

高等院校医学实验教学系列改革教材

生物化学 与 分子生物学实验

主 编 ● 宋海星 王 丹
副主编 ● 蒲铃铃 尹小菲



西南交通大学出版社

高等院校医学实验教学系列改革教材

生物化学与分子生物学实验

主 编 宋海星 王 丹
副主编 蒲铃铃 尹小菲
编 委 曾莉萍 程 琳
杨 菁 饶 磊
刘 锐（四川大学）

西南交通大学出版社
· 成都 ·

图书在版编目 (C I P) 数据

生物化学与分子生物学实验 / 宋海星, 王丹主编
—成都: 西南交通大学出版社, 2021.8
ISBN 978-7-5643-8200-1

I. ①生… II. ①宋… ②王… III. ①生物化学-实验-高等学校-教材②分子生物学-实验-高等学校-教材 IV. ①Q5-33②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2021) 第 171444 号

Shengwu Huaxue yu Fenzi Shengwuxue Shiyān

生物化学与分子生物学实验

主编 宋海星 王丹

责任编辑 罗在伟

封面设计 何东琳设计工作室

出版发行 西南交通大学出版社
(四川省成都市金牛区二环路北一段 111 号
西南交通大学创新大厦 21 楼)

邮政编码 610031

发行部电话 028-87600564 028-87600533

网址 <http://www.xnjdcbs.com>

印刷 成都中永印务有限责任公司

成品尺寸 185 mm × 260 mm

印张 18

字数 448 千

版次 2021 年 8 月第 1 版

印次 2021 年 8 月第 1 次

定价 48.00 元

书号 ISBN 978-7-5643-8200-1

图书如有印装质量问题 本社负责退换

版权所有 盗版必究 举报电话: 028-87600562

前言

PREFACE

“生物化学与分子生物学实验”课程经过多年的改革和完善，充分体现出实验技术在生物化学与分子生物学中的重要地位和作用。以往实验项目常附属理论课程之后，作为知识补充和实践学习，在教学过程也经常出现实验相关知识在理论课程教学中相对独立或涉及很少，以及实验教学因学时有限，没有充足的时间讲授相关理论内容等情况。生物化学与分子生物学实验技术具有完整而系统的知识体系，实验理论详尽充分，可以构成独立设置的课程，以便于学生进行实验技术的系统培训。本书内容按实验不同层面类别分列于 4 篇中，从基本实验操作到综合设计性实验延伸，可供不同条件的学校选做，特别是一些实验设备和经费有限的院校，可以让学生做一些基本实验。同时添加了生物化学与分子生物学常用软件和相关网站介绍，通过教师的讲授和演示，借助微课视频和网络等手段，可以提高实验技术的教学效果。书中一些难度较大的实验，可供教学条件较好的院校选做，也为学校条件的改善和学科的发展留出了适当的余地。希望本书的出版，能够促进生物化学与分子生物学实验独立设课的进程，能够有利于提高学生的技术水平和创新能力，也希望本书的出版能进一步推广“讲做结合”的教学模式，从而大幅提高生物化学与分子生物学实验教学水平。

本书将生物化学与分子生物学实验理论与技术融为一体，涉及有机化学、物理化学、生物化学以及分子生物学等多门学科，故仅是生物化学与分子生物学理论难以支撑，特别是实验中各实验试剂的作用及功能，质与量对实验的影响等方面，以往教学中往往有所偏缺，因此对于实验本身的原理及实验相关理论，本书进行了补充和完善，有利于提高教学效率。另外，由于不少院校相关课程学时较少，附属实验项目和时间更为简略，因此本书作为独立系统的一门课程引导教材，对于单独开设实验课程具有一定支撑意义，将生物化学与分子生物学实验作为一门单独的课来开设，对于促进学生培养动手能力、加深理论知识掌握，显然是有利的。

本书力求全面系统、深入浅出、注重实用，技术原理的叙述避免与理论课重复，对于每一种生物大分子都从定量到定性进行实验讲解和操作，在第 4 篇中注重综合设计性实验思维和技能的培养，提高学生对理论和实验的掌握能力。同时补充部分最新实验技术，如生物芯片和蛋白质组学涉及的相关部分实验，以增加学生对前沿知识领域的了解和掌握。

