

蛋白质分离介质的选择

(二、配基及基质的选择)

蛋白质分离介质选择要同时考虑两方面，一是配基，也就是选择色谱模式；二是选择基质，包括基质的种类和排阻极限的选择。

根据目标产品与杂质的性质差异选择介质是介质选择的主要依据。选择了介质也就是选择了分离模式。

目标产品与杂质在分子大小、等电点 pI 、不失活或可逆失活条件下的疏水性、与亲和配基的作用四种性质上的差异是介质选择的主要依据之一。产品与杂质某方面的性质有大的差异，就可用来做为分离方法选择的依据。目标产品与杂质分子大小差异大可用凝胶色谱分离；等电点 pI 差异大可用离子交换色谱分离；不失活或可逆失活条件下的疏水性差异大可用疏水色谱分离；与某个亲和配基有特异作用的可用亲和色谱分离。

在凝胶色谱、离子交换、疏水和反相、亲和类色谱中，反相色谱一般容易使样品失活，常用于定性、定量分析和氨基酸序列分析，不太用于制备；其他的色谱方法，只要条件选择合适，都可以得到高的活性回收率，可以用于制备分离。

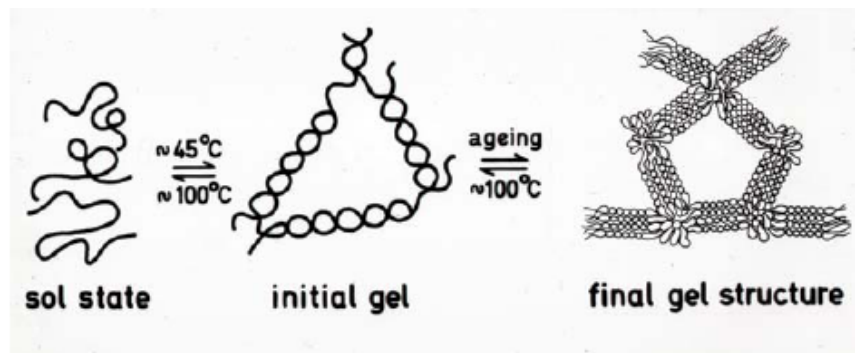
基质主要有 3 大类：聚多糖，如交联琼脂糖、葡聚糖基质；硅胶和多孔玻璃；有机聚合物（聚苯乙烯等）。

由于目标产品限定在蛋白质，分子量比较大，用于小分子的小孔填料肯定不能用。因为，多孔填料的总的表面积，有 90~95%是在孔内，球型填料的球面上的面积只占有 5~10%。小孔填料的柱容量太小。

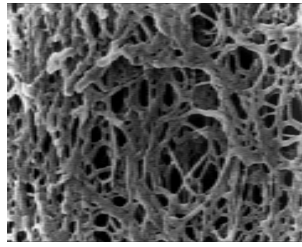
大孔硅胶和多孔玻璃，与蛋白质生物相容性差，大孔硅胶价格贵，表面活性基团少，制备的填料会残留酸性的硅羟基，造成非特异性吸附。大孔有机聚合物疏水性强，与蛋白质生物相容性太差，不作亲水性处理无法用于蛋白质分离。

交联琼脂糖、葡聚糖基质是最适合用于蛋白质分离的基质材料，这两类材料生物相容性好，无非特异性吸附，表面有大量羟基，可用于连接配基，制得各种填料。

琼脂糖介质利用琼脂糖热溶液冷却可凝胶化的特点制备成微球，热溶液在冷却时先形成螺旋状纤维束，最后形成纤维束网状结构，形成的孔的大小（也就是排阻极限）取决于糖浓度。见下图。



下图是琼脂糖微球的电镜图，显示了其微观结构特征。



琼脂糖微球及其交联后的产品一般叫 4B、CL4B、4FF、6B、CL6B、6FF，这些产品再键合上不同基团得到离子交换、疏水、亲和色谱填料。4B、CL4B、4FF 制备时的糖浓度为 4%，排阻极限为 6 万~2000 万。6B、CL6B、6FF 制备时的糖浓度为 6%，排阻极限为 1 万~400 万。4B、6B 耐压低；CL4B、CL6B 耐压稍高一点，仍很低；4FF、6FF 耐压较高，使用压力可到 0.15 或 0.3MPa。

