

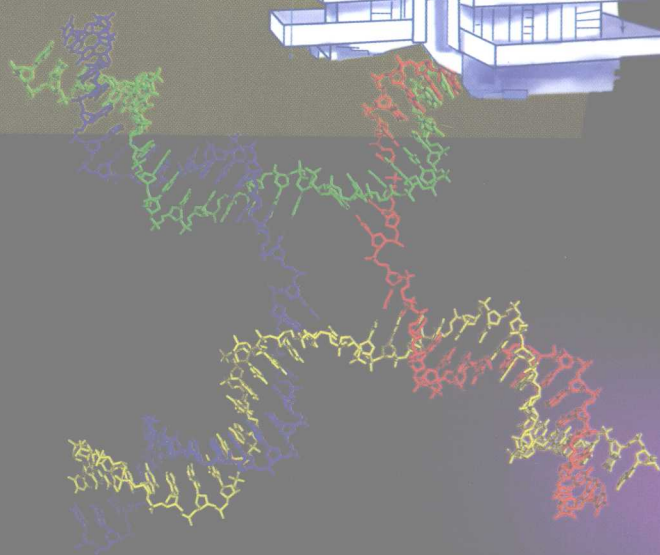
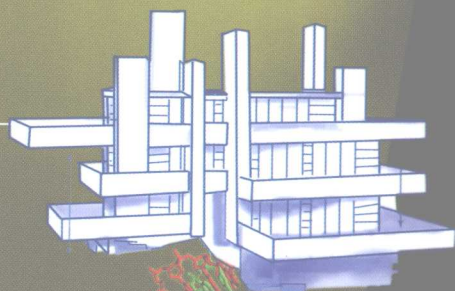


普通高等教育“十一五”规划教材

生物化学过程工程学

实践指导

蒋立科 郭春绒 主编



科学出版社
www.sciencep.com

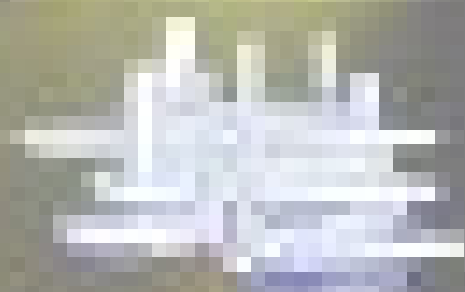


第 2 版 2015 年 12 月第 1 次印刷

生物化学过程工程学

实践指导

周建民 周建民 主编



化学工业出版社

普通高等教育“十一五”规划教材

生物化学过程工程学实践指导

主 编 蒋立科 郭春绒

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书的出发点旨在使读者不仅懂得怎样对已获成果进行孵化,而且能将其推上市场。体现对读者先进行内功操练,使其达到既能掌握从原材料筛选、分离提取、纯化精制的技术,又懂得如何克服产品进入市场的风险(如经营、产品销售等),真正能成为不但有理论修养,而且懂专业,还能通过实践逐步成为拥有开拓市场能力的人才。通过本书的学习和实践,也可使读者掌握在保持目标产物高活性、高纯度、高收率情况下,系统提取工程的概念,为进一步生物科学研究和开发应用训练技能奠定基础。

全书设绪论、基础性实验(内设21个实验,有的实验中还设若干平行实验供选择)、探索性试验(4个)和课程实践(2个)四部分。

本书适合生物化学工程、生物技术、生物制药、食品科学、生物工程和农林科技等相关专业使用,也适合上述专业对毕业实习指导的需要。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学过程工程学实践指导 / 蒋立科, 郭春绒主编. —北京: 科学出版社, 2009

(普通高等教育“十一五”规划教材)

ISBN 978-7-03-024436-9

I. 生… II. ①蒋…②郭… III. 生物化学-化学过程-实践-高等学校-教材 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 058705 号

责任编辑: 单冉东 沈晓晶 / 责任校对: 邹慧卿

责任印制: 张克忠 / 封面设计: 耕者设计工作室

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

*

2009年4月第一版 开本: 787×1092 1/16

2009年4月第一次印刷 印张: 11 3/4

印数: 1—3 000 字数: 258 000

定价: 25.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈环伟〉)

《生物化学过程工程学实践指导》编委会名单

主 编 蒋立科 郭春绒

副主编 文 汉 吴宗好 张玉琼

编 委 (按姓氏拼音排序)

郭春绒	郭 峰	蒋立科	金 青
梁小红	罗 曼	穆姝慧	彭艳辉
孙 锋	孙京臣	陶 芳	王 荣
魏练平	文 汉	吴宗好	张宽朝
张玉琼			

前 言

生物化学过程工程学实践指导是一门综合了生物学、物理学、化学等多个学科的理论、方法，把生物目标产物的生产、流通等环节集成的一门课程，它的产品提取纯化过程与现代科学研究发展规律方向一致，不仅要保持高活性、高纯度、高收率，而且要低成本、低污染，还要重视对原材料的综合利用，体现对资源的再生和节约。

