

普通高等医学院校实验教材

生物化学实验指导

SHENGWU HUAXUE SHIYAN ZHIDAO

许静洪 张海莲 主编



中国科学技术出版社
CHINA SCIENCE AND TECHNOLOGY PRESS

Q5-33
61

普通高等医学院校实验教材

生物化学实验指导

许静洪 张海莲 主编



中国科学技术出版社
CHINA SCIENCE AND TECHNOLOGY PRESS

· 北 京 ·

BEIJING

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验指导/许静洪,张海莲主编. —北京:中国科学技术出版社,2010

ISBN 978 - 7 - 5046 - 5680 - 3

I. ①生… II. ①许… ②张… III. 生物化学—实验—高等学校—
教学参考资料 IV. ①Q5 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 145128 号

本社图书贴有防伪标志,未贴为盗版

内 容 提 要

本书侧重学生的基本实验方法和技能的训练,让学生了解并掌握分光光度法、离心法、层析法、电泳法、PCR 技术等实验基本原理,通过开设创新型实验来逐步提高学生的科学思维和创新能力,以适应目前高等教育对人才培养的要求。本书由生物化学技术原理、生物化学实验和附录三部分组成。生物化学技术原理部分重点介绍常规的实验室技术,内容尽可能地简洁扼要。实验部分除了一些生物化学基础实验外,还增加了有关酶的综合大实验及分子生物学基本实验的内容,其中既保留了一些旨在加强学生基本实验方法和技能训练的传统实验,也引进了一些新近发展起来的生物化学实验技术,旨在培养学生的动手能力和良好的科研素质及独立开展研究工作的能力。本教材适用于高等院校生物化学实验教学,生物、医药和农林等专业学生可根据各自特点选择使用。

中国科学技术出版社出版

北京市海淀区中关村南大街 16 号 邮政编码:100081

策划编辑	林 培 孙卫华	责任校对	赵丽英
责任编辑	孙卫华	责任印制	安利平

发行部电话:010 - 62173865 编辑部电话:010 - 84123361 - 6029

<http://www.kjpbooks.com.cn>

科学普及出版社发行部发行

北京蓝空印刷厂印刷

*

开本:787 毫米×1092 毫米 1/16 印张:4.25 字数:103 千字

2010 年 8 月第 1 版 2010 年 8 月第 1 次印刷 定价:9.00 元

ISBN 978 - 7 - 5046 - 5680 - 3/Q · 154

(凡购买本社的图书,如有缺页、倒页、
脱页者,本社发行部负责调换)

会委编《前言》学小师主

生物化学是当今生命科学研究领域中最为活跃的学科之一,是一门课堂理论与实验技术相结合的专业基础课,生物化学的发展和深入与其实验技术的迅速发展密不可分。生物化学实验技术不仅是生物化学的重要内容和理论基础,也是生命科学研究领域中非常重要的研究手段。学习生物化学实验技术,掌握生物化学实验技术的基本原理和方法,不仅可以加强学生对生物化学基本理论的进一步理解,而且可以为以后其他专业课的学习及科研工作打下一个坚实的基础。生物化学实验课是帮助同学掌握基本实验技能和基本实验操作技术,提高独立思考、独立分析和独立解决问题的能力,提高学生的科学思维和创新能力,把同学所学的理论知识与实践技术相结合的重要手段。

由于各个院校具体情况不同,生物化学实验指导没有统编教材。因此,我们编写完成了本书,以供临床医学、护理、影像、检验、麻醉等专业学生使用,也可供有关科研工作者学习参考。本书对生物化学这门课的内容进行了必要的调整和修改并补充了许多新的实验内容,侧重实用性,以期学生在今后的临床实践中可独立进行基本的常规生物化学检验;兼顾综合性和验证性内容,以期对学生职业素养的提高和理论知识的掌握有所帮助。

本书编写过程中,得到了领导和同仁的大力支持和帮助,使得编写工作顺利完成。但由于编写时间仓促,难免有不妥之处,恳望读者批评指正。

第二部分 实验 延安大学医学院生物化学教研室

2010年3月

实验一 蛋白质的变性、凝固及沉淀反应	22
实验二 酮体生成及清除法分离酮体	24
实验三 紫外分光光度法测定蛋白质	26
实验四 酶活性测定与竞争性抑制	28
实验五 维生素C含量的测定	29
实验六 糖定量——邻苯三酚法	31
实验七 胰岛素及肾上腺素对血糖含量的影响	32
实验八 血清铜测定	33
实验九 血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	36
附I:血清 γ -球蛋白的分离与纯化	39
附II:血清 γ -蛋白的鉴定(醋酸纤维素薄膜电泳)	40
实验十 脂肪酸的 β -氧化	40
实验十一 血清胆固醇测定(修改13)	43

