

生物技术和生物工程专业规划教材

生物分离工程实验

Experiment in Bioseparation Engineering

刘叶青 主编



高等教育出版社
Higher Education Press

生物技术和生物工程专业规划教材

生物分离工程实验

Experiment in Bioseparation Engineering

刘叶青 主编

曹学君 主审



高等教育出版社
Higher Education Press

内容提要

本书为高等院校生物分离工程实验教材。全书分为三篇，第一篇为生化物质分离纯化技术的基本原理，简明扼要地叙述了与生物分离工程实验相关的各种分离技术的基本原理；第二篇为生物分离工程基础实验，重点在于各种分离技术的参数测定及基本实验技能的训练；第三篇为生物分离工程大型综合实验，着重于综合型、科研型的实验。本书内容丰富，涉及面广，实验内容不仅有常用的传统生物分离技术，如沉淀法、有机溶剂萃取法、离子交换和大网格树脂吸附法，还涉及近年来发展的各种新分离技术和方法，包括新型的萃取技术，膜分离技术，层析（色谱）技术和电泳技术。涉及的实验对象不仅有微生物发酵液和基因工程菌的细胞培养液，还有动植物天然产物的分离纯化过程；不仅包括了中、小分子物质的分离过程，还有蛋白质和酶等生物大分子物质的分离纯化技术。本书的实验操作方法叙述详细，可操作性强。

本书主要适于生物技术和生物工程专业本科生使用，也适于相关专业研究生选用，还可供科研人员查阅参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物分离工程实验 / 刘叶青主编. —北京: 高等教育出版社, 2007.8

ISBN 978-7-04-022086-5

I. 生... II. 刘... III. 生物分解—实验 IV. Q503-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 109143 号

策划编辑 王莉 责任编辑 张晓晶 封面设计 张楠 责任绘图 吴文信
版式设计 王艳红 责任校对 俞声佳 责任印制 陈伟光

出版发行	高等教育出版社	购书热线	010 - 58581118
社 址	北京市西城区德外大街 4 号	免费咨询	800 - 810 - 0598
邮政编码	100011	网 址	http://www.hep.edu.cn
总 机	010 - 58581000		http://www.hep.com.cn
经 销	蓝色畅想图书发行有限公司	网上订购	http://www.landaco.com
印 刷	北京宝旺印务有限公司		http://www.landaco.com.cn
		畅想教育	http://www.widedu.com
开 本	787 × 1092 1/16	版 次	2007 年 8 月第 1 版
印 张	12.75	印 次	2007 年 8 月第 1 次印刷
字 数	300 000	定 价	17.70 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题，请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 22086-00

郑重声明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话：(010) 58581897/58581896/58581879

传 真：(010) 82086060

E - mail：dd@hep.com.cn

通信地址：北京市西城区德外大街4号

高等教育出版社打击盗版办公室

邮 编：100011

购书请拨打电话：(010) 58581118

前 言

当前,在世界高新技术产业中,生物工程占据了显著的地位,在人们的生产实践和日常生活中起着越来越重要的作用。近年来,随着生物工程的飞速发展,作为生物工程学科中必不可缺的“下游技术”——生物分离工程,也得到了迅猛发展,出现了许多适合大分子生化物质(如蛋白质、酶等)分离纯化的新技术,如新型的萃取技术(两水相萃取、反胶束萃取、超临界流体萃取、液膜萃取和微波萃取等),膜分离技术(微滤、超滤、纳滤和反渗透等),层析(色谱)技术(凝胶层析、亲和层析、离子交换层析和疏水层析等)和电泳技术(凝胶电泳、等电聚焦电泳等)。同时还开发和研制了新材料和先进的分离设备及仪器,以适应这些分离技术的发展。可以预料,随着生物技术产业的更迅速发展,生物分离技术的研究和开发必将更深入和广泛。因此,在生物技术和生物工程专业中,生物分离工程已成为越来越重要的一门课程。

生物分离工程的不断进步,无疑给这门课程的教育改革工作带来了机遇和挑战。近年来随着实验室建设和实验教学改革工作的深入开展,本专业实验教学已从原先传统分离技术的实验内容扩展到现代分离技术的实验内容,从原先单一的基本技能训练扩展到基本技能和综合性实验以及创新实验几大板块,生物分离工程实验教学已增添了许多新的内涵,本书就是在这样的背景下诞生的。这几年,国内已出版了几本有关生物分离工程方面的理论书,但是,与本课程相配套的生物分离工程实验教材却还未见到,为此,作者在多年教学实践和实验室建设工作的基础上,总结了以往教学改革和科研工作的成果,编写了此书,以奉献给生物工程、生物技术专业的师生和对生物分离技术实验感兴趣的读者。希望本书对本科生(或研究生)的实验教学改革能起到启发和推进作用,使实验课程更上一个台阶。

