




全国高等农林院校“十三五”规划教材

生物化学实验

倪郁◎主编



 中国农业出版社

ISBN 978-7-109-28248-2

全国高等农林院校“十三五”规划教材

生物化学实验

倪郁 主编

中国农业出版社
北京

定价：28.80元

中国农业出版社 北京 100081
地址：北京市朝阳区麦子店街32号院
电话：(010) 64193111

ZHONGGUO NONGYE CHUBANSHE
中国农业大学出版社

中国农业出版社
地址：北京市朝阳区麦子店街32号院
邮编：100101
电话：(010) 64193111
电子邮箱：nyjbs@163.com
网址：http://www.nyjbs.com.cn
印刷：北京印刷厂
发行：北京农业出版社
ISBN 978-7-109-28248-2

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学实验 / 倪郁主编. —北京: 中国农业出版社, 2019. 12

全国高等农林院校“十三五”规划教材

ISBN 978-7-109-26248-5

I. ①生… II. ①倪… III. ①生物化学—化学实验—高等学校—教材 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2019) 第 261352 号

生物化学实验

SHENGWU HUAXUE SHIYAN

中国农业出版社出版

地址: 北京市朝阳区麦子店街 18 号楼

邮编: 100125

责任编辑: 宋美仙 文字编辑: 徐志平

版式设计: 杨婧 责任校对: 刘丽香

印刷: 中农印务有限公司

版次: 2019 年 12 月第 1 版

印次: 2019 年 12 月北京第 1 次印刷

发行: 新华书店北京发行所

开本: 787mm×1092mm 1/16

印张: 10.75

字数: 255 千字

定价: 28.80 元

版权所有·侵权必究

凡购买本社图书, 如有印装质量问题, 我社负责调换。

服务电话: 010-59195115 010-59194918

编写人员名单

主 编 倪 郁

副主编 朱利泉 晏本菊 刘悦萍

编 者 (按姓氏笔画排序)

朱利泉 (西南大学)

刘 灿 (北京农学院)

刘悦萍 (北京农学院)

李 治 (四川农业大学)

李 胜 (甘肃农业大学)

李关荣 (西南大学)

张长禹 (贵州大学)

张贺翠 (西南大学)

林 春 (云南农业大学)

晏本菊 (四川农业大学)

倪 郁 (西南大学)

梁艳丽 (云南农业大学)

前言

生物化学实验是学习、掌握生物化学基础理论知识的实践性教学环节。为了适应目前生物化学研究的发展趋势，并顾及传统生物化学的研究需要，本教材对生物化学实验内容进行精选，使难易适度，可操作性强，同时编入综合性、设计性与研究性实验，以提高学生的创新能力和实践能力。

全书内容分为上、中、下三篇。上篇为生物化学实验技术概论，包括生物化学的概念、研究对象、研究内容以及常用的实验研究技术。中篇为生物化学基础性实验，分为5个部分，主要是核酸、蛋白质、酶及维生素、糖类、脂类等相关实验。选取的实验涉及最基本的、最代表学科特点的实验方法和技术，包括了核酸、蛋白质、维生素、糖、脂等定性、定量测定实验49个，着重培养学生的基本实验技能。下篇为综合性、设计性与研究性实验。这些实验由多种实验手段、技术和多层次的实验内容所组成，共9个实验，主要训练学生对所学知识和实验技术的综合运用能力、独自动手能力、对实验结果的综合分析能力，使学生得到科学研究的初步训练。

编写分工为：生物化学实验技术概论、实验一、实验七、实验四十六、实验四十七、实验四十八、实验四十九、实验五十由西南大学倪郁编写；实验二、实验三、实验六、实验八、实验九、实验十、实验五十一由贵州大学张长禹编写；实验四、实验十一、实验二十、实验二十五、实验二十六、实验三十四、实验三十六、实验三十八由西南大学张贺翠编写；实验五、实验三十九、实验四十、实验四十一、实验四十二、实验四十三、实验五十三由云南农业大学林春编写；实验十二、实验十三、实验五十五由西南大学李关荣编写；实验二十一、实验二十八、实验三十二、实验三十三、实验三十七、实验五十七由云南农业大学梁艳丽编写；实验二十三、实验二十七、实验五十四由四川农业大学李治编写；实验二十九、实验三十、实验三十一、实验五十二由甘肃农业大学李胜编写。初稿完成后，编写人员互相审阅修改，由倪郁和朱利泉统稿。