本课程是生物目标产物在进入市场前生物学、物理学、化学三个过程及集成化系统的缩影。正如常言所说，“麻雀虽小，五脏俱全”。因此，在进行每个过程的实践内容前需做认真预习，不仅要全面熟悉当堂实践的内容，还要回顾已学过程工程学中的相关知识。有的内容还要去企业考察实践，培养自身“找水喝”的务实作用，摒弃依靠别人、依赖老师“给水喝”的惰性习惯，培养自己独立创业、自主创业的坚强性格，把已学的知识通过实践转变为自身创业的技能 and 能力。

本书设 25 个独立实验和工厂见习的指导提纲，均由富有经验的老师所编写。书中所列实验包含较成熟的并在应用的产品提取检测技术的训练，也有个别供探索的提示项目。但因这些实验的集成和开发利用研究尚只限于实验室水平，与真正生产过程有所差别，若有错误或缺漏之处，敬请广大读者提出宝贵意见。

作 者

2009 年 1 月

目 录

前言

绪论	1
第一篇 基础性实验	15
实验一 转氨基作用定性鉴定及氨基酸纸层析	15
实验二 胰岛素 N 末端氨基酸 DNS 分析法	19
实验三 金针菇子实体多糖 PA ₅ DE 的提取	22
第一部分 多糖的提取与纯化	22
第二部分 多糖组分的鉴定	24
实验四 豆腐柴的综合开发利用——叶豆腐的制作及其果胶的提取	26
实验五 总 RNA 提取与 mRNA 分离	28
实验六 硫酸软骨素提取工艺的研究	30
第一部分 硫酸软骨素的提取纯化工艺	30
第二部分 硫酸软骨素的检测	32
实验七 姜黄素的提取与实验应用	34
实验八 刀豆脲酶的分离纯化及动力学研究	39
第一部分 脲酶的分离与纯化	39
第二部分 脲酶纯度的鉴定	42
第三部分 刀豆脲酶活性测定	47
第四部分 蛋白质浓度测定	50
第五部分 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质亚基的相对分子质量	53
第六部分 刀豆脲酶的动力学研究	58
实验九 胰凝乳蛋白酶(糜蛋白酶)的制备	70
实验十 纤维素酶活力检测	73
实验十一 蛋清溶菌酶的提取及活性测定	78
第一部分 蛋壳蛋清的预处理	78
第二部分 蛋清溶菌酶的精制	79
第三部分 蛋清溶菌酶活性的测定	80
实验十二 柑橘皮果胶的提取工艺	83
第一部分 柑橘皮果胶的提取过程	83
第二部分 果胶产品合格率的检测	86
实验十三 牛眼透明质酸的分离及含量测定	89
实验十四 可溶性糖分离提取与薄层层析鉴定	92
实验十五 植酸钙的精制工艺	98

实验十六 真菌多糖的提取与鉴定	103
实验十七 牛乳中酪蛋白、乳蛋白素和乳糖的提取与检测	106
实验十八 辣椒红色素的制备和检测	109
实验十九 银杏叶黄酮的提取与分离	112
实验二十 亮菌素的生物合成、分离与鉴定	117
第一部分 菌物的培养与接种	117
第二部分 菌物的提取	118
第三部分 菌物的检测	119
实验二十一 竹笋过氧化物酶的提取及活性测定	121
第一部分 竹笋过氧化物酶的初步提取	121
第二部分 竹笋过氧化物酶精制	122
第三部分 竹笋过氧化物酶活性的测定	125
第二篇 创新探索性实验	127
实验二十二 石斛生物碱的提取分离与检测	127
实验二十三 啤酒酵母蔗糖酶的部分分离纯化和理化特性的监测	131
第一部分 啤酒酵母蔗糖酶的分离纯化	131
第二部分 圆盘电泳检测纯度	133
第三部分 酶活力、蛋白质浓度测定	134
第四部分 酶促动力学	136
第五部分 pH 对酶活性的影响	139
第六部分 酶的最适温度	141
第七部分 分子筛层析测酶相对分子质量	142
第八部分 蔗糖酶的 SDS-PAGE	143
实验二十四 复合酶中辅酶的测定	146
第一部分 辅酶 I 的测定——醇脱氢酶法	146
第二部分 辅酶 II 的测定——葡萄糖-6-磷酸脱氢酶法	148
第三部分 辅酶 A 的测定——乙酰化酶-磺胺法	149
实验二十五 RNA 干扰实验技术	152
第三篇 见习实践	161
第一部分 生产工艺流程实地技能考察及训练提纲	161
第二部分 生物制品市场流通过程考察指导提纲	163
附 见习报告范文（仅供参考）	167
附录	171
一、酸碱指示剂配制和变色范围	171
二、化学试剂的分级与保管	172
三、有毒化学药品相关介绍	173
四、常用层析分离材料	176

绪 论

《生物化学过程工程学》是一门指导读者从提高生物目标积累、分离、提取到投入市场的全过程性教科书。与之配套的《生物化学过程工程学实践指导》(以下简称《实践指导》)是指导读者对生物目标产物如何从改造结构基因、优化培养条件入手,提高目标产物分离量,获得高活性、高纯产物,增强产品的竞争力、生命力。

