

第 1 篇 总 论

实 验 须 知

生化与分子生物学实验课是教学的重要环节。通过实验教学，观察某些生化与分子生物学反应现象，联系并加深对理论内容的理解，验证和巩固理论知识；掌握生化与分子生物学实验的基本操作、实验原理和一般仪器的使用；培养科学实验技能和严谨的科学态度，准确记录，科学分析并作出实事求是的实验报告，逐步提高观察问题、分析问题和解决问题的能力，为今后学习生物医学专业后续课程打好必要的基础。

为此，要求学生在实验前必须预习、理解基本原理和实验基本操作步骤、注意事项，列出所需试剂和仪器，实验中组织安排好时间，严肃认真地进行操作，细致观察变化，如实作好记录、书写实验报告等。

一、实验记录

实验记录要整洁、字迹清楚。

实验中观察到的现象、结果和数据，要及时地直接记在记录本上。原始记录必须准确、简练、详尽、清楚。

记录时，应如实正确地记录实验结果，不可夹杂主观因素。在实验条件下观察到的现象，也应如实仔细地记录下来。在定量实验中测得的数据，如称量物的重量、滴定管的读数、光电比色计的光密度值等，都应设计一定的表格准确记录，并根据仪器的精确度准确记录有效数字。要求对实验的每个结果都应正确无遗漏地做好记录。

实验中使用的仪器类型、试剂规格、化学反应式、分子量、浓度等 都应记录清楚。实验过程中，应一丝不苟，努力培养严谨的科学作风。

完整的实验记录应包括日期、实验题目、目的、操作、结果。

二、实验报告

实验结束后，应及时整理和总结实验结果及记录，写出实验报告。

实验报告应包括实验名称、实验日期、目的要求、原理、试剂配制、仪器设备、操作方法、实验结果、讨论等内容。

书写实验报告时，目的和要求、原理以及操作方法部分应作简单扼要的叙述，但对实验条件和操作的关键环节必须写清楚。对于实验结果部分，应根据实验的要求，把所得的实验结果和数据进行整理、归纳、分析和对比，并尽量总结成各种图表，如标准曲线图以及实验组与对照组实验结果的比较表等。还应针对实验结果进行必要的说明和分析。讨论部分不是对结果的重述，而是对实验方法、实验结果和异常现象进行探讨和评论，以及对于实验设计

的认识、体会和建议。

一般实验，要有结论，结论要简单扼要，说明本次实验所获得的结果。

三、爱护仪器、节约试剂

（一）实验前应检查本次实验仪器是否清洁完整，如有不足可向教师领取；不洁仪器洗净后交教师更换；实验结束应把所有仪器清洗干净；若发生破损，应填写仪器破损记录，注明原因，经教师同意后更换。

（二）实验试剂用后立即盖上瓶塞，不得盖错。不无故浪费试药、试剂。

（三）贵重或不熟悉之仪器，未经教师许可和指导，不要随意乱动。操作过程中要互相关心、互相帮助。

（四）爱护实验动物。

四、注意安全

（一）用橡胶吸球吸取试液，不要用口吸取试液，不要用口直接以吸管吸取，吸取强酸、强碱或剧毒试剂更需注意。不要肆意摆弄橡胶吸球，以免损坏。

（二）勿使易燃试剂（如乙醚、丙酮、苯等）近火，如遇这些物品着火时，要用湿揩布和灭火沙掩盖，不要用水冲。如遇强酸、强碱或有毒试液溅触身体，应立即用少量水冲洗，并报告教师速作处理。

（三）离开实验室必须关断电源、自来水，并关好门窗。

五、实验室清洁

（一）保持实验室安静、清洁，不准随地吐痰、乱丢纸屑。以讲卫生为光荣，不讲卫生为耻辱。

（二）用过的固体物品（如棉球、滤纸、火柴等）、腐蚀性或有毒物品不得丢在桌上、地下及水槽中，应丢入污物缸统一处理。

（三）每次实验结束，各人负责自己实验桌的卫生整理工作，由值日小组（以实验桌为单位）轮流打扫实验室。

第 1 章 基本操作法

第 1 节 吸量管的种类和使用

吸量管是生化与分子生物学实验最常用的仪器之一，测定结果的准确度和吸量管的正确选择与使用有密切关系。

一、吸量管的分类

(一) 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 1 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。

(二) 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 1 个刻度，放液时，量取的液体自然流出后，管尖需在盛器内壁停留 15s。注意管尖残留液体不要吹出。

(三) 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。

刻度吸量管的上方有一彩色标志环，此标志表示如表 1-1。

表 1-1 刻度吸量管上方彩色标志环的表示内容

	标准容量(mL)									
	0.1	0.2	0.25	0.5	1	2	5	10	25	50
色 标	红	黑	白	红	黄	黑	红	桔红	白	黑
环 数	单	单	双	双	单	单	单	单	单	单

