

# 高效亲和色谱

姚志建

(军事医学科学院基础医学研究所,北京)

1978年, Ohlson 等首先提出了高效亲和色谱 (High Performance Affinity Chromatography, 简称 HPAC 或 PHLAC) 的概念<sup>[1]</sup>。他们将 6-氨基己基腺苷酸或抗人血清白蛋白的抗体做为亲和配体, 连接到一种高效液相色谱填料——二醇基键合相硅胶上, 分离乳酸脱氢酶与乙醇脱氢酶、牛血清白蛋白与人血清白蛋白, 得到了较好的结果。例如可以在四分钟之内将结构很相似的人血清白蛋白与牛血清白蛋白完全分开。此后高效亲和色谱逐渐发展成一种为生物化学家密切注意的高效液相色谱方法。

## 一、惰性载体和配体

### 1. 载体:

与其它分离蛋白质的高效液相色谱填料一样, 载体一定要比较坚硬耐压, 尽量避免对蛋白质的非特异性吸附, 而且表面是亲水性的。目前使用的载体主要有两类。最多用的一类是用于高效凝胶过滤色谱的某些键合硅胶, 如二醇基键合硅胶<sup>[1]</sup>。另一类是羟烷基甲基丙烯酸的共聚物<sup>[2]</sup>。在比较硅胶上不同的孔隙度对分离效率的影响 (图 1) 时, 发现为提高柱效应, 或是选用完全排阻溶质分子的小孔径, 或是选用可容许溶质分子自由穿入的大孔径, 而不要选用与溶质分子大小相似的孔径<sup>[3]</sup>。至于载体的粒度, 则以等于或小于  $10\mu\text{m}$  为好, 以减小峰扩展。

### 2. 配体:

配体可分为两类。一类是所谓“通用性”的, 它们对于性质相仿的物质的亲和性大体相同; 另一类可称为“特异性”的, 主要用来分离某一种溶质。其实例见表 1。

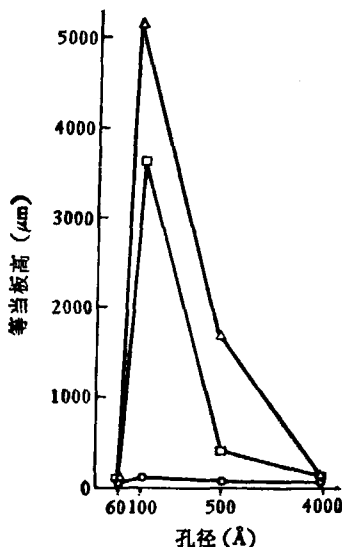


图 1 孔径的对数与柱效的关系

○——○ 尿嘧啶  
□——□ 牛血清白蛋白  
△——△ 伴刀豆球蛋白 A

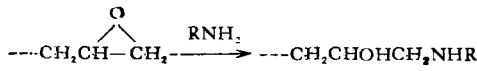
表 1 高效亲和色谱中使用的一些配体

分类	配体	应用范围	文献
通用性	三嗪类染料	某些脱氢酶、激酶等	[4]
	硼酸	核苷、核苷酸、转移 RNA 等含二醇基的化合物	[5]
	伴刀豆球蛋白 A	过氧化物酶和葡萄糖氧化酶	[6]
	植物血凝素	糖蛋白	[7]
特异性	抗体	蛋白质、多肽	[8]
	胰蛋白酶抑制剂	胰蛋白酶	[9]

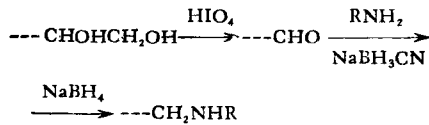
## 二、载体与配体的联结

配体在载体上的固定, 一般是通过配体上的游离胺基与载体上的羟基相结合而实现的<sup>[40]</sup>。常用的有以下几种方法:

