

活性蛋白质的高效疏水作用色谱法分离和纯化

茅 力 练 鸿 振

(南京医学院预防医学系) (南京大学现代分析中心)

提 要

高效疏水作用色谱是最近几年才发展起来的分离蛋白质的新方法,具有分离效率高、容量大、不损伤蛋白质的活性等特点。本文简要阐述该方法的基本概念,并介绍几种常见高效疏水作用色谱固定相的合成及其最新应用。

关键词 高效疏水作用色谱,蛋白质,分离纯化

生物工程领域中的细胞工程、基因工程、酶工程、发酵工程和单克隆抗体的应用等等,都需要经常进行大量的生物大分子的分离工作,特别是从复杂的混合体系中分离和纯化活性蛋白质。而活性蛋白质的空间排列极易从天然分子的有序结构变成较无序的三维结构,即发生所谓的变性作用,或称失活,因此分离方法有先必须不损伤蛋白质的活性。在这方面,高效疏水作用色谱(High Performance Hydrophobic Interaction Chromatography, HPHIC)是一个令人满意的方法。

HPHIC能够完整地保持蛋白质活性的关键在于采用了弱疏水性的键合相为固定相和高离子强度的盐溶液为流动相。根据Horváth等人的疏溶剂理论(Solvophobic Theory)^[1],在高盐浓度的流动相中,水分子在疏水性固定相表面有序排列,而蛋白质分子中的疏水部分与疏水性固定相的结合(吸附)减弱了水分子排列的有序程度,熵值增加。在洗脱过程中,逐渐降低流动相中的盐浓度,熵值减小,蛋白质与固定相的作用力减弱,即流动相的洗脱强度增大,蛋白质按其疏水性从小到大的顺序被依次选择性地洗脱。另外,配制在中性缓冲液(pH6—7)中的高离子强度盐溶液大多数情况下不会破坏蛋白质的空间构型^[2,3],色谱分离后蛋白质的生

物活性不会受到损伤。

HPHIC是在经典疏水作用色谱(HIC)的基础上发展起来的。HIC由Hjertén在1973年正式命名^[4],实际上,在这以前HIC已经有了十几年的历史^[5]。在经典的HIC中,最常用的固定相为表面键合烷基或芳基的琼脂糖和葡聚糖软性凝胶^[6],这些软胶颗粒大且不均匀,刚性差,分离效率低,重现性也差。七十年代中期开始出现刚性较强、分离效率较高的HIC固定相^[7],但作为HPHIC固定相的填料最早是日本科学家Kato等人在1983年报道的^[8]。从那以后,各种类型的HPHIC固定相相继出现。这些固定相的共同特点是(1)一般选用大孔硅胶为基质,孔径约300—500 Å;(2)表面疏水基团密度较低,比用于反相色谱的长链烷基键合相低10—100倍。

常见 HPHIC 固定相及其应用

和其它任何一种色谱法一样,HPHIC的发展是和各种HPHIC固定相的发展紧密相关的。下面介绍几种目前国际上较为流行的HPHIC固定相及其在活性蛋白质分离中的应用实例。

1. Butyl-G3000SW 和 Phenyl-G3000 SW

将丁基或苯基通过缩水甘油醚偶合到硅胶

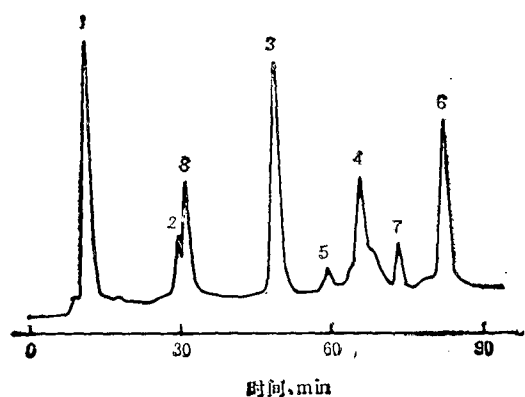


图1 蛋白质在 Phenyl-G3000SW 柱上的分离^[8]

1. 细胞色素 C; 2. 核糖核酸酶; 3. 溶菌酶; 4. 牛血清蛋白; 5. 卵清蛋白; 6. α -糜蛋白酶; 7. α -糜蛋白酶原; 8. 肌红蛋白

色谱柱: Phenyl-G3000SW, 6×150 mm

流动相: 在 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0) 中,

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 从 1.5 mol/L $\xrightarrow{60 \text{ min}}$ 0