葡聚糖是线形结构，用环氧氯丙烷交联成球。因糖浓度和交联度不同，得到不同排阻极限的微球。葡聚糖微球排阻极限范围小些，在使用时不同条件下柱体积会有较大的变化，已逐渐较少用于离子交换、疏水、亲和色谱，较多用于凝胶色谱。

1. 凝胶色谱

蛋白质凝胶色谱介质是一些表面亲水性的多孔微球，主要是使用无配基的交联琼脂糖、葡聚糖基质介质；其他如改性大孔硅胶基质、改性大孔有机聚合物基质一般用于分析。理想的凝胶色谱基质在与样品接触部分不应有离子基团，尽可能少的疏水基团。

大家知道，凝胶色谱分离机理是分子量大的能进入胶的大孔，进入浅，流出快；分子小的进入胶的大孔和较小的孔，进入深，流出慢。

选择凝胶色谱介质要特别注意其排阻极限。下面为琼脂糖、葡聚糖基质凝胶色谱介质品种及性能表。

凝胶品种	排阻极限	耐压 MPa	应用	生产厂家
琼脂糖 4B/CL4B/4FF	6 万~2000 万	0.008/0.012/0.15	大分子	西安保赛，美国 GE
琼脂糖 6B/CL6B/6FF	1 万~400 万	0.02/0.03/0.3	大分子	西安保赛，美国 GE
葡聚糖 25	1000~5000	0.15	脱盐，肽	西安保赛，美国 GE
葡聚糖 50	1000~30000		脱盐，肽，分子量测定	西安保赛，美国 GE
葡聚糖 75	3000~80000		小分子量蛋白质分离，分子量测定	西安保赛，美国 GE
Sephacryl s-100	$10^3 \sim 10^5$	0.2	肽，小蛋白	美国 GE，保赛在研
Sephacryl s-200	$5 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^5$	0.2	蛋白质	美国 GE，保赛在研
Sephacryl s-300	$10^4 \sim 1.5 \times 10^6$	0.2	蛋白质	美国 GE，保赛在研

凝胶色谱上样量较小；分辨率较差，分开的球形蛋白质分子量差异至少要在 30% 以上。

多糖基质的凝胶色谱介质表面会有微量的羧基，流动相中要加少量盐抑制离子交换作用。

凝胶色谱常用在分离工艺的末尾。

2. 离子交换色谱

蛋白质表面在溶液中一般都带电荷，带电荷的类型取决于蛋白质 pI 和溶液的 pH。pH 小于 pI 时蛋白质带正电，pH 大于 pI 时蛋白质带负电。不同的等电点的蛋白质在同一个溶液中，表面带电情况不同。离子交换色谱法就是利用不同的蛋白质有不同的等电

点在同一个溶液中表面带电情况不同实现分离。

在近似处理中，将蛋白质分子和交换基团看作点电荷，它们之间的作用力 F 为：

$$F = q_1 \cdot q_2 / \epsilon r^2$$

q_1, q_2 分别为蛋白质分子和交换基团两个点电荷的电量； ϵ 为介质介电常数； r 为两点电荷间的距离。

在离子交换色谱中交换基团的电荷和大小是不变的，而样品的电荷（表面带电情况）和大小是不同的，受到交换基团的作用力也不同，从而实现分离。

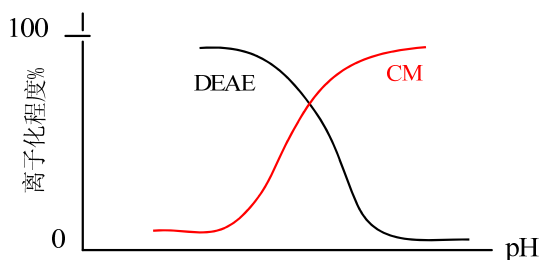
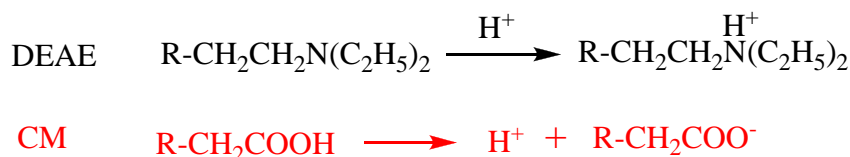
与凝胶色谱基质一样，离子交换介质的基质也有 3 类：交联多糖如交联琼脂糖、交联葡聚糖，大孔硅胶和多孔玻璃，大孔有机聚合物（聚苯乙烯等）。在蛋白质的离子交换分离中主要使用交联多糖，特别是交联琼脂糖基质介质，有强阴、弱阴、强阳、弱阳 4 种，下面为国内外离子交换色谱介质的名称、基质、交换基团等性质的表格。

