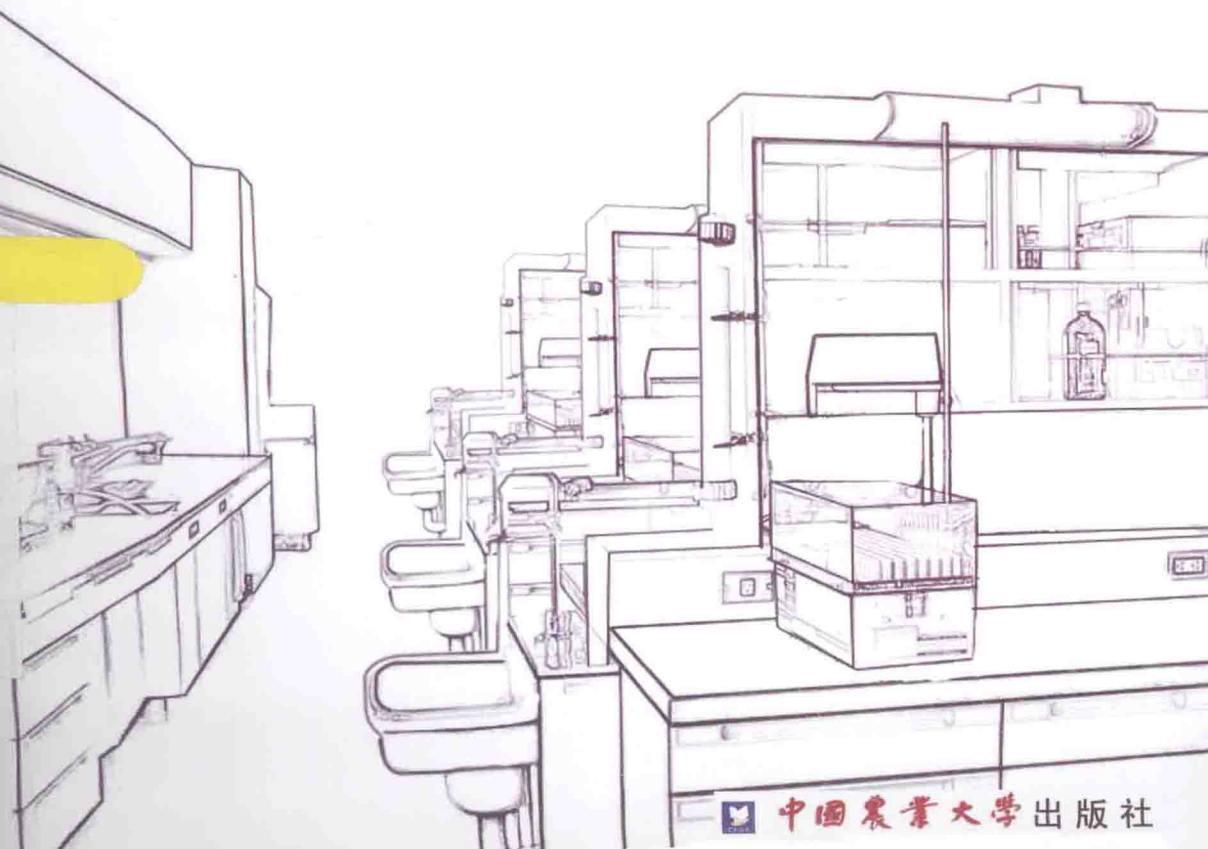


生物化学实验指导

Shengwuhuaxue Shiyan Zhidao

张 桦 主编



生物化学实验指导

第三版

主编 王德成

副主编 王德成 王德成



生物化学实验指导

张 桦 主编

中国农业大学出版社
· 北京 ·

内 容 简 介

本书主要介绍了适合高等院校农科和理工科专业学习的基础生物化学实验。全书共5章,第一章介绍生物化学基本实验技术的原理和方法,第二章到第五章是38个实验内容,按照配套教材《生物化学》的知识体系选编完成,包括基础性实验、综合性实验和设计性实验,并在各实验后附有思考题,以便于进一步理解实验内容。最后是附录,选择了生物化学实验常用的数据和试剂配制方法供参考。