本书适合作为本科生或硕士研究生实验技术课的教材，也可供有关科技人员参考。

由于作者水平有限，本书难免存在疏漏和不足之处，恳请有关专家和广大读者批评指正。

编者

2021 年 5 月

目 录

CONTENTS

第一篇 常用实验仪器及实验技术

第一章 常用实验技术原理及操作	2
第一节 层析技术	2
第二节 分光光度技术	6
第三节 离心技术	9
第四节 透析超滤沉淀法	12
第五节 电泳技术	17
第二章 常用实验仪器的工作原理及操作	21
第一节 分光光度计的使用	21
第二节 离心机的使用	26
第三节 电泳仪的使用	31
第四节 PCR 仪的使用	37
第五节 移液器的使用	41

第二篇 生物化学实验

第三章 糖分子	46
第一节 糖的分子结构	47
第二节 糖分子的理化性质	48
第三节 实验内容	49
第四章 脂分子	62
第一节 血脂的组成和理化特性	62
第二节 脂类的氧化分解	63
第三节 实验内容	65

第五章 酶分子	77
第一节 酶的分子结构	77
第二节 酶的理化性质	78
第三节 影响酶活性的因素	81
第四节 实验内容	83
第六章 氨基酸分子	102
第一节 氨基酸的分子结构	102
第二节 氨基酸的理化性质	102
第三节 实验内容	106
第七章 蛋白质化学	110
第一节 蛋白质物理化学性质	110
第二节 蛋白质的分离纯化	114
第三节 实验内容	121
第八章 核酸分子	145
第一节 核酸的理化性质	145
第二节 实验内容	148

第三篇 分子生物学实验

第九章 基因工程原理与技术	163
第一节 基因工程实验策略	163
第二节 基因工程实验技术	164
第三节 实验内容	172

第四篇 探索与拓展实验

第十章 蛋白质组学实验	188
第一节 蛋白组学研究策略和内容	188
第二节 蛋白质组学研究技术	191
第三节 蛋白质组学基本实验	195
第四节 蛋白质组数据处理	203
第五节 蛋白组实验数据库	203
第十一章 基因芯片实验	206
第一节 基因芯片实验原理	206
第二节 生物芯片实验方法	209

第三节	芯片扫描及数据处理	215
第十二章	探索性实验与实验设计	219
第一节	实验设计的选题	219
第二节	医学分子实验设计的原理与方法	221
第三节	数据的记录与处理	223
第四节	设计性实验的指导与考核	226
第五节	实验报告和论文的撰写	227
第六节	实验内容（综合性、探索性实验）	231
第五篇 生物信息与数据库的使用		
第十三章	生物医学文献数据库	248
第一节	中文文献数据库	248
第二节	外文文献数据库	254
第三节	部分常用专业网站	261
附 录	266
附录 A	实验室管理要求	266
附录 B	常见缓冲液和标准液的配制	270
附录 C	常见限制性核酸内切酶酶切位点	279
参考文献	280

第一篇

常用实验仪器及实验技术

第一节 层析技术

一、引言

层析法又称色层分析法或色谱法 (Chromatography), 是一种基于被分离物质的物理、化学及生物学特性的不同, 使它们在某种基质中移动速度不同而进行分离和分析的方法。例如: 我们利用物质在溶解度、吸附能力、立体化学特性及分子的大小、带电情况及离子交换、亲和力的大小及特异的生物学反应等方面的差异, 使其在流动相与固定相之间的分配系数 (或称分配常数) 不同, 达到彼此分离的目的。目前层析法已成为生物化学、分子生物学及其他学科领域有效的分离、分析工具之一。

二、层析的基本概念

(一) 固定相

固定相是层析的一个基质。它可以是固体物质 (如吸附剂, 凝胶, 离子交换剂等), 也可以是液体物质 (如固定在硅胶或纤维素上的溶液), 这些基质能与待分离的化合物进行可逆的吸附, 溶解, 交换等作用。它对层析的效果起着关键的作用。

