

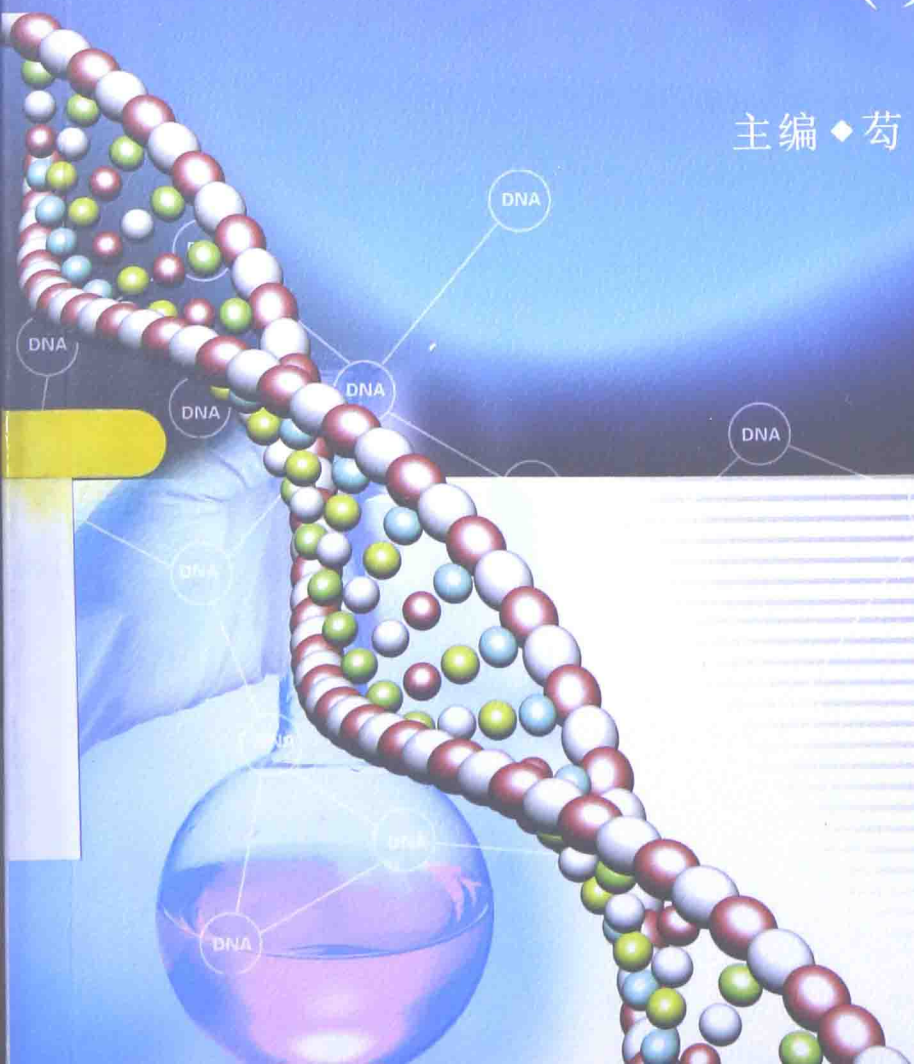
SHENGWU
HUAXUE SHIYAN



生物化学实验

(第二版)

主编◆苟琳单志



西南交通大学出版社

生物化学实验

(第二版)

主 编 苟 琳 单 志

编 委 (按姓氏拼音排序)

陈 惠 韩学易 李成磊

阮景军 唐自钟 王晓丽

吴 琦 晏本菊 张军杰

主 审 杨婉身

西南交通大学出版社

· 成 都 ·

图书在版编目 (C I P) 数据

生物化学实验 / 苟琳, 单志主编. —2 版. —成都:
西南交通大学出版社, 2015.8

ISBN 978-7-5643-4101-5

I. ①生… II. ①苟…②单… III. ①生物化学—化
学实验—高等学校—教材 IV. ① Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 176664 号

生物化学实验

(第二版)

