

高等农林院校教材 四川省精品课程教材

生物化学实验教程

王晓丽 苟琳 主编



biochemistry

高等农林院校教材

四川省精品课程教材

生物化学实验教程

主编 王晓丽 苟琳

编委 晏本菊 陈惠 张军杰 吴琦

审稿 杨婉身

四川出版集团
四川科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验教程/王晓丽,荀琳主编. - 成都:四川科学技术出版社,2005.1
ISBN 7-5364-5695-6

I. 生... II. ①王... ②荀... III. 生物化学-实验-教材 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 004501 号

高等农林院校教材 四川省精品课程教材
生物化学实验教程

主 编 王晓丽 荀 琳
组稿编辑 康利华
责任编辑 李蓉君
封面设计 韩建勇
版面设计 康永光
责任出版 周红君
出版发行 四川出版集团·四川科学技术出版社
成都市盐道街3号 邮政编码 610012
开 本 787mm×1092mm 1/16
印 张 10.75 字数 250 千 插页 1
印 刷 四川省地矿局测绘队印刷厂
版 次 2005 年 1 月成都第一版
印 次 2005 年 1 月成都第一次印刷
印 数 1-6 100 册
定 价 15.00 元
ISBN 7-5364-5695-6/0·72

■ 版权所有·翻印必究 ■

■ 本书如有缺页、破损、装订错误,请寄回印刷厂调换。

■ 如需购本书,请与本社邮购组联系。

地址/成都盐道街3号

邮政编码/610012

前 言

生物化学是农林院校中大多数专业的专业基础课,而该课程又是建立在坚实的实验基础上的。因此,生物化学实验不仅是生物化学教学的重要组成部分,而且在培养学生操作技术、分析和解决问题能力、独立工作能力和严谨求实的科学态度等方面,也有着不可替代的作用。四川农业大学生物化学课程组历来重视课程建设,1992年即被四川省确定为首批重点建设课程,2004年又被评为四川省精品课程。本教材也是四川农大教学成果的一个体现。

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,各高等院校采取了一系列措施加强实践性教学。在农林院校,生物化学实验作为一门课程独立开设就是有益的尝试之一。独立开课改变了生物化学实验教学从属于理论教学的状况,也对实验教学在系统性、实用性、先进性方面提出了更高的要求,原有实验教材已不能适应新的教学需要。为此,四川农业大学生物化学课程组全体教师和实验技术人员,按照《生物化学实验教学大纲》的要求,于2000年编写了《生物化学实验指导》校内使用教材。使用3年后,根据在教学实践中发现的问题和从学生中收集到的反馈信息,我们于2004年对该教材进行了认真修改,编写了这本《生物化学实验教程》。本教程是在总结多年开设生物化学实验课的基础上,广泛吸取兄弟院校生物化学实验教学的宝贵经验,参阅有关文献资料,进一步整理编写而成。

本实验教材包括三篇:第一篇为生物化学主要实验技术原理,对生物化学研究中常用实验技术进行了系统介绍,旨在为学生和其他读者提供一个较完整的可供选择的实验技术指南;第二篇为基础性实验,该部分按糖类和脂类、蛋白质、酶、核酸、维生素、代谢六个系列分类编排,供训练学生的基本实验技能之用;第三篇为综合性实验,通过这一部分的教学进一步提高学生的学习能力、动手能力和分析解决问题的能力,促进学生的创新思维的形成,提高学生对科学研究的兴趣。此外,书后有附录可供读者查用。本教材共选编39个实验,在使用时可根据具体情况选做。