流速: 0.5 ml/min

为基质的排阻色谱固定相 TSK-GEL 3000SW 表面, 生成的 Butyl-G 3000 SW 和 Phenyl-

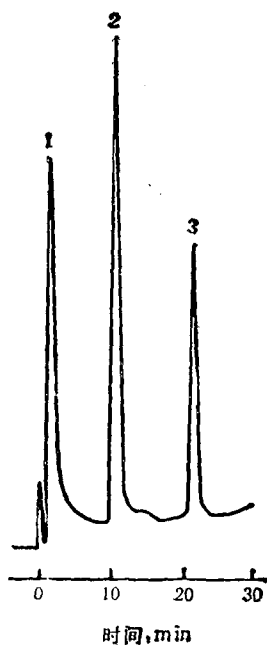


图2 蛋白质在 TSK-GEL Phenyl 5PW 柱上的分离^[10]

1. 细胞色素 C; 2. 肌红蛋白; 3. 溶菌酶

色谱柱: TSK-GEL Phenyl 5PW, 7.5×75 mm

流动相: 在 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中,

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 从 1.7 mol/L $\xrightarrow{30 \text{ min}}$ 0

流速: 1.0 ml/min

G 3000 SW 键合相对蛋白质能进行高效率的分离(图1)。

当其它色谱条件不变, 流速为 1.0 ml/min 时, 所测八种蛋白质的酶活力回收率在 93—108% 之间^[8]。这种键合相是世界上第一个 HPHIC 固定相, 其商品柱自问世以来, 一直受到普遍的重视。

2. TSK-GEL Phenyl 5PW

键合了苯基的非刚性高聚物 Bio-GEL TSK 5PW 对蛋白质的分离也具有高分离效率

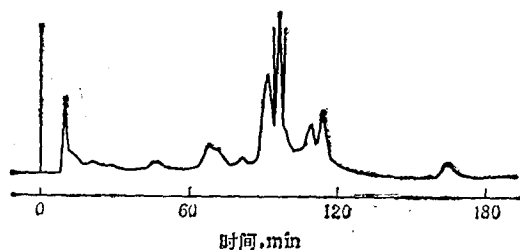


图3 1000mg 脂肪氧化酶在 TSK-GEL Phenyl 5PW 柱上的精制^[11]

色谱柱: 同图 2, 55×200 mm; 流动相: 同图 2,

1.5 mol/L $\xrightarrow{120 \text{ min}}$ 0 流速: 40 ml/min

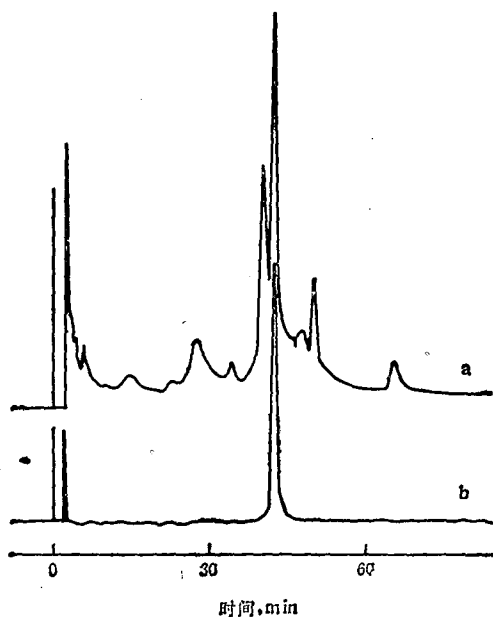


图4 脂肪氧化酶制品精制前后色谱图的对比^[11]

a. 精制前; b. 精制后

色谱柱: 同图 2 流动相: 同图 2, 1.5 mol/L $\xrightarrow{60 \text{ min}}$ 0
流速: 同图 2

和酶活力回收率(图 2)^[9,10], 这种键合相的商品名称为 TSK-GEL Phenyl 5PW。用这种填料制成的制备柱具有可观的负载容量, 当柱尺寸为 55 × 200mm 时, 脂肪氧化酶、磷酸葡萄糖异构酶和乳酸脱氢酶粗制品可分别上样 1000、500 和 200mg 进行纯化, 酶活力回收率分别为 84%、99% 和 82%^[11]。图 3 为 1000mg 脂肪氧化酶在制备柱上的色谱图, 收集对应于两条竖线之间的峰的柱后流出液, 即可达到精制酶制品的目的。精制前、后脂肪氧化酶在分析柱上的色谱行为如图 4。

