



普通高等教育“十二五”规划教材

# 生物化学技术 原理及应用

第五版

赵永芳◎主 编  
黄 健◎副主编



科学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

# 生物化学技术原理及应用

(第五版)

主 编 赵永芳

副主编 黄 健

编 委 赵永芳(武汉大学)

何其敏(华瑞分子医学生物研究院)

王银善(中国科学院武汉病毒研究所)

黄 健(武汉大学)

肖华胜(上海佰豪生物技术有限公司)

刘建平(复旦大学)

黄 燕(复旦大学)

陈 洪(中国农业科学院油料研究所)

夏伏建(中国农业科学院油料研究所)

邓丽娟(武汉东湖学院)

## 内 容 简 介

本书是在第四版的基础上,结合近几年来科学进展修订而成。全书共分3编,20章:第一编概述蛋白质、核酸等生命大分子物质的制备方法及其基本要点;第二编讲解从动物、植物和微生物材料中分离纯化上述物质的常见方法,如离子交换层析、疏水层析、亲和层析、聚焦层析、凝胶过滤、高效液相色谱、沉淀法等;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序列测定、生物芯片、聚合酶链反应(包括DNA和RNA的扩增)、电泳(包括各种聚丙烯酰胺凝胶电泳和琼脂糖凝胶电泳等)、免疫分析(包括多克隆和单克隆抗体的制备、免疫扩散、各种免疫电泳、固相免疫吸附法——酶联免疫吸附法和免疫印迹法等)、薄层与薄膜层析、气相色谱、分光光度法和离心法等。书中在阐明各类方法基本原理的同时,还讲述了主要操作、注意事项及应用实例,在每章末尾附有思考题和主要参考文献,全书共有图、表360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,还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.—5版.—北京:科学出版社, 2015.3

普通高等教育“十二五”规划教材

ISBN 978-7-03-043805-8

I. ①生… II. ①赵… III. ①生物化学-高等学校-教材 IV. Q5

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第052582号

责任编辑:刘丹 韩书云/责任校对:韩杨

责任印制:赵博/封面设计:铭轩堂

**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>

**铭浩彩色印装有限公司印刷**

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2008年8月第 四 版 开本:787×1092 1/16

2015年3月第 五 版 印张:29

2015年3月第十四次印刷 字数:634 000

**定价:65.00元**

(如有印装质量问题,我社负责调换)

## 第五版前言


《生物化学技术原理及应用》教科书,从1988年第一版公开发行到今天的第五版,历时近30年。在这漫长的岁月里,承蒙不少读者一如既往对其支持和关心。编者认为主要缘由,一是书中各章均对生物化学相关方法阐述了具有广泛指导价值的基本原理、准确概念和关键环节等内容。另外,每一方法都融入了编者多年从事生物化学工作的心得感受,使读者容易掌握精髓,能够学会操作。二是书中体现了“授人以渔”的编撰理念,注重传授获取生物化学技术知识的方法和技巧,认真遴选能启发读者认识实验本质的实例,用心讲述,力求使读者能够举一反三、触类旁通,因此能有效调动读者勤学好问、多思善思的主动性和积极性。此外,本书主编近年为配合该教材的发行,特撰写了《〈生物化学技术原理及应用〉要点解析》(由科学出版社出版发行),对读者深入学习、理解本书内容及各章末尾的思考题大有裨益。

第五版的编排与第四版基本相同。本版修订的重点,主要包括:第一,各章内容不同程度地进行了增补、修改,在“序列分析”和“聚合酶链反应”章节中分别增写了第三代测序法和RNA扩增等内容;“生物传感器”章节有机地并入“固定化的酶与微生物”一章;把与“免疫分析”一章直接有关的、且也出现于本书其他章节的内容进行了调整和合并;“电泳”一章篇幅稍大,缩减了部分次要的素材;“细胞凋亡的检测”一章适宜自成体系,经斟酌后未编入本版;“标记”一章进行了版面调整和表述统一。第二,曾在本教材第一版编排的“分光光度法”和“离心法”两章,经时间过滤和删改增补后,适宜重新列入本版。实践证明,有些传统经典的方法,在生命大分子物质的分离、纯化和鉴定过程中是不可或缺的重要工具。

