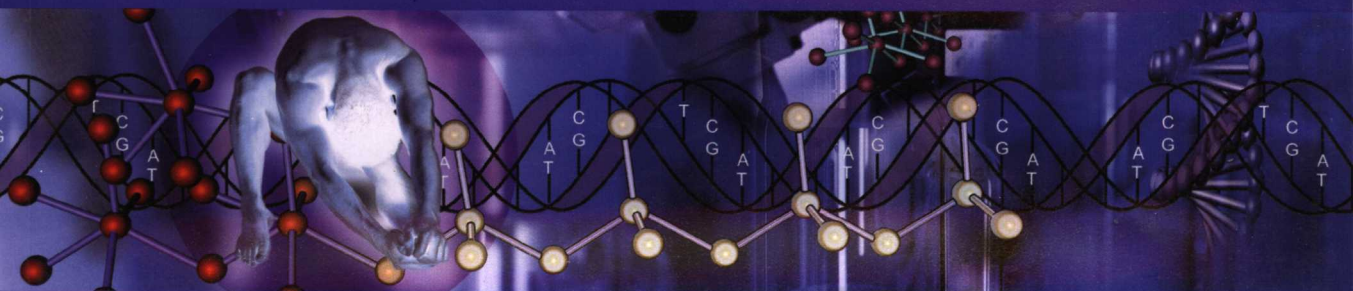




# 医学分子生物学 实验指导

主编 张吉林 宋玉国 主审 罗速



YIXUE FENZI SHENGWUXUE  
SHIYAN ZHIDAO



中国医药科技出版社

# 医学分子生物学实验指导

主 编 张吉林 宋玉国  
主 审 罗 速

中国医药科技出版社

## 内 容 提 要

本书介绍了分子生物学技术的基础理论、医学分子生物学实验的基本方法及其在科学研究中的应用。主要内容有核酸的分离制备、蛋白质的分离纯化、电泳技术、核酸分子杂交、放射自显影术、PCR 技术、生物芯片技术、流式细胞术的基础理论和实验技术。

本书主要读者对象为医学院校本科、七年制学生,也可作为硕士研究生、相关学科进修生和教师的参考书。

### 图书在版编目 (CIP) 数据

医学分子生物学实验指导/张吉林,宋玉国主编. —北京:中国医药科技出版社,2005.8

ISBN 7-5067-3231-9

I. 医… II. ①张…②宋… III. 医药学:分子生物学—实验 IV. Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 086597 号

美术编辑 陈君杞  
责任校对 张学军  
版式设计 郭小平

出版 中国医药科技出版社  
地址 北京市海淀区文慧园北路甲 22 号  
邮编 100088  
电话 010-62244206  
网址 www.mpsky.com.cn  
规格 787×1092mm<sup>1</sup>/<sub>16</sub>  
印张 13<sup>3</sup>/<sub>4</sub>  
字数 275 千字  
印数 1-4000  
版次 2005 年 9 月第 1 版  
印次 2005 年 9 月第 1 次印刷  
印刷 廊坊市海翔印刷有限公司  
经销 全国各地新华书店  
书号 ISBN 7-5067-3231-9/G·0450  
定价 22.00 元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

# 编 委 会

主 编	张吉林	宋玉国		
副主编	项小丰	王冰梅	庄文越	曲 萌
主 审	罗 速			
编 者	(以姓氏笔画为序)			
	王冰梅	王雪松	庄文越	李正祎
	曲 萌	刘 燕	宋玉国	张吉林
	项小丰	黄建文	董志恒	

## 序

21世纪是“生命科学的世纪”。尤其，当生命科学取得重大突破和巨大成就时，这不但使分子生物学这门新兴学科得到前所未有的快速发展，也使它在生命科学中的地位愈发凸显出来。同时，分子生物学作为最具活力的科学涉足于其他学科领域，也为如物理学、数学、化学、信息科学、材料科学、航天科学等提出新问题、新思路和新挑战；也推动着医学诸分支领域研究的不断深入。我们必须承认分子生物学已成为生命科学的带头学科之一，其技术路线与方法更成熟，新技术研究更活跃，正在成为许多学科发展的动力与支撑。

在“人类基因组计划”参加国中，中国是惟一的发展中国家，并且是在该计划启动10年后（1999年）加入到研究行列，仅占1%的份额，说明我们在国际竞争中不占明显优势。随着我国融入国际经济活动的频繁与深入，科学技术上的国际竞争也将日趋激烈，竞争的焦点将是人才的竞争。高等教育必须努力培养有竞争意识和创造性能力的拔尖人才，具有综合素质的优秀人才以及高素质应用型和复合型人才。高等学校要完成人才培养目标，提高教学质量，必须着力进行人才培养模式、教学内容、课程体系、教学方法等一系列的教学改革，也必须花大力气搞好教学基本建设，而教材建设是其重要组成部分。教材是教师教学经验和学科理论与技术等融合的结晶，它凝聚着教师教学的心血，是教学和科研水平的重要体现。它承载着人才培养最根本的知识与信息，是教师进行教学的基本工具。教材建设是直接关系到提高教学质量的基本环节，更是保证人才培养质量的重要保障。

