

高等医药院校基础医学实验教学规划教材

医学生物化学与 分子生物学实验

主 编 唐 微 朱名安



科学出版社

高等医药院校基础医学实验教学规划教材

医学生物化学与分子 生物学实验

主 编 唐 微 朱名安

副主编 丁爱玲 李 珊 王小波

编 委 (按姓氏笔画排序)

丁爱玲 王小波 王晓燕

朱名安 孙设宗 李 珊

李 强 陈宗运 唐 微

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话: 010-64030229; 010-64034315; 13501151303 (打假办)

内 容 简 介

本书在内容上分为四篇,分别为常用实验技术、生物化学实验、分子生物学实验、专题篇。其中,生物化学实验部分从基本实验、提高型实验和研究创新型实验三个层次来讲解,所有实验都设置有“实验目的”和“实验思考”。在专题篇部分详细介绍了实验仪器的基本使用、实验室所要注意的安全问题,实验须知和实验报告书写的要求,并附有相关的实验数据供学生查阅。同一实验尽可能介绍多种常用的方法,以便于教学。此外,还有创新型实验,学生在掌握基本实验技能的基础上可以自己设计实验,极大提高了学生的兴趣和动手能力。

本书编写考虑了多层次教学的要求,适合于各医学院校临床、麻醉、口腔、影像、检验、药学、护理等专业人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

医学生物化学与分子生物学实验 / 唐微,朱名安主编 —北京:科学出版社,2014

高等医药院校基础医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-041919-4

I. ①医… II. ①唐… ②朱… III. ①医用化学-生物化学-实验-医学院校-教材②医药学-分子生物学-实验-医学院校-教材 IV. ①Q5-33②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 218218 号

责任编辑:王 颖 / 责任校对:张怡君

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

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>

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

*

2014 年 12 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2014 年 12 月第一次印刷 印张:9

字数:204 000

定价:25.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《高等医药院校基础医学实验教学规划教材》

编写指导委员会

主 任 涂汉军

副 主 任 魏文芳 严世荣

委 员 (按姓氏笔画排序)

王汉琴	朱名安	刘 涛	严世荣	李国华
张 鹏	赵万红	郭 阳	涂汉军	魏文芳

丛 书 主 编 朱名安 赵万红

丛书副主编 王汉琴 郭 阳 张 鹏

编 委 (按姓氏笔画排序)

王汉琴	石 蕾	朱名安	刘长俊	李文春
杨 虹	杨树国	张 鹏	国宏莉	尚 静
金志雄	赵万红	姚柏春	郭 阳	郭怀兰
唐 微	黄 琪	曾凡龙	鄢红春	

总 序

随着现代生命科学及其各种实验技术的飞速发展和高校教学模式的改革,现代高等医学教育更加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,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有机结合又相对独立。同时,必须加大对实验项目、实验条件、实验教学体系的改革力度,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,从而提高医学实验教学质量。

本系列实验教材由湖北医药学院组织编写,共9种,包括《医学大体形态学实验(人体解剖学分册)》《医学大体形态学实验(系统解剖学与局部解剖学分册)》《医学显微形态学实验》《病原生物学实验》《医学免疫学实验》《医学生物化学与分子生物学实验》《医学细胞生物学与医学遗传学实验》《预防医学实验》和《医用化学实验》。系统介绍了系统解剖学、局部解剖学、组织胚胎学、病理学、医学免疫学、病原生物学、生物化学与分子生物学、医学细胞生物学和医学遗传学、预防医学和医用化学的实验研究所必需的知识与技术。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,借鉴国内外同类实验教材的编写方法,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,按照实验教学逻辑和规律,将实验内容按模块层次进行编写,基本上包括:①实验操作及常用仪器使用;②基本实验或经典验证性实验;③综合性实验;④研究创新性实验等。不同层次学生可按照本专业培养特点和要求,对不同板块的必选实验项目和自选实验项目进行适当取舍。

其基本理念和设计思路具有以下特点:

1. 明确目标,准确定位 本系列实验教材编写过程中增加了临床应用多、意义较大的实验内容,适当选编新的内容,力求突出基础医学知识在医学相关专业临床工作中的应用。

2. 突出能力,结合专业 以“自主学习能力、临床执业能力”培养为根本,将各学科的相关知识与临床实践应用“链接”为一体,增强学生学习兴趣,突出应用能力培养,提高学生自主学习能力和学习效果。教材重视生命科学研究中如何发挥学生观察、分析与思辨能力的培养,主要任务是使大学生通过动手,得到实验技术的基本操作技能训练、科学思维和创新能力的培养,同时也要使他们初步了解或掌握先进技术和方法,与迅速发展的学科前沿接轨。