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验指导/许静洪, 张海莲主编. —北京: 中国科学技术出版社, 2010

ISBN 978-7-304-5680-3 《生物化学实验指导》编委会

I. ①生… II. ①许… ②张… III. 生物化学—实验—高等学校—

教材—IV. ①Q646.3

《生物化学实验指导》编委会

主 编 许静洪 张海莲

副 主 编 庞秋霞 王爱红 郭贤利

编 委 刘晓斌 樊霞 李建龙 雷光星 林敏

中国科学技术出版社出版

北京市西城区车公庄大街14号 邮编100044

发行部电话: 010-58882611 58882612 58882613 58882614

010-58882615

010-58882616 010-58882617

010-58882618

010-58882619 010-58882620 010-58882621 010-58882622

010-58882623 010-58882624 010-58882625 010-58882626

010-58882627 010-58882628 010-58882629 010-58882630

010-58882631 010-58882632 010-58882633 010-58882634

010-58882635 010-58882636 010-58882637 010-58882638

010-58882639 010-58882640 010-58882641 010-58882642

010-58882643 010-58882644 010-58882645 010-58882646

目 录

第一部分 生物化学实验技术概论

第一章 实验室基本知识	1
第一节 玻璃仪器的洗涤与清洁	1
第二节 吸量管的种类和使用	2
第三节 溶液的混匀	3
第四节 过 滤	4
第二章 生化实验基本技术	5
第一节 离心分离技术	5
第二节 电泳技术	8
第三节 分光光度分析技术	12
第四节 层析分离技术	15
第五节 PCR 技术	18

第二部分 实验内容

实验一 蛋白质的变性、凝固及沉淀反应	22
实验二 圆形滤纸色谱法分离氨基酸	24
实验三 紫外分光光度法测定蛋白质	26
实验四 酵母 RNA 的提取与定性	28
实验五 维生素 C 含量的测定	29
实验六 糖定量——邻甲苯胺法	31
实验七 胰岛素及肾上腺素对血糖含量的影响	32
实验八 血清铜测定	33
实验九 血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	36
附 I : 血清 γ -球蛋白的分离与纯化	39
附 II : 血清 γ -蛋白的鉴定 (醋酸纤维素薄膜电泳)	40
实验十 脂肪酸的 β -氧化	40
实验十一 血清胆固醇测定 (修改 LRC 法)	42

第一部分 生物化学实验技术概论

本部分的内容为生物化学实验中所涉及的常规操作技术和主要实验技术原理，是学生进行正规实验训练的重要内容。常规操作技术包括玻璃仪器的洗涤、洗液的配制、吸量管使用、混匀的方法以及过滤、离心等一般实验室技术。重点讨论离心分离技术、电泳原理、分光分析、层析分离和放射性同位素技术等重要技术的原理，内容则尽可能简洁扼要，作为具体实验内容的参考。

第一章 实验室基本知识

第一节 玻璃仪器的洗涤与清洁

玻璃仪器是生物化学实验中不可缺少的器具，玻璃仪器的清洁与否，直接影响实验结果的准确性。因此，玻璃仪器的清洁工作是很重要的。

一、新购玻璃仪器的清洗

新购来的玻璃仪器，其表面附有游离质，可先用肥皂水洗刷，再用流水冲洗，浸泡于1%~2%的HCl中过夜，再用流水冲洗，最后用蒸馏水冲洗2~3次，在干燥箱中烤干，或晾干备用。

二、使用过的玻璃仪器清洗

1. 一般玻璃仪器

试管、烧杯、锥形瓶等，先用自来水洗刷至无污物，再选用大小合适的毛刷蘸取洗衣粉或肥皂水，将器皿内外壁细心刷洗，再用自来水冲洗干净，洗至器皿内壁上不挂水珠为止，最后用蒸馏水冲洗2~3次，倒置在清洁处晾干，急用时可用干燥箱烤干。

2. 容量仪器

吸量管、滴定管、容量瓶等，使用后应立即浸泡于清水中，勿使沾污物质干涸，并及时用流水冲洗干净，稍干后再用铬酸洗液浸泡数小时，然后用自来水反复冲洗干净，最后用蒸馏水冲洗2~3次，晾干备用。