二、吸量管的使用

量取整数量液体，并且取量要求准确时，应选用奥氏吸量管。量取大体积时要用移液管。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同管中，并且取量不同时，应选择 1 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 0.30、0.50、0.70、0.90mL 时，应选用 1 支 1.0mL 刻度吸量管。具体使用方法见表 1-2。

表 1-2 吸量管的使用方法

	正 确	错 误
拿 法	中指和拇指拿住吸管上端，食指顶住吸量管顶端	用拇指顶住吸量管顶端，其余四指拿住吸量管
取 液	用橡皮球吸液体至刻度上，眼睛看着液面上升 吸完后用食指顶住吸量管上端，并用滤纸擦干其外壁	眼睛不看液面上升 不用滤纸擦或调刻度后再擦

续表 1-2

	正 确	错 误
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上，液体凹面、刻度和视线应在同一水平面上	吸量管倾斜，悬空调刻度 液体凹面、刻度、视线不在同一水平面上
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。吸量管仍保持垂直 放开食指，使液体自动流出。奥氏吸量管和刻度到底的吸量管应吹出尖端残留的液体。移液管应最后靠壁 15s。不要吹	吸量管倾斜，其尖端不与容器壁接触，不成一角度 过早吹，奥氏吸量管和刻度到底吸量管未吹出尖端液体

第 2 节 玻璃仪器的洗涤与清洁

生化与分子生物学实验常用各种玻璃仪器，其清洁程度将直接影响测量样品的可靠性和反应的准确性。因此，玻璃仪器的清洁不仅是实验前后的常规工作，而且是一项重要的基本技术。

洗涤的玻璃仪器要求清洁透明，玻璃表面不含可溶解的物质。水沿器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，选用不同的清洁方法。

一、新购玻璃仪器的清洗

新购玻璃仪器表面附着油污和灰尘，特别是附有可游离的金属离子。因此，新购玻璃仪器需用肥皂水刷洗，流水冲净后，浸于 $0.93\text{mol/L Na}_2\text{CO}_3$ 溶液中煮沸。用流水冲净后，再浸泡于 $0.3\sim 0.6\text{mol/L HCl}$ 溶液中过夜。流水洗净酸液，用蒸馏水少量多次冲洗后，干燥备用。

二、使用过的玻璃仪器的清洗

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。

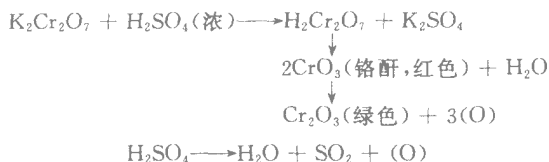
容量分析仪器 如吸量管、滴定管、容量瓶等 先用自来水冲洗 沥干后 于铬酸洗液中浸泡数小时。然后用自来水和蒸馏水冲洗干净，干燥备用。

比色杯，用毕立即用自来水反复冲洗，如有污物粘附于杯壁，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。

第 3 节 清洗液的种类与配制

一、铬酸洗液

广泛用于玻璃仪器的洗涤，其清洁效力来自它的强氧化性和强酸性。由重铬酸钾 ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 和浓硫酸配制而成。



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。

配制时有下列 3 种方法:

(一) 常用铬酸洗液 浓度为 30~50g/L。配制方法如下: 称取重铬酸钾 5g 置 250mL 烧杯中, 加入热水 5mL 搅拌, 为使其尽量溶解, 在烧杯下放一石棉网, 向烧杯中缓慢注入工业用浓硫酸 100mL, 随加随搅拌, 注意不要溅出来。因为放热较多, H_2SO_4 不宜加入过快。此时溶液由红黄色变为黑褐色。冷却后装瓶备用。盖严以防吸水。

(二) 取 100mL 工业用浓硫酸置烧杯中, 小心加热, 然后慢慢加入 5g 重铬酸钾粉 边加边搅, 待全部溶解后冷却, 贮于有塞的细口瓶中。

(三) 取 80g 重铬酸钾溶于 1 000mL 水中, 慢慢加入工业用硫酸, 边加边搅, 冷却后备用。

二、肥皂水和洗衣粉溶液

这是最常用的洗涤剂, 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。

三、50g/L $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 水溶液

碱性。可用于洗涤油污。所洗仪器不可用于磷的测定。

四、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA 二钠) 洗液

浓度为 50~100g/L, 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。

五、尿素洗液

8mol/L 的尿素溶液是清洗血污和蛋白质的良好溶剂。

六、草酸洗液

称取 5~10g 草酸 溶于 100mL 水中, 加入少量硫酸或浓盐酸, 可洗脱高锰酸钾的痕迹。

七、盐酸-乙醇洗液

30g/L 的盐酸-乙醇可以除去玻璃器皿上的染料附着物。

八、乙醇-硝酸混合液

用于清洗一般方法难于洗净的有机物。最适合于洗净滴定管。

思考题

1. 吸量管使用需注意哪些方面?
2. 有哪几类常用清洁液? 如何配制?

