



全国普通高等教育“十二五”规划教材

生物化学与 分子生物学实验指导

张克中 郭 巍 主编

LABORATORY MANUAL FOR BIOCHEMISTRY
AND MOLECULAR BIOLOGY

中国林业出版社

全国普通高等教育“十二五”规划教材

生物化学与分子 生物学实验指导

主编 张克中 郭巍



中国林业出版社

内容提要

本教材是普通高等院校生物化学与分子生物学实验的教学用书。内容包括：糖类、脂类、蛋白质、核酸、维生素、新陈代谢、免疫、分子标记等实验。主要分为实验原理、基础实验、综合性实验和研究性实验四部分内容。本教材适用于各类院校生物学、植物学、动物学、农学、林学等相关专业本科生和研究生的实验教学使用。另外，本教材除了用于实验教学之外，还可供有关科研人员参考使用。

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学与分子生物学实验指导/张克中, 郭巍主编. —北京: 中国林业出版社, 2015. 8
ISBN 978-7-5038-8115-2

I. ①生… II. ①张… ②郭… III. ①生物化学-实验-高等学校-教学参考资料 ②分子生物学-实验-高等学校-教学参考资料 IV. ①Q5-33 ②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 193347 号

中国林业出版社·教育出版分社

策划、责任编辑: 许 玮

电 话: (010) 83143559

传 真: (010) 83143516

出版发行 中国林业出版社 (100009 北京市西城区德内大街刘海胡同 7 号)

E-mail: jiaocaipublic@163.com 电话: (010) 83143500

网 址: <http://lycb.forestry.gov.cn>

经 销 新华书店

印 刷 北京宝昌彩色印刷有限公司

版 次 2015 年 8 月第 1 版

印 次 2015 年 8 月第 1 次

开 本 787mm × 1092mm 1/16

印 张 17.75

字 数 396 千字

定 价 30.00 元

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。

版权所有 侵权必究

全国普通高等教育“十二五”规划教材
《生物化学与分子生物学实验指导》
编写人员名单

主 编 张克中 郭 巍

副 主 编 崔金腾

编写人员 (按姓氏笔画排序)

巩校东 (河北农业大学)

陈 艳 (北京农学院)

李 佳 (北京农学院)

张克中 (北京农学院)

赵 丹 (河北农业大学)

郭晓军 (河北农业大学)

郭 巍 (北京农学院)

崔金腾 (北京农学院)

藏金萍 (河北农业大学)

前言

生物化学与分子生物学理论与基本实验技术已广泛渗透并常规应用于生命科学各个领域,其实验教学是高等院校生命学科教育的重要组成部分,是提高学生基本实验技能的主要方式,是培养学生独立分析问题和解决问题能力的重要途径。实验教学不仅体现了学生参与、师生互动、加强实践的现代教育理念,更是培养学生创新意识、动手能力及科研能力的良好手段。因此,为了使各类院校生物学、植物学、动物学、农学和林学等专业学生能够系统地学习和掌握生物化学与分子生物学的基本实验技能,我们组织了有丰富教学经验并热心于教学改革教师们,历时2年共同合作编写了生物化学与分子生物学实验教材。

本教材内容涉及糖类、脂类、蛋白质、核酸、维生素、新陈代谢、免疫、分子标记8个方面共32个实验,体现了生物化学与分子生物学知识体系的科学性、完整性和先进性。本教材共分为四部分:第一部分为实验原理部分,主要提供层析技术、电泳技术、离心技术、光谱技术、色谱技术、核酸提取技术、蛋白提取技术、PCR扩增技术、分子标记技术、免疫化学技术和细胞培养技术等生物化学与分子生物学常使用到的实验技术的原理内容;第二部分为基础实验部分,主要用于各类院校生物学、植物学、动物学、农学、林学等本科专业的生物化学与分子生物学基础实验使用;第三部分为综合性实验,主要用于各类院校生物学、植物学、动物学、农学、林学等本科专业的生物化学与分子生物学综合实验,以及相关专业的硕士研究生教学使用;第四部分为研究性实验,主要用于各类院校相关专业研究生的实验教学使用。

本教材由张克中和郭巍任主编,崔金腾任副主编。编写分工如下:第一部分实验原理由崔金腾、郭晓军、陈艳、巩晓东、李佳、藏金萍编写;第二部分基础实验由郭巍、崔金腾、赵丹、郭晓军、陈艳、巩晓东、李佳、藏金萍编写;第三部分综合性实验和第四部分研究性实验由张克中、崔金腾编写;附录部分由崔金腾、李佳编写;全书由张克中、郭巍和崔金腾负责修改、审核和统稿。

