

# 高级生物化学实验 理论与技术

主编 王燕菲



科学出版社

# 高级生物化学实验 理论与技术

主 编 王燕菲  
副主编 刘 誉 黄 炜  
编 委 (按姓氏笔画排序)  
王燕菲(广州医科大学)  
朱文渊(广州医科大学)  
刘 誉(暨南大学)  
宇 丽(暨南大学)  
李 帅(广州医科大学)  
李雅楠(广州医科大学)  
陈新美(广州医科大学)  
赵 青(广州医科大学)  
黄 炜(广州医科大学)  
龚 青(广州医科大学)



科学出版社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

## 内 容 简 介

本书理论部分共有六章,第一章是蛋白质分离纯化的基本原理和方法,主要介绍蛋白质的粗分和层析纯化。第二章是电泳,主要介绍常用的电泳方法。第三章是荧光免疫,主要介绍荧光标记和抗原抗体反应。第四章是蛋白质组学,介绍蛋白质组学的产生和发展,研究内容以及一些新进展和应用。第五章是基因芯片,主要介绍基因芯片的原理,制备和应用。第六章是酶促反应动力学,重点介绍底物和抑制剂对酶促反应的影响,相关的计算及各种作图法。实验部分的内容包括蛋白分离技术、电泳及蛋白质印迹技术、酶活性测定、 $K_i$  及  $IC_{50}$  的测定、等电聚焦、双向电泳、小鼠原代细胞培养及染色等八个实验。其中层析和电泳是重点要求掌握的实验,其他实验可选择开设。

本书可供硕士研究生课程学习使用,也可作为博士研究生、青年科研工作者和医学生们参考资料。

## 图书在版编目(CIP)数据

高级生物化学实验理论与技术 / 王燕菲主编. —北京:科学出版社,2015.6

ISBN 978-7-03-044730-2

I. ①高… II. ①王… III. ①生物化学—化学实验—高等学校—教学参考资料 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 124344 号

责任编辑:王 颖 / 责任校对:鲁 素

责任印制:徐晓晨 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京京华虎彩印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2015 年 6 月 第 一 版 开本:787×1092 1/16

2015 年 6 月 第一次印刷 印张:8

字数:187 000

定价:25.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

# 前 言

对于生命科学和医学领域的研究生来说,他们将要研究的课题通常都会涉及生物化学或分子生物学的方法,前者较多地偏重于蛋白质,后者则偏重于核酸。从本科阶段学习的普通生物化学知识到研究生课题中比较专业的实验内容,中间的跨度比较大,部分学生进入实验室后无法迅速适应,实验结果不太理想甚至可能影响到课题的进展。因此,在两者之间衔接一个比较系统的高级生物化学实验理论与技术的学习课程就显得非常重要,这也是每年我们开设研究生高级生物化学课程都深受学生们欢迎的原因。

本书分为理论和实验两大部分。理论部分的内容有六章,第一章是蛋白质分离纯化的基本原理和方法,主要介绍层析的原理和应用以及盐析等各种沉淀法。帮助学生了解如何取材,对材料的处理,蛋白质的粗分以及蛋白质的纯化。第二章是电泳,主要介绍几个常用的电泳方法,包括等电聚焦、毛细管电泳和蛋白质印迹法(Western blot)等方法,可在蛋白质分离过程中不断追踪,检测目的蛋白。第三章是荧光免疫,通过荧光标记和抗原抗体反应来进行蛋白质的检测和细胞定位。第四章是蛋白质组学,介绍蛋白质组学的产生和发展,蛋白质组的表达模式和功能模式的研究以及蛋白质组学研究的一些新进展和应用。第五章是基因芯片,主要介绍基因芯片的原理、制备和应用。第六章是酶促反应动力学,这一章是经典的高级生物化学内容,重点介绍底物和抑制剂对酶促反应的影响,相关的计算方程式推导和演算以及相对应的各种作图法。主要帮助学生对动力学的分析,计算和作图有初步的了解和入门。本书的实验部分是配合理论课程的实际操作,着重培养学生进行一些实验室的常规实验,熟悉实验室的常规仪器和设备的使用。实验内容包括蛋白分离技术、电泳及蛋白质印迹技术、酶活性测定、 $K_i$ 及 $IC_{50}$ 的测定、等电聚焦、双向电泳、小鼠原代细胞培养及染色等,其中层析和电泳是重点要求掌握的实验,其他实验可根据实验室条件,学生人数和他们的课题方向作不同的选择。综上所述,本书将研究课题中常见的一些生物化学问题,从原理、方法到发展、应用都作了一些介绍。希望学生们学习之后对实验室的工作有了初步的认识,对课题的实验方法和设计思路起到抛砖引玉的效果,在实验中能够举一反三,尽快地适应课题组的工作。

本书是在我们自编教材的基础上,由广州医科大学生物化学教研室和暨南大学医学院生物化学教研室联合编写。高级生物化学的自编教材在广州医科大学的硕士研究生课程中使用已近二十年,暨南大学医学院开设研究生高级生物化学课程更是超过了三十年。本书的参编教师都具有长期的教学和科研经历,教学实践经验丰富。高级生物化学于2013年获得广东省教育厅研究生示范课程,在长期的教学中深受研究生们的欢迎,因此我们联系科学出版社出版本书,希望可以提供给其他高校的研究生课程选用。

本书主要是作为硕士研究生的课程学习之用;也可作为博士研究生、青年科研工作者和临床医生的学习参考资料;对于参加硕士研究生招生考试的本科生进行复试准备,也有一定的参考借鉴之处。

由于我们的编写经验不足,水平有限,在编写过程中难免会出现一些疏漏和不当之处,敬请同行专家,特别是使用本教材的师生给予批评和指正。

王燕菲  
2015年5月

# 目 录

## 第一篇 实验理论

第一章 蛋白质分离纯化的基本原理和方法 .....	(1)
第一节 材料的选择与处理 .....	(1)
第二节 纯化方案的设计与评价 .....	(2)
第三节 纯化方法 .....	(4)
第二章 蛋白质电泳的基本原理和方法 .....	(24)
第一节 概述 .....	(24)
第二节 聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....	(29)
第三节 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....	(38)
第四节 等电聚焦 .....	(40)
第五节 毛细管电泳 .....	(44)
第六节 印迹法(转移电泳) .....	(47)
第三章 免疫荧光 .....	(50)
第四章 蛋白质组学 .....	(55)
第一节 蛋白质组学的产生与发展 .....	(55)
第二节 蛋白质组学的研究方法 .....	(57)
第三节 蛋白质组学在疾病研究中的应用 .....	(69)
第五章 基因芯片 .....	(71)
第一节 基因芯片的概述 .....	(71)
第二节 基因芯片的基本原理 .....	(72)
第三节 基因芯片的应用 .....	(79)
第六章 酶促反应动力学 .....	(85)
第一节 酶促反应 .....	(85)
第二节 酶促反应的影响因素 .....	(89)
第三节 抑制反应动力学 .....	(94)

