



生物化学实验技术丛书

色谱法 (二)

陶宗晋 主编

58.1

2

科学出版社

生物化学实验技术丛书

色 谱 法 (二)

陶宗晋 主编

科学出版社

1986

内 容 简 介

本书介绍生化研究中的六项基本技术：包括气相色谱、高效液相色谱、亲和色谱、逆流分溶、粘度以及光散射。分别由从事有关方面的研究人员编写。主要阐述这些方法的原理、特点、仪器设备、操作技术、数据处理，并论及科研和生产上的应用实例，对操作技术介绍比较详尽，理论背景只作必要的简述。章后附有参考文献。

本书可供化工、农、医等方面从事化学分析的工作者，有关研究部门的科学工作者及大专院校有机化学、分析化学、生物化学专业的师生参考。

生物化学实验技术丛书

色 谱 法 (二)

陶宗晋 主编

责任编辑 吴铁双

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1986 年 3 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

1986 年 3 月第一次印刷 印张：12 1/8

印数：0001—4,700 字数：274,000

统一书号：13031·3099

本社书号：4069·13—10

定 价：2.85 元

编 者 的 话

生物化学是二十世纪有了惊人发展的生物学中最活跃的分支学科之一。促使生物化学迅速发展的重要因素之一是新技术的开发。

过去一、二十年间生物化学的实验方法日趋专门化和复杂化,牵涉到生化实验工作的领域也越来越多。今天,农业、工业、医学、环境以及生命科学等的研究都涉及生物化学研究,生化实验已成为常规的实验操作了。因此,对于开始进行生化研究的工作者,或者要开拓自身专业领域以外生化研究领域的工作者来讲,都希望能有一本合适的实验指导书。有鉴于此,科学出版社于1977年夏委托中山大学在广州召开了由国内从事生化工作的部分研究所(中国科学院上海生物化学研究所、中国科学院微生物研究所)、大学(中山大学、北京大学、武汉大学、南开大学、南京大学、复旦大学)、工厂(江门甘蔗化工厂、中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂)参加座谈会,拟定了编写一套切实可行,供有关工作者随时查阅参考的《生物化学实验技术丛书》。

本《丛书》各册编写的内容是建国以来国内已经应用、开展或正在开展的生化技术。随着我国生化研究工作的进展,国外新技术的引进,国内独创技术的开展,将不断补充新的内容。

本《丛书》着重在实验技术,各册内容力求做到:

- (1) 理论部分简洁明了,实验部分重复性高;
- (2) 直接触及实验设计的各项要领;
- (3) 指出实验操作中应注意的地方;
- (4) 尽可能多地举例说明。

本《丛书》的编写,虽经大家共同努力,但缺点错误在所难免,热情希望读者批评指正。如果本《丛书》的出版,能推动生物化学的进展,为实现科学技术现代化作出一些贡献,编者将感到十分高兴。

目 录

第一章 亲和色谱法	1
第一节 基本原理	1
第二节 载体的选择	2
一、琼脂糖凝胶	2
二、聚丙烯酰胺凝胶	3
三、葡聚糖凝胶	3
四、多孔玻璃	4
第三节 配基的选择	4
一、配基与所要分离的生物高分子间的亲和力	4
二、配基上的化学基团	4
三、共价结合的配基	5
四、疏水的配基	5
第四节 亲和吸附剂的制备	6
一、多糖类载体	6
(一) 溴化氰活化及偶联法	7
(二) 水溶性碳二亚胺的偶联作用	8
(三) N-羟基琥珀酰亚胺活化酯的偶联作用	8
(四) 偶氮键的偶联作用	9
(五) 巯基琼脂糖	10
(六) 琼脂糖凝胶的多价“手臂”	11
(七) 琼脂糖的酰肼衍生物	11
(八) 双环氧活化法	12
二、聚丙烯酰胺载体	12
(一) 羧基衍生物的制备	13
(二) 酰肼衍生物的制备	13
(三) 氨基衍生物的制备	13
三、多孔玻璃载体	13
第五节 吸附和洗脱	13
一、吸附	13
二、洗脱	14
第六节 应用举例	14
一、酶	14
二、抗体及抗原	15
三、结合蛋白和输送蛋白	16
四、受体蛋白	16
五、细胞及病毒	16
六、刀豆球蛋白 A 和糖蛋白	16
参考文献	17

第二章 逆流分溶法	19
第一节 基本原理	19
第二节 实验	23
一、仪器	23
二、操作方法	25
三、溶剂系统	27
第三节 操作	30
第四节 分溶曲线的绘制	32
第五节 数据处理	33
参考文献	33
第三章 粘度法	35
第一节 基本原理	35
一、粘度的定义	35
二、泊稷叶定律	35
三、各种粘度的定义与符号	36
四、蛋白质溶液的粘度与浓度及温度的关系	37
五、粘度与分子形状的关系	37
六、特性粘度与分子量的关系	39
七、非牛顿型粘度	40
第二节 粘度计的结构与操作	41
第三节 奥氏粘度计	42
一、结构	42
二、粘度的测定	42
三、奥氏粘度计的变型	43
第四节 水平式粘度计	44
一、结构	44
二、粘度测定及其注意之点	45
第五节 毛细管粘度计的误差讨论	46
一、动能校正	46
二、尾端校正	46
三、其他因素引起的误差	47
第六节 蛋白质溶液的配制及有关问题	47
一、溶液的配制与稀释	47
二、蛋白质浓度的测定	48
附录 毛细管的选择	48
第四章 光散射法	49
第一节 基本原理	49
第二节 仪器的装置及校验	55
一、光源	55
二、入射光束	56
三、散射池和水池	56

