

全国高等院校医学实验教学计划教材

# 生物化学与分子生物学 实验技术

徐跃飞 孔 英 主编



科学出版社

全国高等院校医学实验教学规划教材

# 生物化学与分子生物学 实验技术

主 编 徐跃飞 孔 英  
副主编 田余祥 任 凤  
编 者 (以姓氏笔画为序)  
马克里 马郁芳 孔 英  
田余祥 任 凤 杨 帆  
杨雪松 张文利 张嘉宁  
林 琳 徐跃飞 高 颖  
樊建慧 燕 秋

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

本书针对生物化学教学及研究中涉及三个主要的生物大分子——蛋白质、酶和核酸,根据生物大分子的理化性质,结合实用的电泳技术、层析技术、离心技术、分析测定技术、分子克隆技术等,综合系统地介绍生物大分子的分离、纯化、含量测定、分析鉴定和应用,并结合教学中物质代谢、酶促反应动力学的系统分析,设计实验并融入相关实验技术和新近的研究进展,使学生在实验教学中掌握知识、技能的同时,体会对科研方法的选择与评价。

本书可作为高等医学院校本科生和研究生教材使用,也可供有关的教学及科技人员参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验技术 / 徐跃飞,孔英主编. —北京:科学出版社,2011.2

(全国高等院校医学实验教学规划教材)

ISBN 978-7-03-030148-2

I. 生… II. ①徐… ②孔… III. ①生物化学-实验-医学院校-教材  
②分子生物学-实验-医学院校-教材 IV. ①Q5-33 ②Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第015282号

责任编辑:周万灏 李国红 / 责任校对:宋玲玲

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄超

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>

铭浩彩色印装有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2011年2月第一版 开本:787×1092 1/16

2011年2月第一次印刷 印张:9

印数:1—5 000 字数:225 000

定价:19.80元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

# 前 言

生物化学与分子生物学是运用化学等学科原理,依托先进的技术、方法和仪器设备研究生物信息大分子结构、功能及其在遗传信息传递中的作用。生物化学不仅是生命科学的基础与核心,其原理和技术已经应用于医学、生物学、农学、药学、食品科学、环境科学等重要领域。

实验教学是生物化学与分子生物学基本的教学形式之一,鉴于本科生及研究生教学的需要,根据教学实际情况,我们编写了《生物化学与分子生物学实验技术》一书。本书的特点是:

(1) 较系统地介绍了生物化学与分子生物学的基本研究技术和方法,如分光光度法、层析技术、电泳技术、离心技术、基因重组、基因表达分析等。

(2) 既注重基础训练,又强调课程的综合性、实用性。

(3) 以综合性思路设计实验加强学生创新思维、科研能力的培养,其中所涉及各个实验项目又可以单独安排教学,以适合多层次学生的教学需要。

本书共分两部分。第一部分是生物化学与分子生物学常用分析技术,介绍了蛋白质分离纯化、分光光度法、层析、电泳、离心等生物化学实验技术的基本原理及分子生物学实验基本技术原理。第二部分是实验部分,主要介绍了蛋白质的分离提取及结构和性质的鉴定;酶的催化作用及酶反应动力学分析;物质代谢的分析方法;基因工程及基因表达分析。

全书分15章,共设实验项目33个。本书可供医学类高等院校本科生及研究生使用,也可供其他相关学科的研究工作者参考。热切欢迎使用本书的教师和同学给予批评指正,以利我们进一步修改。

作 者

2010年12月

# 目 录

## 第一部分 生物化学与分子生物学常用分析技术

第一章 分光光度法 .....	(1)	第四节 离心条件的确定 .....	(32)
第一节 基本原理 .....	(1)	第五章 蛋白质制备与分析技术 .....	(34)
第二节 分光光度法的应用 .....	(4)	第一节 概述 .....	(34)
第三节 分光光度计的结构原理 .....	(5)	第二节 选择材料及预处理 .....	(35)
第四节 常用的国产分光光度计的 使用 .....	(7)	第三节 细胞的破碎及细胞器的分离 .....	(35)
第二章 电泳技术 .....	(10)	第四节 蛋白质的提取、分离与纯化 .....	(37)
第一节 影响泳动率的因素 .....	(10)	第五节 蛋白质的定量及纯度分析 .....	(43)
第二节 电泳技术的种类 .....	(12)	第六节 蛋白质相对分子量测定 .....	(46)
第三节 染色方法 .....	(17)	第七节 蛋白质的浓缩、干燥及储存 .....	(46)
第三章 层析技术 .....	(19)	第六章 基因工程及基因表达分析技术 .....	(49)
第一节 吸附层析 .....	(19)	第一节 基因工程基本技术 .....	(49)
第二节 分配层析 .....	(20)	第二节 聚合酶链反应 .....	(54)
第三节 离子交换层析 .....	(21)	第三节 核酸分子杂交 .....	(58)
第四节 凝胶过滤 .....	(24)	第四节 DNA 测序技术 .....	(60)
第五节 亲和层析 .....	(25)		
第四章 离心技术 .....	(28)		
第一节 基本原理 .....	(28)		
第二节 离心机的种类与用途 .....	(29)		
第三节 离心分离方法的选择 .....	(30)		

