生物化学实验技术丛书

生物化学制备技术

苏拔贤 主编

科学出版社

China

生物化学实验技术丛书

生物化学制备技术

苏拔贤 主编

科学出版社

1986

China

内 容 简 介

生化制备技术涉及面很广，包括材料处理、提取、各种分离手段的使用，以至浓缩、结晶、纯度测定和保存等内容。由于生化物质种类繁多，制备方法多种多样，不可能有一个统一操作规程，因此，本书着重介绍实验的设计思路、有关分离技术的原理和实验条件的选择，并列举各种例子加以说明。书末并附有各类生化物质制备的参考文献。

本书可供生物化学、生物学、医药、食品工业技术人员及有关大专院校师生参考。

生物化学实验技术丛书
生 物 化 学 制 备 技 术
苏拔贤 主编
责任编辑 赵甘泉
科学出版社 出版
北京朝阳门内大街137号
中国科学院印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售
*
1986年1月第 一 版 开本：787×1092 1/16
1986年1月第一次印刷 印张：20 1/2
印数：0001—4,200 字数：467,000
统一书号：13031·3053
本社书号：4062·13—10
定价： 4.80 元

编　者　的　话

在二十世纪有了惊人发展的生物学中，生物化学是最活跃的分支学科之一。促使生物化学迅速发展的重要因素之一是新技术的开发。

过去一、二十年间生物化学的实验方法日趋专门化和复杂化，牵涉到生化实验工作的领域也越来越多。今天，农业、工业、医学、环境以及生命科学等的研究都涉及生物化学研究，生化实验已成为常规的实验操作了。因此，对于开始进行生化研究的工作者，或者要开拓自身专业领域以外生化研究领域的工作者来讲，都希望能有一本合适的实验指导书。有鉴于此，科学出版社于 1977 年夏委托中山大学在广州召开了由国内从事生化工作的部分研究所（中国科学院上海生物化学研究所、中国科学院微生物研究所）、大学（中山大学、北京大学、武汉大学、南开大学、南京大学、复旦大学）、工厂（江门甘蔗化工厂、生物化学研究所东风生化试剂厂）参加座谈会，拟定了编写一套切实可行，供有关工作者随时查阅参考的《生物化学实验技术丛书》。

本《丛书》各册编写的内容是建国以来国内已经应用、开展或正在开展的生化技术。随着我国生化研究工作的进展，国外新技术的引进，国内独创技术的开展，将不断补充新的内容。

本《丛书》着重在实验技术，各册内容力求做到：

（1）理论部分简洁明了，实验部分力求重复性高；

（2）直接触及实验设计的各项要领；

（3）指出实验操作中应注意的地方；

（4）尽可能多的举例说明。

本《丛书》的编写，虽经大家共同努力，但缺点错误在所难免，热情希望读者批评指正。如果本《丛书》的出版，能推动生物化学的进展，为实现科学技术现代化作出一些贡献，编者将感到十分高兴。

前　　言

《生物化学制备技术》分册，内容包括生物化学制备技术特点、实验设计原理，有关生化制备一些常用方法如提取、沉淀、过滤与超滤、结晶、浓缩与干燥、样品保存，以及在分离纯化时使用较多的色谱法、超离心技术等。与制备有关的分析鉴定方法，则分别由其他分册予以介绍，使本分册篇幅与其他分册大致相同。

尽管如此，生化制备技术所涉及的面还是很宽的，任何一类生化物质的制备方法或制备方法中某一技术都可以写成一本专著。在实际工作中我们还体会到各类生化物质制备的方法、手段是很不相同的，即使同一种生化物质也有多种制备方法，就是同一生化物质，采用同一制备方法，也因材料差异、设备和条件的不同、工作人员的习惯经验等彼此工艺流程并不一样。所以本分册编写的指导思想，一方面是作为《生物化学实验技术丛书》整体的一部分，内容选择上与其他分册互相呼应、互相补充；另方面希望通过本书的介绍，使读者对生化制备技术有一比较系统认识。因此，在内容方面我们尽可能把有关技术原理讲清楚，并适当多举一些例子加以说明，企图使理论与实例结合起来，起到触类旁通的作用。同时在本书末尾，附上各类生化物质制备及测定的参考资料，以便读者查阅。

参加本书编写的有：苏拔贤、程明哲、卓肇文、劳子谦。附录部分由粟舜英编译。编写过程中，上海生物化学研究所东风生化试剂厂顾涵英同志、香港中文大学生化系江润祥教授等均先后赠送了大量珍贵图书资料。本书初稿完成后，得到北京大学王镜岩副教授、中山大学曾淑云副教授、陈俊民副教授等在百忙中给予审阅并提出了许多宝贵意见。全书编写得以完成，还由于江门甘蔗化工厂、中国科学院微生物研究所、上海生化制药厂和中山大学生化教研室同志们具体帮助和积极支持的结果，在此仅向这些同志致以最衷心的感谢！

由于我们水平所限，实践经验很少，书中肯定存在不少错误和缺点，恳请读者批评指正。

苏拔贤

1983.8.

