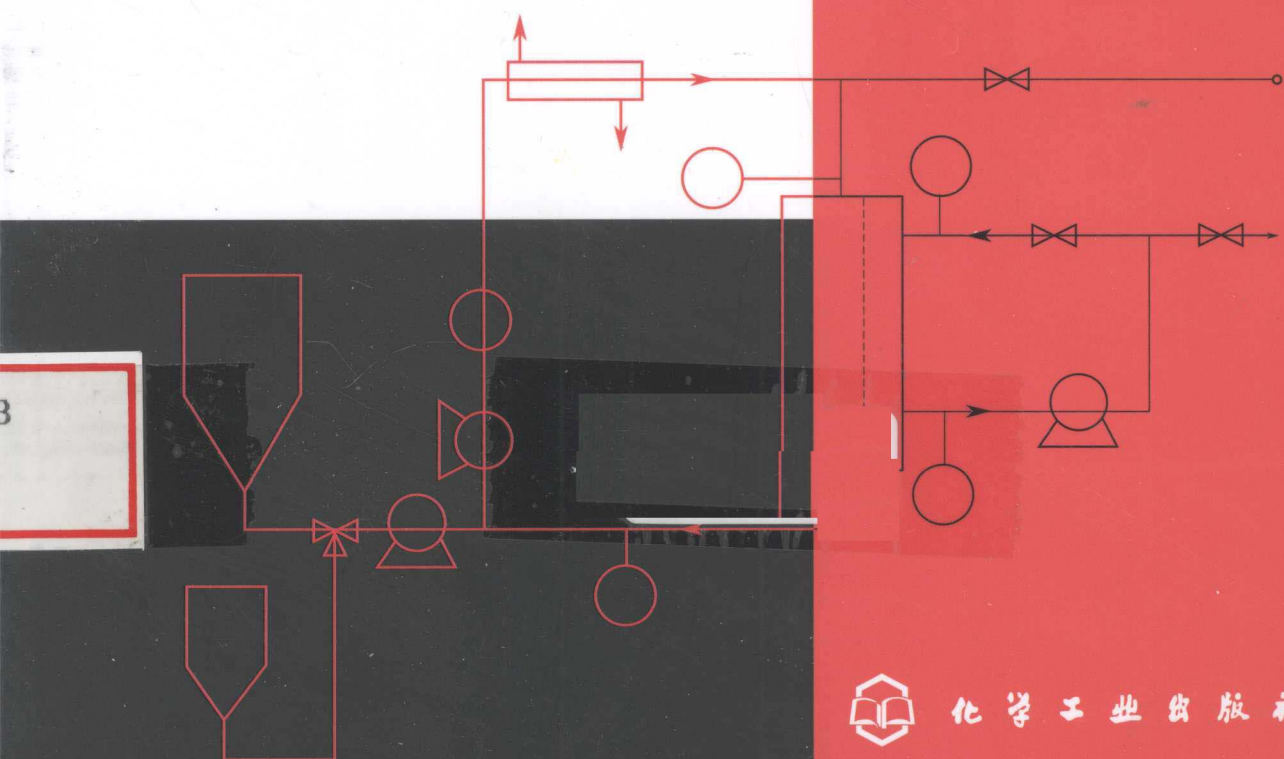


Bioseparation

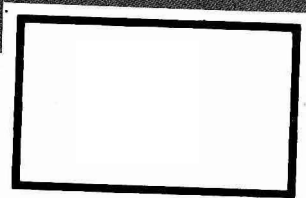
Principle and Technology

生化分离原理与技术

田亚平 周楠迪 主编



化学工业出版社



Bioseparation

Principle and Technology

生化分离原理与技术

田亚平 周楠迪 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

生化分离原理与技术/田亚平, 周楠迪主编. —北京: 化学工业出版社, 2010.5
ISBN 978-7-122-07894-0

I. 生… II. ①田…②周… III. 生物化学-分离 IV. TQ033

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 037931 号

责任编辑: 傅四周 孟 嘉
责任校对: 顾淑云

文字编辑: 周 侗
装帧设计: 周 遥

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: 大厂聚鑫印刷有限责任公司
787mm×1092mm 1/16 印张 18½ 字数 517 千字 2010 年 5 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: 69.00 元

版权所有 违者必究

前 言

生物技术是发展国民经济的关键技术之一，近年来由于全球能源和资源短缺、生态环境恶化等一系列问题日渐突出，只有依赖生物技术产业建立以可再生生物质资源为原料清洁化生产各种化学品、材料与能源的新型工业模式，才能更好地保障人类社会的可持续发展。

生化分离技术作为生物技术的下游技术，在整个生物技术中扮演的角色和所处的地位已日益受到人们的关注，生化分离技术方面的技能知识对从事生物技术方面研究的人员，或将要进行这方面研究的人们来讲，显然是非常需要的。

