

本书就基因工程基本原理及其在改良食品加工原料、食品加工过程、食品检测和食品安全等方面作了系统的介绍,有助于增加人们对转基因食品的认识。通过正确运用基因工程的工具和有效的食品安全管理规范,将能极大地发挥基因工程技术的优势,促进食品生物技术产业化,为解决人类面临的“粮食、能源、癌症、环境”等问题提供美好的前景。

此外,对新兴的营养基因组学研究进展介绍,将会使人们进一步了解基因工程,不但对食品的质量改进有重要的作用,同时在解决如今人们对眼花缭乱的功能食品市场的商品规范管理以及功能食品的个性化供配方面提供有力的工具。

本书重点阐述基因工程原理及其在食品工业中的应用,理论联系实际。期望本书的出版对发展食品工业、农副产品深加工能起到促进作用。

本书可供食品企业和科研单位技术人员使用,亦可作为食品、基因工程相关专业在校大学生参考用书。

图书在版编目 (CIP) 数据

食品与基因工程/林影,石磊,杜红丽编著. —北京:化学工业出版社,2007.10

ISBN 978-7-122-01272-2

I. 食… II. ①林…②石…③杜… III. 基因-遗传工程-应用-食品工业 IV. TS201.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 156684 号

责任编辑:张彦 路金辉 梁虹 文字编辑:焦欣渝
责任校对:蒋宇 装帧设计:郑小红

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)
印 装:北京云浩印刷有限责任公司
720mm×1000mm 1/16 印张12 字数203千字 2008年1月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686)
售后服务:010-64518899
网 址: <http://www.cip.com.cn>
凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价: 28.00 元

版权所有 违者必究

《食品与基因工程》编委会

主 任 彭志英

委 员 （以姓氏笔画为序）

陈 坚 江南大学教授、博士生导师

赵谋明 华南理工大学教授、博士生导师

郭 勇 华南理工大学教授、博士生导师

彭志英 华南理工大学教授、博士生导师

谢明勇 南昌大学教授、博士生导师

序

知识经济时代在崛起，现代科技在飞跃发展。21 世纪是生物技术世纪。20 世纪 50 年代初人类进入了划时代的分子生物学时代，70 年代初由于基因工程的诞生，现代生物技术产业应运而生，并将这一高新技术应用于医药、食品、农业、环保和化工等部门，对人类健康、经济发展和工业科技产生了深刻影响。因而，在科学发展史上逐步形成许多生物技术分支，包括医药生物技术、食品生物技术、农业生物技术、化工生物技术和环境生物技术等。

食品生物技术 (food biotechnotogy) 或称为食品生物工程 (food bioengineering) 是生物技术的重要分支学科。虽然，迄今为止对这一门分支学科尚未有统一涵义，但从其实际应用角度而言，应可概括为食品原材料或细胞通过生物技术手段进行 DNA 重组改造或加工表达形成高附加值、高性能和优质的新型食品。

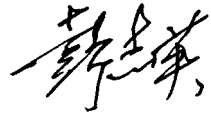
传统的食品发酵在我国有着数千年的历史，它是采用自然界的各种微生物或经过纯种培养后对谷物、果蔬原料等的糖类物质进行发酵而制成各种食品。如今，可采用现代的基因工程手段，通过不同种属间的 DNA 重组以达到改造食品工业原材料，从而促使食品工业达到优质高产，以满足人类生活和健康日益增长的需要。目前，应用于食品加工的多种酶制剂，其生产菌株约占 60% 以上都是经过基因工程技术改造过的。至于转基因食品 (包括转基因大豆、小麦、番茄等)，在全球也已有很大发展。据统计全球转基因作物种植面积已达到 5000 多万公顷，其中美国约有 60% 以上的加工食品均含有转基因成分。鉴于食品中引入新的“基因”成分，是否引起副反应，虽然现在仍未有确切实验证据，但已有各种不同的意见，为了维护消费者权益，各国已通过制订新的法规、实行“标识”等措施来规范市场秩序。