主编 苟琳 单志

责任编辑	牛 君
封面设计	墨创设计
出版发行	西南交通大学出版社 (四川省成都市金牛区交大路 146 号)
发行部电话	028-87600564 87600533
邮 编	610031
网 址	http://www.xnjdcbs.com
印 刷	成都中铁二局永经堂印务有限责任公司
成品尺寸	185 mm × 260 mm
印 张	11.25
字 数	280 千
版 次	2015 年 8 月第 2 版
印 次	2015 年 8 月第 7 次
书 号	ISBN 978-7-5643-4101-5
定 价	29.50 元

课件咨询电话: 028-8700533

图书如有印装质量问题 本社负责退换

版权所有 盗版必究 举报电话: 028-87600562

第二版前言

《生物化学实验》作为高等农林院校生物化学课程的实验教材，自出版以来，受到了学生及读者的欢迎。本书力求将生物化学基本实验技术融入具体实验中，帮助学生学习和掌握生物化学基本理论知识和基本实验方法，为今后工作、科研等的实际应用奠定良好基础。为适应生物化学教学发展的实际需要，我们对本书进行了再版修订。本次修订保持了原书的特点，注重理论与实践的有机结合，并根据编者的科研成果新增了实验项目以方便使用者选用。增加的实验项目有：第十章“酶”中由阮景军编写的实验十七、十八和十九，由唐自钟编写的实验二十，由李成磊编写的实验二十一。

在此，我们衷心感谢本书的使用者，以及关心和支持我们的相关专业教师和科研人员，希望你们能继续为本教材提出宝贵意见，以期进一步提高本书的质量，更好地服务于生物化学实验教学和科研需要。

鉴于编者知识水平和实践经验有限，书中不妥之处在所难免，敬请批评指正。

编 者

2015年8月

第一版前言

生物化学是医学院和各类综合性大学生命科学专业的基础课,亦是许多农林院校大多数专业的专业基础课。该课程的学习必须建立在坚实的实验基础之上,因此,生物化学实验是生物化学教学的重要组成部分。生物化学实验教学不仅能加深学生对理论知识的理解,而且在培养学生实验操作技能、实际分析问题和解决问题的能力以及独立工作能力和严谨求实的科学态度等方面具有不可替代的作用。

随着生命科学的迅猛发展,各种生物实验技术的不断改进和更新,原有生物化学实验教材在实验教学的系统性、实用性和先进性等方面都存在不同程度的不足。为适应高等院校面向 21 世纪教学改革的需要,加强对学生能力、素质和创新意识的培养,四川农业大学生物化学课题组按照《生物化学实验教学大纲》的要求,在总结多年开设生物化学实验课经验的基础上,广泛汲取兄弟院校生物化学实验教学的宝贵经验,参阅有关资料编写了《生物化学实验》一书。本教材注重实验内容编排的实用性、科学性和先进性,并尽可能覆盖生物化学相关实验技术。全书分为两部分,第一部分重点介绍生物化学实验的基本要求与常用仪器的使用方法,使学生对生物化学实验从理论角度加以感知,了解各种生物化学实验技术的基本原理、方法和应用,同时也为学生和其他读者提供一个较为完整的实验技术指南;第二部分为实验,包括基础性实验和综合性实验。基础性实验部分,本书选取了糖、蛋白质、酶、维生素、核酸、体内代谢共六个系列,并分类编排。每个实验项目包括原理、器材与试剂、操作步骤、结果处理和注意事项等模块,力求做到简明扼要,操作具体,充分体现实验技能训练的实用性。综合性实验部分,本书编写了三个带有设计理念的实验内容,有目的地通过这一部分的实验进一步提高学生的理解能力、实践能力和分析能力,并促进学生创造性思维的形成,提高学生对科学研究的兴趣。最后,在本书的附录部分,我们汇集了生物化学实验中常用的各种缓冲溶液配方等相关数据资料,以方便读者查阅。

在本书的编写过程中，我们参考了同行专家、学者已出版的生物化学实验技术方面的书籍及一些网络资料，在此对相关作者表示衷心感谢！参加本书编写的人员有苟琳、单志、王晓丽、晏本菊、陈惠、吴琦、张军杰和韩学易。