## 第二部分 生物化学与分子生物学实验

第七章 蛋白质分离纯化与理化性质 分析 .....	(62)	实验六 酶的特异性及温度、pH 对 酶活性的影响 .....	(77)
实验一 蛋白质的定量测定 .....	(62)	实验七 碱性磷酸酶的提纯、比活性的 测定 .....	(80)
实验二 血清蛋白质的层析分离 .....	(64)	实验八 碱性磷酸酶的 $K_m$ 测定 .....	(83)
实验三 血清蛋白质的电泳分离 .....	(67)	实验九 磷酸盐对碱性磷酸酶的抑制 作用 .....	(85)
实验四 蛋白质理化性质分析 .....	(71)	实验十 乳酸脱氢酶同工酶分析 .....	(86)
实验五 固定化蛋白质的免疫生化 鉴定(Western 印迹) .....	(75)	第九章 物质代谢 .....	(88)
第八章 酶作用及酶反应动力学 .....	(77)		

实验十一 胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的影响 ..... (88)	实验二十四 目的 DNA 片段的分离和纯化 ..... (109)
实验十二 肝糖原的提取和定量 ... (89)	实验二十五 DNA 片段与载体的连接 ..... (110)
实验十三 血浆高密度脂蛋白-胆固醇含量的测定 ..... (91)	<b>第十三章 连接产物转化</b> ..... (113)
实验十四 磷脂的提取及其薄板层析 ..... (92)	实验二十六 感受态细菌的制备 (化学法) ..... (113)
实验十五 血清丙氨酸转氨酶活性的测定(改良赖氏法) ..... (94)	实验二十七 质粒 DNA 的转化 ... (114)
实验十六 纸层析法鉴定转氨酶的转氨基作用 ..... (96)	<b>第十四章 重组质粒筛选</b> ..... (115)
<b>第十章 外源基因的制备</b> ..... (99)	实验二十八 重组质粒的筛选 ... (115)
实验十七 真核生物基因组 DNA 的制备(苯酚法) ..... (99)	实验二十九 Southern blot(印迹) ... (116)
实验十八 人外周血白细胞 DNA 的制备 ..... (100)	<b>第十五章 基因表达分析</b> ..... (119)
实验十九 DNA 与 RNA 含量测定 ..... (100)	实验三十 外源基因的原核表达 ... (119)
实验二十 琼脂糖凝胶电泳分离 DNA ..... (101)	实验三十一 外源基因在真核生物中的表达 ..... (120)
实验二十一 聚合酶链反应(PCR)技术体外扩增 DNA ..... (102)	实验三十二 动物组织总 RNA 的提取 ..... (121)
<b>第十一章 载体选择与限制性内切酶酶切</b> ..... (104)	实验三十三 反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) ..... (122)
实验二十二 质粒 DNA 的制备 ... (104)	<b>附录</b> ..... (124)
实验二十三 限制性内切酶酶切 ..... (107)	附录一 硫酸铵饱和度计算表 ... (124)
<b>第十二章 外源基因与载体连接</b> ... (109)	附录二 常用缓冲溶液的配制 ... (125)
	附录三 常用蛋白质相对分子量及等电点 ..... (128)
	附录四 色谱法常用数据 ..... (131)
	附录五 离心转速和离心力的换算 ..... (133)
	附录六 实验数据和数据处理 ... (134)

# 第一部分 生物化学与分子生物学 常用分析技术

## 第一章 分光光度法

物质的分子或离子对光波有选择性的吸收作用。不同的物质由于其分子(或离子)结构不同,对光波的吸收能力也各不相同。利用物质对不同波长光波的吸收特性,对物质进行定性、定量及结构分析的方法,称为分光光度法。

分光光度法是在比色法的基础上发展起来的,两者所依据的原理基本相同。比色法仅限于在可见光区进行测定,而且谱带宽度范围偏大(通常是 40~120nm),灵敏度、精确度不高,使其应用受到一定限制。而分光光度法由于采用了更为先进的单色系统和光检测系统,不仅光谱带宽大大缩窄(可见区最大不超过 3~5nm,紫外区更是在 1nm 以下),而且可在可见光区和紫外区(合称紫外可见分光光度法)、红外区(红外分光光度法)进行测定,因此其在灵敏度、准确度、精密度及应用范围上都大大优于比色法,在医药、化工、冶金、环境保护、地质等诸多领域有着广泛的应用。本章重点介绍紫外可见分光光度法。

### 第一节 基本原理

#### 一、光波的基本知识

光线是高速运动的光子流,也是具有波长和频率特征的电磁波。光子的能量与频率成正比,与波长成反比。肉眼可见的光线称为可见光,只占电磁波谱的很窄一部分,不同波长的可见光具有不同的颜色。波长大于 760nm 的光线称为红外线。波长小于 400nm 的光线称为紫外线(表 1-1)。

表 1-1 各种光波的波长范围

光波	波长 $\lambda$	光波	波长 $\lambda$
紫外线	200~400nm	可见光	400~760nm
远紫外线	200~280nm	红光	780~640nm
中紫外线	290~320nm	橙色光	640~610nm
近紫外线	320~400nm	黄光	610~530nm
红外线	770nm 至 1000 $\mu$ m	绿光	530~505nm
近红外线	0.7~2 $\mu$ m	蓝靛色光	505~470nm
中红外线	3~5 $\mu$ m	紫光	470~380nm
远红外线	8~1000 $\mu$ m		

