

利用人工合成的离子交换树脂来分离纯化各种化学物质已有将近四十年的历史。在生物化学方面也成功地用于氨基酸的分析。生物高分子如蛋白质核酸等虽然也可以用离子交换树脂来分离,但有以下缺点:

(1)交联的树脂孔洞很小,生物高分子不能进入内部,只能在树脂表面吸附,所以吸附容量较小;(2)树脂的离子交换基团排列很密,对蛋白质吸附得太牢,一经吸附上去则很难洗脱下来,必须用剧烈的条件(较高的盐浓度和较大的pH变化),容易引起蛋白质变性;(3)树脂的疏水性强,溶胀性低,引起蛋白质与树脂之间的疏水相互作用,并且在油水界面上也容易引起蛋白质变性。

离子交换纤维素的制成^[1]及在分离蛋白质方面的应用^[2],证明它是有优越性的。纤维素是开放性的长链,有较大的表面积,所以对蛋白质的吸附容量较大。纤维素上离子基团数量不多,排列疏散,对蛋白质分子吸附得不是太牢固,用缓和的洗脱条件即可达到分离目的而不致引起蛋白质变性。此外纤维素的亲水性强,溶胀性强,也有利于蛋白质层析。所以近年来离子交换纤维素广泛地应用于生物高分子的分离及纯化方面。

其后又有一些新的进展,改良型离子交换纤维素^[3]是利用微晶纤维素加以适当交联再结合上离子交换基团制成的,有较高的吸附容量和分辨率。用凝胶如交联葡聚糖(Sephadex)*和聚丙烯酰胺**等作骨架的离子交换剂也相继出现。这种交换剂有较高的吸附容量,但缺点是随pH和盐浓度的改变柱体积改变较大。另外由于它的凝胶性质,大分子物质被排阻在孔洞之外。最近看到有DEAE-Bio-Gel A**,它的孔洞很大,分子量是一千五百万以下的物质可以进入孔洞,有较高的吸附容量及分辨率,体积不变化,耐酸碱而且可以高温灭菌。Bio-Gel A是琼脂糖凝胶,一般不耐高温,估计这可能是将琼脂糖用环氧氯丙烷交联并加以适当处理而制成的^[4]。另外,两性离子交换剂的制成及应用^[5]也是一个改进,它对蛋白质的吸附和解吸更容易迅速达到平衡,离子环境的微小改变即可进行洗脱。在较小分子量的蛋白质如蛇毒蛋白的情况,用一个恒组成缓冲液(0.066M碳酸铵, pH8.0)可以洗脱下来10个组份。

本文仅限于介绍离子交换纤维素层析技术的基本原理和操作技术,这方面的参考文献有不少篇^[6-12]。

一、离子交换纤维素

(一)离子交换纤维素的种类

离子交换纤维素的种类见表1。其中最常用的是DEAE-纤维素和CM-纤维素两种,制备方法见文献[1,11]。纤维素又有“纤维性”和“微粒性”两种。微粒性纤维素是将纤维素经化学处理除去非晶部分保留微晶部分,再加以适当交联使其结构稳定,然后再结合上离子基团而制成的。粒子细,比重大,能装成紧密的柱,吸附容量大,分辨率高。

(二)对蛋白质的吸附容量

一般商品注明的交换当量是指酸碱当量,常用每克干物质具有的离子基团的毫克当量数表示(见表1),但对蛋白质的吸附容量则是另外一回事。例如离子交换树脂虽然有较高的离子交换当量,但因蛋白质分子不能进入孔内而对蛋白质的吸附容量却很小。具有相同的交换当量的DEAE-纤维素,不同的批号其吸附容量有时相差到六倍甚至十倍。这是因制备时有副反应,形成如下基团: $-O-CH_2-CH_2-N(C_2H_5)-CH_2-CH_2-N(C_2H_5)_2$, $pK' = 6$ 而非 9.5,碱性弱得多,吸附容量小。近来改进了的商品这种变动性小多了。由于纤维素的类型不同,虽然有相同的交换当量,而吸附容量却大不相同(见表2)。另外吸附容量因缓冲液