本书内容涉及面广,实验内容基本将现有的生物分离技术都包括进去了,不仅保留了目前还应用较多的传统分离技术,也包括了近年来发展起来的各种新技术和新方法。涉及的实验对象不仅有微生物发酵液和基因工程菌的细胞培养液,还有动、植物天然产物的分离纯化过程;不仅包括了中、小分子物质的分离过程,还有蛋白质和酶等生物大分子物质的分离纯化过程。由于本书中的许多实验已经过校内教学试用,有些实验甚至开设过多次;有些实验是从科研成果中转化而来,因此,实验操作方法比较可靠,可操作性强。为了对实验的操作过程有更直观的认识,本书对实验所涉及的典型(或较先进)仪器设备采用了较多的插图照片,力争做到图文并茂,增添了实验操作的直观性。

本书扼要地叙述了生物分离工程实验相关的各种分离技术的基本原理,对分离技术中的各种实验技能和方法做了重点阐述。全书共分三篇,第一篇为生化物质分离纯化技术的基本原理,第二篇为生物分离工程基础实验,第三篇为生物分离工程大型综合实验。每篇的内容都以生物分离技术为主线,基础实验重点在于各种分离技术的参数测定,着重基本实验技能的训练;大型综合实验着重于工艺性研究,属于科研型的实验较多,一般都要制备得到最后产品,

对培养学生的科研思维能力和实验室动手能力大有好处。基础实验相对实验时间较短，而大型综合实验时间较长，通常应集中实验时间。对于有多个工艺条件的实验，可将学生分组，各组做不同的条件，实验结束时，将数据汇总，并进行分析和讨论，可取得很好的教学效果。为了方便实验操作的进行，本书最后的附录部分汇总了各种物性参数和较全面的缓冲溶液配制方法。

本教材主要适于生物技术和生物工程专业本科生使用，也适合于相关专业研究生选择使用，还可供科研工作参考。各校可根据具体条件选择其中的部分内容进行实验。

参加本书编写工作的还有赵延斌（第三篇实验九）和沈亚领（第三篇实验十三），他们都是长期在教学和科研第一线工作的有经验教师。另外，研究生何洁敏、陈霖杰、郁晓娟、宋庆荣、王金枝和尹芳分别在第二篇实验十、第三篇实验四、实验五、实验六、实验十和实验十二中做了许多基础工作。曹学君教授在本教材的编写中给予了大力支持和帮助，并精心审校了全部书稿，在此一并表示衷心的感谢。同时也要感谢高等教育出版社在本书的出版中给予的许多帮助和认真仔细的审阅。

