

实验五

离子交换层析法分离氨基酸

实验目的

学习用阳离子交换树脂分离氨基酸的操作方法和基本原理

层析技术



- 1903年，俄国科学家M. C. Jber首创了一种从绿叶中分离多种不同颜色色素成分的方法，他将植物叶子的色素通过装填有吸附剂的柱子，各种色素以不同的速率流动后形成不同的色带而被分开，由此得名为色谱法 (Chromatography)，又被称为层析法。
- 层析法不断发展，形式多种多样。1944年出现纸层析以后，层析法不断发展，相继出现薄层层析、亲和层析、凝胶层析、气相层析、高压液相层析 (HPLC) 等。
- 几乎每一种层析法都已发展成为一门独立的生化高技术，在生化领域内得到了广泛的应用。



层析系统都由两个相组成：

- **固定相**：固定相是层析的一个基质。它可以是固体物质（如吸附剂，凝胶，离子交换剂等），也可以是液体物质（如固定在硅胶或纤维素上的溶液），这些基质能与待分离的化合物进行可逆的吸附，溶解，交换等作用。
- **流动相**：在层析过程中，推动固定相上待分离的物质朝着一个方向移动的液体、气体等，都称为流动相。柱层析中一般称为**洗脱剂**，薄层层析时称为**展层剂**。

层析法是利用混合物中各组分物理化学性质的差异（如吸附力、分子形状及大小、分子亲和力、分配系数等），使各组分在两相中的分布程度不同，从而使各组分以不同的速度移动而达到分离的目的。

■ 按操作形式不同分类：

柱层析：将固定相装于柱内，使样品沿一个方向移动而达到分离。

纸层析：用滤纸做液体的载体，点样后，用流动相展开，以达到分离鉴定的目的。

薄层层析：将适当粒度的吸附剂铺成薄层，以纸层析类似的方法进行物质的分离和鉴定。

纸层析和薄层层析主要适用于小分子物质的快速检测分析和少量分离制备，通常为一次性使用，而柱层析是常用的层析形式，适用于样品分析、分离。生物化学中常用的凝胶层析、离子交换层析、亲和层析、高效液相色谱等都通常采用柱层析形式。

