

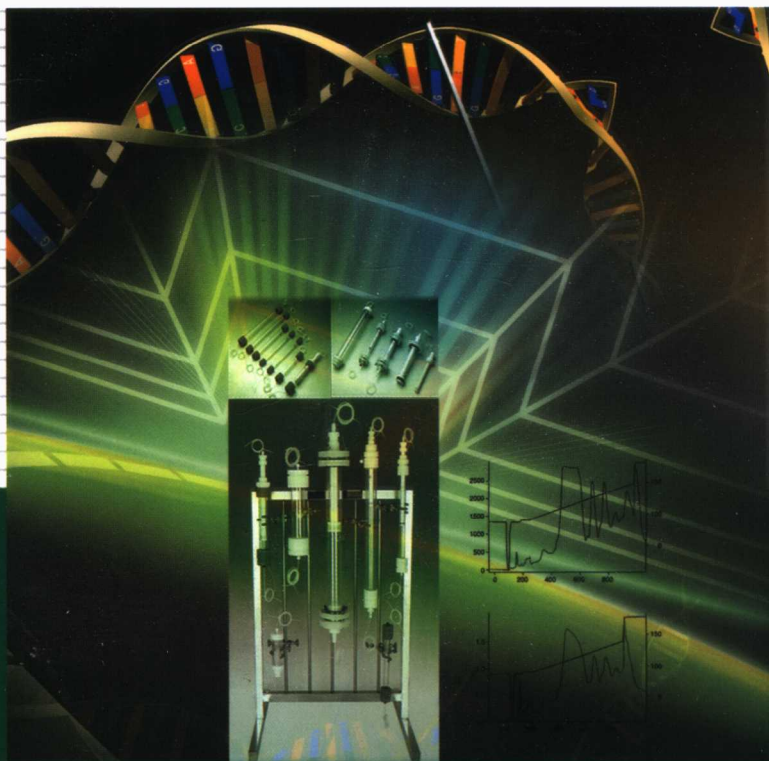


普通高等教育“十一五”国家级规划教材

生物工程 生物技术系列

生物分离技术

谭天伟 编著



化学工业出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

生物分离技术

谭天伟 编著



化学工业出版社

·北京·

本书系统而详尽地介绍了生化分离中的一些关键技术,如发酵液预处理和细胞破碎技术、萃取、膜分离、色谱和电泳分离技术。特别是在萃取和色谱技术方面的内容涵盖了双水相萃取、反胶团萃取、亲和技术等新型技术的内容。

本书既着力于技术发展前沿和趋势的讨论,又兼顾了基础知识和背景的阐述。可作为生物化工专业的教材,也可作为从事相关产品分离工作科研人员的工具用书。

图书在版编目 (CIP) 数据

生物分离技术/谭天伟编著. —北京: 化学工业出版社, 2007.7

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

ISBN 978-7-5025-9607-1

I. 生… II. 谭… III. 生物分解-高等学校-教材
IV. Q503

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 098946 号

责任编辑: 赵玉清

装帧设计: 郑小红

责任校对: 洪雅姝

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: 北京市白帆印务有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张 17½ 字数 429 千字 2007 年 8 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: 29.80 元

版权所有 违者必究

前 言

工业生物技术 (industrial biotechnology) 又称为白色生物技术 (white biotechnology), 是以可再生生物质资源为原料基础生产化学品、材料与能源的新型工业模式。近年来由于能源和资源短缺、生态环境恶化等一系列问题日渐突出, 人类社会的可持续发展面临着前所未有的挑战, 工业生物技术成为 21 世纪社会可持续发展最有前途的技术之一。

生物分离技术从动物、植物及微生物发酵体系分离纯化目标产物, 是工业生物技术的重要组成部分, 发展极为迅速, 许多近年来出现的分离技术 (如微波萃取技术) 已成为工业化应用的重要技术之一。

本书是在北京化工大学给学生开设多年的“生化分离工程”的讲义基础上编写而成的, 不但对一些常用的分离技术 (如色谱技术、电泳技术等) 进行了描述, 而且对近几年发展较快的技术 (如分子印迹技术、外力场萃取技术、固相萃取技术等) 及其作者自己的一些科研内容, 都进行了整理、加工, 并有实例说明。

书中对近年来生化分离技术的一些新进展进行了较为系统的综述, 可作为该领域进行科研和开发的研究人员、教师、研究生及高年级学生作为参考书, 也可作为食品、药品和天然活性成分分析、制备等领域技术人员的参考资料。

瑞典 Uppsala 大学 Jerker Porath 教授、Stellan Hjerten 教授、Jan Christer Janson 教授为本文作者提供了大量的素材, 在此深表感谢。