全书仍分20章,各章基本由第四版的原班撰稿人(见每章末尾,除“免疫分析”一章有邓丽娟新参加外)承担。全书由赵永芳审查、统编和定稿。

编者对多年来一直关注、支持本书并提出宝贵意见、建议的读者及打印、校对的王雨等表示谢意,同时感谢科学出版社的大力支持。

在本书再版修改过程中,参编人员呕心沥血、精心撰稿。但限于知识水平、编写能力及学科特点等原因,书中难免有不足之处,恳请读者指正。



2015年1月于武昌珞珈山



## 第四版前言

《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。

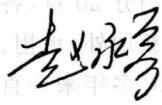
如今,值第四版修订之机,期待能以适应生化技术快速发展趋势的眼光,能从人们选择与评价专业书籍刊物的角度,对前一版中的原理要点、名词概念,以及文理图表等环节进行认真核查补正、遣词推敲,争取编撰出一本更符合读者心意、更能满足读者需求的教科书。

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,切忌矛盾、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



科学出版社

### 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,《生物化学技术原理及应用》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和应用的,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月于武昌珞珈山

# 目 录

第五版前言	
第四版前言	
第三版前言	

## 第一编 概 述

第一章 生命大分子物质的制备	2
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	3
第二节 测定方法的确立	4
一、目的与要求	4
二、常用的测定方法	4
第三节 细胞破碎	7
一、机械破碎	7
二、溶胀和自溶	8
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	12
一、沉淀法	12

二、吸附法	12
三、超过滤法	12
四、透析法	13
五、离心法	13
六、干燥法	13
第六节 纯化方案的设计与评价	14
一、纯化方案的设计	14
二、纯化方案的评价	15
第七节 有效成分纯度和性质的分析	16
第八节 应用实例	16
一、高纯度人转铁蛋白的制备	16
二、叶绿体的提取与 4.5S RNA 的制备	16
三、细菌质粒 DNA 的提取	17
思考题	17
参考文献	17

## 第二编 纯化方法

第二章 沉淀法	20
第一节 基本原理与沉淀类型	20
一、基本原理	20
二、制备蛋白质	20
三、制备核酸	29
第二节 应用实例	32
一、脾磷酸二酯酶的纯化	32
二、细菌染色体 DNA 的制备	32

三、蔗糖酶的初步纯化	33
思考题	33
参考文献	34
第三章 吸附层析	35
第一节 吸附柱层析	36
一、常用术语	36
二、基本原理	37
三、吸附剂	38



四、洗脱液·····	41	思考题·····	89
五、层析柱的制备与层析操作·····	41	参考文献·····	90
六、应用与实例·····	43	<b>第六章 凝胶过滤</b> ·····	91
<b>第二节 薄层层析</b> ·····	45	<b>第一节 凝胶的分类及性质</b> ·····	91
一、操作及注意事项·····	46	一、葡聚糖凝胶·····	92
二、应用实例·····	51	二、琼脂糖凝胶·····	94
<b>第三节 聚酰胺薄膜层析</b> ·····	52	三、聚丙烯酰胺凝胶·····	95
一、基本原理·····	52	四、Sephacryl·····	96
二、应用实例·····	53	五、Superdex·····	97
思考题·····	56	<b>第二节 基本原理</b> ·····	97
参考文献·····	57	<b>第三节 操作</b> ·····	100
<b>第四章 疏水层析</b> ·····	58	一、凝胶的选择和处理·····	100
<b>第一节 基本原理</b> ·····	58	二、凝胶柱的制备·····	101
一、疏水作用·····	58	三、加样与洗脱·····	102
二、吸附剂·····	59	四、凝胶柱的再生及保存·····	106
<b>第二节 操作与应用</b> ·····	59	<b>第四节 应用</b> ·····	106
一、层析柱的制备·····	59	一、脱盐和浓缩·····	106
二、加样与洗脱·····	60	二、分离生命物质·····	107
三、应用实例·····	60	三、去除热源物质·····	108
思考题·····	62	四、测定分子质量·····	108
参考文献·····	62	五、其他·····	111
<b>第五章 离子交换层析</b> ·····	63	思考题·····	111
<b>第一节 基本原理</b> ·····	63	参考文献·····	111
<b>第二节 离子交换剂的分类及性质</b> ·····	65	<b>第七章 亲和层析</b> ·····	112
一、分类·····	65	<b>第一节 基本原理</b> ·····	112
二、性质·····	71	<b>第二节 操作</b> ·····	114
<b>第三节 离子交换剂与缓冲液的选择</b> ·····	78	一、载体的选择·····	114
一、离子交换剂的选择·····	78	二、配体的选择·····	115
二、缓冲液的选择·····	79	三、亲和吸附剂的制备·····	116
三、加样量的确定·····	82	四、特异性吸附·····	118
<b>第四节 操作</b> ·····	82	五、分离大分子物质·····	120
一、离子交换剂的处理、再生和转型·····	82	六、亲和层析柱的再生·····	121
二、分离物质的交换·····	83	<b>第三节 提高吸附剂的操作容量</b> ·····	121
三、物质的洗脱与收集·····	84	一、在配体和载体间引入“手臂”·····	121
<b>第五节 应用</b> ·····	86	二、增加配体取代的程度·····	123
一、制备、纯化生命物质·····	86	三、配体与载体衍生物以最少的关键连接·····	123
二、测定蛋白质的等电点·····	89	四、载体多孔性的影响·····	123

