

近,为此再选择十种不同种类的谷物对 ISO 法与醋酸氯化钙旋光法进行比较(表3)。

醋酸氯化钙旋光法与 ISO 法的比较结果在统计学上没有明显的差异(表3)。标准差及 T 值分布统计计算符合要求。从实验结果来看,醋酸氯化钙旋光法的准确度及精密度略高于 ISO 法,尽管两种方法的可溶性淀粉回收率都达 99% 以上,但醋酸氯化钙旋光法的标准差比 ISO 法的标准差要小得多。从快速准确这两点来考虑,以醋酸氯化钙为分散介质的旋光法为更好。而且操作简单易行,分析结果可靠,用于常规批量分析,尤为合适。

本文承蒙李伟格副研究员、查如璧、常碧影、陈必芳同志的协助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Jones, M. G. K.: *Biochem.*, Vol. B3. 303/1, 1981.
- [2] Macrae, J. C. et al.: *J. Sci. Food. Agri.*, Vol. 25, 1465, 1974.
- [3] 张力田:《淀粉糖》,轻工业出版社,1981,第120页。
- [4] ICC-Standard, No. 123.
- [5] Zelenka, S et al.: *Die Stärke*, 18(3), 77, 1966.
- [6] Hansen, J. et al.: *Anal. Biochem.*, 68, 87, 1975.
- [7] 上海商品检验局,《食品化学分析》,上海科学技术出版社,1982,第33页。
- [8] 余纳哲:《郑州粮食学院学报》,1981,第1期。
- [9] Trop, M. et al.: *J. AOAC.*, Vol. 55, 1191, 1972.
- [10] Frozlr, J R. et al.: *Die Stärke*, No. 11. 398, 1962.
- [11] Ulmann, et al.: *Cereal Chem.*, Vol. 49, No. 3, 298, 1972.

[本文于1982年10月17日收到]

高效液相色谱在蛋白质化学中的应用

姚 志 建

(军事医学科学院基础医学研究所,北京)

最近十年,高效液相色谱的迅速发展已经愈来愈受到蛋白质化学家的重视。本文拟就其应用的现状,做一些介绍。

一、色 谱 填 料

1. 凝胶过滤色谱

凝胶过滤色谱是利用大小不同的溶质分子进入一定孔隙填料的程度不同而使之分离的。这是蛋白质和肽类分离中最常用的简便方法。但传统的凝胶色谱填料,如葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等都是些遇水即膨胀的软胶,不耐压,故不适于做高效液相色谱填料。

寻求高效凝胶过滤色谱填料,主要集中在两方面:

(1) 改造无机填料的表面性质: 可控孔隙的硅胶和玻璃珠是高效液相色谱填料的基

础,但是存在于这种填料表面的负电荷硅醇基团或是吸附阳离子或是排斥阴离子,使它们不能直接适用于溶液中呈两性电解质的蛋白质分子。因此许多工作都致力于改造硅胶的表面性质,主要方法是把糖基硅烷键合到硅胶的表面,以遮盖极性基团,从而得到一种中性的亲水性表面^[1,2]。

(2) 合成较硬的有机凝胶 例如甲基丙烯酸乙二醇双脂与乙二烯苯的共聚多孔微球^[3]。

表1列出了某些蛋白质样品在一种糖基硅烷键合相硅胶——TSK 2000SW 上的色谱行为。

2. 离子交换色谱

分离原理是基于溶质分子与填料表面上解离基团的相互作用。过去,对于蛋白质的分离,纤维素类离子交换树脂用的最多。但是,这类

表1 某些蛋白质在 TSK-2000SW 柱上的保留体积及 K_d 值*

蛋白质名称	分子量	保留体积 (ml)	K_d
甲状腺球蛋白	660000	8.8	0
卵清蛋白	43000	9.8	0.12
羧基水解酶	29000	11.8	0.35
肌球蛋白	17000	12.8	0.47
细胞色素C	12000	14.0	0.61
胰蛋白酶抑制因子(肺)	6500	15.0	0.73
胰岛素B链	3400	16.60	0.92
苯丙氨酸	117	17.3	1.