由于水平有限，书中错误和不足之处，敬请读者批评指正。

编 者

2006年12月于华东理工大学

目 录

第一篇 生化物质分离纯化技术的基本

原理 1

第一章 培养液的预处理 2

一、凝聚和絮凝 2

二、加沉淀剂 2

三、调节培养液的 pH 3

四、吸附作用 3

第二章 细胞破碎 3

一、机械法 4

二、非机械法 6

第三章 基因工程菌包涵体的分离纯化 7

一、包涵体的洗涤和目标蛋白的变性溶解 8

二、目标蛋白的复性 8

第四章 沉淀法 10

一、盐析法沉淀蛋白质 10

二、等电点沉淀法 13

三、有机溶剂沉淀法 13

四、其他沉淀方法 13

第五章 膜分离技术 14

一、膜分离技术的分类 14

二、膜的性能参数 15

三、膜的结构和材料 16

四、膜组件型式和操作方式 17

五、浓差极化 18

六、影响膜分离的因素 19

七、膜的污染和清洗 20

八、膜亲和过滤法 20

第六章 有机溶剂萃取法 20

一、基本原理和操作 20

二、分配系数和弱电解质的分配平衡 21

三、影响萃取操作的因素 22

第七章 两水相萃取 24

一、基本概念 24

二、成相系统 24

三、分配平衡 25

四、影响分配系数 K_d^* 的因素 26

五、亲和分配 27

第八章 反胶束萃取 28

一、基本概念和反胶束相系统 28

二、反胶束萃取过程 30

三、影响反胶束萃取的因素 31

四、亲和反胶束萃取 33

第九章 超临界流体萃取 33

一、超临界流体的特性 33

二、超临界流体的溶解性能 35

三、超临界流体萃取的基本操作和设备 36

四、夹带剂对超临界 CO_2 流体萃取的强化作用 37

五、超临界萃取的特点和应用 37

第十章 微波萃取技术 38

一、基本原理 38

二、微波萃取的特点 39

三、影响微波萃取的因素 40

四、微波萃取设备 41

五、微波萃取技术的应用 42

第十一章 离子交换法 42

一、离子交换剂 42

二、离子交换树脂的分类 43

三、离子交换树脂几个主要的物理参数 45

四、离子交换树脂的交换能力和选择性 46

五、离子交换树脂和操作条件的选择 47

第十二章 大网格(大孔)树脂吸附法 47

一、大网格树脂吸附剂的结构和类型 47

二、吸附等温线 49

三、大网格树脂吸附法提取生化物质工艺

条件的选择	49	II 比色法测定四环素的化学效价	97
第十三章 色层分离法	51	III 薄板层析法鉴定四环素成品纯度	98
一、基本概念	51	实验二 用超滤技术浓缩和分离碱性蛋	
二、凝胶层析	53	白酶	100
三、离子交换层析	55	实验三 用两种分离技术提取红霉素的工	
四、亲和层析	57	比较	104
第十四章 电泳技术	59	I 有机溶剂萃取法制备硫氰酸红霉素的	
一、基本原理	59	工艺研究	104
二、凝胶电泳	60	II 大网格树脂吸附法提取红霉素的	
三、SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳	61	工艺研究	106
四、等电聚焦电泳	62	III 比色法测定红霉素效价	109
参考文献	65	实验四 用反胶束萃取技术提取胰蛋	
第二篇 生物分离工程基础实验	67	白酶	111
实验一 絮凝技术预处理发酵液及滤饼的		I 反胶束萃取法提取胰蛋白酶的工艺	
质量比阻测定	67	研究	111
实验二 碱性蛋白酶的盐析沉淀	69	II 胰蛋白酶酶活和比活的测定方法	114
实验三 Folin 法测定碱性蛋白酶活性	71	实验五 超临界萃取青蒿素和 HPLC	
实验四 有机溶剂萃取法中 pH 对表观分配		鉴定	116
系数的影响	74	I 超临界 CO ₂ 流体萃取青蒿素	116
实验五 反胶束萃取法 pH 对萃取率的		II 用高效液相色谱 (HPLC) 鉴定	
影响	76	青蒿素纯度	119
实验六 PEG/(NH₄)₂SO₄ 两水相系统的		实验六 用微波萃取和大网格树脂吸附法	
相图	78	提取茶多酚	122
实验七 两水相系统中蛋白质分配系数的		I 微波萃取和常规萃取提取茶多酚的	
测定	79	工艺比较	123
实验八 考马斯亮蓝比色法测定蛋白质		II 大网格树脂吸附法精制茶多酚	126
含量	81	III 酒石酸亚铁分光光度法测定茶多酚	
实验九 离子交换树脂总交换容量的测定	82	含量	128
实验十 大网格吸附树脂的吸附等温线的		实验七 用两种分离技术提取柠檬酸的	
制作	86	工艺比较	129
实验十一 凝胶层析法测定蛋白质相对分子		I 钙盐沉淀法提取柠檬酸	130
质量	88	II 离子交换法提取柠檬酸	134
实验十二 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳		实验八 离子交换法提取抗生素的工艺	
测定蛋白质的等电点	91	研究	137
第三篇 生物分离工程大型综合		实验九 离子交换法制备纯水	140
实验	95	实验十 凝胶层析法纯化胰激肽原酶	144
实验一 四环素的沉淀法提取及鉴定	95	I Sephadex G-75 凝胶层析法纯化	
I 四环素的沉淀法提取工艺	95	胰激肽原酶	144
		II 紫外分光光度法测定胰激肽原酶	

活性	148	纯化	170
实验十一 重组人酸性成纤维细胞生长		I 包涵体 TRAIL 蛋白复性的前处理	171
因子的分离和纯化	150	II 包涵体复性方法的研究	173
I 菌体的细胞破碎和前处理	150	III 用亲和层析和离子交换层析法分离	
II 亲和层析法纯化目标蛋白	153	纯化目标蛋白复性液	176
III SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定相对		附录	181
分子质量及纯度	155	一、实验室常用酸碱的密度和浓度	181
实验十二 基因工程血管生长抑素包涵体		二、一些常见蛋白质相对分子质量参	
的变性和复性工艺研究	159	考值	181
I 菌体的细胞破碎和洗涤	160	三、一些常见蛋白质的等电点参考值	182
II 目标蛋白的变性溶解和凝胶层析纯化		四、某些氨基酸的等电点参考值	183
的工艺研究	162	五、硫酸铵饱和度计算表	184
III 目标蛋白的复性工艺研究	165	六、酸度计标准缓冲溶液的配制方法	185
IV 四唑盐 (MTT) 比色法检测细胞		七、常用缓冲溶液的配制方法	186
活性	167		
实验十三 包涵体 TRAIL 蛋白的复性和			

第一篇

生物物质分离纯化技术的基本原理

人类所需的生物化工产品（如生化药物）常通过微生物发酵、酶反应、动植物机体和它们的细胞、组织大量培养而获得，但是从上述过程得到的发酵液、反应液或培养液中含有大量的杂质，人们必须通过各种分离、精制方法使所需的生物活性物质脱离原来的环境，提高纯度，从而获得达到一定质量标准的产品，以满足人们的需求，这就是生物物质的分离纯化过程。

分离纯化技术是生物工程中重要的、必不可少的组成部分，属于生物工程的下游加工过程，又称“后处理工程”或“下游工程”。因为它与产品密切相关，纯化纯度决定了产品的质量，纯化收率决定了产品的产量和成本，因此其重要性并不亚于上游工程。由于生物产品的特殊性、复杂性和对生物产品要求的严格性，导致后处理过程成本往往要占整个生物加工过程成本的大部分。例如，基因工程药物和精制蛋白质产品的纯化过程要占80%~90%，这主要是因为纯度要求高，分离难度大，步骤多。能否设计一条合理的分离纯化工艺路线关系到整个生物加工过程的成败，它常常是生物技术产品能否产业化、走向市场的关键。因此，人们逐渐认识到现代生物技术的发展是与下游分离技术的进步紧密相关的，生物分离技术已受到越来越多的重视。