本教材可作为高等院校植物生产类、生物类各专业学生的生物化学实验教材，也可供有关教师和科研人员参考。

由于编者水平有限，书中不足之处在所难免，恳请广大读者批评指正。

编者

2019年5月

目 录

前言

上篇 生物化学实验技术概论	1
一、生物化学的概念、研究对象、研究内容	1
二、生物化学常用的实验研究技术	1
(一) 生物大分子的制备和保存技术	1
(二) 分光光度技术	10
(三) 色谱技术	11
(四) 电泳技术	12
(五) 离心技术	13
(六) 免疫组化技术	15
中篇 生物化学基础性实验	16
第一部分 核酸	16
实验一 利用 CTAB 法提取植物总 DNA	16
实验二 利用 SDS-苯酚法提取动物基因组总 DNA	19
实验三 质粒 DNA 的制备与纯化	21
实验四 酵母 RNA 的分离及组分鉴定	24
实验五 离子交换层析分离核苷酸	26
实验六 醋酸纤维素薄膜电泳分离核苷酸	28
实验七 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	30
实验八 RNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳	32
实验九 PCR 技术扩增 DNA	34
实验十 Southern 印迹杂交	36
第二部分 蛋白质	39
实验十一 氨基酸的纸层析	39
实验十二 氨基酸的纤维素薄层层析	42
实验十三 氨基酸的硅胶 G 薄层层析	43
实验十四 利用茚三酮溶液显色法测定植物组织氨基酸总量	45
实验十五 谷物种子中赖氨酸含量的测定	47
实验十六 玉米种子中色氨酸含量的测定	49
实验十七 植物组织中脯氨酸含量的测定	50
实验十八 蛋白质的盐析与透析	52
实验十九 微量凯氏定氮法测定蛋白质含量	53
实验二十 Folin-酚试剂法 (Lowry 法) 测定蛋白质含量	56

实验二十一	考马斯亮蓝法测定植物组织中可溶性蛋白质含量	58
实验二十二	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的相对分子质量	60
实验二十三	等电聚焦电泳法测定蛋白质的等电点	63
实验二十四	免疫印迹	66
第三部分 酶及维生素		70
实验二十五	环境条件对酶促反应的影响	70
实验二十六	小麦幼苗淀粉酶活性的测定	72
实验二十七	脂肪酶活性的测定	75
实验二十八	过氧化氢酶 (CAT) 活性的测定	77
实验二十九	硝酸还原酶活性的测定	78
实验三十	超氧化物歧化酶活性的测定	81
实验三十一	植物呼吸酶活性的测定	83
实验三十二	脲酶米氏常数的简易测定	86
实验三十三	亲和层析纯化胰蛋白酶	88
实验三十四	聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳分离植物过氧化物酶同工酶	90
实验三十五	聚丙烯酰胺凝胶电泳分析法分离酯酶	93
实验三十六	还原型维生素 C 含量的测定	96
实验三十七	荧光法测定维生素 B ₁ 含量	98
第四部分 糖类		101
实验三十八	还原糖和总糖含量的测定 (3,5-二硝基水杨酸比色法)	101
实验三十九	可溶性糖的硅胶 G 薄层层析	103
实验四十	蒽酮比色法测定植物组织可溶性糖含量	106
实验四十一	谷物淀粉含量的测定 (旋光法)	108
实验四十二	植物组织淀粉和纤维素含量的测定	110
实验四十三	糖酵解中间产物的鉴定	113
第五部分 脂类		115
实验四十四	粗脂肪的定量测定	115
实验四十五	油料种子油脂含量的快速测定	116
实验四十六	卵黄中卵磷脂的提取、纯化与鉴定	118
实验四十七	油脂皂化值的测定	120
实验四十八	油脂碘值的测定	121
实验四十九	油脂酸值的测定	123
下篇 综合性、设计性与研究性实验		126
实验五十	植物叶片膜脂脂肪酸组分对低温的响应	126
实验五十一	植物细胞基因组 DNA 的提取与定量测定	127
实验五十二	植物苯丙氨酸解氨酶的提取、纯化及活力测定	129
实验五十三	天然产物中多糖的分离、纯化与鉴定	132
实验五十四	种子蛋白质的系统分析	134
实验五十五	大米蛋白质的分离及含量测定	139
实验五十六	血清 γ 球蛋白的分离、纯化与分析	141
实验五十七	探讨不同因素对植物抗氧化酶活性的影响	144

实验五十八 果蔬维生素 C 的提取及体外抗氧化作用研究	148
附录 1 常用缓冲溶液的配制	151
附录 2 实验室安全及防护知识	156
附录 3 实验场地警告标志	157
参考文献	162

上篇 生物化学实验技术概论

一、生物化学的概念、研究对象、研究内容

生物化学是介于生物和化学之间的一门学科，它是用化学的理论和作为主要手段来研究生命现象，从而揭示生命奥秘的科学。生物化学的任务就是研究组成生物体基本物质的性质、结构、功能，以及这些物质在生命活动过程中所进行化学变化规律及其与生理机能的关系，从而阐明生命现象的本质，并把这些知识应用到社会实践和生产实践中去，以达到征服自然和改造自然的目的。

