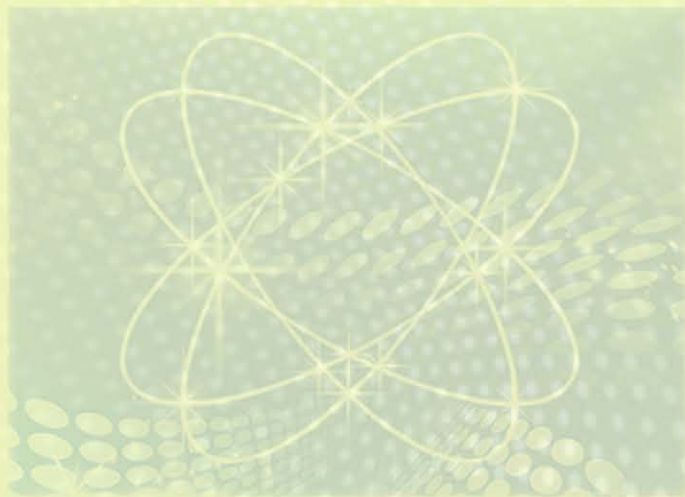


医学生物化学与分子生物学 实验技术双语教程

(第2版)

主编 苏 燕 席海燕



人民军医出版社

- 全国高等医学院校改革教材
- 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

(第2版)

主 编 苏 燕 席海燕
主 审 赵云山 崔成立
副主编 张学明 李 斌 丁海麦
编 者 (以姓氏笔画为序)
丁海麦 王步云 孔凡青 闫巧梅
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. —2版. —北京:人民军医出版社,2015.9

全国高等医学院校改革教材

ISBN 978-7-5091-8636-7

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医学—分子生物学—实验—双语教学—医学院校—教材 IV. ①Q5-33 ②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 201321 号

策划编辑:徐卓立 郝文娜 文字编辑:秦 珑 黄维佳 责任审读:周晓洲

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.pmp.com.cn

印、装:京南印刷厂

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:13 字数:312千字

版、印次:2015年9月第2版第1次印刷

印数:0001—3050

定价:28.00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

本书为高等医学院校实验教材,经两年教学实践后修订再版。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,分为概论、蛋白质实验、酶学实验、物质代谢实验、核酸实验、特色创新实验及实验设计 7 个章节,分别介绍了相关实验中常用的一般仪器、方法及 25 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,每项技术均附有英文对照。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。

目 录

第 1 章 概论	(1)
第一节 常用生物化学与分子生物学实验方法	(1)
一、分光光度法	(1)
二、层析	(3)
三、电泳	(6)
四、离心技术	(9)
第二节 常用生物化学与分子生物学仪器设备的基本操作	(10)
一、实验室基本操作技能	(10)
二、实验室常用仪器的使用方法	(12)
第三节 实验样品的制备	(18)
一、血液样品的制备	(18)
二、尿液样品的制备	(18)
三、组织样品的制备	(19)
四、微生物样品的制备	(19)
附录 A 实验室规则	(19)
附录 B 实验室安全	(20)
附录 C 实验记录及实验报告	(20)
附录 D 实验室用水的种类和标准	(21)
第 2 章 蛋白质实验	(23)
一、蛋白质分离纯化的原则	(23)
二、蛋白质分离纯化的一般程序	(24)
三、蛋白质的浓缩、干燥和保存	(27)
四、蛋白质的定量和定性分析	(27)
五、蛋白质的鉴定	(28)
实验 1 蛋白质的分离纯化	(29)
Experiment 1 Separation and purification of protein	(29)
实验 1-1 盐析法分离血浆白蛋白	(29)
Experiment 1-1 Separation of plasma albumin by salt precipitation	(30)
实验 1-2 分子筛层析(凝胶过滤)	(31)
Experiment 1-2 Molecular sieve chromatography (gel filtration)	(33)
实验 1-3 亲和层析纯化胰蛋白酶	(34)
Experiment 1-3 Affinity purification of trypsin	(36)
实验 1-4 离子交换层析	(39)

