

## 讲 座

# 高效液相色谱在生物医药研究中的应用

## 第三讲 蛋白质的反相高效液相色谱分离

华 家 桢

(中国科学院上海药物研究所, 200031)

近十年来, 高效液相色谱 (HPLC) 在蛋白质分离纯化方面取得了很大的进展, 并得到了广泛的应用。HPLC 包括排阻色谱、离子交换色谱、亲和色谱、疏水反应色谱以及反相色谱等, 几乎已在蛋白质分离各种传统方法中得到应用。这些方法在蛋白质分离中各有其地位, 但到目前为止人们普遍认为反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 是分离纯化蛋白质的最有效的方法之一。虽然肽的 RP-HPLC 已积累了许多成功的经验, 可供蛋白质分离时借鉴, 但蛋白质有其自身的特殊性, 这主要表现在它的分子量往往很大, 构象严格, 极度的 pH, 高盐浓度, 与有机溶剂接触, 甚至疏水吸附也会引起蛋白质变性<sup>(1)</sup>, 因此在使用 RP-HPLC 分离蛋白质时需作某些特殊的考虑。

要成功地实现蛋白质的 RP-HPLC 分离, 须从仪器、填料及流动相等三个方面进行适当的选择。

### § 3-1 仪器

仪器中对分离影响最大的是柱、泵和检测器。

**1. 泵及梯度形成<sup>(2-4)</sup>** 蛋白质在反相柱上的保留性对流动相有机溶剂浓度变化十分敏感, 浓度的少许变动往往会引起蛋白质保留时间的急剧改变, 因此蛋白质的分离必须采用梯度洗脱。形成梯度有低压及高压两种系统。低压系统不论有几种溶剂混合仅需要一个泵, 梯度在泵前形成, 其优点是价格便宜, 维修方便, 工作性能良好。

高压系统输送一种溶剂就需要一个泵, 梯度在泵后形成, 由微处理机控制, 因此流量精度高, 梯度重复性好, 使用方便, 但价格较高。

**2. 检测器<sup>(2-4)</sup>** 对于微量蛋白质的分离, 高灵敏度的检测方法十分重要。目前蛋白质的检测主要使用紫外及荧光检测器。蛋白质在 280、254 及 215nm 左右有吸收, 尤其在 215nm 附近肽键吸收很强, 可以检出 5—10pmol 的肽或 50—500ng 的蛋白质<sup>(4)</sup>, 但所用溶剂必须在此波段透明, 如乙腈等。对于常用于蛋白质分离的吡啶就不适用。有些溶剂可在 254 或 280nm 测定, 但灵敏度较差, 280nm 的检出灵敏度仅及 215nm 的 1/10。紫外检测器的优点是使用十分方便, 也有相当高的灵敏度, 为大家乐于采用, 但对溶剂要求较高。荧光检测灵敏度很高, 理想情况下可达  $10^{-15}$ mol, 溶剂只要不含胺类物质, 一般均可使用, 但蛋白质样品(除含有色氨酸者外)均须先与荧光试剂反应后再测定其衍生物的荧光。现在常用的荧光试剂主要为邻-苯二甲醛和荧光胺。荧光检测有柱前及柱后衍生之分, 柱前衍生法往往只适用于分析, 而纯化制备必须采用柱后衍生法。荧光胺柱后衍生系统另需三个泵来输送高 pH 缓冲液、荧光胺溶液及水等, 此外还须有分流装置, 以便只使小部分洗脱液用以衍生、检测。在实验室中除了紫外检测器外, 能有一套荧光检测系统对提高检测灵敏度及扩大洗脱剂的选择范围大有好处。

**3. 柱** 柱是 HPLC 系统中的心脏, 泵、梯度

系统及检测系统选定后,一般不再变动,因此蛋白质的分离主要取决于柱及流动相的选择。柱由柱管及填料组成。柱管一般为不锈钢管,常用的柱为柱径4.6mm的标准柱,现在还有直径为2mm及1mm的细内径柱供应,后两者的优点是分离时间短,溶剂省,缺点是上样量少,微径柱(内径1mm)的主要缺点在于流速很低,需要一套特殊设计的泵及检测系统<sup>(2)</sup>。分离较多量蛋白质时可用直径10mm左右的半制备柱。就标准柱而言,长度对分离的影响不大,长5cm柱的分辨率和回收率为长25cm柱的90%<sup>(3)</sup>。对于微量样品的分离,使用短柱十分方便,我们用2cm长的预柱纯化羧甲基化碱性磷酸酶取得很好的分离效果<sup>(5)</sup>。柱的选择主要是指填料的选择,我们将在下面讨论。