## 第二篇 实验技术

实验一 离子交换层析等方法分离纯化鸡卵黏蛋白 .....	(103)
实验二 胰蛋白酶活性测定及鸡卵黏蛋白抑制试验 .....	(105)
实验三 胰蛋白酶抑制剂对反应速度的影响、抑制剂类型的判定及 $K_i$ 、 $IC_{50}$ 的测定 .....	(106)
实验四 苯丙氨酸解氨酶的纯化及活性测定 .....	(110)
实验五 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白印迹 .....	(113)
实验六 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳法 .....	(117)
实验七 蛋白质的双向电泳 .....	(120)
实验八 小鼠原代肝细胞培养及油红“O”染色 .....	(123)

# 第一篇 实验理论

---

## 第一章 蛋白质分离纯化的基本原理和方法

随着人类基因组的 30 亿碱基对测序工作的完成,生命科学研究已进入后基因组时代,研究的焦点将从基因的序列转移到功能方面。为鉴定大量未知蛋白质(酶)的结构和功能,蛋白质研究也将进入一个空前活跃的时期。蛋白质的结构与核酸相比更具有奇妙独特的复杂性和艺术性,它是由 20 个不同性质的氨基酸交互排列而成,不仅潜在的数量多,而且相互间差异大。致使蛋白质的分离、纯化和鉴定有较大的难度和特殊性。其次,蛋白质和核酸类物质通常是与自然界存在的诸多不同化合物结合在一起,或者是不同蛋白质、不同核酸自身相互组合在一起出现的,加之它们稳定性较差、含量相对偏低,这使提取分离过程变得更加困难、艰巨。另外提取生物大分子物质的材料五花八门、千变万化,所用的方法通用性较差,尤其是提取分离蛋白质的方法更是如此,这也给制备工作带来了麻烦和困惑。尽管如此错综复杂,却也不是无轨迹可寻。因此,本章将以蛋白质为主线讨论其制备的共有特质和一般过程,其中包括材料的选择与处理、测定方法的确立、有效成分的抽提、粗品的纯化和纯品的鉴定等相关步骤。

### 第一节 材料的选择与处理

#### 一、材料选择

在进行材料的选择时,常会提及有效成分一词。所谓有效成分是指欲纯化的某种单一的生命大分子物质。而有效成分以外的其他物质则统称杂质。在动物、植物和微生物材料中,有效成分的含量一般较少,如胰脏中胰岛素的含量小于其鲜重的百万分之一。此外,有效成分稳定性较差,大多数对酸、碱、高温和高浓度有机溶剂等因子较敏感,而且容易被微生物分解变质。因此,提取有效成分的成功与否,首先与选用的材料关系密切。选用的材料如果不同,有效成分的含量就不一样;选用的材料即使相同,但是部位、生长期、生长地区或存放时间不同,有效成分的含量也不尽相同。总的来说,材料选择应遵循的原则是:有效成分含量多、稳定性好;来源丰富、保持新鲜;提取容易、工艺简单;杂质有综合利用价值等。例如,上面提到的胰岛素,从含量看,牛胰脏中比猪胰脏中高,但从我国实际出发,全国猪的饲养头数远比牛多,加之牛可拉车、耕田,因此制备胰岛素一般不选用牛胰脏而选用猪胰脏作材料。又例如磷酸单酯酶,就含量而言,虽然在胰脏、肝脏和脾脏中较丰富,但是因其与磷酸二酯酶共存,进行提纯时,这两种酶很难分开,所以实践中常选用含磷酸单酯酶少、几

乎不含磷酸二酯酶的前列腺作材料。

## 二、材料处理

选择到合适的材料后,应及时使用,否则所需的有效成分会部分甚至全部被破坏变性,从而影响得率。例如,从猪肠黏膜提取肝素时,如果用新鲜材料,每公斤小肠可得肝素钠 5 万~6 万单位。如将材料置 25℃ 以上的室温存放约 1h,肝素钠的含量会显著下降。其原因是,猪小肠内的大量微生物不停地繁殖(如大肠杆菌约 20min 繁殖一次),有的会产生降解肝素的酶系。若选择的动物材料难于立即使用时,应及时移至-20℃ 冰库(可短时间保存)或-70℃ 低温冰箱(数月不变质)储存,或者干燥等方法处理,同时还应将易于去掉的非需物质(如脂类)除去,该物质不仅容易氧化酸败,导致原料变质,而且还会影响纯化操作和制品得率。若选择由室内栽培或野外采集的植物材料,当是植物的叶片(如菠菜、芹菜),需用清水洗净方可使用,或置-30~-4℃ 冰箱储藏,可在 10h 内使用;当是植物的种子,则需泡涨或粉碎后才可使用。如材料中含油脂较多时,也要进行脱脂处理。由于微生物具有种类多、繁殖快、培养简便、诱变容易和不受季节影响等优点,因此,它已成为制备生命大分子物质的主要材料之一。当选用的微生物接种于适当的培养液培养一段时间后,用离心法收集到的上清液即可用于制备胞外酶和某些辅基等有效成分。

## 第二节 纯化方案的设计与评价

纯化方案是指在纯化某一物质过程中,根据实际情况将几种分离方法(如沉淀法、离子交换层析、葡聚糖凝胶等)有机地互补联用、灵活调节的总称。它既是从各类材料中提取分离有效成分的基础,又是成功地达到纯化目的的一条必经之路。因此,只有潜心设计一个合理、实用、周密的纯化方案,才能在操作时得心应手、事半功倍。

### 一、纯化方案的设计

鉴于纯化方案是由几种分离方法组成的,因此,设计纯化方案时,首先要选择分离方法。一般选择分离方法多半是依据抽提液中有效成分和杂质之间理化性质的差异性。例如,沉淀法是从有效成分与杂质之间溶解度的差异性着眼的;而离子交换层析法、凝胶过滤法和亲和层析法则分别是从小分子有效成分与杂质之间电荷、分子质量和对配体亲和力的差异性分析的。根据这些原理,为纯化某一有效成分可结合其特性,从诸多分离方法中反复比较,认真权衡,仔细筛选出两种、两种以上乃至更多种方法,组成一个满足需要的、合适的纯化方案。其中各分离方法的排布顺序,通常应当选用先粗处理、快速、有利于缩小样品体积的方法,而精确、费时和需样品量少的方法,则适宜后面使用。虽然分离方法的基本原理各具特色,操作程序繁简不一,利弊得失有多有寡(表 1-1-1)。但是,只要认真分析有效成分的特性和结构及所用材料的特点,深入理解各种分离方法的原理和用途,合理、巧妙地设计纯化方案,就能从成分复杂、相互混合的抽提液中提取纯化出一种单一的有效成分。最后还有两点要提醒:一是在一个纯化方案中,切忌一种分离方法重复使用,否则,不但不能提高纯化倍数,反而会降低回收率;二是初期设计的提纯方案,并



