



生物化学实验

层析技术

4.2 凝胶过滤层析

北京大学 王青松 胡晓倩

概述

- 凝胶过滤层析 (Gel Filtration Chromatography, **GFC**) , 又称分子筛层析 (Molecular sieve chromatography) 和排阻层析 (Size exclusion chromatography, **SEC**) , 是20世纪60年代发展起来的, 利用生物大分子分子大小不同进行层析分离的方法。
- 特点: 具有设备简单、操作方便、重复性好、条件温和等优点, 是生物学研究和生物制药中生物大分子分离纯化必不可少的手段。

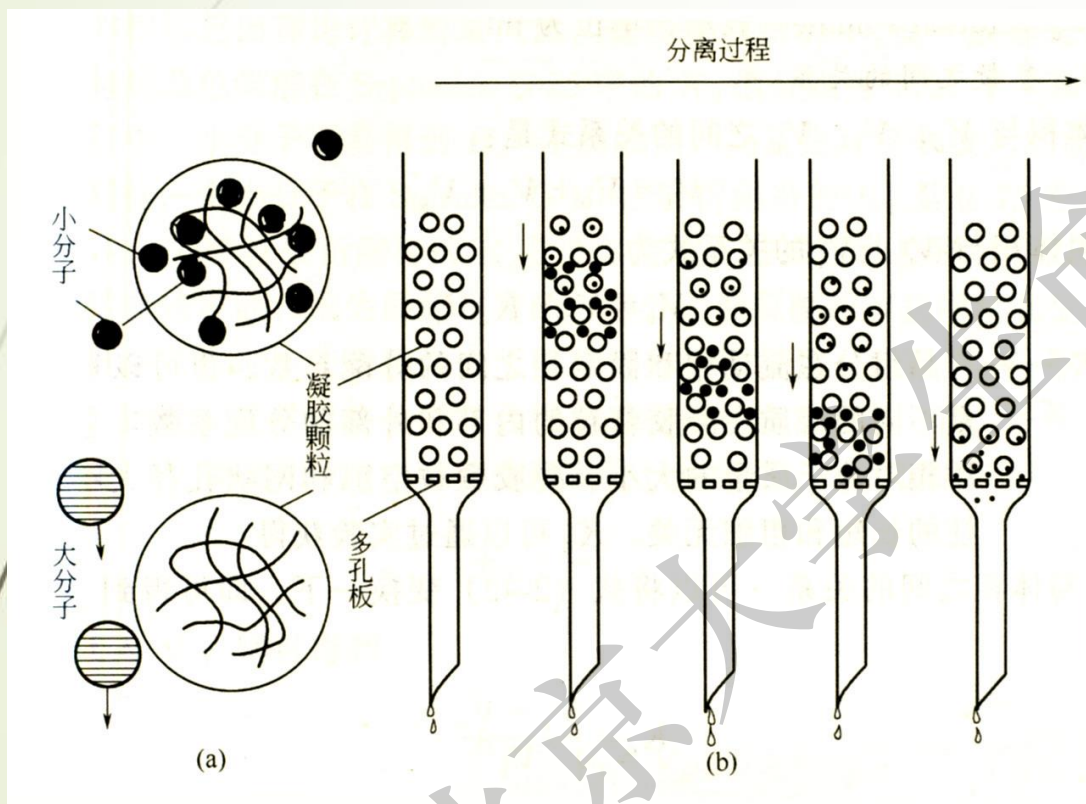
凝胶

- 凝胶主要是以葡聚糖、琼脂糖、聚丙烯酰胺等为原料，通过特殊工艺制备的内部具有多孔、网状结构的凝胶球形颗粒。利用凝胶层析介质的分子筛效应对大小、形状不同的分子进行层析分离。
- 凝胶过滤层析常用的的介质有：
 - 葡聚糖凝胶 (Sephadex G)
 - 琼脂糖凝胶 (Sephacrose, Bio-Gel A-)
 - 聚丙烯酰胺凝胶 (Bio-gel P-)
 - 高交联度多孔琼脂糖与葡聚糖交联凝胶 (Superdex)
 - 丙烯葡聚糖凝胶 (Sephacryl)

葡聚糖凝胶Sephadex G

凝胶型号	颗粒大小/ μm	溶胀体积/mL/g	分离范围/ M_r
Sephadex G-10	40~120	2~3	小于 7×10^2
Sephadex G-15	40~120	2.5~3.5	小于 1.5×10^3
Sephadex G-25	50~150	4~6	$1.0 \times 10^3 \sim 5.0 \times 10^3$
Sephadex G-50	50~150	9~11	$1.5 \times 10^3 \sim 3.0 \times 10^4$
Sephadex G-75	40~120	12~15	$3.0 \times 10^3 \sim 8.0 \times 10^4$
Sephadex G-100	40~120	15~20	$4.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^5$
Sephadex G-150	40~120	20~30	$5.0 \times 10^3 \sim 3.0 \times 10^5$
Sephadex G-200	40~120	20~40	$5.0 \times 10^3 \sim 6.0 \times 10^5$