### § 3-2 填料

填料对分离的主要影响有以下几项:

**1. 组成** 用于RP-HPLC的主要填料为多孔的硅胶微粒,其次为有机多聚物。硅胶微粒的机械强度高,键合化学清楚,其缺点是在碱性条件下不稳定,缓冲液pH超过8就会使柱的寿命明显缩短<sup>(2)</sup>,实际使用时,pH最好不要超过7.5。在同样粒径(5 $\mu$ m)及孔径(300Å)条件下,同样键合C4,有机多聚物填料与硅胶填料在分离蛋白质时,峰宽及分辨率相仿,但有机多聚物填料具有拖尾小、收率高,对各种不同操作条件稳定性好的优点,其寿命比硅胶填料高十倍<sup>(6)</sup>。有机多聚物填料还耐高温,在150℃仍保持稳定,而硅胶填料在60℃使用十几次后柱效就明显下降<sup>(6)</sup>。但目前有机多聚物填料的键合相品种还比较少。

**2. 粒子大小与形状<sup>(1,2)</sup>** 填料的颗粒越小,单位体积颗粒的表面积就越大,分辨率也就越高,但操作压也随之升高。为使操作压不致太高,可使用短柱。现常用的为3—10 $\mu$ m的颗粒。球形颗粒可装填得比较均匀,因此柱效较好<sup>(2)</sup>。

**3. 粒孔大小<sup>(1,2)</sup>** 填料的95%表面积在孔内,填料孔太小,蛋白质就不能进入孔内,只能与颗粒外表面作用使分辨率降低,这是过去适于

小分子分离的填料不适于蛋白质分离的一个原因。现在用于蛋白质分离的填料孔径为300—500Å。孔径过大不仅使单位体积颗粒的总表面积减少,而且还会引起溶剂滞留,使蛋白质扩散减慢,这两者均使柱的分辨率降低,此外,孔径过大还会影响颗粒的机械强度。

**4. 键合相<sup>(2,3)</sup>** RP-HPLC是疏水色谱,因此需要疏水的键合相,现在的键合相是单层分布,而且通常还用三甲基氯硅烷把未反应的硅羟基戴上“帽子”,加以封闭,使硅羟基的密度大为减低,使之成为真正的反相柱。许多功能基团可作为键合相,提供非极性表面,用来分离蛋白质。现有的键合相有各种不同长度碳链的烷基、烷基苯、苯基、二苯基及氰基等。不同键合相往往有不同的选择性,有的蛋白质在C<sub>18</sub>柱上分离良好,有的却不好,有的甚至被吸附在C<sub>18</sub>柱上用高浓度的有机溶剂也洗脱不下来,但改用短碳链烷基或烷基苯柱却能得到很好的分离。一般说,长碳链键合相有可能引起蛋白质变性,而短碳链烷基键合相如C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>更适合于较大蛋白质的分离。通过不同类型键合相的选择,在流动相及梯度不变或少变情况下,可以方便地得到几种不同的洗脱图谱及回收率数据,从而可以作出较佳的选择。

### § 3-3 流动相

流动相通常由水相缓冲液及不同浓度的有机溶剂组成。流动相对蛋白质分离的影响因素主要有以下几个方面:

**1. pH<sup>(1,2)</sup>** 蛋白质与反相固定相的相互作用主要取决于蛋白质的极性,极性越小,则与疏水固定相的作用越强。流动相的低pH使蛋白质分子中的羧基质子化,从而降低了它的极性,加强了蛋白质与反相键合相的作用。氢离子对各蛋白质功能团离子化的影响取决于它们的化学组成及立体结构,因此改变pH会影响洗脱的选择性即洗脱顺序。对大多数蛋白质而言,使用低pH(2.5—3.5)的流动相可以得到最好的分离。此时填料中残留的硅羟基也不会被离子化。有些蛋白质在一定的pH范围内对pH的变化反应不大。

必须注意的是有许多蛋白质和酶在低 pH 时不稳定, 因此流动相的 pH 必须通过预试验决定, 同时还须注意不使 pH 与蛋白质的等电点太近, 以免蛋白质沉淀。

**2. 离子强度与离子对试剂<sup>(1,3)</sup>** 增加离子强度也增强了蛋白质与键合相的疏水反应。在多数情况下, 较高的离子强度 (>0.2) 可使蛋白质有较好的分辨率和回收率, 降低离子强度引起峰形变宽, 分辨率降低。但有些蛋白质如卵白蛋白及磷酸化酶 b 在低离子强度时收率反而提高。