本书可供高等院校生物工程、生物科学、食品工程、医学等专业作为实验课教材，也可供相关专业教师和科研人员参考。

鉴于编者水平有限，书中不足之处在所难免，敬请读者批评指正。

编 者

2009年12月

目 录

第一部分 生物化学实验基本要求与常用仪器使用方法

第一章 生物化学实验基本操作	1
第二章 生物活性成分的制备	5
第三章 分光光度技术	13
第四章 荧光光谱技术	17
第五章 层析技术	21
第六章 电泳技术	34
第七章 离心技术	53

第二部分 实 验

第八章 糖	58
实验一 总糖和还原糖的测定 (3, 5-二硝基水杨酸法)	58
实验二 蒽酮比色定糖法	60
实验三 血液中葡萄糖含量的测定 (Folin-Wu 法)	61
第九章 蛋白质	64
实验四 蛋白质含量的测定	64
I. 凯氏定氮法测定蛋白质含量	64
II. 紫外吸收法测定蛋白质含量	68
III. 双缩脲 (Biuret) 法测定蛋白质含量	69
IV. Folin-酚法测定蛋白质含量	71
V. 考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量	73
实验五 醋酸纤维薄膜电泳分离血清蛋白质	74
实验六 不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳分离预染的血清脂蛋白	77
实验七 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质相对分子质量	80
实验八 凝胶层析法测定蛋白质相对分子质量	84
实验九 植物组织中游离氨基酸的分离鉴定	88
实验十 蛋白质两性解离及等电点的测定	89
第十章 酶	92
实验十一 影响酶作用的因素	92
实验十二 过氧化氢酶活力的测定	95

实验十三	淀粉酶活力的测定	96
实验十四	植酸酶活性的测定	99
实验十五	蛋白酶活性的测定	101
实验十六	血清碱性磷酸酶活性的测定	104
实验十七	荞麦胰蛋白酶抑制剂活性测定	106
实验十八	离子交换层析法纯化荞麦胰蛋白酶抑制剂	108
实验十九	亲和层析法纯化荞麦胰蛋白酶抑制剂	111
实验二十	β -葡萄糖苷酶活性的测定 (pNPG 法)	113
实验二十一	苦荞重组 PAL 的活性鉴定	115
第十一章	维生素	117
实验二十二	维生素 C 的定量测定	117
实验二十三	维生素 B ₁ 的定量测定	119
第十二章	核 酸	122
实验二十四	植物组织中 DNA 的提取和纯度鉴定	122
实验二十五	肝脏 DNA 的提取及纯度鉴定	123
实验二十六	质粒 DNA 的小量提取 (碱裂解法)	126
实验二十七	纳米磁性粒子法小量提取细菌质粒 DNA	130
实验二十八	植物叶片总 RNA 小量制备 (Trizol 法)	132
实验二十九	紫外吸收法测定核酸含量	134
实验三十	二苯胺法测定 DNA 含量	135
实验三十一	定磷法测定 RNA 含量	137
实验三十二	琼脂糖凝胶电泳分离鉴定 DNA	139
第十三章	体内代谢	142
实验三十三	酶促转氨基作用及其鉴定	142
实验三十四	胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的影响	144
实验三十五	血清谷丙转氨酶 (SGPT) 活力测定	146
实验三十六	植物总黄酮的提取与测定	148
第十四章	生物化学综合实验	151
实验三十七	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白印迹	151
实验三十八	猪血超氧化物歧化酶的分离纯化、活性测定及同工酶鉴定	154
实验三十九	目的基因的 PCR 扩增	158
附 录		161
附录 A	常用缓冲溶液的配制方法	161
附录 B	硫酸铵饱和度的常用表	167
附录 C	常用指示剂的配制	169
参考文献		170

第一部分 生物化学实验基本要求与常用仪器使用方法

第一章 生物化学实验基本操作

生物化学实验与其他学科的实验一样，有一些基本的操作。按照操作要求进行实验是获得成功的重要保证。在本章我们将根据生物化学实验的特点，对一些较特殊的基本操作进行介绍，为今后的实验奠定良好的操作基础。

一、仪器的清洗

1. 玻璃、塑料仪器的清洗

实验室所用的仪器必须保持清洁，这是获得理想结果的前提。每个实验人员都要养成实验结束立即清洗仪器的良好习惯，因为带有污物的仪器放久了会给洗刷带来困难。实验前要确保玻璃仪器已清洗干净，即洗净的容器倒置时，器壁上有一层均匀水膜而无水珠，这是非常重要的准备工作。

