

层析技术及其应用

CENG XI JI SHU JI QI YING YONG CENG XI
JI SHU JI QI YING YONG

周本正 编著

Chromatography Technic

Chromatography Technic

Thin Layer chromatography

chromatography

Partition chromatography Absorption

Ion-exchange chromatography

Affinity chromatography



层析技术 及其应用

周本正 编著

江苏工业学院图书馆
藏书章

Chromatography Technic
Thin Layer chromatography
Partition chromatography
Absorption chromatography
Ion-exchange chromatography
Affinity chromatography

湖北科学技术出版社

鄂新登字03号

层析技术及其应用

周本正 编著

湖北科学技术出版社出版发行

中国科学院武汉分院科技印刷厂印刷

787×1092毫米 32开本 9.125印张 200千字

1992年9月第1版 1992年9月第1次印刷

ISBN7—5352—0844—4/Q·2

印数：1—1000 定价：7.00元

前 言

层析技术是一门古老的物质分离、滤过性技术。系采用滤砂、纤维等载体，多以滤纸或玻板等简单分配形式，其分离效果不甚理想。20世纪40年代至今，随着现代科学迅速发展，新的技术不断涌现，层析技术也随之进入生命科学新领域并成为生物各学科的一种常用技术。

现代层析技术有凝胶层析、纤维素层析、离子交换树脂层析、亲和层析、聚酰胺薄膜层析和高效薄层层析等。除以连续、梯度和阶段不同方式交替洗脱应用外，还出现多种选择性载体，以利被测物质的分离、纯化和需要。当今生物科学的奋进，技术手段的更新，层析技术已全面用于无机物、有机物，特别是生物和分子生物的分 离、提纯、鉴定和检测，甚至在制备上已成为一项不可缺少的实用性技术。

本书根据作者长期实践并结合国内外有关资料，同时考虑到技术上的实用性和科学性，为方便读者，拟用程序方式，分原理、设备、试剂、操作和注意事项等，突出方法学和技术应用。本书可供生物学、分子生物学、医学生物学、畜牧兽医学、植保学、水产学、遗传化学、免疫化学、临床化学、制药制剂学、微生物病毒学以及卫生化学中的食品、环境、生态、职业病、传染病、流行病等诸多方面的参考应用与研究。

本书在撰写中，得到中国预防医学科学院李玉瑞研究员

的关心和指导，并承湖北省医学科学院魏玉梅、李林富、陈国英、袁方玉和湖北医学院病毒研究所严银飏等同志，用于部分实验验证。还得到“科学出版社”武汉办事处吴锦文、牛海卫编辑的审校与修订，在此一并致谢。

由于应用技术飞速发展，收集整理疏漏难免，敬请批评指正。

作 者

1992年4月1日

目 录

一、层析技术简介	(1)
二、层析技术分类	(4)
1. 两相物质在层析全过程中所处的生物物理状态	(4)
2. 层析表现形式	(4)
3. 层析载体内容	(5)
4. 技术形式及理化性质	(5)
三、层析技术应用	(10)
(一) 凝胶层析技术	(10)
1. 免疫球蛋白 G (IgG) 的纯化与制备	(15)
2. 肌红蛋白的纯化与制备	(19)
3. 酶标记体 (IgG) 的纯化与制备	(22)
戊二醛标记二步法与检测	(23)
过碘酸氧化法与检测	(26)
4. IgM 类 MoAb 的纯化与制备	(28)
Sephadex 凝胶层析技术	(28)
Sephrose 凝胶层析技术	(30)
5. 蓖麻毒蛋白-A 链的纯化与制备	(32)
6. 细胞色素-C 的纯化与制备	(34)
7. 胰岛素的纯化与制备	(36)
8. 分泌型 IgA 的分离与制备	(37)
9. 核酸 (RNA) 的纯化	(39)
10. 胶体金标记单克隆抗体的纯化	(40)

