

第三章

层析技术

层析法(chromatography)又称层析技术或色谱法,它是利用样品中不同物质在不同相态的选择性分配,以流动相对固定相中的混合物进行洗脱,混合样品中不同组分会以不同的速度沿固定相移动,最终达到分离目的的分技术。

层析法最早在1906年由俄国植物学家 M. Tswett 发现并命名。他将植物色素的石油醚提取液倾入装满碳酸钙(CaCO_3)颗粒的玻璃管中,再加入石油醚使其自由流下(图1-3-1),结果植物色素中的各组分分离形成不同颜色的色带,Tswett 将其称之为色谱。装有碳酸钙的玻璃管称为色谱柱(column),管内填料碳酸钙称为固定相(stationary phase),洗脱液石油醚为流动相(mobile phase)。

目前,层析法作为一种重要的分析、分离和纯化技术,已广泛地应用于科学研究与工业生产上,在石油、化工、医药卫生、生物科学、环境科学、农林科学等领域都发挥着十分重要的作用。

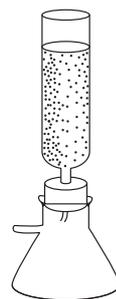


图1-3-1 层析柱示意图

第一节 层析原理

层析法是一种基于被分离物质的理化性质及生物学特性不同,使它们在某种基质中移动速度不同而进行分离和分析的技术。例如:利用物质在溶解度、吸附能力、立体化学特性及分子大小、带电性质及离子交换、亲和力大小及特异的生物学反应等方面的差异,使其在流动相与固定相之间的分配系数(或称分配常数)不同,达到彼此分离的目的。

任何层析体系都由两相构成:一是固定相,固定相可以是固体物质(如吸附剂、凝胶、离子交换剂等),也可以是液体物质(如固定在硅胶或纤维素上的溶液),这些基质能与待分离的化合物进行可逆的吸附、溶解、交换等作用;另一个是流动相,在层析过程中,推动固定相上待分离的物质朝着一个方向移动的液体或气体,都称为流动相,流动相在柱层析中一般称为洗脱剂,在薄层层析中常称为展层剂。当待分离的混合物通过固定相时,由于各组分的理化性质存在差异,与两相发生相互作用(吸附、溶解、结合等)的能力不同,在两相中的分配(含量对比)不同,与固定相相互作用力越弱的组分,随流动相移动时受到的阻滞作用越小,向前移动的速度越快。反之,与固定相作用越强的组分,向前移动速度越慢。分步收集流出液,可得到样品中所含的各单一组分,从而达到将各组分分离的目的。

第二节 层析分类及常用层析技术介绍

一、层析分类

1. 根据固定相基质的形式分类,层析可以分为纸层析、薄层层析和柱层析(表 1-3-1)。纸层析是指以滤纸作为基质的层析。薄层层析是将基质在玻璃或塑料等光滑表面铺成一薄层,在薄层上进行层析。柱层析则是指将基质填装在管中形成柱形,在柱中进行层析。纸层析和薄层层析主要适用于小分子物质的快速检测分析和少量分离制备,通常为一次性使用,而柱层析是常用的层析形式,适用于样品分析、分离。生物化学中常用的凝胶层析、离子交换层析、亲和层析、高效液相色谱等多采用柱层析。

表 1-3-1 按固定相基质形式分类

名称	根据固定相基质形式
柱层析	固定相装于柱内,使样品沿着一个方向前移而达到分离
薄层层析	将适当黏度的固定相均匀涂铺在薄板上,点样后用流动相展开,使组分分离
纸层析	用滤纸用作载体,点样后用流动相展开,使各组分分离
薄膜层析	将适当的高分子有机吸附剂制成薄膜,以类似纸层析方法进行物质的分离

2. 根据层析分离原理不同分类,层析可以分为吸附层析、分配层析、凝胶过滤层析、离子交换层析、亲和层析等(表 1-3-2)。

表 1-3-2 按层析分离原理分类

名称	分离原理
吸附层析	固定相是固体吸附剂,各组分在吸附剂表面吸附能力不同
分配层析	各组分在流动相和静止液相(固相)中的分配系数不同
离子交换层析	固定相是离子交换剂,各组分与离子交换剂亲和力不同
凝胶过滤层析	固定相是多孔凝胶,各组分因分子大小不同,在凝胶上受阻滞的程度不同
亲和层析	固定相只能与一种待分离组分专一结合,而与无亲和力的其他组分分离

