



全国医学类专业创新教材

生物化学实验指导 与自测练习

马鸣旺 李元宏 主编



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

全国医学类专业创新教材
(供本、专科医学类相关专业学生使用)

生物化学实验指导 与自测练习

马鸣旺 李元宏 主编

中国科学技术出版社

· 北 京 ·

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验指导与自测练习 / 马鸣旺, 李元宏主编. —北京: 中国科学技术出版社, 2017.7

ISBN 978-7-5046-7546-0

I. ①生… II. ①马… ②李… III. ①生物化学—化学实验—高等职业教育—教学参考资料 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2017)第163739号

策划编辑 王晓义
责任编辑 王晓义 蒋宵宵
版式设计 张乾坤
责任印制 徐 飞

出 版 中国科学技术出版社
发 行 中国科学技术出版社发行部
地 址 北京市海淀区中关村南大街16号
邮 编 100081
发行电话 010-62173865
传 真 010-62179148
投稿电话 010-63581202
网 址 <http://www.cspbooks.com.cn>

开 本 889mm × 1194mm 1/16
字 数 390千字
印 张 15.5
版 次 2017年8月第1版
印 次 2017年8月第1次印刷
印 刷 北京盛通印刷股份有限公司

书 号 ISBN 978-7-5046-7546-0 / Q · 205
定 价 39.00元

(凡购买本社图书, 如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责调换)

前言

全国医学类专业规划创新教材

《生物化学实验指导与自测练习》编委会

主 编 马鸣旺 李元宏

副主编 吴双芝 程 凯

编 委 (按姓氏笔画排序)

马鸣旺 山西医科大学汾阳学院

申 瑜 山西医科大学汾阳学院

田嵩浩 山西医科大学汾阳学院

李元宏 山西医科大学汾阳学院

吴双芝 山西医科大学汾阳学院

张笑添 山西医科大学汾阳学院

贾艳梅 山西医科大学汾阳学院

贾乔瑾 山西医科大学汾阳学院

程 凯 山西医科大学汾阳学院



前 言

生物化学是生命科学的前沿性学科,发展迅速,渗透到医学的各个领域,发挥着重要的作用。伴随着生物化学知识的更新与发展,生物化学教材不断推陈出新。为满足在校学生学习需要,我们特编写了这本《生物化学实验指导与自测练习》。

本书内容包括实验指导和自测练习两部分。实验指导部分包括电泳技术、分光光度技术、离心技术、层析技术等常用的分子生物学实验技术以及生物化学实验常规仪器设备的操作规程。医学生通过对生物化学实验课的学习,不仅可以加深对所学理论知识的理解,还可以培养实际动手操作能力及分析解决问题的能力,养成实事求是的科研态度。另外,实验指导部分还为医学检验技术专业的同学编写了部分生物化学检验的综合性和应用性实验。

自测练习部分,以人民卫生出版社出版的,由查锡良、药立波主编的第8版《生物化学与分子生物学》为基础,结合近年西医综合生物化学考试大纲和执业医师资格考试生物化学大纲编写而成。自测题具体内容及题量主要依据《山西医科大学汾阳学院生物化学教学大纲》的要求和教学时数而定。学生在学习过程中通过做自测题,可以检验对所学知识的理解和掌握的程度,使之在学习过程中有的放矢,对每一个知识点从不同的角度去理解,从而提高学习效果。有些综合性强的试题可以使将所学的知识前后联系起来,加以总结、系统化,既增加了学生学习的兴趣,又提高了学习能力,为专科学科生将来升入本科以及本科生考研和执业医师资格考试打下坚实的基础。本书可作为高等医学院校本科各专科学科生物化学与分子生物学配套教材,也可供医学类各专科学科生使用。

全书由山西医科大学汾阳学院检验系生化与生化检验教研室教师编写,参与编写的教师有马鸣旺、李元宏、吴双芝、程凯、贾艳梅、张笑添、申瑜、贾乔瑾、田嵩浩等。全书由马鸣旺负责统稿。同时本书也得到生物化学实验室各位老师的鼎力帮助,以及山西医科大学汾阳学院检验系领导的大力支持,在此一并表示衷心的感谢。

