

蛋白质制备色谱的研究^{*}

师治贤^{* *1}, 樊立民²

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001;

2. 中国科学院兰州化学物理研究所, 甘肃 兰州 730000)

摘 要:研究了蛋白质纯化制备的二种运行模式. 其一,在色谱柱超载下纯化制备蛋白质模式,并成功地用离子交换色谱纯化制备了大豆中的胰蛋白酶,用反相液相色谱纯化了细胞色素 C;其二,用溶质-溶质顶替色谱纯化制备了核糖核酸酶-A,并对顶替色谱过程中诸参数进行了讨论和选择.

关键词:离子交换色谱;反相液相色谱;顶替色谱;蛋白质

中图分类号:O657.3

文献标识码:A

文章编号:1006-3757(2000)04-0206-06

传统的生物化学分离技术,如盐析、萃取、透析、离心等技术,一般效率较低,但处理量大,设备投资小,作为产品初步分离和纯化仍被广泛地使用,但对一些精细生化产品的分离和纯化受到了许多的限制. 毛细管电泳虽具有高的分离能力,但它固有负载小的特性使其只能是一种很好的分离分析手段,很难成为一种高效的分离制备方法. 相比之下,高效液相色谱的分离制备效率之高,应用范围之广,是其它方法无法相比的,特别是在生物工程技术下游产品的最终纯化过程中是必需的步骤. 某些基因工程产品,生产成本的 80 %花在难度大、费用高的分离与纯化上,世界上发达国家都十分重视生物技术的研究与开发. 因而对生物技术下游产品的分离和纯化予以高强度的投资. 我国则把生物技术一直列为高新技术,重点支持,特别是改革开放以来,面对 21 世纪,生物高新技术的发展和开发更是方兴未艾.

蛋白质制备色谱的研究,早就引起国际学术界的极大兴趣,人们寄希望于用高效液相色谱分离、制备、纯化和大规模提取感兴趣的蛋白质,从而使生物工程下游产品的纯化和制备向降低成本、扩大规模及提高效益的方向发展. 因此,蛋白质制备色谱的研究具有很明显的学术意义和实际应用价值.

1 柱超载环境中蛋白质的制备

液相色谱制备蛋白质的理论基础是以吸附—解附为基本着眼点,无论用那种色谱模式纯化制备蛋白质,都可以从流动相的改变来实现,盐溶液对蛋白质离子交换色谱的吸附—解附,甲醇、乙腈含量的变化对蛋白质反相液相色谱的吸附—解附,特异性解附剂对蛋白质的亲和色谱吸附—解附等均与流动相的组成、浓度等诸参数相关.

柱超载运行一般不能借助于分析范围内的分离度,因为分析操作在线性范围内,而制备过程是在色谱柱饱和条件下进行的. 柱超载一般有二种方法,一种采用体积超载运行,这时吸附等温线仍然起重要的作用,一种采用溶质超载运行,被纯化的蛋白质的量比较大,这时样品的浓度已超出了吸附等温线范围,因此,吸附等温线不起作用.

1.1 离子交换色谱制备蛋白质

在用离子交换色谱分离和制备蛋白质的过程中,主要利用蛋白质彼此具有不同的电荷而进行选择性的分离和制备,由于选择的条件各异,蛋白质和离子交换填料之间的作用是多种多样的. 因此蛋白质的分离纯化在离子交换色谱上主要控制 pH 值的变化和离子强度的梯度,以使被纯化和制备的目标

^{*} 中国科学院大型仪器功能开发基金(9817E-090).

^{* *} 通讯联系人.

收稿日期: 2000-10-22.

