

新疆生产建设兵团

“生物化学”精品课程建设教材

SHENGWUHUAXUE JINGPINKECHENG JIANSHEJIAOCAI  
SHENGWUHUAXUE SHIYAN

# 生物化学实验

主 编 李树伟

 北京科学技术出版社

新疆生产建设兵团  
“生物化学”精品课程建设教材

# 生物化学实验

主 编 李树伟

副主编 张剑云

参 编 陈水红 应 璐

 北京科学技术出版社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学实验/李树伟主编. —北京:北京科学技术出版社, 2012.7 重印

ISBN 978-7-5304-5824-2

I. ①生… II. ①李… III. ①生物化学-实验-医学院校-教材 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 058743 号

## 生物化学实验

---

主 编: 李树伟  
责任编辑: 张晓雪  
责任校对: 黄立辉  
责任印制: 焦志炜  
封面设计: 晓 林  
出 版 人: 张敬德  
出版发行: 北京科学技术出版社  
社 址: 北京西直门南大街 16 号  
邮政编码: 100035  
电话传真: 0086-10-66161951 (总编室)  
          0086-10-66113227 (发行部)  
          0086-10-66161952 (发行部传真)  
电子邮箱: bjkjpress@163.com  
网 址: www.bkjpress.com  
经 销: 新华书店  
印 刷: 三河市国新印装有限公司  
开 本: 720mm × 1020mm 1/16  
字 数: 320 千  
印 张: 12.75  
版 次: 2012 年 4 月第 1 版  
印 次: 2012 年 7 月第 2 次印刷  
ISBN 978-7-5304-5824-2/Q·069

---

定 价: 32.00 元



京科版图书, 版权所有, 侵权必究。  
京科版图书, 印装差错, 负责退换。

# 前 言

生物化学是农业院校大多数专业的基础课，该课程是建立在坚厚的实验基础上。没有实验课，学生难以理解现代生物化学理论，也影响学生对相关课程（如细胞学、生理学、分子生物学、遗传学、微生物学等）的学习。因此，生物化学实验不仅是生物化学教学的重要组成部分，而且在培养学生分析问题和解决问题的能力，以及培养学生独立工作能力和严谨科学态度等方面，也有着不可替代的作用。

生物化学实验教学的宗旨是帮助学生学习生物化学基本原理及实验方法，掌握生物化学的基本技能，了解生物化学在生产实践中的重要意义，培养学生细致、认真、实事求是的科学作风。通过本实验课程的学习，要求学生正确、熟练地掌握电泳、离心、分光光度技术和分离提取、滴定、层析等常见的生物化学分析、制备技术，通过讲授和操作，学生将受到系统的生物化学方法和技术的基本训练，其目的在于使学生有一个完整的实际锻炼过程，为学生进入更高层次的学习或参加科研工作奠定基础。

全书分为三大部分。第一部分为生物化学主要实验技术原理。第二部分为基础实验和综合实验，基础实验包括蛋白质和氨基酸、核酸、酶和维生素、糖类、脂类和生物氧化六个系列，每个系列贯穿基础、设计、综合三方面技能训练，共设 38 个实验。

第三部分为附录，包括实验室规则、安全事项和常用试剂的配制等，以供实验参考。

本书是在使用多年的实验讲义的基础上编写而成，结合各专业的不同要求增加了内容的系统性和完整性，形成了本书的初稿，后经过反复斟酌完成了本书的修改工作。本书结合本校实际，应用于生物技术、应用生物科学、动植物检疫、动科、动医、水产、草业、林学、园艺、农学、植保等专业。本书在编写过程中参考了其他院校的实验教材，对内容进行了补充、修改和调整，在此对选用参考文献及有关资料的作者表示感谢。

