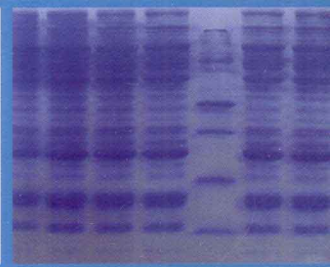
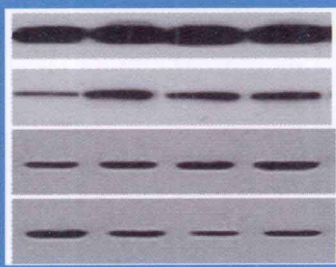
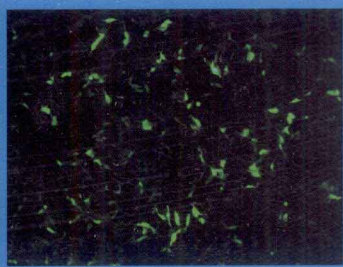
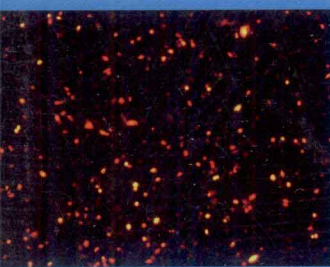


高级生物化学 实验技术

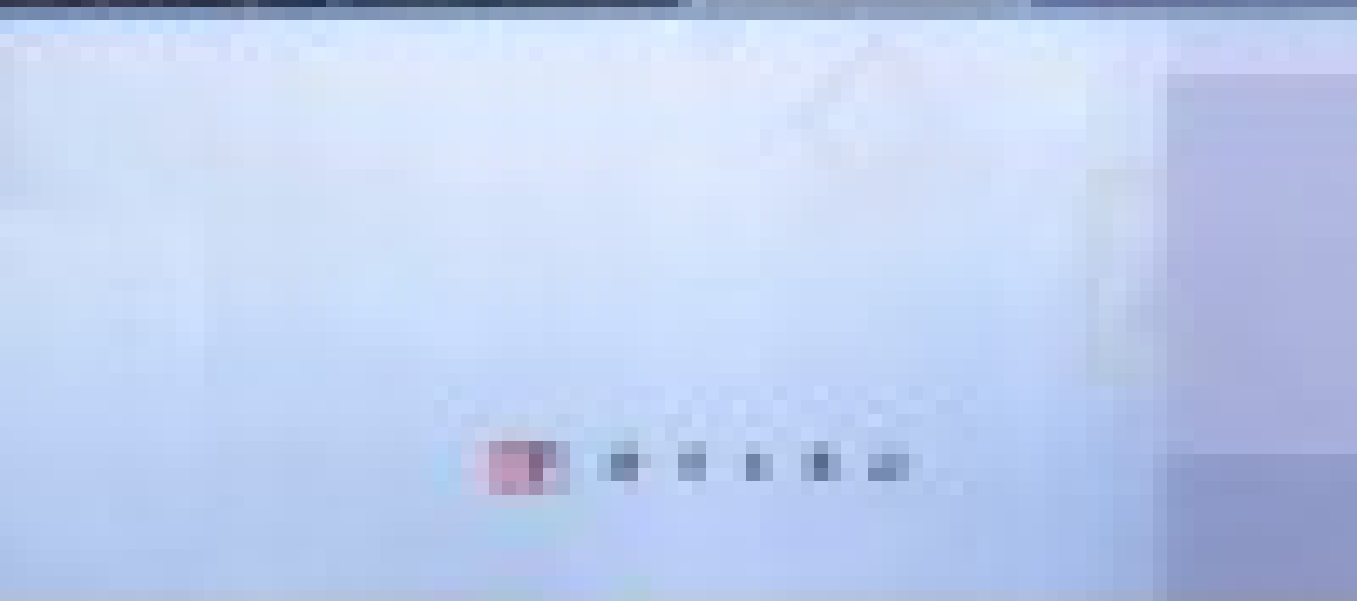
高英杰 郝林琳 主编



科学出版社

高级生物化学 实验技术

主编 王德成 副主编 王德成 王德成



高级生物化学实验技术

高英杰 郝林琳 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书按实验技术系统编写,以蛋白质、核酸等生物大分子的分离、制备、定性和定量为主要内容,共分11个部分,包括生物化学样品制备、沉淀、膜分离、色谱、分光光度、离心、电泳、印迹、酶联免疫吸附测定、放射免疫测定、蛋白质结构分析等技术。每一部分均系统阐述相关技术的理论知识,并精选科研中常用的生物化学实验技术,同时辅以具体实验为例,使读者能够理论联系实际。

