

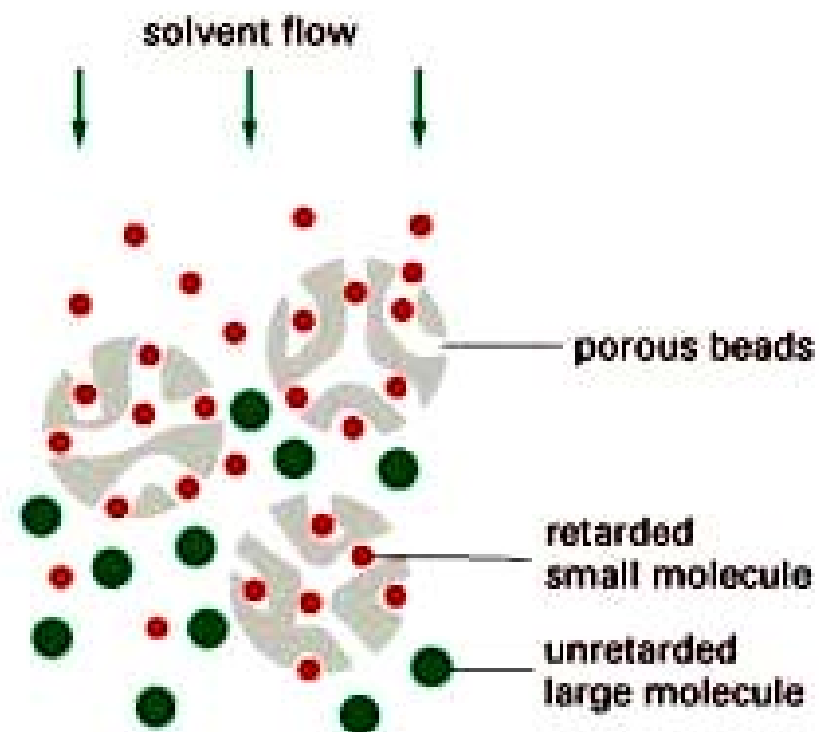
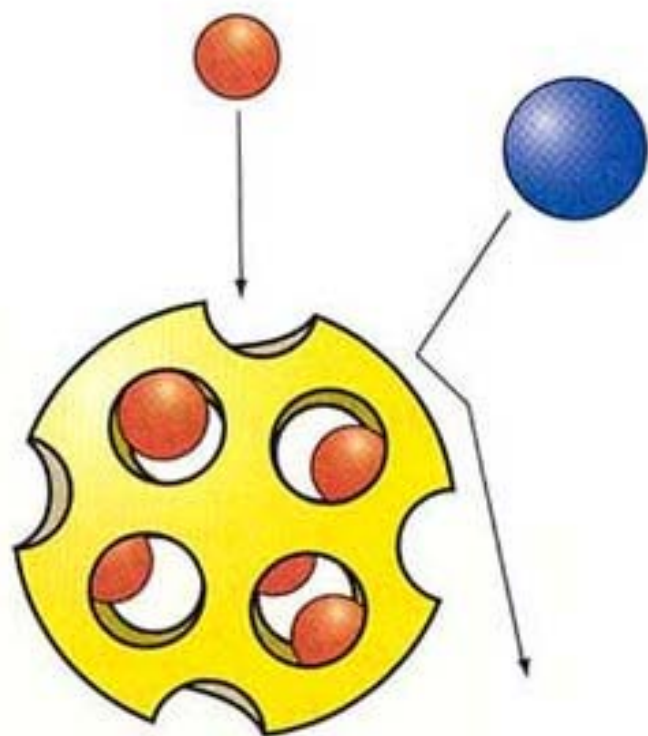
Sephadex G-75凝胶 色谱法分离不同分子 量蛋白质

