



过氧化物酶的固定及同工酶鉴定 综合实验设计

李 晨^{1,2}, 谭宗花^{1,2}, 杨晓月^{1,2}, 李 娇^{1,2*}

(1. 山西大学 国家级生物学实验教学示范中心, 太原 030006; 2. 山西大学 生命科学学院, 太原 030006)

摘要: 酶学原理及应用是生物化学课程的一个重点和难点内容, 具有很强的理论性和实用性。为了提高学生对酶学知识的综合理解及应用能力, 在生物化学实验教学中设计了“过氧化物酶的固定及同工酶鉴定”综合性实验项目。该综合实验将酶的重点内容进行了有机整合, 着重设计了酶的制备、活性测定、酶学性质(米氏常数及稳定性)表征、酶的固定化和同工酶鉴定 5 个实验环节。通过深度参与、统筹实施, 提升学生分析及解决实际问题的能力, 取得了很好的教学效果。

关键词: 生物化学; 综合性实验; 酶; 固定化; 科研能力

中图分类号: G642.3

文献标志码: A

DOI: 10.12179/1672-4550.20230474

Comprehensive Experimental Design of Immobilization and Isoenzyme Identification of Peroxidase

LI Chen^{1,2}, TAN Zonghua^{1,2}, YANG Xiaoyue^{1,2}, LI Jiao^{1,2*}

(1. National Biological Experimental Teaching Demonstration Center, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: With strong theoretical and practical significance, the principles and applications of enzymology are a key and difficult content in the course of biochemistry. In order to improve students' comprehensive understanding and application ability of enzyme knowledge, a comprehensive experimental project "immobilization and isoenzyme identification of peroxidases" is designed. It integrates the main content of enzymes and focuses on five sections, namely, enzyme preparation, activity determination, characterization of enzymatic properties (Michaelis constant and stability), immobilization, and isoenzyme identification. Students' ability to analyze and solve problems are improved by deep participation and coordinated implementation, and the experiment achieves a good teaching effect.

Key words: biochemistry; comprehensive experiment; enzyme; immobilization; scientific research ability

酶(enzyme)是由生物体活细胞产生的、对底物具有高度特异性和高催化效率的蛋白质或核酸。酶在生物体内发挥着重要作用, 各种生命活动都离不开酶的催化作用。近年来, 酶在工业、农业、医药卫生、能源开发及环境工程等领域的应用也日益广泛^[1]。酶学是生物化学课程的一个重要模块, 知识点繁多, 难点也较多, 如酶促反应动力学、酶工程等内容^[2]。生物化学是一门实验性学科, 综合性实验不仅能帮助学生巩固基础理论

知识, 还有利于培养学生的实践动手能力、独立思考能力和团队合作意识等综合素质^[3-4]。然而, 目前教材有关酶的实验教学均以独立实验为主, 缺少综合性实验设计, 如“影响酶促反应的因素”用的是淀粉酶, “米氏常数测定”用的是胰蛋白酶, “酶的提纯结晶”用的是溶菌酶, “电泳法分离同工酶”用的是乳酸脱氢酶。独立的实验项目之间缺乏关联性和系统性, 知识以碎片化形式呈现, 学生难以构架知识体系^[5]。本文设计

收稿日期: 2023-10-09; 修回日期: 2023-11-20

基金项目: 山西省高等学校教学改革创新项目(J20220065); 山西省自然科学基金(202203021221015); 山西省研究生教育教改课题(2021YJJG002, 2023JG018)。

作者简介: 李晨(1981-), 女, 博士, 副教授, 主要从事蛋白质与酶工程方面的研究。

*通信作者: 李娇(1989-), 女, 博士, 讲师, 主要从事蛋白质与酶工程方面的研究。E-mail: lijiao@sxu.edu.cn

“过氧化物酶的固定及同工酶鉴定”突出单元内容的关联性,综合考虑仪器设备等实验条件,整合了酶的主要知识点,包括酶的制备、酶促反应动力学、酶的固定化、同工酶电泳等重点内容,以帮助学生加深对生物催化剂的理解。

1 实验目的

1) 学习并掌握酶活、酶动力学、米氏常数、酶工程、固定化酶、同工酶电泳等酶学相关的系列概念;

