

第一章 生物大分子的基本制备技术

Basic Techniques for Preparation of Biomacromolecules

生物大分子的制备过程包括选材、细胞破碎和细胞器分离、生物大分子提取纯化、以及样品浓缩干燥和储存等。生物大分子的制备是一项十分细致的工作，既要设法得到它们的纯品，又要努力保持其生物活性。有时制备一个纯度较高的蛋白质、酶或核酸，需要付出较长时间的艰苦劳动。生物大分子制备方法的选择是以生物大分子的理化性质为依据的(表 1-1)。对于理化性质不同的生物大分子，所选用的分离提纯方法也不相同。

表 1-1 生物大分子的理化性质与分离纯化方法的选择

理化性质	分离及纯化方法
分子大小和形态	差速离心、超滤、分子筛、透析
溶解度	盐析、萃取、分配层析、结晶
电荷差异	电泳、等电聚焦电泳、离子交换层析
生物功能专一性	亲和层析

在生物大分子的制备过程中，为随时了解所用方法和条件的效果，以及提取物质的纯度和得率，必须对所提取的生物大分子进行追踪分析鉴定。因此在提纯以前，必须建立对所提取生物大分子相应的分析鉴定方法。

以蛋白质的分离纯化过程为例，在分离、纯化过程中，每进行一个步骤都需对所得样品的比活性(总活性/总蛋白)、得率(每一步骤总活性与第一步总活性的百分比，设开始时的总活性为 100%)和提纯倍数(每一步骤比活性与第一步比活性的比值，设开始时为 1)进行测定。一般认为所得样品的比活性和得率越高以及纯化倍数越大则效果越好。但实际应用中往往须考虑多方面的因素来选择和确定提纯方法及步骤，如对提纯样品纯度和活性的要求、原材料的来源、实验条件以及所用材料的价格等都是我们要考虑的。

下面是从猪肝中提纯异柠檬酸脱氢酶的过程。该提取过程有六个步骤，现将每一步骤所得样品的比活性、得率和纯化倍数等追踪测定结果列于表 1-2。据此结果可判断每一步骤的提纯效果。

表 1-2 猪肝异柠檬酸脱氢酶的提纯及分析

步骤	总体积 (ml)	酶浓度 (单位/ml)	酶总活性 (单位)	蛋白质浓度 (mg/ml)	总蛋白质量 (mg)	比活性 (单位/mg)	得率 (%)	提纯倍数
组织匀浆	7.00	2.85	19.95	35.50	248.50	0.080	100	1.0
氯仿抽提	5.00	3.60	20.88	19.20	111.40	0.187	105	2.3
37.5-55% 硫酸 铵盐析的上清 液(透析)	1.50	11.25	16.87	21.40	32.10	0.525	845	6.5
DEAE-纤维素 离子交换层析	2.39	3.32	9.09	1.00	2.38	3.82	455	477
磷酸钙层析	0.45	15.05	6.77	0.90	0.41	16.70	34	209
凝胶过滤	0.52	9.80	5.09	0.22	0.11	45.60	255	570

从表 1-2 可知猪肝异柠檬酸脱酶被提纯 570 倍，得率是 25.5%。

本章仅以蛋白质分离纯化为例，对一些基本技术进行介绍。电泳、层析、离心技术等将在专门章节给予介绍。

### 一、盐析 (Salting out)

盐析方法是蛋白质和酶提纯工作中应用最早，至今仍广泛应用的方法。其原理是蛋白质在高浓度的盐溶液中，随着盐浓度的逐渐增加，蛋白质表面的电荷被中和，水化膜被破坏，蛋白质分子相互聚集而从溶液中沉淀析出。盐析法就是根据各种蛋白质在一定浓度的盐溶液中溶解度降低程度的不同而达到彼此分离的方法。

在盐析时，蛋白质的溶解度与溶液中离子强度（见第四章电泳）的关系可用下式表示：

$$\log \frac{S}{S_0} = -K_s \times I$$

式中  $S_0$  是蛋白质在纯水（离子强度  $I=0$ ）中的溶解度， $S$  为蛋白质在离子强度为  $I$  的溶液中的溶解度， $K_s$  为盐析常数。

上述公式中当温度和 pH 一定时， $S_0$  仅取决于蛋白质的性质。因此对于同一蛋白质，在一定温度和 pH 时， $S_0$  是一常数。

设  $\text{Log } S_0 = \beta$

则  $\text{Log } S = \beta - K_s \times I$

盐析常数  $K_s$  主要取决于盐的性质（盐的离子价数和离子平均半径），也和蛋白质的性质有关。不同的蛋白质在同一种盐溶液中的  $K_s$  值不同， $K_s$  值愈大，盐析效果愈好。从上述公式可知在温度和 pH 一定的同一种盐溶液中，不同蛋白质有各自一定的  $\beta$  和  $K_s$  值。

可以通过改变盐的离子强度来分离不同的蛋白质。这种方法称分段盐析法。对于同一种盐溶液，如果保持离子强度不变，通过改变温度和 pH 来改变  $\beta$  值，也可达到盐析分离的目的。这种方法称为“ $\beta$  分段盐析法”。

盐析法提纯蛋白质时应注意以下几个条件的选择。

### （一）盐的种类

蛋白质盐析常用中性盐。主要有硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、氯化钠、磷酸钠等。应用最广泛的是硫酸铵，其优点是：

1. 溶解度大 25℃时硫酸铵的溶解度可达 4.1mol/L(541g/L)以上。大约每升水可溶解 767g 之多。在这一高溶解度范围内，许多蛋白质和酶都可以被盐析沉淀出来。

2. 温度系数小 硫酸铵的溶解度受温度影响不大。例如 0℃时，硫酸铵的溶解度仍可达到 3.9mol/L(515g/L)。大约每升水可溶解 676g。对于需要在低温条件下进行酶的纯化来说，应用硫酸铵是有利的。

3. 硫酸铵不易引起蛋白质变性，对于很多种酶还有保护作用，且价格低廉，容易获得。

硫酸铵的缺点是铵离子干扰双缩脲反应，为蛋白质的定性分析造成一定困难。

### （二）盐的浓度

分段盐析法是通过改变盐的浓度以达到分离目的。应该将盐的浓度准确地分步提高到各种蛋白质所需的浓度。盐的浓度常用饱和度表示，饱和溶液定为 100%。调整硫酸铵溶液饱和度的方法有计算、查表两种：

#### 1. 添加饱和溶液的计算法

如  $S_2$  为所需达到的饱和度， $S_1$  为原来的饱和度， $V$  为达到所需饱和度的溶液体积， $V_0$  为原来的体积。则：
$$V = V_0 \frac{S_2 - S_1}{1 - S_2}$$

体积的改变造成的误差小于 2%，可以忽略不计。

#### 2. 查表法（表 1-3）

可以从表中直接查到将 1 升饱和度为  $S_1$  的盐溶液浓度提高到饱和度为  $S_2$  的浓度时所需添加固体硫酸铵的重量(克)。

### （三）pH 值

如前所述， $\beta$  值与溶液的 pH 值有密切关系。当溶液的 pH 值达到蛋白质等电点时， $\beta$  值最小，蛋白质的溶解度最低，最易从溶液中析出。因此在盐析时，应控制溶液的 pH 值使之接近蛋白质的等电点。

#### (四) 温度

温度对  $\beta$  值的影响不如对 pH 值的影响显著。因此，对温度的要求不严格，低温主要是防止蛋白质变性和降解。

#### (五) 蛋白质浓度

溶液中蛋白质浓度愈高，盐析所需的盐饱和度愈低。所以，盐析的蛋白质浓度不宜过低，但过高的蛋白质浓度也不适合，因其会和其它蛋白产生共沉淀作用而影响纯度。

表 3-5 室温下由  $S_1$  提高到  $S_2$  时每升加固体硫酸铵的克数

$S_1 \backslash S_2$	0.10	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60	0.65	0.70	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	1.00
0	55	113	144	175	209	242	278	312	350	390	430	474	513	553	603	657	703	760
0.10		57	67	118	149	182	215	250	287	325	365	405	448	494	530	585	634	685
0.20			29	59	90	121	154	188	225	260	298	337	379	420	465	512	559	610
0.25				29	60	91	123	157	192	228	285	304	345	386	430	475	521	571
0.30					30	61	93	126	160	185	232	270	310	351	394	439	485	533
0.35						30	62	94	128	163	199	235	275	315	358	403	449	495
0.40							31	63	96	131	166	205	240	280	322	365	410	458
0.45								31	64	98	133	169	206	245	285	330	373	420
0.50									32	63	100	135	172	211	250	292	335	380
0.55										33	66	101	138	176	214	255	298	344
0.60											33	67	103	140	179	219	261	305
0.65												34	69	105	143	182	224	267
0.70													34	70	108	146	187	228
0.75														35	72	110	149	190
0.80															36	73	112	152
0.85																37	75	114
0.90																	37	76
0.95																		38

## 二、透析和超滤 (Dialysis and Ultrafiltration)

1、透析是利用蛋白质等生物大分子不能透过半透膜而进行纯化的一种方法。脱盐透析是应用最广泛的一种透析方法。将含盐的生物大分子溶液装入透析袋内，将袋口扎好放入装有蒸馏水的大容器中，并不断搅拌使蒸馏水保持流动。经过一段时间后，小分子盐类透过半透膜进入蒸馏水中（图 1-1），使膜内外盐浓度达到平衡。如在透析过程中更换几次大容器中的液体，可以达到使生物大分子溶液脱盐的目的。平衡透析也是常用的透析方法之一。方法是将装有生物大分子的透析袋装入盛有一定浓度的盐溶液或缓冲液的大容器中，经过透析，袋内外的盐浓度或缓冲液 pH 一致，从而有控制地改变被透析溶液的盐浓度或 pH。

如将透析袋放入高浓度吸水性强的多聚物溶液中，透析袋内溶液中的水便迅速被袋外多聚物所吸收，从而达到使袋内液体浓缩的目的。这种方法称为“反透析”。可用做反透析的多聚物有聚乙二醇（Polyethylene Glycol, PEG）、聚乙烯吡咯烷酮（Polyvinyl Pyrrolidone, PVP）、右旋糖、蔗糖等。透析用的半透膜种类很多，玻璃纸、棉胶、动物膜、皮纸等都用来制作透析袋。

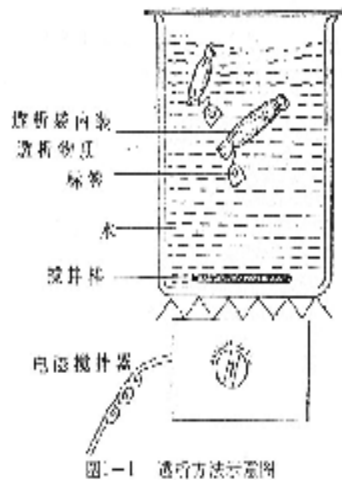


图1-1 透析方法示意图

2、超滤法是利用具有一定孔径的微孔滤膜，对生物大分子溶液进行过滤（常压、加压或减压），使大分子保留在超滤膜上面的溶液中，小分子物质及水过滤出去，从而达到脱盐、更换缓冲液或浓缩的目的。这种利用超滤膜过滤分离大分子和小分子物质的方法叫做超滤法（图1-2）。

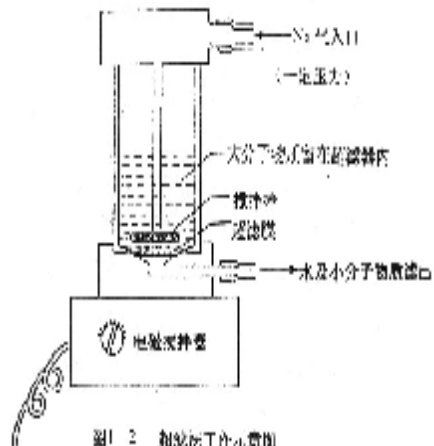


图1-2 超滤法工作示意图

### 三、减压浓缩冷冻干燥

因为生物大分子通常遇热不稳定，极易变性，浓缩和干燥生物大分子不能用加热蒸发的方法。因此减压浓缩和冷冻干燥已成为生物大分子制备过程常用的浓缩干燥技术。低压冻干法是使蛋白质溶液在容器壁上冷冻，同时让液体在真空中升华，以得到冻干的样品。通过冷冻干燥所得的产品能够保持生物大分子物质的天然性质，还具有疏松，易于溶解的特性，便于保存和应用。这是保存生物大分子最常用和最好的方法。

#### 常用词汇

生物大分子      Biomacromolecule

蛋白质      Protein

酶      Enzyme

核酸      Nucleic Acid

透析      Dialysis

结晶      Crystallization

超滤      Ultrafiltration

盐析      Salting out

亲和层析      Affinity Chromatography

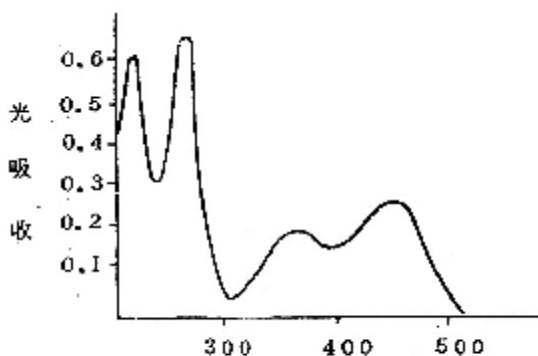
## 第二章 分光光度法

### Spectrophotometry

#### 一、基本原理

光线是高速运动的光子流，也是具有波长和频率特征的电磁波。光子的能量与频率成正比，与波长成反比。肉眼可见的光线称为可见光。可见光只占电磁波谱的很窄部分(400nm 到 760nm)。不同波长的可见光具有不同的颜色。波长大于 760nm 的光线称为红外线。波长小于 400nm 的光线称为紫外线。

当一束白光通过一杯有颜色的溶液时，具有一定波长的光线，选择性的被溶液所吸收。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不同，因此每种物质都具有其特异的吸收光谱。吸收光谱的测定可以用来鉴定各种不同的物质。例如核黄素之所以呈现黄色，是由于它仅吸收可见光中的蓝光范围，并测得其吸收峰在 450nm(图 2-1)。在紫外光范围它还有两个吸收峰。它们分别是 260nm 和 370nm。



(核黄素 22mmol/L 溶于 0.1mol/L 磷酸钠中, pH7.06, 吸收杯厚 1cm)

图2-1 核黄素200~500波长的吸收光谱

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。其理论依据是郎伯—比尔(Lambert-Beer)定律。

#### (一) 郎伯定律(Lambert's Law)

一束单色光在通过一溶液时，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，光强度的减弱也愈显著(图 2-2)

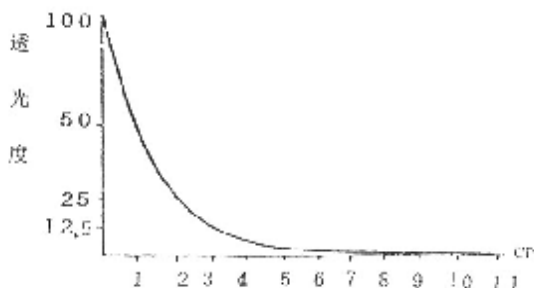


图2-2 光吸收与溶液厚度的关系

若  $I_0$  表示入射光强度,  $I$  表示光线通过溶液后的强度,  $L$  表示溶液的厚度。

$$\text{则 } \frac{-dI}{dL} = \alpha I, \quad -\frac{dI}{dL} = \alpha I, \quad \text{或} \quad \frac{dI}{I} = -\alpha dL$$

$$\text{积分: } \int \frac{dI}{I} = -\int \alpha dL$$

$$\text{得: } \ln I = -\alpha L + C$$

当  $L=0$  时,  $I=I_0$ , 所以  $C=\ln I_0$

$$\text{即 } \ln I = -\alpha L + \ln I_0$$

$$\text{所以 } \ln \frac{I_0}{I} = \alpha L \quad \text{或} \quad \frac{I}{I_0} = e^{-\alpha L}$$

$$\text{或 } \text{Log} \frac{I_0}{I} = K_1 L \quad (K = \frac{\alpha}{2.303}), \quad \frac{I}{I_0} = 10^{-K_1 L}$$

$K_1$  是一常数, 受光线波长、溶液性质和溶液浓度影响。从上述公式可知, 透过溶液后, 光强度的减弱 ( $I/I_0$ ) 与溶液厚度 ( $L$ ) 呈指数函数关系。可见光强度的改变与溶液厚度并不呈简单的正比关系。这一关系就是郎伯定律。

## (二) 比尔定律(Beer's Law)

当一束单色光通过一溶液时, 若溶液的厚度不变, 则溶液浓度愈高, 光线强度减弱也愈显著, 与上定律相似。两者的关系可以表示如下:

$$\text{Log} \frac{I_0}{I} = K_2 C \quad \text{或} \quad \frac{I}{I_0} = 10^{-K_2 C}$$

其中,  $C$  表示溶液的浓度。 $K_2$  是一常数, 受光线波长、溶液性质和溶液厚度的影响。上述公式所表示的光强度与溶液浓度的关系称为比尔定律。

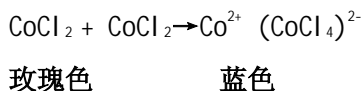
虽然所有的溶液均符合郎伯定律, 但并非所有的溶液都符合比尔定律。这是由于有些物质在不同浓度条件下其颜色可能发生改变, 即在不同浓度条件下其吸收光的波长发生改变。常见的原因如下:

1. 有些有色物质在溶液中可能解离成相应的离子, 离子的颜色与分子的颜色不同,



造成对比尔定律的误差。

2. 有些物质在较高浓度状态下可形成络合物，络合物使吸收光谱发生改变。例如：氯化钴在稀溶液中呈玫瑰色，而在浓溶液中呈蓝色。



3. 氢离子浓度和电解质也可引起一些有色物质颜色的改变，这些改变也可能造成比尔定律的误差。

### (三) 郎伯——比尔定律及其应用

$$\text{Log} \frac{I}{I_0} = -KCL \quad \text{或} \quad \frac{I}{I_0} = 10^{-KCL}$$

一般将通过溶液后的光线强度(I)和入射光(I<sub>0</sub>)的比值称为透光度(transmittance, T)，将-Log I/I<sub>0</sub>用吸光度(absorbance, A)表示，以反映该溶液对光吸收的情况。有时也用吸光度(Optical density, O.D.)表示。则它们之间的关系如下

$$A(O.D.) = -\text{Log} \frac{I}{I_0} = -\text{Log} T = ECL \quad \dots\dots(1)$$

其中，E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。

从公式(1)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。

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{C_1}{C_2} \quad \text{或写作} \quad C_1 = \frac{A_1}{A_2} \times C_2 \dots\dots(2)$$

如果C<sub>2</sub>为标准溶液的浓度，则可根据测得的吸光度值，按公式(2)求得待测溶液的浓度。

实际工作中为简便起见，常常不是每测一个待测样品都做一个标准管，而是事先测定一系列不同浓度的标准管，然后以吸光度对标准浓度作图，得到标准曲线，测得待测物质的吸光度后，便可从标准曲线上查到相应的浓度数值。

从公式(1)可知，若知道某待测物质的消光系数和溶液的厚度，也可以从吸光度推算出待测溶液的浓度。消光系数的常用表示方法有二：

1. 百分消光系数(E<sub>1%<sup>1cm</sup></sub>)；浓度以百分浓度来表示的消光系数。百分消光系数等于浓度为1%，液层厚度为1cm的吸光度值。



2. 克分子消光系数 ( $\epsilon$ )；浓度以摩尔浓度来表示的消光系数。克分子消光系数等于溶液浓度为 1 个摩尔浓度，液层厚度为 1cm 的吸光度值。

用消光系数计算浓度的公式是：

$$C = \frac{A}{E_{1\text{cm}}^{1\%}} \quad (\text{浓度单位为 g/100ml}) \quad \text{或} \quad C = \frac{A}{\epsilon} \quad (\text{浓度单位为摩尔浓度})$$

例：一蛋白质溶液在其吸收峰  $\lambda = 278\text{nm}$  处的吸光度  $A=0.520$ ，吸收杯厚度为 1.00cm，已知  $E_{1\text{cm}}^{1\%}278=5.10$ ，则此蛋白质溶液的浓度为

$$C = \frac{A}{E_{1\text{cm}}^{1\%}} = \frac{0.502}{5.10} = 0.102\%$$

## 二、分光光度计的结构原理

不论光度计(Photometer)、比色计 (Colorimeter) 还是分光光度计 (Spectrophotometer)，其基本结构原理都是相似的，都由光源、单色光器、狭缝、吸收杯和检测器系统等部分组成 (图 2-3)。

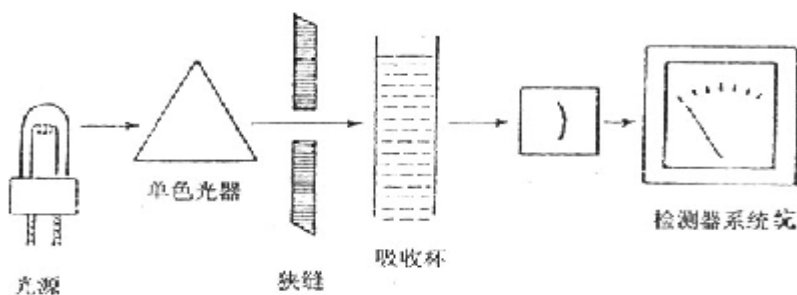


图2—3 光度计或分光光度计结构原理

### (一) 光源

一个好的光源要求具备发光强度高、光亮稳定、光谱范围广和使用寿命长等特点。几乎所有的光度计都采用稳压调控的钨灯(Tungsten Lamp)。它适用于做 340-900nm 范围的光源。更先进的分光光度计外加有稳压调控的氢灯(Hydrogen Lamp)。它适用于做 200 -360nm 的紫外分光分析的光源。

### (二) 单色光器

分光光度法测定某一物质的吸光度需要在某一特定波长下进行。单色光器的作用在于根据需要选择一定波长范围的单色光。在实际工作中欲选择出单个某波长的光线是困难的。所谓单色光是指在此波长有最大发射，而在相邻较长和较短波长范围内的发射能量较少而言。单色光的波长范围愈窄，仪器的敏感度愈高，测量的结果愈可靠。

最简单的单色光器是光电比色计上所采用的滤光片（一定颜色的玻璃片）。由于通过光线的光谱范围较宽，所以光电比色计的分辨效果较差，但对比色分析还是可以得到较为满意的效果的。棱镜（Prism）的衍射光栅（Diffraction Grating）是较好的单色光器。它们能在较宽光谱范围内分离出相对单一波长的光线（图 2-4）。

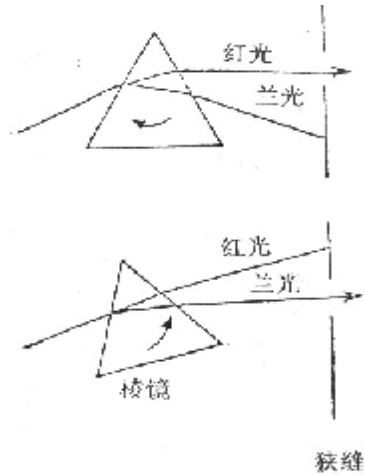


图 2-4 用棱镜产生单色光

### （三）狭缝

通过单色光器的发射光的强度可能过强也可能过弱不利于进一步检测。狭缝是由一对隔板在光通路上形成的狭缝。通过调节狭缝的大小来调节入射单色光强度并使入射光形成平行光线，以适应检测器的需要。光电比色计的狭缝是固定的，而光度计和分光光度计的狭缝大小是可调的。