蛋白质具有高的柱容量、高的分离度和高的产量。如大豆蛋白中的胰蛋白酶在离子交换色谱柱上分离纯化比较理想。

1. 1. 1 大豆混合蛋白质的提取 取 4~5 粒大豆,研磨均匀取研磨后的粉样 1.0 g,加入到冷冻的 50 mol/L 的磷酸盐溶液中,调整 pH 为 6.8,不断摇动萃取 30 min,然后将萃取液在 10 000 r/min 离心机中离心 15 min,过滤,上部澄清液保存在冰箱中,以备此混合蛋白质来纯化和制备胰蛋白酶。

1. 1. 2 大豆蛋白中胰蛋白酶的纯化 胰蛋白酶抑制剂和脂肪氧合酶这二个重要蛋白都存在于大豆中,脂肪氧合酶是以同功酶的形式存在于大豆花中,而胰蛋白酶抑制剂(trypsin inhibitor)存在于大豆的提取物中。将萃取得到的胰蛋白酶粗品和比较纯化的制品,在四氨基 PEI Vydac silica (5.5 μ m) 的柱上进行色谱操作,选择纯化条件,如图 1。

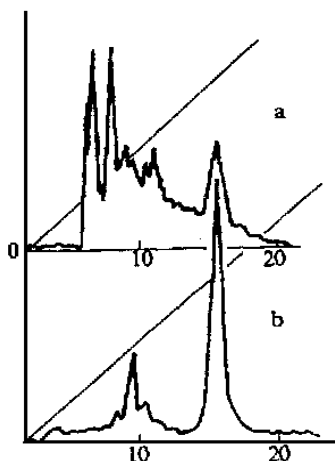


图 1 大豆中胰蛋白酶的分离

色谱柱:(50 $\times$ 4.1 mm) 四氨基-PEI Vydac silica (5.5 μ m)

流动相:0.01 mol/L Tris-HCL(pH8) $\xrightarrow{20 \text{ min}}$ 0.5 mol/L NaCl(pH8)

流速:1.0 mL/min 紫外检测:254 nm a. 混合蛋白 b. 标准样

Fig. 1 Separation of trypsin inhibitor of soybean

column:(50 $\times$ 4.1 mm) Qme-PEI Vydac silica (5.5 μ m)

mobile phase:

0.01 mol/L Tris-HCL(pH8) $\xrightarrow{20 \text{ min}}$ 0.5 mol/L NaCl(pH8)

flow rate:1.0 mL/min UV:254 nm a. crude b. standard

根据选择的操作条件然后在柱超载下,进行大豆胰蛋白酶制剂的纯化。如图 2。

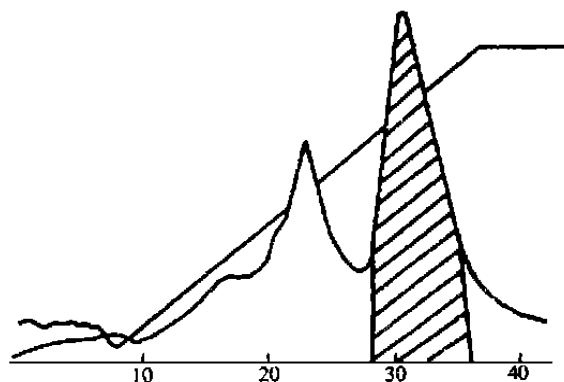


图 2 大豆蛋白中胰蛋白酶的制备

色谱柱:(50 $\times$ 4.8 cm) 四氨基-PEI Sfr-200 (30 μ m)

流动相:0.01 mol/L Tris-HCL(pH8) $\xrightarrow{40 \text{ min}}$ 0.5 mol/L NaCl(pH8)

流速:50 mL/min 紫外检测:254 nm 进样量:7.0 g

Fig. 2 Preparation of trypsin inhibitor of crude soybean

column:(50 $\times$ 4.8 cm) Qme-PEI Sfr-200 (30 μ m)

mobile phase:

0.01 mol/L Tris-HCL(pH8) $\xrightarrow{40 \text{ min}}$ 0.5 mol/L NaCl(pH8)

flow rate:50 mL/min UV:254 nm sample:7.0 g crude S72

1. 2 反相色谱制备蛋白质

根据吸附-解附的理论基础,在非线性色谱条件下,用混合蛋白质样,其中细胞色素 C 约占 98 %,其它五种蛋白质约占样品的 2 %。在色谱操作过程中,用短的 C₈ 柱(50 $\times$ 4.6 mm)进行纯化和制备。

