

北京市高等教育精品教材立项项目
高等院校生命科学实验系列教材

生物化学实验原理和方法

(第二版)

萧能惠摇余瑞元摇袁明秀摇陈丽蓉
陈雅蕙摇陈来同摇胡晓倩摇周先碗 摇合编
(排名不分先后)



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

摇图书在版编目(悦孕)数据

摇生物化学实验原理和方法 轱陈雅蕙等编援—圆版援—北京:北京大学出版社 愿园缘愿
摇(北京市高等教育精品教材立项项目)
摇(高等院校生命科学实验系列教材)
摇陈月娥 郑月娥 郑月娥 郑月娥

摇 I 鄞生...摇 II 鄞陈... 摇 III 鄞生物化学—实验—高等学校—教材摇 IV 鄞纡纡

摇中国版本图书馆 悦孕数据核字(圆园缘缘)第 圆园缘缘号

摇书 名:生物化学实验原理和方法(第二版)

著作责任者:陈雅蕙摇等编

责 任 编 辑:郑月娥

标 准 书 号:陈月娥 郑月娥 郑月娥 郑月娥 圆园缘缘

出 版 发 行:北京大学出版社

地 摇 址:北京市海淀区成府路 圆缘号摇 愿园缘愿

网 摇 址:陈月娥 郑月娥 郑月娥 郑月娥

电 子 信 箱:陈月娥 郑月娥 郑月娥 郑月娥

电 摇 话:邮购部 愿园缘愿摇发行部 愿园缘愿摇编辑部 愿园缘愿

排 版 者:兴盛达打字服务社摇 愿园缘愿

印 刷 者:

经 销 者:新华书店

愿园毫米 伊 愿园毫米摇 愿开本摇 愿印张摇 愿千字

愿园年 愿月第 愿版摇 愿园年 愿月第 愿次印刷

定 摇 价:愿园元

摇未经许可,不得以任何方式复制或抄袭本书之部分或全部内容。

摇版权所有,翻版必究

内 容 简 介

全书分上、下篇和附录。上篇为生物化学实验原理,共十四章,对生物大分子的分离纯化、含量测定和纯度分析作了较全面扼要的介绍,并着重论述各种层析技术、离心技术、膜分离技术、电泳技术等常用生化实验方法的基本原理。下篇为生物化学实验,共选编了 150 个实验,包括糖类、脂类、维生素、蛋白质、酶、核酸等生物物质的分离制备与分析鉴定方法,如纸层析、薄层层析、离子交换层析、凝胶层析、疏水层析、亲和层析、金属螯合层析、各种电泳和免疫技术,以及紫外可见吸收光谱测定法等。其中既保留了一些对加强学生基本实验方法和技能训练行之有效的传统实验,也引进了一些较新的生化实验技术。大多数实验可以在 2~5 学时内完成,有些实验可以组合成一个综合实验,也可以各自独立作为一个实验,便于安排教学。每个实验后附有思考题和参考资料。附录包括各种常用数据表,供读者查阅。

本书可供综合性大学、师范、医药和农林院校生物化学及相关专业的本科生作为实验课教材,也可供相关教师和科研人员参考。

编 者 的 话

(第二版)

《生物化学实验原理和方法》一书自1989年出版以来,历经九次印刷,一直受到北京大学生命科学学院及其他高等院校师生和广大读者的欢迎,在生物化学实验课教学和普及生物化学实验技术中发挥了良好作用。为此我们感到极大的欣慰和鼓舞。读者的厚爱也成为这次再版的动力。

近10年生命科学出现了惊人的进展,它不仅吸引学术界的极大关注,而且很大程度上影响了人们的日常生活。生命科学逐渐成为带头学科已成为不争之事实。作为生命科学基础的生物化学在广度和深度上都发生了巨大的变化,生物化学实验技术也相应有了新的发展。随着生命科学进入后基因组时代,即蛋白质组学研究,生物化学实验技术再次显示了它的重要作用。因此,生物化学的理论和实验技术作为分子生物学、生物技术等生物学各分支学科的基础课程,不但不能轻视,而且有必要加强。正是基于这种认识,许多综合性大学、医、农、师范院校都纷纷增设生物化学实验课程。加强生化实验课的教学,有一本能适应学科发展的教材是十分重要的。时过十载,面对学科不断发展的形势,总结我们教学的经验和体会,很有必要对本书第一版内容进行删改、补充,使它成为一本更好的生化实验课教材,以满足学生和相关人员的学习、参考之用。

再版的编写原则仍然是着眼于加强基础,侧重于加强学生生物化学基本实验方法和技能训练。为了使学生不但会做实验,而且对相关实验技术原理有基本了解,以便在今后的科研实践中能融会贯通、举一反三、灵活运用,本书的前半部分重点介绍主要生化实验技术的原理,并在第一版基础上进行了修改和补充。本着少而精的原则,把握基础性、代表性和实用性,对第一版的实验内容进行了精选,删去了部分目前相对应用较少的内容,补充和引进了一些较新的实验方法和技术,为大学生进入更高层次的学习或参加科研工作打下基础。

本书编写格局与第一版基本相同,分上、下篇和附录。上篇为生物化学实验技术原理,共十四章。除对第一版内容进行修改外,增加了生物大分子活性物质含量和纯度的分析方法、疏水层析、离心技术、膜分离技术四章,使其涵盖的生化实验技术更为全面。下篇生化实验由原来的21个减少为15个,其中新编实验15个,如多糖的制备和分析、疏水层析、蛋白质印迹等,其余的都是在总结教学和科研实践经验的基础上,经过修改补充或改写。新增的实验内容都是编者在科研工作中应用过的实验方法,经过反复实践,比较成熟。附录也补充了一些有用的实验数据表,供读者查阅。