由于编写水平有限,时间仓促,书中错漏在所难免,敬请使用本书的教师、实验技术人员和广大学生多提宝贵意见,定加改进。

马鸣旺

目 录

第一部分 实验指导.....	1
第一章 实验室规则与安全	1
第一节 实验室规则	1
第二节 生物化学实验室安全知识	2
第二章 生物化学实验技术	4
第一节 生物化学实验基本技术	4
第二节 分光光度技术	6
第三节 层析技术	8
第四节 电泳技术	12
第三章 生物化学与分子生物学实验	16
实验一 血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	16
实验二 血清总蛋白的测定及标准曲线的制备（双缩脲法）	18
实验三 酶的专一性及影响酶活性的因素	21
实验四 血糖的测定（葡萄糖氧化酶法）	24
实验五 血清高密度脂蛋白胆固醇的测定（胆固醇氧化酶法）	26
实验六 肝组织的转氨基作用（纸层析法）	27
实验七 血清尿素氮（BUN）的测定（二乙酰一肟法）	29
附录1：脲酶—谷氨酸脱氢酶偶联速率法测定血清尿素	31

附录2: 苦味酸法检测血清肌酐 (Crea) (固定时间法)	32
实验八 聚合酶链式反应及产物鉴定 (PCR) (综合性实验)	33
实验九 质粒DNA的快速提取制备 (综合性实验)	36
实验十 DNA的限制性核酸内切酶酶切技术 (综合性实验)	38
实验十一 DNA琼脂糖凝胶电泳	40
实验十二 方法学评价——回收实验 (综合性实验)	43
实验十三 方法学评价——干扰实验 (综合性实验)	44
实验十四 硼酸亲和液相层析测定糖化血红蛋白	45
实验十五 胆固醇氧化酶法测定血清 (浆) 总胆固醇	46
实验十六 连续监测法测定血清丙氨酸氨基转移酶	48
实验十七 改良J-G法测定总胆红素和结合胆红素	50
实验十八 批内重复性实验	52
第二部分 自测练习	56
第一章 蛋白质的结构与功能	56
第二章 核酸的结构与功能	66
第三章 酶	72
第四章 维生素	84
第五章 糖代谢	92
第六章 脂质代谢	101
第七章 生物氧化	113
第八章 氨基酸代谢	120
第九章 核苷酸代谢	130

第十章 非营养物质代谢	135
第十一章 物质代谢的整合与调节	144
第十二章 DNA的生物合成	148
第十三章 RNA的生物合成	157
第十四章 蛋白质的生物合成	168
第十五章 基因表达调控	177
第十六章 细胞信号转导的分子机制	183
第十七章 常用分子生物学技术的原理及其应用	189
第十八章 DNA重组及重组DNA技术	195
参考答案	203
主要参考文献	238

第一部分

实验指导

第一章

实验室规则与安全

第一节 实验室规则

1. 请穿白色实验服进入实验室，严格遵守纪律，不迟到，不早退。关闭手机。书包、衣服等不要放在实验台上。

2. 实验前须预习实验指导，明确实验目的、原理、操作关键步骤及注意事项。实验时要严肃认真，仔细观察实验过程中出现的现象和结果并及时将实验结果如实记录下来，根据实验结果进行科学分析，按时将实验报告交给教师评阅。

3. 保持实验台整洁，试剂、仪器应整齐，按次序放置。实验完毕要按各类仪器的清洗方法和要求将仪器清洗干净。废液废纸倒入指定容器内。

4. 室内应保持肃静，不得吸烟、玩闹，不得随地吐痰，乱丢纸屑。

5. 爱护公物，节约水、电、试剂，遵守损坏仪器报告、登记、赔偿制度。贵重仪器要尽力爱护，使用前应熟悉使用方法，严格遵守操作规程，凡不熟悉操作方法的仪器不得随意动用。仪器发生故障，应立即关闭电源并报告老师，不得擅自拆修。

