



生物化学实验室规则

1. 实验前必须认真预习实验内容，明确本次实验的目的和要求，掌握实验的基本原理，否则不能进行实验。
2. 实验时应自觉遵守实验室纪律，保持室内安静，不能大声说笑和喧哗。
3. 实验过程中要听从教师指导，认真按照实验步骤和操作规程进行实验。若想改进和设计新的实验方法，必须取得实验指导教师的同意。实验时应认真进行实验记录，实验完毕后应及时整理数据，按时交实验报告。
4. 实验台面、试剂架、水池以及各种实验仪器内外都必须保持清洁整齐，药品用完后立即盖好瓶盖放回原处，严禁瓶盖及药勺混杂，切勿使药品洒落在实验台面上。
5. 所用试剂和去离子水要注意节省，按实验实际需求使用，多余的重要试剂和各种有机试剂要按教师要求进行回收，昂贵的如 Sephadex、Sephadex 凝胶等化学试剂，用后必须及时回收，不得丢弃。
6. 制备的试剂和实验过程中的样品，必须贴上标签、写上品名、浓度和日期等。存放在冰箱中的易挥发溶液和酸性溶液，必须严密封口。
7. 实验完毕后必须及时洗净各种仪器并放好，保持实验台面和实验柜内的整洁。毛刷用后必须立即挂好，各种器皿不得丢弃在水池内。
8. 使用贵重精密仪器应严格遵守操作规程。使用分光光度计时不得将溶液洒在仪器内外和地面上。使用高速冷冻离心机、PCR 仪等贵重仪器必须经过考核。仪器发生故障应立即报告实验指导教师，未经许可不得自己随意检修。
9. 实验室内严禁吸烟、进食，严禁用嘴吸移液管和虹吸管。易燃液体不得接近明火和电炉，凡产生烟雾、有害气体和不良气味的实验，均应在通风柜内进行。
10. 严禁使用其他组的仪器，不得将器皿遗弃在实验台面上，损坏的玻璃仪器要及时向指导教师报告，并自觉登记，学期结束时按规定进行处理。
11. 每位学生要熟悉实验室内水、电闸的位置，注意节约用水，烘箱和电炉用完后必须立即断电，要严格遵守实验室安全用电规则和其他安全规则。
12. 每次实验完毕，值日生要认真做好实验室的卫生值日工作。最后离开实验室的实验人员 必须检查并关好水、电、门、窗。

实验室安全及防护

生物化学实验室可以说是“五毒”俱全，即着火、爆炸、中毒、触电和割伤的危险均时刻存在。因此要求每位在生化实验室工作的人员都必须有充分的安全意识、严格的防范措施，一旦发生意外能进行正确处理，以防事故扩大。

一、预防火灾必须严格遵守以下操作规程

1. 严禁在开口容器和密闭体系中用明火加热有机溶剂，只能使用加热套或水浴加热。
2. 废有机溶剂不得倒入废物桶，应倒入回收瓶，以后再集中处理。量少时用水稀释后排入下水道。
3. 不得在烘箱内存放、干燥、烘烤有机物。
4. 在有明火的实验台面上不允许放置开口的有机溶剂或倾倒有机溶剂。

二、灭火方法

实验室中一旦发生火灾切不可惊慌失措，要保持镇静，根据具体情况正确进行灭火或立即报火警（火警电话 119）。

1. 容器中的易燃物着火时，需用灭火毯盖灭。
2. 乙醇、丙酮等可溶于水的有机溶剂着火时可以用水灭火。汽油、乙醚、甲苯等有机溶剂着火时不能用水灭火，只能用灭火毯和砂土盖灭。
3. 导线、电器和仪器着火时不能用水和二氧化碳灭火器灭火，应先切断电源，然后用 1211 灭火器（内装二氟一氯一溴甲烷）灭火。
4. 个人衣服着火时，切勿慌张奔跑，以免风助火势，应迅速脱衣，用水龙头浇水灭火，火势过大时可就地卧倒打滚压灭火焰。

三、中毒

生化实验室常见的化学致癌物有：石棉、砷化物、铬酸盐、溴化乙锭等。

剧毒物有 氟化物、砷化物、乙腈、甲醇、氯化氢、汞及其化合物等。

中毒的原因主要是不慎吸入、误食或由皮肤渗入。

中毒的预防：

1. 保护好眼睛最重要，使用有毒或有刺激性气体时，必须佩戴防护眼镜，并应在通风橱内进行。

2. 用有毒物品时必须戴橡皮手套。
3. 严禁用嘴吸移液管，严禁在实验室内饮水、进食、吸烟，禁止赤膊和穿拖鞋。
4. 不要用乙醇等有机溶剂擦洗溅洒在皮肤上的药品。

四、外伤

1. 防止触电 ①不能用湿手接触电器；②电源裸露部分都应绝缘；③坏的接头、插头、插座和不良导线应及时更换；④先接好线路再插接电源，反之先关电源再拆线路；⑤仪器使用前要先检查外壳是否带电；⑥如遇有人触电要先切断电源再救人。