本书上篇各章和下篇的实验内容均由编者分工负责修改补充或重新编写。福建师范大学生物工程学院高居易教授编写实验15个,全书由陈雅蕙统编和定稿。本书的再版,也是对已故李建武教授的最好纪念。

本书的再版得到了北京市教委精品教材出版项目资助。北京大学生命科学学院原生物化学与分子生物学系主任朱圣庚教授对本书再版给予了很大关心和支持。多年参与实验课教学的青年教师刘健、文津和实验技术人员邓爱平、聂力嘉都为本书的出版做出了贡献。北京大学

员

出版社责任编辑郑月娥在编辑加工中做了大量细致的工作。编者在此一并表示衷心感谢。

我们深知编写一本让读者认可的教材绝非易事,因此在撰稿过程中本着科学严谨的精神努力工作,力图做得更好,但由于生化实验技术涉及知识面很广,编者的学识和实验室经验的局限,书中难免有疏漏、欠妥甚至错误之处,恳请读者批评指正。

编 者

圆年 愿月 圆日

编 者 的 话

(第一版)

生命科学在 20 世纪有了惊人的发展,生物化学是其中最活跃的分支学科之一。今天,生物化学已是发展生命科学各分支学科和生物工程技术的重要基础,工业、农业、医药、卫生和环境科学的某些研究也以生物化学理论为依据,以其实验技术为手段。生物化学也成为高等院校许多相关学科学生的必修课程,因此,为这些学生提供一本新的、适用的生物化学实验教材是十分必要的。

北京大学原生物学系生物化学教研室分别于 1956 年、1959 年和 1963 年先后三次系统总结各个历史阶段的教学经验,编写出版过三本《生物化学实验指导》。这几个版本的《生物化学实验指导》在北京大学生物学系及使用它们的高等院校的教学中发挥了良好的作用。鉴于近 50 余年间,生物化学发展迅速,新的实验方法和技术不断出现,为了引进新的内容,跟上学科的发展,编者本着继承与创新相结合的精神,汲取了以上几版教材的精华,并在我们近几年使用的实验教材基础上,经过总结经验,重新整理编写成这本新的实验教材。

本书以综合性大学、师范、医药和农林院校有关专业的本科生为对象,也可供其他生物化学实验技术工作者参考。它是一本高等学校生物化学实验教材,也是一本小型生物化学实验技术工具书。全书内容分生物化学实验原理、生物化学实验和附录三部分。生物化学实验原理部分对一些重要的常用生物化学实验技术的有关理论进行了较系统、全面的论述。生物化学实验部分共选编了 125 个实验,包括生物化学分离、制备、分析和鉴定技术(如滴定、比色、纸层析、薄层层析、离子交换层析、凝胶层析、亲和层析、各种电泳和免疫技术)以及瓦氏检压法等。在选材方面,除保留一些对加强学生基本技能训练行之有效的传统实验外,也注意引进新近发展起来的生物化学实验技术,为大学生进入更高层次的生物化学乃至分子生物学实验打下基础。这些实验方法在科学研究和生产实践方面也有较大应用价值。本书约有三分之二篇幅的实验都是历来来北京大学原生物学系各专业的本科生和中国协和医科大学医预班学生做过的,其余新增的实验也是编者近年来在科学研究工作中经常应用的技术。书中的附录以及每个章节、每个实验后所附的参考文献,可供读者查阅。

本书经过集体讨论、分工负责进行编写。李建武教授生前主持了本书的编写、出版工作,并为此付出了很大的心血和精力。本书的出版是集体劳动的成果。

北京大学生命科学学院生物化学及分子生物学系王镜岩教授审阅了全稿,并提出了很好的修改意见。沈同、张庭芳、朱圣庚和胡美浩教授对本书的内容提供过宝贵意见。青年教师陈劲秋和姚瑾预做并编写了个别新增实验,实验技术人员邓爱平、孙相超和孙冬梅以及近年来参加实验教学工作的文津和刘健也为本书的出版付出了劳动。本书的责任编辑朱新邨在编辑加工中做了大量细致的工作,李丽霞和张虹为本书绘制了大部分图表。编者在此对他们一并表示衷心感谢。

诚挚地欢迎使用本书的教师、实验技术人员、学生及其他读者提出批评和指正。

编 者

1983 年 缘月

猿

生物化学实验室规则

每个同学都应该自觉遵守课堂纪律,维持课堂秩序,不迟到,不早退,不大声谈笑。

实验前必须认真预习,熟悉本次实验的目的、原理、操作步骤,懂得每一操作步骤的意义和了解所用仪器的使用方法,否则不能开始实验。

实验过程中要听从教师的指导,严肃认真地按操作规程进行实验,并把实验结果和数据及时、如实地记录在实验记录本上,文字要简练、准确。完成实验后经教员检查同意,方可离开实验室。

实验台面应随时保持整洁,仪器、药品摆放整齐。公用试剂用毕,应立即盖严放回原处。勿使试剂、药品洒在实验台面和地上。实验完毕,玻璃器皿须洗净放好,将实验台面抹拭干净,才能离开实验室。

使用仪器、药品、试剂和各种物品必须注意节约。洗涤和使用仪器时,应小心仔细,防止损坏仪器。使用贵重精密仪器时,应严格遵守操作规程,发现故障须立即报告教员,不得擅自手检修。

实验室内严禁吸烟!煤气灯应随用随关,严格做到:人在火在,人走火灭。乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热,并要远离火源操作和放置。实验完毕,应立即关好煤气开关和水龙头,拉下电闸。离开实验室以前应认真、负责地进行检查,严防发生安全事故。

