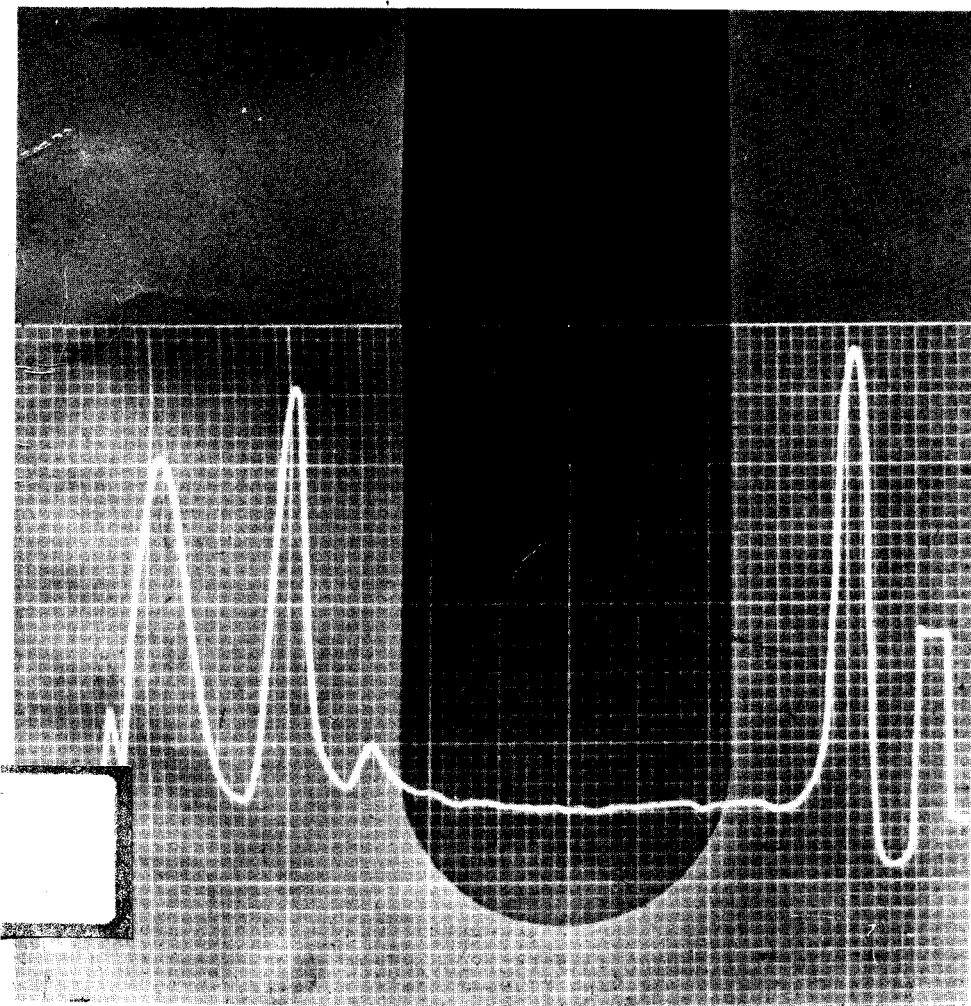


生化技术

冯万祥 赵伯龙 等编著 ● 湖南科学技术出版社



生 化 技 术

冯万祥 赵伯龙等编著

责任编辑：刘奇琰

•

湖南科学技术出版社出版发行

(长沙市展览馆路8号)

湖南省新华印刷二厂印刷

•

1989年11月第1版第1次印刷

开本：850×1168毫米 1/32 印张：12.125 插页：4 字数：317,000

印数：1—2,700

ISBN 7—5357—0444—1

Q·11 定价：6.30元

前 言

随着生物技术的崛起和发展，当代生物学在高度分化又高度综合的基础上，各学科相互渗透，飞速发展。生物化学的现代理论及新技术的研究和应用，展现了该学科广阔的发展前景。为了适应生物化学教学、科研和生产的需要，我们在我院《生化技术》教材的基础上，经多次修改后编成此书。在编写中，我们力图以基本原理、操作要点、实际应用为纲，使读者尽可能了解和掌握生化技术中最有用的工具和技术。

本书第八章和第九章分别由中科院上海细胞所叶敏和中科院上海生化所陈韵编写。本书的编写承蒙钮经义、汪静英、王庆诚、余微明校阅，提供了修改意见，并得到俞俊棠、邬行彦的关怀。对此，我们表示衷心地感谢。鉴于我们水平有限，书中不妥和错误之处，敬请广大读者批评指正。

