



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

基础生物化学实验

(第3版)

主编 魏 群



高等教育出版社



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

基础生物化学实验

(第3版)

主编 魏 群

编者 魏 群 李 森 井 健

向本琼 尹燕霞 佟 丽



高等教育出版社

内容提要

本书分实验理论和学生实验两个部分。实验理论部分涉及最基本的实验技术及原理和实验方法的介绍。学生实验部分选用包括糖类、脂质、蛋白质、核酸、酶、代谢中最基本的实验和一些训练生物化学基本技术和基本方法的实验及综合实验。书后附有实验室基本操作、常用仪器的使用方法、常用试剂的配制等附录。

第3版精简或删除了一些目前已不常用的方法介绍和实验。增加了近年发展起来的生物化学新技术、新方法和新仪器,以及一些与现代科学研究、医学、农林等应用密切相关的新实验。并增加了一些综合设计实验。在实验编写风格方面,更突出基础、简明、实用、系统。对实验中应注意的地方、学生在实验过程中易出现的问题、加入关键试剂应有的正常现象、部分仪器的正确操作等都加强了提示和指导。

本教材适合高等院校及专科学校生物、农、林、医等专业使用。

图书在版编目(CIP)数据

基础生物化学实验/魏群主编. —3版. —北京:
高等教育出版社,2009.7

ISBN 978-7-04-027274-1

I. 基… II. 魏… III. 生物化学-实验-高等学校-
教材 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 087878 号

策划编辑 王 莉 责任编辑 田 军 封面设计 张 楠 责任绘图 尹 莉
版式设计 余 杨 责任校对 姜国萍 责任印制 陈伟光

出版发行 高等教育出版社

社 址 北京市西城区德外大街4号

邮政编码 100120

总 机 010-58581000

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司

印 刷 中青印刷厂

购书热线 010-58581118

咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>

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

网上订购 <http://www.landaco.com>

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

畅想教育 <http://www.widedu.com>

开 本 787×1092 1/16

印 张 16.5

字 数 400 000

版 次 1982年10月第1版

2009年7月第3版

印 次 2009年7月第1次印刷

定 价 21.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 27274-00

郑重声明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话：(010) 58581897/58581896/58581879

反盗版举报传真：(010) 82086060

E-mail：dd@hep.com.cn

通信地址：北京市西城区德外大街4号

高等教育出版社打击盗版办公室

邮 编：100120

购书请拨打电话：(010)58581118

第3版前言

《基础生物化学实验》教材自1982年第1版,1999年第2版出版以来,一直深受广大师生的喜爱。

随着生命科学技术日新月异的发展,生物化学实验手段越来越成为研究生命科学中更多学科的重要研究工具,实验用途也得到了更大的拓宽。同时随着一些新仪器、新技术的涌现,生物化学本身的实验技术得到了更为迅速的发展,提出了一些更为简便、快速、灵敏的方法,而原教材中有一些方法已完全不能适应当前时代的需要。在实验课教学中,我们也总结出一些指导学生更好的经验和方法,这些都促使我们对教材第2版的修订。

第3版是在王秀奇、秦淑媛、高天慧、颜卉君编著的第二版的基础上修订而成,并增加了近年发展起来的生物化学新技术、新方法和新仪器的应用。增加了一些与现代科学研究、医学农林等应用密切相关的新实验。如:多种方法进行蛋白质浓度的测定,蛋白质相对分子质量的测定,蛋白印迹,血糖、维生素和血清胆固醇的测定,质粒的提取及DNA琼脂糖凝胶电泳等。还增加了一些综合设计实验。精简或删除了一些目前已不常用的方法介绍和实验,但对于一些虽已落伍,但还有特色的实验和方法仍给予了保留。

在实验编写风格方面,第3版更强调基础、简明、实用、系统。突出生物化学中的最基本的实验基础、实验方法和生物化学基本技术。尽量避免购买昂贵的仪器和材料。并详细列出所需仪器、材料和试剂的配制。对实验中应注意的地方、学生在实验过程中易出现的问题、加入关键试剂应有的正常现象、某些仪器的正确操作等都加强了提示和指导。书后还增加了许多有用的附录。