3. 根据流动相的形式分类,层析可以分为液相层析和气相层析(表 1-3-3)。气相层析是指流动相为气体的层析,而液相层析指流动相为液体的层析。气相层析测定样品时需要汽化,大大限制了其在生化领域的应用,主要用于氨基酸、核酸、糖类、脂肪酸等小分子的分析鉴定。液相层析是生物医学领域最常用的层析形式,适于生物样品的分析、分离。

表 1-3-3 按流动相形式分类

固定相	流动相	
	液体	气体
液体	液-液层析法	气-液层析法
固体	液-固层析法	气-固层析法

二、常用层析技术介绍

(一) 吸附层析

1. 原理 吸附是指某些物质能够从溶液中将溶质浓集在其表面的现象。吸附层析(adsorption chromatography)是把吸附剂如硅胶、氧化铝、活性炭、淀粉、纤维素及陶土等装入玻璃柱内(柱层析)或涂布于玻璃板上(薄层层析)作为固定相,吸附剂的吸附能力受溶剂影响会发生改变,当样品组分被吸附剂吸附后,加入适当的洗脱液(展层剂),可改变吸附剂的吸附能力并使样品溶解,解吸的样品随洗脱液向前移动。随之样品再被吸附剂重新吸附,再被洗脱液解吸,经如此反复的吸附-解吸-再吸附-再解吸的过程,样品即可沿着洗脱液的前进方向移动。由于同一吸附剂对样品中不同组分的吸附能力有差异,流动相也有不同的解吸能力,与吸附剂结合紧密的组分较难被展层剂解吸,而与吸附剂松散结合的组分则较容易被解吸,所以在洗脱过程中样品各组分移动的距离不同而使其分开,这就是吸附层析的基本过程。吸附剂吸附能力的强弱与被吸附物质的化学结构、溶剂和吸附剂的性质有关。使被吸附物质从吸附剂上解吸下来的过程称为“洗脱”(elution)或“展层”。

2. 分类

(1) 柱层析(column chromatography):是将吸附剂装入玻璃管柱中对混合物进行层析分离。层析柱内充填溶剂湿润的吸附剂,待分离样品从柱顶部加入,样品完全进入吸附柱后,再加入适量洗脱液洗脱。假如待分离的样品内含有 A、B 两种组分,在洗脱过程中,随着流动相流经固定相,样品组分在柱内连续不断地进行吸附、解吸、再吸附、再解吸过程。由于洗脱液和吸附剂对 A 和 B 的溶解力与吸附力不同,A 和 B 在柱内移动的速率也不同。溶解度大而吸附力小的物质在前,相反,溶解度小而吸附力大的物质在后,经过一段时间以后,A、B 两种物质可在柱的不同区域各自形成区带。然后继续用洗脱液洗脱,分段收集,直到各组分按顺序先后完全从柱中洗出为止(图 1-3-2)。

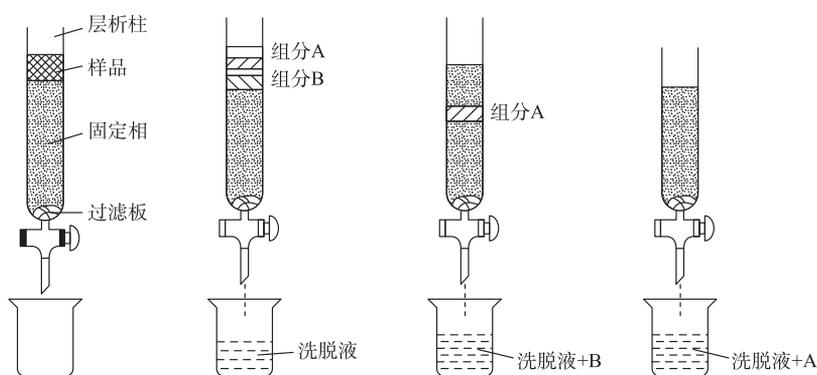


图 1-3-2 柱层析的分离过程

(2) 薄层层析(thin layer chromatography):是利用玻璃板作为固定相载体,在玻璃板上均匀涂布一层吸附剂作为固定相,把待分离的样品点样在薄层层析板上,然后选择合适的

溶剂系统(展层剂)作为流动相,利用毛细管现象进行展开,从而达到对样品分离的目的。由于整个层析过程是在薄层板上进行,所以称为薄层层析或薄板层析(图 1-3-3)。

薄层层析的原理视固定相而异。若涂布物质是吸附剂,如氧化铝、硅胶等,则属于吸附薄层层析;若涂布的是纤维素、硅藻土等,则属于分配薄层层析;若涂布的是离子交换剂如离子交换纤维素,则属于离子交换薄层层析。其中主要的是吸附薄层层析,简称薄层层析。