(吴士良)

第 4 节 离心机的使用方法

欲使沉淀与母液分开，过滤和离心都可以达到目的，但是当沉淀粘稠，或颗粒小得可以通过滤纸时，则需选用离心法。特别是溶液量小又需定量测定时，离心分离法更具优越性。

离心机种类很多。一般实验室配备的离心机是最大转速约为 4 000r/min 左右的台式或落地式离心机。本节将简要叙述一般离心机的使用方法（特殊用途的离心机请参阅相关的说明书）。

一、将待离心的液体置于玻璃离心管中。

二、两只装有待离心液的离心管分别装入两个完整的并且配备了橡皮软垫的离心套管中。置天平两侧配平，较轻一侧在离心管和套管之间用滴管加水，直至平衡。

三、检查离心机内有无异物和无用的套管，并且运转平稳。将已配平的两个套管对称地放置于离心机的离心平台上。盖好上盖，开启电源。

四、慢慢推动转速调节杆，增加离心机转速。当离心机转速达到要求时，记录离心时间。

五、达到离心时间后，逐渐减速，断开电源，当离心机自然停止后，取出离心管和离心套管。

六、倒去离心套管内的平衡用水，倒置于干燥处晾干。

第 5 节 分光光度计结构及分光光度法

一、分光光度计的结构

分光光度计的种类很多，其原理及结构基本相似，一般都包括下列几个部件：

（一）光源

一个好的光源要求具备发光强度高、光亮、稳定、光谱范围较宽和使用寿命长等特点。分光光度计上常用的光源有钨灯和氢灯（或氘灯），前者适用于 340~900nm 范围的光源，后者适用于 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。

（二）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。

（三）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控制入射单色光的强度，并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。

（四）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。

注意保持比色杯的清洁是取得良好分析结果的重要条件之一，吸收池上的指纹、油污和壁上的一些沉积物，都会显著地影响其透光性，因此务必注意仔细操作和及时清洗并保持清

洁。

(五) 检查系统

主要由受光器和测量器两部分组成，常用的受光器有光电池、真空光电管或光电倍增管等。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。较高级的现代仪器，还常附有电子计算机及自动记录器，可自动描出吸收曲线。

二、分光光度法

光是由光子所组成，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。

将电磁波按波长（或频率）顺序排列起来，即得 γ 射线、X 射线、紫外线、可见光、红外线、无线电用电磁波等。

人肉眼可见的光线称可见光，波长范围在 $400 \sim 760\text{nm}$ ； $200 \sim 399\text{nm}$ 为紫外光区（波长 $< 400\text{nm}$ 的光线）； $761 \sim 500\,000\text{nm}$ 为红外区（波长 $> 760\text{nm}$ 的光线）。 $\text{nm} = \text{m}\mu = 10\text{\AA}$ （埃， $1\text{\AA} = 10^{-8}\text{cm}$ ）。

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为单色光，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，是各种单色光的混合光（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。

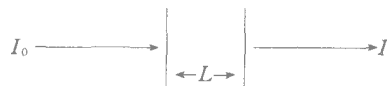
一切物质都会对某些波长的光进行吸收，而物质对不同波长的射线，表现为不同的吸收现象，这一性质称为选择性吸收。有色溶液之所以呈现不同颜色，就是由于这种对光的选择性吸收所致。某些无色物质虽对可见光无吸收作用，但也能选择性地吸收在可见光范围外的部分光线，即可吸收特定波长的紫外线或红外线。物质的吸收光谱与它们本身的分子结构有关，不同物质由于其分子结构不同，对不同波长光线的吸收能力也不同，因此每种物质都有其特异的吸收光谱。在一定条件下，其吸收程度与该物质浓度成正比，故可利用各种物质的不同的吸收光谱特征及其强度对不同物质进行定性和定量分析。吸收光谱的测定可用来检测各种不同的物质。

分光光度法，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。

(一) Lambert 定律

一束平行单色光垂直照射于一均匀物质（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，光线强度的减弱也愈显著。

设：入射光强度为 I_0 ， L 表示溶液的厚度（即光程）出射光（透过光）强度为 I ，则：



根据辐射能理论推导 I_0 与 I 之间关系为：

$$\lg \frac{I_0}{I} = K_1 L \quad (1)$$

K_1 是常数，受光线波长、溶液性质、溶液浓度的影响。

(二) Beer 定律

当一束单色光通过一溶液时, 光能被溶液介质吸收一部分, 若溶液的厚度不变, 则溶液浓度 C 愈大, 光吸收愈大, 透射光线强度的减弱也愈显著, 光强度减弱的量与溶液浓度增加量成正比。

$$\lg \frac{I_0}{I} = K_2 C \quad (2)$$

K_2 为吸收系数, 是常数, 溶液对光吸收的大小与溶液浓度 C 成正比。

(三) Lambert-Beer 定律 (又称吸收定律)