3. 比色杯

用毕立即用自来水反复冲洗干净。如洗不净时，可用盐酸或适当溶剂冲洗，再用自来

水冲洗干净。切忌用试管刷、粗糙的布或纸擦洗，以免损坏比色杯透光度，亦应避免用较强的碱或强氧化剂清洗，洗净后倒置晾干备用。

第二节 吸量管的种类和使用

吸量管是生化实验中常用的仪器，测定的准确度与吸量管的正确使用密切相关。

一、分类生化常用的吸量管有三类

1. 奥氏吸量管

供准确量取 0.5mL、1mL、2mL 液体时用。每根吸量管上只有一个刻度，放液时必须吹出最后残留在吸量管尖端的液体。

2. 移液管

供准确量取 5mL、10mL、25mL 等较多体积液体时用，每根吸量管上只有一个刻度，放出液体流毕后，将吸量管尖在容器内壁停留 15 秒钟注意不要吹出尖端内的最后部分。

3. 刻度吸量管

供量取 10mL 以下的任意体积的液体时用。每根吸量管上都有许多等分刻度，一般刻度包括尖端部分，欲将所量取液体全部放出时，须将残留管尖的液体吹出。在吸量管的上端常标有吹字，此类吸量管又称全流出式。刻度标记有两种方式：上为零刻度，下无总量刻度的；上为总量刻度，下无零刻度的。若吸量管上端未标有吹字，则残留管尖的液体不必吹出。个别旧制的吸量管其刻度不包括吸量管的最下部分，即吸量管上有零刻度，也有总刻度的，使用时放液至相应的容量刻度线处，不要放液到最低的刻度线以下，此类吸量管称不完全流出式吸量管。

近来为便于准确快速地选取所需的吸量管，国际标准化组织统一规定：在刻度吸量管的上方印上各种彩色环，其容积标志如下表：

标准容量 (mL)	0.1	0.2	0.25	0.5	1	2	5	10	25	50
色环	红	黑	白	红	黄	黑	红	橘红	白	黑
环数	单	单	双	双	单	单	单	单	单	单

不完全流出式在单环或双环上方再加印一条宽 1~1.5 的同颜色彩环以与完全流出式刻度吸量管相区别。

二、吸量管的使用

1. 选择

使用前先根据需要进行适当的吸量管，刻度吸量管的总容量最好等于或稍大于最大取液量。临用前要看清容量和刻度。

2. 执管

用拇指和中指（辅以无名指），拿住吸量管上部，用食指堵住管上口以控制液流速度，

刻度数字要面向自己。

3. 取液

另一只手捏压橡皮球，将吸量管插入液体内（不得悬空，以免液体吸入球内），用橡皮球将液体吸至最高刻度上端 1~2cm 处，然后迅速用食指按紧管上口，使液体不至于从管下口流出。

4. 调准刻度

将吸量管提出液面，吸黏性较大的液体，先用滤纸擦干管尖外壁。然后用食指控制液流使之缓慢下降至所需刻度（此时液体凹面，视线和刻度应在同一水平面上），立即按紧吸量管上口。

5. 放液

放松食指，让液体自然流入受器内，放液时，管尖最好接触受器内壁，但不要插入受器内原有的液体中，以免污染吸量管和试剂。

6. 洗涤

吸取血液、血清等黏稠液体及标本（尿液）的吸量管。使用后要及时用自来水冲洗干净，吸一般试剂的吸量管可不必马上冲洗，实验完毕后再冲洗，冲洗干净后，晾干去水分，再浸泡于铬酸洗液中，数小时后取出，再用流水冲洗，最后用蒸馏水冲洗，晾干备用。

第三节 溶液的混匀

样品与试剂的混匀是保证化学反应充分进行的一种有效的措施，为了使反应体系内各物质迅速地互相接触，必须借助于外加的机械作用，混匀时须防止容器内液体溅出或被污染。严禁用手指直接堵塞试管口或锥形瓶口振摇，混匀的方式大致有以下几种，可随使用的器皿和液体容量而选用。