本教材的编写得到了北京市教委面上项目(KM201510020011)、北京市属高等学校创新团队建设与教师职业发展计划项目(IDHT20150503)、城乡生态环境北京实验室项目(PXM2015-014207-000014)和北京市乡村景观规划设计工程技术研究中心共同资助。同时北京农学院和河北农业大学的教师、教务部门和中

国林业出版社对本教材的编写和出版给予了大力支持，在此表示我们最诚挚的谢意。

由于编者水平有限、时间紧迫，教材中不当或错误之处敬请同行专家和广大师生提出宝贵意见。

编 者

2015 年 4 月

目 录

前 言

第一部分 实验原理	(1)
一、层析技术	(1)
二、电泳技术	(19)
三、离心技术	(29)
四、光谱技术	(37)
五、质谱技术	(44)
六、色谱技术	(53)
七、核酸提取原理及测序	(62)
八、蛋白质提取与测序技术	(69)
九、PCR 扩增技术	(78)
十、分子标记技术	(90)
十一、免疫化学技术	(98)
十二、细胞培养技术	(104)
第二部分 基础实验技术	(113)
实验一 糖类的颜色反应和还原反应	(113)
实验二 总糖的提取和测定	(117)
实验三 血糖的含量测定	(119)
实验四 粗脂肪的提取和定量测定	(121)
实验五 血清总胆固醇的含量测定	(123)
实验六 总蛋白质的提取	(126)
实验七 蛋白质的含量测定方法	(129)
实验八 蛋白质的性质测定方法	(139)
实验九 蛋白质的分离与纯化方法	(144)
实验十 氨基酸分离与鉴定——纸层析法	(153)
实验十一 酶活性测定方法	(155)
实验十二 DNA 的提取与鉴定	(164)

实验十三	RNA 的提取与鉴定	(171)
实验十四	核酸的扩增和电泳	(176)
实验十五	DNA 的回收与重组	(183)
实验十六	核酸分子杂交实验——Southern 杂交	(188)
实验十七	维生素 A 定量测定	(190)
实验十八	维生素 C 的定量测定	(194)
实验十九	动物食品抗生素生物含量测定	(196)
实验二十	不同生理期淀粉酶活力的比较分析	(200)
实验二十一	血清钙含量的测定 (EDTA 二钠滴定法)	(204)
实验二十二	肌糖原的酵解	(206)
实验二十三	血清丙氨酸氨基转移酶测定	(209)
实验二十四	酶联免疫吸附测定——ELISA	(212)
实验二十五	蛋白质免疫印迹	(216)
实验二十六	非变性聚丙烯酰胺凝胶的 SSR 标记分析	(220)
实验二十七	变性聚丙烯酰胺凝胶的 AFLP 标记分析	(223)
第三部分 综合性实验		(227)
实验一	采用 RT-PCR 法对植物病毒的测定与分析	(227)
实验二	蛋白质双向电泳	(229)
实验三	葡萄糖异构酶基因的克隆、表达及纯化鉴定	(233)
第四部分 研究性实验		(237)
实验一	利用分子标记技术分析植物群体的遗传多样性	(237)
实验二	植物特异性基因的克隆与测序	(241)
附 录		(248)
参考文献		(273)

第一部分 实验原理

一、层析技术

有色物质如植物色素在吸附柱上流动后可以排列成一系列有序的、单一组分的集合，这种将混合物分离的方法称为层析法，又称色层分析法或色谱法。无色物质也可利用吸附柱层析分离。层析技术是利用混合物中各组分物理化学性质（如吸附力、分子形状、分子大小、分子极性、分子亲和力及分配系数等）的差别使各组分以不同程度分布在两相中（其中一相为固定相，另一相流过此固定相，称流动相。流动相分为气相和液相），使各组分以不同速度移动而达到分离，达到分离纯化的目的。

层析法的种类很多，如按两相物理状态，可分为气相层析、液相层析及超临界流体层析；按分离原理，可分为吸附层析、分配层析、离子交换层析、排阻层析、亲和层析等；按层析过程及动力学过程，可分洗提层析、置换层析及前沿层析；按固定相的形态，分为柱层析和平板层析，此外，还有其他多种层析类型。下边着重介绍几种层析方法。

