



## 第四节 凝胶过滤层析

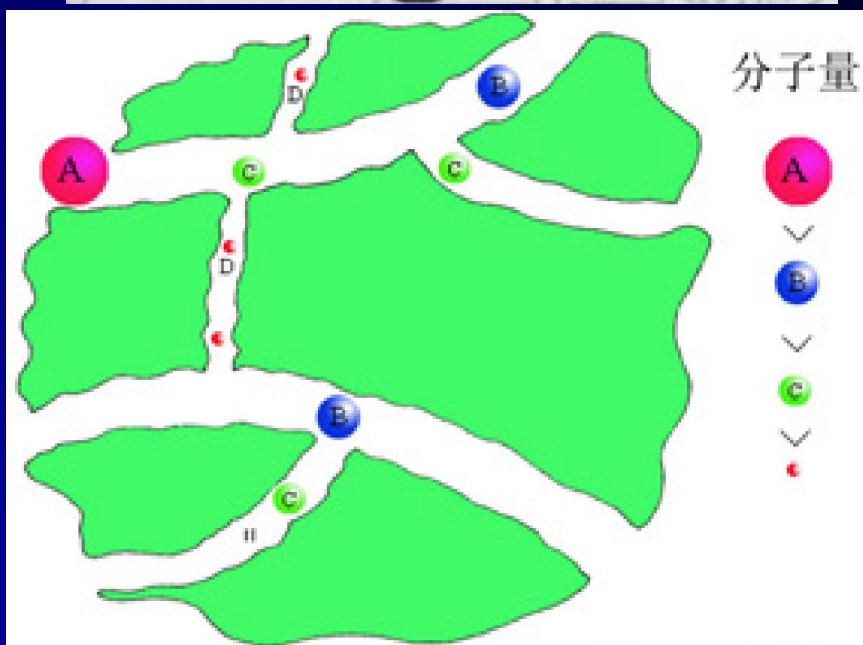
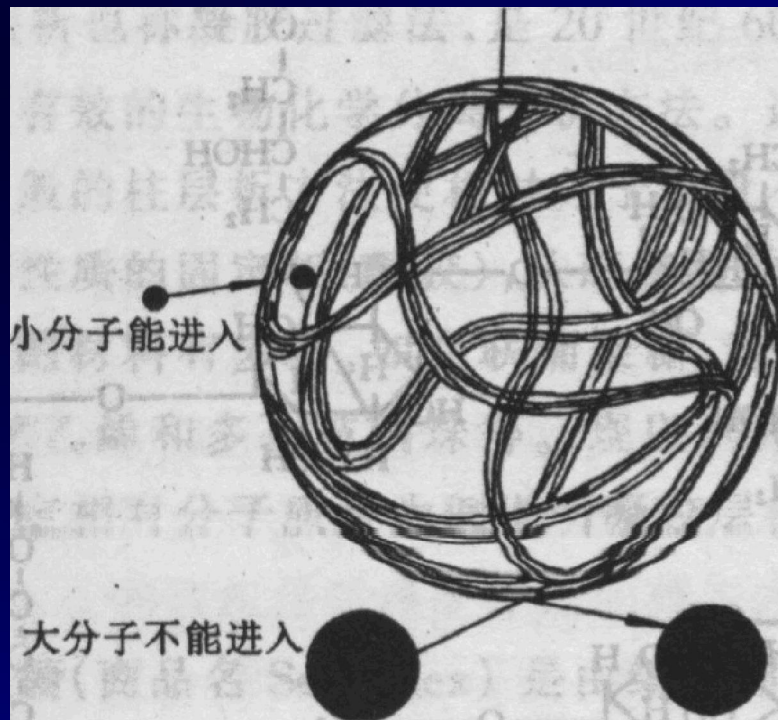
( Gel filtration chromatography , GFC )

## 一、原理与操作

### 原理

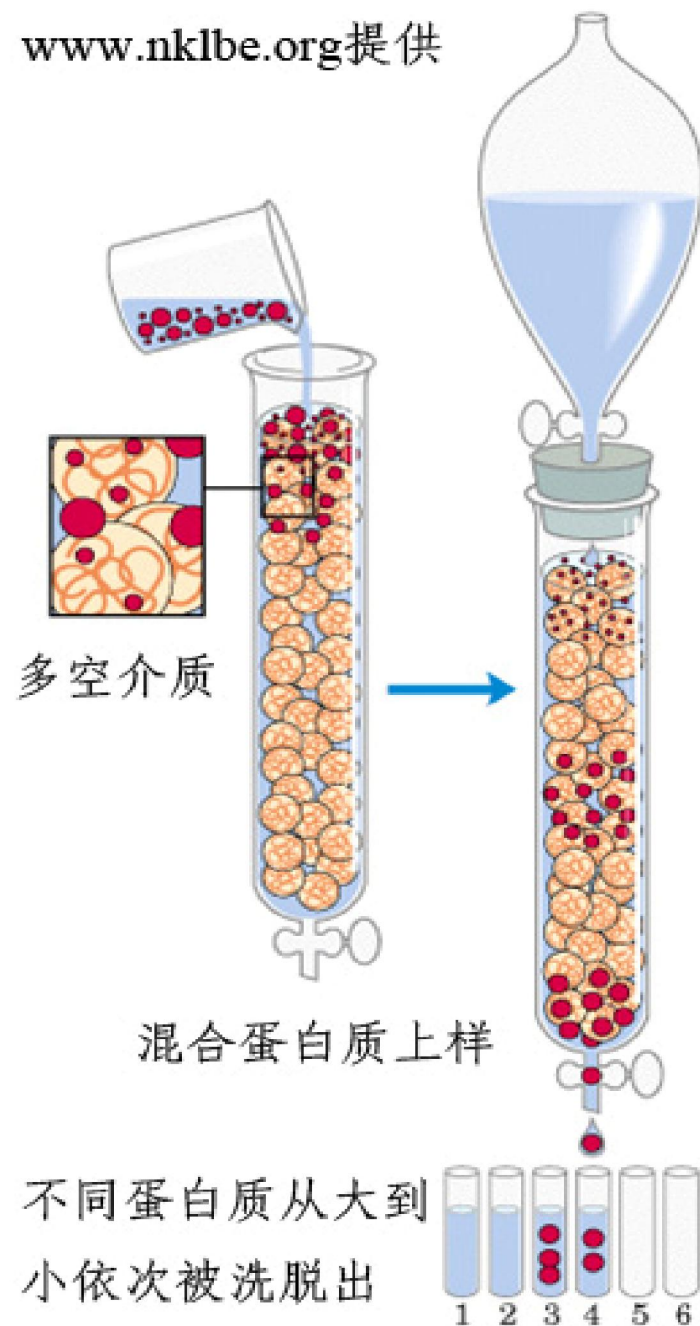
利用**凝胶粒子**为固定相，根据**料液中溶质相对分子质量**的差别进行分离的液相层析法。

凝胶介质像分子筛一样，将大小不同的分子进行分离，因而又叫**体积排阻色谱**



www.nklbe.org 提供

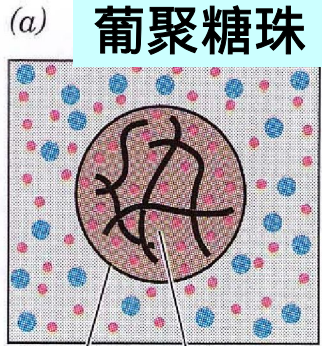
www.nklbe.org提供



# 凝胶过滤的基本原理：

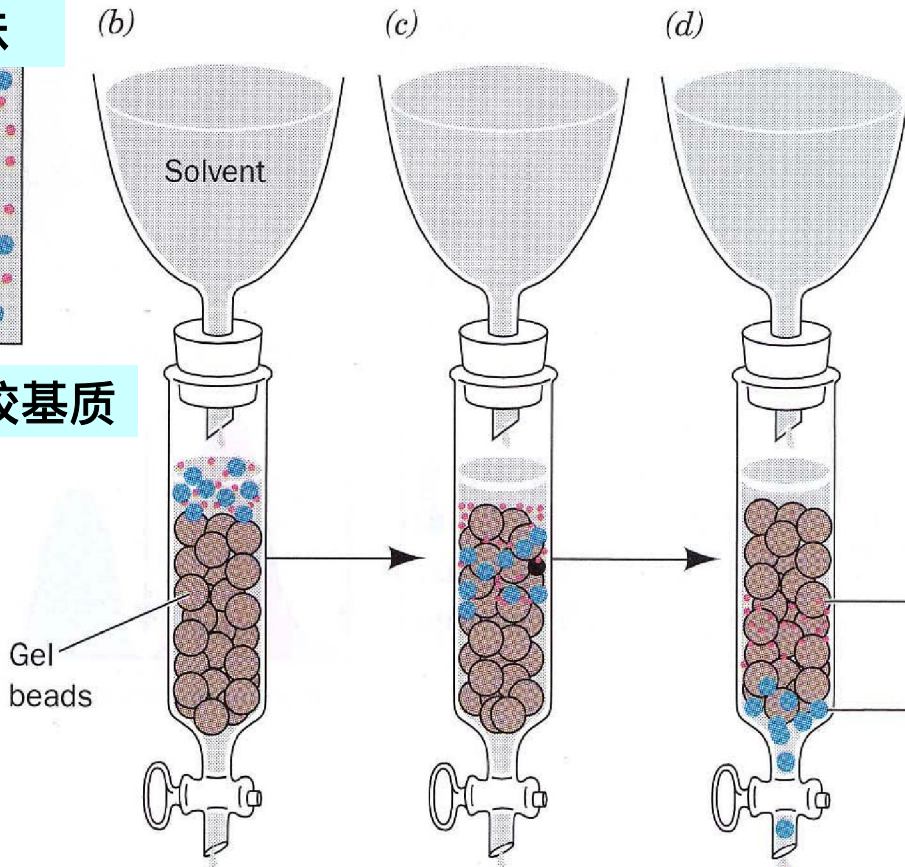
- 含有尺寸大小不同分子的样品进入层析柱后，较大的分子不能通过孔道扩散进入凝胶珠体内部，较小的分子可以通过部分孔道，更小的分子可通过任意孔道扩散进入珠体内部。从而使得小分子移动最慢，中等分子次之，不同分子尺寸分子先后顺序不同流出层析柱，达到分离的目的。