新购买的玻璃仪器表面常附着游离的碱性物质，可先用 0.5% 的去污剂洗刷至无污物，再用自来水洗净，然后浸泡在 1%~2% 盐酸中过夜（或浸泡在 0.5% 的清洗剂中超声清洗），再用自来水冲洗，最后用去离子水冲洗两次。

使用过的玻璃仪器，先用自来水洗刷至无污物，再用合适的毛刷沾去污剂（粉）洗刷，或浸泡在 0.5% 的清洗剂中超声清洗（比色皿绝对不可超声清洗），然后用自来水彻底洗净去污剂，用去离子水洗两次。石英和玻璃比色皿的清洗绝对不可用强碱，只能用洗液或 1%~2% 的去污剂浸泡，然后依次用自来水和去离子水冲洗干净。

塑料器皿如聚乙烯、聚丙烯器皿等在生物化学实验中用得越来越多。首次使用时可用 8 mol/L 尿素（用浓盐酸调 pH=1）清洗，接着依次用 1 mol/L KOH 和 1×10^{-3} mol/L EDTA 除去金属离子的污染，最后用去离子水彻底清洗；以后每次使用时，可只用 0.5% 的去污剂清洗，然后用自来水和去离子水洗净即可。

2. 玻璃仪器的干燥

清洗后的仪器要进行干燥。不同实验对干燥有不同的要求，一般定量分析用的烧杯、锥形瓶等仪器洗净即可使用，而分析测试则要求仪器是干燥的。应根据不同要求进行仪器干燥。仪器的干燥方法主要有烘干、烤干、晾干、吹干和有机溶剂干燥五种。

(1) 烘干：洗净的仪器可以放在电热干燥箱（烘箱）内烘干，注意放进去之前应尽量把水倒净。烘箱温度为 $105 \sim 110^{\circ}\text{C}$ ，烘 1 h 左右。也可放在红外灯干燥箱中烘干。放置仪器时，应注意使仪器的口朝下。此法适用于一般仪器。

(2) 烤干：烧杯或蒸发皿可以放在石棉网上用小火烤干。试管可以直接用小火烤干，操作时，试管要略为倾斜，管口向下，并不时地来回移动试管，把水珠赶掉。

(3) 晾干：洗净的仪器可倒置（部分仪器要平置）在干净的实验柜内仪器架上，让其自然干燥。

(4) 吹干：用压缩空气或吹风机把仪器吹干。

(5) 用有机溶剂干燥：一些带有刻度的计量仪器，不能用加热的方法干燥，否则，会影响仪器的精密度。我们可以将一些易挥发的有机溶剂（如酒精或丙酮）加到洗净的仪器中，把仪器倾斜转动，使器壁上的水与有机溶剂混合，然后倾出，少量残留在仪器内的混合液可很快挥发，使仪器干燥。

二、移液器的用法

随着科技的发展，移液器以其操作的便利性和移液的准确性越来越多地被用到生物化学与分子生物学实验中来。移液器有固定量程、可调量程和多道可调量程三种类型。其规格有 $0.1 \sim 10 \mu\text{L}$ 、 $0.5 \sim 20 \mu\text{L}$ 、 $2 \sim 200 \mu\text{L}$ 、 $50 \sim 1000 \mu\text{L}$ 、 $100 \sim 1000 \mu\text{L}$ 、 $1 \sim 10 \text{ mL}$ 等。通过选择合适规格的移液器及相应的吸头，可随意量取我们需要液体的体积。单道移液器和多道移液器结构如图 1-1 所示。