本教材的内容均经过编者反复摸索研究后编写而成，但限于实验条件和水平，不足或不妥之处，恳请读者给予批评指正。

编者

2012年2月

# 目 录

<b>第一章 生化成分制备</b> .....	1
第一节 材料的培养、选择与预处理 .....	1
第二节 常用实验样品的处理 .....	2
<b>第二章 常用生化实验技术原理及应用</b> .....	16
第一节 电泳技术原理及应用 .....	16
第二节 分光光度法原理及应用 .....	29
第三节 离心技术原理及应用 .....	34
第四节 层析技术原理及应用 .....	41
第五节 DNA 重组技术 .....	49
<b>第三章 蛋白质与氨基酸</b> .....	53
实验一 醋酸纤维薄膜电泳法分离血清蛋白质 .....	53
实验二 蛋白质的含量测定 .....	58
实验三 纸层析法分离氨基酸 .....	66
实验四 脯氨酸含量的测定 .....	68
<b>第四章 核酸</b> .....	71
实验五 动物组织核酸的提取与鉴定 .....	71
实验六 菜花(花椰菜)中核酸的分离和鉴定 .....	75
实验七 DNA 的定量测定(二苯胺法) .....	78
实验八 RNA 的定量测定(地衣酚法) .....	79
实验九 紫外吸收法测定核酸的含量 .....	81

<b>第五章 酶和辅酶</b> .....	85
实验十 唾液淀粉酶活性观察 .....	85
实验十一 King 氏法测定转氨酶活性 .....	88
实验十二 琥珀酸脱氢酶的作用及竞争性抑制的观察 .....	92
实验十三 过氧化氢酶活力的测定 .....	94
实验十四 NBT 法测定超氧化物歧化酶(SOD)活力 .....	96
实验十五 硝酸还原酶活性测定 .....	99
实验十六 荧光法测定维生素 B <sub>2</sub> .....	101
实验十七 维生素 C 的提取和含量测定 .....	104
<b>第六章 糖类</b> .....	107
实验十八 血液葡萄糖含量的测定 .....	107
实验十九 蒽酮比色法测定植物组织中可溶性糖含量 .....	112
实验二十 砷钼酸比色法测定还原糖含量 .....	114
实验二十一 叶绿素含量的测定 .....	117
<b>第七章 脂类</b> .....	120
实验二十二 香草醛法测定血清总脂含量 .....	120
实验二十三 磷硫铁试剂法测定生物组织中固醇含量 .....	122
实验二十四 索氏抽提法测定粗脂肪含量 .....	124
实验二十五 脂肪酸的 $\beta$ -氧化 .....	126
<b>第八章 生物氧化</b> .....	131
实验二十六 植物总黄酮的提取与测定 .....	131
实验二十七 植物组织中丙二醛含量的测定 .....	133
实验二十八 发酵过程中无机磷的利用和 ATP 生成的测定 .....	135
<b>第九章 综合性实验</b> .....	140
实验二十九 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质相对分子质量 .....	140
实验三十 细胞色素 C 的制备及测定 .....	144

实验三十一	同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....	147
实验三十二	琼脂糖凝胶电泳分离 LDH 同工酶 .....	152
实验三十三	银耳多糖精品的制备及一般鉴定 .....	155
实验三十四	鱼油中不饱和脂肪酸 EPA 和 DHA 的制备 .....	157
实验三十五	植物血球凝集素的提取、分离及活性检测 .....	159
实验三十六	酶联免疫吸附实验(ELISA) .....	162
实验三十七	DNA 的 PCR 扩增及产物的琼脂糖凝胶鉴定和回收 .....	166
实验三十八	DNA 重组技术 .....	170
附 录	.....	175
参考文献	.....	195



1. 植物材料 植物叶片（如菠菜、小麦、三叶草、黑麦草的叶片）用水洗净即可使用，或在10h内置 $-4\sim -30^{\circ}\text{C}$ 冰箱中贮藏备用；种子则需要泡涨、去壳或粉碎后才可使用。

2. 动物材料 常选择有效成分含量高的脏器为原材料，而脏器中常含有较多的脂肪，易被氧化发生酸败，也会影响纯化操作和制品得率。因此，取得动物脏器之后需马上去除脂肪和筋皮等结缔组织，冲洗干净。若不马上进行提取纯化，应在最短的时间内骤冷（ $-45^{\circ}\text{C}$ ）后将其置于 $-10^{\circ}\text{C}$ 冰库（短期保存）或 $-70^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱（数月保存）中贮存。

常用的脱脂方法有：人工剥离脏器外的脂肪组织；浸泡在脂溶性有机溶剂（如丙酮、乙醚等）中脱脂；快速加热（ $50^{\circ}\text{C}$ 左右）和快速冷却的方法脱脂；利用油脂分离器使油脂与水溶液分离等。对于像脑下垂体一类的小组织，可经丙酮脱水干燥后，制成丙酮粉贮存备用；对于含耐高温有效成分（如肝素）的材料，可经沸水蒸煮处理，烘干后长期保存。