本书可作为高等院校农科和理工科专业本科生和研究生讲授生物化学实验课的教材,也适合作为从事生命科学教学和科研工作人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验指导/张桦主编. —北京:中国农业大学出版社,2014.8
ISBN 978-7-5655-1055-7

I. ①生… II. ①张… III. ①生物化学—化学实验—高等学校—教学参考资料 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第191646号

书 名 生物化学实验指导

作 者 张 桦 主 编

责任编辑 潘晓丽

封面设计 郑 川

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路2号

电 话 发行部 010-62818525,8625

编辑部 010-62732617,2618

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

经 销 新华书店

印 刷 北京时代华都印刷有限公司

版 次 2014年8月第1版 2014年8月第1次印刷

规 格 787×980 16开本 16印张 288千字

印 数 1~4 000

定 价 30.00元

责任校对 陈 莹 王晓凤

邮政编码 100193

读者服务部 010-62732336

出版部 010-62733440

e-mail cbsszs@cau.edu.cn

图书如有质量问题本社发行部负责调换

编写人员

主 编 张 桦

副主编 李鸿彬 王希东

参 编(按姓氏笔画排序)

代培红 任雪艳 任燕萍 刘晓东

刘 超 李 月 苏豫梅 姚正培

倪志勇 夏木斯亚·卡坎 葛 杰

前 言

生命科学的发展在 21 世纪突飞猛进,生物化学作为生命科学各专业的基础课程,也是一门重要的实验科学,在生物学科中的地位十分重要。为了紧跟生物科技的发展,也为在生命科学领域培养创新型、高技术人才,我们结合多年在生物化学课程实践教学和改革经验,编写了这本实验指导。

本实验指导介绍生物化学技术的基本原理,希望能适应学科发展的需要,力求具有科学性、系统性和启发性。本书第一章介绍生物化学实验的基本原理和方法,第二章至第五章共 38 个实验,其中蛋白质和氨基酸类实验 11 个,酶学实验 9 个,糖、脂代谢类实验 8 个,核酸类实验 10 个,附录中列出了实验室基本操作和常用数据及常用试剂的配制,基本包括了基础生物化学课程的教学内容。本书适合作为农学和理学学科的本、专科生实验教材,同时也可作为研究生和科研人员的参考资料。

本实验指导由新疆农业大学和石河子大学从事生物化学教学的老师共同编写完成。第一章由石河子大学李鸿彬和任雪艳编写。第二章由新疆农业大学姚正培编写实验 1~5,葛杰编写实验 6~8 和实验 10,石河子大学任雪艳编写实验 9,李鸿彬编写实验 11。第三章由石河子大学李鸿彬编写实验 1~2,新疆农业大学夏木斯亚·卡坎编写实验 3~5,苏豫梅编写实验 6~9。第四章由新疆农业大学代培红编写实验 1~4,刘超编写实验 5~8。第五章由新疆农业大学刘晓东编写实验 1~3 和实验 5,倪志勇编写实验 4 和实验 9~10,李月编写实验 6~8。附录部分由新疆农业大学任燕萍编写。全书由张桦和王希东总纂、统稿。尽管我们在编写过程中尽力认真完善,但是纰漏之处在所难免,希望读者批评指正。

