

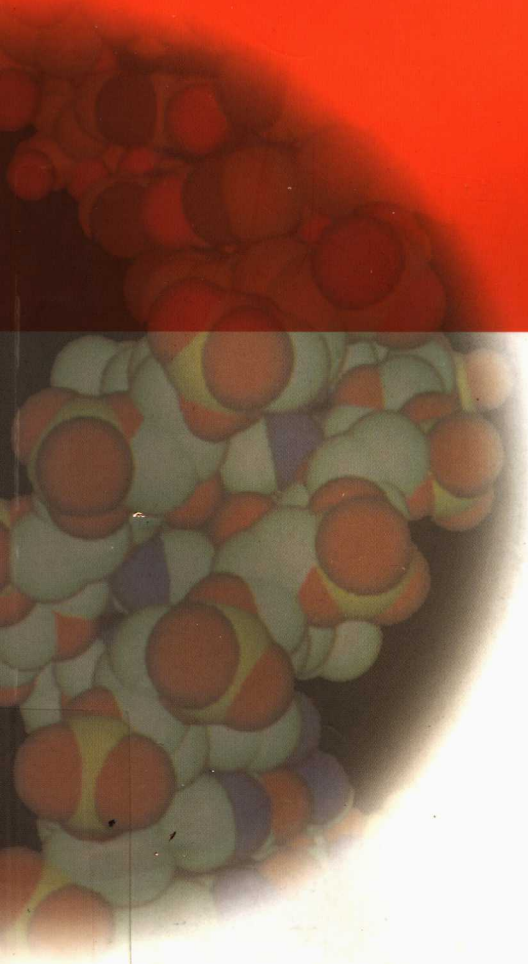


北京市高等教育精品教材立项项目

生物化学实验原理和方法

(第二版)

萧能愿 余瑞元 袁明秀 陈丽蓉 合编
陈雅蕙 陈来同 胡晓倩 周先碗



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

北京市高等教育精品教材立项项目
高等院校生命科学实验系列教材

生物化学实验原理和方法

(第二版)

萧能愿 余瑞元 袁明秀 陈丽蓉 合编
陈雅蕙 陈来同 胡晓倩 周先碗
(排名不分先后)



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验原理和方法/陈雅蕙等编. —2版. —北京:北京大学出版社,2005.8

(北京市高等教育精品教材立项项目)

(高等院校生命科学实验系列教材)

ISBN 7-301-07854-4

I. 生… II. 陈… III. 生物化学—实验—高等学校—教材 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 092687 号

书 名: 生物化学实验原理和方法(第二版)

著作责任者: 陈雅蕙 等编

责任编辑: 郑月娥

标准书号: ISBN 7-301-07854-4/Q·0098

出版发行: 北京大学出版社

地 址: 北京市海淀区成府路 205 号 100871

网 址: <http://cbs.pku.edu.cn>

电子邮箱: zpup@pup.pku.edu.cn

电 话: 邮购部 62752015 发行部 62750672 编辑部 62752038

排 版 者: 兴盛达打字服务社 82715400

印 刷 者: 北京大学印刷厂

经 销 者: 新华书店

787 毫米×1092 毫米 16 开本 32 印张 800 千字

2005 年 8 月第 2 版 2005 年 8 月第 1 次印刷

定 价: 39.00 元

未经许可,不得以任何方式复制或抄袭本书之部分或全部内容。

版权所有,翻版必究

内 容 简 介

全书分上、下篇和附录。上篇为生物化学实验原理,共十四章,对生物大分子的分离纯化、含量测定和纯度分析作了较全面扼要的介绍,并着重论述各种层析技术、离心技术、膜分离技术、电泳技术等常用生化实验方法的基本原理。下篇为生物化学实验,共选编了 45 个实验,包括糖类、脂类、维生素、蛋白质、酶、核酸等生化物质的分离制备与分析鉴定方法,如纸层析、薄层层析、离子交换层析、凝胶层析、疏水层析、亲和层析、金属螯合层析、各种电泳和免疫技术,以及紫外-可见吸收光谱测定法等。其中既保留了一些对加强学生基本实验方法和技能训练行之有效的传统实验,也引进了一些较新的生化实验技术。大多数实验可以在 6~12 学时内完成,有些实验可以组合成一个综合实验,也可以各自独立作为一个实验,便于安排教学。每个实验后附有思考题和参考资料。附录包括各种常用数据表,供读者查阅。

