

微生物学技术丛书

酶学研究技术

上册

张树政 主编
孟广震
何忠效



科学出版社

DE 10/10

微生物学技术丛书

酶 学 研 究 技 术

上 册

张树政 孟广震 何忠效 主编

科 学 出 版 社

1 9 8 7

内 容 简 介

《酶学研究技术》上册是微生物学技术丛书的一个分册。内容包括酶的提纯和结晶、纯度鉴定、催化及物理化学性质、化学结构、化学修饰及溶液构象六大部分。从实用角度详细描述了 36 个不同方面的实验技术，并介绍了基本原理和实验经验。本书可供生物化学、生物工程学、酶学及微生物学等专业的科研人员、大专院校师生及工程技术人员参考。

微生物学技术丛书 酶 学 研 究 技 术 上 册

张树政 孟广震 何忠效 主编
责任编辑 范淑琴

科 学 出 版 社 出 版
北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1987 年 12 月第 一 版 开本：787×1092 1/32
1987 年 12 月第一次印刷 印张：12 3/8
印数：0001—8,600 字数：279,000

ISBN 7-03-000047-1/Q·11

统一书号：13031·3967

定 价： 3.20 元

前 言

中国微生物学会编辑出版工作委员会于1983年11月4—6日在苏州召开了第一次工作会议。会议决定组织编辑出版一套“微生物学技术丛书”，后经微生物学会常务理事会通过正式成立了编辑委员会。

本丛书主要目的是为了适应“四化”需要，为广大微生物学工作者提供适用的工具书，以便提高技术水平和实验手段。主要对象为具有大专程度的微生物学科技工作者以及大专院校师生及研究生等。丛书由编委会邀请有实践经验的微生物学专家编写。内容力求新颖，但也考虑到国内条件，要便于使用，易见实效。要求作者本人有亲身经验，简要叙述原理，着重介绍具体操作，实验结果及本人心得体会，便于读者应用。

会议并初步确定了一些分册的选题，如：普通微生物学操作技术、微生物分类学技术、微生物菌种保藏技术、微生物生理和代谢实验技术、酶学研究技术、微生物遗传学实验技术、微生物细胞学实验技术、免疫学实验技术、病毒及噬菌体实验技术、抗生素实验技术等。这是微生物学会组织编写的第一套技术丛书，由于缺乏经验，缺点错误在所难免，希望读者批评指正。

另外，由于要求作者具有亲身经验，故在选题及内容方面，就有一定的局限性。涉及的方面可能不够广，或者方法不够先进。也希望读者提出改进意见。随着学科的发展和技术的进步，新的分册和新的内容将不断增加，继续出版下去，使

这套丛书成为微生物学工作者的得力助手，更好地为“四化”建设服务。

张树政

1985 年 10 月

编 者 的 话

关于微生物酶学实验技术的文献书籍不算太少,但科学工作者大都有这样的体验:把“书本上的方法”转变成“自己的方法”并不一直都是信手拈来的事情,这其中需要融入实验者的许多经验和体会。有时候,那怕为了摸索一个小小的窍门也得花费不少宝贵的精力和时间。在此情况下,最好是有了一本使读者“拿过来就能做”的实验技术手册。本书的写作宗旨正是期望朝这个方向迈出小小的一步。应邀参加本书写作的大多数作者,多年从事微生物酶学的研究工作,在其参加执笔的有关实验技术中,大都有丰富的第一手实验经验,我们相信,这将有助于实现我们的写作宗旨。

限于作者经验,本书不可能涉及酶学研究技术的全部领域或追随实验方法的最新进展。只是就力所能及的编写了一批较常用、较重要的微生物酶学实验技术,以满足大多数读者的需要。

本书是“微生物学技术丛书”的一个分册,因此,除个别章节有特殊需要外,一律引用来源于微生物的酶为例证。

本书如有谬误、差错或疏漏之处,还望同行们不吝指正。

编者

1985 年于北京中关村

目 录

前言·····	i
编者的话·····	iii

第一部分 酶的提纯和结晶

1. 细胞破碎技术·····	矫庆华 张启先	1
2. 盐析法提纯蛋白质·····	何忠效	16
3. 聚乙二醇分级沉淀技术·····	曾宇成	23
4. 离子交换色谱·····	严自正	30
5. 凝胶色谱技术·····	汪大受	42
6. 羟基磷灰石柱色谱·····	何忠效	55
7. 亲和色谱·····	张渝英 杨开宇	61
8. 酶的结晶技术·····	孟广震 李 钦 何秉旺	73

