

葡聚糖凝胶G-25层析脱盐

中文全名： 葡聚糖凝胶G-25
英文全名： Sephadex G-25 Fine
别名： 交联葡聚糖凝胶G-25；交联右旋糖酐凝胶G-25
外观： 白色微球，多孔。
说明： 适用于脱盐、肽与其它小分子的分离。
特性： 分离范围1000-5000； 粒径80-180 μm

Sephadex G-15葡聚糖凝胶 G-15 分离范围<1500 适用于脱盐、肽与其它小分子的分离
Sephadex G-25葡聚糖凝胶 G-25 分离范围 1000-5000 适用于脱盐、肽与其它小分子的分离
SephadexG-50葡聚糖凝胶 G-50 分离范围 1500-30000 适用于多肽分离、脱盐、清洗生物提取液、分子量测定
Sephadex G-75葡聚糖凝胶 G-75 分离范围 3000-80000 适用于蛋白分离纯化、分子量测定、平衡常数测定
Sephadex G-100葡聚糖凝胶 G-100 分离范围 4000-150000 适用于蛋白分离纯化、分子量测定、平衡常数测定
Sephadex G-150葡聚糖凝胶 G-150 分离范围 5000-300000 适用于蛋白分离纯化、分子量测定、平衡常数测定
Sephadex G-200葡聚糖凝胶 G-200 分离范围 5000-600000 适用于蛋白分离纯化、分子量测定、平衡常数测定

一. 目的

凝胶层析的工作原理和操作方法

掌握利用葡聚糖凝胶层析进行蛋白质脱盐的技术

二. 原理

凝胶层析又称凝胶过滤或排阻层析。凝胶过滤的主要装置是填充有层析介质的层析柱。

1. 层析介质的特点

- (1) 遇水为不溶解的固相；
- (2) 是化学惰性物质；
- (3) 离子基团含量少；
- (4) 颗粒大小和网眼均匀；
- (5) 机械强度较强；
- (6) 具有可选择的多种孔径。

目前使用较多的是葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶及其衍生物。尤其葡聚糖凝胶（商品名称Sephadex）是最常用的层析介质。它是由一定平均分子量的葡聚糖和交联剂1-氯-2,3-环氧丙烷（ $\text{ClCH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{Cl}$ ）交联成的具有三维结构不溶于水

的高分子化合物。调节葡聚糖和交联剂配比，可以获得网眼大小不同，型号各异的凝胶。当葡聚糖分子量越小，交联剂用量越大，则交联度越大，凝胶网眼越小，吸水量越小，G值也越小。G值表示每克干胶吸水量（mL）的十倍。例如Sephadex G-25其吸水量应为2.5mL/g干胶。常用的葡聚糖凝胶有多种规格，如G-10、G-15、G-25、G-50、G-75、G-100等。实验中选用何种型号应根据被分离的混合物分子的大小及工作目的来确定。

2. 分离原理

当混合样液加到凝胶柱上，随着洗脱剂而通过凝胶柱时，分子大小不同的物质受到不同的阻滞作用。颗粒接近或大于网眼的分子，不能进入凝胶的网眼中，在重力作用下它们随着溶剂在凝胶颗粒之间沿较短流程向下流动，受到的阻滞作用小，移动速度快，先出层析柱（此现象叫作被排阻。被排阻的最小分子量称为该规格凝胶的排阻极限）；而颗粒小于网眼的分子可渗入凝胶网眼之中，它们被洗脱时不断地从一个网眼穿到另一个网

眼，逐层扩散，阻滞作用大，流程长，移动速度慢，因而后出层析柱。在层析柱的出口处，我们用多个试管分步收集洗脱液，就可将混合物中各组分彼此分离。

当我们从生物组织中用盐析法提取蛋白质后，常需要进行蛋白质的脱盐工作，我们可采用层析介质为葡聚糖凝胶G-25（或G-15、G-50），用适当的洗脱剂进行洗脱，经凝胶层析，就可以将大分子蛋白质与小分子盐类分离。

三．实验材料及设备

1．材料

含硫酸铵盐的蛋白质溶液（参见附注3）

2．器材

层析柱：内径×柱高=1.0cm×25cm

滴定台架、螺丝夹：各1

刻度试管：10mL×14

移液管：1mL×1

烧杯：250mL×1 50mL×1

滴管：2

洗耳球：2

洗瓶、试管架、移液管架、玻棒：各1

四．试剂的配制

1．葡聚糖凝胶G-25（或G-15、G-50）

溶胀凝胶方法：按每个层析柱约4g的量称取葡聚糖凝胶G-25于烧杯中，加过量蒸馏水于沸水浴中溶胀2小时或在室温下溶胀6小时以上。用倾泻法除去上层漂浮的细碎凝胶，重复3~4次。操作中避免剧烈搅拌，防止破坏其交联结构。

2．BaCl₂溶液（1%）

3．考马斯亮蓝G-250

称取0.1g考马斯亮蓝G-250，先溶于50mL95%乙醇中，再加入85%的磷酸100mL，最后用蒸馏水定容到1000mL。暗处存放。

4．脲（6mol/L）

5．洗脱剂

应依据被纯化的蛋白质的不同特性而选用不同的缓冲液。

五．操作步骤

1．层析柱的准备

（1）清洗：每组取一支层析柱，用清水冲洗干净。

（若玻璃柱较脏，应卸去塑料装置，先入洗液中浸泡2小时。）

（2）安装与检查：检查出口装置中尼龙绸或烧结滤板是否完好干净。安装层析柱，让其垂直固定于滴定台架上。对准出口处，放一只250mL烧杯。向层析柱内灌洗脱剂，打开出口螺旋夹，检查有无渗漏、出口乳胶管是否通畅等情况。