本教材是四川农业大学推荐出版的系列实验课教材之一。主要编写人员有四川农业大学王晓丽、苟琳、晏本菊、陈惠、张军杰、吴琦。书稿完成后杨婉身教授审阅并提出宝贵意见。

感谢四川农业大学教务处和生命理学院的大力支持,感谢本书所参考和引用参考文献的编者。由于编者水平有限,教材中疏漏、错误之处难免,敬请读者批评指正。

编 者

2004年12月

目 录

生物化学实验室工作规程	1
第一篇 生物化学实验技术原理	3
第一章 生物化学实验样品的制备	3
一、动物样本的制备	3
二、植物材料的处理	4
三、微生物样品的处理	5
第二章 生命大分子物质的制备	6
一、材料的选择与处理	6
二、细胞的破碎	7
三、抽提	8
四、目的物初级分离	9
五、目的物的纯化与纯度鉴定	10
六、制品的浓缩、干燥和保存	11
第三章 光谱光度技术	14
一、光谱与光度	14
二、Lambert - Beer 定律及应用	15
三、分光光度法在生物化学中的应用	16
四、分光光度计的结构	16
第四章 层析技术	18
一、原理	18
二、分类	18
三、分配系数和迁移率	19
四、主要层析技术	19
第五章 电泳技术	33
一、电泳的基本原理	33
二、影响电泳的主要因素	34
三、几种常见的电泳方法	36
第六章 离心技术	48
一、离心技术原理	48
二、离心技术分类	50
三、离心机的种类及其特点	51
四、离心操作时的注意事项	52

第二篇 生物化学基础实验	53
第七章 糖和脂	53
实验一 总糖和还原糖测定(3,5-二硝基水杨酸法)	53
实验二 蒽酮比色定糖法	55
实验三 血液葡萄糖含量的测定(Folin-Wu法)	56
实验四 血清中游离脂肪酸的测定	58
实验五 碘价的测定(Hanus法)	60
实验六 酸值的测定	63
第八章 蛋白质	65
实验七 蛋白质含量的测定	65
I. 凯氏定氮法测定蛋白质含量	65
II. 紫外吸收法测定蛋白质含量	69
III. 双缩脲(Biuret)法测定蛋白质含量	70
IV. Folin-酚法测定蛋白质含量	72
V. 考马斯亮蓝G-250法测定蛋白质含量	74
实验八 醋酸纤维薄膜电泳分离血清蛋白质	75
实验九 不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳分离预染的血清脂蛋白	78
实验十 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质相对分子质量	81
实验十一 蛋白质相对分子质量的测定——凝胶层析法	84
实验十二 植物组织中游离氨基酸组分的分离鉴定(薄层层析法)	88
实验十三 蛋白质等电点的测定和两性解离	90
实验十四 酶联免疫吸附测定法	92
第九章 酶	97
实验十五 影响酶作用的因素	97
实验十六 过氧化氢酶活力的测定	99
实验十七 淀粉酶活力的测定	101
实验十八 蛋白酶活力的测定	103
实验十九 血清碱性磷酸酶总活性的测定	106
第十章 核酸	109
实验二十 植物组织中DNA的提取和纯度鉴定	109
实验二十一 DNA的琼脂糖凝胶电泳	111
实验二十二 酵母RNA的提取——苯酚法	113
实验二十三 酵母RNA的提取——浓盐法	114
实验二十四 紫外吸收法测定核酸含量	115
实验二十五 二苯胺法测定DNA含量	117
实验二十六 定磷法测定RNA含量	118
实验二十七 苔黑酚法测定RNA含量	120
第十一章 维生素	122

目 录

实验二十八 维生素 C 的定量测定	122
实验二十九 维生素 B ₁ 的定量测定	124
第十二章 体内代谢	127
实验三十 酶促转氨基作用及其鉴定	127
实验三十一 胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的影响	129
实验三十二 血清谷丙转氨酶(SGPT)活力测定(King 氏法)	130
实验三十三 肝组织的生酮作用	133
实验三十四 糖酵解中间产物的鉴定	134
第三篇 生物化学综合实验	137
实验三十五 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白印迹	137
实验三十六 猪血超氧化物歧化酶的分离纯化、活性测定及同工酶鉴定	140
实验三十七 肝脏 DNA 的提取	145
实验三十八 PCR 基因扩增	148
实验三十九 质粒 DNA 的提取及鉴定	150
I. 质粒 DNA 的小批量提取	150
II. DNA 的琼脂糖凝胶电泳	153
III. 质粒 DNA 限制性酶消化	155
附录	158
附录一 常用缓冲溶液的配制方法	158
附录二 硫酸铵饱和度的常用表	164
主要参考文献	166