2. 防止电器着火 ①保险丝、电源线的截面积、插头和插座都要与使用的额定电流相匹配；②三条线要平均用电；③生锈的电器、接触不良的导线接头要及时处理；④电炉、烘箱等电热设备不可过夜使用；⑤仪器长时间不用要拔下插头，并及时拉闸；⑥电器、电线着火不可用泡沫灭火器灭火。

生物化学实验基本操作

一、玻璃仪器的洗涤与清洁

生化实验所用的各种玻璃仪器，其清洁程度将直接影响实验的可靠性和准确性。因此，玻璃仪器的清洗不仅是实验前后的常规工作，而且是一项最基本的技术。

洗涤过的玻璃仪器要求清洁透明，表面不含可溶解的物质，水沿器皿壁自然下流时不挂水珠。

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洗方法。

（一）新购置的玻璃仪器清洗

新购置的玻璃仪器表面附着油污和灰尘，特别是附着有游离的金属离子，清洗方法如下：

1. 先用肥皂水刷洗，用流水冲净。
2. 浸于 10% Na_2CO_3 溶液中煮沸，用流水冲净。
3. 于 1%~2% HCl 溶液中浸泡过夜。流水洗净酸液，用少量蒸馏水多次冲洗后，干燥备用。

（二）用过的玻璃仪器清洗

1. 一般非计量玻璃仪器或粗容量仪器，如试管、烧杯、量筒等先用肥皂水刷洗，再用自来水冲洗干净，最后用蒸馏水冲洗 2~3 次后，倒置于清洁处晾干。

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

3. 比色皿用毕立即用自来水反复冲洗，如有污物黏附于皿壁，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。

二、清洗液的原理与制备

1. 铬酸洗液 广泛用于玻璃仪器的洗涤，其清洁效力来自于它的强氧化性和强酸性。由重铬酸钾 ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 和浓硫酸制备而成。

硫酸越浓，铬酐越多，其清洁效力越强。因洗液具有强腐蚀性，所以使用时，必须注意安全。当洗液由棕红色变为绿色时，不宜再用。

【制备方法】

(1)取重铬酸钾 5g 置于 250mL 烧杯之中，加 5mL 水使其尽量溶解，然后慢慢加入 100mL 工业用硫酸，边加边搅拌，冷却后备用。

(2)取 100mL 工业用浓硫酸置于烧杯中，小心加热，然后慢慢加入重铬酸钾 5g 边加边搅拌，待全部溶解后冷却，贮于具塞瓶中。

2. 肥皂水和洗衣粉溶液 是最常用的洗涤剂，主要是利用其乳化作用以除去污垢，一般玻璃仪器均可用其刷洗。

3. 5% $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 主要用于洗涤油污。所洗仪器不可用于磷的测定。

4. EDTA- Na_2 洗液 5%~10% 的 EDTA- Na_2 洗液，加热煮沸，可去除玻璃器皿内部钙、镁盐类的白色沉淀和不易溶解的重金属盐类。

5. 尿素洗液 45% 的尿素溶液是血污和蛋白质的良好洗液。

6. 草酸洗液 于 10% 草酸溶液中加入少量浓硫酸或浓盐酸可清洗高锰酸钾的痕迹。

7. 盐酸-乙醇洗液 3% 的盐酸-乙醇可以除去玻璃器皿上的染料附着物。

8. 乙醇-硝酸混合液 用于清洗难以去除的有机物，最适合于洗净滴定管。

三、吸量管的种类和使用

吸量管是生化实验最常用的玻璃仪器之一，测定的准确性和吸量管的正确选择与使用密切相关。

(一) 吸量管的分类

1. 奥氏吸量管供准确量取 0.50, 1.0, 2.0, 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，管尖残留的液体必须吹入容器内。

2. 移液管常用来量取 50.0, 25.0, 10.0, 5.0, 2.0, 1.0mL 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 15 秒钟，注意管壁残留液体不要吹出。

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。

(二) 吸量管的选择

1. 量取整数体积液体，并且量取要求准确时，应选用奥氏吸量管。

2. 量取大体积液体时要用移液管。

3. 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 应选用 0.2mL 的刻度吸量管。

4. 在同一试验中，如欲加同种试剂于不同管中，并且取量不同时，应选择一支与最大取液量最接近的刻度吸量管，如各试管应加的试剂量为 0.30, 0.50, 0.70, 0.90mL 时，应选用一支 1mL 刻度吸量管。

(三) 吸量管的使用

1. 拿法 中指和拇指拿住吸量管的上端，食指置于吸量管顶端。

2. 取液 用吸耳球吸液体至刻度上，注意液面上升，吸完后用食指堵住吸量管上端，

并用滤纸擦拭其外壁。

3. 调刻度 吸量管与地面保持垂直，下口与试剂瓶接触并成一角度，用食指控制液体下降至最上一刻度液体凹面处，刻度和视线应在同一水平面上。

4. 放液 吸量管移入准备接受溶液的容器中，仍使其出口尖端接触器壁并成一角度，吸量管保持垂直，放开食指，使液体自动流出。

四、微量加样器的分类和使用

(一) 分类

1. 固定容量 常用的有 $25\ \mu\text{L}$, $50\ \mu\text{L}$, $100\ \mu\text{L}$, $200\ \mu\text{L}$, $500\ \mu\text{L}$, $1000\ \mu\text{L}$ 。