1. 旋转混匀法

用手持容器，使溶液做离心旋转；适用于未盛满液体的试管或小口器皿，如锥形瓶，旋转试管时最好用手腕旋转。

2. 指弹混匀法

左手持试管上端，用右手指轻轻弹动试管下部，使管内溶液做旋涡运动。

3. 倒转混匀法

适用于有塞量筒和容量瓶，试管内容物混匀，一般试管内容物的混匀可用聚乙烯等薄膜封口，再用手按住管口倒转混匀。

4. 吸量管混匀法

用吸量管将溶液反复吸放数次，使溶液充分混匀。

5. 玻棒搅动法

适用于烧杯内容物的混匀，如固体试剂的溶解和混匀。

6. 甩动混匀法

右手持试管上端，轻轻甩动振摇，即可混匀。

7. 电磁搅拌混匀法

在电磁搅拌机上放置烧杯，在烧杯内放入封闭于玻璃或塑料管中的小铁棒，利用磁力使小铁棒旋转以达到混匀杯中液体的目的。适用于酸碱自动滴定，pH 梯度滴定等。

8. 振荡器混匀法

利用振荡器使容器中的内容物振荡，达到混匀的目的。

第四节 过 滤

是分离沉淀和滤液的一种方法。可用于收集滤液，收集或洗涤沉淀。生化实验的过滤，操作与化学相同，应注意以下几点。

(1) 制备血滤液等实验过滤时，要用于滤纸而不能用水把滤纸先弄湿，因为湿滤纸会影响血液稀释的体积。

(2) 折叠滤纸的角度应与漏斗相合，使滤纸上缘能与漏斗壁完全吻合，不留缝隙。一般采用平折法（即对折后再对折）。

(3) 向漏斗中加溶液时最好使用玻棒引流，倒入速度不要太快，不得使液面超过滤纸上缘。

(4) 较粗的过滤可用脱脂棉或纱布代替滤纸，有时可用离心沉淀法代替过滤法。

色 环	容 量	容 量	容 量	容 量	容 量	容 量	容 量	容 量	容 量
红	10	20	30	40	50	60	70	80	90

1. 选择

使用前先根据需要选择适当的吸量管，吸量管的容量和刻度。

2. 执管

用拇指和中指（辅以无名指），拿住吸量管上部，用食指堵住管上口以控制液面高度。

第二章 生化实验基本技术

第一节 离心分离技术

离心是蛋白质、酶、核酸及细胞亚组分离的最常用的方法之一，也是生化实验室中常用的分离、纯化的方法。尤其是超速冷冻离心已经成为研究生物大分子实验室中的常用技术方法。离心机（centrifuge）是实施离心技术的装置。离心机的种类很多，按照使用目的，可分为两类，即制备型离心机和分析型离心机。前者主要用于分离生物材料，每次分离样品的容量比较大，后者则主要用于研究纯品大分子物质，包括某些颗粒体如核蛋白体等物质的性质，每次分析的样品容量很小，根据待测物质在离心场中的行为（可用离心机中的光学系统连续地监测），能推断其纯度、形状和相对分子质量等性质。这两类离心机由于用途不同，故其主要结构也有差异。

一、离心原理

离心技术的主要原理就是将样品放入离心机转头的离心管内，离心机驱动时，样品液就随离心管做匀速圆周运动，于是就产生了一个向外的离心力。由于不同颗粒的质量、密度、大小及形状等彼此各不相同，在同一固定大小的离心场中沉降速度也就不相同，由此便可以得到相互间的分离。

1. 离心力和相对离心力

离心力的单位为 g ，即重力加速度（ 980.6cm/s^2 ），离心力的大小可根据离心时的旋转速度 V （ r/min 每分钟转数，revolution per minute）和物体离旋转轴中心的距离 r （ cm ）按下式计算： $g = r \times V^2 \times 1.118 \times 10^{-5}$ 或按下式计算所需的转速： $V = \sqrt{g \times 89445/r}$ 。

离心技术是根据微小颗粒物质在离心场中的行为建立并发展起来的。离心机的转头能够以稳定的角速度做圆周运动，从而产生一个强大的辐射向外的离心力场，它赋予处于其中的任何物体一个离心加速度，使之受到一个外向的离心力，其定义为：

$$F = m\omega^2 r$$

式中： F 为离心力的强度； m 为沉降颗粒的有效质量； ω 为离心转子转动的角速度，其单位为 rad/s ； r 为离心半径（ cm ），即转子中心轴到沉降颗粒之间的距离。

