

疏水相互作用层析法

王素云 编译

(北京大学生物系)

七十年代初, Z. Er-el 及 S. Shaltit 在纯化活化的糖元磷酸化酶 b 及糖元合成酶时, 首先发展了疏水作用亲和层析法, 目前这个技术已广泛应用于纯化蛋白质或许多生物大分子。

一、原理

疏水作用亲和层析法的特点, 在于利用载体与样品的疏水基团间的相互作用。作用的强弱受中性盐或乙二醇浓度的影响。在水相中提高中性盐的浓度或降低乙二醇的浓度增强体系的疏水性可增强疏水基团间的相互作用, 相反就会减弱疏水基团间的相互作用。疏水层析就是通过中性盐或乙二醇浓度的控制, 调节疏水作用的强弱, 以达到分离或纯化样品的目的。由于许多蛋白质分子表面都存在疏水位区, 所以疏水层析技术得以广泛的应用。

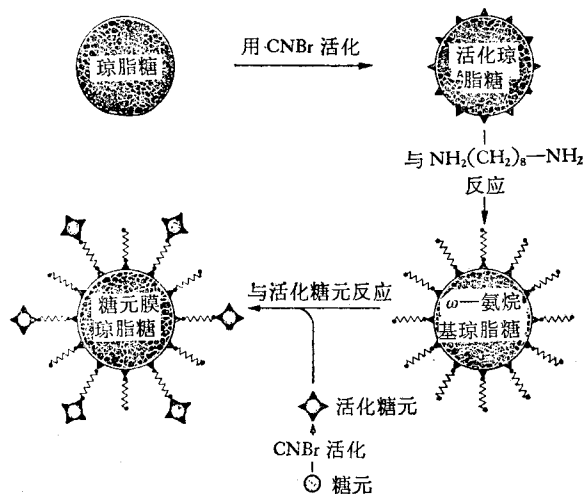


图 1 Seph-C. 糖元亲和剂的制备示意图

▲——由 BrCN 活化而产生的功能团
~~~~~1,8 二氨基辛烷

疏水层析用的载体, 即疏水胶, 已有不少类型。Z. Er-el 等最先使用的是糖元琼脂糖, 他

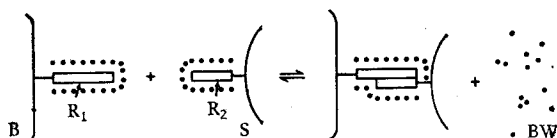
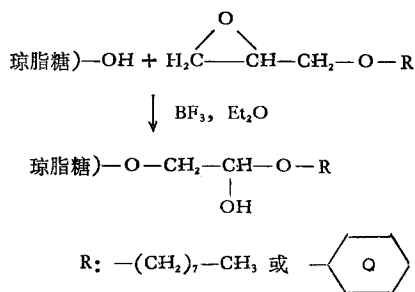


图 2 疏水相互作用

柱床 B 上的疏水基团  $R_1$  与溶质分子 S 上的疏水基团  $R_2$ , 在水中相互作用, 最后二者结合在一起, 同时增加了水的无序性, BW 为无序水分子(图中没有画出水的结构)

用  $\alpha, \omega$ -二氨基烷和用 CNBr 活化的琼脂糖偶联。然后再与 CNBr 活化的糖元结合而制得, 即在琼脂糖珠的表面通过  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_8\text{NH}-$  形成了一层由糖元所组成的外膜 (图 1)<sup>[6]</sup>。它和样品通过疏水相互作用而结合 (图 2)<sup>[2]</sup>。氨基烷琼脂糖结构如图 3<sup>[7]</sup>。

辛烷(苯基)琼脂糖疏水胶也是在实验室中常用的类型, 它由琼脂糖和缩水甘油醚反应生成<sup>[1]</sup>。



本文将以糖元琼脂糖疏水胶为例介绍疏水层析及其应用。

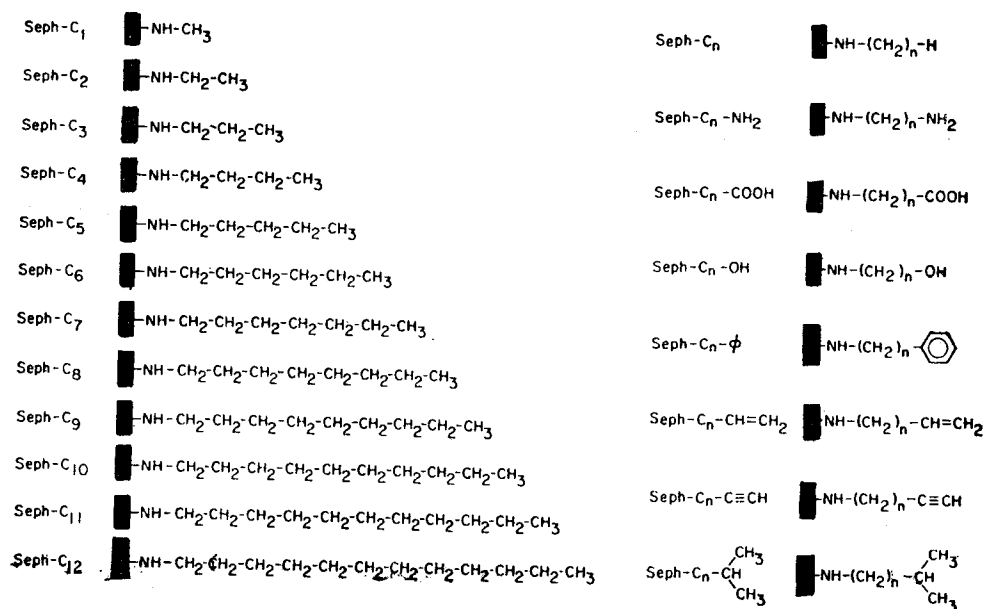


图 3

C<sub>n</sub>—不同碳原子数的同系物      n—碳原子 1—12      —琼脂糖

## 二、影响疏水胶的疏水基团与蛋白质的疏水基团间相互作用的因素

**1. 氨基烷的碳原子数目。**实验表明,在用疏水层析纯化活化的糖元磷酸化酶 b 时,氨基烷中碳原子的数目直接影响层析效果,在 C<sub>5</sub>—C<sub>8</sub> 的 Seph-C<sub>n</sub> 糖元琼脂糖柱和酶有很强的亲

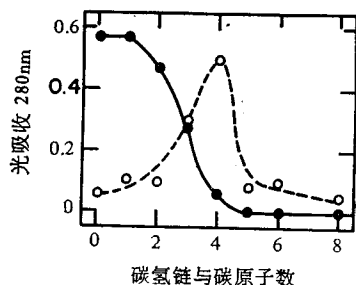


