

第1章

如何在分子水平研究生命

问题讨论

1. 为什么要从分子水平研究生命?
2. 如何从分子水平研究生命?

生物化学与分子生物学是在分子水平上研究生命的科学，是人类探索生命的知识结晶和有力武器。生物化学与分子生物学的完整体系不仅包括其理论体系，还包括其技术体系。该学科快速发展在很大程度上得益于一系列实验技术的创新和仪器设备的发明，如 DNA 重组技术、核酸分子杂交技术、PCR 技术、转基因技术、基因打靶技术、DNA 芯片技术、基因测序技术、蛋白质组学技术等，这些技术本身构成了生物化学与分子生物学的重要内容。生物化学与分子生物学实验技术 (experimental techniques of biochemistry and molecular biology) 以生物分子为研究对象，通过各种手段对其理化性质、组成结构、功能活性以及在生命活动中的作用进行研究。

1.1 生物化学与分子生物学实验技术的发展简史

早在 19 世纪 30 年代，J. von Liebig 就将定量分析技术用于生物体系的研究。20 世纪 20 年代，微量分析技术用于生物分子的研究，导致了维生素、激素和辅酶的发现。20 世纪 30 年代，J. A. Folin 和吴宪先后建立了血糖分析、蛋白质含量分析、氨基酸测定等方法，这些方法至今仍在使用。

1923 年，T. Svedberg 制成了世界上第一台相对离心力 (relative centrifugal force, RCF) 为 $5000 \times g$ 的新型离心机，他用这台离心机准确测定了血红蛋白等复杂蛋白质的分子质量，开启了用离心机分离生物高分子的先河，为此，他获得了 1926 年的诺贝尔化学奖。为了纪念这位超离心技术的奠基人，人们将大分子沉降系数 (sedimentation coefficient, s) 的基数 ($10^{-13} s$) 命名为 1 个 Svedberg 单位 ($1S = 1 \times 10^{-13} s$)。

1809 年，Peñce 首次发现电泳现象。1909 年，L. Michaelis 首次将胶体颗粒在电场中的移动现象称为电泳 (electrophoresis)。1937 年，A. W. K. Tiselius 对电泳仪器作了改进，制成 “Tiselius 电泳仪”，建立了研究蛋白质的移动界面电泳方法，并首次证明血清蛋白包括清蛋白及 α 、 β 、 γ 球蛋白。Tiselius 在电泳技术方面作出了开拓性贡献，他获得了 1948 年的诺贝尔化学奖。1948 年，Wieland 和 Fischer 发展了以滤纸作为支持介质的电泳方法，对氨基酸进行分离。1949 年，L. C. Pauling 等用电泳法证明镰形红细胞贫血是因为有异常血红蛋白的存在，据此引入分子病

(molecular disease) 的概念。1950 年, Durrum 用电泳进行各种蛋白质的分离, 开创了利用各种固体物质(如滤纸、醋酸纤维素薄膜、琼脂凝胶、淀粉凝胶等)作为支持介质的区带电泳方法。1959 年, S. Raymond 和 L. Weintraub 利用人工合成的凝胶作为支持介质, 创建了聚丙烯酰胺凝胶电泳方法, 极大提高了电泳的分辨率, 开创了电泳技术的新时代。至今聚丙烯酰胺凝胶电泳仍是对蛋白质、多肽、核酸等生物高分子使用最普遍、分辨率最高的分析鉴定技术, 是检验生化物质纯度的标准分析鉴定方法, 被看作是对生物高分子进行分析鉴定最准确也是最后的手段 (Last Check)。1969 年, K. Weber 应用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳技术测定了蛋白质的相对分子质量。1981 年, J. W. Jorgenson 和 K. D. Lukacs 首先在 $75\mu\text{m}$ 内径毛细管柱内用高电压进行电泳, 建立了高效毛细管电泳技术 (high performance capillary electrophoresis, HPCE)。1984 年, S. Terabe 等建立了胶束毛细管电动力学色谱方法。1987 年, S. Hjerten 建立了毛细管等电聚焦电泳 (capillary isoelectric focusing, CIEF), A. Cohen 和 B. Karger 建立了毛细管凝胶电泳。1988 年出现了第一批毛细管电泳商品仪器。由于 HPCE 高效、快速、经济, 适用于多肽、蛋白质(包括酶和抗体)、核苷酸以及 DNA 的分离分析, 短短几年内得到了迅速发展。HPCE 是经典电泳技术和现代微柱分离技术相结合的产物, 是一种可以自动化操作的高效分离技术。

1961 年, B. D. Hall 和 S. Spiegelman 建立 DNA-RNA 分子杂交法。分子杂交技术与电泳技术相结合, 形成了新的实验技术——印迹技术 (blotting)。1975 年, E. M. Southern 利用凝胶电泳分离 DNA 片段, 然后将 DNA 片段转移到硝酸纤维素膜上, 利用 DNA-RNA 杂交检测特定的 DNA 片段, 创立“Southern 印迹法”。尔后人们用类似的方法, 对 RNA 和蛋白质进行印迹分析, 对 RNA 的印迹分析称为“Northern 印迹法”, 对单向电泳后的蛋白质进行印迹分析称为“Western 印迹法”, 对双向电泳后的蛋白质进行印迹分析称为“Eastern 印迹法”。

1935 年, G. Hevesy 制得人工放射性磷, 奠定了放射性核素示踪技术的基础, 这使他获得 1943 年的诺贝尔化学奖。同年, R. Schoenheimer 和 Rittenberg 将核素示踪用于糖类及脂类物质的中间代谢的研究。1942 年, Schoenheimer 出版《身体成分的动态变化》, 该书大量采用²H、¹⁵N、¹⁸O、¹⁴C 等多种核素示踪的方法追踪代谢途径, 从而得出体内物质不断变化更新的动态概念。放射性核素示踪技术在 20 世纪 50 年代有了很大发展, 为阐明各种生物分子的代谢过程起了关键作用。

1940 年, A. J. P. Martin 和 R. L. M. Synge 建立色层析法, 后来又发展为纸层析及分配层析, 并应用于分析氨基酸, 他们因此获得 1952 年的诺贝尔化学奖。1949 年, W. H. Stein 和 S. Moore 报告了用淀粉柱区带层析测定 β -乳球蛋白的全部氨基酸组成。在 20 世纪 40 年代, 层析技术有很大发展, 成为分离生物分子的关键技术; 在 20 世纪 60 年代, 层析技术又有重大进展。1968—1972 年, Anfinsen 建立了亲和层析 (affinity chromatography, AC) 技术, 开辟了层析技术的新领域。

1949—1950 年, F. Sanger 发展了 2, 4-二硝基氟苯法, P. Edman 发展了异硫氰酸苯酯法鉴定肽链的 N-末端。1953 年, Sanger 研究出蛋白质序列的测定方法。1958 年, W. H. Stein、S. Moore 和 D. H. Spackman 设计出氨基酸自动分析仪, 加快了蛋白质的分析工作。1967 年, Edman 和 G. Begg 建成多肽氨基酸序列分析仪。1973 年, Moore 和 Stein 又设计出氨基酸序列自动测定仪, 大大加快了多肽一级结构的测定。

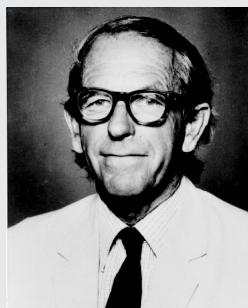
1975 年, Sanger 建立 DNA 碱基序列的分析方法并不断加以改进, 1977 年完成了 ϕX174 噬菌体全部 5400 个碱基序列的分析。1976 年, A. Maxam 和 W. Gilbert 建立了快速测定大片段 DNA 序列的化学法。1977 年, Sanger 提出应用链终止抑制法测定 DNA 序列。随后, DNA 序列测定仪、DNA 合成仪等相继问世。1985 年, Smith 等报道了 DNA 测序中应用荧光标记取代核素标记

的方法。

Sanger 在高分子测序方面作出了杰出贡献，他曾经两次荣获诺贝尔化学奖，1958 年因为确定了胰岛素的分子结构获奖，1980 年又因为设计出测定 DNA 核苷酸排列顺序的方法而与 W. Gilbert 和 P. Berg 共同获奖。

桑格传记

1918 年 8 月 13 日，Frederick Sanger 出生于英国格罗斯特郡的一个普通村庄。1939 年，他在剑桥大学圣约翰学院获得自然科学学士学位。1943 年，完成博士论文《赖氨酸的代谢》，获哲学博士学位，毕业后留校工作并开始研究胰岛素。桑格非常腼腆，不善言谈，不喜欢表现自己，讲课乏味，也不擅长工作上的沟通与合作，既无领导能力，又不去筹措科研经费，仅从事一些不需大量经费的研究项目，长期默默无闻，有几位助手因为耐不住寂寞离他而去。桑格认为，项目少反而使自己免受干扰，也不必分心面对多种选择，可以一心一意地把所能做的唯一研究课题进行到底。桑格经过多年的研究，终于找到一种试剂——2, 4-二硝基氟苯，给蛋白质一端的氨基酸着色、切割，然后用纸色层法分离测定氨基酸，测定胰岛素的分子结构。后来，此试剂被广泛用于标记氨基酸的氮端和碳，被称为“桑格试剂”。他应用逐段递增的方法，花费了 10 年心血测定了胰岛素的一级结构。1955 年，桑格公开发表了胰岛素的全序列，这是人类历史上第一次完整测定蛋白质中氨基酸的顺序，为以后人工合成蛋白质奠定了基础。1965 年 9 月 17 日，世界上第一个人工合成的蛋白质——牛胰岛素在中国诞生了。消息传出，引起强烈反响。1966 年 4 月召开鉴定会，许多科学家看到论文后纷纷来信来电祝贺，称赞中国作出了一项“可得诺贝尔奖”的工作。1966 年 8 月 1 日在华沙召开的欧洲生物化学联合会第 3 次会议上，中国人工合成胰岛素成了会议的中心话题。桑格特别兴奋地说：“中国合成了胰岛素，也解除了我思想上的一个负担。”因为有人一直怀疑他在 10 年前测出胰岛素一级结构的部分顺序。



