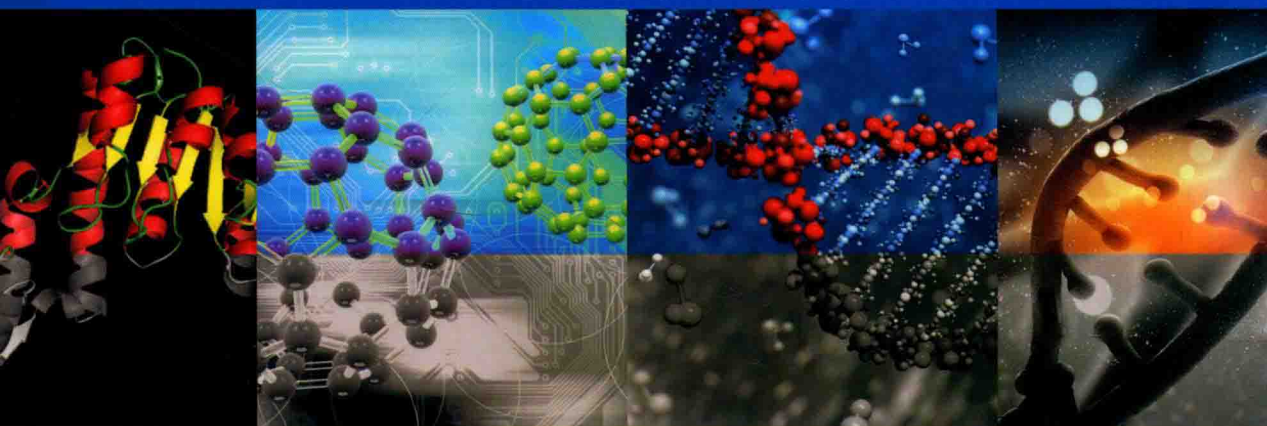




生物化学分析技术 实验教程

丁 益 华子春 主编



科学出版社

生物化学分析技术实验教程

丁 益 华子春 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书主要介绍在当前生命科学研究、应用和生产领域内对天然及基因重组生物分子的分离、纯化、制备、分析、鉴定、数据处理等多方面生化分析的技术原理、实验方法、实验操作、实验设计,以及相关生化仪器的使用,涵盖了当前在蛋白质化学、蛋白质组学及生物工程下游技术中所应用的大多数层析、电泳等实验方法。本书步骤描述具体细致、实验过程系统完整,实验装置可精可简,全书图文并茂、数据优化详尽,具有较强的指导性和可操作性。本书的内容分为基础实验部分和综合实验部分,实验内容可以根据相关本科生及研究生的不同层次和基础,以及不同实验室条件和应用需求进行选择教学,其实验教学的主要方式是在着重学生基本实验操作技能训练的基础上开展综合性大实验训练。

本书适合应用于高等院校生命科学、生物技术类本科生及研究生的实验教学,并可应用于生物制药、食品、药品、医学、临床检验、环境监测等学科的本科生及研究生进行实验教学,亦可以作为相关生物制药企业等社会研究和应用部门的实验技术参考书。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学分析技术实验教程/丁益,李子春主编. —北京:科学出版社, 2015.6

ISBN 978-7-03-043813-8

I. ①生… II. ①丁…②华… III. ①生物化学-化学分析-实验-高等学校-教材 IV. ①Q503-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 126925 号

责任编辑:刘 丹/责任校对:郑金红

责任印制:徐晓晨/封面设计:铭轩堂

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>

北京科印技术咨询服务公司印刷

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:15

字数:384 000

定价:42.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《生物化学分析技术实验教程》 编委会

主 编：丁 益 华子春

副主编：唐惠炜 刘新建 庄苏星 庄红芹

参加编写人员（按姓氏笔画排序）：

丁 益 朱彤阳 华子春 庄红芹

庄苏星 刘新建 陈东琛 陈江宁

李红召 沈萍萍 郑伟娟 唐惠炜

编写单位：南京大学生命科学学院

医药生物技术国家重点实验室

前 言

为了生命科学类本科生及研究生在学习和研究中能够了解和掌握当前在生命科学研究、应用和生产领域内对天然及基因重组生物分子的分离、纯化、制备、分析、鉴定、数据处理等多方面生化分析的技术原理、实验方法、实验操作、实验设计，以及相关生化仪器的使用，同时为了适应当前科研对加强实践性教学的需求，我们在教学中结合理论课“生物化学分析原理及技术”进行系统性配套，选编了《生物化学分析技术实验教程》这本实验教材。