### （四）吸收杯

吸收杯又叫样品杯 (Sample Cell)，是光度测量系统的最重要部分之一。在可见光范围内测量时选用光学玻璃吸收杯，在紫外线范围内测量时要选用石英吸收杯。注意保护吸收杯的质量是取得好的分析结果的重要条件之一。不得用粗糙、坚硬物质接触吸收杯，不能用手指握取吸收杯的光学面；用后要用水及时冲洗，不得残留测定液，尤其是蛋白质和核酸溶液。

### （五）检测器系统

硒光电池、光电管或光电倍增管等光电元件常用来作为受光器，将通过吸收杯的光线（I）的能量转变成电能。进一步再用适当的方法测量所产生的电流。

光电比色计用硒光电池为受光器。硒光电池的光敏感性低。它不能检出强度非常弱的光线。并且，对波长在 270nm 以下和 700nm 以上的光波不敏感。

较精密的分光光度计都是采用真空光电管或光电倍增管作为受光器的，并采用放大

装置以提高敏感度。虽然光谱范围狭窄的单色光的能量比范围宽的弱很多，但这种有放大线路的灵敏检测系统仍可能准确地检测出来。

三、几种常用的国产分光光度计

(一) 721 型分光光度计 (图 2-5)

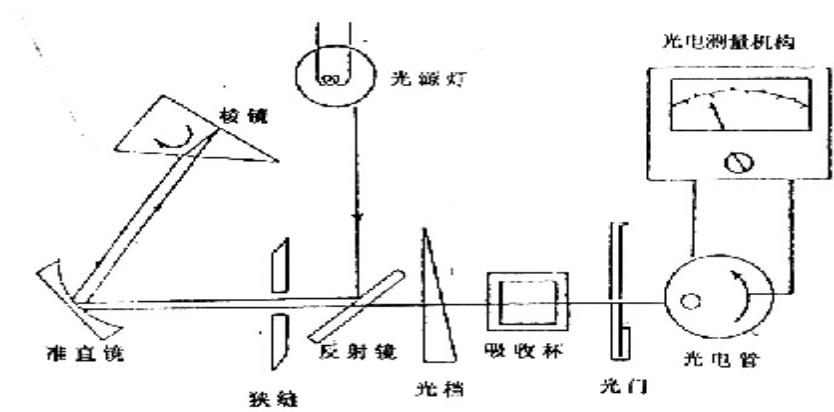


图2—5 721型分光光度计示意图

这是一种采用光电管为受光器的较高级可见光分光光度计。由稳压电源供电的光源灯发出稳定的白光。如图 2-5 所示。光线经反射镜投入狭缝，再经准直镜反射进入棱镜，在棱镜中发生色散后，光线经铝面反射后，其中一部分经原路返回，并穿过狭缝，透过反射镜进入吸收杯。从吸收杯射出的光线再经光门射到光电管上，产生相应的电流，并经电流表指示出相应的刻度值。

其中色散棱镜装在一个可以转动的圆盘上，旋转波长选择钮可使之发生偏转，使不同波长的光线通过狭缝形成一定波长的单色平行光线。同时，波长盘也随之转动以指示波长数字。此型分光光度计给出 360-800nm 范围的波长，在 410-710nm 之间灵敏、适用。使用方法如下（各调节部位参看图 2-6）。

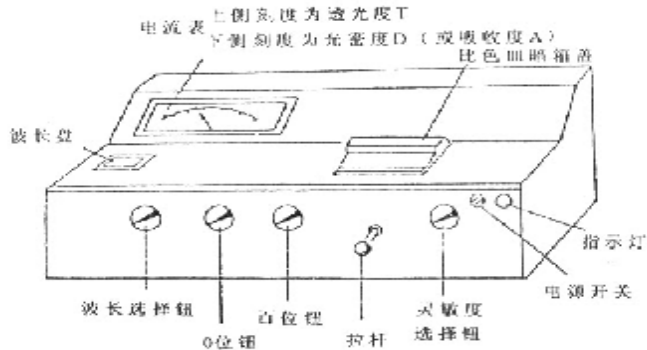


图2—6 721型分光光度计外观

1. 灵敏度选择钮放在“1”档（如调不到“0”时，再选用较高的档）。
2. 转动波长选择钮，选用所需的波长。
3. 接通电源（指示灯亮）。
4. 揭开比色皿暗箱盖，转动“0”位钮，使电表指针对准  $T=0$  处。
5. 将比色杯放入比色杯架上，使空白管对向光路，盖好比色皿暗箱盖，转动“百位钮”调准电表指针使之指向  $A=0$  ( $T=100$  处)。
6. 拉动比色皿座的拉杆，使测定杯进入光路，迅速从电表上读出吸光度值，记录。测读过程中，随时将拉杆推回到原位，使空白杯进入光路，并转动“百位钮”，使指针回到  $A=0$  处。
7. 比色完毕后，关上电源开关，取出比色杯，将比色皿暗箱盖盖好，清洗比色皿并空干。

#### 8. 注意事项

- (1) 光电比色计属精密仪器，应精心爱护使用，要防震、防潮、防腐蚀。
- (2) 比色杯的好坏对吸光度读数的影响很大，要保持比色杯的清洁干净，保护光学面的透明度，不能手握光学面，也不能用粗糙的物体接触光学面，比色杯中的液体应适量，不应过满，比色杯外壁的液体应用擦镜纸擦干，以防腐蚀仪器和影响读数。如比色液为强酸强碱，应尽快比色，以防破坏比色杯。
- (3) 比色时间应尽量缩短，以防光电系统疲劳。如需连续使用，中间应适当暂停使用，使之避光休息。

#### (二) UV-754 型分光光度计

这是一种可供在紫外到红外区（200-1000nm）测量吸收光谱的较高级分光光度计。此仪器的光学部分与 721 型分光光度计相类似，但它采用石英棱镜作单色光器，有钨丝灯和氢弧灯两种光源。754 型分光光度计的电学部分较为复杂（图 2-7）。光电流经过放大线路加以放大后，得到的样品信号变为与透光率成比例的值。其后，调零、变换对数、浓度计算、打印数据等均由微处理机进行。

#### 仪器的使用方法

##### 1、测试准备

- (1) 打开电源开关之前，检查一下试样室是否放置遮光物。
- (2) 试样槽置“参考”位置。
- (3) 接电源开关(如果波长工作在于 200-360nm 时需按氘灯触发按钮)。(参见图 2-7)

(4)显示器显示 754 后, 继而显示为 100.0, 则表示仪器已通过自检程序。

(5)仪器预热三十分钟后开始测试。

## 2、测试

(1)数显为 100.0 后, 稳定 2-3 秒钟, 即可把试样槽置“样品”位置进行测试。待第一个数据打印完毕后, 再可将试样槽置第二个“样品”位置测试。

(2)当需要调换波长时, 必须把试样槽置“参考”位置, 重新调满度。

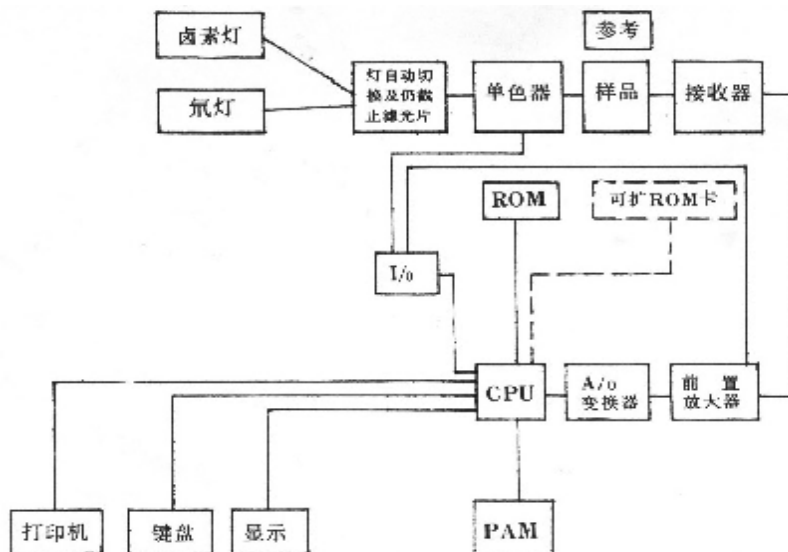


图 2-7 UV-754 电气系统

### 常用词汇

分光光度法 Spectrophotometry

分光光度计 Spectrophotometer

吸收光谱 Absorption Spectrum

紫外光 Ultraviolet

入射光强度 Intensity of the Incident Light

# 第三章 层析技术

## Chromatography Techniques

层析技术是近代生物化学实验中常用的分析方法。任何层析过程都是在两个相中进行的。一是固定于支持物上的固定相，另一是流经固定相的流动相，由于样品中各组分理化性质（如溶解度、吸附能力、分子形状、分子所带电荷的性质和数量、分子表面的特殊基团、分子量等）不同，表现出对固定相和流动相的亲合力也各不相同。当混合物通过多孔的支持物时，它们受固定相的阻力和受流动相的推力也不同，各组分移动速度各异并在支持物上集中分布于不同的区域，从而使各组分得以分离。

根据层析法中两相的性质和操作方法的的不同可分为许多类型。本章介绍几种常用的层析方法。

### 一、吸附层析(Absorption Chromatography)

吸附作用是指某些物质能够从溶液中将溶质浓集在其表面的现象。吸附剂吸附能力的强弱与被吸附物质的化学结构、溶剂的本质和吸附剂的本质有关。当改变吸附剂周围溶剂成分时，吸附剂对被吸附物质的亲合力便发生变化，使被吸附物质从吸附剂上解脱下来，这一解脱过程称为“洗脱”或“展层”。

吸附层析是把吸附剂装入玻璃柱内（柱层析法）或铺在玻璃板上（薄层层析法）。由于吸附剂的吸附能力可受溶剂影响而发生改变，样品中的物质被吸附剂吸附后，用适当的洗脱液冲洗，改变吸附剂的吸附能力，使之解吸，随洗脱液向前移动。当解吸下来的物质向前移动时，遇到前面新的吸附剂又重新被吸附。此被吸附的物质再被后来的洗脱液解脱下来。经如此反复的吸附—解吸—再吸附—再解吸的过程，物质即可沿着洗脱液的前进方向移动。其移动速度取决于吸附剂对该物质的吸附能力。由于同一吸附剂对样品中各组分的吸附能力不同，所以在洗脱过程中各组分便会由于移动速度不同而逐渐分离出来，这就是吸附层析的基本过程。

实验中常用的固体吸附剂有氧化铝、硅酸镁、磷酸钙、氢氧化钙、活性钙、蔗糖、纤维素和淀粉。常用的洗脱液有乙烷、苯乙醚、氯仿，以及乙醇、丙酮或水与有机溶剂形成的各种混合物。吸附层析通常用于分离脂类、类固醇类、类胡萝卜素、叶绿素以及它们的前体等非极性和极性不强的有机物。

值得提出的是，几乎所有的溶质对于所有的层析介质，即使是惰性的物质都有一定限度的吸附力，除吸附层析本身之外，吸附作用还或多或少地存在于所有其他类型的层

析中。

## 二、分配层析 (Partition Chromatography)

分配层析是利用混合物中各组分在两相中分配系数不同而达到分离目的的层析技术, 相当于一种连续性的溶剂抽提方法。

在分配层析中, 固定相是极性溶剂 (例如水、稀硫酸、甲醇等)。此类溶剂能和多孔的支持物(常用的是吸附力小、反应性弱的惰性物质如淀粉、纤维素粉, 滤纸等)紧密结合, 使呈不流动状态; 流动相则是非极性的有机溶剂。分配系数(a)是指在一定温度和压力条件下物质在固定相和流动相两部分浓度达到平衡时的浓度比值。

$$\text{分配系数 (a)} = \frac{\text{物质在固定相中的浓度}}{\text{物质在流动相中的浓度}}$$

在层析过程中, 当有机溶剂流动相流经样品点时, 样品中的溶质便按其分配系数部分地转入流动相向前移动。当经过前方固定相时, 流动相中的溶质就会进行分配, 一部分进入固定相。通过这样不断进行的流动和再分配, 溶质沿着流动方向不断前进。各种溶质由于分配系数不同, 向前移动的速度也各不相同。

分配系数较大的物质, 由于分配在固定相多些, 分配在流动相少些, 溶质移动较慢; 而分配系数较小的物质, 移动速度较快。从而将分配系数不同的物质分离开来。

支持物在分配层析中起支持固定相的作用, 根据其使用方式也分柱层析和薄层层析两种。用滤纸做支持物的纸层析法是最常用的分配层析。实验中应选用厚度适当、质地均一、含金属离子(钙、铜、镁、铁等)尽量少的滤纸为支持物。滤纸中吸附着的水 (约含 20-22%) 是常用的固定相。酚、醇是常用的流动相。展层方法多可采用垂直型 (图 3-1), 也可采用水平型。把欲分离的样品点加于纸的一端, 使流动相经此移动, 这样在两相间就发生分配现象。根据样品中各组中的分配系数不同, 它们就逐渐集中于纸上不同的部位。各组分在滤纸上的移动速度可用迁移率 ( $R_f$ ) 来表示。

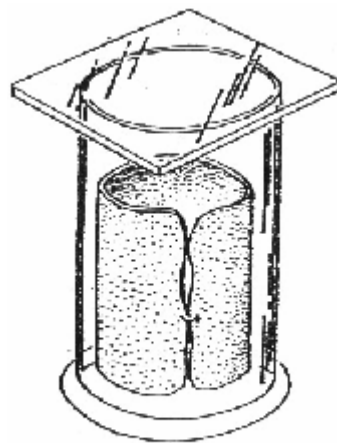


图3—1 纸层析示意图

$$R_f = \frac{\text{溶质层析点中心到原点中心的距离}}{\text{溶剂前沿到原点中心的距离}}$$

在纸层析中,  $R_f$  值的大小主要取决于该组分的分配系数。分配系数大者移动速度慢,



其  $R_f$  值也小；反之分配系数小者移动速度快  $R_f$  值也大。因为每种物质在一定条件下对于一定的溶剂系统，其分配系数是一定的， $R_f$  值也恒定。因此可以根据  $R_f$  值对分离的物质进行鉴定。

有时几种成分在一个溶剂系统中层析所得  $R_f$  值相近，不易分离清楚。这时可以在第一次层析后将滤纸吹干逆转  $90^\circ$  角，再采用另一种溶剂系统进行第二次层析，往往可以得到满意的分离效果。这种方法称为“双向纸层析法”（图 3-2）。

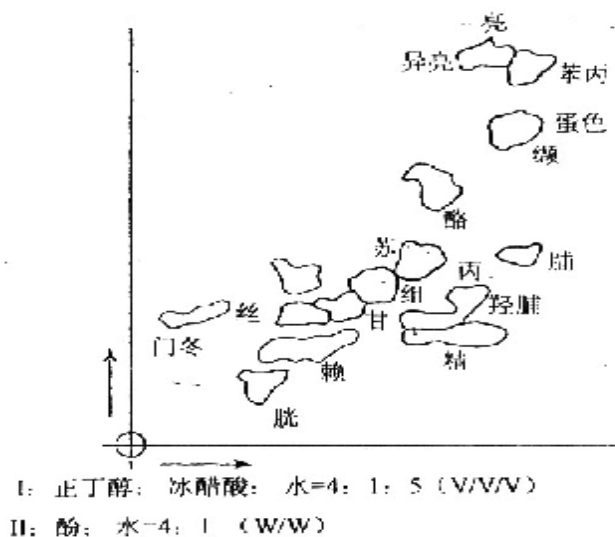


图3-2 氨基酸双向纸层析色谱

### 三、离子交换层析 (Ion-exchange Chromatography)

离子交换层析是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。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。

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（图 3-3）。

据离子交换剂的化学性质，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。

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。

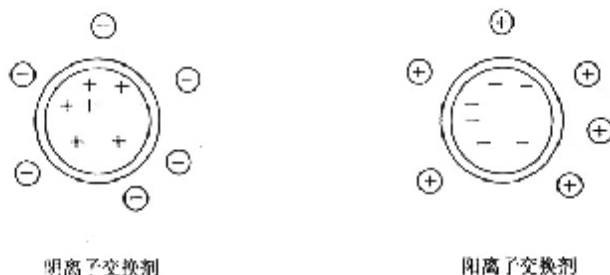


图3—3 离子交换剂和它们所吸引的电荷

离子交换纤维素（图 3-4）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够满意。

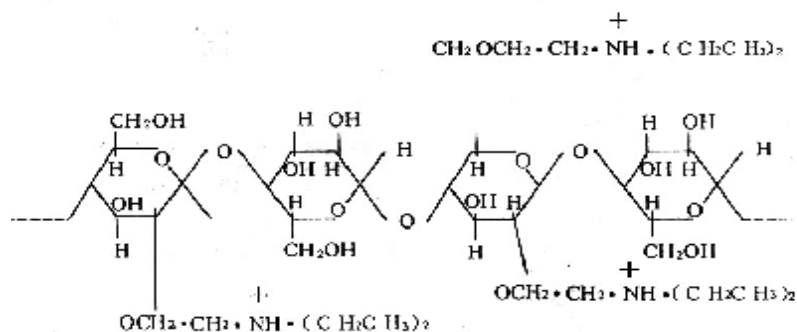


图3—4 DEAE—纤维素部分结构

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。

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，现列于表 3-1。

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

通过共价键吸附于离子交换剂上(图 3-5),然后用基本上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。洗脱待分离物质常用

表 3-1 离子交换剂的类型及其功能基团

类 型		名 称	功 能 基 团
阳离子交换树脂	强酸型	Dowex 50 国产强酸 1×7 (732) IR-120 Zerolit 225	硫酸基 $-\text{SO}_3^-$
	弱酸型	IRC-150Zerolit 226 国产弱酸 101×128 (724)	羧基 $-\text{COO}^-$
阴离子交换树脂	强碱型	Dowex 1 Dowex 2 201×7 (713) 及 国产 201×4 (714) Zerolit FF IRA-400	季胺基 $-\text{N}^+\text{R}_3$
	弱碱型	IR-45 Dowex 3 国产弱碱 301 (701) Zerolith	伯胺基 $-\text{N}^+\text{H}_3$ 伯胺基 $-\text{N}^+\text{H}_2\text{R}$ 伯胺基 $-\text{N}^+\text{HR}_2$
阳离子交换纤维素	强酸型	磷酸纤维素 (P) 磺甲基纤维素 (SM) 磺乙基纤维素 (SE)	磷酸基 $-\text{O}-\text{PO}_3^-$ 磺甲基 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$ 磺乙基 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$
	弱酸型	羧甲基纤维素 (CM)	羧甲基 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$
阴离子交换纤维素	强碱型	三乙基氨基乙基纤维素 (TEAE)	三乙基氨基乙基 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$
	弱碱型	二乙基氨基乙基纤维素 (DEAE) 氨基乙基纤维素 (AE) 三羟乙基氨基纤维素 (ECTEOLA)	二乙基氨基乙基 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}-(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 氨基乙基 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}_2$ 三羟乙基氨基 $-\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$
阳离子交换葡聚糖凝胶	强酸型	SE—葡聚糖凝胶 G25 SE—葡聚糖凝胶 G50 SP—葡聚糖凝胶 G25 SP—葡聚糖凝胶 G50	磺乙基 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$   磺丙基 $-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$
	弱酸型	CM—葡聚糖凝胶 G25 CM—葡聚糖凝胶 G50	羧甲基 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$
阴离子交换葡聚糖凝胶	强碱型	QAE—葡聚糖凝胶 A25  QAE—葡聚糖凝胶 A50	二乙基(α-羟丙基)氨基乙基 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+ \begin{matrix} \text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \swarrow \\ \text{CH}_2\text{OH}-\text{CH}_2 \\ \searrow \\ \text{CH}_2\text{CH}_3 \end{matrix}$
	弱碱型	DEAE—葡聚糖凝胶 A25 DEAE—葡聚糖凝胶 A50	二乙基氨基乙基 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}-(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$

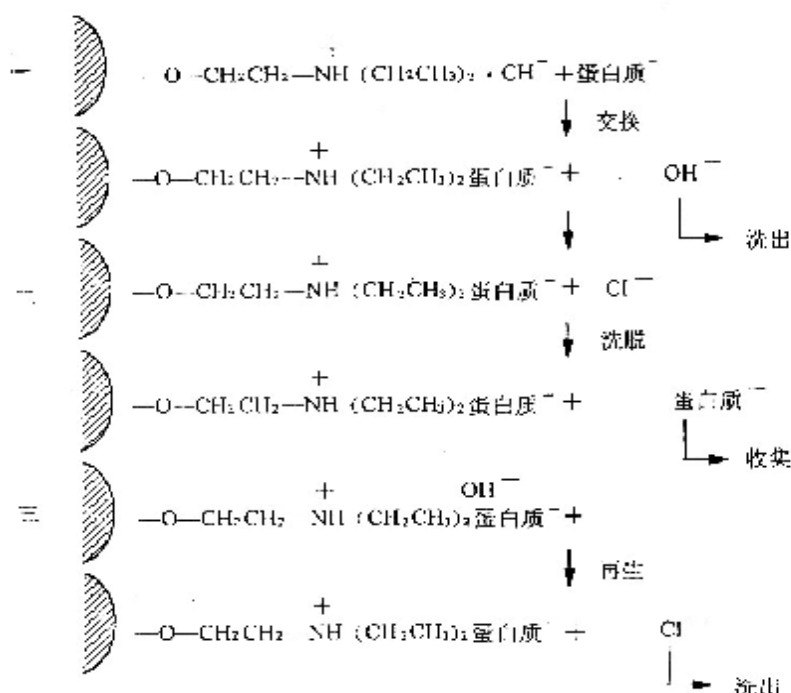


图3—5 离子交换分析基本过程举例

两种方法，一是制作电解质浓度梯度，即离子强度梯度。通过不断增加离子强度，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洗脱下来；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，该离子就被洗脱下来。在实际工作中，离子强度梯度和 pH 梯度可以是连续的（称连续梯度洗脱），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。图 3-6 为最简单的一种梯度混合器，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

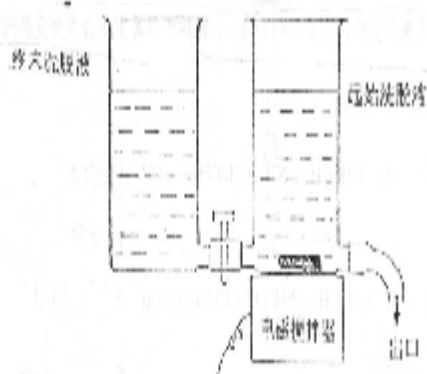


图3-6 梯度混合器

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。

#### 四、凝胶过滤(Gel Filtration)

凝胶过滤是利用具有一定口径范围的多孔凝胶的分子筛作用对生物大分子进行分离的层析技术。当样品随流动相经过由凝胶组成的固定相时,分子量大的物质不能扩散进入凝胶颗粒内部,于是随流动相流经颗粒之间的狭窄空隙,首先洗脱出层析柱;分子量小的物质可以扩散进入凝胶颗粒内部,比较大分子量物质流经的截面积宽,流动速度慢,而后被洗脱出来。这样分子量大的物质得以分离(图 3-7)。即固定相的网孔对不同分子量的样品成分具有不同的阻滞作用,使之以不同的速度通过凝胶柱,从而达到分离的目的,凝胶过滤又因此得名“分子筛层析”和“凝胶排阻层析”。