按层析过程的机理分类：

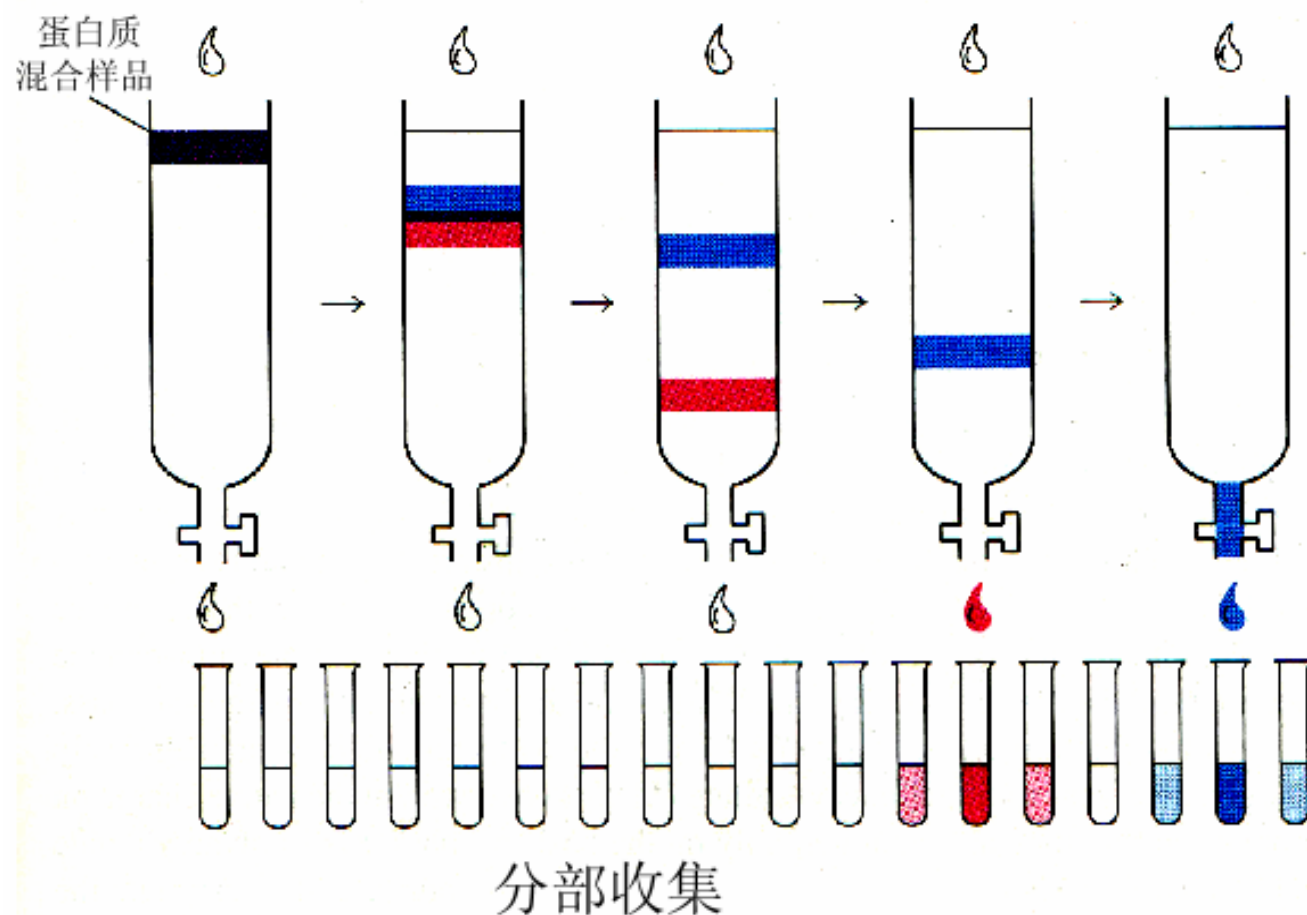
名称	操作方式	固定相	流动相	分离依据
分配层析	纸层析 薄层层析	液体	液体	溶解度
离子交换层析	离子交换柱层析	固体	液体	带电性 静电引力
吸附层析	吸附薄层层析 气体吸附层析	固体 固体	液体 气体	吸附力
亲合层析	酶与底物 抗原与抗体	固体	液体	配体专一性
凝胶层析	凝胶过滤	固体	液体	分子大小

➤ 将作为固相成分的不溶性基质，例如葡聚糖凝胶、纤维素、树脂等填充到柱子中，用平衡液平衡。

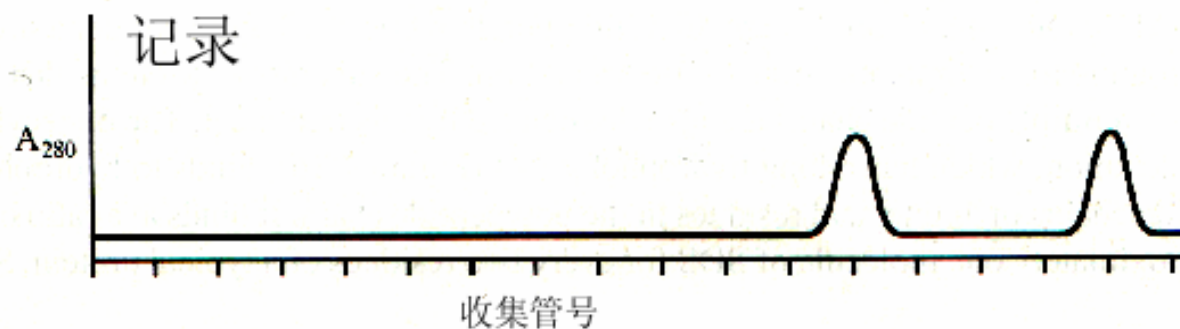
然后加样品，再用适当的溶剂洗脱。

➤ 样品中各种成分通过柱子取决于与固相成分的相互作用，最后以不同速率被洗脱出来，达到将各个成分分离的目的。

(a) 层析示意图



(b)



