraction)。如用带水的材料(载体)作为一种液相(固定相),加入与水不相溶的溶剂作为另一种液相(流动相),根据混合物各组分在两相中分配程度不同而将其分开,形成层析谱。

分配层析中的载体只起负载固定相的作用,通常是一些吸附力小、反应性弱的惰性物质,如淀粉、纤维素粉、滤纸等。固定相除水外,也可用稀硫酸(diluted sulfuric acid)、甲醇(methanol)、仲酰胺(secondary amide)等强极性溶液,流动相则采用比固定相极性小或非极性的有机溶剂。

纸层析(paper chromatography)是应用最广泛的一种分配层析,以滤纸为载体,滤纸上吸附的水作为固定相。某些有机溶剂如醇(alcohol)、酚(phenol)等为常用的流动相。把欲分离的物质加在纸的一端,当流动相流过时,待分离物质将在两相间不断地进行分配。在固定相中分配系数较高的成分,随流动相移动的速度较慢;反之,在流动相中分配系数较高的成分,随流动相移动的速度较快。不同物质移动速率可用比移值(relative to front value, R_f)表示:

$$R_f = \text{色斑中心至加样点中心的距离} / \text{溶剂前沿至加样点中心的距离}$$

每一种物质在一定溶剂中的分配系数是一定的, R_f 值也是恒定的,因此可以根据 R_f 值来鉴定被分离的物质。

2. 吸附层析(absorption chromatography) 指溶液中的溶质随流动相通过吸附介质时,溶质会被吸附介质表面的吸附基团吸附。常用的吸附介质有氧化铝、硅胶、药用炭等,它们对不同物质的吸附能力不同,利用这种差异可将混合物分离。根据操作方式的不同分为柱层析与薄层层析两种。

(1) 柱层析(column chromatography): 柱层析是用一根玻璃管柱,下端铺垫棉花或玻璃棉,管内加吸附剂粉末,用一种溶剂润湿后,即成为吸附柱。然后从柱顶加入要分离的样品溶

液,待全部流入吸附柱后立即加入洗脱剂进行洗脱。在此过程中,管内连续进行溶解-吸附-再溶解-再吸附的过程,被分离物随洗脱剂以不同速率向下流动,达到最后分离。通常非极性或极性不强的有机物如胡萝卜素、磷脂、胆固醇等用此法分离最为合适。

(2)薄层层析法(thin layer chromatography):在玻璃板上将吸附剂均匀地铺成薄层,将样品点到薄层上用合适的溶剂展开。由于各组分性质不同,迁移速度因此不同,展开一定距离后,即得到互相分离的组分斑点。可用适当方法使各组分在板上显示其位置,如组分本身有颜色,即可直接观察,否则可喷显色试剂或在紫外灯下观察荧光。

3. 离子交换层析(ion-exchange chromatography) 以离子交换剂为固定相,依据流动相中的组离子与交换剂上的平衡离子进行可逆交换时结合力大小的差别进行分离的一种层析方法。离子交换剂上带有酸性或碱性基团,分别能与溶液中的阴离子或阳离子进行交换(图1-1)。如有两种以上的成分吸附在离子交换剂上,洗脱时亲和力(即静电引力)强的离子移动较慢,而亲和力弱的离子移动较快先被洗脱下来,进而将它们分开。

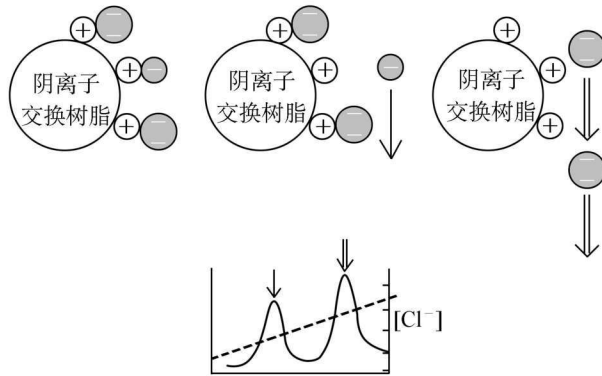
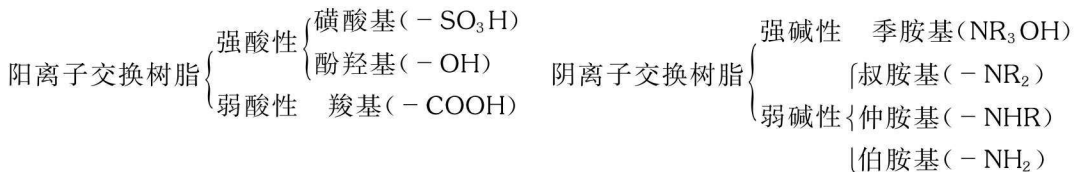