本书适合对研究生的教学之用,还可供广大科研工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

高级生物化学实验技术/高英杰,郝琳琳主编. —北京:科学出版社, 2011.8

ISBN 978-7-03-032360-6

I. ①高… II. ①高…②郝… III. ①生物化学-化学实验-研究生-教材 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第188334号

责任编辑:单冉东 / 责任校对:陈玉凤

责任印制:张克忠 / 封面设计:陈 敬

科 学 出 版 社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京市农林印务有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011年8月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2011年8月第一次印刷 印张:15 1/4

印数:1 2 500 字数:361 000

定价:35.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

生物化学既是现代生命科学最重要的一门基础学科，同时又是现代生物学中高速发展的一门前沿学科。其理论与技术的应用已渗透到许多与生命科学、环境科学、海洋科学等相关的其他学科。生物化学实验技术已成为生命科学的基石与主要技术，同时也是其他相关学科深入研究的必备技术。本书参编人员广泛收集资料，结合教学实践进行深入研究，力图在教材的结构形式、内容选材和参考资料的收录等方面做较合理的布局。目的在于加强对学生基本实验技术和基本操作技能的训练，提高学生分析问题和解决实际工作的能力；培养学生深化理论知识，拓宽实验范围，理论联系实际主动获取知识的学习能力。

本书按实验技术系统编写，便于读者全面、系统地掌握生物化学实验技术的基本理论和基本操作。全书共分 11 个部分，包括 36 个实验，以蛋白质和核酸等生物大分子的分离、制备、定性和定量检测为主要内容。选用的方法主要是科研中经常采用的生物化学技术，如电泳技术、层析技术、分光光度技术、膜分离技术、大分子印迹技术等。既有经典常规的实验方法，又有近年来国内外发展起来或广泛应用的一些新方法、新技术。内容比较全面，方法切实可行，重复性高。在每项技术的具体实验前冠以较为系统的理论知识，在侧重基本技能和基本技术训练的同时，注重培养学生在理论方面比较深入地学习。使学生在学期间能够理论指导实践，从而培养其掌握科学的分析方法，训练理论联系实际的工作能力。在实验的理论阐述上，力求系统、简明、易于理解；在操作步骤上，做到具体、详尽、可操作性强。许多实验既能单独进行，又可相互组合，形成综合性较强和难度较大的大型实验（如沉淀技术、层析技术和电泳技术）。这样可进一步提高学生独立分析问题和解决问题的能力。本书由吉林大学、吉林农业大学、黑龙江八一农垦大学、吉林省农业科学院、白城师范学院等单位合作编写，可作为生物化学实验教材或供从事生物化学科研工作者参考。

