

层析聚焦

——一种新的高分辨率蛋白质纯化技术

雷克健 编译

(中国科学院生物物理研究所)

等电聚焦技术的发展为生物化学家提供了一种高分辨率的分离、分析方法。但是由于在柱等电聚焦后样品从柱中流出时已聚焦的分离带有重新混合的趋势，大大降低了其有效分辨率，以及平板制备等电聚焦纯化样品的有限容量，使等电聚焦技术作为一种高分辨率纯化技术受到限制。为此 Sluyterman 及其同事发展了层析聚焦这一技术，它结合了柱层析的大容量和等电聚焦样品按 PI (等电点) 分离，洗出峰被聚焦效应浓缩，具有高分辨率等方面的优点。整个操作不需特殊实验装置，从而成为一种具有很大潜力的新型蛋白质纯化技术。

一、原 理

1. pH 梯度的形成 在离子交换层析中，pH 梯度通常利用一个梯度混合器产生，对于下降的 pH 梯度，混合贮器中盛高 pH 的起始缓冲液，另一个贮器中盛低 pH “限制”缓冲液。当

溶液离开混合贮器进到柱上时，越来越多的低 pH “限制”缓冲液进入混合贮器，流到柱上的 pH 逐渐降低 (图 1a)。

层析聚焦则是利用离子交换剂自身电荷的缓冲作用，当洗脱缓冲液滴到离子交换剂上，pH 梯度自动形成。见图 1b。柱中装填商品名称为 PBE 94 的阴离子交换剂，它首先被平衡到 pH9，淋洗液的 pH 选定为 pH6，淋洗液中含商品名称为多缓冲剂 (poly buffer) 的物质。当它流到柱上时多缓冲剂中最酸的组份与碱性阴离子交换剂结合。洗脱的开始阶段离开柱的 pH 与起始缓冲液相接近 (图 2a)，淋洗过程中 (图 2b, c) 在柱上每一点的 pH 随着越来越多的多缓冲剂加入而逐渐下降，以至于最后流出液的 pH 等于淋洗液的 pH。由此可见在聚焦层析中，柱的 pH 梯度是在洗脱过程中自动形成并随着洗脱进程梯度逐渐迁移以至最后消失，这是和在恒 pH 梯度下的聚焦电泳完全不同的一点。

2. 蛋白质的行为 蛋白质所带电荷取决于它们的 PI 和介质的 pH，当介质的 pH 低于它的等电点时，蛋白质携带正电荷，它不与阴离子交换剂结合，而随洗脱剂向前移动，在它移动过程中随着其距柱顶的距离增大，其周围环境的 pH 增高 (图 2)，当它移动到某一点其环境的 pH 高于 PI，蛋白质从带正电荷变为带负电，并与离子交换剂结合。蛋白质分子被结合到柱上，直到它周围环境的 pH 再一次低于它的 PI 时它又

