

目 录

第一篇 生化分离技术

第一章 生物大分子的提取与沉淀分离技术	1
第一节 细胞破碎	1
第二节 蛋白质和酶的提取与沉淀分离	3
第三节 核酸的提取与沉淀分离	10
第四节 实验	12
实验 1-1 大肠杆菌细胞的超声波破碎	12
实验 1-2 枯草杆菌碱性磷酸酶的提取与盐析	12
实验 1-3 枯草杆菌 DNA 的提取与分离	14
实验 1-4 酵母 RNA 的提取与分离	15
实验 1-5 大蒜细胞 SOD 的提取与分离	16
实验 1-6 大鼠肝 rRNA 的提取与分离	18
第二章 层析分离技术	19
第一节 吸附层析	19
第二节 分配层析	23
第三节 离子交换层析	38
第四节 凝胶层析	42
第五节 亲和层析	46
第六节 实验	47
实验 2-1 蛋白质溶液的凝胶层析脱盐	47
实验 2-2 氨基酸的纸层析	48
实验 2-3 核苷酸的离子交换层析	50
实验 2-4 胰蛋白酶的亲和层析	52
实验 2-5 凝胶层析测定蛋白质的相对分子质量	53
实验 2-6 DNS-氨基酸的聚酰胺薄膜层析	55
实验 2-7 醇酯成分的气相层析	57
实验 2-8 胆酸混合液的薄层层析	59
第三章 电泳技术	60
第一节 电泳的基本原理	60
第二节 纸电泳	61
第三节 薄层电泳	63
第四节 薄膜电泳	64
第五节 凝胶电泳	64
第六节 等电点聚焦电泳	68
第七节 实验	71

实验 3-1	核苷酸的纸电泳	71
实验 3-2	蛋白质的醋酸纤维薄膜电泳	72
实验 3-3	DNA 的琼脂糖凝胶电泳	73
实验 3-4	蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳	75
实验 3-5	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质的相对分子质量	77
实验 3-6	蛋白质的二元凝胶电泳	78
第四章	离心分离技术	81
第一节	离心机的种类与用途	81
第二节	离心方法的选择	82
第三节	离心条件的确定	84
第四节	实验	86
实验 4-1	细菌核糖体的分离	86
实验 4-2	大肠杆菌细胞膜的分离	87
实验 4-3	RNA 的蔗糖密度梯度离心分离	88
实验 4-4	大鼠肝细胞核的分离	89
第二篇 生化检测技术		
第五章	化学检测技术	91
第一节	糖类的化学检测	91
第二节	蛋白质和氨基酸的化学检测	95
第三节	蛋白质的免疫化学检测	104
第四节	核酸的化学检测	106
第五节	实验	108
实验 5-1	斐林试剂置换法测定还原糖	108
实验 5-2	葡萄糖淀粉酶的活力测定	109
实验 5-3	微量凯氏定氮法测定总氮量	111
实验 5-4	福林-酚试剂法测定蛋白质含量	112
实验 5-5	丹磺酰化法分析蛋白质 N-末端氨基酸	113
实验 5-6	异硫氰酸苯酯分析法测定肽链的氨基酸排列次序	114
实验 5-7	茚三酮显色法测定氨基酸含量	116
实验 5-8	双向免疫扩散法测定抗血清效价	117
实验 5-9	定磷法测定核酸含量	118
实验 5-10	地衣酚显色法测定 RNA 含量	119
实验 5-11	二苯胺显色法测定 DNA 含量	120
第六章	光学检测技术	122
第一节	旋光检测技术	122
第二节	荧光检测技术	123
第三节	分光光度检测技术	126
第四节	实验	127
实验 6-1	旋光法测定味精的纯度	127
实验 6-2	荧光法测定核黄素含量	128

实验 6-3 荧光法测定氨基酸含量	129
实验 6-4 紫外吸收法测定核酸含量	130
实验 6-5 紫外吸收法测定蛋白质含量	131
第七章 气体检测技术	132
第一节 华勃氏呼吸仪检压法	133
第二节 范·斯莱克检测仪测定 α -氨基酸含量	135
第三节 实验	136
实验 7-1 酵母细胞耗氧量的测定	136
实验 7-2 华勃氏呼吸仪测定 L-谷氨酸脱羧酶活力	137
实验 7-3 华勃氏呼吸仪测定 L-谷氨酸含量	138
第八章 放射性同位素检测技术	140
第一节 基本知识	140
第二节 放射性同位素的检测	142
第三节 放射性同位素的掺入	145
第四节 实验	146
实验 8-1 γ - ^{32}P -ATP 的酶促合成	146
实验 8-2 ^3H -蛋白质的生物合成	146
实验 8-3 ^3H -蛋白质凝胶的放射荧光显影	147
第九章 生物检测技术	149
第一节 生物检测的主要内容	149
第二节 抗生素的生物检测	151
第三节 生长促进物质的生物检测	152
第四节 实验	153
实验 9-1 卡那霉素的效价测定	153
实验 9-2 二环素的杀菌能力测定	154
第十章 核磁共振检测技术	156
第一节 核磁共振的基本原理	156
第二节 核磁共振的操作要点	160

第三篇 酶、基因和细胞操作技术

第十一章 酶技术	163
第一节 酶生物合成的调节	163
第二节 酶反应动力学的研究	167
第三节 酶、细胞和原生质体固定化技术	171
第四节 酶分子修饰	175
第五节 实验	183
实验 11-1 β -半乳糖苷酶的诱导合成	183
实验 11-2 无机磷酸对枯草杆菌碱性磷酸酶生物合成的阻遏作用	184
实验 11-3 碱性磷酸酶的反应动力学性质	185
实验 11-4 L-谷氨酸脱羧酶的固定化	187

