



“十二五”职业教育国家规划教材
经全国职业教育教材审定委员会审定
国家级精品资源共享课程配套实验教材



生物化学实验技术

(第二版)

何金环 连艳鲜 主编



中国轻工业出版社 | 全国百佳图书出版单位



“十二五”职业教育国家规划教材
经全国职业教育教材审定委员会审定
国家级精品资源共享课程配套实验教材

生物化学实验技术

(第二版)

何金环 连艳鲜 主编



中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学实验技术/何金环, 连艳鲜主编. —2 版. —北京: 中国轻工业出版社, 2014. 10

“十二五”职业教育国家规划教材

ISBN 978 - 7 - 5019 - 9862 - 3

I. ①生… II. ①何…②连… III. ①生物化学—实验—职业教育—教材 IV. ①Q5 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 171840 号

责任编辑: 张 靓 责任终审: 唐是雯 封面设计: 锋尚设计
版式设计: 王超男 责任校对: 燕 杰 责任监印: 张 可

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

印 刷: 北京君升印刷有限公司

经 销: 各地新华书店

版 次: 2014 年 10 月第 2 版第 1 次印刷

开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 12.25

字 数: 240 千字

书 号: ISBN 978 - 7 - 5019 - 9862 - 3 定价: 26.00 元

邮购电话: 010 - 65241695 传真: 65128352

发行电话: 010 - 85119835 85119793 传真: 85113293

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社邮购联系调换

131223J2X201ZBW

本书编写人员

主 编：何金环 连艳鲜

副 主 编：李祥 索江华 李华玮

参编人员：何金环 连艳鲜 李凤玲 李 祥 索江华
李华玮 潘春梅 梁月丽 张 华

主 审：王永芬

前言

PREFACE

生物化学是生命科学领域中最活跃的分支学科之一，生化技术是发展生命科学各分支学科和生物工程技术的重要基础。工业、农业、医药、卫生和环境科学的很多研究领域也以生物化学理论为依据，以其实验技术为手段。

河南牧业经济学院课程组承担的《生物化学》课程于2013年成功转型升级为国家级精品资源共享课程（课程网址：http://www.icourses.cn/coursestatic/course_2289.html），网站资源主要由11个课程基本教学模块和1个课程专题讲座模块组成，包含演示文稿、教学录像、教学内容、作业习题等；拓展资源包括教学案例、动画、图片素材、互动平台、生物化学中常见英文词汇详解、试题库等栏目。为进一步提高教学质量，提升精品资源共享课程建设，适应当前社会对专业人才的需求，特组织修订了该课程的配套实验教材《生物化学实验技术》。

本教材分为两部分：生物化学实验技术基本原理和生物化学实验。第一部分对基本生物化学实验技术理论进行了较翔实的介绍，以期使用者能够掌握生物化学实验的背景和原理，在做实验的同时使自己的专业理论水平真正得到提高。第二部分广泛选取了生物化学实验中较为成熟的糖类、脂类、氨基酸和蛋白质类、核酸类、酶类、维生素类和代谢类实验，特别注意实验内容的全面性，共计50多个实验项目，包括基础性实验、综合性实验和设计性实验。附录部分选择常用的实验数据。

本教材可作为高等院校生物、食品、化工、环境、动物等专业教材，也可供相关专业的学生、教师和科技工作者参考。

本教材主要由河南牧业经济学院生物化学课程组教师编写。本书的编写分工为：何金环编写前言、附录、第一、五、十章部分内容；连艳鲜编写第二、七、九章、第十一章部分内容；李祥编写第三、八、十章部分内容；索江华编写第四、六、十一章部分内容；李华玮编写第二、六、十二章部分内容；李凤玲编写第八、十章部分内容；潘春梅编写第六、十章部分内容；张华编写第五、七章部分内容；梁月丽编写附录部分。在本教材编写过程中河南牧业经济学院王永芬教授对全书进行了认真的校读，同时也得到了河南中医学院、河南农业大学等院校同仁的帮助，得到了各级相关领导的大力支持，在此特向他们表示衷心的感谢。

由于时间仓促，书中难免有疏漏和不当之处，希望在使用过程中能得到批评和建议的反馈信息，以便修订完善。

编者

目 录

CONTENTS

第一部分 生物化学实验的基本原理和技术

第一章 生物大分子制备技术	2
第一节 材料的选择和预处理	2
第二节 细胞的破碎及细胞器的分离	3
第三节 生物大分子的提取和分离纯化	4
第四节 样品的浓缩、保存及纯度鉴定	7
第五节 生化实验样品制备	9
第二章 离心技术	12
第一节 基本原理	12
第二节 离心机的类型和使用方法	13
第三节 常用离心方法	15
第三章 分光光度技术	16
第一节 基本原理	16
第二节 分光光度计的基本结构	18
第三节 分光光度技术的基本应用	20
第四节 提高测量精确度的方法	20
第四章 层析技术	22
第一节 层析的基本理论	22
第二节 常用的层析技术介绍	24
第五章 电泳技术	42

第一节	电泳的基本原理和影响因素	42
第二节	常用电泳操作技术	45
第三节	电泳设备及其应用	47

第二部分 生物化学实验

第六章	氨基酸及蛋白质类实验	51
实验一	薄层层析法分离氨基酸	51
实验二	纸层析法分离氨基酸	53
实验三	氨基氮的测定——甲醛滴定法	54
实验四	蛋白质的沉淀反应	56
实验五	蛋白质的两性反应和等电点测定	58
实验六	双缩脲法测定蛋白质含量	60
实验七	Folin - 酚试剂法测定蛋白质含量	62
实验八	考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量	63
实验九	紫外吸收法测定蛋白质含量	65
实验十	微量凯氏定氮法测定粗蛋白含量	66
实验十一	乙酸纤维素薄膜电泳法分离血清蛋白质	70
实验十二	聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳法分离蛋白质	73
实验十三	SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质相对分子质量	77
实验十四	离子交换柱层析法分离混合氨基酸	79
实验十五	酪蛋白的制备	81
实验十六	细胞色素 C 的制备及测定	82
实验十七	血清免疫球蛋白的分离纯化及鉴定	84
第七章	核酸类实验	90
实验十八	动物组织中 DNA 的提取与含量测定	90
实验十九	酵母 RNA 的提取及鉴定	92
实验二十	质粒 DNA 的微量快速提取与鉴定	95
实验二十一	PCR 基因扩增 DNA	98
实验二十二	DNA 琼脂糖凝胶电泳检测	100
实验二十三	二苯胺显色法测定 DNA 含量	102

实验二十四 地衣酚显色法测定 RNA 含量	103
实验二十五 定磷法测定核酸含量	104
第八章 酶类实验	107
实验二十六 温度、pH、激活剂、抑制剂对酶活力的影响	107
实验二十七 琥珀酸脱氢酶的作用及其竞争性抑制	109
实验二十八 蔗糖酶活力测定	110
实验二十九 血清转氨酶活力测定	112
实验三十 蛋清溶菌酶的制备及活力测定	114
实验三十一 碱性磷酸酶的分离与纯化	116
实验三十二 淀粉酶的活力及比活力测定	119
实验三十三 蛋白酶活力测定	121
实验三十四 大蒜超氧化物歧化酶 (SOD) 的分离提取与活力测定	124
第九章 维生素类实验	127
实验三十五 维生素 C 的定量测定 (2, 6 - 二氯酚靛酚滴定法)	127
实验三十六 维生素 A 的定量测定 (比色法)	129
实验三十七 维生素 B ₂ 的定量测定	131
实验三十八 维生素 B ₁₂ 的定量测定 (HPLC 法)	132
第十章 糖类实验	135
实验三十九 糖类性质实验	135
实验四十 血糖的定量测定 (福林 - 吴宪法)	137
实验四十一 总糖和还原糖测定 (3, 5 - 二硝基水杨酸法)	139
实验四十二 肝糖原的提取与鉴定	141
实验四十三 果胶的提取	142
实验四十四 糖酵解产物乳酸的测定	144
第十一章 脂类实验	146
实验四十五 粗脂肪的定量测定 (索氏抽提法)	146
实验四十六 卵磷脂的提取及鉴定	147
实验四十七 脂肪酸价的测定	149
实验四十八 脂肪碘值的测定	150
第十二章 其它实验	152

实验四十九 水分的测定 152

实验五十 血清无机磷的定量测定 154

实验五十一 血清钙测定（EDTA - Na₂ 滴定法） 155

实验五十二 叶绿素含量的测定（分光光度法） 156

实验五十三 畜禽肉中己烯雌酚的测定（高效液相色谱法） 158

实验五十四 酶联免疫吸附法（ELISA）测定食品中磺胺二甲嘧啶残留 160

实验五十五 蔬菜上有机磷和氨基甲酸酯类农药残毒快速检测方法 162

附录 165

一、试剂的配制 165

（一）常用溶液浓度的单位及计算 165

（二）标准溶液的配制和标定 166

（三）常用缓冲溶液的配制 167

（四）调整硫酸铵溶液饱和度计算表 174

二、生物化学实验常用参数 175

（一）一般化学试剂的分级 175

（二）实验室分析用水规格 176

（三）常用酸碱的相对密度和质量分数、溶解度的关系 176

（四）常见蛋白质等电点参考值 180

（五）元素的相对原子质量表 182

参考文献 184

第一部分

生物化学实验的基本原理和技术

近代生物化学研究的发展已从细胞水平、亚细胞水平，深入到生物大分子水平，甚至能研究分子内的结构与功能关系，能进行分子的改造和重建以改变生物性状。生物化学研究的任一突破性进展，无不与新的实验技术方法的创建密切关联。

重要的现代生物化学实验技术，按其目的和性质大致可分为三大类：一是按不同的物理化学性质进行分析鉴定和分离制备；二是经一系列不同的化学和物理方法处理，以求得差异分辨，或按指令合成不同的高分子物质。如氨基酸序列分析和序列合成、核苷酸序列分析和序列合成等；三是有目的地对 **DNA** 进行剪切拼接，然后引入细胞中的 **DNA** 重组技术（或分子克隆技术）和单克隆抗体技术等。

本部分主要介绍现代生物化学实验技术，如大分子物质的制备技术、离心技术、分光光度技术、层析技术、电泳技术等实验技术理论，以期使用者能够掌握生化实验的背景和原理，在做实验的同时使自己的专业理论水平真正得到提高，掌握经典的生物化学分析技术的原理及现代生物化学分析技术发展的最新动态。

当然，随着科学技术的发展，一些高效自动化、灵敏精确度高、重复性好、特异性强的高性能仪器使得生物化学实验技术日臻完善。必须强调的是，技术方法是十分重要的实验手段，但实验设计是实现实验目的的重要因素，只有巧妙地利用不同的生物化学实验技术，方能达到预期的研究目的。

第一章 生物大分子制备技术

生物大分子主要指蛋白质（包括酶）和核酸。以蛋白质和核酸的结构与功能为基础，从分子水平上认识生命现象，已经成为现代生物学发展的主要方向，研究生物大分子，常常需要一些高度纯化并具有生物学活性的目的物质。

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、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，因为它是整个分离纯化过程的“眼睛”。③通过文献调研和预实验，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，这是最困难的过程。⑥生物大分子制备物的均一性（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。

第一节 材料的选择和预处理

一、生物材料的选择

制备生物大分子，首先要选择适当的生物材料。材料的来源无非是动物、植物和微生物及其代谢产物。从工农业生产角度选择材料，应选择含量高、来源丰富、制备工艺简单、成本低的原料，但往往这几方面的要求不能同时具备，含量丰富但来源困难，或含量来源较理想，但材料的分离纯化方法烦琐，流程很长，反倒不如含量低些但易于获得纯品的材料，由此可见，必须根据具体情况，抓住主要矛盾决定取舍。从科研工作的角度选材，则只需考虑材料的选择符合实验预定的目标要求即可。除此之外，选材还应注意植物的季节性、地理位置和生长环境等。选动物材料时要注意其年龄、性别、营养状况、遗传素质和生理状态等。动物在饥饿时，脂类和糖类含量相对减少，有利于生物大分子的提取分离。选微生物材料时要注意菌种的代数和培养基成分等之间的差异，例如在微生物的对数期，酶和核酸的含量较高，可获得较高的产量。

二、材料的预处理

材料选定后要尽可能保持新鲜，尽快加工处理，动物组织要先除去结缔组织、脂肪等非活性部分，绞碎后在适当的溶剂中提取，如果所要求的成分在细胞内，则要先破碎细胞。植物要先去壳、除脂。微生物材料要及时将菌体与发酵液分开。生物材料如暂不提取，应冰冻保存。动物材料则需深度冷冻保存。

第二节 细胞的破碎及细胞器的分离

一、细胞的破碎

细胞是生物体结构和功能的基本单位。就真核生物而言,细胞除有细胞膜、细胞质和细胞核外,还有线粒体、质体等细胞器。通常人们所需的物质有些分泌于细胞外,用适当的溶剂可直接提取;有些则存在于细胞内,提取时必须使细胞破碎,使生物大分子充分释放到溶液中。不同生物体,或同一生物体不同的组织,其细胞破碎难易不一,使用方法也不完全相同。如动物胰脏、肝脏、脑组织一般比较柔软,用普通匀浆器研磨即可;肌肉及心脏组织较韧,需预先绞碎再匀浆。植物肉质组织可用一般研磨方法,含纤维较多的组织则必须在高速捣碎器内破碎或加砂研磨。许多微生物均具有坚韧的细胞壁,常用自溶、冷热交替、加砂研磨、超声波和加压处理等方法破碎细胞。

1. 机械法

机械法是通过机械切力的作用使组织细胞破碎的方法,常用的器械有:

(1) 高速组织捣碎机 适宜于动物内脏组织、植物肉质种子、叶和芽等材料的破碎。

(2) 玻璃匀浆器 由一内壁经过磨砂的玻璃管和一根一端为球状(表面经过磨砂)的杆组成。操作时,先把绞碎的组织置于管内,再套入研杆用手工来回研磨,或把杆装在电动搅拌器上,用手握住玻璃管上下移动,即可将组织细胞研碎。匀浆器的内杆球体与管壁之间一般只有十分之几毫米,细胞破碎程度比高速组织捣碎机高,机械切力对生物大分子破坏较少。适用于量少的动物脏器组织。

(3) 研钵 常用研钵研磨。细菌及植物材料应用较多,加入少量的玻璃砂效果较好。

2. 物理法

(1) 反复冻融法 把待破碎样品放至 -20°C 以下冰冻,室温融解,反复几次大部分动物性的细胞及细胞内的颗粒可被破碎。

(2) 冷热交替法 在细菌或病毒中提取蛋白质和核酸时可使用此法。操作时,将材料投入沸水中,维持数分钟,立即置于冰浴中使之迅速冷却,绝大部分细胞被破坏。

(3) 超声波处理法 此法多用于微生物材料,处理效果与样品浓度和使用频率有关。用大肠杆菌制备各种酶,常选用质量浓度为 $50\sim 100\text{mg/mL}$ 的浓度,在 $10\sim 100\text{kHz}$ 频率下处理 $10\sim 15\text{min}$ 。应用超声波处理时应注意避免溶液中气泡的存在,对超声波敏感的核酸及酶慎用。

(4) 加压破碎法 加气压或水压使每平方英寸达 $3\sim 5\text{MPa}$ 压力时,可使90%以上细胞被压碎,此法多用于工业上微生物酶制剂的制备。

3. 化学及生物化学法

(1) 自溶法 将待破碎新鲜生物材料存放在一定的pH和适当温度下,利用组织细胞中自身的酶系将细胞破坏,使细胞内含物释放出来。自溶的温度,动物材料常选在

0~4℃, 微生物材料则多在室温下进行。自溶时, 需加少量防腐剂如甲苯、氯仿等以防止外界细菌的污染。因自溶的时间较长, 不易控制, 所以制备具有活性的核酸或蛋白质比较少用。

(2) 溶菌酶处理 溶菌酶具有专一地破坏细菌细胞壁的功能, 适用于多种微生物, 另外, 蜗牛酶、纤维素酶也常被选为破坏细菌及植物细胞之用。

(3) 表面活性剂处理法 较常用的有十二烷基硫酸钠(SDS)、氯化十二烷基吡啶、去氧胆酸钠等。

无论用那一种方法破碎组织细胞时, 都在一定的稀盐溶液或缓冲溶液中进行, 一般还需加入某些保护剂, 以防止生物大分子的变性及降解。

二、细胞器的分离

各类生物大分子在细胞内的分布是不同的, DNA 几乎全部在细胞核内, RNA 则主要在胞浆中, 各种酶在细胞内的分布也有特定的位置。因此应根据某一目的物质的位置来选取材料。

细胞器的分离一般采用差速离心法, 这是利用细胞各组分质量大小不同, 沉降于离心管内不同区域, 分离后即得到所需组分。细胞器分离中常用的介质有蔗糖、Ficoll(一种蔗糖多聚体)或葡萄糖、聚乙二醇等溶液。

第三节 生物大分子的提取和分离纯化

一、蛋白质和酶的提取及分离纯化

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、电荷和与其他分子的亲和性等。各种方法的基本原理基本上可以归纳为两个方面: 一是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; 二是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。

影响提取的因素主要有: 目的产物在提取的溶剂中溶解度的大小; 由固相扩散到液相的难易; 溶剂的 pH 和提取时间等。一种物质在某一溶剂中溶解度的大小与该物质的分子结构及使用的溶剂的理化性质有关。一般地说, 极性物质易溶于极性溶剂, 非极性物质易溶于非极性溶剂; 碱性物质易溶于酸性溶剂, 酸性物质易溶于碱性溶剂; 温度升高, 溶解度加大; 远离等电点的 pH, 溶解度增加。提取时所选择的条件应有利于目的产物溶解度的增加和保持其生物活性。

1. 水溶液提取

蛋白质和酶的提取一般以水溶液为主。稀盐溶液和缓冲系统的水溶液对蛋白质的稳定性好, 溶解度大, 是提取蛋白质和酶最常用的溶剂。用水溶液提取生物大分子应注意

的几个主要影响因素：

(1) 盐浓度（即离子强度） 离子强度对生物大分子的溶解度有极大的影响，有些物质，如 DNA - 蛋白复合物，在高离子强度下溶解度增加，而另一些物质，如 RNA - 蛋白复合物，在低离子强度下溶解度增加，在高离子强度下溶解度减小。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。但中性盐的浓度增加至一定时，蛋白质的溶解度又逐渐下降，直至沉淀析出，称为“盐析”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。所以低盐溶液常用于大多数生物物质的提取。通常使用 0.02 ~ 0.05 mol/L 缓冲液或 0.09 ~ 0.15 mol/L NaCl 溶液提取蛋白质和酶。不同的蛋白质极性大小不同，为了提高提取效率，有时需要降低或提高溶剂的极性。向水溶液中加入蔗糖或甘油可使其极性降低，增加离子强度 [如加入 KCl、NaCl、NH₄Cl 或 (NH₄)₂SO₄] 可以增加溶液的极性。

(2) pH 蛋白质、酶与核酸的溶解度和稳定性与 pH 有关。过酸、过碱均应尽量避免，提取溶剂的 pH 应在蛋白质和酶的稳定范围内，通常选择偏离等电点的两侧。碱性蛋白质选在偏酸一侧，酸性蛋白质选在偏碱的一侧，以增加蛋白质的溶解度，提高提取效果。例如胰蛋白酶为碱性蛋白质，常用稀酸提取，而肌肉甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶属酸性蛋白质，则常用稀碱来提取。

(3) 温度 为防止变性和降解，制备具有活性的蛋白质和酶，提取时一般在 0 ~ 5℃ 的低温操作。但少数对温度耐受力强的蛋白质和酶，可提高温度使杂蛋白变性，有利于提取和下一步的纯化。

(4) 防止蛋白酶或核酸酶的降解作用 在提取蛋白质、酶和核酸时，常常受自身存在的蛋白酶或核酸酶的降解作用而导致实验的失败。为防止这一现象的发生，常常采用加入抑制剂或调节提取液的 pH、离子强度或极性等方法使这些水解酶失去活性，防止它们对欲提纯的蛋白质、酶及核酸的降解作用。例如在提取 DNA 时加入 EDTA 络合 DNAase 活化所必须的 Mg²⁺。

(5) 搅拌与氧化 搅拌能促使被提取物的溶解，一般采用温和搅拌为宜，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。因为一般蛋白质都含有相当数量的巯基，有些巯基常常是活性部位的必需基团，若提取液中有氧化剂或与空气中的氧气接触过多都会使巯基氧化为分子内或分子间的二硫键，导致酶活性的丧失。在提取液中加入少量巯基乙醇或半胱氨酸以防止巯基氧化。

2. 有机溶剂提取

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，因此常用来提取与脂结合较牢或含非极性侧链较多的蛋白质、酶和脂类。例如植物种子中的玉蜀黍蛋白、麸蛋白，常用 70% ~ 80% 的乙醇提取，动物组织中一些线粒体及微粒上的酶常用丁醇提取。

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。例如,胰岛素可溶于稀酸、稀碱和稀醇溶液中,但在组织中与其共存的糜蛋白酶对胰岛素有极高的水解活性,因而采用6.8%乙醇溶液并用草酸调溶液的pH为2.5~3.0,进行提取,这样就从下面三个方面抑制了糜蛋白酶的水解活性:①6.8%的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 Ca^{2+} ;③pH 2.5~3.0,是糜蛋白酶不宜作用的pH。以上条件对胰岛素的溶解和稳定性都没有影响,却可除去一部分在稀醇与稀酸中不溶解的杂蛋白。

二、核酸的提取和分离纯化

1. 核酸的提取

核酸都溶于水,而不溶于有机溶剂,利用此性质进行提取。在细胞内DNA与蛋白质结合成脱氧核糖核蛋白(DNP),RNA与蛋白质结合成核糖核蛋白(RNP),在不同浓度的盐溶液中它们的溶解度差别很大,DNP在纯水或1mol/L NaCl溶液中溶解度较大,但在0.14mol/L NaCl溶液中溶解度很低,相反,RNP易溶解。因此,用0.14mol/L NaCl溶液可简单地初步分开DNP和RNP。

在分离核酸中最困难的是将核酸与紧密结合的蛋白质分开,而且还要避免核酸的降解。常用的解离剂是阴离子去垢剂,如脱氧胆酸钠、十二烷基硫酸钠(SDS)、4-氨基水杨酸钠和萘-1,5-二磺酸钠等,它们具有溶解病毒、细菌的作用,可使核酸从蛋白质上游离出来,还具有抑制核糖核酸酶的作用。另外除去核酸中的蛋白质的一个有效办法是用酚-氯仿混合液,它们可使蛋白质变性,并对核糖核酸酶有抑制作用,另外氯仿相对密度大可使有机相和水相完全分开,减少残留在水相中的酚。在用酚-氯仿抽提核酸提取液时,还需要剧烈振摇,为防止起泡和促使水相与有机相的分离,在酚-氯仿抽提液中再加上一一定量的异戊醇。

