



# 生物化学实验

## 层析技术

### 4.5 柱层析系统基本操作

北京大学 王青松 胡晓倩

# 概述

- 柱层析系统是利用层析技术分离生物大分子不可缺少的核心仪器，主要包括输液系统、上样系统、层析柱、紫外检测仪、记录仪、自动部分收集器等。
- 柱层析系统，即色谱系统，已实现仪器化、自动化、高速化，广泛应用于科学研究、食品检测、药物研发等各个领域。

# 柱层析系统主要组成部分



提供连续、稳定的流速：

- 1) 手动加缓冲液
- 2) 恒压瓶系统
- 3) 蠕动泵系统
- 4) 梯度混合仪

将样品加到层析柱中：

- 1) 手动进样
- 2) 自动进样

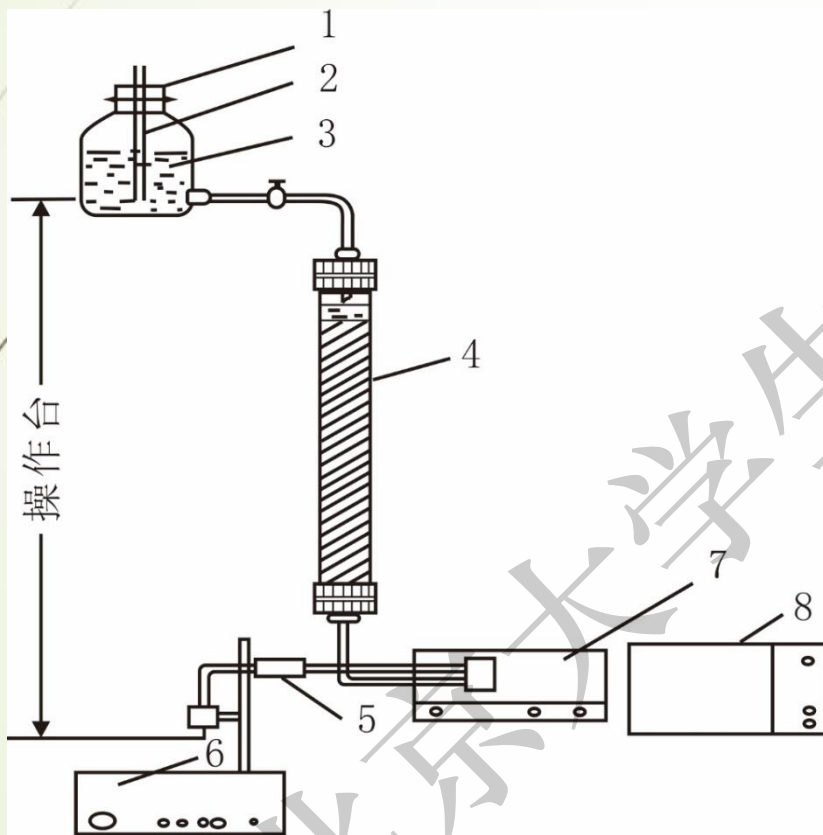
**柱层析系统的核心，决定层析分离的效果。**

对分离得到的各组分的信号进行检测，并记录。

收集层析柱出口流出的组分：

- 1) 手动收集
- 2) 自动收集

# 简易柱层析系统示意图

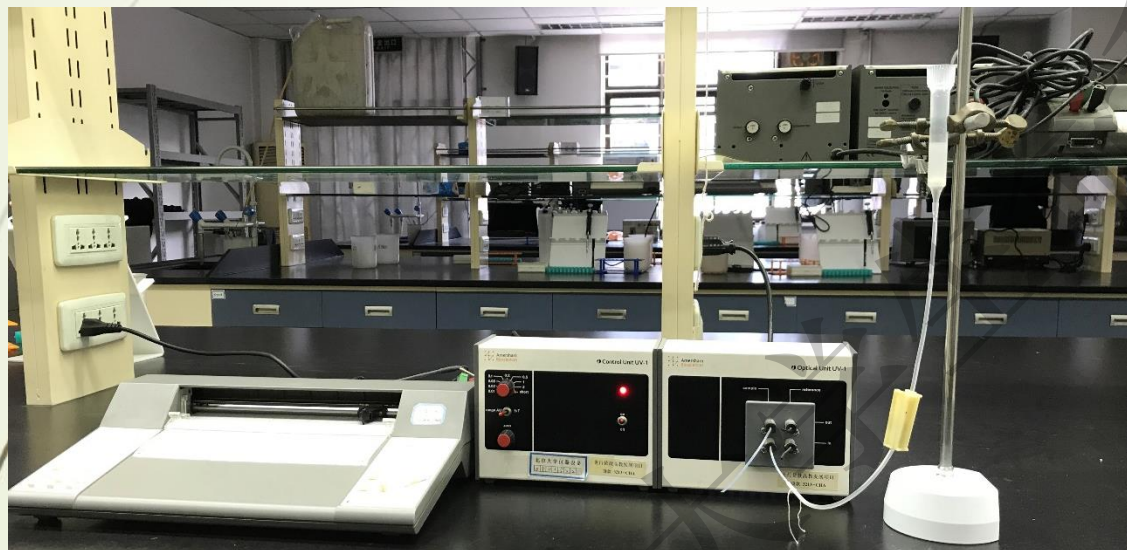