本书可供综合性大学、师范、医药和农林院校生物化学及相关专业的本科生作为实验课教材,也可供相关教师和科研人员参考。

编者的话

(第二版)

《生物化学实验原理和方法》一书自 1994 年出版以来,历经九次印刷,一直受到北京大学生命科学学院及其他高等院校师生和广大读者的欢迎,在生物化学实验课教学和普及生物化学实验技术中发挥了良好作用。为此我们感到极大的欣慰和鼓舞。读者的厚爱也成为这次再版的动力。

近 20 年生命科学出现了惊人的进展,它不仅吸引学术界的极大关注,而且很大程度上影响了人们的日常生活。生命科学逐渐成为带头学科已成为不争之事实。作为生命科学基础的生物化学在广度和深度上都发生了巨大的变化,生物化学实验技术也相应有了新的发展。随着生命科学进入后基因组时代,即蛋白质组学研究,生物化学实验技术再次显示了它的重要作用。因此,生物化学的理论和实验技术作为分子生物学、生物技术等生物学各分支学科的基础课程,不但不能轻视,而且有必要加强。正是基于这种认识,许多综合性大学,医、农、师范院校都纷纷增设生物化学实验课程。加强生化实验课的教学,有一本能适应学科发展的教材是十分重要的。时过十载,面对学科不断发展的形势,总结我们教学的经验和体会,很有必要对本书第一版内容进行删改、补充,使它成为一本更好的生化实验课教材,以满足学生和相关人员的学习、参考之用。

再版的编写原则仍然是着眼于加强基础,侧重于加强学生生物化学基本实验方法和技能训练。为了使学生不但会做实验,而且对相关实验技术原理有基本了解,以便在今后的科研实践中能融会贯通、举一反三、灵活运用,本书的前半部分重点介绍主要生化实验技术的原理,并在第一版基础上进行了修改和补充。本着少而精的原则,把握基础性、代表性和实用性,对第一版的实验内容进行了精选,删去了部分目前相对应用较少的内容,补充和引进了一些较新的实验方法和技术,为大学生进入更高层次的学习或参加科研工作打下基础。

本书编写格局与第一版基本相同,分上、下篇和附录。上篇为生物化学实验技术原理,共十四章。除对第一版内容进行修改外,增加了生物大分子活性物质含量和纯度的分析方法、疏水层析、离心技术、膜分离技术四章,使其涵盖的生化实验技术更为全面。下篇生化实验由原来的 61 个减少为 45 个,其中新编实验 15 个,如多糖的制备和分析、疏水层析、蛋白质印迹等,其余的都是在总结教学和科研实践经验的基础上,经过修改补充或改写。新增的实验内容都是编者在科研工作中应用过的实验方法,经过反复实践,比较成熟。附录也补充了一些有用的实验数据表,供读者查阅。

本书上篇各章和下篇的实验内容均由编者分工负责修改补充或重新编写。福州师范大学生物工程学院高居易教授编写实验 2,3。全书由陈雅蕙统编和定稿。本书的再版,也是对已故李建武教授的最好纪念。

本书的再版得到了北京市教委精品教材出版项目资助。北京大学生命科学学院原生物化学与分子生物学系主任朱圣庚教授对本书再版给予了很大关心和支持。多年参与实验课教学的青年教师刘健、文津和实验技术人员邓爱平、聂力嘉都为本书的出版做出了贡献。北京大学

出版社责任编辑郑月娥在编辑加工中做了大量细致的工作。编者在此一并表示衷心感谢。

我们深知编写一本让读者认可的教材绝非易事,因此在撰稿过程中本着科学严谨的精神努力工作,力图做得更好,但由于生化实验技术涉及知识面很广,编者的学识和实验室经验的局限,书中难免有疏漏、欠妥甚至错误之处,恳请读者批评指正。

编 者

2004 年 8 月 20 日

编 者 的 话

(第一版)