# 带网孔的葡聚糖珠



凝胶基质

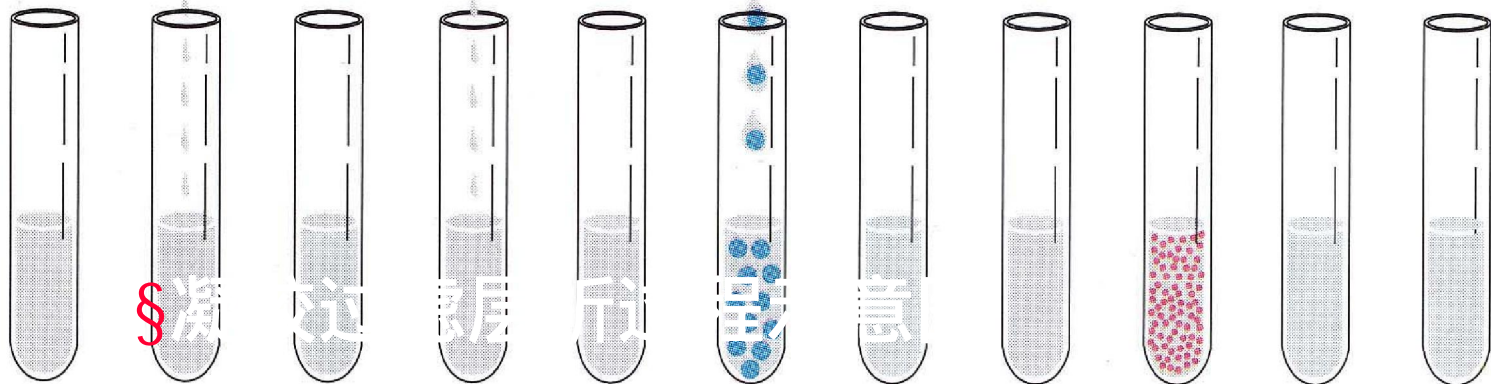
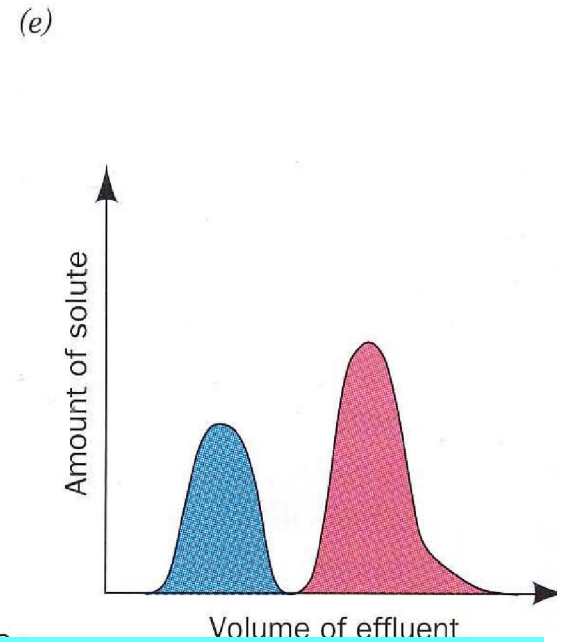
凝胶珠



Gel beads

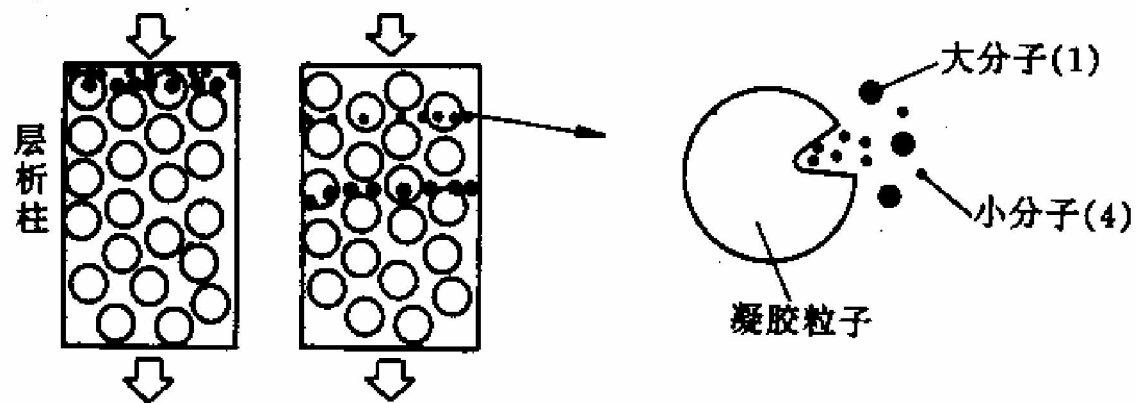
Small molecules  
Large molecules

小分子进入葡聚糖珠内  
大分子不能进入珠内，经珠之间缝隙流出

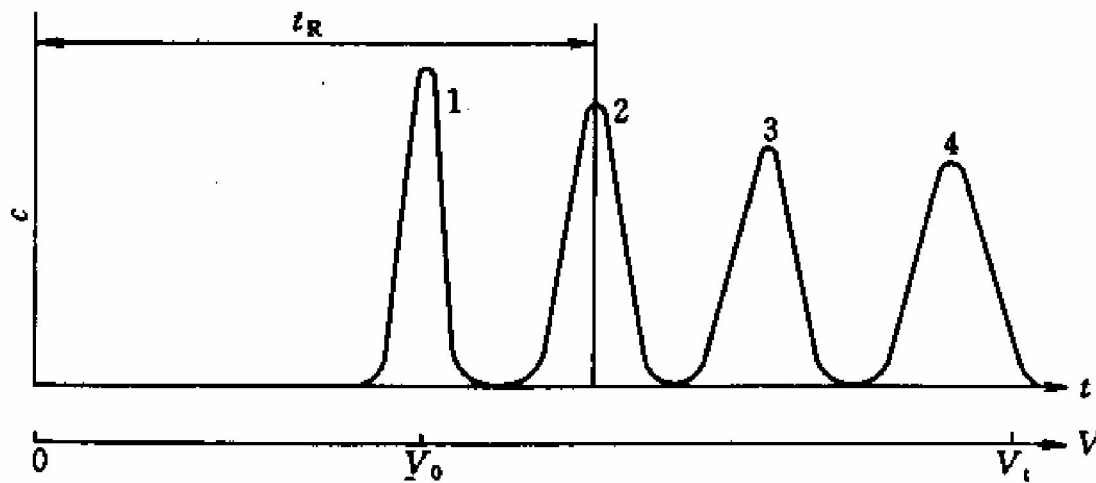


注意

# 操作



a. 分离原理



b. 洗脱曲线

图 7.10 GFC 的分离原理及洗脱曲线

## 二、凝胶过滤介质

### 1、应用

蛋白质等生物大分子的分级分离、除盐和分子量测定

### 2、介质的要求

亲水性高，表面惰性；  
稳定性强，在较宽的pH和离子强度范围以及化学试剂中保持稳定，使用寿命长；  
具有一定的孔径分布范围；  
机械强度高，允许较高的操作压力（流速）。

### 3、介质的种类

(1) **Sephadex G**是最传统的软凝胶过滤介质,是利用葡聚糖交联制备的,交联剂采用环氧氯丙烷。**G**后面的数字越大表示孔径越大,排阻极限也越大。

(2) **琼脂糖凝胶Sepharose**机械强度较低。Sepharose CL是利用环氧氯丙烷交联制备的琼脂糖凝胶,机械强度较普通Sepharose高。

(3) **TSK凝胶**是利用亲水性合成高分子制备的凝胶过滤介质,有较高的机械强度,其中HW系列为半刚性凝胶,适用于中压液相层析;PW系列机械强度更高,适用于高压液相层析。