## 二、物质对光波的选择性吸收

### (一) 吸收光谱

光在与物质作用时,物质可对光产生不同程度的吸收。物质的分子或离子结构决定了物质在吸收光波时只能吸收某些特定波长的光,也就是说,物质对光的吸收具有选择性。例如,当一束白光(复合光)通过硫酸铜溶液时,水合铜离子中的电子选择性地吸收复合光中的黄光而发生跃迁,其他颜色的光不被吸收而透过溶液,故溶液呈现出黄色的互补色—蓝色。我们通常见到的有色物质,都是由于他们吸收了可见光中的部分光,而呈现出被吸收光颜色的互补色。不同分子中的电子跃迁需要的能量不一样,因此不同物质对光的吸收特性也各不相同。

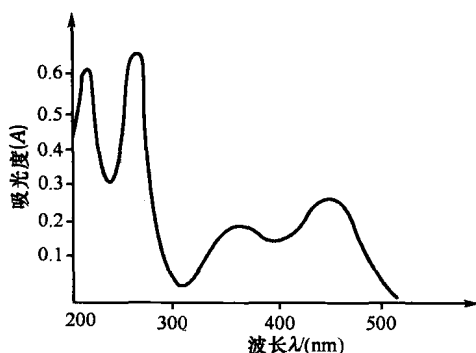


图 1-1 核黄素 200~500 波长的吸收光谱  
注:核黄素 22 $\mu\text{mol/L}$  溶于 0.1 $\text{mol/L}$  磷酸钠中,  
pH 为 7.06,吸收杯厚 1 $\text{cm}$

将不同波长的光连续地照射到一定浓度的样品溶液,便可得到与不同波长相对应的不同的吸收强度(吸光度)。如以波长( $\lambda$ )为横坐标,吸光度( $A$ )为纵坐标,就可绘出该样品的特异性吸收曲线,这种曲线体现了物质对不同波长的光的吸收能力,称为吸收光谱。每种物质都具有其特异的吸收光谱,据此可以用来鉴定各种不同的物质。例如核黄素之所以呈现黄色,是由于它仅吸收可见光中的蓝光范围,并测得其吸收峰在 450nm(如图 1-1 所示)。在紫外光范围它还有两个吸收峰,分别是 260nm 和 370nm。

### (二) 影响紫外-可见吸收光谱的因素

物质的吸收光谱与测定条件有密切的关系。测定条件(温度、溶剂极性、pH 等)不同,吸收光谱的形状、吸收峰的位置、吸收强度等都可能发生变化。

1. 温度 在室温范围内,温度对吸收光谱的影响不大。

2. 溶剂 在选择使用溶剂时,要注意如下几点:

(1) 同一种物质由于使用的溶剂不同,得到的紫外-可见吸收光谱的峰形和最大吸收位置可能不一样,所以在测定物质的吸收光谱时,一定要注明所使用的溶剂。

(2) 尽量选用低极性溶剂。

(3) 能很好地溶解待测样品,并且形成的溶液具有良好的化学和光化学稳定性。

(4) 溶剂本身在样品的吸收光谱区无明显吸收。

3. pH 溶液的酸碱度对待测样品、显色剂、二者形成的有色化合物及溶液体系中的其他试剂的解离均可产生显著的影响。解离程度不同,溶液的颜色也不尽相同,即可能会造成吸收光谱发生一定程度的位移。为尽可能减少这种影响,应该在实验前确定合适的 pH 范围,并选择适宜的缓冲体系。

## 三、郎伯-比尔定律(Lambert-Beer's Laws)

在实际应用中,分光光度法常被用来测定溶液中存在的某个光吸收物质的浓度,其理论依



据是郎伯-比尔(Lambert-Beer)定律。

### (一) 郎伯定律(Lambert's Law)

一束单色光在通过一溶液时,由于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,光强度的减弱也愈显著(如图 1-2 所示)。

若以  $I_0$  表示入射光强度,  $I$  表示光线通过溶液后的透过光强度,  $L$  表示溶液的厚度,

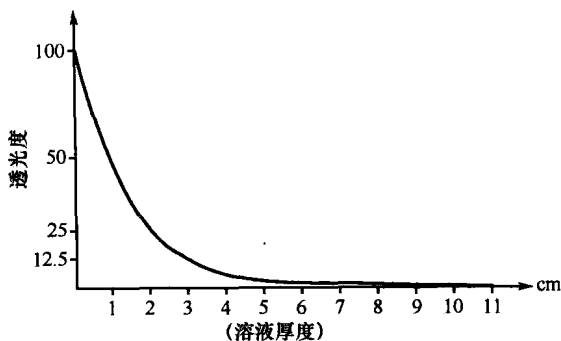


图 1-2 光吸收与溶液厚度的关系

$$\text{则} \quad \frac{-dI}{dL} \propto I, \quad -\frac{dI}{dL} = \alpha I \quad \text{或} \quad \frac{dI}{I} = -\alpha dL$$

$$\text{积分:} \quad \int \frac{dI}{I} = -\int \alpha dL$$

$$\text{得:} \quad \ln I = -\alpha L + C$$

当  $L=0$  时,  $I=I_0$ , 所以  $C=\ln I_0$

$$\text{即} \quad \ln I = -\alpha L + \ln I_0$$

$$\text{所以} \quad \ln \frac{I_0}{I} = \alpha L \quad \text{或} \quad \frac{I}{I_0} = e^{-\alpha L}$$

$$\text{或} \quad \lg \frac{I_0}{I} = K_1 L \quad (K_1 = \frac{\alpha}{2.303}) \quad \frac{I}{I_0} = 10^{-K_1 L} \quad (1)$$