2) 掌握酶活力的测定方法、海藻酸钠包埋法固定化酶的原理及操作、同工酶分析方法;

3) 掌握聚丙烯酰胺凝胶电泳的种类、原理和应用,学习垂直平板电泳的操作方法;

4) 掌握酶的米氏常数、最适反应温度、最适反应时间、pH 稳定性和温度稳定性的测定方法;

5) 锻炼学生数据分析及论文写作能力。

2 实验原理

2.1 过氧化物酶

过氧化物酶(peroxidase, POD)(EC 1.11.1.7)含有铁卟啉辅基,以过氧化氢(H_2O_2)为电子受体催化多种底物的氧化反应,是过氧化物酶体的标志酶,在自然界广泛存在^[6]。植物体中含有大量过氧化物酶,参与植物的呼吸作用、光合作用及生长素的氧化等。在植物的不同生长发育时期和不同的组织器官中,POD 的活性和种类有较大变化。POD 用途广泛,如辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)是生化分析技术中的一种主要标记酶,在环境保护中用作清除剂,降解消除酚类、胺类、甲醛、甲苯等多种污染物。POD 可催化邻甲氧基苯酚(愈创木酚)和过氧化氢生成红棕色产物 4-邻甲氧基苯酚,反应式如图 1 所示,本实验即利用此方法通过分光光度计测定 POD 活性。

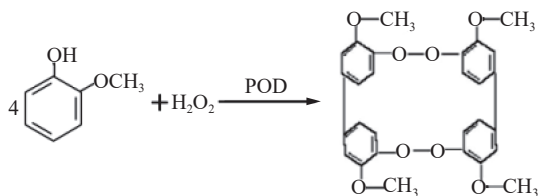


图 1 愈创木酚法测定过氧化物酶活性反应原理图

2.2 酶的固定化

酶固定化技术是指通过物理吸附、包埋或化

学结合、交联等方法,将酶与不溶于水的固相载体结合,把酶束缚或限制在一定的空间内,保留其催化活性,能够重复连续使用的一种技术。固定化酶的稳定性普遍高于游离酶,且易于回收,有利于简化生产工艺、降低成本、提高产品纯度和生产效率。目前,固定化酶技术已广泛用于医药生产、食品加工及环境保护等多个领域。包埋法是一种常用的固定化方法,其基本原理是将酶液与载体混合后,借助引发剂进行聚合反应,把酶包埋在高聚物形成的微小凝胶网格中。包埋法通过物理作用进行固定,未发生化学反应,酶的活性不受影响,回收率高,适用于各种类型酶的固定。海藻酸是由 β -D-甘露糖醛酸和 α -L-古洛糖醛酸两种结构单元组成的线性阴离子型多聚糖,可与二价阳离子形成凝胶,具有来源丰富、生物相容性好、化学稳定性高等优点。本实验采用海藻酸钠包埋法对 POD 进行固定化。

2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 是分离蛋白质常用的电泳技术。聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺在催化作用下聚合形成的亲水性高聚物,为三维网状立体结构,具有分子筛效应。常用的催化方法以过硫酸铵为催化剂,四甲基乙二胺为加速剂。常用的 PAGE 有非变性(Native-PAGE)和变性 (SDS-PAGE) 两种形式。在 Native-PAGE 中,蛋白质空间结构是完整的,蛋白质的电泳迁移率与其分子质量、形状、带电荷量都有关系。SDS-PAGE 中由于引入了强阴离子型变性剂十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS),破坏了蛋白质的空间结构,使蛋白带上大量负电荷,消除了蛋白质分子的空间结构和电荷差异,电泳迁移率仅取决于分子质量大小。Native-PAGE 中蛋白活性不受影响,可对分离后的蛋白进行活性分析。本实验中,用联苯胺染色法对 Native-PAGE 后的凝胶进行 POD 同工酶谱分析,SDS-PAGE 后的凝胶则用考马斯亮蓝 R-250 染色,以分析样品中的总蛋白分布。

