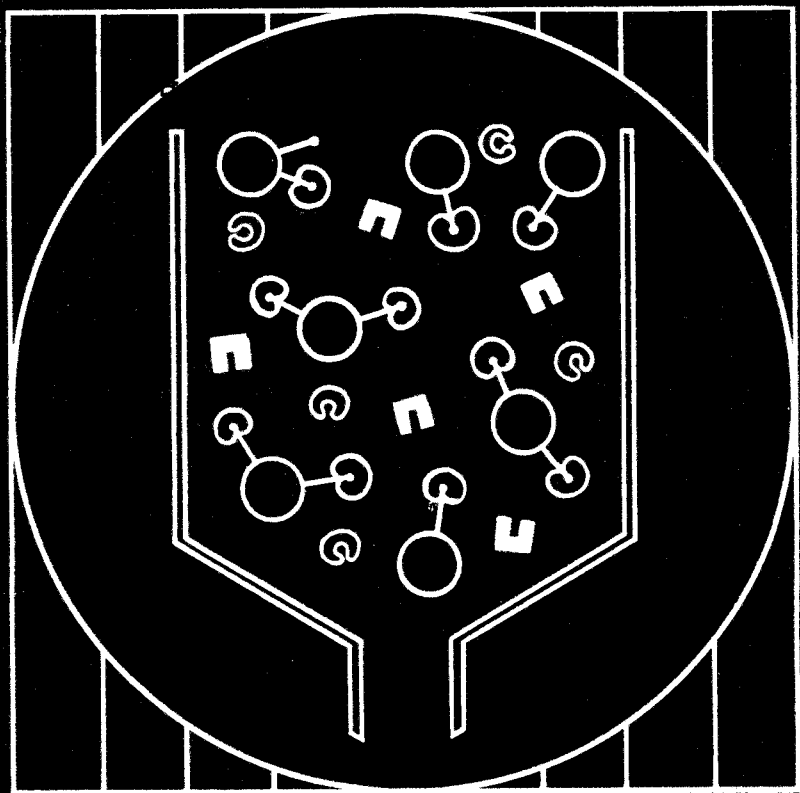




亲和色谱导论

内 容 简 介

本书综合亲和色谱法的最新进展,系统地介绍了这一方法有关的理论和实践。论述了分离、纯化生物大分子时正确选择基质、间隔臂和配位体的原则,比较了各种偶联方法和色谱技术,分析了影响色谱效果的诸因素,列举了它在生物大分子研究中的应用及由此而发展的各种技术。书中穿插有大量实例和图表,并介绍了一些常用的吸附剂、间隔臂衍生物的商品性能和重要参考文献,便于读者参阅。

