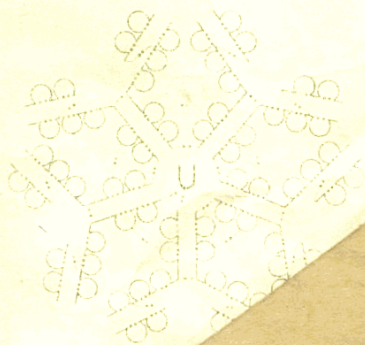


免疫化学技术

下

李成文



科学出版社

PDF

免疫化学技术

(下册)

目 录

一、各种凝胶纤维素的理化性质及使用参考资料	1
二、常用生化试剂的配制	17
三、抗血清制备免疫方案	26
四、免疫化学中常用标记曲线	38
五、缓冲液的配制(约有100种以上配方)	61
六、常用免疫化学器材性能及试剂的配制	118
七、人和动物血浆蛋白分子量及糖成分	138
八、人血浆蛋白的分子参数	141
九、蛋白质的最大紫外吸收峰及A 1% 1 cm吸收值	145
十、蛋白质的等电点和分子量	162

带•者为第二稿新增补内容

各种凝胶纤维素的理化性质及使用参考资料

(文献综述)

李 成 文

前 言

六十年代以来,由于各种凝胶分子筛、离子交换剂问世,促进了生物化学与免疫化学中的分离制备技术的迅速发展。先后出现了离子交换纤维素层析,凝胶过滤技术,聚丙烯酰胺凝胶电泳以及亲和层析等分离制备方法。

上述技术中所使用的介质与载体,种类较多,型号繁杂,欲要掌握这些技术和达到预期效果,必须对其基本性质和作用作进一步了解。目前这些虽然在国内生物学和医学研究中已广泛使用,但是,大部分依靠进口,国内又非常缺乏对这些介质与载体的详细介绍,有的根本没有资料。为了工作的需要,本文将有关这方面的资料归纳整理,以供工作中参考。

一、交联葡聚糖凝胶

“Sephadex”⁽¹⁾是由右旋葡萄糖苷为残基的多糖称葡聚糖(dex-

tran),分子间是 α -1,6糖苷键(约占95%),分枝为1,3糖苷键(约占5%),和甘油基以醚桥

($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{O}-$)形式相互交

联形成三维空间的网状结构,如图1。
通常所合成的“Sephadex”化学性质是十分稳定的。然而在酸性环境中,它的糖苷键易水

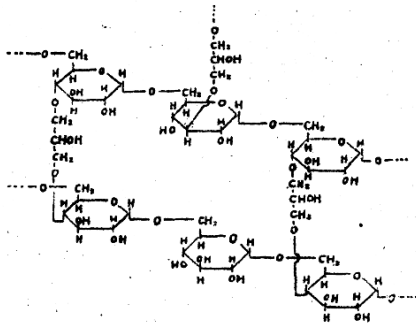


图1 交联葡聚糖的化学结构式

解。一般在 0.02N 盐酸中，低温中也只能保持 24 年。而在碱性条件下却十分稳定。Sephadex G-25，在 0.25N NaOH 中，60°C 经两个月仍不改变其层析性质。因而常常用碱来去除凝胶上的污染物。用 0.5N NaOH (内含 0.5N NaCl) 可有效地去除可能残留在凝胶上的变性蛋白和其它污染物。在氧化剂存在下易使羟基氧化成羧基而增加离子电荷，会影响其层析性质，必须避免。

“Sephadex”在湿态时，当加热到 110°C 时仍是稳定的，而在干态时可耐受 120°C 左右不会破坏。

不同型号的“Sephadex”用英文字母“G”表示，在“G”后面的阿拉伯数为凝胶的得水值再乘 10。其数字从小到大，表示凝胶交联度从大到小。而凝胶的孔径从小到大。如 G-10，交联度最大，孔径最小，而 G-200，则是交联度最

小，孔径最大。

各种物质在凝胶中的分配(扩散)系数“ K_d ”

$$K_d = \frac{V_0 - V_i}{V_i} \text{ 或 } V_i = V_0 + V_i K_d$$

V_0 : 洗脱体积

V_0 : 空体积(为常数)

V_i : 胶内体积(为常数)

一般物质在不同类型的 Sephadex 的分配系数 K_d ，大于零而小于 1，即 $0 < K_d < 1$ 。

Sephadex G10-50 的线性流速符合 Darcy's 的规律

$$\text{即, } U = K_d \frac{\Delta P}{L}$$

U: 流速, cm/小时或 ml/cm² · 小时

ΔP : 压差变化值

L: 柱高

K_d : 为当洗脱物的粘度是一个厘泊时的渗透系数

有关 Sephadex 的参考数据见表 1-5。

表 1 交联葡聚糖凝胶的类型和性质⁽¹⁾

Sephadex 类型	干颗粒直径 (μ)	分 级 范 围 (分子量)		得 水 值 ml/克·干胶	床 体 积 ml/克·干胶	流 速 最 少 时 间 (小时)	
		肽或球状蛋白质	溶液或线状分子			室 温	沸 水
G-10	40-120	< 700	< 700	1.0 ± 0.1	2-3	8	1
G-15	40-120	< 1500	< 1500	1.5 ± 0.2	2.5-3.5	9	1
G-25							
大颗粒	100-300						
中颗粒	50-150	1000-5000	100-5000	2.5 ± 0.2	4-6	6	2
细颗粒	20-80						
超细颗粒	10-40						
G-50	100-300 50-150 20-80 10-40	1500-30000	500-10000	5.0 ± 0.3	9-11	6	2
G-75	40-120 10-40	3000-70000	1000-50000	7.5 ± 0.5	12-15	24	3
G-100	40-120 10-40	4000-150000	1000-100000	10 ± 1.0	15-20	48	5
G-150	40-120 10-40	5000-400000	1000-150000	15 ± 1.5	20-30 18-22	72	5
G-200	10-120 10-40	5000-800000	1000-200000	20 ± 2.0	30-40 20-25	72	5

