

田亚平 等编

生化分离技术



Chemical Industry Press



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

生化分离技术

田亚平 等编



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

·北京·

图书在版编目 (CIP) 数据

生化分离技术/田亚平等编. —北京: 化学工业出版社, 2006.7

ISBN 7-5025-9170-2

I. 生… II. 田… III. 生物化学-分离 IV. TQ033

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 087763 号

生化分离技术

田亚平 等编

责任编辑: 郎红旗 孟 嘉

文字编辑: 张 娟

责任校对: 顾淑云

封面设计: 胡艳玮

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京永鑫印刷有限责任公司印刷

三河市万龙印装有限公司装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 21 $\frac{1}{4}$ 字数 608 千字

2006 年 9 月第 1 版 2006 年 9 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-9170-2

定 价: 50.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

前 言

生物技术是上世纪末及本世纪初发展国民经济的关键技术之一，近年来生物技术产业以日新月异的步伐迅速发展，特别是在医药、食品、食品添加剂以及化妆品等方面，但生物技术要走向产业化，上下游必须兼容、协调，以使全过程能优化进行。

生化分离技术作为生物技术中的一门实用下游技术，人们越来越深刻地认识到其在整个生物技术中扮演的角色和存在的地位。无论是适用于小规模的分选技术，还是大规模进行的工业分离技术，都在科学研究和生产实践中起着重要的作用。分离技术的发展目前主要有两种趋势，一是单元技术水平的提高，二是几种技术的融合（或称为集成化技术）。人们为了在科学研究和生产实践中更好地利用和发挥这些技术的优势，更好地进行优化组合及合理使用，就必须掌握它们的原理、适用的范围、实际的操作技能或放大技术等，这些技能和知识对于进行生物技术方面的研究人员，或将要进行这方面研究的人们来讲，都是非常需要的。

生化分离技术发展快，应用面广，各方面也都有迫切需要强化的要求，所以促使此方面的学术书籍出版速度较快，数量较多，但每本书的选材角度与侧重点不同，而且大多偏向于工程类分离技术，少数偏向于科学研究的又大多把对象集中在某一种物质或某一类技术上，如蛋白质纯化技术、色谱技术或膜分离技术等。如果要培训能够充分掌握此方面技能的人员，如未来的科研工作人员、企业的技术骨干，应该对分离、提取所涉及的各种典型技术及其应用做较为全面的介绍，要让他们知道如何进行选择，如何进行分离条件优化，如何进行合理排序与合理组合，为什么这样做等。鉴于此种原因，促使我下决心组织同事们展开生化分离技术教材的编写工作。

本书内容主要包括各种材料的预处理、沉淀技术、膜分离技术、各种层析技术（包括凝胶层析、离子交换层析、层析聚焦、亲和层析、反相层析、疏水层析）、各种电泳技术、一些融合技术的简介及本课程准备开设的综合实验。各种技术除介绍较为详细的原理外，还具体阐明其主要的的应用范围，并有针对性地列举一些具体应用实例。本书内容深入，理论与应用并重，在“实验部分”还介绍了常见生化分离实验的详细步骤。适于作为研究生教材或相关科研人员的参考书。

参与编写的教师有周楠迪、华子安、史锋、杨海麟，非常感谢他们在繁忙的工作学习之余，收集大量资料并结合自己的科研经验，和我共同完成了编写本书的工作。

最后要感谢化学工业出版社的大力支持，使本书得以顺利出版。由于编者水平有限，书中一定还存在许多不足与缺陷。三人行，必有我师，真诚希望能得到广大读者的赐教。

编者

2006年8月于无锡

目 录

第一章 绪论	1	一、膜分离技术发展的历史	47
一、生化分离技术发展的历史和地位	1	二、膜分离技术在分离工程中的重要作用及 存在的问题	47
二、生化分离技术的应用范围	2	第二节 分类和定义	47
三、生化分离技术的主要种类	2	一、膜的定义	47
四、研究对象、特点及基本原理	2	二、膜的分类	48
五、生化分离技术的基本步骤	6	第三节 技术原理	52
六、生化分离技术方案设计与选择	7	一、压力特征	52
七、生化分离技术的发展趋势	8	二、浓差极化	53
参考文献	10	三、膜分离理论	53
第二章 生物样品的预处理	11	四、膜的截留能力	54
第一节 概述	11	五、膜的污染	54
第二节 样品分离的预提取过程	11	六、纳滤膜技术	55
一、植物组织提取物的制备	11	第四节 膜分离主要参数	56
二、动物组织提取物的制备	17	一、国内外主要膜和组件产品简介	56
三、细菌中重组蛋白的提取制备	19	二、膜组件的选择	57
第三节 细胞的破碎与分离	22	三、膜的选择及使用	58
一、概述	22	第五节 操作技术	59
二、常用的几种破碎方法	22	一、超滤和微滤过程的预处理	59
三、细胞破碎技术研究的发展方向	28	二、膜的操作	59
参考文献	29	三、污染膜的清洗和膜性能的再生	62
第三章 沉淀技术	30	第六节 膜分离技术的应用	63
第一节 概述	30	一、微滤的应用	63
第二节 沉淀方法分类	31	二、超滤的应用	64
一、盐析法	31	三、纳滤的应用	66
二、有机溶剂沉淀法	36	参考文献	68
三、等电点沉淀法	38	第五章 凝胶过滤层析	69
四、非离子多聚物沉淀法	39	第一节 概述	69
五、选择性变性沉淀	40	第二节 原理	69
六、生成盐类复合物的沉淀	41	一、凝胶过滤的概念	69
七、亲和沉淀	42	二、生物分子的相对分子质量、分子大小 和形状	70
八、SIS 聚合物与亲和沉淀	42	三、凝胶过滤的有关理论问题	70
第三节 沉淀技术应用	42	第三节 凝胶过滤介质	73
一、蛋白质	42	一、凝胶过滤介质的基本结构	73
二、核酸	44	二、凝胶过滤介质的参数及性质	73
三、多糖	45	三、凝胶过滤介质的主要类型	74
参考文献	45	第四节 实验方案设计	81
第四章 膜分离技术	47		
第一节 概述	47		