研究高分子的空间结构离不开电子显微镜技术和 X 射线衍射技术。1932 年，M. Knoll 和 E. Ruska 制成世界上第一台电子显微镜模型，后来 Ruska 对模型作了改进，这就是现代电子显微镜的原型，电子显微镜打开了人类观察微观世界的窗口。1938 年，W. T. Asbury 和 F. O. Bell 对胸腺核酸进行了 X 射线研究；J. D. Bernal、I. Frankuchen 对糜蛋白酶进行了 X 射线研究。以后，J. C. Kendrew 利用 X 射线衍射技术测定了肌红蛋白的结构，M. F. Perutz 分析了血红蛋白的结构，他们二人因此获得 1962 年的诺贝尔化学奖。同年，M. H. F. Wilkins 因为用 X 射线衍射技术证实了 DNA 的双螺旋模型，与 J. D. Watson 和 F. H. C. Crick 分享了当年的诺贝尔生理学或医学奖。1965 年，D. Phillips 首次用 X 射线衍射技术阐明了鸡蛋清溶菌酶的三维结构。1969 年，D. M. C. Hodgkin 获得 0.28nm 分辨率的胰岛素晶体结构的分析结果。1970 年和 1974 年，梁栋材等先后完成了 0.25nm 和 0.18nm 分辨率的牛胰岛素分子结构的分析工作。1980 年，C. Anderson 和 D. B. McKay 利用 X 射线分析法测定了两种 DNA 结合蛋白质的结构。1989 年，J. E. Johnson 等用 0.30nm X 射线分析法测定了一种二十面体病毒中蛋白质-RNA 的相互作用。

1943 年，B. Chance 首次将灵敏的分光光度法用于酶-底物反应相互关系的研究。20 世纪 60 年

代,用于生物化学研究的各种仪器分析方法取得很大的发展,如高效液相层析(high performance liquid chromatography, HPLC)技术、红外、紫外、圆二色等光谱技术、磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)技术等。

20世纪70年代, W. Arber、H. O. Smith 和 D. Nathans 3 个小组发现并纯化了限制性内切核酸酶, 这为后来的重组 DNA 技术奠定了基础。1972 年, P. Berg 在体外成功重组猴细胞病毒 SV40 的 DNA 与 λ 噬菌体的 DNA。1973 年, S. N. Cohen 将外源 DNA 片段插入大肠杆菌质粒后产生嵌合质粒, 当嵌合质粒重新导入大肠杆菌时仍具有功能, 这成为外源基因导入细菌的主要方法, 从此开创了基因工程(genetic engineering)时代。20 世纪 80~90 年代, 基因工程技术进入辉煌发展的时期。

1984 年, G. J. F. Kohler、C. Milstein 和 N. K. Jerne 由于发展了单克隆抗体技术, 完善了极微量蛋白质的检测技术而获得诺贝尔生理学或医学奖。1985 年, K. Mullis 等建立了聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术, 使一向昂贵、繁杂的分子生物学实验能够在比较简易、经济的条件下有效地开展, 这是基因分析技术的重大突破, 对于生物化学与分子生物学的研究具有划时代的意义。这一技术在很短的时间里风行全球, 被广泛应用于众多学科领域。Mullis 因此获得 1993 年的诺贝尔化学奖。

1.2 生物化学与分子生物学实验技术的完整体系

生物化学与分子生物学实验技术是在具体研究工作中建立起来的, 并不断得到完善。从早期个别零散的实验方法, 经过不断发展, 形成了完整的实验技术体系。

生物化学与分子生物学实验技术按其研究目的和特点可分为 4 个层次: 第一层次是对生物分子进行分析鉴定; 第二层次是对生物分子进行人工合成; 第三层次是对生物分子进行人工改造; 第四层次是对生物分子进行功能研究。

1.2.1 对生物分子进行分析鉴定

不同的生物分子具有不同的理化性质, 据此可以对其进行分离制备和分析鉴定, 具体方法又可分为 5 类: ① 根据生物分子大小不同, 可采用凝胶过滤法、超滤法、超速离心法、SDS 电泳法等; ② 根据生物分子荷电不同, 可采用等电聚焦电泳法、离子交换层析法等; ③ 根据生物分子吸收光谱和放射性不同, 可采用分光光度法(包括紫外、红外、荧光)、X 射线结构分析法、共振法(包括电子顺磁共振、电子自旋共振、磁共振)、放射性核素示踪法、放射免疫分析法等; ④ 根据生物分子疏水相互作用或氢键形成的引力不同, 可采用反相高效液相层析法、分子杂交法等; ⑤ 根据生物分子特异相互作用不同, 可采用亲和层析法、免疫化学分析法等。

1.2.2 对生物分子进行人工合成

不同的生物分子具有不同的组成和结构, 在搞清楚生物分子结构的前提下, 可以对其进行人工合成。1828 年, F. Wohler 用氨及氰酸铅合成了第一个有机化合物——尿素; 1953 年, V. du Vigneaud 合成了第一个多肽——缩宫素(oxytocin); 1965 年, 中国人合成了第一个蛋白质——牛胰岛素; 1981 年, 中国人合成了第一个核酸——酵母丙氨酸 tRNA。这标志着人们不仅可以合成生物低分子, 也可以合成生物高分子。合成生物高分子是极富挑战性的工作, 例如合成牛胰岛素就花了 7 年时间。1963 年, B. Merrifield 提出固相合成法, 并于 1969 年人工合成了具有酶活性的

牛胰核糖核酸酶。这一方法后来成为合成中等大小多肽的常用方法,在此基础上设计出多肽合成的自动装置, Merrifield 因此获得 1984 年的诺贝尔化学奖。现在氨基酸序列分析和序列合成、核苷酸序列分析和序列合成已经实现自动化。

1.2.3 对生物分子进行人工改造

生物分子的结构与功能有着密切的关系,尤其是生物高分子的组成和结构非常复杂,是长期自然进化的产物,对其进行改造,有可能使之产生新的功能。基因工程的兴起使人们可以按照预先的设计对 DNA 进行剪切拼接,将其引入细胞中进行克隆表达。基因工程是重组 DNA 技术的产业化设计与应用,包括上游技术和下游技术两大部分。上游技术即重组 DNA 技术,主要是基因重组、克隆和表达的设计与构建;下游技术主要是基因工程菌或细胞的大规模培养以及基因产物的分离纯化。从 20 世纪 70 年代开始,基因工程的发展已经经历了 4 代:第一代是经典基因工程,主要是使蛋白质或多肽基因进行高效表达;第二代是蛋白质工程 (protein engineering),主要是通过基因的定向诱变使之表达出具有特殊功能的蛋白质;第三代是代谢工程 (metabolic engineering),主要是利用基因工程技术定向改造细胞的代谢途径,以改善产物的形成和细胞的性能;第四代是基因组工程 (genome engineering),主要是进行基因组或染色体的转移,也称染色体工程 (chromosome engineering)。

蛋白质工程是基因工程的一部分,是基因工程发展的第二代。蛋白质工程与经典基因工程虽然密不可分,但两者也有区别。经典基因工程是通过基因操作把外源基因转入适当的生物体内并在其中进行表达,它的产品是该基因编码的天然蛋白质。蛋白质工程是根据蛋白质的精细结构与功能之间的关系,利用基因工程的手段,按照人类自身需要,定向改造天然的蛋白质,甚至创造自然界不存在的新的蛋白质。蛋白质工程可以根据对分子预先设计的方案,通过对基因进行改造,来实现对它所编码的蛋白质进行改造。天然蛋白质都是通过漫长进化过程形成的,蛋白质工程相当于人为加快了进化过程,其产品已不再是天然的蛋白质,而是经过改造的具有人类所需优点的蛋白质。

经典基因工程通常只涉及少量基因的改造,例如将编码某种蛋白质药物的单一基因转入酵母,然后利用该酵母发酵生产该药物。代谢工程则涉及大范围的基因改变,例如要在大肠杆菌中生产某种代谢产物——紫杉醇,必须把相关途径一系列酶的基因全部导入大肠杆菌,并且敲除大肠杆菌中原有的不必要的和有害的代谢途径,以构建出一整套大肠杆菌中原本没有的紫杉醇代谢途径,使大肠杆菌能够生产紫杉醇。因此,代谢工程还是属于基因工程,只是改变基因的量非常大。

染色体工程是对染色体(基因组)进行设计和工程改造的一项综合性技术。染色体是基因的载体,将染色体切成片段进行重新组合,构成新的“人工染色体”。如果将这种人工染色体转移到其他物种的细胞内,培养成的生物体就称为“转染色体生物”。转染色体技术不同于转基因技术,前者是将人工染色体整合到宿主细胞内;后者是将单个基因种植于宿主的基因组内。两者所产生的生物效应有着本质差别,前者可以改造宿主生物的整体生理功能,后者只能改变宿主生物生理活动的某一环节或某一种蛋白质产品。转染色体技术比克隆技术更进一步,克隆是同一物种体细胞核移植后的无性生殖,产生的是同一个体的复制品;而转染色体技术则是将人工染色体转移到另一物种的去核细胞内,产生人造新物种。如果将人的染色体或染色体片段转移到其他生物细胞内,形成的“人源化生物”就能表达人的某些生理活动和表型。如果将人的一群相关基因转移到其他生物体内,该生物就能产生具有人类特点的生物分子、细胞、组织或器官。从人源化生物中可以获得人类可以接受的细胞、组织甚至器官,移植后不会产生排斥反应;也可以获得用作药物