本教材适用对象及层次较广,适合高等及专科学校生物、农、林、医等专业的采用。

由于我们的水平有限,希望读者在使用过程中,对我们教材的不当之处,提出批评指正。

编者

2009年2月于北京师范大学

第 2 版前言

《基础生物化学实验》教材,自 1982 年出版后,曾被师范院校师生广泛采用,受到他们的欢迎,并提出了许多宝贵的意见,使我们受到鼓舞和鞭策,以便我们对修订此教材充满信心和决心。本教材自问世以来,至今已过 15 载,印数虽已达十几万册,但仍不能满足广大师生的需要。通过长期的教学实践,我们深深感到生物化学实验的重要性。随着科学技术的发展,实验理论和方法也相应地向前发展,提出了不少的简便、快速、灵敏的方法,在论证科学实验中起到了关键的作用。回顾我们这本教材,有些理论和实验方法难免还有不足之处。为了进一步提高生物化学实验教学水平及改正第一版中存在的缺点与不足之处,有必要修订再版。

这次修订侧重下列两点:

一、在保持原有特色的基础上,作了必要的修改。删除了第七、十三章和一些实验。增加了一些新材料和内容,如亲和层析和糖类、脂质等实验。共编写了 42 个实验。

二、为了便于教学,使学生深入了解实验内容的重点和难点,掌握实验步骤的关键问题,提高学生对实验结果的分析能力在每个实验后增添了思考题。

十几年来,不少读者曾先后对本教材提出许多好的意见和建议,我们在修订过程中,酌情加以采纳,并对读者表示感谢。在修订过程中,得到了高等教育出版社谭丽霞副编审的指导,特在此表示感谢。鉴于我们知识及能力所限,加之多种客观原因,缺点、错误难免存在,希望读者再次批评与指正。

编 者

1997 年 5 月

第 1 版前言

本书根据 1980 年教育部制订的师范院校教学大纲编写而成,另外多增加了一些实验以供使用。可与《生物化学简明教程》配合使用。全书共分三篇。

第一篇选取了若干与所编写实验有关的技术理论和应用,使学生扩大这方面的知识。共分八章,包括实验的准确性、透析法、层析法、电泳法、分光光度法及同位素技术等。

在第二、三篇中编写了四十组学生实验(每组用 3~4 学时,个别试验用 6~8 学时)和演示实验,其中多数是我们在历年教学中采用的;少数是从国内外参考书上选取,经过我们试作,认为适合基础生物化学实验使用。演示实验是根据目前一般师范院校实验教学学时和实验条件考虑的,各校应创造条件将其中若干实验改为学生。

由于我们的经验不足,理论水平有限,书中的错误和不足之处敬希读者指正。

北京师范大学生物系生物化学教研室

1982 年 5 月

目 录

第一篇 常用生物化学实验技术及原理

第一章	层析技术	2
第二章	电泳技术	11
第三章	光谱技术	23
第四章	离心技术	36
第五章	膜技术及其在生物化学中的应用	42
第六章	蛋白质的分离纯化和检测	46
第七章	蛋白质的分析技术	54
第八章	临床生物化学检验	64

第二篇 学生实验

第九章	糖类的化学	80
实验一	糖类的性质实验(一)——糖类的颜色反应	80
I.	α -萘酚反应(Molisch 反应)	80
II.	间苯二酚反应(Seliwanoff 反应)	81
实验二	糖类的性质实验(二)——糖类的还原作用	82
实验三	总糖的测定——蒽酮比色法	84
实验四	还原糖的测定——3,5-二硝基水杨酸比色法	86
实验五	血糖的定量测定——GOD-PAP 法	88
第十章	脂质的化学	92
实验六	粗脂肪的提取和定量测定	92
实验七	脂肪碘值的测定	93
实验八	血清胆固醇的测定	96
I.	化学比色法——磷硫铁法	96
II.	化学比色法——邻苯二甲醛法	98
III.	酶法	99