表2 Sephadex G-25 脱盐时不同粒度凝胶要求样品的粘度(厘泊, 20°C)⁽¹⁾

粒 度	相 对 样 品 粘 度 (20°C)
超 细	1—50
细	25—200
中 等	50—500
粗 粒	200—2000

表3 用 Sephadex 过滤中得到的普通物质的 Kd 值⁽²⁾

蛋 白 质 类 型	K _d				
	G-25	G-50	G-75	G-100	G-200
卵 白 蛋 白	0	0	0	0	0
γ-球蛋白(196)	0	0	0	0	0
γ-球蛋白(75)	0	0	0	0	0.2
转铁蛋白	0	0	0	0.1	0.3
血清白蛋白	0	0	0	0.2	0.4
血红蛋白	0	0	0.1	0.3	0.5
溶 菌 酶	0	0	0	0	0
糜 菌 素	0	0	0	0	0.2
胰 胃 液	0	0	0	0.2	—
凝 乳 酶	0	0	0.3	0.5	0.7
胃 酶	0	0	0.3	—	—
烟 酸 蛋 白	0	0	0.4	0.7	—
核 糖 体 酶	0	0	0.4	—	—
木 瓜 凝 乳 酶	0	0	0.3	0.5	0.7
凝 乳 酶	0	0	—	0.7	—

表4 葡聚糖(dextran)类型及性质⁽³⁾

类 型	平均分子量(MW)近似值	粘度系数1%/20°C近似值
T 10	1 万	0.1
T 20	2 万	0.16
T 40	4 万	0.19
T 70	7 万	0.26
T 110	11 万	0.32
T 150	15 万	0.35
T 250	50 万	0.42
T 500	2000 万	0.53
T 2000	2000 万	0.70

表5 Sephadex 的流速⁽¹⁴⁾

型	别	层析柱 1.5 × 100cm			2.5 × 100 cm		
		工作范	最大流	速	工作范	最大流	速
		cmH ₂ O	ml/cm ² ·h	ml/分	cmH ₂ O	ml/cm ² ·h	ml/分
G-75	细	50-200	25	0.75	40-100	23	1.0
	粗	50-200	6	0.18	10-100	5.5	0.45
G-100	细	25-100	10	0.47	24-80	15	1.2
	粗	25-100	1	0.12	21-66	37	6.3
G-150	细	10-40	7.4	0.22	8-30	7	0.57
	粗	10-40	1.3	0.05	8-31	1.7	0.14
G-200	细	5-20	4	0.12	4-16	3.6	0.3
	粗	5-20	1	0.03	4-16	0.9	0.07

另外, 1979年瑞典 Pharmacia Fine Chemicals 开始出售预先膨胀好的 Sephaeryl S-300, 排阻极限为球蛋白分子量 150 万, Sephaeryl S-200, 对球蛋白分子的排阻极限为 25 万。二者湿球直径为 40—150μm 的超细颗粒⁽⁹⁾。

交联葡聚糖凝胶 LH-20 的性质

Sephadex LH-20 是 Sephadex 中的羟基被羟丙酰基所取代, 可在各种有机溶剂中溶胀, 可用于分离脂类、固醇类, 保护多肽和脂溶性维生素等。

Sephadex LH-20 中的凝胶多用 G-25 或

表6 Sephadex LH-20在各種溶剂中的床体积⁽⁹⁾

溶 剂	得 经 剂 值 ml/克干胶	近 似 床 体 积 ml/克干胶
二甲苯甲酰胺	2.2	4.0-4.5
水	2.1	4.0-4.4
甲 醇	1.9	3.9-4.3
乙醇(含1%苯)	1.8	3.8-3.9
丙 酮		3.7-4.0
氯仿(含1%乙醇)	1.6	3.5-4.1
丁 醇		3.5-3.8
二氧杂环己烷	1.4	3.0-3.5
正丁醇	1.3	3.0-3.5
四氢呋喃	1.4	3.0-3.5
丙 酮	0.8	2.4-2.6
乙酸乙酯	0.4	1.8-1.8
甲 苯	0.2	1.5-1.6
二氧乙烷		3.8-4.1
异丁醇		3.6-3.9
甲 醚		3.6-3.9
苯		1.8-2.0

G-50, 其得水值约为 2ml/克干胶, 工作范围为 100—2000, 和 100—10000, 在各种溶剂中的性质如表 6 所示。

二、生物凝胶

生物凝胶——P(Bio-Gel P) 是聚丙烯酰胺凝胶 (polyacrylamide gel) 的商品名。它是一种人工合成的颗粒状的干粉凝胶。在溶剂中能自动溶胀成凝胶状。

Bio-Gel 是由丙烯酰胺单体和甲叉双丙烯酰胺 (N-N-methylene Bis-acrylamide) 等交联剂在一定条件下聚合而成。其结构式见图 2。

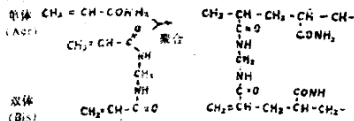
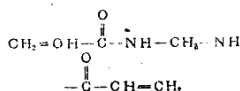