生物化学实验室工作规程

为保证生物化学实验能正常进行并获得理想的实验结果,避免在实验中出现差错和意外事故,实验操作者必须严格遵守实验室规则,认真做好试验前后和试验过程中的各项工作。

一、要求

1. 实验前必须预习实验指导和有关理论,明确实验目的、原理、预期的结果,操作关键步骤及注意事项。
2. 实验时要严肃认真专心进行操作,注意观察实验过程中出现的现象和结果。结果不良时,必须重做。
3. 实验中,应及时将实验结果如实记录下来,并请老师当场审核。根据实验结果进行科学分析,按时交实验报告。

二、仪器保管及清洁

1. 常用仪器在首次实验时,按仪器清单进行清点,并负责保管,若有缺损要到实验准备室换领,实验中如有仪器破损必须登记。
2. 实验后,必须把仪器洗净,按次序放置好。
3. 贵重仪器尤其要尽力爱护,非本次实验使用的仪器未经老师允许不得乱动。本次实验必须使用的仪器,在使用前要了解其使用方法,严格遵守操作规程。
4. 玻璃仪器清洗:一般玻璃仪器都应用洗衣粉或去污粉洗涤。⁷

三、试剂使用规则

1. 使用试剂前应仔细辨认标签,看清名称及浓度是否为本实验所需要。
2. 取出试剂后,应立即将瓶塞盖好,放回原处,瓶塞切勿盖错;未用完的试剂不得倒回瓶内。
3. 使用有毒试剂及强酸强碱时,尽可能用量筒量取,若用吸管时只能用吸耳球吸取,切勿用嘴吸取,以免造成意外。

四、安全注意事项

1. 低沸点有机溶剂,如乙醚、石油醚、酒精等均系易燃物品,使用时应禁明火,远离火源。若须加热要用水浴加热,不可直接在火上加热。

2. 凡属发烟或产生有毒气体的化学实验,均应在通风橱内进行,以免造成人体危害。
3. 若发生酸碱灼烧事故,先用大量自来水冲洗,酸灼伤者用饱和 NaHCO_3 溶液中和,碱灼烧者用饱和 H_3BO_3 溶液中和,氧化剂伤害者用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理。
4. 若发生起火事件,根据发生起火性质分别采用砂、水、 CO_2 或 CCl_4 灭火器扑灭。
5. 离开实验室必须切断电源、水源,以确保安全。

五、实验室清洁

1. 实验室必须经常保持清洁,不得随地吐痰,乱丢纸屑。
2. 实验后要清扫实验台面、地面。试剂瓶要码放整齐。
3. 下课时轮流由值日生打扫卫生,经老师检查合格后,方能离开实验室。

第一篇 生物化学实验技术原理

第一章 生物化学实验样品的制备

在科学研究和生产实践中通常要分析生物材料中某种物质的含量,研究物质代谢过程和规律,这常常涉及动物、植物和微生物样品的制备和处理。各种实验样品的处理和制备方法很多,现简要介绍如下。

一、动物样本的制备

1. 血液样品

(1) 血液的采取

各种动物的采血部位不尽相同,如马、牛、猪等多由颈静脉采取;小动物如兔由耳静脉采取;鼠则由心脏采取。

作为正常成分测定的血液样品应在动物清晨饲喂前采取,以避免食物成分的影响。

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。为此,采血时要避免溶血,以免造成成分混杂。引起测定误差。为避免溶血,采血及处理时所用的注射器、针头及盛血容器需干燥清洁,采出的血要沿管壁缓缓注入容器内,以免吹起气泡造成溶血。

