

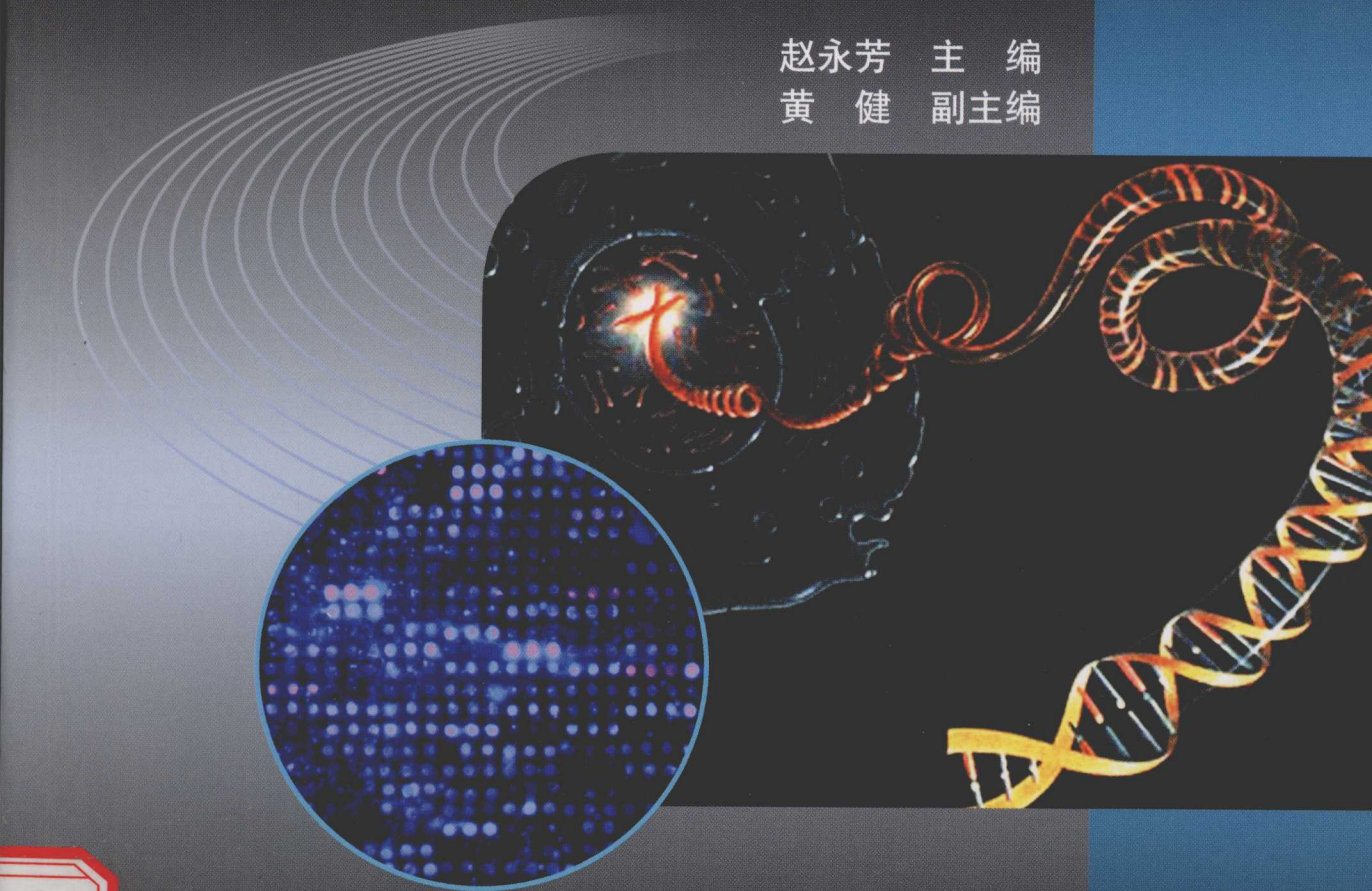
21世纪高等院校教材

生·物·科·学·系·列

生物化学 技术原理及应用

第四版

赵永芳 主 编
黄 健 副主编



科学出版社
www.sciencep.com

21 世纪高等院校教材——生物科学系列

生物化学技术原理及应用

(第四版)