(4) **Superdex**凝胶粒径为24-44 $\mu\text{m}$ ，分离精度高，适用于高效液相层析。

(5) **Superose**常用于高效离子交换层析和高效亲和层析的载体。

## 4、凝胶特性参数

**(1)柱体积**：柱体积是指凝胶装柱后，从柱的底板到凝胶沉积表面的体积。在色谱柱中充满凝胶的部分称为凝胶床，因此柱体积又称“床”体积，常用 $V_t$ 表示。

- **峰洗脱体积**：指被分离物质通过凝胶柱所需洗脱液的体积，常用 $V_e$ 表示。

外水体积：色谱柱内凝胶颗粒间隙，这部分体积称外水体积，亦称间隙体积，常用 $V_0$ 表示。

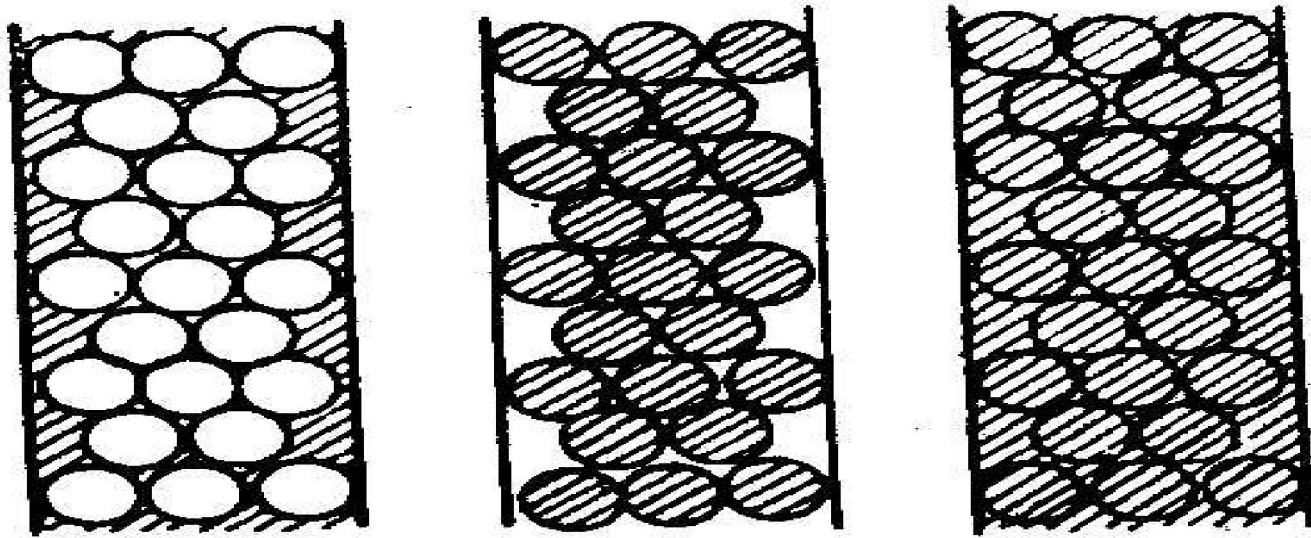
- 空隙体积可用相对分子质量大于排阻极限的溶质测定。
- 一般使用平均相对分子质量为2000kD的水溶性蓝色葡聚糖 (blue dextran)。

内水体积：因为凝胶为三维网状结构，颗粒内部仍有空间，液体可进入颗粒内部，这就分间隙的总和为内水体积，常用 $V_i$ 表示。不包括固体支持物的体积（ $V_g$ ）。

支持物的体积（ $V_g$ ）

## 【基本概念】

- 外水体积、内水体积、柱床体积
- 外水体积 ( $V_o$ ) 是指凝胶柱中凝胶颗粒周围空间的体积内水体积 ( $V_i$ ) 是指凝胶颗粒中孔穴的体积。柱床体积是 ( $V_t$ ) 凝胶柱所能容纳的总体积。



$$V_o \quad V_t - V_o = V_i + V_s \quad V_t$$

图 6-2 凝胶柱床中  $V_t, V_o$   
等关系示意图



**(2)排阻极限 ( exclusion limit ) :**

指不能扩散到凝胶网络内部的最小分子的相对分子质量，其洗脱体积为 $V_0$ 。

**(3)分级范围(fractionation range):**

能为凝胶阻滞并且相互之间可以得到分离的溶质的相对分子质量范围。

#### (4) 溶胀率:

市售干燥凝胶颗粒使用前要用水溶液进行溶胀处理，溶胀后每克干凝胶所吸收的水分的百分数

$$\text{溶胀率} = \frac{100\% \times (\text{溶胀处理平衡后重量} - \text{干燥重量})}{\text{干燥重量}}$$

Sphadex G50的溶胀率为500%±30%。  
Sphadex G系列中的凝胶型号与溶胀率有关。

## (5) 凝胶粒径:

一般为球形，粒径越小，HETP越小，分离效率越高。

凝胶粒径多用筛目或微米表示。

软凝胶粒径较大，一般为 $50-150\mu\text{m}$ (100-200目)，硬凝胶粒径较小，一般为 $5-50\mu\text{m}$ 。

例如，Sephacrose和Sephadex凝胶粒径分布为 $45-165\mu\text{m}$ ，而Superose和TSK Toyopearl HW系列可小到 $20-40\mu\text{m}$ ，甚至 $6-10\mu\text{m}$ 。

- **(6) 填充体积 (Packing volume)**
- 1克干凝胶溶胀后所占有的体积。由此可以估算装满一定体积的层析柱所需的干凝胶量。譬如，SephadexG50的填充体积为9 - 11cm<sup>3</sup>/g，也叫溶胀因子。



### 三、影响分离特性的因素

#### 1、流动相流速

蛋白质分离时，流速对分离度的影响是一个很重要的因素，一般在低流速下蛋白质分离是比较理想。

## 2、样品容量

进样体积和样品的浓度将明显地影响蛋白质的分离度。

样品的浓度范围一般在0.01%--0.5%，最好是高浓度、小体积，在一般范围内可以得到好的分离效果，蛋白质的样品体积为柱体积的1%--3%比较合适。

## 料液浓度

理论上，洗脱时间和HETP与料液浓度无关。

实际上，料液浓度较高时，洗脱曲线常呈现不对称形状，如出现吐舌或拖尾，甚至出现分裂的两个峰，使HETP急剧增大。

主要原因是料液区和流动相的粘度差引起的。经验表明，料液与流动相的粘度比需小于2

### 3、相对分子质量与分配系数

要分离的分子分为三类：

A类： $d_A >$  最大孔径，全排阻（出）

凝胶对它无阻滞，最早流出； $Kd=0$

C类： $d_C <$  最小孔径，能进入全部孔隙区

阻滞最大，流速最慢，最晚流出； $Kd=1$

B类：最小孔径  $< d_B <$  最大孔径，进入部分孔隙区

大小不同B类分子之间阻滞不同，可以分离

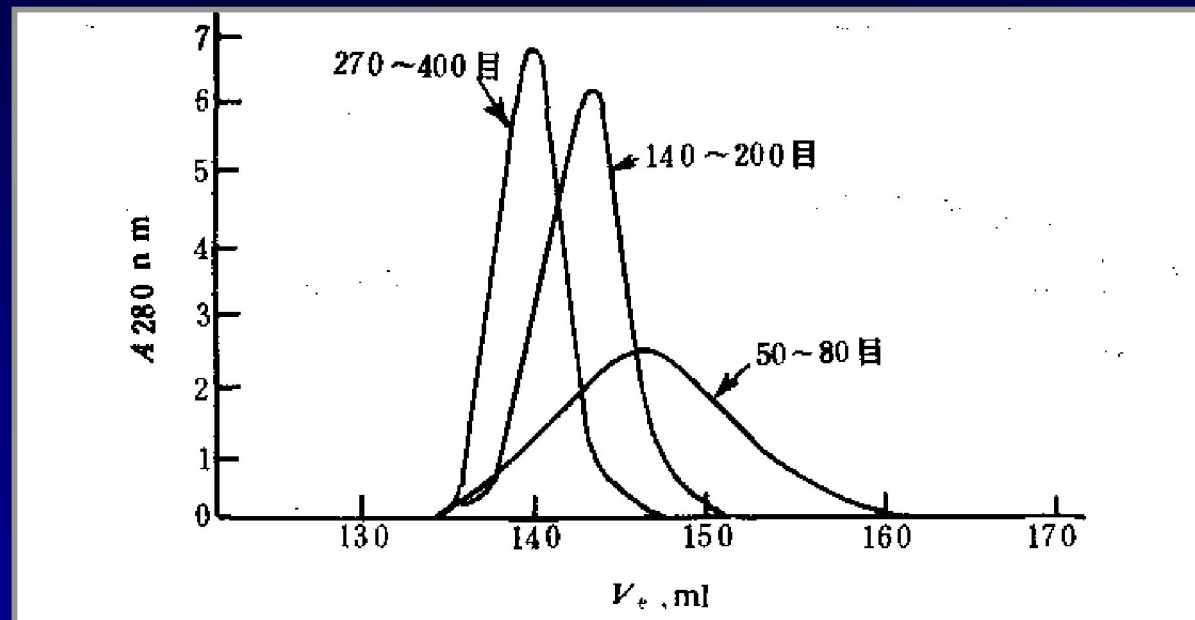
$0 < Kd < 1$

把B类分子的分离称为分级分离 B B ...