一、实验目的

- ◆学习凝胶色谱法的基本原理及其应用
- ◆掌握凝胶色谱法分离蛋白质的基本方法

二. 实验原理

- 凝胶过滤色谱亦称凝胶色谱、排阻色谱或分子筛，是利用具有网状结构的凝胶把分子大小不同的物质分离开的一种方法。凝胶色谱的机理是分子筛效应。



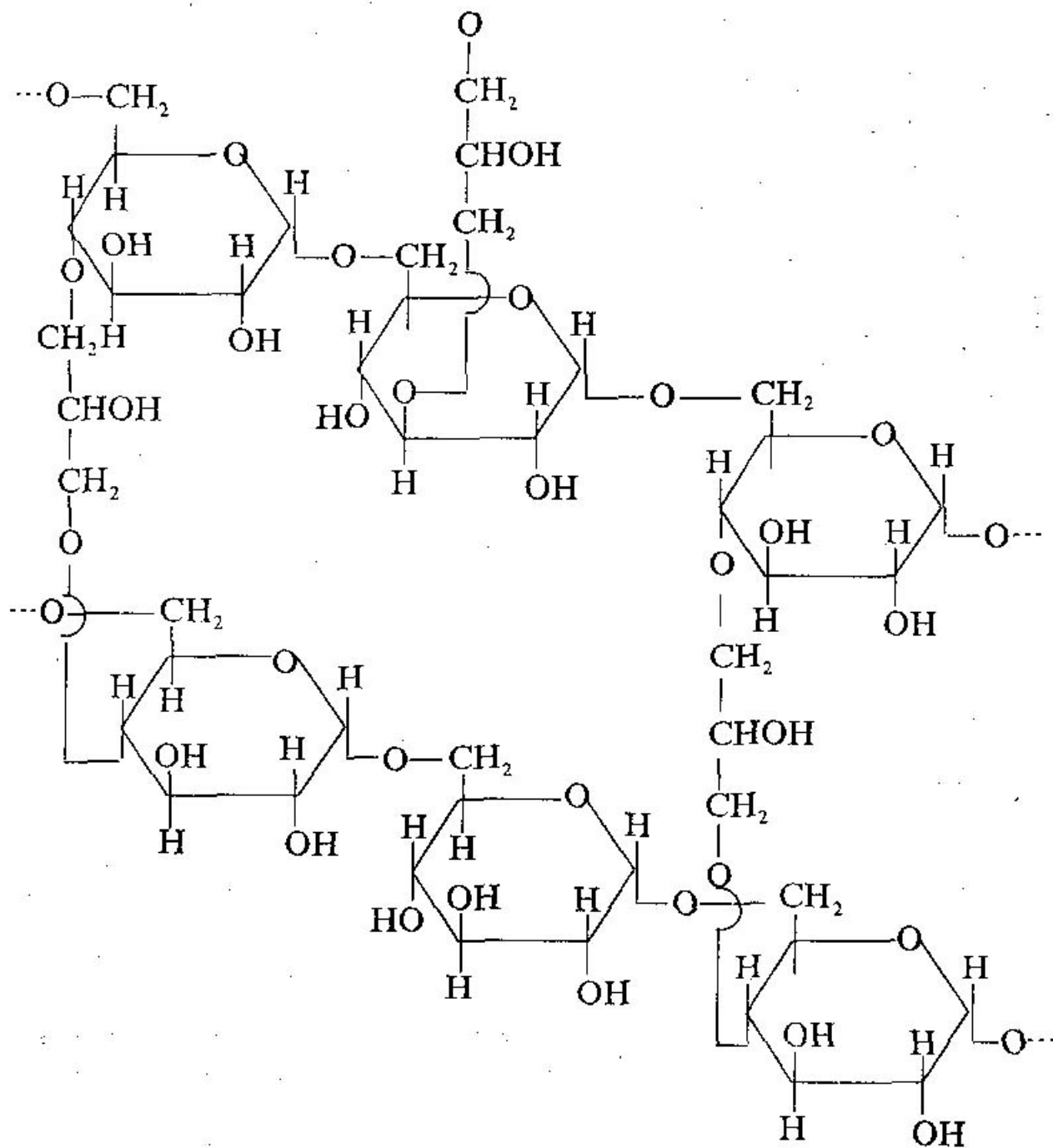
常用凝胶

