

·实验技术·

## “多糖提取、纯化”实验的设计与实施

白 晨, 何正平, 张 翼, 吴 刚, 陆 红

(复旦大学 生物科学教学实验中心 生物化学实验室, 上海 200433)

**摘 要:**最近十年生物化学理论教学中糖类研究相关内容不断增加,而实验教学中却没有做到同步改进。本文针对这一问题为本科生生化课程设计了多糖提取、纯化高级生化技术实验,并通过在 50 名学生中进行的尝试性试验对其实施效果、注意要点做了深入探讨。

**关键词:**高级生化技术实验; 多糖; 实验设计

**中图分类号:** Q5-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006 - 7167(2007)10 - 0008 - 03

## Design and Implementation of a Experiment of the Extraction and Purification of Polysaccharides

BAI Chen, HE Zheng-ping, ZHANG Yi, WU Gang, LU Hong

(Lab. of Biochemistry, Teaching Center of Biology, Fudan Univ., Shanghai 200433, China)

**Abstract:** During the past ten years, great progress of carbohydrate research and glycobiology has been made in the theoretical teaching of biochemistry, but the same increasing of experimental teaching was not observed. To resolve this problem a new experiment—the extraction and purification of polysaccharides, was designed for advanced biochemistry technique teaching. The key points of the experiment process and the effect evaluation were given through a small-scale test with 50 students.

**Key words:** advanced biochemistry technique experiment; polysaccharide; experimental design

**CLC number:** Q5-33

**Document code:** A

**Article ID:** 1006 - 7167(2007)10 - 0008 - 03

随着生命科学的迅速发展,糖类的生物学功能逐渐被认知。对它的认识产生了由“能源提供及结构组成物质”到“生命信息分子”的重大飞跃<sup>[1,2]</sup>。近 10 年,在高校生命科学、系的生物化学教学中糖化学与糖生物学知识作为重要内容被大幅增加,国外的一些院校还在高年级学生中设置了相关的专业课程<sup>[3]</sup>。但是,相对理论教学的快速发展,实验教学仍停留在 80 年代始沿用至今的糖类呈色反应等简单内容上,较为系统的糖类研究新增实验教学未见报道。我校为高年级本科生开设的“高级生化技术实验”课程中也未曾涉及这方面内容。近 10 年在对最受学生欢迎的“自主命题生命科学探究实验”的调查统计中发现,学

生选择糖类研究相关实验的比例逐年增多,但是对糖类提取、分析实验的基本操作方法、原理等了解甚少,在实验中经常出现一些错误<sup>[4]</sup>。这些现象说明随着理论教学的改进学生对这一领域的研究兴趣不断增加。但是为达到更好的教学效果,在理论教学扩展的同时,相关领域的实验教学必须做到同步改进,在生物化学实验教学中增加糖类相关实验内容非常必要。本文利用较易获取的微生物来源多糖类,选取了糖类研究中较为关键且有特点的酒精分级沉淀、凝胶层析等方法设计了适合于生命科学专业学生的多糖功能研究实验,并选取 50 个 4 年级学生分 25 组分别完成了该实验,对实验产生的效果和学生的体会做了综合评价。

### 1 实验部分

#### 1.1 实验流程(图 1)

#### 1.2 仪器与试剂

(1) 仪器。旋转蒸发仪,高速离心机,精密电子天

收稿日期: 2006 - 10 - 23

基金项目: 国家自然科学基金委员会“人才培养基金项目”资助

作者简介: 白 晨(1969 - ),女,博士,副教授, Tel: 021 - 65643674;

E-mail: baichen@fudan.edu.cn

平,真空冷冻干燥机,752型紫外光栅分光光度计,电热恒温水浴锅,恒流泵,部分收集仪。

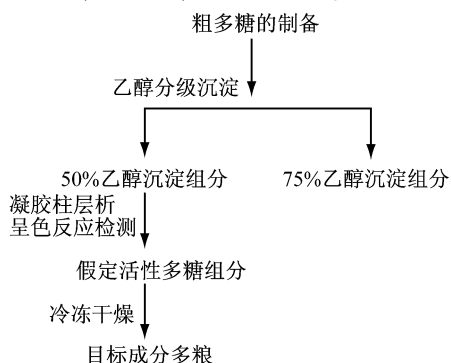


图 1 多糖提取、纯化实验流程

(2) 试剂。自制灵芝菌丝体发酵粗多糖,葡萄糖:分析纯,硫酸:优级纯,蒽酮:分析纯,无水乙醇:分析纯,SephadexG-100,蒸馏水。

### 1.3 实验步骤

(1) 粗多糖的制备。此部分属于实验准备工作:通过灵芝菌体发酵获得灵芝发酵培养液,低温减压浓缩后通过 80%酒精沉淀获得灵芝粗多糖用于实验<sup>[5]</sup>。