* 色谱条件:柱: Micropak TSK 2000SW, 60cm×7.5mm
移动相: 0.1M NH_4OAc 于2%的醋酸中, pH4.1 流速: 1.0ml/分

$$K_d = \frac{V_R - V_0}{V_i}$$

K_d :分配系数。 V_R :样品的保留体积。
 V_0 :空体积 V_i :内体积

填料同样是软胶,不能在加压下工作。

寻求适用于蛋白质分离的高效色谱填料,主要途径是在上述(1)(2)类凝胶色谱填料的基础上引入离子交换基团。例如以环氧树脂的单体在糖基化的硅烷上进行共聚,然后将具有离子交换功能的基团连结到这层环氧树脂上^[4]。也可以通过吸附一层低分子量的聚乙烯亚胺到填料表面,再交联相邻的氨基而得到具有阴离

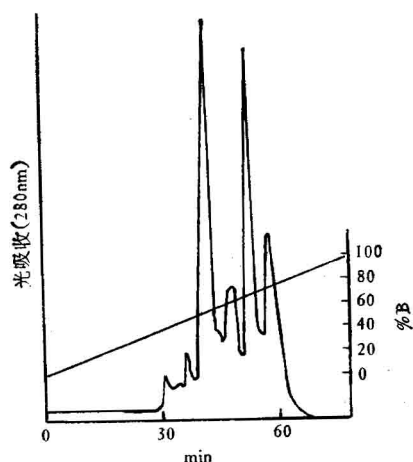


图1 卵清蛋白的高效离子交换层析谱

柱: Synchropak A×300, 250×4.1mm ID,
移动相: A. 0.02M Tris-Ac, pH8
B. 0.02M Tris-Ac+0.5M NaAc, pH8
流速: 0.5ml/分

子交换性质的填料,其性能类似 DEAE 纤维素^[5]。图1为这种类型的填料 Synchropak AX 300 对卵清蛋白的分离图谱^[6]。

3. 反相色谱

分离机理取决于一系列的相互作用——疏水效应,氢键形成及溶质分子中带电荷的支链与硅胶的作用等等。起主要作用的是疏水效应。组成肽和蛋白质的各种氨基酸具有各不相同的侧链,因此各种肽和蛋白质的疏水性也必定是各不相同的。

常用的反相填料如十八烷基、辛烷基、乙烷基等。键合相填料等都可直接用于肽类和较小的蛋白质。回收率和分辨率在孔隙较大的填料上可能会较好^[7]。一般说来,反相填料较适用于分离分子量不太大的肽类。

4. 其它类型的填料

对于某些疏水性较强的蛋白质, Rubinstein 曾报告用 Lichrosorb-diol 进行正相分离。例如对小牛血清加入正丙醇,离心除去沉淀,上清液中的蛋白质上 diol 柱,用80%降到50%的正丙醇梯度进行洗脱^[8]。在人工合成肽的工作中,对于被保护的合成肽的中间产物和终产物的制备,硅胶柱也是很有用的。

亲和色谱是选择性分离蛋白质的有效手段。近来也出现称为“高效液相亲和色谱”的方法。例如用抗人血清白蛋白的抗体做成亲和柱,使人血清白蛋白与牛血清白蛋白在五分钟内得到完全分离^[9]。

现将一些新近在市场上出现用于蛋白质分离的高速液相色谱填料列于表2。

二、蛋白质的分离与分析

细胞中的核糖核蛋白体是蛋白质生物合成的场所,它由两个亚单位组成,每个亚单位含20—30种蛋白质。过去用分部沉淀加离子交换层析曾对其全部蛋白质进行分离纯化,但一个流程经常要延续几个星期。最近我们用高效液相色谱法对30S亚单位的蛋白组分进行分离,方法是先用 TSK2000SW 柱将30S亚单位的蛋白组份分成6个小组,收集每组的流出液并在

表2 一些用于蛋白质的高效液相色谱填料

分离原理	名 称	孔隙度 (Å)	颗粒大小 (μ)	生产厂家
凝胶过滤	TSK2000SW	250	10 $\pm$ 2	Toyo Soda
	TSK3000SW	250	10 $\pm$ 2	Toyo Soda
	TSK4000SW	250	10 $\pm$ 2	Toyo Soda
	Glycophase CPG	250	5—10	Synchrom Inc
	Synchrompak GPC100	100	10	Synchrom Inc
	Synchrompak GPC500	500	10	Synchrom Inc
	Protein Column I-125			Waters
	Spheron			
离子交换	DEAE-Glycophase	250	5—10	Synchrom Inc
	Synchrompak AX	300	10	Synchrom Inc
	Mono Q (阴离子交换)		10	Pharmacia
	Mono S (阳离子交换)		10	Pharmacia
	TSK545DEAE		10 $\pm$ 2	ToYo Soda
	TSK535CM		10 $\pm$ 2	ToYo Soda
聚焦色谱	Mono P		10	Pharmacia