一、凝胶过滤介质的选择	82	第五节 技术的应用	129
二、洗脱剂的选择	83	一、酶、蛋白质及肽类	129
三、层析柱的选择	84	二、糖类化合物	131
四、选择预装柱	84	参考文献	134
第五节 层析技术	85	第七章 亲和层析	135
一、凝胶的准备	85	第一节 概述	135
二、装柱	85	一、基本原理	135
三、样品和洗脱剂的准备	86	二、亲和层析的分离过程	135
四、加样	87	第二节 亲和层析配体	136
五、洗脱技术	88	一、亲和配体的要求和性质	136
六、样品的检测、收集和处理	88	二、亲和配体的类型	136
七、凝胶过滤介质的再生、清洗和储存	89	第三节 亲和吸附剂	137
第六节 应用实例	90	一、配体的选择	138
一、脱盐	90	二、载体的选择	138
二、缓冲液交换	91	三、连接臂的选择	139
三、相对分子质量的测定	91	四、亲和吸附剂的制备方法	139
四、测定多聚物的分子量分布	93	五、裸露活化基团的封闭和亲和吸附剂的	
五、混合物的分级分离	93	储存	146
六、蛋白质的复性	97	六、配体浓度的估计	146
参考文献	98	第四节 实验技术	147
第六章 离子交换层析	99	一、亲和层析操作过程	147
第一节 概述	99	二、亲和层析的操作注意事项	149
第二节 相关理论	99	第五节 亲和层析的特殊类型	150
一、基本原理	99	一、凝集素亲和层析	150
二、离子交换理论	100	二、免疫亲和层析	152
三、离子交换的分辨率	102	三、金属螯合亲和层析	154
第三节 离子交换剂	104	四、染料配体亲和层析	158
一、基本结构	104	五、共价层析	159
二、功能基团和酸碱性质	104	第六节 应用	161
三、离子交换剂的部分性质	105	一、抗体和抗原的纯化	161
四、离子交换剂的类型	109	二、酶的纯化	163
第四节 方案设计和层析技术	114	三、糖蛋白和脂蛋白的纯化	165
一、离子交换剂的选择	114	四、其他蛋白质的纯化	165
二、缓冲液的选择和层析条件的确定	116	五、细胞的纯化	166
三、层析柱的尺寸	118	参考文献	166
四、离子交换剂的准备	118	第八章 层析聚焦	168
五、样品的准备	119	第一节 概述	168
六、加样	120	第二节 原理简介	168
七、洗脱技术	121	一、蛋白质的等电点	168
八、样品的收集和处理	127	二、pH梯度的形成	169
九、离子交换剂的再生、清洗、消毒和		三、聚焦效应	170
储存	127	第三节 多组分缓冲剂与多缓冲离子	
十、大量样品的离子交换	128	交换剂	171
十一、分批分离	128	一、多组分缓冲剂	171

二、多缓冲离子交换剂	171	一、用反相层析对样品脱盐	193
三、其他缓冲液	172	二、分析型高分辨率分离	193
第四节 实验要点	172	三、制备型分离纯化	194
一、PBE、PB 和起始缓冲液的选择	172	参考文献	195
二、凝胶柱的装填	173	第十章 疏水作用层析	196
三、样品的准备	173	第一节 引言	196
四、上样和洗脱	173	第二节 原理	196
五、从分离的蛋白质中除去多组分缓冲剂的方法	174	一、疏水作用层析的概念	196
六、多组分缓冲离子交换剂的再生	174	二、疏水作用层析与反相层析的区别	197
七、层析聚焦实验中需注意的问题	174	三、影响疏水作用层析过程的参数	198
八、结果讨论	174	第三节 疏水作用层析介质	200
第五节 技术的应用	175	一、疏水作用层析介质的基本结构	200
一、分离模型蛋白质	175	二、常见疏水作用层析介质的种类	201
二、层析聚焦法分离纯化 HIV-1 反转录酶	175	第四节 实验方案设计和层析技术	202
三、层析聚焦法分离谷胱甘肽转硫酶	175	一、介质的选择和层析柱的准备	202
四、层析聚焦法分离人血清载脂蛋白 (apoCIII) 及其亚型	176	二、样品的准备	203
五、鉴定某些酶的性质	177	三、层析条件的确定和优化	204
参考文献	177	四、层析介质的再生、清洗和储存	205
第九章 反相层析	178	第五节 应用实例	206
第一节 引言	178	参考文献	207
第二节 原理	179	第十一章 电泳技术	209
一、反相层析的概念	179	第一节 概述	209
二、溶质分子的疏水性质	179	一、基本原理	210
三、反相层析的保留机理	180	二、凝胶介质	211
四、反相分离过程中的参数	180	三、检测方法	213
第三节 反相层析介质	182	四、电泳仪器	213
一、反相层析介质的基本结构	182	第二节 天然聚丙烯酰胺凝胶电泳	214
二、反相层析介质的参数和性质	183	一、基本原理	214
三、几种常见的反相介质	184	二、天然 PAGE 的类型	215
第四节 反相层析的流动相	185	三、影响分离效果的因素	216
一、有机溶剂	185	四、蛋白质分子量的测定	217
二、流动相的 pH 控制	186	五、天然 PAGE 的实验方法	217
三、离子对试剂	187	六、天然 PAGE 的应用范围	221
第五节 方案设计和层析技术	187	第三节 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	222
一、反相介质的选择和层析柱的准备	187	一、SDS-PAGE 的分离原理	222
二、流动相的选择和准备	188	二、SDS-PAGE 的类型	223
三、样品的准备和加样操作	189	三、影响分离效果的因素	223
四、洗脱模式的选择和条件控制	190	四、蛋白质亚分子量的测定	224
五、样品的检测和收集	192	五、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的实验方法	224
六、层析柱的再生、清洗和储存	192	六、SDS-PAGE 的应用范围	225
第六节 应用实例	192	第四节 等电聚焦	226
		一、原理	227
		二、载体两性电解质和 pH 梯度的形成	228

