

生 物 实 验 室 系 列

生物化学实验技术

何忠效 主编

化 学 工 业 出 版 社

现代生物技术与医药科技出版中心

• 北 京 •

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学实验技术/何忠效主编. —北京: 化学工业出版社, 2004.2
生物实验室系列
ISBN 7-5025-5165-4

I. 生… II. 何… III. 生物化学-实验 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 005915 号

生物实验室系列
生物化学实验技术

何忠效 主编

责任编辑: 郎红旗 周 旭

责任校对: 蒋 宇

封面设计: 关 飞

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京管庄永胜印刷厂印刷

三河市延风装订厂装订

开本 787 毫米×1092 毫米 1/16 印张 26 插页 1 字数 650 千字

2004 年 3 月第 1 版 2004 年 3 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-5165-4/Q·83

定 价: 60.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

出版者的话

21 世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20 世纪后叶现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为 21 世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如 17 世纪 Leeuwenhoek 等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973 年 Cohn 和 Boyer 完成了 DNA 体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988 年 Kary Mullis 发明的 PCR 技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学无时无刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展了实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化工出版社组织出版了“生物实验室系列图书”。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，约请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

“生物实验室系列图书”的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望“生物实验室系列图书”的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的科学技术工作者致以崇高的敬意！

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

前 言

21 世纪是公认的生命科学世纪，生命科学将为人类做出前所未有的重大贡献。生命科学之所以能有今天这样的地位，在于现在人们已基本搞清了生命现象的主要本质和规律。而这其中关键在于对生物大分子的结构与功能，以及其在生物体中的调控作用有了较深入的了解。生物化学主要就是研究生物大分子在生命现象中所起作用的一门科学分支。它过去已经且今后将继续在揭示生命现象本质和规律的过程中起关键作用。

生物化学是一门实验性学科。生物化学的许多本质和规律性问题，都是通过几代人艰苦的实验室工作而得出和确认的，这种例子不胜枚举！因此，实验室工作对生物化学的发展是至关重要的。回顾生物化学的发展历程并展望其在 21 世纪肩负的重任，加强生物化学工作者们的实验室工作能力则永远是必要的。

化学工业出版社应时地推出了“生物实验室系列”图书。应该说这是为 21 世纪生命科学的发展做了一件有意义的实事。本人应邀编写《生物化学实验技术》一书，既感荣幸又感使命之重大。对于已年过六旬的我，回顾这一生从大学时代学习生物化学专业开始；中青年时代主要是在中国科学院微生物研究所和美国国立卫生院国家肿瘤研究所（NIH-NCI）的实验室内从事生物化学实验；中老年时代成为北京师范大学的一名教师，并为中国科学院研究生院的研究生们讲授“生物化学实验技术”课程。回顾 20 年来讲授该课程的一个深刻体会是：讲授这门课程，教师本人必须有十分充分的实验室实际操作经验做后盾，同时又要通过不断地总结提炼，把这些实验技术提升到足够的理论高度，从原理到特色乃至实际操作体会做全面、深刻的阐述，才会真正对学生们今后的教学和科研有所帮助。

回首往事，在长期从事艰苦的实验室工作的同时，也曾翻译或编写了多部与生物化学实验技术相关的专著。但我深知“写书难，写出一本真正对广大读者有用的书更难！”本人的精力已不如前，此乃生命规律使然。在本书写作过程中，顾郁先生参与了第三章、第四章部分内容的编写；欧阳津先生参与了第五章部分内容的编写。在本书编写过程中，还得到丁小川、刘颖、陈萍、王玉珍、李小丽、周大伟、林力、范月萍、宋大林、万宏、田玉林、马民强等同志的大力帮助，在此一并致谢。

同时，这里应注明，在本书的编写中为满足生物化学科研中的实际需要，对部分常用的非法定计量单位未做改动。由于我们的水平所限，本书难免有这样、那样的不足之处。还望广大读者不吝指正，以在再版时改正之！

何忠效

2003 年 12 月

目 录

第一章 缓冲液的使用	1
第一节 生物化学实验中为什么要使用缓冲液	1
第二节 缓冲液的原理及配制	1
一、pH 值和缓冲液	1
二、使用缓冲液时的一些注意事项	5
参考文献	5
第二章 生化物质的制备	6
第一节 起始材料及前期处理	6
一、起始材料	6
二、前期处理	6
第二节 常用的分离纯化技术	7
一、离心作用	7
二、密度梯度离心	8
三、过滤	9
四、溶液的浓缩	9
五、透析	10
第三节 一些生化物质的制备	11
一、细胞组分及细胞器的分级	11
二、蛋白质的提取	12
三、糖类的制备	13
四、核酸的制备	15
五、脂类的制备	18
参考文献	21
第三章 生化物质的分析检测方法	22
第一节 光谱学方法	22
一、电磁辐射和光谱	22
二、光吸收的定量	24
三、紫外和可见光谱法	27
四、荧光光度法	28
五、红外光谱法	29
六、核磁共振光谱法	32
第二节 放射性同位素的使用	39
一、基本原理	39
二、测量仪器及方法	41
三、放射自显影	46
四、实验室防护	53
第三节 一些特定生化物质的定性和定量	59