实验 11-5 枯草杆菌细胞固定化	188
实验 11-6 谷氨酸棒杆菌原生质体固定化	188
实验 11-7 固定化原生质体生产谷氨酸脱氢酶	189
第十二章 克隆技术	191
第一节 基因的获取技术	191
第二节 载体的制备技术	193
第三节 限制性内切核酸酶的应用	195
第四节 基因重组	197
第五节 细胞转化和基因表达	197
第六节 实验	199
实验 12-1 大肠杆菌 Col EI 质粒的分离	199
实验 12-2 重组 DNA 的细胞转化	201
第十三章 细胞和原生质体融合技术	202
第一节 细胞融合	202
第二节 原生质体分离	204
第三节 原生质体融合	205
第四节 细胞壁的再生	206
第五节 实验	207
实验 13-1 枯草杆菌原生质体的制备	207
实验 13-2 酵母原生质体的分离与再生	207
实验 13-3 从胡萝卜细胞分离原生质体	208
附录	210
一、常用缓冲液的配制	210
二、指示剂的配制	217
三、气体检测常用的物理常数	219
四、氨基酸的一些理化常数	220
五、某些有机溶剂的一些物理常数	221
主要参考书目	222

第一篇 生化分离技术

要在分子水平上对某种生物体内物质进行研究和应用，首先必须把该物质从细胞内提取出来，并使之与其他物质分离，这就得借助于各种生化分离技术。

生化分离技术各种各样，发展很快，本书主要介绍沉淀分离、层析分离、电泳分离和超离心分离技术。

第一章 生物大分子的提取与沉淀分离技术

生物大分子是指在生物体内存在的具有特殊生物学功能的高分子化合物，主要包括蛋白质、酶、核酸、多糖和脂类。其中蛋白质（包括酶）和核酸是生命现象的基本体现者，是生命运动的物质基础，对其结构和功能的研究已成为探索生命奥秘的焦点。为了研究生物大分子的结构、功能和各种特性，为了进行生物工程特别是基因工程和酶工程的基础和应用研究，就必须获得高纯度的、完整的生物大分子。为此，首先要把它们从细胞内提取出来，然后再进行分离纯化。

第一节 细胞破碎

除了体液和微生物胞外的某些蛋白质和多肽以外，大多数生物大分子都存在于细胞之内。为了将细胞内的生物大分子提取和分离，就得将细胞或组织破碎。

对于不同的生物体，或同一生物体的不同细胞，由于各自的结构不同，细胞破碎的条件和方法也有所不同，必须根据具体情况进行选择，以便达到预期的效果。

细胞破碎的方法有：机械方法、物理方法、化学方法及酶学方法等。现分述如下：

一、机械破碎方法

通过机械运动所产生的剪切力的作用，使细胞破碎的方法称为机械破碎法。常用的有下列几种：

1. 高速组织捣碎机

利用高速旋转的叶片所产生的剪切力将组织细胞破碎。叶片的转速可高达 10 000 r/min，适用于较脆嫩的组织细胞的破碎。操作时，首先将欲捣碎的组织细胞悬浮于水或其他液状介质中，配成稀糊状液体，然后放置于捣碎机玻璃筒内，不能装得太多，以免溅出筒外。固定好筒盖后，将调速器调节在最低速位置，开动马达后，逐步加速至所需速度，破碎一定时间后，停机，从筒内取出捣碎液。

2. 匀浆器

匀浆器是常用来破碎那些比较柔软、易于分散的组织细胞的器具。一般由玻璃制成，也可由硬质塑料或不锈钢制成。

匀浆器由一根内壁经磨砂的管和一根表面经磨砂的研杆组成。管和研杆必须配套使用，杆与管内壁之间仅有几百微米的间隙。

匀浆器的细胞破碎程度比组织捣碎机高，而其机械剪切力对生物大分子的破坏较少。

操作时，先将欲破碎的组织细胞配成糊状置于管内，再套入研杆用手工来回研磨，或把研杆连接在电动搅拌器上，用手握住管，上下移动，即可将组织细胞破碎。

3. 研磨器

通常由陶瓷制的研钵和研杆组成。操作时，将欲破碎的材料置于研钵中，用手持研杆反复研磨，即可将组织细胞研碎。加入少量的精制石英砂，则效果更好。

研磨器常用于微生物与植物细胞的破碎。

二、物理破碎方法

通过各种物理因素的作用，使组织细胞破碎的方法，统称为物理破碎方法。常用的物理因素有：温度、压力、超声波等。

物理破碎方法多用于微生物细胞的破碎。

1. 温度差破碎法

把待破碎的样品通过温度的反复变化而使细胞破碎。

操作时，可将样品投入沸水中，在 90℃ 左右的温度下维持数分钟，然后立即置于冰浴中迅速冷却。也可将样品冷冻至 -18℃ 左右，使其冻结，然后迅速升温，均可将细胞破碎。上述操作可反复进行，使细胞破碎更完全。

2. 压力差破碎法

通过压力的变化，使细胞内与细胞外所受的压力不同，而使细胞破碎。例如：可将细胞悬浮于蒸馏水中，利用细胞内外渗透压的不同使细胞破碎。也可用 30.0 MPa 左右的水压或气压将细胞压碎。或在加压后急速减压而使细胞破碎。