（一）分配层析

分配层析是利用混合物中各组分在两种或两种以上不同溶剂中的分配系数不同而分离混合物中各组分的方法，相当于一种连续的溶剂抽提方法。纸层析法（paper-chromatography）是分配层析技术的一种，是利用各物质不同的分配系数，使混合物随流动相通过固定相而予以分离的方法。

分配系数是指一种溶质在两种互不相溶的溶剂中的溶解达到平衡时，该溶质在两相溶液中所具浓度的比例。不同物质因其结构和性质不同而有不同的浓度比，即有不同的分配系数。在等温等压条件下，分配系数（ K ）用下式表示：

$$K = K_2 / K_1$$

式中： K_1 ——物质在流动相中的浓度；

K_2 ——物质在固定相中的浓度。

1. 基本原理

纸层析是以滤纸为载体的分配层析，滤纸上吸附着水（约含 20% ~ 22%），

是经常使用的固定相。某些有机溶剂如醇、酚等为常用的流动相。把欲分离的物质加在滤纸的一端，使流动相溶剂经此移动，这样待分离物就在两相发生分配现象。由于样品中各物质的分配系数不同，就逐渐在纸上分别集中于不同的部位。在固定相中分配趋势较大的成分，随移动相流动的速度较慢；反之，在流动相中分配趋势较大的成分，移动速度就较快。物质在纸上的移动速率可以用 R_f 表示。物质在一定溶剂中的分配系数是一定的，移动速率(R_f)也恒定，因此，可以根据 R_f 来鉴定被分离的物质。

R_f 由两个因素决定，即物质在两相间的分配系数及两相的体积比。

R_f = 组分移动的距离/溶剂前沿移动的距离

= 原点中心至层析点中心的距离/原点中心至溶剂前缘的距离

在滤纸、溶剂、温度等各项实验条件恒定的情况下，各物质的 R_f 值是不变的，它不随溶剂移动距离的改变而变化。 R_f 与分配系数 K 的关系为：

$$R_f = 1/(1 + \alpha K)$$

α 是由滤纸性质决定的一个常数。由此可见， α 值愈大，溶质分配于固定相的趋势愈大，而 R_f 值愈小；反之， α 值愈小，则分配于流动相的趋势愈大， R_f 值愈大。 R_f 值是定性分析的重要指标。

2. 影响 R_f 值的因素

由于在同一实验条件下，两相体积比为一常数，所以 R_f 主要取决于分配系数 K 。因此，凡能影响分配系数的因素，均能影响 R_f 。这些因素主要有：

(1) 物质结构与极性

在纸层析中，固定相实际上是水，流动相为非极性溶剂，在水与有机溶剂两相之间决定物质分配系数的主要因素是物质极性大小，分配系数的改变即反映出 R_f 值的变化，极性大的物质其 R_f 值较小。

(2) 层析溶剂

选择溶剂时应考虑被分离物质在溶剂系统中的 R_f 需要在 0.05 ~ 0.85 之间。常见的纸层析溶剂系统见表 1-1。

表 1-1 一些纸层析分离系统的例子

化合物	溶剂系统(体积比)
氨基酸	正丁醇/乙酸/水(40/10/50)
	正丁醇/吡啶/水(33/33/33)
单糖或二糖	正丁醇/吡啶/水(50/28/22)
	甲醇/吡啶/水(25/12/63)
叶绿素和类胡萝卜素	丙醇/石油醚(4/96)
	氯仿/石油醚

(3) pH

pH 可以影响物质的解离及流动相中的含水量。pH 值增加或降低，都会使极性物质 R_f 增加。当分离两性物质时，可用酸碱两向层析，能获得较好效果。

(4) 温度

温度不仅影响物质在两相间的分配系数，还影响溶剂组成及纤维素的水合作用。因此要获得准确的 R_f 值，层析过程在恒温下为宜。

(5) 展开方式

R_f 值可因展开方式不同而有所差异，其中上行展开的 R_f 值较小，下行展开的 R_f 值较大。环形展开时，由于溶剂是从中心向四周扩散，内圈较外圈小，限制了溶剂的流动，故 R_f 值也较大。

