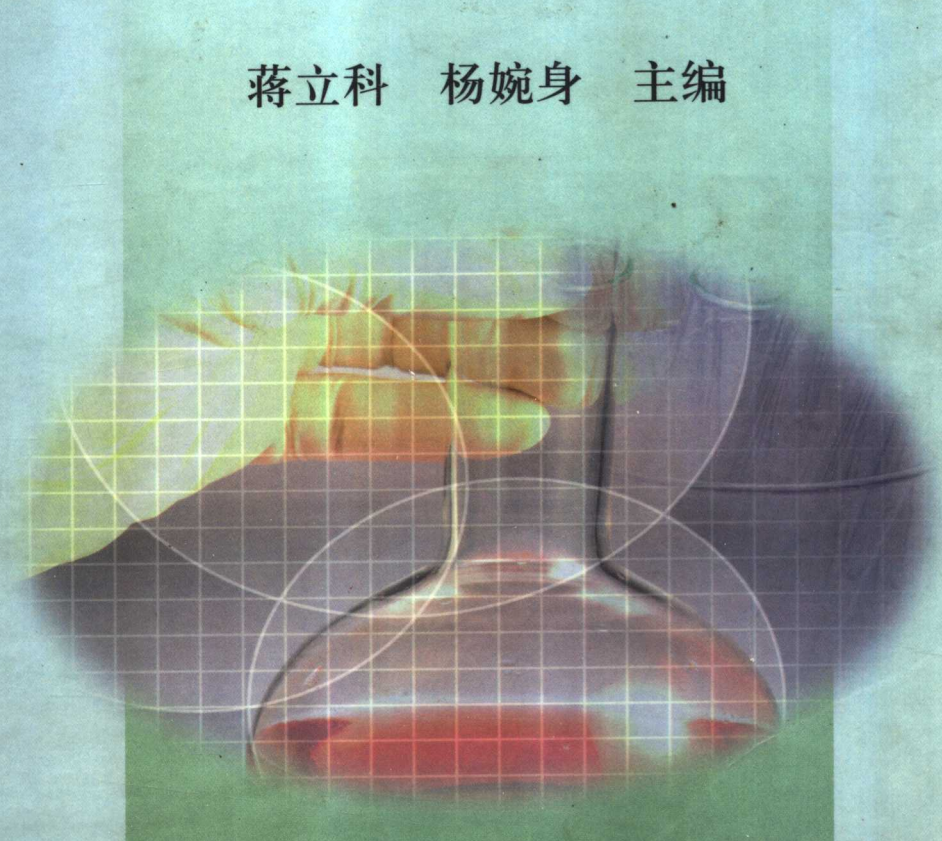


全国高等农业院校教材  
全国高等农业院校教学指导委员会审定

# 现代生物化学实验技术

蒋立科 杨婉身 主编



中国农业出版社

全国高等农业院校教材  
全国高等农业院校教学指导委员会审定

# 现代生物化学实验技术

蒋立科 杨婉身 主编

中国农业出版社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

现代生物化学实验技术 / 蒋立科, 杨婉身主编. —北京: 中国农业出版社, 2003.8

全国高等农业院校教材

ISBN 7-109-08391-8

I. 现... II. ①蒋...②杨... 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 (2003) 第 072173 号

中国农业出版社出版  
(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)  
(邮政编码 100026)  
出版人: 傅玉祥  
责任编辑 毛志强

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行  
2003 年 8 月第 1 版 2004 年 9 月北京第 2 次印刷

开本: 787mm×960mm 1/16 印张: 22.5  
字数: 352 千字  
定价: 29.50 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

# 前 言

生物化学是农业院校中大多数专业的基础课，而该课程又是建立在坚厚的实验基础上的。没有实验课，学生难以理解现代生物化学理论，也影响着学生对相关课程（如细胞学、生理学、分子生物学、遗传学、微生物学等）的学习。因此，生物化学实验不仅是生物化学教学的重要组成部分，而且在培养学生分析和解决问题能力、独立工作能力和严谨科学态度等方面，有着不可替代的作用。其次，随着科学技术的飞速进步，生物化学和分子生物学发生了深刻的变化，为使大学生能尽快消化新的技术和理论，迫切需提高大学生动手和动脑能力，需要在原有实验教材的基础上改变原有教材编写思路和内容，使之有利于培养学生发现、分析、解决问题的创新能力，为大学生进入现代生物化学、分子生物学和结构生物学研究领域打下基础。