很显然，离心力随着转速和颗粒质量的提高而加大，而随着离心半径的减小而降低。

通常离心力常用地球引力的倍数来表示，因而称为相对离心力“ RCF ”。或者用数字乘“ g ”来表示，例如 $25000 \times g$ ，则表示相对离心力为 25000。相对离心力是指在离心场中，作用于颗粒的离心力相当于地球重力的倍数，单位是重力加速度“ g ”（ 980cm/s^2 ），此时“ RCF ”相对离心力可用下式计算：

$$RCF = 1.119 \times 10^{-5} \times (r/\text{min})^2 \times r$$

由上式可见，只要给出旋转半径 r ，则 RCF 和 rpm 之间可以相互换算。但是由于转头

的形状及结构的差异,使每台离心机的离心管,从管口至管底的各点与旋转轴之间的距离是不一样的,所以在计算时规定旋转半径均用平均半径“ r_{av} ”代替:

$$r_{av} = (r_{\min} + r_{\max}) / 2$$

一般情况下,低速离心时常以转速“rpm”来表示,高速离心时则以“g”表示。计算颗粒的相对离心力时,应注意离心管与旋转轴中心的距离“ r ”不同,即沉降颗粒在离心管中所处位置不同,则所受离心力也不同。因此在报告超离心条件时,通常总是用地心引力的倍数“ $\times g$ ”代替每分钟转数“rpm”,因为它可以真实地反映颗粒在离心管内不同位置的离心力及其动态变化。科技文献中离心力的数据通常是指其平均值(RCF_{av}),即离心管中点的离心力。

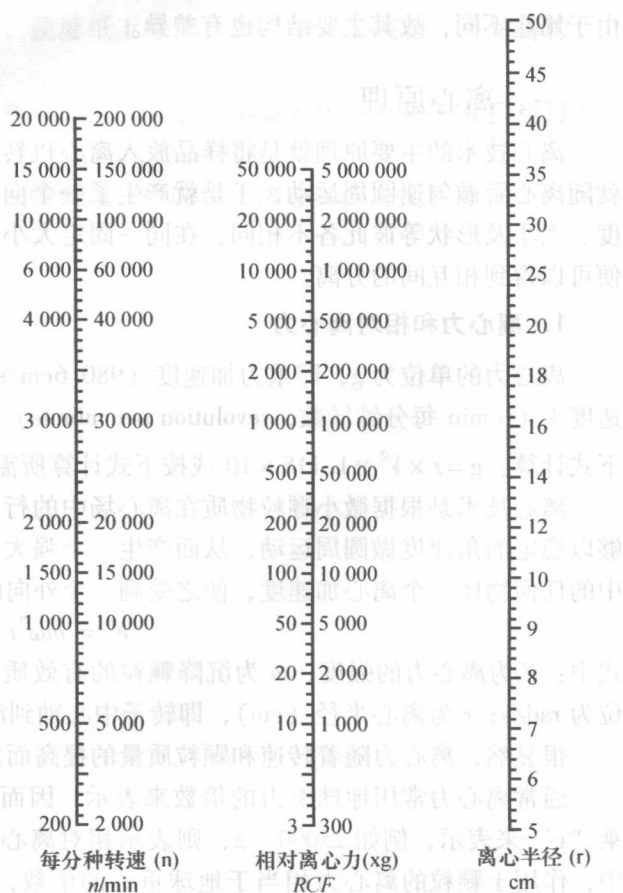
为便于进行转速和相对离心力之间的换算,Dole 和 Cotzias 利用 RCF 的计算公式,制作了转速“rpm”、相对离心力“ RCF ”和旋转半径“ r ”三者关系的列线图,图式法比公式计算法方便。换算时,先在 r 标尺上取已知的半径和在 rpm 标尺上取已知的离心机转数,然后将这两点间画一条直线,与图中 RCF 标尺上的交叉点即为相应的相对离心力数值。注意,若已知的转数值处于 rpm 标尺的右边,则应读取 RCF 标尺右边的数值,转数值处于 rpm 标尺左边,则应读取 RCF 标尺左边的数值。Dole 和 Cotzias 制作了与转子速度和半径相对应的离心力的转换列线图(离心力的转换列线图),在用图将离心机转数换成相对离心力时,先在离心机半径标尺上取已知的离心机半径和在转数标尺上取已知的离心机转数,然后将这两点间画一条直线,在图中间 RCF 标尺上的交叉点,即为相应的离心力数值。例已知离心机转数为 2500r/min,离心机的半径为 7.7cm,将两点连接起来交于 RCF 标尺,此交点 $500 \times g$ 即是 RCF 值。