20世纪80年代以来，生物技术产业迅猛发展，特别是基因工程和细胞融合等现代生物技术的惊人进步，使有限的天然存在的生物活性物质可以通过细胞大量培养，进行商业化的规模生产。生物技术发生了质的飞跃，产品数量越来越多，出现了许多具有显著应用价值的精细生化药物，如：用DNA重组体菌种生产的胰岛素、干扰素、白细胞介素、疫苗以及用杂交瘤技术生产的单克隆抗体等，这就促使分离纯化技术迅速发展，许多节省能耗，高分辨特性和较温和的分离技术大量涌现，使低成本、高收率、高纯度地纯化目标产物成为现实。

分离纯化过程由多个单元操作组成，可分四个阶段：预处理和过滤，初步分离，精细分离，成品加工。预处理和过滤的目的是除去对后步分离有影响的杂质，设法使生物物质转移到液相中并进行固液分离。初步分离（或称提取）过程是采取各种分离技术，除去大部分杂质，浓缩产品，制取粗制品或浓缩液。精细分离（或称精制）过程是采用高选择性的分离技术（如色谱分离技术），将产物与性质相近的杂质尽量分离，制得高纯度产物。成品加工是采用浓缩、结晶、干燥等手段，制得最终产品（浓缩液或晶体）。所以，整个分离纯化过程是一个不断浓缩、不断纯化的过程，最后得到符合要求的产品。

由于生物物质通常稳定性较差，在分离纯化过程中，应注意操作条件要相对温和，如较低

的温度,适宜的 pH 条件等。还应采取相应措施防止产物受到空气的氧化、酶的降解和微生物污染。整个操作过程应尽可能快速。

第一章 培养液的预处理

发酵液或细胞培养液中的成分相当复杂,除了目标产物外,还有其他杂质,主要杂质是菌体细胞、细胞碎片、中间代谢产物、杂蛋白、核酸、脂质、糖类和无机盐等。

从各种发酵液或细胞培养液中提取生物物质的第一个必要步骤就是预处理和固液分离,它包含如下操作:对于胞外产物应采取措施将部分黏附在菌体表面的目标产物转移到液相,然后固液分离除去悬浮颗粒(如培养基残渣、菌体、细胞或絮凝体等),同时还应尽可能改善滤液的性状,以利后继各步操作。对于胞内产物首先应离心收集细胞(菌体),进行细胞破碎,使生物物质溶出到液相中,再通过离心或过滤,将目标产物与细胞碎片分离。预处理主要包括除去固体悬浮颗粒、杂蛋白质、重金属离子、色素、热源和毒素等,主要的方法有凝聚和絮凝、加沉淀剂和调节 pH 等。

一、凝聚和絮凝

凝聚和絮凝是最常用的预处理方法,能有效改变细胞、细胞碎片和可溶性杂蛋白的分散状态,使其聚集起来,形成大颗粒,从而提高固液分离速度。

凝聚作用是在培养液中加入某些电解质,特别是高价无机离子,促使蛋白质等胶体粒子的扩散双电层结构发生变化,使其排斥电位(ζ 电位)降低,并使其水化膜破坏而聚集成大颗粒。常用的凝聚剂主要是铝盐、铁盐、镁盐和锌盐等高价金属盐。

絮凝作用是加入某些高分子絮凝剂,由于高分子絮凝剂长链的吸附架桥作用,使其聚集成粗大的絮凝团。絮凝剂是一种长链、线状、水溶性的高分子聚合物。如果链上带多价电荷为离子型,不带电荷则为非离子型。它们依靠静电引力、氢键、范德华分子引力的作用,吸附到胶粒表面,因为是长链、线状物,一根链可以分别吸附到不同的胶粒表面上,产生架桥联结,形成粗大的絮团。工业上使用的絮凝剂可分三类:第一类是人工合成的高分子聚合物,如聚丙烯酰胺类(分阳离子型、阴离子型和非离子型)、聚丙烯酸类(阴离子型)、聚乙烯亚胺和聚苯乙烯类衍生物等;第二类是天然高分子聚合物,如壳聚糖和葡聚糖、海藻酸钠、明胶和骨胶等;第三类是无机高分子聚合物,如聚合铝盐(碱式氯化铝)、聚合铁盐等。絮凝过程中絮凝剂的相对分子质量、盐的加量、溶液的 pH、搅拌速度和时间等因素都会影响絮凝效果,选择絮凝剂时还应注意其毒性。实际使用时,常将凝聚与絮凝结合起来,可大大提高效果。

二、加沉淀剂

加蛋白质沉淀剂,使形成复合物沉淀,也是一种除去杂蛋白的方法。在酸性溶液中,蛋白质能与一些阴离子如三氯乙酸盐、水杨酸盐、钨酸盐、苦味酸盐、鞣酸盐、过氯酸盐等形成沉淀;在碱性溶液中,蛋白质能与一些阳离子,如 Ag^+ 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Pb^{2+} 等

