

梯度洗脱液相色谱中蛋白质的累加进样分离法

常建华^{1,2} 梁峰² 郭立安¹

(1. 西安交大保赛生物技术股份有限公司, 西安 710054; 2. 西北大学化学系, 西安 710069)

在一般的色谱实验里, 一次分离过程只能进一次样。但是在蛋白质的梯度洗脱色谱中, 一次分离中可以多次进样, 而蛋白质的保留时间及峰形无可觉察的变化。这种进样法可以叫累加进样法。累加进样法在提高蛋白质和生物大分子的分析灵敏度、提高柱子的处理量、节省溶剂和提高分离制备效率方面有十分明显的效果和广泛的应用前景。

1. 蛋白质洗脱曲线有明显的突跃区

王俊德等人^[1-6]和作者报道了在梯度洗脱的反相色谱、离子交换色谱和疏水色谱中, 蛋白质洗脱曲线会有明显突变的现象^[1-6]。在某一个 B 液百分组成的附近, B 液一个较小的变化, 可以引起蛋白质容量因子很大的变化。不同的蛋白质, 引起容量因子突变的 B 液变化范围不同。所以, 不同的蛋白质在不同的 B 液百分含量处被洗脱。

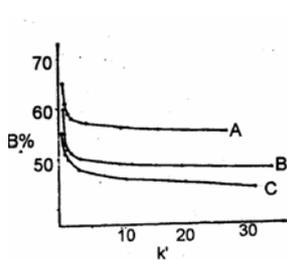


图1 蛋白质 RPC 中 k' 与 B% 的关系
柱子: C₈ 反相柱。
蛋白质: 图 1~2, A. 溶菌酶, B. 细胞色素 C, C. 胰岛素;

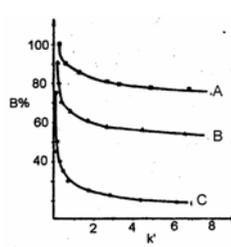


图2 蛋白质 HIC 中 k' 与 B% 的关系
柱子: HIC 柱(自己合成)。

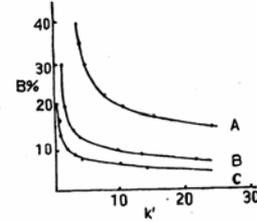


图3 蛋白质 IEC 中 k' 与 B% 的关系
柱子: 强阳离子交换柱(自己合成)。
图 3, A. α 胰凝乳蛋白酶原-A, B. 细胞色素 C, C. 溶菌酶

蛋白质在以上 3 种色谱中的保留值与洗脱液中强洗脱剂之间的关系可以用下式表达^[9]:
 $k' = I/[D]^Z$ 或 $\lg k' = \lg I - Z \lg [D_0]$

因为在蛋白质的色谱中 Z 值在几十到几百, 故 k' 与 [D] 的上百次方成反比。由此可知, 在一定的 [D] 值 (对应一定 B 液的百分浓度 B%) 附近, [D] 值一个较小的变化, 会引起 k' 较大的改变。

每一条曲线在 B% 变小时, 逐渐变平缓, 到了一定的 B% 值, k' 可以变得非常大, 以此时的洗脱液组成进行洗脱, 蛋白质实际上在柱子中没有任何可觉察的移动。

2. 蛋白质在累加进样分离中保留值和峰形无可觉察的变化

我们发现, 在一次分离中的某一段时间范围内可以多次进样, 而蛋白质的保留时间与峰形无可觉察的变化。这种方法叫做累加进样分离法。

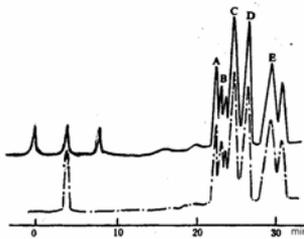


图4 RPC 中累加进样与常规进样的对照
柱子与流动相同图 1, 梯度时间 20min,
—●— 常规进样, — 间隔 5min 累加进
样 3 次。
蛋白质: A. 肌红蛋白, B. 细胞色素 C, C. 溶
菌酶, D. 牛血清白蛋白, E. 卵清蛋白。

