

卓越工程师教育培养计划生物食品类系列实验教材
高等学校食品专业通用实验教材

SHENGWU HUAXUE SHIYAN
ZHIDAOSHU

生物化学实验 指导书

■ 钱鑫萍 余顺火 主编



合肥工业大学出版社
HEFEI UNIVERSITY OF TECHNOLOGY PRESS

卓越工程师教育培养计划生物食品类系列实验教材
高等学校食品专业通用实验教材

生物化学实验指导书

主 编 钱鑫萍 余顺火
副主编 缪国鹏 李秀丽 王朝霞
主 审 魏兆军



合肥工业大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验指导书/钱鑫萍,余顺火主编. —合肥:合肥工业大学出版社,2016.7

ISBN 978-7-5650-2642-3

I. ①生… II. ①钱…②余… III. ①生物化学—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(2016)第 023293 号

生物化学实验指导书

主编 钱鑫萍 余顺火

责任编辑 陆向军 刘 露

出 版 合肥工业大学出版社
地 址 合肥市屯溪路 193 号
邮 编 230009
电 话 综合编辑部:0551-62903028
市场营销部:0551-62903198
网 址 www.hfutpress.com.cn
E-mail hfutpress@163.com

版 次 2016 年 7 月第 1 版
印 次 2016 年 7 月第 1 次印刷
开 本 787 毫米×1092 毫米 1/16
印 张 6.5
字 数 150 千字
印 刷 安徽联众印刷有限公司
发 行 全国新华书店

ISBN 978-7-5650-2642-3

定价: 19.80 元

如果有影响阅读的印装质量问题,请与出版社市场营销部联系调换。

第1部分 生物化学实验技术与方法

第1部分 生物化学实验技术与方法

第一节 离心法	(1)
第二节 盐析	(5)
第三节 分光光度法	(7)
第四节 层析分离法	(9)
第五节 电泳	(13)

第2部分 基础实验

糖类基础实验

实验一 可溶性总糖的提取与测定——蒽酮比色法	(21)
实验二 3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS法)测定还原糖	(23)
实验三 血清中葡萄糖的测定	(25)
实验四 蔗糖含量的测定	(27)

蛋白质基础实验

实验一 蛋白质的沉淀、变性反应	(29)
实验二 蛋白质含量测定	(33)
实验三 醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白	(38)
实验四 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的相对分子质量	(43)
实验五 葡聚糖凝胶过滤层析法测定蛋白质分子量	(51)
实验六 植物体内的转氨基作用	(53)

酶的基础实验

实验一 酶的基本特性	(55)
实验二 淀粉酶活力的测定	(61)
实验三 脲酶 K_m 值的测定	(64)
实验四 多酚氧化酶和过氧化物酶活性的测定	(67)

实验五 过氧化物酶同工酶的提取与分离——PAGE 法	(70)
----------------------------------	------

核酸基础实验

实验一 植物组织 DNA 的提取	(74)
实验二 动物组织 DNA 的提取	(76)
实验三 琼脂糖凝胶电泳分离 DNA	(78)
实验四 酵母核糖核酸(RNA)的分离和组分的鉴定	(80)

第 3 部分 应用实验

实验一 茶叶中茶多酚类物质的提取与含量测定	(82)
实验二 农产品中多糖提取、纯化与鉴定	(83)
实验三 酵母蔗糖酶的提取及性质研究	(84)
实验四 蛋白质的制备及其含量测定	(85)
实验五 高效液相色谱法分析蓝莓果实类黄酮类化合物和鲜叶中黄酮类化合物组分	(86)

第 4 部分 个案分析和思考题

一、蛋白质电泳常见问题分析	(87)
二、醋酸纤维素薄膜电泳分离人血清常见失败图片与原因	(89)

第 5 部分 附 录

实验室常用仪器使用	(92)
生物化学实验细则	(94)
实验记录及实验报告	(95)
参考文献	(97)

第1部分 生物化学实验技术与方法

生物化学实验一般涉及细胞内部各种组分的分离提取、含量测定、结构解析和活性检测等内容,因此具有一些独有的方法和技术。提前对这些方法和技术的原理有所认识将帮助同学们对具体实验内容的理解。本部分针对该课程所涉及的一些实验方法和技术,对原理进行了简要介绍,内容包括:离心、盐析、分光光度计法、层析分离法和电泳。

第一节 离心法

离心技术是物质分离的一种重要手段,利用物质在离心力的作用下,按其沉降系数或浮力密度不同而进行分离、浓缩操作。各种细胞提取液常常是由固形物与液相组成的悬浮液,这种悬浮液的固液分离是生物化学实验的重要操作之一。

一、原理

任何物体受地球引力作用都会下沉,在沉降过程中,当物体的受力为零时,即做匀速运动,此刻下沉力、摩擦力、浮力达到平衡。物体在重力场的液体介质内,因受到地球引力(向下)、溶液浮力(向上)和溶液黏滞力(向上)的共同作用,会出现不同的运动。重力 F_g 可以用公式表示为

$$F_g = \frac{1}{6} \pi d^3 \rho_p g \quad (1-1)$$

式中, d 为物体直径大小, ρ_p 为物体密度, g 为重力加速度。物体在 F_g 的作用下,不管原始形状如何,都将在重力场的方向加速,但是这种加速度只能持续极短的时间,这是由于物体在做加速运动的同时,受到的摩擦阻力愈来愈大,阻止它在介质中的运动。根据 Stokes 定律,对于球形物体颗粒在介质中沉降所受到的黏滞力 F_f 表示为

