

全国高等农业院校教材

生物化学 研究技术

● 陈毓荃 主编

● 植物生理生化及农科各专业用

中国农业出版社

ND01/30

前 言

生物化学研究技术是生物化学不断深入发展的基础,也是生命科学许多相关学科的重要研究手段。在农业部颁布的硕士学位研究生培养方案中,生物化学研究技术被确定为生物化学等专业的学位课程或必修课程。在国内尚无适应农科各专业研究生相应教材的情况下,我们以中国科学院院士阎隆飞教授主持制定的生物化学专业攻读硕士学位研究生培养方案要求为纲,试编了这本研究生教材,以应急需。

全书分上、下两篇。上篇介绍生物化学研究技术原理,下篇分6个单元选编了32个实验。上篇比较系统地介绍了现代生物化学研究基本技术及其最新进展。下篇所列实验项目较多,便于各校根据自己的需要和条件选做。为适应农业院校特点,实验材料以植物为主。理论部分力求简明扼要,重点介绍现代生化核心技术。实验部分详尽具体,便于操作,所有方法均在科研和教学中反复验证,成熟实用。本书适合高等农业院校生化专业及农科各专业硕士研究生作为教材使用,也适应相应专业高年级本科生及生物科学、林学、牧医、水产、医药、食品、环保等专业师生、科研人员参考。

本书由西北农业大学陈毓荃主编,编委有沈阳农业大学程国华,华中农业大学孙湘宁,浙江农业大学徐璧文。1991年10月,在西北农业大学召开了编委会,讨论、拟定了编写大纲(草案)。经阎隆飞教授审阅修订,由各编委执笔编写。初稿先经主编统稿、修改,再由编委会集体审阅,互相修改,后请阎隆飞教授审阅。最后,由主编根据阎隆飞教授的审阅意见再进行修改、定稿。前后经历2年多。虽然几易其稿,但谬误之处仍在所难免。敬请生化界前辈和各位同仁、广大读者提出宝贵意见,以便再版时修订。

参加本书部分内容编写的还有:华中农业大学张方东、马平福、陈翠莲,浙江农业大学胡家恕,西北农业大学赵丽莉。西北农业大学魏琦同志为本书精心绘制了插图。北京农业大学刘国琴副教授、王荣臣副教授、刘雄副教授参审了部分章节内容,并提出了中肯的修改意见,特此致谢。

在本书的编写和出版过程中,各参编院校领导和有关教研组,西北农业大学研究生部,给予了极大的关心和支持。特别是农业部教育司研究生处在本书出版的组织上给予了悉心指导和大力支持。在本书面世之际,编者对为本书出版给予了关心、支持和付出了辛勤劳动的各位先生表示衷心地感谢。

编 者

1993年12月

全国高等农业院校教材
生物化学研究技术

陈毓奎 主编

• • •

责任编辑 张本云

中国农业出版社出版 (北京市朝阳区农展馆北路2号)
新华书店北京发行所发行 通县曙光印刷厂印刷

787×1092mm16开本 17.75印张 420千字

1995年10月第1版 1995年10月北京第1次印刷

印数 1-2,000册 定价 13.90元

ISBN 7-109-03683-9/O·80

目 录

上篇 生物化学研究技术原理

第一章 生物化学制备技术概论	1
第一节 生化分离制备方法的特点	1
第二节 溶剂提取法	2
第三节 沉淀法	3
第四节 膜分离技术	6
第五节 浓缩与干燥	8
第二章 离心	9
第一节 离心技术基本原理与设备	9
第二节 制备超离心方法	15
第三节 超速离心技术在生化研究中的应用	16
第三章 层析	20
第一节 层析概述	20
第二节 凝胶层析	21
第三节 离子交换层析	24
第四节 纸层析	28
第五节 薄层层析	30
第六节 聚酰胺薄膜层析	32
第七节 亲和层析	33
第八节 气相色谱原理及其在生化研究中的应用	39
第九节 高压液相色谱原理及其在生化研究中的应用	41
第四章 电泳	43
第一节 电泳的基本原理	43
第二节 影响电泳的主要因素	44
第三节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	45
第四节 琼脂糖凝胶电泳	51
第五节 电泳及配套技术的新进展	53
第五章 酶的分离、纯化及活力测定	56
第一节 材料的选择和处理	57
第二节 酶的提取、分离与纯化	58
第三节 酶活力的测定	61
第六章 同工酶分析	63
第一节 同工酶概述	63
第二节 同工酶的分析与鉴定	64