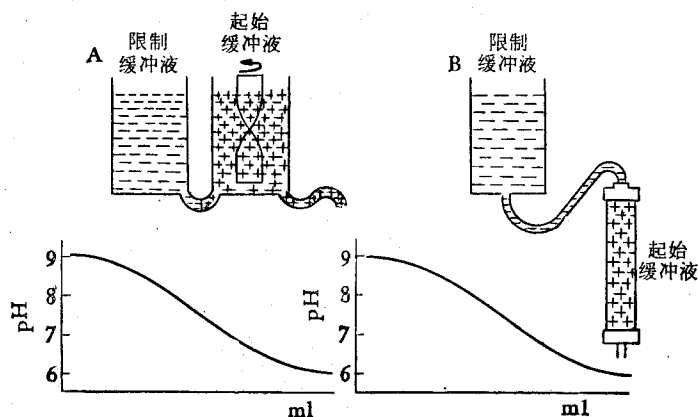


图 1 梯度形成图解

a. 离子交换层析 b. 层析聚焦

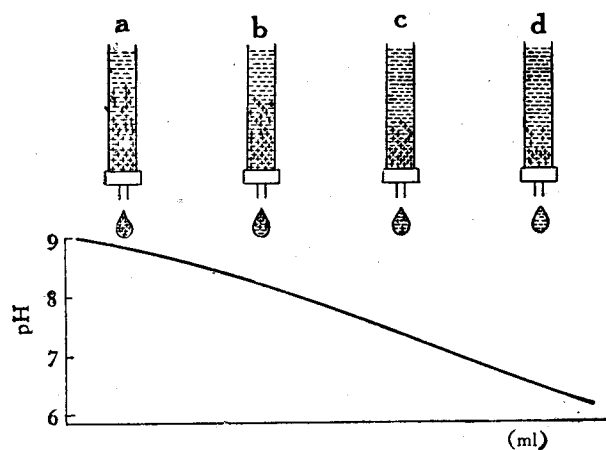


图2 PBE 94柱用多缓冲剂96淋洗时 pH 梯度 (pH9—6) 的形成
a、b、c、d 代表不同的洗脱阶段

带正电荷。从交换剂解吸并随洗脱液向柱底迁移, 这个过程反复进行, 直到各种蛋白质在它们的各个不同等电点时从柱上洗下。从而达到了分离的目的。

蛋白质具有不同的等电点, 在它们被离子交换剂结合以前将移动不同的距离, 并按等电点顺序洗出。这个过程被说明在图3中。

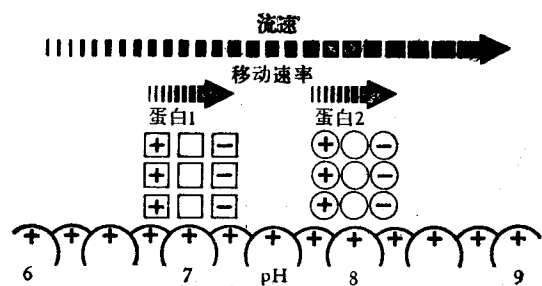


图3 蛋白质分子在层析聚焦时的行为

pH 沿着柱长增加, 在梯度中蛋白质分子在高于它们等电点的 pH 时带负电荷被凝胶结合, 在低于它们等电点 pH 时, 它从凝胶上解吸下来, 分子在等电点的 pH 时, 既不结合, 又不解吸。图中假定蛋白质 1 等电点为 7, 蛋白质 2 的等电点为 8。

3. 聚焦效应 pH 梯度的形成预示了过程的聚焦效应。如果一个蛋白质加到已形成 pH 梯度的柱上, 它将随洗脱液尽快地迁移到它等电点的 pH 处, 从这一点它开始以较慢的速度吸附, 解吸附直到在等电点 pH 被洗出。如果在这个蛋白样品被洗出之前, 再加入第二份同一

蛋白样品。它将以洗脱液移动的同样速度向前迁移, 而不被交换剂吸附, 一直迁移到慢迁移的第一份样品处 (聚焦), 然后二份样品以同样慢速迁移直到共同从柱底洗出。这个过程见图 4。所以只要样品在其洗出前任何时间加到柱上都能完成这个聚焦过程。

二、多缓冲剂和多缓冲离子交换剂

一种缓冲液用另一种不同 pH 的缓冲液滴定并不能产生满意的线性 pH 梯度, 这是因为系统的缓冲容量是随 pH 而改变的 (不同 pH 有不同的缓冲容量), 为了获得线性 pH 梯度需要二种缓冲剂在它们工作的

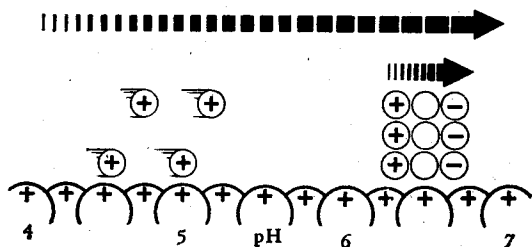


图4 层析聚焦时的聚焦效应

在区带后面的蛋白质分子不被凝胶结合, 它移动的速率比走在它前面的蛋白质分子更快, 如果在第一份样品上柱后加入第二份同种样品, 它将赶上第一份样品, 并与第一份样品同时洗出, 如果第二份样品的等电点比第一份样品更高, 它将超过第一个区带而先被洗出。

pH 范围有均衡的缓冲容量, 为此瑞典 Pharmacia 公司专门设计并生产了多缓冲交换剂 PBE 118 和 PBE 94, 以及多缓冲剂 poly buffer 96 和 poly buffer 74, 它们在非常宽的 pH 范围内都有极均衡的缓冲容量。使层析聚焦技术成为可能。