层析所用吸附剂一般应满足以下几个要求:一是要具有较大的表面积和足够的吸附能力,且对不同物质的吸附力有所差异;二是吸附剂不能与被吸附物质和展开剂发生化学反应,不破坏或降解样品各组分;三是吸附剂的粒度要求大小适中,粒度过大则展层太快,分离效果差,粒度太细小则展层过慢,斑点易扩散或出现拖尾现象;四是吸附剂具有可逆吸附性,既能吸附样品组分,又易于解吸。薄层层析中最常用的吸附剂是硅胶和氧化铝。硅胶略带酸性,适用于中性和酸性物质如氨基酸、糖类、磷脂、类固醇等的分离,但不适用于碱性物质分离;氧化铝略带碱性,适用于中性及碱性物质如生物碱、食物染料、酚类、维生素等的分离。

薄层层析广泛应用于生化、医药、化工等方面,具有以下优点:设备简单,操作方便,样品展层时间较短,分离效果较好;可采用腐蚀性的显色剂,耐高温下显色;各种无机和有机化合物都可进行分离。

(二) 分配层析

1. 原理 分配层析(partition chromatography)是利用混合物中各组分在两种不同溶剂中的分配系数不同而使物质分离的方法。分配系数是指一种溶质在两种互不相溶的溶剂中的溶解达到平衡时,该溶质在两种溶剂中所具有浓度之比。不同的物质因其在各种溶剂中的溶解度不同,因而也就有不同的分配系数。分配层析以物质在两相中的浓度比,即以分配系数为依据,分配系数在等温条件下可用下式表示:

$$K_d = \frac{c_2}{c_1}$$

式中 K_d 为分配系数; c_2 是物质在固定相中的浓度; c_1 是物质在流动相中的浓度。分配系数与温度、溶质及溶剂的性质有关。

在分配层析中,大多选用多孔物质为支持物,利用它对极性溶剂的亲合力,吸附某种极性溶剂作为固定相,这种固定相极性溶剂在层析过程中始终固定在支持物上。用另一种非极性溶剂流经固定相,此移动溶剂称为流动相。如果把待分离物质的混合物样品点加在多孔支持物上,在层析过程中,当流动相沿着支持物流经样品时,样品中各种物质便会按分配系数大小转入流动相向前移动;当遇到前方的固定相时,溶于流动相的物质又将与固定相进行重新分配,一部分转入固定相中。因此,随着流动相的不断移动,样品中的物质便在流动相和固定相之间进行连续的、动态的分配,这种情况相当于非极性溶剂中对物质的连续抽提过程。由于各种物质的分配系数不同,分配系数较大的物质留在固定相中较多,在流动相中较少,层析过程中它向前移动较慢;相反,分配系数较小的物质

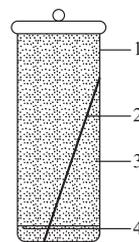


图 1-3-3 直立式
层析缸示意图

1. 层析缸; 2. 薄层层析板;
3. 展开剂饱和和蒸气; 4. 流动相

进入流动相较多而留在固定相中较少,层析时向前移动就较快,据此原理,样品中各种物质就能被分离开来。

分配层析中应用最广泛的支持物是滤纸,此外还有硅胶、硅藻土、纤维素粉、淀粉和微孔聚乙烯粉等。下面以纸层析为例进行介绍。

2. 纸层析 是以滤纸为支持物。滤纸纤维和水有较强的亲和力,能吸收 22 % 左右的水,而且其中 6 % ~ 7 % 的水是以氢键形式与纤维素的羟基结合,在一般条件下较难脱去,而滤纸纤维与有机溶剂的亲和力甚弱,所以一般的纸层析实际上是以滤纸纤维的结合水为固定相,以有机溶剂为流动相,当流动相沿纸经过样品时,样品点上的溶质在水和有机相之间不断进行分配,一部分样品随流动相移动,进入无溶质区,此时又重新分配,一部分溶质由流动相进入固定相(水相)。随着流动相的不断移动,各种不同的部分按其各自的分配系数不断进行分配,并沿着流动相移动,从而使物质得到分离和提纯。

溶质在滤纸上的移动速率可用比移值来表示。

$$\text{比移值}(R_f) = \frac{\text{原点到层析点中心的距离}}{\text{原点到溶剂前沿的距离}}$$

R_f 值取决于被分离物质在两相间的分配系数以及两相的体积比。由于两相体积比在同一实验条件下是常数,所以 R_f 值主要决定于分配系数。不同物质分配系数不同, R_f 值也不同。对于某种给定的化合物而言,在标准条件下 R_f 是常数。