第三节 同工酶分析技术的应用	66
第七章 植物主要成分分析	68
第一节 试样的采集和处理	68
第二节 水分分析	69
第三节 碳水化合物的分析	72
第四节 蛋白质的分析	79
第五节 核酸的分析	87
第六节 脂质分析	91
第八章 蛋白质序列分析	92
第一节 蛋白质序列分析的基本战略	93
第二节 蛋白质序列分析的一般方法和步骤	95
第三节 氨基酸组成分析	97
第四节 蛋白质的裂解	101
第五节 末端氨基酸残基的测定	105
第六节 手工微量序列测定技术	107
第七节 蛋白质自动序列分析仪	110
第八节 二硫键及其位置的确定	111
第九章 核酸的制备与分析	111
第一节 DNA的制备及分析	111
第二节 RNA的制备与分析	121
第三节 DNA的顺序分析	124
第四节 DNA的体外扩增——PCR技术	132
第十章 DNA重组技术	136
第一节 克隆载体	136
第二节 DNA和RNA的酶学操作	144
第三节 cDNA文库的构建与筛选	159
第四节 重组DNA导入寄主细胞	165
第十一章 免疫化学技术	170
第一节 概述	170
第二节 抗原与抗体	171
第三节 免疫途径	171
第四节 免疫反应测定方法	173
第五节 免疫化学技术的应用	176
第十二章 放射性同位素示踪技术	178
第一节 基本知识	178
第二节 放射性的测量	180
第三节 射线的剂量与卫生防护	183
第四节 放射性同位素示踪技术在生化领域中的应用	184

下篇 生物化学实验

一单元 成分分析	187
----------------	-----

实验一	谷物及植物材料中还原糖、可溶性糖及淀粉含量分析	187
实验二	谷物脂肪含量及脂肪酸组分分析	189
实验三	谷物蛋白氮和非蛋白氮的测定	191
实验四	植物组织中金属元素的测定	193
第二单元	蛋白质	196
实验五	谷物种子蛋白质的分级分离	196
实验六	蛋白质分子量的测定 (SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法)	198
实验七	聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦法测定蛋白质等电点	200
实验八	蛋白质的双向电泳	202
实验九	蛋白质N-末端的测定 (DNS法)	204
实验十	蛋白质C-末端的测定 (胍解法)	207
实验十一	种子蛋白氨基酸组分分析	208
实验十二	亲和层析法提纯麦胚凝集素	209
第三单元	酶	214
实验十三	苹果酸脱氢酶的纯化与活力测定	214
实验十四	硝酸还原酶的离体测定	216
实验十五	脲酶K _m 值的测定	218
实验十六	酸性磷酸酯酶的动力学测定	221
实验十七	植物过氧化物酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳	223
第四单元	核酸	225
实验十八	植物组织中DNA的分离	225
实验十九	叶绿体DNA的分离及纯化	229
实验二十	线粒体DNA的分离及纯化	232
实验二十一	碱性SDS法提取大肠杆菌质粒DNA	235
实验二十二	EcoRI酶切质粒DNA及Southern转移	238
实验二十三	DNA的分子杂交	240
实验二十四	植物mRNA的分离与纯化	246
实验二十五	RNA的碱基组成分析	248
第五单元	代谢	251
实验二十六	光合磷酸化反应活力的测定	251
第六单元	免疫化学技术	253
实验二十七	单向免疫扩散	253
实验二十八	双向免疫扩散试验	255
实验二十九	对流免疫电泳	256
实验三十	单向火箭免疫电泳	257
实验三十一	酶联免疫间接法测定抗体	258
实验三十二	酶联免疫双抗体夹心试验	261
附录:		262
附录1	调整硫酸铵溶液饱和度计算表 (25℃)	262
附录2	调整硫酸铵溶液饱和度计算表 (0℃)	262
附录3	国外主要厂商微孔滤膜产品的规格和性能	263

附录4	国产WX型微孔滤膜的规格和性能	266
附录5	rpm与 $2.303/60\omega^2$ 换算表	267
附录6	某些转头用于5%—20% (w/w) 线性蔗糖梯度离心时的比例常数	268
附录7	计算相对离心力的列线图	268
附录8	各类葡聚糖凝胶的性质	269
附录9	薄层层析分离各类物质常用的展层溶剂	269
附录10	腐蚀性万能显色剂的组成及用法	270
附录11	各类物质常用的显色剂	271
附录12	各种碱基在0.1N HCl溶液中的紫外吸收	271
附录13	与生化分析有关的法定计量单位新规定	271
附录14	本书常用缩写符号	274
参考文献		276

上篇 生物化学研究技术原理

第一章 生物化学制备技术概论

第一节 生化分离制备方法的特点

在生物化学研究中往往要对研究对象予以分离和制备。由于实验的目的不同，生化分离技术可分为生化分离分析和生化分离制备两个方面。生化分离分析的目的在于分离生物材料中各种不同组分而加以定性、定量鉴定，它不一定要把某组分从混合物中分离提取出来。而生化分离制备则是为了获得生物体内某一单纯组分。

“ 生物物质在生物体内具有各种生理活性。这些活性的产生与其结构有着密切的关系。化学中已经十分成熟的分离方法如蒸馏、熔炼等，对生物物质的分离制备已完全不适用。客观的需要，推动了生化制备技术的建立与发展。与一般化学分离制备技术相比，生化制备技术有下列几个特点：