非一成不变,而是在试验中,往往需要对整个方案及所属的方法(包括相关细节)进行不断地修正、调节,才能日趋完善。

表 1-1-1 几种主要分离方法的比较

方法	原理	优点	缺点	应用范围
沉淀法	蛋白质的盐析作用	操作简便、成本低廉、对蛋白质或酶有保护作用,重复性较好	分辨力差,纯化倍数低,蛋白质沉淀中混杂大量盐分	蛋白质或酶的分级沉淀和结晶
有机溶剂沉淀法	脱水作用和降低介电常数	操作简便,分辨力较强	对蛋白质或酶有变性作用,成本较高	蛋白质、多肽、核酸和多糖等物质的分级沉淀
选择性沉淀法	等电点、热变性、酸碱变性和特殊的可逆沉淀作用	选择性较强,方法简便,种类较多	应用范围较窄	生命大分子物质的沉淀
结晶法	沉淀形成规则晶体	纯化效果较好,可除去微量杂质,方法简单	样品纯度要高,时间长	蛋白质或酶等
吸附法	化学、物理吸附	操作简便	易受离子干扰	生命大分子物质的分离脱色和去热源
离子交换法	离子基团的交换反应	分辨力强,分离量大	费时间、耗酸碱	可电离的生化物质
凝胶过滤法	分子筛的排阻效应	分辨力强,不会引起蛋白质或酶的变性	成本高	分子质量有明显差别可溶性物质
分配层析法	两种溶剂相中的溶解效应	分辨力强、重复性较好、能分离微量物质	影响因子多	分离、鉴定生化物质
亲和层析法	分离物与配体之间有特殊亲和力	分辨力很强	一种配体只用于一类分离物,局限性大	生命大分子物质
聚焦层析法	等电点和离子交换作用	分辨率高	试剂昂贵	蛋白质或酶类
固相酶法	分离物与固相载体之间有特异亲和力	分辨力强、用于连续生产	有局限性	抗体、抗原、酶或底物
亲和电泳法	交叉免疫电泳时,分子间相互作用	对糖蛋白有特异亲和力,不需要制备抗体	一种凝集素只能与相应的糖蛋白反应	糖蛋白

## 二、纯化方案的评价

对纯化方案的评价,实质上是对组成纯化方案的每一种分离方法的评价。而这种评价仅采用理论分析是远远不够的,只有经过实践检验才能正确得出。其方法是,对纯化过程的每一步收集到的溶液都要进行有效成分的含量测定,并将各自的比活性(活性单位数/毫克蛋白)、纯化倍数(每步的比活性/粗抽提液的比活性)和收得率(每步的总活性/粗抽提液总活性 $\times 100\%$ )计算出来。视纯化倍数的大小,收得率的高低,就能初步确定每种分离方法的应用价值。一般认为,凡是在特定实验中能较快增大纯化倍数和较缓慢降低收得率的方法均属于有应用价值的。反之,则应用价值不大,也不宜采用。但是,在纯化过程中,随着



纯化倍数的增大,有效成分的含量却是逐渐减少,收得率也往往小于 100% (除非抽提液中存在酶的抑制物)。因此,实践中对纯化倍数和收得率的要求是根据材料来源的难易而变化的。若材料来源难,就希望提高收得率;反之,则希望提高纯化倍数。下面以从赛氏杆菌 (*Serratia* sp.) 提取 *L*-天冬酰胺酶为例,说明纯化方案与纯化倍数和收得率之间的关系(表 1-1-2)。

表 1-1-2 *L*-天冬酰胺酶纯化

步骤	总蛋白/g	总活性/U	比活性 U/mg	纯化倍数	收得率/%
1. 粗提液	30.0	21 000	0.7	1	100
2. 氯化锰处理	7.64	15 017	2.0	2.8	72
3. 冰冻融解	5.58	14 872	2.7	3.8	71
4. DEAE-纤维素层析	0.113	5025	44.5	63.5	24
5. 硫酸铵盐析	0.048	3367	71.7	102.0	17
6. 羟基磷灰石柱层析	0.016	3133	200.0	286.0	15
7. 聚丙烯酰胺凝胶电泳	0.012	3100	255.0	365.0	15

从表 1-1-2 看出,分离纯化操作是一个比较复杂的过程,欲从赛氏杆菌中提取分离出 *L*-天冬酰胺酶需要分 7 步完成,其中包括细胞破碎、选择性沉淀、硫酸铵分级、离子交换层析、吸附层析、凝胶电泳等方法。也就是说,这个纯化方案是由 7 种分离方法组合起来的。从粗酶液(粗抽提液)到纯酶液,每步的纯化倍数都在有序增加,最后的纯化倍数为 365,而每步的收得率却都在逐渐下降,最后仅为 15%,其中损失占 85%。这反映出,本纯化方案中所列分离方法的选择、组合和排列是适当的。在此期间,总蛋白量共降低 2500 倍,而酶总活性只降低 6.7 倍。这表明杂蛋白比酶蛋白降低快得多,因而 *L*-天冬酰胺酶得到了纯化。此处酶含量用活性单位表示,纯度用比活性表示;如纯化的物质是胰岛素,其含量将用效价表示,纯度用每毫克蛋白质所含效价单位表示。总之,纯化的有效成分不同,表示其含量和相对纯度的单位亦不一样。

## 第三节 纯化方法

### 一、沉淀法

沉淀法是纯化生命大分子物质常用的一种经典方法。该法操作简单、成本低廉,一般包括盐析沉淀、有机溶剂沉淀和选择性沉淀等类型。

#### (一) 基本原理

沉淀法也称溶解度法。其基本原理是根据各种物质的结构差异(如蛋白质分子表面疏水基团和亲水基团之间比例的差异等)来改变溶液的某些性质(如 pH、极性、离子强度、金属离子等),就能使抽提液中有有效成分的溶解度发生变化。换句话说就是不同的物质置入相同溶液,溶解度是不同的;相同的物质置入不同的溶液,溶解度也是不一样的。因此,选择适当的溶液就能使欲分离的有效成分呈现最大溶解度,而使杂质呈现最小溶解度,或者