三、载体两性电解质等电聚焦方法	229	三、沉降系数	267
四、固相 pH 梯度介质及其 pH 梯度的形成	232	四、离心时间和 K 因子	267
五、固相 pH 梯度等电聚焦方法	234	五、分子质量的计算	269
六、等电聚焦系统的选择	235	第四节 超离心技术	270
七、等电聚焦的应用范围	235	一、制备超离心	270
第五节 双向电泳	236	二、分析超离心简介	275
一、样品制备	237	第五节 应用实例	276
二、等电聚焦	237	一、差速离心法从细菌中分离糖原	276
三、缓冲液置换	238	二、非连续密度梯度区带离心法分离甲型肝炎病毒 (HAV)	277
四、梯度 SDS-PAGE	239	三、连续密度梯度区带离心法的应用	277
五、检测	239	参考文献	278
六、蛋白质图谱分析	239	第十三章 其他分离技术	280
七、应用	239	第一节 泡沫分离法	280
第六节 免疫电泳	239	一、泡沫分离法的分类	280
一、原理	240	二、泡沫分离技术的基本原理	281
二、免疫电泳类型	240	三、泡沫分离的操作方式及其影响因素	283
三、免疫电泳技术	241	四、泡沫分离的应用	285
四、电泳方法	242	第二节 液膜分离法	286
五、应用	243	一、液膜及其分类	287
第七节 蛋白质印迹	243	二、液膜分离的机理	288
一、原理	244	三、液膜材料的选择与液膜分离的操作过程	290
二、实验材料的选择	245	四、液膜分离技术的应用	294
三、蛋白质印迹实验方法	246	第三节 膜层析技术的原理与应用	296
四、应用	248	一、概述	296
第八节 毛细管电泳	248	二、膜层析的原理和特点	297
一、原理	249	三、膜层析介质材料及其组件	299
二、毛细管电泳的主要类型	250	四、膜层析的制备	300
三、毛细管电泳仪	251	五、膜层析的应用	302
四、影响毛细管电泳分离的主要因素	252	六、展望	305
五、毛细管电泳过程	253	参考文献	305
六、毛细管电泳的应用	253	生化分离实验部分	306
参考文献	254	实验 1 凝胶层析法测定蛋白质相对分子质量	306
第十二章 离心分离技术	256	实验 2 酵母蔗糖酶的提取与纯化	308
第一节 概述	256	实验 3 等电聚焦电泳法测定蛋白质的等电点	318
第二节 离心设备及其用途	256	实验 4 蛋白质的双向聚丙烯酰胺凝胶电泳	321
一、离心机	256	实验 5 亲和层析纯化胰蛋白酶	324
二、转子	259	参考文献	329
三、离心管	264		
四、离心机附件	264		
第三节 基本原理和计算	264		
一、离心加速度、离心力和相对离心力	264		
二、沉降速度	266		

第一章 绪 论

一、生化分离技术发展的历史和地位

地球上约有 180 多万种动物、植物、微生物，从最简单的病毒、细菌直至最复杂的人类，不论它们之间形态上多么不同，但它们最基本组成成分都含有核酸和蛋白质两类物质，而进化比较高级的生物体，其组成成分除了核酸和蛋白质（包括酶）两大类物质外，还含有糖类、维生素、脂类、激素以及多种多样的代谢中间产物和次生物质。可以说细胞中包含成千上万种分子，每种分子每时每刻都在变化和运动中，就像一座座小小的“化工厂”一样，分成许多车间，有着各种各样的机器，不断消耗着各种各样的原料，产生出各样产品。而生化分离技术就是解决如何把细胞这一“工厂”里某一机器的“部件”或“产品”巧妙地分离出来的一种方法和手段，生化分离技术就是人们在不断揭开生命奥秘的过程中诞生和发展起来的。

生化分离技术 (separation methods in biochemistry) 作为生物化学的一个重要组成部分，它是描述回收生物产品分离过程原理和方法的一个术语，是指从动植物组织培养液或微生物发酵液中分离、纯化生物产品的过程中所采用的方法和手段的总称。

生化分离过程是生物技术转化为生产力所不可缺少的重要环节，其技术的进步程度对于生物技术的发展有着举足轻重的作用，为突出其在生物技术领域中的地位和作用，常称它为生物技术的下游工程 (downstream processing)。

分离与纯化过程几乎涉及到生物技术所有的工业和研究领域，生物技术产品不断开发与发展的同时伴随相应分离纯化过程的研究与开发。

从 19 世纪 60 年代到 20 世纪上半叶，由于开发了微生物纯种培养技术，从而使生物技术产业的发展进入了新时期，此阶段的生物技术产品的下游工艺，主要采用压滤、蒸馏等手段，分离产品以经验为依据，可称为手工业式的，属原始分离纯化时期，可看作生化分离纯化技术发展的第一阶段。20 世纪 40 年代，抗生素、氨基酸、有机酸、核酸、酶制剂、单细胞蛋白等一大批用发酵技术制造的产品投入了工业生产。这一时期的特点是产品类型多，不但有初级代谢产物，还出现了次级代谢产物，产品的多样性对分离、纯化的方法和技术提出了更高的要求，此时在实验室阶段出现了离子交换及电泳技术，这可看作生化分离纯化技术发展的第二阶段。进入 21 世纪，以细胞融合技术和 DNA 重组技术为主，包括酶工程、基因工程、发酵工程、细胞工程和蛋白质工程在内的生物技术的发展，使生物技术迅猛地发展成为一门集现代生物科学和工程技术于一身的新兴学科，成为当前世界各国高新技术发展的主要领域。特别是其中基因技术的发展使人们基本可以按照自己的意愿来设计和生产生物制品，但是，实践表明，获取高纯度的生物制品远非易事，因此生物分离工程的研究应运而生。但是，由于历史原因，生物工程下游分离纯化过程的研究投入远较上游的少，使得下游处理过程的研究明显滞后，成为生物技术整体优化的瓶颈。因此，当前生物分离工程已经日渐引起学术界的重视。世界各国都注意到发展下游技术对现代生物技术及其产业化的重要性，纷纷加强研究力量，增加投入，组织专门研究机构，一些著名的生产分离设备和层析填料的公司 在竞争中不断成长，如现在瑞典的 Amersham Pharmacia Biotech 就是在当时的前身 LKB 和 Phamaxia 基础上成立的。此时的生化分离技术已进入了高速发展的第三阶段，除实验室开发出各种层析技术，如亲和层析、疏水作用层析、反相层析等，还发展了生化分离分析技术方面较为优越的各种电泳技术，包括双向电泳和分辨率很高的毛细管电泳等技术，各种膜过滤及凝胶层析和离子交换等技术则进入了工业规模的应用。

生化分离技术作为生物技术的下游技术，人们越来越深刻地认识到其在整个生物技术中扮演

的角色和存在的地位。生物技术产业以日新月异的步伐迅速发展，特别是在与医药、食品、食品添加剂以及化妆品方面，由于生物技术产品多数是与人类生活密切相关的物质，对有害物质有严格的控制，生产过程也要求有严格的管理，在最终产品中往往不允许极微量的有害杂质存在，使得生物产品的分离纯化在整个生产过程中显得尤为重要；一些新的功能性生物产品物质的研究和开发，在得到应用之前对其构效需有清楚的认识，此时就需通过一系列分离技术将之纯化至相当高的纯度，才能消除干扰正确分析结构与功能、特性等，此部分的研究成本和代价较高，但却是不可缺少的；此外对实际得到应用的生物产品，由于其具有的特殊性和复杂性，往往导致生化分离下游技术的成本占整个生产过程成本的比例较大。一般，大多数酶的回收纯化过程成本约占70%，基因工程表达产物的回收纯化过程成本一般占85%~90%以上。所以，下游技术质量往往决定整个生物加工过程的成败，合理设计和优化后的生化分离下游技术将使目标产品的生产成本可大大降低，有利于实现大规模商业化生产。

