

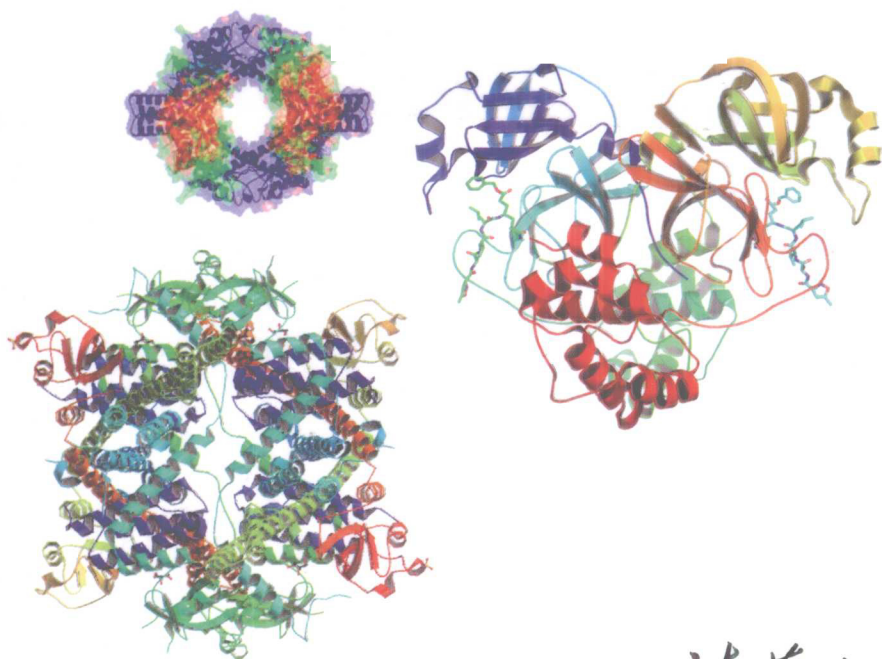
高等院校生命科学与技术实验教材

生物化学 实验指导

SHENGWU HUAXUE
SHIYAN ZHIDAO

(第2版)

余冰宾 主编



清华大学出版社

高等院校生命科学与技术实验教材

生物化学实验指导

(第2版)

主 编 余冰宾

编著者 余冰宾 陈坚刚 单 珊

赵 聪 梁帅怡 薛 飞

清华大学出版社

北 京

内 容 简 介

生物化学实验课程为清华大学精品课程,《生物化学实验指导》(第2版)是清华大学生命科学学院生物化学教研室多年实验教学经验的结晶。本教材分为理论和实验两大部分。理论部分论述了生物大分子制备、层析技术、电泳技术、离心技术、分光光度技术、免疫化学技术等内容,补充了新的蛋白质技术;实验部分,除经典的生物化学实验外,增加了生物化学综合大实验的内容,并更新了生物软件在生物化学实验中的应用部分内容。生物化学实验的英文参考资料及优秀学生实验报告举例见所附光盘。

修订再版后的教材,删除了陈旧、过时的内容,补充了一些新内容,理论部分和实验部分结合更紧密,更加注重培养学生的动手能力、独立思考问题的能力,有利于学生科研能力的提高。

本教材内容新颖、科学,实用性强,可供全国高等院校生物化学及相关学科专业学生和科研人员参考。

版权所有,侵权必究。侵权举报电话:010-62782989 13701121933

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验指导/余冰宾主编. —2版. --北京:清华大学出版社,2010.9

(高等院校生命科学与技术实验教材)

ISBN 978-7-302-23722-8

I. ①生… II. ①余… III. ①生物化学—实验—高等学校—教学参考资料
IV. ①Q5-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第165580号

责任编辑:罗 健

责任校对:赵丽敏

责任印制:李红英

出版发行:清华大学出版社

地 址:北京清华大学学研大厦A座

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

邮 编:100084

社 总 机:010-62770175

邮 购:010-62786544

投稿与读者服务:010-62776969, c-service@tup.tsinghua.edu.cn

质 量 反 馈:010-62772015, zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn

印 装 者:北京国马印刷厂

经 销:全国新华书店

开 本:185×260 印 张:16.5 字 数:378千字

版 次:2010年9月第2版 印 次:2010年9月第1次印刷

印 数:1~3000

定 价:32.00元(含光盘)

