

生
教材



研究生规划教材

全国高等医药院校教材·全国高等医药教材建设研究会规划教材

医学分子生物学实验技术

供 研 究 生 用

Graduate
Student
Graduate
Student

主 编 药立波
副主编 常智杰



人民卫生出版社

全国高等医药院校教材

供研究生用

医学分子生物学实验技术

主 编 药立波

副主编 常智杰

编 者 (以姓氏笔画为序)

- 马文丽 (第一军医大学生物化学与分子生物学教研室)
王吉村 (第四军医大学生物化学与分子生物学教研室)
王丽颖 (吉林大学白求恩医学部生物化学与分子生物学教研室)
申宗侯 (复旦大学上海医学院生物化学与分子生物学教研室)
冯作化 (华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学教研室)
孙黎光 (中国医科大学生物化学与分子生物学教研室)
刘新平 (第四军医大学生物化学与分子生物学教研室)
李清解 (中南大学湘雅医学院生物化学与分子生物学教研室)
杨 晓 (军事医学科学院生物工程研究所)
吴季辉 (中国科技大学生命科学院生物大分子结构研究中心)
何凤田 (第三军医大学生物化学与分子生物学教研室)
周 虹 (哈尔滨医科大学生物化学与分子生物学教研室)
药立波 (第四军医大学生物化学与分子生物学教研室)
钱小红 (军事医学科学院蛋白质组学研究中心)
梅柱中 (军事医学科学院放射医学研究所)
常智杰 (清华大学医学院后基因组学研究所)
曾宪录 (东北师范大学遗传与细胞研究所)
焦炳华 (第二军医大学生物化学与分子生物学教研室)

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目(CIP)数据

医学分子生物学实验技术/药立波主编. —北京:
人民卫生出版社, 2002

ISBN 7-117-04838-7

I. 医… II. 药… III. 医药学: 分子生物学-实
验技术 IV. R318

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 065374 号

医学分子生物学实验技术

主 编: 药立波

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 67616688)

地 址: (100078)北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网 址: [http://www. pmph. com](http://www.pmph.com)

E - mail: [pmph@pmph. com](mailto:pmph@pmph.com)

印 刷: 北京人卫印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 889×1194 1/16 印张: 20.75

字 数: 495 千字

版 次: 2002 年 10 月第 1 版 2002 年 10 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 7-117-04838-7/R·4839

定 价: 38.00 元

版权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

全国高等医药院校研究生规划教材出版说明

《中国医学教育改革和发展纲要》明确指出，在今后的5~15年我国医学教育要加速发展研究生教育，到2005年，本专科教育（含高等职业技术教育）和研究生教育年招生总量占总体的比例要达到60%以上，到2015年增长到70%以上。为适应这一要求，经全国高等医药教材建设研究会和卫生部教材办公室研究决定，自2001年8月起组织编写一套供研究生使用的规划教材。此套教材较五年制和七年制教材要体现“更高”、“更新”、“更深”的特点；在教材的“三基”（基础理论、基本知识、基本技能）、“五性”（思想性、科学性、先进性、启发性、适用性）方面要更强调启发性，以培养善于思考、勇于探索、敢于创新的临床型和科研型人才。与以课程教育为主的本科学教育不同，研究生学历教育是课题教育，研究生可根据自己的课题方向选择性地研修相关课程。这就要求我们除了考虑整套教材的一定系统性和交叉内容外，还要指出每种课题中有争论的问题，以及其前沿和发展的方向，以启发研究生在学习中的兴趣，甚至产生科学灵感。