3 实验材料、试剂与仪器

实验材料:豆芽、红薯、香蕉、白菜、西葫芦、土豆、小米谷糠、小米粉、小麦粉。

实验试剂:磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、愈创

木酚、过氧化氢、中分子量标准蛋白、考马斯亮蓝 R-250、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠、过硫酸铵、四甲基乙二胺、溴酚蓝、联苯胺、氯化铵、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2NA)、乙酸、甘油、海藻酸钠、氯化钙。

实验仪器:紫外可见分光光度计、离心机、电子天平、酸度计、电泳仪、垂直电泳槽、凝胶成像系统。

4 实验方法

4.1 粗酶液的制备

称取新鲜样品各 8 g(豆芽、红薯、香蕉、白菜、西葫芦、土豆),切碎剁细,量取 20 mL、pH 6 的磷酸缓冲液,分次加入研钵中,对样品进行冰浴研磨。浸提 30 min 后,于 8000 r/min、4 ℃ 下离心 15 min,所得上清即为粗酶液。小米谷糠、小米粉、小麦粉以相同的料液比加入 pH 6 的磷酸缓冲液,相同条件提取、离心后取上清液,得到粗酶液。POD 活性测定及固定化实验以小米谷糠过氧化物酶为研究对象,PAGE 实验以 9 种材料为研究对象。

4.2 谷糠过氧化物酶活性测定

向 3.5 mL PBS 缓冲液(50 mmol/L, pH 6)中加入 0.1 mL H_2O_2 (1%)和 0.4 mL 愈创木酚(1%)作为反应液。加入 0.1 mL 酶液启动反应后测定溶液在 470 nm 处的吸光度值,每隔 15 s 记录一次数据,至光吸收值不再增加。以时间为横坐标, $A_{470\text{ nm}}$ 为纵坐标绘制反应进程图,根据点的斜率确定反应初速率。在测定条件下,吸光度变化值 ΔA_{470} 每分钟变化 0.01 定义为一个酶活力单位(U)。

4.3 谷糠 POD 酶学性质分析

以谷糠过氧化物酶为研究对象,测定酶的米氏常数、最适反应温度、最适反应 pH、热稳定性及 pH 稳定性。

4.3.1 米氏常数(K_m)的测定

在 pH 6、25 ℃ 条件下测定不同浓度 H_2O_2 (10~50 mmol/L)时的酶活力,采用双倒数作图(Lineweaver-Burk)法计算酶的 K_m 值^[7]。

4.3.2 最适反应温度和热稳定性的测定

在不同温度下(35~85 ℃)测定 POD 的催化活力以确定最适反应温度。将酶分别于不同温度下(40~80 ℃)加热不同时间(10~60 min)后测定酶活性,以剩余酶活力分析酶的热稳定性。

4.3.3 最适反应 pH 值和 pH 稳定性的测定

配制系列缓冲液(100 mmol/L, pH 3~11),测定不同 pH 值时酶的催化活力,确定最适反应 pH 值。分别将酶液在不同 pH 值缓冲液中处理不同时间(10~60 min),测定剩余酶活,确定酶的 pH 稳定性。

4.4 海藻酸钠包埋法固定谷糠过氧化物酶

4.4.1 固定化酶的制备

配制 4% 海藻酸钠溶液作为固定相载体,与酶液按体积比 1:1 充分混合一定时间后,用注射器缓慢滴注到 7% 的氯化钙溶液中。海藻酸钠迅速形成凝胶,POD 被包埋在凝胶中制成固定化酶,得到球状固定化 POD,并用蒸馏水洗涤 3 次,备用。称取 0.10 g 固定化酶,测定固定化酶的活力。

4.4.2 不同因素对酶固定化效果的影响

测定不同浓度 $CaCl_2$ (2%、4%、6%、8%、10%)、载体与酶液比(0.5:1、1.0:1、1.5:1、2.0:1、2.5:1)和固定化时间(5、15、25、35、45 min)对固定化酶活性的影响。

4.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离过氧化物酶

4.5.1 Native-PAGE

所用分离胶和浓缩胶浓度分别为 7.5% 和 4%。将 9 种材料的粗酶液与 6×Native-PAGE 样品缓冲液以 5:1 的比例混合后直接点样,4 ℃ 下 100 V 稳压电泳至指示剂溴酚蓝到分离胶底部,结束电泳。

