



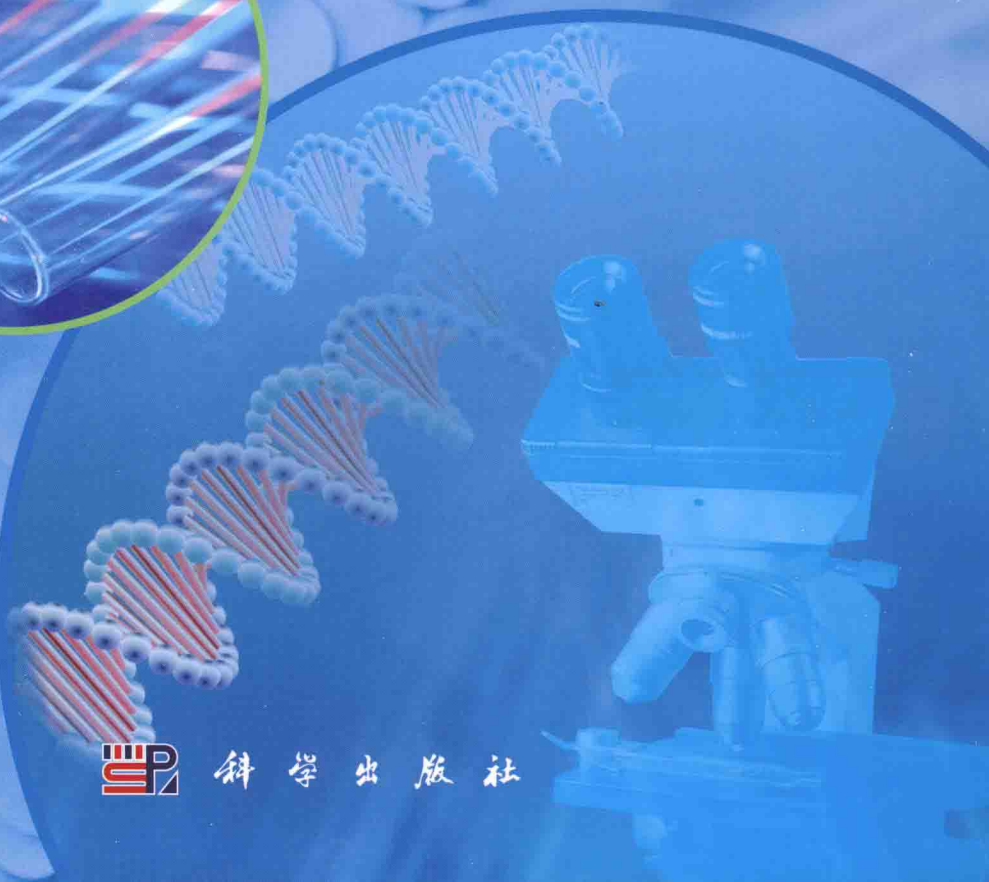
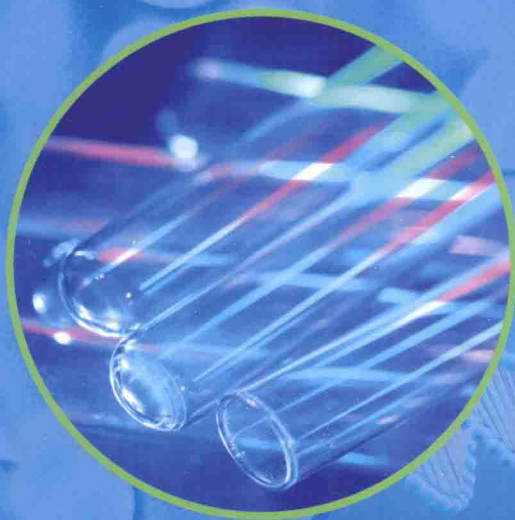
普通高等教育“十二五”规划教材



现代生化技术

(第三版)

郭 勇 崔堂兵 于平儒 编著



科学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

现代生化技术

(第三版)