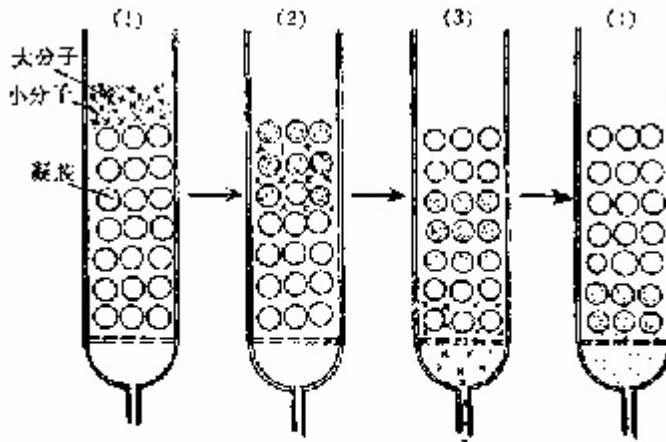


图 7-1 凝胶层析分离层析图

(1) 样品(其中含有大、小不同的分子)溶液加在层析柱顶端;(2) 样品溶液流经层析柱,小分子通过扩散作用进入凝胶颗粒的孔隙中,而大分子则被排阻于颗粒之外。大、小分子因向下移动的速度发生差异而将大、小分子分离开来;(3) 向层析柱顶加入洗脱液,大、小分子分开的距离增大;(4) 大分子已移出层析柱。

在实际工作中,对于同一个凝胶柱来说,各种分子量的物质有其固定的洗脱体积。因此,准确掌握凝胶柱的一些基本因素是十分有益的。

凝胶柱的总体积 ( $V_t$ ): 凝胶颗粒之间空隙的体积 (外水体积  $V_o$ )、凝胶颗粒网眼内的体积 (内水体积  $V_i$ ) 和凝胶颗粒基质本身的体积 ( $V_r$ ) 的总和 (图 3-8)。

$$V_t = V_o + V_i + V_r$$

如果被分离的物质分子量很大,完全不能进入网孔内,那末它从柱上洗脱下来(小样品时以洗脱峰为准)所需的洗脱液体积 ( $V_e$ ) 就等于颗粒间隙的体积 ( $V_o$ ), 即  $V_e = V_o$ 。

如果被分离物质的分子量极小，可以非常自由的通过网孔即进出凝胶颗粒，那么它的洗脱液体积就应当等于颗粒内和颗粒间隙体积的总和 ( $V_e=V_o+V_i$ )。至于分子量位于上两者之间的，其洗脱体积便位于  $V_o$  和  $V_o+V_i$  之间。可见，分子量大小不同的物质，其洗脱体积不同，从而可以用于物质的分离。另外，如果有已知分子量的标准物质做对照的条件下，就可以根据洗脱体积来估计待测物质的分子量（图 3-9）。

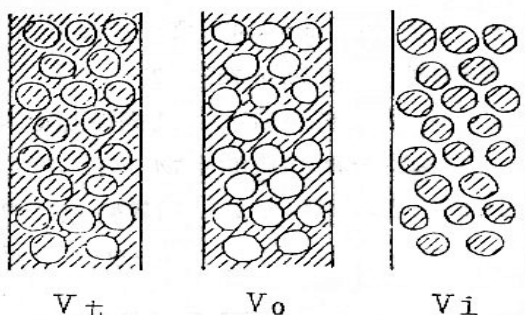


图3—8 凝胶过滤的 $V_t$ 、 $V_o$ 和 $V_i$   
 $V_r$ （凝胶粒本身体积）

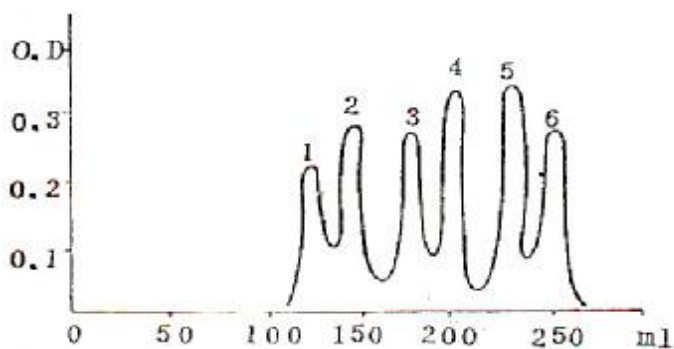


图3—9 几种标准物质凝胶过滤图

Sephadex G-200（超细颗粒）柱  $2.6 \times 70\text{cm}$ ，洗脱液：0.05mol/L 磷酸钾缓冲液，内含 0.1 mol/L NaCl 及 0.02%  $\text{NaN}_3$ ，流速  $1\text{ml}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 。

- 1、 过氧化氢酶（210 000）
- 2、 醛缩酶（158 000）
- 3、 牛血清蛋白（67 000）
- 4、 卵清蛋白（43 000）
- 5、 糜蛋白酶原 A（25 000）
- 6、 核糖核酸酶 A（13 700）

凝胶过滤除用于生物大分子的分离、分子量测定外，还可用于提纯、脱盐和复合物组分成分分析等。

适用于做凝胶过滤的材料有多种，主要有葡聚糖凝胶颗粒(Sephadex G)、琼脂糖凝胶颗粒(Sepharose)和聚丙烯酰胺凝胶颗粒(Bio Gel)等。现将这些凝胶颗粒的种类和某些应用数据列于表 3-2。

不论何种凝胶，其共同特点是化学性质稳定，不带电，与待分离物质吸附力很弱，不影响待分离物质的生物活性，样品得率可达 100%，凝胶过滤尚有操作简便，凝胶柱不经特殊处理便可反复使用等特点，是近年来被广泛应用的生化技术之一。

表 3-2 一些凝胶过滤用凝胶颗粒

凝胶种类 型号		每克涨溶后 柱床体积 (ml)	溶胀所需时间(小时)		适用于分离球形蛋白 质的分子量范围
			22℃	100℃	
葡聚糖凝胶	G-10	2-3	3	1	—700
	G-15	2.5-3.5	3	1	—1500
	G-25	4-6	3	1	1000—1500
	G-50	9-11	3	1	1500—30000
	G-75	12-15	24	3	3000—70000
	G-100	15-20	72	5	4000—150000
	G-150	20-30	72	5	5000—400000
	G-150 超细	10-22	72	5	
	G-200	30-40	72	5	5000—800000
	G-200 超细	20-25	72	5	
聚丙烯酰胺凝胶	P-2	3.8	4	2	200—1800
	P-4	5.8	4	2	800—4000
	P-6	8.8	4	2	1000—6000
	P-10	12.4	4	2	1500—20000
	P-30	14.8	12	3	2500—40000
	P-60	19.0	12	3	3000—60000
	P-100	19.0	24	5	5000—100000
	P-150	24.0	24	5	15000—150000
	P-200	34.0	48	5	30000—200000
	P-300	40.0	48	5	60000—400000
琼脂糖凝胶颗粒	6B	(以溶胀状态出售)			$4 \times 10^6$
	4B				$20 \times 10^6$
	2B				$40 \times 10^6$



## 五、亲和层析(Affinity Chromatography)

亲和层析法是近年来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（图 3-10）。

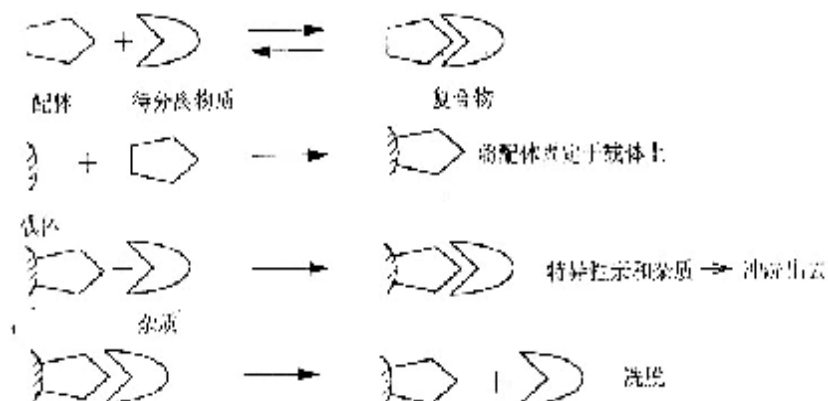


图3-10 亲和层析的基本原理

亲和层析由于是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，可提高纯度几千倍，是当前最为理想的提纯和浓缩方法。亲和层析的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取出其中未变性的部分，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，机械强度好，不易变形，能保障流速的物质。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(Sepharese 4B)型应用最广泛。亲和层析的关键是设法选择合适的配体，并将此配体与载体以化学

方法连接起来，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。

#### 常用词汇

吸附层析    **Apsorption Chromatography**

洗脱        **Elution**

固定相      **Stationary Phase**

分配系数    **Partition Coefficient**

阳离子      **Cation**

阴离子      **Anion**

树脂        **Resin**

DEAE 纤维素    **Diethylaminoethyl Cellulose**

葡聚糖凝胶    **Sephadex Gel**

pH 梯度        **pH Gradient**

## 第四章 电泳技术

### Techniques in Electrophoresis

#### 一、基本概念

目前电泳技术已被广泛应用于蛋白质、核酸和氨基酸等物质的分离和鉴定。

何谓电泳？在溶液中，带电粒子在外加电场的作用下，向相反电极方向移动的现象，称为电泳。电泳时不同的带电粒子在同一电场中泳动速度不同。电泳速度常用泳动率（M）来表示。泳动率也称迁移率。它等于泳动速度（V）与电场强度（E）之比（1式），亦即带电粒子在单位电场强度下的泳动速度称泳动率。

$$M = \frac{V}{E} \quad (1)$$

$$\text{因} \quad V = \frac{L}{t} \quad (2)$$

$$\text{和} \quad E = \frac{V}{d} \quad (3)$$

在式（2）中，L 为泳动距离，t 为通电时间；在式 3 中，V 为加在支持物两端的端电压，d 为支持物的有效长度。

将式 2 和式 3 代入式 1 得：

$$M = \frac{L d}{V t} \quad (4)$$

由式 4 可知，当 d、L、V 及 t 等数值为已知时（实验测得），可以计算求得泳动率 M 的值。

#### 二、影响泳动率的因素

根据物理学原理，带电粒子在电场中所受电场力（F）等于电场强度与粒子所带电量的乘积

$$F = E Q \quad (5)$$

在上式中，E 为电场强度，Q 为粒子所带电量。

又据 Stokes 定律，一个球形分子在溶液中泳动时，受到的阻力（F'）与球形分子的半径（r）、溶液的粘度（ $\eta$ ）及泳动速度（v）成正比，其比例系数为  $6\pi$ 。即：

$$F' = 6\pi r \eta v \quad (6)$$

当带电粒子所受的电场力 F 与阻力 F' 相等时，即  $F = F'$ ，就有

$$E Q = 6\pi r \eta v \quad (7)$$

7 式两端同时除  $6 \pi r \eta E$ , 得:

$$\frac{V}{E} = \frac{Q}{6 \pi r \eta} \quad (8)$$

由式 7 和 8 可得

$$M = \frac{Q}{6 \pi r \eta} \quad (9)$$

由上式可见, 泳动率与球形分子所带电荷电量成正比, 与球形分子的大小及介质粘度成反比。泳动率除受上述自身性质及介质粘度的影响外, 还受其他外界因素的影响。

### 1、电泳介质 pH 值的影响

对于蛋白质和氨基酸等两性分子, 电泳介质的 pH 值决定了它们所带净电荷性质和多少。pH 值小于等电点, 分子带正电荷, 向负极泳动, 如果 pH 值大于等电点, 分子带负电荷, 向正极泳动。pH 值偏离等电点越远, 分子所带净电荷越多, 其泳动速度越快。当缓冲液 pH 值等于其等电点时, 分子处于等电状态, 不移动。由于血清蛋白质的等电点多在 pH4-6 之间, 因此, 分离血清蛋白常用 pH8.6 的巴比妥缓冲液或三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲液。

### 2、缓冲液的离子强度

离子强度是表示溶液中电荷数量的一种量度。离子强度等于溶液中各种离子的摩尔浓度与其价数平方之积总和的一半

$$I = 1/2 \sum m_i Z_i^2 \quad (10)$$

式中  $m_i$  系离子的摩尔浓度,  $Z_i$  为相应离子的价数。

例 1 两个单价离子化合物 (如 NaCl) 离子强度在数值上等于它的摩尔浓度, 如 0.05mol/L NaCl 溶液的离子强度

$$I = 1/2 (0.05 \times 1^2 + 0.05 \times 1^2) = 0.05$$

例 2 两个二价化合物 ( $\text{CuSO}_4$ ) 的离子强度在数值上等于它的摩尔浓度的 4 倍, 例如 0.05mol/L  $\text{CuSO}_4$  溶液的离子强度

$$I = 1/2 (0.05 \times 1^2 + 0.05 \times 1^2) = 0.20$$

溶液中的离子浓度越大、或离子的价数越高, 离子强度就越大。对缓冲液来说, 离子强度过低主要是影响缓冲液的缓冲容量, 不易维持介质 pH 的恒定; 离子强度过高, 带电粒子的电泳速度减慢。这是由于带电的生物大分子吸附溶液中的反电荷离子 (图 4-1) 形成反离子氛, 犹如大气层包围地球。距离中心离子愈近, 反离子密度愈大; 反之, 密度愈小。根据反离子与中心离子结合的紧密程度不同, 可将反离子层分为吸附层

和扩散层。在电场的作用下，吸附层的反离子随中心离子一起泳动。离子强度越大，吸附层反离子越多，泳动粒子团的净电荷越少，泳动速度也就越慢。

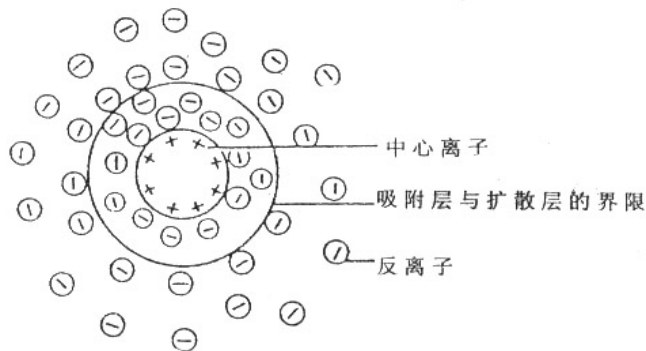


图 4—1 离子氛示意图

### 3、电渗

在电场中，液体对于固体支持物的相对移动称为电渗。电渗是由于支持物带有电荷所引起的。支持物上的电荷使介质中的水感应产生相反电荷。如纸上电泳所用的滤纸纤维素带有负电荷；琼脂电泳中，所用的琼脂由于大量硫酸根的存在也带有负电荷，它们使水感应产生水合氢离子( $\text{H}_3\text{O}^+$ )。在外电场的作用下，水向负极移动。如果被测定样品也带正电荷，则移动更快；如果被测定样品带负电荷，则移动减慢。所以电泳时，颗粒泳动所表现的速度决定于颗粒本身的泳动速度和溶液的电渗作用。因此在选用支持物时，应尽量避免高电渗作用的物质。

### 4、电场强度的影响

电场强度增高，带电粒子受到的电场力增大，泳动速度加快，但泳动率不变。

随着电场强度的增高，电流强度增加，产热也增多。产热的不良后果是：(1) 引起水的蒸发，改变溶液 pH 及离子强度；(2) 引起介质温度升高，使蛋白质变性。因此电泳必需控制电压在一定范围之内，当进行高压电泳时，必需装备有效的冷却系统。

### 三、电泳技术的种类

电泳技术的种类很多。根据有无固体支持物，可分为两大类，即界面电泳和区带电泳。界面电泳是指在溶液中进行的电泳，没有固体支持物。当溶液中有几种带电粒子时，通电后，由于不同粒子泳动速度不同，在溶液中形成相应的区带界面。但区带界面可因为扩散而易于互相重叠，不易得到纯品，且分离后不易收集，故目前已很少应用界面电泳。区带电泳是指在支持物上进行的电泳。支持物将溶液包绕在其网孔中，防止溶液自

由移动。通电后各种带电粒子可以形成许多清晰的区带。故区带电泳的分离效果远比界面电泳的好。根据支持物的不同，常用的区带电泳又可分为纸上电泳、醋酸纤维素薄膜电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳及琼脂糖凝胶电泳等。

### (一) 醋酸纤维素薄膜电泳

醋酸纤维素薄膜电泳是利用醋酸纤维素薄膜做固体支持物的电泳技术，和纸上电泳相似是在其基础上发展起来的。该电泳技术具有比纸电泳电渗小，分离速度快、样品用量小、而分辨率高、分离清晰等优点。

### (二) 琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖 (Agarose) 是经过挑选，以质地较纯的琼脂 (Agar) 作为原料而制成的。琼脂在化学上是由琼脂糖和琼脂胶组成的复合物。琼脂胶是一种含有硫酸根和羟基的多糖，它具有离子交换性质，这种性质会给电泳及凝胶过滤以不良的影响。琼脂糖是直链多糖，它由 D-半乳糖和 3,6-脱水-L-半乳糖的残基交替排列织成 (图 4-2)。

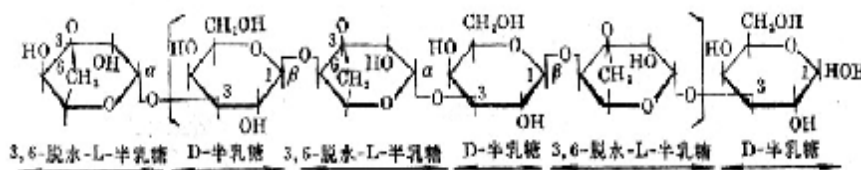


图 8-5 琼脂糖结构中的一个链段

琼脂糖主要通过氢键而形成凝胶。电泳时因凝胶含水量大 (98-99%)，近似自由电泳，固体支持物的影响较少，故电泳速度快，区带整齐。而且由于琼脂糖不含带电荷的基团，电渗影响很少，是一种较好的电泳材料，可达到较好的分离效果。

### (二) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

#### 1、聚丙烯酰胺的合成和结构

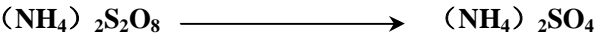
聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺 (Acrylamide 简写为 Acr) 和交联剂甲叉双丙烯酰胺 ( $N, N'$ -methylene-bisacrylamide, 简写 Bis) 在催化剂的作用下，聚合交联成含有酰胺基侧链的脂肪族大分子化合物。单体及聚合物的化学结构式见 29 页。

催化剂有两个系统可供选用。

(1) 过硫酸胺-四甲基乙二胺 ( $N, N, N, N$ -Tetramethyl-ethylene Diamine, 简写 TEMED) 系统，其中过硫酸铵是引发剂。它在光照射下裂解成带有自由基的硫酸铵，通过自由基的传递，使丙烯酰胺成为自由基，发动聚合反应。TEMED 是加速剂，加快







(2) 核黄素-TEMED 系统, 其中核黄素是引发剂, TEMED 是加速剂。这一催化系统需较强的光线和少量氧。

聚丙烯酰胺凝胶具有三维网状结构, 能起分子筛作用。用它作电泳支持物, 对样品的分离不仅取决于各组分所带电荷的多少, 也与分子大小有关。凝胶网孔的大小主要受成胶物的总浓度及 Acr 和 Bis 的比例的影响。一般电泳采用成胶物质总浓度为 7.5%, 此浓度称为标准凝胶浓度。如果改变总胶浓度, 也应相应改变 Acr 和 Bis 的比例。

总胶浓度为 5%以下时, Acr: Bis 在 20 左右。

总胶浓度为 5~10%时, Acr: Bis 在 40 左右。

总胶浓度为 5~20%时, Acr: Bis 在 125~200 左右。

实验中应根据分子量大小, 选择合适的凝胶总浓度和 Acr 和 Bis 的比例。

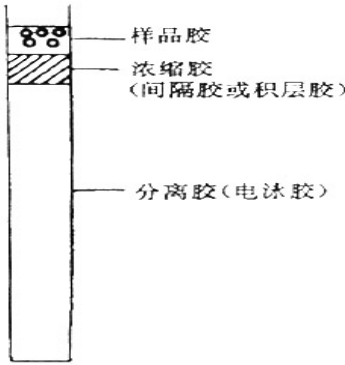
分子量与凝胶浓度的关系

分子量范围	凝胶浓度(%)
蛋白质 <10 <sup>4</sup>	20-30
1-4 × 10 <sup>4</sup>	15-20
4 × 10 <sup>4</sup> ~1 × 10 <sup>5</sup>	10-15
1~5 × 10 <sup>5</sup>	5-10
>5 × 10 <sup>5</sup>	2-5
核酸 <10 <sup>4</sup>	15-20
10~10 <sup>5</sup>	5-10
10~2 × 10 <sup>5</sup>	2-5

## 2、不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳的基本原理

不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳是在聚丙烯酰胺凝胶支持物的介质缓冲液组成、缓冲液 pH、凝胶孔径和电势梯度不连续的条件下进行的电泳。不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳有较高的分辨率。这是因为分离过程中不仅有电荷效应和分子筛效应(存在于分离胶中), 而且还有一种独特的浓缩效应。下面简单介绍不连续园盘电泳的基本原理:

(1) 浓缩效应 不连续园盘电泳一般是在小玻璃管内进行的。把三种性质不完全一样的聚丙烯酰胺凝胶重叠起来。如图 4-3 所示, 层胶的凝胶浓度为 3%是大孔胶, 应用 Tris-HCl 缓冲液, 总浓度为 7.5%, 是小孔胶, 也用 Tris-HCl 是 Tris-甘氨酸缓冲液, pH=8.3。通电后, 向阳极移动的是阴离子 (Pr<sup>-</sup>) 和甘氨酸阴离子 (Gly<sup>-</sup>)。在样品胶中, 样品电离为 Cl<sup>-</sup>, 甘氨酸仅极少部分电离为 Gly<sup>-</sup> (甘氨酸



阴离子。这样， $\text{Cl}^-$ 泳动最快（称快离子）， $\text{Gly}^-$ 泳动最慢（称慢离子），蛋白质介于其间。通电后，快离子很快超过蛋白质离子和  $\text{Gly}^-$ ，泳动到最前面。于是，快慢离子之间形成一个离子浓度低的区域，即低电导区域，低电导区域有较高的电压梯度。电压梯度驱动慢离子加速泳动。这样，当快慢离子移动速度相等时，就建立一个不断向阳极移动的界面。 $\text{Pr}^-$ 的泳动速度恰好介于快慢离子之间。因而被挤压在快慢离子之间形成一条窄带。这种浓缩作用可使蛋白质浓缩数百倍。血清蛋白在纸上电泳和醋酸纤维素薄膜电泳上仅可分成 5-7 个组分。而在聚丙烯酰胺凝胶电泳上则可以分为 20-30 个组分。

(2)电荷效应 蛋白质样品在界面处被浓缩成一狭窄的高浓度蛋白质区，但由于每种蛋白质分子所带有效电荷不同，因而泳动率也不同。图 4-3 在玻璃管中有三层不同的凝胶示意图顺序排列成一个一个圆盘区带。在进入分离胶时，电荷效应引起作用。

