



生物化学实验

层析技术

4.4 亲和层析

北京大学 王青松 胡晓倩

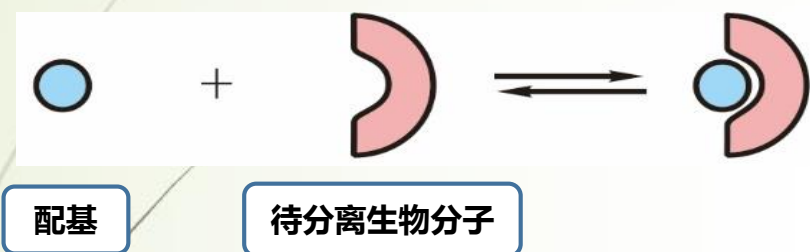
概述

- 亲和层析 (Affinity Chromatography) 是根据具有**亲和力**的生物分子间**可逆地结合和解离**的原理建立和发展起来的一种层析技术，在科研和工业化生产中广泛应用于生物大分子，如酶、蛋白、抗体和核酸等的分离纯化。

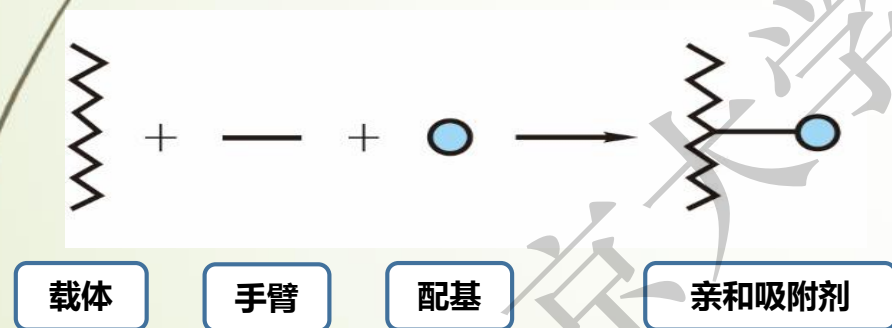
亲和层析的实验原理

- 亲和力：在自然界生物体中有很多生物大分子与相应的分子间具有**专一的可逆结合**的特性，如抗体与抗原，酶与其底物、抑制剂、辅助因子等，它们依靠分子间的氢键、范德华力进行结合，这种专一的可逆结合力称为**亲和力**。
- 亲和层析法就是根据生物分子间这种可逆结合和解离的原理建立起来的纯化方法。