将左侧 r 点与右侧 n 点连成一条直线,与中间 RCF 相交的点即为相对离心力($\times g$) $RCF = 1.119 \times 10^{-5} \times r \times n^2$

2. 沉降速度与沉降系数

一个颗粒要沉降,它必须置换出位于它下方等体积的溶液,这只有当颗粒的质量大于被置换出的液体的质量时才能通过离心的手段达到,否则,在离心过程中颗粒将发生向上漂浮,而不是下沉。当颗粒在运动时,不论方向如何,它都要穿过溶剂分子,所产生的摩擦力总是与颗粒运动的方向相反。

摩擦力的大小与颗粒的运动速度成



离心力的转换列线图

正比,并且受颗粒的大小、形状及介质性质的影响,颗粒沉降速度与三方面的因素有关。

(1) 颗粒本身的性质沉降速度与颗粒直径和密度成正比。密度相同时大颗粒比小颗粒沉降快;大小相同时,密度大的颗粒比密度小的沉降快。

(2) 介质的性质沉降速度与介质的黏度、密度成反比,介质黏度、密度大,则颗粒沉降慢。

(3) 离心条件颗粒沉降速度与离心时转速和旋转半径成正比。如果其他的条件不变,沉降速度随着 r 的增大而增大,在进行速度区带离心时, r 对沉降速度的这种影响不利于达到满意的分离效果,所以需要在沿半径方向上相应地增加介质的密度和黏度以克服 r 的增加造成的影响。

沉降系数 (sedimentation coefficient): 为沉降速度与离心力的比率或单位离心场中颗粒的沉降速度,它以 svedberg 单位计算, $1S = 1 \times 10^{-13} S$ 。例如:核糖核酸酶 A 的沉降系数为 $1.85 \times 10^{-13} S$ 。即可记作 1.85S。当我们对某些生物高分子和亚细胞器组分的化学结构、相对分子质量还不了解时,可以用沉降系数对它们的物理特性进行初步描述,将它们区分开来。例如大肠杆菌核蛋白体是 70S,它由两个亚基组成,用超离心的方法测得其沉降系数分别为 30S 和 50S,当我们还不清楚它们的结构时就暂以 30S 和 50S 命名以示区别。沉降系数 S 的值与颗粒的大小、形状和密度,以及离心所使用的介质的密度和黏度有关,而与转头的速度和类型无关。

二、离心机分类

常见的离心机有超速离心机(分析和制备用)、高速冷冻离心机、大容量冷冻离心机、连续离心机、一般用途低速离心机(无冷冻)以及台式(超速、高速、低速、特殊用途)离心机。在实际应用中,不同的离心机有不同的应用范围。

1. 低速离心机

低速离心机的最大额定转速一般为 4000r/min,且连续可调。根据处理样品的容量大小,低速离心机可分为台式低速离心机、水平型桶式低速离心机和大容量立式低速离心机。台式低速离心机体积小,重量轻,能自动控制工作时间。操作简单。使用方便。适用于医院化验室、生物化学与分子生物学实验室进行定性分析;血浆、血清、尿素、疫苗制造等。大容量低速离心机往往用于样品的初级分离制备,还可直接用于瓶装、袋装样品的离心,为实验室大量样品的分离提供了条件。

2. 高速离心机

高速离心机的最大额定转速为 20000r/min 左右,最大相对离心力可达到 45000g,由于运转速度高,一般配备冷冻控温装置。高速离心机适用于各种生物细胞、病毒、血清蛋白等有机物、无机物溶液,悬浮液及胶体溶液等样品的分离、浓缩、提取等制备工作,是细胞和分子水平研究的基本工具。高速离心机的速度控制系统和温度控制系统都优于低速离心机。如某些全自动高速冷冻离心机的速度控制系统采用 IC 电路,结构简单,性能稳定,且在 IC 速度自动控制电路内,专门设有超速保护电路,安全可靠,而温度控制系统则用 SCR 元件,通过两个热敏元件,检测离心室温度及环境温度,对离心室温度进行自动控制。

由于高速离心机转速较高,离心力较大,对离心转头的强度要求也较高,多采用超硬

铝、锻铝或不锈钢加工制成，且要经过满载超速爆炸试验，安全系数很高。高速离心机的离心管通常以塑料及聚丙烯、聚乙烯、聚碳酸酯等制成。实际工作中可按照不同的要求选择使用各种离心管。