相反,有效成分呈现最小溶解度,而杂质呈现最大溶解度。然后经过适当处理,即可达到从抽提液中分离有效成分的目的。

## (二) 制备方法

**1. 盐析法** 蛋白质在稀盐溶液中,溶解度会随盐浓度的增高而上升(盐溶),但当盐浓度增高到一定数值时,其溶解度又逐渐下降,直至蛋白质析出(盐析)。盐析的发生是由于盐浓度增高到一定数值时,使水活度降低,进而导致蛋白质分子表面电荷逐渐被中和,水化膜相继被破坏,最终引起蛋白质分子间相互聚集并从溶液中析出。盐析法一般是采用分级沉淀法进行操作的,常选用的盐是硫酸铵,因为硫酸铵与其他盐(如氯化钠、硫酸钾等)相比,有溶解度大,对温度不敏感等优点。如果选择的分级范围为25%~60%饱和度的盐溶液,其操作步骤是,首先选择0~25%饱和度盐溶液,使部分杂质呈“盐析”(或沉淀)状态,有效成分呈“盐溶”(溶解)状态。经离心分离后得到上清液,再选择25%~60%饱和度的盐溶液,使有效成分等物质呈盐析状态,而另一部分杂质呈盐溶状态,用离心法收集的沉淀物即为初步纯化的有效成分物质。这也是蛋白质进行分级沉淀时常用的一种操作步骤。

**2. 有机溶剂沉淀法** 有机溶剂能降低蛋白质溶解度的原因有二:其一,与盐溶液一样具有脱水作用;其二,有机溶剂的介电常数比水小,导致溶剂的极性变小。常用的有机溶剂是甲醇、乙醇和丙酮等。由于有机溶剂加入水溶液时,产生放热反应会引起蛋白质变性,因此必须把有机溶剂预冷至 $-10^{\circ}\text{C}$ ,而且整个操作要在低温下进行。另外加入适量的中性盐能增加蛋白质在有机溶剂中的溶解度,可降低有机溶剂对蛋白质的变性作用,同时还可提高分级效果。但是,加入的量过多,则可引起蛋白质析出,影响有机溶剂的分级作用。因此,用有机溶剂沉淀蛋白质时,宜在稀盐溶液或低浓度缓冲液中进行。

**3. 蛋白质沉淀法** 所用的试剂则仅对一类或一种蛋白质沉淀起作用。

(1) 碱性蛋白质:多价阳离子的碱性蛋白质,如鱼精蛋白,除能有效地沉淀核酸物质外,还能沉淀某些蛋白质。当把90mg鱼精蛋白加入部分纯化的酵母磷酸果糖激酶溶液(含1g蛋白质)时,溶液中的酶蛋白便吸附到鱼精蛋白-核酸沉淀物上。沉淀物用 $0.1\text{mol/L}$ 磷酸缓冲液洗脱后,收得的磷酸果糖激酶的纯度比原来提高了9倍。但是,多价阳离子碱性蛋白质移去阴离子物质的反应多半是不可逆的,故使它的应用受到了限制。再者,由于多价阳离子物质的水溶液pH为2~3,所以要小心地中和后,才可加到蛋白质溶液中。

(2) 凝集素:如植物凝血素,它是一种特殊的蛋白质。该物质对糖蛋白中糖链的末端序列具有明显、特异的凝集力。例如,伴刀豆球蛋白与含有葡萄糖、甘露糖等分子的糖蛋白能发生特异的凝集沉淀作用,通过离心操作可把糖蛋白和一般蛋白质分开。获得的凝集素-糖蛋白复合物,用单糖作抑制剂就能使其解离。该沉淀法的优点是反应条件较温和,专一性强,因此研究者颇多。

(3) 重金属盐:如铅盐、汞盐作为蛋白质沉淀剂,也能使蛋白质或酶得到纯化。由于重金属会使蛋白质变性,因此应用时要控制在较温和的条件下进行,并及时通过透析方法把蛋白质与重金属尽快分开。

**4. 聚乙二醇沉淀法** 聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)和右旋糖苷硫酸钠等水溶性非离子型聚合物可使蛋白质发生沉淀作用。这种沉淀的条件温和,不易引起蛋白质变性,而且沉淀较完全,因此应用范围颇广。但是,它也受各种因素如pH、离子强度、蛋白质浓度

及聚合物分子质量的影响。Honing 等的试验表明,沉淀作用较满意的聚合物是分子质量在 400~6000Da 的 PEG。当从卡尔斯伯酵母菌提取  $\alpha$ -葡萄糖苷酶时,将盛其抽提液的离心管置冰浴,加入 20% PEG6000 或 57% PEG400,立即在旋涡仪上振荡混合,再置冰浴 15~18h, 10 000r/min 离心 1h(0℃),倾去上清液,沉淀物溶在 10mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.8)中, $\alpha$ -葡萄糖苷酶的回收率在 80% 左右。就  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的纯度而言,用 PEG400 沉淀远比用 PEG6000 高。PEG400 产生的高专一性的分离效果,有时可与葡聚糖凝胶层析媲美。

**5. 结晶沉淀法** 蛋白质沉淀可分为晶体沉淀和无定形(非晶体)沉淀两大类,前者分子排列有规则,呈一定形状。后者分子排列无规则,也无定形。蛋白质结晶形成过程,实际上也是一种纯化过程。在提纯阶段,当某一纯蛋白质溶液的浓度达到较高(5%~30%)水平时,只要条件适合,就能产生一定形状的结晶。当蛋白溶液中混有杂质时,即使条件适合,也得不到整齐的结晶,或无结晶形成。因此,用显微镜观察结晶的有无及形状,也可作为判断提纯物质纯化程度的一种方法。

结晶实质上是在特定条件下,改变溶解度产生沉淀的一种方法。其具体操作是,将欲结晶的物质溶解于适当溶剂中,然后在此溶液中加入适量的盐(如 20%~40% 饱和度的硫酸铵)或有机溶剂(如乙醇、丙酮),使欲结晶物质的溶解度降低至接近饱和的临界浓度或刚刚开始出现微弱的混浊状态,同时调节 pH 至等电点附近,控制温度在 4℃ 左右,使溶解度进一步降低,经过一定时间(一般比沉淀时间要长)的陈化,即可得到结晶沉淀。另外,对于难结晶的物质,有时采用加入少量“晶种”引子,或进行适当搅拌,或在容器壁上用玻棒轻轻摩擦等办法,对结晶形成会有加速作用。