3. 超声波破碎法

超声波是指频率超过人耳可听范围 (16~20 kHz) 的波，即频率为 20 kHz 以上的波称为超声波。

通过超声波的作用，使细胞结构解体，而使细胞破碎。

超声波细胞破碎器一般由超声波发振器、振动子和喷嘴三部分组成。一般在超声波发振器上有时间控制和功率控制二个指示器，可根据需要进行调整和控制。喷嘴有不同的规格，可根据样品的量而进行选择。

超声波破碎的效果与样品浓度、超声波频率、输出功率和破碎时间有密切关系。对于

大肠杆菌细胞，细胞浓度常选用在 50~100 mg 菌体/ml 左右，频率一般选择在 20 kHz，输出功率一般选用在 100~200 W 范围，可根据喷嘴的规格和样品的量而改变。破碎时间一般为 3~15 min。为减少发热，操作时，可在冷库中进行，或者将样品置于冰浴中，并采用间歇操作。例如，破碎 30 s 至 1 min，间歇 1 min，如此反复进行。

超声波破碎多用于微生物细胞的破碎，然而不同的微生物细胞所要求的破碎条件是不同的。此外要注意避免样品中气泡的存在。一些对超声波敏感的生物大分子，在处理时，要仔细选择条件，以免变性。

三、化学破碎方法

通过化学试剂的作用，使细胞膜的结构改变或破坏，使细胞膜的透过性改变。

常用的化学试剂可分为有机溶剂和表面活性剂两大类。

属于有机溶剂的主要有丙酮、甲苯、丁醇、氯仿等。

常用的表面活性剂有十二烷基硫酸钠 (SDS)、氯化十二烷基吡啶、特里顿 (Triton)、吐温 (Tween) 和去氧胆酸钠等。

在实际操作时，应根据不同的细胞和欲分离的生物大分子的不同，而选用不同的化学试剂和不同的处理条件。

四、酶学破碎方法

通过外加的或细胞本身存在的酶的作用使细胞破碎的方法称为酶学方法。

1. 外加酶制剂

对于细菌，一般加进溶菌酶，有的还要加入 EDTA。对于酵母，则采用 β -葡聚糖酶，而霉菌则要加进几丁质酶等，在一定的温度和 pH 条件下，保温一段时间，细胞壁即被破坏。对于植物材料，一般加进纤维素酶、半纤维素酶和果胶酶等，破坏植物细胞间的联系和破坏细胞壁，而达到细胞破碎。有关具体内容请参看本书第十三章。

2. 自溶法

将欲破碎的细胞在一定的 pH 条件和适宜的温度下保温一定的时间，通过细胞本身存在的酶系的作用，将细胞破坏，使胞内物质释出的方法，称为自溶法。动物细胞的自溶温度一般选在 0~4℃，而微生物细胞的自溶多在室温条件下进行。自溶时，为了防止外来微生物的污染，可以加进少量的防腐剂，如甲苯、氯仿、叠氮钠等。

第二节 蛋白质和酶的提取与沉淀分离

一、提取的基本概念与影响因素

提取是在一定的条件下用一定的溶剂处理样品，使欲分离的物质充分释放到溶剂中的过程。又称为抽提或萃取。

影响提取的主要因素是欲提取的物质在所使用的溶剂中的溶解度大小以及该物质向溶

剂相扩散的难易。

一种物质在某一溶剂中的溶解度大小与该物质的分子结构及所使用的溶剂的理化性质有密切关系。一般说来，极性物质易溶于极性溶剂中，非极性物质易溶于非极性的有机溶剂中，酸性物质易溶于碱性溶剂中，碱性物质易溶于酸性溶剂中；温度升高，溶解度一般增大；两性电解质在等电点时，溶解度最小。

从细胞或细胞碎片中提取生物大分子还受到扩散作用的影响。由固体溶解于液体的扩散速度与温度、溶液粘度、扩散面积、扩散距离以及两相界面之浓度差有密切关系。一般说来，增加温度，降低溶液粘度，增加扩散面积，减少扩散距离，保持两相界面的最大浓度差，延长扩散时间等都有利于提高扩散速度，从而使提取效果增加。

二、蛋白质和酶的提取

蛋白质和酶的种类繁多，在提取时，应根据其存在部位、分子结构及溶解性质的不同，选择不同的提取方法。

首先要根据蛋白质和酶在生物体中的存在部位，决定是否进行细胞破碎。存在于体液或胞外的蛋白质和酶不需经细胞破碎；而存在于细胞内的蛋白质和酶，一般要使细胞破碎。

然后，再根据欲提取之蛋白质和酶的结构及溶解性质的不同选择适当的溶剂进行提取。溶于水的可用水溶液提取；不溶于水的则用有机溶剂提取。

1. 水溶液提取

大多数蛋白质和酶均能溶于水或稀盐、稀碱、稀酸溶液中。因此蛋白质和酶的提取一般采用水溶液提取。其中稀盐溶液和缓冲液对蛋白质的溶解度大，稳定性好，在蛋白质和酶的提取过程中经常采用。提取时，要注意控制好盐浓度、温度、pH 值等因素。

(1) 盐浓度的选择。盐浓度的高低直接影响蛋白质和酶的溶解度。一般选用等渗盐溶液进行提取，例如：0.15 mol/L 的氯化钠溶液（生理盐水）、0.02~0.5 mol/L 的磷酸缓冲液或碳酸缓冲液等。作者等人的研究表明，0.1 mol/L 的氯化镁溶液对枯草杆菌碱性磷酸酶的提取有显著效果。有些蛋白质在低盐溶液中溶解度低，需要采用较高浓度的盐溶液提取。例如：脱氧核糖核蛋白用 1 mol/L 的氯化钠溶液提取；而某些蛋白质，如某些霉菌中的脂肪酶，则用纯水提取的效果较好。