亲和层析的基本过程

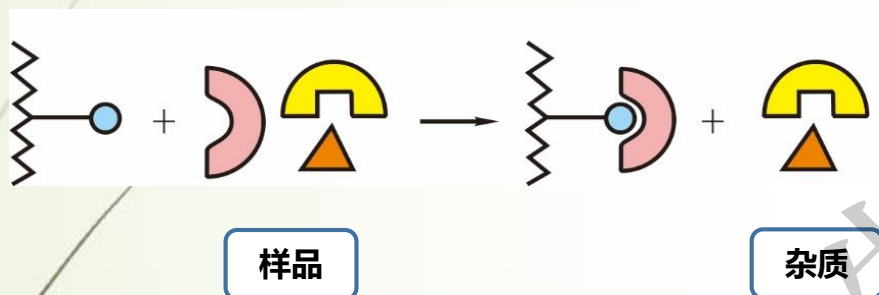


- 1) **确定合适的配基**：将可与待分离的生物分子可逆结合和解离的一方作为**配基**。

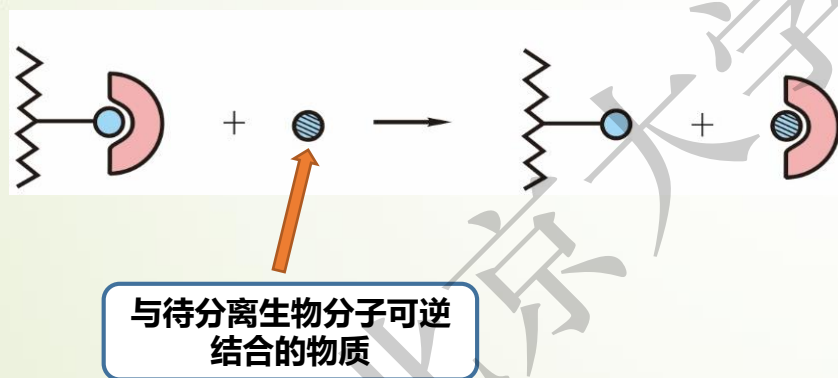


- 2) **制备专一的亲和吸附剂**：将配基与大孔径、亲水性的固相载体共价偶联。

亲和层析的基本过程



- **3) 样品吸附:** 将含有待分离生物大分子的样品随流动相经过亲和吸附剂时，吸附剂上的配基有选择地吸附样品中的待分离物质。



- **4) 洗脱:** 通过解吸附使待分离的生物大分子纯化。

配基的选择

- 亲和层析介质的制备首先要根据待分离物质与配基之间的结合特性选择配基，可以是**有机小分子、生物大分子、染料等**，通过实验来确定理想的配基。
- **配基必须满足：**
 - 存在适合的化学基团与载体的活化基团发生偶联作用，且有较高的偶联率。
 - 偶联后配基与生物大分子的专一结合特性不变。
 - 配基和生物大分子结合后，一定条件下能解离，且不破坏生物大分子的生物活性和理化性质。

载体的选择

- 亲和层析介质的制备首先要选择合适的载体，一般是凝胶类层析介质。
- 载体应具备：
 - 有稀松的多孔网状结构，大孔径凝胶介质可有效使凝胶内部的羟基活化，以保证较高的活化效率，提高配基有效浓度，提供较高的亲和容量。
 - 有足够数量的化学基团，经活化后可以与大量的配基相偶联。
 - 具有良好的机械性能，保证亲和柱维持较好的流速。
 - 必须不溶于水、化学惰性，非特异性吸附弱。
 - 有良好的物理和化学稳定性，在介质的反复使用过程中能抵抗微生物和酶的侵蚀。

常用载体

纤维素

琼脂糖
凝胶

葡聚糖
凝胶

聚丙烯酰
胺凝胶

多孔
玻璃柱

琼脂糖凝胶载体

- 琼脂糖凝胶是由D-半乳糖和3, 6-脱水-L-半乳糖交替结合而成，目前使用最多的是GE公司生产的Sepharose。
- **优点：**迅速活化偶联功能基团，很好保持吸附物质活性，孔径大，流速快。
- 商品主要有Sepharose 2B, 4B和6B，其中阿拉伯数字表示凝胶中干胶的百分含量。多用Sepharose 4B来分离生物大分子。
- 琼脂糖凝胶的多聚合链不是由共价键连接而成的，在使用中不宜加热消毒，应**低温湿态保存**，冻存会破坏其结构，要**避免在pH低于4高于9下长期工作**，使用破坏氢键的试剂会降低凝胶的稳定性。