由于编者水平有限, 加上涉及的内容和学科广泛, 书中难免有不妥之处, 敬请专家和广大读者批评指正。

谭天伟

北京化工大学生命科学与技术学院
北京市生物加工过程重点实验室教授
教育部长江学者, 特聘教授

2007 年 6 月

目 录

1 生化分离技术的研究历史	1
1.1 引言	1
1.2 凝胶过滤的发现历史	3
1.2.1 葡聚糖的发现	3
1.2.2 凝胶过滤和 Sephadex 的发明	3
1.2.3 琼脂糖的发现和 Sepharose	4
1.3 电泳的发展历史	4
1.3.1 凝胶电泳	4
1.3.2 等电聚焦	5
1.3.3 毛细管电泳的诞生	6
1.4 亲和色谱的发明	6
1.4.1 染料亲和色谱的发现	6
1.4.2 固定化金属离子亲和色谱	7
参考文献	7
2 发酵液预处理	8
2.1 概述	8
2.2 预处理简述	9
2.3 发酵液杂质的去除	9
2.3.1 无机离子的去除	9
2.3.2 可溶性蛋白质的去除	10
2.3.3 有色物质的去除	12
2.4 发酵液处理性能的改善	12
2.4.1 降低发酵液的黏度	12
2.4.2 调节 pH 值	13
2.5 絮凝技术	13
2.5.1 絮凝和凝聚的区别	13
2.5.2 细胞絮凝的种类	13
2.5.3 絮凝剂的分类	14
2.5.4 絮凝机理和动力学	16
2.5.5 絮凝的优化	17
2.5.6 絮凝设备	18
2.5.7 絮凝技术的应用	19
2.5.8 絮凝技术的新进展	20
参考文献	21

3 固液分离技术	23
3.1 概述	23
3.2 过滤	24
3.2.1 传统的过滤方法	24
3.2.2 膜过滤	30
3.3 离心	34
3.3.1 离心原理	34
3.3.2 离心方法	34
3.3.3 离心分离设备及其放大	36
参考文献	39
4 细胞破碎和分离提取技术	40
4.1 细胞破碎技术	40
4.1.1 细胞破碎方法及机理	40
4.1.2 机械方法破碎	40
4.1.3 细胞物理破碎方法	43
4.1.4 化学法破碎	44
4.1.5 生物法破碎	45
4.1.6 超临界细胞破碎技术	46
4.1.7 胞内产物的选择性释放	47
4.2 从发酵液直接分离产物	49
4.2.1 双水相分离技术	49
4.2.2 膨胀床分离技术	50
4.2.3 泡载分离技术	56
参考文献	58
5 生物产品萃取技术	60
5.1 双水相萃取	60
5.1.1 双水相基本原理	61
5.1.2 影响分配平衡的因素	62
5.1.3 双水相萃取的应用	64
5.1.4 双水相萃取技术的新进展	65
5.2 反胶团萃取	68
5.2.1 反胶团萃取原理	68
5.2.2 反胶团体系分类、制备方法和影响因素	69
5.2.3 反胶团萃取的应用	70
5.2.4 反胶团萃取分离技术的新进展	73
5.2.5 反胶团萃取的设备研究	74
5.2.6 反胶团技术前景展望	75
5.3 凝胶萃取	75
5.3.1 凝胶萃取过程简介	75

5.3.2	凝胶萃取的热力学原理	76
5.3.3	凝胶萃取的凝胶	76
5.3.4	凝胶萃取的影响参数	77
5.3.5	凝胶萃取在分离中的应用	78
5.3.6	凝胶萃取的设备	78
5.4	固相微萃取	79
5.4.1	固相微萃取的原理	79
5.4.2	固相微萃取的操作	79
5.4.3	萃取过程的影响因素	80
5.4.4	固相萃取的应用	81
5.5	超临界萃取	82
5.5.1	超临界萃取的原理	82
5.5.2	超临界萃取的方式	82
5.5.3	影响 SFE 的因素	82
5.5.4	超临界萃取的特点	84
5.5.5	超临界萃取的应用	84
5.6	超声和微波萃取	85
5.6.1	超声波萃取	85
5.6.2	微波萃取	88
5.7	新型萃取技术	91
5.7.1	协同-络合萃取	91
5.7.2	几种萃取方式的结合	92
	参考文献	92
6	沉淀和膜分离技术	94
6.1	沉淀分离技术	94
6.1.1	有机溶剂沉淀	94
6.1.2	盐析	95
6.1.3	高聚物沉淀	97
6.1.4	其他沉淀方法	97
6.2	膜分离技术	97
6.2.1	膜分离技术发展的历史	97
6.2.2	膜分离技术的原理及特点	98
6.2.3	膜的种类及膜组件	98
6.2.4	膜分离技术的工业应用	100
6.3	微滤膜分离	101
6.3.1	微滤膜概论	101
6.3.2	微滤膜的特点和分离机理	101
6.3.3	微滤膜的制备方法	103
6.3.4	微滤膜的应用	105
6.3.5	微滤膜的污染与防治	106