图 1-1 离子交换树脂

目前多采用人工合成的离子交换剂,即离子交换树脂,呈球状或无定形粒状。按照所交换离子的性质将离子交换树脂分为两大类:阳离子交换树脂[具有酸性(负电)基团,能交换阳离子]和阴离子交换树脂[具有碱性(正电)基团,能交换阴离子]。按离子解离性的大小,又可将离子交换树脂分为强弱两种。



4. 凝胶层析(gel chromatography) 也称凝胶过滤(gel filtration)、排阻层析(exclusion chromatography)或分子筛层析(molecular sieve chromatography),是利用网状结构的凝胶具有的分子筛效应,将被分离物质按照分子大小不同进行分离(图1-2)。分子量小的物质可以进入凝胶颗粒内部,行程长,较晚被洗脱出来;分子量较大的物质不可以进入凝胶颗粒内部而从凝胶颗粒之间流出,行程短,较早被洗脱出来。因此凝胶层析可以去除大分子溶液中的小分子物质,被广泛应用于高分子的蛋白质、酶和核酸等的分离和提取。凝胶的种类很多,常用

的主要有葡聚糖凝胶(sephadex)、聚丙烯酰胺凝胶(polyacrylamide)、琼脂糖凝胶(agarose)以及聚丙烯酰胺和琼脂糖之间的交联物。葡聚糖凝胶又名右旋糖酐(dextran),是应用最广的凝胶。不同规格型号的葡聚糖具有不同的交联度和吸水性,吸水性通常用英文字母G表示。一般G值越小,交联度越大,吸水性越小;相反,G值越大,交联度越小,吸水性就越大。G后面的阿拉伯数字代表凝胶吸水值的10倍,因此根据柱床体积可以估算出葡聚糖凝胶干粉的用量。例如,G50代表每克干胶可以吸5克水。

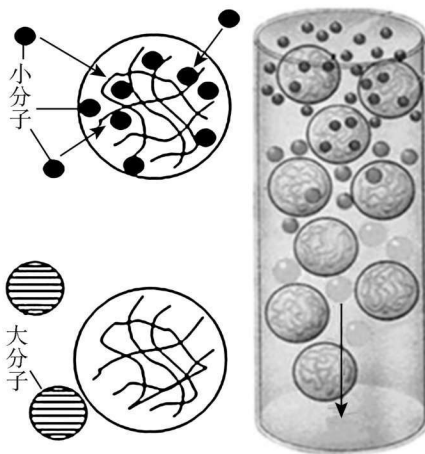


图 1-2 分子筛层析

5. 亲和层析(affinity chromatography) 是利用生物高分子物质能与相应配基特异性可逆结合的原理对高分子进行分离纯化的方法。生物大分子间存在很多特异性相互作用,如抗原与抗体、DNA与互补DNA或RNA、酶与底物或抑制剂、激素(或药物)与受体、糖蛋白与它相应的植物凝集素等的结合,这种结合力就称为亲和力。如果将配基共价连接在固相载体上,制备成吸附系统,则通过层析柱的生物高分子就能以高亲和力与配基特异结合,使它与其他杂质分离开来,从而达到纯化的目的。层析时(图 1-3),层析柱中有一定的配基浓度,上样后,所分离的物质与相应配基形成特异复合物。随着样品的不断加入,复合物形成增多,从而形成紧密的吸附带。此时应选择适当离子强度及 pH 的缓冲溶液使其更易于形成复合物,然后用平衡缓冲液充分洗涤,以除去非特异性吸附的杂质,使柱中只留下特异性吸附的物质,最后再改变缓冲液的 pH 或离子强度,将所要分离的物质从吸附柱中洗脱下来,也可加入可溶性配基做竞争性洗脱。