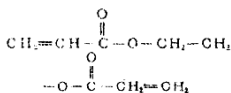
图2 聚丙烯酰胺凝胶的结构式

交联剂有以下几种:

甲叉双丙烯酰胺(简称 Bis), 分子式为:



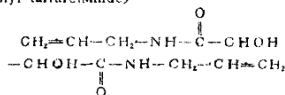
二丙烯酸乙酯(Ethylene Diacrylate, 缩写为 ED)



此交链剂可用来制备可溶性凝胶。

N,N'-二烯丙基酒石酸二酰胺 (N,N'-

diallyl tartardiamide)



有关生物凝胶的资料见表7和表8。

表7 Bio-Gel 制备物质的理化性质⁽¹³⁾

性 质	四 烯 胺 胺	甲 叉 双 丙 烯 脲 胺	四 甲 基 乙 二 胺
分子式	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$	$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$
分子量	71.08	154.16	116.20
状 态	白色结晶物	白色结晶物	淡青色油状
溶解性(含水量/100°C)	水、醇、丙酮、氯仿(9.4)	—	—
密 度	1.222(D ₄ ²⁰)	—	0.777(D ₄ ²⁰)
折射线(n _D ²⁰)	—	—	1.418±0.000
水中变化	缓慢自发聚合	缓慢自发聚合	变黄
沸 点	54.5±0.3	185 或多聚化	120-122°C

三、琼脂和琼脂糖凝胶

琼 脂

琼脂(Agar)是以各种红藻(red algae)提取的多糖的商品名。这类藻的细胞壁,经酸水解,过滤加工成条状或粉状。加热85°C开始熔化,32-39°C凝固成半透明具有弹性的胶状物。

琼脂主要是D-半乳糖和3,6-脱水-L-半乳糖,也含有少量的L-半乳糖和D-葡萄糖醛酸。含有Ca²⁺、Mg²⁺以及丙酮酸和硫酸盐等。

琼脂成分中含有两种多糖:琼脂糖乙酸盐和琼脂糖果胶乙酸盐。

典型琼脂是酸性的,每8-20个半乳糖单位中有一个硫酸盐基(硫酸根),这硫酸根与钙离子一起起到琼脂溶液的凝固作用。

目前市场上常见的琼脂商品有:

国产琼脂:海燕牌琼脂条(青岛产)和红旗牌琼脂条及琼脂粉(广州产)。

国外琼脂牌号: Agar Agar Powder (日本产,琼脂粉), Danagar(丹麦产), Davies Agar(英国产), Difco, Becto agar, Specified agar-Noble, Purified agar(美国⁽¹⁴⁾), Bio-Rad, DEAE-Bio-Gel(美国产), Behring Rein-Agar(德国产)。

琼脂糖凝胶

琼脂糖(agarose)是琼脂经净化去掉其中带电荷的琼脂胶(agaro-pectin)后的一种不带电荷、性质较稳定的多糖类凝胶。主要用于凝胶层析、免疫电泳、琼脂糖扩散的支持膜以及层析中的载体。琼脂糖的化学结构如图3。

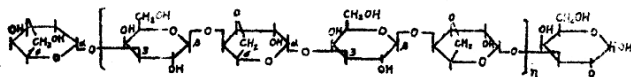


图3 琼脂糖结构示意图⁽¹⁵⁾

表 8 生物凝胶的类型及性质⁽⁵⁾

类 型	颗粒直径 (μ)	颗粒目数	工作范围 (M·W)	得 水 位 ml/克干胶	床 休 积 ml/克干胶	溶液平衡最少时间 (小时)		
						室温(20°C)	沸 水 浴	
Bio-Gel	P-2	150-300	50-100	200-2000	1.5	3.0	2-4	2
	"	75-150	100-200					
	"	40-75	200-400					
	"	<40	<400					
P-1	P-1	150-300	50-100	300-4000	2.4	4.8	2-4	2
	"	75-150	100-200					
	"	40-75	200-300					
	"	<40	<400					
P-6	P-6	150-300	50-100	1000-5000	3.7	7.4	2-4	2
	"	75-150	100-200					
	"	40-75	200-400					
	"	<40	<400					
P-10	P-10	150-300	50-100	1500-2万	4.6	9.0	2-4	2
	"	75-150	100-200					
	"	40-75	200-400					
	"	<40	<400					
P-30	P-30	150-300	50-100	3500-4万	5.7	11.4	10-12	3
	"	75-150	100-200					
	"	<40	<400					
	"	<40	<400					
P-60	P-60	150-300	50-100	3000-6万	7.2	14.4	10-12	3
	"	75-150	100-200					
	"	<40	<400					
	"	<40	<400					
P-100	P-100	150-300	50-100	5000-10万	7.5	15.0	24	5
	"	75-150	100-200					
	"	<40	<400					
	"	<40	<400					
P-150	P-150	160-300	50-100	15000-15万	9.2	18.4	24	5
	"	25-150	100-200					
	"	<40	<400					
	"	<40	<400					
P-200	P-200	150-300	50-100	30000-20万	14.7	29.4	48	5
	"	25-150	100-200					
	"	<40	<400					
	"	<40	<400					
P-300	P-300	150-300	50-100	60000-40万	18.0	36	48	5
	"	25-150	100-200					
	"	<40	<400					
	"	<40	<400					

注：匈牙利生产的生物凝胶珠的商品名字“Acrylex” P-300的孔径50-100 μ 或水压17-19克/克，床体体积38-42ml/干克，工作范围M=300000