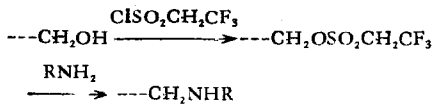
### 1. 经环氧硅烷作用后直接反应<sup>[5]</sup>



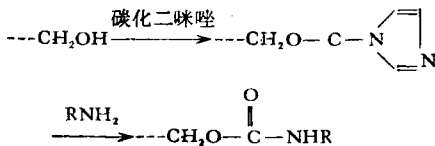
## 2. Schiff 碱法<sup>[1]</sup>



## 3. Tresyl Chloride 法<sup>[11]</sup>



## 4. 碳化二咪唑化<sup>[12]</sup>



方法 1 很简便,但固定的效率低,仅约 20%。方法 3 通过 Tresyl Chloride 活化二醇基硅胶,效率可达 50—70%。方法 2 要通过几步反应,但固化效率最高;在以 Con A 做配体,其浓度达到每克硅胶 80 毫克时,仍可有 70% 的效率<sup>[6]</sup>。

## 三、应用

高效亲和色谱既可作为分析的方法,也可作为制备的手段。

图 2 是一个由兔肌粗制品中提纯乳酸脱氢酶的例子。使用的是以三嗪类染料——

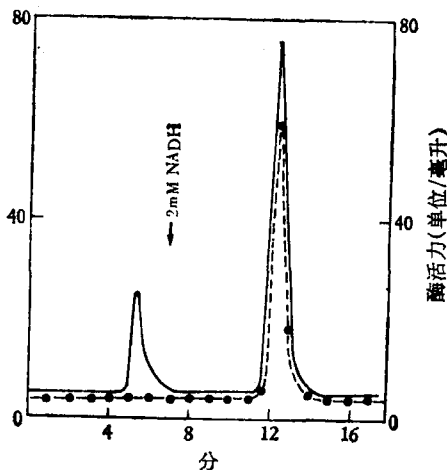


图 2 用高效亲和色谱制备乳酸脱氢酶  
纵坐标(左方)表示检测反应(—)

Procion Blue MX-R 为配体的硅胶柱。先用不含还原型辅酶 I 的平衡液洗下杂蛋白,然后换用含 2 毫克分子还原型辅酶 I 的溶液洗下乳酸脱氢酶。这一操作使酶的比活性提高 3—5.1 倍,由 79 单位/毫克蛋白提高到 400 单位/毫克蛋白,且回收率达到上样量的 80%,全过程仅十五分钟,操作可在室温下进行<sup>[4]</sup>。用 HPAC 做为制备手段,除了快速外,其填料还不易被细菌分解。对于不稳定的蛋白质,快速的分离大大减少粗制品中蛋白分解酶的作用。

高效亲和色谱用于分析工作是基于亲和层析的高选择性。样品不需要作任何预处理,简化了操作,检测时一般用紫外检测器即可。Crowley 等曾报道将 3 $\mu$ l 血清通过一个以金黄色葡萄球菌 A 蛋白为配体的柱子,可直接测定血清中免疫球蛋白 G 的量<sup>[13]</sup>,每次测定不超过 4 分钟。一根接有 1.1 毫克配体的柱子可使用 200 多次。其测定结果与环形免疫扩散法 (Radio Immunodiffusion, RID), 颇为接近 (表 2)。

表 2 HPAC 法与 RID 法测定 IgG 量结果比较

血清样品	IgG (mg/ml)	
	RID	HPAC
1	28.15	28.2
2	22.55	25.7
3	16.90	17.0
4	11.25	10.8
5	5.65	6.1
6	1.69	1.4

高效亲和色谱也可以与其它类型的高效液相色谱技术配合使用,以加大分析的深度。例如,先用以植物血凝素为配体的硅胶柱分离糖蛋白,然后再将洗脱下的糖蛋白峰用三通阀直接切换注入高效凝胶色谱柱 (TSK-G3000SW),又可以使这些糖蛋白进一步分成六个以上的谱峰<sup>[7]</sup>。

由于亲和色谱有高度选择性的特点,也即被吸附与不被吸附的两种溶质的容量因子 ( $k'$ ) 相差可以很大。在这样的条件下,理论板数的多寡就不十分重要了。因此可以应用极短的柱

子,在极短的时间内完成分析。图3是用大豆胰蛋白酶抑制剂为配体分离胰蛋白酶的活性成份,分离时间为18秒钟<sup>[9]</sup>。使用这种微型柱除了可提高分离速度外,还兼有便宜、非特异性吸附低、容易与其它色谱柱偶联、使稀溶液浓缩和操作压力低的特点。