目　　录

第一章　生物化学制备技术特点及实验设计原理 …… 1
第一节　生物体组成及生物分子间的作用力 …… 1
一、生物体组成成分 …… 1
二、生物分子间的作用力 …… 2
第二节　生化分离制备方法特点及基本原理 …… 6
一、生化分离制备方法特点 …… 6
二、生化分离制备方法基本原理 …… 7
第三节　生化分离制备实验的设计及实验方法的选择 …… 8
一、生化分离制备实验的设计 …… 8
二、分离纯化各阶段对实验技术的选择 …… 16
参考文献 …… 22
第二章　提取及溶剂分离法 …… 23
第一节　引言 …… 23
第二节　选用的溶剂与物质溶解度的一般规律 …… 23
第三节　影响物质溶解度的几个主要因素 …… 26
一、离子强度 …… 26
二、PH 值 …… 26
三、温度 …… 27
四、去垢剂 …… 27
第四节　固一液萃取中扩散作用的应用 …… 27
第五节　液一液萃取时分配定律的应用 …… 28
第六节　提取时对具有生理活性物质的保护措施 …… 29
第七节　各类物质的提取分离 …… 30
一、蛋白质和酶的提取分离 …… 30
二、核酸的提取分离 …… 37
三、脂类化合物的提取分离 …… 44
四、其他脂溶性生化物质的提取分离 …… 45
五、糖、氨基酸及其他水溶性生化物质的提取分离 …… 47
六、植物次生物质的提取及溶剂系统分离的选择 …… 48
参考文献 …… 49
第三章　沉淀及沉淀剂 …… 51
第一节　引言 …… 51
第二节　盐析法 …… 51
一、基本原理 …… 51
二、影响盐析的若干因素 …… 53

三、一般常用的中性盐盐析方法 …… 56
第三节　有机溶剂沉淀法……61
一、基本原理 …… 61
二、有机溶剂的选择及浓度计算 …… 62
三、有机溶剂沉淀的影响因素及注意事项 …… 64
四、有机溶剂沉淀法实例 …… 65
第四节　等电点沉淀法……68
第五节　生成盐类复合物沉淀法……68
第六节　选择性变性沉淀法……72
第七节　非离子多聚物沉淀法……73
一、基本原理 …… 73
二、应用方法和范围 …… 74
三、应用实例 …… 76
第八节　其他沉淀剂……78
一、氨基酸类 …… 78
二、大分子核酸类 …… 78
三、粘多糖类 …… 78
参考文献……79
第四章　生物小分子常用色谱分离法……80
第一节　吸附色谱法……81
一、吸附过程的本质 …… 81
二、常用吸附剂的特性和应用 …… 82
三、吸附柱色谱的实验技术 …… 86
第二节　离子交换色谱法……88
一、离子交换剂的类型 …… 88
二、离子交换树脂的性质 …… 91
三、离子交换的动力学 …… 93
四、离子交换剂的选择 …… 94
五、离子交换色谱法的应用 …… 97
第三节　高效液相色谱法……99
一、引言 …… 99
二、高效液相色谱仪概述 …… 100
三、高效液相色谱的固定相填料 …… 103
四、色谱方法的选择 …… 104
五、分离度的调整 …… 104
六、具体操作及注意事项 …… 108
参考文献…… 111
第五章　生物大分子的色谱分离法…… 112
第一节　多糖基离子交换剂色谱法…… 112
一、多糖基离子交换剂的分类 …… 112
二、实验操作技术 …… 114

三、应用实例 …… 117
第二节　分子筛色谱 …… 119
一、分子筛色谱的基本原理 …… 119
二、常用凝胶的结构和性质 …… 121
三、分子筛色谱的实验技术 …… 127
四、分子筛色谱的应用 …… 129
第三节　亲和色谱 …… 135
一、基本原理 …… 135
二、载体的选择 …… 136
三、琼脂糖的活化及其衍生物的制备 …… 138
四、亲和色谱条件的选择 …… 140
五、亲和色谱应用举例 …… 141
第四节　色谱聚焦 …… 145
一、色谱聚焦的原理 …… 146
二、多缓冲剂 …… 147
三、多缓冲交换剂 …… 148
四、操作步骤 …… 149
五、应用实例 …… 152
参考文献 …… 153
第六章　制备离心技术 …… 155
第一节　引言 …… 155
第二节　一般制备离心 …… 156
一、过滤式离心机 …… 156
二、沉降式离心机 …… 157
三、分离式离心机 …… 158
四、一般制备离心机的选择 …… 158
第三节　制备超离心 …… 159
一、原理和计算 …… 160
二、制备超离心的方法及其选择 …… 163
三、转子、离心管及其选择 …… 168
四、梯度、梯度介质及其选择 …… 173
五、制备超离心的操作 …… 177
六、制备超离心实例 …… 184
参考文献 …… 187
第七章　过滤与膜分离技术 …… 189
第一节　过滤 …… 189
一、过滤速度 …… 189
二、提高滤速的主要措施 …… 189
三、生化工业常用的过滤装置 …… 194
第二节　膜分离技术 …… 197
一、透析 …… 198