Experiment 1-4 Ion exchange chromatography	(40)
实验 1-5 醋酸纤维薄膜电泳分离血浆蛋白	(42)
Experiment 1-5 Cellulose acetate membrane electrophoresis of plasma proteins	(44)
实验 1-6 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血浆蛋白	(45)
Experiment 1-6 Polyacrylamide gel electrophoresis of plasma proteins	(47)
实验 2 蛋白质定量	(50)
Experiment 2 Protein quantitative analysis	(50)
实验 2-1 考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量	(50)
Experiment 2-1 Bradford protein assay	(51)
实验 2-2 双缩脲法测定蛋白质含量	(52)
Experiment 2-2 Biuret protein assay	(54)
实验 2-3 Folin-酚试剂法(Lowry 法)	(56)
Experiment 2-3 Lowry protein assay	(58)
实验 2-4 紫外分光光度法	(59)
Experiment 2-4 UV spectrophotometric method	(60)
实验 2-5 二喹啉甲酸法(BCA 法)测定蛋白质含量	(62)
Experiment 2-5 BCA method	(63)
实验 3 蛋白质鉴定——蛋白质印迹法	(64)
Experiment 3 Identification of protein-Western blotting	(66)
第 3 章 酶学实验	(69)
一、酶的分离纯化	(69)
二、酶活力测定	(70)
三、同工酶	(71)
实验 4 影响酶促反应速度的因素	(71)
Experiment 4 Affecting factors of enzymatic reaction speed	(74)
实验 5 血清淀粉酶活性的测定	(78)
Experiment 5 Activity assay of serum amylase	(79)
实验 6 米氏常数的测定	(80)
Experiment 6 Determination of the Michaelis constant	(81)
实验 6-1 酸性磷酸酶的提取及 K_m 测定	(82)
Experiment 6-1 Extraction of acid phosphatase and determination of K_m	(83)
实验 6-2 碱性磷酸酶的提取及 K_m 测定	(84)
Experiment 6-2 Extraction of alkaline phosphatase and determination of K_m	(86)

第 4 章 物质代谢实验	(89)
一、物质代谢的研究方法	(89)
二、物质代谢相关性疾病的常用生物化学与分子生物学诊断方法	(91)
实验 7 邻甲苯胺法测定血糖浓度	(92)
Experiment 7 Determination of blood glucose by o-toluidine method	(93)
实验 8 葡糖氧化酶法测定血糖浓度	(95)
Experiment 8 Determination of blood glucose by GOD-POD	(96)
实验 9 血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	(98)
Experiment 9 Separation of serum lipoproteins by agarose gel electrophoresis	(100)
实验 10 转氨基作用(纸层析法)	(101)
Experiment 10 Transamination(paper chromatography)	(103)
实验 11 血尿素氮测定	(106)
Experiment 11 Determination of serum urea nitrogen	(107)
第 5 章 核酸实验	(110)
第一节 核酸的提取、鉴定和保存	(110)
一、核酸的分离、提取和纯化	(110)
二、核酸的鉴定	(113)
三、核酸的保存	(113)
四、常用核酸的提取方法	(113)
第二节 核酸扩增	(115)
一、聚合酶链反应的基本原理	(115)
二、PCR 反应体系	(116)
三、PCR 技术的主要类型和应用	(117)
第三节 分子杂交	(117)
一、DNA 印迹	(118)
二、RNA 印迹	(119)
三、蛋白质印迹	(119)
四、原位杂交	(120)
五、菌落杂交	(120)
六、斑点杂交	(120)
第四节 核酸的测序技术	(121)
一、Sanger 双脱氧链终止法	(121)
二、Maxam-Gibert 化学降解法	(122)
三、全自动的 DNA 测序法	(123)
第五节 基因芯片技术	(123)
第六节 酵母杂交系统	(124)
一、酵母双杂交系统	(124)