冯万祥 赵伯龙

1988.3于华东化工学院

目 录

1. 生物物质的提取

- § 1.1 组织及细胞的破碎 1
- § 1.2 生物物质的提取 10
- § 1.3 有机溶剂萃取法 22
- § 1.4 水溶液两相系统分配法 26

2. 常用分离方法

- § 2.1 盐析法 41
- § 2.2 有机溶剂沉淀法 53
- § 2.3 等电点沉淀及常用沉淀剂 60
- § 2.4 选择性变性沉淀 64
- § 2.5 膜分离技术 67
- § 2.6 离子交换技术 80

3. 柱层析技术

- § 3.1 层析技术总论 100
- § 3.2 离子交换柱层析 121
- § 3.3 吸附柱层析 144
- § 3.4 分配柱层析 154
- § 3.5 凝胶柱层析 157

4. 亲和层析

- § 4.1 亲和层析的基本原理和过程 183
- § 4.2 载体的活化与配基的偶联 202
- § 4.3 用于固定配基的凝胶衍生物 218
- § 4.4 共价层析 222
- § 4.5 其他亲和层析 225

5. 薄层层析

- § 5.1 薄层介质的选择与处理 231
- § 5.2 薄层的制作 234
- § 5.3 薄层层析的操作 238
- § 5.4 溶剂系统 248
- § 5.5 凝胶薄层层析 255

6. 电泳技术

- § 6.1 电泳的基本原理 260
- § 6.2 琼脂糖凝胶电泳 263
- § 6.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳 269

7. 离心技术

- § 7.1 离心分离的基本原理 302

- § 7.2 制备性离心的方法 309
- § 7.3 制备用离心转子及其应用 323

8. 淋巴细胞杂交瘤和单克隆抗体技术

- § 8.1 基本原理 327
- § 8.2 杂交瘤和单克隆抗体的制备 331
- § 8.3 单克隆抗体的检测 344
- § 8.4 单克隆抗体的分离纯化 348
- § 8.5 其他杂交瘤 349
- § 8.6 单克隆抗体的应用 353

9. 多肽的化学合成

- § 9.1 氨基保护 358
- § 9.2 羧基保护 360
- § 9.3 侧链基团的保护 362
- § 9.4 肽键的形成 367
- § 9.5 合成的几种策略 373

1

生物物质的提取

提取是把生物物质（如蛋白质、酶、核酸等）从生物材料的组织或细胞中，以溶解的状态释放出来的过程，以便再进一步分离与纯化。合适的提取方法的确立，与该生物物质在生物体中存在的部位和状态有关。例如，一些细胞的胞外酶在代谢过程中分泌到细胞或组织之外，它们的提取比较方便；然而，许多生物物质是分布在细胞内部或是细胞的结构物（如磷酸酯酶或细胞膜酶^[1]），提取这类物质，先要将细胞破碎，才能将生物物质有效地提取出来。有时首先将细胞器、细胞碎片进行分级分离，然后再进行提取。生物物质种类繁多、稳定性不一，分布在生物体的各个部分；各种组织、细胞以及细胞器对裂解作用的抗性亦不一样。因此，对于细胞破碎方法的选择和提取过程的确立必须仔细谨慎。

§ 1.1 组织及细胞的破碎^[2-9]

组织及细胞的破碎是打碎组织和打开细胞壁或细胞膜，使细

胞的内含物有效地释放出来，便于提取所需要的生化物质，实际上这是一种增溶作用。

一、机械法

(一)组织捣碎

组织绞碎一般采用绞肉机。大的组织应先切成小块后再绞碎，组织糜粒子不能太大，可选用不同孔径的绞板进行调节控制。高速组织捣碎器（绞切器）是一种比较剧烈的破碎器，虽然只允许间断操作（每次30—45秒），但仍会使温度迅速升高，所以破碎时必须保持制剂的冷却。新型的高速组织捣碎器具有多种处理容量。由于这种绞切力仅对动植物组织有效，所以用于酵母、细菌破壁时，要在浓稠的悬浮液中加入其体积的 $\frac{1}{3} - \frac{1}{2}$ 的玻璃小珠，利用碰撞