(1) 生物材料组成非常复杂。其中往往包括数百种甚至数千种化合物。在分离制备过程中，这些化合物仍在发生代谢变化，如蛋白质和核酸的水解等。

(2) 有些化合物在材料中含量极微，如激素等，需用大量材料才能获得少量制备物。

(3) 许多具有生物活性的物质一旦离开了活体，很易变性破坏，这是生化制备中最困难的地方。在生物大分子的制备中，为最大限度地保持其活性，常选择十分温和的条件，并尽可能在较低温度和洁净环境下进行。

(4) 生化分离制备几乎都在溶液中进行，影响因素很多，实验方法经验性较强。一个实验重复性的建立，必须严格规定材料、方法、条件和试剂。

(5) 生化分离方法最后均一性的证明与化学上纯度的概念并不完全相同。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，故对其均一性的评定常常是有条件的，或者只能通过不同角度测定，最后才能给出相对的“均一性”结论。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。

由于生化制备技术的上述特点，现代用于生物化学分离的制备技术，大都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（大多数是液相）中，外加一定的作用力，使各组分分配于不同的区域，从而达到分离目的（如层析，电泳，超离心，超滤等）。

本章重点介绍溶剂提取法、沉淀法、膜分离技术、浓缩与干燥等技术。现代生化制备中常用的离心法、层析法、电泳法等，因内容较多，在本书中另列章节介绍。

第二节 溶剂提取法

溶剂提取法是生化制备的最基本技术。利用溶剂的溶解作用把所需物质从细胞中转移出来。所以，凡能影响物质溶解度的因素，均能影响提取效率。影响物质溶解度的主要因素有：

1. 溶剂的性质 一种物质溶解度的大小与溶剂的性质密切相关。物质溶解性质有以下一般规律：

(1) 极性物质易溶于极性溶剂中，非极性物质易溶于非极性溶剂中。有些化合物如糖类，虽然是非极性物质，但分子内有较多极性基团，也易溶于水。

(2) 碱性物质易溶于酸性溶剂中，酸性物质易溶于碱性溶剂中。

(3) 在极性溶液中，溶剂的介电常数减小，溶质的溶解度也随之减小。

以上规律可简称为相似物溶解于相似物原则。一些常用溶剂按其极性大小，可依顺序大致排列如下：

饱和烃类 < 全卤代烃类 < 不饱和烃类 < 醚类 < 未全卤代烃类 ~ 脂类 < 芳胺类 < 酚类 < 酮类 < 醇类

2. 离子强度 离子强度是影响物质溶解度的主要因素之一。但离子强度对不同物质溶解度的影响不同。如高离子强度下DNA-蛋白溶解度增加，而低离子强度下RNA-蛋白溶解度增加。核酸制备中正是利用这一差别实现两类核酸的分离。绝大多数球蛋白和酶，在稀盐溶液中其溶解度比纯水中大，这种现象称为盐溶效应。这是由于少量离子的活动，减少了蛋白质分子极性基团之间的静电引力，加强了蛋白质-溶剂间的相互作用。低离子强度溶剂不仅能增加某些溶质的溶解度，还有稳定一些生化物质生理活性的作用。所以稀盐溶液常用于大多数生化物质的提取。

3. pH值 溶剂的pH值影响溶质分子的解离状态。离子状态的物质，不论是阳离子或阴离子都易溶于水。非解离的分子状态则易溶于有机溶剂。所以，当酸性物质处于低pH值，碱性物质处于高pH值时，都可以转溶于有机溶剂。但有些两性物质如氨基酸，在等电点以外任何pH值时，均呈离子状态存在。所以，氨基酸一般不用有机溶剂提取（稀的乙醇例外）。提取蛋白质、酶、核酸等生物大分子，除了考虑pH对其溶解度的影响外，更重要的是首先要保证这些生物大分子活性不受破坏为前提。一般控制pH在6—8左右，尽量避免使用过酸或过碱的溶剂。

4. 温度 温度的升高可增加物质的溶解度。略为提高温度对提取是有利的。50—70℃的热提取法多用于一些植物成分和某些小分子生化物质。对绝大多数生物大分子，除了某些特殊例子外，一般提取温度选择在0—10℃，以防止生物大分子变性。

5. 去垢剂 去垢剂是一类既具有亲水基又具有疏水基的物质，可分阴离子、阳离子和中性去垢剂等多种类型。去垢剂一般具有乳化、分散和增溶作用。其中中性去垢剂对蛋白质的变性作用影响较少，宜用于提取蛋白质或酶。常用的中性去垢剂有Tween20、40、60、85，Triton X-100，Lubrol w等。常用的阴离子去垢剂有十二烷基硫酸钠（SDS），它可以促进核蛋白的解体，将核酸释放出来，并对核酸酶有一定抑制作用。常用于核酸的提取。