编 者

2014 年 7 月

目 录

第一章 生物化学实验基本原理和方法	1
第一节 生物大分子的分离纯化的一般步骤与方法	1
第二节 层析技术	12
第三节 离心技术	20
第四节 电泳技术	26
第五节 分光光度技术	28
第二章 蛋白质与氨基酸类实验	30
实验一 蛋白质和氨基酸的呈色反应	30
内容一 双缩脲反应	30
内容二 茚三酮反应	32
内容三 黄色反应	34
内容四 乙醛酸反应	35
内容五 坂口反应	37
内容六 米伦反应	39
实验二 蛋白质的等电点测定	40
内容一 pH 值沉淀法	40
内容二 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦法	43
实验三 蛋白质的沉淀反应	48
实验四 蛋白质定量测定	51
内容一 双缩脲法测定蛋白质含量	51
内容二 Folin-酚法测定蛋白质含量	53
内容三 紫外分光光度法测定蛋白质含量	56
内容四 染料结合法测定蛋白质含量	58
内容五 BCA 法测定蛋白质含量	60
实验五 脯氨酸含量测定	63
实验六 氨基酸纸层析	66
实验七 牛乳中酪蛋白制备与鉴定	69
实验八 SDS-PAGE 电泳测定蛋白质相对分子质量	71
实验九 血清免疫球蛋白 IgG 的分离纯化	75

实验十 胰蛋白酶抑制剂的分离纯化和活性测定	78
实验十一 蛋白质的双向电泳	81
第三章 酶类与维生素和辅酶实验	87
实验一 酶的基本性质	87
实验二 马铃薯多酚氧化酶的制备及性质分析	92
实验三 同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳分析	95
实验四 丙二酸对琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制作用	101
实验五 脲酶米氏常数的测定	104
实验六 植物组织中抗氧化酶的活性测定	107
内容一 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定	108
内容二 过氧化物酶(POD)的活性测定	111
内容三 过氧化氢酶(CAT)活性测定	113
实验七 酵母蔗糖酶的粗提及活力和比活力分析	115
实验八 糖化酶的固定化及酶学性质分析	119
实验九 果蔬维生素 C 的提取和定量测定	128
第四章 糖、脂类及代谢实验	133
实验一 发酵过程中无机磷的利用	133
实验二 总糖和还原糖的测定	135
内容一 3,5-二硝基水杨酸法	135
内容二 蒽酮比色法	138
实验三 可溶性糖的分离提取与薄层层析鉴定	141
实验四 天然产物中多糖的分离纯化与鉴定	145
内容一 多糖的提取、纯化	145
内容二 多糖的鉴定	148
实验五 脂类的测定	150
内容一 索氏抽提法测定粗脂肪含量	150
内容二 脂肪酸含量测定	152
内容三 血清甘油三酯简易测定	154
内容四 血清胆固醇含量的测定(磷钼铁法)	156
实验六 脂肪酸的 β 氧化	158
实验七 卵磷脂的提取和鉴定	162
实验八 丙二醛含量的测定	164
内容一 油炸方便面中丙二醛含量的测定	164
内容二 植物组织中丙二醛含量的测定	166

第五章 核酸类实验	168
实验一 薄层层析分离 AMP、ADP 和 ATP	168
实验二 核酸含量的测定	170
内容一 紫外分光光度法	170
内容二 地衣酚法	171
内容三 定磷法	173
内容四 二苯胺法	176
实验三 酵母 RNA 的提取和组分鉴定	178
实验四 植物基因组 DNA 提取	180
实验五 动物基因组 DNA 提取	183
内容一 动物肝脏组织中基因组 DNA 的提取(高盐法)	183
内容二 动物血液中基因组 DNA 的提取	185
内容三 动物传代细胞基因组 DNA 的提取	187
实验六 质粒 DNA 提取	188
实验七 核酸的琼脂糖凝胶电泳	193
实验八 植物总 RNA 的提取和电泳分析	195
实验九 核酸的酶切分析	200
实验十 PCR 技术	203
附 录	206
第一节 实验室安全防护知识	206
第二节 生物化学实验各类样品制备	210
第三节 玻璃仪器的洗涤及各种洗液的配制	212
第四节 实验的基本操作和要求	215
第五节 实验室常用仪器的使用和维护	218
第六节 常用试剂的配制与保存	220
第七节 实验室常用数据表	230
第八节 分子生物学与基因工程常用试剂及数据表	233
参考文献	244