(2) 血液的制备

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。1ml 血液中加入抗凝剂的种类可以根据实验的需要进行选择,但是用量不宜过大,否则将影响实验的结果。抗凝剂最好先配成水溶液,按取血量的需要加于试管或适当容器内,横放,再蒸干水分(肝素不宜超过 30℃),使抗凝剂在容器内形成薄层,利于血液与抗凝剂的均匀接触。取得的全血如不立即使用,应贮于 4℃ 冰箱之中。

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。

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。制备血清时,血凝块收缩析出血清,大约需要 3h。为促进血清尽快析出,可以采用离心缩短分离时间,并且可获得较多的血清,但离心速度不宜过高。

制备血清同样要防止溶血,所以,所用的器具应当干燥清洁。而且血清析出后宜用干净的玻璃棒轻轻分离血凝块与容器壁的粘连,及时吸出析出的血清。

无蛋白血滤液:血液中含有丰富的蛋白质,在许多生化实验中,如血糖的测定等,蛋白质的存在会干扰测定的结果,所以通常需要将其中的蛋白质除去,制成无蛋白血滤液,再进行分析测定。常用的蛋白质沉淀剂有钨酸、三氯乙酸或氢氧化锌。血液加入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。以钨酸为蛋白沉淀剂的无蛋白血滤液,常用于血糖、肌酐等成分的测定。用三氯乙酸沉淀蛋白质,所得的血滤液呈酸性,利于钙磷的溶解,因此在测定血清离子含量时多采用。

2. 组织样品

在生化实验中,常利用离体组织研究各种物质代谢途径和酶系的作用,或者从组织中分离、纯化核酸、酶以及对某些具有生物活性的代谢物质进行研究。

但是,在生物组织中,因含有大量的具有催化作用的活性物质,离体组织的采集必须在低温条件下进行,并且尽快完成测定。否则其所含物质的量和生物活性物质的活性都将发生变化。

一般采用断头法处死动物,放出血液,立即取出所需脏器或组织,除去脂肪和结缔组织之后,用冰冷的生理盐水洗去血液,再用滤纸吸干,称重后,按试验要求制成组织糜或匀浆。

组织糜:迅速将组织剪碎,用捣碎机绞成糜状,或者加入少量石英砂于乳钵中,研磨至糊状。

组织匀浆:取一定量新鲜组织剪碎,加入适量匀浆制备液,用高速电动匀浆器或者玻璃匀浆器磨碎组织。由于匀浆器杵头在高速运转中会产生热量,因此在制备匀浆时,需将匀浆器置于冰浴中。

常用的匀浆制备液有生理盐水、缓冲液和0.25mol/L的蔗糖液等,可根据实验的要求加以选择。

组织浸出液:上述组织匀浆液再经过离心分离后得到的上清液即为组织浸出液。

3. 尿液样品

尿液中含有多种代谢产物。但是昼夜之中尿液中的化学物质含量,往往随着进食、饮水、运动及其他情况有所变动。一般定性实验,收集一次尿液即可。若作定量测定,则需收集24h尿液。收集方法是:记录时间,收集到次日同一时间的全部尿液,盛入有盖的清洁容器内,混合后,量出尿液总量,并作记录。然后取适量尿液测定。

为防止尿液变质,可适当加入少量的防腐剂。如测定含氮物质时,每升尿液加入5ml甲苯;测定激素时,每升尿液加入5ml浓盐酸。

二、植物材料的处理

1. 种子样品的处理

一般谷物种子可用电动粉碎机粉碎。首先要把机器内清理干净,最初粉碎出的少量样品可弃去不用,然后再进行粉碎,使全部样品通过一定筛孔的筛子,混合均匀,按四分法取出一定数量的样品作为分析样品,贮存于干燥的磨口广口瓶中。而对于蓖麻、芝麻等油料种子,应取少量样品在研钵中研碎,以免脂类损失。