生化分离技术发展快，应用面广，各方面也都有迫切需强化的要求，所以促使此方面的学术书籍更新较快。2006年出版的《生化分离技术》是江南大学给研究生开设的“生化分离技术”课程的教材，本书在该教材的基础上重新编写而成，除继续保留对一些经典技术的原理较为系统的描述外，还专门结合近年来新的应用实例来说明这些技术在应用上的拓展以及以它们为基础发展起来的融合技术的特点。而本书更重要的特色是在整体篇幅精简的同时，又专门增加了分离方案设计的内容，因为生化分离过程往往是将若干单元纯化技术联合使用而实现的，在此过程中，选择合理单元纯化技术固然很重要，然而如何将这些技术合理地组合和按顺序使用也是成功分离所必须考虑的。每章后设有相应的思考题，是笔者多年来在教学方面的一些积累，可帮助更好地学习和掌握各种分离技术的原理。而技术的真正掌握和运用尚需经过实验的实践过程，这是本书仍保留最经典的两个分离系列实验的主要原因。

本书从内容上讲不仅适用于作为相关专业学生的教材（生物技术方向的本科生或生物工程、食品工程等专业的研究生），也很适合作为相关领域科研人员的参考书。

非常感谢参与《生化分离技术》编写的教师周楠迪、史锋、华子安、杨海麟，他们的辛苦笔耕给本书的编写创造了良好的基础。

最后要感谢化学工业出版社的大力支持，使本书得以顺利出版。由于本人水平有限，不足与疏漏之处在所难免，敬请专家和广大读者批评斧正。

田亚平
江南大学生物工程学院
2010年4月

目 录

第一章 绪论	1
一、生化分离技术发展的历史和地位	1
二、生化分离技术的研究范畴	2
三、生化分离技术的应用及发展趋势	5
思考题	7
参考文献	7
第二章 生物样品的预处理	8
第一节 概述	8
第二节 动植物材料预处理	8
一、植物组织提取物的制备	8
二、动物组织提取物的制备	12
三、细菌中重组蛋白的提取制备	13
第三节 细胞的破碎与分离	16
一、概述	16
二、常用的几种破碎方法	16
三、细胞破碎技术研究的发展方向	21
第四节 沉淀技术	21
一、概述	21
二、沉淀方法	22
第五节 预处理技术实例	32
一、纳米级微生物细胞破碎原理及实例	32
二、 β -环糊精共沉淀分离法	33
三、壳聚糖沉淀分离法	33
思考题	33
参考文献	34
第三章 膜分离技术	35
第一节 概述	35
一、发展史	35
二、作用及存在问题	35
三、分类和定义	36
第二节 技术原理	39
一、压力特征	39
二、浓差极化	40
三、膜分离理论	41
四、膜的截留能力	41
五、膜的污染	42
六、膜组件的选择	43
七、膜的选择及使用	43
第三节 微滤技术	45

一、概述	45
二、膜的分类	45
三、膜的特点和分离机理	46
四、膜的污染和清洗	47
第四节 超滤技术	47
一、概述	47
二、原理	48
三、问题及解决措施	48
四、膜的改性	48
第五节 纳滤技术	49
一、概述	49
二、分离机理	50
三、纳滤膜	51
第六节 超-微滤操作技术	51
一、预处理	51
二、膜的操作	52
三、膜的清洗和膜性能的再生	55
第七节 膜分离技术的应用	56
一、微滤技术应用	56
二、超滤技术应用	57
三、纳滤技术应用	59
思考题	60
参考文献	60
第四章 色谱分离技术	62
第一节 概述	62
一、色谱的基本概念	62
二、色谱法的分类	63
第二节 吸附色谱简介	64
一、吸附色谱影响因素	64
二、羟基磷灰石色谱方法介绍	65
第三节 凝胶过滤色谱	67
一、凝胶过滤色谱原理	68
二、凝胶过滤色谱介质	70
三、凝胶过滤色谱实验技术	78
四、凝胶过滤色谱的应用	83
第四节 离子交换色谱	84
一、离子交换色谱相关理论	85
二、离子交换色谱介质（离子交换剂）	89
三、离子交换色谱实验技术	96
四、离子交换色谱的应用	109
第五节 亲和色谱	110
一、基本原理	110
二、亲和色谱配体	111
三、亲和吸附剂	112

四、亲和色谱实验技术	119
五、亲和色谱的特殊类型	122
六、亲和色谱的应用	132
第六节 反相色谱	134
一、反相色谱原理	135
二、反相色谱介质	138
三、反相色谱流动相	141
四、反相色谱实验技术	144
五、反相色谱的应用	148
第七节 疏水作用色谱	150
一、疏水作用色谱基本原理	150
二、疏水作用色谱介质	153
三、疏水作用色谱实验技术	155
四、疏水作用色谱的应用	158
第八节 色谱聚焦简介	159
一、机制简介	160
二、多组分缓冲剂与多缓冲离子交换剂	162
三、实验要点	163
思考题	165
参考文献	166
第五章 电泳技术	168
第一节 概述	168
一、基本原理	168
二、凝胶支持介质	170
三、检测方法	171
四、电泳仪器	172
第二节 天然聚丙烯酰胺凝胶电泳	173
一、基本原理	173
二、天然聚丙烯酰胺凝胶电泳的类型	174
三、影响分离效果的因素	174
四、蛋白质分子量的测定	176
五、天然聚丙烯酰胺凝胶电泳的实验方法	176
六、天然聚丙烯酰胺凝胶电泳的应用范围	180
第三节 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳	180
一、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳的分离原理	180
二、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳的类型	181
三、影响分离效果的因素	181
四、蛋白质亚基分子量的测定	182
五、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳的实验方法	182
六、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳的应用范围	183
第四节 等电聚焦	184
一、原理	184
二、载体两性电解质和 pH 梯度的形成	185
三、载体两性电解质等电聚焦方法	186