11. 蛋白质分子量测定	(43)
(二) 离子交换树脂层析技术	(46)
1. 硫胺素 (维生素B ₁) 的提取	(48)
2. 核黄素的分离与提取	(51)
3. 碱性氨基酸的分离	(53)
4. 核苷酸的分离	(55)
5. 单核苷酸的分离	(57)
6. 肽的制备性分离	(61)
7. 食物中胡萝卜素的分离与测定	(65)
8. 胆红素的分离与测定	(69)
(三) 离子交换纤维素层析技术	(73)
1. 蛇毒磷酸酯酶-A ₂ 的纯化	(79)
2. 碱性磷酸酯酶的纯化	(83)
3. 钩体属特异抗原的纯化	(88)
4. 鸡卵类粘蛋白的纯化	(91)
5. 免疫球蛋白 M-Fc (IgM-Fc) 重链的纯化	(94)
6. 补体 C ₃ 抗血清的纯化	(97)
7. 血红蛋白肽链的纯化	(102)
8. 干扰素的纯化	(105)
(四) 离子交换-交联葡聚糖层析技术	(108)
1. 输卵管 AKP 的纯化	(110)
2. 乙型肝炎 "e" 抗体的纯化	(113)
3. 羧肽酶-Y 的纯化	(116)
4. 鸽血清、组织 AKP 的纯化	(120)
5. IgG 链、片段的纯化	(121)
6. IgE 的分离与纯化	(123)
(五) 亲和层析技术	(125)
1. 胰蛋白酶的分离与纯化	(126)
2. 蛇毒磷酸酯酶-A ₂ 的分离与纯化	(131)

3. 葡萄球菌蛋白-A 分离与纯化	(134)
4. 人与哺乳动物的 IgG 亚类的分离与纯化	(138)
5. 抗 IgG 抗体的分离与纯化	(141)
6. 旋毛虫幼虫 α -杆细胞颗粒可溶性组份进一步分离与 纯化	(144)
(六) 纸层析技术	(148)
1. 氨基酸的层析与检测	(156)
2. His 的层析与检测	(159)
3. Arg 的层析与检测	(160)
4. Pro 与 hydroxy-Pro 的层析与检测	(160)
5. Trp 的层析与检测	(161)
6. Tyr 的层析与检测	(162)
7. Gly 的层析与检测	(162)
8. Val、Gly、Leu 共存时的层析与检测	(162)
9. 微量蛋白质、肽或氨基酸的层析与检测	(163)
10. 多种金属离子的层析与检测	(164)
11. Cu_2SO_4 、 CuCl_2 和 CuNO_3 的层析与检测	(165)
12. Mg^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 的层析与检测	(166)
13. 糖类的层析与检测	(166)
14. 糖果色素的层析与检测	(168)
(七) 薄层层析技术	(170)
1. 菌体细胞壁含糖物质的分离分析	(171)
2. 混合性糖的分离与检测	(175)
3. 食用色素的分离与检测	(180)
4. 食物中黄曲霉毒素 B_1 的分离与检测	(184)
5. 3·4-苯并芘的分离与检测	(187)
6. 亚硝胺类化合物的分离与检测	(189)
7. 生物碱的分离与检测	(192)
8. 雷公藤碱的分离与检测	(193)

9. 苦楝素的分离与检测	(194)
10. 矿物油的分离与检测	(195)
11. 有机磷农药的分离与检测	(195)
12. 有机氯农药的分离与检测	(199)
13. 核苷酸的分离与分析	(203)
14. 细胞膜磷脂的分离与分析	(205)
15. 寡核苷酸的同系层析与分离	(210)
(八) 聚酰胺薄膜层析技术	(215)
1. 丹磺酰氯-氨基酸层析与鉴定	(217)
2. DNS-氨基酸膜板层析与鉴定	(221)
3. 蛋白质 N-末端层析与鉴定	(224)
4. DNP-氨基酸层析与鉴定	(228)
5. 肽链顺序层析与鉴定	(232)
附录	(238)
1. 装填 Sephadex、Bio 及 Sepharose column, 流速 受到影响的原因及处理办法	(238)
2. 影响分辨率的因素及解决办法	(239)
3. 国内外各种层析载体、商品种类、物理特性、吸附 剂及显色反应	(240)
4. 各种氨基酸中、英文缩写及理化性质	(265)
5. 常用冷却剂和干燥剂	(268)
主要参考文献	(270)

