

全国高等医药院校实验教材

医学生物化学与 分子生物学实验技术



主编 王玉明

清华大学出版社

全国高等医药院校规划教材

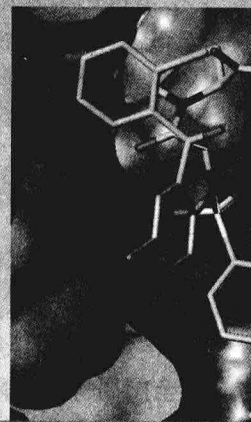
医学生物化学与 分子生物学实验技术

主编 王凤翔

清华大学出版社

全国高等医药院校实验教材

医学生物化学与 分子生物学实验技术



主编 王玉明

清华大学出版社

北京

内 容 简 介

本教材包括 16 章,每一章介绍一项技术,并配有相应实验,使学生在系统了解有关技术的同时,通过动手实验而强化对生化知识的认知。本教材所介绍的技术包括:大分子制备技术、分光光度技术、层析技术、电泳技术、离心技术、分子杂交技术、PCR 技术、测序技术、转基因技术、基因敲除技术、蛋白质组学技术、EMSA 和 ChIP 技术、酵母双杂交等。同时还介绍了实验技术的发展简史、技术创新、实验室管理等内容。本教材的主要对象为医学院校各专业的本科生,也可供其他类型院校的学生参考。本教材既可以自成体系,独立成课,也可以与理论教材配套使用;既可以作为实验教材,也可以作为考研的复习材料。

版权所有,侵权必究。侵权举报电话:010-62782989 13701121933

图书在版编目(CIP)数据

医学生物化学与分子生物学实验技术/王玉明主编. —北京:清华大学出版社,2011.9

(全国高等医药院校实验教材)

ISBN 978-7-302-26700-3

I. ①医… II. ①王… III. ①医药学:生物化学—实验—医学院校—教材 ②医药学:分子生物学—实验—医学院校—教材 IV. ①Q5-33 ②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 172586 号

责任编辑:罗 健

责任校对:王淑云

责任印制:李红英

出版发行:清华大学出版社

地 址:北京清华大学学研大厦 A 座

<http://www.tup.com.cn>

邮 编:100084

社 总 机:010-62770175

邮 购:010-62786544

投稿与读者服务:010-62776969, c-service@tup.tsinghua.edu.cn

质 量 反 馈:010-62772015, zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn

印 装 者:三河市春园印刷有限公司

经 销:全国新华书店

开 本:185×260 印 张:18 字 数:481 千字

版 次:2011 年 9 月第 1 版 印 次:2011 年 9 月第 1 次印刷

印 数:1~3000

定 价:34.80 元

编委会名单

- 主 编** 王玉明
- 副主编** 陈建业 秦宜德 宋高臣 张向阳
- 编 委** (按编写顺序排列)
- 王玉明 (成都医学院)
- 宋高臣 (牡丹江医学院)
- 严世荣 (湖北医药学院)
- 王建东 (成都医学院)
- 田余祥 (大连医科大学)
- 李 洪 (泸州医学院)
- 王 珉 (泸州医学院)
- 陈建业 (川北医学院)
- 宋永燕 (川北医学院)
- 陈 瑜 (福建医科大学)
- 于水澜 (黑龙江中医药大学)
- 王海生 (内蒙古医学院)
- 刘淑萍 (内蒙古医学院)
- 王 顺 (辽宁医学院)
- 林 娟 (成都医学院)
- 何凤田 (第三军医大学)
- 杨 平 (成都医学院)
- 张向阳 (济宁医学院)
- 秦宜德 (安徽医科大学)
- 主 审** 余冰宾 (清华大学)

前 言

PREFACE

本教材与理论教材《医学生物化学与分子生物学》互为配套。实验教材既可以自成体系、独立成课，凸显实验教学的地位，也可以与理论教材配套使用。

本教材定名为《医学生物化学与分子生物学实验技术》主要基于如下考虑：①实验技术既是生物化学与分子生物学学科形成和发展的基础，也是该学科完整体系的重要组成部分。理论体系和技术体系两者相辅相成，同样重要。②传统教学重理论轻实验，实验课仅仅是理论课的附属品。在教材建设方面也是重理论教材而轻实验教材，实验教材多为“实验指导”，在内容上也是采取实用主义，以简单、够用为度。实验技术有些编入理论教材，有些编入实验教材，难以自成体系。③医学教育的趋势是：加强实验教学，提高其地位，有些学校实验课单独开课，增加实验课技术含量，减少验证性实验，增加综合性和设计性实验，以培养学生的创新意识和能力。本教材正是顺应了这一潮流，在编排上力求新意，以实验技术为线索进行编排，每一章介绍一项技术，并配有相应实验，使学生在系统了解有关技术的同时，通过动手实验而得以强化。