凝胶过滤层析原理



1. 分子大小不同的混合物样品上柱;
2. 洗脱开始, 小分子扩散进入凝胶颗粒内, 大分子被排阻于颗粒之外;
3. 大小分子分开;
4. 大分子行程较短, 已洗脱出层析柱, 小分子尚在进行中。

凝胶过滤层析的参数

- 柱床体积：凝胶介质装柱后所占层析柱内的总体积，以 V_t 表示。
- 外水体积：存在于柱床中凝胶颗粒之外，颗粒之间的空隙所占有的水相容积，以 V_o 表示。
- 内水体积：凝胶吸水溶胀后存在于凝胶颗粒内部的水相容积，以 V_i 表示。
- 凝胶体积：凝胶颗粒自身的体积，即柱床体积减去外水体积和内水体积后所占有的容积，以 V_g 表示。
- 洗脱体积：从加样品溶液开始到洗脱组分浓度最大时（洗脱峰峰顶）为止所收集的体积，以 V_e 表示。

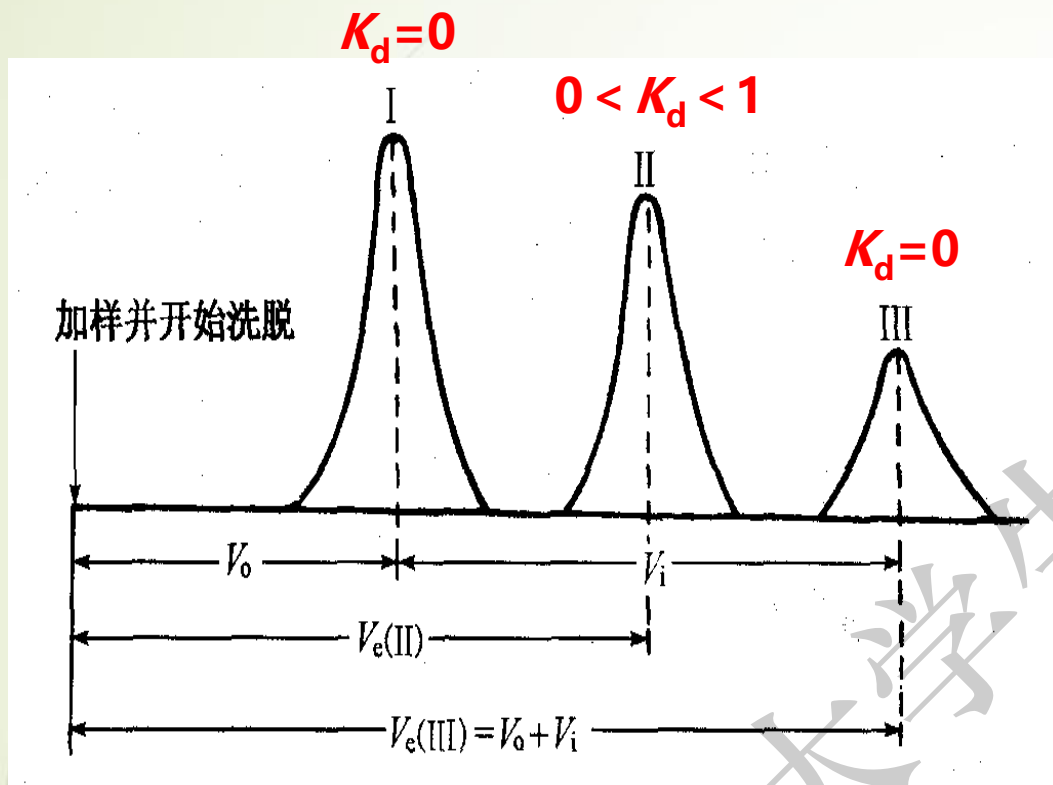
$$V_t = V_o + V_i + V_g = \pi * R^2 * h \quad (R: \text{层析柱半径}; h: \text{层析柱高}) \quad (1)$$

分配系数 K_d

- 分配系数是指某个组分在固定相中和流动相中的浓度比，对于凝胶过滤层析，分配系数表示待分离组分在内水体积和外水体积中的浓度分配关系。

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i} \quad (2)$$

$$V_e = V_o + K_d * V_i \quad (3)$$



- $K_d = 1$: 洗脱体积 $V_e = V_0 + V_i$, 小分子物质完全进入凝胶内部, 为全渗入。
- $K_d = 0$: 洗脱体积 $V_e = V_0$, 对于完全不能进入凝胶内部的大分子物质, 为全排阻。
- $0 < K_d < 1$: 洗脱体积 $V_e = V_0 + K_d V_i$, 为部分渗入。

$$V_e = V_0 + K_d * V_i \quad (3)$$

有效分配系数 K_{av}

- 实际工作中，由于部分水分子与凝胶结合较牢固，成为凝胶本身的一部分， V_i 不能以凝胶的吸水量进行计算，小分子难以得到 $K_d = 1$ 的数值。因此，通常以小分子通过凝胶柱的洗脱体积来测定 V_i 值。用 K_{av} （有效分配系数）来代替 K_d ，用 $V_t - V_o$ 代替 V_i 。