难能可贵的是，《医学分子生物学实验指导》突破了已往实验类教材编写的模式，体例框架结构设计新颖，涵盖分子生物学技术的内容较为丰富，引进近年来的新技术，参考文献与技术参数详实，资料时限新。根据医学培养人才的特点，将知识掌握要点与技术操作技巧有机衔接，形成该教材的编写特色与风格。为其他实验类教材的编写提供了有益的尝试与经验，也为教材建设质量的提高打下良好基础。

《医学分子生物学实验指导》既注重基本理论，又充分考虑到在医学应用中的实际问题；既注重技术基本原理，又恰当地注意最新技术的引入；既注重课堂教学的延伸，又引导学生在实践中不断提出问题；既注重学生实践能力的训练，又为培养学生的创造意识与能力提高提供了较大的空间。

任何一门学科都处于不断地发展中，《医学分子生物学实验指导》也必将在教学实践中得到不断地充实与完善，能为培养合格的医学人才做出无愧于教学的努力更将是教师毕生的实践。



2005年3月

# 前 言

分子生物学以实验技术为主体，是生命科学发展中最重要的前沿学科。分子生物学实验技术正深刻地影响着医学的各个分支领域。因此，掌握分子生物学技术的基础理论和实验基本方法对医学生而言十分重要。

编写一本适合医学生使用的实验教材是我们面临的新课题。本书是在实验指导讲义（供北华大学医学、检验、预防、药学等专业科生使用）的基础上，增加了分子生物学的相关理论与技术，如流式细胞术的原理与作用、STR的检测方法、DNA多态性分析、流式细胞术检测细胞周期及DNA倍体分析等，经修订和改编而形成的。这本《医学分子生物学实验指导》主要适用于检验医学的临床医学本科生，但其中一些综合性实验对临床检验诊断学硕士研究生及从事分子生物学方面研究的教科研人员来讲，也可作为分子生物学实验技术的教学参考书。

本书编写的宗旨是简明、实用。全书体例框架分三大模块。第一模块是扼要地介绍分子生物学技术的基础理论。主要包括八大技术：核酸分离与纯化、蛋白质分离与纯化、电泳、核酸分子杂交、放射性自显影、PCR、生物芯片及流式细胞术。第二模块是分子生物学实验的基本方法。主要编写了分子生物学的基本实验和常用方法。为加强学生的动手能力，这部分详细地介绍了实验原理、试剂的配制、操作步骤及所需仪器和材料等。第三模块是附录部分。主要内容包括：分子生物学实验中常用试剂的配制方法及常用资料和参数等。此外，还有附录中提供了分子生物学理论与实验的重要知识点，这将有助于学生对分子生物学技术有一个相对全面的了解，以便加深理论与实践的结合。相信本书定能成为医学本科初学者的入门教材，并能为以后的深造学习奠定实验基础，同时也能成为广大医学生了解分子生物学的良师益友。

本书编者主要是本教研室（北华大学分子生物学教研室）工作在教学和科研第一线的中青年教师。他们努力工作、认真编写、倾注了大量的心血才完成了各自承提的任务，在此表示衷心的感谢！

由于我们的知识水平有限，书中难免有错误，不妥和疏漏之处，恳请同仁及广大读者在使用的过程中予以指正赐教。

张吉林  
2005年3月

# 目 录

## 第一部分 分子生物学技术的基础理论

<b>第一章 核酸的分离制备</b> .....	( 1 )
一、核酸分离制备的总原则.....	( 1 )
二、核酸提取的主要步骤.....	( 1 )
三、制备核酸时应注意的问题.....	( 1 )
四、核酸提取.....	( 2 )
五、核酸沉淀.....	( 3 )
六、核酸定量.....	( 4 )
七、核酸保存.....	( 4 )
<b>第二章 蛋白质的分离纯化</b> .....	( 5 )
一、蛋白质分离纯化的一般原则.....	( 5 )
二、蛋白质分离纯化的主要方法.....	( 6 )
三、蛋白质纯度鉴定与含量测定.....	( 9 )
<b>第三章 电泳技术</b> .....	( 10 )
一、基本原理.....	( 10 )
二、影响电泳迁移率的因素.....	( 10 )
三、核酸电泳的指示剂与染色剂.....	( 11 )
四、不同波长紫外线对 EB - DNA 复合物的影响 .....	( 12 )
<b>第四章 核酸分子杂交</b> .....	( 13 )
一、基本原理 .....	( 13 )
二、探针的种类 .....	( 13 )
三、探针的标记方法.....	( 14 )
四、核酸分子杂交的基本方法.....	( 15 )
五、常见的放射性核素标记物的比较.....	( 16 )
<b>第五章 放射自显影术</b> .....	( 17 )
一、放射自显影术的基本原理.....	( 17 )
二、放射自显影的特点.....	( 17 )
三、放射自显影的应用.....	( 18 )
<b>第六章 PCR 技术</b> .....	( 19 )
一、PCR 技术的基本原理.....	( 19 )
二、PCR 主要相关技术.....	( 19 )
三、PCR 技术在医学中的主要应用.....	( 21 )

