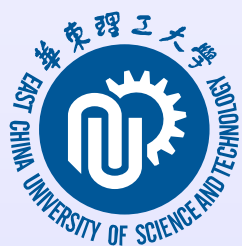




第三章 目标成分纯度和性质研究方法

目标成分提取-浓缩-分离纯化-纯度检测



目标成分（化合物）的提取

溶剂提取法

溶剂提取法原理：

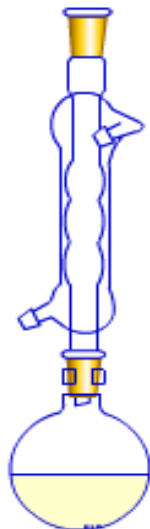
根据各种成分在不同溶剂中的溶解度不同，选用对目标成分溶解度大，对杂质成分溶解度小的溶剂，而将目标成分从材料组织细胞内溶解出来的方法。

溶剂提取法溶剂选择的原则：

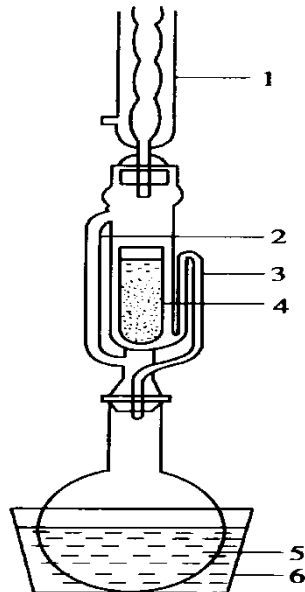
“相似相溶”原则

溶剂可分为水、亲水性有机溶剂及亲脂性有机溶剂，被溶解的成分也有亲水性及亲脂性的不同。亲水性、亲脂性及其程度的大小，是和化合物的分子结构直接相关。

石油醚 < 苯 < 氯仿 < 乙醚 < 乙酸乙酯 < 正丁醇 < 丙酮 < 乙醇 < 甲醇 < 乙腈 < 水



回流装置示意图



1. 冷凝管
2. 溶剂蒸气上升管
3. 虹吸管
4. 装有药粉的滤纸袋
5. 溶剂
6. 水浴



索氏提取装置（连续回流）

溶剂提取常用方法：

- √ 浸渍法
- √ 渗漉法
- √ 煎煮法
- √ 回流提取法
- √ 连续回流提取法
(索氏提取法)
- √ 超声提取法



超声波仪器

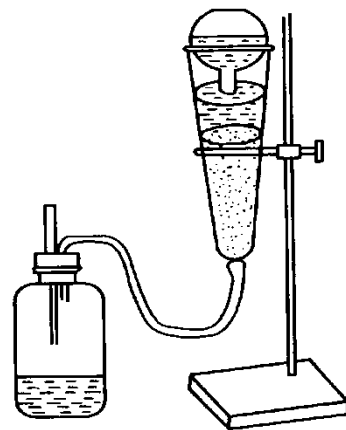


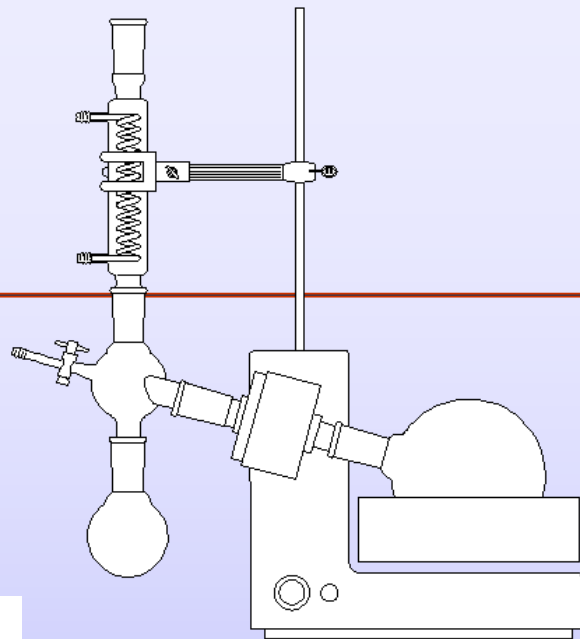
图 2-1 连续渗漉装置

提取液的浓缩

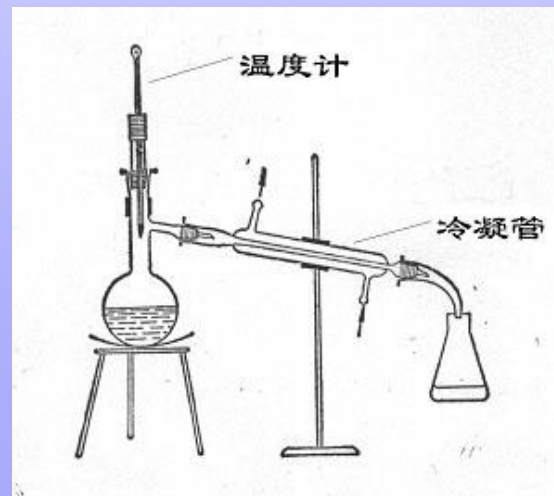
提取液浓缩的常用方法：

- 1. 蒸发法：**通过加热使溶剂气化挥散，不需回收的一种浓缩方法。适用**水**提取液的浓缩。
- 2. 蒸馏法：**将提取液加热沸腾，使溶剂气化并冷凝为液体而回收，达到提取液浓缩的目的。

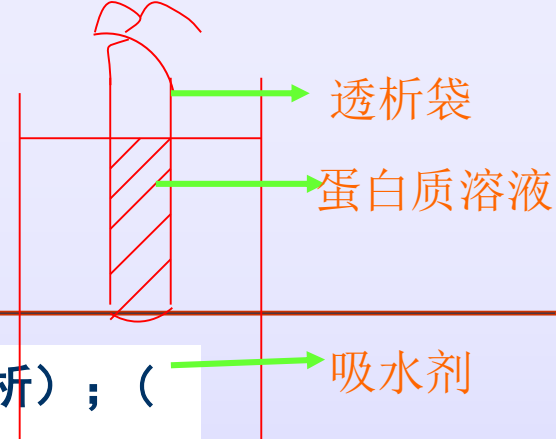
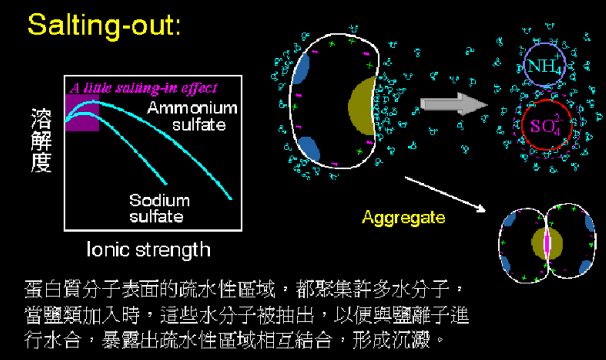
相比常压蒸馏, 负压蒸馏可以提高效率, 且适用不耐高温样品的浓缩.