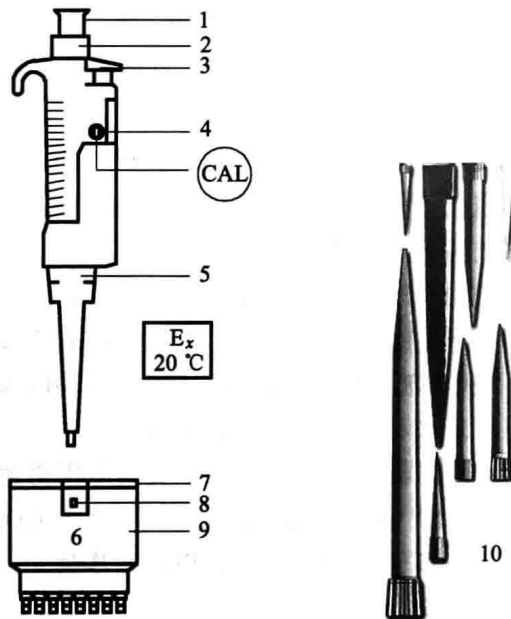


图 1-1 单道移液器和多道移液器示意图

- 1—控制钮，第一挡：液体体积计量，吸入并排出液体，第二挡：吹出吸嘴内剩余液体；2—调节钮，用于设定移液量；3—弹射键，弹除吸嘴；4—调整开孔，对移液器进行调整时插入扳手；5—弹射套筒；6—多道移液器下半段；7—盖板；8—下半段分离键；9—外罩；10—各种型号吸头

移液器的详细用法如下：

1. 设定体积

旋转调节钮可对体积进行连续设定。自顶端视窗读取显示的数字。最好从大量程开始调节体积，即先将体积调节钮调过目的量程，再向下回调。

2. 安装吸嘴

根据移液器量程，从吸嘴盒架中选择恰当的吸嘴并安装。

3. 吸 液

把移液器挂在手上，用拇指按下控制钮至第一挡，并将移液器吸嘴浸入液面下约 3 mm，然后使控制钮缓慢滑回原位，移液器移出液面前略等待 3 s，随后缓慢提出移液器，并确保吸嘴外壁无液体，以保证移液准确度。

4. 排 液

将吸嘴以一定角度抵住试管或微孔板孔的内壁，缓慢将控制钮按至第一挡并等待至无液体流下，将控制钮按至第二挡使吸嘴完全排空，按住控制钮将吸嘴沿内壁向上拉，最后慢放控制钮。

注意事项：切勿在吸嘴中有液体时平置移液器，以防液体流入移液器。为达到高精度度，使用新移液器吸嘴时反复吸、排 2~3 次。离开液面时将吸嘴抵在容器内壁上，确保将吸嘴内液体完全排空。需要换吸嘴时，按压移液器侧面的弹射键弹出吸嘴。

三、离心管中液体的混匀法

在进行生物化学实验时由于目标物质多是生物大分子，其液体体积较小，常为几微升，且操作多在离心管中进行，因此对离心管（见图 1-2）中液体的混合有较高的要求，方法主要有如下几种。