第三节 沉淀法

沉淀是溶液中的溶质由液相变成固相析出的过程。在制备过程中采用沉淀的手段,主要是为了达到浓缩的目的,或者通过沉淀固液分相后,除去非必要成分(纯化),也可以将已纯化的产品由液态变成固态便于保存或进一步处理。在生化制备中常用下列几种沉淀方法:盐析法、有机溶剂沉淀法、等电点沉淀法、非离子多聚体沉淀法、生成盐复合物沉淀法、热变性或酸碱变性沉淀法及其他专一性沉淀法。

一、盐析法

一般地说,所有固体溶质都可以在溶液中加入中性盐而沉淀析出,这一过程称为盐析。蛋白质、多肽、多糖、核酸、病毒等都可用盐析法进行沉淀分离。但盐析法应用最广泛的还是在蛋白质领域内。

当蛋白质溶液中的中性盐浓度渐增至一定程度时,蛋白质分子表面电荷被中和,水化膜破坏,使蛋白质分子之间相互聚集而沉淀。

(一) 影响蛋白质盐析的因素

1. 蛋白质的浓度对盐析的影响 在不同浓度的蛋白质溶液中进行盐析,使用硫酸铵的饱和度范围是不同的。蛋白质浓度较高时,需硫酸铵量较少;蛋白质浓度较低时,需硫酸铵量较多。蛋白质溶液太浓时,盐析时易发生共沉现象,造成各种蛋白质分离不好。而蛋白质溶液太稀时,耗盐量大,蛋白质回收率也低。一般认为2.5%—3.0%的蛋白质浓度比较适中。

在实际使用中,蛋白质的盐析方法因制备阶段不同而异。一般在制备早期,保持一定的pH和温度,而改变离子强度(盐浓度)进行蛋白质的分步分离。在后期分离纯化及结晶阶段,则往往保持一定的离子强度而改变pH和温度。

2. 离子强度和离子类型对盐析的影响 当溶液中离子强度不断增加时,各离子之间及离子与溶质分子之间相互竞争水分子,结果导致溶质的溶解度渐渐减小,产生盐析现象。一般说来,离子强度越大,蛋白质的溶解度越低,越容易产生盐析现象。

不同蛋白质发生盐析时所需要的离子强度不同。据此,可以用不同离子强度分步盐析的方法,进行混合物中各组分的分离。在进行分离的时候,一般从低离子强度到高离子强度,顺次进行。每一组分被盐析出来后,经过固—液分离(离心或过滤),再在溶液中逐渐提高中性盐的饱和度,使另一种蛋白质组分盐析出来。

虽然离子强度的大小对蛋白质的溶解度起着决定性的影响,但在同样的离子强度下,离子种类的不同对蛋白质溶解度的影响也不同。一般来说,离子半径小而价数高的离子在盐析方面影响较强,离子半径大而价数低的离子影响较弱。

3. pH对盐析的影响 蛋白质所带净电荷越多,它的溶解度越大。在蛋白质净电荷等于零时溶解度最低,此时溶液的pH值为该蛋白质的等电点(pI)。在盐析时,常调整溶液pH值在该蛋白质等电点附近,可获得最佳盐析效果。但必须注意,蛋白质在水或稀盐溶液中的pI值与高盐溶液中的pI值是不同的。要根据实际情况调整pH值至蛋白质溶解度最低处,才能获得最佳盐析效果。

4. 温度对盐析的影响 在低离子强度或纯水中,在一定范围内,蛋白质的溶解度随着温度的升高而增加。但在高盐溶液中,温度的升高有时反而使蛋白质溶解度下降。在一般情况下,蛋白质的盐析温度要求不严格,可以在室温下进行。某些对温度敏感的酶的盐析操作,宜在0—4℃下进行,避免酶活力丧失。

(二) 硫酸铵盐析法 用于盐析的中性盐种类很多,如硫酸铵、硫酸钠、硫酸镁、磷酸钠、磷酸钾、氯化钠、氯化钾、醋酸钠、醋酸钾、硫氰化钾等。由于硫酸铵的溶解度大,受温度变化影响较小(在0℃时饱和度为5.35M,在25℃时为5.82M),价格便宜,所以是盐析中应用最广泛的中性盐。其缺点是缓冲能力较弱,且含氮原子,对蛋白质的分析有一定影响。尽管如此,硫酸铵仍是盐析时最受欢迎的盐类。

1. 硫酸铵使用前的预处理 生化研究中要选用纯度较高的硫酸铵,或重结晶后再使用。蛋白质的巯基(—SH)对重金属离子十分敏感,必要时在使用前,要用H₂S气体处理浓硫酸铵溶液,过滤、重结晶,烘干后使用。高浓度硫酸铵溶液一般呈酸性(pH5.0左右),使用前可用浓氨水或硫酸调至所需pH值。

2. 硫酸铵的饱和度及其调整法 盐析时硫酸铵的浓度常用饱和度表示,达到饱和状态时的硫酸铵饱和度为100%。不同的硫酸铵饱和度可用下述三种方法中的任意一种进行调整:

(1) 加入固体盐法 当盐析要求饱和度较高而又不增大溶液的体积时,多用此法。先将硫酸铵磨碎成均匀细粒,在搅拌下缓慢撒入。尽管硫酸铵的饱和度受温度影响较小,在实际工作中还是要考虑溶液温度的。本书附录1和附录2分别给出了25℃和0℃下各种不同的饱和度应加入硫酸铵的量。

(2) 加入饱和溶液法 饱和硫酸铵的配制,一般是取过量硫酸铵加热溶解,再在0℃或室温放置,直至固体硫酸铵析出为度。

要达到某一饱和度所需加入硫酸铵溶液的体积可按下列式计算:

$$V = V_0(S_2 - S_1)/(1 - S_2)$$

式中: V——所需加入饱和硫酸铵溶液的体积;

V₀——待盐析溶液的体积;

S₁——待盐析溶液的原始饱和度;

S₂——所需达到的硫酸铵的饱和度。

加入饱和溶液法适于要求硫酸铵饱和度不高,而且原来溶液体积不大时使用。

(3) 透析平衡法 把待盐析的样品溶液装在透析袋内,浸入饱和硫酸铵溶液中进行透析。外部的硫酸铵靠扩散作用不断通过半透膜进入透析袋内,逐步达到所需要的盐析饱和度,蛋白质便产生沉淀,此时停止透析。

透析法的优点是硫酸铵浓度变化有连续性,盐析效果较好,主要用于蛋白质结晶阶段。

3. 注意事项

(1) 加固体硫酸铵时,必须看清楚附录1和附录2上规定的温度,避免计算错误。

(2) 不论是加入固体硫酸铵,还是加入硫酸铵饱和溶液,均要在搅拌下缓慢加入,以免造成局部过浓,影响分离效果。

(3) 为了获得实验的重现性,盐析的条件如pH值、温度和硫酸铵的纯度都必须严格控制。

(4) 盐析后一般放置半小时至1小时,待沉淀完全后再分离,以免影响回收率。低浓度的硫酸铵溶液盐析后固液分离常采用离心法。高浓度溶液常用过滤法。这是因为蛋白质沉淀从高密度溶液中分离出来,需要较高的离心速度和长时间的离心操作,离心法反不如过滤快。

二、有机溶剂沉淀法

有机溶剂对许多能溶于水的小分子生物物质以及核酸、多糖、蛋白质等生物大分子都能发生沉淀作用。有机溶剂的沉淀作用主要是降低溶液的介电常数,从而增强溶质分子之间的相互作用,使其溶解度降低。对于具有表面水层的生物大分子来说,有机溶剂可破坏溶质分子表面的水膜,使这些大分子脱水而相互聚集析出。不同溶质的沉淀要求不同浓度的有机溶剂,因此可用有机溶剂进行分步沉淀。

有机溶剂沉淀法分辨能力比盐析法高,沉淀不用脱盐,过滤比较容易。但对某些具有生物活性的大分子如酶,容易引起变性失活,操作常需在低温下进行。

选择的有机溶剂必须能和水混溶。沉淀核酸、糖类、氨基酸和核苷酸等物质的有机溶剂最常用乙醇。当然还有其他一些可供选择的溶剂。

进行有机溶剂沉淀时,欲使原溶液达到一定的有机溶剂浓度,需加入的有机溶剂的体积可按下列式计算:

$$V = V_0(S_2 - S_1)/(S_3 - S_2)$$

式中: V ——需要加入 S_3 浓度($S_3 > S_2$)有机溶剂的体积;

V_0 ——原溶液体积;

S_1 ——原溶液中有机溶剂的浓度;

S_2 ——所要求达到有机溶剂的浓度;

S_3 ——需要加入的有机溶剂浓度。

有机溶剂沉淀操作应在低温下进行。样品浓度要适宜。样品过浓溶质易变性,共沉作用大,分离效果差;样品过稀,具有生理活性的样品易产生稀释变性,回收率低。在样品结构稳定范围内选择溶解度最低处的pH值,有利于提高沉淀效果。离子强度及离子种类对有机溶剂沉淀也都有影响。

三、等电点沉淀法

两性电解质在电中性时溶解度最低。不同的两性电解质其等电点不同,因而等电点沉淀法可用于某些两性电解质的分离,如氨基酸、蛋白质、核苷酸等。为了增强沉淀效果,往往在等电点时再加上其他沉淀因素。所以,等电点沉淀法一般并不独立使用,常和盐析法、有机溶剂沉淀法或其他沉淀剂一起使用,以提高其沉淀能力。

四、非离子多聚物沉淀法

非离子多聚物是60年代发展起来的一类新沉淀剂。常用的有各种不同分子量的聚乙二醇(缩写为PEG)、壬苯乙烯化氧(NPEO)、葡聚糖、右旋糖酐硫酸钠等。其中应用最多的是聚乙二醇。Laurent根据众多研究结果认为PEG的沉淀机理主要是通过空间位置排斥,使液体