6.4	超滤膜分离技术	107
6.4.1	超滤膜分离技术的原理和特点	107
6.4.2	超滤膜的种类	108
6.4.3	超滤膜中存在的主要问题及解决办法	109
6.4.4	超滤膜的改性	109
6.4.5	超滤膜的应用	109
6.5	纳滤膜分离技术	111
6.5.1	纳滤膜的特性	111
6.5.2	纳滤膜制备	112
6.5.3	纳滤膜技术研究进展	114
6.5.4	纳滤膜分离技术的应用	114
6.5.5	纳滤技术展望	116
	参考文献	117
7	色谱原理	118
7.1	色谱的由来	118
7.2	色谱的原理和分类	118
7.2.1	色谱基本原理	118
7.2.2	色谱的分类	119
7.2.3	色谱的主要检测器	120
7.2.4	生物分离制备液相色谱的类型和特点	121
7.2.5	液相色谱介质和操作形式	123
7.3	色谱理论	123
7.3.1	概论	123
7.3.2	吸附平衡热力学	123
7.3.3	塔板理论	126
7.3.4	非平衡速率理论	129
	参考文献	133
8	常见的生化分离色谱技术	135
8.1	凝胶色谱	135
8.1.1	凝胶色谱原理	135
8.1.2	凝胶色谱理论	136
8.1.3	凝胶色谱介质	136
8.1.4	应用举例	141
8.2	离子交换色谱	142
8.2.1	离子交换色谱原理	142
8.2.2	离子交换介质	143
8.2.3	离子交换吸附和解吸条件	146
8.2.4	离子交换树脂的再生、转型和毒化	147
8.2.5	操作形式的选择	147

8.2.6	应用举例	147
8.2.7	离子交换色谱的放大	148
8.3	正相色谱	148
8.3.1	正相色谱原理	148
8.3.2	柱型的选择	149
8.3.3	流动相的选择	150
8.3.4	流速的选择	150
8.3.5	正相色谱的放大	150
8.3.6	应用举例	150
8.4	反相色谱	151
8.4.1	反相色谱原理	151
8.4.2	反相色谱介质	152
8.4.3	流动相的选择	152
8.4.4	应用举例	153
8.5	疏水色谱	155
8.5.1	疏水色谱原理	155
8.5.2	疏水色谱介质制备	155
8.5.3	疏水色谱的吸附和解吸条件	156
8.5.4	应用举例	157
8.6	共价色谱	160
8.6.1	共价色谱原理	160
8.6.2	共价色谱的介质合成	160
8.6.3	色谱吸附和解吸条件	161
8.6.4	应用举例	161
	参考文献	162
9	亲和色谱	163
9.1	亲和分离技术概论	163
9.1.1	亲和配基	164
9.1.2	亲和洗脱	167
9.2	亲和色谱分离技术	167
9.2.1	亲和色谱的理论	167
9.2.2	亲和色谱介质的制备	168
9.2.3	常见的亲和色谱	176
	参考文献	186
10	亲和分离技术	187
10.1	亲和膜分离技术	187
10.1.1	亲和膜分离技术的原理和特点	187
10.1.2	亲和膜的制备	189
10.1.3	亲和膜分离的理论模型	192

10.1.4	亲和膜分离技术的应用	193
10.2	亲和萃取	195
10.2.1	亲和萃取简介	195
10.2.2	亲和配基高聚物的合成	195
10.2.3	亲和分配的影响因素	196
10.2.4	亲和萃取模型	197
10.2.5	亲和分配的应用	198
10.3	亲和沉淀分离技术	200
10.3.1	亲和沉淀的原理	200
10.3.2	亲和沉淀聚合物	202
10.3.3	亲和沉淀的新进展	205
10.4	分子印迹分离技术	207
10.4.1	分子印迹概述	207
10.4.2	分子印迹聚合物的制备	210
10.4.3	分子印迹技术的应用	213
10.4.4	分子印迹在分离领域中的研究进展	214
10.4.5	分子印迹技术存在问题与展望	218
	参考文献	218

