


chapter 4

酶的提取与分离纯化

The Extraction, Separation and Purification of Enzyme

本章重点

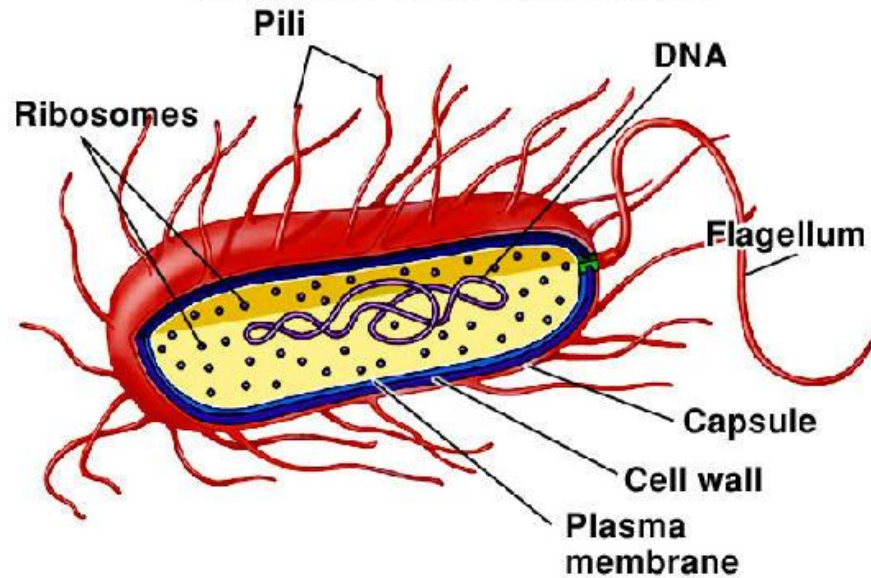
- 各种分离方法的操作原理
- 分离方法的应用原则
- 酶分离纯化中应注意的问题

- 
- Go** 1、酶的提取与分离纯化技术路线
 - Go** 2、细胞破碎
 - Go** 3、酶的提取
 - Go** 4、酶的分离方法
 - Go** 5、酶的组合分离纯化策略
 - Go** 6、酶的浓缩、干燥与结晶

细胞结构与酶分布

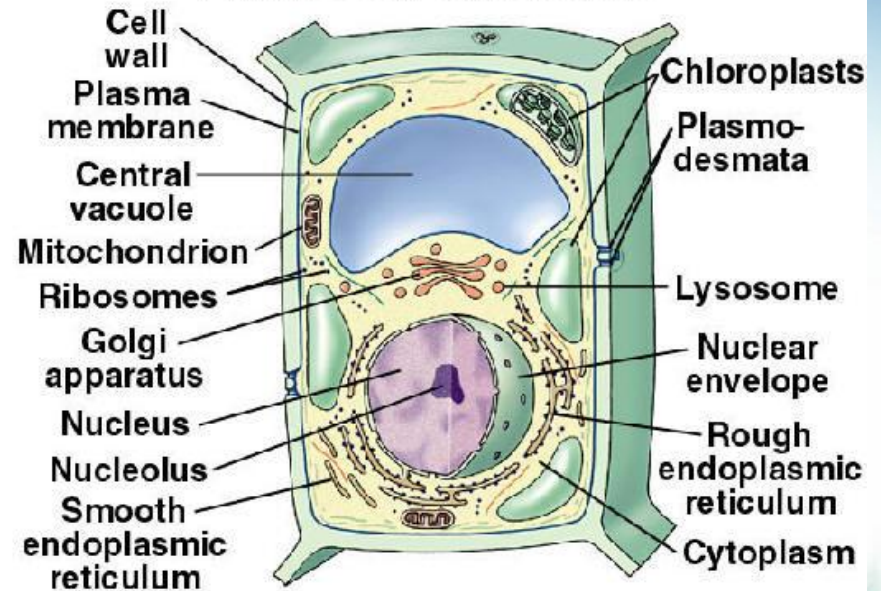
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

Bacterial Cell Structure



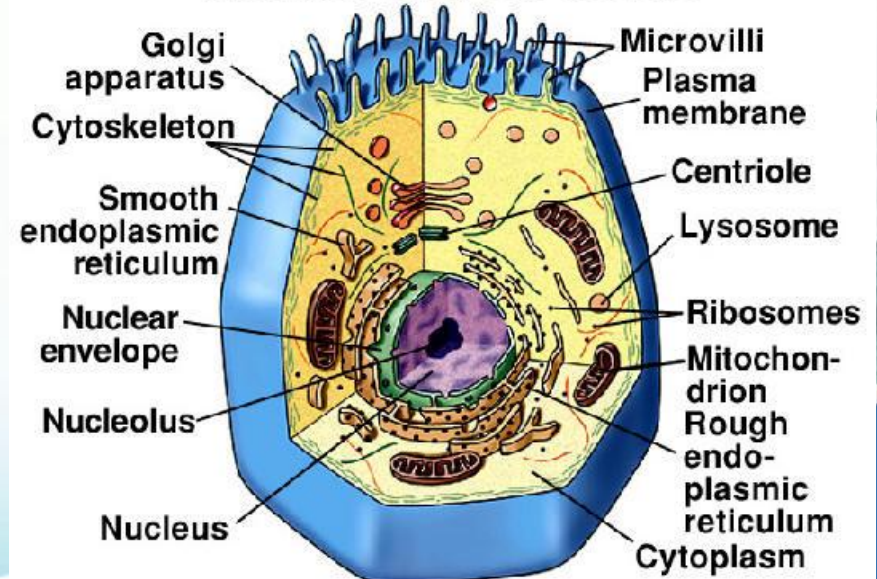
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

Plant Cell Structure

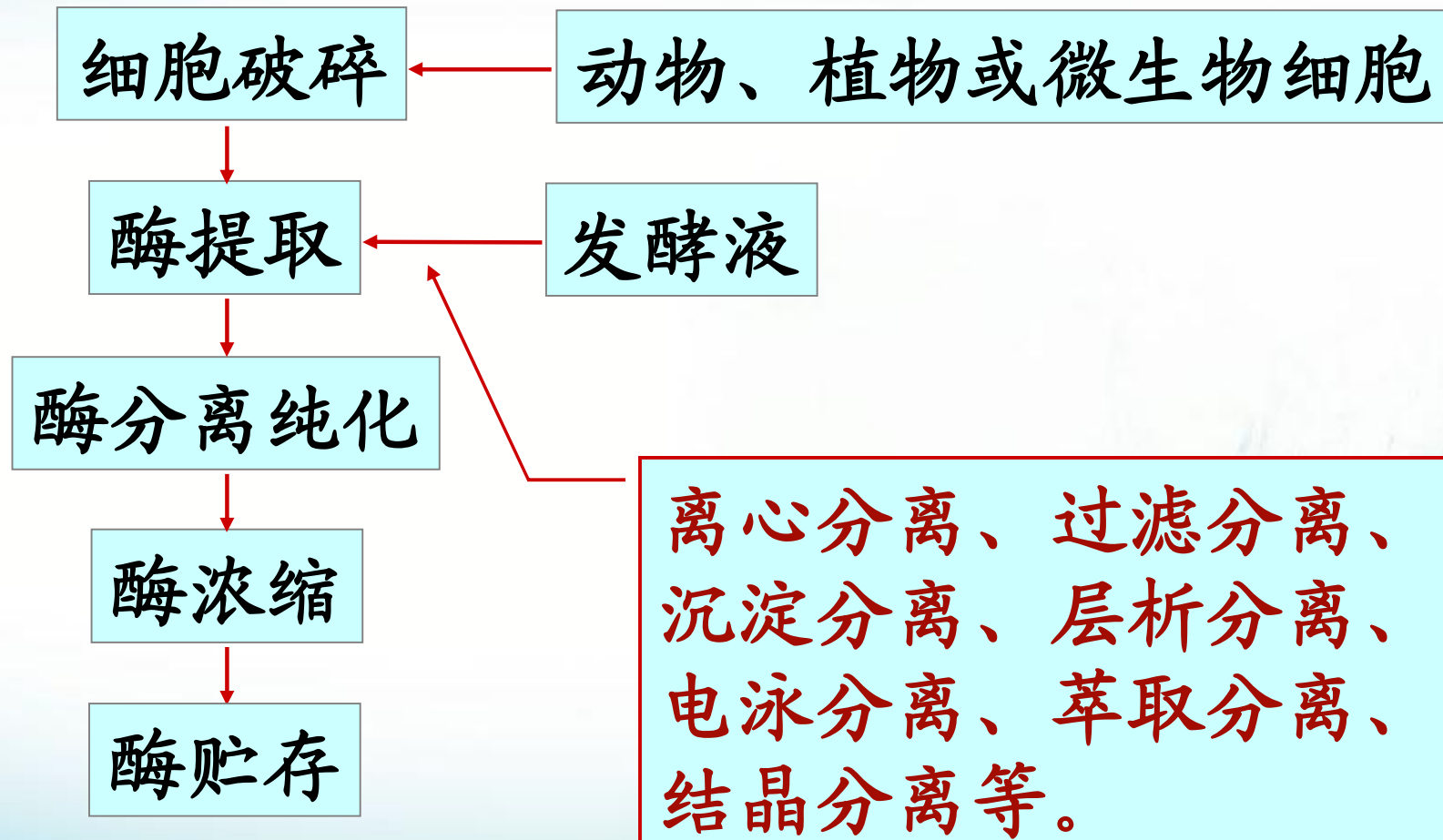


Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

Animal Cell Structure



酶的提取、分离纯化技术路线



第一节 细胞破碎

许多酶存在于细胞内。为了提取这些胞内酶，首先需要对细胞进行破碎处理。

- 1) 机械破碎
- 2) 物理破碎
- 3) 化学破碎
- 4) 酶促破碎



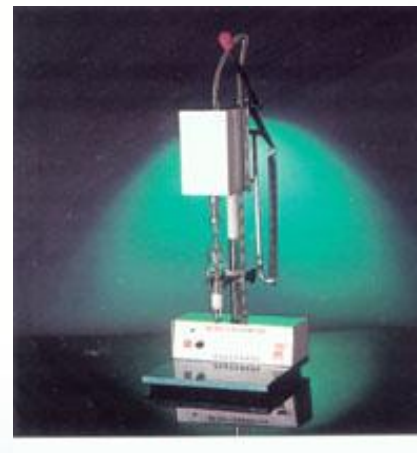
JY92-II D 超声波
细胞粉碎机



高压
细胞
破碎机



细胞
破碎
珠



DY89-I型 电动玻璃匀浆机



细胞破碎方法及其原理

机械破碎

通过机械运动产生的剪切力，使组织、细胞破碎

捣碎法
研磨法
匀浆法

物理破碎

通过高压冲击法
突然降压法
渗透压变化法

温度差破碎法
压力差破碎法
超声波破碎法

化学破碎

通过各种化学试剂对细胞膜的作用，而使细胞破碎

有机溶剂：
甲苯、丙酮
丁醇、氯仿
表面活性剂：
Triton、Tween

酶促破碎

通过细胞本身的酶系或外加酶制剂的催化作用，使细胞外层结构受到破坏，而达到细胞破碎

自溶法
外加酶制剂法

第二节 酶的提取

- **酶的提取**是指在一定的条件下，用适当的溶剂或溶液处理含酶原料，使酶充分溶解到溶剂或溶液中的过程。也称为酶的抽提。
- 酶提取时首先应根据**酶的结构和溶解性质**，选择**适当的溶剂**。一般说来，极性物质易溶于极性溶剂中，非极性物质易溶于非极性的有机溶剂中，酸性物质易溶于碱性溶剂中，碱性物质易溶于酸性溶剂中。

酶都能溶解于水，通常可用水或稀酸、稀碱、稀盐溶液等进行提取，有些酶与脂质结合或含有较多的非极性基团，则可用有机溶剂提取。

提取目标

- 将目的酶最大限度地溶解出来
- 保持生物活性

注意：温度升高，溶解度加大。为防止酶失活，一般采用低温（0~10℃）操作。

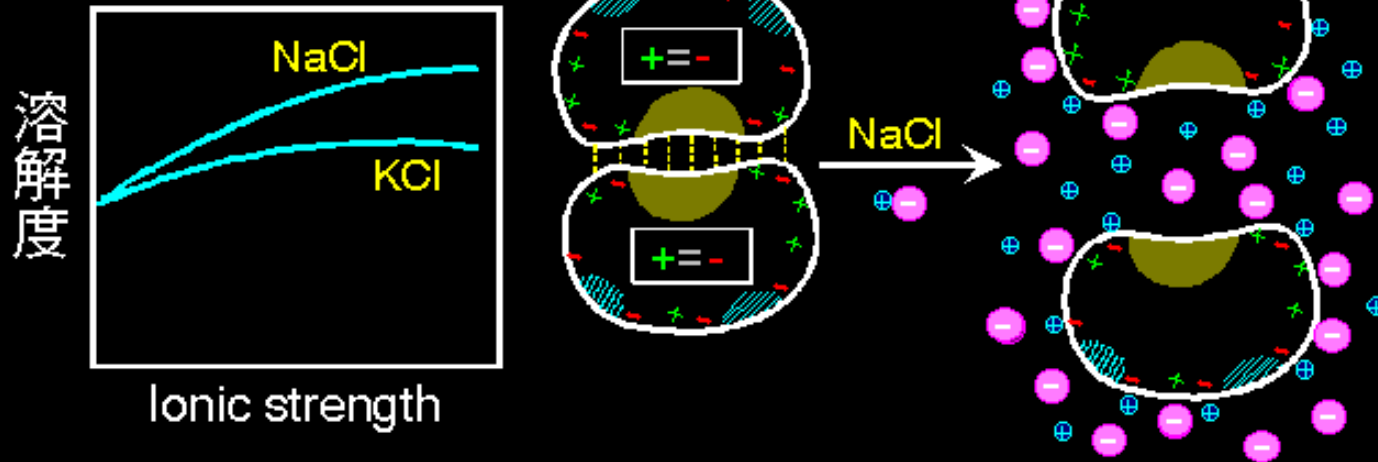
提取原则

- 相似相溶
- 远离等电点的pH值，溶解度增加

一、酶提取的方法

提取方法	溶剂或溶液	提取对象
盐溶液	0.02~0.5mol/L	提取在低浓度盐溶液中溶解度较大的酶
酸溶液	pH2~6水溶液	提取在稀酸溶液中溶解度大且稳定性较好的酶
碱溶液	pH8~12水溶液	提取在稀碱溶液中溶解度大且稳定性较好的酶
有机溶剂	能与水混溶的有机溶剂	提取与脂质结合牢固或含有较多非极性基团的酶

Salting-in:



分子在其等電點時，容易互相吸引，聚合成沉澱；加入鹽離子會破壞這些吸引力，使分子散開，溶入水中。

大多数蛋白类酶都溶于水，而且在低浓度的盐存在的条件下，酶的溶解度随盐浓度的升高而增加，这称为**盐溶现象**。

二、影响酶提取的主要因素

酶在所使用溶剂中的溶解度、酶向溶剂中的扩散速度、温度、pH值及提取液的体积。

提高温度，降低溶液粘度、增加扩散面积、缩短扩散距离，增大浓度差等都有利于提高酶分子的扩散速度，从而增大提取效果。

为了提高酶的提取率并防止酶的变性失活，在提取过程中还要注意控制好**温度、pH值**等提取条件。

酶的分离方法

- Go → 1、沉淀分离
- Go → 2、离心分离
- Go → 3、过滤与膜分离
- Go → 4、层析分离
- Go → 5、电泳分离
- Go → 6、萃取分离

第三节 沉淀分离

以溶解度变化为依据

盐析沉淀法

等电点沉淀法

有机溶剂沉淀法

复合沉淀法

选择性变性沉淀法

沉淀分离方法	分离原理
盐析沉淀法	利用不同蛋白质在不同盐浓度条件下溶解度不同的特性，通过在酶液中添加一定浓度的中性盐，使酶或杂质从溶液中析出沉淀，从而使酶与杂质分离
等电点沉淀法	利用两性电解质在等电点时溶解度最低，以及不同的两性电解质有不同的等电点这一特性，通过调节溶液pH值，使酶或杂质沉淀析出，从而使酶与杂质分离
有机溶剂沉淀法	利用酶与其它杂质在有机溶剂中的溶解度不同，通过添加一定量的某种有机溶剂，使酶或杂质沉淀析出，从而使酶与杂质分离
复合沉淀法	在酶液中加入某些物质，使之与酶形成复合物而沉淀下来，从而使酶与杂质分离
选择性变性沉淀法	选择一定条件，使酶液中存在的某些杂质变性沉淀，而不影响所需的酶，使酶与杂质分离

一、盐析沉淀法-改变离子强度

- **盐溶**：加入离子有助于分散大分子上所带的电荷而使溶解度提高。
- **盐析**：离子强度提高到超过某一数值，带电分子将会沉淀下来。

特点：1. 最古老，但应用广

2. 常用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，溶解度大，T影响小

0°C时，溶解度为697g/L

25°C时，溶解度为767g/L

在0°C时也能把几乎所有的蛋白盐析出来。

盐析时，溶液中硫酸铵的浓度通常以饱和度表示。

即：溶液中加入的饱和硫酸铵体积与混合液总体积之比

成功的关键： $\text{pH} = \text{pI}$

主要用于分级沉淀，在0°C左右进行。

蛋白质溶解度与盐浓度之间的关系：

$$\log S = \log S_0 - K_s \cdot I$$

I: 离子强度, $I = \sum MZ^2$; M: 离子浓度 (mol/L);

Z: 离子价数

S: 离子强度为 I 时蛋白质的溶解度 (g/L)

S_0 : 离子强度为 0 时蛋白质的溶解度 (g/L)

K_s : **盐析系 (常) 数**, 由蛋白质性质、盐种类决定

K_s 代表盐析效率, 其含义是随着盐浓度的增加, 蛋白质溶解度降低的速度, K_s 越大盐析效果越好。

当温度一定时， S_0 对于某一溶质是常数，用 β 表示，盐析方程式可改写为：

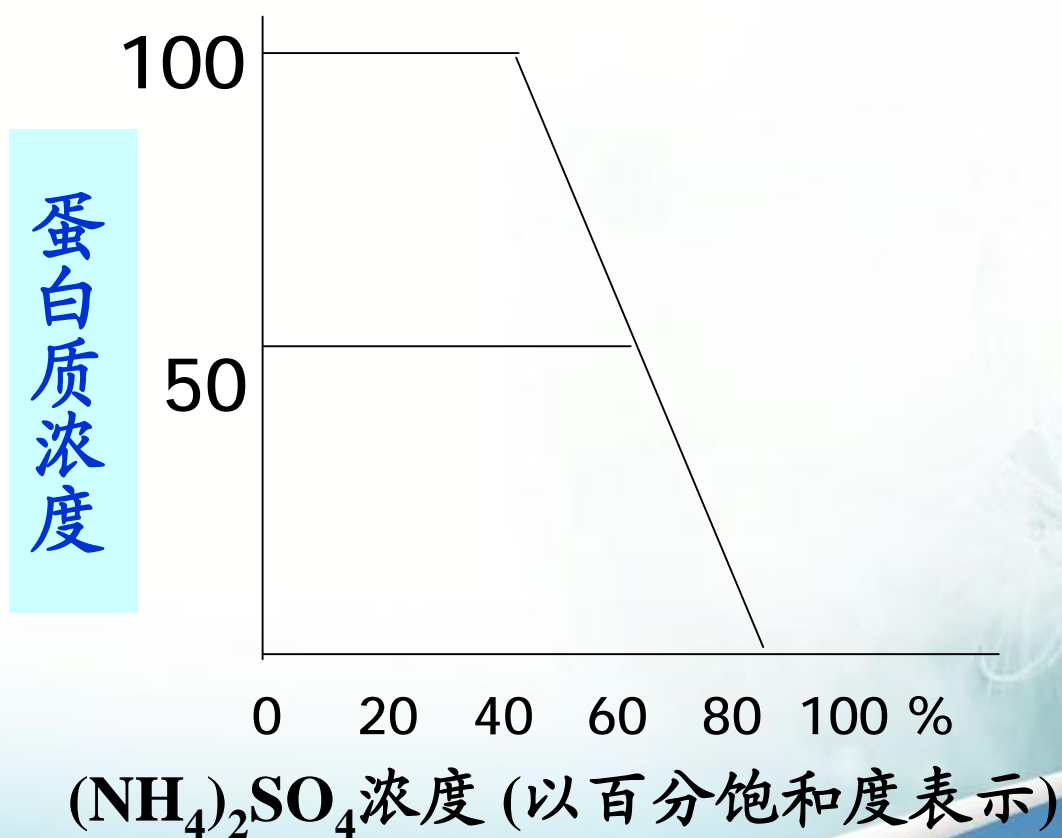
$$\log S = \beta - K_s I$$

K_s 分级盐析：在一定的pH和温度条件下（ β 为常数），通过改变离子强度使不同的酶或蛋白质分离的方法。

β 分级盐析：在一定的盐和离子强度的条件下（ $K_s I$ 为常数），通过改变温度和pH值，使不同的酶或蛋白质分离的方法。

最好用分级盐析

从55%开始有沉淀析出，65%时有50%沉淀，
75%时有70~80%沉淀



操作方式:

① 饱和溶液法（添加饱和硫酸铵溶液）

蛋白质溶液体积不太大，而达到的盐浓度又不太高

② 添加固体硫酸铵

蛋白质溶液体积已经很大，而要达到的盐浓度又很高
实际使用时，可直接查表得各种饱和度下需加固体硫酸铵的量

优点：简便、安全、重复性高。

缺点：脱盐（对浓盐溶液透析），分辨率低。

脱盐一般采用透析、超滤、层析等。

调整硫酸铵溶液饱和度计算表

	(硫酸铵最终浓度%饱和度)																	
	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100	
	每升溶液需加入固体硫酸铵的克数																	
硫酸铵起始浓度%饱和度	0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694	
20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619	
25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583	
30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546	
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522	
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506	
40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469	
45									32	65	99	134	171	210	250	339	431	
50										33	66	101	137	176	214	302	392	
55											33	67	103	141	179	264	353	
60												34	69	105	143	227	314	
65													34	70	107	190	275	
70														35	72	153	237	
75															36	115	198	
80																77	157	
90																	79	