$K_1$  是一常数,受光线波长、溶液性质和溶液浓度影响。从上述公式可知,透过溶液后,光线强度的减弱( $I/I_0$ )与溶液厚度( $L$ )呈指数函数关系。可见光强度的改变与溶液厚度并不呈简单的正比关系,这一关系就是郎伯定律。

### (二) 比尔定律(Beer's Law)

当一束单色光通过一溶液时,若溶液的厚度不变,则溶液浓度愈高,光线强度减弱也愈显著。与上定律相似,两者的关系可以表示如下:

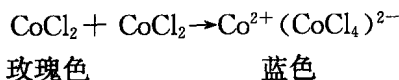
$$\lg \frac{I_0}{I} = K_2 C \quad \text{或} \quad \frac{I}{I_0} = 10^{-K_2 C} \quad (2)$$

式中  $C$  表示溶液的浓度,  $K_2$  是一常数,受光线波长、溶液性质和溶液厚度的影响。上述公式所表示的光线强度与溶液浓度的关系称为比尔定律。

虽然所有的溶液均符合郎伯定律,但并非所有的溶液都符合比尔定律。这是由于有些物质在不同浓度条件下其颜色可能发生改变,即在不同浓度条件下其吸收光的波长发生改变,常见原因如下:

(1) 有些有色物质在溶液中可能解离成相应的离子,离子的颜色与分子的颜色不同,造成对比尔定律的误差。

(2) 有些物质在较高浓度状态下可形成络合物,络合物使吸收光谱发生改变。例如:氯化钴在稀溶液中呈玫瑰色,而在浓溶液中呈蓝色。



(3) 氢离子浓度和电解质也可引起一些有色物质颜色的改变,这些改变也可能造成比

尔定律的误差。

### (三) 郎伯-比尔定律

将 Lambert 定律和 Beer 定律合并,即(1)和(2)式合并为:

$$\lg \frac{I_0}{I} = KCL \text{ 或 } \frac{I}{I_0} = 10^{-KCL}$$

一般将通过溶液后的光线强度( $I$ )和入射光( $I_0$ )的比值称为透光度(transmittance,  $T$ ),将 $-\lg I/I_0$ 用光密度(optical density, OD 或  $D$ )表示,以反映该溶液对光吸收的情况。有时也用吸光度(absorbance,  $A$ )表示。则它们之间的关系如下

$$A(D) = -\lg \frac{I}{I_0} = -\lg T = KCL \quad (3)$$

其中, $K$ 为常数,称为消光系数(extinction coefficient,符号  $E$ ),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。

## 第二节 分光光度法的应用

分光光度法以物质特异性的吸收光谱为检测基础,因此具有灵敏度高、选择性好、准确度高等优点,而且由于其分析成本低,操作简便、快速,现在已被广泛地应用于化工、冶金、地质、医学、食品、制药及环境监测等领域,是研究物质的成分、含量、结构、纯度及物质间相互作用的非常有效而便捷的手段之一。此外,紫外分光光度法还可作为红外(IR)、核磁共振(NMR)、质谱(MS)等方法的辅助手段,对有机物进行定量、定性及结构等方面的分析。现将分光光度法的应用做一简要介绍。

1. 定量分析测定物质的浓度 这是分光光度法最早期的应用之一,其基本原理是郎伯-比尔定律。根据郎伯-比尔定律,对于相同物质和相同波长的单色光来说,公式(3)中的消光系数不变,是个定值。而在实际工作中利用分光光度计测量吸光度时,所用比色杯的大小是一样的,因此公式(3)就变成了:

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{C_1}{C_2} \text{ 或 } C_1 = \frac{A_1}{A_2} \times C_2 \quad (4)$$

如果  $C_2$  为标准溶液的浓度,则可根据测得的吸光度值,按公式(4)求得待测溶液的浓度。

为简便起见,实际工作中常常不是每测一个待测样品都做一个标准管,而是事先测定一系列不同浓度的标准管,然后以吸光度对标准浓度作图,得到标准曲线,测得待测物质的吸光度后,便可从标准曲线上查到相应的浓度数值。

从公式(3)可知,若知道某待测物质的消光系数和溶液的厚度,也可以从吸光度推算出待测溶液的浓度。消光系数的常用表示方法有二:

(1) 百分消光系数( $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ ):浓度以百分浓度来表示的消光系数。百分消光系数等于浓度为 1%,液层厚度为 1cm 的吸光度值。

(2) 克分子消光系数( $\epsilon$ ):浓度以摩尔浓度来表示的消光系数。克分子消光系数等于溶液浓度为 1 个摩尔浓度,液层厚度为 1cm 的吸光度值。

用消光系数计算浓度的公式是:

$$C = \frac{A}{E_{1\%}^{1\text{cm}}} \text{ (浓度单位为 g/100ml)} \quad \text{或} \quad C = \frac{A}{\epsilon} \text{ (浓度单位为摩尔浓度)}$$