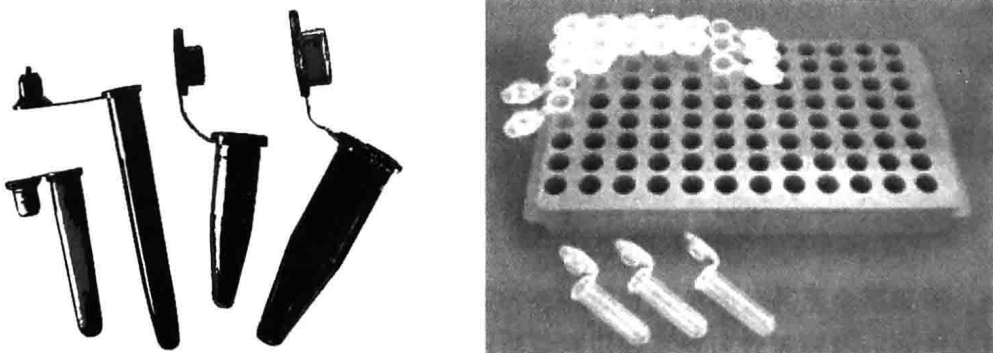


图 1-2 几种常见的小型离心管及离心管架

（1）离心法：事先将液体移入离心管，盖上盖子，稍弹敲，然后瞬时离心，即可将离心管中的液体混合。该方法适合极微量液体混合时使用，特别是在 PCR 管中混合液体。

（2）弹敲法：将液体移入离心管中，盖上盖子，左手拇指和中指持离心管盖子两侧，食指轻轻抵住盖子顶部，然后用右手中指或食指敲打离心管底端，反复几次即可混匀。

（3）涡旋法：用旋涡混合器可非常容易地实现对各种离心管中液体的混合。旋涡混合器利用偏心旋转，使离心管中的液体产生涡流，从而达到使液体充分混合的目的。该方法的特点

是混匀速度快，彻底，液体呈漩涡状能将管壁上的液体全部混匀。

■ (4) 颠倒混匀法：当离心管中液体体积较大时，可在盖上盖子后用拇指和食指持住离心管的顶部和底部，上下颠倒，反复几次即可将液体混匀。

(5) 吹打混匀法：实验室中较常用的一种方法是移液枪吹打混匀法。可在各种液体加到离心管中后用移液枪反复吹打，直到混匀为止。

第二章 生物活性成分的制备

生物活性成分是动物、植物及微生物在进行新陈代谢时所产生的蛋白质（包括酶）、核酸、多糖、脂类以及各种次生代谢物等生物分子的总称。作为生命科学研究中的主要对象，这些物质与生物、化学、医学、食品、物理及数学等学科密切相关。随着各种模式生物基因组及人类基因组全序列测序工作的相继完成，生命科学研究已经进入一个全新的时期——蛋白质组时代。另外，近几年来，随着糖生物学的再次兴起，以及各种次生代谢物质在医药开发上的应用等，对生物体内各种生化成分结构和功能的研究进入一个空前活跃的时期。因此，对各种生化成分进行分离、提取、纯化、鉴定及保存等各方面相关工作的研究就显得十分重要。由于不同的生化成分具有不同的来源、结构和性质特征等，制备它们所采用的方法通用性也较差。尽管如此，为获得结构完整的高纯度的活性生化成分，它们的制备原理和相关程序仍存在不少的共同之处。本章将以蛋白质和核酸为例来讨论其制备的一般过程。

一、生物材料的选择与预处理

（一）材料选择

“有效成分”一词在生物材料的培养与选择过程中时常提到，它是指具有相同生理功能的一类生化组分。有效成分以外的其他成分则统称为杂质。在各种生物材料中，有效成分的含量一般都较少，只有万分之一、几十万分之一甚至百万分之一。而且，有效成分的稳定性也比较差，大多数对酸、碱、高温、重金属离子和高浓度有机溶剂等因子较敏感，易被破坏变性。因此，有效成分的制备成功与否，与培养及选用的材料关系十分密切。总的来说，材料的培养和选择需遵循以下原则：来源丰富、成本低；有效成分含量高、稳定性好；或者尽管有效成分含量低，但组成单一，易被浓缩、富集；提取工艺简单，综合利用价值高等。

（二）材料的预处理

实验材料选定后，需及时处理，否则所需的有效成分将会部分甚至全部破坏，从而影响其得率。如果材料不能立即使用，则需要预处理以防有效成分被破坏。因为动物、植物和微生物材料的生物学特异性各异，所以进行预处理的要求和方法也不尽相同。

1. 微生物材料

由于微生物具有种类多、繁殖快、易培养、诱变简单和不受季节影响等许多特点，因此，它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。细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。噬菌体可在低温下进行短期保存，制成冻干粉后则可在 4℃ 下保存数月。

2. 动物材料

对于动物材料而言,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,另外还会影响纯化操作和制品得率。因此,动物脏器在获得之后需马上剥去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°C)后将其置于 -10°C 冰库(短期保存)或 -70°C 低温冰箱(数月保存)中储存。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°C 左右)和快速冷却;利用油脂分离器使油脂与水溶液分离等。另外,对于像脑下垂体一类的小组织,可经丙酮脱水干燥后,制成丙酮粉储存备用;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。作为分析测定常用的血液样品,一般应在清晨饲喂前采取,以避免动物饲喂后食物成分的影响。由于血液中许多化学成分在血浆、血清和血细胞中的分布不同,有的差别很大,因而在血液分析中常需分别测定血浆、血清和血细胞中的成分含量。

全血:取清洁干燥的试管或其他容器,收集动物的新鲜血液,立即与适量的抗凝剂充分混匀,所得到的抗凝血为全血。

血浆:经抗凝的全血在离心机中离心,使血球下沉,如此得到的上清液即为血浆。质量上乘的血浆应为淡黄色。为避免产生溶血,必须采用干燥清洁的采血器具和容器,并尽可能少振摇。