生物化学研究的主要内容包括：

1. 生物体的物质组成、结构与功能 高等生物体主要由蛋白质、核酸、糖类、脂类以及水、无机盐等组成，通过对生物大分子结构的理解，揭示结构与功能之间的关系。
2. 物质代谢与调控 物质代谢的基本过程主要包括三大步骤：消化、吸收→中间代谢→排泄。其中，中间代谢在细胞内进行，是最为复杂的化学变化过程，它包括合成代谢、分解代谢、物质互变、代谢调控、能量代谢。
3. 遗传信息的传递与表达 研究生物体遗传与繁殖的分子机制，也是现代生物化学与分子生物学研究的一个重要内容。

二、生物化学常用的实验研究技术

(一) 生物大分子的制备和保存技术

1. 概述 生物大分子主要是指蛋白质、脂类、糖类和核酸，这几类物质是生命活动的物质基础。在自然科学，尤其是生命科学高度发展的今天，蛋白质等生物大分子的结构与功能的研究是探求生命奥秘的中心课题，而研究生物大分子的结构与功能，必须首先解决生物大分子的制备问题，没有能够达到足够纯度的生物大分子的制备工作为前提，结构与功能的研究就无从谈起。

(1) 生物大分子制备的主要特点 与化学产品的分离制备相比较，生物大分子的制备有以下主要特点：

① 生物材料的组成极其复杂，常常包含数百种乃至几千种化合物。其中许多化合物至今还是个谜，有待人们的研究与开发。有的生物大分子在分离过程中还在不断地代谢，所以生物大分子的分离纯化方法差别极大，想找到一种适合各种生物大分子分离制备的标准方法是不可能的。

② 许多生物大分子在生物材料中的含量极微，只有万分之一、几十万分之一，甚至几百万分之一。分离纯化的步骤繁多，流程又长，有的目的产物要经过十几步、几十步的操作才能达到所需纯度的要求。例如由脑垂体组织取得某些激素的释放因子，要用几吨甚至几十

吨的生物材料，才能提取出几毫克的样品。

③ 许多生物大分子一旦离开了生物体内的环境就极易失活，因此分离过程中如何防止其失活，就是生物大分子提取制备中最困难之处。过酸、过碱、高温、剧烈搅拌、强辐射及本身的自溶等都会使生物大分子变性而失活，所以分离纯化时一定要选用最适宜的环境和条件。

④ 生物大分子的制备几乎都是在溶液中进行的，温度、pH、离子强度等各种参数对溶液中各种组成的综合影响很难准确估计和判断，因而实验结果有很大的经验成分，实验的重复性较差，个人的实验技术水平和经验对实验结果会有较大的影响。

(2) 生物大分子制备的步骤 由于生物大分子的分离和制备是如此的复杂和困难，因而对于其实验方法和流程的设计就必须尽可能地多查资料，多参照前人所做的工作，探索中的失败是不可避免的。生物大分子的制备通常可按以下步骤进行：

① 确定要制备的生物大分子的目的和要求。是进行科研、开发还是要发现新的物质？

② 建立相应可靠的分析测定方法，这是制备生物大分子的关键，因为它是整个分离纯化过程的“眼睛”。

③ 通过资料调研和预备实验，掌握生物大分子目的产物的物理化学性质。

④ 生物材料的选择与预处理。

⑤ 进行分离纯化方案的选择和探索，这是最困难的过程。

⑥ 生物大分子制备物均一性（即纯度）的鉴定，要求达到一维电泳一条带、二维电泳一个点，或高效液相色谱（HPLC）和毛细管电泳都是一个峰。

⑦ 浓缩产物，进行干燥和保存。

2. 选择材料与预处理 制备生物大分子，首先要选择适当的生物材料。材料的来源无非是动物、植物和微生物及其代谢产物。从工业生产角度来选择材料，应选择含量高、来源丰富、制备工艺简单、成本低的原料，但往往这几方面的要求不能同时具备：含量丰富但来源困难，或含量、来源较理想，但材料的分离纯化方法烦琐，流程很长，反倒不如含量低些但易于获得纯品的材料。由此可见，必须根据具体情况，抓住主要矛盾决定取舍。

选动物材料时要注意其年龄、性别、营养状况、遗传素质和生理状态等。动物材料一般要进行绞碎等处理。选植物材料时应注意植物的品种、季节性、地理位置、生长环境、气候条件等，甚至采摘的时间段都要考虑。选微生物材料时要注意菌种的代数和培养基成分等之间的差异，例如在微生物的对数期，酶和核酸的含量较高，可获得较高的产量。

材料选定后要尽可能保持新鲜，尽快加工处理。动物组织要先除去结缔组织、脂肪等非活性部分，绞碎后在适当的溶剂中提取，如果所要求的成分在细胞内，则要先破碎细胞；植物要先去壳（如有）；微生物材料要及时将菌体与发酵液分开。上述处理后的材料，若不立即进行实验应冷冻保存，对于易分解的生物大分子应选用新鲜材料制备。

