凝胶层析法及其应用

袁静明 编著

科学出版社

凝胶层析法及其应用

袁静明 编著

科学出版社

1975

内 容 简 介

凝胶层析法又称分子筛过滤，它是60年代发展起来的一种快速、简便的生物化学分离分析方法，目前已被生物化学的各有关领域普遍采用。本书共分八章，对凝胶层析的理论、各种类型凝胶的制备及其性质、凝胶层析的设备、操作方法及其应用，以及有关凝胶的某些特殊技术等都作了比较详细的介绍。

本书可作为生物化学实验法中的一本参考书，可供生化、微生物、医药、食品、有机合成工业等方面有关研究单位、工厂及学校的工人、技术人员、教师和学生参考。

凝胶层析法及其应用

袁静明 编著

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

蓝田县印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1976年5月第一版 开本：787×1092 1/32

1975年5月第一次印刷 印张：4 1/4

印数：0001—7,420 字数：95,000

统一书号：13031·297

本社书号：464·13—10

定价：0.46元

编者的话

当前，“生物化学”这门学科，不但和生物学、医学有着十分密切的关系，而且与物理、化学以及有关工业部门也紧密地联系了起来。生物化学所以能取得如此迅速的发展，其重要的原因之一可归之于先进的分离分析方法，凝胶层析法就是其中的一种。由于此法简便易行，又有一定的独到之处，近年来不但已成为生物化学研究中常用的一种分离分析手段，而且已扩展到化学、医药、食品等各个领域，最近甚至在工业范围内亦已开始应用，因此，它是值得加以介绍和推广的一项技术。遵照伟大领袖毛主席关于“**我们必须打破常规，尽量采用先进技术，在一个不太长的历史时期内，把我国建设成为一个社会主义的现代化的强国**”的教导，本人根据在中国科学院生物化学研究所工作时的一点实践，并结合国内外有关资料，尝试编写了这本着重介绍方法学的“凝胶层析法及其应用”的小册子。

本书的编写尽可能以方法学为主，目的是通过参阅本书，使广大工农兵和科技人员能基本上了解和掌握这一技术，且借鉴有关内容能解决实际操作中所遇到的某些问题。全书共分八章，第一章至第三章叙述一般概念和理论；第四章至第六章着重方法和用途的介绍；第七章简要地描述了凝胶层析的一些其他技术；第八章介绍了层析法中常用的一些生物化学测定方法。由于编著者知识浅薄，实践不多，以及资料蒐集不全，因此难免有遗漏和错误之处，恳切希望同志们批评指正。

在本书的编写过程中，曾得到各级领导的支持和同志们的帮助。承蒙中国科学院生物化学研究所鲁子贤和林其谁两位同志对全文提出了宝贵意见；袁中一和马风竹两位同志提供有关资料；赵宗普同志帮助绘制和摄影插图。在此特向各位表示感谢。

袁静明

1974年2月

试读结束：需要全本请在线购买： www.ertongbook.com

54.6471
(2)

目　录

第一章　凝胶层析的概念……（1）
第一节　什么是凝胶层析……（1）
第二节　凝胶层析的特点……（2）
第三节　凝胶层析的应用范围和前景……（4）
第二章　凝胶层析的理论……（6）
第一节　凝胶层析的简单原理……（6）
第二节　在凝胶层析法中所使用的有关术语……（7）
第三节　凝胶层析的理论……（12）
第四节　溶质分子量和洗脱特征之间的
相互关系(图解法)……（16）
第三章　凝胶的类型及其性质……（20）
第一节　凝胶的定义……（20）
第二节　层析凝胶的主要性质……（21）
第三节　交联葡聚糖的制备及其性质……（23）
第四节　聚丙烯酰胺凝胶的合成及其性质……（28）
第五节　琼脂和琼脂糖凝胶的制备及其性质……（32）
第六节　在有机溶剂中使用的凝胶……（38）
第四章　凝胶柱层析的设备……（41）
第一节　层析柱……（41）
第二节　控制流速的设备……（44）
第三节　检出洗脱液的设备……（45）
第四节　其他设备……（47）
第五章　凝胶层析的实验技术……（50）
第一节　凝胶的选择……（50）
第二节　凝胶的颗粒度……（53）