本教材从农业院校具体实际情况出发，打破生化实验教学以基础性、论证性实验覆盖一切的编写思路，以培养学生自己动脑、动手及脑手结合为出发点，以农副产品深加工为动力，从原材料的选择、处理开始，通过点缀关键处，激发学生的积极性；紧密抓住基本技能训练，掌握生化实验技术，在实践中消化生化基本理论。通过本教材的使用，使学生初步学到由易到难，由简到繁，由初步懂得到深刻理解的学习方法，促进从单纯的传授专业知识向培养学生发现问题，独立获取知识和创新能力的转变；通过该教材的使用，对本科生进行专业思想的辅助教育，激发、培养和增进学生以农为本，以农为荣，热爱农业的信念，认清生化技术在新农业发展中的重要地位，能动地为加速现代农业服务。

本教材从根本上改变了过去那种一切由书本或教师准备好的条件，再由学生去模仿的饲喂式摄取知识的状况，而由学生作为主人，从实验准备、制备至目的物的鉴别，加强每个系列上中下实验的联系，前一个实验为后一个实验打下基础，体现了思维的

连续性；各系列中实验技术各有独立性，体现各种方法的代表性，由易到难，由分散到综合，以培养学生的自主意识，克服依赖思想，走上自觉学习的轨道。

本教材系作者根据长期从事应用生物化学研究和教学所获得的成果和经验而写成的，全书分三大部分。第一部分为生物化学主要实验技术原理。第二部分为实验，该部分设糖类、脂类、蛋白质、核酸、酶、新陈代谢六个系列，每个系列贯穿基础、设计、综合三方面技能训练，其比例分别为50%~70%、15%~20%、10%~15%，均改变原来纯验证式的教学方法。共设28个实验，依照实验性质的不同，有的实验又分若干小实验，各高校可根据实际情况选用。第三部分是附录，即实验室规则和安全事项等，供预备实验时参考。