小容量台式高速离心机，机型轻小，操作方便，样品量小，离心力大，自动平衡，速度可调，性能稳定，安全可靠。可放在一般实验台、冷库、低温水箱中使用，适用于实验室小量样品液沉淀浓缩，是分子生物学实验中使用的基本设备。

3. 超速离心机

超速离心机可分为分析用超速离心机和制备用超速离心机两种。制备用超速离心机最高额定转速在 $55000 \sim 83000 \text{ r/min}$ 之间，最大相对离心力在 $6 \times 10^5 \text{ g}$ 左右。超速离心机是医学、检验学、生物学、生物化学与分子生物学、化学、农业科学等研究领域的重要仪器之一。利用超速离心转头高速旋转所产生的巨大离心力可对细胞器、病毒、生物大分子进行分离、浓缩、精制，并可用于测定蛋白质、核酸的相对分子质量等。超速离心机的运转速度高，产生的离心力场极强，对离心机的材料及各项质量要求极高。

与制备用超速离心机相比，分析用超速离心机一般都装备有特殊设计的转头、控制系统和光学系统，可以直接观察了解和分析样品的沉降情况，能精确控制离心力，并且可用照相方法或者电子技术记录沉降粒子在离心过程中的行为。对这些记录进行分析，可以测定粒子的物理性质，如沉降系数、分子量、扩散系数、沉降物质的不均一性等。

三、离心机的使用方法

欲使沉淀与母液分开，过滤和离心都可达到目的，但当沉淀黏稠，或颗粒太小能通过滤纸，总容量太少又需定量测定时，使用离心沉淀法比过滤要好。

使用离心机前，应先检查离心机转动状态是否平稳，以确定离心机性能，检查套管与离心管大小是否相配，套管是否铺好软垫（用棉花或橡皮）。套管底部有无碎玻片或漏孔（碎玻片必须取出，漏孔须修补好）。

检查合格后，每一对离心管放入一对套管中，然后连套管一起分置粗天平两侧，用滴管向较轻的一侧离心管与套管之间加水，直至天平两侧彼此相等为止。将各对已平衡的套管连同内容物放置于离心机内，两个等重的管必须放于对称位置。

放妥后，接通电源开关，逐步扭动转速旋钮，缓慢增加离心机转速，直至所需的转速，达规定时间后，将转速旋钮逐步回零，待离心机停稳后，取出离心管。

第二节 电泳技术

若将两个电极插在电解质溶液中，通上直流电，正离子则向负极移动，而负离子向正极移动，这种现象就是我们熟悉的电泳现象，也称“电泳”。概括而言，电泳是指带电粒子在电场中向与自身带相反电荷的电极移动的现象。例如蛋白质具有两性电离性质，当溶液 pH 大于蛋白质等电点时，蛋白质带负电荷，在电场中向正极移动，反之则带正电荷，向负极移动。当蛋白质溶液 pH 与蛋白质的等电点相等，净电荷为零时则不移动。

各种电泳技术具有以下特点：①凡是带电物质均可应用某一电泳技术进行分离，并可进行定性或定量分析；②样品用量极少；③设备简单；④可在常温进行；⑤操作简便省

时；⑥分辨率高。目前，电泳技术已经广泛应用于基础理论研究、临床诊断及工业制造等方面。例如用醋酸纤维薄膜电泳分析血清蛋白；用琼脂对流免疫电泳分析病人血清，为原发性肝癌的早期诊断提供依据；用高压电泳研究蛋白质核酸的一级结构；用具有高分辨率的凝胶电泳分离酶、蛋白质、核酸等大分子的研究工作，对生物化学与分子生物学的发展起了重要作用。

一、电泳技术的基本原理

带电荷的质点，在一定条件的电场作用下，可向一极移动，如带正电荷的质点移向负极。许多生物分子都带有电荷，其电荷的多少取决于分子性质及其所在介质的 pH 和组成，由于混合物中各组分所带电荷性质、电荷数量以及分子量的不同，在同一电场的作用下，各组分泳动的方向和速度也各异。因此，在一定时间内，由于各组分移动距离的不同，而达到分离鉴定各组分的目的。