名称	交换基团	基质	应用	生产公司
强阴(Q)	$\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	交联琼脂糖 CL6B/6FF	蛋白质分离，除内毒素	西安保赛，美国 GE
弱阴(DEAE)	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	交联琼脂糖 CL6B/6FF	蛋白质分离，	西安保赛，美国 GE
强阳(SP)	$(\text{CH}_2)_3\text{SO}_4^-$	交联琼脂糖 CL6B/6FF	蛋白质分离	西安保赛，美国 GE
弱阳(CM)	CH_2COOH	交联琼脂糖 CL6B/6FF	蛋白质分离	西安保赛，美国 GE

离子交换填料吸附量大（见下表），分辨率好，可用在工艺的任何一步。但是上样时样品溶液中盐浓度（即离子强度）不能太大，否则会不保留或分辨率差。现在有一些新的介质产品，可以允许样品溶液有较大的盐浓度。

名称	交换基团	最大吸附量 (mg/ml)	pH 工作范围	生产公司
强阴(Q)	$\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	120HSA	2~12	西安保赛，美国 GE
弱阴(DEAE)	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	110HSA	2~9	西安保赛，美国 GE
强阳(SP)	$(\text{CH}_2)_3\text{SO}_4^-$	70RNase	4~13	西安保赛，美国 GE
弱阳(CM)	CH_2COOH	50RNase	5~10	西安保赛，美国 GE

离子交换填料配基只有带电荷才能对蛋白质有吸附。强阴(Q)和强阳(SP)介质的离解度很大，所以 pH 工作范围很宽；但弱阴(DEAE)和弱阳(CM)填料在一定的 pH 范围内离解，pH 工作范围有较大的局限。（见上表和下表）

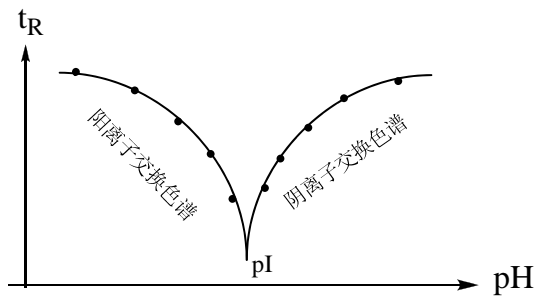


交换基团离子化程度与pH的关系

弱阴(DEAE)在较小 pH 值时离解度较大；而弱阳(CM) 在较大 pH 值时离解度较大。

强阴(Q)和强阳(SP)在溶液中几乎完全离解,与pH关系不大。

蛋白质的保留与其pI及溶液的pH值有关。



蛋白质的保留值 t_R 与pH值的关系

从以上两点看,使用弱阴(DEAE)时较小pH值离解度较大,但要大于蛋白质等电点才有保留,而弱阳(CM)较大pH值离解度较大,但要小于蛋白质等电点才有保留。要兼顾离解度和保留值对溶液pH的要求。弱阳(CM)常在酸性下如pH5.0使用,此时适合pI大于5.0的蛋白质样品,pI越大保留值越大。弱阴(DEAE)常在碱性如pH8.0使用,此时适合pI小于8.0的蛋白质样品,pI越小保留值越大。强阴(Q)和强阳(SP)的pH使用范围更大。

3. 疏水色谱

蛋白质表面有些疏水基团,在裂隙内部疏水基团更多,在较大浓度的盐水体系中与疏水填料配基会有疏水作用而保留,在稀盐溶液中蛋白质被洗脱。

疏水色谱只能用于生物大分子的分离,不能用于小分子分离,常用于前几步工艺的初步分离和蛋白质复性中。疏水色谱上样量一般小于离子交换色谱而大于凝胶色谱;分辨率也是小于离子交换色谱而大于凝胶色谱。其特别之处在于上样时盐浓度可以很大,盐浓度越大,保留越大。