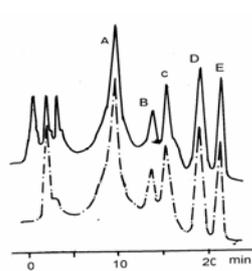


图5 HIC 中累加进样与常规进样的对照
柱子与流动相同图 2, 梯度时间 20min,
—●— 常规进样, — 间隔 3min 累加
进样 3 次。
蛋白质: A. 细胞色素 C, B. 核糖核酸酶,
C. 牛血清白蛋白, D. α 淀粉酶, E. 胰岛素

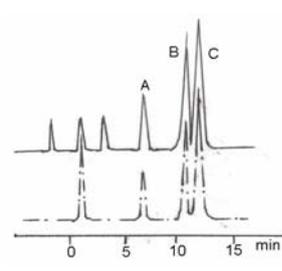


图6 IEC 中累加进样与常规进样的对照
柱子与流动相同图 3, 梯度时间 20min,
—●— 常规进样, — 间隔 3min 累加
进样 3 次
蛋白质: A. 肌红蛋白, B. 细胞色素 C
C. 溶菌酶。

3. 选择性保留累加进样分离法

选择在一定洗脱强度的 A 液中进样，进样后并不开始梯度洗脱，而仍然用 A 液洗脱。此时保留弱的蛋白质已经达到或接近突变区，在进样后被较快地洗脱，而保留强的蛋白质还远离突变区。待保留弱的蛋白质完全洗出柱子后再进第二次样，如此重复进样多次后再开始梯度洗脱，分离并收集所需的组分。实验发现，保留强的蛋白质保留值与常规进样一致。这种方法可以叫做选择性保留累加进样分离法。见图 7。

在一个蛋白质样品中，如果待分离的目标产品保留值比杂质的保留值大，让保留较小的杂质在进样后到第 2 次进样前随 A 液流出柱子，多次进样后再开始梯度洗脱，收集目标组分。如果待纯化的目标产品保留值比杂质都小，可以让目标产品在每次进样后随时随 A 液流出柱子，并进行收集，多次进样后，再用强洗脱剂洗脱杂质。在这两种情况下，部分物质随 A 液流出，不吸附在柱子上，等于增大了柱子的处理量，扩大了柱子有效容量。同时还可以浓缩样品，节省时间和洗脱剂，解决一次进样体积受限制的问题。

例如，从尿激酶的粗品中含有大量的杂蛋白，杂蛋白在强阳离子交换色谱柱上保留较弱。常规进样时活性回收率 74.3%，回收液蛋白质的浓度为 10.2mg/ml；而用选择性保留累加进样分离法时，活性回收率 83.4%，回收液蛋白质的浓度为 34.3mg/ml。见图 8。

郭立安、朱宝泉将此方法用于了重组人干扰素的分离中。提高 A 液的洗脱能力，采用累加进样分离法，可将大部分杂蛋白洗脱掉。此操作既能分离，又可实现良好的蛋白复性^[10]。

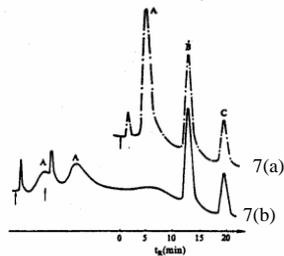


图 7. HIC 中常规 7 (a) 和累加进样 7 (b) 的对照
流动相: A 液, 2.25mol.L⁻¹(NH₄)₂SO₄+0.01 mol.L⁻¹PBS,pH7.0;
B 液: 0.01 mol.L⁻¹PBS,pH7.0;15min 线性梯度。
蛋白质: A.细胞色素 C,B.溶菌酶, C.胰岛素。