(3)分子筛效应 当被浓缩的蛋白质样品从浓缩胶进入分离胶时，pH 值和凝胶孔径突然改变，选择分离胶的 pH 值 8.9 接近甘氨酸的  $\text{Pka}$  值 (9.7-9.8)，这样慢离子的解离度增大，因而它的有效泳动率也增加。此时慢离子的有效泳动率超过了所有蛋白质的有效泳动率。这样，高电势梯度不存在了，各种蛋白质仅会由于其分子量或构型的不同，在一个均一的电势梯度和 pH 条件下，根据其通过一定孔径的分离胶时所受阻滞程度的不同，表现出不同的泳动率而被分开。

#### (四) 高效毛细管电泳

##### 1. 基本原理

高效毛细管电泳 (High Performance Capillary Electrophoresis, HPCE) 和一般电泳法的区别在于使用毛细管柱。在熔融石英毛细管内壁覆盖一层硅氧基 ( $\text{Si-O}^-$ ) 阴离子，由于吸引了溶液中的阳离子，由此在毛细管内壁形成表面带阴离子的双电层。层外缘扩散层中富集的阳离子被电场阴极吸引导致溶液向阴极的流动，这种效应称为电渗。电渗流的速度  $u_{eo}$  和电场强度  $E$  成正比，定义电渗速度  $u_{eo}$  和场强  $E$  的比值为电渗淌度  $\mu_{eo}$ ，即  $\mu_{eo} = u_{eo}/E$

电渗淌度与硅氧层表面的电荷密度成正比，与离子强度的平方根成反比。在低 pH 条件下，不着硅氧层形成分子 ( $\text{Si-OH}$ )，因而减少了表面电荷密度，故电渗速度减小。如在 pH 9 的硼砂缓冲液中电渗速度约 2mm/s，而在 pH 3 介质中电渗速度减小约一个数量级。影响电渗的一个重要因素是毛细管中因电流作用产生的焦耳热，能使得柱中心的温度高于边缘的温度，形成抛物线型的温度梯度，管壁附近温度低，中心温度高，结

果使电渗速度不均匀而造成区带变宽，柱效降低。为此，应避免使用过长和内径大于 50  $\mu\text{m}$  的毛细管柱，还应注意减小毛细管的壁厚、选择适宜的电压和缓冲液以及使用良好的冷却系统。

HPCE 中观察到的离子淌度是离子的电泳淌度  $\mu_{\text{ep}}$  和溶液的电渗淌度的加和。定义表观淌度为  $\mu_{\text{app}}$ ，则

$$\mu_{\text{app}} = \mu_{\text{ep}} + \mu_{\text{eo}}$$

根据以上的讨论，带正电荷的离子的  $\mu_{\text{ep}} > 0$ ， $\mu_{\text{eo}} > 0$ ，故  $\mu_{\text{app}}$  总是为正号，离子向阴极移动；而带负电荷的离子受电泳流的影响被阴极排斥， $\mu_{\text{ep}} < 0$ ，在高 pH 条件下，若  $\mu_{\text{eo}} > \mu_{\text{ep}}$ ， $\mu_{\text{app}}$  仍为正号，离子仍然可向阴极移动，但在低 pH 条件下， $\mu_{\text{app}}$  可为负号，离子将向反方向移动。此时必须改变电场方向，方可检测到欲分析的离子。

对于实际速度为  $u_{\text{net}}$ （net 指 net speed）的组分，表现淌度可由下式计算：

$$\mu_{\text{app}} = \frac{u_{\text{net}}}{E} = \frac{Ld/t}{V/Lt}$$

式中  $Ld$ ：从进样口到检测器的实际柱长； $Lt$ ：总柱长； $V$ ：电压； $t$ ：所需的分析时间。

实际测试电渗淌度时可用中性组分，此时  $\mu_{\text{ep}} = 0$ ， $\mu_{\text{eo}} = \mu_{\text{app}}$ ， $\mu_{\text{ep}} = \mu_{\text{eo}}$  上式为：

$$\mu_{\text{eo}} = \frac{u_{\text{中性}}}{E} = \frac{Ld/t}{V/Lt}$$

HPCE 的毛细管容易冷却，故可以使用 20~30 kV 的高电压，由于管内径只有 25~100  $\mu\text{m}$ ，无涡流扩散，使传质阻抗趋于零，因此，有很高的分辨率。电解质液由毛细管阳极端进入毛细管，携带被分离的组分可以从毛细管阴极端流入检测器的比色池，电泳过程与结果分析均容易自动化，已成为效率极高的分析仪器。

## 2、类型及应用

### (1) 毛细管区带电泳

毛细管区带电泳法（Capillary Zone Electrophoresis, CZE）的分离是基于组分淌度的区别。一般毛细管内壁带负电荷，电渗流从阳极移动至阴极，流出顺序是阴离子 < 中性分子 < 阳离子。若毛细管内壁涂上一层阳离子表面吸附剂，则极性颠倒，流出顺序是阳离子 < 中性分子 < 阴离子。

毛细管区带电泳具有分离方便、快速、样品用量小的特点，在无机离子、有机物、氨基酸、蛋白质及各种生物样品的测试中有着广泛的应用。

### (2) 胶束电动毛细管色谱

CZE 主要用于分析带电荷的离子，对中性分子的测试主要是依靠电渗的作用，分

离比较困难。此时可应用胶束电动毛细管色谱 (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MECC) 进行分离分析。

MECC 是在缓冲溶液中加入表面活性剂, 当表面活性剂浓度超过临界胶束浓度时, 则形成荷电胶束。而当无胶束存在时, 所有中性分子将同时到达检测器, 有胶束时带负电荷的胶束在电场作用下向相反方向泳动, 溶质分子在胶束和水相间形成平衡, 在溶液的电渗流和胶束的电泳流的共同作用下分离。溶质分子在胶束内停留时间越长, 其迁移所需时间即保留时间越长。

最常用的表面活性剂是十二烷基硫酸钠 (SDS)。各种阴阳离子表面活性剂和环糊精等添加剂使得本法有相当多的选择余地, 可广泛用于各种类型的样品, 在手性分子的分离中也有成功的应用。

### (3)毛细管凝胶电泳

毛细管凝胶电泳 (Capillary Gel Electrophoresis, CGE) 是在毛细管中填充具线状缠结聚合物结构的物理凝胶, 使样品中各组分通过净电荷差异和分子大小差异双重机制得以分离。CGE 在蛋白质、多肽、DNA 序列分析中得到成功应用, 已成为生命科学基础和应用研究中有力的分析工具。

近年来, 其他类型的毛细管电色谱法 (Capillary Electro-Chromatography, CEC) 发展很快。其中填充毛细管电色谱法是将细粒径固定相填充在毛细管柱中, 开管毛细管电色谱法是把固定相的官能团键合在毛细管内壁表面而形成的色谱柱。CEC 是很有前途的分析方法。

常用词汇

电场 Electric Field

泳动率 Mobility

离子强度 Ionic Strength

电泳介质 Electrophoretic Medium

带电粒子 Charged Particle

## 第五章 离心技术

### Centrifugation Techniques

#### 一、基本原理

物体围绕中心轴旋转时会受到离心力  $F$  的作用。当物体的质量为  $M$ 、体积为  $V$ 、密度为  $D$ 、旋转半径为  $r$ 、角速度为  $\omega$  (弧度数/秒) 时, 可得:

$$F=M\omega^2r \text{ 或者 } F=VD\omega^2r \quad (1)$$

上述表明：被离心物质所受到的离心力与该物质的质量、体积、密度、离心角速度以及旋转半径呈正比关系。离心力越大，被离心物质沉降得越快。

在离心过程中，被离心物质还要克服浮力和摩擦力的阻碍作用。浮力  $F'$  和摩擦力  $F''$  分别由下式表示：

$$F' = VD' \omega^2 r \quad (2)$$

$$F'' = f \frac{dr}{dt} \quad (3)$$

其中  $D'$  为溶液密度， $f$  为摩擦系数， $\frac{dr}{dt}$  为沉降速度（单位时间内旋转半径的改变）。在一定条件下，可有

$$F = F' + F''$$

$$\begin{aligned} VD\omega^2 r &= V.D' \omega^2 r + f \frac{dr}{dt} \\ \frac{dr}{dt} &= V \frac{D-D'}{f} \omega^2 r \end{aligned} \quad (4)$$

式(4)表明，沉降速度与被离心物质的体积、密度差呈正比，与  $f$  成反比。若以  $S$  表示单位力场（ $\omega^2 r = 1$ ）下的沉降速度，则

$$S = V \frac{D-D'}{f} \quad (5)$$

$S$  又称沉降系数。

沉降系数对于生物大分子来说，多数在  $(1 \sim 500) \times 10^{-13}$  秒之间。为应用方便起见，人们规定  $1 \times 10^{-13}$  秒为一个单位（或称 1S）。一般单纯的蛋白质在 1~20S 之间，较大核酸分子在 4~100S 之间，更大的亚细胞结构在 30~500S 之间。

实际应用中，离心机工作时对单位质量物质产生的离心力是以地心引力（Gravity）的倍数来表示的，这种方法表示的离心力称为相对离心力（RCF），常用“数字×g”来表示。

$$RCF(\times g) = \frac{\omega^2 r}{980} \quad (\text{厘米.克.秒制})$$

其中角速度  $\omega$  与每分钟转数 rpm 的关系是

$$\omega = 2 \pi \text{ rpm} / 60$$

$$\text{所以 } \text{RCF} = 1.119 \times 10^{-5} \cdot \text{rpm}^2 \cdot r \quad (6)$$

根据这个公式，相对离心力和每分钟转数之间便可以互换，这种互换关系是很有实用价值的。

## 二、离心技术的应用

根据应用目的不同，离心机有分析用和制备用两种。分析用超速离心机仅能对小样品（小于 1ml）进行分析（如分子量的测量）；制备用离心机是为提取、纯化大分子组分设计的，可对 10~2000ml 的样品进行分离。

制备用离心机是应用最广泛的离心机，根据其性能可分为低速离心机（最大速度不超过 10,000rpm）、高速离心机（High-speed centrifuge，最大转速 20,000-25,000rpm）和超速离心机（Ultracentrifuge，最大离心力可超过 5000,000×g，即 75,000rpm，r=8cm）。有的低速离心机的离心室有冷却装置；高速离心机都有冷却装置，以防止转轴的温度过高和保护生物样品；所有超速离心机都有真空装置，以减少离心室内空气和转头的摩擦作用。高速和超速离心机的转头都标有最大转速，离心时绝对不得超过这一限度，否则会引起转头破裂，仪器损坏和人身伤亡。

制备用离心机在应用方法上有沉降离心和梯度离心两种。

### （一）沉降速度离心

沉降速度离心（Velocity Sedimentation Centrifugation）是指在离心管内液体密度均一情况下进行的离心。最常见的方法是差速离心（Differential Centrifugation），差速离心是对含两种以上大小不同的待分离物质的混合液，以不同离心速度分步骤离心沉淀，使之互相分离的离心方法。例如用差速离心法进行亚细胞结构成分的分离（表 4-1）。

从表 4-1 可知，如果以 4,000×g 离心 15 分钟，未打破的真核细胞、细胞碎片和细胞可以沉淀下来；将此上清液再以 15,000×g 离心 20 分钟可将线粒体沉淀出来。如将去除线粒体的上清液再以 30,000×g 离心 30 分钟，溶酶体便被沉淀下来。如将去除溶酶体的上清液再以 100,000×g 离心 3 小时，核糖体和多聚核糖体可被沉淀下来。由此可知，对于沉淀不同的亚细胞组分，相对离心力和离心时间这两个因素是不可忽视的。如果根据离心条件的不同，需要改变离心力或离心时间（必须是同一大小的转头）应根据下述公式进行计算方可达到相同的分离目的。

$$\text{rpm}^2 \text{ 规定} \cdot t \text{ 规定} = \text{rpm}^2 \text{ 新选} \cdot t \text{ 新选}$$

rpm 为每分钟转速，t 为时间。

表 4-1 用差速离心法分离亚细胞成分

离 心 条 件		沉 淀 的 亚 细 胞 成 分
1,000×g	5 分钟	真核细胞
4,000×g	10 分钟	叶绿体
		真核细胞碎片
		细胞核
15,000×g	20 分钟	线粒体
		细菌
30,000	30 分钟	溶酶体
		细菌菌体碎片
100,000×g	3 小时	核糖体
		多聚核糖体

## (二)梯度离心

梯度离心是待分离的物质在具有密度梯度的介质中进行的离心。梯度离心可分为两种，即密度梯度离心（又称沉降速度离心、速度区带离心或差速区带离心）和平衡密度梯度离心（等密度梯度离心和沉降平衡离心）。

### 1. 密度梯度离心

密度梯度离心（Density gradient centrifugation）是在密度梯度介质中进行的一种沉降速度离心。常用有机物如蔗糖或甘油来制作梯度。梯度的作用是使离心液稳定以减少扩散或得到较为锋利的区带。被离心的物质根据其沉降系数不同进行分离，同类物质则因分子大的沉降速度快于分子小的物质（见公式 5）从而得到分离（图 5-1）。密度梯度离心和差速离心一样是依赖时间的，离心时间过长已经分离的物质均可沉到管底或某一介质密度区域（图 5-2）。

### 2. 平衡密度梯度离心

平衡密度梯度离心（Equilibrium Density Gradient Centrifugation）虽然也是在密度梯度介质中进行的离心，但被分离的物质是依靠它们的密度不同进行分离的，此种离心常用无机盐类（如氯化铯 CsCl）制作密度梯度。在梯度介质中，当被分离的物质分别达到与其密度相同的介质部位时就不再移动，从而达到分离的目的（图 5-3）。例如，DNA 在平衡密度梯度离心过程中，停留在密度梯度为 1.7g/cm 的位置，而 RNA 停止在 1.9g/cm 的部位。由此可见平衡密度梯度离心是不依赖于时间的，只要梯度不破坏，时间延长不影响分离（图 5-3）

常用词汇



离心 Centrifugation

离心机 Centrifuge

超速离心机 Ultracentrifuge

差速离心 Differential Centrifugation

沉降系数 Sedimentation Coefficient

密度梯度离心 Density Gradient Centrifugation

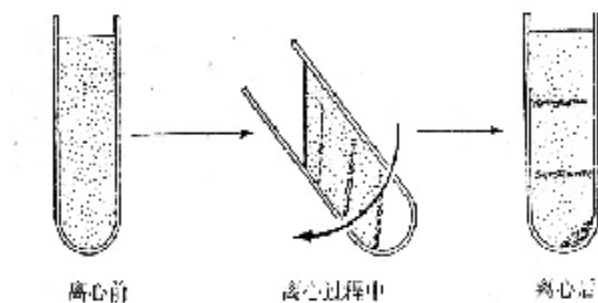


图5-1 密度梯度离心示意图

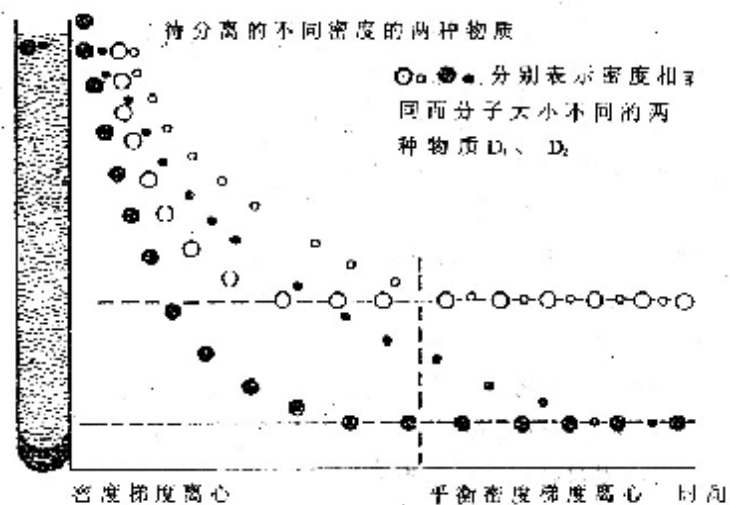


图5—2 两种梯度离心比较

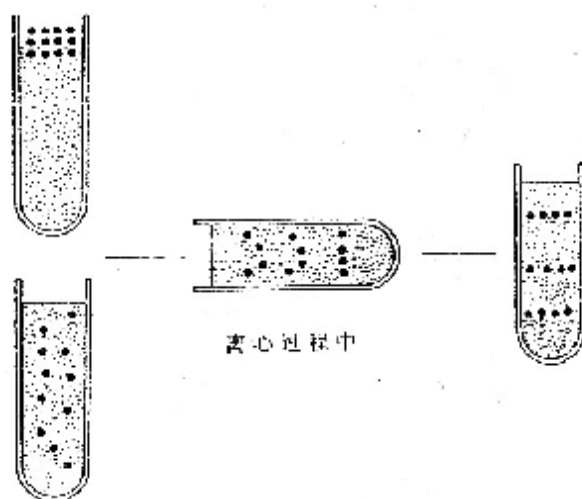


图 5—3 平衡密度梯度离心示意图

## 第六章 分子生物学基本理论

### 一、核酸是遗传物质

核酸是遗传物质。核酸被分为核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)。DNA是一种由四种单核苷酸组成的高分子单链化合物,并由两条单链严格按A与T配对和G与C配对的规律组成双螺旋结构,该结构赋予其拥有将遗传信息从上一代传给下一代的能力,其分子中单核苷酸的排列顺序就决定了生物的遗传特性。RNA作为遗传物质的作用主要是将储存于DNA分子中的遗传信息表达为相应的蛋白质,RNA主要分为mRNA、tRNA和rRNA。mRNA是合成蛋白质的模板,其核苷酸序列中三个连续的单核苷酸构成一个密码子,指导蛋白质合成过程中氨基酸的掺入,从而mRNA中的核苷酸序列就直接决定了蛋白质中的氨基酸序列。tRNA作用是结合与其分子中反密码相对应的氨基酸,并将该氨基酸运送到正在合成中的蛋白质多肽链上,根据模板mRNA上的密码将正确的氨基酸掺入到正在合成中的蛋白质上。rRNA与蛋白质共同组成核糖体,是蛋白质合成的场所。

遗传物质至少应该具有两种功能,一种是将上一代的遗传信息传给下一代,另一种是将遗传信息以蛋白质的形式表达出来。DNA担当了前一种功能,RNA参与了后一种功能,之所以这样是因为DNA与RNA的结构赋予了其相应的功能。

### 二、基因与基因组

基因一般是指表达一种蛋白质或功能RNA的遗传物质的基本单位。但完整地说,一个基因应该是合成有功能的蛋白质多肽链或RNA所必需的全部核酸序列,不仅包括编码蛋白质肽链或RNA的核酸序列,也包括为保证转录所必需的调控序列、5'端非翻译序列、内含子和3'端非翻译序列等所有的核酸序列。

基因组对于原核生物来说,就是它的整个染色体,对于一般的二倍体高等生物来说,是能维持配子或配子体正常功能的最低数目的一套染色体构成一个基因组。

原核生物基因组的特点是:基因组小,基因数目少,只有单一的复制起始位点;单个染色体,一般呈环状,染色体DNA或RNA并不和蛋白质形成固定结合物;只含有少量重复序列;功能上密切相关的基因高度集中,常转录成多基因mRNA。

真核生物基因组大,基因数目多,有多个复制起始位点;多个染色体,结构亦较复杂;含有大量重复序列,低度重复序列一般有1~10个拷贝,中度重复序列一般有10~1000个拷贝,高度重复序列可达几百万个拷贝;真核生物基因组含有大量插入序列,基

因在转录成 mRNA 时会将这些插入序列切除。

### 三、DNA 复制、损伤与修复

在细胞分裂过程中，亲代细胞所含的遗传信息完整地传递到两个子代细胞，其中的 DNA 在传代时完整地复制成两份，这个过程称为 DNA 复制。复制是严格按照 A 与 T 配对和 G 与 C 配对的规律进行的，通常有高度的完整性与准确性。但生物存在的内外环境有许多使 DNA 分子损伤的因素，致使复制造成一些错误，因此，生物体本身有一套机制来修复这种损伤。未能修复的错误被保留下来，成为突变。突变有可能改善了基因，增强了生物适应环境的能力；也可能产生不利的影响，严重的可致死。隐性突变对生物性状不产生影响。突变是生物进化的一种手段。

#### （一）半保留复制

为研究复制的机理，1957 年 Meselson 和 Stahl 设计了一个实验。他们先把大肠杆菌在  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  的培养液中培育 15 代，使所有的 DNA 都被  $^{15}\text{N}$  标记， $^{15}\text{N}$ -DNA（重 DNA）比通常的  $^{14}\text{N}$ -DNA（轻 DNA）重约 1%；然后把大肠杆菌转移到含  $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$  的培养液中继续培育，随着复制的进行， $^{14}\text{N}$  DNA 不断生成。在培育过程的不同时间取出样品，将大肠杆菌细胞用裂解液裂解，放入  $\text{CsCl}$  溶液中超速离心（140,000 r / min）20 小时，此时从管底到管口  $\text{CsCl}$  密度形成一个梯度分布，DNA 分子在与它密度相等的层次中停留，在紫外检测下可观察到一条吸收带。他们发现在含  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  培养液中所得到的亲代全为重 DNA（两条链都是含  $^{15}\text{N}$  的重链），在转移入含  $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$  的培养液中所得到的第一子代（F1）的 DNA 则既不是重 DNA，也不是轻 DNA（两条链都是含  $^{14}\text{N}$  的轻链），而是密度介于两者之间的混合链 DNA；第二子代（F2）的 DNA 也显示两条吸收带，一条是密度介于轻、重 DNA 之间的 DNA，另一条是轻 DNA；第三子代（F3）的 DNA 也显示两条吸收带，使轻 DNA 的比例加大；第四子代（F4）的轻 DNA 的比例则更大。子代 DNA 中从不出现重 DNA，说明了大肠杆菌中 DNA 复制是半保留复制。

他们的实验结果支持了 Watson 和 Crick 提出的 DNA 复制模式。由于 DNA 分子由两条多核苷酸链组成，两条链上的碱基有严格的配对规律，所以两条链是互补的。也就是说，DNA 分子中任一条链上的核苷酸排列顺序就已经决定了与其互补的另一条链的核苷酸排列顺序。所以他们提出了 DNA 的半保留复制机制：DNA 在复制过程中碱基间的氢键首先断裂，双螺旋解链分开，两条链分别作为模板合成新链，产生互补的两条新链。这样新形成的两个 DNA 分子与原来的 DNA 分子的核苷酸顺序完全一样，只是子代 DNA 分子中的一条链来自亲代 DNA，另一条链则是新合成的。

DNA 的半保留复制机理很好地说明了 DNA 作为遗传物质的结构与功能的完美统一。

## (二) 复制的起始与方向

DNA 复制是从链上某个特定的起始点开始的, 同时向两侧相反方向进行, 称为双向复制。简单生物像大肠杆菌只有一个起始点, 真核细胞 DNA 分子巨大, 有多个复制起始点, 哺乳动物细胞的 Alu 重复序列可能与复制起始点有关。绝大部分原核细胞和真核细胞以及病毒都是双向复制, 并且两个方向的复制速率对称相等。

复制开始时起始点处的 DNA 双螺旋先解开, 电镜下可看到眼泡状, 称为复制泡或复制眼; 松开的两股 DNA 单链和未松开的双螺旋形状像一把叉子, 称为复制叉; 复制起始点和两侧的复制叉共同构成一个单位, 称为复制子。大肠杆菌只形成一个复制子, 而真核细胞由于有多个复制起始点, 所以有多个复制子。