(2) pH 值的选择。溶液的 pH 值与蛋白质和酶的溶解度及稳定性有密切关系。为了增大蛋白质的溶解度，提取时溶液的 pH 值不宜选在欲提取的蛋白质的等电点附近；为防止蛋白质和酶的变性失活，pH 值不宜过高或过低。此外，考虑到某些蛋白质常以离子键形式与其他物质结合，选用 pH 值在 3~6 范围内，则有利于离子键的分离。

(3) 温度的选择。为了防止蛋白质和酶的变性、失活和降解，提取时一般在 0~10℃（4℃左右常用）的温度下操作，然而有些蛋白质和酶对温度的耐受性较高，提取时适当提高温度，可以使其他杂蛋白变性分离，有利于提取和进一步的纯化。例如：酵母醇脱氢酶、胃蛋白酶、碱性磷酸酶、多肽类激素等选择 37℃ 甚至更高一些的温度下提取，效果比低温提取更好。

(4) 在提取酶时，若加入该酶的作用底物或辅酶，可改变酶分子表面电荷的分布，一般对提取有促进作用。

2. 有机溶剂提取

一些蛋白质和酶，由于与脂质结合比较牢固或分子中有较多的非极性侧链，难溶或不溶于水、稀盐溶液、稀酸或稀碱溶液中，因此必须用不同比例的有机溶剂提取。常有的有机溶剂有乙醇、丙酮、丁醇等。例如：植物种子中的醇溶谷蛋白用70%~80%的乙醇提取，微粒体或线粒体中的酶可用丁醇提取。

有些蛋白质可用水溶液提取，也可用有机溶剂提取。如胰岛素既可溶于稀酸或稀碱溶液，又可溶于酸性乙醇或酸性丙酮中，在操作时则可从优选择提取方案。若采用60%~70%的酸性乙醇提取胰岛素，一方面可抑制蛋白酶对胰岛素的破坏，另一方面又可以大量除去杂蛋白，提取效果较好。

此外，对于某些与脂质结合的蛋白质和酶也可采用十二烷基硫酸钠（SDS）、胆酸盐等表面活性剂处理。

三、蛋白质和酶的沉淀分离

经提取得到的蛋白质和酶都含有各种同类或不同类的杂质，必须经过进一步的分离纯化，才能获得纯度较高的蛋白质和酶。

蛋白质和酶的分离纯化是重要而又复杂的环节。操作时不仅要考虑到欲分离纯化的蛋白质和酶的特性，还要考虑到混杂物质的种类和特性。根据不同物质的不同特性，选择适当的分离纯化技术。

蛋白质和酶分离提纯的方法很多，归纳起来主要有四大技术。即沉淀分离、层析分离、电泳分离和超离心分离等。其中层析、电泳和超离心技术发展迅速，应用广泛，已成为最重要的现代生化分离技术，将在本书的第二、三、四章分别阐述。这里仅介绍与溶解度有关的分离技术，即沉淀分离技术。

沉淀分离是通过改变某些条件或加入某种物质，使溶液中某种溶质的溶解度降低，从而从溶液中沉淀析出的技术。

沉淀分离技术包括盐析沉淀、等电点沉淀和有机溶液沉淀等。

（一）盐析沉淀法

盐析沉淀法简称为盐析法，是蛋白质和酶分离纯化中应用最早而且至今仍广泛使用的方法。

1. 盐析原理

蛋白质和酶在水溶液中的溶解度受到溶液中盐浓度的影响。一般在低盐浓度的情况下，蛋白质的溶解度随盐浓度的升高而增加，这种现象称为盐溶；而当盐浓度升高到一定程度后，蛋白质的溶解度又随着盐浓度的升高而减少，结果使蛋白质沉淀析出，这种现象称为盐析作用。在某一浓度的盐溶液中，不同蛋白质的溶解度也不一样，借此可达到彼此分离的目的。

盐之所以会改变蛋白质的溶解度，是由于盐在溶液中离解为正离子和负离子，由于反离子作用改变了蛋白质分子表面的电荷，同时由于离子的存在改变了溶液中水的活度，使蛋白质的水化膜改变。故此，蛋白质的溶解度与溶液中离子强度有密切关系。两者的关系可用下式表示：

$$\lg \frac{S}{S_0} = -K_s I$$

式中, S 为蛋白质在离子强度为 I 时的溶解度 (g/L); S_0 为蛋白质在离子强度为 0 时的溶解度; K_s 为盐析常数; I 为离子强度。

在温度一定的条件下, 某一蛋白质在某一 pH 值的水溶液中的溶解度为一常数 S_0 。故上式可改写为:

$$\lg S = \lg S_0 - K_s I = \beta - K_s I$$

式中, $\beta = \lg S_0$, 为一常数; β 值主要取决于蛋白质的性质, 也与溶液的温度和 pH 值有关; 盐析常数 K_s 主要与盐的性质 (离子价数、平均半径等) 和蛋白质的结构有关, K_s 越大, 盐析效果越好。

表 1-1 为几种常用的盐对某些蛋白质的盐析常数。

表 1-1 几种常用的盐对某些蛋白质的盐析常数

蛋白质 \ 盐	氯化钠	硫酸镁	硫酸铵	硫酸钠	硫酸钾
β -乳球蛋白				0.63	
马血红蛋白		0.33	0.71	0.76	1.00
人血红蛋白					2.00
马肌红蛋白			0.94		
卵清蛋白			1.22		
血纤维蛋白元	1.07		1.46		