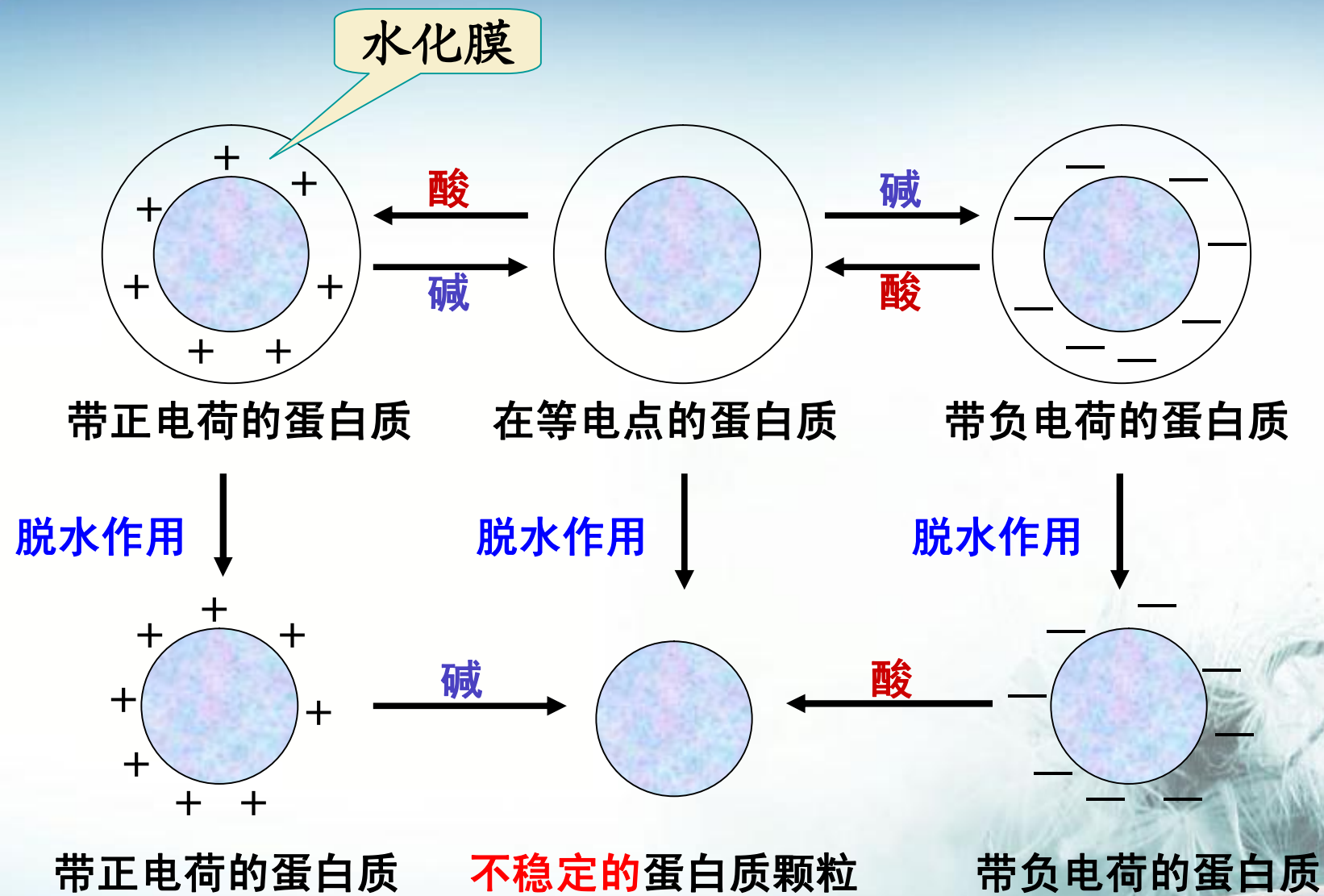
二、等电点沉淀法-改变pH

调整pH至酶的等电点

原理:

溶解度随分子引力加大而减小，其他条件相同，只pH在等电点附近，分子引力最大，蛋白质就沉淀。

一般不单独使用，配合其他方法使用



溶液中蛋白质的聚集沉淀

三、有机溶剂沉淀法-改变介电常数

加与水相混的有机溶剂，降低溶液的介电常数，增加蛋白质间静电引力，减弱蛋白质与溶剂分子之间的作用（破坏蛋白质表面的水膜，脱水作用），导致蛋白质聚集而沉淀。

1) **温度 0℃操作。**

常用丙酮，还有甲醇、乙醇等，
有机溶剂先在-15~-20℃下预冷，
沉淀后立即在低温下离心分离。

2) **pH = pI**

3) **[I] 常加5~10% (NH₄)₂SO₄，以提高分离效果**
[I] < 0.05 M 可以提高分辨率和酶稳定性

4) **沉淀后立即用缓冲液溶解，减少有机溶剂浓度**

优点：分辨率高且易去除，与pI同时使用，
用于酶粗分

缺点：对有机溶剂不稳定的酶，容易变性。

四、复合沉淀法

利用离子聚合物（SDS），非离子聚合物（单宁，聚乙二醇，聚乙烯亚胺，聚丙烯酸）等，在一定条件下与蛋白质直接或间接形成络合物，与酶蛋白一起沉淀，再用适当方法把酶溶解下来。

PEI (聚乙烯亚胺) + 菌体超声上清液 (酶)



0.2M KCl

(DNA)---PEI --- 杂蛋白质和酶沉淀



0.6M KCl

EcoRI(酶)被溶解下来 + (DNA)-PEI -杂蛋白沉淀,
不溶解

聚丙烯酸（PAA）等杂多酸，在低浓度时，选择性地与某种（某类）酶络合沉淀。作用机制还不清楚

PAA + 酶溶液（酶 + 杂蛋白）

↓ 溶菌酶，蛋白酶等

（PAA---酶）沉淀 + 杂蛋白（在溶液中）

↓ Ca^{++}

酶在溶液中 + （PAA--- Ca^{++} ）沉淀

↓ SO_4^{2-}

PAA + Ca SO_4^{2-} 沉淀

聚乙二醇（PEG）沉淀

为水溶性非离子型聚合物，方法同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，但与PEG分子量有关系。

优点：PEG对蛋白质活性构象起稳定作用。

缺点：PEG分子量大，溶液粘度大，操作难。

分子量小，用PEG多才能使蛋白质沉淀，PEG用后，要去除；

PEG价格很贵，不太用于大量样品。

常用PEG4000，6000。

五、选择性变性沉淀法

- **热变性**

利用生物大分子对热稳定性不同，加热升高温度使某些非目的生物大分子变性沉淀而保留目的物在溶液中。此方法最为简便，但分离效率较低，通常用于初期分离纯化

- **表面活性剂和有机溶剂变性**

不同蛋白质和酶等对于表面活性剂和有机溶剂的敏感性不同，使用它们可以使那些敏感性强的杂蛋白变性沉淀，而目的物仍留在溶液中。

- **选择性酸碱变性**

利用蛋白质和酶等对于溶液中酸碱不同、pH 值的稳定性不同而使杂蛋白变性沉淀，通常是在分离纯化流程中附带进行的一个分离纯化步骤。

第四节 离心分离

离心分离是借助于离心机旋转所产生的离心力，使不同大小、不同密度的物质分离的技术过程。

在离心分离时，要根据待分离物质以及杂质的**颗粒大小、密度和特性的不同**，选择适当的离心机、离心方法和离心条件。

一、离心机的种类与用途

转速分：常速（低速）、高速和超速

1、常速离心机

- $<8000\text{r/min}$, $\text{RCF} < 1 \times 10^4\text{g}$
- 用途：分离细胞、细胞碎片、培养基残渣及粗结晶等较大颗粒

2、高速离心机

- $(1\sim 2.5) \times 10^4 \text{ r/min}$, $\text{RCF } 1 \times 10^4 \sim 10^5\text{g}$
- 用途：分离各种沉淀物、细胞碎片及较大的细胞器等
- 高速冷冻离心机

3、超速离心机

- $2.5 \sim 12 \times 10^4$ r/min , RCF 5×10^5 g或更高
- 结构：离心管帽、冷冻装置和温控系统、真空系统、安全保护系统、制动系统、指示仪表等。
- 按用途分：
 - 制备用超速离心机：分离纯化生物大分子、细胞器和病毒等
 - 分析用超速离心机：测定样品纯度（根据紫外吸收率或折光率等判断）、沉降系数、相对分子量



左上：普通台式离心机。 左下：冷冻台式离心机。右：超速离心机。

离心管

- 材质：玻璃，塑料
- 强度：和离心速度相配
- 大小：和转子配套
- 高速超速管要加盖



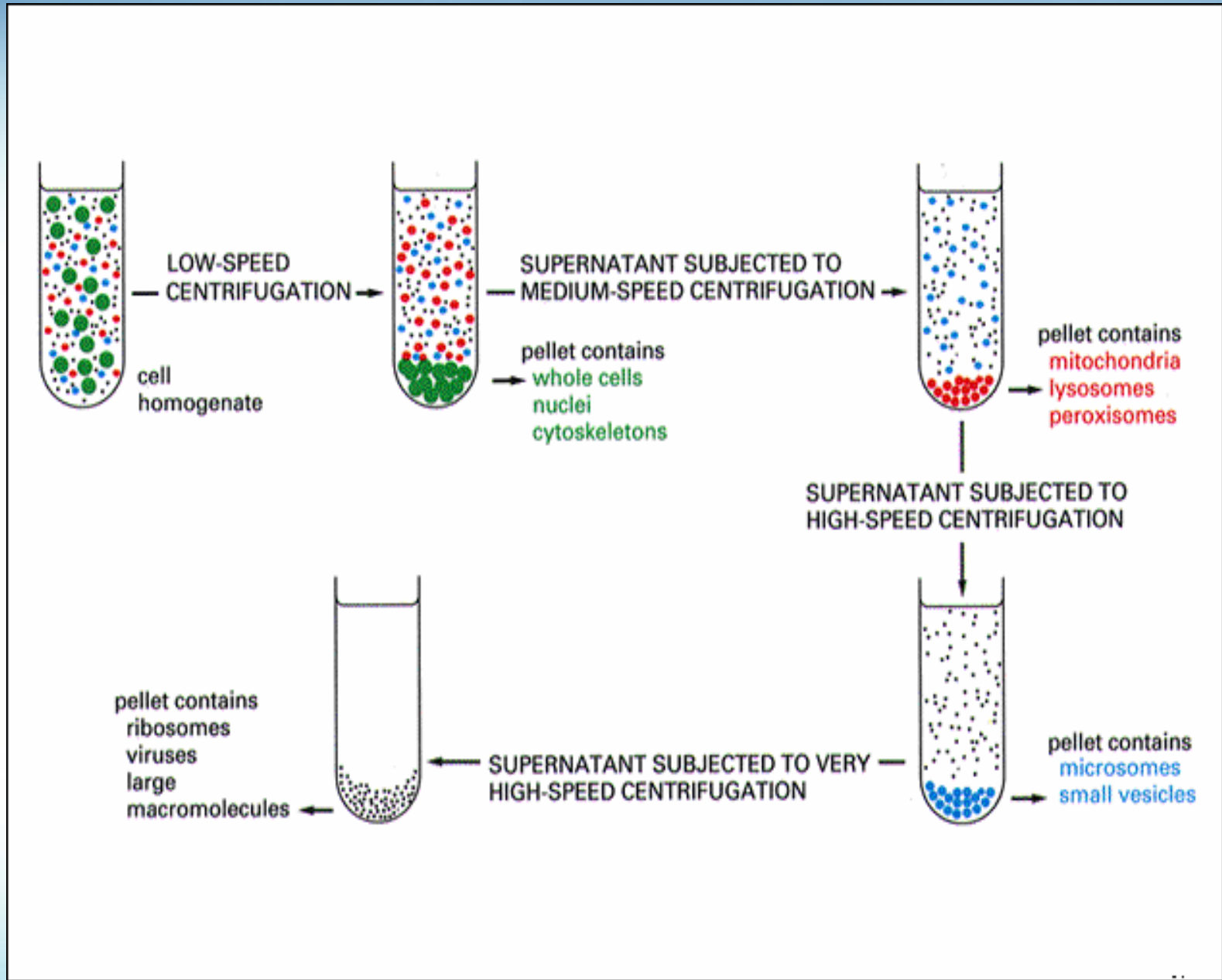
二、离心方法的选择

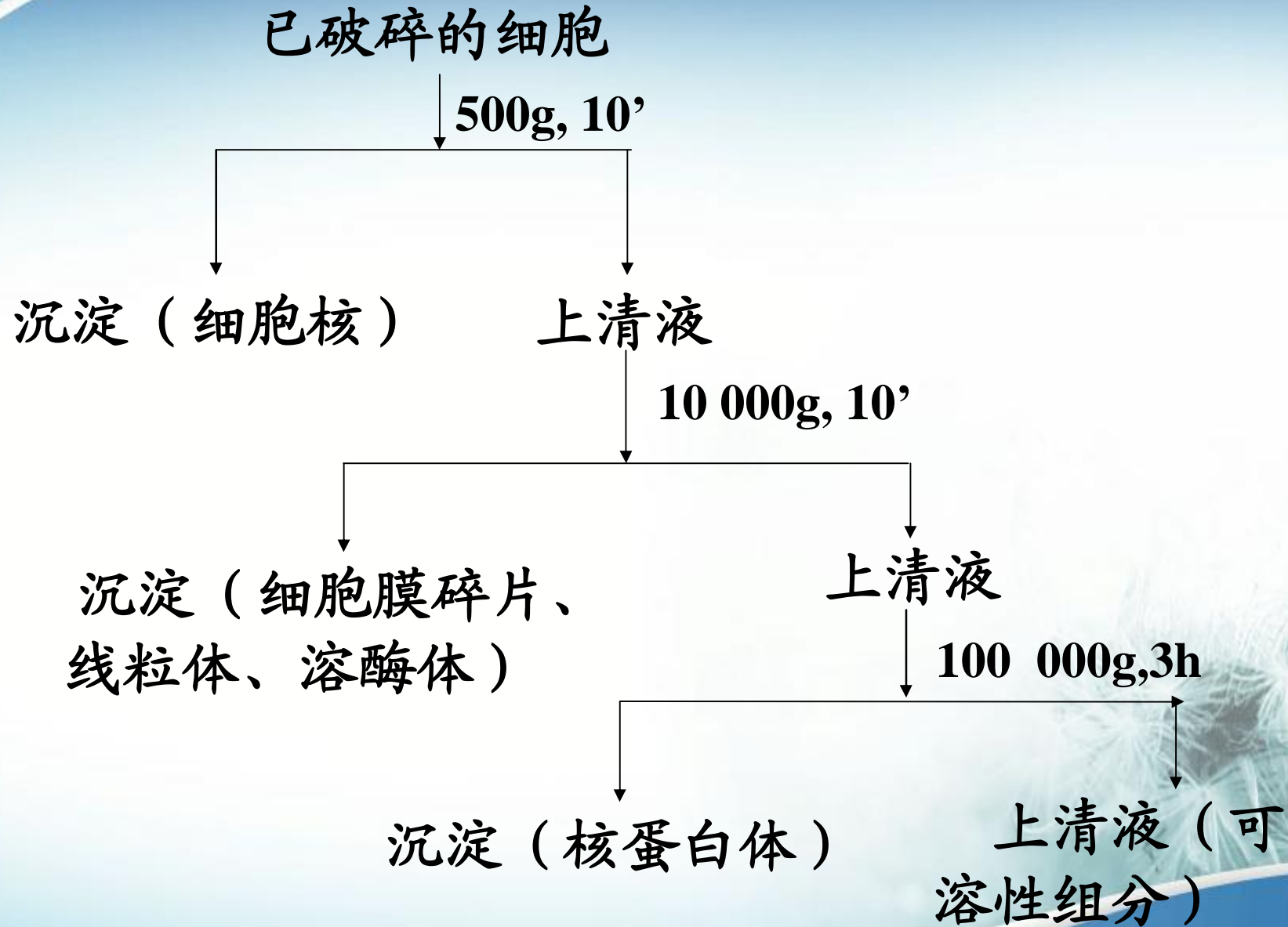
- 对于常速和高速离心机，由于所分离的颗粒大小和密度相差较大，只要选择好离心速度和时间，就能达到分离效果。
- 超速离心的方法：差速离心、密度梯度离心和等密度梯度离心

1、差速离心

- 采用不同的离心速度和离心时间，使沉降速度不同的颗粒分批分离的方法。主要用于分离大小和密度差异较大的颗粒。

差速离心分离示意图





2、密度梯度离心

- 样品在密度梯度介质中进行离心，使沉降系数比较接近的物质得以分离的一种区带分离方法。
- 密度梯度系统：梯度介质有足够大的溶解度，不与分离组分反应，不会引起分离组分的凝集、变性或失活。
- 常用介质：蔗糖、甘油等。
- 样品铺在密度梯度溶液表面，离心后形成若干条界面清楚的不连续区带。

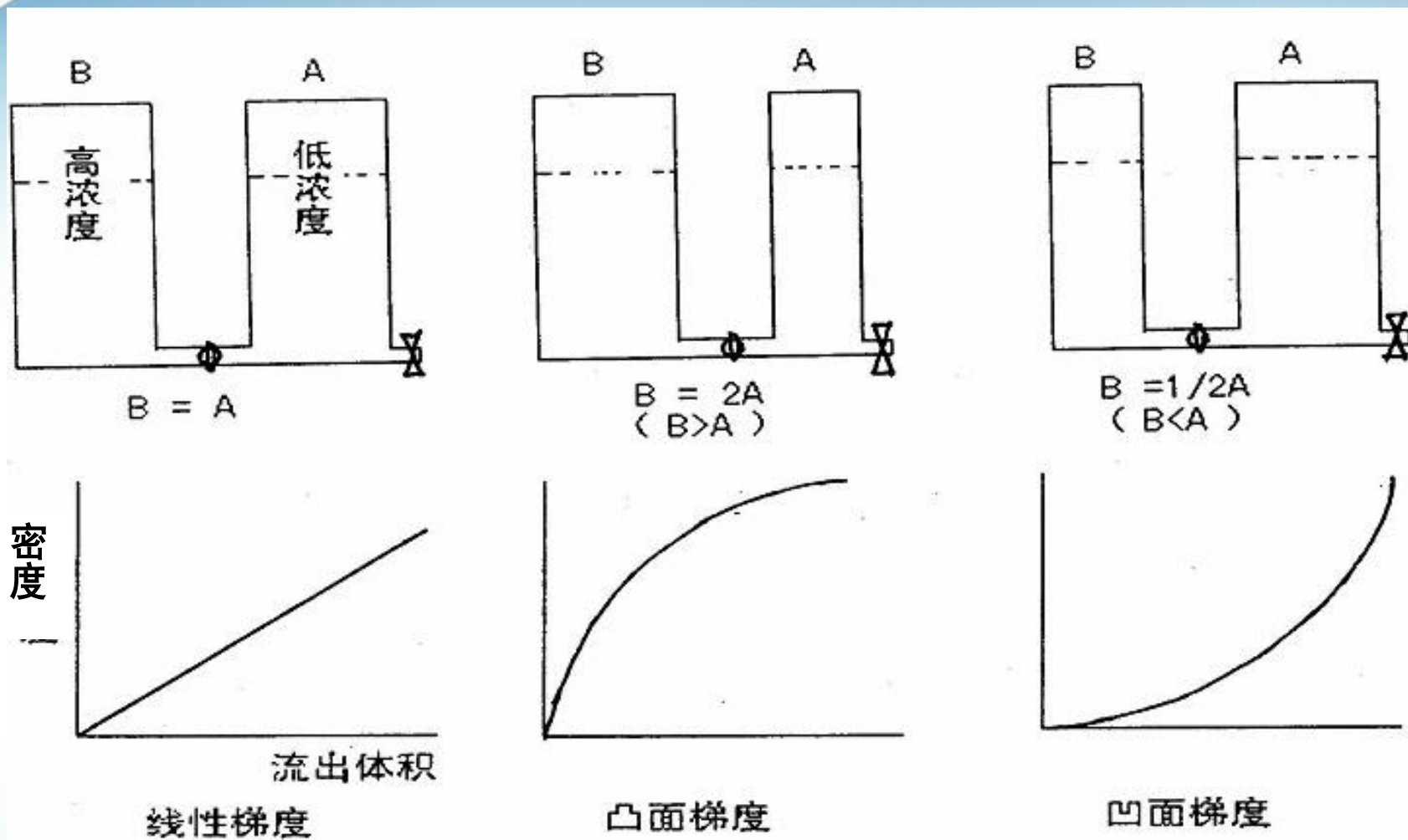


图4-1 三种梯度形成示意图

A: 混合室 (低浓度) B: 储液室 (高浓度)

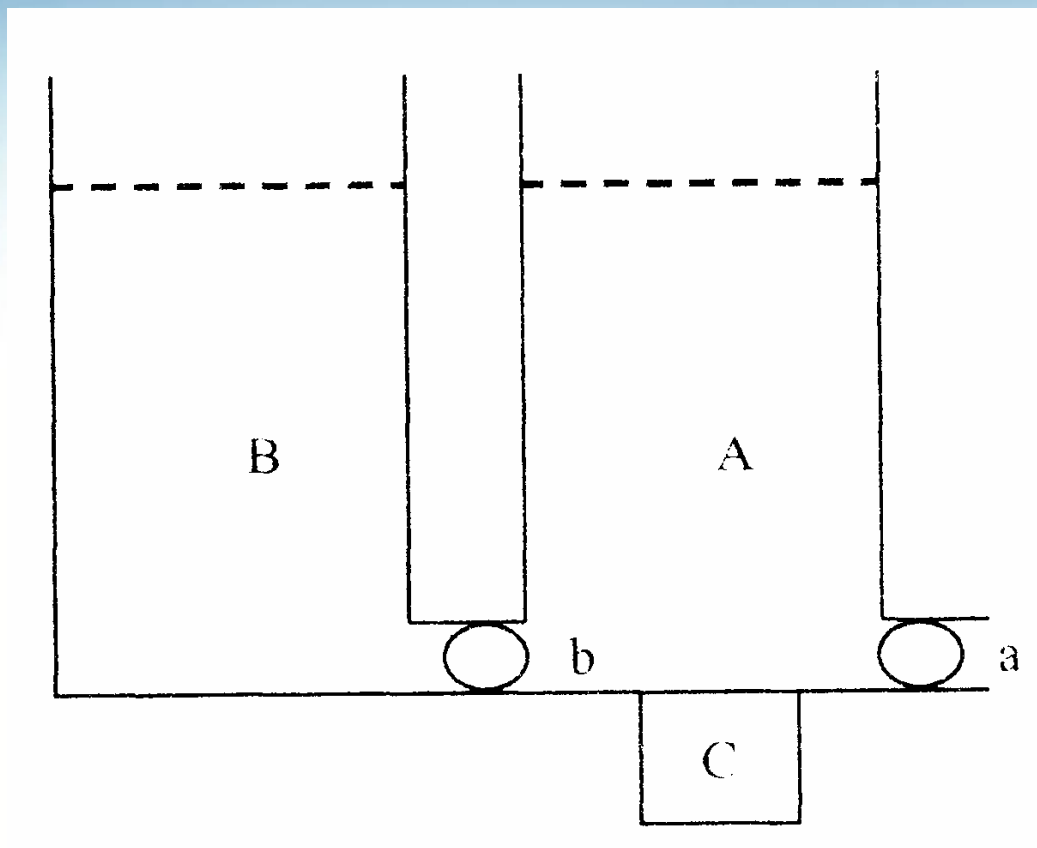
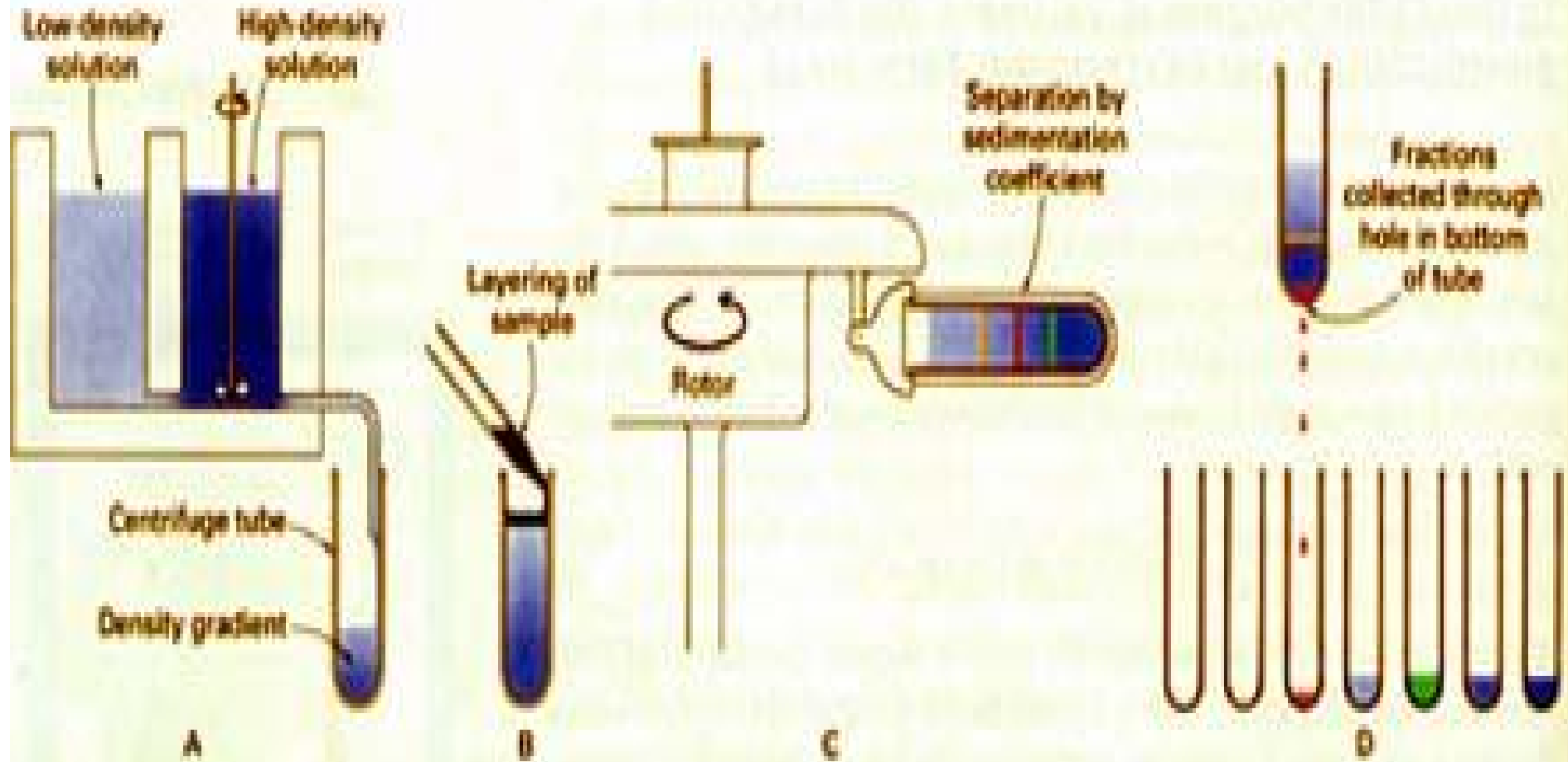


