

目 录

第一编 概 论

第一章 生命大分子物质的制备.....	1
第一节 材料的选择与处理.....	2
一、材料的选择	2
二、材料的处理	2
第二节 确立测定方法.....	4
一、目的与要求	4
二、常用的测定方法	5
第三节 细胞的破碎.....	6
一、机械破碎	6
二、溶胀和自溶	7
三、化学处理	8
四、生物酶降解	8
第四节 抽提.....	9
一、抽提的含义	9
二、抽提有效成分的影响因子	9
第五节 浓缩	14
一、沉淀法	14
二、吸附法	14
三、超过滤法	14
四、透析浓缩法	14
五、减压蒸馏浓缩法	15

六、冰冻干燥法	15
第六节 纯化方案的设计与评价	16
一、纯化方案的设计	17
二、纯化方案的评价	17
第七节 有效成分纯度和性质的分析	20
第八节 实例	21
一、制备高纯度人转铁蛋白的快速方法	21
二、叶绿体的提取与 4.5SRNA 的制备	21
三、细菌质粒 DNA 的提取	22
思考题	22

第二编 纯化方法

第二章 沉淀法	24
第一节 基本原理	24
第二节 沉淀的类型与操作	25
一、盐析法	25
二、有机溶剂沉淀法	33
三、蛋白质沉淀剂	35
四、聚乙烯醇沉淀作用	36
五、选择性沉淀法	36
六、结晶	37
第三节 实例	38
思考题	39
第三章 吸附层析	40
第一节 吸附柱层析	42
一、常用术语	42
二、基本原理	44

三、吸附剂	44
四、洗脱剂	48
五、层析柱的制备与层析操作	49
六、应用与实例	52
第二节 薄层层析	55
一、操作及注意事项	57
二、实例	63
第三节 聚酰胺薄膜层析	68
一、基本原理	69
二、应用	70
思考题	76
 第四章 离子交换层析	 78
第一节 基本原理	78
第二节 离子交换剂的分类及性质	81
一、分类	82
二、性质	86
第三节 离子交换剂与缓冲液的选择	96
一、离子交换剂的选择	96
二、缓冲液的选择	99
第四节 操作	99
一、离子交换剂的处理、再生和转型	99
二、分离物质的交换	101
三、物质的洗脱与收集	102
第五节 应用	105
一、制备、纯化生命物质	105
二、测定蛋白质的等电点	110
思考题	111

第五章 凝胶过滤	113
第一节 凝胶的分类及性质	113
一、葡聚糖凝胶	113
二、琼脂糖凝胶	117
三、聚丙烯酰胺凝胶	121
四、Sephacryl	122
第二节 基本原理	123
第三节 操作	127
一、凝胶的选择和处理	127
二、凝胶柱的制备	129
三、加样与洗脱	130
四、凝胶柱的再生及保存	135
第四节 应用	138
一、脱盐和浓缩	138
二、分离生命物质	138
三、去热源物质	139
四、测定分子量	140
五、其它	145
思考题	146
 第六章 亲和层析	 147
第一节 基本原理	148
第二节 操作	151
一、基质的选择	151
二、配体的选择	152
三、亲和吸附剂的制备	153
四、特异吸附	158
五、分离大分子物质	160
六、亲和层析柱的再生	162

第三节 提高吸附剂的操作容量.....	162
一、在配体和基质之间引入“手臂”(arms)	162
二、增加配体取代的程度	164
三、配体与基质以最少的键连接	164
四、基质多孔性的影响	166
五、其它	167
第四节 应用.....	167
一、纯化大分子物质	167
二、研究酶的结构与功能	172
思考题.....	173
 第七章 聚焦层析.....	174
第一节 基本原理.....	174
一、多缓冲剂和多缓冲交换剂	174
二、聚焦层析原理	176
第二节 操作.....	179
一、多缓冲剂的选择	181
二、多缓冲交换剂用量的确定	181
三、多缓冲交换剂的处理	181
四、样品的准备	183
五、上样和洗脱	183
六、样品中多缓冲剂的去除	184
第三节 应用.....	184
一、分离模型蛋白质	185
二、分离复杂的物质	186
三、鉴定某些酶的性质	188
思考题.....	189
 第八章 气相色谱.....	190

