

生物化学与分子生物学 实验技术教程

安建平 王廷璞 编著

兰州大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验技术教程 安建平, 王廷璞主编. —兰州: 兰州大学出版社, 2005 .7
ISBN 7 - 311 - 02624 - 5

生... . 安... 王... . 生物化学 - 实
验 - 师范大学 - 教材 分子生物学 - 实验 - 师范大学 -
教材 . Q5 - 33 Q7 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 077795 号

生物化学与分子生物学实验技术教程

安建平 王廷璞 编著

兰州大学出版社出版发行

兰州市天水南路 222 号 电话:8617156 邮编:730000

E-mail:press@onbook.com.cn

http: www.onbook.com.cn

天水新华印刷厂印刷

开本:787×1092 毫米 1 16 印张:23 .75

2005 年 7 月第 1 版 2005 年 7 月第 1 次印刷

字数:578 千字 印数:1—1500 册

ISBN 7 - 311 - 02624 - 5 Q·34 定价:42 .00 元

前 言

生物化学和分子生物学作为生命科学中最重要的学科，近年来发展十分迅速，尤其是生物化学和分子生物学实验理论、技术和方法都有较快的发展，其技术和方法已经渗透到了生命科学的各个领域，使生命科学的各个领域发生了根本性的改变。生物化学和分子生物学实验教学在生命科学领域和人才培养中的地位也显得十分重要，这就给生物化学和分子生物学实验教学提出了更高的要求。因此，为了适应高校实验教学改革的要求，加强生物化学与分子生物学实验教学间的联系，保持实验教学内容的连续性和连贯性，编写一部适合于生命科学领域各专业需求又可兼顾师范院校各相关专业使用的生物化学和分子生物学实验教程就显得十分必要。

《生物化学与分子生物学实验技术教程》不同于以前传统的生物化学和分子生物学实验教材的编写模式。全书分为一、二、三篇。第一篇为生物化学和分子生物学实验技术基本理论，包括生物大分子制备技术、分光光度技术、电泳技术、离心技术、层析技术、核酸的分离纯化技术、DNA 重组技术、分子杂交技术、聚合酶链式反应技术、DNA 序列测定技术、生物芯片技术等 11 章。将现代生物化学和分子生物学技术的精华系统扼要地介绍给读者。第二篇为生物化学和分子生物学实验，该篇包括 21 个生物化学实验及 19 个分子生物学实验。在实验内容的选择上，遵循了新颖性、系统性、连贯性、综合性和层次性的原则，适当减少了验证性实验内容，增加了综合性实验内容；兼顾学生知识面的拓宽和能力的培养以及各高等学校的实验教学条件，经过讲授和操作，学生将受到系统的生物化学和分子生物学实验方法和技术的训练，使他们能够获得生物化学和分子生物学基本实验技术的理论和系统、新颖、实用的实验技能，为他们将来从事科学研究奠定一定的基础。本教程第一篇的每一章和第二篇的每个实验后都附有思考题，目的是通过思考题使读者对现代生物化学和分子生物学实验技术的理论和方法有较为系统和深入的理解。第三篇为精编附录，内容广泛，实用性强，使本教程具有一定的工具书的属性。本教程是在原生物化学实验指导的基础上编写的，以师范院校有关专业的本科生为对象，也可供其他院校相关专业的本科生和生物化学及分子生物学实验技术工作者参考。