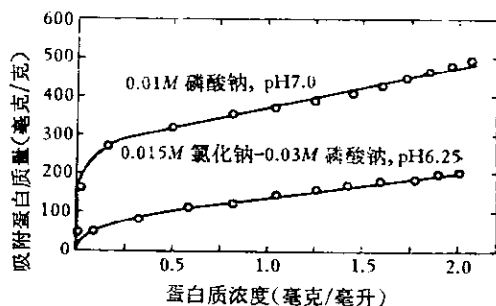



图1 牛血清清蛋白在DEAE-纤维素上吸附情况
上面曲线为在紧密吸附状态;
下面曲线为在缓慢移动状态。

* 瑞典 Pharmacia 厂。

** 美国 Bio-Rad 厂。

表1 离子交换纤维素的种类

阴离子	解离基团	交换当量*	pK' **	特 点
DEAE-	二乙氨基—O—CH ₂ —CH ₂ —N(C ₂ H ₅) ₂ X	0.1—1.1	9.1—9.5	应用最广泛,在 pH8.6 以下
TEAE-	三乙氨基—O—CH ₂ —CH ₂ —N(C ₂ H ₅) ₃	0.5—1.0	10	碱性稍强
GE-	胍乙基—O—CH ₂ —CH ₂ —NH—C(=NH)—NH ₂	0.2—0.5		强碱性,极高 pH 仍有效
PAB-	对氨基苯基—O—CH ₂ — 	0.2—0.5		极弱碱性
ECTEOAL-	三乙醇胺+环氧氯丙烷,结构不详	0.1—0.5	7.4—7.6	弱碱性,适于分离核酸
BD-	苯甲酰化的 DEAE—	0.8		适于分离核酸
BND-	苯甲酰和苯甲酰化的 DEAE—	0.8		同 上
PEI-	聚乙烯亚胺吸附于纤维素	0.1		适于分离核苷酸
阳离子				
CM-	羧甲基 —O—CH ₂ —COOH	0.5—1.0	3.6	应用最广泛,在 pH4 以上
P-	磷酸根 —O—PO ₃ H ₂	0.7—7.4	pK ₁ ' 1—2 pK ₂ ' 6.0—6.5	酸性较强,用于低 pH
SE-	磺乙基 —O—CH ₂ —CH ₂ —SO ₃ H	0.2—0.3	2.2	强酸性,用于极低 pH

* 毫克当量/克; ** pK' 外观解离常数负对数,在 0.5—1.5M NaCl 中。

表2 商品离子交换纤维素的特性

DEAE-纤维素	形 状	长 度 (微米)	交换当量 (毫克当量/克)	蛋白吸附容量(毫克/克)		床体积 (毫升/克)	
				胰 岛 素 (pH8.5)	牛血清清蛋白 (pH8.5)	pH6.0	pH7.5
DE-22	改良纤维性*	12—400	1.0±0.1	750	450	7.7	7.7
DE-23	同上(除细粒)	18—400	1.0±0.1	750	450	8.3	9.1
DE-32	微粒性(干粉)	24—63	1.0±0.1	850	660	6.0	6.3
DE-52	同上(溶胀)	24—63	1.0±0.1	850	660	6.0	6.3
CM-纤维素				溶 菌 酶 (pH5.0)	7S-γ 球蛋白 (pH3.5)	pH5.0	pH7.5
CM-22	改良纤维性	12—400	0.6±0.06	600	150	7.7	7.7
CM-23	同上(除细粒)	18—400	0.6±0.06	600	150	9.1	9.1
CM-32	微粒性(干粉)	24—63	1.0±0.1	1,260	400	6.8	6.7
CM-52	同上(溶胀)	24—63	1.0±0.1	1,260	400	6.8	6.7

* 英国 Whatman 厂的型号,原有旧型号如 DE-1, 为长纤维性,长度 1,000 微米。还有 DE-11, 纤维性, 50—250 微米,对牛血清清蛋白的吸附容量仅为 130 毫克/克。

的 pH 和离子强度不同而不同。并且与蛋白质浓度有关,浓度愈大吸附量愈大(见图 1)。

二、离子交换层析的基本原理

(一)生物高分子离子交换层析的根据

生物高分子如蛋白质核酸等是多价电解质,它们

对离子交换剂的亲和力取决于每个分子能够和离子交换剂形成的静电键的数目,数目越多亲和力越大。这首先决定于一个分子带有的适当电荷(正或负)的数目。另外分子的大小以及电荷排列方式也有关系,因为这与它是否易于在吸附剂上的适当部位形成静电键有关。有人认为离子交换和电泳都是根据电荷差异来分离的,效果相同,这是错误的。电泳分离的根据是分