在电场中，推动带电质点运动的力 (F) 等于质点所带净电荷量 (Q) 与电场强度 (E) 的乘积： $F = QE$

质点的前移同样要受到阻力 (F') 的影响，对于一个球形质点，服从 Stoke 定律，即：

$$F' = 6\pi r\eta v$$

式中 r 为质点半径， η 为介质黏度， v 为质点移动速度。当质点在电场中做稳定运动时：

$$F = F' \text{ 即 } QE = 6\pi r\eta v$$

可见，球形质点的迁移率，首先取决于自身状态，即与所带电量成正比，与其半径及介质黏度成反比。除了自身状态的因素外，电泳体系中其他因素也影响质点的电泳迁移率。

二、影响电泳的主要因素

1. 电泳介质 pH

当介质的 pH 等于某种两性物质的等电点时，该物质处于等电状态，即不向正极或负极移动。当介质 pH 小于其等电点时，则呈正离子状态，移向负极；反之，介质 pH 大于其等电点时，则呈负离子状态，移向正极。因此，任何一种两性物质的混合物电泳均受介质 pH 的影响，即决定两性物质的带电状态及其量，为了保持介质 pH 的稳定性，常用一定 pH 的缓冲液，如分离血清蛋白质常用 pH 8.6 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

离子强度对电泳的影响是离子强度低，电泳速度快，分离区带不易清晰；离子强度高，电泳速度慢，但区带分离清晰。如离子强度过低，缓冲液的缓冲量小，不易维持 pH 的恒定；离子强度过高，则降低蛋白质的带电量（压缩双电层）使电泳速度减慢。所以常用离子强度为 0.02 ~ 0.2 之间。

$$\text{溶液离子强度计算: } I = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$$

I = 离子强度 c_i = 克分子浓度（指离子而言） z_i = 离子的价数

如：0.154mol/L 氯化钠溶液的离子强度为：

$$I = \frac{1}{2} \sum (0.154 \times 1^2 + 0.154 \times 1^2) = 0.154$$

0.1mol / L 硫酸锌溶液的离子强度为:

$$I = \frac{1}{2} \sum (0.1 \times 2^2 + 0.1 \times 2^2) = 0.4$$

3. 电场强度

电场强度和电泳速度成正比关系。电场强度以每厘米的电势差计算,也称电势梯度。如纸电泳的滤纸 15cm,两端电压(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。电压增加,相应电流也增大,电流过大时易产生热效应可使蛋白质变性而不能分离。

4. 电渗作用

在电场中,液体对固体的相对移动,称为电渗。如滤纸中含有表面带负电荷的羧基,溶液则向负极移动。电渗现象与电泳同时存在,所以电泳的粒子移动距离也受电渗影响,如纸上电泳蛋白质移动的方向与电渗现象相反,则实际上蛋白质泳动的距离,等于电泳移动距离减去电渗距离,如电泳方向和电渗方向一致,其蛋白质移动距离等于二者相加,电渗现象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间,观察电渗方向和距离。

三、区带电泳的分类

区带电泳是指有支持介质的电泳,待分离物质在支持介质上分离成若干区带。

(1) 按支持物物理性状不同,可分为:

- ① 滤纸及其他纤维素膜如乙酸纤维膜、玻璃纤维膜、聚胶纤维膜电泳。
- ② 粉末电泳,如纤维素粉、淀粉、玻璃粉电泳。
- ③ 凝胶电泳,如琼脂糖、琼脂、硅胶、淀粉胶、聚丙烯酰胺凝胶电泳。
- ④ 丝线电泳,如尼龙丝、人造丝电泳。

(2) 按支持物的装置形式不同,可分为:

- ① 平板式电泳,支持物水平放置,是最常用的电泳方式。
- ② 垂直板式电泳。

③ 连续一流动电泳,首先应用于纸电泳。将滤纸垂直竖立,两边各放一电极,缓冲液和样品自顶端下流,与电泳方向垂直。可分离大量的蛋白质。以后有用淀粉、纤维素粉、玻璃粉等代替滤纸,分离效果更好。

(3) 按 pH 的连续性不同,可分为:

- ① 连续 pH 电泳:电泳的全部过程中缓冲液 pH 保持不变。如纸电泳、乙酸纤维膜电泳。
- ② 非连续 pH 电泳:缓冲液和支持物间有不同的 pH,如聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳、等电聚焦电泳、等速电泳等。能使分离物质的区带更加清晰,并可对极微量物质 (ng 级) 进行分离。

四、电泳技术的应用

电泳技术是目前医学研究的重要手段。它可分离各种有机物(氨基酸、多肽、蛋白