图4-2 梯度混合器示意图

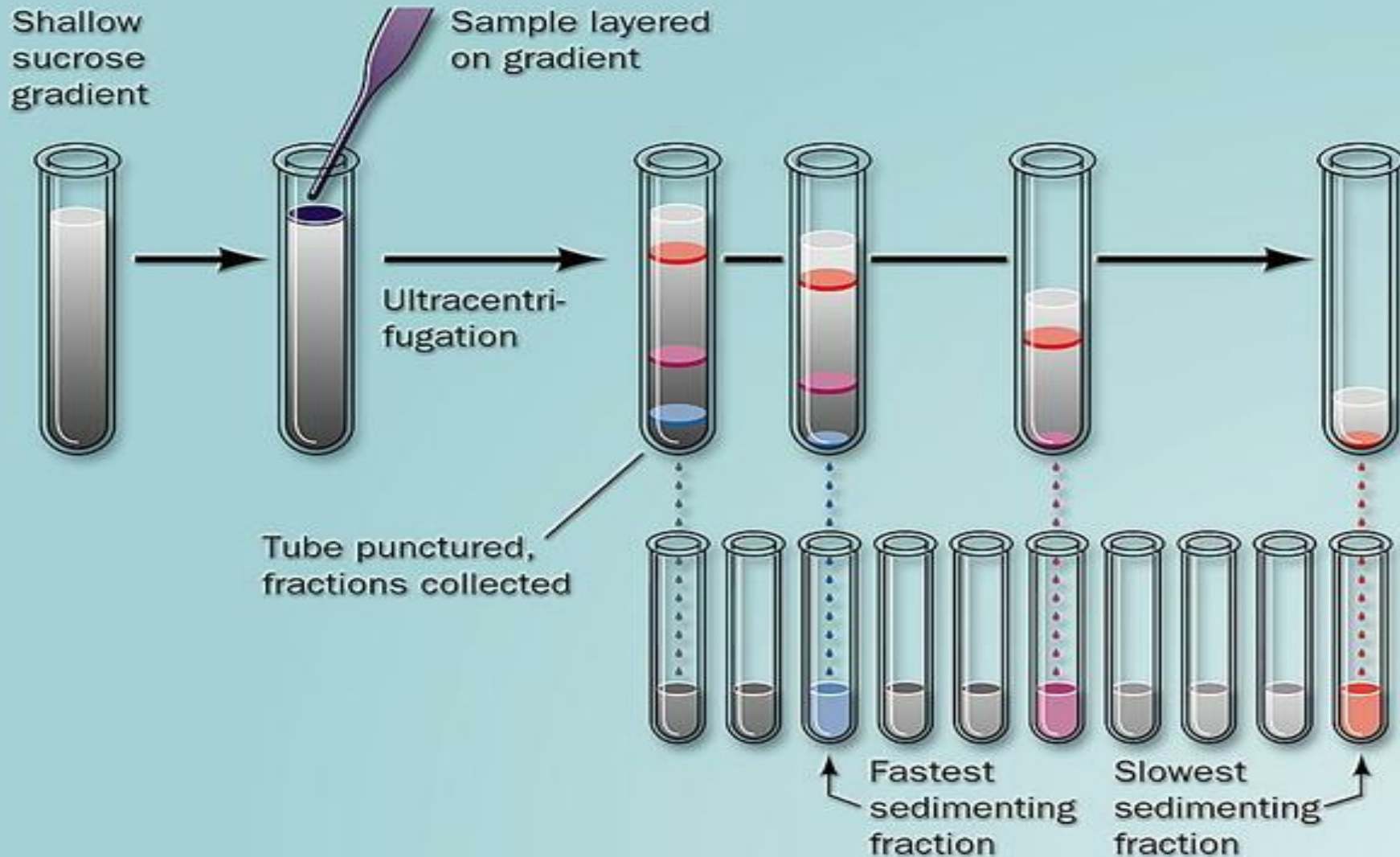
A: 混合室 B: 储液室 C: 磁力搅拌器 ○: 阀门

密度梯度离心



步骤： A.形成密度梯度 B.加样 C.离心 D.收集样品

Density gradient ultracentrifugation



3、等密度梯度离心

- 当待分离的不同颗粒的密度范围在离心介质的密度梯度范围内时，不同浮力密度的颗粒在离心力作用下一直移动到与各自浮力密度相等的位置（等密度点），形成区带。
- 等密梯度离心常用的介质：
 铯盐，如CsCl, Cs₂SO₄, CsBr
- 方法：一定浓度的介质溶液与样品液混合均匀
 一定量的铯盐加入样品液使之溶解

沉降速度离心和沉降平衡离心的特点

	密度梯度离心	等密度梯度离心
梯度介质	通常用蔗糖 最大的梯度密度 < 最小密度的沉降样品	通常用 CsCl 最大的梯度密度 > 密度最大的沉降样品
离心条件	在最前的沉降物质达到管底前停止，短时间，低速度	使各组分沉降到其平衡的密度区，长时间，高速度
分离依据	密度相近，但沉降系数不同	沉降系数相近，但密度不同

总结:

- **差速离心**是一种动力学方法，关键在于选择适合于各分离物的离心力。
- **等密梯度离心**是一种测定颗粒浮力密度的静力学方法，关键在于选择氯化铯浓度，使之包括待分离物的密度范围。
- **密度梯度离心**兼有以上两种方法的特点，关键在于制备优质的密度梯度溶液。

第五节 过滤与膜分离

过滤是借助于**过滤介质**将不同大小、不同形状的物质分离的技术过程。

过滤介质多种多样，常用的有滤纸、滤布、纤维、多孔陶瓷、烧结金属和各种高分子膜等，可以根据需要选用。

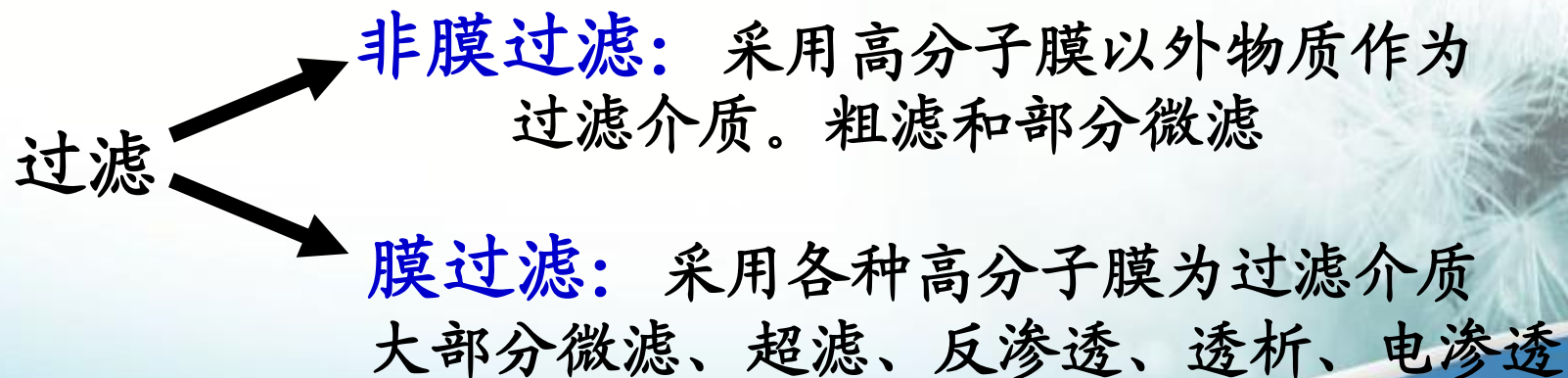


表4-4 过滤的分类及其特性

类别	截留的颗粒大小	截留的主要物质	过滤介质
粗滤	$>2 \mu\text{m}$	酵母、霉菌、动植物细胞、固形物	滤纸、滤布、纤维、多孔陶瓷
微滤	$0.2\sim 2 \mu\text{m}$	细菌、灰尘	多孔陶瓷、烧结金属微滤膜
超滤	$20\text{\AA}\sim 0.2 \mu\text{m}$	病毒、生物大分子	超滤膜
反渗透	$<20 \text{\AA}$	生物小分子、盐、离子	反渗透膜

根据过滤介质截留的物质颗粒大小不同

一、非膜过滤

1、粗滤

截留颗粒直径大于 $2\ \mu\text{m}$ ，用于分离酵母、霉菌、动植物细胞、培养基残渣等。过滤介质有滤纸、滤布、多孔陶瓷等

(1) 常压过滤 以液位差为推动力，易操作，分离效果差，难成规模。

(2) 加压过滤 以压力泵或压缩空气为推动力。效果较好，生产上应用广泛。

(3) 减压过滤 真空过滤、抽滤。多用于粘性不大的物料。

2、微滤

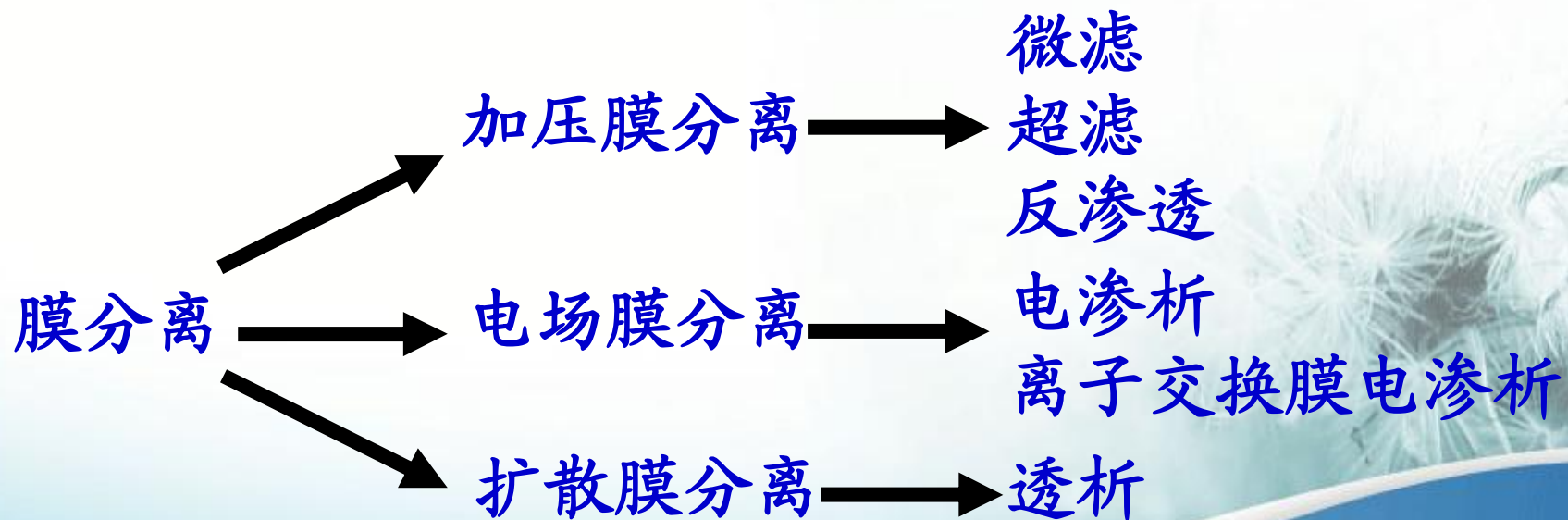
微孔过滤，截留颗粒直径 $0.2\sim 2\ \mu\text{m}$ ，光学显微镜可见颗粒，采用微孔陶瓷、烧结金属等。

二、膜分离技术

借助于一定孔径的各种高分子薄膜，将不同大小、不同性状和不同特性的物质颗粒或分子分离的技术。薄膜有丙烯腈、醋酸纤维素、硝酸纤维素、赛璐玢及尼龙等高分子聚合物制成的高分子膜。

膜分离过程中，薄膜的作用是选择性地让小于其孔径的物质颗粒或分子通过，而把大于其孔径的颗粒截留。膜的孔径有多种规格可供使用时选择。

根据颗粒或分子通过薄膜的原理和推动力不同分三类



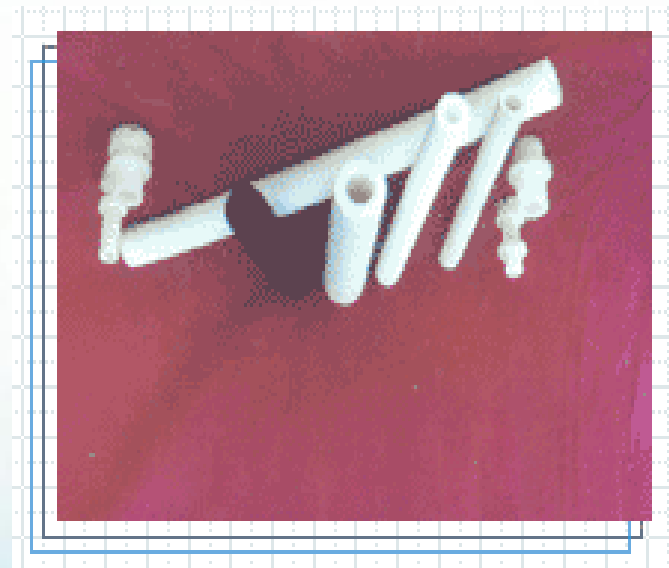
1、加压膜分离

以薄膜两边的流体静压差为推动力；
根据截留的颗粒大小可分为3种；

(1) 微滤(Microfiltration, MF)

截留的物质颗粒直径
为 $0.2\sim 2\ \mu\text{m}$ ，操作压
力 0.1MPa 以下。

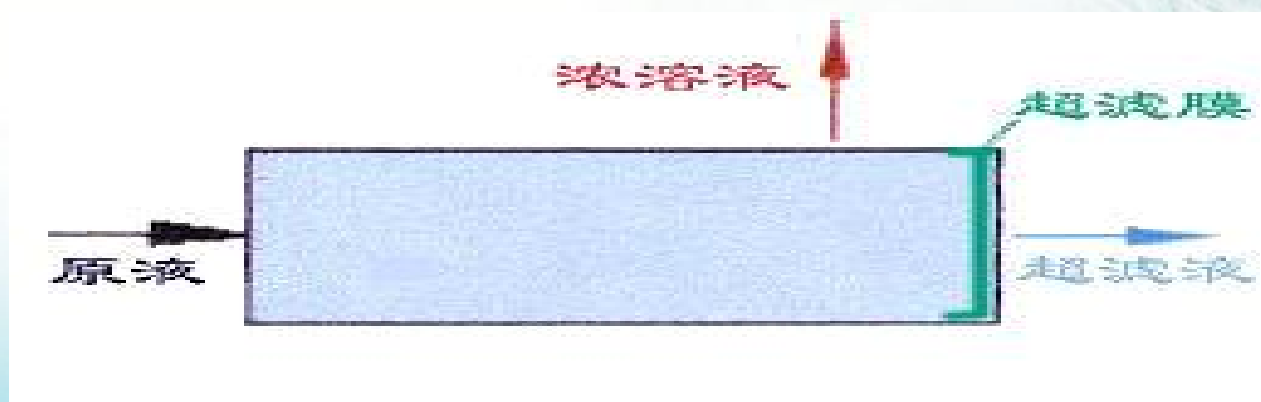
MEF微滤器

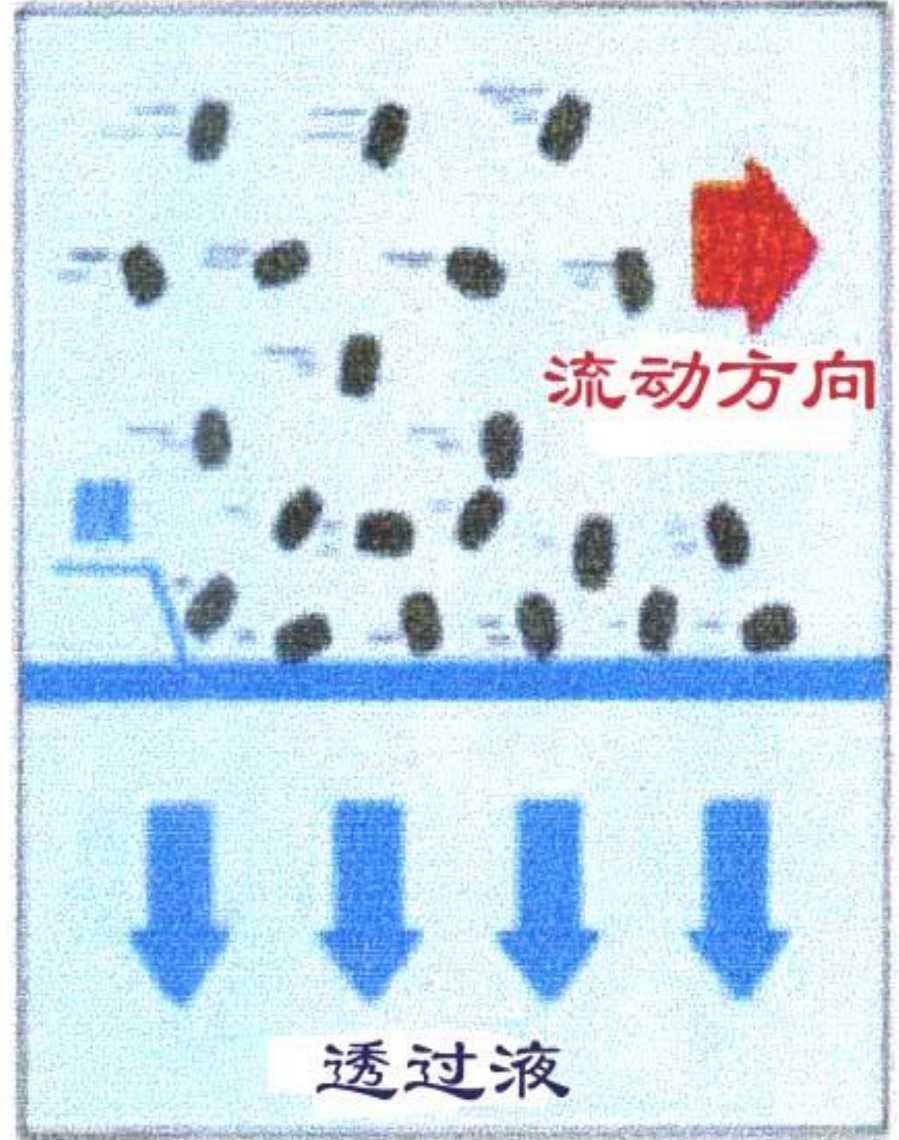
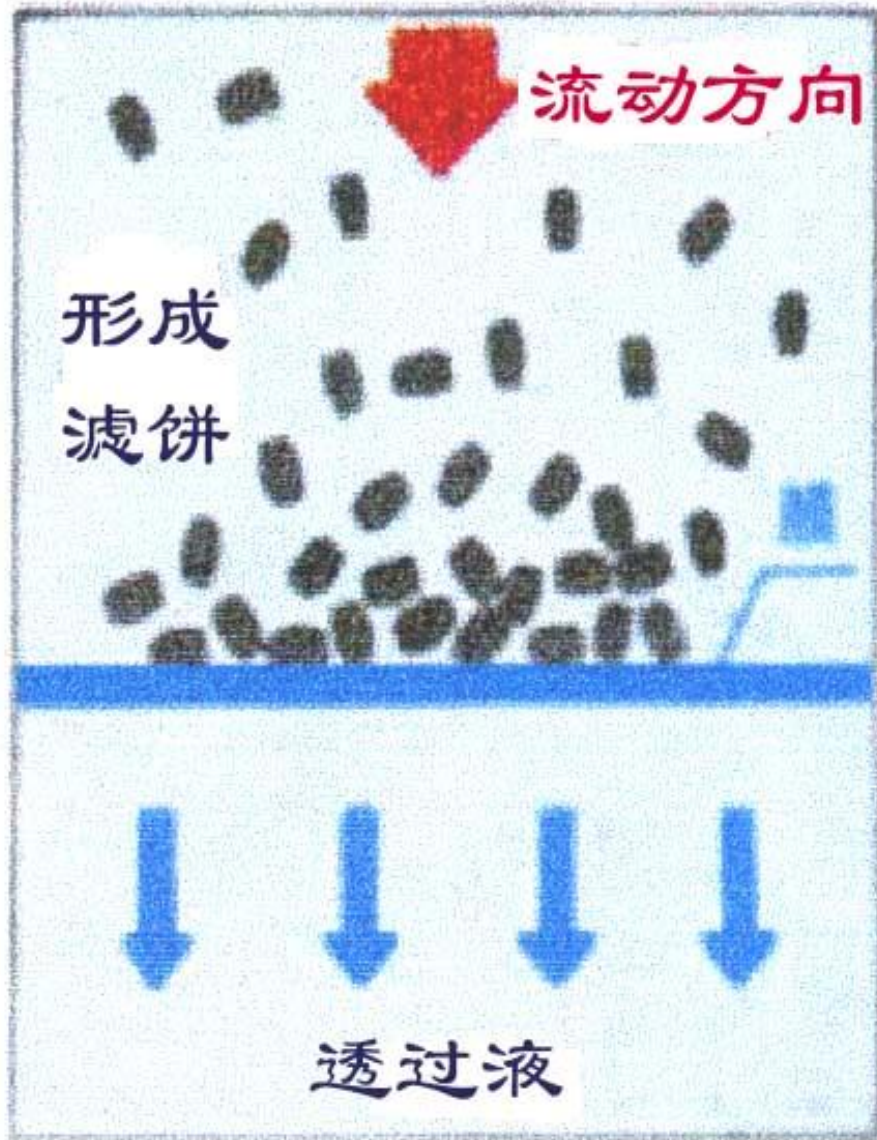