本教程第一篇第一至第五章，第二篇第一章，第三篇附录一至十三由安建平编写。第一篇第六至第十一章，第二篇第二章，第三篇附录十四至二十四由王廷璞编写。

在编写过程中，我们参阅了众多的书籍和资料，在参考文献中未能全部列出。

由于本教程涉及的知识面广及我们的水平有限，书中难免存在错误和不妥，敬请广大读者和同行们批评指正。

编者

2005 年 1 月 28 日

目 录

第一篇 生物化学与分子生物学实验技术基本理论

第一章 生物大分子制备技术.....	(3)
第一节 概述.....	(3)
一、生物大分子制备的特点.....	(3)
二、生物大分子制备的方法和步骤.....	(3)
三、生物大分子制备过程中的分析和鉴定.....	(4)
四、生物大分子分离纯化的方法.....	(4)
第二节 生物大分子制备的前处理.....	(4)
一、生物材料的选择.....	(4)
二、细胞破碎的方法.....	(5)
三、生物大分子的提取.....	(6)
第三节 生物大分子的分离纯化.....	(8)
一、沉淀.....	(8)
二、透析.....	(12)
三、超滤.....	(13)
四、超临界流体萃取.....	(14)
五、萃取与相分离.....	(16)
六、结晶.....	(16)
七、冰冻干燥.....	(17)
八、分离纯化方法的选择.....	(18)
第四节 生物大分子样品的保存.....	(18)
一、影响生物大分子样品保存的主要因素.....	(18)
二、蛋白质和酶等生物大分子样品的保存方法.....	(19)
第二章 分光光度技术.....	(21)
第一节 基本原理.....	(21)
一、光谱.....	(21)
二、分子能态.....	(21)
三、吸收光谱曲线.....	(22)
四、紫外光谱中常用的术语.....	(23)
五、光吸收定律.....	(24)
第二节 分光光度计的组成、构造和类型.....	(25)

一、分光光度计的组成	(25)
二、分光光度计的构造	(25)
三、紫外 - 可见分光光度计的类型	(28)
四、分光光度法在生物化学和分子生物学实验技术中的应用	(28)
第三章 电泳技术	(30)
第一节 基本理论	(30)
一、电泳发展的历史	(30)
二、电泳装置	(30)
三、电泳的基本原理	(31)
四、影响电泳分离的主要因素	(32)
第二节 电泳的分类	(33)
一、电泳的分类	(33)
二、生物化学和分子生物学实验中常用的电泳	(34)
第三节 常用电泳支持介质和染色方法	(45)
一、常用电泳支持介质	(45)
二、染色方法	(46)
第四章 离心技术	(49)
第一节 离心技术基本原理	(49)
一、离心力	(49)
二、相对离心力	(49)
三、沉降系数	(50)
四、沉降速度	(50)
五、沉降时间	(50)
六、相对分子量	(50)
第二节 离心设备	(51)
一、离心机的主要类型和构造	(51)
二、制备性超速离心的分离方法和离心操作的注意事项	(53)
第五章 层析技术	(57)
第一节 层析技术概述	(57)
一、层析技术的发现与发展	(57)
二、层析技术的应用范围	(57)
三、层析技术的分类	(58)
四、层析技术的术语	(59)
第二节 层析技术基本理论	(61)
一、分离现象	(61)
二、塔板理论	(62)
三、速率理论	(63)
四、分辨率	(64)
第三节 吸附层析	(65)

一、吸附层析的基本原理	(65)
二、吸附介质的分类及其性质	(66)
三、吸附层析技术	(69)
第四节 凝胶层析	(71)
一、凝胶层析的基本原理	(71)
二、凝胶层析的基本概念	(72)
三、凝胶的种类和性质	(74)
四、凝胶的选择、处理和保存	(76)
五、凝胶层析的基本操作	(77)
六、凝胶层析的应用	(78)
第五节 离子交换层析	(79)
一、离子交换层析的基本原理	(79)
二、离子交换剂的种类和性质	(80)
三、离子交换剂的选择、处理和保存	(82)
四、离子交换层析的基本操作	(83)
五、离子交换层析的应用	(84)
第六节 亲和层析	(85)
一、亲和层析的基本原理	(86)
二、亲和吸附剂	(86)
三、亲和层析的基本操作	(90)
四、亲和层析的应用	(91)
第六章 核酸的分离纯化技术	(94)
第一节 概述	(94)
一、核酸的理化性质	(94)
二、DNA 提取的几种方法	(94)
第二节 核酸的分离、纯化和鉴定	(95)
一、质粒 DNA 的分离、纯化和鉴定	(95)
二、基因组 DNA 的提取	(98)
三、RNA 提取操作中的一般要求	(98)
四、DNA 酶切及凝胶电泳	(99)
第七章 DNA 重组技术	(102)
第一节 工具酶	(103)
一、限制性核酸内切酶的概念	(103)
二、限制性核酸内切酶的命名	(104)
三、限制性核酸内切酶的分类	(104)
四、限制性核酸内切酶的作用	(104)
第二节 基因工程载体	(105)
一、质粒载体	(106)
二、噬菌体载体	(107)