凝胶：具有三维空间多孔网状结构的非水溶性物质，为胶体溶液凝结而成。

- 葡聚糖凝胶（商品名**Sephadex**）
- 聚丙烯酰胺凝胶(商品名**Bio-GelP**)
- 琼脂糖凝胶(商品名因生产厂家而不同)

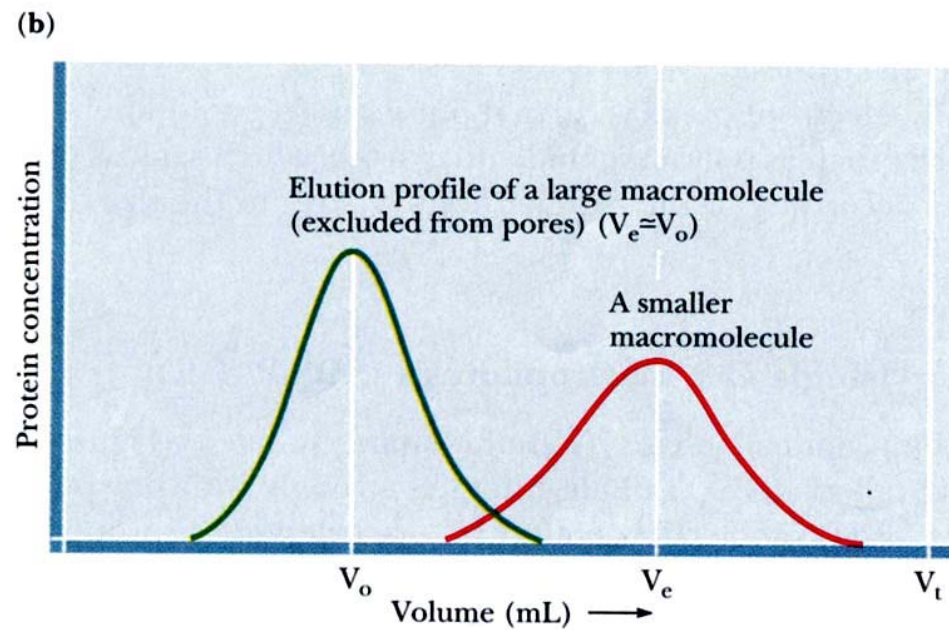
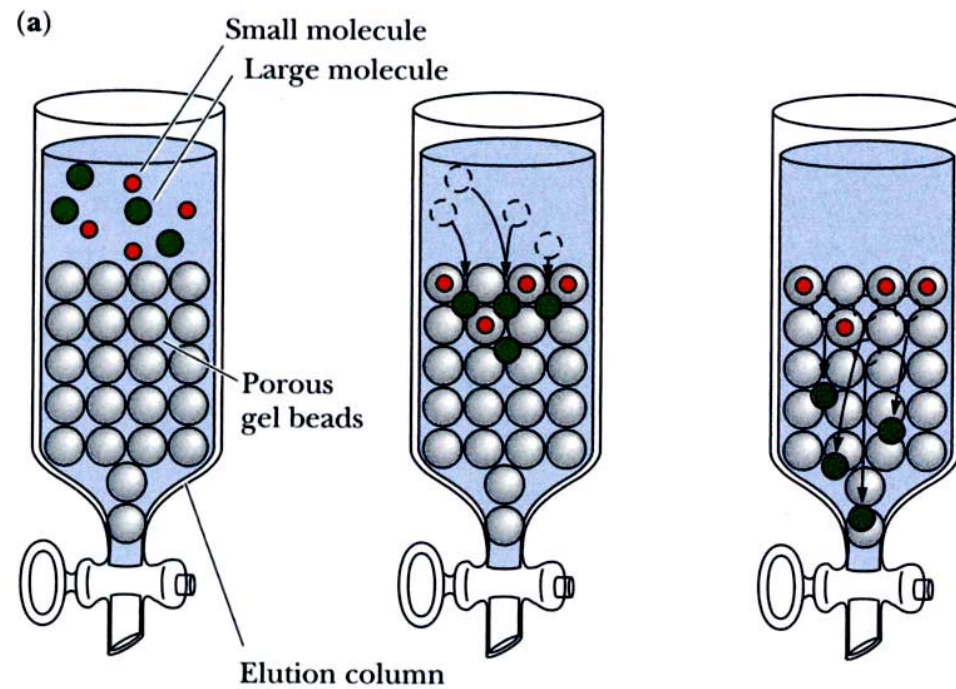
葡聚糖凝胶（Sephadex）