这次编写的19种为第一批研究生规划教材，今后将陆续编辑出版，以供广大读者使用。

第一批研究生教材目录

- | | | |
|----------------------|-----|---------|
| 1. 医学科学技术哲学 | 主 编 | 冯显威 |
| 2. 医学计算机实用教程 | 主 审 | 王行言 |
| | 主 编 | 童隆正 |
| 3. 医学统计学 | 主 编 | 孙振球 |
| 4. 临床流行病学 | 主 审 | 李立明 |
| | 主 编 | 黄悦勤 |
| 5. 医学科研方法学 | 主 编 | 梁万年 |
| 6. 医学分子生物学 | 主 审 | 刘德培 |
| | 主 编 | 查锡良 |
| 7. 医学分子生物学实验技术 | 主 编 | 药立波 |
| 8. 医学细胞分子生物学 | 主 编 | 宋今丹 |
| 9. 组织和细胞培养技术 | 主 编 | 章静波 |
| 10. 分子病理学 | 主 编 | 李玉林 |
| 11. 组织病理技术 | 主 审 | 王伯沅 |
| | 主 编 | 李甘地 |
| 12. 医学遗传学 | 主 编 | 夏家辉 |
| 13. 神经生物学 | 主 编 | 鞠 躬 |
| 14. 分子病毒学 | 主 编 | 黄文林 |
| 15. 基础与临床药理学 | 主 编 | 姚明辉 |
| 16. 实验核医学 | 主 编 | 张永学 |
| 17. 肿瘤学 (第二版) | 主 编 | 曾益新 |
| 18. 外科学——前沿与争论 | 主 编 | 邹声泉 龚建平 |
| 19. 外科常用实验方法及动物模型的建立 | 主 编 | 陈孝平 |

前 言

分子生物学是生命科学发展中最重要的前沿领域,在医学研究中的重要性更是无论怎样强调也不过分。分子生物学理论研究的种种突破无一不与分子生物学技术的产生和发展息息相关,可以说两者是科学与技术相互促进的最好例证。分子生物学技术的产生得益于生物化学与分子生物学、遗传学、免疫学和生理学等领域中的许多重大发现,它的诞生为这些领域的研究工作提供了新的研究工具和手段,利用分子生物学技术在这些领域中获得的新发现又使这一技术自身不断地得以丰富和发展。

以重组 DNA 为中心内容的分子生物学技术在 20 世纪 80 年代初完成了创始阶段,进入了在全世界的普及阶段,并且在多方面不断有新的进展,手段日新月异。我国的科学研究工作者紧跟这一趋势,在 70 年代末至 80 年代初,开始了对基因工程技术的跟踪研究,主要的医学院校也都在 80 年代初、中期相继成立了基因工程实验室。至 20 世纪 80 年代末,基因工程技术已经在国内得到了相当程度的普及,并开始从跟踪研究向创新性研究过渡。国家高新技术发展计划——“863”计划资助了一大批基因工程项目,在当时对于国内基因工程技术的发展发挥了重要作用。

近几年,随着人类基因组计划的完成,分子生物学技术在医学领域中的应用越来越广泛。因此分子生物学理论和分子生物学技术在医学院校研究生的教学中也越来越重要。加强基础医学和临床医学专业研究生的分子生物学实验技术教学对于他们在研究课题的设计中充分利用现有的先进技术手段解决各自领域的问题无疑会有所帮助。

虽然目前国内已有多种介绍分子生物学相关技术的专门书籍,但是尚缺乏可供医学院校研究生的分子生物学实验技术教学以及课题研究用的较系统的教学用书。为此,我们按照全国高等医药教材建设研究会和卫生部教材办公室的要求,组织编写了这部医学分子生物学实验技术教材。

本书读者对象定位于高等医药院校及研究机构的硕士和博士研究生。主要是作为医学研究生分子生物学实验课必修课或选修课教材,同时也可以作为医学院校研究生课题研究过程中分子生物学技术参考用书。

本书共 19 章,主要由三部分内容构成。第一部分是蛋白质研究相关技术,包括了一般定性定量分析、分离与纯化以及结构分析技术;第二部分集中介绍了核酸研究的基本技术,涵盖了从体外基因操作到细胞内基因操作直至整体基因重组等基本实验技术;第三部分则介绍了一些在分子生物学领域新近发展起来的技术及其在医学领域的应用。此外,还在附录部分提供了分子生物学实验中常用的资料和参数以及常用试剂的配制。我们期望这样的构架可以帮助研究生对于分子生物学技术有一个相对全面的了解,以便在研究课题中选择使用。