(1) 式与 (2) 式合并得:

$$\lg \frac{I_0}{I} = KCL$$

$$\text{令 } A = \lg \frac{I_0}{I}, T = \frac{I}{I_0}$$

$$\text{则 } A = KCL, A = -\lg T$$

T 为透光度 A 为吸光度 (光密度、消光度)

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。相同物质和相同波长的单色光的消光系数不变。

(四) 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 $\frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} = \frac{KC_{\text{样}}L}{KC_{\text{标}}L} = \frac{C_{\text{样}}}{C_{\text{标}}}$

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

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。

利用分光光度法对物质进行定量测定的方法, 主要有如下几种:

(一) 标准曲线法

用已知浓度的标准溶液, 配制成一系列不同浓度的标准溶液, 在最大吸收波长 (λ_{max}) 处测得各个吸光度 (A 值), 以 A 为纵坐标, 浓度为横坐标, 作标准曲线 (绘制 $A-C$ 曲线) 取其直线部分作定量依据。

在测定被测样品时, 以相同条件在 λ_{max} 处测定 A 值, 再从标准曲线上查得该样品的相应浓度。

标准曲线制作与样品的测定, 应在同一仪器上进行。在配制样品时, 一般选择其浓度相当于标准曲线中部的浓度较好。

(二) 直接比较法 (标准管法)

将样品溶液与已知浓度的标准溶液在相同条件下 (λ_{max}) 分别测定 A 值 (因为在此条件

下,两者 K 值相等), 然后可根据下列公式, 求得样品溶液的浓度。

$$\frac{A_{\text{标}}}{C_{\text{标}}} = \frac{A_{\text{样}}}{C_{\text{样}}}, \quad C_{\text{样}} = \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \cdot C_{\text{标}}$$

(三) 吸收系数法

1. 摩尔消光系数 (ϵ)

即溶液浓度为 1mol/L 、溶液厚度为 1cm 时的吸光度值 (光密度值)。 ϵ 值在 λ_{max} 时, 可在一定实验条件下测得或由手册、药典中查出。

在已知 ϵ 的情况下, 可将样品在同样条件下测定其 A 值, 再根据下式求得样品的浓度。

$$C = \frac{A}{\epsilon}$$

2. 百分消光系数 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$)

即浓度以百分浓度 ($\text{g}/100\text{mL}$) 来表示的消光系数, 实际上即溶液浓度为 1% 及厚度为 1cm 时的光密度值。

$$\frac{A}{E_{1\text{cm}}^{1\%}}$$

用于定性分析。

用不同波长的单色光作为入射光, 分别通过被测溶液, 并记录被测溶液对每一波长的吸光度 (A), 然后以波长 (λ) 为横轴, 相应的吸光度 (A) 为纵轴作图, 可得到某种物质的特征性的吸收光谱曲线。在吸收光谱中, 往往可以找到 1 个或几个大的吸收值。其中最大吸收峰处的波长称为最大吸收波长 (λ_{max})。物质不同, 它们的最大吸收波长也往往不同。

思考题

1. 离心机的一般使用步骤。
2. 分光光度法的原理与哪两条定律有关? 其内容是什么?

(吴士良)

第 2 章 电泳技术

第 1 节 电泳的基本原理

带电荷的质点，在一定条件的电场作用下，可向一极移动，如带正电荷的质点移向负极，这种现象称为电泳。许多生物分子都带有电荷，其电荷的多少取决于分子性质及其所在介质的 pH 及其组成。由于混合物中各组分所带电荷性质、电荷数量以及分子量的不同，在同一电场的作用下，各组分泳动的方向和速度也各异。因此，在一定时间内，根据各组分移动距离的不同，可达到分离鉴定各组分的目的。

设一带电粒子在电场中所受的力为 F ， F 的大小取决于粒子所带电荷 Q 和电场的强度 X ，即： $F=QX$

又按 Stoke 定律，一球形的粒子运动时所受到的阻力 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，

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

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 也称电泳速度 以 u 表示，即：

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

由(2)可见粒子的迁移率在一定条件下取决于粒子本身的性质，即其所带电荷及其大小和形状。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 （以厘米计）即：

