离子交换层析
分离氨基酸

一、实验目的

- 学习离子交换树脂分离生物大分子的基本原理
- 掌握离子交换柱层析法分离氨基酸的基本操作技术.
- 学习氨基酸的检测及定量测定方法

二. 实验原理

两个概念:

- 离子交换层析（**Ion Exchange Chromatography，IEC**）：利用离子交换剂对各种带电粒子具有不同的亲和力（静电引力）而达到分离目的的层析技术。
- 离子交换剂: 不溶性高分子化合物，含有可解离的基团，水溶液中能与溶液中的其它阳离子或阴离子起交换作用。

离子交换剂的种类

- 根据可交换离子的性质分为：

  阳离子交换剂: 带酸性可解离基团(如-SO_3H),

  阴离子交换剂: 带碱性可解离基团(如R_4NOH)

- 据离子交换剂的化学本质分为：

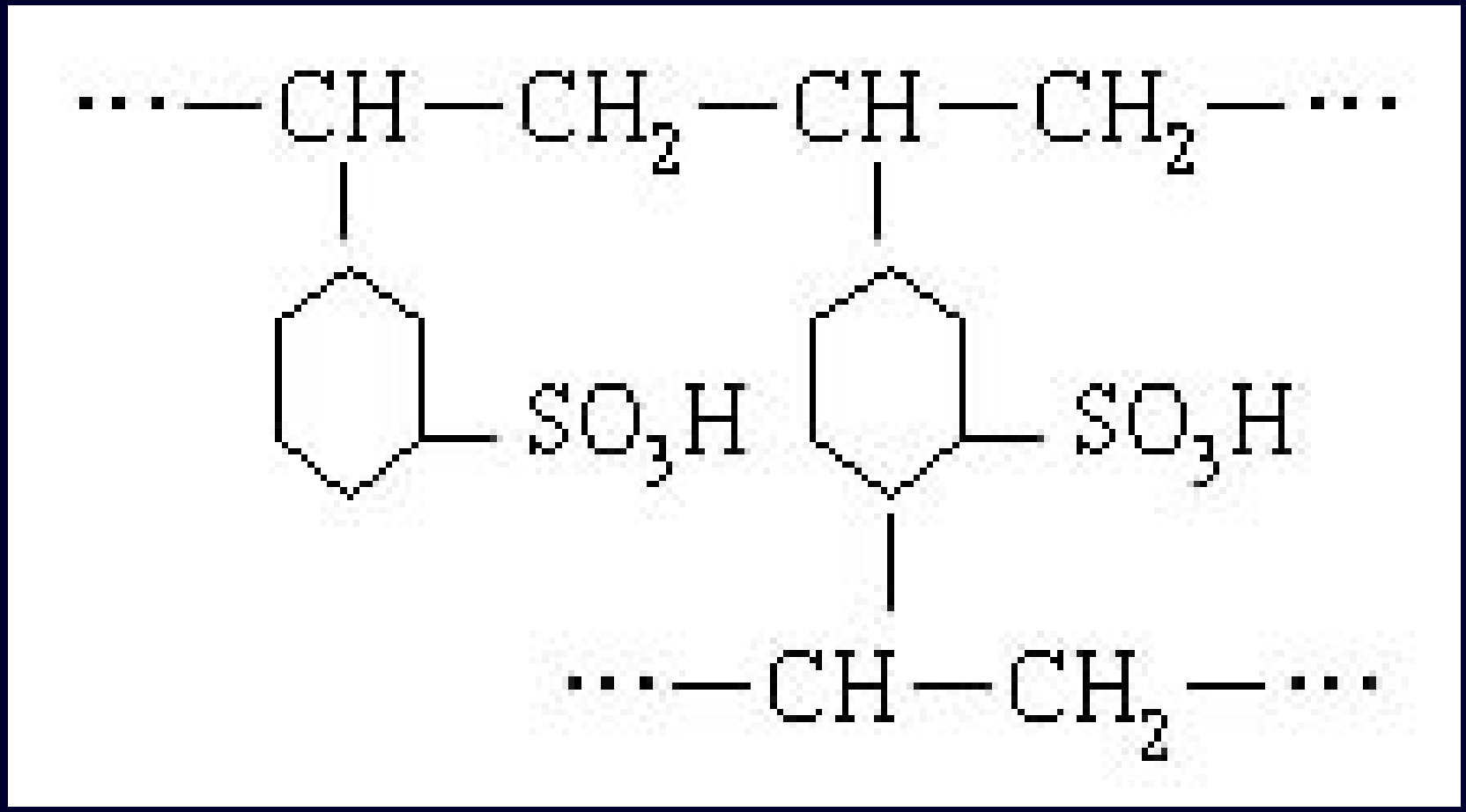
  离子交换树脂

  离子交换纤维素

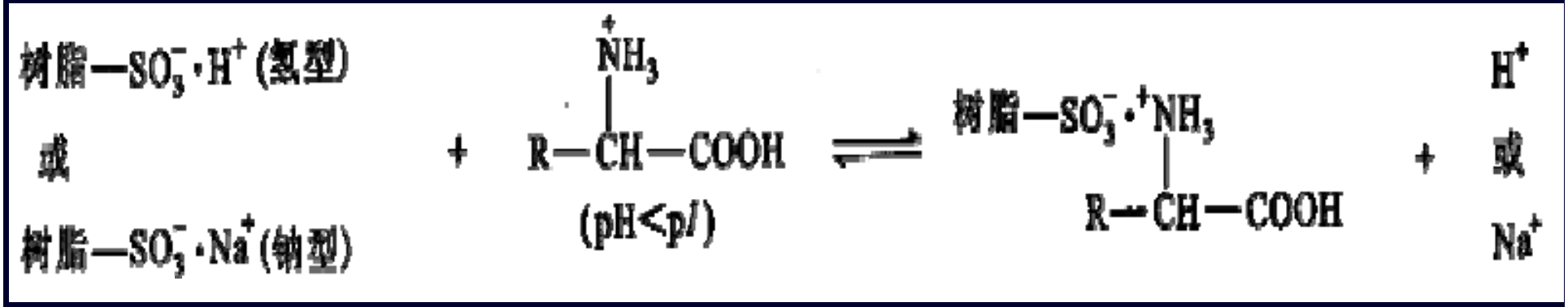
  离子交换葡聚糖

氨基酸分离常用离子交换树脂

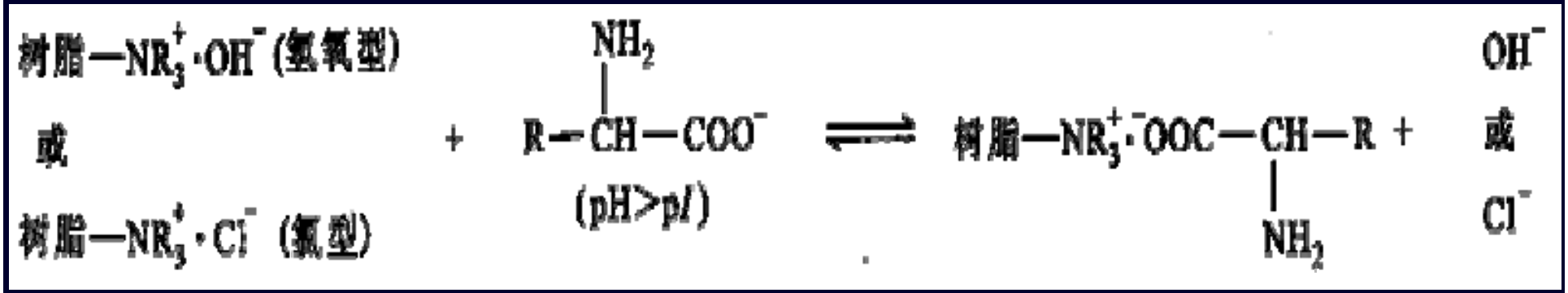