3. 增减内容,突出重点 本系列实验教材在编写过程中,坚持基本理论和基本知识以“必须、实用、够用”的原则。实验内容去旧增新,删繁就简。将原来一些经典实验与现代科学思维相结合,适当压缩,并进行内容和教学方法的改革。对原书的插图进行了精选。对所开设的每一个实验要求达到的培养目标作了清晰而明确的阐述。

4. 整体优化,彰显特色 教材在整体结构上,既考虑到教与学的传统习惯,力求整

体上系统化,又考虑到教材内容的创新,体现教材的思想性和先进性;在教材内容的编写上突出专业特色,体现专业特点,强化知识应用,部分教材增加实验流程图以及实验要点和实验结果图的应用,使规划教材具有更广泛的适应性;在结构及内容编排上条理清楚,层次分明,充分体现规范化特点。为扩大学生的知识面,启发其思维,根据每个部分的内容在临床工作中的应用情况,精选相关内容与临床密切相关的学科知识和有应用前景的新进展和新技术,将各相关学科有机结合在一起,具有基础扎实、应用性强、科研创新性突出的优势。

本规划教材的使用对象以本科临床医学专业为主,兼顾预防、麻醉、口腔、影像、药学、检验、护理、康复、生物科学与生物技术、公共事业管理、信息管理与信息系统等专业需求,涵盖全部医学生的基础医学实验教学。

由于基础医学实验教学模式尚存在地区和校际间的差异,本规划教材可能存在偏颇之处,也会有不足和疏漏,敬请广大医学教育专家和同学提出宝贵意见,以便修订再版。

湖北医药学院

《高等医药院校基础医学实验教学规划教材》编委会

2014年7月

前 言

生物化学和分子生物学是生命科学的基础学科之一，其理论和实验技术已渗透到生物学的各个领域并促进了一批新学科的兴起和发展。随着新版教材的问世，我们特编写了与其相适应的《医学生物化学与分子生物学实验》。

本书分四篇，具体如下：

第一篇，主要介绍生物化学的经典技术：分光光度技术，色谱技术，电泳技术，离心技术，蛋白质的分离、纯化技术和分子生物学技术等常用实验技术。

第二篇，主要介绍经典的生物化学实验，如蛋白质含量的测定、胆类（甘油三酯和胆固醇）含量的测定，血糖含量的测定，血清丙氨酸氨基转移酶活性的测定，这些实验和临床关系非常密切。每个实验由实验目的、实验原理、实验材料、实验方法、注意事项和实验思考等部分组成。“实验原理”简洁明了，与理论课内容紧密相连；“实验方法”具体、可操作性强；“注意事项”重点强调实验成功与否的关键，使学生在操作时减少出错；每个实验最后列出 1~2 个“实验思考”题，使学生将理论课所讲的理论知识与实验联系起来。本书在层次上包括基本实验、提高性实验和研究创新性实验三个实验层次。学生在掌握基本实验及操作技能后进行创新性实验，极大地提高了学生的兴趣和动手能力。

第三篇，主要介绍常用的分子生物学技术，如白细胞中提取 DNA、细菌中提取质粒、RNA 的提取与鉴定、PCR 扩增 DNA、目的基因的酶切、载体和目的基因的连接等，这些实验为日后进行基因工程操作打下坚实的基础。

第四篇，专题篇，主要介绍一些常用玻璃器皿的洗涤，常用量器的正确使用，加样器的使用和校正，常用实验样品的制备等。此外，附上了实验室常用数据，如不同动物正常的血糖值、正常的甘油三酯含量等实验数据，方便学生将实验结果与之对照。最后，介绍了实验报告的书写格式，使学生的实验报告有统一的规范。

本书适合各医学院校临床、麻醉、口腔、影像、检验、药学、护理等专业人员使用。教材编写过程中得到了学校的大力支持，在此表示诚挚的谢意！

湖北医药学院 唐 微

2014 年 5 月

目 录

第一篇 常用实验技术

第一章 分光光度技术	1
第二章 色谱技术	6
第一节 概述	6
第二节 常用的色谱方法	7
第三章 电泳技术	15
第一节 基本原理	15
第二节 乙酸纤维薄膜电泳	17
第三节 琼脂糖凝胶电泳	18
第四节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	19
第五节 染色方法	24
第四章 离心技术	27
第一节 离心理论	27
第二节 离心分离的种类	31
第三节 离心操作要领	33
第五章 蛋白质的分离与纯化	35
第一节 蛋白质分离与纯化的原理和方法	35
第二节 蛋白质的制备	38
第三节 蛋白质的浓缩、干燥和保存	39
第六章 酶学分析	41
第七章 基因工程技术及分子生物学技术	46
第一节 概述	46
第二节 目的基因的制备	47
第三节 基因载体的选择	50
第四节 基因工程常用的工具酶	54
第五节 重组体的构建	58
第六节 重组体导入受体细胞	59
第七节 重组子的筛选与鉴定	61

