

基础生化实验与技术

JICHU SHENGHUA SHIYAN YU JISHU

主编 蔚荣海 崔喜艳 于少华

吉林大学出版社

基础生化实验与技术

[!\[\]\(529949c2c3dadbaa4e538e8c643454bc_img.jpg\)](#)
[!\[\]\(9d83b67c094360bb3c4e3b68ca3d779f_img.jpg\)](#)
[!\[\]\(7dbe5b492efc9d2ec2df517769c7fbf7_img.jpg\)](#)

基础生化实验与技术

主编 蔚荣海 崔喜艳 于少华

吉林大学出版社

主 编 蔚荣海 崔喜艳 于少华

编 者 (姓氏笔划为序)

于少华 宋 慧 匡亚兰

崔喜艳 蔚荣海

主 审 宋 慧

基础生化实验与技术

主编 蔚荣海 崔喜艳 于少华

责任编辑、责任校对:孟亚黎

封面设计:孙昌武

吉林大学出版社出版
(长春市解放大路 125 号)

吉林大学出版社发行
长春市永昌印刷厂印刷

开本:787×1092 毫米 1/16

2000 年 9 月第 1 版

印张:7.875

2000 年 9 月第 1 次印刷

字数:167 千字

1—3 000 册

ISBN7-5601-2402-x/O·257

定价:11.40 元

前 言

现代生物化学的飞速发展得益于现代生化实验技术的不断改进及应用,两者相互促进,相辅相成。生化实验技术已被广泛地应用于现代农业科学、生物学、医学及食品科学等领域的研究中。现代分子生物学实验技术已成为生化实验技术的最前沿。本书结合农业院校的实际特点,针对现代农业科学所需要的研究手段,扼要地介绍了各种生化技术的原理、生物大分子及生物活性物质制备过程的注意事项及一般程序。全书分为两部分:一部分为生化技术理论内容;另一部分为实验内容。共选择了三十一个最基本又能在农业科研中经常使用的实验。在内容上努力介绍适合一般设备条件下的实验技术方法,既做到了选材的精练性和文字的简洁性,又保证了理论与实践的相结合。本教材适于农学类本科生教学使用,同时也可作为研究生及相关科研工作者的工具书、参考书。由于编者水平有限,不足之处在所难免,欢迎读者给予批评指正。

编 者
2000 年 7 月

目 录

第一部分 生化技术原理

第一章 生化分离制备的特点与原理	(1)
第一节 生化分离制备方法的特点	(1)
第二节 生化分离制备方法的原理	(2)
第三节 生化分离制备的分析鉴定方法	(3)
第四节 生化分离制备中材料提取方法的选择	(4)
第五节 生化分离制备中分离纯化方法的选择	(6)
第二章 几种物质的提取分离	(7)
第一节 蛋白质和酶的提取分离	(7)
第二节 核酸的提取分离	(10)
第三节 脂类化合物的提取分离	(13)
第四节 糖、氨基酸及其他水溶性生化物质的提取分离	(14)
第五节 植物次生物的提取及溶剂系统分离的选择	(14)
第三章 生化分离制备中几个最常用的技术	(16)
第一节 层析分离技术	(16)
第二节 电泳技术	(28)

第二部分。实验内容

实验一 氨基酸的纸层析法	(36)
实验二 游离氨基酸总量的测定(茚三酮法)	(38)
实验三 蛋白质色氨酸含量的直接测定	(40)
实验四 蛋白质含量的测定(考马斯亮蓝 G-250 法)	(42)
实验五 蛋白质等电点的测定	(44)
实验六 凯氏定氮法测定蛋白质含量	(46)
实验七 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质分子量	(50)
实验八 凝胶层析脱盐(SephadexG-25)	(54)
实验九 植物组织中核酸的提取和测定	(57)
实验十 酵母核糖核酸的提取	(62)
实验十一 植物组织中 DNA 的快速提取	(64)
实验十二 醋酸纤维薄膜电泳分离核苷酸	(66)
实验十三 5'-核苷酸定量测定(过碘酸氧化法)	(68)

