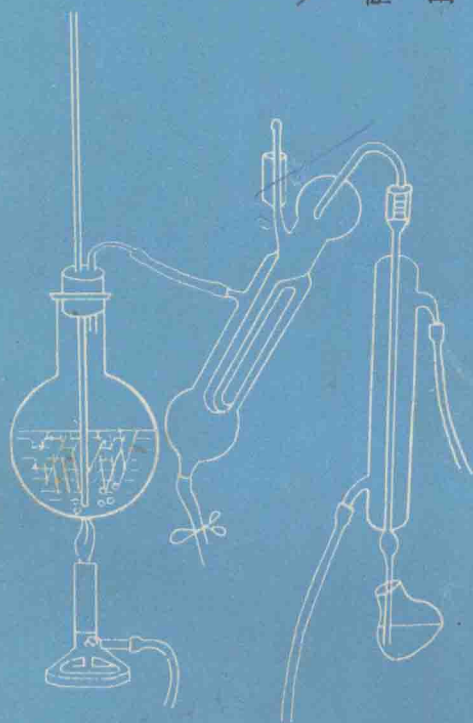


高等医药院校实验教材

生物化学实验指导

(修订本)

尹桂山 主编



河北科学技术出版社

生物化学实验指导

尹桂山 主编

河北科学技术出版社出版发行（石家庄市北马路45号）

河北医学院印刷厂印刷

787×1092毫米1/16 7.25印张 165000字 1993年1月 第2版
1993年1月第2次印刷 印数：10001—20000 定价：3.40元

ISBN7-5375-0234-X/Q·5

前 言

实验课教学是整个教学过程的重要组成部分，加强和改进实验课教学是提高教学质量的重要环节。为了提高生物化学实验课的教学质量，加强校际间的交流与合作，1989年由河北医学院、兰州医学院、内蒙古医学院、承德医学院和华北煤炭医学院的生物化学教师共同编写了《生物化学实验指导》一书。经过3年的试用情况表明，该书的内容和实验项目，基本上能反映教学大纲和五年制普通高等医药院校生物化学实验的基本要求。但随着时间的推移和科学的发展，有些内容已过时，有必要进行调整和修改。

参加本书编写和修订除原有5所院校外，又有张家口医学院和内蒙古蒙医学院。主要修改的内容有：删去了一些已过时或国家已明文淘汰的临床检验项目，相应增添了一些新的检测项目和技术；审定了各种计量单位，用法定计量单位取代了已废用的计量单位。

全书在内容上仍分为生物化学实验基本知识、生物化学实验基本操作、常用的生物化学实验技术、39个常用的实验项目和附录几个部分。内容较目前几个参编单位实际安排的实验项目略多些，各校可根据自己的实际情况加以选择。

本书除主要供五年制本科医学、儿科、口腔和卫生专业学生使用外，医学各专业的研究生和大专生也可使用。

书中的插图由河北医学院绘图室张萌老师协助绘制，河北医学院生化教研室的老师们在书的印刷、校对等方面做了大量工作。

由于我们的水平有限，缺点和错误在所难免，望同志们在使用过程中提出宝贵意见。

编者

1992.12月

目 录

生物化学实验基本知识

- 一、实验课的目的要求..... (1)
- 二、生化实验室规则..... (1)

生物化学实验某些基本操作

- 一、玻璃仪器的使用及清洁..... (2)
- 二、一般技术操作..... (4)
- 三、实验样品的制备..... (5)

常用的生物化学实验技术

- 一、电泳法..... (7)
- 二、层析法..... (11)
- 三、比色和分光分析法..... (18)
- 四、离心法..... (24)

实验内容

- 实验一 蛋白质的沉淀与凝固..... (27)
- 实验二 蛋白质等电点的测定..... (29)
- 实验三 紫外吸收法测定蛋白质含量..... (30)
- 实验四 双缩脲法测定蛋白质含量..... (31)
- 实验五 改良酚试剂法测定蛋白质含量..... (31)
- 实验六 微量凯氏定氮法..... (33)
- 实验七 血清 γ -球蛋白的分离、纯化及鉴定..... (36)
- 实验八 血清蛋白醋酸薄膜电泳..... (40)
- 实验九 血清蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳..... (41)
- 实验十 SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质分子量..... (43)
- 实验十一 离子交换层析分离混合氨基酸..... (47)
- 实验十二 凝胶过滤层析脱盐和分离蛋白质..... (48)
- 实验十三 乳酸脱氢酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳分离法..... (49)
- 实验十四 温度、pH、激动剂和抑制剂对酶活性的影响..... (51)
- 实验十五 底物浓度对酶促反应速度的影响..... (53)
- 实验十六 动物组织中核酸的提取和含量测定..... (58)
- 实验十七 酵母RNA的提取和鉴定..... (63)