本书虽数易其稿，但由于生物化学实验技术日新月异，加之作者水平有限，仍可能有疏漏或不足之处，敬请读者批评指正，使其日臻完善，作者不胜感谢。

编 者

2011 年 6 月

常用生物化学实验词汇及缩写

中文名词	英文名称	英文缩写
丙烯酰胺	acrylamide	Acr
甲叉双丙烯酰胺	bis-acrylamide	Bis
四甲基乙二胺	tetramethylethylenediamine	TEMED
过硫酸铵	ammonium persulfate	APS
核黄素	vitamin B ₂	VB ₂
十二烷基硫酸钠	sodium dodecyl sulfate	SDS
牛血清白蛋白	bovine serum albumin	BSA
人血清白蛋白	human serum albumin	HAS
兔血清白蛋白	rabbit serum albumin	RSA
醇脱氢酶	alcohol dehydrogenase	ADH
异柠檬酸脱氢酶	isocitrate dehydrogenase	IDH
乳酸脱氢酶	lactate dehydrogenase	LDH
苹果酸脱氢酶	malate dehydrogenase	MDH
谷氨酸脱氢酶	glutamate dehydrogenase	GDH
考马斯亮蓝 G-250	Coomassie brilliant blue G-250	CBB-G-250
考马斯亮蓝 R-250	Coomassie brilliant blue R-250	CBB-R-250
环磷酸腺苷	cyclic adenosine monophosphate	cAMP
2,5-二苯基恶唑	2,5-diphenyl-oxazole	PPO
1,4-双(5-苯基-2-恶唑)苯	1,4-bis(phenylphospino) propane	POPOP
抗体	antibody	Ab
抗原	antigen	Ag
免疫球蛋白	immunoglobulin	Ig
酶联免疫吸附测定(酶标免疫吸附测定)	enzyme-linked immunosorbent assay	ELISA
放射免疫测定技术	radioimmunoassay	RIA
酶免疫测定技术	enzyme immunoassay	EIA
荧光抗体定位技术	fluorescent antibody positioning technology	FIA
邻苯二胺	<i>o</i> -phenylenediamine	OPD
聚乙烯吡咯烷酮	polyvinylpyrrolidone	PVP
芥酸	erucic acid	EA
人绒毛膜促性腺激素	human chorionic gonadotropin	ECG
前列腺素	prostaglandin	PG
酪氨酸甲酯	tyrosine methyl ester	TME
胃泌素	gastrin	SHGI
聚乙二醇	polyethylene glycol	PEG
脱氧核糖核酸	deoxyribonucleic acid	DNA
核糖核酸	ribonucleic acid	RNA
脱氧核糖核蛋白	deoxyribose nucleoprotein	DNP

核糖核蛋白	ribonucleoprotein	RNP
沉降系数	sedimentation coefficient	S
透光度	transmittance	T
光密度	optical density	O. D 或 D
吸光度	absorbance	A
羧甲基纤维素	carboxymethyl cellulose	CMC
等电点	isoelectric point	pI
磷钼蓝	phosphorus molybdenum blue	PMB
溴化乙锭	ethidium bromide	EB
乙二胺四乙酸二钠	ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt	EDTA-Na ₂
等电聚焦电泳	isoelectric focusing electrophoresis	IFE
分离度 (分辨率)	resolution	Rs
高效液相层析	high-performance liquid chromatography	HPLC
辣根过氧化物酶	horseradish peroxidase	HRP
限制性内切核酸酶	restriction endonuclease	RE
联大茴香胺 (邻联茴香胺)	<i>o</i> -dianisidine	OD
5-氨基水杨酸	5-aminosalicylic acid	5-ASA
邻联甲苯胺	<i>o</i> -tolidine	OT
抑制性消减杂交	suppression subtractive hybridization	SSH
蛋白酪氨酸磷酸酶	protein tyrosine phosphatase	PTP
凝胶渗透层析	gel permeation chromatography	GPC
快速蛋白液相层析	fast protein liquid chromatography	FPLC
邻苯二甲醛	<i>o</i> -phthalaldehyde	OPT
超氧化物歧化酶	superoxide dismutase	SOD
移界电泳法	moving boundary electrophoresis	EP
聚丙烯酰胺凝胶电泳	polyacrylamide gel electrophoresis	PAGE
SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	SDS- polyacrylamide gel electrophoresis	SDS-PAGE
毛细管电泳	capillary electrophoresis	CE
自由溶液毛细管电泳	free solution capillary electrophoresis	PSCE
毛细管等电聚焦	capillary isoelectric focusing	CIEF
毛细管凝胶电泳	capillary gel electrophoresis	CGE
微团电动毛细管色	micelle electrokinetic capillary chromatography	MECC

目 录

前言

常用生物化学实验词汇及缩写

第一部分 生物化学样品制备技术	1
第二部分 沉淀技术	8
第三部分 膜分离技术	13
第四部分 色谱技术	22
实验一 分子筛层析	28
➤ 血清蛋白质盐析及分子筛层析脱盐	32
实验二 离子交换层析	34
➤ 离子交换层析纯化血清蛋白	36
实验三 亲和层析	39
➤ 亲和色谱分离 GST 融合蛋白	41
第五部分 分光光度技术	44
实验四 蛋白质的定量检测	49
➤ 蛋白质的直接定量 (UV) 检测	49
➤ 比色法蛋白质定量	50
实验五 氨基酸的定量测定	54
实验六 色氨酸的定量测定	56
实验七 超氧化物歧化酶活力测定 (邻苯三酚自氧化法)	59
实验八 核酸含量的测定	61
➤ 紫外吸收法测定核酸含量	61
➤ DNA 含量测定——改良二苯胺法	62
➤ RNA 的测定——苔黑酚法	63
实验九 血液葡萄糖的测定	65
➤ 邻甲苯胺法	65
➤ 葡萄糖氧化酶法	67
实验十 血清钙的测定	70
➤ 邻甲酚酞络合酮法	70
➤ 甲基麝香草酚蓝比色法	71
实验十一 血清无机磷的测定	73
➤ 硫酸亚铁磷钼蓝比色法	73
➤ 紫外光光度法	74