三、动物病毒载体	(109)
第三节 目的序列与载体的连接	(109)
一、粘性末端连接	(109)
二、平末端连接	(111)
第四节 目的基因序列的来源和分离	(111)
一、基因组 DNA 文库	(111)
二、cDNA 文库	(112)
三、聚合酶链式反应	(113)
四、人工化学合成	(114)
第五节 基因序列导入细胞	(114)
一、转化	(114)
二、感染	(114)
三、转染	(114)
第六节 目的基因序列克隆的筛选与鉴定	(115)
一、根据重组载体的标志作筛选	(115)
二、核酸杂交法	(115)
三、PCR 法	(116)
四、免疫学方法	(116)
五、DNA 限制性内切酶图谱分析	(116)
六、核苷酸序列测定	(116)
第七节 克隆基因的表达	(116)
第八章 分子杂交技术	(119)
第一节 DNA 的变性与复性	(119)
一、DNA 的变性	(119)
二、DNA 的复性	(121)
第二节 放射性同位素标记核酸探针	(122)
一、缺口平移法	(122)
二、末端标记法	(122)
三、应用特异单引物法标记 DNA 探针	(122)
四、双引物法标记 DNA 探针	(122)
五、聚合酶链式反应 (PCR) 标记高活性 DNA 探针	(123)
第三节 非放射性标记的核酸探针	(123)
一、生物素标记核酸探针方法	(123)
二、光敏生物素标记核酸探针	(124)
三、生物素 - 补骨脂素标记法	(125)
四、生物素 - α - 氨基乙酸 - N - 羧基琥珀酰标记化学修饰的 DNA 法	(125)
五、缺口平移法标记生物素 DNA 探针	(125)
六、生物素随机引物标记探针方法	(125)
七、异羟基洋地黄毒甙 (Digoxigenin) 标记核酸探针	(126)

八、光敏 2	(126)
九、三硝基苯磺酸 (TNBS) 标记核酸探针	(126)
十、生物素化的 RNA 探针标记	(126)
十一、辣根过氧化物酶标记核酸探针法	(127)
十二、用聚合酶链式反应标记高活性 DNA 探针	(127)
第四节 几种常见的核酸分子杂交方法	(127)
一、Southern 杂交	(128)
二、Northern 杂交	(129)
三、菌落原位杂交	(129)
四、斑点杂交	(129)
五、杂交反应的条件及参数的优化	(130)
第九章 聚合酶链式反应 (PCR) 技术	(131)
第一节 PCR 技术的原理	(131)
第二节 PCR 反应体系的组成	(131)
一、PCR 反应体系的组成	(131)
二、电泳分析	(133)
三、PCR 操作范例	(133)
第三节 影响 PCR 的主要因素	(135)
一、温度循环参数	(135)
二、引物设计	(136)
三、DNA 聚合酶	(137)
四、影响 PCR 特异性的因素	(139)
五、扩增平坡	(140)
第四节 PCR 各种应用模式	(140)
一、兼并引物 PCR	(140)
二、套式引物 PCR	(141)
三、复合 PCR	(141)
四、反向 PCR	(141)
五、不对称 PCR	(142)
六、标记 PCR 和彩色 PCR	(142)
七、加端 PCR	(142)
八、锚定 PCR 或固定 PCR	(143)
九、玻片 PCR	(143)
十、反转录 PCR 方法检测 RNA	(143)
十一、定量 PCR	(144)
第五节 样品处理与注意事项	(145)
一、样品处理	(145)
二、注意事项	(146)
第六节 PCR 仪器的发展	(147)