1. 多缓冲剂 多缓冲剂是一种二性电解质性缓冲剂, 性质与二性载体电解质相似, 是分子量大小不同多种组份的多羧基多氨基化合物。商售的多缓冲剂有二种型号即 poly buffer 94 和 poly buffer 74, 它们分别适用于 pH9—6 和 pH 7—4 范围的层析聚焦。与这二种多缓冲剂相匹配的多缓冲交换剂是 PBE 94。pH9 以上的层析聚焦则应选用 pH 8—10.5 的二性载

体电解质 (pharmalyte) 和配以相应的多缓冲交换剂 PBE 118。在所使用的pH范围,多缓冲剂 96 和 74 都有很均衡的缓冲容量(图 5)。多缓

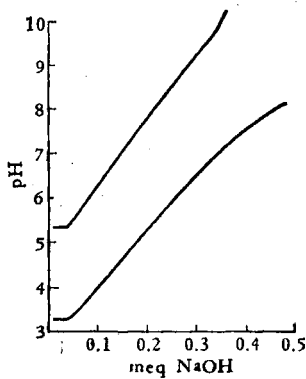


图 5 2ml 多缓冲剂用 0.1M NaOH 滴定曲线

冲剂在 280nm 的吸收极低,但是在 250nm 有较高吸收,所以洗脱监测应该选用 280nm 波长。多缓冲剂通常以液体形式提供,用前稀释,并应于 3—8℃ 暗处贮存。

2. 多缓冲交换剂 PBE 118 和 94 是以交联 Sepharose 6B 为载体并在糖上通过醚键偶合上配基制成。它们在 pH 3—12 的范围对水、盐、有机溶剂都是稳定的。它们也能在 8M 脲素中使用。由于交联它们有较好的物理稳定性和流速,并防止了由于不同pH值静电相互作用所引起的床体积的变化,它的盐型在 pH 7 可经受 110°—120℃ 的高压灭菌处理。

偶合剂 Sepharose 6B 上的配基经特别选择,以确保在很宽的 pH 范围内有均衡的缓冲容量。二类缓冲交换剂的缓冲容量数据列在表 1。它们的滴定曲线见图 6。它们的商品是以

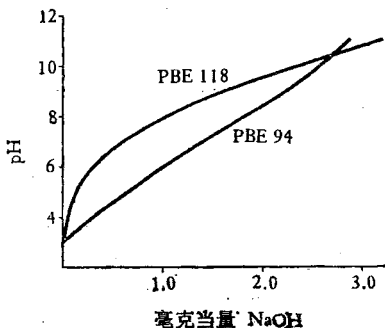


图 6 10ml PBE118 和 PBE94 在 1M KCl 中的滴定曲线

悬浮液形式提供,并含 24% 乙醇。

表 1 多缓冲交换剂 PBE94 和 PBE118 的缓冲容量资料

多缓冲交换剂	容量 meq/100ml 不同 pH 间隔凝胶							
	3—4	4—5	5—6	6—7	7—8	8—9	9—10	10—11
PBE94	2.2	3.3	3.1	3.0	3.5	3.9	3.1	2.1
PBE118	0.6	0.3	0.9	1.7	2.8	3.7	4.6	4.9

三、实验过程

层析聚焦像等电聚焦一样,适合于分离任何水溶性二性分子,它们包括蛋白质,多肽和核酸。整个实验过程的方框图如下(图 7)。

1. 选择多缓冲交换剂和相应缓冲液 每次使用多缓冲交换剂和相应多缓冲剂的 pH 为 3 个 pH 单位。实验前必须知道欲分离组份的 PI 范围。选择的实验 pH 范围应包含欲分样品的 PI, 并使其有 $\frac{2}{3}-\frac{1}{2}$ 柱长的吸附解吸时间,以提高柱的分辨率,不同 pH 范围层析聚焦缓冲剂和凝胶的选择以及实验条件见表 2。