(1) 实验设计

实验设计采用二步,第一步选择分析模式对混合蛋白质进行分离,以选择纯化的优良条件。第二步,在体积超载非线性范围内进行色谱操作,当在梯度条件下出现突破峰时,则表示色谱柱被蛋白质饱和,这时用谱带分步切割、收集,用分析条件进行蛋白质的纯度确证。

(2) 实验条件

仪器和试剂:Varian 5000 型液相色谱仪;异丙醇和乙腈(北京化学试剂厂)、三氟乙酸和六种标准蛋白(美国 Sigma 公司),它们分别是核糖核酸酶(RNase)、溶菌(Lys)酶、细胞色素 c(Cyt)、胰岛素(Ins)、牛血清蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)。

色谱条件:色谱柱(50 $\times$ 4.6 mm) 填有 Syn-Chropak C₈ 紫外检测 254 nm,柱温 25 $^{\circ}$ C,流速 1.0 mL/min,二元流动相组成:(A) 0.1 % (V/V) TFA

水溶液, pH = 2, (B) 0.1 % (V/V) TFA 的异丙醇溶液 pH = 2, 梯度范围 40 min B 从 0 % 到 80 % 按照

研究设计的蛋白质纯化程序, 细胞色素 C 在柱超载下运行, 分步收集的色谱图如图 3.

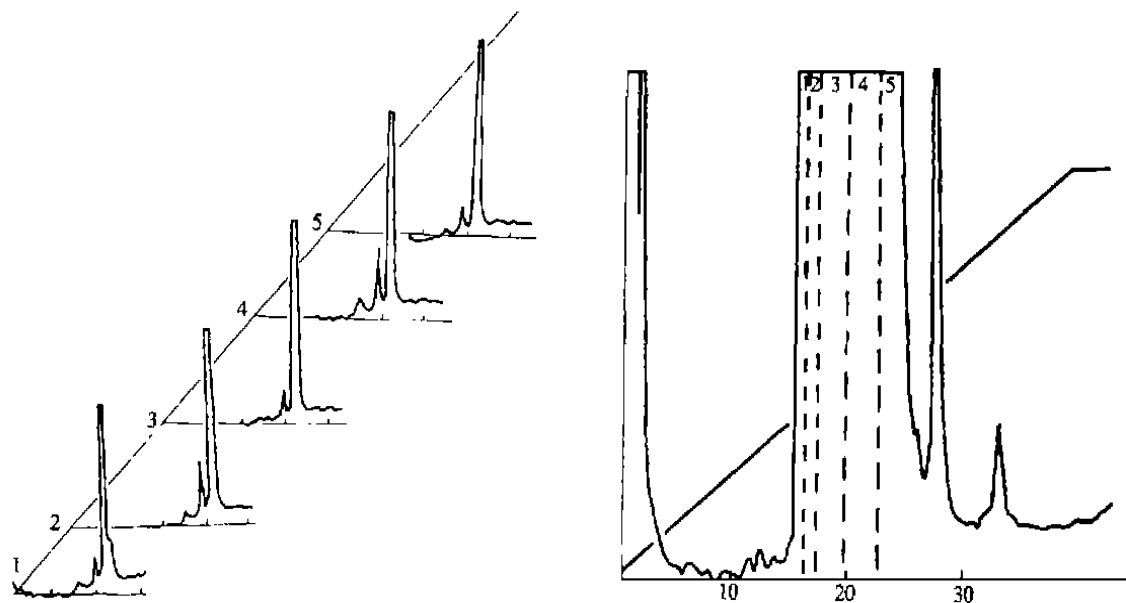


图3 在反相色谱上混合蛋白质的制备

色谱柱: (50 × 4.6 mm) SynChropak C₈

流动相: 0.01 (V/V) TFA in water pH 2 $\xrightarrow{40 \text{ min}}$ 80 % 0.1 (V/V) TFA in isopropyl alcohol pH 2

流速: 1.0 mL/min 紫外检测: 254 nm 温度: 25

Fig. 3 Preparation of mix proteins on RP - chromatography

column: (50 × 4.6 mm) SynChropak C₈

mobile phase: 0.01 (V/V) TFA in water pH 2 $\xrightarrow{40 \text{ min}}$ 80 % 0.1 (V/V) TFA in isopropyl alcohol pH 2

flow rate: 1.0 mL/min UV: 254 nm temperature 25

很明显, 细胞色素 C 在切割收集“3”“5”部分时一次可得到比较纯的蛋白质组份. 收集的其它部分仍可逐步再进一步纯化.