本教材内容包括 16 章：如何在分子水平研究生命；从组织中分离纯化生物高分子——高分子制备技术；测定物质的吸收光谱——分光光度技术；将混合物中各种组分分开——层析技术；分离带电粒子的有效手段——电泳技术；利用离心场沉降高分子——离心技术；利用碱基互补探查核酸序列——分子杂交技术；微量 DNA 体外扩增——PCR 技术；阅读遗传天书的第一步——测序技术；建立转基因动物模型——转基因技术；去除动物体内某种基因——基因敲除技术；21 世纪的生命科学技术——蛋白质组学技术；蛋白质与核酸相互作用分析——EMSA 和 CHIP 技术；蛋白质和蛋白质相互作用分析——酵母双杂交等技术；科学发展的不竭源泉——技术创新；确保实验技术的最佳效果——实验室管理。这些内容基本反映了生物化学与分子生物学实验技术体系的整体面貌。

参加本教材编写的人员来自全国 13 所医学院校，他们长期在教学一线工作，本教材凝聚着他们多年的教学经验和心得体会。本教材的编写得到有关院校的支持，在此深表谢意。尤其是成都医学院、福建医科大学为本教材的“编写会”和“定稿会”提供了很多帮助，有关领导和专家参会指导，使本教材的质量得以保证。尽管如此，本教材仍然有很多不尽如人意之处，殷切希望得到广大师生的批评指正。

王玉明

2011 年 6 月于成都

目 录

CONTENTS

第 1 章	如何在分子水平研究生命	1
1.1	生物化学与分子生物学实验技术的发展简史	1
1.2	生物化学与分子生物学实验技术的完整体系	4
1.2.1	对生物分子进行分析鉴定	4
1.2.2	对生物分子进行人工合成	4
1.2.3	对生物分子进行人工改造	5
1.2.4	对生物分子进行功能研究	6
1.3	生物化学与分子生物学实验技术的广泛应用	6
1.3.1	电泳技术在临床检验中的应用	7
1.3.2	DNA 重组技术在医药卫生领域的扩展	7
1.3.3	基因诊断和治疗技术在未来医学领域的前景	8
1.3.4	动物模型在医学研究中的重要地位	8
第 2 章	从组织中分离纯化生物高分子——高分子制备技术	10
2.1	预处理和细胞的分离	11
2.1.1	选择材料及预处理	11
2.1.2	细胞的分离	11
2.2	细胞破碎及细胞器分离	11
2.2.1	细胞破碎	11
2.2.2	细胞器的分离	13
2.3	分离与纯化	13
2.3.1	蛋白质的分离纯化	13
2.3.2	核酸的分离纯化	14
2.3.3	蛋白质浓度的测定	15
2.3.4	核酸的浓度、纯度测定和完整性鉴定	17
2.4	生物高分子提纯后的处理	18
2.4.1	样品的浓缩	18
2.4.2	样品的干燥	18
2.4.3	样品的保存	19
2.5	实验项目——蛋白质的盐析与透析	20
第 3 章	测定物质的吸收光谱——分光光度技术	22
3.1	分光光度技术的基本原理	22
3.1.1	光的性质	22
3.1.2	光谱	23
3.1.3	Lambert-Beer 定律	24
3.2	分光光度计的基本结构	25
3.2.1	光源	26
3.2.2	分光系统	26
3.2.3	样品室	27
3.2.4	检测器	27
3.2.5	显示器	28
3.3	常用分光光度计的使用方法	28
3.3.1	721e 型分光光度计	28
3.3.2	722s 型分光光度计	28
3.3.3	Sp-756 紫外可见分光光度计	29
3.4	分光光度技术的应用	29
3.4.1	溶液的定性分析	29
3.4.2	溶液的定量分析	30
3.5	实验项目	30

3.5.1	蛋白质的定量测定	30
3.5.2	脲酶 K_m 值测定	34
3.5.3	血清丙氨酸氨基转移酶活性测定 (赖氏法)	36
3.5.4	血糖的定量测定——葡萄糖氧化酶法	39
3.5.5	激素对血糖浓度变化的影响	40
3.5.6	血浆高密度脂蛋白-胆固醇的测定	41
3.5.7	紫外分光光度法检测核酸的浓度及纯度	43

第4章

将混合物中各种组分分开——

层析技术 44

4.1	层析技术的形成和发展	44
4.2	层析技术概述	45
4.2.1	层析技术的基本原理	45
4.2.2	层析技术的分类	45
4.2.3	层析技术的基本要求	46
4.3	吸附层析	46
4.3.1	吸附层析的原理	46
4.3.2	吸附层析的操作	46
4.4	分配层析	48
4.4.1	纸层析的原理	48
4.4.2	纸层析的操作	49
4.5	凝胶过滤层析	50
4.5.1	凝胶过滤层析的原理	50
4.5.2	凝胶过滤层析的特征常数	51
4.5.3	凝胶过滤层析的常用介质	51
4.5.4	凝胶过滤层析的操作	52
4.5.5	凝胶过滤层析的应用	53
4.6	离子交换层析	53
4.6.1	离子交换层析的原理	54
4.6.2	离子交换剂	54
4.6.3	离子交换层析的操作	55
4.6.4	离子交换层析的应用	57
4.7	亲和层析	57
4.7.1	亲和层析的原理	58
4.7.2	亲和层析的操作	58