$$F_f = -3\pi\eta dv \quad (1-2)$$

式中, η 为介质的黏度, d 为球形颗粒直径, v 为颗粒沉降速度。负号表示黏滞力的方向与颗粒的加速度方向相反。

除此之外,由于颗粒是在液体的介质中,还会受到液体浮力的作用。浮力 F_b 可以表示为

$$F_b = -\frac{1}{6} \pi d^3 \rho_m g \quad (1-3)$$

式中, d 为颗粒直径, ρ_m 为介质密度, g 为重力加速度。负号表示浮力的方向与颗粒的加速度方向相反。

当作用在颗粒上的总力为零时,颗粒将会做匀速运动,也就是达到临界速度,作用力的关系式为

$$F_g - F_b = F_f \quad (1-4)$$

联立以上四式,可以得出方程式

$$\frac{1}{6} \pi d^3 \rho_p g - \frac{1}{6} \pi d^3 \rho_m g = 3 \pi \eta d v \quad (1-5)$$

由此可以推出颗粒在介质中的沉降速度 v :

$$v = d^2 (\rho_p - \rho_m) g / 18 \eta \quad (1-6)$$

此方程为 Stokes 方程,由此可以判断颗粒与沉降速度之间的关系。

地球表面的重力加速度几乎是一个常数。从理论上讲,只要颗粒的密度大于液体就会发生沉降,但是,对于分离生物材料的样品,如细胞、细胞器、细菌、病毒、蛋白质和核酸等生物大分子来说,由于颗粒非常细,依靠自然沉降是不能达到完全分离的,只有通过离心力的作用才能使它们沉降下来。物体在围绕旋转轴以角速度旋转时,就产生了离心场,物体在离心场中受到离心力的作用。一般情况低速离心转速单位以 r/min 表示,高速离心则用重力加速度 g 表示。

离心分离是制备生物样品广泛应用的重要手段,如分离活体生物、细胞器、生物大分子、小分子聚合物等,离心方式多样,目前较多使用的有沉淀离心、差速离心、速率区带离心、等密度区带离心、淘汰离心和连续流离心等。

二、沉淀离心

沉淀离心技术是目前应用最广的一种离心方法。介质密度一般约为 $1g/mL$ 。选用一种离心速度,使悬浮溶液中悬浮颗粒在离心力作用下完全沉淀下来,这种离心方式称沉降离心。主要适宜细菌等微生物、细胞和细胞器等生物材料及病毒和染色体 DNA 等的离心分离。

三、差速离心

差速离心是采用逐渐增加离心速率或低速和高速交替进行离心,使沉降粒子在不同离心速率及不同离心时间下分批分离的方法。由于各个细胞内组分的密度差异不大,因此差速离心法主要依据的是固形物的大小不同进行分离。如取均匀悬浮液,控制离心力及时间,使沉降系数最大的粒子先沉降,而上清液中不再含有这种粒子;取出上清液,增加离心力及时间使沉降系数小的粒子再沉降,如此逐级分离。如果悬浮液中只含有一种固形物粒子,则只需要一步离心即可将其沉降至管底。如果悬浮液中含有不止一种待分离的目标固形物,则可以选用逐步增加离心力及时间的方法,典型应用便是细胞中各种细胞器的分离(图 1-1)。

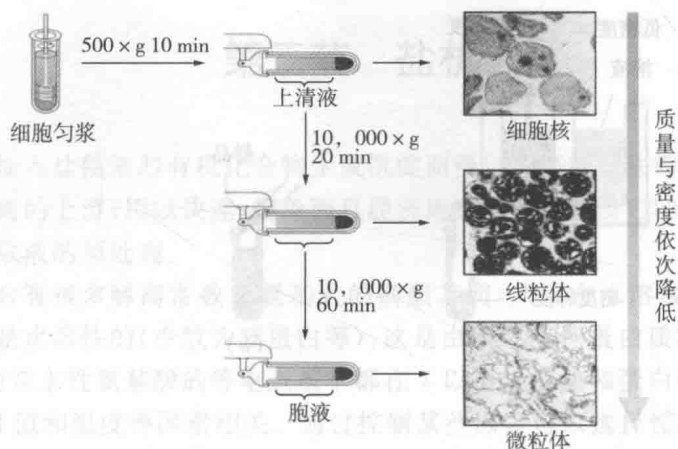


图 1-1 差速离心法分离细胞器

然而,由于距离离心管底较近的那些轻小固形物也会在较短的时间里抵达管底,因此差速离心得到的固形物往往是不均一的,需要将沉淀重新悬浮、洗涤、再次离心,反复数次,才有较好的效果。另一方面,差速离心操作比较麻烦,其收率和纯度不可能做到两者兼得。所以差速离心一般用于粗级分离,而不用与精细分离。

四、等密度-梯度离心

一般差速分级离心只能分离沉降系数差别在 10 倍以上的颗粒,在 10 倍以下的颗粒就难以分开了。密度梯度离心可以分离沉降系数相差 $10\% \sim 20\% S$ 的颗粒,或者颗粒的密度差小于 0.01 g/mL 的组分。可以同时使混合样品中沉降系数相差在 $10\% \sim 20\% S$ 的几个组分分开,得到的产品纯度较高。