纸层析按层析方式不同可分为三种,即垂直上行纸层析(图 1-3-4)、垂直下行纸层析和水平环形纸层析。为提高分辨率,纸层析也可用两种不同的展开剂进行双向纸层析。双向纸层析一般把滤纸剪成长方形。一角点样,先用一种溶剂系统展开,吹干后转 90°,再用第二种溶剂系统进行第二次展开。这样,单向纸层析难以分离的某些物质,通过双向层析往往可以获得比较理想的分离效果。

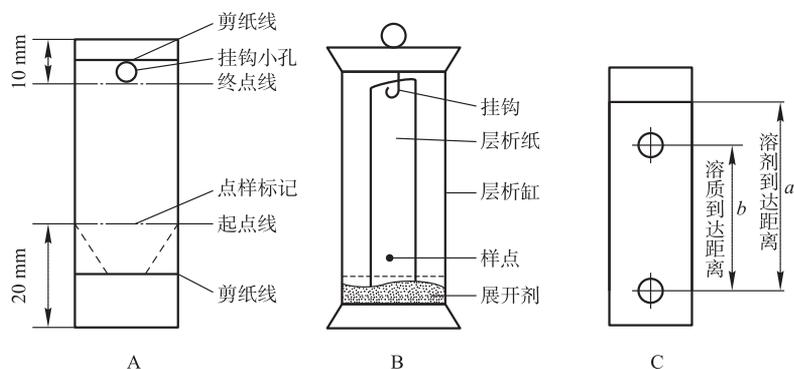


图 1-3-4 垂直纸层析装置

A. 纸层析制备 B. 层析缸及展层 C. 层析展开图

纸层析设备简单、价廉,可用于氨基酸、肽类、核苷酸、糖类、维生素、有机酸等多种小分子物质分离、定性和定量。纸层析具体操作分为样品处理、点样、展层、显色、 R_f 值计算及定量分析等若干步骤。

(三) 凝胶过滤层析

1. 概念 凝胶过滤层析(gel filtration chromatography, GFC)又称分子排阻层析(molecular exclusion chromatography),是指样品混合物随流动相流经固定相的凝胶层析柱时,混合物中各物质因分子大小不同而被分离的层析技术。凝胶颗粒多是交联聚糖类物质(如葡聚糖或琼脂糖),具有三维多孔性网状结构,不带电荷,对样品组分起到滤过或“筛子”作用,因此又称分子筛层析(gel chromatography)。

凝胶过滤层析的优点主要表现在:层析所用凝胶为惰性载体,吸附力弱,不带电荷,操作条件比较温和,不需要有机溶剂,而且可以保持被分离组分的理化性质不变。

2. 原理 凝胶过滤层析时,把凝胶颗粒装填在层析柱内(装柱),再把待分离的混合物自柱顶加入,然后用合适的洗脱液进行洗脱。在洗脱过程中,混合物中各物质主要依据分子的大小进行层析分配,相对分子质量大的物质(直径较大),不能进入凝胶颗粒的网孔内,而被排阻在凝胶颗粒外,只能沿着凝胶颗粒的间隙向下移动,在洗脱液的“冲洗”下,它们流速较快,“流程”相对较短,先从层析柱洗出。而相对分子质量小的物质(直径较小),能够顺利穿过颗粒表面网孔进入颗粒内部即被滞留在凝胶内部,洗脱液洗脱时,这些小分子物质先在孔隙中间扩散,再被洗出至孔隙,再次进入颗粒内部……如此不断地入出和出入,直至这些物质最终被洗出柱外。由于小分子物质的流程较长,因而洗脱时间较长,后出层析柱。