6. 要节约水电，一经用完随手关闭。

7. 实验完毕，将有关仪器和器材洗净归置好，值日生负责整个实验室的清洁和整理，台面、地面保持干净，试剂瓶要码放整齐，保持实验室整洁卫生。

第二节 生物化学实验室安全知识

在生物化学实验室学习与工作,经常与易燃易爆和有腐蚀性甚至毒性较强的化学药品接触,使用的器皿大多数是易碎的玻璃制品和陶瓷制品,实验中还经常用到高温电热设备和各种高、低压电源仪器,因此安全操作至关重要。

1. 安全用电

(1) 切忌超负荷使用电器设备,切忌用铁丝、铜丝代替易熔保险丝。实验室管理人员必须经常检查电线线路,一旦发现有绝缘胶皮老化等隐患要及时更换和维修。

(2) 要注意实验室电源电压、电流是否符合仪器的要求,必要时需使用稳压设备。

(3) 严格按照电器使用规程操作,不能随意拆卸、玩弄电器。

(4) 绝不可用湿手或在眼睛靠近电源开关时开关电器。应使用试电笔检查电器设备是否漏电,或用手背轻轻触及仪器表面。凡是漏电的仪器一律不能使用,严防触电。

(5) 若不慎触电应立即切断电路,关闭电源,用木棍将导线与受害者分开,并将受害者和土地分离。急救者手或脚必须绝缘,做好防止触电的安全措施。

2. 防止火灾

(1) 实验室配备一定数量的消防器材,并按消防规定保管使用。

(2) 安全用电,防止因电路短路、不安全使用电炉等不安全用电引发的火灾。

(3) 实验室内严禁吸烟。小心使用易燃易爆物品。冰箱内严禁存放可燃液体。

(4) 实验室内严禁贮存大量易燃物(如乙醚、丙酮、乙醇、苯和金属钠等)。少量的易燃物应置于远离热源和电源开关的地方,妥善保管。

(5) 易燃易爆物质的残渣或有机废液应收集在指定的容器内,严禁倒入污物桶或水槽中。

(6) 实验室一旦发生火灾,应保持镇静,切勿惊慌失措。首先应立即切断室内一切火源和电源。然后根据具体情况积极正确地进行抢救和灭火。

若酒精及其他可溶于水的液体着火,可用水灭火。

若乙醚、甲苯等有机溶剂着火,应用石棉布或沙土扑灭,严禁用水扑灭。

若导线着火,切勿用水及二氧化碳灭火器,应切断电源或用四氯化碳灭火器。

较大的着火事故应立即报警。

3. 避免灼伤和创伤

灼伤是指由于热力或化学物质作用于身体,引起局部组织损伤,并通过受损的皮肤、黏膜组织导致全身病理生理改变,有些化学物质还可以被创面吸收,引起全身中毒。浓酸、浓碱腐蚀性很强,必须极为小心地操作。用吸量管量取这些试剂及有毒物质时,必须使用洗耳球,严禁口吸。避免因火焰、高温、辐射、电击或腐蚀性物质而造成的伤害。使用玻璃、金属器材时注意防止割伤及机械创伤。

如果是氢氧化钠、氢氧化钾等强碱触及皮肤而引起灼伤,应先用大量自来水冲洗,再用5%硼酸

溶液或 2% 乙酸溶液涂洗。

如果强酸触及皮肤而致灼伤，应立即用大量自来水冲洗，再用 5% 氢氧化钠或 5% 氢氧化钾溶液洗涤。

如果酚触及皮肤引起灼伤，可用酒精洗涤。

如果玻璃割伤或其他机械损伤，首先必须检查伤口内有无玻璃或金属物等碎片，然后用硼酸水洗净，再涂擦碘伏，必要时用纱布包扎。若伤口较大或过深而大量出血，应迅速在伤口上部和下部扎紧血管止血，立即到医院诊治。