当不同固形物存在密度差时,在离心力作用下,固形物向下沉降或向上浮起,一直移动到与它们密度恰好相等的位置上并形成区带(图 1-2),此时密度差为零,离心力的值也即为零。当固形物继续向密度大的液相区域移动时,会受到指向转轴中心的力而上浮;相反,当固形物移动到密度较其本身密度小的液相区域时则会继续沉降。由此也可以看出,不管固形物的质量或体积是多少,只要密度相等便会处于同一区带上。两种离心方法各自利用了固形物特性中的大小或密度,如若将两种方法结合起来可以更高效地起到分离效果。最常见的应用便是首先用差速离心分离不同大小的组分,然后将各组分进行等密度-梯度离心(图 1-3)。

一般先用差速分离法将具有相同沉降系数的组分进行分离,接着用等密度-梯度离心将具有不同密度的组分进行进一步分离。

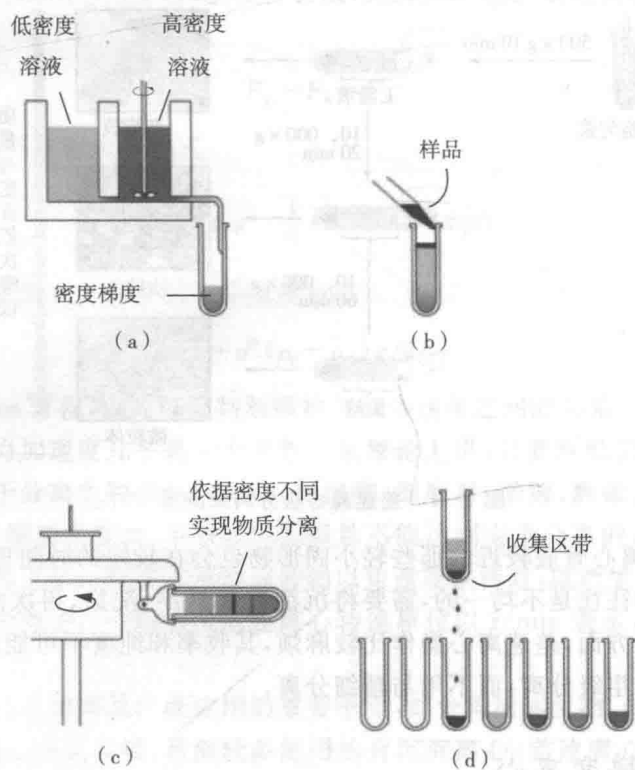


图 1-2 等密度-梯度离心法的操作步骤

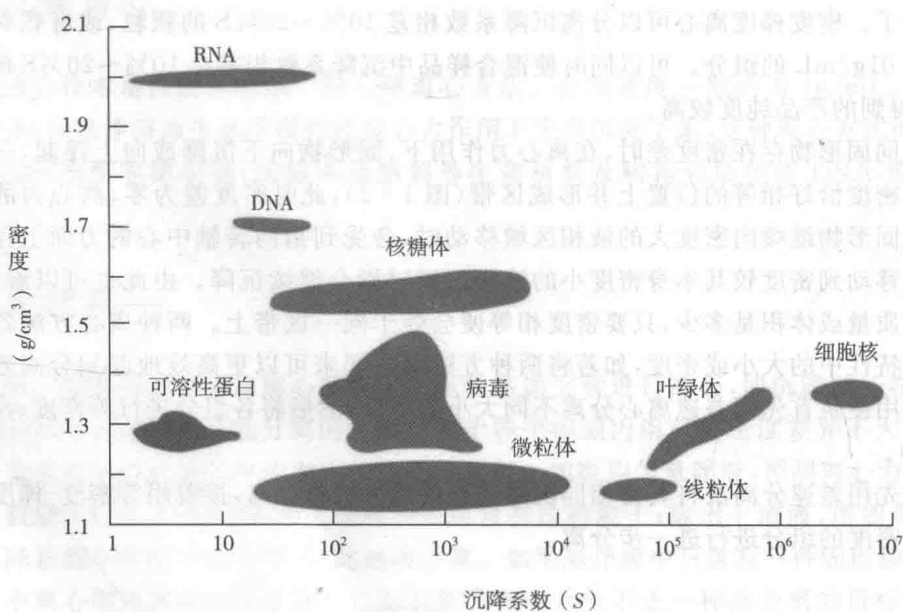


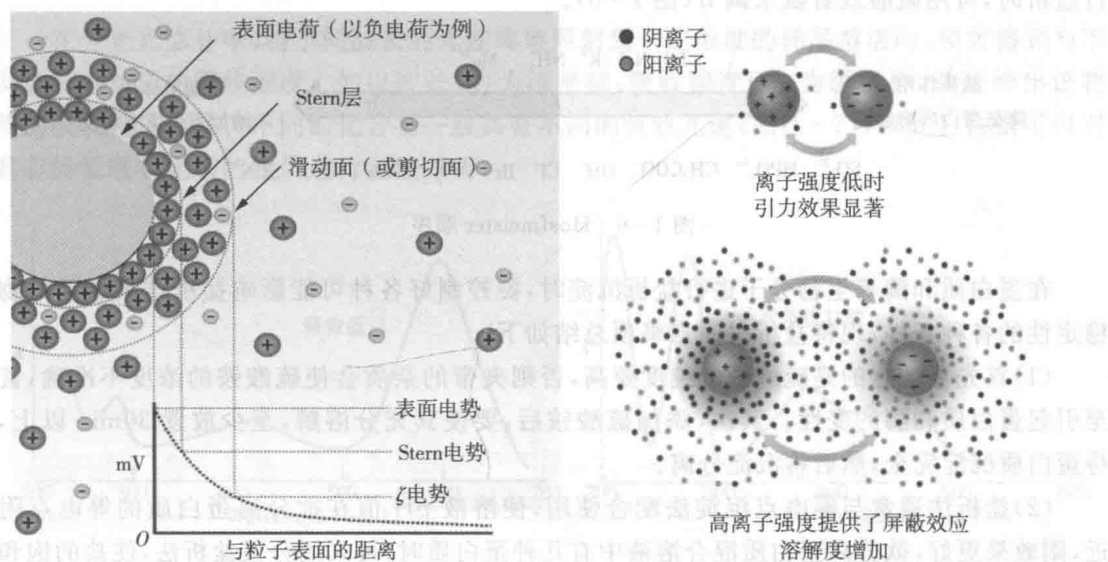
图 1-3 联合使用差速离心和等密度-梯度离心分离法分离不同类型的细胞组分

第二节 盐析

向提取液中加入盐使某些有机化合物生成沉淀而得以分离的方法即为盐析。盐析通常用在生物物质分离的上游,用以快速、简单而且经济地去除部分杂质,其操作温和,尤其适合核酸和蛋白质提取液的预处理。

核酸分子中含有很多解离常数比氨基大的磷酸基团,从而在水溶液中往往带负电荷。大多数蛋白质都是水溶性的(少数为膜蛋白等),这是由于可溶性蛋白质将亲水性氨基酸露在分子的外面,而亲水性氨基酸的等电点基本都在7以下。核酸和蛋白质的溶解性由盐浓度、溶剂极性、pH值和温度等因素相关。通过控制某些因素可以选择性地使提取液中的某些组分沉淀下来。这里针对盐浓度这一因素对蛋白质盐析作一详细说明。