实验十八	血糖的测定	(64)
实验十九	胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的影响	(68)
实验二十	血清胆固醇测定	(69)
实验二十一	甘油三酯的测定	(70)
实验二十二	血清脂蛋白琼脂糖电泳	(72)
实验二十三	脂类的薄层层析	(74)
实验二十四	生物氧化实验	(75)
实验二十五	线粒体的制备与P/O比值测定	(78)
实验二十六	谷氨酸的氧化脱氨基作用	(79)
实验二十七	血清尿素氮的测定	(82)
实验二十八	血清丙氨酸氨基转移酶测定	(83)
实验二十九	纸层析法鉴定转氨基作用	(85)
实验三十	钾钠测定	(87)
实验三十一	血清无机磷的测定	(90)
实验三十二	血清钙的测定	(91)
实验三十三	血清氯化物的测定	(93)
实验三十四	血浆CO ₂ 结合力测定(滴定法)	(94)
实验三十五	食物中维生素C的提取和定量	(95)
实验三十六	胡萝卜素的柱层析分离法	(97)
实验三十七	维生素B ₁ 的测定	(97)
实验三十八	维生素B ₂ 的测定	(100)
实验三十九	淀粉酶活性测定(碘—淀粉比色法)	(102)

附录

一、常用酸碱的比重和浓度	(104)
二、常用酸碱指示剂	(104)
三、常用缓冲液的配制	(105)
四、常用试剂配制公式	(107)
五、常用元素原子量原子价表	(108)

生物化学实验基本知识

一、实验课的目的要求

生物化学是一门实验性学科，它之所以能够迅速发展，主要原因就是由于生物化学实验技术不断进步和实验内容的深邃发展。因此，生物化学实验课是生物化学教学的重要组成部分，加强和改进实验课教学是提高教学质量的重要环节，通过生化实验课教学要达到以下 3 方面的教学目的：

1. 加深对生物化学基本理论的理解和掌握。
2. 掌握生物化学的基本实验方法和实验技术。
3. 培养学生严谨的科学态度和思维能力以及独立分析问题和解决问题的能力。

以往在教学过程中发现，部分学生对实验课重视不够，这主要是由于他们对实验课的性质及实验课的教学目的不够了解。

实践是检验真理的唯一标准。我们应合理安排实验课的课时比例，充实实验课的教学内容，改进实验课的教学方法，培养同学的动手能力，这样才能真正提高教学质量。

二、生化实验室规则

1. 课前要预习实验教材，了解实验目的和原理，熟悉操作规程。
2. 实验室严禁吸烟、饮食，要保持实验室安静、整洁。
3. 要爱护仪器，节约药品。第 1 次实验时要按仪器清单清点仪器，如有缺损应向准备室老师换取。清点完毕后签名，负责保管。在使用时如有破损，应填写破损单，经指导老师检查后到准备室换领，期终如数交还。如有损坏，按学校规定赔偿。

贵重仪器，如分光光度计、离心机等，使用前应熟悉使用方法，严禁随意开动。

4. 要保持实验台整洁，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。

固体废物如滤纸、棉花、血块等不要倒入水池，以免堵塞水管。一般废液可倒入水池冲走，但强酸强碱溶液必须用水大量稀释以免腐蚀水管。

5. 注意防火、防事故。使用乙醚、苯、乙醇等易燃有机溶剂时，须远离火源，不许直接在电炉、酒精灯上加热。如有火险发生应先关电源。有机溶剂着火时，勿用水浇泼，以免扩大燃烧面积，可用砂土或灭火器灭之。

凡强酸、强碱及有毒液体，勿用口吸，吸取此类物品的吸管等不准乱甩，以免伤人。

试管内容物加热时管口不要对着人。

6. 要节约水电，一经用完随手关闭水门、电门。

生物化学实验某些基本操作

一、玻璃仪器的使用及清洁

(一) 玻璃仪器的洗涤及干燥

1. 一般仪器：烧杯、试管、离心管等普通玻璃仪器，可直接用毛刷蘸肥皂或洗衣粉刷洗，然后用自来水冲洗，直至容器内不挂水珠即可。最后用少量蒸馏水冲洗内壁2~3次，倒置晾干即可。

2. 容量分析仪器：容量瓶、滴定管及吸管等容量仪器，用后自来水多次冲洗，如能清洁（壁不挂水珠），再用蒸馏水少量冲洗2~3次晾干即可备用。若仍不干净附有油污等，则须于干后放入铬酸洗液内浸泡数小时，然后倒净（或捞出）洗液，用自来水充分冲洗至水不显黄色后再冲几次，最后用少量蒸馏水冲洗2~3次晾干备用。

在做酶学实验时，对仪器的清洁要求更高，因如有极微量的污物（如重金属离子）即可导致整个实验失败。因此，必要时仪器经上述方法洗涤后，还需用稀盐酸或稀硝酸洗涤，以除去铬及其它金属离子，然后再用自来水、蒸馏水冲洗。生化实验室常用的洗液有以下几种：