赵永芳 主 编

黄 健 副主编

科学出版社

北 京

20
A. 20215

原系学林出版社——林慧林副等高专第 18

内 容 简 介

本书在第三版的基础上,结合近年来学科进展修订而成。全书共分三编、二十章;第一编概述蛋白质、核酸等生命大分子物质的制备程序及基本要点;第二编讲解从动、植物和微生物材料中分离上述物质的常见方法,如疏水层析、离子交换层析、凝胶过滤、亲和层析、聚焦层析、反相高效液相色谱等;第三编介绍鉴定生命大分子物质所涉及的相关方法,如同位素标记(包括 DNA、RNA 和蛋白质的标记)、基因重组、DNA 测序、生物芯片、细胞凋亡检测、生物传感器、各种电泳(包括凝胶电泳、聚焦电泳、琼脂电泳、转移电泳、毛细管电泳,以及多种大分子物质电泳后所用染色液的配制等)、免疫分析(包括单克隆抗体的制备、免疫扩散、各种免疫电泳、微球测定、固相免疫测定等)、薄层与薄膜层析和气相色谱等。书中在阐明各类方法基本原理的同时,还讲述了主要操作和应用实例,在每章末尾附有思考题和参考文献,全书共有图、表 370 余幅。

本书适合综合性大学及医、农、师范院校等相关专业本科生和研究生使用,也可供从事生物科学工作的有关人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学技术原理及应用/赵永芳主编,黄健副主编.—4 版.—北京:科学出版社,2008

21 世纪高等院校教材·生物科学系列

ISBN 978-7-03-021562-8

I. 生… II. ①赵…②黄… III. 生物化学-高等学校-教材 IV. Q503

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 045837 号

责任编辑:单冉东 席 慧/责任校对:张 琪

责任印制:张克忠/封面设计:耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

1988 年 7 月第 一 版 1994 年 6 月第 二 版

武汉大学出版社

2002 年 7 月第 三 版 开本:787×1092 1/16

2008 年 8 月第 四 版 印张:29 1/2

2008 年 8 月第八次印刷 字数:680 000

印数:20 001—25 000

定价:42.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

第四版前言

尽管《生物化学技术原理及应用》第三版从2002年7月出版以来,至今6年共印刷7次,受到很多读者的赞同与认可,国内有些高校也选其作为教材或参考书,但是,相对于国内外优秀的同类书,它与读者要求的内容丰富翔实、表述通俗精练、知识融会贯通、技术与时俱进等还有相当差距,还需狠下工夫。

如今,值第四版修订之机,期待能以适应生化技术快速发展趋势的眼光,能从人们选择与评价专业书籍刊物的角度,对前一版中的原理要点、名词概念,以及文理图表等环节进行认真核查补正、遣词推敲,争取编撰出一本更符合读者心意、更能满足读者需求的教科书。

第四版的编排与第三版基本相同,其修订的重点主要包括:精心完善经典方法,着力推荐现代技术,紧密联系理论与实际,尽量删除过时资料,消除矛盾、重复与罅漏。新版教材会比前一版让读者更易学、易懂、易行。

全书仍为二十章,各章基本是由第三版原班撰稿人(见第三版前言)承担,唯第十四章的编者黄燕属新加盟。为方便工作,本次再版邀黄健博士任副主编。另外,何其敏博士为第七章提供了部分素材。全书由赵永芳审查、统编和定稿。

本书在编撰过程中,参编人员都尽心竭力、几易其稿。但限于学术水平、编写能力以及学科特点等原因,书中难免有不足、欠妥和错漏之处。编者恳请读者指正。

编者对多年来一直关注本书并提出宝贵意见、建议的读者、老师和同学表示谢意,同时感谢科学出版社及单冉东编辑的大力支持。



2008年元月于武昌珞珈山

第三版前言

20 世纪后期,生命科学的一系列突破——基因工程、人类基因组计划、克隆羊的成功,不仅加速了生命科学的发展进程,而且把生命科学推进到一个完整的技术体系。它的进展具有直接的实践意义,使以往生命科学仅用于认识生物和利用生物的状况,很快转变到人工改造生物乃至创造新生物的局面。生命科学的这一变化,导致生化技术理论的研究越来越深入,生化技术的应用也越来越广泛,从而使其逐步形成一门独立的重要分支学科。

面对新世纪不同学科将进一步相互渗透、彼此交叉的发展趋势,面对生化技术可在诸多学科领域广泛应用的特点,面对探讨蛋白质和核酸等物质的结构与功能在认识生命活动本质方面起着关键作用,《生物化学技术及其应用》的编著者邀约了几位赞同该书观点的同行,在 1988 年和 1994 年武汉大学出版社先行出版之教材(两个版本)的基础上,结合各自多年从事教学、科研的经验体会,并参考国内外文献资料,重新撰写了一本以讲解如何从生物材料中提取制备蛋白质和核酸等物质为主线,以介绍当前生化技术领域的新成果和精华知识为重点,以阐述分离、鉴定生命大分子物质所涉及的方法基理和操作技巧为核心的《生物化学技术原理及应用》教科书。此书从一个侧面提示了科学发展和前沿领域的研究方向,较好地满足了一些综合性大学,医、农、师范院校,以及部分生物研究所等单位教学与科研的需要。