3. SynChropak R

在硅胶表面通过亲水性聚合物为媒介, 可直接键合烷基, 这类键合相的商品名称为 SynChropak R。固定相的疏水性按照羟基丙基、丙基、苄基、异丙基、苯基、戊基的顺序递增^[12]。图 5 所示的例子表明, 胰蛋白酶在 SynChropak Propyl 柱上分离后, 酶活力保持不变。

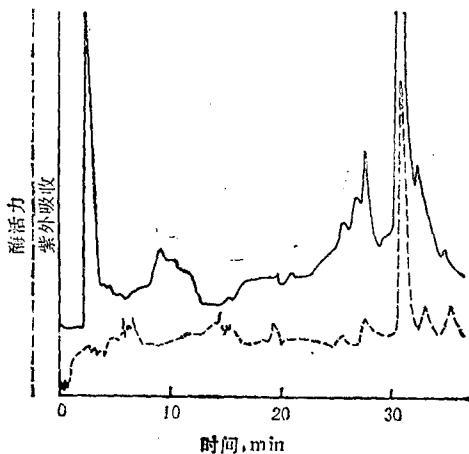


图 5 胰蛋白酶在 SynChropak Propyl 柱上的纯化^[12]

色谱柱: SynChropak Propyl, 4.1 × 250 mm
流动相: 在 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中,

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 从 2.1 mol/l. $\xrightarrow{30 \text{ min}}$ 0.1 mol/L

流速: 1.0 ml/min

4. 聚酰胺键合相

在以硅胶为基质的聚氨基键合相表面通过酰化作用增加烷基链的长度, 也可作为 HPHIC 固定相分离蛋白质, 酶活力回收率高(图 6)^[13,14]。根据酰化剂的不同, 可将聚酰胺键合相分为丙

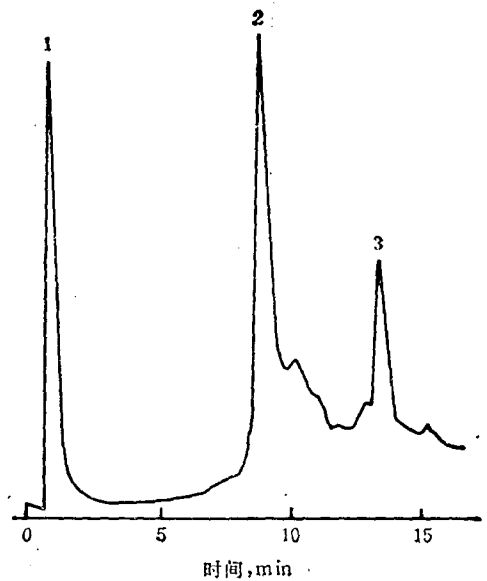


图 6 蛋白质在 Butyrate 聚酰胺柱上的分离^[14]

1. 纤维素 C; 2. 血清蛋白; 3. β -葡萄糖苷酶
色谱柱: Butyrate, 4.1 × 40 mm

流动相: 在 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中,

Na_2SO_4 从 $3\mu \xrightarrow{30 \text{ min}}$ 0(I)

流速: 1.0 ml/min

酸酯型、丁酸酯型等等。需要指出的是, 聚酰胺属极性键合相, 因此对分离条件的要求如离子强度、pH 等要相对严格一些^[15]。

5. Ether Phase

硅基醚键合相的通式为 $\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n\text{R}$ 它已成功地用于蛋白质的分离^[16]和蛋白质粗制品的大容量提纯^[17]。Ether Phase II ($n = 2$, $\text{R} = \text{CH}_3$) 的制备柱对大豆胰蛋白酶抑制剂的处理量达到每毫升柱体积 15 mg。在尺寸为 21.2 × 150 mm 的制备柱上, 667 mg 大豆胰蛋白酶抑制剂粗制品可一次处理完毕, 图 7 为大豆胰蛋白酶抑制剂粗制品和精制品在 Ether Phase II 分析柱 (4.6 × 100 mm) 上的色谱图的对比。

6. 聚醚键合相

用缩水甘油丙氧基三甲氧基硅烷将大孔硅胶转变成活化环氧基硅胶, 再与聚乙二醇 (PEG) 反应, 结果在硅胶表面键合了聚醚。这种键合相不但可用于活性蛋白质的分离^[18], 也可用于核酸 (t-RNA) 的分离(图 8)^[19]。另外,