随着基因工程的发展，酶工程、发酵工程和细胞工程等新技术手段也得到有效的应用。固定化酶、固定化活细胞等新技术正在推动着食品加工工艺革新。例如，过去生产淀粉糖是采用传统的酸水解法，而现在已成功地采用全酶法或固定化酶系统生产葡萄糖、麦芽糖或高果糖浆等。这样，可大大降低能耗、减少污染和提高产品质量和生产效率。发酵技术也有很大的进步，已由传统的间歇式发酵发展为连续控制式发酵。已有人采用动、植物大量培养生产各种具有保健功能的活性因子、维生素和多种生长素等，作为制备各种保健食品的原材料。

随着生物科学的发展，生物技术更融入新的学科内涵，逐步发展所谓基因组学、蛋白质组学，以期阐明细胞内各种代谢途径与整体基因群、蛋白质体之间协调关系。从整体细胞上研究蛋白质组成、结构、功能及其生命活动规律，更能揭示生命的奥秘。这一崭新的学科领域必将对经济发展、人类健康产生深远的影响。

鉴于食品生物技术的发展日新月异及其在食品工业中应用的范围广泛，本编委会组织撰写了《食品与基因工程》一书，旨在于满足食品科技工作者的要求，从中吸取新技术的“营养”、提高自己的科技水平。

本书由有实践经验的在职专家、教授编著，编委会对全书内容进行过审阅，认为该书重点阐述基因工程原理及其在食品工业中的应用，理论联系实际，深入浅出，文笔流畅，通俗易懂，例举典型。期望本书的出版对发展食品工业、农副产品深加工起到促进作用。

A stylized, handwritten signature in black ink, likely the name of the author or a member of the editorial board.

2007年12月于广州

前 言

当今，生物技术发展日新月异，基因工程的应用已渗透到工、农、医、国防和环保等各个领域，并取得了惊人的成果。同样，基因工程在食品工业中的应用也越来越广泛。本书就基因工程基本原理及其在改良食品加工原料、食品加工过程、食品检测和食品安全等方面作了系统的介绍，有助于人们对转基因食品的认识。随着人们对基因工程技术的深入认识，相信谈转基因食品“色变”的时代将会逐渐过去。通过正确运用基因工程的工具和有效的食品安全管理规范，将能极大地发挥基因工程技术的优势，促进食品生物技术产业化，为解决人类面临的“粮食、能源、癌症、环境”等问题提供美好的前景。

此外，对新兴的营养基因组学研究进展介绍，将会使人们进一步了解基因工程不但对食品的质量改进有重要的作用，同时为解决如今人们对眼花缭乱的功能食品市场的商品规范管理以及功能食品的个性化供配提供有力的工具。

本书可供食品企业和科研单位技术人员使用，亦可作为食品、基因工程相关专业在校学生参考用书。

本书由林影、石磊和杜红丽编著，其中：第一章、第二章由石磊编写；第三章、第四章由林影编写；第五章由杜红丽编写；第六章由石磊和林影共同编写。全书内容经过编委会及出版社审定，在此向编委会成员和出版社编辑表示感谢。限于编者的学术和知识水平，书中不足之处在所难免，望读者赐教。

编 者
2007 年 12 月

目 录

第一章 基因工程概论	1
第一节 基因工程的基本原理	1
一、基因工程的诞生及发展趋势	1
二、基因工程的研究内容	2
三、基因工程的基本操作程序	3
四、基因工程常用的工具酶	3
五、基因工程的安全防护	4
第二节 蛋白质纯化与氨基酸序列分析	5
一、蛋白质分离纯化的意义	5
二、蛋白质分离纯化的要求	5
三、蛋白质分离纯化的一般程序	6
四、酶的活力测定	8
五、蛋白质的纯度鉴定	9
六、蛋白质的氨基酸序列分析	9
第三节 基因产物的生化分析	10
一、基因产物的主要分析方法	12
二、其他分析方法	19
第四节 核酸的提取及序列分析	20
一、核酸的提取	20
二、核酸的分离纯化	22
三、核酸的序列分析	23
第五节 蛋白质工程及其应用	26
一、蛋白质工程基本操作程序	27
二、蛋白质工程研究进展与应用前景	29
三、食品与蛋白质工程	31
四、蛋白质工程发展前景与展望	32
参考文献	34
第二章 基因工程在食品原料改良中的应用	35
第一节 改善食品中蛋白质组成	35
一、粮食与饲料生产	35
二、牛奶生产	38