(1) 铬酸洗液：为最常用的洗液，由重铬酸钾、粗硫酸及水配制而成，去污力强，清洗效果好。其配制方法有多种，可根据需要进行选择，常用的配方如下表。

重铬酸钾 (g)	100	60	100
水 (ml)	750	300	200
粗硫酸 (ml)	250	460	800
清洁性能	较弱	较强 (常用)	最强

配制方法为：先将重铬酸钾溶于水，再慢慢加入浓硫酸。因配制过程产生大量热，容器需放入冷水中，边加硫酸边搅动混合。由于产热量很大，使用玻璃容器有破裂的危险，所以最好用耐高温的陶瓷或耐酸的搪瓷容器。洗液可多次反复使用，如效力变弱，可加入少量重铬酸钾及浓硫酸继续使用，但如果变为绿色，则不宜再用。

(2) 100g/L 尿素液：为蛋白质良好溶剂，故适用于洗涤盛血的容器。

(3) 草酸盐液：用于清洗过锰酸钾的痕迹。

(4) 硝酸液：用 1 : 1 的硝酸水溶液，用于清洗微量滴定管。

(5) 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-Na₂) 液：50~100g/L 的 EDTA-Na₂ 液可用于洗涤器皿内无机盐类。

玻璃仪器的干燥方法可根据不同仪器的种类而定。一般地说洗净后的玻璃仪器，如不急用应倒放在晾架上令其自然干燥。若有急用可放在烘烤箱中烤干，但容量玻璃仪器，如容量瓶、吸量管、滴定管以及烧结、结构复杂的玻璃仪器等，严禁烘烤。此类仪器，如急用可采用水泵抽气法干燥。

(二) 常用玻璃仪器的使用方法

1. 吸量管：吸量管是用来测量一定容积的液体，并把它从一个器皿转移至另一个器皿中的量器。常用的吸量管有以下几种：

(1) 移液吸量管：移液吸量管是单标卸出吸量管，中间有一个膨大部分，为定量移出整量液体之用。有5ml、10ml、15ml、20ml、25ml、50ml及100ml等规格。其容量是根据液体自内流出之量来计算，卸放液体时，将管尖紧靠受器内壁，使液体自行流出，流完后，管尖在受器内壁上停留15~30秒即可，管尖残余液体不要吹出。

(2) 刻度吸量管：刻度吸量管是多刻度吸量管，有0.1ml、0.2ml、0.5ml、1.0ml、2.0ml、5.0ml、10.0ml等规格。吸量管刻度所标的数字有自上而下和自下而上两种，使用之前应仔细分辨。实验室所用之刻度吸管多属于刻度到尖端的吸管，所以要吹出尖端留存的液体。

(3) 奥氏吸管：在量取粘度较大的液体如血液、血清等，应当使用奥氏吸管。这种吸管也是单标的，并且在其下端有一个膨大部分。所以液体与吸管表面接触面积较小，当量取血液时，较他种吸管准确。奥氏吸管的容量包括遗留在尖端的液体，故在缓缓使液体流出后，再停留数秒钟，吹出最后一滴。在学生实验中常用的有1ml、2ml、5ml等规格。

吸量管的使用法：使用吸量管时，用拇指和中指靠近顶端部分。将管的下端插入液体里，用皮球吸入液体到需要刻度的标线上1~2cm处（插入液面下的部分不可太深，以免管的外壁沾附的溶液太多；也不可太浅，防止空气突然进入管内，将溶液吸入皮球内），将已充满液体的吸量管提出液面，用小片滤纸揩去管外沾附的溶液，把吸管提到与眼睛在同一水平线上。然后小心松开上口，使液体缓慢地调到需要的刻度处。将吸管移到另一容器，松开上口，按所需要液体容积缓缓自由流出。最后再根据规定吹出或者不吹出尖端的一滴。

2. 容量瓶及量筒：容量瓶是一个细长颈梨形的平底瓶，具有磨口塞，颈上有标线，表示在所示温度下（一般为20°C）当液体充满到标线时，液体体积恰好与瓶上所注明的体积相等。容量瓶有10ml、25ml、50ml、100ml、200ml、250ml、500ml、1000ml、2000ml等规格。容量瓶是装置型的定量容器，多用作稀释溶液或配制精确试剂。当将液体加至刻度后，须用瓶塞塞好，颠倒混匀数次方可使用。

容量瓶是较精确的定量容器，不得直接加热或烘烤，也不应将盛有溶液的容量瓶放入冰箱内。当配制溶液需要加热促其溶解时，必须在烧杯中加热溶解，并待溶液达到室温后，再定量的转入容量瓶内，然后稀释到刻度，并要注意摇匀。