（3）排气泡：保持柱内一定的水位，用手指弹击柱壁，部分气泡会从溶液中上浮排出。出口处的小气泡易停留在螺旋夹附近的乳胶管内，要想法排尽，否则会影响分离结果，排气完毕，保留柱内1~2cm高水位，关紧螺旋夹。

（4）标记高度：在距顶端8~10cm处做一标记，作为衡量灌装层析介质床体高度（15~17cm）的依据。

2．装柱

每组用50mL烧杯取溶胀的凝胶悬浆25~30mL，静置片刻，观察凝胶沉淀与水的体积之比，约为1:1即可，否则应作调整。

轻轻搅匀杯中凝胶，用玻璃棒引流入柱，打开出水口，并不断地向柱内补充凝胶，直到凝胶沉淀高度位于标记上方约2cm为止，凝胶柱内若有气泡和断层或柱床表面干水和歪斜，都将影响分离效果。必要时，需倒出凝胶，重新装柱。

3. 平衡

取15mL洗脱剂，用滴管沿柱内壁旋转着缓缓流下，不可冲动胶平面，打开出水口，经洗脱液的流动，一方面清洗内壁，另一方面使胶床收紧。洗脱平衡完毕，胶床上方保留约4cm高水位，关闭出水口。此时，胶床高度≥15cm为宜。

4. 准备收集

取6只干净的刻度试管（除净试管内残留的水），1~6编号，并在试管2mL处作一标记，插入试管架上，为收集洗脱样品作好准备。

5. 上样与收集

打开出口排水，当胶床与上方水层的弯月面相切时，关闭出口，用滴管将0.2mL混合样液沿柱内壁缓缓加入，勿冲动胶面。上样完毕，打开出水口，开始收集一号管。每管收集洗脱液2mL。

当样液进入胶床，其弯月面与胶面相切时，暂停排液，用滴管将洗脱剂沿柱内壁旋转着加入1cm高水位，然后排液，至其弯月面与胶面相切，再缓缓注入3~5cm高的洗脱剂。

6. 洗脱

不断向柱内加洗脱剂，保持胶床上水位3~5cm。出口流速控制在每6秒1滴，直至收集到6号管达2mL时，关闭出口。

7. 鉴定

另取6只干净试管，按收集顺序将洗脱液一分为二，即每管1mL，依次在试管架上排成二排。

第一排每管加2滴BaCl₂，根据白色沉淀多少，判断SO₄²⁻在各管中的浓度。

第二排每管加1mL考马斯亮蓝G-250试剂，根据蓝色情况，判断蛋白质在各管中的浓度。将结果记录于下表中。若鉴定的第6号管中，仍有样品，表明洗脱和收集不够，需增加7号、8号……试管继续洗脱与收集，同上法鉴定其蛋白质和盐浓度情况。

管 号

项 目 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

白色沉淀量

蓝色深浅

8. 再生

鉴定完毕，打开出水口，继续用2~3倍床体积洗脱剂洗脱，洗脱后关闭出口，以备下次使用。

六. 结果处理

1. 根据实验结果，在同一坐标系中，以收集的管号为横坐标，颜色深浅程度为纵坐标，绘制二条（蛋白质及(NH₄)₂SO₄）洗脱曲线。

2. 分析混合样品分离效果。

七. 思考题

1. 利用凝胶层析分离混合物时，怎样才能得到较好的分离效果？

2. 还有哪些方法可进行蛋白质脱盐？

附注

1. 凝胶的再生

通常层析柱经洗脱剂再生、平衡后，就可反复使用。但使用过多次后凝胶床体积变小，流速降低，凝胶污染杂质过多，甚至变色，需经再生后才可使用。再生方法有多种：如（1）用水进行逆向冲洗，再用洗脱剂平衡，便

可重新使用。又如(2)把凝胶倒出,用6mol/L脲浸泡凝胶半小时,抽滤,再用水漂洗数次,除净脲,必要时重复上述操作即可重新使用。

2. 凝胶的保存

(1) 湿法保存,可保存几个月至一年,有多种方法:

- 加入防腐剂硫柳汞,使其浓度为0.005%,下次使用前,水洗除去硫柳汞。
- 加入几滴氯仿,摇匀存放。下次使用前用热水浴除去氯仿。(沸点60°C)。
- 凝胶保存在60~70%乙醇溶液中,即凝胶以部分收缩状态保存。

(2) 干法保存

此法操作不及湿法简便,但处理得好,凝胶存放时间长。

先抽取过量水分,再向凝胶逐步加入百分浓度递增的乙醇溶液,每次停留一段时间,使凝胶逐步脱水,最后加入95%乙醇,凝胶脱水收缩。抽干,铺与搪瓷盆中,60~80°C经常翻动烘烤。若有结块,在下次膨胀时会散开的,不可用力敲碎,否则会破坏颗粒结构。

3. 用盐析法分离提取麦清蛋白

取10g小麦种子,粉碎。转入250mL具塞磨口锥形瓶中。加100mL蒸馏水,在康氏震荡器上震荡1小时。静置半小时,上清液以3000转/分钟离心15分钟。将上清液在布氏漏斗上(铺3~4层滤纸)抽滤。滤液应透明。用醋酸酸化滤液至pH4.7。加等体积的饱和硫酸铵溶液,边加边搅动,即有白色絮状沉淀生成。置冰箱过夜,使麦清蛋白全部盐析沉淀出来,以3000转/分钟离心20分钟,弃去上清液,加10mL无离子水使沉淀溶解,即得麦清蛋白和硫酸铵的混合液。