子的表面静电荷密度(单位面积上的静电荷),凝胶电泳虽然根据分子大小来分离,但在离子交换层析的情况,电荷排列也有关系,所以分离效果不同。例如人的一氧化碳-血红蛋白(等电点 = 6.5),在 pH7.0, 0.01M 磷酸缓冲液中,这时它的静电荷虽是负的,却能被吸附在 CM-纤维素上。很可能是其分子的某些部位有足够的正电荷,恰好能与 CM-纤维素上的负电荷形成静电键。

(二)吸附状态

多价电解质与离子交换剂之间形成多个静电键,每一个静电键由于盐离子的竞争而处于永恒的解离与再结合过程中。由于键数多少不同,它们同时解离的机率也就不同。依此机率的大小可分为三种吸附状态。

1. 紧密吸附 静电键的数目相当多以致它们同时解离的机率为零,称为紧密吸附状态。处于此状态的物质停留于柱顶不移动。

2. 有限吸附平衡 静电键的数目较少,它们同时解离的机率达到某有限值(0—1 之间),也就是在某一时间内,物质分子呈解吸状态,随溶液向柱下方移动,又被吸附一段时间。如此进行多次的解吸与再吸附,逐渐向柱下移动,从极缓慢的移动(机率稍大于零)到接近溶剂前峰(机率稍小于 1)之间,此种状态称为有限吸附平衡。只有在此范围内才能达到较高的分辨率。柱层析时各区带移动得越慢,分辨率越高,但区带会扩展过宽,所以要二者兼顾,采取适当条件。

3. 解吸状态 静电键数目极少,同时解离的机率为 1,完全不吸附。处于此状态的物质在层析时与溶剂前峰同时移动,呈现为一个高而窄的“穿过峰”。如果混合物中有几种物质同时处于解吸状态,则同时被洗脱下来,根本达不到分辨的目的。所以不能简单地认为只要洗脱峰越高越窄则分出的物质越纯。

(三)洗脱

洗脱就是改变缓冲液的 pH 或离子强度,降低物质的亲合力,使原来紧密吸附的物质逐步进入有限吸附平衡或解吸状态而由柱上洗脱下来。洗脱的办法有两种:①增加缓冲液的离子强度,使离子的竞争能力加大;②改变 pH,使被分离物质的解离度降低,电荷减少。用阴离子交换剂时降低 pH,用阳离子交换剂时升高 pH。

有时两种办法并用,这对分离复杂的混合物是有效的。一方面因盐浓度的增加,所需要改变的 pH 范围就可以减小,避免蛋白质变性。另一方面由于蛋白质的组成不同,所含解离基团不同,受 pH 改变的影响就不同。即使在某一 pH 条件具有相同的静电荷,因而受盐竞争的程度相同而分不开,改变 pH 时则电荷

不同而能分开。

实际上生物高分子处于有限吸附平衡状态的条件范围是相当窄的,而生物样品中又往往有多种多样的物质,其有限吸附平衡的条件分布范围很广。因此用一个简单的洗脱条件很难将多种物质分离开来。这与氨基酸层析显然不同,后者用一个不变的缓冲液可以相继洗下多个成分。蛋白质的洗脱条件要复杂得多。通常采用梯度洗脱或阶段洗脱两种方式。

(四)梯度洗脱

缓冲液离子强度和 pH 改变是逐步的连续性的。混合物中的各成分逐个地进入有限吸附平衡而互相分离。梯度的设计应满足以下要求:①洗脱液总体积要足够大,一般要几十倍于床体积,使分离的各峰不致太拥挤;②梯度的上限要足够高,使吸附最紧密的物质能被洗脱下来;③梯度的斜度要足够平缓以使各峰分开,但又足够陡,以免峰形过宽和拖尾;④梯度升得不要太快,要恰好使移动的区带在快到柱末端时达到解吸状态。这样即可利用全柱长进行无数次的解吸和再吸附平衡,达到分辨分离的目的。如过早地达到解吸状态,则柱的下部不但不起分辨作用,反而只会引起区带扩散,在这种情况下,一根短柱会起同样作用,而且甚至更好一些。但梯度升得太慢,使物质在有限吸附平衡状态出柱也不好,这样峰形太宽。通常通过试验,靠前一个试验结果来正确地调节梯度使达到理想的结果。

(五)阶段洗脱

阶段洗脱就是用几个具有不同洗脱能力的缓冲液相继进行洗脱。这种洗脱方式有很多缺点。

(1) 不同的物质不易分开。很难恰好找到使被分离物质处于有限吸附平衡的条件。如洗脱能力增加过大,则可能有几种物质同时进入解吸状态,在一个“穿过峰”中同时洗下来。如洗脱能力增加过小,则可能任何成分也没有移动。