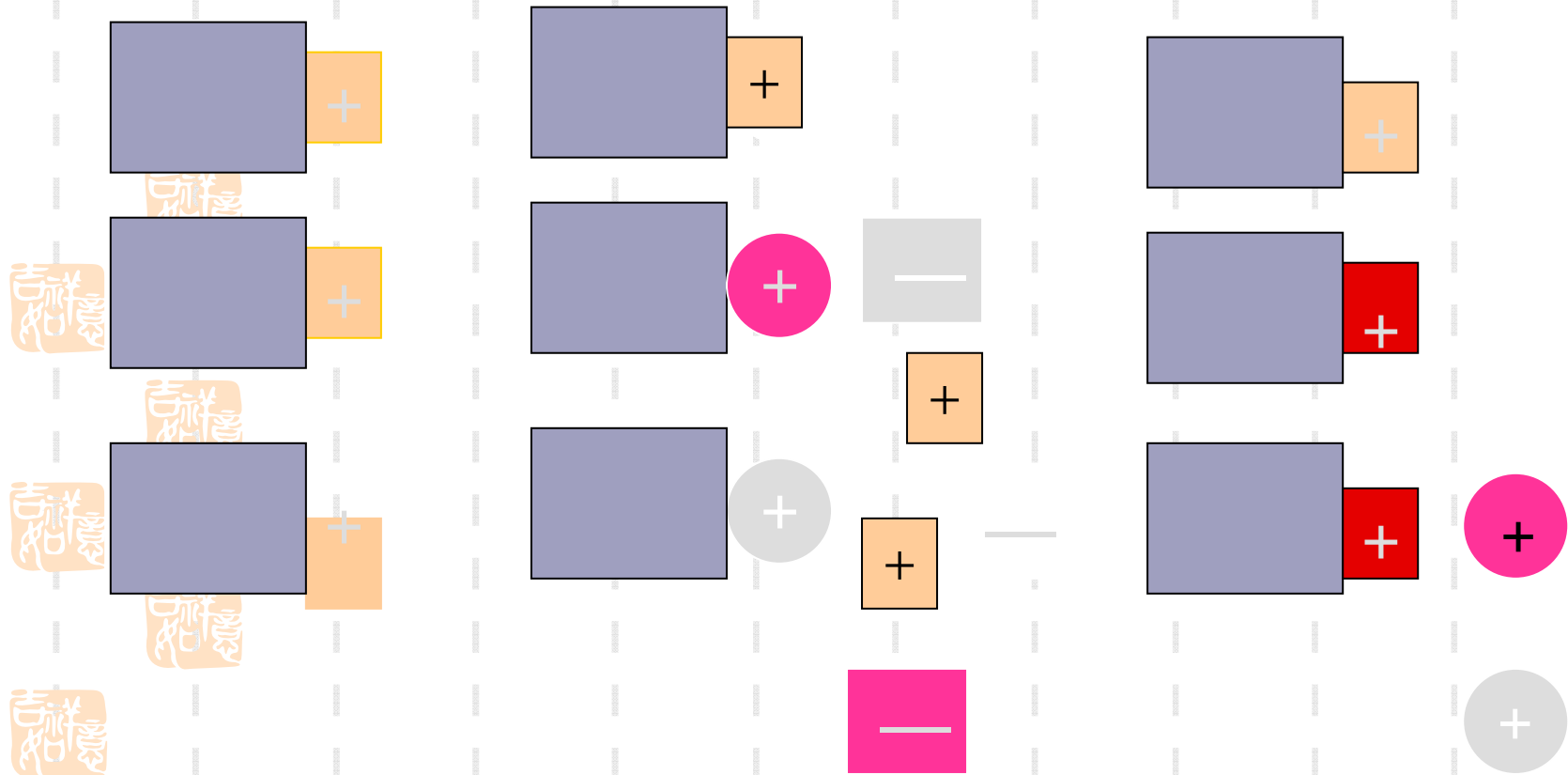
离子交换层析法

- 离子交换层析技术主要用于分离氨基酸、多肽及蛋白质以及核酸、核苷酸及其它带电荷的生物分子。
- 离子交换层析以离子交换剂作固定相，利用它与流动相中需要分离的各种离子的亲和力不同而达到分离的目的。