4. 预防生物危害

(1) 微生物、动物组织、细胞培养液、血液和分泌物等生物材料可能存在细菌和病毒感染的潜伏性危险，需谨慎、小心地处理各种生物材料，实验后用肥皂、洗涤剂或消毒液充分洗净双手。

(2) 若微生物作为实验材料，尤其要注意安全和清洁卫生。被污染的玻璃用具用后应立即浸泡在消毒液中，被污染的物品必须进行高压消毒或烧毁。

(3) 人的血液、血制品和组织可能含有隐藏的传染性物质，具有生物学危险，应注意安全操作。操作时要戴上一次性的手套和护目镜，穿上工作服，使用机械移液设备，在气流流动的橱内或者生物学安全柜内操作，预防发生烟雾并在处理废品前进行消毒。污染的塑料制品经高压消毒后再处置，污染的液体经高压消毒或用体积分数为 10% 的漂白剂至少处理 30min 后再扔掉。

(4) 紫外辐射具有诱变性和致癌性，应严格按照操作规程处理紫外光下的物品。

5. 常用化学试剂使用的安全注意事项

化学试剂分为相对无毒、中度毒性和剧毒几类，在处理剧毒药物时要特别谨慎小心。使用毒性物质、诱变剂和致癌物时，须严格按试剂瓶标签说明操作，安全称量、转移和保管。操作时应戴手套，必要时戴口罩或防毒面罩，并在通风橱中进行。沾有毒性、诱变剂、致癌物的容器应单独清洗、处理。有毒物质使用应符合实验室的规定，办理审批手续后领取，并妥善保管。

(1) 涉及浓酸和浓碱的操作应十分小心，易挥发的浓酸应在化学试剂通风橱中操作。

(2) 水银温度计、气量计等汞金属设备破损时，应立即采取措施回收汞，并在污染处撒上一层硫黄粉以防止汞蒸气中毒。

(3) 木瓜蛋白酶抑制剂、胃蛋白酶抑制剂对人体可能有害，避免吸入或触及皮肤。抑蛋白酶肽可能会引起过敏反应，触及皮肤可能会引起胃肠不良反应、肌肉疼痛、血压变化和支气管痉挛。

(程 凯)

第二章

生物化学实验技术

第一节 生物化学实验基本技术

【玻璃仪器的洗涤与清洗】

玻璃仪器的清洗方法很多, 需要根据实验的要求, 以及污物性质选用不同的清洁方法。

1. 新购玻璃器皿, 首先需要用肥皂水或洗衣粉水刷洗, 流水冲净后, 用 10% Na_2CO_3 煮沸。冲净, 浸泡于 1% ~ 2% HCl 中过夜。流水洗净, 蒸馏水少量多次冲洗, 干燥备用。

2. 一般非计量玻璃容器或粗容量容器, 如试管、烧杯、量筒等先用肥皂水, 再用自来水冲净, 最后用蒸馏水冲洗 2 ~ 3 次后, 倒置晾干。

3. 容量分析仪器, 如吸量管、滴定管、容量瓶等, 先用自来水冲洗, 沥干后, 在铬酸洗液中浸泡数小时。然后用自来水和蒸馏水冲洗干净, 干燥备用。

4. 比色杯, 用毕立即用自来水反复冲洗, 如有污物黏附于杯壁, 宜用盐酸或适当溶剂清洗。然后用自来水、蒸馏水冲洗干净。切忌用刷子、粗糙的布或滤纸等擦拭。洗净后, 倒置晾干备用。

【吸量管的种类和使用】

1. 吸量管的分类。常用的吸量管可以分为 3 类 (图 2-1)。

(1) 奥氏吸量管。供准确量取 0.5mL、1.0mL、2.0mL、3.0mL 液体所用。此种吸量管只有一个刻度, 当放出所量取的液体时, 管尖余留的液体必须吹入容器内。