形成沉淀。

发酵液（培养液）中的钙、镁、铁等金属离子对后继离子交换分离技术有干扰，应在预处理时去除。除去钙离子，可加入草酸。但草酸在水溶液中溶解度较小，用量大时，使用可溶性的草酸钠，反应生成的草酸钙沉淀还能促使蛋白质凝固，提高滤液质量。除去镁离子也可用草酸，但草酸镁的溶解度较大，故不能除尽镁离子。可以加入三聚磷酸钠（ $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ），使它和镁离子形成可溶性络合物而除去。用磷酸盐处理，也能大大降低钙离子和镁离子的浓度。要除去铁离子，可加入黄血盐，使其形成普鲁士蓝沉淀。

三、调节培养液的 pH

两性电解质处于等电点时溶解度最小，常可使某些杂蛋白质沉淀出来。在抗生素生产中，常将发酵液的 pH 调至 pH 4 ~ 5 的偏酸性范围或 pH 7.5 ~ 8.5 的偏碱性范围，使蛋白质凝固，一般在酸性条件下除去的杂蛋白较多。通常采用草酸或无机酸、碱来调节 pH。

四、吸附作用

利用吸附作用也可除去杂蛋白质。例如，黄血盐和硫酸锌作用，生成亚铁氰化锌钾 $\text{K}_2\text{Zn}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ 的胶状沉淀，可吸附杂蛋白质，此法用于四环素类抗生素生产中除杂蛋白，取得了很好的效果。在枯草杆菌发酵液中，常加入氯化钙和磷酸氢二钠，这两者本身生成庞大的凝胶，把杂蛋白质、菌体及其他不溶性粒子吸附并包裹在其中而除去，从而加快了过滤速度。

第二章 细胞破碎

细胞破碎是提取胞内产物的关键步骤。细胞破碎的目的就是采用一定的方法，在一定程度上破坏细胞壁和细胞膜，设法使胞内的目标产物最大程度地释放出来，并通过离心（或过滤）方法将细胞碎片与某些杂质分离除去，然后才能将上清液进一步分离纯化。

不同生物的细胞结构、组成和强度不同。动物细胞没有细胞壁，外层为细胞膜，某些动物细胞原生质膜和细胞骨架相对较柔软，采取温和的操作方法，如一般的匀浆器研磨即可破坏，但存在于结缔组织中的动物细胞难分离。微生物细胞和植物细胞外层均有细胞壁，细胞壁内是细胞膜，通常细胞壁较坚韧而细胞膜脆弱，细胞膜主要由蛋白质和脂质组成，易受渗透压冲击破碎，所以细胞破碎的主要阻力来自于细胞壁。

细胞破碎前，通常要收集细胞，将其悬浮在一定的介质（如缓冲溶液）中，组成匀浆液，主要作用是：第一，使破碎后的释放物溶解在其中。第二，作为破碎时的冷却介质，避免某些生物高分子物质受热变性。第三，保持生生物质稳定的必要环境（如 pH）。常用的匀浆介质主要成分和作用见表 1.2.1。

表 1.2.1 常用的匀浆介质主要成分和作用

匀浆介质主要成分	作用
缓冲液	保持适宜的 pH, 防止释放出来的目标蛋白失活, 常用的缓冲液为 Tris 和磷酸盐缓冲液 (保持生理 pH7.0 ~ 8.0)
蔗糖	防止细胞器 (如线粒体、溶酶体) 渗透性破裂和提高蛋白质稳定性
无机盐	由于胞内离子强度较高, 常用 KCl 和 NaCl 维持其离子强度
Mg ²⁺	中和膜磷脂上的阴离子, 保持膜系统的完整性
EDTA	螯合并除去某些二价金属离子, 如 Ca ²⁺ 、Cu ²⁺ 、Pb ²⁺ 和 Hg ²⁺ 等, 因为 Ca ²⁺ 能激活某些酶, 如蛋白酶、脂肪酶和核酸酶, 二价金属离子还会与巯醇基结合而使蛋白质失活
蛋白酶抑制剂	如 PMSF、抑肽酶等, 它能防止细胞破碎时释放出来的蛋白酶水解蛋白质
还原剂	如 α -巯基乙醇、二硫苏糖醇、1 mmol/L 半胱氨酸, 能防止蛋白质氧化
去垢剂	如 Triton X-100、SDS 等, 有助于使结合在细胞膜上的蛋白质与膜分离并使胞内物质游离出来

为了适应不同类型细胞壁的破碎, 已发展了多种细胞破碎方法。可归纳为机械法和非机械法两大类。

一、机械法

机械法具有处理量大, 破碎速度较快的优点。但是所有的机械操作都会产生热量, 容易使蛋白质变性, 因此应采取冷却措施。通常料液 (匀浆液) 要进行冷却或破碎设备带有冷却装置, 同时尽可能将破碎过程的时间缩短。