一般废液体可倒入水槽内,同时放水冲走。强酸、强碱、有机溶剂和有毒液体必须倒入专用废液缸内。废纸、火柴头及其他固体废物和带渣滓的废物倒入废品缸内,不能倒入水槽或到处乱扔。

仪器损坏时,应如实向教员报告,并填写损坏仪器登记表,然后补领。

实验室内一切物品,未经本室负责教员批准,严禁携出室外,借物必须办理登记手续。

每次实验课由班长负责安排值日生。值日生的职责是负责当天实验室的卫生、安全和一切服务性的工作。

上篇摇生物化学实验原理

第一章摇生物大分子的分离纯化

第一节摇概摇摇述

生物大分子主要包括氨基酸、多肽、蛋白质、酶、辅酶、激素、维生素、多糖、脂类、核酸及其降解产物等。以上这些生化物质具有不同的生理功能,其中有些是生物活性物质如蛋白质、酶、核酸等,它们与人们的生活密切相关。目前这些生物活性物质已成为生命科学研究的主要对象。特别是随着人类基因组序列“完成图”的完成(1996年1月12日公布),生命科学研究将进入后基因组时代(研究的焦点将从基因的序列转移到功能方面),我国在“十五”期间将人类基因组的后续研究与开发工作列为十二个国家重大科技专项之一,国家已投入10亿元,主要开展重大疾病、重要生理功能相关功能基因等多项研究。为此,鉴定大量未知蛋白质(酶)的结构及关于其功能研究也必将进入一个空前活跃的时期,因此分离纯化和测试分析蛋白质技术显得十分重要。

与核酸相比,蛋白质的结构更具有奇妙独特的复杂性和艺术性。它是由20多个不同性质(或极性)的氨基酸交互排列而成,不仅潜在的数量多达10²⁴种(这就是蛋白质构成如此巨大的、丰富多彩的生命世界的原因),而且相互间差异大。因此,相对而言,蛋白质的分离、纯化和鉴定有较大的难度和特殊性。而核酸的结构,虽然也有异乎寻常的多样性,但是,它是由结构相似、理化性质比较接近的4个碱基交互排列,且有一定规律可循。因此,核酸的分离、制备和鉴定比较容易。

另外,蛋白质和核酸类物质通常是与自然界存在的诸多不同化合物结合在一起,或者是蛋白质和核酸自身相互组合在一起出现的,加之它们离体后稳定性较差(如酶)、含量偏低,这都给分离纯化带来了一定的困难。

此外生物活性物质都有复杂的空间结构,而维系这种特定的三维结构主要靠氢键、盐键、二硫键、疏水作用力和范德华引力等。这些生物活性物质对外界条件非常敏感,过酸、过碱、高温、剧烈的振荡等都可能导致活性丧失,这是生物大分子物质不同于其他物质的一个突出特点。因此,在整个分离、纯化流程中,要选择十分温和的条件,尽量在低温条件下操作。同时还要防止体系中的重金属离子及细胞自身酶系的作用。为了得到高纯度的生物产品,必须要认真了解生物活性物质的一些特性与特点。

一、生物大分子活性物质的存在方式

生物大分子活性物质的存在方式与其生物功能

生物活性物质的存在方式与其生物功能关系十分密切。一般情况下,可以根据生物活性物质的生物功能推断其存在部位和分布方式。生物活性物质分为“胞内”与“胞外”两种存在部位。“胞外”物质是由细胞产生,再释放出来的,因此两者实质上没有严格界限。如尿中的尿激酶是由肾细胞产生,血中的 γ 球蛋白来自 β 淋巴细胞。多数微生物酶如淀粉酶、蛋白质水解酶、糖化酶常大量存在于胞外培养液中。而合成酶类、代谢酶类、遗传物质和代谢中间产物则存在于细胞内,如 γ 球蛋白聚合酶、细胞色素 c 等。真核细胞的 γ 球蛋白大部分存在细胞核内,只有少量存在于线粒体和微粒体中,而 β 球蛋白主要存在于胞质中,电子传递系统物质(包括黄素蛋白、细胞色素类)以及糖类、脂肪酸的氧化分解和氧化磷酸化有关的酶系大部分存在于线粒体中。消化酶虽然可分泌到胞外,但难于从消化道进行收集,只能由相应的腺体提取分离,而且这些酶在细胞内刚合成时常常是以无活性的酶原形式存在,提取时需要预先激活。细胞内的生物活性物质有些游离在胞浆中,有些结合于质膜或器膜上,或存在于细胞器内。对于胞内物质的提取要先破碎细胞,对于膜上物质则要选择适当的溶剂使其从膜上溶解下来。

生物大分子分子间的作用力

生物体系中的分子结构及分子间相互联系的作用力十分复杂。作为一个生物大分子,其基本骨架中各原子与基团间都是共价结合,整个分子的一级结构比较稳定,但分子间的连接主要是通过一些非共价键如氢键、盐键、金属键、范德华引力、碱基堆积力所维系,其键能较弱,而且键的性质差别较大,它们与生物分子的生物功能关系十分密切,因此要采取不同方法使之解离,而不损伤其分子基本结构。但须注意的是许多生物大分子的空间高级结构也是由非共价键结合的,因此分离时应十分小心,确保空间结构不受破坏。故常常在十分温和的条件下操作,以避免因强烈外界因素的作用而丧失其生物活性。这就是生化技术与一般有机化学制备技术的重大不同之处。