采用联苯胺法对分离胶进行染色。称取 0.8 g 联苯胺,加入 6 mL 冰醋酸和 34 mL 蒸馏水溶解即制得联苯胺溶液。将联苯胺溶液、氯化铵溶液(4%)、EDTA-2NA 溶液(5%)、过氧化氢溶液(0.3%)和蒸馏水以 1:2:2:2:3 混合制成染色液。用该染色液浸泡凝胶,振荡,待酶谱带显现后,拍照,得到各样品的过氧化物酶同工酶电泳图。

4.5.2 SDS-PAGE

将 9 种材料的粗酶液与样品缓冲液混合,煮沸 3 min,12 000 g 离心 1 min 后取上清点样。以分子质量 Marker 为对照。采用 4% 浓缩胶和 12.5% 分离胶,考马斯亮蓝 R-250 染色,用脱色液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{醋酸}}:V_{\text{水}}=2:3:35$)脱至背景无色后在凝胶成像系统中拍照^[8]。

5 实验安排

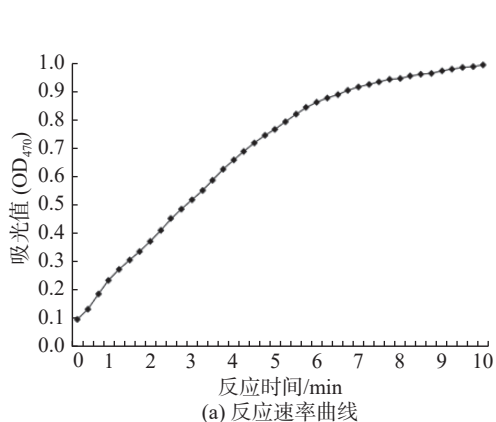
本实验安排在学期的中期进行,集中在 4 周

内完成。由于实验内容较多，耗时较长，学生实验时间可以灵活安排^[9]。在学生掌握基本操作(如酶活测定等)后，实验室可以全天对学生开放，学生只要在规定教学周内完成即可。实验报告要求以学术论文的形式呈现，具体格式和要求参照《山西大学学报(自然科学版)》。

6 实验结果与讨论

6.1 反应初速率及米氏常数测定

如图 2(a)所示，在反应刚开始阶段(0~5 min)，



反应液的吸光度值随着时间的延长呈线性增加，反应速率保持恒定。5 min 后吸光度值缓慢增加，反应速率下降。约 8 min 后，随着时间延长反应液吸光度值并没有发生明显变化，表明催化反应已基本完成。

以不同浓度 H₂O₂ 为底物，测定谷糠 POD 活力，用双倒数作图法求得谷糠 POD 的 K_m 值为 5.61 mmol/L，如图 2(b)所示。此 K_m 值远低于甘薯叶 POD 的 K_m 值(291 mmol/L)^[10]，表明谷糠 POD 与底物具有较高的亲和力。

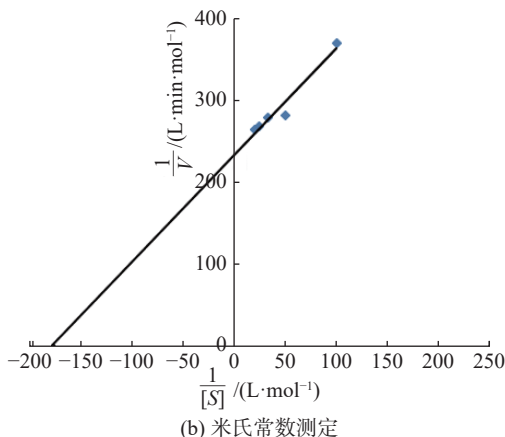


图 2 谷糠过氧化物酶反应速率曲线及米氏常数测定

6.2 最适反应温度与温度的稳定性

随着温度上升谷糠 POD 的催化活性缓慢升高，60 °C 时活性最高，为其最适反应温度，继续升高温度后酶活力逐渐下降，85 °C 时已检测不到酶活性，如图 3(a)所示。谷糠 POD 的最适反应温度高于枸杞 POD(50 °C)^[11]，低于金鱼藻

