

Protein Purification

Protocols and Applications

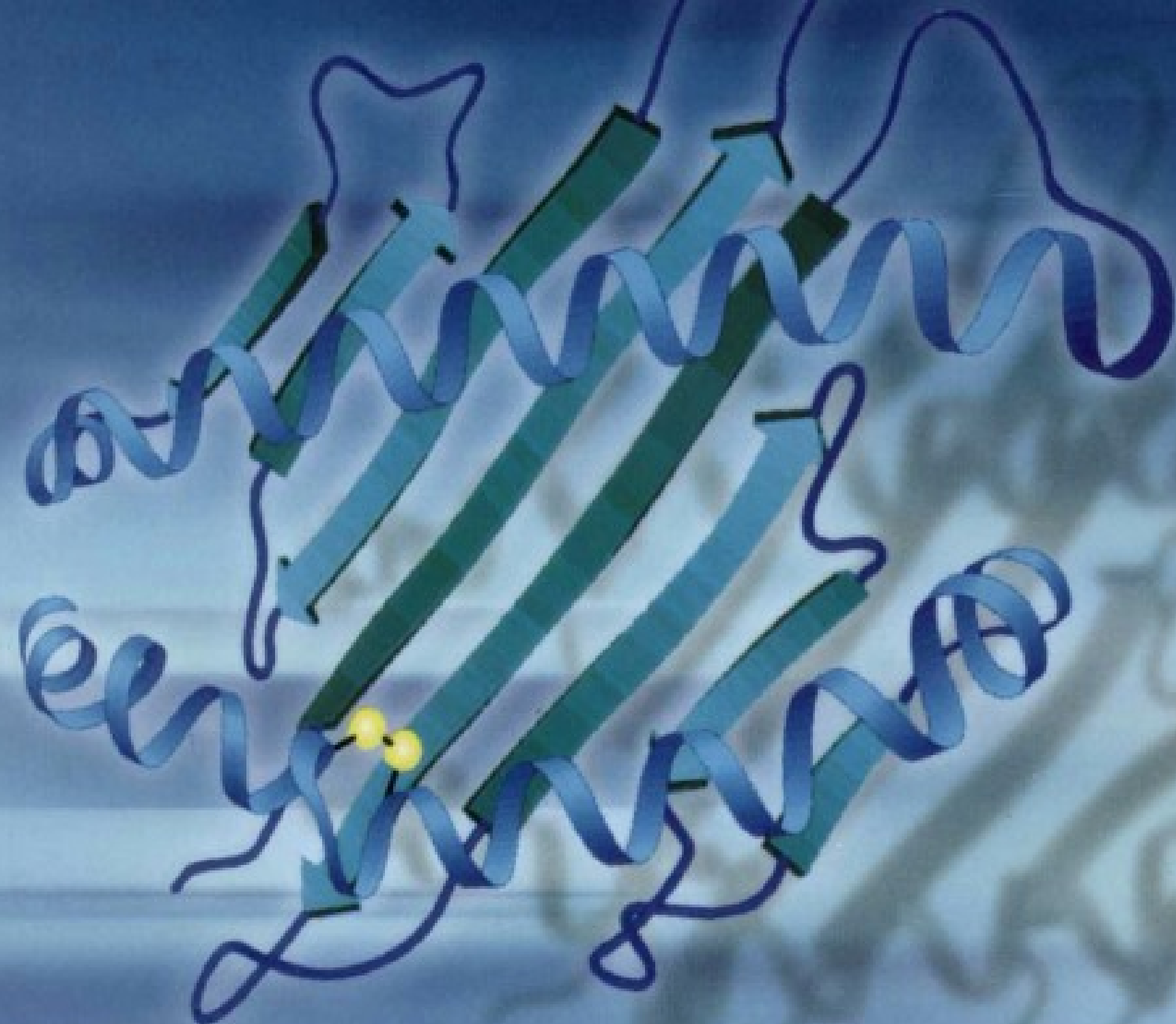
蛋白质纯化 实验方案与应用

吕宪禹 主编



化学工业出版社

蛋白质纯化
吕宪禹 主编
PDG



内容导读

本书详细介绍了各类蛋白质纯化实验技术，包括材料的预处理、蛋白质的粗提、经典色谱方法、高效液相色谱、质谱、电色谱、分子印迹、电泳以及蛋白质检测的实验方案及应用实例。

→ 强调可操作性，对每一项实验技术，都系统介绍其原理方法和实验过程，特别注重讲解问题分析及解决方案，让读者了解到每一点成就都是建立在大量方案设计、具体步骤以及实验结果的正确处理的基础之上。

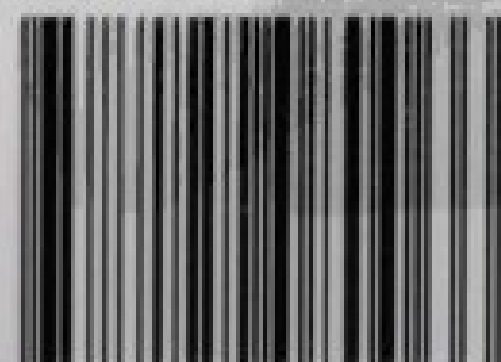
→ 不仅含有经典的实验技术，还特别突出了当前实验的新理论、新技术与新发展，给予蛋白质纯化专业人员以借鉴和引导作用。

本书对于遗传学、细胞生物学、分子生物学，以及医学和生物工程领域研究人员开展蛋白质相关研究，具有很强的参考价值。

销售分类建议：生物 / 生物技术

定价：58.00 元

ISBN 978-7-122-08006-6



9 787122 080066 >

Protein Purification

Protocols and Applications

蛋白质纯化 实验方案与应用



化学工业出版社

· 北京 ·

化学工业出版社
PDG

图书在版编目 (CIP) 数据

蛋白质纯化实验方案与应用/吕宪禹主编. —北京:
化学工业出版社, 2010.5

(生物实验室系列)

ISBN 978-7-122-08006-6

I. 蛋… II. 吕… III. 蛋白质-提纯 IV. Q51

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 050613 号

责任编辑: 傅四周

文字编辑: 菅京岩

责任校对: 宋 玮

装帧设计: 关 飞

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装: 三河市延风印装厂

720mm×1000mm 1/16 印张 13 $\frac{3}{4}$ 字数 263 千字 2010 年 6 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 58.00 元

版权所有 违者必究

编写人员名单

主 编 吕宪禹

副主编 孙 蕾 陈小刚 周 浩

编写人员 (以姓氏笔画为序)

吕 喆 吕宪禹 孙 蕾 吴 迪

陈小刚 苗会娟 周 浩 周先虎

周爱玲 赵 莉 高金珉 裴朝玉



出版者的话

21世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20世纪后叶现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为21世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如17世纪Leeuwenhoek等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973年Cohn和Boyer完成了DNA体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988年Kary Mullis发明的PCR技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学无时无刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和促进了实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化学工业出版社组织出版了“生物实验室系列”图书。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每

一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，约请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

“生物实验室系列”图书的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望“生物实验室系列”图书的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的科学工作者致以崇高的敬意！

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社
生物·医药出版分社



前 言

在当前日益广泛的蛋白质结构和功能研究中，尤其是在从生物材料中进行多种蛋白的分离、纯化和鉴定的研究中，蛋白质样品的分析和制备技术的应用日益广泛。特别是当前分子生物学和现代医学的发展对不同生物组织中蛋白的研究日益增多，了解和掌握此类蛋白分析、分离的现代化方法，对于研究者来说显得尤为重要。

生命科学是实验性很强的科学，所以生命科学的发展对实验技术提出了更高要求。为了有助于生命科学工作者进一步了解蛋白纯化相关实验，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，我们编写了《蛋白质纯化实验方案与应用》。

本书详细介绍了材料的预处理、蛋白质的粗提、经典色谱分离、高效液相色谱、质谱、电色谱、分子印迹、电泳以及蛋白质检测的基本原理及实验设计方案。本书强调可操作性，对每一项实验技术都系统介绍其原理方法和实验过程，让读者了解到每一点成就都是建立在大量方案设计、具体步骤以及实验结果的正确处理的基础之上的。其中不仅含有经典的实验技术，还特别突出了当前实验的新理论、新技术与新发展，给蛋白质纯化专业人员以借鉴和引导作用。

本书的完成离不开南开大学生命科学学院相关实验室的老师和同学们的大力支持，同时 GE 公司提供的案例对编者启发很大，在此一并表示感谢。

由于水平所限，本书中涉及的某些特殊领域，编者未能面面俱到，同时书中错漏之处在所难免，敬请广大读者批评指正。

编者

2010年4月

资源分享网
PDG

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 蛋白质的研究历史	1
1.2 蛋白质的理化性质和生物学特性	1
1.3 蛋白质纯化手段的历史回顾	2
1.4 纯化蛋白的应用	2
参考文献	3

第 1 部分 材料的预处理和蛋白质的粗提

第 2 章 不同来源材料的预处理	6
2.1 不同材料的预处理	6
2.1.1 植物材料的预处理	7
2.1.2 动物材料的预处理	7
2.1.3 微生物材料的预处理	8
2.2 细胞的破碎	8
2.2.1 机械法	9
2.2.2 非机械法	11
方案 2.1 超声波法提取烟草叶中的 3-磷酸甘油脱氢酶	12
方案 2.2 从猪胰脏中提取胰凝乳蛋白酶	13
方案 2.3 从大肠杆菌中提取诱导表达的 (His) ₆ -X	14
参考文献	16
第 3 章 蛋白质的沉淀	17
3.1 盐析法	17
3.2 有机溶剂沉淀法	18
3.3 等电点沉淀法	19
3.4 非离子多聚物沉淀法	19
3.5 选择性沉淀法	20
方案 3.1 用盐析法选择性沉淀蛋白质	21
方案 3.2 用有机溶剂沉淀蛋白质	22
方案 3.3 使用蛋白质排阻和拥挤剂选择性沉淀蛋白质	23
参考文献	24

第 4 章 蛋白质的浓缩	26
4.1 吸附法	26
4.2 超滤法	27
4.3 沉淀法	28
4.4 透析法	28
4.5 冷冻干燥法	28
4.6 双水相分离法	29
方案 4.1 用透析袋进行脱盐、浓缩和更换缓冲液	29
方案 4.2 用不对称圆盘膜超滤进行浓缩或透析	31
参考文献	32

第 2 部分 色谱法分离纯化蛋白质

参考文献	35
第 5 章 凝胶过滤色谱	36
5.1 基本原理	36
5.2 实验方案设计	37
5.2.1 凝胶介质的选择	37
5.2.2 凝胶介质的预处理	37
5.2.3 色谱柱的选择	38
5.2.4 凝胶柱的装填	38
5.2.5 样品处理和上样	38
5.2.6 洗脱和收集	39
5.2.7 色谱柱的清洗、再生与保存	39
方案 5.1 用凝胶过滤色谱更换缓冲液	39
方案 5.2 凝胶过滤色谱分离三种分子量不同的蛋白质	41
参考文献	43
第 6 章 离子交换色谱	44
6.1 基本原理	44
6.2 实验方案设计	46
6.2.1 离子交换介质的选择	46
6.2.2 流动相的选择	47
6.2.3 色谱柱的选择	47
6.2.4 离子交换剂预处理和装柱	47
6.2.5 加样	48
6.2.6 洗脱	48
6.2.7 洗脱组分的收集和分析	49

6.2.8	离子交换剂的再生、清洗与储存.....	49
方案 6.1	弱阴离子交换色谱和强阳离子交换色谱在分离纯化单克隆 抗体中的应用	49
	参考文献	53
第 7 章	亲和色谱	54
7.1	基本原理.....	54
7.2	亲和色谱的几种类型.....	55
7.2.1	金属螯合亲和色谱.....	55
7.2.2	免疫亲和色谱.....	56
7.2.3	凝集素亲和色谱.....	56
7.3	实验方案设计.....	56
7.3.1	亲和吸附剂的选择.....	56
7.3.2	装柱.....	56
7.3.3	上样.....	57
7.3.4	吸附.....	57
7.3.5	流速和清洗.....	57
7.3.6	洗脱.....	57
7.3.7	再生和保存.....	58
方案 7.1	亲和色谱纯化抗体融合蛋白	58
方案 7.2	金属螯合亲和色谱分离大肠杆菌重组表达的蛋白	61
方案 7.3	从大肠杆菌中提取诱导表达的 GST 标签融合蛋白	63
	参考文献	65
第 8 章	疏水色谱	66
8.1	基本原理.....	66
8.2	实验方案设计.....	67
8.2.1	疏水配基的选择.....	67
8.2.2	离子强度及种类.....	67
8.2.3	破坏水化作用的物质.....	68
8.2.4	温度.....	68
8.2.5	洗脱方式.....	68
8.2.6	表面活性剂.....	68
8.2.7	色谱柱使用后的处理.....	69
方案 8.1	用疏水色谱去除抗体融合蛋白样品中的多聚体	69
	参考文献	72
第 9 章	分子印迹技术	73
9.1	分子印迹主要术语.....	74

9.1.1	功能单体	74
9.1.2	交联剂	74
9.1.3	溶剂和致孔剂	75
9.1.4	引发剂	75
9.1.5	适用的印迹分子	76
9.2	分子印迹的分类	76
9.2.1	共价型	76
9.2.2	非共价型	77
9.3	印迹效率的评价	77
9.3.1	保留因子	77
9.3.2	分离因子	77
9.3.3	分离度	77
9.3.4	等温吸附方程	78
9.3.5	经典孔径分布曲线	78
9.3.6	吸附曲线	78
9.3.7	其他手段	78
9.4	分子印迹技术在蛋白质分离中的展望	78
方案 9.1	溶菌酶分子印迹的制备和应用	80
方案 9.2	血红蛋白分子印迹的制备和应用	83
	参考文献	86
第 10 章	高效液相色谱法分离纯化蛋白质	88
10.1	高效液相色谱的基本原理和分类	88
10.1.1	与经典液相(柱)色谱法比较	88
10.1.2	高效液相色谱法的特点	88
10.1.3	高效液相色谱仪	89
10.1.4	高效液相色谱常用参数	90
10.1.5	高效液相色谱仪标准操作规程	92
10.2	常用流动相的极性和选择	94
10.2.1	何谓流动相	94
10.2.2	流动相的性质要求	94
10.2.3	流动相的选择	95
10.2.4	准备流动相的一般过程	95
10.2.5	卤代有机溶剂应特别注意的问题	97
10.2.6	HPLC 用水	97
10.2.7	常用流动相组分的物理特性	97
10.3	常用检测器	97

10.3.1	概述	97
10.3.2	检测器的性能指标	98
10.3.3	各类检测器	99
10.4	特异性蛋白专用柱特点和操作	106
10.4.1	固定相	106
10.4.2	色谱类型	106
10.4.3	常用键合相的表面化学结构	107
10.4.4	色谱柱	107
10.5	常见故障排除	109
10.5.1	与色谱柱相关的问题	109
10.5.2	造成色谱峰（不对称）拖尾的原因	110
10.5.3	如何解决峰形拖尾的问题	110
10.5.4	如何贮存色谱柱	111
10.5.5	谱图问题	111
10.5.6	常见故障	111
10.6	高效液相色谱在蛋白质分离纯化中的应用实例	115
10.6.1	反相色谱分离蛋白质	115
方案 10.1	肽类酶解混合物色谱过程	117
方案 10.2	蛋白质样品纯化色谱过程	118
方案 10.3	白细胞介素-2 反相高效液相色谱纯化	119
方案 10.4	水蛭素 12 肽的反相高效液相色谱纯化	120
10.6.2	疏水作用色谱	121
方案 10.5	高效疏水作用色谱分离纯化四种蛋白质纯品	125
方案 10.6	人唾液蛋白的高效疏水色谱分离纯化	126
方案 10.7	疏水作用色谱法同时纯化及复性基因重组人干扰素	127
10.6.3	高效离子交换液相色谱法纯化蛋白质分子	128
方案 10.8	高效阴离子交换液相色谱法	129
方案 10.9	高效阳离子交换液相色谱法	130
方案 10.10	高效离子交换色谱法分离皖南尖吻蝮蛇毒活性组分	131
方案 10.11	高效离子交换色谱（HPIEC）分离经 HPHIC 分离后的微粒体 P450	132
10.6.4	高效排阻液相色谱法纯化蛋白质分子	133
方案 10.12	高效体积排阻液相色谱基本操作程序	135
方案 10.13	重组人粒细胞集落刺激因子分子量测定	136
	参考文献	137

第 11 章 毛细管电色谱及其在蛋白质分离纯化中的应用	138
11.1 毛细管电色谱	138
11.2 毛细管电色谱技术历史回顾	138
11.3 毛细管电色谱基本分离模式	139
11.3.1 开管柱电色谱	139
11.3.2 填充柱电色谱	140
11.3.3 整体柱电色谱	140
11.3.4 CEC 分离模式的选择	141
11.3.5 CEC、CE 和 HPLC 的对照分析	141
11.4 毛细管电色谱在蛋白分离分析中的新技术	142
11.4.1 在线样品预浓集-毛细管电色谱联用技术	142
11.4.2 毛细管电色谱-质谱联用技术在蛋白分离分析中的应用	143
11.5 毛细管电色谱基本术语和原理	143
11.5.1 电迁移和电渗、电渗流、电动现象、焦耳热效应	143
11.5.2 保留机制和分离机理	143
11.6 毛细管电色谱仪器	144
11.6.1 毛细管电色谱仪器的基本要求	144
11.6.2 基本装置	145
11.6.3 检测系统	145
方案 11.1 离子交换电色谱纯化蛋白质的研究	146
方案 11.2 微流控芯片-多维毛细管电色谱分离牛血清白蛋白酶消解产物 ...	150
方案 11.3 毛细管电色谱耦合飞行时间质谱分离鉴定卵清蛋白的酶解 产物	153
参考文献	154
第 12 章 其他色谱分析方法简介	156
12.1 超临界流体色谱	156
12.1.1 超临界流体简介	156
12.1.2 超临界流体色谱简介	156
12.1.3 SFC 的流动相	156
12.1.4 SFC 的固定相	157
12.1.5 SFC 的检测系统	157
12.1.6 联机分析与定性	158
12.2 逆流色谱	158
12.2.1 简介	158
12.2.2 逆流色谱的特点	159
12.2.3 溶剂体系的选择和制备	159

12.2.4	CPC 的检测仪器	160
12.3	亲水色谱	160
12.3.1	简介	160
12.3.2	HILIC 的特点	160
12.3.3	HILIC 固定相	161
12.3.4	展望	162
12.4	快速色谱	162
12.4.1	简介	162
12.4.2	快速色谱原理与系统组成	162
12.4.3	与制备 HPLC 的关系	163
	参考文献	163

第 3 部分 电泳法分离纯化蛋白质

第 13 章	聚丙烯酰胺凝胶电泳	166
13.1	聚丙烯酰胺凝胶电泳常用溶液及配制	166
13.2	不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳	167
13.3	变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	167
13.4	聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳	169
13.5	小分子多肽凝胶电泳	170
13.6	非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	170
13.7	聚丙烯酰胺凝胶中蛋白的回收	170
方案 13.1	SDS 变性电泳分析牛血清白蛋白 (BSA)	171
方案 13.2	BSA 变性梯度胶电泳方案	173
方案 13.3	小分子多肽 (抗菌肽) 凝胶电泳	174
方案 13.4	非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	175
	参考文献	177
第 14 章	聚丙烯酰胺等电聚焦	178
14.1	聚丙烯酰胺等电聚焦具有高分辨率的特点	178
14.2	等电聚焦 pH 梯度的形成	178
14.3	等电聚焦电泳板式	179
方案 14.1	HeLa 细胞裂解液等电聚焦	179
	参考文献	181
第 15 章	双向电泳	182
15.1	样品的制备	182
15.2	IPG 的选择和上样	183
15.3	第一向电泳: 等电聚焦电泳 (IEF)	183

15.4	IPG 胶条平衡	184
15.5	采用垂直系统进行第二向电泳：十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)	184
方案 15.1	HeLa 细胞周期依赖性蛋白表达和修饰的分析	184
	参考文献	186

第 4 部分 蛋白质纯化效果的评价和蛋白质分析

第 16 章	蛋白质浓度、纯度及活性的分析	188
16.1	测定蛋白质浓度的方法简介	188
16.1.1	凯氏定氮法	188
16.1.2	双缩脲法	188
16.1.3	Lowry 法	189
16.1.4	紫外分光光度法	189
16.1.5	考马斯亮蓝染色法	190
16.1.6	BCA 检测法	190
16.2	测定蛋白质纯度的方法简介	190
16.2.1	电泳法	190
16.2.2	色谱法	190
16.2.3	免疫化学法	190
16.3	测定蛋白质活性的方法简介	191
方案 16.1	双缩脲法测定未知蛋白的含量	191
方案 16.2	BCA 法测定蛋白质浓度	192
方案 16.3	豆类中球蛋白的定量分析	193
方案 16.4	心肌、骨骼肌线粒体内膜 ATPase 的测定	194
方案 16.5	荧光分光光度法测定肌肉中乳酸脱氢酶的活性	195
	参考文献	196
第 17 章	蛋白质的分析及应用	197
17.1	质谱技术在蛋白质分析中的应用	197
17.2	核磁共振法在蛋白质分析中的应用	197
17.3	X 射线晶体学相关的蛋白质纯化	198
方案 17.1	白眉蝮蛇蛇毒精氨酸酯酶分离提纯及分子量的质谱测定	198
方案 17.2	肿瘤差异蛋白质的质谱定性	198
方案 17.3	果蝇蛋白质磷酸化的质谱分析	200
方案 17.4	核磁共振法研究细胞色素空间结构	202
方案 17.5	以 X 射线衍射为目的的 SARS-COV M ^{prc} 蛋白的分离纯化	202
	参考文献	203

第 1 章 绪 论

1.1 蛋白质的研究历史

蛋白质是一种复杂的有机化合物，旧称“朊”。蛋白质这一概念最早是由瑞典化学家永斯·贝采利乌斯于 1838 年提出的，但当时人们对于蛋白质在机体中的核心作用并不了解。1926 年，詹姆斯·B·萨姆纳揭示尿素酶是蛋白质，首次证明了酶是蛋白质。第一个被测序的蛋白质是胰岛素，由弗雷德里克·桑格完成，他也因此获得 1958 年度的诺贝尔化学奖。首先被解析的蛋白质结构包括血红蛋白和肌红蛋白的结构，所用方法为 X 射线晶体学；该工作由马克斯·佩鲁茨和约翰·肯德鲁于 1958 年分别完成，他们也因此获得 1962 年度的诺贝尔化学奖。

1.2 蛋白质的理化性质和生物学特性

蛋白质是由氨基酸分子呈线性排列所形成的，相邻氨基酸残基的羧基和氨基通过形成肽键连接在一起。蛋白质的氨基酸序列是由对应基因所编码的。除了遗传密码所编码的 20 种“标准”氨基酸以外，在蛋白质中，某些氨基酸残基还可以被翻译后修饰而发生化学结构的变化，从而对蛋白质进行激活或调控。多个蛋白质可以一起，往往是通过结合在一起形成稳定的蛋白质复合物，发挥某一特定功能。

与其他生物大分子（如多糖和核酸）一样，蛋白质是生物体中的必要组成成分，参与了细胞生命活动的每一个进程。酶是最常见的一类蛋白质，它们催化生物化学反应，尤其对于生物体的代谢至关重要。除了酶之外，还有许多结构性或机械性蛋白质，如肌肉中的肌动蛋白和肌球蛋白，以及细胞骨架中的微管蛋白（参与形成细胞内的支撑网络以维持细胞外形）。另外一些蛋白质则参与细胞信号传导、免疫反应、细胞黏附和细胞周期调控等。同时，蛋白质也是人们日常饮食中必需的营养物质，这是因为动物自身无法合成所有必需氨基酸；通过消化所摄入的蛋白质食物（将蛋白质降解为氨基酸），人体就可以将吸收的氨基酸用于自身的蛋白质合成。

蛋白质是由不同的 L 型 α 氨基酸所形成的线性聚合物。目前在绝大多数已鉴定的天然蛋白质中发现的氨基酸有 20 种。不过在自然界中还存在着一些特殊的氨基酸，例如在一种海洋寡毛纲小蠕虫 *Olavius algarvensis* 以及与之存在共生关系的

细菌 $\delta 1$ (该细菌属于 δ 变形菌) 中存在着高含量的硒代半胱氨酸 (Selenocysteine), 由原本为终止密码子的 UGA 编码, 以及吡咯赖氨酸 (Pyrrolysine), 由终止密码子 UAG 编码。

蛋白质是细胞中的主要功能分子。除了特定类别的 RNA, 大多数的其他生物分子都需要蛋白质来调控。蛋白质也是细胞中含量最为丰富的分子之一; 例如, 蛋白质占大肠杆菌细胞干重的一半, 而其他大分子如 DNA 和 RNA 则只分别占 3% 和 20%。在一个特定细胞或细胞类型中表达的所有蛋白被称为对应细胞的蛋白质组。

蛋白质能够在细胞中发挥多种多样的功能, 涵盖了细胞生命活动的各个方面: 发挥催化作用的酶; 参与生物体内新陈代谢的调剂作用, 如胰岛素; 一些蛋白质具有运输代谢物质的作用, 如离子泵和血红蛋白; 发挥储存作用, 如植物种子中的大量蛋白质, 就是用来萌发时的储备; 许多结构蛋白被用于细胞骨架等的形成, 如肌球蛋白; 还有免疫、细胞分化、细胞凋亡等过程中都有大量蛋白质参与。

1.3 蛋白质纯化手段的历史回顾

为了进行体外 (*in vitro*) 研究, 必须先将目的蛋白质从其他细胞组分中分离提纯出来。这一过程通常从细胞裂解开始 (对于分泌性蛋白质的提纯则不需要裂解细胞), 通过破坏细胞膜将细胞内含物释放到溶液中, 从而获得含有目的蛋白质的细胞裂解液。然后通过超速离心将细胞裂解液中膜脂和膜蛋白、细胞器、核酸以及含有可溶蛋白质的混合物。盐析法是一种较为常用的通过沉淀从裂解液中分离浓缩蛋白质的方法。基于目的蛋白质的化学性质 (如分子量、带电情况和结合活性), 可以利用不同的色谱法来进一步分离提纯蛋白质。纯化的程度可以用电泳 (已知目的蛋白质的分子量)、光谱学 (目的蛋白质具有独特的光谱学特征) 或者酶活性分析反应 (目的蛋白质具有特定的酶活性) 来衡量。

对于天然蛋白质, 可能需要一系列的纯化步骤才能获得纯度足以用于实验室应用的蛋白质。为了简化这一过程, 通常采用基因工程的手段在目的蛋白质上添加一些化学特性, 在不改变其结构和生物学活性的情况下使纯化过程更为简单。通常是将含有特定氨基酸序列的“标签”连接在目的蛋白质的 N-端或 C-端。例如, 含有连续多个组氨酸的序列, 称为组氨酸标签 (His-tag); 将含有带组氨酸标签蛋白质的裂解液流过含有镍的亲合色谱柱, 组氨酸就可以与镍螯合从而结合在柱子上, 而裂解液中其他蛋白质由于没有组氨酸标签而直接流出柱子, 从而达到分离目的。通过基因工程 (即 DNA 重组) 改造而获得的蛋白质被称为重组蛋白质。

1.4 纯化蛋白的应用

对于早期的生物化学家来说, 研究蛋白质的困难在于难以纯化大量的蛋白质以

用于研究。因此，早期的研究工作集中于能容易纯化的蛋白质，如血液、蛋清、各种毒素中的蛋白质以及消化性和代谢酶（获取自屠宰场）。20世纪50年代后期，Armour Hot Dog Co. 公司纯化了1kg纯的牛胰腺中的核糖核酸酶A，并免费提供给全世界科学家使用。目前，科学家可以从生物公司购买越来越多的各类纯蛋白质。

蛋白质组学对蛋白质纯化提出了更高要求。在一定时间内一个细胞或一类细胞中存在的所有蛋白质被称为蛋白质组，研究如此大规模的数据的领域就被称为蛋白质组学，与基因组学的命名方式相似。生物体内的蛋白质种类繁多，含量差异很大，有些蛋白质含量极微。必须开发出更为高效、快捷、灵敏的方法才能满足蛋白质组学研究对蛋白质分离纯化的要求。

参 考 文 献

- [1] Kendrew J, et al. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis. *Nature*, 1958, 181 (4610): 662.
- [2] Muirhead H, et al. Structure of hemoglobin. A three-dimensional fourier synthesis of reduced human hemoglobin at 5.5 Å resolution. *Nature*, 1963, 199 (4894): 633.
- [3] Sumner J B. The Isolation and Crystallization of the Enzyme Urease. *Preliminary Paper J Biol Chem*, 1926, 69: 435.
- [4] 黄熙泰等. 现代生物化学. 第2版. 北京: 化学工业出版社, 2005.



第 1 部分

材料的预处理和蛋白质的粗提

研究蛋白质的结构与功能是从分子水平上认识生命现象的基础，蛋白质的研究已经成为现代生物学发展的主要方向之一。研究蛋白质，就必须得到高度纯化并具有生物活性的目的蛋白。蛋白质的分离纯化工作涉及各方面的知识，一般分为以下几个过程：材料的选择和预处理，细胞的破碎及细胞器的分离，蛋白质的分离和纯化，蛋白质的浓缩和保存。蛋白质分离纯化的前提是要有适当的材料来源。大多数情况下，所需蛋白质可以在很多种类的生物体中产生，因此应选择合适的蛋白质来源。不同来源的材料有不同的处理方法，恰当地选择蛋白质预处理的方法将有助于后续的分​​离纯化过程。



第 2 章 不同来源材料的预处理

蛋白质大体上可以分为天然蛋白质和重组蛋白质。植物、动物、微生物都可作为提取天然蛋白质的原材料，所选用的材料主要依据实验目的来确定。植物材料主要为植物的叶、胚和果实。动物材料主要来源于屠宰的牛、羊和猪以及实验动物的组织和器官。对于微生物，材料就是微生物菌体本身或者发酵液，如果能选择正确的培养条件，便可获得含有大量特定蛋白质的菌体。随着基因工程技术的发展，人们可以利用各种表达系统来生产重组蛋白质，例如胰岛素。从原则上讲，任何一种自然界中存在或不存在的蛋白质都可以被外源表达出来。克隆基因可以放在不同的宿主细胞中表达，常用的有大肠杆菌、酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞。重组蛋白的分离纯化相对于天然蛋白质来说要简单和容易，尤其是在细菌或酵母表达体系中，因为重组蛋白的含量比杂蛋白的含量高。重组蛋白分离纯化的策略与从天然组织中分离提取天然蛋白全然不同，对于不同的材料来源，要选择和设计不同的易于分离纯化的方案。

对于蛋白质的提取应尽量多地提取出有活性的目的蛋白，同时避免各种因素导致的目的蛋白失活。大部分蛋白质都可溶于水、稀盐、稀酸或稀碱溶液，少数与脂类结合的蛋白质则溶于乙醇、丙酮、丁醇等有机溶剂中。因此，可采用不同的溶剂来提取分离蛋白质。蛋白质的提取常用各种水溶液，一般在偏离蛋白质的等电点 0.5pH 单位以上，此时蛋白质的溶解度增加。通常缓冲液的用量是原材料体积的 1~5 倍，提取时需要均匀地搅拌，以利于蛋白质的溶解。提取蛋白质时一般在低温环境中操作，以避免蛋白质在提取过程中降解，还可加入蛋白酶抑制剂（如 PMSF、EDTA、antipain 和 leupeptin 等）。提取等电点在碱性范围的蛋白质，可以用稀酸；提取等电点在酸性范围的蛋白质，可以用稀碱，以尽可能提高目的蛋白在提取液中的溶解度。接近细胞生理条件（比如 $\text{pH} \approx 7.0$ ， 0.15 mol/L NaCl ）对于提取大多数蛋白质都很有效。常用 $\text{pH} 7.0 \sim 7.5$ ， $20 \sim 50 \text{ mmol/L}$ 磷酸盐缓冲液或 $\text{pH} 7.5$ ， $0.1 \text{ mol/L Tris-HCl}$ （含 $0.05 \sim 0.15 \text{ mol/L NaCl}$ ）缓冲液提取蛋白质。

2.1 不同材料的预处理

获得材料之后，在细胞破碎之前，材料常需要进行预处理，例如动物材料要除

去与实验无关甚至妨碍蛋白提取的结缔组织、脂肪组织和血污等；植物种子需要除壳；微生物材料需将菌体和发酵液成分分开等。下面介绍各种来源材料的不同预处理方法。

2.1.1 植物材料的预处理

天然蛋白存在于为数甚多的植物体内，能够提取植物蛋白的原料很多，包括野生植物和一些农作物，但主要还是种植某些植物专门用于提取蛋白。植物很少整体用于蛋白质提取，通常是将一些器官如叶或茎作为主要原料，制备相对均一的细胞类型作为起始材料。以植物为原材料提取蛋白质存在一些特殊的问题：蛋白质的得率往往比以动物或微生物为材料要低；植物的生长是季节性的，材料来源有时间限制；植物在生长过程中会在液泡中积累排泄物，细胞分解这些排泄物时产生的大量沉淀剂和变性剂常使植物蛋白发生不可逆的失活；许多蛋白质既可以在植物中合成，也可以在许多别的生物中合成。多数情况下，来源的选择应考虑技术和经济两方面的因素，谨慎选择材料来源以及恰当的组织破碎方法是非常重要的。

影响植物组织蛋白质提取的因素很多，与大部分其他生物不同，植物材料里除了蛋白质外，还含有大量的淀粉、纤维素、果胶和半纤维素等生物大分子。最初的均质化处理必须在大量的缓冲液中进行，经过初步过滤后只能得到低浓度的蛋白质，需要经过沉淀或浓缩，硫酸铵沉淀和 PEG 沉淀常用于植物蛋白质的沉淀。如果采用超滤浓缩，应考虑植物蛋白与膜结合的能力，以免产生负面影响。植物含有的主要蛋白水解酶类包括丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶和金属蛋白酶，可在缓冲液中加入相应的抑制剂。一旦蛋白质成为可分离的形式，植物蛋白就可像其他蛋白一样，采用一般的纯化方法进行处理。

2.1.2 动物材料的预处理

许多有用的蛋白质来源于动物的组织和器官，比如大量的治疗学蛋白质如胰岛素和血液因子。只要获得含有某种我们需要的特定蛋白质的特殊组织和器官，就能以之为材料进行特定蛋白质的提取。理想的原料组织应含有丰富的目的蛋白质，如肾脏皮质中许多细胞表面肽酶含量很高，而且这些器官相对较大，可以分离出相当数量的蛋白质。在分离蛋白质时，可能不仅要考虑含量是否丰富，还要考虑动物组织是否容易获得。当地的屠宰场可以是猪和牛等家畜的大部分组织的有效来源，而小型动物（鼠类、兔子等）的组织通常可以从公共动物机构获得。因此，小型动物的组织适合于纯化少量蛋白，而大型动物的组织可能更适用于大量制备。

蛋白质在细胞中可能在胞外或者在胞内或者位于亚细胞器中，可能是可溶性的或者是膜结合的，这些因素决定了选择什么样的组织破碎方法合适。对于少量组织，可采用小型均质器。对于大量组织，可采用大型组织捣碎机快速破碎。对于大型器官，如猪肾脏或人胎盘，首先要用剪刀或解剖刀将其切成碎片。对于软组织，可采用玻璃均质器。均质化后，残留的大块组织可通过细纱布过滤或者低速离心除

去。组织均质化后，通常在不同亚细胞结构内的蛋白酶将释放到溶液中，并与目的蛋白相接触，很可能将其降解。所以均质化时间应尽量短，以减少不必要的蛋白质水解和变性。根据一般规律，存在于细胞表面或以可溶形式分泌的蛋白以及糖基化蛋白对于降解有较强的抗性。在4℃预冷的缓冲液中进行均质化操作及后续的分选操作，对于降低蛋白质的水解会有帮助。通过在各种缓冲液中添加蛋白酶抑制剂可进一步控制蛋白质水解。

2.1.3 微生物材料的预处理

许多蛋白质是由微生物产生的，蛋白质包括天然蛋白和重组蛋白，微生物包括细菌如枯草芽孢杆菌和乳酸杆菌，真菌包括曲霉属和青霉属等的很多种，酵母如酿酒酵母。对于天然蛋白，先要进行大量的菌种筛选得到高产菌株，然后通过诱变育种分离产量更高的正突变菌株。基因工程技术的发展被用于提高内源微生物蛋白的产量，比如将相关基因的克隆在强启动子下控制表达，这样能成倍提高蛋白质的产量。对于重组蛋白质，相对来说就简单得多，容易获得大量表达的目的蛋白质。由于微生物能通过发酵在相对短时间内大量培养，作为蛋白质来源它们是很有吸引力的。因此，微生物可用于分离纯化丰富的、合格的所需蛋白质。微生物蛋白通常比来源于植物或动物的相同的蛋白质更稳定。此外，微生物比动物和植物更易于遗传学操作。虽然微生物的生长受环境因素影响很大，如培养基的成分、温度、诱导剂和抑制剂的添加等都可能影响蛋白质的含量，但是筛选出正确的培养条件并不是很难，这样就可以获得含有大量特定蛋白质的菌体。

许多重要的蛋白质是由微生物发酵直接分泌到培养基中的，这些细胞外蛋白质产物由于不需要破坏微生物细胞去释放蛋白质，大大简化了后续的分选纯化步骤。因此，一些细胞外的蛋白质只要经过离心或过滤去除菌体，再通过很少的纯化步骤就能获得所需纯度的蛋白质。而一些蛋白质存在于细胞内，则必须在发酵后收集细胞并破碎，释放出包括所需蛋白质在内的细胞内所有的内容物，并进行复杂的纯化过程而获得目的蛋白质。

2.2 细胞的破碎

细胞的结构根据细胞种类不同而不同，动物、植物和微生物细胞的结构差异很大，而原核细胞和真核细胞也有所不同。细胞的破碎是指用物理、化学、酶或机械等方法来破坏细胞壁或细胞膜从而将胞内物质释放到周围环境的过程。植物细胞和微生物细胞有一层坚固的细胞壁，破碎困难，需要较强烈的破碎方法。动物细胞没有细胞壁，只有细胞膜，易于破碎。尽管所有细胞壁中的主要成分都是多糖、脂质和蛋白质，但是了解不同种类细胞的细胞壁的物理化学结构对有效地破碎细胞非常重要。

目前已发展了多种细胞破碎方法，以便适应不同用途和不同类型的细胞壁破

碎。破碎方法大体上可分为机械法和非机械法两大类，也可根据破碎原理的不同，分为机械方法、物理方法、化学方法和生物化学方法等。不同实验规模、不同实验材料和实验要求，使用的破碎方法和条件不同。一些坚韧组织，如肌肉、植物的根茎等，常需要强烈的搅拌或研磨作用，才能把其组织细胞破坏；而比较柔软的组织如肝、脑等，用普通的玻璃匀浆器即可达到完全破坏细胞的目的。不管是哪种方法破碎细胞都有自身的局限性和不足，有时需要结合利用几种不同的方法，应根据破碎细胞的目的、回收蛋白质的性质和在细胞中的位置选择合适的方法，达到选择性地分布释放蛋白质的目的。

2.2.1 机械法

2.2.1.1 高压匀浆破碎法

匀浆法是一种常见的细胞破碎方法，最简单的就是使用玻璃匀浆器（见图 2.1），先将剪碎的组织置于管中，再套入研杆来回研磨，即可将细胞研碎。匀浆器的研钵磨球和玻璃管内壁之间间隙保持在十分之几毫米距离。此法细胞破碎程度较高，适用于量少和动物组织。如果要破碎大量的组织和细胞，可以采用高压匀浆器。高压匀浆法对各种细菌、酵母、霉菌以及动植物组织等都是比较合适的。高压匀浆器的原理是让细胞浆液在高压下迫使其在排出阀的小孔中高速冲出，并射向撞击环上，由于突然减压和高速冲击，使细胞受到高的液相剪切力而破碎。在操作方式上，可以采用单次通过或多次循环通过等方式，也可连续操作。

