

层析技术介绍*

梁 荣 梯

(中国科学院发育生物学研究所)

层析技术又名色谱法 是用来从混合物中分离各组分的方法。早在1903年就有人用它成功地分离过植物色素。不过,真正引起人们的重视,是在1931年有人用氧化铝柱将胡萝卜素的两种同分异构体分离开之后。这一技术从五十年代发展起来以后,一直发展很快,特别是近二十年进展非常迅速。它已成为生物学研究中的三种常用分离技术(即离心法、层析法、电泳法)之一。

用层析法分离物质,是根据混合物中各组分在两个相(即固定相和移动相)中分布比例上的差异来进行的。这是它同离心法和电泳法的根本区别。层析法主要优点是:设备简易,分离接近于生理环境,分离物质的量幅度大,效率高。它即能用于微量物质的分离,也可用于大规模的制备分离^[1]。有人报道,将在亲和层析基础上发展出一种变多步骤为单一步骤的,崭新的分离方法,这一方法将对八十年代的蛋白质分离产生冲击性的影响。

一、层析法原理和分离过程

尽管层析系统有各种各样,但基本上包括固定相和移动相(简称定相和动相)。选择何种物质来作定相和动相,要视分离物质而定。混合物中各组分在物理、化学或生物学上的性质方面存在着差异,选择适当的物质作定相或动相可使这种差异显著地表现出来,从而达到分离目的。一般用分布常数(Distribution Constant) K_D 来表示某组分在定相与动相中浓度的比值: $K_D = C_1/C_2$ 。

式中 C_1 是该组分在定相中的浓度, C_2 是它在动相中的浓度。有时,被表示成相反的关系,

即: $K_D = C_2/C_1$ 。

分布常数又名分配系数 选择的定相和动相搭配越好,混合物中各组分的 K_D 值的差别也就越大。有时用有效分配系数(又名质量分布比) D_m 来表示某物质在两个相中总量的比值。显然,有效分配系数等于分配系数乘以两个相的体积比: $D_m = K_D \cdot V_1/V_2$ 。

式中 V_1 为该物质所占的定相体积, V_2 为它所占动相体积。

可以看出,两种物质的 D_m 差别越大,它们在定相和动相中的分布差别也就越大,分离也就越好。常用分离因子 d 来表示它们的 D_m 值差别的大小: $d = D_{m_2}/D_{m_1}$ 。

式中 D_{m_1} 为在动相中总量较大的物质的有效分配系数,它首先被分离出来,而 D_{m_2} 则为后被分离出来的物质的有效分配系数。所以,要达到两种物质的分离, d 应大于1。

现以分配柱层析为例来说明在层析过程中,两种物质在分配系数上的差异,是如何转换成二者在动相位置上的差异,并进而被分离的(见图1)。

在图1中,设柱床的高为16厘米。为了清晰直观,用柱的中轴部分表示定相,两侧表示动相(在实际情况下定相和动相是密切交织着的)。每厘米高的柱床能容纳的动相体积为1毫升。现将含有A、B两种组分的混合物样品1毫升加于柱顶。A的分布系数为1, B的分布系数为1/3。加样后,打开柱下端的开关,让柱原先含有的动相从柱的下端流出1毫升。由于动相依次向下移动的结果,可使样品液入柱