四、固相 pH 梯度介质及其 pH 梯度的形成	189
五、固相 pH 梯度等电聚焦方法	191
六、等电聚焦系统的选择	192
七、等电聚焦的应用范围	193
第五节 双向电泳	193
一、样品制备	193
二、等电聚焦	193
三、缓冲液置换	195
四、梯度十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳	195
五、检测	196
六、蛋白质图谱分析	196
七、应用	196
第六节 免疫电泳	196
一、原理	196
二、免疫电泳类型	196
三、免疫电泳技术	198
四、电泳方法	199
五、应用	200
第七节 蛋白质印迹	200
一、原理	200
二、试验材料的选择	202
三、蛋白质印迹试验方法	203
四、应用	204
第八节 毛细管电泳	205
一、原理	205
二、毛细管电泳的主要类型	206
三、毛细管电泳仪	208
四、影响毛细管电泳分离的主要因素	209
五、毛细管电泳过程	210
六、毛细管电泳的应用	210
思考题	210
参考文献	211
第六章 其他分离技术	212
第一节 离心分离技术	212
一、概述	212
二、基本原理和计算	219
三、超离心技术	225
第二节 泡沫分离技术	229
一、分类	229
二、基本原理	230
三、操作方式及其影响因素	231
四、泡沫分离的应用	233
第三节 膜分离集成技术	234
一、概述	234

二、原理和特点	234
三、膜色谱介质材料及其组件	236
四、膜色谱的制备	237
五、膜色谱的应用	238
第四节 模拟移动床简介	240
一、概述	240
二、工作原理	240
三、模拟移动床模型	241
四、模拟移动床的应用	242
思考题	242
参考文献	243
第七章 分离方案的设计	244
第一节 概述	244
第二节 分离的主要流程	245
一、建立分析方法	245
二、提取材料选择	246
三、提取方法选择	246
四、分离纯化方法的探索	248
五、均一性的鉴定	248
第三节 分离技术的选择和组合	248
一、单元分离技术的选择	248
二、融合技术或称集成分离技术	249
三、分离技术组合方案的选择原则	253
第四节 典型生物分子分离实例分析	254
一、蛋白质(酶)的分离纯化与鉴定	254
二、核酸的分离纯化与鉴定	261
三、多糖的分离纯化与鉴定	265
四、小分子物质的分离与鉴定	268
思考题	273
参考文献	274
附录 生化分离实验部分	275
系列实验 1 凝胶色谱法测定蛋白质相对分子质量	275
一、实验目的	275
二、实验原理	275
三、实验器材和试剂	275
四、实验操作	276
五、实验结果分析与处理	277
系列实验 2 酵母蔗糖酶的提取与纯化	278
一、实验目的	278
二、实验过程	278

第一章 绪论

一、生化分离技术发展的历史和地位

生化分离过程是生物技术转化为生产力所不可缺少的重要环节，生化分离技术 (bioseparation technology) 是描述生物产品分离过程原理和方法的一个术语，是从动植物组织培养液或微生物发酵液中分离、纯化生物产品的过程中所采用的方法和手段的总称，其技术的进步程度对于生物技术的发展有着举足轻重的作用，为突出其在生物技术领域中的地位和作用，常称它为生物技术的下游工程 (downstream processing)。分离与纯化过程几乎涉及生物技术所有的工业和研究领域，生物技术产品不断开发与发展的同时伴随相应分离纯化过程的研究与开发。

从 19 世纪 60 年代到 20 世纪上半叶，由于开发了微生物纯种培养技术，生物技术产业的发展进入了新时期，此阶段的生物技术产品的下游工艺，主要采用压滤、蒸馏等手段，分离产品以经验为依据，可称为手工式式的，属原始分离纯化时期，可看作生化分离纯化技术发展的第一阶段。20 世纪 40 年代，抗生素、氨基酸、有机酸、核酸、酶制剂、单细胞蛋白等一大批用发酵技术制造的产品投入了工业生产。这一时期的特点是产品类型多，不但有初级代谢产物，而且还出现了次级代谢产物，产品的多样性对分离、纯化的方法和技术提出了更高的要求，此时在实验室阶段出现了离子交换及电泳技术，这可看作生化分离纯化技术发展的第二阶段。进入 21 世纪，以细胞融合技术和 DNA 重组技术为主，包括酶工程、基因工程、发酵工程、细胞工程和蛋白质工程在内的生物技术的发展，使生物技术迅猛地发展成为一门集现代生物科学和工程技术于一身的新兴学科，成为当前世界各国高新技术发展的主要领域。特别是其中基因技术的发展使人们基本可以按照自己的意愿来设计和生产生物制品，但是，实践表明，获取高纯度的生物制品远非易事，因此生物分离工程的研究应运而生。然而，由于历史原因，生物工程下游分离纯化过程的研究投入远较上游的少，使得下游处理过程的研究明显滞后，成为生物技术整体优化的瓶颈。因此，当前生物分离工程已经日渐引起学术界的重视。世界各国都注意到发展下游技术对现代生物技术及其产业化的重要性，纷纷加强研究力量，增加投入，组织专门研究机构，一些著名的生产分离设备和色谱填料的公司竞争中不断成长，如现在瑞典的 Amersham Pharmacia Biotech 就是在当时的前身 LKB 和 Pharmacia 基础上成立的。此时的生化分离技术已进入了高速发展的第三阶段，除实验室开发出各种色谱技术，如亲和色谱、疏水作用色谱、反相色谱等，还发展了生化分离分析技术方面较为优越的各种电泳技术，包括双向电泳和分辨率很高的毛细管电泳等技术，各种膜过滤及凝胶色谱和离子交换等技术则实现了工业规模的应用。

