

蛋白质分离介质的选择之 ——蛋白质分离工作的特殊性

蛋白质的分离纯化有多类方法，如沉淀法（特别常用盐析法、等电点沉淀法、有机溶剂沉淀法）、膜分离法（超滤法、透析法）、色谱法、离心分离法等。每类方法有其自己的特点和适用范围。如粗提常用沉淀法，精提就不会用沉淀法。这些方法中，应用最广的是色谱法。

色谱法，在生化和医药行业叫层析。但中国化学会、中科院相关部门及有关期刊都规定要叫色谱。在国家有关色谱名词术语的国家标准中“chromatography”一词翻译成“色谱”。故在此我们将柱分离叫色谱。柱内的分离介质一般也叫填料、固定相。

在蛋白质色谱纯化中最重要的是分离介质和色谱条件的选择。有些从事分离工作的人，拿到样品后常不知道怎么办。其实这两者的选择只要根据分离对象和每种色谱的分离机理来考虑，就可以自行设计分离方案。蛋白质分离介质的选择应从蛋白质分子结构入手考虑。

与一般小分子的天然产物和合成化合物的分离纯化工作比起来，蛋白质的分离有许多特殊性。

1.蛋白质分子的结构决定了其分离工作的方法选择。

蛋白质分子量大，都在6KD以上，是由多个氨基酸按一定序列通过肽键组合成肽链，再由一个或多个肽链通过共价键和非共价键组合成有复杂三级、四级结构的蛋白质分子。蛋白质还可能与糖、脂及核酸结合得到结合蛋白，不同的结合蛋白在性质上会有差异。蛋白质的外形为球状和纤维状，其大小因其分子量不同差异很大。故可以用排阻色谱、超滤和膜法分离大小不同的蛋白质。

蛋白质与氨基酸一样，会两性离解，在不同的pH下形成正离子或负离子，蛋白质也有等电点。在相同的pH下，不同的蛋白质表面带电情况不一样，故可以用离子交换色谱分离蛋白质。

蛋白质的氨基酸残基会有一些苯基、烷基等疏水性基团，这些疏水侧链在水相中会尽可能避开水相而藏于蛋白质分子内部，形成蛋白质分子外部亲水性基团多，疏水性基团多在蛋白质裂隙内部的情况，在不同条件下蛋白质裂隙会有不同的伸展而

暴露出内部的疏水基团。在同一个介质中，不同蛋白质表面的疏水性不同，可以用疏水相互作用色谱和反相色谱分离。

生物大分子有一个特性，某些分子或基团对它们有特异性很强的吸附作用。这种作用只针对一种或一类目标物质。如抗体特异性吸附抗原，苯甲脒对含丝氨酸的蛋白质有吸附作用。这就是亲和色谱的应用原理，一般的小分子是不会有这种特异性吸附作用的。

2.要特别注意保持样品的生物活性。

蛋白质有复杂的三级、四级结构，热、光和化学品会导致其理化性质改变和生理活性丧失，这叫失活。失活有可逆和不可逆两种。不可逆失活的蛋白质常是固体，不溶于水和溶剂，不再具有蛋白质原有的生理性质。可逆失活的蛋白质可用不同的复性方法恢复其原有的生理活性。

蛋白质在选择和评价分离纯化的方法、介质和色谱条件时，不仅要注意样品的质量回收率，还特别要重视活性回收率。要保持样品的生物活性，在分离方法、填料、色谱条件和操作工艺上要注意。

在排阻、离子交换、疏水和反相、亲和四类色谱中，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。

3.使用的色谱介质要注意其合适的分子量适用范围。

一般的介质都是多孔的，多孔介质的比表面有90%~95%是在孔内。分离时充分利用孔内表面，柱容量才能大。所以要根据样品分子量选择具有合适的孔的介质。在排阻色谱中孔的大小用排阻极限表示；其他色谱用分子量适用范围表示，实际是其基质的排阻极限。

常用的蛋白质分离介质是琼脂糖和葡聚糖系列。琼脂糖的分子量适用范围取决于制备时琼脂糖的浓度，大家熟悉的4B，糖的浓度是4%，适用 $6 \times 10^4 \sim 2 \times 10^7$ 分子量；6B，糖的浓度是6%，适用 $1 \times 10^4 \sim 4 \times 10^6$ 分子量。葡聚糖系列的分离范围要看产品说明书，从几千到上千万不等。

常用的硅胶系列孔径有用于小分子的6~12nm；有用于一定分子量蛋白质的30、50、100nm。

4.生物大分子有不同于小分子的色谱特性。

包括蛋白质在内的生物大分子有一些特别的色谱性质。

在梯度洗脱的色谱，如反相色谱、疏水色谱、离子交换中，强洗脱剂的浓度对保留值（容量因子）作图有明显的突跃。在蛋白质分离的许多问题可由此得到解释。

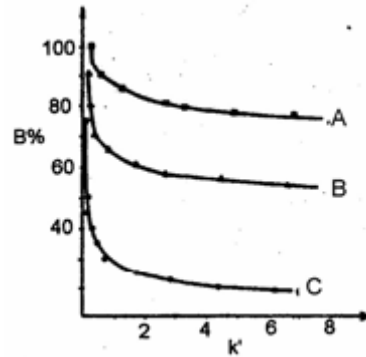


图1蛋白质HIC中 k' 与B%的关系

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。有机小分子没有此突跃。

5. 紫外检测器检测波长固定在280nm和220nm。

280nm是检测蛋白质中的苯基，220nm是检测肽键。蛋白质检测实际常在选用280nm检测波长。

（常建华）