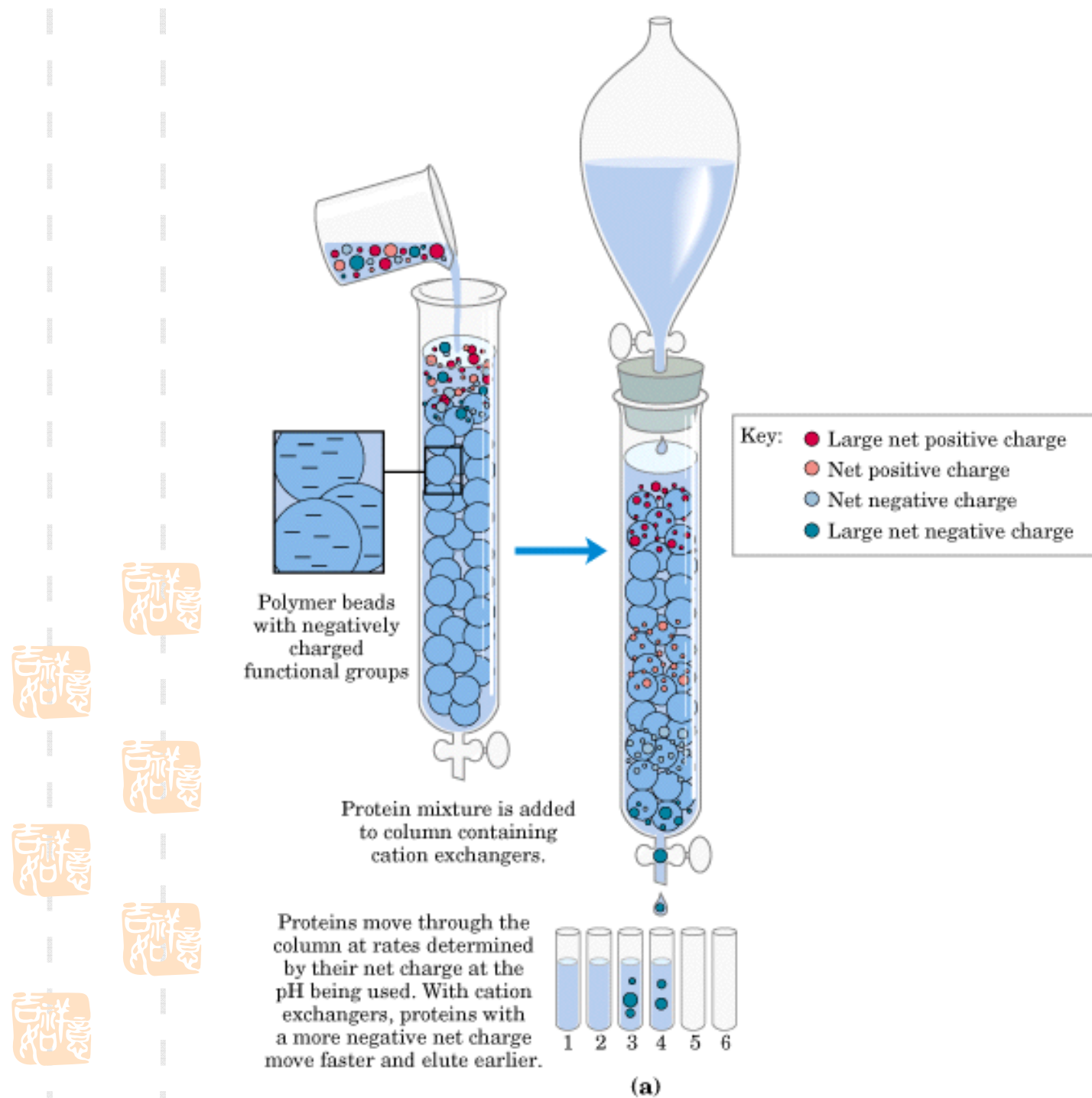
氨基酸的PI不同，在同一pH下所带电荷的数量和性质不同，与树脂的亲合力就有差异

- 在pH接近中性的溶液中，精氨酸、组氨酸、赖氨酸残基带**正电荷**，而天冬氨酸和谷氨酸则带**负电荷**。
- 在一定pH下净电荷为正的氨基酸（**精氨酸**）可通过静电键结合到阳离子交换剂上
- 通过改变离子强度或(和) pH使氨基酸再从离子交换剂上先后被洗脱下来。