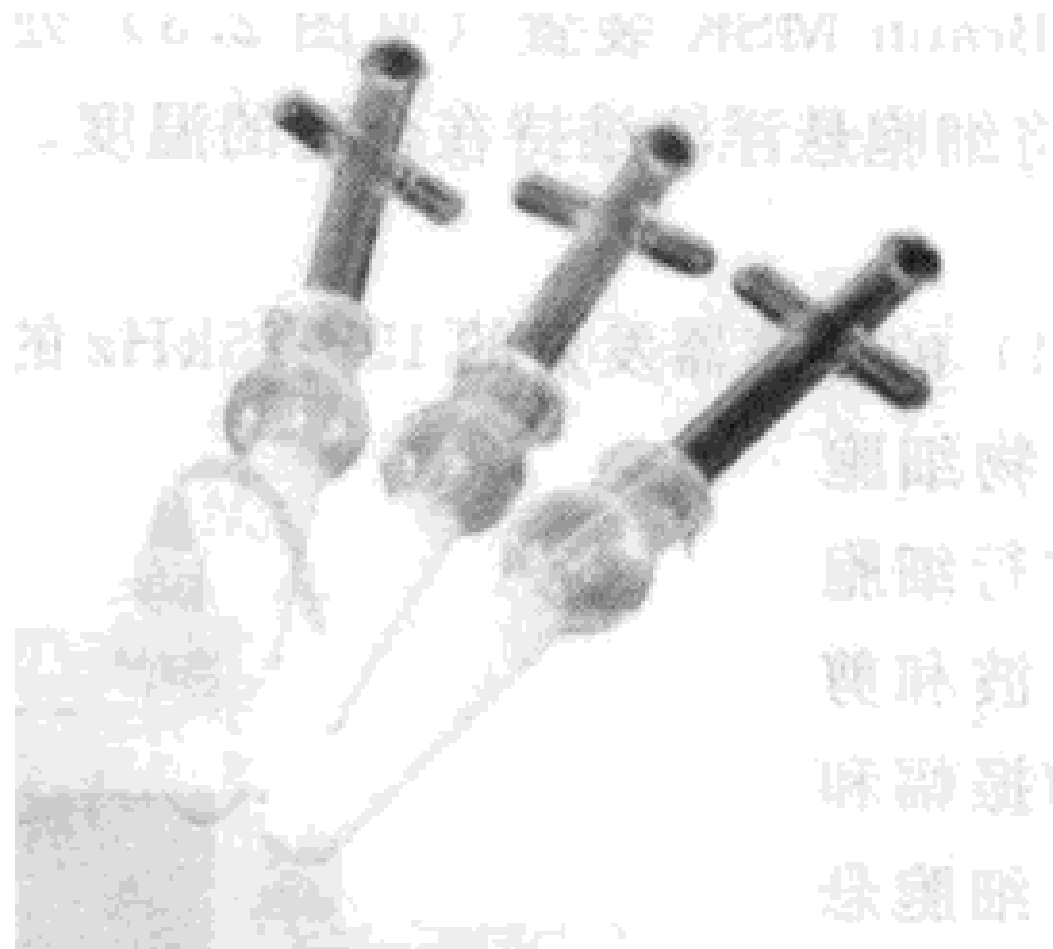


图 2.1 玻璃匀浆器

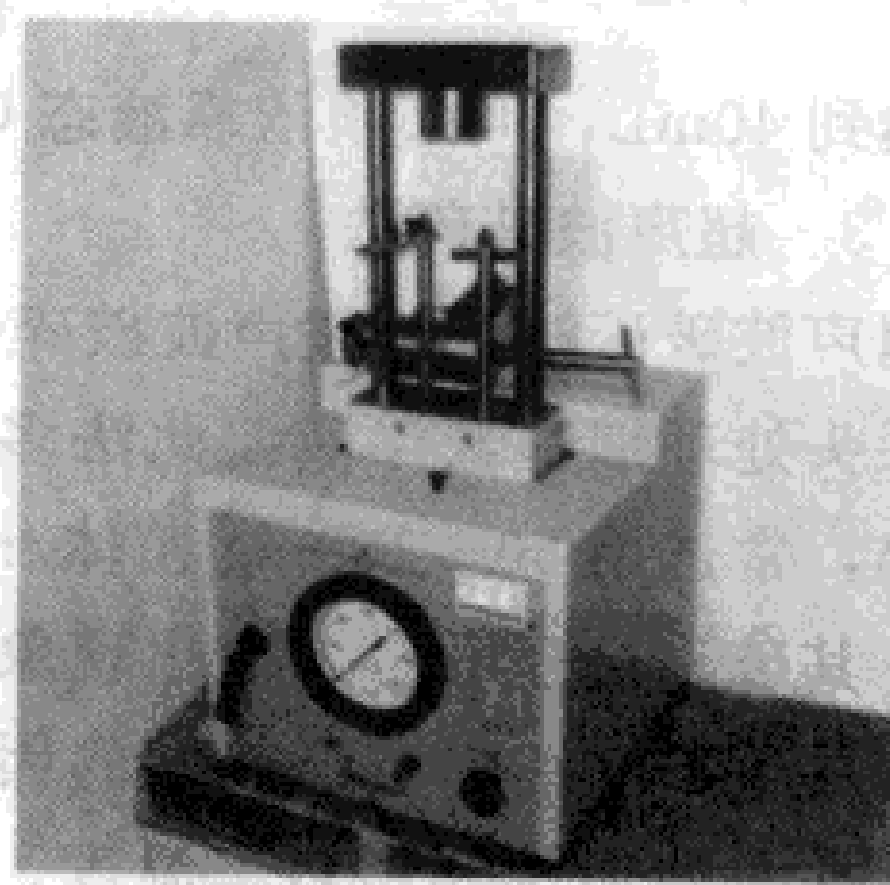


图 2.2 高压匀浆器 French Press

典型的实验室规模的匀浆器是 French Press（见图 2.2），它采用的是柱式活塞，能产生高达 40000psi (1psi = 6894.76Pa) 的压力，被压缩后的大约 35mL 的液体以 1mL/min 的速度通过一针形阀。一般压力越高，细胞悬浮液需要通过的次数越少。压力在 20000psi 时可处理的料液为 4~35mL，当然也可以采用 40000psi 压力对 35mL 料液进行破碎。由于该过程产生热量，细胞悬浮液、活塞和汽缸通常都要进行预冷却。APV Gaulin 型高压匀浆器可在 23000psi 压力下进行细胞破碎，Micron Lab 40 高压匀浆器可进行间歇操作，处理量为 20~40mL。另外，使用最

多的大型高压匀浆机是 Manton Gaulin-APV 匀浆机，具有数种型号和不同阀种类。在大规模破碎过程中需多个循环处理才能达到较高的细胞破碎率。

2.2.1.2 高速珠磨破碎法

研磨是将细胞悬浮液与玻璃小珠、石英砂或氧化铝等研磨剂一起快速搅拌，使细胞获得破碎。该方法利用高强度进行细胞破碎，适用于酵母、孢子及微小藻类等采用其他方法难破碎细胞的破碎。在大规模的破碎中，常采用高速珠磨机。在珠磨机中，大量的小玻璃球由于摇摆或搅拌而产生碰撞和摩擦，对细胞产生剪切力和碰撞力，最终达到细胞破碎的目的。高速珠磨法对真菌的大规模机械破碎是非常有效的，小规模范围内对动植物组织细胞的破碎效果也很好。



图 2.3 高速珠磨机 Braun MSK

实验室中，可简单地将破碎物置于一装有玻璃珠的试管里手动摇动使玻璃球旋转从而实现细胞破碎的目的。细胞悬浮液与 1~5 倍体积的研磨球体混合后高速旋转研磨数分钟，但该种手工摇动的速度慢，而且过程繁琐，采用机械振动的球磨机可达 3000~6000 次/min 的振动速率，但多数振动研磨的处理量 ≤ 3.0 mL；在大规模研磨过程中，温度是非常重要的影响因素，冷却调控是比较困难的。例如 250 mL 的研磨器，若无冷却装置，操作过程中样品温度每分钟升高 10℃。德国制造的 Braun MSK 装置（见图 2.3）处理

量能达到 40 mL，但必须依靠液态 CO₂ 冷却剂将细胞悬浮液维持在合适的温度。

2.2.1.3 超声波破碎法

超声波破碎法利用超声波破碎仪（见图 2.4）的振荡器发射的 15~25 kHz 的超声波探头处理细胞悬浮液。此法多适用于微生物细胞的破碎，常选用 50~100 mg 菌体/mL 的浓度进行细胞破碎。其破碎机理可能与空化现象引起的冲击波和剪切力有关。影响细胞破碎效率的因素有探头的振幅和强度、探头的形状和材料、温度、细胞浓度、细胞悬浮液的黏度、表面张力等。超声波在操作过程中，也会产生大量的热，所以必须先将细胞悬浮液进行预冷却，或者让细胞悬浮液一直放置在冰浴上进行破碎，这不仅有利于保持蛋白的活性，同时可保证超声波强有力地传播和蔓延。因此，理想状态下超声破碎的液体应保持在冰点附近。



图 2.4 超声波破碎仪

对微生物细胞破碎而言，可加入 1.0~1.5 mm 的玻璃球，有助于将气泡破裂和物理碰撞释放出的能量聚集起来，提高细胞的破碎

率，尤其对于酵母及孢子的破碎，玻璃球的加入是非常重要的。一般地，玻璃球与细胞悬浮液的比例为1:2（体积比）。对于比较硬的组织，例如皮肤和肌肉等，首先用搅切器或类似的仪器将其绞小，然后再用超声波破碎，效果比较好。超声波破碎法操作简单，重复性较好，节省时间，在实验室应用较普遍，处理少量样品时操作简便。另外在超声破碎过程中还会产生能与蛋白质反应的活性自由基，可以通过加入半胱氨酸、二硫苏糖醇及其他巯基化合物或在氮气或氩气等保护性环境中进行细胞的破碎，从而降低自由基氧化作用的损害。

2.2.2 非机械法

2.2.2.1 渗透压冲击破碎法

无论动物细胞还是植物细胞，胞内物质都是由膜组织包裹起来的，因此，破坏细胞膜系统是胞内物质释放的关键步骤。通常细胞膜系统强度较差，易受渗透压冲击而破碎。最简单的是渗透压冲击法。渗透压冲击是较温和的一种破碎方法，将细胞放在高渗透压的溶液（如一定浓度的甘油或蔗糖溶液）中，由于渗透压的作用，细胞内水分便向外渗出，细胞发生收缩，当达到平衡后，将介质快速稀释，或将细胞转入水或缓冲液中，由于渗透压的突然变化，胞外的水迅速渗入胞内，引起细胞快速膨胀而破裂。

2.2.2.2 冻融破碎法

将细胞放在低温下冷冻（约 -15°C ），然后在室温中融化，反复多次而达到破壁作用。由于冷冻，一方面能使细胞膜的疏水键结构破裂，从而增加细胞的亲水性能，另一方面胞内水结晶，形成冰晶粒，引起细胞膨胀而破裂。对于细胞壁较脆弱的菌体，可采用此法。该方法可进行大规模操作，成本较低，但过程较慢，而且可能引起细胞内初级代谢产物的降解，不适合容易发生酶降解的物质的回收过程。植物细胞的破碎需多次反复冻融，可溶蛋白的释放率不是很高，动物细胞和酵母采用冻融破碎效果较差，细菌的破碎率居中。

2.2.2.3 酶解破碎法

酶解是利用溶解细胞壁的酶处理细胞，使细胞壁受到部分或完全破坏后，再利用渗透压冲击等方法破坏细胞膜，进一步增大胞内产物的通透性。溶菌酶适用于革兰阴性菌细胞的分解，应用于革兰阳性菌时，需加入EDTA使之更有效地作用于细胞壁。有些细菌对溶菌酶不敏感，可以加入少量巯基试剂或 8mol/L 尿素处理，使之转为对溶菌酶敏感而溶解。真核细胞需采用不同的酶，比如纤维素酶、蜗牛酶、半纤维素酶、脂酶等，将细胞壁分解，使细胞内含物释放出来。酶解破碎法适用多种微生物，具有作用条件温和、内含物成分不易受到破坏、细胞壁损坏的程度可以控制等优点。但是酶解法也存在一些问题：比如酶解法通用性差，不同菌种需选择不同的酶；易造成产物抑制作用，这可能是导致胞内物质释放率低的一个重要因素；各种破碎细胞的酶的价格高，限制了大规模利用。因此，酶解法有一定局限性，不适宜大量的蛋白质提取，给进一步纯化带来困难。

2.2.2.4 化学破碎法

采用化学法处理可以溶解细胞或抽提胞内组分。常用酸、碱、金属螯合剂、表面活性剂和有机溶剂等化学试剂。这些化学试剂可以改变细胞壁或膜的通透性，使内含物有选择地渗透出来。试剂与细胞接触时间尽量短，因为这些试剂能够导致蛋白质的变性。比如表面活性剂有天然的和合成的两类，一般说来，离子型的表面活性剂比非离子型表面活性剂更有效，但也容易使蛋白质变性，而且使得后续的纯化过程复杂，因此难以大规模应用。另外像尿素、离子去污剂等可以破碎细胞和溶解（或变性）胞内蛋白质。当二硫键还原剂与这些物质一起应用时，几乎可以溶解所有的蛋白质。在目的蛋白复性前，必须将杂质蛋白从化学溶剂中除去，但并不是所有的蛋白质变性后都可复性。化学破碎法多用于破碎细菌，且作用比较温和，但是化学破碎法需要的时间长，效率低，同时对蛋白质也有变性等作用，进一步分离时需要用透析等方法除去这些试剂，并且某种试剂只能作用于某些特定类型的微生物细胞，通用性较差。

方案 2.1 超声波法提取烟草叶中的 3-磷酸甘油脱氢酶

简介

烟草作为一种重要的模式植物，在遗传学、生理和代谢过程研究等方面发挥了积极的作用。甘油在逆境胁迫条件下，是一种极其理想的细胞内抗胁迫保护剂。3-磷酸甘油脱氢酶（GPDH）作为生物体内甘油合成代谢途径中的限速酶，直接决定了葡萄糖分解代谢过程中向甘油合成方向的物质流分配量和甘油合成水平。最近研究发现，利用超声破碎技术可促进植物有效成分的提取，具有可缩短提取时间、不易使酶失活等特点。在一些欧美发达国家，此提取手段已经广泛应用于植物有效成分的提取中，并实现了工业化应用。

材料

新鲜的烟草叶片

提取缓冲液（20mmol/L 咪唑，pH 7.0，1mmol/L DTT，1mmol/L MgCl₂）

超声波破碎仪

方法

1. 称取一定量的新鲜的烟草叶片，经自来水清洗，晾干后剪切成长 1~2cm 的小段；
2. 加入一定比例（比如 5~20 倍体积的）预冷的提取缓冲液（20mmol/L 咪唑，pH 7.0，1mmol/L DTT，1mmol/L MgCl₂）；
3. 在冰浴上捣碎此叶片，然后超声波破碎处理此液汁；
4. 于 15000r/min，4℃ 离心 10min，取上清液即得到含有 3-磷酸甘油脱氢酶的粗提液；

5. 得到的粗提液可以检测 3-磷酸甘油脱氢酶的酶活力和含量，以确定提取的效果；

6. 对得到的粗提液可以进一步采用各种色谱方法进行分离纯化。

问题分析及解决方案

1. 料液比对提取效果的影响。

在其他因素确定的条件下，当料液比较低时，溶液较黏稠，影响了超声波破碎的效果，不利于酶的溶出；当料液比较高时，酶的活力会下降；因此应该通过预实验确定最佳的料液比，得到的酶量和酶活力都是相对最高的。

2. 超声波处理条件对提取效果的影响。

超声波处理的主要作用是破碎细胞，其影响主要是在功率和处理时间两个方面，处理功率对提取效果的影响比较显著，在一定范围内增加超声波功率时，酶的产量和活力有显著的提高；在偏大的功率下虽有利于破碎细胞，但易使酶失活加速，这在酶的提取中是不适宜的。同时超声波处理时间加长，提取物溶出增多，酶活力上升趋势明显，但处理时间过长，酶活力同样会下降。另外，超声波处理间歇时间也对提取酶的产量和活力有影响。因此，要通过预实验确定最佳的超声波处理条件。

方案 2.2 从猪胰脏中提取胰凝乳蛋白酶

简介

胰凝乳蛋白酶是一种蛋白酶，为脊椎动物的消化酶。在胰脏中以酶前体物质胰凝乳蛋白酶原的形态生物合成，随胰液分泌出去。在小肠受到胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的一定的分解，转变成活性的胰凝乳蛋白酶。属于肽链内切酶，主要切断多肽链中的芳香族氨基酸残基的羧基一侧。对其氨基酸序列、高级结构，反应机制的研究还在进展中。与同样在胰脏里生物合成的胰蛋白酶虽然在结构和催化机制方面关系非常密切，但底物特异性完全不同。

材料

新鲜猪胰脏

0.125mol/L H_2SO_4

固体 $(NH_4)_2SO_4$

1%酪蛋白溶液（溶于 0.1mol/L, pH 8.0 磷酸盐缓冲液中）

磷酸盐缓冲液（0.1mol/L, pH 7.4）

10%三氯乙酸溶液

0.1mol/L NaOH 溶液

高速组织捣碎机

分析天平

冷冻离心机

方法

1. 取新鲜猪胰脏，放在盛有冰冷 $0.125\text{mol/L H}_2\text{SO}_4$ 的容器中，保存在冰箱中待用；
2. 去除胰脏表面的脂肪和结缔组织后，用组织捣碎机绞碎；
3. 悬浮于2倍体积的冰冷 $0.5\text{mol/L H}_2\text{SO}_4$ 中，放冰箱内过夜；
4. 将上述悬浮液离心 10min ，上清液经2层纱布过滤至烧杯中，即为提取液；
5. 取提取液 10mL ，加固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.14g 达 0.2 饱和度，放置 10min ，然后 3000r/min 离心 10min ，弃去沉淀，保留上清液；
6. 在上清液中加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.323g 达 0.5 饱和度，放置 10min ，然后 3000r/min 离心 10min ，弃去上清液，保留沉淀；
7. 将沉淀溶解于3倍体积的水中，装入透析袋中，用 pH 为 5.0 、 0.1mol/L 醋酸缓冲液透析，直至 1% BaCl_2 检查无白色 BaSO_4 沉淀产生；
8. 然后 3000r/min 离心 5min ，弃去沉淀（变性的酶蛋白），保留上清液即为胰凝乳蛋白酶；
9. 可以进一步采用其他方法纯化或者测定其酶活力。

问题分析及解决方案

1. 如何选择动物组织细胞破碎的方法？

动物组织的细胞相对来说比较容易破碎，因为动物细胞没有细胞壁。如果初始材料较少，可以采用玻璃匀浆器或者液氮研磨的方法，此法细胞破碎程度比高速组织捣碎机为高；如果初始材料较多，可以用高速组织捣碎机或超声波破碎仪处理；如果初始材料很多，可以用高压匀浆机或者高速珠磨机等设备，并且可以结合其他的非机械方法。

2. 如何选择动物蛋白质的提取溶液？

盐析法只是常用的提取蛋白质的方法之一，在提取蛋白质时，应根据蛋白质的性质选择合适的提取溶液。提取动物组织蛋白质一般采用各种水溶液，稀盐和缓冲体系的水溶液对蛋白质稳定性好、溶解度大，是最常用的溶剂。稀盐溶液（一般用 NaCl 溶液）可促进动物蛋白质溶解，同时因盐离子与蛋白质部分结合，具有保护蛋白质不易变性的优点。缓冲液常用 $0.02\sim 0.05\text{mol/L}$ 磷酸、碳酸以及 Tris-HCl 等。一些蛋白质和酶与脂质结合比较牢固或分子中非极性侧链较多，不溶于水、稀盐，稀酸或稀碱溶液，可用乙醇、丙酮和丁醇等有机溶剂提取。它们具有一定的亲水性和较强的亲脂性，是理想的提取脂蛋白质的溶剂，但必须低温操作。

方案 2.3 从大肠杆菌中提取诱导表达的 $(\text{His})_6\text{-X}$

简介

由于大肠杆菌操作容易，能够得到优化的表达质粒，生长容易，重组蛋白生产

的首选宿主系统是大肠杆菌。而组氨酸标签 (His)₆ 是最常用的用于重组蛋白纯化的标签。

材料

感受态细胞

表达载体 pET 系列

LB 培养基

氨苄青霉素

IPTG

蛋白酶抑制剂

结合缓冲液 (50mmol/L Tris, pH 7.9, 500mmol/L NaCl, 5mmol/L 咪唑)

洗脱缓冲液 (50mmol/L Tris, pH 7.9, 500mmol/L NaCl, 500mmol/L 咪唑)

微量紫外分光光度计

超声波破碎仪

高速冷冻离心机

Ni 柱

方法

1. 采用 RT-PCR 扩增得到目的基因 X, 构建到表达载体上;
2. 用构建的质粒转化表达菌株 BL21, LB 平板 37°C 过夜培养;
3. 从 LB 平板上挑取一单菌落接入 5mL LB 液体培养基 (100 μ g/mL Amp) 中, 37°C 培养 3~5h;
4. 将 5mL 菌液接入 1L LB 液体培养基 (100 μ g/mL Amp) 中, 37°C 培养至 OD₆₀₀ \approx 0.6, 加入终浓度为 0.3mmol/L 的 IPTG, 16°C 诱导 16h;
5. 培养好的菌液于 5000r/min 离心 10min, 弃去上清液, 收集菌体, 离心后的菌体沉淀悬浮于 25mL 结合缓冲液中;
6. 悬浮的菌液装在 50mL 玻璃烧杯中, 加入适量蛋白抑制剂 (10 μ L 的 10mg/mL antipain, 10 μ L 的 10mg/mL leupeptin 和 1mL 的 1mol/L PMSF), 冰浴放置;
7. 超声破碎, 每个循环 26 次, 超声 6s, 间隔 5s, 视破碎效果共 2~4 个循环, 破碎后的菌体 4°C 18000r/min 离心 30min, 上清液保持在 4°C;
8. Ni 柱先用结合缓冲液平衡, 而后上样, 结合 30min, 每隔 5~10min 搅拌一次, 流干;
9. 用 2~3 倍柱体积结合缓冲液清洗非特异结合的蛋白质, 流干, 加入 15mL 洗脱缓冲液进行洗脱, 可分两次加入以增加洗脱效率;
10. SDS-PAGE 检测初步纯化效果, 进行下一步的纯化步骤。

问题分析及解决方案

1. 目的蛋白得不到可溶性表达, 或者表达量很低。

在原核蛋白表达过程中, 选择构建一个合适原核表达体系需要综合考虑三大因

素：表达载体、宿主菌株、表达诱导条件。如果表达量低或者没有可溶性表达，首先可以考虑更换不同的表达菌株，比如 BL21、Rosetta、Origami、pLysS 等等。其次可以考虑更换表达载体，比如换成带有其他有助于蛋白可溶和折叠的标签（GST 和 MBP 等）的载体。还可以优化表达诱导条件，比如采用低温诱导（25℃ 和 18℃）有利于蛋白质的折叠。如果都不行，可以采用其他的真核表达系统。

2. 表达出来的蛋白质容易降解。

如果所提取的蛋白质容易降解，首先要尽量保证整个操作过程在低温下进行，甚至所用的缓冲液都要预冷；其次要调整超声波处理的条件，看是不是超声波处理过于剧烈的原因；另外，可以在操作的过程中补加一些蛋白酶抑制剂，尽量缩短整个提取的时间，洗脱出来的目的蛋白溶液可于 4℃ 短暂保存，但时间不宜过长，尽快用于下游实验或者于 -80℃ 长期保存。

参 考 文 献

- [1] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10 (5): 411.
- [2] Cregg J M, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*, 2000, 16 (1): 23.
- [3] Pfeifer T A. Expression of heterologous proteins in stable insect cell culture. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, 9 (5): 518.
- [4] 范代娣等. 重组蛋白分离与分析. 北京: 化学工业出版社, 2004: 81.
- [5] 陆健等. 蛋白质纯化技术及应用. 北京: 化学工业出版社, 2005: 244.
- [6] 孟琳等. 动物组织蛋白质提纯方法的研究进展. *食品与药品*, 2009, 11 (5): 53.
- [7] 王俊杰等. 超声波萃取烟叶中 3-磷酸甘油脱氢酶的研究. *中国生物工程杂志*, 2008, 28 (8): 74.
- [8] [爱尔兰] 沃尔什著. 蛋白质生物化学与生物技术. 王恒樑等译. 北京: 化学工业出版社, 2006: 32.
- [9] 颜真等. 蛋白质研究技术. 西安: 第四军医大学出版社, 2007: 27.



第3章 蛋白质的沉淀

蛋白质沉淀是指蛋白质分子凝聚从溶液中析出现象，变性蛋白质一般易于沉淀。由于蛋白质溶液是亲水溶胶，存在着两个稳定因素：电荷和水化膜。如果能除去其水化膜并中和其电荷，则蛋白质可从溶液中沉淀出来。单独使用脱水剂（如乙醇、硫酸钠等）破坏其水化膜，或者调整 pH 使其达到蛋白质的等电点，消除其电荷，都不能使蛋白质立即沉淀，只有两者合用，才能有效地沉淀蛋白质。沉淀法是比较传统的分离纯化蛋白质的方法，该法所需设备简单，操作方便，目前仍然在实验室内广泛使用。在蛋白质纯化的初期，可以迅速减少样品体积，起到浓缩的作用，便于后续的纯化，降低纯化成本；还可以尽快将目的蛋白与杂质分开，提高目的蛋白的稳定性；通过该方法，目的蛋白的收率比较高。但由于沉淀法对提高蛋白质纯度的效果比较有限，该法常只用于蛋白质的初步纯化。

蛋白质的沉淀法有盐析法、有机溶剂沉淀法、等电点沉淀法、聚乙二醇沉淀法、选择性沉淀法等。沉淀方法的选择很可能取决于逆转沉淀的难易程度。很强的沉淀剂（如聚合电解质）可能很难从目的蛋白中除去或释放出来。所以，一般先使用合成的聚合电解质进行共沉淀，将打算弃掉的杂蛋白沉淀，然后使用聚集性较差、较易控制和可逆的沉淀剂来捕获上清液中剩余的目的蛋白。在进行沉淀之前，样品必须澄清。选择沉淀方法时，需要考虑沉淀剂对目的蛋白稳定性的影响、沉淀剂的成本以及操作难易程度、沉淀剂的去除及残留、目的蛋白的纯度要求及收率要求等。

3.1 盐析法

盐析一般是指溶液中加入无机盐类而使某种物质溶解度降低而析出的过程。沉淀法中常用的是盐析法，该方法条件温和、操作简便。在蛋白质的粗提阶段，常用盐析法来沉淀分离蛋白质。盐析法有两种方法，第一种是在一定 pH 和温度下通过改变离子强度实现，用于早期的粗提液；第二种是在一定离子强度下通过改变 pH 和温度来实现，用于后期进一步分离纯化和结晶。采用盐析法沉淀目的蛋白，起到了浓缩及初步分离纯化蛋白质的作用，盐析条件的确定必须综合考虑原材料的来源、纯化目的、盐析后目的蛋白的收率及纯化倍数等因素。影响盐析的因素有如下

几种。

(1) 蛋白质浓度 在低浓度蛋白质溶液中盐析，所用的盐量较多，而共沉淀作用比较少；高浓度蛋白溶液可以节约盐的用量，但若蛋白浓度过高，会发生严重的共沉淀作用，因而需要在两者之间进行适当选择。用于分步分离提纯时，宁可选择稀一些的蛋白质溶液，多加一点中性盐，使共沉淀作用减至最低限度。一般认为2.0%~3.0%的蛋白质浓度比较适中。

(2) 离子强度和类型 在进行分离的时候，一般从低离子强度到高离子强度顺次进行。每一组分被盐析出来后，经过过滤或冷冻离心收集，再在溶液中逐渐提高中性盐的饱和度，使另一种蛋白质组分盐析出来。离子种类对蛋白质溶解度也有一定影响，离子半径小而很高电荷的离子在盐析方面影响较强，离子半径大而低电荷的离子的影响较弱。高价阴离子的沉淀效果比较好，磷酸盐的效果好于硫酸盐、醋酸盐，单价阳离子中，铵离子效果要好于钾离子和钠离子。

(3) pH 一般来说，蛋白质所带净电荷越多溶解度越大，净电荷越少溶解度越小，在等电点时蛋白质溶解度最小。为了提高盐析效率，多将溶液pH值调整到目的蛋白的等电点处，这样产生沉淀时所消耗的中性盐较少，蛋白质的收率也高，同时也可以减少共沉作用。但必须注意，在水中或稀盐溶液中的蛋白质等电点与高盐浓度下所测的结果是不同的，需根据实际情况调整溶液pH值，以达到最好的盐析效果。

(4) 温度 在低离子强度或纯水中，蛋白质溶解度在一定范围内随温度增加而增加。但对多数蛋白质而言，在高盐浓度下，其溶解度随温度上升反而下降。在一般情况下，蛋白质对盐析温度无特殊要求，可在室温下进行，只有某些对温度比较敏感的蛋白质要求在0~4℃进行。另外，蛋白质在高温条件下还容易降解和变性。

3.2 有机溶剂沉淀法

有机溶剂的沉淀机理主要有两点：一是降低水的介电常数，导致蛋白质分子之间的静电引力增加，从而促使它们相互聚集而沉淀出来；二是水溶性有机溶剂亲水性强，它会抢夺本来与蛋白质结合的自由水，使其表面的水化层被破坏，导致蛋白质分子间相互作用增大，发生凝聚而沉淀出来。该法优点在于：①分辨能力比盐析法高，即蛋白质或其他溶质只在一个比较窄的有机溶剂浓度下沉淀；②沉淀不用脱盐，过滤较为容易。其缺点是容易使蛋白质等生物大分子变性失活，操作要求在低温下进行。总体来说，蛋白质的有机溶剂沉淀法不如盐析法应用的普遍。有机溶剂的选择首先是能和水混溶，使用较多的有机溶剂是乙醇、甲醇、丙酮等。使用有机溶剂时，需小心操作，注意安全。大多数蛋白质通过加入等体积的丙酮或4倍体积的乙醇就可以沉淀下来，但也造成了蛋白质溶液的稀释，所以蛋白质的浓度一般要在1mg/mL以上。影响有机溶剂沉淀的因素有

如下几种。

(1) 温度 有机溶剂与水混合时, 会放出大量的热量, 使溶液的温度升高, 从而增加有机溶剂对蛋白质的变性作用。另外, 温度还会影响有机溶剂对蛋白质的沉淀能力, 一般温度越低, 沉淀越完全。因此, 在使用有机溶剂沉淀蛋白质时, 整个操作过程应在低温下进行。

(2) 蛋白质浓度和 pH 与盐析法中的作用基本相同。

(3) 离子强度 盐浓度太大或太低都对分离有不利影响, 较低浓度的中性盐存在有利于沉淀作用, 减少蛋白质变性, 一般在有机溶剂沉淀时, 中性盐浓度以 $0.01 \sim 0.05 \text{ mol/L}$ 为好, 常用的中性盐为乙酸钠、乙酸铵、氯化钠等。

(4) 金属离子 一些多价阳离子如 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 在一定 pH 下能与呈阴离子状态的蛋白质形成复合物, 这种复合物在水中或有机溶剂中的溶解度都大大下降, 而且不影响蛋白质的生物活性, 有利于沉淀形成, 并降低溶剂用量。实际操作时往往先加入有机溶剂沉淀去杂蛋白, 再加 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 沉淀目的物。

3.3 等电点沉淀法

两性生物物质在溶液 pH 处于等电点时, 分子表面电荷为零, 分子间静电排斥作用减弱, 因此吸引力增大, 能相互聚集起来, 发生沉淀。不同的两性电解质具有不同的等电点, 蛋白质也一样, 不同蛋白质有不同的等电点。根据这一特性, 用依次改变溶液 pH 的方法, 可将不同的蛋白质分别沉淀析出, 从而达到分离纯化的目的。如工业上生产胰岛素时, 在粗提液中先调 pH 8.0 去除碱性蛋白质, 再调 pH 3.0 去除酸性蛋白质。

等电点沉淀法只适用于水化程度不大、在等电点时溶解度很低的蛋白质, 如酪蛋白。对于亲水性很强的蛋白质, 在等电点附近仍有相当大的溶解度, 用等电点沉淀法往往沉淀不完全。利用等电点沉淀法除杂蛋白时必须了解蛋白质对酸碱的稳定性, 不要盲目使用。不少蛋白质与金属离子结合后, 等电点会发生偏移, 如胰岛素等电点为 5.3, 与 Zn^{2+} 结合后, 形成胰岛素锌盐, 其等电点为 6.2, 故溶液中含有金属离子时, 必须注意调整 pH 值。

该方法的优点是很多蛋白质的等电点在偏酸性范围内, 比如血清蛋白的等电点在 4.9, 脲酶的等电点在 5.0。调节 pH 所需的无机酸价格低, 操作也比较方便。所以对低 pH 敏感的目的蛋白, 应避免使用此法。但是很多蛋白质的等电点比较接近, 故很少单独使用等电点沉淀法。等电点沉淀法常与盐析法、有机溶剂沉淀法或其他沉淀方法联合使用, 以提高其沉淀能力。

3.4 非离子多聚物沉淀法

非离子多聚物是 20 世纪 60 年代发展起来的一类重要沉淀剂, 最早用于沉淀分

离血纤维蛋白原和免疫球蛋白以及一些细菌和病毒，近年来逐渐广泛应用于核酸和酶的分离提纯。这类非离子多聚物包括不同分子量的聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、葡聚糖等，其中应用最多的是聚乙二醇。一般使用分子量（即相对分子质量，下同）4000 以上的 PEG，常用分子量 6000 和 20000 的。PEG 无毒，不可燃，操作条件温和、简便，沉淀比较完全，而且对蛋白质有一定的保护作用。PEG 沉淀蛋白质的机理，到目前为止，仍未找到很合适的理论解释。有人认为是 PEG 分子在溶液中形成了网状结构，与溶液中的蛋白质分子发生空间排斥作用，使蛋白质分子凝聚和沉淀。

该方法受到蛋白质的分子量、浓度、溶液的 pH、温度以及 PEG 的平均分子量等因素的影响。蛋白质的分子量越大，蛋白质沉淀所需的 PEG 浓度越小；蛋白质浓度越高，越易于沉淀，但是蛋白质浓度也不能太高，一般要小于 10mg/mL；pH 越接近蛋白质的等电点，所需 PEG 浓度也越低；在 30℃ 以下一般都可以使用此法，只是操作时需要考虑到的目的蛋白对温度的敏感性；PEG 的分子量越高，沉淀蛋白质所需的浓度越低，但是 PEG 的分子量过高，会造成溶液黏度大，不利于操作。一般来说，PEG 浓度常为 20%。

用非离子多聚物沉淀蛋白质，一般有两种方法：①选用两种水溶性非离子多聚物组成液-液两相体系，不等量分配，而造成分离。此方法基于不同蛋白质表面结构不同，有不同的分配系数。并外加离子强度、pH 值和温度等因素的影响，从而扩大分离的效果。②选用一种水溶性非离子多聚物，使蛋白质在同一液相中，由于被排斥相互凝聚而沉淀析出。该方法操作时先离心除去大悬浮颗粒，调整溶液 pH 值和温度至适度，然后加入中性盐和多聚物至一定浓度，冷贮一段时间，即形成沉淀。

3.5 选择性沉淀法

选择性沉淀法的原理是利用蛋白质对某些物理或化学因素敏感性的不同，而有选择地使之变性沉淀，达到分离提纯的目的。不同蛋白质在不同的条件下有不同的稳定性，改变温度、pH 或加入有机溶剂，许多杂蛋白发生变性沉淀，而目的蛋白不形成沉淀，就可以分离出比较纯的目的蛋白。

利用对热的稳定性不同，加热破坏某些蛋白，而保留目的蛋白，可以达到除去杂蛋白的目的。比如利用杂蛋白在不同温度下产生沉淀，将样品溶液升温至 45~65℃，保温一定时间，使杂蛋白形成最大程度的沉淀，同时，目的蛋白的活性损失最少。由于不少蛋白酶在此温度范围内比较稳定，为了避免样品中发生酶解而造成目的蛋白的活性损失，操作前可适当加入蛋白酶抑制剂。

利用酸碱变性有选择地除去杂蛋白，很多蛋白质在 pH 5.0 或以下被沉淀，只有少数蛋白质在中性或碱性条件下形成沉淀。如果目的蛋白在此 pH 范围内能够保

持稳定，就可以通过调节 pH 来除去杂蛋白。这样的例子很多，比如用 2.5% 的三氯乙酸处理胰蛋白酶、抑肽酶或细胞色素 c 粗提液，均可除去大量杂蛋白，而对所提取的酶活性没有影响。该方法还适用于初步纯化原核生物中表达的重组蛋白质，因为很多细菌蛋白质的等电点在 pH5.0 左右，通过调节 pH 至其等电点，可以先除去这部分蛋白质。调节 pH 时，常用醋酸、柠檬酸或碳酸钠，也可采用高氯酸、三氯醋酸等强酸，但是需要注意安全。加入 10% 的三氯醋酸可以沉淀大部分的蛋白质，20% 的三氯醋酸可以沉淀分子量低于 20000 的蛋白质，操作时需冰水浴中进行。

方案 3.1 用盐析法选择性沉淀蛋白质

简介

蛋白质盐析常用中性盐，主要有硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、氯化钠等。其中应用最广的是硫酸铵，其优点是温度系数小而溶解度大（25℃时饱和溶解度为 4.1mol/L，即 541g/L；0℃时饱和溶解度为 3.9mol/L，即 515g/L），在这一溶解度范围内，许多蛋白质和酶都可以盐析出来，而且硫酸铵价廉易得，分段效果比其他盐好，不容易引起蛋白质变性。在建立沉淀蛋白质的最初盐析方案时，硫酸铵是最好的选择。盐析就是从没有颗粒物的含有蛋白质混合物溶液开始，使用分步盐析的方法将粗混合物分级分离成两个部分，只有一个部分含有目的蛋白。

材料

适当 pH 的缓冲液

硫酸铵

澄清的粗蛋白溶液

方法

1. 将蛋白质样品对缓冲液或缓冲液/硫酸铵混合液透析，硫酸盐的浓度要低于使蛋白质开始沉淀所需的盐浓度；
2. 进行一个预试验来确定蛋白质浓度、pH、盐浓度、温度和温育时间，在小试管中放入一系列的小份样品，在开始的试验中使用大的步级（如 1~2 个 pH 单位，或 5~10 倍的盐浓度差异），在后续的试验中可以将步级变窄；
3. 用量筒测量要浓缩的蛋白质的体积，然后倒入适当容积的烧杯中，烧杯置于冰浴中；
4. 在硫酸铵表中，查找产生 20% 饱和度所需的固体硫酸铵的量，称量出所需的硫酸铵，研磨成光滑的粉末；
5. 在冷室中将装有预冷的蛋白质溶液的烧杯放在一个搅拌器上，然后缓慢加入固体硫酸铵，让混合物搅拌 60min 以确保沉淀完全；

6. 将混合物转移至离心管中，平衡后于 4℃，10000g 离心 15min；
7. 轻轻倒出上清液，将蛋白质颗粒（占 0~20% 组分）及上清液（含有仍溶解于 20% 硫酸铵的蛋白质）保存好；
8. 将上清液放回冷室，缓慢地往上清液中加入硫酸铵至 30% 的浓度，让混合物搅拌 60min 以保证沉淀完全；
9. 将溶液转移至离心管中，平衡后于 4℃，10000g 离心 15min；
10. 轻轻倒出上清液，将蛋白质颗粒（占 20%~30% 组分）及上清液保存好；
11. 重复步骤 6~8，添加硫酸铵至浓度为 40%，50%，…最后达到 80% 饱和度，在增加硫酸铵浓度前，离心除去沉淀的蛋白质；
12. 在缓冲液中重悬回收的蛋白质沉淀（0~20%，20%~30%，30%~40%，…），用 SDS-PAGE 和快速 Western 印迹分析来分析这些蛋白质沉淀以及最终上清液中的目的蛋白和总蛋白。

问题分析及解决方案

1. 硫酸铵容易吸潮导致称量不准。

盐析一般用的硫酸铵容易吸潮，因而在使用前，一般先磨碎，然后平铺放入烤箱内 60℃ 烘干后再称量，这样更准确。

2. 盐析成败主要取决于什么？

盐析的成败主要决定于溶液的 pH 值与离子强度，溶液 pH 值越接近蛋白质的等电点，蛋白质越容易沉淀。当然还有蛋白质浓度、温度、温浴时间等因素会影响盐析，对于不同的蛋白质，可以通过预实验来确定最佳的蛋白质盐析条件。

3. 盐析最后得到的酶变性或者没有活性。

首先，整个过程最好在低温下进行；其次，在加入盐时应该缓慢均匀，搅拌也要缓慢，越到后来越注意速度缓慢，如果出现一些未溶解的盐，应该等其完全溶解后再加盐，以免引起局部的盐浓度过高，而导致酶失活，盐析后最好搅拌 40min~1h 而且再在冰浴中放置一段时间；最后，盐析后的蛋白质最好尽快脱盐处理，以免变性，透析较慢，也可以用超滤或者脱盐柱处理的方法脱盐。另外，为了避免盐对酶的影响，也要在脱盐处理后再测酶活性。

方案 3.2 用有机溶剂沉淀蛋白质

简介

在水溶液中，当有机溶剂浓度达到 50% 时，大多数分子量大于 20000 的蛋白质都会被沉淀下来。一般来说，较大的蛋白质或具有更多亲水性的蛋白质要比疏水性较小的蛋白质更易在较低浓度的有机溶剂中沉淀下来。外加有机溶剂被作

为一种简便的浓缩蛋白质的方法，用于大容量或通过边浓缩边分级分离蛋白质的过程中。

材料

乙醇或丙酮（冷却至 -20°C ）

适当 pH 的缓冲液

粗的蛋白质溶液

冰-盐浴

方法

1. 进行预实验以确定蛋白质和沉淀剂的最佳浓度以及最佳的 pH 和孵育时间；
2. 用量筒测量蛋白质溶液的体积，将溶液倒入玻璃烧杯中，置于冰-盐浴中，使溶液温度降到 0°C ；
3. 往每 100mL 的蛋白质溶液中缓慢加入 100mL 丙酮或乙醇（预冷至 -20°C ），并在冰上连续搅拌，确保温度稳定在 0°C ；
4. 在有机溶剂加入完全后，要在冰上连续搅拌混合 10~20min；
5. 将混合物转移至预冷的离心管中，平衡后于 4°C ，10000g 离心 10min，以回收沉淀的蛋白；
6. 尽量弃去上清液，将蛋白质沉淀重悬于最小体积（1~2 倍的沉淀体积）的冷的缓冲液中；
7. 在用于纯化操作之前，用膜过滤或离心除去难溶解的残留颗粒。

问题分析及解决方案

用有机溶剂沉淀的蛋白质变性怎么办？

常温下有机溶剂可使蛋白质变性，低温条件下可减慢变性速度。因此用有机溶剂沉淀蛋白质时应在低温条件下进行，并在加入有机溶剂时注意搅拌均匀以避免局部浓度过大。如利用丙酮沉淀蛋白质时，必须在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 低温下进行。蛋白质被丙酮等有机溶剂沉淀后，应立即用水或缓冲液溶解，以降低有机溶剂浓度，否则蛋白质也会变性。另外，有机溶剂在中性盐存在时能增加蛋白质的溶解度，减少变性，提高分离的效果，在有机溶剂沉淀中添加中性盐的浓度一般为 0.05mol/L 左右。对于某些敏感的酶和蛋白质，使用有机溶剂沉淀尤其要小心。

方案 3.3 使用蛋白质排阻和拥挤剂选择性沉淀蛋白质

简介

用于蛋白质沉淀的拥挤（crowding）剂和分子排阻聚合物包括聚乙二醇（PEG）、聚丙烯醇（PPG）、聚乙烯醇（PVA）、甲基纤维素、葡聚糖和羟丙基葡聚糖。PEG 常用于蛋白质的沉淀，它作为一种非离子化和水可溶性物质能引起特

定蛋白质在不连续的 PEG 浓度下从溶液中沉淀出来。

材料

粗蛋白质溶液

适当的 pH 缓冲液

沉淀剂 PEG

方法

1. 进行预实验以确定蛋白质和沉淀剂的最佳浓度以及最佳的 pH、温度和孵育时间；
2. 配制沉淀剂的水溶液，缓慢地将 PEG 溶液加到一定量的蛋白质溶液中，并且轻轻地连续搅拌；
3. 蛋白质溶液和沉淀剂混合后，继续搅拌 30~60min，直到形成沉淀物，将混合物转移至离心管；
4. 4℃，10000g 离心悬浮液 15min，弃去上清液，尽量倒干残留的液体；
5. 收集沉淀物，然后将蛋白质沉淀重悬于最小体积（1~2 倍的沉淀体积）的冷的缓冲液中；
6. 如果有必要从蛋白质中除去残留的 PEG，可以推荐用硫酸铵沉淀方法，超滤或者离子交换色谱。

问题分析及解决方案

1. 如何选择合适的沉淀方法？

沉淀方法可以用来沉淀目的蛋白，也可以用来去除杂蛋白，这是沉淀方法两个方面的应用。沉淀方法的选择很可能取决于逆转沉淀的难易程度，很强的沉淀剂（如聚合电解质）可能很难或很慢从目的蛋白中除去或释放出来，所以，要先使用强沉淀剂将打算弃掉的非目的蛋白沉淀，然后选择聚集性较差但较易控制和可逆的沉淀剂来捕获上清液中剩余的蛋白质。

2. 沉淀前蛋白质样品应该怎么处理？

不管采用何种方法来沉淀蛋白质，在蛋白质沉淀之前，样品必须澄清，常用的方法是通过离心去除颗粒物，也可以通过调节 pH、调节盐浓度来起作用，或者将溶液在 Whatman 1 号滤纸上用 2~4mm 的“助滤”层来过滤。合适的助滤材料包括纤维素纤维、硅藻土材料等。如果这些都不起作用，可以使用一些更强的颗粒和胶体胶凝剂。另外，除了澄清，进行沉淀前的样品必须具有一定的浓度才能达到好的效果，所以还需要对样品进行浓缩，一般让蛋白质的起始浓度在 0.01%~2%。

参 考 文 献

- [1] Cañas B, et al. Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. *J Chromatogr A*, 2007, 1153 (1-2): 235.
- [2] Mondal K, et al. Emerging options in protein bioseparation. *Biotechnol Annu Rev*, 2006, 12: 1.