第十一章 蛋白质的化学	102
实验九 总氮量的测定——凯氏(Micro-Kjeldahl)定氮法	102
实验十 氨基酸的分离鉴定——纸层析法	105
实验十一 蛋白质的性质实验(一)——蛋白质及氨基酸的呈色反应	107
I. 双缩脲反应	107
II. 茚三酮反应	109
III. 黄色反应	110
IV. 考马斯亮蓝反应	112
实验十二 蛋白质的性质实验(二)——蛋白质等电点的测定和蛋白质的沉淀反应	113
I. 蛋白质等电点的测定	113
II. 蛋白质的沉淀与变性	115
III. 尿蛋白定性检验	118
实验十三 蛋白质相对分子质量的测定(一)——SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	120
实验十四 蛋白质相对分子质量的测定(二)——凝胶过滤法	125
实验十五 蛋白质浓度的测定	129
I. 考马斯亮蓝 G-250 法(Bradford 法)测定蛋白质的浓度	129
II. 用福林-酚试剂法(Lowry 法)测定蛋白质的浓度	131
实验十六 酪蛋白的制备	133
第十二章 核酸的化学	135
实验十七 大肠杆菌质粒 DNA 的提取、酶切和琼脂糖凝胶电泳鉴定	135
实验十八 肝细胞核中核酸(RNA 和 DNA)的分离与测定	138
实验十九 薄层层析法分离 AMP、ADP 和 ATP	140
实验二十 紫外分光光度法测定核酸含量	142
实验二十一 应用 PCR 技术扩增 DNA 分子	144
第十三章 酶和维生素	147
实验二十二 酶的特性	147
I. 温度对酶活力的影响	147
II. pH 对酶活力的影响	148
III. 唾液淀粉酶的活化和抑制	150
IV. 酶的专一性	151
实验二十三 枯草杆菌蛋白酶活力测定	154
实验二十四 底物浓度对酶促反应速率的影响——米氏常数的测定	156
实验二十五 胰凝乳蛋白酶的制备及活力测定	160
实验二十六 维生素C 的定量测定	165
I. 2,4-二硝基苯胍法	165
II. 荧光法	168
实验二十七 维生素A 的定量测定	170
I. 三氯化锑法	170

II. 紫外分光光度法	173
第十四章 新陈代谢	176
实验二十八 肌糖原的酵解作用	176
实验二十九 小麦萌发前后淀粉酶活力的比较	178
实验三十 发酵过程中无机磷的利用	180
实验三十一 脂肪酸的 β -氧化	183
实验三十二 血液中转氨酶活力的测定	185
实验三十三 组织中乳酸脱氢酶同工酶的活性染色	187
第十五章 综合实验	191
实验三十四 碱性磷酸酶的分离纯化及其特性研究	191
I. 碱性磷酸酶的分离纯化及各级分 酶活性和蛋白含量的测定	191
II. 碱性磷酸酶的纯度、蛋白印迹鉴定 及其亚基相对分子质量测定	196
III. 碱性磷酸酶的酶学特性研究	200
实验三十五 溶菌酶的提取和系列性质测定	207
I. 溶菌酶的分离纯化	208
II. 溶菌酶分离纯化参数的测定	209
III. SDS-PAGE 鉴定纯化产物的纯度 和测定溶菌酶的相对分子质量	212
IV. 溶菌酶的酶学特性研究	214
V. 分子筛层析测酶相对分子质量	216
附录	219
一、实验室基本操作	219
二、试剂的配制及其分级	227
三、实验误差的统计学处理	229
四、硫酸铵饱和度计算表	232
五、常用核酸、蛋白质换算数据	233
六、氨基酸符号及相应密码子	234
七、常见酸碱试剂的浓度及密度	235
八、常用缓冲液的配制	236
九、常用酸碱指示剂	243
十、离心机转速与相对离心力的换算	244
十一、层析中常用介质的规格及性能	246
参考文献	250

第一篇

常用生物化学实验技术及原理



- ① 第一章 层析技术
- ② 第二章 电泳技术
- ③ 第三章 光谱技术
- ④ 第四章 离心技术
- ⑤ 第五章 膜技术及其在生物化学中的应用
- ⑥ 第六章 蛋白质的分离纯化和检测
- ⑦ 第七章 蛋白质的分析技术
- ⑧ 第八章 临床生物化学检验

朱廷清编 一

本书共分八章，第一章层析技术，第二章电泳技术，第三章光谱技术，第四章离心技术，第五章膜技术及其在生物化学中的应用，第六章蛋白质的分离纯化和检测，第七章蛋白质的分析技术，第八章临床生物化学检验。

第一章 层析技术

层析技术也被称为色谱技术(chromatography),它利用混合物中各组分物理化学性质的差别,使各个组分以不同程度分布在两个相中,其中一个相是固定的(称为固定相),另一个相则流过此固定相(称为流动相)并使各组分以不同速度移动,从而达到分离纯化的效果。