11	电泳分离技术	221
11.1	电泳分离技术概述	221
11.2	凝胶电泳	223
11.2.1	凝胶电泳的介质	223
11.2.2	凝胶电泳的应用	226
11.3	等电聚焦	229
11.3.1	等电聚焦的基本原理	229
11.3.2	pH值梯度的形成	230
11.3.3	等电聚焦的应用	231
11.3.4	双向电泳	231
11.4	毛细管电泳	233
11.4.1	毛细管电泳原理	233
11.4.2	毛细管电泳的进样技术	234
11.4.3	毛细管电泳的检测器	234
11.4.4	毛细管电泳的应用	235
11.4.5	亲和毛细管电泳	237
11.4.6	毛细管电泳色谱	239
11.5	制备电泳综述	241
11.5.1	制备等电聚焦	241
11.5.2	自由流动电泳	245
11.5.3	梯度流系统	249
11.5.4	多通道流动电泳	250

11.5.5 制备电泳的发展方向	252
参考文献	253
12 基因重组蛋白包涵体的分离和复性	255
12.1 重组蛋白的生产	255
12.2 包涵体的分离纯化和蛋白质复性	256
12.2.1 包涵体形成的机制及其影响因素	256
12.2.2 包涵体的提取、溶解与纯化	258
12.2.3 重组蛋白的体外复性	259
12.3 重组蛋白质的分离纯化	267
参考文献	267

1. 生化分离技术的研究历史

1.1 引言

生化分离技术对生物技术和生物学的发展起着重要的作用，而近代生化分离技术与瑞典 Uppsala 密切相关。瑞典 Uppsala 大学对生化分离方法的研究最早起源于 Svedberg 教授。在 20 世纪 20 年代初，Svedberg 在 Uppsala 大学物理化学系首先采用超高速离心技术分离蛋白质等生物大分子。1924 年，Svedberg 发明了超高速离心机，并且首次从血液中分离出血红蛋白 (Hb)^[1]。1926 年，Svedberg 由于超高速离心机的发明及血红蛋白的发现获诺贝尔化学奖。

1925 年，23 岁的 Arne Tiselius 大学毕业后，作了 Svedberg 的研究生。当时 Svedberg 认识到蛋白质的物理性质不但可以在离心场中观察到，而且有可能在电场中研究。因此他鼓励 Tiselius 从事移动界面电泳法 (Moving boundary method) 的研究。1930 年 Tiselius 首先发明了一种 U 形管自由移动界面电泳装置，之后 Tiselius 对该装置进行了改进，如采用冷却系统消除热扩散等。Tiselius 最早的移动界面电泳装置和当时的蛋白质检测照片如图 1-1 所示^[2]。

可以看出当时蛋白质的检测非常复杂，检测结果主要采用照片拍照的方式获得。之后 Tiselius 的学生 Philpot 和 Svensson 发明了一种紫外光学系统 (图 1-2^[2])，用于检测蛋白质，成功地将蛋白质浓度变成了色谱峰，即现在常用的紫外检测器的雏形。

1937 年 Tiselius 推出了新的电泳装置^[3]，并将有关结果投到几个生物化学杂志，但这些生物化学刊物都没有刊登这篇文章，可能是由于这篇文章主要涉及了物理仪器，而生物内容较少的原因。Tiselius 采用新的移动界面电泳装置从血清蛋白粗品中分离出血清蛋白及三种