二、生物大分子活性物质的存在特点

生物材料组成的复杂性

生物材料中的化学组成十分复杂。不同生物含有不同种类的活性物质。同种生物在细胞与细胞之间,组织与组织之间,由于细胞的类型、年龄、分化程度的不同,都会改变活性物质的组成。尤其是色素类物质和某些生理活性成分的种类与组成在不同生物间的差别更大。如植物含叶绿素、胡萝卜素、花色素类,动物与微生物含细胞色素、原卟啉,藻类含藻胆色素,脊椎动物含脊椎动物激素:甲状腺素、肾上腺素、胰岛素、甲状旁腺素、生长激素、性激素;无脊椎动物含蜕皮激素(变态激素)、促幼激素和外激素(信息素)——蚕的性外激素与蚂蚁的报警激素,植物含吲哚乙酸、脱落酸、玉米素、乙烯、赤霉素等植物激素。

生物大分子活性物质存在的特点

生物活性物质在生物体材料中含量较低,杂质含量很高,而且生理活性愈高的成分,含量往往愈低。如胰岛素在胰脏中的含量约为万分之二,脱氧核糖核酸酶含量为十万分之四,胆汁中的胆红素含量为万分之五到八,由几吨竹笋方可得到几毫克竹笋素。所以直接从生物材料纯化含量极低的生理活性物质没有太大的实用价值,这正是现代生物技术的重点开发领域。

生物材料中的生化组成数量大 种类多。目的物与杂质的理化性质如溶解度、相对分子质量、等电点等都十分接近,所以分离、纯化比较困难。尤其是在纯化过程中生物材料中有效成分的生理活性处于不断变化中,它们可能被材料中自身的代谢酶所破坏,或为微生物活动所分解,还可能在制备过程中受到酸、碱、盐、重金属离子、机械搅拌、温度,甚至空气和光线的作用而改变其生理活性。因此在整个制备过程中都要把防止目的物的失活放在首位。

生物大分子的分离纯化就是把生物体内的生化基本物质,既保持原来的结构和功能,又能在含有多种物质的液相或固相中,较高纯度地分离出来。这是一项严格、细致、复杂的工艺过程,涉及物理、化学、生物学等方面的知识和操作技术。

由于各种生物物质的结构和理化性质的不同,分离方法也不一样,就是同一类生物物质产品,其原料不同,使用的方法差别也很大,不可能有一个统一的标准方法。

如果研制新品种,在实验前要充分查阅有关文献资料,对分离纯化的生物大分子的理化性质、生物活性等都要事先了解,再着手实验工作。对于一个未知结构及性质的试样,进行创造性的分离提纯时,要经过各种方法的比较和摸索,才能找到一些工作规律和获得预期的效果。在分离提纯前,常需建立相应的分析鉴定方法,正确指导分离提纯的顺利进行。

一般从天然生物材料制备生物物质的过程大体可分为以下几个阶段:① 原料的选择和预处理;② 生物组织与细胞的破碎;③ 从生物材料中提取有效的活性物质;④ 有效成分的分离纯化;⑤ 后处理及制剂。

不是每个生物物质的分离制备都完整地具备以上五个阶段,也不是每个阶段都截然分开。选择性提取包含着分离纯化;沉淀分离包含着浓缩;从发酵液中分离胞外酶,则不用破碎细胞,离心过滤去菌体后,就可以直接进行分离纯化。选择分离纯化的方法及各种方法的先后次序也因材料而异。选择性溶解和沉淀是经常交替使用的方法,整个制备过程中各种柱层析常放在纯化的后阶段,结晶则只有产品达到一定纯度后进行,才能收到良好的效果。不论是哪个阶段,使用哪种操作技术,都必须注意在操作中保持生物大分子的完整性,防止变性和降解的发生。

第二节摇生物原料的选择和预处理

一、生物材料的选取

选择生物材料时需考虑其来源、价格、目的物的含量、杂质的种类、数量和性质等。

有效成分的含量

(员) 生物品种:根据目的物的分布,选择富含有效成分的生物品种是选材的关键。如从胰脏中提取胰岛素时,单从含量看,牛胰脏中胰岛素的含量比猪胰脏的高,但从我国实际看,我国猪的饲养头数远比牛多,因此,制备胰岛素一般不选用牛胰脏而选用猪胰脏作材料。

(圆) 合适的组织器官:例如提取 阅 从含量看,细胞核中最多,线粒体次之,但由于在从动物脏器(经洗涤、破细胞)提取细胞核过程中,常常会受到酶水解和机械损伤等作用,致使得到的细胞核 阅 相对分子质量(圆伊万~缘伊万)仅为其完整 阅 的 员,而线粒体 阅,由于相对分子质量较小(员伊万),提取步骤也较少,所以有人在提取 阅 时选用线粒体作材料。

(猿) 生物的生长期:生物的生长期对生理活性物质的含量影响很大。如凝乳酶只能以哺

猿

乳期小牛、仔羊的第四胃为材料,成年牛、羊胃不适用。提取胸腺素应选用幼年动物胸腺为原料。提取绒毛膜促性腺激素(匀浆)要收集孕期为员~源个月孕妇的尿。另外动物的营养状况、产地、季节对活性物质的含量也有影响。

圆援杂质情况

难于分离的杂质会增加工艺的复杂性,严重影响收率、质量和经济效益,选材时应避免与目的物性质相似的杂质对纯化过程的干扰。如胰脏含有磷酸单酯酶和磷酸二酯酶,两者难于分开,故不选用胰脏为原料制备磷酸单酯酶,而改用前列腺为原料,因为它不含磷酸二酯酶,使操作较为简化。

猿援来源

应选用来源丰富的材料,尽量不与其他产品争原料,最好能一物多用,综合利用。如用胰脏可同时制备弹性蛋白酶、激肽释放酶、胰岛素和胰酶等,用人胎盘制备 γ 球蛋白、胎盘脂多糖及胎盘水解物,用人尿制备尿激酶、匀浆等,用猪心制备细胞色素 C 和辅酶 Q_{10} 。