生化分离技术作为生物技术的下游技术，其在整个生物技术中扮演的角色和所处的地位被人们越来越深刻地认识。生物技术产业以日新月异的速度迅速发展，特别是在医药、食品、食品添加剂以及化妆品方面，由于生物技术产品多数是与人类生活密切相关的物质，对有害物质有严格的控制，生产过程也要求有严格的管理，在最终产品中往往不允许极微量的有害杂质存在，使得生物产品的分离纯化在整个生产过程中显得尤为重要。一些新的功能性生物产品物质的研究和开发，在得到应用之前对其构效需有清楚的认识，此时就需通过一系列分离技术将之纯化到相当高的纯度，才能消除干扰，正确分析结构与功能、特性等，此部分的研究成本和代

价较高，但却是不可缺少的。此外，对实际得到应用的生物产品，由于其具有的特殊性和复杂性，往往导致生化分离下游技术的成本占整个生产过程成本的比例较大。一般地，大多数酶的回收纯化过程成本约占 70%，基因工程表达产物的回收纯化过程成本一般占 85%~90% 以上。所以，下游技术质量往往决定整个生物加工过程的成败，合理设计和优化后的生化分离下游技术将使目标产品的生产成本大大降低，有利于实现大规模商业化生产。

二、生化分离技术的研究范畴

(一) 主要研究对象

生化分离技术的分离对象主要包括单体、大分子、复合分子、超分子复合物、细胞器。

1. 单体或小分子类

单体是指如氨基酸、单糖、核苷酸、维生素、植物的次生物质等。其中氨基酸、单糖、核苷酸本身是构成蛋白质、多糖、核酸的基本结构单位。

(1) 氨基酸

氨基酸直接参与生物体内的新陈代谢和其他生理活动的特殊功能，成为现代医药不可缺少的重要原料。20 种构成蛋白质的氨基酸中有 8 种是人体不能自身合成的，需从外界吸收的必需氨基酸，有重要的营养和医用价值，常用作食品添加剂和临床输液的主要成分。此外，氨基酸还可作为日用化工的新材料——皮肤营养剂、抗氧化剂；畜牧业方面的增效剂——高效饲料添加剂；农业方面无公害农药、除草剂的主要原料；轻工业领域的新生力量——新型表面活性剂、新型纤维等。

氨基酸的生产主要有两种途径，一是利用微生物进行发酵，二是从含量丰富的生物材料中直接提取，但不管是何种方式都要利用生化分离技术来得到最终产品。

氨基酸为两性电解质，具有等电点，带电情况受溶液 pH 的影响显著，所以氨基酸的分离纯化常采用等电点沉淀、离子交换色谱等方法。

(2) 多肽

多肽类化合物广泛存在于自然界中，其中对具有一定生物活性的多肽的研究，一直是药物开发的一个主要方向。

生物活性肽的来源主要有 3 种：①存在于生物体中的各类天然活性肽；②消化过程中产生的或体外水解蛋白质产生的；③通过化学方法（液相或固相）、酶法、重组 DNA 技术合成。

天然产物及微生物中也存在各种活性多肽，如利用乳酸乳球菌发酵淀粉类原料生产乳链菌肽，但天然存在的生物活性肽含量低，结合机制复杂，难以分离纯化，只有谷胱甘肽的酵母发酵、绿藻培养提取取得了成功并投入工业化生产。

采用何种方法分离纯化肽类往往要由所提取的组织材料、所要提取物质的性质决定。对多肽提取的常用方法包括盐析法、超滤法、凝胶过滤法、等电点沉淀法、离子交换色谱、亲和色谱、吸附色谱、逆流分溶、酶解法等。大多分离方法利用了肽类物质为两性电解质的特性，一些小肽还可以采用反相色谱、灌注色谱进行分离，而高效液相色谱（HPLC）与反相高效液相色谱（RP-HPLC）则为肽类物质的分离提供了有利的方法手段。