琼脂糖凝胶的商品名，因各国生产厂不同而异。目前有 Sepharose(瑞典)、Bio-GelA(美国)、Sagavac(英国)、Gelarose(丹麦)，除了 Sagavac 外都已制成了珠状的凝胶颗粒。有关资料见表 9-11。

聚丙烯酰胺——琼脂糖凝胶珠^(9,10)

聚丙烯酰胺——琼脂糖凝胶珠，商品名为“Ultrigel”，主要用于凝胶过滤和免疫吸附剂的固相支持物。

“Ultrigel”有三种规格 AcA_{25} 、 AcA_{48} 和

表 9 琼脂糖凝胶的性质⁽⁵⁾

类 型	琼脂糖浓度%	颗粒直径(微米)	工作范围(分子量)
Sephacrose	6B*	6	40—210
	4B	4	40—190
	2B	2	60—250
Sagavac	2	2	1×10^4 — 2×10^5
	4	4	1×10^4 — 2×10^5
	6	6	2×10^4 — 10×10^5
	8	8	2×10^4 — 15×10^5
	10	10	5×10^4 — 2×10^6

F* 细粉末状, C* 颗粒状, 1979 年瑞典 Pharmacia Fine chemicals 生产 DEAE-Sephacrose 6B⁽¹⁴⁾表 10 琼脂糖凝胶(Bio-Gel A)的性质⁽⁵⁾

类 型*	琼脂糖含量 (%)	孔径(微米) (μ)	球蛋白的分级范围 (近似分子量)	应用范围 (分子量)
Bio-GelA 0.5M	10	50—100	< 1万—50万	> 10 ⁵
		100—200		
		200—400		
Bio-GelA 1.5M	8	50—100	< 1万—150万	> 10 ⁵
		100—200		
		200—400		
Bio-GelA 5M	6	50—100	1万—500万	> 10 ⁵
		100—200		
		200—400		
Bio-GelA 15M	4	50—100	4万—1500万	> 10 ⁵
		100—200		
		200—400		
Bio-GelA 50M	2	50—100	100万—5000万	> 10 ⁵
		100—200		
Bio-GelA 150M	1	50—100	100万—15000万	> 10 ⁵
		100—200		

* 最近有报告 DEAE-Bio-Gel, 交换剂, 美国

表 11 蛋白质偶联于琼脂糖珠上的百分率⁽⁵⁾

样 品	偶联前蛋白质含量(克/100ml)	偶联后蛋白质含量(克/100ml)	偶联百分率
豚鼠 HBAg 抗血清	总蛋白 4.85	总蛋白 2.54	
	白蛋白 2.832	1.701	60
	球蛋白 α. 0.902	0.596	66.6
	β. 0.529	0.2127	55.4
	γ. 0.587	0.0853	15.5

表 12 Ultragal 的型号和性质

型 号	成 分		珠 直 径 (μ)	换 液 比 (μl/10 ⁵)
	丙烯酰胺%	琼脂糖%		
AcA ₂₂	2	2	100—160	1.2×10^5
AcA ₂₀	3	2	100—180	6×10^5
AcA ₁₈	3	4	100—160	4×10^5

AcA₂，可用戊二醛或溴化氰活化，但偶合蛋白量不如琼脂糖大，每毫升凝胶仅能偶合 0.4—2mg 蛋白。用 pH 2.8 甘氨酸-HCl 缓冲液，可解离出 87—92% 的抗体蛋白。

四、聚丙烯酰胺^[11]

交联的聚丙烯酰胺(Bio-Beads Strygel)是一种用芳香碳氢化合物非水溶剂的层析凝胶

载体，用于分离脂类、多聚物、含巯基多肽中的保护肽等疏水胶体。商品名为“Strygel”和“Bio-Beads”等。

“Strygel”是一种大网孔型结构，工作范围比较广，分子量从 1600 到 40,000,000 左右，适用于有机多聚物分子量测定和脂溶性天然物质的分级，通常以非极性溶剂二甲基亚砜(dimethyl Sulfoxide)作洗脱剂较合适。

表 13 Strygel-Bio-Beads 的层析性质

型 号	粒 度 (千、目)	大约排阻极限 (分子量)	使用介质	水中溶质床 体积 ml/g	操 作 压 力
Bio-Bead					
S × 1	200—400	3500	非水溶剂	9.8	200—14000
S × 2	"	2700	"	6.2	100—2700
S × 3	"	2100	"	5.1	到 2000
S × 4	"	1700	"	4.2	到 1400
S × 8	"	1000	"	3.0	到 1000
SM*—1	25—50	200A*	水溶剂	3.1	600—14000
SM—2	"	80A*	"	2.9	"

* 为大孔 Strygel 凝胶

五、颗粒状多孔玻璃^[11]

颗粒状多孔玻璃，也是适于作层析的一种

载体，它有不同型号与不同颗粒的珠子，其层析性质如下。

表 14 Bio-Glass 的层析性质

型 号	粒 度 (目)	排阻分子最极限	分子量操作范围	平均孔径
Bio-Glass, 200	50—100 80—100 100—120 100—200 200—325 —825	3 万	3000—3 万	200A*
Bio-Glass, 300	50—100 80—100 100—120 100—200 200—325 —325	1 万	1 万—10 万	600A*
Bio-Glass, 1000	50—100 80—100 100—120 100—200 200—325	5 万	5 万—50 万	1000A*