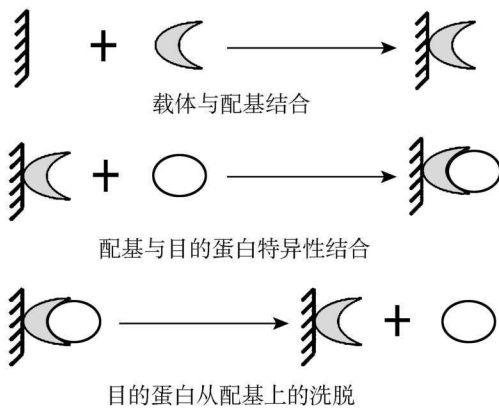


图 1-3 亲和层析分离蛋白质

三、电 泳

1. 电泳(electrophoresis)的基本原理 电场中带电颗粒向与它电性相反的电极移动的现象称为电泳。由于混合物中各组分所带电荷的性质、数量以及分子量各不相同,在电场中的泳

动方向和速度也不同,因此可以将不同组分分离。

2. 影响电泳速度的因素

(1)粒子本身的因素:氨基酸、蛋白质等很多物质都具有可解离的酸性或碱性基团,它们在特定的缓冲溶液中会进行解离从而携带一定的电荷。一般在碱性环境中($\text{pH} > \text{pI}$)分子带负电荷,在电场中向阳极移动;在酸性环境中($\text{pH} < \text{pI}$)分子带正电荷,在电场中向阴极移动。当其他电泳条件恒定时,带电粒子的泳动速度主要取决于其电荷数、分子大小和分子形状。

(2)电泳介质的 pH:决定带电粒子的解离方向和程度,即带电粒子所带净电荷的性质和多少。对蛋白质和氨基酸等两性电解质而言,介质的 pH 距等电点越远,所带净电荷越多,泳动速度也越快;反之则越慢。因此,当电泳分离某一混合物时,应选择一个合适的 pH,使各种蛋白质所带净电荷量差异较大,以利于彼此的分离。为了使电泳过程中溶液的 pH 恒定,必须采用缓冲溶液。

(3)缓冲液的离子强度(ionic strength):离子强度如果过低,缓冲液的缓冲容量小而不易维持 pH 恒定;离子强度过高,则降低带电粒子的带电量,使电泳速度减慢。一般常用的离子强度为 $0.02 \sim 0.2 \text{ mol/L}$ 。

(4)电场强度(electric field strength):即每厘米的电势差,也称电势梯度。电泳时需要选择合适的电场强度。电场强度越高,带电粒子的移动速度越快,但产热也会增加,进而引起蛋白质变性、缓冲液水分蒸发过多和支持物上离子强度增加,因此高压电泳(电场强度大于 50 V/cm)常需要冷却装置。但是电场强度过低,电泳速度太慢,会导致电泳区带扩散从而影响分离效果。

(5)电渗(electroosmosis):指在电场作用下液体相对于和它接触的固相载体做相对运动的现象。如滤纸可以吸附水分子的羟基而带负电荷,而与纸相接触的水溶液带正电荷,液体便向阴极移动。由于电渗现象往往与电泳同时存在,所以带电粒子的移动同时受电泳及电渗的影响,如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;如方向相同,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的支持物的中心,以观察电渗的方向和距离。

3. 电泳的分类 电泳技术的种类很多,根据有无固体支持物,可分为界面电泳(boundary electrophoresis)和区带电泳(zone electrophoresis)两大类。界面电泳是指在溶液中进行的电泳,没有固体支持物。当溶液中有几种带电粒子时,通电后由于不同粒子泳动速度不同,在溶液中形成相应的区带界面。由于界面电泳分离后不易收集,故目前已很少使用。区带电泳是指在支持物上进行的电泳,其分离效果远比界面电泳好。根据支持物的不同,常用的区带电泳又可分为纸上电泳、醋酸纤维素薄膜电泳、琼脂糖凝胶电泳及聚丙烯酰胺凝胶电泳等。