本教材由来自全国 15 所高等院校和科研院所的 18 位教授编写。作者均为生物化学与分

子生物学教学和科研第一线工作的人员,在所编写的内容方面都有相当多的实践经验。有一些章节如蛋白质组学研究技术、遗传重组动物模型、蛋白质空间结构分析等还专门邀请了综合大学和科研院所从事相关领域的专家撰写。

在编写原则上,本书在注重介绍每一种技术的基本原理和用途的基础上,突出了研究生教学特点,强调基本技术与进展、广度与深度并重,在介绍分子生物学基本技术的基础上,尽可能包含相关技术的最新进展。

本书属于实验技术类书籍,在编写时我们特别注意了每一项技术的可操作性,尤其是对于那些目前在国内主要医学院校有条件开展的实验技术均给出了具体操作步骤和注意事项。为了帮助研究生更好地理解 and 利用这些技术,我们还在一部分章节附加了对部分实验结果的分析 and 讨论,期望对于研究思路 and 设计可以有所帮助。由于篇幅的限制,我们不能对每一项技术介绍的过于专门 and 具体,学生如有需要,可以阅读有关各项技术的专门书籍。

从方便教学组织的角度考虑,我们在蛋白质的分离纯化和 DNA 体外重组两部分分别附加了适合组织教学的系统实验举例,可以直接依照该内容指导实验。

本教材在编写工作中得到了全国高等医药教材建设研究会、卫生部教材办公室、第四军医大学研究生院的大力支持,第四军医大学生物化学教研室高级实验师陈南春在全书审核、秘书王景媛在插图的整理方面做了大量工作,在此一并致谢。

药立波

2002年7月

目 录

第一章 蛋白质的分离纯化	1
第一节 蛋白质分离纯化的一般原则	1
一、蛋白质分离纯化技术及其依据	1
二、蛋白质纯化的一般设计原则	2
第二节 蛋白质的层析分离	2
一、层析技术的发展简史及科学意义	2
二、层析技术的基本原理	3
三、离子交换层析	5
四、凝胶过滤层析	9
五、亲和层析	11
六、其它层析技术	14
第三节 蛋白质的电泳分离	15
一、电泳发展简史及科学意义	16
二、电泳技术的基本原理	16
三、电泳技术的分类	17
四、聚丙烯酰胺凝胶电泳概述	17
五、不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳	19
六、等电聚焦电泳	22
七、毛细管电泳	25
第四节 蛋白质的浓缩	25
一、超滤法	25
二、冷冻干燥法	26
三、吸收法	26
四、沉淀法	26
第五节 蛋白质纯化及鉴定的教学实验举例	
——血清白蛋白、 γ -球蛋白的分离纯化及鉴定	28
第二章 蛋白质的定性定量分析	33
第一节 蛋白质的含量测定	33
一、凯氏定氮法	33
二、Lowry法	34

三、紫外光谱吸收法	36
四、考马斯亮蓝 G-250 染色法	37
五、二喹啉甲酸检测法	38
第二节 蛋白质相对分子量的测定	39
一、SDS-PAGE 法测定蛋白质的相对分子量	39
二、凝胶过滤层析法测定蛋白质相对分子量	40
第三节 等电聚焦电泳测定蛋白质的等电点	42
一、等电聚焦电泳测定蛋白质等电点的原理	42
二、等电聚焦电泳测定蛋白质等电点的操作	42
第四节 其它蛋白质定性定量分析技术	44
一、蛋白质的电泳染色定量	44
二、免疫印迹法分析特定蛋白质的相对含量	44
三、其它测定特定蛋白质含量的方法	52
第三章 蛋白质一级结构的测定	53
第一节 蛋白质一级结构测定的历史及测定策略	53
一、蛋白质一级结构测定的历史	53
二、蛋白质一级结构的测定策略	54
第二节 蛋白质的氨基酸组成分析	54
一、水解	54
二、衍生	54
三、分离及检测	55
第三节 多肽链的末端分析	55
一、N 端分析	56
二、C 端分析	56
第四节 肽段的氨基酸序列分析	56
一、肽链降解成肽段	56
二、肽段一级的结构测定	57
第五节 二硫键、酰胺基、磷酸化及糖基化修饰定位	59
一、蛋白质分子中二硫键的定位	59
二、酰胺基及其它修饰氨基酸残基的定位	60
第四章 蛋白质的空间结构分析	61
第一节 蛋白质的二级结构分析	61
一、圆二色光谱法	62
二、傅里叶变换红外光谱法	63
第二节 X 线衍射法分析蛋白质的晶体空间结构	63
一、基本原理	64
二、晶体结构解析过程	64