第七节 其他链扩增技术及应用范围	(148)
一、免疫 PCR	(148)
二、转录依赖的扩增系统 (TAS)	(149)
三、再生式序列复制技术	(149)
四、连接酶链式反应 (LCR)	(150)
五、PCR - SSCP 分析技术	(150)
第十章 DNA 序列测定技术	(151)
第一节 测序原理与策略	(151)
一、Sanger 双脱氧链终止法	(151)
二、Maxam - Gilbert DNA 化学降解法	(154)
三、测序策略	(154)
第二节 非同位素银染测序系统和 T_7 DNA 聚合酶测序技术	(157)
一、非同位素银染测序系统	(157)
二、 T_7 DNA 聚合酶测序技术	(157)
第三节 DNA 序列分析的自动化和杂交测序法	(158)
一、DNA 序列分析的自动化	(158)
二、DNA 杂交测序法 (SBH)	(159)
第十一章 生物芯片技术	(162)
第一节 生物芯片及应用简介	(162)
一、生物芯片	(162)
二、应用领域	(162)
第二节 生物芯片的制作	(165)
一、点样设备	(166)
二、芯片片基	(167)
三、点样样品	(168)
第三节 图像的采集和分析	(176)
一、磷感屏成像系统	(176)
二、荧光芯片扫描仪	(177)
三、基因芯片上各克隆荧光信号的分析原理	(177)
四、Microarray 数据分析	(178)
第四节 生物芯片 (DNA 微阵列) 荧光扫描仪中的激光共聚焦扫描技术	(179)
一、微阵列的相关特性	(179)
二、微阵列扫描仪	(180)
三、激光共聚焦扫描仪	(182)

第二篇 生物化学与分子生物学实验

第一章 生物化学实验	(187)
实验一 3,5 - 二硝	(187)

实验二	粗脂肪的定量测定 (Soxhlet 提取法)	(189)
实验三	蛋白质和氨基酸的呈色反应	(191)
实验四	蛋白质的沉淀、变性反应	(196)
实验五	聚丙烯酰胺等电聚焦电泳法测定蛋白质的等电点	(199)
附	pH 法测定蛋白质的等电点	(205)
实验六	Folin - 酚法测定血清蛋白质含量	(206)
附 1	双缩脲法测定蛋白质含量	(208)
附 2	考马斯亮蓝 G - 250 染色法测定蛋白质含量	(209)
实验七	紫外吸收法测定蛋白质含量	(210)
实验八	SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质分子量	(212)
实验九	凝胶过滤层析法测定蛋白质分子量	(218)
实验十	血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	(223)
实验十一	吸附层析法分离制备细胞色素 C	(229)
实验十二	菜花 (花椰菜) 中核酸的分离和鉴定	(231)
实验十三	定磷法测定核酸浓度	(233)
附 1	RNA 的定量测定 (苔黑酚法)	(237)
附 2	DNA 的定量测定 (二苯胺法)	(238)
实验十四	紫外线 (UV) 吸收法测定核酸含量	(239)
实验十五	薄层层析法分离 AMP、ADP 和 ATP	(241)
实验十六	离子交换柱层析分离核苷酸	(243)
实验十七	酶的特性	(249)
实验十八	酯酶同功酶的垂直板不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳分析	(252)
实验十九	超氧化物歧化酶的分离纯化	(255)
实验二十	亲和层析法纯化胰蛋白酶	(259)
实验二十一	饱食、饥饿及激素对肝糖原含量的影响	(265)
第二章	分子生物学实验	(268)
实验一	植物组织基因组 DNA 的提取	(268)
实验二	动物组织基因组 DNA 的提取	(270)
实验三	细菌基因组 DNA 的制备	(271)
实验四	DNA 定量和电泳检测	(272)
实验五	质粒 DNA 的碱裂解法提取与纯化	(273)
实验六	DNA 酶切及凝胶电泳	(276)
实验七	大肠杆菌感受态细胞的制备和转化	(279)
实验八	动植物组织 mRNA 提取	(281)
实验九	植物病毒 RNA 提取	(283)
实验十	重组质粒的连接、转化及筛选	(284)
实验十一	RFLP 技术	(287)
实验十二	RAPD 技术	(289)
实验十三	聚合酶链式反应 (PCR)	(291)

实验十四	Southern 杂交	(294)
实验十五	Northern 杂交	(296)
实验十六	菌落原位杂交	(298)
实验十七	斑点杂交	(300)
实验十八	非同位素银染测序系统操作技术	(301)
实验十九	T_7 DNA 聚合酶测序技术	(308)