(2) 超滤(ultrafiltration, UF)

一种动态过程，由**泵提供推动力**，在膜表面产生两个分力：一个是垂直于膜面的法向分力，使水分子透过膜面，另一个是于膜面平行的切向力，把膜面截流物冲掉。

- ┆ 溶液中大分子滞留，而小分子及溶剂滤过
- ┆ 广泛应用于蛋白质溶液除盐、浓缩及分离纯化





A

B

常规过滤(A)和超滤(B)的示意图

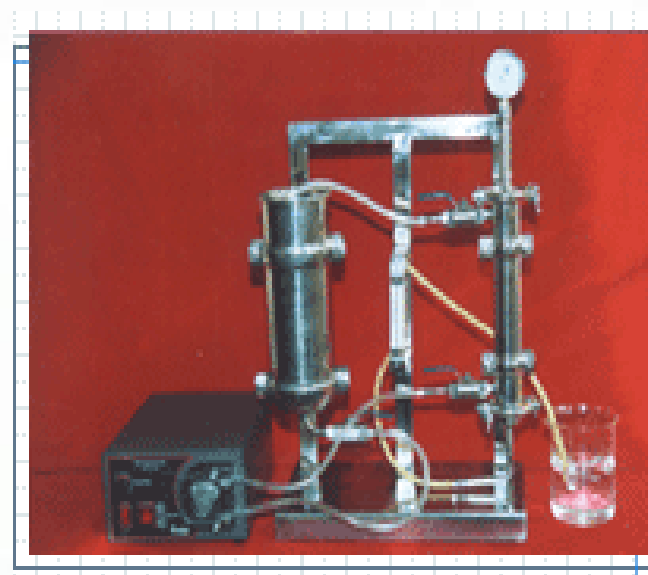
截留颗粒直径：20~2000Å (0.2 μm)

可同时截留菌丝体和可溶性蛋白

操作压力：0.1~0.7MPa

特别适于液体酶制剂的生产

不适用于需要辅酶的酶的生产

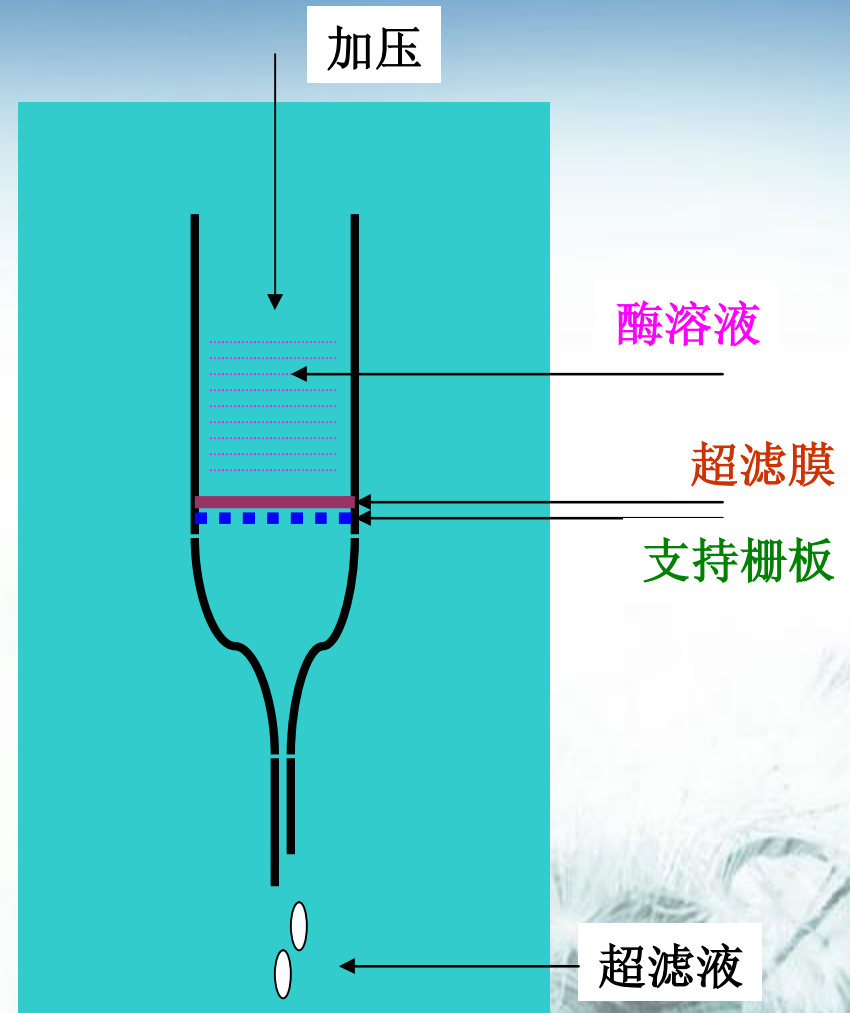
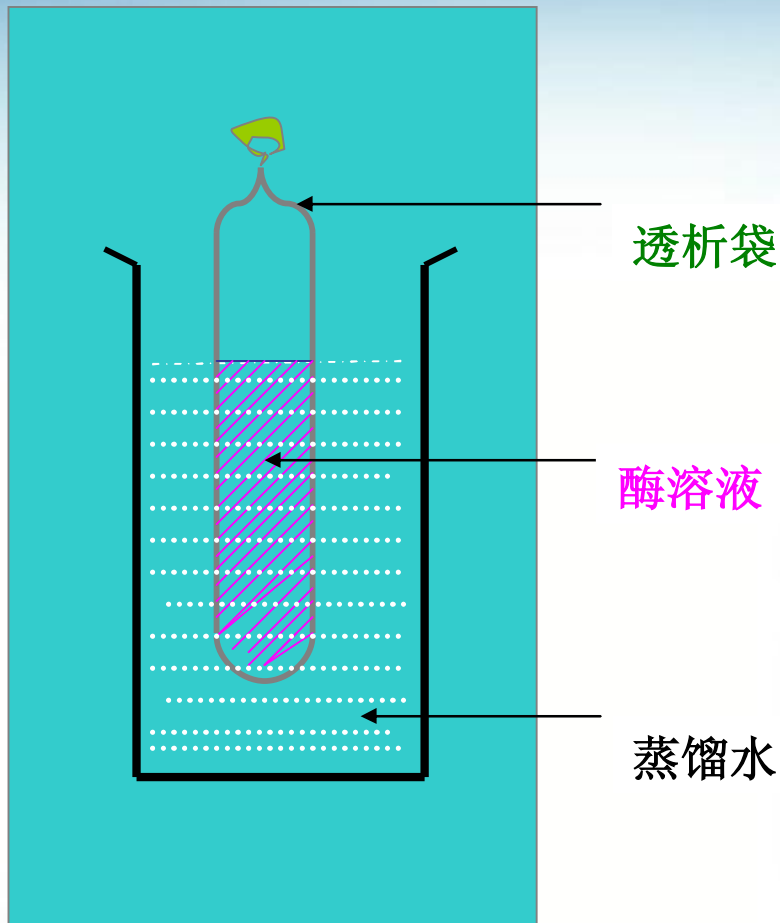


SHM系列膜分离装置

【截留分子量】：300~50000道尔顿

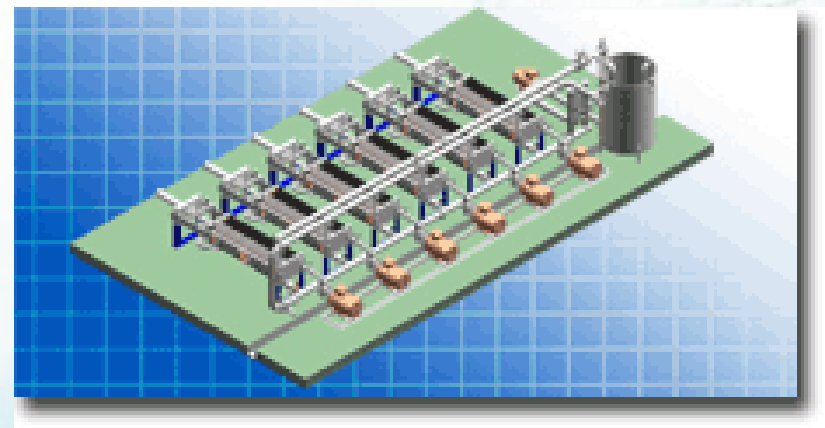
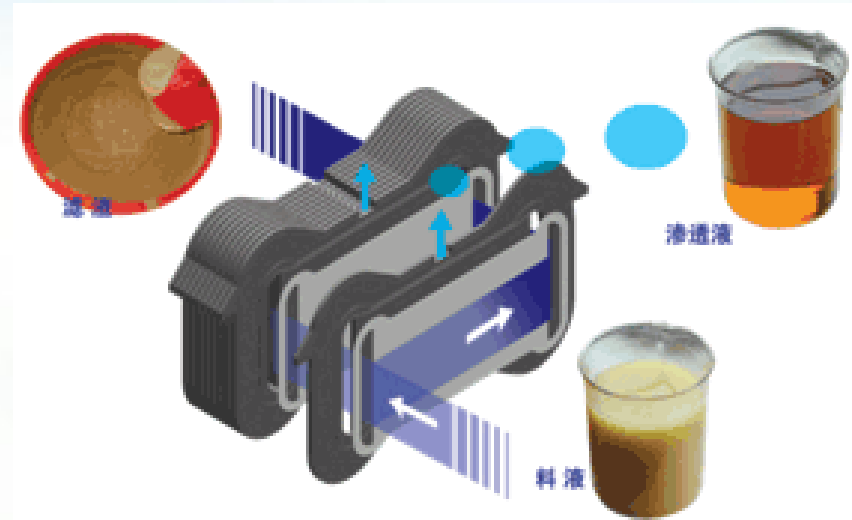
【操作压力】：0.1~0.2Mpa

【操作温度】：20~50℃。



透析与超滤简易装置

- 超乎寻常的膜通量，且维持恒定
- 适合处理高粘度、高含固量料液
- 浓缩倍数极高，可使浓缩液呈糊状
- 消除浓差极化，不易堵塞，易清洗
- 系统可逐级拓展，中试结果完全适用于生产规模



(3) 反渗透 (Reverse osmosis, RO)

【反渗透膜】

【截留颗粒直径】：< 20Å

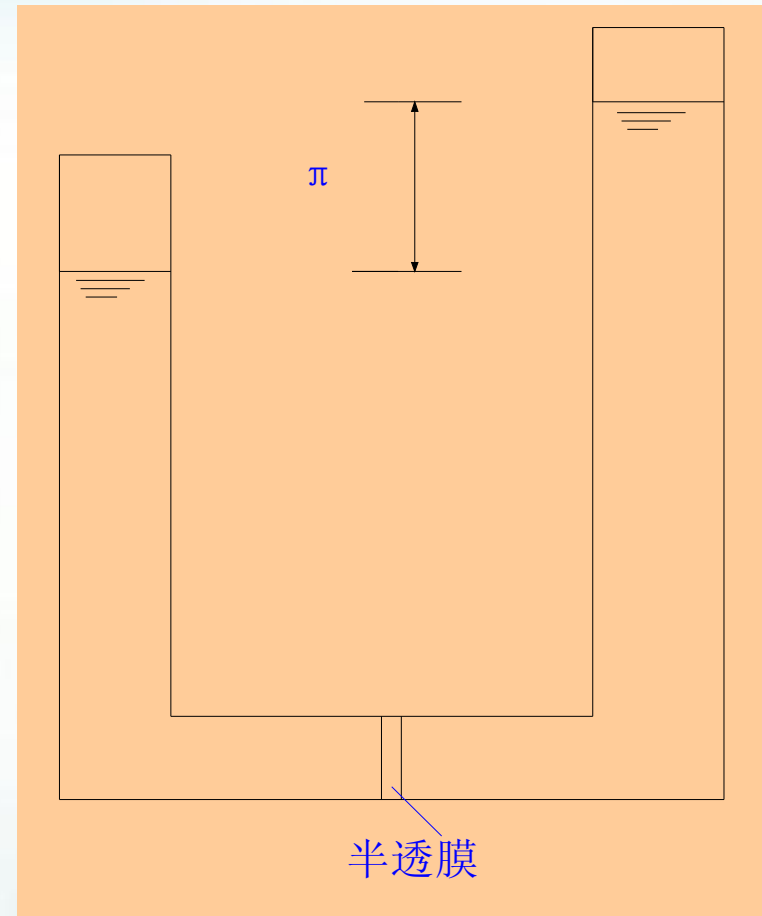
【截留分子量】：< 1000道尔顿

【操作压力】：0.7~13 MPa

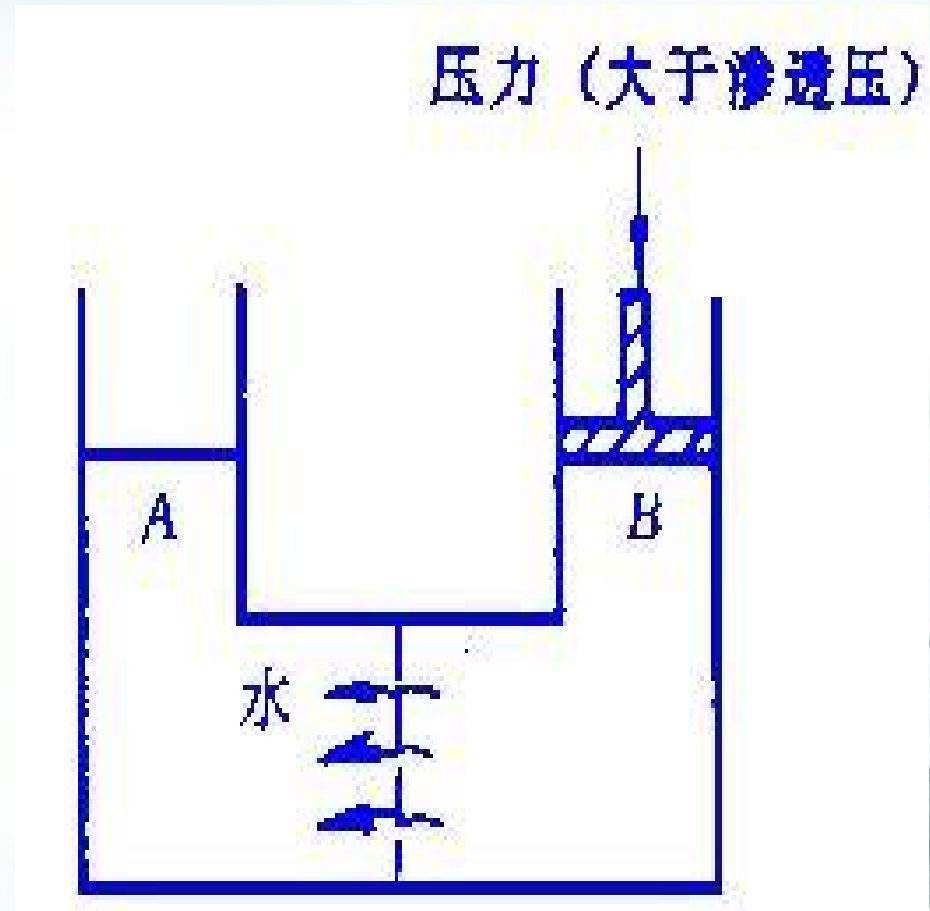
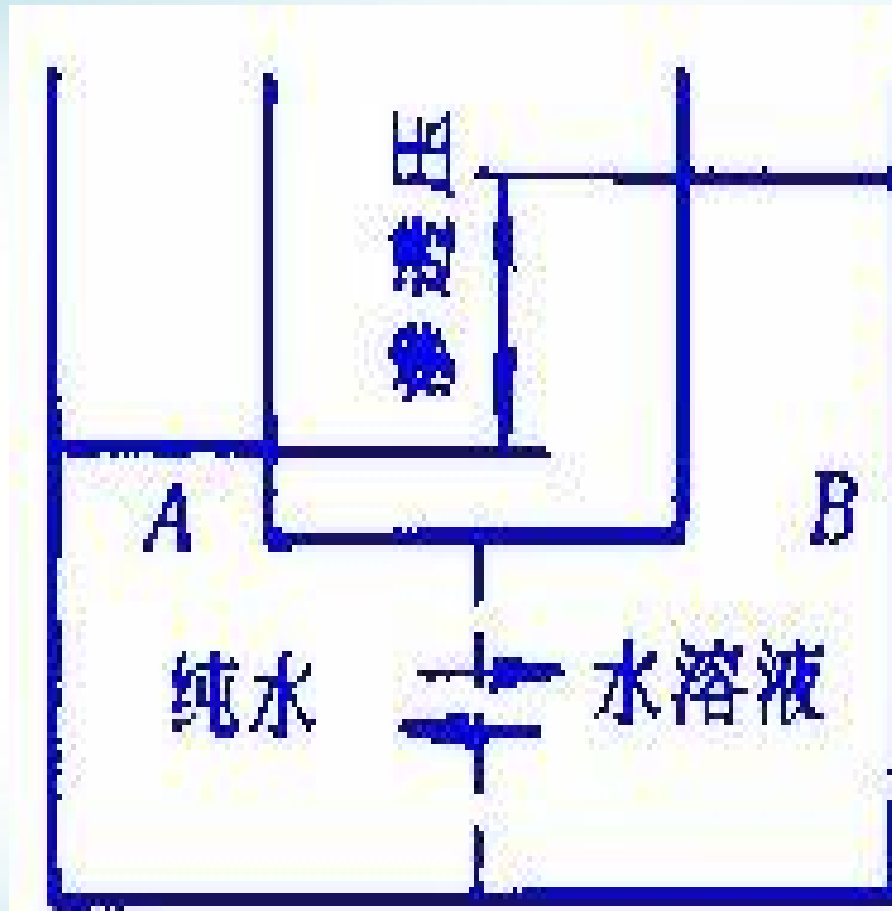
【用途】：分离各种离子和小分子物质
海水淡化、无离子水制备



利用反渗透膜选择性地**只能透过溶剂(通常是水)**的性质，对溶液施加压力，使溶剂通过反渗透膜（其他无机盐、微生物与有机物等由于反渗透膜截留特性而不能透过膜）而从溶液中分离出来的过程。



渗透与反渗透

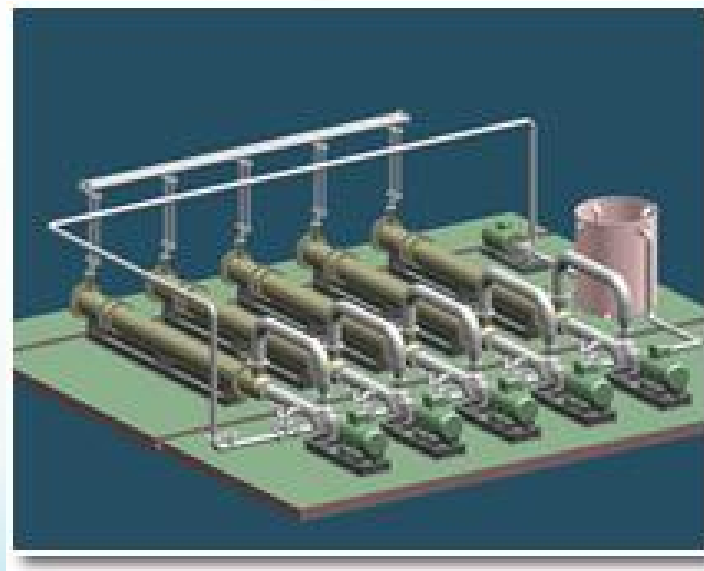


金属膜

在较宽的化学条件、
压力和温度范围内运行。

具有较优良的机械强
度和稳定性，在使用过程
中不易破裂。

组件可在高达 350°F
(177°C) 的温度下长期
使用。



陶瓷膜 (无机膜)

无机膜具有耐高温、耐化学腐蚀、机械强度高、抗微生物能力强、渗透量大、可清洗性强、孔径分布窄、分离性能好和使用寿命长等特点;

过滤孔径一般在 $0.01\ \mu\text{m}$ - $4\ \mu\text{m}$ 之间选择; 通常是一个微滤过程;

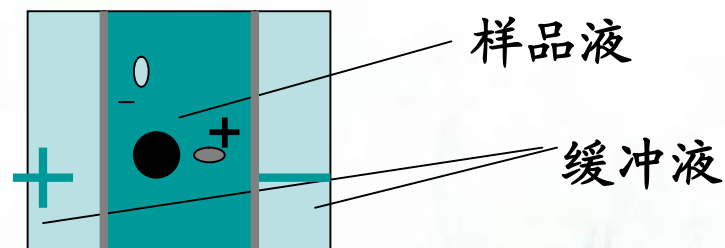
茶汁类高温的澄清过滤过程;
葡萄酒、生啤酒的澄清过滤;
牛奶的澄清过滤;
果汁澄清;