3. 细胞的破碎与细胞器的分离

(1) 细胞的破碎 除了某些细胞外的多肽激素和某些蛋白质与酶以外，对于细胞内或多细胞生物组织中的各种生物大分子的分离纯化，都需要事先将细胞和组织破碎，使生物大分子充分释放到溶液中，并不失去生物活性。不同的生物体或同一生物体不同部位的组织，其细胞破碎的难度不一，使用的方法也不相同，如动物脏器的细胞膜较脆弱，容易破碎，植物和微生物由于具有较坚固的纤维素、半纤维素组成的细胞壁，要采取专门的细胞破碎方法。

细胞的破碎包括以下几种方法:

① 机械法。

A. 研磨。将剪碎的动物组织置于研钵或匀浆器中,加入少量石英砂研磨成匀浆,即可将动物细胞破碎,这种方法比较温和,适宜实验室使用。工业生产中可用电磨研磨。细菌和植物组织细胞的破碎也可用此法。此法适合处理较少量的细胞破碎。

B. 组织捣碎器。这是一种较剧烈的破碎细胞的方法,通常可先用家用食品加工机将组织打碎,然后再用内刀式组织捣碎机(即高速分散器)从 10 000~20 000 r/min 的转速将组织的细胞打碎,为了防止发热和升温过高,通常是转 10~20 s,停 10~20 s,可反复多次。此法适合处理动物内脏组织和植物肉质种子等。

② 物理法。

A. 反复冻融法。将待破碎的细胞冷至 $-20\sim-15\text{ }^{\circ}\text{C}$,然后放于室温(或 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$)迅速融化,如此反复冻融多次,此时由于细胞内形成冰粒,使剩余胞液的盐浓度增高而引起细胞溶胀破碎。此法常用于细菌和一些植物材料的破壁。

B. 超声波处理法。此法是借助超声波的振动力破碎细胞壁和细胞器,多用于处理微生物材料,如用大肠杆菌制备各种酶。破碎微生物细菌和酵母菌时,时间要长一些,处理的效果与样品浓度和使用频率有关。使用时注意降温,防止过热。对于超声波敏感的酶和核酸要慎用此法。

C. 压榨法。这是一种温和的、彻底破碎细胞的方法。在 $1\ 000\times 10^5\sim 2\ 000\times 10^5\text{ Pa}$ 的高压下使几十毫升的细胞悬液通过一个小孔突然释放至常压,细胞将彻底破碎。这是一种较理想的破碎细胞的方法,但仪器费用较高。

D. 冷热交替法。从细菌或病毒中提取蛋白质和核酸时可用此法。在 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右维持数分钟,立即放入冰浴中使之冷却,如此反复多次,绝大部分细胞可以被破碎。

③ 化学与生物化学方法。

A. 自溶法。将新鲜的生物材料存放于一定的 pH 和适当的温度下,细胞结构在自身所具有的各种水解酶(如蛋白酶和酯酶等)的作用下发生溶解,使细胞内含物释放出来的方法称为自溶法。使用时要特别小心操作,因为水解酶不仅可以破坏细胞壁和细胞膜,同时也可能会把某些要提取的有效成分分解了。

B. 溶胀法。细胞膜为天然的半透膜,在低渗溶液和低浓度的稀盐溶液中,由于存在渗透压差,溶剂分子大量进入细胞,将细胞膜胀破释放出细胞内含物。

C. 酶解法。利用各种水解酶,如溶菌酶、纤维素酶、蜗牛酶和酯酶等,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 为 8 的条件下处理 15 min,可以专一性地将细胞壁分解,释放出细胞内含物。此法适用于处理多种微生物。例如从某些细菌细胞提取质粒 DNA 时,可采用溶菌酶(来自蛋清)破细胞壁;而在破酵母细胞时,常采用蜗牛酶(来自蜗牛),将酵母细胞悬浮于 0.1 mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH=5.4)中,加 1% 蜗牛酶,在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 30 min,即可使大部分细胞壁破裂,若同时加入 0.2% 的巯基乙醇,效果会更好。此法可以与研磨法联合使用。

D. 有机溶剂处理法。利用氯仿、甲苯、丙酮等脂溶性溶剂或十二烷基硫酸钠(SDS)等表面活性剂处理细胞,可将细胞膜溶解,从而使细胞破裂。此法也可以与研磨法联合使用。

(2) 细胞器的分离 各类生物大分子在细胞内的分布不同,如 DNA 几乎全在细胞核

内，RNA 主要在细胞质中；各种酶在细胞中也有特定的位置。因此要根据目的物质的存在位置选取提取材料。

细胞器的分离一般采用差速离心法。利用细胞各组分质量不同，各组分沉降于离心管的不同区域，分离后得到所需组分。此法常用于分离细胞器的介质有蔗糖、氯化铯、葡萄糖、聚乙二醇等。

4. 提取与纯化

(1) 生物大分子的提取 提取是在分离纯化之前将经过预处理或破碎的细胞置于溶剂中，使被分离的生物大分子充分地释放到溶剂中，并尽可能保持原来的天然状态不丢失生物活性的过程。这一过程是将目的产物与细胞中其他化合物和生物大分子分离，即由固相转入液相，或从细胞内的生理状态转入外界特定的溶液中。