四、散射光束及散射光强测量系统	56
五、仪器的调整	57
六、仪器对称性的检验	57
第三节 实验及数据处理	58
一、除尘	58
二、校正因子	59
三、参比标准	60
四、蛋白质折射率增量及溶液浓度的测定	60
五、干涉仪的使用	62
六、测定	63
七、数据处理实例	64
八、误差的估计	66
附表	66
参考文献	67
第五章 高效液相色谱法	68
第一节 引言	68
第二节 基本原理	69
一、溶质在色谱柱中的滞留	69
二、色谱柱的选择性	69
三、色谱柱的效率	70
四、色谱分析的分辨率及其控制的一般原则	70
第三节 主要设备	73
一、输液泵	73
二、加样系统	74
三、色谱柱	74
四、检测器	76
第四节 流动相	78
一、溶剂的物理性质	78
二、溶剂的极性	80
三、溶剂的选择性	81
四、溶剂在使用前的处理	82
第五节 液-固色谱法	83
一、吸附剂与溶质的相互作用	83
二、液-固色谱法中流动相的选择	83
三、液-固色谱法的应用	86
第六节 键合相色谱法	86
一、正常相色谱法	87
二、反相色谱法	87
三、键合相色谱法的应用	90
第七节 离子配对色谱法	92
第八节 离子交换色谱法	94
一、离子交换色谱的固定相	95

二、离子交换色谱的流动相	96
三、离子交换色谱的应用	97
第九节 体积排阻色谱法	98
第十节 色谱分析中的几个实际问题	100
一、样品的制备	100
二、固定相和流动相的选择	102
三、色谱峰的鉴别	104
四、色谱峰的定量分析	105
参考文献	107
第六章 气相色谱法	110
第一节 引言	110
第二节 气相色谱仪器装置	111
一、载气	112
二、进样	113
三、色谱柱	114
四、温度控制	114
五、鉴定器	115
六、记录器	120
第三节 气相色谱原理	121
一、线性气相色谱法	121
二、保留值的测量	122
三、塔板理论	125
四、速率理论	126
五、色谱峰的分离	126
第四节 担体和固定液	128
一、吸附剂	128
二、担体	129
三、多孔聚合物	132
四、固定液	133
五、色谱柱的填充和老化	137
六、毛细管色谱柱	140
第五节 定性和定量分析	141
一、定性分析	142
二、定量分析	143
第六节 气相色谱法在生物化学中的应用	146
一、脂类的分析	147
二、糖的分析	151
三、甾体化合物的分析	157
四、尿香草扁桃酸和高香草酸的测定	168
五、氨基酸的分析	174
六、嘧啶、嘌呤和核苷的分析	183
参考文献	184

第一章 亲和色谱法

余微明 袁中一

第一节 基本原理

分离和纯化生物大分子的方法很多,大都是根据它们在理化性质上的差别,如分子大小、溶解度、带电性质,由此,建立了盐析、有机溶剂分级沉淀、离子交换色谱、凝胶过滤、电泳和超离心等方法。一般来说,这些方法繁琐,回收率较低。

亲和色谱则是利用了生命现象中生物分子之间非常特异的相互作用,而十分巧妙地进行分离纯化的方法。生物体内生物分子之间,如酶与底物、酶与抑制剂、酶与变构效应剂、酶与辅酶、激素与细胞受体、维生素与结合蛋白、基因与核酸、抗体与抗原、外源凝集素与红血球表面上的抗原等等,都相互具有亲和力,能形成可逆的络合物,亲和色谱就是利用这种可逆络合物结合与解离的原理而发展起来的新的纯化技术。

亲和色谱的基本过程如下(参见图 1-1)。

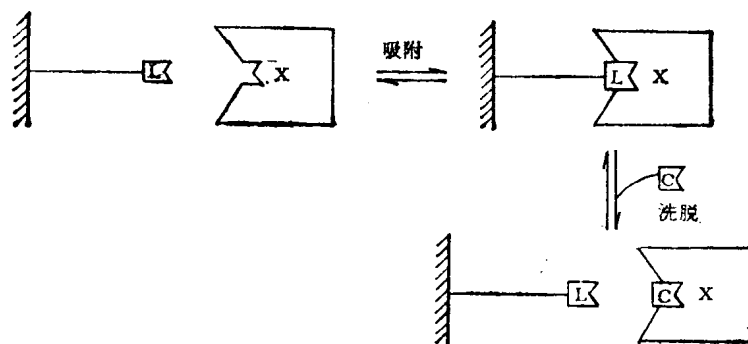


图 1-1 亲和色谱的基本过程

(1) 与纯化对象 X 能专一地作用的配基 L 连接在水不溶的载体上,制得固定化的配基,称为亲和吸附剂。

(2) 在色谱柱内装入亲和吸附剂。

(3) 亲和吸附。含有纯化对象 X 的混合液,在有利于 X 与配基形成络合物的条件下进入色谱柱。混合液中只有能形成络合物的高分子 X 被吸附在柱上,其他杂质因不能络合而直接流出色谱柱。再进一步用缓冲液洗涤色谱柱,以除去非专一吸附的物质。