- [3] Simpson R J. Purifying Proteins for Proteomics: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003: 41.
- [4] Trevino S R. Measuring and increasing protein solubility. J Pharm Sci, 2008, 97 (10): 4155.
- [5] [美] 科林根 J E 等著. 精编蛋白质科学实验指南. 李慎涛等译. 北京: 科学出版社, 2007: 75.
- [6] 陆健等. 蛋白质纯化技术及应用. 北京: 化学工业出版社, 2005: 22.
- [7] 颜真等. 蛋白质研究技术. 西安: 第四军医大学出版社, 2007: 35.



第 4 章 蛋白质的浓缩

蛋白质在制备过程中由于分离纯化的过程而使样品变得很稀，澄清后的蛋白质溶液常常需要进行浓缩，以提高蛋白质的浓度，减少样品体积，这样有利于随后进一步进行蛋白质的色谱纯化。常用的浓缩方法有：吸附法、超滤法、沉淀法、透析法、冷冻干燥法和双水相分离法等。每种方法都有自己的优缺点，比如吸附法选择性比较差，不能连续操作，浓缩倍数较低；超滤法成本低，操作方便，条件温和，能较好地保持生物大分子的活性，回收率高等；沉淀作用对样品中蛋白质浓度要求在 100mg/L 以上，并且由于相变导致收率较低；用透析法浓缩需要比较长的时间，体积也受到一定的限制；冷冻干燥所需时间长，收率也低，而且在浓缩蛋白质的同时浓缩了盐等等。

4.1 吸附法

通过吸附剂直接吸收除去溶液中水分子使之浓缩。所用的吸附剂必须与溶液不起化学反应，对蛋白质不吸附，易与溶液分开。常用的吸附剂有聚乙二醇、聚乙烯吡咯酮、蔗糖和凝胶等。吸附法是最简单快速的浓缩蛋白质溶液的方法，所需仪器简单，适用于稳定性比较差的蛋白质。

可以利用透析袋浓缩蛋白质溶液：将要浓缩的蛋白质溶液放入透析袋（无透析袋可用玻璃纸代替），结扎好后把高分子聚合物如聚乙二醇、聚乙烯吡咯或蔗糖等撒在透析袋外即可；也可将吸水剂配成 30%~40% 浓度的溶液，将装有蛋白质溶液的透析袋放入即可。吸水剂用过后，可放入温箱中烘干或自然干燥后，仍可再用。

还可以利用凝胶来浓缩蛋白质，凝胶是一种惰性的多孔基质聚合物，孔径较小的凝胶具有很强的吸水性能，它能吸收低分子量的物质，如水、葡萄糖、蔗糖、无机盐等，适宜浓缩分子量 10000 以上的蛋白质。根据干胶的吸水量和蛋白液需浓缩的倍数而称取所需的干胶量。将干的凝胶比如葡聚糖凝胶（Sephadex），加入到蛋白质溶液中吸收水和其他小分子，当凝胶完全膨胀后，用过滤或离心的方法除去凝胶，分离出蛋白质。常用的凝胶有 Sephadex G 系列及 Bio-Gel P 系列凝胶。必须注意，浓缩溶液的 pH 值应大于被浓缩物质的等电点，否则在凝胶表面产生阳离子

交换，影响蛋白质的回收率。

4.2 超滤法

超滤法是使用一种特别的薄膜对溶液中各种溶质分子进行选择过滤的方法，液体在一定压力下或离心力作用下通过膜时，溶剂和小分子透过，大分子受阻保留，这是近年来发展起来的新方法，最适于生物大分子尤其是蛋白质的浓缩或脱盐，并具有很多优点。应用超滤法关键在于膜的选择，不同类型和规格的膜，水的流速、分子量截止值（即大体上能被膜保留分子最小分子量值）等参数均不同，必须根据工作需要来选用。常用的两种超滤浓缩装置见图 4.1 和图 4.2。



图 4.1 离心超滤装置

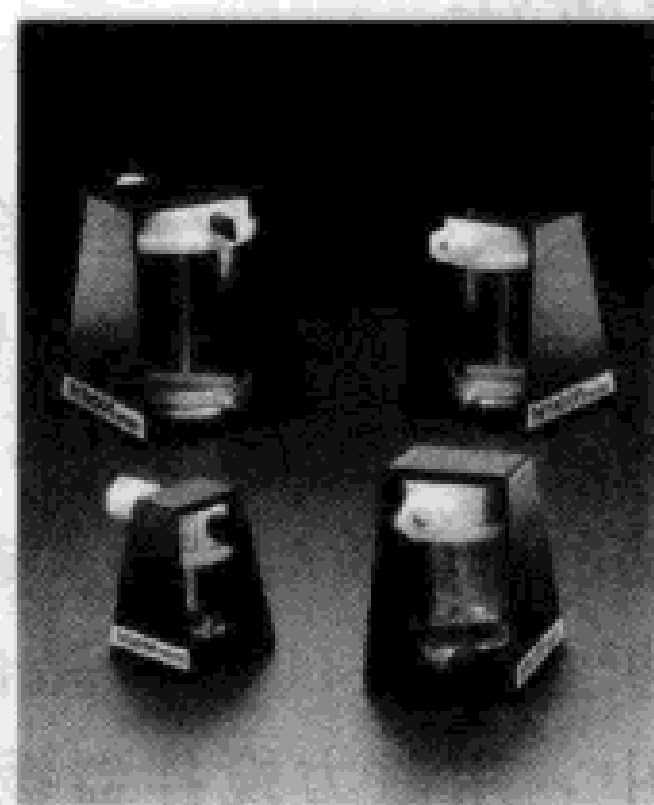


图 4.2 加压超滤装置

影响超滤的因素主要是流量，尤其对于大规模的浓缩。操作压力、样品溶液的组成及黏度、流速、膜以及超滤系统的选择都影响到流量。高的压力能够提高流量，但是如果超过一定的限制后，极化作用就会限制流量，而且会增加膜的污染和泵的运行费用；高的流速可以减轻膜的污染和极化作用，但是过高的剪切力会使蛋白质变性；溶液黏度升高会使流量减慢，提高温度虽然可以降低黏度，但一般不考虑此措施，以免因为热而使蛋白质变性；通常在浓缩前使用离心、絮凝、透析、粗滤或微滤来除去溶液中的杂质，以减少对膜的污染；缓冲液的 pH 不要接近或等于目的蛋白的等电点。

超滤浓缩的具体操作可以根据所需处理的样品体积来选择，一般用于超滤浓缩的装置可以从 Millipore、Filtron、Whatman、Amicon 和 Sartorius 等公司获得，样品处理量可以从几毫升到几百毫升，通常用于蛋白质浓缩的膜的截留分子量 (MWCO) 从 1000~1000000。PALL 公司的仪器可以浓缩 5~150mL 的样品，其中 150mL 的有 Navacell 或 Omegacell 两种类型装置。样品体积比较少时，可以利用离心力作用驱动小分子物质通过半透膜。

4.3 沉淀法

在早期的蛋白质纯化过程中，沉淀法作为分离蛋白质的主要方法之一，但是现在该法只用于蛋白质的初步分离，然后采用色谱方法进一步纯化。沉淀法也用于蛋白质的浓缩。蛋白质分子在水溶液中的溶解性受到蛋白质分子表面亲水性和疏水性带电基团分布的影响，这些基团与水溶液中离子基团相互作用，通过改变 pH 值或离子强度，加入有机溶剂或多聚物，可以促进蛋白质分子凝聚，形成蛋白质沉淀，通过离心或过滤可以获得沉淀物，然后利用合适的缓冲液清洗、溶解沉淀物，再经过透析或凝胶过滤，除去残留的溶剂成分。

4.4 透析法

用透析来进行浓缩比较适合于 50mL 以下的样品体积，但操作时间稍长，常使用 20% 的分子量大于 20000 的聚乙二醇或干的葡聚糖凝胶。具体的操作过程如下：将商品化的透析袋适当处理后，封住一端，可先用纯水检查透析袋的完整性，然后将需要浓缩的蛋白质溶液倒入透析袋中，赶出袋中的空气，封住袋子的另外一端，将透析袋放入 10 倍于蛋白质样品体积的装有 20% (200g/L) 聚乙二醇溶液的容器中，用磁力搅拌器缓慢搅拌，直到达到所需浓度为止。若使用干的葡聚糖凝胶 G-25，用量为 25g/100mL 蛋白质样品，需注意不能够浓缩到完全脱水。

4.5 冷冻干燥法

冷冻干燥技术在热不稳定的蛋白质、多肽等的浓缩、保存方面有着重要作用，利用低温、低压来取出可溶性的水，它对于超滤膜不能截留的低分子量多肽浓缩效果好。

冷冻干燥系统由干燥箱、真空系统、制冷系统组成，近年来还发展了自动整理设备、自动装瓶和倒瓶设备。干燥箱通常由不锈钢制成，是压力容器，其内表面光洁性要好，以便于清洁，提高抗腐蚀性。冷冻干燥系统中最关键的是旋转式油泵。具体操作时，将需冻干的样品装入冷冻干燥烧瓶中，小玻璃瓶常用一个橡皮塞部分塞住，在塞子上开一道槽使水蒸气逸出。小玻璃瓶放在金属托盘中，放入冻干机进行浓缩。

对蛋白质，干燥后残余水的多少可能影响其活性的稳定性。将样品干燥到最低残余水的水平，在细分小瓶，在几个相对不同的湿度得到不同残余水含量的样品，进行稳定性研究，以确定合适的残余水分含量。

4.6 双水相分离法

利用两种多聚物，或多聚物与盐在水相中的不相容性，可以从细胞破碎后的细胞碎片中直接分离、纯化蛋白质，同时起到浓缩蛋白质的作用。该方法比较温和，一般不造成蛋白质变性失活，可在室温下进行，双水相中聚合物还可提高蛋白质的稳定性。最常用的多聚物是聚乙二醇和葡聚糖。葡聚糖的使用由于其成本较高及其造成溶液黏度较高而受到限制，可以使用价格较低、黏度也不高的变性淀粉替代葡聚糖。

采用双水相系统浓缩目的蛋白，受到聚合物分子量及浓度、溶液 pH、离子强度、盐类型及浓度等因素的影响，各因素之间也相互影响。以 PEG/葡聚糖系统为例，通过降低 PEG 分子量、增加葡聚糖分子量或提高 pH，都可以提高目的蛋白在 PEG 相中的分配系数。

在实验室中，可以采用 5~10mL 塑料离心管试验比较合适的条件。先配制较高浓度的溶液（40%PEG 和 30%葡聚糖），使用时按照一定比例添加，以达到在双水相系统中的预期浓度。操作时先混合蛋白质样品、PEG 和葡聚糖溶液 1min，然后 3000g 离心 5min，富集在聚合物相中的目的蛋白经过滤得到。分别测定两相的体积及目的蛋白在两相中的浓度，最后确定 PEG 和葡聚糖各自合适的使用浓度。一般采用 Bradford 方法测定蛋白质，以避免 PEG 的影响。

方案 4.1 用透析袋进行脱盐、浓缩和更换缓冲液

简介

透析膜是半透膜。蛋白质是大分子物质，它不能透过透析膜，而小分子物质（无机盐、单糖等）可以自由通过透析膜，与周围的缓冲溶液进行溶质交换，进入到透析液中。在实验室分离纯化蛋白质的过程中，常利用透析的方法除去蛋白质溶液中的小分子物质。当样品体积小于 200mL 时，使用这种方案最好，对于更大的体积，可使用多个透析袋。

材料

- 50%（体积分数）乙醇
- 10mmol/L EDTA, pH 8.0
- 0.05mol/L NaHCO₃
- 1g/L 叠氮钠
- 蛋白质溶液
- 透析袋
- 透析袋夹

方法

1. 选择合适 MWCO 的透析袋，剪下需要长度的干透析袋，只能用无粉手套触摸透析袋；

2. 对于新的透析袋要进行必要的处理，然后才能用于透析；

3. 用一个透析袋夹关闭透析袋的一端，把蛋白质样品加入透析袋中，再用一个透析袋夹关闭透析袋另一端，在透析袋里留下一定的空间，并检查每一端样品有无渗漏；

4. 将装好样品的透析袋放入装有透析缓冲液的烧杯中，确信透析袋被完全浸没，然后把烧杯放在磁力搅拌器上搅拌，整个装置放在有适当温度（通常为 4℃，以增加蛋白质的稳定性）的环境中；

5. 可以通过测定透析缓冲液的电导来监测，当透析液的电导增加慢下来时，就更换透析缓冲液，直到在经过 1~2h 的搅拌后电导基本保持不变为止，如果没有电导仪，至少再更换一次缓冲液，间隔时间为 4~6h，若样品体积较大或透析袋大于 20mm，间隔时间可为 8~12h；

6. 从缓冲液中取出透析袋，用蒸馏水冲洗，除去夹子后将透析过的样品小心地倒入一个合适的容器内；

7. 通过比较透析样品和未用过的透析缓冲液的电导值，证实达到了所希望的盐浓度。

问题分析及解决方案

1. 如何选择合适的透析袋？

一般来讲，影响透析的因素有很多，如分子量、三维结构、水合程度和电荷、缓冲液的 pH 值和离子强度等，根据蛋白质的特性以及具体的要求来选择合适的透析袋，例如做快速透析，就选择与蛋白质分子量相近的 MWCO 的透析袋；如果需要高回收率，就选择远低于蛋白质分子量的 MWCO 的透析袋；那么最好的分离效率，一般是蛋白质分子量与截留分子量相差 10 倍，就可获得好的透析效果。例如，对于常规的蛋白质，使用 MWCO 12000 的透析袋；对于小蛋白质，使用 MWCO 3500 的透析袋。

2. 如何处理新的透析袋？

将剪下的新透析袋浸入蒸馏水中，用手指捏住透析袋将两层分开，先用 50% 乙醇彻底冲洗透析袋里外侧（对于蛋白质方面的工作，建议不要煮透析袋，为了更彻底地除去甘油和硫，可以将透析袋浸入 50% 的乙醇中），然后在一个 1L 的烧杯中混合 400mL 10mmol/L EDTA (pH 8.0) 和 400mL 0.05mol/L NaHCO₃，将透析袋移入烧杯中，用磁力搅拌器搅拌 30min；用 800mL 水替换溶液，搅拌 10min，重复一次，将透析袋移入新蒸馏水中。透析袋用完之后，4℃ 保存于含 0.1% 叠氮钠的水中，任何时候都不能让透析袋变干。

方案 4.2 用不对称圆盘膜超滤进行浓缩或透析

简介

用超滤可以很容易地浓缩起始浓度 $\leq 20\text{mg/mL}$ 的蛋白质样品。由于大多数的盐和水一起通过膜，所以样品的体积减少不会明显地改变缓冲液的组成。用超滤方法浓缩蛋白质有操作简便、条件温和、回收效率高等诸多优点。

材料

蛋白质溶液

5% (体积分数) 乙醇

超滤膜, MWCO >10000 , 直径与搅拌室相适合

超滤器, 搅拌室型 (如 Amicon 公司的 8000 系列), 带以与 N_2 源相连的管子
烧杯

N_2 气瓶和二级压力调节器

方法

1. 用蒸馏水冲洗新超滤膜, 让其彻底湿透, 只能用无粉末的手套触碰, 拿住膜的边缘, 防止将其擦伤;
2. 将超滤膜装入超滤室内, 光面朝上, 根据样品的量, 选用适当大小的超滤器, 确保 O 形圈密封完整, 并正确地安放在超滤膜上, 以防渗漏;
3. 往超滤室内加样品至最大操作体积, 可以通过加样孔直接倒入样品, 将加样孔的盖盖好, 检查压力释放阀是否处于关闭的位置;
4. 于冷室在磁力搅拌器上搅拌, 以不产生泡沫或无剧烈振动的最高速为宜, 将出液管对准超滤液收集容器;
5. 将超滤室连接到氮气调节器上, 调节到适当的压力, 检查超滤器的底部有无液体, 如果有液体, 则除去压力, 检查安装有无渗漏;
6. 监测流速和超滤液的体积, 直到达到所希望的浓缩率, 如果样品总体积超过了超滤室的容量, 当体积下降了 $1/3$ 时, 可以重新装满超滤室;
7. 关闭搅拌器和氮气流, 让超滤室内的压力慢慢释放, 然后重新搅拌 2min, 重悬凝胶层中的蛋白质, 关闭搅拌器, 通过倾倒或从加样孔中用移液器吸的方法移出超滤液, 如果膜是反复使用的, 注意不要让移液管接触到膜表面;
8. 如果膜是反复使用的, 从边缘将其拿住, 用蒸馏水仔细冲洗, 并尽快地按生产商建议的清洁方法进行清洁, 在任何时候都要保持膜湿润, 然后于 4°C 保存于 5% 的乙醇中。

问题分析及解决方案

超滤过程中流速越来越慢。

首先, 在恒温和恒压和情况下, 流速是超滤膜面积和超滤程度 [能够避免浓度

极化 (polarization) 的超滤程度] 的函数。蛋白质在膜表面的聚集会导致滤过变慢, 甚至样品的蛋白质浓度相对较低时也一样。其次, 由于黏度的影响, 在 4℃ 时的滤过率通常只有在 25℃ 时的一半。采用搅拌式超滤装置时, 当蛋白质向滤膜表面堆积时, 被电磁搅拌器分散到溶液中, 这样就不容易产生浓度极化现象, 提高了超滤的速度。另外, 不要将样品浓缩到样品接触不到搅拌棒的位置, 因为除了浓度很稀的样品以外, 所有的样品, 没有搅拌都会导致严重的浓度极化。

参 考 文 献

- [1] Simpson R J. Purifying Proteins for Proteomics: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003: 17.
- [2] Trevino S R. Measuring and increasing protein solubility. J Pharm Sci. 2008, 97 (10): 4155.
- [3] 范代娣等. 重组蛋白分离与分析. 北京: 化学工业出版社, 2004: 175.
- [4] [美] 科林根 J E 等著. 精编蛋白质科学实验指南. 李慎涛等译. 北京: 科学出版社, 2007: 69.
- [5] 陆健等. 蛋白质纯化技术及应用. 北京: 化学工业出版社, 2005: 17.
- [6] 辛秀兰等. 生物分离与纯化技术. 北京: 科学出版社, 2008: 249.
- [7] 徐玉福等. 微结构葡聚糖凝胶浓缩分离蛋白质的性能. 化工学报, 2007, 12 (58): 3097.



第2部分

色谱法分离纯化蛋白质

色谱法又称层析法，是由俄国化学家 Tswett 在 1907 年最先提出的。色谱法是目前广泛应用的一种分离技术。色谱法已成为生物化学、分子生物学及其他学科领域有效的分离分析工具之一。

色谱法是利用不同物质理化性质的差异而建立起来的技术。所有的色谱系统都由两个相组成：一个是固定相，它或者是固体物质或者是固定于固体物质上的成分；另一个是流动相，即可以流动的物质，如水和各种溶剂。当有待分离的混合物随流动相通过固定相时，由于各组分的理化性质存在差异，与两相发生相互作用（吸附、溶解、结合等）的能力不同，在两相中的分配比例不同，而且随溶剂向前移动，各组分不断地在两相中进行再分配。与固定相相互作用力弱的组分，随流动相移动时受到的阻滞作用小，向前移动的速度快；反之，与固定相相互作用强的组分，向前移动的速度慢。分部收集流出液，可得到样品中所含的各单一组分，从而达到将各组分分离的目的，这就是色谱法的基本原理。

根据色谱峰的位置及峰高或峰面积，可以定性及定量。色谱法与光学、电学或电化学仪器联用，可检测出色谱分离后各组分的浓度或质量，同时绘出色谱图。色谱仪与电子计算机联用，可使操作及数据处理自动化，大大缩短分析时间。与其他分离纯化方法相比，色谱分离具有很多优点，比如分离效率高，应用范围广，选择性强，设备简单，操作方便等，因此适用于杂质多、含量少的复杂样品分析，尤其适用于生物样品的分离分析。色谱法的缺点是处理量小、操作周期长、不能连续操作，因此主要用于实验室。

色谱法不仅适用于分离小分子物质，比如氨基酸、核苷酸、单糖、色素、生物碱和抗生素等，同样适用于分离生物大分子物质，如蛋白质、核酸和多糖等。对于蛋白质的分离纯化来说，一般采用的是液-固色谱法和柱色谱法。应用柱色谱法纯化蛋白质时，关注于将不同的蛋白质通过固-液两相间的分配差异进行相互分离：

固定相（色谱颗粒，通常填充在圆柱中），流动相（通常是缓冲液）。除凝胶过滤色谱外，所有应用于蛋白质纯化的柱色谱都具有吸附性质。在通常情况下分离蛋白质混合物时，进样后柱色谱条件能够选择性保留目的蛋白。在理想状态下，此目的蛋白为唯一保留在色谱柱上的组分，但事实上很难实现。上样完成后，色谱柱用流动相冲洗（灌洗）以除去不被色谱柱保留的组分。改变流动相的组成，将色谱柱吸附的组分洗脱下来，洗脱液收集于试管中，用于进一步的总蛋白测定和目的蛋白检测，收集含有目的蛋白的部分用于下一步的纯化，这就是用色谱法分离纯化蛋白质的基本步骤。

任何纯化过程的初始步骤均可以设计成为：①分离和浓缩目的蛋白；②去除大部分杂质，包括颗粒物、脂质和可能污染或堵塞色谱柱的其他物质。初始化步骤不是着重于目的蛋白的纯化程度，而在于对目标蛋白有很高的回收率。在经过了粗分离之后，蛋白纯化就进入下一阶段，称为中间纯化期。在这个阶段，样品中应当仅存留少量的其他类型的生物分子（如脂质和核酸）。目的蛋白和残留的杂蛋白质可能具有相同的结构和功能的属性，其性质取决于粗分离所用的分离技术。所以在中间纯化期最好选择与粗分离期所选择的不同属性对目的蛋白和杂质蛋白进行分离。联合使用离子交换色谱和疏水相互作用色谱或者联合使用阳离子交换和阴离子交换都是非常有效的蛋白质分离纯化策略。在中间纯化期所用的色谱技术应该根据单一理化性质的细小差异将目的蛋白和杂蛋白分开，首要目标是高分辨率和高回收率，要实现这些目标，应该选用直径更小的色谱介质，较小的凝胶颗粒介质的优点是能减小峰宽，从而提高分辨率。

每一个蛋白质具有一系列别于其他蛋白质分子的特定属性，这些属性包括大小、形状、总电荷、表面疏水基团百分率、与特定配基结合的能力等等。单就任何一项属性作比较，有相当多的蛋白质分子与其他蛋白质分子在性质上相近。但是，所有蛋白质都具备独特的上述属性的特定组合，构成了这个蛋白质特有的色谱“指纹”。色谱技术可以根据蛋白质这些属性上的差异将不同的蛋白质进行分离，采用任何一个利用蛋白质分子性质差异的色谱技术将大大提高目标蛋白的纯度，组合使用这些色谱技术可以制备高纯度的蛋白质。用于蛋白质分离纯化的色谱方法主要有凝胶过滤色谱、离子交换色谱、亲和色谱、疏水色谱。每种色谱方法都有自己的特点：①凝胶过滤色谱，根据蛋白质分子量或分子形状的差异达到分离的目的，效率不高，对低浓度的样品没有富集作用，上样量小；②离子交换色谱，根据蛋白质在特定 pH 条件下表面电荷的差异进行分离，样品必须没有高浓度的盐；③疏水色谱，根据蛋白质表面疏水性的差异分离蛋白质，分离效率高，上样量大，特别适合分离盐析沉淀的样品；④亲和色谱，基于蛋白质和特定配基之间的特异结合作用进行分离，是最有效的手段，关键是了解目标蛋白的特性以便选择合适的色谱填料。

应用色谱技术可以将许多蛋白质有效地分离开来，然而对于感兴趣的蛋白质而言，其回收率可能大大低于 100%，通常情况下，回收率在 25%~95% 之间。在保

证理想的蛋白质纯度的前提下,设计的纯化方案应采用尽可能少的色谱分离步骤。蛋白质的纯度需要从其结构和功能两方面来评判,这取决于目的蛋白的性质和目的用途。如果研究的目的是检查目的蛋白的功能,那么在纯化过程中必须保持目的蛋白的活性,这样在纯化的每一步都需要对目的蛋白的纯度进行功能性评定。如果研究的目的是检查目的蛋白的结构,那么必须保持结构的完整性,这就需要对结构纯度进行评定。当然,在蛋白质纯化过程中,不仅要考虑纯度,同时还要考虑到量的问题,那就必须注意在每步纯化过程中保持尽可能高的收率。每一步色谱分离技术的具体条件对于目标蛋白的回收率有着至关重要的影响,因而常常需要优化。蛋白质纯化体系常常采用3~5个高分辨率的色谱分离步骤,蛋白质纯化常用的色谱技术将在下列各章中予以讨论。

参 考 文 献

- [1] Simpson R J. Purifying Proteins for Proteomics: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003: 147.
- [2] [美]科林根J E等著.精编蛋白质科学实验指南.李慎涛等译.北京:科学出版社,2007:234.
- [3] 鲁碧楠等.蛋白质分离分析中的色谱技术新进展.中国现代应用药学杂志,2009,26(13):1116.
- [4] 陆健等.蛋白质纯化技术及应用.北京:化学工业出版社,2005:29.
- [5] 辛秀兰等.生物分离与纯化技术.北京:科学出版社,2008:138.



第 5 章 凝胶过滤色谱

5.1 基本原理

凝胶过滤色谱，又称空间排阻色谱、分子筛等。工作原理是应用蛋白质分子量或分子形状的差异来进行分离。由于通过此项技术进行分离的蛋白质分子一般具有相似的分子形状，简单而言，凝胶过滤色谱可以描述为根据分子量的差异将蛋白质分离开来。应用凝胶过滤色谱时，将含有蛋白质的溶液通过装有多孔性介质填料的色谱柱床，收集流出的蛋白质组分。当样品从色谱柱的顶端向下运动时，大的蛋白质分子不能进入凝胶颗粒而迅速被洗脱，而小的蛋白质分子能够进入凝胶颗粒，其在凝胶柱中的迁移被延缓。而且所有能进入凝胶的蛋白质在凝胶中的保留时间也不同，蛋白质分子越小，它可能进入的路线就越多，因此它在多孔颗粒结构中的保留时间就越长。因此分子量越大，流出的时间越早，最终使样品中不同分子大小的蛋白质彼此分离。其分离的原理如图 5.1 所示。

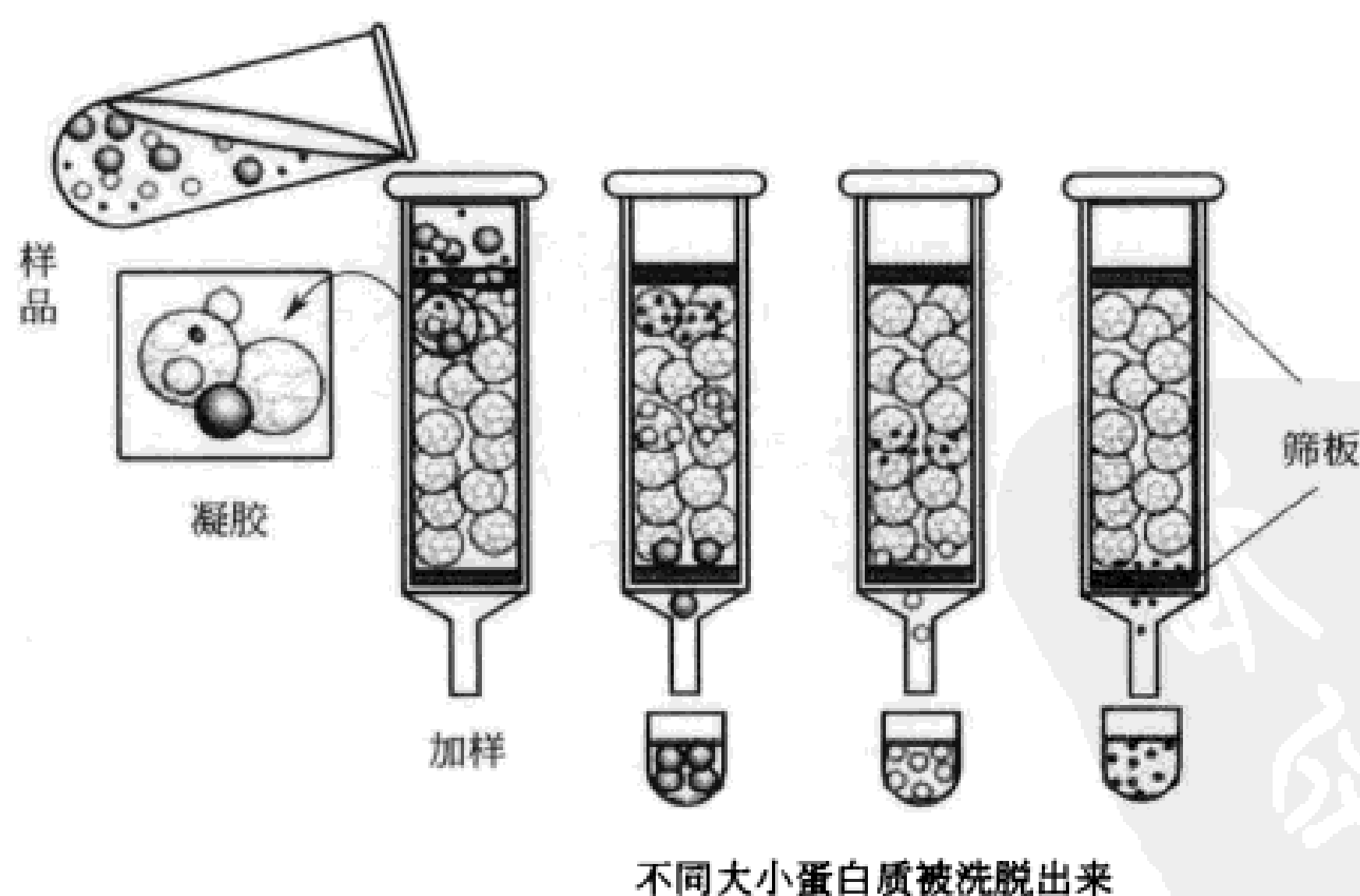


图 5.1 凝胶过滤色谱的原理

大多数凝胶基质都是化学交联的聚合物分子制备的，交联程度控制凝胶颗粒的平均孔径。因此用任何一种聚合物合成的凝胶都可以有不同的孔径，交联程度越高，平均孔径越小，凝胶颗粒的刚性越强。常用的色谱基质有葡聚糖凝胶（Sephadex）、

琼脂糖凝胶 (Sephacrose)、聚丙烯酰胺凝胶 (Bio-Gel P) 等 (见表 5.1)。高度交联的凝胶基质可以用来分离蛋白质和其他分子量更小的分子, 也经常用于从蛋白质溶液中除去低分子量的缓冲液成分和盐。较大孔径的凝胶用于蛋白质分子之间的分离。在任何给定条件下使用什么孔径的凝胶最合适, 很大程度上取决于目标蛋白的分子量和主要蛋白质杂质的分子量。

表 5.1 常用凝胶过滤色谱介质的分离范围

凝胶介质	蛋白质的分离范围/ $\times 10^3$	凝胶介质	蛋白质的分离范围/ $\times 10^3$
Sephadex G25	1~5	Sephacrose 2B	70~40000
Sephadex G50	1.5~30	Bio-Gel P-4	0.5~4
Sephadex G100	4~150	Bio-Gel P-10	5~17
Sephadex G200	5~600	Bio-Gel P-60	30~70
Sephacrose 6B	10~4000	Bio-Gel P-150	50~150
Sephacrose 4B	60~20000	Bio-Gel P-300	100~400

通过凝胶过滤色谱分离蛋白质要求使用长的色谱柱。足够的柱长是使蛋白质混合物得到充分分离所必需的, 混合物在沿色谱柱向下迁移的过程中按分子大小和形状分离成不连续的蛋白质带。在蛋白质纯化的初期阶段很少使用凝胶过滤色谱。为了获得有效的分离, 凝胶过滤色谱的上样体积必须很小, 而且目的蛋白已经相对比较纯, 上样后用合适的缓冲液冲洗将蛋白质成分从柱上顺序洗脱。很多情况下, 柱上流出的洗脱液要经过一个检测器, 当含蛋白质的带从柱上洗脱时可以立刻检测到。虽然凝胶过滤色谱是一项有效的分离技术, 但是对于上样体积而言, 洗脱液一般都高度稀释。与其他色谱介质相比, 柱流速也常常低得多, 这导致整个过程时间比较长。

5.2 实验方案设计

5.2.1 凝胶介质的选择

各种凝胶在结构上是很相似的, 都是三维空间网状交织的高分子聚合物。常用的凝胶介质有 Sephadex G 系列、Sephacrose 系列和 Bio-Gel P 系列等。可以根据待分离蛋白质和杂质蛋白质的分子量选择具有相应分离范围的凝胶, 同时还要考虑分辨率和稳定性等因素。如果目的是要将样品中的蛋白质和小分子物质分开, 由于它们在分配系数上有显著差异, 一般可选用 Sephadex G-25 和 G-50; 对于小肽和低分子量物质的脱盐, 可使用 Sephadex G-10、G-15 及 Bio-Gel P-2 或 P-4。如果目的是将样品中一些分子量比较近似的蛋白质进行分离, 一般选用排阻限度略大于样品中最高分子量物质的凝胶, 色谱分离过程中这些物质都能不同程度地深入到凝胶内部, 由于保留时间不同, 最后得到分离。

5.2.2 凝胶介质的预处理

凝胶使用前应用水充分溶胀 (胶: 水=1:10), 不同型号的凝胶溶胀所需的时间

间不同，G-75 以下的凝胶只需要泡一天，但是 G-100 以上的型号，至少需要泡 3 天。自然溶胀费时较长，加热可使溶胀加速，即在沸水浴中将湿凝胶浆逐渐升温至近沸，1~2h 即可达到凝胶的充分胀溶，加热法既可节省时间又可消毒。在烧杯中将干燥凝胶加水或缓冲液，搅拌、静置，倾去上层混悬液，除去上清液中细小的凝胶碎块，如此重复数次，直到上清液澄清为止。

5.2.3 色谱柱的选择

色谱柱的体积和高径比与色谱分离效果的关系相当密切。色谱柱的长度与直径的比一般称为柱比。凝胶柱床的体积、柱长和柱的直径以及柱比的选择必须根据样品的数量、性质以及分离目的加以确定。组别分离时，大多采用 2~30cm 长的色谱柱，柱床体积为样品溶液体积的 5 倍或略多一些就够了；分级分离时，一般需要 100cm 左右长的色谱柱，并要求柱床体积大于样品体积 25 倍以上。对于柱的直径，一般在 1~5cm 范围内，小于 1cm 产生管壁效应，大于 5cm 则稀释现象严重。另外，对于组别分离，柱比一般宜在 5~10 之间，这样流速快，节省时间，样品稀释程度也小；对于分级分离，则要求柱比在 25~100 之间，大柱、长柱的分离效率比小柱、短柱的高，可以使分子量相差不大的组分得以分离。但这样的柱阻力大，流速慢，费时长，样品稀释也相当严重，有时达 10 倍以上。

5.2.4 凝胶柱的装填

凝胶色谱与其他多种色谱方法不同，溶质分子与固定相之间没有力的作用，样品组分的分离完全依赖于它们各自的流速差异。因此，装柱的好坏对于分离效果的影响是很大的。装柱时，柱体要垂直固定在架子上，关上柱子下口，先在柱内加入约 1/3 柱床体积的水或缓冲液，然后沿着柱子的一侧将缓冲液中的凝胶搅拌均匀，缓慢并连续地一次性注入柱内。凝胶悬液浓度也需控制，过稀和过浓都会产生不利影响。待凝胶沉积约 5cm 左右打开柱子下口，流速在 1mL/min。装柱过程中，应注意不可让柱内缓冲液流干，装完后可用蓝色葡聚糖溶液过柱检查柱床。如果柱床装得很均匀，可见蓝色区带在不变形的情况下通过凝胶，也无裂缝产生，即可认为装柱成功。

5.2.5 样品处理和上样

根据样品的类型和进一步纯化及分析的需要可以选择合适的缓冲液，缓冲液的成分并不影响凝胶色谱的分辨率。为了达到良好的分离效果，上样量必须保持较小的体积。样品体积一般为柱床体积的 1%~5%，如果超过 5%，则会使分离效率降低，所以蛋白质样品上样前应尽可能浓缩，因为样品浓度与分配系数无关，故样品浓度可以提高，但分子量较大的物质，溶液的黏度将随浓度增加而增大，使分子运动受限，故样品黏度不可过高，过高会影响流速，如果样品黏度太高，应该稀释后上样。对蛋白质来说，样品浓度以不大于 4% 为宜。上样前样品应经滤膜过滤或以 10000g 离心 5min，以除去可能堵塞色谱柱的各种杂质。上样是凝胶色谱的关键操

作，加样时尽量减少样品的稀释和凝胶床面的搅动。否则，会造成色谱带的扩散，影响分离效果。

5.2.6 洗脱和收集

凝胶过滤色谱对于洗脱液的要求低于其他几种色谱方法。用单一缓冲液或含盐缓冲液作为洗脱液即可，主要考虑两方面因素：蛋白质的溶解性和稳定性。所用的缓冲液一定要保证蛋白质样品在其中不能变性或沉淀，pH 值范围应选在样品较稳定、溶解性良好的范围之内。为了防止凝胶可能对带电荷蛋白质的吸附作用，在缓冲液中要含有一定离子强度的盐（一般使用 NaCl），对蛋白质起稳定和保护作用。

为了防止柱床体积的变化，造成流速降低及重复性下降，整个洗脱过程中始终保持一定的操作压。在凝胶过滤色谱分离过程中，流速不可过高，一般保持在 0.5~3.0 mL/min 左右，低流速可提高分辨率，并且流速要保持稳定。

5.2.7 色谱柱的清洗、再生与保存

一次装柱后可以反复使用，不必特殊处理，并不影响分离效果。洗脱完成后，再用 3~5 个柱体积的缓冲液洗涤柱体即可。色谱柱使用一段时间后，可用 0.2 mol/L NaOH 或 1 mol/L NaCl 去除杂质，再用双蒸水平衡。一些结合在凝胶上的很难去除的蛋白质，可加入 2% 的蛋白酶液进行处理。如果长期不用，可加入 0.02% NaN₃ 保存，在下次色谱分离前应将抑菌剂除去，以免干扰洗脱液的测定，另外，也可在 20% 乙醇中保存。

如果不再使用可将其回收，一般方法是將凝胶用水冲洗干净滤干，依次用 70%、90%、95% 乙醇脱水平衡至乙醇浓度达 90% 以上，滤干，再用乙醚洗去乙醇，滤干，干燥保存。应该注意的是，溶胀后的凝胶不能直接高温烘干，以避免破坏凝胶的结构。

方案 5.1 用凝胶过滤色谱更换缓冲液

简介

在蛋白质纯化过程中，经常需要对蛋白质的缓冲液进行置换，以利于下一步工作的进行，如酶切。换液过程用目标缓冲液为洗脱液，将蛋白质和原缓冲液进行分离，从而达到换液的目的。肠激酶酶切条件需要在 20 mmol/L PB, pH 8.0 的缓冲液环境中进行，通过镍柱亲和色谱分离得到的蛋白质溶液中含有高盐和咪唑，需要通过凝胶过滤色谱改变缓冲液的类型。

材料

色谱介质：Sephadex G-25，中压大型特制玻璃色谱柱（ $\phi 7.5\text{cm} \times 50\text{cm}$ ）

色谱设备：AKTA Pilot

工作站：Unicorn software

样品：镍柱亲和纯化的重组蛋白，洗脱缓冲液含 200mmol/L 咪唑，500mmol/L 氯化钠，该蛋白具有肠激酶酶切位点

方法

1. 装柱

(1) 根据试验条件，计算所需沉降胶体积，然后将超纯水与沉降胶按照 15% : 85% (体积分数) 比例悬浮，轻轻搅匀。

(2) 从柱底端进口泵入超纯水，排除管道及筛板中的气泡，停泵，然后从出口端放出部分超纯水，保留 1~2cm 高度的超纯水。

(3) 通过玻璃棒引流将悬浮胶倒入色谱柱，在柱上端补充部分超纯水，搅匀，装上适配器，适配器末端进入胶面下 2mm 处。

(4) 打开柱出口，设泵线速为 50cm/h，装填至恒定的柱床高度，降低适配器到胶面上端 2cm 处，泵线速增加到 100cm/h，继续装填至恒定的柱床高度，逐步增加线速到 300cm/h，柱后压不超过 0.3MPa，柱床高度稳定后，标记胶面位置，降低适配器至柱上标记柱床位置下 2mm。固定适配器，继续装填 2~3 柱体积。

(5) 确定柱体积，测量柱高，计算柱体积。

2. 平衡

用含 20mmol/L PB, pH 8.0 的缓冲液冲洗 5~10 柱体积，电导显示 (3.5 ± 1.0) mS/cm, pH 显示 8.0 ± 0.1, 表示平衡完全。

3. 上样

平衡完毕后，选择样品泵进行上样，上样流速 150mL/min, 上样体积为柱体积的 25%，根据流速，设置上样时间。上样完毕后，用含 20mmol/L PB, pH 8.0 的缓冲液进行流洗，待电导峰到达顶点开始下降到半峰高时，再开始上样，循环进行，进行样品换液，换液过程见图 5.2。

