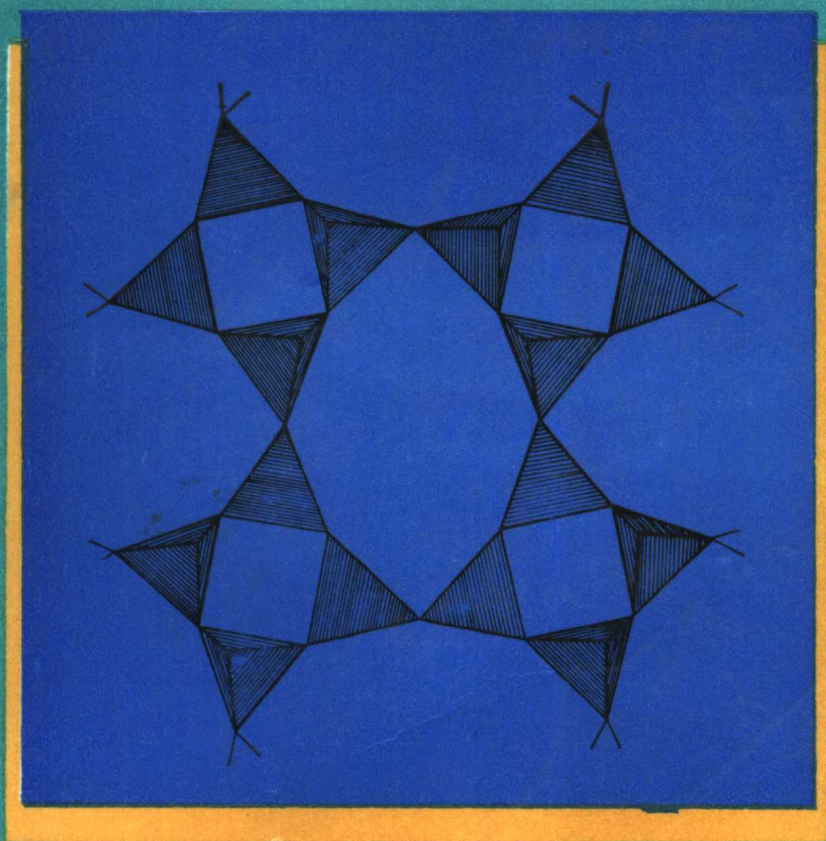


天然高分子化学

TIANRAN GAOFENZI HUAXUE

甘景镐 甘纯玗 胡炳环



高等教育出版社

天然高分子化学

甘景镛 甘纯玃 胡炳环

肆拾壹

丁

红

高等教育出版社

(京) 112 号

内 容 提 要

本书分 14 章阐述各类天然高分子化合物的组成、结构、分类、合成、测试方法, 及其生理功能和应用。内容包括蛋白质、核酸、生漆、多糖、酶、橡胶、金属天然高分子和无机天然高分子等。书中还选用了与动、植物生理和人类生命息息相关的材料, 如激素、抗体、动植物营养、天然高分子的改性及降解等, 并反映了天然高分子在化学与物理学方面的新成就。每章后附参考文献。

本书可作为大学化学、材料等学科大学生及研究生教材, 并兼供本学科教师、研究工作者及其他有关人员参考。

高等教育出版社出版

新华书店总店科技发行所发行

河北省香河县印刷厂印装

*

开本 787×1092 1/16 印张 22.5 字数 510 000

1993 年 9 月第 1 版 1993 年 9 月第 1 次印刷

印数 0001—2 640

ISBN7-04-003929-X/O·1144

定价 11.85 元

编 者 的 话

我国是世界上最早而且最广泛应用天然高分子物质的国家。这方面许多应用技术,在我国都已有几千年的历史。本书作者所在学校(福建师范大学高分子研究所)在两次国家科学技术十年与十二年远景规划中,都承担了这门科学的主攻任务。几十年来,我们累积了一些资料,并在学校开设了大学本科与研究生的本门科学课程。兹承高等教育出版社约,并得到福建省人民政府资助,编写本书作为大学与研究生教科书的尝试。为方便读者选用,特对该书编写作如下说明:

1. 本书拟供大学本科与研究生课程教材,兼供本学科研究工作者与其他有关人员的参考。
2. 针对教学计划分工,本书内容已与大学其他课程,如有机化学、分析化学、生物化学等学科分工,避免重复。
3. 关于基础知识,除必要外,概不涉及。
4. 本书对天然高分子化学和物理学方面的新成就,尽可能列入,但因为教材,凡未有定论的在外。
5. 本书为着兼顾生物、生理等专业学生使用,各章节中均兼顾动植物的成例,并专章叙述植物体中高分子有关知识,以免偏颇。
6. 本书除生漆化学为胡炳环同志编写初稿,甘纯玗同志编写多糖化学初稿外,全书其他章节均为甘景镛执笔。甘景镛教授并担任全书统一布局与审校工作。