低浓度的盐往往会增加核酸和蛋白质的溶解度,这种现象叫作盐溶(salting in)。低浓度的盐可以掩盖核酸和蛋白质的带电基团(图1-4(a)),从而削弱这些化合物之间静电引力,使其不利于相互聚集而发生沉淀(图1-4(b))。因此,在一定范围内增加盐浓度会利于核酸和蛋白质的溶解。



(a) 以Stern模型展示盐离子在蛋白质表面的分布

(b) 不同盐离子浓度下蛋白质之间的引力效应不同

图1-4 低浓度盐离子对蛋白质表面电荷的屏蔽效应

然而,当溶解度增加到某一峰值以后,继续增加盐的浓度会使这些有机化合物的溶解度降低,这种现象叫作盐析(salting out)。核酸或蛋白质在水(多数为水,也可能是其他溶剂)中溶解时,表面有很多水合分子,形成水化层,这一结构对核酸和蛋白质的溶解稳定性非常重要。盐离子的溶解同样会在表面形成水化层,且盐离子与水分子的结合力要远大于核酸和蛋白质,因此,随着盐浓度的增加,核酸或蛋白质表面的水合分子将越来越少,分子间的“隔阂”越来越弱,最终将聚集在一起发生沉淀(图1-5)。

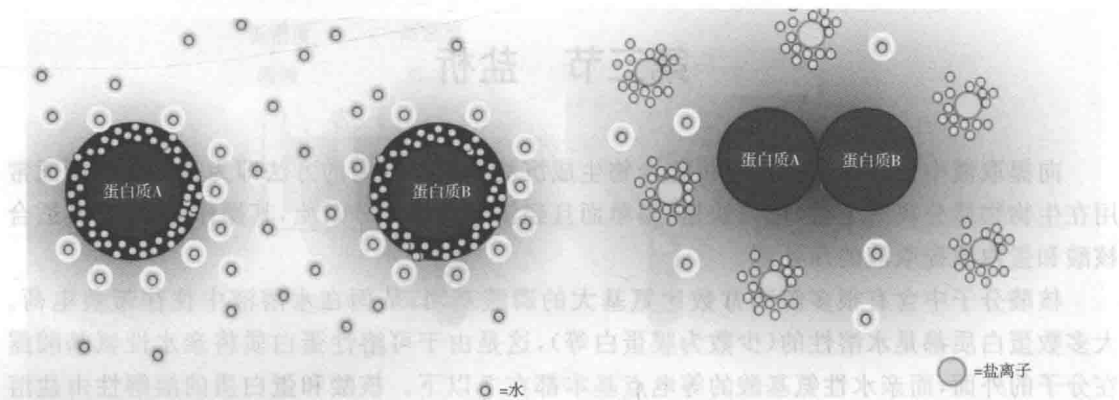


图 1-5 盐离子对蛋白质表面水合层的破坏导致蛋白质互作、沉淀

不同的盐对蛋白质的沉淀效果不同,在蛋白质和酶的盐析中,常用的中性盐主要有 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 Na_2SO_4 、 K_2SO_4 、 MgSO_4 、 NaCl 、 Na_3PO_4 等,其中应用最多最重要的是 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,因为它在水中的溶解度大且温度系数小,分离效果好,不易引起蛋白质和酶的变性失活,价格便宜。另外,硫酸铵溶液的 pH 常在 4.5~5.5 之间,需在其他 pH 条件下进行盐析时,可用硫酸或者氨水调节(图 1-6)。