五、其他 .....	124	第二节 反相高效液相色谱 .....	148
第四节 应用实例 .....	124	一、固定相、流动相和色谱柱 .....	149
一、纯化大分子物质 .....	124	二、纯化糖基化白蛋白肽片段 .....	151
二、研究酶的结构与功能 .....	127	第三节 应用 .....	153
三、实例 .....	128	一、定性和定量分析 .....	153
思考题 .....	131	二、测定酶活性 .....	154
参考文献 .....	131	三、测定蛋白质分子质量 .....	154
<b>第八章 聚焦层析 .....</b>	<b>132</b>	四、分离核酸和蛋白质 .....	155
第一节 基本原理 .....	132	思考题 .....	160
一、多缓冲剂和多缓冲交换剂 .....	132	参考文献 .....	160
二、聚焦层析原理 .....	133	<b>第十章 固定化的酶与微生物 .....</b>	<b>161</b>
第二节 操作 .....	136	第一节 制备方法 .....	162
一、多缓冲剂的选择 .....	136	一、固定化酶 .....	162
二、多缓冲交换剂用量的确定 .....	136	二、固定化微生物 .....	165
三、多缓冲交换剂的处理 .....	137	三、生物传感器 .....	166
四、样品的准备 .....	137	第二节 制品的性质 .....	167
五、加样和洗脱 .....	137	一、酶的相对活性 .....	167
六、样品中多缓冲剂的去除 .....	138	二、活性曲线与最适 pH .....	168
第三节 应用 .....	138	三、稳定性 .....	169
一、分离模型蛋白质 .....	138	四、米氏常数 .....	170
二、分离复杂物质 .....	139	五、其他 .....	170
三、鉴定某些酶的性质 .....	140	第三节 应用实例 .....	171
思考题 .....	141	一、工业方面 .....	171
参考文献 .....	141	二、医学方面 .....	174
<b>第九章 高效液相色谱 .....</b>	<b>142</b>	三、生化分析方面 .....	175
第一节 基本原理 .....	143	四、应用实例 .....	177
一、高效液相色谱仪 .....	143	思考题 .....	179
二、固定相 .....	145	参考文献 .....	179
三、流动相 .....	145		
四、洗脱液 .....	145		
五、检测器 .....	145		
六、应用 .....	145		
七、思考题 .....	145		
八、参考文献 .....	145		
		<b>第三编 鉴定方法</b>	
<b>第十一章 标记 .....</b>	<b>182</b>	第一节 标记物的纯化与鉴定 .....	195
第一节 核酸标记 .....	182	一、标记物纯化 .....	196
一、基本原理 .....	182	二、探针的鉴定 .....	197
二、标记方法 .....	183	第二节 应用实例 .....	201
第二节 蛋白质标记 .....	189	一、cDNA 组学和蛋白质组学 .....	201
一、机制 .....	190	二、激酶的磷酸化和脱磷酸化 .....	205
二、类型 .....	190	三、蛋白质半衰期的测定 .....	206
三、标记物制备 .....	191	思考题 .....	207