(4) 洗脱。用另一与 X 有亲和力的 C 溶液或改变反应条件,促使 X 与配基形成的络合物解离而释放出纯化对象 X。

(5) 再生。色谱柱中使用过的亲和吸附剂充分洗涤后可以再生,用于又一周期的纯

化工作。

亲和色谱的原理虽然早已引起人们的注意,但是由于配基固定化的方法没有很好地解决,所以长时期中,这一技术仍然停步不前。60年代后期固定化酶领域中固定化技术有了很大的进步,尤其是溴化氰活化多糖的技术引用到亲和色谱中,促使这项技术获得了迅速的发展,这方面的综述、专著以及工作报告^[1-10]层出不穷。

大量分离纯化成功的事实表明,亲和色谱不仅简单、快速,而且回收率高,甚至能从粗抽提液中只经亲和色谱一步就能纯化成百上千倍。亲和色谱在分离体内微量成分尤为有效,可用作纯化酶、酶的抑制剂、抗体、抗原、各种结合蛋白、激素和药物的受体、核酸、基因、多酶系统等,还可用于分离细胞;亲和色谱还为了解生物体内各种分子间相互作用及其机制提供有效的手段。

国外亲和色谱的技术已为生物化学、医学、各种生物学研究的实验室所广泛使用,工业生产上的应用也已开始,工作十分活跃。本文将局限于实验技术方面作一些介绍,希望这一技术在我国也得到更广泛的发展与应用。

本文的前几部分着重介绍亲和色谱的四个重要组成份:载体,配基,配基与载体的连接,亲和吸附与洗脱;随后阐述几个实际应用方面的例子。

第二节 载体的选择

选择适当的载体是亲和色谱能否成功的第一步,因为载体是负载着配基的固相支持物,它直接影响生物分子间的相互作用,理想的载体应具备(1)均一、有一定硬度,不溶于水;(2)多孔网状结构,易为大分子渗透;(3)具有相当数量的可供偶联反应的基团;(4)没有吸附能力,不会发生非专一吸附;(5)有足够的化学稳定性,经得起吸附、洗脱和再生时所用的各种条件的处理;(6)不受微生物腐蚀和酶解;(7)亲水。

目前,还没有一种载体能满足所有的条件,较好的有琼脂糖凝胶、交链葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶和多孔玻璃。其中以琼脂糖凝胶用得最多。

一、琼脂糖凝胶

琼脂糖是由1,3连接的 β -D-吡喃半乳糖和1,4连接的3,6-脱水- α -1-吡喃半乳糖构成的直链多糖,见图1-2。凝胶状态时多糖链形成平行的双螺旋,链间由氢键维系。这些多糖链纵横交错形成了多孔的结构。珠状琼脂糖凝胶的商品名为 Sepharose 或 Bio-gel A,

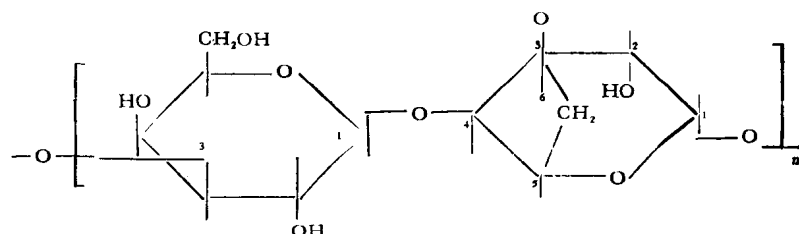


图 1-2 琼脂糖的结构

根据凝胶中琼脂糖的含量不同,分为几种型号即 2B、4B、6B 等。Sepharose 4B 有恰当的多孔性,装色谱柱后流速也好,是使用最广泛的一种。

琼脂糖凝胶必须保持湿的状态。它经不起一些有机溶剂的处理或冷冻干燥,否则会导致不可逆的皱缩。但与 50% 乙二醇或 100% 二氧六环能相容。凝胶用二氧六环彻底洗涤后抽干形成干粉,当它们重新投入水溶液时能膨胀成原形。

琼脂糖凝胶的悬浮液在 pH 4—9 稳定。珠状凝胶能在 0.1mol/L 氢氧化钠或 1mol/L 盐酸中至少 2—3 小时不改变其物理性质。长期在 6mol/L 盐酸胍或 7mol/L 尿素中,凝胶稍有缩小。加热至 40—50℃,珠状凝胶就会熔化。

可以通过交联剂的处理,使琼脂糖凝胶的性能更为改善,环氧氯丙烷、双环氧乙烷、2,3-二溴丙醇和二乙烯砜等都可作为琼脂糖凝胶的交联剂。交联的凝胶网状结构更为坚实,富于弹性,适用的 pH 范围扩大到 3—12,能经受更多种类的有机溶剂的处理,非专一性吸附也减少了,还能经受 100℃ 加热而不致熔化。但对它的透性有一定的影响。