本书可供生物化学、药理学、免疫学及细胞生物学的科研和教学人员及有关实验室和有关工厂技术人员参考。

C. R. Lowe

Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology

AN INTRODUCTION TO AFFINITY CHROMATOGRAPHY

Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1979

亲和色谱导论

C. R. 洛 著

刘毓秀 译

陈能乾 校

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

*

1983 年 5 月第 一 版 开本: 787×1092 1/32

1983 年 5 月第一次印刷 印张: 7 3/8

印数: 0001—5,000 字数: 165,000

统一书号: 13031·2241

本社书号: 3064·13—10

定价: 1.15 元

序 言

近年来,亲和色谱法已成为生物化学家最有效的分离手段之一。这一技术几乎已应用于生物化学的各个领域,并已迅速渗透于细胞生物学、免疫学、医学及工艺学之中。鉴于该技术的迅猛发展,本书无意于全面地叙述亲和色谱法在各方面的应用,仅对其现代的发展趋势作一扼要介绍。然而,尽管各种应用详细的方法学千变万化,但均以共同的原理为基础。本书的目的即在于叙述这些共同的原理,并指出在实践中如何应用这些原理。因此,在简要地介绍了色谱学中的术语之后,第2章论述了亲和吸附剂设计的基本概念,通过正确评价这些基本原理,将使读者有可能选择适合于他自己所研究的特殊系统的固定用配位体。第3章详述了大部分广泛应用的固定化技术,以及如何将预期的吸附剂从概念付诸实践。第4章则提出了吸附剂的检测及其在纯化应用过程中所涉及的色谱技术。这3章概括了亲和吸附剂的设计、构成及实际操作所必需的全部知识。本书的其余章节讨论了亲和色谱法在包括制备和分析工作中各种可能的应用,及许多应用亲和色谱原理但方式略有不同的有关技术。所选用的实例系用来说明亲和色谱分离中所涉及的某些参量,而不是对每一问题进行全面的评论,但为了对每一特殊领域有更完整的了解,书中给出了相应的参考文献。

C. R. 洛

目 录

序言.....	vi
第1章 色谱分类介绍.....	1
1.1. 色谱分析原理.....	1
1.2. 分配色谱.....	2
1.3. 凝胶过滤.....	3
1.4. 吸附色谱.....	7
1.4.1. 经典的吸附色谱	9
1.4.2. 离子交换色谱	9
1.4.3. 亲和色谱	11
1.5. 亲和色谱的命名.....	14
第2章 亲和色谱吸附剂设计中的基本概念.....	16
2.1. 基质.....	16
2.1.1. 理想基质的性质	16
2.1.2. 具有实际应用价值的基质的性质	19
2.1.2.1. 纤维素.....	19
2.1.2.2. 交联葡聚糖.....	20
2.1.2.3. 琼脂糖.....	21
2.1.2.4. 交联琼脂糖.....	24
2.1.2.5. 聚丙烯酰胺凝胶.....	27
2.1.2.6. 聚丙烯酰胺-琼脂糖凝胶	31
2.1.2.7. 多孔玻璃和陶瓷.....	32
2.1.2.8. 亲和色谱法中的其它惰性支持物.....	36
2.2. 与基质有关的问题.....	38
2.2.1. 基质的宏观环境或排阻效应	38
2.2.2. 微环境或空间效应	39

2.2.3. 间隔分子	39
2.2.3.1. 间隔臂的长度	40
2.2.3.2. 间隔臂的性质	42
2.3. 与间隔分子有关的问题	44
2.4. 配位体选择时应考虑的各种因素	45
2.4.1. 配位体-大分子相互作用的性质	46
2.4.2. 大分子与配位体的亲和力	47
2.4.3. 配位体和基质的连接方式	49
2.4.4. 配位体的浓度	54
2.5. 亲和吸附剂设计中的其它有关因素	57
2.6. 运用有关基本原理制备亲和吸附剂的实例	58
第3章 亲和色谱法的化学工艺	61
3.1. 基质的活化和功能化	62
3.1.1. 多糖基质	62
3.1.1.1. 卤化氰	63
3.1.1.2. 三嗪	73
3.1.1.3. 高碘酸盐的氧化作用	74
3.1.1.4. 环氧乙烷偶联	76
3.1.1.5. 其它双功能试剂	78
3.1.1.6. 其它方法	80
3.1.2. 聚丙烯酰胺	80
3.1.2.1. 聚丙烯酰胺的直接活化	81
3.1.2.2. 共聚技术	83
3.1.3. 多孔玻璃与陶瓷	84
3.1.4. 其它支持物	85
3.2. 间隔臂	85
3.2.1. 疏水间隔臂	86
3.2.2. 亲水间隔臂	89
3.2.3. 多价大分子的间隔分子	90
3.2.4. 无电荷的间隔分子	91