郭 勇 崔堂兵 于平儒 编著



科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书是在 1996 年华南理工大学出版社出版的《现代生化技术》和 2005 年科学出版社出版的《现代生化技术》(第二版)的基础上,根据国内外生化技术的最新进展和发展趋势,结合作者的教学和科研实践,修改、补充而成。主要介绍重要而又常用的各种现代生化技术的技术原理和操作要点。内容包括三篇共 15 章,第一篇为生化分离技术,包括提取与沉淀分离技术、过滤与膜分离技术、萃取分离技术、层析分离技术、电泳技术、离心分离技术 6 章;第二篇为生化检测技术,包括化学检测技术、光学检测技术、酶学检测技术、气体检测技术、生物检测技术、放射性同位素检测技术 6 章;第三篇为酶、基因和细胞操作技术,包括酶操作技术、基因操作技术、细胞操作技术 3 章。每一章都有一节列出若干实验,可供选择使用。

本书可供高等院校生物技术、生物工程、生物科学、生物化工、发酵工程、酶工程、生物制药,以及其他有关学科的本科生和研究生作为教材使用,也可供有关专业的教学工作者、科研工作者和工程技术人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

现代生化技术/郭勇,崔堂兵,于平儒编著. —3 版. —北京:科学出版社,2014. 3
普通高等教育“十二五”规划教材
ISBN 978-7-03-039719-5

I. ①现… II. ①郭… ②崔… ③于… III. ①生物化学-技术-高等学校-教材 IV. ①Q503

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 022375 号

责任编辑:席 慧 贺霁青/责任校对:桂伟利
责任印制:阎 磊/封面设计:迷底书装

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

安泰印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

1996 年 8 月第 一 版 华南理工大学出版社
2005 年 2 月第 二 版 开本:787×1092 1/16
2014 年 3 月第 三 版 印张:17 1/4
2014 年 3 月第九次印刷 字数:453 000

定价:37.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

第三版前言

本书第三版是在 1996 年华南理工大学出版社出版的第一版和 2005 年科学出版社出版的第二版的基础上, 查阅国内外大量文献资料, 结合作者的教学、科研成果重新补充、修改而成。

本书自问世以来, 在国内几十所高等院校作为教材使用, 教学效果良好, 受到广泛的好评。

自从本书第二版出版以来, 已经经过 8 年的时间, 在此期间生化技术又有了长足的进步。例如, 利用酶的催化作用进行物质检测的酶学检测技术已经在医药、食品、工业、农业、环境保护等领域广泛应用; 随着易错 PCR、DNA 重排等基因体外随机突变技术和突变基因的高通量定向选择技术的发展, 分子定向进化已经成为生物科学和生物技术的热点之一。为此, 在本次编写过程中, 根据生化技术的发展情况, 对本书内容进行了较大的修改和补充。由原来的 3 篇 14 章扩展到现在的 3 篇 15 章。新增加了酶学检测技术、基因体外随机突变技术和突变基因的高通量检测技术等内容, 同时对其他内容也作了适当的修改和补充。

在本书的编写过程中得到许多专家学者的指导和支持, 在此表示衷心的感谢。

希望本书第三版的出版能更为全面地反映现代生化技术, 能为读者更好地掌握现代生物科学和生物技术的研究手段及试验方法, 为生物科学和生物工程的腾飞作出应有的贡献。

虽然本书第三版的内容有了较多更新, 但是由于生化技术发展很快, 加上编著者水平所限, 疏漏之处诚请读者批评指正。

郭 勇

2013 年 10 月于广州

第二版前言

为了适应学科发展的要求,作者在1986年编写了《生化技术》讲义,在华南理工大学微生物工程、生物化工、发酵工程专业作为本科生和硕士研究生的教材使用,1992年经过第一次补充修改,1996年经过再次补充修改后,改名为《现代生化技术》,由华南理工大学出版社正式出版发行。本书第二版是在第一版的基础上,查阅国内外大量文献资料,结合笔者的教学、科研成果重新补充修改而成。

自本书第一版出版以来,已经经过8年多的时间,在这期间,本书在华南理工大学等几十所高等院校作为教材使用,教学效果良好,受到广泛的好评。

近30年来,生物科学和生物工程飞速发展,在理论研究和应用研究方面均取得了举世瞩目的巨大成就。这些成就的取得,与生化技术的发展密不可分。一方面,生物科学与生物工程的发展要求,推动生化技术的高速发展;另一方面生化技术的发展又极大地加速了生物科学和生物工程的发展步伐。例如,1990年启动的人类基因组计划,要求有一套快速、准确的基因测序技术,这一迫切要求极大地推动了基因测序技术的发展,新发展的基因测序技术又对人类基因组计划的提前完成起到了至关重要的作用。