树脂合成的基本原料：苯乙烯，二乙烯苯

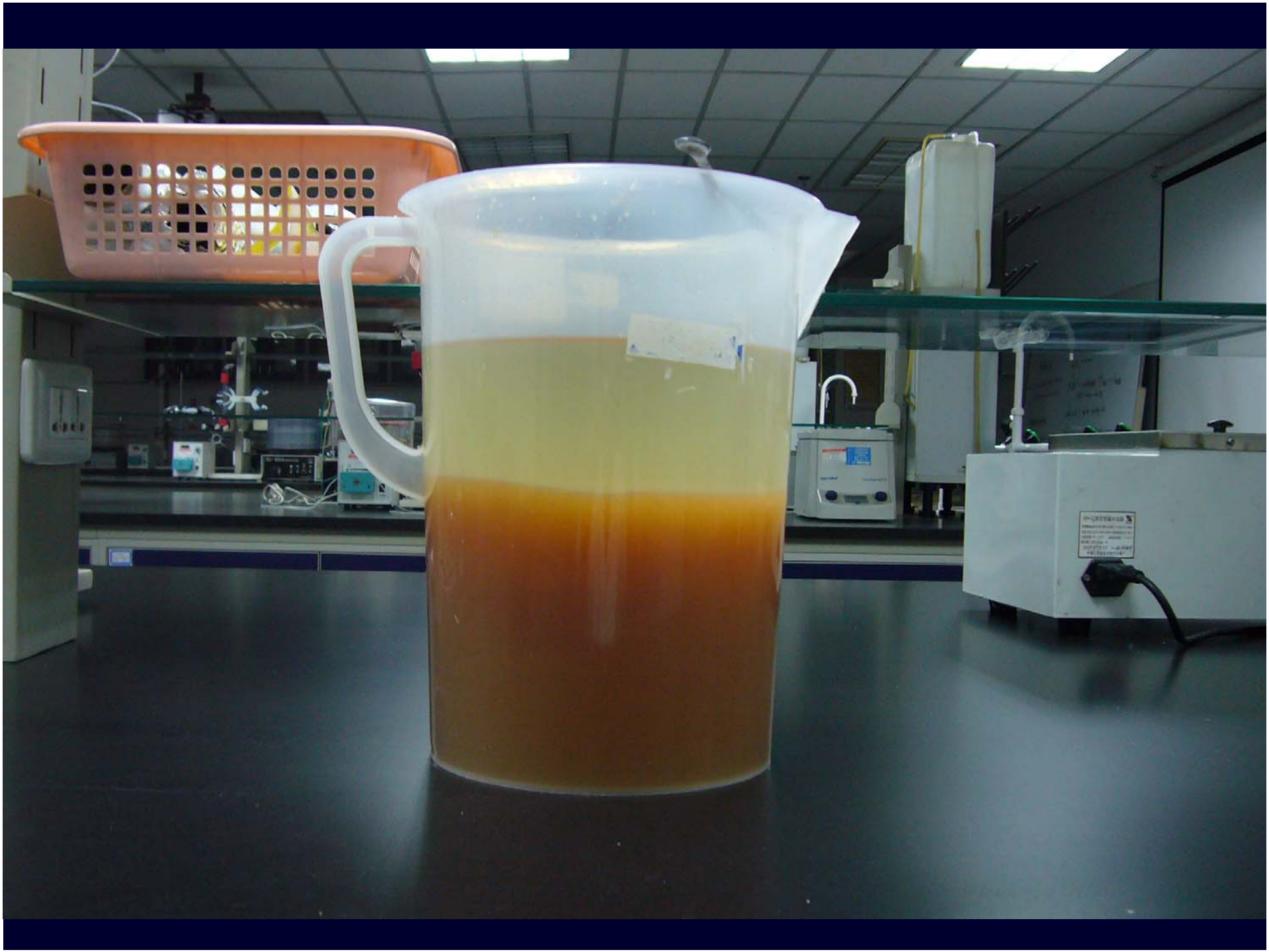


阳离子交换树脂



阴离子交换树脂



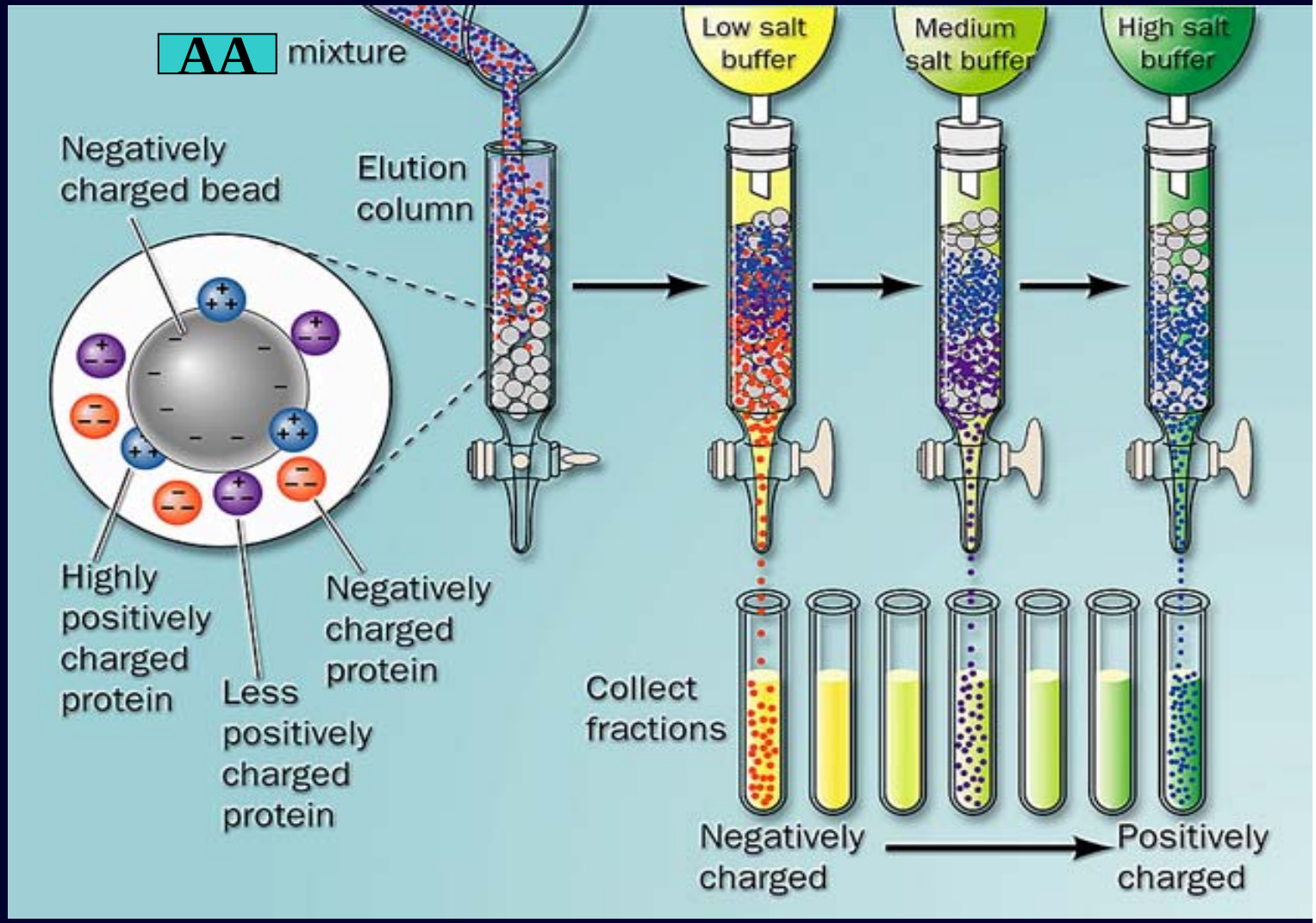


分离过程

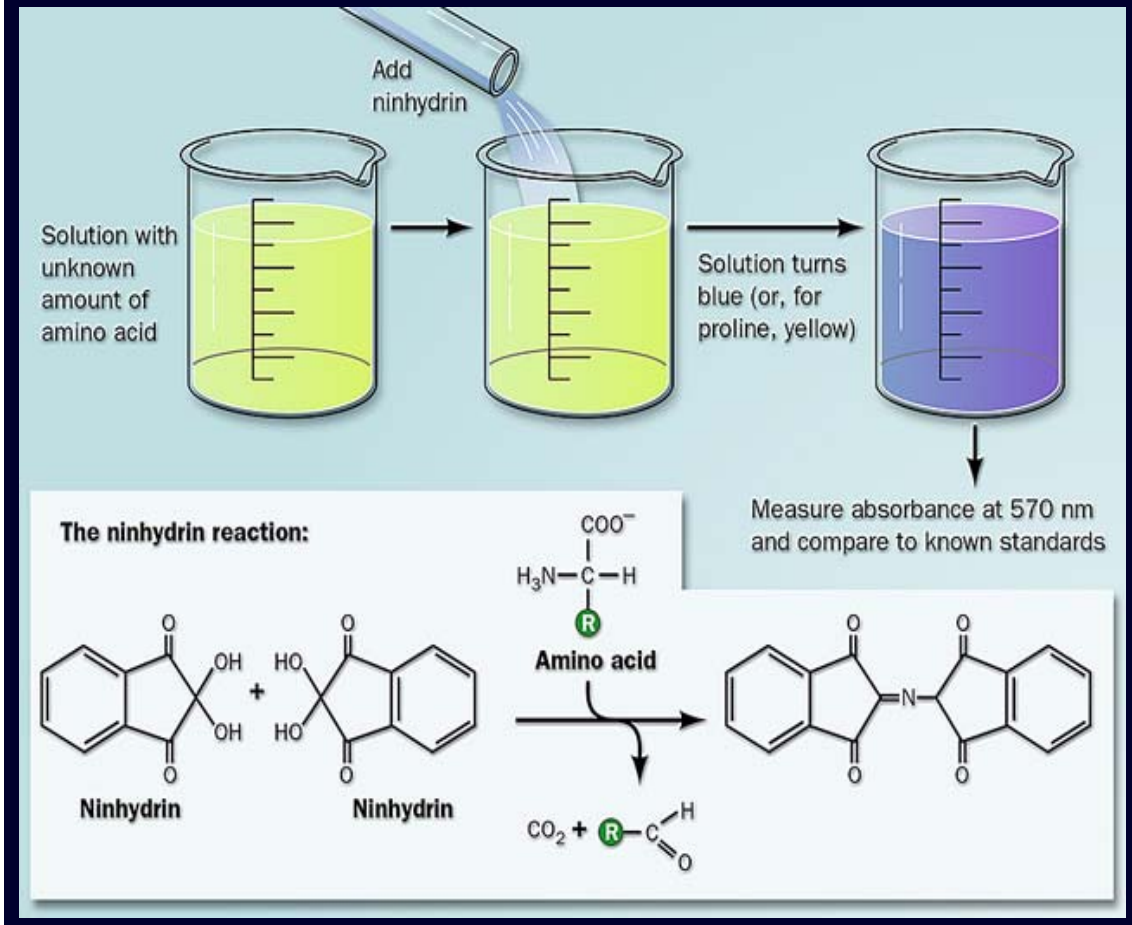
洗脱条件:

离子强度

pH



氨基酸检测--- 茚三酮反应



氨基酸与茚三酮水合物共热，可生成蓝紫色化合物，其最大吸收峰在**570nm**处。此吸收峰值与氨基酸的含量存在正比关系，可作为氨基酸定量分析方法。

三、主要试剂

- 上样缓冲液: **0.05mol/L柠檬酸缓冲液, pH6.6**
- 洗脱缓冲液: 洗脱**0.5mol/L柠檬酸缓冲液, pH6.6**
- 茚三酮试剂: **1g 茚三酮 + 100ml 95%乙醇**
- 氨基酸混合液: **10mgAsp, 10mgArg于10ml**

  上样缓冲液

四、实验步骤及注意事项

1．离子交换树脂的处理

- 强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂
- 蒸馏水膨胀过夜
- **4 V, 2mol/L HCL, 浸4h, 蒸馏水洗制pH5-6**
- **4 V, 2mol/L NaOH, 浸4h, 蒸馏水洗制pH5-6**
- 上柱缓冲液平衡

2.装柱

- 固定(垂直), 加入1/5V缓冲液, 排气泡，关闭出口
- 混匀树脂, 缓慢加入(高10-12cm, 约30ml)

  要求: 连续, 均匀, 无纹路, 无气泡, 表面平整

  注意: 缓冲液面永远高于树脂
- 平衡, 检测pH

准备收集

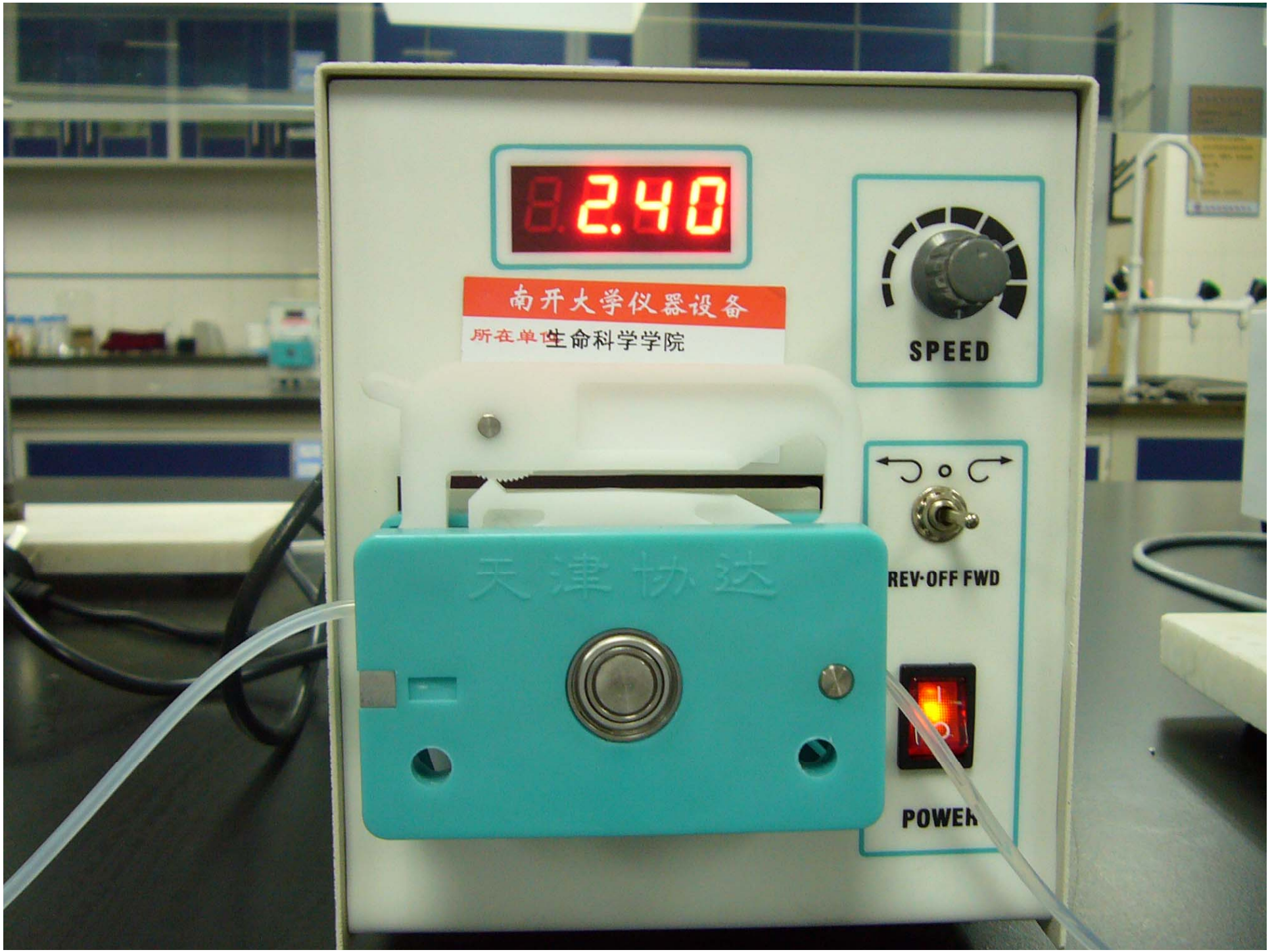
- 自动分步收集器:

  定时: **360S/3ml/管(0.5ml/分钟)；**调节位置

- 恒流蠕动泵:

  控制流速


BATHS
SBS-Z-100 数控计测自动部份收集器


8.240