环氧氯丙烷交联的琼脂糖凝胶的制备^[1],是将 1 升琼脂糖凝胶和 1 升 1mol/L 氢氧化钠、20 毫升环氧氯丙烷以及 5 克硼氢化钠 (NaBH_4) 在室温混和,混合物在搅拌下加热到 60℃,之后,用热水洗到中性;再在凝胶中加入 500 毫升 2mol/L 氢氧化钠和 2.5 克硼氢化钠,120℃ 加热 1 小时,然后用 1mol/L 氢氧化钠、0.5% 硼氢化钠洗涤,第一次用 1.5 升的热溶液,第二次用 1.5 升的冷溶液;凝胶转移到含碎冰的烧杯中,用醋酸调节 pH 到 4.0,布氏漏斗过滤,热水洗涤,以除去少量残留的硼酸,最后用冰水洗涤,即得到交联的琼脂糖凝胶,悬浮于 0.02% 叠氮化钠的溶液中备用。

二、聚丙烯酰胺凝胶

商品名为 Bio-Gel P, 它是由丙烯酰胺 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CHCONH}_2$) 单体和交联剂 N,N'-甲叉双丙烯酰胺 ($\text{H}_2\text{C}=\text{CHCONHCH}_2\text{NHCCH}=\text{CH}_2$) 在催化剂作用下聚合而成的稳定的凝胶 (见图 1-3), 以不同比例的单体和交联剂聚合可制得孔径不同的产品,它可成为干粉保存,加水后溶胀成凝胶。它能经受有机溶剂及盐类、去污剂、盐酸胍、尿素的稀溶液处理,凝胶表面有许多酰胺基可供偶联配基,它的缺点是结构紧密、孔小,有些配基在孔内,大分子钻不进小孔,因而只能接触到分布在凝胶表面上的配基,有时就会影响分离效果。

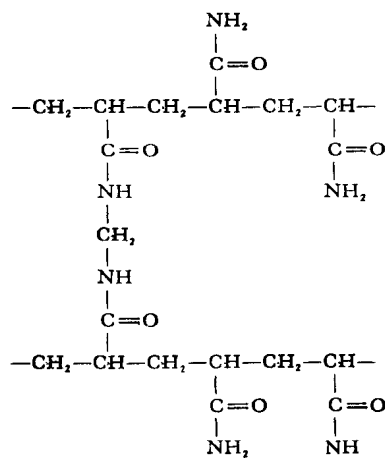


图 1-3 聚丙烯酰胺的部分结构

三、葡聚糖凝胶

商品名 Sephadex 是右旋糖苷经环氧氯丙烷交联而成的珠状凝胶 (见图 1-4)。它对化学处理稳定,耐受 0.25mol/L 氢氧化钠在 60℃ 放置 2 个月或 0.1mol/L 盐酸浸泡 1 至 2 小时的处理,也能经受高温消毒。它的缺点是孔小,因此在亲和色谱中很少使用成功,只有交链程度最低的 Sephadex G-200,偶而用作载体。

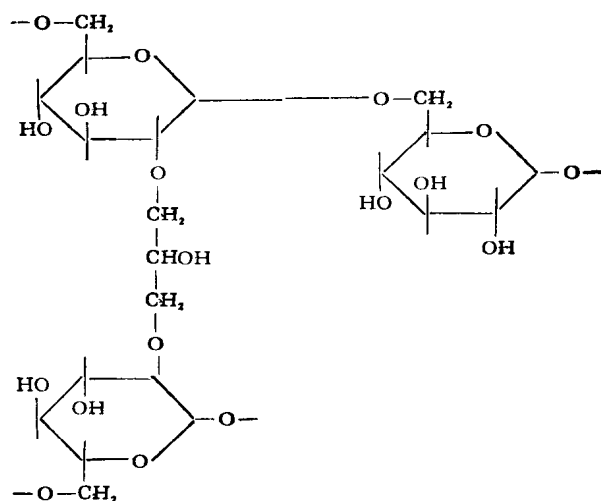


图 1-4 葡聚糖凝胶的部分结构

四、多孔玻璃

与其他载体不同,这是一种无机载体,它的优点是多孔、坚硬,经得起有机溶剂的处理,也不受微生物腐蚀。它的缺点是表面上的羟基在水溶液中带负电荷,因而有非专一的吸附。

第三节 配基的选择

配基必须对纯化的对象具有专一的亲和力。生物学中存在着许多配对系统,每一方都可作为分离它的天然伙伴的配基。在亲和色谱中用作为配基的有酶的底物和底物类似物、抑制剂、效应剂、辅因子;核酸、核苷酸、植物激素、甾体、抗生素以及疏水性的配基等。选择配基要考虑以下几个因素。

一、配基与所要分离的生物高分子间的亲和力

配基固相化后制成亲和吸附剂,这种吸附剂对生物高分子的吸附强度,与在溶液中配基和该高分子生成的络合物的解离常数直接有关。O'carra^[12] 提出这样的关系式:

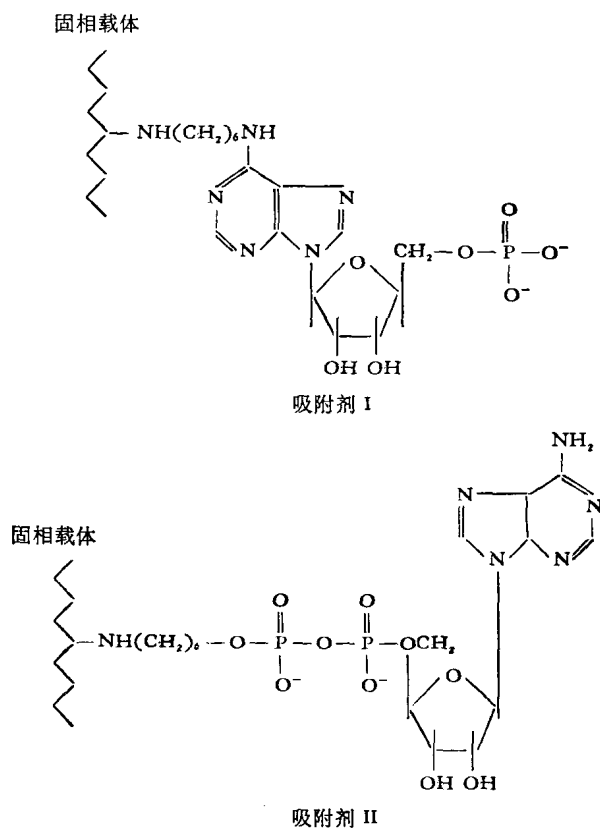
$$R = \frac{[L]}{K}$$

式中 R 表示结合在亲和吸附剂上的生物高分子的活力单位, $[L]$ 表示固相化的配基的克分子浓度, K 是解离常数。固相配基的浓度越大,络合物的解离常数越小,则吸附效果好。但配基浓度过大,反而造成空间障碍或增加非专一性的吸附。

二、配基上的化学基团

配基必须具有可与载体相连接的化学基团,而且配基固定化之后不影响它的生物活

力。有些配基可能具有一个以上的功能团可与载体连接,例如核苷酸作配基时^[13],可通过磷酸根与载体连接(吸附剂 I),或通过嘌呤或嘧啶碱基与载体连接(吸附剂 II),应观察这些固定化配基能否保持与它互补的蛋白质的亲和力。醇脱氢酶、甘油激酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶都是腺嘌呤核苷酸的互补蛋白,但是前二个酶只被吸附剂 I 所吸附,而后一个酶则被吸附剂 II 吸附^[13]



三、共价结合的配基

和纯化对象能形成共价键的配基也可用于亲和色谱,在这种情况下,配基专一地和互补蛋白质的活性基团反应生成共价键,洗脱时只有当此键断裂时才能释放结合着的蛋白质。如含巯基的配基可和有些蛋白(如木瓜蛋白酶)的活泼巯基反应生成共价的二硫键^[14]。又如,以有机磷作为配基的亲合吸附剂可与胆碱酯酶的活性部位的丝氨酸羟基形成共价键,即磷酸化酶,只有用解磷定洗脱才能使酶游离出来^[15]。

四、疏水的配基

近年来发现蛋白质分子上有疏水区,它们主要由赖氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸等非极性的侧键密集一起形成,对于保持蛋白质的三级结构是很重要的。这就促使人们考虑,若以

疏水的烃链作为配基,制成吸附剂,便可利用它对蛋白质疏水区的特殊亲和力达到分离纯化的目的,这种类型的亲和色谱又名疏水色谱法^[16,17] (Hydrophobic chromatography),用于纯化糖原磷酸化酶、糖原合成酶、天冬氨酸氨基甲酰转移酶、 α -胰凝乳蛋白酶等,都取得了很好的效果。这种疏水色谱的一般操作,是在酶吸附上之后用氯化钠梯度洗出非专一结合的蛋白质,再用改变离子强度的方法使所需要的生物高分子洗脱。有时也可用醇、胺等表面活性剂洗脱。

第四节 亲和吸附剂的制备

亲和吸附剂的制备首先要使载体活化,然后进行偶联。由于载体的性质不同,活化及偶联的方法也有差异。以下分别叙述。

一、多糖类载体

这类载体的活化最常用溴化氰法^[18]。溴化氰与多糖在碱性条件下反应,当有连位羟基时形成活泼的亚氨碳酸盐。亚氨碳酸盐对化合物的氨基的亲核反应十分敏感,生成 N-取代异脲、N-取代亚胺硫酸酯和 N-取代氨基甲酸酯等衍生物,见图 1-5。