的抗体、清蛋白和胰岛素等产品。通过转染色体工程,人类就为自己建立了细胞、组织和器官的生产工厂。

1.2.4 对生物分子进行功能研究

各种生物分子都有其特殊的功能,搞清楚它们的功能是生物化学与分子生物学的基本任务。在基因组时代,大规模基因组测序计划的实施使人们对于包括人类在内的许多生物基因组的结构有了整体了解,但这仅仅是认识基因组功能的一个起点。因为 DNA 序列信息并不能预测:① 基因表达产物是否被翻译或何时被翻译;② 基因产物的含量;③ 翻译后修饰的程度;④ 基因剔除或过表达的影响;⑤ 遗留的小基因或<300bp 的可读框(ORF)的出现;⑥ 多基因的表型;此外还有转录后加工、翻译调节以及翻译后加工等问题。鉴于基因组研究的局限性,1994 年澳大利亚麦考瑞(Macquarie)大学的 M. Wilkins 和 K. Williams 等在意大利的一次科学会议上首次提出了蛋白质组(proteome)概念。蛋白质组学主要是对基因组表达的全套蛋白质进行定量测定,对基因调节进行动态描述,进而阐明基因表达调控的机制。蛋白质组研究技术并非从零开始,它是已有 20 年历史的蛋白质(多肽)图谱和基因产物图谱技术的一种延伸。目前对蛋白质组的分析工作分为两个方面:一方面是得到正常生理条件下的机体、组织或细胞的全部蛋白质的图谱,相关数据作为待测机体、组织或细胞的二维参考图谱和数据库;另一方面是比较分析在改变生理条件下蛋白质组所发生的变化。目前蛋白质组研究技术主要有:① 用于蛋白质分离的技术,如双向凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)、双向高效柱层析等;② 用于蛋白质鉴定的技术,如质谱技术、凝胶图像分析、蛋白质和多肽的 N 端、C 端测序以及氨基酸组成分析等;③ 用于蛋白质相互作用及作用方式研究的双杂交系统;④ 用于分析大量数据的生物信息学等。

近年来,各种生物分子间的相互作用逐渐得到重视,因为细胞的各种生理活动都是以这种相互作用为基础的。要认识基因的功能,必然要涉及基因表达的产物蛋白质,而蛋白质的功能往往体现在它与其他高分子的相互作用。因此,研究蛋白质与蛋白质的相互作用以及蛋白质与核酸的相互作用,对于揭示生物高分子的功能,进而揭示生命的奥秘无疑是一个突破口,有关的技术和方法主要有:酵母双杂交和噬菌体展示技术、核酸适体技术、生物信息学方法、蛋白质芯片技术以及纳米技术等。

今天,探求生命奥秘的中心课题仍然是研究生物高分子。生物化学与分子生物学实验技术已经形成了一整套研究方法,从生物高分子分离、纯化、制备到定性、定量研究,从序列测定到结构分析,从理化性质分析到功能确定,从单个高分子到高分子间的相互作用,都有一系列技术方法可供选择。例如,生物高分子的分离纯化与制备,可以选择离心技术、电泳技术、层析技术、透析技术、超滤技术以及外源基因表达(原核或真核)等;生物高分子的定性研究,可以选择 PCR 与 RT-PCR、DNA 测序以及蛋白质组学技术等;生物高分子的定量与半定量研究,可以选择紫外分光、定量 PCR、免疫印迹分析(Western blotting)、定量电泳、Southern blotting 与 Northern blotting 等;基因与蛋白质的功能确认,可以选择基因转导、基因剔除技术、转基因技术、RNAi 技术等。为了使这些技术实现高效自动化,既灵敏精确而且重复性又好、特异性高,人们设计了一系列有微机控制的高性能仪器,使这些技术日臻完美。必须强调的是,虽然技术方法是重要的,但更重要的是精巧的实验设计,只有巧妙地利用各种实验技术,才能达到预期的研究目的。

1.3 生物化学与分子生物学实验技术的广泛应用

20 世纪以来,生物化学与分子生物学实验技术不断取得突破,例如,20 世纪 20 年代超离心

技术建立；30年代电子显微镜技术兴起；40年代电泳技术奠基，层析技术迅速发展；50年代放射性核素示踪技术应用；60年代各种仪器分析方法用于生物化学研究；70年代基因工程技术取得突破；80年代PCR技术异军突起；90年代大规模基因组测序计划开始实施；21世纪头10年蛋白质组技术方兴未艾；这些实验技术极大地促进了生物化学与分子生物学学科的发展，丰富了学科的内容。

生物化学与分子生物学实验技术的发展使生物化学与分子生物学的研究领域不断拓宽，从基因组时代（genome era）到后基因组时代（post-genome era），从基因组学（genomics）到蛋白质组学（proteomics），无不有赖于生物化学与分子生物学实验技术的贡献。如果没有DNA序列分析技术，就不可能实施人类基因组计划；如果没有基因芯片技术，就不可能全面了解基因表达的规律；如果没有二维电泳和质谱技术的黄金组合，就不可能开展蛋白质组学研究。

1.3.1 电泳技术在临床检验中的应用

生物化学与分子生物学实验技术不仅广泛应用于生命科学各个领域的基础研究，也广泛应用于医学研究以及临床疾病的诊断。例如电泳技术在临床检验中就发挥着重要作用。新鲜血清经电泳后可以精确反映患者血清蛋白质的概貌，对于许多疾病的诊断都有参考价值。如急性炎症时可见 α_1 和 α_2 区百分率升高；肾病综合征或慢性肾小球肾炎时可见清蛋白下降、 α_2 和 β 球蛋白升高；缺铁性贫血时由于转铁蛋白的升高而呈现 β 区带增高；慢性肝病或肝硬变呈现清蛋白显著降低、 γ 球蛋白升高2~3倍。对单一克隆浆细胞异常增殖所产生的无抗体活性均一的免疫球蛋白称为M蛋白（monoclonal protein），由M蛋白所导致的一系列疾病（如多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症、重链病、游离轻链病、半分子病、良性单株丙球蛋白血症和双M蛋白血症等）已不罕见。血清蛋白电泳是诊断这类疾病的首选方法，对其早期诊断、疗效观察以及预后判断均有十分重要的意义。电泳技术与免疫技术相结合，大大扩大了其临床应用的范围。免疫电泳技术的种类很多，如对流免疫电泳、火箭免疫电泳、电免疫扩散等。在各种免疫电泳基础上，又不断派生出一些新的技术。1969年，Alper与Johnson推荐的免疫固定电泳是一种包括琼脂糖凝胶蛋白电泳和免疫沉淀两个过程的操作，是免疫沉淀反应的一种混合技术，检测标本可以是血清、尿、脑脊液或其他体液。

1.3.2 DNA重组技术在医药卫生领域的扩展

DNA重组技术和建立在DNA重组技术之上的基因工程，在近40年的发展中已经取得了丰硕的成果，尤其是在医药卫生领域得到广泛应用，包括活性多肽、蛋白质和疫苗的生产，疾病发生机制研究以及诊断和治疗，新基因的分离等，都要应用DNA重组技术。许多活性多肽和蛋白质具有治疗和预防疾病的作用，由于在组织细胞内产量极微，所以采用常规方法分离制备很难满足临床需要。基因工程则突破了这一局限性，能够大量生产这类多肽和蛋白质，迄今已成功生产出治疗糖尿病和精神分裂症的胰岛素，治疗血癌和某些实体肿瘤的干扰素，治疗侏儒症的人生长激素，治疗肢端肥大症和急性胰腺炎的生长激素释放抑制因子等100多种产品。抗生素在治疗疾病中的作用是不言而喻的，但是用传统方法发现新抗生素的概率越来越低，现在采用DNA重组技术已获得数十种基因工程“杂合”的抗生素，为寻找开发新的抗生素开辟了广阔途径。

利用基因工程可将抗原的DNA导入活的微生物中，这种微生物在受免疫刺激后的宿主体内生长可产生弱毒活疫苗，具有抗原刺激剂量大、持续时间长等优点。目前正在研制的基因工程疫苗就有数十种之多，其中有针对各种细菌的疫苗（如麻风杆菌、百日咳杆菌、淋球菌、脑膜炎双球菌等），也有针对各种病毒的疫苗（如甲型肝炎、乙型肝炎、巨细胞病毒、单纯疱疹、流感、人