1100847

第三节　实验凝胶的准备……（55）
第四节　防止微生物的污染……（56）
第五节　凝胶的再生和干燥……（59）
第六节　影响分离分辨力的主要因素……（61）
第七节　凝胶层析的操作步骤……（65）
第八节　其他层析方式……（77）
第六章　凝胶层析的应用……（80）
第一节　分析上的应用……（80）
第二节　制备上的应用……（92）
第七章　有关凝胶层析的其他技术……（102）
第一节　薄层凝胶层析……（102）
第二节　网篮式离心分离法……（112）
第三节　用凝胶浓缩高分子的蛋白质稀溶液……（114）
第八章　洗脱液中物质的鉴定……（115）
第一节　蛋白质的测定……（115）
第二节　核酸的测定……（119）
第三节　糖类的测定……（121）
第四节　氧化物的测定……（122）
参考文献……（123）

第一章 凝胶层析的概念

第一节 什么是凝胶层析

凝胶层析是60年代发展起来的一种简便有效的生物化学分离分析方法。

凝胶层析(gel chromatography)有许多同义词，在有关资料中已提及的有凝胶过滤(gel filtration)，分子筛过滤(molecular sieve filtration)，阻滞扩散层析(restricted diffusion chromatography)，排阻层析(exclusion chromatography)，凝胶渗透层析(gel permeation chromatography)等。按其分离原理，任一种说法都不十分确切，因此很难有一个统一的名词。到目前为止，在资料中仍然按不同工作者的习惯选定其中之一。在本书中均采用"凝胶层析"这个名词。

在生物化学和分子生物学的研究中，常常需要精细地从复杂的生物组织中分离纯化某种物质，并尽可能维持物质原来的性状，尤其是一些生物活性物质（如酶），还得考虑其失活的可能性。经典的分离方法显然不能适应这种特殊的需要。因此，生物化学工作者一直期待着更先进的分离分析方法。于是相继发展了离子交换层析（按物质的酸碱度、极性和分子大小的差异而加以分离）、电泳分离（根据物质颗带电荷在电场中移动性质的不同而得以分离）和制备超离心（按物质的扩散系数、质量和浮力因子(buoyancy factors)的不同而加以分离）等。它们在推动生物化学和分子生物学的

发展上都曾起了一定的作用。然而，这些方法或因设备昂贵、操作复杂，或因分离容量小，或因不够精确等限制，因而各法都有一定的缺陷。60年代初，瑞典科学家 Flodin 首先试制成交联葡聚糖(商品名为 Sephadex)，并用于生物化学研究中一些物质的分离，取得了甚为满意的结果[1]。这种分离方法主要根据溶质（被分离物质）分子量的不同，通过固定相（凝胶）具有分子筛的性质，采用一般柱层析方法就能使物质达到分离纯化的目的。它具有比制备超离心简便易行，而比透析法更正确可靠的特点。由于这种方法设备简单，操作方便，因此各国科学工作者普遍均采用了这一技术。在数年时间内就发展成为生物化学研究中一种惯用的分离分析方法。随着交联葡聚糖凝胶的使用，又相继发展了聚丙烯酰胺凝胶（商品名为Bio-Gel）和琼脂糖凝胶（商品名为Sepharose），同时还发展了凝胶的各种衍生物，如羧甲基-交联葡聚糖(C.M-Sephadex)，二乙基氨乙基-交联葡聚糖（DEAE-Sephadex）和羟丙酰基-交联葡聚糖（Sephadex-LH20）等。目前，凝胶层析这一技术不但广泛地应用于科学实验研究，而且已较大规模地用于工业生产[1—4]。