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

又电场强度 X 为单位距离 l （以厘米计）内电势差 E （以伏特计）即：

$$X = \frac{E}{l}$$

以 $v = \frac{d}{t}$ ， $X = \frac{E}{l}$ 代入(2)式即得：

所以迁移率的单位为 $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ 。

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：

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

两种物质移动距离的差为：

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

(3)式指出物质 A 和 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。

第 2 节 影响电泳的主要因素

一、电泳介质的 pH

当介质的 pH 等于某种两性物质的等电点时，该物质处于等电状态，即不向正极或负极移动。当介质 pH 小于其等电点时，则呈正离子状态，移向负极；反之，介质 pH 大于其等电点时，则呈负离子状态，移向正极。因此，任何一种两性物质的混合物电泳均受介质 pH 的影响，即决定两性物质的带电状态及电量。为了保持介质 pH 的稳定性，常用一定 pH 的缓冲液，如分离血清蛋白质常用 pH8.6 的巴比妥或三羟甲基氨基甲烷（Tris）缓冲液。

二、缓冲液的离子强度

离子强度对电泳的影响是：离子强度低，电泳速度快，区带分离不清晰；离子强度高，电泳速度慢，但区带分离清晰。如离子强度过低，缓冲液的缓冲量小，不易维持 pH 的恒定 离子强度过高，则降低蛋白质的带电量（压缩双电层），使电泳速度减慢。所以常用离子强度为 0.02~0.2 之间。

溶液离子强度的计算：

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

I 离子强度 C_i ：物质的量浓度（指离子而言） Z_i^2 ：离子的价数

如：0.154mol/L 氯化钠溶液的离子强度为：

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

0.1mol/L 硫酸锌溶液的离子强度为：

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

0.01mol/L NaCl 和 0.1mol/L Na_2HPO_4 的溶液，其离子强度为：

$$I = \frac{1}{2} \sum (0.01 \times 1^2 + 0.01 \times 1^2 + 2 \times 0.1 \times 1^2 + 0.1 \times 2^2) = 0.31$$

溶液中不能解离的或极少解离的物质不应计入离子强度。

三、电场强度

电场强度和电泳速度成正比关系。电场强度以每厘米的电势差计算，也称电势梯度。如纸电泳的滤纸长 15cm 两端电压（电势差）为 150V 则电场强度为 $\frac{150}{15} = 10\text{V/cm}$ 。电场强度愈高，则带电粒子的移动愈快。电压增加，相应电流也增大，电流过大时易产生热效应，可使蛋白质变性而不能分离。

四、电渗作用

在电场中，液体对固体的相对移动，称为电渗。如滤纸中含有表面带负电荷的羧基，溶液则向负极移动。由于电渗现象与电泳同时存在，所以电泳的粒子移动距离也受电渗影响。如

纸上电泳蛋白质移动的方向与电渗现象相反,则实际上蛋白质泳动的距离,等于电泳移动距离减去电渗距离。如电泳方向和电渗方向一致,其蛋白质移动距离,等于两者相加。电渗现象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间,观察电渗方向和距离。

第 3 节 区带电泳的分类

一、按支持物物理性状不同区分

- (一) 滤纸及其他纤维素膜电泳 如醋酸纤维膜、玻璃纤维膜、聚胺纤维膜电泳。
- (二) 粉末电泳 如纤维素粉、淀粉、玻璃粉电泳。
- (三) 凝胶电泳 如琼脂糖、琼脂、硅胶、淀粉胶、聚丙烯酰胺凝胶电泳。
- (四) 丝线电泳 如尼龙丝、人造丝电泳。

二、按支持物的装置形式不同区分

- (一) 平板式电泳 支持物水平放置,是最常用的电泳方式。
- (二) 垂直板式电泳
- (三) 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,缓冲液和样品自顶端下流,与电泳方向垂直。可分离大量的蛋白质。以后改用淀粉、纤维素粉、玻璃粉等代替滤纸,分离效果更好。

三、按 pH 的连续性不同区分

- (一) 连续 pH 电泳 电泳的全部过程中缓冲液 pH 保持不变。如纸电泳、醋酸纤维膜电泳。
- (二) 非(不)连续 pH 电泳 缓冲液与支持物之间有不同的 pH 如聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳、等电聚焦电泳、等速电泳等,能使分离物质的区带更加清晰,并可作 ng 级微量物质的分离。

不连续电泳与连续电泳的主要区别在于前者(1)有两层不同孔径的凝胶系统;(2)电极槽中及两层凝胶中所用的缓冲液 pH 值不同;(3)电泳过程中形成的电位梯度亦不均匀。而后者在这三个方面都是单一或是均匀的。

第 4 节 几种常见的电泳方法

一、聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis) 是以聚丙烯酰胺凝胶作为载体的一种区带电泳,这种凝胶由丙烯酰胺 (acrylamide 简称 Acr) 和交联剂 N,N'- 甲叉基 亚甲基 双丙烯酰胺 (N,N'-methylene-bis-acrylamide 简称 Bis) 聚合而成。聚丙烯酰胺凝胶具有机械强度高、弹性大、透明、化学稳定性高、无电渗作用、设备简单、用量少 (1~100 μ g) 和分辨率高等优点,并可通过控制单体浓度或单体与交联剂的比例聚合成孔径大小不同的凝胶,可用于蛋白质、核酸等物质的分离、定性和定量分析。还可结合去垢剂十二烷基硫酸钠 (SDS),以测定蛋白质亚基分子量。