4.8	实验项目	59
4.8.1	氨基酸的分离鉴定——纸层析法	59
4.8.2	转氨酶的活性鉴定——薄层层析法	60
4.8.3	核苷酸的分离——离子交换柱层析法	62
4.8.4	胰蛋白酶的分离纯化——亲和层析法	63
4.8.5	血清蛋白质的层析分离——分子筛层析法	64

第5章

分离带电粒子的有效手段——

电泳技术 66

5.1	电泳技术的形成和发展	66
5.2	电泳技术的基本原理	66
5.3	影响泳动率的因素	67
5.3.1	溶液的 pH	67
5.3.2	缓冲液的离子强度	68
5.3.3	电场强度	68
5.3.4	电渗作用	69
5.4	电泳技术的种类	69
5.4.1	纸电泳和醋酸纤维素薄膜电泳	69
5.4.2	凝胶电泳	70
5.4.3	等电聚焦电泳	72
5.4.4	双向电泳	73
5.4.5	核酸电泳	74
5.4.6	印迹转移电泳	75
5.5	实验项目	76
5.5.1	血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	76
5.5.2	血清乳酸脱氢酶同工酶琼脂糖凝胶电泳	78
5.5.3	血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	79
5.5.4	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质的相对分子质量	80
5.5.5	DNA 琼脂糖凝胶电泳	83
5.5.6	限制性内切酶对质粒 DNA 酶切产物的电泳鉴定	84

第 6 章**利用离心场沉降高分子——离心技术**

6.1 离心技术的基本原理	86
6.1.1 颗粒沉降的原理	86
6.1.2 沉降系数	87
6.1.3 相对离心力	87
6.2 离心机的类型和操作规程	87
6.2.1 离心机的类型	87
6.2.2 制备型离心机	88
6.2.3 分析型离心机	90
6.3 制备性超速离心的分离方法	90
6.3.1 差速沉降离心法	91
6.3.2 密度梯度区带离心法	91
6.3.3 等密度梯度区带离心法	91
6.4 离心机操作的注意事项	91
6.5 实验项目	92
6.5.1 肝糖原的提取和鉴定	92
6.5.2 酪蛋白的制备	94
6.5.3 动物肝脏 DNA 的提取	95
6.5.4 酵母 RNA 的提取及成分鉴定	96
6.5.5 质粒 DNA 的提取与鉴定	98
6.5.6 感受态细菌的制备及质粒 DNA 的转化	102

第 7 章**利用碱基互补探查核酸序列——分子杂交技术**

7.1 核酸分子杂交的基本原理	105
7.1.1 变性与复性	105
7.1.2 建立在 DNA 变性与复性基础上的核酸杂交技术	106
7.2 核酸探针的分类和标记	107
7.2.1 核酸探针的分类	107
7.2.2 核酸探针的标记	108
7.3 核酸分子杂交技术	110
7.3.1 固相杂交的支持物	110
7.3.2 常用的转移方法	111
7.3.3 固相杂交的基本程序	111
7.4 主要的杂交类型	112
7.4.1 Southern 杂交	112
7.4.2 Northern 杂交	112

7.4.3 组织原位杂交	113
7.4.4 斑点杂交	113
7.5 实验项目	113
7.5.1 Southern 杂交	113
7.5.2 Northern 杂交	115
7.5.3 组织原位杂交	116
7.5.4 斑点杂交	118

第 8 章**微量 DNA 体外扩增——PCR 技术**

8.1 PCR 技术的产生与发展	120
8.1.1 PCR 技术的产生	120
8.1.2 PCR 新技术的发展	121
8.2 PCR 技术基础	123
8.2.1 PCR 技术的基本原理	123
8.2.2 PCR 技术的特点	124
8.2.3 PCR 反应体系中的基本成分	124
8.2.4 PCR 的反应参数	128
8.2.5 常规 PCR 反应	129
8.2.6 PCR 反应条件的优化	130
8.2.7 PCR 产物的检测分析	130
8.3 PCR 技术的应用	131
8.3.1 PCR 技术在分子生物学中的应用	131
8.3.2 PCR 技术在传染病病原体检测中的应用	131
8.3.3 PCR 技术在肿瘤相关基因检测中的应用	132
8.3.4 PCR 技术在遗传病早期诊断的应用	132
8.4 PCR 的衍生技术	132
8.4.1 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)	132
8.4.2 实时荧光定量 PCR	136
8.5 实验项目——聚合酶链式反应 (PCR) 体外扩增 DNA	142

第 9 章**阅读遗传天书的第一步——测序技术**

9.1 DNA 序列测定的基本原理	145
-------------------	-----

9.2 DNA 测序方法	145
9.2.1 酶学法——双脱氧链终止法	146
9.2.2 化学(裂解)法——Maxam-Gilbert 测序法	148
9.2.3 双脱氧测序法和化学测序法的 选择	149
9.3 DNA 测序自动化和大规模测序	151