众所周知,提取分离及制备鉴定生命物质过程的成败,和所选用的最佳方案与方法关系密切。因此本书阐述的诸多应用实例和实验方法,多半是经过推敲检验确认的,有的是在原始方法基础上修改或优化的,有的是编者或所在实验室建立的,还有的是热心读者推荐或建议的。另外,在讲述相关方法的基理和程序时,还扼要介绍了操作要点和注意事项,力求使读者在按书中所述内容开展试验时,能得到满意的结果;尽量让不同层次的读者能从书中找到自己需要的东西。但限于每个实验方法的建立、发展乃至完善都有其不同的背景,所介绍的方法可能是专为特定对象设计的。因此,读者可以在基理范围内按照实际需要进行适当改动。

本书由二十章组成,共分三编,第一编概述生命大分子物质的制备程序;第二编讲解分离制备蛋白质和核酸等物质的常见方法;第三编介绍鉴定上述物质所涉及的相关方法。每章一般都按基本原理、操作步骤和应用实例等格式编排。其中应用实例仅用来说明有关方法的某些参数,辅助读者理解书中的内容,而不是对每一问题的详细讲解和全面评论。在每章末尾附有思考题和参考文献,以便读者学习。

本书各章分别由何其敏(第十一章,第十九章中固相免疫吸附)、黄健(第十二、十五章)、肖华胜(第十三章)、刘建平(第十四章)、吴超群和余应年(第十六章)、王银善(第四、十八章)、陈洪和夏伏建(第十八章中第六节)、舒邦良(第十九章中免疫微球测定)和赵永芳(第一~三、五~十、十七、十九、二十章)撰写。另外,何其敏先生还提供了相关参考资料及毛细管电泳的部分图谱。全书由赵永芳审查、统编、定稿。

俗话说,“一本好书半个师”。这充分肯定了优秀出版物在传播知识和技术过程中所起的巨大作用和重要意义,但姑且勿言编撰好书,就是编写一本让读者认可的书籍也绝非易事。本书的编写人员在撰稿过程中都付出了辛勤的劳动,也很想把工作做漂亮,但限于水平、时间和生化技术涉及的知识面较广等原因,故书中难免有欠妥和错漏之处。编者诚恳希望读者指正。

编者衷心感谢科学出版社相关同志的大力支持。

赵永芳

2001年6月于珞珈山

本书在编写过程中,得到了许多同行专家的指导和帮助,特别是中国科学院植物研究所的专家们,他们不仅提供了大量的参考资料,还亲自到实验室进行实地考察,为本书的编写提供了极大的便利。此外,还有许多同行专家在百忙之中抽出宝贵的时间,对本书的初稿进行了认真的审阅和修改,使本书的内容更加充实,质量得到了进一步的提高。在此,编者对他们表示衷心的感谢。同时,也要感谢科学出版社的编辑同志,他们为本书的出版付出了辛勤的劳动,使本书得以顺利出版。本书的出版,得到了许多领导和同志的支持,特别是中国科学院植物研究所的领导,他们为本书的编写提供了良好的工作环境和条件,使本书的编写工作得以顺利进行。在此,编者对他们表示衷心的感谢。

本书在编写过程中,得到了许多同行专家的指导和帮助,特别是中国科学院植物研究所的专家们,他们不仅提供了大量的参考资料,还亲自到实验室进行实地考察,为本书的编写提供了极大的便利。此外,还有许多同行专家在百忙之中抽出宝贵的时间,对本书的初稿进行了认真的审阅和修改,使本书的内容更加充实,质量得到了进一步的提高。在此,编者对他们表示衷心的感谢。同时,也要感谢科学出版社的编辑同志,他们为本书的出版付出了辛勤的劳动,使本书得以顺利出版。本书的出版,得到了许多领导和同志的支持,特别是中国科学院植物研究所的领导,他们为本书的编写提供了良好的工作环境和条件,使本书的编写工作得以顺利进行。在此,编者对他们表示衷心的感谢。

本书在编写过程中,得到了许多同行专家的指导和帮助,特别是中国科学院植物研究所的专家们,他们不仅提供了大量的参考资料,还亲自到实验室进行实地考察,为本书的编写提供了极大的便利。此外,还有许多同行专家在百忙之中抽出宝贵的时间,对本书的初稿进行了认真的审阅和修改,使本书的内容更加充实,质量得到了进一步的提高。在此,编者对他们表示衷心的感谢。同时,也要感谢科学出版社的编辑同志,他们为本书的出版付出了辛勤的劳动,使本书得以顺利出版。本书的出版,得到了许多领导和同志的支持,特别是中国科学院植物研究所的领导,他们为本书的编写提供了良好的工作环境和条件,使本书的编写工作得以顺利进行。在此,编者对他们表示衷心的感谢。