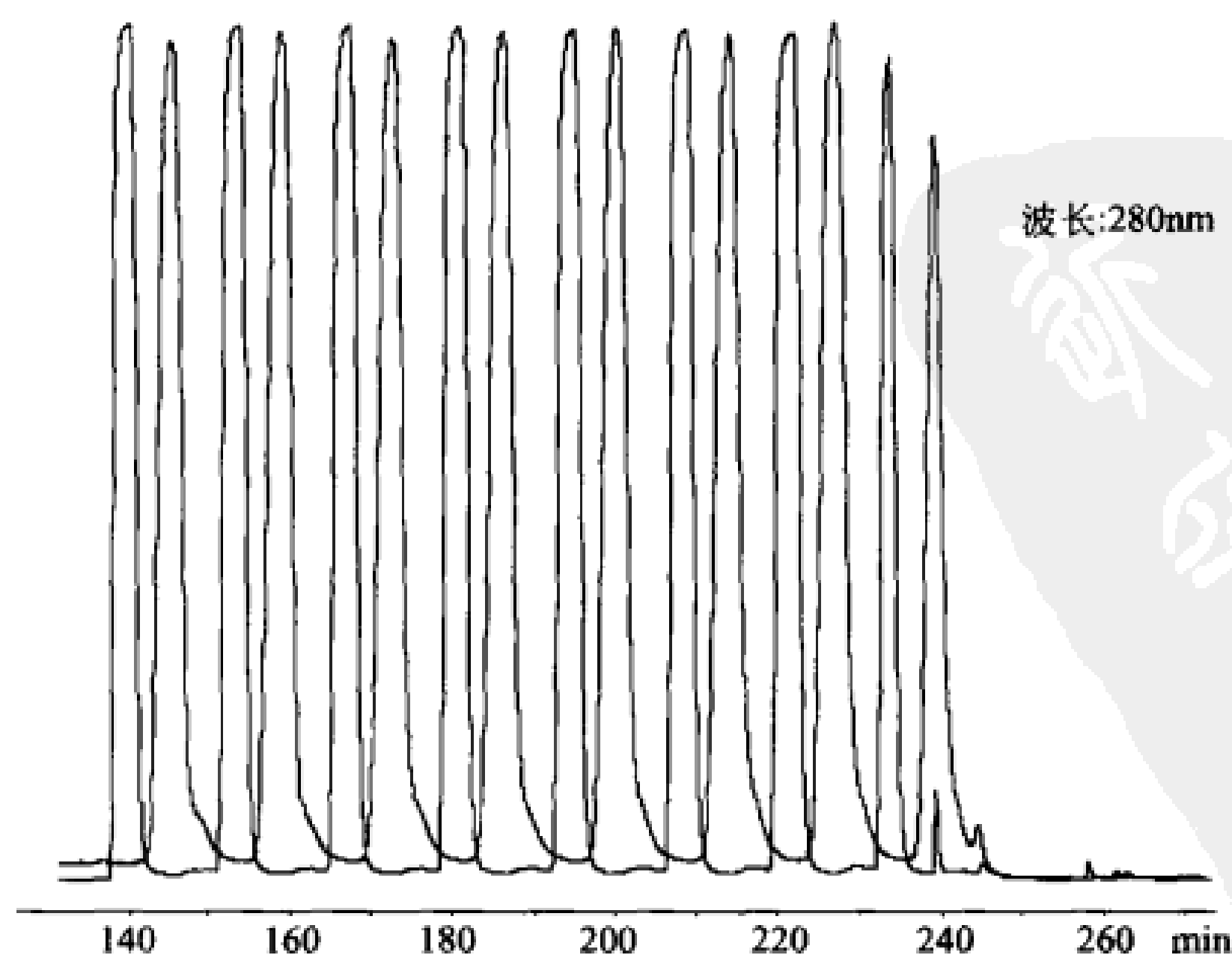


图 5.2 换液过程

4. 凝胶消毒处理

换液结束后，用 0.5mol/L NaOH 冲洗 30min，流速 80mL/min。

5. 凝胶保存

消毒处理结束后，用超纯水冲洗柱，流速 150mL/min，冲洗至 pH 显示接近中性，然后用 20%乙醇冲洗 5 柱体积，冲洗完毕后，将柱两端封死，4℃保存。

问题分析及解决方案

1. 色谱分离前一般用什么方法对样品进行净化？

离心和过滤是净化样品的标准技术，并且在处理小量样品时经常使用。建议在色谱分离纯化前离心或者过滤任何样品，已经净化过的样品如果不能立即使用，可能在几分钟内开始沉淀，如果这样的话，建议再次净化。离心能除去大部分的块状物，如果离心后样品仍然不清澈，则需要用滤膜进行过滤。由醋酸纤维素或 PVDF 材料制成的滤膜能够非特异性地结合最少量的蛋白，色谱分离前需要选择一个孔径和色谱柱介质相对应的滤膜。

2. 溶液交换不彻底怎么办？

如果溶液交换不彻底，有以下几个解决方法：

- (1) 严格控制上样体积，上样体积不超过柱体积的 30%；
- (2) 若样品溶液体积较多，可以分多次上样，注意每次上样之间的时间间隔，最好根据电导色谱峰确定下一次上样的时间。

方案 5.2 凝胶过滤色谱分离三种分子量不同的蛋白质

简介

凝胶过滤色谱适用于蛋白质纯化中的精纯阶段，可获得较高的蛋白质纯度。本方案主要是考察在凝胶过滤色谱分离范围内不同分子量蛋白质的分离情况。

材料

色谱介质：Sephacryl S-200，蛋白质分离范围 $(5\sim 250)\times 10^3$

色谱柱：XK16/60 预装柱 ($\phi 1.6\text{cm}\times 60\text{cm}$)，生产厂家 GE Healthcare

色谱设备：AKTA Explorer

工作站：Unicorn software

混合样品：含单克隆抗体，分子量 180000；牛血清白蛋白，分子量 68000；溶菌酶 14000。

0.5mol/L NaOH

200mmol/L NaCl, 20mmol/L PB, pH 7.0 的缓冲液

方法

1. 柱效测定

标准品：丙酮；上样体积：1%柱床体积；线速：30cm/h；评价因子：对称因

子 (asymmetry factor), 理论塔板高度 (HETP); 标准: 对称因子 $0.8 \sim 1.5$, $HETP/d < 3$ (d 表示粒径)。

2. 凝胶除菌处理

超纯水冲洗柱后, 用 0.5 mol/L NaOH 正向冲洗柱, 流速 3 mL/min , 冲洗 3 柱体积。

3. 平衡

NaOH 处理完毕后, 用超纯水冲洗 2 柱体积, 接着用含 200 mmol/L NaCl 和 20 mmol/L PB 的 $\text{pH } 7.0$ 的缓冲溶液冲洗 $5 \sim 10$ 柱体积。

4. 上样

平衡完毕后, 选择样品泵进行上样, 上样流速 3 mL/min , 上样体积为 1 mL , 根据流速设置上样时间。

5. 洗脱

上样结束后, 用平衡缓冲溶液进行洗脱。

6. 结果

电泳结果显示: 色谱峰 A 是分子量为 180000 的单克隆抗体; 色谱峰 B 是分子量为 68000 的牛血清白蛋白, 色谱峰 C 是分子量为 14000 的溶菌酶。单克隆抗体和牛血清白蛋白没有达到基线分离, 选择分离范围更窄的凝胶可能会达到较好的分离效果。结果见图 5.3。

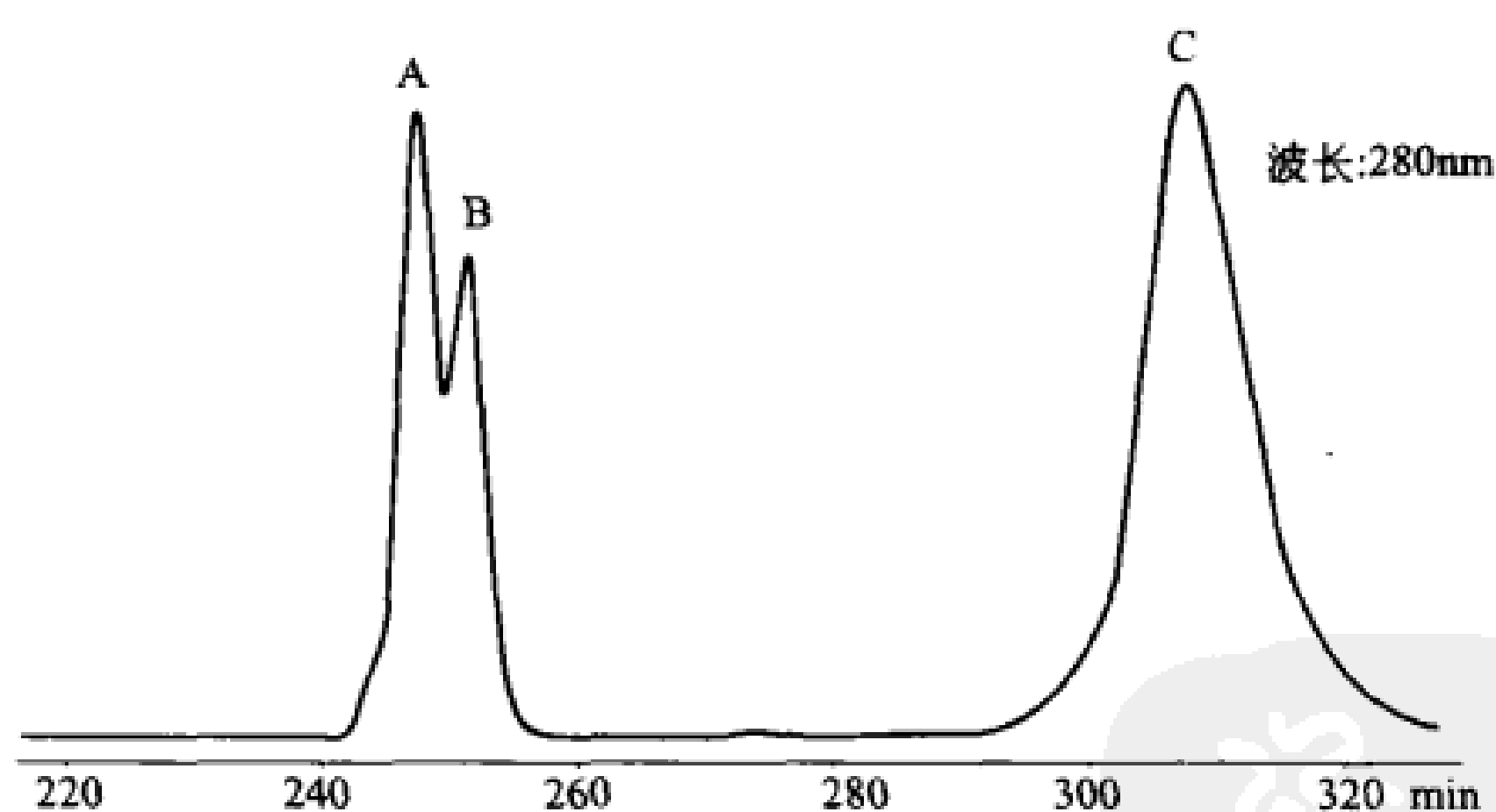


图 5.3 凝胶过滤色谱分离三种蛋白的色谱峰

7. 柱的在线清洗与保存

纯化结束后, 用 0.5 mol/L NaOH 反向冲洗 2 柱体积, 冲洗时间 $30 \sim 60 \text{ min}$, 冲洗结束后, 用超纯水正向冲洗 5 柱体积, 接着用 20% 乙醇冲洗 3 柱体积, 然后拆下柱, 两端封死, 将柱保存在 4°C 环境条件下。

问题分析及解决方案

1. 分辨率不高怎么办?

如果分辨率不高, 有以下几个解决方法:

(1) 提高装柱质量, 使色谱柱装填较为匀实;

- (2) 适当提高柱床的高度；
- (3) 控制上样的体积，最大上样体积不超过柱床体积的5%；
- (4) 控制样品的黏度，样品黏度与洗脱溶液的黏度最好保持一致；
- (5) 根据样品的特点，选择合适的洗脱溶液，调节洗脱溶液的离子强度或亲水性；

(6) 选择合适的凝胶。

2. 色谱峰对称性差怎么办？

色谱峰对称性差的可能原因及解决办法有：

(1) 提高装柱质量，装柱匀实，若柱装得太松，引起拖尾，装得太紧，引起前沿；

(2) 由于样品的非特异性吸附，选择合适流动相；

(3) 柱较脏，应再生色谱柱。

3. 肩峰出现的原因及解决方法。

(1) 柱床松动，出现塌陷，重新装柱或反向冲洗柱；

(2) 柱筛板堵塞，超声清洗筛板；

(3) 柱干裂，重新装柱。

参 考 文 献

- [1] Simpson R J. Purifying Proteins for Proteomics: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003: 147.
- [2] 冯小黎等. 分离纯化中蛋白质的不稳定性及其对策. 生物工程进展, 2000, 20 (3): 67.
- [3] [美] 科林根 J E 等著. 精编蛋白质科学实验指南. 李慎涛等译. 北京: 科学出版社, 2007: 234.
- [4] 鲁碧楠等. 蛋白质分离分析中的色谱技术新进展. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26 (13): 1116.
- [5] 陆健等. 蛋白质纯化技术及应用. 北京: 化学工业出版社, 2005: 29.
- [6] 王子佳等. 蛋白质分离纯化方法研究进展. 化学与生物工程, 2009, 26 (8): 8.
- [7] 向文斌等. 分离纯化对蛋白质活性的影响. 生命的化学, 2003, 23 (3): 238.
- [8] 辛秀兰等. 生物分离与纯化技术. 北京: 科学出版社, 2008: 138.
- [9] 颜真等. 蛋白质研究技术. 西安: 第四军医大学出版社, 2007: 49.

数字图书馆
PDG

第 6 章 离子交换色谱

6.1 基本原理

在组成蛋白质的 20 种氨基酸中，有几种的侧链是带电荷的。在 pH 7.0 时，天冬氨酸和谷氨酸的酸性侧链基团带负电荷，而赖氨酸、精氨酸和组氨酸的碱性侧链基团带正电荷。因此蛋白质分子中既有正电荷也有负电荷，主要是由于分子中存在不同数量的这几种氨基酸残基。任何蛋白质带的净电荷都取决于蛋白质分子中这些氨基酸残基的相对数量以及蛋白质溶液的 pH 值。蛋白质分子所带净电荷为零时的 pH 值称作等电点 (pI)，pH 值高于等电点时蛋白质分子带负的净电荷，而 pH 值低于等电点时蛋白质分子带正的净电荷。

离子交换色谱的原理是，被分离物质借所带的电荷可与离子交换剂所带的相反电荷结合，这种带电分子与固定相之间的结合作用是可逆的，在改变 pH 值或者用逐渐增加离子强度的缓冲液洗脱时，离子交换剂上结合的物质可与洗脱液中的离子发生交换而被洗脱到溶液中。由于不同的物质所带的电荷不同，它们与离子交换剂的结合能力也不同，所以被洗脱到溶液中的顺序也不同，从而可被分离开来。离子交换色谱的原理如图 6.1 所示。

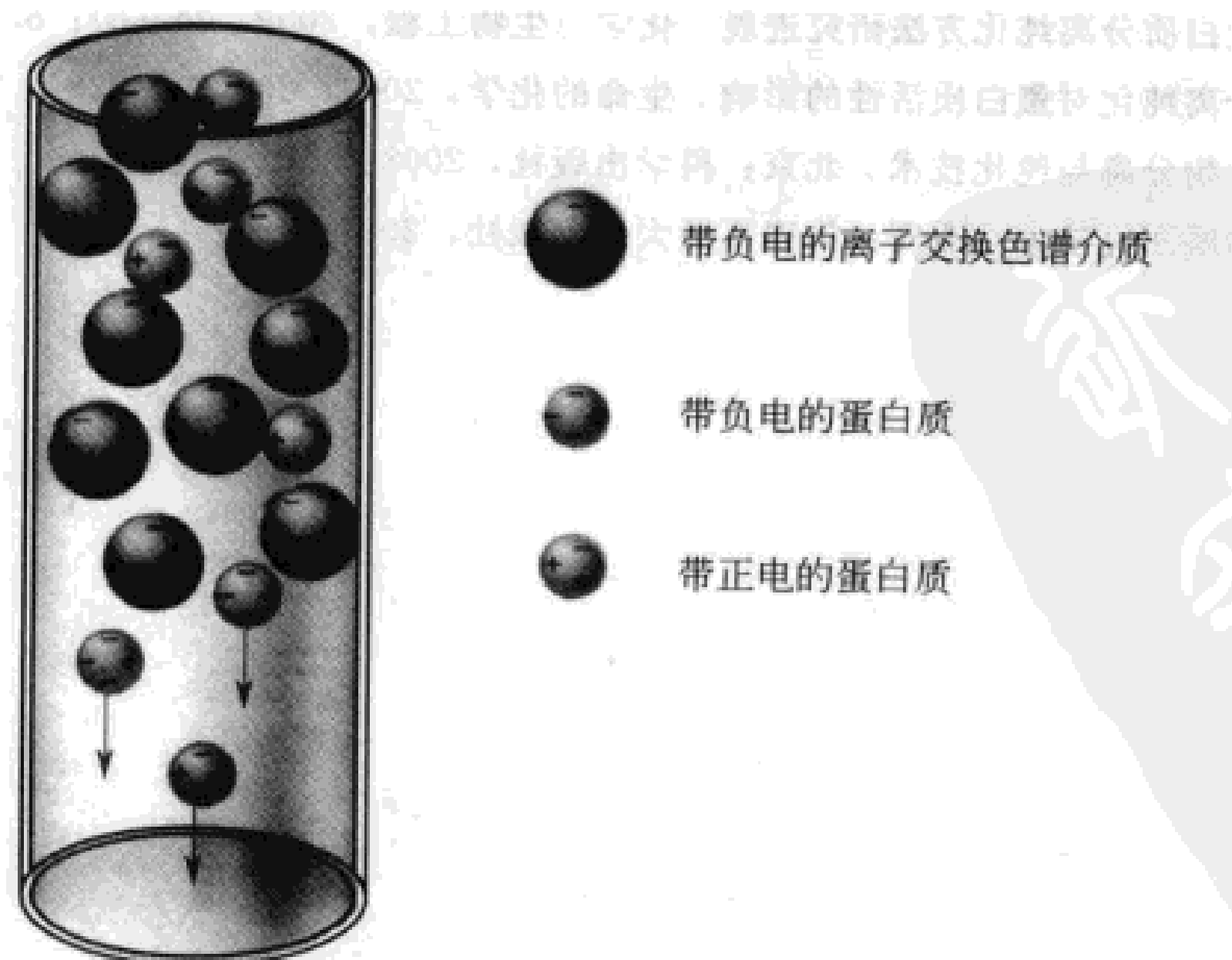


图 6.1 离子交换色谱的原理

离子交换剂是由不溶于水的网状结构高分子聚合物骨架组成的。这类不溶性骨架包括树脂、纤维素、葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶等（见表 6.1）。它们在交换过程中不发生任何反应。在网状结构的骨架上有许多共价结合的带电基团（见表 6.2），如果侧链是带正电的基团，如氨基和二乙基氨基，可与带负电的离子相结合，称为阴离子交换剂，吸附带负电的蛋白质。如果侧链是带负电的基团，如磺基和甲基，可与带正电荷的离子相结合，称为阳离子交换剂，吸附带正电的蛋白质。也可以用“强”或“弱”来描述离子交换剂。强离子交换树脂在宽 pH 值范围内保持离子化，而弱离子交换树脂只在窄 pH 值范围内离子化。表 6-2 中列出了比较常用的离子交换功能基团的名称和种类。强酸型交换剂中最常用的是磺基，弱酸型中最常用的是羧基，强碱型中最常用的是季铵基，弱碱型中最常用的是氨基。

表 6.1 常用的离子交换色谱介质

名称	供应商	骨架结构	配基
Bio-Gel A	Bio-Rad	琼脂糖	DEAE, CM
Macro-Prep	Bio-Rad	聚甲基丙烯酸酯	Q, DEAE, CM, S
Cellulose	Whatman	纤维素	DEAE, CM, SE, P
Matrex Cellufine	Millipore	珠状交联纤维素	Q, DEAE, CM
Mini	Amersham Biosciences	亲水性聚醚类	Q, S
Mono	Amersham Biosciences	亲水性聚醚类	Q, S
Sephacel	Amersham Biosciences	珠状纤维素	DEAE QAE, DEAE,
Sephadex	Amersham Biosciences	交联葡聚糖	CM, SP
Sepharose CL	Amersham Biosciences	交联琼脂糖	DEAE, CM
Spherodex	Ciphergen	硅胶-葡聚糖复合物	DEAE, SP
Spherosil	Ciphergen	经聚合物修饰的多孔硅胶	QMA QAE, DEAE,
Toyopearl	Tosohaas	聚甲基丙烯酸酯	CM, SP
TSK Gel	Tosohaas	G5000 亲水胶	DEAE, Q, SP

表 6.2 常见的离子交换功能基团

类型	名称	英文符号
阴离子交换剂	二乙基氨基乙基	DEAE
	季铵基乙基	QAE
	季铵基	Q
	三乙基氨基乙基	TEAE
	氨基乙基	AE
阳离子交换剂	羧甲基	CM
	磺丙基	SP
	磺甲基	S
	磷酸基	P

在阳离子交换过程中，带正电荷的蛋白质与带负电荷的离子交换介质结合，取代原先通过静电作用结合在树脂上的相应离子（经常是 H^+ ）。用含盐缓冲液冲洗可以洗脱蛋白质，盐阳离子，常常是 $NaCl$ 中的 Na^+ ，从离子交换树脂上顺次取代蛋白质。对于带负电荷的蛋白质，显然是用阴离子交换剂，蛋白质取代带负电荷的相应离子吸附到柱子上。

绝大多数纯化过程都至少要用到一步离子交换，离子交换是蛋白质纯化中最普遍的色谱技术。离子交换色谱普及的基础是高水平的分辨率，可以直接放大规模而应用在工业上，而且使用方便，柱再生容易，另外还使目标蛋白得到浓缩，它也是目前的色谱技术中费用最低的。大多数蛋白质在生理 pH 值的净电荷是负值，因此阴离子交换色谱应用最普遍。

6.2 实验方案设计

6.2.1 离子交换介质的选择

选择离子交换介质首先要考虑目的分子的大小，因为目的分子的大小会影响其接近介质上的带电功能基团，因此也会影响介质对目的分子的动力载量，从而影响其分离。不过，在选择离子交换介质时，只要目的分子的大小在介质凝胶骨架的排阻极限以下，便无需考虑介质对其分离时产生的凝胶过滤效应，因为静电作用才是离子交换色谱的作用原理，只有不带电荷的分子才会在离子交换色谱中按凝胶过滤的原理分离。

对于大多数纯化步骤来说，建议开始的时候使用强离子交换柱，可在摸索方法的过程中有一个宽的 pH 范围。对于一个已知等电点的蛋白质，可根据其等电点来选择。如果选用阴离子交换剂，使用缓冲液的 pH 值应高于该蛋白质的等电点，因为此时蛋白质在该缓冲液中携带净负电荷，可与阴离子交换剂结合。如果选用阳离子交换剂，缓冲液的 pH 值应低于该蛋白质的等电点，因为此时蛋白质在该缓冲液中携带净正电荷，可与阳离子交换剂结合。对于一个未知等电点的蛋白质，选择则有一定的困难。在实际操作中常采用这样的方法，先选择一个阴离子交换剂，再选择一个中性的 pH 缓冲液（例如 pH 7.0），将蛋白质样品透析至 pH 7.0，然后过阴离子交换柱，根据过柱后的结果确定下一个使用的缓冲液的 pH。如果目的蛋白再穿过液中，说明目的蛋白在此 pH 条件下带正电荷，可将缓冲液升高一个 pH，将蛋白质样品透析至 8.0，然后再过阴离子交换柱，根据过柱后的结果确定下一个使用的缓冲液的 pH。依此类推，直至目的蛋白能够结合在阴离子交换柱上为止。也可用阳离子交换剂作类似的选择，不过要注意，pH 的改变应向减小的方向进行。

还要考虑交换功能基团的强弱，如果目的分子很稳定，应首先选择强交换介质，强交换介质的动力载量不会随着 pH 的不同而改变，离子交换过程遵循最基本

的吸附原理。使用强离子交换介质允许较大吸附 pH 及离子强度选择范围，目的分子吸附后只需提高缓冲液的盐浓度即可洗脱，同时可有目的分子的浓缩效应。而弱离子交换介质 pH 适用范围较小，在 pH 小于 6 时，弱阳离子交换介质失去电荷，而在 pH 大于 9 时，弱阴离子交换介质失去电荷。所以，一般情况下，在分离等电点 pH 为 6~9 的目的分子，尤其是当目的分子不稳定时，需要较温和的色谱条件才会选用弱交换介质。

6.2.2 流动相的选择

离子交换色谱的流动相必须是有一定离子强度的并且对 pH 有一定缓冲能力的溶液。基于离子交换的原理，目的分子在与介质上的反离子交换后，释放到溶液中的反离子可以使液相中的离子强度增大，pH 可能会发生改变，有可能导致目的分子失活。所以，使用缓冲液可稳定流动相的 pH，使之在色谱过程中不发生明显变化，同时还可稳定目的分子上的电荷量，保证色谱结果的重现性。

选择正确的缓冲液对离子交换色谱的分离结果有着重要的影响。选择缓冲液一般依据下述原则：阳离子交换剂应选用阴离子缓冲液，可用柠檬酸盐、醋酸盐、磷酸盐、甘氨酸盐等；阴离子交换剂应选用阳离子缓冲液，可用烷基胺、Tris、氨基乙醇胺、乙二胺、咪唑等；起始缓冲液的浓度应尽可能低，可低于 10mmol/L 甚至更低，这样可以使色谱柱上更多地吸附分离物质；缓冲液应不含会影响被分离物质活性和溶解度的成分；洗脱时应尽量不采用 pH 梯度洗脱。

6.2.3 色谱柱的选择

离子交换色谱通常选用粗短柱，即高径比小的色谱柱。典型的离子交换柱高度在 5~20cm，高径比一般小于 5。这是由于离子交换分离蛋白质是依靠吸附强弱的不同，发生吸附时蛋白质会优先结合在色谱柱的上部，如果柱子过长，增加了从吸附位置到收集位置的流程距离，容易增加样品扩散，导致峰宽增加。阶段洗脱时一定要用短柱以避免分辨率降低和区带扩散。如果一定要增加离子交换剂的体积，只能增加柱的直径而不能增加其高度。如果是连续梯度洗脱，可以适当增加柱的长度。如果有条件，开始的时候可以采用预装离子交换柱来摸索最佳的分离纯化条件，这样速度和效率都会大大提高。

6.2.4 离子交换剂预处理和装柱

各种不同的离子交换剂在使用前所需进行的预处理是不同的，液态湿胶形式的交换剂，一般无需预处理，直接用起始缓冲液平衡后即可使用；以干胶形式存在的离子交换剂，使用前需要先进行溶胀。对基于纤维素的离子交换剂，要用流水洗去少量碎的不易沉淀的颗粒，以保证有较好的均匀度。溶胀的交换剂使用前要用稀酸或稀碱处理，使之成为带 H^+ 或 OH^- 的交换剂型。阴离子交换剂常用“碱-酸-碱”的顺序处理，使之最终转为 $-OH^-$ 型或盐型交换剂；对于阳离子交换剂则用“酸-碱-酸”的顺序处理，使之最终转为 $-H^+$ 型交换剂。洗涤好的介质使用前必须平衡

至所需的 pH 和离子强度。

装柱之前先用缓冲液将色谱柱底部死空间内的空气排空，已平衡的交换剂在装柱前还要进行减压除气泡。为了避免颗粒大小不等的交换剂在自然沉降时分层，要适当加压装柱，同时压紧柱床，减少死体积，有利于分辨率的提高。柱子装好后再用起始缓冲液淋洗，直至达到充分平衡方可使用。

6.2.5 加样

想要获得好的分辨率及延长色谱柱的使用寿命，样品中必须没有颗粒状物质存在。如果样品浑浊，可以通过离心和过滤除去。一般来说，所使用的分离介质颗粒越小，对样品溶液的澄清度要求越高。样品的黏度也是影响分离效果的一个重要方面，所以蛋白质浓度最好不超过 5%，或者样品中目的蛋白的浓度最好低于 10mg/mL。目的蛋白占样品总的含量如果很低，可以不超过柱的饱和水平为界限大量上样。在上样前，必须确保样品溶液在 pH 和离子强度方面与起始缓冲液是一致的，溶解蛋白质样品的缓冲液的离子浓度最好低于 50mmol/L。另外，上样时速度一般不要过快，为了达到满意的分离效果，上样量要适当，不要超过柱的负荷能力。柱的负荷能力可用交换容量来推算，通常上样量为交换剂交换总量的 1%~5%，最好不要超过交换容量的 20%。

6.2.6 洗脱

上样后应先用足够量的起始缓冲液洗去未吸附的组分，然后再开始洗脱。可通过改变溶液的 pH 或改变离子强度的方法将结合物洗脱，也可同时改变 pH 与离子强度，也可添加特定离子或者一种置换剂来进行洗脱。为了使复杂的组分分离完全，往往需要逐步改变 pH 或离子强度，其中最简单的方法是阶段洗脱，即分次将不同 pH 与离子强度的溶液加入，使不同成分逐步洗脱。由于这种洗脱 pH 与离子强度的变化大，使许多洗脱体积相近的成分同时洗脱，纯度较差，不适宜精细的分离。最好的洗脱方法是连续的梯度洗脱。

梯度洗脱的优点是在一定的 pH 条件下能观察到样品中所有蛋白质的大致分离情况。进行梯度洗脱时应注意下述事项：①梯度上限要足够高。这是为了使吸附能力最强的目的蛋白被洗脱下来，尤其是在对样品进行第一次梯度洗脱时，最好用 100% 的梯度洗脱。②梯度的斜度要比较平缓。为了保证各个洗脱峰分开，梯度的斜度要足够平缓，以避免峰形变宽或拖尾。目的物的过早解吸，会引起区带扩散；目的物的过晚解吸，会使峰形过宽。③洗脱液总体积要足够大。一般要几十倍于床体积，这是为了避免各分离峰之间靠得太近。如果总体积不够大，就有可能影响分离效果，但也不能太大，否则也会影响分离效果并且浪费时间。④洗脱速度。洗脱速度不可过快或过慢。在总体积为 500~2000mL 时，以 5~10mL/min 较为合适。当然，要根据柱子的大小进行增减，如果柱子较小，流速也要降低。

一般应在先进行梯度洗脱之后再采用阶段洗脱，根据梯度洗脱的结果，来确定适合

的阶段洗脱的离子强度。阶段洗脱的优点是洗脱速度比梯度洗脱快，因为洗脱的总时间短了。

6.2.7 洗脱组分的收集和分析

通常色谱柱下端连接一个紫外检测器，用于检测蛋白质组分的洗脱过程，而后又连着分部收集器，用于收集洗脱液。收集的洗脱组分，可用聚丙烯酰胺凝胶电泳、测定活性等方法鉴定，根据鉴定结果来确定分离的效果，对分离条件进行进一步的改进。

有时目的蛋白组分被分离成多个洗脱峰，导致这种现象的原因是多方面的，可能是上样量过大造成的，也可能是起始条件过分远离解吸条件，目的蛋白结合过于牢固而造成部分变性引起的，目的蛋白如果是多亚基的，亚基之间发生解聚也会导致多洗脱峰的出现。遇到这种现象时，应对其产生原理进行分析，通过改变色谱条件来排除。

6.2.8 离子交换剂的再生、清洗与储存

每次色谱柱用完之后，往往有些变性蛋白和脂类等残留在离子交换剂上，它们会干扰正常的吸附，并可能对样品造成污染，甚至堵塞色谱柱。因此离子交换剂使用一段时间后，可以通过处理让其再生，再生过程根据介质的稳定性和功能基团的不同有着不同的方法，通常制造商会提供介质再生和清洗的方法。一般情况下，选择 NaCl 溶液清洗色谱柱，因为 Na^+ 是大多数阳离子交换剂的平衡离子，而 Cl^- 是大多数阴离子交换剂的平衡离子。如 Sephadex、Sepharose、Sephacel 等用 1~2 mol/L NaCl 溶液清洗即可再生。如果色谱柱上结合的污染物用盐溶液无法将其除去时，可用酸或碱溶液清洗，如要洗去油脂等与色谱介质结合的物质，可用 0.1 mol/L NaOH 溶液清洗。如果离子交换剂需要长期保存，一般储存在 20% 的乙醇中，保存在 4℃。对特殊的离子交换剂，需要查阅说明书来决定如何保存。对阴离子交换剂宜用 0.002% 氯己定（洗必泰），阳离子交换剂可用乙基硫柳汞（0.005%），有些产品建议用 0.02% 叠氮钠。

方案 6.1 弱阴离子交换色谱和强阳离子交换色谱在分离纯化单克隆抗体中的应用

简介

离子交换是蛋白质纯化工艺中的重要手段，既可以用于捕获阶段，也可以用于精纯阶段。本方案的目的是考察两种离子交换剂对单克隆抗体精纯的效果，分别采用穿透及吸附分离纯化单克隆抗体。

材料

色谱介质：DEAE Sepharose Fast Flow，生产厂家 Pharmacia biotech；Poros

50HS, 强阳离子交换柱, 生产厂家 Applied Biosystems

中压大型特制玻璃色谱柱 ($\phi 7.5\text{cm} \times 50\text{cm}$), 生产厂家上海华美实验仪器厂

色谱设备: AKTA Pilot

工作站: Unicorn software

样品: 单克隆抗体, pI 8.5

方法

1. 装柱

(1) 将超纯水与沉降胶按照 1:3 (体积比) 比例悬浮, 轻轻搅匀。

(2) 将色谱柱固定在设备支架上, 连接后柱出口端管道, 从柱底端进口反向泵入超纯水, 排除管道及筛板中的气泡, 停泵, 然后从出口端放出部分超纯水, 保留 1~2cm 高度的超纯水, 封死出口端, 然后正向冲洗进口端管道和适配器, 排除筛板和管道中的气泡。

(3) 通过玻璃棒引流将悬浮胶倒入色谱柱, 在柱上端补充部分超纯水, 搅匀, 装上适配器。

(4) 将柱出口端与色谱设备连接, 以 0.2MPa 恒压装柱, 装填至恒定的柱床高度, 标记柱床胶面位置, 关闭泵, 松开适配器, 降低适配器至胶面下 2mm 处, 继续装填, 待柱床高度稳定后, 标记柱床胶面位置, 降低适配器至柱上标记柱床位置下 2mm。固定适配器, 继续装填 2~3 柱体积。

(5) 确定柱体积, 测量柱高, 计算柱体积及记录装柱时的最大流速。

(6) 选择最佳线速, 用 0.5mol/L NaOH 冲洗柱, 冲洗 3~5 柱体积。

(7) 接着用超纯水冲洗柱, 冲洗 10 柱体积, 至 pH 显示接近超纯水 pH。

2. 柱效评估

标准品: 丙酮; 上样体积: 1% 柱床体积; 线速: 30cm/h; 评价因子: 对称因子 (asymmetry factor), 理论塔板高度 (HETP); 标准: 对称因子 0.8~1.5, $\text{HETP}/d < 3$ (d 表示粒径)。

3. 纯化策略

(1) DEAE 弱阴离子穿透收集目标组分;

(2) Poros 50HS 强阳离子交换洗脱目标组分。

4. 纯化步骤

策略 A 纯化步骤:

(1) 柱的平衡。20mmol/L 磷酸盐缓冲溶液, pH 6.5, 用 10 柱体积平衡缓冲溶液平衡柱, 直至 pH 及电导率监控显示与平衡缓冲溶液的 pH 及电导一致。

(2) 上样。根据柱体积及装柱的最大流速确定上样流速, 上样流速不超过装柱最大流速的 75%, 同时, 上样流速也要尽可能低, 保证样品和介质充分发生作用。

(3) 淋洗。上样结束后, 用平衡缓冲溶液冲洗 1~2 柱体积, 使 UV280 响应信号重新回到基线。

(4) 淋洗结束后，用含有 0.5 mol/L NaCl 的溶液洗脱，冲洗 2~3 柱体积，收集色谱峰。

策略 B 纯化步骤：

(1) 柱的平衡。20 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液，pH 6.5，用 10 柱体积平衡缓冲溶液平衡柱，直至 pH 及电导率监控显示与平衡缓冲溶液的 pH 及电导一致。

(2) 上样。根据柱体积及装柱的最大流速确定上样流速，上样流速不超过装柱最大流速的 75%，同时，上样流速也要尽可能低，保证样品和介质充分发生作用。

(3) 淋洗。上样结束后，用平衡缓冲溶液冲洗 1~2 柱体积，使 UV280 响应信号重新回到基线。

(4) 淋洗结束后，用 20 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液，pH 7.0，含 0.2 mol/L NaCl 的溶液洗脱，冲洗 2~3 柱体积，收集色谱峰。

(5) 接着增加盐离子强度，进行洗脱，用 20 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液，pH 7.0，含 0.5 mol/L NaCl 的溶液洗脱，冲洗 2~3 柱体积，收集色谱峰。

5. 结果

电泳结果（图 6.2、图 6.3）显示：DEAE 阴离子交换穿透峰 1 和穿透峰 2 为同一组分。

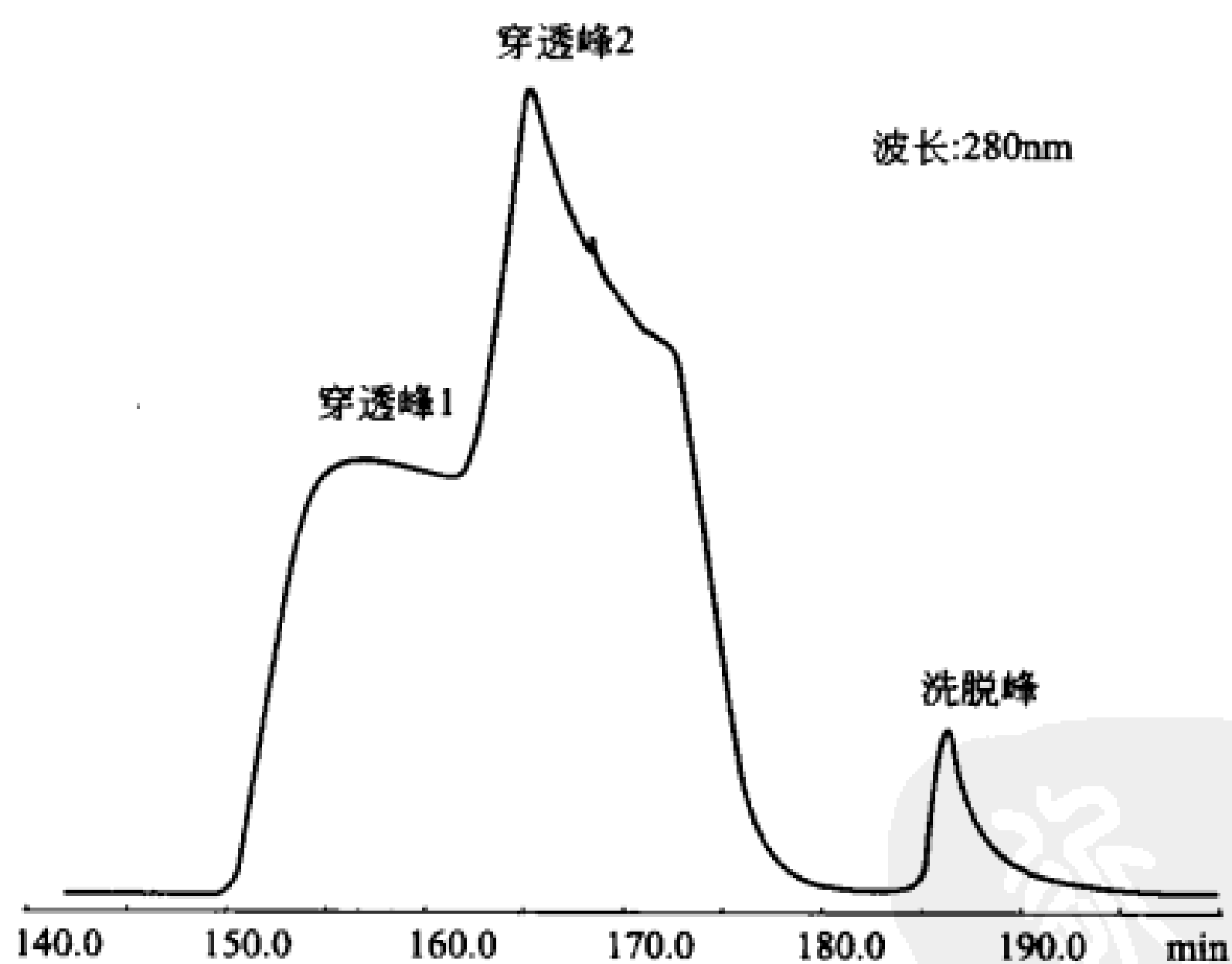


图 6.2 DEAE 离子交换纯化样品的色谱图

6. 离子交换填料的再生与清洗

(1) 离子交换填料的再生。用 1~2 mol/L NaCl 冲洗柱 1~2 柱体积。

(2) 离子交换填料的清洗。

根据分析样品的来源及结构特点，适当选择清洗试剂种类及步骤。反向冲洗，线速保持 40 cm/h，冲洗时间 60 min。

选择 1 mol/L NaOH 作为清洗溶液，目的是去除脂蛋白、沉淀蛋白、疏水性蛋白。选择含 0.5% 非离子型表面活性剂如 Tween 的 0.1 mol/L 乙酸溶液，目的是去

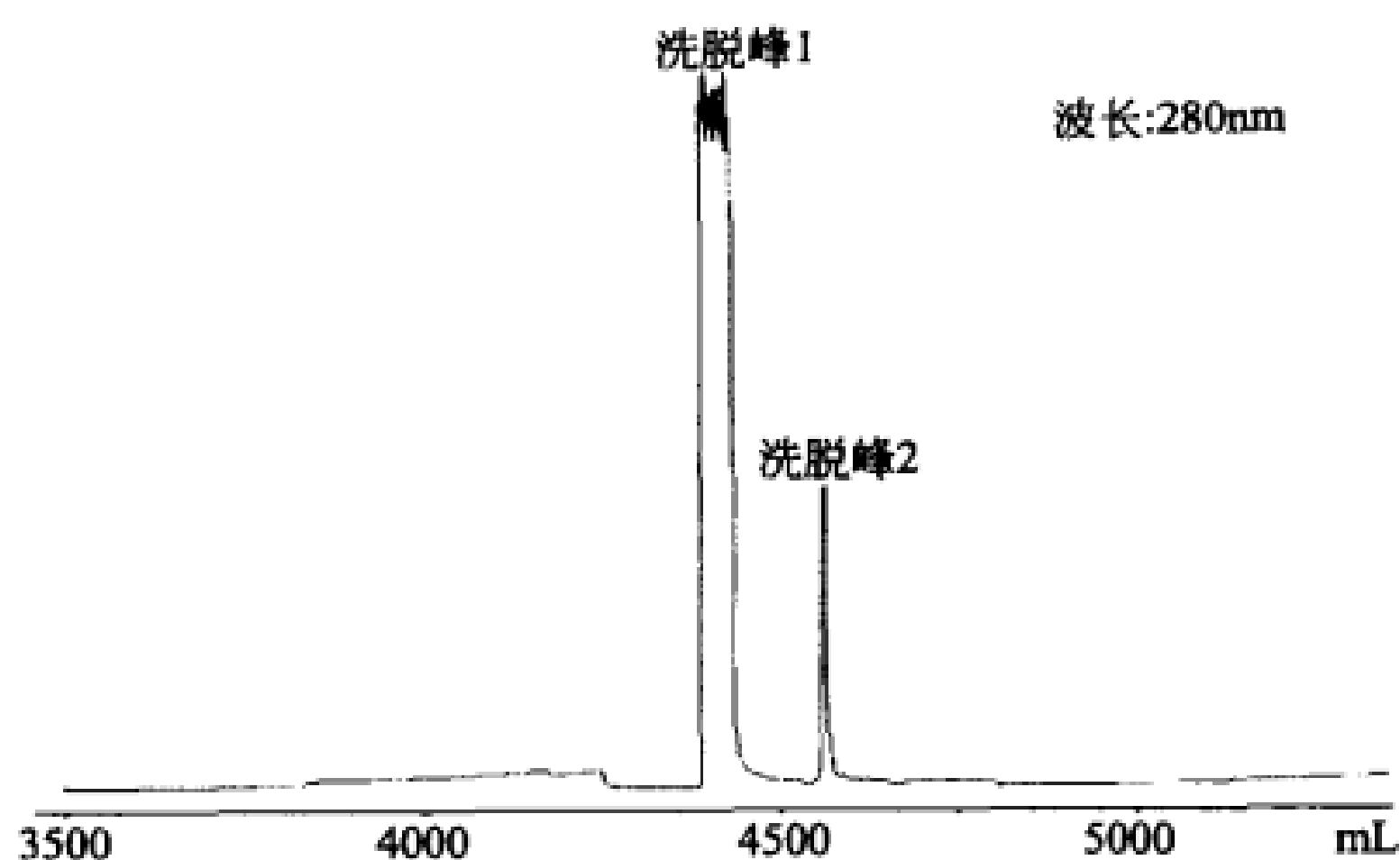


图 6.3 Poros 50HS 强阳离子交换纯化样品的色谱图

除强疏水性蛋白。

7. 胶的保存

用超纯水冲洗后，接着用 20% 乙醇冲洗 5 柱体积，然后将柱两端进行密封，保存在 4℃ 环境中。

问题分析及解决方案

1. 纯化后样品纯度不高的解决方法。

如果纯化后样品的纯度不高，可以有以下几个解决方法：

(1) 若目标蛋白和杂蛋白等电点差异较大，目标蛋白通过穿透步骤获得，通过调节起始缓冲溶液的 pH，使目标蛋白与填料之间的静电作用更强；

(2) 若目标蛋白和杂蛋白等电点差异较小，目标蛋白通过洗脱步骤获得，通过调节起始缓冲溶液的 pH，使蛋白与填料之间的静电作用更强，再调节洗脱溶液的离子强度或 pH，使目标蛋白与杂蛋白质逐渐分离；

(3) 选择合适的离子交换填料类型及粒径；

(4) 柱没有经过起始缓冲溶液的充分平衡；

(5) 降低洗脱流速；

(6) 调整样品溶液的黏度。

2. 纯化后目的蛋白的收率较低怎么办？

如果目的蛋白的收率较低，可以从以下几个方面调整：

(1) 调整样品 pH，使样品 pH 与起始缓冲溶液 pH 保持一致；

(2) 改变洗脱模式，如将线性梯度模式改变成阶段性梯度洗脱；

(3) 改变洗脱方法，如将 pH 洗脱方法改变成盐梯度方法洗脱；

(4) 改变洗脱强度，调节洗脱液 pH 或盐浓度。

3. 纯化后目的蛋白的蛋白质构象发生变化的解决方法。

(1) 稳定性试验，确定蛋白质稳定性条件，如温度、pH、离子强度等，选择合适的洗脱液条件；

(2) 根据稳定性结果, 选择合适的填料类型及添加剂。

4. 样品过于黏稠怎么处理?