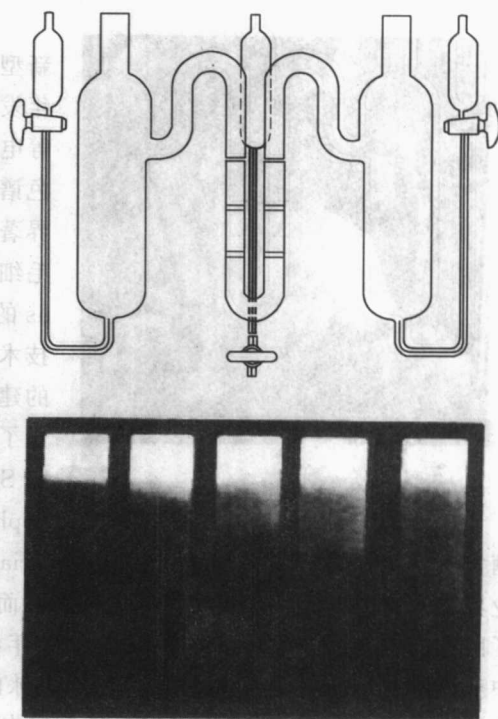


图 1-1 移动界面电泳装置和检测图谱

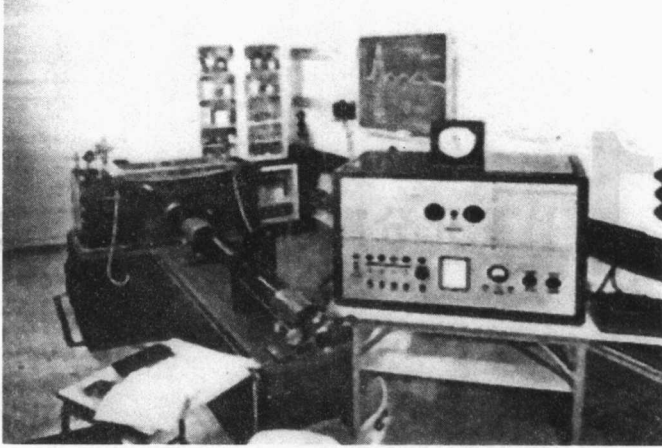


图 1-2 Philpot-Svensson 光学蛋白质检测系统

球蛋白，他将这三种球蛋白分别命名为 α 、 β 、 γ 球蛋白。同年 Uppsala 大学因为 Tiselius 的工作专门成立了生物化学系，Tiselius 成为生物化学系的第一位教授，但由于物理化学系拥有许多当时世界领先的仪器（如超高速离心机、电泳装置等），因而他的实验室仍主要在物理化学系。

20 世纪 40 年代后，Tiselius 开始了色谱分离技术的研究。1956 年，Tiselius 首先发明了羟基磷灰石，系统研究了吸附色谱的规律，建立了至今仍在应用的三种色谱洗脱方式（洗脱、前沿及置换），并首先将梯度洗脱引入色谱（图 1-3）。由于在色谱及电泳方面的杰出贡献，1948 年 Tiselius 获得诺贝尔化学奖^[3]。



图 1-3 Tiselius 研究色谱照片^[4]

20 世纪 50 年代后，Uppsala 大学生物化学系在新型生化分离技术研究上进入了一个黄金时代。1959 年发明了凝胶过滤（Gel filtration），60 年代发明了等电聚焦、凝胶电泳，以及 70 年代发明的金属亲和和色谱分离技术和毛细管电泳技术等。培养了一大批世界著名的教授，如凝胶过滤的发明人 Jerker Porath、毛细管电泳的发明人 Stellan Hjerten 等。而且 Tiselius 的许多学生进入了工业界，参与了瑞典两大生物技术公司 Pharmacia 和 LKB 及美国的 Bio-Rad 公司的建设，如 1950 年 Kirstie Granath 在 Pharmacia 建立了物理化学实验室，1953 年在电泳领域颇有建树的 Svensson 成为 LKB 的研究开发部主任，1954 年 Sephadex 的发明人 Per Flodin 成为 Pharmacia 的葡聚糖实验室主任，1955 年 Bertil 在 Pharmacia 建起了生物化学实验室。这些任命不但加强了工业界和 Uppsala 大学生物化学系的联系，而且加速了科研成果向企业界的转化，给企业带来了巨大的财富，如 Pharmacia 公司 1983 年年销售额的三分之一是从生化分离技术（介质）中获得的。LKB 的主要产品如色谱、电泳的技术都来自 Uppsala 大学。美国 Bio-Rad 公司的色谱介质 Biogel A、Biogel P 及毛细管电泳技术也是来自 Uppsala 大学。世界范围内生化分离的色谱介质（软介质）及电泳装置的技术均主要来自 Uppsala 大学。因此 20 世纪 60 年

代到 80 年代 Uppsala 大学生物化学系被国际学术界称为“Uppsala 分离技术学院”。

1.2 凝胶过滤的发现历史

1.2.1 葡聚糖的发现

1941 年 23 岁的 Ingelman 从 Uppsala 大学毕业后,作了 Tiselius 的研究生。Tiselius 让他接手一个瑞典制糖厂的项目,从甜菜糖中分离出果胶,以替代进口果胶。当时由于第二次世界大战,果胶极为缺乏,Ingelman 意外地发现其提取的果胶中存在另一种多糖——葡聚糖(dextran)。为了提高葡聚糖的成胶性,Ingelman 采用一种双功能基团交联剂——氯代环氧丙烷进行交联,得到了一种不溶于水,但在水中溶胀的凝胶。他将有关结果报告给制糖公司,但制糖公司对这种水不溶性凝胶并不感兴趣,因此 Ingelman 于 1946 年放弃了这个成果的专利申请。但 Ingelman 发现这种凝胶能够渗透一些物质而排斥另一些物质,有可能用于医药,因此他没有公开发表有关内容。1946 年他进入 Pharmacia 后,继续葡聚糖的研究。1947 年 Pharmacia 推出了第一个基于葡聚糖的浸剂溶液(商品名 Macrodex)。1950 年 Pharmacia 由 Stockholm 搬到了 Uppsala,同时 Ingelman 被任命为葡聚糖研究室主任,之后 Pharmacia 开发出许多葡聚糖产品,成为世界上生产葡聚糖最大的厂家^[4]。