由于 DNA 双螺旋的两条链为反向平行, 所以当复制时两条母链松解开分别作为模板合成子链, 如果一条子链的方向是 5' -3', 则另一条子链的方向为 3' -5'。DNA 聚合酶的催化合成的方向只能是 5' -3', 故一条子链能够以 5' -3' 的方向连续合成, 称为前导链; 另一条子链只能以 5' -3' 的方向不连续合成许多小片段, 这条链被称为随从链, 这些小片段被称为冈崎片段, 小片段的随从链最后由 DNA 连接酶连接成完整的一条子链。

## (三) 参加复制的引物、酶类和蛋白质因子

### 1. RNA 引物

DNA 聚合酶只能从 3' 端延长已经存在的 DNA 或 RNA 链开始合成, 而不能从头合成一条 DNA 链, 因此, 复制起始必须有一条 RNA 引物。通常 RNA 引物的长度是 4~12 个核苷酸, 由引发酶催化合成。

### 2. DNA 聚合酶

大肠杆菌中分离到 3 种 DNA 聚合酶, 分别称为 DNA 聚合酶 I、II、III。其中 DNA 聚合酶 III 是催化复制的主要酶。

### 3. 引发酶和引发体

RNA 引物的合成是由引发酶催化的, 事实上引发酶先与其他多种蛋白质共同构成一个多蛋白复合体, 才能使复制起始, 这个复合体称为引发体。参与其中的蛋白质有 dnaA, dnaB, dnaC 和单链 DNA 结合蛋白等。

### 4. DNA 连接酶

该酶可连接双链 DNA 上的一些缺口，而不能将两条单链连接起来。其主要作用是连接冈崎片段。

#### 5. 拓扑异构酶 I 和 II

其主要作用是在 DNA 双螺旋解链时，解决缠绕的问题。该酶能够切断 DNA 双链中的一条，解除旋转张力后又把切口封闭，因此又称旋转酶。

#### 6. 端粒酶或端粒末端转移酶

真核细胞染色体 DNA 是线性的，它的 3' 端有特殊的序列，被称为端粒，该序列是线性 DNA 末端复制所必需的。端粒酶是一个蛋白质与 RNA 组成的核糖核蛋白，有逆转录酶的性质，能够利用自己的 RNA 成分作为模板，与端粒配合合成线性 DNA 的末端，以保证真核细胞染色体线性 DNA 的复制得以完成。

### （四）DNA 损伤与修复

DNA 损伤可分为自发性损伤和环境因素引起的损伤。自发性损伤主要指 DNA 聚合酶催化时的错误配对，虽然这种自发性错误的概率极低，但那些未能被修复的错误便被保留了下来。环境因素主要有物理、化学和生物三种。物理因素有紫外线和电离辐射等；化学因素如烷化剂、碱基或核苷类似物、亚硝酸盐和亚硝胺等；生物因素包括一些致癌病毒。

DNA 修复主要有光修复、切除修复、重组修复和 SOS 修复。光修复主要用于修复由紫外线引起的胸腺嘧啶二聚体；细菌中有一种需光能激活的修复酶系，称为光修复酶。激活的光修复酶能使两个嘧啶之间的共价键断裂，恢复原来的两个核苷酸。切除修复是利用一种特殊的核酸内切酶将损伤部位的一段 DNA 切除，留下一段空隙，由 DNA 聚合酶 I 填补，最后由 DNA 连接酶封口。重组修复是在 DNA 分子损伤面较大时启动，利用重组蛋白 RecA 的核酸酶活性将另一条正常母链与缺口部分进行交换，以填补缺口，此时正常母链因重组而出现的缺口可由 DNA 聚合酶 I 和 DNA 连接酶共同修复。SOS 修复属应急修复，发生于 DNA 损伤至难以继续复制的地步，DNA 单链缺口很多，由此诱发一系列极复杂的反应增强其修补能力。这些反应的特异性低，对 DNA 的碱基识别能力差。因此，SOS 修复可带入很多错误，引起广泛的突变。

### 四、基因表达和遗传密码

DNA 能够自主复制、永久存在的性质决定了其作为遗传信息载体的使命，其分子上以核苷酸序列为存在形式的遗传信息还要通过基因表达才能体现。基因表达是指遗传信息通过转录和翻译生成具有特定生物学功能的蛋白质的过程。转录是在 DNA 序列指

导下合成对应的 RNA 的过程；翻译指在 RNA 的指导下进一步合成对应的蛋白质的过程。转录过程是由碱基互补规律决定新合成 RNA 的序列的；翻译过程的准确性却是由遗传密码决定的。mRNA 上连续的三个核苷酸能够决定蛋白质多肽链上的一个氨基酸，这三个核苷酸被称为三联密码子，也就是遗传密码。

### （一）转录

转录的产物是 RNA，其中 mRNA 是合成蛋白质时的直接模板，tRNA 和 rRNA 虽然不是翻译的模板，但直接参与蛋白质的生物合成。tRNA 的功能是转运氨基酸，rRNA 的功能是作为蛋白质生物合成的场所。

转录是由 DNA 指导的 RNA 聚合酶催化的，合成底物是 ATP, GTP, CTP 和 UTP。在聚合反应时，一条 DNA 单链作为合成时的模板，根据碱基互补规律（G-C, A-T, C-G, U-A）进行聚合反应，一个核苷酸分子的 3' OH 与另一个核苷酸分子的三磷酸的  $\alpha$  磷酸基团发生亲核反应，形成磷酸二酯键，合成方向也是 5' -3'。DNA 模板只是双链 DNA 中的一条链，模板 DNA 链称为反意义链，也称为负链；与其相互补的 DNA 链为有意义链、密码链或正链。新合成的 RNA 序列与正链 DNA 相同，只是 U 替代了 T。转录过程以 RNA 聚合酶辨认、结合 DNA 模板开始，随着酶向前移动，转录产物 RNA 逐渐延长，直至 RNA 聚合酶到达终止信号处，RNA 聚合酶与 DNA 模板分离，产物 RNA 链脱落，转录终止。

在原核生物中，mRNA 分子基本上不经过加工，在合成后就能作为模板参与蛋白质的生物合成，而 tRNA 和 rRNA 则要在合成的前体分子基础上经过加工才能成为具有生物功能的成熟分子。tRNA 的加工方式主要是通过核酸酶切除某些序列和某些碱基的化学修饰。rRNA 的前体分子被核酸酶切成 3 种 rRNA 分子。真核生物 RNA 的加工过程比原核生物复杂得多，首先因为转录发生在细胞核内而翻译是在细胞浆内进行的，转录和翻译在时间和空间上是分开的，然后真核基因有内含子，其转录生成的 mRNA 必须经过剪切加工才能成为成熟的 mRNA。rRNA 的加工在细胞核仁中进行，终产物是核糖体 40S 和 60S 亚基；tRNA 的加工包括去除 5' 端先导序列，剪接去除内含子，3' 端的 UU 被 CCA 替代，碱基修饰等。mRNA 的加工主要指 5' 端加帽，3' 端加多聚腺苷酸尾和剪接去除内含子。

在 RNA 病毒中发现一种与常规转录相反的转录方式，即由 RNA 指导下合成 DNA，被称为逆转录，并发现了催化该过程的酶是 RNA 指导的 DNA 聚合酶，也称逆转录酶。

### （二）翻译



翻译就是指蛋白质的生物合成，是将存在于 DNA 上以核苷酸序列形式存在的遗传信息通过遗传密码转变为蛋白质上氨基酸序列的过程。在原核生物中转录和翻译可同时进行，但在真核生物中转录在细胞核内进行，翻译在细胞浆内进行。翻译过程可分为起始、延长和终止三个阶段。参与蛋白质生物合成的物质主要有 mRNA、tRNA 和 rRNA 三种 RNA，核糖体，20 种氨基酸，蛋白质因子，酶，游离核苷酸和无机离子等。

### 1. mRNA 是翻译的直接模板

mRNA 分子中的遗传信息是从 DNA 分子中转录而来的，mRNA 分子中的核苷酸序列通过翻译转变成蛋白质分子中的氨基酸序列，这种信息的转变是通过遗传密码来实现的。mRNA 分子上每三个核苷酸决定蛋白质多肽链上的一个氨基酸，这三个核苷酸称为遗传密码，即三联密码子。翻译时从起始密码子 AUG 开始，沿着 mRNA 5' -3' 的方向连续阅读密码，直至读到终止密码子为止，生成一条具有特定序列的蛋白质。在密码阅读时既无重叠也无间隔，遵循遗传密码的非重叠性和无间隔特性，因而 DNA 分子上的核苷酸插入和缺失可导致遗传密码的框移突变，产生结构和功能异常的肽链。遗传密码的另一个性质是简并性，许多氨基酸有多个密码子，而且这些密码子之间的第一个，第二个核苷酸往往是一样的，不同主要在于第三个核苷酸，可以理解 DNA 分子上碱基置换可能产生两种结果：如果突变是在密码子的第一个核苷酸上，必定导致密码子的改变，因此产生带有不同氨基酸的多肽链；如果突变是在密码子的第三个核苷酸上，就有很大的可能成为一种隐性突变，即改变密码子而不改变氨基酸种类。

### 2. 核糖体是肽链合成的场所

核糖体由大、小亚基构成，亚基中含有几十种不相同的蛋白质和几种 rRNA，按一定的空间位置镶嵌成为显微镜下可见的细胞内大颗粒。核糖体就像一个能沿着 mRNA 模板移动的工厂，执行着蛋白质生物合成的功能。核糖体中蛋白质种类繁多，每种蛋白质都各有功能，为蛋白质合成提供了一切必要的条件。

### 3. tRNA 和氨基酰 tRNA

tRNA 在蛋白质合成中处于关键地位，它不但为每个密码子翻译成氨基酸提供给合体，还为准确无误地将所需氨基酸运送到核糖体上提供了运送载体。tRNA 分子中有两个重要部分，即反密码环和 3' CCA-OH 末端。反密码环有可以与 mRNA 上密码子相配对的反密码子，而 3' CCA-OH 末端能够与特定的氨基酸结合。氨基酰 tRNA 是氨基酸的活化形式，由氨基酰-tRNA 合成酶催化生成，该酶有绝对的专一性，只允许特定的氨基酸与特定的 tRNA 结合，从而保证了翻译的正确性。

#### 4. 核糖体循环

蛋白质生物合成可以分为三个步骤：①起始：核糖体亚基和起始 tRNA 在起始因子和其他因子参与下与 mRNA 上编码区 5' 端起始密码子结合，生成起始复合物。②延伸：核糖体与 mRNA 相对移动，在延伸因子参与下由 tRNA 携带氨基酸进入核糖体，合成由 mRNA 序列编码的多肽链。③终止：延伸至 mRNA 上出现终止密码，释放因子进入核糖体，使新生肽链及核糖体从 mRNA 上释放出来，从而完成一条多肽链的合成。释放出来的核糖体又可以与起始 tRNA、起始因子、mRNA 结合，再进行另一个蛋白质的合成，因此称核糖体循环。肽链合成时的方向是从氨基端到羧基端，mRNA 模板上的翻译方向是 5' → 3'。在翻译过程中，每一条 mRNA 链上可以同时有数个核糖体结合进行肽链合成，这种现象被称为多核糖体。

#### 5. 蛋白质合成后加工

新合成的肽链必须经过翻译后加工，才能成为有生物活性的成熟蛋白质。有限水解是最常见的加工形式：新生肽链的先导 N 端的蛋氨酸残基，在肽链离开核糖体后，即由特异的蛋白水解酶切除；分泌性蛋白和跨膜蛋白的翻译初始产物的 N 端都具有 13~36 个氨基酸残基，被称为信号肽，跨膜转运后被切除；有些蛋白质前体中的某些肽段被切除后，才能折叠形成空间结构；多蛋白在翻译后经水解作用产生数个不同的蛋白质。共价化学修饰是另一种常见的加工形式。氨基酸残基中某些侧链可被乙酰化、糖基化、羟化、甲基化、核苷酸化、磷酸化等。

#### 五、基因表达的调控

DNA 储存着细胞和生物体的所有信息，但在不同组织、不同的发育阶段，这些细胞是有着很大差异的，这些差异源于某些基因的表达与否及表达量上的差异。基因表达的调控可在转录水平和翻译水平上进行，通常以转录水平的调控为主，转录水平的调控还包括 mRNA 加工成熟。不同生物使用不同的信号来指挥基因调控，原核生物对营养状况和环境因素反应敏感，真核生物则受激素水平和发育阶段的影响。

##### （一）原核生物的操纵子调控模式

对原核生物的研究，提出了操纵子模式。原核生物几个功能相关的结构基因往往会排列在一起，转录出一段 mRNA，然后分别翻译出几种蛋白质。这些蛋白质可能是催化某代谢途径的酶系统，或执行其他相关功能。这样一套结构基因，连同其上游的调控成分，称为一个操纵子。操纵子除含有一组结构基因外，还有启动子和操纵基因。启动子是结合 RNA 聚合酶的 DNA 序列；操纵基因是结合阻遏物的部位，位于启动子与结构

基因之间。操纵基因是 RNA 聚合酶能否通过的开关，如果有阻遏物结合在操纵基因上，RNA 聚合酶则不能通过，转录停止；如果无阻遏物结合在操纵基因上，RNA 聚合酶则可以通过并转录结构基因。这种方式称为负调控。乳糖操纵子和色氨酸操纵子分别是可诱导的负调控和可阻遏的负调控的典型代表。

## （二）真核生物的基因转录调控

真核生物结构基因上也有调控区。DNA 核苷酸序列分析表明，这些区域存在特有的相似或一致性的序列，它们能与特定的蛋白质因子结合而产生调控作用。这些相似性序列被称为顺式作用元件，蛋白质因子被称为反式作用因子。顺式作用元件有启动子、增强子和衰减子等；蛋白质因子大都是转录因子，结构上有能够与 DNA 结合的区域，如螺旋—转角—螺旋结构、锌指结构和亮氨酸拉链结构等。

## 六、重组 DNA

DNA 又称基因工程（Genetic Engineering）。这项技术是在体外按照一定的目的和方案对 DNA 分子进行人工操作，将同一起来源或异源的基因进行重组，然后把它们引入适当受体细胞中，随着该细胞的繁殖，DNA 重组体得到扩增，并同时得到表达。这样就可以获得大量重组 DNA 的产物。重组 DNA 技术又称为分子克隆（Molecular Cloning）。克隆一词原意为一个个体经无性繁殖得到后代的总和。而分子克隆是将单一基因引入适当的受体细胞中，使其进行复制，从而得到重组 DNA 的大量拷贝。

### （一）重组 DNA 常用的工具酶

将 DNA 在体外切割成小片段，然后再进行重组，这需要一系列酶的参加。这些酶称为工具酶。常用的工具酶有以下几种。

1. 限制性内切酶（Restriction Endonuclease）能识别和切割双链 DNA 分子内特异核苷酸序列的酶称为限制性核酸内切酶。限制性核酸内切酶都是从原核生物中发现的，其天然生物学功能是构成细菌抵抗外源入侵 DNA 的防御机制。限制性核酸内切酶常分为三种类型：I 型限制性核酸内切酶对 DNA 链的识别位点与切割位点不同，不能产生特异性 DNA 片段；II 型限制性核酸内切酶能识别与切割 DNA 链上同一个特异性核苷酸序列，产生特异性的 DNA 片段；III 型限制性核酸内切酶虽有特异性切割位点，但其有多个亚基并分别由不同的基因编码。故 I 和 III 型内切酶作为工具酶的意义不大，通常所说的限制性核酸内切酶即是 II 型酶。已经从 250 多种微生物中分离到约 400 种限制性核酸内切酶，它们识别的 DNA 序列一般含 4~6 个核苷酸，切割时有的产生平头末端，有的产生粘性末端。限制性核酸内切酶是基因操作中最重要的工具酶。

2. DNA 连接酶 能将两个 DNA 片段拼接起来的酶叫做 DNA 连接酶。DNA 连接酶不但在 DNA 复制（如冈崎片段的连接）和 DNA 修复中起作用，在 DNA 的体外重组中也用于连接两个 DNA 的片段。

3. 逆转录酶 逆转录酶在 RNA 病毒的复制中起作用。在分子克隆技术中利用这种酶的活性将 mRNA 经逆转录合成互补 DNA（cDNA），cDNA 比 mRNA 稳定，易于操作。

4. 其他酶类 在分子克隆技术中依据实验设计的需要，可选择各种其他催化作用不同的酶类。如末端转移酶、DNA 聚合酶等。

## （二）重组 DNA 中常用的载体

克隆载体（Cloning Vector）是另一种 DNA 分子，它能携带外源基因（目的基因）进入受体细胞，并在受体细胞内复制和表达。克隆载体具有某些遗传特性，如抗药性、噬菌斑等。最常用的载体为以下几种：

1. 质粒（Plasmid） 是细菌染色体外能自主复制的小分子 DNA，多为环形双链。质粒带有某些遗传性状，如对某些抗生素的抗性。可根据质粒的特性筛选携带有目的基因的受体菌。由于质粒有自我复制的能力，质粒在细胞分裂时可被保持恒定的传给子代细胞，能使携带的目的基因遗传下去。最初常用的质粒为 pBR322。

2. 噬菌体（Phage） 由于噬菌体可以感染细菌，并在细菌内复制，故它们也可以作为克隆的载体。常用的噬菌体如  $\lambda$  DNA。

3. 病毒 病毒能感染真核生物，并在宿主细胞中进行复制。经过适当改造后可以作为载体。常用的 SV40 是一种猴病毒。

4. 酵母人工染色体（YAC） 这是由酵母基因和质粒 pBR322 人工拼接的载体。这种载体能携带大片段 DNA（102~103kb），能在大肠杆菌中复制，同时带有酵母基因组的基本功能单位。在人类基因组研究中是很有用的工具。

## （三）基因工程的基本过程

基因工程大体可分为以下几个步骤：目的基因的制备，载体 DNA 的选择及制备，目的基因与载体 DNA 在体外重组，重组 DNA 分子导入受体细胞，筛选鉴定含有重组分子的受体细胞，扩增重组分子和目的基因的表达与鉴定。

1. 目的基因 获得目的基因的常用方法包括：①从染色体 DNA 经限制酶切成所需的 DNA 片段；②逆转录反应，以 mRNA 为模板，在逆转录酶的作用下，从 mRNA 合成互补 DNA 即 cDNA；③较短的核苷酸序列可利用 DNA 自动合成仪按已知多肽链中

氨基酸编码的核苷酸序列，人工合成目的基因；④利用 PCR 技术，体外扩增所需的目的基因。

2. 载体 DNA 的选择及制备 根据目的基因的性质选择不同的载体，并将载体纯化及用限制性内切酶处理。

3. 目的基因与载体 DNA 在体外重组 利用 DNA 连接酶将目的基因及载体 DNA 在体外连接成重组 DNA。

4. 重组 DNA 引入受体细胞 通过物理与化学的方法可将重组 DNA 引入受体细胞，并在受体细胞内进行表达。重组质粒 DNA 分子引入受体细胞的过程称为转化，重组噬菌体与病毒引入受体细胞的过程称为转染。

5. 筛选及鉴定 利用载体 DNA 的遗传标记与目的基因的某些特性筛选含有重组子的受体细胞及鉴定重组子。

6. 扩增重组子及目的基因表达 重组 DNA 分子在受体细胞中能自主复制，使目的基因得到扩增，并经转录与翻译，表达和分泌有生物活性的蛋白质，此蛋白质即为所需要的基因工程产物。

## 下篇 生物化学与分子生物学实验技术

---

### 实验一 血清 $\gamma$ -球蛋白的提取与纯化

#### 【基本原理】

在蛋白质溶液中加入中性盐至一定浓度时,蛋白质会沉淀析出,这种作用称为盐析,其机制与下列因素有关:蛋白质分子表面水化层被破坏;蛋白质分子所带电荷被中和。盐析沉淀的蛋白质,其性质不变,经透析或稀释后仍可溶解。盐析是可逆过程。

在血清蛋白中,清蛋白占绝大部分,其余为球蛋白,在血清中加入硫酸铵至 33%饱和时,  $\gamma$ -球蛋白被沉淀,依此可将  $\gamma$ -球蛋白分离出来,然后再用凝胶过滤法除盐即可得到比较纯的  $\gamma$ -球蛋白。

#### 【器材】

1. 层析柱
2. 乳胶管
3. 螺旋夹
4. 橡皮塞

#### 【试剂】

1. 血清样品
2. pH7.2 饱和硫酸铵:用氨水将饱和硫酸铵溶液调至 pH7.2。
3. 磷酸盐缓冲液—生理盐水(PBS):用 0.01mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.2) 配制的 0.9%NaCl 溶液。
4. 纳氏试剂
5. 双缩脲试剂:CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.39g, 酒石酸钾钠 1.2g 分别溶于 50ml 水中,2.5N NaOH 60ml, KI 0.2g 与上述溶液混匀,加水至 200ml。

#### 【操作步骤】

##### 1. 血清蛋白的盐析

(1) 将血清 1.0ml 加入离心管中,加 PBS 液 1.0ml,混匀,再逐滴加入 pH7.2 饱和硫酸铵 1.0ml 边加边摇匀,静置 30min 后 3000rpm 离心 10min,倾去上清(此液主要含清蛋白)。

(2)将离心管中的沉淀用 1.0ml PBS 液搅拌溶解,再逐滴加入饱和硫酸铵溶液 0.5ml



混匀，静置 30min，3000rpm 离心 10min，倾去上清（主要含  $\alpha$ ,  $\beta$  球蛋白），其沉淀即为初步纯化的  $\gamma$ -球蛋白。若要得到更纯净的  $\gamma$ -球蛋白，可以重复此过程 1 - 2 次。

## 2. 脱盐

（1）凝胶制品的预处理：取 Sephadex G50 1g，放入 100ml 烧杯中，加蒸馏水 50ml，于沸水浴中煮沸 1 h，冷却后倾去上清液，再加入 PBS 10ml 备用。

（2）装柱：关闭出口，将 Sephadex G50 悬液混匀自层析柱顶部加入，待凝胶在柱中沉淀 1-2cm 高时，打开出口，同时不断加入凝胶，直至距顶部 2cm 左右。继续用 PBS 流洗整个柱床，控制其流速为 1ml/min。操作过程中严防出现气泡或分层。如床面不平，可用玻璃棒轻轻搅动表层，使凝胶重新自然沉降（整个过程中，切勿使液面低于床面，以免气体进入，使柱床干裂）。

（3）加样：将床面以上的液体放出，待液面恰好与凝胶面重合时，关闭下口。用滴管吸取  $\gamma$ -球蛋白液，缓慢沿内壁加入（尽量不扰动凝胶面）。打开出口，使样品进入柱内，再陆续小心加入 PBS 液。

（4）收集：准备 12 只小试管收集流出液，从加样后开始，每管收集 1ml。将收集液经 280nm 波长测定后，以洗脱体积为横坐标，光密度为纵坐标，作出洗脱图谱。

（5）检测：准备二块反应板，向各孔内加入收集液各 1 滴，其中一块板各孔内分别加入纳氏液一滴，有  $\text{NH}_4^+$  者呈黄色至橙色。再向另一反应板各孔内加入双缩脲试剂各一滴，观察双缩脲反应并记录呈色深浅，用（-或+）表示。