生命科学在 20 世纪有了惊人的发展,生物化学是其中最活跃的分支学科之一。今天,生物化学已是发展生命科学各分支学科和生物工程技术的重要基础,工业、农业、医药、卫生和环境科学的某些研究也以生物化学理论为依据,以其实验技术为手段。生物化学也成为高等院校许多相关学科学生的必修课程,因此,为这些学生提供一本新的、适用的生物化学实验教材是十分必要的。

北京大学原生物学系生物化学教研室分别于 1958, 1964 和 1978 年先后三次系统总结各个历史阶段的教学经验,编写出版过三本《生物化学实验指导》。这几个版本的《生物化学实验指导》在北京大学生物学系及使用它们的高等院校的教学中发挥了良好的作用。鉴于近 10 余年间,生物化学发展迅速,新的实验方法和技术不断出现,为了引进新的内容,跟上学科的发展,编者本着继承与创新相结合的精神,吸取了以上几版教材的精华,并在我们近几年使用的实验教材基础上,经过总结经验,重新整理编写成这本新的实验教材。

本书以综合性大学、师范、医药和农林院校有关专业的本科生为对象,也可供其他生物化学实验技术工作者参考。它是一本高等学校生物化学实验教材,也是一本小型生物化学实验技术工具书。全书内容分生物化学实验原理、生物化学实验和附录三部分。生物化学实验原理部分对一些重要的常用生物化学实验技术的有关理论进行了较系统、全面的论述。生物化学实验部分共选编了 61 个实验,包括生物化学分离、制备、分析和鉴定技术(如滴定、比色、纸层析、薄层层析、离子交换层析、凝胶层析、亲和层析、各种电泳和免疫技术)以及瓦氏检压法等。在选材方面,除保留一些对加强学生基本技能训练行之有效的传统实验外,也注意引进新近发展起来的生物化学实验技术,为大学生进入更高层次的生物化学乃至分子生物学实验打下基础。这些实验方法在科学研究和生产实践方面也有较大应用价值。本书约有三分之二篇幅的实验都是历年来北京大学原生物学系各专业的本科生和中国协和医科大学医预班学生做过的,其余新增的实验也是编者近年来在科学研究工作中经常应用的技术。书中的附录以及每个章节、每个实验后所附的参考文献,可供读者查阅。

本书经过集体讨论、分工负责进行编写。李建武教授生前主持了本书的编写、出版工作,并为此付出了很大的心血和精力。本书的出版是集体劳动的成果。

北京大学生命科学学院生物化学及分子生物学系王镜岩教授审阅了全稿,并提出了很好的修改意见。沈同、张庭芳、朱圣庚和胡美浩教授对本书的内容提供过宝贵意见。青年教师陈劲秋和姚瑾预做并编写了个别新增实验;实验技术人员邓爱平、孙相超和孙冬梅以及近年来参加实验教学工作的文津和刘健也为本书的出版付出了劳动。本书的责任编辑朱新邨在编辑加工中做了大量细致的工作,李丽霞和张虹为本书绘制了大部分图表。编者在此对他们一并表示衷心感谢。