1.2.2 凝胶过滤和 Sephadex 的发明

20 世纪 50 年代, Tiselius 开始研究填充柱中的电泳。他的两个学生 Per Flodin 和 Jerker Porath 先后于 1950 年和 1952 年也加入了这个行列,研究用淀粉、纤维素等为填充物抑制电泳热扩散,在制备填充柱电泳上取得了进展。

1954 年 Flodin 离开 Tiselius 实验室到 Pharmacia 任职,而 Porath 继续在生物化学系从事填充柱区带电泳的研究,这两位朋友经常保持联系,讨论一些科研问题。当时 Porath 对纤维素的结果并不十分满意,因为其吸附作用较大。1956 年秋天, Flodin 建议 Porath 试一下交联葡聚糖。Porath 在实验中吃惊地发现分子量大的蛋白质反而比分子量小的蛋白质移动得快。1957 年 Porath 向 Flodin 报告了这一情况,并说交联葡聚糖柱和几年前研究的淀粉柱具有类似的分子筛效应,但是物理性质要比淀粉好得多,而且孔径可以准确地控制。这两位科学家立刻意识到他们的发现将有重要的科学意义和潜在的应用价值。Ingelman 知道这一消息后,立刻让 Flodin 专门制备凝胶,而 Porath 主要进行蛋白质和肽的分离实验,并且 Pharmacia 很快立项。经过几个月的实验,得到了令人满意的结果,开发了一种可以替代透析的色谱过滤技术。Pharmacia 申请了两项专利,一项是凝胶制备,于 1958 年 3 月申请,发明人为 Flodin 和 Ingelman。另一项专利为凝胶过滤(Gel filtration)方法,1958 年 4 月申请,发明人为 Flodin 和 Porath。申请专利后,由 Pharmacia 总经理 Elis Goth 和 Tiselius 教授提议,Pharmacia 开始生产交联葡聚糖,商品名为 Sephadex,由 Separation、Pharmacia 和 dextran 三个词组成。1959 年 Porath 和 Flodin 在 Nature 上发表了著名的文章“Gel Filtration: A Method for Desalting and Group Separation”,第一次提出了凝胶过滤技术^[5]。1959 年, Pharmacia 开始出售两种凝胶 Sephadex G-25 和 Sephadex G-50。G 为 Gel 的字头,数字表示胶的持水量(即 1g 干胶所能持水的最大体积乘以 10)。1960 年 Pharmacia 又开发出 Sephadex G-75,1963 年 Sephadex G-100 和 Sephadex G-200 问世,1965 年高度交联的 Sephadex G-10 和 Sephadex G-15 上市,而且 Sephadex 的衍生物(如 DEAE-Sephadex)也



图 1-4 凝胶过滤的几位主要研究者

从左至右: Björn Ingel man, Jerker Porath, Per Flodin

陆续问世,从而形成了 Sephadex 家族。Sephadex 是目前生物分离中应用最广的色谱介质之一。凝胶过滤的主要几位研究人员如图 1-4 所示^[4]。

1.2.3 琼脂糖的发现和 Sepharose

1961 年美国的 Polson 首先将琼脂 (agar) 用于垂直柱电泳中,但由于琼脂有很多带电基团,对电泳产生干扰,导致重复性不好。20 世纪 60 年代初 Uppsala 大学生物化学系的 Stellan Hjerten 开始研究琼脂。通过文献检索和实验,他发现琼脂是由琼脂糖 (agarose) 和琼脂果胶 (agaropectin) 组成,琼脂中的带电基团

是琼脂果胶引入的。其实这一结果早在 1937 年首先由日本学者 Araki 发现,Araki 在一篇文章中阐述了琼脂是由两部分——琼脂糖和琼脂果胶组成,但由于这篇文章发表在日文杂志上,因此很少有人知道。Hjerten 从琼脂中分离出琼脂糖,并且将琼脂糖制成了凝胶球,成功地建立了琼脂糖凝胶电泳^[2]。同时 Hjerten 意识到新做成的琼脂糖凝胶很有可能用于凝胶过滤。经过实验 Hjerten 发现琼脂糖凝胶完全可以用作色谱介质,因而发明了琼脂糖凝胶色谱。Hjerten 先和 LKB 商量申请专利,但 LKB 由于经费原因放弃了专利权。而后 Hjerten 又建议 Pharmacia 公司申请专利,但 Pharmacia 当时对琼脂糖凝胶不感兴趣,Hjerten 只好将这个研究结果公开。Hjerten 将琼脂糖凝胶用于电泳,取得了很好的分离效果。之后 Hjerten 又研究了聚丙烯酰胺凝胶,发现这种凝胶用于电泳,可以分离许多蛋白质,从而奠定了凝胶电泳的基础。