一、层析技术简介

层析技术（亦称色谱技术或色分离……等）是一项多种选择性载体，又有多种表现形式，且具备有不同物理化学分离分析及制备性技术。早在本世纪初，俄国植物化学家茨维斯，首先应用简便层析，分离出植物叶子中的色素获得成功，其方法是将植物树叶子中存在的色素，经石油醚提取、浓缩，注入已填充菊根粉或碳酸钙的玻璃柱中，继续用石油醚淋洗，植物叶中的各种色素移动速率各不相同，随冲洗溶剂逐层分开，形成一层层色带。这种连续洗脱色带称之为色谱或色层。这种分离技术就叫做层析。随后被广泛用于无色物质的分离与层析。

本世纪30年代，Adam 和 Holmes，首次用酚醛缩合反应，人工合成有机离子交换功能团的树脂，并由 Samuelson 应用于化学上的多种物质分离。实际上早在 100 多年前，这种离子交换形式就被两位英国学者（Thompson 和 Way）已确定。他们较系统地研究了土壤和其他硅酸盐，在各种电介质作用下，发生的离子交换过程。尽管酚醛离子交换剂，在性能上尚存缺陷，但为后来人获得性质优良的离子交换剂开辟了新途径。40年代，Consden 和 Mantin 选用滤纸进行层析，既简单、方便、适用性又强，从而一度替代了柱层析，确立了一种纸上离析与检定被测物的纸上层析技术。50年代初，Mantin 继续深入研究，和 Jamas 将固相物质或液体物质，

转变成气胶状态下进行检测，便发明了气相层析。随后 Sober 和 Peterson，将离子交换基结合到纤维素上，制成多种离子交换纤维素，并成功地用于各种蛋白质、离子多糖、寡核苷酸的分离、纯化，使生物大分子得以顺利分级分离。科学技术飞跃前进的60年代，特别是生命科学各相应学科的相互协作与渗透，使得生物技术得以迅速、全面发展与推广。进入50年代末期，瑞典科学家 Porath 与 Flodin 协作，潜心研究，将葡聚糖水解成一种交联葡聚糖凝胶，商品性质称为 Sephadex，并广泛应用于蛋白质的研究与分析。其中凝胶基本骨架结构（网络）作用在20年代末，就由 Mcbain 提出，并由 Synge 和 Tiselius 在电泳技术上予以证实。凝胶具有特殊的分子筛效应。它的三维网状结构的建立，极大地加强了生物高分子物质（蛋白质、酶与核酸）的研究，分离、纯化工作。随着低得水质凝胶类型的出现，多肽、氨基酸和糖类等低分子物质的分离纯化，亦同样得到普遍研究与应用。与此同时，较大规模的制备分离，如，脱盐、浓缩、蛋白质脱糖、除热原质和清除杂质等，也有较大发展。现在，该技术已作为测定蛋白质分子量的标准化方法予以采用。除此，还用于鉴定蛋白质纯度、比较，以及蛋白质深入研究、酶的解离和聚合过程，亚基测定等。由于凝胶种类和型号有很大发展，各种新型凝胶仍在不断出现，凝胶层析技术不仅仅只限于生物化学方面的应用，它几乎遍及生物学、化学、医学、畜牧兽医学、免疫化学、卫生化学中的食品、生态和轻工业等各个领域。随着离子交换树脂技术的完善，离子交换纤维素与 Sephadex 合成协同应用，薄层层析、聚酰胺薄膜层析，高效液相层析以及亲和层析等新技术相继产生，已成为近代生物学、生物化学、分子生物学中重要工具与检测手

段，是物质分离、分析、纯化、提取与鉴定的一门综合性技术。

层析技术与待分离混合物中各组分的理化性质（分子自然形状、大小、获电状态、溶解度与选择性吸附剂或载体物的吸附能力，分配系数、酸碱环境（pH）、温度、极性以及分子的亲和能力等）有着直接关系。除此，任何层析技术，均具有两相条件（即流动相和固定相），造成流动相对固定相作单向相对运动。这种流动相推动样品中各组分通过固定相向前迁移，其运动速率与两相物质和被分离物质状态有关。由于被分离物各组分中的理化性质不同，对不同的两组或两组以上组分，具有不同的作用力，通过吸附-解吸，或离子交换、分子筛效应、静电引力，免疫特异性吸附等，造成各组间生物分子分离、迁移距离不等，最终达到被测物的分离、纯化的目的。这一技术的应用，不但能分离有机化合物，还能分离无机物，更主要的是适合于分离分析生物高分子物质，其分离范围广，适用性强。化学性稳定、灵敏度高，既可纯化又可制备，条件简便，倍受广大科学工作者的欢迎。