第一节 基本原理.....	191
一、常用术语	191
二、原理	193
第二节 气相色谱仪的构造	195
一、气源、载气流速的控制和测量	196
二、进样系统	197
三、恒温室	198
四、色谱柱	198
五、检定器	204
第三节 操作.....	206
一、操作要点	206
二、条件的选择	207
第四节 定性和定量分析.....	207
一、定性分析	207
二、定量分析	209
第五节 应用.....	214
一、分析蛋白质和氨基酸	215
二、分析核酸	215
三、分析糖类物质	217
四、分析脂肪酸	217
五、分析农药	218
思考题.....	218
 第九章 高效液相色谱.....	 219
第一节 基本原理.....	219
第二节 应用.....	223
一、定性和定量分析	224
二、测定酶活性	225
三、测定蛋白质分子量	226

四、分离核酸和蛋白质	228
五、附表:部分色谱柱的性能及有关参数	230
思考题	235
第十章 固定化酶与微生物	236
第一节 制备方法	237
一、固定化酶	237
二、固定化微生物	241
第二节 制品的性质	242
一、酶的相对活力	242
二、活力曲线与最适 pH	245
三、稳定性	249
四、米氏常数	251
五、其它	252
第三节 应用	253
一、工业方面	253
二、医学方面	255
三、生化分析方面	256
四、应用实例	259
思考题	262

第三编 鉴定方法

第十一章 生物传感器	264
第一节 基本原理	265
一、离子选择电极	265
二、生物活性材料	267
第二节 类型与制备	268
一、类型	268

二、制备	269
第三节 应用	270
一、工业方面	270
二、医学方面	271
三、环境监测方面	272
思考题	274
 第十二章 电泳	275
第一节 基本原理	276
第二节 纸电泳	279
一、材料准备	280
二、点样	282
三、电泳	284
四、烘干	284
五、显色	284
六、定量测定	284
第三节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	287
一、基本原理	288
二、操作	295
第四节 琼脂电泳	321
一、基本原理	321
二、操作	322
三、应用实例	324
第五节 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	324
一、基本原理	325
二、操作	326
第六节 聚丙烯酰胺凝胶电聚焦	327
一、基本原理	328
二、两性电解质的理化性质	329

三、两性电解质的 pH 范围与用量的选择	330
四、测定蛋白质等电点的操作	331
第七节 印迹法(转移电泳)	335
一、基本原理	336
二、操作及注意事项	337
三、应用	340
思考题	342
 第十三章 免疫分析	344
第一节 抗体的性质、制备及纯化	344
一、抗体的性质	344
二、多克隆抗体的制备	345
三、单克隆抗体的制备	353
四、抗体的检测	358
五、抗体的纯化	362
第二节 抗原抗体反应	366
一、标记	366
二、分析方法	373
思考题	385
 第十四章 聚合酶链式反应	388
第一节 原理	388
一、反应物与最适条件	389
二、PCR 原理	391
第二节 操作	393
一、试剂的配制	393
二、步骤	394
第三节 应用	396
一、检测基因的分离和表达	396

二、检测癌症	397
思考题	397
附录	399
一、常用数据	399
二、常用缓冲液的配制	414
参考文献	423

第一编 概 论

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、植物和微生物进行新陈代谢时所产生的蛋白质（包括酶）和核酸等有机化合物。它不仅是生物科学工作者研究的重要对象，而且与化学、医学和食品等工业部门有密切关系。在这些方面，特别是科研和医学方面，当用其探讨结构与功能、防治某些疾病时，常常需要一些纯的和比较纯的生命大分子物质，如 γ -球蛋白、尿激酶、脱氧核糖核酸（DNA）等等。然而，这类物质却往往与自然界存在的成百上千种不同化合物结合在一起，或者自身之间相互组合在一起，离体后稳定性较差、含量偏低，加之提取的材料五花八门、纷繁复杂，因此在进行纯化实践中所选用的方法也自然（或多数）是通用性差、多种多样的。尽管如此，制备生命大分子物质的基本程序却是大体相似的。本章将侧重以蛋白质为例讨论其制备的一般过程，即材料的选择与处理；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）等步骤。