(2) 移液管。常用来量取 1mL、2mL、5mL、10mL、25mL、50mL 的液体, 这种吸量管只有一个刻度, 放液时, 量取的液体自然流出后, 管尖需在容器内壁停留 15min, 注意管尖残留液体不要吹出。

(3) 刻度吸量管。供量取 10mL 以下任意体积的溶液。一般刻度包括尖端部分。将所量液体全部放出后, 还需要吹出残留于管尖的溶液。此类吸量管为“吹出式”, 吸量管上端标有“吹”字。未标“吹”字的吸量管, 则不必吹出管尖的残留液体。

2. 吸量管的使用。

(1) 选用原则。量取任意体积的液体时, 应选用取液量最接近的吸量管。如欲取 0.15mL 液体, 应选用 0.2mL 的刻度吸量管。同一定量试验中, 如欲加同种试剂于不



图 2-1 吸量管的正确握持及不同类型的吸量管

1、2 刻度吸量管; 3 移液管

同管中,并且取量不同时,应选择一支与最大取液量接近的刻度吸量管。如各试管应加的试剂量为0.30mL、0.50mL、0.70mL、0.90mL时,应选用一支1.0mL刻度吸量管。

(2) 吸量管的使用。使用吸量管时,用拇指和中指捏住吸量管上端,将管的尖部插入液体1~2cm,另一手持洗耳球捏扁排掉空气,将尖伸入吸量管上端,松左手,液体沿管上升。待吸入液体到所需刻度标线上1~2cm处(插入液面下的部分不可太深,也不可太浅,防止空气突然进入管内,将溶液吸入洗耳球内),用食指封闭上口将吸量管提出液面,把吸量管提到与眼睛同一水平线上,然后拇指和中指轻轻捻动吸量管,调节液面至需要的刻度处。将吸量管移到另一容器,尖端挨在容器壁,松开上口,使液体自由流出。最后再根据规定吹出或不吹出尖端的液。

【微量移液器的使用】

1. 微量移液器的结构。推动按钮内部的活塞分两档行程,第一档为吸液,第二档为放液,手感十分清楚(图2-2)。

2. 微量移液器的操作。

(1) 调整节轮至所需体积值。

(2) 套上吸头,左右旋紧。

(3) 垂直持微量移液器用大拇指按至第一档。

(4) 将吸头插入溶液,徐徐松开大拇指,使其复原。

(5) 将微量移液器移出液面,必要时可用纱布或滤纸拭去附于吸头表面的液体(注意:不要接触吸头孔口)。

(6) 排放时,重新将大拇指按下,至第一档后,继续按至第二档以排空液体。

(7) 用完移液器,请调至最大量程,悬挂放置。

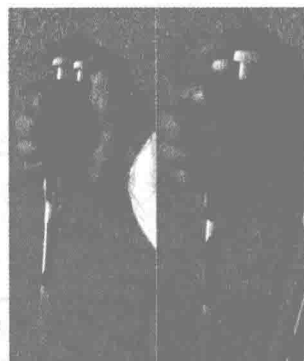


图2-2 微量移液器的握持

A 吸液; B 放液

【离心机的使用】

离心法是利用离心力将悬浮液中的悬浮微粒快速沉降,借以分离比重不同的各种物质成分的方法,是实验室常规采用的技术。

离心机种类很多,转速少于6000r/min的为低速离心机;转速介于6000r/min~30000r/min的为高速离心机;转速超过30000r/min的为超速离心机。根据离心机的用途不同,还可以将离心机分为分析离心机和制备离心机。其中制备离心技术又分为分级离心技术和密度梯度离心技术。用于生物大分子分离的,还有超速离心技术。低速离心机的使用如下。