在本次编写过程中,根据生化技术的发展情况,对本书内容进行了较大的修改和补充。由原来的三篇13章扩展到现在的三篇14章。其中新增加了过滤与膜分离技术、萃取分离技术两章,由于核磁共振检测技术主要是由专业人员操作的仪器分析技术,一般生物科学与生物工程工作者很少直接操作,所以在本书第二版中予以删除,有兴趣者可以查阅有关专著。同时对提取与沉淀分离技术、层析分离技术、离心分离技术、分光光度检测技术、生物检测技术、酶分子修饰技术、基因克隆技术和细胞融合技术等章节的内容也作了较大的修改和补充。

在本书的编写过程中,得到余若黔教授、谢秀祯教授、韩双艳博士等许多专家学者的指导和支持,在此表示衷心的感谢。

希望本书第二版的出版能全面反映现代生化技术的全貌,通过对现代生化技术的基本原理和基本技术的介绍,为读者更快、更好地掌握现代生物科学和生物工程的研究手段和实验方法,为21世纪生物科学和生物技术的腾飞和普及做出应有的贡献。

虽然本书第二版的内容有了较多更新,但是由于生化技术的发展日新月异,加上作者水平所限,错漏之处,诚请读者批评指正。

作 者

2004年9月于广州

第一版前言

在生物化学及其相关学科应用的各种技术统称为生化技术,主要是指生物体内物质及其代谢产物,特别是生物大分子的分离、检测、制备与改造技术。

近 20 多年来,生物科学在理论与应用方面都取得了惊人的进展,重要的原因之一是生化技术的重大发展。

生化技术的发展过程可以追溯到半个多世纪以前。1925 年, Svedberg 设计的超速离心机以及同时代的 Warburg 发明的微量检压计等,推动生物化学进入到现代生物化学阶段。1935 年,放射性同位素技术在生物化学过程中的应用,以及随后建立并逐步发展起来的层析技术、电泳技术及其他分离、检测技术,都迅速地促进了生物化学的进展,从而使生物化学的研究工作从整体水平、细胞水平提高到分子水平。20 世纪 60 年代以来生物工程迅速发展,已成为世界新技术革命的主要内容之一。生物工程的发展要求现代生化技术迅速发展,同样,现代生化技术的迅速发展也大大地推动了生物工程的发展。

现代生化技术不仅是生物化学工作者进行研究工作必不可少的手段,也是其他相关学科,如微生物学、酶学、分子生物学、分子物理学、分子遗传学、食品科学、营养学、医学、药理学等进行基础研究的重要工具。同时与生物工程、生物化工、生物制药、微生物工程、发酵工程、酶工程、食品工程、生化工程等息息相关。

本书是作者在 1986 年编写的、1992 年第一次修改补充的《生化技术》讲义的基础上再次修改补充而成的。主要阐述了现代生物科学领域中重要而又常用的生化技术的基本原理及操作要点。实验内容在有关章集中一节列出。这些实验内容都是从国内外公开发表的论文著作中选择而来,其中有一部分是作者在华南理工大学、日本东京大学、美国爱达荷大学(University of Idaho)进行科学研究时亲自做过的,另一部分是作者指导博士研究生和硕士研究生进行学位论文研究时成功使用的,可供研究生或本科生选择部分内容进行实验。

