

蛋白质在不同的高效液相色谱 模式上的分离

师治贤

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁, 810001)

摘 要

研究了蛋白质在体积排阻色谱, 离子交换色谱, 反相色谱和疏水作用色谱的不同模式上保留。根据它们的选择性, 在不同的洗脱条件下, 选择了最佳蛋白质的分离。

关键词: 体积排阻色谱; 离子交换色谱; 反相色谱; 疏水作用色谱 疏水性, 带电荷, 蛋白质

蛋白质的分离和纯化是生命学科研究中十分主要的一环。最早经典的方法是利用蛋白质在不同的介质中不同的溶解度而得到分离和纯化, 如盐析法, 调节不同的pH, 离子强度对不同等电点的蛋白质进行沉淀分离。随着分离技术的发展, 特别是高效液相色谱的出现和不断的完善, 直到目前它的选择性和规模性的纯化以及分离潜力, 没有一个方法与其相比拟(师治贤等, 1992)。根据蛋白质的不同性质, 它可以把复杂的蛋白质在不同的液相色谱模式上得到分离并能得到需要的蛋白质。因此, 目前广泛的应用在生命学科研究和生物技术工程过程。本文将讨论几种主要的色谱模式在分离纯化蛋白质中的应用。

一、实验部分

1. 仪器和试剂

(1) 仪器包括日本生产的 Toyo-Soda-803A; Beckman-Altex Model 和 Varian 5000 型液相色谱仪; Waters 600E, 液相色谱仪并配有 Waters 486 多波长紫外探测器, Waters 746 电脑处理数据, U6k 进样阀。

(2) 试剂 核糖核酸酶 (RNase) (12600)、溶菌酶 (Lys) (13900)、细胞色素 C (Cytc) (12000)、牛血清蛋白 (BSA) (67000)、卵清蛋白 (OVA) (43000)、肌红蛋白

* 国家自然科学基金项目和中国科学院大型仪器功能开发基金项目
本文1995年9月11日收到。

(Myo) (25000) 均购于 Sigma 公司, 其它试剂为国产, 分析纯。

2. 实验方法的设计

不同的色谱模式, 依据是色谱柱的改变, 选用和调节各种色谱条件, 同一蛋白质在不同的色谱模式上, 它的保留行为是显然不同的, 根据蛋白质保留、分离纯化感兴趣的蛋白质。

3. 蛋白质分离纯化条件的选择

选择分离纯化条件主要根据蛋白质的特性与液相色谱模式, 在流动相的组成, 梯度形式, 参数变换等进行最佳选择, 最终保证蛋白质在色谱柱上有理想的分离度和选择性。

二、结果和讨论

1. 体积排阻色谱 (SEC)

体积排阻色谱是最常用而比较理想的一种方法。在体积排阻色谱中, 溶质分子的保留是由于小分子化合物进入填满溶剂的填料微孔, 而大分子根据体积大小而被排阻, 大分子优先于小分子被洗脱出来, 其保留方程为:

$$V_B = V_0 + K_d V_1$$

V_B 是溶质洗脱体积, V_0 是柱空隙体积, V_1 是填料微孔体积, K_d 是分配系数由 0—1。蛋白质在体积排阻色谱的分离机理主要受以下二个条件控制。

(1) 填料 体积排阻色谱的填料应具备足够的亲水性, 无机担体通过表面的改性, 形成亲水性单分子层和多层覆盖, 以便除体积排阻以外的其它效应被消除或抑制。它的填料主要分醇型、酰胺型、醚型、单糖及多糖型等, 粒度 1—3 微米比较合适。近年来的研究表明, 键合单糖、寡糖和多糖填料, 由于表面亲水性增加, 更适合于生物活性酶的分离和纯化, 酶活性回收率接近 100%。

(2) 洗脱液 以硅胶为基质的填料, pH 范围在 2.0—7.5, 如果超出这个范围将会使键合相的有机层溶解速率增加, 加快了柱子的恶化。键合硅胶如 TSK 系列凝胶柱, 在分离纯化蛋白质时, 离子强度不能低于 0.3—0.5 摩尔/升, 如果太低不能抑制填料表面上的硅醇基与离子反应。常用磷酸盐和硫酸盐进行离子强度调节, 氯化钠作离子剂疏水作用最小, pH 不能太低, 一般选用中性较为理想。根据体积排阻色谱的分离纯化蛋白质的保留特性, 其蛋白质的分离如图 1。