血清:收集不加抗凝剂的血液,室温下自然凝固,所析出的淡黄色液体,即为血清。为促进血清尽快析出,必要时可以采用离心缩短分离时间,并且可获得较多的血清,但离心速度不宜过快。

无蛋白血滤液:在许多生化实验中,通常需要将血液中的蛋白质除去,再进行分析测定。血液加入钨酸、三氯乙酸或氢氧化锌等蛋白质沉淀剂后离心或过滤所得到的上清液或滤液,即为无蛋白血滤液。

对于尿液样品,其代谢成分往往随着进食、饮水、运动及其他情况有所变动,一般收集晨尿进行分析,并可适当加入少量的稳定剂或防腐剂等并低温冷冻保存。

3. 植物材料

植物叶片(如菠菜、水稻的叶片)用水洗净即可使用,或在10 h内置于 $-4\sim -30^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储藏备用;种子则需要泡胀、去壳或粉碎后才可使用。如果材料富含油脂,还要进行脱脂处理。

二、细胞破碎

对于分泌在胞外的生物活性成分,其收集相对简单,可在不破细胞的情况下,用缓冲液进行抽提;但人们所需的多数生化成分都存在于细胞内,因此细胞破碎是进行有效生物活性成分提取的前提。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。常用的细胞破碎方法有物理破碎法、化学处理法和生物酶解法。

（一）物理破碎

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。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。

2. 组织捣碎器法

用捣碎器（转速 8 000 ~ 100 000 r/min）处理 30 ~ 45 s 就可将植物和动物细胞完全破碎。破碎微生物细胞时，需要加入石英砂才更有效。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，以防止温度升高而引起有效成分变性。

3. 超声波法

这种方法多用于微生物细胞的破碎，破碎时间一般为 3 ~ 15 min。如在细胞悬浮液中加入石英砂则可缩短处理时间。另外，该法常采用间歇处理和降低温度的方法进行，以防止电器长时间运转而产生过多的热量。

4. 压榨法

该法是一种温和、细胞破碎彻底的方法。用 30 MPa 左右的压力迫使几十毫升细胞悬浮液通过一个小于细胞直径的小孔，致使其挤破、压碎。

5. 反复冻融法

先将材料置于 -15 ~ -20 °C 低温下冰冻一定时间，再将其置于室温下（或 40 °C 左右）迅速融化。如此反复冻融多次，可以将大部分细胞破碎。此法多适用于含对温度不敏感有效成分的动物材料。

6. 急热骤冷法

先将样品材料投入沸水中，维持 85 ~ 90 °C 15 min 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。

7. 溶 胀

溶胀是由于在低渗溶液中细胞内外存在渗透压差，致使溶剂分子大量进入细胞而引起细胞膜发生胀破的一种现象。将红血球置于清水中，它会迅速溶胀破裂释放出血红蛋白。

8. 自 溶

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。

（二）化学处理法

用脂溶性溶剂（如丙酮、氯仿）或表面活性剂（如十二烷基磺酸钠或十二烷基硫酸钠）处理细胞时，可以使细胞壁和细胞膜的结构部分破坏，进而使细胞释放出各种酶类等物质，最后导致整个细胞破碎。

(三) 生物酶解法

许多生物酶(如溶菌酶、纤维素酶、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。

三、目标物质的抽提

(一) 抽提的含义

抽提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。经过预处理和细胞破碎的原材料中,所含有效成分可用缓冲液、稀酸、稀碱或有机溶剂(如丙酮)等进行抽提,有时候还可以用蒸馏水进行抽提。一般理想的抽提液需要具备下述条件:对有效成分溶解度大而破坏性小;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。抽提的原则是“少量多次”,即对于等量的抽提液,分多次抽提比一次抽提效果要好得多。