第一章 生物化学实验基本原理和方法

第一节 生物大分子的分离纯化的一般步骤与方法

一、概述

生物大分子是指蛋白质(包括酶)、多聚糖和核酸类化合物,一般分子质量从几千到几百万。它们广泛存在于各种生物体内,与各种生命活动息息相关。除了天然存在的外,还有生物工程培养和发酵的。生物大分子具有十分重要的生理功能和应用价值。研究生物大分子的结构、功能及应用已成为生命科学的一个关键问题。蛋白质药物及其他生物制品在医药方面有着十分重要的应用前景。不论从动植物和微生物体内提取或用生物工程制备的生物大分子产品,都是组成十分复杂的混合物,在使用前都要分离和纯化。

为了研究各种生化物质的分子结构、功能和各种特性,进行生物科学和生物工程的基础与应用研究,就必须获得高纯度、具有完整结构和生物活性的各种生化物质,特别是各种生物大分子,如蛋白质、核酸、酶等。为此,首先要从生物体的组织、器官、细胞中将它们提取出来,然后再用沉淀分离等各种分离技术进行分离纯化。

二、生物大分子分离与纯化基本步骤

生物大分子分离与纯化的基本步骤主要有以下过程:

- (1)前期准备。
- (2)组织与细胞破碎。
- (3)初步分离提取。
- (4)精细分离纯化。
- (5)生物大分子含量的测定与纯化鉴定。
- (6)产品处理:浓缩、干燥和保存。

三、生物大分子分离与纯化方法

当纯化的对象选定之后,首先碰到的问题是,哪些材料中含有此物质?哪些组织中含量较丰富?其次是在从选定的材料提纯此物质的过程中,纯度是否逐渐增加?也就是说,所用的纯化方案是否合适?要回答这些问题就必须确立专一、准确、灵敏和简便的测定方法。

由于有效成分在原材料中含量较低。这一事实决定了抽提液和纯化的前一阶段溶液中有效成分的比活性较小,加之此时测定的样品很多(每一步骤都需测定),因而确立的测定方法应简单、灵敏、花时间少。此外,确立的方法要专一性强、可比性强。否则,所测得的结果误差大。鉴于实验材料的丰富多彩,对于同一种物质往往有不同的测定方法,故而在选择时总的原则是根据实验材料的生理生化特点选择干扰因素最小的方法,并在同系列操作中运用同一方法,以取得可比性。

分析测定的方法主要有两类:即生物学和物理、化学的测定方法。生物学的测定法主要有酶的各种测活方法、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(即纯度)的鉴定,通常只采用一种方法是不够充分的,必须同时采用2~3种不同的纯度鉴定法共同映证确定。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。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 7.0时260 nm与280 nm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。

要了解的生物大分子的物理、化学性质主要有:①在水和各种有机溶剂中的溶解性。②在不同温度、pH和各种缓冲液中生物大分子的稳定性。③固态时对温度、含水量和冻干时的稳定性。④各种物理性质。如分子的大小、穿膜的能力、带电的情况、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。⑤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。⑥对其他生物分子的特殊亲和力等。

制备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、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。例如纯化某种酶,理想的结果是比活力和总回收率都要高才好,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,而牺牲一些回收率,在工业生产上则正相反。

(一)生物大分子制备的前处理

1. 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。材料的来源无非是动物、植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,但往往这几方面的要求不能同时具备,含量丰富但来源困难,或含量来源较理想,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,由此可见,必须根据具体情况,抓住主要矛盾决定取舍。从科研工作的角度选材,则只需考虑材料的选择符合实验预定的目标要求即可。除此之外,选材还应注意植物的季节性、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。动物在饥饿时,脂类和糖类含量相对减少,有利于生物大分子的提取分离。选微生物材料时要注意菌种的代数和培养基成分等之间的差异,例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。生物材料如暂不提取,应冰冻保存。动物材料则需深度冷冻保存(如可将材料保存于 -80°C)。