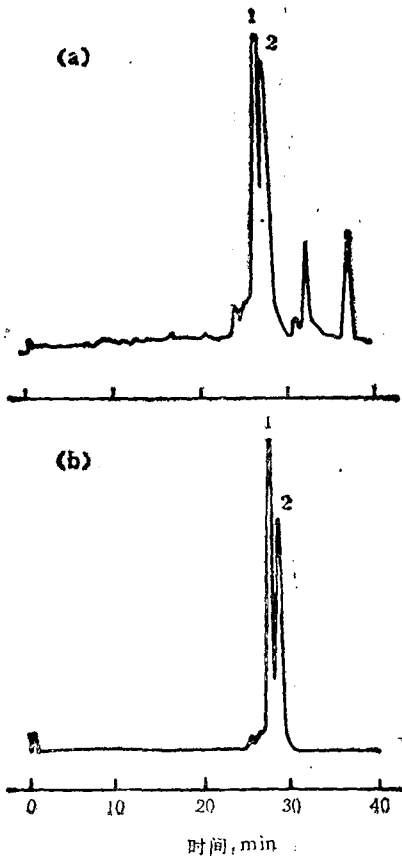


图7 大豆胰蛋白酶抑制剂纯化前后色谱图的对比^[17]

a. 粗制品; b. 精制品 1+2. 大豆胰蛋白酶抑制剂
 色谱柱: Ether Phase II, $4.6 \times 100\text{mm}$
 流动相: 在 0.5 mol/L 醋酸缓冲液 ($\text{pH}6.0$) 中,
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 从 $3.0 \text{ mol/L} \xrightarrow{20 \text{ min}} 0.5 \text{ mol/L}$
 流速: 1.0 ml/min

用聚乙烯醇 (PVA) 或寡氨醇 (OAA) 代替聚乙二醇也可达到同样的目的。

关于这类键合相, 最令人感兴趣的是已有实验证明, 聚乙二醇键合相为填料的小尺寸分析柱具有较大的柱容量, 可以在不影响分离度的情况下进行毫克级的蛋白质的分离^[20], 提纯核糖核酸酶 (图9) 和过氧化氢酶粗制品, 酶活力回收率基本上为 100% ^[21]。

结 语

从上面的几个例子可以看出, HPHIC 有以下三个主要特点: (1) 利用蛋白质和固定相的弱疏水作用, 流动相从高离子强度向低离子

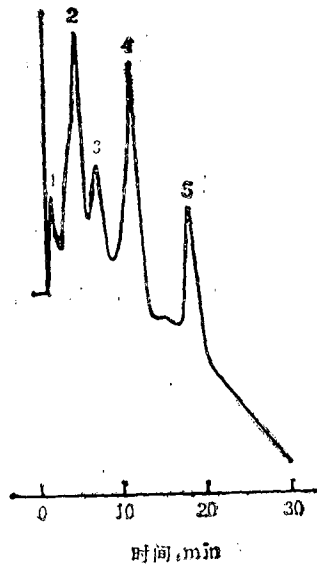


图8 t-RNA 在 PEG 键合相柱上的分离^[19]

1. $\text{t-RNA}^{\text{Glu}}(\text{GLU})$; 2. $\text{t-RNA}^{\text{Val}}(\text{VAL})$;
 3. $\text{t-RNA}^{\text{Lys}}(\text{LYS})$; 4. $\text{t-RNA}^{\text{Glu}}(\text{GLU})$;
 5. $\text{t-RNA}^{\text{Phe}}(\text{PHE})$
 色谱柱: POE 4M, $4.6 \times 100\text{m}$
 流动相: 在 Na_2HPO_4 缓冲液 ($\text{pH}6.3$) 中,
 盐浓度从 $1.2 \text{ mol/L} \xrightarrow{25 \text{ min}} 0.25 \text{ mol/L}$
 流速: 1.0 ml/min

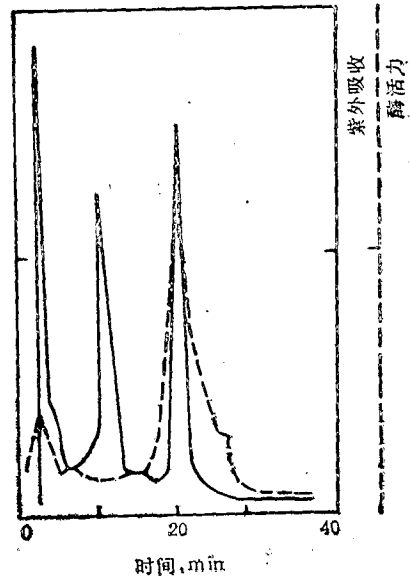


图9 核糖核酸酶在 PEG 键合相柱上的精制^[21]