实验十四	酶的性质	(71)
实验十五	淀粉酶活性的测定	(74)
实验十六	植物过氧化物酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳	(76)
实验十七	过氧化物酶活性的测定	(79)
实验十八	过氧化氢酶活性的测定	(81)
实验十九	邻苯三酚自氧化法测定 SOD(超氧化物歧化酶)活性	(83)
实验二十	脲酶 K_m 值简易测定法	(85)
实验二十一	比色法快速测定淀粉含量	(87)
实验二十二	总糖和还原糖的测定(菲林氏法)	(89)
实验二十三	还原糖的快速测定法	(92)
实验二十四	糖的定量测定(蒽酮法)	(94)
实验二十五	维生素 C 含量的测定(2,6-二氯酚靛酚法)	(96)
实验二十六	维生素 E 含量的测定	(98)
实验二十七	维生素 B ₂ (核黄素)含量的测定(荧光法)	(100)
实验二十八	粗脂肪含量的测定(残余法)	(102)
实验二十九	脂肪酸纸层析法	(104)
实验三十	游离脂肪酸含量的快速测定	(106)
实验三十一	PCR 技术	(107)
附录		(109)
一、实验室规则		(109)
二、实验室基本操作		(109)
(一)玻璃仪器的洗涤		(109)
(二)搅拌和振荡		(110)
三、常用仪器的使用		(110)
(一)容量玻璃仪器的使用方法		(110)
(二)台秤		(112)
(三)分光光度计		(112)
(四)电动离心机		(114)
(五)干燥箱和恒温箱		(115)
(六)电热恒温水浴		(115)
附表 I	常用缓冲液的配制	(116)
附表 II	市售酸碱的密度和浓度	(119)
附表 III	常用基准物质的干燥温度和应用范围	(119)
附表 IV	酸碱指示剂	(120)

第一部分 生化技术原理

第一章 生化分离制备的特点与原理

生物大分子,尤其是蛋白质、酶、核酸、脂类等各自具有独特的结构与功能,根据它们各自的理化性质而建立起相对独立的分离提纯技术。这种生化分离制备的主要对象由于是特殊的生理活性物质,因此与一般的化学分离制备有着一定的区别。

第一节 生化分离制备方法的特点

生化分离技术是化学分离技术的一个分支。生化分离技术由于实验目的的不同,可分为生化分析和生化制备两个方面。前者主要对生物体内各组分加以分离后进行定性、定量鉴定,它不一定要把某组分从混合物中分离提取出来;而后者则主要是为了获得生物体内某一单纯组分。与一般化学分离制备技术比较,生化分离制备有自己的特点:

(1)生物材料组成是非常复杂的。一个生物材料常包括数百种甚至数千种化合物,其中有不少化合物迄今还是未知物质,而且某些化合物在分离时仍不断在代谢变化中。

(2)有些化合物在生物材料中含量极微。有的提取物只占生物材料的几十万分之一,甚至百万分之一。

(3)许多具有生物活性的化合物一旦离开了生物体内的环境,很易变性、破坏。因此,在分离过程中要十分注意保护这些化合物的生理活性,许多生物大分子在分离过程中,过酸、过碱、重金属离子、高温、剧烈的机械作用、强烈的辐射和机体内自身酶的作用均可破坏这些分子的生物活性。

(4)生化分离方法几乎都在溶液中进行。各种参数(温度、pH值、离子强度等)对溶液中各组分的综合影响常常无法固定,以致许多实验的设计理论性不强,实验结果常常有很大经验性。

(5)为了保护被提取物质的生物活性及结构上的完整,生化分离方法多采取温和的“多阶式”方法进行,一种物质的分离制备常常多至十几个步骤,并不断变换各种分离方法,才能达到纯化目的。因此,制备操作时间长、手续繁琐,给制备工作带来困难。

第二节 生化分离制备方法的原理

生化分离制备技术,大都是根据物理或化学某一原理建立起来的,但其主要原理不外乎有两个主要方面:一是根据混合物中的不同组分分配率的差别把它们分配于可用机械方法分离的两个或几个物相中(如有机溶剂抽提、盐析、分配层析、结晶等);二是将混合物置于单一物相中,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、超滤、电渗析、离心等)。除了一些小分子如氨基酸、脂肪酸、某些维生素及固醇类外,几乎所有有机体中大分子物质都不能融化,也不能蒸发,只限于分配在固相和液相中,并在这两相之间相互交替进行分离纯化。许多生化分离制备方法都可以看做是各种溶质分子在溶液中运动,并在一定时间内只有一个运动方向,它受两个不同方向力(F_1 、 F_2)的作用。

F_1 表示与溶质分子运动方向相同的推动力; F_2 表示与溶质分子运动方向相反的阻滞力。作为推动力可能是流体动力(如色谱)、电场力(如电泳)、重力、离心力(如沉降)及其他作用力,如扩散、渗透中的分子运动等。许多分离方法常常不止一种推动力,而是几种推动力共同起作用。阻滞力一般包括:

- (1)在均一溶液中分子的摩擦效应
- (2)极化分子的静电作用,尤其是生物大分子溶质与溶液中其他溶质分子的静电引力,往往成为这些大分子溶质运动时遇到的主要阻力。
- (3)溶质在两相中的分配系数及分子筛效应等。
- (4)吸附作用、渗透作用及其他因素所引起的阻滞力。

因此,溶质分子A的移动速度取决于 $F_1^A - F_2^A = \Delta F^A$,而溶质分子B的移动速度取决于 $F_1^B - F_2^B = \Delta F^B$ 。溶质分子A与溶质分子B的分离效果将取决于 $\Delta F^A / \Delta F^B = \Delta F$ 的比值。所以,在分离混合物的各组分时,必须尽量设法扩大各组分之间的 ΔF 的差别,以使各组分之间完全分离。

各种分离方法中 F_1 、 F_2 及分离时主要依据如表 1-1 所示:

表 1-1 生化分离方法分类表

分离方法	推动力 F_1	阻滞力 F_2	占优势的作用力	分离主要依据
一、色谱				
(a)吸附	流体动力	表面能、范德瓦尔斯力、位阻效应	F_2	极性、位阻因素
(b)离子交换	流体动力	静电吸引力、极化度、分子筛效应	F_2	离子性质、分子大小
(c)分配	流体动力	渗透(扩散)、偶极作用、缔合和解离效应	F_2	极性因素
(d)分子筛	流体动力	渗透作用	F_2	分子大小
二、逆流分配	机械作用	渗透、缔合和解离效应	F_2	极性因素

续表 1-1

分离方法	推动力 F_1	阻滞力 F_2	占优势的作用力	分离主要依据
三、电场力				
(a) 在自由溶液中	静电引力	分子摩擦力、极化度、动电作用	F_2	离子性质
(b) 在多孔支持物中	静电引力	分子摩擦力、极化度、动电作用、表面能	F_1	离子性质
(c) 在凝胶支持物中	静电引力	分子筛效应	F_1 和 F_2	离子性质及分子大小
(d) 等电聚焦	静电引力	平衡作用	离子性质	
(e) 对流电泳	静电引力、电动力	分子摩擦效应	F_1	离子性质
(f) 电渗析	静电引力、电动力	分子筛效应	F_1 和 F_2	分子大小及离子性质
四、扩散方法				
(a) 透析	渗透力	分子筛效应	F_2	分子大小
(b) 超滤	流体动力	分子筛效应表面能	F_2	分子大小
(c) 在溶液中热扩散	温度梯度重力	分子摩擦效应	F_2	分子大小
五、结晶	结晶格子能	扩散	F_1	分子大小及形状
六、沉降				
(a) 动力学的	重力、离心力	分子摩擦效应	F_1	分子大小
(b) 等密度的	离心力	分子大小及介质密度		
七、亲和层析	生物功能专一性			

第三节 生化分离制备的分析鉴定方法

生化分离制备实验目的性质尽管各有不同,但都必须首先建立对制备物的分析鉴定方法。生化物质分离制备工作的分析鉴定方法大致可分为三种类型:

1. 生物测定方法

对一个未知结构的新物质,生物测定方法常常比一般物理化学方法具有更大优越性,并且是实验取得成功必不可少的一步。因为生物体在亿万年的进化过程中,逐步形成了一套相对稳定的代谢系统。当生物体内每种物质的含量突然升高或降低时,都可能引起生物的异常反应。

生物测定方法的应用范围常包括三方面:

(1) 检出所制备的有效成分的存在,以指导分离提纯工作进一步进行。

(2) 某些生物制品中当其含量及功效用理化方法不能准确地测定和表达时,常用生物方法测定这些物质的量和功效;或虽然能使用某些理化方法进行定性定量,但生理活性的大小,最后仍以生物测定的结果来表达者。

(3) 各种生化制品作为医学研究及应用对象时,需做一系列安全实验者。

一个生物测定方法的建立,必须先选择适当的生物对象,继而决定测试的生物反应类型。如细菌的生长和抑制,食物中缺乏某种维生素可以引起维生素缺乏症,受到实验物质刺激后某种组织分泌物增加或减少等。然后在这些定性反应基础上进一步建立生物反应的定量标准。

2. 理化测定方法

这是最常用最方便的分析测定方法,生物测定法虽然有很高特异性,但手续繁琐,对于指导分离制备实验的进行,时间上太受限制。因此,对于一个未知化学结构的物质,在生物

反应测定确定其存在后,应立即着手建立理化测定方法。理化测定方法的建立一般是先进行预备试验,初步肯定该物质属于哪一类有机物,然后按各类有机物质的特殊理化性质建立定性、定量鉴定方法,这类方法有:

(1)呈色法:包括染色和比色法。

(2)色谱法:包括纸上色谱、薄层色谱、气相色谱、高效液相色谱、离子交换层析、亲和层析等。

(3)光谱法:包括紫外光谱、红外光谱、荧光光谱等。

(4)电泳法:包括纸电泳、凝胶电泳等。

(5)核磁共振波谱法。

(6)其他:如电子显微镜观察。

理化测定方法的最大优点是实验操作简便、快速,能及时指导分离工作。

3. 理化方法和生物学方法结合测定

对于某些生物体内含量较低,或所建立的理化测定方法的特异性和灵敏度不足以反应物质定性与被告量的要求时,常需要结合生物学测定方法才能全面地准确地反应该物质的存在情况。理化分析方法与生物学测定方法相结合,用于各类抗菌素、信息素、激素、维生素和具有生理活性的生化药物的定性及定量相当普遍。

第四节 生化分离制备中材料提取方法的选择

选择材料主要根据实验的目的而定。从生产角度上考虑,首先是材料来源丰富、含量高、成本低。有时材料来源丰富但含量不高,或材料来源、含量都很理想,而材料中杂质太多,分离纯化手续十分繁琐,以致影响质量和收率,反不如含量低些但易于操作获得纯品者。但为了科学研究的某种特殊需要,例如从某种材料或某一生物品种中寻找未知物质,选材时就不必全面考虑上述问题,只要达到实验目的就可以了。

生物体内某种成分不是一成不变的。如植物材料所含各种成分常随季节和生长时期而变化,动物材料中的各种组分处于不同生理状态也有很大差别。微生物材料中各组分的变化受环境因子影响尤为显著。因此,必须因时、因地和根据实验目的要求而具体解决。一个材料选择是否合理,不仅关系到实验进行的难易,而且常常是导致实验成败的原因。

材料选定之后,通常要进行预处理。如动物组织先要剔除结缔组织、脂肪组织等非活性部位;植物种子要先去壳、除脂;微生物纯净菌体的获得。如所得材料不是立即进行实验,则应冷冻保存。制备某些易在体内被分解的活性生物大分子,应用新鲜材料。

材料处理及洗净以后,应选用适当方法将组织细胞破碎,进行抽提。材料中被制备物质的存在形式及部位与组织细胞破碎及抽提方法有直接关系,必须在实验前明确。如属生物体分泌到体外的分泌物,则不必进行组织细胞破碎,但细胞内含物不论存在哪些部位,均需采取不同方法进行细胞破碎。组织细胞的破碎方法很多,常用的破碎方法如下:

(一)机械法

此法包括:高速组织捣碎机、匀浆器、研磨法、压挤法等。

1. 高速组织捣碎机

转速最高可达1~2万转/min, 适宜于动物内脏组织、植物肉质种子、柔嫩的叶和芽等材料的破碎, 但高速操作, 有其不利之处, 制备较大分子如核酸就很少使用。

2. 匀浆器

用这种方法可以产生足够的切变力来打碎较薄的动物细胞膜, 对生物大分子破坏较少, 但不容易打碎植物和细菌的细胞。

3. 研磨法

常用的有研钵和研磨, 加入一些磨料(如玻璃粉、石英砂、氧化铝等)效果好。细菌及植物材料应用较多。将材料与磨料混合, 然后研磨, 使细菌内容物释放。如果研磨是在很低温度下进行, 往往不必加入磨料。研磨法缺点是费力, 产量小。

(二) 物理法

包括冰冻复融法、热处理碎裂法、渗透压碎裂法、减压法、晶态转化法, 超声波振荡法等。

1. 冰冻复融法

把待破碎样品冷至-15~-20℃, 使之冻固, 然后慢慢地溶解, 如此反复操作, 大部分动物细胞及细胞内的颗粒可被破碎。

2. 渗透压碎裂法

曾经有人用这样一种方法使棕色固氮菌细胞碎裂。先把细菌悬浮在0.5mol/L以上的甘油液里, 给予充分的时间, 让甘油缓缓地进入细胞里面。然后突然用水稀释这种悬浮液, 水就很快渗入到细胞中, 由此产生的液体静压力就足以使细胞碎裂, 这种方法只能用来处理细胞壁比较脆弱的微生物。