(摘自: H. Neurath and K. Bailey: The Proteins, Academic Press, New York, 1953)

所以对某一蛋白质来说, 在温度和 pH 值等盐析条件确定 (即 β 确定), 所采用的盐确定 (即 K_s 确定) 以后, 蛋白质的溶解度决定于离子强度 I 。 I 可用下式计算:

$$I = \frac{1}{2} \sum m_i Z_i^2$$

式中, m_i 为溶液中离子的摩尔浓度; Z_i 为离子的价数。

对于多种蛋白质或酶的混合液, 可采用分段盐析法进行分离纯化。在一定的 pH 和温度条件下 (β 确定), 改变离子强度 I , 称为“ K_s 分段盐析”; 而在一定的盐和离子强度条件下 ($K_s I$ 确定) 改变温度或 pH 值, 称为“ β 分段盐析”。

2. 盐的选择

蛋白质和酶的盐析通常采用中性盐, 如硫酸铵、硫酸钠、硫酸镁、氯化钠、磷酸钠等。其中在实际中应用最广的是硫酸铵。硫酸铵在水中的溶解度大而温度的影响小 (25 °C 时溶解度为 4.1 mol/L, 即 767 g/L; 0 °C 时溶解度为 3.7 mol/L, 即 697 g/L), 而且硫酸铵价廉易得, 不易引起蛋白质变性, 分离效果比其他盐好。但是用硫酸铵盐析时, 缓冲能力较差, 而且铵离子会干扰蛋白氮的测定, 故有时也要用其他盐来进行盐析。磷酸钾和硫酸钠的盐析系数 K_s 较大 (见表 1-1), 但由于在较低温度下的溶解度太低, 受温度影响大, 故应用不广泛。

3. 硫酸铵浓度的计算与调整方法

在实际应用硫酸铵进行盐析时，蛋白质溶液中硫酸铵浓度的调整方法主要有二种：一种是在蛋白质溶液体积不大，所需调整的硫酸铵浓度不高时，可加入饱和硫酸铵溶液。饱和硫酸铵的配制方法是在一定量的水中加入过量的硫酸铵，加热至 50~60℃ 保温数分钟，趁热滤去沉淀，再在 0℃ 或 25℃ 平衡 1~2 天，有固体析出时即达 100% 饱和度。盐析时所需添加的饱和硫酸铵溶液的体积可按下式计算：

$$V = V_0 \frac{S_2 - S_1}{1 - S_2}$$

式中， V 为所需加进的饱和硫酸铵溶液的体积； V_0 为原溶液体积； S_2 为所需达到的硫酸铵饱和度； S_1 为原溶液的硫酸铵饱和度。第二种方法是直接加进固体硫酸铵，其加入量可按下列公式计算：

$$t = \frac{G(S_2 - S_1)}{1 - AS_2}$$

式中， S_2 和 S_1 分别代表所需达到的硫酸铵饱和度和原溶液的硫酸铵饱和度； t 为将 1 L S_1 饱和度的溶液提高到 S_2 饱和度时所需加进的硫酸铵克数； G 和 A 为常数，与温度有关。在 0℃ 时， G 为 707， A 为 0.27；在 20℃ 时， G 为 756， A 为 0.29。在实际使用时，为方便起见，可直接查表得到（表 1-2 和表 1-3）。

表 1-2 25℃ 下调整硫酸铵饱和度计算表

		硫酸铵终浓度 (%饱和度)																
		10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
		25℃ 下，每升溶液所加固体硫酸铵克数																
硫酸铵初浓度 (%饱和度)	0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
	10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
	20			59	89	108	121	154	187	222	259	298	338	382	428	476	574	676
	25				90	109	122	155	188	223	260	300	340	385	432	480	578	680
	30					110	123	156	189	224	261	301	341	386	433	481	579	681
	33						112	145	178	213	250	290	330	375	422	470	568	670
	35							114	147	180	215	251	291	331	376	423	521	623
	40								116	149	182	216	252	292	332	377	475	577
	45									118	151	183	217	253	293	333	431	533
	50										120	152	184	218	254	294	432	534
	55											122	153	185	219	255	433	535
	60												124	154	220	256	434	536
	65													126	155	221	435	537
	70														128	156	436	538
75															130	437	539	
80																132	540	
90																	134	

表 1-3 在 0 °C 下调整硫酸铵溶液饱和度计算表

		0 °C 硫酸铵终浓度 (%饱和度)																
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
硫酸铵初浓度 (%饱和度)		每 100ml 溶液加固体硫酸铵的克数																
	0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.5	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
	5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.8	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2
	10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7
	15	2.6	5.4	8.2	11.1	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2
	20		2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
	25			2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2
	30				2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8
	35					2.8	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.4	29.1	32.9	36.9	41.0	45.3
	40						2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	25.8	29.6	33.5	37.6	41.8
	45							2.9	5.9	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3
	50								3.0	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.0	26.8	30.8	34.8
	55									3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.5	27.3	31.3
	60										3.1	6.2	9.5	12.9	16.4	20.1	23.1	27.9
	65											3.1	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5	24.5
	70												3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	20.9
	75													3.2	6.6	10.1	13.7	17.4
	80														3.3	6.7	10.3	13.9
	85															3.4	6.8	10.5
90																3.4	7.0	
95																	3.5	