(2) 一个物质有拖尾现象。生物高分子本身电荷的分布是不均匀的。离子交换纤维素表面电荷的分布也是不规则的,有的部位电荷密度大而且排列恰当,对蛋白质的亲合力就大。另一些部位则亲合力小。同一种蛋白质分子所遇到的微环境有差别,吸附紧密程度就不同。在一个恒定的洗脱条件下,吸附较紧密的就会落在后面,形成拖尾。在梯度洗脱条件下,洗脱能力逐步加强,落后的分子即逐渐赶上去,所以峰形对称。

(3) 同一物质会出现多个峰。由于上述的同一物质的分子吸附紧密程度不同,每改变一次洗脱液就会出现一个峰,即使每次用极大的洗脱体积也是一样。特别是分子量大的物质,占据的空间大,遇到的微环境差别就更大,更容易出现假峰。在梯度洗脱的情况下,

每个分子都处在有限吸附平衡状态，在柱上进行无数次的解吸和再吸附过程，各分子所遇到的差异就统计学地抵消了，不容易出现假峰。

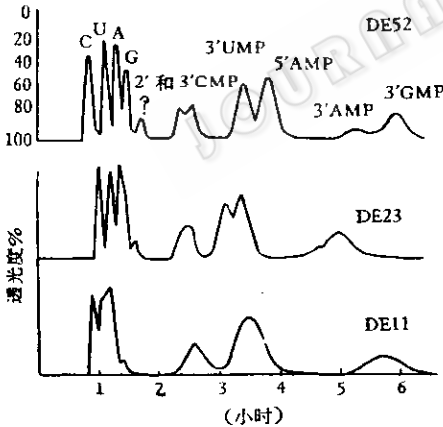
另外一种情况就是当负荷量过大时，每改变一次洗脱液，则有一部分蛋白质洗脱下来，这代表吸附剂在不同条件下吸附容量的差值(见图2)。更不能达到分离的目的。

同一种蛋白质在阶段洗脱时出现多个峰的现象，在文献中报道极多，并且有很多人以此作为物质异质性的证据，这都是忽略了阶段洗脱的这一严重缺点。

虽有以上缺点，阶段洗脱也有它的用途。设备和操作简单，洗脱体积小，浓度高，便于分析。可用来初步探索蛋白质混合物的洗脱行为。用于低活性物质的分离。当时间因素很重要时，快速的分离以除去一些有害物质(如蛋白酶对被分离物质有破坏作用或有其他抑制剂存在时)是有利的。此外，如被分离的混合物的组成比较简单，而且它们对吸附剂的亲和力差别比较大时，阶段洗脱是比较适用的。

(六)分辨率

洗脱液的梯度平缓而且流速慢时分辨率高。单位柱体积的吸附容量越大，则进行吸附平衡的次数就越多(柱单位高度内的理论段数(ETP/厘米)越多)，就有可能使亲和力差异较小的物质分开，也就是分辨率越高。微粒性纤维素吸附容量大且装柱紧密，所以分辨率高(见图2)^[3]。



柱: 34×1.5 厘米 流速 23 毫升/厘米²/小时
图2 不同型号的离子交换纤维素分离核苷和核苷酸效果的比较

三、层析条件的选择

(一)离子交换剂的选择

(1) 参照电泳的结果。在中性或偏碱性条件下进行电泳，向阳极移动较快的物质，在同样条件下可被阴离子交换剂吸附，向阴极移动或向阳极移动较慢的可

被阳离子交换剂吸附。如前所述，这只是近似的情况，有时有例外。

(2) 已知等电点的物质，在高于其等电点的 pH 用阴离子交换剂，在低于其等电点的 pH 用阳离子交换剂。同时考虑到该物质的稳定性及溶解度，选择适当的 pH 范围(见图3)。