本教材的实验内容是根据教师多年来的教学积累和在一般实验室和国家重点实验室不同实验条件下的科研经验而编写的，涵盖了当前在蛋白质化学、蛋白质组学及生物工程下游技术中所应用到的大多数层析、电泳等实验方法。其特点是采用了将科研中的生化分析实验技术转化到教学中来的方法进行实验教学，具有不同的代表性、实用性和先进性。

本教材的实验内容分为基础实验部分和综合实验部分。实验安排循序渐进，步骤描述具体细致，实验过程系统完整，实验装置可精可简。大实验的内容主要安排在综合实验部分。全书图文并茂、数据优化详尽，结合实验过程与结果提出思考性问题和部分延展性注解，具有较强的指导性。其实验教学的主要方式是在着重学生基本实验操作技能训练的基础上开展综合性大实验训练。在实验室通过对学生独立操作、整体实验、大实验和综合创新型实验的系统安排，以加强和提高学生理论联系实际、分析问题和解决问题的能力。

在实验手段现代化方面，结合色谱工作站系统、电泳图像分析系统、计算机仿真生物化学分析技术实验系统、双向互动式网络实验教学系统等先进设备和软件的应用，以提高学生的学习效率。

本教材的实验内容可以根据相关本科生及研究生的不同层次和基础及不同实验室条件和应用需求进行选择教学。本书实验原理部分的描述简明扼要，对于详细部分的了解需要有“生物化学分析原理及技术”理论课学习的基础。关于实验装置可精可简，即可根据实验室条件书中的部分实验装置选择采用自制手工装置或相关商品化装置或高效自动化装置。例如，相关层析用到的梯度洗脱装置可采用烧杯自己组装或选用商品化简易梯度混合仪或可以应用由电脑控制的高效自动梯度发生器乃至自动化层析系统进行实验；又如，对于相关层析柱流出液的检测可以采取逐管收集后手工测定，也可使用紫外检测仪和记录仪或组合色谱工作站进行自动检测及数据处理和管理等。

由于教学水平和实验室条件有限，书中如有不妥之处，敬请读者批评指正。

丁 益

2015年2月于南京大学

目 录

前言

基础实验部分

实验 1	紫外分光光度法 (测定蛋白质吸收光谱曲线及含量)	2
实验 2	荧光光度测定法 (测定核黄素含量)	5
实验 3	离子交换柱层析 (分离氨基酸)	8
实验 4	凝胶层析 (分离蛋白质及相对分子质量测定)	13
实验 5	DEAE-纤维素梯度洗脱柱层析	18
实验 6	疏水层析	23
实验 7	亲和层析分离纯化胰蛋白酶 (环氧氯丙烷活化法)	27
实验 8	亲和层析分离纯化胰蛋白酶抑制剂 (溴化氰活化法)	32
实验 9	金属螯合柱层析	38
实验 10	反相层析	42
实验 11	聚焦层析	46
实验 12	吸附层析 (羟基磷灰石柱层析分离纯化 DNA)	53
实验 13	单向火箭免疫电泳	58
实验 14	聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳和圆盘电泳	61
实验 15	SDS-聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳 (不连续体系)	69
实验 16	SDS-聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳 (连续体系)	75
实验 17	Tricine-SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (分离小分子多肽)	79
实验 18	管式凝胶等电聚焦	85
实验 19	水平平板凝胶等电聚焦	91
实验 20	U 形管密度梯度等电聚焦	98
实验 21	潜水式琼脂糖凝胶电泳	101
实验 22	梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳	106
实验 23	印迹转移电泳	113
实验 24	酶联免疫吸附测定	120

综合实验部分

实验 25	蔗糖酶的综合分离纯化及其性质鉴定	128
实验 26	人绒毛膜促性腺激素的综合分离纯化及其性质鉴定	139
实验 27	α -淀粉酶的综合分离纯化及其性质鉴定	143
实验 28	亲和层析分离纯化尿激酶及其性质鉴定 (溴化氰活化法)	149

实验 29	双向电泳 (双向电泳比较 FADD 和 FADD ^{-/-} 细胞株的蛋白质表达差异)	156
实验 30	脉冲场凝胶电泳	171
实验 31	毛细管电泳	183
实验 32	基因融合蛋白质的纯化	191