在以上所说疏水色谱使用的盐是指盐析性盐,如 $(NH_4)_2SO_4$ 、 Na_2SO_4 等。在这些盐的浓溶液中蛋白质溶解度减小,但稳定性增加。另一种盐叫盐溶性盐,如盐酸胍和硫氰酸盐,在这些盐的浓溶液中蛋白质溶解度增大,但稳定性减小,甚至可逆性失活。盐溶性盐不能用于疏水色谱流动相。

用于蛋白质制备的疏水介质的基质是琼脂糖。配基主要有丁基、辛基和苯基。

名称	配基	疏水性	应用	生产公司
丁基琼脂糖微球	$-OC_4H_9(-NC_4H_9,-SC_4H_9)$	弱	乙肝疫苗、蛋白质等分离	西安保赛, 美国 GE
辛基琼脂糖微球	$-OC_8H_{17}$	中	蛋白质分离	西安保赛, 美国 GE
苯基琼脂糖微球	$-OPh$	强	蛋白质分离	西安保赛, 美国 GE

4. 亲和色谱

分子识别在色谱中的应用就是亲和色谱。生物大分子对亲和色谱配体(某些基团或分子)有特异性作用,形成一种特殊的分子间作用。这种作用是多种作用力(疏水力、静电力、氢键力、范德华力等)的综合作用结果加上立体适配作用的集成。配体对溶液中分子的作用是有选择性的,只对一类或一种生物大分子起作用而使其保留,对其他物质不起作用。就象一把钥匙开一把锁,有人也把这亲和作用叫锁钥作用。

亲和色谱是一种分离度最高的色谱法,但只能用于生物大分子分离。做好亲和色谱的关键是选好配体和色谱条件。

亲和色谱最常用的基质是琼脂糖凝胶，根据目标蛋白质的分子量大小选用凝胶。分子量在百万以上选用 4B (CL4B, 4FF) 系列，分子量稍小些的选用 6B (CL6B, 6FF) 系列。CL 系列键合密度大，FF 系列耐压高、机械性能好。

要根据分离对象选择合适的配体，配体应对某一个样品或某一类样品有特异性吸附。我们现在已经知道的有些配体如底物和抑制剂对酶、抗体对抗原有特异性吸附；有些配体对某一类样品有特异性吸附，如刀豆球蛋白对糖蛋白、某些三嗪染料对干扰素及某些蛋白、对氨基苯甲脒对含丝氨酸的蛋白质有吸附。（详见有关专著）

商品化的亲和色谱介质品种不多，见下表。

品种	规格	应用	生产公司
环氧活化琼脂糖微球	环氧值 20~40 $\mu\text{mol/ml}$	亲和色谱中间体，可偶联带 NH_2 、 SH 、 OH 的配基	西安保赛，美国 GE
BrCN 活化琼脂糖微球		亲和色谱中间体，可偶联带 NH_2 的配基	西安保赛，美国 GE
赖氨酸琼脂糖微球 4B	0.6mg 血纤维蛋白溶酶原/ml	纯化血纤维蛋白溶酶原等	西安保赛，美国 GE
肝素高流速琼脂糖微球	$\geq 3\text{mg}$ 凝血酶/ml	纯化抗凝血酶III、凝血酶	西安保赛，美国 GE
明胶琼脂糖微球 4B/4 FF	1mg 血纤维结合蛋白/ml	纯化或去除血纤维结合蛋白	西安保赛，美国 GE
蓝色染料琼脂糖微球	18mg HSA/ml	生物大分子的纯化分离	西安保赛，美国 GE
金属螯合琼脂糖微球	24~30 $\mu\text{mol/ml}$ Zn^{+2}	与金属有作用的蛋白质纯化	西安保赛，美国 GE

亲和色谱种类太多，很多情况下买不到商品填料，要自己合成。可以根据配基活性基团的种类选择购买活化琼脂糖微球再合成是比较方便的途径。也可以购买交联琼脂糖自己从头合成。（见相关专著）

（常建华）