(2) 多糖的酒精分级沉淀。每组实验原料为 5g 粗多糖,将其完全溶解后加入体积比 1:1 的无水乙醇溶液,置 4℃ 冰箱保存 1 h 后,5 000 r/min 离心 20 min,收集沉淀得多糖 50%乙醇沉淀组分。上清液内继续加入乙醇至 75%浓度,重复上述操作得 75%酒精沉淀组分,分别称量记录,选取 50%组分假定为活性组分进一步纯化。

(3) 多糖的凝胶柱层析提纯。以 SephadexG100 为柱填料,制作 2×60cm 层析柱,进一步提纯多糖。上柱量为 3mL (含 60mg 多糖组分)。洗脱速度为 24mL/h,用部分收集仪收集洗脱液,收集多糖样品 2mL 每管共 30 管。

(4) 蒽酮-硫酸法。检测多糖组分分布,绘制凝胶层析洗脱图谱,合并最大峰值处组分,65~70℃ 减压旋转蒸发浓缩至 1mL 后,冷冻干燥获得假定活性组分并计算得率。结合葡萄糖标准曲线计算糖含量。

## 2 实验要点

实验材料粗多糖可以直接使用市售产品,但是由于多糖原料成分复杂,产品稳定性差,为了保证原料来源统一、获得较好的再现性,我们自主制备了多糖原料,原料可在 -20℃ 冰箱保存 3 年。本实验预实验发现除蛋白质操作对本实验原料无明显影响,因此未增加该步骤。若使用市售原料,可根据具体情况在实验准备工作中增加蛋白酶处理、透析等除蛋白质步骤,必要时还可以增加活性炭脱色步骤,以保证后续提取、纯化操作的顺利完成。

酒精分级沉淀是多糖提取、纯化的重要手段,一般

可通过此项操作将多糖分为若干各组分,经活性测定,确定目标组分。由于本实验重点是让学生掌握多糖酒精沉淀的操作方法,为获得明显的实验结果,选取了 50%、75% 的两种浓度的多糖酒精沉淀组分。同时为缩短实验时间,选取第一步沉淀获得的 50% 组分为假定活性组分继续下一步操作。

凝胶柱层析是大分子化合物分离的重要手段,为保证实验在规定时间内完成,装柱、平衡由同组成员在实验开始阶段与其他操作同步完成。本环节主要希望学生了解多糖凝胶层析洗脱液与其他高分子化合物分离时的区别,由于多糖不存在蛋白质两性电介质特点,在多糖洗脱中一般不必采用缓冲溶液,但是为避免多糖降解,通常选用低离子浓度的中性盐溶液或蒸馏水。

糖的检测可根据实验室具体情况采用现有的糖呈色反应方法。本文采用了经典的蒽酮-硫酸法,药品配制、操作、葡萄糖标准曲线的绘制可参考基础生物化学实验手册的相关内容<sup>[6,7]</sup>。

多糖不存在高温变性失活问题,与蛋白质相比可以承受较高温度,但是由于多糖的活性与其高级结构存在非常重要的关系,过高温度可能破坏多糖高级结构甚至使多糖发生降解,因此在本实验中要求学生减压浓缩时的温度必须低于 70℃,多糖水溶液浓缩至约 1mL 后,采用冷冻干燥的方法除去残留水分。

## 3 实验效果

作为学生实验,其知识性、趣味性、实验结果的再现性、实验时间的可行性都是非常重要的<sup>[8]</sup>。为考察本实验的可行性,我们选取了 50 个同学分为 25 组对本实验的完成情况做了调查(见表 1)。通过对实验实施过程的仔细观察及对实验后学生体会的综合考察,

表 1 学生实验体会调查结果

项目	学生选择结果		
开设必要性	十分必要	必要	不太需要
	60%	28%	12%
预习重要性	重要	比较重要	不需要预习
	80%	20%	0
对理论学习 辅助作用	很大提高	提高	无改变
	学习兴趣	64%	26%
研究技能	70%	30%	0
实验完成情况	基本在规定时间内	提前	超过规定时间
	88%	0	12%
实验结果与预期结果 对比	符合	基本符合	有较大差异
	90%	10%	
实验创新性	以前从未涉及	有一定了解	很熟悉
	86%	24%	0

(下转第 33 页)

蓝牙技术的成本门槛高,开发周期长,也是目前难以普及的主要原因。当然,蓝牙技术互换性好,但是如果发射端和接收端都使用同一芯片,nRF24Z1 芯片在多媒体教室无线话筒音频电路设计中是最好不过的选择。

**参考文献 (References):**

[1] Nordic Semiconductor ASA. nRF24Z1 wireless audio streamer[EB/OL]. [2006-10-25]. <http://www.nordicsemi.no>  
 [2] 雷志华. 多媒体教室技术管理的研究与实践 [J]. 实验室研究与探索, 2005, 24(4): 22-24.  
 [3] 电子工程世界. WM8951L [DB/OL]. [2006-11-5]. <http://data>