POD(70 °C)^[12]。在 40~60 °C 范围内谷糠 POD 非常稳定，继续升高温度则酶的稳定性下降，如 70 °C 加热 1 h 后酶剩余活力不到 40%，80 °C 加热 10 min 后酶催化活性完全丧失，如图 3(b)所示。谷糠 POD 的热稳定性与枸杞 POD 相近，后者在 40~60 °C 内稳定。

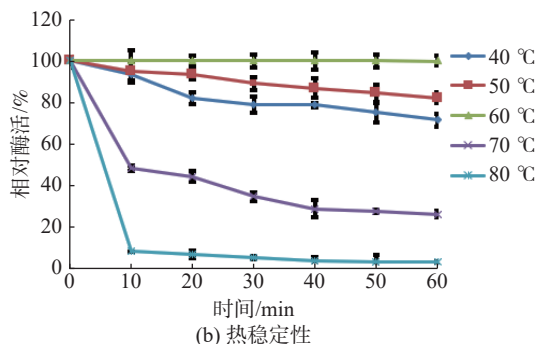
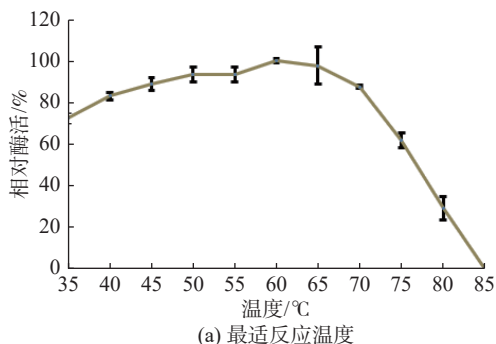


图 3 谷糠过氧化物酶最适反应温度及热稳定性

6.3 最适反应 pH 值和 pH 稳定性

谷糠 POD 在不同 pH 溶液中的相对活力如图 4(a)所示，酶的最适反应 pH 值为 6，过酸过碱都会影响酶的活性。相对而言，谷糠 POD

在偏碱性环境时活力下降更明显，如 pH 值为 8 和 pH 值为 11 时酶活力较最适 pH 值时分别降低了 30% 和 85%。pH 稳定性实验结果如图 4(b)所示，谷糠 POD 在 pH 值为 4~8 范围内稳定性

较好,在pH值为3时最不稳定,仅处理10min酶便基本失活。谷糠POD的pH稳定性与金鱼藻POD相似,但后者的最适反应pH值为5^[12]。与化学催化剂相比,生物酶的专一性强,催化效

率高,但易失活,因此酶的稳定性是限制其应用的重要因素。谷糠过氧化物酶有较好的热稳定性和pH稳定性,有利于其进一步生产应用。

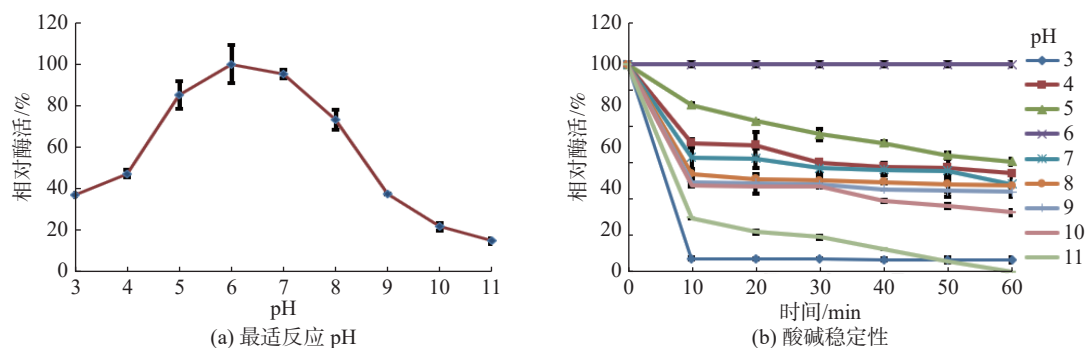
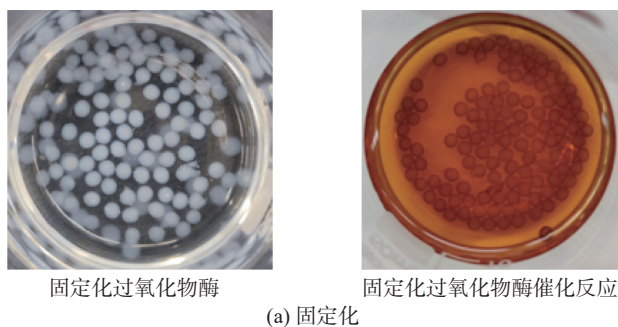