从20世纪初发展至今,层析技术的种类已经有许多种,根据分离原理的不同可分为凝胶过滤层析、离子交换层析、亲和层析、吸附层析、金属螯合层析、疏水层析等。

凝胶过滤层析是以具有网状结构的凝胶层析介质作为固定相,利用凝胶层析介质交联度的不同形成不同大小的网状孔洞,在层析时能阻止比网孔直径大的物质通过,根据物质的分子大小进行分离的一种层析技术。

离子交换层析是以离子交换剂为固定相,利用这些离子交换剂与流动相中带电的待分离物质发生可逆性离子交换反应,根据物质的带电性质不同进行分离的一种层析技术。

亲和层析是根据生物大分子和配体之间的特异性亲和力,将某种配体连接在载体上作为固定相,对能与配体特异性结合的生物大分子进行分离的一种层析技术。

吸附层析是利用吸附层析介质表面的活性分子或活性基团,对流动相中不同物质吸附能力的强弱而进行分离的一种层析技术。

疏水层析是利用固定相载体上偶联的疏水性配基与流动相中的待分离的疏水物质发生可逆性结合而进行分离的一种层析技术。

基于固定相基质,层析技术有柱层析、薄层层析和纸层析等不同形式。将基质填装在柱状管中形成层析柱并在柱中进行层析的形式被称为柱层析技术;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,被称为薄层层析技术。以滤纸作为基质的层析则为纸层析技术。无论在科学研究还是生产实践中,柱层析技术都得到了非常广泛的应用。薄层层析和纸层析技术一般用于对于小分子物质的快速检测或者少量制备方面。在讨论几种常见的层析法之前,先重点了解一下最为常用的柱层析技术。

一、柱层析技术

目前,柱层析是应用最为广泛的层析技术之一,从外观看,它由层析柱、加样系统、检测系统和收集系统组成。一般情况下,层析柱包括柱子本身和其中的层析介质。加样系统一般的设备

有加样器或者与试剂瓶相连的泵系统。检测系统通常是紫外检测仪以及与之相连的记录仪。收集系统则为部分收集器或者特殊的溶液收集装置。近些年来,经典的柱层析技术结合自动化技术和先进的微电子技术,产生出以 HPLC、FPLC 为代表的新型成套设备,使这一操作形式更为灵敏、高效和自动化。

柱层析法的操作步骤一般都是由装柱、平衡及加样、洗脱、收集组成。不同的层析方法可能会在某个步骤有特殊的要求,视具体情况而定。

(1) 装柱:柱层析系统的层析柱通常是玻璃的。总的说来,长柱分辨力好,但大量物质的处理则用粗的柱比较适宜。层析柱的基本装置如图 1-1 所示。层析介质的种类有很多种,许多材料都可在层析法中使用。在装柱前这些材料要用溶剂平衡,另外还需作一些预处理。例如,凝胶层析材料需要溶胀,吸附剂需要加热或酸处理来活化,离子交换树脂需要用酸碱处理来得到所需的电离形式。

层析柱的填装是先关闭出口,用溶剂灌注至 1/3 体积,并使支持板下的“死体积”不存有气泡,再慢慢地向溶剂中加浆状物,要小心地沿着玻棒倾注以防止气泡存留在柱内。让悬浮液沉淀,并放出过多的溶剂,为了避免分层,最好一次装完,如需分几次填装,则在二次填装前应先已在已经沉淀的表面用玻棒搅拌后再倾注,重复这个过程,直至装到需要的高度。用溶剂彻底洗涤层析柱后使液面降到比层析床表面略高一点。最后覆盖一张圆形滤纸或尼龙布,以免加样时扰乱床表面。

(2) 平衡及加样:层析柱正式上样前必须用缓冲液洗柱,平衡至所需的 pH 和离子强度,一般用相当于 3~5 倍床体积的起始缓冲液在恒定压力下走柱,使交换剂充分平衡,柱床稳定。尤其在进行凝胶过滤柱层析时要求更为严格,介质必须平衡到在柱上不变的高度。样品上柱前,先将样品溶解在溶剂里或对洗脱液透析,样品溶液的浓度应该尽可能高些,以减少样品溶液体积,使区带狭窄。将样品仔细加到层析床的表面,打开旋塞至液面与床面齐,然后连接溶剂池,保持一定高度的液面。