3. 微生物材料 微生物具有种类多、繁殖快、易培养、诱变简单和不受季节影响等许多特点，它们已成为制备生化成分的主要材料之一。一般用离心法就可分离菌体和上清液，胞外酶和某些代谢物可以从上清液中获得，它们可以置于低温下进行短期保存。而胞内有效成分需破碎菌体后进行分离提纯，湿菌体可在低温下进行短期保存，制成冻干粉后则可在 $4^{\circ}\text{C}$ 下保存数月。

## 第二节 常用实验样品的处理

### 一、动物血样的处理

#### （一）血液样品的采集

血液是生化分析中十分重要的样品之一。血液中各成分的生化分析结果是了解机体代谢变化的重要指标，因此必需掌握正确的血液样品的采集及处理的方法。

#### 1. 采血前准备

（1）采血器具准备：采血器皿及样品容器都必须清洁，充分干燥和冷

却后才能使用。抽取血液时，动作不宜太快，采出的血液要沿管壁慢慢注入盛血容器内。若用注射器取血时，采血后应先取下针头，再慢慢注入容器内。推动注射器时速度也不可太快，以免吹起气泡造成溶血。盛血的容器不能用力摇动以免溶血。为防止疾病的产生和蔓延，必须做到一动物一针，或使用一次性消毒采血针头。

(2) 实验动物准备：采血应在禁食 12h 后进行，这样可以将食物对血液各种成分浓度的影响减少到最低程度。血液中有些化学成分有明显的昼夜波动，如血浆皮质醇在早晨高而傍晚低，至午夜降到最低水平；血清铁也有类似的波动；有些成分在动物进食前后有所改变且进餐后血清容易出现浑浊，影响和干扰结果的准确性，如血糖（Glu）、总胆固醇（TC），碱性磷酸酶（ALP）等。

2. 对采血操作人员要求 实验动物在出现兴奋、恐惧等状态时，某些生化指标会发生变化，影响实验结果的准确性，例如，实验操作过程中动作的简单粗暴，会使实验动物体内血液循环加快，糖消耗加快，使血糖结果偏低，因此要求实验操作人员对待实验动物必须要有爱心，动作要轻柔。

3. 采血部位的确定 各种实验动物的采血部位和方法需视动物的种类、检验项目、试验方法及所需血量而定。一般较大动物如马、牛、猪等多由颈静脉采取；小动物如兔常由耳静脉采取，也可从颈静脉及心脏采血。犬由隐静脉，天竺鼠和大白鼠则由心脏采取，家禽由翼静脉和隐静脉及心脏采取。

#### 4. 血液采集注意事项

(1) 在采血时要避免溶血，溶血将造成成分混杂，引起测定误差。

(2) 动脉血和静脉血的化学成分略有差异，除血氧饱和度、二氧化碳分压等有明显不同以外，静脉血中乳酸的浓度比动脉血中的略高。

(3) 整个试验期间，选择采取血液样品的时间必须一致。

#### (二) 血清的制备

1. 血清的概念 血清是全血不加抗凝剂自然凝固后析出的淡黄清亮液体。其所含成分接近于组织间液，代表着机体内环境的物理化学性状，比全血更能反映机体的状态，是常用的血液样品。

2. 操作过程 将刚采集的血液直接注入试管，将试管倾斜放置，使血

液形成一斜面。夏季于室温下放置，待血液凝固后，即有血清析出；冬季，室温较低，不易析出血清，故需将血液置于 37℃ 水浴或温箱中促进血清析出。也可将刚采集的血液注入洁净的离心管中，待血液凝固后，以钝头玻璃棒将血块与管壁轻轻剥离，2000 ~ 2500r/min 离心 15min 便有血清析出。析出的血清应及时用吸管吸出、备用，若不清亮或带有血细胞，应离心；制备好的血清，应及时进行实验测定，否则应加盖冷藏备用。