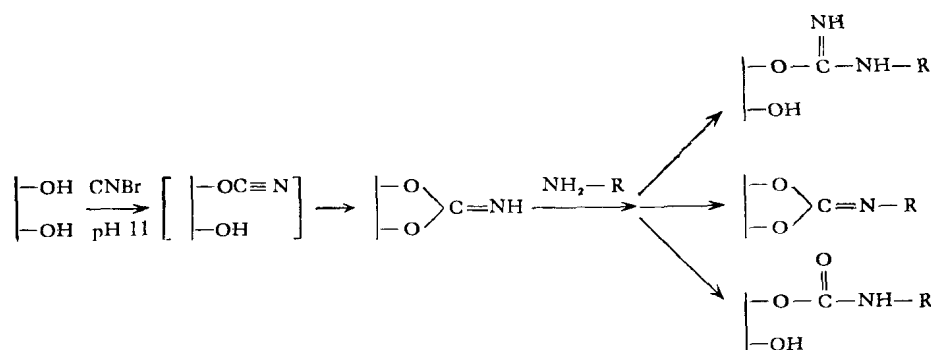


图 1-5 溴化氰活化多糖与氨基化合物的反应

偶联配基可有多种方式。对于大分子的配基如蛋白质可以直接偶联在载体上,这就是图 1-6 中的第一种连接方式。但是小分子的配基直接连在载体上往往不能有效地发挥配基的作用,这可能是由于固相载体的立体障碍,使配基不能和纯化对象有效接触,以致于完全丧失亲和力。补救的方法是在配基和载体之间引入“手臂”^[20]。对于配基和纯化对象亲和力差的系统,“手臂”更显得必要。用作“手臂”的大都是二胺类化合物 $NH_2(CH_2)_xNH_2$, x 可由 2 至 12,也可以是末端氨基的羧酸,如 ϵ -氨基酸 $NH_2(CH_2)_5COOH$ 。在大多数情况下,“手臂”首先引到载体表面上,再将配基偶联于“手臂”的顶端,这就是图 1-6 中的第二种连接方式,假如需要一个较长的“手臂”,可以在二胺基化合物上接琥珀酸酐,最后连接带氨基的配基,这就是图 1-6 的第三种连接方式。

“手臂”的长度对亲和吸附剂的效果很有关系,一般认为“手臂”长些分离效果好,但以 20—30Å 为限,长度再增加则碳氢链可能扭曲,反而降低了配基的吸附效率。

下面介绍这类载体的活化、偶联及一些衍生物制备的常用方法。

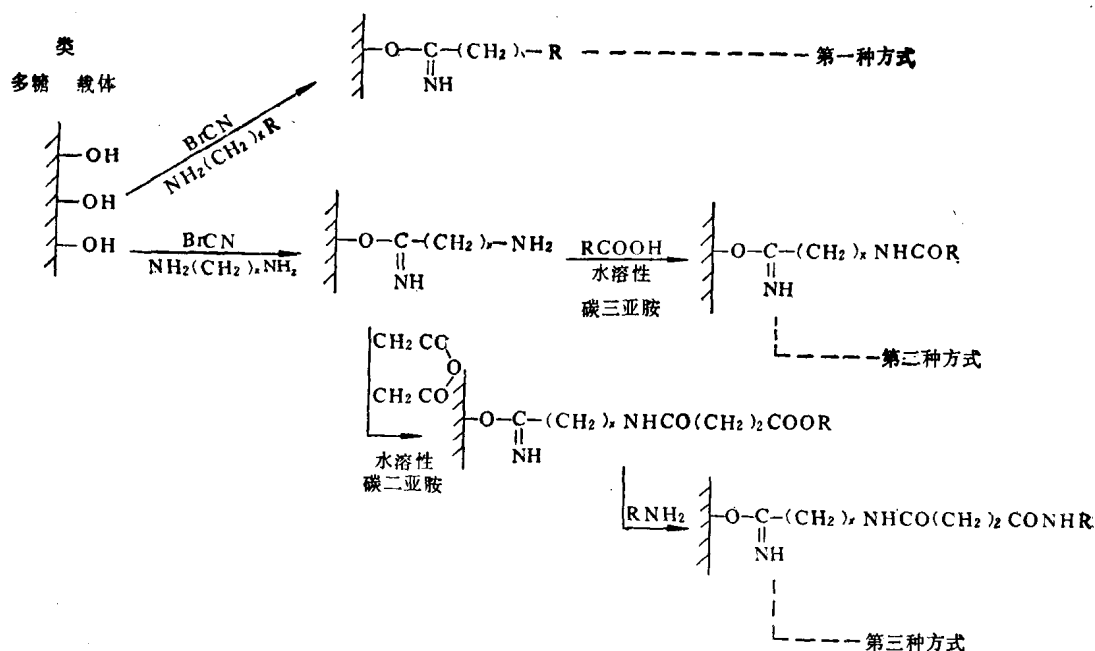


图 1-6 配基与多糖类载体的连接方式 (R 是配基)

(一) 溴化氰活化及偶联法^[18]

首先需提请注意,溴化氰有毒,操作应在通风橱内进行。琼脂糖凝胶依次用 0.1mol/L 氯化钠及水充分洗涤,悬浮在等体积的水中,放在烧杯中搅拌,加少许冰块,使保持冷却。称取溴化氰加入凝胶溶液中,假如每毫升凝胶用 50 毫克的溴化氰,则用 2mol/L 氢氧化钠调 pH,假如每毫升凝胶用 300 毫克的溴化氰,则用 8mol/L 氢氧化钠。pH 调节到大约 11,温度须维持在 30℃,10 到 12 分钟之后溴化氰已全部溶解,碱液的用量也降低了,将凝胶倒入冷的砂芯漏斗中过滤,用 5—10 倍容积的冰冷的蒸馏水洗(此步骤须尽量快,在 2—3 分钟内完成),再以偶联时所用的缓冲液洗涤,立即将凝胶放入含有偶联化合物(配基)的缓冲液中,在 4℃ 慢慢搅拌 12 小时。