二、生物材料的采集与保存

生理活性物质易失活与降解,采集时必须保持材料的新鲜,防止腐败、变质与微生物污染。如胰脏采摘后要立即速冻,防止胰岛素活力下降。胆汁不可在空气中久置,以防止胆红素氧化。酶原提取要及时,防止酶原激活转变为酶。因此生物材料的采摘必须快速,及时冷冻,低温保存。选取材料要求完整,尽量不带入无用组织,同时要注意符合卫生要求,不可污染微生物及其他有害物质。

保存生物材料的主要方法有速冻、冻干、有机溶剂脱水、制成“丙酮粉”,或浸存于丙酮与甘油中等。

三、生物材料的预处理

采集到的原材料在纯化之前通常必须进行预处理。动物脏器及组织先要剔除结缔组织、脂肪组织等各种非活性部分,植物种子先要去壳除脂,微生物要进行菌体和发酵液的分离等操作。总之,暂不使用的材料都要进行预处理,并迅速冷冻保存,防止在存放过程中变质。

员援动物脏器的处理

将新采集的动物材料置原速冻冰柜冷冻保存,这样可抑制酶和微生物的作用,降低化学反应速度。有些材料经速冻,细胞内形成微小冰晶,破坏细胞结构,使细胞膜容易破坏,有利于细胞内物质的提取,另外经冷冻的材料,还有利于机械破碎。在某些情况下,材料也可预先用有机溶剂除去水分(动物脏器和组织一般含远豫的水分),可降低水分至员豫以下,延长保存时间。使用有机溶剂时,注意不要破坏有效成分,常用有机溶剂为丙酮和乙醇等。经丙酮处理的原料(如猪脑垂体),能脱水脱脂,制成丙酮干粉,不仅减少酶的变性失活,同时因蛋白质与脂结合的部分化学键打开,促使某些酶很容易释放到溶液中去,有利于有效成分的分离提取。某些材料收集时必须要在特定的温度及环境下保存,方可保持有效成分不被降解,保持其生物活性。有的材料必须事先经过处理,如从猪脑垂体前叶提取促滤泡素(云匀)和促黄体生成激素(蕴匀),脑垂体必须采集后投入丙酮中浸泡,达到破坏酶和脱水脱脂的目的,有利于材料的贮存和下一步工序的进行。

植物组织的材料

从室内栽培或野外采集的植物材料,如果是叶片(如菠菜、芹菜的叶片),用水洗净即可使用,或在阴凉处干燥后,置于冰箱冷藏备用;如果是植物种子,则需泡涨或粉碎后才可使用。如材料含油脂较多时,也要进行脱脂处理。

微生物的材料

把选用的微生物接种于适宜的培养液培养一段时间后,用离心法收集到的上清液,即可用于制备胞外酶和某些辅基等有效成分。而收集到的菌体,经破细胞处理后则可从中提取其他有效成分。前者可置低温下短时间贮存,后者可制成冻干粉,在干燥保存数月不会变质。

第三节摇生物组织与细胞的破碎

组织与细胞的破碎方法有物理法、化学法与生物法。

一、物理法

(1) 磨切法:生产上常用的有绞肉机、胶体磨、球磨机、万能磨粉机。实验室常用的有匀浆器、乳钵、高速组织捣碎机。用乳钵时,常加入石英粉、氧化铝等助磨剂。

(2) 压力法:有压榨法、高压法、减压法和渗透压法。高压法是用几百千克气压或水压反复冲击物料,例如高压匀质机,达到(100-150 MPa)的压力时,可使细胞以上细胞被压碎,多用于微生物细胞的破碎;减压法是对菌体缓缓加压,使气体溶入细胞,然后迅速减压使细胞破裂。渗透压法是将细胞在浓盐中平衡,再投入水中膨胀破裂。

(3) 振荡法:用超声波振荡破碎细菌细胞,频率为20-100 kHz,该法产热较多,要注意冷却。

(4) 冻融法:将材料先在-20℃以下冻结,再使其溶化,反复操作使细胞与菌体破碎。

二、化学法

用稀酸、稀碱、浓酸、有机溶剂或表面活性剂(如胆酸盐、氯化十二烷基吡啶)处理细胞,可破坏细胞结构,释放出内容物。

三、生物法

(1) 组织自溶法:利用组织中自身酶的作用改变、破坏细胞结构,释放出目的物称为组织自溶。自溶过程酶原被激活为酶,既便于提取又提高了效率,但不适用于易受酶降解的目的物的提取。

(2) 酶解法:用外来酶处理生物材料,如用溶菌酶处理某些细菌。用做专一性分解细胞壁的酶还有细菌蛋白酶、纤维素酶、蜗牛酶、酯酶、壳糖酶等。

(3) 噬菌体法:用噬菌体感染细菌、裂解细胞,释放出内容物。此法较少应用。

第四节摇生物大分子的提取

利用一种溶剂对不同物质溶解度的差异,从混合物中分离出一种或几种组分的过程称为提取(萃取)。提取又称萃取或抽提,其含义基本相同。提取是在分离纯化的前期,将经过

预处理或破碎了的细胞或组织置于一定条件下和溶剂中,使被提取的生物大分子以溶解状态充分地释放出来,并尽可能保持原来的天然状态,不丢失生物活性的过程。用冷溶剂从固体物质提取的过程可称为浸渍(皂苷提取)。用热溶剂则可称为浸提(甾体提取),也称浸煮。提取通常贯穿在分离纯化过程中,包括生化物质与细胞固体成分或其他相结合物质由固相转移到液相中,或从细胞内的生理状态转入外界特定的溶液中。提取可分为两类:一类是对固体的提取,也称液固提取,被处理的原料为固体;另一类是对液体的提取,也称液液提取(习惯上多称为萃取),被处理的原料为液体。