➤ 米吐尔直接显色法	75
实验十二 血清甘油三酯 (TG) 的测定	77
实验十三 血清胆固醇的测定	78
实验十四 血液尿酸的测定	80
实验十五 抗坏血酸 (维生素 C) 的测定	82
实验十六 维生素 A 的测定	84
第六部分 离心技术	86
实验十七 动物肝脏 DNA 的提取和鉴定	90
实验十八 质粒 DNA 的制备	93
实验十九 兔肝 RNA 的制备及其含量测定	96
实验二十 差速离心法分离大鼠肝脏细胞核和线粒体	101
实验二十一 家兔血清、血浆和无蛋白血滤液的制备	103
➤ 血清的分离与制备	103
➤ 血浆的分离与制备	104
➤ 无蛋白血滤液的制备	104
第七部分 电泳技术	107
实验二十二 不连续聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳分离血清蛋白质	114
实验二十三 SDS-不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质分子质量	121
实验二十四 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳测定蛋白质的等电点	126
实验二十五 聚丙烯酰胺凝胶浓度梯度电泳测定蛋白质的分子质量	136
实验二十六 琼脂糖凝胶电泳分离血清乳酸脱氢酶同工酶	140
实验二十七 醋酸纤维薄膜电泳分离血清蛋白质	144
实验二十八 琼脂糖凝胶电泳分离 DNA	147
实验二十九 蛋白质双向电泳	150
第八部分 印迹技术	158
实验三十 蛋白质印迹	164
实验三十一 核酸印迹	171
第九部分 酶联免疫吸附测定技术	177
实验三十二 酶联免疫法测定兔血清 IgG	185
第十部分 放射免疫测定技术	188
实验三十三 放免法测定血清 cAMP	199
第十一部分 蛋白质结构分析技术	203
实验三十四 DNS-Cl 法测定蛋白质的 N 端氨基酸	204
实验三十五 蛋白质 C 端氨基酸的测定及顺序分析 (羧肽酶法)	208
实验三十六 蛋白质及多肽顺序分析 (DABITC/PITC 双偶合法)	211
附录	215
一、常用缓冲溶液的配制	215
二、易变质及需要特殊方法保存的试剂	226

三、离心机和转数的换算·····	227
四、硫酸铵饱和度常用表·····	228
五、某些物质燃烧时应用的灭火剂·····	229
六、几种常用实验动物的采血量和采血方法·····	230
七、干燥器内常用的干燥剂·····	230
八、测定蛋白质浓度的方法·····	231
九、SDS-PAGE 中通常选用的标准蛋白质的分子质量 ·····	231
主要参考文献·····	232

第一部分 生物化学样品制备技术

生物分子制备是研究生物分子特别是生物大分子的前提。从生物材料中获得某一组分的方法称为生物化学制备技术。它是生化工程、生化制药及生化分析的基础。

生物化学样品的制备包括特殊细胞器或细胞组分（如膜、线粒体、叶绿体、核糖体或高尔基体），或4种主要类型生物分子（蛋白质、糖类、核酸和脂类）的分离和纯化。采用的实验技术主要有细胞溶解、组织匀浆化、过滤、离心、层析、盐析、有机溶剂沉淀或浓缩等。

本部分介绍、描述可被分离纯化的不同细胞组分和生物化学物质的制备，以及所使用的不同方法及其原理。

一、生物化学样品制备特点

生物大分子通常是指动物、植物和微生物在进行新陈代谢时所产生的蛋白质（包括酶）和核酸等有机化合物的总称。它不仅是生物科学工作者研究的主要对象，而且与化学、医学和食品学科有密切关系。在科研方面，随着人类基因组的30亿个碱基对测序工作的完成，生命科学进入了后基因组时代。为鉴定大量未知蛋白质的结构和功能，蛋白质的研究也进入了一个空前活跃的时期，因此分离纯化和测试分析蛋白质技术显得十分重要。