2. 多汁样品的处理

多汁样品,如瓜果、蔬菜等,将其切成小块,放入电动捣碎机中打成匀浆。如果样品含水量少,可按样品重量加入适量水,然后捣碎;如样品量少,可在研钵内研磨,必要时可在研钵内加少量石英砂。如果所测物质不稳定(如维生素和酶等),则上述操作均应在低温下进行。样品匀浆如果不及时测定,可暂存冰箱内。

3. 丙酮干粉的制备

在分离、提纯或测定某种酶的活力时,丙酮干粉法是常用的有效方法之一。将新鲜材料打成匀浆,放入布氏漏斗,按匀浆重量缓慢加入 10 倍在低温冰箱内冷却到 $-15 \sim -20^{\circ}\text{C}$ 的丙酮,迅速抽气过滤,再用 5 倍冷丙酮洗 3 次,在室温下放置 1 小时左右至无丙酮气味,然后移至盛有五氧化二磷的真空干燥器内干燥。丙酮干粉的制备在低温下完成,所提丙酮干粉可长期保存于低温冰箱内。用这种方法能有效地抽提出细胞中的物质,还能除掉脂类物质,免除脂类干扰,而且使得某些原先难溶的酶变得能溶解于水。

三、微生物样品的处理

当选用的微生物菌种接入适当培养液培养一段时间(一般到对数期)后,若需获得胞外代谢产物,则用离心方法收集到上清液,再进行抽提处理;若需胞内代谢产物,则需先将细胞破碎,方可进一步抽提,抽提效果往往与细胞破碎程度有关。细胞破碎的方法有机械破碎法、酶法、化学试剂或丙酮粉法等。

1. 机械破碎法

研磨是最简单的破壁方法。用少量石英砂或氧化铅与浓稠的菌体悬液相混,置于研钵中研磨即可破碎细胞。超声波破碎是将超声波探头置于微生物悬液中,再用功率 100 ~ 500 瓦,频率 10 ~ 25 千赫的超声波处理,可使细菌、放线菌细胞破碎。一种高压匀浆器破碎细胞的效果也十分良好,这是一种特殊结构的器械,可以产生数百千克/厘米² 的压力,使细胞破碎。剧烈的研磨或超声波处理时都很容易产生热量,使细胞悬液温度升高,故这类操作需在冰浴中进行。

2. 酶法或化学试剂破壁法

溶菌酶能破坏革兰氏阳性细菌的细胞壁,使细胞壁降解,一些表面活性剂如 TritonX - 100(聚己二醇烷基芳香醚)也能很好地破碎细胞。

3. 丙酮粉法

丙酮能使细胞迅速脱水并破坏细胞壁,故可用来破坏细胞。经冷冻离心收集的菌体,加入冷却的丙酮液,迅速搅拌均匀后,随即用布氏漏斗抽滤,反复用冷丙酮洗涤数次,抽干后,置于干燥器中低温保存。若培养液和菌体不立即使用时,前者可置低温下短时期保存,后者可制成丙酮粉,在 4°C 保存数月,不会变性。

第二章 生命大分子物质的制备

生命大分子物质通常是指动物、植物及微生物在进行新陈代谢时所产生的蛋白质(包括酶)和核酸等有机化合物的总称。它不仅是生物科学工作者研究的主要对象,而且与化学、医学和食品等学科有密切关系。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,生命科学的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,使得生命物质结构和功能的研究进入一个空前活跃的时期。因此,对各种生命物质进行分离、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。由于不同的生命物质有不同的来源、结构和性质,因此,提取分离它们所采用的方法通用性较差,这给分离提纯工作带来了不小的麻烦。尽管如此,在实践中,确实需要一定纯度的生命大分子物质,制备这些物质的程序也存在不少共同点。因此本章将以蛋白质和核酸为主线讨论其制备的一般过程。