体免疫缺陷病毒等)。我国乙肝病毒携带者和乙肝患者过亿,面对严峻的现实,我国科学家成功研制出乙肝疫苗,取得了巨大的社会效益和经济效益。抗体是人体免疫系统防病、抗病的主要武器,20 世纪 70 年代建立的单克隆抗体技术在防病、抗病方面虽然发挥了重要作用,但由于人源性单克隆抗体很难获得,使得单抗在临床上的应用受到限制。近年来科学家采用 DNA 重组技术获得了人源性抗体,这种抗体既可保证它与抗原结合的专一性和亲合力,又能保证正常功能的发挥。目前,已有多种这样的抗体进行了临床试验,为一些用常规方法难以治疗的疾病带来了福音。例如,乳腺癌是威胁妇女健康的主要恶性肿瘤,研究表明,人表皮生长因子受体-2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER-2) 的过度表达与乳腺癌呈正相关,目前利用基因工程技术研制的抗 HER-2 人源化单抗治疗乳腺癌已进入Ⅲ期试验。支气管哮喘是儿童最常见的慢性呼吸道疾病之一,引起哮喘发病的关键环节之一是血清特异性 IgE 水平增高。因此,如何降低哮喘患者体内的特异性 IgE 水平成为哮喘防治的重点,目前抗 IgE 人源化单克隆抗体治疗哮喘病已进入Ⅱ期试验。

1.3.3 基因诊断和治疗技术在未来医学领域的前景

基因诊断技术是建立在核酸分子杂交、聚合酶链式反应、DNA 序列分析、基因芯片等技术之上的第四代诊断技术。目前,基因诊断技术已经进入临床服务,其应用的范围也在不断扩大。从临床诊断到血清诊断,从生化诊断到基因诊断,每一代新的诊断技术的出现,都使诊断水平大幅提高。基因诊断在 30 余年的时间里已经取得长足进步,其实用性不断提高。基因诊断技术不仅能够诊断疾病,而且能够预测疾病,指导用药,评价疗效。从理论上讲,几乎所有的疾病都与基因有直接或间接的关系,因此都能从基因水平进行诊断和预测。

基因治疗技术开辟了治疗疾病的新途径,代表了疾病治疗的发展方向。传统医学并不能解决基因的问题,因此目前对很多严重危害人类健康的疾病(如肿瘤、糖尿病、动脉粥样硬化、冠心病、高血压、精神分裂症等)仍然缺乏有效的办法。要彻底根治这些疑难疾病,只能从基因水平入手,根据基因与疾病的关系设计治疗方案。基因治疗是通过 DNA 重组技术创建具有特定功能的基因重组体,导入人体靶细胞以矫正或置换致病基因的治疗方法,是以改变遗传物质为基础的生物医学治疗。在此过程中,目的基因被导入靶细胞内,并与宿主细胞染色体整合成为细胞基因组的一部分,或不与宿主细胞的染色体整合而独立于染色体之外,但可在宿主细胞内表达,从而达到治疗目的。目前已有 100 多个基因治疗方案处于临床试验阶段,随着基因治疗技术的发展,基因治疗的目标和范围也在拓宽,从最初的用正常基因替代突变基因,扩展到利用基因转移技术,将各种各样的目的基因(包括正常的、改组的基因,甚至病毒基因)转入人体,以达到治疗疾病的目的。从广义上说,凡是采用生物化学与分子生物学实验技术在核酸水平上对疾病进行治疗都属于基因治疗。

1.3.4 动物模型在医学研究中的重要地位

人类各种疾病的发生发展过程十分复杂,一般也不允许在人体上试验,建立动物模型(animal model)是现代医学研究人类疾病的有效手段。转基因(transgene)和基因打靶(gene targeting)技术为建立人类疾病动物模型提供了新方法,对现代医学的发展极为重要。

自古以来,人类就有意识地对某些动物进行研究,并将研究结果用于解释人类疾病,但对动物模型进行系统、深入的研究却是近百年之事。用于研究的动物种类繁多,常用的主要有低等动物,如线虫(*nematodes*)和果蝇(*drosophila*);低等脊椎动物,如斑马鱼(*zebrafish*)和非洲爪蟾(*laevis*);高等哺乳类,如鼠、狗、马、牛及某些灵长类动物。其中小鼠(mice)是最常用的

动物。小鼠具有与人类相似的遗传、解剖和生理特征，其基因组与人类基因组有 99% 的相似性。小鼠个体小、繁殖能力强、生命周期短、养殖成本低，这些是大型哺乳动物所不具备的。对小鼠的系统研究始于 20 世纪初，目前已建立了数十种纯系和杂交品系，培育出数千种经遗传修饰后的小鼠，这对于研究基因在各种不同遗传背景中的功能提供了有利条件，因此，动物模型的建立和研究成为后基因组时代的又一重点领域。

转基因鼠基因组中携带有外源基因，这些基因往往由特定的启动子（promoter）和增强子（enhancer）控制，表达量比内源基因高，易于研究这些基因在整体动物中的功能。1984 年，哈佛大学 P. Leder 教授将癌基因 *myc* 转入小鼠，使其在乳腺特异表达，结果小鼠在特定时期内产生乳腺癌，由该技术产生的小鼠模型至今仍被广泛使用。1986 年，英国 M. Evans 建立鼠胚胎干细胞；1987 年，美国 M. Capecchi 和 O. Smithies 对鼠胚胎干细胞进行基因打靶首获成功。基因打靶包括基因敲除（knock-out）和敲入（knock-in）。基因敲除一般指使基因失去功能，而基因敲入主要指引入特异型的突变，例如通过外源 DNA 与染色体 DNA 之间的同源重组引入突变。自 1989 年第一只携带次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶（hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase, HGPRT）突变基因的小鼠问世以来，目前至少建立了 4000 余种小鼠突变品系。从理论上讲，基因打靶技术可将所有基因逐一敲除，并建立所有由单一基因突变导致的人类遗传病的全部动物模型。由于基因打靶对医学的巨大影响，Capecchi、Smithies 和 Evans 获得了 2007 年度的诺贝尔生理或医学奖。

目前，转基因动物模型主要用于研究疾病的发病机制，检测新的治疗方案，进行药效评价和药物筛选。

综上所述，生物化学与分子生物学实验技术在医学领域中有着广泛应用的空间。培根有一句名言：“没有实验，任何新的东西都不能深知”。无论是探索生命，还是呵护生命；无论是从事生命科学的基础研究，还是从事临床工作，生物化学与分子生物学实验技术都是必备的。尤其是 21 世纪的医学生，仅学习传统医学是不够的，必须认真学习掌握生物化学与分子生物学实验技术，才能在未来的医学领域中有立足之地，生物化学与分子生物学实验技术是打开未来医学之门的钥匙。

（王玉明）

第2章

从组织中分离纯化生物高分子

——高分子制备技术

问题讨论

1. 怎样从组织中分离纯化生物高分子？
2. 怎样评价各种分离纯化生物高分子方法的优劣？

生物高分子主要是指蛋白质（包括酶）、核酸、多糖和脂类，这里主要介绍蛋白质和核酸的制备技术。以蛋白质和核酸的结构与功能为基础，从分子水平上认识生命现象，已经成为现代生物学发展的主要方向。研究生物高分子，首先要得到高度纯化并具有生物活性的目的物质。制备工作包括：预处理和细胞的分离；细胞的破碎及细胞器的分离；生物高分子的提取和纯化；提纯后样品的浓缩、干燥和保存等。在制备过程中必须注意保留生物高分子的结构完整性和功能完整性，防止酸、碱、高温、剧烈机械作用而导致所提物质生物活性的丧失。因此，在制备之前，首先要根据所要制备的物质的特点，查阅资料，制定详细的技术路线。

分离纯化是生物高分子制备的关键技术，其方法很多，主要利用待分离物质之间特异性的差异，如分子大小、形状、酸碱性、溶解度、极性、电荷以及对其他分子的亲和性等。生物高分子的制备工作涉及物理、化学和生物等各方面的知识，目前使用的各种分离纯化方法，其主要原理基本上可归纳成两个方面：一是利用混合物中几个组分分配系数的差异，把它们分配到两个相或几个相中，如盐析、盐溶、分配层析、有机溶剂沉淀、共沉淀和结晶等；二是将混合物置于单一的物相中，通过物理力场的作用使各组分分配于不同区域而达到分离的目的，如电泳、离心、超滤等。表 2-1 将生物高分子制备的方法按照分子的大小和形状、密度、溶解度、带电性质对其他分子的亲和力等主要因素进行了分类。在实际工作中，往往需要综合使用几种方法才能制备出一种纯化的生物高分子。

表 2-1 生物高分子分离纯化方法类型

理化性质	分离纯化方法
分子大小和形态	离心、超滤、分子筛层析、透析、凝胶色谱、SDS-聚丙烯酰胺电泳
溶解度	盐析、有机溶剂沉淀、等电点沉淀、分配层析等
分子的密度	超速离心
电荷差异	电泳（醋酸纤维素、琼脂糖、聚丙烯酰胺）、等电聚焦电泳、离子交换层析
生物功能专一性	亲和层析、疏水层析、共价色谱

2.1 预处理和细胞的分离

2.1.1 选择材料及预处理

微生物、植物和动物都可作为制备生物高分子的原材料,所选用的材料主要依据实验目的来确定。

对于微生物,应注意它的生长期,如在微生物的对数生长期,酶和核酸的含量较高,可以获得高产量。以微生物为材料时有两种情况:①利用微生物菌体分泌到培养基中的代谢产物,如胞外酶等;②利用菌体含有的生化物质,如蛋白质、核酸和胞内酶等。

植物材料必须经过去壳、脱脂时应注意植物品种和生长发育状况不同时,其中所含生物高分子的量变化很大,另外与所处季节关系密切。

对动物组织,要选择有效成分含量丰富的脏器组织为原材料,先进行绞碎、脱脂等处理。

2.1.2 细胞的分离

分离细胞是生物化学与分子生物学实验中的基本技术之一,它主要是根据细胞本身的某些性质来分离具有同一性状的细胞群,综合起来主要基于细胞以下性质:①细胞大小;②细胞密度;③细胞表面电荷;④细胞表面标志;⑤每个细胞的散射光线总量;⑥细胞中1个或多个成分的荧光;⑦细胞对其他介质的吸附作用。选用细胞分离技术时,除根据不同目的而选用外,原则上要求所用方法既简便可行,又能获得高纯度、高收获量、高活力的细胞。下面介绍几种常用的细胞分离方法。