第二节 凝胶层析的特点

从 Flodin 发明凝胶层析以来，在数年时间内，凝胶层析所以能作为一种通用的分离方法广泛地应用于科学研究和生产部门，其主要原因是它不但具有一般柱层析法所具备的特点，而且还有其本身所固有的一些性质。总的说来，可简单概括为以下几点：

①凝胶层析法无需昂贵的仪器设备，技术操作简便易行。它的主要部件——层析柱，就是普通的玻璃管或有机玻璃管，至于其他所需设备，都是实验室常用的仪器，因而各实

验室都可以采用这种技术。其次，凝胶层析的操作条件比较温和、温度的适应范围广、溶质分子的温度系数小，只要有效地防止微生物的污染，就可连续地进行操作。另外，所使用的洗脱溶剂可以是水、醋酸、碳酸氢铵等，这些物质可借蒸发或冷冻干燥除去，因而所得样品不会残留盐分。最后，凝胶本身不带电，洗脱条件温和，溶质不会产生吸附或其他变化，即使是极不稳定的物质也极少有被破坏的可能。

②凝胶层析的工作范围比较广。交联葡聚糖凝胶（sephadex）可分离的分子量从数百到数十万，而琼脂糖凝胶（agarose）可分离分子量为数十万，甚至可达上亿，这对于生物体液物质的分离是极为合适的。它们的工作范围主要决定于凝胶三维空间网状结构的“网眼”大小，而“网眼”的大小可预在合成凝胶时调节大分子骨架与交联剂的配比而得到控制。商品凝胶的各种型号即代表“网眼”的不同大小，也就是被分离物质允许自由出入“网格”的分子量范围（见第三章）。因此，根据欲分离物质的分子量，就可选择适当型号的凝胶。

③凝胶是一种不带电荷的惰性载体，所以凝胶本身不与溶质发生相互作用，分离的效果好，重复性高。在生物化学研究中可作为一种标准化的分离分析方法。例如，用凝胶层析法测定各个蛋白质的分子量时，根据一系列已知分子量的纯蛋白质作为参照的标准物质进行层析分离所得到分子量和洗脱体积之间的一定关系（洗脱曲线），未知样品即可按参照洗脱曲线计算其分子量。

④凝胶层析每进行一次操作后，无需再生处理就可进行下一次的分离。在分离不纯物质时，层析床表面可能产生少量沉积物，则可小心地加以除去，必要时再添加少量新溶涨的凝胶，经适当平衡后就能使用。一般的层析床可反复使用数次

到数十次。如果注意防止微生物污染的话，同一个凝胶经适当保藏（干态或湿态）可用数年不会改变其层析特性。

凝胶层析有许多特点，特别经过人们的实践，更充分显示了它的优越性。但一切事物都是一分为二的，凝胶层析也存在一定的缺陷，诸如样品粘度有一定限制，对芳香族物质有一定的吸附作用，分离能力仅限于分子大小等等。

总之，近年来由于生化方法学的迅速发展，相继发展了许多分离分析方法[4，4a]，如离子交换、凝胶层析、亲和层析、凝胶电泳、电聚焦等，它们既各有千秋，又相辅相成。因此，在实际使用时必须根据具体情况作具体分析，因地制宜地灵活选取一种或几种方法，以便能够获得满意的结果。如蛋白质的脱盐，凝胶层析就有其独到之处，一步层析就可达到预期的目的；而在酶的分离提纯时，常常需要同时结合采用几种分离手段（盐析、凝胶层析、离子交换、结晶等），才能得到一个均一的酶制剂或结晶。