把A、B、C类分子间分离称为组别分离 A B C

## 4、凝胶粒度的影响

- 凝胶粒度的大小对分离效果有直接的影响。一般来说，细粒凝胶柱流速低，但洗脱峰窄，分辨率高，多用于精制分离或分析等。粗粒凝胶柱流速高，但洗脱峰平坦，分辨率低，多用于粗制分离，脱盐等。



同一流速下不同粒度的 Sephadex G-25 柱的洗脱效果

## 四、凝胶过滤层析实验技术

### 1、凝胶的选择

- 选择适宜的凝胶是取得良好分离效果的最根本的保证。选取何种凝胶及其型号、粒度，一方面要考虑凝胶的性质，包括凝胶的分离范围（渗入限与排阻限）、理化稳定性、强度、非特异吸附性质等

另一方面：

对生物样品来说，经常遇到的是两种分离形式

## 组别分离

- 目的是分开样品中分子量悬殊的“较大分子组”和“较小分子组”两类物质，并不要求分离分子量相近的组分
- 选择凝胶时，应使样品中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。也就是说大分子的分配系数 $K_d=0$ ，小分子的 $K_d=1$ 。这样能取得最好的分离效果。

例题：从某蛋白质溶液（ $MW=5500D$ ）中除去无机盐，应选择下列哪种凝胶最合适？

- A. Sephadex G-15（分级范围， $<1,500 D$ ）
- B. Sephadex G-25（分级范围， $1000-5000 D$ ）
- C. Sephadex G-150（分级范围， $5,000-400,000 D$ ）

## 分级分离

• 目的是分开分子量不很悬殊的大分子物质

- 使各种物质的 $K_d$ 值尽可能相差大一些。
- 首先决不能使它们的分子量都分布在凝胶分离范围的一侧，也就是 $K_d$ 不要都接近于0或1，而要使组分的分子量尽可能分布在凝胶分离范围的两侧，或接近两侧的位置。
- 如果样品中含有3个组分的话，最好一个接近全排阻，另一个接近全渗入，第三个为部分渗入，且分子量大于渗入限的3倍，并小于排阻限的 $1/3$ 。



例题：从某三种蛋白质混合溶液（MW=5000、20,000、60,000）中除去无机盐，应选择下列哪种凝胶最合适？

- A. Sephadex G-25（分级范围，1000-5000 D）
- B. Sephadex G-75（分级范围，3,000~70,000 D）
- C. Sephadex G-150（分级范围，5,000-400,000 D）

## 2、层析柱的选择

层析柱大小主要是根据样品量的多少以及对分辨率的要求来进行选择。

层析柱的长度对分辨率影响较大，长的层析柱分辨率要比短的高；但层析柱长度不能过长，否则会引起柱子不均一、流速过慢等实验上的一些困难。

一般柱长度不超过100cm，为得到高分辨率，可以将柱子串联使用。用于分组分离的凝胶柱，如脱盐柱由于对分辨率要求较低，所以一般比较短。

### 3、洗脱液的选择

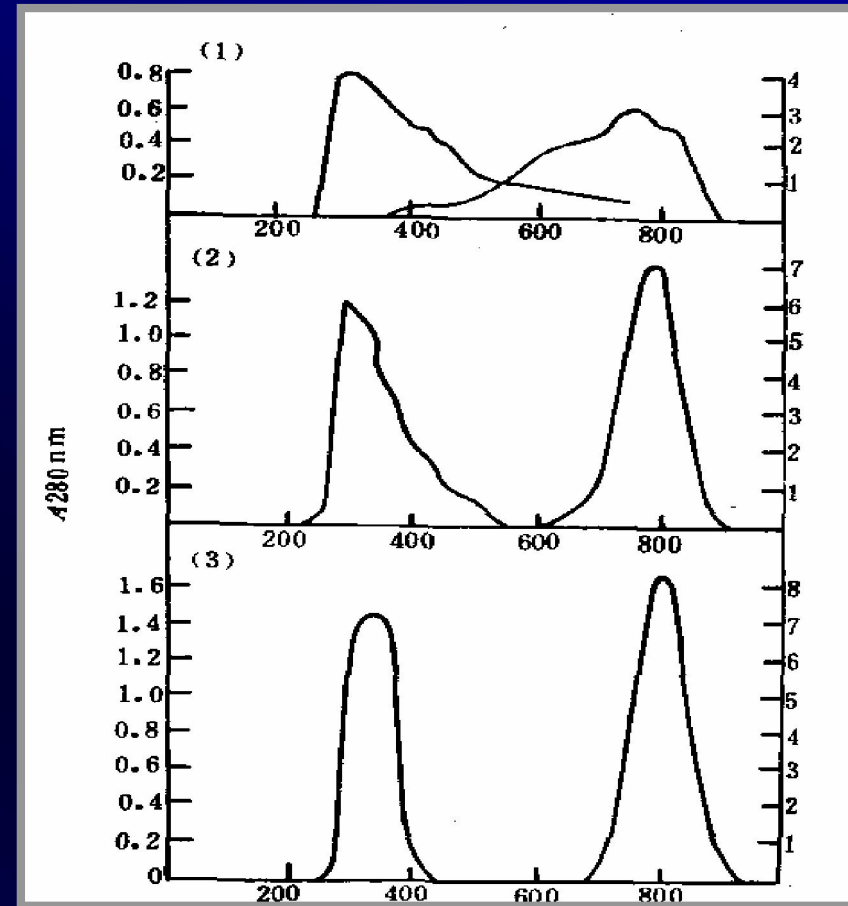
在凝胶层析中流动相只是起运载工具的作用，一般不依赖于流动相性质和组成的改变来提高分辨率，改变洗脱液的主要目的是为了消除组分与固定相的吸附等相互作用，所以和其他层析方法相比，凝胶层析洗脱液的选择不那么严格。

由于凝胶层析的分离机理简单以及凝胶稳定工作的pH值范围较广，所以洗脱液的选择主要取决于待分离样品，一般来说只要能溶解被洗脱物质并不使其变性的缓冲液都可以用于凝胶层析。

为了防止凝胶可能有吸附作用，一般洗脱液都含有一定浓度的盐。

## 4、样品的准备

- 样品的粘度：粘度大产生介质吸附，一般要求样品粘度小于 $0.01\text{Pa}\cdot\text{s}$
- 样品的浓度：样品浓度以不大于4%为宜，样品浓度过大往往导致粘度增大。如果样品浑浊，应先过滤或离心除去颗粒后上柱。
- 样品的体积：分析用量一般应低于总柱体积的5%，制备用量一般为15%或更多（20-30%）。



样品黏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%.

## 5、洗脱速度

**要恒定而且合适**

方法：a.使用恒流泵，b.恒压重力洗脱。

洗脱速度取决于柱长、凝胶种类、颗粒大小等。

**洗脱速度慢，样品可以与凝胶基质充分平衡，分离效果好，但过慢会造成样品扩散加剧，区带变宽，反而会降低分辨率，而且实验时间延长。**

选择合适的洗脱速度，可以通过预备实验来选择。

市售的凝胶一般会提供一个建议流速，可供参考。

## 四、GFC 的应用及特点

### 1、分离纯化

GFC可用于相对分子质量从几百到 $10^6$ 数量级的物质的分离纯化，是蛋白质、肽、脂质、抗生素、糖类、核酸以及病毒(50-400nm)的分离与分析中常用的液相层析法。