- 基本骨架：葡聚糖（ α -1,6-糖苷键95%；1,3-糖苷键5%）
- 交联剂：3-氯-1,2-环氧丙烷
- 葡聚糖、交联剂比例→凝胶颗粒网孔大小来
- 网孔的大小决定→被分离物质能够自由出入凝胶内部的分子量范围（分子量从几百到几十万）



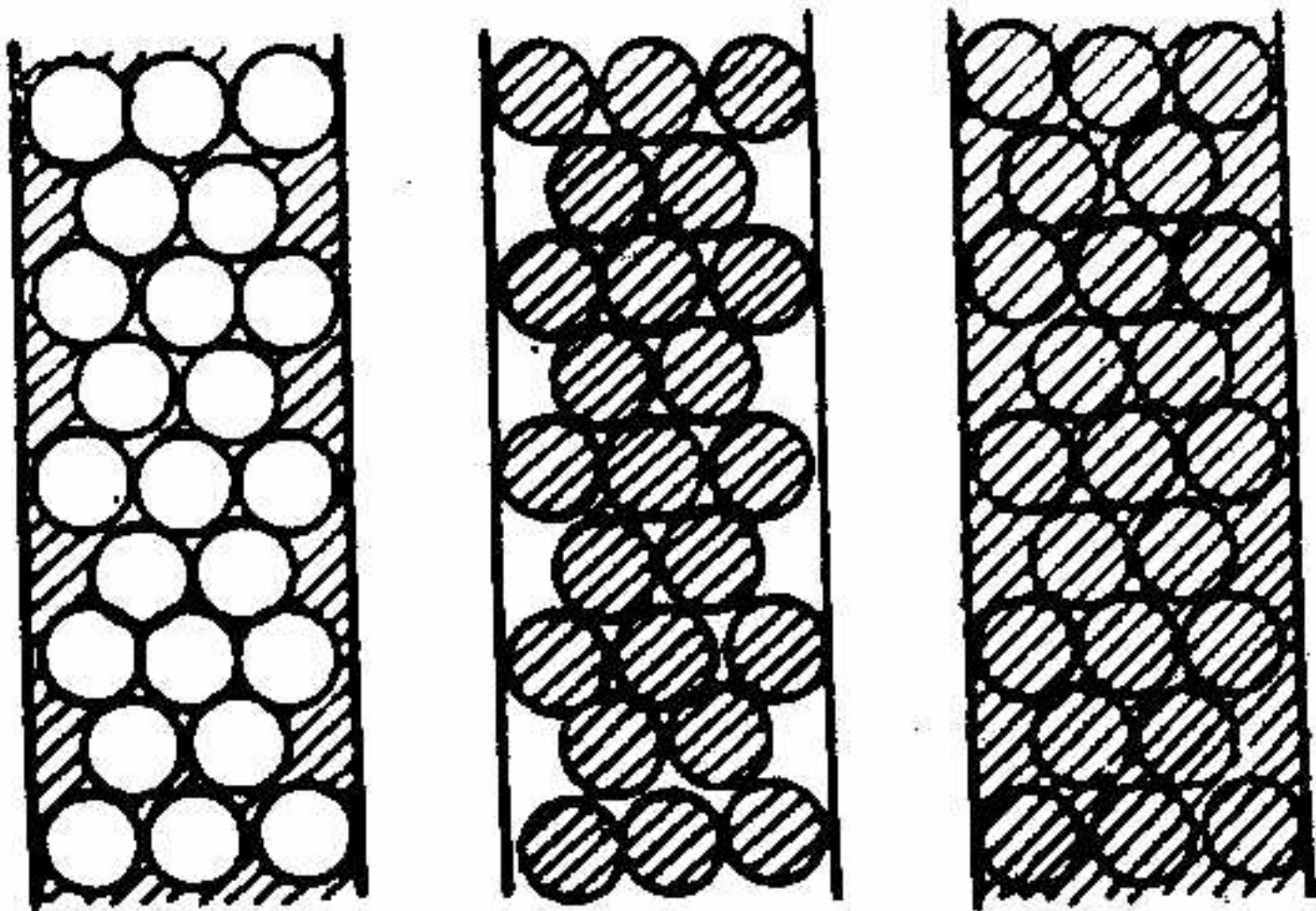
	G-10	G-15	G-25	G-50	G-75	G-100	G-150	G-200
吸水量 (g/g干 凝胶)	1.0	1.5	2.5	5.0	7.5	10.0	15.0	20.0
工作范 围(肽 与蛋 白) D	<700	<1500	<5000	1500- 20000	3000- 70000	4000- 150000	5000- 300000	5000- 500000