3. 操作方法

定量法有三种：

(1) 剪洗法

分离显色后剪下样品斑点，用适当溶剂洗脱，并用等高处无样点滤纸(面积相同)作对照，比色定量，该法一般有 $\pm 5\% \sim 10\%$ 的误差。

(2) 扫描法

用光密度计直接扫描滤纸条，描绘出色谱曲线图，根据积分计数或测量曲线面积求出物质含量，一般有 $\pm 5\% \sim 10\%$ 的误差。

(3) 直接测量斑点面积

此法影响因素较多，每次斑点的形状不易控制，重复性差。

纸层析法按操作方法分成两类，即垂直型和水平型。垂直型是将纸悬起，使流动相向上或向下扩散。水平型是将圆形滤纸置于水平位置，溶剂由中间向四周扩散。

垂直型使用较广，按分离物质的多寡，将滤纸截成长条，在某一端离边缘 $2 \sim 4\text{cm}$ 处点样，待干后，将点样端边缘与溶液接触，在密闭的玻璃缸内展开，如图 1-1 所示。

一次展开，称为单向层析。如果样品成分较多，而且彼此的 R_f 相近，单向层析分离效果不好，此时可采用双向层析法。即在长方形或方形滤纸的一角点样，卷成圆筒形，先用第一种溶剂系统展开；展开完毕吹干后转 90° ，再放于另一种溶剂系统中，向另一方向进行第二次展开，可使各成分的分离较为清晰，如图 1-2 所示。

在纸层析中，通常支持相是含水的，移动相是有机溶剂。但是，有些化合物用有机的支持相和含水的移动相能得到更好的分离。为此，层析纸先用有机相(一般是液体石蜡)浸润。当被分离的混合物加到纸上时，用一种含水溶剂按通常的方法展开，称为反相层析。

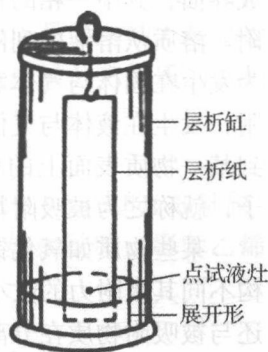


图 1-1 垂直型纸层析

(二) 吸附层析

吸附层析是溶液中的溶质随流动相通过吸附层析介质时，柱内的吸附介质表面的吸附基团对溶质发生吸附作用，某些溶质就会被吸附在介质表面上。介质表

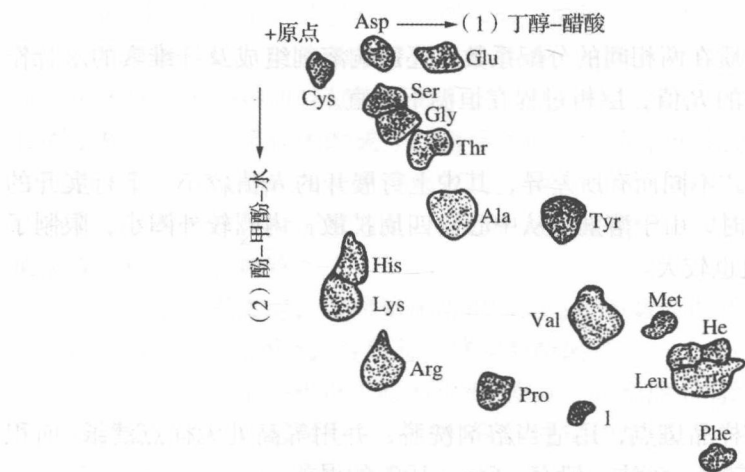


图 1-2 氨基酸双向纸层析色谱

(1) 正丁醇：冰醋酸：水 = 4：1：5 (体积比)；(2) 酚：水 = 8：2 (质量比)

面的活性基团不同，对溶质产生的吸附能力的强弱有较大的差异。因此，可以利用介质对溶质吸附能力的强弱，通过吸附层析将不同溶质分开。凡是利用固定相表面的活性基团来吸附流动相中溶质而进行分离的方法，均称之为吸附层析。

吸附层析技术是一种比较成熟的方法，至今在常规层析分离中应用很广，在微量分析方面也有较大的发展，在生物大分子的分离纯化中发挥着重要作用。

1. 原理

(1) 吸附现象

吸附作用是物质表面的一个重要性质，就理论上而言，任何两相都有可能形成界面，其中一相的物质或溶解在其中的溶质在表面上发生密集行为，称之为吸附。溶质从溶液中到停留在固体表面上这一过程，称之为吸附现象。溶质密集行为发生在固体与气体之间称为固-气吸附，发生在固体与液体之间称为固-液吸附，发生在液体与气体之间称为液-气吸附。因此凡是能够将周围其他分子聚集到某一物质表面上的材料，就称之为吸附介质。能够聚集在吸附介质表面的分子，就称之为被吸附物质。

