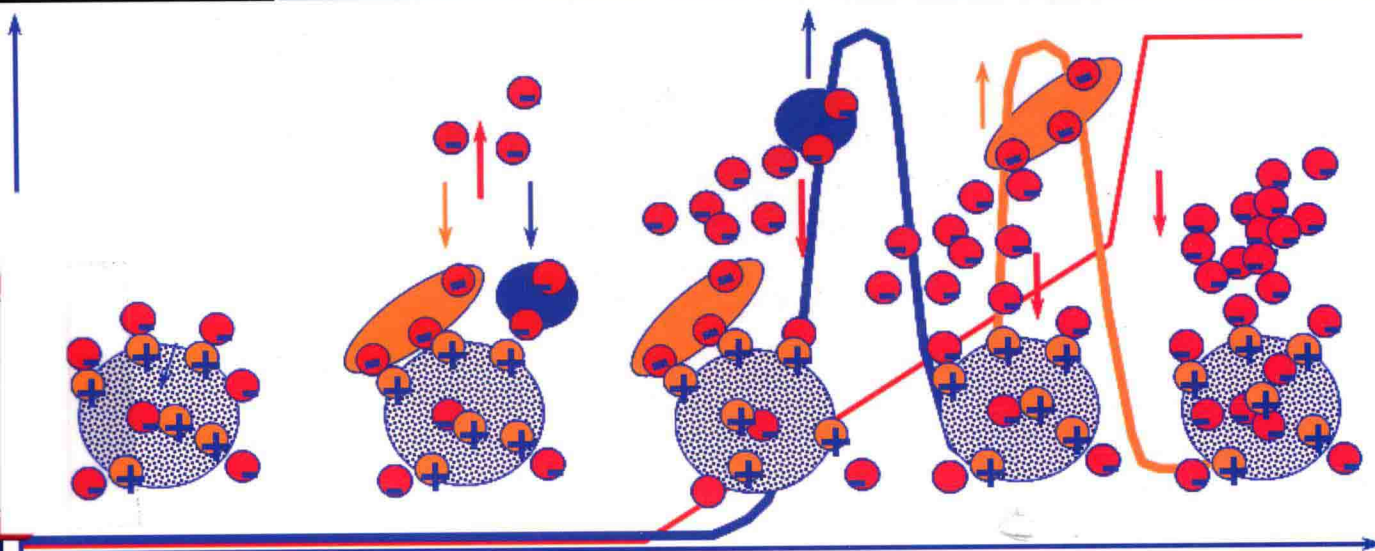




“十三五”江苏省高等学校重点教材

生物分离 实验技术

胡永红 谢宁昌 主编



化学工业出版社



“十三五”江苏省高等学校重点教材

生物分离 实验技术

胡永红 谢宁昌 主编



6
化学工业出版社

·北京·

本教材紧紧围绕生化分离中重要分离技术的原理和方法,介绍主要的新型生化分离技术,通过单元实验操作以及大型综合实验操作,提高学生利用理论知识的能力,培养学生的综合能力,使学生对本学科的前沿和发展方向有全面的了解。

本书适合生物工程、生物技术专业的师生以及对生物分离技术实验感兴趣的读者使用。

图书在版编目 (CIP) 数据

生物分离实验技术/胡永红,谢宁昌主编. —北京:
化学工业出版社, 2018.12

ISBN 978-7-122-33645-3

I. ①生… II. ①胡…②谢… III. ①生物工程-分
离-实验 IV. ①Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 297280 号

责任编辑: 赵玉清

文字编辑: 周 侗

责任校对: 宋 夏

装帧设计: 刘丽华

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 刷: 三河市延风印装有限公司

装 订: 三河市宇新装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张 8½ 字数 204 千字 2019 年 8 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888

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: 29.00 元

版权所有 违者必究

编 委 会

主 审：欧阳平凯

主 编：胡永红 谢宁昌

副 主 编：唐拾贵

编写人员：胡永红 谢宁昌 唐拾贵 韦 策

宫长斌 孟政杰 曾 杨 姚 忠

胡 南 吴菁岚 吕 浩 吴 昊

韦 萍 应汉杰 姜 岷 谢寒宵

前言

近年来，随着生物工程的飞速发展，生物分离工程作为生物工程学科中必不可缺的“下游技术”，也得到了迅猛发展。随着实验室建设和实验教学改革工作的深入开展，生物分离工程专业实验教学已经从原先传统的分离技术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加综合性实验以及创新实验几大板块。

本教材的目的在于，通过实验操作，使学生理解并掌握生化分离中重要的分离技术、原理和方法。通过介绍主要的新型生化分离技术，使学生对本学科的前沿和发展方向有全面的了解。通过这门实验课，有利于提高学生的理论知识水平，培养学生的综合能力。

