

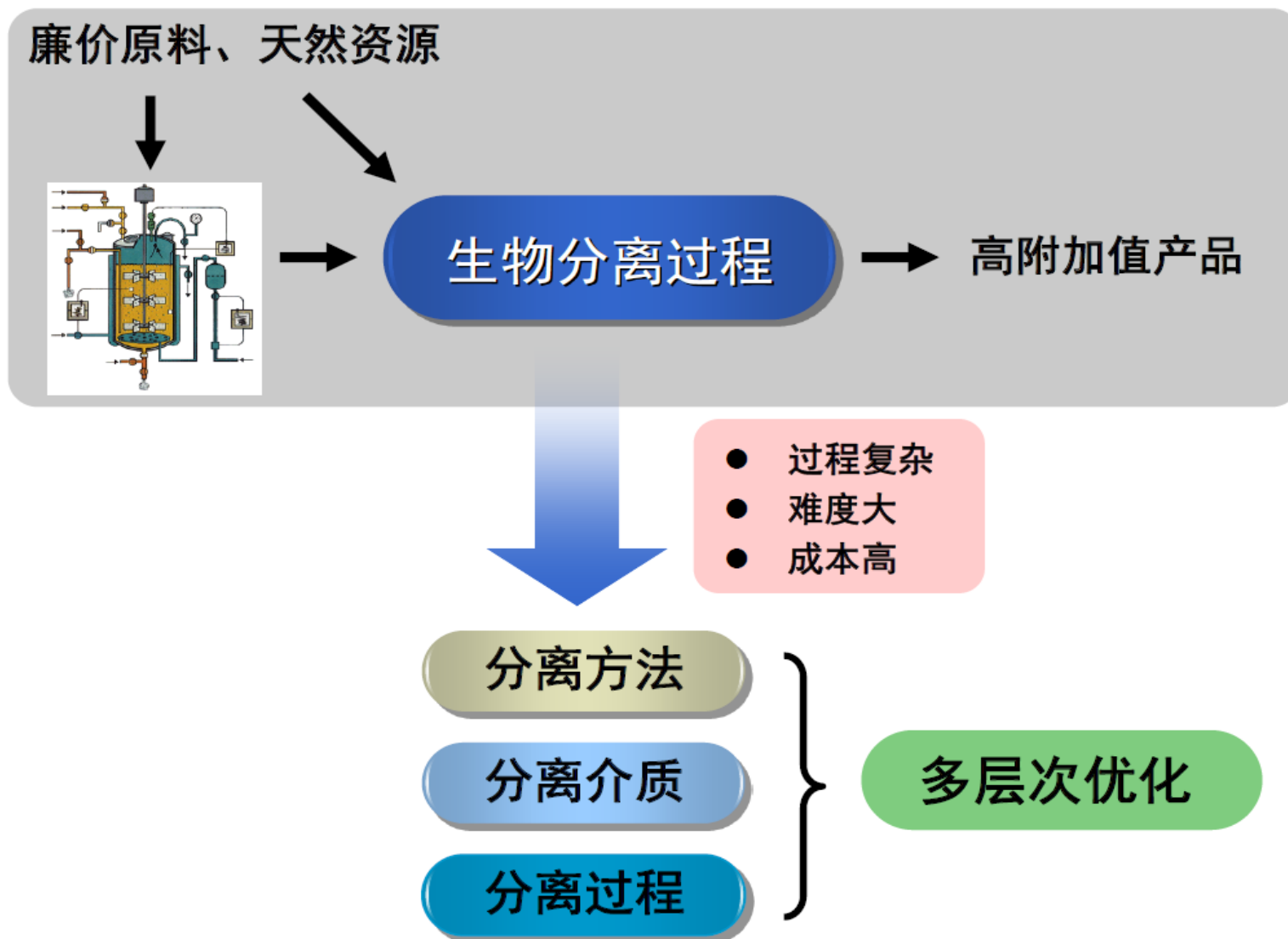
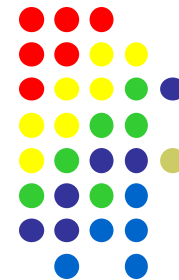
4.1 吸附层析

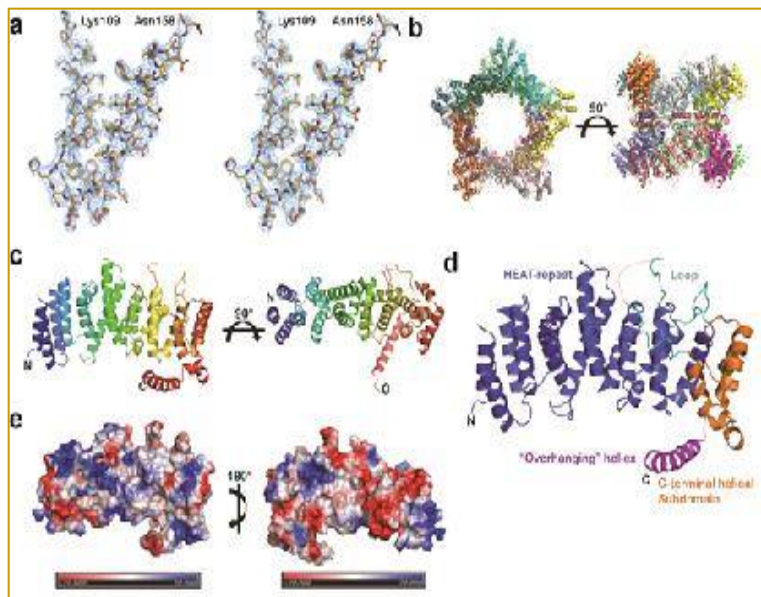
4.2 分配层析

4.3 亲和层析

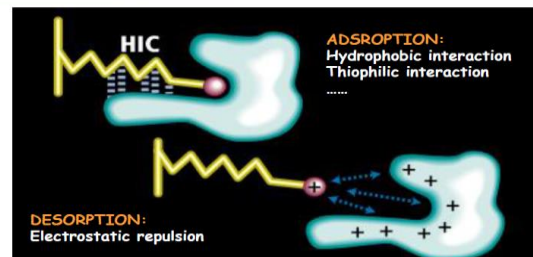
4.4 凝胶层析

5.4 实验技术





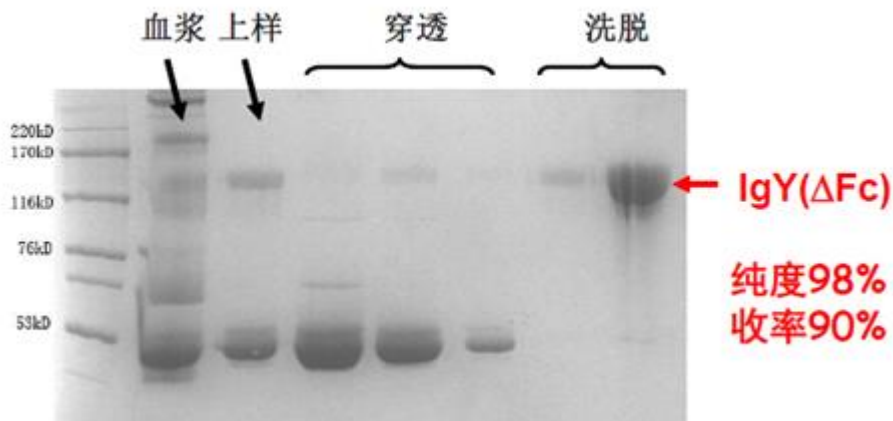
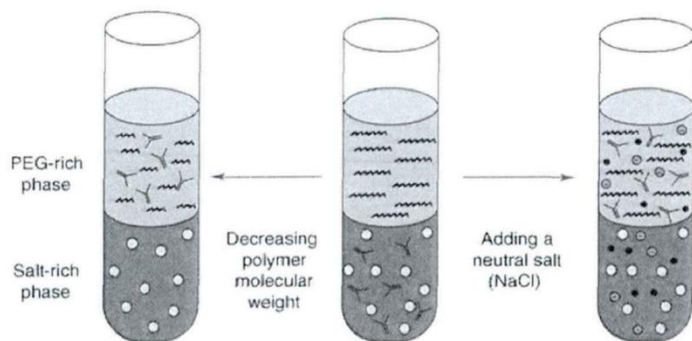
混合模式层析

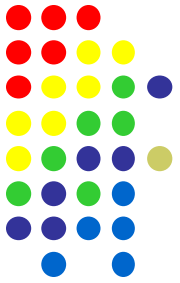


小分子配基

- 可设计
- 化学稳定
- 不易泄漏
- 易于清洗

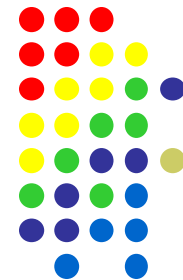
- 混合模式配基
- 兼有疏水和静电等多种相互作用
- 配基密度高
- 吸附容量大
- 非盐依赖吸附
- 调节pH, 利用静电排斥协助洗脱