一、糖类	59
二、氨基酸、肽和蛋白质	66
三、核苷酸及核酸	74
四、脂类和类固醇	77
五、其他物质的测定	79
参考文献	81
第四章 免疫学方法在生化实验中的应用	83
第一节 基本原理	83
一、抗原	83
二、抗体	84
三、抗原与抗体的反应	85
第二节 抗血清的制备和鉴定	86
一、抗血清的制备	86
二、抗血清的鉴定及分装保存	89
第三节 免疫扩散	89
一、双向免疫扩散	89
二、单向免疫扩散	90
三、逆向免疫扩散	91
第四节 免疫标记	91
一、酶标抗体技术	91
二、生物素亲和素免疫标记试剂的制备方法和技术	96
三、胶体金标记抗体技术	98
第五节 放射免疫测定	102
一、基本原理	102
二、测定方法	103
三、操作步骤	103
参考文献	104
第五章 生物大分子的分离纯化及纯度鉴定	105
第一节 生物大分子分离纯化的必要性及意义	105
一、总体考虑	106
二、分离程序和进展	107
第二节 离心技术	108
一、原理和应用	108
二、超离心技术	109
第三节 生物大分子的抽提	120
一、酶的抽提	120
二、用于生化物质分离的沉淀技术	123
第四节 各种分离纯化技术的基本理论依据	126
第五节 层析技术	126
一、层析概论	126
二、凝胶过滤	129
三、吸附层析	137
四、离子交换层析	139

五、高效液相层析 (HPLC)	146
六、亲和层析	152
七、其他分析用层析技术	160
第六节 电泳技术	168
一、电泳概论	168
二、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)	175
三、等电聚焦 (IEF)	185
四、几种其他的 PAGE	204
五、双向电泳及印迹转移 (blotting) 技术	206
六、等速电泳	217
七、几种其他电泳技术	243
八、电泳仪器及设备	292
参考文献	293
第六章 蛋白质及酶分子的结构与性质研究	294
第一节 蛋白质化学结构研究技术	294
一、氨基酸组成的分析技术	294
二、酶蛋白的断裂及肽图谱	296
三、酶蛋白的断裂及分肽技术	299
四、N-端氨基酸的测定方法	302
五、C-端氨基酸的测定方法	308
六、序列分析技术	311
七、糖蛋白中糖的组成与连接方式的研究方法	315
第二节 蛋白质空间结构研究技术	321
一、从蛋白质的一级结构预测二级结构	321
二、酶或蛋白质的结晶	327
三、酶的溶液构象研究法	333
四、计算机辅助设计在蛋白质结构研究中的应用	352
第三节 酶的物化性质及催化性质	354
一、凝胶过滤法测定蛋白质的分子量	354
二、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定分子量	356
三、酶蛋白溶液的特性黏度	361
四、酶蛋白的沉降系数及相对分子质量	364
五、等电聚焦测定等电点	365
六、凝胶电聚焦测定等电点	368
七、酶的电镜观察	371
八、酶的催化性质研究法	377
第四节 酶分子的化学修饰	390
一、氨基酸残基的化学修饰	390
二、酶分子中必需基团的测定	405
参考文献	406

第一章 缓冲液的使用

第一节 生物化学实验中为什么要使用缓冲液

生物化学主要是研究生物大分子及其相互作用的学科。而生物大分子是存在于生命的基本单元——细胞中的，它们在活细胞内的特定存在条件（pH、离子强度及其他生物大分子的相互制约）下，不仅能保持其结构的完整而且能保持其生物活力。至今，我们若想研究生物大分子的结构和功能，尚未找到一种在细胞内即可进行的方法。因此，我们若想研究生物大分子的结构和功能，从而在分子水平上阐述生命现象的本质，就必须先要把生物大分子从细胞内完整、纯净且保持其活力地“拿”出来。为此，当我们将细胞破碎并在体外（*in vitro*）分离纯化和研究这些生物大分子的结构与功能时，就必须时刻注意保持它们结构的完整及活力的“充沛”！若想做到这一点，从细胞破碎一开始（生物大分子马上失去了其赖以保持活力的制约条件），我们就必须时刻注意为这些“离体”的生物大分子提供保持其活力和结构完整（后者是前者的基础）的环境条件。

这种条件，不是纯净水、无离子水等所能提供的。也就是说，我们要为生物大分子提供一个合适而相对稳定的 pH 环境（这一点是最主要的，我们将在下面详述）、合适的离子强度及其他外界条件。要做到这一点，则必须使用“缓冲液”（buffer）这种特定的溶液形式。