2. 凝胶量的选择 层析聚焦所需要多缓冲

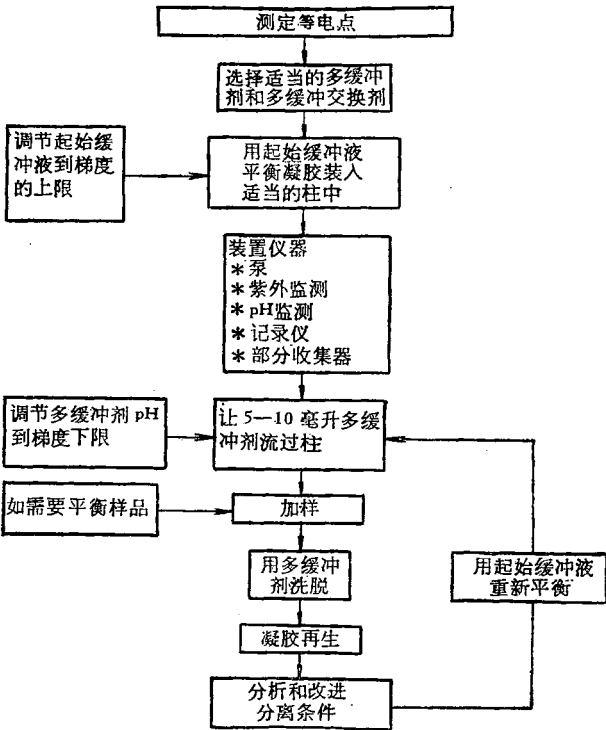


图 7 实验过程的方框图

表 2 不同 pH 范围层析聚焦所用凝胶和缓冲剂

胶的 pH 范围	起始缓冲液	洗脱液	稀释倍数	所用溶液近似体积(以柱体积为 1 计算)		
				梯度开始前	梯度体积	总体积
10.5—9 ¹ PBE 118	pH11 0.025M triethylamine-HCl	pH8.0 Pharmalyte	1:45	1.5	11.5	13.0
10.5—8 "		pH8—10.5-HCl				
10.5—7 "	"	pH7.0 Pharmalyte pH8—10.5-HCl	1:45	2.0	11.5	13.5
9—8 ² PBE 94	pH9.4 0.025M ethanolamine-HCl	pH8.0 Pharmalyte	1:45	1.5	10.5	12.0
9—7 "	"	pH8—10.5-HCl				
9—6 "	pH9.4 0.025M ethanolamine- CH ₃ COOH	pH7.0 Polybuffer 96-HCl	1:10	2.0	12.0	14.0
		pH6.0 Polybuffer 96- CH ₃ COOH	1:10	1.5	10.5	12.0
8—7 PBE 94	pH8.3 0.025M tris-HCl	pH7.0 Polybuffer 96-HCl	1:13	1.5	9.0	10.5
8—6 "	pH 8.3 0.025M tris-CH ₃ COOH	pH 6.0 Polybuffer 96- CH ₃ COOH	1:13	3.0	9.0	12.0
8—5 ³ "	"	pH 5.0 Polybuffer 96 (30%)+Polybuffer 74 (70%)— CH ₃ COOH	1:10	2.0	8.5	10.5
7—6 PBE 94	pH7.4 0.025M imidazole- CH ₃ COOH	pH6.0 Polybuffer 96- CH ₃ COOH	1:13	3.0	7.0	10.0
7—5 "	pH7.4 0.025M imidazole- HCl	pH5.0 Polybuffer 74-HCl	1:8	2.5	11.5	14.0
7—4 "	"	pH4.0 Polybuffer 74-HCl	1:8	2.5	11.5	14.0
6—5 PBE 94	pH6.2 0.025M histidine-HCl	pH5.0 Polybuffer 74-HCl	1:10	2.0	8.0	10.0
6—4 "	"	pH4.0 Polybuffer 74-HCl	1:8	2.0	7.0	9.0
5—4 PBE 94	pH5.5 0.025M piperazine-HCl	pH4.0 Polybuffer 74-HCl	1:10	3.0	9.0	12.0

所有缓冲液用前除气

1 因为 9 在 Pharmalyte pH8—10.5 的 pH 之上,所以不推荐使用

2 PBE 118和 Pharmalyte pH8—10.5 也覆盖了这个区域

3 混合使用效果最好,如单独使用 Polybuffer 14 比 Polybuffer 96 更好。

交换剂量取决于样品量,多数情况 20—30ml 床体积已足够分离 1—200mg 蛋白/pH 单位。然而准确的量还必须根据实验分辨率的要求来具体确定。

3. 凝胶的准备 装柱前凝胶必须用起始缓冲液平衡,每种 pH 相应的起始缓冲液见表 2。交换剂的反离子是 Cl⁻,除 Cl⁻ 以外高价阴离子也可作反离子,但它们的解离 PK_a 必须比梯度

选择的最低点低二个 pH 单位。碳酸氢离子会引起 pH 梯度的变化,所以所有缓冲液用前必须除气。大气中的 CO₂ 在 pH 5.5—6.5 实验条件下会使梯度变得平坦,用醋酸根作反离子可防止这一情况。但是对 poly buffer 74 不能使用醋酸根作反离子。