二、超滤 …… 204
三、电渗析和离子交换膜电渗析 …… 218
参考文献 …… 220
第八章　结晶方法 …… 222
第一节　结晶与晶体一般性质 …… 222
第二节　生化物质形成结晶的条件 …… 223
一、样品纯度 …… 223
二、溶液的饱和度 …… 224
三、溶剂的选择 …… 225
第三节　晶核形成及晶体生长的影响因素 …… 226
一、晶核的形成及诱导方法 …… 226
二、影响结晶生成的因素 …… 226
第四节　结晶衍生物及重结晶 …… 228
一、结晶衍生物 …… 228
二、重结晶 …… 228
第五节　结晶的一般方法 …… 229
第六节　有关蛋白质结晶的几项技术 …… 231
一、抽提结晶技术 …… 231
二、蛋白质微量结晶技术 …… 233
参考文献 …… 237
第九章　浓缩与干燥 …… 239
第一节　浓缩 …… 239
一、蒸发 …… 239
二、吸收 …… 252
三、膜浓缩 …… 253
四、冰冻融化 …… 255
五、其他 …… 256
第二节　干燥 …… 256
一、影响干燥的因素 …… 256
二、常压吸收干燥 …… 257
三、真空干燥 …… 259
四、冷冻干燥 …… 260
五、喷雾干燥 …… 264
六、滚筒干燥 …… 266
参考文献 …… 267
第十章　样品的保存 …… 269
第一节　样品的保存与环境条件的关系 …… 269
第二节　样品保存的一般方法 …… 270
第三节　各类生化物质的保存 …… 273
一、蛋白质的保存 …… 273
二、核酸的保存 …… 276

三、油脂的保存 …… 276
四、细胞及生物制剂的保存 …… 277
五、小分子生化物质的保存 …… 281
参考文献 …… 282
附录一　各类生化物质制备及测定的参考资料 …… 284
附录二　部分国际单位换算及缓冲液配制方法 …… 305

第一章　生物化学制备技术特点及实验设计原理

苏　拔　贤

第一节　生物体组成及生物分子间的作用力

一、生物体组成成份[1,2]

现知地球上约有一百八十多万种动、植物(包括微生物)，从最简单的病毒、细菌直至最复杂的人类，不论它们之间形态上多么不同，但它们最基本组成成份都含核酸和蛋白质两类物质。核酸是遗传信息的携带者，在生物体内指导着各种蛋白质的合成，决定着每一生物个体和种族的差异。蛋白质则担负着机体的生长、发育、感觉、运动、保护、运输营养物质和氧气，消灭外来疾病因素等多种重要生理功能。进化比较高级的生物体，其组成成份除了核酸和蛋白质(包括酶)两大类物质外，还含有糖类、维生素、脂类、激素以及多种多样的代谢中间产物和次生物质。

一个生物体内含有多少生物分子？以及这些生物分子结构、形状、大小如何？都是通过亿万年进化而确定的，每一种生物分子结构与功能不仅十分协调，而且每个分子在空间排列也很有次序，相互契合，并通过细胞的形式共同组织起来，执行着各种复杂生理功能，体现出生命的高级活动。

单细胞生物一个细胞就是一个完整的生命体系。多细胞生物逐渐出现高度分化的器官组织，细胞内不同的细胞器的化学组成也有明显区别。一个细胞究竟由多少生物分子组成呢？现以大肠杆菌为例，说明一个简单的细胞的分子组成。见表 1-1。

表 1-1 可以代表细菌这一类细胞的组成成份的基本情况，当然不同类型的生物、不同

表 1-1　大肠杆菌细胞中主要的分子组成[2]

组　分	总量的百分率	分子种类的概数
水	70	1
蛋白质	15	3,000
核酸 DNA RNA	 1 6	 1 1,000
糖类	3	50
脂类	2	40
基本单位分子与中间产物	2	500
无机离子	1	12

类型的细胞其组成分子种类和概数是不相同的，有的差异很大，有的差异较小。但在同一个细胞内各类的分子分布大致有一个规律，在真核细胞中，脱氧核糖核酸（DNA）大部分存在于细胞核内，只有极少量存在于线粒体或叶绿体中。而核糖核酸（RNA）则主要存在于细胞质中。电子传递系统组成物质，包括黄素蛋白，细胞色素 c、c_1、a、a_3 以及糖类分解，脂肪酸合成和氧化，氧化磷酸化等有关酶系大部分存在于线粒体中，关于蛋白质(包括酶)和核酸两大类大分子在细胞内分布情况，现以肝细胞为例介绍于表 1-2[3]

表 1-2 蛋白质、酶及核酸在肝细胞内分布情况

细胞器名称	主要蛋白质及酶类	核酸类
细胞核	精蛋白、组蛋白、核酸合成酶等	RNA 占总量 10% 左右 DNA 几乎全部
线粒体	电子传递、氧化磷酸化、三羧酸循环、脂肪酸氧化、氨基酸氧化、脲合成等酶系	RNA 占总量 5% 左右 DNA 微量
内质网(微粒体)	蛋白质合成酶系、羟化酶类	RNA 占总量 50% 左右
溶酶体	水解酶系(包括 RNA 酶、DNA 酶、磷酸脂酶、硫酸酯酶、脂酶、组织蛋白酶、糖苷酶等)	
高尔基氏体	糖苷转移酶、粘多糖及类固醇合成酶系	
细胞膜	载体与受体蛋白、抗原 ATP 酶、环化腺苷酶、5′-核苷酸酶以及多种脂蛋白及糖蛋白	
细胞汁	嘧啶和嘌呤代谢物、氨基酸合成酶系、各种可溶性蛋白	RNA(主要是 tRNA)占总量 30%