(三) 化学法

化学法或称为化学及生物化学法。包括自溶法、碱或去垢剂碎裂法、溶剂提取法、表面活性剂处理法、酶解法等。

1. 表面活性剂处理法

十二烷基磺酸钠(SDS)、氯化十二烷基吡啶、去氧胆酸钠等均对细胞膜有一定破坏作用。

2. 酶解法

使用某些酶, 可以对微生物或植物的细胞壁进行酶解。研究得比较清楚的是溶菌酶, 它具有专一地破坏细菌细胞壁的功能。溶菌酶能够分解细菌细胞壁坚韧的胞壁质层里面的由N-乙酰-胞壁酸肽和N-乙酰-葡萄糖胺之间构成的 $\beta(1-4)$ 糖苷键。溶菌酶适于多种微生物, 但有些种类的细菌都需要一些附加处理, 如冰冻复融处理或加入EDTA处理才能获得好的结果。在酸性的范围内(pH=5.5左右或者更低一些), 细胞不解体, 甚至当壁已被酶解作用破坏后, 细胞仍不发生瓦解现象。这是原生质溶解度下降的结果。因此, 必须强调指出, 细胞壁的破裂和适宜的溶解条件, 对有效地释放细胞内含物来说, 都同样是必要的。除溶菌酶外, 蜗牛酶、纤维素酶也常用来破碎细菌及植物细胞壁。

由于温度上升容易使酶变性, 因此必须在低温下进行。但是, 必须注意, 有少数酶对冷是不稳定的。为了得到一定的重复性, 破碎中必须注意各种因素, 如温度、裂解时间、速度和压力的变化。理想的匀浆是能使它十分顺利地进行以后的分级分离。

第五节 生化分离制备中分离纯化方法的选择

分离纯化是整个生化制备过程的核心部分。生物体的组成成分千千万万种,分离纯化的实验方案也必然千变万化。因此,不可能有一种分离纯化方法适用于所有物质的分离纯化,一种物质也不可能只有一种分离纯化方法。所以对于某一种物质,究竟选用什么分离纯化方法最理想,主要是根据该物质化学性质和具体实验条件而定。认真借鉴前人经验可以避免许多盲目性、节省实验摸索时间。即使是分离一个未知组分,根据分析和预试的初步结果,参考别人对类似物质分离纯化经验,也可以帮助少走些弯路。表 1-2 和表 1-3 可供分离纯化时选择试验方法的参考。

表 1-2 供选择分离某些生物分子的方法时参考

化合物	技 术									
	分配 纸色谱	吸附薄 层色谱	吸附柱 色谱	通透 色谱	气-液 色谱	逆流 分溶	离子 交换	亲和 色谱	电泳	超速 离心
氨基酸	+	++	-	-	++	++	+++	-	++	-
多肽	+	++	-	+	-	++	++	+	++	-
蛋白质	-	-	-	+++	-	+	+	+++	+++	+++
嘌呤/嘧啶	+	++	-	-	-	+	+++	-	++	-
核酸	-	+	-	++	-	++	+	+++	+	+++
单糖和二糖	++	++	+	-	++	-	+	-	+	-
寡聚糖和多聚糖	-	-	+	+++	-	-	-	-	++	
脂肪酸	+	++	+	-	++	-	-	-	-	-
磷脂	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-
蒽类、胡萝卜素、叶绿素	+	+++	+++	-	+	+	-	-	+	-
固醇和类固醇	-	++	++	-	+++	+++	-	-	-	-

表 1-3 以溶质物理性质为基础的各种分离方法

方法	分子大小	分子电荷	分子相互作用	
			氢键结合	疏水键结合
色谱				
吸附	+	+	+++	+++
分配	+	++	+++	+++
离子交换树脂	+++	+++	-	+
多聚糖	±	+++	+	-
分子筛	+++	+	+	±
气相	+	++	+++	+++
逆流分配	+	++	+++	+++
电泳				
自由溶液	++	+++	-	-
聚乙烯介质	++	+++	-	-
纤维素	++	+++	+	-
凝胶	+++	+++±	±	
等电聚焦	±	+++	-	-
沉降	+++	+	-	±
膜穿透(透析)和扩散	+++	++	±	±
溶解度	+	++	+++	+++

第二章 几种物质的提取分离

第一节 蛋白质和酶的提取分离

一、蛋白质及酶的一般提取方法

(一)水溶液提取

凡能溶于水、稀盐、稀酸或稀碱的蛋白质或酶，一般都可用稀盐溶液或缓冲溶液进行提取。稀盐溶液和缓冲液有利于稳定蛋白质结构和增加蛋白质溶解度。加入的提取液的量要适当，加入量太少提取不完全，加入的量太大，则不利于浓缩。一般用量为原材料的3~6倍体积左右，可一次提取或分次提取。提取时常缓慢搅拌，以提高提取率。以盐溶液或缓冲液提取蛋白质和酶时，常综合考虑下列因素。