某些物质如氧化铝、硅胶等具有吸附其他物质的特性。被吸附物质的分子结构不同其吸附力的大小而有差异，利用这种差异将混合物分离。这种方法的效果还与被吸附物质在分离用的溶剂(洗脱液或展开剂)中的溶解度等因素有关。

(2) 吸附力的产生

固体表面上的分子(离子或原子)和固体内部分子所受的吸引力不相等，在内部分子与分子之间的相互作用力是对称的，其力场相互抵消。而处在固体表面的分子所受的力是不对称的，向内的一侧受到固体内部分子的作用力大，表面一侧受到的力小，形成了分子间的内引力，这种内引力对周围的分子具有一定的吸附作用。当气体分子或溶质分子在运动过程中碰到吸附介质表面时，受其内部分子引力的作用，就会被吸引而停留在固体表面。不同的物质被吸附的紧密程度不

同, 利用吸附能力的强弱进行吸附层析。

(3) 吸附

在一定条件下, 吸附介质与被吸附物质之间相互作用, 二者结合在一起。当改变它们的吸附环境后, 二者又可以分开。吸附介质对周围分子的吸附力是微弱的, 根据吸附介质的基本性质, 吸附可分为物理吸附和化学吸附等。

物理吸附 物理吸附是依靠分子间相互作用的范德华力引起的吸附, 所以也称之为范德华力吸附。物理吸附的特点是对吸附分子无选择性, 吸附速度快, 吸附是可逆的, 吸附过程中释放的能量较小, 吸附力较强, 吸附的分子层既有单层, 也有多层。随着吸附环境的改变吸附介质的吸附能力也会发生变化, 被吸附的分子容易解吸附。

化学吸附 化学吸附是依靠物质中的化学键的作用引起吸附, 如电子转移或被吸附分子与吸附介质表面共用电子等。化学吸附的特点是在一定的条件下进行选择性的吸附, 吸附速度慢, 吸附过程中释放的能量较大, 吸附力强, 不易解吸附, 被吸附的分子层只有单层。

复合吸附 复合吸附是物理吸附和化学吸附同时发生, 这要根据吸附介质和被吸附分子的性质而定。有的吸附介质在一定的条件下, 既可以发生物理吸附又可以发生化学吸附, 也可以由物理吸附转变为化学吸附或者由化学吸附转变为物理吸附。

饱和和吸附 吸附层析的吸附过程是可逆的, 在吸附的过程中同时发生解吸附。在吸附初期吸附速度大于解吸附速度, 随着吸附量的增加解吸附的速度不断增大。在单位时间内被吸附物在吸附介质某一表面积上被吸附的分子与同一单位时间内在该介质的同一表面上解吸附的分子相等时, 层析柱内的吸附和解吸附达到了动态平衡, 处于该环境中吸附介质的吸附作用达到饱和, 此时层析柱应当停止吸附。如何判断饱和和吸附对吸附层析是很重要的, 最直接、最简单的方法是检测流入和流出溶液中被分离物质的量。如果流入和流出溶液中被分离物质的量相等, 说明该层析柱已经达到饱和和吸附。

2. 吸附介质的分类

目前使用的吸附层析介质种类很多, 大多数都是用天然材料制成的(如硅胶、氧化铝、沸石、活性炭和磷酸钙等), 少数是化学合成的(如聚酰胺、聚苯乙烯等)。不同原料制成的吸附介质其吸附原理是不同的。

(1) 活性炭

活性炭是常用的一种吸附介质, 活性炭的吸附原理主要是活性炭分子中的活性基团(如羟基等)与被分离物质分子中的某些基团产生范德华引力形成的吸附作用。

(2) 硅胶

硅胶是一种广泛使用的极性吸附介质, 其优点是化学性质稳定, 吸附量大。在硅胶的制备过程中, 絮凝作用的快慢决定着硅胶表面积的大小, 也就决定硅胶吸附能力的大小。硅胶的吸附活性取决于其含水量。当含水量小于1%时, 吸附

