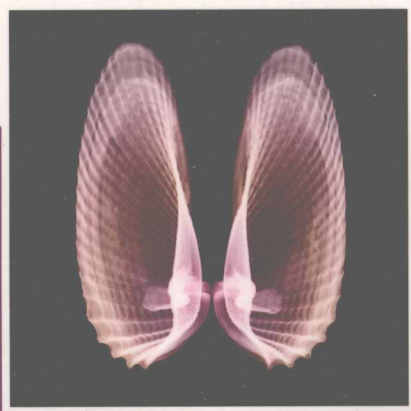




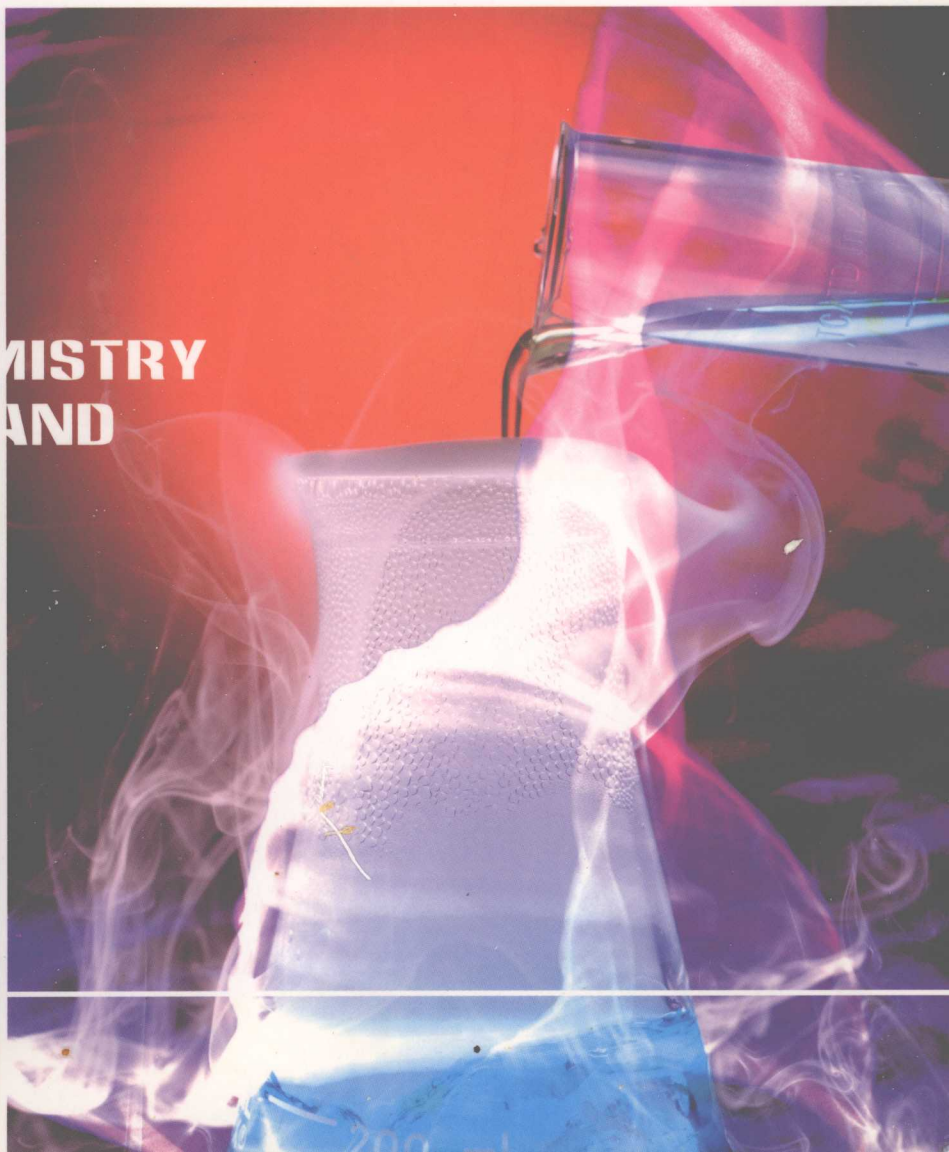
全国高等农林院校教材

崔喜艳 主编

基础生物化学实验 方法和技术



BASIC BIOCHEMISTRY
EXPERIMENTS AND
TECHNIQUES



中国林业出版社

基础生物化学实验方法和技术

第2版

基础生物化学实验 方法和技术



主编：王德成 副主编：王德成 王德成
主审：王德成 副主审：王德成 王德成
王德成 王德成 王德成 王德成 王德成



全国高等农林院校教材

基础生物化学 实验方法和技术

图例 (CIP) 目录附录

崔喜艳 主编

ISBN 978-7-2638-2028-8

1. 基... 2.