第二部分 酶纯度的鉴定技术

9. 用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定酶的纯度·····	孙晋武 王扬声	86
10. 凝胶电泳中微量蛋白质的检测技术·····	周爱民 杨开宇	99
11. 用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定酶蛋白的多聚体·····	孟广震	111
12. 用免疫扩散技术鉴定酶的纯度·····	孟广震	115
13. 用免疫电泳技术鉴定酶的纯度·····	孟广震	119
附录: 抗血清的制备·····	孟广震	125

第三部分 酶的催化及物理化学性质研究法

14. 酶的催化性质研究法	孙晋武	130
15. 凝胶过滤法测定蛋白质的分子量	何忠效	159
16. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定分子量	孙晋武	164
17. 酶蛋白溶液的特性粘度 $[\eta]$	孙晋武	175
18. 酶蛋白的沉降系数及分子量	李 钦	183
19. 等电聚焦测定等电点	何忠效	187
20. 凝胶电聚焦测定等电点	杨寿钧	195
21. 酶的电镜观察	李 钦 郝凤兮 孟广震	201

第四部分 酶的化学结构研究技术

22. 氨基酸组成的分析技术	孟广震	223
23. 酶蛋白的断裂及肽图谱	李 钦	230
24. 酶蛋白的断裂及分肽技术	孟广震	238
25. N-末端氨基酸的测定方法	严自正	244
26. C-末端氨基酸的测定方法	孟广震	261
27. 序列分析技术	孟广震	267
28. 糖蛋白中糖的组成与连接方式的研究方法	戈苏国	277

第五部分 酶的化学修饰

29. 氨基酸残基的化学修饰	杨寿钧 钱世钧 孟广震	289
30. 固定化亚基技术	孟广震	323
31. 分子杂交技术	王志美	329

第六部分 酶的溶液构象研究法

32. 紫外差光谱	杨寿钧	338
-----------	-----	-----

33. 圆二色光谱	杨寿钧	347
34. 荧光光谱	郭尧君	355
35. 生物化学中的微量热法	何忠效	370
36. 蛋白质的氢离子滴定	何忠效	377

第 一 部 分

酶的提纯和结晶

1 细胞破碎技术

矫庆华 张启先

微生物所产生的酶,根据酶存在细胞内、外而别,可分胞外酶和胞内酶两大类。胞内酶在细胞内合成后,透过细胞膜进入培养基中,而胞外酶则不必破碎细胞即可直接从发酵液中提取。胞内酶存在于生物细胞内的一定部位与区域,要得到胞内酶必须先把细胞破碎,再经过各种方法提纯,才能得到理想的酶制剂。胞内酶的种类最多。生物合成中参与分解与合成反应的酶,基本上都是胞内酶。例如细胞膜表面存在有吸收及传递营养物质的酶类;与呼吸有关的酶多数与原生质内膜或亚细胞结构(如线粒体)结合在一起,等等。基于它们存在于细胞内的部位及所处理的生物材料不同,则破碎细胞时所采用的方法也不尽相同。本文将以微生物细胞为对象,介绍我们所接触过的几种细胞破碎方法。

1.1 研 磨 法

1.1.1 基本原理

将微生物细胞与磨料相混合,置于研钵中,经研磨后,导

1106297

• 1 •

致细胞破裂,而使酶从细胞内游离出来。

(1) 材料: 研钵、杵、菌体(大多数微生物菌体都可)、磨料(玻璃砂、石英砂、氧化铝等)。

(2) 方法: 将微生物细胞与磨料相混合, 在研钵中用杵研磨, 细胞破裂后, 用水或缓冲液抽提, 抽提液即为含酶溶液。

(3) 实例

① 由辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*) 中提取蛋白质。菌体经液体培养基培养后捞出, 用蒸馏水洗去残留的培养基后用 25% 乙醇洗涤一次, 再用蒸馏水充分洗净, 水泵抽滤, 称重所得的菌体, 然后置培养皿中按湿重 1:1 的比例加入 pH 6.0 磷酸缓冲液, 于 -15°C 放置过夜。在冰浴内将冰冻菌体研磨成浆。然后于冷冻离心机 12,300 g 离心 30 分钟, 弃去沉淀, 即为含蛋白质粗溶液。