(3) 洗脱:下一步是用适当的洗脱液把各组分依次从柱上洗脱下来。溶剂与层析材料的相互作用比柱上的物质与层析材料的相互作用要强,于是与柱结合的分子被取代。每一个柱能结合多少物质都有一个限度(即总柱容量)。在取代扩展的情况下,当样品上柱量差不多达到总柱容量的 50% 时,一般尚能完全分离。但是为了得到更好的分辨力,洗脱法更为可取。洗脱法是最常用的方法。使用洗脱法,上柱量不超过总柱容量的 10%,溶剂与柱的相互作用比溶质与柱的相互作用弱,溶剂越过结合的分子,逐渐地将它们从柱上冲洗下来。在冲洗过程中各组分因为吸附力不同而逐渐分离。在一个组分被洗脱后可以更换洗脱液,这就是所谓的分步洗脱。另外,还有一个可行的方法是逐渐改变溶剂的性质,形成一个离子强度、pH 或极性的递增梯度从而使各组分依次被洗脱,这种方法称梯度洗脱,它的优点之一是能够减少拖尾现象。

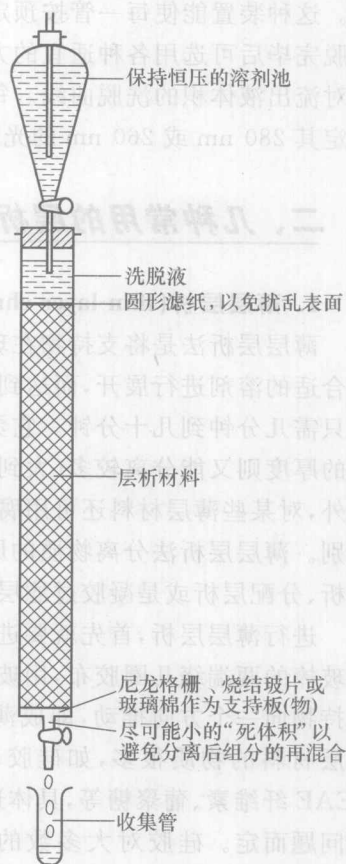


图 1-1 柱层析装置

(4) 部分收集及分析:柱的流出液可以用人工的方法收集到一系列试管中或使用部分收集器。这种装置能使每一管按预定的时间或滴数收集流出液,然后自动移位,下一管再继续收集。洗脱完毕后可选用各种适宜的方法将已收集的许多部分流出液进行定量分析,并画出洗脱物的量对流出液体积的洗脱曲线。每一部分的蛋白质或核酸的含量可以让流出液通过一个流动小室测定其 280 nm 或 260 nm 的光吸收来进行连续监测。

二、几种常用的层析技术简介

1. 薄层层析(thin-layer chromatography, TLC)

薄层层析法是将支持物在玻璃板上均匀地铺成薄层,把待分析的混合物加到薄层上,然后选择合适的溶剂进行展开,而达到分离鉴定的目的。薄层层析操作方便,设备简单,展开时间短,一般只需几分钟到几十分钟。它灵敏度高,适用于微量样品的分析(小到 0.01 mg),但是加大薄层的厚度则又能分离较多(大到 500 mg)的样品。薄层层析还有一个优点是除了可用一般显色剂外,对某些薄层材料还可用腐蚀性显色剂,另外,还可以在支持物中加荧光染料以有助于点的鉴别。薄层层析法分离物质的原理依所用不同支持物的性质而不同,可以是吸附层析、离子交换层析、分配层析或是凝胶过滤层析。

进行薄层层析,首先就要进行薄层的制作。在玻璃板上涂铺一层薄层,最简单的方法是在一根玻棒的两端绕几圈胶布,用玻棒压在玻璃板上,把支持物向一个方向推动,即成薄层(图 1-2)。可做薄层材料的物质很多,如硅胶、氧化铝、纤维素粉、DEAE 纤维素、葡聚糖等,具体选择哪一种依所研究的问题而定。硅胶对大多数的物质分离都是适宜的。有时在硅胶中加入煅石膏作为黏合剂,这时一旦与水调和就需快速操作。然后进行薄层的展开,这需要在密闭的器皿中进行,溶剂必须达到饱和,可以在器皿内部贴上浸湿了溶剂的滤纸条以加速饱和。薄层层析的展开方式可以是上行、下行、单向或双向。最后进行定位,可以用适当的显色剂喷雾或根据组分的紫外线吸收或荧光来定位。