样品过于黏稠可能是由于含有的蛋白太多, 或者含有大分子量的核酸分子, 通常有以下的解决办法:

- (1) 增加裂解之前稀释细胞所用体积;
- (2) 增加裂解的时间, 直到黏度下降, 或者增加 DNase 和 Mg^{2+} 的剂量;
- (3) 增加机械裂解细胞的效率;
- (4) 将裂解物抽过注射器针头数次;
- (5) 降低上样时的流速。

参 考 文 献

- [1] Simpson R J. Purifying Proteins for Proteomics: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003: 121.
- [2] [美] 科林根 J E 等著. 精编蛋白质科学实验指南. 李慎涛等译. 北京: 科学出版社, 2007: 224.
- [3] 陆健等. 蛋白质纯化技术及应用. 北京: 化学工业出版社, 2005: 54.
- [4] 浦宇等. 蛋白质层析用离子交换和疏水作用层析介质的发展概况. 生物工程学报, 2004, 20 (6): 966.
- [5] 王子佳等. 蛋白质分离纯化方法研究进展. 化学与生物工程, 2009, 26 (8): 8.
- [6] [爱尔兰] 沃尔什著. 蛋白质生物化学与生物技术. 王恒樑等译. 北京: 化学工业出版社, 2006: 71.
- [7] 向文斌等. 分离纯化对蛋白质活性的影响. 生命的化学, 2003, 23 (3): 238.
- [8] 辛秀兰等. 生物分离与纯化技术. 北京: 科学出版社, 2008: 94.
- [9] 颜真等. 蛋白质研究技术. 西安: 第四军医大学出版社, 2007: 45.
- [10] 张轶华等. 阴离子交换整体柱对蛋白质的分离与纯化. 色谱, 2005, 23 (3): 219.



第7章 亲和色谱

7.1 基本原理

亲和色谱是利用待分离物质和它的特异性配体间具有特异的亲和力，从而达到分离目的的一类特殊色谱技术。具有专一亲和力的生物分子对主要有：抗原与抗体、DNA与互补DNA或RNA、酶与它的底物或竞争性抑制剂、激素（或药物）与它们的受体、维生素和它的特异结合蛋白、糖蛋白与它相应的植物凝集素等。每对反应物之间都有一定的亲和力，正如在酶与底物的反应中特异的底物能和一定的酶结合产生复合物一样，在亲和色谱中是特异的配体才能和一定的生物大分子之间具有亲和力，并产生复合物。

具有亲和作用的一对分子中的一方以共价键形式与不溶性载体相连作为固定相吸附剂。亲和色谱中所用的载体称为基质，与基质共价连接的化合物称配基。因此，当把固相载体装入小色谱柱（几毫升到几十毫升床体积）后，让准备分离的样品溶液通过该柱时，样品中对配基有亲和力的物质就可借助静电引力、范德华力，以及结构互补效应等作用吸附到固相载体上，而无亲和力或非特异吸附的物质则被起始缓冲液洗涤出来，并形成了第一个色谱峰。然后，恰当地改变起始缓冲液的pH值，或增加离子强度，或加入抑制剂等因子，即可把结合在配基上的目的物从固相载体上解离下来，并形成第二个色谱峰。显然，通过这一操作程序就可把目的物与杂质满意地分离开。如果样品中存在两个以上的物质与固相载体具有亲和力（其大小有差异）时，采用选择性缓冲液进行洗脱，也可以将它们分离开。亲和色谱的原理见图7.1。

亲和色谱法大致可分为特异性配体亲和色谱法和通用性配体亲和色谱法。这两种亲和色谱法相比，前者的配体一般为复杂的生命大分子物质（如抗体、受体和酶的类似底物等），它具有较强的吸附选择性和较大的结合力；而后者的配体则一般为简单的小分子物质（如金属、染料，以及氨基酸等），它成本低廉、具有较高的吸附容量，通过改善吸附和脱附条件可提高色谱的分辨率。

亲和色谱具有高选择性、高分辨率和高容量的特点，并且亲和色谱纯化过程简单、迅速，且分离效率高，对分离含量极少又不稳定的活性物质尤为有效。但本法必须针对某一分离对象，制备专一的配基和寻求色谱分离的稳定条件。此外，与离

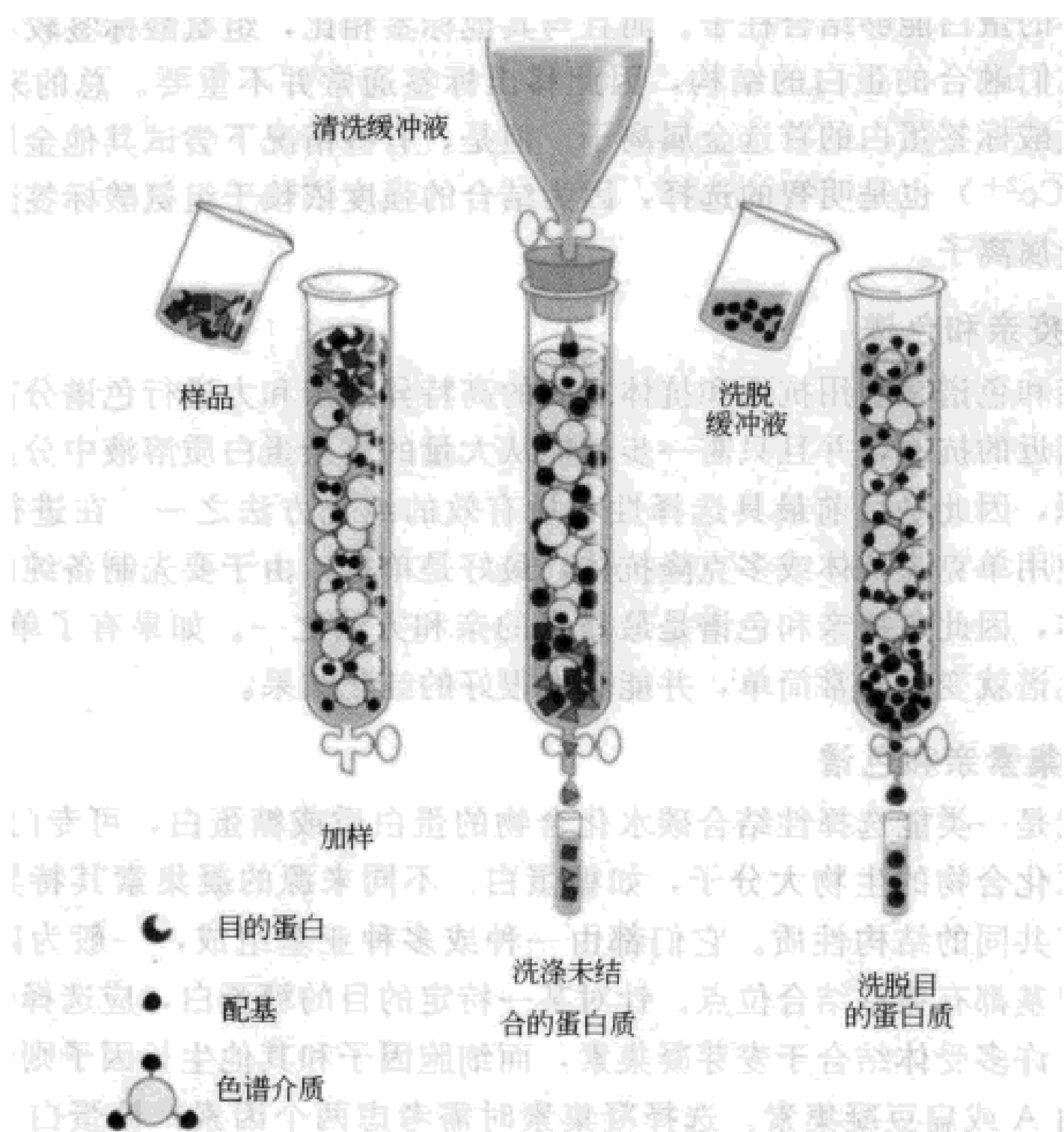


图 7.1 亲和色谱的原理

子交换色谱和凝胶过滤色谱相比，亲和色谱的成本较高。因此亲和色谱的应用范围受到了一定的限制。亲和色谱可用于纯化生物大分子、稀溶液的浓缩、不稳定蛋白质的贮藏、从纯化的分子中除去残余的污染物、分离核酸等等。

7.2 亲和色谱的几种类型

7.2.1 金属螯合亲和色谱

金属螯合亲和色谱又称固定化金属离子亲和色谱，这种方法介于高特异性的生物亲和分离方法和低特异性的吸附方法之间。这种色谱对肽或蛋白质表面的特殊基团如组氨酸残基有特异性。它是以普通凝胶作为载体，连接上合适的螯合配体和金属离子，从而制成亲和吸附剂，固定相中金属离子的数目没有限制，但必须有足够的暴露出来，以便于与蛋白质发生相互作用。金属螯合亲和色谱是基于蛋白质的组氨酸咪唑基和半胱氨酸巯基能与铜、锌、镍离子间形成稳定的螯合物而进行分离的。载体、螯合配体和金属离子的选择并不复杂。一般而言，组氨酸标签蛋白是在粗提物（比如细菌裂解物）中与柱子结合能力最强的蛋白。真核细胞的提取物中通

常会有较多的蛋白能够结合柱子。而且与其他标签相比，组氨酸标签较小，通常不易破坏和它们融合的蛋白的结构，因此移出标签通常并不重要。总的来说， Ni^{2+} 是纯化组氨酸标签蛋白的首选金属离子。但是，有些情况下尝试其他金属离子（比如 Zn^{2+} 和 Co^{2+} ）也是明智的选择，因为结合强度依赖于组氨酸标签蛋白，同时也依赖于金属离子。

7.2.2 免疫亲和色谱

免疫亲和色谱是利用抗原和抗体之间的高特异性亲和力进行色谱分离的，它能区分非常相近的抗原，并且只需一步就能从大量的复杂蛋白质溶液中分离出极少量的目的抗原，因此是目前最具选择性和最有效的纯化方法之一。在进行免疫纯化时，必须使用单克隆抗体或多克隆抗体，最好是单抗，由于要先制备纯的针对性的单克隆抗体，因此免疫亲和色谱是最昂贵的亲和方法之一。如果有了单克隆抗体，免疫亲和色谱就变得非常简单，并能获得很好的纯化结果。

7.2.3 凝集素亲和色谱

凝集素是一类能选择性结合碳水化合物的蛋白质或糖蛋白，可专门用于分离、提纯含碳水化合物的生物大分子，如糖蛋白。不同来源的凝集素其特异性有所不同，但具有共同的结构性质。它们都由一种或多种亚基组成，一般为四亚基蛋白质，每个亚基都有糖基结合位点。针对某一特定的目的糖蛋白，应选择合适的凝集素。例如，许多受体结合于麦芽凝集素，而细胞因子和其他生长因子则优先结合伴刀豆球蛋白A或扁豆凝集素。选择凝集素时需考虑两个因素：糖蛋白上寡糖的性质和凝集素的可获得性。用凝集素亲和色谱分离的糖蛋白主要分为两类：水溶性糖蛋白和膜结合糖蛋白。前者包括细胞分泌蛋白，如激素、胶原蛋白等；后者有转运蛋白和细胞表面识别标记等。

7.3 实验方案设计

7.3.1 亲和吸附剂的选择

选择亲和色谱的介质时要考虑分离纯化的规模和商业可行性，即大规模地纯化蛋白时，要考虑成本的问题。为了节约时间和保证重复性，开始可以用预装柱来摸索实验方法。在用亲和色谱进行蛋白质的分离纯化时，首先要获得有效的亲和吸附剂。有两种方法可以获得：①自行制备，针对待分离蛋白质的性质，选择专一性配体、合适的载体和连接臂，然后用合适的化学偶联方法制备亲和吸附剂，这种方法非常费时，成本很高；②直接购买，商品化亲和吸附剂都是基团特异性吸附剂，其配体针对某个化学基团具有亲和力，这类吸附剂的特异性较低，往往用于纯化一类蛋白质，如用蛋白质A纯化抗体。

7.3.2 装柱

根据固相配基的吸附能力和样品中目的蛋白的含量计算装柱的体积，一般用量

应是计算用量的2~3倍。一般来说,高的容量可以用粗的短柱,大多数情况下,可以采用一次性的塑料小柱和1~5mL凝胶。柱和柱顶及柱底多孔板的疏水性质用0.1%的Tween-20溶液处理消除。选择合适的柱长,目标蛋白与杂质的分离效率取决于柱的长度。

7.3.3 上样

亲和色谱的样品中也同样要进行预处理:除去样品中的颗粒物、细胞碎片等,对样品进行浓缩及除去蛋白酶,通过沉淀等方法除去许多不需要的杂蛋白。因为样品中杂质的存在所导致的非特异性吸附会大大降低纯化效果,一般来说,杂质的非特异性吸附的量与其浓度、性质、载体材料、配基固定化方法以及流动相的离子强度、pH和温度等因素有关。样品应处于完全溶解状态,样品缓冲液一般用含有0.5mol/L NaCl的磷酸盐缓冲液或0.1~0.2mol/L Tris缓冲液。这样的缓冲液可减少配基与蛋白质之间的非特异性结合。上样时应用较慢的流速,可以循环重复几次。

7.3.4 吸附

吸附的目的是使亲和吸附剂上的配基与待纯化蛋白质间形成紧密结合物。由于蛋白质与配基之间是通过次级键相互作用发生结合的,因此预先了解配基-蛋白质间的相互作用类型将有助于选择合适的吸附缓冲液,包括最适的pH、盐浓度和离子强度等。pH不仅能调节蛋白质的电荷基团,也能调节配基的电荷基团,因此在结合过程与解析过程中起到十分重要的作用。例如,中等盐浓度的缓冲液(0.1~0.15mol/L NaCl)能够稳定溶液中的蛋白质并防止由于离子交换所引起的非特异性相互作用;很高的盐浓度如2mol/L硫酸铵能特异地提高配基和靶蛋白的疏水相互作用;EDTA约10mmol/L用于稳定蛋白质中的巯基。蛋白质与配基结合缓冲液的优化往往也是减少亲和色谱中非特异性的关键。

7.3.5 流速和清洗

流速是影响色谱柱柱效和分离速度的重要因素,提高流速虽然可以提高分离速度,但柱效降低,因此吸附操作一定要在适当的流速下进行。为了使纯化的蛋白能够得到尖的洗脱峰、最小的稀释度和最大的回收率,最好使用低流速。太高的流速会降低分离效果和容量,因为它需要长的时间达到平衡。

清洗是为了洗去吸附介质内部及柱空隙中存在的杂质,一般使用与吸附操作相同的缓冲液,必要时加入表面活性剂。由于亲和吸附是可逆的,清洗过度会使目标产物损失增多,而清洗不充分则使洗脱回收的目的产物纯度降低。对于以静电作用吸附在柱上的非特异性结合物质,可以用增加离子强度的缓冲液清洗。清洗也不能过于剧烈,强烈的清洗可能会损害亲和介质的配基和柱子的结合容量。

7.3.6 洗脱

目的蛋白的洗脱可以分为特异性洗脱和非特异性洗脱两种。与其他色谱方法一

样, 可以通过改变缓冲液的类型、改变缓冲液的 pH 和离子强度、改变洗脱温度等措施进行洗脱。特异性洗脱是利用含有与亲和配基或目的蛋白具有亲和作用的小分子化合物溶液作为洗脱液, 通过竞争性结合, 洗脱目的产物。特异性洗脱的条件温和, 有利于保护目的产物的生物活性。另外, 特异性洗脱对于特异性较低的亲和体系, 有利于提高目标产物的纯度。如果没有特异性洗脱液, 便可采用非特异性洗脱方式, 即通过改变洗脱液的 pH、离子强度、离子种类或温度等使目的蛋白洗脱下来, 是较多采用的洗脱方法。在实际应用中, 最基本的方法就是用中等浓度 (0.1~0.2mol/L) 的可溶性配体或类似物在比较温和的解吸条件下竞争性地置换结合蛋白质。常采用较强酸性的洗脱液 (如 pH 2.5 的甘氨酸-盐酸缓冲液) 洗脱目的蛋白。此时应尽快用碱性溶液将洗脱液的 pH 变为中性, 避免目的蛋白失活。

7.3.7 再生和保存

亲和色谱柱的清洗可以用高浓度的特异性洗脱液进行, 如用 0.5~1.0mol/L NaCl, 或者用几倍体积的起始缓冲液进行再平衡, 也足以使亲和柱再生。但要注意, 在某些条件下, 高浓度的盐可能会改变蛋白质的构象。如果配基是蛋白, 高浓度的盐可能会破坏其对样品的结合能力。一般不使用极端 pH 条件或加热灭菌法来清洗和再生亲和柱。处理好的亲和色谱柱可储存在 8℃ 以下, 如果长期不用, 可加 0.05% 的苯甲醇或者 0.02% 的叠氮钠, 防止长菌。再次使用前, 应用缓冲液彻底洗去。

方案 7.1 亲和色谱纯化抗体融合蛋白

简介

目的: Protein A 亲和填料用于抗体纯化捕获阶段, 可获得较高的抗体纯度及回收率。本方案在于考察 Protein A 填料在抗体纯化中的应用。

材料

色谱介质: Protein A Sepharose™ Fast Flow, 粒径 60~165μm, 生产厂家 Amersham Bioscience

色谱柱 XK26/40 (φ2.6cm×40cm), 生产厂家 GE Healthcare

色谱设备: AKTA Explorer

工作站: Unicorn software

样品: 抗体融合蛋白, 含有抗体 Fc 片段

样品来源: 细胞发酵液上清液

平衡缓冲液: 20mmol/L PB, pH 8.0 缓冲溶液

洗脱溶液 1: 50mmol/L citrate buffer, pH 4.0

洗脱溶液 2: 50mmol/L citrate buffer, pH 3.0

方法

1. 装柱

(1) 根据细胞表达量和细胞发酵液体积计算纯化目标组分含量，结合 Protein A 色谱胶动态载量计算出所需要的柱体积，根据说明书的沉降系数计算出所需沉降胶体积。

(2) 然后将超纯水与沉降胶按照 40% : 60% (体积分数) 比例悬浮，轻轻搅匀。

(3) 将色谱柱固定在设备支架上，连接后柱出口端管道，从柱底端进口反向泵入超纯水，排除管道及筛板中的气泡，停泵，然后从出口端放出部分超纯水，保留 1~2cm 高度的超纯水，封死出口端，然后正向冲洗进口端管道和适配器，排除筛板和管道中的气泡。

(4) 通过玻璃棒引流将悬浮胶倒入色谱柱，在柱上端补充部分超纯水，搅匀，装上适配器，适配器末端进入胶面下 2mm 处。

(5) 将柱出口端与色谱设备连接，以 0.1MPa 恒压装柱，装填至恒定的柱床高度，标记柱床胶面位置，关闭泵，松开适配器，降低适配器至胶面下 2mm 处，继续装填待柱床高度稳定后，标记柱床胶面位置，按下适配器锁定按钮，降低适配器至柱上标记柱床位置下 2mm。固定适配器，继续装填 2~3 柱体积。

(6) 确定柱体积，测量柱高，计算柱体积。

2. 柱效评估

标准品：丙酮；上样体积：1% 柱床体积；线速：30cm/h；评价因子：对称因子 (asymmetry factor)，理论塔板高度 (HETP)；标准：对称因子 0.8~1.5， $HETP/d < 3$ (d 表示粒径)。

3. 样品纯化步骤

(1) 亲和柱的平衡。用 5 柱体积平衡柱，pH 及电导率监控显示和平衡缓冲溶液的 pH 及电导一致。

(2) 上样。根据柱体积及装柱的最大流速确定上样流速，上样流速不超过装柱最大流速的 75%，同时，上样流速也要尽可能低，保证样品和介质充分发生作用。

(3) 淋洗。上样结束后，用平衡缓冲溶液冲洗 1~2 柱体积，使 UV280 响应信号重新回到基线。

(4) 淋洗结束后，用洗脱溶液 1 冲洗 2~3 柱体积，收集色谱峰。

(5) 接着用洗脱溶液 2 进行洗脱，收集色谱峰。

(6) 接着用洗脱溶液 3 进行洗脱，收集色谱峰。

4. 结果

见图 7.2。

5. 柱的在线清洗

柱反复使用后，柱效和载量明显下降，需要对填料进行在线清洗。清洗步骤如下：

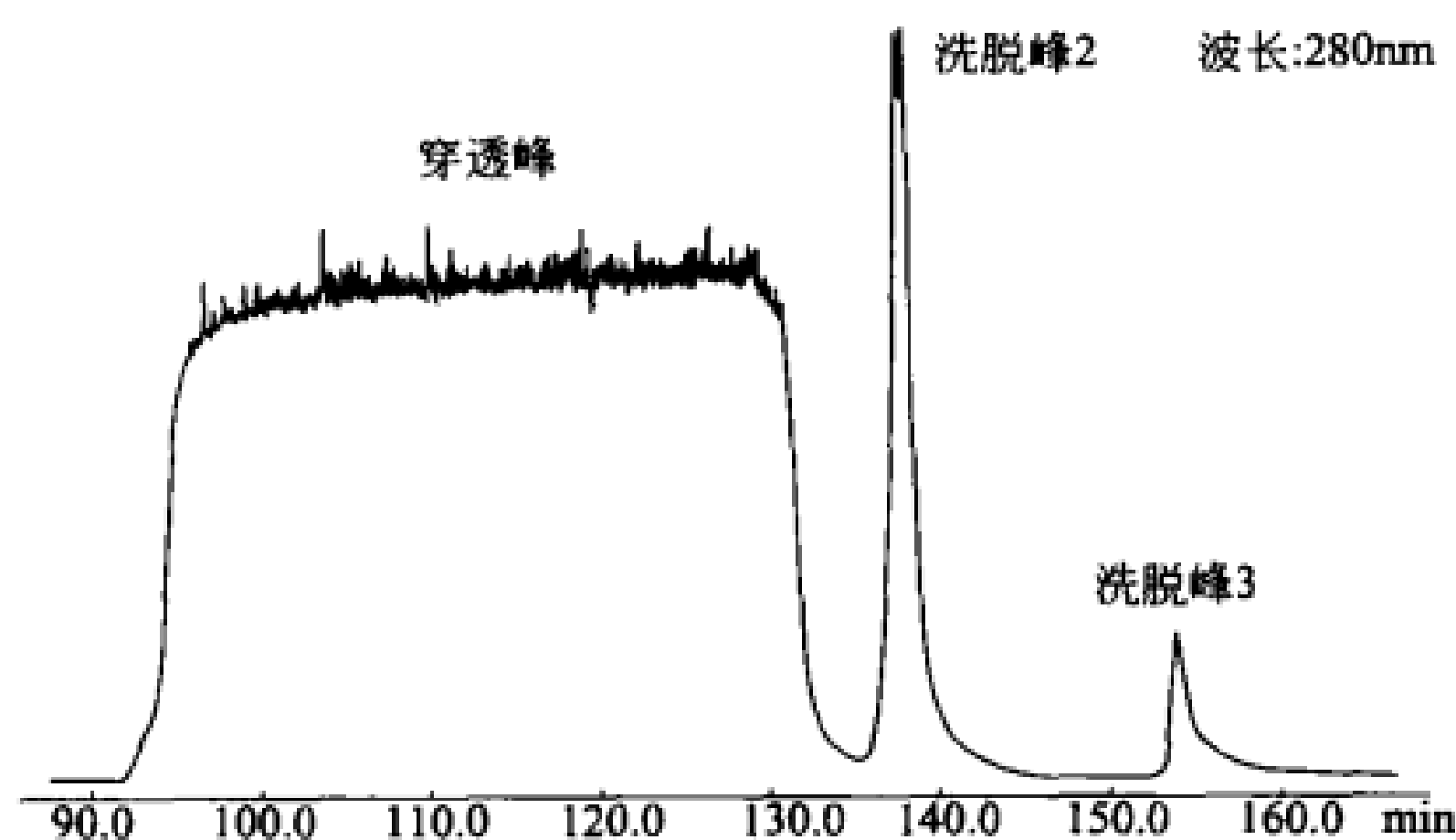


图 7.2 Protein A 亲和色谱纯化抗体融合蛋白的色谱图

- (1) 6mol/L GuHCl (盐酸胍) 冲洗 2 柱体积;
- (2) 超纯水冲洗 5 柱体积;
- (3) 0.1% Tween-80 冲洗 2 柱体积;
- (4) 超纯水冲洗 5 柱体积。

6. 亲和胶处理

每次纯化结束后, 如不需要对柱在线清洗处理, 先用超纯水冲洗色谱柱, 接着用 20%乙醇冲洗色谱柱, 冲洗 5 柱体积, 冲洗结束后, 卸下色谱柱, 将色谱柱置于 4℃ 保存, 或拆下色谱柱, 倒出胶, 按照胶与 20%乙醇为 5:3 的比例加入 20%乙醇, 倒入密闭容器, 置于 4℃ 保存。

问题分析及解决方案

1. 装柱过程中应注意的问题。

装柱中需要注意的问题有:

- (1) 最重要的是整个过程不要在柱子中引入气泡;
- (2) 装完柱后保持装柱流速至少 3 柱体积, 直到达到一个稳定不变的柱床高度, 在随后的色谱分离过程中, 流速不要超过装柱流速的 75%。

2. 怎样摸索蛋白质稳定的条件?

通常可以从以下几个方面来摸索让蛋白质稳定的条件:

- (1) 以 1 个 pH 单位为步长, 在 pH 2~9 之间检测蛋白质对 pH 变化的稳定性;
- (2) 以 0.5mol/L 为步长, 在 0~2mol/L NaCl 和 0~2mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 之间 (包括缓冲试剂) 检验蛋白对盐浓度变化的稳定性;
- (3) 以 10℃ 为步长, 在 4~40℃ 之间检验蛋白对温度变化的稳定性, 至少要先在冷室和室温检测;
- (4) 还可以通过把部分样品在室温放置过夜, 检测蛋白质的稳定性以及被蛋白酶降解的活力。

方案 7.2 金属螯合亲和色谱分离大肠杆菌重组表达的蛋白

简介

金属螯合亲和色谱是纯化带有 his-Tag 的融合蛋白的重要方法，本方案主要考察镍柱亲和色谱在纯化含有 his-Tag 的融合蛋白中的应用。

材料

色谱介质：Chelating Sepharose Fast Flow，粒径 45~165 μm ，生产厂家 Pharmacia biotech

中压大型特制玻璃色谱柱 ($\phi 7.5\text{cm} \times 50\text{cm}$)，生产厂家上海华美实验仪器厂

色谱设备：AKTA Pilot

工作站：Unicorn software

样品：重组融合蛋白，含有 (His)₆ 标签

样品来源：大肠杆菌表达的重组融合蛋白，破菌经离心后收集的上清液

镍柱填料制备所需溶液：

(1) 0.5mol/L NaOH；

(2) 50mmol/L EDTA；

(3) 50mmol/L NiSO₄。

平衡缓冲液及洗脱溶液：

(1) 平衡缓冲液 60mmol/L 咪唑，20mmol/L PB，pH 8.0 缓冲溶液（同破碎缓冲溶液）；

(2) 洗脱溶液 1 20mmol/L PB，200mmol/L 咪唑，pH 8.0 缓冲溶液；

(3) 洗脱溶液 2 20mmol/L PB，400mmol/L 咪唑，pH 8.0 缓冲溶液。

方法

1. 装柱

(1) 根据大肠杆菌表达量和细胞发酵液体积计算纯化目标组分含量，结合说明书动态载量计算出所需要的柱体积，根据说明书的沉降系数计算出所需沉降胶体积。

(2) 然后将超纯水与沉降胶按照 1:3（体积比）比例悬浮，轻轻搅匀。

(3) 将色谱柱固定在设备支架上，连接后柱出口端管道，从柱底端进口反向泵入超纯水，排除管道及筛板中的气泡，停泵，然后从出口端放出部分超纯水，保留 1~2cm 高度的超纯水，封死出口端，然后正向冲洗进口端管道和适配器，排除筛板和管道中的气泡。

(4) 通过玻璃棒引流将悬浮胶倒入色谱柱，在柱上端补充部分超纯水，搅匀，装上适配器。

(5) 将柱出口端与色谱设备连接，以 0.2MPa 恒压装柱，装填至恒定的柱床高

度，标记柱床胶面位置，关闭泵，松开适配器，降低适配器至胶面下 2mm 处，继续装填待柱床高度稳定后，标记柱床胶面位置，按下适配器锁定按钮，降低适配器至柱上标记柱床位置下 2mm。固定适配器，继续装填 2~3 柱体积。

(6) 确定柱体积，测量柱高，计算柱体积及记录装柱时的最大流速。

(7) 选择最佳线速，用 0.5mol/L NaOH 冲洗柱，冲洗 3~5 柱体积。

(8) 接着用超纯水冲洗柱，冲洗 10 柱体积，至 pH 显示接近超纯水 pH。

(9) 超纯水冲洗结束后，用 50mmol/L NiSO₄ 冲洗柱，冲洗 3 柱体积。

(10) NiSO₄ 冲洗完毕后，用超纯水冲洗游离的及结合不牢固的 NiSO₄，冲洗 2~3 柱体积。

2. 样品纯化

(1) 镍柱的平衡。用 5 柱体积平衡柱，pH 及电导率监控显示和平衡缓冲溶液的 pH 及电导一致。

(2) 上样。根据柱体积及装柱的最大流速确定上样流速，上样流速不超过装柱最大流速的 75%，同时，上样流速也要尽可能低，保证样品和介质充分发生作用。

(3) 淋洗。上样结束后，用平衡缓冲溶液冲洗 1~2 柱体积，使 UV280nm 响应信号重新回到基线。

(4) 淋洗结束后，用洗脱溶液 1 冲洗 2~3 柱体积，收集色谱峰。

(5) 接着用洗脱溶液 2 进行洗脱，收集色谱峰。

(6) 收集的色谱峰进行电泳检测，检验其纯度。

3. 结果

见图 7.3。

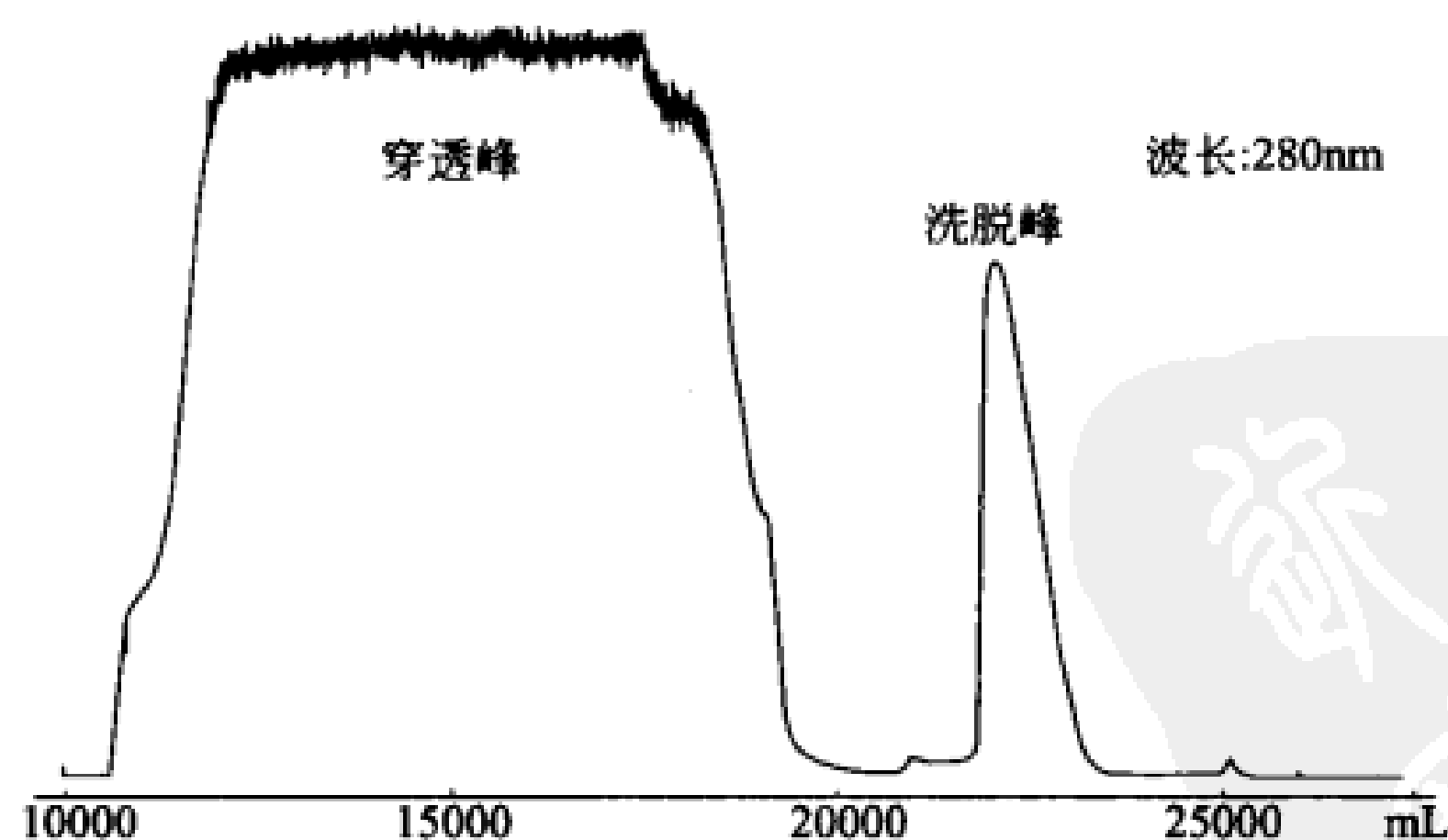


图 7.3 镍柱亲和色谱纯化带 (His)₆ 标签融合蛋白的色谱图

4. 镍柱再生

镍柱经过几个循环的重复利用后，若发现有 Ni²⁺ 脱落或载量下降，应该对填料进行再生处理。处理步骤如下：用超纯水冲洗柱后，用 50mmol/L EDTA 冲洗柱，冲洗 3~5 柱体积直至填料呈无色，接着用超纯水冲洗，冲洗结束后，再用

0.5mol/L NaOH 反向冲洗 40min, 线速为 40cm/h, 冲洗结束后, 用超纯水正向冲洗, 接着将填料保存在 20%乙醇中。

5. 镍柱保存

对于再生的填料, 使用结束后, 用超纯水冲洗后, 接着用 20%乙醇冲洗 3~5 柱体积, 然后将柱两端进行密封, 保存在 4℃环境中。

问题分析及解决方案

1. 镍柱亲和色谱分离之后目的蛋白纯度不高。

如果目的蛋白纯度不高, 有以下解决方法:

(1) 使用 Protein A 的亲合填料, 适当提高洗脱目标蛋白溶液的 pH; 提高起始缓冲溶液中盐离子强度, 增加非特异性蛋白的穿透能力。

(2) 对于金属螯合填料如镍柱, 调节起始缓冲溶液中咪唑和盐离子的浓度, 增加杂蛋白的穿透。

(3) 对于拖尾或前沿色谱峰应控制回收区间, 应设立多个取样点, 检测纯度, 然后确定样品液回收区间。

2. 色谱分离纯化之后目的蛋白收率不高。

如果目的蛋白纯度不高, 有以下解决方法:

(1) 适当降低上样流速;

(2) 调节上样量;

(3) 调节起始缓冲溶液的 pH、离子强度及竞争试剂的浓度;

(4) 填料的再生;

(5) 调整洗脱样品液回收区间。

3. 纯化后目的蛋白的活性低。

蛋白活性低的解决方法:

(1) 对于 Protein A 纯化蛋白, 先进行 pH 稳定性试验, 选择合适 pH 的流动相;

(2) 控制纯化温度及洗脱时间;

(3) 洗脱后的蛋白立即调节 pH。

方案 7.3 从大肠杆菌中提取诱导表达的 GST 标签融合蛋白

简介

谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 亲和标签已经成为纯化重组蛋白的常用方法, 该方法以 GST 能够偶联在介质上的谷胱甘肽配体结合为基础。带有 GST 标签的蛋白与配体的结合是可逆的, 能够在温和、非变性的条件下通过加入还原型的谷胱甘肽被洗脱下来。

材料

BL21 感受态细胞

表达载体 pGEX

LB 培养基

氨苄青霉素 (Amp)

IPTG

蛋白酶抑制剂

缓冲液 1 (100mmol/L Tris, pH 8.5, 500mmol/L NaCl)

缓冲液 2 (100mmol/L NaAc, pH4.5, 500mmol/L NaCl)

PBS 缓冲液 (100mmol/L NaCl, 2.7mmol/L KCl, 10mmol/L Na₂HPO₄,

1.8mmol/L KH₂PO₄)

洗脱缓冲液 (50mmol/L Tris, pH 8.0, 10mmol/L GSH)

微量紫外分光光度计

超声波破碎仪

高速冷冻离心机

GST 柱: Glutathione sepharose 4B

方法

1. 载体构建和细菌培养

(1) 采用 RT-PCR 扩增得到目的基因, 构建到表达载体 pGEX-4T-1 上;

(2) 用构建的质粒转化表达菌 BL21, LB 平板 37°C 过夜培养;

(3) 从 LB 平板上挑取一单菌落接入 5mL LB 液体培养基 (100μg/mL Amp) 中, 37°C 培养 3~5h;

(4) 将 5mL 菌液接入 1L LB 液体培养基 (100μg/mL Amp) 中, 37°C 培养至 OD₆₀ ≈ 0.6, 加入终浓度为 0.3mmol/L 的 IPTG, 16°C 诱导 16h;

(5) 培养好的菌液于 5000r/min 离心 10min, 弃上清液, 收集菌体, 离心后的菌体沉淀悬浮于 25mL Binding buffer 中。

2. 细胞破碎和蛋白分离

(1) 悬浮的菌液装在 50mL 玻璃烧杯中, 加入适量蛋白抑制剂 (10μL 的 10mg/mL antipain, 10μL 的 10mg/mL leupeptin 和 1mL 的 1mol/L PMSF), 冰浴放置;

(2) 超声破碎, 每个循环 26 次, 超声 6s, 间隔 5s, 视破碎效果共 2~4 个循环, 破碎后的菌体 4°C 18000r/min 离心 30min, 上清液保持在 4°C;

(3) GST 柱先用 PBS 缓冲液平衡, 而后上样, 结合 30~60min, 每隔 5~10min 搅拌一次, 流干;

(4) 用 2~3 倍柱体积 PBS 缓冲液平衡清洗非特异结合的蛋白质, 流干, 加入 15mL 洗脱缓冲液进行洗脱, 可分两次加入以增加洗脱效率;

(5) 由于残存少量蛋白酶, 洗脱出来的含目的蛋白的溶液可于 4°C 短暂保存几小时, 时间不宜过长;

(6) SDS-PAGE 检测初步纯化效果, 进行下一步的纯化步骤。

3. 蛋白检测和 GST 柱的恢复

- (1) 用 3 倍柱体积的 6mol/L 盐酸胍处理柱子 10min;
- (2) 用 3 倍柱体积的水洗柱子 2~3 次;
- (3) 用 3 倍柱体积缓冲液 1 处理柱子 10min;
- (4) 用 3 倍柱体积缓冲液 2 处理柱子 10min;
- (5) 再重复第三和第四步两次;
- (6) 用 3 倍柱体积水洗柱子 2~3 次;
- (7) 用 3 倍柱体积 PBS 缓冲液洗柱子 2 次;
- (8) 往柱子里加 3 倍柱体积 PBS 缓冲液以待使用;
- (9) 若长时间不用, 第七步改用 20%乙醇, 将柱材料浸泡在 20%乙醇中。

问题分析及解决方案

GST 标签蛋白不结合柱子或结合非常弱的原因及解决办法。

可能的原因有:

- (1) 过分的机械裂解使标签蛋白变性, 阻止其结合;
- (2) GST 标签蛋白在样品中有聚集, 导致沉淀;
- (3) 标签蛋白的浓度过低;
- (4) 标签蛋白可能改变了 GST 的构象;
- (5) 平衡时间太短。

相应的解决方法有:

- (1) 在裂解过程中, 用温和的裂解条件;
- (2) 在细胞离解前的缓冲液中加入 DTT;
- (3) 浓缩样品, 结合能力依赖于浓度;
- (4) 可以通过降低结合的温度来改善结果;
- (5) 确认至少用 5 倍柱体积的 pH 6.5~8.0 的缓冲液平衡过。

参 考 文 献

- [1] Simpson R J. Purifying Proteins for Proteomics: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003: 301.
- [2] 冯小黎等. 分离纯化中蛋白质的不稳定性及其对策. 生物工程进展, 2000, 20 (3): 67.
- [3] [美] 科林根 J E 等著. 精编蛋白质科学实验指南. 李慎涛等译. 北京: 科学出版社, 2007: 261.
- [4] 李蓉等. 固定金属离子亲和色谱——蛋白质分离的方法、原理、特性和应用. 化学通报, 2005, 5: 352.
- [5] 陆健等. 蛋白质纯化技术及应用. 北京: 化学工业出版社, 2005: 120.
- [6] 王子佳等. 蛋白质分离纯化方法研究进展. 化学与生物工程, 2009, 26 (8): 8.
- [7] [爱尔兰] 沃尔什著. 蛋白质生物化学与生物技术. 王恒樑等译. 北京: 化学工业出版社, 2006: 76.
- [8] 向文斌等. 分离纯化对蛋白质活性的影响. 生命的化学, 2003, 23 (3): 238.
- [9] 颜真等. 蛋白质研究技术. 西安: 第四军医大学出版社, 2007: 55.