(一) 研磨法

研磨法通常是将细胞悬浮液与某些研磨剂一起快速搅拌或研磨, 常用的研磨剂是玻璃小珠、石英砂或氧化铝等, 利用研磨剂与细胞之间的相互剪切、碰撞, 使细胞破碎。高速组织捣碎机和匀浆器是实验室规模的破碎设备。处理量较大的细胞可采用胶体磨。工业规模破碎常采用高速珠磨机, 它是利用装在同心轴上的圆盘搅拌器高速旋转, 使细胞悬浮液和玻璃小珠相互搅动, 产生剪切、碰撞而破碎。在料液出口处, 玻璃小珠被阻挡, 滞留在磨室内不被带出。操作过程中产生的热量, 由夹套层中的冷却水带走。

破碎作用是相对于时间的一级反应速率过程, 与搅拌转速、细胞悬浮液的浓度和循环速度、玻璃小珠的装量和珠体的直径, 以及温度等因素有关。通常适当增加玻璃小珠装量、延长细胞悬浮液在磨室中的停留时间、提高搅拌转速都有利于提高破碎速率, 但是应注意控制磨室内的温度。

(二) 高压匀浆法

高压匀浆法是大规模破碎细胞的常用方法。高压匀浆机由可产生高压的正向排代泵和排出阀组成, 图 1.2.1 为排出阀的结构简图。细胞浆液在高压作用下进入排出阀内, 从小孔中高速

冲出，撞击到撞击环上，由于突然减压和高速冲击，使细胞受到高的液相剪切力和撞击力的作用而破碎。如果料液一次通过匀浆机后的破碎率较低，可采用多次循环的方式。

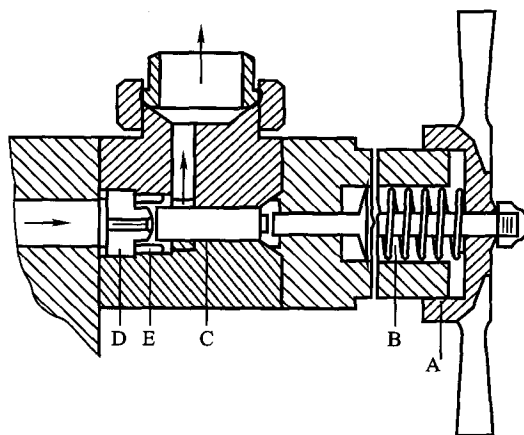


图 1.2.1 高压匀浆机排出阀的结构简图

A. 手轮 B. 阀杆 C. 阀体 D. 阀座 E. 撞击环

破碎属于一级反应速率过程。影响破碎的主要因素是压力、温度和通过匀浆器阀的次数。升高压力有利于破碎，它可以减少细胞的循环次数，使细胞碎片不至过小，从而给随后细胞碎片的分离工作带来好处。但压力也不宜过高，否则易造成匀浆机磨损。工业生产中，通常采用的压力为 55 ~ 70 MPa。虽然温度常会影响破碎率，但由于机械法破碎过程中会使温度升高，为了保护目标蛋白的生物活性，常在料液进口处设置冷却措施，以防破碎过程中温度过高，通常控制出品料液温度为 20 °C 左右。

高压匀浆法适用于酵母和大多数细菌细胞的破碎，料液细胞浓度可达 20% 左右。由于团状和丝状真菌容易堵塞小孔，故不适宜采用高压匀浆法破碎细胞。另外，表达产物为包涵体的基因工程菌，由于包涵体质地坚硬，易损坏匀浆器阀，应谨慎使用。

(三) 超声波破碎法

超声波破碎法是实验室规模应用较多的一种破碎方法。由于操作简便，料液损失少，在基因工程中，处理大肠杆菌的胞内产物常用该法。超声波振荡器具有频率高、波长短、定向传播等特点，通常在 15 ~ 25 kHz 的频率下操作。超声波对细胞的破碎作用与液体中空穴的形成有关。当超声波在液体中传播时，液体中的某一小区域交替重复地产生巨大的压力和拉力，由于拉力的作用，产生一个极为强烈的冲击波压力，由它引起的黏滞性漩涡在悬浮细胞上造成了剪切应力，促使其内部液体发生流动，而使细胞破碎。

破碎作用受声强、频率、处理时间等多种因素的影响。此外，介质的离子强度、pH、菌体的种类和浓度也有很大的影响。不同的菌种，用超声波处理的效果不同，一般杆菌比球菌易破碎，革兰氏阴性菌细胞比阳性菌易破碎，酵母菌效果较差。菌体浓度太高或介质黏度高，均不利于超声波破碎。超声波处理易引起温度急剧上升，料液需用冰水浴冷却。由于大规模操作过程中产生的热量不容易驱散，而且声能传递也有困难，故超声波破碎法一般不适用于大规模的工业操作。

二、非机械法

非机械法包括酶解、渗透压冲击、冻结和融化、干燥法和化学法等。

(一) 酶解法

酶解法是在一定的反应条件（如温度和 pH）下，利用酶促反应特异性水解细胞壁上某些键，达到破碎目的。可以在细胞悬浮液中加入特定的酶，也可以利用自溶作用。

常用的酶有溶菌酶，主要作用于细菌类细胞壁。此外，还有蛋白酶、脂肪酶、核酸酶、透明质酸酶、甘露糖酶、葡聚糖酶、肽链内切酶和壳聚糖酶等，主要对酵母作用。几丁质（壳多糖）酶可处理丝状真菌。常将几种酶混合使用，效果更好。