第二节 缓冲液的原理及配制

一、pH 值和缓冲液

1. pH 值

氢离子浓度的常用对数的负值就是 pH 值，用下式表示：

$$\text{pH} = -\lg[\text{H}^+] \quad (1-1)$$

pH 标尺是用来度量氢离子浓度的，它可避免 10 的大数目乘方，而把大范围的氢离子浓度范围压缩到更方便的 $1\sim 14$ 的标尺上（图 1-1）。氢离子浓度高（ 10^{-1}mol/L ）时，pH 值低，即 $\text{pH}=1$ ；而氢离子浓度低（ 10^{-12}mol/L ）时，pH 值高，即 $\text{pH}=12$ 。

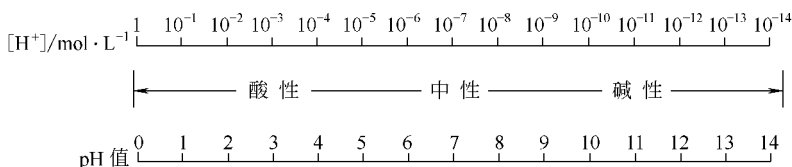


图 1-1 pH 标尺

溶液中的氢离子是由酸解离产生的。



强酸在稀溶液中可完全解离成离子。而弱酸（或弱碱）在溶液中只能部分解离，因此在离子和未解离的分子之间建立一种平衡。



平衡常数 K'_a 定义为：

$$K'_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (1-4)$$

其中，HA 代表未解离酸， H^+ 代表氢离子， A^- 代表共轭碱。由这个表达式，可以导出 Henderson-Hasselbach 方程，通常叫缓冲液方程。这个方程使溶液的 pH 与酸的 $\text{p}K'_a$ 和未解离酸及共轭碱的相对浓度相互有关。

由方程式（1-4）先解出氢离子浓度：

$$[\text{H}^+] = K'_a \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} \quad (1-5)$$

将上述方程转换成常用对数形式，则有：

$$\lg[\text{H}^+] = \lg K'_a + \lg \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} \quad (1-6)$$

方程两边同乘以 -1 ，则有：

$$-\lg[\text{H}^+] = -\lg K'_a - \lg \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} \quad (1-7)$$

因为 $\text{pH} = -\lg [\text{H}^+]$ ， $\text{p}K'_a = -\lg K'_a$ ，代入上式：

$$\text{pH} = \text{p}K'_a - \lg \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} \quad (1-8)$$

颠倒 $\lg([\text{HA}]/[\text{A}^-])$ 项里的分子分母，则有：

$$\text{pH} = \text{p}K'_a + \lg \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (1-9a)$$

$$\text{pH} = \text{p}K'_a + \lg \frac{[\text{共轭碱}]}{[\text{酸}]} \quad (1-9b)$$

这就是 Henderson-Hasselbach 方程，它对制备缓冲液很有用，有助于理解弱酸的未解离酸浓度和共轭碱浓度如何影响 pH 值。

2. 缓冲溶液

顾名思义，缓冲液能抵抗溶液 pH 的变化。缓冲液必须含有能“中和”外加酸或碱的化学成分。一般来说，缓冲液是弱酸及其共轭碱（如乙酸和乙酸钠）或弱碱及其共轭酸（如氨和氯化铵）组成的溶液。选择缓冲液的依据是它的 $\text{p}K'_a$ 值及其化学性质。

Henderson-Hasselbach 方程 [式 (1-9a)] 表达了缓冲液的 pH、 $\text{p}K'_a$ 和盐浓度与酸浓度比之间的相互关系。如式 (1-9b) 所示，当共轭碱与未解离酸的浓度相等时，即 $[\text{共轭碱}] = [\text{酸}]$ ，此时：

$$\text{pH} = \text{p}K'_a + \lg 1$$

$$\text{因} \quad \lg 1 = 0$$

$$\text{则} \quad \text{pH} = \text{p}K'_a$$

即溶液的 pH 等于缓冲液的 pK'_a 。

当[共轭碱]=10×[酸]，则有：

$$\lg \frac{[\text{共轭碱}]}{[\text{酸}]} = \lg 10 = 1$$

$$\text{pH} = pK'_a + 1$$

当[共轭碱]= $\frac{1}{10}$ [酸]时，则有： $\lg \frac{[\text{共轭碱}]}{[\text{酸}]} = \lg \frac{1}{10} = -1$

$$\text{pH} = pK'_a - 1$$

因此，缓冲液在 $\text{pH} = pK'_a \pm 1$ 的范围内是最有效的。超出这个范围，无论是酸浓度还是共轭碱浓度都太小，不能有效抵抗外加氢离子或羟基离子的影响。

一旦决定了实验所用的 pH 范围，就可以根据 pK'_a 值选择缓冲液。表 1-1 列出了常用的生物缓冲液。在 $\text{pH} = 7$ 附近区域内，有 8 种缓冲液可供用来控制 pH。由于温度影响某些弱酸和弱碱的解离，因此也影响 pK'_a 值。所以缓冲液的温度变化总是对缓冲液的 pH 有调节作用。表 1-1 说明了温度对某些重要缓冲液的影响。