二、生化分离技术的应用范围

生化分离技术与生物技术发展密切相关，应用广泛，并始终处于不断的发展之中。各行各业利用生物技术生产的产品，一般都需从生物体（包括植物、动物、微生物）细胞内或由含有细胞的酶反应液中将其分离出来，并通过精制达到一定纯度（或活力）。由于目的产物在细胞或反应液中的含量通常都不高，而杂质的种类和数量却往往很多、很高，加上不少杂质的性质与产物相近，产物往往又不够稳定，因此对细胞或反应液的后处理——产物的分离和精制的要求很高，技术复杂。生物技术在科研和生产过程中，存在着大量的蛋白质、多肽和核酸等生物大分子的分析、分离和纯化工作，迫切需要高效快速的分析、分离和制备方法，所以下游技术是生物技术实现产业化的关键，而产品分离纯化是下游技术最重要的组成部分。

三、生化分离技术的主要种类

目前相对比较广泛采用的生化分离技术可归纳如下。

(1) 沉淀分离 盐析、有机溶剂沉淀、选择性变性沉淀、非离子聚合物沉淀等。

(2) 层析分离 吸附层析、凝胶层析、离子交换层析、疏水层析、反相层析、亲和层析及层析聚焦等。

(3) 电泳分离 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦、双向电泳、毛细管电泳等。

(4) 离心分离 低速、高速、超速（差速离心、密度梯度）离心分离技术等。

(5) 膜分离技术 透析、微滤、超滤、纳滤、反渗透等。

此外还有一些其他的分离技术，如各种萃取技术（双水相萃取、超临界流体萃取、反胶束萃取）、液膜分离法、泡沫分离法、结晶技术等。

四、研究对象、特点及基本原理

（一）主要研究对象

生化分离技术的分离对象主要包括单体、大分子、复合分子、超分子复合物、细胞器。

1. 单体或小分子类

单体是指如氨基酸、单糖、核苷酸、维生素、植物的次生物质等。其中氨基酸、单糖、核苷酸本身是构成蛋白质、多糖、核酸的基本结构单位。

(1) 氨基酸 氨基酸具有直接参与生物体内的新陈代谢和其他生理活动的特殊功能，成为现代医药不可缺少的重要原料。20种构成蛋白质的氨基酸中有8种是人体不能自身合成的，需从外界吸收的必需氨基酸，有重要的营养和医用价值，常用作食品添加剂（调味剂、增色、增香剂）和临床输液（复合氨基酸、代血浆）的主要成分。此外氨基酸还可作为日用化工的新材料——皮肤营养剂、抗氧化剂；畜牧业方面的增效剂——高效饲料添加剂；农业方面无公害农药、除草剂的主要原料；轻工业领域的新生力量——新型表面活性剂、新型纤维；生物工程不可缺的基本材料——细胞工程、发酵工程所需培养基的添加剂等。

氨基酸的生产主要有两种途径，一是利用微生物进行发酵，二是从含量丰富的生物材料中直接提取，但不管是何种方式都要利用生化分离技术来得到最终产品。

氨基酸为两性电解质，具有等电点，带电情况受溶液 pH 的显著影响，所以氨基酸的分离纯化常采用等电点沉淀、离子交换树脂等方法。

(2) 多肽 多肽类化合物广泛存在于自然界中，其中对具有一定生物活性的多肽的研究，一直是药物开发的一个主要方向。生物体内已知的活性多肽主要是从内分泌腺组织器官、分泌细胞和体液中产生或获得的，生命活动中的细胞分化、神经激素递质调节、肿瘤病变、免疫调节等均与活性多肽密切相关。

生物活性肽的来源主要有 3 种：①存在于生物体中的各类天然活性肽；②消化过程中产生或体外水解蛋白质产生；③通过化学方法（液相或固相）、酶法、重组 DNA 技术合成。

天然产物及微生物中也存在各种活性多肽，如利用乳酸乳球菌发酵淀粉类原料生产乳链菌肽，但天然存在的生物活性肽含量低，结合机制复杂，难以分离纯化，只有谷胱甘肽的酵母发酵、绿藻培养提取取得了成功并投入工业化生产。

采用何种方法分离纯化肽类往往要由所提取的组织材料、所要提取物质的性质决定。对多肽提取的常用方法包括：盐析法、超滤法、凝胶过滤法、等电点沉淀法、离子交换层析、亲和层析、吸附层析、逆流分溶、酶解法等。大多分离还是利用了其为两性电解质的特性，一些小肽还可以采用反相层析、灌注层析进行分离，而高效液相层析（HPLC）与反相高效液相层析（RP-HPLC）则为肽类物质的分离提供了有利的方法手段。

(3) 核苷酸 核苷酸类物质包括 UMP、GMP、CMP、AMP 及其衍生物，是重要的医药中间体和核酸类药物。它们在治疗心血管疾病、中枢神经系统疾病、循环与泌尿系统用药及抗病毒、抗肿瘤等方面有特殊疗效，其用途已由食品工业扩大到农业、医药领域。呈味核苷酸 IMP·Na、GMP·Na 及这些物质的混合物 5'-核苷酸钠可用作调味品。核苷酸的混合物能促进农作物和果树的生长。核苷酸类似物可以抑制核苷酸合成代谢的某些酶，或干扰阻断核苷酸的合成，进一步抑制核酸与蛋白质的合成，具有抗肿瘤或抗病毒的作用。科学工作者利用微生物发酵工厂的副产品，从含有丰富核酸的微生物细胞中大量制备了各种核苷酸，一般采用的提取步骤为：提取 RNA 粗品→酶解→离子交换提取→浓缩→结晶→成品。

(4) 脂质及植物次生物质 脂质是构成生物膜的主要成分，在生物体内发挥重要作用。一般来讲，脂质是水溶性很小的一类物质的总称，种类繁多，有脂肪酸，甾醇类，维生素 A、维生素 D、维生素 E 等中性脂质，卵磷脂等糖脂。脂质在食品添加剂和医药等方面用途广泛，其分离纯化技术的研究开发亦受到广泛的重视。目前脂质的分离纯化主要采用有机溶剂萃取、超临界流体萃取和层析等方法。

