



生物化学基本实验技术

一、分光光度法

(一) 原理

光线的本质是电磁波的一种，有不同的波长。肉眼可见的彩色光称为可见光，波长范围在 400—760nm。短于 400nm 的光线称为紫外线（200—400nm 为紫外光区），短于 200nm 的叫远紫外线，再短的就是 X 射线和 γ 射线了。长于 760nm 的光线称为红外线（760—500000nm 为红外区），再长的就是无线电波了。

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，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。

当光线通过透明溶液介质时，其辐射的波长有一部分被吸收，一部分透过，因此光线射出溶液之后，部分光波减少。例如，可见光通过有色溶液后，或红外线通过多种气体后，部分光波被吸收。不同的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有的吸收光谱，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的分析。

在可见光范围内，利用溶液的颜色深浅来测定溶液中物质含量的方法，称为比色法。采用适当的光源、棱镜和适当的光源接受器，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。这就是分光光度法。

分光光度法是生物化学中最有价值的测定方法之一。通过测定紫外、可见或红外的特征吸收光谱可以鉴定未知化合物；通过测量在某一波长的光吸收可以测定溶液中未知化合物的浓度。

分光光度法所依据的原理是 Lambert 和 Beer 定律。

1. Lambert 定律 一束单色光通过透明溶液时，一部分波长的光波被吸收，被吸收光波的量与溶液厚度有一定的比例关系。

即：

$$\frac{dI}{I} = -a dl$$

将上式积分得：

$$\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = - \int_0^l a dl$$

$$I = I_0 e^{-al} \dots \dots \dots (1)$$

式中 I_0 为入射光强度

I 为通过溶液后的光强度

l 为溶液的厚度

e 为自然对数的底 2.718

a 为溶液的吸光率

(1) 式可改写为：

$$\ln I_0/I = al \dots \dots \dots (2)$$

将 (2) 式换算成常用对数式，即：

$$\lg I_0/I = 0.4343. al$$

令 $k=0.4343 \cdot a$

则

$$\lg I_0/I = kl \dots \dots \dots (3)$$

此处以 k 为吸光率。

2. Beer 定律 以溶液中溶质浓度变化代替溶液厚度的改变,光波的吸收与溶质浓度的改变有类同的关系。即一束单色光通过溶液时,光波被溶液吸收一部分,吸收多少与溶液中溶质浓度有一定比例关系。依据 Lambert 定律中同样的推导,可得出下式:

$$\lg I_0/I = kc \dots \dots \dots (4)$$

式中 c 为溶液中溶质的浓度。

Lambert 定律和 Beer 定律合并,即 (3) 和 (4) 式合并为 (5) 式:

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

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

则 $A=kl \dots \dots \dots (6)$

$$A = -\lg T$$

式中 A 为吸光度 (光密度、消光度), T 为透光度。其中 k 为常数,又称为消光系数 (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。对于相同物质和相同波长的单色光则消光系数不变。

(6) 式为 Lambert-Beer 定律的物理表示式,其含义为:一束单色光通过透明溶液后,光波被吸收一部分,吸收多少与溶液中溶质的浓度和溶液



的厚度成正比。此式为分光光度法的基本计算式。

(二) 计算

利用分光光度法对物质进行定量测定的方法，主要有以下三种：

1. 利用标准管计算测定物含量（直接比较法） 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，读取吸光度，再根据（6）式计算，即

$$A_{\text{标}} = KC_{\text{标}}L \quad A_{\text{样}} = KC_{\text{样}}L$$

$$\text{故 } \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} = \frac{KC_{\text{样}}L}{KC_{\text{标}}L} = \frac{C_{\text{样}}}{C_{\text{标}}}$$

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

2. 利用标准曲线换算（标准曲线法） 先配制一系列已知浓度的测定物溶液，按测定管同样方法处理显色，读取各管光密度。然后以各管光密度为纵轴，浓度为横轴，在坐标纸上作图得标准曲线。再以测定管光密度从标准曲线上查得测定物的浓度。

标准曲线的制作与测定管的测定，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。

3. 吸收系数法 利用克分子消光系数 ϵ 求取测定物浓度。当溶液浓度 c 为 1mol/L ，溶液厚度 l 为 1cm 时的消光系数既为克分子消光系数，以 ϵ 表示，此时 ϵ 与 A 相等。实际应用中测定物常以 g/ml 作浓度单位。 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。