(二) 流动相

在层析过程中, 推动固定相上待分离的物质朝着一个方向移动的液体、气体或超临界体等, 都称为流动相。柱层析中一般称为洗脱剂, 薄层层析时称为展层剂。它也是层析分离中的重要影响因素之一。

(三) 分配系数及迁移率 (或比移值)

分配系数是指在一定的条件下, 某种组分在固定相和流动相中含量 (浓度) 的比值, 常用 K 来表示。分配系数是层析中分离纯化物质的主要依据。

$$K=C_s/C_m \quad (1-1)$$

式中: C_s ——固定相中的浓度;

C_m ——流动相中的浓度。

迁移率 (或比移值) 是指在一定条件下, 在相同的时间内某一组分在固定相移动的距离

与流动相本身移动的距离之比值。常用 R_f 来表示。实验中我们还常用相对迁移率的概念。相对迁移率是指在一定条件下，在相同时间内，某一组分在固定相中移动的距离与某一标准物质在固定相中移动的距离之比值。它可以 ≤ 1 ，也可以 > 1 ，用 R_x 来表示。

不同物质的分配系数或迁移率是不同的。分配系数或迁移率的差异程度是决定几种物质采用层析方法能否分离的先决条件。很显然，差异越大，分离效果越理想。

分配系数主要与下列因素有关：被分离物质本身的性质；固定相和流动相的性质；层析柱的温度。对于温度的影响有下列关系式：

$$\ln K \sim (\Delta G^\circ / RT)$$

式中： K ——分配系数（或平衡常数）；

ΔG° ——标准自由能变化；

R ——气体常数；

T ——绝对温度。

这是层析分离的热力学基础。一般情况下，层析时组分的 ΔG° 为负值，则温度与分配系数成反比关系。通常温度上升 20°C ， K 值下降一半，它将导致组分移动速率增加。这也是为什么在层析时最好采用恒温柱的原因。有时对于 K 值相近的不同物质，可通过改变温度的方法，增大 K 值之间的差异，达到分离的目的。

三、层析的基本理论

对于一个层析柱来说，可作如下基本假设：

(1) 层析柱的内径和柱内的填料是均匀的，而且层析柱由若干层组成。每层高度为一个理论塔板。塔板一部分为固定相占据，一部分为流动相占据，且各塔板的流动相体积相等，称为板体积。

(2) 每个塔板内溶质分子在固定相与流动相之间瞬间达到平衡，且忽略分子纵向扩散。

(3) 溶质在各塔板上的分配系数是一常数，与溶质在塔板的量无关。

(4) 流动相通过层析柱可以看成是脉冲式的间歇过程（即不连续过程）。

(5) 溶质开始加在层析柱的第零塔板上。根据以上假定，将连续的层析过程分解成了间歇的动作，这与多次萃取过程相似，一个理论塔板相当于一个两相平衡的小单元。

四、层析的分类

层析根据不同的标准可以分为多种类型。

(一) 按固定相基质的形式分

层析可以分为纸层析、薄层层析和柱层析。纸层析是指以滤纸作为基质的层析。薄层层析是将基质在玻璃或塑料等光滑表面铺成一薄层，在薄层上进行层析。柱层析则是指将基质填充在管中形成柱形，在柱中进行层析。纸层析和薄层层析主要适用于小分子物质的快速检测分析和少量分离制备，通常为一次性使用，而柱层析是常用的层析形式，适用于样品分析、分离。生物化学中常用的凝胶层析、离子交换层析、亲和层析、高效液相色谱等都通常采用柱层析形式。

(二) 按流动相的形式分

层析可以分为气相层析和液相层析。气相层析是指流动相为气体的层析，而液相层析指流动相为液体的层析。气相层析测定样品时需要气化，大大限制了其在生物化学领域的应用，主要用于氨基酸、核酸、糖类、脂肪酸等小分子的分析鉴定。而液相层析是生物领域最常用的层析形式，适于生物样品的分析、分离。