1. 温度

温度的升高可增加物质的溶解度，减少溶液的粘度。这是有利于提取的，但对于蛋白质和酶等生物大分子，在选择温度范围时，不但考虑溶解度，而主要是防止其变性。蛋白质和酶一般都不耐热，所以提取时通常要求低温操作。一般选择提取温度的范围是0~10℃。只有对某些耐高温的蛋白质或酶(如胃蛋白酶、某些多肽激素)才在比较高的温度下提取，以便更有利于和其他不耐热蛋白质的分离。

2. pH 值

许多有机分子或生物分子都同时是有酸性或碱性基团，这些基团在不同的解离状态、在水中或有机溶剂中便有不同的溶解度，这些物质处于等电点时溶解度最低，而处于远离等电点两侧的pH值时溶解度增大。蛋白质和酶所用的提取液pH值一般选择远离被提取的蛋白质等电点两侧的稳定区内。如细胞色素C是一碱性蛋白质，常用稀酸提取。植物组织中的一些酸性或碱性蛋白质常分别用0.1%~0.2%的氢氧化钾水溶液或1%碳酸钠溶液提取。在某些情况下，为了破坏所分离的蛋白质与其他杂质的静电结合，选择偏酸(pH3~6)或偏碱(pH10~11)提取液，可以使离子键破坏而获得单一的蛋白质成分。但对蛋白质和酶等生物大分子来说，提取液的pH值选择首先要保证这些生物大分子活性不受破坏为前提，过酸、过碱应尽量避免，一般控制在pH6~8范围，常选接近中性的pH比较稳定。

3. 盐浓度

提取蛋白质的盐浓度，一般在0.02~0.2mol/L的范围内。常用的稀盐溶液和缓冲液有0.02~0.05mol/L磷酸缓冲液，0.09~0.15mol/L氯化钠溶液。在某些情况下，也用到较高的盐浓度，如提取脱氧核糖核蛋白及膜蛋白。有时为了螯合某些金属离子和解离酶分子与其他分子的静电结合，选用柠檬酸缓冲液和焦磷酸钠缓冲液，可获得较好效果。所以盐溶液和缓冲液的浓度及组分的选择应根据不同对象及具体情况而定。有时为了破坏蛋白质与

其他物质的离子键或氢键的结合,加入少量多价阴离子也有助于对这些蛋白质的提取分离。总之,能溶于水溶液而与细胞颗粒结合较松的蛋白质或酶,在细胞破碎以后,只要选择适当的盐浓度和 pH 值,一般是不难提取的。

提取了蛋白质或酶的溶液,常需要将所需蛋白质与其他杂蛋白分离,通过向溶液中加入中性盐而使蛋白质沉淀析出的盐析法是纯化蛋白质的主要方法之一,其原理根据不同的蛋白质在一定浓度的盐溶液中溶解度降低程度不同,而达到彼此分离。常用的盐析剂是硫酸铵,它具有盐析能力强,较高的溶解度,较低的溶解温度系数,价格低廉和不产生副作用等优点,但缓冲能力较差, pH 值较难控制。此外,还可利用硫酸钠、硫酸镁和氯化钠做盐析剂。

盐析的过程是:先将蛋白质溶液的 pH 值调至等电点,使其溶解度达到最低,然后加入固体硫酸铵,并达到一定浓度,这时该蛋白质即从溶液中析出,离心分离,即得到该蛋白质制品。其除盐方法有凝胶层析法、透析法及纤维滤膜透析法。

一个含有几种蛋白质的混合液,可用不同浓度的硫酸铵来使其中各种蛋白质先后分别沉淀下来,达到分离提纯的目的,这种方法称分级沉淀法。

分级沉淀法向蛋白质溶液中加入盐的速度是很重要的,必须很慢,每次加入少量,待溶解后再加。否则某些蛋白质会变性,加盐最合适的速度必须通过实验确定。如果将硫酸铵加到一种没有缓冲的或缓冲力很弱的溶液中,必须仔细监视 pH 值的变化。