二、酵母单杂交系统	(125)
三、酵母三杂交系统	(126)
第七节 DNA 重组技术	(126)
一、DNA 重组技术的基本要素	(127)
二、DNA 重组技术的基本流程	(128)
三、DNA 重组技术的支撑技术	(131)
实验 12 核酸提取	(132)
Experiment 12 Extraction of nucleic acid	(132)
实验 12-1 血液基因组 DNA 的提取	(132)
Experiment 12-1 Preparation of genome DNA from blood	(133)
实验 12-2 大鼠肝脏 RNA 的提取	(134)
Experiment 12-2 Preparation of total RNA from rat livers	(135)
实验 13 基因扩增	(136)
Experiment 13 Gene amplification	(136)
实验 13-1 应用 PCR 技术扩增血红蛋白 β 基因	(136)
Experiment 13-1 Amplification of Hb- β gene by PCR	(138)
实验 13-2 从总 RNA 中采用逆转录 PCR 扩增 GAPDH	(139)
Experiment 13-2 Amplify GAPDH from total RNA by RT-PCR	(140)
实验 14 核酸凝胶电泳	(142)
Experiment 14 Nucleic acid gel electrophoresis	(142)
实验 14-1 核酸琼脂糖凝胶电泳	(142)
Experiment 14-1 Agarose gel electrophoresis of nucleic acid	(143)
实验 14-2 核酸聚丙烯酰胺凝胶电泳	(145)
Experiment 14-2 Polyacrylamide gel electrophoresis of nucleic acid	(147)
实验 15 核酸杂交	(150)
Experimental 15 Hybridization	(150)
实验 15-1 DNA 印迹杂交	(150)
Experimental 15-1 Southern blotting	(152)
实验 15-2 RNA 印迹杂交	(155)
Experiment 15-2 Northern blotting	(157)
实验 16 大肠杆菌的培养及感受态细胞的制备	(159)
Experiment 16 Preparation of competent <i>E.coli</i> DH5α by using calcium chloride method	(161)
实验 17 质粒提取	(162)
Experiment 17 Preparation of plasmid DNA	(162)
实验 17-1 碱裂解法小量提取质粒 DNA	(162)
Experiment 17-1 Mini preparation of plasmid DNA by alkaline lysis	(164)
实验 17-2 碱裂解法大量提取质粒 DNA	(166)
Experiment 17-2 Maxi preparation of plasmid DNA by alkaline lysis	(168)

实验 18 聚乙二醇沉淀法纯化质粒 DNA	(170)
Experiment 18 Purification of plasmid DNA by precipitation with polyethylene glycol(PEG)	(171)
实验 19 DNA 的琼脂糖凝胶电泳回收	(173)
Experiment 19 Recovery of DNA from agarose electrophoretic gels	(174)
实验 20 目的基因与载体的连接	(176)
Experiment 20 Ligation of the target gene and vector	(177)
实验 21 电转化法制备感受态细胞	(178)
Experiment 21 Transformation of <i>E.coli</i> by electroporation	(179)
实验 22 转化子的鉴定	(181)
Experiment 22 Screen positive transforming clones	(182)
实验 23 质粒 DNA 的酶切鉴定	(183)
Experiment 23 Restriction enzyme digestion of plasmid DNA	(184)
第 6 章 特色创新实验	(187)
实验 24 异常血红蛋白的筛查	(187)
Experiment 24 Abnormal hemoglobin screening	(189)
实验 25 血红蛋白电泳释放实验	(192)
Experiment 25 Electrophoresis release test of hemoglobin	(193)
第 7 章 实验设计	(197)
一、实验设计的基本要素	(197)
二、实验设计的基本原则	(198)
三、实验构思与设计	(198)
四、实验设计的基本内容	(199)
五、撰写实验方案	(199)
六、考核评价	(199)

第 1 章

概 论

【知识目标】

掌握:生物化学与分子生物学常用实验方法的原理和应用;常用生物化学与分子生物学仪器设备的基本操作。

熟悉:实验样品的制备;实验室安全守则。

了解:实验室规则。

【能力目标】

通过本章节的学习,对生物化学与分子生物学实验技术的种类、原理和应用有一个总体的了解,认识到这些实验技术在推动生物学及医学发展中的重要作用,激发学习兴趣,逐步培养科学的思维和认知能力。

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的基础课程,是生命科学共同的语言。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。

(一)分光光度法的基本原理

基本原理是朗伯-比尔定律(Lambert-Beer 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。

光波是指波长在 $0.3 \sim 3 \mu\text{m}$ 的电磁波(图 1-1),颜色跟波长和频率有关,分为可见光和不可见光(表 1-1)。可见光指能引起视觉的电磁波,波长在 $400 \sim 700 \text{nm}$,其中紫光频率最大,波长最短,红光恰好相反。不可见光主要包括红外线、紫外线、伦琴射线。发射光的物体叫作光源,光源