2. 可调容量 常用的有 $0.5\sim 10\ \mu\text{L}$, $10\sim 50\ \mu\text{L}$, $20\sim 200\ \mu\text{L}$, $200\sim 1000\ \mu\text{L}$, $1\sim 5\text{mL}$ 等不同规格。

每种微量加样器都有专用的聚丙烯塑料吸头，吸头通常是一次性使用。

(二) 使用

加样器是一种在一定容量范围内可随意调节的精密取液装置，其取液量取决于装置内活塞上下的移动距离，该距离调节可通过调节轮控制螺杆实现。

1. 将相应的聚丙烯塑料吸头装在吸液杆顶端，并轻轻旋转一下以确保密封。然后用四指并拢握住加样器上部，用拇指按住塞杆顶端的按钮，向下按到第一停点。

2. 将加样器的吸头插入待取的溶液中，缓慢松开按钮，吸上液体，并停留 $1\sim 2\text{s}$ 。

3. 将吸头沿器壁取出，用吸水纸擦去吸头表面附着的液体。

4. 排液时吸头接触倾斜的器皿壁，先将按钮按到第一停点，停留 1s ，再按压到第二停点。

5. 吹出吸头尖部的剩余溶液，然后按下吸头推杆，将吸头推入废物缸内。

(三) 注意事项

1. 吸取液体时一定要缓慢平稳地松开拇指，绝不允许突然松开，以防液体吸入过快而进入微量加样器内腐蚀柱塞造成漏气。

2. 为获得较高的精度，吸头需预先吸取一次样品溶液，然后再正式移液，因为吸取血清蛋白溶液或有机溶剂时，吸头内壁会残留一层“液膜”，造成排液量偏小而产生误差。

3. 浓度和黏度大的液体，会产生误差，为消除其误差，可由实验确定补偿量，补偿量可用调节旋钮改变读数窗的读数来进行设定。

4. 可用分析天平称量纯水的重量并用计算的方法，来校正微量加样器， 20°C 时每 1mL 蒸馏水重 0.9982g 。

思考题

1. 某实验需量取 $0.1\sim 0.9\text{mL}$ 之间的五组液体，应选何种量器，为什么？
2. 常用的清洁液有哪几种，如何制备？
3. 如何正确使用吸量管？
4. 如何正确使用微量加样器？



第一章 分光光度技术

分光光度法(Spectrophotography)是利用物质特有的吸收光谱来鉴别物质或测定其含量的一项技术,该技术灵敏度强,精确度高,操作简便、快速,对于复杂的组分系统,无需分离即可检测出其中的微量组分,因此分光光度法已成为生物学研究领域中广泛使用的方法之一。

第一节 基本原理

有色物质的显色,是由于它对光线的吸收具有选择性。人肉眼可见的光线称为可见光,为波长范围 400~760nm 的电磁波,波长小于 400nm 的光线叫紫外线,波长大于 760nm 的叫红外线。可见光区的电磁波因波长不同,呈现出不同的颜色。这些不同颜色的电磁波称为单色光,将电磁波按波长顺序排列起来,即得:

γ 射线	X 射线	紫外光	可见光	红外光	无线电用电磁波
------	------	-----	-----	-----	---------

一切物质都会对某些波长的光进行选择吸收,有色溶液之所以呈现出不同的颜色,是由于物质对光的选择性吸收所致。某些无色物质虽然对可见光无吸收作用,但能选择性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不同,对不同波长光线的吸收能力也不同。每种物质都具有特定的吸收光谱,在一定条件下,其吸收程度与该物质浓度成正比,因此可利用各种物质不同的吸收光谱及其强度,对不同物质进行定性和定量分析。

分光光度法依据的原理是 Lambert-Beer 定律,该定律阐明了溶液对单色光吸收的多少与溶液浓度及溶液厚度之间的关系。

1. 朗伯(Lambert)定律 当单色光通过一吸收光的介质时,其光强度随吸收光介质的厚度增加而呈指数减少,即

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\kappa_1 L}$$

(I_0 入射光强度 , I 出射光强度 , L 介质的厚度)

2. 比尔 (Beer) 定律 : 单色光通过一光吸收介质时 , 光强度随介质浓度增长而呈指数减少。即

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\kappa_2 C} \quad (C: \text{溶液浓度})$$

两者结合在一起为朗伯 - 比尔 (Lambert-Beer) 定律。

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\epsilon CL}$$

式中 $\epsilon (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ 系一常数 即消光系数 也叫摩尔吸光度 透光度 T 为 I/I_0 , 通常以百分率表示。

$$T = \frac{I}{I_0} = e^{-\epsilon CL}$$

$$\text{取对数 } -\lg \frac{I}{I_0} = -\lg T = A = \epsilon CL$$

$$-\lg \frac{I}{I_0} \text{ 称为吸光度 (A)。$$

采用适当的光源、棱镜和适当的光源接收器 , 让某一波长的光透过某一溶液 , 通过仪器的测定 , 定性鉴别物质或定量测定某一组分含量的方法即为分光光度法。通过对光波长的调整 , 可使溶质浓度的测定范围不仅仅局限于可见光 , 尚可扩大到紫外光区和红外光区。经单色器 (棱镜) 得到的光源虽然不是纯的单色光 , 但波长范围更狭窄 , 更符合 Lambert-Beer 定律 , 其灵敏度大为提高。