- 若选择阳离子交换树脂，则带正电荷的物质与 H^+ 发生交换而结合在树脂上。若选择阴离子交换树脂，则带负电荷的物质可与 OH^- 发生交换而结合在树脂上。
- 物质在树脂上结合的牢固程度即亲和力大小有差异，因此选用适当的洗脱液便可将混合物中的组分逐个洗脱下来，达到分离纯化的目的。



实验



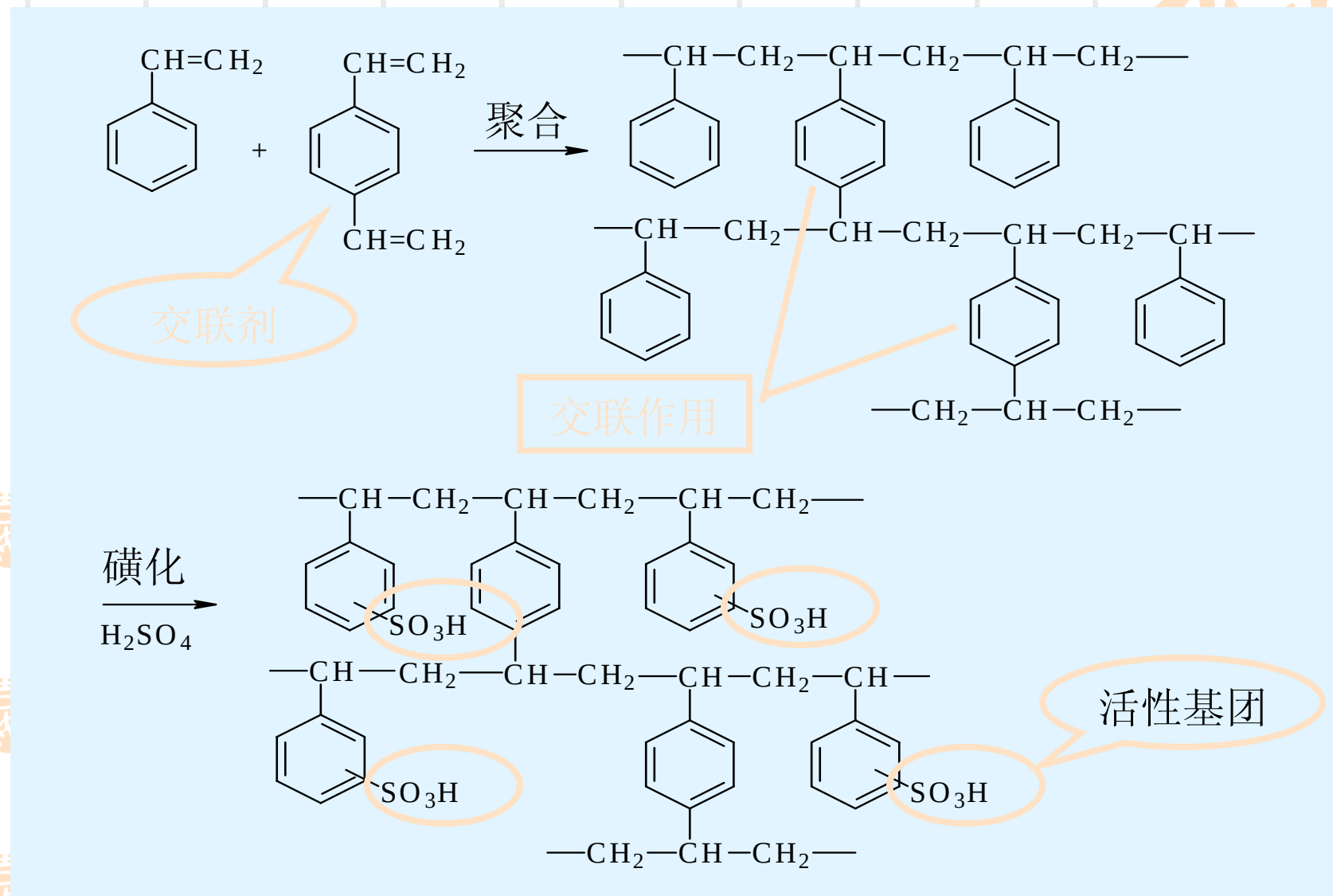
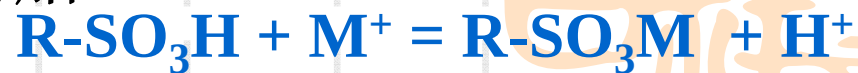
离子交换剂