第 8 章 疏水色谱

8.1 基本原理

在组成蛋白质的常见的 20 种氨基酸中，有 8 种氨基酸的侧链是非极性的，属于疏水性氨基酸（R 基）。多数蛋白质分子都是折叠的，这样可以使其中大多数疏水性氨基酸残基包埋在分子内部，因而与周围的水性环境隔离。包埋在内部的疏水性基团通常与临近的疏水基团发生作用。但是也有少数疏水性氨基酸残基位于蛋白质分子表面，暴露于外部水性环境中，这些氨基酸残基因为排斥水分子而聚集在一起，形成疏水区。不同的蛋白质分子表面的疏水性氨基酸残基的数量和类型都不同，因而表面疏水程度也不同。蛋白质分子表面的疏水性氨基酸残基倾向于成簇或成团排列。疏水作用色谱是在不带电荷的载体上偶联疏水基团制备成疏水吸附剂，通过这些疏水基团与不同蛋白质分子疏水区之间的可逆相互作用达到分离目的蛋白的色谱技术。疏水色谱分辨率低，但此法是根据蛋白质的疏水性质进行分离的方法，因而是一种有用的分离纯化手段。

目前常用的疏水作用色谱介质（见表 8.1）的基质主要有多糖类如琼脂糖、纤维素和人工合成聚合物类如聚苯乙烯、聚丙烯酸甲酯类。其中，半刚性的琼脂糖类凝胶仍是应用最广泛的疏水介质，有代表性的有 Pharmacia 的辛基-Sepharose 和苯基-Sepharose，分别带有辛基和苯基疏水基团。另外，由于壳聚糖具有良好的生物相容性和化学稳定性，近年来在疏水作用色谱中也得到了应用。用于疏水作用色谱

表 8.1 蛋白分离中常用的疏水色谱介质

介质名称	配基	基质	粒度/ μm
Octyl Sepharose CL-4B	辛基	交联琼脂糖	45~165
Phenyl Sepharose FF	苯基	高交联琼脂糖	45~165
Butyl Sepharose FF	丁基	高交联琼脂糖	45~165
Octyl Sepharose FF	辛基	高交联琼脂糖	45~165
Phenyl Sepharose HP	苯基	高交联琼脂糖	34
TSK gel Phenyl 5-PW	苯基	亲水性聚乙烯醇	10
TSK gel Ether 5-PW	聚醚	亲水性聚乙烯	10
SepaBeads FP-BU 13	丁基	聚乙烯	13
SepaBeads FP-OT 13	辛基	聚乙烯	13
SepaBeads FP-DA 13	苯基	聚乙烯	13

介质的疏水配基很多，如羟丙基、丙基、苜基、异丙基、苯基、戊基、辛基等。通常，配基通过稳定的非离子键（如醚键）与基质结合。迄今为止，广泛使用的商品化制备型疏水作用色谱介质配基仍是烷基和芳基。

对某些蛋白质而言，上述配基与其结合力太强，为了洗脱这些蛋白质，需要使用离液序列高的试剂和有机溶剂，常导致活性生物大分子变性。由于具有中等疏水性的高分子配基（如聚乙二醇和聚丙烯二醇等）不仅可以提供足够的结合力，而且避免了上述缺点，因而在蛋白质的分离中也得到了应用。另外，配基密度的增加使疏水作用色谱可以在低盐浓度下吸附蛋白质。这对于疏水性强的蛋白质，低盐浓度下分离蛋白质，不但避免了使用高浓度的盐所带来的腐蚀性，而且无需其他中间步骤（如脱盐或加盐）就可与离子交换色谱或亲和色谱联用。

通过疏水作用色谱分离蛋白质取决于蛋白质分子本身、凝胶基质和周围溶剂（通常是水性的）之间的作用。加入中性盐（如硫酸铵或氯化钠）提高溶液的离子强度，可以提高蛋白质分子的疏水性。这或多或少可以简单地解释为溶液中盐离子的水合作用导致每个离子周围形成有序的水分子层，这样会吸引周围的水分子离开蛋白质分子，使蛋白质分子表面的疏水结构域暴露。由于离子强度的增加能增强蛋白质分子的表面疏水作用，因此疏水作用色谱经常在盐沉淀步骤或者是离子交换色谱之后进行。

经过多年的发展，疏水作用色谱已成为分离纯化蛋白质和多肽等生物大分子的重要手段。疏水作用色谱技术在实验室和工业化生产中得到了广泛的应用。疏水作用色谱介质的重要特点是疏水性弱，与蛋白质的作用比较温和，能更好地保持生物大分子的天然结构和生物活性。此外，其“高盐吸附、低盐洗脱”的特点使得疏水作用色谱能直接与其他分离技术如盐析、离子交换色谱联合使用。

8.2 实验方案设计

蛋白质的疏水性与其电荷性质相比复杂得多，不易定量掌握。除疏水性吸附剂的性质外，流动相的组成以及操作温度对蛋白质疏水性吸附的强弱均有重要影响。

8.2.1 疏水配基的选择

疏水性强的蛋白与疏水性强的配基结合得非常牢固，可能需要极端的洗脱条件，比如离液剂和去污剂。为了避免这个问题，可以先用试剂盒来筛选最佳的疏水介质。如果样品中含有疏水性强的蛋白质，开始的时候可以选择弱疏水性的介质，这种介质应该能在一个合理的低盐浓度条件下得到最好的分辨率。配基结合蛋白强弱的顺序依次是：醚，异丙酯，丁酯，辛酯，苯。但是对于每次实验，配基的选择性和结合强度都会变化，要通过预实验来确定。

8.2.2 离子强度及种类

蛋白质的疏水性吸附作用随着离子强度的提高而增大。除离子强度外，离子的

种类对蛋白质的疏水性也有重要影响。疏水性吸附与盐析沉淀一样，在高价阴离子存在下吸附作用较强。因此疏水作用色谱分离过程中主要利用硫酸铵、硫酸钠和氯化钠等盐溶液为流动相，在略低于盐析点的盐浓度下上样，然后逐渐降低流动相离子强度进行洗脱分离。使用疏水色谱的前提是待分离蛋白必须可用于高浓度的盐溶液中。常采用的盐溶液有： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.7mol/L)、NaCl (4mol/L) 和 KCl (4mol/L)。使用高浓度的盐以促进蛋白质对疏水配基的结合。缓冲液的离子强度对于疏水相互作用来说并不是最关键的，选择一个有利于蛋白质稳定和活性的 pH 很重要，缓冲液必须有足够的浓度来保持 pH 的稳定。

8.2.3 破坏水化作用的物质

SCN^- 、 ClO_4^- 和 I^- 等离子半径大、电荷密度低的阴离子可减弱水分子之间相互作用，即这类离子具有破坏水化作用的性质。因此，这类阴离子与上述盐析作用强的高价阴离子（如 SO_4^{2-} ）的作用正好相反，前者称为离液离子，后者称为反离液离子。在离液离子存在下疏水性吸附减弱，蛋白质易于洗脱。除离液离子外，乙二醇和丙三醇等含羟基的物质也具有影响水化的作用，降低蛋白质的疏水性吸附作用，经常用作洗脱促进剂，洗脱疏水吸附强烈、仅靠降低盐浓度难于洗脱的高疏水性蛋白质。

8.2.4 温度

一般吸附为放热过程，温度降低则吸附结合常数增大。但疏水性吸附与一般吸附相反，吸附结合作用随温度升高而增大。蛋白质疏水部位的失水有利于疏水性吸附，而失水是吸热过程，即疏水性吸附为吸热过程，所以吸附平衡常数随温度升高而增大。

8.2.5 洗脱方式

可采用以下两种：①用负盐梯度洗脱，这是最常用的洗脱方式；②用提高 pH 和降低温度的方式洗脱。因此蛋白质样品最好在高离子强度条件下上样疏水作用柱，当溶液通过柱子时，蛋白质通过疏水作用被保留。蛋白质疏水性越强，结合越牢固。经过一步冲洗，利用促使疏水作用减弱的条件洗脱结合的蛋白质。通过降低缓冲离子强度、加入适当去污剂或加入乙醇或乙二醇等制剂降低缓冲液极性可以实现洗脱。蛋白质洗脱之后疏水作用色谱分离树脂必须充分冲洗以除去任何紧密结合的蛋白质。除去紧密结合的蛋白质首先需要用十二烷基磺酸钠等去污剂冲洗，然后通常用乙醇、丁醇和水等清洗。根据疏水性的不同也可以利用反向色谱分离蛋白质。蛋白质溶液上样于多数蛋白质都结合的高度疏水的柱子，降低流动相的极性可以洗脱结合蛋白质。通常通过加入有机溶剂来降低流动相极性。洗脱条件苛刻，经常导致很多蛋白质变性。

8.2.6 表面活性剂

表面活性剂可以与吸附剂及蛋白质的疏水部位结合，从而减弱蛋白质的疏水性

吸附。根据这一原理，难溶于水的膜蛋白可添加一定量的表面活性剂使其溶解，利用疏水作用色谱进行洗脱分离。但是选用表面活性剂的种类和浓度应当适宜：浓度过小则膜蛋白不溶解，过大则抑制蛋白质的吸附。

8.2.7 色谱柱使用后的处理

应及时用 6mol/L 的洗涤，以起始缓冲液平衡。若不继续使用，可加 0.02% 硫柳汞于 4℃ 保存。

方案 8.1 用疏水色谱去除抗体融合蛋白样品中的多聚体

简介

本方案应用疏水色谱纯化蛋白质，采用线性梯度洗脱及阶段性梯度洗脱模式，去除蛋白质溶液中的多聚体。

材料

疏水色谱介质：TOYOPEARL Phenyl-600M, TOYOPEARL Butyl-600M, TOYOPEARL Phenyl-650M, TOYOPEARL Butyl-650M, 生产厂家 TOSOH Corporation, 粒径 40~90 μm

中压大型特制玻璃色谱柱 ($\phi 7.5\text{cm} \times 50\text{cm}$), 生产厂家上海华美实验仪器厂

色谱设备：AKTA Pilot

工作站：Unicorn software

样品：抗体融合蛋白

平衡缓冲液 A：20mmol/L PB, pH 8.0 缓冲溶液含 1.4mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

洗脱溶液 B：20mmol/L PB, pH 8.0 缓冲溶液

方法

1. 装柱

(1) 根据所需要柱体积，结合说明书的沉降系数，在烧杯中倒入一定体积的胶，沉降胶和超纯水按照 1:3 的比例加入超纯水，玻璃棒轻轻搅拌，搅匀后静置 60min，然后倒出上清液，再重复上述步骤两次。

(2) 将平衡缓冲液与沉降胶按照 50:50 (体积分数) 比例悬浮，轻轻搅匀。

(3) 将色谱柱固定在设备支架上，连接后柱出口端管道，从柱底端进口反向泵入超纯水，排除管道及筛板中的气泡，停泵，然后从出口端放出部分超纯水，保留 1~2cm 高度的超纯水，封死出口端，然后正向冲洗进口端管道和适配器，排除筛板和管道中的气泡。

(4) 通过玻璃棒引流将悬浮胶倒入色谱柱，在柱上端补充部分超纯水，搅匀，装上适配器，适配器末端进入胶面下 2mm 处。

(5) 将柱出口端与色谱设备连接，以 0.2MPa 恒压装柱，装填至恒定的柱床高度，标记柱床胶面位置，关闭泵，松开适配器，降低适配器至胶面下 2mm 处，继

续装填待柱床高度稳定后，标记柱床胶面位置，降低适配器至柱上标记柱床位置下2mm。固定适配器，继续装填2~3个柱体积。

(6) 确定柱体积，测量柱高，计算柱体积。

2. 样品溶解度考察

由于过高的离子强度会造成蛋白质沉淀，必须对样品的盐离子耐受强度进行考察，配制含不同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度的溶液，然后溶解样品，最后确定样品上样条件为20mmol/L磷酸盐缓冲溶液，pH 8.0，含1.4mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

3. 柱效评估

标准品：丙酮；上样体积：1%柱床体积；线速：30cm/h；评价因子：对称因子 (asymmetry factor)，理论塔板高度 (HETP)；标准：对称因子 0.8~1.5， $\text{HETP}/d < 3$ (d 表示粒径)。

4. 纯化策略

A：线形梯度洗脱

B：阶段性梯度洗脱

5. 步骤

线形梯度洗脱

(1) 柱的平衡。20mmol/L PB，含1.4mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，pH 8.0平衡缓冲溶液，冲洗10柱体积，直至pH及电导率监控显示和平衡缓冲溶液的pH及电导一致。

(2) 上样。根据柱体积及装柱的最大流速确定上样流速，上样流速不超过装柱最大流速的75%，同时，上样流速也要尽可能低，保证样品和介质充分发生作用。

(3) 淋洗。上样结束后，用平衡缓冲溶液冲洗1~2柱体积，使UV280响应信号重新回到基线。

(4) 梯度设置。0~60min，70%B → 100%B。

阶段性梯度洗脱

(1) 柱的平衡。20mmol/L PB，含1.4mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，pH 8.0平衡缓冲溶液，冲洗10柱体积，直至pH及电导率监控显示和平衡缓冲溶液的pH及电导一致。

(2) 上样。根据柱体积及装柱的最大流速确定上样流速，上样流速不超过装柱最大流速的75%，同时，上样流速也要尽可能低，保证样品和介质充分发生作用。

(3) 淋洗。上样结束后，用平衡缓冲溶液冲洗1~2柱体积，使UV280响应信号重新回到基线。

(4) 洗脱。

a. 淋洗结束后，用50%B冲洗2柱体积，冲洗至洗脱的色谱峰回到基线；

b. 接着用70%B冲洗2柱体积，冲洗至洗脱的色谱峰回到基线；

c. 接着用100%B冲洗2柱体积，冲洗至洗脱的色谱峰回到基线。

6. 结果

见图 8.1、图 8.2。

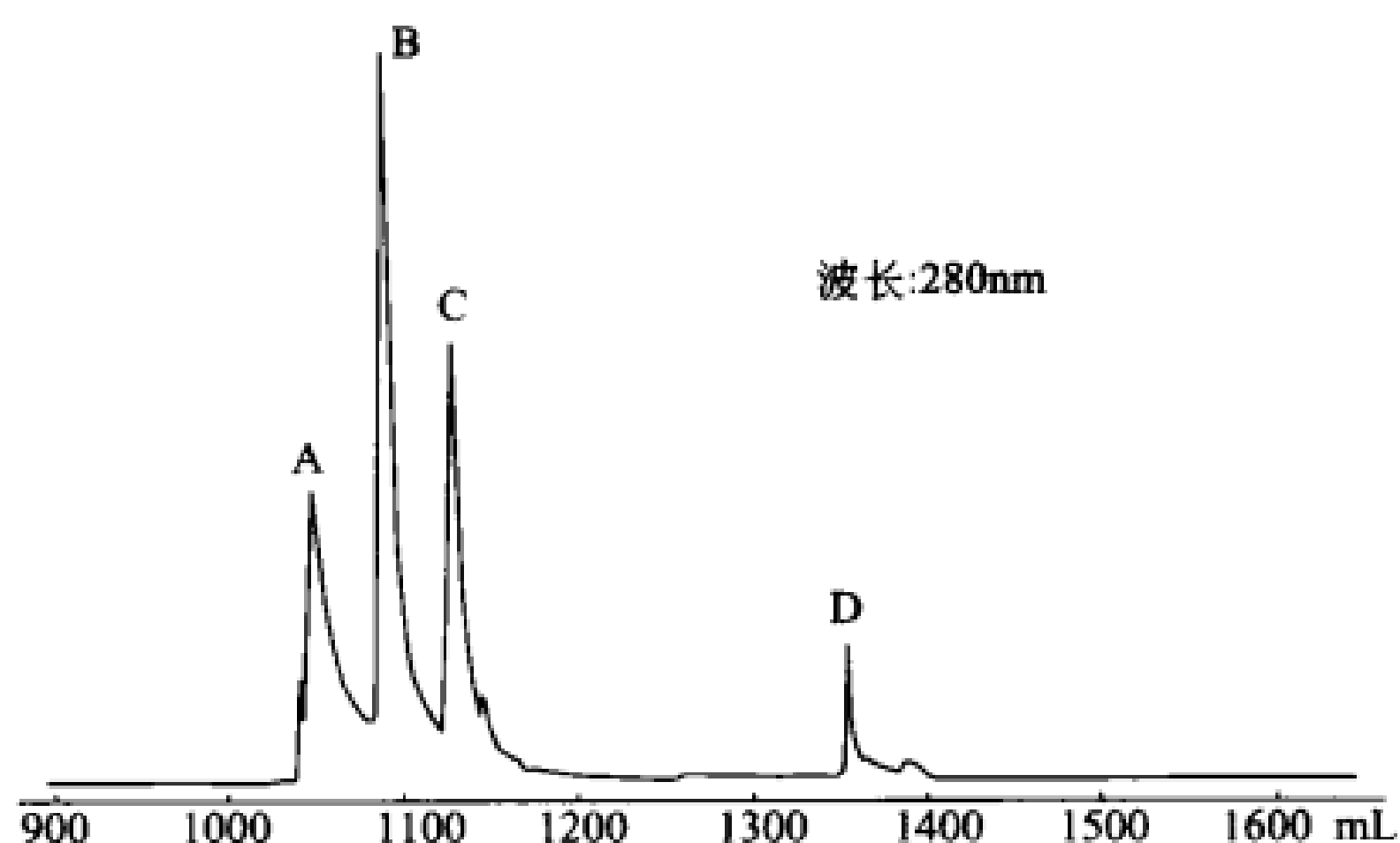


图 8.1 色谱峰 A、B、C 都含有高比例的多聚体

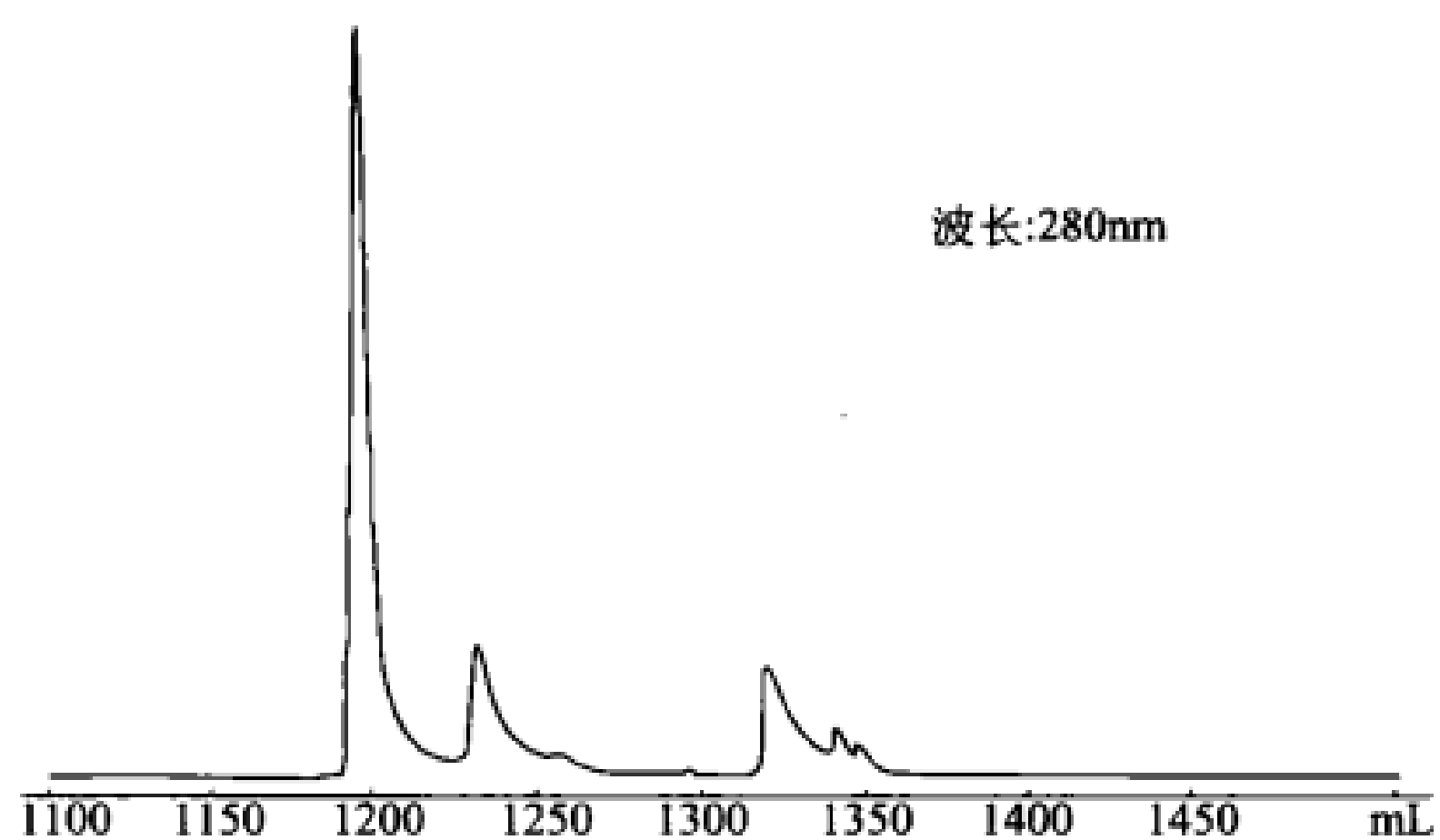


图 8.2 Butyl 600 阶段性梯度洗脱色谱图

7. 胶的再生处理

用 0.5mol/L NaOH 或 0.5mol/L HCl 溶液反向冲洗，冲洗 30~60min。

8. 胶的保存

用超纯水冲洗 5 柱体积，再用 20% 乙醇冲洗 3 柱体积，然后将柱两端封死，4℃ 保存。

问题分析及解决方案

1. 目标蛋白收率不高的解决方法。

- (1) 尽量提高起始缓冲溶液中盐的浓度及选择盐的种类；
- (2) 调节起始缓冲溶液的 pH；
- (3) 降低上样流速；
- (4) 降低洗脱目标蛋白溶液的电导；

- (5) 选择合适的填料类型，如 butyl、phenyl、octyl 等；
- (6) 降低上样量；
- (7) 控制样品与设备系统温度差；
- (8) 样品在高盐条件下容易出现盐析，从而使样品出现浑浊现象，控制盐的浓度，保持样品溶解度。

2. 目标蛋白纯度不高的解决方法。

- (1) 选择合适的填料类型；
- (2) 调节洗脱溶液的电导；
- (3) 改变洗脱方式，阶段性梯度洗脱或线性梯度洗脱。

3. 不出现目标洗脱峰的解决方法。

- (1) 改变洗脱条件，在洗脱溶液中增加合适的添加剂，如非离子型表面活性剂；
- (2) 改变填料的类型；
- (3) 调节样品液中盐的浓度或盐的类型。

参 考 文 献

- [1] Simpson R J. Purifying Proteins for Proteomics: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003: 209.
- [2] 冯小黎等. 分离纯化中蛋白质的不稳定性及其对策. 生物工程进展, 2000, 20 (3): 67.
- [3] [美] 科林根 J E 等著. 精编蛋白质科学实验指南. 李慎涛等译. 北京: 科学出版社, 2007: 241.
- [4] 鲁碧楠等. 蛋白质分离分析中的色谱技术新进展. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26 (13): 1116.
- [5] 陆健等. 蛋白质纯化技术及应用. 北京: 化学工业出版社, 2005: 17.
- [6] 浦宇等. 蛋白质层析用离子交换和疏水作用层析介质的发展概况. 生物工程学报, 2004, 20 (6): 966.
- [7] 王子佳等. 蛋白质分离纯化方法研究进展. 化学与生物工程, 2009, 26 (8): 8.
- [8] [爱尔兰] 沃尔什著. 蛋白质生物化学与生物技术. 王恒樑等译. 北京: 化学工业出版社, 2006: 74.
- [9] 向文斌等. 分离纯化对蛋白质活性的影响. 生命的化学, 2003, 23 (3): 238.
- [10] 颜真等. 蛋白质研究技术. 西安: 第四军医大学出版社, 2007: 52.

数字资源
PDG

第 9 章 分子印迹技术

分子印迹技术 (molecular imprinted technology, MIT) 也叫分子模板技术。MIPs 是以某种化合物的分子结构为模板合成的聚合物, 是一种模拟抗体-抗原相互作用的人工生物模板技术。

该技术最初源于 20 世纪 40 年代的免疫学。当时的诺贝尔奖获得者 Pauling 首次提出了抗体形成学说——锁钥原理, 这是对分子印迹最初的描述, 因此, 现在分子印迹技术又被称为创造与识别的“人工识别”的人工“锁”技术。

20 世纪 70 年代, Wulff 等人利用新的方法合成了几种高分子。这些高分子对糖类和氨基酸衍生物具有较高的选择性, 被用作高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 的固相填充物, 这种新的方法, 被称为分子印迹。但由于他的研究主要集中在共价型模板聚合物上, 动力学过程较慢, 应用仅限于催化领域, 因此在分子识别领域的应用没有展开。

20 世纪 80 年代后非共价型模板聚合物的出现, 使分子印迹技术在生物传感器、人工抗体模拟及色谱固相分离等方面有了新的发展, 尤其是 1993 年 Mosbach 等人有关茶碱分子印迹聚合物的研究报告, 并由此使其成为化学和生物学交叉的新兴领域之一, 得到世界注目并迅速发展。欧洲委员会于 1998 年启动了一项科研发展计划, 资助分子印迹聚合物 (molecularly imprinted polymers, MIPs) 的制备、结构表征以及将 MIPs 用于临床分析、环境分析和生物分析等方面的研究。

其主要原理如图 9.1 所示。

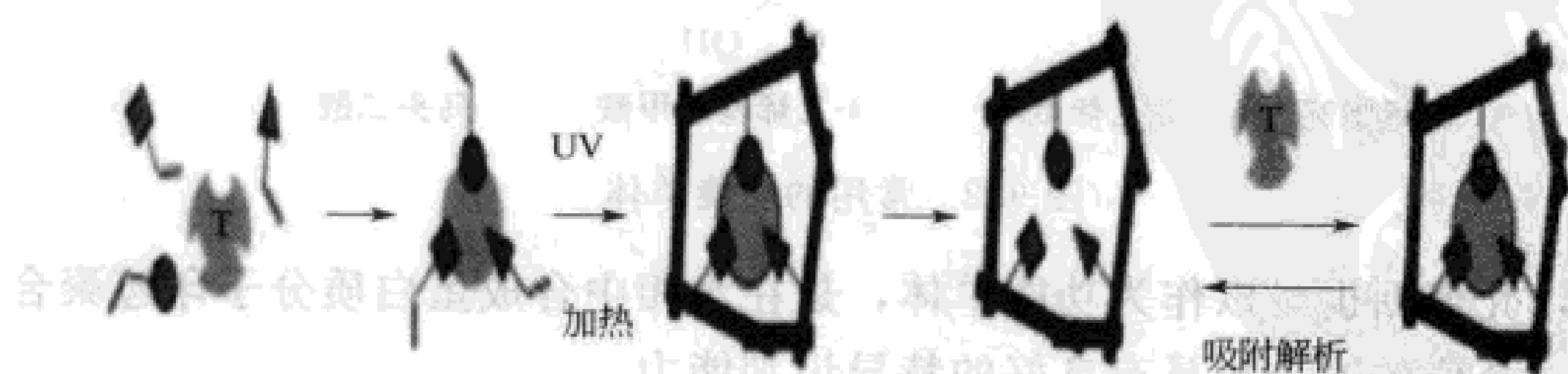


图 9.1 分子印迹示意图

如图 9.1 所示, 在紫外线照射或者加热的条件下, 待分离物质 (模板分子)、功能单体 (见 9.1.1) 与引发剂、交联剂、溶剂、致孔剂等发生多重聚合反应, 形成具有一定硬度和形状的聚合物。由于相互之间的特殊作用力的存在, 模板分子在

聚合物中的位置就会被记忆下来，聚合结束后通过萃取的方法除去聚合物上结合的印迹分子，聚合物主体上就形成了与印迹分子空间结构匹配的具有多重作用位点的“空穴”结构。当含有模板分子的混合溶液通过该聚合物时，模板分子或者其结构类似物会被同样的作用力留在分子印迹聚合物中，而其他物质将不会保留，从而达到了分离纯化的目的。这种具有“记忆”效应的印迹聚合物对印迹分子及其他与印迹分子结构相似的客体分子具有较高的特异性结合能力，类似于酶-底物的“钥匙-锁”相互作用，依赖于印迹聚合物和客体分子大小及形状的匹配。

9.1 分子印迹主要术语

分子印迹实验的主要试剂有：模板分子、功能单体、交联剂、引发剂、溶剂、致孔剂等。

9.1.1 功能单体

能够和模板分子通过共价键、氢键等非共价键发生结合的物质，在分子印迹聚合物中被称为功能单。在反应中，也能与交联分子（9.1.2）处于合适的位置，从而保证印迹分子获得期望的取向和定位。

分子印迹聚合中应用最广的单体是羧酸类（如丙烯酸、甲基丙烯酸、乙烯基苯甲酸）、磺酸类，以及杂环弱碱（如乙烯基吡啶、乙烯基咪唑）。其中最常用的体系为聚丙烯酸和聚丙烯酰胺体系，对金属配位作用则应用氨基二乙酸衍生物。其他可能的体系为聚硅氧烷类。图 9.2 为常见的几种功能单体的结构式。

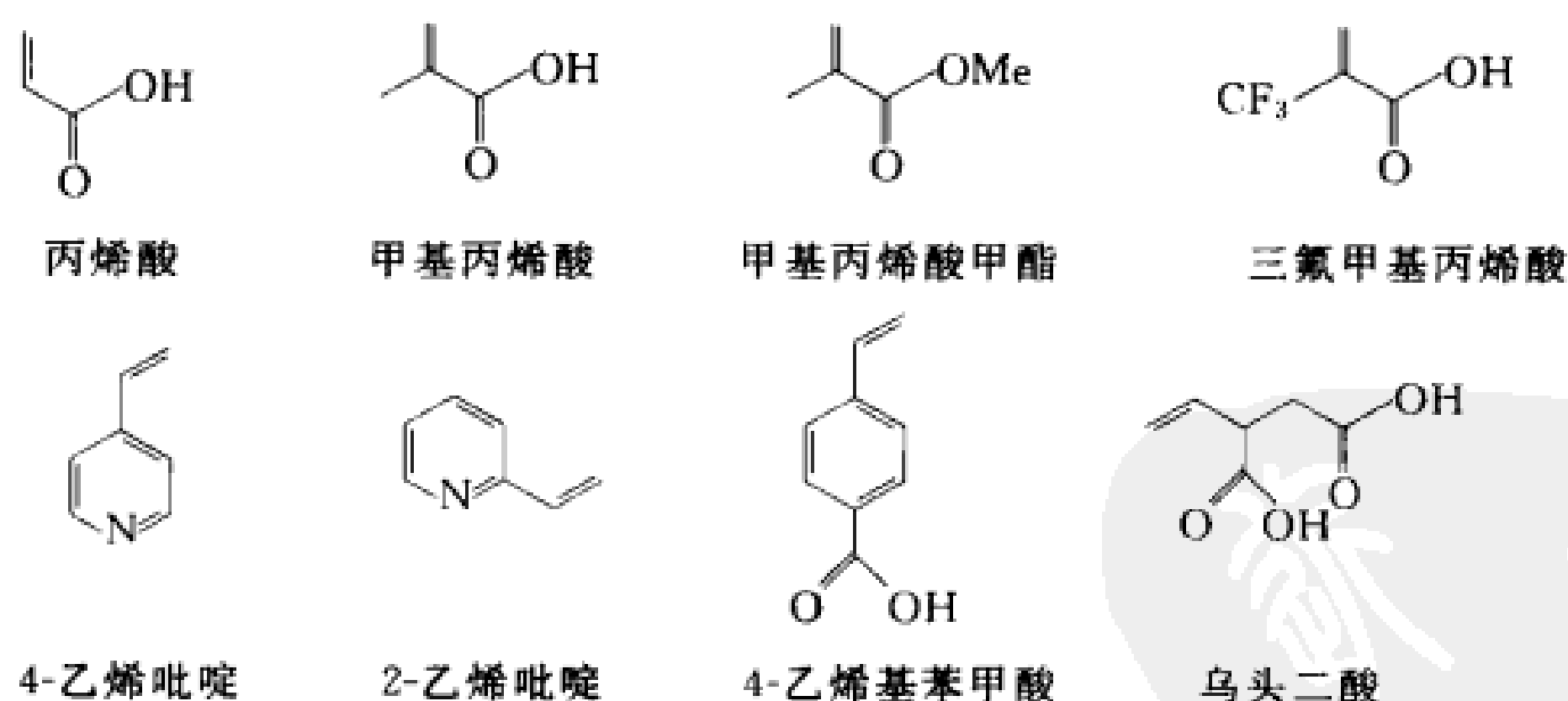


图 9.2 常用的功能单体

另外，壳聚糖也可以作为功能单体，是在水相中合成蛋白质分子印迹聚合物的良好载体，合成的聚合物具有良好的特异识别能力。

9.1.2 交联剂

在分子印迹聚合物中，加入交联剂是为了使生成的 MIPs 具有一定的硬度（特别是用于 HPLC）和形成稳定的结合位点。由于分子印迹聚合物要求的交联度很高（70%~90%），因此交联剂的种类受到限制，而预聚溶液中交联剂溶解性的限制，

又减少了对交联剂种类和浓度的选择。

最初，人们用二乙烯基苯为交联剂，但后来发现丙烯酸类交联剂能制备出特异性更高的聚合物。在肽类分子印迹中，三或四官能交联剂如季戊四醇三丙烯酸酯（PETRA）和季戊四醇四丙烯酸酯（PETEA）已用于聚合体系中。目前，乙二醇二甲基丙烯酸酯（EGDMA）应用最多，制备的 MIPs 选择性高，非特异性吸附低。图 9.3 为常见的几种交联剂。

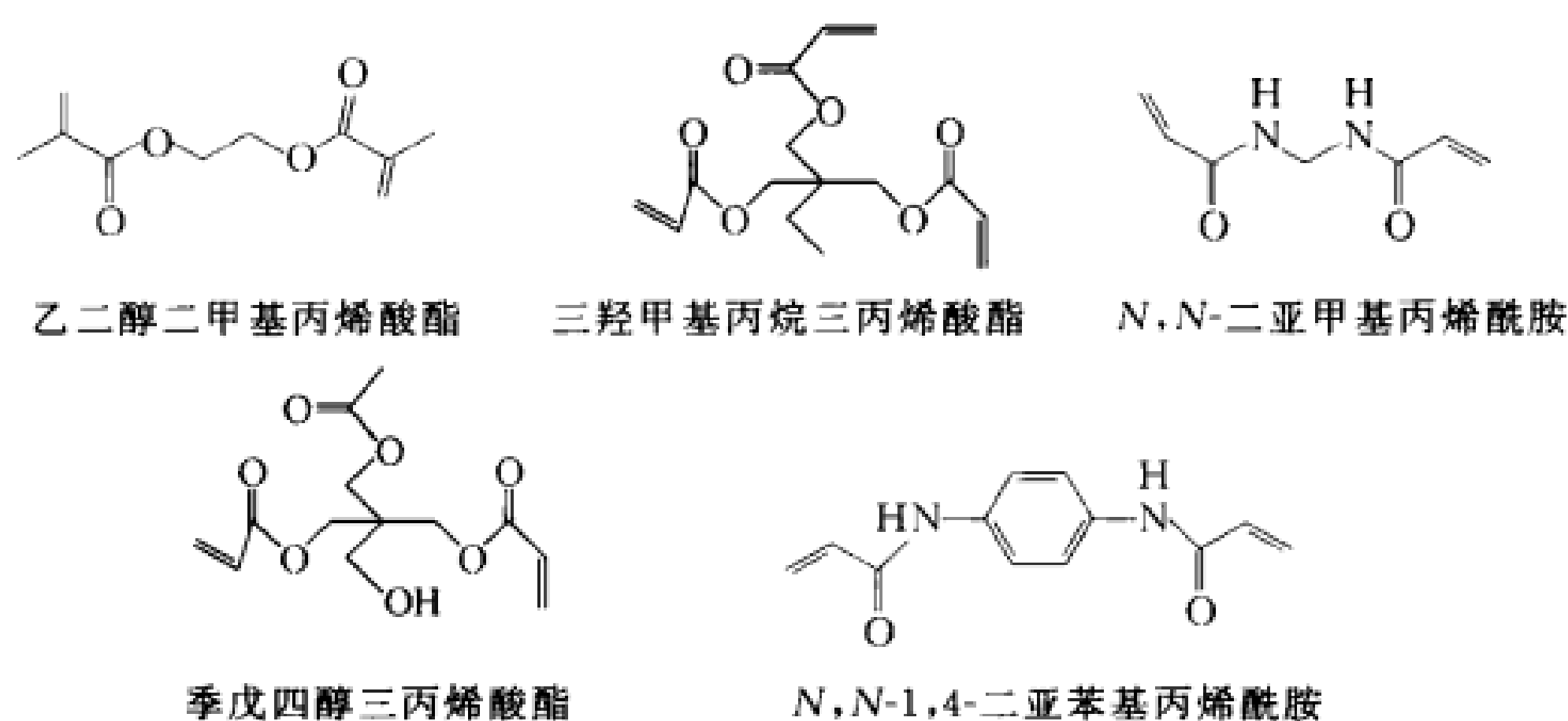


图 9.3 常用的交联剂

9.1.3 溶剂和致孔剂

溶剂和致孔剂的选择在分子印迹制备中发挥着重要作用，对分子间作用力和 MIPs 的形态影响很大。致孔剂分为良性溶剂和不良性溶剂，这里的溶剂单指良性溶剂，致孔剂指不良性溶剂。一般情况下要满足以下条件：

- ① 能溶解模板分子和功能单体；
- ② 能形成大的流通孔，从而保证流动相在较低的压力下流过色谱柱；
- ③ 对模板分子与功能单体之间的相互作用干扰小。

实验时，应根据印迹分子与功能单体间可能的作用力类型选择适宜极性的溶剂。一般说来，溶剂的极性越大，产生的识别效果就越弱。因此最好的溶剂应选择低介电常数的溶剂，比如甲苯、二氯甲烷等。由于模板分子的极性问题，三氯甲烷、二甲基亚砷、乙腈等也是常见的溶剂。

另外，聚合物的形态学也受溶剂的影响。溶剂能使聚合物溶胀，从而导致结合部位三维结构发生变化，对分析物的识别作用减弱。通常，吸附中溶剂最好与聚合反应溶剂相一致，以避免任何溶胀问题。

致孔剂的作用主要是形成孔穴，维持模板分子聚合物的立体结构，增加聚合物的通透性。目前，尽管在水相中进行的非共价型印迹已取得成功，但是通常还是选用长链的醇类作为致孔剂，环己醇、十二醇、四氢呋喃、癸醇、苯甲醇等有机溶剂也是常用的致孔剂。

9.1.4 引发剂

也称自由基引发剂，在加热或者紫外线的作用下，引发剂发生分解，产生自由

基，通过对单体的攻击，继而长出链增长自由基。常用的引发剂是偶氮二异丁腈（AIBN）或者偶氮二异庚腈（ADVN）。

9.1.5 适用的印迹分子

理论上讲，只要有合适的功能单体，任何物质都可以作为模板分子。如药物、氨基酸、碳水化合物、蛋白质、核酸、激素、杀虫剂、酶或辅酶等均已成功地用于分子印迹的制备中。一般地，由于氢键具有饱和性和方向性，作用力较强，分子中含强极性基团的化合物易于制备高效能的 MIPs。

9.2 分子印迹的分类

根据模板分子和功能单体形成复合物时作用力的性质，分子印迹可分为共价型和非共价型两种。

9.2.1 共价型

在共价型印迹过程中，印迹分子与官能团单体以共价键形式结合而形成印迹分子的衍生物，该衍生物在交联剂的存在下连接到聚合物的基质上。在印迹聚合物形成后，再将与印迹分子连接的这些共价键打断，并将印迹分子洗脱出来，从而形成具有吸附活性的印迹聚合物。在共价键法中，所采用的单体通常为低分子化合物，在选择时应考虑该单体与印迹分子形成的共价键键能（见表 9.1）要适当，达到在聚合时能牢固结合，在聚合后又能完全脱除的目的；另外还要考虑该单体与客体印迹分子有良好的相互作用。目前，共价键结合作用包括硼酸酯、席夫碱、缩醛（酮）、酯、螯合键作用等。

表 9.1 常见共价键的键能 (298K, 1000kPa) 单位: kJ/mol

键	H	F	Cl	Br、	I	O	S	N	P	C	Si	
单键	H	436										
	F	565	155									
	Cl	431	252	243								
	Br	368	239	218	193							
	I	297	—	209	180	151						
	O	465	184	205	—	201	138					
	S	364	340	272	214	—	—	264				
	N	389	272	201	243	201	201	247	159			
	P	318	490	318	272	214	352	289	293	264	331	
	C	415	486	327	276	239	343	289	293	264	331	
Si	320	540	360	289	214	368	226	—	214	281	197	
双键	C=C		620		C=N	615		C=O	798		C=S	578
	O=O		498		N=N	419		S=O	420		S=S	423
三键	C≡C		812		N≡N	945		C≡N	879		C=O	1072

9.2.2 非共价型

把适当比例的印迹分子与官能团单体和交联剂混合，通过非共价键结合在一起制成非共价键印迹分子聚合物。这些非共价键包括离子键、氢键、偶极作用、疏水作用、静电作用以及范德华力等。由于这种方法与溶剂的极性密切有关，所以印迹高聚物的形成是在有机溶剂中完成的。在溶液中官能团单体与印迹分子的比例至少为4:1，以便尽可能多的非共价作用形成。这些与印迹分子相配位的官能团单体在溶液中与交联剂达到快速平衡，形成印迹聚合物，将印迹分子包围，产生与印迹分子在形状、功能上互补的识别位点。在聚合物形成后再将印迹分子洗脱掉，所得的印迹聚合物就具有吸附活性。