植物体内各种成分基本上可分为两类，一类是植物本身必需的营养物质如糖类，脂肪、蛋白质等成分，另一类是植物次生物质，如生物碱、苷类、萜类等具广泛生物活性的物质。目前已发现的对昆虫生长有抑制、干扰作用的植物次生物质大约有 1100 余种，这些物质均不同程度对昆虫表现出拒食、驱避、抑制生长发育及直接毒杀作用。萜类、生物碱有很多都被发现具有抗病毒、抗肿瘤、抗 HIV 的作用，它们的开发往往与中草药的研发联系起来，具有极大的应用潜力，甚至一些新药的开发，就是以植物中特殊药理成分研究为基础，进一步利用人工合成的方法大量研制，从而降低成本。植物中的这些小分子的活性物质的分离纯化则主要需进行组织破碎，然后再采用抽提或有机溶剂萃取以及吸附树脂或离子交换树脂等方法进行分离，也可以利用超临界流体萃取、纳滤或反相层析等方法进行。

2. 生物大分子类

生物大分子就是指蛋白质、核酸、多糖。

(1) 蛋白质 生物体内的蛋白质种类繁多，分布广泛，担负着多种多样的任务。据人类基因组的研究估计，人类共有 10 万个基因，这些基因能编码 10 万种蛋白质。与氨基酸类似，蛋白质

或多肽均为两性电解质，每一分子上带有多个正负电荷，具有等电点。因此常利用其带电性质进行分离纯化，如离子交换层析、电泳等。此外由于作为大分子的蛋白质具有特定的立体构象，还可通过其自身的电荷分布、疏水基分布等特性以及与某些相对应的分子发生亲和相互作用的特性来进行分离，如疏水作用层析与亲和层析等，亲和层析因具有专一性分离的特点，已成为重要的蛋白质分离纯化手段。蛋白质的种类繁多，具有多彩的生物机能。如酶作为生物催化剂在工业生产和人类的日常生活中发挥重要作用，而作为医药品的各种生理活性物质在维持现代人类健康方面已必不可少，成为现代生物技术的主要研究和开发对象。

(2) 多糖 多糖主要是通过启动免疫细胞，如启动 T 细胞、B 细胞、活化补体巨噬细胞、自然杀伤细胞等，促进细胞因数生成等途径对免疫系统发挥多方面的调节作用。

多糖分离是将存在于生物体中的多糖或分泌到体外的多糖提取解离出来的过程。对胞外多糖而言，一般来说粗分离阶段常用手段是溶剂抽提和乙醇沉淀，对胞内多糖则多了破碎细胞的过程。不同的多糖提取所用溶剂不同，大多数可采用一定温度的水或稀碱溶液提取，为不引起多糖中糖苷键断裂，要尽量避免酸性条件。提取所得粗多糖要进一步纯化才能获得单一的多糖组分。其步骤包括脱除非多糖组分，再对多糖组分进行分级。所用方法总体来讲，无非都是利用一些性质上的差别来设计，如选择性变性沉淀、分级盐析、离子交换层析、凝胶层析、亲和层析、超滤等。但在具体进行分离时，需根据规模大小、纯度要求进行设计分离方案 and 选择方法。

(3) 核酸 核酸存在于多种细胞中，如病毒、细菌、寄生虫、动植物细胞；亦存在于多种标本中，如血液、组织、唾液、尿液等其他来源的标本。因此分离方法复杂而多样。总的说来，核酸的分离与纯化是在破碎和溶解细胞的基础上，利用苯酚等有机溶剂抽提（核酸溶于缓冲液，即水相），分离，纯化；乙醇、丙酮等有机溶剂沉淀，收获。溶解细胞的方法因标本不同而不同，有的用 SDS 加 NaOH，有的用蛋白酶，有的用超声波破碎等方法。苯酚提取主要使蛋白质变性沉淀于有机相，而核酸保留在水相，达到分离核酸的目的。为了除去分离过程中残留的有机溶剂，常用的方法是加冷乙醇和盐沉淀核酸，通过离心回收核酸，然后用 70%~80% 乙醇洗涤沉淀，除去多余的盐，以免影响核酸溶解和抑制后续步骤的酶促反应。为得到纯的核酸，可用蛋白酶除去蛋白，用 RNA 酶除去 RNA，得到纯的 DNA，或用 DNA 酶除去 DNA 而获得 RNA。目前开发了许多商品化的核酸分离柱，可简单、快速地分离得到纯度很高的 DNA 或 RNA。其分离原理有的利用核酸的分子量差异，有的利用需分离核酸的特点与其特异性结合达到分离、回收的目的。

3. 复合分子类

复合分子是指由大分子与大分子构成的复合物如多糖与蛋白质构成的糖蛋白、色素与蛋白质构成的色蛋白，也包括大分子与小分子构成的复合物如脂蛋白、磷蛋白等。超分子复合物则是指类似于核糖体一类由大分子与大分子构成的复合物。细胞器则是指由以下几部分构成的在细胞中存在的小单元：超分子复合物+大分子+小分子+膜。如线粒体、叶绿体等。这些物质的分离，往往可以利用分子大小上的明显差异选择凝胶过滤或膜过滤技术进行分离或采用高速离心或超速离心技术进行分离。

(二) 生化分离技术的特点

生化分离技术的特点主要表现为：成分复杂，含量甚微，易变性、易被破坏，具经验性，均一性的相对性。

成分复杂是指要分离的样品处于一个复杂的体系中。首先生物体的组成就非常复杂，一个生物材料常包括数百种甚至数千种化合物，各种化合物的形状、大小、分子量和理化性质都各不相同，其中还有一些化合物是未知物质，其次这些化合物在分离时仍处在不断的代谢变化过程中。

含量甚微是指有些化合物在材料中含量极微，只达万分之一、几十万分之一甚至百万分之一。

易变性、易被破坏是指许多具有生物活性的化合物一旦离开了生物体的环境，很易变性、易被破坏。如许多生物大分子在分离过程中，过酸、过碱、高温、高压、重金属离子及剧烈的搅拌、辐射和机体自身酶的作用都会破坏这些分子的生理活性，所以在分离过程中要十分注意保护这些化合物的活性，常选择十分温和的条件，并尽可能在较低的温度和洁净的环境下进行。

具经验性是指生化分离方法几乎都在溶液中进行，各种参数（温度、pH、离子强度等）对溶液中各种组成综合影响常常无法固定，以致许多实验的设计理论性不强，实验结果有很大的经验成分。因此，一个实验的重复性的建立，从材料到方法直至各种环境条件，使用的试剂药品等都必须严格地加以规定。