色谱条件: 排阻色谱柱: TSK-G3000SW (600×7.5 毫米)

洗脱液: 0.05 摩尔/升 KH_2PO_4 + 0.05 摩尔/升 Na_2HPO_4 + 0.2 摩尔/升 NaCl , pH=6.9

流速: 0.8 毫升/分钟 紫外检测: 280 纳米

2. 离子交换色谱 (IEC)

离子交换分离纯化蛋白质的机理至今并不十分清楚。一般认为, 离子交换填料表面上的静电作用力与活性蛋白酶两性三维结构反应形成了一种络合物, 这个形成过程伴随

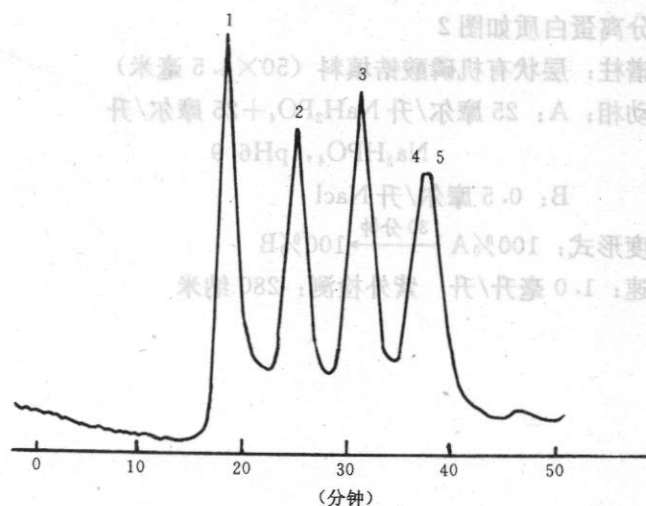


图1 蛋白质在 TSK-G3000SW 的分离

Fig. 1 Separation of Proteins on TSK-G3000SW

1. 牛血清蛋白 (BSA) 2. 卵清蛋白 (OVA) 3. 肌红蛋白 (Myo) 4. 糜蛋白酶原 (Chyn)
5. 细胞色素 C (CytC)

着静电荷的减少而减少，并且一般的活性蛋白酶带有大于等电点的静电荷。

离子交换色谱的基本参数的变化包括填料和洗脱液的组成。

(1) 填料 分为无机填料和有机填料 (师治贤等, 1992)。

无机填料是以硅胶为基质，硅胶表面的硅醇基可以充当弱阳离子交换基团，在 pH > 7 时更为显著，因此，以硅胶为基质的阳离子交换填料的质量取决于这种性质能否有效的消除和抑制。颗粒度范围一般在 3—40 微米，孔径 (10—400) 纳米。阴离子交换主要是二乙 (甲) 氨乙基 (DEAE, DMAE) 和季胺盐，阳离子交换主要是羧甲基、磺酚基 (SP) 和磺酸基。一般孔径在 30 纳米填料既能保证良好的分离，又能达到较高的容量。在 4.6 × 250 毫米的离子交换柱上其容量可达 50 毫克。

有机填料它以微粒大孔离子交换树脂的合成，实现了生物活性蛋白酶的快速分离，如 Spheron 的衍生物，其通式为：



R 是任意离子交换基团，此种填料稳定性很高。Burke 研制成一种无孔丙烯酸类离子交换树脂，表面以共价键合了聚乙烯胺分子，能在短时间完成蛋白质分离。

(2) 脱洗液 主要控制 pH 和离子强度，因为蛋白质在离子交换色谱上分离的基础是用 pH 来控制蛋白质的电荷。如果洗脱液中 pH 高于蛋白质的等电点 (pI)，它将带静的负电荷，如果 pH 低于蛋白质的等电点，则显出静的正电荷，因此，蛋白质的 pI 决定了选择阴、阳离子交换柱，pI 高最好在阳离子交换柱上，pI 低选阴离子交换柱较为合适。盐的类型与 pH 一样都控制着蛋白质在离子交换柱上的保留行为。盐类型对蛋白质保留行为的影响，可分为 3 种类型 (师治贤等, 1991)，强顶替作用的盐降低了蛋白质的保留时间，弱顶替作用的盐影响到蛋白质回收率，一般选择中间顶替作用的盐。离子强度大小