型 号	粒 度 (μ)	排阻分子量极限	分子筛操作范围	应用范围
Bio-Glas, 1500	—325	20万	4万—200万	1500A
	50—100			
	80—100			
	100—120			
	100—200			
Bio-Glas, 2300	—325	60万	80万—900万	2500A
	50—100			
	80—100			
	100—120			
	100—200			
	200—325			
	—325			

六、离子交换葡聚糖凝胶^[12]

离子交换葡聚糖凝胶(Sephadex, A—C)是 Sephadex 被导入功能基团后的层析载体。即由

Sephadex G-25 或 G-50 的分子中被引入阳离子或阴离子集团, 本身既具有离子交换作用, 也具有 Sephadex 分子筛的作用。

表 15 Sephadex 离子交换剂的分类

类 别	基 团	化 学 基 团	性 质	粒 度 (μ)	应用范围
DEAE-Sephadex	A*—25	二乙胺乙基	弱碱性阳离子交换剂	10—120	Cl ⁻
	A-50	$-C_2H_5N^+(C_2H_5)_2H(Cl^-)$	强碱性阳离子交换剂		
QAE-Sephadex	A-25	二乙(二羟丙)氧乙基	强碱性阴离子交换剂	40—120	Cl ⁻
	A-50	$-C_2H_5N^+(C_2H_5)_2C_2H_4CH(OH)CH_2(Cl^-)$	强碱性阴离子交换剂		
CM-Sephadex	C*—25	羧甲基	弱酸性阴离子交换剂	40—120	Na ⁺
	C-50	$-CH_2COO^-(Na^+)$	强酸性阴离子交换剂		
SP-Sephadex	C-25	磺酸丙基	强酸性阳离子交换剂	40—120	Na ⁺
	C-50	$-C_2H_4SO_3^-(Na^+)$	强酸性阳离子交换剂		

DEAE: Diethylaminoethyl.

CM: Carboxymethyl.

A*: 阴离子

C*: 阳离子

同样 C-25, C-50, 分别为 Sephadex G-25 和 G-50 为载体。

QAE: Diethyl-(2-hydroxy-propyl) aminoethyl.

SP: Sulphopropyl.

A-25 的 25 是 Sephadex G-25 为载体,

A-50 的 50 是 Sephadex G-50 为载体,

七、离子交换纤维素

离子交换纤维素广泛地用于生物高分子的分离和纯化方面。它是在纤维素分子上结合上一定的离子基团而制成。改良型离子交换纤维素是利用微晶纤维素加以适当交连, 再结合上离子基团, 纤维短, 粒子细, 比重大, 能装成

紧密的柱, 分辨率高。最近瑞典有 DEAE-Sephacel 的球形离子交换纤维素新产品。

离子交换纤维素是具有离子基团和与其电性相反的平衡离子(相反离子)的一种不可溶性物质。如果纤维素带阳性离子基团而平衡离子就是阴性的, 它将与阴离子进行可逆地交换, 称为阴离子交换剂, 如 DEAE—纤维素是—

表 16 Sephadex 离子交换剂的性质

类 别	型 号	交换容量 (meq/g 干物质)	凝胶床交换容量 (meq/g 干物质)	平均孔径 (Å)	操作 pH 范围	缓冲液
DEAE-Sephadex	A-25		0.5	<3万	4-9	羧基乙酸等
	A-50	8.5 ± 0.5	5	3万-20万		
QAE-Sephadex	A-25		0.3	>20万	2-10	巴比妥, (低于 pH 7.5) tris...
	A-50	3.0 ± 0.4	3			
CM-Sephadex	C-25		0.4	<3万	6-10	乙酸钠比妥
	C-50	1.5 ± 0.5	0	3万-10万		柠檬酸
SP-Sephadex	C-25		0.2		2-10	同上
	C-50	0.3 ± 0.3	2	>10万		

注: 凝胶孔径与交换容量指一型离子交换剂 Sephadex 的平均凝胶孔径(凝胶孔径以分子量为 60000), 凝胶应用 DEAE-, QAE-Sephadex, 用 pH 8.0, 1=0.01, HCl-Tris 缓冲液, CM 和 Sp-Sephadex 用 1=0.01, pH 5.0, 的乙酸钠缓冲液测定。

种弱碱性的阴离子交换剂。同样纤维素带弱酸性离子基团而平衡离子就是阳性的, 它将阳离子进行可逆地交换, 称为阳离子交换剂。像 CM-纤维素是一种弱酸性阳离子交换剂。如图 4。

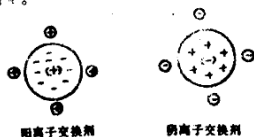


图 4 离子交换剂型

离子交换纤维素的处理

阴离子交换剂, 以 DEAE-纤维素为例。

(1) 0.5M HCl, 浸泡 30 分钟, 用蒸馏水冲至 pH 3-4。

(2) 0.5M NaOH, 浸泡 30 分钟, 用蒸馏水冲至 pH 7 左右, 困难时可加入 0.5M NaCl 过滤。

阳离子交换剂, 以 CM-纤维素为例。

(1) 0.5M NaOH 浸泡 30 分钟, 用蒸馏水冲至 pH 7 左右。

(2) 0.5M HCl 浸泡 30 分钟, 用蒸馏水冲至 pH 中性。

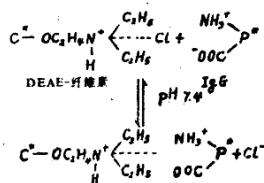
NaOH 及 HCl 都要用 C.P 或 A.R 纯化, 0.5M 的 HCl 与 0.5M NaOH 溶液的用量可取, 每克干纤维素粉 15ml 的 HCl 或 NaOH。