第一节 材料的选择与处理

一、材料的选择

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它物质则统称杂质。在动、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；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；易被微生物分解变质。因此，提取有效成分的成功与否，和选用的材料关系密切。选用的材料不同，有效成分的含量就不同；选用的材料即使相同，但是，部位或生长期不同，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，有效成分含量多、稳定性好；来源丰富、保持新鲜；提取工艺简单；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，在牛的胰脏中比猪的高，但从我国的实际看，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都选用猪胰脏作材料。又例如磷酸单酯酶，从含量看，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，但几乎不含磷酸二酯酶的前列腺作材料。

二、材料的处理

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，从而影响收得率。例如，从猪肠粘膜提取肝素时，如果用新鲜材料，每公斤小肠可得肝素钠 5~6 万单位；如将材料置 25℃ 以上的室温存放约一小时，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（2500~3000 万/克）不停地繁殖（如大肠杆菌约 20 分钟繁殖一次），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。因常用的动物、植物和微生物材料的特点各异，所以处理的要求也就不同。

1. 动物脏器

(1) 冰冻：从刚宰杀之牲畜得到的脏器要迅速剥去脂肪和筋皮等结缔组织，冲洗干净，若不马上抽提、纯化时，应在很短时间内（ $\leq 25^{\circ}\text{C}$ 时）置 -10°C 冰库（可短期保存）或 -70°C 低温冰箱（数月不变质）贮存。

脏器中常含有较多的脂肪，该物不仅容易氧化酸败，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，具体实施须视材料而定。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°C 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）的肠粘膜，可在沸水中蒸煮处理，烘干后能长期保存。

2. 植物组织

由室内栽培或野外采集的植物材料，若是叶片（如菠菜、芹菜的叶子），用水洗净即可使用，或在 10 小时内置 $-4\sim-30^{\circ}\text{C}$ 冰箱贮藏备用；若是植物种子，则须泡胀或粉碎才可使用。如材料含油脂较多时，也要进行脱脂处理。

3. 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。当选用的微生物菌种接入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它有效成分。前者可置低温下短时间贮存，后者可制成冻干粉，在4℃保存（数月不会变质）。例如收集的黄杆菌（*Flavobacterium sp.*）P3-2 细胞，用 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液在 4℃ 洗涤两次，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 确立测定方法

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，纯度是否逐渐增加？也就是说，所用的纯化方案是否合适？要回答这些问题就必须确立专一、准确、灵敏和简便的测定方法。

上节提到，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（每一步骤都需测定），因而确立的测定方法应简单、灵敏、花时间少。此外，确立的方法要专一性强。否则，所测得的结果误差大。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以酶与底物反应后，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，影响了酶活力的真实性。

二、常用的测定方法

1. 光谱法

此方法所用的测定样品量较少，但常常能产生比较高的消光值，且操作简单，反应迅速、灵敏，结果也较准确。因此广泛应用于蛋白质的含量测定。

(1) 吸收光谱法

当一种酶反应的底物或产物有一个明显的吸收光谱时，可借助测定发色团的产生和消失来确定酶存在的数量。

(2) 荧光法

荧光分析法的精确性、重复性和灵敏度比吸收光谱法好。当分析物含量低、用吸收光谱法不能检测时，改用荧光分析法却能得到满意结果。例如 NAD（菸酰胺腺嘌呤二核苷酸）和 NADP（菸酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸）的联锁反应是由于 NADH_2 和 NADPH_2 发荧光，因此它们可用于偶联 NADH_2 （或 NADPH_2 ）的氧化或 NAD（或 NADP）的还原反应系统进行荧光测定。

(3) 浊度法

极稀的悬浮液可采用此法测定，即测定悬浮液在不被吸收的波长下表观的消光值。例如刀豆球蛋白 A（Con·A）的活力测定方法之一就是采用此法（ $A_{420\text{nm}}$ ）。此法也可用于测定培养液中细菌生长的浓度（ $A_{600\text{nm}}$ ）。