表 1-1 某些常用生物缓冲液的性质

品 名	结 构 式	$pK'_a(20^{\circ}\text{C})$	$\Delta pK'_a/^{\circ}\text{C}$
磷酸	H_3PO_4	2.12	—
柠檬酸	$\text{HOOCCH}_2\text{COH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{COOH}$	3.06	—
甲酸	HCOOH	3.75	—
琥珀酸	$\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	4.19	—
柠檬酸二氢钠	$\text{HOOCCH}_2\text{COH}(\text{COONa})\text{CH}_2\text{COOH}$	4.74	—
乙酸	CH_3COOH	4.75	—
柠檬酸氢二钠	$\text{HOOCCH}_2\text{CHOH}(\text{COONa})\text{CH}_2\text{COONa}$	5.40	—
琥珀酸氢钠	$\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{COONa}$	5.48	—
MES[2-(N-吗啉代)乙烷磺酸]①	 $\text{HCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	6.15	-0.011
ADA[N-(2-乙酰氨基)亚氨基二醋酸]①	$\text{H}_2\text{NCOCH}_2\text{NH}(\text{CH}_2\text{COO})\text{CH}_2\text{COONa}$	6.6	-0.011
PIPES[哌嗪-N,N'-双(2-乙烷磺酸)]①	$\text{NaO}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{N} \quad \text{N} \end{array} \text{HCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	6.8	-0.0085
盐酸咪唑		7.00	—
BES[N,N'-双(2-羟乙基)-2-氨基乙烷磺酸]①	$(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^+$	7.1	-0.027
MOPS[3-(N-吗啉代)丙烷磺酸]①	 $\text{HCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3$	7.20	—
磷酸二氢钠	NaH_2PO_4	7.21	—
HEPES[N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙烷磺酸]①	$\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{NH} \quad \text{N} \end{array} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3$	7.55	-0.014
Tricine[N-三(羟甲基)甲基甘氨酸]①	$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$	8.15	-0.021
盐酸甘氨酸酰胺	$\text{NH}_2\text{COCH}_2\text{NH}_3\text{Cl}$	8.2	-0.029
Tris[三(羟甲基)氨基甲烷]盐酸盐	$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_3\text{Cl}$	8.3	-0.031
Bicine[N,N'-双(羟甲基)甘氨酸]①	$(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{COO}^-$	8.35	-0.018

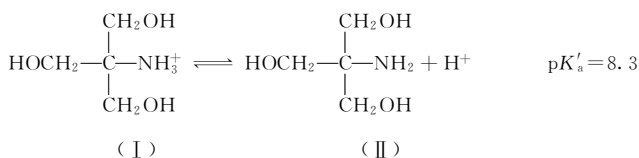
品 名	结 构 式	$pK'_a(20^\circ\text{C})$	$\Delta pK'_a/^\circ\text{C}$
双甘肽	$\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{COO}^-$	8.4	-0.028
硼酸	H_3BO_3	9.24	
磷酸氢二钠	Na_2HPO_4	12.32	

① Good 缓冲液。

例如，根据表 1-1，对常用的 Tris 缓冲液 [三（羟甲基）氨基甲烷] 来说，从参考温度 20°C ，温度每变化 1°C ， pK'_a 变化为 $-0.031 (\Delta pK'_a/^\circ\text{C})$ 。因此， 10°C 时， pK'_a 的变化为 $\Delta pK'_a = (10^\circ\text{C} - 20^\circ\text{C})(-0.031) = 0.31$ ，因此 10°C 时的 pK'_a 为 $8.3 + 0.31 = 8.6$ 。同样， 30°C 时的 pK'_a 的变化为 $(30^\circ\text{C} - 20^\circ\text{C})(-0.031) = -0.31$ ，因此 30°C 时的 pK'_a 为 8.0 。

3. 缓冲能力和离子强度

为了获得适当的缓冲能力要选择缓冲液的两个组分的物质的量浓度；还要着重考虑缓冲液总的离子强度，例如在酶研究中就是如此。缓冲液的离子强度用共轭酸或共轭碱的总浓度来表示。再以 Tris 为例。



20°C 时，Tris 的 pK'_a 是 8.3 ；因此，在 $\text{pH}7.3 \sim 9.3$ 的范围内 Tris 缓冲液可以有效地起作用。要制备 50mmol/L ， $\text{pH}7.8$ 的 Tris 缓冲液，既可从游离碱（II）着手，也可从盐酸盐 Tris-HCl 着手。Tris（游离碱型）的相对分子质量为 121.1 。制备 1L 50mmol/L 溶液所需固体 Tris 的量为： $50\text{mmol} \times 121.1\text{mg/mmol} = 6055\text{mg}$ 。但缓冲液的 pH 要用酸调至 7.8 ，用盐酸调 pH 是最佳选择——因为 Tris-HCl 是可溶的，而且氯离子适合于大多数生物系统。