<b>第七章 简介生物芯片技术</b> .....	( 23 )
一、基本概念 .....	( 23 )
二、检测的基本过程 .....	( 23 )
三、生物芯片的类型 .....	( 23 )
四、生物芯片技术在医学领域中的应用 .....	( 25 )
<b>第八章 流式细胞术</b> .....	( 27 )
第一节 流式细胞术的基本原理 .....	( 27 )
第二节 流式细胞仪的分类和基本构造 .....	( 28 )
第三节 流式细胞仪的主要技术指标 .....	( 38 )
第四节 流式细胞仪应用的技术要求 .....	( 39 )
第五节 流式细胞仪在医学研究中的应用 .....	( 46 )

## 第二部分 分子生物学实验的基本方法

实验一 细菌的培养与收集 .....	( 51 )
实验二 质粒 DNA 的提取 .....	( 54 )
实验三 人外周血白细胞 DNA 的提取 .....	( 59 )
实验四 哺乳动物细胞基因组 DNA 的提取 .....	( 62 )
实验五 真核细胞总 RNA 的制备 .....	( 65 )
实验六 真核细胞 mRNA 的提取 .....	( 70 )
实验七 核酸的定量 .....	( 73 )
实验八 DNA 的限制性内切酶消化法 .....	( 76 )
实验九 琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA .....	( 79 )
实验十 聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测 DNA .....	( 81 )
实验十一 STR 的检测方法 .....	( 85 )
实验十二 低熔点琼脂糖凝胶回收 DNA 片段 .....	( 88 )
实验十三 DNA 分子的体外连接 .....	( 90 )
实验十四 感受态细胞的制备及转化 .....	( 93 )
实验十五 重组质粒的筛选 .....	( 97 )
实验十六 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的相对分子质量 .....	( 101 )
实验十七 等电聚焦电泳法测定蛋白质的等电点 .....	( 105 )
实验十八 Western 印迹法检测表达蛋白 .....	( 108 )
实验十九 免疫荧光法检测重组蛋白 .....	( 114 )
实验二十 放射免疫沉淀法检测重组蛋白 .....	( 117 )
实验二十一 RT - PCR - 微孔板杂交 - ELISA 法检测基因表达 .....	( 121 )
实验二十二 DNA 片段的印迹杂交 .....	( 125 )
实验二十三 RNA 片段的印迹杂交 .....	( 130 )
实验二十四 放射性核素 <sup>32</sup> P 随机引物延伸标记法 .....	( 136 )
实验二十五 光敏生物素标记 DNA 法 .....	( 139 )



实验二十六	地高辛标记 DNA 探针	(141)
实验二十七	乙型肝炎病毒的检测方法	(143)
实验二十八	RT-PCR 法检测 HCV RNA	(148)
实验二十九	PCR-SSCP 分析	(152)
实验三十	<i>apoE</i> 多态性分析	(157)
实验三十一	凋亡细胞梯状条带电泳	(161)
实验三十二	流式细胞术检测细胞周期及 DNA 倍体分析	(164)

### 第三部分 附 录

附录一	分子生物学实验中常用参数及试剂的配制	(167)
一、	常见的市售酸碱	(167)
二、	常用的缓冲液	(168)
三、	常用酶的配制	(173)
四、	常用贮存液的配制	(175)
五、	杂交实验中封闭剂的配制与用途	(178)
六、	放射性核素数据	(179)
七、	常用物理系数及分子量标准	(180)
八、	细菌培养基和抗生素	(183)
九、	中国汉族等位基因频率表	(184)
附录二	分子生物学的重要知识点	(188)
一、	名词理解	(188)
二、	简答题	(196)