2.1.2.1 梯度沉降分离法

梯度沉降分离法主要根据细胞大小分离细胞。细胞在单位重力作用下,通过密度介质,或在低离心力作用下,通过密度梯度溶液沉降。由于细胞大小不同,沉降速度不同,细胞越大沉降越快。用公式表示: $v=r^2/4$,式中 v 表示沉降速度(mm/h), r 表示细胞半径(μm)。

在分离细胞过程中,为了稳定沉降细胞,需要使用适当的分离介质形成一定的密度梯度溶液,常用的分离介质有血清、聚蔗糖和蔗糖等。本法常用于分离大小差异较明显的培养细胞。

2.1.2.2 等密度沉降分离法

等密度沉降分离法主要根据细胞密度差异分离细胞。细胞在连续密度梯度分离介质中,受强离心力作用下,细胞最后到达与其密度相同的分离介质层面,并能保持平衡。在非连续密度梯度中,分离细胞主要集中于介于其自身密度的两种密度介质交界面上,从而达到分离细胞。

2.1.2.3 流式细胞仪分离法

本法是以免疫荧光法使荧光抗体与细胞膜表面抗原结合,继用超声波使其充分分散为单个细胞,再将细胞悬液通过1个直径 $50\mu\text{m}$ 的喷嘴,使细胞悬液成为极细的微滴,每微滴至多含1个细胞,以 10m/s 速度喷出。经激光照射时,细胞上所带的荧光被激发而转换成脉冲,测定脉冲数可换算出各种不同细胞表面抗原的情况。同时由于悬浮微滴中的细胞带不同程度的负电荷,受电场影响后,移行偏斜程度不同,而不带电荷的细胞仍以直线流过,为此可收集到不带电荷或带电荷多少不同的各种细胞,即为不同群的细胞。本法优点是分离速度很快,分离的细胞仍保持各种功能。

2.2 细胞破碎及细胞器分离

2.2.1 细胞破碎

不同的生物体或同一生物体的不同组织,细胞破碎难易不一,使用的方法也不尽相同,如胰

脏、肝脏、脑组织一般比较柔软，用普通的匀浆器研磨即可；肌肉、心脏组织较韧，需预先绞碎再作匀浆；许多微生物都有坚韧的细胞壁，需用自溶、冷热交替、加砂研磨、超声波和加压处理等方法。目前已建立了很多破碎细胞，释放细胞内容物的方法。根据作用方式不同一般将其分为机械法、物理法、电化学法 3 大类。各种组织和细胞的常用裂解方法列于表 2-2。

表 2-2 各种组织细胞破碎方法

细胞破碎方法	组 织 种 类	细胞破碎方法	组 织 种 类
匀浆	大多数动、植物组织	酶解、有机溶剂法	细菌、酵母
手动式匀浆	柔软的动物组织	表面活性剂	组织培养细胞
超声法	细胞混悬液	低渗裂解	红细胞、细菌
研磨	细菌、植物细胞	冻融裂解	培养细胞

2.2.1.1 机械法

通过机械切力作用使组织细胞破碎的方法称为机械法，如匀浆、研磨等。

(1) 匀浆：是破碎机体软组织最常用的方法之一。其原理是将组织剪切成小块，再加入 3~5 倍体积的预冷匀浆缓冲液，通过固体剪切力破坏组织和细胞，释放蛋白质进入溶液。它是通过匀浆器来进行的。市售匀浆器有 4 大类：刀片式组织破碎匀浆器、内切式组织匀浆器、玻璃匀浆器及用于规模生产的高压匀浆器。实验室常用的是由电力驱动、通过调节速度完成匀浆制备的切片式匀浆器。

(2) 组织捣碎机：该方法由调速器、支架、马达、带杆刀叶、有机玻璃筒等部分组成。操作时，将材料制成稀糊状溶液，放置于玻璃筒内约占 1/3 体积，固定筒上盖子，将调速器拨至最慢处，开动马达后，逐步加速到所需速度。一般市售捣碎机转速最高可达 10 000~20 000r/min。捣碎过程注意维持低温，筒外可放置冰水浴。

(3) 研磨：是破碎单一细胞的有效方法。借助于研磨中磨料和细胞间的剪切及碰撞作用破碎细胞。常用的磨料为沙子、氧化铝等。主要用于细菌、酵母等的破碎。

2.2.1.2 物理法

通过各种物理因素作用使组织细胞破碎的方法称为物理法。

(1) 超声法：输入高能超声波可以破碎细胞，其机制与超声波作用溶液时的气泡产生、长大和破碎的空化现象有关。空化现象引起的冲击波和剪切力使细胞裂解。超声波破碎的效率取决于声频、声能、处理时间、细胞浓度及细胞类型等。超声波破碎在处理少量样品时操作简便、效率高、液量损失少，适于实验室使用。但应注意的是超声波产生的化学自由基团能使敏感的活性物质变性失活，另外噪声也比较大。

(2) 反复冻融法：把待破碎样品冷至 -15~-20℃ 冻固，然后缓慢地溶解，如此反复操作，大部分动物性细胞及细胞内颗粒可被破碎。由于在此过程中易使活性蛋白失活，故适用于提取非常稳定的蛋白质。

(3) 冷热交替法：将材料投入沸水中，在 90℃ 维持数分钟，立即置于冰浴中，使之迅速冷却，绝大多数细胞被破坏，一般适用于从细菌或病毒中提取蛋白质。

(4) 低渗裂解法：是指无胞壁细胞在低渗溶液中，通过渗透张力作用裂解的方法，常用于红细胞的裂解。

2.2.1.3 化学法

(1) 有机溶剂法：有些有机溶剂（如苯、甲苯等）可以改变细胞壁或膜的通透性，使内含物

有选择性的渗透出来。丙酮也是常应用的有机试剂，它不仅可以有效地破碎细胞膜，而且可以制成具有蛋白活性的干粉，即丙酮粉，它能长时间保存，另外它还可以脱去脂肪，便于后续的抽提。

(2) 表面活性剂：较常用的有 SDS、Triton X-100、NP-40 和脱氧胆酸等。

(3) 酶解法：用生物酶将细胞壁和细胞膜消化溶解的方法称为酶解法。利用此法处理细胞必须根据细胞的结构和化学组成选择适当的酶。常用的有溶菌酶、蛋白酶、甘露糖酶、糖苷酶和肽链内切酶等。细菌主要用溶菌酶处理，酵母需用几种酶复合处理。酶解时应注意控制温度、酸碱度、用量、先后次序及时间。

2.2.2 细胞器的分离

各类生物高分子在细胞内的分布是不同的，DNA 几乎全部在细胞质内，RNA 则主要在胞质，各种酶在细胞内的分布也有特定的位置。因此在进行生物高分子制备时，应根据分离的目的物质来选取相应的细胞器。

细胞器的分离，一般利用各细胞器质量大小不同，选用差速离心法或密度梯度离心法，不同质量的细胞器沉降于离心管内不同区域，分离后即可得到所需组分。细胞器分离中常用的介质有蔗糖、聚蔗糖或葡萄糖、聚乙二醇等高分子溶液。

2.3 分离与纯化

2.3.1 蛋白质的分离纯化

破碎组织和细胞，将蛋白质溶解于溶液中的过程称为蛋白质的提取。将溶液中的蛋白质相互分离而取得单一蛋白质组分的过程称为蛋白质的纯化。蛋白质的各种理化性质和生物学性质是提取与纯化的依据。目前尚无单一的方法可纯化出所有的蛋白质，每一蛋白质的纯化过程是许多方法综合应用的系列过程。

蛋白质分子能否成功、高效率地制备，关键在于分离纯化方案的正确选择和各纯化方法实验条件的探索。选择与探索纯化实验条件的依据就是蛋白质分子与杂质之间的生物学和物理化学性质上的差异。

2.3.1.1 改变蛋白质的溶解度

通过改变蛋白质的溶解度沉淀蛋白质的常用方法有盐析和有机溶剂沉淀。此外，还有调节 pH 和改变温度等方法。

(1) 盐析 (salting out)：是用高浓度的中性盐将蛋白质从溶液中析出的方法。常用的中性盐有硫酸铵、硫酸钠和氯化钠等。高浓度的中性盐可以夺取蛋白质周围的水化膜，破坏蛋白质在水溶液中的稳定性。对不同的蛋白质进行盐析时，需要采用不同的盐浓度和不同的 pH。盐析时的 pH 多选择在蛋白质的等电点附近。例如，在 pH7.0 附近时，血清清蛋白溶于半饱和硫酸铵中，球蛋白沉淀下来；当硫酸铵达到饱和浓度时，清蛋白也沉淀出来。

蛋白质盐析常用的中性盐主要有硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、氯化钠、磷酸钠等。其中应用最多的是硫酸铵，它的优点是温度系数小而溶解度大 (25℃ 时饱和溶液为 4.1mol/L，即 767g/L；0℃ 时饱和溶解度为 3.9mol/L，即 676g/L)，在这一溶解度范围内，许多蛋白质和酶都可以盐析出来；另外硫酸铵分段盐析效果也比其他盐好，不易引起蛋白质变性。硫酸铵溶液的 pH 常在 4.5~5.5 之间，当用其他 pH 值进行盐析时，需用硫酸或氨水调节。蛋白质在用盐析沉淀分离后，需要