② 酵母异柠檬酸脱氢酶的制备。称取 10—15 g 新鲜的面包酵母, 加入 20 ml 0.1mol/L 碳酸氢钠溶液及 10—20g 洗净的玻璃砂, 于乳钵中, 在冰浴中研磨, 酵母细胞壁很不易破碎, 需要反复地研磨。为了充分发挥玻璃砂摩擦作用, 可适当地调节酵母与玻璃砂的比例。释放出来的酶溶解于足够量的碳酸钠溶液中。再于 660 g 下离心 10 分钟, 除去玻璃砂及酵母碎片收集上清液。再于高速离心机中 1000 g 离心 1 小时, 弃去沉淀, 所得到的上清液即为含酶溶液。

这种方法简单, 不需特殊设备, 缺点是费力、产量低。如果提取的酶在常温下易失活, 那就用冰浴, 或在冷室中操作。如果用干冰或液氮冷却后进行研磨, 往往不必加入磨料。磨料颗粒直径一般在 0.1 mm 左右。

1.2 细 菌 磨

1.2.1 基 本 原 理

同研磨法。即把细胞磨碎，内含物释放出来。

(1) 设备：小型细菌磨。它在实验室中应用十分方便，制作简单，基本结构如图 1-1，主要由研磨和动力两个部分构成。研磨部分包括：①长 15 cm，直径 5 cm 硬质磨砂玻璃管（管壁厚在 2cm 以上为宜）作为滚筒。滚筒内可以装碎冰，以保持低温操作。②一个与半面滚筒密切贴合的凹面瓷质承座（由硬质电瓷制成，由中国科学院冶金研究所窑业组供给材料并代烧制）。玻璃管和穿过中心的钢轴以橡皮塞连接，滚筒与承座不但要密切吻合，而且必须相互贴紧，因此承座底下必须垫以强有力的弹簧或富有弹性的橡皮。动力为 1/12 马力，1400 转/分，经减速后滚筒为 120—130 转/分。

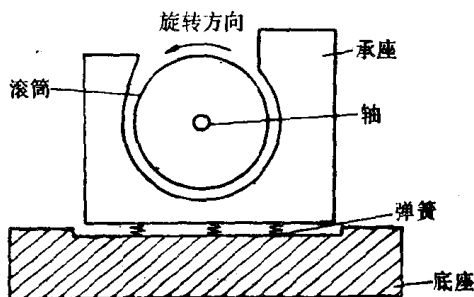


图 1-1 细菌磨滚筒承座放置的侧面图

(2) 试验材料：菌体、玻璃砂（ $3\mu\text{m}$ 以下）、缓冲液、钢勺、长方形玻璃板。

(3) 方法：以多核苷酸磷酸化酶的制备^[1]为例。取冷冻菌体 8g，融化后按 1:1.3—1.5 加入玻璃砂调成糊状物，用不

锈钢勺取 5g 左右自旋转的滚筒前边加入, 在细菌磨上研磨, 研磨温度可维持 15℃ 以下。磨 20—30 秒, 用玻璃板横置于滚筒上, 所有经过均匀研磨的混合物即自滚筒刮下, 悬浮于 2.5 倍体积的 pH 7.4, 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (含 0.01 mol/L 醋酸镁和 0.001 mol/L EDTA) 中, 约 20 ml。搅拌提取 15 分钟后, 0℃ 离心 (13,400g) 20 分钟。轻轻倾出上清液, 粘性沉淀再用上述缓冲液 4 ml 抽提一次, 离心, 合并上清液, 即粗提取液。