总之,凝胶过滤层析分离样品时,样品各组分根据相对分子质量大小得到有效分离。相对分子质量大的物质先出柱,相对分子质量小的物质后出柱(图 1-3-5)。

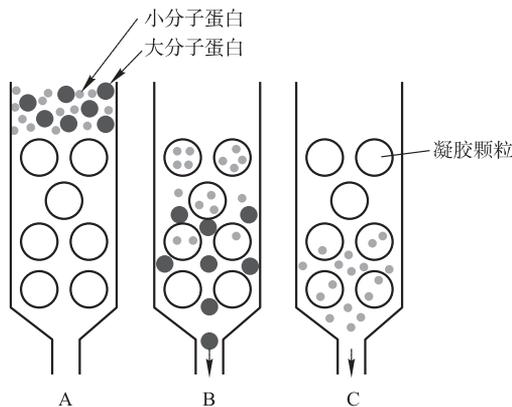


图 1-3-5 凝胶过滤分离蛋白

A. 样品过柱 B. 大分子蛋白先被洗脱出柱 C. 小分子蛋白后被洗脱出柱

常用凝胶主要有交联葡聚糖凝胶(商品名:Sephadex),聚丙烯酰胺凝胶(商品名:Bio-Gel),琼脂糖凝胶(商品名:Sepharse)等。如常用的交联葡聚糖是将葡聚糖(dextran)悬浮于有机溶剂,加入交联剂表氯醇交联聚合而成多糖链的三维结构(图 1-3-6),这种聚合物为白色珠状微粒,是多孔性网状结构,凝胶的孔径大小与交联剂的量有关,交联剂多则交联度大,网状结构紧密,孔径小,交联剂少则孔径大。凝胶过滤层析实验时,要根据目标样品的分子大小不同来选择不同型号的凝胶(表 1-3-4)。

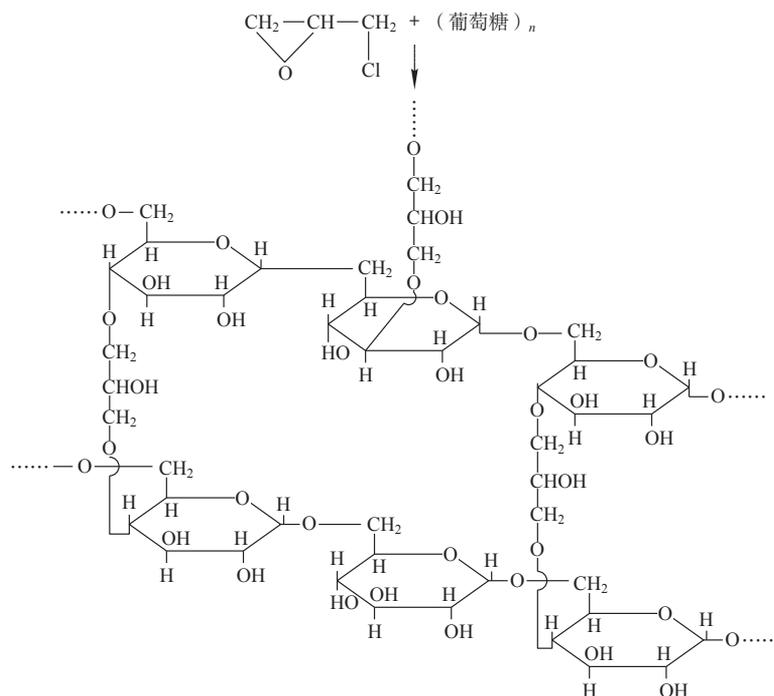


图 1-3-6 交联葡聚糖凝胶的形成

表 1-3-4 交联葡聚糖的规格及性质

型号	分离相对分子质量范围		吸水量 (g 水/g 干凝胶)	柱床体积 (mL/g 干凝胶)	浸泡时间(h)	
	糖类	蛋白质或肽			20~25 °C	90~100 °C
G-10	<700	<700	1	2	3	1
G-15	<1 500	<1 500	1.5	3	3	1
G-25	100~5 000	1 000~5 000	2.5	5	3	1
G-50	500~10 000	1 500~30 000	5.0	10	3	1
G-75	1 000~50 000	3 000~70 000	9.5	12~15	24	3
G-100	100~100 000	4 000~150 000	10	15~20	72	5
G-150	100~150 000	5 000~400 000	15	20~30	72	5
G-200	1 000~200 000	5 000~800 000	20	30~40	72	5

3. 凝胶过滤层析应用

(1) 脱盐:生物大分子如蛋白质、核酸、多糖等溶液中常含有的相对分子质量低的杂质,利用凝胶层析法可将其除去,这一操作过程称为脱盐。

(2) 分离提纯:凝胶过滤层析广泛用于酶、蛋白质、多糖、激素、生物碱等物质的分离提纯。

(3) 相对分子质量测定:在同一条件下,用一系列已知相对分子质量的标准品在同一凝胶柱内层析,记录每分钟成分的洗脱体积,并以洗脱体积对相对分子质量的对数作图,在一定相对分子质量范围内得到一条直线即相对分子质量标准曲线。在测定未知样品的相

