

反相液相色谱柱填料的制备 及在蛋白质分离中应用*

师治贤 邵云

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁, 810001)

摘 要

采用 10 微米颗粒的多孔硅胶, 利用键合的方法合成了 C₈ 键合反相液相色谱柱填料, 使 6 种蛋白质得到了较好的分离。

关键词: 反相液相色谱; 柱填料; 蛋白质

以微粒多孔硅胶作基质制备键合相载体作反相液相色谱填料。其优点明显地超过用其它方法合成的填料。它的主要特点是机械强度和孔结构比较容易控制, 采用适当的比较简单的方法与硅胶表面大量存在的硅醇基进行键合反应。在反相液相色谱柱填料的合成中, 烃类配合基一般是 C₁ 到 C₁₈ 烷基键, 有时也有用苯基和苯乙基硅烷键合。非极性的作用部位随键长的增加而增加, C₁₈ 柱稳定性比较高, 这是由于长的烷基键保护了硅胶基质的缘故。但 C₁₈ 基团空间体积较大, 有效孔径变小, 柱效降低, 对于蛋白质的分离来说, 配合基小于 C₁₈ 比较合适, 而大于 C₁₈ 时, 容易产生不可逆性吸附 (师治贤等, 1992)。

反相液相色谱柱填料的合成多用烷烃二甲基氯硅烷与硅胶表面上的硅醇基反应产生共价键单分子膜。由于色谱保留行为的特殊性, 即是同一类非极性烷基配合基, 由于硅胶基质的来源、性能的不同, 生物大分子在分离过程中的选择性有很大的不同。我们采用正辛烷二甲基氯硅烷与微粒多孔硅胶反应, 合成了分离蛋白质的 C₈ 反相液相色谱柱填料, 使分离蛋白质取得了较明显的效果。

一、实验部分

1. 仪器和试剂

— 仪 器: Waters 600E 高效液相色谱仪, 配有 486 多波长紫外检测器, U6k 进样阀,

* 得到中国科学院兰州分院择优基金的资助。

本文 1995 年 9 月 12 日收到。

746 数据处理机。

装柱机: 2WG 进料泵 (中国科学院大连化学物理研究所仪器厂生产)。

色谱柱: 50×4.5mm, 匀浆法装填。

试剂: 牛血清蛋白 (BSA), 卵清蛋白 (OVA), 细胞色素 C (Cyt c), 核糖核酸酶 (RNase), 溶菌酶 (lys), 糜蛋白酶 (chy) 均购自美国 Sigma 公司。其它试剂均为分析纯的国产试剂。

2. 填料的合成方法

反相液相色谱键合相疏水烷基主要是 C₄、C₈、C₁₈ 和苯基等。为了避免生物活性的失活, 反相色谱填料的链长短对蛋白质的分离明显的有利。

烷基二甲基氯硅烷与硅胶表面上的硅醇基反应是一个多相反应, 加入适量有机碱如吡啶, 可促进此反应的进行。

具体合成方法: 将 10% 的正辛基二甲基氯硅烷加入在四氯化碳中, 慢慢混合均匀不断的脱气, 待混合均匀无气泡产生, 静置 2 小时。然后称一定量经过处理的 10 微米颗粒硅胶, 小心分段加入正辛基二甲基氯硅烷的四氯化碳溶液中, 不断地搅动, 同时在超声波中脱气 1 个小时, 然后, 放在 20℃ 左右反应 24 小时, 用砂芯漏斗过滤, 经四氯化碳洗涤多次, 最后用丙酮多次洗涤, 放置过夜, 保存在干燥器中, 以备装柱用。

二、结 果

(1) 按照上述合成方法, 将烷基配位体浓度分为: 0.1%、1.0%、5.0%、10.0% 和 20% 进行 C₈ 填料的合成, 然后装柱, 以蛋白质分离度参数进行评价。

将合成的系列柱填料, 称取一定量的填料, 放在 40℃ 的恒温箱中加热 12 个小时, 冷却后进行元素分析。

配位体浓度的选择, 填料的元素分析与分离度的数据, 如表 1。

表 1 配位体浓度对蛋白质分离的影响
Table 1 Effect of ligand concentration for resolution

配位体浓度 % Ligand concentration %	元素分析 Elemental analysis		分离度 Resolution $R = \frac{OVA}{BSA}$
	C %	H %	
0.1	0.85	0.66	0.80
1.0	2.53	0.71	3.06
5.0	3.22	1.25	2.57
10.0	3.00	1.28	3.47
20.0	2.89	1.20	3.43

从分离度来观察, 配位体浓度 10% 比较合适。

(2) 选择配位体浓度 10.0% 进行柱填料的合成。然后, 用匀浆法装柱, 选择分离条

件, 对6种混合蛋白质进行分离如(图1), 其分离效果比较满意。

色谱条件: 色谱柱: 自装C₈(50×4.6毫米)