影响提取的因素主要有目的产物在提取溶剂中溶解度的大小、由固相扩散到液相的难易程度、溶剂的 pH 和提取时间等。一种物质在某一溶剂中溶解度的大小与该物质的分子结构及使用溶剂的理化性质有关。一般来说，极性物质易溶于极性溶剂，非极性物质易溶于非极性溶剂（相似相溶原理）；碱性物质易溶于酸性溶剂，酸性物质易溶于碱性溶剂；温度升高，溶解度加大，远离等电点，溶解度增加。提取时所选择的条件应有利于目的产物溶解度的增加和保持其生物活性。减小溶剂黏度、搅拌和延长提取时间可提高扩散速度，提高提取效率。提取采用“少量多次”的效果较好。常用的提取溶剂主要为水和有机溶剂。

① 水。蛋白质和酶的提取一般以水溶液为主。稀盐溶液和缓冲液对蛋白质的稳定性好，溶解度大，是提取蛋白质和酶最常用的溶剂。用水溶液提取生物大分子应注意以下几个主要影响因素：

A. 盐浓度（即离子强度）。离子强度对生物大分子的溶解度有极大的影响，有些物质，如 DNA-蛋白复合物，在高离子强度下溶解度增加，而另一些物质，如 RNA-蛋白复合物，在低离子强度下溶解度增加，在高离子强度下溶解度减小。绝大多数蛋白质和酶，在低离子强度的溶液中都有较大的溶解度。若在纯水中加入少量中性盐，蛋白质的溶解度比在纯水中的大大增加，此现象称为盐溶现象。但中性盐的浓度增加至一定时，蛋白质的溶解度又逐渐下降，直至沉淀析出，此现象称为盐析现象。盐溶现象的产生主要是少量离子的活动，减少了偶极分子之间极性基团的静电吸引力，增加了溶质和溶剂分子间相互作用力的结果。因此，低盐溶液常用于大多数生化物质的提取。通常使用 0.02~0.05 mol/L 缓冲液或 0.09~0.15 mol/L NaCl 溶液提取蛋白质和酶。不同的蛋白质，其极性大小不同，为了提高提取效率，有时需要降低或提高溶剂的极性。向水溶液中加入蔗糖或甘油可使其极性降低，增加离子强度 [如加入 KCl、NaCl、NH₄Cl 或 (NH₄)₂SO₄]，可以增加溶液的极性。

B. pH。蛋白质、核酸的溶解度和稳定性与 pH 有关。过酸、过碱均应尽量避免，一般控制 pH 在 6~8 的范围内，提取溶剂的 pH 应在生物大分子的稳定范围内。例如胰蛋白酶为碱性蛋白质，常用稀酸提取，而肌肉 3-磷酸甘油醛脱氢酶属酸性蛋白质，则常用稀碱来提取。

C. 温度。为防止变性和降解，制备具有活性的生物大分子，提取时一般在 0~5℃ 的低温操作。但少数对温度耐受力强的蛋白质，可提高温度使杂蛋白变性，这样有利于提取和下一步的纯化。

D. 防止蛋白酶或核酸酶的降解作用。在提取蛋白质和核酸时，常常受自身存在的蛋白

酶或核酸酶的降解作用而导致实验的失败。为防止这一现象的发生，常常采用加入抑制剂或调节提取液的 pH、离子强度、极性等方法使这些酶失去活性，防止它们对欲提纯的蛋白质及核酸起降解作用。例如在提取 DNA 时加入 EDTA（乙二胺四乙酸）络合 DNase 活化所必需的 Mg^{2+} 。

E. 搅拌与氧化。搅拌能促使被提取物溶解，一般采用温和搅拌，搅拌速度太快容易产生大量泡沫，增大了提取液与空气的接触面，会引起酶等物质的变性失活。因为一般蛋白质都含有相当数量的巯基，有些巯基常常是活性部位的必需基团，提取液中有氧化剂或与空气中的氧气接触过多都会使巯基氧化为分子内或分子间的二硫键，导致酶活性的丧失。在提取液中加入少量巯基乙醇或半胱氨酸以防止巯基氧化。

② 有机溶剂。一些和脂类结合比较牢固或分子中非极性侧链较多的蛋白质难溶于水、稀盐、稀酸或稀碱中，常用不同比例的有机溶剂提取。常用的有机溶剂有乙醇、丙酮、异丙醇、正丁酮等，这些溶剂可以与水互溶或部分互溶，同时具有亲水性和亲脂性。其中正丁醇在 0℃ 时在水中的溶解度为 10.5%，40℃ 时为 6.6%，同时正丁醇又具有较强的亲脂性，因此常用来提取与脂结合较牢或含非极性侧链较多的蛋白质和脂类。植物种子中的玉蜀黍蛋白、麸蛋白，常用 70%~80% 的乙醇提取，动物组织中一些线粒体及微粒上的酶常用丁醇提取。