国内已出版了数部有关生物分离工程方面的理论书，但本门课程相配套的生物分离工程实验教材却较为匮乏。出版一本符合社会需求且具有创新性的生物分离实验教材，是生物工程、生物技术专业的师生以及对生物分离技术实验感兴趣的读者的迫切希望。本教材与同类实验教材相比特色明显：胡永红教授团队将包括国家技术发明奖、江苏省科学技术奖在内的二十五年科研成果凝练成大型综合实验，让学生不仅能够进行基础实验操作，还能尝试工业化生产实践。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，并在教材中详细描述实验仪器的操作方法，力争做到图文并茂，使实验具有直观性和可操作性。

本书编者全部来自国家级实验教学示范中心和国家级精品课程组，他们有着丰富的授课经验与指导实验经验。其中，胡永红老师负责编撰了实验 18、19；谢宁昌老师负责编撰了实验 8、12、13、17；唐拾贵老师负责编撰了实验 4、5、6、7；宫长斌老师负责编撰了实验 3、15、16；韦策老师负责编撰了实验 9、10、14；曾杨老师负责编撰了实验 1、2、20；孟政杰老师负责编撰了实验 11；姚忠负责编撰了实验 21；胡南负责编撰了实验 22；吴菁岚负责编撰了实验 23；吴昊负责编撰了实验 24；吕浩负责编撰了实验 25；韦萍负责编撰了实验 26；应汉杰和姜岷负责校验工作，谢寒宵负责收集资料。

本书稿编写过程中得到了长期从事生物分离工程领域科研与实践工作的专家指导，在此表示崇高敬意！对参加了本书编写、整理和校对的所有成员表示衷心感谢！

由于作者专业知识水平有限，书中难免存在不足之处，敬请广大读者批评指正。

编者

2018 年 12 月于南京工业大学

目录

第一部分 单元实验/ 001

实验 1	超声波破碎辅助提取薰衣草精油	001
实验 2	黄芩中黄芩苷的提取	003
实验 3	凝胶过滤色谱法分离纯化酸性磷酸酯酶	005
实验 4	磷酸三丁酯萃取乳酸	010
实验 5	反胶团萃取柚皮苷	014
实验 6	CO ₂ 超临界萃取葛根中葛根素	016
实验 7	双水相萃取分离葡萄籽中原花青素	020
实验 8	粗脂肪的提取——索氏提取法	023
实验 9	活性炭吸附色素——亚甲基蓝法	028
实验 10	离子交换树脂总交换容量的测定	030
实验 11	体积排阻法液相色谱检测样品中胰岛素的含量及其质量监控	034
实验 12	纸色谱分离纯化并鉴定氨基酸	041
实验 13	醋酸纤维薄膜电泳分离纯化并鉴定血清蛋白	045
实验 14	盐析大豆蛋白	048
实验 15	L-苯丙氨酸结晶	051
实验 16	真空冷冻干燥生物制剂	054

第二部分 综合实验/ 059

实验 17	SDS-PAGE 分离纯化并鉴定酸性磷酸酯酶	059
实验 18	1, 6-二磷酸果糖的提取	077
实验 19	酵母发酵液提取分离赤藓糖醇	085
实验 20	包埋法固定化酵母发酵产啤酒	089
实验 21	反应分离耦合技术生产 L-苹果酸	095
实验 22	游离整体细胞法生产 L-天冬氨酸	102
实验 23	离子交换法制备纯水	107

实验 24	利用磁性树脂分离提纯赤霉素 GA3	112
实验 25	链霉菌发酵液提取多抗菌素	116
实验 26	脱硫杆菌胞内有效蛋白质分离纯化方法	123

参考文献/ 128

第一部分 单元实验

实验 1 超声波破碎辅助提取薰衣草精油

1 实验目的

- 1.1 了解利用超声波辅助萃取提取精油的方法。
- 1.2 学习并掌握薰衣草花精油的提取方法和操作过程。

2 实验原理

薰衣草 (*Lavender*) 是唇形科薰衣草属多年生植物，是世界上使用最广泛的芳香植物之一。

薰衣草精油是从薰衣草属植物花穗中提取分离得到的具有挥发性的油状液体，具有杀菌、镇静、催眠等多种生理作用，广泛应用于化妆品、食品添加剂等领域。

提取精油的方法有压榨法、水蒸气蒸馏法和有机溶剂萃取法，以及超声波破碎辅助提取、超临界萃取和微波辅助水蒸气蒸馏等。本实验采用超声波破碎辅助提取法。

超声波是一种频率在 20kHz 以上的声波，是一种机械振动在媒质中的传播过程，具有聚束、定向、反射、投射等特性。超声波提取法是应用超声波强化提取植物的有效成分，是一种物理破碎过程。超声波辅助提取的机制包括机械机制、热学机制及空化机制。超声波提取的空化作用是：存在于提取液中的微气泡（空化核）在声场作用下振动，当声压达到一定值时，气泡迅速增长，然后突然闭合，在气泡闭合时产生激波，在波面处造成很大压强梯度，因而产生局部高温高压，温度可达 5000K 以上，压力可达上千大气压，将植物细胞壁打破，香料得以浸出，从而提高提取率。另外，超声波次级效应，如机械振动、乳化、扩散、击碎、化学效应等，也能加速提取成分的扩散、释放并与溶剂充分混合而利于提取。选择合理的声学参数，使萃取液达到最大空化状态，才能获得良好的提取效果。该法最大的优点是提取时间短、温度较低、收率高。