目 录

编者的话	1	第四节 核酸结构的确定	106
第一章 绪论	1	第五节 核酸中 DNA 和 RNA 结构及其性质	116
参考文献	4	第六节 核酸的功能	120
第二章 天然高分子的萃取与提纯	5	第七节 线粒体与叶绿体	132
第一节 萃取与提纯的目的	5	第八节 RNA 催化剂的进展	133
第二节 萃取通法	5	第九节 核酸与癌症	134
第三节 提纯的方法	7	第十节 蝎毒	134
参考文献	17	第十一节 CD ₄ 蛋白与艾滋病	134
第三章 天然高分子的分子大小与形状及其现代测定技术	18	参考文献	135
第一节 高聚物分子量及其表示法	18	第六章 生漆化学	136
第二节 高聚物分子量的测定方法	20	第一节 生漆的历史及其研究工作	136
第三节 高聚物分子量分布及其测定	29	第二节 生漆的化学成分	138
第四节 高聚物分子形状与结构及其现代测定技术	30	第三节 漆酚	142
参考文献	41	第四节 生漆的精制(加工)和用途	159
第四章 蛋白质的高分子化学	42	第五节 生漆固化成膜机理	160
第一节 蛋白质的组成及其作用	42	参考文献	162
第二节 研究蛋白质结构的方法	49	第七章 多糖的高分子化学	163
第三节 蛋白质的二级结构——氢键与折叠	57	第一节 多糖类的基本结构	163
第四节 蛋白质的三级结构与四级结构	59	第二节 多糖类的测量	175
第五节 研究蛋白质分子结构使用的方法	60	第三节 多糖结构的测定	176
第六节 蛋白质的功能与其结构的关系	65	第四节 同多糖类	182
第七节 蛋白质的合成	78	第五节 杂多糖类	190
第八节 超分子——膜的高分子化学	83	第六节 多糖的合成	219
第九节 激素	87	第七节 糖复合物	227
第十节 抗体	90	第八节 纤维素与细胞壁	229
第十一节 干扰素	93	第九节 木质素	234
第十二节 微量元素与蛋白质	94	参考文献	242
参考文献	96	第八章 酶的高分子化学	243
第五章 核酸	97	第一节 酶的命名法	244
第一节 核酸的组成	97	第二节 酶的分离与提纯	245
第二节 核酸分子的大小与组成	102	第三节 酶的活力	247
第三节 标记化合物的方法及其应用	104	第四节 酶的修饰与降解	256
		第五节 酶的生产	262
		第六节 酶的固定化	264
		第七节 酶工程与其应用	268

第八节 酶的应用示例	273
参考文献	286
第九章 橡胶及其类似物	288
第一节 橡胶	288
第二节 橡胶的生物合成化学	289
第三节 聚异戊二烯的化学合成	291
第四节 橡胶的分子量与弹性	293
第五节 橡胶加工过程中的化学	294
第六节 古塔坡树胶	296
参考文献	296
第十章 生物活性高分子	297
第一节 激素与激素类似物	297
第二节 典型的激素示例	300
第三节 存在于无脊椎动物体中的激素	306
第四节 植物激素	307
参考文献	308

第十一章 天然高分子的改性	
与降解	309
第一节 天然高分子的光反应	309
第二节 天然高分子的机械化学降解	318
参考文献	319
第十二章 生物营养与高分子	320
第一节 动物营养中的高分子化学	320
第二节 植物营养中的高分子化学	324
第三节 各种高分子在植物体中的转变	331
第四节 蛋白质在植物体中的降解	336
参考文献	338
第十三章 金属天然高分子	339
参考文献	342
第十四章 无机天然高分子	343
第一节 碳的聚合物	343
第二节 硅酸盐聚合物	345

第一章 绪 论

天然高分子研究的范围,系指自然界与生物界体内存在的高分子化合物。其中包括:作为生命基础的蛋白质;来自染色体等的生命物质,而且掌握着生命机制的核酸与多糖类;这是动物体与植物体,甚至于微生物体中重要的结构材料;还有称为植物胶泥的木质素,弹性材料的橡胶类物质,有生物催化剂之称的酶类,以及我国特有的天然高分子材料,如生漆、甲壳素、蒴类高分子等。此外天然无机物高分子在经济上也有其重要性,亦扼要叙述,以启发读者学习研究兴趣,并达到本学科系统的完整性。

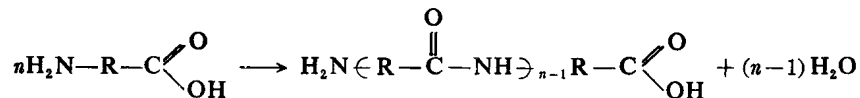
高分子,顾名思义,是很大分子的物质,所以也译作“大分子”。它们是由大量的结构重复单位通过共价键结合而成的大分子:



式中 A 代表结构单位,一代表共价键。

有机高分子是从单体(monomers)合成的,因单体不同,其聚合作用可以通过加成(addition)或缩合(condensation)的机理反应而成的。

线型缩合聚合物是由带有两个反应基团的单体重复结合形成的。反应过程中通过缩合作用可排除一些小分子,如水或氨等。例如氨基酸的缩合作用:



大多数的天然高分子均是通过这种缩合方式由单体而聚合的。但生物体合成中,其反应程

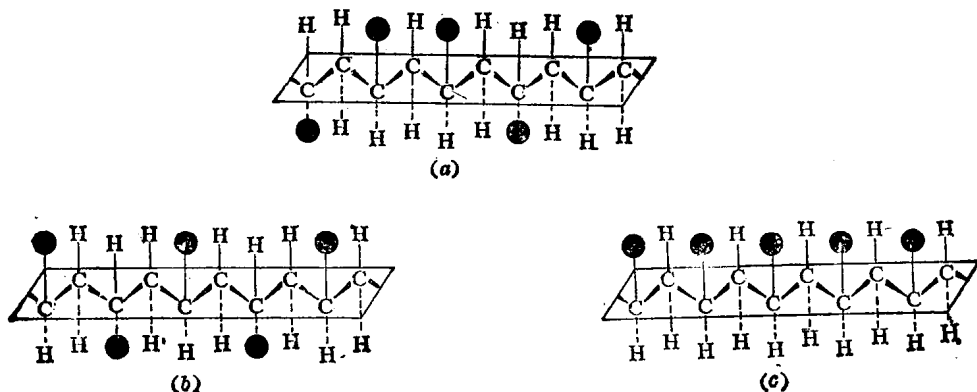


图 1-1 聚合物 $[-\text{CH}_2-\text{CHX}-]_n$ 的各种立体构型

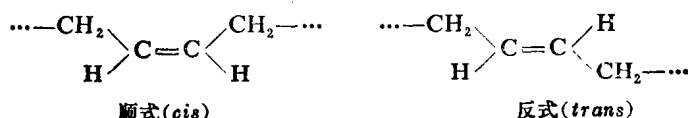
- (a) 无规立构(atatic)
- (b) 间同立构(syndiotatic)
- (c) 全同立构(isotatic)

序都较此复杂得多。反应中包括作为催化剂的酶等。无论是缩合或加成的聚合，都可能产生解聚，这种解聚作用，常在分离过程中产生。

即使是很简单的线型聚合物，其重复单位中也存在着不对称中心(asymmetric center)，因而会产生不同的链构型，或是不同的立体规整度(tacticity)。试以某种具有 $\text{[-CH}_2\text{-CHX-]}_n$ 的聚合物为例，其立体构型亦可有几种方式，如图 1-1。

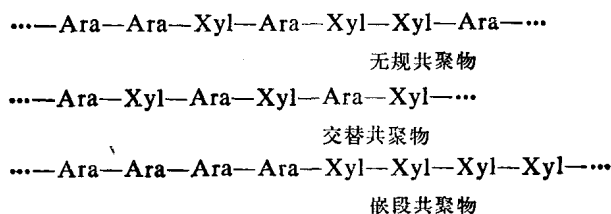
按照图 1-1 所列的构型是最简单的，许多天然高分子中的构型较这里所列的都要复杂得多，我们将在有关章节再详细叙述。总的说来，这一方面在天然高分子结构中较在合成高分子中更为复杂。

从二烯属单位来看，以丁二烯为例，聚合链中是存在着不同的几何构型的。在这种情况下，双键两方的重复单位，存在顺式与反式的不同构型：



后面有关章节中叙述的橡胶与古塔坡树胶的顺式或反式就是以这种形式存在的。

假设聚合物中含有两种或两种以上的重复单位时(在天然高分子中这种情况就很多)，这些单位就称为共聚单元，而这种聚合物则称为共聚物(copolymer)。即使只有两种单体共聚合时，它们也可能按不同方式排列。即或是无规的，成为无规共聚物；或是成为交替共聚物(alternating copolymer)；或是成为同一单体中的基团或嵌入物而成为嵌段共聚物(block copolymer)。以阿拉伯糖(arabinose, Ara)与木糖(xylose, Xyl)单体为例，这些不同的共聚物就有下列几种方式：



对于多种单体都存在时来说，这种理论上的可能性会更增多了。在天然高分子中这类问题更是复杂。若是非线型聚合物，复杂性就更多了。如具有两个官能团以上的单体(如葡萄糖)时，可以成为分支型的均聚物(图 1-2)。这种支链的长度可以是规整的或是不规整的，支链点也可以位于规整的或是非规整的。

从多官能团单体所构成的共聚物来说，也可以有多种形式。例如，假想的阿拉伯葡聚糖(arabinoglucan)在葡聚糖的主链上就可以有相同或不同的侧链，如图 1-2(b)所示那样。

从分子量^①来说，大多数的天然高分子都不止具有一个分子量，而是由多种不同分子量的分子加成起来，取得一个平均的分子量。因此这些聚合物中就有分子量分布，许多天然高聚物同样