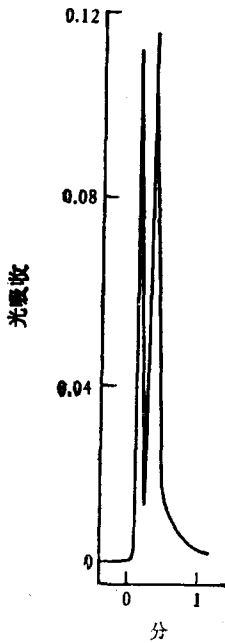


图3 微型柱分离胰蛋白酶

柱: 以大豆胰蛋白酶抑制剂为配体的亲和柱,  
6.35mm×4.1mm  
弱移动相: 0.1M 磷酸钾缓冲液, pH7.0;  
强移动相: 0.1M 磷酸缓冲液, pH2.5。  
样品: 7.5μg 胰蛋白酶粗制品  
流速: 1ml/分

从 HPAC 问世到现在的五、六年里,对它的研究已逐步深入和趋于实用,但也存在着一些问题。问题之一就是层析过程中,溶质被吸附和解吸的过程缓慢。例如糖的衍生物在以 Con A 为配体的柱上,其速度常数比在溶液状态中低一个数量级<sup>[14]</sup>。缓慢的平衡过程造成峰扩展增大,分离效率降低<sup>[15]</sup>。问题之二在于当

HPAC 用于制备时,目前柱容量还不够高,这有可能是因为硅胶柱上的孔隙过小造成的<sup>[14]</sup>。另外,由于配体与溶质分子之间存在多点的相互作用,这就有可能造成峰分裂 (split peaks) 和不可逆吸附现象<sup>[8,10]</sup>。

由于高效亲和色谱具有高选择性和高速度的特点,目前已取得了不少成功的例子,从而吸引了更多的生物化学家和色谱学家对此进行更深入的研究。可以预期,这一新技术将在生化实验室中发挥更大的作用。

### 参 考 文 献

- [1] Ohlson, S. et al.: *FEBS Lett.*, **93**, 5, 1978.
- [2] Jurkova, J.: in *Affinity Chromatogr. and Related Tech.*, (eds. Chribnan J. C. J. et al.), p. 513—528, Elsevier, Scientific Publishing Co., Amsterdam, 1982.
- [3] Walter, R. R.: *J. Chromatogr.*, **249**, 19, 1982.
- [4] Small, D. A. P., et al.: *J. Chromatogr.*, **266**, 151, 1983.
- [5] Glad, O. M. and Ohlson, S.: *J. Chromatogr.*, **200**, 254, 1980.
- [6] Borchert, A. et al.: *J. Chromatogr.*, **244**, 49, 1982.
- [7] Borreback, C. A. K. et al.: *J. Chromatogr.*, **284**, 187, 1984.
- [8] Sportsman, J. R. et al.: *Anal. Chem.*, **55**, 771, 1983.
- [9] Walters, R. R., *Anal. Chem.*: **55**, 1395, 1983.
- [10] Walters, R. R.: *Trends in Anal. Chem.*, **2**, 282, 1983.
- [11] Nilsson, K. and Mosbach, K.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **102**, 449, 1981.
- [12] Bethell, G. S. et al.: *J. Chromatogr.*, **219**, 361, 1981.
- [13] Growley, S. C., and Walter, R. R.: *J. Chromatogr.*, **266**, 157, 1983.
- [14] Muller, A. J. and Carr P. W.: *J. Chromatogr.*, **284**, 33, 1984.
- [15] Kasche, V. et al.: *J. Chromatogr.*, **216**, 169, 1981.

[本文于 1984 年 8 月 25 日收到]

(上接第 59 页)

疗技术的发展,如镰状细胞性贫血及 β 地中海贫血病等遗传性贫血病的基因治疗方法,将会在已有方法的基础上,得到改善和发展。但目前还不清楚,移入的

基因功能是否健全,是否能接受正常的调节,是否能长期稳定地保留下去。基因疗法仍存在许多问题,但目前至少突破口已打开。

[*Nature*, Vol. **310**, No. 5977, 1984 李 晔编译]