生化分离技术应用后对最后结果均一性的证明与化学上纯度的概念并不完全相同，不是绝对的纯度，而是具相对性。主要由于生物分子对环境反应十分敏感，结构与功能关系比较复杂，纯度鉴定的某一种方法往往只是利用其一方面的性质，对其均一性的评定常常是有条件的，所以往往必须通过不同方法或同一方法不同条件下测定，最后才能给出相对的“均一性”结论。如电泳和层析进行组合，不同条件下的电泳等。只凭一种方法所得纯度的结论往往是片面的，甚至是错误的。

为了保护所提取物质的生理活性及结构上的完整，生化分离方法多采用温和的“多阶式”进行，可形象地称之为“逐层剥皮”方法，一个生物分子的分离制备常常需经过许多步骤，并变化各种分离方法，才能达到纯化目的。还有一类被称为“钓鱼法”是近年来随着分离技术发展而出现的，它是利用某些分子特有的专一亲和力，将某一化合物从极复杂的体系中一次“钓”出，如亲和层析（包括金属螯合层析、共价层析、免疫亲和层析等）、亲和沉淀、亲和膜过滤等，这一类方法目前虽仅局限于一些大分子如酶、抗体和核酸的分离纯化工作，但比任何经典化学方法都具有很大的优越性。

生化分离技术一般在应用时分成两种类型。一类是生化分离分析技术，它的任务和目标是将各组分分离后进行定性、定量和最后的鉴定。另一类是生化分离制备技术，其目的是通过各种分离技术，制备获得生物体内某一单纯组分。两者的主要区别在于，前者最后得到的组分纯度要求高，但所需制备量只要满足分析和性质测定的需要即可，而后者需要大量的产品，分离技术要选用处理量大的，对纯度的要求可以按实际的需要来确定。

（三）生化分离技术的主要原理

生化分离方法与一般化学分离方法相比尽管有许多不同特点，但在原理上又有许多相同或相通的地方，反映了生化分离技术的发展与经典化学及物理学有密切的关系。生化分离技术一般都可根据混合物中的不同组分分配率的差别把它们分配于可用机械方法分离的两个或几个物相中（如有机溶剂抽提、盐析、结晶等）。或者将混合物置于某一物相中，外加一定作用力，使各组分分配于不同区域，从而达到分离目的（如电泳、超离心、超滤等）。因为除了一些小分子如氨基酸、脂肪酸、某些维生素及固醇类外，几乎所有有机体中大分子物质都不能融化，也不能蒸发，只限于分配在固相和液相中，并在这两相之间交替进行分离纯化。

表 1.1 中所列的各种生化分离方法，在实际中应用中都属使用较多的，其中盐析、有机溶剂抽提、凝胶过滤、离子交换层析、疏水层析、层析聚焦、亲和层析及各种凝胶电泳技术、离心技术都将分章详细介绍原理和实验技术。

表 1.1 生化分离方法分类

分离主要依据	分离技术种类	分离主要依据	分离技术种类
形状和大小	凝胶过滤、超滤、透析	等电点(pI)	层析聚焦、电聚焦
电离性质	离子交换层析、电泳(除 SDS)	溶解性	盐析、有机溶剂抽提、结晶
极性(疏水性)	分配、吸附、疏水层析	密度、大小	高速离心、超离心
生物功能或特殊化学基团	亲和层析		

五、生化分离技术的基本步骤

(一) 建立分析方法

生化分离整个过程一旦开展，都应首先建立快速灵敏准确的分析方法来衡量效果（收率、纯度），以保证分离工作顺利进行。

一般的分析鉴定方法大致可以分为以下 3 种类型。

1. 生物测定方法

一个生物测定方法的建立，必须选择适当的生物对象，继而决定测试的生物反应类型，如加入受试物后细菌的生长或抑制，血压的变化，组织分泌物的增加或减少等。然后在定性反应基础上进一步建立生物反应的定量标准。

2. 理化测定方法

理化测定方法是一种最常用最方便的分析测定方法，主要根据目的物的初步了解的特殊的理化性质建立定性定量的鉴定方法，这类方法常有：比色法、层析法、光谱法、电泳法等。理化测定方法的最大优点是实验操作简便快速，能及时指导分离过程，判断分离方法的实际效果。

3. 理化方法与生物学方法结合测定

对于某些生物体内含量较低，或所建立的理化测定方法的特异性和灵敏度不足以反映该物质定性与定量的要求时，常常需要结合生物学方法来全面准确地反映该物质的存在情况。如从家蚕中提取家蚕醇，使用气相层析方法和蚕蛾兴奋反应相结合，使分离流程效果大大提高。理化分析方法与生物学测定方法相结合，用于各类抗生素、信息素、激素、维生素和具有生理活性的生化药物的定性及定量相当普遍。

一个好的分析鉴定方法必须满足以下要求：特异性或专一性强；重现性好；准确度高；灵敏度高；时间短，操作简便。

分析方法的特异性或专一性，对于整个分离纯化实验的成功与否非常重要。特别是在分离纯化的初始阶段，各种干扰物质大量存在的情况下，一个专一性高的分析方法更显得重要。但一般很少有绝对专一的分析方法，为了减少干扰，一般是尽量选择目的物含量丰富而杂质干扰较少的材料，并通过控制适当的条件使干扰物不起作用。

重现性或称重复性，是指分析结果能经受时间的考验重复测出的程度。一般通过仔细控制每次的实验条件，包括仪器装置、药品、材料来源、操作方法等来实现。

分析方法的准确度主要反映在定量测定上的误差范围，原则上是误差越小越好，准确度越高越好，但目的物从一个混杂的体系中逐步分离出来，开始时的干扰是不可避免的，所以分离提纯每一阶段，定量上存在的误差只要不影响分离进程，也可基本满足要求。相比较而言，特异性和重现性在某种意义上比要求精确度更为重要。

灵敏度是指对目的物的最低检测限。高灵敏度的分析方法对微量样品的提取显得比较重要。

生化分子一般都是一些具有生理活性的物质或代谢的中间产物，容易失去活性或发生转变，因此操作简便快速的分析测定方法有着重要意义。

(二) 选择提取材料

选材的主要原则：来源丰富，含量相对较高，杂质尽可能少。选择材料主要根据实验的目的而定，同一种物质由于进化的关系通常在不同种类的生物体中都有存在。从工业生产角度上来考虑，首先是材料来源丰富，含量高、成本低，但如果材料来源，含量都很理想，而材料中杂质太多，分离纯化手续十分烦琐，以至影响质量和收率，反而不如含量低些但易于操作获得纯品者。也就是说在所有条件不能都满足的前提下，必须根据具体情况，抓住主要矛盾决定取舍。例如，提取 DNA，从含量看，细胞核中最多，线粒体次之，由于在从动物脏器提取细胞核过程中，常常会受到酶水解和机械损伤等作用，使所得的细胞核 DNA 仅为完整 DNA 的 1%，而线粒体 DNA 提取步骤较少，所以反而是较好的选择材料。再如，提取磷酸单酯酶，从含量看，虽然在胰脏、肝脏和脾脏中较丰富，但因其与磷酸二酯酶共存，进行提纯时，这两种酶很难分开，所以