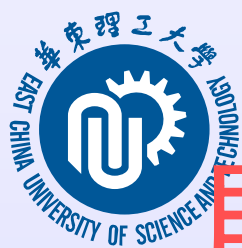
实验室用旋转蒸发仪
(负压蒸馏)



蒸馏简单装置(常压蒸馏)



3. **沉淀浓缩法：**硫酸铵沉淀，利用高浓度盐将蛋白质析出（盐析）；（低温）有机溶剂，0-4度可用乙醇，丙酮等将蛋白质析出。
4. **冷冻干燥浓缩法：**冰冻状态下直接升华去除水分。具体做法是将蛋白液在低温下冰冻，然后移置干燥器内，密闭，迅速抽真空，数小时后即可获得含有蛋白的干燥粉末。
5. **透析袋浓缩法：**将要浓缩的蛋白溶液放入透析袋（无透析袋可用玻璃纸代替），结扎，把高分子（6 000—12 000）聚合物如聚乙二醇、聚乙烯吡咯、烷酮等或蔗糖**吸水剂**撒在透析袋外即可，也可将配成30%—40%浓度的溶液，将装有蛋白液的透析袋放入即可。
6. **超滤膜浓缩法：**利用微孔纤维素膜通过高压将水分滤出，而蛋白质存留于膜上达到浓缩目的。
7. **凝胶浓缩法：**选用孔径较小的凝胶，如SephadexG25或G50，将凝胶直接加入蛋白溶液中。放入冰箱内，凝胶粒子吸水后，通过离心除去。
8. **浓缩胶浓缩法：**浓缩胶是一种高分子网状结构的有机聚合物，具有很强的吸水性能，能吸收低分子量的物质，如水、葡萄糖、蔗糖、无机盐等，适宜浓缩10 000分子量以上的生物大分子物质。



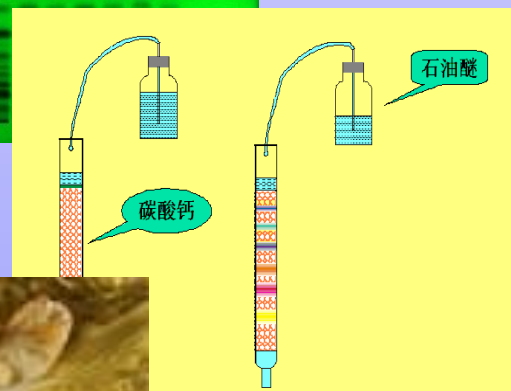
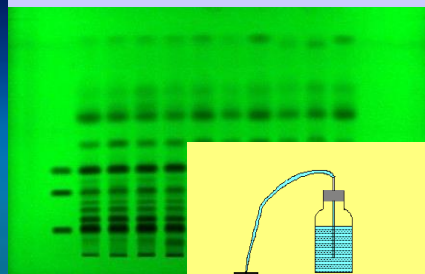
目标成分分离纯化常用技术

粗分级分离技术

- ✓按照溶解度差异：沉淀法、萃取法
- ✓按照分子量差异：透析、微滤、纳滤、电渗析等

细分级分离技术

- ✓薄层色谱 (TLC)
- ✓柱色谱 (CC)
- ✓高效液相色谱 (HPLC)

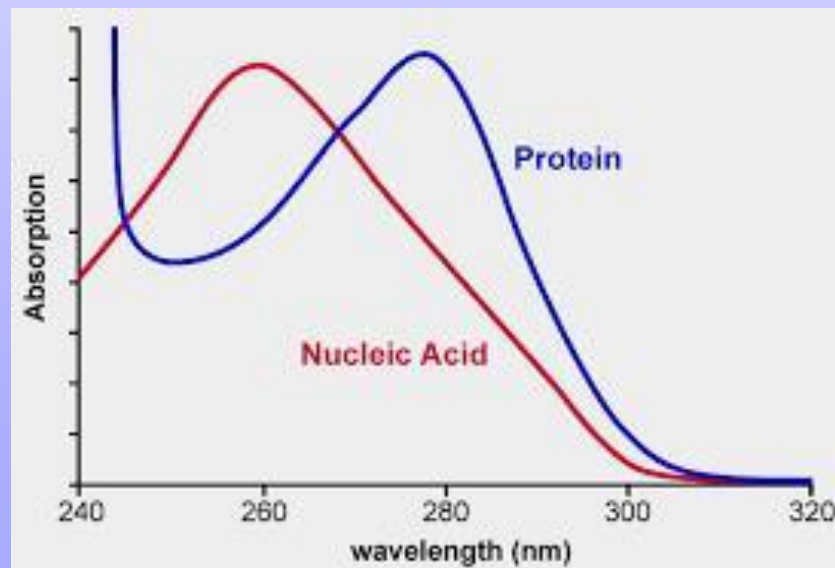
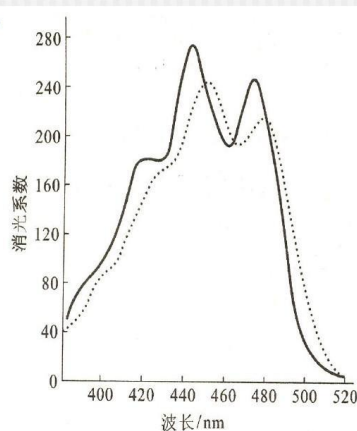


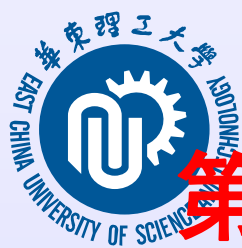
思考

导师指导分离纯化一重组蛋白, 如何判断其纯度?
从植物叶中提取分离胡萝卜素, 如何判断其纯度?

● 类胡萝卜素吸收光谱:

最大吸收区域在
蓝紫光部分 (400-500nm),
基本上不吸收黄光,
从而呈现黄色。





第三章 目标成分纯度和性质研究方法

第一节 目标成分纯度检测方法

电泳法 (EC) ----- 电泳纯

高效液相色谱法 (HPLC) --- 色谱纯

薄层色谱法 (TLC) 和纸色谱 (PC)