(1)纸上电泳(paper electrophoresis)和醋酸纤维素薄膜电泳(cellulose acetate membrane electrophoresis):纸上电泳是以滤纸为支持体进行电泳,现已基本被醋酸纤维素薄膜电泳所代替。醋酸纤维素薄膜是一种细密而薄的微孔膜,其优点是对样品的吸附性小、电渗作用小、电泳速度快和所需样品量小。长期以来,醋酸纤维素薄膜电泳以其操作简便、快速、区带清晰、容易定量、价廉等优点被广泛用于科学实验、生化产品分析以及临床检验,如血浆蛋白、脂蛋白、糖蛋白、核酸及其他生物大分子的分析检测。

(2)琼脂糖凝胶电泳(agarose gel electrophoresis):琼脂糖是从海藻中分离的多糖,由 D-半乳糖和 L-半乳糖通过糖苷键交替构成的线性多聚物,呈白色粉末状。制成凝胶后,胶内形

成的网格状空隙直接参与带电粒子的分离。电泳过程中,样品分子通过空隙时会受到阻力,大分子物质在电泳时受到的阻力比小分子的大,所以在琼脂糖凝胶电泳中,带电粒子的分离不仅依赖于净电荷的性质和数量,还与分子大小有关,分辨能力大大提高。目前,常用琼脂糖作为电泳支持物分离蛋白质和同工酶。将琼脂糖电泳与免疫化学相结合,发展成免疫电泳技术。另外,琼脂糖凝胶电泳也常用于分离、鉴定核酸,如 DNA 鉴定, DNA 限制性内切核酸酶图谱制作等。

(3) 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常用电泳技术。聚丙烯酰胺凝胶由单体丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺在自由基的催化下聚合而成。催化聚合的方法包括化学聚合法和光聚合法。化学聚合以过硫酸铵(ammonium persulfate, AP)为催化剂,以四甲基乙二胺(tetramethylethylenediamine, TEMED)为加速剂。在聚合过程中, TEMED 催化 AP 产生自由基,后者引发丙烯酰胺单体聚合,同时甲叉双丙烯酰胺与丙烯酰胺链间产生甲叉键交联,从而形成三维网状结构。

根据有无浓缩效应, PAGE 分为连续系统和不连续系统两大类。连续系统电泳体系中,电泳缓冲液 pH 与制胶缓冲液相同,带电颗粒主要依据电荷效应和分子筛效应分离。不连续体系由电极缓冲液、浓缩胶及分离胶所组成。浓缩胶是由 AP 催化聚合的大孔胶,凝胶缓冲液为 pH6.7 的 Tris-盐酸。分离胶是由 AP 催化聚合的小孔胶,凝胶缓冲液为 pH8.9 的 Tris-盐酸。电极缓冲液是 pH8.3 的 Tris-甘氨酸缓冲液。两种孔径的凝胶、两种缓冲体系、三种 pH 使不连续体系形成了凝胶孔径、pH、缓冲液离子成分的不连续性,这是样品浓缩的主要因素。不连续电泳过程中,除了电荷效应外,还有分子筛效应和浓缩效应。

分子筛效应(molecular sieve effect)是指凝胶聚合物的多孔网状结构对大分子物质的穿过有一定的阻力。颗粒大、形状不规则的分子受到的阻力大,移动速度慢;颗粒小、形状为球形的分子受到的阻力小,移动速度快。