GFC还可用于医药产业中无热原水的制备以及低分子生物制剂中抗原性杂质的除去。

(1) 酶解产物的分离

(2) 纯化青霉素

## 2·脱盐

另一主要用途是生物大分子溶液的脱盐，以及除去其中的低相对分子质量物质。

## 3、相对分子质量的测定（分级分离）

$$m = a - b \log MW$$

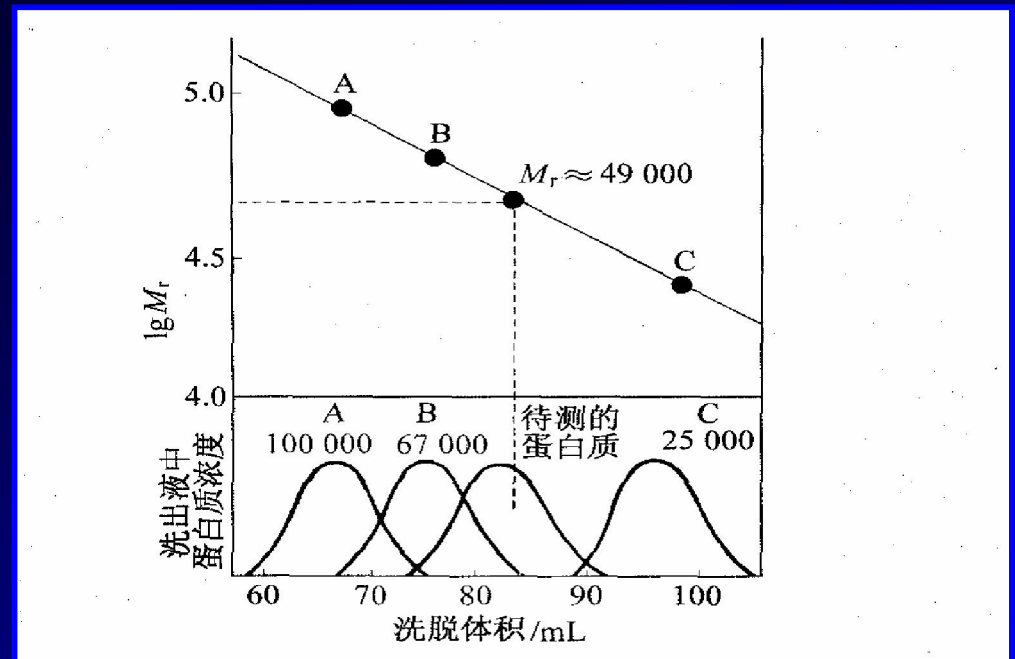
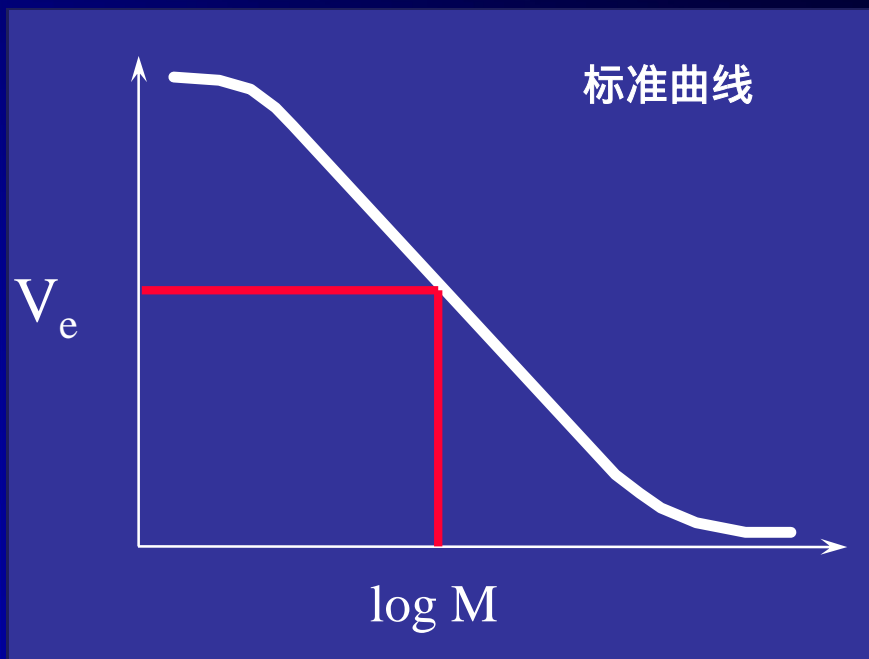


# 测定相对分子质量

- 标准曲线法

- ∅ 对于**特定的测定系统**，先以3个以上（越多越好）的已知分子量的标准蛋白（目前已有配套标准蛋白系列产品出售）过柱，测取各自的 $V_e$ 值。以 $V_e$ 作纵坐标， $\text{Log}M$ 作横坐标制做标准曲线。

- ∅ 在**同一测定系统**中测出未知物质的 $V_e$ 值便可由标准曲线求得分子量。分子量在10 000 ~ 150 000之间的**球形蛋白**用此法测出的分子量误差在10%左右。



## 4、GFC的特点

溶质与介质不发生相互作用，可采用恒定洗脱法洗脱展开，操作条件温和，产品收率可接近100%；每批分离操作结束后不需要进行介质的清洗或再生，故容易实施循环操作，提高产品纯度；作为脱盐手段，GFC比透析法速度快，精度高；与超滤法相比，剪切应力小，蛋白质活性收率高；分离机理简单，操作参数少，容易规模放大。操作简便，凝胶过滤介质相对价廉易得。

## GFC的缺点：

- ∅仅根据溶质之间分子量的差别进行分离，选择性低，料液处理量小；
- ∅经GFC洗脱展开后产品被稀释。因此需要在具有浓缩作用的单元操作(如超滤、离子交换和亲和层析等)后使用。
- ∅料液处理量小，并且样品粘度不宜太高。

## 第五节 离子交换层析

### Ion exchange chromatography, IEC

#### 一、原理

离子交换层析是利用离子交换剂为固定相，根据荷电溶质与离子交换剂之间静电相互作用力的差别进行溶质分离的洗脱层析法。

# 离子交换层析原理示意图

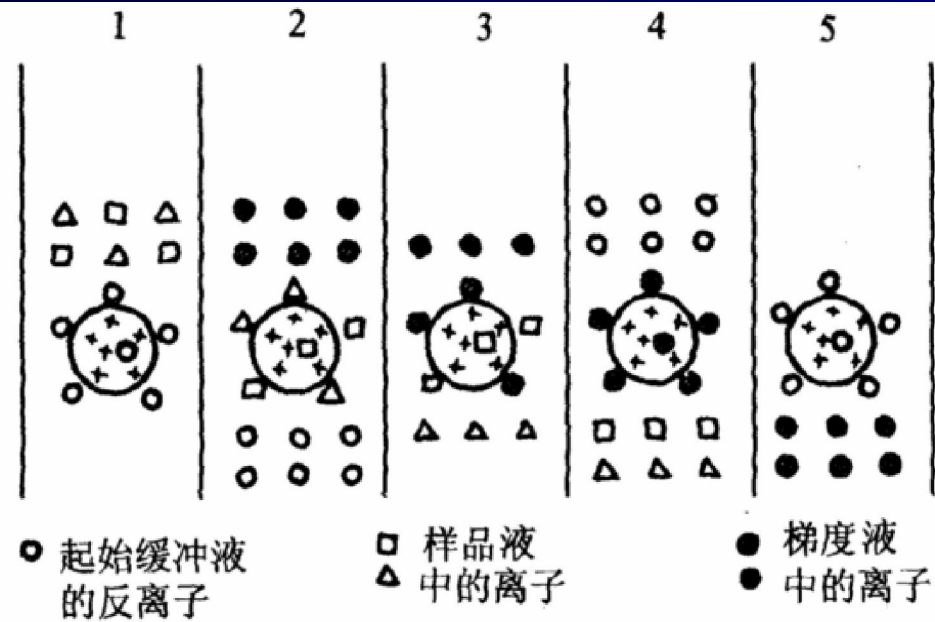


图 5-2 离子交换层析原理示意图

1. 平衡阶段:离子交换剂与反离子结合;2. 吸附阶段:样品与反离子进行交换;3、4. 解吸附阶段:用梯度缓冲液洗脱,先洗下弱吸附物质( $\Delta$ ),尔后洗下强吸附物质( $\square$ );5. 再生阶段:用原始平衡液进行充分洗涤,即可重复使用

## 1、特点

分辨率高、工作容量大，易操作，  
是分离纯化蛋白质、多肽、核酸以及大部分发酵  
产物的重要方法，在生化分离中**约有75%采用离  
子交换层析。**

## 2、离子交换树脂的分类

根据可电离的交换基团或功能基团

阳离子交换树脂

酸性电离基团  
可交换阳离子

强酸  
弱酸

阴离子交换树脂

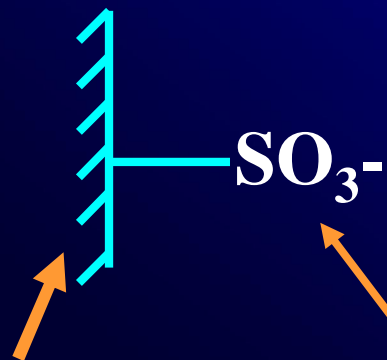
碱性电离基团  
可交换阴离子

强碱  
弱碱

强酸性：

基质

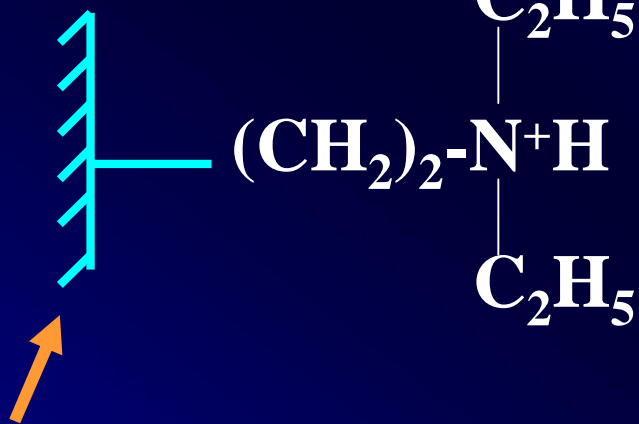
活性功能基团



Sephadex

磺酸基

强碱性：



Sephadex

二乙胺乙基DEAE



常用的阳离子交换基有：

CM（羧甲基， $\text{pH} > 4$ ）；

SP（磺丙基）。

常用的阴离子交换基有：

DEAE（二乙胺乙基， $\text{pH} < 8.6$ ）；

QAE（季胺乙基）。

### 3、离子交换介质

#### (1) 纤维素类

离子交换纤维是最早用于生物大分子分离的介质，具有松散的亲水网络、孔隙大、表面积大等优点。

#### (2) 多糖类

∅**葡聚糖系** 在Sephadex G25及G50两种凝胶介质上引入功能基后，产生的多种离子交换介质。

∅**琼脂糖系** 琼脂糖凝胶介质上引入功能基可得到多种离子交换介质，

### (3) 树脂类

该类离子交换介质商品化型号主要为Toyoperal系列。

性能		类型	DEAE-Toyoperal 650	CM-Toyoperal 650
介质类型			WB	WA
粒径 (S) / $\mu\text{m}$			20 ~ 40	20 ~ 40
粒径 (M) / $\mu\text{m}$			40 ~ 80	40 ~ 80
功能基pK值			11.5 (可用于酸性蛋白)	4.7
排阻极限 (PEG)			1 000 000	1 000 000
交换容量	全交换容量/ $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$		108	120
	有效容量 $/\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	牛血清蛋白	26	45
		铁蛋白	15	-
		甲状腺球蛋白	11.5	-
流速/ $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$			>300	>300