2. 核酸的纯化

核酸的纯化最关键步骤是去除蛋白质,通常只要用酚-氯仿、氯仿抽提核酸的水溶液即可。每当需要把DNA克隆操作的某一步所用的酶灭活或去除以便进行下一步时,可进行这种抽提。然而,如果从细胞裂解液等复杂的分子混合物中纯化核酸,则要先用某些蛋白水解酶消化大部分蛋白质后,再用有机溶剂抽提。这些广谱的蛋白酶包括链霉蛋白酶及蛋白酶K等,它们对多数天然蛋白质均有活性。

用酚-氯仿抽提:这两种有机溶剂合用,比单独用酚抽提除蛋白效果更佳。继而用氯仿抽提则可除去核酸制品中的痕量酚。具体步骤如下:①核酸样品置有盖小离心管中,加入等体积的酚-氯仿;②旋涡混匀管内容物,使呈乳状;③12000g室温离心15s;④水相移入另一离心管,弃去两相界面和有机相;⑤重复步骤①~④,直至两相界面上无蛋白质为止;⑥加入等体积的氯仿并重复②~④步操作;⑦按下述核酸浓缩法沉淀回收核酸。

3. 核酸的浓缩

应用最广的核酸浓缩法是乙醇沉淀法。在中等浓度单价阳离子存在下,加入一定量

的乙醇后，所形成的核酸沉淀可经离心而回收。回收的核酸可按所需浓度，再溶于适当的缓冲液中。具体操作时，可向含样品的小离心管中加入单价阳离子盐贮存液。单价阳离子盐的选择，主要基于下述考虑：用醋酸铵可减少 dNTP 的共沉淀，但如以后要作核酸的磷酸化时应避免用醋酸铵，因铵离子是多核苷酸激酶的强烈抑制剂。当用较高浓度的乙醇沉淀 RNA 时，常用 LiCl，因 LiCl 在乙醇中溶解度很高，不随核酸共沉淀。含有 SDS 的核酸样品，应使用 NaCl，这时该去垢剂在 70% 乙醇中仍保持可溶。DNA 和 RNA 的沉淀，大多使用醋酸钠（pH5.2）。

4. DNA、RNA 的定量

准确的方法是紫外分光光度法。但此法要求核酸样品纯净，其中不应含有蛋白质、酚、琼脂糖或其它核酸、核苷酸等污染物。

用紫外分光光度计测定 260nm 和 280nm 两处的吸光度值。然后按 $1A_{260}$ 相当于 $50\mu\text{g/mL}$ 双链 DNA； $40\mu\text{g/mL}$ 单链 DNA 或 RNA； $20\mu\text{g/mL}$ 单链寡核苷酸计算样品核酸含量。 A_{260}/A_{280} 反映样品核酸的纯度。DNA 纯品其比值为 1.8，RNA 纯品比值为 2.0。样品中含有蛋白质或酚污染，其比值低于此数。

第四节 样品的浓缩、保存及纯度鉴定

一、样品的浓缩

一般抽提液的体积都比较大，应先进行浓缩处理。常用的浓缩方法有下面几种。

1. 沉淀法

在抽提液中加入适量的中性盐或有机溶剂，使有效成分变为沉淀。经离心或过滤收集的沉淀物，加少量缓冲液溶解后，再经离心除去不溶物，获得的上清液通过透析或凝胶过滤脱盐，即可供纯化使用。