# 第一部分 分子生物学技术的基础理论

---

## 第一章 核酸的分离制备

核酸的分离提取是分子生物学研究中很重要的基本技术。核酸样品的质量将直接关系到实验的成败。核酸包括 DNA、RNA 两种分子。真核生物的染色质 DNA 为双链线性分子；RNA 为单链线性分子。95% 的真核生物 DNA 存在细胞核中，其余 5% 存在于细胞器中，RNA 分子主要存在细胞质中，其中 rRNA 的数量最多占 80% 以上，其次是 tRNA 及核内小分子 RNA 大约占 5% ~ 20%，而 mRNA 分子只占 1% ~ 5%。原核生物 DNA、质粒及真核细胞器 DNA 为双链或单链环状分子。一般来说，DNA 分子的总长度随着生物的进化程度而增大，而 RNA 的分子量与生物进化无明显关系。

### 一、核酸分离制备的总原则

1. 保证核酸一级结构的完整性。由于遗传信息全部贮存在核酸一级结构之内，所以完整的一级结构是核酸结构与功能研究的前提。一级结构还决定其高级结构的形式及和其他大分子结合的方式。

2. 应排除其他分子的污染，如提取 DNA 分子时应除去 RNA 分子。
3. 其他生物大分子，如蛋白质、多糖和脂类分子的污染应降低到最低程度。
4. 核酸样品中不应存在对酶有抑制作用的有机溶剂和过高浓度的金属离子。

### 二、核酸提取的主要步骤

1. 制备单个细胞并破碎细胞。
2. 消化蛋白质并去除与核酸结合的蛋白质、多糖、脂类等生物大分子。
3. 除去其他不需要的核酸分子。
4. 沉淀核酸去除盐类、有机溶剂等杂质，纯化核酸。

### 三、制备核酸时应注意的问题

1. 应尽量简化操作步骤，缩短提取过程，以便减少各种有害因素对核酸的破坏。
2. 减少化学因素对核酸的降解。为避免过酸、过碱对核酸链中磷酸二酯键的破坏，

所以操作多在 pH 4 ~ 10 条件下进行。

3. 减少物理因素对核酸的降解，如机械切力（强烈的高速震荡或搅拌）、高温、DNA 的反复冻融。

4. 防止核酸的生物降解。当内外环境的各种核酸酶消化核酸链中的磷酸二酯键时，将会直接破坏核酸的一级结构。其中 DNA 酶需要金属二价离子（ $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ ）激活，使用金属二价离子螯合剂（EDTA），基本上可以抑制 DNA 酶的活性。但 RNA 酶分布广泛，极易污染样品，且耐高温、耐酸、耐碱以及不易失活，所以生物降解是 RNA 提取过程中的主要危险因素。

## 四、核酸提取

### （一）DNA 的提取

DNA 提取最常用的是酚/三氯甲烷抽提法。它是利用酚、三氯甲烷对核酸和蛋白质的变性作用具有不同的反应性来分离核酸和蛋白质。其中，酚主要使蛋白质变性或变成不溶性物质，经离心后沉淀；而酚却不能使核酸变性，所以核酸溶解在水相溶液中。另外，三氯甲烷能加速有机相与液相的分层。有时，操作中还可加少量异戊醇，目的是为了减少蛋白质变性操作中产生的气泡。酚/三氯甲烷抽提法的标准程序是：酚抽提一次→酚/三氯甲烷（1:1）抽提一次→三氯甲烷抽提一次。最后用三氯甲烷抽提的目的是为了去除核酸溶液中迹量酚。如果下一步骤中酶反应条件要求严格，最可靠的方法是再用水饱和的乙醚抽提一次，以彻底去除核酸样品中迹量酚与三氯甲烷。然后，在 68℃ 水浴中放置 10min 使迹量乙醚蒸发掉。

### （二）RNA 的提取

#### 1. 创造一个无 RNA 酶的环境

创造一个无 RNA 酶的环境，主要包括两方面的工作：其一，避免外源性 RNA 酶的污染（主要来源于操作者的手、实验器皿和试剂）；其二，尽量抑制内源性 RNA 酶的活力（主要来源于样品的组织细胞）。RNA 酶是一类生物活性非常稳定的酶类。它耐热、耐酸、耐碱。蛋白质变性剂可使其暂时失活，但变性剂去除后又可恢复活性。RNA 酶的活性不需要辅助因子，二价金属离子螯合剂对它的活性无任何影响。因此，在提取 RNA 时应尽量减少 RNA 酶对 RNA 的降解作用。

#### 2. 消除外源性 RNA 酶污染的措施

①在整个操作中操作者应戴口罩和手套。

②操作过程应在洁净的环境中进行。空气中灰尘携带的细菌、霉菌等微生物也是外源性 RNA 酶污染的一条途径。

③玻璃器皿常规洗净后，应用 0.1% DEPC（二乙基焦碳酸盐）浸泡处理，再用双蒸灭菌水漂洗几次，然后高压灭菌去除 DEPC，最后 250℃ 烘烤 4h 以上或 200℃ 干烤过夜。