由上两表可见，一个细胞包含着成千成万种分子，每种分子每时每刻都在变化运动中，就像一座小小的"化工厂"一样，分成许多车间，有着各种各样的机器，不断消耗着各种原料，产生出各种产品；这处产品运到别处又变成了原料，重新合成或分解成另一产品，直到最后变成最简单的 CO_2、尿素、H_2O 或一些"低值"废物排出体外。生化分离制备的目的，就好像是把这一"工厂"里某一机器的"部件"或"产品"巧妙地、毫无损伤地分离出来。研究其结构，了解其功能或作为一种药物和原料满足人类社会生产和生活需要的一种手段。

二、生物分子间的作用力[4,5]

存在于地壳上的元素已知有九十多种，而组成生物体的元素不过二十多种，其中最重要的元素是碳。以碳为主链连结氮、氧、氢、磷、硫等元素，通过共价结合，组成各种原始生物小分子的骨架，如氨基酸、核苷酸、单糖、甘油、脂肪酸等。我们把这些原始生物分子看成是生命组成的基本结构单位。然后这些小分子通过共价缩合而成各种各样生物大分子，如蛋白质、酶、核酸、多糖等。大分子与大分子，或大分子与小分子之间又常常相互结合形成更大的复合分子，如脂蛋白、糖蛋白、核蛋白等。蛋白质、核酸等生物大分子除了一级结构外，还有二、三、四级结构。生物大分子还可以再聚合成生物超分子复合物，如核糖体便是一个超分子结构复合物。每个核糖体含有一个大亚基，一个小亚基，每个亚基约含有 65%RNA、35% 蛋白质。各种细胞器实际上是由超分子复合物所组成，最后再由不同结构的细胞器建造成细胞。因此，我们欲把细胞中各种生物分子相互间的结合拆开，就

需要了解这些分子结合的力(或称化学键)的有关性质,然后才能使用相应的措施把它们彼此分离出来,这就是我们生化制备实验设计的主要对象及目的。现在简单地就一些主要生物大分子内及分子之间的作用力讨论如下:

(一) 共价键

这是组成各种生物分子元素及基团之间“连结”主要化学键。共价键又称原子键,是指由两个原子通过共用电子对而产生的一种化学键。若电子对是由两个原子平均共有称为非极性共价键。如电子对偏于某原子一侧使整个分子产生极性,称极性共价键。极性键的极性渐增至电子对脱离一个原子而为另一原子所单独占有时,即变为离子键(如图1-1所示)。因此,离子型化合物是一种极性最强的化合物。

上面所述是由二个原子共同提供电子对所形成共价键,如果两个原子之间,由某一原子单方面提供共用电子对所形成的共价键称为“配位键”。许多含有金属离子的蛋白质分子,金属离子与蛋白质的连接大都是配位键。

蛋白质分子内每一个氨基酸的氨基与另一氨基酸的羧基之间脱水缩合形成肽键,核酸分子内每一个核苷酸的磷酸基团与相邻的另一个核苷酸的戊糖上的羟基脱水缩合形成磷酸二酯键。多糖分子内前后单糖上羟基脱水缩合形成的糖苷键都是共价键。现以蛋白质为例,介绍一些共价键的键长及键能如表1-3。