产品编号:035740-01

前 言

《生物化学实验指导》第2版教材，更新充实了部分实验理论及实验内容。既可作为清华大学生命科学学院本科生的生物化学基础实验及生化与分子生物学综合实验（清华大学本科生精品课程）教材；也可作为研究生的现代生命科学与生物技术实验（清华大学研究生精品课程）教材。

2005年夏，我们把全新的科学研究成果转化为实验教学内容的“生物化学与分子生物学综合实验”，该综合实验已成为清华大学生物系本科生暑假小学期的必修课程。该课程2007年被评为“清华大学本科生精品课程”。我们编写《生物化学实验指导》第2版教材时，将该课程的部分内容补充入书，同时也对该书的第1版教材进行了修订，删除了陈旧、过时的内容，使之更新、更前沿，理论和实践结合更紧密。希望给学习生物化学实验的本科生、研究生等提供更好的科学研究训练。

我在清华大学生命科学学院从事实验教学已近十年，教学工作得到了饶子和院士实验室博士生（助教）们的全力支持，他们是：林巍、陈宇航、徐峰、赵强、吴蓓丽、薛晓宇、郑炜、王晖、苏丹、徐元元、吴晓爱、庞效云、董辉、魏磊、杨秀娜、廖爽、赵琪、陈成、张畅。黄潇同学在“层析技术”这一章的修改工作中作出了很大的贡献。博士生们将生物化学前沿研究成果带到我们的实验教学实践中来！另外，本书参考了大量国内外生物化学实验技术书刊，谨向这些编者致以诚挚的谢意！清华大学生命科学学院的段明星教授多年来为实验课教学倾注了大量心血，在此表示衷心的感谢！在本书编写过程中，《临床药物治疗杂志》的杨觉雄编辑给予了我们无私的帮助。

敬请读者们给《生物化学实验指导》第2版教材多提宝贵意见和建议，以利于我们今后进一步修正和完善本书。

清华大学生命科学学院 副教授

牛津大学生物化学系 博士

余冰宾

2010年7月于清华园

目 录

· 理 论 部 分 ·

1 生物大分子的制备	(3)
1.1 概述	(3)
1.2 生物大分子制备的前处理	(5)
1.2.1 生物材料的选择	(5)
1.2.2 细胞的破碎	(5)
1.2.3 生物大分子的提取	(6)
1.3 生物大分子的分离纯化	(8)
1.3.1 沉淀法	(8)
1.3.2 透析	(13)
1.3.3 超滤	(14)
1.3.4 冰冻干燥	(16)
1.3.5 样品的保存	(18)
1.3.6 分离纯化方法的选择	(19)
2 层析技术	(22)
2.1 层析技术概述	(22)
2.1.1 引言	(22)
2.1.2 层析的基本理论	(22)
2.1.3 层析的基本概念	(23)
2.1.4 层析法的分类	(26)
2.1.5 柱层析的基本装置及基本操作	(26)
2.2 凝胶层析	(29)
2.2.1 简介	(29)
2.2.2 凝胶层析的基本原理	(29)
2.2.3 凝胶层析的基本概念	(29)
2.2.4 凝胶的种类和性质	(32)