图 4 活化的糖元磷酸化酶 b, 在烷基数为 C<sub>2</sub>—C<sub>8</sub> 的氨基同系物的柱上疏水亲和层析分布图

●—● 280nm 下光吸收值  
○—○ 从 C<sub>2</sub>—C<sub>8</sub> 洗脱下的蛋白质光吸收值  
洗脱液: 0.4M 咪唑—柠檬酸溶液 (pH7.0) 洗脱  
体积: 2 毫升/管  
纯化的活化糖元磷酸化酶以 1 毫克/毫升浓度上柱,  
操作温度 22°C。  
柱的平衡及最初洗脱 2 毫升为含有 β-甘油 磷酸 钠 (50mM) 和 EDTA (1mM) 的甘油磷酸缓冲液 (pH7.0), 然后用咪唑柠檬酸继续洗脱及用紫外  
仪监测。

合力, 而丁烷琼脂糖柱则亲和力很弱 (图 4)。

**2. 疏水胶对蛋白质的容纳能力和所容纳的蛋白质的分子量 (MW) 无直接的关系。**分子量在 13,000—800,000 间的四种蛋白质: 谷氨酸合成酶 MW 800,000; 谷氨酰胺合成酶 MW 600,000; ATP 谷氨酰胺合成酶腺苷酸转移酶 MW 13,000; 谷氨酰胺代谢调节包缠蛋白 P11D MW 50,000, 它们与 Seph-C<sub>5</sub>-NH<sub>2</sub> 的相互作

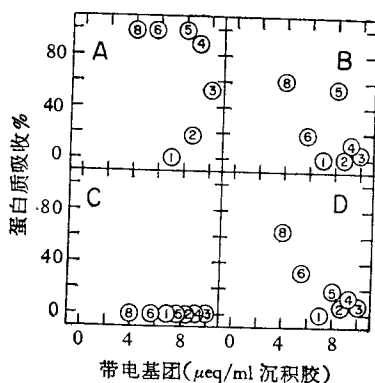
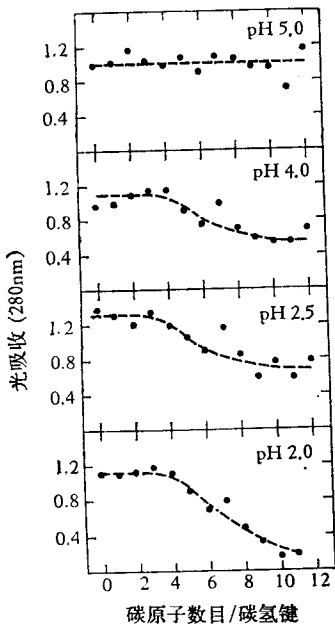


图 5 不同的蛋白质在不同的同系物上的吸收与它们电荷梯度关系

A 活化的糖元磷酸化酶 b  
B 牛血清清蛋白  
C 细胞色素 C  
D β-乳球蛋白  
①—⑧ Seph-C<sub>1</sub>—8

用,不因它们的分子量不同而有差别<sup>[5]</sup>。

**3. 疏水胶对蛋白质的容纳能力与载体疏水胶的电荷量关系不大。** 实验证明在 Seph-C<sub>8</sub> 的柱上电荷量很低,但其接受活化磷酸化酶 b,牛血清清蛋白以及  $\beta$ -乳球蛋白的能力很强。通常,柱的容纳能力随载体疏水基团的碳氢链的增长而增加(图 5),疏水胶层析柱的电荷量都是 8—9 $\mu$ eq/ml 沉积胶, pH7.4 时,对糖元磷酸化酶 b(A),牛血清清蛋白(B)以及  $\beta$ -乳球蛋白(D)的受纳量 Seph-C<sub>7</sub>>Seph-C<sub>4</sub>>Seph-C<sub>2</sub>



**图 6 溶菌酶在 Seph-C<sub>6</sub> 柱上的 pH 效应 ( $n=0-12$ )**  
pH2.5、4.0、5.0 三个梯度由 0.1M 磷酸—柠檬酸  
配制; pH2.0 由 KCl—HCl 配制  
样品 1 毫克蛋白/0.1 毫升巴比妥缓冲液  