## 实验二 蛋白质比色定量法

### 【基本原理】

游离状态的考马斯亮蓝 G250 在酸性溶液中呈红褐色，与蛋白质结合后呈蓝色，蛋白质含量与颜色的深浅成正比，经 595nm 测定，可作出蛋白质含量与吸光度值的标准曲线，并求出未知样品的蛋白质浓度。

### 【器材】

1. 可见光分光光度计
2. 试管

### 【试剂】

1. 0.9% NaCl
2. 蛋白质标准溶液 (500  $\mu$ g/ml): 小牛血清白蛋白 50mg 加生理盐水至 100ml
3. 考马斯亮蓝 G250 溶液: 考马斯亮蓝 G250 100mg 加 95%乙醇 50ml, 加 85%(W/V)  $H_3PO_4$  100ml 加蒸馏水至 1000ml, 置棕色瓶过夜, 用双层滤纸过滤。

### 【操作步骤】

#### (一) 标准蛋白质曲线的绘制

1. 取小试管 7 支, 按下表操作

	1	2	3	4	5	6	7
标准蛋白液(ml)	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
生理盐水(ml)	1.00	0.95	0.90	0.85	0.80	0.75	0.70
考马斯亮蓝(ml)	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00

2. 混匀后静置 5min, 以 1 号为空白, 595nm 比色。
3. 结果处理: 以各管光密度为纵坐标。各管所含蛋白质量为横坐标, 制成标准曲线。

#### (二) 蛋白质含量测定

1. 按下表操作

	测定管	空白管
待测液(ml)	0.10	—
生理盐水(ml)	0.90	1.00
考马斯亮蓝(ml)	5.00	5.00

2. 混匀静置 5min 后, 以空白管调零, 595nm 室温比色, 根据标准曲线确定样品中蛋白质含量。

### 实验三 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)

#### 【基本原理】

一个混合蛋白质样品经过聚丙烯酰胺凝胶电泳以后, 各组分由于电泳迁移率不同而被分离。这种差异就蛋白质分子本身而言主要与分子量以及所带净电荷和形状有关。当电泳体系中含有一定浓度的 SDS 时, 电泳迁移率的大小仅取决于蛋白质的分子量(其它影响因素可忽略不计), 从而可直接由电泳迁移率推算出蛋白质的分子量。

SDS(十二烷基硫酸钠)是一种阴离子去污剂, 能够与蛋白质结合, 破坏蛋白质分子内部、分子之间以及与其它物质分子之间的非共价键, 使蛋白质变性而改变原有的空间构象。当有强还原剂(如巯基乙醇)存在使蛋白质分子内的二硫键被彻底还原, 并且 SDS 的总量为蛋白质量的 3~10 倍、SDS 单位浓度大于 1mol/L 时。这两者的结合是定量的, 大约每克蛋白质可结合 1.4 克 SDS。蛋白质分子一经结合了一定量的 SDS 阴离子, 所带负电荷的量远远超过了它原有电荷量。从而消除了不同种类蛋白质间电荷的差异, 且由于分子量越大的蛋白质结合的 SDS 越多、带负电荷也越多, 这就使各蛋白质-SDS 复合物的电荷密度趋于一致; 同时, 不同蛋白质的 SDS 复合物形状也相似, 均是长椭圆状。因此, 在电泳过程中, 迁移率就取决于蛋白质-SDS 复合物的尺寸, 也可以说是取决于蛋白质分子量的大小。

据经验得知, 当蛋白质的分子量在 17 000-165 000 之间时。蛋白质-SDS 复合物的电泳迁移率与蛋白质分子量的对数呈线性关系:

$$\lg MW = \lg K - bm$$

式中 MW 为蛋白质的分子量, m 为相对迁移率, K 为常数, b 为斜率。将已知分子量的标准蛋白质在 SDS -聚丙烯酰胺凝胶中的电泳迁移率对分子量的对数作图, 即可得到一条标准曲线。只要测得未知分子量的蛋白质在相同条件下的电泳迁移率, 就能根据标准曲线求得其分子量。

#### 【器材】

1. 电泳仪
2. 垂直板电泳槽
3. 微量进样器
4. 乳头吸管
5. 50ml 小烧杯

#### 【试剂】

## 1. 贮备液的配制

(1) 30%丙烯酰胺溶液: 丙烯酰胺 29.2g, 甲叉双丙烯酰胺 0.8g, 加水至 100ml, 棕色瓶 4℃保存。

(2) 1.5mmol/L Tris-Cl 分离胶缓冲液, pH8.8 (4×): 称取 18.15g Tris, 用 1NHCl 调 pH 至 8.8, 加水至 100ml, 4℃保存。

(3) 1.0mmol/L Tris-Cl 浓缩胶缓冲液, pH6.8 (4×): 称取 5.98g Tris, 用 1NHCl 调 pH 至 6.8, 加水至 100ml, 4℃保存。

(4) 电极缓冲液 (pH8.3): 取 14.40g 甘氨酸, 3.00g Tris, 加 10ml 10%SDS, 加水至 1L, 4℃保存。

(5) 10% SDS: 取 10g SDS, 加水至 100ml, 完全溶解后室温保存。

(6) 10%过硫酸铵溶液 (AP): 临用前现配, 或配好后-20℃分装冻存。

(7) 染色液 (0.25%考马斯亮蓝 R-250、50%甲醇、7%乙酸): 考马斯亮蓝 R-250 2.5g, 甲醇 500ml、70ml 冰乙酸, 加水至总体积 1000ml (甲醇可用无水乙醇代替)。

(8) 脱色液 (30%甲醇、7%乙酸): 甲醇 300ml, 冰乙酸 70ml, 加水至 1000ml (也可用无水乙醇代替甲醇)。

(9) 样品缓冲液 (2×): H<sub>2</sub>O 2.4ml, 浓缩胶缓冲液 1.0ml、甘油 0.8ml、10% SDS 3.2ml, 2-巯基乙醇 0.4ml。0.025% (W/V) 溴酚兰 0.2ml。

## (10) TEMED

## 2. 工作液的配制

### (1) 分离胶的配制

	7.5%(ml)	10%(ml)	15%(ml)
H <sub>2</sub> O	4.90	4.10	2.40
30%丙烯酰胺	2.50	3.30	5.00
分离胶缓冲液(pH8.8)	2.50	2.50	2.50
TEMED	0.02	0.02	0.02
10% SDS	0.10	0.10	0.10
10%过硫酸铵	0.02	0.02	0.02
总体积	10ml	10ml	10ml

## (2) 浓缩胶的配制

	3%(ml)	4%(ml)	6%(ml)
H <sub>2</sub> O	3.20	3.05	2.70
30% 丙烯酰胺	0.50	0.65	1.00
浓缩胶缓冲液(pH6.8)	1.25	1.25	1.25
TEMED	0.05	0.05	0.05
10% SDS	0.05	0.05	0.05
10% 过硫酸铵	0.05	0.05	0.05
总体积	5ml	5ml	5ml

### 【操作步骤】

#### 1. 按图安装玻璃板

2. 按表制备分离胶（10%），将分离胶混匀后立即灌注于玻板间隙中，上层小心覆盖一层乙醇，将胶板垂直放于室温下，待分离胶聚合完全后，倾去上铺乙醇，用滤纸吸干。

3. 制备浓缩胶（4%）：将浓缩胶混合后直接灌注在已聚合的分离胶上，立即插入梳子，将凝胶垂直放于室温下聚合。

4. 样品处理：在浓缩胶聚合时，取样品与等体积样品缓冲液混合，100℃加热 1-2min。

5. 待浓缩胶聚合完全后，小心移出梳子，然后将胶板固定于电泳装置上，上下槽各加入电泳缓冲液。

6. 加样：用微量进样器加样，每个样品加入 20 μl。

7. 电泳：在 100-150V 恒压下电泳，直至溴酚蓝达到胶底部，关闭电源。

8. 染色：从电泳装置上卸下玻板，小心撬开玻板取出凝胶，放入染色液中染色 2h 以上。

9. 脱色：移出凝胶放入脱色液中脱色至本底无色为止。

## 实验四 蛋白质印迹免疫分析 (Western Blot Anglysis)

### 【基本原理】

蛋白质印迹免疫分析的过程包括蛋白质经凝胶电泳分离后，在电场作用下将凝胶上的蛋白质条带转移到硝酸纤维素膜上，经封闭后再用抗待检蛋白质的抗体作为探针与之结合，经洗涤后，再将滤膜与二级试剂—放射性标记的或辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶偶联抗免疫球蛋白抗体结合，进一步洗涤后，通过放射自显影或原位酶反应来确定抗原—抗体—抗抗体复合物在滤膜上的位置和丰度。

### 【器材】

1. 转移电泳仪
2. 硝酸纤维素膜
3. 滤纸
4. 剪刀
5. 手套
6. 小尺

### 【试剂】

1. Ig G 标准品
2. 羊抗人辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 Ig G 抗体
3. 转移 buffer: Tris 3.03g, Gly 14.4g, 甲醇 200ml, 加三蒸水至 1000ml 充分溶解, 4℃冰箱贮存。
4. Tris buffer (TBS): Tris 2.42g, NaCl 29.2g, 溶于 600ml 三蒸水, 再用 1N HCl 调至 pH7.5, 然后补加三蒸水至 1000ml。
5. 漂洗液 (TTBS): TBS 液 500ml, 加 Tween20 250ul。
6. 封闭液: 5%脱脂奶粉。
7. 抗体 buffer: 1.5g BSA 溶于 50ml TTBS。
8. 显色液 DAB (3,3-diaminobenzidine, 3,3-二氨基联苯胺) 配制: 5mg DAB 溶于 10ml 柠檬酸 buffer(0.01mol/L 柠檬酸 2.6ml, 0.02 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 17.39ml), 加 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 μl (临用时现配)。
9. 脱色液: 甲醇 250ml, 冰醋酸 100ml, 加蒸馏水至 1000ml。
10. 氨基黑染色液 (0.1%氨基黑-10B): 0.2g 氨基黑-10B 溶于 200ml 脱色液中, 充分搅拌溶解, 滤纸过滤。

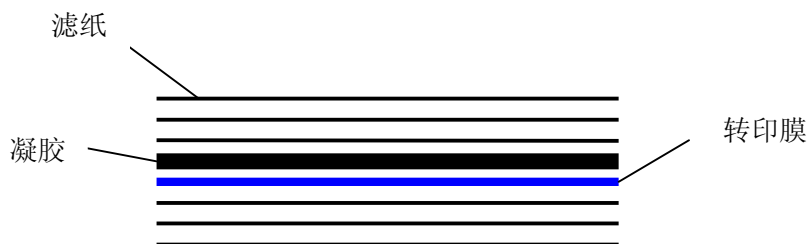
## 【操作步骤】

### （一）转移印迹

1. 转移前准备：将滤纸，硝酸纤维素膜（NC）剪成与胶同样大小，NC 膜浸入蒸馏水中 10-20min 后浸入转移 buffer 中平衡 30min 。
2. 凝胶平衡：将电泳后的 SDS-PAGE 胶板置于转移 buffer 中平衡 30-60min。
3. 按图操作：逐层铺平，各层之间勿留有气泡和皱折。
4. 开始转移，连接正负极，盖好盖子，接上电源，恒流 0.8mA/cm，室温下转移 1h，转移后的凝胶再用氨基黑 10B 染色液染色 20min ，然后脱色检测转移效果。

### （二）免疫染色

1. 转移后的 NC 膜于 5%脱脂奶粉中封闭，4℃过夜。
2. TBS 洗膜 1-2 次，10min/次。
3. 加 HRP 标记的抗体，室温 1h 。
4. TBS 洗 3 次，10min/次。
5. NC 膜再转入 DAB 显色液中，置暗处反应，待显色反应达到最佳程度时，立即用三蒸水洗涤终止反应。



转移单位示意图

## 实验五 组织中基因组 DNA 的制备

### 【基本原理】

真核生物的 DNA 主要存在于细胞核内，以双链线性高分子形式存在。DNA 提取的主要过程是：破碎组织和细胞，去除与核酸结合的蛋白质及其它多糖、脂类等生物大分子，本实验通过蛋白酶 K 和 SDS 使蛋白质变性，再用酚/氯仿除去蛋白质，用乙醇使 DNA 沉淀，经  $A_{260}/A_{280}$  检测 DNA 含量，再经琼脂糖电泳鉴定。

### 【器材】

1. 玻璃匀浆器
2. 台式离心机

### 【试剂】

- |                          |               |                 |
|--------------------------|---------------|-----------------|
| 1. DNA 提取缓冲液:            | 10mmol/L      | Tris-Cl (pH8.0) |
|                          | 0.1mol/L      | EDTA (pH 8.0)   |
|                          | 20 $\mu$ g/ml | 胰 RNA 酶         |
|                          | 0.5%          | SDS             |
| 2. 蛋白酶 K                 | 20mg/ml       |                 |
| 3. 饱和酚                   |               |                 |
| 4. NaAC (pH5.2) 3 mol/L  |               |                 |
| 5. 1 $\times$ TE (pH8.0) |               |                 |
| 6. 100%乙醇                |               |                 |
| 7. 70%乙醇                 |               |                 |

### 【操作步骤】

1. 取新鲜肝组织 0.2g，加 1.2ml DNA 提取缓冲液制成匀浆，勿使细胞核破碎。
2. 加 6  $\mu$ l RNase (20mg/ml)，倒入 Ep 管中，37℃水浴保温 30min，然入加 6  $\mu$ l 蛋白酶 K (终浓度 50  $\mu$ g/ml)，50℃保温 2h。
3. 取 0.5ml 保温液，加 0.5ml 饱和酚，充分振荡混匀，于 10 000rpm 离心 10 min，将上层水相转入 Ep 管中，加等体积氯仿/异戊醇 (24:1)，充分混匀后，10 000rpm 离心 10min。
4. 上层水相转移至 Ep 管中，加 50  $\mu$ l 3mol/L NaAc，加 2-2.5 倍体积的无水乙醇，离心同上。
5. 小心弃出上清，沉淀加 70%乙醇离心洗涤一次，保留沉淀，使之自然干燥，加适量的水或 TE 溶解。
6. 进行核酸定量测定和电泳鉴定。



## 实验六 人外周血白细胞 DNA 的制备

### 【基本原理】

从全血中制备白细胞 DNA，可用水直接破裂血中红细胞和白细胞的细胞膜及核膜，释出血红蛋白、细胞核；再用 KI 裂解细胞核并溶解 DNA；最后用酚/氯仿除去蛋白质，加无水乙醇使 DNA 沉淀，经  $A_{260}/A_{280}$  检测 DNA 含量，再经琼脂糖电泳鉴定。

### 【器材】

1. 离心机
2. 紫外分光光度计

### 【试剂】

1. 5mmol/L KI: 8.3g KI 加  $H_2O$  到 10ml
2. 0.9% NaCl
3. 氯仿/异戊醇 (24: 1)

### 【操作步骤】

1. 取 200  $\mu$ l 抗凝血，加入 1ml 水。
2. 8000rpm 离心 5min，弃上清。
3. 沉淀中加入 40  $\mu$ l 5mol/L KI，旋涡振荡 30Sec。
4. 加入 200  $\mu$ l 0.9% NaCl，然后再加入 300  $\mu$ l 氯仿/异戊醇，振荡 30Sec。
5. 10 000rpm 离心 5min。
6. 小心吸取上清液，加入冷无水乙醇 1ml。
7. 10 000rpm 离心 5min，弃无水乙醇。
8. DNA 样品自然干燥。
9. 加适量的  $H_2O$  或 TE 溶解 DNA，
10. 核酸定量测定和电泳鉴定。

## 实验七 DNA 与 RNA 含量测定

### 【基本原理】

核酸分子中含有碱基使核酸在 260nm 下有最大吸收。紫外吸收是嘌呤环和嘧啶环的共轭双键系统所具有的性质，含有嘌呤和嘧啶的物质，不论是核苷、核苷酸或核酸都有吸收紫外光的特性。

蛋白质由于含芳香族氨基酸，因此也能吸收紫外光，通常蛋白质在 280nm 波长有特异吸收。因此核酸在 A<sub>260</sub> 及 A<sub>260</sub>、A<sub>280</sub> 测定的比值（A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>）可以反映样品中核酸的含量及纯度。RNA 在 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 的比值在 2.0 以上；DNA 在 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 的比值为 1.8 左右。当样品中蛋白质含量较高时比值即下降。

DNA 浓度计算公式：

$$DNA \text{ 浓度} (mg/ml) = \frac{A_{260} \times 50 \times \text{稀释倍数}}{1000}$$

根据浓度计算 DNA 总量：

$$DNA \text{ 总量} (\mu g) = DNA \text{ 浓度} (\mu g/\mu l) \times \text{体积} (\mu l)$$

### 【器材】

1. 紫外分光光度计
2. 紫外灯或凝胶成像仪

### 【试剂】

1. 双蒸水
2. DNA 样品或 RNA 样品

### 【操作步骤】

1. 将样品加适量水或 TE 稀释。
2. 用 1ml 水（或 TE）做空白调零。
3. 把样品杯放入分光光度计比色槽中。
4. 测 A<sub>260</sub> 吸光值，计算出样品 DNA 或 RNA 含量。
5. 如检测样品纯度，还要再测 A<sub>280</sub> 值，并计算二者比例，若比例为 1.6 左右，说明有蛋白质或其他吸收此波长的杂质在其中，建议再用酚/氯仿抽提，继以乙醇沉淀以除去杂质。

## 实验八 琼脂糖凝胶电泳

### 【基本原理】

琼脂糖凝胶电泳是分离、纯化、鉴定 DNA 片段的常用方法，具有简便、快速的优点。DNA 琼脂糖凝胶电泳的原理与蛋白质的电泳原理基本相同，DNA 分子在高于其等电点的溶液中带负电荷，在电场中向正极移动。DNA 分子在电场中通过介质而泳动，除电荷效应外，凝胶介质还有分子筛效应，与分子大小及构象有关。对于线性 DNA 分子，其电场中的迁移率与其分子量的对数值成反比。在凝胶中加入少量溴化乙锭，其分子可插入 DNA 的碱基之间，因此可在紫外灯下直接观察到 DNA 片段在凝胶上的位置，并可在紫外灯下或经凝胶成像系统观察或拍照。

线状 DNA 片段分离的有效范围与琼脂糖凝胶浓度关系

琼脂糖凝胶的百分浓度 (%)	线状 DNA 分子的有效范围 (Kb )
0.3	60~5
0.6	20~1
0.7	10~0.8
0.9	7~0.5
1.2	6~0.4
1.5	4~0.2
2.0	3~0.1

### 【器材】

1. 水平电泳槽
2. 电泳仪
3. 紫外灯或凝胶成像仪

### 【试剂】

1. 1%琼脂糖
2. 电泳缓冲液 ( $1\times$ TAE)
3. 10mg/ml EB
4. 电泳样品上样缓冲液：0.25% 溴酚蓝，0.25% 二甲苯腈 FF，40% (W/V) 蔗糖水溶液 4℃ 保存。

### 【操作步骤】

1. 称 0.2g 琼脂糖，加 20ml 电泳缓冲液 ( $1\times$ TAE) 加热熔化。
2. 胶液冷至 60℃ 时，加 EB 20  $\mu$ l，小心混匀，缓慢倒入制胶模具中，在胶一端插上梳子。

3. 待胶凝固后，拨出梳子，将模具置于电泳槽中，加入  $1\times$ TAE，让液面高于胶面 1mm。
4. 在 DNA 样品中加入 1:5 的上样缓冲液，上样。
5. 接通电源，1-5V/cm 电压，开始电泳。
6. 据指示剂迁移位置，判断是否终止电泳。切断电源后，取出凝胶，紫外灯下或经凝胶成像系统观察或拍照。

## 实验九 质粒 DNA 的制备

质粒 (plasmid) 是一种染色体外、具有双链闭环结构的 DNA 分子。质粒具有自主复制能力, 能使子代细胞保持它们恒定的拷贝数, 可表达它携带的遗传信息。目前, 质粒已广泛地用作基因工程中目的基因的运载工具—载体。从大肠杆菌中提取质粒 DNA 也是一种分子生物学最基本的方法。质粒 DNA 的提取是依据质粒 DNA 分子较染色体 DNA 为小, 且具有超螺旋共价闭合环状的特点, 从而将质粒 DNA 与大肠杆菌染色体 DNA 分离。质粒 DNA 提取方法有以下几种: 碱变性法、溴乙锭-氯化铯密度梯度法、DNA 质粒释放法、羟基磷灰石柱层法及酸酚法。

### 一、碱变性法提取质粒 DNA

#### 【基本原理】

普遍采用的碱变性法具有操作简便、快速、得率高的优点。其主要原理是, 利用染色体 DNA 与质粒 DNA 的变性与复性的差异而达到分离目的。在碱变性条件下 (pH 12.6), 染色体 DNA 的氢键断裂, 双螺旋结构解开而变性, 质粒 DNA 氢键也大部分断裂, 双螺旋也有部分解开, 但共价闭合环状结构的两条互补链不会完全分离, 当以 pH 4.8 的乙酸钠将其 pH 调到中性时, 变性的质粒 DNA 又恢复到原来的构型, 而染色体 DNA 不能复性, 形成缠绕的致密网状结构, 离心后, 由于浮力密度不同, 染色体 DNA 与大分子 RNA、蛋白质 SDS 复合物等一起沉淀下来而被除去。分离质粒 DNA 的方法一般包括 3 个基本步骤: 培养细菌使质粒扩增; 收集和裂解细菌; 分离和纯化质粒 DNA。

#### 【器材】

1. 1.5ml Eppendorf 管
2. 微量加样器
3. 培养皿
4. 台式高速离心机
5. 高压灭菌锅

#### 【试剂】

所有的试剂均需高压灭菌 (有机溶剂除外)

- |          |                           |
|----------|---------------------------|
| 1. 溶液 I  | 50mmol/L 葡萄糖              |
|          | 25mmol/L Tris -Cl (pH8.0) |
|          | 10mmol/L EDTA (pH8.0)     |
| 2. 溶液 II | 0.2mol/L NaOH             |
|          | 1%SDS                     |
|          | 临用前配制                     |

- |                         |  |
|-------------------------|--|
| 3. 溶液 III               | 5mol/L 乙酸钾 60ml                          |
|                         | 3mol/L 冰乙酸 11.5ml                        |
|                         | ddH <sub>2</sub> O 28.5ml                |
|                         | pH 5.2                                   |
| 4. RNase A:             | 10mg/ml                                  |
| 5. TE 缓冲液:              | 1mmol/L EDTA in 10mmol/L Tris-Cl (pH8.0) |
| 6. Tris-Cl (pH8.0) 饱和苯酚 |  |
| 7. 氯仿/异戊醇 (v/v):        | 24/1                                     |
| 8. 70%: 乙醇              |  |
| 9. LB/Amp:              | LB/氨苄青霉素 (50 μg/ml)                      |