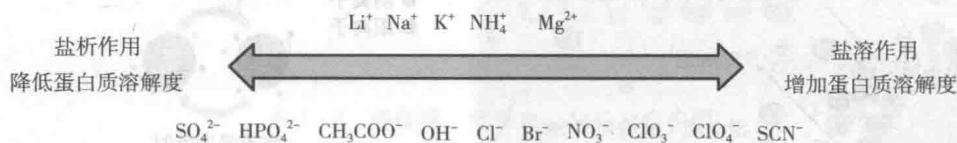


图 1-6 Hofmeister 顺序

在蛋白质和酶等生物分子进行盐析沉淀时,要控制好各种可能影响盐析结果和目的物稳定性的各种条件,现将盐析时注意事项总结如下:

(1) 首先要注意的是硫酸铵的纯度要高,否则夹带的杂质会使硫酸铵的浓度不准确,甚至引起蛋白质和酶的变性。其次,添加硫酸铵后,要使其充分溶解,至少放置 30min 以上,待蛋白质沉淀完全,然后将沉淀分离。

(2) 盐析法通常与等电点沉淀法配合使用,使溶液 pH 值在欲分离蛋白质的等电点附近,则效果更好,欲分离蛋白质混合溶液中有几种蛋白质时,可采用分段盐析法,使盐的饱和度由低到高逐次增加,各种蛋白质就依次沉淀分离出来。

(3) 由于高浓度盐溶液对蛋白质有一定的保护作用,所以盐析操作一般可以在室温下进行。而某些对热特别敏感的酶,则应在低温条件下进行。另外在保证蛋白质不会热变性的情况下,还要注意各种蛋白质溶解度随温度变化,大部分蛋白质在低温时溶解度较低,但也有少数蛋白质在较高温度时溶解度较低,如血红蛋白和肌红蛋白,25℃ 比 0℃ 时溶解度低,更容易盐析。

(4) 在盐析条件相同的情况下,蛋白质浓度越高越容易沉淀,但蛋白质回收率越低。因此,必须选择适当的蛋白质浓度,尽可能避免共沉作用,同时具有较好的分离效果和回收率。通常认为,比较适中的蛋白质浓度是 2.5%~3%。

(5)盐析法得到的蛋白质沉淀含有大量盐,必须对其进行脱盐处理,以获得较纯的产品和便于进一步纯化,常用方法有透析、G-25 凝胶层析、膜分离等。

盐析是众多沉淀技术中的一种,其他还包括等电点沉淀法、有机溶剂沉淀法、聚合物沉淀法和金属离子沉淀法等,这些沉淀技术的机理与盐析有类似之处。包括盐析在内的沉淀技术除在蛋白质提取中应用广泛,也被用来分离、纯化核酸,如核酸提取缓冲液中 NaCl 的加入、利用氯化锂沉淀 RNA、乙醇沉淀 DNA 等。

第三节 分光光度法

分光光度法是通过测定被测物质在特定波长处或一定波长范围内光的吸收度,对该物质进行定性和定量分析的方法。用紫外光源测定无色物质的方法,称为紫外分光光度法;用可见光光源测定有色物质的方法,称为可见光光度法。分光光度法的应用光区还包括红外光区等,但上述的紫外光区与可见光区是最常用的。

一、分光光度法定性和定量的基本原理

在分光光度计中,将不同波长的光连续地照射到一定浓度的样品溶液时,便可得到与不同波长相对应的吸收强度。如以波长(λ)为横坐标,吸收强度(A)为纵坐标,就可绘出该物质的吸收光谱曲线。不同的化合物一般具有不同的吸收光谱(图 1-7),以此为依据可以对具有特征吸收光谱的物质进行定性分析。

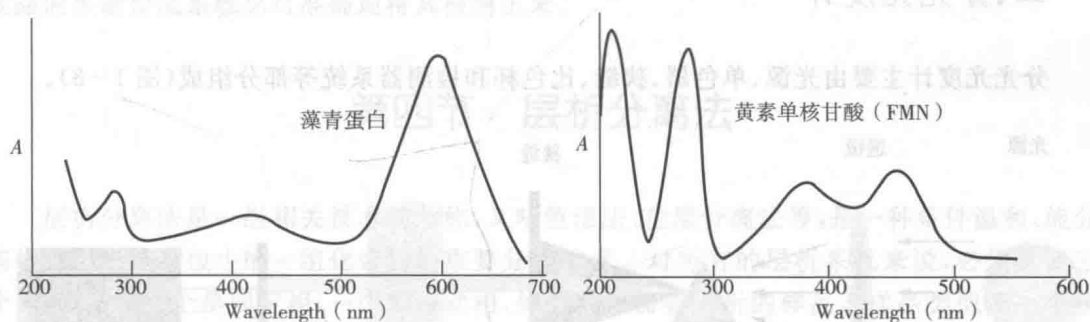


图 1-7 以藻青蛋白和黄素单核苷酸为例说明不同化合物具有不同的吸收光谱

另外,吸收光谱还可以用来检测样品的纯度。最常见的便是利用分光光度法对核酸纯度进行检测。核酸中的嘌呤和嘧啶对波长为 260nm 的光有极大吸收,如果提取的核酸纯度高,则测得的 260nm 处的吸光度值应为 280nm 处的 2 倍,为 260nm 处的 1.8 倍。最有可能与核酸共存的杂质或基团有蛋白质(特征吸收峰为 280nm),芳香族侧链、酚类、尿素(230nm),以及 EDTA(260nm)。这些杂质与核酸共存后将引起 A_{260}/A_{280} 或 A_{260}/A_{230} 的比值发生变化,因此可以通过测定样品对这些光的吸光度值来对其纯度进行检测。