由于所要求的 pH 比 pK'_a 低 0.5 单位，所以用 Henderson-Hasselbach 方程式（1-9）可计算将 pH 调至 7.8 应加入 HCl 的量。计算过程如下：

$$\lg \frac{[\text{共轭碱}]}{[\text{酸}]} = \text{pH} - pK'_a = 7.8 - 8.3 = -0.5$$

$$\text{或 } \lg \frac{[\text{酸}]}{[\text{共轭碱}]} = 0.5, \quad \frac{[\text{酸}]}{[\text{共轭碱}]} = 3.16$$

因为是从 50mmol Tris 的共轭碱形式开始制备缓冲液的，所以最终的浓度比是

$$\frac{[\text{酸}]}{50\text{mmol/L} - [\text{酸}]} = 3.16$$

$$[\text{酸}] = 158\text{mmol/L} - 3.16[\text{酸}]$$

$$[\text{酸}] = 37.98\text{mmol/L} \approx 38\text{mmol/L}$$

因此， 50mmol 固体 Tris 加 38mmol 盐酸，再稀释到 1L ，则在 20°C 时得到 50mmol/L ， $\text{pH}7.8$ 的 Tris-HCl 缓冲液。当然最终 pH 要用 pH 计验证。

缓冲液的化学性质在生物研究中特别重要。选择缓冲液时要考虑的问题包括溶解度、稳定性、与系统中其他离子的相互作用，以及光吸收和对生物系统功能的潜在抑制作用或刺激作用等。Good 及其合作者设计的一组缓冲液特别适用于生物系统，其 pK'_a 值在 $6 \sim 9$ 之间，而

且与无机阳离子有确定的作用。这类两性离子缓冲液不能通过生物膜，也不能络合像 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 这样的阳离子。所有这些缓冲液都具有叔胺功能，在 $\text{pH}6\sim9$ 可解离（见表 1-1）。

二、使用缓冲液时的一些注意事项

在配制缓冲液时，除注意上述问题之外还应注意以下问题。

① 向缓冲液中添加一些必要的稳定剂（如巯基保护剂——巯基乙醇、多元醇、甘油、蔗糖、乙二醇、DTT 等），以保护含巯基的生物大分子。

② 添加金属离子或络合剂，以保护对金属离子敏感（需要或不需要）的生物大分子。如有些酶需两价金属离子（ Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 等）作为其辅因子；相反，有些生物大分子则要时刻防范上述酶类（如 DNase；Nuclease 等）对它们的降解，故要向缓冲液中添加 EDTA 或 EGTA，以保护它们不被降解。

③ 添加蛋白酶抑制剂。如我们要研究蛋白质分子，在分离纯化它们的过程中，必须时刻防止它们被蛋白酶所水解。为此，可向缓冲液中添加 PMSF（苯甲基磺酰氟）或 DFP（磷酸二异丙基氟），它们可分别抑制哺乳动物蛋白酶或丝氨酸蛋白酶的活力。

④ 蛋白质添加剂：生物大分子需要有一定的浓度，才能保持其完整的空间构象。因此，当经过一系列分离纯化步骤而最终得到纯酶制品时，有时其浓度很低。为保持这类浓度很稀的纯酶的活力，往往要向这类酶制品（特别是一些商品限制性核酸内切酶）中人为地添加一些蛋白质（如牛血清白蛋白——BSA 或酪蛋白——Casein），从而既保护了目的酶的空间构象又不影响其活力。

参 考 文 献

- 1 吴冠芸，潘华珍，吴肇．生物化学与分子生物学实验常用数据手册．北京：科学出版社，1999
- 2 W Ferdinand 酶分子．王志美，何忠效，孟广震译．北京：科学出版社，1980
- 3 B L Williams and K Wilson．实用生物化学原理和技术．王海云，冯北元译．北京：科学出版社，1979

第二章 生物物质的制备

生物物质的制备包括特殊细胞器或细胞组分（如膜、线粒体、叶绿体、核糖体或高尔基体）的分离，或四种主要类型生物分子（蛋白质、糖、核酸和脂）的分离和纯化。采用的特殊实验技术有细胞溶解、组织匀浆化、过滤、离心、层析、盐析或有机溶剂沉淀、浓缩等。本章介绍这些基本方法，描述可被分离纯化的不同细胞组分和生物物质的特殊制备以及所使用的不同方法。

第一节 起始材料及前期处理

一、起始材料

起始材料可来自微生物、动物组织和植物组织。如何选择起始材料取决于研究目标。例如，具有某种特殊作用的确定的酶可由确定种类的细菌来生产。为了获得大量酶，则要大規模培养细菌。对于分泌到培养液中的胞外酶来说，需要的是不含细胞的培养清液；相反，对胞内酶来说，需要的是细胞本身。上述两种情况都要求用离心或过滤分离细胞。