2 顶替色谱制备蛋白质

色谱柱中被吸附的组份, 为另一种组份或某一顶替剂从液相色谱柱顶替出来的这个过程称顶替色谱. 选择用作顶替剂的基本条件是: 在色谱柱中它具有比被顶替的样品或组份较强的亲合力. 用于大规模制备, 顶替色谱主要的优点是消除了由于凸形等温线引起峰的拖尾; 较高的柱容量防止了在分离和制备上谱带的扩张; 具有较大的峰容量. 因此, 对于蛋白质的制备, 特别是精细生化产品它具有潜在的能力. 现将顶替反相液相色谱和离子交换色谱制

备蛋白质的研究与结果报告如下.

2.1 溶质-溶质反相顶替色谱制备蛋白质

液相色谱的选择性依靠溶质组份和洗脱剂组份在填料上的吸附能力的差异. 顶替色谱直接反映被分离组份和顶替剂在填料表面吸附的竞争过程, 在研究生物大分子的分离和纯化过程中, 在柱超载的状态下, 除了使用溶剂(顶替剂) — 溶质顶替模型外, 还使用溶质 — 溶质顶替模型, 对分离和纯化蛋白质提供了一种灵活、方便的方法, 选择的顶替溶质要有比被纯化的溶质对填料更强的吸附力, 这一模型, 可使柱容量大大提高, 参数的选择也比较简便.

2.1.1 实验设计 顶替制备色谱多在反相色谱条件下进行. 例如在图 4 中的结果. 我们选择牛血清蛋白(BSA)作为顶替剂, 被纯化的组份是核糖

核酸酶-A (Rnase-A). 首先把被纯化的组份在超载条件下加于柱上,当记录系统出现突破峰时表示柱已在饱和状态,这时把顶替溶质加在柱上,整个运行是在非线性条件下进行,被顶替的组份在柱内移动,在同一流动相和相同流速下顶替分离,手工收集,用分析系统来测定顶替组份的纯度.

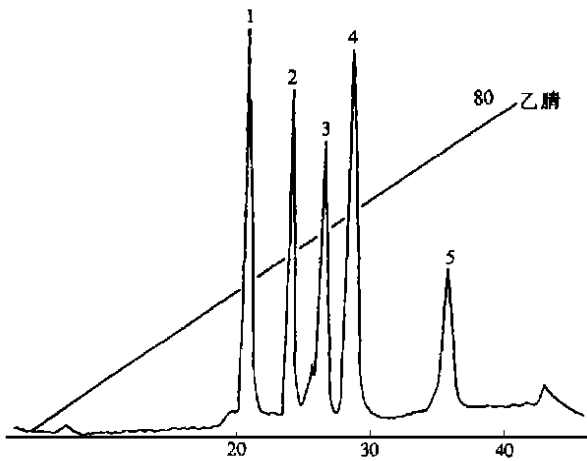


图 4 在反相色谱上蛋白质的分离

1. 核糖核酸酶-A 2. 细胞色素 C

3. 溶菌酶 4. 牛血清蛋白 5. 卵清蛋白

Fig. 4 Separation of proteins on RP-chromatography

1. ribonuclease-A 2. cytochrome C

3. lysozyme 4. albumin-bovine 5. ovalbumin

(1) 实验中的仪器和试剂

仪器系统包括 Beckman-Altex Model 110A 泵, Altex 溶剂梯度程序, Model 7120 进样器, 储样管体积 3 000 μL 和 1 000 μL , Altex 紫外检测器 254 nm, 柱温控制用恒温水浴, 精度 ± 0.5 , 色谱柱采用键合相 C4 (Vydac 214 TPB RP-4) 100 $\times$ 4.5 mm.