2.2.5	凝胶的选择、处理和保存	(35)
2.2.6	凝胶层析的基本操作	(36)
2.2.7	凝胶层析的应用	(37)
2.3	离子交换层析	(38)
2.3.1	简介	(38)
2.3.2	基本原理	(39)
2.3.3	离子交换剂的种类和性质	(40)
2.3.4	离子交换剂的选择、处理和保存	(42)
2.3.5	离子交换层析的基本操作	(43)
2.3.6	阴离子交换树脂 Q - Sepharose	(45)
2.3.7	离子交换层析的应用	(47)
2.4	亲和层析	(48)
2.4.1	简介	(48)
2.4.2	亲和层析的基本原理	(48)
2.4.3	亲和吸附剂	(51)
2.4.4	亲和层析的基本操作	(54)
2.4.5	亲和层析的应用	(55)
2.5	高效液相层析 (HPLC)	(58)
2.5.1	简介	(58)
2.5.2	HPLC 的特点	(59)
2.5.3	HPLC 的分类	(59)
3	电泳技术	(62)
3.1	发展简史	(62)
3.2	电泳基本原理	(62)
3.3	影响电泳分离的主要因素	(64)
3.4	电泳的分类	(65)
3.5	纸电泳和醋酸纤维薄膜电泳	(66)
3.6	琼脂糖凝胶电泳	(67)
3.7	聚丙烯酰胺凝胶电泳	(68)
3.8	SDS - PAGE	(70)
3.9	梯度凝胶电泳	(72)
3.10	等电聚焦电泳	(73)
3.11	二维聚丙烯酰胺凝胶电泳	(74)
3.12	蛋白质的检测、鉴定及回收	(75)
3.13	蛋白质印迹	(76)
3.14	毛细管电泳	(77)
3.15	芯片毛细管电泳	(80)

4 离心技术	(82)
4.1 基本原理	(82)
4.2 离心机的主要构造和类型	(83)
4.3 超速离心技术	(86)
4.4 离心操作的注意事项	(89)
5 分光光度技术	(90)
5.1 基本原理	(90)
5.2 分光光度计的组成和构造	(93)
5.3 分光光度法在生化实验技术中的应用	(97)
6 免疫化学技术	(99)
6.1 免疫化学技术简介	(99)
6.2 抗原的免疫原性和专一性	(99)
6.3 抗体的结构和功能	(101)
6.4 抗原抗体的结合	(102)
6.5 动物的常规免疫	(104)
6.6 双向免疫扩散及免疫电泳	(105)
6.7 酶联免疫吸附法 (ELISA)	(107)
6.7.1 间接法测抗体	(108)
6.7.2 双抗体夹心法	(108)
6.7.3 双位点一步法	(108)
6.7.4 竞争法	(109)
6.7.5 捕获法测 IgM 抗体	(109)
7 其他新技术概览	(112)
7.1 荧光技术	(112)
7.1.1 荧光产生机制	(112)
7.1.2 天然荧光生色团和荧光探针	(113)
7.1.3 荧光共振能量转移	(113)
7.2 等温滴定微量热技术	(115)
7.2.1 等温滴定微量热 (ITC) 简介	(115)
7.2.2 ITC 的优点	(116)
7.2.3 ITC 的主要应用	(116)
7.3 生物大分子相互作用分析	(118)
7.3.1 表面等离子共振技术的原理	(118)
7.3.2 Biacore 分析系统的组成	(119)

7.3.3 Biacore 的工作原理	(119)
7.3.4 Biacore 的应用领域	(120)
7.4 质谱技术	(121)
7.4.1 质谱的基本原理	(121)
7.4.2 质谱的分类	(122)
7.4.3 质谱的应用	(123)
7.5 圆二层析技术 (CD)	(124)
7.5.1 圆二色的基本原理	(124)
7.5.2 圆二色仪	(125)
7.5.3 圆二色技术的应用	(125)
7.6 蛋白质测序技术	(126)
7.6.1 N 端测序	(127)
7.6.2 C 端测序	(127)

· 实验部分 ·

实验 1 蛋白质含量测定法	(131)
1. 微量凯氏 (Kjeldahl) 定氮法	(131)
2. 双缩脲法 (Biuret 法)	(132)
3. Folin - 酚试剂法 (Lowry 法)	(133)
4. 改良的简易 Folin - 酚试剂法	(135)
5. 考马斯亮蓝法 (Bradford 法)	(136)
6. 紫外吸收法	(138)
实验 2 凝胶层析法测定蛋白质分子质量	(141)
1. 实验目的	(141)
2. 实验原理	(141)
3. 器材与试剂	(142)
4. 实验操作	(142)
实验 3 等电聚焦电泳法测定蛋白质的等电点	(145)
1. 实验目的	(145)
2. 实验原理	(145)
3. 器材和试剂	(146)
4. 溶液配制	(147)
5. 操作步骤	(147)
6. 数据处理	(149)