一、《实践指导》的性质和任务

1. 《实践指导》的重要性

“实践指导”是对学过《生物化学过程工程学》的学生步入社会从事食品、医药、生物制品等工作的一门实践课,一方面通过对该课程实习内容的学习和实践,使读者在实践上懂得生物物质的物理化学性质,不同物质成分分布特点及这些物质分离的基本路线;另一方面,通过对一定目标产品分离战略的实践体验,深入懂得如何选择、处理原材料及设计分离过程的方案,从而获得高活性、高纯度、高收率的产品,达到低成本、高效益;此外还要在对生物产品进行分离制备的流程中学会对物质提取的传递规律,既要减少能量和材料的消耗,又要注意控制被制备物质在传递时的流失,提高收率,还要注意制备中因采取剧烈条件去除非目标产物时对其所产生的损失。

因此,《实践指导》是一个将知识与生产实践相结合的纽带,是学生在目标产物制备过程中所获知识的积累和总结。

2. 《实践指导》的基本任务

《实践指导》课程学习的基本任务主要是熟悉各目标产物的材料来源及在细胞组织中存在的可分离性;通过对六大类(糖、脂、蛋白质、核酸、酶和次生产物)物质中各种可被分离及能通过扩大相近物质之间差别方法的学习,能设计出高效的分离途径;掌握某一目标产物各个分离阶段的基本模式,了解各分离阶段所需基本设备的性能并能进行选择,为设计系统制备目标产物的工艺流程奠定基础;通过《实践指导》的实践,增强市场化的观念,懂得生物学产品生产要面向市场并能被消费者接受。如果对制备生物产品的生产若存在只要能生产出来就算完成任务的想法,就会对该课程着眼点产生误区,使“过程工程学”学习失去方向。该课程的宗旨就是建立在面向市场、面向消费者,为社会经济直接发展的服务上。整个分离系统均需满足产品的高活性、高纯度、高产量,以及无污染和低消耗。

3. 实现生物目标分离的产物的中心理论贯穿全过程

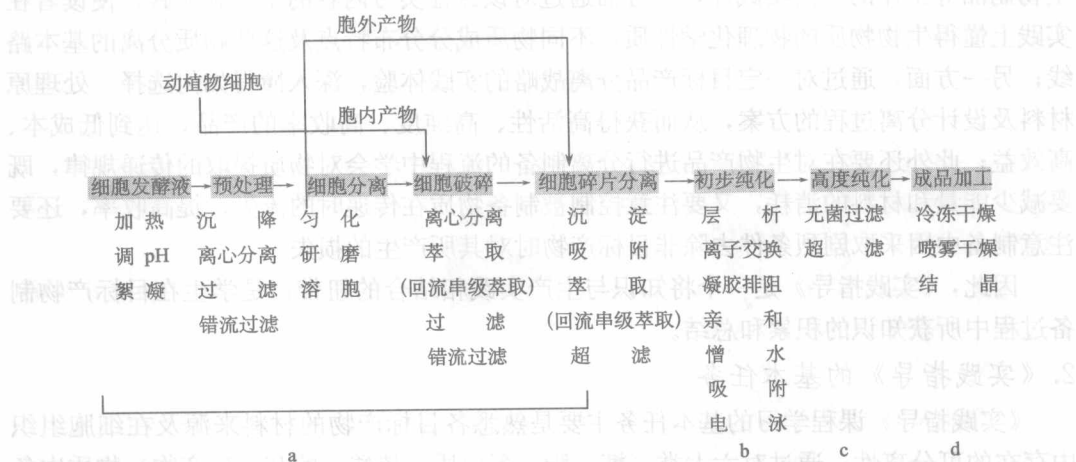
在对目标产物分离制备中,要突出目标产物这一中心,所采用的方法均需有利于对目标产物分离,产品分离中所采取的方法要为产品的“三高”、“三低”服务,其流程要适合于为批量和中试做准备,才有成果研发的市场外向性。

二、生物化学实验的步骤

由于人们所需的生物目标产物不同（如酶或各种代谢产物），用途各异，对产品的质量（纯度）要求是多方面的。故分离与纯化步骤可因产物属性的差异有不同的组合，提取和精制的方法也是多种多样的。但大多数生物目标产物分离过程常常按其过程的顺序分为四个类似步骤（图绪-1）。

（1）动、植物细胞内含物提取液及微生物发酵液的预处理和固液分离（或称不溶固体状物的去除）：在这一步骤中，过滤和离心是基本的单元操作，为了加速两相的分离，采用凝聚和絮凝等技术；为减少过滤介质的阻力，采用错流过滤，但这一步对产物浓度、样品纯度与活性质量的改善作用很小。

动物、植物材料因其组织成分的复杂性，如动物组织中的脂类、植物组织中细胞壁的降解产物等，均影响提取分离，前期的预处理与微生物不同。需要根据材料特点和来源进行预处理，然后破碎细胞制备粗提液。



图绪-1 生物化学实验过程的各阶段的单元操作

a. 目标产物原材料预处理；b. 初步分离提取；c. 高度纯化；d. 目标产物精制

（2）初步分离纯化：这一步骤没有特定的方法，主要是除去与目标产物性质有很大差异的物质，一般会发生显著的浓缩和产品质量的增加。典型的分离方法有吸附、盐析、萃取等。

（3）高度纯化：这类过程技术对产物有高度的选择性，用于除去有类似化学功能和物理性质的不纯物。典型的方法有层析、电泳等。

（4）精制：产物的最终用途决定了最终的加工方法，结晶常常是关键，如果用于研究其生物分子天然结构或构象状态，还需要进行特殊结晶。大多数产品还必须进行干燥，如真空减压干燥、冷冻干燥、喷雾干燥等。