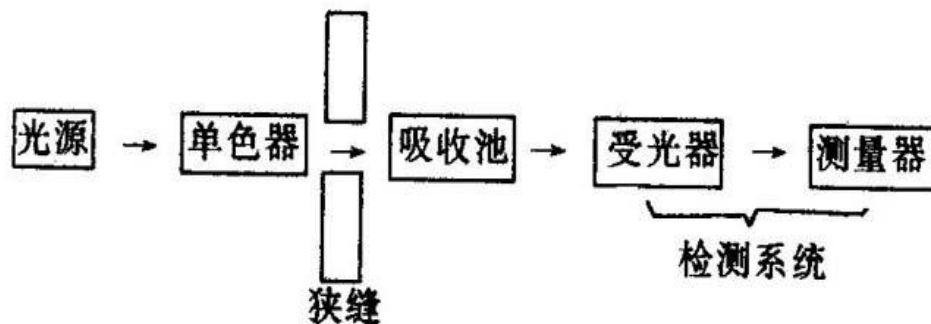
在已知 ϵ 的情况下，可将样品在同样条件下测定其 A 值，再根据下式

求得样品的浓度。

$$C = A / \epsilon$$

(三) 分光光度计的结构

分光光度计的种类很多，其基本原理及结构基本相似，一般都包括下列几个部件，如下图所示。



1. 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，后者适宜于 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。

2. 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。

3. 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调节入

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节的。

4. 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。注意保护比色杯的质量是取得良好分析结果的重要条件之一，吸收池上的指纹、油污或壁上的一些沉积物，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。

5. 检测系统

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。

（四）用于 Lambert-Beer 定律的名词和符号：

名 词	定 义	符 号	同义名词或符号
透光度	I/I_0	T	透射率、透光度、 P/P_0
吸光度	$\lg(I/I_0)$	A	D、OD、光密度
厚度		L	b、d、光路长度
吸收系数	A/CL	K	E 消光系数、比消光

（王鲁华）



二、层析法

层析分离技术是一种物理的分离方法，利用混合物中各组分物理化学性质的差别（如吸附力、分子形状和大小、分子极性、分子亲和力、分配系数等）使各组分以不同程度分布在两个相中，其中一个为固定的，称固定相，另一个相则流过此固定相，称流动相，从而各组分以不同速度移动而达到分离。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，同样流动相可以是液体也可以是气体。

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，根据所用两组分不同分为以下几类：吸附层析、分配层析、离子交换层析、凝胶层析和亲和层析等；根据操作方式不同分为：柱层析、薄层层析和纸层析等。

（一） 吸附层析

1. 原理

利用固定相的固体吸附剂表面对不同组分吸附力的大小及洗脱液对它的溶解作用（解吸作用）的差异进行分离。

2. 吸附剂

吸附剂是具有较大表面积的活性多孔固体，与待分离物质的极性官能团作用。常用的吸附剂有活性炭、硅胶、氧化铝、羟基磷灰石等，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，常用于分离非极性的和极性不强的有机物，如甘油酯、磷脂、胆固醇等。

3. 方式 吸附层析根据操作方式的不同，分为柱层析与薄层层析两种。

（1） 柱层析法：柱层析法是用一根玻璃管柱，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 1 中的①。然后在柱顶部加入要分离的样品溶液，如图 1 中的②。假如样品内含两种成分 A 和 B，则二者被吸附在柱上端，形成色圈，如图 1 中的③。样品溶液全部溶入吸附柱中之后，接着就加入合适的溶剂洗脱，如图 1 中的④。A 与

B 就随着溶剂的向下流动而移动。最后分离情况如图 1 中的⑤所示。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，被吸附后的 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 粒子吸附，随后，新溶剂又使 A 粒子溶解下移。由于溶剂与吸附剂对 A 与 B 的溶解力