所用的蛋白质为美国 Sigma 公司产品, 它们是核糖核酸酶-A (Ribonuclease-A)、细胞色素 C (cytochrome C)、溶菌酶 (lysozyme)、牛血清蛋白 (albumin-bovine) 和卵清蛋白 (ovalbumin).

(2) 实验方法

为了确定 BSA 顶替 Rnase-A 在过程中的变化, 测定顶替强度和进行参数的选择, 采用标准的色谱分析系统, 结果如图 4. 其条件为: 流动相“A” 0.1 % (V/V) TFA 在去离子水中 pH 为 2, 经过 40 min 线性梯度到 80 % 的流动相“B” 0.1 % (V/V) TFA 在

乙腈中 pH 为 2, 流速 1.0 mL/min, 顶替强度和产量多少的直观标志以顶替溶质的峰面积比被顶替组份的峰面积表示, 并以此来讨论诸参数的变化与顶替强度的关系.

2. 1. 2 溶质-溶质顶替实验条件的选择 流速: 顶替色谱过程中, 流速直接与产量成比例, 在柱超载状态下保持其他条件不变改变流速, 其流速对顶替溶质/被顶替组份比率的影响 (比率愈低, 则表明产量愈高) 结果见图 5. 实验结果表明, 选择流速为 2.0 mL/min, 对于该体系比较合适.

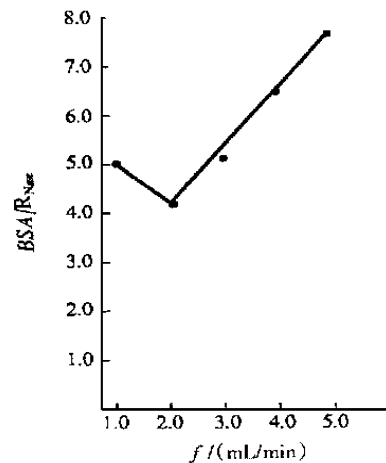


图 5 流速对 BSA/Rnase-A 比率的影响

色谱柱: (100 $\times$ 4.5 mm) C4 Vydac silica (214 TPB RP-4)

流动相: 0.1 % (V/V) TFA 在去离子水中 pH2 $\xrightarrow{40 \text{ min}}$

80 % 0.1 % (V/V) TFA 在乙腈中 pH2

流速: 1.0 mL/min 紫外检测: 254 nm 温度: 25

Fig. 5 Effect of flowrate for BSA/Rnase-A

column: (100 $\times$ 4.5 mm) C4 Vydac silica (214 TPB RP-4)

mobile phase: 0.01 % (V/V) TFA in water pH2 $\xrightarrow{40 \text{ min}}$

80 % 0.1 % (V/V) TFA in pH2

flow rate: 1.0 mL/min UV: 254 nm temperature 25

顶替溶质的量: 顶替溶质必须比任何被顶替组份在柱上具有更强的吸附竞争力, 柱在超负载条件下运行时, 被顶替的组份在色谱柱上处于饱和状态, 这时把顶替的溶质以不同的量加在柱上顶替, 由于被顶替组份柱上的吸附竞争力不如顶替溶质, 于是从填料表面被顶替下来, 依次流出色谱柱, 如图 6.

图 6 中当被顶替的组份的上柱量固定时, 改变顶替溶质的量, 进行顶替, 顶替的能力则随着顶替溶质量的增加而增加, 直至达到顶替平衡.

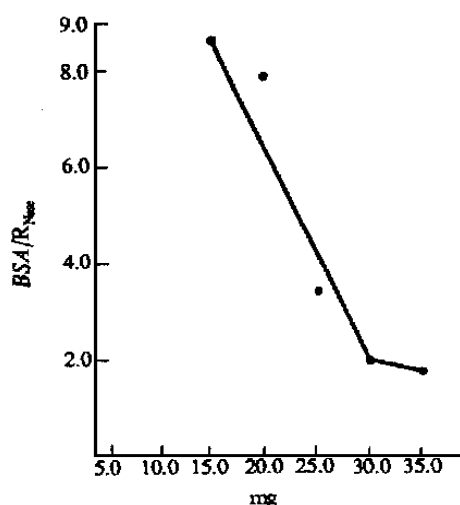


图6 顶替溶质质量对 BSA/ R_{Nase-A} 比率的影响
色谱条件同图5

Fig. 6 Effect of BSA for BSA/ R_{Nase-A}
chromatographic condition as same as Fig. 5