(3) 核苷酸

核苷酸类物质包括 UMP、GMP、CMP、AMP 及其衍生物，是重要的医药中间体和核酸类药物。它们在治疗心血管疾病、中枢神经系统疾病、循环与泌尿系统用药及抗病毒、抗肿瘤等方面有特殊疗效，其用途已由食品工业扩大到农业、医药领域。呈味核苷酸肌苷酸钠、鸟苷酸钠及这些物质的混合物 5'-核苷酸钠可用作调味品。核苷酸的混合物能促进农作物和果树的生长。核苷酸类似物可以抑制核苷酸合成代谢的某些酶，或干扰阻断核苷酸的合成，进一步抑制核酸与蛋白质的合成，具有抗肿瘤或抗病毒的作用。

(4) 脂质及植物次生物质

脂质是构成生物膜的主要成分，在生物体内发挥重要作用。一般来讲，脂质是水溶性很小的一类物质的总称，种类繁多，有脂肪酸，甾醇类，维生素 A、维生素 D、维生素 E 等中性脂质，卵磷脂等糖脂。脂质在食品添加剂和医药等方面用途广泛，其分离纯化技术的研究开发亦受到广泛的重视。目前脂质的分离纯化主要采用有机溶剂萃取、超临界流体萃取和色谱等方法。

植物体内各种成分基本上可分为两类，一类是植物本身必需的营养物质如糖类、脂肪、蛋白质等成分；另一类是植物次生物质，如生物碱、苷类、萜类等具广泛生物活性的物质。目前已发现的对昆虫生长有抑制、干扰作用的植物次生物质大约有 1100 余种，这些物质均不同程度对昆虫表现出拒食、驱避、抑制生长发育及直接毒杀作用。萜类、生物碱有很多都被发现具有抗病毒、抗肿瘤、抗 HIV 的作用，它们的开发往往与中草药的研发联系起来，具有极大的应用潜力，甚至一些新药的开发，就是以植物中特殊药理成分研究为基础，进一步利用人工合成的方法大量研制，从而降低成本。

2. 生物大分子类

生物大分子就是指蛋白质、核酸、多糖。

(1) 蛋白质

生物体内的蛋白质种类繁多，分布广泛，担负着多种多样的任务。据人类基因组的研究估计，人类共有 10 万个基因，这些基因能编码 10 万种蛋白质。与氨基酸类似，蛋白质或多肽均为两性电解质，每一分子上带有多个正负电荷，具有等电点。因此常利用其带电性质进行分离纯化，如离子交换色谱、电泳等。此外，由于蛋白质具有特定的立体构象，还可通过其自身的电荷分布、疏水基分布等特性以及与某些相对应的分子发生亲和相互作用的特性来进行分离，如疏水作用色谱与亲和色谱法等，亲和色谱法因具有专一性分离的特点，已成为重要的蛋白质分离纯化手段。

(2) 多糖

多糖主要是通过启动免疫细胞，如启动 T 细胞、B 细胞、活化补体巨噬细胞、自然杀伤细胞等，促进细胞因子生成等途径对免疫系统发挥多方面的调节作用。

多糖分离是将存在于生物体中的多糖或分泌到体外的多糖提取解离出来的过程。对胞外多糖而言，一般来说粗分离阶段常用手段是溶剂抽提和乙醇沉淀，对胞内多糖则多了破碎细胞的过程。不同的多糖提取所用溶剂不同，大多数可采用一定温度的水或稀碱溶液提取，为不引起多糖中糖苷键断裂，要尽量避免酸性条件。提取所得粗多糖要进一步纯化才能获得单一的多糖组分。其步骤包括脱除非多糖组分，再对多糖组分进行分级。所用方法总体来讲，无非都是利用一些性质上的差别来设计，如选择性变性沉淀、分级盐析、离子交换色谱、凝胶色谱、亲和色谱、超滤等。

(3) 核酸

核酸存在于多种细胞，如病毒、细菌、寄生虫、动植物细胞；多种标本中，如血液、组织、唾液、尿液等其他来源的标本。因此分离方法复杂而多样。总的说来，核酸的分离与纯化是在破碎和溶解细胞的基础上，利用苯酚等有机溶剂抽提（核酸溶于缓冲液，即水相）、分离、纯化；乙醇、丙酮等有机溶剂沉淀，收获。目前开发了许多商品化的核酸分离柱，可简单、快速地分离得到纯度很高的 DNA 或 RNA。其分离原理有的利用核酸的分子量差异，有的利用需分离核酸的特点与其特异性结合达到分离、回收的目的。

3. 复合分子类

复合分子是指由大分子与大分子构成的复合物，如多糖与蛋白质构成的糖蛋白、色素与蛋白质构成的色蛋白，也包括大分子与小分子构成的复合物脂蛋白、磷蛋白等。超分子复合物则是指类似于核糖体一类由大分子与大分子构成的复合物。细胞器则是指有以下几部分构成的存

在于细胞中的小单元，即超分子复合物+大分子+小分子+膜，如线粒体、叶绿体等。这些物质的分离，往往可以利用分子大小上的明显差异选择凝胶过滤或膜过滤技术进行分离或采用高速离心或超速离心技术进行分离。