盐析法应用很广,它不仅简便安全,而且所得的蛋白质并不失活,在一定条件下可以重新溶解,故常用来制取具有活性的蛋白质。

(二)有机溶剂提取

一些和脂质结合比较牢固或分子中非极性侧基较多的蛋白质和酶,难溶于水、稀盐、稀酸和稀碱,常用有机溶剂提取。如丙酮、异丙醇、乙醇、正丁醇等,均可溶于水或部分溶于水,这些溶剂都同时具有亲水性和亲脂性。其中正丁醇有较强的亲脂性,也有一定的亲水性,在 0℃ 时水中有 10.5% 的溶解度,正丁醇取代蛋白质与脂质的结合位置后,由于正丁醇与蛋白质极性基团结合的竞争力较脂质大,能阻止脱落的脂质重新与蛋白质结合,使原来蛋白质在水中的溶解度大大增加。正丁醇在水溶液中解离脂蛋白的能力极强,是其他有机溶剂所不及的。

有些蛋白质和酶既溶于稀酸、稀碱,又能溶于一定比例的有机溶剂。对这样的蛋白质采用稀的有机溶剂提取具有防止水解酶破坏的作用并兼有除杂和提高纯化效果的作用。现举例说明如下:

如胰岛素可溶于稀酸、稀碱和稀醇溶液。但针对组织中共存的糜蛋白酶对胰岛素有极高的水解活性,采用 68% 乙醇溶液并用草酸调至 pH2.5~3.0,这样便能在三方面抑制糜蛋白酶的活性:①68% 乙醇可以使糜蛋白酶暂时失活;②草酸可以除去激活糜蛋白酶的金属离子 Ca^{2+} ;③选用 pH2.5~3.0 是糜蛋白酶不适宜作用的 pH 值。而以上的条件对胰岛素的溶解度和稳定性并没有影响,并可以除去一部分在稀醇及酸性溶液不溶解的杂蛋白。

由于高浓度的有机溶剂易引起蛋白质的变性失活,因此,宜用稀浓度的有机溶剂并在低温下操作,加入有机溶剂时要搅拌均匀。分离的蛋白质沉淀,应立即用水或缓冲液冲洗。操作时的 pH 值大多数控制在待沉淀蛋白质等电点附近。由于使不同种蛋白质沉淀所需的有机溶剂的浓度不同,因此通过调节溶剂的浓度也可使混合蛋白质达到分级沉淀的目的。有机溶剂沉淀蛋白质方法其分辨力比盐析法好,溶剂易除去。缺点是易使酶和具有生理活性

蛋白质变性,对于某些敏感的酶和蛋白质使用有机溶剂沉淀时更应注意。

近年来,聚乙二醇(PEG)等多聚电解质用做沉淀剂日益增多。这个方法的特异性程度受许多因素的影响。较为重要的因素有:pH 值、离子强度、蛋白质溶液的浓度及使用的 PEG 的分子量。许多研究者成功地使用了 PEG6000,但有人认为低分子量的 PEG 对沉淀作用有较高的特异性。尽管这种蛋白质沉淀方法需要做一些预备试验确定它的最适条件,但它却补充了现有的其他沉淀方法。

(三)从细胞膜上提取水溶性蛋白质和酶的方法

膜蛋白分为两大类:一是外部蛋白(外周蛋白),一是内部蛋白(内嵌蛋白)。外部蛋白在膜表面上,与膜结合较松弛;内部蛋白有的深埋在双分子层内,有的横跨全膜,也有的以多酶复合体形式与内部蛋白结合。因此内部蛋白与膜的结合是较牢固的。

外部蛋白是通过静电作用及离子键等较弱的非共价键与膜的外表相结合。经过温和处理,如改变介质的离子强度和 pH 值,或加入螯合剂等即可把外部蛋白分离下来。从膜上分离下来的外部蛋白呈水溶性,不再聚合,与脂类不再形成膜结构。如线粒内膜上的细胞色素 C,用 pH=4.0 的酸或等渗 KCl 溶液就可使之解离转到提取液中。

内部蛋白提取则比较困难,需用较剧烈的条件才能使其从膜上溶解下来。一般常用方法有如下几种:

1. 浓盐或尿素等溶液提取

如高氯酸钠、尿素、胍盐酸盐等溶液,当这些溶液浓度达到 2mol/L 时,可抽提出 27% 以上的膜蛋白,但使用这些条件易引起蛋白质和酶的变性。

2. 碱溶液提取

在 pH8~11 范围内,某些膜蛋白质随着 pH 值的提高而溶解度大大增加,当 pH=11 时,约有 40%~50% 的膜蛋白被抽出,但碱提取法也容易引起蛋白质和酶的失活。