一、物质的性质与提取

易受物质的性质与提取方法的选择

要取得好的提取效果,最重要的是要针对生物材料和目的物的性质,选择合适的溶剂系统与提取条件。生物材料及目的物与提取有关的一些性状,包括溶解性质、相对分子质量、等电点、存在方式、稳定性、比重、粒度、粘度、目的物含量、主要杂质种类及溶解性质、有关酶类的特征等。其中最主要的是目的物与主要杂质在溶解度方面的差异以及它们的稳定性。在提取过程中尽量增加目的物的溶解度,尽可能降低杂质的溶解度,同时充分重视生物材料及目的物在提取过程中的活性变化。对酶类的提取要防止辅酶的丢失和其他失活因素的干扰。对蛋白质类要防止其高级结构的破坏,即变性作用,应避免高热、强烈搅拌,产生大量泡沫、强酸、强碱及重金属离子的作用。多肽类及核酸类需注意避免酶的降解作用。提取过程中,应在低温下进行,并添加某些酶抑制剂。对脂类生化制品应特别注意防止氧化作用,减少与空气的接触,如添加抗氧化剂、通氮气及避光等。

易受活性物质的保护措施

在提取过程中,保持目的物的生物活性十分重要,对于一些生物大分子,如蛋白质、酶及核酸常采用下列保护措施:

(员) 采用缓冲系统:防止提取过程中某些酸碱基团的解离,导致溶液 pH 的大幅度变化,使某些活性物质变性失活或因 pH 变化影响提取效果。常用的缓冲系统有磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、羧酸盐缓冲液、醋酸缓冲液、碳酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液和巴比妥缓冲液等,所使用的缓冲液浓度均较低,以利于增加溶质的溶解性能。

(圆) 添加保护剂:防止某些活性物质的活性基团及酶的活性中心受破坏,如巯基是许多活性蛋白质和酶的催化活性基团,极易被氧化,故提取时常添加某些还原剂如半胱氨酸、 α -巯基乙醇、二巯基赤藓糖醇、还原型谷胱甘肽等。其他措施如提取某些酶时,常加入适量底物以保护活性中心,对易受重金属离子抑制的活性物质,可在提取时添加某些金属螯合剂,以保护活性物质的稳定性。

(猿) 抑制水解酶的作用:抑制水解酶对目的物的作用,是提取操作中最重要的保护性措施之一。可根据不同水解酶的性质采用不同方法,对需要金属离子激活的水解酶(如胰凝乳蛋白酶),常加入 EDTA 或柠檬酸缓冲液,以减少或除去金属离子,使酶活力受到抑制;对热不稳定的水解酶,可用选择性热变性提取法,使酶失活。根据酶的溶解性质的不同,可用不同的缓冲体系提取以减少酶的释放,或根据酶的最适 pH,选用酶发挥活力最低的 pH 进行提取。最有效的办法是在提取时添加酶抑制剂,以抑制水解酶的活力。如提取核酸时添加核糖核酸酶抑制剂,常用的有十二烷基硫酸钠(SDS)、脱氧胆酸钠、羧基苯磺酸钠、三异丙基萘磺酸钠、椰油

氨基水杨酸钠,以及皂土、肝素、二乙基焦碳酸盐(二乙基焦碳酸盐)、蛋白酶 运等。又如在提取活性蛋白和酶类时,加入各种蛋白酶抑制剂,如甲基磺酰氟化物(二异丙基氟磷酸)、二异丙基氟磷酸(二异丙基氟磷酸)、碘乙酸等。

(源) 其他保护措施:为了保持某些生物大分子的活性,也要注意避免紫外线、强烈搅拌、过酸、过碱或高温、高频振荡等。有些活性物质还应防止氧化,如固氮酶铁蛋白提取分离时要求在无氧条件下进行;有些活性蛋白对冷、热变化也十分敏感,如免疫球蛋白就不宜在低温冻结。所以提取时要根据目的物的不同性质,分别具体对待。

二、物质的性质与溶解度

提取包括目的物与细胞中其他生物大分子的分离,即由固相转移入液相或从细胞内的生理状况转入外界特定溶液中。影响提取收率的重要因素主要取决于提取物质在提取溶剂中的溶解度大小、由固相扩散到液相的难易、溶剂 费及提取时间。一个物质在某一溶剂中,其溶解度大小与该物质的分子结构及使用溶剂的理化性质有关。极性物质易溶于极性溶剂,非极性物质易溶于非极性有机溶剂中。碱性生物大分子物质易溶于酸性溶剂,酸性生物大分子物质易溶于碱性溶剂。温度升高时,一般溶解度相应增大。对于蛋白质、酶、活性肽等远离其等电点处的 费,溶解度增加。

为了尽量多地从材料获得目的物一般采用多次提取,溶剂用量为生物材料的 圆~ 缘倍。少数情况也有用 员~ 圆倍量溶剂作一次性提取,目的是节省提取时间,降低有害酶的作用。

当提取物由固相转入液相或从细胞内转到细胞外时,提取率还与物质的扩散作用有关。为了提高提取速度,常采取一些措施,如增加材料的破碎程度、进行搅拌、延长提取时间、提高提取温度(但对一些不耐热的物质,温度不宜过高)等。