(二) 主要技术及特点

目前相对比较广泛采用的单元生化分离技术可归纳如下。

- ① 沉淀分离：盐析、有机溶剂沉淀、选择性变性沉淀、非离子聚合物沉淀等。
- ② 色谱分离：吸附色谱、凝胶色谱、离子交换色谱、疏水色谱、反相色谱、亲和色谱及色谱聚焦等。
- ③ 电泳分离：SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦、双向电泳、毛细管电泳等。
- ④ 离心分离：低速离心、高速离心、超速（差速离心、密度梯度）离心分离技术等。
- ⑤ 膜分离技术：透析、微滤、超滤、纳滤、反渗透等。

此外还有一些其他的分离技术如各种萃取技术（双水相萃取、超临界流体萃取、反胶束萃取）、液膜分离法、泡沫分离法、结晶技术等。主要分类见表 1.1。

表 1.1 生化分离方法分类

分离主要依据	分离技术种类
形状和大小	凝胶过滤、超滤、透析
电离性质	离子交换色谱、电泳(除 SDS)
极性(疏水性)	分配色谱、吸附色谱、疏水色谱
生物功能或特殊化学基团	亲和色谱
等电点 pI	色谱聚焦、等电聚焦
溶解性	盐析、有机溶剂抽提、结晶
密度、大小	高速离心、超速离心、SDS-凝胶电泳

生化分离技术的特点主要表现为：成分复杂、含量甚微，易变性、破坏，具经验性、均一性的相对性。

成分复杂是指要分离的样品处于一个复杂的体系中，一个生物材料常包括数百种甚至数千种化合物，各种化合物的形状、大小、分子量和理化性质都各不相同，其中还有一些化合物是未知物质，其次这些化合物在分离时仍处在不断的代谢变化过程中。

含量甚微是指有些化合物在材料中含量极微，只达万分之一、几十万分之一甚至百万分之一。

易变性、破坏是指许多具有生物活性的化合物一旦离开了生物体的环境，很易变性、破坏。如许多生物大分子在分离过程中，过酸、过碱、高温、高压、重金属离子及剧烈的搅拌、辐射和机体自身酶的作用都会破坏这些分子的生理活性，分离过程中要十分注意保护这些化合物的活性，常选择十分温和的条件，并尽可能在较低的温度和洁净的环境下进行。

具经验性是指生化分离方法几乎都在溶液中进行，各种参数（温度、pH、离子强度等）对溶液中各种组成综合影响常常无法确定，以致许多实验的设计理论性不强，实验结果有很大的经验成分。因此，一个实验的重复性的建立，从材料到方法直至各种环境条件，使用的试剂药品等都必须严格地加以规定。

生化分离技术应用后对最后结果均一性的证明与化学上纯度的概念并不完全相同，不是绝对的纯度，而是具相对性。主要由于生物分子对环境反应十分敏感，结构与功能关系比较复杂，纯度鉴定的某一种方法往往只是利用其一方面的性质，对其均一性的评定常常是有条件的，所以往往必须通过不同方法或同一方法不同条件下的测定，最后才能给出相对的“均一性”结论。如电泳和色谱进行组合，不同条件下的电泳等。只凭一种方法所得纯度的结论往往是片面的，甚至是错误的。

为了保护所提取物质的生理活性及结构上的完整，生化分离方法多采用温和的“多阶式”进行，可形象地称为“逐层剥皮”方法，一个生物分子的分离制备常常需经过许多步骤，并变化各种分离方法，才能达到纯化目的。还有一类被称为“钓鱼法”，是近年来随着分离技术发展而出现的，它是利用某些分子特有的专一亲和力，将某一化合物从极复杂的体系中一次钓出，如亲和色谱（包括金属螯合色谱、共价色谱、免疫亲和色谱等）、亲和沉淀、亲和膜过滤等，这一类方法目前虽仅局限于一些大分子如酶、抗体和核酸的分离纯化工作，但与经典方法相比具有很大的优越性。

三、生化分离技术的应用及发展趋势

近 20 年来，人们将物理和化学分离纯化原理与生物技术产品特性结合，开发了许多新原理、新技术、新材料和新设备。

如灌注色谱（perfusion chromatography）就是 20 世纪 80 年代美国 PE 公司通过填料技术的改进而产生的一种色谱新技术，它第一次带给生命科学家快速高效的纯化理念。

比较图 1.1 与图 1.2 可发现灌注色谱专利性的二元孔网络结构，大的穿透孔（孔径达 600~800nm）足以使流动相快速流动；小的扩散孔（孔径为 50~150nm）提供足够吸附表面积，从而大大加快传质，使分离线速度从传统的 50~360cm/h 达到 1000~7000cm/h，使生物分子分离比使用 HPLC 或传统填料快 10~100 倍。

为满足高效高速分离纯化技术的需要，新材料方面的发展的确非常迅速，除 POROS 填料外，不断有新型高效离子交换剂出现。

高效离子交换剂主要指中压色谱或高压色谱中使用的粒度较小而有一定的硬度，分辨率很高的一类离子交换剂。包含色谱填料制备方面有着悠久历史的瑞典 Pharmacia 公司的 SOURCE、MonoBeads 系列，色谱填料制备方面后起之秀 Bio-Rad 公司的 DEAE-5-PW 和 CM-5-PW（基质为合成高分子有机聚合物）等。