中的微粒（包括生物大分子、病毒和细菌等）被迫挤聚在一起而引起沉淀的发生。

水溶性非离子多聚物的沉淀方法，操作条件温和，不易引起生物大分子的变性，同时具有极高的沉淀效能。沉淀后的多聚物也容易除去。因此广泛应用于细菌、病毒、核酸、蛋白质和酶等多种物质的沉淀分离。

在实际应用时，有两种操作方法：

（1）选用两种水溶性非离子多聚物组成液—液两相系统，使生物大分子或微粒在两相系统中不等量分配而造成分离。

（2）选用一种水溶性非离子多聚物，使生物大分子或微粒在同一液相中由于被排斥相互凝集而沉淀析出。

五、其他沉淀法

除了上述几种方法以外，在生化制备中还有其他一些常用的沉淀法，如利用表面活性剂或有机溶剂引起变性、利用热变性、酸碱变性等选择性变性进行物质的沉淀，或利用一些选择性沉淀剂有选择地沉淀某些物质。

在应用这些沉淀方法进行物质分离或制备时，要注意各种方法的适用范围、沉淀效率。在分离有生物活性的大分子时，特别要注意保持其完整结构和活性。

第四节 膜分离技术

1861年Thomas Graham首次介绍了膜分离技术在脱盐中的应用。现在，膜分离技术已有了很大的发展，广泛应用于生物大分子的脱盐、浓缩和分离提纯。

膜分离主要是根据溶液中各种溶质分子的大小、形状、性质上的差别，对于各种薄膜表现出不同的可透性。薄膜的作用是有选择地让小分子通过，而把较大的分子挡住。分子透过膜可由简单的扩散作用引起，或由膜两侧外加的流体静压差或电场作用所推动。由此衍生出透析、超滤、反渗透、电渗析等多种膜分离技术。

一、透 析

（一）原理 透析用来分离大小不同的分子。其根据是天然或人工半透膜只允许小分子通过而阻碍大分子通过。当膜的两侧存在小分子浓度梯度差时，小分子就从高浓度一侧向低浓度一侧扩散，直至达到平衡。如果能不断除去扩散出来的小分子，就有可能彻底分离大小不同分子的混合物。

（二）影响透析速度的因素

1. 半透膜的通透性 半透膜的通透性取决于膜孔径的大小。在能阻碍大分子扩散的前提下，孔径越大，透析速度越快。有些商品半透膜其通透性界限不明确，某些较小的大分子在短时间内不能透过膜向外扩散，但随着时间的延长最终可能扩散出来。在一些比较精细的实验中，就要选用透析速度快而通透性界限又明确的半透膜。

2. 透析外液的更换 在透析过程中，膜两侧小分子浓度逐渐达到平衡。如果能不断降低膜外溶液中小分子的浓度并使其低于膜内侧小分子的浓度，透析作用就可以较快的速度进

行。为此目的，常用的方法有两种：一是反复更换透析外液，二是对流水透析。为了尽可能维持膜两侧的浓度梯度差具有最大值，透析时一般采用磁力搅拌器搅拌外液。

3. 温度 温度越高，透析速度越快。这是因为温度升高，使溶剂粘度下降，扩散速度增加。但在实际使用中，要顾及分离对象的稳定性。为了防止酶、蛋白质变性，透析一般在低温下进行。

4. 压力 用跨膜的壓力梯度可加速大分子的分离速度。将透析袋放在真空系统里，不断提高密闭系统的真空度，透析袋中小分子和水便很快透析出来。

5. 溶剂 透析是一种扩散作用，对蒸馏水的扩散速度是最快的。但由于水分子向膜内侧的渗入，透析溶液浓度会下降。为了避免这一现象，通常把透析袋装满，防止过多水分进入，减轻样品的稀释。

在溶剂的选择上，一般尽量避免使用纯水，要使用一定pH和离子强度的缓冲液。这是因为透析过程中可能出现杜南（Donnan）效应。在用半透膜进行透析脱盐时，大分子受阻不能扩散到膜外，而与蛋白质带相反电荷的小离子却能通过半透膜。随着离子的外流，膜两侧逐渐建立起一定的电位差。这种现象称为杜南效应。如果渗透出来的是 Na^+ ，外液是水，为了保持溶液的电中性， H^+ 会进入膜内，使膜内pH下降，膜外pH上升。到一定程度，膜内pH的变化会使蛋白质变性和沉淀。为了避免杜南效应，通常采取对中等浓度（ $>0.1\text{M/L}$ ）的盐溶液透析。

（三）透析袋的处理和保存 根据透析溶液的多少和分子的大小，选用一定直径和孔径的透析袋，裁成适当长度。为了除去半透膜上可能携带的金属离子，防止被透析的分子失活，透析袋最好在碱性EDTA溶液（ Na_2CO_3 , 10g/L ; EDTA, 1mM/L ）中煮沸30分钟，然后用蒸馏水洗净。先扎紧透析袋一端，灌满要透析的溶液，再扎住另一端，即可透析。用过的透析袋如要保存，最好浸泡在含有微量苯甲酸钠的溶液里，以防长霉。