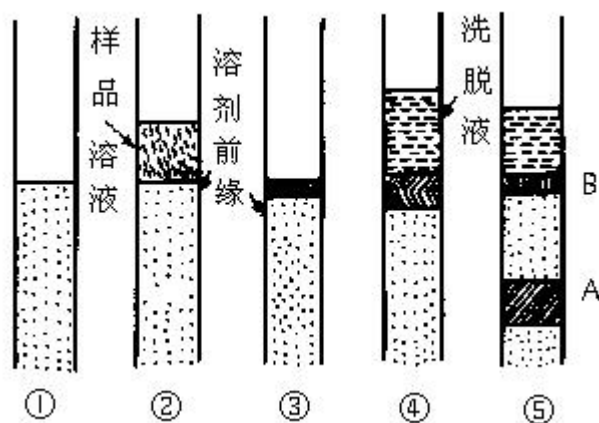


图 1 二元混合物的柱层析示意图

与吸附力不完全相同，A 与 B 移动的速率也不同，经一定时间，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 有颜色可看到色层；如样品无色，可用其它方法使之显色，为进一步鉴定，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。

(2) 薄层层析法：薄层层析是利用玻璃板、塑料板、铝板、聚酰胺膜等作为固定相的载体，在板上涂上一薄层不溶性物质为固定相，再把样品涂铺在薄层的一端，然后用合适的溶剂展开，而达到分离、鉴定的目的。其优点是：设备简单，操作容易；层析展开时间短，分离时几乎不受温度的影响；可采用腐蚀性的显色剂，且可以在高温下显色；分离效率高。

薄板的制备：所用玻璃板表面必须光滑、清洁。

根据制薄板的方法不同薄板可以分为软板和硬板两种。软板即不加粘合



剂，将吸附剂干粉直接均匀铺在玻板上；制作简单方便，但易被吹散。硬板即用粘合剂如水或其他液体，将吸附剂调成糊状再铺板，经干燥后才能使用；制备虽然较繁琐，但易于保存。具体制备方法如下：

①软板：选用一根直径约为 1~1.2cm 的玻璃管，根据薄层的厚度在玻璃管两端缠几圈胶布，胶布的厚度按需要的薄层厚度而定。常用的厚度约为 0.4~1mm 左右。把干的吸附剂倒到玻璃板上，玻板的一端固定，防止推玻璃管时玻板移动，然后将玻璃管压在玻板上，把吸附剂由一端推向另一端，即成薄板。要求：光滑、平整、厚度均匀。

②硬板：将适当调好的吸附剂倒在两块 3mm 玻板中间所夹的一块 2mm 厚度的玻板上，然后用一块边缘光滑的玻片把吸附剂刮向一边，即成厚度一定的薄板。薄层层析的操作步骤是：点样、展开、显色。

（二）分配层析：

1. 原理

利用混合物在两种或两种以上不相混溶的液相（固定相和流动相）之间的分配系数的不同而达到分离各组分的目的。固定相液体均匀覆盖于载体表面，流动相流过固定相。

分配系数：当一种溶质分布在两个互不相溶的溶剂中时，它在固定相和流动相两相内的浓度之比是个常数，称为分配系数（K）。

$$K = \frac{\text{溶质在固定相中的浓度 (Cs)}}{\text{溶质在流动相中的浓度 (Cm)}}$$

分配系数小的溶质在流动相中的分配的数量多，移动快；分配系数大的溶质在固定相分配的数量多，移动慢。因此可彼此分开。

载体在分配层析中只起负担固定相的作用，它们是一些吸附力小、反应性弱的惰性物质，如淀粉、纤维素粉、滤纸等。固定相除水外，还有稀硫酸、甲醇、仲酰胺等强极性溶液。流动相则采用比固定相极性小或非极性的有机溶剂。纸层析是最广泛应用的一种分配层析。

纸层析法以滤纸为载体，滤纸上吸附着水（约含 20%—22%）是经常用的固定相，此类有机溶剂如醇、酚等为常用的流动相。把欲分离的物质加

$$R_f = \frac{\text{色斑中心至原点中心的距离}}{\text{溶剂前缘至原点中心的距离}}$$



在纸的一端，使流动溶剂经此移动，这样就在两相间发生分配现象。由于物质分配系数的不同，就逐渐在纸上集中于不同的部位。在固定相中分配趋势较大的成份，随流动相移动的速度就慢；反之，在流动相分配趋势较大的成分，移动速度就快。物质在纸上移动的速度可以用 R_f 表示：

物质在一定溶剂中的分配系数是一定的，故移动速率（ R_f 值）也恒定，因此，可以根据 R_f 值来鉴定被分离的物质。

2. 分类

纸层析法按操作方法分成两类，即：垂直型和水平型。垂直型是将滤纸条悬起，使流动相向上或向下扩散；水平型是将圆形滤纸置于水平位，溶剂由中心向四周扩散。垂直型使用较广，按分配物质的多寡，将滤纸截成长条，在某一端距边缘 2~4cm 处点样，待干后，将点样端边缘与溶液接触，在密盖的玻璃缸内进行展开