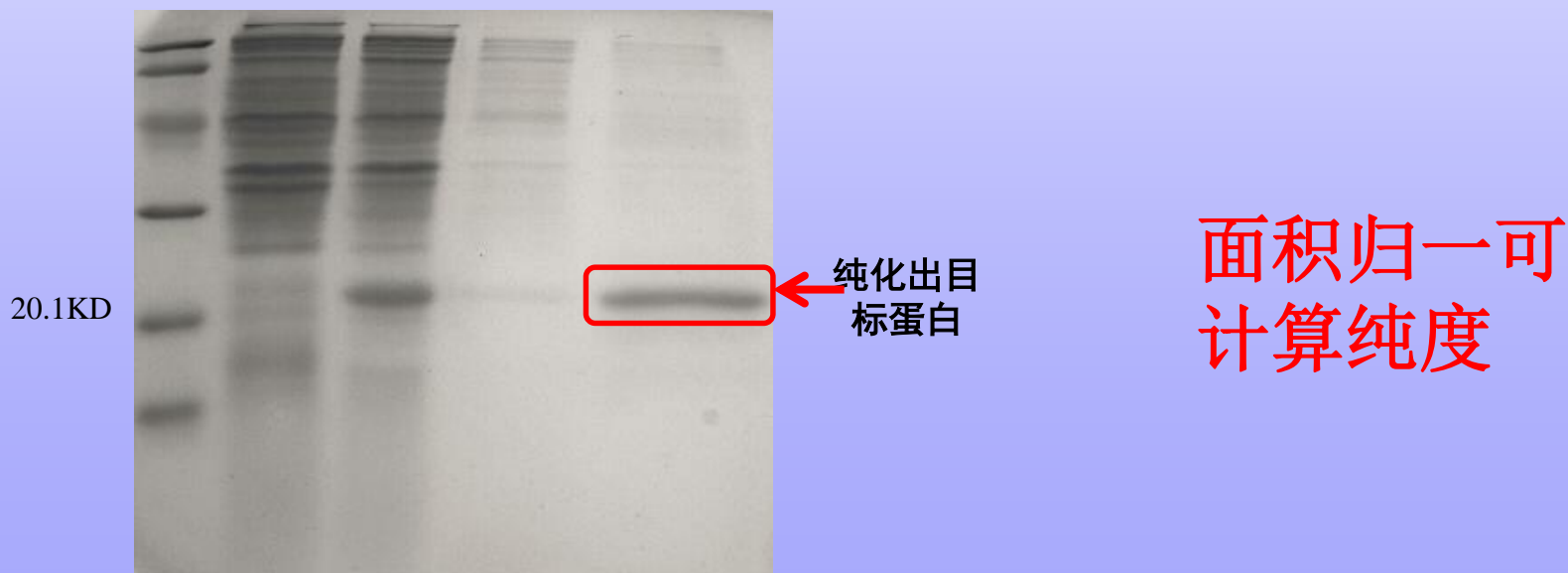
紫外光谱法/紫外吸收法 --- 光谱纯

蛋白质纯度鉴定

1. 电泳法

包括聚丙烯酰胺凝胶电泳、SDS-PAGE、毛细管电泳。

纯的蛋白质在一定条件下进行电泳，将以单一的速度移动，它的电泳图谱只出现一条带。叫电泳纯；最常用。

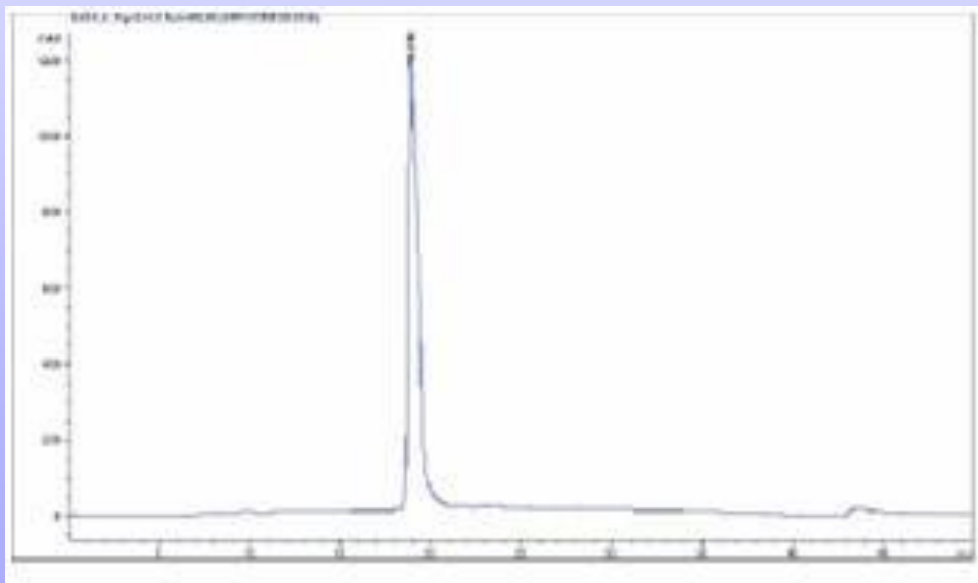


同时电泳样品和标准品，比较迁移率/分子量。

2. HPLC法

常用于多肽、蛋白纯度鉴定。纯的样品在HPLC的洗脱谱上呈现出单一的对称峰。也叫色谱纯。

面积归一可计算纯度



多肽化合物的HPLC纯度图谱

| Peak# | RT | Area | Area% |
|-------|-------|---------|---------|
| 1 | 2.091 | 873 | 0.0114 |
| 2 | 3.345 | 185879 | 2.4355 |
| 3 | 9.861 | 7445184 | 97.5530 |

正相HPLC(多肽类)

凝胶过滤色谱 (GFC) :

水溶性大分子

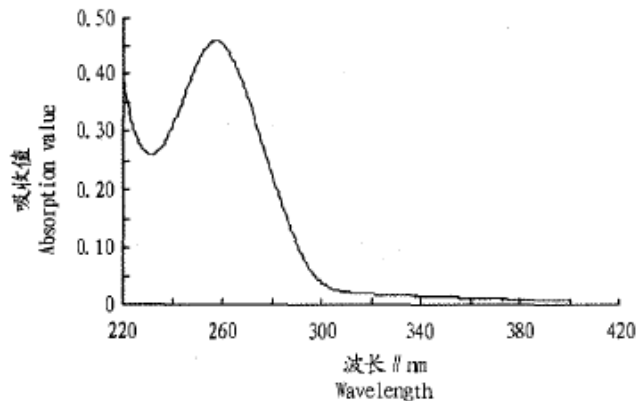
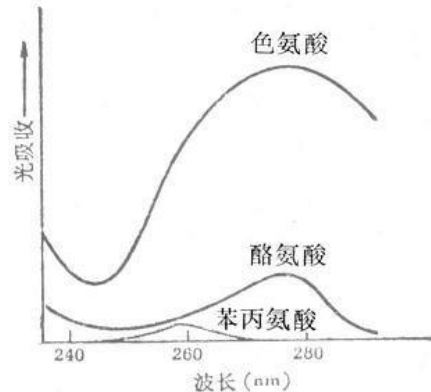


图1 大豆基因组 DNA 紫外光谱



色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的紫外吸收光谱

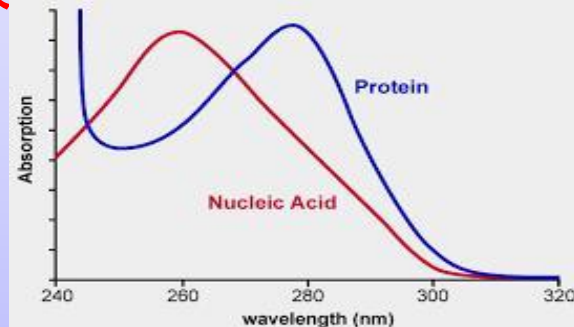
3. 紫外吸收法

由于蛋白质中存在着含有共轭双键的**酪氨酸和色氨酸**

因此蛋白质溶液在**280nm**处具有最大紫外吸收。

蛋白质纯度鉴定常用 OD_{260}/OD_{280} 比值。

纯的蛋白样品： $OD_{260}/OD_{280}=0.57$ 。叫光谱纯。



蛋白样品常含**核酸杂质**。含5%的核酸之后，该值到1.06

| 蛋白质 / % | 核酸 / % | OD_{260}/OD_{280} |
|---------|--------|---------------------|
| 100 | 0 | 0.57 |
| 95 | 5 | 1.06 |
| 50 | 50 | 1.87 |
| 20 | 80 | 1.96 |
| 5 | 95 | 1.99 |
| 0 | 100 | 2.00 |

DNA纯度鉴定

1. 紫外吸收法

DNA链上**碱基**的苯环结构在紫光区具有较强吸收，其最大吸收峰在**260nm**处。

DNA纯度鉴定常用 OD_{260}/OD_{280} 比值

纯DNA： $OD_{260}/OD_{280} \approx 1.8$

(>1.9,表明有**RNA**污染；

<1.6, 表明有蛋白质、酚等污染)