2. 吸附法

通过吸收剂直接吸收除去溶液分子使之浓缩。所用的吸收剂必须与溶液不起化学反应，对生物大分子不吸附，易与溶液分开。常用的吸收剂有聚乙二醇、聚乙烯吡咯酮、蔗糖和凝胶等。使用聚乙二醇吸收剂时，先将生物大分子溶液装入半透膜的袋里，外加聚乙二醇覆盖置于 4°C 下，袋内溶剂渗出即被聚乙二醇迅速吸去，聚乙二醇被水饱和后可更换新的，直至达到所需要的体积。

3. 超过滤法

把抽提液装入超过滤装置，在空气或氮气压力下，使小分子物质（包括水分）通过半透膜（如硝酸纤维素膜），大分子物质留在膜内。

4. 透析浓缩法

把装抽提液的透析袋埋在吸水力强的聚乙二醇（PEG）或甘油中， 10mL 抽提液可在 1h 内浓缩到几乎无水的程度。这种方法的浓缩速度与透析袋的表面积以及 PEG 的数量有密切关系。

5. 减压蒸馏浓缩法

将抽提液装入减压蒸馏器的圆底烧瓶中,在减压真空状态下进行蒸馏。当真空度较高时,溶液的沸点可控制在 30°C 以下。这种方法一般适用于常温下稳定性好的物质。

6. 冰冻干燥法

冰冻的抽提液在真空状态下,可以由固体直接变为气体。用此原理进行浓缩,有效成分几乎不会破坏。冻干机主要由低温干燥箱、真空泵和冷冻机构成。在冻干小体积样品时,可以将其置玻璃真空干燥器中进行。具体作法是,把分装至小瓶中的样品冰冻后放入装有五氧化二磷或硅胶吸水剂的真空干燥器中,连续抽真空使其达到浓缩、干燥状态。

二、干燥

干燥是将潮湿的固体、半固体或浓缩液中的水分(或溶剂)蒸发除去的过程。生物大分子的制备得到所需的产品后,为了防止变质,易于保存和运输,常需要干燥处理,最常用的方法是冷冻干燥和真空干燥,某些无活性的核酸、微生物酶制剂和酪蛋白等工业产品则较多地应用喷雾干燥、气流干燥等直接干燥法。

1. 真空干燥

在相同温度下,被干燥物质所含水分或溶剂由于周围空气压力的减少而蒸发速度增加。真空度愈高,溶液沸点愈低,蒸发愈快,其原理与真空浓缩(或称减压浓缩)相同。真空干燥适用于不耐高温、易氧化物质的干燥和保存,整个装置包括干燥器、冷凝器及真空泵三部分。干燥器顶部连接一带活塞的管道接通冷凝器,汽化后的蒸汽由此管道通过冷凝管凝聚,冷凝器另一端连接真空泵,干燥器内常放一些干燥剂如五氧化二磷、无水氯化钙等,以便样品的干燥保存。

2. 冷冻真空干燥

冷冻真空干燥,除利用真空干燥原理外,同时增加了温度因素。在相同压力下,水蒸气压随温度的下降而下降,故在低温低压下,冰很易升华为气体。操作时,一般先将待干燥液体冷冻到冰点以下使之变成固体,然后在低温低压下将溶剂变成气体而除去。此法干燥后的产品具有疏松、溶解度好、保持天然结构等优点,适用于各类生物大分子的干燥保存。

3. 喷雾干燥

喷雾干燥是将液体通过喷洒装置喷成雾滴后,与干燥介质(一般为热空气)直接接触干燥的方法。由于液体分散为雾滴时,直径通常只有 $1\sim 200\mu\text{m}$ 大小,与热空气接触面大,水分蒸发很快。在 100°C 的热空气中,只需不到一秒的时间即可干燥。因干燥时间短和水分蒸发时吸收热量,使液滴及其附近的空气温度较低,故工业上常用于干燥微生物酶制剂和某些生化产品。

三、保存

生物大分子的储藏保存可分为干固态储藏和液态储藏两种。储藏时应避免长期暴露于空气中被微生物污染,并应注意低温保存。