上述方法只用一种溶剂系统进行一次展开，称为单向层析。如果样品成分较多，而且彼此的 R_f 值相近，单向层析分离效果不佳，可用双向层析法，即在长方形或方形滤纸的一角点样，卷成圆筒形，先用第一种溶剂系统展开，展开完毕吹干后旋转 90°，再放于另一种溶剂系统中，向另一方向进行第二次展开，如此各成分分离较为清晰。

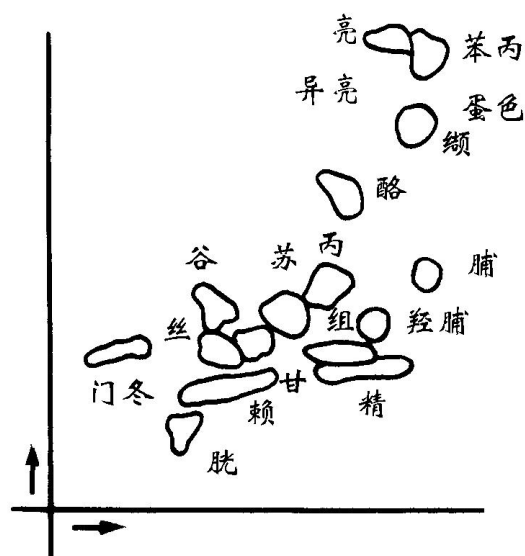
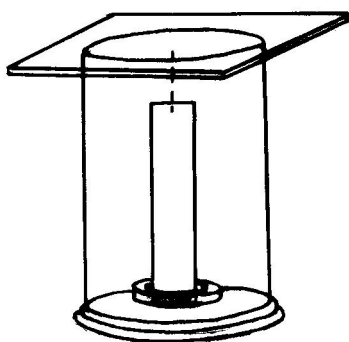




图 3 垂直型纸层析

图 4 氨基酸双向纸层析

色谱

(三) 凝胶过滤层析 (分子筛层析)

1. 原理

当生物大分子通过装有凝胶颗粒的层析柱时,根据它们分子大小不同而进行分离的技术。凝胶颗粒内部具有多孔网状结构,被分离的混合物流过层析柱时,比凝胶孔径大的分子不能进入凝胶孔内,在凝胶颗粒之间的空隙向下移动,并最先被洗脱出来;比网孔小的分子能不同程度的自由出入凝胶孔内外,在柱内经过的路程较长移动速度较慢,最后被洗脱出来。实际所制的胶粒不能绝对均一,每一型胶粒的孔径大小分布可以被控制在一定的范围,即最大极限和最小极限。而被分离的物质的分子量在许多情况下相差并不太大,渗入凝胶颗粒内部的程度则不相同。它们将以不同的速度按先后的顺序洗脱下来。

2. 常用于凝胶层析的凝胶

层析用凝胶是一些具有立体网状结构的和一定网孔直径的天然或人工合成的高分子化合物。用来层析的凝胶应具有下列性质

①是惰性的,即对溶质没有物理的或化学的吸附,也不能和溶质发生化学反应,不能引起酶及蛋白质的变性。

②具有稳定的化学结构,实际上可以反复使用,达几月或几年,在实际条件下允许对 pH 及浓度的选择。

③所含离子基团尽可能少,避免离子交换效应,因带电可引起洗脱峰变为不对称

④具有一定的机械强度,不至因压力增加而使凝胶变形。



根据凝胶物质的来源可分为天然凝胶和人工合成凝胶两类：

(1) 天然凝胶：主要是一些糖类物质，如淀粉、琼脂及琼脂糖等。淀粉凝胶应用较早，但因其理化性质不够稳定，洗脱时的阻力较大，洗脱时间长等缺点影响了它的应用。琼脂来源于一种海藻，是由 D-半乳糖和 L-半乳糖所组成的多聚糖，它能分离分子量较高的物质。其缺点是带有大量的电荷（主要是磺酸基，其次为羧基），层析时常需用较高离子强度的洗脱液，使洗脱物含有一定量盐分，而影响产品的纯度。琼脂糖凝胶（sepharose）应用较多，它又称生物凝胶 A（biogel—A），由琼脂糖溶液冷却后，通过分子间氢键，自发凝集成束，形成稳定的珠状凝胶，稳定性较差，工作 pH 值范围在 4~9 之间，40℃ 以上易老化，不能高压和冰冻，其机械强度取决于琼脂糖的含量。它有 2B、4B、6B 三个级别，含琼脂糖的浓度分别为 2%、4%、6%。Sephарose 结构开放，排阻极限比 Sephadex 大，分离范围广泛，适用于 DNA 大片段分离。