第三节	核磁共振技术分析蛋白质的液相空间结构	66
一、	基本原理	67
二、	主要方法	69
三、	蛋白质空间结构的测定	72
第四节	蛋白质空间结构的预测	75
第五节	蛋白质空间结构的预测工具简介	75
第五章	DNA 体外重组技术	80
第一节	DNA 体外重组载体的种类和选择	80
一、	载体的分类	81
二、	不同载体的特点和分类	81
第二节	基因工程中常用的工具酶	84
一、	限制性核酸内切酶	84
二、	DNA 聚合酶	84
三、	DNA 连接酶	85
四、	其它 DNA 修饰酶	85
第三节	目的基因的获得和修饰	85
一、	采用限制性内切酶酶切法直接分离目的基因	85
二、	采用 PCR 或 RT-PCR 方法制备目的基因	86
三、	基因组文库或 cDNA 文库的构建和筛选	86
四、	化学合成法制备基因片段	87
第四节	目的基因和载体的连接	87
一、	PCR 产物的克隆策略	87
二、	外源 DNA 片段和载体的连接	88
第五节	重组分子的扩增和鉴定	88
一、	重组 DNA 分子导入受体细胞	88
二、	重组 DNA 分子的鉴定	89
第六节	基因体外重组实验举例	90
第六章	核酸分子杂交	94
第一节	核酸探针及其标记	94
一、	核酸标记物及其选择	94
二、	核酸探针的标记方法	96
三、	标记探针的纯化	100
第二节	核酸分子杂交的种类和方法	101
一、	固相支持物与印迹方法的选择	101
二、	Southern 印迹杂交	103
三、	Northern 杂交	106
四、	斑点杂交与狭缝杂交	109

五、原位杂交	109
第七章 聚合酶链反应(PCR)技术	111
第一节 PCR 的反应体系	112
一、寡核苷酸引物	112
二、缓冲液	112
三、DNA 聚合酶	112
四、脱氧核苷三磷酸	113
五、模板 DNA	114
第二节 PCR 引物的设计	114
第三节 PCR 的基本操作步骤及条件优化	115
一、基本操作步骤	115
二、条件优化	115
第四节 PCR 衍生技术	117
第五节 PCR 技术的应用	123
一、基因分析	123
二、定位克隆	125
三、序列分析	125
第六节 PCR 实验举例	125
一、RT-PCR	125
二、重组 PCR	126
第八章 DNA 序列分析技术	129
第一节 DNA 序列测定的原理和技术	129
一、DNA 测序原理	129
二、DNA 测序策略	130
三、DNA 测序的常用技术	131
第二节 全自动激光荧光 DNA 测序	132
一、自动激光荧光 DNA 测序原理	132
二、自动激光荧光 DNA 测序注意事项	133
三、自动激光荧光 DNA 测序程序	134
第九章 外源基因的原核表达	139
第一节 原核表达系统常用的载体及其应用	139
一、大肠杆菌表达系统	139
二、芽孢杆菌表达系统	141
三、链霉菌表达系统	142
第二节 外源基因的表达和鉴定	143
一、蛋白质在原核细胞中的表达特点	143