第三篇 附 录

附录一	实验室安全及防护知识	(317)
附录二	实验室基本操作	(319)
附录三	实验记录与实验报告	(324)
附录四	实验误差与提高实验准确度的方法	(325)
附录五	常用酸碱指示剂的配制	(327)
附录六	常用缓冲溶液的配制方法	(328)
附录七	Union Carbide 各种型号透析管的渗透范围	(334)
附录八	Sepectro por 再生纤维素膜透析袋数据	(334)
附录九	纤维素酯膜透析袋的数据	(336)
附录十	Amicon 圆形超滤膜的规格和有效过滤面积的数据	(337)
附录十一	Amicon 圆形超滤膜的流速	(337)
附录十二	常用蛋白质分子量标准参照物	(337)
附录十三	凝胶数据表	(338)
附录十四	凝胶过滤用标准蛋白	(344)
附录十五	凝胶层析中遇到的故障、原因与排除方法	(345)
附录十六	薄层层析分离各类物质常用的展层溶剂	(346)
附录十七	各类物质常用的薄层显色剂	(347)
附录十八	离子交换纤维素及技术参数	(348)
附录十九	实验室中常用酸碱的比重和浓度	(349)
附录二十	硫酸铵饱和度的常用表	(350)
附录二十一	常见蛋白质分子量参考值	(351)
附录二十二	蛋白质等电点参考值	(352)
附录二十三	离心机转速和离心力的列线计算图	(354)
附录二十四	分子生物学常用溶液、培养基的配制方法	(355)
参考文献		(364)

第一篇

生物化学与分子生物学实验技术

基本理论

第一章 生物大分子制备技术

第一节 概 述

生物大分子主要是指蛋白质、酶和核酸，这一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、酶和核酸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。要对生物大分子结构与功能进行研究，必须首先解决生物大分子的制备问题，如果没有能够达到足够纯度的生物大分子的制备作为前提，结构与功能的研究就无从谈起。

一、生物大分子制备的特点

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，常常包含有数百种乃至几千种化合物。其中许多化合物至今还不清楚，有待于人们进一步研究与开发，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很大，要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客观的。

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几步、几十步的操作才能达到所需纯度的要求。如由脑垂体中取得某些激素的释放因子要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，就非常容易变性失活。因此，分离过程中如何防止其变性失活，就是生物大分子提取制备最困难之处。过酸、过碱、高温、剧烈的搅拌、强辐射和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，溶液的温度、pH 值、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，因而实验结果常有很大的经验成分，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。

二、生物大分子制备的方法和步骤

生物大分子的制备通常可按以下步骤进行： 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； 建立相应的可靠的分析测定方法，这是制备生物大分子的关键； 通过文献调研和预备性实验，掌握生物大分子目的产物的物理化学性质； 生物材料的破碎和预处理； 分离纯化方案的选择和探索； 生物大分子制备物的均一性（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 HPLC 和毛细管电泳都是一个峰； 产物的浓缩、干燥和保存。

三、生物大分子制备过程中的分析和鉴定

分析测定的方法主要有两类：即生物学及物理和化学的测定方法。生物学的测定法主要包括酶的各种测定方法、蛋白质含量的各种测定法、免疫化学方法、放射性同位素示踪法等；物理、化学方法主要有比色法、气相色谱和液相色谱法、光谱法（紫外/可见、红外和荧光等分光光度法）、电泳法以及核磁共振等。实际操作中应尽可能多用仪器分析方法，以使分析测定更加快速、简便。

生物大分子制备物的均一性（纯度）的鉴定，通常采用一种方法是不够的，必须同时采用两种不同的纯度鉴定法才能确定。蛋白质和酶制成品纯度的鉴定最常用的方法是 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦电泳，如能再用高效液相色谱（HPLC）和毛细管电泳（CE）进行联合鉴定则更为理想，必要时再做 N - 末端氨基酸残基的分析鉴定。过去曾用的溶解度法和高速离心沉降法，现已很少使用。核酸的纯度鉴定通常采用琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳，但最方便的还是紫外吸收法，即测定样品在 pH 值为 7.0 时 260nm 与 280nm 的吸光度（ A_{260} 和 A_{280} ），从 A_{260}/A_{280} 的比值即可判断核酸样品的纯度。