## 二、吸附层析

吸附层析(absorption chromatography)又称色层法或色谱法。它是人们在生产和科学实践中建立起来的一种分离纯化方法。

吸附柱层析是以固体吸附剂为固定相,以有机溶剂或缓冲液为流动相构成柱状的一种层析方法。常用的吸附剂有极性的和非极性的两种,前者有羟基磷灰石、硅胶、氧化铝和人造沸石等,后者有活性炭等。

### (一) 基本原理

在吸附层析法中,使用的固定相基质是颗粒状的吸附剂。在吸附剂的表面存在着许多随机分布的吸附位点,这些位点通过范德华力(中性分子彼此距离非常近时,产生的一种微弱电磁引力)和静电引力与蛋白质结合,其结合力的大小与各种生物分子的结构和吸附剂的性质有密切关系。例如,当把含结构不同的 A、B 两种物质的混合溶液加至装有吸附剂的层析柱(图 1-1-1)时,如注入适宜的洗脱剂,控制速度让其下流,便可借助 A、B 两种物质对吸附剂结合力的差异性,将它们两者分离。假如吸附剂对 A 的结合力小于 B 时,则 B 留在柱子上部,A 移至柱子的下部。另外,A、B 两物质在柱上得以分离,也可以说是由于 A、B 两物质在固定相(吸附剂)与流动相(洗脱液)之间的分配系数(即物质在固定相中的浓度除以它在流动相中的浓度)不同所致。如果 A 物质分配系数小于 B 物质,则 A 在柱子上移动的速度大于 B。因此,混合物在层析柱中的分离过程,实质上是吸附、解吸附、再吸附的连续过程,或者是在固定相与流动相之间连续分配的过程。

## (二) 吸附剂的选择

在实践中不论选择哪种类型的吸附剂,都应具备表面积大、颗粒均匀、吸附选择性好、稳定性强和成本低廉等性能。在选择具体吸附剂时,主要是根据吸附剂本身和被吸附物质的理化性质进行的。一般来说,极性强的吸附剂易吸附极性强的物质,非极性的吸附剂易吸附非极性的物质。但是,为了便于解吸附,对于极性大的分离物,应选择极性小的吸附剂。否则反之。吸附剂的用量是根据其自身的操作容量和分离物中各成分的性质决定的。一般吸附剂的用量为被分离样品的 30~50 倍。若样品中各成分的性质相似,难以分开时,则吸附剂用量应增大到 100 倍以上。要选择一个理想的吸附剂必须经过多次试验才能获得(图 1-1-1)。

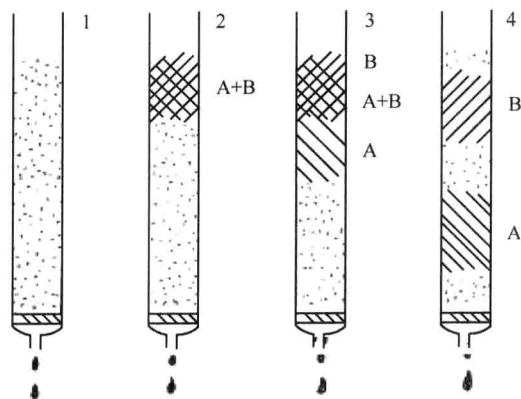


图 1-1-1 吸附柱层析原理示意图

1. 吸附层析柱;2. 加入 A、B 混合样品;3. 洗脱时, A 与 B 开始分离;4. 继续洗脱时, A 与 B 已经分离

## 三、凝胶过滤

凝胶过滤(gel filtration)是 20 世纪 60 年代发展起来的一种分离纯化方法。凝胶过滤又叫分子筛层析。此法具有设备简单、操作方便、重复性好和样品回收率高等特点。所以,除了常用于分离纯化蛋白质(包括酶类)、核酸、多糖、激素、氨基酸和抗生素等物质外,还可用于测定蛋白质的分子质量、样品的浓缩和脱盐等方面。

### (一) 基本原理

凝胶过滤层析所用的载体是具有立体网状结构、筛孔直径较一致,且呈珠状颗粒的物质。这种物质可以全部或者部分排阻某些大分子化合物于筛孔之外,而不能排阻某些小分子化合物,但可让其在筛孔中自由地扩散、渗透。任何一种被分离的化合物在凝胶层析柱被排阻的范围均在 0~100%,其被排阻的程度可以用分配系数  $K_{av}$ [分离化合物在内水体积( $V_i$ )和外水体积中的比例关系]表示。 $K_{av}$  值的大小依赖于凝胶床的总体积( $V_t$ )、外水体积( $V_o$ ),以及分离物本身的洗脱体积( $V_e$ ),即: $K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$ 。

在限定的层析条件(固定相和层析柱体积已确定)下, $V_t$  和  $V_o$  都为恒定值,而  $V_e$  值却是随着分离物分子质量的变化而变化的。分离物分子质量大, $K_{av}$  值小;反之,则  $K_{av}$  值增大。因此,在同一凝胶过滤柱上分离分子质量不同的物质时,由于流动相的作用,这些分离物质将发生排阻和扩散效应。若将缓冲液连续倾入柱中,柱中物质的排阻和扩散效应也将不断发生,其最终结果是分子质量大的物质先从柱中流出,分子质量小的物质则后从柱中流出(图 1-1-2)。其筛分效果受操作条件如载体的颗粒大小、均匀度、筛孔直径和床体积的大小、洗脱液的流速,以及样品的种类等的影响,但更为直接的左右因子是  $K_{av}$  值的差异性。

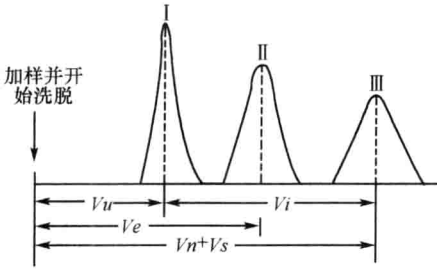


图 1-1-2 凝胶过滤柱洗脱的三种层析峰

- I. 全部排出的组分(大分子物质),  $K_{av}=0$ ; II. 部分进入胶孔的组分(中等分子物质),  $0 < K_{av} < 1$ ;
- III. 全部进入胶孔的组分(小分子物质),  $K_{av}=1$

及洗脱体积  $V_e$ , 即可计算出  $K_{av}$  值。而凝胶床总体积  $V_t$  可用两种方法得到。

其一, 计算法, 即根据层析柱体积计算总体积, 可用下列公式表示:  $V_t = \pi r^2 h$ 。

式中  $r$  表示层析柱半径;  $h$  表示凝胶床高度;  $\pi$  表示圆周率。

其二, 测量法, 由凝胶床的组成可知, 床体积 ( $V_t$ ) 等于外水体积 ( $V_o$ )、内水体积 ( $V_i$ ) 与凝胶颗粒实际占有体积 ( $V_g$ ) 之和, 即:  $V_t = V_o + V_i + V_g$ 。