④塑料器材最好使用灭菌的一次性塑料制品。Eppendorf 管、Tip 头最好用新的，临用前要进行高压灭菌。

⑤所有溶液应加 DEPC 至终浓度为 0.05% ~ 0.1%，室温处理过夜，然后高压处理以

去除残留的 DEPC。

⑥所有化学试剂应为新鲜包装，称量时使用干烤处理的称量勺。所有操作应在冰浴中进行，因为低温条件可减低 RNA 酶的活性。

### 3. 抑制内源性 RNA 酶污染的措施

细胞裂碎的同时 RNA 酶释放出来，这种内源性的 RNA 酶是降解 RNA 的主要危险因素之一。所以原则上要尽可能早地去除细胞内蛋白，加入 RNA 酶抑制剂，力争在提取的起始阶段对 RNA 酶活力进行有效地抑制。常用的抑制剂有：复合硅酸盐、DEPC、肝素、SDS、异硫氰酸胍、盐酸胍等。

## 五、核酸沉淀

沉淀是浓缩核酸最常用的方法。目的是改变核酸的溶解缓冲液及重新调节核酸在溶液中的浓度，以去除溶液中某些盐离子与杂质，在一定程度上纯化核酸。

核酸是多聚阴阳离子的水溶性化合物，它与钠、钾、镁形成的盐在许多种有机溶剂中不溶解，但也不被有机溶剂变性。

### (一) 常用的有机溶剂

1. 乙醇 在适当的盐浓度下，2 倍样本体积的 95% 乙醇可有效沉淀 DNA；2.5 倍样本体积的 95% 乙醇可有效沉淀 RNA。样本中的微量乙醇易蒸发去除，不影响以后的实验。

2. 异丙醇 0.54 ~ 1.0 倍样本体积的异丙醇可选择地沉淀 DNA 和大分子 rRNA 和 mRNA，但对 5sRNA 和 tRNA 及多糖不产生沉淀。选用异丙醇的优点是用量少、速度快，适用于浓度低而体积大的 DNA 样本。其缺点易使盐类与 DNA 共沉淀，沉淀中的异丙醇难以挥发除去，所以常规需要用 70% 的乙醇漂洗 DNA 沉淀数次。

3. 聚乙二醇 (PEG) 可用不同浓度的 PEG 选择沉淀不同分子量的 DNA 片段。PEG 沉淀一般需要加入 0.5mol/L NaCl 或 10mmol/L MgCl<sub>2</sub>。DNA 沉淀中 PEG 去除的最有效方法是用 70% 的乙醇漂洗 2 次。得到的 DNA 可以满足酶切反应和转化实验。

4. 精胺 精胺与 DNA 结合后，使 DNA 在溶液中的结构凝缩而发生沉淀，并可使单核苷酸和蛋白质与 DNA 分开，达到纯化 DNA 的目的。精胺沉淀 DNA 要求是在溶液中无盐或低盐（小于 0.1mol/L）的条件。沉淀中的精胺用 70% 乙醇漂洗或透析法去除。

### (二) 常用的盐类及浓度

表 1-1 核酸沉淀中常用的盐类及浓度

盐类	储存液 (mol/L)	终浓度 (mol/L)
MgCl <sub>2</sub>	1.0	0.01
NaAc	3.0 (pH5.2)	0.3
KAc	3.0 (pH5.2)	0.3
NH <sub>4</sub> Ac	10.0	2.0 ~ 2.5
NaCl	5.0	0.2
LiCl	8.0	0.8

## 六、核酸定量

组成核酸分子的碱基均具有一定的吸收紫外线特征。核酸最大的吸收波长是 260nm, 在波长 260nm 紫外线下, 1 “A” 值的吸光度相当于双链 DNA 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 相当于单链 DNA 或 RNA 浓度为 38 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 相当于寡核苷酸浓度为 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。可用此来计算核酸样本的浓度。

DNA 浓度计算公式: 双链 DNA 浓度  $\mu\text{g}/\mu\text{l} = A_{260} \times 50 \times \text{稀释倍数}/1000$

DNA 纯度的判定:  $A_{260}/A_{280}$  比值应为 1.8, 低于 1.7 表明有蛋白质污染; 高于 1.8 说明有 RNA 尚未除尽, 应再进行酚抽提, 并小心吸取上层水相。

RNA 浓度计算公式: RNA 浓度  $\mu\text{g}/\mu\text{l} = A_{260} \times 38 \times \text{稀释倍数}/1000$