第三节　凝胶层析的应用范围和前景

目前，凝胶层析这一技术已不仅仅限于生物化学方面的应用，而几乎遍及生物学、化学、医学和轻工业等各个领域。仅就它的应用范围和受人们重视的程度，足以说明这一方法具有无限的生命力。凝胶层析法分离物质的基本原理是根据溶质分子量的不同。从这一原理出发，凝胶层析法最广泛的应用仍然是一些生物高分子物质（蛋白质、酶和核酸）的分离提纯[2，3，5，6]。随着低得水值凝胶类型的不断发展，多肽、氨基酸和糖类等低分子量物质的分离纯化亦同样被普遍的研究[7]。凝胶层析特别适合于仅仅需要几微升样品的超微量分析和微量放射性物质的分离。而规模较大的制备分离（如脱盐、浓缩、蛋白质脱糖、除热原等方面）也有了

试读结束：需要全本请在线购买：　www.ertongbook.com

较大的发展[8，9]。

曾作为凝胶层析的标准化方法——蛋白质的分子量测定，除了用于比较和鉴定蛋白质的纯度之外，还用于研究蛋白质或酶的解离和聚合过程以及亚基的测定。

凝胶的种类和型号已有很大发展，但随着应用范围的扩大，各种新型凝胶仍不断出现。聚丙烯酰胺-琼脂糖混合凝胶[10]更适合于较大分子量物质的分离。既有分子筛性质又有离子交换作用的凝胶QAE-交联葡聚糖有效地分离了核苷酸混合物[11]。适合于非水溶剂分离的凝胶类型同样在不断地增加。用特殊细长的层析床已能达到几个碳单位的分辨力[12]，甚至可分离仅仅只有一个甲基差异的菜油甾醇和谷甾醇的混合物[13]。随着分子生物学的发展，在人工合成蛋白质和人工合成核酸的研究中，常常用凝胶层析这一方法分离纯化侧链基团被保护的多肽和多核苷酸，因此相应发展和改进了一些非水溶剂中溶涨的凝胶。

随着凝胶层析技术的不断发展，凝胶本身的应用范围亦在不断地扩大。最近，利用生物高分子的生物学性质，发展了一种新的层析分离法——亲和层析，所用的不溶性载体以凝胶最为理想，尤以琼脂糖凝胶最佳[14]。

从目前凝胶层析的发展和对这一技术的要求来看，急待研究的仍然是方法学的问题，而不是它的理论。尤其在微量、超微量的分离分析和工业规模的大型生产这两个方面，技术上尚有不少问题有待研究解决。如对于软胶(高得水值)型的凝胶层析普遍遇到的困难是流速问题。当然，为了更好地发挥这一技术的特点，也不能忽视对凝胶层析基本理论的研究，例如凝胶结构和凝胶与溶质的相互作用机理等方面。总之，凝胶层析作为生物化学的一种分离方法，前途是广阔的，但需要我们大力加以研究和推广应用。

第二章 凝胶层析的理论

第一节 凝胶层析的簡单原理

凝胶层析法可以说是一种特殊的层析技术，其分离原理和一般离子交换柱层析不同。在讨论凝胶层析的理论之前，为了对这一技术有个基本概念，先叙述一下它的简单原理，至于有些专门术语将在第二节中加以讨论。

层析床在外观上为一支半透明的层析柱。当欲分离的物质通过层析床时，溶质之间在层析床中移动的速率因分子量的大小和在固定相上阻滞作用*（returdation）的差异而不同。分子量大的物质（阻滞作用小），沿凝胶颗粒间孔隙随溶剂流动，流程短，移动速度快，先流出层析床；而分子量小的物质（阻滞作用大），可渗入凝胶颗粒，流程长，移动速度慢，比分子量大的物质迟流出层析床。因此，从统计学观点看来，溶质通过层析床的速率与平均时间（溶质分子在凝胶颗粒间耗用的时间）成正比，而平均时间又决定于溶质在凝胶相和流动相的分配系数 K_d（partition coefficient），因而常常用 K_d 来衡量两个物质的分离分辨力。