柱床 D:h = 0.4:5(cm/cm)  
收集体积 2 毫升/管

而细胞色素 C(C) 则根本不为柱所吸收,增加柱的电荷量与其受纳蛋白质的量无关。

**4. 蛋白质能否与载体结合,关键是蛋白质与载体的疏水基的相互作用,**但如蛋白质带正电荷那末它与疏水胶的结合会发生一定困难,图 6 表明等电点为 10.5—11.0 的溶菌酶,由于在酸性溶液中带正电荷,即便在疏水基链长  $n > 5$  的 Seph-C<sub>n</sub> 载体上,二者的结合亦有困难,同样小牛胸腺组蛋白 H<sub>3</sub>(PI > 9.0) 在 pH4 的偏酸和低盐条件下便可洗脱<sup>[7]</sup>。

### 三、应用疏水层析时的几个实际问题

#### 1. 根据实验目的及样品特点,选择适宜的疏水胶

**2. 离子强度对疏水相互作用的影响。**上柱样品中需含一定浓度的中性盐,以增加溶质与疏水胶的相互作用,在疏水层析中常在较高的离子强度下将蛋白质吸附在柱上(如在 4M NaCl 溶液中)。

**3. 离子的化学性质对疏水相互作用的影响。**各种盐对疏水作用的影响大小由离子的化学本性决定。阴离子、阳离子可按增强疏水作用的能力(“盐析”效应“Salting-out” effect)<sup>[4]</sup>或破坏水的结构(“紊乱”效应) (“Chaotropic” effect) 从而导致疏水作用强度的相对降低的能力排列成如下顺序:

**表 1 离子对疏水作用的影响**

|                                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ← 盐析效应增强                                                                                                                                                                      |
| 阴离子: $\text{PO}_4^{3-}$ , $\text{SO}_4^{2-}$ , $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{Br}^-$ , $\text{NO}_3^-$ , $\text{ClO}_4^-$ , $\text{I}^-$ , $\text{SCN}^-$ |
| 阳离子: $\text{NH}_4^+$ , $\text{Rb}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Na}^+$ , $\text{Cs}^+$ , $\text{Li}^+$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Ba}^{2+}$                  |