图4 谷糠过氧化物酶最适反应pH及酸碱稳定性

6.4 海藻酸钠包埋法固定过氧化物酶

将过氧化物酶与海藻酸钠的混合液滴注到CaCl₂溶液中形成球状凝胶,POD便被束缚在凝胶颗粒中,制备得到固定化的过氧化物酶,如图5(a)所示。加入底物H₂O₂和愈创木酚,溶液变

成棕红色,如图5(b)所示,表明凝胶颗粒有POD活性,过氧化物酶固定成功。单因素实验结果如图5(b)所示,表明谷糠POD固定化的最佳CaCl₂浓度为6%,载体与酶液体积比为1.5:1,固定化时间为25min。



(a) 固定化

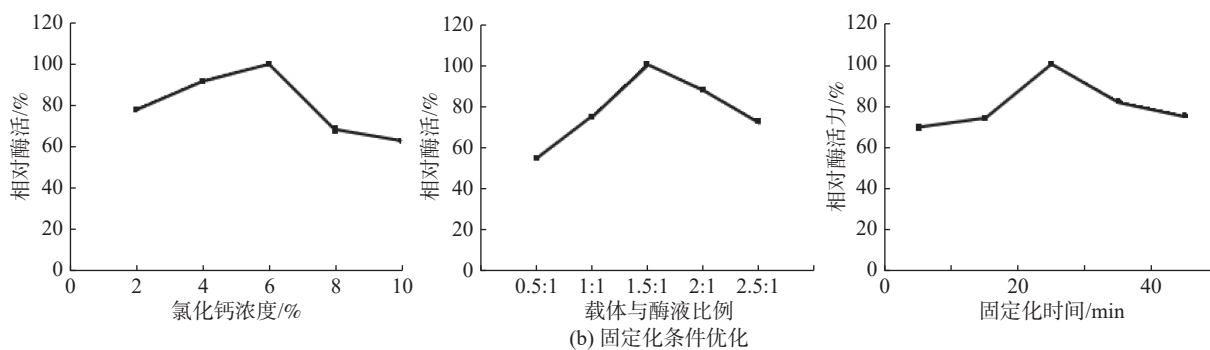


图5 谷糠过氧化物酶的固定化及固定化条件优化

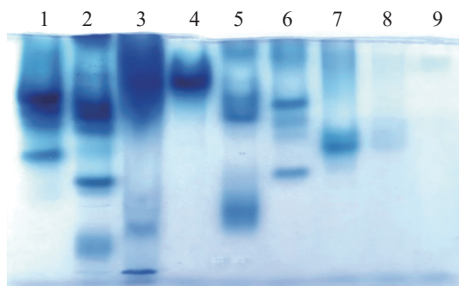
6.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离过氧化物酶

6.5.1 过氧化物酶同工酶谱

对9种植物材料的过氧化物酶进行了聚丙烯酰胺凝胶电泳及活性染色,结果如图6所示。不同材料的酶液经电泳染色后呈现不同的谱带,表明过氧化物酶的种类不同,条带颜色的深浅不同

则反映了酶活力的不同^[13]。由图可知,红薯和绿豆芽中所含的POD同工酶种类较多,电泳迁移率最小的条带着色最深,活性最强。西葫芦和土豆均有两条明显的活性染色带,且两条带的灰度值接近,活性相近。白菜和谷糠中只有一条明显的条带,谷糠过氧化物酶的电泳迁移率显著大于白菜