* 本文承蒋金山同志协助整理特此致谢。

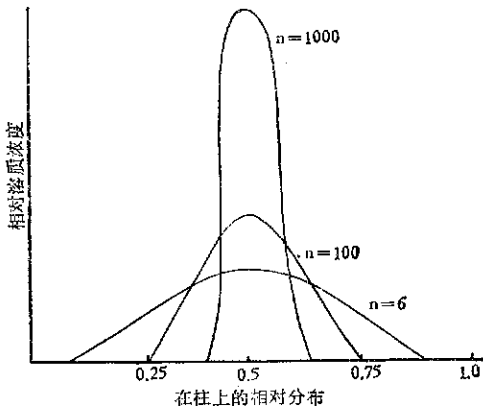


图2 板数(n)对溶质区带形状的影响

可能选择颗粒小的。在装柱时要避免纹路和气泡的出现。第二是分子扩散作用。如果动相移动速度过低,则峰值区域组分分子将朝上方和下方严重扩散。在动相为气体的情况下,这种扩散尤其强烈,比动相为液体时快 10^4 — 10^5 倍。第三是非平衡移动。如果组分还没有在动相和定相中达成分布上的平衡时,新的洗脱液又进入柱内,使动相产生非平衡移动。结果是组分在动相中的峰值跑在定相中峰值的前面,使组分在动相(及在定相)中的峰值变宽。使各种组分的峰交叠起来,分离效果变差。洗脱液流速故不能过高或过低。何谓恰当?因情而异。凝胶过滤的一个床高30厘米的葡聚糖凝胶-G25柱(Sephadex CL-4B柱),流速可以在 $77 \text{ 毫升} \times \text{厘米}^{-2} \times 1 \text{ 小时}^{-1}(\text{h})$,即每小时流过每平方米柱横切面的洗脱液为77毫升。而对于一个床高30厘米的葡聚糖凝胶 CL-4B柱,最高允许流速为 $26 \text{ 毫升} \times \text{厘米}^{-2} \times \text{小时}^{-1}$ 。为了使物质在动相和定相中达成分布平衡所需时间缩短,定相支持物的颗粒宜小而多孔,增大动相和定相接触面积。但如果支持物颗粒小,则动相流动摩擦阻力增大。近年来用高压液相层析来解决这一矛盾。常规液相层析所用定相支持物颗粒直径在100微米左右,而高压液相层析的可以小到10微米左右。第四个因素是样品量。从图1可以看出,样品量越大,允许的平衡次数越少。要想获得较大的分离效率,样品量应大大地小于柱床定相的容量。从上述层析过程可以看

出,当进入柱床的洗脱液体积恰好等于柱床所含有的动相体积时(16毫升),没有任何组分流出柱床。这时分布系数等于1的物质峰值处在柱的中部;分布系数大于1的物质峰值在柱的上部;分布系数小于1的物质峰值在柱的下部。分布系数越大,峰值越靠近柱的顶部,越不容被洗脱。反之则否。用试管等体积的收集(0.5毫升/管)。检测出组分的峰存在哪些管中,可达到分离混合物中各组分的目的。

二、层析系统

对于任何一个具体的层析系统,按不同的标准可有不同称呼。按定相支持物几何形状可称为柱层析或开床层析,按动相一定相的物态可以称为气液层析或气固层析或液凝胶层析等。按展开方式又可称为洗脱层析,迎头分离或置换层析等。但是,最好是按层析分离机制来称呼,将所有层析系统分为吸附、疏水相互作用、离子交换、分配、凝胶过滤、亲和层析六大类。

(一) 吸附层析 组分的分离依赖于它们对定相固体(Al_2O_3 、纤维素粉、硅酸等)表面亲和力的差异。这种亲和力理论上是属于范德华力。组分极性的大小,定相表面分子受力的不对称性,组分在动相(如己烷、苯、甲醇等有机溶剂)中的溶解度都影响分离效果。在吸附薄层层析中,把样品加在含有吸附剂玻璃析靠近边缘的一点以后,吹干样点上的溶剂,放在展开溶剂玻缸中平衡,然后使玻板垂直,样点的一边与溶剂接触。溶剂沿吸附剂上升,样品中的组分则随溶剂移动到不同的位置。用荧光染料,硫酸喷雾、碘蒸汽,放射自显影等方法把组分的位置显示出来。此法优点是分离迅速,30—90分钟即可完成。吸附层析在分离低分子量物质(如氨基酸、核苷酸、寡糖、生物碱、类固醇、脂肪等)方面应用较多。

(二) 疏水相互作用层析 组分的分离依赖于它们同含有疏水基团的不带电荷的床物质的疏水相互作用的强弱差异。许多蛋白质分子表面都有疏水位点^[3],它们可以同辛基-琼脂糖

凝胶 CL-4B, 或苯基-琼脂糖凝胶 CL-4B 这样的物质形成弱的或相当强的结合, 然后可用逐步增强洗脱液疏水性的办法进行洗脱, 分部收集。这一技术正在发展之中。

(三) 离子交换层析 组分的分离依赖于它们与树脂的静电力相互作用的差异。对小分子物质, 树脂颗粒的孔穴起着分子筛的作用, 也依赖于分子大小的差异。树脂本身带正电荷(阴离子交换剂)或负电荷(阳离子交换剂)的基团, 而生物物质一般都具有能够离子化的基团, 二者可以靠静电力维持结合。然后通过逐步增强洗脱液极性洗脱, 分步收集。二乙基氨基乙基纤维素 (DEAE-纤维素) 是一种阴离子交换剂。由于在生理 pH 值时, 大多数蛋白质都带有负电荷^[4], 这样可以用它在接近生理 pH 的状况下完成分离过程。这不但使蛋白质不易失活, 而且便于在分离后直接测定其组分的生物学功能。

(四) 分配层析 组分的分离依赖于它们在定相中溶解度的差异, 或在定相/动相中溶解度比率的差异。分离原理和过程在第一部分已评述。定相可用纤维素、淀粉、硅胶等作支持物。也可用滤纸作支持物进行纸层析。此处有逆流分溶、高压或常压液相分配层析以及薄层分配层析。由于这一系统分离物质是依赖溶解度的差异, 而核酸蛋白质的各种分子在这方面差异较小, 所以分离效率不高, 对小分子有机物则分离较好。