有些蛋白质既能溶于稀酸、稀碱，又能溶于含有一定比例的有机溶剂的水溶液中，在这种情况下，采用稀的有机溶液提取常常可以防止水解酶的破坏，并兼有除去杂质、提高纯化效率的作用。例如，胰岛素可溶于稀酸、稀碱和稀醇溶液，但在组织中与其共存的糜蛋白酶对胰岛素有极高的水解活性，因而采用浓度为 6.8% 并用草酸调 pH 为 2.5~3.0 的乙醇溶液进行提取，这样的提取溶剂对胰岛素的溶解和稳定性都没有影响，但可除去一部分在稀醇与稀酸中不溶解的杂蛋白。

(2) 生物大分子的分离纯化 由于生物体的组成成分复杂，数千种乃至上万种生物分子又处于同一体系中，因此不可能有一个适合于各类分子的固定的分离程序，但多数分离工作关键部分的基本手段是相同的。常用的分离纯化方法主要包括根据蛋白质溶解度不同的分离方法，根据蛋白质分子大小差别的分离方法，根据蛋白质带电性质不同的分离方法，根据蛋白质配体特异性差异的分离方法等。

① 根据蛋白质溶解度不同的分离方法包括以下几种：

A. 蛋白质盐析法。中性盐对蛋白质的溶解度有显著的影响。一般在低盐浓度下随盐浓度的升高，蛋白质溶解度增加。随着盐浓度继续增大，蛋白质的溶解度不同程度地下降，蛋白质先后析出，这种方法称为盐析法。除了蛋白质以外，多肽、多糖和核酸等都可以用盐析法进行沉淀分离：20%~40% 饱和度的硫酸铵可以使许多病毒沉淀；43% 饱和度的硫酸铵可以使 DNA 和 rRNA 沉淀，而 tRNA 保留在上清液中。盐析法应用最广的还是在蛋白质领域，已有 80 多年的历史，其突出的优点是成本低，不需要特别昂贵的设备，操作简单、安全，对许多生物活性物质具有稳定作用。

中性盐在沉淀蛋白质时，高浓度的盐离子有很强的水化作用，可夺取蛋白质的水化层，使之“失水”，于是蛋白质胶粒凝结并沉淀析出。进行盐析时，如果溶液的 pH 在蛋白质的等电点则效果更佳。蛋白质分子的大小不同、亲水程度不同，故盐析所需的盐浓度也不同。因此，可通过调节蛋白质溶液的中性盐浓度，使之分段沉淀。

蛋白质盐析常用的中性盐有硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、氯化钠、磷酸钠等。盐析沉淀后的蛋白质要除去其中的盐，常用透析（时间长，要低温）和葡聚糖凝胶层析柱（时间短）来处理。

B. 等电点沉淀法。等电点沉淀法是利用具有不同等电点的两性电解质，在达到电中性时溶解度最低，易发生沉淀，从而实现分离的方法。氨基酸、蛋白质和核酸都是两性电解质，可以利用此法进行初步的沉淀分离。但是，由于许多蛋白质的等电点十分接近，而且带有水膜的蛋白质等生物大分子仍有一定的溶解度，不能完全沉淀析出，因此，单独使用此法分辨率较低，效果不理想，所以此法常与盐析法、有机溶剂沉淀法或其他沉淀剂一起配合使用，以提高沉淀能力和分离效果。此法在分离纯化过程中主要用于去除杂蛋白，而不用干沉淀目的物。

C. 有机溶剂沉淀法。有机溶剂对于许多蛋白质、核酸、多糖和小分子物质都能发生沉淀作用，是较早使用的沉淀方法之一。其沉淀作用的原理主要是降低水溶液的介电常数。溶剂的极性与其介电常数密切相关，极性越大，介电常数越大，如 20℃ 时水的介电常数为 80，而乙醇和丙酮的介电常数分别是 24 和 21.4，因而向水溶液中加入有机溶剂能降低溶液的介电常数，减小溶剂的极性，从而削弱了溶剂分子与蛋白质分子间的相互作用力，增加了蛋白质分子间的相互作用，导致蛋白质溶解度降低而沉淀。溶液介电常数的减小就意味着溶质分子异性电荷静电力的增加，使带电溶质分子更易互相吸引而凝集，从而发生沉淀。另外，由于使用的有机溶剂与水互溶，它们在溶解于水的同时从蛋白质分子周围的水化层中夺走了水分子，破坏了蛋白质分子的水膜，因而发生沉淀作用。

有机溶剂沉淀法的优点是分辨能力比盐析法高，即一种蛋白质或其他溶质只在一个比较窄的有机溶剂浓度范围内沉淀；沉淀不用脱盐，过滤比较容易（如有必要，可用透析袋脱除有机溶剂），因而在沉淀生物大分子中应用广泛。其缺点是对某些具有生物活性的大分子容易引起变性失活，操作必须在低温下进行。