二、包含体的形成、变性与复性	144
三、蛋白质在原核细胞中表达的调控	145
四、外源基因在原核细胞中表达的鉴定	146
第三节 外源基因表达条件的优化	147
一、表达载体的优化设计与选择	147
二、增加 mRNA 的稳定性	148
三、提高外源蛋白的稳定性	148
四、工程化宿主菌的选择	149
第四节 外源基因原核表达的基本操作方法与步骤	149
一、获得目的基因并克隆入原核表达载体	150
二、rhTNF α 工程菌的建立	150
三、rhTNF α 的表达和鉴定	151
四、rhTNF α 样品的鉴定	151
第十章 外源基因在真核细胞中的表达	153
第一节 概述	153
一、真核细胞表达宿主的种类及各自优势	153
二、真核细胞表达外源基因的意义	154
三、外源基因导入真核细胞的基本方法	154
四、外源基因在真核细胞中表达的主要方式	154
五、外源基因在真核细胞中表达产物的鉴定和纯化	155
第二节 外源基因在哺乳动物细胞中的表达	155
一、哺乳动物细胞表达载体	155
二、常用的哺乳动物细胞的种类	161
三、哺乳动物细胞的基因导入方法	162
第三节 外源基因在酵母细胞中的表达	164
一、酵母细胞表达载体	164
二、酵母细胞培养的基本技术及外源基因的导入方法	166
第四节 外源基因在昆虫细胞中的表达	168
一、用于昆虫细胞蛋白表达的载体或载体系统	168
二、常用的昆虫细胞株	170
三、杆状病毒进行蛋白质表达的程序	170
第十一章 基因的体外转录和翻译	173
第一节 基因的体外转录	173
一、基因体外转录的目的和意义	173
二、基因体外转录的基本原理	173
三、基因体外转录的基本实验流程	174
第二节 基因的体外翻译	177

一、基因体外翻译的目的和意义	177
二、基因体外翻译的基本原理	177
三、基因体外翻译的基本实验流程	178
四、基因体外翻译实验中常遇到的问题	180
五、基因体外翻译方法的选择	181
第十二章 基因文库	182
第一节 基因组 DNA 文库	182
一、基因组 DNA 文库的概念及应用	182
二、基因组 DNA 文库的完整性与代表性	182
三、构建基因组 DNA 文库的载体系统	183
四、基因组 DNA 文库的构建	184
五、基因组 DNA 文库的筛选	187
第二节 cDNA 文库	190
一、概述	190
二、cDNA 文库的构建	191
三、cDNA 文库的筛选	197
第十三章 遗传修饰动物模型	199
第一节 转基因动物的概念及其发展简史	199
第二节 研制转基因动物的基本步骤	199
一、转基因载体的构建及制备	199
二、转基因方法	200
三、转基因动物的检测	201
第三节 建立基因打靶动物模型的策略	202
一、研制基因打靶小鼠的策略	204
二、ES 细胞相关操作技术	209
三、基因打靶小鼠的研究实例 - <i>Smad 5</i> 基因剔除小鼠的建立和鉴定	210
第四节 遗传修饰动物模型在生物医学研究中的应用前景	214
第十四章 生物芯片技术	216
第一节 概述	216
一、生物芯片的概念	216
二、DNA 芯片	217
第二节 生物芯片的制作	218
一、原位合成 DNA 芯片的制作	218
二、DNA 微集阵列芯片的制作	219
第三节 DNA 芯片使用的基本流程	221
一、待测样品的准备	221