附 录

附录 A	聚丙烯酰胺凝胶电泳的蛋白质银染色法	200
附录 B	常用缓冲液的配制方法	202
附录 C	常用数据	210
参考文献		232

基础实验部分

实验 1



紫外分光光度法 (测定蛋白质吸收光谱曲线及含量)



实验目的与要求

- (1) 了解紫外-可见分光光度计的测定原理和使用方法。
- (2) 学习和掌握紫外吸收光谱曲线的制作方法。
- (3) 学习和掌握蛋白质的定性、定量测定方法。



实验原理

蛋白质所含有的一些芳香族氨基酸(如酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸)具有共轭双键结构能够产生 $\pi \rightarrow \pi^*$ 及 $n \rightarrow \pi^*$ 类型的电子跃迁,因此能够在近紫外光区产生光吸收,并且在 280nm 波长处有一特征吸收峰。利用这一特性,通过对蛋白质紫外吸收光谱曲线的测定,可以进行辅助定性分析。根据 Beer 定律,当光径一定时,蛋白质溶液在 280nm 波长处的光吸收,在一定范围内与其浓度呈正比关系,可以进行定量测定。



实验仪器与器材

1. 实验仪器

紫外-可见分光光度计;混合器;电子天平。

2. 实验器材

可调取液器;试管;试管架;吸管;吸管架;烧杯;滴管;容量瓶;洗耳球;剪刀;玻棒;骨勺;称量纸;吸水纸;洗瓶;标签纸。



试剂及配制

1. 实验试剂

①牛血清白蛋白标准品;②牛血清白蛋白测试品。

2. 试剂配制

(1) 牛血清白蛋白标准品溶液 (1.0mg/ml): 准确称取牛血清白蛋白标准品 50.0mg, 置于 50ml 容量瓶中, 然后加蒸馏水定容至刻度, 溶解混匀后即为浓度 1.0mg/ml 的标准品溶液。

(2) 牛血清白蛋白测试品溶液 (1.0mg/ml): 准确称取牛血清白蛋白测试品 50.0mg, 置于 50ml 容量瓶中, 然后加蒸馏水定容至刻度, 溶解混匀后即浓度为 1.0mg/ml 的测试品溶液。

实验步骤

1. 蛋白质的紫外吸收光谱曲线测定与制作

1) 蛋白质的紫外吸收光谱曲线的测定

取 2 只光径为 1.0cm 洁净的石英比色杯, 分别倒入 4ml 蒸馏水和 4ml 牛血清白蛋白标准品 (或测试品) 溶液, 在测定波长处以蒸馏水为空白溶液 (即参比溶液), 调节紫外-分光光度计的光吸收零点。样品溶液在 250~300nm 波长的范围内, 每间隔 5nm 波长依次测定, 同时记录各波长蛋白质溶液的光吸收。在每次更换测定波长时, 均需要重新用空白溶液调节仪器的光吸收零点后, 方能再测定样品溶液。对测定波长的范围和间隔大小, 亦可根据不同样品的情况和要求加以确定 (加大或缩小间隔)。

注: 如果被测样品的溶剂不是蒸馏水, 则应用相应样品的溶剂作为空白溶液。

2) 蛋白质的紫外吸收光谱曲线 ($A-\lambda$) 的制作

以测定的波长 λ 为横坐标, 相应的光吸收 A 为纵坐标对应作图。将图中各点用线连起来, 即得到蛋白质的紫外吸收光谱曲线 ($A-\lambda$), 其中最大吸收峰值所对应的波长即为该蛋白质最大吸收波长 $\lambda_{\max}$ 。

注: 蛋白质或其他生物分子的吸收光谱, 亦可用具有自动连续波长扫描的双光束可见-紫外分光光度计进行自动测定, 通过记录仪或计算机记录所测定的吸收光谱。

对于采用双光束可见-紫外分光光度计进行自动测定时, 首先需要在两个同样的比色杯中装入相同的空白溶液, 分别插入参比 (reference) 光路和样品 (sample) 光路, 在扫描波长起点处调节好光吸收零点后, 再在样品光路换入被测定样品溶液 (参比光路的空白溶液仍保留其中), 进行所确定波长范围的吸收光谱自动扫描。