的浓度范围 0.01 摩尔/升—1.0 摩尔/升。

离子交换色谱分离蛋白质如图 2

色谱条件：色谱柱：层状有机磷酸锆填料 (50×4.5 毫米)

流动相：A：25 摩尔/升 NaH_2PO_4 + 25 摩尔/升
 Na_2HPO_4 , pH6.9

B：0.5 摩尔/升 NaCl

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

流速：1.0 毫升/升 紫外检测：280 纳米

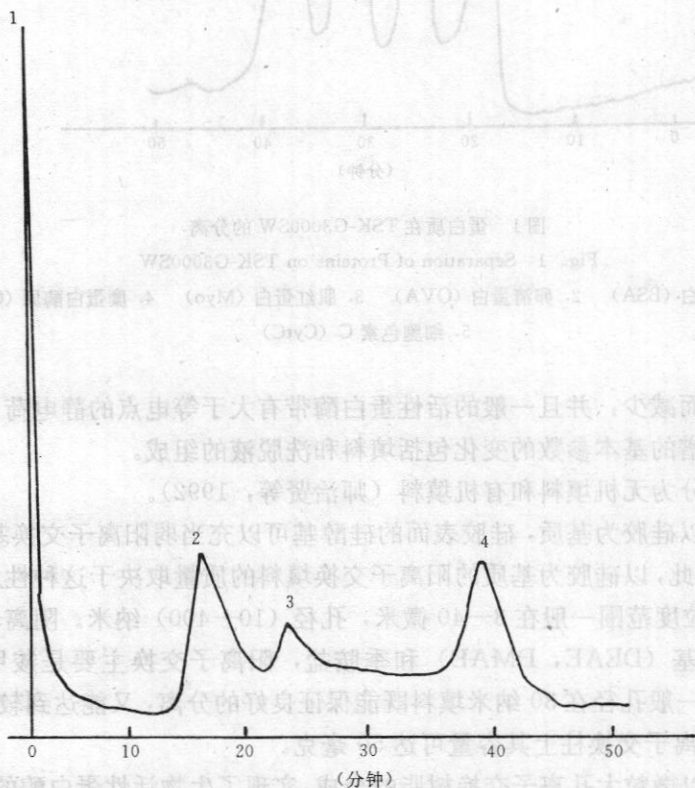


图 2 离子交换色谱分离蛋白质

Fig. 2 Separation of Proteins on Ion Exchange Chromatography

1. 牛血清蛋白 (BSA) 2. 糜蛋白酶 (Chy) 3. 胰蛋白酶 (Try) 4. 细胞色素 C (CytC)

3. 疏水作用色谱 (HIC)

蛋白质的空间排列极易从固有的有序结构变成较无序的三维结构，而发生变性，失去活性。因此，在分离纯化时最易使蛋白质变性失去活性，而高效疏水作用色谱可以利用适度的疏水性填料，含盐的水溶液作为洗脱液，可以使蛋白质结构不变，得到满意的分离纯化效果 (师治贤等, 1994)。

(1) 填料 其显著特征是表面疏水性相对弱一些，配基密度比反相色谱填料要低 10—100 倍。TSK Phenyl-5PW, 这是一种苯基键合在亲水性聚合物 TSK G5000PW 基

质上得到的填料，pH 的适用范围在 2—12，性能良好，应用面广。

(2) 洗脱液 主要考虑盐离子种类、离子强度、pH、柱温等。大多数高浓度的盐溶液对许多蛋白质是无害的，实践证明，无论是 3 摩尔/升 NaCl 或 1 摩尔/升 Na_2SO_4 都不会改变牛血清蛋白和卵清蛋白的构象，某些离子如 SO_4^{2-} 可提高蛋白质的构象的稳定性，有盐析效应，有些离子如 Ca^{2+} 、 SCN^- 会使蛋白质构象稳定性降低，有盐溶效应。