DNA样品中常含有**蛋白质**、**RNA**等杂质。

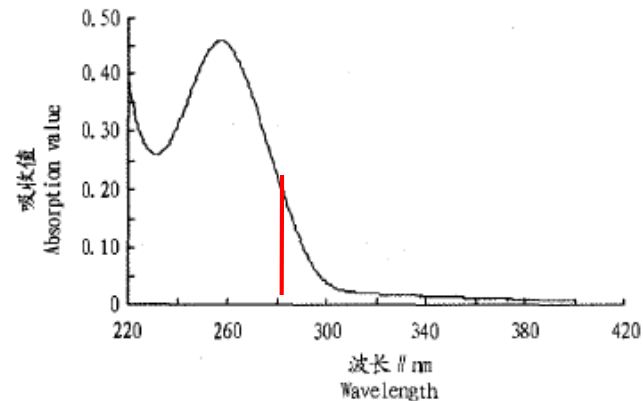
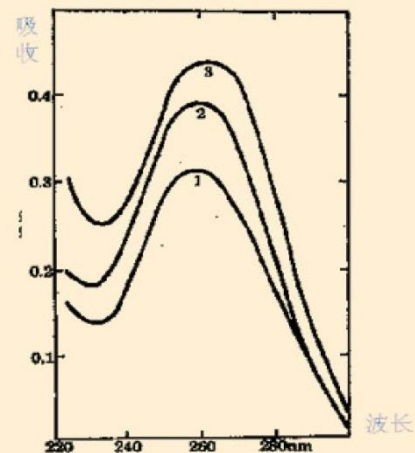


图1 大豆基因组 DNA 紫外光谱



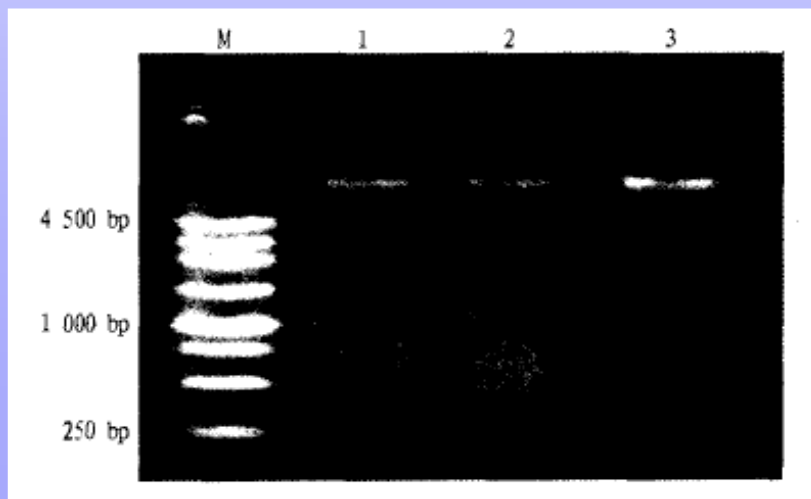
DNA的紫外吸收光谱

1.天然DNA, 2.变性DNA, 3核苷酸总吸收值

DNA紫外吸收光谱

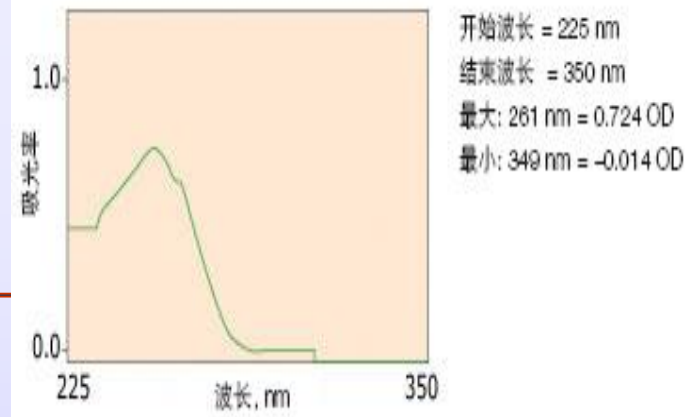
2. 琼脂糖凝胶电泳技术

根据色带的深浅反映出含量高低；杂带的多少可以判断纯度，纯度好一般是指没有**RNA和蛋白质**。RNA一般会出现现在DNA的下方，所以DNA下面（远离点样孔）如果没有杂带就说明没有RNA，蛋白质集中在点样孔周围，如果点样孔周围不是特别亮就说明蛋白污染较少。



RNA 污染？

RNA纯度鉴定



1. 紫外吸收法

RNA链上碱基的苯环结构在紫光区具有较强吸收。 RNA紫外吸收光谱
其最大吸收峰在260nm处。

RNA纯度鉴定常用 OD_{260}/OD_{280} 比值

纯RNA: $OD_{260}/OD_{280} \approx 2.0$

常也采用 $1.8 < OD_{260}/OD_{280} < 2.0$, 表示纯度较好。

(< 1.8 时表明有蛋白质或苯酚污染;

$1.8 < OD_{260}/OD_{280} < 2.0$, 有DNA未除尽;

> 2.0 时表明可能有异硫氰酸残存)

RNA样品中常含有蛋白质、DNA等杂质。

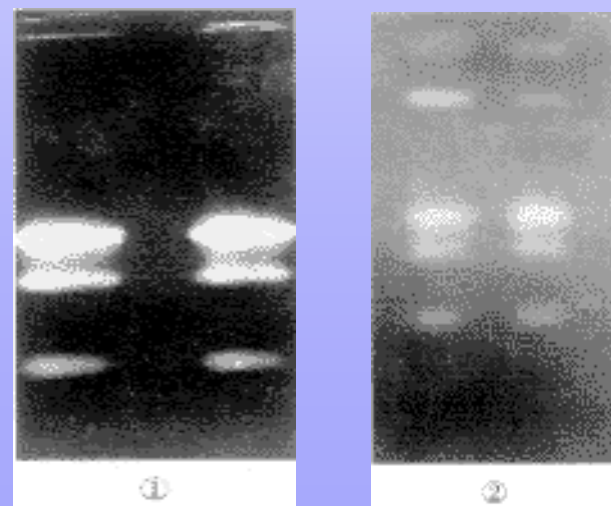
2. 琼脂糖凝胶电泳技术

RNA的完整性可通过琼脂糖电泳法进行鉴定。完整的RNA电泳时，**28S**（约4.8Kb）和**18S**（约1.9Kb）rRNA经EB染色后，两条电泳条带的显色强度近似为2比1。