(二) 抽提条件的选择

提取条件的选择,除考虑该目标物质的溶解度外,同时还应考虑该物质在该溶剂、该 pH 条件下的稳定性。pH 是影响有效成分抽提的主要因素。对于蛋白质或酶等具有等电点的两性电解质物质,抽提液的 pH 一般选在等电点两侧的稳定范围内。通常碱性蛋白质选取低 pH 的溶液进行抽提,而酸性蛋白质选用高 pH 的溶液进行抽提,或者用一定 pH 的有机溶剂进行抽提。如胰岛素提取,选择水做溶剂, $\text{pH} = 2.5 \sim 2.7$,而胰岛素在 $\text{pH} = 2.0$ 时溶解度比 $\text{pH} = 2.5$ 时更大,但在 $\text{pH} = 2.0$ 时,胰岛素的稳定性降低。同时还应考虑提取的最适时间,一般来说,生物大分子提取时间越长,溶解度越大,而同时杂质溶解度也增大。故提取最佳条件的选择,必须综合分析各种影响因素,合理搭配各种提取条件。

四、目标物质初分离

为获得所需要有效成分,采取适当的方法除去混杂在生化成分提取液中杂质的过程称为目标物质的初级分离。常用的方法有沉淀法、超滤法及透析法等,下面逐一介绍。

(一) 沉淀法

沉淀法分离生物分子的基本原理是根据各种物质的结构、性质差异(如蛋白质分子表面疏水基团和亲水基团之间比例的差异)来改变溶液的某些性质(如 pH、极性、离子强度和金属离子等),使抽提液中有效成分的溶解度发生改变,然后经过适当的处理,即可以达到分离的目的。该法是纯化生化成分常用的一种经典方法,具有操作简单、成本低廉等特点。沉淀法主要包括盐析沉淀、有机溶剂沉淀和选择性沉淀等类型。

1. 盐析沉淀法

由于生物大分子都是比较稳定的亲水胶体,因此当在其溶液中加入高浓度的硫酸铵、氯

化钠等中性盐时,可有效地破坏蛋白质颗粒的水化层(盐离子半径越小,水化能力越强),同时又中和了蛋白质表面的电荷,从而使生物大分子集聚而生成沉淀,这种现象称为盐析。

2. 有机溶剂沉淀法

有机溶剂能对许多水溶性成分产生沉淀作用,其原因是有机溶剂有较强的水化能力,可夺取生化分子周围的水化膜,另外也可降低水溶液的介电常数。常用的有机溶剂有乙醇和丙酮。

3. 等电点沉淀法

等电点沉淀法是利用蛋白质在等电点时溶解度最低而各种蛋白质又具有不同等电点的特点进行分离的方法。

(二) 超滤法

超滤法是通过在溶液表面施加一定的压力,借用特别的薄膜对溶液中各溶质分子进行选择过滤的一种纯化方法。当溶液在一定的压力下(氮气压或真空泵压),溶剂和小分子可透过薄膜,而大分子则受阻保留。该法最适合生物大分子的浓缩和脱盐,具有操作简便、分辨率高、条件温和且不引起离子状态及相的变化等优点。

(三) 透析法

透析法是指将待处理的溶液置于具有半透膜性质的透析袋中,然后将此袋放在水或适当离子强度的缓冲液中,无机盐及一些小分子的代谢产物,由于扩散作用通过半透膜而被除去,而大分子物质仍然保留在袋中。该法多用于制备生物大分子时除去或更换小分子物质、脱盐及改变溶剂成分等。

五、目标物质的纯化与纯度鉴定

(一) 目标物质的纯化

目标物质经过初级分离后并不是很纯,需要进一步纯化,这个过程称为目标物质的纯化。纯化常用的方法有层析法、电泳法、超离心法和结晶法等。选择哪一种方法,则取决于目标物质的理化性质等。

1. 层析法

层析技术是当前分离纯化生化成分最有效的手段。不论是哪种层析技术,其基本原理都是根据各种生化成分在两个相中具有不同的分配系数,当两个相做相对运动时,各种生化成分在两相间进行反复多次的分配,从而达到分离纯化的目的。

2. 电泳法

由于生物活性成分的带电性质、电荷多寡、颗粒形态和大小不同,因而在一定电场中移动的方向和速度不同,根据这一原理对它们进行有效分离的技术叫做电泳。电泳技术常以有无支持物来分类。在溶液中不用支持物进行的电泳叫作自由电泳,反之,用支持物进行的电泳叫作区带电泳。根据所用支持物的不同又可以分为纸电泳、醋酸纤维素薄膜电泳、琼脂糖