3.3. 高容量吸附剂的制备	92
3.4. 配位体与间隔臂的偶联反应	93
3.4.1. 含氨基配位体	93
3.4.1.1. 碳二亚胺的缩合作用	94
3.4.1.2. 肽键形成的其它方法	97
3.4.1.3. 酸酐反应	97
3.4.1.4. N-羟基琥珀酰亚胺反应	97
3.4.1.5. 酰基叠氮化法	100
3.4.1.6. 异硫氰酸酯的偶联作用	100
3.4.1.7. 双功能试剂	101
3.4.2. 含羧基的配位体	102
3.4.3. 含芳香族功能团的配位体	102
3.4.4. 含醛基或酮基的配位体	103
3.4.5. 含羟基的配位体	104
3.4.6. 含硫醇基的配位体	105
3.5. 可逆键连接的配位体	106
3.6. 固定配位体浓度的测定方法	107
3.6.1. 差数分析	107
3.6.2. 直接光谱法	107
3.6.3. 凝胶的溶解作用	107
3.6.4. 酸或酶的水解作用	108
3.6.5. 元素分析	109
3.6.6. 放射性分析法	109
3.6.7. 其它方法	109
3.7. 亲和吸附剂制备中的其它因素	111
第4章 亲和色谱的色谱技术	113
4.1. 影响互补蛋白质吸附的诸因素	113
4.1.1. 平衡缓冲液的选择	114
4.1.2. 样品体积、流速和平衡时间	114
4.1.3. 蛋白质浓度的影响	116

4.1.4. 温度效应	116
4.2. 亲和吸附剂的容量	118
4.3. 特异性吸附蛋白质的洗脱	119
4.3.1. 非特异性洗脱法	121
4.3.2. 特殊洗脱技术	124
4.3.3 特异性洗脱技术	125
4.4. 非特异性吸附	128
4.4.1. 离子效应	128
4.4.2. 离子配位体	131
4.4.3. 疏水效应	131
4.4.4. 疏水配位体	132
4.4 5. 复合亲和力 (Compound affinity)	132
4.5. 吸附剂的再生方法	133
4.6. 亲和色谱的标准	134
4.7. 大型制备性亲和色谱	136

第5章 亲和色谱法在蛋白质及其它大分子纯化分离中的应用

5.1. 纯化蛋白质的特异性固定吸附剂	137
5.2. 固定的通用配位体	139
5.2.1. 固定的腺嘌呤核苷酸辅酶	139
5.2.2. 其它固定核苷酸	150
5.2.3. 其它固定辅酶	152
5.2.4. 固定的核酸和多核苷酸	153
5.2.5. 固定的外源性凝集素	158
5 2.6. 固定的染料	162
5.2 7. 对硫醇特异的吸附剂——有机汞制剂	167
5.2.8. 固定的氨基酸	169
5.3. 从纯化的蛋白质制剂中除去微量污染物	171
5.4. 同工酶的分离	173

第 6 章 亲和色谱法在纯化调节大分子和复杂生物结构中的应用	176
6.1. 抗原和抗体.....	176
6.2. 结合和运载蛋白.....	180
6.3. 受体蛋白.....	182
6.4. 细胞的亲和色谱.....	185
6.5. 细胞生物学中的应用.....	188
6.6. 临床应用.....	189
第 7 章 亲和色谱法在分析中的应用	190
7.1. 化学修饰的蛋白质与天然蛋白质的分离.....	190
7.2. 亲和标记活性部位的肽的纯化.....	191
7.3. 合成的肽和蛋白质的纯化.....	193
7.4. 解离常数和平衡常数的测定.....	194
7.5. 酶作用机制的探讨.....	197
第 8 章 某些特殊的亲和色谱技术	199
8.1. 共价色谱.....	199
8.2. 疏水色谱.....	203
8.3. 电荷转移及金属螯合亲和色谱.....	208
8.4. 亲和密度干扰.....	209
8.5. 亲和电泳技术.....	209
8.6. 亲和分配.....	210
8.7. 亲和组织化学.....	212
附录	213
参考文献	220