二、超 滤

（一）原理 超滤是加压膜分离技术之一。其分离原理和过滤相似。主要依赖于被分离物质分子量的大小、形状和性质不同，在一定的压力差下，使小分子通过具有一定孔径的特别薄膜，限额以上的大分子被膜阻留，使大小不同的分子得以分离。可用外源氮气加在样液一侧产生正压或用真空泵在超滤液一侧产生负压，但以加压较为普遍。

根据所加的操作压和所用膜平均孔径的不同，可分为微孔过滤、超滤和反渗透三种：

微孔过滤用于分离较大颗粒，所用操作压在5磅/吋²以下，膜的平均孔径为 500Å — $14\mu\text{m}$ 。

超滤用于分离大分子溶质，所用操作压为5—100磅/吋²，膜的平均孔径为 10 — 100Å 。

反渗透用于分离小分子溶质，所用操作压，为500—2000磅/吋²，膜的平均孔径在 10Å 以下。

超滤均在密封的容器中进行。外源压力迫使小分子溶质通过滤膜。随着超滤进行，在滤膜上逐渐沉积上被阻留的大分子溶质并形成浓度梯度，称为浓度极化现象。这层极化膜越来越厚，降低了流速和膜的选择分离能力。为了克服浓度极化，增加流速，提高选择分离效率，在过滤装置上作了许多改进。如增加搅拌，采用浅道流动系统，使用各向异性的中空纤维。

维系统,使超滤效率大为提高。

(二) 超滤膜的选择和使用 选用合适的超滤膜,是超滤操作的关键。在选择商品超滤膜时,应注意以下问题:

(1) 额定截留水平 表示多种超滤膜所规定的截留溶质分子量的范围。实际使用时,膜的截留水平宜稍低于所分离、浓缩的溶质分子量。对纤维状或不规则的溶质分子选用上限。

(2) 流速 可用在一定压力下每分钟通过单位面积膜的液体量来表示($\text{ml}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$)。流速大小不仅和膜和表观孔径大小有关,而且和膜的结构类别有关。近年出现的各向异性不对称超滤膜比早期的各向同性超滤膜的流速大为提高。

(3) 要注意各种超滤膜的使用条件如操作温度,耐高温处理性能,适用溶剂类型和种类等。

(4) 超滤膜较稳定,如使用适当,能连续用1—2年。暂时不用,可在1%甲醛溶液或5%甘油溶液中保存,避免细菌侵蚀及干燥。

第五节 浓缩与干燥

一、浓 缩

从低浓度的溶液中除去水或溶剂使之变为高浓度的溶液称为浓缩。蒸发、离子交换法、吸附法、冷冻融化法、加沉淀剂、溶剂萃取、亲和层析等方法均能达到浓缩的目的。本节着重介绍实验室中非常实用的吸收浓缩和膜浓缩。

(一) 吸收浓缩 吸收浓缩是加入吸收剂从溶液中吸收水或溶剂使溶液达到浓缩的方法。吸收剂应具有不与溶液起反应、不吸附溶质、容易和溶质分离、除去溶剂后还能重新使用等特性。常用的吸收剂有聚乙二醇、聚乙烯吡咯酮、交联葡聚糖凝胶Sephadex G-25、G-50和聚丙烯酰胺干凝胶Lyphogel。

根据凝胶的吸水率,将一定量的干凝胶投入溶液中后,起初凝胶浮于液面,不久即下沉。待吸水达到平衡后,离心分出上层浓溶液。下层凝胶经回收处理后可以再用。

凝胶直接吸收法使用方便。吸收剂用量与吸水量成正比。浓缩时兼有脱盐效应。浓缩前后溶液pH无变化。

(二) 膜浓缩

1. 高渗透析 如果透析是在多聚物的高渗溶液中进行,膜内溶液中的水就会向膜外扩散,立即被多聚物吸收直至平衡。常用的吸收多聚物有聚乙烯吡咯酮(Polyvinyl Pyrrolidone, PVP, $\text{MW} = 12000$),聚乙二醇(Polyethylene, PEG, $\text{MW} 5000-10000$ 适于浓缩,以6000最好)及葡聚糖等。使用前常需加碱中和PEG中的酸。

高渗透析的缺点是:吸收剂中如果含有分子量较低的聚合物或杂质,就有可能进入透析袋内,造成污染。PVP对280nm紫外光有吸收,干扰蛋白质比色测定。由于半透膜的吸附作用,蛋白质不能全部回收。