酶解法的特点是专一性强，在选择酶系统时，必须根据细胞的结构和化学组成来选择。溶菌酶能专一性地分解细胞壁上肽聚糖分子的 $\beta-1, 4$ -糖苷键，对某些革兰氏阳性菌，如巨大芽孢杆菌、枯草杆菌、微球菌等效果很好。但是，处理革兰氏阴性菌必须将溶菌酶与螯合剂 EDTA（乙二胺四乙酸）联合使用，主要是因为革兰氏阴性菌结构中肽聚糖含量少，并处于细胞壁内层，外表面含有大量脂质（脂蛋白、脂多糖），而脂多糖层需钙镁离子才能维持稳定性，故需利用 EDTA 除去钙镁离子，使脂多糖分子脱落，外层膜出现洞穴，溶菌酶才能透过外膜层进入，从而发挥作用。

酶解法具有条件温和，产物释放的选择性好，细胞外形较完整，不产生细胞碎片，便于后步分离等优点。但由于酶成本较高，一般只适于小规模应用。目前在原生质体融合和基因工程中处理含有包涵体的大肠杆菌宿主细胞，应用较多。

自溶作用是利用生物体自身的酶系来破坏细胞。通过细胞生长环境的改变，诱发产生过剩的自溶酶达到自溶目的。影响自溶过程的因素有温度、时间、pH、缓冲液浓度、细胞代谢途径等。自溶法在一定程度上能用于工业规模，但是，对不稳定的微生物容易引起所需蛋白质的变性。

(二) 化学法

常用有机溶剂、表面活性剂和酸、碱等化学试剂处理来溶解细胞或抽提胞内组分，其作用是改变细胞壁或膜的通透性，使胞内组分有选择性地渗透出来。

醋酸丁酯、丁醇、丙酮、氯仿和甲苯等脂溶性有机溶剂能溶解细胞壁的磷脂层，使细胞结构破坏。用丙酮破壁制备酶或某些蛋白时，还能做成具有活力的干粉，长期保存。

在适宜的温度、pH 和低离子强度条件下，表面活性剂能与脂蛋白结合，形成微泡，使膜的通透性增加或使其溶解。常用的表面活性剂有十二烷基硫酸钠（SDS，阴离子型），十六烷基三甲基溴化铵（阳离子型），吐温（Tween）和 Triton X-100（非离子型）等。

酸、碱处理可通过调节溶液的 pH，改变蛋白质的荷电性质，使蛋白质之间或蛋白质与其他物质之间的相互作用力降低而溶解到液相中。

(三) 渗透压冲击

将细胞放在高渗透压溶液中（如一定浓度的甘油或蔗糖溶液），细胞发生收缩，达到平衡后，将细胞转入水或缓冲液中，由于渗透压的突然变化，引起细胞快速膨胀而破裂，促使细胞内含物释放。

渗透压冲击是较温和的一种破碎方法，仅对较脆弱的细胞壁有效，常与其他方法结合使

用,如预先用酶法处理。

(四) 冻结-融化法

将细胞放在低温(如干冰)下冷冻(约 -15°C),然后在室温中融化,反复多次以达到破壁作用。由于冷冻作用破坏了细胞膜的疏水键结构,从而增加了亲水性能,另外冷冻时胞内形成冰晶粒,使剩余细胞液的盐浓度增高而引起细胞溶胀,导致细胞破裂。对于细胞壁较脆弱的菌体,可采用此法,也常与其他方法结合使用。

(五) 干燥法

经干燥后的细胞,其细胞膜的渗透性发生变化,同时部分菌体会产生自溶,然后用丙酮、丁醇或缓冲液等溶剂处理时,胞内物质就会被抽提出来。干燥法的操作可分空气干燥、真空干燥、喷雾干燥和冷冻干燥等。

细胞破碎的方法有多种,但适用的范围不同,通常在选择破碎方法时,应从细胞的处理量、细胞壁的强度和结构、目标产物的稳定性和释放率等几个方面综合考虑。常选择几种方法联合使用,以达到期望的效果。

第三章 基因工程菌包涵体的分离纯化

基因工程技术是现代生物技术的主要组成部分之一。通过对遗传信息的分子操作和加工,将分离或合成的基因经改造插入载体中,导入宿主细胞内,使其扩增和表达,从而获得大量基因表达产物。

基因工程表达的产物大多数属于胞内表达形式,可以是胞内可溶性表达,也可以形成不溶性的包涵体。对于前者通常将收集的细胞(或菌体)经细胞破碎后,离心,收集上清液,即可进行下一步纯化。对于后者必须在收集细胞后,对包涵体进行处理。

大肠杆菌为宿主细胞的外源基因表达的产物大多数在细胞内部聚集成不溶性的包涵体(inclusion bodies)。用相衬(差)显微镜观察包涵体,它呈现深色的折光斑点,因此也称为折光体。包涵体中大部分是克隆表达的目标产物蛋白,其次还有大肠杆菌菌体蛋白和质粒编码蛋白等。这些目标产物在一级结构上是正确的,但在立体结构上却是错误的,因此没有生物活性。