RNA的质量，主要观察**28S**、**18S**和**5S**
三条带是否清晰，有无降解，以及是否有DNA污染。

有DNA污染样品

大鼠脑组织纯RNA的电泳图



多糖纯度鉴定常用方法

多糖纯度的衡量不同于通常化合物方法，多糖的纯品在结构上也不是完全一致，通常说的多糖纯品实际上是有一定相对分子质量范围的均一组分。

1、紫外吸收光谱法：

200~400nm连续光扫描记录下来的图谱。

原理：是电子在分子轨道之间的跃迁。

260，280nm吸收情况判断核酸和蛋白质的存在。

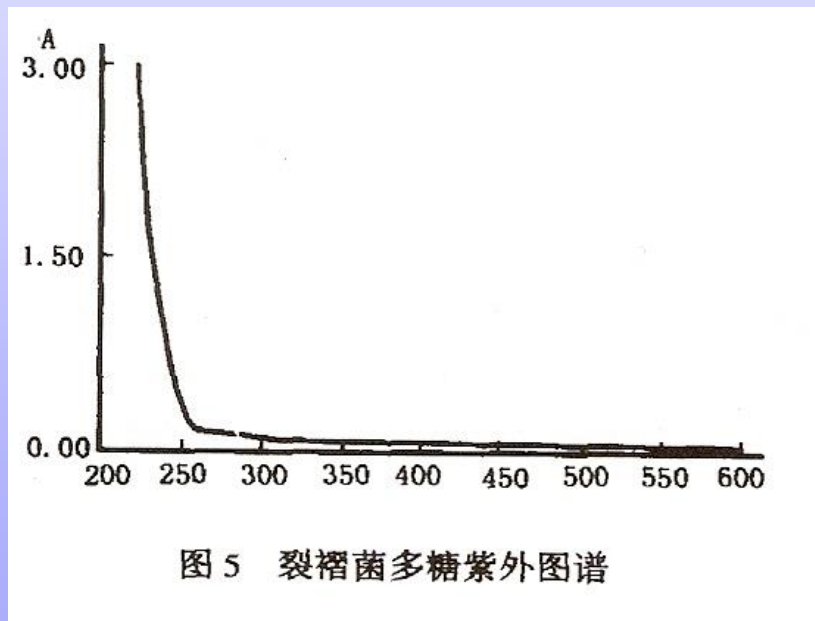


图5 裂褶菌多糖紫外图谱

无核酸蛋白质吸收

2、凝胶柱色谱法：

凝胶过滤色谱（GFC）：
水溶性大分子

NaCl梯度洗脱，硫酸-苯酚法检测。

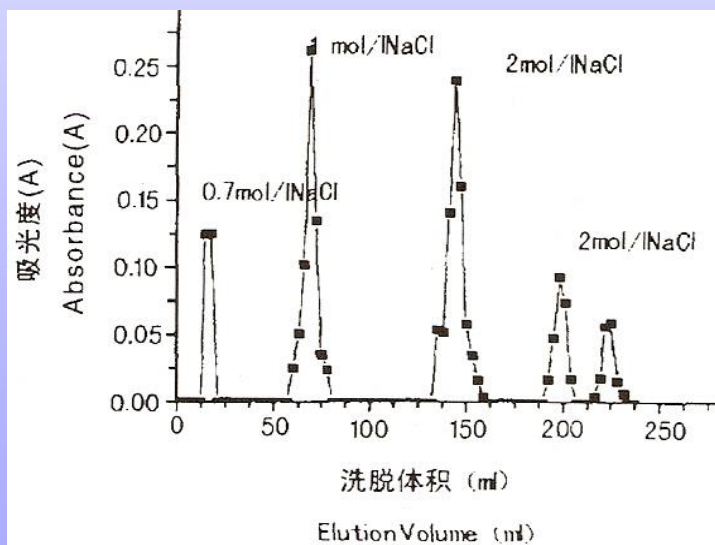


图1 海藻子多糖在 DEAE - Sephadex A - 25

柱上梯度洗脱曲线图

混合组分

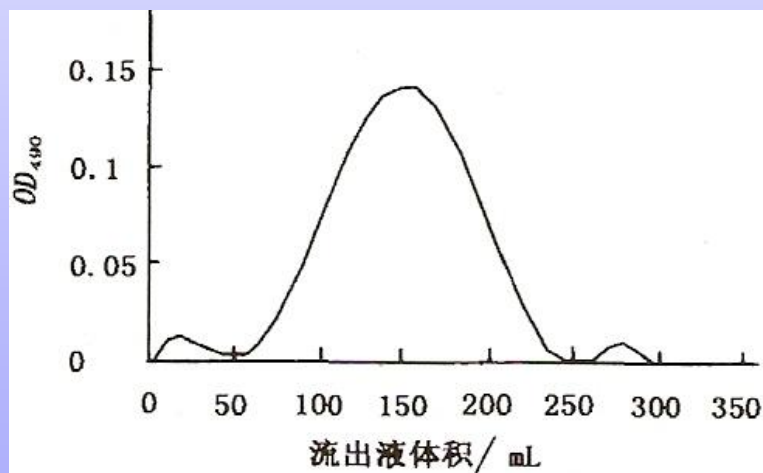
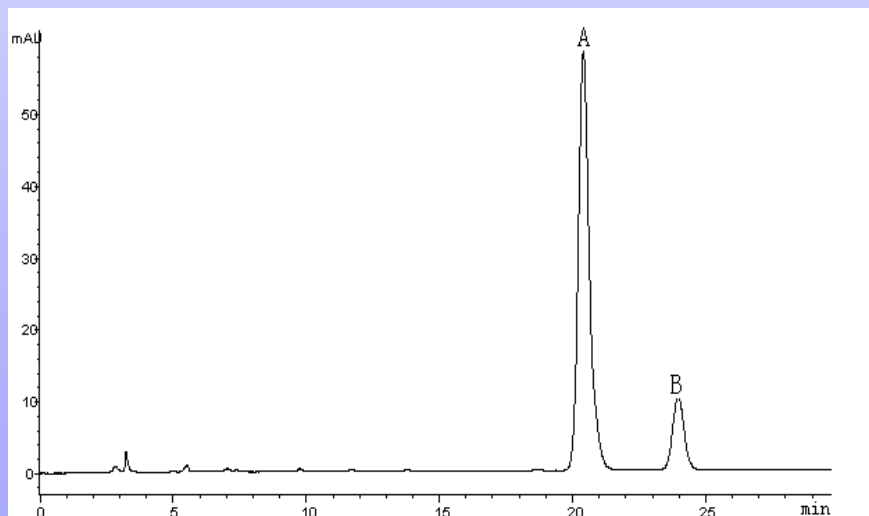


图3 SephadexG-200 凝胶柱层析图谱

均一组分

3、正相高效液相色谱法 (NP-HPLC):

只出现单组分峰，则为均一组分。示差检测器或ELSD



混合组分

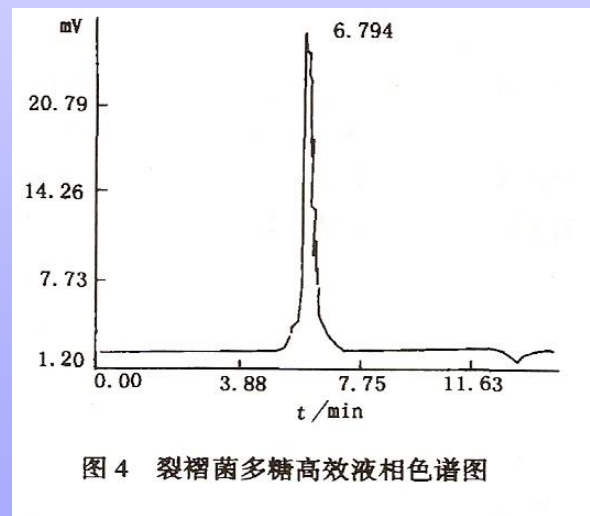


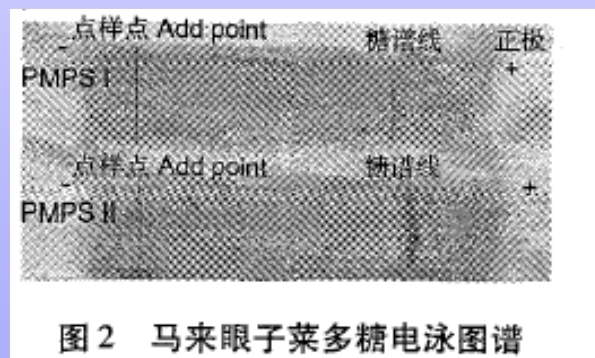
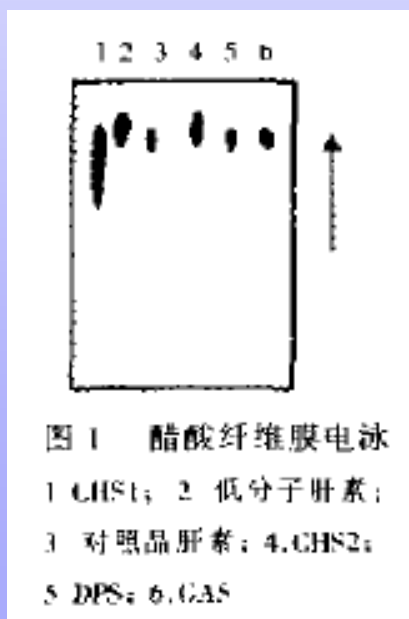
图4 裂褶菌多糖高效液相色谱图