作用达到破壁。

(二)研磨

研磨法破碎细胞，有的比较温和，有的比较剧烈。Potter-E lvehgem匀浆器外管是由硬质玻璃制成，研杵磨球是玻璃或碳氟隆，内杆既可用手动也可以用马达驱动。外管与研杵磨球之间的空隙大小应根据生物材料的不同而异，肝组织与脑组织可选用间隙比较小的，而肌肉与皮肤则应选用间隙较大的。利用研钵和研杵进行研磨也是一种有效的细胞破碎方法，它适合于细胞器的制备（如线粒体、溶酶体、微粒体等）。一些难以破碎的细胞或微生物菌体则可另加一些研磨剂（如玻璃粉、石英砂、氧化铝、硅藻土等），破壁效果更好。对于微生物细胞的破碎，可在微生物细胞悬浮液中加入一些玻璃小珠并加以搅动或振荡。悬浮液中细胞的密度为10—100毫克/毫升，小珠的直径为0.1—0.5毫米，加入的量可与悬浮液的重量相等，振荡或搅动频率约为50—100次/秒。Dyno-Willy^[10]是适合于大规模生产的搅动破碎机，它对细胞破碎的过程是一级反应速度，其破壁速度常数K与搅动速度、滚珠大小、滚珠的负荷以及连续破壁时物料循环的速度等有关（图1—1）。使用玻璃小珠破碎微生物细胞的缺点是：操作后必须除去小珠；

高浓度小珠热扩散性能差,易使操作温度升高;玻璃小珠会吸附某些生化物质。胶体磨和电磨^[11]也常用于微生物细胞破壁,操作时在混合液中加些干冰,能防止生物活性物质的失活。

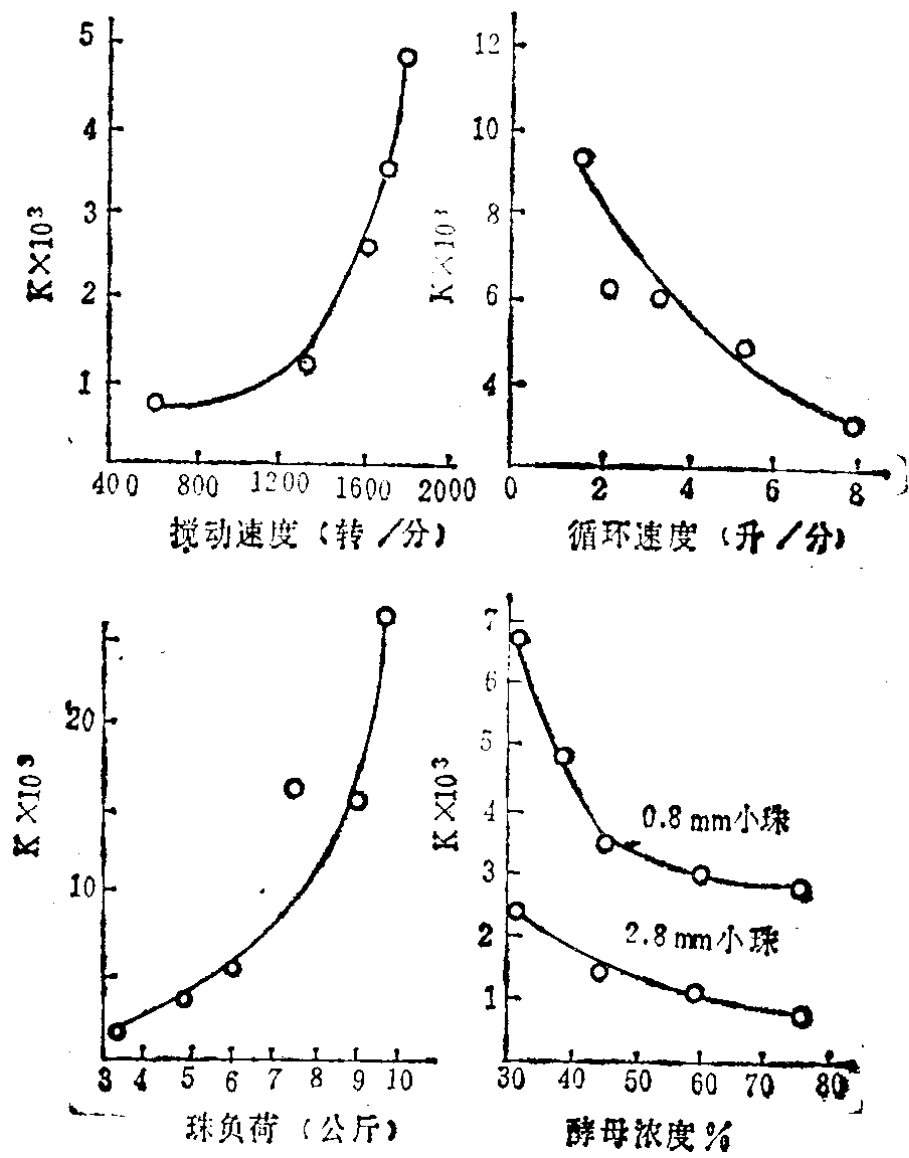


图1—1 影响细胞破碎速度常数K的因素

(三)挤压

微生物细胞在高压泵几百公斤的压力作用下,通过一个狭窄的孔道高速冲出,由于突然减压而引起一种空穴效应,致使细胞破碎。图(1—2)是国产DYJ60-6H型高压匀浆阀^[12],其结构类似于 Manton-Gaulin高压匀浆器。操作时压力大小是由手动调节弹簧控制,受压物料通过两级减压而达到破碎。经过两次循环,能将80%的革兰氏阴性菌破碎。但有些细胞如小球菌、链球菌、酵