包涵体形成的原因尚不很清楚,一般认为是大肠杆菌中目标产物的表达水平太高,超过了正常的代谢水平,有报道可高达大肠杆菌总蛋白的50%左右,过多的表达导致肽链不能形成分子间正常的折叠构象,依靠疏水基团相互作用而在细胞内部积聚起来。此外,蛋白质分子间的离子键、疏水键或共价键等化学作用、本身固有的溶解度、分子内部二硫键的错误连接及表达产物周围的微环境不适,或者缺少某些折叠协助因子等原因,均会促使包涵体形成。包涵体的形成对分离纯化既具有利方面,也具不利方面:由于它是不溶物,经细胞破碎后,很容易与胞内可溶性蛋白等杂质分离,同时包涵体对目标蛋白具保护作用,不容易受外界环境的影响而降解。但是,另一方面,目标蛋白又必须经历变性溶解和复性的过程才能被提取出来,较易形成错误折叠和形成聚合体,因此给分离纯化带来一定困难,产物回收率常常较低。

要从包涵体中分离出具有活性的产物，通常的处理步骤为：收集菌体细胞——细胞破碎——包涵体的洗涤——目标蛋白的变性溶解——目标蛋白的复性。

一、包涵体的洗涤和目标蛋白的变性溶解

细胞破碎后，经离心收集的沉淀中，除包涵体外，还包括许多杂质，如细菌外膜蛋白 OmpC、OmpF 和 OmpA 的结合物、质粒 DNA 以及脂质、肽聚糖、脂多糖等。在复性时，它们会与目标蛋白一起复性形成杂交分子而聚集，给后步纯化带来困难，因此，预先应尽可能多地将杂质洗涤除去。洗涤液常采用蔗糖、较温和的表面活性剂（如 Triton X-100）、低浓度的弱变性剂（如尿素）和脱氧胆酸等，它们的主要作用是溶解除去部分膜蛋白和脂质类杂质；另外，还能除去亲水性较强的杂蛋白。使用时应注意其浓度要以溶解杂质，而不溶解包涵体中表达产物为原则。这样，通过离心就能将包涵体沉淀与溶解的杂质分离。

包涵体中的目标蛋白必须溶解到液相中，使其处于完全伸展的状态，以便于恢复其天然构型和活性。一般采用蛋白质变性的方法。溶解包涵体的主要试剂是采用高浓度的变性剂，如盐酸胍和尿素，另外，还有表面活性剂（如十二烷基硫酸钠，即 SDS）、pH > 9.0 的碱溶液和有机溶剂等。变性剂盐酸胍和尿素主要是通过离子间的相互作用，打断包涵体蛋白质分子内和分子间的各种化学键，从而溶解包涵体，形成伸展的肽链。表面活性剂 SDS 的作用是破坏蛋白质肽链间的疏水相互作用。因此，在这些溶液中，蛋白质呈变性状态，其高级结构破坏，即所有的氢键、疏水键都被破坏，疏水侧链完全暴露。为了保护蛋白质的生物活性和考虑毒性问题，碱和有机溶剂使用较少。

变性增溶效果随目标蛋白的种类不同而不同，关键的影响因素包括作用时间、pH、离子强度、变性剂的种类和浓度等。通常进行实验室小试得出最佳条件。一般能使表达产物溶解的盐酸胍浓度为 5 ~ 8 mol/L，尿素为 6 ~ 8 mol/L，SDS 质量浓度为 1% ~ 2%。

二、目标蛋白的复性

虽然在变性溶解过程中，变性溶剂的存在破坏了蛋白质的高级结构，但一级结构和共价键没有被破坏。因此，当部分变性剂被除去后，蛋白质会重新折叠，恢复其具有活性的天然构型，这一折叠过程称为复性。

传统的复性方法主要是稀释法和膜分离法。稀释法就是加入大量的水或缓冲液，导致变性剂和蛋白质浓度降低，使蛋白质复性。此法虽操作简便，但是会导致目标蛋白浓度降低，料液体积增大，给后步处理带来麻烦。膜分离法中可采用透析、超滤或电渗析等除去变性剂，适用于较高浓度蛋白质的复性，此法不会增加料液体积和降低目标蛋白浓度，克服了稀释法的缺点。透析法适用于实验室规模，将料液对水或缓冲液透析，变性剂透过膜被除去，目标蛋白就得到复性。但是此法耗费时间较长，易形成蛋白质沉淀。超滤和电渗析速度较快，但由于存在剪切力，容易使蛋白质失活。

活性蛋白质的复性或重新折叠是十分复杂的过程，也是基因工程纯化的关键环节，通常复性收率很低，一般仅 20% ~ 40%，复性效果的好坏取决于蛋白质聚集和正确折叠的竞争，一般认为分子间疏水作用是导致蛋白质聚集的重要因素，最大程度促进蛋白质的正确折叠，抑制其不可逆聚集，是提高复性收率的关键，因此，复性操作条件的选择和优化十分重要。变性剂浓度、重组