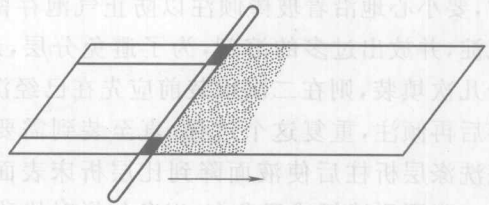


图 1-2 用玻棒涂铺薄层

2. 凝胶过滤层析(gel filtration)

凝胶过滤层析也称分子筛层析(molecular sieve chromatography)、排阻层析(exclusion chromatography)。基于一般的柱层析方法,相对分子质量不同的溶质通过具有分子筛性质的固定相(凝胶),从而使物质分离。用作凝胶的材料有多种,如交联葡聚糖、琼脂糖、聚丙烯酰胺凝胶、聚苯乙烯等。现以利用交联葡聚糖分离物质和测定相对分子质量为例说明凝胶层析法的基本原理和应用。

交联葡聚糖(商品名 Sephadex),是由细菌葡聚糖(以右旋葡萄糖为残基的多糖)用交联剂环氧氯丙烷交联后形成的有三维空间的网状结构物。控制葡聚糖和交联剂的配比及反应条件就可决定其交联度的大小,交联度大,“网眼”就小,从而得到各种规格 of 交联葡聚糖,即不同型号的凝胶。所以,商品名一般在 Sephadex 后紧跟一个大写字母“G”来表示其交联程度。G 越小,交联度越大,“网眼”越小,吸水量也越小,见表 3-3。

把经过充分溶胀的凝胶装入层析柱中,在加入样品后,由于交联葡聚糖的三维空间网状结构,小分子能够进入凝胶。较大的分子则被排阻在交联网状物之外,因此各组分在层析床中移动的速度因分子的大小而不同。相对分子质量(M_r)大的物质只是沿着凝胶颗粒间的孔隙随溶剂流动,其流程短,移动速度快,先流出层析床。相对分子质量小的物质可以透入凝胶颗粒,流程长,移动速度慢,比相对分子质量大的物质迟流出层析柱。经过分部收集流出液,相对分子质量不同的物质便互相分离(图 1-3, 图 1-4)。Sephadex G-10 到 G-50 通常用于分离小肽或脱盐。G-75 到 G-200 可用于分离相对分子质量大于 10 000 的蛋白质。

交联葡聚糖分子含有大量的羟基,极性很强,易吸水,所以使用前必须用水充分溶胀。

1 g 干重凝胶充分溶胀时所需的水量(mL)称为凝胶的得水值(W_r)。因为得水值不易测定,故常用溶胀度即床体积来表示凝胶的得水性,其定义是每克干重凝胶颗粒在水中充分溶胀后所具有的凝胶总体积。

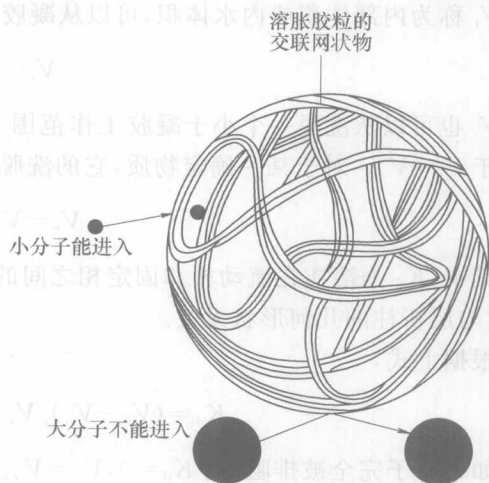


图 1-3 凝胶过滤的原理

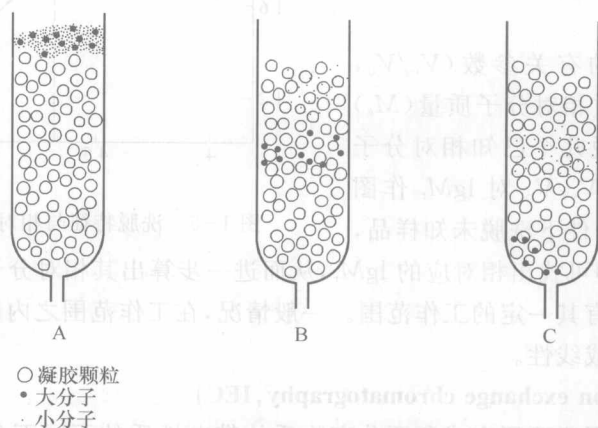


图 1-4 凝胶层析原理

凝胶柱的总体积(总床体积) V_t 是干胶体积 V_g ,在凝胶颗粒内部的水的体积 V_i 及凝胶颗粒外部的水的体积 V_o 之和。即:

$$V_t = V_g + V_i + V_o,$$

V_i 可以从柱的直径及高度计算。

V_o 也称外水体积。常常用洗脱一个已知完全被排阻的物质(如蓝葡聚糖 2000)的方法来测

定,此时其洗脱体积就等于 V_0 。

V_i 称为内部体积或内水体积,可以从凝胶干重(mg)和得水值 W_r 计算:

$$V_i = mg \cdot W_r$$

V_i 也可以从洗脱一个小于凝胶工作范围下限的小分子化合物,如铬酸钾来测定,其洗脱体积等于 $V_i + V_0$ 。对于某一确定物质,它的洗脱体积

$$V_e = V_0 + K_d V_i$$

其中, K_d 为溶质在流动相和固定相之间的分配比例(即分配系数),每一溶质都有特定的 K_d 值,它与层析柱的几何形状无关。

根据上式,

$$K_d = (V_e - V_0) / V_i = (V_e - V_0) / (mg \cdot W_r)$$

如果分子完全被排阻,则 $K_d = 0, V_e = V_0$ 。如果分子可以完全进入凝胶,那么 $K_d = 1, V_e = V_0 + V_i$ 。在通常的工作范围内 K_d 是一个常数($0 < K_d < 1$),有时 K_d 可能大于 1,则说明发生了凝胶对溶质的吸附。在实际操作中,由于 V_i 不易准确测定,而 V_g 所造成的偏差不大,若把整个凝胶相都作为固定相,则分配系数以 K_{av} (有效分配系数)表示,即: $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ 。

溶质的洗脱特征的有关参数 ($V_e/V_0, V_e/V_t, K_d, K_{av}$) 都与溶质相对分子质量 (M_r) 对数成线性关系,先洗脱几个已知相对分子质量 (M_r) 的球蛋白,用 V_e/V_0 对 $\lg M_r$ 作图(图 1-5),然后在同样条件下洗脱未知样品,

测其 V_e/V_0 值,在图上即可找出相对应的 $\lg M_r$,从而进一步算出其相对分子质量 (M_r)。

不同规格的凝胶都有其一定的工作范围。一般情况,在工作范围之内所得的曲线是线性的,超出工作范围曲线就不成线性。

3. 离子交换层析(ion exchange chromatography, IEC)

离子交换层析是根据所要研究或所要分离物质的带电性质的不同而分离、纯化混合物的一种固-液层析方法,即根据物质酸碱性、极性差异,通过离子间的吸附和解吸而将电解质溶液各组分分开。该法可以同时分析多种离子化合物,具有灵敏度高,重复性、选择性好,分离速度快等优点,是当前最常用的层析法之一,常用于多种离子型生物分子的分离,包括蛋白质、氨基酸、多肽及核酸等。

(1) 离子交换层析机制:离子交换层析的固定相是离子交换剂,它是由一类不溶于水的惰性高分子聚合物基质通过一定的化学反应共价结合上特定的电荷基团形成的。离子交换剂可以分为高分子聚合物基质、电荷基团和平衡离子三部分,电荷基团与高分子聚合物共价结合,形成一个带电的可进行离子交换的基团,平衡离子是结合于电荷基团上的相反离子,它能与溶液中其他

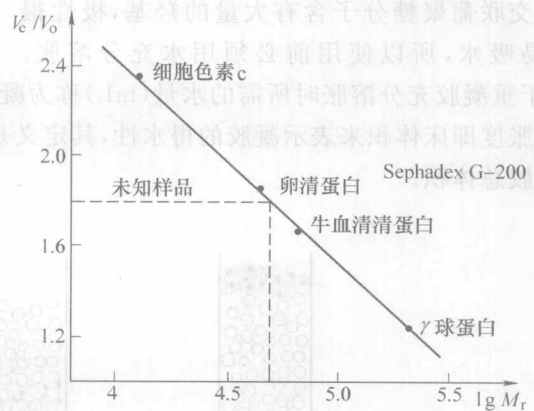


图 1-5 洗脱特征与相对分子质量的关系

的离子基团发生可逆的交换反应。平衡离子带正电的离子交换剂能与带正电的离子基团发生交换作用,称为阳离子交换剂;平衡离子带负电的离子交换剂与带负电的离子基团发生交换作用,称为阴离子交换剂。