真空离心机上适当浓缩,并将每个组分别上到乙烷键合的反相柱上,用磷酸缓冲液与乙腈的混合液进行梯度洗脱,再收集各个谱峰,用两相电泳法对谱峰加以鉴定,发现得到一些纯化了的单个蛋白组份。另外,两次层析加上中间浓缩样品所需时间约为6小时,操作均在室温进

行^[10]。

只要柱体和分离条件选择得当,高效液相色谱法同样能充分保持蛋白质的活性。如Lyous等为了从鼠肝制备谷胱甘肽过氧化物酶而选用 TSK 3000SW 柱,以 10mM 的磷酸钠(含 0.1mM 的 EDTA)洗脱,可提高纯度 3500 倍,产率为 42%,所得产品产率和比活力都较其它制备方法高^[11]。

高效液相色谱除了作为分离手段外,由于它的高灵敏度(10^{-6} — 10^{-7} 克蛋白质即可)和快速分离的特点,还可作为分析手段,应用于临床检验等方面。图2显示一例地中海贫血病人的血红蛋白色谱图,其中 HbA₂ 的组份呈异常偏高^[12]。

三、生物活性肽的分离

近三十年来,具有重要生物活性的新肽不断被发现,旧有的肽类又不断被发现具有新的生物功能。这些肽类在神经活动,免疫反应及其它许多基本的生理活动中都起着重要作用。大约从 1973 年开始应用高效液相色谱进行肽类分离,现在这项技术已广为应用,成为许多研究肽类的实验室的主要分离分析手段。表3列举了用十八烷基反相柱分离某些生物活性肽的

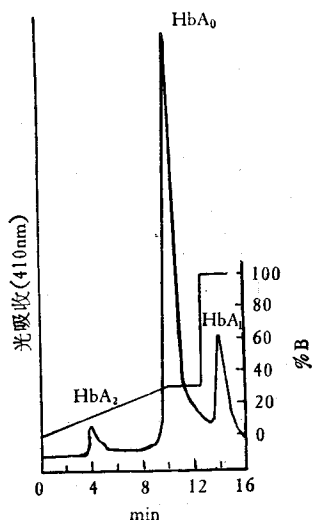


图2 血红蛋白分析

柱: Synchrompak A $\times$ 300; 250 $\times$ 4.1mm
 移动相: A 0.02M Tris-醋酸盐, pH8
 B 0.02M Tris-醋酸盐,
 0.1M 醋酸盐, pH8
 流速: 2.5ml/分

表 3 某些生物活性肽在 C18 柱上的分离条件

名 称	移 动 相	文献
Actinomycins (放线菌肽)	CH ₃ CN-H ₂ O (1:1)	13
ACTH (促肾皮质激素)	甲醇、乙腈及含 0.1M 硫酸钠的缓冲液	14
Angiotensin (血管紧张素)	20 到 33% 的乙腈于 0.01M 的 NH ₄ OAc 中 pH4.0	15
Bacitracin (杆菌肽)	(A), 4% 甲醇于磷酸缓冲液中 pH4.5, (B) 4% 甲醇于磷酸缓冲液中 pH4.5	16
Calcitonin (降血钙素)	(A) 磷酸缓冲液 pH2.1, (B) 乙腈	17
Endorphin (内啡肽)	(A) 0.01M 醋酸铵, pH4.5, (B) 甲醇, 含 1.5ml/L 醋酸	18
Iusulin (胰岛素)	同 上	18
LRF (促黄体激素释放因子)	20—33% 的乙腈于 0.01M 的 NH ₄ OAc 中, pH4.0	15
αMSH (促黑激素)	同 上	15
Neurophysin (后叶激素载体蛋白)	甲醇于醋酸缓冲液中, pH5.7	19
Oxytocin (催产素)	NH ₄ OAc, pH4.0/CH ₃ CN(82:18)	20
Secretin (肠促胰激素)	甲醇/水/醋酸(89/10/1)	21
Somatostatin (生长激素释放抑制因子)	(A) 磷酸缓冲液 pH2.1, (B) 乙腈	17
Vasopressin (抗利尿激素)	同 上	17