三、谷物加工	39
第二节 改善食品中碳水化合物组成	39
一、淀粉食品原料	39
二、聚果糖食品原料	42
第三节 改善食品油脂的组成	44
第四节 保健食品	46
第五节 减少食品中有害成分	49
参考文献	51
第三章 基因工程在食品发酵中的应用	52
第一节 酒类发酵	52
一、酿酒酵母菌株的遗传改良	53
二、工程酵母菌的遗传特征和技术	54
三、酿造酵母发酵能力的改良	54
四、发酵液澄清与净化	55
五、控制腐败微生物的生长	55
六、感官质量的改良	56
第二节 乳制品发酵	56
一、基因突变生产酸奶	57
二、基因敲除提高产品的保健功能	58
三、基因修饰合成不同的胞外多糖	58
四、干奶酪生产	59
五、乳酸的发酵生产	59
第三节 食用有机酸与色素的发酵生产	60
一、柠檬酸的发酵生产	60
二、红曲色素的发酵生产	61
第四节 食品级酶制剂生产	62
一、淀粉酶	62
二、葡萄糖异构酶	67
三、蛋白酶	67
四、脂肪酶	69
五、果胶酶与其他食品用酶	71
第五节 生物活性物质的发酵生产	76
一、维生素与前体物质	76
二、以食用微生物为载体的生物活性物质的生产	81
参考文献	85

第四章 基因工程在农副产品加工中的应用	87
第一节 农副产品品种改良	88
一、农副产品品种改良发展现状	88
二、植物品种改良	90
三、各类作物品种改良进展	94
第二节 农副产品贮藏与保鲜	109
一、水果采后腐烂的原因	110
二、基因工程技术延长果实保鲜期	111
三、应用前景	114
第三节 转基因食品生产	114
一、转基因食品概述	114
二、转基因食品的安全性	118
三、转基因食品的检测方法	123
参考文献	127
第五章 基因工程在食品分析检测与卫生安全中的应用	128
第一节 食品理化分析	128
一、食品理化分析的基本知识	128
二、食品理化分析的内容	132
三、食品营养成分分析	133
四、食品中农药残留的测定	135
第二节 食品中微生物的分析和检测	136
一、食品中的微生物学指标	136
二、食品中微生物检验的传统方法	137
三、PCR 技术检测食品微生物	139
第三节 基因芯片在食品检测中的应用	142
一、基因芯片技术在食品微生物检测中的应用	142
二、基因芯片技术在食品致病菌检测中的应用	143
三、基因芯片技术在转基因食品检测中的应用	144
四、基因芯片技术在食品毒理学研究中的应用	146
五、新兴的营养基因组学	146
第四节 基因食品的安全性	150
一、转基因食品的定义	151
二、转基因食品的特征及优点	151
三、转基因食品的国内外现状	152
四、转基因食品的研究和应用趋势	152

五、历史上关于转基因食品安全性的事件	154
六、转基因食品安全性存在的问题	155
七、各国对转基因食品的态度	157
八、转基因食品的安全检测方法	158
九、如何看待转基因食品的安全性	159
第五节 转基因食品安全性评估	161
一、为什么要进行安全性评价	161
二、转基因食品的安全性要求	164
三、转基因食品的安全性评估	165
第六节 转基因食品的安全性管理	172
一、生物安全管理体系及实施原则	173
二、国外对转基因食品的管理现状	174
三、我国转基因食品的管理现状	179
四、转基因食品等生物技术安全性管理的建议	180
参考文献	181

第一章 基因工程概论

第一节 基因工程的基本原理

基因工程 (gene engineering) 是指按照人类的需要, 用现代遗传学及分子生物学的理论与方法, 特别是用 DNA 重组技术, 将生物基因组的结构或组成在体内或者体外进行人为修饰、改造或重新组合, 然后通过载体把新的 DNA 重组分子导入另一种生物的细胞中, 从而改变生物的结构和功能, 改造生物品种或生产新的转基因产品。