因  $V_g$  与  $V_i$  相比是很小的, 可忽略不计, 故  $V_t = V_o + V_i$ 。

而  $V_o$  和  $V_i$  可以通过实验测得。当把分子质量不同的混合溶液加样在凝胶床上时, 其在内水体积和外水体积中的分布是不一样的。溶液中的分子大于凝胶孔径上限者不能进入凝胶网孔内, 而被排阻在外水体积的溶液中。其洗脱体积 ( $V_e$ ) 刚好等于外水体积 ( $V_o$ ), 即  $V_e = V_o$  ( $K_{av} = 0$ )。然而, 溶液中的分子小于凝胶孔径下限者, 能自由进入凝胶网孔内, 其洗脱体积 ( $V_e$ ) 应等于凝胶床总体积, 即  $V_e = V_t = V_o + V_i$  ( $K_{av} = 1$ )。而溶液中的分子大小介于凝胶孔径上限和下限之间者, 则有一部分能进入凝胶网孔, 故其洗脱体积 ( $V_e$ ) 是在  $V_o$  和  $V_i$  之间 ( $K_{av}$  为  $0 \sim 1$ )。

## (二) 凝胶的分类及性质

凝胶是不溶于水的一类化合物, 但它在水中都有较大膨胀度和较好分子筛功能。这类化合物目前主要有葡聚糖凝胶、天然琼脂糖和交联琼脂糖。其次, 还有聚丙烯酰胺凝胶(生物胶)、交联葡聚糖与双丙烯酰胺共聚凝胶以及交联琼脂糖与葡聚糖共价结合的凝胶等。

**1. 葡聚糖凝胶** 葡聚糖凝胶的商品名称为 Sephadex, 它是由葡聚糖[右旋糖苷(G型)]和 3-氯-1,2 环氧丙烷(交联剂)以醚键相互交联而成的。其结构式如图 1-1-3 所示。在交联葡聚糖 G-25 和 G-50 中分别加入羟丙基基团反应, 即可构成 LH 型烷基化葡聚糖凝胶。

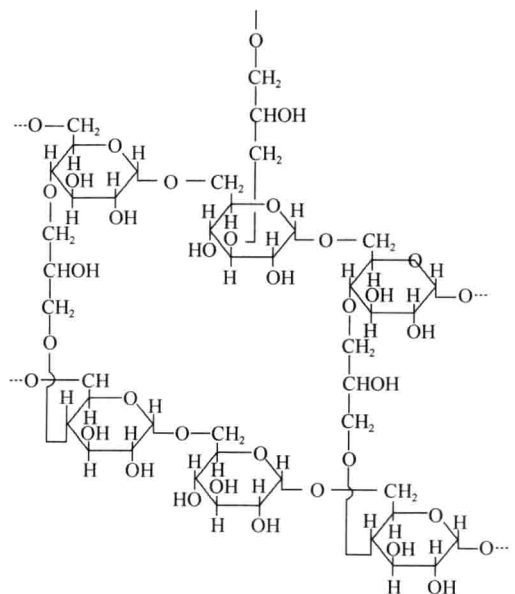


图 1-1-3 葡聚糖凝胶结构示意图

$K_{av}$  值差异性大, 分离效果好;  $K_{av}$  值差异性小, 乃至等于 1 或等于零(即使样品中各组分的分子质量相差很大), 则分离效果很差, 或根本不能分开。相对而言, 排阻次数多寡是决定分离效果优劣的一个重要因素, 尤其是在各分离的  $K_{av}$  值差异较小时, 通过采用加大柱直径或延伸柱长度(均可增加柱体积)的措施, 明显可以提高排阻次数, 进而得到较佳分离效果。

$K_{av}$  值既是判断分离效果的一个参数, 又是测定蛋白质分子质量的重要依据。从公式  $K_{av} = V_e - V_o / V_t - V_o$  看出, 只要测出床体积  $V_t$ 、外水体积  $V_o$

(1) 理化性质:葡聚糖凝胶的外观为白色珠状颗粒,在显微镜下放大 700 倍以上,可见其表面的网状皱纹。它带有大量的羟基,亲水性好,因此在水溶液或电解质溶液中极易膨胀。由于各种型号的葡聚糖凝胶的交联度(交联剂在葡聚糖凝胶中占的百分数)不同,致使其在水中的膨胀度(床体积)、吸水量(每克干凝胶在水中充分膨胀时所需的水量,但不包括颗粒间所带的水量)、筛孔的大小和排阻范围有明显的差异。例如, Sephadex G-25 比 G-100 交联度大,而膨胀度、吸水量和筛孔直径则均小于 G-100。另外,前者对球形蛋白质的排阻范围较窄,即在 1000~5000Da,而后者的排阻范围较宽,即在 4000~150 000Da。从本质上来看,葡聚糖凝胶置盐溶液或清洁剂中引起的膨胀程度并不影响样品的分级效果。但是当盐溶液或清洁剂能改变分离物质的结构时,则会影响分级效果。葡聚糖凝胶的型号不同,其性质亦不一样,详见表 1-1-3。一般以 G 型葡聚糖凝胶(经水溶液膨胀)作为固定相,以水溶液作为流动相,对水溶性物质进行分离的层析方法称为葡聚糖凝胶过滤层析。而以 LH 型葡聚糖凝胶(经乙醇或二甲亚砜甲酰胺或 *N,N*-二甲基甲酰胺等有机溶剂膨胀)作为固定相,以有机溶剂为流动相,对脂溶性物质进行分离的层析方法称为葡聚糖凝胶渗透层析。

表 1-1-3 不同型号葡聚糖凝胶的规格和性质

型号	颗粒大小/目数	分离范围/Da		吸水量/(ml/g)	膨胀度(床体积)/(ml/g)	溶胀时间/h		流速/[ml/(cm <sup>2</sup> ·h)]
		多肽-球蛋白	多糖			20~25℃	90~100℃	
G-10	100~200	<700	<700	1.0±0.1	2~3	3	1	—
G-15	120~200	<1500	<1500	1.5±0.2	2.5~3.5	3	1	—
G-25	粗 50~100 (100~300μm) 中 100~200 (50~150μm) 细 200~400 (20~80μm) 超细>400 (10~40μm)	1000~5000	100~5000	2.5±0.2	4~6	3	1	—
G-50	粗 50~100 中 100~200 细 200~400	1500~30 000	500~10 000	5.0±0.3	9~11	3	1	—
G-75	中 120~200 超细 10~40μm	3000~80 000 3000~70 000	1000~50 000	7.5±0.5	12~15	24	3	30.0
G-100	中 120~200 超细 10~40μm	4000~150 000 4000~100 000	1000~100 000	10.0±1.0	15~20	72	3	10.0
G-150	中 120~200 超细 10~40μm	5000~300 000 5000~150 000	1000~150 000	15.0±1.5	20~30 18~22	72	5	—
G-200	中 120~200 超细 10~40μm	5000~600 000 5000~250 000	1000~200 000	20.0±2.0	30~40 20~25	72	5	6.5