| 紊乱效应增强 →                                                                                                                                                                      |

**4. 洗脱条件。**被吸附的物质,利用不同的洗脱条件,按照疏水相互作用的不同强度而有选择的使之脱附。改变洗脱条件有如下一些方式:

- ① 改变为较低盐析能力的离子(见表 1)
- ② 降低离子强度
- ③ 降低洗脱液的极性,如加入乙二醇
- ④ 在洗脱液中加入去垢剂
- ⑤ 升高洗脱液的 pH

**5. 疏水层析的洗脱条件。**通常洗脱以自高至低盐浓度进行线性梯度洗脱为宜,也可以降低中性盐浓度与逐步提高乙二醇的浓度同时进行<sup>[9]</sup>。

**6. 柱的再生<sup>[10]</sup>。**使用后的柱上可能存在有与柱结合很紧的蛋白以及残存的去垢剂将会对后面的实验带来严重的影响,使柱的结合能力降低甚至丧失。经验证明,依次按下面手续洗柱是有效的。

1 柱体积蒸馏水→1 柱体积乙醇→2 柱体积的正丁醇→1 柱体积的乙醇→1 柱体积蒸馏

水→用缓冲液平衡柱

洗柱时流速可接近或略高于正常实验时情形。

#### 四、应用举例

大麦  $\beta$ -淀粉酶的纯化: 40ml 提取液(25% 饱和度的硫酸铵的 0.01M 磷酸盐缓冲液 pH 6.8)。柱床体积 30ml, 流速 25 毫升/小时, 洗脱时先用 85 毫升样品缓冲液淋洗, 再用硫酸铵浓度降低及乙二醇浓度上升的梯度洗脱(终浓度分为 0% 及 50%)。

疏水胶在图 7 中为辛基—交联—琼脂糖 4B, 图 8 为苯基交联琼脂糖 4B, 二者都得到较好的分离效果。

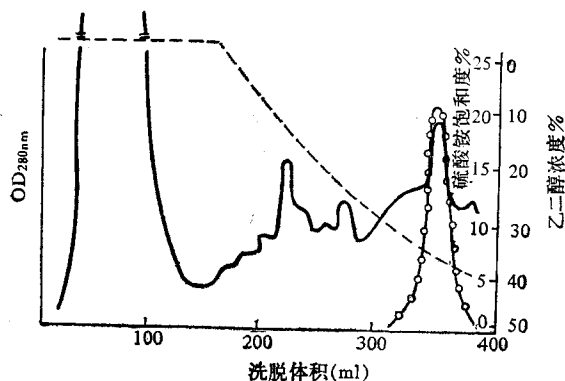


图 7 大麦  $\beta$ -淀粉酶的疏水层析图

— 280nm 下光吸收值  
○—○ 大麦  $\beta$ -淀粉酶  
----- 饱和度硫酸铵梯度及乙二醇浓度梯度

大量的研究工作表明: 在蛋白质分子表面存在着疏水区域, 抗原与抗体免疫结合的分子基础是抗原分子的疏水区域与抗体分子超变区的疏水氨基酸之间的相互作用。金色葡萄球菌细胞壁表面的蛋白 A ( $S_pA$ ) 的分子中的疏水片段 B, 发现可与琼脂糖偶联, 因此可用疏水层析方法纯化 IgG 的  $F_c$  片段<sup>[11]</sup>。应当提到的

(上接第 36 页)

格说, 是在时间和空间上的平均结构; 它可以测定一个变化过程之前和之后的结构, 经过努力也可能测定化学上“凝固”起来的一些稳定中间态的结构, 但不能探测动态过程, 不能跟踪变化速率。特别对于生物机体, 晶态不是其自然状