基因工程的产生, 主要源于限制性内切酶的研究和基因载体的研究。这两方面的基础理论研究为基因工程技术奠定了基础, 再加上其他一些配套技术研究的迅速发展, 到 1972 年, 世界上第一批重组的 DNA 分子诞生了。一年以后, 几种不同来源的 DNA 分子装入载体以后被转入到大肠杆菌中表达, 这表明基因工程正式登上了历史舞台。

基因工程技术的出现, 彻底改变了传统生物科学技术的被动状态, 使得人们可以克服物种之间的遗传屏障, 按照人们的愿望, 定向培养或创造出自然界所没有的新的生命形态, 例如, 蛋白质工程, 也有人称之为第二代基因工程。蛋白质工程主要包括通过基因工程技术了解蛋白质的 DNA 编码序列、蛋白质的分离纯化、蛋白质的序列分析和结构功能分析、蛋白质结晶和蛋白质的 X 射线衍射分析、计算机辅助设计突变区和对蛋白质的 DNA 进行突变改造等诸多过程。它为改造蛋白质的结构和功能找到了新的途径, 大大推动了蛋白质和酶学研究的发展, 也为工业或食品用蛋白质 (包括酶) 的实用化开拓出美好的前景。

一、基因工程的诞生及发展趋势

基因工程又叫做基因拼接技术或 DNA 重组技术, 这种技术是在生物体外, 通过对 DNA 分子进行人工“剪接”和“拼接”, 对生物的基因进行改造和重新组合, 然后导入受体细胞内进行无性繁殖, 使重组基因在受体细胞内表达, 产生出人类所需要的基因产物。基因工程诞生于 20 世纪 70 年代, 1972 年斯坦福大学 Berg 实验室成功地完成世界上第一个体外基因

重组实验，启动了重组 DNA 技术研究发展，直接导致了一种全新的生物技术学科和产业——基因工程的诞生。基因工程的诞生使得外源基因在细菌、酵母和动植物细胞中能进行表达，从而打破了物种的界限，在实验室内可以用工程原理和技术对生物直接进行改造，以达到为生产实践直接所用之目的。1982 年重组人胰岛素开始产业化，随后重组人生长激素、重组人凝血因子、重组疫苗等相继上市，基因工程对人类社会经济发展和起到了巨大的推动作用。现在我们运用基因工程技术已育成高赖氨酸、高苏氨酸、高维生素 K 的生产菌株，并成功地将淀粉酶基因导入了酵母，使之直接利用淀粉生产酒精，从而将发酵工业推到一新的高度。农业上采用基因工程技术已培育成抗虫害烟草、抗除莠剂烟草和抗斑纹病烟草、高蛋白稻米、瘦肉型猪、优质产毛羊等动植物新品种。我国近年来在基因工程方面也取得了重大成果，如乙型肝炎病毒疫苗、甲型肝炎病毒疫苗、幼畜腹泻疫苗、青霉素酰化酶基因工程菌株等，有的已推广使用，有的正在试产；胰岛素、干扰素和生长激素等基因工程产品正进行高效表达试验；抗烟草斑纹病毒、抗除莠剂、抗虫害的植物基因工程研究工作已获阶段性成果；高等植物基因导入的新方法、固氮及相关 DNA 结构和调控等研究达到了世界先进水平。

二、基因工程的研究内容

(1) 特定目的基因的分离或合成 所谓目的基因是指人们想要改造的基因。基因工程的第一步就是要获得目的基因片段。使用的方法有分离法和合成法等。

(2) 构建重组 DNA 分子 在体外，用限制性内切酶处理目的基因片段和载体 DNA 片段。在连接酶的作用下将两个片段连接起来，形成重组 DNA 分子，又称为重组子。

(3) 转化宿主细胞 将重组 DNA 分子转入宿主细胞。重组 DNA 在细胞中利用其中的物质来进行自身繁殖。

(4) 筛选重组 DNA 菌落 转化后的宿主细胞经过培养可产生大量细胞繁殖群体，即菌落。其中，有一部分菌落带有重组体，一部分是未被转化的原细胞菌落。必须将带有重组体的菌落用某种方法分离出来。