2. 蛋白质的紫外分光光度法含量测定

1) 牛血清白蛋白标准品溶液的配制

将已配好的牛血清白蛋白 (BSA) 标准品溶液 (浓度为 1.0mg/ml), 按表 1-1 稀释成 6 种不同浓度的标准品溶液。

表 1-1 不同浓度的 BSA 标准品溶液配制表

管号	0	1	2	3	4	5	6	样品
BSA 标准品 溶液/ml	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	
蒸馏水/ml	5.0	4.5	4.0	3.0	2.0	1.0	0.0	
总体积/ml	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	
含量/(mg/ml)	0.0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	
$A_{280\text{nm}}$								

2) 牛血清白蛋白测试样品溶液的配制

将未知含量的 BSA 测试样品按估计含量, 用蒸馏水稀释配制在标准曲线范围内的浓度, 估计浓度应尽量接近标准曲线中间点的浓度。如果测试样品估计浓度超出 (低

或高于) 标准曲线范围, 需重新调整配制。

3) 标准品溶液及测试样品溶液的测定

用紫外分光光度计在 280nm 波长处, 以蒸馏水 (或相应样品的溶剂) 为空白溶液调节仪器光吸收零点, 然后分别依次测定标准品溶液 (浓度从低到高) 和测试样品溶液的光吸收 A 。

4) A-C 标准曲线的制作

(1) 以所测得的标准品溶液光吸收 A 为纵坐标, 相应已知的标准品含量 C 为横坐标对应作图, 既得标准品溶液光吸收和含量 ($A - C$) 的标准曲线。

(2) 通过被测试样品的光吸收在标准曲线上查出相应蛋白质含量。

A-C 标准曲线亦可用 Excel 线性回归作图进行测定。

注: 该定量方法适用于测定与标准蛋白质氨基酸组成相似的蛋白质。



思考题

1. 蛋白质的特征紫外吸收波长一般为 280nm, 多肽的特征紫外吸收波长为多少? 核酸的特征紫外吸收波长为多少?

2. 在吸收光谱测定中, 为何在每次更换测定波长时均需要重新用空白溶液调节仪器的光吸收零点后再测定样品溶液?

注: 双光束紫外-可见分光光度计进行自动吸收光谱测定时是将空白溶液保留在参比光路中进行测定来解决该问题的。

3. 在定量测定中, 为何测试样品估计浓度超出 (低于或高于) 标准曲线范围需重新配制调整浓度 (或利用 Lambert 定律改变比色杯厚度) 到标准曲线范围内?

4. 如何计算测定样品的百分消光系数和摩尔消光系数?

附注:

几种标准蛋白质的光吸收参数见表 1-2。

表 1-2 几种标准蛋白质的光吸收参数

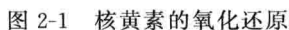
标准蛋白质/(1mg/ml)	A_{280nm}
IgG	1.35
IgM	1.20
IgA	1.30
protein A	0.17
抗生物素蛋白 (avidin)	1.50
链球菌抗生物素蛋白 (streptavidin)	3.40
牛血清白蛋白 (bovine serum albumin)	0.70



- (1) 通过对核黄素的含量测定, 了解荧光光度法测定的原理。
- (2) 学习荧光光度计的操作和使用。
- (3) 掌握荧光光度法定量分析的方法。



核黄素(维生素 B₂)是一种异咯嗪衍生物,在水和乙醇等中性溶液中为黄色,并且有很强的荧光,这种荧光在强酸和强碱中易被破坏。核黄素可被亚硫酸盐还原成无色的二氢核黄素,同时失去荧光,因而样品的荧光背景可以被测定。二氢核黄素在空气中易重新氧化,恢复其荧光,其反应如图 2-1 所示。



可调取液器；试管；试管架；吸管；吸管架；容量瓶；烧杯；量筒；滴管；镊子；

剪刀；玻棒；骨勺；称量纸；吸水纸；吸耳球；记号笔或标签纸。



试剂及配制

1. 实验试剂

①连二亚硫酸钠（保险粉）或亚硫酸钠；②核黄素；③乙酸。

2. 试剂配制

(1) 连二亚硫酸钠（保险粉）或亚硫酸钠，直接用。

(2) 36% 醋酸溶液：取乙酸 36.0ml，用蒸馏水稀释至 100.0ml，混匀即可。

(3) 核黄素标准品溶液 (10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)：准确称取核黄素 10.0mg，放入预先装有少量蒸馏水（约 50ml）的 1000.0ml 容量瓶中，加入 5.0ml 36% 乙酸溶液，再加约 800ml 蒸馏水，置 50℃ 水浴中避光加热直至溶解。冷却至室温，再用蒸馏水定容至 1000.0ml，混匀即可。