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。
- 2) 许多生物大分子在生物材料中的含量极微，分离纯化的步骤繁多、流程长。
- 3) 许多生物大分子一旦离开生物体内的环境就极易失活，因此在分离过程中如何防止其失活就是生物大分子提取制备最困难之处。
- 4) 生物大分子的制备几乎都是在溶液中进行的，温度、pH、离子强度等各种参数对溶液中各种组成的综合影响，很难准确估计和判断。
- 5) 为保护所提取物质的生理活性及结构上的完整性，生化分离方法多采取温和的“多阶式”进行（常说逐层剥皮式）。通常少至几个多至几十个步骤，并不断变换各种分离方法，才能达到纯化目的。
- 6) 生化分离方法的最后均一性的证明与化学上纯度的概念并不完全相同，其均一性的评定常常是有条件的或只能通过不同角度测定，最后才能给出相对的“均一性”结论。

二、生化分离制备实验设计

生命物质提取的材料千变万化，所用的方法通用性差，尤其是提取分离蛋白质的方法，这也给制备工作带来了麻烦。尽管如此，在实践中确实需要一定纯度的生命大分子

物质,制备这些物质的程序也存在一些共同点。生物大分子的制备通常可按以下步骤进行。

1) 确定要制备的生物大分子的目的和要求,是进行科研、产品开发还是要发现新的物质。

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。

3) 通过文献调研并进行预备性实验,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,这是最关键的步骤。

6) 生物大分子制备物均一性(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 HPLC 和毛细管电泳都是一个峰。

7) 产物的浓缩、干燥和保存。

生物大分子的分析测定方法有两类:生物学测定方法和物理、化学测定方法。

生物学测定法主要有:酶的各种测活方法、蛋白质含量的各种测定法、免疫化学方法、放射性同位素示踪法等;

物理、化学测定方法主要有:比色法、气相色谱和液相色谱法、光谱法(紫外/可见、红外和荧光等分光光度法)、电泳法及核磁共振等。

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。掌握生物分子的物理、化学性质,了解生物大分子的物理、化学性质,主要涵盖以下几个方面。

1) 在水和各种有机溶剂中的溶解性。

2) 在不同温度、pH 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,以及在各种凝胶、树脂等填料中的分配系数。

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。

利用性质差异设计纯化方法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、酸碱性、溶解性、溶解度、极性、电荷及与其他分子的亲和性等。

各种方法的基本原理可以归纳为两个方面。

1) 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。

2) 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。

三、生物大分子的提取

1. 选择材料及预处理

起始材料可来自微生物、动物组织和植物组织。如何选择起始材料取决于研究目标。例如,具有某种特殊作用的、确定的酶可由确定种类的细菌来生产。为了获得大量酶,则要大规模培养细菌。对于分泌到培养液中的胞外酶来说,需要的是不含细胞的培养清液;相反,对胞内酶来说,需要的是细胞本身。上述两种情况都要求用离心或过滤分离细胞。

所需要的组分或分子可以来自某种动物或植物的某些部分。例如,实验研究可能涉及兔的骨骼肌、鼠肝、牛心或猪心、胰、脑或人血或唾液,或者涉及个别植物的叶、茎、花、根块茎或种子。器官的种属和类型决定使用方法的类型。

材料选择应遵循的原则是,有效成分含量多、稳定性好;来源丰富、保持新鲜;提取工艺简单、有综合利用价值等。

选择到合适的材料后,应及时应用。否则所需要的成分会部分甚至全部被破坏,从而影响收得率。例如,从猪肠黏膜提取肝素时,如果用新鲜材料,每千克小肠可得肝素钠 5 万~6 万单位,如将材料置 25℃ 以上的室温存放约 1 h,肝素钠的含量会显著降低。其原因是,猪小肠内的大量微生物 ($2.5 \times 10^8 \sim 3.0 \times 10^8$ 个/g) 不停地繁殖(如大肠杆菌约 20 min 繁殖一次),有的会产生降解肝素的酶系。若选择的材料难于立即使用时,一般采用冰冻或干燥等处理方法,同时还应将易于去除的非需物质(如脂类)除去。因常用的动物、植物和微生物材料的特点各异,故处理方法也不尽相同。