- 1/2/3: 恒压瓶输液系统 (包括1. 密封橡皮塞; 2. 恒压管; 3. 恒压瓶)
- 4: 层析柱
- 5: 可调螺旋夹
- 6: 自动收集器
- 7: 核酸-蛋白检测仪
- 8: 记录仪

# 各部分的功能

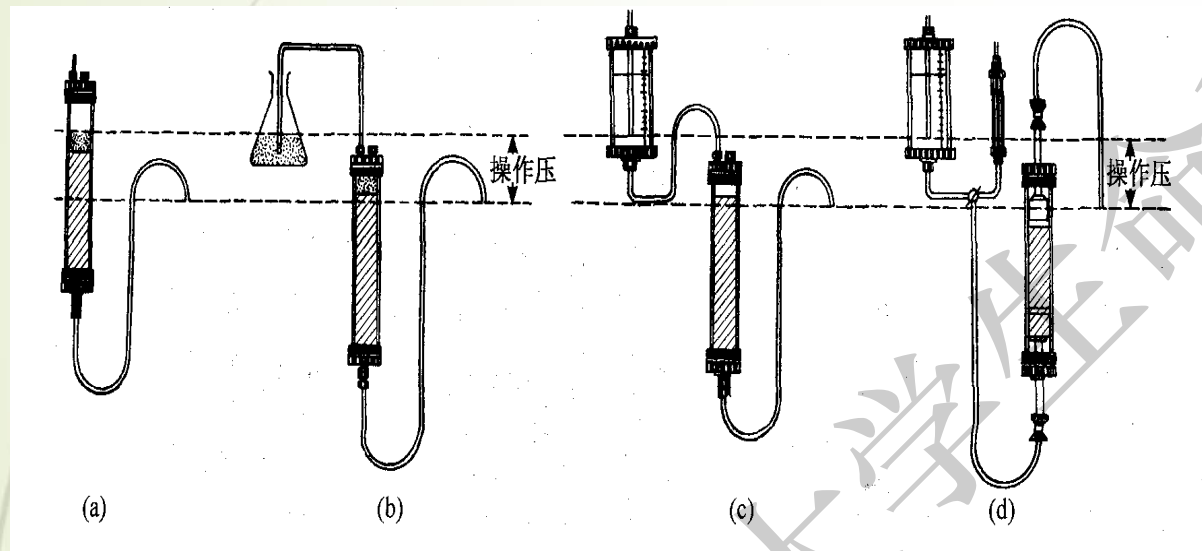
- **核酸-蛋白检测仪：**连续测定层析柱流出液的紫外吸收值，检测流出液的吸光值变化。
- **记录仪：**接收检测仪的信号，根据检测仪检测到的吸光值的变化画出光吸收图谱。
- **自动收集器：**根据设定的时间，自动分部收集层析柱的流出液。
- **恒压瓶：**维持恒定的液位差，从而维持恒定的流速。

# 生化实验用亲和柱层析系统



- 输液系统：手动加缓冲液
- 层析柱：自制简易亲和层析柱
- 加样：手动加样
- 检测记录：核酸-蛋白检测记录系统
- 洗脱：手动加洗脱液
- 收集：手动

# 操作压的概念



## ● 各种层析柱装置的操作压

(a) , (b) 操作压等于柱或贮液器内液面和出水接管末端的高度差;