二、分子杂交反应	222
三、检测分析	222
第四节 蛋白质芯片	223
第五节 生物芯片的基本操作及应用	224
一、DNA 芯片与基因表达谱研究	224
二、DNA 测序	229
三、基因突变检测	230
四、基因诊断	231
五、蛋白质芯片的应用	233
六、药物研发	233
第十五章 人类基因组学相关技术	235
第一节 人类基因组计划的主要研究内容及进展	235
一、遗传图谱	235
二、物理图谱	236
三、序列图谱	237
四、转录图谱	237
第二节 人类基因组计划在医学中的意义	238
一、基因结构与功能的研究	238
二、基因组信息与疾病易感性的研究	238
三、基因组与癌症研究	239
四、疾病的遗传学背景	239
五、药物基因组学	240
第三节 人类基因组计划数据的利用	241
一、主要相关数据库	241
二、NCBI 基因组数据库的应用	241
三、利用基因组数据信息发现新基因	244
四、其它检索系统	244
第十六章 蛋白质组学研究技术	246
第一节 概述	246
一、蛋白质组学的产生	246
二、蛋白质组学的概念	246
三、蛋白质组学研究的意义	247
第二节 蛋白质组学研究的技术体系	248
一、双向电泳	249
二、生物质谱与蛋白质鉴定	253
三、翻译后修饰蛋白质的鉴定	257
四、蛋白质组数据库	260

第三节 蛋白质组学的应用·····	262
第十七章 研究差异表达基因的相关技术·····	263
第一节 概述·····	263
一、研究差异表达基因的目的和意义·····	263
二、研究差异表达基因的主要方法·····	264
第二节 基于 PCR 的消减杂交技术·····	269
一、基本原理·····	269
二、实验流程·····	269
三、实验方法·····	271
四、结果与分析·····	273
五、对所获基因作进一步研究的思路·····	276
六、方法学讨论和注意事项·····	276
第十八章 用酵母双杂交系统研究蛋白质 - 蛋白质相互作用·····	278
第一节 酵母双杂交系统简介·····	278
一、酵母双杂交系统的建立和基本原理·····	278
二、酵母双杂交系统的基本策略·····	280
三、酵母双杂交系统的优点·····	280
四、酵母双杂交技术的应用现状·····	280
五、酵母双杂交系统中常见问题的解决与改进措施·····	281
六、酵母双杂交系统使用注意事项·····	282
七、逆双杂交系统和三杂交技术·····	283
第二节 酵母双杂交的实验过程·····	284
一、基本材料和试剂·····	284
二、实验流程·····	284
三、实验方法·····	284
第三节 酵母双杂交实验实例结果和讨论·····	289
第十九章 新基因功能研究的策略·····	294
第一节 从蛋白质产物功能和基因表达规律研究基因的功能·····	294
第二节 抑制基因表达或除去基因·····	298
附录一 分子生物学实验常用参数·····	300
附录二 常用试剂的配制·····	308

第一章 蛋白质的分离纯化

蛋白质是各种生命活动的物质基础,了解其结构和功能是探索生命奥秘的重要内容。蛋白质的复杂性不仅表现在其自身的结构(氨基酸组成、序列及构象)上,而且也由于它在细胞内与核酸、多糖、脂质及其它小分子以混合物形式存在。蛋白质的分离和纯化是进行生物大分子结构和功能研究的前提。要理解细胞内某种特定蛋白质的结构和功能,必须获得一定质和量的纯品才能满足其结构分析和活性测定的需要。如果要将一种蛋白质用于疾病的治疗,需要大量的高度纯化的蛋白质。即使是在人类基因组计划已经接近完成的今天,蛋白质分离、纯化和鉴定依然是基因表达产物的结构与功能研究的基本需要。蛋白质的分离纯化是一门古老的技术,但是由于蛋白质的复杂多样及其不稳定性,使其操作技术远不如基因操作那样成熟和容易,因而具有更强的挑战性和艺术性。

利用各种方法将蛋白质与其它分子的混合物或者不同种类蛋白质的混合物分成单一蛋白成分的过程称为蛋白质分离,通过分离技术获得目的蛋白的单一成分纯品的过程称为蛋白质的纯化。要纯化必须先分离,不过有些定性或定量分析不要求回收目的蛋白,仅使其得到充分分离即可。

第一节 蛋白质分离纯化的一般原则

蛋白质分离纯化的理想目标是从复杂的混合物中获得一种具有良好生物学活性及化学完整性的单一类型蛋白质。由于不同蛋白质的复杂多样,不会只有一种简单的标准化方法能够包揽所有情况。每一种蛋白质的分离纯化都需要一项独立的工艺,但是也有共同的依据和原则。