Acr 和 Bis 无论是单独存在或混合在一起都是稳定的,一旦出现自由基团时,就会发生聚合反应。自由基团的引发有化学和光合两种方法,化学法的引发剂是过硫酸铵 (简称 Ap),

催化剂为四甲基乙二胺（简称 TEMED）；光化学法是在光线照射下，由光敏感物质核黄素来引发，催化剂也是 TEMED。由于单体及交联剂、引发剂和催化剂的浓度、比例、聚合条件等的不同，便可产生不同孔径的凝胶。一般而言，凝胶浓度愈大，交联度愈大，孔径愈小。凝胶浓度的选用见表 2-1。

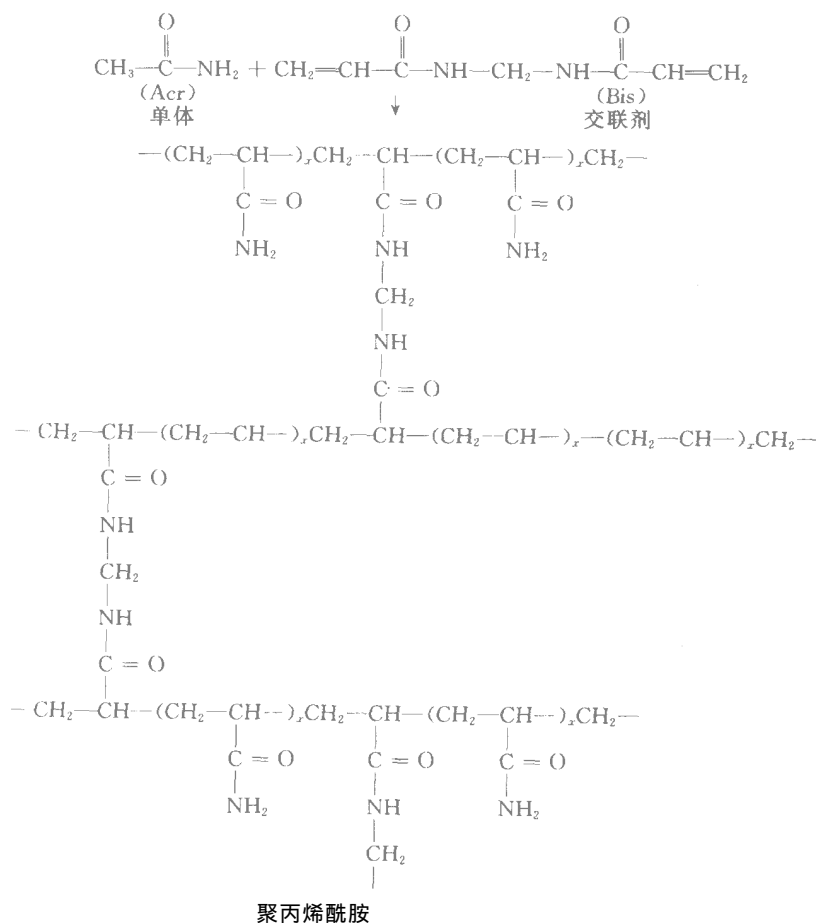
表 2-1 凝胶浓度的选用

	分子量范围	凝胶浓度(%)
	<10 000	20~30
蛋	10 000~40 000	15~20
白	40 000~100 000	10~15
质	100 000~500 000	5~10
	>500 000	2~5
核	<10 000	15~20
酸	10 000~100 000	5~10
	100 000~2 000 000	2~2.6

根据凝胶形状可分为盘状电泳和板状电泳。

盘状电泳是在直立的玻璃管内，利用不同 pH 的缓冲液进行电泳，同时，由于样品混合物被分开后形成的区带非常窄，呈圆盘状（discoid shape）故而得名。板状电泳（垂直或水平）是将丙烯酰胺聚合成方形或长方形平板状，平板大小和厚度视实验需要而定。垂直平板电泳有如下优点：（1）表面积大，易于冷却，便于控制温度；（2）能在同一凝胶板上，相同操作条件下，同时点加多个样品，便于相互比较；（3）

一个样品在第 1 次电泳后，可将平板转 90 度进行第 2 次电泳即双向电泳；（4）便于用各种方法鉴定（如放射自显影等）。制备凝胶时聚丙烯酰胺的聚合反应及其结构如下：