4.4 凝胶层析

Gel chromatography



- **凝胶层析 (gel chromatography) :**

分子筛层析

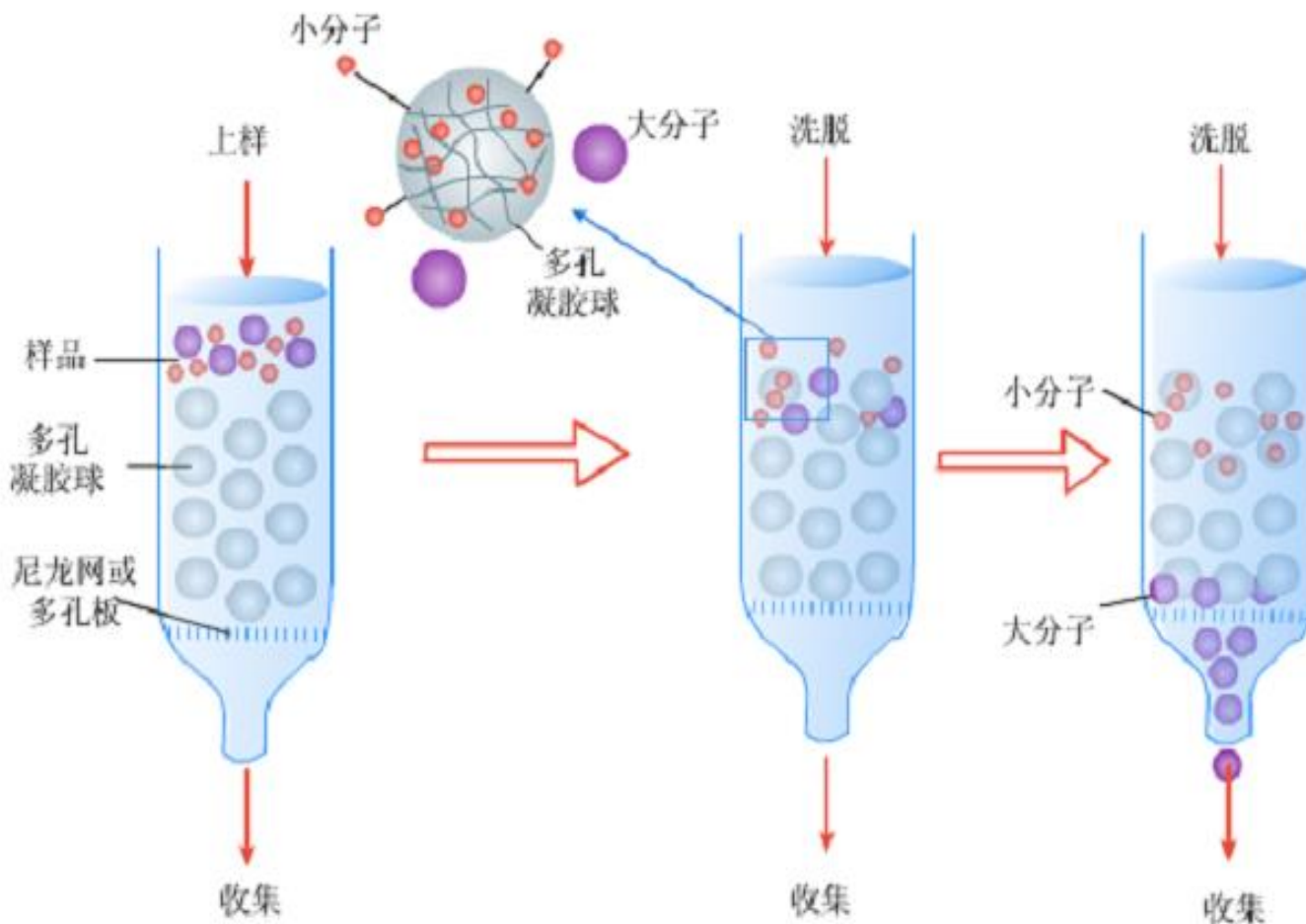
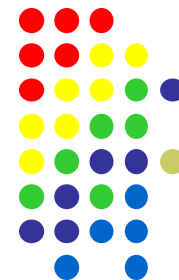
分子排阻层析

凝胶过滤

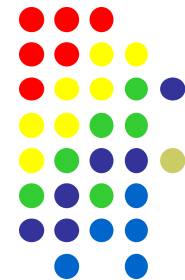
凝胶色谱

混合物随流动相经过凝胶层析柱时，由于各组分**流经体积**的差异，使**不同分子量**的组分得以分离的层析方法。

4.4.1 凝胶层析的基本原理



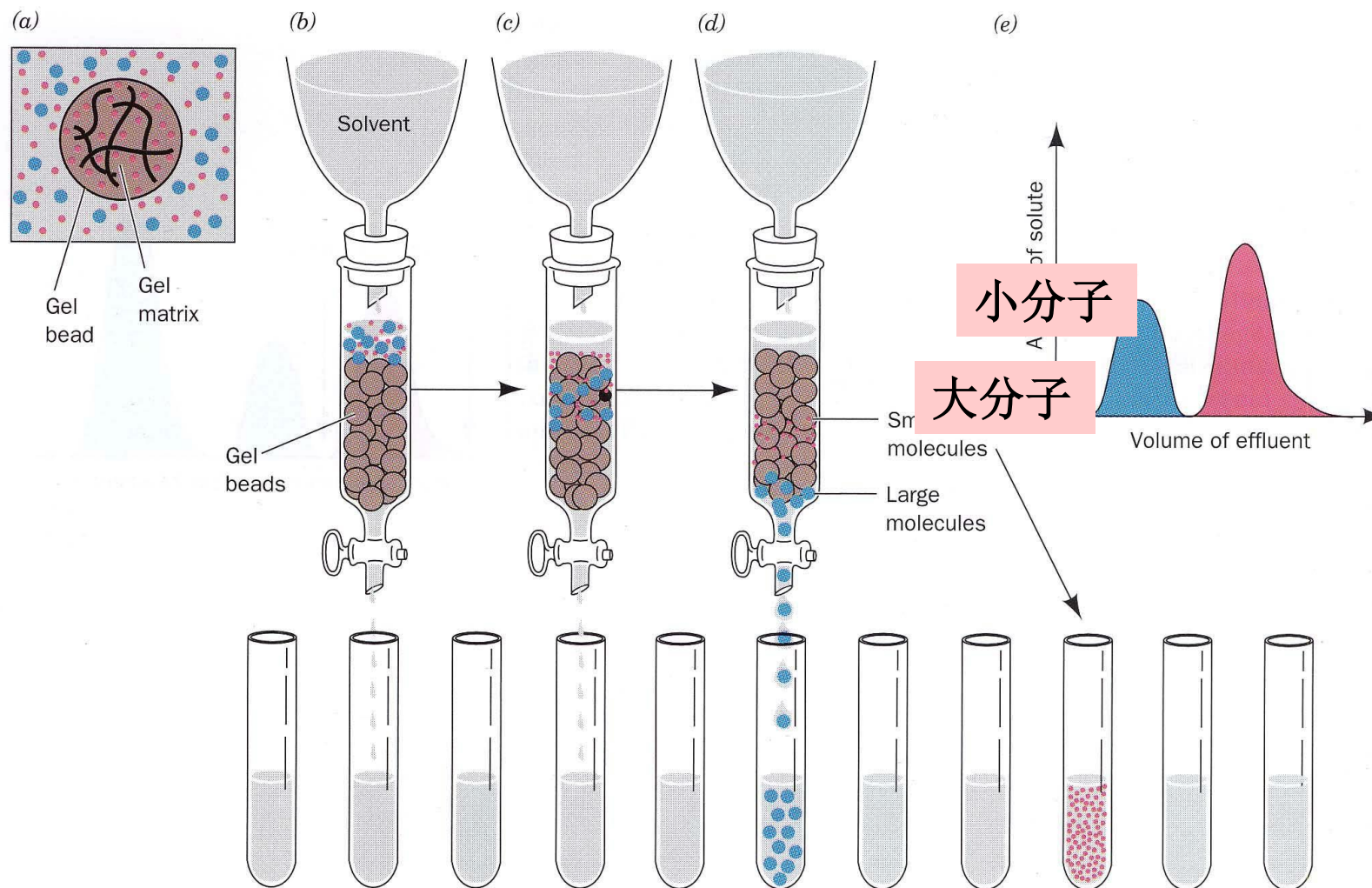
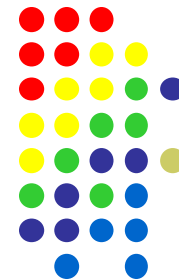
凝胶过滤

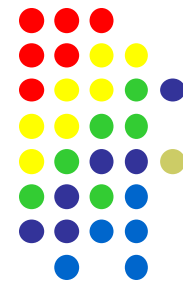


4.4.1 凝胶层析的基本原理

- ◆ **比孔穴孔径大的分子**不能扩散到孔穴内部，完全被排阻在孔外，只能在凝胶颗粒外的空间随流动相向下流动，它们经历的流程短，流动速度快，所以首先流出；
- ◆ **较小的分子**则可以完全渗透进入凝胶颗粒内部，经历的流程长，流动速度慢，所以最后流出；
- ◆ **分子大小介于二者之间的分子**在流动中部分渗透，渗透的程度取决于它们分子的大小，所以它们流出的时间介于二者之间。

4. 4. 1 凝胶层析的基本原理

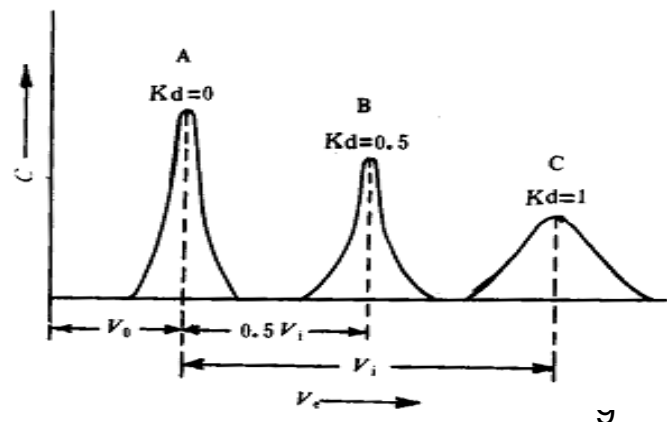
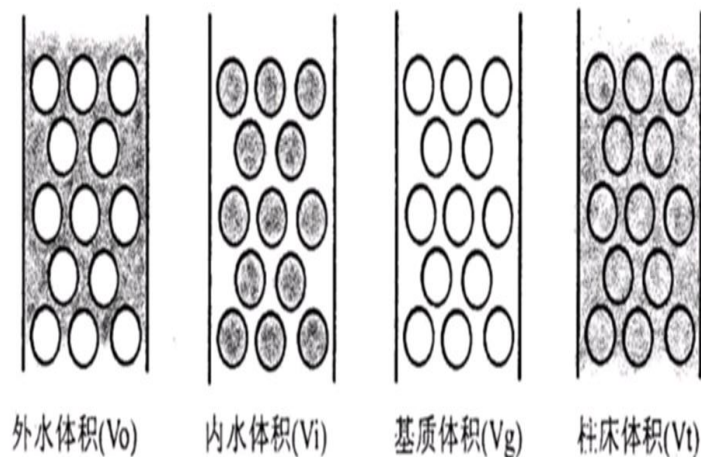


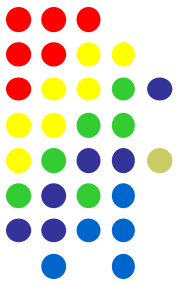


4.4.1 凝胶层析的基本原理

排阻系数： $K_d = \frac{V_e - V_0}{V_i}$

- 当 $K_d=1$ 时，洗脱体积 $V_e = V_0 + V_i$ ，**全渗入**。
- 当 $K_d=0$ 时，洗脱体积 $V_e = V_0$ ，**全排阻**。
- $0 < K_d < 1$ 时，洗脱体积 $V_e = V_0 + K_d V_i$ ，**部分渗入**。





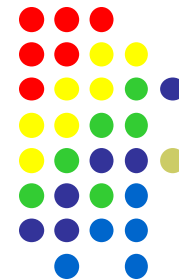
得水率：

1g凝胶吸收水的克数称为得水率。

如：

Sephadex G-X，数字表示凝胶的得水率乘以10；

1g Sephadex G-100干凝胶膨化时能吸收10g水。



排阻极限：

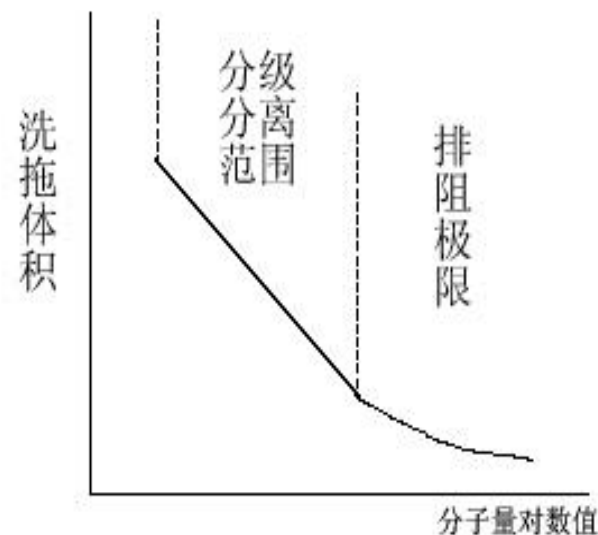
分子量进入上限

渗入限：

分子量进入下限

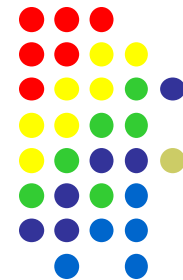
分级分离范围：

使溶质分子在某种凝胶上得到理想的线性分离的范围。



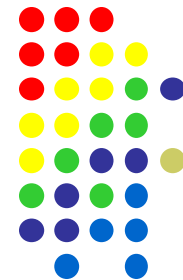
如：葡聚糖凝胶Sephadex G-75，排阻限度,70,000道尔顿

Sephadex G-50，分级分离范围为1500-30,000道尔顿



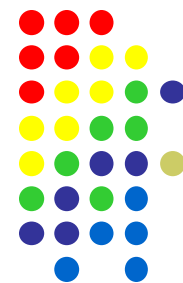
凝胶层析的特点

- (1) 凝胶层析操作简便，所需设备简单。**
- (2) 分离效果较好，重复性高。**
- (3) 分离条件缓和。**
- (4) 应用广泛。**
- (5) 分辨率不高，分离操作较慢。**



4. 4. 2 凝胶的结构和性质

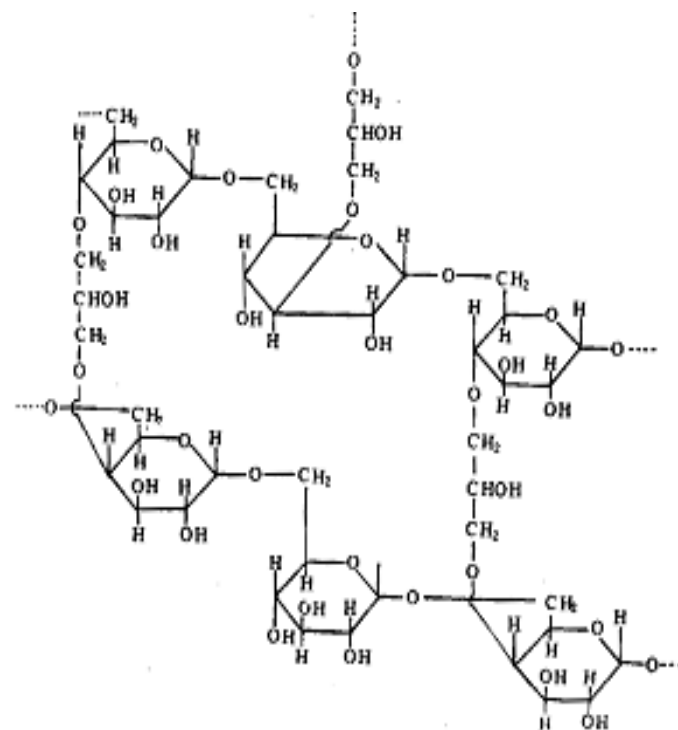
- (1) **葡聚糖凝胶** (Sephadex)
- (2) **修饰葡聚糖凝胶** (Modified Sephadex)
- (3) **聚丙烯酰胺凝胶** (Bio-Gel P)
- (4) **琼脂糖类凝胶** (Sephарose)
- (5) **疏水性凝胶** (hydrophobic gels)

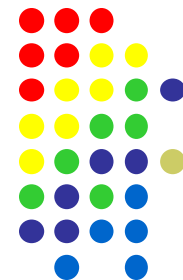


4.4.2 凝胶的结构和性质

(1) 葡聚糖凝胶 (Sephadex G)

- 基本骨架是葡聚糖，再经3-氯-1, 2-环氧丙烷为交联剂，形成三维网状结构的高分子化合物。
- **交联度**越大，网孔越小，吸水膨胀就越小。



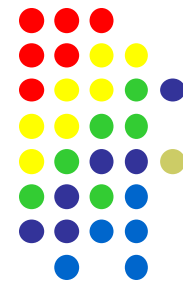


4.4.2 凝胶的结构和性质

葡聚糖凝胶性能与编号的关系 (G-X)

编号	交联度	吸液量	膨胀速度	凝胶孔径	分离限	凝胶强度
Sephadex G-150	小	大	快	大	大	小
Sephadex G-50	大	小	慢	小	小	大

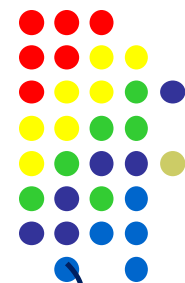
G类葡聚糖凝胶常用**G-X**代表，X数字既代表交联度，也代表持水量。



4.4.2 凝胶的结构和性质

葡聚糖凝胶性质与特点

- ◆ Sephadex在水、盐、碱、弱酸以及有机溶液中稳定
- ◆ 稳定工作pH为2—10
- ◆ 可煮沸消毒100° C下40 min。
- ◆ 含羟基呈弱酸性，可与分离物中的一些带电基团发生吸附作用。离子强度大于0.05的条件下可忽略。
- ◆ 颗粒大小（粗、中、细、超细）可选择；
- ◆ 机械稳定性相对较差，不耐压。



4.4.2 凝胶的结构和性质

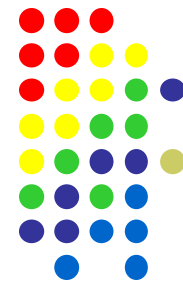
(2) 修饰葡聚糖凝胶 (Modified Sephadex)

- 亲脂性葡聚糖凝胶 (Lipophilic Sephadex)

骨架结构上引入一些有机基团，如甲基、羟丙基，使呈亲脂性，同时保留亲水性。

- 葡聚糖凝胶离子交换剂

引入一些酸性或碱性基团，具有离子交换和分子筛双重作用。磺乙基 (SE-Sephadex)、羧甲基 (CM-Sephadex)、二乙胺基乙基 (DEAE-Sephadex A)



4.4.2 凝胶的结构和性质

(2) 修饰葡聚糖凝胶 (Modified Sephadex)

- Supperdex系凝胶

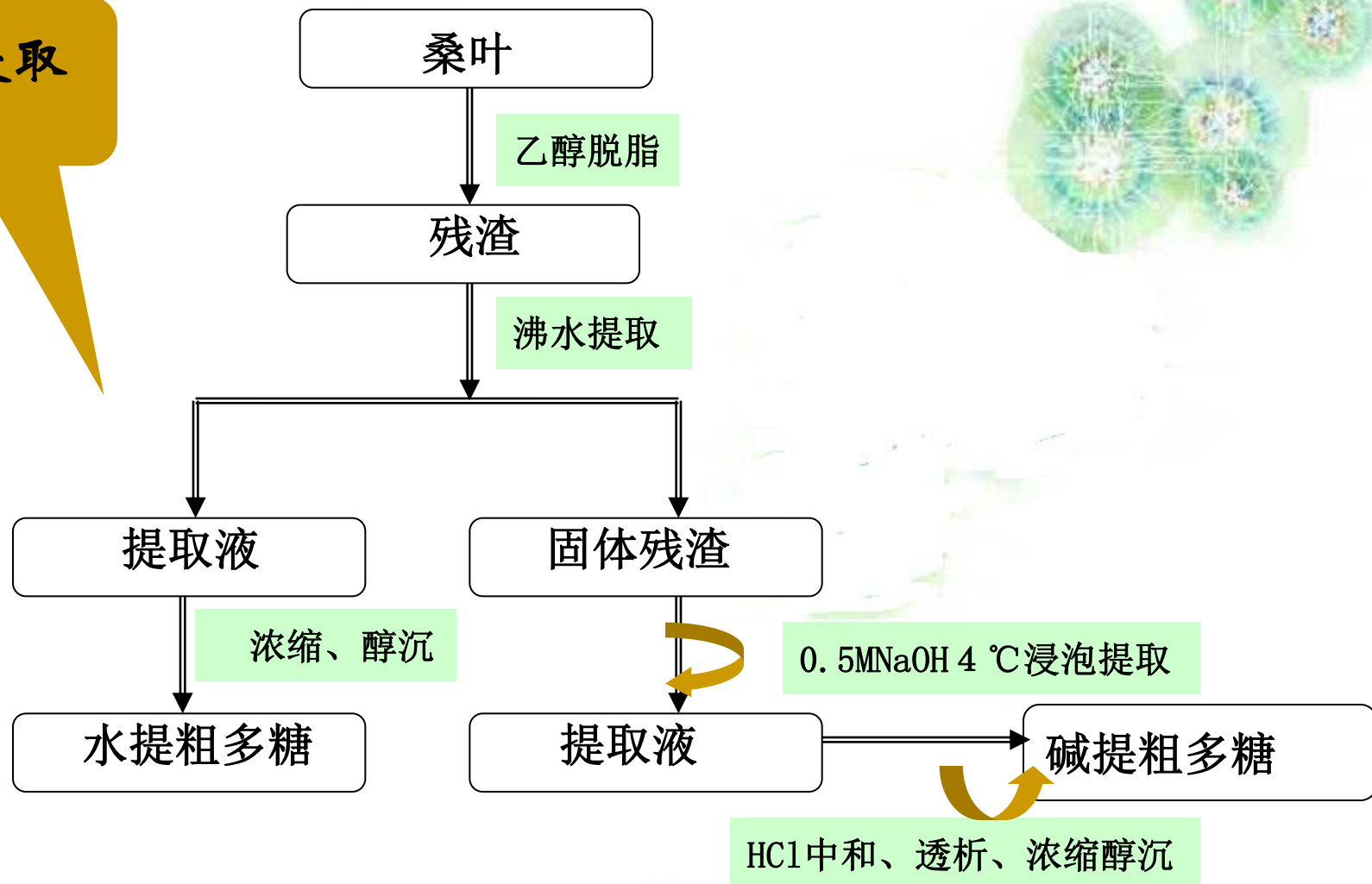
高交联度多孔琼脂糖与葡聚糖共价结合而成。

- Sephacryl系凝胶

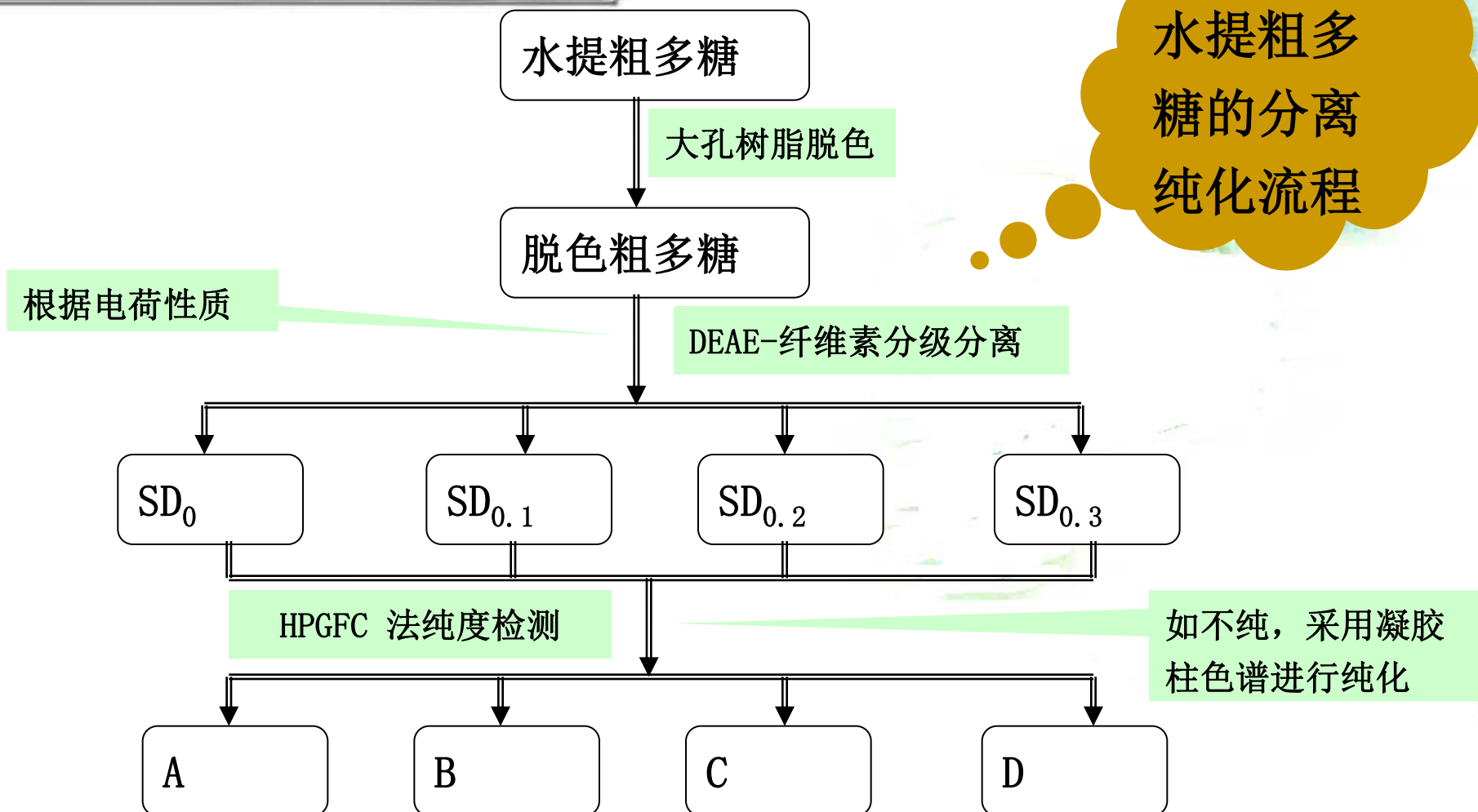
烯丙烷基葡聚糖经双丙烯酰胺共价交联制成。

理化稳定性好，为硬性凝胶，可耐高压灭菌。

桑叶的提取流程

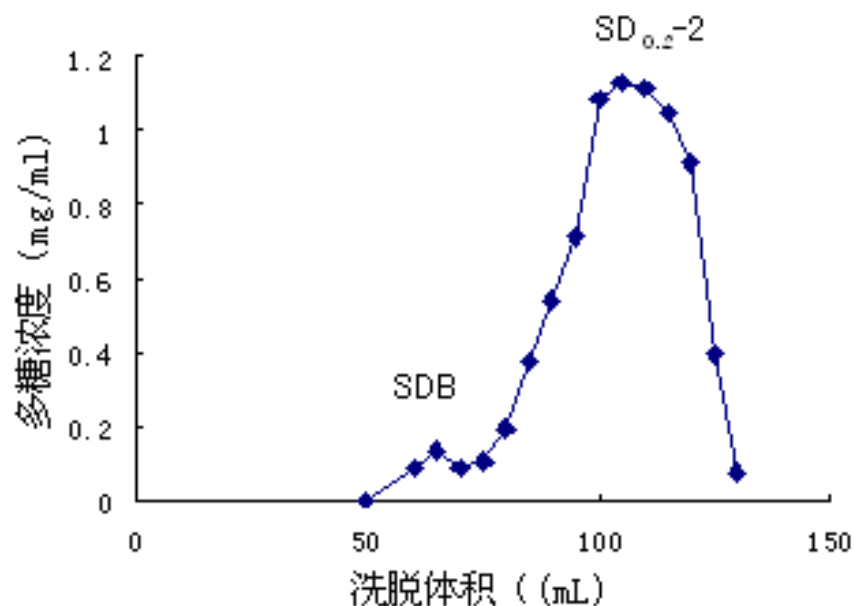


水提粗多糖的分离纯化流程



3) $SD_{0.2}$ 的凝胶过滤柱色谱分离

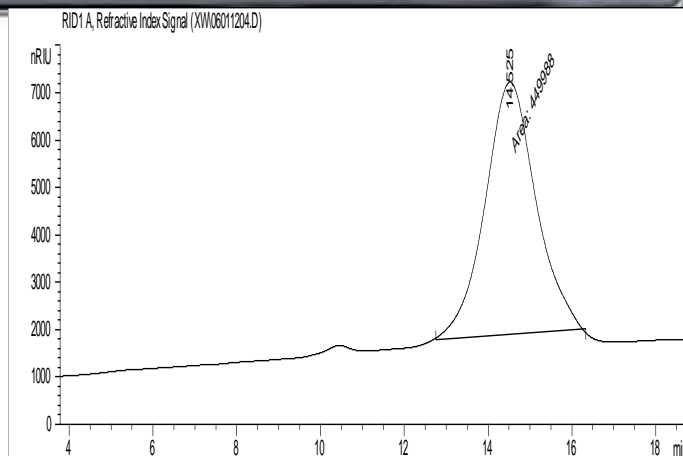
选择Sephacryl S-200凝胶介质进行分离，其分离范围为： $1 \times 10^3 \sim 8 \times 10^4$



$SD_{0.2}$ 经过Sephacryl S-200柱色谱分离得到SDB和 $SD_{0.2-2}$ 两个部分

图2.12 $SD_{0.2}$ 在Sephacryl S-200凝胶层析介质上的洗脱曲线

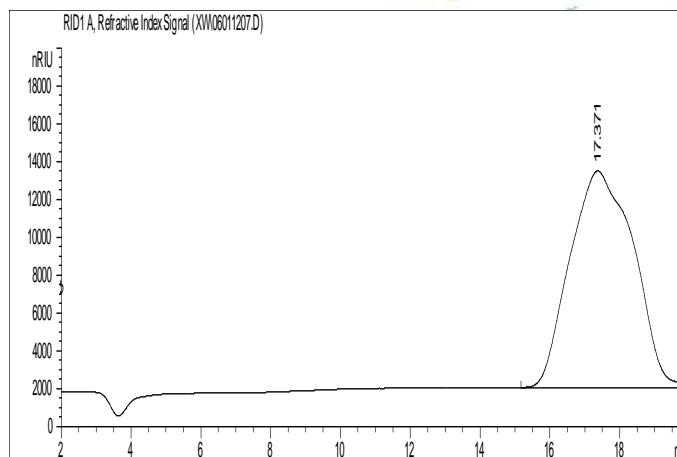




SDB重均分子量 $M_w=8.9 \times 10^4$,
 数均分子量 $M_n=7.5 \times 10^4$, 分散
 度 $D=1.18$

图2.13 SDB 的凝胶过滤色谱图

SDB为均
一多糖

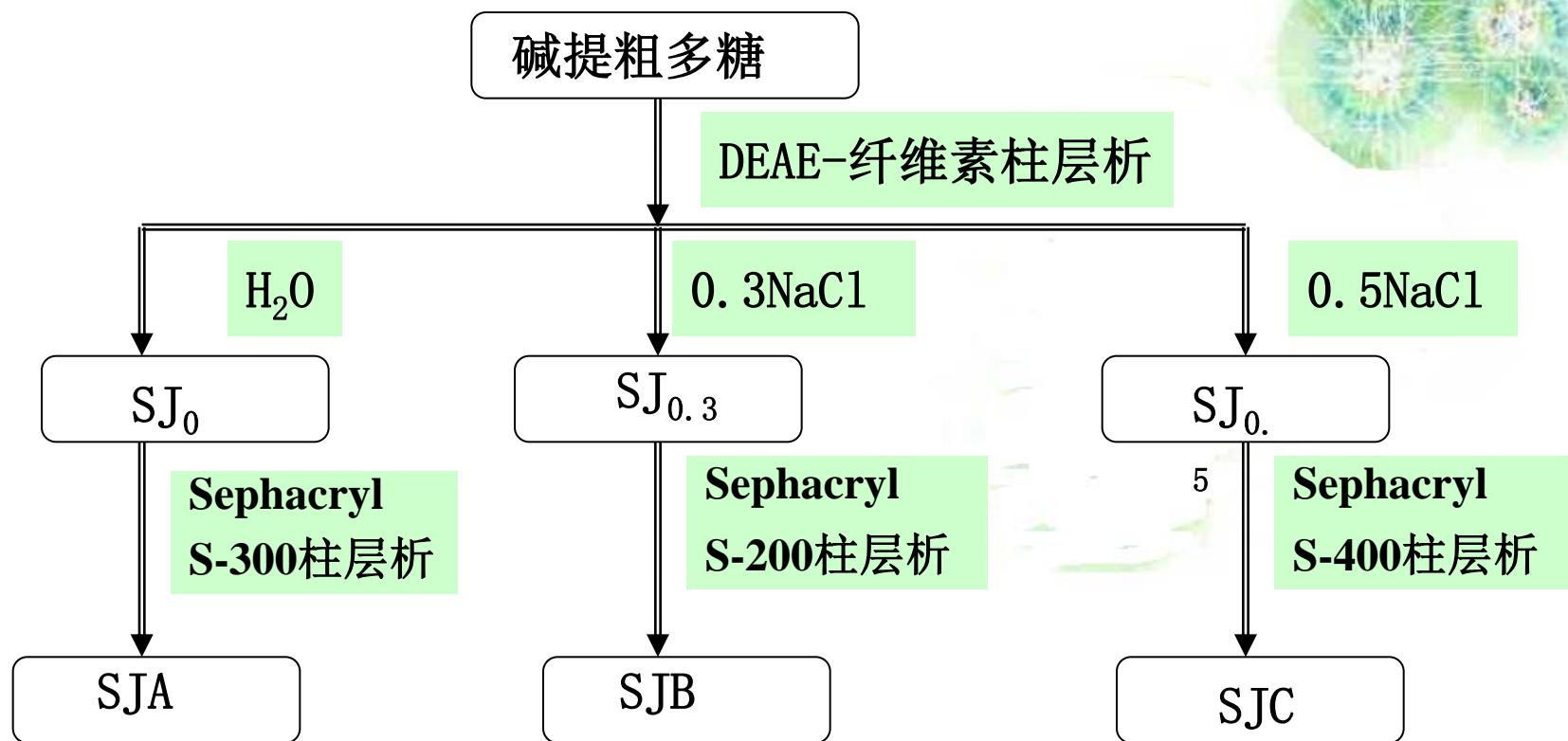


SD_{0.2-2}
不纯

图2.14 SD_{0.2-2}的凝胶过滤色谱图



2. 桑叶碱提粗多糖的分级分离



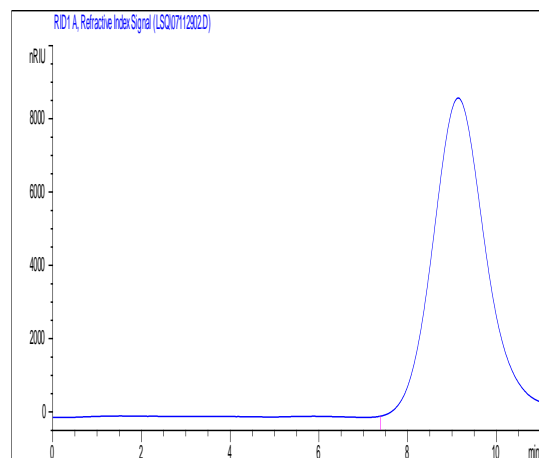


图2. 18 SJA的凝胶色谱图

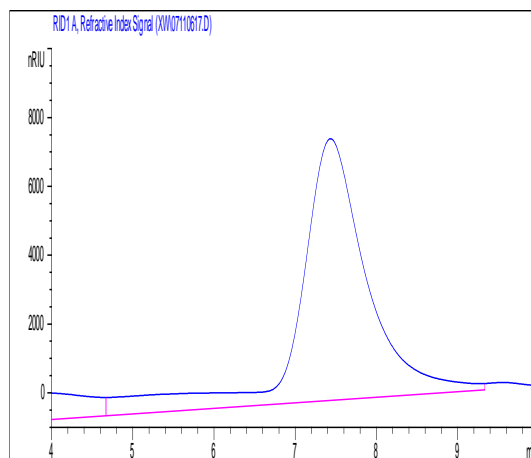


图2. 19 SJB的凝胶色谱图

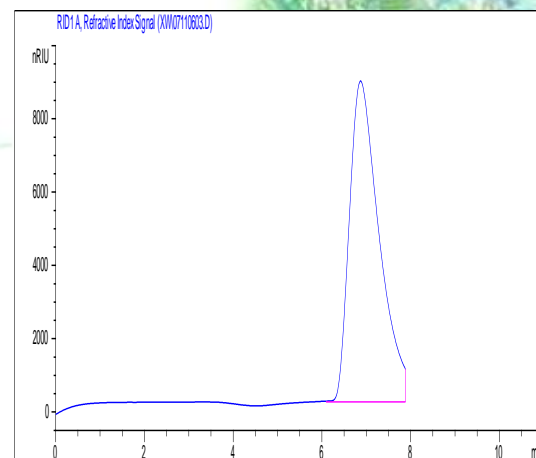
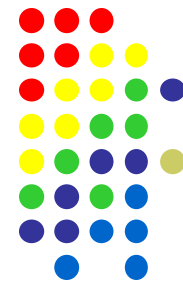


图2. 20 SJC的凝胶色谱图

**SJA的重均分子量 $M_w=1.1 \times 10^5$ ，数均分子量 $M_n=9.2 \times 10^4$ ；
SJB的重均分子量 $M_w=5.4 \times 10^4$ ，数均分子量 $M_n=4.5 \times 10^4$ ；
SJC的重均分子量 $M_w=1.2 \times 10^6$ ，数均分子量 $M_n=8.9 \times 10^5$**



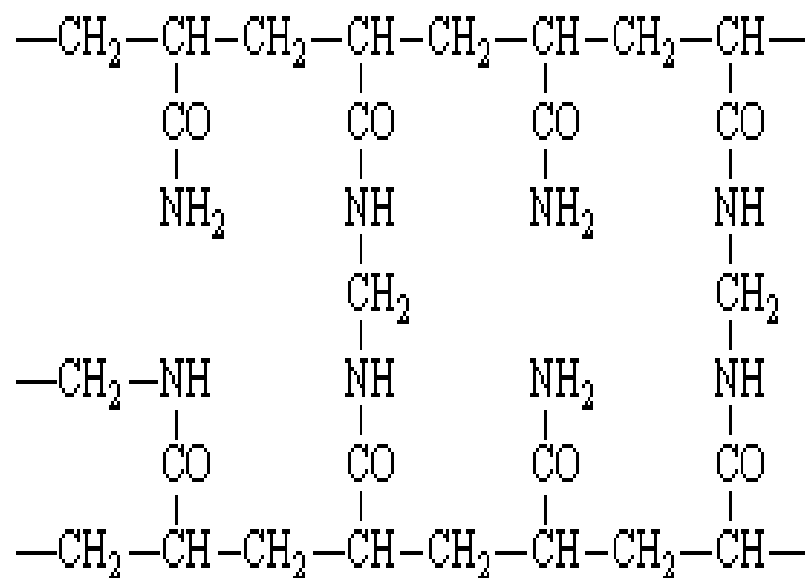


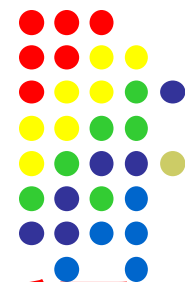
4.4.2 凝胶的结构和性质

(3) 聚丙烯酰胺凝胶 (Bio-Gel P)

- 由**丙烯酰胺**，以**亚甲基双丙烯酰胺**为**交联剂**聚合而成。只要控制单体用量和交联剂的比例，就能得到不同型号的凝胶。

- 特点：
 - 孔径**；
 - 稳定性、强度；
 - 无非特异吸附，保存方便；
 - 编号反映出它的分离界限**。

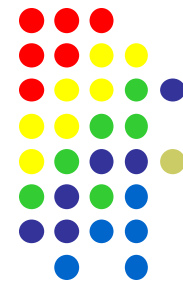




4.4.2 凝胶的结构和性质

分成10种类型：Bio-Gel P-2至Bio-Gel P-300。**P后面的阿拉伯数字乘以1000即相当于排阻限度（按球蛋白或肽计算）。**

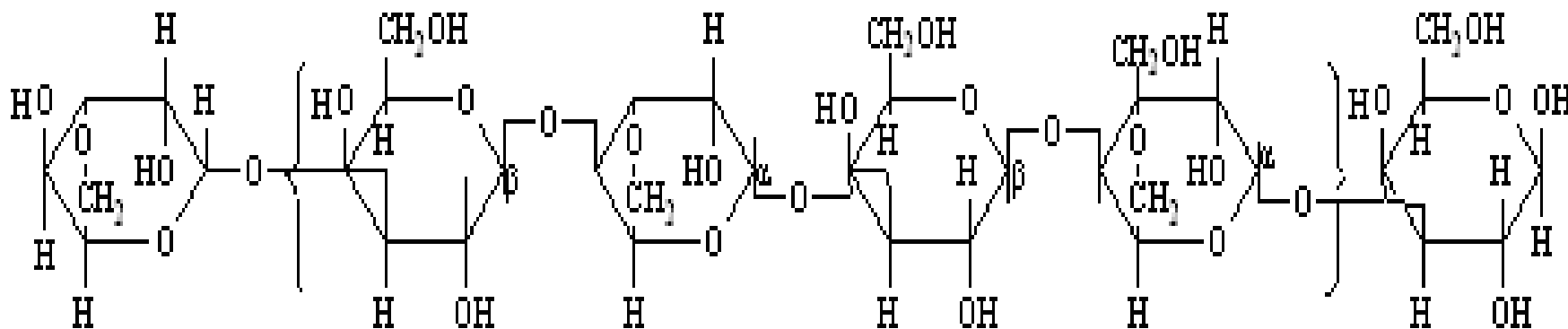
生物胶	吸水量 (ml/g 干凝胶)	膨胀体积 (ml/g 干凝胶)	分离范围 (分子量)	溶胀量间 (h)	
				20℃	100℃
P-2	1.5	3.0	100~1 800	4	2
P-4	2.4	4.8	800~4 000	4	2
P-6	3.7	7.4	1 000~6 000	4	2
P-10	4.5	9.0	1 500~20 000	4	2
P-30	5.7	11.4	2 500~40 000	12	3
P-60	7.2	14.4	10 000~60 000	12	3
P-100	7.5	15.0	5 000~100 000	24	5
P-150	9.2	18.4	15 000~150 000	24	5
P-200	14.7	29.4	30 000~200 000	48	5
P-300	18.0	36.0	60 000~400 000	48	5

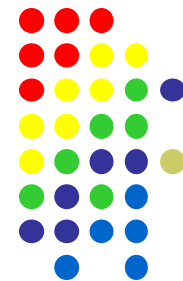


4.4.2 凝胶的结构和性质

(4) 琼脂糖类凝胶 (Sephrose)

- 由 **β -D-半乳糖**与**3, 6-脱水-L-半乳糖**以 **α -1, 3-**和 **β -1, 4-糖苷键**相间连接而成的链状分子。

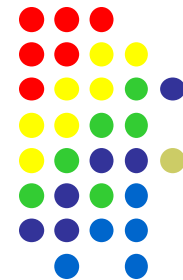




4.4.2 凝胶的结构和性质

琼脂糖凝胶特点：

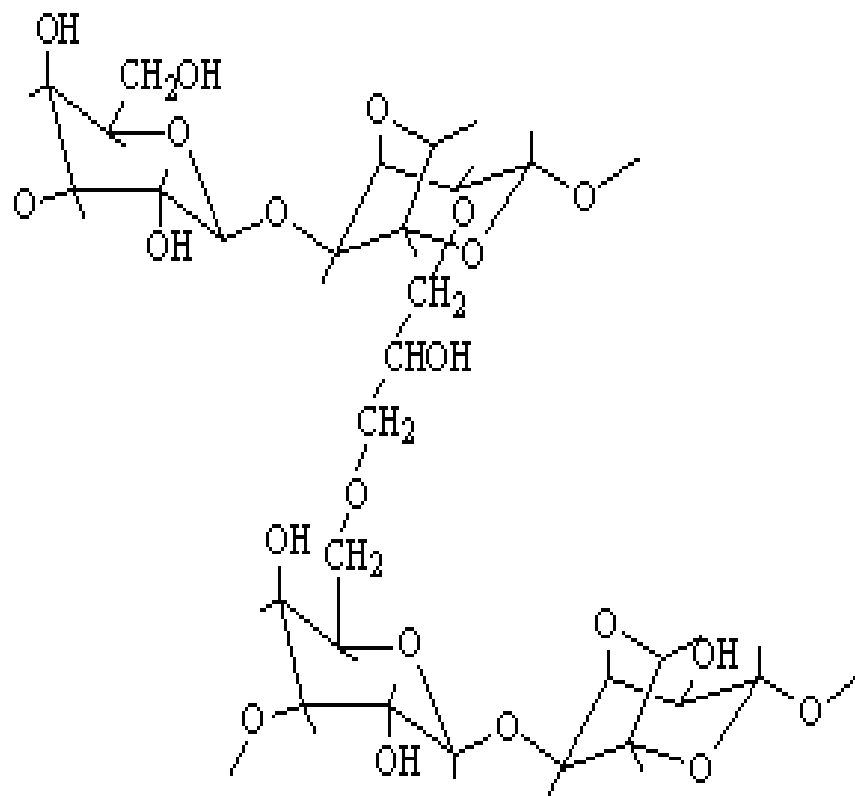
- 1、没有共价键的交联
- 2、孔径依赖于琼脂糖的浓度
- 3、化学稳定性较差：**pH 4~9之间，温度0~40℃；**
- 4、非特异性吸附力低
- 5、分离范围大
- 6、颗粒强度差
- 7、保存：**湿态保存**

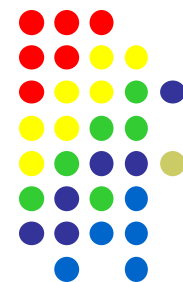


4.4.2 凝胶的结构和性质

架桥琼脂糖凝胶 (Sephacrose CL)

- 琼脂线性分子经
1, 3-二溴丙醇交联
- 孔径均匀, **机械强度**大。
- 对热和化学物质的
稳定性好, pH3~14范
围内稳定。



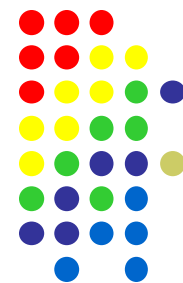
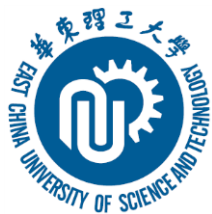


4.4.2 凝胶的结构和性质

超胶 (Utro-gel ACA)

- 琼脂糖与聚丙烯酰胺的混合凝胶。
- 商品名称后面的编号为两位数，各表示混合胶中聚丙烯酰胺与琼脂糖的百分浓度。

超胶的种类	丙烯酰胺 %	琼脂糖 %	膨润粒子的大小 (μm)	球状蛋白质的分离范围 (分子量)	最大流速* $\text{ml}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$
ACA 22	2	2	60~140	100 000~1200 000	3.5
ACA 34	3	4	60~140	20 000~350 000	10
ACA 44	4	4	60~140	10 000~130 000	18
ACA 54	5	4	60~140	5 000~70 000	18



4. 4. 2 凝胶的结构和性质

(5) 疏水性凝胶 (hydrophobic gels)

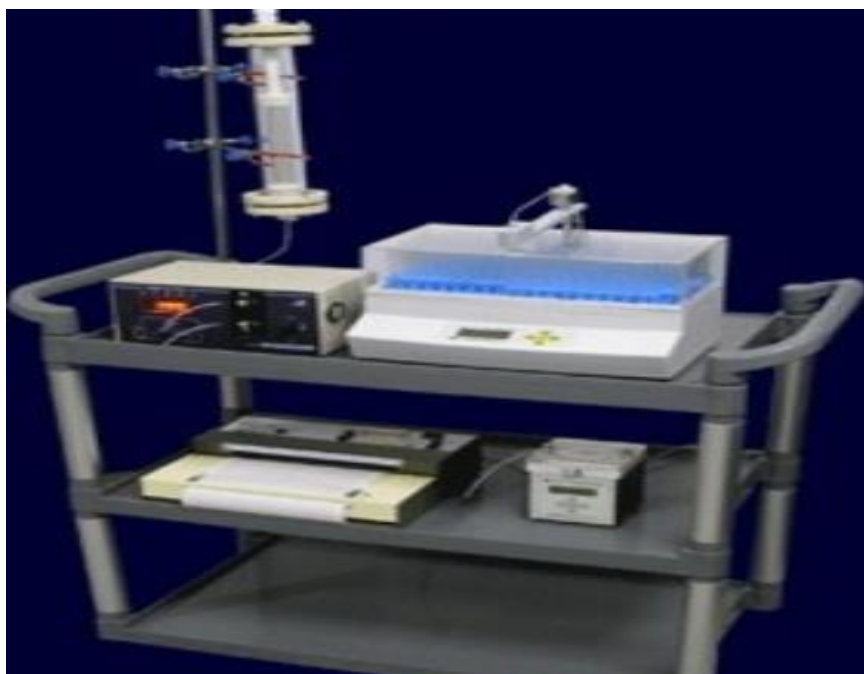
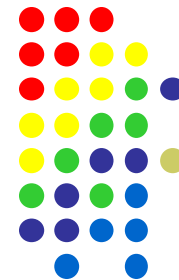
常见的有：聚甲基丙烯酸酯凝胶和聚苯乙烯凝胶。

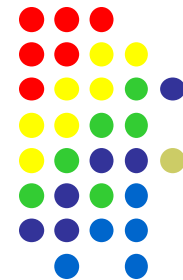
Styragel商品, 分离范围为1 600~40 000 000。

生物珠 (Bio-Bead S) 适于分离分子量较小的物质。

分离不溶水的有机物质。

4. 4. 3 凝胶层析的操作条件

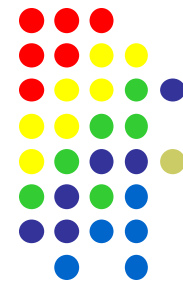




4.4.3 凝胶层析的操作条件

(1) 凝胶的选择

- 凝胶的性质
- 分离目的
- 样品的性质

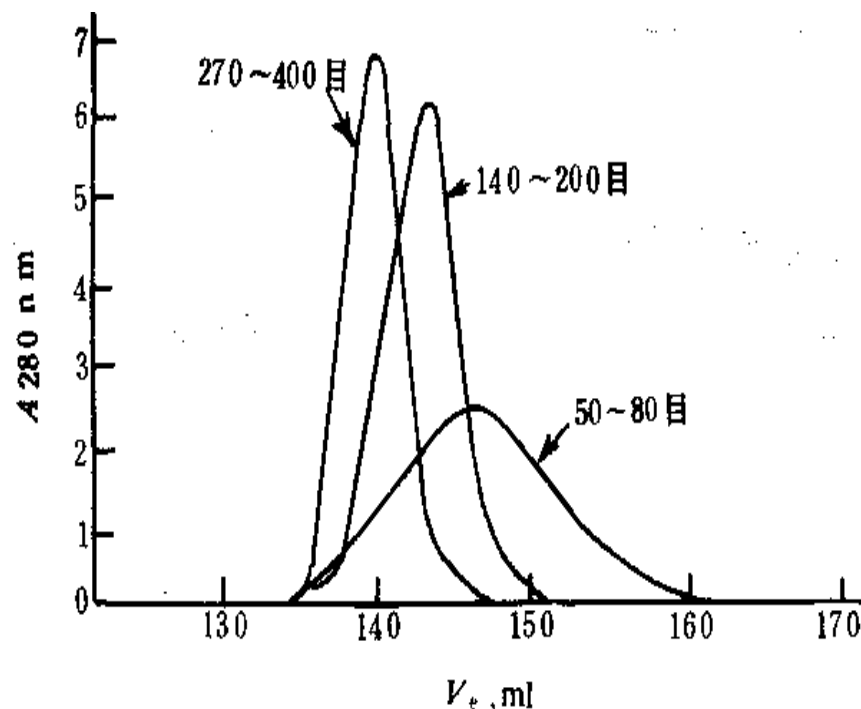


4.4.3 凝胶层析的操作条件

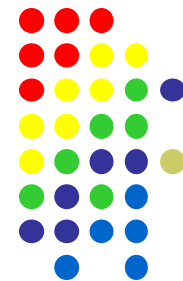
● 凝胶的性质

细粒凝胶柱用于精制
分离或分析。

粗粒凝胶柱用于粗制
分离，脱盐。



凝胶粒度与洗脱效果的关系



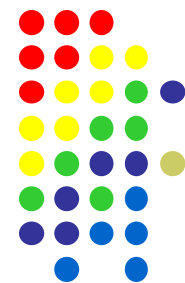
4.4.3 凝胶层析的操作条件

- 分离目的

- ✓ **类分离或组分离：**将分子量极为悬殊的两类物质分开，大分子组的分子量大于其排阻限，而小分子组的分子量小于渗入限。

血清蛋白的脱盐：

Sephadex G-25 (1000-5000)

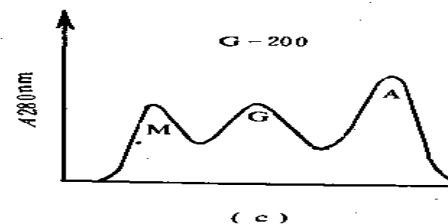
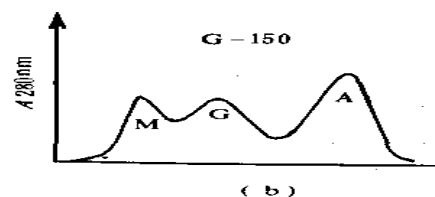
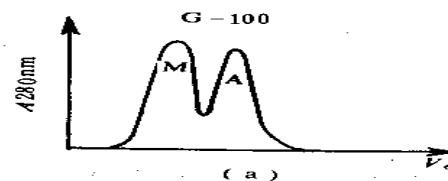


4.4.3 凝胶层析的操作条件

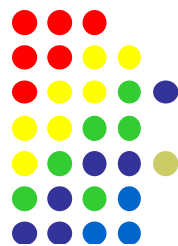
• 分离目的

分级分离： 分离分子量相差不大的大分子物质

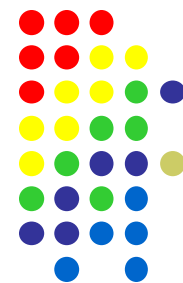
- 各种物质的 K_d 值尽可能相差大些
- 不使分子量分布在凝胶分离范围的一侧。



不同分离范围的葡聚糖凝胶上，血清蛋白的层析图



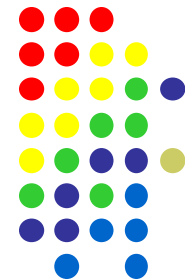
凝胶规格		吸水量 (ml/g 干凝胶)	膨胀体积 (ml/g 干凝 胶)	分离范围		浸泡时间 (h)	
型号	干粒直径			肽或球状蛋白质	多糖	20 ℃	100℃
G-10	40~120	1.0±0.1	2~3	~700	~700	3	1
G-15	40~120	1.5±0.1	2.5~3.5	~1 500	~1 500	3	1
G-25	粗粒 100~300	2.5±0.2	4~6	1 000~5 000	10~5 000	3	1
G-50	粗粒 100~300	5.0±0.3	9~11	1 500~30 000	500~10 000	3	1
G-75	40~120	7.5±0.5	12~15	3 000~70 000	1 000~50 000	24	3
G-100	40~120	10±1.0	15~20	4 000~150 000	1 000~100 000	72	5
G-150	40~120	15±1.5	20~30	5 000~400 000	1 000~150 000	72	5
G-200	40~120	20±2.0	30~40	5 000~800 000	100~200 000	72	5



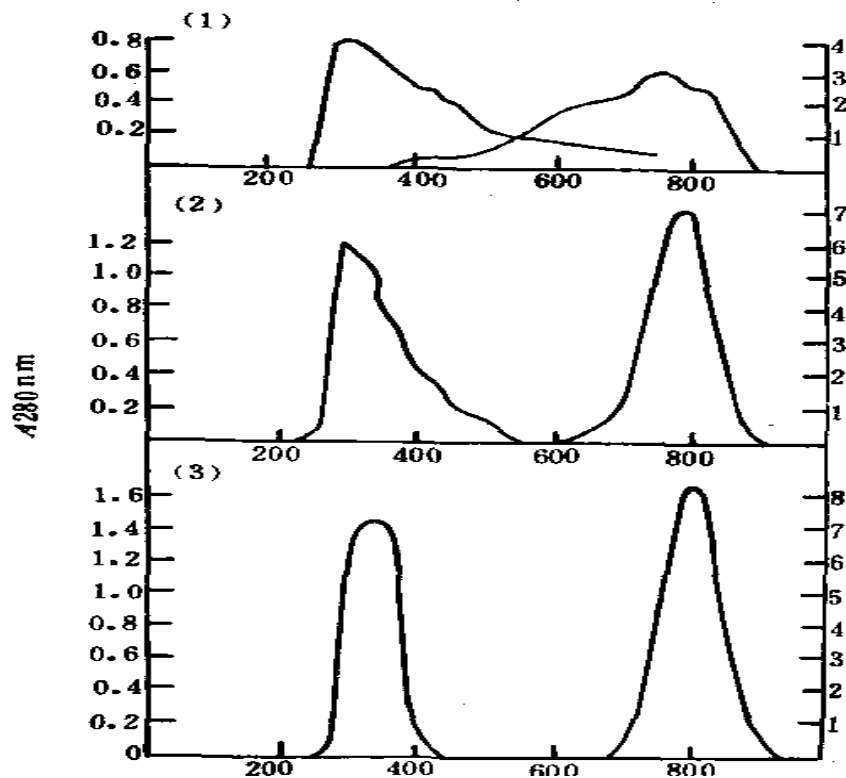
4.4.3 凝胶层析的操作条件

(2) 凝胶的处理

- 使用前须**溶胀**；
- **类分离**：柱床体积一般为样品溶液体积的5倍，柱比5至10，柱高50cm；
- **分级分离**：柱床体积大于样品体积25倍以上，甚至多达100倍。柱比在25至100之间，柱高100cm；
- **加样量**：蛋白质类样品浓度不大于4%。

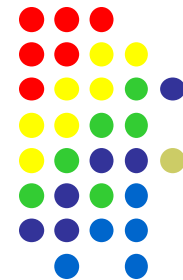


4.4.3 凝胶层析的操作条件



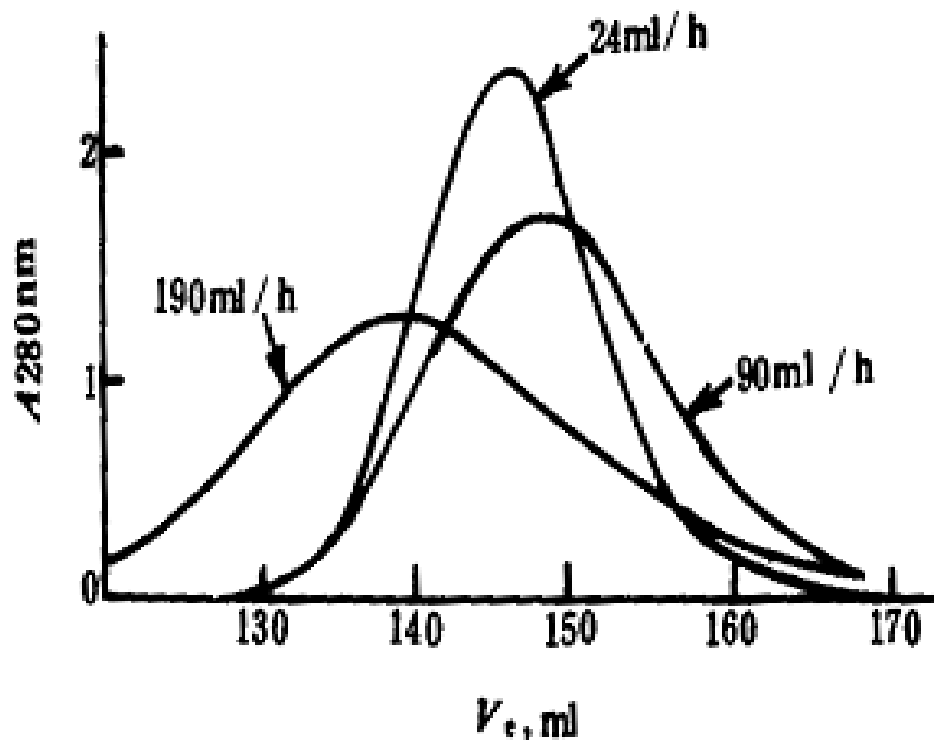
样品粘度对洗脱曲线的影响

(1) 加葡萄糖2 000, 使终浓度为5%, 相对粘度11.8; (2) 加葡萄糖2 000, 使终浓度为2.5%, 相对粘度4.2; (3) 加葡萄糖2 000, 使终浓度为1%.

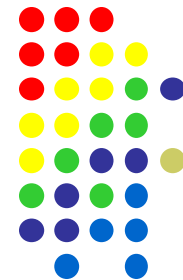


4.4.3 凝胶层析的操作条件

(3) 洗脱与收集



流速对洗脱曲线的影响

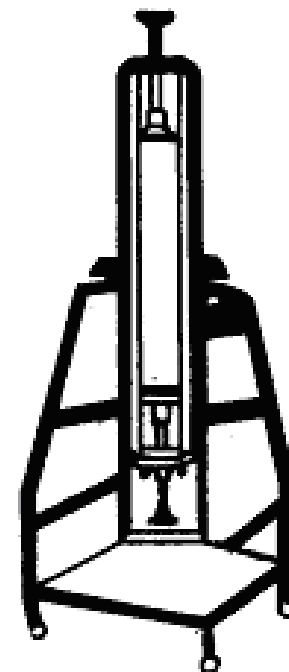


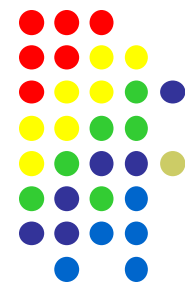
4.4.3 凝胶层析的操作条件

增加有效床高 — 提高分辨率

串联层析：有效柱长；

循环层析：在同一根或两根柱子，
样品反复进行层析。

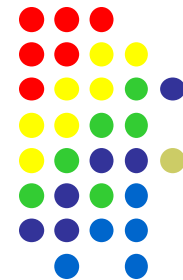




4.4.3 凝胶层析的操作条件

(4) 凝胶保存

- **干法：**用浓度逐渐升高的乙醇分步处理洗净的凝胶，脱水收缩，抽滤，用60–80℃吹干。
- **湿法：**加入一定量的防腐剂置于冰箱中作短期保存（6个月以内），0.02%叠氮化钠、0.02% 三氯叔丁醇、20%乙醇等。
- **半收缩保存：**水洗后滤干，加70%乙醇使胶收缩，再浸泡于70%乙醇中保存。

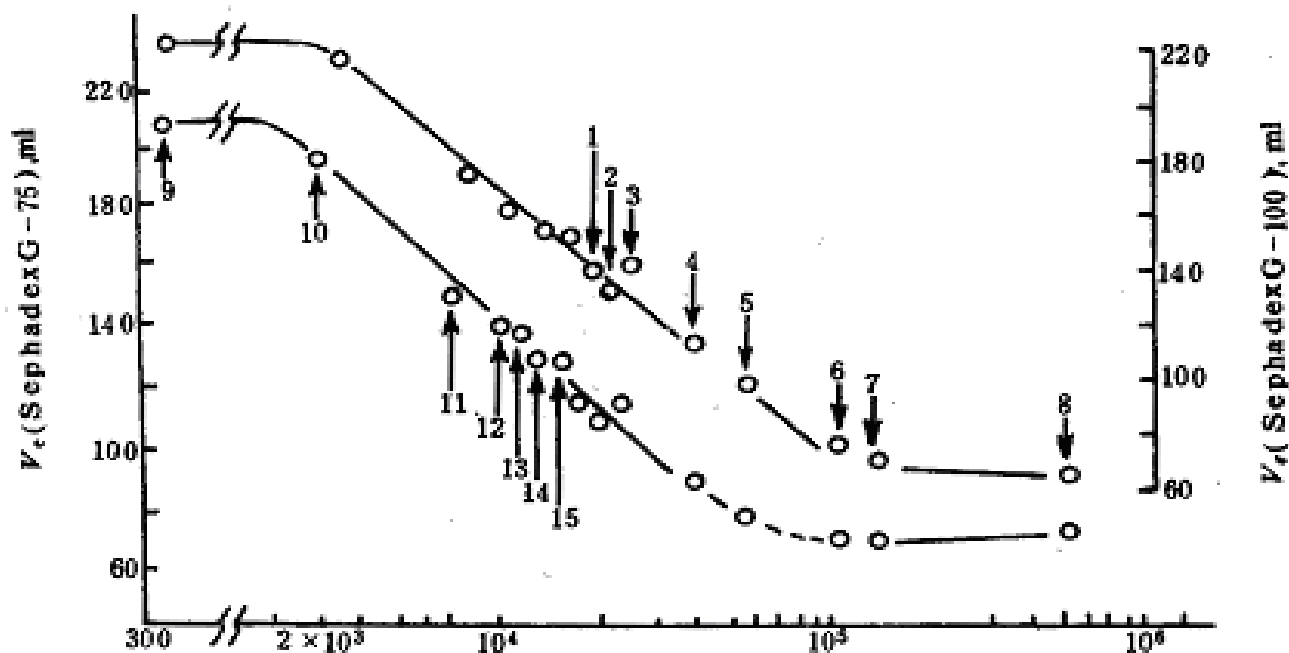
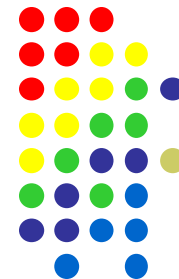


4.4.4 凝胶层析的应用

例1 分子量测定

- 对于一个特定凝胶柱，在凝胶的分离范围内，待测定物质的洗脱体积与分子量的关系符合公式

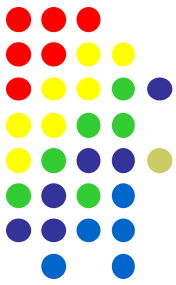
$$V_e = -K \log M + C$$



一些球蛋白分子量与 V_e 的关系

柱: $40 \times 2.4\text{cm}$; 洗脱液: 0.05mol/L Tris-HCl缓冲液pH7.5 (含 0.1mol/L KCl)

1. 大豆胰蛋白酶抑制剂; 2. 细胞色素C二聚体; 3. 胰凝乳蛋白酶原; 4. 卵清蛋白; 5. 血清白蛋白;
6. 血清白蛋白二聚体; 7. γ -球蛋白; 8. 甲状腺球蛋白; 9. 蔗糖; 10. 胰高血糖素; 11. 细胞色素 C_{5611} ;
12. 细胞色素 C_{5611} ; 13. 核糖核酸酶; 14. α -乳清蛋白; 15. 肌红蛋白

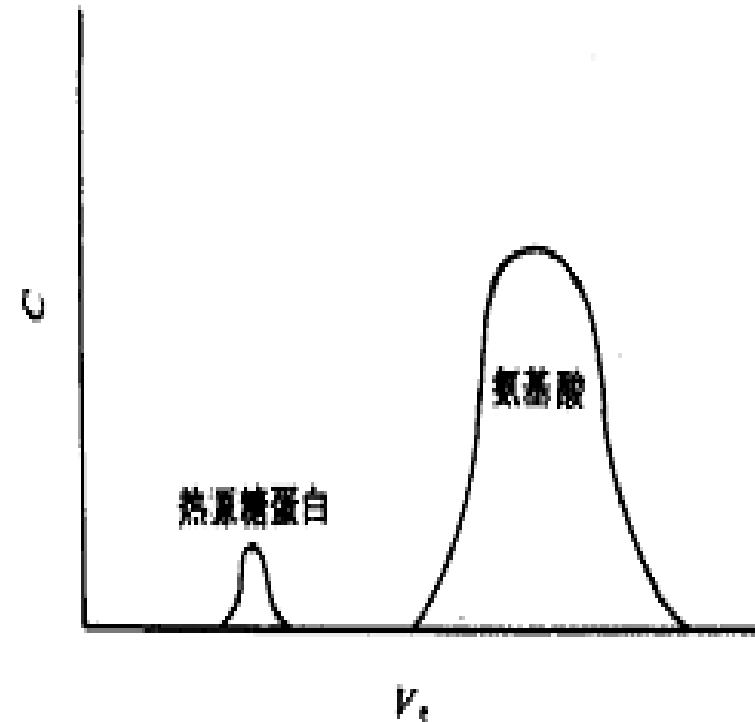


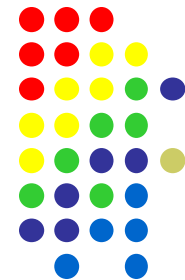
例2 去热原

对 SephadexG-25 来说，

氨基酸 $K_d = 1$

热原性物质 $K_d = 0$





例3 大豆蛋白亚基的分离纯化