① 按照国家标准应称作“相对分子质量”。

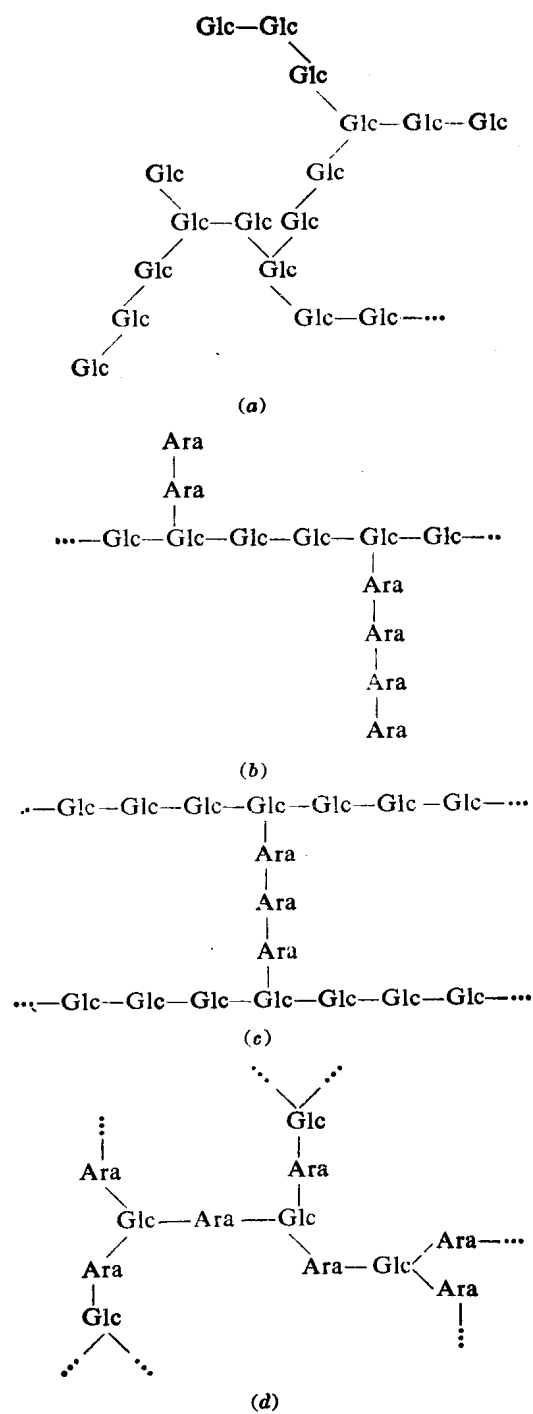


图 1-2 非线性聚合物的图解

(a) 支化均聚物

(b) 嵌段共聚物

(c) 交联共聚物

(d) 共聚物网络

也有这种分子量分布情况。

除分子量大小程度有不同外,天然高分子间的结构也可各异。例如,对于不同的天然高分子的三维结构来说,它们间的支化程度可能是各异的,因而实验数据也只能代表其平均结构。

在溶液中,随着高聚物分子的大小不同,它们的结构可能也有所不同,其构象也不同。在固相时,起重要作用的分子间吸引力也不同,所以用X射线衍射研究作出的结晶图样也有不同。

参 考 文 献

- [1] 林尚安, 高分子化学, 上海科技出版社(1980)。
- [2] R. J. 薛利沙著甘景镐译, 接枝与嵌段共聚物, 上海科技出版社(1965)。
- [3] 李世璿, 高分子电解质, 上海科技出版社(1979)。
- [4] 徐僖, 高分子物理化学原理, 高等教育出版社(1962)。
- [5] 天津大学化工系高分子教研室编, 高分子物理, 化工出版社(1979)。

第二章 天然高分子的萃取与提纯

第一节 萃取与提纯的目的

大多数天然高分子产品中都有某些其他生物高分子混合。例如,细胞产物中常混有百种以上的蛋白质、核酸或酶类。又如国产生漆液中既有主要的成膜材料——漆酚——又有能助漆酚催化的漆酶,还有其他成分如多糖、木质素、色素等等。所以研究一种天然高分子时,首先的任务是提纯,使它先与杂质分离。因此无论是从分析或研究目的考虑,还是从实际生产角度出发,都需要提纯。特别是应该将它们的主成分萃取分离出来并制成溶液,这样不但易于提纯,测试也较为容易了。

测定天然高分子很难有一次成功的通用性的提纯方法,经常要使用种种技术,互为配合。所以本章先扼要叙述提纯法,至于个别的天然高分子还要使用的特殊提纯和检测分析方法,将在有关章节分别叙述。

在提纯过程中,为着要不断检验提纯的目的是否达到,也需要利用各类分析鉴定方法。特别是许多天然高分子物为生物活性的,他们在整体中仍不断地进行反应,所以分析手段应尽量采用快速和自动化的方法。当然应该注意到,研究天然高分子物质组成的准确与否,纯度是一个关键问题。

第二节 萃 取 通 法

I. 萃取

萃取或称提取是提纯的第一步骤。对许多天然物来说,首先应该进行破碎或研磨。即使用机械法或匀浆法(homogenize)。在机械处理过程中,应该注意避免由于通过某些物理法(如热)或化学性加工而引起降解。