(5) 目的基因的有效表达 目的基因在宿主细胞中得到了增殖并不意味着实验的成功。最终目的是获得目的基因的表达产物。而目的基因的表达产物很容易被降解或出现低表达率，特别是真核基因在原核生物中的表达。这方面还有许多问题有待解决。

三、基因工程的基本操作程序

(1) 带有目的基因的 DNA 片段的制备 制备 DNA 片段可通过两个途径：从已有的生物基因组中分离；人工合成。

(2) DNA 片段与载体 DNA 体外重组 分离到带有目的基因的 DNA 片段后，要选择一种能够自我复制的复制子作为载体，在体外进行人工重组，以便转入受体细胞。被利用作 DNA 载体的有质粒、噬菌体和黏粒等，这些载体很重要。DNA 片段与载体 DNA 的体外重组首先是使用某种方法将 DNA 分别进行剪切，然后进行两种 DNA 的连接。

(3) DNA 重组体转入受体细胞 重组 DNA 分子主要的途径被称为转化。转化是细胞直接吸收裸 DNA 的途径。在许多细菌种类中，转化是增加基因组多样性的重要自然途径。具有吸收裸 DNA 能力的状态被称为感受态。自然的转化常发生在生长的特殊阶段（如稳定期），并且与被称为感受态蛋白的一类蛋白质的合成诱导有联系。进行基因操作时，必须人为地诱导像大肠杆菌这样的受体细胞进入感受态，主要采取两种途径：化学处理与电击法。

(4) 重组体克隆的筛选与鉴定 重组体克隆的筛选与鉴定方法较多，其中较为常用的两种方法为：表型直接筛选法，这种方法是利用载体的遗传标记、噬菌斑的形成等特点来选择重组子；菌落或噬菌斑原位杂交，即将菌体或噬菌斑从培养平板转移到硝基纤维膜上，然后用溶菌酶来处理膜，使 DNA 释放出来，经过变性和烘干过程，将 DNA 固定在膜上，用³²P 标记的探针 DNA 与膜上的 DNA 进行杂交，通过放射自显影，确定要选择的菌落。

(5) 外源基因的表达 外源基因的表达是基因操作过程的重要组成部分。成功的表达是基因工程操作的目的，其标准是外源基因在表达体系中，既能保持原来的生物活性，又能高效地产生蛋白产物。目前使用的表达体系有三种，即大肠杆菌、酵母菌和哺乳动物细胞。大肠杆菌表达体系研究较深入，是最早得到应用的表达体系。真核细胞表达体系建立得较晚。下面重点介绍原核细胞的表达体系。

四、基因工程常用的工具酶

克隆和进行基因操作需要对遗传物质（通常是 DNA，有时是 RNA）进行剪切、修饰和连接，这些过程是在工具酶的催化下完成的。将工具酶按功能分类，可分为剪切酶类、修饰酶类和连接酶类。用于特殊目的的酶的选择主要应考虑：提纯的容易程度（花费较小），这决定于该酶在细胞中的含量

以及将它从其他不需要的活性物质中分离出来的难易程度；酶促反应的效率，这取决于酶的特异性（精确性）和催化速率，以及催化反应中的一些细节；酶的稳定性也是应该考虑的问题之一。

基因操作技术已被用于遗传工程酶的生产中。利用克隆的基因可以较容易地大量制备酶，并可通过对基因的修饰来增强酶的功能。

能够剪切核酸的酶被称做核酸酶；能够剪切 RNA 的酶称做核糖核酸酶；能够剪切 DNA 的酶叫做脱氧核糖核酸酶。剪切核酸线性分子有两条途径：从末端逐渐切割或在分子内部切割。第一个过程体现核酸外切活性，第二个过程体现核酸内切活性。为了将核酸分子剪切成片段，需要使用核酸内切酶，最常使用的一类酶为限制性核酸内切酶。