(2) 稳定性:葡聚糖凝胶在水溶液、盐溶液、碱溶液、弱酸溶液和有机溶剂中是稳定的、不溶解的,而且很少发生化学降解。在中性条件下,葡聚糖凝胶悬浮液可置高温(120℃)消



毒 0.5h, 其性质并不改变。在 0.1mol/L HCl 溶液中浸泡 1~2h, 甚至在 0.02mol/L HCl 溶液中浸泡 6 个月以上, 对分离效果无明显的影响。但是, 当暴露于强酸或氧化剂溶液时, 则容易使糖苷键水解断裂, 因此, 要避免与其接触。葡聚糖凝胶欲在室温下长期保存时, 应加入适量的防腐剂, 如氯仿、0.05%  $\text{NaN}_3$  或 20% 乙醇溶液等, 不然微生物将会生长。

(3) 吸附性: 葡聚糖凝胶系弱酸性物质, 这是由于其每克干胶中含 10~20 $\mu\text{g}$  当量的羧基基团所致。该基团能与分离物中电荷基团(尤其是碱性蛋白质)发生吸附作用。但是, 这种吸附作用可以借助提高洗脱液的离子强度得以克服。当离子强度大于 0.05 时, 一般对弱碱性蛋白质就无吸附力了。因此, 进行葡聚糖凝胶层析时, 常用含有 NaCl 的缓冲液作洗脱液。新购得葡聚糖凝胶对蛋白质往往有不可逆的吸附性能, 虽然吸附的数量较少, 但是在制作测定蛋白质分子质量的标准曲线时, 或者分离纯化极难得到的微量样品物质时, 需先用普通蛋白质进行预层析。以便消除其影响。

此外, 葡聚糖凝胶对芳香族化合物、杂环化合物以及某些凝集素具有较强的吸附作用, 当采用凝胶过滤层析分离它们时, 往往利用的是吸附性能, 而非排阻原理。

**2. 琼脂糖凝胶** 琼脂糖的商品名称因生产厂家不同而异: 瑞典称 Sepharose; 美国称 Bio-gel A; 英国称 Segavac; 丹麦称 Gelarose; 我国的同类产品与瑞典的名称一样。这些琼脂糖中除 Segavac 外, 都是以珠状琼脂糖凝胶形式出售。

琼脂糖是从琼脂中分离出来的。在制备过程要尽可能将其中含硫酸根和羧基基团的琼脂胶除去, 才能得到不带电荷基团的琼脂糖。琼脂糖是由 D-半乳糖和 3,6 脱水的 L-半乳糖连接构成的多糖链。这种多糖链在 100 $^{\circ}\text{C}$  左右时呈液态, 当温度降至 45 $^{\circ}\text{C}$  以下时, 它们之间以氢键方式相互连接就成了线性的双链单环的琼脂糖, 经凝聚即呈束状的琼脂糖凝胶。该物质对尿素和盐酸胍等破坏氢键的试剂有较强的抵抗力, 在 pH 4.0~9.0 的缓冲液中是稳定的。琼脂糖凝胶置室温保存, 其物理稳定性超过了聚丙烯酰胺和葡聚糖凝胶。这些凝胶在聚合度相同时, 琼脂糖凝胶能以较高的流速进行层析。琼脂糖凝胶在干燥状态下保存时易破裂, 一般存放在含防腐剂的水溶液中, 同时还要避免剧烈的搅动。

琼脂糖凝胶按其浓度来分有 Sepharose 2B(2%)、Sepharose 4B(4%) 和 Sepharose 6B(6%)。Sepharose 6B 的机械强度大于 Sepharose 2B, 但是筛孔小于 Sepharose 2B。

Sepharose 与 1,3-二溴异丙醇在强碱性条件下反应后, 即生成 CL 型交联琼脂糖。这种琼脂糖的筛孔与同浓度的、未交联的琼脂糖基本相同, 但热稳定性和化学稳定性却都有了提高。CL 型交联琼脂糖可在广范围的 pH 溶液(pH 3~14)中使用。琼脂糖凝胶的机械强度和筛孔稳定性都比葡聚糖凝胶好。而且其排阻范围的上下限, 也远远大于葡聚糖凝胶。它适合于分离 >10 000Da 的蛋白质、核酸或病毒颗粒等物质。用琼脂糖凝胶进行柱层析时, 其流速可以较快些。

**3. 聚丙烯酰胺凝胶** 聚丙烯酰胺凝胶的商品名称为 Bio-gel。它是以甲叉双丙烯酰胺(双体)作交联剂, 以过硫酸铵作催化剂, 在 N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)加速剂的作用下, 将丙烯酰胺(单体)和双体聚合而成的。当改变单体浓度时, 就可得到吸水率不同的产物。商品聚丙烯酰胺凝胶型号从 Bio-gel P-2 到 Bio-gel P-300, 其阿拉伯数字相当于排阻限度的  $10^{-3}$ 。

一般聚丙烯酰胺凝胶均制成珠状颗粒, 并以干凝胶形式出售, 使用前必须溶胀。该凝胶不溶于水和普通有机溶剂, 但能忍受较浓的盐、尿素和胍盐等溶液的作用, 在 pH 1~10 或短时间超过此 pH 范围的溶液中较稳定。但要避免长期与强酸和强碱接触, 如果在高温条



件下与其接触,酰胺基将迅速分解。聚丙烯酰胺凝胶对芳香族的、酸性和碱性的化合物稍有吸附现象,如使用离子强度略高的洗脱液操作,此弊病可以克服。

**4. Sephacryl** Sephacryl 是由烯丙基葡聚糖与甲叉双丙烯酰胺共价交联制成的。此凝胶属硬性凝胶,它具有一定大小的筛孔和少量的羧基基团。Sephacryl 吸水时,其珠状颗粒直径为 25~75 $\mu\text{m}$ (表 1-1-4),通常是用于水相系统中。若在有机相系统使用时,其孔径大小略有变化。它在所有的溶剂中不溶解,化学降解也少见;它可在 pH 2~11 范围内使用,当 pH 低时,葡聚糖链将发生少许水解作用;在 0.2mol/L NaOH 溶液中(室温)处理 100h,对其低流速和多孔性没有明显影响。去污剂(如 SDS)、6mol/L 盐酸胍和 8mol/L 尿素溶液可作为洗脱剂,高温(120 $^{\circ}\text{C}$ )消毒(pH 7.0)处理后,层析性质没有明显变化。