(三) 按分离的原理不同分

层析主要可以分为吸附层析、分配层析、凝胶过滤层析、离子交换层析、亲和层析等。

1. 吸附层析

以吸附剂为固定相，根据待分离物与吸附剂之间吸附力不同而达到分离目的的一种层析技术。

2. 分配层析

根据在一个有两相同时存在的溶剂系统中，不同物质的分配系数不同而达到分离目的的一种层析技术。

3. 凝胶过滤层析（分子筛）

指混合物随流动相流经固定相的层析柱时，混合物中各组分按其分子大小不同而被分类的技术。

(1) 基本原理。

凝胶过滤层析的固定相是凝胶。凝胶是一种不带电荷的具有三维空间多孔网状结构的物质，凝胶的每个颗粒内部都具有很多细微的小孔，如同筛子一样，如图 1-1 所示。凝胶特点：不带电荷，三维结构，细微多孔呈网状。

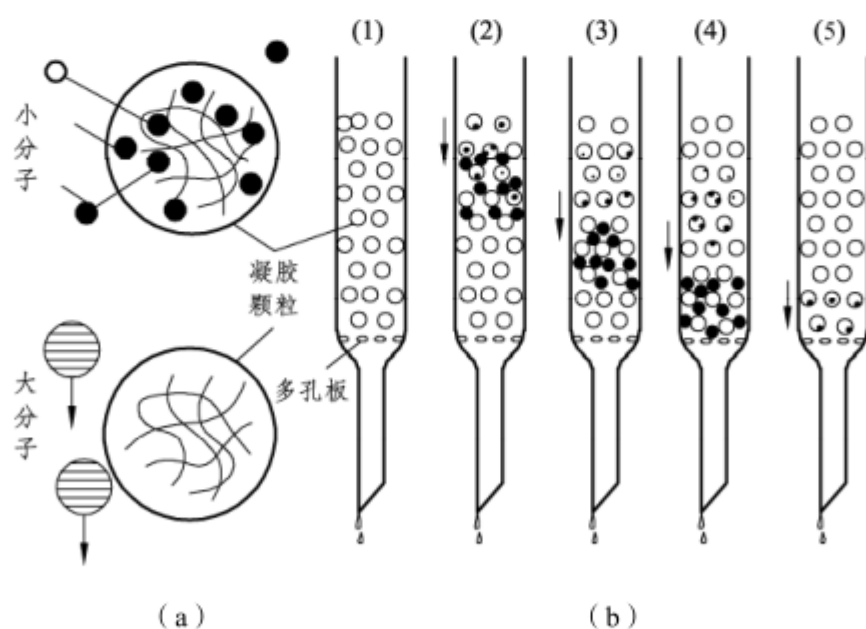


图 1-1 凝胶层析的原理

常用凝胶有琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、葡聚糖凝胶等。

葡聚糖凝胶介质是由多聚葡聚糖与环氧氯丙烷交联而成。最常用的葡聚糖凝胶层析介质是 Sephadex G 系列，不同型号的凝胶用 G 表示，G 代表交联度，从 G-10 到 G-100。“G”后面的数字表示每 10 g 干胶的吸水量，可根据待分离混合物分子量大小选用不同“G”值的凝胶。

(2) 分离过程。

小分子物质→凝胶内部→进出，流程长→ V 下降→后流出大分子物质→不进入孔内部，只在颗粒间移动→流程短，先流出。分子量大小不同的物质因此得以分离。

(3) 影响凝胶层析的主要因素。

① 层析柱的选择与装填：层析柱的大小应根据分离样品量的多少及对分辨率的要求而定。凝胶柱装填后用肉眼观察应均匀、无纹路、无气泡。

② 流动相-洗脱液的选择：是含有一定浓度盐的缓冲液，目的是防止凝胶可能有吸附作用。其选择主要取决于待分离样品，一般来说只要能溶解洗脱物质，并不使其变性的缓冲液都可用于凝胶层析。