缓冲液中的盐和酸除了起缓冲作用外还通过离子对的形成改变蛋白质的表面极性, 从而影响蛋白质的保留性。例如在低 pH 时, 蛋白质的带正电荷功能团与带负电荷的反离子形成离子对复合物 ( $R-NH_3^+ + X^- \rightleftharpoons RNH_3^+ X^-$ ), 这种复合物具有与蛋白质本身完全不同色谱性质。如果反离子是疏水的(如三氟乙酸根或七氟丁酸根), 则使形成的复合物的保留时间增加。如果反离子是亲水的(如磷酸根或甲酸根), 则使复合物的保留时间减少。实际上蛋白质保留时间的改变还涉及离子对对硅羟基的作用。从下面例子可以看出离子对试剂的奇妙功能。

在  $C_3$  柱上分离牛血清白蛋白和  $\beta$ -乳白蛋白, 在其他色谱条件相同情况下, 如用离子对试剂七氟丁酸, 这两种蛋白质在几分钟之内就可分开, 但如改用三氟乙酸, 则两者就分不开。

改变流动相的成份是轻而易举的, 却可能是使蛋白质分离获得成功的一个重要手段。流动相的选择还应考虑其挥发性, 如果 HPLC 是最终纯化步骤, 则流动相的挥发性对随后的氨基酸组成分析、顺序分析以及凝胶电泳都十分重要, 因为高盐含量会干扰这些分析。对于生物活性测定而言, 还应考虑这些盐类会不会影响随后的活性测定, 例如三乙胺磷酸盐影响某些细胞增殖的测定。

如果非用非挥发性溶剂不可, 则在进行上述分析前用适当的离心超滤管(Centricon 10 或 30)超滤脱盐(兼可浓缩), 可能是个速度快、收率高的良好弥补方法。

**3. 有机溶剂<sup>(1-3)</sup>** 通过疏水作用结合在反相柱上的蛋白质需用有机溶剂把它洗脱下来, 因此有机溶剂的选择是改变蛋白质保留性质的重要手段之一。较常用的溶剂有乙腈及丙醇, 不常用的有甲醇、乙醇、二氧六圈及四氢呋喃等。对蛋白质而言, 疏水性较大的丙醇是种较好的溶剂, 因为丙醇洗脱蛋白质的浓度比其他溶剂低, 因而减少了蛋白质变性及失活的可能性<sup>(3)</sup>。适当使用一种以上的有机溶剂如异丙醇—丁醇、乙腈—异丙醇及异丙醇—2-甲基丁醇等可进一步降低有机溶剂总浓度并改善分辨率及回收率<sup>(7)</sup>。选择溶剂时还应考虑溶剂的粘度和对检测系统的兼容性。前面已经提及蛋白质的洗脱需用梯度, 陡峭的梯度使洗脱峰尖锐, 但分辨率较低, 而浅平的梯度使峰变宽, 但分辨率较高。对于疏水性较强的蛋白质, 分析时间(即在柱上时间)越长, 收率就越低<sup>(8)</sup>, 这点也是需要注意的。

**4. 表面活性剂<sup>(8)</sup>** 表面活性剂常用来溶解蛋白质, 有些表面活性剂与反相填料引起不可逆结合, 从而改变了填料的保留特性。一般说来, 阳离子和阴离子型表面活性剂对蛋白质分离不利, 非离子型者对分离影响不大, 而两性离子型表面活性剂可以减少高分子量疏水性较强蛋白质的拖尾, 从而使分离得以改善。

**5. 温度<sup>(1,2,8)</sup>** 蛋白质在 RP-HPLC 过程中构象会发生变化, 这也与温度有关。如核糖核酸酶在 37°C 呈单一尖峰, 但随着温度下降它的峰形变得越来越宽广。这是因为在 37°C 它达到充分变性(可逆性变性), 以单一的变性后构象存在, 而在 37°C 以下时, 天然构象与充分变性构象之间存在一个缓慢的平衡, 导致峰形变宽<sup>(8)</sup>。