1. 离心前检查

取出所有离心套管,起动空载的离心机,观察是否转动平稳;检查套管有无软垫,是否完好,内部有无异物;离心管与套管是否匹配。

2. 离心原则

配平:将一对离心管放入一对套管中,置于天平两侧,用滴管向较轻一侧的离心管与套管之间滴水至两侧平衡。

对称:将已平衡好的一对套管置于离心机中的对称位置。

3. 离心操作

(1) 对称放置配平的一对套管后,盖严离心机盖,开启电源。

(2) 调节转速调节钮, 逐渐增加转速至所需值, 当离心机转速达到要求时, 开始计时。

(3) 达到离心时间后, 缓慢将转速调回零。断开电源, 当离心机自然停止后, 取出离心管和离心套管。

(4) 倒去离心套管内的平衡用水, 倒置于干燥处晾干。

4. 注意事项

(1) 离心机的起动、停止都要慢, 否则离心管易破碎或液体从离心管中溅出。

(2) 离心过程中, 若听到特殊响声, 应立即停止离心, 检查离心管。若离心管已碎, 应清除并更换新管; 若管未碎, 应重新平衡。

(3) 离心血液等标本时, 离心完毕应等气溶胶沉积后方可打开离心机。

第二节 分光光度技术

光是由光子组成的, 光线就是高速向前运动的光子流, 光的本质是一种电磁波, 传播过程呈波动性质, 具有波长和频率的特征, 电磁波谱见表 2-1。

表 2-1

种 类	波 长
γ -射线	0.001 ~ 0.1nm
X-射线	0.1 ~ 10nm
远紫外线	10 ~ 200nm
紫外线	200 ~ 400nm
可见光	400 ~ 760nm
红外线	0.76 ~ 50 μ m
远红外线	50 ~ 1000 μ m
微波	0.1 ~ 100cm
无线电波	1 ~ 100m

人肉眼可见的光线称可见光, 波长范围在 400 ~ 760nm, 波长范围在 200 ~ 400nm 的为紫外光区(波长 < 400nm), 波长范围在 760 ~ 500000nm 的为红外区(波长 > 760nm)。可见光区的电磁波, 因波长不同而呈现不同的颜色, 这些不同颜色的电磁波称单色光, 单色光并非单一波长的光, 而是一定波长范围内的光。太阳及钨丝灯发出的白光, 是各种单色光的复合光, 利用棱镜可将白光分成按波长顺序排列的各种单色光, 即红、橙、黄、绿、青、蓝、紫等, 这就是光谱。

一切物质都会对某些波长的光进行吸收, 而物质对不同波长的射线, 表现为不同的吸收现象, 这一性质称为物质对光的选择性吸收。有色溶液之所以呈现不同颜色, 就是由于这种对光的选择性吸收。

某些无色物质虽对可见光无吸收作用，但也能选择性地吸收在可见光范围外的部分光能，即可吸收特定波长的紫外线或红外线。物质的吸收光谱与它们本身的分子结构有关，不同物质由于其分子结构的不同，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，在一定条件下，其吸收程度与该物质浓度成正比。故可利用各种物质的不同的吸收光谱特征及其强度对不同物质进行定性和定量的分析。吸收光谱的测定可用来检测各种不同的物质。

【分光光度法的原理】

分光光度法，常被用来测定溶液中存在的光吸收物质的浓度，其基本原理是根据 Lambert 和 Beer 定律。

(1) Lambert 定律。一束平行单色光垂直照射于一透明的理想容器时，由于容器中溶液吸收一部分光能，使光的强度减弱，若溶液的浓度不变，则溶液的厚度愈大，光线强度的减弱也愈显著。

(2) Beer 定律。当一束单色光通过一溶液时，光能被溶液吸收一部分，若溶液的厚度不变，则溶液浓度愈大，光吸收愈大，透射光强度的减弱也愈明显，光强度减弱的量与溶液浓度增加量成正比。

(3) Lambert-Beer 定律，又称吸收定律。

$$A = KCL \quad A = -\lg T$$

A 为吸光度（光密度、消光度）， C 为溶液的浓度， L 为溶液的厚度，其中 K 为常数，又称消光系数（extinction coefficient），表示物质对光线吸收的本领，其值因物质种类和光线波长而异。对于相同物质和相同波长的单色光其消光系数不变。