亲和层析的基本操作

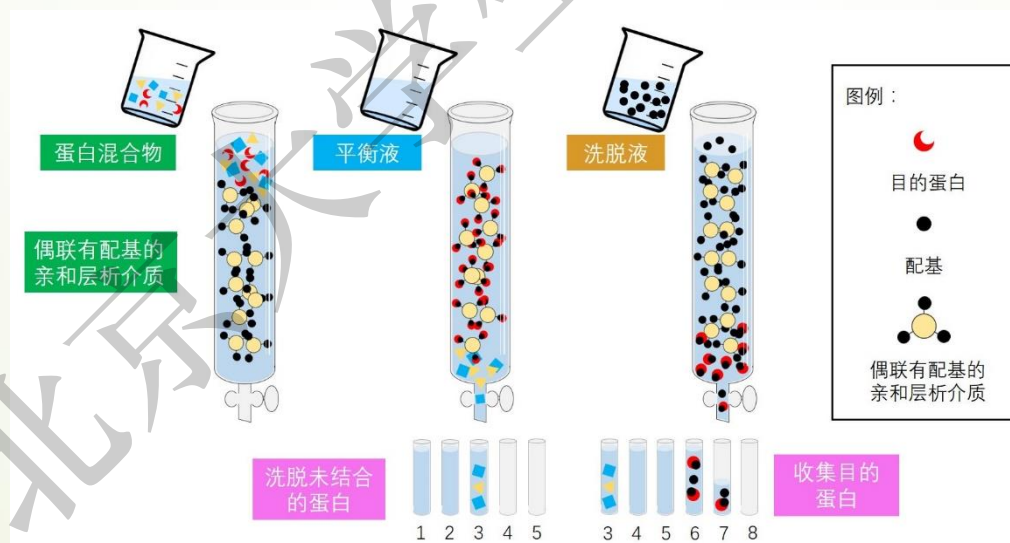
1. 制备亲和
吸附剂

2. 装柱、平衡

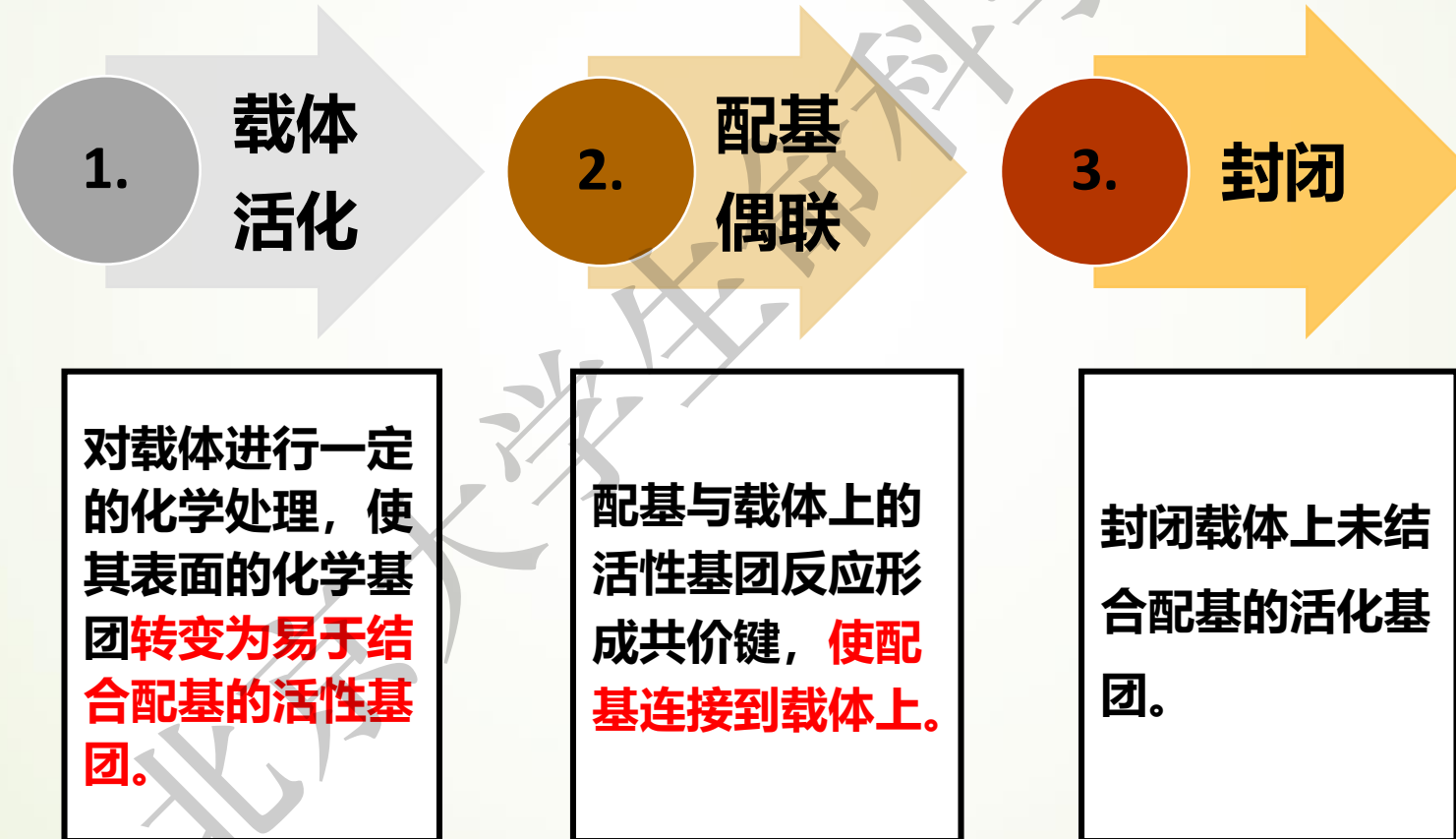
3. 上样、
亲和吸附

4. 洗脱

5. 亲和吸附剂的
再生/保存



1. 亲和吸附剂的制备



4. 洗脱

竞争性洗脱

- 特异配基或底物的竞争性洗脱，被吸附的大分子洗脱下来。

非竞争性洗脱

- 离子强度洗脱
- pH + 离子强度洗脱
- 变性剂洗脱
- 化学断裂

注：亲和层析的洗脱属于特异性的解离方式，洗脱剂的选择必须不引起待分离物的变性失活，并保持亲和吸附剂的稳定性。

非竞争性洗脱

- **离子强度洗脱：**洗脱液离子强度增加使亲和力减弱，将被吸附物洗脱下来，常用NaCl。
- **pH + 离子强度洗脱：**pH的变化改变结合位点上带电基团的离子化程度，pH变化和离子强度双重作用洗脱适合结合得比较牢的物质。
- **变性剂洗脱：**在洗脱液中加入变性剂如盐酸胍，尿素等，有利于亲和介质上结合得比较牢固的蛋白质解离。还可用变性剂将吸附比较牢的杂质洗净，使亲和介质再生。
- **化学断裂洗脱：**一些蛋白质与亲和吸附剂结合非常牢，用专一的化学方法使配基和载体之间连接键断裂，获得配基—蛋白质复合物，使用该方法亲和吸附剂仅能使用1次。

5. 亲和吸附剂的再生/保存

- **再生：**一般情况下，使用过的亲和层析柱，用大量的洗脱液或较高浓度的盐溶液洗涤，再用平衡缓冲液重新平衡即可再次使用。
- **保存：**亲和吸附剂的保存一般是加入0.01%的叠氮化钠，4℃下保存，**注意不能冰冻保存。**

亲和层析的特点

- **优点:**

- 专一性结合，分辨率高；