表 4 氨基酸的保留系数

氨基酸(N)	NaClO ₄ ⁽¹⁾	NaH ₂ PO ₄ ⁽²⁾
色氨酸(24)	17.1	15.1
苯丙氨酸(45)	13.4	12.6
亮氨酸(31)	11.0	9.6
异亮氨酸(10)	8.5	7.0
酪氨酸(37)	7.4	6.7
半胱氨酸(5)	7.1	4.6
缬氨酸(26)	5.9	4.6
甲硫氨酸(22)	5.4	4.0
氨基-(91)	4.6	0.9
脯氨酸(30)	4.4	3.1
一酰胺(18)	4.4	4.9
羧基(81)	2.2	1.6
丙氨酸(29)	1.1	1.0
谷氨酸(14)	0.7	1.1
甘氨酸(50)	-0.2	0.2
精氨酸(23)	-0.4	-2.0
组氨酸(19)	-0.7	-2.2
天冬氨酸(19)	-1.6	-0.5
苏氨酸(18)	-1.7	-0.6
赖氨酸(37)	-1.9	-3.0
谷氨酰胺(16)	-2.9	-2.0
丝氨酸(17)	-3.2	-2.9
天冬酰胺(18)	-4.2	-3.0

注: N 是用于推算此氨基酸保留系数所使用的肽的数目

(1) 移动相为 0.1M NaClO₄-CH₃ CN 体系(含 0.1% 的磷酸)

(2) 移动相为 0.1M NaH₂PO₄ (含 0.2% 磷酸)-乙腈 (含 0.1% 磷酸)

例子。

由于肽在反相柱上的保留主要取决于其组

份氨基酸的极性, 因此根据肽的氨基酸构成来预测这种肽在色谱柱上的保留是有一定可能的。Meek 等通过测定 100 种肽(残基数都少于 20 个) 在反相柱上的保留, 推算出每种氨基酸的保留系数, 凭借某种肽的构成氨基酸系数的总和即可预测该肽在色谱柱上的保留行为。现将他们得到的各种氨基酸及羧基、氨基的保留系数列于表 4^[22]。

表 4 所给的系数是在一定的实验条件下推算出来的, 实验条件改变则可能会有偏离。我们认为, 就移动相的组成而言, 以 pH 的影响最为显著, 因为环境中的 pH 值决定了肽的电离状态, 直接影响到它的疏水性。

肽分离中另一个值得指出的问题是离子对试剂的作用。例如加入 0.1% 的磷酸到乙腈/水的体系中会显著降低某些含自由氨基的肽的保留, 这不仅是由于改变了 pH 的作用, 因为如果加入磷酸缓冲液并保持恒定的 pH, K' 值仍然会有一定程度的降低^[23]。

四、蛋白质结构的测定

在蛋白质一级结构的测定中, 高效液相色谱现已成为水解肽片断的主要分离分析方法。图 3 示出在测定核糖核蛋白体蛋白 L₉ 一级结构时, 用高效液相色谱分离酶解肽片断的色谱图, 收集到的各个纯化了的肽片断可直接用于

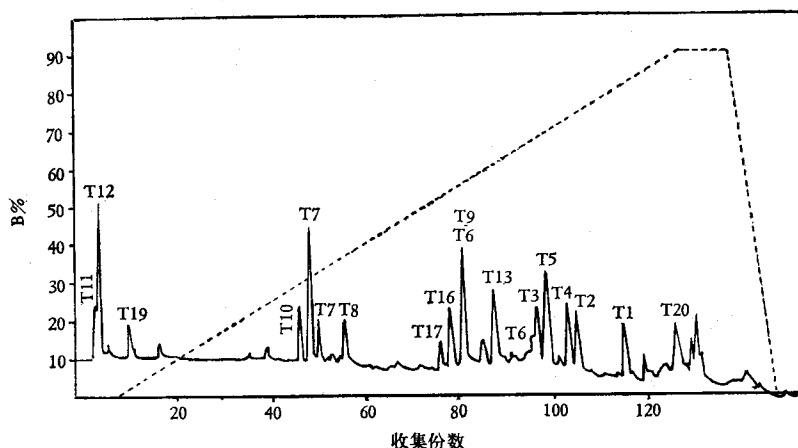


图3 核糖核蛋白体 L₀ 蛋白酶解片断的高效液相色谱分离

柱: RP-18,

移动相: A 甲酸铵, pH7.8 (0.8ml 25% 氨水+0.13ml 98%甲酸/升)