2. 细胞的破碎

除了某些细胞外的多肽激素和某些蛋白质与酶以外,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,并不丢失生物活性。不同的生物体或同一生物体的不同部位的组织,其细胞破碎的难易不一,使用的方法也不相同,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纤维素、半纤维素组成的细胞壁,要采取专门的细胞破碎方法。

(1) 机械法。

①研磨。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。工业生产中可用电动研磨。细菌和植物组织细胞的破碎也可用此法。

②组织捣碎器。这是一种较剧烈的破碎细胞的方法,通常可先用家用食品加工机将组织打碎,然后再用 10 000~20 000 r/min 的内刀式组织捣碎机(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 10~20 s 停 10~20 s,可反复多次。

(2) 物理法。

①反复冻融法。将待破碎的细胞冷至 $-15\sim-20^{\circ}\text{C}$,然后放于室温(或 40°C)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 $(1\ 000\sim 2\ 000)\times 10^5\ \text{Pa}$ 的高压下使几十毫升的细胞悬液通过一个小孔突然释放至常压,细胞将彻底破碎。这是一种较理想的破碎细胞的方法,但仪器费用较高。

④冷热交替法。从细菌或病毒中提取蛋白质和核酸时可用此法。在 90°C 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。

(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稀盐溶液中,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 8.0,处理 15 min,可以专一性地将细胞壁分解,释放出细胞内含物,此法适用于多种微生物。

④有机溶剂处理法。利用氯仿、甲苯、丙酮等脂溶性溶剂或 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,此法也可以与研磨法联合使用。

3. 生物大分子的抽提

“抽提”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,或从细胞内的生理状况转入外界特定的溶液中。

影响提取的因素主要有:目的产物在提取的溶剂中溶解度的大小;由固相扩散到液相的难易;溶剂的 pH 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。一般地说,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,远离等电点的 pH,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。

(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,是提取蛋白质和酶最常用的溶剂。用水溶液提取生物大分子应注意的几个主要影响因素是:

①盐浓度(即离子强度)。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时大大增加,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物物质的提取。通常使用 0.02~0.05 mol/L 缓冲液或 0.09~0.15 mol/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。

②pH 值。蛋白质、酶与核酸的溶解度和稳定性与 pH 值有关。过酸、过碱均应尽量避免,一般控制在 pH 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。碱性蛋白质选在偏酸一侧,酸性蛋白质选在偏碱的一侧,以增加蛋白质的溶解度,提高提取效果。例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。

③温度。为防止变性和降解,制备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。

④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的失败。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、酶及核酸的降解作用。例如在提取 DNA 时加入 EDTA 络合 DNAase 活化所必需的 Mg²⁺。

⑤搅拌与氧化。搅拌能促使被提取物的溶解,一般采用温和搅拌为宜,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与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的二硫键,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以防止巯基氧化。

(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、稀酸或稀碱中,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、正丁酮等,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%,40℃ 时为 6.6%,同时又用具有较强的亲脂性,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。例如,植物种子中的玉蜀黍蛋白、麸蛋白,常用 70%~

80%的乙醇提取,动物组织中一些线粒体及微粒上的酶常用丁醇提取。

有些蛋白质和酶既溶于稀酸、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,采用稀的有机溶液提取常常可以防止水解酶的破坏,并兼有除去杂质提高纯化效果的作用。例如,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%乙醇溶液并用草酸调溶液的pH为2.5~3.0,进行提取,这样就从以下三个方面抑制了糜蛋白酶的水解活性:①6.8%的乙醇可以使糜蛋白酶暂时失活。②草酸可以除去激活糜蛋白酶的 Ca^{2+} 。③选用pH 2.5~3.0,是糜蛋白酶不宜作用的pH。以上条件对胰岛素的溶解和稳定性都没有影响,却可除去一部分在稀醇与稀酸中不溶解的杂蛋白。