由于层析聚焦有很高的分辨率,所以装柱的好坏及床表面情况将严重影响柱的分辨率。

如果操作得当,可以达到 0.02 pH 带宽的分离结果。通常的装柱过程是: 1) 取出需要量的凝胶按 1:1 悬浮于起始缓冲液中,除气泡。2) 将柱调垂直并除尽柱底部尼龙网下的汽包,关闭柱下端出口,3) 在柱中放 2—3ml 起始缓冲液,在搅拌情况下将凝胶倒入柱中。4) 打开柱底部开关,待凝胶慢慢沉降后仔细将柱顶部接头装好,排除所有气泡。5) 用 10—15 个床体积起始缓冲液平衡至柱流出液的 pH 和电导系数与起始缓冲液相同。柱填充的好坏可用牛细胞色素 c 检查,因为它有颜色并且 $PI = 10.5$ 不被柱吸附,很快穿过柱流出。

4. 样品准备 上样量取决于每个区带中蛋白质的量,通常每 10ml 床体积可以加 100mg 样品,由于聚焦效应,样品的体积是不重要的,只要所期望分离的物质从柱上洗下之前加入样品,对分离结果无影响。但样品体积最好不要超过 $\frac{1}{2}$ 床体积,样品应不含过量盐 ($I < 0.05$)。

上样前样品应对洗脱液或起始缓冲液透析平衡,如果样品体积小于 10ml 最好先通过一个 Sephadex G25 柱,用起始或洗脱缓冲液洗脱,以达到最好的平衡效果。如果缓冲液浓度很低,样品 pH 并不重要。

5. 上样和洗脱 最好的上样方法是通过一个加样器,为了确保样品均匀平整地加到床面上,可在床顶部小心铺一层 1—2cm 厚的 Sephadex G25。加样前应先加 5ml 洗脱液以避免样品处于极端(过碱)的 pH,上样后,首先用洗脱缓冲液淋洗,pH 梯度自动形成,梯度的 pH 上限由起始缓冲液确定,其下限由淋洗缓冲液的 pH 决定。推荐使用的缓冲液组成及所用洗脱液体积见表 2, pH 梯度的斜率(或梯度体积)是由用以洗脱的多缓冲剂的浓度决定的。若浓度高,则所需的梯度体积小, pH 梯度斜率陡,洗脱峰窄,但分辨率下降,反之 pH 梯度斜率小洗脱峰宽,但分辨率高。用通常推荐的多缓冲剂浓度,总洗脱体积需 12—13 个床体积。洗脱时的流速一般选择 $30-40\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

6. 从分离蛋白质中去除多缓冲剂 有几种

方法可以很方便地从分离蛋白质中除去多缓冲剂: 1) 加入固体硫酸胺到 80—100% 饱和度,因为蛋白质处在其等电点的 pH,所以很容易沉淀,沉淀可离心收集,再用饱和硫酸胺洗两次,然后透析除去硫酸胺。2) 凝胶过滤: 使用 Sephadex G25 可以将分子量大于 25,000 的蛋白质和多缓冲剂分开,但如蛋白质分子量小于 25000 则不能完全分离。另外亲和层析及疏水层析也可用于选择性的结合蛋白而达到除去多缓冲剂的目的。

四、应用实例

图 8 给出几种混合蛋白质经层析聚焦分离的结果,显示了高的分辨率和窄的带宽。图 9

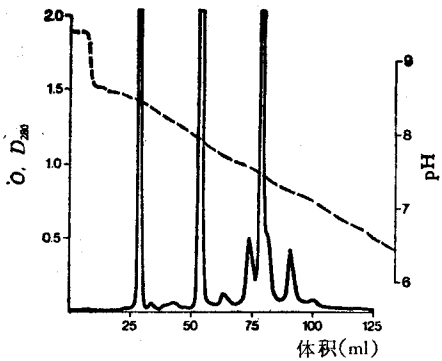


图 8 蛋白质的一个模式混合物

混合标准蛋白在 pH 9—7 范围的分离 柱:SR10/50, 床高 18cm, 样品 5ml 洗脱缓冲液含有沫香鲸肌红蛋白 (2mg) 马血红蛋白 (2mg) 和猴血红蛋白 (2mg)。洗脱条件 起始缓冲液 0.025M 乙醇胺, pH9.5, 洗脱缓冲液 0.0075mM/pH 单位/ml 多缓冲剂 96,pH7, 流速 15cm/小时