其缺点是操作较复杂，电压较高，电泳时间较长。

凝胶的机械性能、弹性、透明度和粘着度取决于凝胶总浓度。通常用 $T\%$ 表示总浓度 即 100mL 凝胶溶液中含有 Acr 及 Bis 的总克数。Acr 和 Bis 的比例常用交联度 $C\%$ 表示 即交联剂 Bis 占单体 Acr 和 Bis 总量的百分数。

凝胶的孔径主要受 $T\%$ 的控制。通常 $T\%$ 越大 平均孔径越小 凝胶的机械强度增加。实验表明，当 $T\%$ 值固定时，Bis 浓度在 5% 的孔径最小，高于或低于 5% 时，孔径却相应变大。为了在使用凝胶做实验时有较高的重现性，制备凝胶所用的 Bis 浓度、Bis 和 Acr 的比例、催化剂的浓度、聚合反应的溶液 pH 值、聚胶所需时间等，凡能影响迁移率的因子都必须保持恒定。欲将蛋白质或核酸类大分子混合物很好地分离，并在凝胶上形成明显的区带，选择一定孔径的凝胶是关键。文献中常见的标准凝胶的浓度为 7.5% 孔径平均为 5nm 。大多数生物体内蛋白质在此标准凝胶中电泳均能得到满意结果。

不连续凝胶电泳的支持体由样品胶、分离胶和浓缩胶组成。样品胶在最上层；中层为浓缩胶，一般 Acr 为 $2\% \sim 3\%$ ，缓冲液为不同浓度的 Tris-HCl, pH 为 6.7 左右；分离胶在最下层，Acr 为 $5\% \sim 10\%$ ，缓冲液常用 Tris-HCl, pH 为 8.9。上下电泳槽盛有 pH 为 8.3 的 Tris-甘氨酸缓冲液，上电泳槽接电源的负极，下电泳槽接正极。

不连续凝胶电泳的分离原理如下：

(一) 样品的浓缩效应

1. 凝胶层的不连续性 浓缩胶与分离胶中所用原料总浓度和交联度不同，孔径大小就不同。前者孔径大，后者孔径小。带电荷的蛋白质离子在浓缩胶中泳动时，因受阻力小，泳动速度快。当泳动到小孔径的分离胶时，遇到阻力大，移动速度逐步减慢，使样品浓缩成很窄的区带。

2. 缓冲液离子成分的不连续性 最上层电极缓冲液中甘氨酸在 pH8.3 时，可部分解离为 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$ 。3 层胶中的缓冲液都是 Tris-HCl, HCl 在各自 pH 条件下均被全部解离为 Cl^- 。而在 pH6.7 时蛋白质被解离带负电（因大部分蛋白质 pI 值在 5.0 左右，通电后，电极缓冲液中的甘氨酸进入浓缩胶缓冲液，pH 由 8.3 变为 6.7）使甘氨酸解离度降低 负电荷减少，迁移率明显下降（称慢离子）。相反 Cl^- 处于解离状态，且颗粒和摩擦力最小，其迁移率最大（称快离子）。结果在浓缩胶中，离子迁移率为 $\text{Cl}^- > \text{蛋白质}^- > \text{甘氨酸}^-$ 。由于 Cl^- 的快速移动 使在 Cl^- 后面胶层中的离子浓度骤然降低，形成一个低电导或称高电位梯度（电位差）区域（电势梯度 $E = \frac{\text{电流强度 } I}{\text{电导率 } \eta}$ ）。因为电泳速度取决于电位差和有效迁移率，所以在此区域中，使蛋白质离子及甘氨酸离子加速向阳极移动。由于蛋白质离子的有效迁移率居于两者之中，一定时间后，当电位梯度不大时， Cl^- 能够超越蛋白质离子，而甘氨酸离子则落后于蛋白质离子。当这三种离子形成界面时，蛋白质离子就聚集在 Cl^- 和甘氨酸离子之间，浓缩成很窄的薄层。此浓缩效应使蛋白质浓缩了数百倍。

在分离胶层中，因缓冲液 pH 为 8.9，甘氨酸进入此胶层后，其解离度大大增加，它的迁移率几乎与 Cl^- 接近。此外，分离胶孔径小，蛋白质在泳动时，所受阻力较浓缩胶中大，移动缓慢。由于这两个原因，使甘氨酸离子在分离胶中有效迁移率超过蛋白质离子，导致分离胶不具备浓缩胶效应，而只有分离效应。

(二) 分子筛效应

由于在凝胶电泳中, 凝胶浓度不同, 其网的孔径大小也不同, 可通过的蛋白质分子量范围也就不同。在分离胶中孔径较小, 分子量和构型不同的蛋白质分子, 通过一定孔径的凝胶时所受阻力的不同, 从而引起泳动速度的变化, 所以多种蛋白质即使所带电荷相同, 迁移率相等, 在聚丙烯酰胺中经一定时间泳动后, 也能彼此分开。大分子受阻程度大, 走在后面, 小分子受阻小, 走在前面。