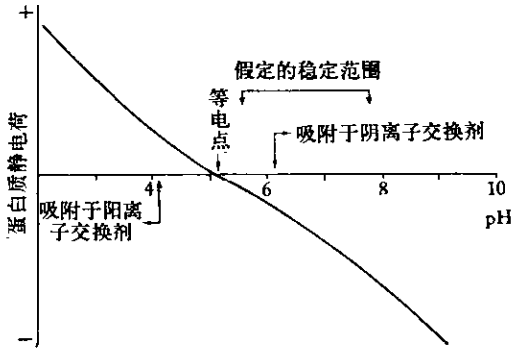


图3 蛋白质的净电荷与 pH 的关系

(3) 用两种常用的离子交换剂分别进行试验。通常用 1 毫升的小柱在低盐浓度(0.005M)用 DEAE-纤维素(在 pH8.6, Tris-HCl 或 Tris-磷酸缓冲液)或用 CM-纤维素(在 pH6.0 磷酸钠或 pH5.5 醋酸钠缓冲液)进行试验。大多数蛋白质可被二者之一或二者均吸附。个别小分子物质由于电荷数少，也有可能均不吸附。一经看到吸附之后，可再改变 pH 条件使不太极端但仍能有效吸附，这样使杂蛋白尽可能少被吸附，而且使所要分离的物质在被吸附的蛋白质中是吸附得最不牢的，便于下一步洗脱。但这就降低了柱床对该蛋白质的吸附容量，容易发生超负荷的危险。

如果蛋白质可被两种吸附剂吸附，则两种均可用于分离。这样与其他杂蛋白质分离的机会就更多了。如果都不吸附，可再降低盐浓度至几乎近于零，如水中溶有二氧化碳或甘氨酸稀溶液(甘氨酸离子洗脱能力弱)。

(4) 对吸附太牢不易洗脱的物质，可改用交换当量较小的吸附剂，如 0.4 毫克当量/克的 DEAE-纤维素，或具有较弱解离基的吸附剂如 ECTEOLA-纤维素，高分子的核酸因电荷密度大，就常用这类吸附剂。相应的弱解离的阳离子交换剂现在还没有。可用 CM-纤维素在极低 pH(2) 进行。这样就降低了 CM-基的解离度从而降低其吸附容量。

(5) 需要在极低或极高 pH 下进行层析时，在 pH 3.0 以下可用 P-纤维素或 SE-纤维素。在 pH10.0 以上用 GE-纤维素。

(二)离子交换纤维素粒子大小的选择

纤维素粒子的大小主要影响分辨率和流速。粗粒子装柱不够紧密，单位柱体积的吸附容量小，而且间隙

大,容易引起区带分散,所以分辨率低,但流速快。细粒子分辨率高,但缺点是流速慢。要求高分辨率时采用细粒子。要求高速度或阶段洗脱时区带宽一些也没有多大妨碍时则可用粗粒子。另外装柱的规模也有关系,粗粒子不适于装太小的柱(直径1厘米以下),细粒子适于装小柱,甚至直径1毫米的柱也可以。

(三)缓冲液的选择

(1) 选用的pH决定于被分离物质的等电点(见图3),以及稳定性和溶解度。也要根据交换剂解离基团的pK值,用阴离子交换剂要在低于其pK值的范围,用阳离子交换剂时要在高于其pK值的范围(见表1)。

(2) 选用的缓冲液离子,其pK值要接近于所用的pH值,这样有较高的缓冲能力,可避免因缓冲离子与吸附剂相互作用而产生pH改变。否则会出现pH的交错界面,形成假峰。

(3) 缓冲液离子应不影响被分离物的活性或干扰其测定(如测紫外吸收时吡啶巴比妥等有干扰)。应不影响被测物的溶解度,或与一些必要的保护剂(如 Ca^{++} 、 Mg^{++})等生沉淀。被分离物需要制成不含盐的干样品时,以用挥发性缓冲液为宜。

(4) 对于阳离子交换剂应使用阴离子型缓冲液(如磷酸、醋酸等);用阴离子交换剂时应使用阳离子型缓冲液(如Tris、胺盐、吡啶等),以避免缓冲液离子被吸附而发生pH改变。但也有人主张不必一定这样作。例如在使用DEAE-纤维素时使用Tris-磷酸或Tris-琥珀酸都是适宜的,只要预先充分平衡即可。实验中经常监测pH和电导度,如发现波动,下次小心避免之。

(5) 洗脱液离子强度梯度可以用单纯增加缓冲液浓度的办法作成,这样便于控制pH。特别是当并用pH梯度时,由于远离其pK值以致缓冲能力降低时,增加浓度可以提高其缓冲能力。当缓冲剂溶解度有限或价格昂贵或有有害作用时,可加入非缓冲盐,如NaCl, KCl等以提高洗脱能力。