活性最高；当含水量大于 20% 时，吸附活性最低。

(3) 氧化铝

氧化铝吸附介质是一类疏水性吸附介质，主要用于分离非极性化合物。氧化铝的吸附原理一般认为是被分离的物质与氧化铝表面的一些羟基相互作用，形成氢键，铝原子提供一个亲电子中心，吸引电子供体的某些基团，如—OH、—NH₂。不同性质的物质提供的基团，亲电子中心产生的引力不同。

(4) 磷酸钙

磷酸钙是一种极性吸附介质，适于分离生物大分子（如蛋白质、核酸等）。羟基磷灰石对蛋白质的吸附原理是溶质分子中的酸性基团与洗脱液中的磷酸根离子对羟基磷灰石中的钙离子有竞争作用；对核酸吸附的机理与蛋白质类似，多聚核苷酸带负电荷的磷酸基与羟基磷灰石结晶表面的阳离子钙之间能相互发生吸附作用。在洗脱时要用高浓度的磷酸盐才能洗脱下来。多聚核苷酸从羟基磷灰石柱上洗脱是通过缓冲液中无机磷酸根离子或溶液中的磷酸残基对羟基磷灰石表面上的阳离子钙发生竞争作用而被解吸附的。

(5) 聚丙烯酰胺

聚丙烯酰胺是一种化学合成的极性吸附介质，适合于分离极性化合物，如酚、羧酸、DNP-氨基酸、醌及芳香族硝基化合物。聚丙烯酰胺吸附的原理是由于分子中的酰胺基与被分离物质羟基和羧基之间形成氢键。介质吸附能力的大小，取决于被分离物质分子中的酚羟基、羧基、氨基酸等与聚丙烯酰胺分子中酰胺基形成氢键的强弱。在聚丙烯酰胺层析的过程中，洗脱剂与被分离物质在聚丙烯酰胺颗粒的表面上竞争性形成氢键，洗脱剂与聚丙烯酰胺形成氢键的能力比被分离物质强，在洗脱过程中被分离物质与聚丙烯酰胺形成氢键的能力不断减弱，洗脱剂与聚丙烯酰胺形成氢键的能力不断增强，最终被分离物质从聚丙烯酰胺介质上被洗脱下来。

(6) 聚苯乙烯

聚苯乙烯属于非极性介质，是由苯乙烯和二苯乙烯共聚而成的，适合于分离分子中含有硝基、氯原子和酚羟基的化合物。分离的原理是被分离物质中的疏水基团与聚苯乙烯之间的范德华力的作用结果。

3. 吸附剂和洗脱剂的选择

要使吸附层析的结果满意，就要正确处理吸附和解吸附矛盾，首先应合理选择和应用吸附剂和洗脱剂。应当指出，由于所分离的物质的复杂性，至今还没发现一种通用的吸附剂。

(1) 吸附剂

通过实践根据具体情况选择比较理想的吸附剂。通常吸附剂应具有以下基本条件：吸附剂不溶于样品溶液和洗脱剂；它与待分离的物质除发生吸附、解吸附作用外，不发生其他化学反应；吸附剂最好是无色或浅色的，便于观察；渗滤的速度要快。

常用的吸附剂是氧化铝、氧化锡、硅胶、碳酸盐、硫酸盐及硅酸盐。分离不稳定的化合物常用淀粉、蔗糖、乳糖等。

(2) 洗脱剂

用来洗脱吸附柱的液体物质称洗脱剂。可根据分离物中各成分的极性、溶解度和吸附活性来选择洗脱剂,一般极性大的成分用极性大的洗脱剂,极性小的成分用极性小的洗脱剂。洗脱剂极性绝不能比待分离成分的极性更小,因为极性强的物质较易把极性弱的物质从吸附柱上洗脱下来。

通常非极性的与极性不强的有机物,如胡萝卜素、甘油酯、胆固醇等的分离,用这种方法最为合适。

(三) 离子交换层析法

离子交换层析(ion exchange chromatography)是利用离子交换剂上的可交换离子与周围介质中被分离的各种离子间的亲和力不同,经过交换平衡达到分离目的的一种柱层析法。1848年,Thompson等人在研究土壤碱性物质交换过程中发现离子交换现象。20世纪40年代,出现了具有稳定交换特性的聚苯乙烯离子交换树脂。50年代,离子交换层析进入生物化学领域,应用于氨基酸的分析。目前离子交换层析仍是生物化学和分子生物学领域中常用的一种层析方法,广泛应用于各种生化物质如氨基酸、蛋白质、糖类、核苷酸等的分离纯化。