例:一蛋白质溶液在其吸收峰  $\lambda = 278\text{nm}$  处的吸光度  $A = 0.520$ ,吸收杯厚度为

1. 00cm, 已知  $E_{1\text{cm}}^{1\%} 278 = 5.10$ , 则此蛋白质溶液的浓度为

$$C = \frac{A}{E_{1\text{cm}}^{1\%}} = \frac{0.520}{5.10} = 0.102\%$$

2. 定性分析鉴定物质的属性 每一种化合物都有自己的特征光谱。测出未知物做吸收光谱, 即可以对该未知物做出定性鉴定, 即当某一未知物质的吸收光谱与某一已知物质的吸收光谱曲线形状一样时, 则很可能二者即为同一物质。如前文所述, 核黄素吸收峰在 450nm, 在紫外光范围它还有两个吸收峰, 分别是 260nm 和 370nm。如果某一样品具有这样的吸收光谱, 则可初步判定该物质为核黄素。分光光度法对复杂化合物的定性分析有一定的困难。

3. 纯度的鉴定 用紫外吸收光谱确定试样的纯度是比较方便的。如核酸的纯度分析中, 可用  $A_{260}/A_{280}$  的比值鉴定其纯度。

4. 结构分析 紫外-可见吸收光谱一般不用于化合物的结构分析, 但利用紫外吸收光谱鉴定化合物中的共轭结构和芳环结构还是有一定价值的。如果某化合物在近紫外区内无吸收, 说明该物质无共轭结构和芳香环结构。

5. 显色剂的选择及使用 对于紫外分光光度法而言, 一般无须特殊的试剂即可直接进行测定。但这种方法只适用于含共轭或芳环结构的有机物和少数无机阴离子(如  $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ ), 对于其他大多数物质来说此法则不适用。为此, 需要对待测样品进行显色。

显色反应所需要的试剂通常包括各种显色剂和增敏剂。常用的无机显色剂有硫氰酸盐、钼酸铵、过氧化氢等几种。有机显色剂则种类繁多, 有杂环偶氮类、三氮烯类、荧光酮、安替比林类、脘类、三苯甲烷碱性染料、环芳烃等几大类, 这些显色剂的显色反应已经涉及元素周期表中的绝大部分元素, 可用于许多阴阳离子及有机组分的直接或间接测定。增敏剂中应用得比较多的是各种表面活性剂、高分子聚合物、环糊精等试剂, 它们在改善光度分析性能, 提高灵敏度方面起重要作用。

有机物的显色反应涉及离子缔合反应、重氮-偶合反应、荷移配位反应、氧化还原反应、金属离子作显色剂的显色反应等几大类。在这些反应中, 只有针对性高、灵敏度好、反应速度快、生成物稳定、显色剂在测定波长处无明显吸收、反应条件易于控制且两种有色物最大吸收波长之差大于 60nm 的化学反应才能满足实验的要求。

### 第三节 分光光度计的结构原理

不论比色计(colorimeters)、光度计(photometers)还是分光光度计(spectrophotometers), 其基本结构原理都是相似的, 都由光源、单色光器、狭缝、吸收杯和检测器系统等部分组成(如图 1-3 所示)。

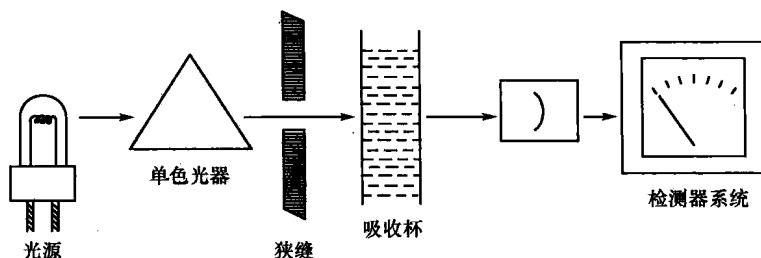


图 1-3 分光光度计结构原理

## 一、光源

一个好的光源要求具备发光强度高、光亮稳定、光谱范围广、有连续性和使用寿命长等特点。利用固体灯丝材料高温放热产生的辐射作为光源的是热辐射光源,如钨灯(tungsten lamp)、卤钨灯,它们适用于作为 340~1000nm 范围的光源,在可见区使用。卤钨灯的使用寿命及发光效率高于钨灯。气体放电光源是指在低压直流电条件下,氢或氖气放电所产生的连续辐射,一般为氢灯或氖灯,适用于做 200~360nm 的紫外分析的光源。此外,金属弧灯(各种汞灯)有时也用作分光光度计的光源。

## 二、单色光器

分光光度法测定某一物质的吸光度需要在某一特定波长下进行。单色光器的作用在于根据需要进行选择一定波长范围的单色光。在实际工作中欲选择出单个某波长的光线是困难的。所谓单色光是指在此波长有最大发射,而在相邻较长和较短波长范围内的发射能量较少而言。单色光的波长范围愈窄,仪器的敏感度愈高,测量的结果愈可靠。