第二篇 生物化学实验

第八章 基本实验	63
实验一 蛋白质的定量测定	63
实验二 氨基酸的离子交换柱色谱分离	69
实验三 血红蛋白与核黄素的凝胶柱色谱分离	71
实验四 乙酸纤维薄膜电泳分离血清蛋白	72

实验五 动物组织中核酸的提取与鉴定	74
实验六 蛋白质的透析纯化	76
实验七 血清过氧化氢酶 K_m 的测定	77
实验八 血糖含量的测定	80
实验九 胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的影响	83
实验十 血清三酰甘油 (TG) 的测定	84
实验十一 酮体的生成和利用	87
实验十二 血浆高密度脂蛋白-胆固醇含量的测定	91
实验十三 血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 活性的测定	92
第九章 提高型实验	96
实验十四 血清蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳	96
实验十五 琥珀酸脱氢酶的作用及其可逆性抑制	98
第十章 研究创新型实验	100
实验十六 肝糖原的提取与鉴定	100
实验十七 不同组织 ALT 活性测定及温度、pH 的影响	100

第三篇 分子生物学实验

第十一章 分子生物学实验技术	102
实验十八 真核基因组 DNA 的分离纯化	102
实验十九 组织细胞总 RNA 的提取	106
实验二十 核酸的凝胶电泳	107
实验二十一 DNA 为模板的 PCR 扩增	113
实验二十二 质粒 DNA 的提取 (碱变性裂解法)	115
实验二十三 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化	116
实验二十四 载体与目的基因的连接	117

第四篇 专题篇

第十二章 实验室基本操作	119
第一节 常用玻璃器皿的洗涤	119
第二节 常用量器的校正	121
第三节 常用量器的正确使用	122
第四节 加样器的使用和校正	123
第五节 常用实验样品的制备	124
第十三章 实验室常用数据	127
第十四章 实验室安全及防护	130
附录 实验须知及实验报告的书写	133
第一节 实验须知	133
第二节 实验报告的书写要求	134

第一篇 常用实验技术

第一章 分光光度技术

有色溶液对光线有选择性的吸收作用,不同物质由于其分子结构不同,对不同波长光线的吸收能力也不同,因此,每种物质都具有其特异的吸收光谱。有些无色溶液,虽对可见光无吸收作用,但所含物质可以吸收特定波长的紫外线或红外线。从一个有连续光谱的光源,逐步地分出各个波长的光,使其透过待测物的真溶液,测出其在不同波长时的光密度;然后以波长为横坐标、光密度为纵坐标,就可以得到待测物的吸收光谱曲线,由此找出其中吸收最强的波长,作为灵敏光波长对该物质未知液进行定量测定。分光光度法主要是指利用物质特有的吸收光谱来鉴定物质性质及含量的技术,其理论依据是 Lambert-Beer 定律。

一、光的基本知识

光是由光子组成的,具有二重性,即不连续的微粒性和连续的波动性。波长和频率是光的波动性的特征,可用下式表示:

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (1-1)$$

式中 λ 为波长,具有相同振动相位的相邻两点间的距离叫波长。 ν 为频率,即每秒钟振动次数。 c 为光速,等于 $(299\,770 \pm 4) \text{ km/s}$ 。光属于电磁波。

自然界存在各种不同波长的电磁波(表 1-1)。分光光度法所使用的光谱范围为 $200 \text{ nm} \sim 10 \text{ }\mu\text{m}$ ($1 \text{ }\mu\text{m} = 1000 \text{ nm}$)。其中, $200 \sim 400 \text{ nm}$ 为紫外线区, $400 \sim 760 \text{ nm}$ 为可见光区, $760 \sim 10\,000 \text{ nm}$ 为红外线区。