修饰酶包括磷酸酶、甲基化酶和聚合酶。磷酸酶的活性是从 DNA 分子上水解去除磷酸基团。由于磷酸基团被氢氧基团取代，便阻止了 DNA 片段的自身连接，这一特性在克隆 DNA 片段时非常有用。磷酸酶的主要来源是小牛肠道和虾。细胞的限制-修饰系统中的修饰作用是由甲基化酶来完成的，甲基化酶同限制性内切酶具有完全相同的识别序列，它可使识别序列中的某一个碱基发生甲基化，这样，可以保护 DNA 不被限制性内切酶剪切。聚合酶属于修饰酶类，常用的聚合酶有三种：依赖 DNA 的 DNA 聚合酶，依赖 RNA 的 DNA 聚合酶，依赖 DNA 的 RNA 聚合酶。

连接酶是细胞维持自身 DNA 所需要的酶系统之一。它们用于连接复制中产生的冈崎片段，封闭损伤和修复过程中产生的切口。连接酶来源于大肠杆菌和已被病毒侵染的细胞。

五、基因工程的安全防护

基因工程使人类能够按照自己的意愿，通过对遗传物质的直接操作来改变生物体的性状。基因工程本身及其产物在给人类带来预期结果的同时，对人类的健康、生态平衡和生物多样性等也产生了重要影响。20 世纪 70 年代，科学家们就提出基因工程可能产生潜在的威胁，并开始研究转基因生物的安全性问题。近些年来，随着基因工程的迅猛发展，生物技术的安全防护问题引起了全世界科学家、政治家及普通公众的广泛关注。

从理论上分析，通过实验，人造的重组体进入自然界后，有可能会带来对环境和社会的潜在危害，即生物公害。科学家所考虑到的生物公害有以下几方面：

(1) 在进行 DNA 重组实验时，有可能意外地造出一些对人和动物有害的细菌和病毒，而这些微生物又获得了异常旺盛的繁殖力。带有高度传染

性、侵害性、毒性和耐药性的病毒闯进自然界，可能会引起意想不到的疾病的流行。

(2) 感染了带有致癌基因的重组体时，可能使人和牲畜患癌症。

(3) 有些重组体可能不直接给人和牲畜带来危害，但可能给其他生物(植物、微生物、昆虫)带来影响，使地球的生态平衡受到破坏。

为了对人类负责，20世纪70年代中期，在一些科学家的倡议下，停止了一些还没有充分了解或可能造成上述公害的实验。以后，又经过慎重的研究和讨论，在既保证安全又不妨碍技术发展的前提下，一些国家制定了DNA重组实验安全规则。对一些项目作出了比较严格的限制。通过几十年的实践，特别是通过专门进行的重组体安全实验表明：重组体比自然界原有生物具有更大危害性的可能性极低。迄今为止，还未发现重组体意外地在自然界广泛散播的实例。DNA重组实验比操作病原体的危险性更小，更安全。尽管这样，人们对基因工程潜在的危险仍不能忽视。作为一名科学工作者，应当注意积累有关安全方面的资料，严格遵守操作规则，控制可能产生的生物公害。这是每一名从事这项工作的人员的神圣职责。

第二节 蛋白质纯化与氨基酸序列分析

蛋白质(酶)存在于一切生物体中，是非常重要的生物大分子。蛋白质是生物功能的执行者，担负着生物催化、物质运输、运动、防御、调控及记忆、识别等多种生理功能。

一、蛋白质分离纯化的意义

(1) 从生物材料中分离制备蛋白质、核酸，研究其结构与功能，对于了解生命活动的规律，阐明生命现象的本质有重大意义。

(2) 工业生产的需要 食品、发酵、纺织、制革等工业，需要大量的高活性的酶制剂，如用淀粉酶制造葡萄糖、麦芽糖、糊精以及糖浆等。

(3) 医疗的需要 如用猪胰岛素治疗糖尿病；基因工程的需要。

二、蛋白质分离纯化的要求

(1) 纯度 主要取决于研究的目的和应用上的要求。如作为研究蛋白和一级结构、空间结构，一级结构与功能的关系的蛋白质制剂、工具酶和标准蛋白、酶法分析的酶制剂，都要求均一。工业、医药方面应用的酶和蛋白质制剂，达到一定纯度即可，不要求均一。