2、电场膜分离

在半透膜的两侧分别装上正负极，电场作用下小分子带电物或离子向与其本身电荷相反的电极移动，透过半透膜，达到分离目的。

(1) 电渗析



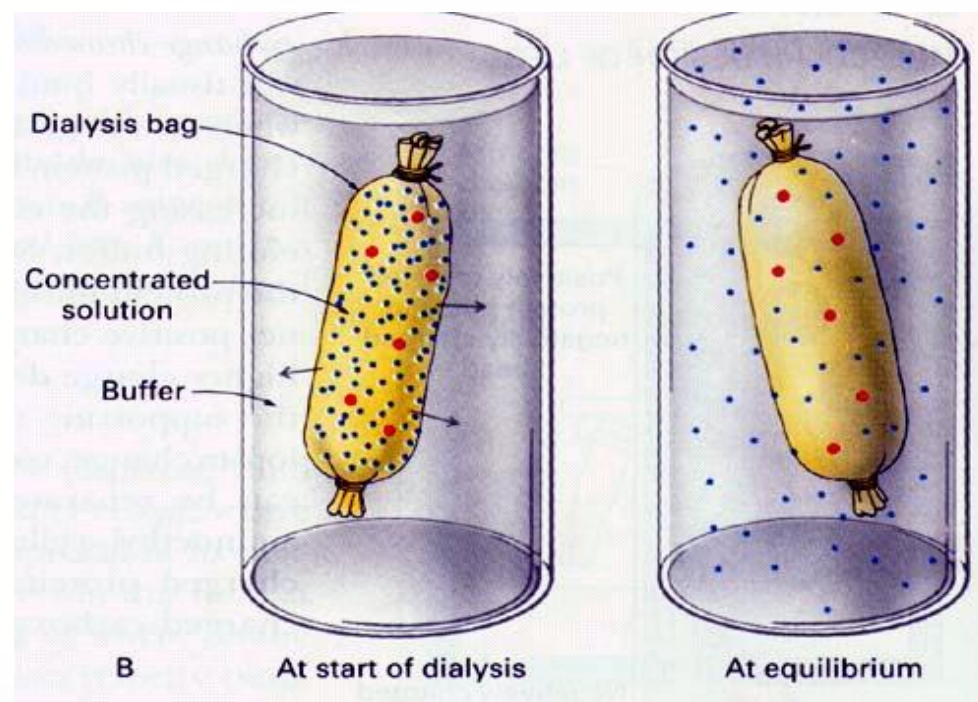
(2) 离子交换膜电渗析

离子交换膜代替一般半透膜

应用：脱盐，海水淡化，纯水制备，从发酵液中分离柠檬酸、谷氨酸及凝胶电洗脱。

3、扩散膜（透析dialysis）分离

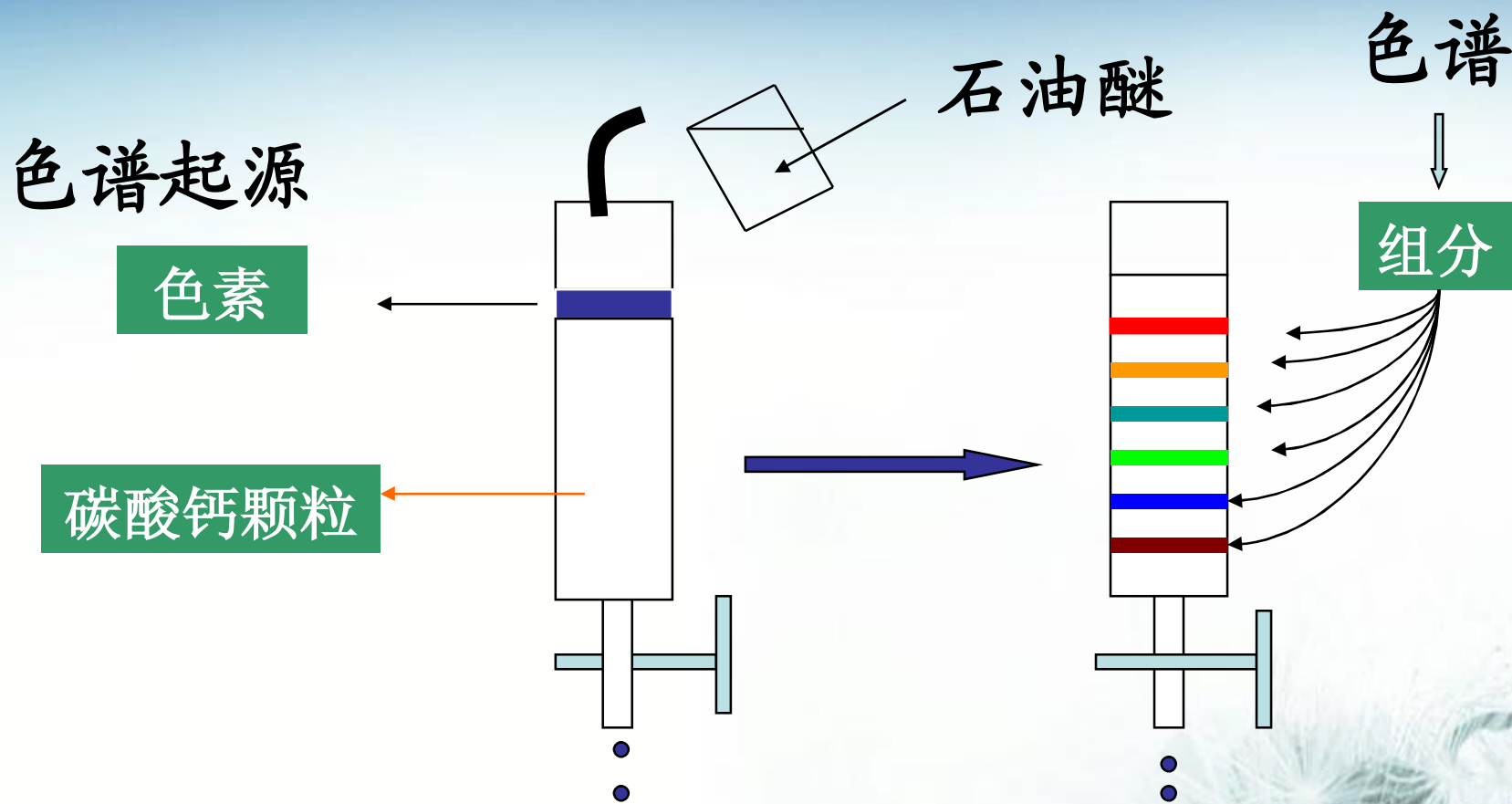
主要指透析；利用小分子扩散作用透过半透膜，而大分子被截留；用于酶、蛋白质、核酸等生物大分子的分离。透析设备简单，但操作时间长，要更换水或缓冲液。



第六节 层析分离

层析技术，亦称色谱技术，是一种物理的分离方法。利用混合物中各组分的物理化学性质的差别，使各组分以不同程度分布在两个相中，其中一个相为固定的(称为固定相)，另一个相则流过固定相(称为流动相)并使各组分以不同速度移动，从而达到分离。

色谱起源



用色彩（chroma）和图谱（graphs）
组成色谱一词（Chromatography）。

固定相(stationary phase)

是层析的一个基质。它可以是固体物质（如吸附剂，凝胶，离子交换剂等），也可以是液体物质（如固定在硅胶或纤维素上的溶液），这些基质能与待分离的化合物进行可逆的吸附，溶解，交换等作用。它对层析的效果起着关键的作用。

流动相 (mobile phase)

在层析过程中，推动固定相上待分离的物质朝着一个方向移动的液体、气体或超临界体等，都称为流动相。柱层析中一般称为洗脱剂，薄层层析时称为展层剂。它也是层析分离中的重要影响因素之一。

层析床:

把固定相填入一个玻璃或金属柱中，或涂布一层于玻璃或塑料片上，或者吸附在醋酸纤维素纸上。

运送系统: 用来促使流动相通过层析床。

检测系统: 用于检测已分离的物质。



层析设备

层析装置:

- 丨 梯度混和器
- 丨 蠕动泵
- 丨 层析柱
- 丨 监测仪
- 丨 记录仪
- 丨 收集器



低温层析柜

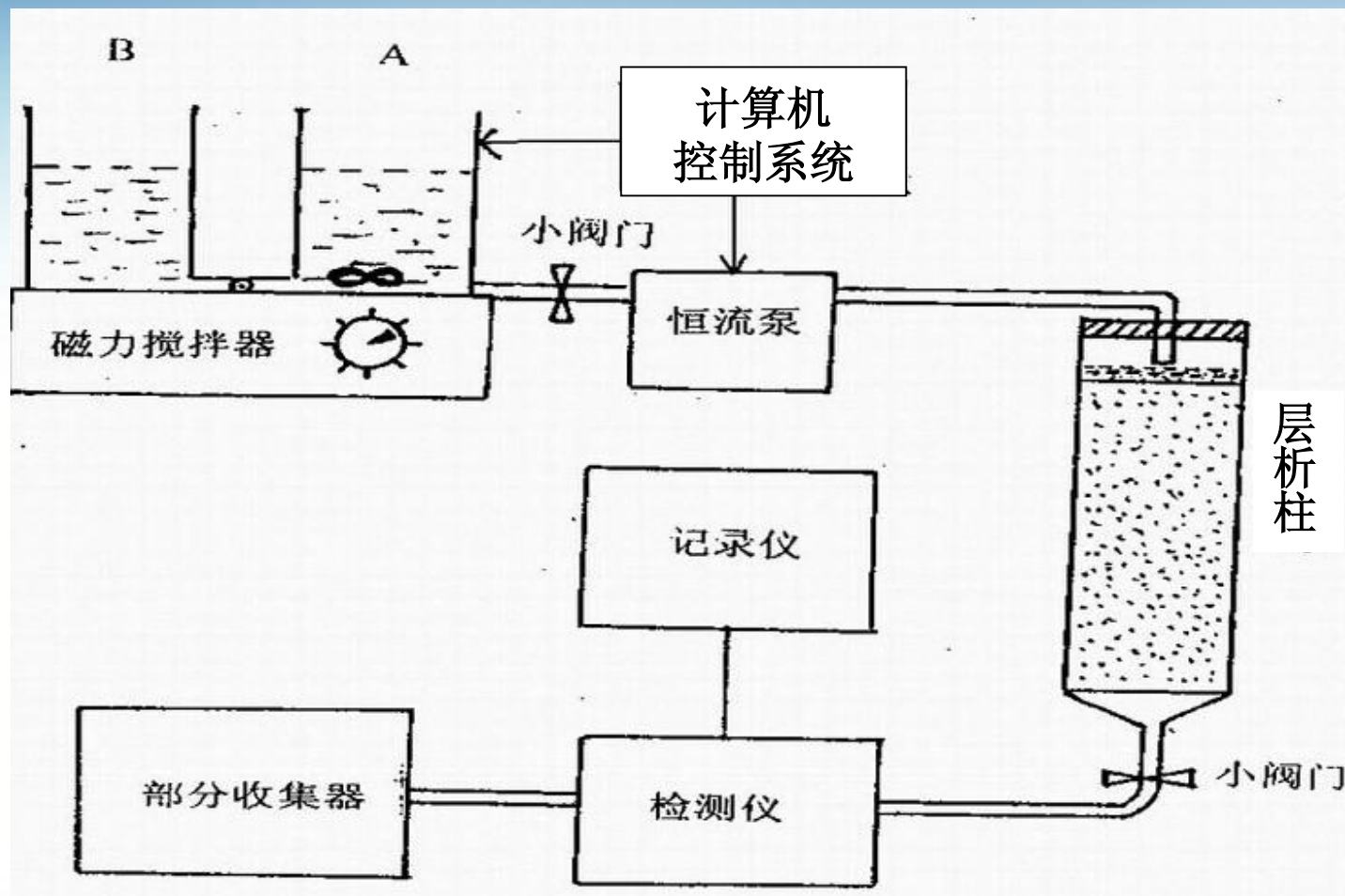
根据**固定相基质**的形式分类：

纸层析、薄层层析、柱层析

纸层析是指以滤纸作为基质的层析。

薄层层析是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。

柱层析则是指将基质填装在管中形成柱形，在柱中进行层析。



柱层析的基本装置



柱层析的基本操作

- (1) 装柱
 - ① 层析柱选择
 - ② 基质的处理
 - ③ 装柱
- (2) 上样
- (3) 洗脱
- (4) 收集
- (5) 基质再生

根据**流动相**的形式分类：
液相层析、气相层析

液相层析指流动相为液体的层析，而**气相层析**是指流动相为气体的层析。

气相层析测定样品时需要气化，大大限制了其在生化领域的应用，主要用于氨基酸、核酸、糖类、脂肪酸等小分子的分析鉴定。而**液相层析**是生物领域最常用的层析形式，适于生物样品的分析、分离。

按操作形式分类

名称	操作形式
柱层析	固定相装于柱内，使样品沿一个方向前移而达分离。
薄层层析	适当粘度的固定相均匀涂铺于薄板，点样后用流动相展开，使各组份分离。
纸层析	用滤纸作液体的载体，点样后用流动相展开，使各组份分离。
薄膜层析	将适当的高分子有机吸附剂制成薄膜，以类似纸层析方法进行物质的分离。

根据分离的原理不同分类

表4-5

层析方法	分离原理
吸附层析	利用吸附剂对不同物质的 吸附力 不同而使混合物中各组分分离
分配层析	利用各组分在两相中的 分配系数 不同，而使各组分分离
离子交换层析	利用离子交换剂上的可解离基团（活性基团） 对各种离子的亲和力 不同而达到分离目的
凝胶层析	以各种多孔凝胶为固定相，利用流动相中所含各种组分的 相对分子质量 不同而达到物质分离
亲和层析	利用生物分子与配基之间所具有的 专一而又可逆的亲和力 ，使生物分子分离纯化
层析聚焦	将酶等两性物质的 等电点特性 与离子交换层析的特性结合在一起，实现组分分离

吸附层析: 以吸附剂为固定相, 根据待分离物与吸附剂之间吸附力不同而达到分离目的的一种层析技术。

分配层析: 根据在一个有两相同时存在的溶剂系统中, 不同物质的分配系数不同而达到分离目的的一种层析技术。

凝胶过滤层析: 是以具有网状结构的凝胶颗粒作为固定相, 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：以离子交换剂为固定相，根据物质的带电性质不同而进行分离的一种层析技术。

亲和层析：根据生物大分子和配体之间的特异性亲和力（如酶和抑制剂、抗体和抗原、激素和受体等），将某种配体连接在载体上作为固定相，而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。亲和层析是分离生物大分子最为有效的层析技术，具有很高的分辨率。

一、吸附层析

吸附层析是利用吸附剂对不同物质的**吸附力**不同而使混合物中各组分分离的方法。吸附层析是各种层析技术中应用最早的技术。

吸附剂与被吸附物之间的相互作用力主要是**范德华力**，其特点是**可逆**的。

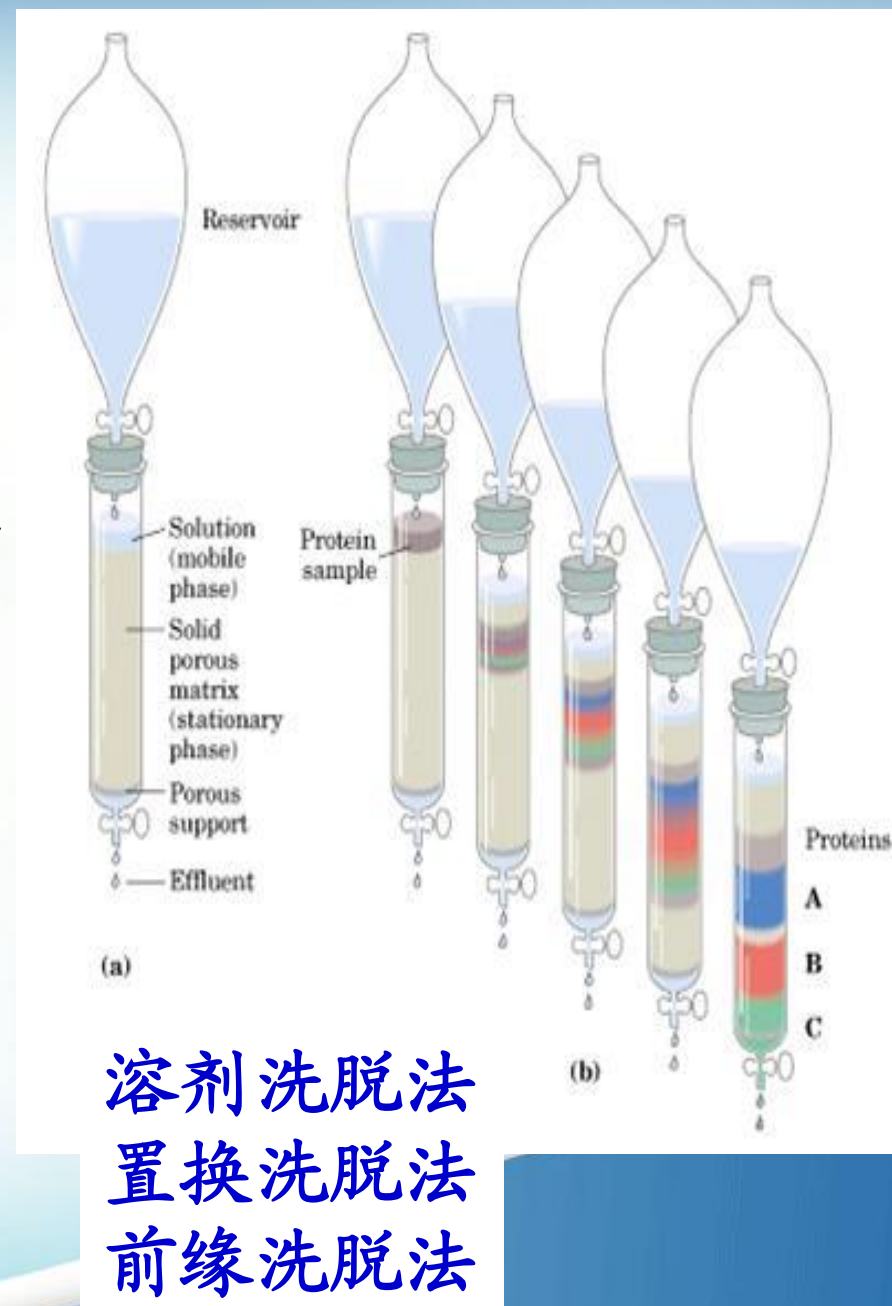
吸附剂来源丰富、价格低廉、可再生，吸附设备简单。

吸附层析通常采用柱型装置，将吸附剂装在吸附柱中，装置成**吸附层析柱**。

层析时，欲分离的混合溶液自柱顶加入，当样品液全部进入吸附层析柱后，再加入洗脱剂解吸洗脱。

在洗脱时，层析柱内不断发生解吸、吸附、再解吸、再吸附的过程。

吸附力弱、解析力强的物质移动快



溶剂洗脱法
置换洗脱法
前缘洗脱法

二、分配层析

分配层析是利用各组分在两相中的分配系数不同，而使各组分分离的方法。

分配系数是指在一定的条件下，某种组分在固定相和流动相中含量（浓度）的比值，常用K来表示。分配系数是层析中分离纯化物质的主要依据。

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

在**分配层析**中，通常采用一种多孔性固体支持物（如滤纸、硅藻土、纤维素等）吸着一种溶剂为**固定相**，这种溶剂在层析过程中始终固定在多孔支持物上。另一种与固定相溶剂互不相溶的溶剂可沿着固定相流动，称为**流动相**。当某溶质在流动相的带动流经固定相时，该溶质在两相之间进行连续的动态分配。

(一) 纸层析 (paper chromatography, PC)

以滤纸作为支持物的分配层析

固定相: 滤纸纤维及其结合的 H_2O (氢键结合)

流动相: 有机溶剂

层析过程中发生两种作用:

- ① 溶质在结合于纤维上的水与流过滤纸的有机相进行分配 (液-液分离) ;
- ② 滤纸纤维对溶质的吸附及溶质溶解于流动相的不同分配比进行分配 (固-液分离)

(二) 薄层层析 (thin-layer chromatography, TLC)

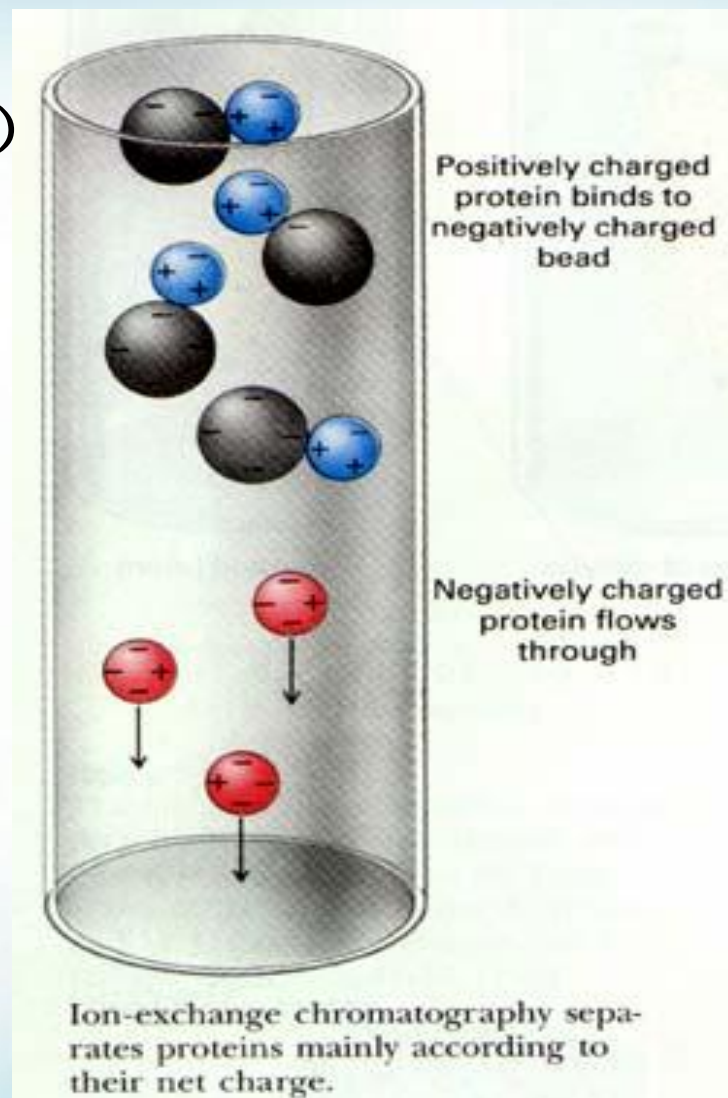
在玻璃板上涂布一层支持剂，待分离样品点在薄层板一端，然后在密闭容器中使用适当的溶剂系统进行展层，从而使各组分得以分离的物理方法。

支持剂：硅胶G、硅胶GF、氧化铝、纤维素、硅藻土、硅胶G硅藻土、纤维素G、DEAE-纤维素、交联葡聚糖凝胶等

三、离子交换层析

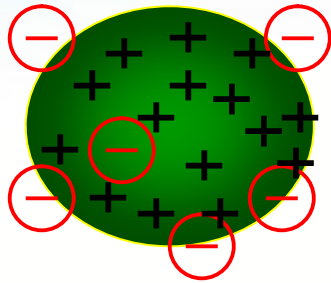
(ion exchange chromatography, IEC)

离子交换层析是利用离子交换剂上的可解离基团（活性基团）对各种离子的亲和力不同（待分离物质带电性质不同）而达到分离目的的一种层析分离方法。

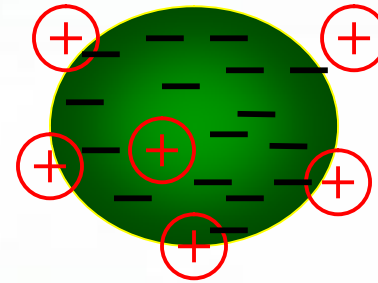


离子交换剂是含有若干活性基团的不溶性高分子物质。通过在不溶性高分子物质（母体）上引入若干可解离基团（活性基团）而制成。

按活性基团的性质不同，离子交换剂可以分为**阳离子交换剂**和**阴离子交换剂**。由于酶分子具有两性性质，所以可用阳离子交换剂，也可用阴离子交换剂进行酶的分选纯化。