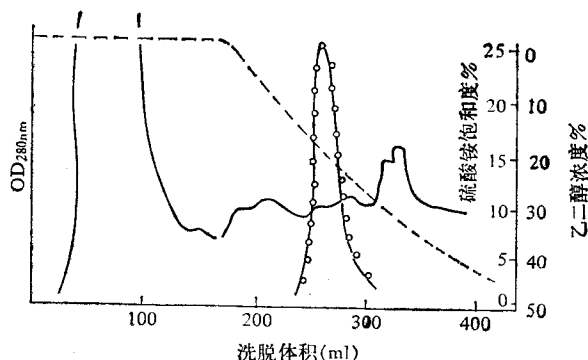


图 8 大麦  $\beta$ -淀粉酶在苯基交联 4B 琼脂糖柱上的纯化效果

— 280nm 下光吸收值  
○—○ 纯化后  $\beta$ -淀粉酶  
----- 硫酸铵梯度及乙二醇梯度

是, 疏水作用有时是十分强烈的, 所以不少工作中利用这种技术实现酶的固定化而应用在工业中。总之疏水层析正好利用了生物大分子的结构特点, 因而有广泛应用的可能性。

#### 参考文献

- [1] Rosengran, J. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **412**, 51—61, 1975.
- [2] Lewin, S. et al.: *Method of Protein Separation*, Vol. 2, 233—243, 1976.
- [3] Hoffmann-Ostenhof, O. et al.: *Affinity Chromatography*, 141—158, 1977.
- [4] Pahlman, S. et al.: *J. Chromatography*, **131**, 99—108, 1977.
- [5] Shaltiel, S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 3397—3401, 1975.
- [6] Axen, R. et al.: *Nature*, **214**, 1302—1304, 1967.
- [7] Shaltiel, S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 778—781, 1973.
- [8] Er-el, Z. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 383—390, 1972.
- [9] Conner, B. J., et al.: *B. B. A.*, **532**, 122—136, 1978.
- [10] Conner, B. J.: *J. B. C.*, **250**, 3283—3291, 1981.
- [11] Hans Bisswanger and Eva Schminke-off: *Multifunctional Proteins*, 312—315, 1980.

[本文于 1981 年 5 月 18 日收到]

态, 且结晶所需要的条件(如浓的盐溶液或有机溶剂)也常与生理条件很不相同, 这就要求我们在应用 X 射线衍射分析结果来阐释生命活动时取谨慎态度。近年来一些新的方法(如低温结晶学)和技术(如高强度高准直性同步辐射 X 光源)的应用, 正在逐步改善这一状况。