### (三) 全血及血浆的制备

若要用全血或血浆作样品，必须在血液凝固前用抗凝剂处理血液。

1. 抗凝剂种类 实验室常用的抗凝剂有如下几种，可根据情况选择使用。

(1) 草酸钾（钠）：此抗凝剂优点是溶解度大，可迅速与血中钙离子结合，形成不溶性草酸钙，使血液不凝固。每毫升血液用 1 ~ 2mg 即可。

操作：配制 10% 草酸钾（钠）水溶液。吸取此液 0.1ml，放入试管中，慢慢转动试管，使溶液尽量铺散在试管壁上，置 80℃ 烘箱烤干（若超过 150℃ 则分解），管壁即呈一薄层白色粉末，加塞备用。每管可抗凝血液 5ml，此抗凝血液，常用于非蛋白氮等多种测定项目。不适用于钾、钙的测定。对乳酸脱氢酶、酸性磷酸酶和淀粉酶具有抑制作用，使用时应注意。

(2) 草酸钾 - 氟化钠：氟化钠是一种弱抗凝剂。但浓度 2mg/ml 时能抑制血液内葡萄糖的分解，因此在测定血糖时常与草酸钾混合使用。

操作：草酸钾 6g、氟化钠 3g，溶于 100ml 蒸馏水中。每个试管加入 0.25ml，于 80℃ 烘干备用，每管可抗凝 5ml 血液。此抗凝血，因氟化钠抑制脲酶，所以不能用于脲酶法的尿素氮测定，也不能用于淀粉酶及磷酸酶的测定。

(3) 乙二胺四乙酸二钠盐（EDTANa<sub>2</sub>）：EDTANa<sub>2</sub>，易与钙离子络合而使血液不凝，有效浓度为 0.8mg，可抗凝 1ml 血液。

操作：配成 4% EDTANa<sub>2</sub> 水溶液。每管装 0.1ml，80℃ 烘干。可抗凝 5ml 血液。此抗凝血液适用于多种生化分析。但不能用于血浆中含氮物质、钙及钠的测定。

(4) 肝素：最佳抗凝剂，主要抑制凝血酶原转变为凝血酶，从而抑制纤维蛋白原形成纤维蛋白而凝血。0.1 ~ 0.2mg 或 20U 可抗凝 1ml 血液。

操作：配成 10mg/ml 的水溶液。每管加 0.1ml 于 37 ~ 56℃ 烘干，可抗凝 5 ~ 10ml 血液（市售品为肝素钠溶液，每毫升含 12500IU，相当于 100mg，故每 125IU 相当于 1mg）。

注意：抗凝剂用量不可过多，如草酸盐过多，将造成钨酸法制备血滤液时蛋白质沉淀不完全，测氮时加奈氏试剂后易产生浑浊等现象。

2. 全血的制备 全血是指抗凝的血液，即在血液取出后立即与适量的抗凝剂充分混合，以免血液凝固。抗凝剂预加于准备承接血液的容器中，抗凝剂的种类可以根据实验的需要进行选择。将刚采取的血液注入预先加有适合要求的抗凝剂试管中，轻轻摇动，使抗凝剂完全溶解并分布于血液中。

3. 血浆的制备 血浆是指抗凝血浆。游离血红蛋白、变性血红蛋白、纤维蛋白原的测定须用血浆。将已抗凝的全血放置一段时间或于 2000r/min 离心 10min，沉降血细胞，上层清液即为血浆。分离较好的血浆应为淡黄色。为避免产生溶血，必须采用干燥清洁的采血器具和容器，尽量少振荡。血浆比血清分离的快而且量多。两者的差别主要是血浆比血清多含一种纤维蛋白原，其他成分基本相同。

4. 血液的量取 已制备好的抗凝血液放置后红血细胞将自然下沉，往往造成量取全血时的误差。因此量取全血时，血液必须充分混合，以保证血细胞和血浆分布均匀。其操作如下：

(1) 血液混匀法：若血液装在试管中，可用玻璃塞或洁净干燥的橡皮塞，塞严管口。缓慢上下颠倒数次，使血细胞、血浆均匀混合。颠倒时切不可用力过猛，以免溶血。也可用一弯成脚形的小玻璃棒插入管内，上下移动若干次，使完全混匀。血液混匀后应立即量取，且每次量取前都必须重复此操作。