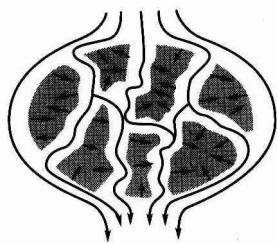


图 1.1 灌注色谱填料的扩散途径

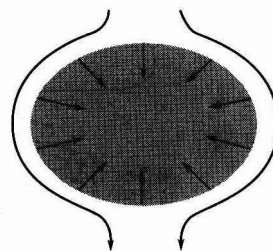


图 1.2 传统色谱填料的扩散途径

伴随填料技术的发展，分离纯化的设备方面也在不断开发和更新，国外生产色谱设备的相关公司都陆续推出一些自动色谱系统，有中低压的、高压等类型。它们都是一类针对生物分子的特性而设计的纯化系统，它能自动制备缓冲液，具有多柱转换、自动上样设计、多波长连续检测等功能，且配有专家辅助软件，能更快速地优化分离条件，更有效地以不同规模纯化不同的生物分子。该系统不仅在酶工程、生物制药的研究上得到广泛应用，同时也是分子生物学实验后期必要的分离系统。

当前生物分离技术发展的主要倾向体现在以下几个方面。

① 多种分离、纯化技术相结合，包括新、老技术的相互渗透与融合，形成所谓融合技术。如膜过滤与亲和配基、离子交换基团相结合，形成了亲和膜过滤技术（见图 1.3）、亲和膜色谱、离交膜色谱；亲和配基和聚合物沉淀作用相结合，形成了亲和沉淀技术；离心分离与膜分离过程结合，形成了膜离心分离过程；还有如将双水相分配技术与亲和法结合而形成效率更高，选择性更强的双水相亲和分配组合技术；可以将离心的处理量、超滤的浓缩效能及色谱的

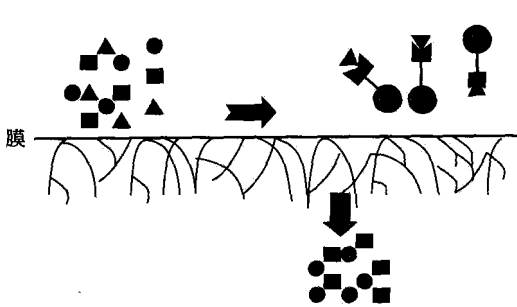


图 1.3 亲和膜过滤技术示意

● 杂质; ▲ 目的物;
 ■ 带有间隔臂和配位基的高分子聚合物

条件的确定都属上游技术，菌种选育和工程菌构建一般都以开发新物种和提高目的产物量为目标，20 世纪后期人们就开始认识到应该有整体观念，除了要达到上述目标外，还应设法使菌种增加产物的胞外分泌量，减少非目的产物的分泌，并赋予产物某种有益的性质以改善产物的分离特性，从而降低下游分离技术的难度；培养基和发酵条件由于直接决定了输送给下游进一步分离的发酵液质量，所以人们现在尽量采用液体培养基，提倡清液发酵，少用酵母膏、玉米浆等有色物质为原料，通过控制比生长速率、消泡剂用量、放罐时间等发酵条件，使下游分离过程更为方便、经济。

发酵与分离耦合过程的研究源自 20 世纪 70 年代，近年来逐步得到发展（图 1.4）。此过程的主要优点是可以解除终产物的反馈抑制效应，提高转化率，同时可简化产物提取过程，缩短生产周期，增加产率，收到一举几得的效果。

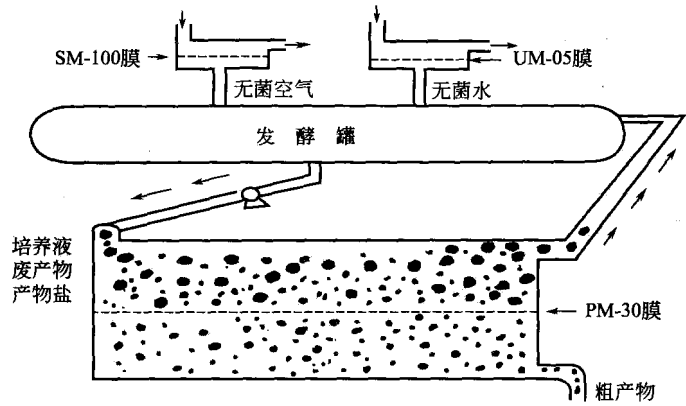


图 1.4 发酵罐与膜分离技术的耦合

③ 生化分离技术规模化工程问题的研究。生物技术产品的工业化往往需要将实验室技术进行放大，需要借助化学工程中有关“放大”效应、“返混”、“质量传递”、“流体输送”等基本理论，结合生化分离过程的特点，研究大型生化分离装置中的流变学特性、热量和质量传递规律，改善设备结构，掌握放大方法，达到增强分离因子、减少放大因子、最终提高分离效果的目的。

与上述几点相符合的一个提法是认为，生化分离技术过程发展的新趋势为高效集成化。过程集成是一般化学加工过程的重要研究方向，生化分离技术的高效集成化的含义在于利用已有的和新近开发的生化分离技术，将下游过程中的有关单元进行有效组合（集成），或者把两种以上的分离技术合成为一种更有效的分离技术，达到提高产品收率、降低过程能耗和增加生产效益的目标。