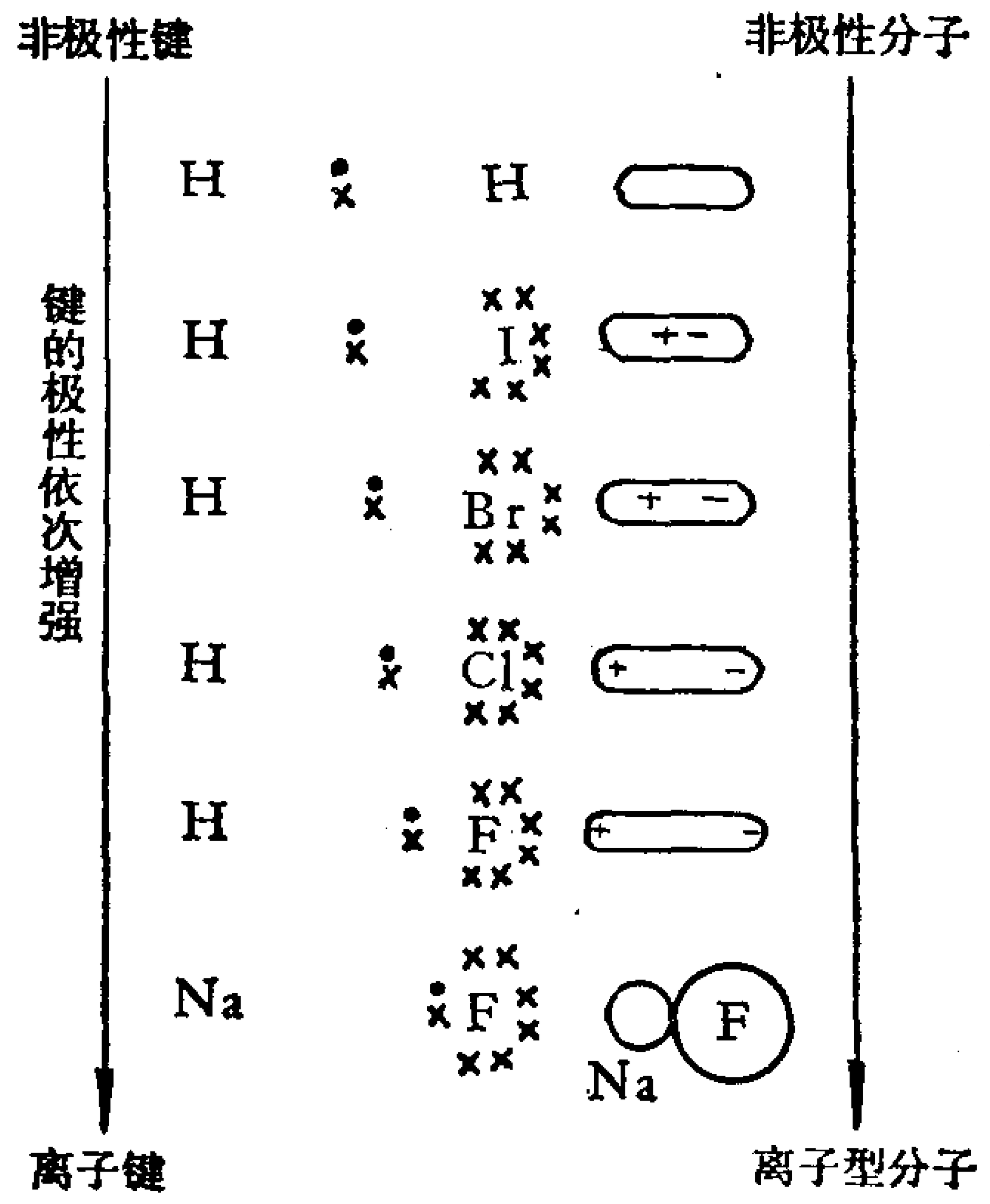

图 1-1 由非极性分子过渡到离子型分子示意图

表 1-3 蛋白质中共价键键长及键能

共 价 键	键长(Å)	键能(KJ/克分子)
C—H	1.08	~378.7
C—C	1.53	276.9
C—N	1.47	232.2
C═N	1.30	468.6
C—N(肽键)	1.32	
C—S	1.81	246.8
C═O	1.24	665.2
O—H	0.96	462.7
N—H	1.01	352.7
S—N	1.33	366.9
S—S	2.08	266.9
P—O	1.66	~335.0

1 卡(cal)= 4.1868 焦耳(J)

从表1-3中可以看到,共价键的键能一般在230至660千焦(KJ)之间,其中肽键(—C—N—)与二硫键(—S—S—)都具有双键性质,肽键不能沿着—C—N—轴自由转动,二硫键不能沿着—S—S—轴自由转动。肽键是蛋白质一级结构中主要共价键,二硫键是维系蛋白质空间结构最强有力的桥键。而磷酸酯键则是核酸一级结构的主要共价键。

(二) 非共价键或非共价键作用力

生物体内的生物大分子如蛋白质、酶、核酸、多糖等的空间结构和分子之间的作用力,

主要是通过非共价的静电引力、氢键和范德瓦耳斯力(Van der Waals')等联系而成。其中除离子键的键能与共价键相近外，其它键的键能一般都小于40千焦(KJ)，而键长则长达3—5Å左右。组成生物分子共价键的强度、方向或其它性质受环境影响较少，而非共价键的性质受环境影响较大。下面我们分别介绍一些非共价键作用力的性质：

1. 离子键(或称离子时，有时称为盐键或盐桥)　离子键指相反电荷的静电作用力，这一作用力与两个带电基团带电量的乘积成正比，与两个基团距离平方成反比，称为库伦定律，可用下式表示：

$$F=\frac{q_1q_2}{D\gamma^2}$$

q_1q_2 表示二个带电基团的带电量。D是介电常数，即介质对有相反电荷微粒之间静电引力影响的数值，常定义为在真空中与在介质中这种带电微粒之间的电位差比。γ 为二个基团的距离。

生物大分子能形成离子键的带电基团很多，如蛋白质分子中的带正电基团有胍基、ε-氨基，N-末端的氨基、咪唑基等，带负电的基团有C-端羧基，天门冬氨酸的β-羧基，谷氨酸的γ-羧基等，都可以相互形成离子键。但离子键在水中，因水的介电常数很高，带电基团受屏蔽，从而使正负电荷相吸引的能力大大减弱。所以分布在蛋白质分子表面的带电基团，实际形成离子键的机会并不多，主要是把水分子吸引在自己周围形成水合层，使蛋白质具有亲水性质。

在核酸分子中的磷酸基团有时候也与蛋白质分子中碱性基团以离子键相结合(如组蛋白、核蛋白)，另某些酶，如胆碱脂酶、酶分子和底物胆碱的结合，也是通过离子静电引力相互作用的。

2. 氢键　在化合物分子中，凡是和负电性较大的原子相连的氢原子(如O—H，N—H，F—H)都可以和同一分子或别的分子上另一负电性较大的原子形成氢键。水、乙醇、醋酸等分子的缔合现象和蛋白质、核酸分子立体结构的维系都和氢键有关。氢键的键距比普通的化学键长，约为2.63至3.10Å。键能比普通化学键弱，一般只有12—34千焦/克分子。氢键还具有方向性，当氢键供体与受体上N、H、O、C等原子在一直线上时，键的强度最大。约为33千焦。在水溶液中，氢键的产生和交换都以很高速度进行。这对生物分子表现其生理活动有着重要的作用，也是生物大分子形成立体构型的主要推动力之一。