四、操作步骤

(一)离子交换纤维素的处理

(1) 过筛 通过标准筛,取40—100目和100—230目的作层析用。微粒性纤维素粒子比较均匀,可以不过筛直接使用。

(2) 洗涤和浮选除细粒 为了除去杂质和使纤维素溶胀,在使用前应相继用碱和酸洗涤。有的商品说明书指出,DEAE-纤维素用酸—碱,CM-纤维素用碱—酸的顺序洗,其实CM-纤维素的盐形更容易进行下一步的平衡,所以为统一起见,两种均可采用碱—酸—

碱的顺序洗。将干纤维素粉洒在0.5M NaOH溶液中(每克干纤维素粉约15毫升碱液)使自然沉降,浸泡约30分钟,用耐酸漏斗抽滤。如碱液呈黄色,可重复洗至无色。用水充分洗净(用pH试纸试呈中性)。再用0.5M HCl洗,再水洗,再用NaOH洗,最后充分用水洗。碱洗时难过滤,可加NaCl至0.5M。如仍难过滤,可用10倍水稀释,使其沉降,倾去上清液。这样可以同时结合浮选,除去太细的粒子,每次放置一定的时间然后倾去上清液,直到上清液不含细粒为止。

(3) 调节到所需pH 用上述条件的起始缓冲液充分洗涤使达到所要的pH和盐浓度,这样要消耗大量的缓冲液,而且时间长。最好先经过粗调,将交换剂放到起始缓冲液中,在搅拌情况下,用玻璃pH电极测pH,根据pH的变化,用缓冲液中较酸或较碱的成分的浓溶液(0.2M)滴定至所需pH的0.1pH范围内。再用起始缓冲液洗,装柱后再淋洗使充分平衡。

(二)装柱

装柱的方式有加压和重力沉降两种。加压装柱的优点是:装的紧密,分辨率高;柱床体积稳定,洗脱时不会因改变pH和盐浓度而变动;不易“流干”,因纤维素有强吸水性,在压紧时由于毛细管作用可保持表面的水对抗重力作用而不致“流干”;表面平而牢固,便于加样。重力沉降法简单方便,无需加压设备,流速也比较好,但它的缺点比起优点来要严重。微粒性纤维素可以不加压,纤维性的最好用加压装柱。层析柱顶上连接一个耐压的厚壁梨形瓶,其中贮放交换剂悬浮液。梨形瓶的上口连接加压装置(氮气或压缩空气以及调压装置)。将柱按十等分画线。开始加压0.3大气压,沉积床每升高一个刻度则增加0.07大气压,最后达一个大气压,立刻减压。

装柱时的注意事项如下:(1) 交换剂悬浮液的浓度要适当,细粒子可以浓一些,加抽滤滤饼体积一半的缓冲液即可。粗粒子要稀一些,太粗的粒子一克干重悬浮于50—100毫升中。(2) 装柱时不时摇动梨形瓶使悬浮液均匀。(3) 注意沉积表面要平,不平应重装。(4) 柱中不要混入气泡,可放在抽滤瓶中减压除气泡。如层析在低温进行,则可于室温装柱,然后用贮藏在室温的缓冲液拿到低温室去淋洗柱,气泡即溶解在缓冲液中。(5) 装柱后必须用起始缓冲液充分淋洗,使床体积稳定并充分平衡使与起始缓冲液有相同的pH及电导度为止。

(三)加样

1. 加样量 加样量的多少随实验目的不同和样品中目的物的浓度及其亲合力不同而有以下几种情况:当目的物在混合物中的含量极低,而且是其中被吸附最紧密的,为了浓缩富集,可以将几倍于柱床体积的样

品通过柱,直到该成分饱和为止。然后洗脱得到富集物。当要求高分辨率时,加样时紧密吸附的区带不要超过床体积的10%。有色蛋白质可以直接看到,无色蛋白质则根据其吸附容量来计算。一般可用蛋白质:纤维素 = 1:10 的比例作初步试验。核酸的吸附容量仅为蛋白质的1/100,可能是由于空间障碍。所以每克干交换剂只能加样1毫克。小分子量物质亲和力低,多不能形成紧密的区带,加样量要少,体积要小。阶段洗脱时加样量可以相当大,因为解吸和再吸附过程是不重要的,但紧密吸附的区带也不应超过床体积的一半。