凝胶过滤的过程

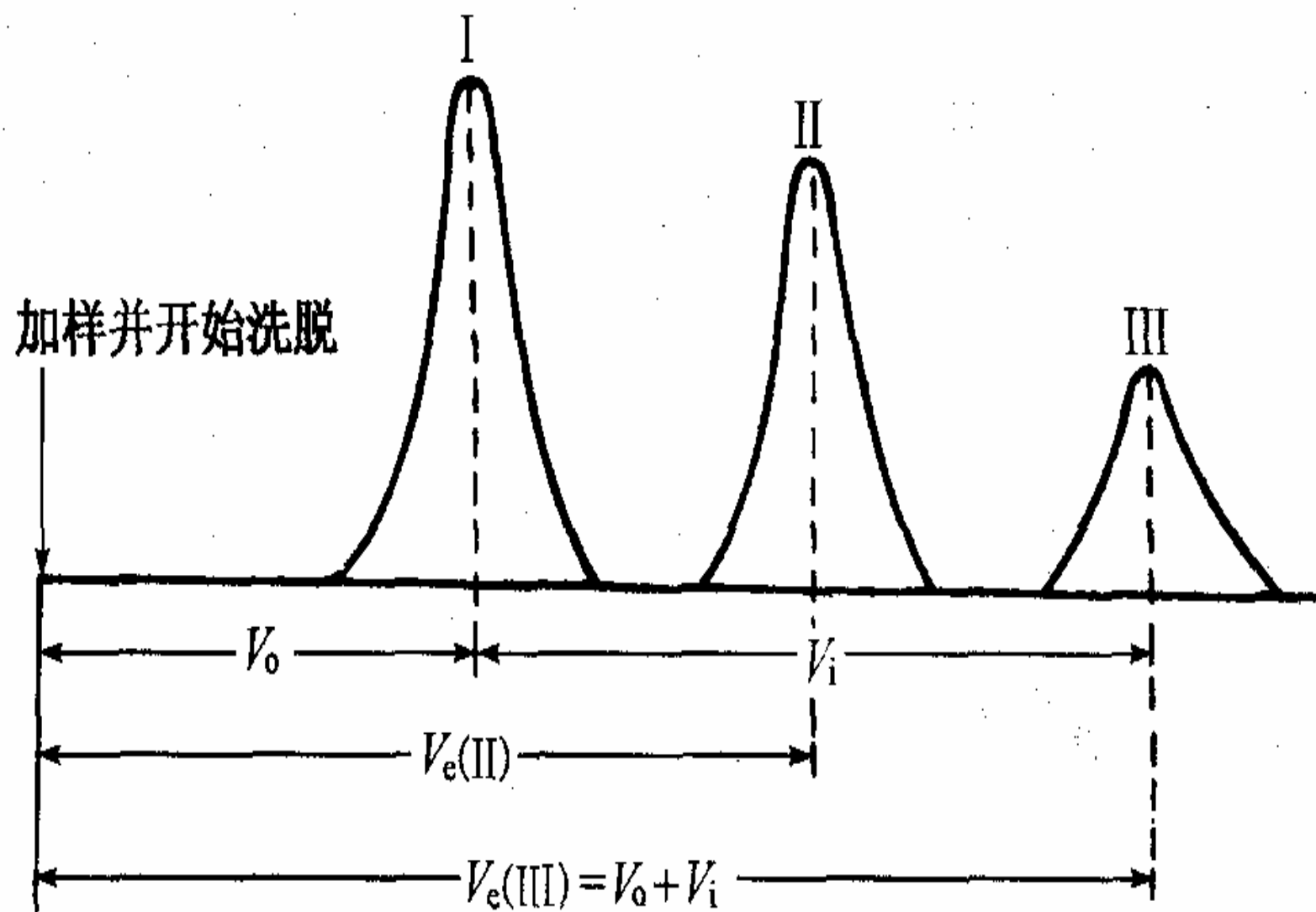


几个概念

- 外水体积 **V_o** : 柱床内凝胶颗粒外空隙间的水相体积
- 内水体积 **V_i** : 凝胶颗粒内部含水体积
- 基质体积 **V_g** : 凝胶本身体积
- 柱床体积 **V_t** : $V_t = V_o + V_i + V_g = \pi R^2 h \approx V_o + V_i$
- 洗脱体积 **V_e** : 样品中某一组分洗脱下来所需洗脱液的体积



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



- **分配系数 K_d** : 某组分在固定相和流动相中的浓度比

$$K_d = (V_e - V_o) / V_i$$

$K_d = 0$, 全排阻; $K_d = 1$, 全渗入

例外: $K_d > 1$, 分子筛 (吸附作用, 离子交换);

小分子 $K_d \neq 1$, 水与凝胶牢固结合

- **有效分配系数: $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$**
- 某型凝胶、一定分子量范围:
- **$V_e = K_1 - K_2 \lg M_r$**

凝胶过滤的要点

- 根据分离样品分子量，选择合适的介质：
Sephadex G-50分子量范围1500—20000；
Sephadex G—75 分子量范围3000--70000
- 柱床要用缓冲液平衡稳定（体积、流速、可反复使用）
- 上样量体积不能大

三、实验步骤

- **Sephadex G-75**凝胶的预处理：蒸馏水室温溶胀>24h
- 抽气：3-4h
- 装柱：连续, 均匀, 无纹路, 无气泡, 表面平整
- 平衡：0.9% NaCl, 1-2柱体积
- 上样：0.4ml（含4mg铁氰化钾；4mg血红蛋白, Mr=64500；2mg蓝葡聚糖2000, Mr=200万）
- 洗脱、收集：0.9% NaCl洗脱, 3ml/360S/管
- 测定：蓝OD₆₄₀、红OD₅₄₀、黄OD₄₂₀

结果处理

- 绘制洗脱曲线
- 计算: V_t 、 V_o 、 V_e 、 K_{av}