③ 加样量：加样量的多少应根据具体的实验而定。一般分级分离时加样量约为凝胶柱床体积的 1%~5%，而分组分离时加样量约为凝胶柱床体积的 10%~25%。

④ 凝胶再生：葡聚糖凝胶再生使用 NaOH (0.2 mol/L) 和 NaCl (0.5 mol/L) 合液处理。



凝胶层析

4. 离子交换层析

利用离子交换剂对需要分离的各种离子具有不同的亲和力（静电引力）而达到分离目的的层析技术。

(1) 离子交换层析的固定相是离子交换剂，流动相是具有一定 pH 和一定离子强度的电解质溶液。

(2) 离子交换剂是具有酸性或碱性基团的不溶性高分子化合物，这些带电荷的酸性或碱性基团与其母体以共价键相连，这些基团所吸引的阳离子或阴离子可以与水溶液中的阳离子或阴离子进行可逆的交换。因此根据可交换离子的性质将离子交换剂分为两大类：阳离子交换剂和阴离子交换剂。

(3) 据离子交换剂的化学本质，可将其分为离子交换树脂、离子交换纤维素和离子交换葡聚糖等多种。

① 离子交换树脂是人工合成的高分子化合物，生化实验中所用的离子交换树脂多为交联聚苯乙烯衍生物。离子交换树脂多用于样品去离子，从废液中回收所需的离子和水的处理等。由于它可使不稳定的生物大分子变性，因此不适用于对生物样品进行分离。

② 离子交换纤维素可用于生物大分子的分离。其缺点是分子形态不规则，孔隙不均一，对要求非常严格的试验尚不能达到要求。较为理想的离子交换剂是离子交换葡聚糖凝胶和离子交换琼脂糖凝胶。它们具有颗粒整齐，孔径均一等优点，往往得到较好的分离效果。

(4) 根据各种离子交换剂所带酸性和碱性功能团的不同和其解离能力的差异，各种交换剂又可进一步分为强酸型、弱酸型、强碱型和弱碱型四种。

(5) 离子交换层析的基本过程是：离子交换剂经适当处理、装柱后，应该先用酸或碱处理（视具体情况可用一定 pH 的缓冲液处理），使离子交换剂变成相应的离子型（阳离子交换剂带负电并吸引相反离子 H^+ ，阴离子交换剂带正电并吸引相反离子 OH^- ）。加入样品后，使样品

与交换剂所吸引的相反离子 (H^+ 或 OH^-) 进行交换, 样品中待分离物质便通过电价键吸附于离子交换剂上面。然后用不会改变交换剂对样品离子亲和状态的溶液 (如起始缓冲液) 充分冲洗, 使未吸附的物质洗出。洗脱待分离物质时常用的两种方法, 一是制作电解质浓度梯度, 即离子强度梯度。通过不断增加离子度使吸附到交换剂上的物质根据其静电引力的大小而不断竞争性的解脱下来; 二是制作 pH 梯度, 影响样品电离能力, 也使交换剂与样品离子亲和力下降, 当 pH 梯度接近各样品离子的等电点时, 该离子就被解脱下来。在实际工作中, 离子强度梯度和 pH 梯度可以是连续的 (称梯度洗脱), 也可以是不连续的 (称阶段洗脱)。一般来讲, 前者分离的效果比后者的分离效果理想, 梯度洗脱需要梯度混合器来制造离子强度梯度或 pH 梯度。最简单的梯度混合器, 它由两个容器组成, 两容器之间以连通管相连接, 与出口连接的容器装有搅拌装置, 内盛起始洗脱液, 此洗脱液代表开始洗脱的离子强度 (或起始 pH); 另一容器内盛有终末洗脱液, 此洗脱液代表洗脱的最后离子强度 (或最后 pH)。在洗脱过程中, 由于终末洗脱液不断进入起始洗脱液中, 并不断被搅拌均匀, 所以流出的洗脱液成分不断的由起始状态向终末状态演变形成连续的梯度变化。