表 1-1 电磁波谱

区 域	波 长		来 源
	M	常用单位	
γ 射线	$10^{-12} \sim 10^{-10}$	$10^{-3} \sim 0.1 \text{ nm}$	原子核
X 射线	$10^{-10} \sim 10^{-8}$	$0.1 \sim 10 \text{ nm}$	芯电子(内层电子)
远紫外线	$10^{-8} \sim 2 \times 10^{-7}$	$10 \sim 200 \text{ nm}$	中层电子
紫外线	$2 \times 10^{-7} \sim 4 \times 10^{-7}$	$200 \sim 400 \text{ nm}$	外层价电子
可见光	$4 \times 10^{-7} \sim 7.6 \times 10^{-7}$	$400 \sim 760 \text{ nm}$	外层价电子
红外线	$7.6 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-5}$	$0.76 \sim 50 \text{ }\mu\text{m}$	分子的振动与转动
远红外线	$5 \times 10^{-5} \sim 10^{-3}$	$50 \sim 1000 \text{ }\mu\text{m}$	分子的振动与转动
微波	1×10^{-3}	$0.1 \sim 100 \text{ cm}$	分子转动
无线电波	1×10^3	$1 \sim 1000 \text{ m}$	磁共振

二、朗伯-比尔 (Lambert-Beer) 定律

朗伯-比尔定律是比色分析的基本原理, 这个定律是讨论有色溶液对单色光的吸收程度与溶液的浓度及液层厚度间的定量关系。此定律是由朗伯定律和比尔定律归纳而得。

1. 朗伯定律 一束单色光通过溶液后, 由于溶液吸收了一部分光能, 光的强度就要减弱。若溶液浓度不变, 则溶液的厚度越大 (即光在溶液中所经过的途径越长), 光的强度减低也越显著。

设光线通过溶液前的强度为 I_0 (入射光的强度), 通过液层厚为 L 的溶液后光的强度为 I_t (透射光的强度), 则 $\frac{I_0}{I_t}$ 表示透射光的强度是入射光强度的几分之几, 称为透光度 (transmittance), 用 T 表示。透光度随溶液厚度的增加而减少, 但实践证明, 透光度和溶液层厚度间并不存在简单的定量关系, 只有透光度的负对数 ($-\lg T$) 才随着溶液厚度的增加而成正比例增加, 即

$$-\lg T = -\lg \frac{I_t}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I_t} \propto L \quad (1-2)$$

将上述比例写成等式, 得到 $\lg \frac{I_0}{I_t} = K_1 L$, 式中 $\lg \frac{I_0}{I_t}$ 称为吸光度 (A) (absorbance), 又称为消光度 (E) (degree of extinction) 或光密度 (D) (optical density), 所以

$$A = K_1 L \quad (1-3)$$

式中 K_1 为比例系数, 其值取决于入射光的波长、溶液的性质和浓度以及溶液的温度等。上式表明, 当溶液的浓度不变时, 吸光度与溶液液层的厚度成正比, 这就是朗伯定律。

2. 比尔定律 当一束单色光通过有色溶液后, 溶液液层的厚度不变而浓度不同时, 则溶液浓度越大, 透射光的强度越弱, 其定量关系如下:

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = K_2 C \quad (1-4)$$

$$\text{即 } A = K_2 C$$

式中 C 为有色物质溶液的浓度, K_2 为比例系数, 其值取决于入射光的波长、溶液的性质和液层的厚度以及溶液的温度等。上式表明, 当溶液液层的厚度不变时, 吸光度与溶液的浓度成正比, 这就是比尔定律。

3. 朗伯-比尔定律 如果同时考虑吸收层的厚度和溶液浓度对光吸收的影响, 则必须将朗伯定律和比尔定律合并起来, 得

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = KLC \quad (1-5)$$

$$\text{即 } A = KLC$$

吸光度与溶液的浓度和液层厚度的乘积成正比, 这就是朗伯-比尔定律。

在上式中, 若 L 用厘米 (cm) 表示, C 用克/升 (g/L) 表示, 则比例常数 K 称为吸光系数, 其值取决于入射光的波长、溶液的性质和温度等, 而与光的强度、溶液的浓度及液层的厚度无关。

若 L 用厘米表示, C 用摩尔/升 (mol/L) 表示, 则上式中的比例常数用 ϵ 表示, 得到

$$A = \epsilon LC \quad (1-6)$$

式中 ε 称为物质的摩尔吸光率 (molar absorptivity) 或摩尔吸光系数 (molar absorption coefficient)。

不同的物质可能会有相同的最大吸收波长, 但其摩尔吸光系数不一定相同。 ε 越大, 说明该物质溶液对光吸收越强烈, 则比色测定的灵敏度越高。

三、分光光度计结构简介

能从含有各种波长的混合光中将每一单色光分离出来, 并测量其强度的仪器称为分光光度计。分光光度计因使用的波长范围不同而分为紫外线、可见光、红外线及万用 (全波段) 分光光度计等。无论哪一类分光光度计都由下列五部分组成, 即光源、单色器、狭缝、样品池、检测系统。