所需要的组分或分子可以来自某种动物或植物的某些部分。例如，实验研究可能涉及兔的骨骼肌、鼠肝、牛心或猪心、胰、脑或人血或唾液，或者涉及个别植物的叶、茎、花、根块茎或种子。器官的种属和类型则决定使用方法的类型。

二、前期处理

不同类型细胞要用不同的细胞溶解方法。动物细胞通常容易破碎，而植物细胞和细菌则难于破碎，因为有坚韧的纤维质或胞壁质细胞壁。有些细胞溶解方法比其他方法更为激烈。激烈的方法可用来获得可溶性的细胞成分，而温和的方法则用来获得细胞器。

激烈的方法包括 French 压榨机法。压榨时，高压迫使细菌或植物细胞通过一个小孔，过孔时产生的剪切力使细胞壁破坏。一般来说，此法不适于破碎大量细胞。另一个激烈的方法是使用超声波。超声波通过剪切和空化作用破坏细胞壁。用球磨机破碎细胞也很激烈。

适中的细胞破碎方法是用搅切器使细胞匀浆化，此法适宜于大多数动物组织、植物组织和各类细菌细胞的破碎。另一个适中的细胞破碎方法特别适用于植物组织或细菌，就是在含有磨料的匀浆器内研磨细胞，磨料为砂或氧化铝。向特别设计的搅切器内加入玻璃球（100~200 μm ）能加强对细菌或霉菌孢子的碎裂效果。

温和的细胞破碎方法包括渗透破碎细胞膜，用溶菌酶处理细菌（革兰阳性菌比革兰阴性菌对溶菌酶更敏感），用有机溶剂（如甲苯）化学溶解细胞。用手动或机动匀浆器可以温和地破碎动物组织。可供利用的匀浆器有几类，其共同的基本特点示于图 2-1。带多孔玻璃或聚四氟乙烯表面的碾锤与带有多孔玻璃内表面的管子密切契合。组织放于管中，碾锤的垂直冲击和旋转则使组织匀浆化。

要制备细胞抽提液，可先将组织和细胞悬浮在适当的缓冲液中。植物组织有一个特殊的问题：很多植物含有酚类化合物，酚很易被组织内的酚氧化酶氧化成深色色素。这些色素能吸附蛋白质并与之反应，结果降低生物活力。加入还原剂，如 20~30mmol/L 的 β -巯基乙醇

或 2~5mmol/L 的二硫苏糖醇可降低或消除氧化作用，或者加入聚乙烯吡咯啉酮吸附酚类化合物。

应用激烈的超声处理和 French 压榨机处理能破碎细菌细胞。这些方法适用于小规模处理，但对大规模处理则不方便。更大规模制备，可用温和的溶菌酶处理法。一般来说，此法可溶解革兰阳性细菌。将细菌悬浮于 pH7~8 的缓冲液中，其中每毫升缓冲液（浓度为 $10^8 \sim 10^{10}$ 细胞/mL）中含 0.1~0.2mg 溶菌酶，在 37℃ 培温 15~30min。如果要分离的组分不是 DNA，则可加入脱氧核糖核酸酶或加入硫酸链霉素，或硫酸鱼精蛋白（ A_{260} 每增加 1500，加 1mL 10% 溶液），以除去 DNA，降低抽提液黏度，改善其质量。0.1% 非离子去污剂（如 TritonX-100 或 Tween 80）与溶菌酶结合使用，或者渗透震荡处理与溶菌酶联用，一般可使革兰阴性菌对溶菌酶的作用敏感。搅切器叶片涂聚四氟乙烯后，再将细玻璃球加进搅切器内，则可相当大规模地破碎细菌细胞（玻璃颗粒为 100~200 μ m，叶片上的合成涂料是绝对必需的，否则玻璃颗粒使叶片迅速裂解）。

用甲苯在 35~40℃ 处理酵母 1~3h，然后加入缓冲液，并在 35~40℃ 搅拌 3~4h，则易溶解酵母细胞。甲苯可使酵母细胞壁变薄，因为甲苯能抽提可溶于有机溶剂中的细胞壁。细胞溶解后，通过离心或过滤，则可得到清晰的抽提液。

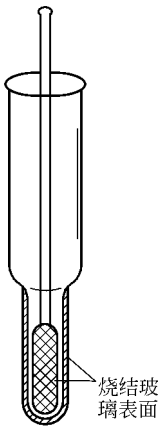


图 2-1 Potter Elvehjem 式组织匀浆器
注：杵锤的垂直运动和转动可使组织匀浆化；可用手工或马达驱动装置完成研磨

第二节 常用的分离纯化技术

一、离心作用

离心作用是利用装有固体颗粒悬浮液的容器迅速旋转的过程，显著增加的离心力使颗粒沉降。离心力或引力与角速度的平方 ω^2 乘以距转动中心的径向距离 r (cm) 成正比。角速度通常以每分钟的转数 (r/min) 来表示。离心力由下式给出：

$$F=1.12\times10^{-5}\omega^2r$$

对于径向距离为 7cm 的转子，若角速度为 10000r/min，则离心力是重力的 8000 倍（表示为 8000g）。表 2-1 列出了不同半径的离心转子以不同角速度运动时所产生的离心加速度（以重力加速度的倍数表示）。