3. 计算

(1) 标准管法 (标准比较法) 实际测定过程中 , 用一已知浓度的测定物按测定管同样处理显色 读出吸光度 再根据前式计算 即 $A_1 = K_1 C_1 L_1$, $A_2 = K_2 C_2 L_2$ 。

式中 A_1 、 A_2 分别为已知浓度标准管和未知浓度测定管吸光度 ; C_1 、 C_2 分别为已知浓度标准管和未知浓度测定管中测定物浓度。因盛标准液和测定液的比色杯径长相同 ($L_1 =$

$$L_2$$
) , 故上二式可写成 $\frac{A_1}{K_1 C_1} = \frac{A_2}{K_2 C_2}$

因标准液和测定液中溶质为同一物 , K 值相同 , 即 $K_1 = K_2$

$$\text{可换算成下式 } C_2 = \frac{A_2}{A_1} C_1$$

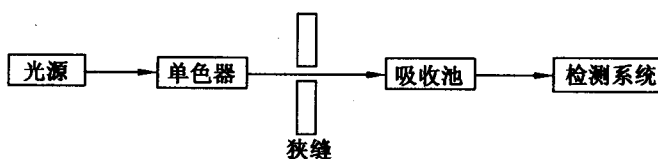
上式为实验操作中常用计算式。因比色皿本身和溶剂也会产生一定的光吸收 , 故设置一个空白管 , 即其中除了待测溶质以外 , 其他的成分完全相同。以空白管对准光路对仪器调零 , 消除非待测物的吸收 , 所测值即为待测物的光吸收。

(2) 标准曲线法 先制备一系列已知不同浓度的测定物溶液 , 按测定管同样方法处理显色 , 分别读取各管吸光度 , 以各管吸光度为纵坐标 , 各管溶液浓度为横坐标 , 在方格坐标纸上作图得标准曲线。以后进行测定时 , 就无需再作标准管 , 以测定管吸光度从标准曲线上可求得测定物的浓度。

一般认为，标准曲线范围在测定物浓度的一半到二倍之间，并使吸光度在 0.05~1.0 范围内为宜。所作标准曲线仅供短期使用。标准曲线制作与测定管测定应在同一台仪器上进行。尽管型号相同，操作条件完全一样，因不是同一台仪器，其结果会有一定误差。

第二节 仪器的结构

分光光度计是一种靠光栅或棱镜提供单色光的，复杂、精巧的仪器。它不仅能在可见光区测定有色物质的吸收光谱，而且也能在紫外光区和红外光区测定无色物质的吸收光谱。分光光度计的种类很多，其原理和结构基本相似，一般都包括以下几个部件：



1. 光源 分光光度计上常用的光源有两种，即钨灯和氢灯（或氘灯）。在可见光区，近紫外光区和近红外光区常用钨灯；在紫外光区，多使用氢灯（或氘灯）。
2. 单色器 它是把混合光分解为单一波长光的装置。多用棱镜或光栅作为它的色散元件。光波通过棱镜时，不同波长的光折射率不同，波长愈短，折射率则愈大，反之，波长愈长，折射率则愈小，因而能将不同波长的光分开。
3. 吸收池（比色皿、比色池）一般由玻璃、石英和熔凝石英制成，用来盛被测试的溶液。
4. 检测器 由光电池、光电管、光电倍增管组成。
5. 测量装置 以电流表、波长分度盘和测量读数盘的形式输出测量结果，现代的仪器常附有自动记录器，可自动描出记录曲线。