3 实验器材

- 3.1 KQ-100VDB 型双频数控超声波清洗器：昆山市超声仪器有限公司（图 1.1）。
- 3.2 N-101 型旋转蒸发器：上海爱朗仪器有限公司（图 1.2）。
- 3.3 SHZ-D(Ⅲ) 循环水式真空泵：巩义市英峪予华仪器厂（图 1.3）。
- 3.4 国家标准检验筛：绍形市上虞纱筛厂。
- 3.5 DHG-9140A 型电热恒温干燥箱：上海一恒科学仪器有限公司。



图 1.1 超声波清洗器

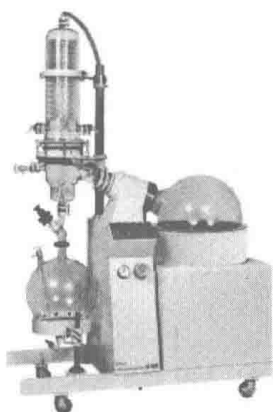


图 1.2 旋转蒸发器

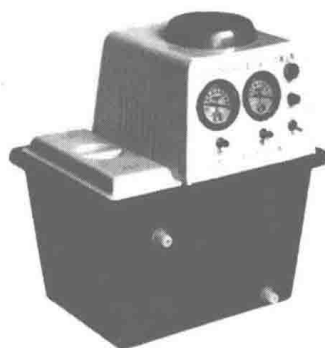


图 1.3 循环水式真空泵

3.6 FA2004 电子天平：上海天平仪器厂。

3.7 XJA-100A 型高速粉碎机：上海标本模型厂。

3.8 100mL 锥形瓶，100mL 烧杯，100mL 量筒，250mL 平底烧瓶，250mL 抽滤瓶。

4 实验试剂

薰衣草干花。

正己烷：分析纯。

5 实验操作

5.1 准备工作：薰衣草干花用高速中药粉碎机粉碎，过 40 目筛。

5.2 提取：称取 5g 已粉碎过筛的薰衣草干花粉末，于 100mL 烧杯内，按料液比 1 : 15 加入正己烷 75mL，充分浸润后置于超声波容器内。超声处理条件：超声功率为 80W，超声温度为 50℃，超声时间 45min。取出冷却至室温。

5.3 回收正己烷：组装好布氏漏斗和抽滤瓶，将已冷却至室温的液体进行抽滤。收集滤液，置于 500mL 圆底烧瓶（旋转蒸发器上使用的烧瓶，并且事先称好质量为 M_1 ）中，在 -0.80MPa 和 40~45℃ 条件下进行旋转 2h，蒸发浓缩到小体积，回收溶剂。

5.4 干燥称重：抽滤得到的粗品放入 120℃ 的电热鼓风干燥箱中 15min，挥尽溶剂，取出冷却后称重 M_2 。

准确称取质量，重复 3 次，取平均值。

6 实验记录、计算与实验结果

烧瓶质量 M_1/g	所得薰衣草精油和烧瓶总质量 M_2/g	薰衣草干花的质量 M/g

$$\text{薰衣草油的得率}(\%) = (M_2 - M_1) / M \times 100$$

式中 M_1 ——圆底烧瓶的质量，g；

M_2 ——圆底烧瓶和薰衣草油的质量，g；

M ——薰衣草干花的质量，g。

7 思考题

- 7.1 本实验设计中, 超声波提取薰衣草精油出油率的主要影响因素有哪些?
- 7.2 提取过程中, 如果超声温度过低或者过高, 对实验结果会产生什么影响?
- 7.3 提取过程中, 如果超声时间过短或者过长, 对实验结果会产生什么影响?