(1) 动物组织

选材:必须选择有效成分含量丰富且易分离的脏器组织为原材料。例如,磷酸单酯酶,从含量看,虽然其在胰脏、肝脏和脾脏中较丰富,但因其与磷酸二酯酶共存,进行提纯时,这两种酶很难分开。所以实践中常选用含磷酸单酯酶少,但几乎不含磷酸二酯酶的前列腺作材料。

脱脂:脏器中含量较高的脂肪,容易氧化酸败,导致原料变质影响纯度操作和制品得率。常用的脱脂方法有:人工剥去脏器外的脂肪组织;浸泡在脂溶性的有机溶剂(丙酮、乙醚)中脱脂;采用快速加热(50℃左右)、快速冷却的方法,使溶化的油滴冷却后凝聚成油块而被除去。

保存:对预处理好的材料,若不立即进行实验,应冷冻或干燥保存。

1) 冰冻:剥去脂肪和筋皮等结缔组织,短期保存时置于-10℃的冰箱内;长期保存时置于-70℃低温冰箱内。

冰箱的除霜循环可能对细胞造成伤害,要特别小心。解冻时要越快越好,但避免局部过热。

2) 干燥:对于像脑垂体一类小组织,可置丙酮液中脱水,干燥后磨粉储存备用;对于含耐高温有效成分(如肝素)的肠黏膜,可用沸水蒸煮处理,烘干后能长期保存。

(2) 植物材料

选材:注意植物品种和生长发育状况不同,其中所含生物大分子的量变化很大,并

与季节性关系密切。种子需泡胀或粉碎才可使用。含油脂较多的植物材料也要进行脱脂处理。

1) 提取核 DNA: 选用黄化苗 (生长 7~10 d 的小麦、水稻), 以防止叶绿体 DNA 的干扰。

2) 提取 RNA: 根据实验目的选用生长幼嫩组织为好。

保存: 冷冻采样后尽快置于 $-20\sim-4^{\circ}\text{C}$ 冰箱内。

DNA、RNA 采样后, 液氮速冻后置于 -70°C 冰箱。对 RNA 样品, 如不立即使用, 冷冻保存尤为重要。

(3) 微生物

选材: 应注意微生物的生长期, 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和胞外酶等, 一般用离心法收集上清液, 上清液只能在低温下短期保存。

2) 利用菌体含有的生化物质, 如蛋白质、核酸和胞内酶等。需破碎菌体细胞分离, 湿菌体可低温短期保存, 冻干粉可在 4°C 保存数月。

2. 细胞的破碎

细胞是生物体结构和功能的基本单位。一个细胞就是一个生物体, 其一般构造包括细胞壁、细胞质膜、细胞质和核区。通常人们所需要的物质有些分泌于胞外, 如淀粉酶和蛋白酶就分泌在胞外的培养液中, 用适当的溶剂可直接提取; 有些则存在于胞内, 欲提取存在于胞内的物质时, 必须把细胞破碎。一般动物细胞的细胞膜比较脆弱, 极易破损, 往往在组织绞碎或提取时就被破坏了。而植物和微生物的细胞壁较牢固, 需要在提取前进行专门的破细胞操作。

(1) 机械破碎

a. 研磨法

将剪碎的动物组织 (如鼠肝、兔肝等) 置研钵中, 用研磨棒研碎。为了提高研磨效果, 可加入一定量的石英砂。用匀浆器处理, 也能破碎动物细胞。此法较温和, 适宜实验室使用。但加石英砂时, 要注意其对有效成分的吸附作用。如系大规模生产时, 可用电动研磨法。细菌和植物组织的细胞破碎均可用此法。

b. 组织捣碎器法

用捣碎器 (转速 $8000\sim 10000\text{ r/min}$) 处理 $30\sim 45\text{ s}$ 可将植物和动物细胞完全破碎。如用其破碎酵母菌和细菌的细胞时, 需加入石英砂才有效。但是在捣碎期间必须保持低温, 捣碎的时间不易太长, 以防温度升高引起有效成分变性。现在多用细胞破碎仪。