第 1 章 色谱分类介绍

1.1. 色谱分析原理

生物化学的历史，在很大程度上与细胞来源物质的解析与分离方法的历史是相并行的。不论多么仔细地破碎细胞，其结果总是得到一种复杂的生物化学物质的混合物。大多数情况下，只有采用适当的分离方法，研究的结果才富有成效。因此，未来的研究工作能否取得成功，将取决于对极为敏感的生化物质进行分离的精巧技术。

分离复杂生化物质混合物最合适的方法，是将根据不同原理分离物质的各种技术结合起来，如电泳、等电点沉淀、离子交换色谱等技术是利用分子的总电荷；而另一些技术如制备性超速离心，则是根据分子的大小或扩散系数将分子分级分离。一个成功的纯化程序总是将这些技术加以组合，根据分子的不同要素，将复杂的混合物分级分离。几乎毫无例外的是，在制备性分离步骤中总是包含某种色谱技术。

色谱分析系利用一种称为流动相的液体流过介质——固定相，使混合物各组分发生不同程度的迁移，达到分离混合物的目的。实际上，分离过程是在色谱床或色谱柱中进行的。色谱床通常由填充在管内的小颗粒状色谱介质组成。在压力、重力或某些其它机械方法的作用下，液体流过色谱床并充满颗粒之间的空隙。流动相携带欲分离的物质流过色谱床；固定相则使物质通过色谱床的速度减慢，其阻滞程度因物质而异，因而物质在色谱柱上移动的速度各不相同。由于各组分

在固定相和液体流动相之间的分配不同，故色谱床可分离多组分的混合物；又由于这类分离作用是通过物质在固定于纤维素、Sephadex、琼脂糖或聚丙烯酰胺等固体上不流动的溶剂或液体，与固体颗粒周围流动的液体之间的分配来实现的，因此，这类色谱通常称为分配色谱。其分离作用取决于物质在固定相和流动相之间溶解度的差异，而色谱介质或溶剂中欲分离物质各组分间的特殊相互作用很小。相反，在吸附色谱中，所选择或设计的介质能与欲分离混合物部分或全部组分发生某种特殊作用。流动相的选择则是用来增加或减少这些特殊的作用。

原则上，分配色谱是以所涉及各组分具有理想热力学行为为基础，而吸附色谱则不同。实际上，大多数天然物质彼此间存在着某种程度的相互作用，所以很难将两种色谱区分开来。因此，不论选择哪种色谱技术，分配过程和吸附过程都能互相协同或干扰。可以认为，在完成一个具体的分离过程中，它们都是重要的。色谱法的这一特点表明色谱材料的选择对某一具体的分离极为重要。

1.2. 分配色谱

一个成功的分配色谱，其固定相应是惰性的，无吸附作用，并有合适的粒度以确保流速和分辨力之间达到良好的平衡。硅胶、氧化铝、纤维素粉或硅藻土常用作分离极性和非极性物质的色谱载体。例如，用疏水性液体如苯涂布载体，以亲水性溶剂如甲醇或甲酰胺为流动相的色谱床可用来分离非极性物质。相反，若用亲水性更强的溶剂如正丁醇涂布载体，以水为流动相；则这种色谱床可用来分离极性更强的物质。

液-液分配色谱的分离作用由物质在固定相和流动相之

间溶解度的差异决定。分配系数 K 是溶于两种彼此接触但互不混溶的溶剂中处于平衡时的物质的数量比。因此,假定理想物质 A 溶于两种理想的互不混溶的溶剂 1 和 2 中,则平衡时的分配系数 K 为常数:

$$K = \frac{(A)_1}{(A)_2} = \frac{(C_A)_1}{(C_A)_2}$$

不言而喻,若在一定浓度范围内,溶质的分配系数为常数,其吸附作用必然最小。若不存在吸附作用,且溶质在两相中的分布是理想的,则欲分离的物质将以对称的峰形从色谱床底部洗脱。由于两相间的平衡状态必须迅速达到,而平衡涉及溶质在液体中的扩散过程,所以,流动相流经色谱床的速度是重要的,它既必须相当慢,以便达到平衡;但又不可太慢,以免由于扩散作用而使物质的洗脱峰变宽。