第三节 常见分光光度计

一、722 型分光光度计

（一）仪器结构：722 型光栅分光光度计由光源室、单色器、样品室、光电管暗盒、电子系统及数字显示器等部件组成。工作原理见图 1-1。

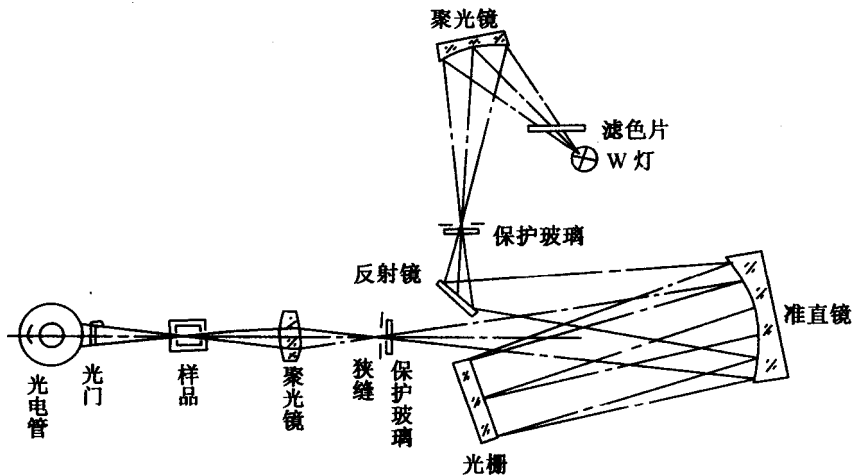


图 1-1 722 型分光光度计的结构图

(二) 操作方法

1. 接通电源开关。
2. 将灵敏度旋钮调至“1”档 (放大倍率最小)。
3. 开启电源, 指示灯亮, 选择开关置于“T”, 波长调至测试用波长, 预热 20 分钟。
4. 打开试样室盖 (光门自动关闭), 调节“0”旋钮, 使数字显示为“0.000”。盖上试样室盖, 使比色皿架处于空白液体位置, 使光电管受光, 调节透过率“100%”旋钮, 使数字显示为“100.00”。
5. 预热后, 按步骤 4 连续几次调整“0”和“100%”即可进行测定工作。
6. 调节吸光度调零旋钮, 使数字显示为“0.000”, 然后将被测样品移入光路, 显示值即为被测样品的吸光度值。
7. 浓度 C 的测量: 将选择开关由“A”旋置“C”, 将已标定浓度的样品放入光路, 调节浓度旋钮, 使数字显示为标定值, 将被测样品放入光路, 即可读出被测样品的浓度。

二、752 型紫外光栅分光光度计

1. 接通电源预热 30min 将选择开关置于“T”档。
2. 选择所需波长, 打开样品室盖, 将空白液置于光路上。
3. 调节灵敏度转盘由低到高逐步增加。
4. 盖上样品室盖, 调节“100”旋钮, 使数字显示为透光度。
5. 将待测样品推进光路, 进行测量。
6. 如果选择开关置于“A”档 (空白液时, 调节消光“0”钮为吸光度“0”) 可读出吸光度 A 值。
7. 如果选择开关置于“C”档 (标准液移入光路) 显示的是相应的标准值, 再将待测样品推进光路, 即可读出浓度值。

注意事项:

1. 比色皿的使用和清洗 分光光度计比色皿类型多样，但最常用的是光径 1cm 的立方形杯。由于 330nm 以下的光不能透过玻璃比色皿，紫外光区测量时要用石英比色皿。同组使用的比色皿必须配套，以装有纯溶剂的比色皿，在试验波长下，测定光吸收是否一致而进行挑选、搭配。

比色皿四面仅有两面系光滑透明，具有光学性质，另两面则无，它们常以磨玻璃为材料，以示区别。比色皿光学表面不能有任何污损，否则会引起光吸收的增加。

比色皿中所盛溶液不能太少，否则光路不能透过待测溶液；但也不能太多，否则溶液易洒出，从而污损或腐蚀仪器，一般所盛液体约占全部容积的 2/3。每次使用后，应立即倒空或以吸液泵吸干，然后用水冲洗比色皿 3~4 次。比色皿的外表面应以高质量的柔软擦镜纸擦干净，不能使用易磨损比色皿的普通纱布。

2. 波长选择 选择波长是测定的关键，可根据被测物的最大吸收峰选择合适的波长。测定时应固定波长，防止波长改变，造成错误结果。

思考题

1. 分光光度法的原理依据的是什么定律？
2. 使用分光光度计时应注意些什么？

(郭 强)

第二章 层析技术

层析技术 (Chromatography techniques) 是目前广泛应用于物质的分离纯化、分析鉴定的技术之一。它是利用混合物中各组分的理化性质 (吸附力、分子形状、大小、分子极性、分子亲和力以及分配系数等) 的差异, 在物质经过两相时, 不断地进行交换、分配等过程。

任何层析都具有两个相, 即固定相和流动相。固定相固定不变, 流动相对固定相作单相的相对运动, 从而推动样品中各组分通过固定相向前移动。由于混合物中各组分的理化性质不同, 对流动相和固定相具有不同的作用力, 因此在流动相推动样品通过固定相的过程中, 通过不断地吸附——解吸——吸附——解吸作用, 造成混合物中各组分距离不等的迁移, 从而达到分离的目的。

层析的分类方法有三种:

1. 根据所处的物理状态分类 气相层析和液相层析。气相层析指的是流动相为气体, 固定相可以是液体 (气液层析) 也可以是固体 (气固层析); 液相层析指的是流动相为液体, 固定相可以是液体 (液液层析) 也可以是固体 (液固层析)。

2. 根据层析的方式分类 纸层析、薄层层析和柱层析。纸层析指的是以滤纸作固定相进行的层析; 薄层层析是将固定相研成粉末, 再压成薄膜或薄板, 类似于纸层析; 柱层析是将固定相装于柱内的层析。

3. 根据层析的原理分类

(1) 吸附层析 (Absorption chromatography) 利用吸附层析介质表面的活性分子或活性基团, 对流动相中不同溶质产生吸附作用, 依据其对不同溶质吸附能力的强弱而进行的分离方法称为吸附层析。