1. 光源 要求能提供所需波长范围的连续光谱, 稳定, 有足够的强度。常用的有白炽灯 (钨丝灯、卤钨灯等), 气体放电灯 (氢灯、氘灯及氙灯等), 金属弧灯 (各种汞灯) 等。

钨灯和卤钨灯发射 320~2000 nm 的连续光谱, 最适宜工作范围为 360~1000 nm, 稳定性好, 可用作可见光分光光度计的光源。氢灯和氘灯能发射 150~400 nm 的紫外线, 可用作紫外线区分光光度计的光源。汞灯发射的不是连续光谱, 能量绝大部分集中在 253.6 nm 波长处, 一般作波长校正用。

钨灯在出现灯管发黑时应及时更换, 如换用的灯型不同, 还需要调节灯座的位置和焦距, 氢灯及氘灯的灯管或窗口是石英的, 且有固定的发射方向, 安装时必须仔细校正。接触灯管时应戴手套以防留下污迹。

2. 分光系统 (单色器) 是指能从混合光波中分解出所需单一波长光的装置, 由棱镜或光栅构成。

用玻璃制成的棱镜色散力强, 但只能在可见光区工作, 石英棱镜工作波长范围为 185~4000 nm, 在紫外线区有较好的分辨率, 而且也适用于可见光区和近红外线区。棱镜的特点是波长越短, 色散程度越好, 越向长波一侧色散程度越差。所以用棱镜的分光光度计, 其波长刻度在紫外区可达到 0.2 nm, 而在长波段只能达到 5 nm。

较高级的分光系统是衍射光栅, 即在石英或玻璃的表面刻画许多平行线, 可多达 1200~2400 线/mm, 刻线处不透光, 于是通过光的干涉和衍射现象, 而形成光谱。由于衍射光栅对不同波长的色散程度是一样的, 因此非常有利于应用计算机来进行自动控制。

3. 狭缝 是指由一对隔板在光通路上形成的缝隙, 用来调节入射单色光的纯度和强度, 也直接影响分辨率。狭缝可在 0~2 mm 宽度内调节, 由于棱镜色散力随波长不同而变化, 较先进的分光光度计的狭缝宽度可随波长一起被调节。

4. 比色杯 也叫样品池、吸收器或比色皿, 用来盛测定溶液, 各个杯子壁厚度等规格应尽可能完全相等, 否则将产生测定误差。玻璃比色杯只适用于可见光区, 在紫外线区测定时要用石英比色杯。不能用手指拿比色杯的光学面, 用后要及时清洗, 可用温水或稀盐酸、乙醇及铬酸洗液 (在浓盐酸中浸泡时不要超过 15 min), 表面只能用柔软的绒布或拭镜头纸擦净。

5. 检测系统 有许多金属能在光的照射下产生电流, 光越强电流越大, 此即光电效应, 因光照射而产生的电流叫光电流。受光器有两种, 一是光电池, 二是光电管。光电池的组成种类繁多, 最常见的是硒光电池。光电池受光照射产生的电流较强, 可直接用微电流计

量出。但是,当连续照射一段时间后会产生产疲劳现象而使光电流下降,要在黑暗中放置一段时间才能恢复。因此使用时不宜长期照射,随用随关,以防止光电池因疲劳而产生误差。

光电管装有一个阴极和一个阳极,阴极是用对光敏感的金属(多为碱土金属的氧化物)做成,当光射到阴极且达到一定能量时,金属原子中的电子发射出来。光越强,光波的振幅越大,电子放出越多。电子是带负电的,被吸引到阳极上而产生电流。光电管产生电流很小,所以需要放大。分光光度计中常用电子倍增光电管,在光照射下产生的电流比其他光电管要大得多,这就提高了测定的灵敏度。

检测器产生的光电流以某种方式转变成模拟的或数字的结果,模拟输出装置包括电流表、电压表、记录器、示波器及与计算机连用等,数字输出则通过模拟/数字转换装置如数字式电压表等进行。