参考文献 .....	207	一、测序原理 .....	246
<b>第十二章 重组 DNA</b> .....	208	二、具体操作 .....	247
第一节 重组 DNA 的部件 .....	208	第四节 新一代测序法 .....	250
一、工具酶 .....	208	一、第二代测序法 .....	250
二、载体 .....	211	二、第三代测序法 .....	252
三、目的基因 .....	213	思考题 .....	253
第二节 重组 .....	218	参考文献 .....	253
一、黏性末端连接法 .....	219	<b>第十四章 生物芯片</b> .....	254
二、平端连接法 .....	220	第一节 基因芯片 .....	254
三、平黏连接法 .....	221	一、基本原理和工作流程 .....	254
四、T-A 连接法 .....	221	二、制备及操作 .....	257
五、同聚物加尾连接法 .....	221	三、应用实例 .....	262
六、人工接头连接法 .....	221	第二节 蛋白质芯片 .....	267
第三节 DNA 扩增 .....	223	一、原理及特点 .....	267
一、重组 DNA 导入宿主细胞 .....	223	二、制备与操作 .....	268
二、重组子的筛选与鉴定 .....	225	三、应用实例 .....	270
三、表达产物的纯化 .....	227	第三节 芯片实验室 .....	273
第四节 应用实例 .....	227	一、结构与制作 .....	273
一、分离总 RNA 和 mRNA .....	228	二、应用实例 .....	276
二、反转录合成第一链 cDNA .....	228	思考题 .....	282
三、PCR 扩增及其产物纯化 .....	228	参考文献 .....	282
四、PCR 产物的克隆 .....	229	<b>第十五章 聚合酶链反应</b> .....	283
五、重组质粒的提取及分析 .....	229	第一节 基本原理及操作系统 .....	283
思考题 .....	230	一、扩增 DNA .....	283
参考文献 .....	230	二、扩增 RNA .....	290
<b>第十三章 DNA 序列测定</b> .....	231	第二节 PCR 的类型 .....	294
第一节 双脱氧链终止法 .....	231	一、普通 PCR .....	294
一、基本原理 .....	231	二、原位 PCR .....	295
二、载体系统 .....	232	三、反转录 PCR .....	295
三、测序试剂 .....	236	四、反向 PCR .....	295
四、测序操作 .....	238	五、不对称 PCR .....	296
五、变性电泳 .....	241	六、巢式 PCR .....	296
六、序列读取 .....	242	七、彩色 PCR .....	297
第二节 PCR 法 .....	242	第三节 应用 .....	297
一、直接测序 .....	243	一、筛选目的基因 .....	297
二、循环测序 .....	244	二、直接测序 .....	297
三、应用实例 .....	245	三、标记 DNA 探针 .....	298
第三节 化学降解法 .....	246	四、寻找新基因 .....	298
参考文献 .....	246		

五、检测血液和组织成分 .....	298	二、免疫扩散 .....	357
六、检测环境中的致病菌与指示菌 .....	298	三、免疫电泳 .....	359
思考题 .....	299	四、固相免疫吸附 (含 ELISA) .....	363
参考文献 .....	299	五、免疫微球测定 .....	370
<b>第十六章 电泳</b> .....	300	思考题 .....	372
第一节 基本原理 .....	301	参考文献 .....	373
一、泳动度概念 .....	301	<b>第十八章 气相色谱</b> .....	374
二、影响泳动度的因子 .....	302	第一节 基本原理 .....	374
第二节 聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....	303	一、常用术语 .....	374
一、基本原理 .....	303	二、塔板与速率理论 .....	376
二、不连续垂直板状和柱状凝胶电泳 .....	309	第二节 气相色谱仪的构造 .....	379
三、连续的垂直板凝胶的电泳 .....	319	一、载气流速的控制和测量 .....	380
四、线性和阶梯式梯度的板状凝胶电泳 .....	320	二、进样系统 .....	380
五、双向电泳 .....	322	三、恒温室 .....	380
第三节 琼脂糖凝胶电泳 .....	323	四、色谱柱 .....	380
一、缓冲液的配制 .....	324	五、检定器 .....	384
二、琼脂糖胶板的制备 .....	324	第三节 操作 .....	385
三、加样和电泳 .....	325	一、操作要点 .....	385
四、观察 .....	325	二、条件的选择 .....	386
第四节 应用 .....	325	第四节 定性和定量检测 .....	386
一、测定分子质量 .....	326	一、定性检测 .....	386
二、测定蛋白质等电点 .....	328	二、定量检测 .....	387
三、鉴定微量物质 .....	333	第五节 应用 .....	390
四、诊断疾病 (转移电泳) .....	336	一、分析蛋白质和氨基酸 .....	390
思考题 .....	339	二、分析核酸 .....	391
参考文献 .....	339	三、分析糖类物质 .....	391
<b>第十七章 免疫分析</b> .....	340	四、分析脂肪酸 .....	392
第一节 抗体的性质、制备及纯化 .....	340	五、分析农药 .....	392
一、抗体的性质 .....	340	思考题 .....	392
二、多克隆抗体的制备 .....	341	参考文献 .....	392
三、单克隆抗体的制备 .....	346	<b>第十九章 分光光度法</b> .....	393
四、抗体的检测 .....	350	第一节 基本原理 .....	393
五、抗体的纯化 .....	352	一、光谱 .....	393
第二节 抗原抗体反应与应用 .....	354	二、物质结构与光谱的关系 .....	394
一、凝集反应 .....	354	三、光吸收的基本规律——比尔-朗伯定律 .....	396
		第二节 分光光度计的结构及类型 .....	397