3. 范德瓦耳斯力(Van der Waals')　范德瓦耳斯力主要包括三种弱的静电引力：

(1) 非极性分子内部电子运动的不对称，产生瞬时极性现象，以及由于这一现象所引起周围电子分布的变化所产生的作用力，也称色散效应或London分散力。

(2) 极性基团之间偶极与偶极相互吸引力(也称定向效应)。

(3) 非极性分子与极性分子接近，在分子内造成的偶极诱导作用(也称诱导效应)。

范德瓦耳斯力总的表现趋势是偶极之间互相吸引，但当两个基团距离很近时排斥作用又占主导地位。范德瓦耳斯力的键距约为3—4Å，其能量比氢键还弱，在水中或一些极性介质中单独起作用不大，但分子中存在许多偶极，这些偶极相互作用所得的范德瓦耳斯力则是很大的。范德瓦耳斯力还具有某些特点，如它一方面可以使分子之间具有吸引能力，同时这种引力又必需使二个分子保持一定距离。这种特殊作用力对于酶和底物，抗

原和抗体的结合和解离有着重大意义。

4. 疏水基相互作用 疏水基相互作用，以往常称为“疏水键”。虽“疏水键”这一词不确，因习惯了现姑用之。它对于维持蛋白质、酶、核酸等大分子立体结构起着重大作用。这些大分子通常都有亲水区域和疏水区域，疏水区域一般位于分子内部，也常是酶与底物，抗原与抗体相互结合的地方。

蛋白质和核酸分子的疏水键主要是蛋白质分子中缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸等一些疏水性基团及核酸分子中嘌呤、嘧啶碱基之间的非极性侧链粘结在一起而形成的。这些非极性疏水基团相互粘合在一起，可以解释为非极性基团为了避开水而被迫相聚的自然趋势。在疏水区域，极性基团一般很难离子化，并造成与自由水溶液十分不同的化学环境。有机溶剂能降低溶液介电常数，故可导致疏水键的破坏，反之，盐类可使非极性基团在水中溶解度减少，可使疏水键增强。

（三）水在各种非共价作用力中的作用

没有水，生命便不可能形成。在生物化学反应中，水不仅是一种良好的溶剂，也是在各种生化反应中提供 H^+ 和 OH^- 的主要源泉。同时，水还是生物分子表现生理活性的唯一天然环境。水的结构特点及对于生物分子作用力的影响可归纳如下：

（1）水分子由一个氧原子和两个氢原子组成，由于分子不对称的空间构型，其中氧原子具有负极作用，而相邻的二个氢原子则合成偶极分子中的正极。二个氢原子核与氧原子核连线之间形成的夹角约为105°，是一个高度极化的极性分子，具有很高的介电常数，图1-2是水分子结构示意图。

（2）由于偶极分子中场力的作用，水分子彼此吸引而缔合，很少单独存在。每个水分子通过氢键可与另外四个水分子配价，形成四面体“冰格”的结构，随着周围条件的变化，结构中的氢键不断破坏又不断形成，水分子间这种独特结构使水有极高的内聚力。