**(上接第 9 页)**

我们发现本实验设计进度合理,由于高年级本科学生对本实验所用仪器的使用方法已较为熟练,25 组学生均能有条不紊地在设定的 10 学时内完成实验。实验内容充实、紧凑,较一般生物化学实验教材中的简单糖类定量反应实验更能激发学生对糖类研究相关方法深入探索的兴趣,学生能积极地完成课前预习及对实验结果的分析讨论。由于实验再现性好、结果明确,学生对糖类区别于蛋白质等其他生物大分子的特殊性质有了更为深刻的认识。本实验作为生命科学专业高级生化技术实验的教学内容非常适合,不仅提高了学生的实验兴趣、操作技能,也丰富了糖类的实验内容。

**参考文献 (References):**

[1] 方福得. 分子生物学前沿技术 [M]. 北京:北京医科大学中国协

**(上接第 23 页)**

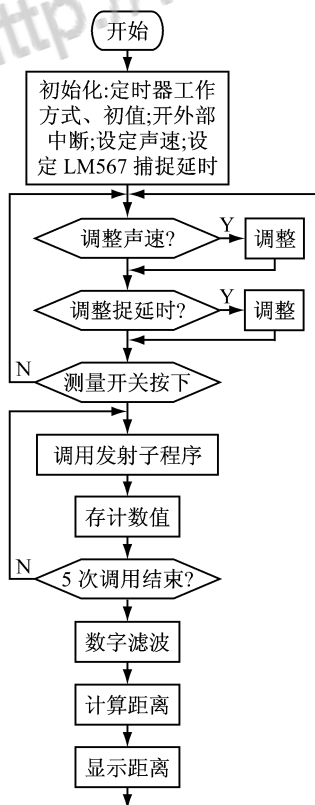


图 6 程序流程图

[eeworld.com.cn/pdf/28870\\_WOLFSON\\_WM8951L.html](http://www.eeworld.com.cn/pdf/28870_WOLFSON_WM8951L.html)

[4] Cirrus Logic, Inc. CS43L41 [EB/OL]. [2006-11-5]. <http://www.cirrus.com>  
 [5] 秦龙. MSP430 单片机 C 语言应用程序设计实例精讲 [M]. 北京:电子工业出版社, 2006  
 [6] 何锋. 用 CP2101 将 USB 口扩展成串口 [J]. 国外电子元器件, 2005(9): 19-21.  
 [7] 殷伟凤,徐君国. 蓝牙技术在音频网关中的应用 [J]. 单片机与嵌入式系统应用, 2003(12): 54-56, 62.  
 [8] 迅通科技. 设计最佳的无线音频产品 [EB]. [2006-10-25]. <http://www.freqchina.com/wireless%20audio.pdf>

和医科大学联合出版社, 1998

[2] 张维杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 杭州:浙江大学出版社, 1999.  
 [3] Varki A. Essentials of Glycobiology [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.  
 [4] 江培红. 开设自选实验,全面提高学生实验能力 [M]//中华教育理论与实践. 中国物质出版社, 2004.  
 [5] 白晨. 灵芝松茸混菌共酵多糖抗肿瘤活性实验的比较研究 [J]. 微生物学通报, 2004, 30(5): 76-78  
 [6] 李建武. 生物化学实验原理和指导 [M]. 北京:北京大学出版社, 1994.  
 [7] 张龙翔. 生化实验技术和方法 [M]. 北京:人民教育出版社, 1981.  
 [8] 陈文俊. 基础生物化学实验教学的改革与实践 [M]//实验教学与创新能力. 南京:南京大学出版社, 2001.

**参考文献 (References):**

[1] 刘大健,夏哲雷. 集成锁相环路解码器 LM567 及其在检测电路中的应用 [J]. 国外电子元器件, 2000, 123(1): 30-31.  
 [2] National Semiconductor Corporation. LM567/LM567C Tone Decoder [DB/OL]. 1999-5. <http://www.21insearch.com/searchpdf/ns/LM567.pdf>  
 [3] 姜道连,宁延一. 用 AT89C2051 设计超声波测距仪 [J]. 国外电子元器件, 2000, 135(12): 31-35.  
 [4] 高明光,唐松林. 超声传感器在物位测量中的应用 [J]. 传感器技术, 1997, 16(3): 46-48  
 [5] 黄邦彦,胡子进. 制动装置的超声波检测方法研究 [J]. 武汉船舶职业技术学院学报, 2002, 5(2): 30-33.  
 [6] 杨振江,杜铁军. 流行单片机实用子程序及应用实例 [M]. 西安:西安电子科技大学出版社, 2002: 1-218.  
 [7] 张友德,赵志英. 单片微型机原理、应用与实验 [M]. 上海:复旦大学出版社, 2000: 1-156.