对分子质量时,可将此样品加在测定标准曲线的凝胶柱内,相同洗脱液洗脱,根据洗脱体积,在标准曲线上查出其对应的相对分子质量大小。

(4) 样品浓缩:通常将 SephadexG-25 或 50 干胶投入到稀的高分子溶液中,此时水分和相对分子质量低的物质就会进入凝胶粒子内部的孔隙中,而高分子物质则被排阻在凝胶颗粒之外,再经离心或过滤,将溶胀的凝胶分离,就得到了浓缩的高分子溶液。

(四) 离子交换层析

1. 概念 离子交换层析(ion exchange chromatography, IEC)是利用离子交换剂为固定相,根据流动相中各组分离子与交换剂上的平衡离子进行可逆交换时的结合力大小差异进行有效分离的一种层析技术。固定相是载有大量电荷的离子交换剂,流动相是具有一定 pH 和离子强度的电解质溶液。

2. 原理 离子交换层析法主要依赖电荷间的相互作用,利用带电分子中电荷的微小差异而进行分离。当样品溶液中带有与离子交换剂相反电荷的组分流经离子交换剂时,后者即对样品各组分选择性结合(电荷吸附结合)。随后,当带有与溶质相同电荷的流动相流经离子交换剂固定相时,被吸附的样品组分可被置换而洗脱下来(离子交换),从而达到分离样品中各带电组分之目的。因此,离子交换层析实质上是一种特殊的吸附作用。

几乎所有的生物大分子都是有极性的,在某条件下都可以使其带电荷而成为离子。因此,离子交换层析广泛应用于各类生化分子如氨基酸、蛋白质、多肽、糖类等生化制品的分离纯化。

3. 离子交换剂 离子交换层析的固定相是离子交换剂,它是由一类不溶于水的惰性高分子聚合物基质通过一定的化学反应共价结合上某种电荷基团形成的。离子交换剂由三部分构成:高分子聚合物基质、电荷基团和平衡离子。电荷基团与高分子聚合物共价结合,形成一个带电荷的可进行离子交换的基团。平衡离子是结合于电荷基团上的相反离子,它能与溶液中其他的离子基团发生可逆的交换反应。平衡离子带正电荷的离子交换剂能与带正电荷的离子基团发生交换作用,称为阳离子交换剂;平衡离子带负电荷的离子交换剂与带负电荷的离子基团发生交换作用,称为阴离子交换剂。在一定条件下,溶液中的某种离子基团可以把平衡离子置换出来,并通过电荷基团结合到固定相上,而平衡离子则进入流动相,这就是离子交换层析的基本置换反应。通过在不同条件下的多次置换反应,就可以对溶液中不同的离子基团进行分离。

离子交换剂按化学性质可分为离子交换树脂、离子交换纤维素和离子交换交联葡聚糖等。按可交换的离子及其交换性能又可分为阳离子交换剂(包括强酸型与弱酸型)和阴离子交换剂(包括强碱型与弱碱型)两大类(表 1-3-5)。

表 1-3-5 离子交换树脂的类型

类型	交换基团	商品型号举例
强酸性阳离子交换树脂	磺酸基($-\text{SO}_3\text{H}$)	国产强酸 1 × 7 (732), Zerolit 225 (英)
	酚羟基($-\text{OH}$)	Dowe × 50 或 Amberlite IR - 120 (美)
弱酸性阳离子交换树脂	羧基($-\text{COOH}$)	国产弱酸 101 × 128 (724), Zerolit (英) Amberlite IRC - 50 (美)

续表

类型	交换基团	商品型号举例
强碱性阴离子交换树脂	季铵基[$-\text{N}(\text{CH}_3)_3$]	国产弱酸 201 \times 7(717)及 201 \times 4(711) Zerolit FF(英)
弱碱性阴离子交换树脂	伯胺基($-\text{NH}_2$) 仲胺基($-\text{NHR}$) 叔胺基($-\text{NR}_2$)	国产弱碱 301(701) Zerolit H(英) Amberlite IR-45(美)

4. 离子交换柱层析操作 离子交换层析通常采用柱层析,其过程包括离子交换剂的选择、离子交换剂使用前处理与转型、装柱、样品制备及加样、洗脱、检测及离子交换剂再生等步骤。

离子交换剂在使用前要用水浸泡使之充分膨胀,再用酸或碱处理,使之转变为带 H^+ 或 OH^- 的形式,称之为转型。如果离子交换剂已经使用过,也可以用这种处理方法使它恢复为原来的离子型,这种处理称为再生。处理好的离子交换剂装柱后,即可上样进行离子交换层析分离。下面以阴离子交换剂为例简单介绍离子交换层析的基本分离过程(图 1-3-7)。