本书在编写过程中,得到了许多同行专家的指导和帮助,特别是中国科学院植物研究所的专家们,他们不仅提供了大量的参考资料,还亲自到实验室进行实地考察,为本书的编写提供了极大的便利。此外,还有许多同行专家在百忙之中抽出宝贵的时间,对本书的初稿进行了认真的审阅和修改,使本书的内容更加充实,质量得到了进一步的提高。在此,编者对他们表示衷心的感谢。同时,也要感谢科学出版社的编辑同志,他们为本书的出版付出了辛勤的劳动,使本书得以顺利出版。本书的出版,得到了许多领导和同志的支持,特别是中国科学院植物研究所的领导,他们为本书的编写提供了良好的工作环境和条件,使本书的编写工作得以顺利进行。在此,编者对他们表示衷心的感谢。

第四版前言 三

第三版前言 四

第一编

概 述

第一章 生命大分子物质的制备 3

第一节 材料的选择与处理 3

一、材料选择 3

二、材料处理 4

第二节 测定方法的确立 5

一、目的与要求 5

二、常用的测定方法 5

第三节 细胞破碎 8

一、机械破碎 8

二、溶胀和自溶 9

三、化学处理 9

四、生物酶降解 9

第四节 抽提 10

一、抽提的含义 10

二、抽提有效成分的影响因子 10

第五节 浓缩 13

一、沉淀法 13

第二编

纯化方法

第二章 沉淀法 21

第一节 基本原理与沉淀类型 21

一、基本原理 21

二、制备蛋白质 21

三、制备核酸 30

第二节 应用实例 33

一、脾磷酸二酯酶的纯化 33

二、细菌染色体 DNA 的制备 33

三、蔗糖酶的初步纯化 34

二、吸附法 13

三、超过滤法 13

四、透析法 14

五、减压蒸馏法 14

六、冰冻干燥法 14

第六节 纯化方案的设计与评价 14

一、纯化方案的设计 15

二、纯化方案的评价 16

第七节 有效成分纯度和性质的分析 17

第八节 应用实例 17

一、高纯度人转铁蛋白的制备 17

二、叶绿体的提取与 4.5S RNA 的制备 17

三、细菌质粒 DNA 的提取 17

思考题 18

参考文献 18

思考题 34

参考文献 35

第三章 吸附层析 36

第一节 吸附柱层析 37

一、常用术语 37

二、基本原理 38

三、吸附剂 39

四、洗脱液 42

五、层析柱的制备与层析操作 42

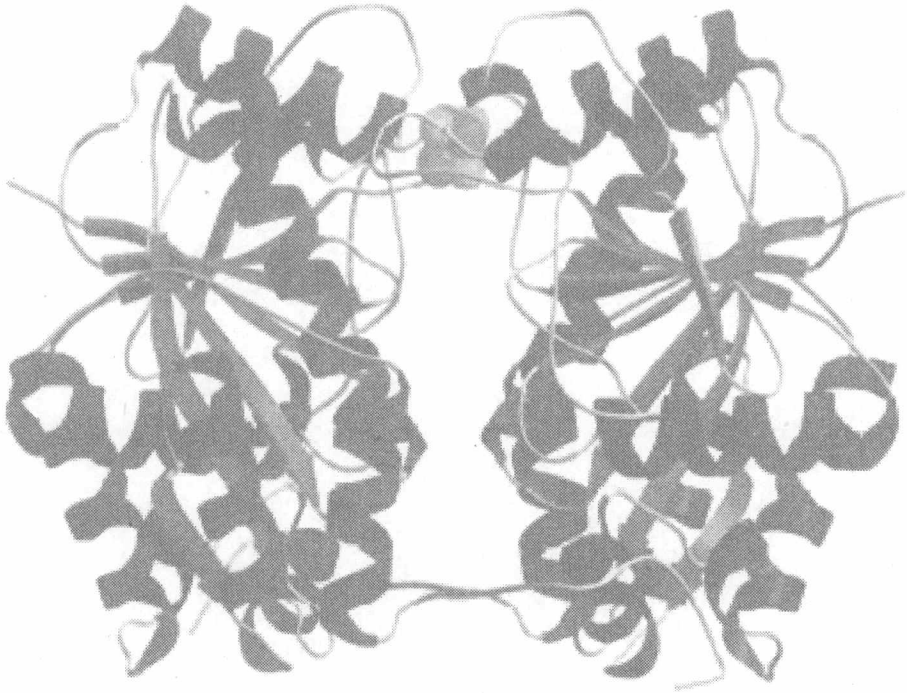
六、应用与实例·····	44	第六章 凝胶过滤 ·····	92
第二节 薄层层析 ·····	46	第一节 凝胶的分类及性质 ·····	92
一、操作及注意事项·····	47	一、葡聚糖凝胶·····	93
二、应用实例·····	52	二、琼脂糖凝胶·····	95
第三节 聚酰胺薄膜层析 ·····	53	三、聚丙烯酰胺凝胶·····	96
一、基本原理·····	53	四、Sephacryl·····	97
二、应用实例·····	54	五、Superdex·····	98
思考题 ·····	57	第二节 基本原理 ·····	98
参考文献 ·····	58	第三节 操作 ·····	101
第四章 疏水层析 ·····	59	一、凝胶的选择和处理·····	101
第一节 基本原理 ·····	59	二、凝胶柱的制备·····	102
一、疏水作用·····	59	三、加样与洗脱·····	103
二、吸附剂·····	60	四、凝胶柱的再生及保存·····	107
第二节 操作与应用 ·····	60	第四节 应用 ·····	107
一、层析柱的制备·····	60	一、脱盐和浓缩·····	107
二、加样与洗脱·····	61	二、分离生命物质·····	108
三、应用实例·····	61	三、去除热源物质·····	109
思考题 ·····	63	四、测定分子质量·····	109
参考文献 ·····	63	五、其他·····	112