实验 4 蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳	(150)
1. SDS - PAGE 的配制	(151)
2. SDS - PAGE 的灌制	(152)
3. 用考马斯亮蓝对 SDS - PAGE 进行染色	(154)
4. 干胶	(155)
5. 测量并计算相对分子质量	(155)
实验 5 小牛胸腺 DNA 的制备	(157)
1. 实验目的	(157)
2. 实验原理	(157)
3. 器材与试剂	(158)
4. 实验步骤	(158)
实验 6 小牛胸腺 DNA 溶解温度的测量	(160)
1. 实验目的	(160)
2. 实验原理	(160)
3. 器材与试剂	(161)
4. 操作步骤	(161)
实验 7 脱辅基血红蛋白的制备和重组	(163)
1. 实验目的	(163)
2. 实验原理	(163)
3. 实验方法	(163)
实验 8 离子交换柱层析分离核苷酸	(166)
1. 实验目的	(166)
2. 实验原理	(166)
3. 试剂与器材	(170)
4. 操作步骤	(170)
5. 结果处理	(172)
实验 9 猪胰蛋白酶的纯化及其活性测定	(174)
1. 实验目的	(174)
2. 实验原理	(174)
3. 器材与试剂	(175)
4. 实验步骤	(176)
5. 注意事项	(177)

实验 10 亲和层析纯化胰蛋白酶	(178)
1. 实验目的与要求	(178)
2. 基本原理	(178)
3. 试剂与器材	(179)
4. 实验操作步骤	(180)
5. 实验结果处理	(183)
6. 参考资料	(184)
实验 11 兔肌酸激酶的分离纯化及部分性质测定	(186)
1. 实验原理	(186)
2. 实验试剂	(187)
3. 实验步骤	(188)
实验 12 免疫化学实验	(192)
1. 免疫血清的制备	(192)
2. 沉淀反应定量	(193)
3. 双向免疫扩散	(194)
4. 对流免疫电泳	(195)
5. 微量免疫电泳	(196)
6. 单向定量免疫电泳 (火箭电泳法)	(197)
7. 双向免疫电泳 (交叉免疫电泳)	(198)
8. 酶联免疫吸附测定 (ELISA)	(198)
9. 蛋白质印迹	(204)
实验 13 生物软件在生物化学实验中的应用	(206)
1. 基因序列的查找与比对	(206)
2. 蛋白质的性质分析与预测	(211)
3. 蛋白质三维结构的显示和分析	(219)
实验 14 热休克蛋白 16.3 的分离纯化和活性测定	(225)
1. 实验目的	(225)
2. 实验原理	(225)
3. 器材与试剂	(226)
4. 实验步骤	(228)
5. 注意事项	(231)
附录	(233)
1. 分光光度计	(233)

2. 恒流泵操作规程	(236)
3. 自动部分收集器操作规程	(236)
4. 日立高速冷冻离心机操作程序	(239)
5. 各种仪器的使用注意事项	(240)
6. 德国耶拿(蔡司) SPECORD 200 和 SPEKOL-1100 使用说明	(242)
SPECORD 200 使用说明	(242)
SPEKOL-1100 使用说明	(250)
参考文献	(252)

理论部分

1 生物大分子的制备

1.1 概述

生物大分子主要是指蛋白质、酶（也是一种蛋白质）和核酸，这三类物质是生命活动的物质基础。在自然科学，尤其是生命科学高度发展的今天，蛋白质、酶和核酸等生物大分子的结构与功能的研究是探求生命奥秘的中心课题，而生物大分子结构与功能的研究，首先必须解决生物大分子的制备问题。没有能够达到足够纯度的生物大分子的制备工作，结构与功能的研究就无从谈起。然而生物大分子的分离纯化与制备是一件十分细致而困难的工作，有时制备一种高纯度的蛋白质、酶或核酸，要付出长期和艰苦的努力。