### 【操作步骤】

1. 从选择性培养平板上取出一个菌落，移至含有 2ml LB/Amp 培养基的试管中。在 37℃ 条件下振荡培养 12-16h。
2. 将 1.5ml 培养物移至 1.5 ml Eppendorf 管中，4000 rpm 离心 8min。
3. 弃上清，将细菌沉淀悬浮在 100 μl 预冷的溶液 I 中，并加入 2.5 μl RNase A (10mg/ml)。
4. 加 200 μl 新配制的溶液 II，盖紧管口。快速颠倒离心管 5 次使内容物混合、放置冰上 5min。
5. 加 150 μl 预冷的溶液 III，盖紧管口。将管颠倒 5-8 次，冰上放置 20min。
6. 离心 (1000rpm, 4℃, 5min)，将上清转移到另一离心管中。
7. 加等体积苯/氯仿/异戊醇，振荡混匀，离心同上。
8. 将水相移至另一离心管中，加入 2.5 倍体积的无水乙醇混匀后置冰上 20min。
9. 10 000rpm 4℃ 离心 10min。
10. 弃上清，加入 0.5ml 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀，离心弃上清，在空气中使质粒 DNA 干燥 10min。
11. 将质粒 DNA 溶于 20 μl, ddH<sub>2</sub>O 中，4℃ 保存。

## 二、质粒 DNA 小量纯化试剂盒提取质粒 DNA

### 【基本原理】

此试剂盒用于质粒 DNA 小量纯化。该试剂盒采用了传统的 SDS 碱裂解法，结合 DNA 制备膜技术，具有高效、快速、方便之特点，全套操作只需 1 小时便可完成。使用本试剂盒可从 1-4ml 的过夜培养的菌液中纯化得到 1~20  $\mu$ g 的高纯度质粒 DNA，此质粒 DNA 可直接用于 DNA 序列分析以及各种酶促反应等。

### 【器材】

1. 离心机
2. Spin Column
3. Collection Tube (2ml)

### 【试剂】

- |                         |           |
|-------------------------|-----------|
| 1. RNase A1 (50mg/ml)*1 | 6 $\mu$ l |
| 2. Solution I*1         | 3ml       |
| 3. Solution II*2        | 3ml       |
| 4. Solution III         | 4.8ml     |
| 5. Rinse A              | 5.5ml     |
| 6. Rinse B              | 16ml      |
| 7. Elution Buffer*3     | 0.8ml     |

\*1 初次使用试剂盒时，请将 RNase A1 全部加入到 Solution I 中，混合均匀后 4℃ 保存。

\*2 若出现沉淀，请于 37℃ 保温溶解，待恢复至室温后使用。

\*3 Elution Buffer 组成：2.5mmol/L Tris-Cl (pH 8.5)。

### 【操作方法】

1. 大肠杆菌的培养。

从平板培养基上挑选单菌落接种至 1~4 ml 的含有抗生素的液体培养基中，37℃ 过夜培养。

注) 培养液不宜过量，培养液过量时，会因菌量太大而溶菌不充分，纯化时会影响质粒的纯度。

2. 取 1~4 ml 的过夜培养菌液，12 000 rpm 离心 2min，弃上清。
3. 用 250  $\mu$ l 的 Solution I (含 RNase A1) 充分悬浮细菌沉淀。



注) 注意不要残留细小菌块, 可以使用振荡器 (Vortex) 等剧烈振荡使菌体充分悬浮。

4. 加入 250  $\mu$ l 的 Solution II 轻轻地上下翻转混合 5~6 次, 使菌体充分裂解, 形成透明溶液。

注) 此步骤不宜超过 5min。

5. 加入 400  $\mu$ l 的 4℃预冷的 Solution III, 轻轻上下翻转混合 5~6 次, 直至形成紧实凝集块, 然后室温静置 2min。

6. 室温 12 000 rpm 离心 5min, 取上清。

注) 此时 4℃离心不利于沉淀沉降。

7. 将试剂盒中的 Spin Column 按置于 Collection Tube 上。

8. 将上述操作 6 的上清液转移至 Spin Column 中, 3600rpm 离心 1min (如 Spin Column 中有液体残留, 可适当提高离心速度, 再离心 1min), 弃滤液。

9. 将 500  $\mu$ l 的 Rinse A 加入 Spin Column 中, 3600rpm 离心 30Sec, 弃滤液。

10. 将 700  $\mu$ l 的 Rinse B 加入 Spin Column 中, 3600rpm 离心 30Sec, 弃滤液。

11. 重复操作步骤 10, 然后 12000 rpm 再离心 1min。

12. 将 Spin Column 按置于新的 1.5 ml 的离心管上, 在 Spin Column 膜的中央处加入 60  $\mu$ l 的水或洗脱液, 室温静置 1min。

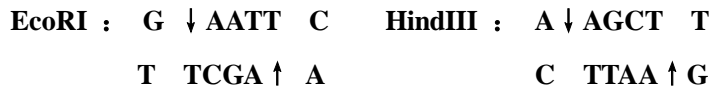
注) 把水或洗脱液加热至 60℃使用时有利于提高洗脱效率。

13. 12 000 rpm 离心 1min 洗脱收集 DNA。

## 实验十 限制性内切酶酶切

### 【基本原理】

限制性内切酶已有百余种，每种酶有其特定的核苷酸序列识别特异性，酶的活性需  $Mg^{+2}$  来激活。不同的酶也有许多差别：有些酶除需  $Mg^{+2}$  外，还需 ATP 等其他辅助因子的激活；切割位点和识别序列间的距离不同；有的内切酶同时具有甲基化作用。根据这些差别，可将限制性内切酶分为 I、II 和 III 种类型。II 型限制性内切酶只需要二价镁离子的激活，酶在其识别序列内切割双链 DNA，产生的各种 DNA 片段具有相同的末端结构，而且大多数的 II 型酶可提供粘性末端，有利于片段再连接，大部分 II 型酶所识别的序列具有反向对称的结构，或称之回文结构。如 EcoRI 和 HindIII 的识别和切口分别为：



限制性内切酶对环状质粒 DNA 产生的酶切片段数与切口数一致。因此，鉴定酶切后的片段在电泳凝胶的区带数，就可以推断切口的数目；从片段迁移率可判断酶切片段大小。用已知分子量的线状 DNA 为对照，通过电泳迁移率的比较，可以粗略地测出分子形状相同的未知 DNA 的相对分子大小。

质粒 DNA 的相对分子量 ( $M_r$ ) 一般在  $10^6 \sim 10^7$  范围内，如质粒 pBR322 的相对分子质量为  $2.8 \times 10^6$ ，在细胞内有三种构型：①共价闭环 DNA，常以超螺旋形式存在；②如果两条链中有一条链发生一处或多处断裂，分子就能旋转而消除链的张力，这种松弛型的分子叫作开环 DNA；③双链线状 DNA 由于两条链的切口在同一部位被切断，不能成环，完全开放成线状，简称线性 DNA。如果要测定质粒 DNA 的相对分子量，最好把质粒用单一切口的酶水解得到线性 DNA 片段。三种构型的质粒 DNA 在电泳时的泳动速度为：共价闭环 DNA > 线状 DNA > 开环 DNA。

本实验采用限制酶 BamHI，切割 pUC18-KanR 质粒中插入的分子大小为 1200 bp 的 KanR 基因片段。

### 【器材】

1. 水浴箱
2. 高压灭菌锅

### 【试剂】

1.  $10 \times$  限制酶缓冲液

## 2. 限制酶 BamH I

## 3. DNA 样品, 重组质粒 (见上)

### 【操作步骤】

#### 1. 在 Ep 管中分别加入以下试剂:

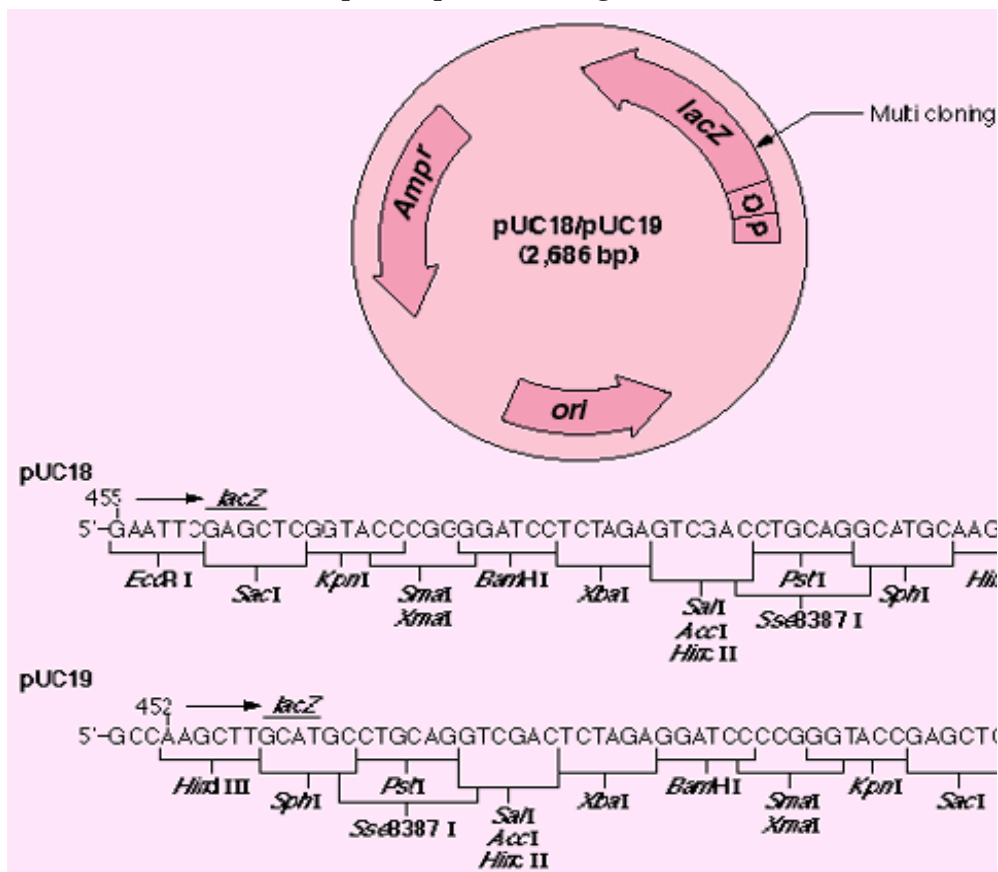
10×限制酶缓冲液	2 μl
pUC18-KanR	2 μl
ddH <sub>2</sub> O	15 μl
BamH I	1 μl

#### 2. 将上液混匀, 37℃保温, 1h。

#### 3. 加入 1 μl 0.5mol/L EDTA (pH8.0) 终止反应。

#### 4. 1% 琼脂糖凝胶电泳, 检测酶切结果。

pUC18/pUC19 cloning site 图



## 实验十一 目的 DNA 片段的分离、回收

### 【实验原理】

琼脂糖凝胶电泳与醋酸纤维素薄膜电泳原理基本相同，但兼有分子筛效应，从而使不同分子量大小的 DNA 片段分离。琼脂糖是从琼脂中提取出来的含有较多的酸根和羟基多糖。回收 DNA 的方法很多，主要包括 DEAE 纤维素纸插片电泳法、透析袋电泳洗脱法、槽沟电泳洗脱法、V 形槽电泳洗脱法以及低熔点琼脂糖凝胶挖块回收法。本实验采用琼脂糖凝胶 DNA 片段纯化试剂盒，此试剂盒采用独特的凝胶融解系统，结合 DNA 制备膜技术，具有高效、快速、方便之特点，全套操作只需要 30 分钟便可完成。使用此试剂盒每次可纯化得到多至 10  $\mu$ g 的 DNA 片段(100bp -30kb ),回收率高达 50-80%。

### 【器材】

1. 紫外分光仪
2. 离心机

### 【试剂】

1. 琼脂糖凝胶
2. DNA Purification Kit (Takara )

### 【操作步骤】

1. 使用 TAE 缓冲液制作琼脂糖凝胶，然后对目的 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳。
2. 在紫外灯下切出含有目的 DNA 的琼脂糖凝胶，用纸巾吸尽凝胶表面的液体。
3. 切碎胶块。
4. 称量胶块重量，计算胶块体积 (1mg =1  $\mu$ l)。
5. 向胶块中加入胶块融化液 DR-I Buffer, DR-I Buffer 的加量如下表：

凝胶浓度	DR-I Buffer 使用量
1.0%	3 个凝胶体积量
1.0-1.5%	4 个凝胶体积量
1.5-2.0%	5 个凝胶体积量

6. 均匀混合后 75℃加热融化胶块（低熔点琼脂糖凝胶只需在 45℃加热）。振荡混合，使胶块充分融化（约 6-10min）。

7. 向上述胶块融化液中加入 DR-I Buffer 量的 1/2 体积量的 DR-II Buffer，均匀混合。当分离小于 400bp 的 DNA 片段时，应在此溶液中加入终浓度为 20% 的异丙醇。

8. 将试剂盒中的 Spin Column 安置于 Collection Tube 上。
9. 将上述操作 7 的溶液转移至 Spin Column 中, 3600rpm 离心 1min。
10. 将 500  $\mu$ l 的 Rinse A 加入 Spin Column 中, 3600rpm 离心 30Sec, 弃滤液。
11. 将 700  $\mu$ l 的 Rinse B 加入 Spin Colum 中, Spin Colum 中, 离心 30Sec , 弃滤液。
12. 重复操作步骤 11, 然后 12 000 rpm 再离心 1min。
13. 将 Spin Column 按置于 1.5ml 的离心管上,在 Spin Column 膜的中央处加入 25  $\mu$ l 的水或洗脱液,室温静置 1min。
14. 12 000 rpm 离心 1min 洗脱 DNA。

## 实验十二 感受态细菌的制备（化学法）

### 【基本原理】

重组 DNA 分子需导入合适的宿主细胞（真核或原核细胞）才能进行复制，增殖和表达。用于分子克隆技术中的受体细胞为大肠杆菌 K-12 的衍生菌(DH5  $\alpha$  等)。细菌处于易于吸收外源 DNA 的状态叫感受态。用理化方法可诱导细菌进入感受态。本实验使用化学法（CaCl<sub>2</sub>）处理处于生长对数期的 DH5  $\alpha$  细胞，使其对外源 DNA 的通透性增加，以达到外源 DNA 分子导入细菌中的目的。

### 【器材】

1. 高压灭菌锅
2. 培养皿
3. 恒温培养摇床
4. 离心机

### 【试剂】

1. 细菌：DH5  $\alpha$
2. 30 mmol/L CaCl<sub>2</sub>（灭菌）
3. LB 培养基：配制每升培养基，应在 950 ml 去离子水中加入

胰蛋白胨 10 g

酵母提取物 5 g

NaCl 10 g

摇动容器直至溶解，用 5mol/L NaOH (约 0.2ml)调节 pH 值至 7.0，加入去离子水至总体积为 1L，高压灭菌 20min。

4. LB 琼脂培养基：先按上述配方配制液体培养基，临高压灭菌前加入琼脂 16~18 g。

### 【操作步骤】

1. 将 DH5  $\alpha$  菌种在琼脂培养平板上画线，37℃培养 12-16h。
2. 从平板上挑取 1 个单菌落，移入含 2ml LB 的试管中，在 37℃条件下，以 220rpm 的速度振荡培养 12-16h。
3. 将 2ml LB 培养物转移到含 50 ml LB 培养基的三角瓶中，37℃培养 2-3h，使其 OD600 值在 0.3-0.6 之间（即细胞处于对数生长期）。
4. 将培养物于冰上放置 10min，离心（3000-4000rpm，4℃）10min，收集细菌。

5. 弃上清, 在沉淀中加入 10ml 预冷的 30mmol/L  $\text{CaCl}_2$  悬浮细菌, 在冰上放置 40-60min 。
6. 离心(3000-4000rpm, 4℃) 10min, 回收细菌。
7. 弃上清, 将细菌重新悬浮于 2 ml 预冷的 30mmol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液中。
8. 感受态细菌于 48h 内使用, 或将已制备好的感受态细菌分装冻存(-70℃)。



## 实验十三 DNA 体外连接

### 【基本原理】

利用 DNA 连接酶把目的 DNA 片段和载体 DNA 连接在一起，成为一个新的重组分子。目的 DNA 片段被限制酶消化后其末端只可能有 3 种形式：

(1) 带有相同的粘性末端：用同一种酶或同尾酶处理可得这样的末端。由于质粒载体也必须用同样的酶消化，亦得两个相同的粘性末端，因此在连接反应中，外源目的基因片段和质粒载体 DNA 均可能发生自身环化，而且正反两种连接方向都有。为防止载体 DNA 自身环化，在连接前需除去载体分子的 5' -P，使之最大限度地抑制载体环化现象。

(2) 带有非互补的粘端：用两种不同的限制酶进行消化可以产生这样的末端、一般情况下，常用质粒载体的多克隆位点总能找到若干个不同的酶单酶切位点；用两种酶分别消化载体和目的 DNA 后，可将外源目的片段定向克隆到载体上。

(3) 带有平末端：由产生平末端的限制酶或核酸外切酶消化产生，或由 DNA 聚合酶 Klenow 片段补平 3' 凹陷，使不相匹配的末端转变为平端。

成功的连接反应需纯净的目的 DNA 片段和载体 DNA 一般采用插入片段（目的 DNA）与载体 DNA 分子数比为 3~5: 1。目的基因比例太多，易产生基因自连后插入载体的多聚体。根据插入片段和载体的分子量大小计算连接反应体系中需要加入的各 DNA 片段含量，计算公式如下：

$$\text{插入片段所需量(ng)} = \frac{\text{载体含量 (ng)} \times \text{插入片段长度(kb)}}{\text{载体长度(Kb)}} \times \text{片段与载体摩尔数的比}$$

### 【器材】

1. 水浴箱
2. Eppendorf 管
3. 离心机

### 【试剂】

1. T4 DNA 连接酶/10×T4 连接酶缓冲液
2. 牛小肠碱性磷酸酶（CIP）/10×CIP 缓冲液
3. 0.5mol/L EDTA

### 【操作步骤】

#### 1. 建立下列去磷酸基团的反应体系:

10×CIP 缓冲液	2 $\mu$ l
线性化载体 (已酶切)	10 $\mu$ l
CIP	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	7 $\mu$ l

#### 2. 37℃水浴 1h。

#### 3. 加入 2 $\mu$ l 0.5mol / L EDTA, 65℃灭活 15min。

#### 4. 经酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀后, TE 溶解 DNA。

#### 5. 在 Ep 管中建立连接反应体系:

10×连接缓冲液	2 $\mu$ l
DNA 片段 (0.2 $\mu$ g)	2 $\mu$ l
线性化的载体 DNA (0.1 $\mu$ g)	2 $\mu$ l
T4DNA 连接酶	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	13 $\mu$ l

#### 6. 混匀, 16℃反应数小时 (5-12h)。

## 实验十四 质粒 DNA 的转化

### 【基本原理】

将质粒 DNA 导入细菌的过程称为转化 (Transformation)。此感受态细菌细胞在  $\text{CaCl}_2$  低渗溶液中膨胀为球状 (感受态细菌的制备, 见前)。质粒 DNA 与  $\text{CaCl}_2$  形成抗 DNase 羟基-磷酸钙复合物黏附于细菌表面, 经  $42^\circ\text{C}$  短时间热冲击处理, 促进细胞吸收 DNA 复合物。在丰富培养基上生长数小时后, 球状细胞复原并分裂增殖。被转化的细菌中, 外源基因得到表达。在选择性培养平板上, 可选出所需的转化子 (即含有质粒 DNA 的细菌)。钙处理的感受态细胞, 一般每微克 DNA 能获得  $10^5 \sim 10^6$  个转化子。除化学方法转化细菌外, 还有电穿孔法 (Electroporation), 其转化率可高达  $10^9 \sim 10^{10}$  个转化子/ $\mu\text{g}$  质粒 DNA。

### 【器材】

1. 培养皿
2. 恒温培养箱

### 【试剂】

1. LB 培养基
2. 选择性 LB 琼脂培养平板 (含氨苄青霉素, 终浓度为  $50 \mu\text{g/ml}$ )
3. 氨苄青霉素  $25 \text{ mg/ml}$
4. 宿主细菌: 经  $30 \text{ mmol/L}$   $\text{CaCl}_2$  处理的感受态细菌 DH5  $\alpha$
5. X-gal 贮存液 ( $20 \text{ mg/ml}$ ),  $-20^\circ\text{C}$
6. IPTG 贮存液 ( $0.2 \text{ g/ml}$ ),  $-20^\circ\text{C}$

### 【操作步骤】

1. 加入  $2 \mu\text{l}$  ( $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) 质粒 DNA 至  $150 \mu\text{l}$  感受态细胞中, 混匀后置冰上  $30 \text{ min}$ 。
2.  $42^\circ\text{C}$  热休克  $2 \text{ min}$ , 迅速放回冰水中冷却  $1 \text{ min}$ 。加入  $850 \mu\text{l}$  LB 培养基,  $37^\circ\text{C}$  振荡 ( $300 \text{ rpm}$ ) 培养细菌  $1 \text{ h}$ , 让细菌中的质粒表达抗生素 (Amp) 抗性蛋白。

取  $200 \mu\text{l}$  转化混合物铺于  $60 \text{ mm}$  的选择性 LB 琼脂培养平板 (含  $50 \mu\text{g/ml}$  Amp, X-gal 和 IPTG) 上, 室温下放置  $10 \sim 20 \text{ min}$ 。待溶液被琼脂吸收后, 倒置平板于  $37^\circ\text{C}$  培养  $12 \sim 16 \text{ h}$ 。

3. 挑取白色菌落 (含重组质粒的转化菌) 进一步培养和鉴定。

## 实验十五 重组质粒的筛选

重组 DNA 转化受体细胞后, 须在不同水平上进行筛选, 以区别转化子与非转化子、重组子与非重组子以及鉴定所需的特异性重组子。在转化过程中, 并非每个受体细胞都被转化; 即使获得转化细胞, 也并非都含有目的基因, 所以需采用有效方法进行筛选。筛选的方法包括根据遗传表型筛选、限制性内切酶分析筛选、核酸探针筛选、PCR 筛选等。本实验采用遗传表型筛选中的抗生素平板筛选或  $\alpha$  互补筛选的方法。

### 一、抗生素平板筛选

#### 【实验原理】

目标基因是 Kan 的抗性基因, 而载体含 Amp 的抗性基因, 因此在含有 Amp 和 Kan 的培养基中生长的菌落即为阳性菌落。

#### 【操作步骤】

1. 制备含有 Amp 和 Kan 的 LB 琼脂培养板
2. 将 100  $\mu$ l 转化菌液用无菌涂布器均匀涂布于含有 Amp 和 Kan 培养板上, 37  $^{\circ}$ C 培养 12-16h。
3. 在含有 Amp 和 Kan 培养板上能生长的菌落即为阳性重组质粒。并将其接种于含 Kan 的 LB 液体培养基 2ml 中培养 8-16h。
4. 小量制备质粒, 限制性酶切分析进一步鉴定。

### 二、 $\alpha$ 互补筛选

#### 【实验原理】

适用于含有半乳糖苷酶基因 (LacZ) 的载体, 如 pUC 系列等, 其原理是: 载体含有 LacZ 的调控序列和 N 端 146 个氨基酸的编码信息。在这个编码区中插入了一个多克隆位点。当这种载体进入可编码  $\beta$ -半乳糖苷酶 C 端部分序列的宿主细胞后 (质粒和宿主细胞编码的片段各自都没有酶活性), 它们可以融为一体, 形成具有酶学活性的蛋白质, 这种现象叫  $\alpha$  互补。由  $\alpha$  互补而产生的 Lac<sup>+</sup> 细菌在呈色底物 5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -半乳糖苷 (X-gal) 和诱导剂异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷 (IPTG) 存在下形成蓝色菌落。当外源 DNA 插入到质粒的多克隆位点后, 导致产生无  $\alpha$  互补能力的氨基端片段。因此, 带有重组质粒的细菌形成白色菌落。通过呈色反应即可初步识别可能带有重组质粒的菌落。通过小量制备质粒 DNA 进行限制酶切分析, 即可确定这些质粒的结构。