简而言之，凝胶层析的基本原理就是按照溶质分子量的大小，分别先后流出层析床。物质的分离效果常用洗脱曲线来表示，所以分离特征直接和洗脱体积有关。一般说来，一

---

*所谓阻滞作用主要来自两个方面：其一，因溶质进入凝胶颗粒内而增加了它的“行程”；其二，因溶质在凝胶表面的吸附作用。此处主要指前者，但后者常难于和前者正确区分。

个物质的洗脱体积，不会超过总的“床体积”，但有少数物质由于阻滞作用比较大，有时洗脱体积会大于“床体积”。严格说来，这种现象是不符合上面所叙述的一般原理的，如有些芳香族物质、杂环类化合物、酚类物质等的洗脱体积常大于总的“床体积”，这种情况对于凝胶层析机理的解释会造成一些偏差，然而并不影响它的实际使用。凝胶层析的简单原理可用图 2－1 表示。

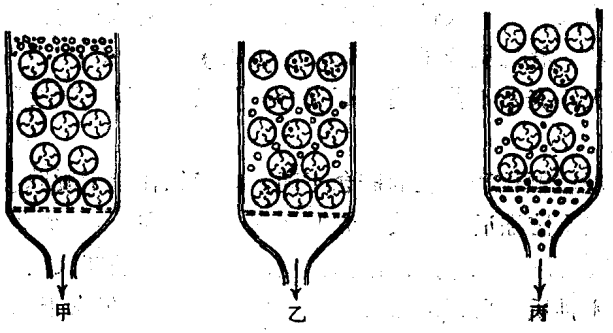

图2-1 凝胶层析的简单原理

甲：待分离的混合液上柱，于层析床表面（○代表大分子物质，·代表小分子物质，⊙代表凝胶）。

乙：当样品随溶剂沿层析床往下移动时，大分子物质因位阻效应，随溶剂流动，而小分子物质渗入凝胶颗粒内。

丙：大分子物质行程短，已流出层析床，小分子物质尚在行进中。

第二节　在凝胶层析法中所使用的有关术語

1.表示凝胶特征的术语

表示凝胶特征的最重要的性质当然是它的层析性质，一般用“工作范围”（fraction ranges）或“排阻限度”（exclu-

sion limit）来表示。所谓“排阻限度”即被分离混合物中凡分子量具有此“限度”以上的溶质不能渗入凝胶颗粒内部，直接随溶剂顺序而下，而分子量在此“限度”以内的溶质，可渗入凝胶颗粒内部，这样被分离的混合物就按分子量的大小，行程之长短，分别先后次序流出层析床。一般用分子量的范围表示“排阻限度”（如交联葡聚糖），有时也用分子的大小来表示(如琼脂糖凝胶)。由于分子构象与“排阻限度”有关，一般线性紊乱螺旋分子（如葡聚糖）的排阻限度比球状折叠螺旋分子（如球状蛋白质）低30—50%，因此用分子大小表示不甚精确，而用分子量表示“排阻限度”更为合适。

凝胶颗粒和凝胶的概念不同，前者往往指干凝胶，而后者指吸水溶涨后的凝胶。它们之间的差别在于一个得水值(w_r)。得水值不易正确测定，所以常常用溶涨度表明干凝胶的得水性质。所谓溶涨度亦称“床体积”，即每克干重凝胶颗粒，在水中充分溶涨后所具有的凝胶总体积。而得水值为一克干重凝胶颗粒充分溶涨时所需水的毫升数（不包括颗粒间隙的液体）。交联葡聚糖及聚丙烯酰胺凝胶的得水值和分部性质有着极为密切的关系。琼脂糖凝胶常用凝胶颗粒的重量百分数表示。在非水溶剂中层析时，所谓得水值可用类似的S_r表示（即所得溶剂的毫升数）。