以上步骤的各阶段都有若干单元操作可以选用，但应根据具体情况而定。为便于技术的选择，将各阶段主要的单元操作的原理、特点分述如下。

第一阶段：细胞的破碎（又称前处理）：这是提取分离细胞内目标产物的必经步骤，依破碎原理的不同，可分为物理、化学和生物学三类方法。

（1）物理方法。利用压力释放时固液剪切（如压力破碎）、固体剪切（如细胞珠磨）、超声波造成空穴产生压力冲击（如超声破碎）、渗透压突变造成细胞内压力差（如稀释法）、微波、超高压等多种力的应变作用而引起的细胞破碎。

（2）化学方法。采用改变细胞壁或膜的通透性，使产物释放（如有机溶剂法和表面活性剂法）。

（3）生物学方法。经酶（如溶菌酶、蜗牛酶、几丁质酶、纤维素酶、果胶酶等）的作用破坏细胞壁或细胞膜，使细胞内产物释放。

三类破碎细胞的方法究竟选哪种好，这要看所分离的目标产物是什么，目标产物的理化性质与用途是什么，以及细胞的材料特点和拥有的条件。

第二阶段：抽提与粗分离。在这一步骤中，是将细胞内所含的被提取的目标产物抽提或溶解出来，即选择一定的溶剂将其溶解后，再将溶解的目标产物与细胞碎片分离开来，或其固液两相分开，即利用被提取物电荷中和及大分子桥联作用形成更大的分子（如絮凝），或依照过滤介质空隙大小进行分离（如过滤），或依据被分离分子大小和膜孔大小进行分离（如膜分离）。

第三阶段：分级纯化。根据所提取各类分子的不同特点，利用各类分子间的显著差异将其分开，然后分别沉淀析出，如蛋白质的分离；采用破坏蛋白质分子水化层或电荷中和使之聚集成更大的分子团，或者通过化学试剂与目标产物形成新的化合物，改变溶解度而沉淀（如有机溶剂、等电点、盐析和化学沉淀法）。更为简洁的方法是根据对热的敏感性大小不同，采用加热变性处理除去杂蛋白，如溶菌酶、SOD等酶的纯化。

第四阶段：高度纯化。利用被分离目标产物各组分的电荷性质及数量不同、与离子交换剂的吸附和交换能力的不同进行分离（如离子交换层析）；依靠范德华力、极性氢键等作用将目标产物吸附于吸附剂上，然后改变洗脱条件，达到纯化目的（如吸附层析）；依据目标产物与专一性配基的相互作用进行精制纯化的亲和层析；依据染料分子与目标产物之间结合的专一性进行纯化的凝胶排阻层析；依靠疏水作用或被分离目标产物分子大小进行分离（如聚丙烯酰胺凝胶层析）；以有机溶剂为固定相，含水溶剂为流动相进行滤纸和薄板层析，对微量物质进行纯化。

第五阶段：结晶与精制。这是制备型生化分离的最后一步。通过该阶段使被分离物质转变成可利用的产品，该阶段主要依据对制品的质量、要求及用途来确定采用哪种方法。通过减压真空、冷冻真空、流化或喷雾等方法干燥。若所分离物质是被用作存在形式及高级结构研究（如蛋白质或DNA），则需保持分子的溶解或结晶状态，此时应采用晶体学的结晶法。

三、生物化学过程工程实验技术的沿革及其产品制备的工程化

分离、纯化及检测过程是生物目标产物及工程化中相互衔接的三部曲，几乎渗入到所有的生化研究和工业生产，并与反应过程相辅相成。随着对所需物质纯度提出越来越高的要求，以及科学技术的发展，分离、纯化和检测过程也不断地得到发展，新方法、

新工艺不断脱颖而出,新原理、新概念也层出不穷,经历着一个诞生和发展的过程。生物化学实验技术同样也经历着这样的过程。

如果将生物化学实验技术定义为“直接或间接地利用生物体的机能来制备目标产物的技术”,则可追溯到古代的酿造产业。古老的生物化学技术产品包括酿造酒、酱油、醋、酸奶、干酪等,当时还只是人类为了生存而进行的兴趣性的或盲目的探索,谈不上生物化学技术过程,产物基本上不经后处理而直接使用。

1. 传统(第一代)生物化学实验技术

传统生物化学技术的出现要从19世纪60年代算起,由于弄清了微生物是引起发酵的原因,随后又发现了微生物的有关功能,开发了纯种培养技术,从而使生物化学技术产业的发展进入了近代酿造产业的阶段。到20世纪上半叶时,除了原有酿造业产品的生物技术有了不少改进,还逐步开发了用发酵法生产乙醇、丙酮、丁醇等产品的方法。上述产品的特点是大多数属于厌氧发酵过程的产物,产物的化学结构比起原料来更为简单,主要采用压滤、蒸馏或精馏等设备,这种生产以经验为依据,可称为手工式的第一代,属原始生物化学分离、纯化时期。在这个时期,Sumner从刀豆中分离出脲酶的化学本质是蛋白质,我国科学家吴宪对血液蛋白变性进行了较系统的研究分析。