RNA 纯度的判定:  $A_{260}/A_{280}$  比值应为 2.0, 低于 1.7 表明有蛋白质污染。

## 七、核酸保存

对于 DNA 来说, 最好溶于 TE 中 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。其中 EDTA 是通过螯合 2 价离子而抑制 DNA 酶的活性。在 -70 $^{\circ}\text{C}$  能保存 5 年以上。对于哺乳动物细胞 DNA 的长期保存, 可在 DNA 样本中加入 1 滴三氯甲烷, 防止细菌和核酸酶的污染。

对于 RNA 来说, 长期存放在 95% 乙醇中 -70 $^{\circ}\text{C}$  保存非常安全。另一种方法是在 RNA 溶液中加入 1 滴 0.2mol/L VRC (氧钒核糖核苷复合物) 冻存于 -70 $^{\circ}\text{C}$ , VRC 可抑制 RNA 酶对 RNA 的降解。VRC 对 RNA 的大多数实验没有干扰作用。VRC 中的 RNA 样本可在 -70 $^{\circ}\text{C}$  条件, 保存数年。

## 第二章 蛋白质的分离纯化

蛋白质广泛存在于自然界，种类和数量众多，结构和性能各异。因此，分离纯化蛋白质应根据研究目的和要求，采用不同的方法配合完成。

### 一、蛋白质分离纯化的一般原则

#### (一) 材料的选择

首先要了解所提取蛋白质的分布情况，如富集于哪个组织、存在于哪种细胞，然后有针对性地选择方法以便破碎某种组织或细胞。蛋白质含量受性别、年龄、季节、饲养条件及培养条件的影响，例如微生物生长的对数期，酶和核酸的含量较高，可获得较高的产量。动物在饥饿时，脂类和糖类含量相对少些，有利于蛋白质、酶、核酸的分离。最后进行预处理。

注意：所用材料如不能立即进行实验则应冷冻保存，体内易被分解的活性生物分子一般用新鲜材料为宜。

#### (二) 细胞的破碎方法

**1. 机械法** 主要通过机械切力的作用使组织细胞破碎。常用器械有：①高速组织捣碎机。在捣碎中注意低温，筒外可放置冰水浴。操作时，将材料配成稀糊溶液，放置于玻璃筒内约占 1/3 体积，固定筒上盖子，将调速器拨至最慢处，开动马达后，逐步加速到所需速度。一般市售捣碎机转速最高可达 10 000 ~ 20 000r/min。②匀浆器。匀浆是破碎机体软组织最常用的方法之一。其原理是将组织剪切成小块，再加入 3 ~ 5 倍体积的预冷匀浆缓冲液，通过固体剪切力破坏组织和细胞，释放蛋白质进入溶液。市售匀浆器有四大类，刀片式组织破碎匀浆器、内切式组织匀浆器、玻璃匀浆器及用于规模生产的高压匀浆器。实验室常用的是由电力驱动，通过调节速度完成匀浆制备的切片式匀浆器。③研钵研磨。这是破碎单一细胞的有效方法。借助于研磨中磨料和细胞间的剪切及碰撞作用破碎细胞。常用的磨料为沙子、氧化铝等。主要用于细菌、酵母等的破碎。

**2. 物理法** 主要通过各种物理因素的作用使组织细胞破碎。

①反复冻融法。把待破碎样本冷至  $-20 \sim -15^{\circ}\text{C}$  使之冻固，然后缓慢地溶解，如此反复操作，大部分细胞及细胞内的颗粒可被破碎。此方法只适用于提取非常稳定的蛋白质。

②冷热交替法。将待分离的材料投入沸水中，在  $90^{\circ}\text{C}$  维持数分钟，立即置于冰浴中，使之迅速冷却，绝大多数细胞被破坏，从细菌或病毒中提取蛋白和核酸时常使用此法。

③超声波处理法。此法是借助超声波的振动力破碎细胞壁。多用于微生物（细菌和酵母菌）材料。使用时注意降温，防止过热。对超声波敏感的核酸及酶更要慎重使用。

④加压破碎法。此法多用于工业上微生物酶制剂的制备，大约有 90% 的细胞被压碎。

#### 3. 化学及生物化学法

①自溶法。将待破碎的新鲜生物材料存放在一定的 pH 和适当温度下，利用组织中自

身的酶系将细胞破坏，使细胞内含物释放出来。

②酶解法。利用各种水解酶，如溶菌酶、纤维素酶、蜗牛酶和酯酶等，在 37℃，pH 为 8，处理 15 min，可专一地将细菌细胞壁分解，释放细胞内容物，适于多种微生物。

③有机溶剂处理法。有些有机溶剂（苯、甲苯等）和表面活性剂（十二烷基磺酸钠、Triton X-100、去氧胆酸钠）等，可以改变细胞壁或膜的通透性，使内含物有选择性的渗透出来。有利于核酸和蛋白质的分离。