## (4) Mono Beads系

对蛋白质、肽及低聚核苷酸等有很高的分离效果，其粒径分布极窄（ $10\ \mu\text{m}$ ），有3种类型的功能基。Mini系为粒径最小的离子交换剂。

牌号	排阻极限	粒径/ $\mu\text{m}$	pH稳定性 [短时清洗]	全交换容量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$	特性/应用
Mono Q	$1 \times 10^7$	10	2 ~ 12 [2 ~ 14]	270 ~ 370	强碱性阴离子交换介质，适用于单克隆抗体的分离
Mono S	$1 \times 10^7$	10	2 ~ 12 [2 ~ 14]	140 ~ 180	强酸性阳离子交换介质，适于分离多肽
Mono P	$1 \times 10^7$	10	2 ~ 12 [2 ~ 14]	150 ~ 210	弱碱性阴离子交换介质，可用于聚焦色谱
Mini Q	-	3	3 ~ 11 [1 ~ 14]	-	强碱性阴离子交换介质，有极高的分辨率
Mini S	-	3	3 ~ 11 [1 ~ 14]	-	强酸性阳离子交换介质，有极高的分辨率

## 二、离子交换层析的洗脱方式



荷电溶质在离子交换剂上的分配系数

$$m(I) = \frac{A}{I^B} + m_{\infty}$$



$$B = \frac{b}{a}$$

流动相的离子强度



B为吸附1个  
蛋白质分子所  
交换的反离子

$m_{\infty}$ 为离子强度无限大时溶质的分配系数，是静电相互作用以外的非特异性吸附引起的溶质在离子交换剂上的分配。

## IEC操作采用恒定洗脱法的问题？

- ∅  $m_{\text{蛋白质}}$  对  $I$  非常敏感， $I$  的微小改变，就会引起  $m$  的很大变化；
- ∅ 不同蛋白质的  $B$  值相差很大，即在同一  $I$  值下不同蛋白质分配系数可能相差非常大(数量级)。

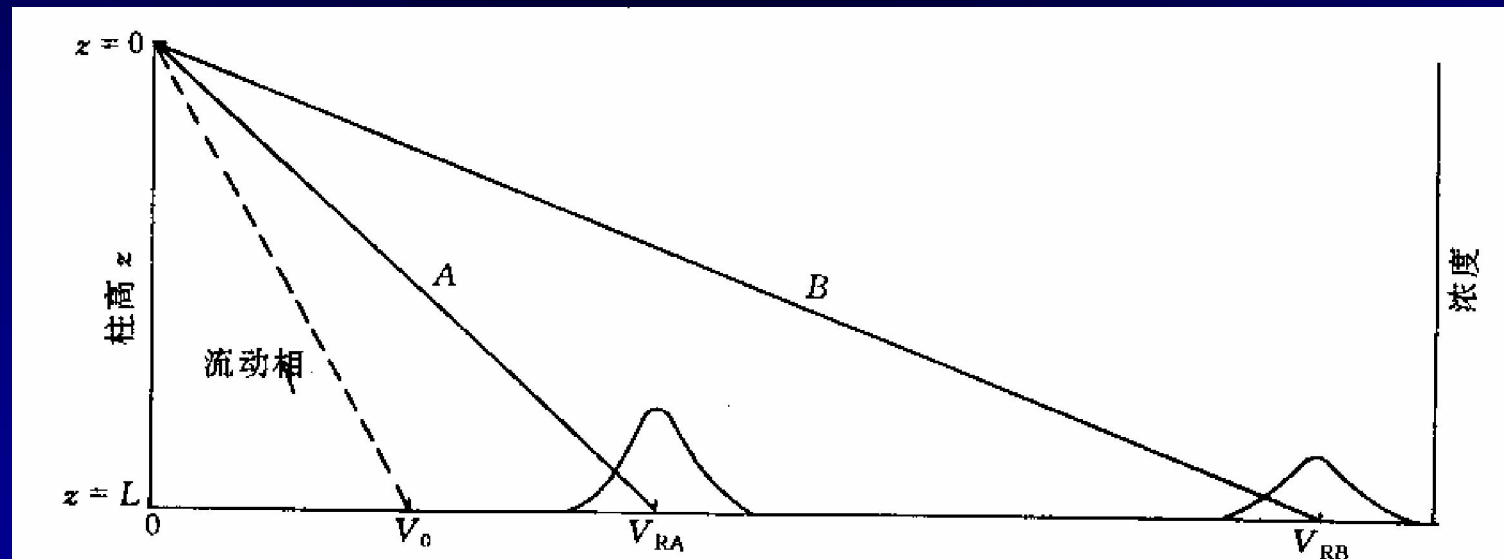


图 7.18 恒定洗脱过程中溶质 A 和 B 在 IEC 柱内的移动和洗脱曲线  
(溶质移动速度一定，柱内溶质之间距离逐渐增大)

解决方法：

n 线性梯度洗脱法

n 离子强度阶跃增大的逐次洗脱法

## 1、线性梯度洗脱

特点：流动相离子强度线性增大

m 连续降低



溶质的移动速度逐渐增大

优点：

| 使恒定洗脱条件下难于洗脱的溶质在较小的流动相体积下洗脱；

| 在改善分离度的同时缩短洗脱时间。

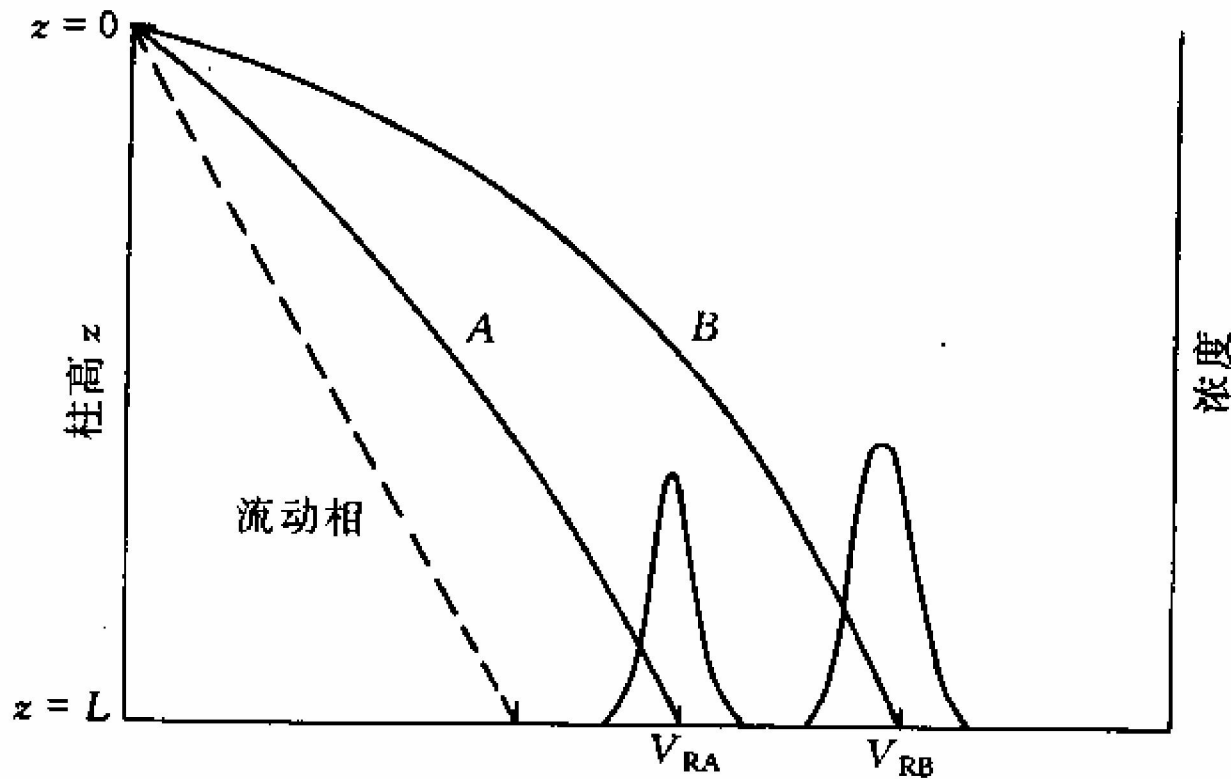
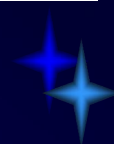