2. 生物化学实验技术产品制备的工业化

这是生化制品的第二代,出现于20世纪50年代。第二次世界大战中,随着青霉素、链霉素等抗生素工业生产的扩大,大型好氧发酵装置的开发和化工操作使酿造产业逐渐扩展为发酵产业。抗生素、氨基酸、核酸、有机酸、酶制剂、单细胞蛋白等一大批用发酵技术制造的产品投入了工业生产。这一时期的特点是产品类型多,不但有初级代谢产物,也出现了次级代谢产物如抗生素、多糖等,其分子结构较基质更为复杂,还有生物转化(甾体化合物等)酶反应(6-APA等)产品等。产品的多样性对生物化学提出了分离、纯化方法多样性的要求,与此同时,一个有利的因素也产生了,即化学工作者加入了生物化学反应过程的行列,一门反应生物与化工相交叉的学科——生化分离技术也随之在20世纪40年代诞生,并获得迅速发展。这个时期初期,英国的G.E.戴维斯和美国的A.D.立特尔特等提出了单元操作的概念,推动了实验和制备技术的发展,并被引入到生物化学技术产品加工过程中(表绪-1),同样也推动了生物化学产品的生产。从表绪-1可见,用于传统化学工业中的分离方法,约有80%在生物化学技术产品的生产中得到使用。所以在20世纪60年代以前,生物化学产品加工过程基本上是套用化工单元操作或略加改造,已能满足传统和近代发酵产品的工业生产需要,虽然这时也发展了离子交换色谱及电泳技术,但尚处于研究和实验室阶段。

表绪-1 用于生物化学技术的分离方法类型

分离方法类型	用于传统化学工业中的方法/种	用于生物化学分离中的方法/种
物理分离方法	7	7
平衡控制的分离方法	22	18
速率控制的分离方法	13	10
合计	42	35

3. 生物化学技术的现状

20 世纪 70 年代中期以来, 由于基因工程、酶工程、细胞工程、微生物发酵工程及生化工程的迅速发展, 特别是 DNA 重组技术及细胞融合技术等方面的一系列重大突破, 推动了现代生物化学技术产品即第三代生物化学技术产品的研究和开发。目前虽然产品还不多, 但潜力很大, 预计在不远的将来, 一个门类齐全、品种众多、技术先进、应用广泛的现代生物化学技术产业将会脱颖而出。这一技术特点体现在围绕产品应具有生物活性展开。

在现代生物化学技术上游工程发展的同时, 20 世纪 70 年代, 国际上也注意到了发展下游加工过程对发展现代生物化学技术及其产业化的重要性, 许多发达国家纷纷加强研究力量, 增加投入, 组建专门研究机构, 甚至包括生产公司和厂家, 也都展开了激烈的竞争。例如, 瑞典的 Biolink 公司, 它集 Alfa-Laval、Chem、LKB 和 Pharmacia 四家著名公司生物工艺之长组建而成, 并不断推出一代又一代新产品。

正是这种投入, 促进了 20 世纪 80 年代以来生物制品加工过程的迅速发展, 目前已达到工业应用水平的技术主要有以下几种。

(1) 回收技术。包括絮凝、离心、过滤、微过滤。发酵液是非牛顿型流体, 所以在一般情况下用普通的离心和过滤技术进行固液分离的效率很低。20 世纪 70 年代以来, 把在化工、选矿和水处理上广泛使用的絮凝技术引入到动、植物细胞匀浆液及发酵物料的处理上, 大大改善了细胞匀浆液与发酵物料的离心或过滤性能, 提高了固液分离效率。

对于传统的离心和过滤技术, 多年来在设备性能上作出了很大的改进, 如采用倾析式离心机 (decenter centrifuge) 和预辅助滤剂层的真空过滤机等。

一种新的过滤方法是利用微孔滤膜进行错流过滤, 它耗能低、效率高, 特别适用于动、植物细胞的收集。

(2) 细胞破碎技术。包括球磨、压力释放、冷冻加压释放、微波、超声波、超高压、液氮及化学等破碎技术。细胞破碎技术的成熟使得工程化大规模生产胞内产物成为可能。

(3) 初步分离技术。开发了酶和蛋白质的各类沉淀法, 如盐析法、有机溶剂沉淀法、化学沉淀法及离子交换层析分离法; 板框过滤技术的出现, 解决了对热、pH、金属离子、有机溶剂敏感的大分子物质的分离、浓缩和脱盐等难题, 提供了一种有效的分离技术, 它的工业应用使酶制剂工业生产有了突破性进展。

(4) 浓缩技术。一般生物材料的提取液体积大, 而有效成分含量少, 需要大量浓缩, 减小体积, 使有效成分在单位体积中的含量提高, 使有限的有效成分得到富集。目前浓缩技术除结冰、薄膜蒸发、旋转蒸发及凝胶吸附等方法外还出现了超滤浓缩, 不仅能通过超滤膜除去水而浓缩, 还能除去一些小分子化合物, 起到纯化作用。此外, 在常温下操作, 能使生物分子不受理化因素的影响, 起到保护生物分子活性的作用。