8 注意事项

精油出油率受超声时间影响, 随着超声时间的延长, 精油在正己烷中的溶解度增加, 同时加热时间过长也会造成热敏性物质损失。所以在实验过程中应注意控制超声及加热的时间。

实验 2 黄芩中黄芩苷的提取

1 实验目的

- 1.1 掌握高速离心机的使用方法和原理。
- 1.2 掌握离心技术提取黄芩苷的方法。

2 实验原理

中药提取液成分复杂, 既有有效成分, 又有无效成分(黏液质、鞣质、淀粉、树脂、果胶等), 前者分子量较小, 一般在 1000 以下, 后者分子量较大, 一般在 50000 以上, 它们共同形成 1~100nm 的胶体分散体系。从动力学观点看, 胶体粒子的布朗运动及其带电性(以负电荷为主)导致胶体溶液建立沉淀平衡的时间较长, 平衡后因胶体浓度梯度很小可使胶体溶液暂时保持稳定; 从热力学观点看, 胶体分散体系自身存在巨大的表面能, 为热力学不稳定体系, 胶体粒子自发向吉氏函数减小的方向逐渐聚集而具有沉降趋势。

高速离心法是以离心机为主要设备, 通过离心机的高速旋转, 离心加速度超过重力加速度成千上万倍, 物体在高速旋转中受到离心力的作用而沿旋转切线脱离, 其本身的重力、旋转速度、旋转半径不同, 从而所受的离心力也不同, 在旋转条件相同的情况下, 离心力与重力成正比。中药制剂采用离心分离法进行分离是利用药液中各成分的密度差异, 借助于离心机的高速旋转产生不同离心力使提取液中的大分子杂质沉降速度增加, 杂质沉淀加速并被除去。

一般在制剂生产中, 遇到含水量较高、含不溶性微粒的粒径较小或黏度很大的滤液, 或将几种密度不同且不相混溶的溶液混合物分开, 而且其他方法难以实现时, 可考虑选用离心机进行分离。

在黄芩苷提取工艺中, 由于黄芩苷提取液难抽滤, 使用离心技术能明显提高黄芩苷提取效率。

3 实验器材

- 3.1 烧杯: 500mL, 两只; 容量瓶: 100mL, 两只; 离心管: 100mL, 两支。

- 3.2 GT10-1 型高速离心机：北京时代北利离心机有限公司（图 2.1）。
- 3.3 FA2004 电子天平：上海天平仪器厂。
- 3.4 UV-1600 型紫外可见分光光度计：上海美谱达仪器有限公司（图 2.2）。
- 3.5 XJA-100A 型高速粉碎机：上海标本模型厂。
- 3.6 DHG-9140A 型电热恒温干燥箱：上海一恒科学仪器有限公司。

4 实验试剂

- 4.1 黄芩药材。
- 4.2 50%乙醇溶液：无水乙醇与蒸馏水按 1:1 体积混匀。
- 4.3 浓盐酸：分析纯试剂。
- 4.4 pH 指示剂：pH1.2~2.8 酸性指示剂，pH5.8~8 中性指示剂。



图 2.1 GT10-1 型高速离心机

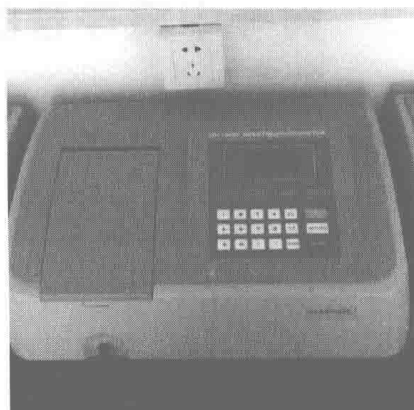


图 2.2 UV-1600 型紫外可见分光光度计

5 实验操作

- 5.1 准备工作：黄芩药材置于 60℃干燥箱内烘干 4h，用高速中药粉碎机粉碎。
- 5.2 提取：用电子天平称取黄芩粉末 50g。将黄芩粉末转移至圆底烧瓶中，加 8 倍量水，煮沸 3h。用纱布滤去药渣，得到滤液。
- 5.3 离心：趁热将滤液倒入 2 支离心管中，用托盘天平进行平衡后，用管式离心机离心，调节转速 4000r/min，时间 20min，留上清液。
- 5.4 酸沉：将上清液倒入烧杯中，放置在水浴锅里保持 80℃，滴加浓盐酸调至 pH2。在水浴锅中继续保温 1h。
- 5.5 离心：趁热将液体倒入 2 支离心管中，用托盘天平进行平衡后，用管式离心机离心，调节转速 4000r/min，时间 20min。留沉淀物。
- 5.6 干燥：沉淀物用 50%乙醇洗涤至 pH7.0。沉淀物经干燥即得黄芩苷粗产品。用电子天平称量，记录产品质量。
- 5.7 黄芩苷含量测定：精确称取实验所得黄芩苷粗产品 50mg，用 50%乙醇溶液溶解定容于 100mL 容量瓶。用干燥滤纸过滤，弃去初滤液，吸取续滤液 2.5mL 于 100mL 容量瓶中，用 50%乙醇定容，按照紫外分光光度计使用方法，于最大吸收波长 278nm 波长处测吸光率。重复三次，编号依次 I、II、III，取三次实验数据平均值（表 2.1）。