在偶联反应之后为了确保凝胶上的活化基团除尽,可在凝胶的水溶液中加入相当量的乙醇胺或 1-氨基-丙烷-2,3-二醇再搅拌 10 小时左右。然后用水、2mol/L 氯化钾依次洗涤,以除去未反应的氨基化合物,再用水将氯化钾洗去。

溴化氰活化法现在又有了进一步改良^[19],使用高浓度的缓冲液维持活化所需要的 pH。将凝胶悬浮在等体积的 2mol/L 碳酸钠溶液中,冷却到 5℃,加入溴化氰,边加边快速搅拌,溴化氰溶解在乙腈中(每毫升乙腈溶解 2 克溴化氰),反应 2 分钟,然后将凝胶倒入砂芯漏斗中过滤。其余处理同前。

琼脂糖凝胶上偶联配基的多少与溴化氰的用量有关,一般每毫升凝胶用 50—300 毫克,若每毫升凝胶用 250 毫克的溴化氰活化,偶联 1,6-二氨基己烷后,可得到每毫升凝胶上有 12 微克分子¹⁾的 6-氨基己基。偶联配基的多少还与温度有关,温度过高则活化的琼脂

1) 按新的国家标准克分子应为摩尔(分子)。以下同。

糖极易失效。偶联时的 pH 也有关系,溴化氰活化的多糖,是和非质子化的伯胺和仲胺反应,因此反应 pH 应高于配基所带胺基的 pK_a 值,在芳香胺作配基时,偶联最好的 pH 为 8—9,氨基酸为 9.5—10,脂族伯胺为 10。应避免反应 pH 大于 10,否则会损害配基的结构。

(二) 水溶性碳二亚胺的偶联作用^[20]

载体制备中碳二亚胺是一种重要的试剂,在图中第二和第三种连接方式中都需碳二亚胺参加缩合作用,它是一种缩合剂,促使氨基和羧基缩合。例如要在 6-氨基基琼脂糖上偶联苏氨酸时^[3],在 5 毫升 6-氨基基琼脂糖(每毫升含 2 微克分子的氨基)中加入 0.1 毫克分子 L-苏氨酸,用 0.1mol/L 盐酸调节 pH 到 4.7。另将 0.25 毫克分子水溶性碳二亚胺,即 1-乙基-3-(3-三甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐,溶解在 0.5 毫升水中,然后将其逐滴加入反应体系中,在 5 分钟内加完, pH 保持在 4.7,室温搅拌 20 小时,凝胶用水、2mol/L 氯化钾及水依次洗涤。

(三) N-羟基琥珀酰亚胺活化酯的偶联作用^[21]

琼脂糖的 N-羟基琥珀酰亚胺衍生物是常用的一种中间物,这是由于它制备方便,也易于保存,如保存在二氧六环中可以放置 6 个月以上而不影响凝胶的物化性能,可用以制得较长“手臂”的亲亲和吸附剂。在与配基偶联时 pH 范围是 5—8.5。非质子化的脂肪族或芳香族的氨基都可与它在 5—30 分钟内在 4℃ 起反应,生成稳定的酰胺键。

它的制备法分两步^[21],见图 1—7。第一步是形成琥珀酰化的凝胶^[20]。琼脂糖在溴化氰活化之后接上 3,3'-二氨基二丙基胺,在 100 毫升的二氨基二丙基胺琼脂糖的凝胶中加入琥珀酸酐 100 毫克分子,用 5mol/L 的氢氧化钠调节 pH 并维持在 6,在此过程中加冰使反应系统的温度在 30℃ 以下,当 pH 不再变化时,在 4℃ 继续反应 5 小时以上。然后用 2 升水在室温洗涤,再加入 0.1mol/L 氢氧化钠 24℃ 保温 30—40 分钟。这是因为琼脂糖的羟基可能与琥珀酸酐形成了酯键,它可在碱性溶液中全部水解。

第二步做成活化酯,即琥珀酰化的琼脂糖凝胶用 2 升水及 1 升无水二氧六环洗涤,并使之脱水后,悬浮在 200 毫升的二氧六环中,加入 0.1 克分子的固体的 N-羟基琥珀酰亚