一般得到的新离子交换纤维素, 可以不用酸碱处理, 也可以用酸、碱液加以处理, 使其相对离子“Cl⁻”或“Na⁺”更充分些, 而使其所带有的“H⁺”与“OH⁻”中和去掉, 根据自己实验中实际应用情况, 离子交换剂使用的情况, 也可在处理一次后, 在总交换容量的前提下, 几次使用之后再处理。

DEAE-纤维素与蛋白质的交换原理与再生过程

1. 与蛋白质(以 IgG 为例)交换原理:

(1) 当 pH 值高于 IgG 的等电点时, IgG 成负电性, 相吸附时:

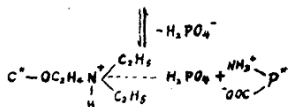


DEAE-纤维素·IgG 复合物

* C 表示纤维素链, P 表示 IgG, 蛋白质分子链。

IgG 分子中的羧基阴离子与交换剂的相对离子 Cl⁻ 交换后被吸附到纤维素功能基团上。

(2) 在一定条件下 IgG 分子的解离。如以磷酸盐缓冲液为洗脱液。



被置换下来的 IgG 随洗脱液流下或在溶液中(批次法)由于各种蛋白质的电负性大小不同,与离子交换纤维素结合能力亦异,故有些还须用洗脱能力(即负电荷更多的)1-2M NaCl 才能将其洗下。

2. 使用后 DEAE-纤维素的再生

使用后的 DEAE-纤维素带有洗脱液的阴离子,当用 HCl 中的“Cl⁻”将其置换后,DEAE-纤维素本身带有相对离子“Cl⁻”,再用 NaOH 中和过量的酸。再生条件同处理时 0.5N HCl

及 0.5 M NaOH 的要求。

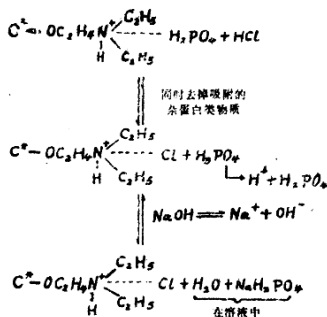



表 17 离子交换纤维素的种类及性质⁽¹⁾

名 称	功 能 基 团	交换容量 (毫克当量/克)	pK ^a	特 点
阴离子交换剂 DEAE-纤维素	Diethylaminoethyl 二乙氨基乙基 —O—(CH ₂) ₂ —N(C ₂ H ₅) ₂	0.1—1.1	9.1—9.6	在 pH 5.5 附近使用
AE-纤维素	Aminoethyl 氨基乙基 —O—(CH ₂) ₂ —NH ₂	0.3—1.0		
TEAE-纤维素	Triethylaminoethyl 三乙氨基乙基 —O—(CH ₂) ₂ —N(C ₂ H ₅) ₃	0.5—1.0	10	碱性最强
CE-纤维素	Carboxymethyl 羧甲基 —O—CH ₂ —COOH	0.2—5		
P-AB-纤维素	p-Aminobenzyl β-氨基苄基 —O—CH ₂ —  —NH ₂	0.2—5		碱性最强
TEA-纤维素	Triethanolamino 三乙醇胺 结构不固	0.1—0.5	7.4—7.6	弱碱性分离核酸
BD-纤维素	Benzoylated DEAE-Cellulose 苯甲酰化 DEAE-纤维素	0.8		适于分离核酸
BND-纤维素	Benzoylated-Naphthoylated DEAE-纤维素 苯甲酰-萘甲酰化 DEAE-纤维素	0.8		适于分离核酸
PEI-纤维素	Polyethyleneimine adsorbed to cellulose or weakly phosphorylated 聚乙烯亚胺吸附纤维素或弱磷酸化纤维素	0.1		适于分离核酸
阴离子交换剂 CM-纤维素	Carboxymethyl-羧甲基 —O—CH ₂ —COOH	0.5—1.0	3.0	在 pH 4.0 以下使用
P-纤维素	Phosphate-磷酸盐	0.7—7.4	PK1-2	酸性较强用于低 pH 值

名 称	结 构 式	交 换 当 量 (毫克当量/克)	PK*	特 点
SE-纤维素	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---O---P---OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ Sulfoethyl--- 硫酸基 $\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---S---O---O} \parallel \text{---OH}$	0.2-0.3	2.2	PK2.0-6.5 强酸性用于纸;H值

PK* 为在0.5-1.5M NaCl中离子位别数解离常数

表 18 商品离子交换纤维素的特性⁽¹¹⁻¹³⁾

名 称	功 能 基 团	型 号	容 量 (%)	交 换 当 量 (毫克当量/克)	PK*	蛋 白 成 份 吸 附 量 (mg/g) 血清白蛋白 (pH8.5) 牛血清白蛋白 (pH5.5)	体 积 (ml/g) pH 6.0 7.5	特 点
DEAE-纤维素	$\text{---O---(CH}_2\text{)}_2\text{---N}^+\text{(C}_2\text{H}_5\text{)}_2$ 二乙氨基乙							
DE-22	"	凝胶纤维素	12-400	1.0±0.1	9.1-9.5	500	150	7.7 7.7 以下 广泛使用
DE-23	"	网上(凝胶粒)	18-400	"	"	"	"	5.3 9.1
DE-32	"	凝胶粒(干粉)	24-63	"	"	450	900	6.0 5.3
DE-32	"	凝胶粒(湿粒)	24-63	"	"	"	"	6.9 6.3
CM-纤维素	$\text{---O---CH}_2\text{---COOH}^+$ 羧甲基					血清白 pH5, pH3.5	7s-γ球 蛋白	
CM-22	"	凝胶纤维素	12-100	6.6±0.08	3.6	500	150	7.7 7.7 pH4以上 广泛使用
CM-23	"	网上(凝胶粒)	18-400	"	"	"	"	9.1 9.1
CM-32	"	凝胶粒(干粉)	24-63	1.0±0.1	"	1250	400	6.8 6.7
CM-32	"	凝胶粒(湿粒)	24-63	"	"	"	"	6.3 6.7