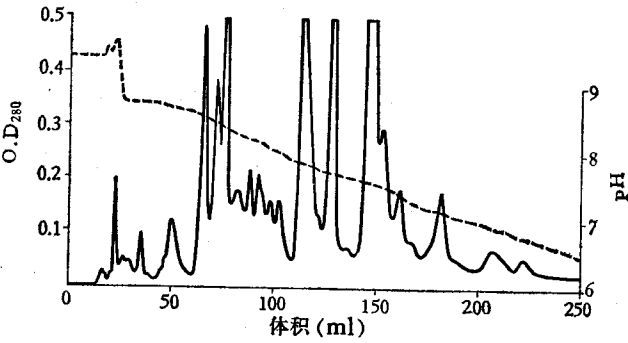


图 9 从麋鹿肌肉提取水溶性蛋白的分离

柱: C10/40, 床高 45cm, 样品: 5ml 麋鹿肌肉匀浆上清液, 洗脱条件: 起始缓冲液 0.025M 乙醇胺-盐酸, pH9.4 洗脱缓冲液, 0.0075mM/pH 单位/ml 多缓冲剂 96pH6, 流速 20cm/小时

为复杂成份的聚焦层析,显示了柱的高容量和分辨率。

五、方法的局限

和等电聚焦相似,待分离的样品必须尽可

能少盐。等电点附近样品的溶解度下降是这一技术使用的主要困难。

文中图、表均引自 *Chromatofocusing* (Pharmacia Fine Chemicals 出版)

生物大分子晶体结构中分子间接触点的计算

毕汝昌 林政炯 高义贵

(中国科学院生物物理研究所)

近年来在用X射线衍射法测生物大分子晶体结构方面的一个进展是用分子置换法解与已知结构相类似的结构^[1]。应用这个方法,首先要确定分子在晶胞中的取向,即求旋转参数。然后确定分子在晶胞中的位置,即求平移参数。经验表明,这第二步往往困难较大,所以相继发展了多种方法,如平移函数(translation function)^[2],偏离函数(disagreement function)^[3]和堆积函数(packing function)^[4]等。

堆积函数根据的简单原理是组成晶体的分子不应当相互穿插。由此可推测出大分子在晶体中的可能堆积方式。此函数成功地用于解蚯蚓血红蛋白(hemerythin)的结构。和这方法类似有人通过寻求与晶胞中分子间原子的最少接触点数相适应的分子排列,来确定分子的可能位置。与偏离函数法相配合,成功地用这个方法确定了火鸡蛋白溶菌酶分子在其晶体中位置^[5]。实践中,常同时使用这几种方法以相互补充,使结果更加可靠。

在尝试用分子置换法测定去B链羧端五肽胰岛素结构的过程中^[6],我们独立地建立了一个计算分子间接触点数的程序,并用它来估计去B链羧端五肽胰岛素分子在晶胞中的可能位置。这个程序不仅可用来求分子置换法所需要的平移参数,还可用于了解已知晶体结构中分子之间原子相互作用的性质。我们用这个程序对三方二锌猪胰岛素晶体结构进行了计算,获

得了一些二聚体之间相互作用的有用的信息。

程序设计要点

程序的基本运算是求晶体中指定分子与其周围相邻分子的原子间距离 S 。若已知指定分子原子的坐标为 X ,则

$$S = |[T'] [T] X_i - [T'] X_j|$$

式中 $[T]$ 为晶体学中对称性变换矩阵,可以进一步分解为

$$[T] X_i = [R] X_i + d.$$

d 为平移向量, $[R]$ 为非平移部分的对称变换矩阵, $[T]$ 矩阵应考虑到所有可能的相邻分子。

$[T']$ 为晶体学坐标系变换到笛卡儿坐标系(以埃为单位)的坐标变换矩阵。

若 t 为表征分子位置的平移向量,则用 $X_i + t$ 代替 X_i ,计算接触点距离并统计短距离接触点数,就可以找出与最少接触点对应的 t 来。

上述计算比较简单,但计算量较大。因为生物大分子是由成千上万个原子组成的。还因为晶胞中某个指定分子与晶胞中其它分子以及周围26个晶胞中所有分子都有可能发生近距离的接触。因此原则上要计算指定分子与 $27 \times N - 1$ 个分子之间的原子距离(N 为晶胞中分子个数)。为了简化计算,我们在程序或计算方案中采取了以下几个措施: