

凝胶层析原理

凝胶层析 (Gel filtration, GF) 是分配层析的一种形式, 是使样品混合物流经一定孔径的填料, 利用不同分子在溶液中的有效尺寸的差别来加以分开的层析方法。凝胶层析有许多其他的称谓, 如体积排阻层析 (Size Exclusion Chromatography, SEC)、分子筛层析 (Molecular Sieve Chromatography)、凝胶渗透层析 (Gel Permeation Chromatography)、凝胶排斥层析 (Gel Exclusion Chromatography) 和凝胶过滤层析 (Gel Filtration Chromatography) 等等。

凝胶层析的用途主要的应用对象是大分子物料, 特别是蛋白质混合物。它相对成本低、操作简便, 具有相对较大规模操作的能力。也可进行产物的定性(如分子量)、产物纯度的估算和各种分子相互作用的估算。

1、原理

体积排阻层析用的介质一般具有三维网状结构, 如图 1 为琼脂糖凝胶的内部网络结构。介质颗粒与颗粒之间有一定的空隙。当溶质随流动相流经柱床内的多孔介质时, 直径小于介质孔径的分子能够进入介质的孔道中, 而大于孔径的大分子则无法进入, 图 2 (a) 由于介质的孔径本身具有一定的分布, 因此不同直径的分子流经不同的路径。这种由于体积差异而形成的流经路径的不同, 最后导致了不同大小物质的分离。如图 2 (b) 所示, 三种分子量逐渐递增的物质依次出峰。

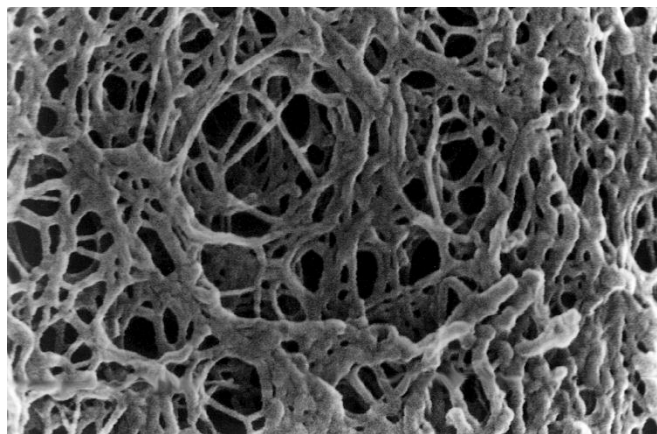
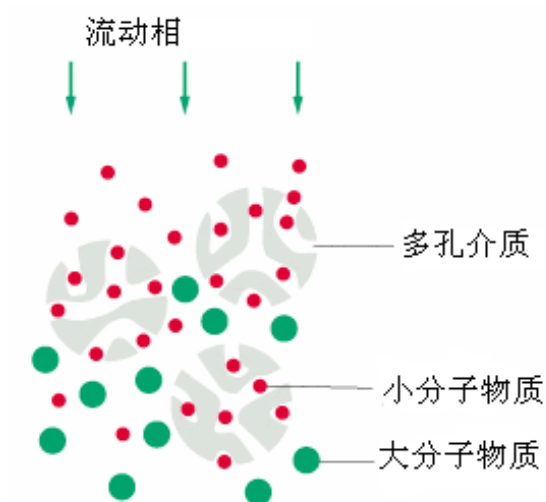
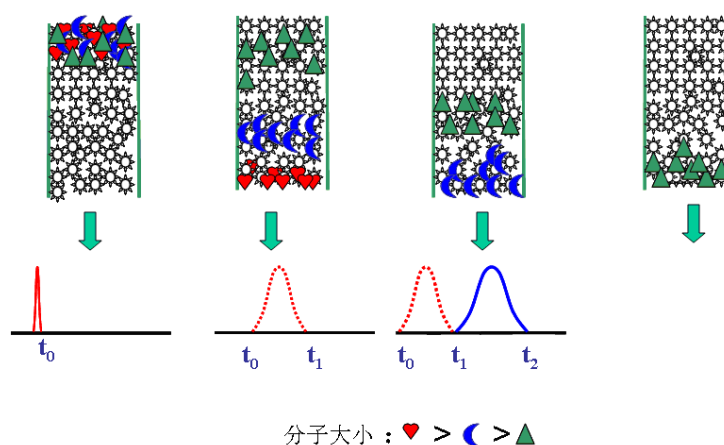


图 1 琼脂糖凝胶的内部电镜照片



(a)



(b)

图 2 分子筛层析示意图

生物分子的大小与相对分子量直接相关，因此体积排阻层析可以分离不同分子量大小的生物物质。

对于一定的凝胶介质，生物分子均可以分为三类：第一类是分子大小大于介质的孔径，完全不能进入孔道的分子。这类分子只能从介质的空隙中通过，因此流程最短，受到的阻力也最小，首先从层析柱中洗脱下来。不能进入到凝胶网络内部的最小分子的相对分子量，称为排阻极限。这时的洗脱体积就等于介质颗粒之间的空隙体积 V_0 。第二类是能够完全进入介质孔道内部的分子。这类分子的分子量较