萃取过程可以把破碎的动植物体组织和水或溶剂共同调合并振荡。有些材料如木质素或聚异戊二烯材料,还要使用非水溶剂。如果这些聚合物是存储在动物、植物或微生物的细胞中,还有必要使用差速离心法把亚细胞材料(subcellular materials)的颗粒分离。

萃取过程也是一个提纯过程,我们必须慎重选择适当溶剂与提纯方法,应尽量考虑不使不必要的物质溶入溶液中。有些细菌性多糖在冷的乙二醇中会溶解,这就要避免把细胞蛋白质或核酸溶入。

II. 萃取的对象及其处理

对于不溶性聚合物,首先应该去除能溶解部分,剩余固态的较纯的非溶性部分,再用适当溶剂溶解。

蛋白质虽然占有天然高分子的大部分,但迄今尚无一种通用的溶解方法可以适用于这类多相性材料。必须注意到,这种具有三级结构的材料,是极为不稳定的;必须在萃取以及后续的提纯过程中保护这些材料,使其结构不受破坏。为了达到这种目的,我们经常要使用稀盐类溶液对蛋白质进行萃取,并要慎重控制离子强度、温度、pH 等条件。在必要时,可稍加一点表面活性剂(洗涤剂)以去除亚细胞结构,并促进蛋白质的溶解。

当原有分子的三级结构被破坏后,大多数蛋白质的溶解度可能降低,所以优先萃取出特别稳定的酸溶性蛋白质是有利的。例如可以在低 pH 下萃取出对酸稳定的蛋白质,这样对某些蛋白质可能破坏了其原来的结构而变成不溶性。蛋白质的溶解度可随离子强度而异,所以使用不同离子强度的介质进行优先萃取是必要的。

许多体组织的被萃取物中都含有酶类——它们本身绝大部分也是蛋白质——它们可能使蛋白质分子断裂成为不同的碎片,所以应该很快速地使它们和要研究的蛋白质分离,或是加入某些化学抑制剂以抑制它们的活性。可以使用很简单的办法萃取溶解性蛋白质,而不会破坏其天然的结构,但对于不溶性的蛋白质萃取手续就不会那么简单。详细处理法将在后面叙述。

对多糖类萃取工作并不是很困难的,但从植物渗出液中萃取含复杂混合物的多糖类,却因很困难将其分离为单一的多糖,手续就较复杂。特别是从植物细胞壁中萃取多糖类时,如要免除夹杂降解产物,就不太容易了。例如从植物体中取出多糖就必须先行脱去木质素,即要先使用氯或二氧化硫处理。这样,却常常会引起多糖类的氧化和/或降解。

有些植物细胞壁中的多糖类也可以不必先脱木质素就可以先期萃取出某些聚合物。但如使用某些溶剂,如稀碱溶液或含有硼酸盐的稀氢氧化钠溶液,还是可能引起解聚作用的。唯一剩下的细胞壁材料,即不溶的部分是纤维素,它只能溶入铜铵溶液中,但在脱木质素或有其他细胞壁时,也可能降解。

动物体中的多糖类很多已和蛋白质共价结合,为着要萃取出无蛋白质的多糖,必须用蛋白质降解酶或碱,对体组织先行处理。但仍要保证多糖不与碱先产生作用。当然在个别情况下,也可能只会萃取出一种动物多糖。

在生物细胞与病毒中的核酸类,一般是已成为核蛋白的复合物(如某些病毒中有蛋白质外衣的核酸)。当把细胞破碎以后,可以用差速离心法去除其中某些亚细胞部分,并可从相适应的部分中用盐类溶液萃取出核蛋白复合物。这些复合物又可以后续在溶液中通过不同离子强度与含有的离子进行分离,但很难保证大的核酸分子在萃取过程中无损,因为使用的机械力可能会使这些物质细胞产生碎裂。如果是较简单的病毒,其核酸类萃取是容易的,所以作许多有关核酸的基础研究时一般选用病毒。

橡胶类天然高分子易于萃取和提纯。如橡胶可以通过加热或加酸使其凝结,凝固物可以用碱洗涤以除去其中的溶解性的聚合物,如蛋白质等。洗涤以后,橡胶可以溶入非极性溶剂,如苯

中。古塔坡树胶则可直接用苯萃取，以后再用丙酮洗涤，以除去溶解性的夹杂物。

木质素在植物细胞中一般和多糖类结合，是惰性的，而且是极不易溶解的高聚物，不通过苛刻的条件，是无法从树木中将它们溶解出来的。有时用二噁烷或乙醇能溶出比例较少的木质素。

漆液的溶解度差，漆酚成膜后溶解度更差，不通过某些苛刻条件是难以提纯的。

第三节 提纯的方法

本节扼要叙述高分子提纯方法的近代发展，对每一类聚合物的应用，当于有关章节再行讨论。

I. 色谱法

色谱法(层析法)首先由俄国化学家 Tswett 所引用。因为是首先将植物色素区分为有色谱带，所以称为色谱法(chromatography)。在分子科学中使用的色谱法有下列几种：

1. 吸附层析法(column adsorption chromatography)

