



生物化学实验

生物大分子制备技术

2.4 生物大分子的分离纯化

北京大学 王青松 胡晓倩

概述

- 分离纯化是生物大分子制备的核心操作。生物体的组成成分非常复杂，成千乃至上
万种生物分子处于同一个体系中，**没有适合于各类生物大分子的固定分离纯化程序。**
- **分离纯化方案的正确选择和分离纯化方法实验条件的摸索，是生物大分子高效成功
制备的关键。**

分离纯化技术分类

- 生化物质分离纯化技术根据分离最终目的的不同分为：
 - **生化产品的分离分析**：主要对生物体内各组分加以分离后进行定性、定量鉴定，**不一定要把某组分从混合物中分离提取出来**；
 - **生化产品的制备**：主要是为了获得生物体内的**单一目的组分**。
- 为了保护目的物的生理活性及结构上的完整性，生化产品的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，结合各种不同类型的分离方法，才能达到目的。操作时间长，步骤繁琐，给制备工作带来众多影响。

分离纯化的原理与方法

性质	方法
分子形状和大小	差速离心、透析、超滤，凝胶过滤层析
溶解度	盐析、有机溶剂沉淀、等电点沉淀
电荷	电泳，离子交换层析，等电聚焦
物质吸附性	选择性吸附与吸附层析
生物功能专一性	亲和层析

生物大分子的分离纯化都是在液相中进行，主要根据待分离目的物的分配系数、分子量大小、溶解度、电荷性质、吸附性和生物功能专一性等进行分类。

分离纯化的程序

1. 确定制备物的研究目的及建立相应的分析鉴定方法

2. 制备物的理化性质稳定性的预试验

3. 材料前处理及抽提方法的选择

4. 分离纯化方法的摸索 (纯化早期和纯化晚期)

5. 产物的含量及均一性的测定

分离纯化早期的方法

特点

- 提取液成分非常复杂;
- 目的物浓度较低;
- 物理化学性质相近的物质多。

对所选方法的要求

- 快速，能较大的浓缩溶液体积;
- 负荷能力要大，分离量多;
- 分辨力不需太高。

**早期分离方法的选择原则是：从低分辨能力到高分辨能力，
且负荷量较大者较为合适。**

分离纯化早期方法的选择

- **低分辨的方法：吸附、萃取、沉淀法等。**

早期分离纯化用这些分辨力低的方法较为有利，这些方法具有负荷能力大、分离量多，且兼有分离提纯和浓缩作用等优点，是进一步分离纯化的基础。

- **高分辨的方法：亲和层析、离子交换等。**

随着新技术的发展，亲和层析等方法的分辨力高，提纯步骤愈简化，收率高，同时生化物质的变性危险愈少，**可用于从粗提取液中分离制备小量目的物。**

分离纯化后期方法的选择

吸附层析

盐析

凝胶过滤层析

离子交换层析

亲和层析

制备型HPLC

分离纯化后期需注意

- 必须**注意避免目的产物的损失**，主要是器皿的吸附、操作过程样品液体的残留、空气的氧化等因素。
- 加入一些电解质以**保护生化物质的活性**，减少样品溶液在器皿中的残留量。
- 在安排纯化方法顺序时，还要考虑到有利于**减少工序，提高效率**。如盐析后采取吸附法，会因离子过多而影响吸附效果，如增加透析除盐，则使操作复杂化。如倒过来进行，先吸附，后盐析就比较合理。

分离纯化后期需注意

- 为了获得足够量的样品，常需加大原材料的用量，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。
- 分离纯化后期，随着目的物的纯度和浓度大大提高，很多敏感的蛋白质（酶）极易变性失活。**操作步骤要连续、紧凑、尽量低温下进行。**
- 得到最终产品，**分装并写明标签，必要时立即冰冻干燥，-20℃ 或- 70℃低温保存。**

分离纯化方案的评价

每一个分离纯化步骤的好坏，需考虑的纯化方法的：

分辨能力

重现性

回收率

- 制备某些含量很少的物质时，回收率的高低十分重要。一般经过5~6步提纯后，活力回收在25%以上。
- 不同物质的稳定性不同、分离难易不同，回收率也不同。

评价方法

- 测定纯化过程每一步收集的组分中有效成分的含量
- 测定酶的比活力
- 纯化倍数 = 每步的比活力/粗提取液的比活力
- 回收率 (产率) = (每步的总活力/粗提取液的总活力) $\times 100\%$

对于纯化中每一步所用方法的优劣，体现在所得目的产物质量及活性平衡关系上。
可通过每一步骤的分析鉴定求出。