5. 亲和层析

亲和层析法是近年来被广为重视并得到迅速发展的提纯、分离方法之一。许多物质都具有和某化合物发生特异性可逆结合的特性。例如: 酶与辅酶或酶与底物 (产物或竞争性抑制剂等), 抗原与抗体, 凝集素与受体, 维生素与结合蛋白, 凝集素与多糖 (或糖蛋白、细胞表面受体), 核酸与互补链 (或组蛋白、核酸多聚酶、结合蛋白) 以及细胞与细胞表面特异蛋白 (或凝集素) 等。亲和层析法就是利用化学方法将可与待分离物质可逆性特异结合的化合物 (称配体) 连接到某种固相载体上, 并将载有配体的固相载体装柱, 当待提纯的生物大分子通过此层析柱时, 此生物大分子便与载体上的配体特异的结合而留在柱上, 其他物质则被冲洗出去。然后再用适当方法使这种生物大分子从配体上分离并洗脱下来, 从而达到分离提纯的目的。

亲和层析由于配体与待分离物质进行特异性结合, 所以分离提纯的效率极高, 提纯度可达几千倍, 是当前最为理想的提纯方法。亲和层析配体与待分离物质特异性结合性质还可用来从变性的样品中提纯出其中未变性部分, 从大量污染的物质中提纯小量所需成分。亲和层析还可用来从极度稀薄的液体中浓缩其溶质。亲和层析所用的载体和凝胶过滤所要求的凝胶特性相同, 即化学性质稳定, 不带电荷, 吸附能力弱, 网状疏松, 机械强度高, 不易变形, 保障流速的物质。聚丙烯酰胺凝胶颗粒、葡聚糖凝胶颗粒以及琼脂糖凝胶颗粒都可用, 其中以琼脂糖凝胶 (Sephadex 4B) 型应用最广泛。亲和层析的关键是设法选择合适的配体并将此配体与载体化学连接起来, 形成稳定的共价键, 这需要在实际工作中根据需要加以选择和试验。

第二节 分光光度技术

一、分光光度技术简介

有色溶液对光线有选择性地吸收作用, 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。分光光度法是利用物质对光的吸收特征和吸收强度，对物质进行定性、定量分析和物质结构分析的方法，其理论依据主要是利用物质特有的朗伯-比尔定律（Lambert-Beer law）。

分光光度法由比色法发展而成。比色法的应用只限于在可见光区，所用的单色光来自滤光片，谱带宽度为 40 ~ 120 nm，精度不高；而分光光度法可以扩展到紫外光区和红外光区，所用的单色光要求近于真正单色光，来自棱镜或光栅，其光谱带宽最大不超过 3 nm，在紫外区可到 1 nm 以下，具有较高的精度。

二、基本原理

当光线照射到物体上，便会有部分光线的能量被物质所吸收。不同物质有它特异的吸收光谱，吸收光谱的测定可以用来鉴别各种不同的物质。

朗伯-比尔定律是分光光度法的基本定律，是描述物质对某一波长光吸收的强弱与吸光物质及其液层厚度间的关系。

根据朗伯-比尔定律，当一束单色光通过溶液时由于部分能量被溶液吸收，通过溶液后射出的光线强度 I 就要比入射光线强度 I_0 小，它们的比值（透光度 $T=I/I_0$ ）和溶液的厚度（ L ）及溶液的浓度（ C ）有如下的关系：

$$D = -\lg \frac{I}{I_0} = KCL \quad (1-2)$$

式中： K ——常数，称为消光系数（Extinction coefficient，也有用符号 E 表示），表示物质对光线吸收的本领，其数值因物质的种类及光线的波长而异。

D ——吸光度（Optical density, OD），表示该溶液对光线吸收的量，亦称之为吸光率（Absorbance, A ）。

常用的有紫外分光光度法及比色分析法。前者应用紫外光区波长的光，其优点是不需显色、简便迅速，有时标本还可回收，减少消耗；后者是指应用波长为可见光范围内的分光光度计，比较待测溶液和标准溶液的光吸收能力来测定未知浓度的方法。待测溶液浓度的计算方法如下：