母菌以及乳酸杆菌破碎比较困难。高浓度和处在生长静止期的细胞，破壁的操作方式应加以选择。例如，10%的乳酸杆菌须经过5次匀浆；25%的大肠杆菌须经过3次匀浆；黑曲霉、酒酵母、绿脓杆菌、面包酵母等经过液氮处理后，2次匀浆才能达到90%的细胞破壁。

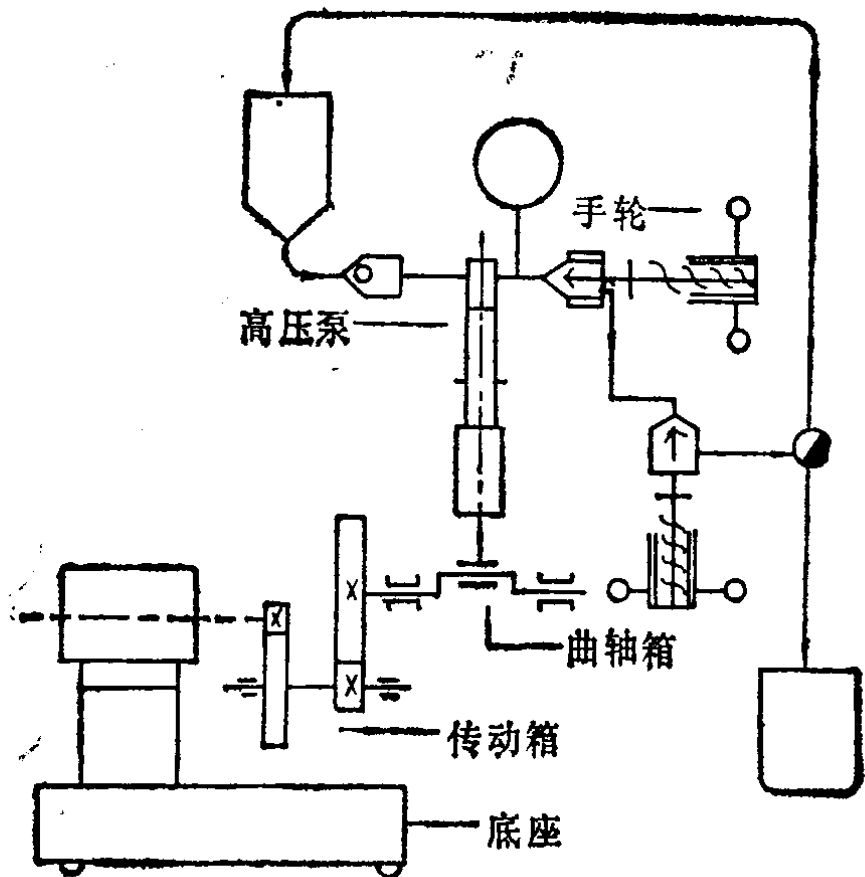


图1—2 DYJ60-6H匀浆阀示意图

利用高压匀浆阀破碎细胞的操作方法有三种(图1—3)[13]：

1. 单次通过 它是将细胞悬浮液单次通过匀浆阀，匀浆后未破碎细胞的分数为：

$$\frac{X_i}{X_0} = K^n \tag{1-1}$$

单次通过的匀浆速度为：

$$P = \frac{W}{n} \tag{1-2}$$

2. 批式循环 它是分批反复匀浆，细胞悬浮液经 t 时间匀浆后，未破碎细胞的分数为：

$$\frac{X_i}{X_0} = e^{\frac{-w(1-k)t}{V}} \tag{1-3}$$

批式循环匀浆的速度为：

$$P = \frac{V}{t} = \frac{-W(1-K)}{\ln X_i/X_o} \quad 1-4$$

3. 边循环边放料 这种操作达到稳态后，放料液中未破碎细胞的分数为：

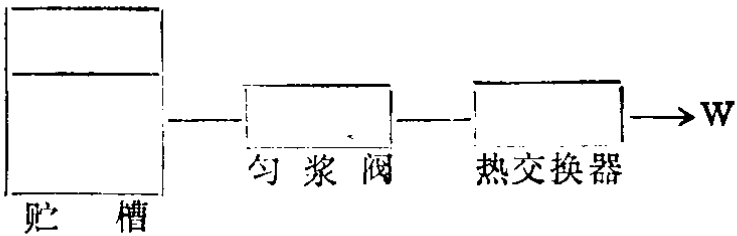
$$\frac{X_i}{X_o} = \frac{1}{\frac{W}{I} \left(\frac{1}{K} - 1 \right) + 1} \quad 1-5$$