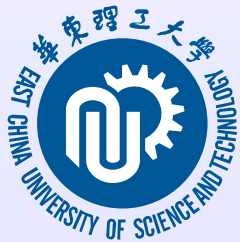
均一组分

4、电泳法：

醋酸纤维薄膜电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳等。

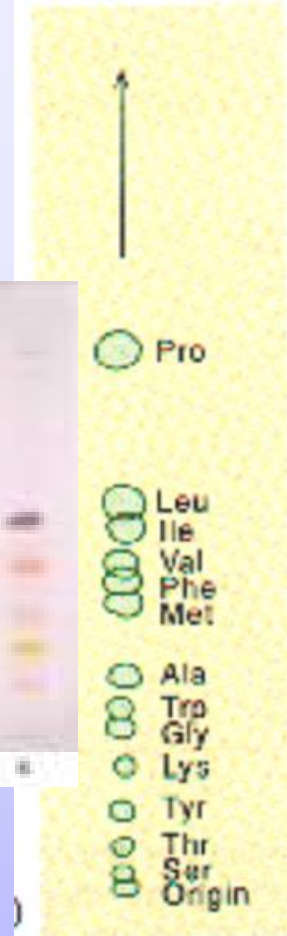
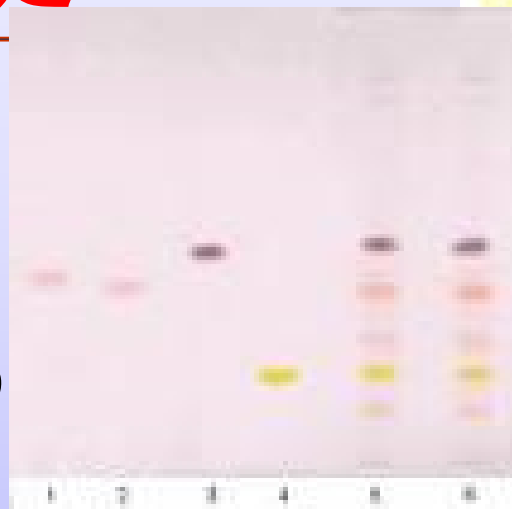
单一斑点或条带表示为均一组分。



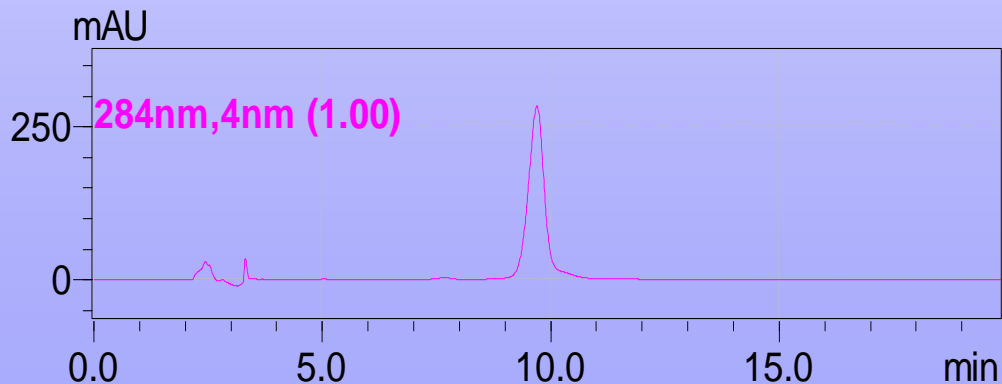


小分子化合物纯度鉴定

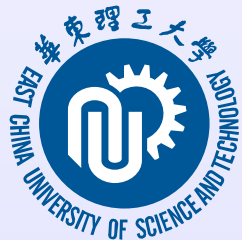
1. 薄层色谱法 (TLC) 和纸色谱 (PC)
2. 高效液相色谱法: 低极性 (RP-HPLC)
大极性 (NP-HPLC)



乙腈-0.5%乙酸 = 23-77

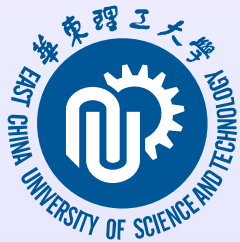


| Peak# | RT | Area | Area% |
|-------|-------|---------|--------|
| 1 | 2.091 | 873 | 0.0114 |
| 2 | 3.345 | 185879 | 2.4355 |
| 3 | 9.861 | 7445184 | 97.553 |



第二节 目标成分分子量测定

- SDS-电泳法
- 凝胶色谱法
- 质谱法



蛋白质分子量测定

1. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)
2. 凝胶过滤法(Gel filtration)
3. 质谱法(Mass Spectrometry)

1. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS-PAGE)

SDS（十二烷基磺酸钠）是一种阴离子型表面活性剂，它能够与蛋白质多肽链中的氨基酸残基按大约1 : 1.4比例结合。

每一个蛋白质分子都因为结合了许多的SDS而带有大量的负电荷，而蛋白质分子原有的电荷则可以忽略。该法主要利用了蛋白质分子量大小不同而分离蛋白质。

用已知分子量的蛋白质作为标准，则可以估算出不同蛋白质的分子量。

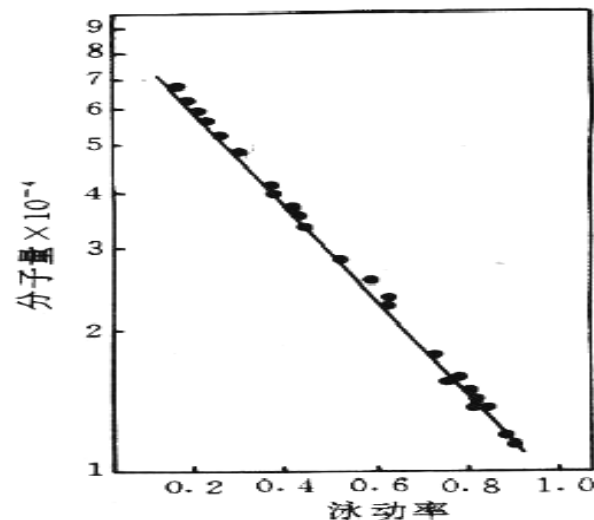
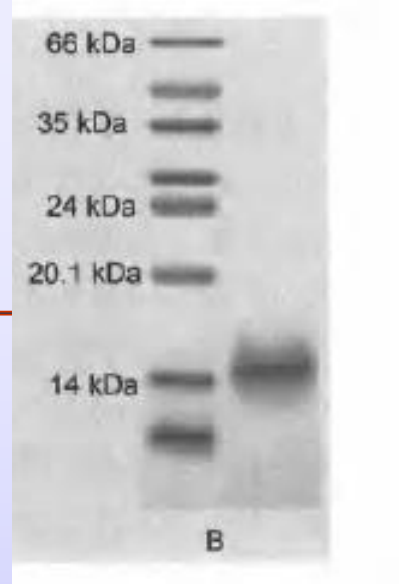