在对某一化合物进行定量检测时,为了最大程度消除其他物质的影响以及增加灵敏度,往往从混合物中分离出待测化合物的最大吸收光对其进行照射。当一束强度为 I_0 的单体

光垂直照射某物质的溶液后,由于一部分光被体系吸收,因此透射光的强度降至 I ,则溶液的透光率:

$$T\% = I/I_0 \times 100\% \quad (1-7)$$

根据朗伯(Lambert)-比尔(Beer)定律:

$$\log(I/I_0) = -\epsilon \times d \times c \quad (1-8)$$

定义吸光度值:

$$A = -\log(I/I_0) \quad (1-9)$$

则:

$$A = \epsilon \times d \times c \quad (1-10)$$

式中, d 为溶液层厚度(cm), c 为溶液的浓度(g/dm^3), ϵ 为吸光系数。其中吸光系数与溶液的本性、温度以及波长等因素有关。溶液中其他组分(如溶剂等)对光的吸收可用空白液扣除。

由上式可知,当固定溶液层厚度和吸光系数时,吸光度 A 与溶液的浓度 c 呈线性关系。在定量分析时,首先需要测定待测物质的吸收光谱,从中确定最大吸收波长,然后以此波长的光为光源,测定一系列已知浓度溶液的吸光度 A ,作出 $A-c$ 工作曲线。在分析未知溶液时,根据测量的吸光度 A ,查工作曲线即可确定出相应的浓度。这便是运用分光光度法进行定量分析的基本原理。

二、分光光度计

分光光度计主要由光源、单色器、狭缝、比色杯和检测器系统等部分组成(图 1-8)。

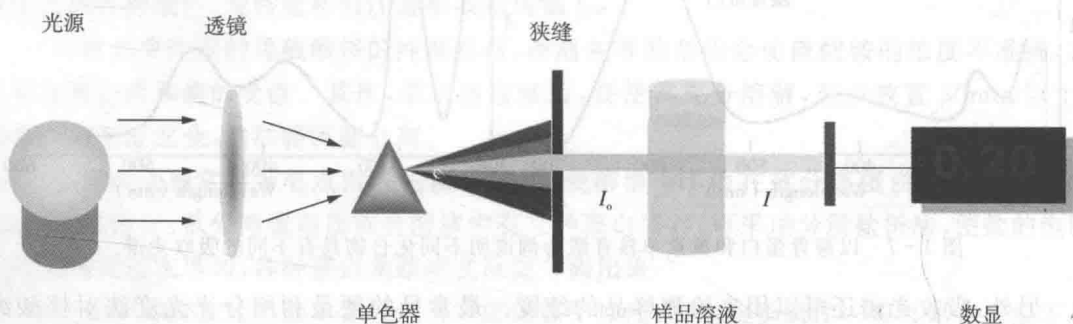


图 1-8 分光光度计的结构示意图

1. 光源

一个好的光源要求具备发光强度高、光亮稳定、光谱范围较宽和使用寿命长等特点。一般的光度计采用稳控的钨灯,适用于 $340 \sim 900\text{nm}$ 范围的光源。更先进的分光光度计中有稳压调控的氢灯,适宜于作 $200 \sim 360\text{nm}$ 的紫外分光分析光源。

2. 单色器

单色器的作用在于根据需要选择一定波长的单色光。所谓单色光是指某特定波长有最大发射,而在相邻较长和较短波长的发射能量较少。最简单的单色光是光电比色上所采用的滤光片(一定颜色的玻璃片),由于通过光线光谱范围较宽,所以光电比色分辨效果较差。

棱镜和光栅是较好的单色光器,它们能在较宽光谱范围内分离出相对较纯的光线。

3. 狭缝

通过单色器的发射强度可能过强,也可能过弱,不适于检测。狭缝是由一对隔板在光路上形成的缝隙,通过调节缝隙的大小来调节入射单色光的强度使入射光形成平行光线,以适应检测器的需要。光电比色计的狭缝是固定的,而光度计和分光光度计的缝隙大小是可调的。

4. 比色杯

比色杯又叫吸收杯、样品杯,是光度测量系统中最重要部件之一。在可见光范围内测量时选用光学玻璃比色杯,在紫外线范围内测量时要选用石英比色杯。保护比色杯的质量是取得良好的分析结果的重要条件之一,不得用粗糙坚硬物质接触比色杯,不能用手指拿取比色杯的光学面,用后要及时洗涤,不得残留测定液。

5. 检测器系统

硒光电池、光电管或光电倍增管等光电元件常用来作为受光器,将通过比色杯的光线能量转变成电能。进一步再用适量的方法测量所产生的电能。光电比色计用硒光电池作为受光器,其光敏感性低,不能检出强度非常弱的光线,对波长在 270nm 以下和 700nm 以上的光线不敏感。较精密的分光光度计都采用真空光电管或光电倍增管作为受光器,并应用放大装置以提高敏感度,虽然光谱范围狭窄的单色光的能量比范围宽要弱很多,但这种有放大线路的灵敏检流系统仍可准确地将其检测出来。

第四节 层析分离法

层析分离法是一组相关技术的总称,又叫色谱法、色层分离法等,是一种条件温和、能分离物化性能差别很小的一组化合物的重要分离技术。对所有的层析系统来说,必须具备三个单元部分,一个是固定相,一个是移动相,另一个是需要离析的样品。样品类似于一个狭窄的原始色区施加在固定相上面,样品组分在固定相和移动相之间分布是可逆的并取决于分布系数值,随着它们被移动相带走而不同程度地受固定相阻滞实现分离。