第 10 章 建立转基因动物模型——转基因技术

10.1 转基因动物	154
10.2 转基因的原理和方法	155
10.2.1 转基因动物技术的基本体系	155
10.2.2 建立转基因动物的方法	155
10.3 基因敲除小鼠和基因敲入小鼠	162
10.3.1 基因敲除小鼠	162
10.3.2 基因敲入小鼠	162
10.4 转基因动物的应用	163
10.4.1 研究基因的结构和功能及其表达 与调控	163
10.4.2 建立人类疾病动物模型	163
10.4.3 研究人类疾病基因治疗	163
10.4.4 利用转基因动物生产生物活性 蛋白	164
10.4.5 利用转基因动物生产人用器官 移植的供体	164
10.4.6 利用转基因技术改良动物品种和 生产性能	164
10.5 转基因安全性问题	165
10.5.1 转基因生物的环境安全性	165
10.5.2 转基因食品的安全性	166

第 11 章 去除动物体内某种基因——基因敲除技术

11.1 基因敲除技术的建立和发展	167
11.2 基因敲除的原理和基本方法	168

11.3 基因敲除小鼠的制备过程	171
11.4 基因敲除的其他方法及进展	175
11.4.1 条件性基因敲除法	175
11.4.2 诱导性基因敲除法	176
11.4.3 利用随机插入突变进行基因敲除	177
11.5 基因敲除技术的应用及前景	179
11.5.1 建立生物模型	179
11.5.2 疾病的分子机理研究和疾病的 基因治疗	179
11.5.3 提供廉价的异种移植器官	179
11.5.4 免疫学中的应用	180
11.5.5 改造生物、培育新的生物品种	180
11.6 基因敲除技术的缺陷	180

第 12 章 21 世纪的生命科学技术——蛋白质组学技术

12.1 蛋白质组学概论	181
12.2 蛋白质组学研究的策略和范围	183
12.3 蛋白质组学的技术	183
12.3.1 蛋白质组研究中的样品制备	184
12.3.2 蛋白质组研究中的样品分离技术	185
12.3.3 蛋白质组研究中的样品鉴定技术	190
12.4 蛋白质组生物信息学	196
12.5 蛋白质组学发展趋势	196
12.6 实验项目	197
12.6.1 家兔血清蛋白质组二维凝胶电泳 技术的建立	197
12.6.2 正常人尿蛋白质组学研究	198

第 13 章 蛋白质与核酸相互作用分析——EMSA 和 ChIP 技术

13.1 电泳迁移阻滞实验的基本原理	200
-----------------------------	-----

13.2 染色质免疫沉淀技术的基本原理	200
13.3 EMSA 的基本操作步骤	201
13.3.1 探针的选择	201
13.3.2 探针的标记与纯化	201
13.3.3 核酸结合蛋白的制备	202
13.3.4 蛋白质与寡核苷酸探针的结合反应	202
13.3.5 非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备	202
13.3.6 预电泳和电泳	202
13.3.7 检测	203
13.4 ChIP 技术的基本操作步骤	203
13.4.1 蛋白质与 DNA 交联	203
13.4.2 染色质 DNA 的剪切	203
13.4.3 免疫沉淀	203
13.4.4 洗脱和纯化与蛋白结合的 DNA	204
13.4.5 DNA 分析	204
13.5 实验项目	204
13.5.1 经 EMSA 验证姜黄素可减少 B 淋巴细胞核中 NF- κ B 的量	204
13.5.2 经 ChIP 验证姜黄素可减少 B 淋巴细胞核中 NF- κ B 的量	207

第 14 章

蛋白质和蛋白质相互作用分析

——酵母双杂交等技术

14.1 概述	211
14.1.1 相互作用蛋白质组学	211
14.1.2 相互作用蛋白质组学的研究目标	212
14.1.3 相互作用蛋白质组学的研究内容和主要技术	213
14.2 酵母双杂交技术	214
14.2.1 酵母双杂交系统的原理	214
14.2.2 酵母双杂交系统的应用	215
14.2.3 酵母细胞内的高通量酵母双杂交	215
14.2.4 酵母双杂交系统的几个版本	216

14.2.5 酵母双杂交系统的假阳性问题	216
14.3 其他常用技术	216
14.3.1 细菌双杂交系统	216
14.3.2 噬菌体展示技术	218
14.3.3 依赖于亲和力和筛选相互作用蛋白质的方法	218
14.3.4 蛋白质芯片技术	219
14.4 实验项目	219
14.4.1 经酵母双杂交技术筛选 TRAC-1 相互作用蛋白质	219
14.4.2 GST 融合蛋白沉降技术筛选 RNF114 相互作用蛋白质	225

第 15 章

科学发展的不竭源泉——技术创新

15.1 “三性”实验	228
15.1.1 “三性”实验的概念	228
15.1.2 “三性”实验的特点和意义	228
15.1.3 实验教学体系的改革	229
15.1.4 “三性”实验基本要求	230
15.1.5 “三性”实验的一般程序	230
15.1.6 “三性”实验选题原则要求	230
15.1.7 “三性”实验的评估及实施	231
15.2 实验项目	231
15.2.1 酵母蔗糖酶的纯化及性质研究	231
15.2.2 猪胰蛋白酶的纯化及其活性测定	237
15.2.3 DNA 重组实验	240

第 16 章

确保实验技术的最佳效果——

实验室管理

16.1 实验室规则	248
16.2 实验用品的清洗	249
16.2.1 玻璃仪器的洗涤	249
16.2.2 塑料器皿的洗涤	250
16.2.3 实验器皿的干燥与消毒	250
16.2.4 常用洗涤液及其配制	250
16.3 实验标本的制备	251