(5) 纯化作用。为提高提取物的纯度和比活, 人们开发了各类层析技术, 如亲和层析、疏水层析、聚焦层析等。用于生化工程的层析, 则主要是离子交换层析和凝胶层析, 前一种技术是到 20 世纪 60 年代以后才逐渐发展成为工业技术的。真正用于生物大

分子分离的层析技术,是各种类型的离子交换树脂、离子交换纤维素(如 DEAE-纤维素、CM-纤维素等)等商品化后才有了迅速的发展。凝胶层析技术的工业应用是 20 世纪 80 年代才得以实现的。

(6) 成品加工(精制):对于从事生物化学工程的人来说还要对成品进行加工精制,其主要工作是干燥与结晶,对于生物活性物质可根据其热稳定性采用喷雾干燥、气流干燥、沸腾床干燥、冷冻干燥等技术,特别是冷冻干燥技术在蛋白质产品的干燥上广为应用。正是以上各种实验技术和设备研究开发成功,才使现代生物化学技术的发展取得重大突破,推动胰岛素、生长激素、乙肝疫苗和干扰素等一批基因工程和细胞工程产品陆续进入工业化生产阶段,提高了一些传统发酵产品和动、植物提取物生产的经济效益。近 10 年来,将这些技术应用于农副产品的深加工,如小牛和乳猪促肝脏生长素、牛和猪胰蛋白酶抑制剂、结缔组织中的黏多糖和大豆磷脂的开发,大大提高了农、副产品的附加值。我国许多省(如山东、河南、安徽等)均把农产品生化加工列为经济腾飞的支柱产业之一,促进了我国农业现代化的进程。

四、生物化学检测技术及其发展动向

生化制品的检测,不仅能对其目标产物进行鉴定,确证所制备的产物是否为所实验和研究的对象,而且能为跟踪所研究生命过程中目标产物的去向提供手段,还能将其目标产物如基因及其表达产物变成经济效益。生物化学检测技术(简称生化检测技术)既是生物化学实验技术中的三大支柱之一,也是生化过程工程学实验中极其重要的组成内容。对于未来从事生命科学工作的大学生来说,更占有极重要的地位。

经典的生化检测技术,最早采用化学分析手段,如通过某种化学反应产生的颜色判别其目标产物或某一基团的存在,但这并不能表明生物类大分子在生化反应中的变化过程,如酶促反应等。根据生物大分子结构对光的吸收性及带电特点,近代发展了紫外吸收分析、气相层析-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GCMS)、色谱法、同位素跟踪、荧光标记及电泳分析等新技术,对生物大分子进行检测。随着现代科学技术的进步,目前人们又创立了分子信标、动态激光散射、显微多道分光光度法、纳米粒子标记、质谱电离技术与核磁共振等技术对生物大分子进行检测,使生物大分子检测技术有了飞跃的进步,推动了人们对生命现象本质认识的深入。限于篇幅,本书只对近 10~15 年所发展起来的方法予以介绍。

1. 分子信标检测技术

核酸是生物体最重要的信息分子,其目前常用的方法有 DNA、RNA 印迹和 PCR 等。这些方法操作中的一个共同点是必须把未杂交的探针和引物与杂交体分离,然后才能借助其他信号对靶核酸进行检测,操作繁琐复杂,技术难度大,而且难以对核酸进行准确定量检测,更不能对活体内的核酸进行研究。

分子信标(molecular beacon)是根据核酸碱基配对原则和荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)现象设计的。FRET 是一种非常有名的荧光现象,当一个荧光分子(又称为供体分子)的荧光光谱与另一个荧光分子(又称受体分子)的激光光谱相重叠时,供体荧光分子的激发能诱发受体分子发出荧光,同时供体

荧光分子自身的荧光强度发生衰减。FRET 程度与供体、受体分析的空间距离紧密相关,一般为 7~10nm 时即可发生 FRET,随着距离延长,呈 10^6 显著减弱。FRET 现象已广泛应用于生物大分子内和分子间的相互作用等生物学研究。

分子信标是基于 FRET 现象设计的一段与特定核酸互补的寡核苷酸探针,分子信标长约 25bp,在空间结构上呈茎环结构,其中环序列是与靶核酸互补的探针。根据分子信标的设计原理和目前的实验结果,与常规核酸检测方法相比,分子信标具有 7 个特点:①可以进行液相杂交检测。常规核酸检测方法主要为固相杂交,要把未结合的探针和引物分离后才能利用其他信号对靶核酸进行检测,分子信标可以直接加入核酸扩增体系进行检测,可以直接在紫外灯下检测或借助荧光光谱仪进行定量检测。②有效消除核酸交叉污染。利用分子信标可以直接对封闭微量离心管或多孔板中的核酸检测,完全避免核酸中间操作环节,彻底消除核酸交叉污染。③可进行核酸实时(real-time)检测。在 PCR 体系中加入分子信标,并把 PCR 仪与荧光光谱仪相连,可以对 PCR 反应过程进行监测。④特异性强。在对分子信标与靶序列杂交特异性的研究中意外发现,与线性寡核苷酸探针相比,茎环状结构的分子信标监测特异性更高,靶序列中单个碱基的错配、缺失或插入突变均能检测出来。⑤灵敏度高。分子信标可以直接检测核酸,在应用过程中常与 PCR 核酸扩增技术联合应用,因而低至 1 拷贝的核酸也能检测,敏感性很高。⑥可实现核酸大规模自动化检测。分子信标的最大优点是可实现核酸大规模自动化检测,分子信标在核酸检测应用中的例子充分证明了这一点。⑦可对活体内核酸动态进行检测。目前尚缺乏有效的方法对活体内核酸直接进行研究,分子信标技术为活体内核酸代谢转移等动态过程研究提供可能并已用实验验证。

Giesendorf 等利用分子信标检测了人亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因的点突变。MTHFR 基因的点突变是导致心血管疾病和神经管缺陷的主要因素,研究结果发现,利用分子信标可以快速、准确地对 MTHFR 基因点突变进行半自动化检测,而且能完全避免核酸交叉污染,为致病基因点突变的自动化大规模检测奠定了基础。

分子信标不仅可以检测基因缺失突变和点突变,还可以对片段 DNA 突变进行分析。Matsuo 以人碱性呈纤维细胞生长因子(bFGF)基因为模型,利用分子信标研究了 bFGF mRNA 在细胞内的代谢运转过程。设计的 15bp 长分子信标两端分别以荧光基团 EDAS 和淬灭分子 DABYL 标记,在脂质体作用下进入细胞。结果发现在倒置显微镜紫外灯照射下,与 bFGF mRNA 互补的分子信标在细胞内发出蓝色荧光,而对照序列的分子信标在细胞内检测不到荧光;而且,分子信标对细胞生长状态无影响。分子信标技术开辟了检测活体内核酸的新方法。

2. 准弹性激光散射技术

光传播时其交变的电磁场引起介质中分子的电子产生强迫振动,这种振动成为二次波源向各个方向辐射电磁波,这是光散射的起因。当微粒子或分子的极化率与周围介质的极化率不同时,便可观察到散射光。如果散射中没有能量转移,散射光的频率应与入射光的频率相同,即发生所谓的静态光散射。但实际上,介质中的质点或分子在不停地作布朗运动,入射光与热运动的分子或粒子发生准弹性碰撞,使它们发生微小的能量变化,结果是散射光场以入射光频率 ω_0 为中心而展宽,此时即发生所谓的动态光散射。

激光散射技术在生物大分子溶液性质研究方面的应用越来越广泛,在某些方面,如蛋白质分子的缔合、聚集等研究中,是其他手段无法比拟的。作为经典的静态光散射方法,它可以测得大分子的平均相对分子质量 M_r 、旋转半径 R_g 以及第二瑞利散射系数 A_2 等重要参数。特别是近十几年发展起来的动态光散射方法,可以测得光强的时间相关函数,从而可得到大分子的平均扩散系数 $\bar{D}$ 及平均流体力学半径 R_h 。该技术具有不破坏样品所处的环境状态,能快速跟踪体系的变化过程等优点,这对于研究生物大分子的溶液状态行为特别适用。该项技术现已在蛋白质研究中开始应用:

(1) 相对分子质量的测定。利用光散射方法测量蛋白质的相对分子质量可以追溯到 20 世纪 30 年代,1931 年 Halwer 等报道了一系列蛋白质相对分子质量的测定,他们在 90° 散射角下测量得到了 β -乳酸球蛋白 (3.57×10^4)、卵蛋白 (4.57×10^4)、溶菌酶 (1.48×10^4)、牛血清白蛋白 (7.3×10^4) 和马血清白蛋白 (7.9×10^4) 的相对分子质量。他们认为只要有足够纯的和未变质的样品,光散射法比渗透压法就有优越性,它所需时间短,而且检测范围宽,还有可连续检测的特点,这可使它非常有效地跟踪体系随时间变化的过程。

根据散射理论的基本原理,采用 Zimm 作图法进行角度和浓度外推,可以得到 M_r 、 R_g 和 A_2 三个参数。但对于相对分子质量很大的生物高分子,如膜蛋白来说,由于这种角度依赖性使得测量结果可能不准确。小角激光散射的出现解决了这一难题,它可在极低角度下,只要进行浓度外推即可得到 M_r 和 A_2 ,但不能得到 R_g 。20 世纪 80 年代以来,小角激光散射与高效凝胶色谱联用被广泛地应用到蛋白质相对分子质量的测定中,例如,用该技术研究了膜蛋白、糖蛋白的相对分子质量和混合物的核酸酶、溶菌酶和牛血清蛋白的平均相对分子质量。

(2) 生物分子大小、形状及构象变化的研究。运用静态和动态散射技术可以有效地研究蛋白质分子的大小、形状和构象的变化。例如,肌动蛋白是真核细胞中常见的蛋白质之一,它参与细胞运动和传递现象中的许多不同的过程,该过程依赖于单体 (G) 和聚合体 (F) 间的动态平衡,而 F-肌动蛋白与各种不同的肌动蛋白的结合蛋白发生缔合作用,因此, G-肌动蛋白的尺寸和形状直接影响细胞的生命过程。以前,虽然通过 X 射线衍射和光学衍射技术得到了很有价值的有关动态肌动蛋白的几何形状和区域结构的信息,但是关于 G-肌动蛋白的聚合动力学及在细胞质中它与其他蛋白质的相互作用和在生理条件下溶液中的分子结构信息,就要利用动态光散射等现代新技术。Patkowski 等利用动态光散射和退偏动态光散射技术测量了水溶液中球形肌动蛋白的分子大小,测得了肌动蛋白分子在水溶液中的平动扩散系数 D_T 和旋转扩散系数 D_R ,并用双轴椭球形来模拟肌动蛋白的分子形状,结果与固体中的形状十分相似。