实践常选尽管含磷酸单酯酶少，但却几乎不含磷酸二酯酶的前列腺作材料，反而容易较快地得到较纯的磷酸单酯酶。

显而易见，一个材料选择是否合理，不仅关系到实验进行的难易，而且常常是导致实验成败的重要原因。

选择材料的范围包括动物、植物、微生物。生物体内某种成分不是一成不变的。如植物材料所含各种成分常随季节和生长时期而变化，动物材料中的各种组分处于不同生理状态也有很大差别。微生物材料中各种组分的变化受环境因子影响尤为显著，利用这一点，人们通过对培养基的组成、培养温度和 pH 等培养条件的优化，以及诱导物、抑制剂的添加都可以大大增加所需物质的含量。菌种的筛选、诱变也是人们所熟悉的传统提高微生物体内某种物质含量最常用的方法。而近年来利用基因工程手段可以将一些生物体内含量很少的活性物质在一些典型的原核或真核生物中大量高效地表达。鉴于微生物所具有的这些特点，在材料的选择上具备了一定的优势。

（三）选择提取方法

实验材料选定后，常常需要进行预处理：动物材料往往要除去一些与实验无关甚至有妨碍的结缔组织、脂肪组织和血污等；植物种子需要除壳；微生物材料需将菌体和发酵液分开等。材料预处理好后，下一步就是要选择适当方法将目的物进行抽提和提取。提取步骤的主要原则：将目的物从材料中以溶解状态释放出来，方法与存在部位及状态有关。如属体液、血液中的游离物质或生物体分泌到体外（细胞外）的物质，就不必进行组织细胞的破碎。但细胞内含物不论存在于哪些部位（如在膜上、核中或细胞浆内）均需采用不同方法进行细胞破碎，具体的预处理和细胞破碎方法将在第二章中专门介绍。

（四）分离纯化方法的探索

分离纯化步骤为核心操作，须据目的物的理化性质，生物学性质及具体条件定。具体技术与方法根据不同的阶段进行选择，如前期常选择的沉淀技术，膜过滤技术及中后期的各种层析技术。选择的原则与各种分离技术的原理将在后面分章节介绍。

（五）均一性的鉴定

当分离工作完成后，所得目的物达什么样的纯度，常常要进行均一性的鉴定。均一性即指所获得的的目的物只具有一种完全相同的成分。对蛋白质、核酸、多糖类物质常用的纯度鉴定方法有层析法、电泳法、超离心法；对酶的鉴定除上述三种外，还可采用恒比活的方法。均一性的评价常需经过数种方法的验证才能肯定。一种方法由于是基于一种特性进行鉴定，所以往往是片面的，可能换一种特性进行分离还是存在不同的成分，所以纯度鉴定一般都只是相对的，一定要标明所用方法，如层析纯、电泳纯等。绝对的标准只有把物质的全部结构弄清楚并经过人工全合成证明具有相同的生理活性，才能说明所分离的物质是绝对纯净的，但这样严格的鉴定，一般只有小分子能做到，生物大分子类物质则非常困难。

六、生化分离技术方案设计与选择

生化分离过程往往是将若干纯化技术联合使用而实现的，在此过程中，选择合理纯化技术固然很重要，然而如何将这些技术合理的组合和按顺序使用也是成功的分离所必须考虑的。

分离纯化一般分成三个阶段：初始阶段、中间阶段和精制阶段。一般而言，在分离纯化的这三个阶段，因所需解决的侧重点不同，人们会据此选择不同的纯化技术。图 1.1 为常用纯化技术在纯化的不同阶段被采用的情况。

图 1.1 中的概率统计结果表明了实际选择的情况，那么人们进行选择的时候又是如何考虑的呢？这主要应根据生化分离技术的各个不同阶段（图 1.2）的侧重点及各种技术所表现的优势来进行选择。

初始阶段：主要任务在于从相对较大体积的抽提液中除去大量杂质，同时能浓缩样品和保障

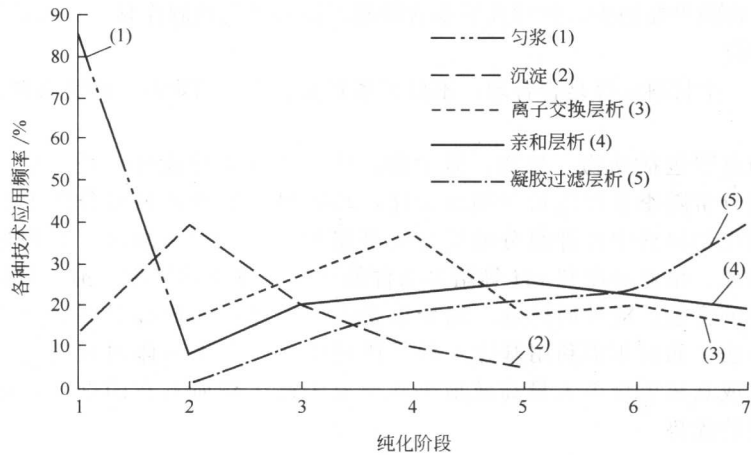


图 1.1 常用纯化技术在纯化的不同阶段被采用的情况
 纯化阶段：1~3 为初始阶段；3~5 为中间阶段；5~7 为精制阶段

样品处于稳定的环境条件。此时所选择的方法往往希望能满足快速大规模处理的需要，此阶段选择方法的时候侧重点应放在速度和处理量上（图 1.3）。一般匀浆和沉淀技术、膜过滤技术等可以在此阶段的前期使用，此阶段的后期则可以使用离子交换和亲和层析等技术。

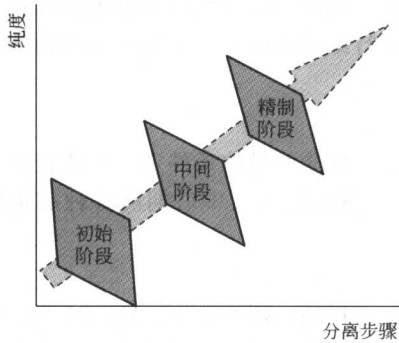


图 1.2 分离纯化的三个不同阶段

中间阶段：主要任务在于进一步除去大量杂质，如混在目的蛋白质中的其他蛋白质、核酸和多糖等，而这些杂质与目的物的性质差异相对较小，显然选择的分离方法要有较高的分辨率，作为中间过程要处理的样品量仍比较大，所以此阶段选择分离方法的侧重点应放在分辨率和处理量上（图 1.4）。离子交换、亲和层析、制备级等电聚焦等技术可以在此阶段使用。