将蛋白质中的盐除去,常用的办法是透析,即把蛋白质溶液装入透析袋内,用缓冲液进行透析,并不断地更换缓冲液,因透析所需时间较长,所以最好在低温中进行。此外也可用葡萄糖凝胶 G-25 或 G-50 过柱的办法除盐,所用时间比较短。

影响盐析的因素有:①温度:除对温度敏感的蛋白质在低温(4℃)操作外,一般可在室温中进行。一般温度低蛋白质溶解度降低。但有的蛋白质(如血红蛋白、肌红蛋白、清蛋白)在较高的温度(25℃)比 0℃时溶解度更低,更容易盐析;②pH:大多数蛋白质在等电点时,在浓盐溶液中的溶解度最低;③蛋白质浓度:蛋白质浓度高时,欲分离的蛋白质常常夹杂着其他蛋白质一起沉淀出来(共沉现象)。因此在盐析前血清要加等量生理盐水稀释,使蛋白质含量在 25~30g/L。

(2) 低温有机溶剂沉淀法:与水互溶的有机溶剂(丙酮、正丁醇、乙醇和甲醇等)可以显著降低溶液的介电常数,使蛋白质分子之间相互吸引而沉淀。有机溶剂沉淀蛋白质应在低温下进行,低温不仅可以降低蛋白质的溶解度,而且还可以减少蛋白质变性的机会。

(3) 等电点沉淀法:蛋白质在静电状态时颗粒之间的静电斥力最小,因而溶解度也最小,各种蛋白质的等电点有差别,可利用调节溶液的 pH 达到某一蛋白质的等电点使之沉淀,但此法很少单独使用,可与盐析法结合使用。

2.3.1.2 根据蛋白质分子大小不同的分离方法

各种蛋白质分子具有不同的分子质量和形状,可采用离心、超滤和层析等技术将其分离。这里主要介绍透析与超滤技术。

(1) 透析:利用具有半透膜性质的透析袋将高分子的蛋白质与低分子化合物分离的方法称为透析(dialysis)。半透膜的特点是只允许低分子通过,而大分子物质不能通过,如各种生物膜及人工制造的火棉胶、玻璃纸、塑料薄膜等,可用来做成透析袋,把含有杂质的蛋白质溶液放于袋内,将袋置于流动的水或缓冲液中,低分子杂质从袋中透出,高分子蛋白质留于袋内,使蛋白质得以纯化。透析法常用于除去以盐析法纯化的蛋白质而带有的大量中性盐,及以密度梯度离心法纯化蛋白质混入的氯化铯、蔗糖等低分子物质。

(2) 超滤:超滤法是利用超滤膜在一定压力下使高分子蛋白质滞留,而低分子物质和溶剂滤过。可选择不同孔径的超滤膜以截留不同相对分子质量的蛋白质。此法的优点是在选择的相对分子质量范围内进行分离,没有相态变化,有利于防止变性。这种方法既可以纯化蛋白质,又可达到浓缩蛋白质溶液的目的。

2.3.1.3 根据蛋白质电荷性质的分离方法

可以根据各种蛋白质在一定的 pH 环境下所带电荷种类与数量不同的特点,分离不同蛋白质。常用的方法有离子交换层析、电泳和等电聚焦。

2.3.2 核酸的分离纯化

核酸的高电荷磷酸骨架使其比蛋白质、多糖、脂肪等其他生物高分子物质更具亲水性,而不溶于有机溶剂,利用此性质进行核酸的提取。在细胞内 DNA 与蛋白质结合成脱氧核糖核蛋白(DNP),RNA 与蛋白质结合成核糖核蛋白(RNP),在不同浓度的盐溶液中它们的溶解度差别很大,DNP 在纯水或 1mol/L NaCl 溶液中溶解度较大,但在 0.14mol/L NaCl 溶液中溶解度很低,相反,RNP 易溶解,因此,用 0.14mol/L NaCl 溶液可简单地初步分开 DNP 和 RNP。

在分离核酸中最困难的是将核酸与紧密结合的蛋白质分开,而且还要避免核酸的降解,常用的解离剂是阴离子去垢剂,如脱氧胆酸钠、十二烷基硫酸钠(SDS)等,它们可使核酸从蛋白质

上游离出来,还具有抑制核糖核酸酶的作用。另外除去核酸中的蛋白质的一个有效办法是使用酚-氯仿混合液,它们可使蛋白质变性并对核糖核酸酶有抑制作用,另外氯仿比重大可使有机相与水完全分开,减少残留在水相中的酚。在用酚-氯仿抽提核酸提取液时,还需要剧烈振摇,为防止起泡和促使水相与有机相分离,在酚-氯仿抽提液中再加上一定量的异戊醇。DNA 和 RNA 的提取有一定的区别,通常在提取的步骤中,也同时考虑到分离作用。

2.3.2.1 DNA 的提取

组织细胞破碎后,加入 0.5mol/L NaCl 溶液,离心去上清液,取沉淀用 1.0mol/L NaCl 溶解,用酚-氯仿混合液抽提,离心取水相,加入 2 倍体积的乙醇沉淀 DNA。在提取 DNA 的溶液中加入 EDTA 等金属螯合剂,以除去 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} ,抑制脱氧核糖核酸酶(DNase)的活性,减少对 DNA 的水解。DNA 制品中的少量 RNA 可用纯的核糖核酸酶(RNase)水解除去。

2.3.2.2 RNA 的提取

RNA 极易降解,在提取时最要紧的问题是防止 RNase 对 RNA 的降解作用,许多试剂中甚至手指上都有 RNase。常用的抑制 RNase 措施有:①低温 4℃操作;②所用器皿高压消毒,试剂中加入 RNase 抑制剂;③操作中戴手套。

细胞中的 RNA 有 3 种:rRNA、tRNA 和 mRNA。将它们完全分开不容易,可先将细胞匀浆进行差速离心,制得细胞核、线粒体、核糖体等细胞器和细胞质,然后再从这些细胞器中分离某一类 RNA。

真核 mRNA 由于其结构上的特异性为提取和纯化带来方便。因 mRNA 3'端均含有多聚 A 序列,可利用寡聚脱氧胸腺核苷酸层析柱,将 mRNA 从总 RNA 中纯化出来。

目前普遍通用的从动物组织和培养细胞中提取完整的总 RNA 的方法是异硫氰酸胍法,它有很强的抑制 RNase 活性作用,使蛋白质变性效果也很好。

2.3.2.3 核酸的纯化

核酸纯化最关键的步骤是去除蛋白质,通常用酚-氯仿抽提核酸的水溶液即可。每当需要把 DNA 克隆操作的某一步所用的酶灭活或去除以便进行下一步时,可进行这种抽提。然后,如果从细胞裂解液等复杂的分子混合物中纯化核酸,则要先用某些蛋白水解酶消化大部分蛋白质后,再用有机溶剂抽提。这些广谱的蛋白酶包括链霉菌蛋白酶和蛋白酶 K 等,它们对多数天然蛋白质均有活性。

用酚-氯仿抽提比单独用酚抽提除蛋白效果更佳,继而用氯仿抽提则可除去核酸制品中的痕量酚。具体步骤如下:①将核酸样品置于离心管中,加入等体积的酚-氯仿;②旋涡混匀管内容物,使呈乳状;③12 000g 室温离心 15s;④将水相移置另一离心管,弃去两相界面和有机相;⑤重复操作,直至两界面相见不到蛋白质为止;⑥加入等体积的酚-氯仿并重复混匀和离心操作,取水相即为核酸溶液;⑦按下述核酸浓缩法沉淀回收核酸。

2.3.3 蛋白质浓度的测定

蛋白质的定量分析是生物化学和其他生命学科最常涉及的分析内容,是临床上诊断疾病及检查康复情况的重要指标,也是许多生物制品、药物、食品质量检测的重要指标。在生物化学实验中,对样品中蛋白质进行准确可靠的定量分析则是经常进行的一项非常重要的工作。蛋白质测定的方法很多,但每种方法都有其特点和局限性,因而需要在了解各种方法的基础上根据不同情况选用恰当的方法,以满足不同的要求。目前常用的有 4 种古老的经典方法,即定氮法,双缩脲(Biuret)法、Folin-酚试剂(Lowry)法和紫外吸收法。另外还有近年才普遍使用起来的新的测定法,即考马

斯亮蓝 (Bradford) 法, 由于其突出的优点, 正得到越来越广泛的应用。在这些方法中以 Bradford 法和 Lowry 法灵敏度最高, 比紫外吸收法灵敏 10~20 倍, 比 Biuret 法灵敏 100 倍以上。定氮法虽然比较复杂, 但较准确, 往往以定氮法作为其他蛋白质测定方法中的标准蛋白质的标定方法。

值得注意的是, 后 4 种方法并不能在任何条件下适用于任何形式的蛋白质, 因为一种蛋白质溶液用这 4 种方法测定, 有可能得出 4 种不同的结果。每种测定法都不是完美无缺的, 均有其优缺点。在选择方法时应考虑: ① 实验对测定所要求的灵敏度和精确度; ② 蛋白质的性质; ③ 溶液中存在的干扰物质; ④ 测定所要花费的时间。