最简单的单色光器是光电比色计上所采用的滤光片(一定颜色的玻璃片)。由于通过光线的光谱范围较宽,所以光电比色计的分辨效果较差,现在已被棱镜(prism)和衍射光栅

(diffraction grating)所取代。后两者是较好的单色光器,它们能在较宽光谱范围内分离出相对单一波长的光线(如图 1-4 所示)。

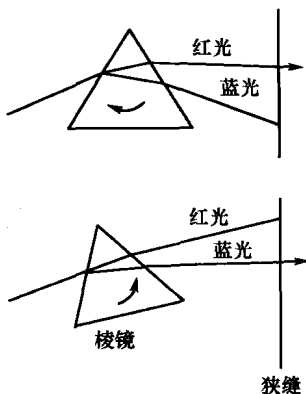


图 1-4 用棱镜产生单色光

1. 棱镜 光波通过棱镜时,不同波长的光折射率不同,因而能将不同波长的光分开。玻璃棱镜的色散能力强,但只能用于可见光区。石英棱镜工作波长范围为 185~4000nm,既可在紫外光区工作,也可用于可见光区和近红外光区。

2. 衍射光栅 在石英或玻璃表面上刻划许多平行线(每英寸约刻 15 000~30 000 条)。由于刻线处不透光,通过光的干涉和衍射使较长的光波偏折角度大,较短的光波偏折角度小,因而形成光谱。

## 三、狭缝

通过单色光器的发射光的强度可能过强也可能过弱不利于进一步检测。狭缝是由一对隔板在光通路上形成的狭缝。通过调节狭缝的大小来调节入射单色光强度并使入射光形成平行光线,以适应检测器的需要。光电比色计的狭缝是固定的,而光度计和分光光度计的狭缝大小是可调的。现在常用的分光光度计其狭缝的调节范围可低至 0~2nm,由于棱镜的色散能力随波长的不同而变化,较先进的分光光度计的狭缝宽度可随波长一起被调节。

## 四、样品池

样品池(即比色杯)是光度测量系统的最重要部分之一。在可见光范围内测量时选用玻璃比色杯,在紫外线范围内测量时要选用石英比色杯。注意保护比色杯的质量是取得好的分析结果的重要条件之一。不得用粗糙、坚硬物质接触比色杯;不能用手指握取比色杯的光滑面;用后要用水及时冲洗,不得残留测定液,尤其是蛋白质和核酸溶液。

## 五、检测器系统

有些金属在受到光的照射时会产生电流,光愈强电流愈大,这种现象叫做光电效应。分光光度计的检测系统(受光器)就是由具备光电效应的金属制成的光电元件。受光器主要有两种:光电池和光电管。常见的光电池是硒光电池,它产生的电流较强,可直接用微电流计测量。但硒光电池易产生疲劳现象,使光电流下降,必须在暗中放置一段时间才能恢复,因此不宜长时间连续使用,并且硒光电池对波长在 270nm 以下和 700nm 以上的光波不敏感,使其使用受到限制。

较精密的分光光度计都是采用真空光电管或光电倍增管作为受光器,并采用放大装置以提高灵敏度。虽然光谱范围狭窄的单色光的能量比范围宽的弱很多,但这种有放大线路的灵敏检测系统仍能准确地检测出来。