分配色谱主要用于分离分子量小的物质。它在分离诸如蛋白质类易受破坏的物质的应用上,已为一些以溶解度之外的其它分子要素为基础更为优良的色谱技术代替。

1.3. 凝胶过滤

凝胶过滤 (Flodin, 1962) 是一种分配色谱技术,其分配作用是根据欲分离物质的分子大小,而不是根据它们的溶解度。方法中应用了一种流动的液相和一种固定相,此固定相由包含在不带电荷的凝胶网络中与流动相相同的液体构成。凝胶过滤中所用的色谱凝胶为对溶剂有高度亲和作用的大分子,它们通常具有以共价交联形成的三维不溶性网络。当溶剂渗过色谱床,则凝胶因吸入大量的液体而膨胀。

凝胶过滤系根据分子大小来分离物质:大分子首先从色谱床流出,然后是较小的分子。对于大多数实际应用而言,可

以认为洗脱体积完全由分子量决定。Flodin (1962) 提出了一个简单的凝胶过滤模型以说明这一观点。溶质在凝胶相和流动相之间的分配系数只受空间效应的控制。由于空间障碍的作用,大分子不能渗入凝胶网络交联的邻近部位,而小分子则能进入这些区域,因而有可能进入凝胶基质各链间的大部分空间。结果,小分子均匀地分布在为凝胶基质包含的游离溶剂中,而大分子在凝胶中却受到较大的限制。于是,改变了大分子的分配系数,使其更有利于分配在凝胶颗粒外部液体中,因而,大分子先于小分子从凝胶床中洗脱。图 1.1 阐明了凝胶过滤的原理。

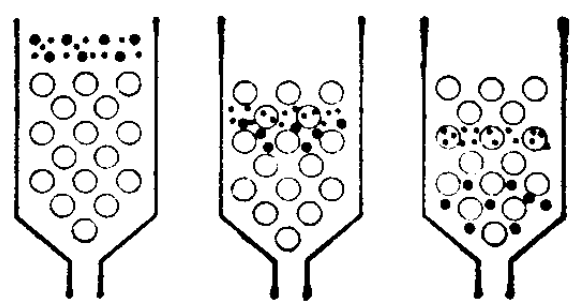


图 1.1 凝胶过滤原理。将分子大小不等的混合物加到凝胶柱的上部。大圆点代表大分子,小圆点代表小分子,空心点代表凝胶珠。洗脱时,渗入凝胶珠中的小分子将在绕过凝胶珠流出的大分子之后出现。引自 Pharmacia Fine Chemicals, «Sephadex-Gel Filtration in Theory and Practice»。

用膨胀过的凝胶珠填充的色谱床,其溶剂可看成为两相 (Flodin, 1961): 凝胶珠之间的溶剂体积为外体积 V_0 , 凝胶网络中包含的溶剂体积为内体积 V_i 。加入柱中的溶质在这两相溶剂中平衡, 尽管只有一部分内体积 (用分配系数 K 表示) 可为溶质利用。因此, 溶质可进入的凝胶网络总体积为 $K V_i$, 溶质将在洗脱体积 V_e 之后的流动相中流出。洗脱体积 V_e 可表示为:

$$V_e = V_0 + K V_i$$

在给定的凝胶和特定的操作条件下,对一定的溶质而言,其分

配系数 K 为:

$$K = \frac{V_e - V_0}{V_i}$$

K 是特定的, 与色谱床的几何形状无关。若溶质完全为内体积排阻, 其 $K = 0$, 因而 $V_e = V_0$, 即溶质在可能的最小体积中流出, 此体积与外体积相等。而对于不受阻碍地进入凝胶珠内体积的极小分子, 其 K 值接近于 1, V_e 接近于最大值, 与 $V_0 + V_i$ 相等。