注：在所有操作过程中，要避免核黄素受阳光（或强光）直接照射，配制好的核黄素溶液需避光保存。



实验步骤

1. 核黄素标准品溶液的配制

用已配制的核黄素标准品溶液 (10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)，按表 2-1 再稀释成 6 种不同浓度。

表 2-1 核黄素标准品溶液配制表

管号	0	1	2	3	4	5	样品
标准品/ml	2.5	2.0	1.5	1.0	0.5	0.25	
蒸馏水/ml	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	9.75	
总体积/ml	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	
核黄素含量/($\mu\text{g}/\text{ml}$)	2.5	2.0	1.5	1.0	0.5	0.25	
$F_1/\%$							
$F_2/\%$							
$F/\%$							

2. 核黄素样品溶液的配制

将被测试的核黄素样品参照标准品溶液的含量范围和溶剂体系配成测定溶液（测定食物和生物材料中的核黄素，一般需要事先经过抽提，或分离、纯化处理后，方可测定）。

3. 荧光测定

1) 选用滤色片

参照 930 型荧光光度计的使用说明，选用滤色片。核黄素荧光测定的激发光波长为 455nm，发射光（荧光）波长为 523nm。因此，可选用带通型 400nm（蓝字）滤色片为激发光滤色片，选用截止型 510nm（红字）滤色片为发射光滤色片，同时启动仪器进

行预热。

注：对于未知荧光物质测定的激发光波长和发射光波长，可以通过荧光分光光度计进行激发光谱和发射光谱扫描确定（实验时由教师示教扫描）。

2) 调仪器满刻度

待仪器预热后，用 $2.5\mu\text{g/ml}$ （含量最高的 0 号管）的溶液调荧光光度计相对荧光强度读数到满刻度（100%），反复调节直至数据稳定在满刻度为止。调好的满刻度，在整个实验结束之前，不可随意重调。

3) 标准品和测试样品的测定

(1) 未还原时标准品和测试样品溶液荧光强度的测定 (F_1)：调好满刻度之后，分别从高浓度到低浓度依次测定表 2-1 所配制的各浓度的标准品溶液和测试样品溶液的荧光强度，并记录各自的读数。需要特别注意的是：在每一份溶液测定完后，必须重新倒回各自的原试管内，供测试溶液还原用。在测定中如果测试溶液的荧光强度超出 100% 或荧光强度过低，则需要重新配制调整。

(2) 还原后标准品和测试品溶液荧光强度的测定 (F_2)：在上述已测定并倒回各自试管内的溶液中，分别加入连二亚硫酸钠（保险粉）约 10.0mg，经溶解混匀后，再重新测定各自荧光强度，并记录其读数。

数据处理

每一个测定溶液的实际荧光强度校正公式为

$$F = F_1 - F_2$$

式中， F 为校正后的实际荧光强度； F_1 为未还原时测定的荧光强度； F_2 为还原后测定的荧光强度。

制作相对荧光强度和浓度 ($F-C$) 的标准曲线：

(1) 以校正后的实际荧光强度为纵坐标，对应标准品的浓度为横坐标制作 $F-C$ 标准曲线。

(2) 通过被测试样品校正后的实际荧光强度在标准曲线上查出相应含量。

$F-C$ 标准曲线亦可用 Excel 线性回归作图进行测定。

思考题

1. 为何配制好的核黄素标准品和测试品溶液需避光保存？
2. 为何核黄素标准品和测试品溶液在荧光测定后还需分别还原处理，再测定各自的荧光强度？
3. 为何荧光测定的比色杯是四面透明的，拿取比色杯时需要注意什么？

实验3

离子交换柱层析 (分离氨基酸)



实验目的与要求

(1) 本实验采用强酸性阳离子交换树脂层析柱, 选取特定的 pH 缓冲洗脱液, 以简易的恒溶剂洗脱方式来分离含有两个性质不同的氨基酸溶液, 以初步体验离子交换柱层析的分离原理。

(2) 通过实验初步学习一般装柱、平衡、上样、清洗、洗脱、收集、测定等离子交换柱层析的基本实验操作技术。



实验原理

离子交换层析 (ion exchange chromatography, IEC) 是根据样品的带电性质差异而进行分离的一种液相层析技术。

有些高分子物质 R (基质 R 可为树脂、纤维素、凝胶) 含有一些可以解离的酸性或碱性基团, 如 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{COO}^-$ 、 $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{NH}_3^+$ 等 (作为固定相) 在一定条件下可以和溶液中的相关离子产生离子交换反应。例如,