#### 【试剂】

1. X-gal (20mg / ml): 将 20mg X-gal 溶于 1 ml 二甲基甲酰胺中, -20 $^{\circ}$ C 避光保存。

2. IPTG (200mg / ml): 将 1g IPTG 溶于 4 ml 去离子双蒸水中, 定容至 5 ml, 用 0.22  $\mu$  m 过滤器除菌, -20℃ 保存备用。

**【操作步骤】**

1. 制备含相应抗生素的琼脂平板。
2. 于平板表面加 X-gal 40  $\mu$  l 和 IPTG 4  $\mu$  l, 并用无菌玻璃涂布器将试剂均匀涂布于整个平板表面。37℃ 静置 1 h。
3. 将 100  $\mu$  l 转化的菌液涂布于平板表面, 置 37℃ 培养箱 20 min 后, 倒置平板继续培养 12~16 h。
4. 中止培养后, 将平板静置 4℃ 4 h, 使蓝色充分显现, 平皿上显示蓝色和白色两种菌落。
5. 挑取白色菌落置 2 ml LB (含相应抗生素) 液体培养基中, 37℃ 摇床培养 8~12 h。
6. 提取质粒, 以限制性酶切分析进一步鉴定。

## 实验十六 DNA 探针的标记

### 【基本原理】

核酸 (DNA 或 RNA) 分子探针是指能与互补核酸序列退火杂交, 并可被特殊的方法探知的已知序列核酸片段。根据核酸探针标记物的性质及探针的检测方法不同, 核酸探针可分为: 放射性标记探针和非放射性标记探针。DNA 探针标记的方法主要有: 缺口平移法、随机引物法、末端标记法和化学标记法等。本实验采用 DIG DNA Labeling and Detection Kit (地高辛标记检测试剂盒), 通过随机引物法标记非放射性 DNA 探针。标记原理是: 以随机六聚体作为引物 (含有各种可能排列顺序的六核苷酸混合物), 模板 DNA 变性后与引物一起退火杂交, 在 Ecoli DNA 聚合酶 Klenow 片段的催化下, 以单链 DNA 为模板, 地高辛标记的 dUTP (Dig-11-dUTP) 及其他四种 dNTP 为原料, 以随机六聚体为引物, 合成与模板互补的 DNA 片段。由于在聚合反应中 Dig-11-dUTP 可掺入新合成的 DNA 链, 因此新生的 DNA 互补链具有地高辛标记, 当加入抗地高辛的碱性磷酸酶酶联抗体后, 探针与抗体形成抗体半抗原复合物, 在底物 (NBT 和 BCIP) 存在下, 经碱性磷酸酶作用, 在杂交部位形成蓝色条带或色斑。

### 【器材】

1. 水浴箱
2. 离心机

### 【试剂】

1. DIG 标记检测试剂盒
2.  $1\times$  TE
3.  $0.2\text{mol/L}$  EDTA
4.  $4\text{mol/L}$  LiCl

### 【操作步骤】

1. 待标记模板 DNA  $1\mu\text{l}$  (含 DNA  $20\text{ng}-200\text{ng}$ )  
ddH<sub>2</sub>O  $14\mu\text{l}$

沸水浴加热 5 min, 冰浴迅速冷却 5min。

- |                          |                |
|--------------------------|----------------|
| 六聚体随机引物                  | $2\mu\text{l}$ |
| dUTP 混合物 (含 Dig-11-dUTP) | $2\mu\text{l}$ |
| Klenow 酶                 | $1\mu\text{l}$ |

混匀, 离心数秒,  $37^{\circ}\text{C}$  水浴, 4-20h 后, 加入  $1\mu\text{l}$   $0.2\text{mol/L}$  EDTA 立即混匀, 终止反应。

2. 再加入  $2.5\mu\text{l}$   $4\text{mol/L}$  LiCl 和  $75\mu\text{l}$  无水乙醇 ( $-20^{\circ}\text{C}$  预冷) 混匀,  $-20^{\circ}\text{C}$  放置 1-2h,  $12000\text{rpm}$  离心 10min, 弃上清。

3. DNA 沉淀干燥后, 加入  $50\mu\text{l}$  TE 溶液溶解,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

## 实验十七 Southern blot(印迹)

### 【基本原理】

Southern blot 是将电泳分离的 DNA 片段转移到一定的固相支持物上的过程。DNA 分子用限制性内切酶酶切后,经琼脂糖凝胶电泳将所得的 DNA 片段按分子量大小分离,然后将含 DNA 片段的琼脂糖凝胶变性,将变性的单链 DNA 经虹吸作用转移并固定于固相支持膜上。转移过程中,膜上 DNA 片段的相对位置保持不变。用标记的 DNA 或 RNA 探针与靶 DNA 杂交,洗去多余探针,经放射性自显影或显色反应确定同源靶序列在膜上的位置和丰度。

### 【器材】

1. 硝酸纤维素膜或尼龙膜
2. 烤箱
3. 封口机等其他实验室常规仪器。

### 【试剂】

1. 限制性核酸内切酶
2. 变性液:

5mol/L NaOH	4ml (0.2mol/L)
1mmol/L Tris-Cl (pH7.6)	15ml (0.15mol/L)
3. 中和液

1mol/L Tris-Cl (pH7.6)	10ml (0.1mol/L)
5mol/L NaCl	3ml
ddH <sub>2</sub> O	定容 100ml
4. 转移液 (20×SSC): 3mol /L NaCl 、 0.3mol / L 柠檬酸钠, pH7.0
5. 平衡缓冲液:

1 mol/L Tris-Cl (pH9.5)	10ml (0.1mol/L)
5 mol/L NaCl	2ml (0.1mol/L)
1 mol/L MgCl <sub>2</sub>	5ml (50mmol/L)
6. 预杂交液:

20×SSC	25 ml(5×)
10%SDS	0.2 ml(0.02%)
10%十二烷基肌酸钠	1 ml(0.1%)
鲑精 DNA	1g (1×)
中和液	20 ml
ddH <sub>2</sub> O	定容 100ml



- |                |       |             |
|----------------|-------|-------------|
| 7. 杂交液（临用前配制）： | 预杂交液  | 50 ml       |
|                | 变性探针  | 50 $\mu$ l  |
| 8. 显色液：        | NBT   | 135 $\mu$ l |
|                | BCIP  | 105 $\mu$ l |
|                | 平衡缓冲液 | 30 ml       |

#### 9. 抗地高辛标记酶联抗体（抗体-Dig-Ap）

### 【操作步骤】

#### 1. 琼脂糖电泳

（1）取一定量的待测 DNA 样品，用适当的限制性内切酶酶切。DNA 的量根据样品的种类及实验目的的不同而异，对于克隆片段的限制性内切酶图谱分析，取 0.1-0.5  $\mu$  g 即可；而对于鉴定基因组 DNA 中的单拷贝基因序列，则需要 10~20  $\mu$  g；当采用寡核苷酸探针或探针的比放射性活性较低时，则需要 30~50  $\mu$  g。

（2）酶切完毕，在琼脂糖凝胶中电泳。

（3）电泳结束后，EB 染色，长波紫外线下观察电泳结果及照相。

#### 2. 印迹转移

（1）切胶并作标记（左下角切除），以便于定位，然后将凝胶置于一容器中。

（2）将凝胶浸泡于适量的变性液中，室温下放置 1h 使之变性，不间断地轻轻摇动。

（3）将凝胶用去离子水漂洗 1 次，然后浸泡于适量的中和液中 30 min，不间断地轻轻摇动。更换中和液，继续浸泡 15 min。

（4）将滤纸，NC 膜剪成与胶同样大小，NC 膜浸入转移 buffer 中平衡 30 min。

（5）按图操作：逐层铺平，各层之间勿留有气泡和皱折。

（6）虹吸转移 12-16h。

#### 3. 固定 DNA

（1）取出转移后的 NC 膜，用滤纸吸干 NC 膜，NC 膜光面朝上平铺于变性液中变性 5min。

（2）用相同的方法将 NC 膜平铺在中性液上，中和两遍，每遍 5min。

（3）将膜夹在两张干燥滤纸间，80℃烘烤 1-2h。

#### 4. 预杂交

（1）将膜浸入 5×SSC 中 2min，将膜放入干净的塑料袋中。

（2）将预杂交液事先在 65℃ 预热，然后将 10 ml 预杂交液加入袋中，封口。

（3）65℃预杂交 1h 以上，不时摇动。

#### 5. 杂交

(1) 取出杂交袋，剪去一角去除杂交液后，加入 5ml 杂交液及  $5\mu\text{l}$  变性探针，排除气泡后封口。

(2) 将杂交袋放入  $65^{\circ}\text{C}$  水浴中杂交过夜。

#### 6. 按下列条件洗膜

$2\times\text{SSC}$ , 0.1%SDS	50ml	室温	5min /2 次
$0.1\times\text{SSC}$ , 0.1%SDS	50ml	$65^{\circ}\text{C}$	15min /2 次

#### 7. 免疫酶联检测

##### (1) 偶联反应

①用中和液 洗膜 2min，室温。

②用封闭液 50ml 洗膜 30min，室温，轻摇。

③用中和液将稀释抗体-Dig -Ap 至 750 mU/ml，将膜封入杂交袋，加入 5 ml 稀释抗体轻摇 50min。

④用中和液 50 ml 洗膜，10min  $\times$ 2 次，室温，轻摇，除去未结合的抗体。

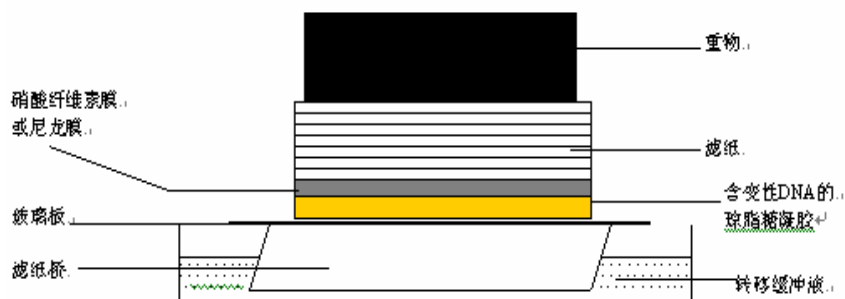
##### (2) 显色反应

①用平衡液 20 ml 平衡膜 2min。

②将膜装入杂交袋中，加入 5ml 显色液，避光 30min 左右，当出现颜色时不要晃动。

③用 TE 洗膜终止反应。

④ $80^{\circ}\text{C}$  烤干。



## 实验十八 聚合酶链反应 (PCR) 技术体外扩增 DNA

### 【基本原理】

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是体外酶促合成特异 DNA 片段的一种技术。利用 PCR 技术可在数小时之内大量扩增目的基因或 DNA 片段, 从而免除基因重组和分子克隆等一系列繁琐操作。由于这种方法操作简单、实用性强、灵敏度高并可自动化, 因而在分子生物学、基因工程研究以及对遗传病、传染病和恶性肿瘤等基因诊断和研究中得到广泛应用。

PCR 进行的基本条件是:

- (1) 以 DNA 为模板 (在 RT-PCR 中模板是 RNA);
- (2) 以寡核苷酸为引物;
- (3) 需要 4 种 dNTP 作为底物;
- (4) 有 Taq DNA 聚合酶。

PCR 每一个循环由三个步骤组成:

- (1) 变性 加热模板 DNA, 使其解离成单链;
- (2) 退火 降低温度, 使人工合成的寡聚核苷酸引物在低温条件下与模板 DNA 所需扩增序列结合;
- (3) 延伸 在适宜温度下, Taq DNA 聚合酶利用 dNTP 使引物端向前延伸, 合成与模板碱基序列完全互补的 DNA 链。

每一个循环产物可作为下一个循环的模板, 因此通过 35 个循环后, 目标 DNA 片段可能性扩增可达  $2^{35}$  倍。

PCR 的影响因素:

(1) 模板 单、双链 DNA 或 RNA 都可作为 PCR 的模板, 若起始材料是 RNA, 需先通过逆转录反应得到一条 cDNA。为提高 PCR 反应的特异性, 所加 DNA 模板量应作相应的调整, 如克隆 DNA (ng), 染色体 DNA ( $\mu$ g), 待扩增片段 ( $10^4$  拷贝数量) 来作起始材料。原料可以是粗制品, 但不能混有蛋白酶、核酸酶、TaqDNA 聚合酶抑制剂以及任何能结合 DNA 的蛋白质。

(2) 引物 引物是决定 PCR 结果的关键。引物的设计应遵循以下原则:

- ① 引物的长度一般为 18-25 个碱基
- ② G+C 含量一般为 40-60%
- ③ 碱基的随机分布

(3) 反应温度和时间 PCR 涉及变性、退火、延伸三个不同温度和时间。通常变性温度和时间为 95℃, 45 秒至 1 分钟, 过高温度或持续时间过长会降低 TaqDNA 聚合酶活性和破坏 dNTP 分子。退火温度可选择比变性温度 ( $T_m$ ) 低 2-3℃, 变性温度按  $T_m = 4(G+C)\% + 2(A+T)\%$  计算。在  $T_m$  值允许的范围内, 较高的退火温度有利于提高 PCR 特异性, 退火时间一般为 0.5-1 分钟。延伸温度为 72℃, 时间与待扩增片段长度有关, 一般 1Kb 以内片段延伸时间为 1 分钟, 如扩增片段较长可适当增加时间。

(4) Taq DNA 聚合酶 目前有两种 Taq DNA 聚合酶供应: 从嗜热水生菌中提取的天然酶和大肠杆菌表达的重组 TaqDNA 聚合酶 (Ampli Taq<sup>TM</sup>)。两种酶都有 5' -3' 外切酶活性, 但均缺乏 3' -5' 外切酶活性。在 PCR 中, 它们可以相互替代, 催化典型的 PCR 所需酶量为 1~2.5 单位。酶量偏少则 PCR 产物相应减少, 酶量过高则会增加非特异性反应。

(5) dNTP 浓度 dNTP 在饱和浓度 (200  $\mu\text{mol/L}$ ) 下使用。由于 dNTP 溶液有较强酸性, 配制时可用 1 mol/L NaOH 溶液将其贮存液 (50 mmol/L) 的 pH 调至 7.0~7.5。分装小管于 -20℃ 保存。过多冻融会使其降解。

(6) PCR 缓冲溶液 在反应体系中二价阳离子的存在至关重要, 镁离子优于锰离子, 而钙离子无效。它对引物与模板的结合、产物特异性、错配率、引物二聚体的生成及酶的活性等方面有较大影响, 镁离子浓度一般在 0.5~2.5 mmol/L 之间。每当首次使用靶序列和引物的一种新组合时, 尤其要调整  $\text{Mg}^{+2}$  浓度至最佳。

本实验从小鼠肝脏中提取的基因组 DNA 中扩增  $\beta$ -actin 基因, 其片段长度为 800 bp。

#### 【器材】

1. PCR 扩增仪
2. 掌式离心机
3. 0.5ml PCR 管

#### 【试剂】

1. PCR 扩增试剂盒
2. 引物 1: 5' ATCTGGCACCACACCTTCTACAATG 3'  
引物 2: 5' CGTCACACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC 3'
3. 标准 DNA: DL 2000

### 【操作步骤】

1. 在 0.5ml PCR 塑料管中加入下列物质，并混匀。

10×PCR buffer(free Mg <sup>+2</sup> )	5 μl
25mmol /L MgCl <sub>2</sub>	3 μl
dNTP	4 μl
引物 1	0.5 μl
引物 2	0.5 μl
Taq(5U/ μl)	0.25 μl
模板(基因组 DNA< 0.1 μg)	5 μl
ddH <sub>2</sub> O	31.75 μl
总体积	50 μl

2. 将上述 PCR 反应混合物混匀放入 PCR 仪中。

3. PCR 循环:	94℃	5 min	1 个循环
	94℃	45 Sec	
	55℃	45 Sec	30 个循环
	72℃	45 Sec	
	72℃	7 min	延伸

4. PCR 产物鉴定：取 10 μl PCR 产物加 2 μl 上样缓冲液，1%琼脂糖电泳。

## 实验十九 动物组织总 RNA 的提取

### 【基本原理】

组织中的 RNA 主要分布在胞浆中, 包括 mRNA、tRNA 和 rRNA 三种。mRNA 含量最低, 半衰期短, 易于降解。在 RNA 的提取过程中, 主要采用强变性剂, 如异硫氰酸胍等破坏细胞结构, 失活 RNA 酶。细胞碎片、蛋白质等经酚、氯仿等有机溶剂抽提被去除。RNA 提取的关键是防止内源性和广泛存在的外源性 RNA 酶, 如器皿、试剂和手上等存在的 RNA 酶对核酸的降解作用, 所用材料、器皿均需经 DEPC 处理 (包括 0.1% 溶液浸泡过夜, 蒸馏水冲洗及高压灭菌 15min 去除残存的 DEPC)。真核生物中 18S rRNA、28S rRNA 经琼脂糖电泳后, 在紫外灯下可观察到两条清晰的条带。

### 【器材】

1. 电子天平
2. 匀浆器
3. Ep 管
4. 冰盒
5. 手套

### 【试剂】

1. TRIzol 试剂 (GIBCO BRL)
2. 氯仿
3. 异丙醇
4. 75% 乙醇
5. 0.1% DEPC 处理水

### 【操作步骤】

#### 1. RNA 提取

- (1) 称取 0.2g 新鲜肝组织, 加 1ml TRIzol 试剂制备肝匀浆, 4℃ 孵育 5min。
- (2) 加 0.2 ml 氯仿, 盖紧盖后用力振摇 15Sec, 然后在冰上放置 5min。
- (3) 4℃, 12 000×g, 离心 15min。
- (4) 将上层水相移入另一管, 加 0.5 ml 异丙醇, 并在冰上孵育 10min。
- (5) 4℃ 12 000×g 离心 10min。

(6) 弃上清，在沉淀（含 RNA）中加 1ml 75% 乙醇洗涤，旋涡混匀。

(7) 4℃，10 000×g 离心 5min，得到 RNA 沉淀。

(8) 空气干燥后，用适量 TE 或无 RNase 水溶解备用。

## 2. RNA 含量和纯度测定

分别测定所提取 RNA 样品的 A 260 和 A 280，并计算其比值。

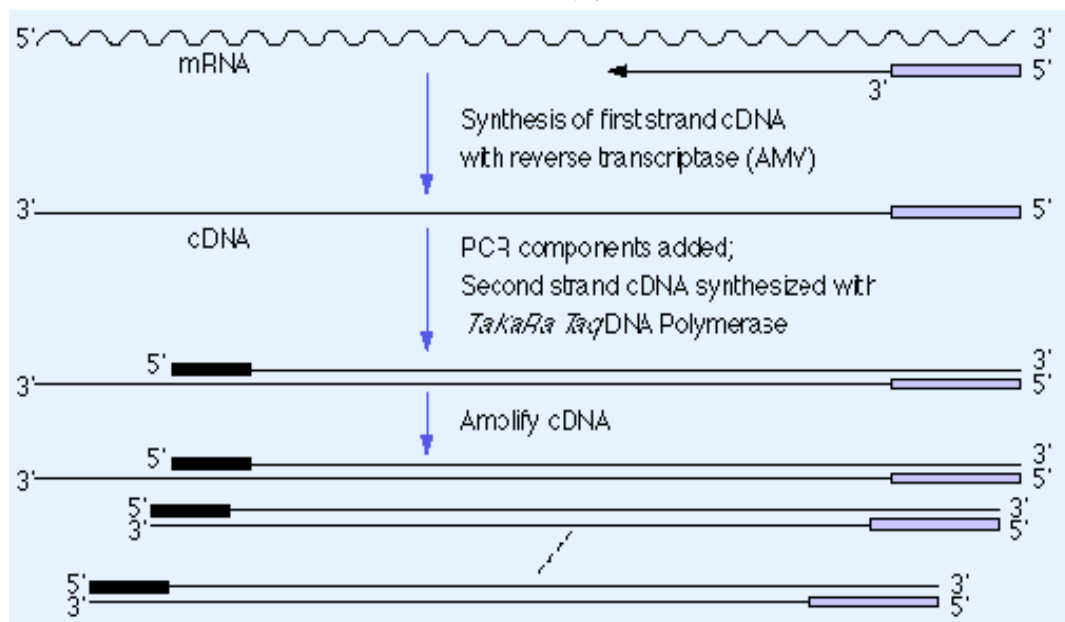
## 3. 电泳鉴定（略）。

# 实验二十 反转录聚合酶链反应（RT-PCR）

### 【基本原理】

PCR 是体外扩增 DNA 的方法，但不能直接以 RNA 为模板扩增。利用反转录酶（RTase），可由 mRNA 生成 cDNA（第一链）。以此 cDNA 为模板即可进行 RNA 的 PCR 扩增。如果在 PCR 反应中，除加入待扩增的特异基因的引物外，再加入常用的  $\beta$ -actin 或 GAPDH 引物作为内参基因扩增，则可对特异基因的转录水平进行半定量分析。

### RT-PCR 的原理



### 【器材】

1. 0.2ml PCR 管
2. 恒温水浴箱
3. PCR 仪
4. 紫外灯检测仪



5. Eppendorf 管

6. 手套

### 【试剂】

1. 特异基因的引物 P1, P2

2. RT-PCR 试剂盒 (Takara)

### 【操作步骤】

#### 一、反转录反应

1. 在 PCR 管中加入以下反应液

10×RNA PCR Buffer	2 μl
MgCl <sub>2</sub>	4 μl
RNase Free dH <sub>2</sub> O	8.5 μl
dNTP Mixture	2 μl
RNase Inhibitor	0.5 μl
AMV Reverse Transcriptase *1	1 μl
Oligo dT-AdAmp tor Primer (Control 反应为 R-1 Primer)	1 μl
RNA 样品 (≤1 μg total RNA) 或 Positive Control RNA	1 μl
Total	20 μl/Sample

2. 按以下条件进行反转录反应

30°C	10 min
42°C~60°C	15min~30 min
99°C	5 min
5°C	5 min

#### 二、PCR 反应

1. 取上液 5 μl 加入 Ep 管中, 再加入下列试剂

10×RNA PCR Buffer	2 μl
MgCl <sub>2</sub>	1.5 μl
灭菌蒸馏水	16 μl
TaKaRa Taq™	0.125 μl
PCR 引物 1	0.25 μl
PCR 引物 2	0.25 μl
总反应体系	25 μl

2. 混匀后, 放入 PCR 仪中进行扩增, 然后经电泳鉴定 (同前, 略)。



表 1-3 室温下由  $S_1$  提高到  $S_2$  时每升加固体硫酸铵的克数





图 3-7 凝胶层析分离层析图

(1)样品（其中含有大、小不同的分子）溶液加在层析柱顶端；(2)样品溶液流经层析柱，小分子通过扩散作用进入凝胶颗粒的微孔中，而大分子则被排阻于颗粒之外。大、小分子因向下移动的速度发生差异而将大、小分子分离开来；(3)向层析柱顶加入洗脱液，大、小分子分开的距离增大；(4)大分子已经流出层析柱。

图 4-2 琼脂糖结构中的一个链段

$$m_o = \frac{u_{\text{中性}}}{E} = \frac{Ld/t}{V/Lt}$$