精制阶段：主要任务在于最后除去微量杂质，使最后的产品获得高纯度，最后的微量杂质往往与目的物的性质较为接近，所以此阶段分离方法的侧重点主要放在分辨率上（图 1.5）。尽管分离技术仍然可以采用离子交换、凝胶层析等技术，但可通过选择高效的填料来满足高分辨率的要求。

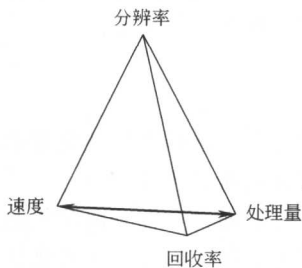


图 1.3 初始阶段

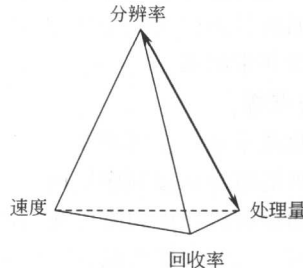


图 1.4 中间阶段

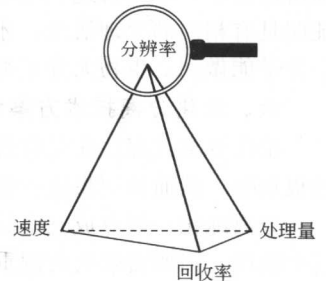


图 1.5 精制阶段

七、生化分离技术的发展趋势

近 20 年来，人们将物理和化学分离纯化原理与生物技术产品特性结合，开发了许多新原理、新技术、新材料和新设备。

如灌注层析 (Perfusion Chromatography) 就是 20 世纪 80 年代美国 PE 公司通过填料技术的改进而产生的一种层析新技术。它第一次带给生命科学家快速高效的纯化理念: 30s~3min 即可完成高分辨率, 高载量的分离。

POROS 填料是灌注层析技术的完美体现, 它独有的二元孔网络结构 [6000~8000Å ($1\text{Å}=10^{-10}\text{m}$) 的贯穿孔 (throughpores) 和 800~1500Å 扩散孔 (diffusivepores)], 克服了传统填料的传质瓶颈, 大大提高了传质效率, 使分离线速度从传统的 50~360cm/h 达到 1000~7000cm/h。

比较图 1.6 与图 1.7 可发现灌注层析专利性的二元孔网络结构, 大的穿透孔 (孔径达 600~800nm) 足以使流动相快速流动; 小的扩散孔 (孔径为 50~150nm) 提供足够吸附表面积, 从而大大加快传质, 流速高达 1000~5000cm/h, 使生物分子分离比使用 HPLC 或传统填料快 10~100 倍。

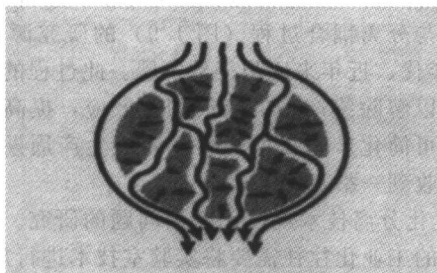


图 1.6 灌注层析填料的扩散途径

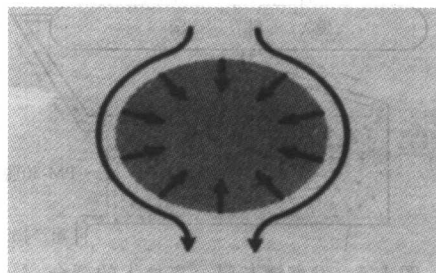


图 1.7 传统层析填料的扩散途径

为满足高效高速分离纯化技术的需要, 新材料方面的发展的确非常迅速, 除 POROS 填料外, 不断有新型高效离子交换剂出现。

高效离子交换剂主要指中压层析或高压层析中使用的粒度较小而有一定的硬度、分辨率很高的一类离子交换剂, 包括层析填料制备方面有着悠久历史的瑞典 Pharmacia 公司的 SOURCE、MonoBeads 系列, 层析填料制备方面后起之秀 Bio-Rad 公司的 DEAE-5-PW 和 CM-5-PW (基质为合成高分子有机聚合物) 等。

伴随填料技术的发展, 分离纯化的设备方面也在不断开发和更新, 国外生产层析设备的相关公司都陆续推出一些自动层析系统, 有中低压、高压等类型。它们都是一类针对生物分子的特性而设计的纯化系统, 它能自动制备缓冲液, 具有多柱转换、自动上样设计、多波长连续检测等功能, 且配有专家辅助软件, 能更快速地优化分离条件, 更有效地以不同规模纯化不同的生物分子。该系统不仅在酶工程、生物制药的研究上得到广泛应用, 同时也是分子生物学实验后期必要的分离系统。

当前生物分离技术发展的主要倾向体现在以下几个方面。

① 多种分离、纯化技术相结合, 包括新、老技术的相互渗透与融合, 形成所谓融合技术。如膜分离与亲和配基、离子交换基团相结合, 形成了亲和膜过滤技术 (图 1.8)、亲和膜层析、离子交换膜层析; 亲和配基和聚合物沉淀作用相结合, 形成了亲和沉淀技术; 离心分离与膜分离过程结合, 形成了膜离心分离过程; 还有如将双水相分配技术与亲和法结合而形成效率更高、选择性更强的双水相亲和和分配组合技术; 可以将离心的处理量、超滤的浓缩效能及层析的纯化能力合而为一的扩张床吸附技术等。这类融合技术将两种及以上的技术的优势结合起来, 往往具有选择性好、分离效率高、步骤简化、能耗低等优点。

② 生化分离技术 (下游技术) 与发酵工艺 (上游技术) 相结合或称耦合, 形成系统工程。此方面的含义有两层, 一是上游技术和下游技术的改

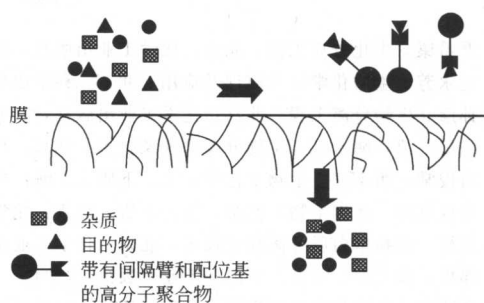


图 1.8 亲和膜过滤技术示意图