美国的 Bio-Rad 公司根据这一结果制备凝胶,商品名为 Biogel A。之后 Pharmacia 意识到这种凝胶的重要性,开始生产这种凝胶,商品名为 Sepharose,取 Separation、Pharmacia 和 agarose 的字头或字尾。但普通的琼脂糖凝胶稳定性较差且容易压缩,20 世纪 70 年代初 Porath 和 Jan Christer Janson 等对琼脂糖凝胶进行交联,生产了今天常用的交联 Sepharose CL,并且将琼脂糖交联技术申请了专利,从此交联型 Sepharose 成为 Pharmacia 的主要产品。70 年代后 Sepharose 的衍生物如离子交换树脂问世,80 年代 Pharmacia 开发了高度交联的 Fast Flow Sepharose 介质和 Superose,从而奠定了 Sepharose 在生化分离中的盟主地位。

1.3 电泳的发展历史

1.3.1 凝胶电泳

凝胶电泳中最为有效的分离技术是聚丙烯酰胺凝胶电泳和琼脂糖凝胶电泳。在 Tiselius 发明移动界面电泳之后,人们一直致力于制备分辨率高的有载体电泳,1959 年 Raymond 和 Weintraub 在 Science 发表了第一篇用聚丙烯酰胺作为介质的凝胶电泳文献,并公开了一些分离结果。由于当时聚丙烯酰胺凝胶还很难制备,数据很难重复。1962 年 Smithies 第一次报道用淀粉作为介质的电泳分离谱图,但结果也很难重复。

聚丙烯酰胺凝胶电泳真正普及是在 Hjerten 系统地研究凝胶单体浓度、交联剂等的关系后，得到了不同交联度凝胶电泳分离蛋白质的范围，为使用者提供了方便。Hjerten 教授于 1962 年引入的两个公式，是目前实验室常用的公式：

$$\begin{aligned} T &= (a+b)/m \times 100\% \\ C &= b/(a+b) \times 100\% \end{aligned} \quad (1-1)$$

式中， a 为聚丙烯酰胺的质量， g ； b 为 N,N' -亚甲基双丙烯酰胺的质量， g ； m 为缓冲溶液的体积， ml 。

如果 $a:b$ 小于 10，则凝胶脆、硬，呈乳白色；如果 $a:b$ 大于 100，则凝胶呈糊状。富有弹性且完全透明的凝胶，其 $a:b$ 值应在 30 左右。聚丙烯酰胺凝胶的有效孔径取决于它的总质量浓度 T ，有效孔径随着 T 的增加而降低。当 $T < 2.5\%$ 时，可以筛分相对分子质量为 10^6 以上的大分子，当 $T > 30\%$ ，可以筛分相对分子质量小于 2kDa 的多肽。

在疏水膜蛋白质的分离纯化中，人们发现加入中性表面活性剂，如 Triton X-100，既可以溶解蛋白，又不产生变性作用。Hjerten 等在研究中发现 SDS 和蛋白质结合后，分离效率最高，但 SDS 对蛋白质变性作用大。经过多年的努力，SDS 凝胶电泳终于成为最为广泛的测定蛋白质分子量的方法。

Hjerten 在 1963 年发明了琼脂糖之后，很快将其用于电泳，结果琼脂糖的凝胶电泳效果非常理想。而且 Hjerten 还发现由于琼脂糖凝胶的孔径比聚丙烯酰胺大，所以更适合于制备分离生物大分子，如核酸等。因此目前分子生物学的主要分离手段如质粒的分离等基本依靠琼脂糖凝胶电泳。

凝胶电泳中，蛋白质的检测一直是个难题。1965 年 Meyer 发明了考马斯亮蓝染色法，并将此方法用于聚丙烯酰胺凝胶电泳，检测灵敏度约为 $0.2 \sim 0.5 \mu g$ 。1979 年 Switzer 等首先介绍了比考马斯亮蓝染色灵敏 100 倍的银染色方法，它可以检测小至 $0.38 ng/mm^2$ 的牛血清白蛋白。银染色方法的原理是将蛋白谱带上的硝酸银（银离子）还原成金属银，以使银颗粒沉积在蛋白谱带上。