3. 加入金属螯合剂

蛋白质通过金属离子与膜成分结合时,加入金属螯合剂如 EDTA 可使蛋白质释放出来。

4. 有机溶剂提取

用乙醇、吡啶、叔戊醇、正丁醇等溶剂抽提及用冷丙酮做成丙酮粉,是提脂蛋白组分最常用的有效方法,其中叔戊醇及正丁醇用于膜内脂蛋白效果更好。正丁醇可在广泛的 pH 值(pH3~10)及广泛的温度范围内(-2~+40℃)使用。用有机溶剂结合其他方法已成功地提取了多种膜上蛋白质和酶。如琥珀酸脱氢酶、细胞色素氧化酶、碱性磷酸酯酶、胆碱脂酶等。

5. 去垢剂处理

去垢剂处理是目前广泛应用于膜上水溶性蛋白和脂蛋白的方法,常用的去垢剂有弱离子型去垢剂脱氧胆酸盐、胆酸盐;强离子型去垢剂十二烷基磺酸钠(SDS)和非离子型去垢剂 TritonX-100、Tween、Lubrol 和 Brij 等。去垢剂处理膜蛋白时的浓度通常为 1% 左右,用此法提取的膜蛋白和酶有细胞色素 b₅、胆碱脂酶、细胞色素氧化酶等。用去垢剂分离膜蛋白时,选择去垢剂应考虑:①去垢剂的溶解能力;②去垢剂的温和性。强离子型去垢剂(SDS)一般具有很好的溶解能力,但温和情况不理想,容易引起蛋白质变性。弱离子型或非离子型去垢剂对蛋白质变性影响小,但溶解能力差。去垢剂的溶解能力与溶液的离子强度大小有

关。一般来说,离子强度增加,去垢剂的溶解能力也随之增大,所以使用去垢剂时须考虑各种条件。

据报道有的使用去垢剂与超声波联合处理,使细胞结构松散,可提高膜蛋白的提取率。

加入酯酶或磷酸酯酶水解蛋白质-脂质复合物,也是一个有用的方法。磷酸酯酶主要用于磷脂,最适 pH 为 6~8。酯酶和磷酸酯酶均需要 Ca^{2+} 所激活。

二、蛋白质和酶提取后的纯化

蛋白质和酶提取后必须进一步纯化。经提取除去了大量与制备理化性质差别较大的杂质,只剩下与制备理化性质大致相近或相似的物质。这为以后纯化工作创造了十分有利的条件。蛋白质和酶经溶剂提取后进一步分离纯化,常用方法有如下几种:

- (1)选择性变性除去杂质;
- (2)分级盐析及有机溶剂沉淀;
- (3)吸附色谱分离;
- (4)多糖基离子交换色谱分离;
- (5)分子筛色谱(凝胶过滤)分离;
- (6)亲和色谱(亲和层析)分离;
- (7)制备超离心分离;
- (8)其他方法分离纯化以及前期结晶纯化等。

由于各类蛋白质和酶从细胞提取分离后进一步纯化的方法选择及操作步骤的繁简都不同,很难做统一的规定,但对同一类的蛋白质,提取分离上仍有许多共同点。

如凝集素是一类能使红细胞凝集的蛋白质,广泛分布于植物及部分低等动物、哺乳动物和病毒中,现已查明凝集素近千种,绝大多数与糖分子共价结合。大豆凝集素(SBA)的提取分离和纯化方法如下:NaCl 溶液抽提、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀、Sephacrose——半乳糖亲和层析、半乳糖洗脱。

第二节 核酸的提取分离

一、不同种类的核酸及其溶解性

核酸分为 DNA 和 RNA 两大类。核酸是两性化合物,有一定等电点,能与金属离子结合成盐,又能与碱性物质结合形成复合物。核酸的水溶液呈酸性,溶于水,而不溶于乙醇。

DNA 和 RNA 常与蛋白质结合成核蛋白,细胞破碎后提取分离核酸。首先就要把核蛋白分离出来,然后再进一步把核酸和蛋白质分离。根据对脱氧核糖核蛋白和核糖核蛋白溶解度研究,在氯化钠浓度为 0.14mol/L 时,脱氧核糖核蛋白的溶解度仅为水中的 1%,当氯化钠浓度增加时,脱氧核糖核蛋白的溶解度逐渐增加,氯化钠浓度增至 1mol/L 时,脱氧核糖核蛋白溶解度比水中大两倍。而核糖核蛋白在 0.14mol/L 氯化钠存在时仍有相当大的溶解度,而当氯化钠浓度增大时,其溶解度逐渐减小。因此,早期常用 0.14mol/L 氯化钠提取核糖核蛋白,此时脱氧核糖核蛋白溶解度极小,从而与核糖核蛋白分开。反之,提取脱氧核糖核蛋白时,则用 1mol/L 浓度氯化钠溶液。由于各类核酸在细胞内分布不同,有时可先