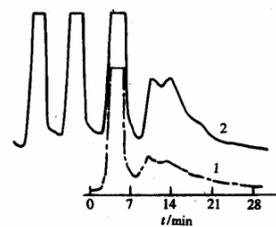


图 8.尿激酶常规进样 (1) 和累加进样 (2) 的对照
流动相 A:0.02 mol.L⁻¹ PBS,pH6.5; 流动相 B: 0.02 mol.L⁻¹PBS
+2.0 mol.L⁻¹NaCl ,pH6.5;20min 线性梯度。
样品: 尿激酶粗品。

4. 累加进样分离的条件选择

在累加进样分离时蛋白质的保留时间与峰形无可觉察变化的直观解释是，梯度开始前到梯度开始后的一定时间内，蛋白质的容量因子非常大，蛋白质还远离其洗脱突变区，溶质在柱子上实际不移动。见图 1~3。

例如，当色谱条件是聚乙二醇配基的疏水作用色谱固定相、流动相 A 为 3mol.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ 加 10mmol.L⁻¹ PBS(pH=7)、流动相 B 为 10mmol.L⁻¹ PBS(pH=7)的时候，3 种蛋白质的保留值可以用下面式子表示：

$$\text{溶菌酶: } \lg k' = 130.2 - 76.1 \lg[\text{H}_2\text{O}]$$

$$\text{胰岛素: } \lg k' = 134.8 - 77.8 \lg[\text{H}_2\text{O}]$$

$$\text{细胞色素 C: } \lg k' = 126.5 - 75.6 \lg[\text{H}_2\text{O}]$$

在梯度开始前的 A 液中，可以推算出各个蛋白质的 k' 值为：溶菌酶 k' = 1.27 × 10⁵；胰岛素 k' = 8.1 × 10⁶；细胞色素 C k' = 1.8 × 10²。在这样的条件下，进样后到梯度开始前的很长时间内溶质 k' 很大，在柱子上实际不移动。实验证明，即使在梯度启动前 40min 进样与正常进样对照，这 3 个蛋白质的保留时间无可觉察的变化。

由于不同蛋白质的 I 值和 Z 值不同，到达突变区时 B 液的百分浓度也不同，梯度开始后一定时间进样保留值不变的这段时间长短不同，保留大的这段时间长。也就是说，不同的组分能够在梯度开始后多次进样而保留值和分离度还无可觉察的变化的时间段是不一样的。如在疏水作用色谱中，细胞色素 C 在梯度开始后的一定时间内进样，保留值不变。超过一定时间，B 液的百分浓度已增大，再进样保留值就会有可觉察的变化。但溶菌酶的容量因子大得多，从梯度开始到再进样保留值有可觉察变化的这段时间比细胞色素 C 长得多。见图 7。

同一个组分多次累加进样分离时表观上出一个峰, 实际是为重叠的多个峰, 且有一个时间差 Δt_R 。

张维冰、许国旺等人综合研究多个色谱保留方程, 得出出峰时间差 Δt_R 为^[11]:

$$\Delta t_R = \frac{\Delta t}{ZC_u t_0 k'_0 + 1} \quad (6)$$

出峰时间差 Δt_R 与进样时间差 Δt 成正比, 而与洗脱剂的变化速率 C_u 、死时间 t_0 、等浓度洗脱时的容量因子 k'_0 近似成反比, 也与 Z 有关^[11]。为了保证小的 Δt_R , 可以通过进样时间差 Δt 、容量因子 k'_0 等来调节。

张维冰、许国旺等人的研究还发现, 如果样品中有两个结构差别不大的组份, 先进样的样品中保留大的组份与后进样样品中保留小的组份的保留时间差 Δt_R^* 可以近似表示为^[11]:

$$\Delta t_R^* = \Delta t_R \left(1 + \frac{\Delta k'_0}{\Delta t} \right) \quad (7)$$