B 80% 甲醇+20%A 液

流速: 1.0ml/分, 收集每 0.5ml/为一份。

微量氨基酸顺序分析^[24]。

由于高效液相色谱有很高的灵敏度, 微量蛋白的裂解谱即可用来测定其氨基酸的组成和鉴定手段。Fullmer 等用 20 微克小肠钙结合蛋白作酶解谱, 经高效液相色谱分析决定了其全部氨基酸组成 (75 个残基)^[25]。25 种血红蛋白的 α 、 β 、 γ 和 δ 链的异常, 用高效液相色谱测定其水解肽片断而得到确定, 与其它方法相比,

具有快速、重复性好和微量的优点^[26]。

蛋白质一级结构测定的最后一步是对氨基端脱落的各个氨基酸的测定, 现在也已较普遍地使用了高效液相色谱法。图 4 显示了一个恒定移动相洗脱系统, 在 9 分钟内分离了全部 PTH 氨基酸^[27]。最近, 有人将高效液相色谱直接与顺序分析仪相联, 希望提高顺序分析仪的自动化水平。

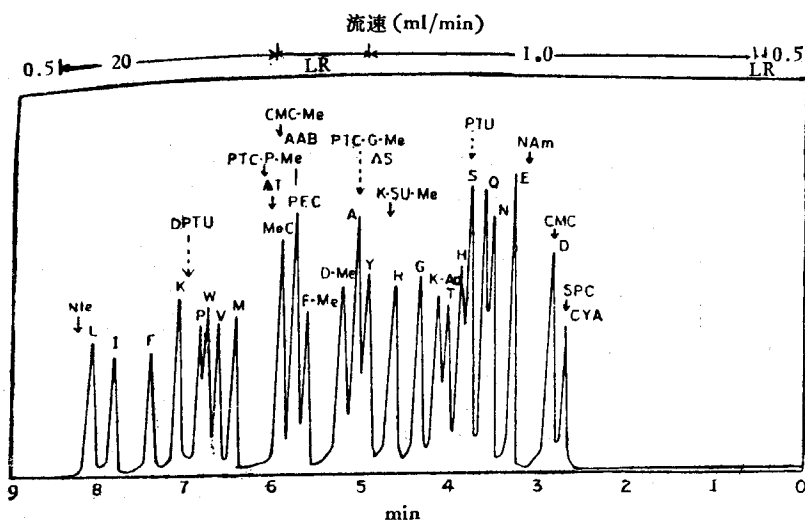


图4 PTH 氨基酸的分离

柱: Ultrasphere ODS, 250×4.6mm

移动相: 48% 乙腈于 0.065M 的醋酸中, 用氨水调 pH 至 4.54

五、适用于蛋白质分离的溶剂驱动泵

蛋白质的分子量大,在色谱分离过程中传质较慢,因此常要求比通常的高效液相色谱流速稍慢一些。图5显示核糖核蛋白体30S亚单位蛋白在不同流速下的分辨。0.2毫升/分时较1.0毫升/分对分辨率有明显地改善,但当流速进一步降低到0.1毫升/分则没有见到更显著的改善,所以根据不同的样品选择适当的流速是重要的。因此在较高流速下流量稳定,而且在较低流速下也能保持流量稳定的溶剂驱动泵是适用的。

另外,用于蛋白质分离的移动相经常包括含盐水溶液,它们对金属有较强的侵蚀作用。因此,应该选用与溶剂接触的表面都由耐腐蚀惰性材料构成的泵。泵最好能连续运转,以免盐类在某些部位沉淀和析出。