许多天然高分子化合物均能在某些粉碎性固体物填充的柱上被吸附。吸附时，固体颗粒与表面积的比例是很高的，这时固体物可用活性碳、硅胶、铝矾土或羟基磷灰石等。在分离高聚物时，可以使用这些吸附剂。之后，先用适当的溶剂从吸附剂上洗脱下来被吸附的分子。由于生物高分子对这些吸附剂的结合能力各有不同，所以洗脱下来的次序也有先后。使用这种方法，可以分开被吸附的分子。例如在分离蛋白质与核酸时，可以使用羟基磷灰石，这种磷酸盐溶液可以使这两类高分子洗脱下来。所使用的是按不同梯度浓度的磷酸盐溶液，因此这法称为梯度洗脱法 (gradient elution)。

我们也可使用活性碳柱来分离低聚糖(oligosaccharides)，在研究多糖结构时，常使用这种方法。

长期以来，用于吸附层析的成套仪器，不断有所发展。例如各种吸附剂的引用；压力的提高(达到几百个大气压)等等，如高压液体色谱仪(high-pressure liquid chromatography)。

作为制备型的吸附层析仪，我们也可以把吸附剂摊放在其他惰性物质上，如在纸、硅胶、玻璃板上等；洗脱剂也可以通过毛细管方法完成。由此发展的有薄层色谱法(thin-layer chromatography)。

2. 分配层析法(partition chromatography)

这是利用两种不混溶相(immiscible phases)进行的层析法。其中一相为固定相，另一相为移动相。被分离离子按照它们在两相中的溶解度差异而得到分离。其关系是：

$$a = \frac{\text{在 A 相(固定相)中的浓度}}{\text{在 B 相(移动相)中的浓度}}$$

在任何温度与压力下 a 都是一个常数。

在进行分配层析中，可以认为溶入物质(混合物中的一个组分)是在固定相与移动相之间进

行扩散。

典型的仪器是气相层析法(gas chromatography)使用的气相层析仪。气相层析法在原理上与柱层析法相似,其不同点在于:①待分离的化合物的分配过程是在一种移动的气相与另一种固定的液相之间进行的。而柱吸附层析法的移动相却是一种液体,固定相则是一种固态吸附剂。②在气相中的任一特定化合物的溶解度仅仅只是它的蒸气压的函数。③由于层析柱是放在一个绝热的炉子内,所以体系内的温度是可以控制的。

使用的固定相,一般为:一种液体,一种蜡或一种低熔点固体。这些物质是比较不易挥发的,它们具有较低的蒸气压和较高的沸点。将涂有液体的载体均匀地装入管中,管可以弯曲或盘绕成卷,以便装入仪器的可加热炉子中。

驱使被分析物(或被分离物)在管内流通,则使用载气(氢、氦或氮)。运转时,将混合物导入载气流中。于是,气流中混合物的各个组分便在移动的气相和固定的液相之间进行平衡分配。液相是借助于它的吸附作用而被固定在载体上。

在室温下,大多数的有机化合物(包括各种天然高分子的组分)并不易溶于氢或氮气体中,所以载气决不会把它们带入柱内,因此要使它们产生相当大的蒸气压(这借助于在炉中加热)。这一蒸气压几乎决定了每一个化合物在气相中的溶解度。

随着混合物进入层析柱进行分离的过程中,产生分离的情况需要进行监控,即使用检测器检测。从检测器响应(即电流)对时间(保留时间)标绘作图所得的纪录而制成的图称为色谱图(chromatogram)。所谓保留时间即是一个化合物经注射进入色谱柱后,流过柱子所需的时间。

3. 凝胶渗透色谱法(gel-permeation chromatography)

凝胶过滤(渗透)色谱法对于鉴定高分子以及不同分子量高分子之间的分离是很有成效的工具。过去使用的亲水性凝胶只适用于水溶性物质的分离。随着这项技术的发展,可使用疏水性凝胶,这样此法也能适应于疏水性物质的分离。

凝胶渗透色谱法是另一种柱状色谱分析技术,其固定相为从多聚糖制备并具有一定大小与孔隙的凝胶颗粒。各种分子可以在这种柱上分离,这是根据它们分子的大小及其扩散到凝胶颗粒内的速度来测定的。较大的分子比较小的分子容易通过,但通过这种柱时较快。

凝胶渗透色谱分离的机理可以根据立体排斥理论说明。该色谱柱中装有多孔性凝胶,凝胶颗粒有大小,且有不同程度分布。高聚物在溶液中呈无规线团形式存在,而线团又具有一定尺寸,当凝胶中孔洞的尺寸与线团尺寸相当时,高聚物分子就会向孔洞扩散。在这一过程中,各种尺寸的分子、扩散的情况均有不同。尺寸大的高聚物分子,由于只能扩散到尺寸大的凝胶孔洞中,它们在色谱柱中停留的时间就较长。而尺寸较小的高聚物分子几乎能够扩散到所有凝胶孔洞中,它们在色谱柱中停留的时间就较短。其结果,不同分子量的高聚物分子就按分子量由大到小的次序淋洗出来,得到分离,这就称为立体排斥理论。