* 血清白, DEAE-Sepharcl, 球形离子交换纤维素⁽¹²⁾

以上 DEAE-纤维素再生反应式, 是推测写出, 实际上反应可能要复杂得多。也可能处理后仍有未带有 C^{1-} 的交换剂, 另外由于纤维素是大分子物质, 可能由分子间的位阻效应使其再生不彻底。

同上道理进行处理与再生其它类型的离子交换纤维素, 阳离子交换纤维素的相对离子为 Na^{+} 。

另外, 英国 Whatman 厂生产的 DE-1 是长纤维, 长 1000 μ , DE-11, 纤维型, 长 50-

250 μ , 对牛血清白蛋白的吸附能力为每克干纤维粉吸附 130 毫克。目前已停止生产。

国产 DEAE-纤维素及 CM-纤维素, 总交换当量为 1.0±0.1, 其它指标不明。

表 19 DEAE-纤维素层析参考值⁽¹⁷⁾

层析柱直径	纤维素量 (克)	血清白蛋白	洗脱体积
1×25cm	2	1-2ml	100-150ml
2×12cm	5	5ml	200-300ml
2×20cm	10	10ml	300-400ml
2×37cm	20	20ml	400-800ml

表 20 批次法 DEAE-纤维素从兔血清分离 IgG 的需要量⁽¹⁾

每毫升血清 DEAE-纤维素量 (克)	IgG 吸收率 (%)	不纯物的 (%) (用高压电泳分析)
0.4 (干重) 1.2 (湿重)	75	28
0.8 "	75	12
0.8 "	73	6
1 "	70	2.4
1.2 "	68	1.7
1.5 "	60	1.3
1.8 "	62	<1

表 21 血清蛋白从 DEAE-纤维素柱上洗脱顺序⁽¹⁾

蛋白质	等电点 (PI)	电泳速度 × 10 ⁴ (厘米 ² /小时 ²)	DEAE-纤维素柱洗脱顺序*
γ 球蛋白	7.3	0.5—1.3	1
α ₂ 球蛋白	5.00	3.0—4.5	2
β 球蛋白	5.1	2.4—3.8	
α ₁ 球蛋白		4.7—5.5	3
清蛋白	4.9	5.7—6.4	4

* 在 0.005M, pH 8.0 Tris-盐酸缓冲液中将血清蛋白与交换吸附于 DEAE-纤维素上, 当用同一洗脱液洗脱, pH 由 8.0 下降至 1.5 时的洗脱顺序, pH 6.5 时 IgG 首先洗下

表 22 离子交换纤维素与洗脱剂⁽¹⁾

离子交换剂	洗 脱 剂			应 用
	缓冲液	pH	离子强度	
DEAE-纤维素	P.B.S Tris 液等	4.0—8.0	0.005—0.2	免疫球蛋白, 抗体, 酶, 激素, 病毒等
羧基-纤维素	P.B.S	7.0—8.0	0.001—0.01	
琥珀基-纤维素	己胺液	3.0—4.0	0.01—0.05	蛋白质, 酶, 激素等
	磷酸盐	3.0—4.0	0.01—0.05	
	柠檬酸盐	3.0—4.0	0.01—0.05	

表 23 离子交换纤维素改变洗脱剂原则⁽¹⁾

离子交换剂	pH 梯度变化	离子强度变化
强离子交换剂	高低或不变	增 加
弱离子交换剂	增 加	减 少

表 24 血清蛋白质分离洗脱的 P.B 离子强度和 pH 值变化⁽¹⁾

NaCl (M)	0.91 M.P.B (pH)	洗 脱 了 的 蛋 白 质
0.025	5.0	IgG
0.030	7.0	IgG
0.035	"	IgG 清蛋白, 纤维蛋白酶
0.040	"	"
0.045	"	α ₂ 球蛋白, β 球蛋白
0.050	"	"
0.060	5.5	IgA, α 球蛋白
0.070	"	"
0.080	"	α ₁ 球蛋白, β 球蛋白, 白蛋白
0.090	"	α ₂ 球蛋白, 免疫球蛋白, 清蛋白
0.10	"	α ₁ 球蛋白, 免疫球蛋白, 清蛋白
0.15	"	IgM, β 球蛋白,
0.20	"	α 球蛋白, 清蛋白

表 25 血清蛋白质从 DEAE-纤维素上洗脱法

P.B (M)	pH	洗 脱 的 蛋 白 质
0.01	7.5—8.0	IgG
0.055	7.0—8.0	IgA
0.04	5.0	α ₂ 球蛋白
0.1	5.0	β 球蛋白
0.4	7.0	α ₁ 球蛋白
0.4+2M NaCl	4.4	IgM

应用 DEAE-纤维素或 DEAE-Sephadex 时, 在 0.01 离子强度, pH 7.4 时 IgG 首先洗下, 逐步改变离子强度至 0.4M, pH 5.1—4.4 时 IgM 可洗下来。