(五) 凝胶过滤层析(又名排阻色谱, 通透层析、分子筛等) 组分的分离依赖于其分子大小和形态上的差异。定相为凝胶颗粒或多孔玻璃珠内部所含有的溶剂, 动相为液体。凝胶颗粒的孔起着分子筛的作用。大的分子不能进入凝胶颗粒内部, 只能存在于颗粒间隙中。随动相的下移而首先流出柱外, 较小的分子能够通过凝胶颗粒孔进入内部的定相中。同动相中的分子达成一种分布平衡。分子越小, 进入定相的机率越大, 在柱内保留的时间越长。

(六) 亲和层析 组分的分离依赖于其对

支持物表面配体的专一性亲和力。这种专一性亲和力同某些或某一组分的生物学功能相一致。例如配体可以是某组分(酶)的可逆性竞争抑制物, 或者是某组分(抗体)的抗原, 或者是同核糖核酸 (RNA) 所带的碱基序列多聚腺苷酸 (如 Poly (A) 相对应的碱基序列如寡聚胸腺嘧啶核苷酸纤维素 Oligo (dT)) 等。先设法把配体共价结合于支持物表面, 然后让样品中某类(或某种)组分结合于其上, 随后以不同的洗脱液进行洗脱, 获得所需组分。这一层析法的效率是相当高的。

三、层析技术的应用

目前, 层析技术已不仅仅限于生物化学(蛋白质和酶的纯化、肽和激素的分离, 抗体纯化、分子量测定以及多聚体研究等)方面的应用, 而几乎遍及生物学、化学、医学(临床分析: 药物制备、去除热源等)、轻工业(高蛋白乳精的制造、脱盐)、等各个领域。层析分离物质的基本原理是根据溶质分子量的不同。从这一原理出发, 层析法最广泛的应用是一些生物高分子物质(蛋白质、核酸和酶)的分离提纯, 也可进行多肽、氨基酸和糖类 etc 低分子量物质的分离提纯。层析方法特别适合于仅仅需要几微升样品的超微量分析和微量放射性物质的分离。而规模较大的制备分离(如脱盐、浓缩、蛋白质脱糖、除热源等方面)也有了较大发展。

曾作为凝胶层析的标准化方法——蛋白质的分子量测定, 除了用于比较和鉴定蛋白质的纯度之外, 还用于研究蛋白质或酶的解离和聚合过程以及亚基的测定。

总之, 层析方法做为生物学领域的一门技术, 正在越来越广泛的发挥其作用。当前, 急待研究的仍是方法学问题, 而不是它的理论, 尤其在微量、超微量的分离分析和工业规模的大型生产这两个方面, 技术尚有不少问题有待研究解决。但是, 层析作为生物化学的一种分离提纯方法。前途是广阔的, 需要我们大力加以研究和推广应用。

结 束 语

层析技术尽管有共同性的原理,但不同层析系统的结构和操作程序差异很大,这是由它们的分离机理决定的。若某一系统分离不够彻底,可接着配合使用另一系统进一步分离,而不宜重复地使用同一类型的层析。配合使用时应考虑先后次序。比如在凝胶过滤之后,样品常被稀释,体积大,盐浓度低,可接着使用离子交换层析。如果样品盐浓度高,不是经过凝胶过滤而得。则可先用葡聚糖凝胶 G-25 脱盐,然后再用离子交换法分离。层析法还可同其他技术配合使用,如层析聚焦^[5] (Chromato-focusing) 就是在离子交换法基础上发展起来的新技术。

参 考 文 献

[1] Allen, R. H., Majerus, P. W. 1972. Isolation of

Vitamin B₁₂-binding proteins using affinity chromatography III. Purification and properties of human plasma transcobalamin II. *J. Biol. Chem.* Vol. 247 No. 21—24 7709—7717.

[2] Laemmli, V. K., Favre, M., 1973 Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* Vol. 80, 575—599.

[3] Rosengren, J, P hlman, S., et al. 1975 Hydrophobic interaction chromatography on non-charged Sepharose derivatives. Binding of a Model Protein, related to ionic strength, hydrophobicity of the substituent, and degree of substitution (determined by NMR). *Biochem. Biophys. Acta* Vol 412, 51—61.

[4] Sluyterman, L. A. AE., Wijdenes, J. 1978 Chromatofocussing isoelectric focusing on ion exchange columns. II. Experimental Verification. *J. Chromatography* Vol. 50, 31—44.

[5] Williams B. L. and K. Wilson ed. Edward Arnold, 1975 Principles & Techniques of Practical Biochemistry.