浓缩效应(concentrated effect)存在于不连续电泳。第一,两层凝胶的孔径不同。待分离的蛋白质分子在大孔径胶中受到的阻力小,移动速度快;移动到小孔径胶处时,阻力突然加大,移动速度急剧减慢。这样就在两种凝胶的交界处,样品的分离区带变窄,浓度升高;而且样品中各组分在交界处,由于电荷效应而依次排列开来。第二,通电后,电极缓冲液中的甘氨酸进入浓缩胶,遇到 pH6.7 的缓冲液,其解离度明显降低,负电荷减少,向阳极移动速度变慢;相反,氯离子在任何 pH 下都处于解离状态,且颗粒和摩擦力都非常小,所以它的泳动速度较快;而蛋白质在 pH6.7 的条件下,大部分以负离子形式存在,带较多的负电荷,泳动速度居于甘氨酸和氯离子中间。结果在浓缩胶中,三种离子的泳动速度为:氯离子 > 蛋白质离子 > 甘氨酸离子。氯离子(快离子)迅速向前移动,在它后面形成一个低离子浓度的低电导区域,电导与电势梯度成反比,所以低电导区就有较高的电势梯度。这种高电势梯度迫使蛋白质离子和甘氨酸离子(慢离子)在此区域内加速前进,追赶快离子,夹在快慢离子中间的蛋白质就在这种追赶过程中被逐渐压缩聚集成一条狭窄的区带。当样品进入分离胶后, pH 由 6.7 变为 8.9,甘氨酸的解离度增加,负电荷增多,泳动加快,超过蛋白质的泳动速度时,凝胶中高电势梯度区域消失,蛋白质样品在均一电势梯度和 pH 条件下,在小孔径胶中按分子筛效应和电荷效应进行分离。

聚丙烯酰胺凝胶具有机械强度高、弹性大、透明、化学稳定性高、无电渗作用、设备简单、样品用量少(1~100 μ g)和分辨率高等优点,并可通过控制单体浓度或单体与交联剂的比例聚

合成孔径大小不同的凝胶,用于蛋白质和核酸等物质的分离及定性或定量分析。此外,还可加入去垢剂十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS),以测定蛋白质亚基的分子量。在实验中常按样品的相对分子质量(M_r)大小来选择适宜的凝胶孔径(表 1-1)。

表 1-1 不同相对分子质量范围所选用的凝胶浓度百分率

物 质	相对分子质量	适用的凝胶浓度(%)
蛋白质	$<1 \times 10^4$	20~30
	$1 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$	15~20
	$4 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$	10~15
	$1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$	5~10
	$>5 \times 10^5$	2~5
核酸(DNA 或 RNA)	$<1 \times 10^4$	15~20
	$1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$	5~10
	$1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$	2~2.6

四、离心法

1. 离心法的概念 离心法(centrifugation)主要用于将悬浮液中的固体颗粒与液体分开;或将乳浊液中两种密度不同,又互不相溶的液体分开;或者利用不同密度的固体颗粒在液体中沉降速度不同将固体颗粒按密度进行分级。离心机运行的速度一般用转速或离心力这两种方式来表示。转速指转头(也称离心陀)每分钟旋转的圈数,通常用 n 表示,单位为 rpm(revolutions per minute)或 r/min。离心力常用地球引力的倍数表示,因而被称为相对离心力(relative centrifugal force, RCF),通常用重力加速度(g)的倍数表示。离心力的大小取决于离心转头的角速度和颗粒距离心轴的距离。离心力和离心转速的换算公式如下:

$$RCF = 1.118 \times 10^{-5} \times n^2 \times r$$

其中 RCF 表示相对离心力,单位为 g ; n 表示转速,单位为 rpm; r 表示离心半径,单位为 cm。

只要 RCF 值不变,一个样品可以在不同半径的离心机上获得相同的离心结果。为了方便, Dole 和 Contzias 制作了与转头速度 n 和半径 r 相对应的 RCF 测算图,可以方便地测出 n 和 RCF 的对应关系(图 1-4);将离心机旋转速度(r/min)换算为 RCF 时,首先在 r 标尺上取离心机半径,再在 n 标尺上取转速,然后将这两点间画一条直线,直线与 RCF 标尺交叉点的刻度即为相应的离心力数值。

2. 离心法的分类

(1)平衡离心法(equilibrium centrifugation):根据粒子大小、形状不同进行分离,包括差速离心法(differential velocity centrifugation)和速率区带离心法(rate zonal centrifugation)。

(2)等密度离心法(isopycnic centrifugation):又称等比重离心法,依据粒子密度差进行分离,等密度离心法和上述速率区带离心法合称为密度梯度离心法。

(3)经典式沉降平衡离心法(classic sedimentation equilibrium centrifugation):用于测定生物大分子的分子量、估计纯度及观察构象变化等。