过氧化物酶。香蕉的过氧化物酶活性染色条带不清晰,呈弥散状,这可能与香蕉粗酶液中较多的杂质(如糖分等)有关。小米粉中过氧化物酶条带颜色很弱,面粉中几乎观察不到 POD 的活性条带。

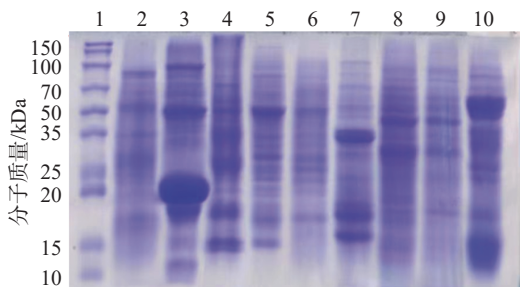


注:泳道 1~9 分别为豆芽、红薯、香蕉、白菜、西葫芦、土豆、谷糠、小米粉、面粉粗酶液。

图 6 过氧化物酶同工酶谱

6.5.2 粗酶液的 SDS-PAGE 图谱

与酶的活性染色不同,考马斯亮蓝 R-250 对所有蛋白都可染色。由粗酶液 SDS-PAGE 结果如图 7 所示,每种样品均有多个条带,条带大小分布也不相同。在 SDD-PAGE 中,蛋白质的电泳迁移率取决于其分子质量大小,颜色与蛋白含量有关。红薯中丰度最高的一种蛋白质分子质量约为 20 kDa,白菜中则以 50 kDa 的蛋白含量最高。土豆中含量丰富的蛋白质有 3 种,其相对分子质量分别约为 35、18、16 kDa。小米谷糠和小米粉的蛋白图谱相同,只是条带亮度不同,这与谷糠更高的蛋白含量有关。虽然面粉中未检测到明显的 POD 条带,但在 SDS-PAGE 结果中,面粉蛋白质呈现出多个条带,表明其蛋白种类丰富。



注:泳道 1 为标准分子质量 Marker,泳道 2~10 分别为豆芽、红薯、香蕉、白菜、西葫芦、土豆、谷糠、小米粉、面粉粗酶液。

图 7 粗酶液蛋白的 SDS-PAGE 图谱

7 综合性实验的实践体会

在授课过程中,老师注重问题引导,培养了学生分析问题和解决问题的能力^[14]。结合实验内

容,让学生思考为何本实验选择过氧化物酶为研究对象?还能选择哪些材料制备过氧化物酶?酶的固定化还能用哪些方法?酶的化学固定法和物理固定法各有哪些优缺点?Native-PAGE 和 SDS-PAGE 有何异同点?操作时有哪些注意事项?同工酶谱有何实际应用?通过提问,让学生积极思考并查阅文献,以点带面,帮助学生触类旁通,更好地构建知识体系,达到了综合实验设计的目的。

学生反映在实验中收获颇多。整个实验设计给了学生充分的自由度,在规定时间内学生可以自己安排进度。更为重要的是,本实验所用的主要仪器如离心机、分光光度计、电泳设备等都是生化实验室的常规仪器,台套件多,实验分组时可保证一人一组,每位同学都能得到一整套数据,保证了教学效果^[15-16]。通过实践,学生自主学习、分析问题的能力得到锻炼和提升。另外,实验报告以学术论文的形式呈现,培养了学生查阅文献、分析数据、论文撰写等科研能力^[17]。本文的数据结果均来自本科生实验,还有同学整理发表了科研论文,极大提高了学生的学习兴趣 and 科学素养^[18-19]。

然而,本实验设计还存在一些问题和不足,如酶的纯化、比活等也是酶学部分的重点内容,本实验只是制备了粗酶液,并未对酶进行纯化。今后可通过盐析、透析、离子交换层析和凝胶过滤纯化谷糠 POD,并计算酶活回收率和纯化倍数,评价纯化方案的优劣。另外,酶的固定化方法有多种,其中共价固定法比物理吸附法重复使用次数更多,在实际应用中也更广泛。以后可以设计一组共价固定 POD 的实验,并与海藻酸钠包埋法进行比较,研究两种方法在固定率、相对活力、重复使用率等方面的不同。最后,POD 的应用广泛,可以再设计与实际应用联系更加密切的一些实验,如将其用于检测血糖、降解双酚 A 等,以增加学生的学习兴趣。