(2) 人工合成的凝胶：常用的有葡聚糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶两大类。

① 葡聚糖凝胶又称交联葡聚糖凝胶，英文名称为 Dextrak，商品名称为 Sephadex，由许多右旋葡萄糖单位通过 1,6-糖苷键联结成链状结构，再由交联剂 1-氯-2,3-环氧丙烷（ $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{CL}$ ，又称氯醇）交联而形成多孔网状结构高分子化合物。这一产物是不溶于水的。在合成凝胶时，调节葡聚糖和交联剂的配比，可以获得具有不同大小网眼的葡聚糖凝胶。G 表示交联度，G 越大，网孔结构越紧密，吸水性差，膨胀也小，适用于分离小分子物质；G 越小，网孔结构疏松，吸水量大，适用分离大分子物质。商品凝胶的型号采用“吸水量”的 10 倍数字表示，例如，每 g 凝胶吸水量为 2.5g 即定为 G-25 型。

各种型号葡聚糖凝胶的性质见下表。

型号	分离范围（分子量）		吸水量 g/g 干凝胶	膨胀体 积 ml/g 干凝胶	浸泡时间 （小时）	
	蛋白质	多糖			20-25 ⁰ C	90-100 ⁰ C
G-10	<700	<700	1.0 ±	2~3	3	1
G-15	<1500	<1500	0.1	2.5 ~	3	1



G-25	1000~5000	100~5000	1.5 ± 3.5	3	1
G-50	1500~3000	500~10000	0.2	4~6	1
G-75	3000 ~	1000 ~	2.5 ± 9~11	24	3
G-100	70000	50000	0.2	12~15	5
G-0	4000 ~	1000 ~	5.0 ± 15~20	72	5
G-15	150000	100000	0.3	20~30	5
G-0	5000 ~	1000 ~	7.5 ± 30~40		
G-20	400000	150000	0.5		
G-0	5000 ~	1000 ~	10±1.0		
	800000	200000	15±1.5		
			20±2.0		

由上表可见，Sephadex—G 值越大，吸水量越大，分离范围（分子量）越大。

②聚丙烯酰胺凝胶其商品名为生物凝胶 P (Bio-Gel P)，是用丙烯酰胺 (acrylamide, 简称 Acr) 和交联剂亚甲基双丙烯酰胺 (N, N' —methylene bisacrylamide, 简称 Bis) 在催化剂的作用下聚合而成。

凝胶浓度和交联度与孔径大小的关系：凝胶浓度与被分离物的分子量大小的关系，大至范围如表：

M_r 范围与凝胶浓度的关系

	M_r 的范围	适用的凝胶浓度%
蛋白质	$<10^4$	20~30
	$1 \sim 4 \times 10^4$	15~20
	$4 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$	10~15
	$1 \sim 5 \times 10^5$	5~10
	$>5 \times 10^5$	2~5
核酸	$<10^4$	15~20
	$10^4 \sim 10^5$	5~10
	$10^5 \sim 2 \times 10^6$	2~2.6

聚丙烯酰胺凝胶的机械强度好，有弹性、透明、相对的化学稳定，对



pH 和温度变化较稳定，在很多溶剂中不溶，是非离子型的，没有吸附和电渗作用。原料成分要采用高纯度制品，通过改变浓度和交联度，可以控制孔径变动在极广泛的范围，并且制备凝胶的重复性好，由于纯度高及不溶性，因此还适于少量样品的制备，不致污染样品。