(三) 电荷效应

由于各种蛋白质所带电荷不同, 有效迁移率也不同, 它们在浓缩胶和分离胶交界处被浓缩成狭窄区带, 仍以一定程序排列成各自的小圆盘状, 紧接在一起。当它们进入分离胶时, 由于电泳体系已处于一个均一的连续状态中, 故此时以电荷效应为主, 带不同电荷的蛋白质离子按其移动速度大小顺次分离。

二、SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳是根据蛋白质分子 (或其他生物大分子) 所带电荷的差异及分子大小的不同所产生的不同迁移率而分离成若干条区带。然而有时两个分子量不同的蛋白质, 由于其分子大小的差异, 被它们所带电荷的差别补偿而以相同的速度向阳极移动, 因而不能达到分离的目的。SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳就是设法将电荷差异这一因素除去或减小到可以略而不计的程度。

SDS 是一种阴离子表面活性剂, 它能使蛋白质的氢键、疏水键打开, 并结合到蛋白质的疏水部分, 形成 SDS- 蛋白质复合物。在一定条件下, SDS 与大多数蛋白质的结合比为 1.4g SDS/1g 蛋白质。由于 SDS 带有负电荷, 使各种 SDS- 蛋白质复合物都带上相同密度的负电荷, 它的量大大超过了蛋白质分子原有的电荷量, 因而掩盖了不同蛋白质分子原有的电荷差别。这样的 SDS- 蛋白质复合物在凝胶电泳中的迁移率不再受蛋白质原有的电荷和形状的影响, 而只与蛋白质的分子量有关。在一定条件下, 迁移率与蛋白质的分子量的对数成正比。

$$Mr = K(10^{-bm}) \quad \lg KM = \lg K - bm = K_1 - bm$$

式中, Mr : 蛋白质的分子量, K, K_1 : 常数, b : 斜率, m : 迁移率。

应用 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳测蛋白质分子量, 必须先以已知蛋白质分子量迁移率为横坐标、已知蛋白质分子量对数为纵坐标作一个标准曲线。然后把未知分子量的蛋白质样品在同样的条件下电泳, 测出其迁移率。再从图中求出未知蛋白质样品的分子量。由于用这种方法测蛋白质分子量简便、快速、精确度高 (一般误差在 $\pm 10\%$ 以内) 近来已得到广泛应用。

三、免疫电泳

免疫电泳是在凝胶电泳与凝胶扩散试验基础上发展起来的一项化学技术。它是一种特异性的沉淀反应, 敏感性较高, 每种抗原可以和相应抗体起反应, 呈现一条乳白色的沉淀弧线。它不仅可以检定混合物中组分的数目, 而且还可以利用各组分的电泳迁移率结合免疫特异性及化学性质和酶的活力等来确定混合物中各组分的性质。

将待检可溶性物质 (抗原) 在琼脂板上进行电泳分离, 由于各种可溶性蛋白质分子的颗粒大小、质量与所带电荷的不同, 在电场作用下, 其带电分子的运动速度 (迁移率) 具有一定的规律。因此通过电泳能把混合物中的各种不同成分分离开来。当电泳完毕后, 在琼脂板一定的位置上挖一条长的槽, 加入相应的抗血清, 然后置湿盆内让其进行双向扩散。在琼脂板中抗原和抗体互相扩散, 当两者相遇且比例适合时, 就形成了不溶性的抗原抗体复合物, 出

现乳白色的特异性沉淀弧线。可以根据出现的沉淀弧线数目来初步判定混合物中抗原的数量。一种好的抗血清应出现较清晰、特异性的沉淀弧线。沉淀弧线的位置取决于抗原和抗体两种反应物的分子量、比率和扩散速度。当抗原扩散速度慢时，沉淀弧线弯曲度大，其位置靠近移动轴。反之当抗原扩散速度较快时，弧度较平，其位置离开移动轴。

思考题

1. 电泳有哪几类？
2. 简述影响电泳的主要因素。

（徐岚）

第 3 章 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。它是利用混合物中各组分的理化性质（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，在两相运动中不断地进行交换、分配、吸附及解吸附等过程，可将各组分间的微小差异经过相同的重复过程而达到分离。配合相应的光学、电学和电化学检测手段，可用于定性、定量和纯化某种物质，其纯度高达 99%。层析法的特点是分离率、灵敏度（pg-fg 级）、选择性均高的一种分离方法。尤其适合样品含量少，而杂质含量多的复杂生物样品的分析。

无论哪种层析均由固定相和流动相组成。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。

第 1 节 层析技术的分类

一、按层析原理分类

（一）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进行分离。

（二）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使物质分离。

（三）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。

（四）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。

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

二、按操作方式不同分类

（一）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。

（二）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。

（三）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。