三、影响提取的因素

员 温度

多数物质的溶解度随提取温度的升高而增加。另外较高的温度可以降低提取物的粘度,有利于分子扩散和机械搅拌,所以对一些植物成分,及某些较耐热的生化成分,如多糖类,可以用浸煮法提取,加热温度一般为 缘~ 怨益。但对大多数不耐热的生物活性物质,浸煮法不宜采用,一般在 园~ 员益进行提取。对一些热稳定性较好的成分,如胰弹性蛋白酶可在 圆~ 圆益提取。有些生化物质在提取时,需要酶解激活,如胃蛋白酶的提取,温度可以控制在 猿~ 源益。应用有机溶剂提取生化成分时,一般在较低的温度下进行提取,一方面是为了减少溶剂挥发损失和造成的不安全,另一方面也是为了减少活力损失。

圆 酸碱度

多数生化物质在中性条件下较稳定,所以提取用的溶剂系统原则上应避免过酸或过碱,费一般应控制在 源~ 怨范围内。为了增加目的物的溶解度,往往要避免在目的物的等电点附近进行提取。

有些生化物质在酸性环境中较稳定,且稀酸又有破坏细胞的作用,所以有些酶如胰蛋白酶、弹性蛋白酶及胰岛素等都在偏酸性介质中进行提取。多糖类物质因在碱性环境中更稳定,故多用碱性溶剂系统提取。

巧妙地选择溶剂系统的 费不但直接影响目的物与杂质的溶解度,还可以抑制有害酶类

的水解破坏作用,防止降解,提高收率。对于小分子脂溶性物质而言,调节适当的溶剂,还可使其转入有机相中,便于与水溶性杂质分离。

猿盐浓度

盐离子的存在能减弱生物分子间离子键及氢键的作用力。稀盐溶液对蛋白质等生物大分子有助溶作用。一些不溶于纯水的球蛋白在稀盐中能增加溶解度,这是由于盐离子作用于生物大分子表面,增加了表面电荷,使之极性增加,水合作用增强,促使形成稳定的双电层,此现象称“盐溶”作用。多种盐溶液的盐溶能力既与其浓度有关,也与其离子强度有关,一般高价酸盐的盐溶作用比单价酸盐的盐溶作用强。常用的稀盐提取液有:氯化钠溶液(猿~猿)、磷酸盐缓冲液(猿~猿)、焦磷酸钠缓冲液(猿~猿)、乙酸盐缓冲液(猿~猿)、柠檬酸缓冲液(猿~猿)。其中焦磷酸盐的缓冲范围较大,对氢键和离子键有较强的解离作用,还能结合二价离子,对某些生化物质有保护作用。柠檬酸缓冲液常在酸性条件下使用,作用近似于焦磷酸盐。

源提取时间

一般地说,生物大分子提取时间愈长,溶解度愈大,而同时杂质溶解度也增大。

综上所述,提取的最佳条件的选择,必须综合分析各种影响因素,合理地搭配各种提取条件。

第五节摇生物大分子的分离纯化

生物大分子的分离纯化技术包括:生物大分子的分离分析和生物大分子的制备。前者主要对生物体内各组分加以分离后进行定性、定量鉴定,它不一定要把某组分从混合物中分离提取出来。而后者则主要是为了获得生物体内某一单纯组分。

为了保护目的物的生理活性及结构上的完整性,生物产品制备中的分离方法多采用温和的“多阶式”方法进行,即常说的“逐级分离”方法。为了纯化一种生化物质常常要联合几个,甚至十几个步骤,并不断变换各种不同类型的分离方法,才能达到目的。因此操作的时间长,手续繁琐,给制备工作带来众多影响。亲和层析法具有从复杂生物组成中专一地“钓出”特异生化成分的特点,目前已在生物大分子,如酶、蛋白、抗体和核酸等的纯化中得到广泛应用。

一、分离纯化原理

生物大分子的分离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,外加一定作用力,使多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)。除了一些小分子如氨基酸、脂肪酸、某些维生素和固醇类外,几乎所有生物大分子都不能融化,也不能蒸发,只限于分配在固相或液相中,并在两相中相互交替进行分离纯化。在实际操作中,我们往往依据以下原理对生物大分子进行分离纯化:

(员) 根据分子形状和大小不同进行分离,如差速离心与超离心、膜分离(透析、电渗析)与超滤法、凝胶过滤法。

(圆) 根据分子电离性质(带电性)的差异进行分离,如离子交换法、电泳法、等电聚焦法。

(猿) 根据分子极性大小及溶解度不同进行分离,如溶剂提取法、逆流分配法、分配层析法、愿

盐析法、等电点沉淀法及有机溶剂分级沉淀法。

(源) 根据物质吸附性质的不同进行分离,如选择性吸附与吸附层析法。

(缘) 根据配体特异性进行分离,如亲和层析法。

精制一个具体生物产品,常常需要根据它的各种理化性质和生物学特性,采用以上各种分离方法进行有机组合,才能达到预期目的。

二、分离纯化初期使用方法的选择与使用的程序

提取是分离纯化目的物的第一步,所选用的溶剂应对目的物具有最大溶解度,并尽量减少杂质进入提取液中,为此可调整溶剂的离子强度、溶剂成分配比和温度范围等。

分离纯化是生物大分子制备的核心操作。由于生物大分子物质种类成千上万,因此分离纯化的实验方案也千变万化,没有一种分离纯化方法可适用于所有物质的分离纯化。一种物质也不可能只采用一种分离纯化方法。所以合理的分离纯化方法是根据目的物的理化性质与生物学性质,依具体实验条件而定。