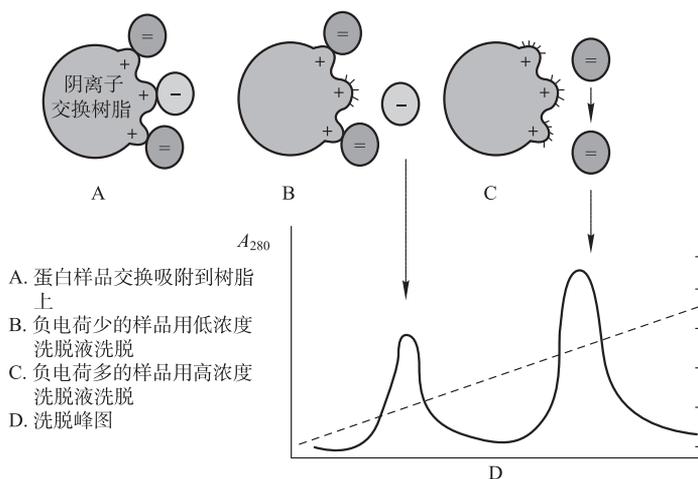


图 1-3-7 离子交换层析分离蛋白质

阴离子交换剂的电荷基团带正电,装柱平衡后,与缓冲溶液中的带负电荷的平衡离子结合。待分离溶液中可能有正电基团、负电基团和中性基团。加样后,负电基团可以与平衡离子进行可逆的置换反应,而结合到离子交换剂上。而正电基团和中性基团则不能与离子交换剂结合,随流动相流出而被去除。通过选择合适的洗脱方式和洗脱液,如增加离子强度的梯度洗脱,随着洗脱液离子强度的增加,洗脱液中的离子可以逐步与结合在离子交换剂上的各种负电基团进行交换,而将各种负电基团置换出来,随洗脱液流出。与离子交换剂结合力小的负电基团先被置换出来,而与离子交换剂结合力强的需要较高的离子强度才能被置换出来,这样带不同负电基团的组分就会按其离子交换剂结合力从小到大的顺

序逐步被洗脱下来,分级分离。

(五) 亲和层析

1. 概念 亲和层析(affinity chromatography)是利用生物分子间专一的亲和力而进行分离的一种层析技术。亲和层析是分离纯化蛋白质、酶等生物大分子最为特异而有效的层析技术,分离过程简单、快速,分辨率高,在生物组分分离中有广泛的应用。同时它也可以用于某些生物大分子结构和功能的研究。

2. 原理 生物分子间存在很多特异性的相互作用,如抗原-抗体、酶-底物或抑制剂、激素-受体等,它们之间都能够专一而可逆地结合,这种结合力就称为亲和力。亲和层析的分离原理就是通过将具有亲和力的两个分子中的一个固定在不溶性基质上,利用分子间亲和力的特异性和可逆性,对另一个分子进行分离纯化。被固定在基质上的分子称为配体,配体和基质是共价结合的,构成亲和层析的固定相,称为亲和吸附剂;与配体特异亲和的样品组分称为配基。亲和层析时首先选择与待分离的生物大分子有亲和力的物质作为配体,例如分离酶可以选择其底物类似物或竞争性抑制剂为配体,分离抗体可以选择抗原作为配体等。并将配体共价结合在适当的不溶性基质上,如常用的 Sepharose-4B 等。将制备的亲和吸附剂装柱平衡,当样品溶液通过亲和层析柱的时候,待分离的生物分子就与配体发生特异性的结合,从而留在固定相上;而其他杂质不能与配体结合,仍在流动相中,并随洗脱液流出,这样层析柱中就只有待分离的生物分子。通过适当的洗脱液将其从配体上洗脱下来,就得到了纯化的待分离物质。

亲和层析是利用生物分子所具有的特异的生物学性质——亲和力来进行分离纯化的。由于生物分子间的亲和力具有高度的专一性,使得亲和层析的分辨率很高,是分离生物大分子的一种理想的层析方法。

3. 亲和吸附剂 亲和吸附剂的选择和制备是亲和层析的关键步骤,此过程包括基质和配体的选择、基质活化、配体与基质的偶联。

(1) 基质

1) 基质的性质:亲和层析基质应具以下性质:①具有较好的理化稳定性;②能与配体稳定结合;③基质本身与样品各个组分均没有明显的非特异性吸附,且不影响配体与待分离组分的结合。常用作亲和层析的基质有纤维素、交联葡聚糖、琼脂糖、聚丙烯酰胺等凝胶,其中以琼脂糖凝胶应用最为广泛。