1. 基本原理

离子交换层析是依据各种离子或离子化合物与离子交换剂的结合力不同而实现分离纯化的。离子交换层析的固定相是离子交换剂,它是由一类不溶于水的惰性高分子聚合物基质通过一定的化学反应共价结合上某种电荷基团而形成的。任何离子通过柱时的移动速度决定于与离子交换剂的亲和力、电离程度和溶液中各种竞争性离子的性质和浓度。离子交换剂可以分为高分子聚合物基质、电荷基团和平衡离子三部分。电荷基团与高分子聚合物共价结合,形成一个带电的可进行离子交换的基团,其上带有许多可电离基团,根据这些基团所带电荷不同,可分为阴离子交换剂和阳离子交换剂。平衡离子是结合于电荷基团上的相反离子,它能与溶液中的其他离子基团发生可逆的交换反应。它的交换过程由5个步骤组成:①离子扩散到树脂的表面;②离子通过树脂扩散到交换位置;③在交换位置上进行离子交换;④被交换的离子通过树脂扩散到表面;⑤用洗脱剂脱附,被交换的离子扩散到外部溶液中。

假定以RA代表阳离子交换剂,在溶液中解离出来的阳离子 A^+ 与溶液中的阳离子 B^+ 可发生可逆的交换反应,反应式如下:



该反应能以极快的速率达到平衡,平衡的移动遵循质量作用定律。

离子交换剂对溶液中不同离子具有不同的结合力,结合力的大小取决于离子交换剂的选择性。离子交换剂的选择性可用其反应的平衡常数 K 表示:

$$K = [RB][A^+] / [RA][B^+]$$

如果反应液中 $[A^+]$ 等于 $[B^+]$,则 $K = [RB] / [RA]$ 。若 $K > 1$,即 $[RB] > [RA]$,表示离子交换剂对 B^+ 的结合力大于 A^+ ;若 $K = 1$,即 $[RB] = [RA]$,表示离子交换剂对 A^+ 和 B^+ 的结合力相同;若 $K < 1$,即 $[RB] < [RA]$,表示离子

交换剂对 B^+ 的结合力小于 A^+ ； K 值是反映离子交换剂对不同离子的结合力或选择性参数，故称 K 值为离子交换剂对 A^+ 和 B^+ 的选择系数。

溶液中的离子与交换剂上的离子进行交换，一般来说，电性越强，越易交换。对于阳离子树脂，在常温常压的稀溶液中，交换量随交换离子的价数增大而增大，如 $Na^+ < Ca^{2+} < Al^{3+} < Si^{4+}$ 。若离子价数相同，交换量则随交换离子的原子序数的增加而增大，如 $Li^+ < Na^+ < K^+ < Pb^+$ 。在稀溶液中，强碱性树脂的各负电性基团的离子结合力次序是： $CH_3COO^- < F^- < OH^- < HCOO^- < Cl^- < SCN^- < Br^- < CrO_4^{2-} < NO_2^- < I^- < C_2O_4^{2-} < SO_4^{2-} < 柠檬酸根$ 。弱碱性阴离子交换树脂对各负电性基团结合力的次序为： $F^- < Cl^- < Br^- = I^- = CH_3COO^- < MoO_4^{2-} < PO_4^{3-} < AsO_4^{3-} < NO_3^- < 酒石酸根 < 柠檬酸根 < CrO_4^{2-} < SO_4^{2-} < OH^-$ 。

两性离子如蛋白质、核苷酸、氨基酸等与离子交换剂的结合力，主要取决于它们的理化性质和特定的条件下呈现的离子状态。当 $pH < pI$ 时，能被阳离子交换剂吸附；反之，当 $pH > pI$ 时，能被阴离子交换剂吸附。若在相同 pI 条件下，且 $pI > pH$ 时， pI 越高，碱性越强，就越容易被阳离子交换剂吸附。

离子交换层析就是利用离子交换剂的荷电基团，吸附溶液中相反电荷的离子或离子化合物，被吸附的物质随后为带同类型电荷的其他离子所置换而被洗脱。由于各种离子或离子化合物对交换剂的结合力不同，因而洗脱的速率有快有慢，形成了层析层。