2.3.3.1 微量凯氏定氮法

微量凯氏定氮法简称凯氏 (Kjeldahl) 定氮法, 是目前分析有机化合物含氮量常用的方法, 是测定样品中总有机氮最准确和最简单的方法之一, 被国际、国内作为法定的标准检验方法。通过对蛋白质样品的消化、蒸馏、吸收和滴定 4 个过程, 完成含氮量的测定。其原理是样品中含氮有机化合物与浓硫酸在催化剂作用下共热消化, 含氮有机物分解产生氨, 氨又与硫酸作用成硫酸铵。然后加碱蒸馏释出氨, 用过量的硼酸溶液吸收氨, 再用盐酸标准溶液滴定求出总氮量, 最后换算为蛋白质含量。

凯氏定氮法适用范围广泛、测定结果准确、重现性好, 但操作复杂、费时、试剂消耗量大。若采用模块式消化炉代替传统的消化装置, 可同时测定几份样品, 节省时间, 提高了工作效率, 适用于批量蛋白质的测定, 具有准确、快速、简便、低耗、稳定的优点。

2.3.3.2 双缩脲法

双缩脲法是第一个用比色法测定蛋白质浓度的方法, 至今仍广泛采用。在需要快速、但不很准确的测定中, 常用此法, 常用于 0.5~10g/L 蛋白质溶液测定。其原理是 Cu^{2+} 与蛋白质的肽键以及酪氨酸残基络合成紫蓝色络合物, 在 540nm 波长处有最大吸收峰。该法可受硫醇以及具有肽性质的缓冲液, 如 Tris 缓冲液等干扰。可用等体积冷的 10% 三氯醋酸沉淀蛋白质, 然后弃上清液, 再用已知体积的 1mol/L NaOH 溶解后进行定量测定, 除去干扰物。

2.3.3.3 Lowry 法

Lowry 法是双缩脲法的进一步发展。其第一步是双缩脲反应, 即 Cu^{2+} 与蛋白质在碱性溶液中形成络合物, 然后这个络合物还原磷钼磷-磷酸钨酸试剂 (Folin-酚试剂), 生成深蓝色物。此法比双缩脲法灵敏, 适合于范围在 20~400mg/L。其干扰物质与双缩脲法相同, 而且受他们的影响更大, 硫醇和许多其他物质的存在会使结果严重偏差。

2.3.3.4 紫外吸收法

利用蛋白质在 280nm 波长处有特征性的最大吸收的特点, 可以计算蛋白质的含量。如果没有干扰物质的存在, 在 280nm 处的吸收可用于测定 0.1~0.5mg/ml 含量的蛋白质溶液。部分纯化的蛋白质样品常含有核酸, 核酸在 260nm 波长处有最大吸收峰。含有核酸时, 对所测得的蛋白质浓度必须作适当的校正。因此, 对其他蛋白质不一定适用。由于各种蛋白质所含芳香族氨基酸的量不同, 因此, 浓度同为 0.1% 的各种蛋白质在 280nm 处的消光系数在 0.5~2.5 之间变化。所有的蛋白质在 230nm 以下都有强吸收。例如, 牛血清清蛋白的 0.1% 在 225nm 和 215nm 处分别为 5.0 和 11.7, 而在 280nm 处测为 0.58。在 230nm 以下的强吸收是由于肽键的存在, 此值对所有的蛋白质都是一样的。因此, 215nm 和 225nm 处的光密度之差可用于测定浓度为 10~100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 的蛋白质。但是, 蛋白质之间的分子质量差异比较大, 在比较几种蛋白质含量时, 必须作适当的校正。由于蛋白质的吸收峰常因 pH 改变而变化, 所以在制作标准曲线时, 必须与样品条件一致。

2.3.3.5 考马斯亮蓝法

考马斯亮蓝法是1976年由Bradford建立的,是根据蛋白质与染料相结合的原理设计的。考马斯亮蓝G-250染料,在酸性溶液中与蛋白质结合,使染料的最大吸收峰位置由465nm变为595nm,溶液的颜色也由棕黑色变为蓝色。经研究认为,染料主要是与蛋白质中的碱性氨基酸(特别是精氨酸)和芳香族氨基酸残基相结合,在595nm下测定的吸光度值与蛋白质浓度成正比。

这种测定法具有超过其他几种方法的突出优点,因而正在得到广泛的应用。优点主要有:①灵敏度高:据估计比Lowry法约高4倍,其最低蛋白质检测量可达1mg。这是因为蛋白质与染料结合后产生的颜色变化很大,蛋白质-染料复合物有更高的消光系数,因而光吸收值随蛋白质浓度的变化范围比Lowry法要大得多;②测定快速、简便,只需加一种试剂。完成一个样品的测定,只需要5min左右。由于染料与蛋白质结合的过程,大约只要2min即可完成,其颜色可以在1h内保持稳定,且在5~20min之间,颜色的稳定性好;③干扰物质少。如干扰Lowry法的 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 离子、Tris缓冲液、糖和蔗糖、甘油、巯基乙醇和EDTA等均不干扰测定结果。

但此法也存在不足:①由于各种蛋白质中的精氨酸和芳香族氨基酸的含量不同,因此对不同蛋白质测定时存在较大的偏差,在制作标准曲线时通常选用G-球蛋白为标准蛋白质,以减少这方面的偏差;②去污剂、TritonX-100、SDS和0.1mol/L的NaOH可干扰此法;③标准曲线有轻微的非线性,因而不能用Beer定律进行计算,而只能用标准曲线来测定未知蛋白质的浓度。

2.3.4 核酸的浓度、纯度测定和完整性鉴定

2.3.4.1 核酸的浓度测定

核酸浓度的定量鉴定可通过紫外分光光度法与荧光光度法进行。

(1) 紫外分光光度法:本法只用于测定浓度大于 $0.25\mu\text{g/ml}$ 的核酸溶液。在波长260nm的紫外线下,1个OD值的光密度大约相当于 $50\mu\text{g/ml}$ 的双链DNA、 $38\mu\text{g/ml}$ 的单链DNA或单链RNA、 $33\mu\text{g/ml}$ 的单链寡聚核苷酸。若DNA样品中含有盐,则会使 A_{260} 的读数偏高,尚需测定 A_{310} 以扣除背景,并以 A_{260} 与 A_{310} 的差值作为定量计算的依据。如双链DNA($\mu\text{g/ml}$)= A_{260} 光密度值 $\times 50 \times$ 稀释倍数。

(2) 荧光光度法:荧光光度法以核酸的荧光染料EB嵌入碱基平面后,使本身无荧光的核酸在紫外线激发下发出橙红色的荧光,且荧光强度积分与核酸含量呈正比。该法灵敏度可达 $1\sim 5\text{ng}$,适合低浓度核酸溶液的定量分析。另外,SYBR Gold作为一种新的超灵敏荧光染料,可以从琼脂糖凝胶中检出低于20pg的双链DNA。

2.3.4.2 纯度测定

紫外分光光度法和荧光光度法,均可用于核酸的纯度鉴定。

(1) 紫外分光光度法:主要通过 A_{260} 与 A_{280} 的比值来判定有无蛋白质的污染。在TE缓冲液中,纯DNA的 A_{260}/A_{280} 比值为1.8,纯RNA的 A_{260}/A_{280} 比值为2.0。比值升高与降低均表示不纯。其中蛋白质与在核酸提取中加入的酚均使该比值下降。判定是蛋白质的污染还是酚的污染,可根据蛋白质的紫外线吸收峰在280nm、酚的紫外线吸收峰在270nm的进行鉴别。RNA的污染可致DNA制品的 A_{260}/A_{280} 比值高于1.8,故比值为1.8的DNA溶液不一定为纯的DNA溶液,可能兼有蛋白质、酚与RNA的污染,需结合其他方法加以鉴定。 A_{260}/A_{280} 的比值是衡量蛋白质污染程度的一个良好指标,2.0是高质量RNA的标志。但要注意,由于受RNA二级结构不同的影响,其读数可能会有一些波动,一般在1.8~2.1之间都是可以接受的。另外,鉴定RNA纯度所用溶液的pH值会影响 A_{260}/A_{280} 的读数。如RNA在水溶液中的 A_{260}/A_{280} 比值就比其在Tris缓

冲液 (pH7.5) 中的读数低 0.2~0.3。

(2) 荧光光度法: 用 EB 等荧光染料示踪的核酸电泳结果可用于判定核酸的纯度。由于 DNA 分子较 RNA 大许多, 电泳迁移率低; 而 RNA 中以 rRNA 最多, 占到 80%~85%, tRNA 及核内低分子 RNA 占 15%~20%, mRNA 占 1%~5%。故总 RNA 电泳后可呈现特征性的 3 条带。在原核生物为明显可见的 23S、16S 的 rRNA 条带及由 5S 的 rRNA 与 tRNA 组成的相对有些扩散的快迁移条带。在真核生物为 28S、18S 的 rRNA 及由 5S、5.8S 的 rRNA 和 tRNA 构成的条带。mRNA 因量少且分子大小不一, 一般是看不见的。通过分析以 EB 为示踪染料的核酸凝胶电泳结果, 我们可以鉴定 DNA 制品中有无 RNA 的干扰, 亦可鉴定在 RNA 制品中有无 DNA 的污染。

2.3.4.3 完整性鉴定

常用凝胶电泳法鉴定核酸的完整性, 样品中含核酸量不足时 ($<0.25\mu\text{g}/\text{ml}$); 或样品中含有其他能吸收紫外线辐射成分, 妨碍 DNA 等的精确定量, 可利用嵌入 DNA 中的 EB 分子受紫外线激发发射的荧光来进行测定。

2.4 生物高分子提纯后的处理

2.4.1 样品的浓缩

生物高分子在制备过程中由于过柱纯化而使样品浓度变得很稀, 往往需要浓缩。常用的浓缩方法有以下几种:

2.4.1.1 减压加温蒸发浓缩

通过降低液面压力使液体蒸发。减压的真空度越高, 蒸发越快。

2.4.1.2 冷冻法

含蛋白质的溶液结冰后, 在缓慢融化时, 不含蛋白质的纯冰结晶浮在液面, 蛋白质在下层溶液中。移去上层冰块, 可得到蛋白质的浓缩液。

2.4.1.3 固体吸收法

在含有生物高分子的溶液中加入吸水性凝胶, 凝胶吸水而膨胀, 离心沉淀凝胶得到浓缩的溶液。

2.4.1.4 透析法

先将生物高分子溶液装入透析袋, 外加聚乙二醇, 置于 4°C 下, 袋内水析出即被聚乙二醇迅速吸收, 聚乙二醇被水饱和后可更换新的, 直至生物高分子溶液达到较小的体积。

2.4.1.5 超滤法

利用一种特别的薄膜, 加压过滤或离心, 水和低分子透过滤膜, 生物高分子受阻保留。本法既可浓缩又可脱盐, 条件温和, 回收率高。

2.4.2 样品的干燥

真空干燥适用于不耐高温、易于氧化物质的干燥和保存, 整个装置包括干燥器、冷凝器及真空泵 3 部分。干燥器内常放一些干燥剂如五氧化二磷、无水氯化钙等。冷冻真空干燥除利用真空干燥原理外, 同时增加了温度因素。操作时先将待干燥的液体冷冻到 $-20\sim-40^{\circ}\text{C}$, 使之变成固体, 然后在低温低压下将溶剂升华成气体而除去。这样既能在低温条件下保护样品在干燥过程中不会失活, 又避免了液态样品在低压下因溶剂迅速气化而产生大量气泡的损失。此法干燥后的产品具有疏松、溶解度好、保持天然结构等优点, 适用于各类生物大分子的干燥保存。

2.4.3 样品的保存

2.4.3.1 蛋白质的保存

蛋白质制品的正确保存极为重要,一旦保存不当,会导致样品失活、变性、变质,使前面的全部制备工作化为乌有。

(1) 低温保存:由于多数蛋白质和酶对热敏感,通常 $35\sim 40^{\circ}\text{C}$ 以上就会失活,冷藏于冰箱一般只能保存1周左右,而且蛋白质和酶越纯越不稳定,液体状态比固体状态更不稳定。因此常保存于 $-5\sim -20^{\circ}\text{C}$,如能在 -70°C 下保存则最为理想。极少数酶耐热:如核糖核酸酶可以短时煮沸;胰蛋白酶在稀 HCl 溶液中可以耐受 90°C ;蔗糖酶在 $50\sim 60^{\circ}\text{C}$ 可以保持 $15\sim 30\text{min}$ 不失活。还有少数酶对低温敏感,如鸟肝丙酮酸羧化酶 25°C 稳定,低温下失活;过氧化氢酶要在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 保存,冰冻则失活;羧肽酶反复冻融会失活等。

(2) 干粉或结晶保存:蛋白质和酶固态比在溶液中要稳定的多。固态干粉制剂放在干燥剂中可长期保存,例如葡萄糖氧化酶干粉 0°C 下可保存2年, -15°C 下可保存8年。通常,酶与蛋白质含水量大于 10% ,室温和低温下均易失活,含水量小于 5% 时, 37°C 活性会下降。如要抑制微生物活性,含水量要小于 10% ;而要抑制化学活性,含水量要小于 3% 。此外要特别注意酶在冻干时常会部分失活。

(3) 保护剂:很早就有人观察到,在无菌条件下,室温保存了45年的血液,血红蛋白仅有少量改变,许多酶仍保留部分活性,这是因为血液中有使蛋白质稳定的因素。为了长期保存蛋白质和酶,常常要加入某些稳定剂,包括:①惰性的生化或有机物保护剂:如糖类、脂肪酸、牛血清清蛋白、氨基酸、多元醇等,以保持稳定的疏水环境;②中性盐保护剂:有一些蛋白质要求在高离子强度 ($1\sim 4\text{mol/L}$ 或饱和的盐溶液) 的极性环境中才能保持活性。最常用的是: MgSO_4 、 NaCl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等。使用时要脱盐;③巯基保护剂:一些蛋白质和酶的表面或内部含有半胱氨酸巯基,易被空气中的氧缓慢氧化为磺酸或二硫化物而变性,保存时可加入半胱氨酸或巯基乙醇。

2.4.3.2 核酸的保存

核酸的结构与性质相对稳定,无需每次制备新鲜的核酸样品,且一次性制备的核酸样品往往可以满足多次实验研究的需要,因此有必要探讨核酸的储存环境与条件。与分离纯化一样, DNA 与 RNA 的保存条件也因性质不同而相异。

(1) DNA 的保存:对于 DNA 来讲,溶于 TE 缓冲液中可在 -70°C 可以储存数年。其中 TE 的 pH 值为 8,可以减少 DNA 的脱氨反应,而 pH 低于 7.0 时 DNA 容易变性;EDTA 作为 2 价金属离子的螯合剂,通过螯合 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等 2 价金属离子以抑制 DNA 酶的活性;低温条件则有利于减少 DNA 分子的各种反应;双链 DNA 因结构上的特点而具有很大的惰性,常规 4°C 亦可保存较长时间;在 DNA 样品中加入少量氯仿,可以有效避免细菌与核酸的污染。质粒 DNA 的保存可将质粒溶于 TE 中, 4°C 短期保存,或 -20°C 和 -70°C 长期保存。也可在含有质粒的细菌培养液中加入等体积的甘油或 7% 的 DMSO, -70°C 长期保存。

(2) RNA 的保存:RNA 可溶于 0.3mol/L 的醋酸钠溶液或消毒的双蒸水中, $-70\sim -80^{\circ}\text{C}$ 保存。若以焦碳酸二乙酯水溶解 RNA,或者在 RNA 溶液中加入 RNase 阻抑蛋白 (RNasin) 或氧钒核糖核苷复合物 (VRC),则可通过抑制 RNase 对 RNA 的降解而延长保存时间。另外, RNA 沉淀溶于 70% 的乙醇溶液或去离子的甲酰胺溶液中,可于 -20°C 长期保存。其中,甲酰胺溶液能避免 RNase 对 RNA 的降解,而且 RNA 极易溶于甲酰胺溶液,其浓度可高达 4mg/ml 。需要注意的是,这些所谓 RNase 抑制剂或有机溶剂的加入,只是一种暂时保存的需要,如果它们对后继的实

验研究与应用有影响,则必须予以去除。

由于反复冻融产生的机械剪切力对 DNA 与 RNA 核酸样品均有破坏作用,在实际操作中,核酸的小量分装是十分必要的。

2.5 实验项目——蛋白质的盐析与透析

【实验目的】

掌握蛋白质盐析和透析两种操作,了解蛋白质的盐析与透析的原理和意义。

【实验原理】

在蛋白质溶液中加入一定浓度的中性盐,蛋白质即从溶液中沉淀析出,这种作用称为盐析,盐析法常用的盐类有硫酸铵、硫酸钠等。

蛋白质用盐析法沉淀分离后,需脱盐才能获得纯品,脱盐最常用的方法为透析法。蛋白质在溶液中因其胶体质点直径较大,不能透过半透膜,而无机盐及其他低分子物质可以透过,故利用透析法可以把经盐析法所得的蛋白质提纯,即把蛋白质溶液装入透析袋内,将袋口用线扎紧,然后把它放进蒸馏水或缓冲液中,蛋白质分子质量大,不能透过透析袋而保留在袋内,通过不断更换袋外蒸馏水或缓冲液,直至袋内盐分透析完为止。透析常需较长时间,宜在低温下进行。

本实验分别用双缩脲试剂和 Nessler 试剂检验蛋白质和 NH_4^+ 的存在。

【实验用品】

(1) 试剂

1) 饱和硫酸铵溶液。

2) 硫酸铵粉末。

3) 双缩脲试剂:称取 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.5g,加蒸馏水少许,微热溶解后稀释至 100ml。另取酒石酸钾钠 ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 10g 和 KI 5g,溶于 500ml 蒸馏水中,再加入 20% 氢氧化钠 300ml,混匀后,慢慢加入硫酸铜溶液中,加蒸馏水至 1000ml。此液可长期储存。

4) Nessler 试剂:称取 150g 碘化钾置于三角烧瓶中,加蒸馏水 100ml 使之溶解,再加入 110g 碘,待完全溶解后加 140~150g 汞,用力振摇 10min 左右,此时产生高热,须将三角烧瓶放入水中继续摇动,直至棕红色的碘转变成带绿色的碘化汞钾为止。将上清液倾入 2000ml 容量瓶中,并用蒸馏水洗涤瓶内的沉淀数次,将洗涤液一并倒入容量瓶内,用蒸馏水稀释至刻度,此为贮存液,储于棕色瓶中备用。取贮存液 150ml,加 10% 氢氧化钠 700ml,混匀后加蒸馏水 150ml,混匀,此为应用液,储于棕色瓶中,如混浊可过滤或静止数天后取上清液使用。本试剂需有适宜的 pH 值,调节时用 1mol/L 盐酸 20ml 滴定,需本试剂 11.0~11.5ml 时为宜。

(2) 血清样本

(3) 仪器

1) 离心管、试管及试管架。

2) 2ml 刻度吸管、玻璃棒、小烧杯。

3) 透析袋。

4) 离心机。

【实验步骤】

(1) 取 2ml 血清加入离心管中,再加入 2ml 饱和硫酸铵溶液,用玻璃棒搅匀,静置 5~10min