凝胶渗透色谱近年来大有发展,测定或分离时间从过去的几小时可缩短到十几分钟,在有机化合物上的应用也日益广泛。近年来的发展方向是:① 提高理论塔板数,可把填充剂直径做得很小;② 在不影响凝胶粒子的受压,又不使它们变形、堵塞筛眼的前提下,加大压力;③

填充剂的凝胶颗粒必须做得便于装填,均匀致密,避免流动相在色谱柱中造成沟流与非平衡移动所形成的物理吸附。这样就会使色谱效力大为提高,发展成为近代的高效(或高速)凝胶色谱法。此方法中采用的凝胶可用多孔玻璃、多孔硅胶、交联聚苯乙烯、交联聚丙烯酰胺、琼脂糖等等。

4. 离子交换层析法(ion exchange chromatography)

离子交换层析技术主要是按照各个分子由于所带电荷的差异,即在酸-碱中的差异,而对它们进行分离的。即使在制备型分离中,也可以使用这种方法。操作时,用的固定相(静止相)是离子交换树脂,移动相是水溶液。离子交换层析通常是在柱内进行的,带电荷的分子通过柱的移动速度系根据它们的正负电荷的不同和大小而被减慢。

填充交换柱是用聚苯乙烯型的离子交换树脂或含有带电荷基团的纤维素衍生物。离子交换剂有两个类型,即阳离子交换剂与阴离子交换剂。阳离子交换剂(树脂)一般使用的为钠型,经过用 NaOH 和 NaCl 洗涤后,使树脂饱和了 Na^+ 离子,或是用酸使其成为氢型。这种树脂可用以提纯带正电荷的天然高分子。把带有该聚合物的混合物自柱顶加入,经过吸附后,将经过调节 pH 与离子强度的洗涤用的缓冲液把已吸附的物质冲洗下来。如果审慎调节缓冲液的 pH 或盐溶液的浓度,也可造成梯度冲洗。

最常用的离子交换树脂是磺酸化的聚苯乙烯。使用阳离子交换树脂在蛋白质研究中可分离氨基酸类。其他使用的离子交换剂为阴离子交换剂,如二乙基氨基纤维素(DEAE-纤维素),它在中性的 pH 下含有正基团,及作为阳离子交换剂的羧甲基纤维素(CM-纤维素)和磷酸基纤维素(P-纤维素),它们在中性 pH 下带有负基团。

这些树脂广泛用于提纯蛋白质。变动工作环境中的 pH,在使用交换剂层析法时对提纯蛋白质影响很大。由于蛋白质具有两性性质(即它们带有阳离子与阴离子基团),所以变动正或负电荷时,其净电荷均有所变化。因而变动 pH 可以使分离产生效果。

阴离子交换剂有助于制备带负电荷的多糖类,在硼酸盐缓冲液中甚至可以用于中性多糖的分离。(这时形成了带负电的硼酸盐-多糖复合物)。苯甲酰化的 DEAE-纤维素可以增进对芳香基团的亲和力,所以广泛用于分离某些 RNA(核糖核酸)。

与凝胶色谱法比较,离子色谱法的用途更为广泛,它的优点是快速、简单、回收率高。两种方法,可以相辅使用。

5. 亲和层析(affinity chromatography)

亲和层析是纯化酶与其他天然分子的新手段。本世纪开始以来,人们首先应用生物高分子间的亲合力以提取淀粉酶。由于酶与底物能形成酶-底物复合物,所以将不溶性淀粉加到组织萃取液或发酵液中,便能吸附其中的淀粉酶,然后再用可溶性淀粉洗脱这些已吸附的酶。

亲和层析的基本过程是:

- (1) 将准备分离的高聚物的配基在不伤害其生物功能情况下,与水不溶的载体结合。
- (2) 在层析柱内装入固相化的配基,构成亲和柱。
- (3) 进行亲和吸附。将含有高分子物质的混合液,于有利于配基和高分子之间形成复合物

的条件下放入层析柱。

(4) 进行亲合吸附后,可变换通过亲合柱的溶液,使亲合吸附剂与高分子的复合物解离后释放,洗脱。

(5) 再生。将固相配基的层析柱充分洗涤后再生,再进行下一轮的纯化工作。

亲合层析可用于纯化酶、抗体、抗原,以及与维生素结合的蛋白质、核酸、激素等。

亲合层析的关键之一是使用配基、即配位体(ligand)。生物体中高分子和小分子配基之间要有一定亲和力,能形成复合物,而这些复合物又能在一定条件下分离。例如将胰蛋白酶联接于固体载体后,装在柱中,当含有胰蛋白酶抑制剂的胰液流过时,它便非常专一地抑制吸住,而其他无亲合力的物质则直接通过柱。而后,改变淋洗液的 pH 使胰蛋白酶-抑制剂复合物解离,从而流出高纯度的胰蛋白酶。

6. 纸上层析法(paper chromatography)