南开大学仪器设备
所在单位 生命科学学院
SPEED
REV·OFF FWD
POWER
天津协达


SBS-Z 100 数控计滴自动部份收集器
滴
秒/分
0360
滴秒分
逆
顺
按
手动
自动
开
关
预 置
断液/清零
报警/换向
手 动
手动/自动
电 源
上海沪西分析仪器厂

3.上样、洗脱

- 上柱: 1.5ml氨基酸混合液(10mgAsp, 10mgArg于10ml上样缓冲液: 0.05mol/L柠檬酸缓冲液, pH6.6)
- 开始收集
- 1.5ml X 2上样缓冲液将样品推入柱中
- 1V(约30ml)上样缓冲液洗脱
- 洗脱缓冲液: 洗脱0.5mol/L柠檬酸缓冲液, pH6.6

4.氨基酸检测

- 每管取0.5ml样品 + 0.5 ml 茚三酮试剂
- 沸水浴5-10分
- 绘制洗脱曲线

分光光度计的使用



- 预热20分钟
- 调波长
- 空白透过率（T），开盖调 0，闭盖调100
- 灵敏度 “1”档（放大倍率最小）
- 吸光度A的测量：空白A调零，样品移入光路，显示值即为被测样品的吸光度值。

思考题

已知柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(0.1 mol/L)配方:

pH	0.1 mol/L柠檬酸(ml)	0.1 mol/L柠檬酸钠(ml)
6.6	1.4	18.6

柠檬酸$C_6H_8O_7.H_2O$, 分子量 210.14

柠檬酸钠$Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$, 分子量 294.12

怎样配制1L 0.5 mol/L上述缓冲液