生物大分子的物理、化学性质主要包括：在水和各种有机溶剂中的溶解性；在不同温度、pH 值和各种缓冲液中生物大分子的稳定性；固态时对温度、含水量和冻干时的稳定性；各种物理性质如分子的大小、穿膜能力、带电情况、在电场中的行为、离心沉降的表现、在各种凝胶、树脂等填料中的分配系数等；其他化学性质如对各种蛋白酶、水解酶的稳定性和对各种化学试剂的稳定性；对其他生物分子的特殊亲和力等。

四、生物大分子分离纯化的方法

生物大分子的分离纯化方法多种多样，主要是利用它们之间特异性的差异，如分子的大小、形状、酸碱性、溶解性、溶解度、极性、电荷和与其他分子的亲和性等。各种方法的基本原理基本上可以归纳为两个方面：一是利用混合物中几个组分分配系数的差异，把它们分配到两个或几个相中，如盐析、有机溶剂沉淀、层析和结晶等；二是将混合物置于某一物相（大多数是液相）中，通过物理力场的作用，使各组分分配于不同的区域，从而达到分离的目的，如电泳、离心和超滤等。目前纯化蛋白质等生物大分子的关键技术是电泳、层析和高速与超速离心。由于生物大分子不能加热熔化和汽化，因而所能分配的物相只限于固相和液相，在此两相之间交替进行分离纯化。在实际工作中往往要综合运用多种方法，才能制备出高纯度的生物大分子。

纯化生物大分子总是希望纯度和产率都要高。如纯化某种酶，理想的结果是比活力和总回收率都要高，但实际上两者不能兼得，通常在科研上希望比活力尽可能的高，在工业生产上则需要高的回收率。

第二节 生物大分子制备的前处理

一、生物材料的选择

制备生物大分子，首先要选择适当的生物材料。材料的来源无非是植物、动物和微生物及其代谢产物。从工业生产角度选择材料，应选择含量高、来源丰富、制备工艺简单、成本低的原料。但往往这几个方面的要求不能同时具备，含量丰富但来源困难，或含量和来源较理想，但材料的分离纯化方法繁琐、流程很长，反倒不如含量低些、但易于获得纯

品的材料。因此，必须根据具体情况决定取舍。从科研工作的角度选材，则只须考虑材料的选择是否符合实验预定的目标。此外，选植物材料应注意季节、地理位置和生长环境等。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。选微生物材料时要注意菌种的代数 and 培养基成分等之间的差异，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。植物材料要先去壳、除脂。微生物材料要及时将菌体与发酵液分开。生物材料如暂时不提取，应冰冻保存，动物材料则需深度冷冻保存。

二、细胞破碎的方法

除了某些细胞外的多肽激素、某些蛋白质和酶以外，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，保持生物活性。不同的生物体或同一生物体的不同部位的组织，其细胞破碎的难易程度不一，使用的办法也不相同，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细胞壁，要采取专门的细胞破碎方法。目前常用的破碎细胞的方法主要有以下几种：

1. 机械法

(1) 研磨法 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或匀浆，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。

(2) 组织捣碎器捣碎法 这是一种较剧烈的破碎细胞的方法，通常可先用食品加工机将组织打碎，然后再用 10000 ~ 20000rpm min 的组织捣碎机（即高速分散器）将组织的细胞打碎，为了防止发热和升温过高，通常是转 10 ~ 20s，停 10 ~ 20s，可反复多次。

2. 物理法

(1) 反复冻融法 将待破碎的细胞冷至 -15 ~ -20℃，然后放于室温（或 40℃）迅速融化，如此反复冻融多次，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。

(2) 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。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。

(3) 压榨法 这是一种温和的、彻底破碎细胞的方法。在 $1000 \times 10^5 \sim 2000 \times 10^5$ Pa 的高压下使细胞悬液通过一个小孔突然转变为常压，细胞将彻底破碎。这是一种较理想的破碎细胞的方法。

(4) 冷热交替法 将生物材料在 90℃ 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。从细菌或病毒中提取蛋白质和核酸时可用此法。