表 2.1 黄芩苷含量计算

实验编号	I	II	III
吸光度			
吸光度平均值			
黄芩苷含量/%			

6 实验记录、计算与实验结果

根据吸光度-浓度回归方程：

$$y = 0.064x - 0.0102$$

$$r^2 = 0.9982$$

计算得出对应浓度，按下式计算黄芩苷含量：

$$\text{黄芩苷含量}(\%) = [\text{对应浓度}(\mu\text{g/mL}) \times 100 \times 40] / \text{样品重}(\text{mg})$$

7 思考题

- 7.1 在实验操作过程中，加酸沉淀的原理是什么？
- 7.2 影响黄芩苷提取效率的因素有哪些？
- 7.3 高速离心机的使用有哪些注意事项？

8 注意事项

8.1 黄芩苷为葡萄糖醛酸苷，在酸性条件下黄芩苷分子被还原析出，故而 pH 值大小对黄芩苷提取率有较大影响，调节 pH 值时小心操作。

8.2 浓盐酸易挥发，取用时要注意通风，小心操作，防止溅洒。如果触及皮肤，立即用水冲洗或送医院治疗。

8.3 应严格按照操纵规程操作高速离心机。在升速期间，如高速离心机出现不正常的振动，则不能继续升速，须停机检查。

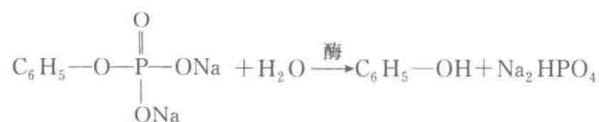
实验 3 凝胶过滤色谱法分离纯化酸性磷酸酯酶

1 实验目的

- 1.1 掌握凝胶色谱的基本原理。
- 1.2 掌握利用凝胶色谱法分离纯化蛋白质的实验技能。

2 实验原理

本实验利用豆芽中提取的酸性磷酸酯酶粗酶溶液，利用凝胶色谱的方法进行分离。然后利用磷酸苯二钠为底物，经过酸性磷酸酯酶作用，水解以后即生成酚和无机磷。其反应式如下：



用 Folin-酚法测定产物酚或用定磷法测定无机磷来检测酸性磷酸酯酶的活力。

凝胶色谱又称凝胶过滤，是一种按分子量大小分离物质的色谱方法。该方法是把样品加到充满着凝胶颗粒的色谱柱中，然后用缓冲液洗脱。大分子不能进入凝胶颗粒中的静止相中，只留在凝胶颗粒之间的流动相中，因此以较快的速度首先流出色谱柱；而小分子则能自由出入凝胶颗粒中，并很快在流动相和静止相之间形成动态平衡，因此就要花费较长的时间流经柱床，从而使不同大小的分子得以分离（图 3.1）。

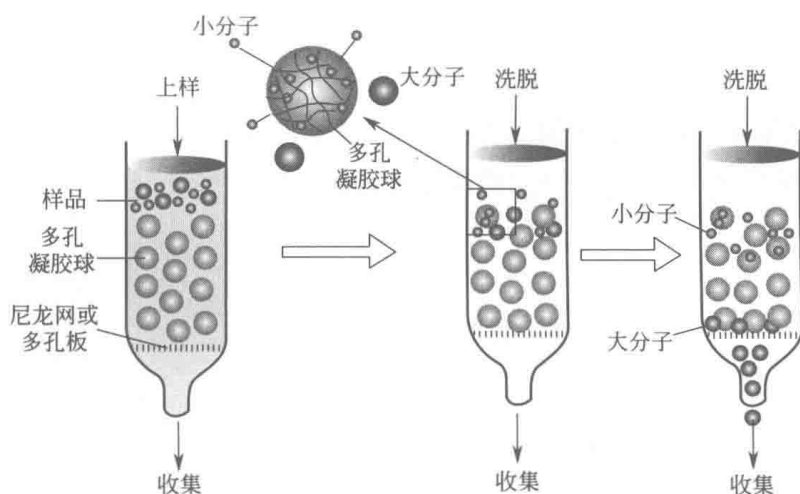


图 3.1 凝胶过滤原理图

凝胶过滤柱色谱所用的基质是具有立体网状结构、筛孔直径一致，且呈珠状颗粒的物质。这种物质可以完全或部分排阻某些大分子化合物于筛孔之外，而对某些小分子化合物则不能排阻，但可让其在筛孔中自由扩散、渗透。任何一种被分离的化合物被凝胶筛孔排阻的程度可用分配系数 K_{av} （被分离化合物在内水和外水体积中的比例关系）表示。 K_{av} 值的大小与凝胶床的总体积 (V_t)、外水体积 (V_o) 及分离物本身的洗脱体积 (V_e) 有关，即：

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

在限定的色谱条件下， V_t 和 V_o 都是恒定值，而 V_e 值却是随着分离物分子量的变化而变化的。分离物分子量大， K_{av} 值小；反之，则 K_{av} 值增大。

V_e （洗脱体积）为某一成分从加入样品算起，到组分的最大浓度（峰）出现时所流出的体积。 V_e 随溶质的分子量大小和对凝胶的吸附等因素而不同。一般分子量较小的溶质，它的 V_e 值比分子量较大的溶质要大。通常选用蓝色葡聚糖-2000 作为测定外水体积的物质。该物质分子量大（为 200 万），呈蓝色，它在各种型号的葡聚糖凝胶中都被完全排阻，并可借助其本身颜色，采用肉眼或分光光度仪检测（210nm 或 260nm 或 620nm）洗脱液体积（即 V_o ）。但是，在测定激酶等蛋白质的分子量时，不宜用蓝色葡聚糖-2000 测定外水体积，因为它对激酶有吸附作用，所以有时用巨球蛋白代替。 V_o 为色谱柱内凝胶颗粒之间隙的总容积，称外水体积。 V_i 为色谱柱内凝胶内部微孔的总容积，称内水体积， $V_i = V_t - V_o$ 。测定内水体积 (V_i) 的物质，可选用硫酸铵、N-乙酰酪氨酸乙酯，或者其他与凝胶无吸附力的小分子物质。

K_{av} 是判断分离效果的一个重要参数。当某种成分的 $K_{av}=0$ 时, 意味着这一成分完全被排阻于凝胶颗粒的微孔之外而最先被洗脱出来, 即 $V_e=V_0$ 。当某种成分的 $K_{av}=1$ 时, 意味着这一成分完全不被排阻, 它可以自由地扩散进入凝胶颗粒内部的微孔中, 而最后被洗脱出来, 即 $V_e=V_t$ 。介于两者分子量之间的物质, 其 $0 < K_{av} < 1$, 在中间位置被洗脱。可见, K_{av} 的大小顺序决定了被分离物质流出色谱柱的顺序。

葡聚糖凝胶有不同的型号, 用于分离不同分子量大小的物质。本实验采用葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 作固相载体, 可分离分子量范围在 2000~70000 之间的多肽与蛋白质。

3 实验器材

3.1 仪器: 色谱装置(色谱柱、恒流泵、自动部分收集器、紫外检测器、记录仪)(图 3.2), 上海沪西仪器厂生产, 1 套/组。

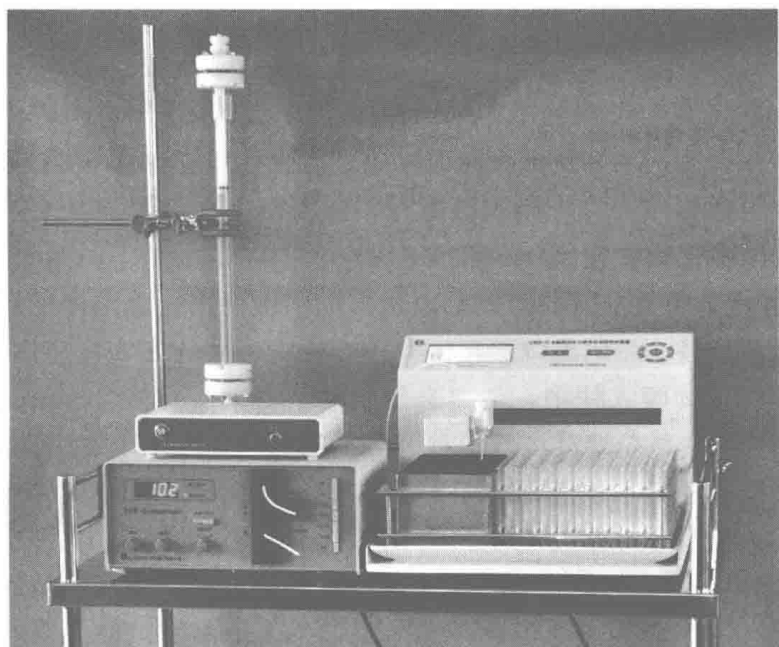


图 3.2 色谱装置

- 3.2 100mL 量筒: 1 个/组。
- 3.3 500mL 烧杯: 1 个/组。
- 3.4 10mm×100mm 试管: 20 根/组。
- 3.5 吸管: 1 个/组。
- 3.6 玻璃棒: 1 支/组。

4 实验试剂

- 4.1 葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 (图 3.3): 50g。
- 4.2 酸性磷酸酯酶粗酶溶液 10mL, 可由豆芽中提取。

5 实验操作

5.1 葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 干粉的预处理: 取葡聚糖凝胶 Sephadex G-75 干粉, 加过量沸水浴中溶胀 3h (新购买的 Sephadex G-75 干粉也可用蒸馏水室温充分溶胀一天),