中图法分类号

中国林业出版社

责任编辑

电话: 010-10109

中国林业出版社

E-mail

http://www.cflp.com.cn

地址

北京市昌平区

2008年2月第1版

2008年2月第1次印刷

850mm x 1168mm 1/16

13

269千字

21元

中国林业出版社

内 容 简 介

本教材全面介绍了基础生物化学实验的基本理论及其技术。共分生物化学实验原理与技术、实验内容和附录3部分。生物化学实验原理与技术对生物化学实验中的一般原理和离心技术、分光光度技术、层析技术和电泳技术进行了较系统和全面的介绍。实验内容共选编35个项目,既有一些锻炼学生基本技能训练的传统实验,还增加了设计性及综合性实验,所有实验均附思考题,以提高学生分析问题和解决问题的能力。

本教材适于高等农林院校植物生产类及生物类本科生教学使用,也可作为研究生及有关科研人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

基础生物化学实验方法和技术/崔喜艳主编. —北京:中国林业出版社, 2008.4

全国高等农林院校教材

ISBN 978-7-5038-5028-8

I. 基… II. 崔… III. 生物化学-实验-高等学校-教材 IV. Q5-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2008)第059846号

中国林业出版社·教材建设与出版管理中心

责任编辑:丰帆 牛玉莲

电话:66170109 66181489

传真:66170109

出版发行 中国林业出版社(100009 北京市西城区德内大街刘海胡同7号)

E-mail: jiaocaipublic@163.com 电话: (010) 66184477

http: //www. cfph. com. cn

经 销 新华书店
印 刷 北京市昌平百善印刷厂
版 次 2008年5月第1版
印 次 2008年5月第1次印刷
开 本 850mm × 1168mm 1/16
印 张 13
字 数 269千字
定 价 21元

未经许可,不得以任何方式复制或抄袭本书之部分或全部内容。

版权所有 侵权必究

《基础生物化学实验方法和技术》

编写人员

主 编 崔喜艳 (吉林农业大学)

副主编 朱永宁 (大连大学)
杨美英 (吉林农业大学)

参 编 (按姓氏笔画排序)
余 涛 (吉林农业大学)
许 月 (吉林大学)
张林波 (吉林农业大学)
李艳丽 (吉林农业大学)
郭红祥 (河南农业大学)
姜秀云 (吉林农业大学)
蔚荣海 (吉林农业大学)

主 审 宋 慧 (吉林农业大学)

前言

生物化学作为生命科学领域各学科重要的基础课程，在生物技术特别是分子生物学的发展中起着举足轻重的作用。近 30 年来，生物科学及各相关学科在理论研究和应用研究方面均取得举世瞩目的成就，这些成就的取得与生物化学实验技术的发展密不可分。生物化学实验技术不仅是生物化学研究者进行研究工作必不可少的手段，也是其他相关学科进行基础研究的重要工具。

为了使學生掌握生物化学实验理论及必要的生化实验技术，巩固生物化学理论知识，结合农林院校和综合性大学的实际特点，由吉林农业大学、大连大学、吉林大学和河南农业大学 4 所高等院校具有多年教学经验的教师合作编写了这本实验指导。

本教材的主要特点：

1. 紧密与理论教材配套。体系编排上与理论教材讲授顺序一致，通过实验的学习，进一步验证理论知识，充分调动学生学习生物化学的积极性。
2. 实验项目全面。在实验项目的安排上，既有验证性实验项目，还有综合性实验内容，能够满足和适应各校教学改革的需要。
3. 定位明确。所选内容是目前多数高等院校开设的实验，代表性强，涉及范围广，经费使用少。

本教材在编写过程中，参阅了众多书籍，在文献中未能一一列出。

由于编者的水平有限，可能会存在缺点和错误，敬请读者在使用过程中给予指正，以便今后补充修订。

编 者

2007 年 8 月

目 录

前 言

第一篇 生物化学实验原理与技术

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 生物大分子的分离制备 (8)

第一节 蛋白质和酶的提取分离 (8)

一、蛋白质及酶的一般提取方法 (8)

二、蛋白质和酶提取后的纯化 (12)

第二节 核酸的提取分离 (13)

一、核酸及其溶解性 (13)

二、提取方法 (13)

第三节 多糖及其他水溶性生化物质的提取分离 (15)

第四节 脂类化合物的提取分离 (16)

第五节 植物次生物的提取及溶剂系统分离的选择 (17)

第三章 生物化学常用实验技术 (19)

第一节 离心技术 (19)

一、基本原理 (19)

二、离心设备 (20)

三、离心方法 (20)

第二节 分光光度法 (22)

一、基本原理 (22)

二、仪器的基本结构 (23)

三、几种常用分光光度计的使用方法	(24)
第三节 层析技术	(30)
一、吸附层析	(30)
二、分配层析	(32)
三、离子交换层析	(33)
四、凝胶过滤	(36)
五、亲和层析	(37)
第四节 电泳技术	(39)
一、电泳原理	(39)
二、聚丙烯酰胺凝胶电泳	(41)
三、几种特殊的聚丙烯酰胺凝胶电泳	(46)
四、琼脂糖凝胶电泳	(49)
五、淀粉凝胶电泳	(50)
六、醋酸纤维素薄膜电泳	(52)