离子交换层析的固定相是离子交换剂，它是由一类不溶于水的惰性高分子聚合物基质通过一定的化学反应共价结合上某种电荷基团形成的

阳离子交换剂（磺酸甲基、羧甲基、磷酸基）：平衡离子带正电，能与带正电的离子基团发生交换作用。可交换离子为 Na^+ 、 H^+

阴离子交换剂（二乙基胺乙基、三乙基胺乙基）：平衡离子带负电，与带负电的离子基团发生交换作用。可交换离子为 Cl^- 、 OH^-

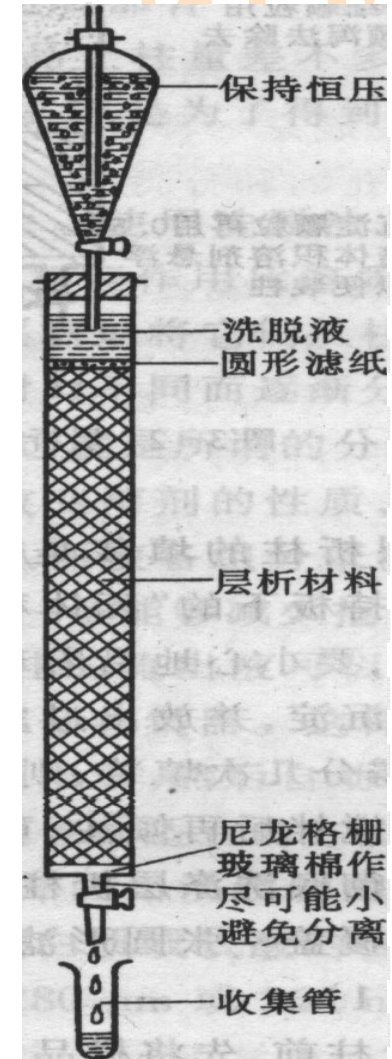
聚苯乙烯磺酸型阳离子交换树脂



实验操作

层析柱

层析柱通常是玻璃的。离子交换用的层析柱一般粗而短，不宜过长。层析柱的基本装置如图。





1、离子交换剂预处理

- 对于离子交换剂要用流水洗去少量碎的不易沉淀的颗粒，以保证有较好的均匀度，对于已溶胀好的产品则不必经这一步骤。

- 溶胀的交换剂使用前要用稀酸或稀碱处理，使之成为带 H^+ 或 OH^- 的交换剂型。



2、装柱:最关键的一步



- 层析柱夹在铁架台上，调成垂直
- 先关闭出口，用溶剂灌注至1 / 3体积
- 重力沉降法装柱: 陆续不断地添加糊状物，使胶粒连续**均匀地沉降**，直至装柱物完全沉降至适当的柱床体积为止。
- 为了避免分层。最好一次装完，如需分几次填装，则在二次填装前应先在已经沉淀的表面用玻棒搅拌后再倾注。
- 柱的表面始终要保持着一层溶剂（一般1 ~ 3cm柱高）柱的任何一部分绝对**不能“流干”**。



3、平衡

用一个柱体积的**0.05M柠檬酸缓冲液**进行平衡。

平衡缓冲液是指装柱后及上样后用于平衡离子交换柱的缓冲液。平衡缓冲液的离子强度和pH值的选择首先要保证各个待分离物质的稳定。其次是要使各个待分离物质与离子交换剂有适当的结合，并尽量使待分离样品和杂质与离子交换剂的结合有较大的差别。一般是使待分离样品与离子交换剂有较稳定的结合。而尽量使杂质不与离子交换剂结合或结合不稳定。

4、加样

- 先将柱内液体用滴管轻轻吸去，使液面下降到刚接近树脂表面。
- 旋紧下端螺旋夹，用滴管准确移取1.0 ml 氨基酸混合样品液，沿柱壁小心加到树脂表面，然后松开下端螺旋夹，使样品液面下降至树脂表面。
- 在树脂表面缓慢滴加少许缓冲液，重复两次。