16.3.1	血液样品的制备和保存	251
16.3.2	尿液标本的收集与保存	252
16.3.3	组织样品的制备与保存	252
16.4	实验仪器的使用	253
16.4.1	刻度吸管的使用	253
16.4.2	微量进样器的使用	253
16.4.3	单道可调式移液器的使用	254
16.4.4	蒸汽压力灭菌器的使用	254
16.4.5	酸度计的使用	255
16.4.6	干燥箱和恒温箱的使用	256
16.4.7	电热恒温水浴锅的使用	257
16.5	实验数据的处理	257
16.5.1	列表法	258
16.5.2	作图法	258
16.5.3	少量实验数据的处理	259
16.5.4	实验误差和提高实验准确度的方法	259

16.6	实验报告的书写	261
16.6.1	实验记录	261
16.6.2	实验报告	261
16.7	常用实验数据	262
16.7.1	一般化学试剂的分级及配制的 注意事项	262
16.7.2	实验室中常用酸碱的比重和浓度	264
16.7.3	常用缓冲溶液	264
16.7.4	溴化乙锭溶液的净化处理	270
16.7.5	离心机转数 (r/min) 与相对 离心力 (RCF) 的换算	271
16.7.6	硫酸铵饱和度的常用表	271
16.7.7	元素原子量表	273

参考文献	275
-------------	------------

第1章

如何在分子水平研究生命

问题讨论

1. 为什么要从分子水平研究生命?
2. 如何从分子水平研究生命?

生物化学与分子生物学是在分子水平上研究生命的科学,是人类探索生命的知识结晶和有力武器。生物化学与分子生物学的完整体系不仅包括其理论体系,还包括其技术体系。该学科快速发展在很大程度上得益于一系列实验技术的创新和仪器设备的发明,如DNA重组技术、核酸分子杂交技术、PCR技术、转基因技术、基因打靶技术、DNA芯片技术、基因测序技术、蛋白质组学技术等,这些技术本身构成了生物化学与分子生物学的重要内容。生物化学与分子生物学实验技术(experimental techniques of biochemistry and molecular biology)以生物分子为研究对象,通过各种手段对其理化性质、组成结构、功能活性以及在生命活动中的作用进行研究。

1.1 生物化学与分子生物学实验技术的发展简史

早在19世纪30年代,J. von Liebig就将定量分析技术用于生物体系的研究。20世纪20年代,微量分析技术用于生物分子的研究,导致了维生素、激素和辅酶的发现。20世纪30年代,J. A. Folin和吴宪先后建立了血糖分析、蛋白质含量分析、氨基酸测定等方法,这些方法至今仍在使用。

1923年,T. Svedberg制成了世界上第一台相对离心力(relative centrifugal force, RCF)为 $5000 \times g$ 的新型离心机,他用这台离心机准确测定了血红蛋白等复杂蛋白质的分子质量,开启了用离心机分离生物高分子的先河,为此,他获得了1926年的诺贝尔化学奖。为了纪念这位超离心技术的奠基人,人们将大分子沉降系数(sedimentation coefficient, s)的基数($10^{-13} s$)命名为1个Svedberg单位($1S=1 \times 10^{-13} s$)。

1809年,Peñce首次发现电泳现象。1909年,L. Michaelis首次将胶体颗粒在电场中的移动现象称为电泳(electrophoresis)。1937年,A. W. K. Tiselius对电泳仪器作了改进,制成“Tiselius电泳仪”,建立了研究蛋白质的移动界面电泳方法,并首次证明血清蛋白包括清蛋白及 α 、 β 、 γ 球蛋白。Tiselius在电泳技术方面作出了开拓性贡献,他获得了1948年的诺贝尔化学奖。1948年,Wieland和Fischer发展了以滤纸作为支持介质的电泳方法,对氨基酸进行分离。1949年,L. C. Pauling等用电泳法证明镰形红细胞贫血是因为有异常血红蛋白的存在,据此引入分子病

(molecular disease) 的概念。1950年, Durrum 用纸电泳进行各种蛋白质的分离, 开创了利用各种固体物质(如滤纸、醋酸纤维素薄膜、琼脂凝胶、淀粉凝胶等)作为支持介质的区带电泳方法。1959年, S. Raymond 和 L. Weintraub 利用人工合成的凝胶作为支持介质, 创建了聚丙烯酰胺凝胶电泳方法, 极大提高了电泳的分辨率, 开创了电泳技术的新时代。至今聚丙烯酰胺凝胶电泳仍是对蛋白质、多肽、核酸等生物高分子使用最普遍、分辨率最高的分析鉴定技术, 是检验生化物质纯度的标准分析鉴定方法, 被看作是对生物高分子进行分析鉴定最准确也是最后的手段 (Last Check)。1969年, K. Weber 应用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术测定了蛋白质的相对分子质量。1981年, J. W. Jorgenson 和 K. D. Lukacs 首先在 $75\mu\text{m}$ 内径毛细管柱内用高电压进行电泳, 建立了高效毛细管电泳技术 (high performance capillary electrophoresis, HPCE)。1984年, S. Terabe 等建立了胶束毛细管电动力学色谱方法。1987年, S. Hjerten 建立了毛细管等电聚焦电泳 (capillary isoelectric focusing, CIEF), A. Cohen 和 B. Karger 建立了毛细管凝胶电泳。1988年出现了第一批毛细管电泳商品仪器。由于 HPCE 高效、快速、经济, 适用于多肽、蛋白质(包括酶和抗体)、核苷酸以及 DNA 的分离分析, 短短几年内得到了迅速发展。HPCE 是经典电泳技术和现代微柱分离技术相结合的产物, 是一种可以自动化操作的高效分离技术。