本教材中，尽管每个实验都经过编者反复摸索研究后编写而成，但由于实验条件和水平的限制，仍然有不足或不妥，恳请读者给予批评斧正。

蒋立科

2003年5月

# 目 录

前言

绪论..... 1

## 第一编 基本原理

第一章 生化成分制备基本策略 ..... 19

第一节 材料的培养、选择与预处理 ..... 19

第二节 细胞破碎及目的物抽提 ..... 21

第三节 目的物初级分离 ..... 24

第四节 目的物的精制与纯度鉴定 ..... 30

第五节 制品的浓缩、干燥与保存 ..... 39

第二章 层析技术 ..... 43

第一节 概述 ..... 44

第二节 纸层析 ..... 53

第三节 离子交换层析 ..... 69

第四节 离子交换纤维素层析 ..... 85

第五节 凝胶层析 ..... 99

第六节 亲和层析 ..... 118

第三章 电泳技术 ..... 135

第一节 电泳的基本原理和影响因素 ..... 135

第二节 聚丙烯酰胺凝胶电泳 ..... 139

第三节 琼脂糖电泳 ..... 151

第四节 醋酸纤维素薄膜电泳 ..... 153

第五节 毛细管电泳 ..... 154

第六节 电泳技术的拓展和创新 ..... 157

第四章 离心技术 ..... 163

第一节 原理与应用 ..... 163

第二节 离心机的结构及主要部件性能 ..... 169

第三节 常用离心技术 ..... 181

第四节 离心机的操作与安全事项 ..... 190

## 第二编 实验内容与方法

<b>第五章 糖生物化学实验</b> .....	194
实验一 植物组织蔗糖及其他还原糖的分离测定 .....	194
实验二 容量法测定马铃薯中淀粉含量 .....	198
实验三 比色法测定果糖含量 .....	202
实验四 透明质酸的分离与鉴定 .....	204
实验五 真菌多糖的提取与鉴定 .....	206
<b>第六章 脂类化学实验</b> .....	209
实验一 粗脂肪的提取和检测 .....	209
实验二 油脂品质测定 .....	212
实验三 豆磷脂的制备与鉴定 .....	218
<b>第七章 蛋白质化学实验</b> .....	224
✓ 实验一 酪蛋白提取及定量测定 .....	224
实验二 酪蛋白性质测定 .....	233
实验三 酪蛋白醋酸纤维素薄膜电泳 .....	237
✓ 实验四 凝胶过滤法测定酪蛋白分子量 .....	241
✓ 实验五 SDS-PAGE 测定酪蛋白分子量 .....	242
实验六 不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳分离预染的血清脂蛋白 .....	245
实验七 胰岛素 N-末端氨基酸 DNS 分析法 .....	248
<b>第八章 核酸化学实验</b> .....	252
实验一 核 DNA 的提取 .....	252
实验二 DNA 片段大小电泳分析 .....	258
实验三 DNA 碱基组成分析 .....	259
实验四 DNA 熔解温度测定 .....	263
实验五 总 RNA 提取及 mRNA 分离 .....	264
<b>第九章 酶学实验</b> .....	267
实验一 酶活性测定 .....	267
实验二 影响酶作用的因素 .....	278
<b>第十章 新陈代谢实验</b> .....	282
实验一 糖原酵解 .....	282
实验二 异柠檬酸裂解酶活性测定 .....	285
实验三 硝酸还原酶活性测定 .....	287
实验四 谷氨酸-丙酮酸转氨酶活性测定 .....	289
实验五 植物总黄酮的提取与测定 .....	291
实验六 维生素 B <sub>1</sub> 含量测定 .....	293

## 附 录

一、掌握实验的内容及操作步骤 .....	295
二、玻璃仪器 .....	295
三、实验室常用仪器的使用与保养 .....	298
四、实验室安全与防护 .....	304
五、试剂的配制与保存 .....	306
六、计量单位与浓度的表示方法 .....	311
七、常用数据表 .....	315
八、层析法有关数据表 .....	333
九、缓冲溶液 .....	345
十、实验记录与实验报告 .....	346
主要参考文献 .....	348



# 绪 论

生物化学实验技术中对物质的分离、提取、精制、检测不仅是生物化学实验课的基本内容，而且也是未来从事生物化学研究和生化物质制备工作的基本技能。它是从微生物、动植物细胞培养液，或酶反应液中分离、纯化生物产品的过程或称后处理技术，也是生物化学技术转化为生产力时所不可缺少的重要环节，此类实验技术的进步对于保持和提高各国在生物技术领域内的经济竞争力至关重要，在促进农业经济、医药及高新技术产业的进步及在生物化学工程中占有重要的地位。

## 一、生物化学实验技术的特点及其重要性

生物化学实验技术制品的制备与检测不同于一般的化学产品的制备和检测，有其自身的特点：

(1) 生物化学实验制品的制备，一般是从杂质含量大大多于产物的提取液中进行分离纯化的，而最后的产品都要求高纯度。在这个非均一体系中，目的产物含量很低（如某种酶或蛋白），每升提取液中仅含数毫克，少者仅数微克（如激素等）；这个稳定性差的胶体体系，易受物理（如光、热及机械剪切力）、化学（如 pH、某些酶）等因素的影响，稍不注意就会引起失活和分解。此外，这一多相体系十分复杂：悬浮液中的固体，可能包含完整的有机体、菌丝碎片、介质成分中的其他不溶物、残存底物、超短纤维等；提取液中的液体，可能包含残存的可溶底物、中间代谢产物和其他不希望有的产物，惟有经过分离和纯化等操作过程，才能制备获得符合使用要求的制品。因此生物制品的分离纯化不仅是生物化学实验技术与工业化的必需手段，而且具有不可缺少或取代的作用。

(2) 目的物常需保持天然状态。生物化学实验对象是对细胞某种物质进行分析测定，尤其是大分子需保持其天然结构及生理活性。这些物质对环境的理化因素（如温度、pH、离子强度、抑制剂、激活剂等）又非常敏感，必须控制这些因素的变化。因此对每项技术、每个操作步骤均需细心、谨慎。