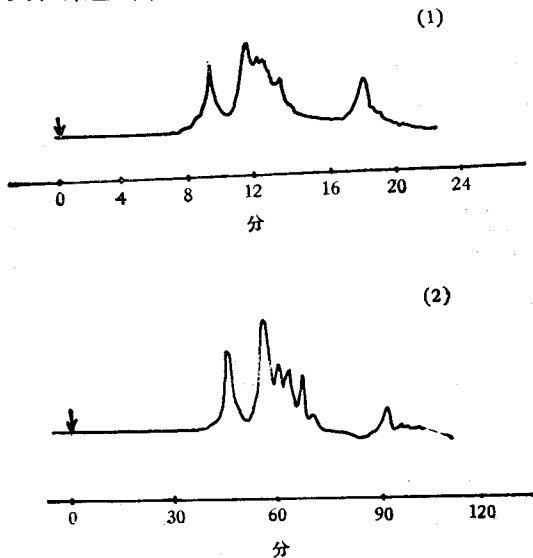


图5 流速对分辨的影响

柱: TSK 2000SW 50cm×7.5mm

移动相: 0.1N 醋酸铵于2%的醋酸中

样品: 250 微克 30S 亚单位蛋白

流速: (1) 1.0 毫升/分 (2) 0.2 毫升/分

六、小 结

高效液相色谱在蛋白质化学中的应用已由分离氨基酸和较小的肽进展到可分离较大分子量的蛋白质。与经典液相色谱相比,有分离速度快,检测灵敏度高和分辨力强的特点,它在生

化领域中的应用迅速扩展,其填料、仪器的进一步改进,是指日可待的。

本文承马立人、吴蔚教授审阅,谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] Chang, S. H. et al.: *J. Chromatogr.*, **120**: 321, 1976.
- [2] Komiya, Y., et al.: *C. A.*, **92**, 199495, 1980.
- [3] 邓澧儒等,《分析化学》10,82,1982。
- [4] Chang, S. H., et al.: *J. Chromatogr.*, **125**, 103, 1976.
- [5] Regnier, F. E. et al.: *Ger. Offen.* **300789**. *C. A.*, **94**: 123934f, 1981.
- [6] Regnier, F. E. et al.: *Anal. Biochem.*, **103**, 1, 1980.
- [7] Pearson, J. D. et al.: *J. Chromatogr.*, **207**, 325, 1981.
- [8] Rubinstein, M., *Anal. Biochem.*, **98**, 1, 1979.
- [9] Ohlson, S., et al.: *FEBS Lett.*, **93**, 5, 1978.
- [10] Yao, Z. J. et al.: in preparation.
- [11] Lyons, D. E. et al.: *J. Liquid Chromatogr.*, **4**, 2063, 1981.
- [12] Gooding, K. M., et al.: *J. Chromatogr.*, **164**, 506, 1979.
- [13] Ryeszotarski, W. J. and Manger, A. R.: *J. Chromatogr.*, **86**: 246, 1973.
- [14] Cazdag, M. and Szepesi, G., *J. Chromatogr.*, **218**: 603, 1981.
- [15] Burgus, R. and River, J.: in "Peptides 1976. Proceedings of the 14th European Symposium on Peptides", pp. 85, 1976.
- [16] Jsuzi, K., Robertson, J. H. and Bach, J. A.: *J. Chromatogr.* **99**, 597, 1974.
- [17] O'Hare, M. J. and Nice, E. C.: *J. Chromatogr.* **171**, 209, 1979.
- [18] Verholf, J. and Witter, A.: in "Biological/Biomedical Application of Liquid Chromatography" Vol. 4: 57, 1981.
- [19] Glasel, J. A.: *J. Chromatogr.*, **145**: 469, 1978.
- [20] Larson, B., et al.: *J. Chromatogr. Sci.*, **16**: 207, 1978.
- [21] Olieman, C., Voskamp, D. and Verhage, M. in "Biological/Biomedical Application of Liquid Chromatography" Vol. 4: 1, 1981.
- [22] Meek, J. L. and Rossetti, Z. L.: *J. Chromatogr.*, **211**, 15, 1981.
- [23] Hancock, W. S. Bishop, C. A. and Prestidge, L.: *J. Chromatogr.*, **153**: 391, 1978.
- [24] Kamp, R. M. et al.: *Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem.*, **364**, 141, 1983.
- [25] Fullmert, C. and Wasserman, R. H.: *J. Biol. Chem.*, **254**: 7208, 1979.
- [26] Wilson, J. B., et al.: *J. Chromatogr.*, **179**, 271, 1979.
- [27] Tarr, G. E., *Anal. Biochem.*, **111**: 27, 1981.

[本文于1982年10月29日收到]