流动相A: 0.01%TFA+20%甲醇

B: 0.05%TFA+90%甲醇

梯度形式: 100%A $\xrightarrow{30\text{分钟}}$ 100%B

流速: 1.00毫升/分钟

紫外检测: 280纳米

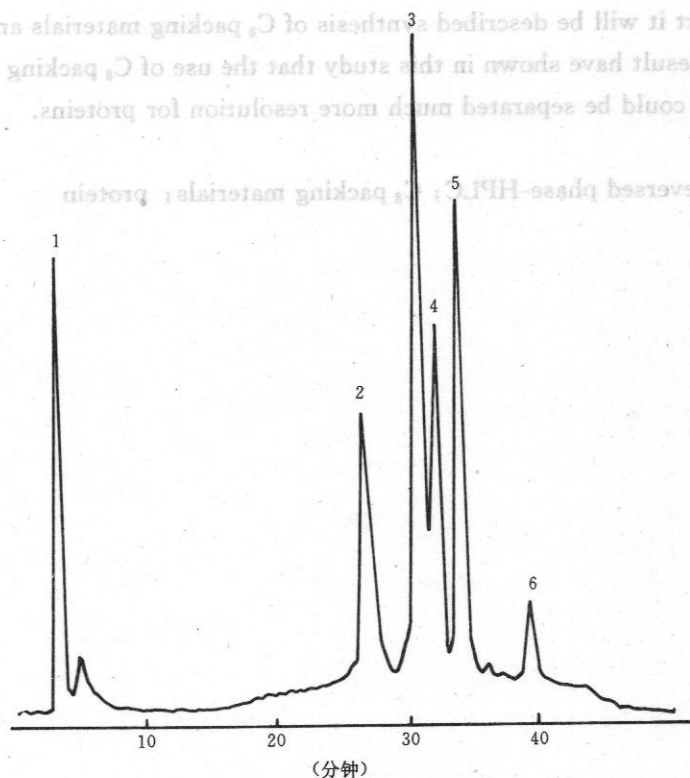


图1 蛋白质在合成的C₈填料柱上的分离

Fig. 1 Separation of proteins on C₈ column

1. 糜蛋白酶(Chy) 2. 核糖核酸酶(RNase) 3. 细胞色素C(Cyt c) 4. 溶菌酶(Lys)
5. 牛血清蛋白(BSA) 6. 卵清蛋白(OVA)

参 考 文 献

师治贤、王俊德, 1992, 生物大分子的液相色谱分离和制备, 科学出版社。

David B. Marshall and Keith A. Stutler, 1984, Synthesis of LC Reversed Phases of higher efficiency by initial partial de-activation of the silica surface. J. Chromatog. Science 22:217-220.

SYNTHESIS OF PACKING MATERIAL FOR REVERSED PHASE-HPLC AND SEPARATION FOR PROTEINS

Shi Zhixian and Shao Yun

(Northwest Plateau Institute of Biology,
The Chinese Academy of Sciences, Xining, 810001)

In this part it will be described synthesis of C_8 packing materials and separation for proteins. The result have shown in this study that the use of C_8 packing material column (50×4.5mm) could be separated much more resolution for proteins.

Key words: Reversed phase-HPLC; C_8 packing materials; protein

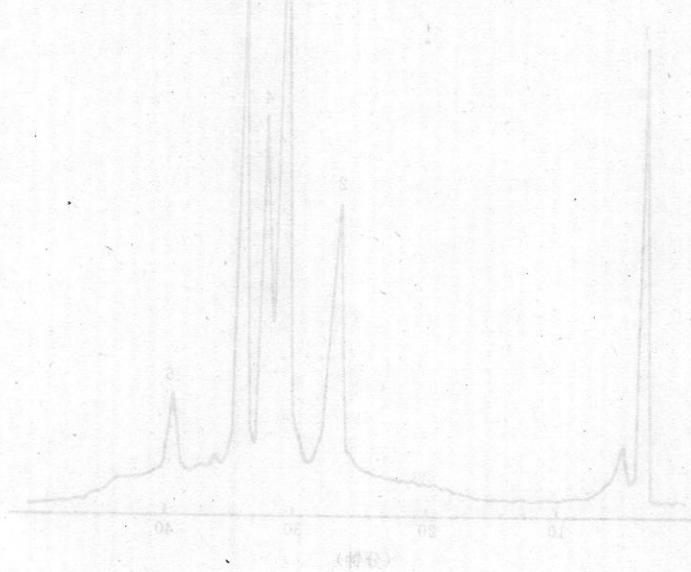


图1 蛋白质在合成的 C_8 材料柱上被分离
Fig. 1 Separation of proteins on C_8 column
1. 血清白蛋白(BSA) 2. 卵清蛋白(OVA) 3. 溶菌酶(Lyso) 4. 胰凝乳蛋白酶(CM) 5. 胰凝乳蛋白酶(CM)

精 文 学 参

David B. Matushik and Keith A. Szele, 1984. Synthesis of LC Reversed Phase of higher efficiency by initial period of activation of the silica surface. J. Chromatog. Science, 22:217-220.
王成德, 1992. 生物大分子的液相色谱分离和制备. 科学出版社.