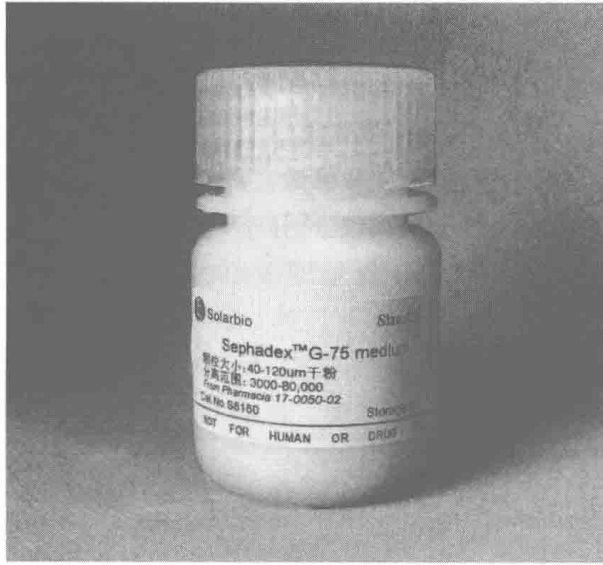


图 3.3 葡聚糖凝胶 Sephadex G-75

该步骤可杀死细菌和霉菌，并可排出凝胶内气泡。溶胀过程中注意不要剧烈搅拌，以防颗粒破碎。待溶胀平衡后搅匀溶液，待凝胶沉降后，倾泻倒去上层清液除去不易沉下的细小颗粒，最后凝胶经减压抽气除去气泡，即可准备装柱。

5.2 装柱与平衡：装柱前须将凝胶上面过多的溶液倾出，取洁净的玻璃色谱柱垂直固定在铁架台上，垂直装好，关闭出口。在柱中注入洗脱液（约 $1/3$ 柱床高度），然后在搅拌下，将浓浆状的凝胶连续倾入柱中，使之自然沉降，待凝胶沉降 $2\sim 3\text{cm}$ 后，打开柱的出口，调节合适的流速，使凝胶继续沉降，待沉降的胶面上升到离柱的顶端约 5cm 处时停止装柱，关闭出水口。装柱要求连续、均匀、无气泡、凝胶不能分层。将洗脱剂与恒流泵相连，恒流泵出口端与色谱柱相连。以 0.9% 的氯化钠为流动相，以 $0.75\text{mL}/\text{min}$ ($\phi 1.6\text{cm}$ 柱) 或 $0.5\text{mL}/\text{min}$ ($\phi 1.0\text{cm}$ 柱) 的速度开始洗脱，用 $1\sim 2$ 倍床体积的洗脱液平衡，使柱床稳定。平衡 1h 。然后在凝胶表面上放一片滤纸或尼龙滤布，以防将来在加样时凝胶被冲起，并始终保持凝胶上端有一段液体。

5.3 凝胶柱总体积 (V_t) 的测定：平衡完毕后，测定凝胶柱床的高度，计算柱床总体积 V_t （凝胶柱直径为 1cm 或 1.6cm ）。

5.4 V_0 的测定：打开出水口，使残余液体降至与胶面相切（但不要干胶），关闭出水口。用细滴管吸取 0.2mL ($4\text{mg}/\text{mL}$) 蓝色葡聚糖-2000，小心地绕柱壁一圈（距胶面 2mm ）缓慢加入，打开出水口（开始收集），等溶液渗入胶床后，关闭出水口，用少许洗脱液冲洗 2 次，待渗入胶床后，再在柱上端加满洗脱液，开始洗脱，作出洗脱曲线。收集并量出从加样开始至洗脱液中蓝色葡聚糖-2000 浓度最高点（肉眼观察）的洗脱液体积即为 V_0 。

蓝色葡聚糖-2000 洗下来之后，还要用洗脱液继续平衡 $1\sim 2$ 倍床体积（实验中平衡 1h ），以备下步实验使用。

5.5 上样、洗脱：将柱中多余的液体放出，使液面刚好盖过凝胶，关闭出口。用移液管吸取 1mL 酸性磷酸酯酶粗酶（原酶液，未稀释）溶液小心地加到凝胶床上，打开出水口，待样品完全进入凝胶后，加少量洗脱液冲洗柱内壁 2 次，待液体完全流进床内后，关闭出水口。在柱上端加满洗脱液，打开恒流泵，开始洗脱收集， 5min 一管。用紫外分光光度计测

定各管收集液的 OD_{280} 值, 如吸光值较大, 可适当稀释。以洗脱体积为横坐标、 OD_{280} 值为纵坐标绘出蛋白质的洗脱曲线。

5.6 酚标准曲线的制作: 按照表 3.1 的要求, 向各试管中依次加入酚标准应用液、乙酸盐缓冲液、碳酸钠溶液和福林-酚试剂。680nm 波长处读取各管的吸光度 A_{680} 。

表 3.1

项目	管号	1	2	3	4	5	0
	0.4mmol/L 酚标准应用液/mL		0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
0.2mol/L 的 pH5.6 的乙酸盐缓冲液 /mL		0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	1
1mol/L 碳酸钠溶液/mL					5		
福林-酚试剂/mL					0.5		