实际上, 凝胶珠内所含溶剂的体积 (V_i) 很难准确计算。因此, 提出了另一种用有效分配系数 K_{av} 来表示溶质行为的方法。令凝胶总体积 ($V_i + V_g$) 代替内体积 V_i , 其中 V_g 为凝胶网络本身占有的体积。由于凝胶床的总填充体积 V_t 为:

$$V_t = V_0 + V_i + V_g$$

所以

$$K_{av} = \left(\frac{V_e - V_0}{V_i + V_g} \right) = \left(\frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \right)^*$$

因此, 从床参数 V_t 、 V_0 和溶质的洗脱体积 V_e 很容易计算出有效分配系数 K_{av} (Laurent 和 Killnader, 1964)。从床的直径和高度或直接用水标定可计算出总床积 V_t , 方法如下: 用水充满柱子, 然后将水逐渐从柱中放出, 称重。以水重对柱的水平面高度作图, 用内插法从图上求出任一床高的体积。色谱一种完全受凝胶珠排阻的物质, 并测定它的洗脱体积, 即可确定外体积 V_0 。实际上, 市面上购得的重均分子量为 2×10^6 的多糖——蓝葡聚糖 2000, 常用于这一测定。测定时最重要的变量是溶质的洗脱体积 V_e 。在一定范围内, V_e 与流过色谱床的流速无关。若像在理想色谱条件下一样, 洗脱峰呈对

* 译者注: 公式应为:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0 - V_g + V_g} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

称形,则洗脱体积 V_e 是从样品加于柱上开始,到洗脱物达最大浓度时为止,流过色谱柱的液体体积。

溶质在凝胶过滤中的色谱行为与其分子大小,或与分子大小密切有关的分子参数如分子量或斯托克半径 (Stoke radius) 有关。经验表明,以许多球形蛋白质的洗脱体积 V_e 或与 V_e 有关的函数如 K_{av} 对其分子量的对数作图,大致表现为线性函数关系(Ackers, 1964; Andrews, 1964)。图 1.2 描述了这种关系。在某一分子量以下,曲线几乎是水平的。在此区域内,所有溶质全部被洗脱。对一定几何形状的色谱床而言,此洗脱体积最大,数值约为外体积 V_0 和内体积 V_i 之和。曲线