图 7.19 线性梯度洗脱过程中溶质 A 和 B  
在 IEC 柱的移动和洗脱曲线

溶质的移动速度不断增大，直至与流动相流速相同 ( $m \rightarrow 0$ )





## 2、逐次洗脱过程

特点：

流动相的离子强度阶跃增大；  
m阶段式降低；  
溶质的移动速度阶段式增大

如果流动相离子强度的阶跃速度很快，逐次洗脱接近线性梯度洗脱；反之则接近恒定洗脱。

逐次洗脱是介于恒定洗脱和线性梯度洗脱之间的一种洗脱法。

# IEC柱内溶质区带移动行为可大致分为两种

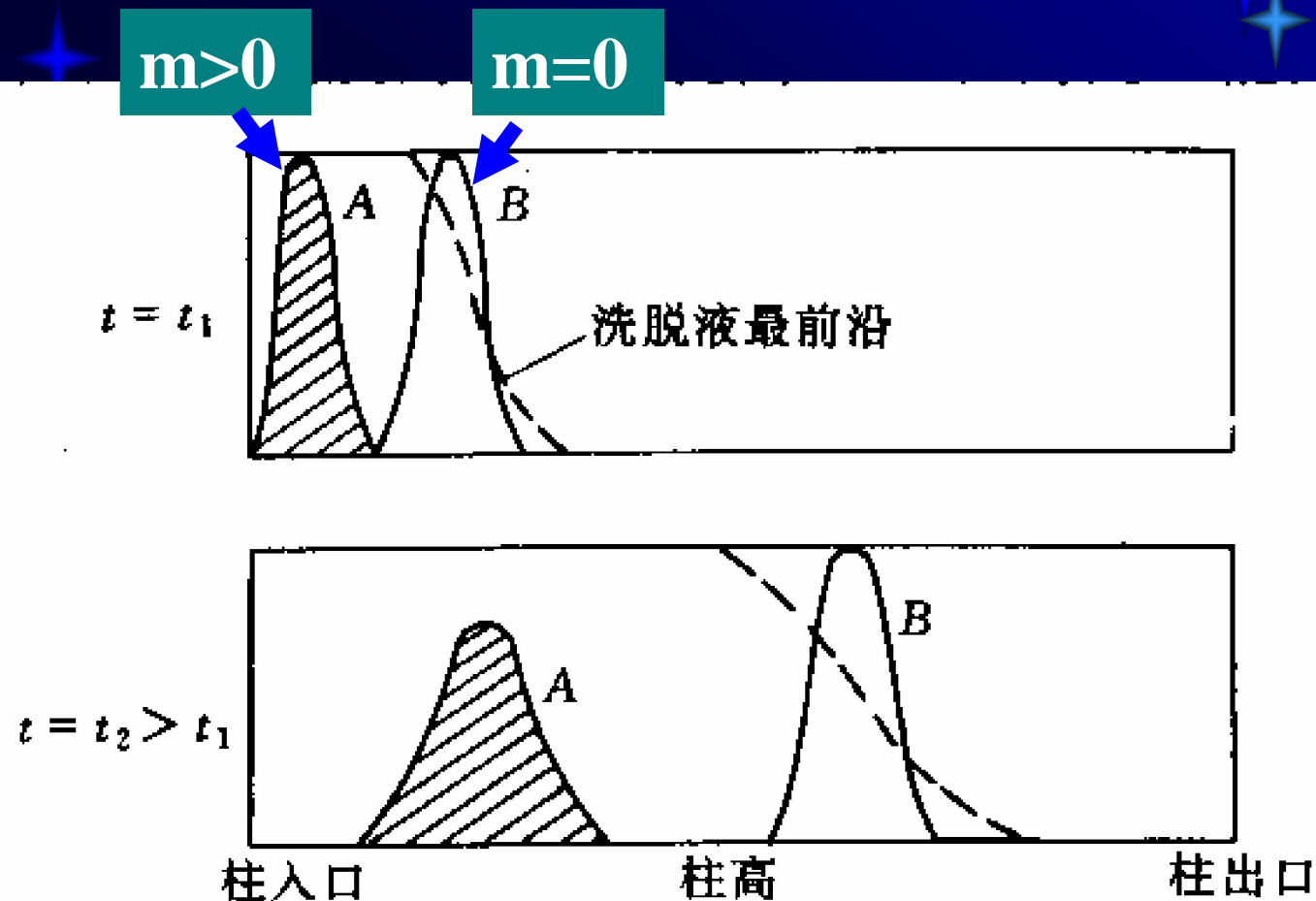


图 7.23 逐次洗脱过程中溶质区带的移动行为

## 线性梯度洗脱和逐次洗脱的特点：

溶质在洗脱过程中得到浓缩

### (1)线性梯度洗脱法

优点：

流动相离子强度 (盐浓度)连续增大，不出现干扰峰，操作范围广

缺点：

需要特殊的调配浓度梯度的设备

## (2) 逐次洗脱法

优点：

利用切换不同盐浓度的流动相溶液进行洗脱，不需要特殊梯度设备，操作简便；

缺点：

流动相浓度不连续变化，易出现干扰峰。出现多组分洗脱峰重叠的现象，因此洗脱操作参数（如盐浓度，体积）的设计较困难。

实际操作

如果料液组成未知，应首先采用线性梯度洗脱法，确定各种组分的分配特性以及层析操作的条件。

### 三、离子交换的影响因素



考虑：蛋白质的等电点、介质的电离常数 $pK$ ，全交换容量等参数。

#### 1、树脂选择

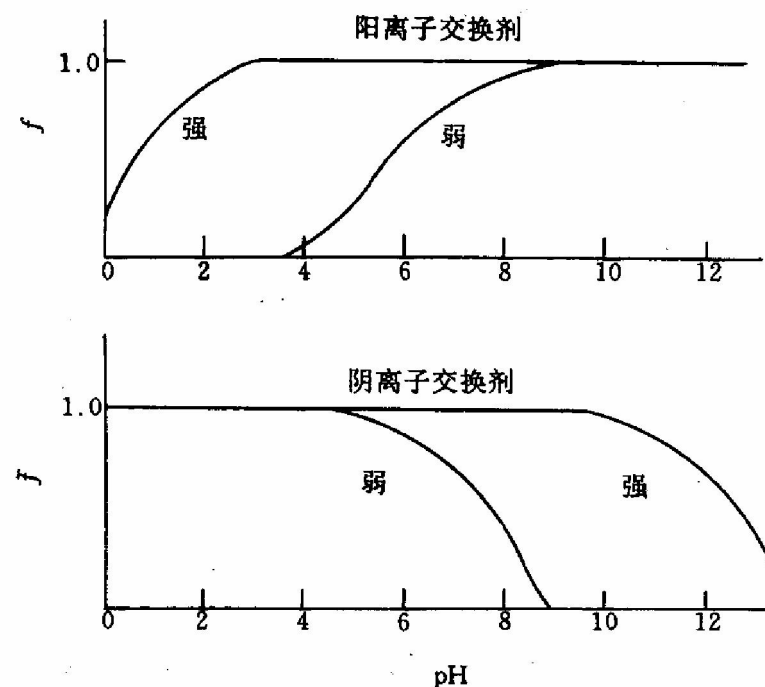


图 6.1 离子交换剂的离子化率  $f$  与 pH 的关系

强型离子交换树脂，操作pH宽广，但难于解吸。  
如用强酸、碱等；  
在实用中，多用弱型离子交换树脂，容易解吸。

## 2、pH ——影响吸附的最重要的一个因素

原因：

pH决定蛋白质的带电荷大小，直接影响蛋白质在离子交换吸附剂上的吸附。

★ 如阴离子交换树脂，当 $\text{pH} > \text{pI}$ 时，蛋白质带有负电，pH越高，负电荷越多，越容易吸附在阴离子交换树脂上。  
结果吸附容量大，但解吸时困难。

### 3、离子强度

$$m = \frac{m_1}{I^Z}$$

离子交换吸附在很低的离子强度下进行

原因

高离子将会解吸吸附的溶质。所以离子交换一般不接在盐析分离后。如果必须在盐析后，也应该先除盐后，再进行离子交换。缓冲液中的离子强度的选择也很重要，一般在10 - 50mmol/L。离子强度越低，吸附越强，但也越难解吸。具体浓度要由试验确定。



# 五、离子交换层析实验技术

## 1、离子交换剂的选择

### (1) 阴阳离子交换剂的选择

依据被分离组分所带电荷

- 若带正电荷，用阳离子交换剂
- 若带负正电荷，用阴离子交换剂
- 若为两性物质，则看其在什么pH范围叫稳定

如：某蛋白的  $pI=5.0$ ，若其在  $pH 5 \sim 8$  稳定，

则选择阴离子交换层析；

若其在  $pH < 5$  较稳定，

则选择阳离子交换层析



## (2) 强、弱离子交换剂的选择

一般，**强性离子交换剂**适用范围广，常用于制备去离子水和分离在极端 pH 中解离且较稳定的物质；而**弱性离子交换剂**的适用范围相对较窄，在中性溶液中的交换容量也较高，且用其分离生命大分子物质时，不易引起失活。