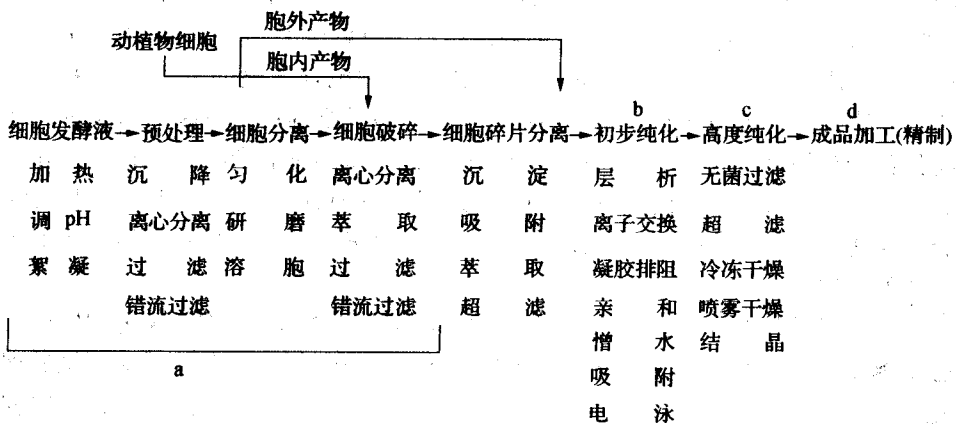
(3) 生物化学实验过程的进行十分艰难, 且代价很大。这种困难和代价是由特殊的稀溶液原料与高纯度的产物之间的巨大变化和差异造成的。其回收率不会高, 如酶一般要损失 80% (如竹笋壳中的过氧化物酶, 每吨仅能提取 8g, 该类酶总量的回收率为 18%; 维生素 C 损失则更大)。生化制备实验中分离纯化的方法较复杂, 从现有的资料分析可知, 在大多数生物产品的研究和开发中, 下游加工过程的研究费用占全部研究费用的 50% 以上, 在制品的成本构成中, 分离与纯化部分占总成本的 40%~80%, 若为精细或药用制品, 则比例更高, 制备过程中下游操作所用人力、物力占全部过程的 70%~90%。显然科学的分离和纯化方法是减少器材损耗或减少损失的重要途径。

总之, 生物化学实验对象的特点给实验过程提出了特殊的要求, 生物化学实验技术没有系统操作过程的配套, 就不可能有理想的结果, 而没有科学思想的操作心态, 更不可能有实验的成功。因此, 在实验的实践中, 要不断总结经验, 开动脑筋, 注意每个操作环节并改进操作方法, 要比原操作方法有所进步, 有所创新。

## 二、生物化学实验的步骤

由于人们所需的生物化学实验及制品不同 (如酶或代谢产物), 用途各异, 对产品的质量 (纯度) 要求也可以是多方面的, 所以分离与纯化步骤可以有不同的组合, 提取和精制的方法也是多种多样的, 但大多数生物化学实验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与固液分离 (或称



图绪-1 生物化学实验过程的各阶段的单元操作

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,采用错流膜过滤,但这一步对产物浓度和样品纯度与活性质量的改善作用很小。

对动物、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,它们前期的预处理与微生物不同。需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。

(2) 初步纯化。这一步骤没有特定的方法,主要是除去与目的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,对用于研究其生物分子天然结构或构象状态,还需进行特殊结晶。大多数产品必须经过干燥。

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的物的必经步骤,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(如超声波破碎)、渗透压突变造成细胞内压力差(如稀释法)等四种物理学力的应变作用而引起细胞的破碎。

(2) 化学方法。这是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、纤维素酶、果胶酶等)的作用破坏细胞壁或膜,使细胞内产物释放。

三种破碎细胞的方法究竟选哪种好,这要看所分离的目的产物是什么,目的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而定。

第二阶段:抽提与粗分离。在这一步骤中,是将细胞内所含被提取的目的物抽提或溶解出来,即选择一定的溶剂将其溶解后,再将溶解的目的物与细胞碎片分离开来,或将其固液两相分开,即利用被提取物电荷中和及大分子桥联作用形成更大分子(如絮凝),或在离心产生的重力场作用下颗粒沉降速度加快而沉淀(如离心),或依照过滤介质孔隙大小进行分离(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

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的物形成新的化合物，改变溶解度而沉淀（如有机溶剂、盐析和化学沉淀法）。

第四阶段：高度纯化。利用被分离目的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而进行分离（如离子交换层析）；依靠范德华力、极性氢键等作用将目的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）；依据目的物与专一性配基的相互作用而进行精制纯化的亲和层析；依据染料分子与目的产物之间的结合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的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，含水溶剂为流动相所进行的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。这是制备性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。通常有真空、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，则需保持分子溶解或结晶状态，那么应采用晶体学的结晶法，如蛋白质和 DNA。

### 三、生物化学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化实验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愈来愈高的要求，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的物的技术”，生物化学技术也可随生物化学实验技术产业的历史追溯到古代的酿造产业。古老的生物化学实验技术产品包括酿酒、制造酱油、醋、酸奶、干酪等等，当时还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 传统生化技术的出现要从 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，到本世纪上半叶时，除了原有酿造业产品的生物技术有了不少改进外，还逐步开发了用发酵法生产酒精、丙酮、丁醇等产品。上述产品的