(2) 活性 要求大分子保持天然构象状态，有高度的生物活性。

(3) 收率 希望收率越高越好，但在分离纯化过程中总有不少损失。而且提纯步骤越多，损失越大。

三、蛋白质分离纯化的一般程序

生物大分子的分离纯化一般可分为以下几个阶段：材料的选择和预处理；破碎细胞及提取（有时还需要进行细胞器的分离）；分离纯化（包括粗分级分离和细分级分离），其中前两个阶段为生物大分子分离纯化的前处理。

1. 蛋白质（酶）分离纯化的前处理

(1) 材料的选择与预处理 选择材料主要根据实验目的而定。工业生产上注意选择含量高、来源丰富、易获得、制备工艺简单、成本低的动植物组织或微生物作原料。科研选材则无需考虑上述问题，只要能达到实验目的即可。

实验材料选定后，常常需要进行预处理，如动物材料需要除去一些与实验无关的结缔组织、脂肪组织；植物种子需要除壳；微生物需要将菌体与发酵液分开。另外，必须尽可能保持材料的新鲜，尽快加工处理。若不立即进行实验或加工，应冷冻保存。

(2) 细胞的破碎 分离提取某一生物大分子，首先要求生物大分子从原来的组织或细胞中以溶解的状态释放出来，并保持原来的天然状态，不失去生物活性。因此应选择适当的方法将组织和细胞破碎。但若材料是体液（如血）或生物体分泌到体外的分泌物，则不必进行组织细胞的破碎。

组织细胞的破碎方法很多，不同的实验规模、不同的实验材料和实验要求，使用的破碎方法和条件也不同。一般动物组织和细胞可用电动捣碎机或匀浆器破碎，或用超声波处理破碎；植物组织和细胞由于具有纤维素、半纤维素和果胶等物质组成的细胞壁，一般常用与石英砂和适当的提取液一起研磨的方法破碎，或用纤维素酶处理也能达到目的；细菌细胞的破碎比较困难，因为整个细菌细胞壁的骨架实际上是一借共价键连接而成的肽聚糖囊状大分子，非常坚韧，破碎的方法常有超声波振荡、与石英砂研磨、高压挤压或溶菌酶处理（以分解肽聚糖）。

(3) 细胞器的分离 细胞器包括细胞核、线粒体、核糖体、内质网，植物细胞还有叶绿体。如果要分离制备分布在这些细胞器中的生物大分子，为了防止其他细胞组分中的物质对制备物的干扰或污染，还需先将细胞器分离出来，然后在某一细胞器中分离某一物质。细胞器的分离一般采用差速离心法，即将破碎后的细胞在适当的介质中进行离心，常用的介质有蔗糖、甘露

醇、柠檬酸、聚乙二醇等。各种细胞组分按质量大小的不同，经过不同速度的离心后，沉降于离心管的不同部位，经多次分步离心后，即可获得所需组分。

(4) 提取 组织细胞破碎过程中，大量的胞内酶及细胞内含物被释放出来，必须立即将其置于一定条件下的溶剂中，让制备物充分溶解，并尽可能保持原来的天然状态，避免因长久放置造成制备物的分解破坏，这就是提取。

大多数蛋白质均能溶于水、稀盐、稀碱或稀酸溶液中，故蛋白质的提取一般以水溶液提取为主。通常采用类似生理条件下的缓冲液，如 20~50mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH7.0~7.5) 或 0.1mol/L Tris-HCl (pH 7.5~8.0) 缓冲液作提取液。对于一些和脂质结合比较牢固或分子中非极性基团较多的蛋白质和酶，不溶于水、稀盐、稀碱、稀酸，常在提取液中加入适量的有机溶剂，如乙醇、丙酮、异丙醇、正丁醇等。