提高柱温往往可以改变蛋白质的保留时间和收率, 但必须考虑到提高温度也会引起蛋白质的不可逆变性和失活, 因此蛋白质分离一般在室温或低温下进行。蛋白质样品在分析前最好贮存在 5°C 以下, 这样有利于提高收率<sup>(8)</sup>。对于热敏的蛋白质和酶的低温 HPLC, 一个简单的方法是将 HPLC 柱浸没在装有冰水的 2 升量筒或其他适当容器中, 并在圆盘形部分收集器的试管盘中也

放入冰水, 以使柱和接收试管的温度保持在 4℃ 左右。

**6. 流速<sup>(2)</sup>** 由于蛋白质的分子大, 扩散慢, 所以较低的流速有利于提高分辨率。常用的流速为 0.5—1ml/min 左右。

蛋白质的 RP-HPLC 机制非常复杂, 迄今还不十分明了, 尚未找到普遍适用的规律, 因此蛋白质样品的 RP-HPLC 必须通过实践才能获得最佳的分离条件。由于许多蛋白质和酶对于周围环境条件相当敏感, 容易变性失活, 因此在进行 RP-HPLC 之前对欲选的缓冲液、pH、温度及有机溶剂等须作适当的预试验, 以确定这些条件是否合适。缓冲液中加入某些盐类可以改善某些酶的活性, 如加入 2mM CaCl<sub>2</sub> 可以保护胰蛋白酶的活性<sup>(9)</sup>, 1mM MgCl<sub>2</sub> 及 0.02mM ZnSO<sub>4</sub> 可改善碱性磷酸酶的稳定性<sup>(5)</sup>, 有利于 RP-HPLC 分离。某些分离条件引起蛋白质变性可导致峰的多重化, 如钙结合蛋白—钙调素及拟清蛋白等在 RP-HPLC 分离时可能出现难以确定的宽峰, 但当流动相中加入 CaCl<sub>2</sub> 或螯合剂乙二醇四乙酸(EGTA)时, 这些蛋白质就以尖峰洗脱出来, 因此对这种需要特殊辅助因子的蛋白质在分离前应将这种因子除去, 或者把辅助因子加到缓冲液中, 以避免峰的多重化<sup>(10)</sup>。对于非常难溶的疏水蛋白质的 RP-HPLC 可以试用 60% 甲酸—乙腈(或异丙醇)系统<sup>(11)</sup> 或常用的三氟乙酸—乙腈系统(但用 6M 盐酸胍溶解蛋白质)<sup>(12)</sup>, 这两个系统分别在分离脊髓灰质炎病毒及细胞巨化病毒结构蛋白方面获得良好结果。在摸索条件过程中, 如在第一次梯度洗脱时, 所要的蛋白质不一定能从柱上洗脱下来, 因为它可能不可逆地结合在柱上, 或者被有机溶剂沉淀析出, 或者被一开始出来的溶剂峰或其他成份峰所掩盖, 因此需用其他方法进行校核<sup>(1)</sup>, 如用生物活性检定, SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶色谱) 或放射性测定等。即使到了最后纯化步骤, 所得单一尖峰的纯度也还得用其他方法如

SDS-PAGE 加以证实<sup>(4)</sup>。

虽然有些蛋白质的纯化只用一步 HPLC 就可解决, 如 64K 糖蛋白<sup>(12)</sup> 及单抗 IgG<sup>(13)</sup>, 但生物体内许多蛋白质和酶含量很低, 其分离纯化往往不是靠一次 HPLC 所能解决的, 而必须把几种分离技术结合起来才能达到目的。几种分离方法必须作适当的安排, 例如离子交换色谱、疏水反应色谱和排阻色谱最好在 RP-HPLC 之前进行, 这样在最后通过 RP-HPLC 时可以一次达到纯化、脱盐或浓缩的目的。

下面是一个大分子蛋白质——成人肠碱性磷酸酶(分子量 14.4 万)的纯化实例<sup>(14)</sup>。其纯化步骤包括丁醇处理、丙酮沉淀、离子交换层析(DE Nugel)(图 3-2A)、凝胶过滤(Sephadex G-200)(图 3-2B), 最后在甲基(C<sub>1</sub>)键合相柱上进行 RP-HPLC(图 3-2C), 得到分离良好, 与活性峰完全一致的单一尖峰 SDS-PAGE 显示其为单一色带(图 3-1), 氨基酸顺序分析得到了满意的结果。