在鉴定各种未知氨基酸如蛋白质水解液时,可以采用与已知氨基酸对 R_f 值方法在纸上进行层析法。

分离时先将蛋白质样品水解。进行纸上层析时,取 $24 \times 15.5\text{cm}$ 的滤纸作“层析柱”(使用纸上层析法分离化合物,在整个分离过程中仍然在纸上)。利用化合物在两个液相间发生的分配作用达到分离目的。通常使用的两相液体,其移动相是与水相混和的溶剂(如丙酮、丁醇等)。滤纸浸入溶剂后,分离的物质就向着运动方向走,其走的距离与溶剂前沿走的距离成比例,即是那个化合物在一定温度、一定溶剂系统下的 R_f 值。在一定的实验条件下,一定化合物的 R_f 值是恒定的,它决定于分配系数。在这一分离过程中,其静相是水,动相是有机溶剂。以此与标准物的 R_f 值对照,可以找出未知物。制备型的分离也可以采用纸上层析法。

7. 顶空气相色谱法(head space gas chromatography)

顶空气相色谱法是近年来发展的一项层析技术。它在天然高分子分离方面已经得到广泛应用。如在酶学方面,特别是对于病源中某些酶,如 β -葡萄糖醛酸在癌变中成分的测定。

II. 电泳法

电泳法(electrophoresis)是鉴定天然高分子纯度的重要工具,许多天然高分子,如:氨基酸、多肽、蛋白质与核酸都带有可电离的基团,即在溶液中能形成带电荷的离子,所以在电场的影响下其移动的速度自然也不同。由于各种分子所带净电荷多少不同,因而在电场中移动的速度也不同,这就是电泳法的最基本原理。

影响到迁移率的因素,有如下几个方面:

(1) 样品 把一种净电荷为(q)的离子放在电场中,其分子就要受到一个力(F)的作用。这个力的大小决定于分子所带的电荷和电场强度

$$F = \frac{E}{d} q$$

式中, E 为两个电极间的电势差; d 是两个电极间的距离。 E/d 就是场强。如果是在真空中,带电分子的移动会更快,最后则撞在电极上。但在溶液里,因为电场对分子有拉力就被运动分子和

溶液之间产生的阻力或摩擦力所平衡。根据 Stoke 方程, 这种阻力的大小取决于分子的大小和形状以及分子所通过的介质的粘度:

$$v = \frac{Eq}{d6\pi r\eta}$$

式中, v 为分子运动的速度, η 是溶液的粘度, r 是球形分子的半径; d 是两电极间的距离。可见, 大小相同, 形状不同的分子, 因受摩擦力作用, 会具有不同的迁移率。也就是样品的形状大小与迁移率有很大的关系。

(2) 电场 迁移率与支持介质的类型、大小以及缓冲液的离子强度有关。

(3) 缓冲液 其浓度、pH 都与迁移率有关。

(4) 支持介质的类型 电泳中有使用支持物和不用支持物两个类型, 因而区分为不同型式。

1. 自由界面电泳(free 或 moving boundry electrophoresis)

这一类包括 Tiselius 微量电泳、等电聚焦(密梯度)电泳等, 它们都是不用支持物的电泳。其中自由界面电泳最为突出, 它在分析工作方面较制备型的用途更大。

操作时, 审慎将缓冲剂布在贮于 U 形管顶部的生物高聚物(如蛋白质)的顶部上。在 U 形管中通入电流(图 2-1)后, 产生下列变化, 带负电荷的分子向着阳极移动, 而带正电荷的分子则向阴极移动; 实际上, 要选用适当的缓冲剂, 调节其 pH, 使大部分混合物中的蛋白质只向一个方向前进。

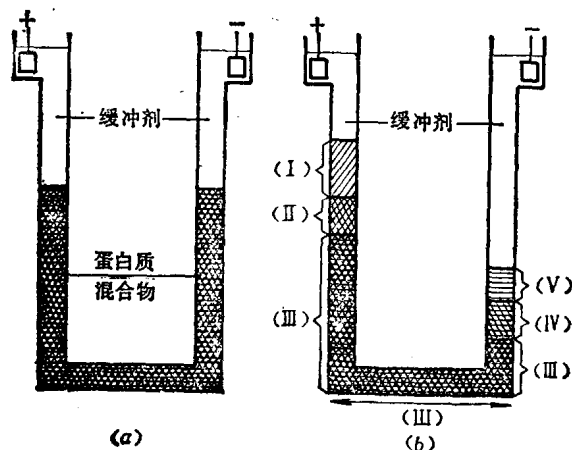


图 2-1 自由界面电泳示意图

运转中具有较高流动性的蛋白质首先迁移进入混合物上方的缓冲剂并形成明显的界面, 流动性较慢的蛋白质先是不会完全分离, 但久后也逐渐在溶液中形成界面(如图 2-1(b))。

可以逐渐看出, 最高的与最低流动性的蛋白质可以在顶端与拖尾带上出现。实验上可以使用光学检测, 但这种方法毕竟是有利于进行分析而不利于制备。

电泳对象: 带三个负电荷的蛋白质

∕ 表示第一种具有最高(流动性)迁移率的蛋白质(1)