现代生化技术正在飞速发展,原有的技术经常有新的突破,新的技术不断涌现,往往是书未印出,又有了新的发展,加上作者水平所限,不当之处,诚请读者批评指正。

作 者

1995 年 6 月

目 录

第三版前言

第二版前言

第一版前言

第一篇 生化分离技术

第一章 提取与沉淀分离技术	2
第一节 细胞破碎	2
一、机械破碎法	2
二、物理破碎法	3
三、化学破碎法	4
四、酶促破碎法	4
第二节 提取	4
一、提取的方法	5
二、影响提取的因素	6
第三节 沉淀分离	6
一、盐析沉淀法	7
二、等电点沉淀法	10
三、有机溶剂沉淀法	10
四、复合沉淀法	11
五、金属盐沉淀法	11
六、选择性变性沉淀法	12
第四节 实验	12
实验 1-1 大肠杆菌细胞的超声波破碎	12
实验 1-2 枯草杆菌碱性磷酸酶的提取与盐析	13
实验 1-3 枯草杆菌 DNA 的提取与分离	14
实验 1-4 酵母 RNA 的提取与分离	15
实验 1-5 大蒜细胞 SOD 的提取与分离	16
实验 1-6 大鼠肝 rRNA 的提取与分离	17
第二章 过滤与膜分离技术	19
第一节 非膜过滤	19
一、非膜过滤的分类	19
二、非膜过滤的操作过程	20
第二节 膜分离技术	20
一、膜分离的分类	21
二、膜分离的操作过程及其控制	22
第三节 实验	23
实验 2-1 胰凝乳蛋白酶的透析脱盐	23

实验 2-2 糖化酶的超滤分离	24
第三章 萃取分离技术	26
第一节 有机溶剂萃取	26
一、有机溶剂的选择	26
二、有机溶剂萃取的操作过程	26
第二节 双水相萃取	27
一、双水相萃取的原理	27
二、双水相萃取的操作过程	27
第三节 超临界萃取	28
一、超临界萃取的原理	29
二、超临界萃取的操作过程	29
第四节 反胶束萃取	31
一、反胶束萃取的原理	31
二、反胶束萃取的操作过程	31
第五节 实验	32
实验 3-1 青蒿素的超临界萃取分离	32
实验 3-2 人生长激素的双水相萃取分离	33
实验 3-3 穿心莲内酯的有机溶剂萃取	34
第四章 层析分离技术	35
第一节 吸附层析	35
一、吸附层析原理	35
二、吸附柱层析	36
三、聚酰胺薄膜层析	39
四、其他吸附层析	39
第二节 分配层析	39
一、纸层析	40
二、薄层层析	43
三、气相层析	45
第三节 离子交换层析	52
一、离子交换剂的选择与处理	53
二、离子交换层析的操作过程	54
第四节 凝胶层析	55
一、凝胶层析的基本原理	55
二、凝胶的选择与处理	57
三、凝胶层析操作过程	58
第五节 亲和层析	60
一、亲和层析母体和配基	60
二、亲和层析方法	61
第六节 层析聚焦	62
一、交换剂和缓冲液体系	63
二、pH 梯度的形成	63
三、层析聚焦的操作过程	63

第七节 实验	64
实验 4-1 蛋白质溶液的凝胶层析脱盐	64
实验 4-2 氨基酸的纸层析	64
实验 4-3 核苷酸的离子交换层析	66
实验 4-4 胰蛋白酶的亲和层析	68
实验 4-5 凝胶层析测定蛋白质的相对分子质量	69
实验 4-6 DNS-氨基酸的聚酰胺薄膜层析	70
实验 4-7 醇酯成分的气相层析	72
实验 4-8 胆酸混合液的薄层层析	74
第五章 电泳技术	75
第一节 电泳的基本原理	75
第二节 纸电泳	76
一、缓冲液的选择	76
二、滤纸的选择与剪裁	76
三、电泳操作要点	76
第三节 薄层电泳	78
第四节 薄膜电泳	78
第五节 凝胶电泳	79
一、聚丙烯酰胺凝胶的制备原理	79
二、不连续电泳中样品压缩成层的原理	80
三、SDS 凝胶电泳原理	81
四、凝胶电泳的操作要点	81
第六节 等电点聚焦电泳	82
一、稳定 pH 梯度的形成	83
二、两性电解质载体	83
三、支持 pH 梯度的介质	83
四、等电点聚焦电泳的操作要点	84
第七节 实验	85
实验 5-1 核苷酸的纸电泳	85
实验 5-2 蛋白质的醋酸纤维薄膜电泳	86
实验 5-3 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	87
实验 5-4 蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳	88
实验 5-5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质的相对分子质量	90
实验 5-6 蛋白质的二元凝胶电泳	91
第六章 离心分离技术	94
第一节 离心机的选择	94
一、常速离心机	94
二、高速离心机	94
三、超速离心机	94
第二节 离心方法的选择	95
一、差速离心	95
二、密度梯度离心	96