共价型分子印迹中，单体与模板分子之间是通过化学键结合在一起的，印迹过程复杂，形成的复合物也很稳定，但是必须采用化学方法才能除去模板分子。因此，有限的可逆化学反应，限制了此法的应用性。与共价型印迹相比，非共价型印迹简单易行，模板分子易于除去，是目前广为采用的方法，其分子识别过程也更接近于那些天然的分子识别系统，如“抗体-抗原”和“酶-底物”等。在印迹过程中还可以同时采用多种单体，以提供给模板分子更多的相互作用，产生更好的印迹效果。

9.3 印迹效率的评价

考察分子印迹聚合物的效果，即考察合成的聚合物对模板分子的吸附效果，一般要从物理和生物化学两个角度来考察。不论是分子印迹整体柱，还是分子印迹固相萃取，在分离纯化蛋白质时，通常会和高效液相色谱，甚至质谱联用。

9.3.1 保留因子

保留因子考察的是每种物质在分子印迹聚合物-高效液相色谱的保留状态。对于能够使用分子印迹聚合物分离的物质，都有各自的保留因子 k 。

$$k = (t_R - t_0) / t_0$$

式中， t_R 表示该物质的保留时间； t_0 表示该色谱条件下仪器的死时间，一般情况下，是指丙酮在整体柱上的保留时间。

9.3.2 分离因子

分离因子 α 考察的是分子印迹聚合物对两种物质的选择特异性，按照下式进行计算：

$$\alpha = k_2 / k_1$$

式中， k_1 、 k_2 分别为两种物质的保留因子，通常情况下，取 k_2 为模板分子的保留因子， k_1 为模板分子的结构类似物的保留因子。

9.3.3 分离度

分离度 R_s ，又称分辨率，是分子印迹-高效液相色谱条件总的分离效能指标，

用来判断分离物质在色谱柱中的分离情况。计算公式如下：

$$R_s = (t_2 - t_1) / (W_1 + W_2)$$

式中， t_1 、 t_2 分别为先被洗脱的组分和后被洗脱的组分的保留时间； W_1 、 W_2 分别为两组分对应的峰底宽度。

R_s 越大，表明相邻组分分离越好，一般来说 $R_s < 1$ 时，两峰有部分重叠，当 $R_s = 1.0$ 时，分离度可达 98%， $R_s = 1.5$ 时，分离度可达 99.7%。

《中国药典》中规定： $R_s > 1.5$ 。

9.3.4 等温吸附方程

在使用分子印迹聚合物来分离纯化蛋白质的时候，除了要考虑蛋白质自己构象外，还要考虑到在模板分子靠近相应“空穴”时，不仅会受到空穴附近物质正的作用力，同时也会受到周围其他物质“负”的作用力，主要包括传质阻力、静电斥力等。

在理想情况下，假设这些负的作用力是不存在的，在这种情况下，模板分子与聚合物之间的作用力就符合一级动力学说。用 Langmuir 方程表示如下：

$$c_e / Q_e = c_e / Q_{\max} + 1 / (bQ_{\max})$$

式中， c_e 为平衡吸附液中模板分子的游离浓度，mg/mL； Q_e 为吸附平衡时分子印迹聚合物对模板分子的结合量，mg/g； Q_{\max} 为结合位点的最大表观结合量，mg/g； b 为 Langmuir 吸附平衡常数，mL/mg。

9.3.5 经典孔径分布曲线

采用 BJH 分析法，参见文献 [13]。

9.3.6 吸附曲线

采用氮气吸附模型，BET 间接测量法。

9.3.7 其他手段

在条件允许的情况下，还可以利用扫描电子显微镜来观察合成颗粒的孔的分布情况，或者利用压汞实验来测定比表面积等，也可以利用红外技术来考察洗脱前后分子印迹聚合物结合模板分子的情况。

9.4 分子印迹技术在蛋白质分离中的展望

分子印迹技术拥有三大优点，即预定性、识别性和实用性。正是因为这三大优点，该技术受到了科研工作者的追捧。近年来，风头正劲，合成的分子印迹聚合物的种类也越来越多。随着水相合成体系的出现，蛋白质分子印迹聚合物的合成数目也日渐增多。在这些研究中，分子印迹聚合物都表现出了特异的功能和性质。另一方面，这些研究大部分停留在模仿的阶段，缺乏理论和应用上的创新，主要体现在以下几个方面。

① 分子印迹过程和分子识别过程的机理和表征问题。尽管有不少研究者在这方面作过努力，但结合位点的作用机理，聚合物的形态和传质机理仍不明了。如何从分子水平上更好地理解分子印迹形成和识别过程，仍需科研工作者的努力。

② 低质量的等温吸附和缓慢的传质是限制其作为分离介质的两个主要因素。当溶剂组成改变时，MIPs 容易发生膨胀，常导致印迹空穴的不可逆变形，从而失去选择性。

③ 制备 MIPs 大都在有机溶剂中进行，存在不便。因而，改善 MIPs 的动力学性能，设法在水溶液或水溶性介质中进行合成，优化空间几何因素设计等研究，均待深入开展。

④ 目前使用的功能单体、交联剂和聚合方法都有较大的局限性。尤其是功能单体的种类太少，以至于不能满足某些分子识别的要求，这就使得分子印迹技术远远不能满足实际应用的需要。因此，有待发展基于新的功能性单体的有机聚合物，用以代替常用的丙烯酸类和二乙烯基类单体。最近虽已提出聚酚、聚氨基苯基硼酸酯、过度氧化的聚吡咯、聚氨酯、聚苯二胺、聚苯胺等，但仅能适应相应特殊要求，性能尚待完善。

⑤ 用于生物传感时，与生物传感器相比的相对噪声较高，灵敏度较低。

展望未来，分子印迹技术的发展趋势可能有如下几个方面：

① 分子印迹和识别过程的机理将从目前的定性和半定量描述向完全定量描述发展，从分子水平上真正弄清楚印迹和识别过程；

② 合成更多更有用的功能单体和交联剂，以满足分子印迹和识别的需要；

③ 分子印迹和识别过程将从有机相转向水相，以便完全能够达到与天然分子识别系统相媲美的完美境地；

④ 手性分离和固相萃取氨基酸、手性药物将步入商业化阶段；

⑤ 印迹技术将从氨基酸、药物等小分子、超分子过渡到核苷酸、多肽、蛋白质等生物大分子，甚至生物活体细胞；

⑥ 利用计算机辅助设计聚合物结合模式，开发更有效的合成方法；

⑦ MIPs 仿生传感器既具有抗各种恶劣环境的能力，又具有与生物酶类似的高选择性，利用这两个性质可以将 MIPs 传感器做成分子探针，可以直接插入生物组织或细胞内进行探测和分析。

总之，随着生物技术、电子技术、合成手段和现代分析检测手段的迅猛发展，MIPs 的合成、表征方法和理论系统将日臻完善，其应用范围将更加广泛。

蛋白质印迹应用最多的是利用非共价键作用。在非共价键作用时，乙腈-氯仿等有机溶剂有利于氢键和离子键的形成和加强，但蛋白质在有机溶剂中会有变性的可能，而在水中则由于水的极性较强，会导致这种非共价键作用变弱。这一矛盾也成为阻碍分子印迹在蛋白质大分子上应用的难题之一。寻找一种有效洗脱蛋白质的手段也是一个有待解决的课题。虽然现阶段的研究工作中都可以成功洗脱蛋白质分

子，但是洗脱后的活性蛋白质无法回收利用，这就无形中增加了成本，对以后蛋白质 MIP 的大规模应用造成了一定的阻碍。尽管存在以上问题，但是随着分子印迹技术的不断发展，蛋白质的印迹技术上存在的问题会得到最大程度的解决，蛋白质 MIP 的应用也会越来越广泛。

方案 9.1 溶菌酶分子印迹的制备和应用^①

简介

分子印迹聚合物的制备一般要经过以下三个步骤：①使模板分子和单体分子间产生互补的相互作用，形成复合物；②加入交联剂，在模板-单体复合物周围进行本体聚合反应；③除去聚合物中的模板分子。

制备过程中的所有试剂和条件都会影响到分子印迹聚合物的性质。但是模板分子一旦确定了，可以选用的功能单体基本上也就确定了；其次根据模板分子的极性和非极性，可以排除部分溶剂和致孔剂，甚至可以排除一些功能单体。因此，合成印迹分子的关键就在于其中功能单体和交联剂的比例、单体和溶剂的比例等。

溶菌酶聚合物颗粒是通过 UV 诱发自由基的方式进行的，用来从鸡蛋清中分离纯化溶菌酶。

1. 考虑到聚羟乙基丙烯酸酯 (2-hydroxyethylmethacrylate) 的亲水性、对蛋白质的非特异性作用较小、化学和机械的高度稳定性以及对微生物和酶的钝性，因此选择其作为基质。

2. N-甲基丙烯酸-1-组氨酸甲酯 (MAH) 作为金属离子配合的功能单体，因为它的嘧啶上的氮原子可以作为氢供体，和 Cu^{2+} 发生作用。

3. 生物大分子和金属离子之间的作用特异性很强，在温和的环境下通常是可逆反应的。因此，金属螯合可能是一个有用的结合模型，用来制备特异性的模板分子。金属螯合作为特异反应可逆进行的基础，需要各种不同的单体在印迹过程中提高选择性。这样就使用了一种联合选择策略来提高选择性。

4. 对溶菌酶吸附和选择性的研究，与对其他蛋白质的研究，例如人血清白蛋白和细胞色素 c 进行对比。最后讨论了该聚合物的重复使用性。

材料

溶菌酶、细胞色素 c、1-组氨酸甲酯、甲基丙烯腈、吗啉丙磺酸 (MOPS)、羟乙基哌嗪乙磺酸、氢醌、二氯甲烷、三乙胺、氮气、人血清白蛋白、乙腈、甲基丙烯酸乙酯 (HEMA)、乙二醇二甲基丙烯酸酯 (EGDMA, 4℃ 保存使用)、 α -偶氮异丁腈 (AIBN)、氢氧化钠、乙醇、醋酸酐、丙酮、甲醇、氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、五水硝酸铜、磷酸、盐酸、吸附试验用水使用反相色谱纯化

① 引自文献 [14]。

溶壁球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*)

烧杯、量筒、磁力搅拌器、分析天平、氮气瓶、分液漏斗、滤纸、旋转蒸发器、超声波破碎仪、水浴锅、紫外灯管、20目筛、研钵、真空干燥仪、pH计、紫外分光光度计、低温高速离心机、origin绘图软件

方法

1. N-甲基丙烯酸-1-组氨酸甲酯 (MAH) 的合成

(1) 将 5.0g 的 L-组氨酸甲酯和 0.2g 的氢醌溶于 100mL 的二氯甲烷中，溶液冷却至 0℃。

(2) 加入 12.74g 的三乙胺，在氮气的保护下，向溶液中缓慢通入 5.0mL 的甲基丙烯腈。

(3) 接着使用磁力搅拌器在室温下搅拌 2h。

(4) 在该化学反应的最后阶段，使用 10% 的氢氧化钠将未反应的甲基丙烯腈萃取出来。萃取后旋转蒸发，使用乙醇和醋酸酐结晶，即为 MAH。

2. MAH-Cu²⁺-溶菌酶复合物制备

(1) 将 0.223g 的 MAH 缓慢加入到 15mL 的乙醇中，室温下加入 0.232g Cu(NO₃)₂ · 5H₂O。磁力搅拌溶液 3h，直至变成澄清的蓝色。

(2) 旋转蒸发，除去乙醇，产生蓝色固体。MAH-Cu²⁺ 复合物使用乙醇/丙酮脱水重结晶，产生 0.201g (62.3%) 的蓝色晶体。

(3) 22mg 的溶菌酶 (模板分子) 和 4mg 的 MAH-Cu²⁺ 复合物加入到离心管内，使用 pH 7.4 的 MOPS 作为溶剂，旋转 1h，可以形成三者的复合物。铜离子的偶合数是 4，因此，MAH : Cu²⁺ 的摩尔比 = 4 : 1。

3. 印迹颗粒的制备

UV 引发聚合反应。典型的过程描述如下：

(1) 单体 (包括 2.0mL HEMA、4.0mL EGDMA、500mg MAH/Cu²⁺、2mL 乙腈) 加入到试管中，继续加入 40mg 的 AIBN；

(2) 通入氮气 5min，密封试管，振荡 2min，置于 5℃ 水浴中，使用 365nm 波长的紫外灯照射 4h；

(3) 非模板印迹分子颗粒使用同样的合成步骤，只是不加入溶菌酶；

(4) 得到的聚合物是一个脆弱的固体，利用研钵粉碎，真空干燥，将干燥的粉末通过 20 目，63μm 的筛子；

(5) 首先使用甲醇进行洗涤，接着使用 1mol/L NaCl (pH 8.0) 进行洗涤，最后使用双蒸水进行洗涤；

(6) 将溶菌酶-分子印迹聚合物置于萃取溶液 (pH 8.0, 0.02mol/L PBS-1.0mol/L NaCl) 的离心管中，在室温下连续振荡 2h，接着使用 50mmol/L NaCl 洗涤；

(7) 从聚合物中萃取出来的溶菌酶的含量使用 Bradford 法测定 (参考汪家政. 蛋白质技术手册. 科学出版社, 2002)。

4. 颗粒的性能考察

(1) 使用氮气吸附实验来考察颗粒的极性。干燥颗粒的比表面积的测定使用多点 Brunauer-Emmet-Teller 设备, 具体操作参考设备说明书。

(2) NIP 和溶菌酶-分子印迹聚合物颗粒的含水比例是通过不同的溶液来决定的(例如 MOPS 缓冲溶液、磷酸缓冲溶液和蒸馏水)。

实验进行如下: 将干颗粒仔细称量, 置于含有蒸馏水的烧瓶中。将烧瓶置于 25℃ 的水浴中, 恒温 30min。将颗粒从水中取出, 使用滤纸包裹, 称量。记录干颗粒和湿颗粒的重量。非印迹分子和印迹分子颗粒的含水量使用下式进行计算:

$$\text{水含量}(\%) = [(W_s - W_o) / W_o] \times 100\%$$

式中, W_o , W_s 分别代表了颗粒吸水前后的质量。

(3) 颗粒的表面形态使用扫描电子显微镜进行观察。将样品放置在空气中 25℃ 条件下干燥 2 天。将部分颗粒放置在镀金的样品盘上离子化 2min。接着使用电子扫描显微镜进行观察。可以对样品中感兴趣的表面进行放大观察。

为了考察 MAH 的结合程度, 颗粒还需要进行元素分析, 使用氮元素分析仪进行分析。

5. 溶菌酶的吸附实验

非印迹分子和印迹分子对溶菌酶的吸附实验是分批进行测定的。

(1) 将 10mg 的干颗粒投入 0.1mL 的 PBS 中吸附 45min。

(2) 将已知浓度的溶菌酶溶液加入到离心管中, 振荡 4h, 离心。

(3) 测定上清液中的溶菌酶浓度。吸附上的溶菌酶的含量利用物质守恒定律进行计算, 即吸附前后溶液中溶菌酶浓度的变化。

(4) 分别考察溶菌酶初始浓度、pH、缓冲溶液和离子强度对于吸附容量的影响。为了考察缓冲液的影响, 使用 0.02mol/L HEPES 和 PBS 在各自缓冲范围内的溶液; 为了观察起始溶菌酶起始浓度的影响, 考察的浓度范围为 0.011 ~ 0.11mg/mL; 溶液中蛋白质的浓度使用 Bradford 法测定。

6. 选择系数的考察

为了考察印迹聚合物对溶菌酶选择的特异性, 对 HSA 和 cyt c 的竞争吸附实验进行了考察。印迹聚合物颗粒 (10mg) 和上述竞争蛋白混合, 用 HPLC 系统进行考察, 分别记录其保留时间, 分别计算其分离因子。

具体操作和部分参见本书的色谱部分。

7. 从鸡蛋清中吸附纯化溶菌酶

(1) 从新鲜鸡蛋中取出蛋清, 使用 10mmol/L、pH 7.0 的 PBS 等体积稀释, 将其置于冰浴上打碎, 4℃、10000r/min 条件下离心。上清液作为溶菌酶来源。

(2) 将 100mg 的溶菌酶-分子印迹聚合物和 10mL 稀释的蛋白溶液置于锥形瓶中, 150r/min 磁力搅拌共培养 2h。

(3) 将颗粒洗干净, 离心, 去除未结合的蛋白。结合在印迹物上的溶菌酶分子的含量通过吸附介质前后的溶菌酶浓度之差来计算。

(4) 将溶菌酶-分子印迹颗粒置于解析溶液中, 25°C 、 $100\text{r}/\text{min}$ 搅拌 1h。使用 $1\text{mol}/\text{L}$ NaCl 从非印迹聚合物上解析溶菌酶。

解析下来的溶菌酶的活性测定方法: 将溶壁球菌在 30°C 条件下培养 48h 后, 使用 $\text{pH } 7.0$ 、 $0.0\text{mol}/\text{L}$ 磷酸盐缓冲溶液溶解菌液, 加入溶菌酶 5min 后, 迅速于 620nm 处测量其吸光度值。1 个溶菌酶活力单位定义为 $\text{pH } 7.0$ 、 25°C 条件下, 能够引起每分钟 0.001 吸光度变化的溶菌酶的量。

8. 解析和重复利用

使用 PBS ($\text{pH } 8.0$, $0.02\text{mol}/\text{L}$, 含有 $1.0\text{mol}/\text{L}$ NaCl) 来考察溶菌酶的解析实验。

将吸收了蛋白质的非印迹分子和印迹分子聚合物置于装有解析缓冲溶液的离心管中, 室温下连续振荡 2h。溶菌酶的最终浓度利用 Bradford 在 595nm 处进行测定。通过计算颗粒吸附的溶菌酶和溶液中最终的溶菌酶浓度来计算溶菌酶的解析量。

为了检验溶菌酶-印迹聚合物的重复利用性, 溶菌酶吸附-解析步骤重复 25 次。每次吸附后, 为了对印迹聚合物进行再生, 使用 $50\text{mmol}/\text{L}$ NaCl 洗涤颗粒。

为了考察溶菌酶构象的变化对吸附情况的影响, 我们采用了天然、解析和经过处理变性的溶菌酶, 使用荧光检测器进行考察。天然溶菌酶浓度 $1\text{mg}/\text{mL}$, $\text{pH } 7.4$, 将其置于 70°C 条件下加热 4h。溶菌酶的荧光检测从 $315\sim 390\text{nm}$ 扫描, 激发波长为 295nm 。

问题分析及解决方案

1. 乙二醇二甲基丙烯酸酯, 在使用前需要除去其中所含的阻聚剂, 可以使用活性炭吸附或者减压蒸馏等方法; AIBN 在使用前经甲醇重结晶, 并且真空干燥, 24h 后备用。

2. 实验中第一步和第二步, 即 *N*-甲基丙烯酸-1-组氨酸甲酯 (MAH) 的合成和 MAH- Cu^{2+} -溶菌酶复合物制备是最关键的步骤。在第一步中, 要严格控制温度和反应时间, 同时做好防护, 防止冻伤。为了合成 MAH- Cu^{2+} -溶菌酶复合物, 要保证形成的 MAH 的纯度, 因此, 最好通过核磁共振等手段来检验。

方案 9.2 血红蛋白分子印迹的制备和应用^①

简介

应用分子印迹技术, 对复杂体系中的目标物大分子进行分离富集的研究正在成为关注的热点, 主要集中在分离 (如色谱固定相) 和检测 (如压电传感器) 两个方

● 引自文献 [15]

面。然而传统的分子印迹聚合物多是在有机相中合成，故大多数方法不适用于合成以生物大分子为模板分子的聚合物。

壳聚糖载体和蛋白质体系有着天然的相容性，并且壳聚糖本身有较大的吸附容量，因此，可将壳聚糖或改性后的壳聚糖作为印迹聚合物的载体，应用于印迹蛋白质分子的研究。另外，若能将壳聚糖与分子印迹技术相结合，将无序的作用力转变为利用特定功能基团进行有序识别的结合位点，则可以提高其吸附的选择性。

3-氨基苯硼酸曾作为亲和色谱填料的接枝化合物被应用。近年来发现，可作为一种新型的水溶性功能单体，用于合成以蛋白质为模板分子的印迹聚合物。

本文采用该新型的功能单体 3-氨基苯硼酸，以一定形态的壳聚糖作为载体，合成了牛血清白蛋白的分子印迹聚合物。结果表明，该印迹聚合物对于牛血清白蛋白具有良好的选择识别能力。

以壳聚糖为载体，3-氨基苯硼酸为功能单体，对牛血清白蛋白进行了分子印迹的研究，并对吸附过程进行 Langmuir 等温吸附模型的数据处理。结果表明，印迹聚合物上形成了对于模板分子有较高的吸附容量和选择性的识别位点。Langmuir 等温吸附平衡常数为 49.5 mL/mg，结合位点的最大表观结合量为 16.3 mg/g，证明该印迹聚合物对于牛血红蛋白和溶菌酶这些非模板蛋白的吸附不具有选择性。

材料

壳聚糖（脱乙酰度 80%，分子量 300000）、戊二醛、一水合 3-氨基苯硼酸、牛血清白蛋白、溶菌酶、牛血红蛋白、重蒸水、乙酸、氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠

紫外-可见分光光度计、傅里叶变换红外光谱仪、pH 计、电磁搅拌器、移液管、量筒、振荡仪

方法

1. 以壳聚糖为载体的 BSA 分子印迹及非印迹聚合物的制备

(1) 将分子量为 300000 的壳聚糖用体积分数为 5% 的乙酸水溶液溶解，制成质量分数为 0.5% 的溶液，迅速加入过量的饱和 NaOH 水溶液，使壳聚糖从溶液中析出，形成小颗粒的悬浮浑浊液。

(2) 24h 陈化后，用重蒸水充分洗去过量的 NaOH，备用。

(3) 移取上述悬浮浑浊液 20mL，滴加等体积的体积分数为 5% 的戊二醛水溶液，充分反应后，再用二次水将过量的戊二醛洗去，备用。

(4) 3-氨基苯硼酸 (APBA) 水溶液与牛血清白蛋白 (BSA) 混合振荡 2h。二者的摩尔比及反应条件如下：移取 50mmol/L 的 BSA 溶液 1mL 于 10mL 比色管中，加入 100mmol/L 的 3-氨基苯硼酸水溶液 10mL，以及 0.1mol/L、pH 6.25 的 PBS 10mL，补入 1mol/L 的 NaCl 水溶液 0.5mL，以二次石英蒸馏水定容至 25mL，然后摇匀，静置 1h。

(5) 将壳聚糖溶液滴加到上述体系中，开动电磁搅拌使反应体系均匀，再静置

24h, 即得到以壳聚糖为载体的 BSA 分子印迹聚合物。

非印迹聚合的制备步骤同上, 只是不加入模板分子 BSA。

2. 对 BSA 的分子印迹及非印迹聚合物的洗脱

将聚合物先用二次水充分洗净后, 再用洗脱液(一定浓度山梨醇的磷酸盐缓冲液)充分洗脱后备用。

3. BSA 的分子印迹及非印迹聚合物吸附模板分子的动力学

(1) 制备 0.05~2.0mg/mL 范围的 BSA 水溶液, 将其在印迹或非印迹聚合物上进行吸附实验。

(2) 通过紫外-可见分光光度法测定聚合物对模板蛋白的吸附等温线。当吸附达到平衡之后, 先离心将上清液与聚合物分离, 然后用二次水充分洗脱, 去除聚合物上非特异吸附的 BSA, 再将上清液与聚合物离心分离。然后用同样方法, 加入洗脱液洗脱上述聚合物, 直到 280nm 处紫外吸收光谱的吸光度低于原始吸附溶液的 3%。然后, 用二次水将聚合物中残留的洗脱液充分洗去后备用。

4. BSA 的分子印迹及非印迹聚合物对蛋白的吸附及洗脱

制备相同浓度的牛血清白蛋白(BSA)、牛血红蛋白(BHb)和溶菌酶(Lys)的水溶液, 分别以印迹(BSA-MIP)或非印迹聚合物(Non-MIP)进行吸附实验。吸附以及非特异性和特异性洗脱的步骤同上。

5. BSA 的分子印迹及非印迹聚合物吸附模板分子的动力学

制备 0.05~2.0mg/mL 范围的 BSA 水溶液, 将其在印迹或非印迹聚合物上进行吸附实验。通过紫外-可见分光光度法测定聚合物对模板蛋白的吸附等温线。当吸附达到平衡之后, 先离心将上清液与聚合物分离, 然后用二次水充分洗脱, 去除聚合物上非特异吸附的 BSA, 再将上清液与聚合物离心分离。

用同样方法, 加入洗脱液洗脱上述聚合物, 直到 280nm 处紫外吸收光谱的吸光度低于原始吸附溶液的 3%。然后, 用二次水将聚合物中残留的洗脱液充分洗去后备用。

6. BSA 的分子印迹及非印迹聚合物对蛋白的吸附及洗脱

制备相同浓度的牛血清白蛋白(BSA)、牛血红蛋白(BHb)和溶菌酶(Lys)的水溶液, 分别以印迹(BSA-MIP)或非印迹聚合物(Non-MIP)进行吸附实验。吸附以及非特异性和特异性洗脱的步骤同上。

问题分析及解决方案

1. 壳聚糖不溶于水, 易溶于强酸, 但是强酸的条件不能形成可逆性的分子印迹聚合物, 因此使用氢氧化钠中和一定要彻底; 同样, 使用二次水洗涤强碱也一定要彻底。

2. 分子聚合物的制备原理如图 9.4 所示。用戊二醛将表面的一NH₂转化为一CH=O, 与此同时, 功能单体 APBA 与 BSA 预聚合, 形成二者的复合物, 然后将预聚合的产物加入到改性后的壳聚糖载体悬浮液中, 使 APBA 上的一NH₂通过

与载体上—CH=O 的席夫碱反应，接枝到载体表面。特异性洗脱时，通过调节体系的 pH 值，可以用山梨酸来破坏氢键，即能将载体上吸附的 BSA 洗脱下来。

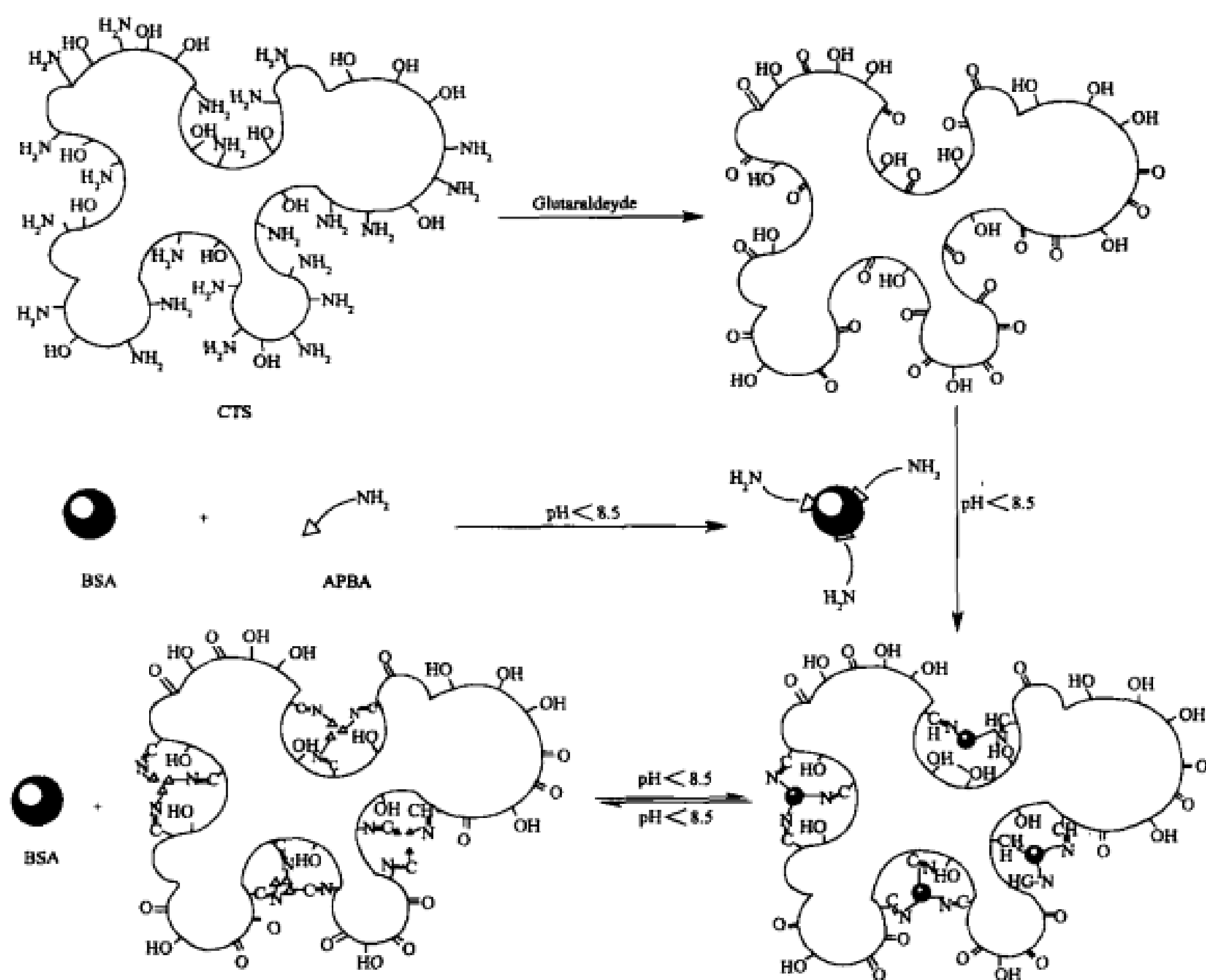


图 9.4 BSA 分子印迹聚合物合成原理

参 考 文 献

- [1] Lopezramon M, Bandosz T, Seaton N, et al. Determination of the pore size distribution and the specific surface area of mesoporous solids by means of nitrogen sorption-Method of Barrett, Joyner and Halenda (BJH). *Langmiur*, 1997, 13.
- [2] Wulff G, Sarhan A, Zabrocki K, et al. Enzyme-analogue built polymers and their use for the resolution of racemates. *Tetrahedron Lett*, 1973, 44; 4329-4332.
- [3] Norrllow O, Glad M, Mosbach K, et al. Acyclic polymer preparations containing recognition sites obtained by imprinting with substrates. *J Chromatography*, 1984, 299; 29-41.
- [4] Haupt K, Mosbach K. Assay system for the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using a molecularly imprinted polymer as an artificial. *Chem Rev*, 2000, 100; 101-112.
- [5] Lee S, Mitchell D, Trofin L, et al. Antibody-based bio-nanotube membranes for enantiomeric drug separations. *Science*, 2002, 296; 2198-2200.
- [6] Mosbach K, Ramström O. The Emerging Technique of Molecular Imprinting and Its Future Impact on Biotechnology. *Nature Biotechnology*, 1996, 14; 163-170.
- [7] Odaba M, Denizli A. Cibacron Blue F-GA incorporated magnetic poly (2-hydroxyethyl methacrylate) beads for lysozyme adsorption. *Appl Polym Sci*, 2004, 93; 719-725.
- [8] Rachkov A, Minoura N. Protein Structure and Molecular Enzymology. *Biophysica Acta*, 2001, 1544;

- 255-266.
- [9] Shi H, Tsai W, et al. Template-imprinted nanostructured surfaces for protein recognition. *Nature*, 1999, 395: 593-597.
- [10] Wulff G. Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates-A Way towards Artificial Antibodies. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1995, 34: 1812-1832.
- [11] Pang X, Cheng G. Chemisorption of Hydrogen Molecules on Carbon Nanotubes under High Pressure. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 384: 225-234.
- [12] Ye L, Mosbach K. Molecularly imprinted monodisperse microspheres for competitive radioassay. *Anal Commun*, 1999, 36: 35-38.
- [13] 小宫山真, 竹内俊文, 务川高志等. 分子印迹学——从基础到应用, 2006.
- [14] Mehmet Odaba, Ridvan Say, et al. Molecular imprinted particles for lysozyme purification. *Materials Science and Engineering*, 2007, 27: 90-99.
- [15] 王华芳, 何运华, 何锡文等. 3-氨基苯硼酸为功能单体在壳聚糖上印迹牛血清白蛋白的研究. *高等学校化学学报*, 2008, 29 (4): 726-730.



第 10 章 高效液相色谱法

分离纯化蛋白质

高效液相色谱法 (HPLC) 是 20 世纪 60 年代末期, 在经典液相色谱法和气相色谱法的基础上发展起来的新型分离分析技术。50 年代后期随着气相色谱仪的商业化, 气相色谱法在色谱理论研究和实验技术上迅速崛起。而液相色谱技术, 因其操作繁琐, 分析时间冗长, 仍停留在经典操作方式。60 年代以后, 随着气相色谱法对高沸点有机物分析局限性的逐渐显现及键合技术出现, 同时成功地制造了高压输液泵和高灵敏度检测器, 完善了液相色谱仪, 液相色谱法重新获得新生。

10.1 高效液相色谱的基本原理和分类

10.1.1 与经典液相 (柱) 色谱法比较

高效液相色谱法和经典液相 (柱) 色谱法没有本质的差别, 仅由于它采用了新型高压输液泵、高灵敏度检测器和高效微粒固定相, 在分离分析速度、分离效能、检测灵敏度和操作自动化方面都远远超出了经典液相 (柱) 色谱法, 同时保持了经典液相色谱对样品适用范围广、可供选择的流动相种类多和便于用作制备色谱等优点 (见表 10.1)。

表 10.1 高效液相色谱法与经典液相 (柱) 色谱法的比较

项 目	高效液相色谱法	经典液相(柱)色谱法
固定相粒度(粒径)/ μm	5~50	75~600
色谱柱压力/MPa	2~20	0.001~0.1
柱效/(理论塔板数/m)	$2 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$	2~50
分析时间/h	0.05~1.0	1~20

10.1.2 高效液相色谱法的特点

(1) 分离效能高 采用微粒径固定相填料, 液相色谱填充柱可达 100000/m 理论塔板数, 远远高于经典色谱。

(2) 选择性高 由于可通过流动相的设计控制和改善分离过程, 高效液相色谱

法拥有无限选择性。

(3) 检测灵敏度高 高效液相色谱的高柱效,使组分的局部浓度明显增大,大大提高了检测器的灵敏度。

(4) 分析速度快 高压输液泵和耐高压固定相的使用,流动相流速可以加快,完成一个样品的分离分析时间仅需几分钟到几十分钟。

10.1.3 高效液相色谱仪

一套色谱仪基本的配置是输液泵、进样器、色谱柱、检测器以及数据获取和处理系统(工作站)。

10.1.3.1 输液泵

泵是驱动流动相和样品通过色谱柱和检测系统的动力源。泵应满足流量稳定($\pm 1\%$)、耐高压(30~60MPa)的要求,适用于各种流动相,如有机溶剂、水和缓冲液。高效液相色谱仪普遍采用往复泵。

对于复杂混合物,为了能在较短的时间内对所有各组分均实现满意的分离,可采用梯度淋洗操作。即在分离过程中按一定程序连续改变流动相的强度、极性、pH值或离子强度等,以提高分离效果,缩短分析时间。

10.1.3.2 色谱柱

色谱柱是色谱的核心所在——分离过程在这里进行。色谱柱填料即为色谱系统的固定相,它与柱技术的发展一直是色谱工作者共同关心的问题,液相色谱的每一个重大发展都和色谱柱的每一次突破密切相关。依据分离分析要求,可有不同柱型、不同性质的填料。

10.1.3.3 进样器

进样器是将样品溶液准确送入色谱柱的装置,分手动和自动两种方式。进样器要求密封性好,死体积小,重复性好,进样时引起色谱系统的压力和流量波动要很小。现在的液相色谱仪所采用的手动进样器几乎都是耐高压、重复性好和操作方便的六通阀进样器。

10.1.3.4 检测器

HPLC检测器是用于连续监测被色谱系统分离后的柱流出物组成和含量变化的装置。其作用是将柱流出物中样品组成和含量的变化转化为可供检测的信号,完成定性定量的任务。

常用检测器有示差折光、紫外吸收或分光光度检测器,荧光检测器,电化学检测器,电导率检测器,光散射检测器等。近年来质谱作为检测器也被广泛应用。发展更灵敏和更通用的检测器是今后应探索的一个重要课题。

10.1.3.5 馏分收集器

如果所进行的色谱分离不是为了纯粹的色谱分析,而是为了做其他波谱鉴定,或获取少量试验样品的小型制备,馏分收集是必要的。用小试管收集,手工操作只适合于少数几个馏分,手续麻烦,易出差错。馏分收集器比较理想,因为便于用微

处理机控制，按预先规定好的程序，或按时间、或按色谱峰的起落信号逐一收集或重复多次收集。

10.1.3.6 数据获取和处理系统

把检测器的信号显示出来的数据系统可以有多种形式。最简单的是电位差式长图记录器，记录信号随时间的变化，得到色谱流出曲线或色谱图。而对定性定量较有利的是采用积分仪，记录保留时间或峰号，以及峰面积。先进的高效液相色谱仪多用微机控制，这通常是一台专用的微型计算机，其功能有二：一是作为数据处理机，例如输入定量校正因子，按预先选定的定量方法（归一化、内标法和外标法等），将面积积分数据换算成实际的成分分析结果，或者给出某些色谱参数；二是作为控制机，控制整个仪器的运转，例如按预先编好的程序控制冲洗的选择、梯度淋洗、流速、柱温、检测波长、进样和数据处理。所有指令和数据通过键盘输入，结果在阴极射线管或绘图打印机上显示出来。更新一代的色谱仪，应当具有某些人工智能的特点，即能根据已有的规律自动选择操作条件，根据规律和已知的数据、信息，进行判断，给出定性定量结果。

10.1.4 高效液相色谱常用参数

10.1.4.1 基本参数

从色谱图上可以直接获取的参数见图 10.1。

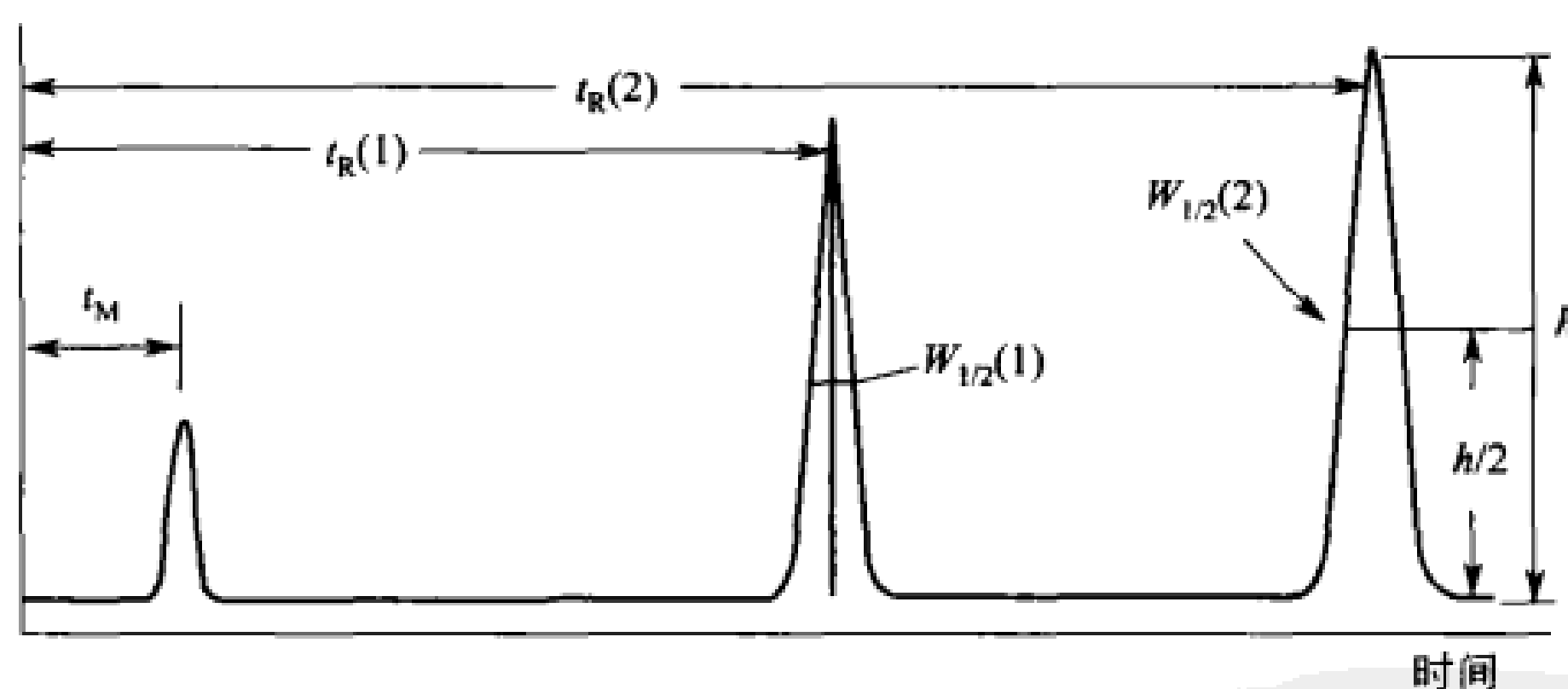


图 10.1 色谱的基本参数

死时间 (t_M) 不保留组分的保留时间，在反相 HPLC 中可用尿嘧啶来测定死时间。

死体积 (V_M) 进样器到检测器流动池之间除被固定相所占据的空间以外的空间，由 4 部分组成：进样器至色谱柱之间的管路体积；柱内固定相间隙；柱出口管路体积；检测器流动池体积。

保留时间 (t_R) 某组分从进样开始到在检测器流通池内出现浓度极大值的时间。

保留体积 (V_R) 某组分从进样开始到检测器流通池内出现浓度极大值时流出流动相的体积。

峰高 (h) 以峰的最高点作垂线与基线的交点间的距离。

半峰宽 ($W_{h/2}$) 峰高一半处平行于基线的线段与峰两边交点之间的宽度。

10.1.4.2 容量因子 (K')

容量因子是色谱法中广泛采用的保留值参数，它是样品组分的质量在两相中分配的比值，定义为

$$K' = (t_R - t_M) / t_M$$

10.1.4.3 分离因子 (α)

α 代表了两个物质在相同的色谱条件下的分离选择性。物质的化学性质或结构上的差异，反映在与固定相和流动相之间作用力上也有所差异。这就是色谱分离的基础。

$$\alpha = K'_2 / K'_1$$

10.1.4.4 柱效 (理论塔板数, N)

理论塔板数 N 是反映物质在固定相和流动相中动力学特性的重要色谱参数，它是代表色谱柱分离效能的指标。理论塔板数的定义为

$$N = 5.54(t_R / W_{h/2})^2$$

10.1.4.5 分离度 (R_s)

$$R_s = 1/4[K' / (1 + K')]N^{1/2}(\alpha - 1)$$

提高分离度可以通过改变 K' 、 N 、 α 三个参数来实现。增加 K' 可以提高分离度，但当 $K' > 5$ ，它对 R 的影响就越来越小， K' 增加就延长分离时间，色谱峰形变平坦，影响检出灵敏度。因此， K' 改变的有效范围以 $1 < K' < 5$ 为宜。 K' 的改变可以通过调节流动相的极性实现。对正相色谱来讲，流动相极性增加， K' 减小；反相色谱则相反，流动相极性增大， K' 增大。