检测器产生的光电流信号通常转变成模拟的或者数字的结果输出,模拟输出装置包括电流表、电压表、记录器、示波器及与计算机联用等,数字输出则通过数字式电压表进行。

## 第四节 常用的国产分光光度计的使用

### 一、721 型分光光度计

721 型分光光度计是学生实验常用的一种分光光度计,用于样品在可见光范围内的定量、定性测定(如图 1-5,1-6 所示)。

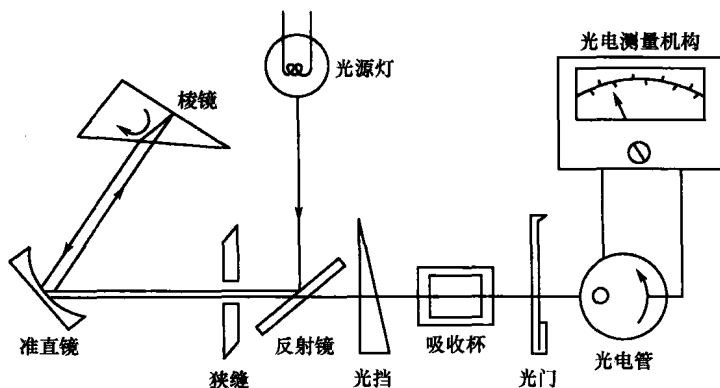


图 1-5 721 型分光光度计示意图

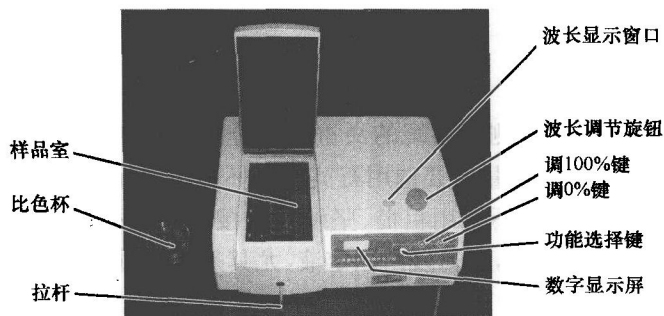


图 1-6 721 型分光光度计外观

### 1. 使用方法

- (1) 开启电源,指示灯亮,仪器预热 20 分钟,选择功能键于“透射比 T”。
- (2) 打开样品室盖(光门自动关闭),将装有溶液的比色杯放置于样品室的比色架中,注意要让光路通过比色杯的光玻璃面。
- (3) 旋动波长调节旋钮,把测试所需的波长调节至刻度线处。
- (4) 盖上样品室盖,将装有空白对照液的比色杯置于光路,按下“调 100%”按键,数字依次显示为“8L”,“100.0”。
- (5) 拉动拉杆,将被测溶液依次置于光路中,从液晶显示屏上直接读出被测溶液的透射比(T)值。
- (6) 吸光度 A 的测量:选择功能键于“吸光度 A”位置,参照(2)~(4)放置比色杯及调整仪器(注意按下“调 0%”按键时,数字依次显示为“8L”,“—0.00”),然后依次移入被测溶液,显示屏上显示的数值即为样品的吸光度 A 值。
- (7) 仪器在使用时,应常参照本操作方法中(4)调试仪器。
- (8) 每台仪器所配套的比色皿不能与其他仪器上的比色皿调换。
- (9) 如大幅度改变测试波长时,需等数分钟后才能正常工作,因波长由长波向短波或短波向长波移动时,光能量变化急剧,光电管受光后响应较慢,需一段光响应平衡时间。
- (10) 比色完毕后,关上电源开关,取出比色杯,将比色样品室盖好,清洗比色杯并分开倒置晾干。

### 2. 注意事项

- (1) 分光光度计属精密仪器,应精心爱护使用,要防震、防潮、防腐蚀。
- (2) 比色杯的好坏对吸光度读数的影响很大,要保持比色杯的清洁干净,保护光学面的透明度,不能手握光学面,也不能用粗糙的物体接触光学面,比色杯中的液体应适量(占比色杯体积的 2/3~3/4),不应过满,比色杯外壁的液体应用擦镜纸擦干,以防腐蚀仪器和影响读数。如比色液为强酸强碱,应尽快比色,以防破坏比色杯。
- (3) 比色时间应尽量缩短,以防光电系统疲劳。如需连续使用,中间应适当暂停使用,使之避光休息。

## 二、UV-754 型分光光度计

这是一种可供在紫外到红外区(200~1000nm)测量吸收光谱的较高级分光光度计。此

仪器的光学部分与 721 型分光光度计相类似,但它采用石英棱镜作为单色光器,有钨丝灯和氢弧灯两种光源。754 型分光光度计的电气部分较为复杂(如图 1-7 所示)。光电流经过放大线路加以放大后,此时得到的样品信号变为与透光率成比例的值。其后,调零、变换对数、浓度计算、打印数据等均由微处理机进行。

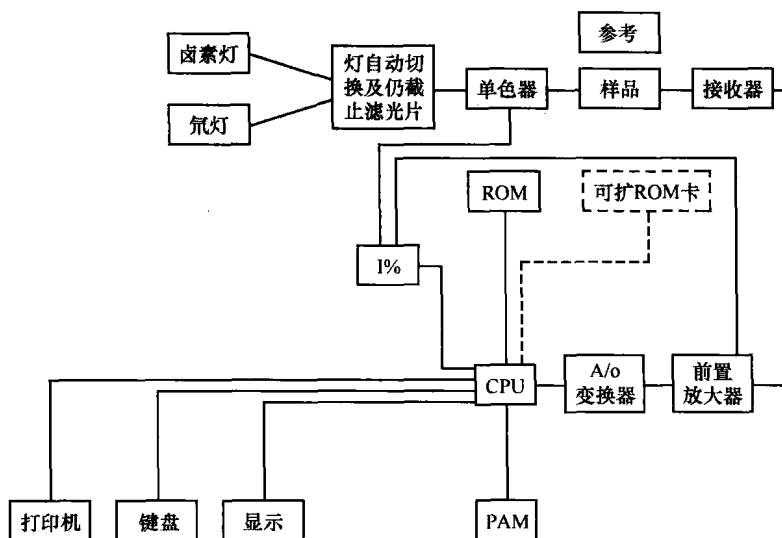


图 1-7 UV-754 电气系统

## 仪器的使用方法

### 1. 测试准备

- (1) 打开电源开关之前,检查一下样品室是否放置遮光物。
- (2) 样品室的试样槽置“参考(空白调零)”位置。
- (3) 接电源开关(如果波长工作在 200~360nm 时需按氘灯触发按钮)。显示器显示“754”后,数字显而易见:“100.0”,则表示仪器已通过自检程序。
- (4) 仪器预热三十分钟后开始测试。

### 2. 测试

- (1) 数显为 100.0 后,稳定 2~3 秒钟,即可把试样槽置“样品”位置进行测试。待第一个数据打印完毕后,再可将试样槽置第二个“样品”位置测试。
- (2) 每当需要调换波长时,必须把试样槽置“参考”位置,重新调满度。

### 【注意】

如果在设定测试波长时,需等待数分钟后才能工作,因这时光能量变化急剧,使光电管受光后响应缓慢,需一段光响应平衡时间。

(杨帆 马郁芳)