表 2-1 离心机转子半径和角速度与获得的离心加速度的关系

转子半径 r /cm	角速度 ω /r · min ⁻¹									
	1000	3000	6000	10000	20000	25000	30000	50000	70000	100000
3	35g	300g	1200g	3500g	14000g	20000g	30000g	85000g	160000g	400000g
7	100g	700g	3000g	8000g	32000g	50000g	70000g	200000g	400000g	1×10 ⁶ g
15	170g	1500g	6000g	17000g	65000g	100000g	150000g	412000g	800000g	—

离心机制造厂家一般提供其转子速度与产生的离心力的对应关系数据。为便于衡量离心力的大小，通常采用离心力相对于重力的倍数，亦即离心加速度相对于重力加速度 g 的倍数来表示离心作用，比用转速 (r/min) 表示为好，因为对不同类型和大小的转子来说，离

心加速度的大小能提供同一的可重复的离心条件。离心分离的效果还取决于离心时间及所发挥出的离心加速度的大小。表 2-2 列出的沉降各类生物颗粒所需要的 g 值和离心时间。因此，使用不同离心加速度的大小、不同离心时间的差速离心法可用来分离细胞组分。

表 2-2 在离心场中沉降生物颗粒所需离心加速度和时间的比较

离心加速度	时 间	沉降的组分	离心加速度	时 间	沉降的组分
100g	5min	真核细胞	30000g	30min	溶酶体、细菌细胞碎片
4000g	10min	叶绿体、细胞碎片、细胞核	100000g	3~10h	核糖体
15000g	20min	细菌、线粒体			

市售高速离心机大小各异，有只用 1mL 或更小离心管的小型离心机；也有使用 500mL 管的大型离心机。这些离心机很多都有制冷设备，温度可调，以降低对温度敏感的材料生物活力损失。可供利用的转子也有不同类型，如角转子（离心管在这种转子中的角度是固定的，例如与垂直方向呈 55° ）、平旋吊桶式转子（主要用于密度梯度离心，离心时离心管可在水平面上旋转）。

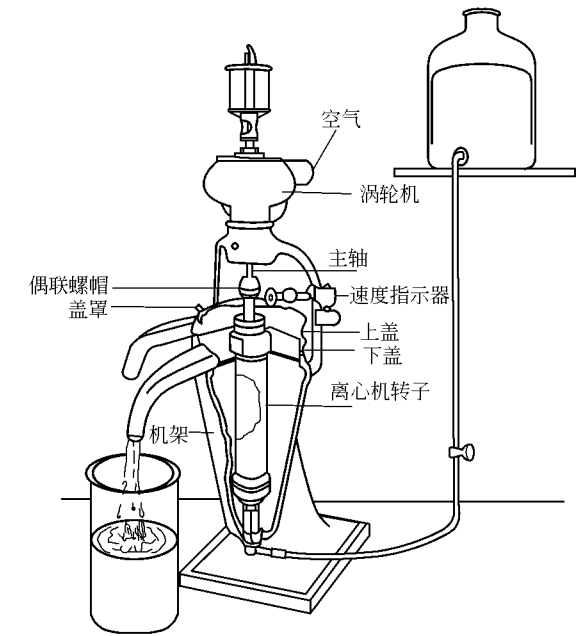


图 2-2 实验室用连续流动离心机

相当大体积的离心则需要连续流动离心机。Sharples 离心机就是一种有效而可靠的连续流动离心机，它类似于奶油分离器（图 2-2）。转子或转筒是相当长的细圆筒，由马达或气流涡轮机驱动旋转。含固体颗粒的悬浮液从旋转转子的底部进入；当液体向上流动时，颗粒被堆积在转子壁上，清液从转子上部流出。空气驱动的 Sharples 离心机可达到 50000r/min 的高速，离心加速度为 70000g。

离心作用的理论是 Svedberg 于 20 世纪 20 年代，为测定大分子的分子量而开发出来的。研制的超速离心机可产生 $(420000 \pm 100) g$ 的离心加速度，温度可控制在 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 。这类分析型超速离心机装有光学探测系统，可以测定离心过程中任一时间大分子的浓度分布。测量沉降系数、扩散系数，则可求出大分子的分子质

量。由于这些测量费时费力，而且需要非常贵重的仪器，所以这个方法一般已被更简单的聚丙烯酰胺凝胶电泳法和凝胶渗透层析法所取代。

二、密度梯度离心

密度梯度离心是根据大分子密度的差别而使分子分离的一种手段。有两种基本类型：速度密度梯度离心和平衡密度梯度离心。

前一种方法是在离心管中制备蔗糖或甘油的密度梯度：用自动泵将浓蔗糖或浓甘油与水按递减比率混合，混合同时装管，这样管下部的蔗糖或甘油浓度为 600g/L [60% (W/V)]，上面为 200g/L [20% (W/V)]。待分离的组分溶解或悬浮在缓冲液中后，加到梯度上端