特点是大多数属于嫌气发酵过程的产物，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，生产以经验为依据，可称为手工业式的；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并证明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。第二次世界大战以后，随着青霉素、链霉素等抗生素工业生产的扩大，大型好气发酵装置的开发和化工单元操作的引进，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制品提出了分离、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，即化学工程工作者加入了生物化学反应过程的开发行列，一门反映生物与化工交叉的学科——生化分离技术也随之以在 20 世纪 40 年代诞生，并获得迅速发展。这个时期之初，英国的 G.E. 戴维斯和美国的 A.D. 利特尔等人提出了单元操作的概念，推动了实验和制备技术的发展，并被引入生物化学技术产品加工过程中来（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 年代以前生物化学技术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数	用于生物化学分离中的方法数
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，特别是在 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（表绪-2，表中所列为到1998年底生产的品种），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。

表绪-2 国外已商品化生产和正在放大的现代生物技术产品

产品类型	产物名称
动物细胞培养生产的产品	EPO, $\beta$ -干扰素, OKT单抗, 乙肝疫苗, 透明质酸, 促肝脏生长素等
植物细胞培养生产的产品	人参皂甙, 长春花碱, 紫草宁, 小蘖碱, 紫杉醇, 迷迭香酸, 黄连素, 趾草灵, 雪莲素等。
基因工程发酵产品	人胰岛素, $\alpha$ -干扰素, 人生长因子, HBsAg

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。如瑞典的Biolink公司，它集Alfa-Laval、Chemp、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，导致了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：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、选矿和污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、超声波、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、盐析及凝胶吸附等方法外，还出现了超滤浓缩，不仅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，使生物分子不受理化因子的影响，起到保护生物分子活性的作用。

(5) 纯化技术：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，是在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）等材料商品化后才有了迅速的发展，凝胶层析技术的工业应用是从 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，推动着胰岛素、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、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，不仅对其目的物进行鉴定，确证所制备的产物是否为所实验和研究的对象，而且为跟踪所研究生命过程中目的物的去向提供手段，还能将其目的物如基因及其表达产物转变成经济效益。它是生物化学实验技术中三大支柱之一，也是生化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们来说，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，判别其目的物或某一类基团的存在，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、带电特点，近代发展了紫外吸收分析、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。

1. 分子信标检测技术 核酸是生物体最重要的信息分子，其目前常用的检测方法有 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) 则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 是一种非常有趣的荧光现象，当一个荧光分子 (又称为供体分子) 荧光光谱与另一个荧光分子 (又称受体分子) 的激发光谱相重叠时，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衰减，这种现象即是荧光 FRET，FRET 程度与供、受体分子的空间距离紧密相关，一般为 7~10 nm 时即可发生 FRET，随着距离延长，FRET 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 25 bp，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 反应过程随时进行监测。④特异性强：在对分子信标与靶序列杂交特异性研究中意外发现，与线性寡核苷酸探针相比，茎环状结构的分子信标检测特异性更高，对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的大规模自动化检测，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：目前尚缺乏有效方法对活体内核酸直接进行研究，分子信标技术为对活体内核酸代谢转移等动态过程研究提供了可能并已用实验证实。

Giesendorf 等利用分子信标检测了人甲叉四氢叶酸还原酶 (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，而且完全避免核酸交叉污染，分子信标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，还可以对长段 DNA 突变进行分析。结核分枝杆菌抗药性是结核防治的难题，建立快速、敏感和自动化的结核杆菌抗药性筛选方法是结核防治和公共卫生的重要课题。

利用分子信标技术还可以对生物大分子在生物活体内的代谢转运等动态过程进行示踪分析。Matsuo<sup>①</sup>以人碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 基因为模型，利用分子信标研究了 bFGF mRNA 在细胞内的代谢转运过程。设计的 15 bp 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，分子信标对细胞的生长状态无影响，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，当质点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。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做布朗运动，由多普勒效应可以知道，对处于静止参考体系中的观察者来说，质点或分子辐射的次波频率与其运动速度有关。质点或分子的运动有快有慢，因此频移有个分布范围，结果是散射光光场以入射光频率  $\omega_0$  为中心而展宽，此时即发生所谓的动态光散射 (图绪-2)。

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所无法比拟的。作为经典的静态光散射方法，它可以测得大分子的平均分子量  $M_w$ 、旋转半径  $R_g$  以及第二瑞利系数  $A_2$  等重要参数。特别是近十几年来发展起来的动态光散射方