2. 电化学法

有些反应过程会放出质子氢（ H^+ ），可用灵敏的 pH 计或 NaOH 溶液滴定等方法追踪其变化，从而计算出欲测物的含量或活力。例如葡萄糖氧化酶能催化葡萄糖氧化成葡萄糖酸，用 NaOH 溶液滴定该酸的含量，便可求出葡萄糖氧化酶的活力。

3. 生物活性检测法

大多数生命物质，尤其是一些激素类物质，当把它们注射入动物的特定器官时，所属机体将发生相应的变化，并且二者间有

一定的相关性。根据这一性质设计的方法，即可对生命活性物质进行检测。例如，人绒毛膜促性腺激素（HCG）能使小鼠子宫加速增殖，所以通过检测小鼠子宫的变化，就可推测出 HCG 的生物活性。

4. 免疫分析法

采用抗体与抗原之间发生的特异反应，并结合放射性同位素标记或酶标记，就可对有关物质进行灵敏的定性或/和定量分析（详见第十三章）。

5. 生物传感器

用生物传感器中的敏感膜与待测溶液中的某一物质进行反应，即可通过显示器反映出有效成分的数量（详见第十一章）。

第三节 细胞的破碎

细胞是生物体的结构和功能的基本单位。就真核生物而言，细胞除有细胞膜、细胞质和细胞核外，还有线粒体、质体等细胞器。通常人们所需的物质有些分泌于细胞外，如淀粉酶和蛋白酶等是分泌在胞外的培养液中，用适当的溶剂可直接提取；有些则存在于细胞内。存在于细胞内的酶又有游离酶和结合酶之分，前者游离在细胞质中，后者则与细胞器紧密结合（如氧化还原酶和有机磷水解酶等），而欲提取存在于细胞内的物质时，必须把细胞破碎，个别的例外，如从黄杆菌 P3-2 提取一种水解酶时，可在不破细胞的情况下，用含 0.15mol/L MgCl_2 的 Tris/HCl 缓冲液进行抽提。一般动物脏器的细胞膜较脆弱极易破损，往往在组织绞碎或提取时就破坏了。而植物和微生物的细胞壁较牢固，需要在提取前进行专门的破细胞操作。

一、机械破碎

1. 研磨法

剪碎的动物组织如鼠肝、兔肝等置研钵中，用研磨棒研碎。为了提高研磨效果，可加入一定量的石英砂（ $45\sim 50\mu$ ）。用匀浆器处理，也能把动物细胞破碎。此法较温和，适宜实验室应用。但加石英砂时，要注意其对有效成分的吸附作用。如系大规模生产时，可用电动研磨法。细菌和植物组织的细胞破碎均可用此法。

2. 组织捣碎器法

这是一种剧烈的破碎细胞方法。捣碎器（转速 $8000\sim 10000\text{r/min}$ ）处理 $30\sim 45$ 秒，植物和动物细胞能完全破碎。如用其破碎酵母菌和细菌的细胞时，就须加入石英砂才有效。但是在捣碎期间必须保持低温，以防温度升高引起有效成分变性。因此捣碎的时间不易太长。

3. 超声波法

它是借助声波的振动力破碎细胞壁和细胞器的有效方法。细菌和酵母菌悬液用超声波处理时，时间宜长点。有些菌体破碎要 $5\sim 10$ 分钟，或更长。如果在细胞悬浮液中加石英砂则可缩短时间。为了防止电器长时间运转产生过多的热量，常采用间歇处理和降低温度的方法进行。

4. 压榨法

此法是一种温和、彻底破碎细胞的方法。用 $1.77\times 10^8\sim 3.54\times 10^8\text{Pa}$ 的压力迫使几十毫升细胞悬液通过一个小孔（ $<$ 细胞直径的孔），致使其被挤破、压碎。

5. 冻融法

将细胞置低温下冰冻一定时间，然后取出置室温下（或 40°C 左右）迅速融化。如此反复冻融多次，细胞可在形成冰粒和增高剩余胞液盐浓度的同时，发生溶胀、破碎。

二、溶胀和自溶

1. 溶胀

细胞膜为天然的半透膜，在低渗溶液如低浓度的稀盐溶液中，