当所量取的液体量要求不十分准确时，可使用量筒，因其较使用吸管或量瓶更为简便，量筒之底座及筒身是焊接一起的，因而不能量取过热液体，更不能直接加热，以防炸裂。

3. 滴定管：滴定管是供容量分析滴定之用，用带玻塞及橡皮管的两种类型。前者用以量酸，后者用以量碱。

滴定管有刻度较精细的微量滴定管，有1.0ml、2.0ml、5.0ml、10ml等规格。还有25ml、50ml、100ml等规格的常量滴定管。使用滴定管应该注意以下事项：

(1) 检查是否清洁干燥，是否漏水，玻塞是否滑润，如有漏水或转动不灵，应拆下活塞重新涂抹凡士林。涂抹前要将玻塞擦干，用手指沾少量凡士林在活塞两头各擦一薄层，将活塞插入槽内，然后向同一方向转动活塞，直到从外面看时，全部透明为止。油涂好后，在活塞的小头的槽上套一橡皮圈，以防活塞滑脱。

(2) 使用前必须认出每一格表示多少毫升。先用少量滴定液清洗滴定管2~3次，然后方可装液。装液体后，管内如有气泡必须排出。

(3) 滴定前先应读取起始点。滴定时，左手控制玻塞，右手持瓶，边滴边摇，密切注意被滴定溶液的颜色变化。

(4) 装置滴定管时，管身必须与地面垂直。读数时眼睛与溶液月形面下缘在同一水平线上，不要仰头或低头读数。

(5) 如用酸式滴定管装硷性溶液，滴定后应立即洗净，以免活塞粘连。

二、一般技术操作

1. 混匀法：欲使一化学反应充分进行，必须使反应体系内各种物质迅速地相互接触，因此除特别规定外，一般都需要将反应物彻底混匀。混匀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：手持容器作离心旋转，适用以未盛满液体的试管或小口器皿，如三角瓶等。

(2) 弹指混匀法：左手持试管使之直立，以右手食指轻击试管之下部，使管内溶液作旋转流动。

(3) 倒转混匀法：适用于有玻璃塞的瓶子，如容量瓶等。

(4) 弹动混匀法：以右手大拇指、食指、中指握住试管上部，将试管放平，于左手掌中弹动。

(5) 吸管混匀法：用吸管将溶液反复吸放数次，适用于量少而无沉淀的液体。

(6) 搅拌混匀法：适用于烧杯等大口容器所盛之溶液的混匀，一般在配制混合试剂时，用玻棒搅拌以助溶，或混匀大量的溶液。

2. 保温与加热：为使某一化学反应在一定温度下进行，常需要保温；为促进或停止化学反应，有时要加热。

(1) 保温：常用恒温箱或恒温水浴进行，后者的温度较前者稳定。

(2) 加热：加热常用两种方法，一是直接把试管、烧杯等器皿在酒精灯、电炉或煤气火焰上加热；二是在水浴中加热或煮沸，应根据实验的目的而定。

3. 过滤：过滤的目的是将沉淀与液体分开，可用滤纸、棉花、纱布等。生化实验中所进行的过滤，为了不改变溶液的浓度，一般不要用水湿润滤纸。过滤所用的滤纸常摺成多摺状，以增大过滤面积。当过滤难滤之物或为了加快速度，可采用减压抽滤法。实验室中有时用离心法代替过滤。

三、实验样品的制备

在生物化学实验中，无论是分析组织中各种物质的含量，还是研究组织中物质代谢的过程，皆需利用特定的生物样品。为了达到一定的实验目的，往往需要将获得的样品预先做适当的处理。掌握实验样品的正确处理方法乃是做好生物化学实验的先决条件。

基础生物化学实验中，最常用的动物或人体样品是全血、血清、血浆及无蛋白血滤液。组织样品则常用肝、肾、胰、胃粘膜或肌肉等，实验时可制成组织匀浆、组织糜、组织切片或组织浸出液等形式。有关这些组织样品的制备方法，扼要介绍如下：

(一) 血液样品

全血：无论是收集动物还是人的血液，均应注意仪器的清洁与干燥，同时也要及时加入适当的抗凝剂以防止血液的凝固。一般在血液取出后，迅速盛于含有抗凝剂的器皿中，同时轻轻摇动，使血液与抗凝剂充分混合，以免形成小凝块。取得全血如不立即进行实验，应储存于冰箱内。

常用的抗凝剂有草酸盐、柠檬酸盐、氟化钠及肝素等，可视实验要求而选用。一般实验用草酸盐即可，但它不适用于血钙测定。氟化钠因兼有抗凝及抑制糖酵解之作用，故可用于血糖测定。但因其也能抑制脲酶，故用脲酶测定尿素时，则不能应用。肝素虽好，但价格较贵。

抗凝剂的用量不应过多，否则影响实验结果。通常每ml血液加1~2mg草酸盐即可，5mg柠檬酸钠或5~10mg氟化钠，肝素仅需要0.01~0.2mg，最好将抗凝剂制成适当浓度的水溶液，然后取0.5ml置于准备盛血的器皿内，再横放蒸干（肝素不宜超过30°C），则抗凝剂在器皿壁上形成一层薄膜，使用时较为方便，效果较满意。

血浆：上述抗凝的全血在离心机中离心，所得的上清液即为血浆。如需用血浆进行分析时，必须严格防止溶血，故采血时一切用具（注射器、针头、试管等）皆需清洁干燥，取出的血液也不能剧烈振摇。

血清：收集的血液不加抗凝剂，在室温下放5~20分钟即自行凝固。通常经3小时，血块收缩，析出清亮的血清。为了节省时间，必要时可离心分离血清。制备血清同样须防止溶血。

无蛋白血滤液：分析血液中许多成分时，也常除去蛋白质，制成无蛋白血滤液。如血液中的尿酸、肌酸等测定皆需先把血液制成无蛋白血滤液后，再进行分析测定。蛋白质沉淀剂如钨酸、三氯醋酸或氢氧化锌皆可用于制备无蛋白血滤液，可根据不同的需要而加以选择。

(二) 尿液样品

一般定性实验只需将尿收集一次即可，但一天之中各次排出尿液的成分随食物、饮水及一昼夜之内生理变化等的影响而有很大的差异，因此定量测定尿液中各种成分皆应收集24小时尿混合后取样。通常在早晨一定时间排出残余尿而弃去，以后每次尿皆收集

于清洁大玻瓶中，到第2天早晨同一时间收集最后一次尿即可，随即混合并用量筒量准其体积。

收集的尿液如不能立即进行实验，则应置于冷处保存。必要时可在收集尿时即于收集的玻瓶中加入防腐剂如甲苯、盐酸等，通常每L尿中约加入5ml甲苯或5ml盐酸即可。

如须收集动物尿液，可将动物置于代谢笼中，其排出之尿液经笼下漏斗流入瓶中而收集之。

(三) 组织样品

离体不久的组织，在适宜的温度及pH等条件下，可以进行一定程度的物质代谢。因此，在生物化学实验中，常利用离体组织，研究各种物质代谢的途径与酶系的作用，也可以从组织中提取各种代谢物质或酶进行研究。

但是各种组织器官离体过久后，都要发生变化。例如，组织中的某些酶在久置后发生变性而失活。有些组织成分如糖原、ATP等，甚至在动物死亡数分钟至十几分钟内，其含量即有明显的降低，因此，利用离体组织作代谢研究或作为提取材料时，都必须迅速将它取出，并尽快地进行提取或测定。一般采用断头法处死动物，放出血液，立即取出实验所需之脏器或组织，去除外层的脂肪及结缔组织后，用冰冷之生理盐水洗去血液，必要时也可用冰冷之生理盐水灌注脏器以洗去血液，再用滤纸吸干，即可作实验之用，取出的脏器或组织，可根据不同的目的，用以下不同的方法制成不同的组织样品。

组织糜：将组织用剪刀迅速剪碎，或用绞肉机绞成糜状即可。

组织匀浆：新鲜组织称取重量后剪碎，加入适当的匀浆制备液，用高速电动匀浆器将组织研磨成匀浆。为了降低研磨产生的热量，使组织及酶不致变性，制备匀浆时一般应将玻璃匀浆管插入冰水浴中，适当控制研磨的速度。

玻璃匀浆管是一种特制的厚壁毛玻璃管和一个一端带有磨砂玻璃杵头的研磨杆组成，规格大小不一，使用时可根据需要进行选择。

常用的生物化学实验技术

一、电泳法

带有电荷的粒子在电场中移动的现象称为电泳。1937年Tiselius利用U形玻管进行血清蛋白电泳。电泳后用光学系统使各种蛋白所形成界面折光率差别成为曲线图象，发现血清蛋白可分为4~5高峰，即白蛋白、 α (α_1 及 α_2)、 β 和 γ 球蛋白。使电泳技术开始用于临床。但这类电泳仪结构较复杂，价值昂贵，不宜推广。1948年Wieland和König等发明用滤纸作为支持物，使电泳技术大为简化，而且可使许多组份相互分离为区带，所以这类电泳被称为区带电泳，而Tiselius的电泳装置则称为界面自由电泳。纸上电泳发明后在临床上得到广泛的应用。1950年发展为琼脂凝胶电泳。1953年又发展为电泳后用免疫沉淀线检测的免疫电泳。1955年Smithies以淀粉胶为支持物进行血清蛋白电泳分离，结果可分为10余条区带，这是由于淀粉胶尚具有分子筛作用使蛋白质更有效地分离。1959年Davis发明聚丙烯酰胺凝胶电泳。聚丙烯酰胺具有耐热、透明、化学稳定等优点，并可以不同浓度的丙烯酰胺单体聚合为各种不同大小孔径的凝胶，即可制备各种不同孔径的分子筛，对于蛋白质和核酸等大分子物质的分离，提供了有用的技术。60年代以来又出现了等电聚焦电泳和等速电泳等新的电泳技术。本章主要介绍常用区带电泳的一般原理和它们的应用。