2. 其他膜浓缩法 利用减压透析、离心超滤、加压超滤等都能收到良好的浓缩效果。

二、干 燥

干燥是将潮湿的固体、膏状物、浓缩液及液体中的水或溶剂除尽的过程。干燥后可使生化制品提高稳定性，便于分析、研究、应用和保存。

蒸发面积、干燥速度、物料所处的状态、温度、湿度、压力等是影响干燥的主要因素。在生化研究中，最重要的干燥方法是真空干燥和冰冻干燥。

(一) 真空干燥 真空干燥即减压干燥。实验室中常用的装置有真空干燥器和真空干燥箱，通过冷凝器、抽滤瓶和真空泵相连。真空干燥有利于生化物质活性的保存。

(二) 冰冻干燥 冰冻干燥是先将溶液或混悬液冷冻成固态，然后在低温和高真空度下使冰升华，留下干物质。因为冰冻干燥是在低温高真空度下进行的，所以样品不起泡、不暴沸。干物不沾壁，易取出，而且成为疏松的粉块，极易溶于水。由于上述优点，冰冻干燥广泛用于生化研究中，尤其适于对热敏感、易吸湿、易氧化及溶剂蒸发时易产生泡沫而引起变性的蛋白质、酶、核酸、抗菌素、激素等的干燥。

(陈毓荃)

第二章 离 心

离心分离技术是生命科学研究中一项最基本的技术。随着我国生物高技术的开展和高速、超速离心机的增加，离心技术将进一步为人们所重视和广泛地应用。

第一节 离心技术基本原理与设备

一、沉降原理

悬浮液中颗粒在重力场中的沉降速率取决于颗粒本身及悬浮介质的性质。对于刚性球形颗粒来说，在沉降过程中它要受到摩擦力 (F_1) 和浮力 (F_2) 双重作用：

$$F_1 = 6\pi\eta r_p \frac{dr}{dt} \quad (2-1)$$

$$F_2 = (\rho_p - \rho_m)V \cdot g \quad (2-2)$$

(2-1) 式中： η ——介质的粘度；

r_p ——颗粒半径；

$\frac{dr}{dt}$ ——是沉降速率。

(2-2) 式中： ρ_p ， ρ_m ——分别是颗粒和介质的密度；

V ——颗粒体积。

当颗粒是匀速沉降时， $F_1 = F_2$ ，因此，

$$6\pi\eta r_p \frac{dr}{dt} = (\rho_p - \rho_m)V \cdot g \quad (2-3)$$

球形颗粒体积 $V = \frac{4}{3}\pi r_p^3$, 故

$$6\pi\eta r_p \frac{dr}{dt} = \frac{4}{3}\pi r_p^3 (\rho_p - \rho_m)g$$

$$\frac{dr}{dt} = \frac{2r_p^2(\rho_p - \rho_m)g}{9\eta} \quad (2-4)$$

如果沉降是在强大的离心力场中发生, 颗粒沉降的离心加速度 $\omega^2 r$ 比重力加速度 g 大得多, 此时沉降速率

$$\frac{dr}{dt} = \frac{2r_p^2(\rho_p - \rho_m) \cdot \omega^2 r}{9\eta} \quad (2-5)$$

(2-5)式仅仅适用于球形颗粒。对非球形颗粒来说, 沉降过程中摩擦系数比球形颗粒要大得多, 其沉降速率

$$\frac{dr}{dt} = \frac{2r_p^2(\rho_p - \rho_m)\omega^2 r}{9\eta(f/f_0)} \quad (2-6)$$

(2-6) 式中, f , f_0 分别为非球形颗粒和球形颗粒的摩擦系数。

从 (2-6) 式可以看出, 悬浮液中颗粒在离心力场中的沉降速率与颗粒大小 (半径)、形状 (影响摩擦系数)、颗粒及介质密度、介质的粘度有关。实际上, 当颗粒和介质的性质确定之后, 沉降速率主要取决于颗粒所受到的离心力大小, 即与离心机转速及颗粒离转轴中心的距离有关。

一般以相对离心力来表示颗粒在离心力场中所受到的离心作用:

$$RCF = \frac{\omega^2 r}{g} \quad (2-7)$$

由于角速度不便测量, 而角速度 ω 与离心机每分钟转数有如下关系:

$$\omega = \frac{2\pi \cdot \text{rpm}}{60} = \frac{\pi \cdot \text{rpm}}{30}$$

故:

$$RCF = \frac{(\pi \cdot \text{rpm}/30)^2 \cdot r}{g}$$

$$= \frac{\pi^2 \cdot \text{rpm}^2 \cdot r}{900g}$$

$$= 1.119 \times 10^{-5} \text{rpm}^2 \cdot r$$

其大小以重力加速度 g 值的倍数来表示。这样, 当知道了离心机转头每分钟转数和转头半径后, 就很容易计算相对离心力 (RFC)。

大多数厂家离心机转头说明书上会分别写明各个转头的半径大小 (最大 r 与最小 r), 其最大 r 一般是指从离心管底到旋转轴的距离。但文献中所列的离心力除非另有说明, 一般都是指从溶液的中心位置到旋转轴之间的离心力, 称为平均离心力。