——故分离生物样品时习惯采用**弱性离子交换剂**

### (3) 不同基质离子交换剂的选择

常见的几种不溶性基质有**树脂**、**纤维素**、**葡聚糖**和**琼脂糖**。在分离生命大分子物质时，一般选择**亲水性基质**

(因为由亲水性基质制成的离子交换剂对生命大分子物质的吸附和洗脱都比较温和，层析时不会导致被分离物质活性丧失)

## 2、缓冲液的选择

由于离子交换剂除了可与被分离组分进行交换外，还可以与缓冲液中的离子进行交换。离子交换剂吸附被分离物的量与缓冲液的 pH 值及离子强度密切相关。

## (1) 已知 p 的生物样品的分离

pH 和离子强度应满足有效成分与离子交换剂结合，而杂质不能与交换剂结合。pH 值一般应比有效成分的 p 值高或低 1 个单位；

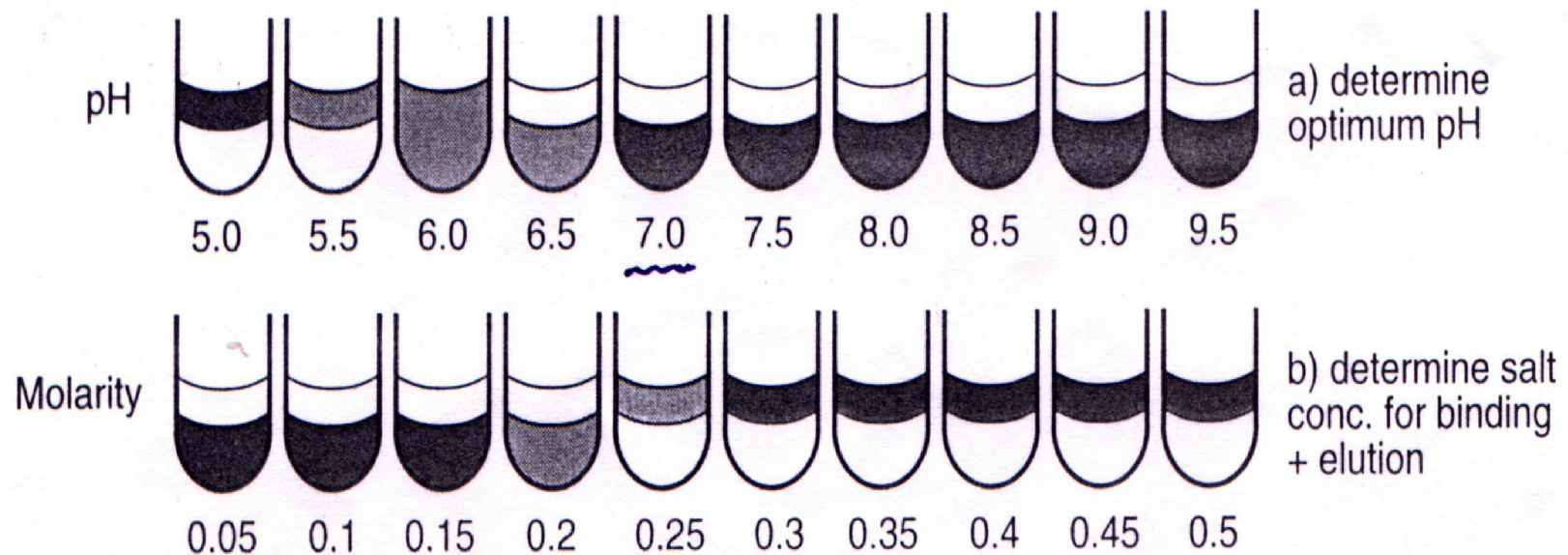
缓冲液的离子强度 pH 值，使有效成分与离子交换剂疏松结合，而杂质与交换剂牢固结合；然后选用高于初始缓冲液离子强度的缓冲液作为洗脱液，使有效成分解离下来，而杂质不解离，达到分离的目的。

## (2) 未知 pI 的生物样品的分离

关键在于了解有效成分的 pI

起始缓冲液 pH 的选择：看哪一管的有效成分完全被吸附

### Test-tube methods for selecting ion exchange condition



### 3、操作形式的选择

固定床或膨胀床

——可以采用膨胀床直接  
处理发酵液或破碎液

柱子状吸附还是批次投料

## 五、应用举例

IEC是蛋白质，肽和核酸等产物的主要纯化手段。  
具有通用性，选择性远高于GFC。

1、氨基酸和碱性肽类的分离

2、碱性水溶性抗生素的分离

3、蛋白质的分离纯化

目前约有80%的蛋白质分离纯化中用到离子交换。  
离子交换纯化倍数一般可达到3 - 10倍左右。离子交换层析中一般采用盐浓度梯度洗脱，以达到高分辨率。

## IEC具有如下的特点：

料液处理量大，具有浓缩作用，可在较高流速下操作；  
应用范围广泛，优化操作条件可大幅度提高分离的选择性，所需柱长较短；  
产品回收率高；  
商品化的离子交换剂种类多，选择余地大，价格也远低于亲和吸附剂。



## 第六节 疏水性相互作用层析

(Hydrophobic interaction chromatography , HIC)

### 一、原理

利用表面偶联弱疏水性基团(疏水性配基)的**疏水性吸附剂**为固定相，根据蛋白质与疏水性吸附剂间的**弱疏水性相互作用的差别**进行蛋白质类生物大分子分离纯化的洗脱层析法。

依据：

亲水性蛋白质表面均含有一定量的疏水性基团，疏水性氨基酸（如酪氨酸、苯丙氨酸等）含量较多的蛋白质疏水性基团多，疏水性也大。

疏水基团可与亲水性固定相表面偶联的短链烷基、苯基等弱疏水基发生疏水性相互作用，被固定相（疏水性吸附剂）所吸附。

**特点：**

在离子强度较高的盐溶液中，蛋白质表面疏水部位的水化层被破坏，裸露出疏水部位，疏水性相互作用增大。

蛋白质在疏水性吸附剂上的分配系数随流动相盐析盐浓度 (离子强度) 的提高而增大。

 HIC洗脱则主要采用降低流动相离子强度的线性梯度洗脱法或逐次洗脱法。

## 二、疏水性吸附剂

各种凝胶过滤介质经偶联疏水性配基后均可用作疏水性吸附剂。

常用的疏水性配基

苯基、短链烷基(C3-C8)、烷氨基、聚乙二醇和聚醚等。

## 特点：

疏水性吸附作用与配基的疏水性（疏水链长度）和配基密度成正比；

疏水性高的配基应较疏水性低的配基修饰密度低。

一般配基修饰密度在 $10-40\mu\text{mol}/\text{cm}^3$ 之间。

配基修饰密度过小则疏水性吸附作用不足，密度过大则洗脱困难。

### 三、影响疏水性吸附的因素

#### (1) 离子强度及种类

随离子强度的提高而增大，高价阴离子存在吸附作用较强，常用硫酸铵、硫酸钠和氯化钠等盐溶液为流动相，在略低于盐析点的盐浓度下进料，逐步降低浓度洗脱。

#### (2) 破坏水化作用的物质

$\text{SCN}^-$ 、 $\text{ClO}_4^-$ 和 $\text{I}^-$ 等半径大、电荷密度低的阴离子疏水性吸附减弱，蛋白质易于洗脱

乙二醇、丙三醇等含羟基的物质 洗脱促进剂

### (3) 表面活性剂

与吸附剂及蛋白质的疏水部位结合，减弱蛋白质的疏水性吸附。

膜蛋白的分离

表面活性剂的种类和浓度

## 四、HIC的特点

- HIC与IEC作用机理不同，互相取长补短；
- 由于在高浓度盐溶液中疏水性吸附作用较大，因此HIC可直接分离盐析后的蛋白质溶液；
- 通过调节疏水培养基链长和密度调节吸附力，因此可以根据目标产物的性质选择适宜的吸附剂；
- 吸附剂种类多，选择余地大，价格与离子交换剂相当。



## 思考题？

1. 液相色谱的原理及分类。
2. 凝胶过滤色谱、离子交换色谱、疏水性相互作用色谱的分离原理；
3. 层析介质的特点和最常用的层析基质；
4. 容量因子、选择性和理论塔板数如何影响分离度？
5. 何为凝胶过滤层析的排阻极限与分级范围？
6. 凝胶过滤层析中待分离的物质可以分为哪几类，分离方式可以分为哪几类？
7. 色谱分离中的各参数如何影响分离效率？
8. 如何确定凝胶过滤层析的实验操作参数？
9. 凝胶过滤层析有那几个方面的应用。

- 凝胶层析、离子交换层析、疏水性相互作用层析的原理、洗脱方法与特点、影响因素、实验参数选择？