(一) 电泳的基本原理

设一带电粒子在电场中所受的力为 F ， F 的大小决定于粒子所带电荷 Q 和电场的强度 X ，即

$$F = QX$$

又按Stoke氏定律，一球形的粒子运动时所受的阻力 F' 与粒子运动的速度 v 、粒子的半径 r 、介质的粘度 η 的关系为：

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

当 $F = F'$ 时，即达到动态平衡时：

$$QX = 6\pi r \eta v$$

移项得

$$\frac{v}{X} = \frac{Q}{6\pi r \eta} \quad (1)$$

$\frac{v}{X}$ 表示单位电场强度时粒子运动的速度，称为迁移率 (mobility)，也称为电泳速度，以 u 表示，即

$$u = \frac{v}{X} = \frac{Q}{6\pi r \eta} \quad (2)$$

由(2)式可见粒子的迁移率在一定条件下决定于粒子本身的性质即其所带电荷及其大小和形状,即决定于粒子的电荷密度,两种不同的粒子(如两种蛋白质分子)一般有不同的迁移率。在具体实验中,移动速度 v 为单位时间 t (以秒计)内移动的距离 d (以 cm 计),即

$$v = \frac{d}{t}$$

又电场强度 X 为单位距离(以 cm 计)内电势差 E (以 V 计),即

$$X = E/l$$

以 $v = d/t$, $X = E/l$ 代入(2)式即得

$$u = \frac{v}{X} = \frac{d/t}{E/l} = \frac{dl}{Et}$$

所以迁移率的单位为 cm^2 , 秒^{-1} , V^{-1} 。

某物质(A)在电场中移动的距离为

$$d_A = u_A \frac{Et}{l}$$

另物质(B)的移动距离为

$$d_B = u_B \frac{Et}{l}$$

两物质移动距离的差为:

$$\Delta d = (d_A - d_B) = (u_A - u_B) \frac{Et}{l} \quad (3)$$

(3)式指出物质A、B能否分离决定于两者的迁移率。如两者的迁移率相同,则不能分离;如有差别则能分离。实验所选的条件如电压和电泳时间与两物质的分离距离成正比,电场的距离(如滤纸长度)与分离距离成反比。

(二) 几种影响电泳的因素

1. 电泳介质的 pH : 溶液的 pH 值决定了带电颗粒解离的程度,亦即决定颗粒所带电荷的多少。对蛋白质、氨基酸等两性电解质而言, pH 值离等电点越远,颗粒所带电荷越多,泳动速度越快,反之越慢。因此,当分离某一蛋白质混合物时,应选择一个合适 pH 值,使各种蛋白质所带的电荷量差别较大,以利于彼此分开。为了保证电泳过程中溶液的 pH 值恒定,必须采用缓冲溶液。

2. 缓冲液的离子强度: 离子强度如果过低,缓冲液的缓冲容量小,不易维持 pH 恒定,离子强度过高,则降低蛋白的带电量(压缩双电层降低Zeta电势),使电泳速度减慢,所以常用离子强度为 $0.02 \sim 0.2$ 之间。

溶液中离子强度的计算方法如下:

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2$$

I = 离子强度

C_i = 离子的克分子浓度

Z_i = 离子的价数

例 1. 两个单价离子化合物如 (NaCl) 的离子强度等于它的克分子浓度, 如 0.154mol/L NaCl 溶液的离子强度:

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

例 2. 两个两价离子化合物 (如 $ZnSO_4$) 的离子强度等于它的克分子浓度的 4 倍, 如 0.1mol/L $ZnSO_4$ 溶液的离子强度:

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

由上述例子中可以看出多价离子会使离子强度增高, 所以电泳缓冲液常用单价离子的化合物配制。

3. 电场强度: 实验所用电场强度对移动距离起正比作用。电场强度以每 1 厘米的电势差计算, 也称电势梯度。以滤纸电泳为例, 滤纸长 15cm, 两端电势差为 150V, 则电场强度为 $150/15 = 10V$ 。电场强度愈高, 则带电粒子的移动愈快, 但电压愈高, 电流也随之增高, 产生的热量也增加。所以在高压电泳 (电场强度大于 50V) 常需加用冷却装置, 否则热量可引起蛋白质等物质的变性而不能分离, 还因发热引起缓冲液中水分蒸发过多, 使支持物 (滤纸、薄膜或凝胶等) 上离子强度增加, 以及引起虹吸现象 (电泳槽内液被吸到支持物上) 等, 都会影响物质的分离。