第五章 离子交换层析 ·····	64	思考题 ·····	112
第一节 基本原理 ·····	64	参考文献 ·····	112
第二节 离子交换剂的分类及性质 ·····	66	第七章 亲和层析 ·····	113
一、分类·····	66	第一节 基本原理 ·····	113
二、性质·····	72	第二节 操作 ·····	115
第三节 离子交换剂与缓冲液的选择 ·····	79	一、载体的选择·····	115
一、离子交换剂的选择·····	79	二、配体的选择·····	116
二、缓冲液的选择·····	80	三、亲和吸附剂的制备·····	117
三、加样量的确定·····	83	四、特异性吸附·····	119
第四节 操作 ·····	83	五、分离大分子物质·····	121
一、离子交换剂的处理、再生和 转型·····	83	六、亲和层析柱的再生·····	122
二、分离物质的交换·····	84	第三节 提高吸附剂的操作容量 ·····	122
三、物质的洗脱与收集·····	85	一、在配体和载体间引入“手臂” ·····	122
第五节 应用 ·····	87	二、增加配体取代的程度·····	124
一、制备、纯化生命物质·····	87	三、配体与载体衍生物以最少的 键连接·····	124
二、测定蛋白质的等电点·····	90	四、载体多孔性的影响·····	124
思考题 ·····	90	五、其他·····	125
参考文献 ·····	91	第四节 应用实例 ·····	125

第十二章 重组 DNA	208	一、应用实例	249
第一节 重组 DNA 的部件	208	二、测序进展	250
一、工具酶	208	思考题	251
二、载体	211	参考文献	251
三、目的基因	213	第十四章 生物芯片	252
第二节 重组	218	第一节 基因芯片	252
一、黏性末端连接法	218	一、基本原理和 workflow	252
二、平端连接法	220	二、制备及操作	255
三、平黏连接法	220	三、应用实例	260
四、T-A 连接法	221	第二节 蛋白质芯片	265
五、同聚物加尾连接法	221	一、原理及特点	265
六、人工接头连接法	221	二、制备与操作	266
第三节 DNA 扩增	223	三、应用实例	268
一、重组 DNA 导入宿主细胞	223	第三节 芯片实验室	271
二、重组子的筛选与鉴定	225	一、结构与制作	271
三、表达产物的纯化	228	二、应用实例	274
第四节 应用实例	228	思考题	280
一、分离总 RNA 和 mRNA	228	参考文献	280
二、反转录合成第一链 cDNA	228	第十五章 聚合酶链反应	281
三、PCR 扩增及其产物纯化	229	第一节 基本原理	281
四、PCR 产物的克隆	229	一、反应系统	281
五、重组质粒的提取及分析	229	二、反应过程及条件	285
思考题	230	第二节 PCR 的类型	288
参考文献	230	一、普通 PCR	288
第十三章 DNA 序列测定	231	二、原位 PCR	288
第一节 双脱氧链终止法	231	三、反转录 PCR	289
一、基本原理	231	四、反向 PCR	290
二、载体系统	232	五、不对称 PCR	290
三、测序试剂	236	六、巢式 PCR	290
四、测序操作	238	七、彩色 PCR	291
五、变性电泳	241	第三节 应用	291
六、序列读取	242	一、筛选目的基因	291
第二节 PCR 法	243	二、直接测序	292
一、直接测序	243	三、标记 DNA 探针	292
二、循环测序	244	四、寻找新基因	292
第三节 化学降解法	245	五、检测环境中的致病菌与指示菌	292
一、测序原理	245	思考题	293
二、具体操作	246	参考文献	293
第四节 应用与进展	249		