分为自然光 and 人造光。按照发光原理分为辐射发光、电子发光、化学发光、生物发光等。

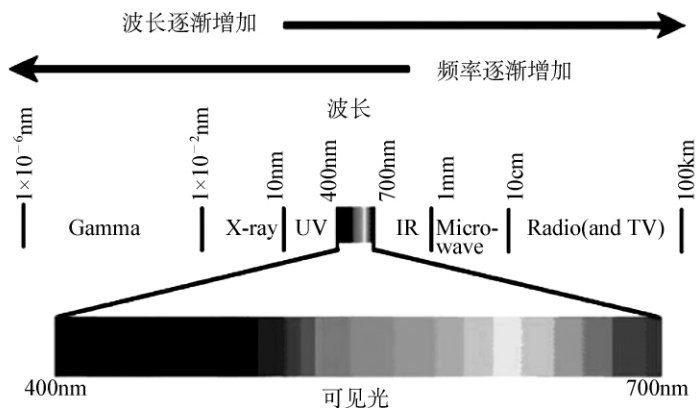


图 1-1 光波的种类及波长范围

表 1-1 可见光的波长与频率对照

名称	波长 (nm)	频率 (MHz)
紫光	400~435	790~680
蓝光	450~480	680~620
青光	480~490	600~620
绿光	500~560	600~530
黄光	580~595	530~510
橙光	595~605	510~480
红光	605~700	480~405

(二) 分光光度法的应用

1. 定量分析 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。

$$\text{标准系数} = \text{标准液浓度} / \text{标准液平均吸光度}$$

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。

2. 定性分析 将各种不同波长的单色光分别通过一定浓度物质的溶液,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,吸光度为纵坐标绘制吸光度-波长曲线,此曲线称为吸收光谱曲线。各种物质都有一定的吸收光谱曲线,因此应用吸收光谱曲线可对有机化合物、生物物质和药物等进行某些特性或结构分析。当将一种未知物质和已知物质的吸收光谱曲线比较时,若两者相同,可推断它们是同一种物质,从而对该物质做出鉴定。

3. 物质纯度分析 分光光度法也可用来测定物质的相对纯度。例如 DNA 纯品的 A_{260}/A_{280} 为 1.8,若比值高,说明含有 RNA;比值低说明有蛋白质存在。RNA 纯品的 A_{260}/A_{280} 为 2.0,比值低于 1.7 时,说明有蛋白质污染。

(三)分光光度法的误差

1. 溶液浓度 待测物质溶液的浓度过高或过低都会偏离朗伯-比尔定律,影响检测的准确度。一般情况下,待测物质溶液浓度的吸光度为 0.1~0.8 最符合光吸收定律,此时检测线性好,读数误差小。如吸光度不在此范围,可适当稀释或浓缩比色溶液再进行测定。

2. 干扰物质 某些物质能干扰待测物质显色反应过程,或其本身具有与待测物质相同或相似的光吸收特性。这些物质存在于待测溶液中时,会使溶液测定值与待测物质实际浓度不相符合,因而产生误差。

3. 反应条件 溶液 pH、环境温度和显色时间等反应条件的改变,都会引起待测物质的结构或成分发生变化,从而使溶液颜色的深浅度发生改变,进而产生误差。

4. 反射光与散射光 待测溶液与参比溶液的光折射率不同时,会引起发射损失的不同。待测溶液浑浊,入射光通过时会产生散射效应。这些非吸收作用都会产生测量误差。

5. 狭缝宽度 分光光度计单色器分出来的单色光是通过狭缝截获的,如果狭缝的质量不好或开得过大,所截获的单色光的单一性差,杂波会与测定光波一起通过待测溶液,干扰测定,产生误差。

6. 仪器噪声 分光光度计的噪声主要由光源强度、电子器件和光电管产生。仪器噪声过大,可严重影响测定的灵敏度和准确度。

7. 吸收池 吸收池的不匹配、透光面不平行或定位不准确等,都会使其透光率产生差异,使测定结果产生误差。

二、层析

(一)层析技术的基本原理

层析(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)及分子极性(molecular polarity)等的差异,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。

(二)层析技术的主要类型

层析法根据分离原理不同分为以下几种。

1. 分配层析(partition chromatography) 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 R_f 值(relative to front value)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) 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、活性炭等,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(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,依据流动相中的组分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1-2)。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。