c. 超声波法

超声波法是借助声波的震动力破碎细胞壁和细胞器的有效方法。多用于微生物细胞的破碎, 一般输出功率 $100\sim 200\text{ W}$, 破碎时间 $3\sim 15\text{ min}$ 。如果在细胞悬浮液中加入石英砂则可缩短时间。为了防止电器长时间运转产生过多的热量, 常采用间歇处理和降低温度的方法进行。

d. 压榨法

压榨法是一种温和、彻底破碎细胞的方法。用 30 MPa 左右的压力迫使几十毫升细胞悬液通过一个小孔 (<细胞直径的孔), 致使其被挤破、压碎。

e. 冻融法

将细胞置低温下冰冻一定时间, 然后取出置室温下 (或 40℃ 左右) 迅速融化。如此反复冻融多次, 细胞可在形成冰粒和增高剩余胞液盐浓度的同时, 发生溶胀、破碎。

(2) 溶胀和自溶

溶胀: 细胞膜为天然的半透膜, 在低渗溶液, 如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, 引起细胞膜发生胀破的现象称溶胀。例如, 红细胞置清水中会迅速溶胀破裂并释放出血红蛋白。

自溶: 细胞结构在本身所具有的各种水解酶 (如蛋白酶和酯酶等) 的作用下发生溶解的现象称自溶。应用此法时要特别小心操作, 因为水解酶不仅可使细胞壁、细胞膜破坏, 同时也可将某些有效成分在自溶时分解。

(3) 化学处理

用脂溶性的溶剂 (如丙酮、氯仿和甲苯) 或表面活性剂 (如十二烷基磺酸钠、十二烷基硫酸钠) 处理细胞时, 可将细胞壁、细胞膜的结构部分溶解, 进而使细胞释放出各种酶类或 DNA 等物质, 并导致整个细胞破碎。

(4) 生物酶降解

生物酶 (如溶菌酶) 有降解细菌细胞壁的功能。在用此法处理细菌细胞时, 先是细胞壁消解, 随之而来的是因渗透压差引起的细胞膜破裂, 最后导致细胞完全破碎。

例如, 从某些细菌细胞提取质粒 DNA 时, 不少方法都采用了加溶菌酶 (来自蛋清) 破坏细胞壁的步骤。当有些细菌对溶菌酶不敏感时, 可加巯基乙醇 (ME) 或 8 mol/L 的尿素, 以促进细胞壁的消化。另外, 也可加入蛋白酶 K 来提高破壁效果。

而在破坏酵母菌的细胞时, 可采用蜗牛酶进行。一般对数期的酵母细胞对该酶较敏感。将酵母细胞悬于 0.1 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 (pH 5.4) 中, 加入 1% 蜗牛酶, 在 30℃ 处理 30 min, 即可使大部分细胞壁破裂, 如同时加入 0.2% 巯基乙醇效果更好。

3. 抽提

(1) 抽提的含义

1) 抽提通常是指用适当的溶剂和方法从原材料中把有效成分分离出来的过程。

2) 经过处理的原材料中的有效成分可用缓冲液、稀酸、稀碱或有机溶剂 (如丙酮、乙醇) 等抽提, 有时还可用水抽提。

3) 一般理想的抽提液应具备下述条件: 对有效成分溶解度大, 破坏作用小; 对杂质不溶解或溶解度很小; 来源广泛、价格低廉、操作安全等。

(2) 抽提的影响因素

在抽提阶段, pH、金属离子、溶剂的浓度和极性等, 可明显影响有效成分的性质和数量。因此选择抽提液必须考虑这些因素。

a. pH

对蛋白质或酶等具有等电点的两性电解质物质，一般选择抽提液的 pH 应在偏离等电点的稳定范围内。通常碱性蛋白质选用低 pH 的溶液抽提，酸性蛋白质选用高 pH 的溶液抽提，或者用调至一定 pH 的有机溶剂抽提。

注意：当用酸、碱控制溶液 pH 时，要边加入边搅拌，防止局部出现过高的酸、碱浓度造成蛋白质变性。

b. 溶剂的极性和离子强度

有些生物大分子在极性大、离子强度高的溶液中稳定，有些则在极性小、离子强度低的溶液中稳定。例如，提取刀豆球蛋白 A 时，用 0.15 mol/L 甚至更高浓度的 NaCl 溶液，都可使其从刀豆粉中溶解出来，稳定存在；而抽提脾磷酸二酯酶时，则需用 0.2 mol/L 蔗糖水溶液。