小，层析时的流程最长，所受的阻力最大，因此最后出峰，被称为全渗透分子。全渗透分子的洗脱体积等于空隙体积 V_0 和孔内体积 V_i 之和 ($V_0 + V_i$)。能进入到凝胶网络内部的最大分子的相对分子量，称为渗透极限。第三类则是部分能够进入介质孔道的分子。这类分子的分子量介于排阻极限和渗透极限之间，依据分子的大小流经不同孔道的路径而被分离，因此是体积排阻层析分离的主要对象，它们的洗脱体积用 V_e 表示。排阻极限和渗透极限所形成的范围称为凝胶介质的分级范围，即指能为凝胶阻滞、并且相互之间可以得到分离的生物溶质的相对分子量范围。

对于一个固定的凝胶柱，柱内的总柱床体积 V_t 为介质的实际体积 V_g 、孔内体积 V_i 和空隙体积 V_0 之和。表示为：

$$V_t = V_0 + V_i + V_g \quad (1)$$

分级范围内生物分子的洗脱体积 V_e 取决于生物分子能够进入的孔径体积 V' 与空隙体积 V_0 之和。即：

$$V_e = V_0 + V' \quad (2)$$

V' 是孔内体积 V_i 的一部分，它与 V_i 的比值即为该分子在流动相和固定相的分配系数 K_d ，其关系为：

$$K_d = V'/V_i \quad (3)$$

由 (2) 和 (3) 可知，洗脱体积 V_e 和分配系数又可表示为：

$$V_e = V_0 + K_d V_i \quad (4)$$

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_i} \quad (5)$$

K_d 又称为排阻系数或渗透系数，它反应了生物分子进入凝胶介质的程度，当 $K_d = 1$ 是，分子为全渗入分子，当 $K_d = 0$ 时，分子为全排阻分子，当 K_d 介于两则之间，则为部分渗入分子。对于一定的凝胶，物质的 K_d 是其特征常数。

对于可溶胀、压缩的凝胶介质， V_i 和 V_g 是两个不容易测定的参数，一般可以引入一个有效分

配系数 K_{av} 来代替，即将整个凝胶颗粒体积最为固定相，表示为：

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (6)$$

2、凝胶层析的介质

凝胶介质是体积排阻层析的关键和基础，其自身的分级范围和孔道特性决定了对生物分子的选择性和分离效果。衡量介质的优劣有几个重要的参考因素：

(1) 化学惰性

理想的介质对所要分离的物质是化学惰性的，并且具有亲水性。疏水表面的材料有可能出现蛋白质不可逆变性。介质的表面不带电荷，避免产生静电效益。。使用高带电的填料会减少或增加分子通过柱的速率，并且会使蛋白质出现不可逆吸附。

(2) 稳定性

层析剂的稳定性在于：不溶于所处理的溶液；在所操作的 pH 及温度范围内稳定；在一些溶剂、盐类或菌种中不会降解。

(3) 刚性

层析剂一般可被分为二类：可压缩性担体和不可压缩性担体。以可压缩性担体作为介质进行层析时，由于介质能够承受的压力有限，达到一定层度后介质变形，因此床层的流速先随压力的增加而增加，在经过一个最大值后，就开始下降。流速的限制会造成较长的分离时间，降低产量。不可压缩性担体则没有上述压力与流速的限制，粒子的尺寸也不会产生严重的影响。

(4) 孔径分布

孔径分布由被处理对象来确定：用于脱盐的层析，要求孔径非常小；对于蛋白质之间的分离，则要求孔径与被分离的蛋白质比较接近。严格地符合这些要求有一定困难，有时需要折衷。

(5) 凝胶粒径

凝胶一般为球形，其粒径大小对分离度有重要影响。一般粒径越小，*HETP* 越小，柱效越高。软凝胶粒径较大，分布较大，一般为 50-150 μm (100-200 目)。硬凝胶粒径较小，一般为 5-50 μm 。

软凝胶一般是由干凝胶溶胀后得到。干凝胶颗粒在使用前要用水溶液进行溶胀处理，溶胀后每克干凝胶所吸收的水分的百分数称为溶胀率，即：

$$\text{溶胀率} = \frac{\text{溶胀处理后平衡干重} - \text{干凝胶重量}}{\text{干凝胶重量}} \times 100\% \quad (7)$$

(6) 床体积

这里指 1 克干凝胶溶胀后所占有的体积。由此可以估算装满一定体积的层析柱所需的干燥凝胶量。

目前使用最广泛的担体材料有交联后的葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺、琼脂糖和一些其他材料。

琼脂糖(agarose)从红色海藻中提取的多糖混合物，由 β -D-半乳糖和 3,6-无水-L-半乳糖交替连接而成。琼脂糖能在 100 $^{\circ}\text{C}$ 时溶于水，当冷却到室温时不需要交联就会形成刚性的琼脂糖凝胶，因此可以通过先热溶后冷却的方法制备。

聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺（单体）和亚甲基丙烯酰胺（双体）经四甲基乙二胺催化，通过自由基引发聚合而成的合成产物。线性的聚丙烯酰胺是水溶性的，因此具有亲水性。线性分子的交联，形成不溶性的网络。凝胶网络在水存在下，开始溶胀，形成开放的多孔结构。颗粒的孔径大小分布可以通过调整交联度，即单体和双体的相对量来加以控制。