一、层析技术分类

层析技术有很多种,根据不同的标准,可以分成多种类型。

1. 根据流动相的形式进行分类,层析可分为液相层析和气相层析。气相层析是指流动相为气体的层析,而液相层析是指流动相为液体的层析。气相层析测定样品时需要汽化,这大大限制了其在食品生化领域的应用,主要用于氨基酸、糖类、脂肪酸、核酸等小分子的分析鉴定;而液相层析是食品生化领域常用的层析形式,适用于样品的分析、分离。

2. 根据固定相基质的形式进行分类,层析可以分为纸层析、薄层层析和柱层析。纸层析是以滤纸作为基质的层析。薄层层析是将基质在玻璃或塑料等光滑表面铺成一薄层,在薄层上进行层析。柱层析是将基质填装在管中形成柱形,在柱中进行层析。纸层析和薄层层析主要适用于小分子物质的快速监测分析和少量分离制备,通常为一次性使用,而柱层析是常用的层析形式,适用于样品的分析、分离分析、制备等。蛋白质等生物大分子分离纯化中常用的凝胶层析、离子交换层析、亲和层析、高效液相色谱等都通常采用柱层析形式。

3. 根据分离原理的不同进行分类,层析主要可分为吸附层析、分配层析、离子交换层析、凝胶层析、亲和层析等。

吸附层析是以吸附剂为固定相,根据固定相对待分离物质的吸附能力差异而使样品中各组分分离的方法。

分配层析是利用样品中不同组分在固定相和流动相之间的分配系数不同而达到分离目的的一种层析技术。

离子交换层析是以离子交换剂为固定相,利用离子交换剂上的活性基团对各组分离子的亲和力不同而达到分离效果的一种层析技术。

凝胶层析是以各种多孔凝胶为固定相,根据各组分的相对分子质量大小而达到分离目的的一种层析技术。

亲和层析是利用生物大分子与配体间专一的、可逆的亲合作用而使酶等生物大分子进行分离的一种层析技术。

二、纸层析

纸层析是分配层析的一种。分配层析是利用混合物中各组分在两种不同溶剂中的分配系数不同而使物质分离的方法。分配系数是指一种溶质在两种互不相溶的溶剂中的溶解达到平衡时,该溶质在两种溶剂中所具有的浓度之比。不同的物质因其在各种溶剂中的溶解度不同,因而也就有不同的分配系数。分配层析中应用最广泛的多孔支持物是滤纸,其次是硅胶、硅藻土、纤维素粉、淀粉和微孔聚乙烯粉等。下面主要介绍纸层析。

纸层析是以滤纸为惰性支持物的分配层析。滤纸纤维和水有较强的亲和力,能吸收22%左右的水,而且其中6%~7%的水是以氢键形式与纤维素的羟基结合,在一般条件下较难脱去,而滤纸纤维与有机溶剂的亲和力甚弱,所以一般的纸层析实际上是以滤纸纤维的结合水为固定相,以有机溶剂为流动相。在实际操作中,点样后的滤纸一端浸没于流动相液面之下,由于毛细作用,有机相即流动相开始从滤纸的一端向另一端渗透扩展。当流动相(有机相)沿滤纸经点样处时,样品点上的溶质在水和有机相之间不断进行分配,一部分样品离开原点随流动相移动,进入无溶质区,此时又重新分配,一部分溶质由流动相进入固定相(水相)。随着流动相的不断移动,因样品中各种不同的溶质组分有不同的分配系数,移动速率也不一样,所以各种不同的部分按其各自的分配系数不断进行分配,并沿着流动相流动的方向移动。对固定相亲和力小的组分相对地移动快些,单位时间内移动的距离就大些;反之,对固定相亲和力大的组分移动就慢些,单位时间内移动的距离就小些。这样,经过展开一定距离后,各组分便可得到分离(图1-9)。

纸层析对混合物进行分离时,发生两种作用:第一种是溶质在结合于纤维上的水与流过

滤纸的有机相进行分配(即液-液分配);第二种是滤纸纤维对溶质的吸附及溶质溶解于流动相的不同分配比进行分配(即固-液分配)。显然混合物的彼此分离是这两种因素共同作用的结果。

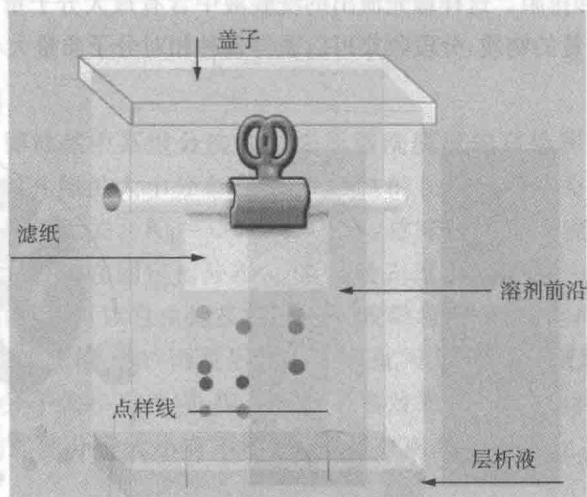


图 1-9 纸层析示意图

综上所述,不同组分在滤纸上展展开后迁移距离的是不同的,其迁移能力可用比移值 R_f 来表示:

$$R_f = \text{组分移动的距离} / \text{溶剂前沿移动的距离}$$

$$= \text{原点至组分斑点中心的距离} / \text{原点至溶剂前沿的距离}$$

在滤纸、溶剂、温度等各项实验条件恒定的情况下,各物质的 R_f 值是不变的,它不随溶剂移动距离的改变而变化。 R_f 与分配系数 K 的关系为:

$$R_f = 1 / (1 + \alpha K) \quad (1-11)$$

α 是由滤纸性质决定的一个常数。由此可见, K 值越大,溶质分配于固定相的趋势越大,而 R_f 值越小;反之, K 值越小,则分配于流动相的趋势越大, R_f 值越大。 R_f 值是定性分析的重要指标。