一、蛋白质分离纯化技术及其依据

由于构成蛋白质的氨基酸残基的种类、数目和序列不同,使得不同蛋白质的理化性质各有不同。这些特性是使不同蛋白质从复杂混合物中得到分离纯化的依据。目前常用的分离纯化蛋白质的技术和方法的主要种类和依据归纳为表 1-1。

表 1-1 主要的蛋白质分离纯化方法及依据

性 质	分离方法
分子的大小与形状	超滤、透析、密度梯度离心、凝胶过滤层析、凝胶电泳
在不同溶剂中的溶解度	沉淀法、相分配法、分配层析法、结晶、溶剂抽提、逆流分配
电荷分布性质	电泳技术、等电点沉淀、离子交换层析、聚焦层析、等电聚焦电泳
生物功能专一性	亲和层析(DNA亲和层析、免疫亲和层析、外源凝集素亲和层析等)
疏水性	疏水作用层析、反相 HPLC

二、蛋白质纯化的一般设计原则

大部分情况下,分离蛋白质的目的是要获得一种纯度和活性均理想的纯化产物。为达到这一目标,在纯化方案设计时要遵循以下几个原则:

1. 目的蛋白的分离和纯化应该尽可能选择那些来源方便、成本低、易操作的组织或细胞作为原料,其中目的蛋白的含量及生物活性要尽可能高,可溶性及稳定性要尽可能好。天然组织中大部分蛋白质的丰度很低,用于分析研究尚可,但要作为药物制备就极为困难。这也是基因工程技术将在生物制药领域占有优势的原因之一。

2. 在开始纯化前,要建立一个特异、快速、精确、可重复、经济的目的蛋白活性检测方法,可以在分离和纯化过程中始终监测目的蛋白的活性。单位重量蛋白质中的特异生物活性称为比活性(specific activity)。随着目的蛋白的纯化,其在蛋白质混合物中的比例逐步提高,比活性也相应提高。

3. 蛋白质分离纯化工艺的设计应该遵循分级分离、先粗后细的原则。先利用目的蛋白的一种特性,采用最简单的方法去除最主要杂质,使其达到一定纯度,然后再利用其它特性进行细致的分离纯化。有的目的蛋白可一步纯化到理想目标,有的需要多步纯化方能达到目的。不同方法的选用次序,因不同情况而异。天然原料中目的蛋白含量低,应该首先使用粗分级分离,即非特异性和低分辨率的操作,如硫酸铵沉淀法和等电点沉淀法及超滤法等,中期主要采用多选择性的亲和层析、离子交换层析和疏水作用层析等,后期采用分离速度慢、分离规模小的凝胶过滤层析等等。基因工程中原核细胞表达产物在总蛋白中的比例较高,可以一步进入亲和层析或离子交换层析。在分级分离的前提下,为保证目的蛋白的活性,应尽量减少纯化步骤,缩短操作时间。

4. 纯化条件要尽可能温和,目的是避免蛋白质的变性。注意维持低温、溶剂温和、操作轻柔。

第二节 蛋白质的层析分离

色层分析法,简称为层析法(chromatography),也称色谱法,一般指待分离液体(流动相, mobile phase)经过一个固态物质(固定相, solid phase; 基质, matrix)后所发生的组分分布变化。混合物中各组分理化性质的差别(如分子形状和大小、分子极性及其分子亲和力等)使它们以不同程度分布在两个相中,从而以不同速度相对于固相移动而达到分离。层析和电泳同为生物化学中生物大分子的分离纯化常用的手段,两者相辅相成,各有所长。在蛋白质大量制备时,层析比电泳更有优势。

一、层析技术的发展简史及科学意义

层析技术在20世纪初开始形成。1906年俄国植物学家M. Tswett将绿叶的石油醚提取液与CaCO₃细粉混合时,发现许多色素被CaCO₃吸附,后来他将CaCO₃装入一个柱内,让一定量的绿叶石油醚提取液通过CaCO₃填充的柱子。结果将叶绿素分成许多不同的色带,且各色带间是无