边循环边放料的速度为：

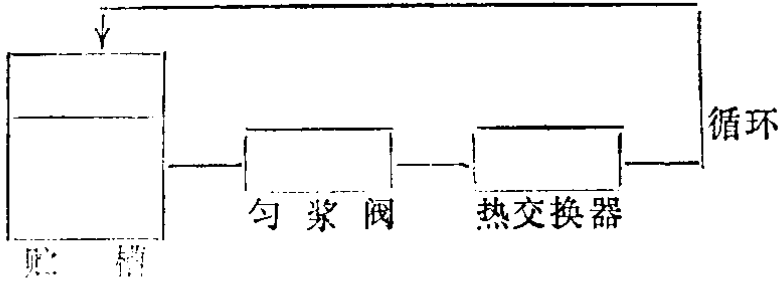
$$P = I = \frac{W(1-K)}{\left(\frac{X_o}{X_i} - 1 \right) K} \quad 1-6$$

上述各式中， I 为放料速度； K 为经过一次破碎后料液中残存细胞分数； n 为料液经过匀浆阀的次数； t 为时间； V 为储槽中料液体积； W 为料液通过匀浆阀的速度； X_o 为起始料液中未破碎的细胞浓度； X_i 为经过匀浆后料液中未破碎的细胞浓度。使用这几个公式的条件是，储槽中细胞悬浮液是均一的，经过一次破碎后细胞残存分数是恒定的。

1. 单次通过



2. 批式循环



3. 边循环边放料

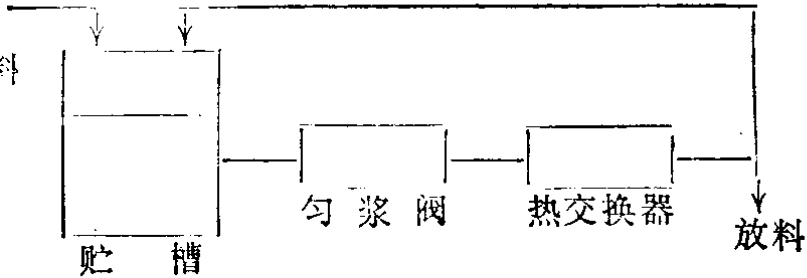


图1—3 利用高压匀浆阀破碎细胞的几种操作方法

挤压法破碎细胞也是一级反应速度过程。经过一次匀浆后完整细胞的残存率为 K ，则细胞破碎的反应速度常数为 $1-K$ 。挤压法破壁可根据 K 的大小确定操作方式，一般单次操作效率高。遇到难以破壁的细胞时，循环操作是必要的，但 K 值增加使三种操作方式的效率都下降。

利用挤压法破碎细胞时，其操作方法的选择应与下一步提取工艺过程相结合。例如，从大肠杆菌提取DNA聚合酶(它与核酸相结合)，经单次破碎后用硫酸链霉素沉淀，便可获得DNA聚合酶。而二次匀浆会使核酸受到切力而发生变化，此时用硫酸链霉素沉淀该酶就比较困难。因此，可在第一次匀浆并离心(或过滤)除去细胞碎片后，将未破碎的细胞再进行第二次匀浆。然后合并二次匀浆液。用硫酸链霉素沉淀DNA聚合酶。

二、化学处理法

(一)溶剂处理

丙酮、氯仿、甲苯等脂溶性溶剂可以溶解细胞膜上的脂质化合物，从而使细胞结构受到破坏。一般将细胞制成丙酮粉后，再加提取液提取其细胞的内含物。微生物细胞的丙酮粉制备方法为：将菌体悬浮液滴入10倍量冰冻的无水丙酮中(-15°C)，边滴边剧烈搅动，全部滴加完毕后应呈絮状，否则应再加无水丙酮。接着静止5—10分钟，倾去上层清液，抽滤下层沉淀物，用少量无水丙酮洗涤并迅速抽滤，将沉淀物摊于滤纸上，置室温干燥。制备动物细胞丙酮粉可将动物组织糜或匀浆悬浮于0.01MpH6.5磷酸缓冲液中，也可用0.005M焦磷酸盐缓冲液，以后加入丙酮溶液，将所得沉淀用三倍体积的冰冻丙酮洗涤。

(二)干燥法

1. 热空气干燥 例如鲜酵母经 $25-35^{\circ}\text{C}$ 热空气吹干后，便会部分自溶。

2. 真空干燥 它适用于细菌。例如经 P_2O_5 真空干燥过夜的细菌也产生自溶，然后把干燥成块的菌体磨碎。提取不稳定的酶(如含巯基的酶)，真空干燥时要加少量还原剂(如半胱氨酸、