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

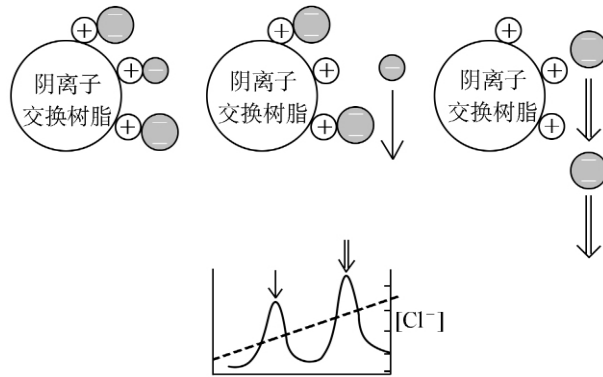


图 1-2 离子交换树脂

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。

阳离子交换树脂	{ 强酸性 { 磺酸基($-\text{SO}_3\text{H}$) 酚羟基($-\text{OH}$) 弱酸性 羧基($-\text{COOH}$)	阴离子交换树脂	{ 强碱性 季胺基(NR_3OH) { 仲胺基($-\text{NHR}$) 弱碱性 { 叔胺基($-\text{NR}_2$) 伯胺基($-\text{NH}_2$)
---------	---	---------	---

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 1-3)。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 5g 水。

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

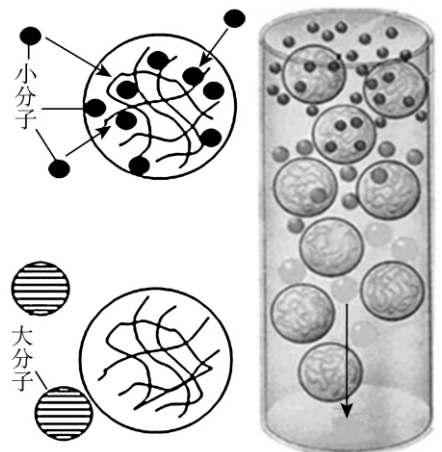


图 1-3 分子筛层析

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1-4),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作竞争性洗脱。

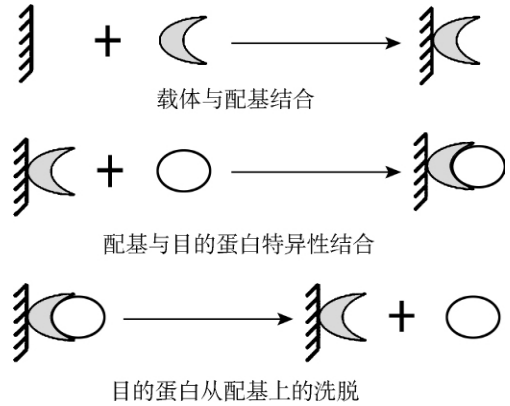


图 1-4 亲和层析分离蛋白质

三、电泳

(一) 电泳的基本原理

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(electrophoresis)。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。

(二) 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在 $0.02 \sim 0.2 \text{ mol/L}$ 。

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 $> 50 \text{ V/cm}$)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) 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在支持物的中心,以观察电渗的方向和距离。

(三) 常用电泳技术

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,如血浆蛋白质、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) 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,四甲基乙二胺催化过硫酸铵产生自由基,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发生交联,从而形成三维网状结构。

根据有无浓缩效应,聚丙烯酰胺凝胶电泳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。浓缩胶是由过硫酸铵催化聚合的大孔胶,凝胶缓冲液为pH6.7的Tris-盐酸。分离胶是由过硫酸铵催化聚合的小孔胶,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;移动至小孔径胶处时,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 6.8 变为 8.8,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,蛋白质样品在均一的电势梯度和 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浓度(表 1-2)。

表 1-2 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

根据变性与否分为变性和非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。

4. 等电聚焦电泳(isoelectric focusing electrophoresis, IEF) 利用具有 pH 梯度的支持介质来分离不同等电点蛋白质的电泳技术称为等电聚焦电泳。电泳介质中加入两性电解质载体,如脂肪族多氨基多羧基的混合物,pH 范围有 3~10、4~6、5~7、6~8、7~9 和 8~10 等。在电场作用下,两性电解质形成一个从阳极到阴极逐渐增大的 pH 梯度。在这种介质中电泳时,带负电荷的蛋白质分子向阳极移动,带正电荷的蛋白质分子向阴极移动。当蛋白质分子移