(2) 分配层析 (Partition chromatography) 利用分离组分在固定相和流动相中不断发生吸附和解吸作用, 在移动的过程中物质在两相之间进行分配。依据被分离物质在两相中分配系数的差异而进行分离的方法称为分配层析。

(3) 凝胶层析 (Gel chromatography) 利用凝胶层析介质交联度的不同所形成网孔径大小, 在层析时能阻止比网孔直径大的生物大分子通过。依据流动相中溶质的分子量大小差异而进行分离的方法, 称为凝胶层析。

(4) 离子交换层析 (Ion exchange chromatography) 利用固定相球形介质表面活性基团经化学键合方法, 将具有交换能力的离子基团固定在固定相上面, 这些离子基团可以与流动相中离子发生可逆性交换反应而进行分离的方法, 称为离子交换层析。

(5) 亲和层析 (Affinity chromatography) 利用固定相载体表面偶联具有特殊亲和

作用的配基，这些配基可以与流动相中溶质分子发生可逆的特异性结合而进行分离的方法，称为亲和层析。

(6) 金属螯合层析(Metal chelating chromatography) 利用固定相载体上偶联的亚氨基乙二酸为配基与二价金属离子发生螯合作用，结合在固定相上，二价金属离子可以与流动相中含半胱氨酸、组氨酸、咪唑及其类似物发生特异螯合作用而进行分离的方法，称为金属螯合层析。

(7) 疏水层析(Hydrophobic chromatography) 利用固定相载体上偶联的疏水性配基与流动相中的一些疏水分子发生可逆性结合而进行分离的方法，称为疏水层析。

(8) 反相层析(Rreverse phase chromatography) 利用固定相载体上偶联的疏水性较强的配基，在一定非极性的溶剂中与溶剂中疏水分子发生作用，以非极性配基为固定相，极性溶剂为流动相来分离不同极性的物质的方法，称为反相层析。

第一节 吸附层析

吸附层析(Absorption chromatography) 指溶液中的溶质随流动相通过吸附介质时，柱内的吸附介质表面吸附基团对溶质发生吸附，某些溶质就会被吸附在介质上。介质表面的活性基团不同对溶质产生的吸附力有较大的差别。因此，利用介质对溶质吸附力的强弱，将不同溶质分开。凡是利用固定相表面的活性基团来吸附流动相中溶质而进行分离的方法称为吸附层析。

一、基本原理

任何两个相都可以形成界面，其中一个相的物质或溶解在其中的溶质表面上发生密集的行为，称为吸附。能够将其他物质聚集到自己表面上的物质，称吸附剂；聚集于吸附剂表面的物质称吸附物。当混合物随流动相流经由吸附剂组成的固定相时，由于吸附剂对不同的物质具有不同的吸附力，从而使不同组分的移动速度也不相同，最终达到分离的目的。

1. 吸附力的产生 固体表面上的分子(分子或原子)和固体内部的分子所受的吸引力不相等，在内部分子与分子之间的相互作用力是对称的，其力场相互抵消，而在固体表面的分子所受的力是不对称的，向内的一侧受到的力较大，表面一侧受到的力较小，形成了分子间的内引力，这种内引力对周围的分子具有一定的吸附作用。当气体分子或溶质分子在运动过程中碰到吸附介质表面时，受其内部分子引力的作用，就会被吸引而停留在固体表面。不同的物质被吸附的紧密程度不同，利用吸附能力的强弱进行吸附层析。

2. 吸附 在一定条件下，吸附介质与吸附物之间的相互作用，二者结合在一起。当改变它们的吸附环境后，二者又可以分开。吸附介质对周围分子的吸附力是微弱的，根据吸附介质的性质，可分为物理吸附和化学吸附。

(1)物理吸附 指依靠分子间相互作用的范德华力引起的吸附。物理吸附的特点为对吸附分子无选择性，吸附速度快，吸附是可逆的，吸附过程中释放的能量较小，吸附力较强，被吸附的分子容易解吸附。

(2)化学吸附 指依靠物质中的化学键的作用引起吸附。化学吸附的特点是对吸附分子有选择性, 吸附速度慢, 吸附过程中释放的能量较大, 吸附力强, 被吸附的分子不易解吸附。

二、常用吸附剂的类型及特性

层析用的吸附剂应该满足以下要求: ①在层析溶剂中不溶解; ②对洗脱液及被分离物质呈化学惰性; ③吸附能力强, 同时具吸附可逆性; ④分子扩散速度应尽可能地快。

常用吸附剂是多孔结构的, 粒子大小、形状以及孔的结构是影响层析的基本因素。下面简要介绍几种常用吸附剂:

1. 硅胶 硅胶略带酸性, 适用于中性和酸性物质的分离, 如氨基酸、糖、脂类等, 其优点是化学惰性强、吸附量大、制备容易。

2. 氧化铝 氧化铝略带碱性, 适用于中性及碱性物质的分离, 如生物碱、类固醇、维生素、氨基酸等, 其优点是吸附量大、价格低廉、分离效果好。

3. 活性炭 活性炭大多以木屑为原料。根据其粗细程度可分为三种: ①粉末活性炭: 颗粒极细, 呈粉末状, 吸附量及吸附力大; ②颗粒活性炭: 颗粒较大, 表面积及吸附力都比粉末活性炭小; ③锦纶—活性炭: 以锦纶为黏合剂, 将粉末活性炭制成颗粒, 表面积介于粉末活性炭和颗粒活性炭之间, 吸附能力较两者弱。