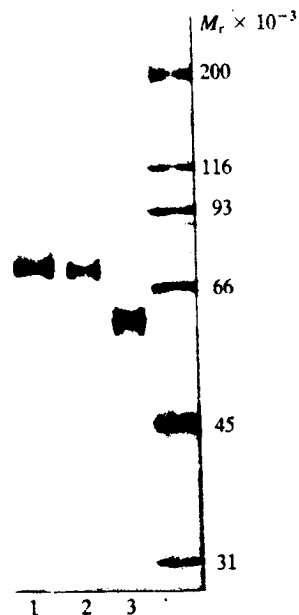


图 3-1 肠碱性磷酸酶的 SDS-PAGE

1. 成人肠碱性磷酸酶
2. 胎儿肠碱性磷酸酶
3. 牛肠碱性磷酸酶

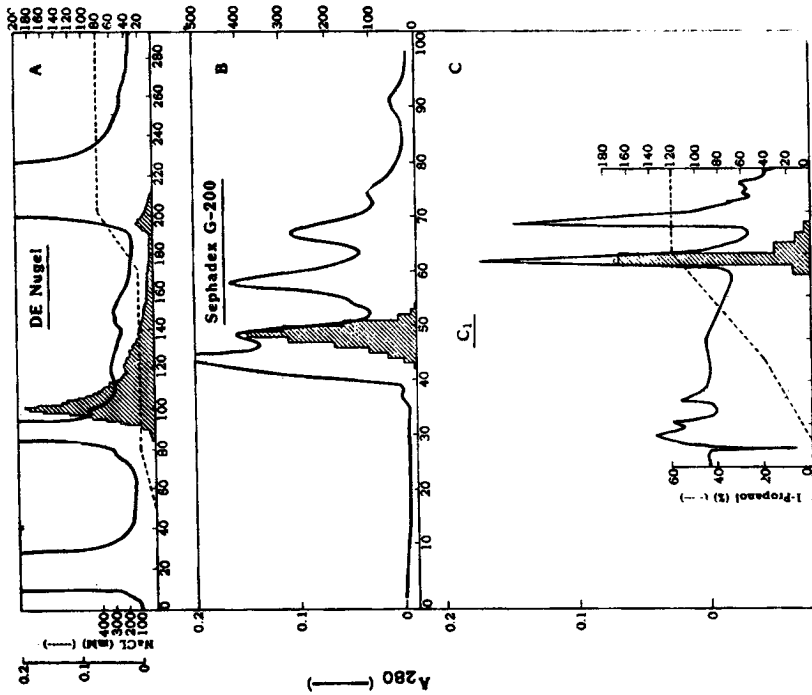


图 3-2 成人肠碱性磷酸酶的纯化

- A. 成人肠碱性磷酸酶提取物在 DE-Nugel 柱(2.5×10cm)上的离子交换色谱
  - B. A 的第 100-115 管在 Sephadex G-200 柱(2.5×90cm)上的排阻色谱
  - C. B 的第 49 管在甲基(C<sub>1</sub>)柱(0.46×25cm)上的反相高效液相色谱
- 碱性磷酸酶活性(单位) ■■■

### 参 考 文 献

<p>(1) W.S. Hancock, J.T. Sparrow, in "High Performance Liquid Chromatography Vol. 3" (ed.C. Horvath), Acad. Press Inc. Orlando, Florida, P.49, 1983.</p> <p>(2) R.L. Potter, R.V. Lewis, in "High Performance Liquid Chromatography Vol.4"(ed. C. Horvath), Acad. Press Inc., Orlando, Florida, p.1,1986.</p> <p>(3) P.E. Petrides, in "Methods of Protein Microcharacterization"(ed.J.E. Shively), The Homana Inc., P.3,1986.</p> <p>(4) J.E. Shively, <i>ibid</i>, P.41,1986.</p> <p>(5) J.C. Hua et al., Arch. Biochem. Biophys., 241,380(1985).</p> <p>(6) W. G. Burton et al., J. Chromatogr., 443, 363 (1988).</p>	<p>(7) J.P. Chang et al., J. Chromatogr., 318, 11(1985).</p> <p>(8) K.D. Nugent et al., J. Chromatogr., 443, 381(1988).</p> <p>(9) K.Titani et al., Anal. Biochem., 123, 408(1982).</p> <p>(10) M. W. Berchtold et al., Anal. Biochem., 129, 120(1983).</p> <p>(11) J.Heukeshoven, R. Dernick, J. Chromatogr., 326, 91(1985).</p> <p>(12) B.R. Clark et al., J. Biol., 49, 279(1984).</p> <p>(13) C.Poiesi et al., J. Chromatogr., 465, 101(1989).</p> <p>(14) J. C. Hua et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2368(1986).</p>
---	--