4. 盐析时的注意事项

(1) 在盐析过程中，首先要注意所添加的硫酸铵的纯度要高，否则夹带的杂质会使硫酸铵的浓度不准确，甚至引起蛋白质和酶的变性。其次添加硫酸铵后，要使其充分溶解，至少放置 30 min 以上，待蛋白质沉淀完全，然后将沉淀分离。

(2) 在同一溶液中欲分离几种蛋白质时，可采用分段盐析的方法。盐的饱和度由低到高逐次增加，每出现一种蛋白质沉淀即分离出来，然后增加盐的饱和度，使另一种蛋白质沉淀。

盐析通常与下述之等电点沉淀法相配合，即将蛋白质溶液的 pH 值调节到欲分离的蛋白质的等电点附近，再加进盐进行盐析。

(3) 由于高浓度的盐溶液对蛋白质有一定的保护作用，所以盐析操作一般可在室温下进行。而某些对热特别敏感的酶，则应在低温条件下进行。

(4) 在盐析条件相同的情况下，蛋白质浓度越高越容易沉淀。但浓度过高时，也容易引起其他杂蛋白的共沉作用。因此必须选择适当的浓度，尽可能避免共沉作用。

(5) 用盐析沉淀得到的蛋白质和酶，都含有所加进的盐。为获得较纯的产品，必须经过脱盐过程。脱盐方法最常用的是透析法。即把蛋白质溶液装进半透膜制成的透析袋或透析槽中，在低温条件下，对蒸馏水或缓冲液进行透析。盐的相对分子质量小，可透过半透膜扩散到水或缓冲液中；蛋白质和酶的相对分子质量大，不能透过半透膜而留在透析袋或透析槽中。通过水或缓冲液的不断更换，使蛋白质溶液中的盐分不断减少直至透析完全为止。为了防止微生物污染，透析时可加入适当的防腐剂。为了加快透析速度，可在外加电场下进行透析，称为电透析。电透析初期，由于透析袋内盐分较高，电压要低些，随着盐分的降低而逐渐升高电压以缩短透析时间。

此外，也可用凝胶层析法进行脱盐，还可用超过滤技术，在溶液浓缩的同时达到脱盐的目的。

(二) 等电点沉淀法

利用蛋白质在等电点时溶解度最低以及不同的蛋白质具有不同等电点这一特性，对蛋白质进行分离纯化的方法称为等电点沉淀法。

在等电点时，蛋白质分子的净电荷为零，消除了分子间的静电斥力，但由于水膜的存在，蛋白质仍有一定的溶解度而沉淀不完全，所以在实际使用时等电点沉淀法经常与盐析法或有机溶剂沉淀法联合使用。单独使用等电点法主要是用于去除等电点相距较大的杂蛋白。

在加酸或加碱调节 pH 的过程中，要一边搅拌一边慢慢加进，以便均匀，防止局部过酸或过碱。

(三) 有机溶剂沉淀法

有机溶剂与水作用能破坏蛋白质分子周围的水膜，同时有机溶剂能改变溶液的介电常数，导致蛋白质溶解度降低，而使蛋白质沉淀析出。利用不同蛋白质在不同浓度的有机溶剂中的溶解度不同而使蛋白质分离的方法，称为有机溶剂沉淀法。经常使用的有机溶剂是乙醇和丙酮。

有机溶剂沉淀法析出的蛋白质沉淀一般比盐析法析出的沉淀容易过滤或离心分离，分辨力比盐析法好，溶剂也容易除去，故常用于蛋白质和酶的分离。

有机溶剂沉淀法的缺点是易使蛋白质和酶变性，所以操作必须在低温条件下进行。蛋白质和酶沉淀分离后，应立即用水或缓冲液溶解，以降低有机溶剂浓度，避免变性。

有机溶剂在中性盐存在时可减少蛋白质的变性，提高分离效果，故一般在有机溶剂沉淀法使用时要添加 0.05 mol/L 的中性盐。而中性盐又会增加蛋白质在有机溶剂中的溶解度，故中性盐不宜添加太多。

有机溶剂沉淀法一般与等电点沉淀法联合使用。即操作时溶液的 pH 值应控制在欲分离蛋白质的等电点附近。

(四) 选择性变性沉淀法

选择一定的条件使溶液中存在的某些杂蛋白变性沉淀而不影响所需蛋白质的方法称为选择性变性沉淀法。例如：利用加热，改变 pH 或加进某些重金属离子等使杂蛋白变性沉淀而除去。

应用选择性变性沉淀法时，事先应对溶液中需除去的杂蛋白以及欲提纯的蛋白质的物理化学性质都有较为全面的了解。

第三节 核酸的提取与沉淀分离

核酸类化合物都溶于水而不溶于有机溶剂。所以核酸的提取一般采用水溶液提取，而沉淀分离则可采用有机溶剂沉淀法。

在细胞内，核酸通常和蛋白质结合以核蛋白的形式存在。核糖核酸与蛋白质结合成核糖核蛋白，脱氧核糖核酸与蛋白质结合成脱氧核糖核蛋白。所以提取出来的一般都是核蛋白。

两种核蛋白在不同浓度的电解质溶液中的溶解度有明显差别：在 0.14 mol/L 的氯化钠溶液中，核糖核蛋白的溶解度相当大，而此时脱氧核糖核蛋白的溶解度仅为在水中溶解度的百分之一；当氯化钠的浓度达到 1 mol/L 的时候，核糖核蛋白的溶解度小，而脱氧核糖核蛋白的溶解度比在水中的溶解度大 2 倍。所以应选用 0.14 mol/L 的氯化钠溶液提取核糖核蛋白，而选用 1 mol/L 的氯化钠溶液提取脱氧核糖核蛋白。

两种核蛋白在不同 pH 条件下溶解度也不相同，核糖核蛋白在 pH2.0~2.5 时溶解度最低，而脱氧核糖核蛋白则在 pH4.2 时溶解度最低。

一、核糖核酸的提取

核糖核酸 (RNA) 有三类，即转移核糖核酸 (tRNA)、信使核糖核酸 (mRNA) 和核糖体核糖核酸 (rRNA)。三种核酸的特性有所不同，其提取方法和提取条件有所差别。其中 tRNA (约占细胞内 RNA 的 15%) 的相对分子质量较小，在细胞破碎以后溶解在水溶液中，滤液用酸处理，调节到 pH5 即可得到“pH5 沉淀”，从中可分离得到 tRNA。mRNA 占细胞 RNA 的 5% 左右，很不稳定，提取条件要严格控制。rRNA 约占细胞内 RNA 的 80%，一般提取的 RNA 主要是 rRNA。

RNA 的提取方法主要有稀盐溶液提取和苯酚溶液提取。

(一) 稀盐溶液提取

首先将细胞破碎，制成细胞匀浆，然后用 0.14 mol/L 的氯化钠溶液反复抽提，得到核糖核蛋白提取液，再进一步与脱氧核糖核蛋白、蛋白质、多糖等分离，可得 RNA。

(二) 苯酚水溶液提取

在细胞破碎制成匀浆后 (从酵母或细菌中提取 tRNA，可不经细胞破碎)，加入等体积的 90% 苯酚水溶液，在一定条件下振荡一定时间，将 RNA 与蛋白质分开，并同时把 RNA 提取出来，结果 DNA 和蛋白质沉淀于苯酚层中，而 RNA 和多糖溶解于水层中。

苯酚溶液提取法操作时温度可控制在 2~5℃ 进行，称为冷酚法提取；也可控制在 60℃ 左右，称为热酚法提取。

苯酚溶液提取法的优点在于不需事先提取核糖核蛋白，而是直接将 RNA 与蛋白质、DNA 等初步分开，是目前提取 RNA 的常用而有效的方法。必须注意，市售的苯酚往往含有某些重金属和杂质，可能引起核酸的变性或降解。使用时，苯酚一般需要减压重蒸。

此外也可用表面活性剂，如十二烷基硫酸钠 (SDS)、二甲基苯磺酸钠等处理细胞匀浆

而提取 RNA。

二、脱氧核糖核酸的提取

脱氧核糖核酸 (DNA) 主要存在于细胞核中, 一般都以脱氧核糖核蛋白的形式存在。

从细胞中提取 DNA, 一般在细胞破碎后用浓盐法提取。即用 1 mol/L 的氯化钠溶液从细胞匀浆中提取脱氧核糖核蛋白, 再与含有少量辛醇或戊醇的氯仿一起振荡除去蛋白质。或者先以 0.14 mol/L 氯化钠溶液 (也可用 0.1 mol/L NaCl 加上 0.05 mol/L 柠檬酸代替) 反复洗涤除去核糖核蛋白后, 再用 1 mol/L 氯化钠溶液提取脱氧核糖核蛋白, 经氯仿-戊醇 (辛醇) 处理, 除去蛋白质, 而得到 DNA。

此外, 可用 SDS 提取核酸, 经除蛋白和 RNA, 而得 DNA。上述苯酚水溶液提取法亦可用于提取 DNA。即在水层提取 RNA 的同时, 在苯酚层得到 DNA 和蛋白质沉淀, 经进一步纯化可得 DNA。

三、核酸的沉淀分离

上述提取得到的核蛋白或核酸仍含有蛋白质、多糖和各种核酸同类物质, 必须进一步分离纯化以除去杂质。

在核酸分离纯化的整个过程中, 必须维持在 0~4 °C 的温度条件下, 以防止核酸的变性和降解。为防止核酸酶引起的水解作用, 可加入十二烷基硫酸钠 (SDS)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、8-羟基喹啉、柠檬酸钠等以抑制核酸酶的活性。

根据 DNA、RNA 与其他杂质的溶解性质不同, 可用各种沉淀分离法, 使核酸分离纯化。现将常用的沉淀分离法介绍如下:

1. 有机溶剂沉淀法

由于核酸都不溶于有机溶剂, 所以可在核酸提取液中加入乙醇或 2-乙氧基乙醇, 使 DNA 或 RNA 沉淀下来。

2. 等电点沉淀法

脱氧核糖核蛋白的等电点为 pH4.2; 核糖核蛋白的等电点为 pH2.0~2.5; tRNA 的等电点为 pH5。所以将核酸提取液调节到一定的 pH, 就可使不同的核酸或核蛋白分别沉淀而分离。

3. 钙盐沉淀法

在核酸提取液中加入一定体积比 (一般为 1/10) 的 10% 氯化钙溶液, 使 DNA 和 RNA 均成为钙盐形式, 再加进 1/5 体积的乙醇, DNA 钙盐即形成沉淀析出。

4. 选择性溶剂沉淀法

选择适宜的溶剂, 使蛋白质等杂质形成沉淀而与核酸分离, 这种方法称为选择性溶剂沉淀法。例如: ①在核酸提取液中加入氯仿-戊醇或氯仿-辛醇, 振荡一段时间, 使蛋白质在氯仿-水界面上形成凝胶状沉淀而离心除去, 核酸仍留在水溶液中。②在对氨基水杨酸等阴离子化合物存在下, 核酸的苯酚水溶液提取液中, DNA 和 RNA 都进入水层, 而蛋白质沉淀于苯酚层中被分离除去。③在 DNA 与 RNA 的混合液中, 用异丙醇选择性地沉淀 DNA 而与留在溶液中的 RNA 分离。