三、等密度梯度离心	97
第三节 离心条件的确定	98
一、离心力	98
二、离心时间	98
三、温度	99
四、pH	99
第四节 实验	99
实验 6-1 细菌核糖体的分离	99
实验 6-2 大肠杆菌细胞膜的分离	100
实验 6-3 RNA 的蔗糖密度梯度离心分离	101
实验 6-4 大鼠肝细胞核的分离	102
第二篇 生化检测技术	
第七章 化学检测技术	104
第一节 糖类的化学检测	104
一、蓝-爱农法	104
二、斐林试剂快速法	105
三、次碘酸钠法	106
四、铜试剂法	107
第二节 蛋白质和氨基酸的化学检测	108
一、定氮法测定蛋白质的含量	108
二、双缩脲试剂法测定蛋白质含量	109
三、福林-酚试剂法测定蛋白质含量	109
四、蛋白质 N 端氨基酸丹磺酰化测定法	110
五、蛋白质的氨基酸排列顺序测定——埃德曼分析法	111
六、蛋白质 N 端氨基酸 2,4-二硝基氟苯测定法	113
七、茚三酮显色法测定氨基酸含量	115
八、甲醛滴定法测定氨基酸	116
第三节 蛋白质的免疫化学检测	116
一、基本概念与原理	116
二、蛋白质的免疫化学检测方法	117
第四节 核酸的化学检测	118
一、定磷法测定核酸含量	118
二、二苯胺法测定 DNA 含量	119
三、地衣酚法测定 RNA 含量	119
第五节 实验	120
实验 7-1 斐林试剂置换法测定还原糖	120
实验 7-2 葡萄糖淀粉酶的活力测定	121
实验 7-3 微量凯氏定氮法测定总氮量	122
实验 7-4 福林-酚试剂法测定蛋白质含量	124
实验 7-5 丹磺酰化法分析蛋白质 N 端氨基酸	124
实验 7-6 异硫氰酸苯酯分析法测定肽链的氨基酸排列次序	125
实验 7-7 茚三酮显色法测定氨基酸含量	127

实验 7-8 双向免疫扩散法测定抗血清效价	128
实验 7-9 定磷法测定核酸含量	129
实验 7-10 地衣酚显色法测定核糖核酸(RNA)含量	130
实验 7-11 二苯胺显色法测定 DNA 含量	131
第八章 光学检测技术	132
第一节 旋光检测技术	132
一、原理	132
二、操作要点	133
第二节 荧光检测技术	133
一、邻苯二甲醛荧光分析法测定氨基酸	133
二、荧光胺荧光分析法测定肽含量	134
第三节 分光光度检测技术	135
一、原理	135
二、操作要点	136
第四节 实验	137
实验 8-1 旋光法测定味精的纯度	137
实验 8-2 荧光法测定核黄素含量	138
实验 8-3 荧光法测定氨基酸含量	139
实验 8-4 紫外线吸收法测定核酸含量	139
实验 8-5 紫外线吸收法测定蛋白质含量	140
第九章 酶学检测技术	141
第一节 酶学检测技术的特点	141
一、酶学检测的专一性强	141
二、酶学检测的灵敏度高	141
三、酶学检测的速度快	141
四、酶学检测的条件温和	141
第二节 酶法分析技术	142
一、酶法分析的基本过程	142
二、常用于酶法分析的酶及其检测方法	142
第三节 酶联免疫吸附检测技术	144
一、ELISA 的基本原理	144
二、ELISA 常用的标记酶	144
三、常用的 ELISA 方法	146
四、ELISA 技术的应用	147
第四节 实验	148
实验 9-1 利用酶法分析测定鸡蛋中总胆固醇的含量	148
实验 9-2 利用酶法分析快速测定发酵液中的 L-乳酸	149
实验 9-3 利用酶法分析测定发酵液中葡萄糖的浓度	151
实验 9-4 酶联免疫吸附检测法(双抗体夹心法)检测艰难梭菌毒素	152
实验 9-5 酶联免疫吸附检测法(间接法)测定兔血清免疫球蛋白 IgG	153
第十章 气体检测技术	155
第一节 华勃氏呼吸仪检压法	156