一、材料的选择与处理

(一)材料的选择

在材料的选择时,常会提及有效成分一词。所谓有效成分,是指欲纯化的某种单一的生命大分子物质。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,如胰脏中胰岛素的含量小于其鲜重的百万分之一。而且,有效成分的稳定性较差,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,易被微生物分解变质。因此,有效成分制备的成功与否,与选用的材料关系十分密切。选用的材料不同,有效成分的含量就不同,选用的材料即使相同,如果条件、部位或生长期不同,有效成分的含量也不尽相同。总的来说,材料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)材料的处理

实验的生物材料选定后,需及时使用,否则所需的有效成分将会部分甚至全部破坏,从而会影响其收得率。如果选择的材料不能立即使用时,需要进行处理以防止有效成分被破坏。一般应采用冰冻或干燥等方法处理,同时还应将易于去掉的非需物质(如脂肪)除去。因常用的动物、植物和微生物材料的特点各异,故处理要求和方法也不尽相同。

1. 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)中贮存。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℃左右)和快速冷却的方法脱脂;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,可经丙酮液中脱水,干燥后磨粉贮存备用;对于含耐高温有效成分(如肝素)的材料,可经沸水蒸煮处理,烘干后能长期保存。

2. 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10h内置-4~-30℃冰箱中贮藏备用;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。

3. 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优点,因此,它已成为制备生命大分子物质的主要材料之一。一般用离心法就可分离菌体和上清液。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,湿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。

二、细胞的破碎

通常人们所需的物质有些分泌于细胞外,多数则存在于细胞内。欲提取存在于细胞内的物质时,必须先把细胞破碎。细胞外物质用适当的溶剂可直接提取。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。

(一) 机械破碎

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 000r/min)处理30~45s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3~15min。在细胞悬浮液中如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、细胞破碎彻底的细胞破碎方法。用30MPa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. 冻融法

先将材料置于-15~-20℃低温下冰冻一定时间,再将其置于室温下(或40℃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℃ 15min 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。

(二) 溶胀和自溶

1. 溶胀

溶胀是由于在低渗溶液中细胞内外存在着渗透压差,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。

2. 自溶

自溶是指细胞结构在本身所具有的各种水解酶(如蛋白水解酶和酯酶等)作用下,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的分解。

(三) 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或 DNA 等物质,最后导致整个细胞破碎。

(四) 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、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。一般理想的抽提溶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。

(二) 影响有效成分抽提的因素

pH 值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 值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 值的溶液进行抽提,而酸性蛋白质选用高 pH 值的溶液进行抽提,或者用一定 pH 值的有机溶剂进行抽提。在抽提过程中如果需要用弱碱或弱酸调节溶液的 pH 值,则要不断地进行搅拌,以防止溶液局部出现过高的酸、碱浓度导致有效成分变性。

在抽提阶段,pH 值、金属离子、溶剂的浓度和极性等因子,可明显影响有效成分的性质和数量。

(三) 抽提条件的选择

提取条件的选择,除考虑该目的物的溶解度外,同时还应考虑该物质在该溶剂、该 pH

值条件下的稳定性。如胰岛素提取,选择水作溶剂,pH 2.5~2.7,而胰岛素在 pH 2.0 时溶解度比 pH 2.5 时更大,但在 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,一般地说,生物大分子提取时间愈长,溶解度愈大,而同时杂质溶解度也增大。故提取的最佳条件的选择,必须综合分析各种影响因素,合理地搭配各种提取条件。

四、目的物初级分离

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的物的初级分离。常用的方法主要有沉淀法、超滤法及透析法等,下面将它们逐一介绍。

(一) 沉淀法

沉淀法也称为溶解度法,其纯化生化成分的基本原理是:根据各种物质的结构差异(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 值、极性、离子强度和金属离子等),就能致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,即可以达到从抽提液中分离有效成分的目的。该法是纯化生化成分中常用的一种经典方法,具有操作简单、成本低廉等特点。主要包括盐析沉淀、有机溶剂沉淀和选择性沉淀等类型。