(2) 准确量取法：用吸管量取血液时，要将已充分混匀的血液吸至需要量取血液容量的稍上方处，用滤纸片擦净吸管外壁黏着的血液，而后使血液慢慢流至刻度，放出多余血液。再次擦净管尖血液。然后运用示指压力控制流出速度，慢慢把血液放入容器内，将最后一滴吹入容器内（若是不应吹的吸管，则将管尖贴在容器的壁上转动几秒钟，使液体尽量流出即可）。血液流出后，管壁应清明而看不到血液薄层附着。

#### (四) 无蛋白血滤液的制备

测定血液或其他体液的化学成分时，样品内蛋白质的存在常常干扰测定。因此，需要先做成无蛋白血滤液再行测定。无蛋白血滤液制备的基本原理是以蛋白质沉淀剂沉淀蛋白，用过滤法或离心法除去沉淀的蛋白。常用的方法有：

##### 1. 福林 - 吴宪 (Folin - Wu) 氏法 (钨酸法)

(1) 原理：钨酸钠与硫酸混合，生成钨酸，反应式  $\text{Na}_2\text{WO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{H}_2\text{WO}_4 + \text{Na}_2\text{SO}_4$ 。血液中蛋白质在 pH 值小于等电点的溶液中可被钨酸沉淀。沉淀液过滤或离心，上清液即为无色而透明、pH 值约等于 6 的无蛋白滤液。可供非蛋白氮、血糖、氨基酸、尿素、尿酸及氯化物等项测定使用。

(2) 试剂：①10% 钨酸钠。称取钨酸钠 ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 100g 溶于少量蒸馏水，最后加蒸馏水至 1000ml。此液以 1% 酚酞为指示剂，试之应为中性 (无色) 或微碱性 (呈粉红色)。②1/3mol/L 硫酸溶液。

(3) 操作：①取 50ml 锥形瓶或大试管 1 支；②吸取充分混匀的抗凝血 1 份，擦净管外血液，缓慢放入锥形瓶或试管底部；③准确加入蒸馏水 7 份，混匀，使完全溶血；④加入 1/3mol/L 硫酸溶液 1 份，随加随摇；⑤加入 10% 钨酸钠 1 份，随加随摇；⑥放置约 5min 后，如振摇亦不再发生泡沫，说明蛋白质已完全变性沉淀。用定量滤纸过滤或离心 (2500r/min, 10min)，即得完全澄清无色的无蛋白血滤液。

制备血浆或血清的无蛋白血滤液与上述方法相似。不同点是加水 8 份，而钨酸钠和硫酸各加 1/2 份。

2. 黑登 (Haden) 改良法 取血液 1 份加入锥形瓶或大试管中，加入 8 份 1/24mol/L 硫酸溶液，此时血细胞迅速破裂，颜色变黑 (若反应进行较慢，可振摇容器以加速反应进行)，再加入 10% 钨酸钠 1 份，摇匀，过滤或离心即可。以此方法准备无蛋白滤液的优点是产生的滤液较多。

用上述任何方法制得的血滤液，都是将原来样品稀释 10 倍 (1:10)。所以 1ml 无蛋白血滤液相当于 0.1ml 的全血、血浆或血清。

##### 3. 氢氧化锌法

(1) 原理：血液中蛋白质在 pH 值大于等电点的溶液中可用  $\text{Zn}^{2+}$  来沉淀。生成的氢氧化锌本身为胶体，可将血中葡萄糖以外的许多还原性物质

吸附而沉淀。所以，此法所得滤液最适做血液葡萄糖的测定。

(2) 试剂：①10% 硫酸锌溶液：称取硫酸锌 ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 10g 溶于蒸馏水并定容至 100ml；②0.5mol/L 氢氧化钠溶液。

(3) 操作：①取干燥洁净 50ml 锥形瓶或大试管 1 支，准确加入 7 份水；②准确加入混匀的抗凝血 1 份，摇匀；③加入 10% 硫酸锌溶液 1 份，摇匀；④慢慢加入 0.5mol/L 氢氧化钠溶液 1 份，边加边摇。放置 5min，用定量滤纸过滤或离心 (2500r/min, 10min)。得清明透亮的滤液，此滤液稀释 10 倍。

#### 4. 三氯醋酸法

(1) 原理：三氯醋酸能使蛋白质变性而沉淀。

(2) 试剂：10% 三氯醋酸溶液。

(3) 操作：取 10% 三氯醋酸 9 份置于锥形瓶或大试管中，加 1 份已充分混匀的抗凝血液。加液时要不断摇动，使其均匀。静置 5min，过滤或 2500r/min 离心 10min。即得 10 倍稀释的清明透亮的滤液。