（四）离子交换层析

1. 原理

离子交换层析法 (ion exchange chromatography IEC) 是利用离子交换剂对需要分离的各种离子有不同的亲和力而达到分离的目的，这种柱层析称为离子交换层析。离子交换剂是通过化学反应将带电荷基团引入惰性支持物上而形成。离子交换作用是指一溶剂中某一种离子与一固体中的另一种具有相同电荷的离子进行相互位置的调换。由于各种离子所带电荷的多少不同，它们对交换剂的亲和力就有所差别。因此，在洗脱过程中，各种离子由固体柱上先、后下来的顺序不同，从而可达到分离的目的。这种离子交换是定量完成的，因此测定溶液中由固体上交换下来的离子量，可知样品中原有离子的含量，也可将吸附在交换剂上的样品的成分用另一洗脱液洗脱下来，进行定量测定。

离子交换层析主要用于蛋白质、多肽的分离。核酸也是强极性分子，用离子交换层析也能得到很好的分离效果。

2. 离子交换剂

离子交换剂种类很多，根据交换剂上吸附的离子交换基团不同，可分为阳离子交换剂和阴离子交换剂；根据惰性支持物不同，又有树脂、纤维素、葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶及琼脂糖凝胶等种类。目前大多采用的离子交换剂是合成离子交换剂，即离子交换树脂，其分为两大类：分子中具有酸性基团，能交换阳离子的称为阳离子交换树脂；分子中具有碱性基团，能交换阴离子的称为阴离子交换树脂。按其解离性的大小，又可分为强弱两种：





	聚糖)	
阴离子交换交联葡聚糖	强碱型(胍乙基交联葡聚糖) 弱碱型(二乙基氨基乙基交联葡聚糖)	二乙基氨基乙基(-O-CH ₂ -CH ₂ -NH(C ₂ H ₅) ₃)

(五) 亲和层析

1. 原理

利用生物大分子间特异的亲和能力来纯化生物大分子 如: 抗原和抗体; 酶和底物或辅酶或抑制剂; 激素和受体; RNA 和其互补的 DNA 等。

将待纯化物质的特异配体通过适当的化学反应共价的连接到载体上, 待纯化的物质可被配体吸附, 杂质则不被吸附, 通过洗脱杂质即可除去。被结合的物质再用含游离的相应配体溶液把它从柱上洗脱下来。

2. 基本过程

(1) 偶联: 将欲分离的高分子物质 X (如抗原) 的配基 L (如抗体) 在不影响其生物功能的情况下与水不溶性的载体相结合 (称为固相化或固定化), 制成亲和吸附剂或免疫吸附剂。

(2) 装柱: 在层析柱内装入固相化的配基—亲和吸附剂 (称为亲和柱)。

(3) 亲和吸附: 含有高分子物质 X 的混合液 (如粗匀浆提取液或血清等), 在有利于配基和高分子之间形成复合物的条件下, 进入亲和吸附剂的层析柱。混合液中只有能与配基形成复合物的高分子 X 被吸附, 而所有不能形成复合物的杂质则直接流出。亲和柱进一步用缓冲液洗涤, 以尽可能地除去非亲和吸附的物质。

(4) 洗脱: 改变洗脱条件, 促使亲和吸附剂—高分子复合物解离而释放出高分子的物质 X, 便得到欲纯化的活性物质。

(5) 再生: 将欲分离、纯化的生物大分子从亲和吸附剂中洗脱的过程, 就是再生的过程。再生后的亲和吸附剂可直接用于又一周期的纯化工作

(周晓慧)



三、电泳法

带电核的粒子在电场中的趋向运动称为电泳。自从 1937 年首创电泳技术后，随着电泳技术的不断进步，电泳的种类和应用在深度和广度两个方面均迅速发展，已经成为生物化学及分子生物学技术中分离生物大分子的重要手段。不同电泳技术的区别主要是电泳支持物的性质不同，电泳支持物不同的特性决定了它们在使用方面的不同。目前，常用的电泳方法有：薄膜电泳、琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳，以及由聚丙烯酰胺凝胶电泳衍生出来的各种不同的电泳方式。其中凝胶电泳由于操作简便、快速、灵敏等优点，使其成为分离、纯化和鉴定生物大分子的首选方法。在实验课中，我们将利用薄膜电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白；琼脂糖凝胶电泳分离血浆脂蛋白和核酸。