诚挚地欢迎使用本书的教师、实验技术人员、学生及其他读者提出批评和指正。

编 者

1994 年 5 月

生物化学实验室规则

1. 每个同学都应该自觉遵守课堂纪律,维持课堂秩序,不迟到,不早退,不大声谈笑。
2. 实验前必须认真预习,熟悉本次实验的目的、原理、操作步骤,懂得每一操作步骤的意义和了解所用仪器的使用方法,否则不能开始实验。
3. 实验过程中要听从教师的指导,严肃认真地按操作规程进行实验,并把实验结果和数据及时、如实地记录在实验记录本上,文字要简练、准确。完成实验后经教员检查同意,方可离开实验室。
4. 实验台面应随时保持整洁,仪器、药品摆放整齐。公用试剂用毕,应立即盖严放回原处。勿使试剂、药品洒在实验台面和地上。实验完毕,玻璃器皿须洗净放好,将实验台面抹拭干净,才能离开实验室。
5. 使用仪器、药品、试剂和各种物品必须注意节约。洗涤和使用仪器时,应小心仔细,防止损坏仪器。使用贵重精密仪器时,应严格遵守操作规程,发现故障须立即报告教员,不得擅自动手检修。
6. 实验室内严禁吸烟! 煤气灯应随用随关,严格做到:人在火在,人走火灭。乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热,并要远离火源操作和放置。实验完毕,应立即关好煤气开关和水龙头,拉下电闸。离开实验室以前应认真、负责地进行检查,严防发生安全事故。
7. 一般废液体可倒入水槽内,同时放水冲走。强酸、强碱、有机溶剂和有毒液体必须倒入专用废液缸内。废纸、火柴头及其他固体废物和带渣滓的废物倒入废品缸内,不能倒入水槽或到处乱扔。
8. 仪器损坏时,应如实向教员报告,并填写损坏仪器登记表,然后补领。
9. 实验室内一切物品,未经本室负责教员批准,严禁携出室外,借物必须办理登记手续。
10. 每次实验课由班长负责安排值日生。值日生的职责是负责当天实验室的卫生、安全和一切服务性的工作。

目 录

上篇 生物化学实验原理

第一章 生物大分子的分离纯化	(1)
第一节 概述	(1)
第二节 生物原料的选择和预处理	(3)
第三节 生物组织与细胞的破碎	(5)
第四节 生物大分子的提取	(5)
第五节 生物大分子的分离纯化	(8)
第六节 生物大分子活性物质的浓缩	(10)
第七节 生物大分子的结晶	(12)
第八节 生物大分子活性物质的干燥	(13)
第二章 生物大分子活性物质含量和纯度的分析方法	(16)
第一节 蛋白质含量的测定	(16)
第二节 粘多糖的定量及生物活性测定	(17)
第三节 核酸含量的测定	(19)
第四节 生物大分子纯度的鉴定	(20)
第三章 层析技术	(23)
第一节 层析技术分类	(23)
第二节 液相层析法的基本原理	(25)
第三节 柱层析系统基本操作方法	(33)
第四章 吸附层析法	(39)
第一节 基本原理	(39)
第二节 影响吸附的因素	(40)
第三节 吸附柱层析法	(41)
第五章 纸层析法	(45)
第一节 纸层析基本原理	(45)
第二节 影响 R_f 的主要因素	(45)
第三节 纸层析实验技术	(47)
第六章 薄层层析法	(53)
第一节 薄层层析原理	(53)
第二节 薄层层析的特点	(55)
第三节 吸附剂的性质与选择	(56)

第四节	薄层层析实验技术	(56)
第五节	薄层层析的定性分析	(62)
第六节	薄层层析的定量分析	(63)
第七节	薄层层析法的近代发展	(64)
第七章	离子交换层析法	(66)
第一节	基本原理	(66)
第二节	离子交换层析介质	(67)
第三节	离子交换树脂	(68)
第四节	离子交换纤维素	(74)
第五节	葡聚糖凝胶离子交换剂及琼脂糖凝胶离子交换剂	(77)
第六节	离子交换层析实验技术	(80)
第七节	离子交换层析法的应用	(84)
第八章	凝胶层析法	(85)
第一节	引言	(85)
第二节	基本原理	(85)
第三节	凝胶的条件和类型	(88)
第四节	凝胶层析实验技术	(92)
第五节	影响凝胶层析的主要因素	(94)
第九章	亲和层析法	(96)
第一节	基本原理	(96)
第二节	配基和载体的选择	(96)
第三节	亲和吸附剂的制备方法	(98)
第四节	亲和层析实验技术	(102)
第五节	亲和层析应用举例	(104)
第六节	金属螯合亲和层析	(106)
第十章	疏水层析法	(111)
第一节	疏水层析原理	(111)
第二节	疏水层析的分离机理	(112)
第三节	影响疏水层析分离的因素	(113)
第十一章	电泳技术	(115)
第一节	电泳基本原理	(115)
第二节	电泳的分类	(119)
第三节	醋酸纤维素薄膜电泳	(120)
第四节	琼脂糖凝胶电泳	(121)
第五节	聚丙烯酰胺凝胶电泳	(127)
第六节	染色方法	(148)
第七节	聚丙烯酰胺凝胶电泳过程中异常现象产生的原因及解决办法	(155)
第八节	毛细管电泳	(157)