## 二、细胞破碎方法

多数生化成分都存在于细胞内，或游离在细胞质中，或与细胞器紧密结合（如氧化还原酶），或分布在细胞核（如 DNA）中。这些胞内生化成分在进行提取时，必须先把细胞破碎，做成组织匀浆后才能进行分离和提取。所以生化实验中，破碎组织细胞使细胞内容物悬浮于缓冲液中形成混悬液是重要的操作之一。

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同。一般动物细胞的细胞膜较脆弱易破损，经常在组织绞碎或提取时就被破坏了，而植物和微生物细胞的细胞壁较牢固，在提取前需要进行专门的细胞破碎操作。常用的方法有以下几种。

1. 研磨法 将剪碎的生物材料直接置于研钵中，用研棒研碎。通常在研磨时加入一定量的石英砂以提高研磨效果，这时需要注意石英砂对有效成分的吸附作用。用匀浆器处理也能破碎动物细胞，该方法较温和，适宜实验室用。如果要进行大规模生产，则可采用电动研磨法。此法多用于肝脏、植物叶片等柔软组织。

制作组织匀浆需要在低温下快速进行。组织器官离体后就应放置于冰

冷溶液中处理，匀浆时，匀浆器相互摩擦而产生高热，易使酶变性，所以在匀浆器轴的中空部要放入冰盐溶液，匀浆器外套管也应用冰盐溶液冷却。

2. 组织捣碎器法 这是一种用组织捣碎机（即高速分散器，转速8000 ~ 10000r/min）处理30 ~ 45s就可将植物和动物细胞完全破碎的方法，该法的优点是快速，但应注意由于瞬间高温可能会引起蛋白质的变性，多用于心脏等坚实组织。操作时亦可先用组织捣碎机捣成粗组织糜，然后再用玻璃匀浆器磨碎。该方法是一种剧烈的细胞破碎法，捣碎期间需保持低温，并且时间不能太长。破碎微生物细胞时，需要加入石英砂才更有效。

3. 反复冻融法 将待破碎的细胞冷至-15 ~ -20℃，然后放于室温（或40℃）迅速融化，如此反复多次，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。此法多适用于含对温度不敏感有效成分的动物材料，如红细胞的破碎。

4. 超声波法 此法是借助超声波的振动力破碎细胞壁和细胞器，破碎时间一般为3 ~ 15 min。破碎微生物细菌和酵母菌时，时间要长一些，在细胞悬浮液中如加入石英砂则可缩短处理时间。

#### 5. 溶胀和自溶法

(1) 溶胀：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。例如，将红细胞置于清水中，它会迅速溶胀破裂释放出血红蛋白。

(2) 自溶：是指细胞结构在一定的pH和适当的温度下，利用其自身所具有的各种酶系（如蛋白水解酶等多种水解酶）使其自身发生溶解的现象。该法所需时间较长，操作时需特别小心，以防止有效成分在细胞自溶时分解。

6. 有机溶剂处理法 利用氯仿、甲苯、丙酮等脂溶性溶剂或SDS（十二烷基硫酸钠）等表面活性剂处理细胞，可将细胞膜溶解，从而使细胞破裂，使细胞释放出各种酶类等物质，此法也可以与研磨法联合使用。

7. 生物酶解法 许多生物酶（如纤维素酶、溶菌酶、蜗牛酶等）都具有专一性降解细菌细胞壁的作用。用这种方法处理细菌细胞时，先是使细胞壁破坏，然后由渗透压差引起细胞膜破裂，最后导致整个细胞完全破

碎。例如，从细菌细胞中提取质粒 DNA 时，有很多方法都采用了加溶菌酶破碎细胞壁的步骤。

8. 急热骤冷法 先将样品材料投入沸水中，维持 85 ~ 90℃ 15min 后，再置于冰浴中急速冷却，使细胞迅速破碎。这种方法常用于含对热不敏感有效成分的细菌或病毒材料。

### 三、生物大分子抽提

“抽提”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、保持其生物活性的过程。抽提效果的好坏，关键在于溶剂的选择。选择溶剂的原则是：在所选溶剂中，目的产物溶解度大，同时又能有效保持其生物活性，而多数杂蛋白变性沉淀。