表 1-1-4 几种 Sephacryl 的型号及物理性质

类型	吸水时珠状 颗粒直径/ $\mu\text{m}$	分子质量范围/Da		排阻极限 DNA
		蛋白质	多糖	
Sephacryl-200HR	20~25	1~100	—	—
Sephacryl-300HR	20~75	5~250	1.0~80.0	118
Sephacryl-400HR	25~75	10~1500	2.0~400.0	118
Sephacryl-500HR	25~75	20~8000	10.0~2000.0	271
Sephacryl-1000HR	25~75	—	40.0~20 000	1078

Sephacryl 能用于分离蛋白质、核酸、多糖和蛋白聚糖(proteoglycan),甚至大的病毒颗粒(直径>300~400nm)。层析时,用细颗粒凝胶分辨率较高。

**5. Superdex** Superdex 是由高交联度多孔琼脂糖与葡聚糖共价结合而成的。该凝胶具有良好的分子筛特性和物理、化学稳定性。在用其分离样品过程中,溶液的酸碱度可在 pH 3~12 范围内变化,溶液中加入去污剂(如 1% SDS)和(或)解离剂(如 8mol/L 尿素、6mol/L 盐酸胍)时,也不会影响分离效果。此凝胶共有 6 种类型,详见表 1-1-5。

表 1-1-5 Superdex 的类型及性质

类型	颗粒大 小/ $\mu\text{m}$	分级范围/kDa		类型	颗粒大 小/ $\mu\text{m}$	分级范围/kDa	
		球形蛋白	多糖			球形蛋白	多糖
Superdex 肽	11~15	0.1~7.0	—	Superdex 75	11~15	3.0~70.0	0.5~30.0
Superdex 30 制备级	24~44	~10.0	—	Superdex 200 制备级	24~44	10.0~600.0	1.0~100.0
Superdex 75 制备级	24~44	3.0~70.0	0.5~30.0	Superdex 200	11~15	10.0~600.0	1.0~100.0

### (三) 凝胶的选择和处理

#### 1. 凝胶的选择

(1) 型号:凝胶型号很多,型号不一样,筛分范围亦不相同。Sephadex G 型一般适宜于分离蛋白质。如果用其分离核酸时,则限于该物质空间结构和所带基团的影响,宜选用高于其分子质量范围的型号,或者选用适当型号的生物胶和 Sephacryl。如果要除去蛋白质溶液中的盐类时,可选用凝胶 Sephadex G-25。当溶液通过 G-25 柱时,蛋白质被排阻在凝胶外面先流出来,而盐类则扩散到凝胶网孔里后流出来,这样就使蛋白质得到纯化。一般来说,

在规定的筛分范围内,混合物之间分子质量差别越大,分离的效果就越好。

(2) 粒度:凝胶的粒度有粗有细(与交联度无关)。细颗粒凝胶之间空间小,装柱易均一,因此分离效果较好。但是由于细颗粒凝胶流速慢,故宜用大直径的层析柱,这类凝胶用于小型试验,可得到满意结果。而粗颗粒凝胶流速快,宜用于小直径较长的层析柱,如操作得当也可得到较好的结果。

**2. 凝胶的处理** 将所用的干凝胶慢慢倾入 5~10 倍的蒸馏水中,参照表 1-1-3 凝胶溶胀所需的时间进行充分浸泡,然后用倾斜法除去表面悬浮的小颗粒,再用 0.5mol/L NaOH 和 0.5mol/L NaCl 混合溶液在室温下浸泡 0.5h,以抽滤法除去碱液,用蒸馏水洗至中性。为了除去凝胶颗粒空隙中的气泡,可把处理过的凝胶浸泡于蒸馏水或平衡液中,用抽气方法来完成。有的采用加热煮沸方法,不仅能达到此目的,而且还能加快凝胶的溶胀速度。但是,必须避免置于酸或碱溶液中加热。

#### (四) 凝胶柱的再生及保存

**1. 再生** 仅使用过一次的凝胶柱,通常进行重新平衡后即可再次使用;但若使用过多次后,由于凝胶床体积变小、流动速度降低或污染杂质过多等原因,致使其正常性能受到影响。在此情况下,如欲重复使用,就须进行再生处理。其方法是,先用蒸馏水反复进行逆向冲洗,再用缓冲液进行平衡。平衡毕,即可重复使用;另一种方法是,把凝胶倒出,用低浓度的酸或碱按其预处理方法进行,处理后重新装柱即可再行使用。

**2. 保存** 使用过的凝胶柱,若要短时间保存,则需进行反复洗涤以除去蛋白质等杂质,并加入适当的防霉剂;若要长时间保存,则需将凝胶从柱中取出,进行洗涤、脱水和干燥。其方法是将凝胶用低浓度的酸或碱溶液短时间浸泡后,再用蒸馏水反复洗涤除去杂质、过滤抽干,浸泡在 50% 乙醇溶液中进行脱水。然后,再过滤抽干,并浸泡在浓度稍高的乙醇溶液中。如此依次提高乙醇浓度进行反复处理,待乙醇浓度增加至 95% 时,将凝胶抽干,置 60℃ 烘箱中烘干,可装瓶保存。在此过程中,溶胀的凝胶不能直接用高温烘烤,否则会黏结成块(机械捣碎会破坏珠状结构),影响使用。溶胀后凝胶脱水的难易程度,与其交联度大小有关。交联度大的脱水较易;反之,则脱水较难。一般脱水时,可采用将其较长时间浸泡在 60%~70% 乙醇溶液中的做法,也能达到这一目的。

### 四、离子交换层析

离子交换层析(ion exchange chromatography)是常用的层析方法之一。它是在以离子交换剂为固定相,液体为流动相的系统中进行的。此法广泛应用于很多生化物质(例如,氨基酸、多肽、蛋白质、糖类、核苷酸和有机酸等)的分析、制备、纯化等方面。

#### (一) 基本原理

离子交换剂是由载体、电荷基团(或功能基团)和反离子构成的(图 1-1-4)。它在水中呈不溶解状态,能释放出反离子,将与溶液中的其他离子或离子化合物相互结合,结合后本身的理化性质仍保持不变。

离子交换剂与溶液中离子或离子化合物的反应主要以离子交换方式进行,或者借助离子交换剂上电荷基团对溶液中离子或离子化合物的吸附作用进行。这些过程都是可逆的。