一、主要结构	397	三、离心法	413
二、类型	400	四、沉降系数	415
第三节 应用	402	第二节 离心机的类型及构造	416
一、定性分析	402	一、制备型离心机	416
二、含量测定	404	二、分析型离心机	419
三、参数测定	409	第三节 应用	419
四、物质结构的分析	410	一、离心机的操作概述	419
思考题	410	二、应用实例	421
参考文献	411	三、测定沉降系数	423
<b>第二十章 离心法</b>	412	四、分离纯化生命物质	424
第一节 基本原理	412	思考题	424
一、沉降现象	412	参考文献	425
二、离心力	413		
参考文献	426		
附录	435		
中英文缩写词	448		

在细胞内，核酸的复制、转录和翻译是生命活动的基础。DNA 是遗传信息的载体，通过复制传递给子代。RNA 则在蛋白质合成中起着桥梁作用。蛋白质的合成依赖于 mRNA 的模板，在核糖体上由 tRNA 携带氨基酸进行。这一过程受到多种酶的催化和调控。

此外，细胞还通过信号转导途径感知外界环境的变化，并作出相应的反应。这涉及到受体蛋白、第二信使和蛋白激酶等分子的参与。细胞凋亡和增殖也是维持组织稳态的重要过程。

随着分子生物学技术的发展，我们对生命现象的理解越来越深入。基因组学、蛋白质组学和系统生物学等新兴学科正在揭示生命的复杂性。这些研究不仅有助于理解疾病的发生机制，也为新药开发和个性化医疗提供了理论基础。

# 第一编 概述

## 第一章 绪论

### 第一节 绪论

绪论部分主要介绍本书的研究背景、目的和意义。首先，阐述了当前生命科学领域的研究现状和面临的挑战。其次，明确了本书的研究目标和主要内容。最后，介绍了本书的编写原则和结构安排。

本书力求做到概念清晰、重点突出、循序渐进。通过深入浅出的讲解，帮助读者建立起对生命科学的整体认识。同时，本书还注重培养读者的科学思维和实践能力，为后续课程的学习打下坚实基础。

# 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,还与广大从事化工、医学和食品等学科的人员密切相关。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,不但潜在的数量多(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 个碱基交互排列而成的,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,使提取分离过程变得更加困难。最后,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。因此,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。本章将以蛋白质和核酸为主线讨论其制备的共有特质和一般过程,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(分别见后面各编评述)等相关步骤。

## 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,与选用的材料关系密切。如果选用的材料不同,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,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。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,每千克小肠可得肝素钠 5 万~6 万 U。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

从刚宰杀的牲畜得到的脏器(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。若不能马上抽提、纯化时,应及时移至 $-10^\circ\text{C}$ 冰库(可短时间保存)或 $-70^\circ\text{C}$ 低温冰箱(数月不变质)贮存。

脏器中常含有较多的脂肪,该物质不仅容易氧化酸败,导致原料变质,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( $50^\circ\text{C}$ 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的小组织,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(如菠菜、芹菜)的叶片,需用清水洗净方可使用,或置 $-30 \sim -4^\circ\text{C}$ 冰箱贮藏,可在 10h 内使用;若是植物的种子,则需泡胀或粉碎后才可使用。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 3 个月,检测降解对硫磷水解酶活力的影响时,发现无明显影响。

## 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,很难对其作出准确、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。例如,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。紫外光谱法是利用某些生物大分子物质具有吸收紫外线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,测定其表观吸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,即可从测定的吸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,会使其吸光值( $A_{260}$ )随之发生增高或降低变化,二者之间呈正比关系。通常 1 个  $A_{260}$  分别相当于 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  双链