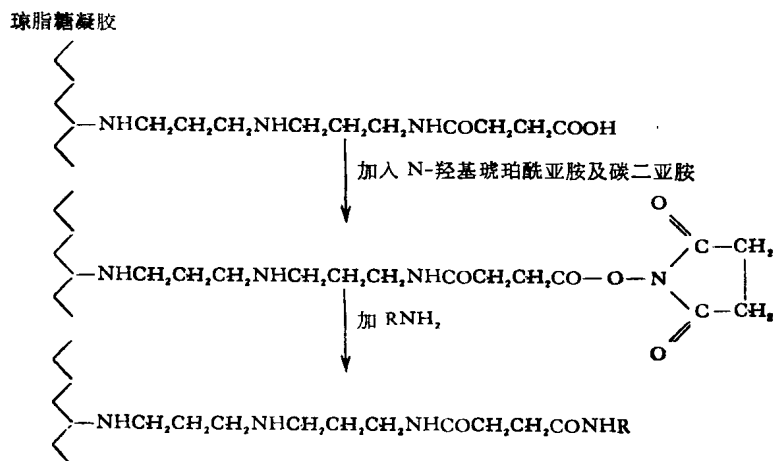


图 1-7 N-羟基琥珀酰亚胺活化酯的偶联作用

胺及 0.1 克分子的碳二亚胺, 室温振摇 90 分钟, 然后用二氧六环洗, 所得的琼脂糖 N-羟基琥珀酰亚胺活化酯可在二氧六环的悬浮液中保存, 也可以在二氧六环充分洗涤后冷冻干燥保存。

在偶联配基时先将凝胶中的二氧六环抽干, 加入到与凝胶等体积的含有末端氨基的配基溶液中。溶解配基的缓冲液一般用柠檬酸、磷酸、乙酸、碳酸氢盐, pH 选用 5—8.5, 在 4℃ 反应, 反应的时间可从 10 分钟到 6 小时。反应完后加入 1mol/L 甘氨酸, 在 pH 9、室温反应 2 小时, 以除去未反应的活化酯基团, 凝胶再用缓冲液充分洗涤。

(四) 偶氮键的偶联作用^[22,23]

琼脂糖凝胶或其他载体的偶氮衍生物可以与含有酚或咪唑基的配基偶联。偶联作用包括如下几步, 首先溴化氰激活琼脂糖连接上一个二氨基化合物, 得到氨基琼脂糖, 然后加上对位硝基苯甲酰叠氮, 使琼脂糖上暴露在外面的那个氨基酰化, 再用连二亚硫酸钠使硝基还原, 所形成的苯胺基重氮化后与配基相偶联, 见图 1-8。

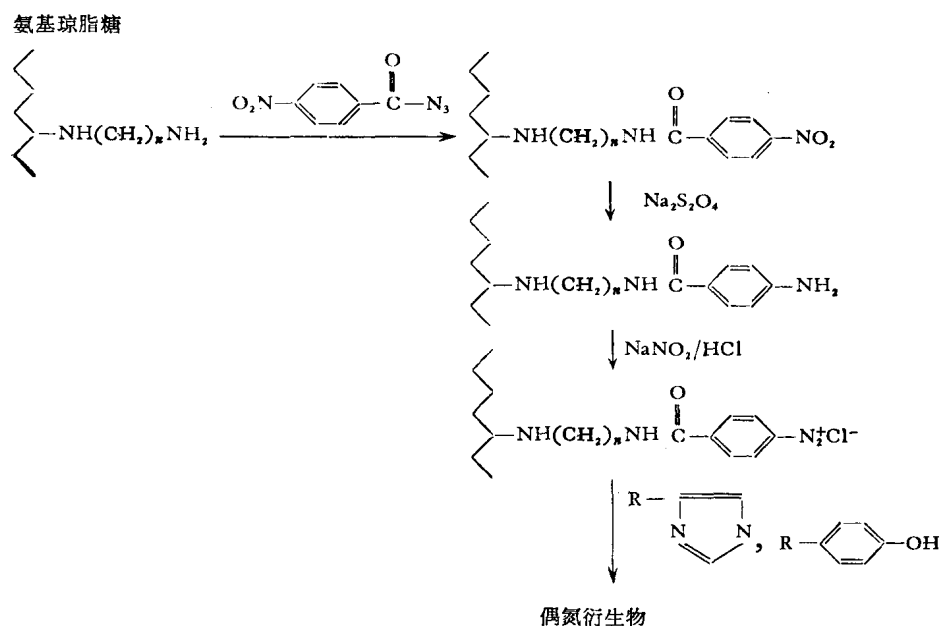


图 1-8 偶氮衍生物的制备

这个方法的缺点是步骤多, 操作繁琐, 它的优点是偶联反应迅速、完全, 偶联作用可在 pH 5—8 的温和条件下进行。偶氮衍生物在碱性条件下用连二亚硫酸钠处理, 可使偶氮键还原断裂而让配基完全释放出来, 这样可测定固相载体上配基的含量, 还可用作分离那些和配基结合得十分紧密的纯化对象。

具体操作是将氨基琼脂糖悬浮在二倍体积的硼酸钠-二甲基甲酰胺中 (以硼酸钠 0.2mol/L pH 9.3 与二甲基甲酰胺以 6 比 4 混和), 此混合物冷却到 0—5℃, 对位硝基苯甲酰叠氮溶解在二甲基甲酰胺中, 配成 0.1mol/L 的溶液, 在每毫升凝胶中加 80—100 微克分子的叠氮。反应混合物在 5℃ 搅拌 1 小时, 在室温继续反应 3—4 小时, 凝胶以 50% 二甲基甲酰胺洗涤, 再用水洗。然后悬浮在 0.2mol/L 的连二亚硫酸钠溶液中 (连二亚硫