第十二章 离心技术	(165)
第一节 离心的基本理论.....	(165)
第二节 离心的基本方法.....	(167)
第三节 离心机的安全操作与保养.....	(170)
第十三章 膜分离技术	(172)
第一节 过滤技术.....	(172)
第二节 半透膜分离技术.....	(173)
第三节 超滤技术.....	(175)
第十四章 紫外-可见吸收光谱分析	(178)
第一节 光谱分析的基本概念.....	(178)
第二节 化合物中的发色基团及助色基团.....	(181)
第三节 紫外-可见分光光度计	(183)
第四节 紫外-可见吸收光谱分析方法	(188)
第五节 紫外-可见吸收光谱分析的影响因素	(192)

下篇 生物化学实验

实验 1 香菇多糖的制备	(194)
实验 2 魔芋多糖的提取、魔芋葡甘聚糖含量的测定及还原糖成分分析	(197)
实验 3 甲壳素和壳聚糖的制备及壳聚糖乙酰度的测定	(202)
实验 4 脂肪碘值的测定	(206)
实验 5 血清总胆固醇含量的测定(磷硫铁法)	(209)
实验 6 卵磷脂的制备	(212)
实验 7 维生素 C 的定量测定(2,6-二氯酚靛酚滴定法)	(215)
实验 8 氨基酸定量测定——茚三酮显色法	(219)
实验 9 氨基酸的分离与鉴定——滤纸层析法	(222)
实验 10 蛋白质定量测定(1)——微量凯氏定氮法	(227)
实验 11 蛋白质定量测定(2)——双缩脲法	(232)
实验 12 蛋白质定量测定(3)——Folin-酚法(Lowry 法)	(236)
实验 13 蛋白质定量测定(4)——考马斯亮蓝染色法	(240)
实验 14 蛋白质定量测定(5)——BCA 法	(243)
实验 15 蛋白质定量测定(6)——紫外(UV)吸收法	(246)
实验 16 蛋白质相对分子质量测定(1)——凝胶过滤层析法	(250)
实验 17 蛋白质相对分子质量测定(2)——SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法	(262)
实验 18 聚丙烯酰胺等电聚焦电泳测定蛋白质等电点	(271)
实验 19 蛋白质及多肽 N-末端氨基酸残基测定——DNS-Cl 法	(278)
实验 20 蛋白质印迹法	(286)
实验 21 血红蛋白脱辅基和重组	(293)

实验 22	细胞色素 c 的制备和测定	(297)
实验 23	凝胶层析法分离纯化含锌金属硫蛋白	(310)
实验 24	固定化金属离子亲和层析	(313)
实验 25	疏水层析分离金属结合蛋白	(316)
实验 26	脂蛋白的分离——琼脂糖、聚丙烯酰胺凝胶电泳法	(319)
实验 27	聚丙烯酰胺凝胶电泳分离乳酸脱氢酶同工酶(活性染色鉴定法)	(323)
实验 28	谷胱甘肽转硫酶的制备及动力学研究	(332)
实验 29	溶菌酶的制备及活性测定	(340)
实验 30	超氧化物歧化酶的分离纯化	(345)
实验 31	超氧化物歧化酶活性染色鉴定法	(351)
实验 32	酯酶的分离、纯化与活性测定	(354)
实验 33	亲和层析及离子交换层析法分离纯化乳酸脱氢酶及其同工酶	(359)
实验 34	核酸定量测定(1)——定磷法	(368)
实验 35	核酸定量测定(2)——紫外(UV)吸收法	(373)
实验 36	猪脾脏 DNA 制备与二苯胺测定法	(376)
实验 37	酵母 RNA 提取与地衣酚测定法	(380)
实验 38	质粒 DNA 的微量制备(碱裂解法、煮沸裂解法)	(384)
实验 39	质粒 DNA 限制性内切酶酶切及琼脂糖凝胶电泳	(390)
实验 40	大肠杆菌感受态细胞的制备及转化	(397)
实验 41	聚合酶链式反应(PCR)	(402)
实验 42	核酸原位杂交	(407)
实验 43	免疫球蛋白的分离纯化	(413)
实验 44	免疫学检测法	(420)
实验 45	酶联免疫吸附测定法	(434)
附 录		(444)
附录 I 实验室安全及防护知识		(444)
一、实验室安全知识		(444)
二、实验室灭火法		(445)
三、实验室急救		(446)
附录 II 试剂及试剂配制与保存		(447)
一、一般化学试剂的分级		(447)
二、试剂配制的一般注意事项		(447)
三、易变质及需要特殊方法保存的试剂		(448)
四、标准溶液的配制和标定		(448)
五、缓冲溶液		(449)
六、指示剂		(457)
七、干燥剂		(458)

