

高等学校教材

制药工程专业实验

▶ 沈齐英 王腾 主编

Specialized Experiment of
Pharmaceutical Engineering

 化学工业出版社

■ 高等学校教材 ■

制药工程专业实验

► 沈齐英 王腾 主编

Specialized Experiment of
Pharmaceutical Engineering



化学工业出版社

· 北京 ·

制药工程专业实验是制药工程专业教学的重要环节之一。本实验教材内容涉及制药工程基础课、专业基础课和专业课,包括生物化学、工业微生物学、药物化学、天然药物化学、工业药剂学、药物分析和制药分离工程等课程内容。本书共分:生物化学实验、工业微生物学实验、综合专业实验和常用实验技术及仪器操作规程4部分。书中结合基础型实验和专业型实验,详细介绍了实验原理、实验内容和注意事项等,并介绍了常用仪器的工作原理、使用方法及维护和保养等内容。通过专业实验训练,力求促使学生掌握制药基本知识和基本技术。

本书可作为高等学校制药工程、制剂工程、药学等专业的本科生教材,也可供相关专业人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

制药工程专业实验/沈齐英,王腾主编. —北京:化学工业出版社,2012.1
高等学校教材
ISBN 978-7-122-15663-1

I. ①制… II. ①沈…②王… III. ①制药工业-化学工程-实验-高等学校-教材 IV. ①TQ46-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第248029号

责任编辑:杜进祥 徐雅妮
责任校对:宋 玮

文字编辑:向 东
装帧设计:韩 飞

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)
印 装:大厂聚鑫印刷有限责任公司
787mm×1092mm 1/16 印张9½ 字数234千字 2013年1月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价: 25.00 元

版权所有 违者必究



前言

制药工程是化学、药学和工程学相互渗透的新兴交叉学科，以培养在化学制药、中药制药和生物制药等领域中从事和药物生产相关的工程技术研究人才为目标。至 1998 年教育部设立以来，全国已有 300 多所高等院校设立制药工程专业。

为适应教育改革的需要，北京石油化工学院制药工程系以 CDIO 工程教育模式作为办学理念，培养学生的实际动手能力，强调学生对基础及专业知识的综合运用与实践，从而建立对药品生产过程的感性和理性认识。制药工程专业实验是制药工程专业教学实践的重要环节，为将上述教学理念更好地融入教学，我们本着强调基础理论、基本知识和基本技能的主旨编写了本书。

本书主要面向制药工程专业三、四年级本科生，实验内容涉及制药工程基础课、专业基础课和专业课，包括生物化学、工业微生物学、药物化学、天然药物化学、工业药剂学、药物分析和制药分离工程等课程内容。本书的特色为将实验划分为基础课、专业基础课和专业课实验三类，内容设置结合药品生产技术的发展贯穿了整个制药工程专业的培养方案，将各门相关课程的实验内容有机结合，加强了从基础课到专业课的内在联系，同时避免基础课和专业课内容的脱节及不必要的重复。全书内容较全面，涵盖了药物合成、提取、分离纯化、药物检测技术及药物制剂等方面，鼓励学生在高要求的实验训练中加强对已学各科知识的综合运用，以利于实践型人才的培养。另外，本书的第四章介绍了部分制药工程专业实验的方法、技术及设备，有利于学生了解、掌握和药品生产相关的制药技术和设备特点。

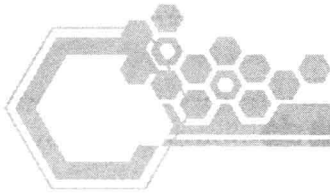
本书截稿时，正值教育部“卓越工程师教育培养计划”的推出，本书的出版也有利于“卓越工程师教育培养计划”模式下制药工程专业实践教学工作的进一步改进。

本书由沈齐英、王腾主编，参加编写的还有张志红、晁建平、迟姚玲等。在本书的编写过程中，得到了北京石油化工学院及化学工业出版社领导的鼓励和支持，并获得了北京石油化工学院教学改革重点项目的资助（2012zd001），在此深表感谢！书稿曾参考国内外同类相关书籍及文献，在此向原作者表示诚挚的感谢！

由于编者水平有限，书中不妥之处及瑕疵在所难免，恳请读者批评指正。

编者

2012 年 8 月



目 录

第一章 生物化学实验	1
实验一 蛋白质的两性性质和等电点的测定	1
实验二 凯氏定氮法测定蛋白质的含量	3
实验三 牛奶中酪蛋白的提取及含量测定	5
实验四 蛋白酶的分离提取及纯化	7
实验五 碱性磷酸酶动力学参数的测定	9
实验六 植物中可溶性总糖的测定	12
实验七 卵磷脂的提取和鉴定	13
实验八 DNA 的制备和鉴定	15
实验九 糖酵解中间产物的鉴定	18
实验十 凝胶过滤层析法分离血红蛋白和鱼精蛋白	20
第二章 工业微生物学实验	22
实验一 培养基的制备和灭菌技术	22
实验二 常见微生物的分离和纯化技术	27
实验三 原核微生物的形态结构观察及染色技术	30
实验四 微生物细胞数的计数	34
实验五 石炭酸系数法对药物药效的检测	35
实验六 食品中细菌总数及大肠杆菌群的检测	38
第三章 综合专业实验	43
实验一 阿司匹林的制备及鉴别	43
实验二 L-抗坏血酸棕榈酸酯的合成	45
实验三 (R)-四氢噻唑-2-硫酮-4-羧酸的合成	46
实验四 外消旋 α -苯乙胺的制备	48
实验五 外消旋 α -苯乙胺的拆分	50
实验六 茶叶中咖啡因的提取与鉴定	52
实验七 中药槐花米中芦丁和槲皮素的提取、分离与鉴定	55
实验八 滴丸的制备及质量检查	59
实验九 栓剂的制备	62
实验十 片剂的制备及质量检查	65
实验十一 阿司匹林中乙酰水杨酸的含量测定	69
实验十二 对乙酰氨基酚片溶出度的测定	72
实验十三 赖氨酸发酵	75

实验十四 基因工程干扰素的制备	78
-----------------------	----

第四章 常用实验技术及仪器操作规程	81
--------------------------------	-----------

第一节 层析技术	81
----------------	----

一、凝胶过滤层析	81
----------------	----

二、离子交换层析	83
----------------	----

三、亲和层析	84
--------------	----

第二节 离心技术	86
----------------	----

第三节 电泳技术	87
----------------	----

一、电泳的基本原理	87
-----------------	----

二、影响电泳的因素	88
-----------------	----

三、聚丙烯酰胺凝胶电泳	89
-------------------	----

四、电泳的基本操作	90
-----------------	----

第四节 多聚酶链式反应技术	90
---------------------	----

第五节 熔点仪	92
---------------	----

第六节 旋光仪	95
---------------	----

第七节 滴丸机	96
---------------	----

第八节 融变时限检查仪	98
-------------------	----

第九节 单冲压片机	100
-----------------	-----

第十节 智能崩解仪	103
-----------------	-----

第十一节 片剂硬度测试仪	106
--------------------	-----

第十二节 片剂脆碎度检测仪	107
---------------------	-----

第十三节 智能溶出试验仪	109
--------------------	-----

第十四节 高效液相色谱仪	117
--------------------	-----

一、高效液相色谱仪的基本结构	117
----------------------	-----

二、高效液相色谱的基本要求	120
---------------------	-----

三、高效液相色谱的测定方法	121
---------------------	-----

四、Waters 2695 型高效液相色谱仪操作规程	122
----------------------------------	-----

第十五节 紫外-可见分光光度计	124
-----------------------	-----

一、仪器的校正和检定	125
------------------	-----

二、对溶剂的要求	126
----------------	-----

三、测定法	126
-------------	-----

四、U-2800 可见分光光度计简易操作规程	127
------------------------------	-----

第十六节 生物反应器发酵罐	132
---------------------	-----

附录一 制药工程专业实验室基本规则和实验基本要求	136
---------------------------------------	------------

附录二 生化实验常用缓冲溶液和酸碱指示剂	139
-----------------------------------	------------

参考文献	143
-------------------	------------

第一章

生物化学实验

实验一 蛋白质的两性性质和等电点的测定

蛋白质 (protein) 是生命的物质基础, 没有蛋白质就没有生命。因此, 它是与生命及与各种形式的生命活动紧密联系在一起物质。蛋白质是由 20 种 L-型 α -氨基酸组成的高分子化合物。虽然大多数的 α -氨基和 α -羧基成肽键结合, 但仍有 N 末端的氨基和 C 末端的羧基存在, 同时侧链上还有一些可解离基团。因此, 蛋白质和氨基酸一样是两性电解质。在一定的溶液 pH 条件下都可解离成带正电荷和负电荷的基团。当蛋白质溶液处于某一 pH 时, 其分子中所带的正电荷和负电荷相等, 此时溶液中蛋白质以兼性离子形式存在, 在外加电场中蛋白质分子既不向正极移动也不向负极移动, 此时溶液的 pH 称为蛋白质的等电点 (isoelectric, pI)。不同的蛋白质, 因氨基酸的组成不同有不同的等电点。在等电点时, 蛋白质分子以两性离子形式存在, 其分子净电荷为零 (即正负电荷相等), 此时蛋白质分子颗粒在溶液中因没有相同电荷的相互排斥, 分子相互之间的作用力减弱, 其颗粒极易碰撞、凝聚而产生沉淀, 所以蛋白质在等电点时, 其溶解度最小, 最易形成沉淀物。等电点时的许多物理性质如黏度、膨胀性、渗透压等都变小, 从而有利于悬浮液的过滤。在等电点外的所有其他 pH 值, 依据蛋白质所带净电荷采用电泳和离子交换色谱来分离和纯化该蛋白质。

本实验通过酪蛋白的两性反应及测定其等电点, 使学生掌握蛋白质的两性解离性质; 熟练掌握测定蛋白质等电点的基本方法。

一、实验材料、试剂与仪器

1. 材料与试剂

- (1) NaOH, HCl, 乙酸, 溴甲酚绿, 酪蛋白, 精密 pH 试纸等。
- (2) 0.5% 酪蛋白溶液: 0.5g 酪蛋白, 先加入几滴 1mol/L 的 NaOH 使其湿润, 用玻璃棒搅拌研磨使成糨糊状, 逐滴加入 0.01mol/L 的 NaOH 使其完全溶解后定容到 100mL。
- (3) 酪蛋白-乙酸钠溶液: 将 0.25g 酪蛋白加 5mL 1mol/L 的 NaOH 溶解, 加 20mL 水温热使其完全溶解后, 再加入 5mL 1mol/L 的乙酸, 混合后转入 50mL 的容量瓶内, 加水到刻度, 混匀备用 (pH 应为 8~8.5)。
- (4) 0.01% 的溴甲酚绿溶液: 将 0.01g 溴甲酚绿溶解于 100mL 含有 0.57mL 0.1mol/L NaOH 的水中。该指示剂的变色范围是酸性 (pH 3.8) 为黄色, pH 5.4 为蓝色。
- (5) 0.02mol/L 的 HCl 溶液: 将 0.8mL 浓盐酸用蒸馏水稀释到 480mL 即可。
- (6) 0.02mol/L 的 NaOH 溶液: 将 0.8g NaOH 溶解于 100mL 水中, 最终加入到 1000mL。

- (7) 0.1mol/L 的乙酸 (HAc) 溶液: 将 1mL 冰醋酸用水稀释到 170mL。
 (8) 0.01mol/L 的乙酸溶液: 将 0.1mL 冰醋酸用水稀释到 170mL。
 (9) 1mol/L 的乙酸溶液: 1mL 冰醋酸 (17mol/L) 加水到 17mL 即可。

2. 仪器

试管, 滴管, 移液管, pH 试纸等。

二、实验方法与步骤

1. 蛋白质的两性反应

(1) 取一支干净的试管, 加入 20 滴 0.5% 的酪蛋白溶液, 逐滴加入 0.01% 的溴甲酚绿溶液 (约 5~7 滴), 充分混合, 观察溶液的颜色并解释 (蓝色)。

(2) 逐滴加入 0.02mol/L 的 HCl, 随加随摇动试管, 直到出现明显的沉淀为止, 用精密 pH 试纸测溶液的 pH, 观察溶液的颜色变化。

(3) 继续加入 0.02mol/L 的 HCl, 观察沉淀的变化和溶液颜色的变化。

(4) 逐滴加入 0.02mol/L 的 NaOH 到上面的溶液中, 使溶液的 pH 接近中性, 观察沉淀是否形成。

(5) 继续滴加 0.02mol/L 的 NaOH, 观察沉淀的变化。

2. 酪蛋白等电点的测定

(1) 取 9 只试管分别编号 1~9。

(2) 按表 1-1 向每管中加入试剂。注意, 每种试剂加完后, 要振荡试管。

(3) 试剂全部加完后, 静置 20min。

(4) 观察每管内溶液的浑浊度, 用“+”, “-”表示沉淀的多少。

(5) 判断酪蛋白的 pI 是多少。

表 1-1 酪蛋白等电点测定试剂用量

试管号	水/mL	1mol/L HAc/mL	0.1mol/L HAc/mL	0.01mol/L HAc/mL	酪蛋白-乙酸 钠溶液/mL	溶液最终的 pH	沉淀多少
1	2.4	1.6	—	—	1	3.5	
2	3.2	0.8	—	—	1	3.8	
3	—	—	4.0	—	1	4.1	
4	2.0	—	2.0	—	1	4.4	
5	3.0	—	1.0	—	1	4.7	
6	3.5	—	0.5	—	1	5.0	
7	1.5	—	—	2.5	1	5.3	
8	2.75	—	—	1.25	1	5.6	
9	3.38	—	—	0.62	1	5.9	

三、思考题

- (1) 何谓蛋白质的等电点? 在等电点时蛋白质的溶解度最低, 为什么?
 (2) 本实验中, 根据蛋白质的何种性质测定其等电点?
 (3) 测定蛋白质等电点为什么应在缓冲溶液中进行?

实验二 凯氏定氮法测定蛋白质的含量

蛋白质是一类重要的生物大分子 (Biomacromolecule), 在生物体内占有特殊的地位。生物体结构越复杂其蛋白质种类和功能也越繁多。具有复杂空间结构的蛋白质在生物体内承担着惊人的动态与结构功能, 是生物体的重要组成成分和生命活动的基本物质基础, 也是生物体中含量最丰富的生物分子。测定样品中蛋白质的方法较多, 主要有凯氏 (Kjedahl) 定氮法、紫外分光光度法、双缩脲法、考马斯亮蓝法、Folin-酚试剂法等。

尽管蛋白质的种类繁多、结构复杂, 但化学组成有极大的相似性, 其平均含氮量为 16%, 这是蛋白质元素组成的一个特点, 也是凯氏定氮法测定蛋白质含量的计算基础。

蛋白质是含一定量氮的有机化合物, 蛋白质样品在凯氏烧瓶中经过浓 H_2SO_4 消化后, 有机物炭化生成碳, 碳将硫酸还原为 SO_2 , 本身则变成 CO_2 , SO_2 使 N 还原为 NH_3 , 本身则氧化为 S_2O_3 而消化过程中生成 H_2 , 又加速了 NH_3 的形成。在反应过程中, 生成的 H_2O 和 S_2O_3 溢出, 而 NH_3 则与 H_2SO_4 结合成 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 存在溶液中, 加入 NaOH 并蒸馏, 使 NH_3 溢出, 用 H_3PO_3 吸收后, 以标准酸溶液滴定, 根据标准酸溶液消耗的量计算样品中的含氮量, 从而可以折算出蛋白质含量。本实验可使学生掌握半微量凯氏定氮法的原理; 熟悉利用半微量凯氏定氮法测定样品中蛋白质含量的操作方法。

一、实验材料、试剂与仪器

1. 材料与试剂

(1) 市售不同品牌牛奶, 浓 H_2SO_4 , K_2SO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaOH , HCl , H_3PO_4 , 甲基红, 乙醇, 溴甲酚绿, 定量滤纸等。

(2) 40% NaOH 溶液: 40g NaOH 溶于 100mL 水中。

(3) 0.05mol/L HCl 标准溶液: 4.2mL HCl 溶于 1000mL 水中, 碳酸钠法标定盐酸。

(4) 2% H_3BO_3 溶液: H_3BO_3 2mL 溶于 100mL 水中。

(5) 加速剂: 150g K_2SO_4 , 10g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 仔细混匀研磨。

(6) 甲基红-溴甲酚绿混合指示剂: 甲基红溶于乙醇配成 0.1% 乙醇溶液, 溴甲酚绿溶于乙醇配成 0.5% 乙醇溶液, 两种溶液等体积混合, 阴凉处保存 (保存期三个月以内)。

2. 仪器

凯氏定氮仪, 消化管, 酸式滴定管, 小漏斗, 研钵, 量筒, 玻璃珠, 锥形瓶, 天平等。

二、实验方法与步骤

1. 样品消化

(1) 牛奶 5mL 置于消化管内, 加入加速剂 5g, 并沿烧瓶壁缓缓加入 20mL 浓硫酸, 加入玻璃珠 2~3 粒, 摇动烧瓶使全部样品浸没于硫酸。

(2) 消化管放在消化炉支架上, 套上并下压毒气罩后, 用消化炉支架两侧的挂钩将其锁住。

(3) 把支架连同装有试样的消化管一起移至电热炉上保持消化管在电炉中心, 设定温度在 420°C 保持消化管中液体连续沸腾, 沸腾的酸在瓶颈下部冷凝回流。待溶液消煮至无微小

碳粒，呈蓝绿色时继续消煮 5min 左右。

(4) 消化结束，将支架连同消化管一同移回消化管托底上，冷却至室温。注意，在冷却过程中，毒气罩必须保持吸气状态（切忌放入冷水中冷却）放置，防止废气溢出。

2. 样品蒸馏

(1) 打开自来水给水龙头，使自来水经过给水口进入冷凝管。注意水流量以保证冷凝管起到冷却作用为止。

(2) 开总电源开关，待红色指示灯亮起，按一下蒸汽按钮待蒸汽导出管放出蒸汽，按消除按钮停止加热。

(3) 在蒸馏导出管托架上，放上已经加入适量（15mL 左右）接受液（2% H_3BO_3 溶液和甲基红-溴甲酚绿混合指示剂）的锥形瓶。抬起锥形瓶支架使蒸馏导出管的末端浸入接受液内。

(4) 在消化完全冷却后的消化管内，逐个加入 10mL 左右蒸馏水稀释样品。

(5) 向下压左侧手柄，将消化管套在防溅管密封圈上，稍加旋转使其保持接口密封，拉下防护罩。

(6) 按一下蒸汽按钮，开始蒸馏，到时或到量时自动停止。用洗瓶将蒸馏水冲洗接收，取下锥形瓶。

(7) 加 40% NaOH 溶液，按一下碱按钮，NaOH 溶液量必须至蒸馏液碱性颜色变黑为止。

3. 滴定与计算

吸收氨后的吸收液，用标定后的 0.05mol/L HCl 标准溶液进行滴定，溶液由蓝绿色变为灰紫色为滴定终点。

$$\text{粗蛋白质含量} = \frac{(V_2 - V_1) \times c \times 0.014 \times K \times V'}{W \times V} \times 100\%$$

式中 V_2 ——滴定样品时消耗 HCl 标准溶液的体积，mL；

V_1 ——滴定空白时消耗 HCl 标准溶液的体积，mL；

V' ——试样消解液蒸馏用体积，mL；

V ——样品分解液总体积，mL；

c ——HCl 标准溶液浓度，mol/L；

K ——氮换算成粗蛋白质的系数，牛奶为 6.3；

W ——样品质量，g；

0.014——氮的毫摩尔质量，g/mmol。

三、注意事项

(1) 实验中注意浓硫酸的正确使用。

(2) 实验中注意废液的处理。

四、思考题

(1) 能否使用碱溶液进行滴定，应如何设计实验？

(2) 凯氏定氮法是否适用于所有含氮化合物的测定？

(3) 何谓样品消化？在定氮仪的反应室内将发生什么化学反应？

实验三 牛奶中酪蛋白的提取及含量测定

蛋白质是被研究得最多的一类生物分子，对它们的研究包括体内和体外。体外研究多应用于纯化后的蛋白质，将它们置于可控制的环境中，以期获得它们的功能信息；例如，酶动力学相关的研究可以揭示酶催化反应的化学机制和与不同底物分子之间的相对亲和力。而体内研究实验着重于蛋白质在细胞或者整个组织中的活性作用，从而可以了解蛋白质发挥功能的场所和相应的调节机制。一般蛋白质分离、纯化的方法有中性盐析法，电泳法，层析法及有机溶剂法等。

酪蛋白在牛奶中主要以磷酸二钙、磷酸三钙或两者的复合物形式存在，结构复杂，相对分子质量大约为 57000~375000。酪蛋白是乳蛋白中最丰富的一类蛋白质，约占乳蛋白的 80% 以上，是一些含磷蛋白质的混合物，在牛奶中的含量约 35g/L，比较稳定，其等电点为 pH 4.6。纯酪蛋白为白色、无味、无臭的粒状固体，相对密度约 1.26，不溶于水和有机溶剂。通常的制备方法是新鲜牛奶脱脂，加酸（乳酸、乙酸、盐酸或硫酸），将 pH 调至等电点，使酪蛋白微粒失去电荷而凝固沉淀。用这种方法得到的酪蛋白称为酸酪蛋白，加酸的种类不同得到的酸酪蛋白却几乎毫无区别。酸酪蛋白是白色至淡黄色粉末或颗粒，稍有奶臭和酸味。在水中只是溶胀，若加入氨、碱及其盐时，则可分散溶解于水中，可溶于强酸、二乙醇胺、尿素、甲酰胺等。

蛋白质的呈色剂是酚试剂，主要成分是磷钼酸-钨酸的混合物，其化学成分包括 $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 和 $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 14\text{WO}_3 \cdot 4\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ，它可被蛋白质中半胱氨酸、酪氨酸、色氨酸和组氨酸等还原成多种还原型混合酸并且具有特殊的蓝色。同时蛋白质与酚试剂呈色深浅与蛋白质量成正比。

本实验从牛奶中提取酪蛋白，并用 Folin-酚法测定制备酪蛋白的纯度。

一、实验材料、试剂与仪器

1. 材料与试剂

(1) 市售不同品牌牛奶，标准酪蛋白，酚试剂，酒石酸钾钠， NaHCO_3 ， NaOH ， HCl ， NaCl ， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ，95%乙醇，无水乙醚，醋酸，醋酸钠，精密 pH 试纸等。

(2) 0.2mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲溶液 (pH 4.7)：称取醋酸钠 ($\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 27.22g，定容至 1000mL 为 A 液；取醋酸（含量大于 99.8%）12g 定容至 1000mL 为 B 液。取 A 液 885mL，B 液 615mL 混合即得 pH 4.7 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液。

(3) 乙醇-乙醚混合液：95%乙醇：无水乙醚为 1：1（体积比）。

(4) 试剂 A：酒石酸钾钠 2g 及 NaHCO_3 100g，溶于 500mL 1mol/L NaOH 中，去离子水定容至 1000mL。

(5) 试剂 B：酒石酸钾钠 2g 及 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1g 混合后加去离子水 90mL，再加 1mL 1mol/L NaOH 即可。

(6) 试剂 C：市售酚试剂 1：5 稀释后，用标准 0.15mol/L NaOH 溶液滴定确定浓度。

(7) 0.9%生理盐水：0.9g NaCl 加水至 100mL。

2. 仪器

分光光度计，离心机，抽滤装置，电炉，温度计，烧杯，容量瓶，试管，滴管，移液

管，试管架等。

二、实验方法与步骤

1. 酪蛋白的制备

将 50mL 牛乳放在烧杯中加热到 40℃ 左右，边搅拌边缓慢加入预热到 40℃ 左右、pH4.7 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液 50mL，用精密 pH 试纸调 pH 至 4.7。将上述悬浮液冷却至室温后，2000r/min 离心 15min，弃上清液，沉淀为酪蛋白粗制品。

将上述沉淀水洗数次，然后悬浮于 30mL 95% 的乙醇中。将此悬浮液倾入布氏漏斗中，抽滤除去乙醇溶液，再倒入乙醇-乙醚混合溶液洗涤沉淀两次，最后再用乙醚洗涤沉淀两次，抽干。将沉淀从布氏漏斗中移出，在表面皿上摊开除去乙醚，干燥后得到的是酪蛋白纯品。准确称重后，计算出每 100mL 牛乳中所制备的酪蛋白质量 (g/L)，计算酪蛋白产率。

2. 制备样品纯度测定

(1) 标准曲线的绘制 用已知浓度的标准酪蛋白溶液 (浓度 0.025%) 配制一系列不同浓度的蛋白质溶液，取 6 只试管，按表 1-2 进行试剂加量。

表 1-2 标准曲线绘制试剂用量

试管号	生理盐水 /mL	标准蛋白 /mL	试剂 A /mL		试剂 B /mL		试剂 C /mL	蛋白质含量 / μ g
1	0.9	0.1	0.9	50℃ 保温 10min 冷却	0.1	室温 放置 10min	3.0	25
2	0.8	0.2	0.9		0.1		3.0	50
3	0.7	0.3	0.9		0.1		3.0	75
4	0.6	0.4	0.9		0.1		3.0	100
5	0.5	0.5	0.9		0.1		3.0	125
6	1.0	—	0.9		0.1		3.0	—

加入试剂 A 后立即混匀，50℃ 保温 10min，冷却后加入试剂 B，室温放置 10min 后，加入试剂 C，立即充分混匀后放置 30min。以 6 号管为空白，在波长 650nm 处，测各管透光率。以吸光度为纵坐标，标准蛋白浓度为横坐标绘制标准曲线。

(2) 制备样品纯度测定 将牛奶中提取的酪蛋白配制成 0.025% 的溶液，按表 1-3 进行试剂加量。

表 1-3 样品纯度测定试剂用量

试管号	测定管	空白管
待测样品/mL	0.5	—
生理盐水/mL	0.5	1.0
试剂 A/mL	0.9	0.9
混匀, 50℃ 保温 10min, 冷却		
试剂 B/mL	0.1	0.1
室温放置 10min		
试剂 C/mL	3.0	3.0

加入试剂 A 后立即混匀，50℃ 保温 10min，冷却后加入试剂 B，室温放置 10min 后，加入试剂 C，立即充分混匀后放置 30min。以空白管调零，在波长 650nm 处，测定样品管透光率，从标准曲线上获得样品的蛋白质量，计算从牛奶中制备的酪蛋白的纯度。

三、注意事项

各管加酚试剂时应快并立即混匀。

四、思考题

- (1) 本实验中，蛋白质的提取采用何种方法？
- (2) Folin-酚试剂法测定蛋白质有何优缺点？

(沈齐英)

实验四 蛋白酶的分离提取及纯化

酶 (enzyme) 是生物细胞产生的，能催化化学反应的一类具有特殊空间结构的生物大分子。酶是一种生物催化剂。生物体内含有千百种酶，它们支配着生物的新陈代谢、营养和能量转换等许多催化过程，与生命过程关系密切的反应大多是酶催化反应。

许多酶都存在于细胞内。为了提取这些胞内酶，首先需要对细胞进行破碎处理。细胞破碎的方法很多，主要包括机械破碎法、物理破碎法、化学破碎法和酶学破碎法等。机械破碎法是指利用捣碎机，研磨器或匀浆器等将细胞破碎；物理破碎法是指利用温度差，压力差或超声波等将细胞破碎；化学破碎法是指利用甲醛、丙酮等有机溶剂或表面活性剂作用于细胞膜，使细胞膜的结构遭到破坏或透性发生改变；酶学破碎法是指选用合适的酶，使细胞壁遭到破坏，进而在低渗溶液中将原生质体破碎。

绝大多数酶的化学本质是蛋白质，其分离提取与纯化的方法和蛋白质相似。一般蛋白质的分离、纯化的方法有中性盐析法，电泳法，层析法及有机溶剂法等。通常需多种方法配合使用，才能得到纯净的蛋白质或酶。利用有机溶剂分离提取酶，是利用不同的蛋白质在不同浓度的有机溶剂中的溶解度差异而达到分离的方法，称为有机溶剂分段沉淀法。使用的有机溶剂，多为能与水相溶的乙醇和丙酮等，可以通过降低介质的介电常数及其对蛋白质的脱水作用，将蛋白质溶液的 pH 调至等电点附近，使酶蛋白凝集而易于从溶剂中沉淀析出。同时在有机溶剂中添加中性盐可稳定蛋白质，减少变性，提高分离效果。

碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 是一种能够将对应底物去磷酸化的酶，即通过水解磷酸单酯将底物分子上的磷酸基团除去，并生成磷酸根离子和自由的羟基，这类底物包括核酸、蛋白质、生物碱等。AKP 广泛分布于人体各脏器官中，其中以肝脏为最多，其次为肾脏、骨骼、肠和胎盘等组织。血清中的 AKP 主要来自肝脏和骨骼，所以通过观察 AKP 的变化可了解机体健康状况。

本实验以新鲜猪肝为样品，采用有机溶剂沉淀法从细胞中提取 AKP，学习利用有机溶剂分离纯化蛋白酶的方法及基本操作。

在制备肝匀浆液时使用低浓度的醋酸钠，使肝细胞充分破膜，醋酸镁则有保护和稳定碱性磷酸酶的作用，匀浆中加入正丁醇是为使部分杂蛋白变性、沉淀；内含 AKP 的滤液则再以冷丙酮和冷乙醇进行分离、纯化；依据 AKP 在终浓度 33% 的丙酮或乙醇中溶解，在终浓度 50% 的丙酮或乙醇中不溶的特性，反复离心分离、纯化，使 AKP 部分纯化。在室温条件下有机溶剂可使大部分酶失活，分离提纯实验须在低温下进行。有机溶剂预先冷却，并缓慢滴加、充分搅拌，避免局部浓度过高使酶蛋白变性。

一、实验材料、试剂与仪器

1. 材料与试剂

(1) 猪肝, 碱性磷酸酶, 磷酸苯二钠 (基质), 碳酸钠, 碳酸氢钠, 氯仿, 醋酸镁, 醋酸钠, 1%醋酸, 4-氨基安替比林, 铁氰化钾, 乙醇, 正丁醇, 硼酸, 丙酮, 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), NaOH, HCl 等。

(2) 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH10): 碳酸钠 6.35g、碳酸氢钠 3.36g, 蒸馏水溶解至 1000mL。

(3) 0.04mol/L 基质液: 磷酸苯二钠 (2 个结晶水) 15.16g 或 8.72g (无结晶水), 用煮沸冷却的蒸馏水溶解至 1000mL, 加 4mL 氯仿防腐, 盛于棕色瓶, 冰箱内保存 (可使用一周)。

(4) 0.5mol/L 醋酸镁溶液: 醋酸镁 107.25g, 蒸馏水溶解至 1000mL。

(5) 0.1mol/L 醋酸钠溶液: 醋酸钠 10.2g, 蒸馏水溶解至 1000mL。

(6) 0.5mol/L 醋酸镁-醋酸钠溶液: 0.5mol/L 醋酸镁溶液 20mL 与 0.1mol/L 醋酸钠溶液 100mL 混合后加蒸馏水至 1000mL。

(7) Tris 缓冲液 (pH 8.8): Tris 12.1g, 蒸馏水溶解至 1000mL; 取此溶液 100mL, 加蒸馏水 800mL, 再加 0.1mol/L 醋酸镁溶液 100mL, 混匀后用 1%的醋酸调节 pH 值至 8.8, 用蒸馏水稀释至 1000mL 即可。

(8) 0.5mol/L NaOH 溶液: NaOH 20g, 蒸馏水溶解至 1000mL。

(9) 酶液: 碱性磷酸酶 5mg, 用 Tris 缓冲液 (pH 8.8) 配制 100mL, 冰箱内保存。

(10) 0.3% 4-氨基安替比林溶液: 4-氨基安替比林 0.3g、碳酸氢钠 4.2g, 蒸馏水溶解至 100mL。

(11) 0.3% 铁氰化钾溶液: 铁氰化钾 5g、硼酸 15g, 各溶于 400mL 蒸馏水中, 溶解后混合至 1000mL, 盛于棕色瓶, 冰箱内保存。

2. 仪器

烧杯 (100mL), 量筒 (10mL, 100mL), 镊子, 剪子, 组织匀浆器, 玻棒, 移液管, 刻度离心管, 试管, 试管架, 离心机, 电子天平, 水浴等。

二、实验方法与步骤

1. AKP 的制备

取新鲜猪肝 2g, 剪碎后置于玻璃匀浆器内, 加 0.5mol/L 的醋酸镁-醋酸钠溶液 6mL, 迅速制匀浆后置于刻度离心管中记录体积。吸出 0.1mL 匀浆液置于另一试管中, 加入 4.9mL pH8.8 的 Tris 缓冲液稀释, 此为 A 液。

刻度离心管中的匀浆加正丁醇 2mL, 用玻棒充分搅拌 2min, 静置 20min 后滤纸过滤, 留滤液于刻度离心管中。

滤液中加等体积的丙酮, 立即混匀后 2000r/min 离心 5min, 弃上清液, 在沉淀中加入 0.5mol/L 醋酸镁 4mL, 充分溶解后记录体积。取 0.1mL 置另一试管中, 并加入 pH 8.8 的 Tris 缓冲液 4.9mL, 此为 B 液。

悬液中缓慢加入 95% 冷乙醇, 使乙醇的终浓度为 30%, 立即混匀后 2000r/min 离心 5min, 上清液倒入另一刻度离心管中, 弃沉淀。上清液中加入 95% 冷乙醇, 使乙醇的终浓度为 60%, 立即混匀后 2000r/min 离心 5min, 弃上清液, 沉淀以 0.5mol/L 醋酸镁 3mL 充

分溶解并记录体积。取此液 0.2mL 置另一试管中, 加入 pH 8.8 Tris 缓冲液 3.8mL, 此为 C 液。

醋酸镁溶解的悬液中加入冷丙酮, 使丙酮的终浓度为 33%, 混匀后 2500r/min 离心 5min, 上清液倒入另一刻度离心管中, 弃沉淀。上清液中缓慢加入冷丙酮, 使丙酮的终浓度为 50%, 混匀后 4000r/min 离心 10min, 弃上清液, 沉淀即为部分纯化的 AKP。往此沉淀中加入 pH 8.8 Tris 缓冲液 4mL, 充分溶解, 再 2000r/min 离心 5min, 上清液倒入另一离心刻度管中, 记录体积, 弃沉淀。上清液是部分纯化酶液。取其 0.2mL 置另一试管中, 加入 pH 8.8 Tris 缓冲液 0.8mL, 此为 D 液。

2. AKP 的鉴定

取干净试管 5 支, 编号, 按表 1-4 操作。

表 1-4 AKP 鉴定试剂用量

试管号	水/mL	0.04mol/L 基质液/mL	碳酸盐缓冲液 /mL	37°C 水浴中 保温 5min	酶液 /mL	最终基质浓度 /(mmol/L)
1	0.9	0.1	0.9		A 液 0.1	2.0
2	0.9	0.1	0.9	B 液 0.1	2.0	
3	0.9	0.1	0.9	C 液 0.1	2.0	
4	0.90	0.1	0.9	D 液 0.1	2.0	
5	0.90	0.1	0.9	标准酶液 0.1	2.0	

加入酶液后, 立即计时, 37°C 水浴中保温 15min。保温结束后, 立即加入 0.5mol/L NaOH 溶液 1.0mL 以终止反应。

各管分别加入 0.3% 4-氨基安替比林 1.0mL 及 0.3% 铁氰化钾 2.0mL, 充分混匀, 放置 10min 以 9 号管为对照, 在 510nm 波长处比色, 观察各管颜色的深浅。

三、注意事项

- (1) 有机溶剂沉淀是个放热过程, 应在低温下进行。溶剂应预冷, 加入时要边搅拌边滴加, 以避免局部温度过高使酶蛋白变性。
- (2) 溶剂的 pH 控制在被分离物质的等电点附近, 以提高分离效果。
- (3) 蛋白质浓度应控制在 5~20mg/mL, 以防高浓度样品的共沉淀作用。
- (4) 溶液的离子强度应控制在 0.05~0.10 范围。

四、思考题

- (1) 各步加入有机溶剂的量如何能做得相对准确?
- (2) 加入有机溶剂混匀后为何不宜放置过久?

(沈齐英)

实验五 碱性磷酸酶动力学参数的测定

酶反应动力学主要研究酶催化的反应速率以及影响反应速率的各种因素。在探讨各种因

素对酶促反应速率的影响时，通常测定其初始速度来代表酶促反应速率，即底物转化量 < 5% 时的反应速率。酶促反应动力学是研究酶促反应速率及其影响因素的科学。这些因素包括酶浓度，底物浓度，pH 值，温度，激活剂和抑制剂等。在实际生产中要充分发挥酶的催化作用，以较低的成本生产出较高质量的产品，就必须准确把握酶促反应的条件。为了最大限度地发挥酶的高效率，寻找最有利的反应条件；为了解酶在代谢中的作用需要掌握酶促反应速率的规律。

酶促反应动力学参数多由实验确定。在温度、pH 值及酶浓度恒定的条件下，底物浓度对酶的催化作用有很大的影响。通常情况下，当底物浓度很低时，酶促反应的速率 (v) 随底物浓度 (c_s) 的增加而迅速增加，但当底物浓度继续增加时，反应速率的增加幅度减小，当底物浓度增加到一定程度时，反应速率不再增加即反应速率达到一个极限值（最大反应速率 v_{\max} ），如图 1-1 所示。米氏常数是反应速率等于最大反应速率一半时的底物浓度，是酶的特征性常数。测定 K_m 是研究酶的一种重要方法，大多数酶的 K_m 值在 0.01~100mmol/L 之间。

底物浓度和反应速率的关系可用米氏方程式表示

$$v = \frac{v_{\max} c_s}{K_m + c_s}$$

但是通常情况下，根据实验结果绘制成的双曲线，难以正确求得 K_m 和 v_{\max} 值，因此往往要进行线性化处理。将米氏方程两边取对数可得下列形式

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \times \frac{1}{c_s} + \frac{1}{v_{\max}}$$

以 v 和 c_s 的倒数作图可得一直线，依据其斜率和截距便可求出米氏常数和最大反应速率。这种作图法的两个坐标分别是 v 和 c_s 的倒数，故称双倒数作图法，如图 1-2 所示。