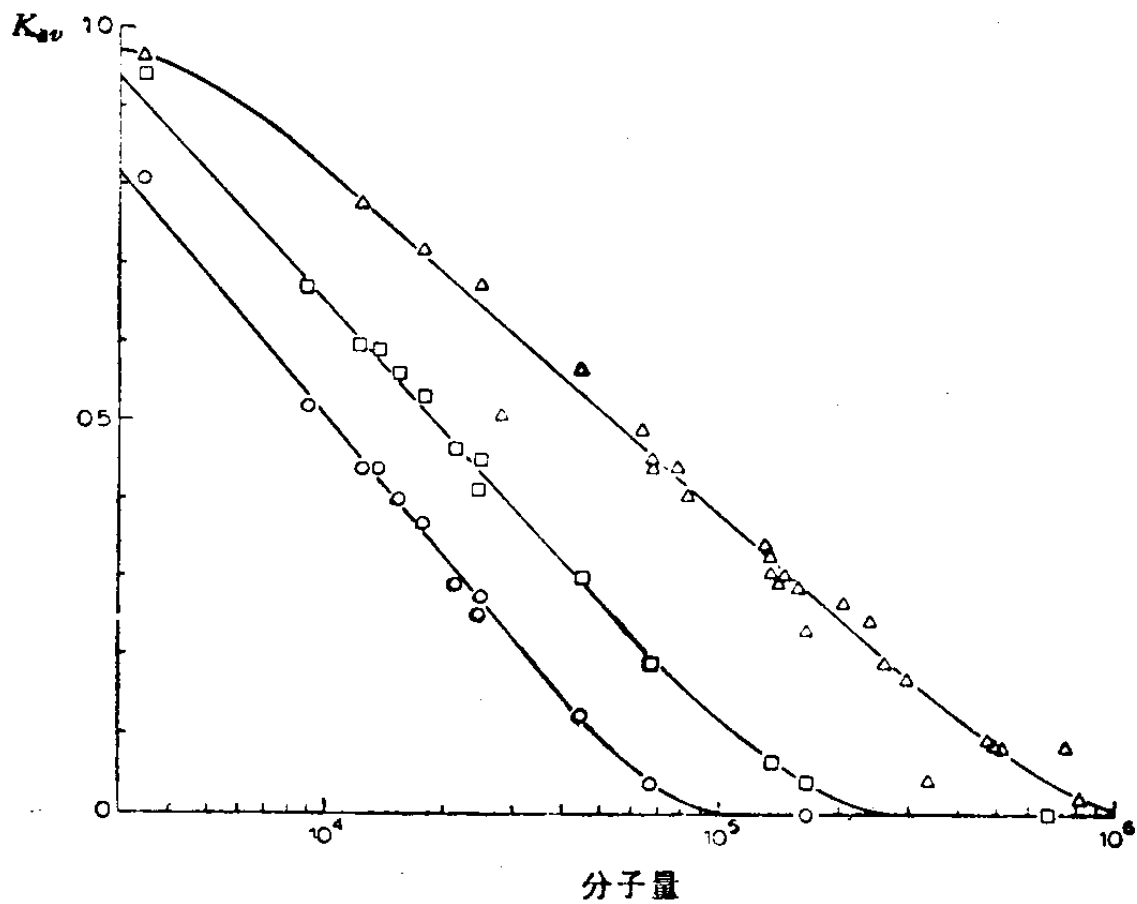


图 1.2 洗脱行为和分子性质之间的关系: 在不同类型的 Sephadex 上,各种球蛋白的 K_{av} 与其分子量的关系。 Δ Sephadex G-200, $\square$ Sephadex G-100, $\circ$ Sephadex G-75。引自 L. Fischer, «An Introduction to Gel Chromatography». North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1969。

的中间部分向下倾斜，表明分子量的变化与洗脱体积明显改变有关。这一区域是凝胶的工作区域或分级分离范围。显然，工作曲线斜率大的凝胶在这一区间能有效地分离各种分子。然而，在实际应用中，需要适当兼顾曲线的陡峭程度和分级分离的范围。当分子量超出此范围时，曲线又趋于水平，此区间内全部溶质均在与外体积相等的洗脱体积中洗脱。这类溶质的分子很大，其 $K_{av} = 0$ ， $V_e = V_0$ ，此点称为凝胶的排阻极限。

凝胶过滤法可用来测定球蛋白的分子量，即用各种已知分子量的标准球蛋白的 K_{av} 与分子量的对数作图，然后根据未知蛋白质的洗脱体积或 K_{av} ，用内推法从图中求出分子量。然而，Siegel 和 Monty (1966) 指出，蛋白质的洗脱体积与斯托克半径的关系比与分子量的关系更为密切。因此，方法中假定欲分析蛋白质的水合程度及不对称性大致和标准的标定蛋白质相同。对于大多数球蛋白，这一假定似乎是合适的；但含有大量糖或能与凝胶基质本身发生相互作用的蛋白质却不符合。某些葡聚糖酶 (Porath, 1968)、聚葡聚糖酶 (Pettersson, 1968) 和植物凝集素 (So 和 Goldstein, 1968) 能特异地、有时极强烈地与多糖骨架组成的凝胶相互作用。这些例子中有效分配系数 K_{av} 可大于 1，极端情况下，可为无限大。此时，色谱已不再是分配色谱而成为吸附色谱。有关凝胶过滤更为详细的理论和实验操作，L. Fischer 已在《凝胶色谱导论》(An introduction to gel chromatography) 一书的有关章节中作了介绍。