第二节 范·斯莱克检测仪测定 α -氨基酸含量	158
第三节 实验	158
实验 10-1 酵母细胞耗氧量的测定	158
实验 10-2 华勃氏呼吸仪测定 L-谷氨酸脱羧酶活力	159
实验 10-3 华勃氏呼吸仪测定 L-谷氨酸含量	160
第十一章 生物检测技术	162
第一节 安全性试验	162
一、毒性试验	162
二、局部刺激性试验	163
三、溶血试验	163
四、热原试验	163
五、过敏试验	164
第二节 生长抑制物质的生物效价测定	164
一、稀释法	165
二、扩散法	165
第三节 生长促进物质的生物效价检测	167
一、稀释法	167
二、扩散法	167
三、比浊法	167
四、滴定法	167
第四节 实验	168
实验 11-1 卡那霉素的效价测定	168
实验 11-2 二环素的杀菌能力测定	169
实验 11-3 细胞病变抑制法测定干扰素的效价	170
实验 11-4 热原试验	171
第十二章 放射性同位素检测技术	173
第一节 基本知识	173
一、放射性同位素	173
二、放射性同位素的衰变与射线	173
三、衰变规律	174
四、放射线的防护	174
第二节 放射性同位素的检测	175
一、放射自显影技术	175
二、盖革计数管探测	176
三、闪烁计数器探测	177
第三节 放射性同位素的掺入	177
第四节 实验	178
实验 12-1 γ - ^{32}P -ATP 的酶促合成	178
实验 12-2 ^3H -蛋白质的生物合成	179
实验 12-3 ^3H -蛋白质凝胶的放射荧光显影	179
第三篇 酶、基因和细胞操作技术	
第十三章 酶操作技术	182
第一节 酶生物合成的调节技术	182

一、酶的诱导合成	182
二、酶生物合成的阻遏	184
第二节 酶反应动力学研究技术	185
一、酶反应初速率的测定	185
二、底物浓度对反应速率的影响—— K_m 和 v_{max} 的测定	185
三、最适温度、热稳定性和活化能的测定	187
四、最适 pH 的测定	188
五、酶的激活与抑制	188
第三节 酶、细胞和原生质体固定化技术	189
一、吸附法固定化技术	189
二、包埋法固定化技术	190
三、结合法固定化技术	191
四、交联固定化技术	192
第四节 酶分子修饰技术	193
一、金属离子置换修饰	193
二、大分子结合修饰	193
三、酶的侧链基团修饰	194
四、肽链有限水解修饰	196
五、核苷酸链的剪切修饰	197
六、氨基酸置换修饰	197
七、核苷酸置换修饰	198
八、酶分子的物理修饰	198
第五节 酶分子定向进化技术	199
一、基因体外随机突变技术	199
二、突变基因的高通量筛选技术	201
第六节 实验	204
实验 13-1 β -半乳糖苷酶的诱导合成	204
实验 13-2 无机磷酸对枯草杆菌碱性磷酸酶生物合成的阻遏作用	205
实验 13-3 碱性磷酸酶的反应动力学性质	206
实验 13-4 L-谷氨酸脱羧酶的固定化	208
实验 13-5 枯草杆菌细胞固定化	209
实验 13-6 谷氨酸棒杆菌原生质体固定化	209
实验 13-7 固定化原生质体生产谷氨酸脱氢酶	210
实验 13-8 采用易错 PCR 技术提高扁桃酸酯酶的立体选择性	211
实验 13-9 利用 DNA 重排技术提高 β -甘露聚糖酶的温度耐受性	213
第十四章 基因操作技术	216
第一节 基因的获取技术	216
一、分离法	216
二、反转录法	217
三、化学合成法	218
四、聚合酶链反应技术	219
第二节 载体的制备技术	221