2) 基质的活化:基质的活化是指通过对基质进行化学处理,使其表面的一些化学基团转变为易与特定配体结合的活性基团。溴化氰活化法是最常用的活化方法之一,活化主要是生成可与伯胺基反应的亚胺碳酸活性基团,含有伯胺基的配体如氨基酸、蛋白质都可以结合在活化基质上。

(2) 配体:理想的配体应具有以下性质:①配体与待分离组分有特异的强亲和力,且对其他组分没有非特异性吸附作用;②配体能与基质共价稳定结合,偶联过程不影响配体与待分离组分的亲和力;③配体本身应具有较好稳定性,可多次重复使用。

(3) 配体与基质的偶联:基质活化处理后,其表面具有多种活性基团,这些基团在温和的条件下可与含氨基、羧基、醛基、酮基、羟基、硫醇基等多种配体反应,使配体偶联在基质上。配体和基质偶联后,必须要反复洗涤,以去除未偶联的配体。

(4) 亲和吸附剂再生:将使用过的亲和吸附剂,通过特定方法去除吸附在其基质和配体上结合的杂质,使亲和吸附剂恢复亲和吸附能力,此过程称为吸附剂再生。一般情况下,使用过的亲和层析柱,用大量的洗脱液或高浓度的盐溶液洗涤,再用平衡液平衡即可再次使用。

4. 亲和层析操作 亲和层析的基本操作如图 1-3-8 所示:选择能与待分离组分特异识别及可逆结合的配体分子;将配体活化后,共价结合到层析基质载体上,即配体与基质的偶联固定;把基质-配体复合物装入层析柱内做成亲和层析柱;上样→洗涤杂质→洗脱收集亲和分子(待分离组分)→亲和吸附剂再生。

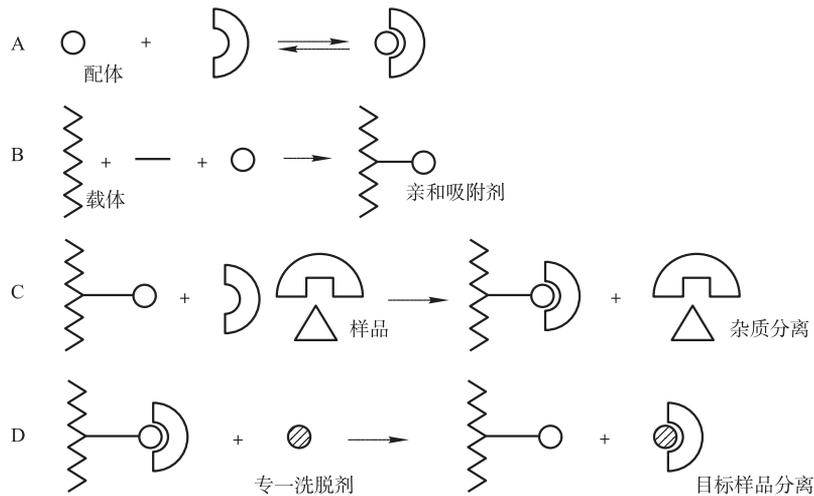


图 1-3-8 亲和层析分离大分子示意图

A. 配体的选择 B. 配体偶联载体基质 C. 上样亲和,杂质分离 D. 目标样品洗脱分离

5. 亲和层析应用 亲和层析在生物大分子分离纯化方面的应用极为广泛,下面举例简单介绍几种常见的亲和层析应用。

(1) 抗原和抗体:利用抗原、抗体间高特异的亲和力而进行亲和层析分离的方法称为免疫亲和层析。例如将抗原结合于亲和层析基质上,就可以从血清中分离其对应的抗体。

(2) 激素与受体:利用激素和受体间的高亲和力进行亲和层析是分离受体的重要方法。目前已经用亲和层析方法纯化出了大量的受体,如乙酰胆碱、肾上腺素、生长激素、胰岛素等多种递质或激素的受体。

(3) 多核苷酸和核酸:利用 poly(U) 作为配体可以用于分离 mRNA 以及各种 poly(U) 结合蛋白。Poly(A) 可以用于分离各种 RNA、RNA 聚合酶以及 poly(A) 结合蛋白。以 DNA 作为配体可分离各种 DNA 结合蛋白、DNA 聚合酶、RNA 聚合酶等。

(4) 细胞分离:利用配体与细胞表面受体的相互作用,亲和层析可用于细胞分离。例如凝集素可用于分离红细胞以及淋巴细胞,胰岛素可用于脂肪细胞分离等。

(张 伟)