附录Ⅲ 一些常用单位	(459)
一、长度单位	(459)
二、体积单位	(459)
三、质量单位	(459)
四、物质的量与物质的量浓度单位	(460)
附录Ⅳ 单位与浓度的表示及溶液浓度的调整	(460)
一、单位表示	(460)
二、溶液浓度的表示及其配制	(461)
三、溶液浓度的调整	(462)
附录Ⅴ 实验误差与提高实验准确度的方法	(463)
一、实验误差	(463)
二、误差来源	(465)
三、提高实验准确度的方法	(466)
四、准确度、精确度和误差的关系	(467)
附录Ⅵ 实验记录与实验报告	(467)
一、实验记录	(467)
二、实验报告	(468)
三、表格和图解	(469)
附录Ⅶ 常用数据表	(470)
一、元素的相对原子质量表	(470)
二、常用市售酸碱的浓度	(472)
三、一些常用化合物的溶解度(20℃)	(472)
四、一些常用做缓冲剂的化合物的酸解离常数	(473)
五、某些有机溶剂的主要物理常数	(474)
六、氨基酸的一些物理常数	(474)
七、常见氨基酸在不同溶剂系统中的 R_f	(476)
八、嘌呤、嘧啶碱基、核苷和核苷酸的相对分子质量	(477)
九、某些蛋白质的物理性质	(477)
十、一些常见蛋白质相对分子质量参考值	(478)
十一、常用蛋白质相对分子质量标准参照物	(479)
十二、常见蛋白质等电点参考值	(479)
十三、硫酸铵饱和度的常用表	(481)
十四、离心机转数(r/min)与相对离心力(RCF)的换算	(482)
十五、常用化学物质相对分子质量表	(483)
附录Ⅷ 层析法常用数据表及层析介质性质	(485)
一、常用离子交换纤维素	(485)
二、常用国产离子交换树脂的某些物理化学性质表	(486)
三、各类常用离子交换树脂型号对照表	(488)
四、离子交换层析介质的技术数据	(489)

五、凝胶过滤层析介质的技术数据	(490)
六、聚丙烯酰胺凝胶的技术数据	(492)
七、琼脂糖凝胶的技术数据	(492)
八、疏水层析介质的技术数据	(493)
九、部分亲和层析介质的技术数据	(494)
十、各种凝胶所允许的最大操作压	(495)
附录Ⅸ 常用限制性内切酶酶切位点	(496)

上篇 生物化学实验原理

第一章 生物大分子的分离纯化

第一节 概 述

生物大分子主要包括氨基酸、多肽、蛋白质、酶、辅酶、激素、维生素、多糖、脂类、核酸及其降解产物等。以上这些生化物质具有不同的生理功能,其中有些是生物活性物质如蛋白质、酶、核酸等,它们与人们的生活密切相关。目前这些生物活性物质已成为生命科学研究的主要对象。特别是随着人类基因组序列“完成图”的完成(2003年4月15日公布),生命科学研究将进入后基因组时代(研究的焦点将从基因的序列转移到功能方面),我国在“十五”期间将人类基因组的后续研究与开发工作列为十二个国家重大科技专项之一,国家已投入6亿元,主要开展重大疾病、重要生理功能相关功能基因等多项研究。为此,鉴定大量未知蛋白质(酶)的结构及关于其功能研究也必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。