分离纯化初期使用方法的选择

分离纯化的初期,由于提取液中的成分复杂、目的物浓度较稀、与目的物物理化学性质相似的杂质多,所以不宜选择分辨能力较高的纯化方法。因为在杂质大量存在的情况下,任何一种高分辨力的分离方法都难于奏效,被分离的目的物难于集中在一个区域。因为此时,大批理化性质相近的分子在相同分离条件下,彼此在电场中或力场中竞争占据同一位置。这样,被目的物占据的机会就很少,或者分散在一个很长区域中而无法集中于一点,所以早期分离纯化采用萃取、沉淀、吸附等一些分辨力低的方法较为有利,这些方法负荷能力大,分离量多兼有分离提纯和浓缩作用,为进一步分离纯化创造良好的基础。

总的来说,早期分离方法的选择原则是从低分辨能力到高分辨能力,而且负荷量较大者为合适,但随着许多新技术的建立,一个特异性方法的分辨力愈高,便意味着提纯步骤愈简化、收率愈高、生物物质的变性危险愈少,因此亲和层析法、纤维素离子交换层析法、连续流动电泳、连续流动等电聚焦等在一定条件下,也用于从粗提取液中分离制备少量目的物。

各种分离纯化方法的使用程序

生物大分子物质的分离都是在液相中进行,故分离方法主要根据物质的分配系数、相对分子质量大小、离子电荷性质和数量及外加环境条件的差别等因素为基础。而每一种方法又都在特定条件下发挥作用,因此,在相同或相似条件下连续使用同一种分离方法就不太适宜。例如纯化某一两性物质时,前一步已利用该物质的阴离子性质,使用了阴离子交换层析法,下一步提纯时再应用其阳离子性质作层析或电泳分离便会取得较好分离效果。各种分离方法的交叉使用对于除去大量理化性质相近的杂质也较为有效。如有些杂质在各种条件下所带电荷性质可能与目的物相似,但其分子形状和大小与目的物相差较大,而另一些杂质的分子形状与大小可能与目的物相似,但在某条件下与目的物的电荷性质不同,在这种情况下,先用分子筛层析、沉淀离心或膜过滤法除去相对分子质量相差较大的杂质,然后在一定离子强度和离子强度范围内,使目的物变成有利的离子状态,便能有效地进行离子交换层析分离。当然,这两种步骤的先后顺序反过来应用也会得到同样效果。

在安排纯化方法顺序时,还要考虑到有利于减少步骤、提高效率,如在盐析后采取吸附法,必然会因离子过多而影响吸附效果,如增加透析除盐,则使操作大大复杂化,如倒过来进行,先

吸附,后盐析就比较合理。

对于一未知物通过各种方法的交叉应用,有助于进一步了解目的物的性质。不论是已知物或未知物,当条件改变时,连续使用一种分离方法是允许的,如分级盐析和分级有机溶剂沉淀等。分离纯化中期,由于各种原因,如含盐太多、样品量过大等,一个方法一次分离效果不理想,可以连续使用两次,这种情况常见于凝胶过滤与~~离子交换层析~~层析。在分离纯化后期,杂质已除去大部分,目的物已十分集中,重复应用先前几步所应用的方法,对进一步肯定所制备的物质在分离过程中其理化性质有无变化和验证所得的制备物是否属于~~矫作物~~矫作物又有着新的意义。

延缓分离后期的保护性措施

在分离操作的后期必须注意避免产品的损失,主要损失途径是器皿的吸附、操作过程样品液体的残留、空气的氧化和某些事先无法了解的因素。为了取得足够量的样品,常常需要加大原材料的用量,并在后期纯化工序中注意保持样品溶液有较高的浓度,以防制备物在稀溶液中的变性。有时常加入一些电解质以保护生物物质的活性,减少样品溶液在器皿中的残留量。

第六节摇生物大分子活性物质的浓缩

浓缩(~~精制或提纯~~)是从低浓度的溶液除去水或溶剂变为高浓度的溶液。生化产品制备工艺中往往在提取后和结晶前进行浓缩。加热和减压蒸发是最常用的方法,一些分离提纯方法也能起浓缩作用。例如,离子交换法与吸附法使稀溶液通过离子交换柱或吸附柱,溶质被吸附以后,再用少量洗脱液洗脱、分部收集,能够使所需物质的浓度提高几倍以至几十倍。超滤法利用半透膜能够截留大分子的性质,很适于浓缩生物大分子。此外,加沉淀剂、溶剂萃取、亲和层析等方法也能达到浓缩目的。下面重点介绍几种浓缩方法。

一、盐析法

用添加中性盐的方法来使某些蛋白质(或酶)从稀溶液中沉淀出来,从而达到样品浓缩的目的。最常用的中性盐是硫酸铵,其次是硫酸钠、氯化钠、硫酸镁、硫酸钾等。

二、有机溶剂沉淀法

在生物大分子的水溶液中,逐渐加入乙醇、丙酮等有机溶剂,可以使生物大分子物质的溶解度明显降低,从溶液中沉淀出来,这也是浓缩生物样品的常用方法。其优点是溶剂易于回收,样品不必透析除盐,在低温操作下,对多种生物大分子较为稳定,但对某些蛋白质或酶易使它们变性失活,应小心操作。

三、葡萄糖凝胶浓缩法

向~~100~~左右的稀样品溶液中,加入固体的干葡聚糖凝胶(~~凝胶颗粒~~),缓慢搅拌~~10~~至~~15~~分钟,葡聚糖凝胶吸水膨胀,进行吸滤,生物大分子全部留在溶液中,如此重复数次,可在短时间使溶液浓缩到~~10~~左右,每次葡聚糖凝胶的加入量为溶液量的~~10~~为宜,用过的葡聚糖凝胶经去离子水洗净后,可用乙醇脱水,干燥后重复使用。