2. 样品的准备 样品应与起始缓冲液有相同的pH和离子强度,可用透析、凝胶过滤或稀释法处理。透析用1/4吋的透析袋对20倍体积的起始缓冲液透析过夜,换一次缓冲液再透析6小时,透析时内外液均应不时搅动。凝胶过滤可用交联葡聚糖* G-25或G-50,先用起始缓冲液平衡,然后加样(不超过床体积的20%),再用起始缓冲液洗脱。蛋白质在一个空体积(V_0 ,约相当1/3总体积)流出,盐在一个总体积流出,分别收集之。如洗脱液的前一部分分辨率要求不高,则以用稀释法较为方便。先将样品调至所需pH,再加水稀释至与起始缓冲液有相同的电导度。加样的体积一般关系不大。例如0.3克牛血清清蛋白在适宜条件下上柱,溶于500毫升中和溶于1毫升中上柱,洗脱结果基本相同。此外样品应澄清,离心除去不溶物。

3. 加样方法 打开柱流出口,排除床表面缓冲液,关闭出口,用移液管加样,其前端接触内壁在离床表面数毫米处,随加随沿柱内壁转动一周,然后速移至中心,使样品尽快均匀分布于全表面。再打开出口,继续加样,待样品进入床内,以少量水(0.5—1毫升)冲洗内壁数次,加满缓冲液,连接缓冲液贮槽。如加样时表面破坏,可用玻璃棒搅起数毫米的交换剂,使其自然沉降平整为止。

(四)洗脱

加样后要用足够量的起始缓冲液淋洗,使未吸附的物质洗出,并使充分平衡,特别是用稀释法处理样品时此步更为必需。然后进行梯度洗脱。因洗脱装置不同又可分为直线梯度、凸形梯度和凹形梯度三种^[13]。见图4及其说明。

图5的恒容梯度混合器比较简单。由混合瓶中流出多少溶液则由上限缓冲液瓶中补充进多少溶液。这是一种凸形梯度。为了使流速恒定可采用恒流泵。简单的办法是用马氏瓶保持恒定的液柱静压。如采用如图4中的梯度混合器时,应将两容器上口均密闭并互相连通,于上限贮瓶中装一根马氏管即可。有时需要很复杂的梯度,可采用“Varigrad”^[14]或其他自动梯度混合器。

(五)洗脱液的分析

洗脱液分别收集于试管,一般总体积为500—2000毫升时每管收集5—10毫升或15毫升。测定每管的

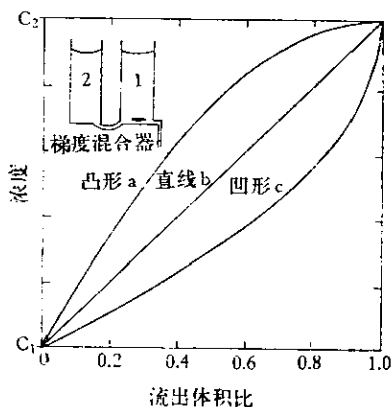


图4 梯度混合器流出浓度

$C = C_2 - (C_2 - C_1)(1 - V)^{A_2/A_1}$
 $a, A_2 = 2A_1, b, A_2 = A_1, c, 2A_2 = A_1$;
 A_1, A_2 分别代表容器1, 2的横截面积, C_1, C_2 分别代表容器1, 2中的溶液浓度, V 为流出体积对总体积的比。

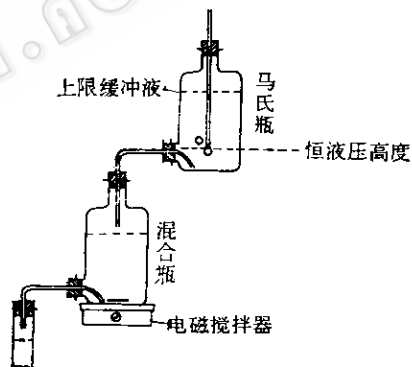


图5 恒容梯度混合器及马氏瓶

蛋白质含量及酶活力(或其他生物活力)。为了检查层析的效果并确定各峰的位置,最好测定pH及电导度。

测定蛋白质常用的方法有紫外吸收法(280毫微米),简单方便而且不破坏样品,还可以用流动式监测器更为方便。但需要较贵的设备,而且灵敏度不够高。Lowry法比紫外吸收法灵敏约10倍。已沿用了几十年。最近报道有些灵敏度较高的方法。如使蛋白质与铜生成复合物,再利用铜的催化作用使酚与氯胺-T生成颜色^[15],灵敏度比Lowry法高500倍,可测定0.01—0.2微克的蛋白质。但操作复杂。又如利用一种新的荧光试剂(fluorescamine)与蛋白质中的氨基作用发