阳离子交换反应: $\text{R}-\text{SO}_3\text{H} + \text{M}^+ \rightleftharpoons \text{R}-\text{SO}_3\text{M} + \text{H}^+$

阴离子交换反应: $\text{R}-\text{NH}_3\text{OH} + \text{Cl}^- \rightleftharpoons \text{R}-\text{NH}_3\text{Cl} + \text{OH}^-$

这类高分子物质通称为离子交换剂, 其中使用较为普遍的是离子交换树脂。在离子交换柱层析中, 由于一定的离子交换剂对不同离子的交换能力 (或亲和力) 不同, 因此在采用一定条件的流动相洗脱过程中, 不同带电离子在离子交换柱上的迁移速度也不同, 最后得到分离。

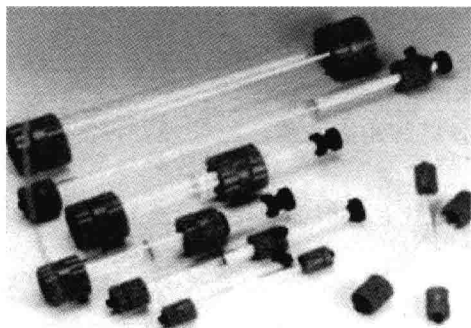


图 3-1 层析柱图



实验仪器、器材与装置

1. 实验仪器

紫外-可见分光光度计; 恒温水浴 (或电炉与水浴锅); 自动部分收集器; 磁力搅拌器; 混合器; 恒流泵; 电子天平。

2. 实验器材

可调取液器; 连续加液器; 层析柱 ($\Phi 1.0\text{cm} \times 10\text{cm}$, 图 3-1); 吸管; 吸管架; 试管; 试管架; 烧杯; 量筒; 滴管; 玻棒; 剪刀; 镊子; 骨勺; 洗耳球; 称量纸; 吸水

纸;保鲜膜;标签纸。

3. 实验装置

实验装置如图 3-2 所示。

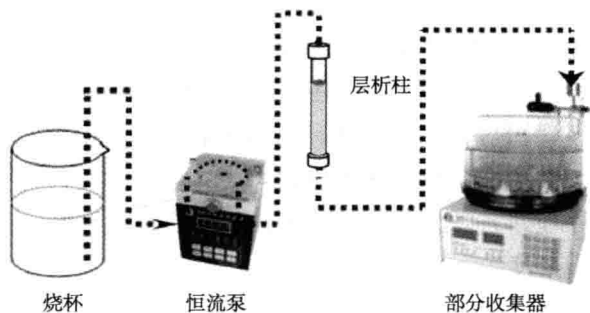


图 3-2 离子交换柱层析实验装置图



试剂及配制

1. 实验试剂

①Zerolit 225 强酸型阳离子交换树脂(颗粒直径 $\Phi 30\mu\text{m}$ 或相近型号); ②天冬氨酸; ③赖氨酸; ④无水乙醇; ⑤95%乙醇; ⑥氢氧化钠; ⑦柠檬酸; ⑧茚三酮; ⑨浓硫酸; ⑩盐酸。

2. 试剂配制

(1) 洗脱溶液(0.45mol/L, pH 5.3 柠檬酸缓冲液): 称取柠檬酸 2.85g, 氢氧化钠 1.86g 于一烧杯中, 先用少量蒸馏水溶解, 再加浓硫酸 1.05ml, 最后用蒸馏水稀释至 100ml, 混匀即可。

(2) 盐酸(0.02mol/L HCl) 溶液: 吸取 1.0mol/L HCl 1.0ml, 用蒸馏水稀释至 50.0ml, 混匀即可。

(3) 样品溶液(Asp 和 Lys): 分别称取赖氨酸和天冬氨酸各 7.0mg 于小烧杯内, 然后加 0.02mol/L HCl, 10.0ml 溶解即可(根据分离情况亦可再加甘氨酸)。