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad (4)$$

$$V_e = V_o + K_{av} * (V_t - V_o) \quad (5)$$

凝胶过滤层析的特点

- 1. 操作简便，所需设备简单。只要有一根层析柱便可进行。分离介质凝胶不需要像离子交换剂那样复杂的再生过程便可重复使用。
- 2. 分离效果较好，重复性高，**样品回收率高**。
- 3. 分离条件缓和。凝胶骨架亲水，分离过程不涉及化学键的变化，所以对分离物的活性没有不良影响。
- 4. 应用广泛。适用于各种**生化物质的分离纯化、脱盐、浓缩**等。
- 5. 分离生物大分子相对分子质量的范围也很宽。
- **6. 缺点：**分辨率不高，分离操作过程较慢。

凝胶过滤层析的应用

1. 生物大分子的分离纯化

2. 蛋白质相对分子质量测定



3. 脱盐

4. 浓缩

5. 去热源

6. 脱色

凝胶过滤层析的基本操作

1. 凝胶选择
与处理

2. 装柱、平衡

3. 加样、洗脱

4. 凝胶再生
保存

1. 凝胶选择与处理

- **凝胶的选择：**根据实验目的不同选择不同型号的凝胶（**排阻范围和粒径**）
 - **排阻范围：**根据待分离蛋白质的分子量选择具有相应排阻范围的凝胶。在排阻范围内，混合物之间分子量差别越大，分离效果越好。
 - **粒度：**凝胶的粒度有粗有细，颗粒细的分离效果好，但流速慢，费时。粗颗粒会因流速过快使洗脱峰变平拉宽，分辨率低。
- **凝胶的处理**
 - 商品凝胶多以干粉形式保存，使用前需用水或洗脱缓冲液充分溶胀，倾斜法除去悬浮的过细颗粒，通常需要较长时间。
 - 为加速溶胀，可将凝胶煮沸1-2小时，能除去凝胶颗粒内部气泡，并具有杀菌作用。

2. 装柱、平衡

- **层析柱的选择：**层析柱根据样品量多少及分辨率要求进行选择。一般层析柱长度不超过100 cm，直径与长度比是1：25~1：100。用于脱盐的层析柱，一般比较短。
- **凝胶装柱：**按本章4.7柱层析系统基本操作的装柱方法进行。
- **层析柱的鉴定：**通常使用有色的**蓝色葡聚糖-2000**上柱，观察有色区带在柱中的洗脱行为，检测凝胶柱的均匀程度。
- **层析柱的平衡：**新柱装好，用**5倍柱床体积**的洗脱缓冲液在恒定压力下平衡层析柱。

3. 加样、洗脱

- **加样**

- 加样要尽量快速、均匀。
- 分级分离加样体积约为凝胶柱床体积的1~5%；分组分离（脱盐）加样体积约为凝胶柱床体积的10~25%。

- **样品洗脱流速**

- 凝胶过滤层析的洗脱流速与操作压、层析柱体积、凝胶颗粒的性质都有关。
- 一般来说，洗脱流速慢，分离效果越好。流速过慢会造成样品扩散加剧，区带变宽，反而会降低分辨率，且实验时间延长。一般凝胶的流速是2~10 mL/h。

4. 凝胶再生保存

- **凝胶柱保养：**性能正常的凝胶层析柱，重新平衡后，可再次使用。凝胶柱不用时可4℃保存。
- **凝胶再生：**凝胶柱多次使用，性能变差，需进行凝胶再生处理。
 - 1) 用水反复对凝胶柱进行逆向冲洗，再用缓冲液进行平衡，即可重复使用。
 - 2) 把凝胶从柱中倒出，用低浓度的酸或碱按其预处理方法进行，处理后重新装柱使用。
- **凝胶保存**
 - **湿法保存：**经常使用的凝胶，可将洗净的凝胶悬浮于含适量抑菌剂的溶液中，防止微生物生长，4℃保存。常用的抑菌剂有0.02%叠氮钠、20%乙醇等。
 - **干法保存：**较长时间不用的凝胶，水力浮选洗涤除去碎颗粒及杂质，依次用70%、90%和95%乙醇使凝胶脱水收缩，最后在60-80℃下烘干，4℃保存。