本实验以碱性磷酸酶为催化剂，磷酸苯二钠为底物，在一定温度、pH 及酶量的条件下，碱性磷酸酶催化磷酸苯二钠转化为苯酚；利用分光光度计测定在不同底物浓度下苯酚的生成量。采用双倒数作图法确定一定温度、pH 等条件下碱性磷酸酶的 v_{\max} 和 K_m 。通过实验可以加深对有关酶促反应动力学基本知识的理解和记忆；并熟记利用双倒数法测定酶 K_m 值的原理，熟悉实验方法。

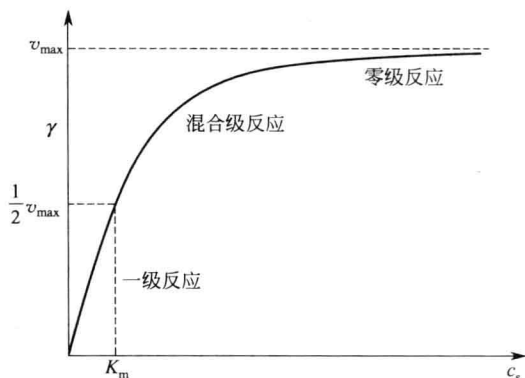


图 1-1 底物浓度与酶促反应速率关系

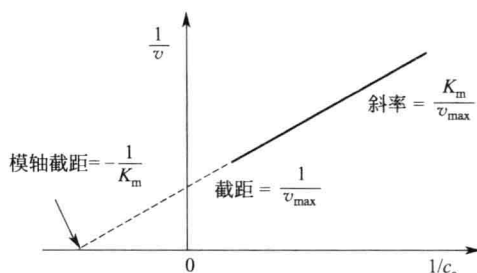


图 1-2 双倒数法求 v_{\max} 和 K_m

一、实验材料、试剂与仪器

1. 材料与试剂

(1) 磷酸苯二钠，氯仿，醋酸镁，醋酸，碱性磷酸酶，4-氨基安替比林，铁氰化钾，硼

酸, 苯酚, 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), NaOH, 0.1mol/L HCl, 碳酸钠, 碳酸氢钠。

(2) 0.1mol/L 碳酸盐缓冲溶液 (pH10): 碳酸钠 6.35g、碳酸氢钠 3.36g, 蒸馏水溶解至 1000mL。

(3) 0.04mol/L 基质溶液: 磷酸苯二钠 (2 个结晶水) 15.16g 或 8.72g (无结晶水), 用煮沸冷却的蒸馏水溶解至 1000mL, 加 4mL 氯仿防腐, 盛于棕色瓶, 冰箱内保存 (可使用一周)。

(4) 0.1mol/L 醋酸镁溶液: 醋酸镁 21.45g, 蒸馏水溶解至 1000mL。

(5) pH 8.8 Tris 缓冲溶液: Tris 12.1g, 蒸馏水溶解至 1000mL; 取此溶液 100mL, 加蒸馏水 800mL, 再加 0.1mol/L 醋酸镁 100mL, 混匀后用 1% 的醋酸调节 pH 值至 8.8, 用蒸馏水稀释至 1000mL 即可。

(6) 0.5mol/L NaOH 溶液: NaOH 20g, 蒸馏水溶解至 1000mL。

(7) 酶液: 碱性磷酸酶 5mg, 用 pH 8.8 的 Tris 缓冲溶液配制 100mL, 冰箱内保存。

(8) 0.3% 4-氨基安替比林液: 4-氨基安替比林 0.3g、碳酸氢钠 4.2g, 蒸馏水溶解至 100mL。

(9) 0.3% 铁氰化钾溶液: 铁氰化钾 5g、硼酸 15g, 各溶于 400mL 蒸馏水中, 溶解后混合至 1000mL, 盛于棕色瓶, 冰箱内保存。

(10) 酚标准溶液: 苯酚 1.5g, 溶于 0.1mol/L 盐酸至 1000mL, 为储备液。取此储备液 25mL, 标定后用蒸馏水稀释至 0.1mg/mL 作为标准溶液。

2. 仪器

烧杯 (100mL), 量筒, 移液管, 试管, 试管架, 分光光度计, 电子天平, 恒温水浴等。

二、实验方法与步骤

1. 标准曲线的制备

取酚标准液 0.00、0.05、0.10、0.20、0.30、0.40mL 于 6 支试管中, 分别加蒸馏水至 2.00mL 后, 37°C 水浴中保温 5min, 然后各加入 0.5mol/L NaOH 溶液 1.00mL、0.3% 4-氨基安替比林溶液 1.00mL、0.3% 铁氰化钾溶液 2.00mL, 混匀后室温放置 17min, 510nm 波长处比色, 并绘制标准曲线。各管酚含量分别为 0、5、10、20、30、40 μ g。

2. 动力学参数确定实验

取干净试管 9 支, 编号, 按表 1-5 正确操作。特别注意准确吸取基质液和酶液。

表 1-5 动力学参数测定试剂用量

试管号	水/mL	0.04mol/L 基质液 /mL	碳酸盐缓冲液 /mL		酶液/mL	最终基质浓度 /(mmol/L)
1	0.9	0.1	0.9	37°C 水浴 中保温 5min	0.1	2.0
2	0.85	0.15	0.9		0.1	3.0
3	0.8	0.2	0.9		0.1	4.0
4	0.75	0.25	0.9		0.1	5.0
5	0.7	0.3	0.9		0.1	6.0
6	0.6	0.4	0.9		0.1	8.0
7	0.2	0.8	0.9		0.1	16.0
8	—	1.0	0.9		0.1	20.0
9	1.0	—	0.9		0.1	—

加入酶液后, 立即计时 37°C 水浴中保温 15min。保温结束后, 立即加入 0.5mol/L