与化学产品的分离制备相比较，生物大分子的制备有以下主要特点：

（1）生物材料的组成极其复杂，常常包含有数百种乃至几千种化合物。其中许多化合物至今还是个谜，有待人们的研究与开发。有的生物大分子在分离过程中不断地代谢，使得生物大分子的分离纯化方法差别极大，想找到一种适合各种生物大分子分离制备的标准方法是不可能的。

（2）许多生物大分子在生物材料中的含量极微，只有万分之一、几十万分之一，甚至几百万分之一。分离纯化的步骤繁多，流程又长，有的目的产物要经过十几步、几十步的操作才能达到所需纯度的要求。例如，由脑垂体组织取得某些激素的释放因子，要用几吨甚至几十吨的生物材料，才能提取出几毫克的样品。

（3）许多生物大分子一旦离开了生物体内的环境就极易失活，因此分离过程中如何防止其失活，是生物大分子提取制备最困难之处。过酸、过碱、高温、剧烈的搅拌、强辐射及本身的自溶等都会使生物大分子变性而失活，所以分离纯化时一定要选用最适宜的环境和条件。

（4）生物大分子的制备几乎都是在溶液中进行的，温度、pH 值、离子强度等各种参数对溶液中各种成分的综合影响，很难准确估计和判断，因而实验结果常有很大的经验成分，实验的重复性较差，个人的实验技术水平和经验对实验结果会有较大的影响。

由于生物大分子的分离和制备是如此的复杂和困难，因而实验方法和流程的设计就必须尽可能多查文献，多参照前人所做的工作，吸取其经验和精华；探索中的失败和反复是不可避免的，只有具有百折不挠的钻研精神的人才能达到预期的目的。

生物大分子的制备通常可按以下步骤进行：①明确制备生物大分子的目的和要求。

②建立相应的、可靠的分析测定方法，这是制备生物大分子的关键，因为分析测定是整个分离纯化过程的“眼睛”。③通过文献调研和预备性实验，掌握生物大分子目的产物的物理化学性质。④生物材料的破碎和预处理。⑤分离纯化方案的选择和探索，这是最困难的过程。⑥生物大分子制备物的均一性（即纯度）的鉴定，要求达到一维电泳一条带，二维电泳一个点，或高效液相层析和毛细管电泳（CE）都是一个峰。⑦产物的浓缩、干燥和保存。

分析测定的方法主要有两类：即生物学和物理、化学的测定方法。生物学的测定方法主要有酶的各种测定方法、蛋白质含量的各种测定法、免疫化学方法、放射性核素示踪法等；物理、化学方法主要有比色法、气相层析和液相层析法、光谱法（紫外/可见、红外和荧光等分光光度法）、质谱法、电泳法以及核磁共振等。实际操作中尽可能多用仪器分析方法，以使分析测定更加快速、简便。

生物大分子制备物的均一性的鉴定，通常只采用一种方法是不够的，必须同时采用两三种不同的纯度鉴定法才能确定。蛋白质和酶制成品纯度的鉴定最常用的方法是：十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）和等电聚焦电泳，如能再用高效液相层析和毛细管电泳进行联合鉴定则更为理想，必要时再做N-末端氨基酸残基的分析鉴定，过去曾用的溶解度法和高速离心沉降法，现已很少再用。核酸的纯度鉴定通常采用琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳，但最方便的还是紫外吸收法，即测定样品在pH 7.0时260 nm与280 nm的吸光度（ A_{260} 和 A_{280} ），从 A_{260}/A_{280} 的比值即可判断核酸样品的纯度。

要了解的生物大分子的物理、化学性质主要有：①在水和各种有机溶剂中的溶解度。②在不同温度、pH值和各种缓冲液中生物大分子的稳定性。③固态时对温度、含水量和冻干时的稳定性。④各种物理性质如分子的大小、穿膜的能力、带电的情况、在电场中的行为、离心沉降的表现、在各种凝胶、树脂等填料中的分配系数等。⑤其他化学性质，如对各种蛋白酶、水解酶的稳定性和对各种化学试剂的稳定性。⑥对其他生物分子的特殊亲和力等。