1.4. 吸 附 色 谱

吸附色谱是一种历史悠久、应用普遍而又了解得很少的

色谱技术。这种情况不仅由于吸附过程非常复杂，而且由于它有着令人惊异的多方面用途所致。

在吸附色谱中，吸附介质的选择或设计，是使其能与欲分离的混合物的一部分或全部组分发生某种特殊的相互作用。吸附作用只是固体表面的原子和外界物质分子之间作用力的一种表现。据认为与色谱吸附作用有关的分子间作用力主要包括：

- (a) 表面分子和被吸附分子间的范德瓦尔斯力。
- (b) 静电力。
- (c) 氢键。
- (d) 疏水力。

此外，色谱吸附剂具有许多能与各种物质相互作用的吸附部位。吸附部位的不均一性意味着液相中溶质浓度(c)每增加一个增量，其相应增加的吸附量(q)却逐渐减少(图1.3)。由于亲和力较大的结合中心往往首先被占满，因而额外增加的溶质结合不牢固，所以，若以溶质的吸附量(q)对浓度(c)作图，曲线将呈现向上凸起的形状。这种性质数学上可用朗缪尔等温线表示：

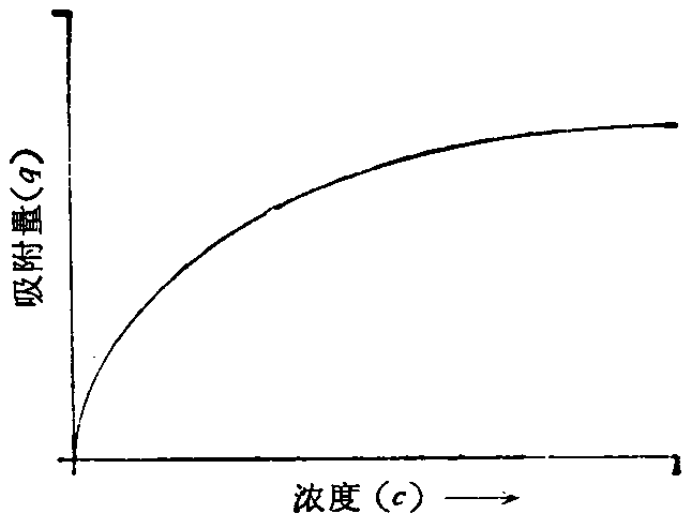


图1.3 朗缪尔吸附等温线

$$q = \frac{K_1 C}{1 + K_2 C}$$

式中, q 为单位质量吸附剂 (m) 吸附的溶质量 (x), C 为平衡时溶质的浓度, K_1 和 K_2 为常数。当溶质浓度足够低, 以致 $K_2 C \ll 1$ 时, 公式可简化为线性吸附等温线的形式:

$$q = K_1 C$$

即吸附量与溶质浓度成正比。若溶质浓度很高, 则 $K_2 C \gg 1$, 此时

$$q = \frac{K_1}{K_2}$$

即吸附量 q 的上限为 K_1/K_2 , 其意义为单位质量吸附剂吸附的最大溶质数量。这一参数一般认为是吸附剂的容量。

应当指出, 与强吸附作用比较, 弱吸附作用的等温线曲率较小。这是因为曲率是可供利用的空间与用于填充此空间分子浓度的比值的函数。吸附作用通常包含多种弱作用力, 它们极易发生可逆的反应, 因而是完成良好的色谱必不可少的。吸附色谱即以此为基础进行分类。

1.4.1. 经典的吸附色谱

经典的吸附色谱应用一流动的液相和一固定的固相, 如氧化铝、硅胶、活性炭和多种其它的无机材料。但是这一技术很少应用于蛋白质的纯化。

1.4.2. 离子交换色谱

离子交换色谱是一种吸附色谱。色谱介质和溶质之间的相互作用主要以离子电荷为基础。离子交换剂通常是半合成或全合成的树脂。这类合成树脂常以交联聚苯乙烯、纤维素或其它多糖为基础, 并能与水溶液交换离子。将树脂浸入水