四、分光光度技术的应用

1. 测定溶液中物质的含量 可见或紫外分光光度法都可用于测定溶液中物质的含量。这需要测定标准液(浓度已知的溶液)和未知液(浓度待测定的溶液)的吸光度,将两者进行比较。由于所用吸收池的厚度是一样的,可用下式进行计算。

$$\frac{A_x}{A_s} = \frac{KC_xL}{KC_sL} = \frac{C_x}{C_s} \quad \text{即} \quad C_x = \frac{A_x}{A_s} \times C_s \quad (1-7)$$

式中 C_x 代表未知液的浓度, C_s 代表标准液的浓度, A_x 和 A_s 分别代表未知液和标准液所测得的吸光度,式中只有 C_x 是未知的,可由上式计算得之。也可以先测出不同浓度标准液的吸光度,绘制校正曲线(标准曲线),在选定的浓度范围内标准曲线应该是一条直线,然后测定出未知液的吸光度,即可从标准曲线上查到其相对应的浓度。

含量测定时所用波长通常要选择被测物质的最大吸收波长,这样做有两个好处:一是灵敏度大,物质在含量上的稍许变化将引起较大的吸光度差异;二是可以避免其他物质的干扰。

还可利用摩尔吸光率(ϵ)求得测定物质的浓度,由于物质的 ϵ 是已知的,读取光径(液层厚度)为 1 cm 时溶液的吸光度(A),则可计算溶液中物质的浓度(C):

$$C = \frac{A}{\epsilon} \quad (1-8)$$

此式常在紫外线吸收法时应用,无需显色反应,操作方便。

2. 用紫外线谱鉴定化合物 使用分光光度计可以绘制吸收光谱曲线。方法是用各种波长不同的单色光分别通过某一浓度的溶液,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,以吸光度为纵坐标绘制吸光度-波长曲线,此曲线即吸收光谱曲线。

各种物质有它自己一定的吸收光谱曲线,因此用吸收光谱曲线图可以进行物质种类的鉴定。当一种未知物质的吸收光谱曲线和某一已知物质的吸收光谱曲线形状一样时,则很可能它们是同一物质。一定物质在不同浓度时,其吸收光谱曲线中峰值的大小不同,但形状相似,即吸收高峰和低谷的波长是一定不变的。

紫外线吸收是由不饱和的结构造成的,含有双键的化合物能表现出吸收峰。紫外线吸收光谱比较简单,同一种物质的紫外线吸收光谱应完全一致,但具有相同吸收光谱的化合物结构不一定相同。除了特殊情况外,单独依靠紫外线吸收光谱不能决定一个未知物的结

构,必须与其他方法配合。紫外吸收光谱分析主要用于已知物质的定量分析和纯度分析。

五、使用分光光度计的注意事项

(1) 分光光度计必须放置在固定而且不受振动的仪器台上,不能随意搬动,严防振动、潮湿和强光直射。

(2) 比色杯盛液量以达到杯容积 $2/3$ 左右为宜。若不慎将溶液流到比色杯的外表面,则必须先用滤纸吸干,再用擦镜纸或绸布拭净,然后才能把比色杯放入比色杯槽内。移动比色杯槽要轻,以防溶液溅出,腐蚀机件。

(3) 不可用手拿比色杯的光学面,禁止用毛刷等物摩擦比色杯的光滑面。

(4) 用完比色杯后应立即用自来水冲洗,再用蒸馏水洗净。若用上法不能洗净时,可用 5% 的中性皂溶液或洗衣粉稀溶液浸泡,也可用新配制的重铬酸钾-硫酸洗液短时间浸泡,之后立即用水冲洗干净。洗涤后应把比色杯倒置晾干或用滤纸条将水吸去,再用擦镜纸轻轻揩干。

(5) 一般应把溶液浓度尽量控制在吸光度为 $0.2 \sim 0.8$ 的情况下进行测定。这样所测得的读数误差较小。如吸光度不在此范围内,可调节比色液浓度,适当稀释或浓缩,使其在仪器准确度较高的范围内进行测定。

(6) 分光光度计内放有硅胶干燥袋,需定期更换。

(丁爱玲)

第二章 色谱技术

第一节 概述

1903 年, 俄国科学家 Mikhail Semenovich Tswett 首创了一种从绿叶中分离多种不同颜色色素成分的方法, 命名为色谱法 (chromatography), 由于翻译和习惯的原因, 又常称为层析法。近百年来, 色谱法不断发展, 形式多种多样。从 20 世纪 50 年代开始, 相继出现了气相色谱、液相色谱、高效液相色谱、薄层色谱、通透色谱、离子交换色谱、凝胶色谱、亲和色谱、金属螯合色谱、反相色谱、疏水作用色谱、正相色谱等。几乎每一种色谱法都已发展成为一门独立的生化技术, 并且在生化领域内得到了广泛的应用。