（一）利用标准管浓度的计算

当溶液的厚度（ L ）不变，对于同一物质和同样波长的单色光（即消光系数不变），溶液的吸光度和溶液的浓度成正比，即：

$$\frac{D_1}{D_2} = \frac{C_1}{C_2} \quad (1-3)$$

根据式（1-3）， D_1 为待测溶液的吸光度值， D_2 为标准溶液的吸光度值，若 C_2 为已知浓度的标准溶液的浓度，则根据吸光度的比值即可求出待测溶液的浓度 C_1 。

（二）利用消光系数的计算

从式（1-2）还可以看到若已知溶液的消光系数和溶液的厚度（即比色杯的内径，常用的比色杯内径为 1 cm），也可以直接从吸光度推算出溶液的浓度。

消光系数的常用表示方法有如下 2 种：

(1) 百分消光系数：即浓度以百分浓度 g/100 mL 来表示的消光系数，实际就是当溶液浓度为 1% 及厚度为 1 cm 时的吸光度值。

(2) 摩尔消光系数：即浓度以摩尔浓度来表示的消光系数，实际就是当溶液浓度为 1 mol/L 及厚度为 1 cm 时的吸光度值。

(三) 利用标准曲线求得

分析大批样品时，采用此法比较方便，但需要事先制作一条标准曲线（或称工作曲线）。

配制一系列浓度由小到大的标准溶液，测出它们的光吸收。在标准溶液的一定浓度范围内，溶液的浓度与其光吸收之间呈直线关系。以各标准溶液的浓度为横坐标，相应的光吸收为纵坐标，在方格坐标纸上绘出标准曲线。制作标准曲线时，起码要选 5 种浓度递增的标准溶液，测出的数据至少要 3 个落在直线上，这样的标准曲线方可使用。

比色测定待测样品时，操作条件应与制作标准曲线时相同。测出光吸收后，从标准曲线上可以直接查出它的浓度，并计算出待测样品的含量。

三、分光光度技术的基本应用

(一) 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。测定标准溶液（浓度已知的溶液）和未知液（浓度待测定的溶液）的吸光度，进行比较，由于所用吸收池的厚度是一样的。也可以先测出不同浓度的标准液的吸光度，绘制标准曲线，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，这样做有如下 2 个好处：

- (1) 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。
- (2) 可以避免其他物质的干扰。

(二) 用紫外光谱鉴定化合物

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，即吸收高峰和低峰的波长是一定的。紫外线吸收是由不饱和的结构造成的，含有双键的化合物表现出吸收峰。紫外吸收光谱比较简单，同一种物质的紫外吸收光谱应完全一致，但具有相同吸收光谱的化合物其结构不一定相同。除了特殊情况外，单独依靠紫外吸收光谱决定一个未知物结构，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。

第三节 离心技术

一、离心技术简介

离心技术是根据颗粒在匀速圆周运动时受到一个外向的离心力的行为发展起来的一种分离分析技术。

当物体围绕一个中心轴做圆周运动时，运动物体就会受到离心力的作用，旋转速度越快，运动物体所受到的离心力越大。将装有悬浮液或高分子溶液的容器放在离心机内，使之绕离心机中心轴高速旋转，就会产生离心力场，强大的离心力作用于溶剂中的悬浮颗粒或高分子，会使其沿着离心力的方向运动而逐渐背离中心轴。在相同转速条件下，容器中不同大小的悬浮颗粒或高分子溶质会以不同的速率沉降。经过一定时间的离心，就能实现不同悬浮颗粒或高分子溶质的有效分离。

离心机的主要用途是分离溶液中的物质，如分离蛋白质、DNA、细胞等。通常用各种专门的离心机、转子、离心管来完成不同的实验，离心机提供驱动力，而转子决定细化的离心功能。通过仔细选用离心机、转子和离心管，可以达到预期的目的。

用于工业生产的，如化工、制药、食品等工业大型制备用的离心技术，转速都在 5000 r/min 以下。用于生物、医学、化学等实验室分析研究的，转速从每分钟几千到几万转以上，此类技术的使用目的在于分离和纯化样品，以及对纯化样品的有关性能进行研究。

二、基本原理

(一) 离心力 (Centrifugal force, F)

$$F = m\omega^2 r \quad (1-4)$$

式中： ω ——旋转角速度，rad/s；

r ——旋转体离旋转轴的距离，cm；

m ——颗粒质量。

(二) 相对离心力 (Relative centrifugal force, RCF)