三、吸附层析技术

1. 吸附剂的选择 吸附剂的选择是吸附层析的关键, 吸附层析介质种类繁多, 目前还没有一种固定的选择原则, 一般要通过预实验来确定。

2. 溶剂和洗脱剂的选择 溶剂和洗脱剂的选择主要考虑样品的溶解度和稳定性。一种好的溶剂应该对样品有很好的溶解性, 有利于吸附介质对溶质的吸附; 而洗脱剂则对被吸附在吸附介质上的样品有较强的解吸附能力, 被洗下的物质具有较好的稳定性, 不发生聚合、沉淀、变性和相关的化学反应。

第二节 离子交换层析

离子交换层析 (Ion exchange chromatography) 是利用固定相偶联的离子交换基团和流动相解离的离子化合物之间发生可逆的离子交换反应而进行的分离方法。

一、基本原理

离子交换层析是利用离子交换剂对各种离子的亲和力不同, 借以分离混合物中各种离子的一种层析技术。其主要特点是依靠带有相反电荷的颗粒之间的吸引力的作用。离子交换层析的固定相是带有大量电荷的离子交换剂, 流动相是具有一定 pH 值和一定离子强度的电解质溶液。当混合物溶液中含有与离子交换剂相反电荷的溶质流经离子交换剂时, 后者即对不同溶质进行选择性吸附, 随后, 用带有与溶质相同电荷的洗脱液进行洗脱, 被吸附的溶质可被置换而洗脱下来, 从而达到分离混合物中各种带电荷溶质的目的。

离子交换剂按其所带电荷的性质分为阴离子交换剂和阳离子交换剂两类。阴离子交换剂本身带有正电荷，可以吸引并结合混合物中带负电荷的物质；阳离子交换剂本身带有负电荷，可以吸引并结合混合物中带正电荷的物质。图 2-1 是以阴离子交换剂为例，说明离子交换层析的一般原理。许多生物物质，如氨基酸、蛋白质、核苷酸等都具有离子化基团，它们可以带净正电荷，也可以带净负电荷，其带净电荷情况取决于溶液 pH 值以及化合物的等电点，因此可以利用化合物的带净电荷不同，从混合物中加以分离。

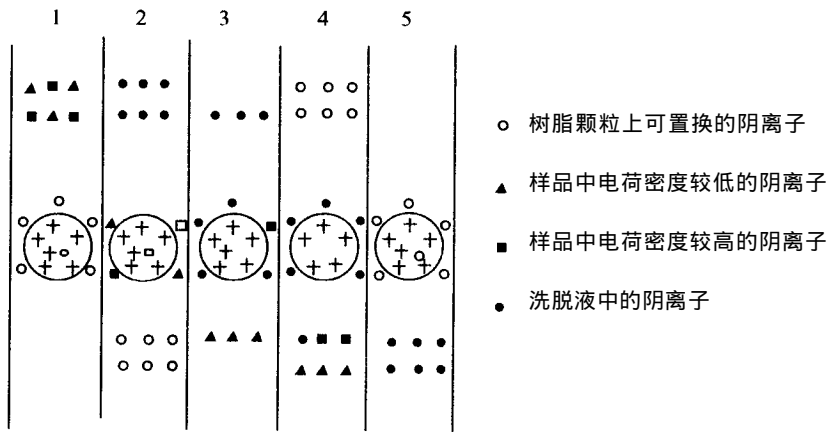


图 2-1 离子交换基本原理

1. 开始状态 2. 吸附样品 3. 开始洗脱 4. 洗脱结束 5. 再生

二、离子交换层析介质

离子交换介质主要由惰性载体和交换基团两部分组成。载体是由高分子化合物聚合或多糖类化合物交联而成的球形颗粒，交换基团一般都是由容易解离的酸性基团或碱性基团组成。

1. 载体的基本性质 载体应当具有良好的亲水性、水不溶性、较好的化学稳定性和较多的容易被活化基团。

2. 离子交换基团的性质 离子交换基团分酸性离子基团也称为阳离子交换基团和碱性离子基团（也称为阴离子交换基团）。离子交换基团在溶液中吸附电荷相反的离子，该离子基团可与被分离的物质发生可逆性的交换作用。

3. 离子交换基团的分类 根据离子交换基团的酸、碱性质可以分为以下几类。

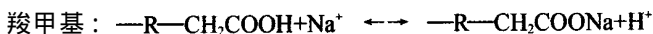
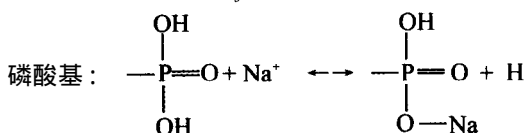
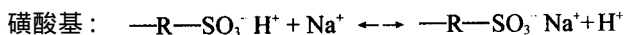
强酸型阳离子交换基团（如磺酸基）、中强酸型阳离子交换基团（磷酸基）、弱酸型阳离子交换基团（如羧酸基）、强碱型阴离子交换基团（如季氨基）、弱碱型阴离子交换基团（如伯氨基）。常用离子交换基团见表 2-1。