应注意的是, 研磨物含水量极为重要, 太少时不能附着, 太多时破碎率大为降低。

这种方法比研磨法省力, 其破碎率也较研磨的效率。

1.3 超声波破碎法

1.3.1 基本原理

它是利用超声波 (10—15 kHz) 的机械振动而使细胞破碎的一种方法。由于超声波发生时的空化作用 (cavitation) 使得液体形成局部减压引起液体内部发生流动, 旋涡生成与消失时, 产生很大的压力使细胞破碎。虽然有时看不到空化现象, 细胞也破裂了, 这可能是由于声波震荡引起了原生质内部的涡流运动, 并且由于这种涡流运动所产生的切变力促进了细胞的破裂。

1.3.2 仪器

大致可分为二种类型。1. 间歇超声式 (图 1-2)。2. 流动连续超声式。

国产 Jc C-2 型晶体管超声处理机属于第一种类型, 它是由中国科学院声学研究所与吉林省通化市无线电元件厂设计

制造的。本机性能稳定使用方便。

1.3.3 间歇超声处理法

(1) 一般操作程序：①插电源，机器预热 15 分钟。②将探头浸入被处理液 中 约 10 cm 左右，扭动调幅旋钮，到所需指示的幅度，一般细菌在 80 左右。③如果样品需低温操作，则把盛悬浮液的容器置于冰浴中。

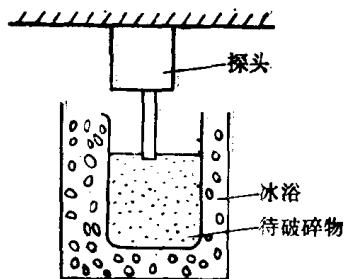


图 1-2 间歇式超声破碎示意图

连续超声时间长则样品温度升高，因此，在控温设施不完备的条件下，可采用间歇式处理，即超声 30 秒至 1 分钟停止 30 秒至 1 分钟，以便维持样品处于低温状态。

如处理小量样品时 (5 ml 左右)，应降低功率使用，以免造成液体飞溅和效率降低。

可根据实际处理样品的容器尺寸大小来选择探头的不同尺寸。

超声完毕，将探头用水洗净，擦干。

(2) 实例：产青霉素酰化酶的大肠杆菌细胞的超声破碎法。

分别称取大肠杆菌湿菌体 5 g、7.5g、10g、15g、25g 于烧杯中之后各加 pH 7.7, 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 50 ml，搅匀，然后将此装有菌悬液的烧杯置于冰盐浴中，放置到处理室内，探头置于液面下 10cm 左右，超声 30 秒停 30 秒，反复处理若干次。分别取样，离心，测定上清液的酶活力。比较结果如表 1-1。

从表 1-1 中可以看出，处理样品的细胞浓度，以 0.2 g/ml 为最佳。从处理时间看，过长的处理时间似乎是没有价值的，

表 1-1 产青霉素酰化酶的大肠杆菌细胞破碎的结果

相对释放率 (%)	处理时间 (分)							
湿菌体 (g/50ml)	2	4	6	8	10	12	14	16
5.0	94.0	96.8						
7.5	85.0	92.6	89.5	87.3	84.2	101.5	93.6	94.7
10	100	97.25						
15	63.1	60.0	61	62	64.2	63.7	67.7	68.4
25	31.5	31.6	32.6	35.8	36.8	35.3	38.4	37.3