1961年, B. D. Hall 和 S. Spiegelman 建立 DNA-RNA 分子杂交法。分子杂交技术与电泳技术相结合, 形成了新的实验技术——印迹技术 (blotting)。1975年, E. M. Southern 利用凝胶电泳分离 DNA 片段, 然后将 DNA 片段转移到硝酸纤维素膜上, 利用 DNA-RNA 杂交检测特定的 DNA 片段, 创立“Southern 印迹法”。尔后人们用类似的方法, 对 RNA 和蛋白质进行印迹分析, 对 RNA 的印迹分析称为“Northern 印迹法”, 对单向电泳后的蛋白质进行印迹分析称为“Western 印迹法”, 对双向电泳后的蛋白质进行印迹分析称为“Eastern 印迹法”。

1935年, G. Hevesy 制得人工放射性磷, 奠定了放射性核素示踪技术的基础, 这使他获得 1943 年的诺贝尔化学奖。同年, R. Schoenheimer 和 Rittenberg 将核素示踪用于糖类及脂类物质的中间代谢的研究。1942年, Schoenheimer 出版《身体成分的动态变化》, 该书大量采用 ^2H 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{14}C 等多种核素示踪的方法追踪代谢途径, 从而得出体内物质不断变化更新的动态概念。放射性核素示踪技术在 20 世纪 50 年代有了很大发展, 为阐明各种生物分子的代谢过程起了关键作用。

1940年, A. J. P. Martin 和 R. L. M. Synge 建立色层析法, 后来又发展为纸层析及分配层析, 并应用于分析氨基酸, 他们因此获得 1952 年的诺贝尔化学奖。1949年, W. H. Stein 和 S. Moore 报告了用淀粉柱区带层析测定 β -乳球蛋白的全部氨基酸组成。在 20 世纪 40 年代, 层析技术有很大发展, 成为分离生物分子的关键技术; 在 20 世纪 60 年代, 层析技术又有重大进展。1968—1972年, Anfinsen 建立了亲和层析 (affinity chromatography, AC) 技术, 开辟了层析技术的新领域。

1949—1950年, F. Sanger 发展了 2, 4-二硝基氟苯法, P. Edman 发展了异硫氰酸苯酯法鉴定肽链的 N-末端。1953年, Sanger 研究出蛋白质序列的测定方法。1958年, W. H. Stein、S. Moore 和 D. H. Spackman 设计出氨基酸自动分析仪, 加快了蛋白质的分析工作。1967年, Edman 和 G. Begg 建成多肽氨基酸序列分析仪。1973年, Moore 和 Stein 又设计出氨基酸序列自动测定仪, 大大加快了多肽一级结构的测定。

1975年, Sanger 建立 DNA 碱基序列的分析方法并不断加以改进, 1977年完成了 ϕX174 噬菌体全部 5400 个碱基序列的分析。1976年, A. Maxam 和 W. Gilbert 建立了快速测定大片段 DNA 序列的化学法。1977年, Sanger 提出应用链终止抑制法测定 DNA 序列。随后, DNA 序列测定仪、DNA 合成仪等相继问世。1985年, Smith 等报道了 DNA 测序中应用荧光标记取代核素标记

的方法。

Sanger 在 高分子测序方面作出了杰出贡献，他曾经两次荣获诺贝尔化学奖，1958 年因为确定了胰岛素的分子结构获奖，1980 年又因为设计出测定 DNA 核苷酸排列顺序的方法而与 W. Gilbert 和 P. Berg 共同获奖。

桑格传记

1918 年 8 月 13 日，Frederick Sanger 出生于英国格罗斯特郡的一个普通村庄。1939 年，他在剑桥大学圣约翰学院获得自然科学学士学位。1943 年，完成博士论文《赖氨酸的代谢》，获哲学博士学位，毕业后留校工作并开始研究胰岛素。桑格非常腼腆，不善言谈，不喜欢表现自己，讲课乏味，也不擅长工作上的沟通与合作，既无领导能力，又不去筹措科研经费，仅从事一些不需大量经费的研究项目，长期默默无闻，有几位助手因为耐不住寂寞离他而去。桑格认为，项目少反而使自己免受干扰，也不必分心面对多种选择，可以一心一意地把所能做的唯一研究课题进行到底。桑格经过多年的研究，终于找到一种试剂——2, 4-二硝基氟苯，给蛋白质一端的氨基酸着色、切割，然后用纸色层法分离测定氨基酸，测定胰岛素的分子结构。后来，此试剂被广泛用于标记氨基酸的氮端和碳，被称为“桑格试剂”。他应用逐级递增的方法，花费了 10 年心血测定了胰岛素的一级结构。1955 年，桑格公开发表了胰岛素的全序列，这是人类历史上第一次完整测定蛋白质中氨基酸的顺序，为以后人工合成蛋白质奠定了基础。1965 年 9 月 17 日，世界上第一个人工合成的蛋白质——牛胰岛素在中国诞生了。消息传出，引起强烈反响。1966 年 4 月召开鉴定会，许多科学家看到论文后纷纷来信来电祝贺，称赞中国作出了一项“可得诺贝尔奖”的工作。1966 年 8 月 1 日在华沙召开的欧洲生物化学联合会第 3 次会议上，中国人工合成胰岛素成了会议的中心话题。桑格特别兴奋地说：“中国合成了胰岛素，也解除了我思想上的一个负担。”因为有人一直怀疑他在 10 年前测出胰岛素一级结构的部分顺序。



研究高分子的空间结构离不开电子显微镜技术和 X 射线衍射技术。1932 年，M. Knoll 和 E. Ruska 制成世界上第一台电子显微镜模型，后来 Ruska 对模型作了改进，这就是现代电子显微镜的原型，电子显微镜打开了人类观察微观世界的窗口。1938 年，W. T. Asbury 和 F. O. Bell 对胸腺核酸进行了 X 射线研究；J. D. Bernal、I. Frankuchen 对糜蛋白酶进行了 X 射线研究。以后，J. C. Kendrew 利用 X 射线衍射技术测定了肌红蛋白的结构，M. F. Perutz 分析了血红蛋白的结构，他们二人因此获得 1962 年的诺贝尔化学奖。同年，M. H. F. Wilkins 因为用 X 射线衍射技术证实了 DNA 的双螺旋模型，与 J. D. Watson 和 F. H. C. Crick 分享了当年的诺贝尔生理学或医学奖。1965 年，D. Phillips 首次用 X 射线衍射技术阐明了鸡蛋清溶菌酶的三维结构。1969 年，D. M. C. Hodgkin 获得 0.28nm 分辨率的胰岛素晶体结构的分析结果。1970 年和 1974 年，梁栋材等先后完成了 0.25nm 和 0.18nm 分辨率的牛胰岛素分子结构的分析工作。1980 年，C. Anderson 和 D. B. McKay 利用 X 射线分析法测定了两种 DNA 结合蛋白质的结构。1989 年，J. E. Johnson 等用 0.30nm X 射线分析法测定了一种二十面体病毒中蛋白质-RNA 的相互作用。

1943 年，B. Chance 首次将灵敏的分光光度法用于酶-底物反应相互关系的研究。20 世纪 60 年

代,用于生物化学研究的各种仪器分析方法取得很大的发展,如高效液相层析(high performance liquid chromatography, HPLC)技术、红外、紫外、圆二色等光谱技术、磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)技术等。

20世纪70年代, W. Arber、H. O. Smith和D. Nathans 3个小组发现并纯化了限制性内切核酸酶,这为后来的重组DNA技术奠定了基础。1972年, P. Berg在体外成功重组猴细胞病毒SV40的DNA与 λ 噬菌体的DNA。1973年, S. N. Cohen将外源DNA片段插入大肠杆菌质粒后产生嵌合质粒,当嵌合质粒重新导入大肠杆菌时仍具有功能,这成为外源基因导入细菌的主要方法,从此开创了基因工程(genetic engineering)时代。20世纪80~90年代,基因工程技术进入辉煌发展的时期。

1984年, G. J. F. Kohler、C. Milstein和N. K. Jerne由于发展了单克隆抗体技术,完善了微量蛋白质的检测技术而获得诺贝尔生理学或医学奖。1985年, K. Mullis等建立了聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术,使一向昂贵、繁杂的分子生物学实验能够在比较简易、经济的条件下有效地开展,这是基因分析技术的重大突破,对于生物化学与分子生物学的研究具有划时代的意义。这一技术在很短的时间里风行全球,被广泛应用于众多学科领域。Mullis因此获得1993年的诺贝尔化学奖。

1.2 生物化学与分子生物学实验技术的完整体系

生物化学与分子生物学实验技术是在具体研究工作中建立起来的,并不断得到完善。从早期个别零散的实验方法,经过不断发展,形成了完整的实验技术体系。

生物化学与分子生物学实验技术按其研究目的和特点可分为4个层次:第一层次是对生物分子进行分析鉴定;第二层次是对生物分子进行人工合成;第三层次是对生物分子进行人工改造;第四层次是对生物分子进行功能研究。

1.2.1 对生物分子进行分析鉴定

不同的生物分子具有不同的理化性质,据此可以对其进行分离制备和分析鉴定,具体方法又可分为5类:①根据生物分子大小不同,可采用凝胶过滤法、超滤法、超速离心法、SDS电泳法等;②根据生物分子荷电不同,可采用等电聚焦电泳法、离子交换层析法等;③根据生物分子吸收光谱和放射性不同,可采用分光光度法(包括紫外、红外、荧光)、X射线结构分析法、共振法(包括电子顺磁共振、电子自旋共振、磁共振)、放射性核素示踪法、放射免疫分析法等;④根据生物分子疏水相互作用或氢键形成的引力不同,可采用反相高效液相层析法、分子杂交法等;⑤根据生物分子特异相互作用不同,可采用亲和层析法、免疫化学分析法等。