八、纤维素碳蜡盐⁽¹⁾

纤维素碳酸盐 (Carbow Carbon) 是 Barker 等于 1971 年首先制备并用于免疫化学的载体, 可将蛋白原抗原化学或物理结合在碳酸盐上, 进行抗体或抗球蛋白的分离技术。

九、醋酸纤维素⁽¹⁾

醋酸纤维素系纤维素的醋酸酯, 是纤维素的羟基进行乙酰化而获得。醋酸含量 5%—10% 粘度为 500 厘泊左右, 水分低于 4%。

用于生化与免疫化学上的醋酸纤维素提

表 26 免疫球蛋白联到纤维素(C)或纤维素羧酸盐(C·C)的效果⁽²⁸⁾

免疫球蛋白	联 接 抗 原	联 接 抗 体		
		每100mg 的C或C·C 联接总蛋白mg.	联接抗原到C或C·C上的 %	蛋白抗原到C或C·C上的比率
兔IgG	G ₁ C	0.5	12.5	1:200
	G ₂ C	0.3	13.5	1:333
	G ₃ C	0.4	14.0	1:250
	G ₄ c.c	0.2	50.0	1:50
	G ₅ c.c	1.5	45.0	1:55
	G ₆ c.c	1.0	40.0	1:63
人IgM	M ₁ C	2.42	40.3	1:41
	M ₂ C	1.82	25.3	1:63
	M ₃ c.c	5.54	92.3	1:18
	M ₄ c.c	5.46	87.4	1:19

膜，是将醋酸纤维素粉溶于有机溶剂，如丙酮、氯仿、醋酸乙酯等，涂抹成均一薄膜。目前已广泛用作细菌滤膜，血清蛋白及同功酶的分离，免疫电泳和免疫扩散的支持物等。

醋酸纤维素滤膜有弹性并有较好的机械强度，最好在潮湿的条件下保存。

表 27 醋酸纤维素滤膜的平均孔径率⁽²⁹⁾

组别	10ml 蒸馏水在 0.5 大气压条件下通过所需时间(秒)	平均孔径率(微米)
1	416	0.17
2	376	0.19
3	366	0.23
4	556	0.12
5	436	0.14

平均孔径率小于 0.2 微米以下可用于作蛋白质浓缩用的超过滤膜。

十、离子交换树脂⁽²⁸⁾

离子交换树脂(ion-exchange resin)是由交联结构的交联分子骨架和能够解离的活性基团两个基本部分组成，形成不熔不溶的高分子电解质。它是能与液体中带有与活性基团同种电荷的离子进行可逆置换反应的物质。目前广泛用于工业上纯水制备及生化上氨基酸、核苷酸等物质的分离等。

树脂处理：

阳树脂：(1) 7% HCl(工业品，原 30% N=0.4, 7% 约 N=1.92) 浸泡 2—3 小时用水冲至 pH 3—4。

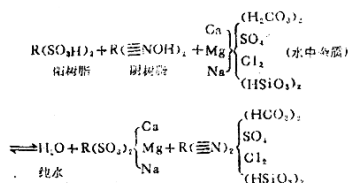
(2) 8% NaOH(工业品，8% 约 N=1.17) 浸泡 2—3 小时，用水冲至 pH 9—10。

(3) 7% HCl 浸泡 2—3 小时，用水冲至 pH 4 左右。

阴树脂：同上浸泡 2—3 小时，步骤为：

8% NaOH → 7% HCl → 8% NaOH，用水冲至 pH 9—10。

纯水制备原理：



树脂再生原理：

阳树脂再生：

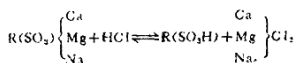


表 28 国产离子交换树脂的性质

型号名称	外观	交换容量 (毫克当量/克)	交换速度	粒径	硬度	机械强度 (%)	膨胀率 (%)	点比真 克/毫升	含水量 克/毫升	吸水 %	总交换容量 毫克当量	离子形式	用途	国际产品
732 苯乙烯磺 强酸(阴离子)	淡黄色颗粒 球状颗粒	>4.5	15分钟处理 水量 > 60万单位/克	16—50目 占85%以上				1.20—1.27	0.75—0.85	46—52	—SO ₃ ⁻	Na ⁺	水处理 高纯水制 备	Amberlite IR-120
724 丙烯酸甲 强酸(阴离子)	乳白色球 状颗粒	>9	15分钟处理 水量 > 60万单位/克	20—50目 占80%以上						≤85	—COO ⁻	Cl ⁻	水处理 ，拉西莱 投练	SKFB Amberlite IRC-50
711 苯乙烯磺 强酸(阴离子)	淡黄色金黄 球状颗粒	>4.5		16—50目 占90%以上							—N(CH ₃) ₂ ⁺	Cl ⁻	原燃料 心率的分 酒成提	K5 47Z Amberlite IRA-401
717 苯乙烯磺 强酸(阴离子)	淡黄色金黄 球状颗粒	>3		16—50目 占80%以上				1.00—1.11	0.45—0.75	49—50	—N(CH ₃) ₂ ⁺	Cl ⁻	水制备	Amberlite IRA-401
701 丙烯酸甲 弱酸(阴离子)	淡黄色玉珠 球状颗粒	>9	15分钟处理 水量 > 40%	16—50目 占80%以上				0.9—0.75	58—68	—NH ₂	OH ⁻	水处理 ，拉西莱 投练	SA19A Amberlite IRA-105	
704 苯乙烯磺 强酸(阴离子)	淡黄色球状 颗粒	>9		16—50目 占95%以上							—NH ₂ —N —N —N	Cl ⁻	水制备	Amberlite IRA-45