(c) , (d) 压力的大小是由恒压瓶内空气入口管的底部至出口接管末端的高度计算。向下 (c) 或向上 (d) 移动出水管无关紧要。

**注意：不同的凝胶、交联度不同的葡聚糖凝胶能够承受的最大操作压是不同的。**



# 柱层析系统基本操作方法





# 1. 装柱、平衡

- 装柱 (重力沉降法)

在柱内先装入约1/3高度的水或缓冲液，然后将溶胀好的凝胶边搅拌边加入柱内，使其自然沉降。如此连续操作，可以得到一个均匀的柱床。

- 凝胶柱鉴定

检查凝胶柱是否均匀，可用有色的蓝色葡聚糖-2000在恒压下走柱，观察有色区带在柱中的洗脱行为，如色带均匀，说明凝胶柱是均匀的。

- 平衡

层析柱使用前，必须平衡至所需的pH和离子强度，一般用起始缓冲溶液在恒定压力下走柱，洗脱5个柱床体积，使层析介质充分平衡。

## 2. 上样

- **上样量和上样体积**

- 上样量多少和上样体积大小是影响分离效果的关键因素，取决于凝胶类型和分离目的。
- 取决于层析目的（分析型 or 制备型）：分析型凝胶层析，上样量一般不超过柱床体积0.5~1%。

- **样品前处理**

- 样品溶液需先经过**0.45  $\mu\text{m}$ 滤器过滤**或**高速离心**除去颗粒后取上清上柱。

# 加样方法

- **手动加样**

移去柱床表面以上的溶液，小心用滴管加样。加样后将溶液加至2~3 cm高，连接好柱子和装有洗脱液的贮液瓶。

- **增加样品密度加样**

样品中加入1%蔗糖来增加样品的密度，不需柱流干至柱床表面，样品溶液自然沉降到层析柱的凝胶表面。

- **蠕动泵加样：**用蠕动泵直接把样品传送到柱表面。

- **自动进样器加样：**通过仪器的自动进样器实现自动加样。

**注意：保持胶面平整/柱内无气泡/胶床不干裂**

### 3. 洗脱&收集

- **一步洗脱法：**简单常用的洗脱方法，用一种浓度的洗脱液进行洗脱。凝胶过滤层析常用一步洗脱。
- **分布洗脱法：**分段改变洗脱液pH或盐浓度，使吸附在柱上的各组分洗脱下来。
- **梯度洗脱法：**连续改变洗脱液中的pH和盐浓度，使吸附柱上的各组分被洗脱下来。需使用梯度混合器实现梯度洗脱。

# 流速对洗脱的影响

- 分离过程中，洗脱液过柱**保持稳定的流速**是十分重要的。
  - 流速太低，洗脱峰加宽，分辨率降低。
  - 流速过快，流速先快后慢，发生阻塞。
- 流速可通过调节“操作压”来控制，使用**恒压瓶或蠕动泵**保持稳定流速。

# 组分收集&合并

- 组分收集

- 层析分离过程中，洗脱液是分成小组分收集，这些组分一般收集在试管或微量离心管中。
- 每管收集的体积越小，越容易得到纯的组分。
- 收集过程需用到**自动部分收集器(fraction collector)**，当一个管中收集一定体积洗脱液后，切换到下一个新的收集管。

- 组分合并

- 洗脱液组分按一定体积分别收集于试管后，可根据核酸-蛋白检测仪的层析图谱结果，对来自于同一个洗脱峰的多个组分进行合并。

## 4. 洗脱峰的纯度鉴定

- 柱层析系统的分辨率有限，1个洗脱峰 **≠** 1个纯的组分。
- 一个特定柱层析分离条件下得到每个洗脱峰通常需要用2-3个高分辨方法，确定其纯度（均一性）。

SDS-  
PAGE凝胶  
电泳

IEF等电聚  
焦电泳

高效液相色  
谱HPLC

N末端氨基  
酸残基测定

...

详见：2.9 生物大分子的含量测定与纯度鉴定



## 5. 脱盐&浓缩

- 柱层析分离纯化后得到的洗脱峰样品经常会体积变大，浓度很稀，为了保存和鉴定等目的，往往需要进行脱盐浓缩。常用的方法有：

透析法

超滤法

有机溶剂  
沉淀法

冷冻  
干燥法

...

详见：2.7 生物大分子样品的浓缩