纯化能力合而为一的扩张床吸附技术等。这类融合技术将两种技术的优势结合起来，往往具有选择性好、分离效率高、步骤简化、能耗低等优点。

② 生化分离技术（下游技术）与发酵工艺（上游技术）相结合或称耦合，形成系统工程。此方面的含义有两层，一是上游技术和下游技术的改良要紧密联系，通盘考虑，可通过改进上游因素，简化下游分离提取过程；二是把发酵、分离作为一个耦合的过程来进行。

菌种选育和工程菌构建以及培养基和发酵

生化分离技术或过程的高效集成化研究目前还很肤浅，尚未大规模应用；研究的目标产物液大多局限在简单分子，对于基因工程蛋白质以及有重要应用价值的其他生物活性物质的分离则研究得很少，对有关新技术的分离机理、控制因素、模型化等方面的研究还处于初步摸索阶段。但是应该看到研制和发展生化分离过程的高效集成化技术是改进和优化生物下游处理过程的重要手段之一，也是生物工程在 21 世纪得到高度发展的重要保证，这种集成化技术不仅会加强和改善发酵液和基因工程菌培养液的分离手段，而且对天然物质中高价值的有效物质提取和分离过程的改进也会有明显的指导意义和借鉴作用。因此，生化分离过程的高效集成化的现实作用相当重大，潜在的发展前景是十分美好的。

思考题

1. 简述生化分离技术在生物技术中的地位和主要作用。
2. 简述生化分离技术的主要种类及特点。
3. 何谓生化分离技术的集成化概念？请举例加以说明。
4. 说明生化分离的主要步骤并指出胞内产物和胞外产物的分离纯化流程不同之处。

参考文献

- [1] 严希康. 生化分离工程. 北京：化学工业出版社，2001.
- [2] 赵永芳. 生物化学技术原理及应用. 北京：科学出版社，2002.
- [3] 俞俊棠等. 新编生物工艺学（上、下册）. 北京：化学工业出版社，2003.
- [4] 袁辉. 药物蛋白质分离纯化技术. 北京：化学工业出版社，2005.
- [5] 余冰宾. 生物化学实验指导. 北京：清华大学出版社，2003.

第二章 生物样品的预处理

第一节 概 述

生物样品中往往含有大量有机物、无机物及各种微量元素等，因此对目标组分进行初步富集和分离，对干扰组分进行初步去除等工作都属于预处理。

初级分离阶段一般位于生物反应之后，其任务是分离细胞和培养液，破碎细胞释放产物，溶解包含体，复原蛋白质，浓缩产物和去除大部分的杂质。

预处理的材料种类主要是来自各种生物反应的悬浮液，包括动物细胞培养液、植物细胞培养液、微生物发酵液、动物血液、乳液和动物植物组织提取液等。这些悬浮液有如下特征：目标产物浓度普遍比较低，悬浮液中大部分是“水”，组分非常复杂，是含有细胞、细胞碎片、蛋白质、核酸、脂类、糖类、无机盐类等多种物质的混合物；分离过程很容易发生失活现象，pH、离子强度、温度等变化常常造成产物的失活；性质不稳定，易随时间变化，如被空气氧化、微生物污染、蛋白水解作用等。根据上述性质，分离过程应迅速，并注意控制操作温度和pH值，减少或避免与空气接触受污染的机会，总体设计好各组分的分离顺序。

本章主要介绍不同来源不同种类的化合物提取时材料的预处理方法、各种细胞破碎的方法原理及初步富集和分离常用的各种沉淀技术。

第二节 动植物材料预处理

一、植物组织提取物的制备

植物组织提取物的制备，往往要根据不同部分组织的特点及材料的具体情况来进行处理。下面以典型的生物大分子为例，说明植物组织提取的主要方法和策略。

(一) 植物组织中酶的提取

1. 概述

植物组织中所存在的酚类化合物使植物中提取酶的过程变得复杂。在植物中酶和酚类化合物处于相互间隔分离的状态，但当植物组织被破坏时，酶和酚类化合物便开始处于混合接触状态，很易发生反应。反应产物苯醌和单宁酸类化合物还会继续和酶蛋白质反应，往往会使得目的酶失去活性，为分离得到有活性的酶，必须考虑从组织中去除酚类化合物。

2. 酚类复合物的形成及对酶提取的影响

酚类复合物，包括单体和聚合物，一开始是由酶和其他蛋白质非共价键结合，这种结合最初是可逆的，游离的苯酚特别是相邻的羟基很可能与蛋白质形成氢键，但当多酚物质的邻苯二酚残基被氧化为邻苯醌，后者通过共价键再与蛋白质分子中的自由氨基以及巯基结合，这种结合就属于不可逆的结合了。

单宁与蛋白质聚合的模型一般包含两个阶段：一开始，单宁通过自己的芳香环残基连接到位于疏水性的表面，这个结合会加强位于酚类和蛋白质附近极性区域的氢键作用，最终这个产