一、载体的分类	221
二、载体的制备	221
第三节 DNA 体外重组技术	223
一、黏性末端连接	223
二、平头末端连接	224
三、修饰末端连接	225
第四节 重组 DNA 引入受体细胞技术	225
一、受体细胞的筛选与处理	225
二、外源 DNA 引入受体细胞	226
第五节 重组 DNA 的鉴定技术	227
一、DNA 印迹技术	227
二、RNA 印迹技术	228
三、蛋白质印迹技术	228
四、DNA 序列测定技术	229
第六节 实验	232
实验 14-1 大肠杆菌 ColE I 质粒的分离	232
实验 14-2 重组 DNA 的细胞转化	233
实验 14-3 Sanger 测序法测定基因的序列	234
实验 14-4 DNA 印迹杂交	235
实验 14-5 PCR 扩增目的基因	236
实验 14-6 碱裂解法提取质粒 DNA	237
第十五章 细胞操作技术	239
第一节 动物细胞融合技术	239
一、细胞的制备	239
二、细胞融合	240
三、融合子的筛选	240
第二节 原生质体融合技术	241
一、原生质体制备	241
二、原生质体融合	244
三、细胞壁的再生	245
四、融合子的筛选	245
第三节 细胞拆合技术	246
一、细胞器的分离	246
二、细胞器重组	247
第四节 实验	248
实验 15-1 枯草杆菌原生质体的制备	248
实验 15-2 酵母原生质体的分离与再生	249
实验 15-3 从胡萝卜细胞分离原生质体	250
实验 15-4 动物细胞微核体和胞质体的制备	250
主要参考文献	252
附录	253

第一篇 生化分离技术

生化分离技术是指从含有多种组分的混合物中将某种生化物质与其他物质分离的技术。

生化分离技术在生物科学与生物工程的基础研究、应用研究和实际生产中是广泛使用、不可缺少的手段。

生化分离技术有多种,本篇主要介绍提取与沉淀分离技术、过滤与膜分离技术、萃取分离技术、层析分离技术、电泳技术、离心分离技术等。

第一章

提取与沉淀分离技术

生化物质种类繁多,主要包括各种蛋白质、多肽、氨基酸、核酸、核苷酸、多糖、寡糖、二糖、单糖、脂类、脂肪酸及各种初级代谢物和次级代谢物等。

为了研究各种生化物质的分子结构、功能和各种特性,进行生物科学和生物工程的基础与应用研究,就必须获得高纯度、具有完整结构和生物活性的各种生化物质,特别是各种生物大分子,如蛋白质、核酸、酶等。为此,首先要从生物体的组织、器官、细胞中将它们提取出来,然后再用沉淀分离等各种分离技术进行分离纯化。本章主要介绍各种生化物质的提取与沉淀分离技术。

第一节 细胞破碎

生物体内的各种物质种类繁多,存在于生物体的不同部位。除了动物、植物体液中和微生物细胞胞外的某些蛋白质和多肽之外,大多数生物大分子都存在于细胞内部。为了获得细胞内的各种生化物质,就得收集组织、细胞并进行组织或细胞破碎,破坏细胞的外层结构,才能进行生化物质的提取和分离纯化。

不同的生物体,或同一生物体不同组织的细胞,由于结构不同,所采用的细胞破碎方法和条件不同。必须根据具体情况进行适当的选择,以达到预期的效果。

细胞破碎方法很多,可以分为机械破碎法、物理破碎法、化学破碎法和酶促破碎法等。在实际使用时应当根据细胞的特性、生化物质的特性等具体情况选用适宜的细胞破碎方法。有时也可以采用2种或2种以上的方法联合使用,以便达到细胞破碎的效果,又不会影响酶的活性。

一、机械破碎法

通过机械运动产生的剪切力的作用,使细胞破碎的方法称为机械破碎法。常用的破碎机械有组织捣碎机、细胞研磨器、匀浆器等。按照所使用破碎机械的不同,机械破碎法可以分为捣碎法、研磨法和匀浆法3种。

1. 捣碎法 利用捣碎机的高速旋转叶片所产生的剪切力将组织或细胞破碎的方法称为捣碎法。捣碎机的转速可以高达10 000 r/min。此法常用于动物内脏、植物叶芽等比较脆嫩的组织或细胞的破碎,也可以用于微生物,特别是细菌的细胞破碎。使用时,先将组织、细胞悬浮于水或其他介质中,置于捣碎机内进行破碎。

2. 研磨法 利用研钵、石磨、细菌磨、球磨等研磨器械所产生的剪切力将组织或细胞破碎的方法称为研磨法。必要时可以加入精制石英砂、小玻璃球、玻璃粉、氧化铝等作为助磨剂,以提高研磨效果。研磨法设备简单,可以采用人工研磨也可以采用电动研磨。其中,电动球磨机可以在实验室也可以在工业生产中使用。此法常用于微生物和植物组织或细胞的破碎。