若破碎大肠杆菌,处理 4 分钟就足够了。

1.3.4 连续超声式处理装置

如图 1-3 所示,该仪器由中国科学院声学研究所和北京医疗设备二厂研制,型号 CYC 250 型,功率 250W,频率 20 KHz。

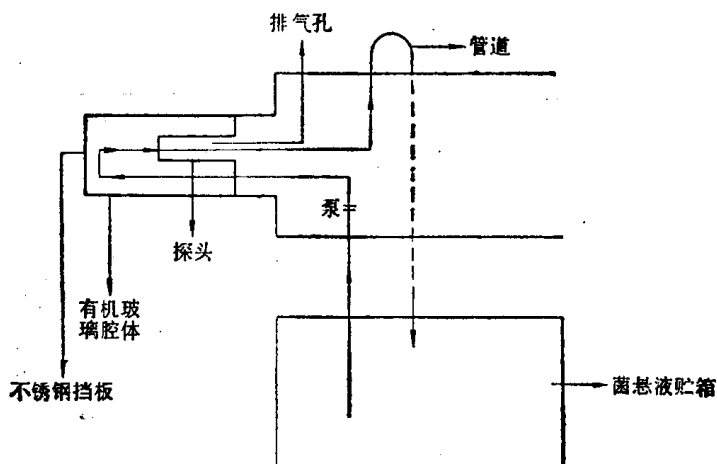


图 1-3 连续超声波处理装置

(1) 操作程序: ①启动电源。②开启超声波发生器电源开关, 预热 15 分钟。③打开排气孔开关。④由泵输入菌悬液至有机玻璃腔充满。⑤开动发生器工作开关, 即超声开始, 调泵速度至要求值, 菌悬液随箭头所指方向流回储箱, 再经泵循环。⑥不同时间取样, 检查超声效果。⑦到一定时间后, 破碎率不再增长, 停机。⑧由储箱中取出破碎后的悬浮液, 于 4℃ 12,300 g 离心 20 分钟。取上清液放入冰箱, 沉淀加少量缓冲液搅匀, 再离心, 得上清液与上次上的清液合并。如菌悬液浓度高于 30%, 则需多次抽提沉淀中游离酶, 即为粗酶液。

表 1-2 连续超声波处理大肠杆菌细胞的效果

菌体与溶剂之比 (w/v)	1 小时处理体积 (ml)	折合 1 小时处理 湿菌体 (g)	破碎率(%)
1:5.00	1513	260.0	74.0
1:2.00	931	312.5	80.7
1:1.33	985	419.7	84.0
1:1.18	940	444.0	83.3
1:1.00	564	282.0	89.0

(2) 实例: 取大肠杆菌湿菌体(发酵液经 3780 g 离心 30 分钟的沉淀)按 1:5, 1:2, 1:1.33, 1:1.18, 1:1 的比例与 0.05 mol/L, pH 7.7 磷酸盐缓冲液制成菌悬液, 于 CYC 250 型超声波液体处理机连续超声处理。处理结束后, 测定结果, 比较破碎效果(表 1-2)。

1.3.5 讨论

用超声波破碎法处理细胞操作简单, 重复性较好, 我们用该法处理大肠杆菌细胞, 酶的回收率一般都稳定在 85% 以上。但它的适用范围有一定的局限性, 对杆菌类细菌细胞和动物细胞的胞内酶的破碎提取有广泛的适用性。而对霉菌、

酵母、放线菌及球菌类细胞的破碎都较困难，费时长，效果差。

连续式与间歇式相比，前者处理量大，破碎率高。这可能是由于连续式破碎装置的特殊结构所决定的，它在探头前有不锈纲挡板，而且，菌悬液经过探头声强最大处后进入探头腔体而再排出，强烈的机械作用有利于细胞的破碎。

虽然超声波处理中有升温的弊病，但它具备维持低温操作的条件，例如，将超声波处理机置于冷库中，或将加盐冰块装入塑料袋置于有机玻璃腔体上，或将储箱置于冰浴中等。

在超声处理时，有几点必须注意：①要注意处理液的温度，及时采取降温措施。②超声波处理中的空化作用是细胞破坏的直接原因，但与此同时，因空化作用所产生的活性氧又容易使酶氧化而导致失活。为此，往往在超声处理细胞提酶时，都要加一些巯基保护剂。③细胞浓度对破碎效果也有影响，太稀有失活的危险，过稠破碎率降低，一般以 1g 湿菌体加 1—2 ml 缓冲液为好。

1.4 自 溶 法

1.4.1 基本原理

在一定的环境条件下，由于细胞自身酶类的作用，或者往菌体中加入丙酮、甲苯、乙醚、氯仿等有机溶剂导致细胞的破碎，包括酶蛋白在内的细胞内含物就释放出来。

下面我们用一些实例说明这一方法的具体使用。

(1) 从大肠杆菌中提取 L-天冬酰胺酶^[2]

① 材料：丙酮， $MnCl_2$ ，大肠杆菌 AS1.357。

② 方法：从大肠杆菌 AS 1.357 的培养液中离心收集菌体，然后用 4 倍体积的冷丙酮处理，过滤，吹干，粉碎，得丙