(4) 待测样品浓度计算。根据 Lambert-Beer 定律，如果单色光的波长、溶液的性质和溶液的厚度一定时，用一个已知浓度的标准液和一个未知浓度的待测液进行比色分析就可以得出下列运算公式：

$$A_{\text{标}} / KC_{\text{标}} L = A_{\text{样}} / KC_{\text{样}} L$$

由于是同一类物质及相同光径，故：

$$A_{\text{样}} / A_{\text{标}} = KC_{\text{样}} L / KC_{\text{标}} L = C_{\text{样}} / C_{\text{标}}$$

$$C_{\text{样}} = A_{\text{样}} / A_{\text{标}} \cdot C_{\text{标}}$$

式中： $C_{\text{样}}$ = 待测样品浓度， $A_{\text{样}}$ = 待测样品吸光度， $C_{\text{标}}$ = 标准溶液浓度， $A_{\text{标}}$ = 标准溶液吸光度。

根据上式可知，对于相同物质和相同波长的单色光（消光系数不变）来说，溶液的吸光度和溶液的浓度呈正比。故已知标准溶液的浓度及吸光度按公式可算出测试样品溶液的浓度。

【分光光度计的结构】

分光光度计的种类很多，其基本原理及结构基本相似，一般包括六个部件，如图 2-3 所示。



图 2-3 分光光度计结构

(1) 光源。分光光度计上常用的光源有卤钨灯和氢灯（或氘灯），前者适用于 340 ~ 900nm 范围的光源，后者适宜于 200 ~ 360nm 的紫外光区。为了使发出的光线稳定，光源的供电需要由稳压

电源供给。

(2) 单色器。单色器是将混合光波分解为单一波长光的装置,多用棱镜或光栅作为色散元件,它们能在较宽光谱范围内分离出相对纯波长的光线,通过此色散系统可根据需要选择一定波长范围的单色光,单色光的波长范围愈狭,仪器的敏感性愈高,测量的结果愈可靠。

(3) 狭缝。狭缝是由一对隔板在光通路上形成的缝隙,通过调节缝隙的大小和入射单色光的强度,使入射光形成平行光线,以适应检测器的需要。分光光度计的缝隙大小是可调的。

(4) 吸收池(或称比色杯、比色皿、比色池)。一般由玻璃或石英制成,在可见光范围内测量时,选用光学玻璃吸收池;在紫外线范围内测量时必须用石英池。注意保护比色杯的质量是取得良好分析结果的重要条件之一,吸收池上的指纹、油污或壁上的一些沉积物,都会影响其透光性,因此务必注意仔细操作和及时清洗并保持清洁。

(5) 光电倍增管。它们可将接收到的光能转变为电能,并应用高灵敏度放大装置,将弱电流放大,提高敏感度。通过测量所产生的电能,由电流计显示出电流的大小,在仪表上可直接读得 A 值, T 值。

(6) 显示器。是显示光电倍增管转换并放大的光电流的仪表,由对数转换装置加以转换,可直接读出 7% 、 A 和 C (浓度)值,准确度较高。

第三节 层析技术

层析技术是近代生物化学最常用的分离技术之一。层析系统包括两个相,一个称为固定相,另一个称为流动相。当流动相流过加有样品的固定相时,由于样品各组分的理化性质(吸附力、分子形状和大小、分子极性、分子亲和力、分配系数等)的差异,受固定相的阻力与流动相的推力的影响不同,因而各组分在固定相与流动相之间的分配也不同,从而使各组分以不同的速度移动而达到分离的目的。