选择合适的盐对保证生物活性蛋白质的分离纯化十分重要。在 HIC 中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4OAc 、磷酸盐和氯化钠是常采用的几种盐。蛋白质在高效疏水作用色谱的分离如图 3。

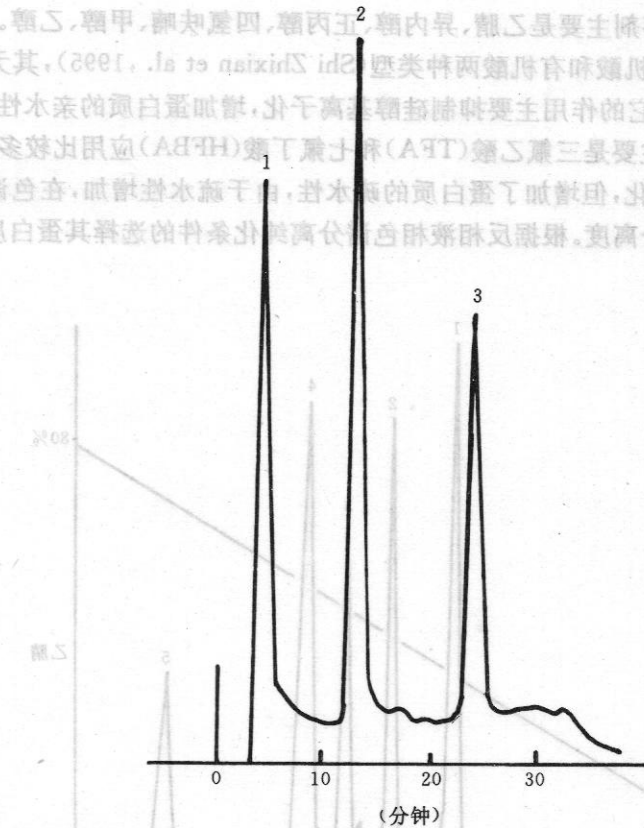


图 3 蛋白质在疏水作用色谱上的分离

Fig. 3 Separation of Proteins on HIC

1. 细胞色素 C (CytC) 2. 肌红蛋白 (Myo) 3. 溶菌酶 (Lys)

色谱条件：疏水柱 TSK 5PW (75×7.5 毫米)

液动相：A: 1.7 摩尔/升 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 在 0.1 摩尔/升 Na_2HPO_4

pH=7.5

B: 0.1 摩尔/升 Na_2HPO_4

pH=7.0

梯度形式：100% A $\xrightarrow{15 \text{ 分钟}}$ 100% B

紫外检测:280 纳米 流速:1.0 毫升/分钟

4. 反相色谱 (RPC)

分离多肽和蛋白质着眼于蛋白质的疏水性 (Jiao Qingcai 等, 1993)。采用非极性烷基固定相作为填料, 其表面化学性质和流动相的选择最大限度地满足疏水要求。

(1) 填料 键合相的配基密度约为 2.0—3.5 微摩尔/米², 键合疏水烷基主要有 C₄、C₈、C₁₈ 和苯基等, 烷基键合键最好短一些, 因为增加键长, 填料的疏水性相应增强, 需增加洗脱液中的有机成分比例, 更易使蛋白质失活。为了提高键合相的水解稳定性, 新型的反相填料往往拥有一个亲水层。

(2) 洗脱液 有机溶剂主要是乙腈、异内醇、正丙醇、四氢呋喃、甲醇、乙醇。洗脱液中包括的离子对试剂分无机酸和有机酸两种类型 (Shi Zhixian et al., 1995), 其无机酸通常有磷酸、盐酸和高氯酸, 它的作用主要抑制硅醇基离子化, 增加蛋白质的亲水性, 降低色谱柱上的保留值。有机酸主要是三氟乙酸 (TFA) 和七氟丁酸 (HFBA) 应用比较多。虽然作用也是阻止硅醇基的离子化, 但增加了蛋白质的疏水性, 由于疏水性增加, 在色谱柱上的保留值增加, 从而提高了分离度。根据反相液相色谱分离纯化条件的选择其蛋白质的分离如图 4。