摇匀, 在 35℃ 保温显色 10min

画图: 以加入酚标准溶液的体积 (mL) 为横坐标、 A_{680} 为纵坐标绘出酚溶液的浓度与吸光值的标准曲线。

5.7 取不同出峰时间的蛋白质溶液, 检测酸性磷酸酯酶的活性。如果有 N 个待测样品, 取 $N+1$ 支试管, 编号 1~ N 、0, 将 0 号试管作为空白, 测定 1~ N 号试管在 680nm 处的光吸收值。详细的加样顺序和操作见表 3.2。

表 3.2

项目	管号	1	N	0
	5mmol/L 磷酸苯二钠溶液/mL		0.5	0.5	0.5
35℃ 预热 2min					
酶液(35℃ 预热过的, 一加入就计时)/mL		0.5	0.5	0.5	0
摇匀, 35℃ 精确反应 10min 后立即各加入 1mol/L 碳酸钠溶液 5mL(终止反应用)					
福林-酚稀溶液/mL		0.5	0.5	0.5	0.5
0 号试管加入酶液 0.5mL					
摇匀, 35℃ 保温显色 10min 以上					
OD_{680}					

冷却后以 0 号管作空白, 在可见光分光光度计上 680nm 波长处读取各管的吸光度 OD_{680} 。以洗脱体积为横坐标、 OD_{680} 值为纵坐标绘出酸性磷酸酯酶蛋白质的洗脱曲线。

5.8 凝胶柱的处理: 一般凝胶柱用过后, 反复用蒸馏水 (2~3 倍床体积) 通过柱即可。如若凝胶有颜色或比较脏, 需用 0.5mol/L NaOH-0.5mol/L NaCl 洗涤, 再用蒸馏水洗。冬季一般放 2 个月无长霉情况, 但在夏季如果不用, 需要加 0.02% 的叠氮化钠防腐。

6 实验记录、计算与实验结果

绘制洗脱曲线: 以洗脱体积为横坐标、OD 值为纵坐标, 在坐标纸上绘出酸性磷酸酯酶蛋白质的洗脱曲线。

7 思考题

7.1 某样品中含有 1mg A 蛋白质 (M_r 10000Da)、1mg B 蛋白质 (M_r 30000Da)、

4mg C 蛋白质 (M_r 60000Da)、1mg D 蛋白质 (M_r 90000Da)、1mg E 蛋白质 (M_r 120000Da), 采用 Sephadex G-75 (排阻上下限为 2000~70000Da) 凝胶柱色谱, 请指出各蛋白质的洗脱顺序。

7.2 利用凝胶色谱法分离混合样品时, 怎样才能得到较好的分离效果?

7.3 怎样计算各种蛋白质的相对含量?

8 注意事项

8.1 在装柱过程中需要注意的有以下几点: 垂直放置, 防止产生气泡, 防止柱分层; 柱上表面要平, 平衡柱时间要长一些, 让凝胶充分沉降为均一的柱床。

8.2 加样前打开出口, 使展开剂流出, 至正好露出凝胶上平面时, 立即关闭出口。

8.3 加样时, 用滴管缓缓沿柱内壁旋转加入柱内。

实验 4 磷酸三丁酯萃取乳酸

1 实验目的

1.1 掌握萃取的原理和磷酸三丁酯萃取乳酸的方法。

1.2 了解生化传感分析仪的原理。

1.3 测定乳酸发酵液-磷酸三丁酯萃取体系中乳酸分配系数和萃取率。

2 实验原理

萃取是利用物质在两种互不相溶(或微溶)的溶剂中溶解度或分配系数的不同, 使物质从一种溶剂内转移到另外一种溶剂中。经过反复多次萃取, 将绝大部分的该物质提取出来。

乳酸具有较强的亲水性, 萃取剂一般采用正丁醇、三正辛基氧化膦、磷酸三丁酯以及胺类物质等。本实验以磷酸三丁酯为萃取剂, 从乳酸发酵液中萃取乳酸。

乳酸分配系数 (D) 公式定义如下:

$$D = \frac{\text{乳酸在有机相中的平衡质量浓度(g/L)}}{\text{乳酸在水相中的平衡质量浓度(g/L)}}$$

乳酸萃取率的计算式如下:

$$\text{乳酸萃取率} = \frac{\text{乳酸在有机相中含量}}{\text{发酵液中乳酸总含量}} \times 100\%$$

3 实验器材

3.1 回旋式振荡器, HY-5A 型 (图 4.1), 江苏省常州市金坛区岸头科辉仪器厂。

3.2 生化传感分析仪, SBA-40C 型 (图 4.2), 山东省科学院。

3.3 取样器: 5mL, 北京青云卓立精密设备有限公司生产。

3.4 梨形分液漏斗: 60mL。

3.5 试管: 20mL。

3.6 吸管: 10mL。