制备生物大分子的分离纯化方法多种多样，主要是利用它们之间特异性的差异，如分子的大小、形状、酸碱度、溶解度、极性、电荷和与其他分子的亲和性等。各种方法的基本原理基本上可以归纳为两个类别：一是利用混合物中几个组分分配系数的差异，把它们分配到两个或几个相中，如盐析、有机溶剂沉淀、层析和结晶等；二是将混合物置于某一物相（大多数是液相）中，通过物理力场的作用，使各组分分配于不同的区域，从而达到分离的目的，如电泳、离心、超滤等。目前纯化蛋白质等生物大分子的关键技术是电泳、层析和高速与超速离心。由于生物大分子不能加热熔化和汽化，因而所能分配的物相只限于固相和液相，在此两相之间交替进行分离纯化。实际工作中往往要综合运用多种方法，才能制备出高纯度的生物大分子。

纯化生物大分子总是希望纯度和产率都要高。例如纯化某种酶，理想的结果是比活性和总回收率都要高才好，但实际上两者不能兼得，通常在科学研究中希望比活性尽可能地高，而牺牲一些回收率，在工业生产上则正相反。

1.2 生物大分子制备的前处理

1.2.1 生物材料的选择

制备生物大分子,首先要选择适当的生物材料。材料的来源无非是动物、植物和微生物及其代谢产物。从工业生产角度选择材料,应选择含量高、来源丰富、制备工艺简单、成本低的材料,但往往这几方面的要求不能同时具备,含量丰富但来源困难,或含量、来源较理想,但材料的分离纯化方法繁琐,流程很长,反倒不如含量低些,但易于获得纯品的材料,由此可见,必须根据具体情况,抓住主要矛盾决定取舍。从科研工作的角度选材,则只须考虑材料的选择符合实验预定的目标要求即可。除此之外,选材还应注意植物的季节性、地理位置和生长环境等。选动物材料时要注意其年龄、性别、营养状况、遗传素质和生理状态等。动物在饥饿时,脂类和糖类含量相对减少,有利于生物大分子的提取分离。选微生物材料时要注意菌种的代数和培养基成分等之间的差异,例如在微生物的对数期,酶和核酸的含量较高,可获得较高的产量。

材料选定后要尽可能保持新鲜,尽快加工处理,动物组织要先除去结缔组织、脂肪等非活性部分,绞碎后在适当的溶剂中提取,如果所要求的成分在细胞内,则要先破碎细胞。植物要先去壳、除脂。微生物材料要及时将菌体与发酵液分开。生物材料如暂不提取,应冰冻保存。动物材料则需深度冷冻保存。

1.2.2 细胞的破碎

除了某些细胞外的多肽激素、某些蛋白质和酶以外,对于细胞内或多细胞生物组织中的各种生物大分子的分离纯化,都需要事先将细胞和组织破碎,使生物大分子充分释放到溶液中,并不丢失生物活性。不同的生物体或同一生物体的不同部位的组织,其细胞破碎的难易不一,使用的方法也不相同,如动物脏器的细胞膜较脆弱,容易破碎,植物和微生物由于具有较坚固的纤维素、半纤维素组成的细胞壁,要采取专门的细胞破碎方法。

(1) 机械法

1) 研磨:研磨是破碎单一细胞的有效措施。借助研磨中磨料和细胞间的剪切及碰撞作用破碎细胞。常用的磨料为石英沙和氧化铝,目前已有用玻璃珠替代磨料来进行珠磨。这种方法比较温和,适宜实验室使用。工业生产中可用电磨研磨。细菌和植物组织细胞的破碎也可用此方法。

2) 匀浆:匀浆是机体软组织破碎常用的方法之一。主要是通过固体剪切力对组织和细胞进行破碎,将生物大分子释放进入溶液。可用的匀浆器主要有4种类型,刀片式组织破碎匀浆器、内切式匀浆器、玻璃匀浆器 and 高压匀浆器。