## 第二章 电泳技术

目前,电泳技术已被广泛应用于蛋白质、核酸和氨基酸等物质的分离和鉴定。

电泳(electrophoresis)是指溶液中带电粒子在外加电场的作用下,向相反电极方向移动的现象。电泳时不同的带电粒子在同一电场中泳动速度不同。电泳速度常用泳动率(mobility)来表示,泳动率也称迁移率,即带电粒子在单位电场强度下的泳动速度。

$$M = \frac{V}{E} \quad (1)$$

因 
$$V = \frac{L}{t} \quad (2)$$

和 
$$E = \frac{V}{d} \quad (3)$$

在式(2)中, $L$ 为泳动距离, $t$ 为通电时间;在式(3)中, $V$ 为加在支持物两端的实际电压, $d$ 为支持物的有效长度。

将式(2)和式(3)代入式(1)得: 
$$M = \frac{Ld}{Vt} \quad (4)$$

由式(4)可知,当 $d$ 、 $L$ 、 $V$ 及 $t$ 等数值为已知时(实验测得),可以计算求得泳动率 $M$ 的值。

### 第一节 影响泳动率的因素

根据物理学原理,带电粒子在电场中所受电场力( $F$ )等于电场强度与粒子所带电量的乘积

$$F = EQ \quad (5)$$

在式(5)中, $E$ 为电场强度, $Q$ 为粒子所带电量。

又据 Stokes 定律,一个球形分子在溶液中泳动时,受到的阻力( $F'$ )与球形分子的半径( $r$ )、溶液的黏度( $\eta$ )及泳动速度( $v$ )成正比,其比例系数为 $6\pi$ 。即:

$$F' = 6\pi r\eta v \quad (6)$$

当带电粒子所受的电场力 $F$ 与阻力 $F'$ 相等时,即 $F = F'$ ,就有

$$EQ = 6\pi r\eta v \quad (7)$$

式(7)两端同时除以 $6\pi r\eta E$ ,得:

$$\frac{V}{E} = \frac{Q}{6\pi r\eta} \quad (8)$$

由式(1)和式(8)可得

$$M = \frac{Q}{6\pi r\eta} \quad (9)$$

由式(9)可见,泳动率与球形分子所带电量成正比,与球形分子的大小及介质黏度成反比。此外泳动率还受其他外界因素的影响。



## 一、电泳介质 pH 的影响

对于蛋白质和氨基酸等两性分子,电泳介质的 pH 决定了它们所带净电荷性质和数量。pH 小于等电点,分子带正电荷,向负极泳动;如果 pH 大于等电点,分子带负电荷,向正极泳动。pH 偏离等电点越远,分子所带净电荷越多,其泳动速度越快。当缓冲液 pH 等于其等电点时,分子处于等电状态,净电荷为零,不移动。由于血清蛋白质的等电点多在 pH4~6 之间,因此,分离血清蛋白质常用 pH8.6 的巴比妥缓冲液或三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲液。

## 二、缓冲液的离子强度

离子强度是表示溶液中电荷数量的一种量度。离子强度等于溶液中各种离子的摩尔浓度与其价数平方之积总和的一半

$$I = 1/2 \sum mi Zi^2 \quad (10)$$

式中,  $mi$  系离子的摩尔浓度,  $Zi$  为相应离子的价数。

两个单价离子化合物(如 NaCl)离子强度在数值上等于它的摩尔浓度,如 0.05mol/L NaCl 溶液的离子强度

$$I = 1/2(0.05 \times 1^2 + 0.05 \times 1^2) = 0.05$$

两个二价化合物( $\text{CuSO}_4$ )的离子强度在数值上等于它的摩尔浓度的 4 倍,例如 0.05mol/L  $\text{CuSO}_4$  溶液的离子强度

$$I = 1/2(0.05 \times 2^2 + 0.05 \times 2^2) = 0.20$$

溶液中的离子浓度越大或离子的价数越高,离子强度就越大。对缓冲液来说,离子强度过低主要是影响缓冲液的缓冲容量,不易维持介质 pH 的恒定;离子强度过高,带电粒子的电泳速度减慢,这是由于带电的生物大分子吸附溶液中的反离子(如图 2-1 所示)形成反离子氛,犹如大气层包围地球。距离中心离子愈近,反离子密度愈大;反之,则密度愈小。根据反离子与中心离子结合的紧密程度不同,可将反离子层分为吸附层和扩散层。在电场的作用下,吸附层的反离子随中心离子一起泳动。离子强度越大,吸附层反离子越多,泳动粒子团的净电荷越少,泳动速度也就越慢。

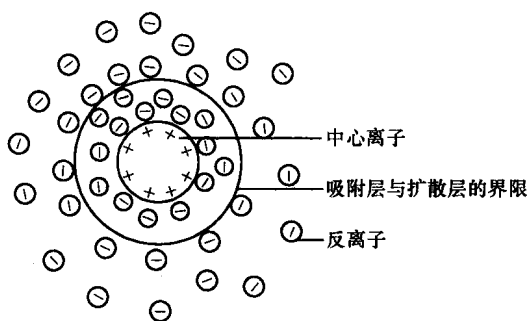


图 2-1 离子氛示意图

## 三、电 渗

在电场中,液体对于固体支持物的相对移动称为电渗(electro-osmosis)。电渗是由于支持物带有电荷所引起的。支持物上的电荷使介质中的水感应产生相反电荷。如纸上电泳所用的滤纸纤维素带有负电荷;琼脂电泳中,所用的琼脂由于大量硫酸根的存在也带有