色谱技术因操作较简便、设备不复杂、样品量可大可小, 既可用于实验室的科学研究, 又可用于工业化生产。它与光电仪器、电子计算机结合, 可组成各种各样的高效率、高灵敏度的自动化分离分析装置。这充分显示了色谱技术的强大生命力, 它是近代生物化学发展的关键技术之一。

一、色谱法的概念和特点

色谱法是利用混合物中各组分的理化性质的差异 (吸附力、溶解度、分子形状和大小、分子极性、分子亲和力等), 使各组分以不同程度分布在两个相中, 其中一个相叫固定相 (stationary phase), 另一相流过此固定相叫做流动相 (mobile phase)。由于各组分受流动相作用产生的推力和受固定相作用产生的阻力的不同, 各组分产生不同的移动速度, 使结构上只有微小差异的各组分得到分离。再配合相应的光学、电学、电化学和 (或) 其他相关检测手段, 对各组分进行定性和定量分析。

色谱法是一种物理化学分离分析方法。它既是一种极好的分离纯化的方法, 也是一种进行精确定性、定量分析的方法。在色谱分析中, 通常是根据色谱峰的位置来进行定性分析, 根据色谱峰的面积或高度进行定量分析。

色谱法的特点:

1. 具有极高的分辨效力 只要选择好适当的色谱法 (色谱类型、色谱条件), 它就能很好地分离理化性质极为相近的混合物, 如同系物、同分异构体, 甚至同位素, 这是经典的物理化学分离方法不可能达到的。

2. 具有极高的分析效率 一般说来, 对某一混合组分的分析, 只需几十分钟, 乃至几分钟就可完成一个分析周期。如用现代气相色谱仪, 在 12min 内就可完成含有 12 个组分的混合物的分离分析工作; 用现代的快速蛋白液相色谱 (FPLC) 在 15~20min 就可完成对血浆蛋白质等的分离分析工作; 又如选用空心毛细管色谱柱一次就解决含有 100 多个组分的烃类混合物的分离分析工作; 用现代的高效薄层色谱 (high performance thin layer liquid chromatography, HPTLC) 一次仅 10min 就可完成 40 个样品的点样和分析工作。

3. 具有极高的灵敏度 样品组分含量仅数微克, 或不足一个微克都可进行很好的分

析。现代的气相色谱仪，由于使用了高灵敏的检测器，可检出 $10^{-13} \sim 10^{-11}$ g 的样品组分。一般样品中只要含有 1 ppm (10^{-9} ，即一百万分之一)，乃至 1ppb (10^{-12} ，即十亿分之一) 的杂质，使用现代的气相色谱仪都可将之检出，而且样品还不需浓缩。

4. 操作简便，应用广泛 它广泛地应用于工农业、化学、化工、医药卫生、环境保护、大气监测等各个方面，是现代实验室中常用的分析手段之一。在生物化学中常用于各种体液、组织抽提液的化学组分的分离、纯化及检测，也用于帮助鉴定某种提取物是否纯净（表 2-1）。在现代生化制备技术中色谱法占有核心地位。

当然，色谱法也有它的局限性：①在定量分析中需要纯制的标准物质。②不能精确地解决物质的化学结构问题。

表 2-1 蛋白质纯化技术

分离依据	分离方法 色谱类型	特点	用途
分子大小	凝胶过滤	分级分离，分辨率适中，适于脱盐分级分离时流速较慢（>8h 循环）的情况	大规模纯化的最后一步，用于去除微量杂质及聚集体脱盐，可用于任何阶段
电荷	离子交换	分辨率通常较高流速较快（合适的填料），容量很大，样品体积不受限	最适于早期纯化，即大体积样品及蛋白纯度较低时使用
等电点	色谱聚焦	分辨率较高，流速快容量很大，样品体积不受限	纯化最后阶段
疏水特性	疏水作用	分辨率较高，流速快容量大，样品体积不受限	适于任何阶段，特别适用于离子强度较高时，如沉淀、离子交换和亲和层析后
	反相	分辨率较高，流速很快，容量大	适于最后阶段，特别适于相对分子质量较小的肽
生物亲和性	亲和	分辨率极高，流速快，容量大，体积不限	适于任何阶段，特别是样品浓度小、杂质含量多时使用