3. 化学与生物化学方法

(1) 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，

此方法称为自溶法。使用时要特别小心操作，因为水解酶不仅可以使细胞壁和膜破坏，同时也可能会把某些要提取的有效成分分解。

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

(3) 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℃，pH 值为 8.0 的条件下处理 15min，可以专一性地将细胞壁分解，释放出细胞内含物，此方法适用于多种微生物。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），将酵母细胞悬于 0.1mmol/L 柠檬酸 - 磷酸氢二钠缓冲液（pH 值为 5.4）中，加 1%（质量分数）蜗牛酶，在 30℃ 处理 30min，即可使大部分细胞壁破裂，如同时加入 0.2%（质量分数）巯基乙醇效果会更好。本方法可以与研磨法联合使用。

(4) 有机溶剂处理法 利用氯仿、甲苯和丙酮等有机溶剂或 SDS（十二烷基硫酸钠）等表面活性剂处理细胞，可将细胞膜溶解，从而使细胞破裂。

三、生物大分子的提取

生物大分子的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而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，或从细胞内转入外界特定的溶液中。

1. 影响生物大分子提取的因素

影响生物大分子提取的因素主要有以下几个方面：

- (1) 目的产物在提取溶剂中溶解度的大小；
- (2) 目的产物由固相扩散到液相的难易程度；
- (3) 溶剂的 pH 值和提取时间等。

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的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，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 pH 值，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。

2. 常用的生物大分子的提取方法

(1) 水溶液提取 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，是提取蛋白质和酶等生物大分子最常用的溶剂。用水溶液提取生物大分子应注意以下几个主要影响因素：

盐浓度（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，如在纯水中加入少量中性盐，蛋白质的溶解度比在纯水中增加，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，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。所以低盐溶液常用于大多数生化物质的提取。通常使用 0.02 ~ 0.05mol/L 的缓冲液或 0.09 ~ 15mol/L

NaCl 溶液提取蛋白质和酶。不同的蛋白质极性大小不同，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。

pH 值 蛋白质、酶和核酸的溶解度和稳定性与介质的 pH 值有关。过酸、过碱均可使之变性，一般控制在 pH 值在 6~8 范围内，提取溶剂的 pH 应在蛋白质和酶的稳定范围内，通常选择偏离等电点的两侧。碱性蛋白质选择偏酸一侧，酸性蛋白质则选择偏碱的一侧，以增加蛋白质的溶解度，提高提取效果。如胰蛋白酶为碱性蛋白质，常用稀酸提取，而肌肉甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶属酸性蛋白质，则常用稀碱来提取。

温度 为防止变性和降解具有活性的蛋白质和酶，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（如金属硫蛋白）和酶，可提高温度使杂蛋白变性，有利于提取和下一步的纯化。

防止蛋白酶或核酸酶的降解作用 在提取蛋白质、酶和核酸时，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、离子强度或极性等方法使这些水解酶失去活性，防止它们对欲提纯的蛋白质、酶和核酸的降解作用，如在提取 DNA 时加入 EDTA 络合 DNase 活化所必须的 Mg²⁺。

搅拌与氧化 搅拌能促使被提取物的溶解，一般采用温和搅拌，速度太快容易产生大量泡沫，增大了与空气的接触面，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，若提取液中有氧化剂或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可防止巯基氧化。

(2) **有机溶剂提取** 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和酶难溶于水、稀盐、稀酸和稀碱溶液，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、正丁醇等，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% (体积分数)，40℃ 时为 6.6% (体积分数)，同时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、酶和脂类。如植物种子中的玉蜀黍蛋白、麸蛋白，常用 70%~80% (体积分数) 的乙醇提取，动物组织中一些存在于线粒体及微粒体的酶常用正丁醇提取。

有些蛋白质和酶既能溶于稀酸、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，采用稀的有机溶剂提取常常可防止水解酶的破坏，并兼有除去杂质提高纯化效果的作用。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 6.8% (体积分数) 乙醇溶液并用草酸调溶液的 pH 值为 2.5~3.0 进行提取，这样就从下面三个方面抑制了糜蛋白酶的水解活性：6.8% (体积分数) 的乙醇可以使糜蛋白酶暂时失活；草酸可以除去激活糜蛋白酶的 Ca²⁺；选用 pH 值为 2.5~3.0 是糜蛋白酶不宜作用的 pH 值。以上条件对胰岛素的溶解和稳定性都没有影响，又可除去一部分在稀醇和稀酸中不溶解的杂蛋白。