在样品所含溶质较多或某些组分在单相纸层析中的 R_f 比较接近,不易明显分离时,可采用双向纸层析法。该法是将滤纸在某一特殊的溶剂系统中按一个方向展层以后,即予以干燥,再转向 90 度角,在另一溶剂系统中进行展层,待溶剂到达所要求的距离后,取出滤纸,干燥显色,从而获得双向层析谱。应用这种方法,即使溶质在第一溶剂中不能完全分开,经过第二种溶剂的层析也能得以完全分开,大大地提高了分离效果。

三、凝胶过滤层析

凝胶过滤层析又叫作排阻层析,常用于蛋白质、DNA 分离纯化、缓冲液替换和除盐等生化实验操作中。

由原理图 1-10 可见,含有不同组分的溶液,通过网状结构的凝胶(常用的有葡聚糖凝胶、琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶等),小分子物质自由扩散于凝胶颗粒的缝隙中而进入凝胶相,大分子物质被排阻在凝胶相外。加入洗脱剂后溶液向下推移,大分子及剩余小分子进入下层新的凝胶相中,重复上述扩散和排阻。这样最先流出的洗脱液中含有最大分子量的物质,而最后流出的洗脱液中含有最小分子量的物质,分段收集可以获得各种相对分子质量大小的区段。

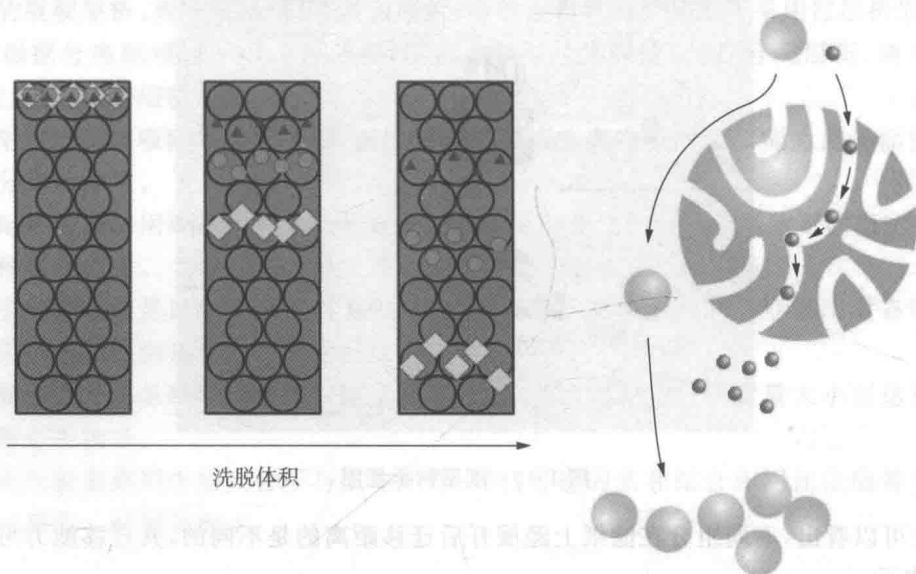


图 1-10 凝胶过滤层析的原理图

与其他层析技术一样,凝胶过滤层析也有自己的分配系数,并可以通过分布系数对层析系统的特征进行描述。凝胶床内各部分体积关系如图 1-11 所示,并可用下式表示:

$$V_t = V_o + V_i + V_g \quad (1-12)$$

式中,外水体积(V_o)是指凝胶柱中凝胶颗粒周围空间的体积,也就是凝胶颗粒间液体流动相的体积;内水体积(V_i)是指凝胶颗粒中孔穴的体积,凝胶层析中固定相体积就是指内水体积;基质体积(V_g)是指凝胶颗粒实际骨架体积;柱床体积(V_t)是指凝胶柱所能容纳的总体积。

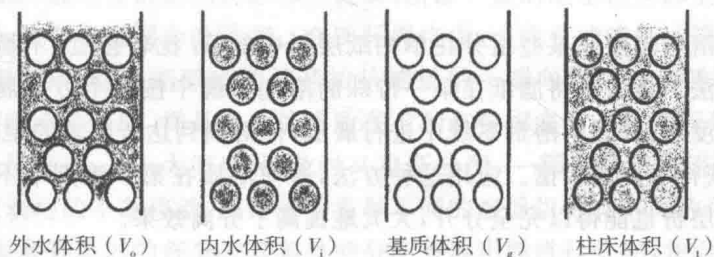


图 1-11 凝胶床内各部分体积示意图

洗脱体积 V_e 与 V_o 及 V_i 之间的关系可以用下式表示:

$$V_e = V_o + K_d V_i \quad (1-13)$$