图2-36 对于不同的多肽链
(分子量 11 000~70 000) 用 SDS-连续
系统测得的泳动率与其分子量对数的
关系图[2]

2. 凝胶过滤法(Gel filtration)

分子量对数与洗脱体积、保留时间或分配系数成线性关系。

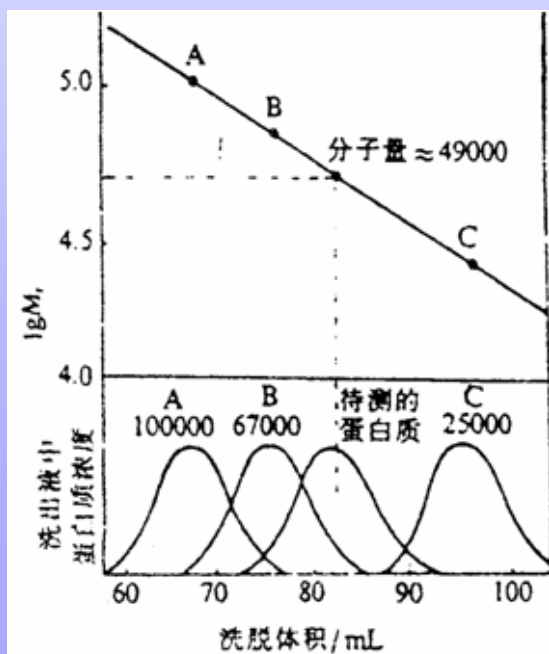


图 17-9 洗脱体积与分子量(M_w)的关系

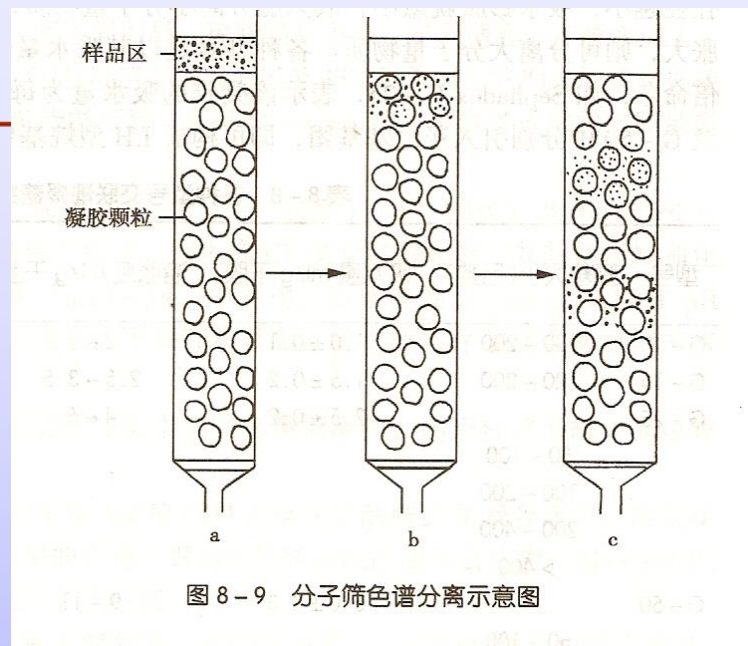
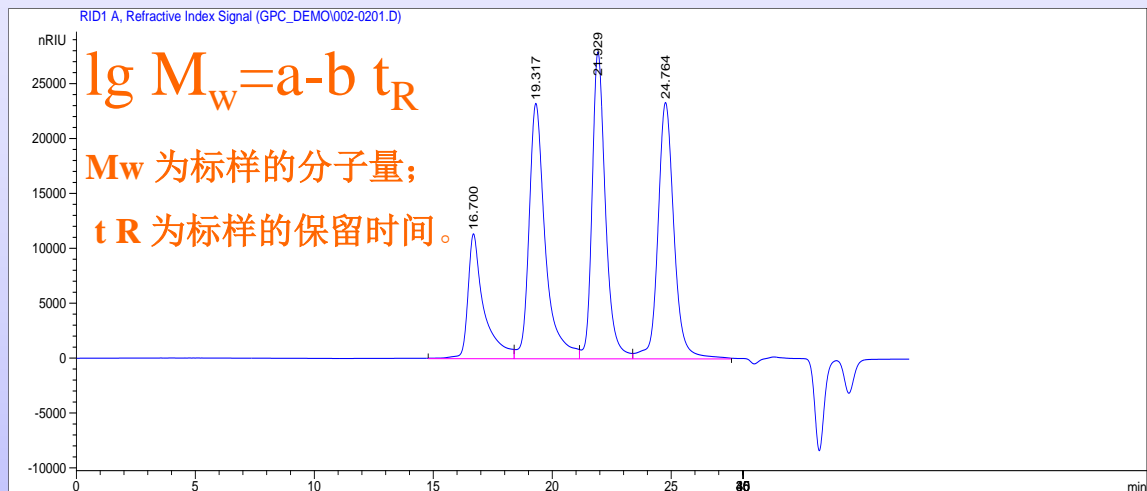
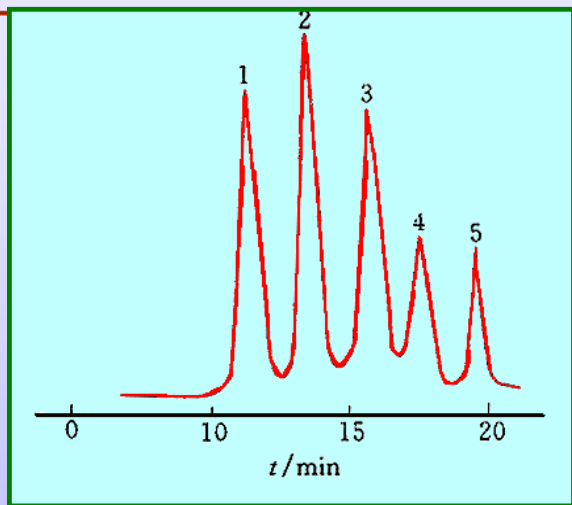