谷胱甘肽、巯基乙醇、亚硫酸钠等)进行保护。

3. 冷冻干燥 它适用于制备不稳定的酶，一般配制成10—40%的细胞悬浮液进行冷冻干燥。经冻干后细胞的渗透性大大变化，便于下步抽提。

(三)反复冻融法

将细胞在低温下冰冻(−15℃)后，在室温下融化，如此反复多次就能达到细胞破壁。由于生物膜结构是双层脂质和蛋白质组成，维持膜结构的一部分作用力为疏水键，而冷冻过程促使疏水键削弱，因而增加了细胞的亲水性能。另外，冷冻时细胞内形成冰粒，使盐浓度增加而引起细胞溶胀，细胞的结构破坏。表面活性剂对细胞膜也有一定的破坏作用，有关这方面内容详见第二节。

三、物理处理法^[14—16]

(一)超声波振荡法

超声波具有频率高、波长短、定向传播等特点。超声波在液体中传播时，使液体中某一点一瞬间受到巨大的压力，而另一瞬间压力又迅速消失，由此产生了巨大的拉力，使液体拉伸而破裂并出现细小的空穴。这种空穴在超声波的继续作用下，又迅速闭合，产生极为强烈的局部附加压强，它的数值可达几万个大气压。介质中的悬浮细胞在这样大的压力作用下，产生一种应力，促使内部液体流动而使细胞受到破碎。声波在介质中传播时其声强的衰减为：

$$I = I_0 e^{-2\alpha x} \quad 1-7$$

I_0 及 I 分别为声源处和距离为 x 处的声强； α 为吸收系数，其数值分别与介质的物理性质（粘滞性、热传导、散射等）以及声波的频率有关。因此，利用超声波破碎细胞时，样品浓度应有一定限制，其蛋白质的含量应低于30毫克/毫升；处理微生物细胞时，其浓度可取50—100毫克/毫升。图1—4表示红血球破膜释放血红蛋白与超声波振幅的关系。

声波对细胞的破碎作用与空穴的形成有关，而影响空穴的因素则为超声波的声强、频率、液体介质的性质、温度、静力压强等。另外，我们还应注意介质的离子强度、pH值、超声处理的时间

间等。例如，超声波处理细胞膜时，用低离子强度和碱性溶液则细胞的增溶作用增加；革兰氏阴性杆菌的破壁处理10—15分钟即可，而革兰氏阳性菌的破壁一般要处理30—60分钟。超声波的空穴作用还会产生许多其它的效应。首先，当压强增加到最高峰时，介质的局部温度急剧上升，可使生物大分子破坏、失活，因此，必须进行冷却。有时候操作系统虽然降温了，但局部温度仍然很高，仍会造成活性分子的失活。其次，空穴作用还会产生氧化性游离基和化学效应^[17]（氧化、还原、降解等），前者严重影响含巯基酶的活性，因此处理介质中必须加入保护剂，或在介质中通入氮气防止氧化；后者使亚细胞粒子碎裂，使酶、蛋白质、核酸、多糖产生不可逆降解，即使是纤维素和胶原蛋白一类稳定的高分子也不例外。例如，用超声波处理棕色固氮菌时，受超声波损伤而释放原生质的固氮菌，其细胞壁上约有40%的组分被溶解下来，继续用超声处理细胞壁会更进一步溶解。最后，在空穴闭合时又将中和所带的电荷，于是引起放电和发光。