第二节 常用的色谱方法

一、吸附色谱

吸附色谱（absorption chromatography）是指混合物随流动相通过由吸附剂组成的固定相时，由于吸附剂对不同组分有不同的吸附力，从而不同组分随流动相移动的速度不同，最终可将混合物中不同组分分离。这种分离方法取决于待分离物质被吸附剂固定相所吸附的能力，以及它们在分离时所用的溶剂流动相中的溶解度这两个方面的差异。根据操作方式不同，吸附色谱可分为柱色谱和薄层色谱两种。

（一）柱色谱

在柱色谱（column chromatography）中，混合物的分离是在装有适当吸附剂的玻璃管柱中进行的，色谱柱下端铺垫棉花或玻璃棉，柱内充填溶剂湿润的吸附剂，待分离样品自柱顶部加入，样品完全进入吸附柱后，再用适当的溶液（洗脱液）洗脱。假如待分离的样品内含有 A、B 两种成分，在洗脱过程中随着流动相流经固定相，它们在柱内连续地分别产生溶解、吸附、再溶解的现象。由于洗脱液和吸附剂对 A 和 B 的溶解力与吸附力不同，A 和 B 在柱内移动的速率也不同。溶解度大而吸附力小的物质走在前面，相反，溶解度小而吸附力大的物质走在后面。经过一段时间以后，A、B 两种物质可在柱的不同区域各自形成环带。如 A、B 为有色物质，就可以明显看到不同的色层，每个色带就是一种纯物质。

然后继续用洗脱液洗脱，分段收集，直到各组分按顺序先后完全从柱中洗出为止。

一般讲，非极性或极性不强的有机物如三酰甘油、胆固醇、磷脂等的分离，采用这种方法较为合适。

（二）薄层色谱

薄层色谱（thin layer chromatography）法是由德国学者 E.S.Tahi 于 1958 年改进的一种新色谱法，现广为应用。其方法是把吸附剂均匀地铺在一块玻璃板或塑料膜上形成薄层，待分离的样品点在薄层一端，在密闭容器中用适宜的溶剂（展开剂）展开，由于吸附剂对不同物质吸附力大小不同，因此当溶剂流过时，不同物质在吸附剂和溶剂之间发生连续不断地吸附、解吸附、再吸附、再解吸附，易被吸附的物质相对地移动较慢，较难吸附的物质则相对地移动得快一些。经过一段时间的展开，不同的物质就被彼此分开，最后形成互相分离的斑点。

薄层色谱的特点是：①灵敏度高，可检出微量物质。②分离能力强，斑点集中。③展开时间短。④操作简便。其适用于很多微量样品的分离鉴定。

（三）常用的吸附剂

色谱用吸附剂一般应满足两个要求：一是要有较大的吸附表面和一定的吸附能力，对不同的物质吸附力不同，而且不能与被吸附的物质及洗脱液（或展开剂）发生反应；二是吸附剂粒度大小适中，不宜过粗（展开太快，分离效果差），也不宜太细（展开过慢，斑点易于扩散）。就一般来说，薄层色谱所用吸附剂的粒度较细。如硅胶要求在 200 目左右。

常用的吸附剂有氧化铝、硅胶、聚酰胺等。

（四）洗脱液（展开剂）

不论是柱色谱还是薄层色谱，在选择洗脱液或展开剂时应符合以下条件：

- （1）一般应使用比较纯的试剂，含有杂质常会影响洗脱能力。
- （2）与样品及吸附剂不发生化学反应。
- （3）能溶解样品中的各成分。
- （4）黏度小流动性好，不致洗脱或展开太慢。
- （5）容易与所要分离的成分分开。

选择色谱分离条件时，必须从吸附剂、洗脱液（展开剂）及被分离物质三方面考虑，一般用亲水性吸附剂（如硅胶、氧化铝）作色谱分离时，若被测组分极性较大，应选用吸附性较强（活动较低）的吸附剂，用极性较大的洗脱液或展开剂；若被测组分亲脂性较强，应选用较强（活动较高）的吸附剂及极性较小的洗脱液或展开剂。常用洗脱液或展开剂极性递增的次序是：石油醚<环己烯<四氯化碳<苯<甲苯<乙醚<氯仿<乙酸乙酯<正丁醇<丙酮<乙醇<甲醇<水。

二、分配色谱

分配色谱（partition chromatography）是利用混合物在两种或两种以上的不同溶剂中的分配系数不同而使物质分离的方法，相当于一种连续性的溶剂抽提方法，如用带水的材料