图 8-9 分子筛色谱分离示意图

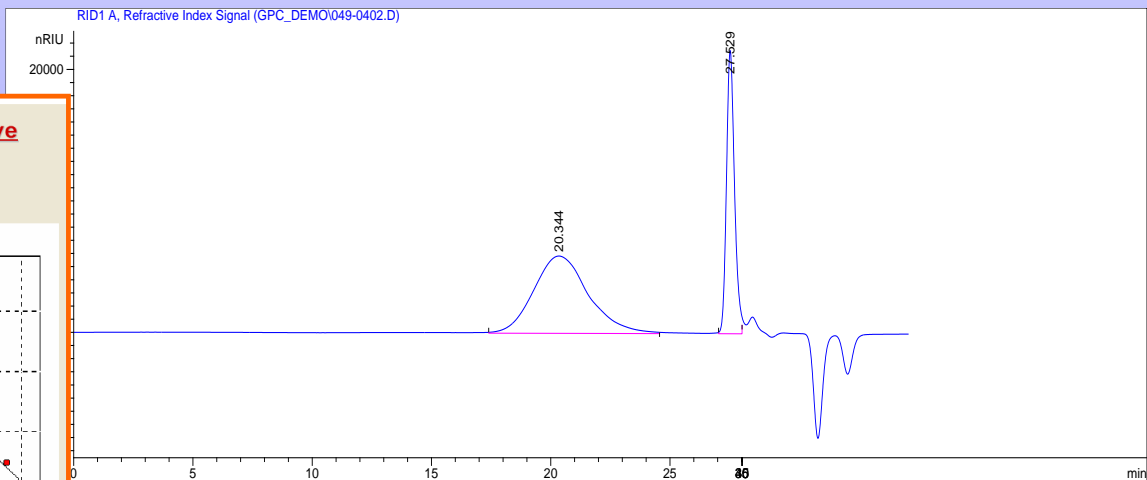
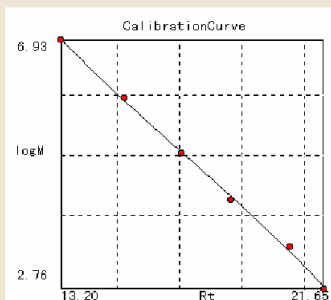
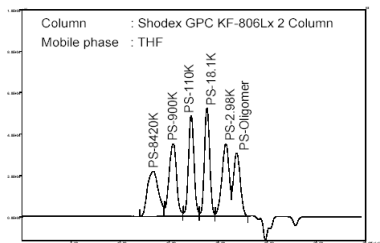
$$\lg M_w = a - bV_e$$

M_w 为标样的分子量;
 V_e 为标样的洗脱体积。



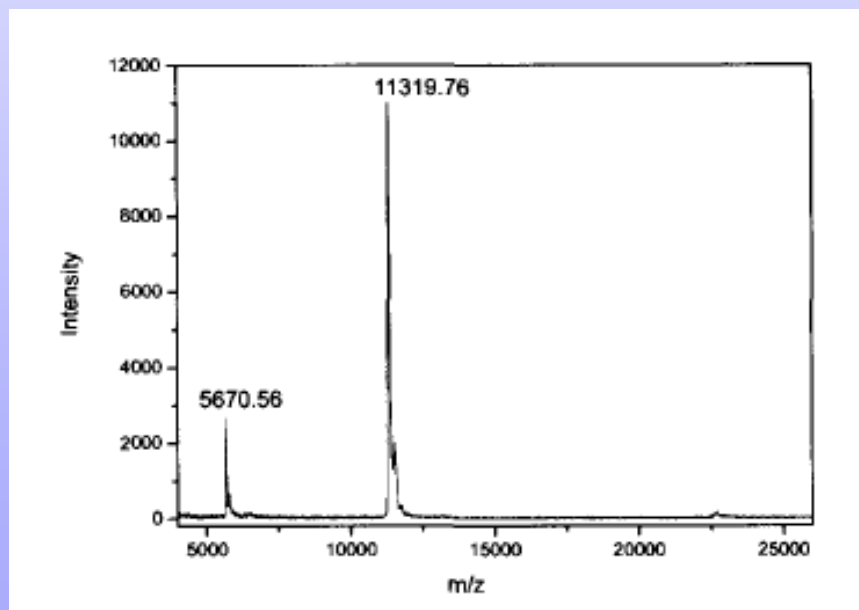
标准品图谱

Gel permeation chromatography and calibration curve

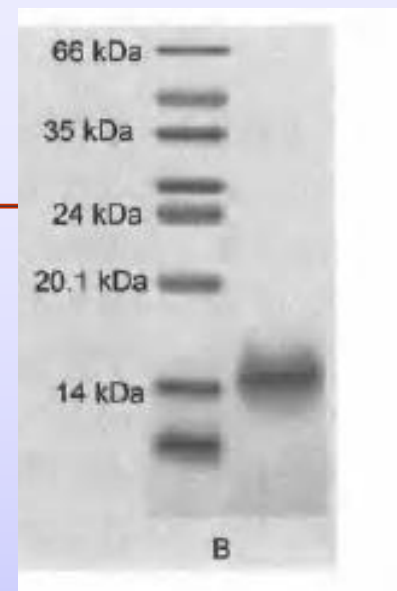


3. 质谱法 (Mass Spectrometry)

ESI-MS



分子离子峰即 $[M + H]^+$ 精确分子量为 $(11319.76 \pm 5.66) \text{ Da}$

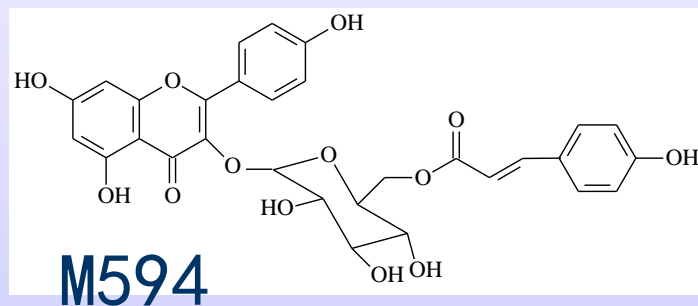


相对分子量在 15 kDa

结果有大约 20% 的误差

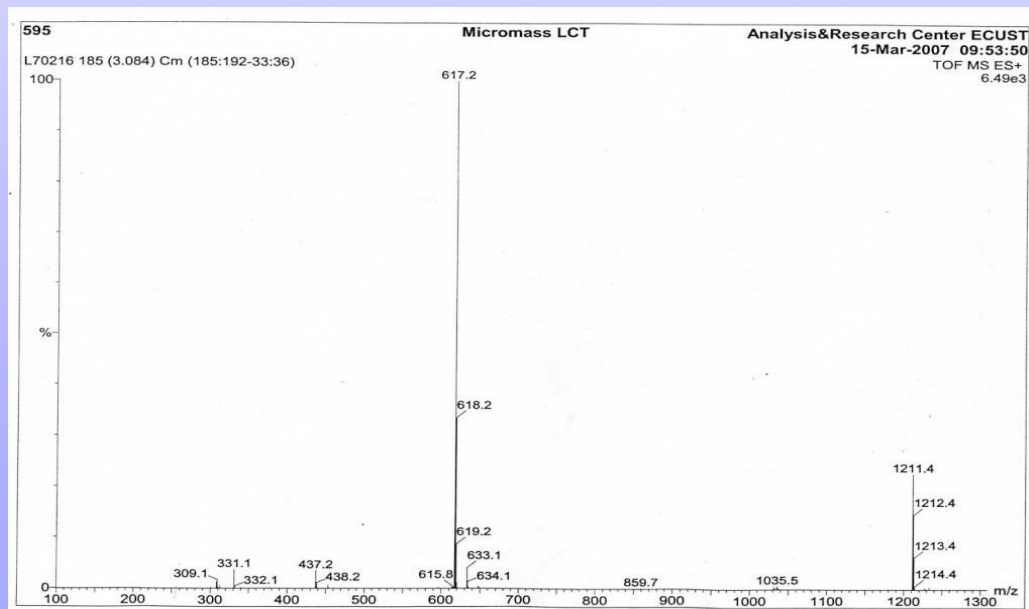
小分子化合物分子量测定

质谱法 (Mass Spectrometry)

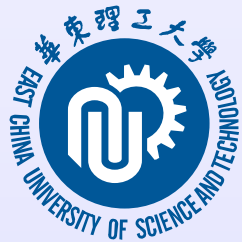


ESI-MS

MS: 617.2 (M+Na)⁺



覆盆子中槲树苷的MS图谱



思考

1. 重组表达 α -干扰素, 分离纯化后如何鉴定其纯度。
2. 从青蒿中分离得到青蒿素, 如何判断其纯度?