8 结束语

“过氧化物酶的固定及同工酶鉴定”综合实验着重设计了酶的制备、活性测定、酶学性质(米氏常数及稳定性)、酶的固定化和同工酶鉴定 5 个实验内容,将酶的关键知识点有机融合在一起。实验内容同时兼顾了酶学基础理论知识和酶工程应用,旨在培养学生综合分析问题、理论联系实

际的能力。经过6年实践,取得了很好的教学效果,学生们给予了高度评价。学生普遍反映通过实验学习不仅加深了对酶学知识点的理解,学生的自主性、责任感、解决问题的能力都得到了锻炼与提高。

参考文献

- [1] BASSO A, SERBAN S. Overview of immobilized enzymes' applications in pharmaceutical, chemical, and food industry[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2020, 2100: 27-63.
- [2] 李小英, 张文博, 高启禹, 等. 以提高能力为目标的《酶工程》教学改革探索[J]. *教育教学论坛*, 2017(1): 77-78.
- [3] 温聪颖, 张雨, 曾景斌. 超顺磁性纳米簇捕获和分离细菌综合性实验[J]. *实验技术与管理*, 2022, 39(4): 51-56.
- [4] 王庆国, 罗平, 吴锋, 等. 高校实验室开展综合性实验项目的探索[J]. *实验室科学*, 2022, 25(3): 9-12.
- [5] 史影, 王伟伟, 周耐明, 等. 生物化学综合性虚拟仿真实验建设与教学探索[J]. *实验室研究与探索*, 2022, 41(4): 154-158.
- [6] BILAL M, RASHEED T, ZHAO Y P, et al. "Smart" chemistry and its application in peroxidase immobilization using different support materials[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 119: 278-290.
- [7] 朱圣庚, 徐长法. 生物化学-上册[M]. 4版. 北京: 高等教育出版社, 2017.
- [8] 李俊, 张冬梅, 陈钧辉. 生物化学实验[M]. 6版. 北京: 科学出版社, 2020.
- [9] 方心葵, 葛海燕, 陈鲁勇. 验证性实验教学改革的实践与探索[J]. *实验室研究与探索*, 2022, 41(3): 212-216.
- [10] 付伟丽, 唐靓婷, 王松, 等. 甘薯叶过氧化物酶的分离纯化及其部分性质研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(7): 223-227.
- [11] 高倩玲, 胡龄文, 陈鸿平, 等. 枸杞过氧化物酶的提取工艺优化及其酶学特性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2023, 35(5): 819-827.
- [12] 董桃杏, 张国森, 杨劭. 金鱼藻过氧化物酶降解双酚A的特性[J]. *中国环境科学*, 2022, 42(10): 4604-4611.
- [13] 张涛, 张林, 甘金华, 等. 拉萨裂腹鱼3种同工酶的电泳分析[J]. *华北农学报*, 2022, 37(S1): 366-372.
- [14] 王吟, 李欢欢, 于佳玉, 等. 三维生物物质水凝胶吸附剂制备及性能测定实验设计[J]. *实验技术与管理*, 2023, 40(1): 44-49.
- [15] 陈杰, 黄鑫. 研究性实验教学中学生分组策略的研究[J]. *实验室科学*, 2020, 23(2): 229-232.
- [16] 傅双庆, 杜洁, 贾新超, 等. 姜黄素生物可降解纳米胶囊制备综合实验设计[J]. *实验技术与管理*, 2022, 39(6): 30-33.
- [17] 李晓玲, 李晨. 一种重组蛋白的表达、纯化及应用综合实验设计及实践[J]. *实验技术与管理*, 2020, 37(10): 72-76.
- [18] 范三红, 田贺贺, 柴利萍, 等. 响应面法优化藜麦种皮过氧化物酶固定化条件[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(13): 197-201.
- [19] 杨晓月, 李小平, 李晨. 藜麦麸过氧化物酶分离纯化及酶学特性研究[J]. *山西农业科学*, 2019, 47(6): 977-981.

编辑 葛晋