与核酸相比,蛋白质的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,不仅潜在的数量多达 20^{100} 种(这就是蛋白质构成如此巨大的、丰富多彩的生命世界的原因),而且相互间差异大。因此,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、理化性质比较接近的4个碱基交互排列,且有一定规律可循。因此,核酸的分离、制备和鉴定比较容易。

另外,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,或者是蛋白质和核酸自身相互组合在一起出现的,加之它们离体后稳定性较差(如酶)、含量偏低,这都给分离纯化带来了一定的困难。

此外生物活性物质都有复杂的空间结构,而维系这种特定的三维结构主要靠氢键、盐键、二硫键、疏水作用力和范德华引力等。这些生物活性物质对外界条件非常敏感,过酸、过碱、高温、剧烈的振荡等都可能导导致活性丧失,这是生物大分子物质不同于其他物质的一个突出特点。因此,在整个分离、纯化流程中,要选择十分温和的条件,尽量在低温条件下操作。同时还要防止体系中的重金属离子及细胞自身酶系的作用。为了得到高纯度的生物产品,必须要认真了解生物活性物质的一些特性与特点。

一、生物大分子活性物质的存在方式

1. 生物大分子活性物质的存在方式与其生物功能

生物活性物质的存在方式与其生物功能关系十分密切。一般情况下,可以根据生物活性物质的生物功能推断其存在部位和分布方式。生物活性物质分为“胞内”与“胞外”两种存在部位。“胞外”物质是由细胞产生,再释放出来的,因此两者实质上没有严格界限。如尿中的尿酸酶是由肾细胞产生,血中的 γ -球蛋白来自 β -淋巴细胞。多数微生物酶如淀粉酶、蛋白质水解酶、糖化酶常大量存在于胞外培养液中。而合成酶类、代谢酶类、遗传物质和代谢中间产物则存在于细胞内,如DNA聚合酶、细胞色素c等。真核细胞的DNA大部分存在细胞核内,只有少量存在于线粒体和微粒体中,而RNA主要存在于胞质中,电子传递系统物质(包括黄素蛋白、细胞色素类)以及糖类、脂肪酸的氧化分解和氧化磷酸化有关的酶系大部分存在于线粒体中。消化酶虽然可分泌到胞外,但难于从消化道进行收集,只能由相应的腺体提取分离,而且这些酶在细胞内刚合成时常常是以无活性的酶原形式存在,提取时需要预先激活。细胞内的生物活性物质有些游离在胞浆中,有些结合于质膜或器膜上,或存在于细胞器内。对于胞内物质的提取要先破碎细胞,对于膜上物质则要选择适当的溶剂使其从膜上溶解下来。

2. 生物大分子分子间的作用力

生物体系中的分子结构及分子间相互联系的作用力十分复杂。作为一个生物大分子,其基本骨架中各原子与基团间都是共价结合,整个分子的一级结构比较稳定,但分子间的连接主要是通过一些非共价键如氢键、盐键、金属键、范德华引力、碱基堆积力所维系,其键能较弱,而且键的性质差别较大,它们与生物分子的生物功能关系十分密切,因此要采取不同方法使之解离,而不损伤其分子基本结构。但须注意的是许多生物大分子的空间高级结构也是由非共价键结合的,因此分离时应十分小心,确保空间结构不受破坏。故常常在十分温和的条件下操作,以避免因强烈外界因素的作用而丧失其生物活性。这就是生化技术与一般有机化学制备技术的重大不同之处。

二、生物大分子活性物质的存在特点

1. 生物材料组成的复杂性

生物材料中的化学组成十分复杂。不同生物含有不同种类的活性物质。同种生物在细胞与细胞之间,组织与组织之间,由于细胞的类型、年龄、分化程度的不同,都会改变活性物质的组成。尤其是色素类物质和某些生理活性成分的种类与组成在不同生物间的差别更大。如植物含叶绿素、胡萝卜素、花色素类;动物与微生物含细胞色素、原卟啉;藻类含藻胆色素;脊椎动物含脊椎动物激素:ACTH、MSH、GH、后叶激素、胰岛素、肾上腺素、甲状腺素、垂体激素;无脊椎动物含蜕皮激素(变态激素)、促幼激素和外激素(信息素)——蚕的性外激素与蚂蚁的报警激素;植物含吲哚乙酸、脱落酸、玉米素、乙烯、赤霉素等植物激素。