2.有关“层析床”方面所使用的术语

“层析床”（chromatographic bed）为层析柱内溶涨的凝胶和凝胶颗粒间隙间液体体积之总和。在层析柱内的凝胶颗粒为“床物质”(bed material)。在讨论凝胶层析的理论时，一般把整个凝胶相作为固定相（stationary phase），而通过层析床的液体叫做流动相（mobile phase）或

洗脱剂（eluant）。被分离的物质称为样品（sample）或溶质（solutes）。

有关层析床的另外一些术语包括“床高”（bed height）或“床长”（bed length），即从底部支撑滤板到凝胶表层的距离，而“床直径”（bed diameter）就是层析柱的直径。这些术语很容易理解。总床体积（total bed volume）V_t，可以由圆柱形层析柱的体积计算（$V = \frac{1}{4}\pi D^2 h$）。在公式中体积与直径呈平方关系，所以必须准确地测量它的直径，否则误差太大。在正确计算中，往往分段测定层析柱的直径，以避免柱的不均一性。

外水体积（void volume）V_0，就是在层析床中溶涨凝胶颗粒孔隙间的液体所占的体积，常常用洗脱一个已知完全被排阻的物质的方法来测定V_0，此时其洗脱体积就等于V_0。有些高分子量的蛋白质可用来作为测定V_0的参照物。在实际工作中，经常用一个平均分子量为二百万的蓝葡聚糖2000（blue dextran 2000）作为测定V_0的参照物。在测定V_0时要注意层析柱底部滤板下可能存在的死空间（dead space）和层析柱与部分收集器接管之间的体积。根据经验值，一般均匀的硬凝胶（指交链度比较大的凝胶）V_0为V_t的35%。但由于凝胶有一定的弹性，同时颗粒度均匀也是相对的，以及装柱方式和操作压等因素，所以测得的V_0值往往小于理论值。

凝胶体积V_x即为总床体积与外水体积之差（$V_x = V_t - V_0$）。为便于理解，可用图2-2表示V_0，V_t和V_x之间的关系。

除了上述术语之外，还有内部体积（inner volume）V_i，即为凝胶体积与凝胶颗粒的体积之差，即$V_i = V_x - V_g$（V_g为凝胶的干体积），也可以用$V_i = m_g w_i$计算，但w_i不

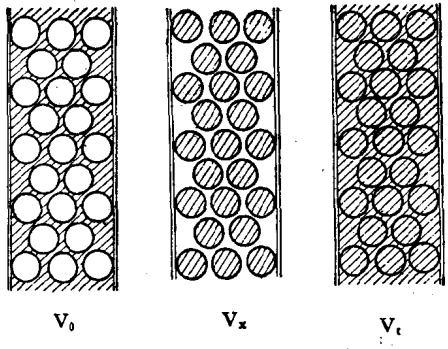

图2-2 V_0, V_x 和 V_t 之间的关系示意图

易正确测定。

3. 用于表明流速的术语

在进行柱层析时，液体流动的情况极为复杂，并不象自来水管中的水流那样简单，诸如凝胶的软硬度、洗脱时的压力等等，影响因素甚多。在实际应用中，流速往往用毫升/分钟或毫升/小时表示，如果在几个不同直径的层析柱上进行层析比较，则流速一般用单位横截面的流速表示，即为毫升/小时·厘米^2。

在层析时，控制流速是很重要的。为了维持恒定的流速，一般根据凝胶的特性，可用微量泵或借层析柱进出口的液体压力差来维持。不论哪一种情况，洗脱液流经层析床时都可能产生一个压力点，这个压力点称之谓操作压（operating pressure)。使用软凝胶（交链度小的凝胶）时，尤其要控制恒定的操作压才能维持一定的流速。

4. 用于表明溶质特征的术语

经凝胶层析后洗脱液中被分离物质的浓度直接与洗脱曲

试读结束：需要全本请在线购买： www.ertongbook.com