[图 2-3 (a)], 然后在水平位置上离心。混合物中的各组分以其密度所决定的速度在密度梯度中沉降。不同密度的组分分离成带或区带 [图 2-3 (b)], 然后用注射针刺穿离心管底部, 用蠕动泵将管内物泵入部分收集器中 [图 2-3 (c)], 这样就可分离各区带。或者用注射器将区带吸出。该技术在分离不同细胞组分 (细胞核、线粒体、高尔基体等) 和不同核酸时特别有效。

后一种方法则不事先制备密度梯度, 而是制备 6mol/L 氯化铯 (CsCl) 溶液, 待分离的大分子溶解在氯化铯中。当溶液放于高离心场中时, CsCl 沉降; 几小时后达到平衡, 则形成稳定的 CsCl 密度梯度, 大分子混合物按照颗粒的密度分布在各区带中而得到分离。当大分子的密度等于梯度溶液的密度时, 则形成区带。用上述同样的方法取出大分子区带。此法可获得极高分辨力, 特别适用于分离不同类型的核酸 (tRNA、mRNA、细胞核 DNA)。

三、过滤

有时用过滤法从悬浮液中除掉固体材料。小规模过滤是澄清溶液的好方法, 但很多生物颗粒, 由于大小及柔韧性方面的原因, 能迅速堵塞过滤器。使用助滤剂, 如 C 盐 (Johns Manville 产品) 可改善过滤速度。C 盐是硅藻土材料, 主要由二氧化硅组成。C 盐加到悬浮液中, 再倒入布氏漏斗中的过滤器中, 布氏漏斗上放一滤纸, 抽气过程中将 C 盐糊倒在滤纸上, 做成 2~5mm 厚的 C 盐垫, 再小心将待过滤的悬浮液倒在滤垫上。

随着 Millipore 公司成功地开发出一种膜过滤片, 有可能进行大规模过滤。这种过滤是强迫悬浮液颗粒总是处在膜上面, 而液体在压力下可通过膜, 所以悬浮液中的颗粒浓度越来越浓。膜的表面积相当大, 有 2m^2 , 流速为 $1\text{L}/\text{min}$ 。浓缩后的糊状物 (大约浓缩 10 倍) 置于普通离心管中离心。这个技术特别适用于从大量发酵液中获得菌体或发酵上清液。

四、溶液的浓缩

生物溶液常很稀, 且含对热不稳定的分子, 不能用加热溶液法浓缩。大体积 (10~100L) 溶液可用 Pellicon 膜浓缩, 使用的膜应能阻止待浓缩的分子通过膜。溶液中的水通过膜而被除去, 结果使该分子的溶液被浓缩。

图 2-4 是一种更普通的超滤系统, 适用于小体积 (10mL~1L) 溶液的浓缩。搅拌池中的液体在压力下通过膜, 池中留下浓溶液。

另一种温和的浓缩方法是加入吸水的不溶性固体。例如, 将高交联度的葡聚糖和生物胶 (如 Sephadex G-15、Bio-Gel P6) 加入到水溶液中时, 这些物质就吸水, 使生物分子留在更小体积的溶液中。胶材料吸水后, 抽滤, 得滤液, 体积为原来的 $1/3\sim 1/2$ 。

将待浓缩的溶液放入透析袋内, 再将透析袋放到烧杯或结晶盘中, 用聚乙二醇 (相对分

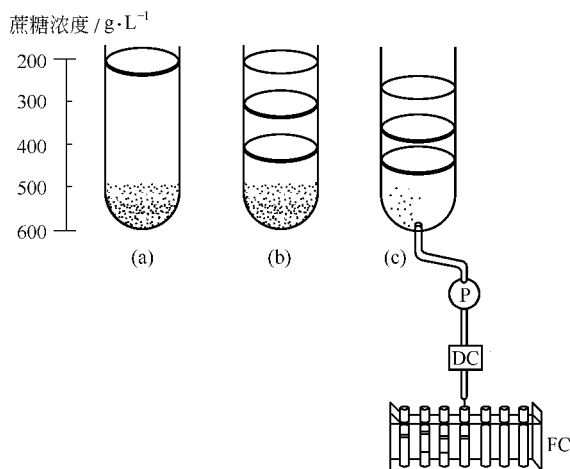


图 2-3 密度梯度离心 (蔗糖梯度为 20%~60%)

- (a) 将待分离的细胞组分或分子样品放到密度梯度上部。
(b) 水平离心后, 不同密度的组分或分子分离开来。(c) 分级梯度和分离了的分子; 刺穿离心管底部, 用蠕动泵 (P) 取出各层, 用计滴器计算滴数 (DC), 用部分收集器 (FC) 收集各组分