（3）水溶液中的水分子因自身形成氢键的趋势极强，故水分子的存在可使其它分子形成氢键能力减弱，水分子还可以减弱离子键的相互作用，而增强非极性疏水键的相互作用。

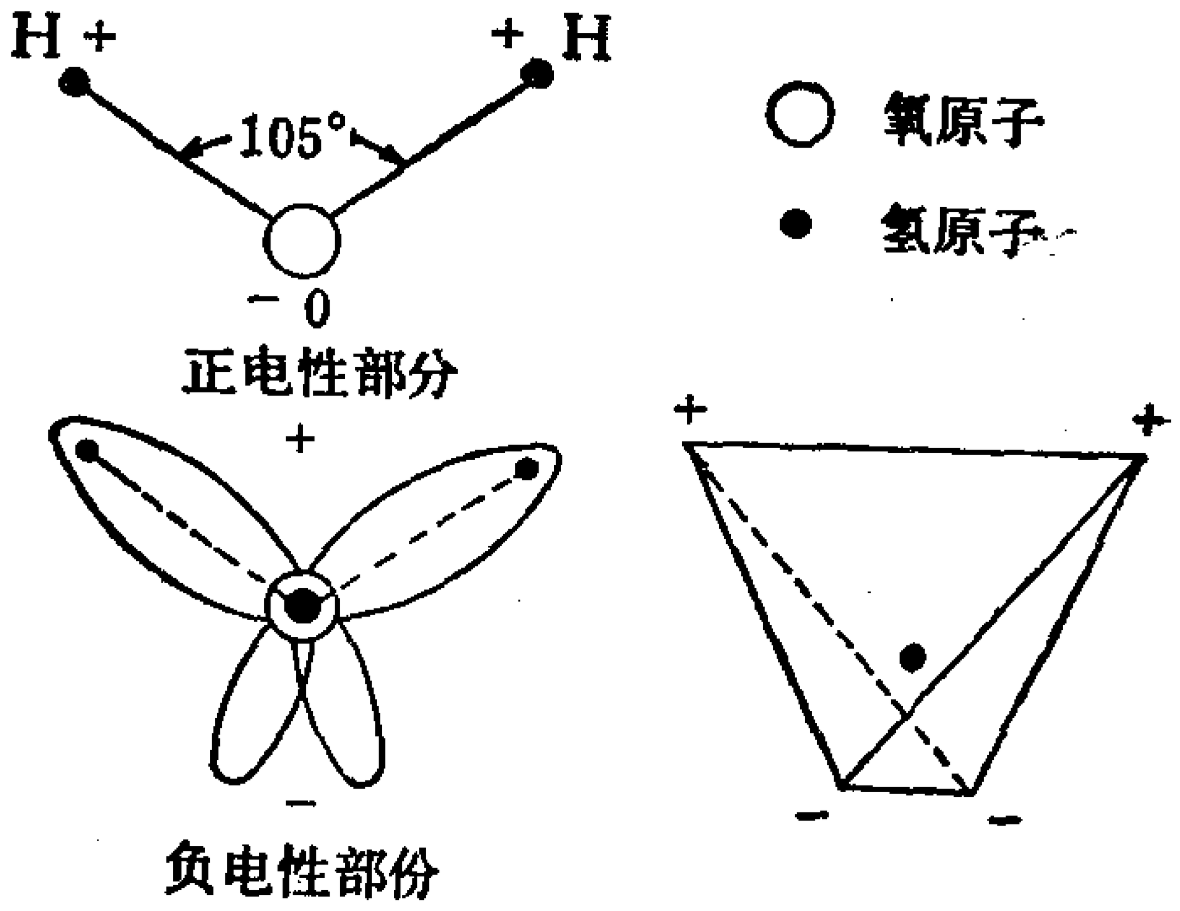

图 1-2 水分子结构示意图

（4）通过氢键的缔合作用，许多生物分子如多糖、淀粉、蛋白质、核酸等分子中的羟基或氧、氮等原子都可以通过氢键与水结合，从而具有巨大的水合或称“水化”能力。

上述关于一些生物分子中的结合力及分子间的作用力的简单介绍，可以看到生物体系中分子结构及分子之间联系的作用力十分复杂。作为一个生物分子，其基本骨架各原子及基团之间都是共价结合，整个分子一级结构是比较稳定的。但分子与分子间的连结主要通过一些非共价键如氢键、盐键、金属键、范德瓦耳斯引力所维系，其键能较弱，而且键的性质差别较大，故可采取不同方法使之分离，而不损伤其分子基本结构。但须注意的是许多生物大分子的二、三级立体结构也是一些非共价结合，因此分离时就必须十分小心，使其立体结构不受破坏。故常常保持在十分温和的条件下，以避免由于强烈的外界因

子而丧失其生理活性。这就是生化分离制备技术与有机化学分离制备技术最重要区别之处。

第二节　生化分离制备方法特点及基本原理

一、生化分离制备方法特点

混合物中各组分的分离是化学科学中一个重要内容，但某些经典的化学分离方法如蒸馏、熔炼等，对具有特殊生理活性物质的分离是不适合的。许多生理活性物质如蛋白质、酶、核酸等的分离已给经典的化学分离方法带来了新的课题，并有力地推动了化学分离技术向另一分支——生化分离技术的发展。生化分离技术由实验目的的不同，可分为生化分离分析和生化分离制备二个方面。前者主要对生物内各组份加以分离后进行定性，定量鉴定，它不一定要把某组份从混合物中分离提取出来。而后者则主要是为了获得生物体内某一单纯组份。生化制备技术与一般化学分离制备技术比较，其特点有下列几点：

第一，生物材料组成非常复杂。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，其中有不少化合物迄今还是未知物质，而且这些化合物在分离时仍不断在代谢变化中。

第二，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。如从脑垂体组织提取某些激素的释放因子，从蚕体中提取某些信息素，和从竹笋中提取竹笋素等，都是用几吨或几十吨的原料才提取到几个毫克的目的物。

第三，许多具有生物活性的化合物一旦离开了生物体内的环境，很易变性、破坏。因此，在分离过程中要十分小心保护这些化合物的生理活性，这是生化制备最困难的地方，许多生物大分子在分离过程中，过酸、过碱、重金属离子、高温、剧烈的机械作用、强烈的辐射和机体内自身酶的作用均可破坏这些分子的生理活性。故分离具有生物活性的生物分子，特别一些生物大分子，常选择十分温和条件，并尽可能在较低温度和洁静环境下进行。

第四，生化分离方法几乎都在溶液中进行，各种参数(温度、pH 值、离子强度等)对溶液中各种组成综合影响常常无法固定，以致许多实验的设计理论性不强，实验结果常常有很大经验成份。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。

第五，为了保护所提取物质的生理活性及结构上的完整，生化分离方法多采取温和的“多阶式”进行，也就是我们常说的“逐层剥皮”方法，一个生物分子的分离制备常常少至几个步骤，多至十几个步骤，并不断变换各种分离方法，才达到纯化目的。“多阶式”的分离制备方法操作时间长，手续繁琐，常常会给制备工作带来许多影响。近年来出现所谓“钓鱼法”，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，这一方法目前虽只用于某些大分子如酶、抗体和核酸等的分离提纯工作，但比起任何经典化学方法都具有很大的优越性。