表 2-1 常用离子交换基团

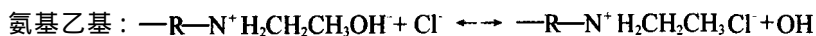
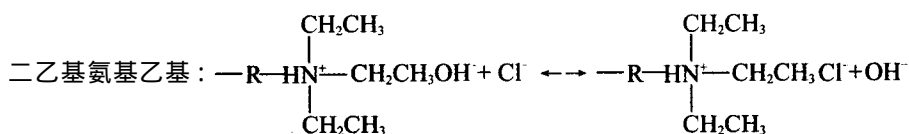
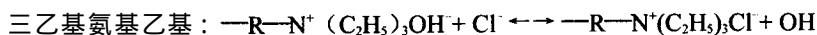
类 型	名 称	缩 写	结 构
阳离子交换基团	乙基磺酸基	SE	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$
	甲基磺酸基	SM	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$
	磷酸基	P	$-\text{O}-\text{PO}_3^-$
	羧甲基	CM	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$
阴离子交换基团	三乙基氨基乙基	TEAE	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$
	二乙基氨基乙基	DEAE	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
	氨基乙基	AE	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}_3$

4. 交换基团的交换反应式

阳离子交换基团



阴离子交换基团



三、常用的离子交换介质

常用的离子交换剂主要有离子交换树脂、离子交换纤维素、离子交换葡聚糖或离子交换琼脂糖凝胶等。

1. 离子交换树脂 苯乙烯作为单体，苯二乙烯作为交联剂，进行聚合和交联反应生成的具有三维网状结构的高聚物，其上再引入所需要的酸性基团或碱性基团。带酸性基团的属阳离子交换树脂，带碱性基团的属阴离子交换树脂。

2. 离子交换纤维素 离子交换纤维素对蛋白质和核酸的纯化极为有用，生物大分子不能渗入到交联的结构中，因此不能在一般的树脂上被分离，而纤维素之所以具有分离、纯化高分子量化合物的能力，是因为它具有松散的亲水性网状结构，有较大的表面积，大

分子可以自由通过。因此对生物大分子来说，纤维素的交换能力比离子交换树脂要大，同时纤维素来源于生物材料，洗脱条件温和，回收率高。常用的离子交换纤维素有两种，一种是二乙基氨基纤维素，即 DEAE-纤维素，属阴离子交换剂；另一种是羧甲基纤维素，即 CM-纤维素，属阳离子交换剂。

3. 离子交换葡聚糖或离子交换琼脂糖凝胶 将离子交换基团联结于交联葡聚糖或琼脂糖上而制成的各种交换剂。交联葡聚糖和琼脂糖具有三维网状结构，因此这种交换剂既有离子交换作用，又具有分子筛作用。

四、离子交换层析技术

1. 离子交换层析介质的选择 在液相层析分离中，选用阳离子交换层析介质还是阴离子交换层析介质，主要取决于被分离物质在溶液中的解离度及解离后离子所带电荷的性质，如果是正离子应当选用阳离子层析介质，负离子则选用阴离子层析介质。

2. 缓冲液的选择 离子交换层析的缓冲液来源很广，凡是由弱酸和强碱、强酸和弱碱、弱酸和弱碱组成，并具有一定缓冲容量的溶液均可以作为缓冲液。选择缓冲液主要考虑以下几方面：①有利于被分离物质的分离和稳定；②有利于再次纯化所用的缓冲溶液的衔接；③有利于从分离的样液中除去缓冲离子等。缓冲溶液主要包括缓冲溶液的浓度、缓冲容量、pH 值、离子强度和保护剂等。

第三节 凝胶层析

凝胶层析(Gel chromatography) 又称凝胶过滤、凝胶色谱、分子筛层析、分子排阻层析等，是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离的技术。

一、基本原理

凝胶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，小的分子可以进入凝胶网孔，而大的分子则被排阻于凝胶颗粒之外，因而具有分子筛的性质。

当样品加到凝胶层析柱时，样品随洗脱液的流动而移动，这时的样品一般作两种运动：①随洗脱液垂直向下移动；②作不定向扩散运动。分子量小的物质，在不定向扩散中可以进入到凝胶孔内部，然后再扩散出来，故流程长，通过柱子的速度慢，一般后流出层析柱；分子量大的物质，由于不能进入凝胶孔内部，只能在凝胶颗粒之间移动，故流程短，先流出层析柱。这样，分子量大小不同的物质就会彼此得到分离。图 2-2，可以形象地说明这个分离过程。

凝胶孔隙中的水称内水，用 V_i (inner volume) 表示。凝胶颗粒空隙之间的水称外水，用 V_o (outer volume) 表示，层析柱中凝胶颗粒的体积用 V_g (gel volume) 表示，层析柱的总体积以 V_t (total volume) 表示，即 $V_t = V_g + V_i + V_o$ 。