蛋白质的去除可以选择去污剂法或有机溶剂法。去污剂法是利用 SDS 等阴离子去污剂与蛋白质带正电荷的侧链结合，从而使核酸与蛋白质分开。然后加入浓乙酸钾溶液，使 SDS-蛋白质复合物沉淀，并使多余的 SDS 转化为溶解度小的钾盐而同时沉淀。有机溶剂法是利用酚、氯仿的混合液作蛋白质的变性剂，当它们与含核酸和蛋白质的水溶液一起振摇时形成乳状液，蛋白质因充分接触酚和氯仿而变性，与核酸分开。离心后可分为两相，一般上层为含核酸的水相，下层为有机相，交界处是变性凝聚的蛋白质层。最后利用乙醇或异丙醇将核酸沉淀离心收集即可。

2. 蛋白质的分离纯化

从细胞中提取得到的生物大分子往往是不纯净的，含有大量杂质，必须进一步分离纯化，这一阶段可分为粗分级分离和细分级分离两步。

蛋白质分离纯化的方法很多，主要是根据蛋白分子之间特异性的差异 (如分子大小、溶解度、电荷等) 建立起来的 (表 1-1)。

表 1-1 蛋白质分离纯化方法

性 质	方 法
分子大小	透析、超滤、密度梯度离心、凝胶过滤
溶解度	等电点沉淀、盐析、有机溶剂沉淀
电荷	电泳、离子交换色谱
吸附性质	吸附色谱(羟基磷灰石色谱、疏水作用色谱)
对配体分子的生物亲和力	亲和色谱

(1) 盐析 向蛋白质溶液中加入大量的中性盐 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, \text{Na}_2\text{SO}_4, \text{Na}_2\text{SO}_4]$, 使蛋白质脱去水化层而聚集沉淀, 这种现象称为盐析。

盐析作用是由于当盐浓度较高时, 盐离子与水分子作用, 使水的活度降低, 原来溶液中大部分的自由水转变为盐离子的水化水, 从而降低蛋白质极性基团与水分子之间的作用, 破坏蛋白质分子表面的水化层。

常用的盐析剂是硫酸铵, 因为它的盐析能力强, 在水中的溶解度大, 价格便宜, 浓度高时也不会引起蛋白质活性丧失。盐析沉淀的蛋白质仍保持天然构象, 即仍有活性。蛋白质用盐析方法沉淀分离后, 还需要脱盐才能进一步精提纯。脱盐常用透析法。

(2) 等电点沉淀 蛋白质是两性电解质, 其溶解度与其净电荷数量有关, 随溶液 pH 变化而变化。在溶液 pH 值等于蛋白质等电点时, 蛋白质的溶解度最小。不同的蛋白质有不同的等电点, 因此通过调节溶液 pH 到目的蛋白的等电点, 可使之沉淀而与其他蛋白质分开, 从而除去大量杂蛋白。

(3) 有机溶剂法 与水互溶的极性有机溶剂 (如甲醇、乙醇、丙酮等) 能使蛋白质在水中的溶解度显著降低。有机溶剂引起蛋白质变性的原因有两个: 降低水的介电常数, 使蛋白质分子表面可解离基团的离子化程度减弱, 水化程度降低, 促进了蛋白质分子的聚集沉淀; 极性有机溶剂与蛋白质争夺水化水, 而使蛋白质分子沉淀。室温下, 这些有机溶剂不仅能使蛋白质沉淀, 而且伴随着变性。若预先将有机溶剂冷却, 然后在不断搅拌下将其逐渐加入蛋白质溶液中, 防止有机溶剂局部浓度过高, 则在很大程度上解决了变性问题。不同的蛋白质由于水化层厚度不同, 发生沉淀需要的有机溶剂浓度不同, 因此可利用不同浓度的有机溶剂分离不同的蛋白质。

3. 细分级分离

一般蛋白质样品经粗制分级后, 体积较小, 杂质大部分被除去。进一步提纯, 通常使用高分辨率的柱色谱及电泳方法。常用的柱色谱方法有分子筛色谱、离子交换色谱、疏水吸附色谱、亲和色谱。常用的电泳方法有聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦电泳。另外, 结晶也是蛋白质分离纯化的方法之一, 制备的结晶物常常作蛋白质结构分析之用。

四、酶的活力测定

在酶的制备过程中, 每一步骤都应测定留用以及准备弃去部分中所含酶的总活力和比活力, 以了解经过某一步骤后酶的回收率、纯化倍数, 从而决定这一步的取舍。