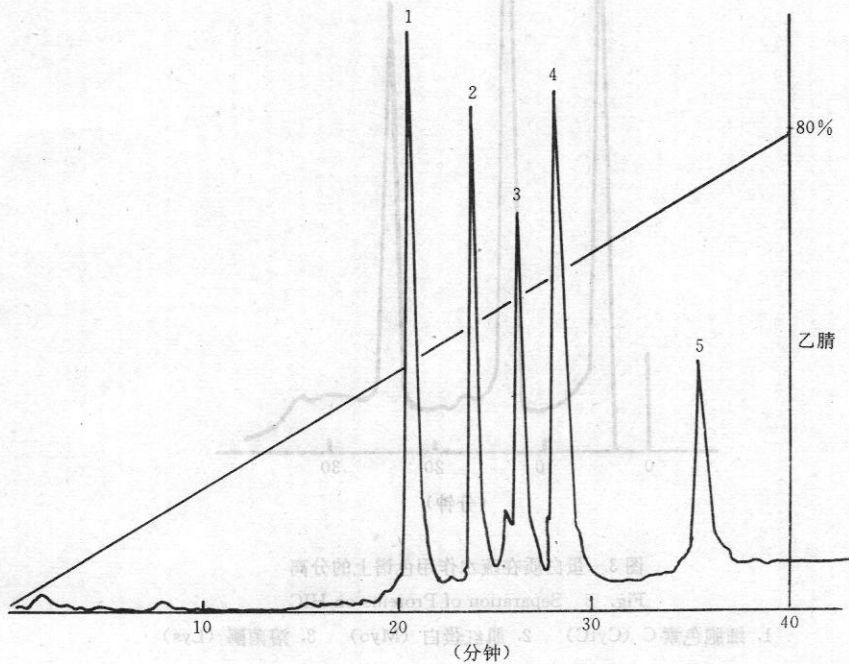


图 4 蛋白质在反相柱上的分离

Fig. 4 Separation of Proteins on RP-C4

1. 核糖核酸酶 (RNase)
2. 细胞色素 C (CytC)
3. 溶菌酶 (Lys)
4. 牛血清蛋白 (BSA)
5. 卵清蛋白 (OVA)

色谱条件: 色谱柱 (10×0.45 厘米) Vydac RP-C4

流动相: A: 0.1% (TFA) 水溶液

B:0.1% (TFA) 乙腈溶液

梯度形式: 100%A $\xrightarrow{40\text{分钟}}$ 80%B

流速: 8 毫升/升

参 考 文 献

师治贤, 1991, 盐溶液的类型对蛋白质分离的影响, 溶液化学、热力学和热化学进展 P. 87, 中国化学会, STTT 委员会

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。

师治贤, 胡凤祖, 邵云, 1994, 高效疏水作用色谱分离高原春小麦淀粉酶, 作物学报, 20 (3): 368—369。

Jiao Qingcai, Chen Yao zu and Shi Zhixian, 1993, Investigations of Retention Rule in Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography, *Science in China* (series B). 36 (1): 1—9.

Zhixian Shi and Qingcai Jiao, 1995. The Selection of Parameters for Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography of Proteins. *ACGC chemical Research Communications* 1: 21—25.

THE SEPARATION PROTEINS ON DIFFERENT HPLC MODEL

Shi Zhixian

(Northwest Plateau Institute of Biology,

The Chinese Academy of Science, Xining, 810001)

In this study, we have demonstrated the retention mechanism of proteins on model of different HPLC. The selection of different elution condition were investigated optimum separation on Size Exclusion Chromatography, Ion Exchange Chromatography.

Reversed Phase Chromatography and Hydrophobic Interaction Chromatography for proteins. The results obtained in this study that utilize different selectivities (Size, Charge, Hydrophobicity) can provide excellent resolving power for Protein Separations.

Key words: Size Exclusion Chromatography; Ion Exchange Chromatography; Reversed Phase Chromatography; Hydrophobic Interaction Chromatography; Proteins, Charge, Hydrophobicity