第二篇 实验内容

实验1 氨基酸的纸层析分离	(54)
实验2 氨基酸纤维素薄层层析	(57)
实验3 植物组织中游离氨基酸总量的测定	(59)
实验4 植物组织中可溶性蛋白质含量的测定	(62)
实验5 植物组织中丙酮酸含量的测定	(69)
实验6 凯氏定氮法测定蛋白质含量	(71)
实验7 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质分子量	(76)
实验8 植物过氧化物酶同工酶的测定	(81)
实验9 醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白质	(85)
实验10 酶的性质	(87)
实验11 蔗糖酶米氏常数的测定	(90)
实验12 淀粉酶活力的测定	(93)
实验13 植物组织中 DNA 的快速提取	(96)
实验14 紫外吸收法测定核酸含量	(98)
实验15 二苯胺法测定 DNA 含量	(100)
实验16 酵母 RNA 的提取与鉴定	(102)
实验17 定磷法测定核酸含量	(104)
实验18 苔黑酚法测定 RNA 含量	(107)
实验19 DNA 聚合酶链式反应 (PCR 技术)	(109)
实验20 植物组织中可溶性糖含量的测定	(111)
实验21 植物组织中淀粉含量的测定	(119)

实验 22	真菌多糖的提取及测定	(123)
实验 23	血清葡萄糖含量的测定	(125)
实验 24	维生素 C 含量的测定	(127)
实验 25	粗脂肪的提取和含量测定	(130)
实验 26	游离脂肪酸含量的快速测定	(132)
实验 27	酮体的生成和利用	(134)
实验 28	血清转氨酶活力的测定	(136)
实验 29	植物体内的转氨基作用	(140)
实验 30	超氧化物酶 (SOD) 活力的测定	(142)
实验 31	过氧化物酶 (POD) 活力的测定	(146)
实验 32	过氧化氢酶 (CAT) 活力的测定	(148)
实验 33	苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 的提取、纯化及活性测定	(152)
实验 34	蔗糖酶的分离提纯	(159)
实验 35	质粒 DNA 的提取、酶切及电泳鉴定	(164)

第三篇 附 录

一、实验室安全及防护知识	(168)
二、实验室常识	(171)
三、实验误差与数据处理	(173)
四、玻璃仪器的洗涤及各种洗液的配制法	(177)
五、常用容量玻璃仪器的使用方法	(179)
六、常用溶液混匀方法	(181)
七、常用缓冲溶液的配制方法	(182)
八、常用酸碱的比重 (密度) 和浓度的关系	(189)
九、常用固态化合物的摩尔浓度配制参考表	(190)
十、常用蛋白质分子量及等电点	(191)
十一、硫酸铵饱和度的常用表	(193)
十二、易变质及需要特殊方法保存的试剂	(195)
参考文献	(196)

第一篇 生物化学实验原理与技术

第一章 生化分离制备的特点与原理

生物大分子——蛋白质、酶、核酸、碳水化合物、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。根据实验目的的不同，生化分离技术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，生化分离制备有其自身的特点：

(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，而且多数化合物在分离时仍处于代谢变化中。

(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，很易破坏、变性。因此，在分离过程中要十分注意保护这些化合物的生物活性。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，以至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的完整，生化分离方法多采取温和的“多阶段式”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，以达到纯化目的。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,大多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作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 及分离时主要依据见表1-1。

表1-1 生化分离方法分类

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、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
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	F_1	离子性质

(续)

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
(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、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、电力	分子摩擦效应	F_1	离子性质
(f) 电渗析	静电引力、电力	分子筛效应	F_1 和 F_2	离子性质、分子大小
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、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。生物物质分离制备工作的分析鉴定方法大致可分为3种类型。

1. 生物测定方法

对于一个未知结构的新物质,生物测定方法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,都可能引起生物代谢的异常反应。

生物测定方法的应用范围主要包括3个方面:

- (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含量和功效;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。
- (3) 各种生化制品作为医学研究及应用对象,需做一系列安全实验。

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。最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、定量的要求时,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、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,以至影响质量和收率,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

机械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1万~2万 r/min,适宜于动物内脏组织、植物肉质种子和柔嫩的叶、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

把待破碎样品预冷至 $-15 \sim -20^{\circ}\text{C}$,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

以棕色固氮菌细胞碎裂为例: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内。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(NAM)和 N-乙酰葡萄糖胺(NAG)之间构成的 $\beta(14)$ 糖苷键。溶菌酶适于多种微生物，但有些种类的细菌需要一些附加处理，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。生物体的组成成分有千万种，分离纯化的实验方案也必然千变万化。因此，不可能有一种适用于所有物质分离纯化的方法，一种物质也不可能只有一种分离纯化方法。所以，对于某一种待分离的物质而言，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的经验，也可以帮助我们少走些弯路。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 纸层析	吸附薄 层层析	吸附 柱层析	通气 层析	气-液 层析	逆流 分溶	离子 交换	亲和 层析	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	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-
萜类、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
层析	+	+	+++	+++
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	+++	+	-	+
透析和扩散	+++	++	+	+
溶解度	+	++	+++	+++

第二章 生物大分子的分离制备

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，减少溶液的黏度。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，不仅要考虑溶解度，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具有酸性或碱性基团，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值比较稳定。