第十六章 细胞凋亡的检测	294	聚丙烯酰胺凝胶的电泳	349
第一节 基本原理与主要特性	294	一、琼脂糖凝胶电泳	350
一、基本原理	295	二、质粒DNA分子质量的测定	352
二、主要特性	304	三、半干式聚丙烯酰胺凝胶电泳	353
第二节 检测凋亡的方法	306	第四节 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	354
一、形态学	306	一、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	354
二、DNA片段	308	二、尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳	356
三、酶活性与组蛋白	310	三、SDS-尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳	357
四、流式细胞仪	312	第五节 聚丙烯酰胺凝胶电聚焦	358
第三节 应用	314	一、基本原理	358
一、抗肿瘤药物的研究和开发	314	二、载体两性电解质的理化性质	359
二、疾病的诊断和治疗	314	三、载体两性电解质的pH范围与用量选择	360
思考题	316	四、测定蛋白质的等电点	360
参考文献	316	第六节 毛细管电泳	364
第十七章 生物传感器	317	一、基本原理与类型	364
第一节 基本原理	317	二、电泳装置	367
一、离子选择电极	318	三、应用实例	369
二、生物活性材料	319	第七节 印迹法(转移电泳)	373
第二节 类型与制备	319	一、基本原理	373
一、类型	319	二、操作及注意事项(以蛋白质为例)	374
二、制备	320	三、应用	376
第三节 应用	321	思考题	377
一、工业方面	321	参考文献	377
二、医学方面	321	第十九章 免疫分析	378
三、环境监测方面	322	第一节 抗体的性质、制备及纯化	378
思考题	323	一、抗体的性质	378
参考文献	323	二、多克隆抗体的制备	379
第十八章 电泳	324	三、单克隆抗体的制备	384
第一节 泳动度概论	325	四、抗体的检测	388
第二节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	327	五、抗体的纯化	391
一、基本原理	327	第二节 抗原抗体反应	393
二、不连续垂直柱状凝胶电泳	333	一、凝集反应	393
三、不连续垂直板凝胶电泳	343		
四、连续的盘状凝胶和垂直板凝胶的电泳	344		
五、线性和阶梯式梯度的柱状及板状凝胶电泳	346		
六、双向电泳	347		
第三节 琼脂糖凝胶和半干式聚丙			

348	二、免疫扩散	396	305	五、检定器	425
350	三、免疫电泳	398	306	第三节 操作	426
352	四、固相免疫吸附(含ELISA)	402	307	一、操作要点	426
	五、免疫微球测定	409	308	二、条件的选择	427
353	思考题	414	309	第四节 定性和定量检测	427
	参考文献	414	309	一、定性检测	427
	第二十章 气相色谱	415	310	二、定量检测	428
354	第一节 基本原理	415	311	第五节 应用	431
356	一、常用术语	415	312	一、分析蛋白质和氨基酸	431
	二、塔板与速率理论	417	313	二、分析核酸	432
357	第二节 气相色谱仪的构造	420	314	三、分析糖类物质	432
358	一、载气流速的控制和测量	420	315	四、分析脂肪酸	433
358	二、进样系统	421	316	五、分析农药	433
	三、恒温室	421	317	思考题	433
359	四、色谱柱	421	318	参考文献	433
	参考文献	421	319		434
	附录	421	320		443
	中英文缩写词	421	321		456
361	421	322		
362	421	323		
363	421	324		
364	421	325		
365	421	326		
366	421	327		
367	421	328		
368	421	329		
369	421	330		
370	421	331		
371	421	332		
372	421	333		
373	421	334		
374	421	335		
375	421	336		
376	421	337		
377	421	338		
378	421	339		
379	421	340		
380	421	341		
381	421	342		
382	421	343		
383	421	344		
384	421	345		
385	421	346		
386	421	347		
387	421	348		
388	421	349		
389	421	350		
390	421	351		
391	421	352		
392	421	353		
393	421	354		