色谱柱: HIC-15, $5 \times 100\text{mm}$
 流动相: 在 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 ($\text{pH}7.0$) 中,
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 从 $3.0 \text{ mol/L} \xrightarrow{35 \text{ min}} 0$
 流速: 1.0 ml/min

生命现象与化学耗散结构

李如生

(清华大学化学系,北京)

提 要

在简单介绍了耗散结构理论的基础上,探讨了生命现象与耗散结构之间的联系,阐述了用化学耗散结构理论解释各种生物有序现象(如生物形态和生物振荡)和生物进化现象的可能性。强调了生命科学与非生命科学相结合的重要性。

关键词 生命现象,耗散结构,有序,非平衡,非线性

一、达尔文和克劳修斯 (Clausius) 的矛盾

按照达尔文的生物进化学说,现在地球上的各种各样的生物都是由共同的祖先经过漫长的年代逐渐演变而来的,这一演变过程遵循着.....强度洗脱,条件温和,能保持蛋白质的生物活性;(2)采用高效液相色谱装置,操作简单快速,分离效率高;(3)柱容量大,可方便地由分析转入制备。由于具备以上三个特点,HPHIC已逐步成为活性蛋白质分离纯化过程中不可缺少的重要手段。目前,生物化学家和色谱学家正利用已有的固定相发展与分析柱具有近似分离效率的制备柱,并继续不懈地合成新的高效、能保持样品生物活性的固定相,旨在进一步扩展柱的负载容量和应用范围,包括提高HPHIC对复杂样品中多种活性生物大分子的分辨能力和快速大量制备,以适应生物工程突飞猛进的发展对HPHIC的特殊要求。

本文承蒙南京大学生物化学系王新昌教授审阅,特此衷心感谢。

参 考 文 献

由简单到复杂、由低等到高等的进化顺序。所谓复杂和高等,在某种意义上是指生物形态和功能上、即构成生物体的物质在空间分布上和时间变化上有严格的和细致的规律,也就是高度的有序。生物形态是典型的空间有序现象,而生物振荡(即生物钟)是典型的时间有序现象

- 2 Plummer D. T 著,吴翠等译.实用生物化学导论.北京:科学出版社,1985:129—132
- 3 Barth H G *et al.* *Anal Chem*, 1986; 58: 211R
- 4 Hjertén S *J Chromatogr*, 1973; 87: 325
- 5 Gillam I *et al.* *Biochemistry*, 1961; 6: 3043
- 6 Hjertén S *et al.* *J Chromatogr*, 1974; 101: 281
- 7 Chang S H *et al.* *J Chromatogr*, 1976; 120: 321
- 8 Kato Y *et al.* *J Chromatogr*, 1983; 266: 49
- 9 Kato Y *et al.* *J Chromatogr*, 1984; 292: 418
- 10 Goheen S C, Engelhorn S. C. *J. Chromatogr.* 1984; 317: 55
- 11 Kato Y *et al.* *J Liquid Chromatogr*, 1986; 9(15): 3209
- 12 Gooding D L *et al.* *J Chromatogr*, 1984; 296: 107
- 13 Gupta S *et al.* *Anal Biochem*, 1983; 128: 196
- 14 Fausnaugh J L *et al.* *Anal Biochem*, 1984; 137: 464
- 15 Engelhardt H, Schön U. *J Liquid Chromatogr*, 1986; 9(15): 3225
- 16 Miller N T *et al.* *J Chromatogr*, 1985; 316: 519
- 17 Miller N T, Shieh C H. *J Liquid Chromatogr*, 1986; 9(15): 3269
- 18 Chang J P *et al.* *J Chromatogr*, 1985; 319: 395
- 19 Rassi Z E, Horvath C. *J Liquid Chromatogr*, 1986; 9(15): 3245
- 20 安建国,张仁斌.色谱,1988;6(1):6
- 21 姚志建,郭燕捷.色谱,1988;6(2):110

[本文于1988年11月7日收到]

1 Horváth C *et al.* *J Chromatogr*, 1977; 125: 239