目前已建立了很多破碎细胞，释放细胞内容物的方法。根据作用方式不同一般将其分为机械法、物理法、化学法三大类（表 1-2）。

表 1-2 各种组织细胞破碎方法

	细胞破碎方法	应用
I 机械法	1 匀浆器	机体软组织
	2 捣碎机	动物韧性组织
	3 研磨	细菌、酵母
II 物理法	1 超声法	细胞混悬液
	2 反复冻融法	培养细胞
	3 冷热交替法	细菌、病毒
	4 低渗裂解	红细胞
III 化学法	1 有机溶剂	细菌、酵母
	2 表面活性剂	组织培养细胞
	3 酶解法	细菌、酵母

### （三）粗分

将得到的蛋白质混合液利用简单易处理并快速的方法大致分成几部分，这样可除去大部分杂质。可选用的方法有：①分段盐析；②有机溶剂分级沉淀；③分级离心。

### （四）精制备

根据不同蛋白质性质的差异采用不同的方法，如离子交换层析、凝胶过滤层析、吸附层析、亲和层析、电泳、离心、结晶及免疫的方法来进一步纯化。因为溶液组分的复杂性常常需要选择几种方法相配合才能达到分离纯化的目的。

## 二、蛋白质分离纯化的主要方法

### （一）沉淀法（precipitation）

**1. 盐析法（salt precipitation）** 在溶液中加入中性盐使生物大分子沉淀析出的过程称为盐析。基本原理是蛋白质在高盐溶液中其溶解度随盐浓度的增加而降低。因为高盐溶液可破坏蛋白质胶粒的水化层并中和其电荷而使蛋白质沉淀。不同的蛋白质其盐析的浓度不同。利用这一点可将溶液中混合的各种蛋白质逐个分开。

常用的中性盐有：硫酸铵、硫酸钠、氯化钠。其中最重要的是硫酸铵。它具有几大优点：溶解度大；分离效果好；不易引起变性；价格便宜，废液不污染环境。

**2. 有机溶剂沉淀法** 基本原理是有机溶剂能降低溶液的介电常数，破坏蛋白质胶粒

上的水化层，使蛋白质沉淀析出。

常用的有机溶剂有：乙醇、丙酮、甲醇。此法优点是有机溶剂易蒸发除去，不需脱盐。

注意：常温下高浓度的有机溶剂易引起蛋白质的变性。因此，应在低温低浓度下快速操作避免蛋白质变性。

## (二) 层析法 (chromatography)

**1. 基本原理** 利用不同物质在同一固定相和流动相中的分配系数不同，当这些物质经层析柱时，在两相间反复多次分配，结果可使分配系数只有微小差异的物质也能获得最大的分离效果。

### 2. 分类

①按两相状态：气相层析、液相层析。

②按层析机制：吸附层析、分配层析、离子交换层析、亲和层析、凝胶层析。

③按操作形式：柱层析、薄层层析、纸层析、薄膜层析。

### 3. 常用的层析方法

①凝胶层析 (gel chromatography)。也称分子筛层析、凝胶排阻层析、凝胶过滤。基本原理：利用蛋白质分子量的差异，通过具有分子筛性质的凝胶而被分离。当含有各种物质的样本溶液缓慢流经凝胶柱时，各物质在柱内同时进行着两种不同的运动，即：垂直向下的移动和无定向的扩散运动。直径大于凝胶孔径的分子不能进入凝胶内部，只能沿着凝胶颗粒的间隙流出。而直径小于孔径的分子除了在凝胶颗粒间隙内扩散外，还可进入凝胶颗粒的微孔中，在柱中停留时间较长。

常用凝胶有：葡聚糖凝胶 (商品名 Sephadex)。它是由葡萄糖与交联剂 (环氧氯丙烷) 交联而成。具有三维空间多孔网状结构的干燥颗粒。二者比例和反应条件决定其交联度的大小。交联度用“G”表示：“G”后面的数字是该凝胶颗粒实际吸水值的 10 倍，如 Sephadex G-25 表示 1g 干凝胶吸水量为 2.5g，即定为 G-25。

琼脂糖凝胶 (商品名 Sepharose)。琼脂糖主要是从海洋植物琼脂中提取来的。一般含有多糖、蛋白质和盐，为链状多糖化合物。经化学修饰后熔点降低的琼脂糖叫低熔点琼脂糖。其机械强度无明显变化。主要应用于染色体 DNA 琼脂糖内包埋后，原位进行内切酶酶切、DNA 片段回收及较小 DNA 片段 (10×500bp) 的分离。

聚丙烯酰胺凝胶 (商品名 Bio-p)。由丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺构成。应用于核苷及核苷酸的分离纯化。