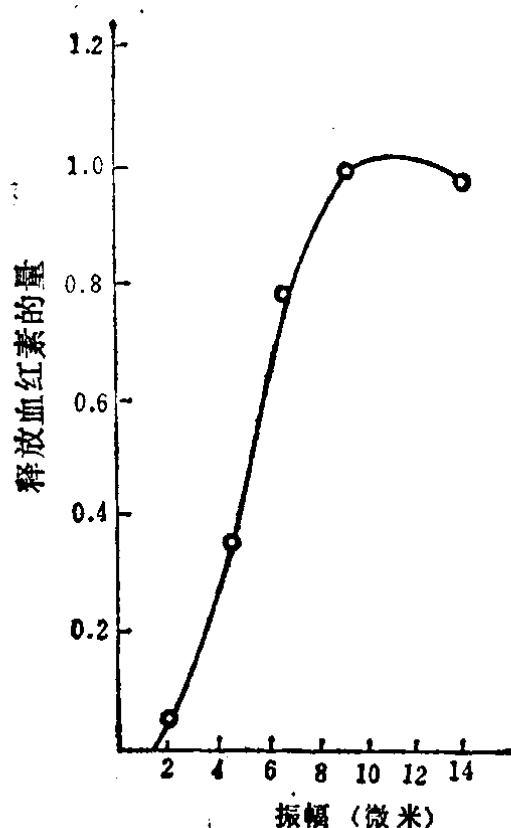


图1—4 超声波振幅与红血球破膜释放血红蛋白的关系。

后者使亚细胞粒子碎裂，使酶、蛋白质、核酸、多糖产生不可逆降解，即使是纤维素和胶原蛋白一类稳定的高分子也不例外。例如，用超声波处理棕色固氮菌时，受超声波损伤而释放原生质的固氮菌，其细胞壁上约有40%的组分被溶解下来，继续用超声处理细胞壁会更进一步溶解。最后，在空穴闭合时又将中和所带的电荷，于是引起放电和发光。

超声波发生器有各种类型，常用的为电声型超声波发生器。它是由一个能产生高频电流的发生器和把电磁振荡转换成机械振动的换能器组成。其中，超声波探头直接插入介质的破壁效果比槽式的好。

（二）渗透压冲击法^[18—20]

将细胞在高渗溶液（如蔗糖溶液）平衡一段时间后，突然转入到水溶液或缓冲液中，细胞会因渗透压的突然变化而破碎。电

子显微镜观察发现，在高渗溶液中细胞发生收缩，细胞内的水分向外渗出，产生质壁分离现象；当细胞转入水或低渗缓冲液中，细胞又开始溶胀，质壁分离产生的间隙消失，由于这种渗透压的冲击作用，造成细胞破碎，促使细胞内含物释放。例如，从大肠杆菌中制备一些亲水性酶和结合蛋白时，先用30mM Tris-HCl(pH7)缓冲液洗涤菌体，然后将菌体悬浮于30mM Tris-HCl缓冲液中(含0.1mM EDTA pH为7.2的20%蔗糖溶液)，搅动10分钟后离心，再将菌体迅速投入4℃冷水中搅动10分钟，离心，在上清液中就有水溶性酶^[21]（如磷酸酯酶、门冬酰胺酶II、核糖核酸酶等）。这个方法与把整个细胞打碎后再提取酶的方法相比较，其纯度高14—20倍。因此，可将它作为一种前处理以除去这类杂酶。

如果将细胞投入低渗溶液（如水、稀盐溶液、稀有机溶剂等），则因溶剂分子的大量渗入细胞而引起膜的膨胀破裂。例如，红血球在水中会迅速溶胀破裂而放出血红素；将猪心肌糜投入pH4酸水中，发生类似的细胞破膜，接着就能抽提出其中的细胞色素c；有人先让甘油(0.5M)慢慢渗入棕色固氮菌^[22,23]，突然转入水溶液而使其破壁。渗透压冲击法只能用于处理细胞壁比较脆弱的微生物。用该法使细胞破碎后，若在不损害原生质体情况下，结合酶解法除去细胞壁，再将原生质体洗涤，最后分解原生质体常能获得十分满意的细胞内含物。

四、酶解法^[24]

酶解破壁有自溶法和加酶促进法。自溶法是动物组织或微生物细胞在存放过程中，因自身的酶促反应而自溶。对微生物来说，自溶可能是细胞不平衡生长的结果，也可能是自身酶类活化的结果。自溶有时也确实使那些不易提取和纯化的酶或其他生化物质，变得容易提取。动物脏器自溶是将组织绞碎后，根据所提取酶或其他活性物质稳定情况，在0—37℃保温1—24小时，例如，肝、胰、肠粘膜等即使在0℃也能迅速自溶；微生物细胞常用干燥和加热进行自溶(如谷氨酸生产菌用0.018—0.028M、pH10的 Na_2CO_3 - Na_2HCO_3 缓冲液制成3%的悬浮液，在60—70℃保温搅动20分钟

即可自溶，接着便能提取核苷酸类物质)。

加酶促进法是在细胞悬浮液中加入专一性的纯净酶，专一性地酶解破壁，常用的有蛋白酶、脂肪酶、核酸酶、透明质酸酶等。加酶促进后，蛋白质、核酸、多糖等彼此分开，使提取液粘度降低，提高分离效果。例如，在大肠杆菌和链球菌破壁时可添加脱氧核糖核酸酶(0.5微克/毫升)；提取与脂质结合的膜蛋白或膜酶时，常加胰脂肪酶水解甘油单酯、二酯和三酯；有些膜酶的制备则加蛇毒磷脂酶水解溶血磷酸脂键；胰蛋白酶具有相对的专一性，也常用于膜蛋白的制备，但有可能将膜蛋白水解或制得不均一的蛋白质。常用的能分解微生物细胞壁结构的是溶菌酶，它能分解胞壁素中的N-乙酰胞壁酸肽和N-乙酰葡萄糖胺之间的 β -(1,4)-糖苷键。例如，将溶菌酶制剂加入巨大芽孢杆菌或小球菌悬浮中，很快就产生溶菌现象。有些细菌(如肠道细菌)除加入溶菌酶外，还要反复冻融或加金属螯合剂(如EDTA)除去与膜蛋白结合的金属离子，暴露出对溶菌酶敏感的结构部分，便于溶菌酶作用。细胞壁的破裂还应与合适的溶解条件相结合，有利于细胞内含物的释放。例如，在酸性范围内细胞不易解体，有时细胞虽已被酶解破坏，但细胞仍无瓦解现象，这说明在该条件下原生质的溶解度下降了。

§ 1.2 生化物质的提取

溶解度规律告诉我们，极性溶质溶于极性溶剂，非极性溶质溶于非极性溶剂。在生化物质的提取过程中，为了增加溶质在提取液中的溶解度，要根据溶质性质选用合适溶剂。多数生化物质具在电解质性质，常用各种水溶液提取，而脂溶性化合物则用有机溶剂提取。

一、酸、碱、盐溶液提取

(一)低离子强度盐溶液提取

低浓度的中性盐类对电解质和非电解质产生不同影响，它使前者的溶解度明显地增加，这就是“盐溶”〔25,26〕。盐溶现象是由盐离子和电解质离子（如蛋白质分子）的极性基团之间的静电作用所产生，它增加了溶质的溶解度。例如，细胞色素c与膜结合蛋白（或脂蛋白）通过静电键互相结合，所以采用等渗KCl溶液就能把它从线粒体上抽提出来。盐溶作用的浓度一般在0.05—0.2M。常用的有0.15M的NaCl溶液、0.02—0.05M的磷酸盐缓冲液0.02—0.05M的焦磷酸钠缓冲液（pH7.4—7.8）等。焦磷酸钠缓冲液的优点是：缓冲能力大；对氢键和离子键的解离作用强；能结合二价金属离子；对有些酶有保护作用。如果要求酸性盐溶液提取，可选用柠檬酸缓冲液（0.02M，pH5.5），它具有与焦磷酸钠缓冲液相似的优点。

（二）稀酸、稀碱溶液提取

这个方法的一般原则是：酸性溶质用稀碱溶液，碱性溶质用稀酸溶液。两性电解质在等电点时溶解度减小，而在偏离等电点0.5个单位后溶解度就大大增加（在盐溶时更明显）。因此，等电点在碱性范围的溶质用稀酸提取；等电点在酸性范围的溶质则用

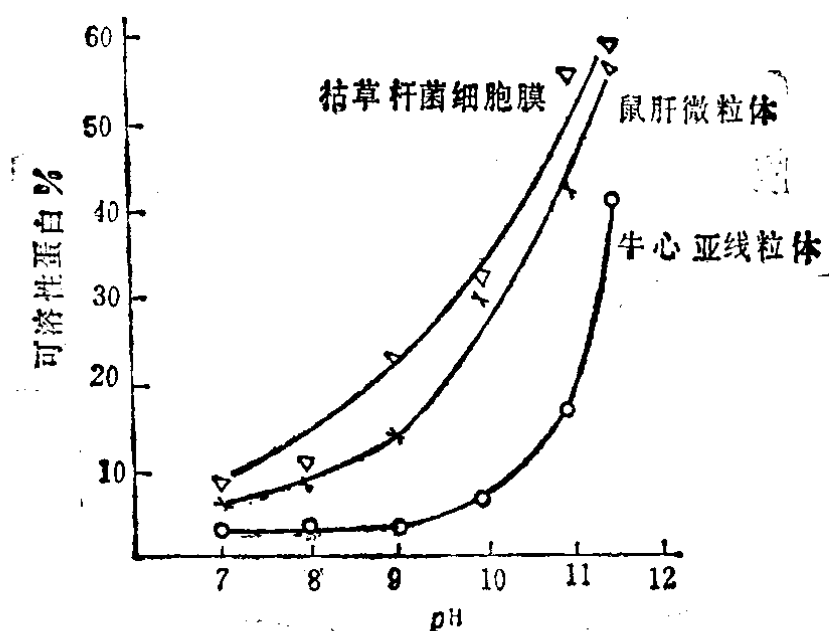


图1—5 PH对膜蛋白的溶解作用 膜首先悬浮于含0.25M的蔗糖缓冲液中（0.1MTris-醋酸，PH7.5），蛋白浓度为10毫克/毫升，用NaOH调高pH值，105,000g离心60分钟后，测定上清液中总蛋白量。