此外, 还可以用电泳、层析等方法使核酸分离纯化, 将在有关章节阐述。

第四节 实 验

实验 1-1 大肠杆菌细胞的超声波破碎

一、原理

微生物细胞在超声波的作用下，细胞结构受到破坏，而使细胞破碎。

二、试剂和材料

- (1) 超声波细胞破碎仪。
- (2) 冰浴：小烧杯一个，内装一些碎冰和一些水。
- (3) 细胞破碎缓冲液：10 mmol/L, pH7.4 Tris-HCl 缓冲液中含 5 mmol/L 的 $MgCl_2$ 。
- (4) 细胞悬浮液：取 50~100mg 大肠杆菌湿细胞悬浮在 1 ml 细胞破碎缓冲液中。
- (5) 培养基：牛肉膏 0.5%，蛋白胨 1%，NaCl 0.5% 制成肉汤液体培养基。取上述肉汤培养基加进 2% 琼脂，制成固体培养基，用作菌种活化与保藏。
- (6) 水浴恒温振荡器。
- (7) 离心机。

三、操作方法

1. 细胞培养和收集

将活化菌种接入肉汤培养基中，于 37℃ 振荡培养。当到达对数生长期后（约 6 h），用离心机收集细胞，8 000 r/min 离心 5 min，或 3 000 r/min 离心 20 min。

2. 细胞破碎

取湿细胞 50~100 mg 悬浮于 1 ml 细胞破碎缓冲液中。

用 20 kHz 频率，150 W 的功率，在冰浴中进行超声波细胞破碎，每破碎 60 s，间隔 60 s，反复破碎三次。

3. 溶胞液分离

破碎结束后，可通过测定破碎前后光密度的变化观测破碎效果。然后，用离心机在 8 000 r/min 条件下离心 5 min，除去未破碎的细胞，上清液为溶胞液，含有胞内各种成分。置于冰箱中保存。

实验 1-2 枯草杆菌碱性磷酸酶的提取与盐析

一、原理

枯草杆菌在无机磷受限制的培养中能合成碱性磷酸酶。该酶主要存在于细胞间质之中，用一定浓度的镁离子溶液，可将该酶提取到溶液中，再经硫酸铵盐析，可分离得到碱性磷酸酶。

碱性磷酸酶（EC 3.1.3.1）能在碱性条件下水解磷酸单酯，放出无机磷酸。用硝基酚

磷酸 (NPP) 为底物, 通过碱性磷酸酶作用, 生成硝基酚和磷酸; 在 420nm 波长下, 用分光光度计测定吸光度, 可测定酶活力。

在 420 nm 波长下, 吸光度每变化 0.001 定义为酶的一个活力单位。即:

$$\text{酶活力 (单位)} = \Delta OD_{420} \times 1000$$

二、试剂和材料

(1) 固体培养基: 牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1%, NaCl 0.5%, 琼脂 2% (pH7.4)。

(2) Tris 培养基: 葡萄糖 0.4%, 酪蛋白水解物 0.1%, NaCl 0.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%, KCl 0.1%, CaCl_2 0.1 mmol/L, MgCl_2 1 mmol/L, Na_2HPO_4 20 $\mu\text{mol/L}$, 溶解于 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中 (pH7.4)。

(3) 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH9.5)。

(4) 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4)。

(5) 40 mmol/L 对硝基酚磷酸溶液 (NPP 液)。

(6) 1 mol/L MgCl_2 溶液。

(7) 硫酸铵。

(8) 高速离心机。

(9) 水浴恒温振荡器。

(10) 分光光度计。

(11) 奈氏 (Nessler) 试剂: 5g KI 溶于 5 ml 水中, 加入饱和 HgCl_2 溶液, 不断搅拌, 至朱红沉淀不再溶解时, 加 40 ml 50% NaOH 溶液, 稀释至 100 ml, 静置过夜取上清液。

三、操作方法

1. 细胞培养与收集

将枯草杆菌 AS 1.398 在固体斜面培养基上活化, 接入 Tris 培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 10h 作为种子液。

将 5% 种量的种子液接入 100 ml Tris 培养基中 (用 2 个 250 ml 三角瓶), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 10 h。取样测酶活力。

将培养液用 8 000 r/min 离心分离 5 min, 收集菌体, 并用 0.1 mol/L, pH7.4 Tris-HCl 缓冲液洗涤菌体二次。

2. 碱性磷酸酶的提取

将上述湿菌体悬浮在 18 ml 0.1 mol/L, pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液中, 加入 2 ml 1mol/L MgCl_2 溶液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 30 min。用 3 000 r/min 离心分离, 取上清液, 此为粗酶液。在离心前后分别取样测定细胞悬浮液和粗酶液的酶活力, 从而计算提取率。

3. 硫酸铵盐析

将上述粗酶液, 在搅拌下慢慢加入硫酸铵粉末, 使达 50% 饱和度 (313 g/L, 25 $^{\circ}\text{C}$), 静置 30 min, 用 13 000 r/min 离心分离 20 min, 去除杂蛋白沉淀。上清液分成 5 份, 分别加进固体硫酸铵, 使达到 70%, 75%, 80%, 85% 和 90% 饱和度, 充分溶解后, 静置 30 min 以上, 用 13 000 r/min 离心分离 20 min。上清液取样测定残留酶活力, 计算沉淀率。