凝胶层析：主要应用在蛋白质、氨基酸的分离分析及蛋白质的脱盐、蛋白质的浓缩、蛋白质的分子量测定等实验中。

②离子交换层析 (ion-exchange chromatography)。基本原理：蛋白质分子是两性电解质。在 pI 处，分子的静电荷为零，与交换剂之间无静电相互作用；当 pH > pI 时，带负电，结合于阳离子交换剂上；当 pH < pI 时，带正电，结合于阴离子交换剂上。由于蛋白质的 pI 不同，故在同一 pH 的环境中所带电荷的多少不同，所以与离子交换剂结合的紧密程度也不同。因此，用一系列 pH 递增或递减的缓冲液洗脱；或提高洗脱液的离子强度，这样可将不同的蛋白质逐个从柱上洗脱下来。

③亲和层析 (affinity chromatography)。又称选择层析、功能层析或生物特异吸附层析。



是利用生物分子间所具有的特异性亲和力而设计的一种方法。基本原理是蛋白质等生物大分子能与某些相对应的分子（配体）特异地可逆结合。如：酶与底物、抗原与抗体、激素与受体、酶与抑制剂或效应剂。将配体固定在固相载体上，并装进层析柱中，当样品通过柱时，由于配体与相对应的蛋白质分子间有特异性的亲和作用，通过某种次级键将这种蛋白质分子吸附于柱中（样品中的其他成分不产生这种特异性结合，都直接流出层析柱）。然后，用洗脱剂将柱中的蛋白质洗脱下来。此法的关键是要有一个被分离蛋白质的配体。这种配体还必须以适当的形式连接在固相载体上。常用的固相载体有琼脂糖凝胶、葡聚糖和纤维素等。

亲和层析具有简单、快速、得率多和纯化倍数高等优点，是一种高度专一性分离蛋白质的有效方法。尤其是对分离含量少又不稳定的活性物质极为有效。

### （三）电泳法

蛋白质在高于或低于其等电点的溶液中是带电的，在电场中能向正极或负极移动。这种通过蛋白质在电场中泳动而达到分离各种蛋白质的技术，称为电泳（electrophoresis）法分离蛋白质。根据支持物的不同，有薄膜电泳、凝胶电泳等。薄膜电泳是将蛋白质溶液点样于薄膜上，薄膜两端分别加正负电极，此时带正电荷的蛋白质向负极泳动；带负电荷的蛋白质向正极泳动；带电多，分子量小的蛋白质泳动速率快；带电少，分子量大的则泳动慢，因此可将不同大小的蛋白质分离。凝胶电泳的支持物为琼脂糖或聚丙烯酰胺。凝胶置于玻璃板上或玻璃管中，两端加上正负电极，蛋白质即在凝胶中泳动。电泳结束后，用蛋白质显色剂显色，即可看到一条条已被分离的蛋白质色带。

### （四）透析法

利用透析袋把大分子量蛋白质与小分子量化合物分开的方法叫透析（dialysis）。透析袋是具有超小微孔的膜，如：用醋酸纤维素膜制成。微孔一般只允许分子量为 10 000 以下的化合物通过。蛋白质是高分子化合物故留在袋内。当透析袋内盛有蛋白质溶液，再置于水中，则小分子物质如硫酸铵、氯化钠等即透过薄膜。不断更换袋外的水，可把袋内小分子物质全部去尽。如果袋外放吸水剂，如聚乙二醇，则袋内水分会同小分子物质透出袋外，袋内蛋白质溶液尚可达到浓缩的目的。

透析已成为生物化学与分子生物学实验室最简便，最常用的分离纯化技术之一。一般在除盐、有机溶剂、生物小分子杂质及浓缩样品时都要用到透析技术。

### （五）超速离心法

超速离心法（ultracentrifugation）既用来分离纯化蛋白质也可用作测定蛋白质的分子量。蛋白质在高达 50 万 g（g 为 gravity，即地心引力）的重力作用下，蛋白质在溶液中逐渐沉淀，直至其浮力与离心所产生的力相等，此时沉降停止。不同蛋白质其密度与形态各不相同，因此，用上述方法可将它们分开。蛋白质在离心场中的沉降用沉降系数（sedimentation coefficient, S）表示。S 使用 Svedberg 单位（1S =  $10^{-13}$ s）。

### （六）超滤

超过滤即超滤。超滤是一种加压膜分离技术，是在一定的压力下，使小分子溶质和溶剂穿过一定孔径的特制薄膜，而大分子溶质不能透过，留在膜的一边，从而使大分子物质得到了部分纯化。超滤根据所加的操作压力和所用膜的平均孔径的不同，可分为微孔过