4. 电渗: 在电场中, 液体对于固体的固定相的相对移动, 称为电渗 (图 1)。如滤纸中含有羟基而带负电荷, 与纸相接触的水溶液带正电荷, 液体便向负极移动。由于电渗现象往往与电泳同时存在, 所以带电粒子的移动距离也受电渗影响, 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。琼脂中含有琼脂果胶, 其中含有较多的硫酸根, 所以在琼脂电泳时电渗现象很明显, 许多球蛋白均向负极移动。除去了琼脂果胶后的琼脂糖用作凝胶电泳时, 电渗大为减弱。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的支持物的中心, 以观察电渗的方向和距离。

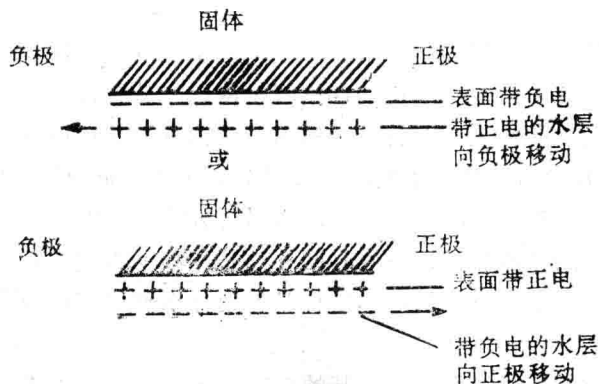


图1 电渗示意图

(三) 电泳的分类

目前所采用的电泳方法,大致可分为3类:显微电泳、自由界面电泳和区带电泳。区带电泳应用较广,区带电泳可分为以下几种类型:

1. 按支持物的物理性状不同,区带电泳可分为:

(1) 滤纸为支持物的纸电泳。

(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、琼脂糖、硅胶、淀粉胶、聚丙烯酰胺凝胶电泳。

(4) 缘线电泳:如尼龙丝、人造丝电泳。

2. 按支持物的装置形式不同,区带电泳可分为:

(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:比较少用,聚丙烯酰胺凝胶可做成垂直板式电泳。

(3) 垂直柱式电泳:聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳即属于此类。

(4) 连续流动电泳:首先应用于纸电泳,将滤纸垂直竖立,两边各放一电极,溶液自顶端向下流,与电泳方向垂直,以后有用淀粉、纤维素粉、玻璃粉等代替滤纸分离血清蛋白,分离量较大。

3. 按pH的连续性不同,区带电泳可分为:

(1) 连续pH电泳:即整个电泳过程中pH保持不变,常用的纸电泳、醋酸纤维素薄膜电泳等属于此类。

(2) 非连续pH电泳:缓冲液和电泳支持物间有不同的pH,如聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分离血清蛋白质时常用这种形式,它的优点是在不同pH区之间形成高的电位梯度区,使蛋白质移动加速压缩为一极狭的区带达到浓缩的作用。但聚丙烯酰胺凝胶电泳分离核酸时则一般采用连续pH装置。

近年来发明的等电聚焦电泳(Electrofocusing)可称为非连续pH电泳,它利用人工合成的两性电解质(商品名Ampholine,一类脂肪族多氨基多羧基化合物),在通电后形成一定的pH梯度,被分离的蛋白质停留在各自的等电点而形成分离区带,电极两端,一端是酸,另一端是碱。

等电聚焦电泳是60年代后期发展起来的一项新技术。其基本原理就是在电泳管或电泳支持物中加入两性载体溶液,经电场作用,可以建立从正极到负极逐步增加的pH梯度。当蛋白质样品进入此体系时,各种蛋白质经电泳分别移动或聚焦到其等电点相当的pH位置上,从而能使各种等电点不同的蛋白质分离出来,形成不同的蛋白质区带。

等电聚焦电泳的主要优点为:分辨率高,可以区分等电点仅相差0.02pH单位的蛋白质,避免了一般电泳的扩散影响,随着时间的延长和移动距离的增加,区带不是越来越宽,而是越来越窄,由于聚焦作用,不管样品加到什么部位都可以聚焦到等电点以及重复性好等。

常用的载体两性电解质是多氨基多羧基的脂肪族化合物,分子量300~1000,商品名Ampholine,是由多乙烯多胺与丙烯酸加合而成。

等速电泳(Isotachopheresis)也是属于非连续pH电泳,它的原理是将分离物质

夹在先行离子和随后离子之间，通电后被分离物质的电泳速度相同，所以叫等速电泳。近年发明的塑料细管等速电泳仪，可以进行纳克量物质的分离，该仪器采用数千伏的高电压，几分钟内即完成分离，用自动记录仪进行检测，它的出现是电泳技术的革新。

(四) 电泳技术的应用

电泳技术主要用于分离各种有机物（如氨基酸、多肽、蛋白质、酶、脂类、核苷、核苷酸、核酸等）和无机盐。也可用于分析某种物质纯度，还可用于分子量的测定。电泳技术与其他分离技术（如层析法）结合，可用于蛋白质结构的分析，“指纹法”就是电泳法与层析法的结合产物。用免疫原理测试电泳结果，提高了对蛋白质的鉴别能力。电泳与酶学技术结合发现了同工酶，对于酶的催化和调节功能有了更深入的了解，所以电泳技术是医学科学中的重要研究技术。