阴离子交换剂
(可吸附带负电的蛋白质)

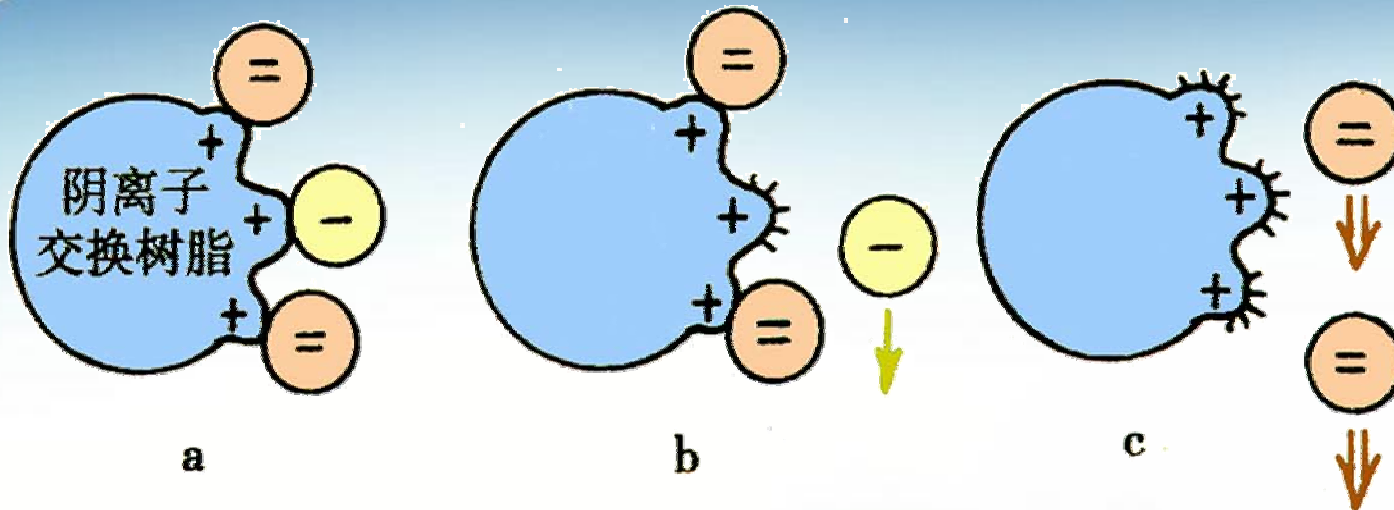


阳离子交换剂
(可吸附带正电的蛋白质)

离子交换纤维素：是纤维素作为母体，引入相应的交换基团，蛋白质不容易变性，交换容量大

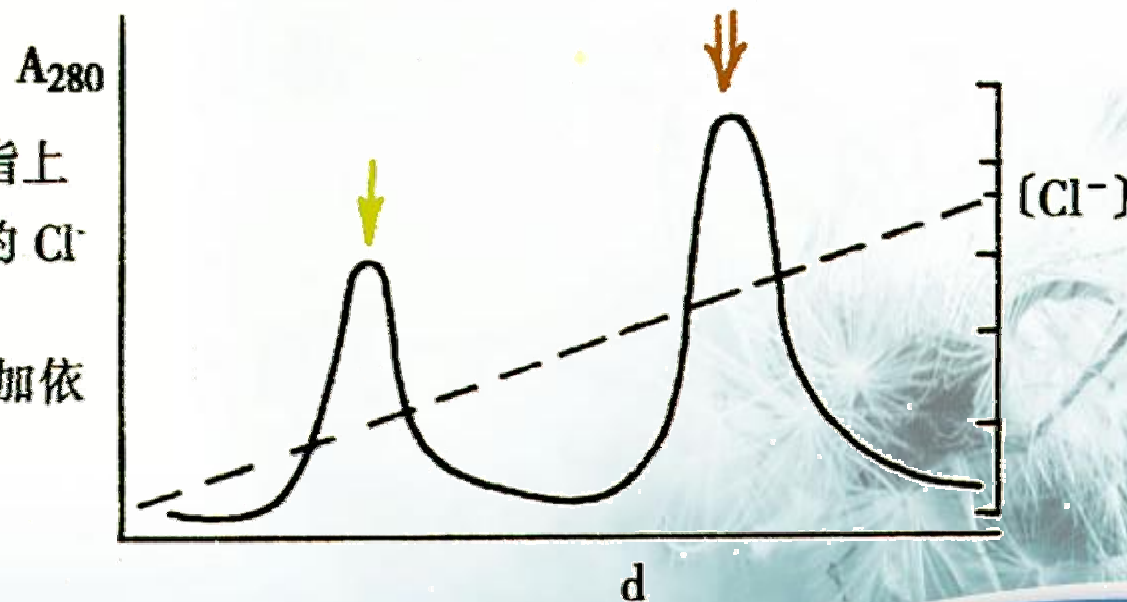
离子交换树脂：聚苯乙烯树脂引入相应的解离基团，分阴、阳离子交换树脂
有强酸，强碱，弱酸，弱碱

离子交换凝胶：葡聚糖凝胶和琼脂糖凝胶为母体，导入相应的交换基团，交换容量更大



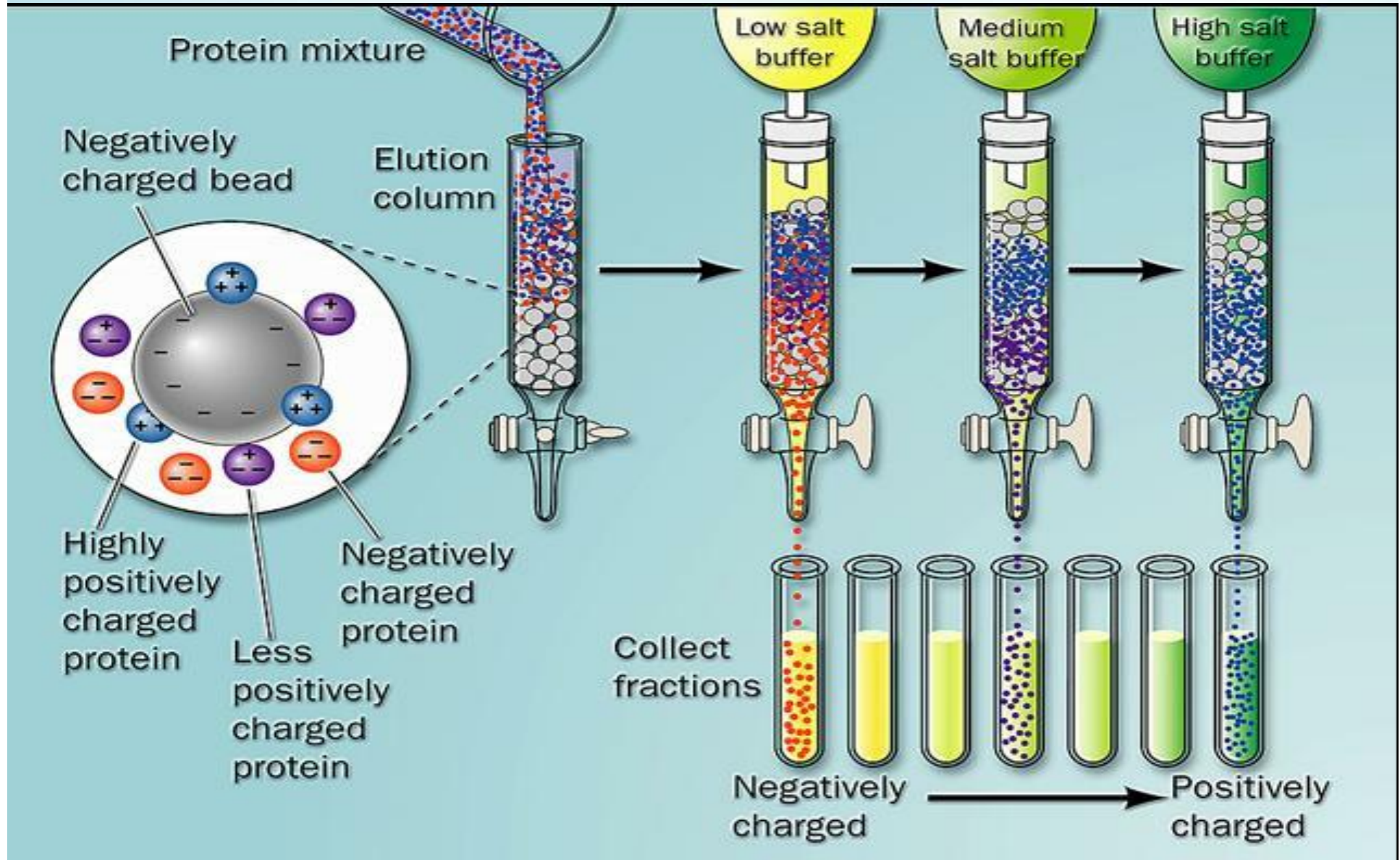
- a. 样品全部交换并吸附到树脂上
- b. 负电荷较少的分子用较稀的 Cl⁻ 或其他负离子溶液洗脱
- c. 电荷多的分子随 Cl⁻ 浓度增加依次洗脱
- d. 洗脱图

A_{280} 表示为 280nm 的吸光度



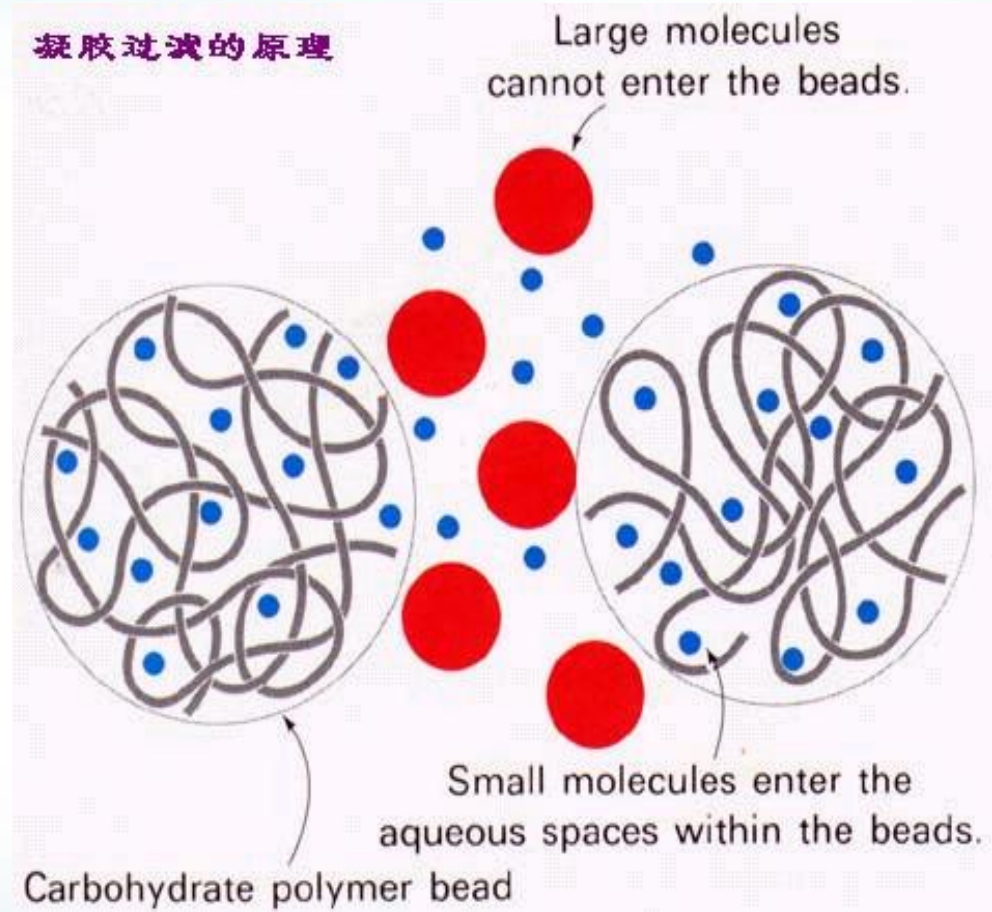
离子交换层析分离蛋白质

Ion-exchange chromatography

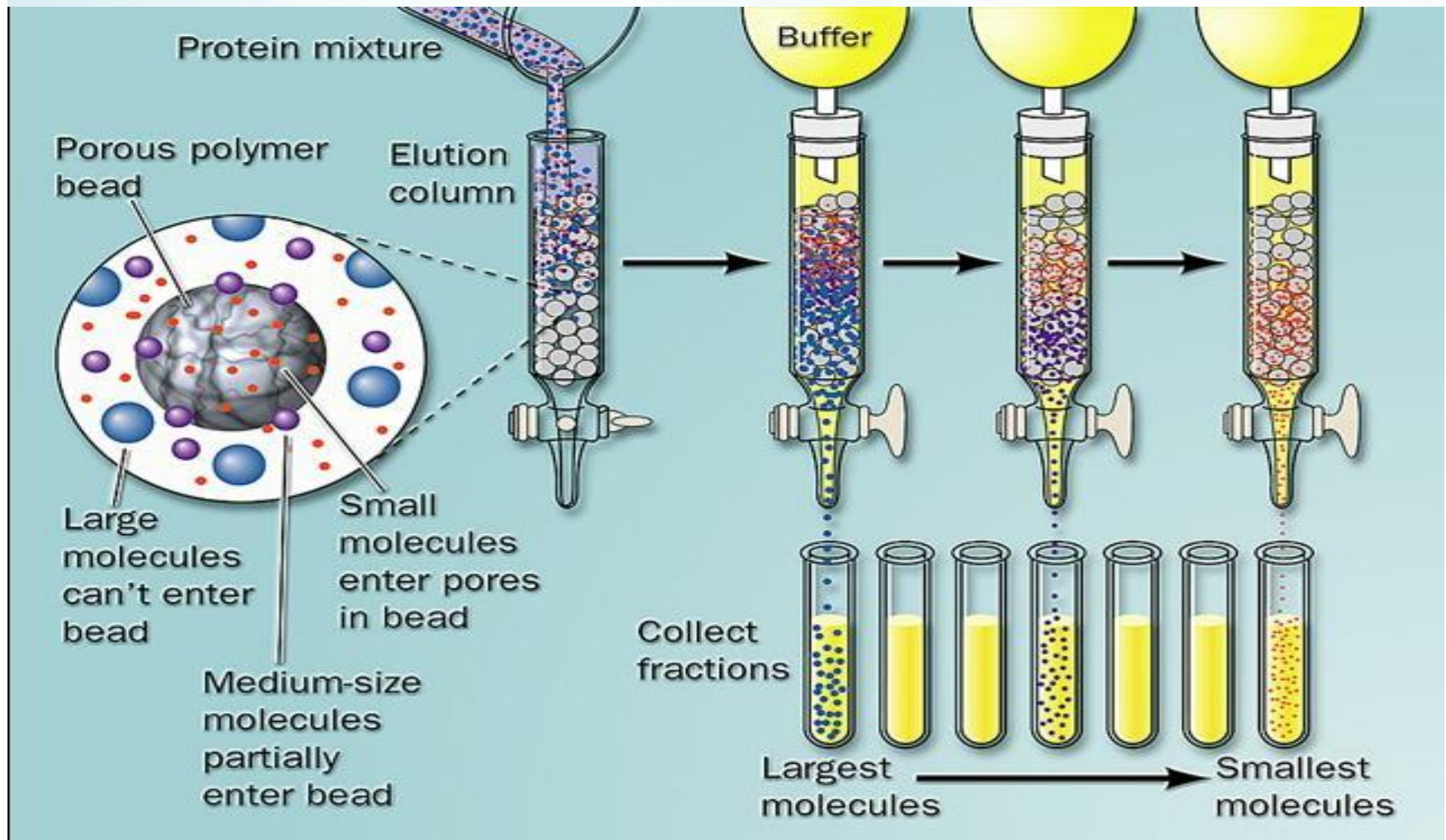


四、凝胶层析 gel chromatography

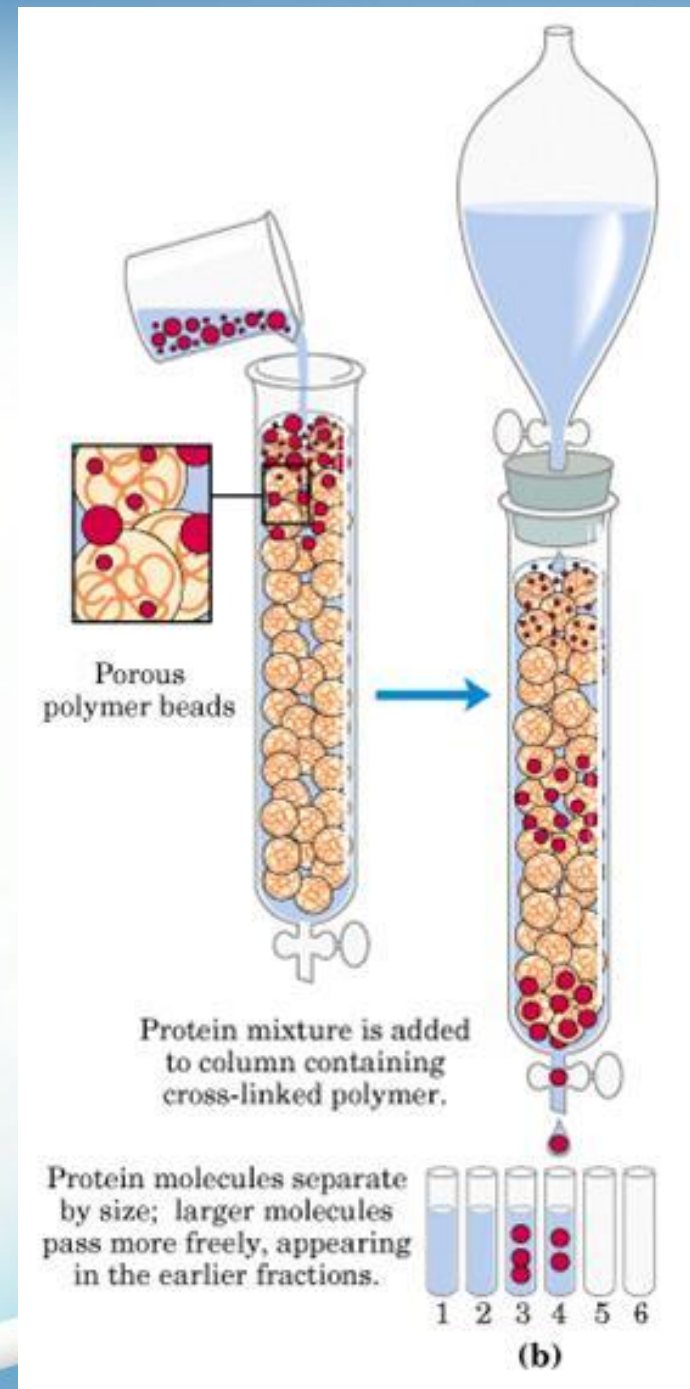
凝胶层析又称为凝胶过滤，分子排阻层析，分子筛层析等。是指以各种多孔凝胶为固定相，利用溶液中各种组分的相对分子质量不同而达到物质分离的一种层析技术。

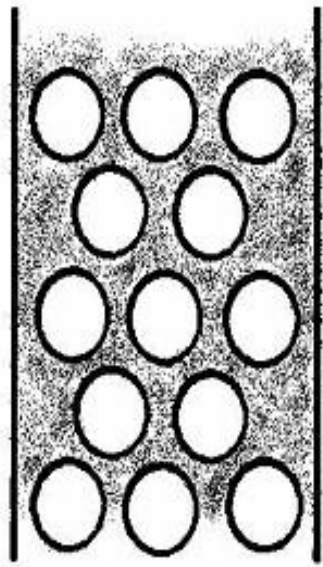


Size-exclusion chromatography

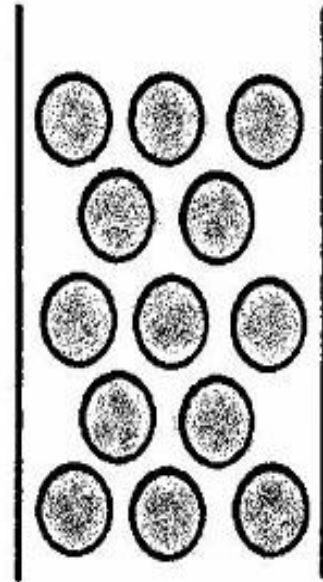


凝胶层析柱中装有多孔**凝胶**，当含有各种组分的混合溶液流经凝胶层析柱时，大分子物质由于分子直径大，不能进入凝胶的微孔，只能分布于凝胶颗粒的间隙中，以较快的速度流过凝胶柱。较小的分子能进入凝胶的微孔内，不断地进出于一个个颗粒的微孔内外，这就使小分子物质向下移动的速度比大分子的速度慢，从而使混合溶液中各组分按照相对分子质量由大到小的顺序先后流出层析柱，而达到分离的目的。

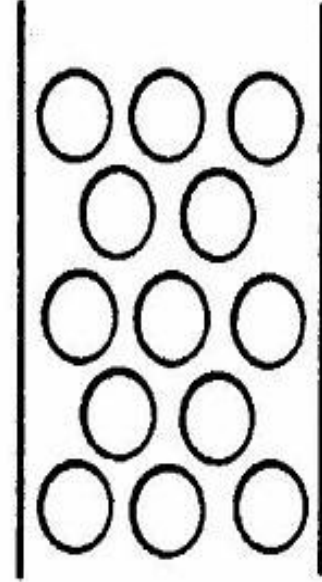




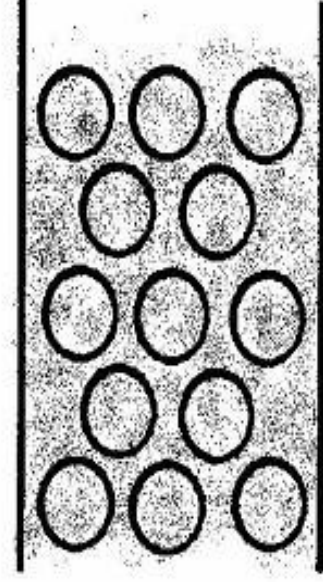
外水体积(V_o)



内水体积(V_i)



基质体积(V_g)



柱床体积(V_t)