5、洗脱

- 当水面降至树脂表面时，再用一个柱体积的缓冲液0.05M柠檬酸缓冲液洗柱，将不被树脂吸附的氨基酸洗下来。
- 增大离子强度，用0.5M 柠檬酸缓冲液洗脱吸附的氨基酸。

洗脱缓冲液

在离子交换层析中一般常用**梯度洗脱**，通常有改变离子强度和改变pH值两种方式。改变离子强度通常是在洗脱过程中逐步增大离子强度，从而使与离子交换剂结合的各个组分被洗脱下来；而改变pH值的洗脱，对于阳离子交换剂一般是pH值从低到高洗脱，阴离子交换剂一般是pH值从高到低。由于pH值可能对蛋白的稳定性有较大的影响，故一般通常采用改变离子强度的梯度洗脱

洗脱速度

洗脱液的流速也会影响离子交换层析分离效果，洗脱速度通常要保持恒定。一般来说洗脱速度慢比快的分辨率要好，但洗脱速度过慢会造成分离时间长、样品扩散、谱峰变宽、分辨率降低等副作用，所以要根据实际情况选择合适的洗脱速度。



6、部分收集及分析

柱的流出液可以用人工的方法收集到一系列试管中或使用部分收集器(这种装置能使每一管按照预定的时间或滴数收集流出液，然后自动移位，下一管再继续收集)。

按一定体积（**1.5ml/管**）收集洗脱液，茚三酮实验检测氨基酸:每管吸取**0.5ml**样品，加入**0.5ml**的茚三酮试剂，并加热**10**分钟，如有氨基酸存在，溶液变成蓝色。

7、离子交换剂的再生与保存

取出树脂的方法是用橡皮球由层析柱的下端向柱内吹气，用烧杯收集流出的树脂。

使用过的离子交换树脂经过再生处理后，可重复使用。可以在柱内处理，也可以将树脂取出后处理。树脂再生的方法与未使用的新树脂预处理方法相同。也可以直接用1M NaCl溶液浸泡或洗涤，最后用蒸馏水洗至流出液的pH值接近中性。

保存离子交换剂时要加防腐剂。对阴离子交换剂宜用0.002%氯己定（洗必泰），阳离子交换剂可用乙基硫柳汞（0.005%）。有些产品用0.02%叠氮钠。

离子交换层析的应用

离子交换层析技术已广泛于各学科领域。在生物化学及临床生化检验中主要用于分离氨基酸、多肽及蛋白质，也可用于分离核酸、核苷酸及其它带电荷的生物分子。



离子交换层析的应用



1) 水处理

离子交换层析是一种简单而有效的杂质及各种离子的方法，聚丙烯树脂广泛的应用于高纯水的制备、硬水软化以及污水处理等方面。

2) 分离纯化小分子物质

离子交换层析广泛应用于无机离子、有机酸、核苷酸、氨基酸、抗生素等小分子物质的分离纯化。例如对氨基酸的分析使用强酸性阳离子交换树脂，将氨基酸混合液在pH值为2~3上脱液的离子强度和pH值，这样各种氨基酸将以不同的速度被洗脱下来，可以进行分离鉴定。全自动氨基酸分析仪就是采用这种原理制成。



3) 分离纯化生物大分子物质

离子交换层析是依据物质的带电性质的不同来进行分离纯化的，是分离纯化蛋白质等生物大分子的一种重要手段。

由于生物样品的复杂性，一般很难只经过一次离子交换层析就达到高纯度，往往要与其它分离方法结合使用。

使用离子交换层析分离样品要充分利用其按带电性质来分离的特性，只要选择合适的条件，通过离子交换层析可以得到较满意的分离效果。

吉祥

水的净化

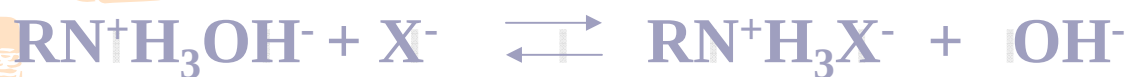
阳离子交换

H^+

阴离子交换

OH^-

去离子水



除去水中的杂质离子

由于生物样品的复杂性，一般很难只经过一次离子交换层析就达到高纯度，往往要与其它分离方法结合使用。

使用离子交换层析分离样品要充分利用其按带电性质来分离的特性，只要选择合适的条件，通过离子交换层析可以得到较满意的分离效果。