顶替溶质体积的选择:在溶质-溶质顶替色谱过程中,顶替溶质的体积影响顶替溶质和被顶替组份比率的大小,即也影响被顶替组份的产量。

当其他实验条件保持不变,而仅改变顶替溶质的体积时色谱过程的结果如图7所示。

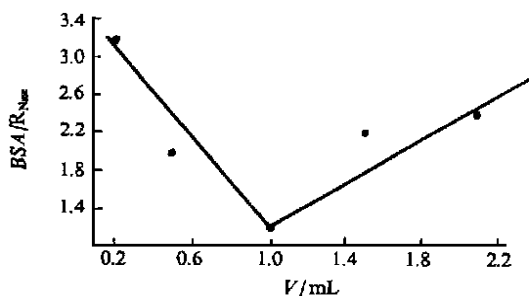


图7 BSA 体积对 BSA/ R_{Nase-A} 比率的影响
色谱条件同图5

Fig. 7 Effect of volume of BSA for BSA/ R_{Nase-A}
chromatographic condition as same as Fig. 5

很明显,顶替过程中有一个临界点,这个临界点表示该值是一个最好的体积数,在运行过程中当其他条件不变时,对于一定的被顶替组份来说,选择这个顶替体积可获得较高的产量。大于或小于这个体积都会影响到被顶替组份的浓度。因此,顶替色谱

中流动相应该选择对顶替组份溶解度最大、而对顶替溶质的洗脱能力最弱的溶剂。

参考文献:

- [1] Jokn H Knox, Hazel M Pyper. Framework for maximizing throughput in preparative liquid chromatography[J]. J of Chromatography, 1986, 363 1~2.
- [2] 师治贤,胡凤祖,邵云,樊立民. 蛋白质在离子交换色谱上选择性和非吸附特性[J]. 分析测试技术与仪器, 1999, 5(4) 240~243.
- [3] Csaba Horvath, Leslie S Ettre. Chromatography in biotechnology [M]. American chemical society, Washington, DC, 1993, 77~78.
- [4] 师治贤,王俊德. 生物大分子的液相色谱分离和制备[M]. 北京 科学出版社, 第二版, 1996, 111~113.

Preparative High Performance Liquid Chromatography for Proteins

SHI Zhi-xian¹, FAN Li-min²

(1. Northwest Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

2. Lanzhou Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 73000, China)

Abstract :Two preparative HPLC model for proteins are discribed. (1) Under condition of volume overloaded on column, the preparative ion exchange and reversed phase chromatography for proteins on column, the volume of the injected sample may be so large that eluted peaks are significantly wider than those from analytical sample. Although the solute concentration is lower, but we still can get more pure protein. First the preparative ion exchange chromatography was prepared trypsin inhibitor from crude soybean by Qme-PEI-si-200 (30 μ m), under condition of volume overloaded on column. The column were eluted with a gradient from 0.01 mol/L Tris-HCl pH 8 to 0.5 mol/L NaCl pH 8, 40 min, at flowrate of 50 mL/min, 30 min, fractions were collected (Fig. 1, 2). Second, the cytochrome C from mix proteins was pured on preparative RP-HPLC by using SynChropak C₈, the column were eluted with a gradient from 0 % to 80 % isopropyl alcohol, containing 0.1 % TFA pH 2, at flowrate of 1.0 mL/min 15 min, fractions were collected (Fig. 3). (2) Solute-solute displacement chromatography for proteins. This study deals with of Rnase by RSA-Rnase displacement on reversed phase chromatography. The amount of displacer, volume of displacer, flowrate of column and displacement effect on the gradient elution RP-HPLC with Vydac C₄ (100 $\times$ 4.5 mm) column is discribed. The optimum displacement and high yield has been obtained.

Key words :ion exchange chromatography ;reversed phase chromatography ;displacement chromatography ;protein

Classifying number :O657.3