$\Delta k'_0$ 是两组份在等浓度洗脱时的容量因子。只有 $\Delta k'_0 / \Delta t$ 足够大, 才能得到良好的分离。

5. 用累加进样分离法可以浓集样品, 提高分析灵敏度

当蛋白质样品的浓度很稀, HPLC 常规分析很难检出时, 可以采用累加进样分离法多次重复进样, 再开始梯度分离。采用此方法, 可在一次分离中完成蛋白质的浓集、分离或分析, 提高分析的检出灵敏度。即使样品的浓度低于检出下限时也可以被检出。作者曾对常规分析难以检出的尿激酶样品, 在累加进样 5 次后, 可以检出尿激酶的两个不能完全分开的峰。

6. 结论

6.1 蛋白质在梯度洗脱的液相色谱中, 以 k' 对 $B\%$ 作图的洗脱曲线有突变区。不同蛋白质的突变区对应的 B 液百分浓度不同。所以, 不同的蛋白质在不同的 B 液百分浓度下被洗脱。

6.2 在达到突变区前, 蛋白质可多次累加进样, 保留值及分离度无可觉察的变化。

6.3 不同时间进样的同一组分出峰时间差 Δt_R 与进样时间差 Δt 成正比, 而与洗脱剂的变化速率 C_u 、死时间 t_0 、等浓度洗脱时的容量因子 k'_0 近似成反比, 也与 Z 有关。为了保证合理的 Δt_R , 可通过进样时间差 Δt 、容量因子 k'_0 等来调节。

6.4 选择合适洗脱强度的 A 液, 选择性地保留某些保留强的组分, 让保留弱的组分随时随 A 液流出柱子, 多次进样后再开始梯度洗脱进行分离的方法是一种很有用的方法。在蛋白质的分离制备中应用, 可以浓缩样品, 大大提高柱子处理量, 节省时间和费用。

6.5 当样品太稀, 无法分析检测时, 用累加进样分离法可以同时完成样品的浓集和分析, 提高分析灵敏度, 解决在一次进样时无法进很大体积的样品的问题。

参考文献

- [1] 常建华, 郭立安. 蛋白质的累加进样分离法的研究[J]. 色谱, 1997, 15 (2): 141~143
- [2] 常建华, 郭立安. 有机化合物的分离与纯化[M]. 西安陕西科学技术出版社, 1997. 286~291
- [3] 梁峰, 郭治安, 高俊萍, 常建华. 在高效离子交换色谱上蛋白质的累加进样分离法的研究[J]. 分析化学, 1998, 26 (8): 955~958
- [4] 常建华. 在高效疏水相互作用色谱中蛋白质色谱特性的研究[J]. 西北大学学报, 1992, 22 (增刊): 139~144
- [5] CHANG Jian-hua, GUO Li-an, YIN Jian-ning, et al. Studies on a new concentrated and an eluted methods in hydrophobic interaction chromatography[R]. Proc. 3rd Beijing Conf. and Exhib. on Instrum. Analysis, 1989: D129
- [6] 王俊德, 李晓红, 董鹏. 无孔硅胶反相键合相用于生物大分子的高效液相色谱分离研究[J]. 色谱, 1995, 13 (5): 361~364
- [7] Geng Xindu (耿信笃), Guo Lian (郭立安), Chang Jianhua (常建华). A study on the reaction mechanism of protein in hydrophobic interaction chromatography [J]. J. Chromatogr., 1990, 507: 1~23
- [8] Benedek K, Dong S, Karger B L. Kinetics of unfolding of proteins on hydrophobic surfaces in reversed-phase liquid chromatography [J]. J. Chromatogr., 1984, 317: 227~243
- [9] J. Chang (常建华), L. Guo (郭立安), X. Geng (耿信笃). Studies on the correlation of chromatographic behaviour of biopolymers between RPC and HIC [J]. Chromatographia, 1992, 32(11/12): 589~596
- [10] 郭立安, 朱宝泉. 高效疏水作用色谱填料的合成及其在重组人干扰素纯化中的应用[J]. 高等学校化学学报, 1997, 18 (9): 1462~1464
- [11] 张维冰, 许国旺, 李瑞江, 等. 色谱累加进样分离实验条件的研究[J]. 分析测试学报, 1999, 18 (2): 21~24