* 天津工农兵食品厂, 上海生化所东风厂, 上海长征药厂均有产品。

荧光,可测定0.5—50微克的蛋白质。并已用于酶纯化时的监测^[14]。

(六)洗脱成分纯度的鉴定

最常用的方法是聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳。它的分辨率比离子交换层析要高。当洗脱图谱中峰形不规则、不对称或拖尾时,要在峰的不同位置选出几管进行电泳。如出现多区带,或峰首峰尾成分的电泳迁移率不同,则证明该峰是不均一的。当分子具有微异质性时,有时层析峰相当对称,但用凝胶电泳可查出其异质性。

另外一些方法有免疫电泳,等电聚焦电泳等。最近报道一种较灵敏的免疫芯电泳^[15],即在盘状电泳的小管中心先加一根细玻璃棒,电泳后取出,充以含抗体的琼脂凝胶,免疫扩散在芯部进行故称免疫芯电泳。

(七)再层析

为了进一步提纯常需要再层析。此外当怀疑各峰是否真正的层析性质不同的实体还是矫作物时亦应进行再层析。如再层析时峰出现在与第一次层析的同样位置,则为真正的层析实体。当一个峰拖得较长时,可将峰首峰尾分别再层析,如分别出现在相当原来的位置,则为不同物质,如出现在同一位置且与一次层析相同,则是一个物质只是拖得较长。再层析时有时发生峰位置的改变,是由于操作过程中蛋白质发生变化所引起的。如复合物的拆开,结合为复合物或多聚体,部分水解(如酰胺基),部分变性,氧化为新物质等,这些都应密切注意。

(八)浓缩

层析之后样品会稀释很多倍,将同一组份汇集后要经过浓缩。常用的方法如下:

1. 离子交换柱浓缩法 将稀溶液大量地通过离子交换纤维素(或离子交换交联葡聚糖)柱,直到饱和,然后用较强的洗脱液一次洗脱。一般可浓缩100倍。
2. 超滤 用适当的超滤膜(截留分子量在10,000以上)及超滤装置可将蛋白质留在膜上,水分及盐滤出。是一种方便有效的浓缩方法。
3. 吸水剂处理 用干的交联葡聚糖凝胶G-25或

G-50直接放入溶液中,待吸足水分后过滤或离心除去凝胶。为了避免凝胶中带走蛋白质而造成损失,可用篮式离心机,小量时可在普通离心管上装个尼龙网袋,离心后凝胶留在网内,溶液在离心管中。用G-200放在透析袋内,然后放在溶液中,它可吸本身干重的15—20倍水,但时间要长。用干的聚丙烯酰胺凝胶棒或片直接放入溶液中,吸水后用镊子取出,损失较小。对高分子聚合物如聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮的浓溶液透析的方法,浓缩快,缺点是有时小分子物质污染蛋白质,要用纯度高的试剂才行。

参 考 资 料

- [1] E. A. Peterson and H. A. Sober, J. Am. Chem. Soc., 78:751, 1956.
- [2] H. A. Sober et al., J. Am. Chem. Soc., 78:756, 1956.
- [3] V. C. Weaver, Chromatographia, 2(12):555, 1969.
- [4] J. Porath et al., J. Chromatog., 60:167, 1971.
- [5] J. Porath, Biotechnol. & Bioeng. Symp., No. 3, 145—166, 1972.
- [6] H. A. Sober and E. A. Peterson, Fed. Proc., 17:1116, 1958.
- [7] E. A. Peterson and H. A. Sober, in "Methods in Enzymology", Vol. 5, P3, 1962.
- [8] S. R. Himmelhoeh, in "Methods in Enzymology", Vol. 22, P273, 1971.
- [9] E. A. Peterson, in T. S. Work and E. Work (eds) "Laboratory Technique in Biochemistry and Molecular Biology", Vol. 2, P228, 1970.
- [10] R. L. Munier, in C. Nicolau (ed.) "Experimental methods in Biophysical Chemistry", Chnp. 6, 1973.
- [11] 姚乾元、陈雪 化学通报 1963 (4), 218.
- [12] 蛋白质核酸酵素 18 (3—13): 商品介绍 1973.
- [13] R. M. Boek and N. S. Ling, Anal. Chem., 26:1543, 1954.
- [14] E. A. Peterson and H. A. Sober, Anal. Chem., 31:857, 1959.
- [15] M. L. Goldberg, Anal. Biochem., 51:240, 1973.
- [16] P. Bohen et al., Arch. Biochem. Biophys., 155:213, 1973.
- [17] R. A. Zeineh et al., Biochim. Biophys. Acta, 315:1, 1973.