实际离心力转化为重力加速度的倍数。

$$RCF = F_{\text{离心力}} / F_{\text{重力}} = m\omega^2 r / mg = \omega^2 r / g \quad (1-5)$$

式中： g ——重力加速度 (9.807 m/s²)。

由于转子旋转一周等于 2π 弧度，因此转子的角速度以每分钟旋转的次数 (每分钟转数 n 或 r/min) 表示：一般情况下，低速离心时常以 r/min 来表示，高速离心时则以 g (或数字 Xg) 表示。

用“ Xg ”表示每分钟转速可以真实反映颗粒在离心管不同位置的离心力。

(三) 沉降系数 (Sedimentation coefficient, S)

当转子内样品绕着旋转轴离心时, 样品沉降率是由样品颗粒的大小、形状、密度和溶剂的黏度、密度以及离心加速度决定的, 在一般情况下, 样品的沉降特征可以用沉降系数来表示:

S 是指单位离心场中粒子移动的速度。 S 的物理意义是颗粒在离心力作用下从静止状态到达匀速运动所经过的时间。 S 在实际应用时常在 $10 \sim 13$ s, 故把沉降系数 $10 \sim 13$ s 称为一个 Svedberg 单位, 简写 S , 单位为 (s), $1S=1 \times (10 \sim 13)$ s。对一定的样品, 在一定的介质中, 样品沉降系数 S 常保持不变。文献中常用沉降系数来描述某些生物大分子或亚细胞器大小。

三、离心分离方法

根据离心原理, 按照实际工作的需要, 目前可设计出各种离心方法, 综合起来可分三类:

(一) 平衡离心法

根据粒子大小、形状不同进行分离, 包括差速离心法 (Differential velocity centrifugation) 和速率区带离心法 (Rate zonal centrifugation)。

1. 差速离心法

(1) 基本原理: 它利用不同的粒子在离心力场中沉降的差别, 在同一离心条件下, 沉降速度不同, 通过不断增加相对离心力, 使得非均匀混合液内的大小、形状不同的粒子分步沉淀。操作过程中一般是离心后用倾倒的办法把上清液与沉淀分开, 然后将上清液加高转速离心, 分离出第二部分沉淀, 如此往复加高转速, 逐级分离出所需要的物质。差速离心的分辨率不高, 沉淀系数在同一个数量级内的各种粒子不容易分开, 常用于其他分离手段之前的粗制品提取。

(2) 注意点: 可用角式、水平式转头; 可用刹车; 难以获得高纯度。例如, 用差速离心法分离已破碎的细胞各组分。

2. 速率区带离心法

(1) 基本原理: 离心前在离心管内先装入密度梯度介质 (如蔗糖、甘油、KBr、CsCl 等), 待分离的样品铺在梯度液的顶部、离心管底部或梯度层中间, 同梯度液一起离心。离心后在近旋转轴处的介质密度最小, 离旋转轴最远处介质的密度最大, 但最大介质密度必须小于样品中粒子的最小密度。这种方法是根据分离的粒子其在梯度液中沉降速度的不同, 使具有不同沉降速度的粒子处于不同的密度梯度层内分成一系列区带, 达到彼此分离的目的。

梯度液在离心过程中以及离心完毕后, 取样时起着支持介质和稳定剂的作用, 避免因机械振动而引起已分层的粒子再混合。该离心法的离心时间要严格控制, 既要有足够的时间使各种粒子在介质梯度中形成区带, 又要控制在任意一个粒子达到沉淀前。如果离心时间过长, 所有的样品可全部到达离心管底部; 离心时间不足, 样品还没有分离。由于此法是一种不完全的沉降, 沉降受物质本身大小的影响较大, 一般是应用在物质大小相异而密度相同的情况。

(2) 注意点: 严格控制离心时间; 粒子密度大于介质密度; 样品事先配制在较平缓的连续密度的梯度溶液; 不能用角式转头、只能用水水平式转头; 不能用刹车。