3) 组织捣碎器:这是一种较剧烈的破碎细胞的方法,通常可先用家用食品加工机将组织打碎,然后再用10 000~20 000 r/min的内刀式组织捣碎机(即高速分散器)将组织的细胞打碎,为了防止发热和升温过高,通常是转10~20 s,停10~20 s,可反复多次。

(2) 物理法

1) 反复冻融法: 将待破碎的细胞冷至 $-20 \sim -15^{\circ}\text{C}$, 然后放于室温 (或 40°C) 迅速融化, 如此反复冻融多次, 由于细胞内形成冰粒使剩余胞液的盐浓度增高而引起细胞溶胀破碎。

2) 超声波处理法: 此法是借助超声波作用于溶液时产生的气泡空化作用, 引起的冲击波和剪切力来破碎细胞壁和细胞器。一般来说, 破碎微生物细菌和酵母菌时, 时间要长一些。破碎的效率主要取决于声频、声能和处理的时间。使用时注意降温, 防止过热, 以免引起生物大分子的变性。

3) 压榨法: 这是一种温和的、彻底破碎细胞的方法。在 $(1000 \sim 2000) \times 10^5 \text{ Pa}$ 的高压下使几十毫升的细胞悬液从高压室的环状隙高速喷射到静止的撞击环上, 被迫改变方向经出口管流出, 细胞将彻底破碎。这是一种较理想的破碎细胞的方法, 但仪器费用较高。

4) 冷热交替法: 从细菌或病毒中提取蛋白质和核酸时可用此法。在 90°C 左右维持数分钟, 立即放入冰浴中使之冷却, 如此反复多次, 绝大部分细胞可以被破碎。

(3) 化学与生物化学方法

1) 自溶法: 将新鲜的生物材料存放于一定的 pH 和适当的温度下, 细胞结构在自身所具有的各种水解酶 (如蛋白酶和酯酶等) 的作用下发生溶解, 使细胞内含物释放出来, 此法称为自溶法。使用时要特别小心操作, 因为水解酶不仅可以使细胞壁和膜破坏, 同时也可能会把某些要提取的有效成分分解了。

2) 溶胀法: 细胞膜为天然的半透膜, 在低渗溶液和低浓度的稀盐溶液中, 由于存在渗透压差, 溶剂分子大量进入细胞, 将细胞膜胀破释放出细胞内含物。

3) 酶解法: 利用各种水解酶, 如溶菌酶、纤维素酶、蜗牛酶和酯酶等, 于 37°C 和 pH 8 条件下, 处理 15 min, 可以专一性地将细胞壁分解, 释放出细胞内含物, 此法适用于多种微生物。例如从某些细菌细胞提取质粒 DNA 时, 可采用溶菌酶 (来自蛋清) 破细胞壁, 而在破酵母细胞时, 常采用蜗牛酶 (来自蜗牛), 将酵母细胞悬于 0.1 mmol/L 柠檬酸—磷酸氢二钠缓冲液 (pH 5.4) 中, 加 1% (质量分数) 蜗牛酶, 在 30°C 处理 30 min, 即可使大部分细胞壁破裂, 如同时加入 0.2% (质量分数) 巯基乙醇效果会更好。此法可以与研磨法联合使用。

4) 有机溶剂处理法: 利用氯仿、甲苯、丙酮等脂溶性溶剂或十二烷基磺酸钠等表面活性剂处理细胞, 可将细胞膜溶解, 从而使细胞破裂, 此法也可以与研磨法联合使用。

1.2.3 生物大分子的提取

提取是在分离纯化之前将经过预处理或破碎的细胞置于溶剂中, 使被分离的生物大分子充分地释放到溶剂中, 并尽可能保持原来的天然状态不丢失生物活性的过程。这一过程是将目的产物与细胞中其他化合物和生物大分子分离, 即由固相转入液相, 或从细胞内的生理状况转入外界特定的溶液中。

影响提取的因素主要有: ①目的产物在提取的溶剂中溶解度的大小; ②由固相扩散