离子交换剂的交换反应是可逆的,一般都遵循化学平衡的规律。吸附过程是由于一定量的混合物通过交换剂时,混合物的离子不断被交换,其浓度逐渐减少,因而可全部或大部分被交换而吸附在离子交换剂上。一般来说,电性越强,越易交换。对于阳离子树脂,在常温常压的稀溶液中,交换量随交换剂离子的电价增大而增大,如 $\text{Na}^+ < \text{Ca}^{2+} < \text{Al}^{3+} < \text{Si}^{4+}$ 。如原子价数相同,交换量则随交换离子的原子序数的增大而增大,如 $\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Pb}^+$ 。在稀溶液中,强碱性树脂各负电性基团的离子结合力次序是: $\text{CH}_3\text{COO}^- < \text{F}^- < \text{OH}^- < \text{HCOO}^- < \text{Cl}^- < \text{SCN}^- < \text{Br}^- < \text{CrO}_4^{2-} < \text{NO}_2^- < \text{I}^- < \text{C}_2\text{O}_4^{2-} < \text{SO}_4^{2-} < \text{柠檬酸根}$ 。弱酸性阴离子交换树脂对各负电性基团结合力的次序为: $\text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{Br}^- = \text{I}^- = \text{CH}_3\text{COO}^- < \text{MoO}_4^{2-} < \text{PO}_4^{3-} < \text{AsO}_4^{3-} < \text{NO}_3^- < \text{酒石酸根} < \text{柠檬酸根} < \text{CrO}_4^{2-} < \text{SO}_4^{2-} < \text{OH}^-$ 。两性离子如蛋白质、核苷酸、氨基酸等与离子交换剂的结合力,主要取决于它们的理化性质和特定的条件所呈现的离子状态:当 $\text{pH} < \text{等电点}(\text{pI})$ 时,能被阳离子交换剂吸附;反之,当 $\text{pH} > \text{pI}$ 时,能被阴离子交换剂吸附。若在相同 pI 条件下,且 $\text{pI} > \text{pH}$ 时, pI 越高,碱性就越强,就越容易被阳离子交换剂吸附。

洗脱过程是由于连续添加新的交换溶液,交换平衡不断地朝正反应方向移动,直至完全,因而可以把离子交换剂上的离子全部或大部分洗脱下来。

(2) 离子交换剂的选择:离子交换剂类别选择还应根据被分离物质所带的电荷来决定,被分离物质带正电荷,应选用阳离子交换剂;被分离物质带负电荷,应选用阴离子交换剂。如果某些被分离物质为两性离子,则一般应考虑在它稳定的 pH 范围带有何种电荷来选择相应的离子交换剂。一般说来,强离子交换剂应用的 pH 范围广,弱离子交换剂应用的 pH 范围窄。强离子交换剂比弱离子交换剂的选择性小,所有的离子全可与强离子交换剂交换。弱离子的交换剂选择性较高。强离子交换剂常用于分离氨基酸、核苷酸等小分子物质,弱离子交换剂常用于分离蛋白质等生物大分子。

由于离子交换剂的生产绝大部分已商品化,其交联度选择余地也不大。对相对分子质量较大的物质,选择较低交联度的交换介质。分离纯化性质相似的小分子物质,则选择较高交联度介质为好。

离子交换剂介质的粒度一般有粗、中粗、细三种。粒度小的介质因表面积大,分离效率高。但另一方面,由于颗粒小,阻力大,流速慢,所以粒度大小,应根据具体需要选择。一般层析分离选择中粗型号的介质。介质球形比无定型的好。一般选用交换容量大、交换速度快、稳定性能好的介质。

4. 亲和层析 (affinity chromatography)

亲和层析又称为功能性层析、选择性层析和生物专一吸附层析。

早在 1910 年,就有人发现淀粉能吸附淀粉水解酶,于是就利用这一现象来分离淀粉水解酶;到 1951 年,有人以“免疫吸附剂”的形式来分离抗体;1967 年, Werle 等开始用胰蛋白酶提纯胰蛋白酶抑制剂,等等。经过几十年的研究,逐渐发展成一种新型的分离技术——亲和层析。生物大分子具有与其相应的专一分子可逆结合的特性,如酶的活性中心或别构中心能通过某些次级键与专一的底物、抑制剂、辅助因子和效应因子相结合,并且结合后可在不丧失生物活性的情况下