凝胶层析柱各种体积示意图（阴影部分）

$V_t = V_o + V_i + V_g$ 柱床体积: V_t 内水体积: V_i

外水体积: V_o 基质体积: V_g



$V_t = V_o + V_i$ V_g 相对很小, 可以忽略不计

洗脱体积 (V_e) 一般介于 V_o 和 V_t 之间

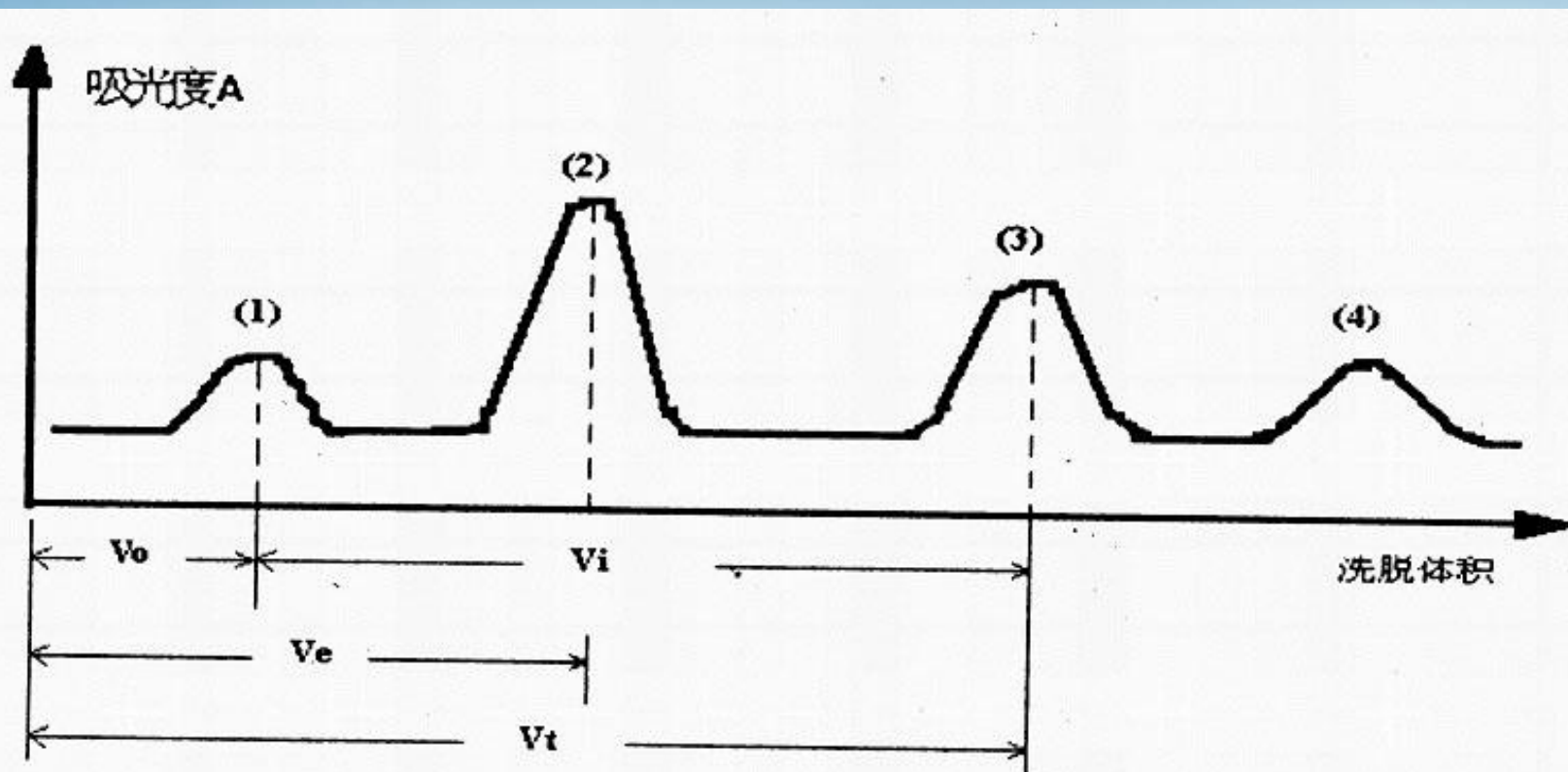
完全排阻的大分子: $V_e = V_o$

完全渗透的小分子: $V_e = V_t$

介于二者之间的分子: $V_o < V_e < V_t$

吸附分子: $V_e > V_t$





凝胶层析洗脱曲线示意图

图 3-7 凝胶层析洗脱曲线示意图

- | | |
|--------------|----------|
| (1) 完全排阻的大分子 | (2) 中等分子 |
| (3) 完全渗透的小分子 | (4) 吸附分子 |

常用的凝胶:

葡聚糖凝胶

琼脂凝胶与琼脂糖凝胶

聚丙烯酰胺凝胶

Table 5. Properties of Sephadex.

Gel type	Dry bead size µm	Fractionation range Globular proteins	Fractionation range Dextrans	Swelling factor ml/g
Sephadex G-10	40 – 120	– 700	– 700	2 – 3
Sephadex G-15	40 – 120	– 1 500	– 1 500	2.5 – 3.5
Sephadex G-25 Coarse	100 – 300	1 000 – 5 000	100 – 5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Medium	50 – 150	1 000 – 5 000	100 – 5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Fine	20 – 80	1 000 – 5 000	100 – 5 000	4 – 6
Sephadex G-25 Superfine	10 – 40	1 000 – 5 000	100 – 5 000	4 – 6
Sephadex G-50 Coarse	100 – 300	1 500 – 30 000	500 – 10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Medium	50 – 150	1 500 – 30 000	500 – 10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Fine	20 – 80	1 500 – 30 000	500 – 10 000	9 – 11
Sephadex G-50 Superfine	10 – 40	1 500 – 30 000	500 – 10 000	9 – 11
Sephadex G-75	40 – 120	3 000 – 80 000	1 000 – 50 000	12 – 15
Sephadex G-75 Superfine	10 – 40	3 000 – 70 000	1 000 – 50 000	12 – 15
Sephadex G-100	40 – 120	4 000 – 150 000	1 000 – 100 000	15 – 20
Sephadex G-100 Superfine	10 – 40	4 000 – 100 000	1 000 – 100 000	15 – 20
Sephadex G-150	40 – 120	5 000 – 300 000	1 000 – 150 000	20 – 30
Sephadex G-150 Superfine	10 – 40	5 000 – 150 000	1 000 – 150 000	18 – 22
Sephadex G-200	40 – 120	5 000 – 600 000	1 000 – 200 000	30 – 40
Sephadex G-200 Superfine	10 – 40	5 000 – 250 000	1 000 – 150 000	20 – 25

五、亲和层析

亲和层析是利用生物分子与配基之间所具有的专一而又可逆的亲合力，而使生物分子分离纯化的技术。

将待纯化物质的特异配体通过适当的化学反应共价的连接到载体上，待纯化的物质可被配体吸附，杂质则不被吸附，从层析柱流出，变换洗脱条件，即可将待分离的物质洗脱下来，实现分离提纯。

目的产物与相应的配基

待分离的目的产物	相应的配基
酶	底物、抑制剂、辅酶（辅因子）
抗体	抗原、病毒、细胞
凝集素	多糖、糖蛋白、细胞受体
激素	受体、载体蛋白
酶RNA	互补RNA或片段
RNA	互补RNA、DNA或片段

1、亲和层析母体和配基

母体
载体
担体
基质

理想的母体应满足以下要求：

- ① 高度的亲水性
- ② 极低的非特异性吸附性（惰性）
- ③ 具有足够的化学基团
- ④ 适当的多孔性
- ⑤ 较好的理化稳定性

琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、葡聚糖凝胶、纤维素

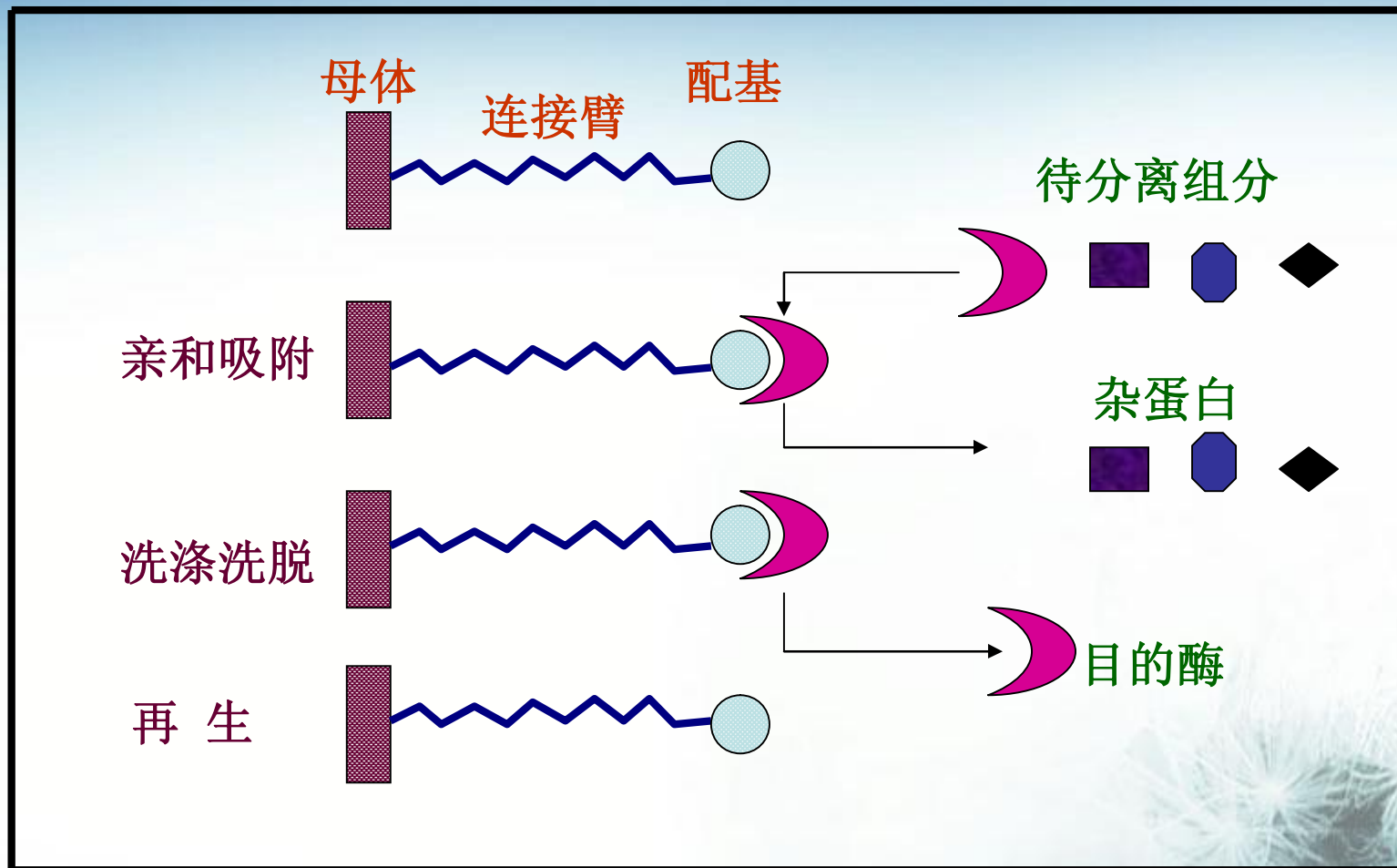
配基
配体

优良配基应具备的条件：

- ① 与待纯化的物质有较强的亲和力
- ② 具有与母体共价结合的基团

连接臂

“接臂”的目的是克服影响配基与生物大分子的结合的空间障碍



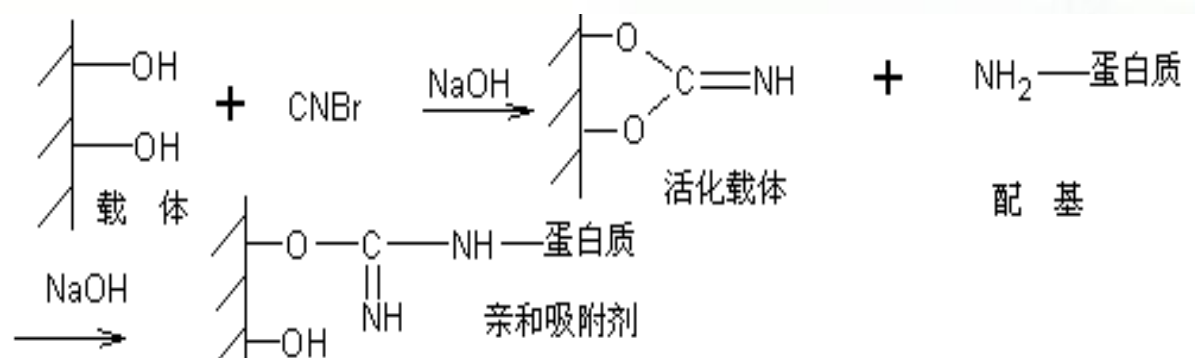
亲和分离原理示意图

母体与配基偶联

母体活化：**溴化氰 (CNBr) 法**、叠氮法、高碘酸氧化法
环氧化法、甲苯磺酰氯法、双功能试剂法等

目的：使母体引入某种活泼基团，以便与配基共价偶联

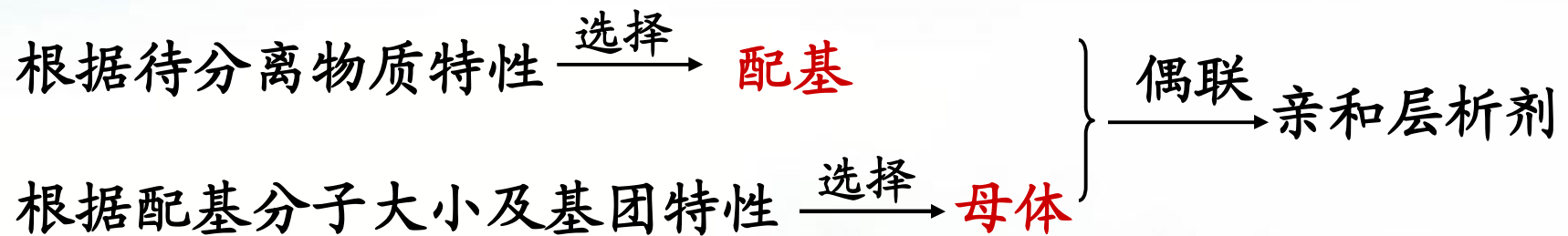
溴化氰法是最早使用且最常用的活化方法



CNBr作用于葡聚糖和琼脂糖的糖羟基

操作

① 制备亲和层析剂



② 装柱、上样

③ 洗脱 非专一性洗脱：改变温度、pH值、离子强度

专一性洗脱：竞争性洗脱剂
半抗原、抑制剂、底物类似物

竞争性地与 { 被吸附物质结合
配体结合

2、亲和层析方法

根据待分离组分与配基的结合特性，

亲和层析可以分为：

共价亲和层析

疏水层析

金属离子亲和层析

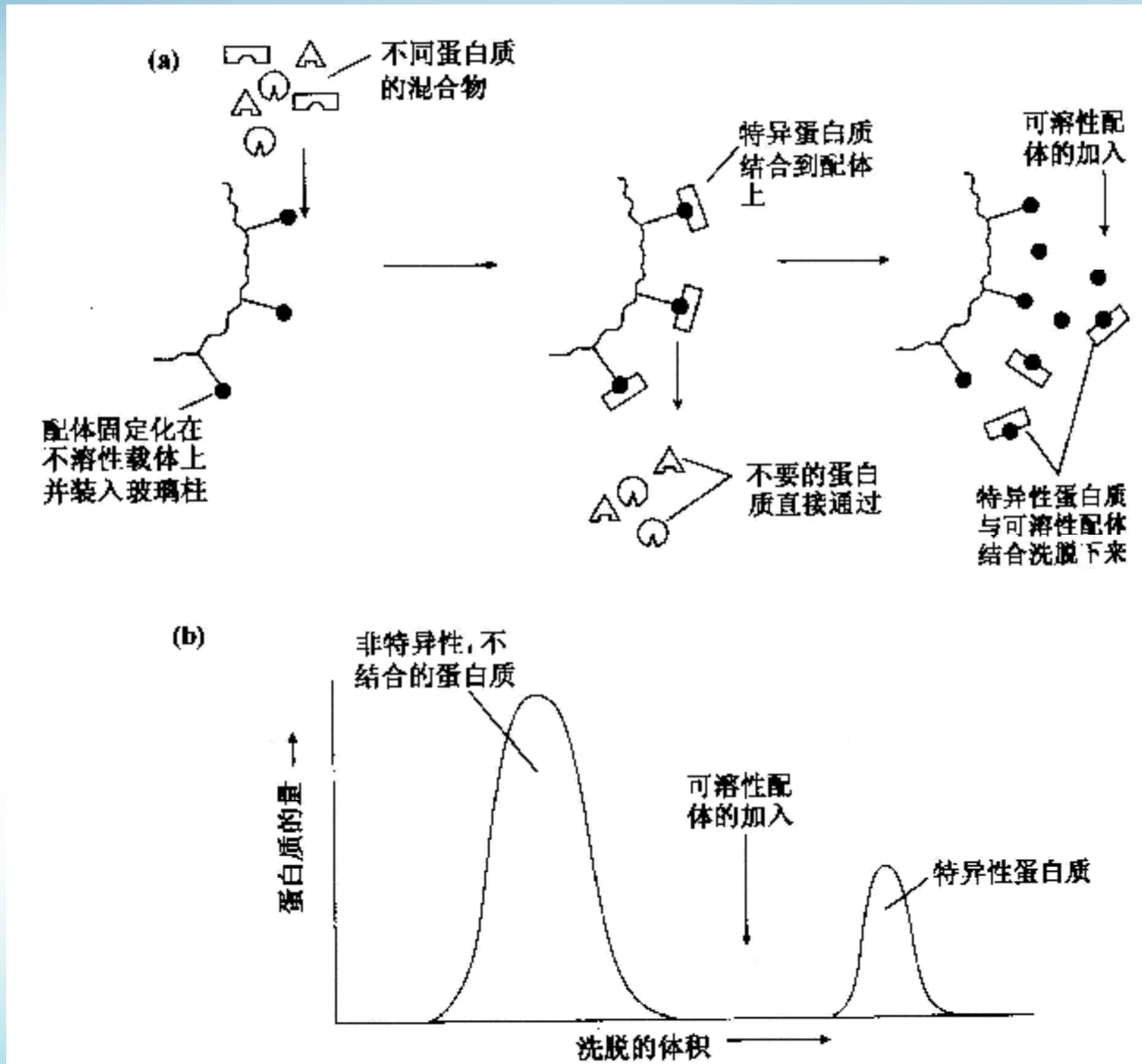
免疫亲和层析

染料亲和层析

凝集素亲和层析

亲和层析原理及流程

示意图



六、层析聚焦 Chromatofocusing

将酶等两性电解质的pI特性与离子交换层析的特性结合在一起，实现组分分离的技术。

层析柱内装上多缓冲离子交换剂，当加入两性电解质载体的多缓冲溶液流过层析柱时，在柱内形成稳定的pH梯度。待分离酶液中的各个组分在此系统中会移动到（聚焦于）与其pI相当的pH位置上，从而使不同pI的组分得以分离。

第七节 电泳分离

带电粒子在电场中向着与其本身所带电荷相反的电极移动的过程称为电

泳。

按其使用的支持体不同，电泳分为：

纸电泳、薄层电泳、薄膜电泳、凝胶电泳

自由电泳、等电聚焦电泳

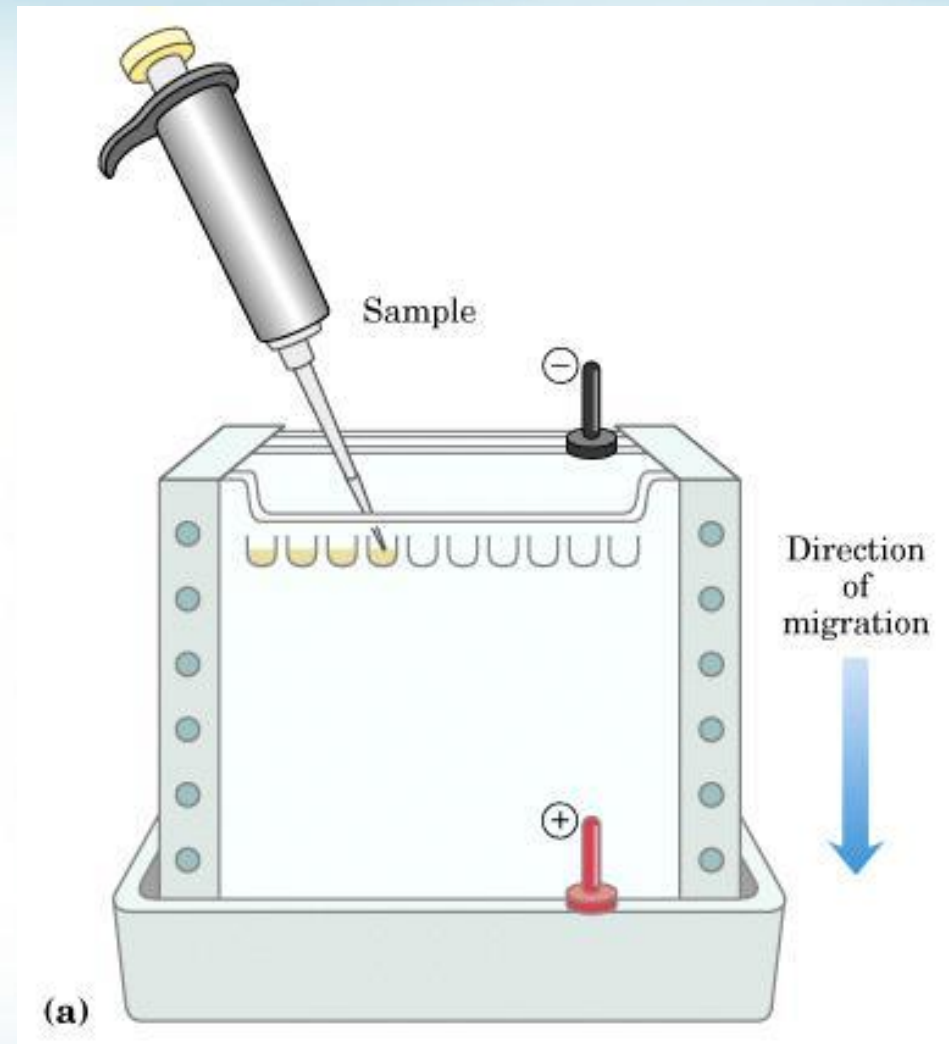
颗粒在电场中的
迁移率取决于：

净电荷量
颗粒形状
颗粒大小

内在特性

电场强度
溶液pH值
离子强度
支持体特性

外界条件



电泳的影响因素

- Ø **待分离大分子的性质**：分子带的电荷量越大、直径越小、形状越接近球形，电泳迁移速度越快。
- Ø **电场强度**：过高，产热，蛋白变性导致不能分离；缓冲液水分蒸发过多，离子强度增加。过低，电泳时间增加，扩散。
- Ø **电渗**：在电场中液体对固体支持物的相对移动；当电渗方向与电泳方向一致时，会加快颗粒泳动速度；反之，会减慢颗粒泳动速度。
- Ø **支持介质的筛孔**：筛孔越小，则颗粒在移动的过程中所受到的阻力也就越大。
- Ø **缓冲液pH和离子强度**：pH值距等电点愈远，所带净电荷越多，电泳速度越快；但pH过高或过低引起蛋白变性，缓冲液通常要保持一定的离子强度（0.02~0.2较为适宜）；强度过低，则缓冲能力差，不易维持pH恒定，离子强度过高，在待分离分子周围形成较强的带相反电荷的离子扩散层（即离子氛），降低了蛋白质的带电量，使电泳速度减慢。

一、纸电泳

以滤纸为支持体的电泳技术

• 操作要点:

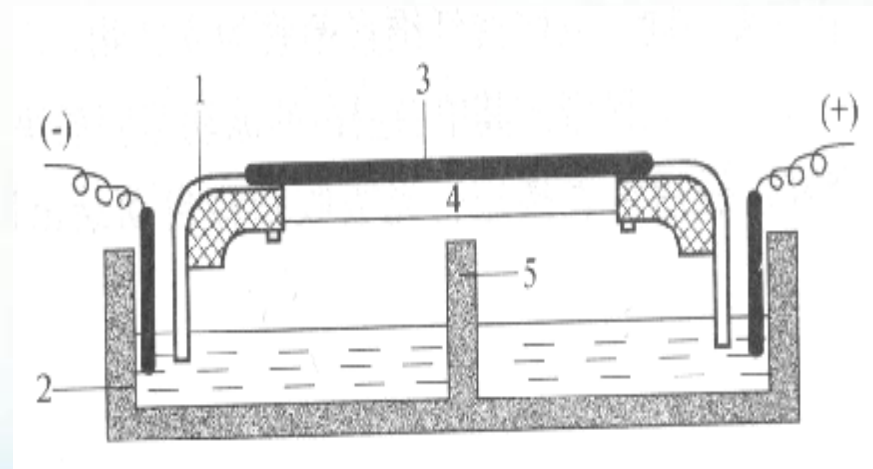
- 1、选择缓冲液
- 2、滤纸的选择与处理
- 3、点样
- 4、电泳
- 5、显色及分析

二、薄层电泳

- 将支持物与缓冲液调制成适当厚度的薄层进行电泳。
- 常用支持物：**淀粉**、琼脂、纤维素粉、硅胶等
- 操作：
 - 1、缓冲液选择 离子强度较高的缓冲液
 - 2、支持物处理 使用前须精制
 - 3、薄层板制作
 - 4、加样：挖沟、混合样品、填埋
 - 5、电泳
 - 6、分析：印染法

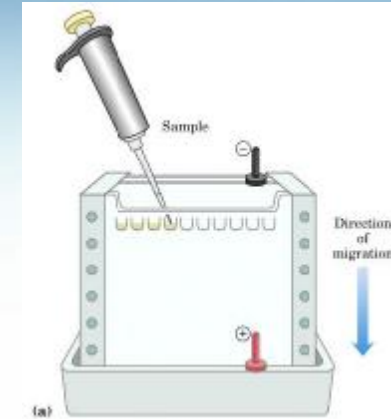
三、薄膜电泳

- 支持体：薄膜（醋酸纤维素）
- 优点：分辨力较高、简便、快速、区带清晰、易于定量、便于保存
- 广泛应用于蛋白质和同工酶等的分离分析
- 操作
 - 1、薄膜的处理与放置
 - 2、点样：平衡
 - 3、电泳： $E 10\sim 25V/cm$,
 - 4、显色



四、凝胶电泳

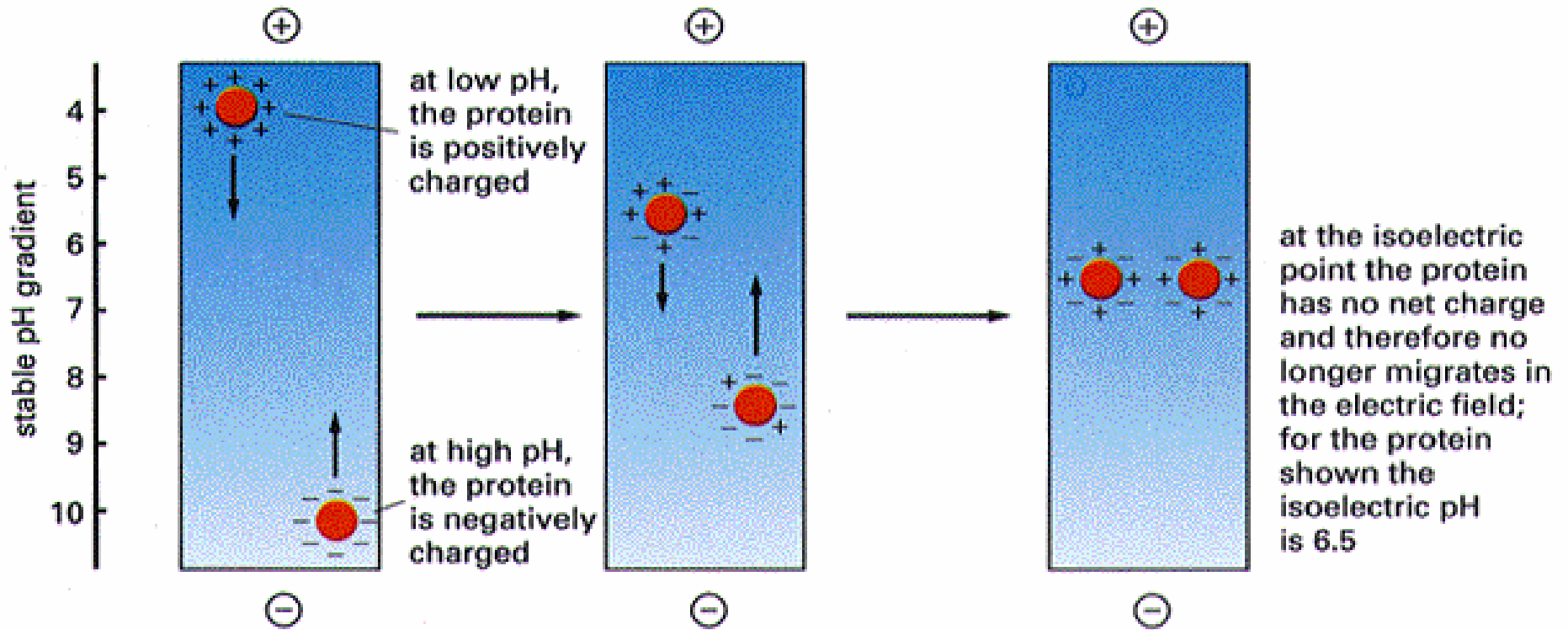
- 支持物：多孔凝胶
- 聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶等
- 具有电泳和分子筛的双重作用，分辨力高
- 最常用聚丙烯酰胺凝胶，原因：
机械强度高、透明有弹性、稳定、无吸附作用和电渗作用，可制成不同孔径的凝胶。
- 分类：垂直管型盘状电泳、垂直板型电泳；
- 连续、不连续、梯度、SDS凝胶电泳



五、等电聚焦 (isoelectric focusing, IEF)

利用蛋白质具有不同等电点的特性，以聚丙烯酰胺为电泳支持物，在其中加入两性电解质载体（商品名：Ampholine，一种含有各种连续 pI 的小分子混合物），在电场作用下，两性电解质载体按各自 pI 形成从阳极到阴极逐渐增加的平滑和连续的 pH 梯度。蛋白质在此 pH 梯度凝胶中泳动，当迁移至 pH 值等于 pI 处时不再泳动，被浓缩成狭窄的区带。

等电聚焦电泳



本
节
目
录

第八节 萃取分离

萃取分离是利用物质在两相中的溶解度不同而使其分离的技术。萃取分离中的两相一般为互不相溶的两个液相。有时也可采用其它流体。

按照两相的组成不同，萃取可以分为：

有机溶剂萃取

双水相萃取

超临界萃取

反胶束萃取

(一) 溶剂萃取法

溶剂萃取法以分配定律为基础

在一定温度、压力下，溶质分布在两个互不相溶的溶剂里，达到平衡后，溶质在两相中的浓度比为一常数。

$$\text{分配系数 } K_0 = \frac{\text{萃取相浓度}}{\text{萃余相浓度}} = \frac{C_1}{C_2}$$

萃取剂：用来进行萃取的溶剂，通常是有机溶剂

萃取液：经接触分离后，溶质转移到萃取剂中与萃取剂形成的溶液

萃余液：被萃取出溶质后的料液。

& 普通有机溶剂萃取难以进行蛋白质的分离

因为：

- 1) 蛋白质亲水性，不溶于有机溶剂
- 2) 蛋白质在有机相中易变性失活

酶萃取过程中，注意低温、缩短接触时间

溶剂萃取法一般仅用于抗生素等小分子生物物质的提取。

(二) 双水相萃取

又称水溶液两相分配技术

用两种不相溶的亲水性高分子聚合物水溶液，如聚乙二醇（PEG）和葡聚糖（Dextran）进行萃取。由于形成的两相均有很高的含水量（达70%~90%），故称“双水相”系统。

| 优点：

- ① 每一水相中均有很高的含水量，为酶等生物物质提供了一个良好的环境；
- ② PEG、Dextran和无机盐对酶等无毒害作用，不会引起变性。

1. 双水相的形成:

两种不同水溶性聚合物浓度达到一定值时，体系会自然地分成互不相容的两相，构成双水相体系。

2. 萃取原理:

利用生物物质在双水相体系中的选择性分

配 3. 双水相萃取法的重要研究方向

——亲和萃取（亲和分配）

使用具有生物特异性的配基来提高分离选择性

亲和萃取酶实例

蛋白质	配基
胰蛋白酶	胰蛋白酶抑制剂
磷酸果糖激酶	三嗪染料
甲酸脱氢酶	三嗪染料
葡糖-6-磷酸脱氢酶	三嗪染料

(三) 超临界流体萃取

兼有蒸馏和溶液萃取的特征，

与常规溶剂萃取的区别：将超临界流体作为萃取剂

超临界流体(supercritical fluid)：超过气液共存时的最高压力和最高温度下物质特有的点——临界点后的流体。临界点的概念可用临界温度和临界压力解释：

临界温度：高于此温度时，无论加压多大也不能使气体液化。

临界压力：在临界温度下，液化气体所需要的压力。

- SCF性质介于液体和气体之间：
- 1) SCF密度接近于液体，溶解度高
 - 2) SCF粘度和扩散系数接近于气体
 - 3) 传质扩散快

基本过程:

- 1) 在SCF中，溶解度大的物质溶于其中，与不溶解或溶解度小的物质分开。
- 2) 降低压力，使SCF变为气态（密度降低），溶解物质能力下降，萃取物与溶剂分离。

常用超临界液态CO₂作为萃取剂，因为:

- 1) 液体CO₂无毒
- 2) 临界温度（304.06K）接近常温
- 3) 临界压力（7.38MPa）较低
- 4) 操作安全

超临界CO₂萃取技术在生物、食品等工业中的应用

CO₂萃取部分产品

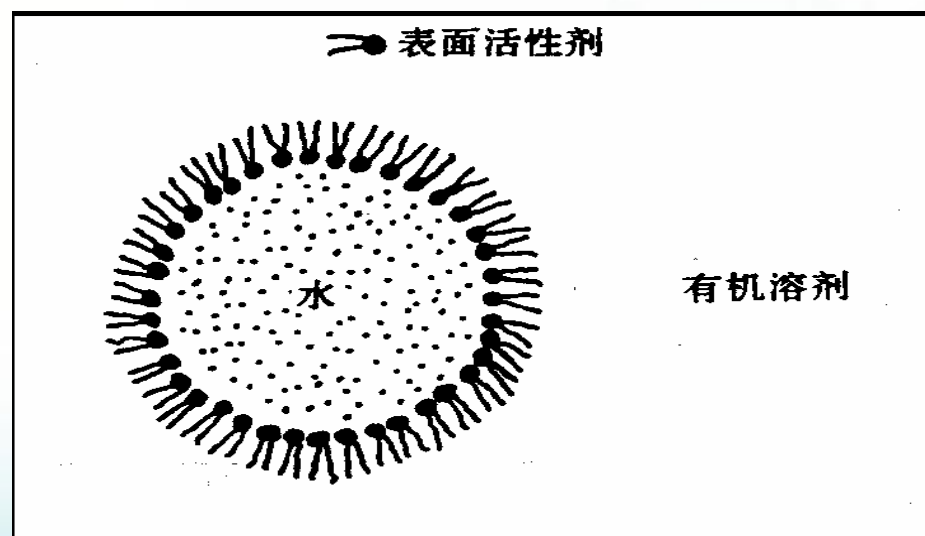
原料名称	产物名称	原料名称	产物名称
小麦胚芽	胚芽油	豆子	豆油精炼油
啤酒花	啤酒花精油	茉莉花	净油
辣椒	辣椒红色素	菊花根	除虫菊酯
当归	精油	紫草	紫草宁
银杏叶	银杏内酯	花生	精炼油

(四) 反胶团萃取

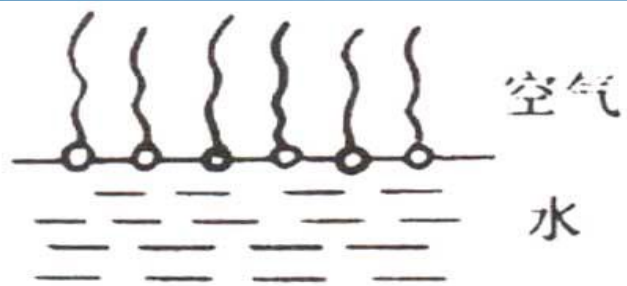
1. 反胶团：又称反胶束 (Reversed Micelles)

指表面活性剂（由亲水的极性基团和疏水的非极性基团两部分组成）分散在连续有机溶剂中自发形成的一种稳定的纳米级的聚集体。

反胶团模型
亲水基团向内聚集



	(正) 胶束	反胶束
形成	表面活性剂溶于水，使其浓度超过临界胶束浓度。	表面活性剂溶于非极性溶剂，使其浓度超过临界胶束浓度。
构造	表面活性剂极性基团在外，非极性基团在内，形成非极性核心	表面活性剂非极性基团在外，极性基团在内，形成极性核心，溶于水后，形成水池(water pool)
功能	溶解非极性物质	溶解极性物质



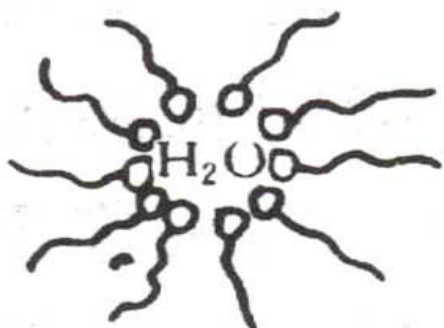
单层



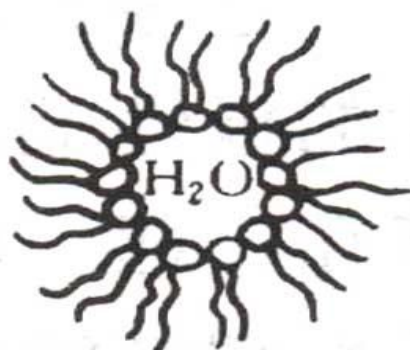
正胶团



棒状胶团



反胶团



反胶团

W/O 微胶团



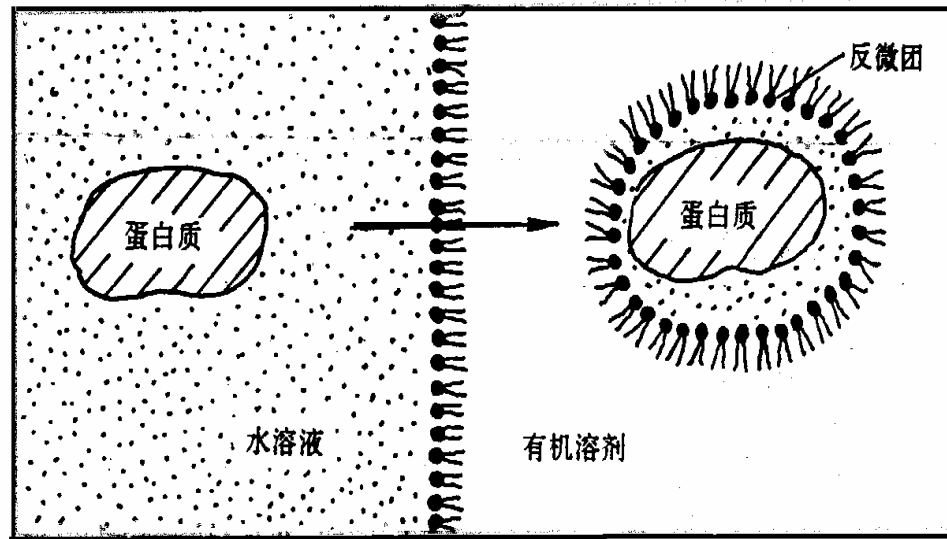
O/W 微胶团

表面活性剂的不同聚集体

2. 萃取过程

第一步：将酶从水相中萃取到反胶束相中。

第二步：将酶蛋白从反胶束转移到第二种水相中，实现对蛋白质的反萃取过程。



反胶团萃取原理

3. 表面活性剂及有机溶剂

反胶团萃取与溶剂萃取的不同，是在有机溶剂中加入了少量表面活性剂。

(1) 表面活性剂

常用： AOT(Aerosol OT) (阴离子表面活性剂，琥珀酸2-乙基己基酯磺酸钠)。

特点： 易获得，强度好；极性基团小，形成的反胶团空间较大，有利于蛋白质等生物大分子进入。

(2) 非极性有机溶剂

环己烷、庚烷、辛烷、异辛烷、己醇、硅油。

4. 优点

- 1) 萃取率和反萃取率高。
- 2) 分离浓缩同时进行，溶剂可反复利用。
- 3) 解决胞内酶在非细胞环境中迅速失活问题
- 4) 破壁功能，直接从完整细胞提取酶蛋白。
- 5) 成本低。

酶的组合分离纯化策略

设计分离纯化工艺的基本要求



第九节 酶的浓缩、干燥与结晶

浓缩与干燥都是酶与溶剂（通常是水）分离的过程。在酶的分离纯化过程中是一个重要的环节。

离心分离、过滤与膜分离、沉淀分离、层析分离等都能起到**浓缩作用**。用各种吸水剂，如硅胶、聚乙二醇、干燥凝胶等吸去水分，也可以达到**浓缩效果**。

蒸发浓缩是通过加热或者减压方法使溶液中的部分溶剂汽化蒸发，使溶液得以浓缩的过程。由于酶在高温条件下不稳定，容易变性失活，故酶液的浓缩通常采用**真空浓缩**。即在一定的真空条件下，使酶液在60℃以下进行浓缩。

在固体酶制剂的生产过程中，为了提高酶的稳定性，便于保存、运输和使用，一般都必须进行干燥。常用的干燥方法有：

真空干燥
冷冻干燥
喷雾干燥
气流干燥
吸附干燥



结 晶

当酶达到一定纯度和浓度后，加入晶种，在一定条件下，经缓慢的过程，使酶的溶解度降低，酶慢慢结晶出来。时间可以从几小时，几天，几个月，甚至几年。

结晶成功关键

1. 浓度要在1~5%为宜。
2. 纯度要高。
3. 酶要有活性

结晶是溶质以晶体形式从溶液中析出的过程。酶的结晶是酶分离纯化的一种手段。它不仅为酶的结构与功能等的研究提供了适宜的样品，而且为较高纯度的酶的获得和应用创造了条件。

盐析结晶

有机溶剂结晶

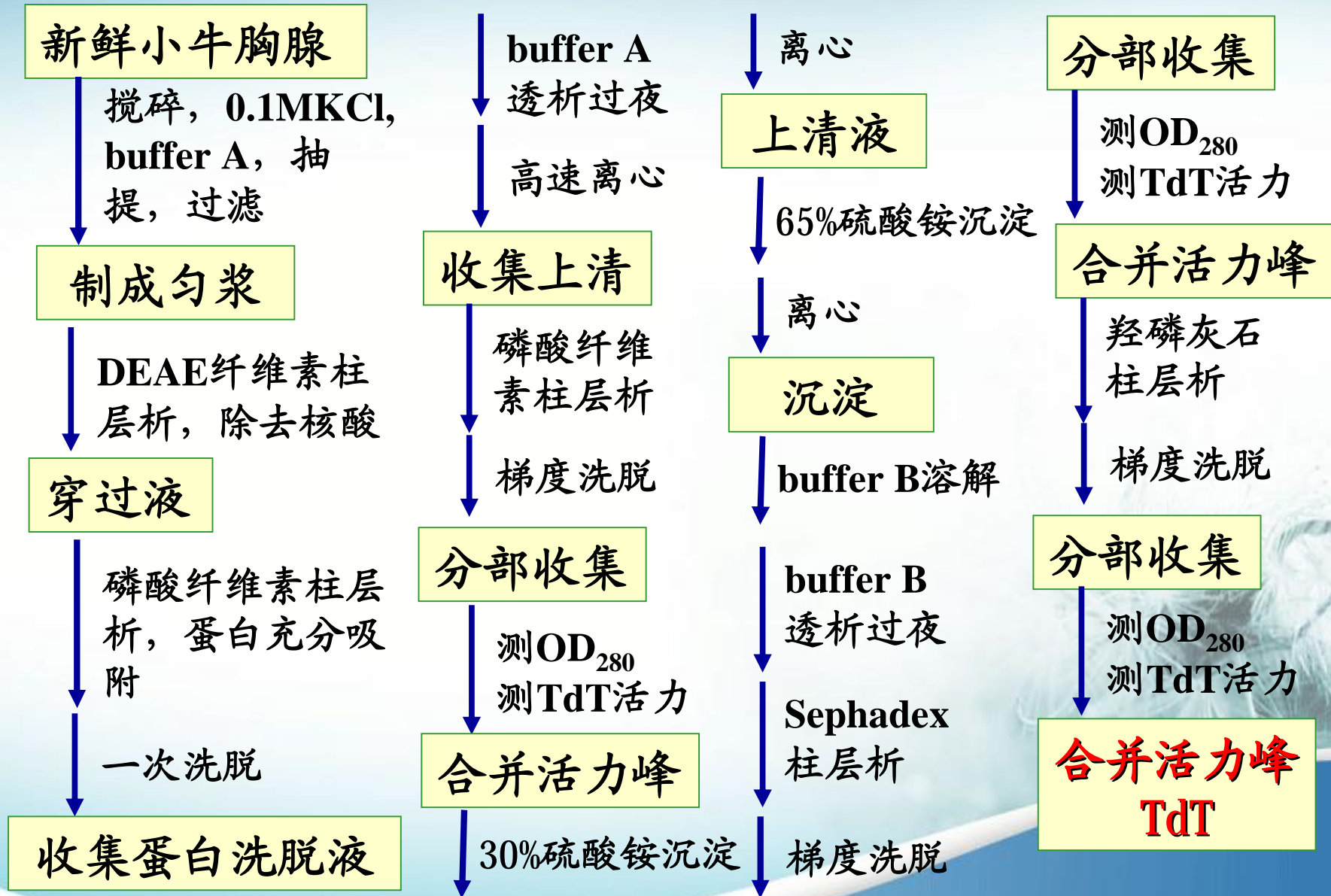
透析平衡结晶

等电点结晶

酶在结晶之前，酶液必须经过纯化达到一定的纯度。如果酶液纯度太低，不能进行结晶。通常酶的纯度应当在50%以上，方能进行结晶。总的趋势是酶的纯度越高，越容易进行结晶。

要说明的是，不同的酶对结晶时的纯度要求不同。有些酶在纯度达到50%时就可能结晶，而有些酶在纯度很高的条件下也无法析出结晶。所以酶的结晶并非达到绝对纯化，只是达到相当的纯度而已。

小牛胸腺末端脱氧核苷酰转移酶 (TdT) 的分离纯化





OVER