1. 盐析法

盐析法的原理是生化成分在稀盐溶液中,溶解度会随盐浓度的增加而上升(盐溶),但当盐浓度增高到一定数值时,其溶解度又逐渐下降,直至生化成分从溶液中析出(盐析)。

2. 有机溶剂沉淀法

有机溶剂对能溶于水的许多生化成分都能发生沉淀作用,其原因主要是:一是和盐溶液一样破坏生化成分分子周围的水膜,另外就是通过降低水溶液的介电常数。常用的有机溶剂主要是乙醇和丙酮。

3. 等电点沉淀法

等电点沉淀法主要是利用两性电解质分子在电中性时溶解度最低,而各种两性电解质具有不同等电点而进行分离纯化的一种方法。

4. 选择性沉淀法

选择性沉淀法是根据蛋白质、酶和核酸等生化成分对某些物理或化学因素(如温度、酸碱度和有机溶剂等)敏感性的不同,而有选择地使之变性沉淀,从而达到纯化有效成分的目的。

(二) 超滤法

超滤法是通过在溶液的表面施加一定的压力并通过一种特别的薄膜对溶液中各种溶质分子进行选择性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)时,溶剂和小分子则透过选择性薄膜,而大分子则受阻保留。这是近年来才发展起来的一种新方法,最适合于生物大分子如蛋白质和酶等的浓缩和脱盐,具有操作简便、成本低廉、分辨效率高、条件温和且不引起温度和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放于具有半透膜性质的玻璃纸袋中,然后将此袋放于水中

或适当低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,而目的大分子物质则仍然保留在袋中。该法多用于提取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、目的物的纯化与纯度鉴定

(一) 目的物的纯化

目的物经过初级分离后,并不很纯,需要做进一步的纯化,这个过程就称为目的物的纯化。纯化过程中常用的方法主要有层析法、电泳法、超离心法和结晶法等。究竟选择哪一种方法,则取决于目的物的理化性质等。

1. 层析法

层析技术现在已被普遍认为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

(1) 电泳技术的分类

电泳技术常以有无支持物来进行分类。在溶液中不用支持物进行的电泳叫做自由电泳,反之,用支持物进行的电泳叫做区带电泳。在区带电泳中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、琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳等。

(2) 电泳技术的基本原理

电泳的方式和方法虽然有许多种,但是其基本原理都是相同的,即:不同的物质,由于其带电性质、颗粒形态和大小不同,因而在一定的电场中它们的移动方向和移动速度也不同,从而可以使它们进行分离。

3. 超离心法

离心分离技术是借助于离心机旋转所产生的离心力,根据物质颗粒的沉降系数、质量、密度和浮力等因子的不同,从而使物质达到分离的一种分离纯化技术。随着生物化学、分子生物学和生物工程的发展,离心分离技术已经在科研和生产中得到了广泛应用。特别是超离心技术已成为分离、纯化、鉴别各种生化成分的重要手段之一。

4. 结晶法

结晶是指物质从液态或气态形成晶体的过程,在生物化学领域内,绝大多数物质的结晶都是从液态通过一定条件形成晶态的过程。它是生化成分进行分离纯化的一个古老而又常用的手段,普通应用于各种生化成分的制备工艺中,制备的结晶物也常作为结构分析之用。

结晶实质上是在特定条件下,通过改变溶解度来产生沉淀的一种方法。其具体操作是将欲结晶的物质溶解于适当的溶剂中,然后在此溶液中加入适量的盐(如 20% ~ 40% 饱和度的硫酸铵)或有机溶剂(如乙醇、丙酮),使欲结晶物质的溶解度降低至接近饱和的临界浓度或刚刚出现微弱的浑浊,同时调节 pH 值至等电点附近,控制温度在 4℃ 左右,然后经过一定时间(一般为几小时至数周)的陈化,即可得到结晶沉淀。

(二) 目的物含量的测定和纯度鉴定

在生化成分分离提纯的过程中,经常需要测定其含量和提纯程度(即跟踪分析)。这些