2. 离子交换剂类型及选择

(1) 离子交换剂的类型

根据离子交换剂中基质的组成及性质，可将其分成两大类：疏水性离子交换剂和亲水性离子交换剂。

疏水性离子交换剂 疏水性离子交换剂的基质是一种与水亲和力较小的人工合成树脂，最常见的是由苯乙烯与交联剂二乙烯苯反应生成的聚合物，在此结构中再以共价键引入不同的电荷基团。由于引入电荷基团的性质不同，又可分为阳离子交换树脂、阴离子交换树脂及螯合离子交换树脂。

阳离子交换剂的电荷基团带负电，反离子带正电，故此类交换剂可与溶液中的阳离子或带正电荷化合物进行交换反应。依据电荷基团的强弱，又可将它分为强酸型、中强酸型及弱酸型三种，各含有以下可解离基团：



阴离子交换剂是在基质骨架上引入季铵 $[-N^+(\text{CH}_3)_3]$ 、叔胺 $[-N(\text{CH}_3)_2]$ 、仲胺 $[-\text{NHCH}_3]$ 和伯胺 $[-\text{NH}_2]$ 基团后构成的,依据氨基碱性的强弱,又分为强碱性(含季铵基团)、弱碱性(含叔胺、仲胺基团)及中强碱性(既含强碱性基团又含弱碱性基团)三种阴离子交换剂。

螯合离子交换树脂具有吸附(或络合)一些金属离子而排斥另一些离子的能力,可通过改变溶液的酸度提高其选择性。由于它的高选择性,只需用很短的树脂柱就可以把欲测的金属离子浓缩并洗脱下来。

疏水性离子交换剂由于含有大量的活性基团,交换容量大、流速快、机械强度大,主要用于分离无机离子、有机酸、核苷、核苷酸及氨基酸等小分子物质,也可用于从蛋白质溶液中除去表面活性剂[如十二烷基硫酸钠(SDS)]、去污剂[如壬基苯基聚氧乙烯醚(Triton X-10)]、尿素、两性电解质(ampholyte)等。

亲水性离子交换剂 亲水性离子交换剂中的基质为一类天然的或人工合成的化合物,与水亲和性较大,常用的有纤维素、交联葡聚糖及交联琼脂糖等。

纤维素离子交换剂或称离子交换纤维素,是以微晶纤维为基质,再引入电荷基团构成的。根据引入电荷基团的性质,也可分强酸性、弱酸性、强碱性及弱碱性离子交换剂。纤维素离子交换剂中,最为广泛使用的是二乙氨基乙基(DEAE-)纤维素、羧甲基(CM-)纤维素。近年来 Pharmacia 公司用微晶纤维素经交联作用,制成了类似凝胶的珠状弱碱性离子交换剂(DEAE-Sephacel),结构与 DEAE-纤维素相同,对蛋白质、核酸、激素及其他生物聚合物都有同等的分辨率。目前常用的纤维素交换剂见表 1-2。离子交换纤维素适用于分离大分子多价电解质。它具有疏松的微结构,对生物大分子物质(如蛋白质和核酸分子)有较大的穿透性;表面积大,因而有较大的吸附容量。基质是亲水性的,避免了疏水性反应对蛋白质分离的干扰;电荷密度较低,与蛋白质分子结合不牢固,在温和洗脱条件

表 1-2 离子交换纤维素

交换剂(简写)	类型	功能基团	交换容量(mmol/g)	适宜工作 pH
磷酸纤维素 (P-C)	中强酸型阳离子交换剂	$-\text{PO}_3^{2-}$	0.7 ~ 7.4	pH < 4
磺酸乙基纤维素 (SE-C)	强酸型阳离子交换剂	$-(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3^-$	0.2 ~ 0.3	极低
羧甲基纤维素 (CM-C)	弱酸型阳离子交换剂	$-\text{CH}_2\text{COO}^-$	0.5 ~ 1.0	pH > 4
三乙氨基乙基纤维素 (TEAE-C)	强碱型阴离子交换剂	$-(\text{CH}_2)_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	0.5 ~ 1.0	pH > 8.6
二乙氨基乙基纤维素 (DEAE-C)	弱碱型阴离子交换剂	$-(\text{CH}_2)_2\text{N}^+\text{H}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	0.1 ~ 1.0	pH < 8.6
氨基乙基纤维素 (AE-C)	中等碱型阴离子交换剂	$-(\text{CH}_2)_2\text{N}^+\text{H}_2$	0.3 ~ 1.0	
Ecteda 纤维素 (ECTE-C)	中等碱型阴离子交换剂	$-(\text{CH}_2)_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_4\text{OH})_3$	0.3 ~ 0.5	