2. 生物大分子活性物质存在的特点

生物活性物质在生物体材料中含量较低,杂质含量很高,而且生理活性愈高的成分,含量往往愈低。如胰岛素在胰脏中的含量约为万分之二,脱氧核糖核酸酶含量为十万分之四,胆汁中的胆红素含量为万分之五到八,由几吨竹笋方可得到几毫克竹笋素。所以直接从生物材料纯化含量极低的生理活性物质没有太大的实用价值,这正是现代生物技术的重点开发领域。

生物材料中的生化组成数量大,种类多。目的物与杂质的理化性质如溶解度、相对分子质量、等电点等都十分接近,所以分离、纯化比较困难。尤其是在纯化过程中生物材料中有效成分的生理活性处于不断变化中,它们可能被材料中自身的代谢酶所破坏,或为微生物活动所分解,还可能在制备过程中受到酸、碱、盐、重金属离子、机械搅拌、温度,甚至空气和光线的作用而改变其生理活性。因此在整个制备过程中都要把防止目的物的失活放在首位。

生物大分子的分离纯化就是把生物体内的生化基本物质,既保持原来的结构和功能,又能在含有多种物质的液相或固相中,较高纯度地分离出来。这是一项严格、细致、复杂的工艺过程,涉及物理、化学、生物学等方面的知识和操作技术。

由于各种生物物质的结构和理化性质的不同,分离方法也不一样,就是同一类生物物质产品,其原料不同,使用的方法差别也很大,不可能有一个统一的标准方法。

如果研制新品种,在实验前要充分查阅有关文献资料,对分离纯化的生物大分子的理化性质、生物活性等都要事先了解,再着手实验工作。对于一个未知结构及性质的试样,进行创造性的分离提纯时,要经过各种方法的比较和摸索,才能找到一些工作规律和获得预期的效果。在分离提纯前,常需建立相应的分析鉴定方法,正确指导分离提纯的顺利进行。

一般从天然生物材料制备生物物质的过程大体可分为以下几个阶段:①原料的选择和预处理;②生物组织与细胞的破碎;③从生物材料中提取有效的活性物质;④有效成分的分离纯化;⑤后处理及制剂。

不是每个生物物质的分离制备都完整地具备以上五个阶段,也不是每个阶段都截然分开。选择性提取包含着分离纯化;沉淀分离包含着浓缩;从发酵液中分离胞外酶,则不用破碎细胞,离心过滤去菌体后,就可以直接进行分离纯化。选择分离纯化的方法及各种方法的先后次序也因材料而异。选择性溶解和沉淀是经常交替使用的方法,整个制备过程中各种柱层析常放在纯化的后阶段,结晶则只有产品达到一定纯度后进行,才能收到良好的效果。不论是哪个阶段,使用哪种操作技术,都必须注意在操作中保持生物大分子的完整性,防止变性和降解的发生。

第二节 生物原料的选择和预处理

一、生物材料的选取

选择生物材料时需考虑其来源,价格,目的物的含量,杂质的种类、数量和性质等。

1. 有效成分的含量

(1) 生物品种:根据目的物的分布,选择富含有效成分的生物品种是选材的关键。如从胰脏中提取胰岛素时,单从含量看,牛胰脏中胰岛素的含量比猪胰脏的高,但从我国实际看,我国猪的饲养头数远比牛多,因此,制备胰岛素一般不选用牛胰脏而选用猪胰脏作材料。

(2) 合适的组织器官:例如提取DNA,从含量看,细胞核中最多,线粒体次之,但由于在从动物脏器(经洗涤、破细胞)提取细胞核过程中,常常会受到酶水解和机械损伤等作用,致使得到的细胞核DNA相对分子质量($2 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$)仅为完整DNA的1%,而线粒体DNA,由于相对分子质量较小(12^7),提取步骤也较少,所以有人在提取DNA时选用线粒体作材料。