第一编 概 述



翅的昆虫面市,成团。面对台彩,意手面全,乱飞要主展需限中得彭强突奇。幸而有用研,冬半出至郑式养同而蔡固全,突出网突因英从国,高而雷为中却翅半齐,补量者从,素品

第一章 生命大分子物质的制备

生命大分子物质通常是指动物、植物和微生物在进行生长发育、新陈代谢时,所形成的蛋白质(包括酶)和核酸等有机化合物的总称。它不仅是一些生物科学工作者研究、探索的主要对象,而且与广大从事化工、医学和食品等学科的人员也密切相关。在这些方面,特别是科研方面,随着人类基因组的30亿碱基对测序工作的完成,生命科学研究已进入后基因组时代(研究的焦点将从基因的序列转移到功能方面)。为鉴定大量未知蛋白质(酶)的结构和功能,蛋白质研究也将进入一个空前活跃的时期,因此分离纯化和测试分析蛋白质技术显得十分重要。首先,蛋白质与核酸(包括DNA、rRNA、mRNA和tRNA等)相比,蛋白质的结构(包括一级结构和空间结构)更具有奇妙独特的复杂性和艺术性。它是由20多个不同性质(或极性)的氨基酸交互排列而成,不仅潜在的数量多(约100亿个),而且相互间差异大。而核酸的结构,虽然也有异乎寻常的多样性,但是,它是由结构相似、理化性质接近的4个碱基交互排列,且有一定规律可循。相对而言,蛋白质的分离、纯化和鉴定有较大的难度和特殊性。而核酸的分离、制备和鉴定则比较容易,有捷径可走。其次,蛋白质和核酸类物质通常是与自然界存在的诸多不同化合物结合在一起,或者是不同蛋白质、不同核酸自身相互组合在一起出现的,加之它们稳定性较差(如离体后的多数酶)、含量相对偏低,这使提取分离过程变得更加困难、艰巨。第三,提取生命物质的材料五花八门、千变万化,所用的方法通用性较差,尤其是提取分离蛋白质的方法更是如此,这也给制备工作带来了麻烦和困惑。尽管如此错综复杂,却也不是无轨迹可寻。另外,在实践中,确实非常需要一定纯度或较高纯度的生命大分子物质。所以,人们在细心观察、认真归纳制备这些物质的程序时,也发现了不少类似操作和共同点,对制备生命大分子物质很有裨益。因此,本章将以蛋白质和核酸为主线讨论其制备的共有特性和一般过程,其中包括材料的选择与处理、测定方法的确立、有效成分的抽提、粗品的纯化和纯品的鉴定(这部分移至后面的章节介绍)等相关步骤。

第一节 材料的选择与处理

一、材料选择

在进行材料的选择时,常会提及有效成分一词。所谓有效成分是指欲纯化的某种单一的生命大分子物质。而有效成分以外的其他物质则统称杂质。在动物、植物和微生物材料中,有效成分的含量一般较少,如胰脏中胰岛素的含量小于其鲜重的百万分之一。此外,有效成分稳定性较差,大多数对酸、碱、高温和高浓度有机溶剂等因子较敏感,而且容易被微生物分解变质。因此,提取有效成分的成功与否,首先与选用的材料关系密切。选用的材料如果不同,有效成分的含量就不一样;选用的材料即使相同,但是部位、生长期、生长地区或存放时间不同,有效成分的含量也不尽相同。总的来说,材料选择应遵循的原则是:有效成分含量高、稳定性好;来源丰富、保持新鲜;提取容易、工艺简单;杂质有综合

利用价值等。在实践过程中则需抓主要矛盾,全面考虑,综合权衡。例如,上面提到的胰岛素,从含量看,在牛胰脏中比猪的高,但从我国实际出发,全国猪的饲养头数远比牛多,加之牛可拉车、耕田,因此制备胰岛素一般不选用牛胰脏而选用猪胰脏作材料。又例如磷酸单酯酶,就含量而言,虽然在胰脏、肝脏和脾脏中较丰富,但是因其与磷酸二酯酶共存,进行提纯时,这两种酶很难分开,所以实践中常选用含磷酸单酯酶少、几乎不含磷酸二酯酶的前列腺作材料。

二、材料处理

选择到合适的材料后,应及时使用,否则所需的有效成分会部分甚至全部被破坏变性,从而影响收得率。例如,从猪肠黏膜提取肝素时,如果用新鲜材料,每公斤小肠可得肝素钠 5 万~6 万单位。如将材料置 25℃ 以上的室温存放约 1h,肝素钠的含量会显著下降。其原因是,猪小肠内的大量微生物($2.5 \times 10^8 \sim 3 \times 10^8$ 个/g)不停地繁殖(如大肠杆菌约 20min 繁殖一次),有的会产生降解肝素的酶系。若选择的材料难于立即使用时,一般应采用冰冻或干燥等方法处理,同时还应将易于去掉的非需物质(如脂类)除去。因常选用的动物、植物和微生物材料的特性各异,故处理要求也不完全相同。