一种物质溶解度大小与溶剂性质密切相关（相似相溶原理），而离子强度通过影响溶质的带电性影响溶质的溶解度。

降低极性：在水溶液中加入蔗糖、甘油、二甲亚砜和二甲基甲酰胺。

提高离子强度：在水溶液中加入中性盐 [KCl、NaCl、NH₄Cl、(NH₄)₂SO₄]

一般离子强度较低的中性盐溶液可促进蛋白质溶解（盐溶），高离子强度的中性盐可引起蛋白质沉淀、析出（盐析）。

高离子强度使 DNA 溶解度增加；低离子强度使 RNA 溶解度增加（核酸分离依据）。

常用的盐溶液是 NaCl 溶液，浓度以 0.15 mol/L 为宜。但是在提取核蛋白或细胞器中的蛋白质时，为促进蛋白质与核酸、蛋白质与细胞器分离，则宜用高浓度（0.5～2.0 mol/L）的盐溶液。

c. 水解酶

细胞破裂后，许多水解酶释放出来。水解酶与欲抽提的蛋白质或核酸接触时，一旦条件适宜，就会发生反应，导致蛋白质或核酸分解，而使实验失败。为此，必须采用加入抑制剂，调节抽提液的 pH、离子浓度或极性等方法，使这些酶丧失活性。

例如，提取、纯化胰岛素时，为阻止胰蛋白酶活化，采用 68% 的乙醇溶液（pH 2.5～3.0，用乙二酸调节），在 13～15℃ 抽提 3 h，可得到较高的回收率。因为 68% 乙醇可使胰蛋白酶暂时失活，乙二酸可除去蛋白酶的激活剂 Ca²⁺，酸性环境也抑制酶蛋白活性。

RNA 提取需防止 RNase 的水解作用，RNase 活性很高，很容易使 RNA 降解，所以每一步都严格控制 RNase，可采用焦碳酸二乙酯（DEPC）处理，戴手套操作，提取液中加强的变性剂异硫氰酸胍等措施。

d. 温度

一般认为蛋白质或酶制品在低温（如 0℃ 左右）时最稳定。

例如，在生产人绒毛膜促性腺激素（HCG，糖蛋白）制品时，一定要在低温下进行。当温度低于 8℃ 时，从 200 kg 孕妇尿中可提取约 100 g HCG 粗品（活力为 160 U/mg）；当温度高于 20℃ 时，从 400 kg 孕妇尿中都提取不到 100 g 粗品，而且活力

很低。此外，高温下制备的 HCG 粗品很难进一步纯化至 3500 U/mg，原因是高温会使 HCG 受到微生物和（或）糖苷酶的破坏。

一般提高温度，溶解度增加，但易使大分子物质变性失活。

小分子物质：50~70℃；生物大分子：0~10℃，最好控制在 0~4℃

e. 搅拌

搅拌能促使欲抽提物与抽提液的接触，并能增加溶解度。但是，一般宜采用温和的搅拌方法，速度太快时容易产生泡沫，导致某些酶类变性失活。

f. 氧化

一般蛋白质都含相当数量的巯基，该基团常常是酶和蛋白质的必须基团，若抽提液中存在氧化剂或氧分子时，会使巯基形成分子内或分子间的二硫键，导致酶（或蛋白质）失活（或变性）。在提取液中加入巯基乙醇、半胱氨酸、还原性谷胱甘肽等还原剂，可防止巯基发生氧化，使蛋白质、酶失活。

g. 金属离子

蛋白质的巯基除易受氧化剂作用外，还能和金属离子如铅、铁或铜作用，产生沉淀复合物。这些金属离子主要来源于制备缓冲液的试剂中。解决的办法：①用无离子水或双蒸水配制试剂；②在配制的试剂中加入 1~3 mmol/L 的乙二胺四乙酸（EDTA，金属离子络合剂）。

h. 抽提液与抽提物的比例

在抽提时，抽提液与抽提物的比例要适当，一般以 5:1 为宜。如抽提液过多，虽有利于有效成分的提取，但不利于纯化工序的进行。