(二)生物大分子的分离纯化

由于生物体的组成成分是如此复杂,数千种乃至上万种生物分子又处于同一体系中,因此不可能有一个适合于各类分子的固定的分离程序,但多数分离工作关键部分的基本手段是相同的。为了避免盲目性,节省实验探索时间,要认真参考和借鉴前人的经验,少走弯路。常用的分离纯化方法和技术有:沉淀法(包括盐析、有机溶剂沉淀、选择性沉淀等)、离心、吸附层析、凝胶过滤层析、离子交换层析、亲和层析、快速制备型液相色谱以及等电聚焦制备电泳等。

1. 分离纯化方案的设计与选择

纯化方案是指在纯化过程中几种纯化方法有机地联合应用的总称。它是成功地达到纯化目的的前提。纯化方案合理,就能事半功倍。

鉴于纯化方案是由几种纯化方法组成的,因此,设计纯化方案时,首先要选择纯化方法。一般选择纯化方法的依据,总的原则是从抽提液中有效成分和杂质之间理化性质的差异性考虑的。生物大分子能否高效率地制备成功,关键在于分离纯化方案的正确选择和各个分离纯化方法实验条件的探索。选择与探索的依据就是生物大分子与杂质之间的生物学和物理化学性质上的差异。由本章前述的生物大分子制备的各种特点可以看出,分离纯化方案必然是千变万化的。

制备生物大分子的方法可以粗略地分类如下:①以分子大小和形态的差异为依据的方法:差速离心、区带离心、超滤、透析和凝胶过滤等。②以溶解度的差异为依据的方法:盐析、萃取、分配层析、选择性沉淀和结晶等。③以电荷差异为依据的方法:电泳、电渗析、等电点沉淀、吸附层析和离子交换层析等。④以生物学功能专一性差异为依据的方法:亲和层析等。表1-1为各种主要分离纯化方法的比较。

表 1-1 各种主要分离纯化方法的比较

方 法	原 理	优 点	缺 点	应用范围
沉淀法	蛋白质的沉淀作用	操作简便、成本低廉、对蛋白质和酶有保护作用,重复性好	分辨力差,纯化倍数低,蛋白质沉淀中混杂大量盐分	蛋白质和酶的分级沉淀
有机溶剂沉淀	脱水作用和降低介电常数	操作简便,分辨力较强	对蛋白质或酶有变性作用,成本较高	各种生物大分子的分级沉淀
选择性沉淀	等电点、热变性、酸碱变性等沉淀作用	选择性较强,方法简便,种类较多	应用范围较窄	各种生物大分子的沉淀
结晶法	溶解度达到饱和,溶质形成规则晶体	纯化效果较好,可除去微量杂质,方法简单	样品的纯度、浓度都要很高,时间长	蛋白质或酶等
吸附层析	化学、物理吸附	操作简便	易受离子干扰	各种生物大分子的分离、脱色和去热源
离子交换层析	离子基团的交换	分辨力高,处理量较大	需酸碱处理树脂平衡,洗脱时间长	能带电荷的生物大分子
凝胶过滤层析	分子筛的排阻效应	分辨力高,不会引起变性	各种凝胶介质昂贵,处理量有限	分子质量有明显差别的可溶性生物大分子
分配层析	溶质在固定相和流动相中分配系数的差异	分辨力高,重复性较好,能分离微量物质	影响因子多,上样量太小	用于各种生物大分子的分析鉴定
亲和层析	生物大分子与配体之间有特殊亲和力	分辨力很高	一种配体只能用于一种生物大分子,局限性大	各种生物大分子
聚焦层析	等电点和离子交换作用	分辨力高	进口试剂昂贵	蛋白质和酶
固相酶法	待分离物与固相载体之间有特异亲和力	分辨力高,用于连续生产	有局限性	抗体、抗原、酶和底物
等电聚焦连续电泳	等电点的差异	分辨力很高,可连续制备	仪器试剂昂贵	蛋白质和酶