(一) 动物脏器

1. 冰冻

从刚宰杀之牲畜得到的脏器(脑组织、心脏等)要迅速剥去脂肪和筋皮等结缔组织,立即冲洗干净。若不马上抽提、纯化时,应及时移至-10℃冰库(可短时间保存)或-70℃低温冰箱(数月不变质)贮存。

脏器中常含有较多的脂肪,该物质不仅容易氧化酸败,导致原料变质,而且还会影响纯化操作和制品得率。脱脂操作可在提纯前进行,也可在提纯过程中进行,具体实施应视材料而定。一般脱脂的方法有:人工剥去脏器外的脂肪组织;浸泡在脂溶性的有机溶剂(如丙酮、乙醚)中脱脂;采用快速加热(50℃左右)、快速冷却的方法,使熔化的油滴冷却后凝聚成油块而被除去;利用油脂分离器使油脂与水溶液得以分离。

2. 干燥

对于像脑下垂体一类小组织,可置丙酮液中脱水,干燥后磨粉贮存备用;对于含耐高温有效成分(如肝素)的肠黏膜,可在沸水中蒸煮处理,烘干后能长期保存。

(二) 植物组织

由室内栽培或野外采集的植物材料,若是植物的叶片(如菠菜、芹菜的),需用清水洗净方可使用,或置-30~-4℃冰箱贮藏,可在 10h 内使用;若是植物的种子,则需泡涨或粉碎后才可使用。如材料中含油脂较多时,也要进行脱脂处理。

(三) 微生物

由于微生物具有种类多、繁殖快、培养简便、诱变容易和不受季节影响等优点,因此,它已成为制备生命大分子物质的主要材料之一。当选用的微生物接种于适当的培养液培养一段时间后,用离心法收集到的上清液,即可用于制备胞外酶和某些辅基等有效成分。

而收集到的菌体,经破细胞处理后则可从中提取其他有效成分如胞内酶。前者可置低温下短时间贮存,后者可制成冻干粉,在 4℃ 保存。例如,收集的黄杆菌(*Flavobacterium* sp.) P3-2 细胞,用 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.5)洗两次,进行冻干处理可得到红棕色的干粉。将其置 4℃ 保存三个月,检测降解对硫磷水解酶的活力时,发现无明显变化。

第二节 测定方法的确立

一、目的与要求

当纯化的对象即某一有效成分选定之后,首先碰到的问题是,此物质在哪些材料中含有? 哪些材料中含量较丰富? 其次是在从选定的材料提纯此物质的过程中,杂质是否逐渐减少,纯度是否逐渐增加? 也就是说,所用的纯化方案是基本合理或部分合理,还是根本不妥? 要回答这些问题,就必须确立一种专一、灵敏和简便快速的测定方法。不然,很难对其做出准确、定量的判断。

第一节提到,有效成分在原材料中含量较低。这一事实决定了抽提液和纯化的前一阶段溶液中有效成分的比活性较小,加之此时测定的样品很多(每一步骤都须测定),因而确立的测定方法应简单、灵敏、省时、快速,除此之外,还要有较好的专一性,否则,所测得的结果误差大,不可靠。比如在从原料中纯化某一酶蛋白时,测定其含量的依据常常是在酶与底物反应后,以产物形成或底物降低的数量来表示的。若选择的底物是非专一性的,或者选择的产物不是待测酶特异催化形成的,这样测出的数值就包含有原料中杂质所消耗的底物或形成的产物,影响了酶活性的真实性。

二、常用的测定方法

(一) 光谱法

由于不同生命大分子物质与相应波长的光会发生特定的作用,而依据作用结果即可推断出被测物质的含量和部分理化性质。人们称这类测定方法为光谱法。该法通常包括紫外光谱法、可见光光谱法、荧光光谱法和浊度法等方法。紫外光谱法是利用某些生物大分子物质具有吸收紫外光的性质而建立的一种方法;可见光光谱法是利用生命大分子物质的一些特殊结构先与相关试剂反应生成不同颜色后,借助可见光检测物质而建立的一种方法;荧光光谱法是利用有些生命大分子物质自身可以吸收特定光波的能量后,依赖发出荧光的特性而建立的一种方法;浊度法是利用测定不同浓度的稀悬浮液,在未被吸收的光波长条件下,测定其表观消光值而建立的一种方法。

将待测物(如核酸、蛋白质)配制成一定浓度的溶液后,注入石英杯,移至相应波长的分光光度计中,即可从测定的消光值换算出待测物的含量。

1. 紫外光谱法

1) 测定核酸含量 构成核酸的碱基组分是分光光度计测定核酸含量的依据。在波长 260nm 测定过程中,DNA 或 RNA 溶液浓度的增高或降低,会使其消光值(A_{260})随之发生增高或降低变化,二者之间呈正比关系。通常 1 个 A_{260} 值分别相当于 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 双链