二、层析法

层析法 (Chromatography) 是利用混合物各组分物理化学性质(如溶解度、吸附能力、电荷和分子量等)的差别，使各组分在支持物上集中分布在不同区域，借此将各组分分离。

层析系统分为两个相，一个称为固定相，另一个称为流动相。由于各组分受固定相的阻力和受流动相的推力影响不同，各组分移动速度也各异，从而使各组分得以分离。此法首先用于有色物质的分离，故又称色层分析法。

层析法是近代生物化学最常用的分析法之一，此法可以分离性质极为相似，而用一般化学方法难以分离的各种化合物，如各种氨基酸、核苷酸、糖、蛋白质等。

层析法有多种类型，根据所用两相组分及操作方式不同可分以下几类，见下表。

固定相	流动相	操作方式	名称
固体 { 吸附剂 离子交换剂	液体	柱型	吸附层析 离子交换层析
固体	液体	薄层	吸附薄层层析
液体	液体	柱型	分配层析
液体	液体	薄层	分配糖层层析
液体	液体	纸	纸层析
固体	气体	柱型	气体吸附层析
液体	气体	柱型	气体分配层析

此外，还有凝胶层析，是60年代在色层分析技术基础上发展起来的一种“分子筛”分离法，它是利用物质分子的大小不同而得到分离的方法，现在已成为分离纯化大分子物质如蛋白质、核酸等广泛采用的技术。

下面对较常用的吸附层析、分配层析、离子交换层析、凝胶层析和亲和层析加以讨论。

(一) 吸附层析

某种物质如氧化铝、硅胶等具有吸附其他一些物质的性质。而且对各种被吸附物质的吸附能力不同，利用这种差异可将混合物分离。吸附力的强弱，除与吸附剂本身的性质有关外，也与被吸附之物质有关。吸附层析根据操作方式的不同，分柱层析与薄层层析两种。

1. 柱层析：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，如图2中的(1)。然后在柱顶部加入要分离的样品溶液，如图2中的(2)。假如样品内含两种成分A与B，则二者被吸附在柱上端，形成色圈如图2中的(3)。样品溶液全部流入吸附柱中之后，接着就加入合适的溶剂洗脱，A与B也就随着溶剂的向下流动而移动，最后分离情况如图2所示。

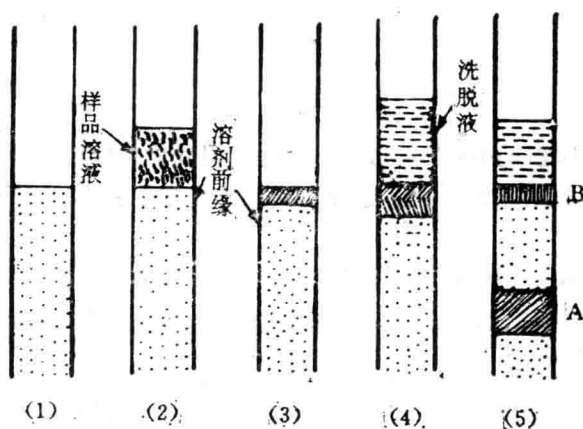


图2 二元混合物的柱层析示意图

在洗脱过程中，管内连续发生溶解、吸附、再溶解、再吸附的现象。例如，被吸附的A粒子被溶解（解吸作用）随溶剂下移，但遇到新的吸附剂，又将A吸附，随后，新溶剂又使A溶解下移。按照同样道理，由于溶剂与吸附剂对A与B的溶解力与吸附力不完全相同，A与B移动的距离也不同，经过一定时间，如此反复地溶解与吸附，而形成两个环带，每一环带是一种纯物质。如A与B有颜色，就可看到色层；如样品无色，可用其它方法使之显色。为了进一步鉴定，可将吸附柱从管中顶出来，用刀将各色层切开，然后分别洗脱。现在多采用溶剂洗脱法，即连续加入溶剂，连续分段收集洗脱剂，直到各成分顺序全部从柱中洗出为止。

最常用的吸附剂是硅胶和氧化铝。硅胶的吸附能力和含水量关系极大，硅胶吸水后，吸附能力下降。

一般讲，非极性的与极性不强的有机物如甘油酯、磷脂、胆固醇等的分离，用这种方法最合适。

2. 薄层层析法：薄层层析法是将吸附剂在玻璃板上均匀地铺成薄层，把要分析的样品点加到薄层上，然后用适当的溶剂展开，而达到分离、鉴定的目的。因为层析是在薄板上进行，故称它为薄层层析。其优点是：设备简单，操作容易；层析展开时间