（一）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 和电场强度 X ，即：

$$F=QX$$

而球形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

$$\frac{v}{X} = \frac{Q}{6\pi r\eta v}$$

$\frac{v}{X}$ 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

$$u = \frac{v}{X} = \frac{Q}{6\pi r\eta v}$$

在电泳过程中，粒子移动的速度 v 为单位时间 t 内移动的距离 d ，即：



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

又电场强度 X 为单位距离内的电势差 E ，即

$$X = E/L \quad \text{即}$$

$$U = \frac{v}{X} = \frac{d/t}{E/L}$$

某物质在电场中移动的距离为

$$d = u \frac{Et}{L}$$

两种物质在电场中移动的距离差为

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

从式子中我们可以看出，两种物质只要迁移率不同即可分离。

(二) 几种影响电泳的因素

1. 电泳介质的 pH 值：介质的 pH 值可以影响粒子的解离度，即决定粒子的带电量。为了保证电泳过程中溶液的 pH 值的稳定，必须采用缓冲溶液。当分离蛋白质混合物时，应该选择一个合适的 pH 值，使各种蛋白质的带电量差别较大，以利于彼此分开。

2. 缓冲液的离子强度：离子强度决定缓冲溶液的缓冲容量，二者之间成正相关关系。过低则缓冲能力降低，过高则会降低蛋白质的带电量，使电泳速度减慢。所以常用离子强度为 0.02~0.2 之间。离子强度的计算公式如下：

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

I ：离子强度 C_i ：离子的克分子浓度 Z_i ：离子的价数

3. 电场强度：与迁移率成正相关。

4. 样品本身的性质：电量，大小和形状。

(王文勇)



四、离心分离法

一、原理

利用物质的沉降系数、质量、浮力等不同因素，应用强大的离心力使物质分离的方法称离心法。离心机所产生的离心力常用下列方程式表示：

$$F = \frac{4\pi^2 v^2 r}{g} \cdot \left(\frac{1}{60}\right)^2$$

$$V (\text{rpm}) = \sqrt{\frac{Fg60^2}{4\pi^2 r}} = \frac{60 \times 31.28}{2\pi} \sqrt{F/r}$$

式中 F 为离心力，单位为地心引力的倍数 g（或×g）。g 为重力加速度，等于 980.6cm/秒²。r 通常指自离心管中轴底部内壁到离心转轴中心之间的距离（cm）。V 为转速，即离心机每分钟的转数（rpm）。

另外，超速离心时，颗粒的沉降速度常用沉降系数表示。沉降系数使用 Svedberg 单位（简称 S，1S=1×10⁻¹³ 秒）。近代生物化学文献中经常出现沉降系数这一概念，用以描述生物高分子或亚细胞器的大小，如 16SRNA、23SRNA、70S 核蛋白体等。沉降系数是单位离心场强的沉降速度，与物质点的大小、形状、密度以及介质的密度和粘度等因素有关，当对某些生物大分子的化学结构、分子量还不了解时，可用沉降系数对它的物理特性进行初步描述，将它们区别开来。

二、离心机的分类：

1. 根据离心速度分类（最常用的分类方法），可将离心机分为：

低速离心机：<5000 rpm；

高速离心机：6000—25000 rpm；

超速离心机：>25000 rpm。

注意：高速和超速离心机必须有低温装置。

2. 根据要求不同可分为：

常温离心机

低温离心机

恒温离心机



3. 根据分离目的不同可分为：

制备离心机

定性离心机

结晶离心机

4. 根据离心条件不同分为：

常压离心机

真空离心机

5. 根据离心机的形式不同分为：

角式离心机

水平式离心机。

三、离心机的应用：

1. 分离多种物质。
2. 分析亚细胞结构。
3. 计算未知物质的分子量。
4. 得到一些基本参数。
5. 酶、疫苗、病毒等的制备。

四、离心机的使用方法及注意事项：

离心机属大型贵重仪器，使用前应了解其性能，掌握其操作规程，以防在离心过程中发生意外，使用时应注意下面几点：

1. 使用之前，应先检查离心机的放置是否水平与稳定，旋转是否平衡。

2. 对称位置的离心管及套管必须用天平平衡，套管底部应用橡皮垫垫上。

3. 接通电源，缓慢加速。

4. 离心机转动时，如机身不稳，声音不均匀，或离心管破裂，应停止离心。

5. 离心完毕，将转速开关缓慢退回起点，任其自停，切勿用手助停。

简言之要做到“平衡”：离心管及套管要在天平上平衡；“对称”：平衡后的离心管要对称放置；“慢加减速”：起动和停转时均应缓慢。对于高速和超高速离心机的使用，须应严格按操作规程进行操作

(李素婷)