有机溶剂沉淀法经常用于蛋白质、多糖和核酸等生物大分子的沉淀分离，使用时先要选择合适的有机溶剂，然后注意调整样品的浓度、温度、pH 和离子强度，使之达到最佳的分离效果。用于生物大分子制备的有机溶剂，首先是能与水互溶。沉淀蛋白质常用的沉淀剂是乙醇、甲醇和丙酮。沉淀核酸、糖、氨基酸和核苷酸最常用的沉淀剂是乙醇。沉淀所得的固体样品，如果不是立即溶解进行下一步的分离，则应尽可能抽干沉淀，减少其中有机溶剂的含量，如若必要可以装透析袋透析除去有机溶剂，以免影响样品的生物活性。

D. 选择性变性沉淀法。利用蛋白质、核酸等生物大分子与非目的生物大分子在物理、化学性质等方面的差异，选择一定的条件使杂蛋白等非目的物变性沉淀而得到分离提纯的方法，称为选择性变性沉淀法。常用的有热变性沉淀、表面活性剂变性沉淀、有机溶剂变性沉淀和选择性酸碱变性沉淀等。

热变性沉淀利用生物大分子对热的稳定性不同，加热升高温度使某些非目的生物大分子变性沉淀而使目的物保留在溶液中。此方法最为简便，不需消耗任何试剂，但分离效率较低，通常用于生物大分子的初期分离纯化。

表面活性剂变性沉淀和有机溶剂变性沉淀都是利用不同蛋白质等对表面活性剂和有机溶剂的敏感性不同，在分离纯化过程中使用它们可以使那些敏感性强的杂蛋白变性沉淀，而目的物仍留在溶液中。使用此类方法时通常都在冰浴或冷室中进行，以保护目的物的生物

活性。

选择性酸碱变性沉淀利用蛋白质等对溶液中 pH 的稳定性不同而使杂蛋白变性沉淀，通常是在分离纯化过程中附带进行的一个分离纯化步骤。

E. 有机聚合物沉淀法。有机聚合物是 20 世纪 60 年代发展起来的一类重要的沉淀剂，最早应用于提纯免疫球蛋白和沉淀一些细菌和病毒。近年来此法广泛用于核酸和酶的纯化。其中应用最多的是聚乙二醇 (PEG)，它的亲水性强，溶于水和许多有机溶剂，对热稳定，有广泛的分子质量范围，在生物大分子制备中，用得较多的是相对分子质量为 6 000~20 000 的 PEG。

本方法的优点：操作条件温和，不易引起生物大分子变性；沉淀效能高，使用少量的 PEG 即可以沉淀相当多的生物大分子；沉淀后有机聚合物容易去除。

② 根据蛋白质分子大小差别的分离方法包括以下几种：

A. 透析与超滤。透析是利用半透膜将大小不同的蛋白质分子分开的方法。在生物大分子的制备过程中，除盐、除少量有机溶剂、除去生物小分子杂质和浓缩样品等都要用到透析技术。通常是将半透膜制成袋状，将生物大分子样品溶液置入袋内，将此透析袋浸入水或缓冲液中，样品溶液中的大分子质量的生物大分子被截留在袋内，而盐和小分子物质不断扩散透析到袋外，直到袋内外两边的浓度达到平衡为止。保留在透析袋内未透析出的样品溶液称为保留液，袋外的溶液称为渗出液或透析液。

透析的动力是扩散压，扩散压是由横跨膜两边的浓度梯度形成的。透析的速度与膜的厚度成反比，与欲透析的小分子溶质在膜内外两边的浓度梯度成正比，还与膜的面积和温度成正比。通常是在 4℃ 透析，在一定范围内升高温度可加快透析速度。

超滤是一种加压膜分离技术，即利用高压或离心力，使小分子溶质和溶剂穿过一定孔径的特制的薄膜，使大分子溶质不能透过，留在膜的一边，从而使大分子物质得到了部分的纯化。超滤技术的关键是滤膜，选择不同孔径的滤膜截留不同相对分子质量的蛋白质。

超滤的优点是操作简便，成本低廉，不需增加任何化学试剂，尤其是超滤技术的实验条件温和，与蒸发、冰冻干燥相比没有相的变化，而且不引起温度、pH 的变化，因而可以防止生物大分子的变性、失活和自溶。在生物大分子的制备技术中，超滤主要用于生物大分子的脱盐、脱水和浓缩等。但超滤也有一定的局限性，它不能直接得到干粉制剂。对于蛋白质溶液，一般只能得到 10%~50% 的浓度。

B. 凝胶层析过滤法 (分子排阻层析法或分子筛层析)。此法是根据分子大小分离蛋白质混合物的有效方法之一。凝胶层析的固定相是惰性的珠状凝胶颗粒，凝胶颗粒的内部具有立体网状结构，形成很多孔穴。当含有不同分子大小组分的样品进入凝胶层析柱后，各个组分就向固定相的孔穴内扩散，组分的扩散程度取决于孔穴的大小和组分分子的大小。比孔穴孔径大的分子不能扩散到孔穴内部，完全被排阻在孔外，只能在凝胶颗粒外的空间随流动相向下流动，它们经历的流程短，流动速度快，所以首先流出；小分子则可以渗透进入凝胶颗粒内部，经历的流程长，流动速度慢，所以后流出；大小介于二者之间的分子在流动中部分渗透，渗透的程度取决于分子的大小，所以其流出的时间介于二者之间，分子越大的组分越先流出，分子越小的组分越后流出。这样样品经过凝胶层析后，各个组分便按分子质量从大到小的顺序依次流出，从而达到分离的目的。层析柱的主要填充材料是葡聚糖凝胶和琼脂糖凝胶。