- 纯化过程简单迅速，分离效率高，一次操作可得到较高纯度的分离物质；
- 具有浓缩作用，可从含量很低的溶液中得到高浓度的样品；
- 分离条件温和，能够很好地保持样品原有的生物学性质。

- **缺点:**

- 亲和吸附剂通用性较差，针对某一分离对象需要制备专一的吸附剂和建立相应的实验条件；
- 配体的选择及其与基质的共价结合需要烦琐的操作步骤。

影响亲和层析的主要因素

- 样品体积的影响

- 样品溶液上柱时对体积要求不很严格，具有浓缩作用。**对亲和力弱的物质要用体积小、浓度高的样品溶液上柱。**

- 流速的影响

- 样品上柱的流速应保证纯化对象与配基之间有足够的时间达到吸附平衡，上样流速尽可能慢。
- 纯化对象与配基亲和力弱时，可控制样品上柱的流速或重复过柱，以使纯化对象与配基充分结合。
- 洗脱时为得到尖锐的洗脱峰、最小的样品洗脱体积和最大的回收，一般采用低的洗脱速度。

影响亲和层析的主要因素

- **柱长的影响**

- 根据亲和吸附剂的吸附容量和待分离物质总量选择大小合适的层析柱。
- 亲和介质的吸附容量高，选择较短的柱子，用较慢的流速，使待分离物质快速分离。
- 亲和吸附剂的亲和性低，选择较长的柱子，保证待分离物与亲和介质有充分接触的时间，使二者较好地结合。

- **温度的影响**

- 通常，亲和吸附剂对于对应生物大分子的亲和力随温度升高而降低。一般选择在**较低温度进行吸附，在不影响生物大分子活性的室温进行洗脱。**

应用

1. 酶和抑制剂的分离纯化



2. 抗体和抗原的纯化



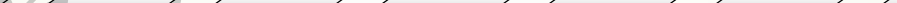
3. 激素受体的纯化



4. 纯化人工合成的多肽和蛋白质



5. 分离纯化细胞



6. 蛋白质-蛋白质相互作用研究