3. 匀浆法 利用匀浆器产生的剪切力将组织或细胞破碎的方法称为匀浆法。匀浆器一般由硬质磨砂玻璃制成,也可以由硬质塑料或不锈钢等制成。

匀浆器由一个内壁经磨砂的管和一根表面经磨砂的研杆组成,管和研杆必须配套使用,研杆与管壁之间仅有几百微米的间隙。通常用于破碎那些易于分散、比较柔软、颗粒细小的组织或细胞。大块的组织或者细胞团需要先用组织捣碎机或研磨器械捣碎分散后才能进行匀浆。匀浆器的细胞破碎程度较高,对酶的活力影响不大,但处理量较少。高压匀浆器可在工业化生产中应用。

二、物理破碎法

通过温度、压力、声波等各种物理因素的作用,使组织或细胞破碎的方法,称为物理破碎法。物理破碎法多用于微生物细胞的破碎。

常用的物理破碎法有**温度差破碎法**、**压力差破碎法**、**超声波破碎法**等,现简介如下。

1. 温度差破碎法 利用温度的突然变化,细胞由于热胀冷缩的作用而破碎的方法称为**温度差破碎法**。例如,将在 -18°C 冷冻的细胞突然放进热水中,或者将较高温度的热细胞突然冷冻,都可以使细胞破坏。

温度差破碎法对于那些较为脆弱、易于破碎的细胞,如革兰氏阴性菌等,有较好的破碎效果。但是在提取酶时,不能在过高的温度下操作,以免引起酶的变性失活。此法难以工业化生产。

2. 压力差破碎法 通过压力的突然变化,使细胞破碎的方法称为**压力差破碎法**。常用的有高压冲击法、突然降压法及渗透压变化法等。

(1) 高压冲击法是在结实的容器中装入细胞和冰晶、石英砂等混合物,然后用活塞或冲击锤施以高压冲击,冲击压力可达 $50\sim 500\text{ MPa}$,从而使细胞破碎。

(2) 突然降压法是将细胞悬浮液装进高压容器,加高压至 30 MPa 甚至更高,打开出口阀门,使细胞悬浮液迅速流出,出口处的压力突然降低到常压,细胞迅速膨胀而破碎。突然降压法又称为爆炸式降压法,是将细胞悬浮液装入高压容器,通入氮气或二氧化碳,加压到 $5\sim 50\text{ MPa}$,振荡几分钟,使气体扩散到细胞内,然后突然排出气体,压力骤降,使细胞破碎。

突然降压法对细胞的破碎效果取决于下列几个因素。①压力差:一般压力差要达到 3 MPa 以上,才有较好的破碎效果。②压力降低速率:压力降低得越快,破碎效果越好,压力若在瞬间骤降,可以达到爆炸性效果。③细胞的种类和生长期:此法对大肠杆菌等革兰氏阴性菌的破碎效果较佳,最好使用对数生长期的细胞。

(3) 渗透压变化法是利用渗透压的变化使细胞破碎。使用时,先将对数生长期的细胞分离出来,悬浮在高渗透压溶液(如 20% 左右的蔗糖溶液等)中平衡一段时间。然后离心收集细胞,迅速投入 4°C 左右的蒸馏水或其他低渗溶液中,由于细胞内外的渗透压差别而使细胞破碎。此法特别适用于膜结合酶、细胞间质酶等的提取。但是对革兰氏阳性菌不适用,主要是由于革兰氏阳性菌的细胞壁由肽多糖组成,可以承受渗透压的变化而不致细胞破裂。

3. 超声波破碎法 利用超声波发生器所发出的 $10\sim 25\text{ kHz}$ 的声波或超声波的作用,使细胞膜产生空穴作用(cavitation)而使细胞破碎的方法称为超声波破碎法。

超声波破碎的效果与输出功率、破碎时间有密切关系。同时受细胞浓度、溶液黏度、pH、温度及离子强度等的影响,必须根据细胞的种类和酶的特性加以选择。

超声波细胞破碎的一般操作条件为:频率 $10\sim 20\text{ kHz}$;输出功率 $100\sim 150\text{ W}$;温度 $0\sim$