凝胶层析过滤法是生物化学中一种常用的分离手段，它具有设备简单、操作方便、样品回

收率高、实验重复性好，特别是不改变样品生物学活性等优点，因此广泛用于蛋白质、核酸、多糖等生物大分子的分离纯化，同时还应用于蛋白质分子质量的测定、脱盐、样品浓缩等。

③ 根据蛋白质带电性质不同的分离方法包括以下几种：

A. 电泳法。各种蛋白质在同一 pH 条件下，因相对分子质量和电荷数量不同而在电场中的迁移率不同得以分开。

在电泳法中，等电聚焦电泳法比较重要。它主要是利用一种两性电解质作为载体，电泳时两性电解质形成一个从正极向负极逐渐增加的 pH 梯度，当带一定电荷的蛋白质在其中泳动时，到达各自等电点位置就停止。等电聚焦电泳法可用于分析和制备各种蛋白质。

B. 离子交换层析法。离子交换层析 (ion exchange chromatography, IEC) 法是以离子交换剂为固定相，依据流动相中的组离子与交换剂上的平衡离子进行可逆交换时的结合力大小的差别而进行分离的一种层析方法。离子交换剂可以分为 3 个部分：电荷基团、高分子聚合物基质和平衡离子。电荷基团与高分子聚合物共价结合，形成一个带电的可进行离子交换的基团。平衡离子是结合于电荷基团上的相反离子，它能与溶液中其他的离子基团发生可逆的交换反应。平衡离子带正电的离子交换剂能与带正电的离子基团发生交换作用，称为阳离子交换剂；平衡离子带负电的离子交换剂能与带负电的离子基团发生交换作用，称为阴离子交换剂。在一定条件下，溶液中的某种离子基团可以把平衡离子置换出来，并通过电荷基团结合到固定相上，平衡离子则进入流动相，这就是离子交换层析法的基本置换反应。通过在不同条件下的多次置换反应，就可以对溶液中不同的离子基团进行分离。目前离子交换层析法仍是生物化学领域中常用的一种层析方法，广泛应用于各种生物分子（如氨基酸、蛋白、糖类、核苷酸等）的分离纯化。

各种离子与离子交换剂上的电荷基团的结合是由静电力产生的，结合过程是一个可逆的过程。结合的强度与很多因素有关，包括离子交换剂的性质、离子本身的性质、离子强度、pH、温度、溶剂组成等。离子交换层析就是利用各种离子本身与离子交换剂结合力的差异，并通过改变离子强度、pH 等条件改变各种离子与离子交换剂的结合力而达到分离的目的。离子交换剂的电荷基团对不同的离子有不同的结合力。一般来讲，离子价数越高，结合力越大；价数相同时，原子序数越高，结合力越大。例如阳离子交换剂对离子的结合力大小顺序为： $\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Rb}^+ < \text{Cs}^+$ ， $\text{Na}^+ < \text{Ca}^{2+} < \text{Al}^{3+} < \text{Ti}^{4+}$ 。蛋白质等生物大分子通常呈两性，它们与离子交换剂的结合与它们的性质及 pH 有较大关系。以用阳离子交换剂分离蛋白质为例，在一定的 pH 条件下，等电点 $pI < pH$ 的蛋白带负电，不能与阳离子交换剂结合； $pI > pH$ 的蛋白带正电，能与阳离子交换剂结合，一般 pI 越大的蛋白与离子交换剂的结合力越强。由于生物样品的复杂性以及其他因素影响，一般生物大分子与离子交换剂的结合情况较难估计，往往要通过实验进行摸索。

离子交换剂的大分子聚合物基质可以由多种材料制成，聚苯乙烯离子交换剂（又称为聚苯乙烯树脂）是以苯乙烯和二乙烯苯合成的具有多孔网状结构的聚苯乙烯为基质。聚苯乙烯离子交换剂机械强度大、流速快，但它与水的亲和力较小，具有较强的疏水性，容易引起蛋白的变性，因此一般常用于分离小分子物质，如无机离子、氨基酸、核苷酸等。以纤维素 (cellulose)、球状纤维素 (sephacel)、葡聚糖、琼脂糖 (sepharose) 为基质的离子交换剂与水有较强的亲和力，适合于分离蛋白质等大分子物质，葡聚糖离子交换剂一般以 Sephadex G-25 和 Sephadex G-50 为基质，琼脂糖离子交换剂一般以 Sepharose CL-6B 为基质。关