固定相可以是固体也可以是液体,但这个液体必须附载在某个固体物质上,该物质称载体或担体(Support)。同样流动相可以是液体也可以是气体。

【分类】

1. 按层析原理分类

(1) 吸附层析(Adsorption Chromatography)。固定相是固体吸附剂,利用各组分在吸附剂表面吸附能力的差别而分离。

(2) 分配层析(Partition Chromatography)。固定相为液体,利用各组分在两液相中分配系数的差别或溶解度不同而使物质分离。

(3) 离子交换层析(Ion Exchanger Chromatography)。固定相为离子交换剂,利用各组分对离子交换剂的亲和力不同而进行分离。

(4) 凝胶层析(Gel Chromatography)。固定相为多孔凝胶,利用各组分在凝胶上受阻滞的程度不同而进行分离。

(5) 亲和层析 (Affinity Chromatography)。根据生物特异性吸附进行分离, 固定相只能和一种待分离组分有高度特异性的亲和能力者结合, 而与无结合能力的其他组分分离。

2. 按操作方式不同分类

(1) 纸层析 (Paper Chromatography)。以滤纸作为液体的载体, 点样后, 用流动相展开, 以达到组分分离目的。

(2) 薄层层析 (Thin Layer Chromatography)。以一定颗粒度的不溶性物质, 均匀涂铺在薄板上, 点样后, 用流动相展开, 使组分达到分离。

(3) 柱层析 (Column Chromatography)。将固定相装柱后, 使样品沿一个方向移动, 以达到分离目的。

3. 几种层析法

(1) 纸层析。用滤纸作为支持物的层析法, 称为纸层析。纸层析结果的好坏除了与选用展开剂的种类、实验中的点样量多少、点样时是否扩散和实验条件是否稳定有关外, 还与所用层析滤纸的质量好坏密切相关。对层析用滤纸的要求是: 质地均匀、厚薄均一、机械强度好、平整、无折痕、无明显纵向和横向纸纹等。由于纸层析是以滤纸作为惰性支持物。滤纸纤维与水有较强的亲和力, 能吸收 20% ~ 22% 的水, 其中部分水与纤维素羟基以氢键形式存在, 而滤纸纤维与有机溶剂的亲和力很小, 所以滤纸的结合水为固定相, 以水饱和的有机溶剂为流动相。当流动相沿滤纸经过样品点时, 样品点上的溶质在水和有机相之间不断进行溶液分配, 各种组分按其各自的分配系数进行不断分配, 从而使物质得到分离和纯化。溶质在纸上的移动速度可用迁移率 R_f 值表示:

$$R_f = \frac{\text{色斑中心至点样原点中心的距离}}{\text{溶剂前缘至点样原点中心的距离}}$$

可以根据测出的 R_f 值来判断层析分离的各种物质, 当与标准品在同一标准条件下测得 R_f 值进行对照, 即可确定该层析物质。

影响 R_f 值的因素有很多, 除被分离组分的化学结构、样品和溶剂的 pH 值、层析中温度等外, 流动相 (展开剂) 的极性也是一个重要因素。展开剂极性大, 则极性大的物质有较大 R_f 值, 而极性小的物质 R_f 值亦小, 反之亦然。常用流动相的极性大小依次排列如下:

水 > 甲醇 > 乙醇 > 丙酮 > 正丁醇 > 乙酸乙酯 > 氯仿 > 乙醚 > 甲苯 > 苯 > 四氯化碳 > 环己烷 > 石油醚

层析时, 流动相不应吸取滤纸中的水分, 否则改变分配平衡, 影响 R_f 值。所以多数采用水饱和的有机溶剂如水饱和的正丁醇。被分离物质的不同, 选择的流动相也不同。

(2) 薄层层析。薄层层析是利用玻璃板、塑料板、铝板、聚酰胺膜等作为固定相的载体, 在板上涂一薄层不溶性物质为固定相, 再把样品涂铺在薄层的一端, 然后用合适的溶剂作为流动相 (展开剂)。薄层层析因固定相涂布物质的不同, 可分成吸附薄层层析、离子交换薄层层析和分配薄层层析三种。通常说的薄层层析就是指吸附薄层层析。有关薄层层析的基本原理与 R_f 的计算与纸层析基本相似。现就薄层层析时应注意的事项简述如下:

1) 吸附剂的选择: 吸附剂的选择是否合适是吸附层析的关键。常用吸附剂有硅胶、氧化镁、