第六，生化分离方法最后均一性的证明与化学上纯度的概念并不完全相同。这里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，故对其均一性的评定常常是

有条件的，或者只能通过不同角度测定，最后才能给出相对的"均一性"结论。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。

二、生化分离制备方法基本原理

生化分离方法与一般化学分离方法虽然有着许多不同特点，但生化分离方法与一般化学分离方法原理上又有许多是相同的或者说是相通的地方，这充分说明反映了近世纪来生物化学的发展与经典化学及物理学的密切关系。用于生物化学分离的制备技术，大都根据混合物中的不同组份分配率的差别把它们分配于可用机械方法分离的两个或几个物相中(如有机溶剂抽提、盐析、结晶等)。或者将混合物置于某一物相（大多数是液相）中，外加一定作用力，使各组份分配于不同区域，从而达到分离目的(如电泳、超离心、超滤等)。除了一些小分子如氨基酸、脂肪酸、某些维生素及固醇类外，几乎所有机体中大分子物质都不能融化，也不能蒸发，只限于分配在固相和液相中，

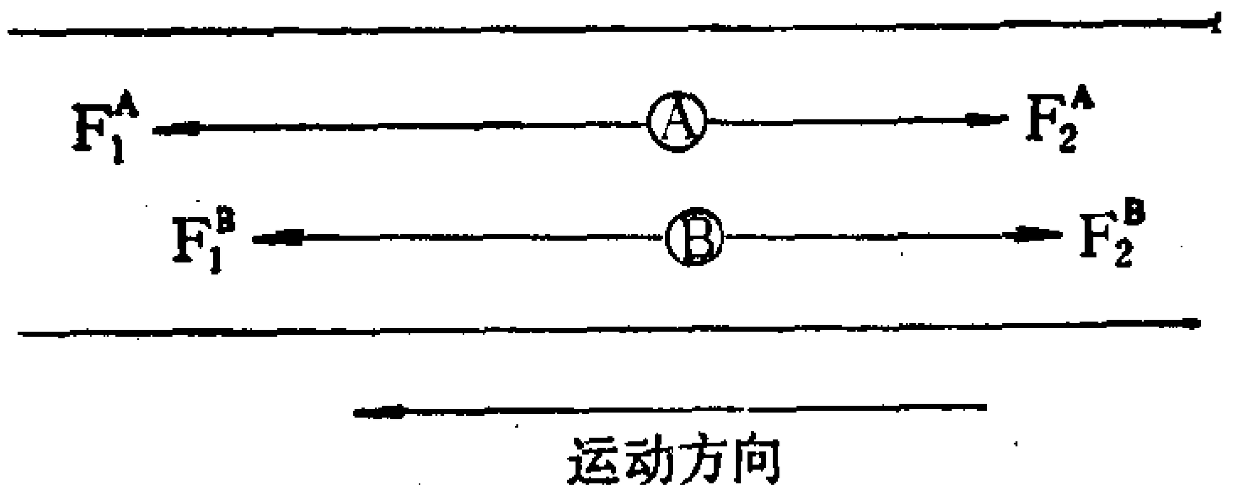

图 1-3　分离时，溶质分子所受的不同作用力示意图

表 1-4　生化分离方法分类表[6]

分离方法	推动力 F_1	阻　滞　力 F_2	占优势的作用力	分离主要依据
一、色谱				
(a) 吸附	流体动力	表面能，范德瓦耳斯力位阻效应	F_2	极性、位阻因素
(b) 离子交换	流体动力	静电吸引力，极化度分子筛效应	F_2	离子性质及分子大小
(c) 分配	流体动力	渗透(扩散)，偶极作用，缔合和解离效应	F_2	极性因素
(d) 分子筛	流体动力	渗透作用	F_2	分子大小
二、逆流分配	机械作用	渗透，缔合和解离效应	F_2	极性因素
三、电场力				
(a) 在自由溶液中	静电引力	分子摩擦力，极化度动电作用	F_1	离子性质
(b) 在多孔支持物中	静电引力	分子摩擦力，极化度动电作用，表面能	F_1	离子性质
(c) 在凝胶支持物中	静电引力	分子筛效应	F_1 和 F_2	离子性质和分子大小
(d) 等电聚焦	静电引力		平衡作用	离子性质
(e) 对流电泳 (Electrophoresis-convection)	静电引力 电动力 (Electrokinetic)	分子摩擦效应	F_1	离子性质
(f) 电渗析	静电引力	分子筛效应	F_1 和 F_2	分子大小和离子性质
四、扩散方法	电动力	电动力		
(a) 透析	渗透力	分子筛效应	F_2	分子大小
(b) 超滤	流体动力	分子筛效应，表面能(吸附)	F_2	分子大小
(c) 在溶液中热扩散	温度梯度 重力	分子摩擦效应	F_2	分子大小
五、结晶	结晶格子能	扩散	F_1	分子大小及形状
六、沉降				
(a) 动力学的	重力、离心力	分子摩擦效应	F_1	分子大小
(b) 等密度的	离心力		平衡作用	分子大小及介质密度