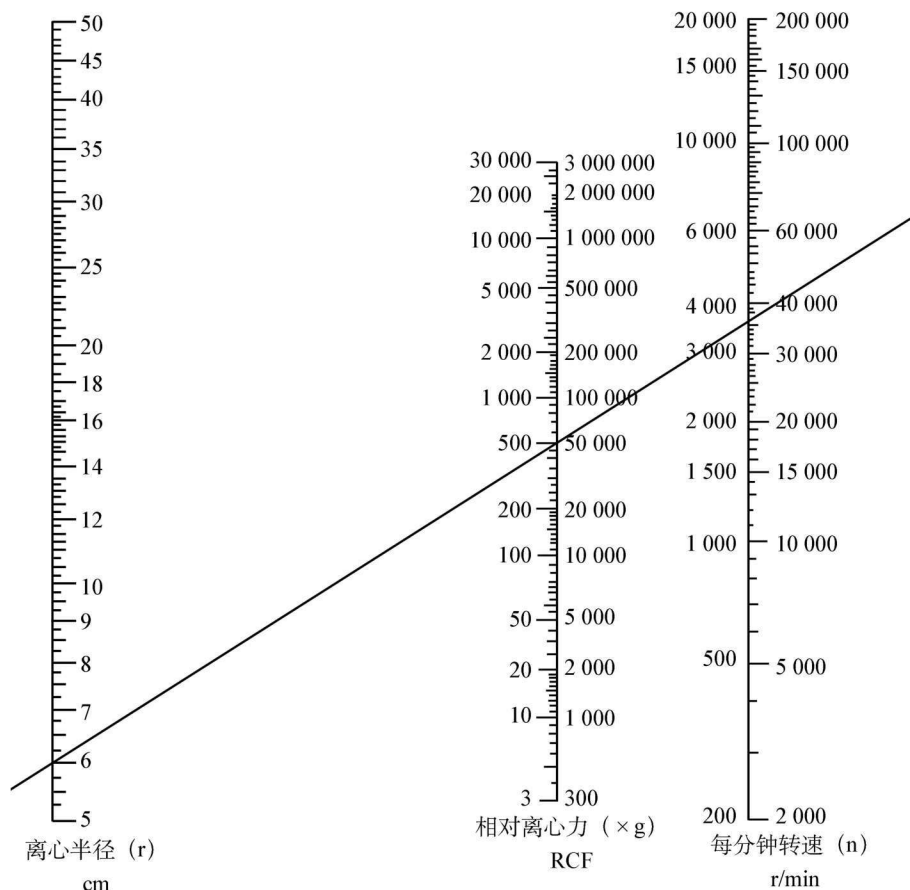


图 1-4 转头速度 n 、离心半径 r 及相对离心力 RCF 测算图

五、核酸扩增

1. 聚合链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 基本原理 PCR 属于核酸扩增 (nucleic acid amplification), 它是 20 世纪 80 年代发展起来的 DNA 体外扩增技术, 具有特异、敏感、产率高、快速、重复性好、易自动化等突出优点。PCR 的基本原理类似于 DNA 的天然复制过程, 是通过控制温度在体外重复进行 DNA 模板的解链 (变性)、引物与模板 DNA 结合 (退火) 及 DNA 聚合酶催化新生 DNA 合成 (延伸) 的过程, 从而使目的 DNA 片段的拷贝数不断扩增。

2. PCR 反应体系 包括 DNA 模板、引物、DNA 聚合酶、dNTP 以及含有 Mg^{2+} 的缓冲液。

(1) 模板 (template): 可以是 DNA, 也可以是 RNA。如果用 RNA 做模板, 则首先要将其反转录生成 cDNA 作为扩增的直接模板。模板可以来源于不同的标本如病原体 (病毒、细菌、真菌等)、临床标本 (细胞、血液、羊水细胞等) 及法医学标本 (血斑、精斑、毛发等)。理论上讲, 只要有 1 分子模板 DNA, 经 PCR 后即可成百万倍地扩增。提取模板 DNA 时, 多数样品需要经过 SDS 和蛋白酶 K 处理。难以破碎的细菌, 可用溶菌酶加 EDTA 处理。得到的粗制 DNA 模