二、层析技术分类

层析技术发展较快、种类繁多、分类形式各异，大体有如下几种：

1. 两相物质在层析全过程中所处的生物物理状态

(1) 气相层析，气体流动相，固体或液体作固定相。表现的是气-固和气-液气相层析技术。

(2) 液相层析，液体作流动相，固体或液体作固定相。表现的是液-固和液-液液相层析技术。上述中两法属大型仪器并有专著介绍，故未收集在册。

2. 层析表现形式

(1) 玻板形式：厚玻板层析、硅胶薄层层析、氧化铝薄层层析、聚酰胺薄层板层析、葡聚糖薄层板层析、纤维素薄层板层析等。

(2) 纸形式：纸纤维素合成层析滤纸。定性与半定量层析，选用 Schleicher-Schüll-2043b, Whatman-1 号纸，指纹图谱用 Whatman-3mm 纸，肽的微量制备则用 Whatman-3

号滤纸。

(3)柱形式: Sephadex-Gel柱层析, 亲和层析, 离子交换树脂层析, 离子交换纤维素层析, 离子交换纤维素-交联葡聚糖凝胶层析, Al_2O_3 柱层析等。

(4)薄膜形式: 聚酰胺薄膜层析、聚酰胺薄板层析。

(5)仪器形式: 气相色谱、高压液相色谱(自动化程度高、灵敏、精密、准确, 但仪器昂贵不能普及)。

3. 层析载体内容

(1)凝胶类: Sephadex-Gel层析, Bio-Gel-p层析, Sepharose层析, Bio-Gel-A层析, Segavac-Gel层析。

(2)化学纤维素类: 聚酰胺薄膜层析, 纸层析, 离子交换纤维素层析, 纤维素薄板层析。

(3)粉末类: 薄层层析、板层析、 Al_2O_3 柱层析, 活性炭层析等。

(4)离子交换类: 离子交换树脂层析、离子交换纤维素层析、板层析、纸层析、离子交换纤维素-交联葡聚糖凝胶层析。

4. 技术形式及理化性质

表-1 层析技术形式、载体、型号、分析内容与特点分类一览表

形式	载 体	型 号	分析内容	特点
玻 璃 柱	凝胶 (Gel)	Sephadex G-10~200 Bio-Gel P-2~300 Sephacrose 2B, 4B, 6B Bio-Gel - 1%~10% Segavac 2B, 4B, 6B	蛋白质、糖、 酶、激素、核 酸、亚基、氧 化物、脱盐... ...	分子筛 效应。 分离、纯 化、提 取与制 备.....。
	离子交换 树脂*	强酸性阳离子交换树脂: 723型、 *1 (1~100为强酸型树脂) 强碱性阴离子交换树脂: *201, 717 (201~300为强碱型树脂) 弱酸性阳离子交换树脂: 724, *101 (101~200为弱酸交换树脂) 弱碱性阴离子型树脂: 320, *330 (*701) 311×2 (*704), 321, *301 (301~400为弱碱性树脂) 螯合型离子交换树脂: Dowex A-1, POTA-4, XMC-84X, 3926-I... 特种树脂 (Levextrel- 树脂、大环 聚酰胺和醚类树脂)。	菌体、蛋白质、 残糖、维生素、 氨基酸、核苷性基、选 酸、单核苷酸、择性吸 有机物、无机附。 物、离子物及色 分离、 素..... 纯化与提 取。	离子交 换、极 性基、选 择性吸 分离、 纯化与提 取。
层	离子交换 纤维素	二乙基氨基乙基-纤 维素 (弱碱性阴离 子交换剂) DE-、AE-、PAB-、BD-、 BNA-PEI-TEA-、三乙氨基乙基-纤 维素 (强碱性阴离子交换剂)、 TEAE- 羧甲基-纤维素 (弱酸性阳离子交换 剂): CM-Ecteala纤维素 (弱碱性 阴离子交换剂): -CET-二乙 (二羟 丙) 氨基乙基-纤维素 (强碱性阴离 子交换剂): QAE-、GE-、TEAE-	蛋白质、酶、激 素、免疫活性 物、有机辅基、 标记物、离子多 糖及其特殊物质 (4S-RNA、 DNA、核糖体 RNA及噬菌体 RNA)。.....	静电引 力、功能 基团、离 子交换。 分离、 分析、 纯化。