蛋白质和酶可以采用稀盐溶液、缓冲液、稀酸或稀碱、有机溶剂等抽提。

1. 稀盐溶液 离子强度对生物大分子的溶解度有极大的影响，绝大多数蛋白质和酶，在低离子强度的溶液中都有较大的溶解度，如在纯水中加入少量中性盐，蛋白质的溶解度比在纯水时大大增加，称为“盐溶”现象。盐溶现象的产生主要是少量离子的活动，减少了偶极分子之间极性基团的静电吸引力，增加了溶质和溶剂分子间相互作用力的结果。

2. 稀酸或稀碱 蛋白质、酶的溶解度和稳定性与 pH 值有关，在酸碱环境中蛋白质或酶的溶解度增加，但过酸、过碱都容易引起蛋白质变性失活。一般提取溶剂的 pH 值应在蛋白质和酶的稳定范围内，常常将 pH 值控制在 6 ~ 8，在偏离等电点的两侧。

3. 有机溶剂 一些和脂类结合比较牢固或分子中非极性侧链较多的蛋白质和酶难溶于水、稀盐、稀酸或稀碱中，常用不同比例的有机溶剂提取。

常用的有机溶剂有乙醇、丙酮、异丙醇、正丁酮等，这些溶剂可以与水互溶或部分互溶，同时具有亲水性和亲脂性。有些蛋白质和酶既溶于稀酸、稀碱，又能溶于含有一定比例的有机溶剂的水溶液中，在这种情况下，采用稀的有机溶液提取常常可以防止水解酶的破坏，并兼有除去杂质提高纯化效果的作用。提取时为防止蛋白质和核酸变性或降解，需要注意



以下几点：一般在  $0 \sim 5^{\circ}\text{C}$  的低温操作；可以加入降解酶的抑制剂；搅拌时要温和，速度太快容易产生大量泡沫，增大了与空气的接触面，会引起酶等物质的变性失活。

#### 四、生物大分子的分离纯化

由于生物体的组成成分非常复杂，数千种乃至上万种生物分子处于同一体系中，因此不可能有一个适合于各类分子的固定的分离程序，但多数分离工作关键部分的基本手段是相同的。常用的分离纯化方法和技术有：沉淀法（包括盐析、有机溶剂沉淀、选择性沉淀等）、离心、透析、超过滤、减压浓缩冷冻干燥、吸附层析、凝胶过滤层析、离子交换层析、亲和层析以及等电聚焦制备电泳等。

1. 沉淀法 沉淀是溶液中的溶质由液相变成固相析出的过程。沉淀法是分离纯化生物大分子，特别是制备蛋白质和酶时最常用的方法。操作简便，成本低廉。基本原理是根据不同物质在溶剂中的溶解度不同而达到分离的目的，不同溶解度的产生是由于溶质分子之间及溶质与溶剂分子之间亲和力的差异而引起的，溶解度的大小与溶质和溶剂的化学性质及结构有关，溶剂组分的改变或加入某些沉淀剂以及改变溶液的 pH 值、离子强度和极性都会使溶质的溶解度产生明显的改变。

最常用的几种沉淀方法是 ① 中性盐沉淀（盐析法）：多用于各种蛋白质和酶的分离纯化；② 有机溶剂沉淀：多用于蛋白质和酶、多糖、核酸以及生物小分子的分离纯化；③ 选择性沉淀（热变性沉淀和酸碱变性沉淀）：多用于除去某些不耐热的和在一定 pH 值下易变性的杂蛋白；④ 等电点沉淀：用于氨基酸、蛋白质等两性物质的沉淀，但此法单独应用较少，多与其他方法结合使用和有机聚合物沉淀：是发展较快的一种新方法，主要使用聚乙二醇（polyethylene glycol, PEG）作为沉淀剂。

（1）盐析法：原理是蛋白质在高浓度盐的溶液中，随着盐浓度的逐渐增加，由于蛋白质水化膜被破坏、溶解度下降而从溶液中沉淀出来。因各种蛋白质的溶解度不同，故而可利用不同浓度的盐溶液来沉淀分离各种蛋白质。

盐析法提纯蛋白质时应注意：① 盐的种类：蛋白质盐析常用中性盐，主要有硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、氯化钠、磷酸钠等。应用最广泛的是硫