1.2.2 对生物分子进行人工合成

不同的生物分子具有不同的组成和结构,在搞清楚生物分子结构的前提下,可以对其进行人工合成。1828年, F. Wohler用氨及氰酸铅合成了第一个有机化合物——尿素;1953年, V. du Vigneaud合成了第一个多肽——缩宫素(oxytocin);1965年,中国人合成了第一个蛋白质——牛胰岛素;1981年,中国人合成了第一个核酸——酵母丙氨酸tRNA。这标志着人们不仅可以合成生物低分子,也可以合成生物高分子。合成生物高分子是极富挑战性的工作,例如合成牛胰岛素就花了7年时间。1963年, B. Merrifield提出固相合成法,并于1969年人工合成了具有酶活性的

牛胰核糖核酸酶。这一方法后来成为合成中等大小多肽的常用方法，在此基础上设计出多肽合成的自动装置，Merrifield 因此获得 1984 年的诺贝尔化学奖。现在氨基酸序列分析和序列合成、核苷酸序列分析和序列合成已经实现自动化。

1.2.3 对生物分子进行人工改造

生物分子的结构与功能有着密切的关系，尤其是生物高分子的组成和结构非常复杂，是长期自然进化的产物，对其进行改造，有可能使之产生新的功能。基因工程的兴起使人们可以按照预先的设计对 DNA 进行剪切拼接，将其引入细胞中进行克隆表达。基因工程是重组 DNA 技术的产业化设计与应用，包括上游技术和下游技术两大部分。上游技术即重组 DNA 技术，主要是基因重组、克隆和表达的设计与构建；下游技术主要是基因工程菌或细胞的大规模培养以及基因产物的分离纯化。从 20 世纪 70 年代开始，基因工程的发展已经经历了 4 代：第一代是经典基因工程，主要是使蛋白质或多肽基因进行高效表达；第二代是蛋白质工程 (protein engineering)，主要是通过基因的定向诱变使之表达出具有特殊功能的蛋白质；第三代是代谢工程 (metabolic engineering)，主要是利用基因工程技术定向改造细胞的代谢途径，以改善产物的形成和细胞的性能；第四代是基因组工程 (genome engineering)，主要是进行基因组或染色体的转移，也称染色体工程 (chromosome engineering)。

蛋白质工程是基因工程的一部分，是基因工程发展的第二代。蛋白质工程与经典基因工程虽然密不可分，但两者也有区别。经典基因工程是通过基因操作把外源基因转入适当的生物体内并在其中进行表达，它的产品是该基因编码的天然蛋白质。蛋白质工程是根据蛋白质的精细结构与功能之间的关系，利用基因工程的手段，按照人类自身需要，定向改造天然的蛋白质，甚至创造自然界不存在的新的蛋白质。蛋白质工程可以根据对分子预先设计的方案，通过对基因进行改造，来实现对它所编码的蛋白质进行改造。天然蛋白质都是通过漫长进化过程形成的，蛋白质工程相当于人为加快了进化过程，其产品已不再是天然的蛋白质，而是经过改造的具有人类所需优点的蛋白质。

经典基因工程通常只涉及少量基因的改造，例如将编码某种蛋白质药物的单一基因转入酵母，然后利用该酵母发酵生产该药物。代谢工程则涉及大范围的基因改变，例如要在大肠杆菌中生产某种代谢产物——紫杉醇，必须把相关途径一系列酶的基因全部导入大肠杆菌，并且敲除大肠杆菌中原有的不必要的和有害的代谢途径，以构建出一整套大肠杆菌中原本没有的紫杉醇代谢途径，使大肠杆菌能够生产紫杉醇。因此，代谢工程还是属于基因工程，只是改变基因的量非常大。

染色体工程是对染色体 (基因组) 进行设计和工程改造的一项综合性技术。染色体是基因的载体，将染色体切成片段进行重新组合，构成新的“人工染色体”。如果将这种人工染色体转移到其他物种的细胞内，培养成的生物体就称为“转染色体生物”。转染色体技术不同于转基因技术，前者是将人工染色体整合到宿主细胞内；后者是将单个基因种植于宿主的基因组内。两者所产生的生物效应有着本质差别，前者可以改造宿主生物的整体生理功能，后者只能改变宿主生物生理活动的某一环节或某一种蛋白质产品。转染色体技术比克隆技术更进一步，克隆是同一物种体细胞核移植后的无性生殖，产生的是同一个体的复制品；而转染色体技术则是将人工染色体转移到另一物种的去核细胞内，产生人造新物种。如果将人的染色体或染色体片段转移到其他生物细胞内，形成的“人源化生物”就能表达人的某些生理活动和表型。如果将人的一群相关基因转移到其他生物体内，该生物就能产生具有人类特点的生物分子、细胞、组织或器官。从人源化生物中可以获得人类可以接受的细胞、组织甚至器官，移植后不会产生排斥反应；也可以获得用作药物