续表

形式	载体	型 号	分析内容	特点
析		磺丙基-纤维素(强酸性阳离子交换剂): SP-、P-、SE-、 苯甲酰-1-茶甲酰-纤维素(特种离子交换树脂): B, 1-N-DEAE- 苯甲酰-纤维素(特种离子交换剂): 1, N-DEAE-		
技	离子交换纤维素-Sephadex	DEAE-纤维素-Sephadex-A (弱碱性阴离子型) CM-纤维素-Sephadex-C (弱酸阳离子型) QAE-纤维素-Sephadex-A (强碱性阴离子型) SP-纤维素-Sephadex-C (强酸阳离子型)	蛋白质(绝大部分被分离)、 肽、酶、核酸、核苷酸、病毒、噬菌体、酵母、植物花粉。……	分子筛效应、极性基团。 分级分离、纯化、提取与制备。
术	亲和层析(纤维素-凝胶)	溴化氰(CNBr)活性Sephrose4-B (最常用) 戊二醛活化 Bio-GelP-2~300 (常用) 戊二醛交联-Sephadex G-50~200 (常用) 过碘酸盐交联-Sephadex G-50~200 SPA-Sephrose4-B (常用) 羟甲基-cellulose DEAE-cellulose 溴乙酰-cellulose	广泛用于高分子物质, 特殊、微量蛋白质, 抗原、抗体、酶、亚基、免疫球蛋白……。	特异免疫吸附, 配基。 灵敏、特异、分离、纯化、制备。

续表

形式	载体	型 号	分析内容	特点
纸层析技术	纤维素纸	Whatman-1, -2, -3, 4…… S.S (德国) 590-G, 602-H: P, 2040, 2043, 2045, 2071, …… M-chr/100, rr-Ele/130 Niederschlag WFI 日本滤纸 中华牌层析用滤纸	蛋白质、多肽、糖类、脂肪酸类、有机酸类、氨基酸、核酸、抗生素、维生素、磺胺类……	分配、吸附、离子交换。方法简单、分离、定性检测。
薄层层析技术	硅胶、氧化铝等	硅胶-G、-H、-CMC; HF ₂₅₄ 氧化铝 (中性、酸性、碱性)、CM-Cellulose (SE-, P-, CM-PP-, DEAE-, PEI-, QA-, ECIEOLA-) Sephadex G-10~200, SE-, CM-, DEAE, 无机铝离子 (磷酸铝, 钨酸铝, 钼酸铝, 磷钼酸铝, 氢氧化铝)。	糖类、酶、激素、类脂、氨基酸、核苷、碱基、嘌呤、嘧啶……	吸附力、分配系数。方法简便、灵敏、应用广泛、分离检定。
聚酰胺薄膜层析技术	聚酰胺化学纤维素	锦纶 锦纶-6 锦纶-66 锦纶-1010	酚类、酸类、醌类、糖类、氨基酸及其衍生物。核酸、碱基、核苷、核苷酸、杂环化合物、合成染料、磺胺、抗菌素、杀虫药、维生素和抗热药等。	氢键吸附力、分配系数。简便、灵敏、分辨力强、速度快、分离鉴定。
板层析技术	** 硅胶、活性炭等	硅胶-G、-H, 活性炭, 硅藻土, 二氧化锰, 玻璃棉…	有机化合物, 无机离子分析, 包括金属络合物及卤素离子…	吸附、分配。鉴定、检测。

* 离子交换树脂详细型号见附录。

** 板层析技术是一种古老分离检定技术。由于新的层析技术出现, 便逐步被取代。