Patkowski 等利用动态光散射和退偏动态光散射技术研究了凝溶胶蛋白 (gelsolin, 一种依赖于钙的肌动蛋白的结合蛋白) 的分子大小、形状参数和 Ca^{2+} 诱导的构象变化。由测得的旋转和平移扩散系数,得到了在络合剂乙二醇二乙醚二胺四乙酸 (EGTA) 存在下与流体力学等效的、轴比为 0.23 的旋转椭球体。在 Ca^{2+} 存在下,当凝溶胶蛋白有两个 Ca^{2+} 键合时,平移扩散系数明显减小而转动扩散系数减小较少,这说明该蛋白从拉长的椭球形转变为较圆形的形状 (轴比变为 0.37),其流体力学体积为无 Ca^{2+} 时的两

倍。但静态光散射证明其表现相对分子质量保持不变,这说明体积的增大不是由该蛋白聚集引起的。这种在 Ca^{2+} 存在下的相对较大的构象变化,可能与分子表面的电荷的改变有关。由于这种构象的变化,肌动蛋白的键合位置变得更加显露,使得该蛋白对两分子肌动蛋白的亲合力更强。

(3) 分子的缔合和聚集。蛋白质分子的缔合和聚集现象是与其生理作用密不可分的,这是一种普遍现象。许多因素,诸如温度、pH、蛋白质本身浓度、离子强度、金属离子等都可引起缔合和聚集。当发生缔合和聚集时,用静态光散射测得的 M_w 、 R_g 和 A_2 参数会显著地改变。因此,静态光散射早就被用于研究蛋白质的缔合和聚集行为。动态光散射可提供平动扩散系数 D_T 和表观扩散系数的角度依赖性系数 C' 及浓度依赖性 K_D 三个重要参数。 D_T 和推导出随浓度等因素的改变的 R_h ,体现了缔合和聚集的存在,而它们改变的时间函数则反映了缔合和聚集的过程。静态和动态光散射相结合获得的 R_g 、 R_h 、 R_{eq} (由热力学定义的等效硬球半径) 不仅含有缔合体 and 聚集体的大小、形状的信息,而且可用于计算缔合体和聚集体单体数目。系数 C' 决定于聚集体颗粒的散射因子形式,从另一个角度提供了聚集体颗粒的形状信息。

3. 对生物分子的显微多道分光光度法检测

显微多道分光光度技术是一种将光学显微镜和分光光度技术相结合,在完整细胞水平上对细胞内成分进行定性、定量或局部定位分析的先进技术。它把定性细胞化学方法推进到数值化局部定量的研究范围。利用该技术可对生物组织、细胞、细胞产物及细菌、寄生虫等进行光密度测量、光谱吸收测量、荧光光度测量,面对研究对象的代谢成分极为复杂、形态各异。传统的显微分光光度系统由于采用单通道光学检测系统,检测时间长,难以进行时间分辨要求高的光谱检测,而且仪器体积庞大,结构复杂,操作不便。近年来,也有一些专业厂家研制出新型显微多道分光光度系统(如 Zeiss 的 MCS Diode Array Spectrometer for Microscopy),这些系统适用于以二极管阵列作为检测器,可使检测时间加快到 20ms,光谱波长检测范围 350~800nm,最小检测区域 $5\mu\text{m}$ 。但是,由于采用二极管阵列,其空间分辨率受到很大限制。因此,此类显微多道分光光度系统的波长分辨率仅在 2.5nm 量级。为此,我国黄耀熊、籍涛等研究开发出一种采用线阵电荷耦合器件(charge couple device, CCD)结合数字信号处理技术构成的显微多道分光光度检测装置,可对微区样品在 350~800nm 波长范围内进行快速光谱检测(最快检测时间为 1ms),波长分辨率可达 0.2nm。由于具有探测波长全范围内光谱一次快速成像、分辨率高、积分时间可调、信噪比高、体积小、便于操作的特点,以及 Windows98 操作环境下的系统软件和计算机强大的数据处理能力,可实现快速、准确、多功能的显微样品分析能力。

显微多道分光光度系统基于一倒置显微镜(NIKON TE300)上。显微镜卤钨稳流光源(100W)光束通过孔径大小可调的光阑 1 后,经透镜聚焦后照射到样品上。其对应孔像直径在 1~200 μm 范围内可调。物镜收集的样品透射光通过中间接力透镜,再经检测光阑 2 入射至分光器。分光器由反射光栅构成,它将光谱展开于 CCD 检测器感光像元上。显微镜放大倍数可在 20~200 倍变化,应检测样品微区直径范围为 1~125 μm ,可根据测量需要选择。