1.3.2 等电聚焦

等电聚焦 (Isoelectric focusing) 的概念最早是 Uppsala 大学的 Svensson 于 1941 年提出的，他提出只要建立 pH 值梯度，蛋白质在该 pH 值梯度中移动到和其等电点一致的 pH 值点时，便会停止移动而产生聚焦作用，即等电聚焦。1954 年 Kolin 按照 Svensson 的设想第一次设计了不稳定的 pH 值梯度场，获得了一些有价值的数值。但由于 pH 值梯度无法建立起来，分离难于进行。1961 年至 1963 年 Svensson 的课题组一直在研究等电聚焦的理论和方法，提出了采用两性电解质的思路以建立稳定的 pH 值梯度。1966 年 Svensson 提出了著名的等电聚焦分辨率的公式：

$$\Delta(PI) = 3 \sqrt{\frac{D[d(pH)/dx]}{E[-dv/d(pH)]}} \quad (1-2)$$

式中， D 为蛋白质扩散系数； E 为电场强度； $d(pH)/dx$ 为 pH 梯度； $dv/d(pH)$ 为蛋白质迁移率的斜率。

但由于没有合成出可实用的两性电解质而无法实现等电聚焦。

1963 年 Svensson 到瑞典哥德堡的 Chalmers 理工学院担任教授，在那里继续进行等电聚焦的研究，并让他的博士研究生 Vesterberg 一直进行两性电解质的合成研究。1964 年的夏天，Vesterberg 在实验室进行了多次试验后，终于合成出了世界上第一个用于等电聚焦的

两性电解质 (图 1-5), 他高兴地将这个消息告诉了正在郊外度假的 Svensson, Svensson 得到消息后, 立刻回到实验室, 进行了重复试验, 从而宣告等电聚焦实用技术的诞生。

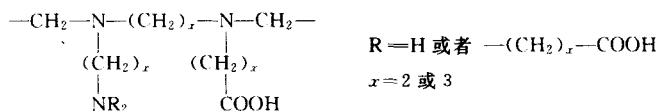


图 1-5 Vesterberg 合成的等电聚焦两性电解质

在 Svensson 之后, 很多研究者和公司陆续合成出多种两性电解质, 使等电聚焦成为生物分离和分析的主要手段之一, 如目前的双向电泳等都是在等电聚焦的基础上改进得到的。

1.3.3 毛细管电泳的诞生

管式电泳的一个重要问题是热效应问题, 采用细管可以降低热效应。Hjerten 于 1967 年首先提出了毛细管区带电泳 (CZE), 他用一个内径 3mm 涂有甲基纤维素的石英管进行电泳, 这是最早的毛细管电泳。1970 年 Everaerts 等人报道其在毛细管等速电泳 (CITP) 系统上得到的 CZE 结果, 但结果还是不尽如人意。1974 年 Virtanen 提出应采用更细的毛细管提高分离效率, 同时可减少热效应。1979 年 Mikkers 用 200 μm 内径的毛细管进行试验, 获得等板高度小于 10 μm 的高效率, 这是 CZE 研究历史上的一次重大突破。1981 年 Jorgenson 和 Lukacs 使用 75 μm 石英毛细管进行 CZE 试验, 由于热效应小, 他们大胆地采用了高电压 (30kV), 结果惊人地发现每米理论板数可达到 4 万块, 从此高效毛细管电泳正式诞生。1983 年 Hjerten 又提出了毛细管凝胶电泳和毛细管等电聚焦, 不仅可以大幅度提高效率, 而且可以实现自动化和定性定量测定。1986 年 Lauer 第一次报道了蛋白质在 CZE 中可以获得每米 10 万块理论板数的极高效率, 这一结果大大地激发了有关 CZE 研究, 同时许多分析仪器厂也加入了毛细管电泳的竞争。1988 年美国 Bio-Rad 公司推出了国际上第一个毛细管电泳仪。

目前毛细管电泳已成为分析上十分有效的方法之一, 每年全世界发表有关毛细管电泳的论文超过 2500 篇, 还有十多个厂家生产毛细管电泳仪器。

1.4 亲和色谱的发明

1.4.1 染料亲和色谱的发现

染料亲和色谱由于价格低廉、应用方便而成为目前亲和色谱中应用最多的方法之一。染料亲和色谱的发现应该归功于东德莱比锡大学的 Kopperschlager 教授。瑞典 Pharmacia Fine Chemicals 公司为便于测定观看凝胶介质的死时间, 以推广凝胶过滤, 将 ICI 公司生产的活性蓝染料 Cibacron blue F3G-A 接到水溶性的高分子葡聚糖上, 作为凝胶过滤的分子量标记物。1968 年 Kopperschlager 教授在一次偶然的凝胶过滤试验中, 发现丙酮酸激酶 (Pyivate kinase) 和蓝染料一起在死时间流出, 似乎该激酶的分子量比预计大得多, 他将该激酶单独走凝胶过滤柱, 发现该激酶的流出时间却在死时间之后, 他立即想到可能是该激酶和蓝染料活化的葡聚糖结合, 实际上在凝胶柱上二者作为一个结合物一起通过柱子, 因此在死时间流出。在发现了这个规律后, Kopperschlager 立即联想到如果将蓝染料固定在 agarose 介质上, 便可以由于吸附纯化激酶, 从而产生一种新的色谱技术。很快 Kopperschlager 教授用