(4) 60%乙醇溶液: 取 95%乙醇 63.0ml, 加蒸馏水至 100.0ml, 混匀即可。

(5) 显色剂: 称取茚三酮 2.0g 于一烧杯中, 然后加无水乙醇 100.0ml, 溶解即可。



实验步骤

1. 离子交换树脂的处理

本实验采用已预先处理好并转成 Na^+ 型的 Zerolit 225 强酸型阳离子交换树脂(200~400 目或颗粒直径 $\Phi 30\mu\text{m}$ 相近型号)。

有关该类型离子交换树脂的一般处理方法如下:

称取所需量离子交换树脂于 3 倍树脂体积蒸馏水中溶胀过夜→用沙芯漏斗(下同)抽干蒸馏水→抽干树脂置于 3 倍树脂体积的 2mol/L HCl 中, 间隔电动搅拌 2h→抽干酸液并用蒸馏水淋洗树脂抽滤至近中性→抽干树脂置于 3 倍树脂体积的 2mol/L NaOH

中, 间隔电动搅拌 2h → 抽干碱液并用蒸馏水淋洗树脂抽滤至近中性 → 抽干树脂置于 3 倍树脂体积的 1mol/L NaCl 中, 间隔电动搅拌 1h (此步骤为转型, 阳离子交换树脂将转成 Na^+ 型, 阴离子交换树脂将转成 Cl^- 型) → 抽干盐溶液并用蒸馏水淋洗树脂抽滤至无盐状态 (5~10 倍树脂体积) → 抽干树脂置于蒸馏水 (或平衡缓冲液) 中备用。

2. 层析柱常规装柱 (湿式重力自然沉降装柱法)

(1) 选择柱底端滤芯完好的洁净层析柱, 将其垂直装在台式铁支架上, 在柱内注入适量洗脱液, 打开柱底端出口, 洗脱液从柱底端流出并排出柱底端及连接管道中的气泡, 待柱内留有约 1.0cm 高洗脱液时关闭柱底端出口。

(2) 向烧杯中已处理好的树脂加适量的洗脱液, 搅成悬浮状, 然后沿着贴紧柱内壁的玻璃棒, 小心加至适当高度。倒入时不要太快, 以免产生泡沫和气泡。

(3) 待树脂在柱子底部有明显沉积 (10min 左右) 后, 慢慢打开柱底端出口, 继续让树脂随水流自然沉下, 用吸管吸去柱内上层过多的洗脱液, 继续向柱内加入悬浮的树脂直至沉积后柱床体高度达 6.0cm 为止, 此时柱床表面之上应留有一定高度 (约 2.5cm) 的溶液, 关闭柱底端出口。

(4) 在装柱时要避免柱内液体流干而使装柱失败。另外, 树脂悬浮液的温度要相对恒定或应与室温接近, 否则柱床体内易产生气泡而影响层析效果。

(5) 装好的层析柱应该没有“纹路”、节痕、气泡和渗漏, 并且柱床体表面平整而均匀, 这样方可投入使用, 否则需要按上述步骤 (1) ~ (4) 重新装柱直至达到要求为止。

(6) 在装柱期间应将其他连接层析柱的仪器设备 (如自动部分收集器, 恒流泵的流速事先调至 0.4ml/min) 接通电源, 并按实验要求进行调试。

3. 层析柱平衡

层析柱装好后将上端的柱头拧紧使其密闭, 将顶端用软管接上已事先调至 0.4ml/min 流速的恒流泵, 打开柱底端出口, 打开恒流泵用洗脱液以恒定的流速进行平衡, 直至柱流出液的 pH (及离子强度) 与原先洗脱液的 pH (及离子强度) 相同为止 (需要平衡 2~4 倍柱床体积), 关闭恒流泵, 关闭柱底端出口。

注: 柱床体积 (CV) = 柱截面积 × 柱床高度。

4. 层析柱加样

(1) 移去层析柱上端柱塞, 轻轻打开层析柱底端出口, 小心使层析柱内液体流至柱床表面时即关闭。

(2) 用取液器吸取 0.5ml 氨基酸混合样液沿柱内壁缓慢地加入柱中直到样品全部加完, 加样时应避免冲坏柱床的树脂表面。

(3) 打开自动部分收集器电源开关, 设定为 10.0min/管 (即 4ml/管), 并启动定时收集。

(4) 在自动部分收集器电源开关打开并开始定时进行收集的同时, 慢慢打开层析柱底端出口, 使柱内样品液面流至与柱床树脂表面相平时即关闭。

注: 进样的速度一定要慢, 不能大于洗脱时的流速。