增加 N 来提高分离度，就是使色谱峰变窄，从而将两个相邻的峰分开。 α 越小，达到给定的 R 所需要的 N 越大，随着 α 的减小，这种趋向越来越厉害。

综上所述，两峰分离的必要条件是：

- ① 两组分在流动相及固定相间有不同的分配比，即 $K'_2 / K'_1 \neq 1$ ；
- ② 样品组分必须有一定的保留，即 $K'(i) \neq 0$ ；
- ③ 色谱柱对所分离的组分必须具有最低的必要的柱效率，即应有一定的理论塔板数。

10.1.4.6 色谱柱转换系数 (S)

$$S = R_2^2 / R_1^2$$

随着柱子半径的增大，要得到同样的结果，就要相应地增大流速，增大的倍数是半径倍数的平方，即

$$F_2 = (R_2/R_1)^2 F_1$$

10.1.4.7 不对称因子 (A_s)

不对称因子用以衡量色谱峰的对称性。

$$A_s = B/A$$

式中, B 和 A 即为 10% 峰高处平行于基线的线段与峰两边的交点到与峰垂线交点的距离。

10.1.5 高效液相色谱仪标准操作规程

10.1.5.1 目的

规范高效液相色谱仪的使用。

10.1.5.2 范围

适用于高效液相色谱仪的使用。

10.1.5.3 职责

质检员对本规程的实施负责。

10.1.5.4 系统组成

本系统由 2 个溶剂输送泵、Rheodyne 7725i 手动进样阀、紫外-可见检测器、色谱数据工作站和电脑等组成, 另外还包括打印机、不间断电源等辅助设备。

10.1.5.5 准备

- ① 准备所需的流动相, 用合适的 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤, 超声脱气 20min。
- ② 根据待检样品的需要更换合适的洗脱柱 (注意方向) 和定量环。
- ③ 配制样品和标准溶液 (也可在平衡系统时配制), 用合适的 $0.45\mu\text{m}$ 滤膜过滤 (注意腐蚀性与有机溶剂)。
- ④ 检查仪器各部件的电源线、数据线和输液管道是否连接正常。
- ⑤ 接通电源, 依次开启不间断电源、B 泵、A 泵、检测器, 待泵和检测器自检结束后, 打开打印机、电脑显示器、主机, 最后打开色谱工作站。

10.1.5.6 参数设定

- ① 波长设定。依据待分离的分子的光学特征和需要去除的杂质分子的光学特征设定合适的波长, 必须保证它们彼此都能有信号显示。
- ② 流速设定。依据所使用的色谱柱的柱床直径和填料粒度选择合适的流速, 流速快能获得更短的分时间, 但会带来更高的柱压。
- ③ 流动相比例设定。
- ④ 梯度设定。

10.1.5.7 更换流动相并排气泡

- ① 分别将连接液路的溶剂滤头放入相应的流动相的储液瓶中。
- ② 逆时针转动 A/B 泵约半圈到一圈, 打开旁通阀。
- ③ 按 A/B 泵的 [purge] 键, 大约 3min 左右, 以排出管道内的气体。
- ④ 将旁通阀顺时针旋转到底, 关闭旁通阀。

⑤ 如管路中仍有气泡，则重复以上操作直至气泡排尽。

⑥ 如按以上方法不能排尽气泡，从柱入口处拆下连接管，放入废液瓶中，设流速为 5mL/min，按 [RUN] 键，冲洗 3min 后再按 [STOP] 键停泵，重新安装好色谱柱并将流速重设为规定值。

10.1.5.8 平衡系统

(1) 查看基线

- ① 打开“在线色谱工作站”软件；
- ② 输入实验信息并设定各项方法参数；
- ③ 按下“查看基线”项。

(2) 等度洗脱方式

① 按 A 泵的 [RUN] 键或由工作站启动泵，用检验方法规定的流动相冲洗系统，一般最少需 6 倍柱体积的流动相。

② 检查各管路连接处是否漏液，如漏液应予以排除。

③ 观察泵控制屏幕上的压力值，压力波动应不超过 1MPa。如超过则可初步判断为柱前管路仍有气泡，检查管路后再操作。

④ 观察基线变化。如果冲洗至基线漂移 $< 0.05\text{mV}/\text{min}$ ，噪声为 $< 0.01\text{mV}$ ，可认为系统已达到平衡状态，可以进样。

(3) 梯度洗脱方式

① 于工作站内编辑好流动相运行程序，启动梯度程序并以初始流动相比比例平衡系统。

② 系统平衡后，在进样前先运行 1 次空白梯度。

10.1.5.9 进样

① 进样前按检测器 [zero] 键调零，按软件中 [零点校正] 按钮校正基线零点。

② 设定工作站内的文件保存路径和文件名称，点击开始键等待进样。

③ 用试样溶液清洗注射器，并排除气泡后抽取适量即可以进样了。

④ 含量测定时，使用定量环定量，对照溶液和样品供试溶液每份至少一次注样 5 倍定量环体积，以保证系统重现性。

⑤ 不可多次累计进样体积。

⑥ 少于定量环进样时，进样针取样必须准确，且不得多于定量环体积的一半。

10.1.5.10 谱图的判断及结果计算

进样结束，首先判断是否满足系统适应性检测要求，然后进行结果处理。

(1) 内标法

用含对照品和内标物质的对照溶液所得色谱峰响应值，按下式算出校正因子 (RF)：

$$RF = \frac{M_s A_r}{M_r A_s}$$

式中， A_s 和 A_r 分别为内标物质和对照品的峰面积或峰高； m_s 和 m_r 分别为加入内标物质和对照品的质量。

(2) 外标法

① 用含对照品的对照溶液所得色谱峰响应值，按下式计算比值 (r):

$$r = m_r / A_r$$

式中， m_r 和 A_r 分别为对照品的量和相应的峰面积或峰高。

② 根据供试品溶液的响应值，计算供试品中被测成分的含量 (m_i):

$$m_i = r A_i$$

式中， A_i 为供试品溶液中被测成分的峰面积或峰高。

③ 必要时，根据稀释倍数、取样量和标示量折算成标示量的百分含量，或根据稀释倍数、取样量折算成百分含量。

10.1.5.11 清洗管路及进样口

① 分析完毕后，使用过滤和脱气好的适当溶剂清洗色谱系统，正相洗脱后一般用正己烷清洗，反相洗脱后应视流动相而定：如使用过含盐流动相，则先用10%的甲醇-水清洗，然后用90%的甲醇-水冲洗，流速与流动相运行时一致，各种冲洗剂一般冲洗30min，特殊情况应延长冲洗时间。

② 清洗完成后，对于反相色谱柱，最好进一次萘-甲醇溶液，记录色谱图和柱压降，以评价色谱柱的性能和状态。

③ 将进样阀置于“INJECT”，用5mL注射器取能有效溶解样品的溶剂，并使用进样阀所附专用冲洗接头清洗进样器。

④ 关断电源，作好使用登记，内容包括日期、检品、色谱柱、流动相、柱压、使用小时数、仪器完好状态等。

10.2 常用流动相的极性和选择

10.2.1 何谓流动相

在液相色谱中，流动相又称为冲洗剂、洗脱剂或载液。它有两个作用，一是携带样品前进，二是给样品提供一个分配相，进而调节选择性，以达到混合物的满意分离。对流动相溶剂的选择应考虑分离、检测、输液系统的承受能力及色谱分离的目的等各方面因素。

10.2.2 流动相的性质要求

10.2.2.1 黏度小

一般适合于做液相色谱流动相的溶剂黏度应小于 $2\text{mPa} \cdot \text{s}$ 。黏度大了，一方面液相传质慢，柱效低；另一方面柱压降 ΔP 增加，流动相黏度增加一倍，柱压降也

相应增加一倍。过高的柱压降给设备和操作都带来麻烦。

10.2.2.2 沸点低，固体残留物少

这个要求对制备液相色谱是非常重要的。久而久之，固体残留物有可能堵塞溶剂运输系统的过滤器和损坏泵体及阀件。

10.2.2.3 与检测器相适应

紫外吸收和紫外分光光度计是高效液相色谱中使用最广泛的一类检测器，因此，流动相应当在所使用波长下没有吸收或吸收很小。如用示差折光检测器时，应当选择折射率与样品差别较大的溶剂做流动相，以提高灵敏度。

10.2.2.4 与色谱系统的适应性

在吸附色谱中吸附剂往往不是酸性的就是碱性的，应当注意所选流动相和固定相之间没有不可逆的化学吸附。

10.2.2.5 溶剂的纯度

不能认为液相色谱流动相应当使用十分纯的溶剂，关键是要能够满足检测器（如紫外吸收）的要求和使用不同瓶（或批）溶剂时能获得重复的色谱保留值数据。目前国内专门供液相色谱使用的流动相溶剂规格不多，使用一般溶剂做流动相时，至少应当选择分析纯试剂，最好选用色谱纯。

10.2.3 流动相的选择

在化学键合相色谱法中，溶剂的洗脱能力直接与它的极性相关。在正相色谱中，溶剂的强度随极性的增强而增加；在反相色谱中，溶剂的强度随极性的增强而减弱。

正相色谱的流动相通常采用烷烃加适量极性调整剂，极性调整剂的性质及其所占比例对溶质的保留值和分离选择性有显著影响。

反相色谱的流动相通常以水作基础溶剂，再加入一定量的能与水互溶的非极性调整剂，如甲醇、乙腈、四氢呋喃等。这些非极性调整剂的性质及其所占比例对溶质的保留值和分离选择性有显著影响。一般情况下，甲醇-水系统已能满足多数样品的分离要求，且流动相黏度小、价格低，是反相色谱最常用的流动相。但 Snyder 则推荐采用乙腈-水系统做初始实验，因为与甲醇相比，乙腈的溶剂强度较高且黏度较小，并可满足在紫外 185~205nm 处检测的要求，因此，综合来看，乙腈-水系统要优于甲醇-水系统。

在分离含极性差别较大的多组分样品时，为了使各组分均有合适的 k 值并分离良好，也需采用梯度洗脱技术。

10.2.4 准备流动相的一般过程

10.2.4.1 流动相的 pH 值

分离弱酸 ($3 \leq pK_a \leq 7$) 或弱碱 ($7 \leq pK_a \leq 8$) 样品时，通过调节流动相的 pH 值，以抑制样品组分的解离，影响组分在固定相上的保留，并改善峰形。

常用的弱酸有：磷酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、全氟羧酸及甲酸等；

常用的弱碱有：磷酸盐缓冲液、三乙胺溶液。

注：流动相中加入有机胺可以减弱碱性溶质与残余硅醇基的强相互作用，减轻或消除峰拖尾现象。所以在这种情况下有机胺（如三乙胺）又称为减尾剂或除尾剂。

10.2.4.2 流动相的脱气

HPLC 所用流动相必须预先脱气，否则容易在系统内逸出气泡，影响泵的工作。气泡还会影响柱的分离效率，影响检测器的灵敏度、基线稳定性，甚至使之无法检测。此外，溶解在流动相中的氧还可能与样品、流动相甚至固定相（如烷基胺）反应。溶解气体还会引起溶剂 pH 的变化，给分离或分析结果带来误差。

溶解氧会在梯度淋洗时造成基线漂移或形成鬼峰（假峰）。在荧光检测中，溶解氧在一定条件下还会引起猝灭现象，特别是对芳香烃、脂肪醛、酮等。在电化学检测中（特别是还原电化学法），氧的影响更大。

除去流动相中的溶解氧将大大提高 UV 检测器的性能，也将改善在一些荧光检测应用中的灵敏度。常用的脱气方法有：加热煮沸、抽真空、超声、吹氮等。对混合溶剂，若采用抽气或煮沸法，则需要考虑低沸点溶剂挥发造成的组成变化。

超声脱气是最为常用的脱气方法，超声处理 10min 左右即可脱除许多有机溶剂或有机溶剂/水混合液中的气体，且不影响溶剂组成。

10.2.4.3 流动相过滤

所有溶剂使用前都必须经 $0.45\mu\text{m}$ 的滤膜过滤，以除去流动相中的不溶性杂质微粒，色谱纯试剂也不例外。

用滤膜过滤时，特别要注意分清有机相（脂溶性）滤膜和水相（水溶性）滤膜。有机相滤膜一般用于过滤有机溶剂，过滤水溶液时流速低或滤不动。水相滤膜只能用于过滤水溶液，一旦用错，溶有滤膜的溶剂将严重堵塞色谱柱，并毒害色谱柱。对于混合流动相，可在混合前分别过滤。

10.2.4.4 流动相的贮存

流动相一般贮存于玻璃、聚四氟乙烯或不锈钢容器内，不能贮存在塑料容器中。因许多有机溶剂如甲醇、乙酸等可浸出塑料表面的增塑剂，导致溶剂受污染。这种被污染的溶剂如用于 HPLC 系统，可能造成柱效降低。贮存容器一定要盖严，防止溶剂挥发引起组成变化，也防止氧和二氧化碳溶入流动相。

磷酸盐、乙酸盐缓冲液很易长霉，应尽量新鲜配制使用，不要贮存。如确需贮存，可在冰箱内冷藏，并在 3 天内使用，用前应重新滤过。容器应定期清洗，特别是盛水、缓冲液和混合溶液的瓶子，以除去底部的杂质沉淀和可能生长的微生物。

因甲醇有防腐作用，所以盛甲醇的瓶子无此现象。

10.2.5 卤代有机溶剂应特别注意的问题

卤代溶剂可能含有微量的酸性杂质，能与 HPLC 系统中的不锈钢反应。卤代溶剂与水的混合物比较容易分解，不能存放太久。卤代溶剂（如 CCl_4 、 CHCl_3 等）与各种醚类（如乙醚、二异丙醚、四氢呋喃等）混合后，可能会反应生成一些对不锈钢有较大腐蚀性的产物，这种混合流动相应尽量不采用，或新鲜配制。此外，卤代溶剂（如 CH_2Cl_2 ）与一些反应性有机溶剂（如乙腈）混合静置时，还会产生结晶。总之，卤代溶剂最好新鲜配制使用。如果是和干燥的饱和烷烃混合，则不会产生类似问题。

10.2.6 HPLC 用水

HPLC 应用中要求超纯水，如检测器基线的校正和反相柱的洗脱。

10.2.7 常用流动相组分的物理特性

见表 10.2。

表 10.2 常用有机溶剂的物理特性

溶剂名称	熔点/℃	沸点/℃	折射率 n_D	最低波长/nm	黏度/mPa·s	偶极矩
乙腈	41	82	1.341	195	3.58	3.37
二氧烷	88	101	1.421	215	1.26	0.45
乙醇	46	78	1.359	205	1.19	1.68
甲醇	32	65	1.326	205	0.584	1.66
异丙醇	60	82	1.375	205	2.39	1.68
四氢呋喃	72	66	1.404	215	2.20	1.70
水	18	100	1.333	185	1.00	1.84

10.3 常用检测器

10.3.1 概述

HPLC 检测器是用于连续监测被色谱系统分离后的柱流出物组成和含量变化的装置。其作用是将柱流出物中样品组成和含量的变化转化为可供检测的信号，完成定性定量的任务。因此，检测器是一种信号接收和能量转换装置。由于在 HPLC 中冲洗剂的性质在大多数情况下与样品的物理性质相近，因此要测定在大量冲洗剂中痕量分析物质的含量是艰巨的任务，迄今还没有一种通用型高灵敏度的检测器能完成所有各类物质的定性定量任务。

10.3.1.1 对检测器的要求

对 HPLC 检测器要满足以下几个方面的要求：

- ① 灵敏度高，以便能检测出 1×10^{-6} 以下溶质的含量；

② 线性范围宽，在样品含量有几个数量级变化时，也能落在检测器的线性动态范围之内，以便准确、方便地进行定量测定；

③ 响应快，以便能快速、精确地将流出物转换成能记录下来的电信号；

④ 稳定性好，对流量、温度的变化不敏感；

⑤ 可靠性高，操作简单，维修方便；

⑥ 噪声低，漂移小，对冲洗剂组分的变化不敏感；

⑦ 价格便宜；

⑧ 不破坏溶质，以便能将样品接收下来，必要时可作其他分析；

⑨ 不引起很大的柱外谱带扩张效应，以保持高的分离效能。

10.3.1.2 检测器分类

HPLC 的检测器很多，分类方法也很多，按照用途分类，可分为通用型和选择性两类。属于通用型的有示差折光检测器和分光光度检测器。选择性检测器有荧光、化学发光、安培、电导、极谱等。它们对检测物质的响应有特异性，而对流动相则没有响应或响应很小，因此灵敏度很高，受操作条件变化和外界环境影响很小，可用作梯度淋洗。

按测量性质分类，可分为浓度型和质量型，前者与溶质在溶液中的浓度有关，是总体性质的检测器，如光吸收、示差折光、荧光等检测器。后者与待测物的质量有关，如光散射、电化学、同位素及质谱检测器。按测量原理又可分为光学检测器和电学检测器，此外还有利用热学原理检测的吸附热检测器。目前 HPLC 与傅里叶变换、红外、质谱、核磁共振、电感耦合等离子体光谱等联用技术的研究，已取得了很大的进展。

10.3.2 检测器的性能指标

10.3.2.1 噪声和漂移

噪声和漂移是检测器稳定性的主要表现，噪声是指与被测物无关的检测器输出信号的随机扰动变化，分短期噪声和长期噪声两种。

短期噪声使基线呈“绒毛状”，因信号频率的波动而引起，由有关电气部件的质量和泵的脉动等产生。长期噪声是输出信号随机的和低频的变化情况，是不规则的变化，大部分情况是由于检测器本身组件不稳定或溶剂不纯、温度和流速等的波动所引起的，只有通过改进结构和设计、更换部件、控制周围环境等来加以消除，可用检测器自身的物理量来表示。

基线随时间的增加而产生的偏离称为漂移。它反映的是信号的连续递增与递减，可用一定时间范围内（如 1h）信号的变化作为漂移大小的量度。它是由于电源电压不稳、色谱系统没有达到平衡、固定相的流失、冲洗剂的变化、温度流量等的波动所引起的，要根据不同情况采取相应措施加以消除。

10.3.2.2 灵敏度

灵敏度是检测器最主要的性能指标。它表示一定量的样品物质通过检测器时所

给出的信号大小。

10.3.2.3 线性范围

色谱法的最大优点在于对于一个复杂的混合物样品可以进行分离和定量测定。定量分析的准确与否，关键在于检测器所产生的信号是否与被测样品的浓度始终呈一定的函数关系。输出信号与样品浓度之间最好呈线性关系，这样进行定量测定时既准确又方便。实际上没有一台检测器能在任何浓度范围内呈线性响应。

线性范围一般都可通过实验确定。然而由于在下限时样品含量太低会引起大的实验误差，加之一般检测器的非线性范围都在高浓度区域，因此其下限就由输出信号等于两倍噪声时的试样浓度来确定。

10.3.2.4 谱峰的扩张

近年来由于 HPLC 微型柱和毛细管柱的出现和发展，加之色谱柱的柱效不断改进和提高，在检测器中所造成的色谱峰的扩展变得越来越明显，因此对检测器的要求越来越高。除制备色谱外，大多数 HPLC 的池体积都小于 $10\mu\text{L}$ 。在使用毛细管填充柱或细管径高效液相柱时，池体积应减小到 $1\sim 2\mu\text{L}$ 甚至更低，不然检测系统所带来的峰扩张问题就变得严重了。因此这时池体的设计、检测器与色谱柱的连接、接头等都要精心设计，不然就会严重影响柱效能和灵敏度。

10.3.3 各类检测器

10.3.3.1 紫外-可见光检测器

紫外-可见光检测器 (ultraviolet-visible detector, UV-VIS)，又称紫外可见吸收检测器、紫外吸收检测器 (UV)、紫外光度检测器或直接称紫外检测器，是液相色谱应用最广泛的检测器。在各种检测器中，其使用率占 70% 左右，对占物质总数约 80% 的有紫外吸收的物质均有响应，既可测 $190\sim 350\text{nm}$ 范围 (紫外光区) 的光吸收变化，也可向可见光范围 $350\sim 700\text{nm}$ 延伸。几乎所有的液相色谱装置都配有紫外可见光检测器。该检测器的广泛应用，源于以下主要特点及优点：

① 灵敏度高，可达 0.001AUFS ；且噪声低，可降至 10^{-5}AU 。对于具有中等强度紫外吸收的溶质，最小检测量可达 10^{-12}g 的数量级，最低检测浓度可达 10^{-10}g/mL ，因此对紫外光吸收不强的样品也可检测，线性范围宽，应用广泛。

② 对流动相基本无响应，属于溶质性能检测器。受操作条件变化和外界环境影响很小，一般对流速和温度变化不敏感，适于梯度洗脱。

③ 属于选择性检测器，对无紫外吸收的物质如饱和烃及有关衍生物无响应。

④ 需选用无紫外吸收特性的溶剂作流动相。

⑤ 属于浓度敏感型检测器。

- ⑥ 属于非破坏型检测器，能用于制备色谱，或与其他检测器串联使用。
- ⑦ 结构简单，使用维修方便。

10.3.3.2 光电二极管阵列检测器

光电二极管阵列检测器的开发是近10多年内高效液相色谱技术最重要的进步。1975年Talmi首次报道了二极管阵列系统的使用，后来Yates、Kuwana和Milano等人对该项技术做了进一步发展。二极管阵列检测器一次进样可得到更多的信息，数据处理更快，不仅可以克服普通紫外可见吸收检测器的缺点，而且还能获得色谱分离组分的三维光谱色谱图，为分析工作者提供十分丰富的定性定量信息。

(1) 主要特点

- ① 可以同时得到多个波长的色谱图，因此可以计算不同波长的相对吸收比。
- ② 可以在色谱分离期间，对每个色谱峰的指定位置实时记录吸收光谱图，并计算其最大吸收波长。
- ③ 在色谱运行期间可以逐点进行光谱扫描，得到以时间-波长-吸收值为坐标的三维图形（三维光谱光谱图），可直观、形象地显示组分的分离情况及各组分的紫外-可见吸收光谱。由于每个组分都有全波段的光谱吸收图，因此可利用色谱保留值规律及光谱特征吸收曲线综合进行定性分析。
- ④ 可以选择整个波长范围、几百纳米的宽谱带检测，仅需一次进样，就将所有组分检测出来。

(2) 应用

① 色谱峰纯度检查。色谱峰纯度的确定可采用比较光谱法和吸收比法，以后者为方便。二极管阵列检测器均可被采用。

倘若化合物是纯净的，那么在它的洗脱色谱峰范围内的任何洗脱时间处，所取的光谱一定仅在振幅响应上有差异。若用归一化法，可以得到完全一致的紫外-可见吸收光谱。倘若在色谱峰的不同部位得到的吸收光谱中吸收最大值或最小值发生了位移，则证明该色谱峰中有杂质存在。

对于纯物质来说，两个特定波长处的吸收比应为一常数，且与浓度无关，所以吸收比可用作谱峰纯度的检查指标。在组分的洗脱过程中，浓度发生变化，因而在特定波长处，色谱峰各点处的吸收光谱振幅大小不一，但吸收比应相等。

② 色谱峰的鉴定。保留时间是色谱工作者对化合物定性的主要依据。要确定某个峰是何种物质，需将该峰收集起来，用红外分光光度计或质谱仪等作进一步分析，整个工作相当烦琐。在对分析样品有一定了解的情况下，使用二极管阵列检测器很容易完成这一工作。

a. 与标准品或标准光谱比较。先取得样品峰的光谱图，再与标准品的光谱图或组分的标准光谱比较。若两个光谱图完全重合，说明是同一种物质；若不重合，说明是不同种物质。

普通紫外光谱缺乏较多的特征性。若将计算机中储存的光谱信息导数运算,则可得到相应导数光谱。导数光谱具有较多定性鉴定的信息,提供更加可靠的色谱峰鉴定依据。若将样品峰的导数光谱与标准品的导数光谱进行比较,则可进一步证明之。

b. 三维色谱能提供更多更全面的信息。DAD扫描速度快,10ms可扫描整个光谱范围,并绘制出三维色谱图。通过三维色谱图可以观察到样品中所有组分(对紫外、可见光有吸收者)对波长的响应。

10.3.3.3 荧光检测器

许多化合物有光致发光现象。化合物受到入射光的照射后,吸收辐射能,发出比吸收波长更长的特征辐射。当入射光停止照射时,特征辐射也很快地消失,这种辐射光线就是荧光。整个电磁波范围内都可能产生这种辐射。液相色谱中的荧光检测器仅使用吸收紫外光或可见光而发射的荧光。利用测量化合物荧光强度对化合物进行检测的液相色谱检测器就是荧光检测器(fluorescence detector, FLD)。

① 灵敏度极高。荧光检测器的灵敏度比紫外-可见光检测器的灵敏度约高两个数量级,最小检测量可达 10^{-13} g。荧光检测器是最灵敏的液相色谱检测器,特别适合于痕量分析。蒽是常用的衡量检测器灵敏度的基准物质。另外,荧光检测器的灵敏度还可以用水的拉曼谱带的信噪比来衡量。

② 良好的选择性。产生荧光的一个必要条件是物质的分子具有能吸收激发光能量的吸收带,即物质分子具有一定的吸收结构;另外的条件是吸收激发能量之后的分子具有高的荧光效率。相对较少的分子具有大的足够检测的量子效率是荧光检测器高选择性的主要原因。在很多情况下,荧光检测器的高选择性能够避免不发荧光的成分的干扰,成为荧光检测的独特优点。

③ 线性范围较宽。线性范围约 $10^4 \sim 10^5$,虽然比紫外吸收检测器窄,但对大多数痕量分析,该线性范围已足够宽。在分析物质浓度较大时,发射强度由于内滤效应可能随浓度增加而降低。

④ 受外界条件的影响较小。

⑤ 只要选作流动相的溶剂不会发射荧光,荧光检测器就能适用于梯度洗脱。其中,荧光检测器的极高灵敏度和良好选择性是它最大的优点,因而在某些领域如药物和生化分析中起着不可替代的作用。

⑥ 荧光检测器不属于通用型检测器,与紫外-可见光检测器相比,应用范围较窄。

10.3.3.4 示差折光检测器

示差折光检测器的通用性在于如果选择合适的溶剂,几乎所有的物质都可以进行检测。示差折光检测器在液相色谱中处于特殊的位置,是少有的通用型检测器之一。

① 响应值取决于柱后流出液折射率的变化，采用含有样品的流出液与不含样品的流出液的同一物理量的示差测量。由于每种物质都有各自的折射率，因此示差折光检测器对所有物质都有响应，是一种通用型检测器，具有广泛的适用范围。它对没有紫外吸收的物质，如高分子化合物、糖类、脂肪烷烃等都能够检测。示差折光检测器还适用于流动相紫外吸收本底大，不适于紫外吸收检测的体系。在凝胶色谱中，示差折光检测器是必不可少的，尤其是对聚合物，如聚乙烯、聚乙二醇、丁苯橡胶等的分子量分布的测定。另外，示差折光检测器在制备色谱中也经常使用。对待测样品，即使不了解其物理化学性质，示差折光检测器仍能给出有用的信息。

② 该检测器属于浓度敏感型检测器，其响应信号与溶质的浓度成正比，具有浓度型检测器的特点。

③ 该检测器属于中等灵敏度的检测器，在优选的操作条件、样品及溶剂选择下，检测限可达 $10^{-6} \sim 10^{-7}$ g/mL。示差折光检测器的灵敏度不高是它的最大缺点。另外，该检测器的线性范围一般都小于 10^5 。

④ 示差折光检测器对压力和温度的变化很敏感。

⑤ 示差折光检测器最常用的溶剂是水，但所有的透明溶剂原则上都可以使用。

⑥ 流动相流速的变化因示差折光检测器对温度和压力的敏感性而对检测器也有一定的影响。该影响受多种因素的制约：流动相的几何形状、流动池的大小及材料、检测器的光路系统等。

10.3.3.5 电化学检测器

电化学检测器 (electrochemical detector, ECD) 是根据电化学原理和物质的电化学性质进行检测的。在液相色谱中对那些没有紫外吸收或不能发出荧光但具有电活性的物质，可采用电化学检测法。若在分离柱后采用衍生技术，还可将它扩展到非电活性物质的检测。目前液相色谱电化学检测器已在生化、医学、食品、环境分析等领域获得广泛的应用。

电化学检测器主要有安培、极谱、库仑和电导检测器四种。前两种统称为伏安检测器，以测量电流的大小为基础，后者则以测量液体的电阻变化为根据。其中，以安培检测器的应用最为广泛。此外，属于电化学检测器的，还有依据测量流出物电容量变化的电容检测器，依据测量电池电动势大小的电位检测器。

10.3.3.6 蒸发光散射检测器

蒸发光散射检测器 (ELSD) 是一种广谱型、通用性质量浓度型检测器，几乎所有样品都能有响应。

(1) 与示差折光检测器相比具有的优点

① 灵敏度高。对于示差折光检测器难以测定的组分，若用蒸发光散射检测器检测，不仅有足够的灵敏度，而且排除流动相溶剂的干扰。

② 对流动相系统温度变化影响不敏感。示差折光检测器受温度影响很大，温

度稍有变化，折射率变化很大，因此必须严格控制温度。而蒸发光散射检测器不受温度变化的影响，消除了流动相温度波动产生的误差。

③ 可进行梯度洗脱。蒸发光散射检测器不仅消除了前溶剂峰的干扰，而且可以进行梯度洗脱。这是因为样品到达流通池时剩下的仅是组分微小颗粒，流动相早在蒸发器中蒸发汽化了。

(2) 与液相色谱最常用的紫外-可见光检测器相比具有的优点

① 能解决最困难的 HPLC 检测问题。对于磷脂、皂苷、糖类、聚合物、树脂等无紫外吸收或紫外末端吸收及紫外吸收系数很小的化合物，紫外-可见光检测器无法检测，而蒸发光散射检测器对这些组分均有响应。

② 没有流动相和杂质的紫外吸收干扰，提高了检测灵敏度和色谱峰的分辩，在较低的紫外吸收波长下检测样品时，流动相可能有溶剂吸收干扰；样品中有的杂质含量很小，但紫外吸收系数很大，而主要组分含量虽高，但吸收系数小，这种情况下用紫外吸收检测器检测时，杂质峰的面积比主峰还大，甚至干扰主峰的检测。

③ 无需测定定量校正因子。蒸发光散射检测器对所有组分的响应几乎相等，响应位仅取决于光束中溶质颗粒的大小和数目，与化学组成关系不大。

蒸发光散射检测器的一个限制因素是受样品组分和流动相的挥发性的影响，样品组分应是非挥发或半挥发性的，而流动相应是易挥发的溶剂。另外，流动相中如含缓冲溶液，缓冲液必须具有挥发性，并且浓度应尽可能低一些。通常选用的缓冲液有：甲醇、乙酸、三氟乙酸、硝酸铵和磷酸氢二铵等。

10.3.3.7 液相色谱仪与质谱仪的联用

色谱-质谱联用技术结合了色谱对复杂基体化合物的高分离能力与质谱独特的选择性、灵敏度、分子量及结构信息于一体，具有广泛的应用领域。现今色谱-质谱主要有气相色谱-质谱和液相色谱-质谱 (HPLC-MS)。气相色谱-质谱的联用技术已趋于成熟，它适于易挥发、半挥发性有机小分子化合物的分析。然而据估计，已知化合物中约 70% 的化合物均为亲水性强、挥发性强的有机物，热不稳定化合物及生物大分子，这些化合物广泛存在于当前应用和发展最广泛、最有潜力的领域，包括生物、医药、环境等方面，因而液相色谱-质谱的联机显得更为迫切。液相色谱-质谱的联用在 20 世纪 80 年代以后进入实用阶段。

液相色谱-质谱联用仪主要由色谱仪、接口、质谱仪、电子系统、记录系统和计算机系统六大部分组成。混合样品注入色谱仪后，经色谱柱得到分离。从色谱仪流出的被分离组分依次通过接口进入质谱仪。根据质谱峰的位置和强度可对样品的成分及其结构进行分析。

LC-MS 能够提供的质谱信息有如下几方面。

(1) 准确的化合物分子量信息 常规生物测蛋白质技术如十二烷基磷酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳、Bio-Gel、超离心、色谱法等方法的分子量测定准确度低，而电

喷雾质谱多电荷离子系列即使是测定生物大分子也能给出精确分子量，测定误差为 0.001%。

(2) 未知化合物碎片结构信息 对于电喷雾源，通过调谐接口锥体上的电压，使加速分子离子在 293.3Pa (2.2Torr) 真空下与 N_2 发生多次碰撞而增加内能，导致分子中某些键断裂形成碎片离子，这种断裂过程叫碰撞诱导解离。调控电压形成不同强度电场，可以控制化合物键断裂的程度。碰撞产生的分子离子、碎片离子流损失小，灵敏度高，重现性强。

(3) 一套完整的图谱和多种扫描方式充分提供定性、定量和峰纯度信息 一套完整的色谱-质谱联机分析图谱包括色谱图、总离子流色谱图 (TIC)、质谱图、质量碎片图、质量色谱图等。另外，在进行色谱分离的同时，质谱仪的质量分析器也进行重复的质谱扫描，即以一定的时间间隔，重复地让某一质量范围的离子次序通过，同时检测系统和计算机进行快速的检测、记录和储存处理。扫描方式有多种：全量程扫描 (full scan)、选择离子扫描 (SIM)、高分辨扫描 (zoom scan)、选择反应检测 (SRM)、自动控制子离子扫描 (data dependent scan)、串联质谱离子扫描 (MS/MS Scan) 等多种分析功能。化合物的定性定量分析就是根据这些图谱和扫描结果来进行的。

(4) 可用于无共价键、无官能团的化合物 色谱检测器如紫外、荧光、电化学等需要待测化合物具有特殊官能团，如共价键、苯环、氧化或还原基团。而大气压电离源这种软电离技术，无需化合物具有特殊官能团即可完成分析测定，使几乎所有化合物均能得到质谱信息。

10.3.3.8 液相色谱仪与其他仪器的联用

复杂样品分析常常需要综合运用分离和鉴定手段，将分离仪器和结构鉴定仪器结合成整体能更好地发挥作用。色谱法是目前最有力的分离手段。20 世纪 70 年代以后，色谱法与各种光谱仪的联用技术发展起来。

(1) 与红外光谱仪的联用 红外光谱是一种强有力的结构鉴定手段，几乎没有两种物质有完全相同的红外光谱。早期的色散型红外光谱扫描速度和灵敏度低，无法满足色谱快速测定的要求。20 世纪 70 年代傅里叶光谱技术问世，红外扫描速度大大提高，满足了普通 HPLC 检测的要求。

要实现红外光谱仪与液相色谱的联机，必须解决两大难题。其一，一般化合物对红外光的吸收都是弱吸收，即化合物振动能级跃迁的概率很小。而普通色散型红外光谱仪的灵敏度很低，要求样品量大 (mg 级)。其二，HPLC 的流动相都可吸收红外光而干扰被测组分的红外光谱测定。尽管如此，色散型红外光谱仪对于检测凝胶色谱流出物——聚合物和高分子化合物——是有效的，这是因为这些化合物的分离可以使用对红外光无强烈吸收的流动相，如水。流动相的干扰可通过选择适当的检测波长范围而被排除，用特定波长检测，就能得到良好的选择性。该系统的联结是通过一个小体积的具有氟化钠或氟化钙窗口的流通池来实现的，可在 2.5~

14.5 μm 波长范围内进行检测。用干涉滤光片来选择检测波长或波长范围，透过 3.5 μm 红外光的滤光片可检测 C—H 伸缩振动，而 C—H 伸缩振动是几乎所有化合物都具有的，此时的红外检测器是一个通用型检测器。若选用可透过 5.8 μm 的滤光片，则只能检测 C=O 化合物，红外检测器就成了专用型检测器。通常，该检测器只用于某些样品的检测，如硅树脂、聚苯乙烯、三甘油酯及某些金属配合物等。

20 世纪 80 年代以来，傅里叶变换红外技术得到迅速的发展。傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR) 具有测量快速 (0.2s)、灵敏度高 (mg 级) 的特点，且能够在得到色谱图的同时监测每个色谱峰的完整光谱。已有的两种类型傅里叶联用光谱仪，一类是不必除去流动相，仪器的数据处理机能通过差减的方式扣除溶剂的红外吸收光谱，得到被测物的红外光谱。由于流动相组成常不是单一的，各组分含量也不定，所以光谱差减较困难，一般只适用于正相色谱，对于反相色谱，需要采用细内径柱和氘代溶剂。另一类是除去溶剂后进行检测，已有的接口包括漫反射转盘接口、缓冲存储接口和粒子束接口等。各种接口有其适用范围和限制。总之，傅里叶变换红外光谱仪在提高灵敏度、记录光谱等方面的改进，可使它用于普通 HPLC 分析物的检测，但联用技术特别是接口技术尚未完全成熟，价格也较昂贵，还有待于进一步发展。

(2) 与核磁共振的联用 与其他 HPLC 检测器相比，核磁共振仪 (NMR) 是一种信息丰富的检测手段，其化学位移和偶合常数能提供丰富的有关分子中每个氢原子的局部电子环境的结构信息。在有机结构分析四大谱 (红外光谱、紫外光谱、核磁共振、质谱) 中，NMR 是一种最好的推断化合物结构的手段。HPLC 与 NMR 联用的有利条件是：HPLC 与 NMR 都是在溶液状态下操作，无需挥发和加热步骤。核磁共振仪对样品是非破坏性的，为实现 HPLC-NMR-MS 三联用和 HPLC-NMR-FTIR-MS 四联用提供了可能性。

LC-NMR 联用技术在 20 世纪 80 年代初期已经开始研究，但是由于技术上的原因，如 NMR 灵敏度低 ($10^{-4} \sim 10^{-5} \text{g}$)、液相色谱使用的氘代溶剂十分昂贵和溶剂信号对样品的干扰等，联用技术发展缓慢。近年来，NMR 技术迅猛发展，磁场强度不断提高，氘锁通道性能改善，可以不用或少用氘代试剂，在抑制溶剂峰方面也有很大进展，设计方面已有专为 LC-NMR 联用的流动液槽探头。以上这些意味着 LC-NMR 的实用阶段正在开始。LC-NMR 联用主要有三种模式，即连续流动模式、停止流动模式和峰存储模式，有两种接口供选择。

LC-NMR 联用技术的应用领域较广泛，在聚合物应用方面有：测定组分结构和分子量、控制原料和产品质量、聚合物动力学研究等。NMR 在序列分布、支化度方面能给出比 IR 和 MS 更多的信息。在药物和临床化学方面有：不需事先分离就能检测混合物中的各个组分，分析体液如尿、胆汁、血清、生物体培养等；研究代谢过程和药效学。在食品工业方面有：各种酒、果汁中的糖类分析；水污染分析和天然产物

的筛选等。

10.4 特异性蛋白专用柱特点和操作

10.4.1 固定相

10.4.1.1 天然材料固定相

① 硅胶，具有高强度，广泛适用于极性和非极性溶剂，但在碱性流动相中不稳定。

② 金属氧化物，如氧化铝/氧化锆，具有与硅胶相同的良好物理性质，且能耐较大的 pH 范围。

10.4.1.2 人工合成固定相

① 高交联度的苯乙烯-二乙烯苯或聚甲基丙烯酸酯等，可以使用任何流动相，在整个 pH 范围内稳定，可以用 NaOH 或强碱来清洗色谱柱，但机械强度比天然材料差，高压下易变形，影响柱效和对称性。

② 原位合成固定相，依据特殊使用设计单体进行原位聚合或共聚，形成整体色谱柱。耐酸碱及有机溶剂，无柱床形变。

10.4.1.3 化学键合固定相

通过化学反应，将有机化合物共价键合到硅胶表面形成的一类固定相称为化学键合相。这种技术奠定了固定相的多样性和选择性。

① 键合相的表面化学结构，直接反映固定相的种类。

② 键合相的表面处理，残留未反应表面的封尾程度，反映了同种表面化学结构的多样性。

③ 键合相的含碳量，化学键合基团的反应程度，反映固定相的表面极性。

④ 键合相的键合反应和水解反应是相对的，酸/碱会加速水解反应。键合相应在水 pH=2~8 的介质中使用。

10.4.2 色谱类型

化学键合相表面化学的多样性造就了 HPLC 色谱类型的多样性，依据样品与固定相之间相互作用的原理不同，可能出现多种色谱模式（见表 10.3）。

表 10.3 色谱的基本类型

类型	相互作用机理	分析对象或应用领域	流动相设计
吸附色谱	吸附能	氢键异构体分离、族分离	极性强弱和溶解度
分配色谱	疏水分配作用	各种有机化合物的分离、分析与制备	样品性质
凝胶色谱	溶质分子大小	高分子分离，分子量及其分布的测定	溶解性
离子交换色谱	库仑力	无机离子、有机离子分析	酸度和离子强度
离子排斥色谱	Donnan 膜平衡	有机酸、氨基酸、醇、醛分析	分子量

续表

类 型	相互作用机理	分析对象或应用领域	流动相设计
离子对色谱	疏水分配作用	离子性物质分析	疏水性
疏水作用色谱	疏水分配作用	蛋白质分离与纯化	疏水性
手性色谱	立体效应	手性异构体分离, 药物纯化	手性分离
亲和色谱	生化特异亲和力	蛋白、酶、抗体分离, 生物和医药分析	改性剂

10.4.3 常用键合相的表面化学结构

化学键合相按键合官能团分为极性、非极性、离子型及各种特殊键合相（手性、亲和、配基、金属离子等）。

常用的极性键合相主要有氰基（ $-\text{CN}$ ）、氨基（ $-\text{NH}_2$ ）和二醇基（DIOL）键合相。混合物在极性键合相上的分离主要是基于极性键合基团与溶质分子间偶极-偶极相互作用及偶极-诱导偶极相互作用，特别是氢键作用，极性强的组分保留值较大。

常用的非极性键合相主要有各种烷基（ $\text{C}_1 \sim \text{C}_{18}$ ）和苯基、环烷基等。非极性键合相的烷基链长对样品容量、溶质的保留值和分离选择性都有影响，一般来说，样品容量随烷基链长增加而增大，且长链烷基可使溶质的保留值增大，并常常可改善分离的选择性；但短链烷基键合相具有较高的覆盖度，分离极性化合物时可得到对称性较好的色谱峰。

离子型键合相组成离子交换色谱家族，依据离子强度不同实现分离。

10.4.4 色谱柱

色谱柱是色谱分离的基础。因此好的分离效果要求色谱柱选择性好、柱效高、分析速度快等。常用于 HPLC 的各种微粒填料如多孔硅胶以及以硅胶为基质的键合相、氧化铝、有机聚合物微球、多孔碳等，其粒度一般为 $3\mu\text{m}$ 、 $5\mu\text{m}$ 、 $7\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m}$ 等，柱效理论值可达 $(5 \sim 16) \times 10^4/\text{m}$ 。

10.4.4.1 柱的构造（见图 10.2）

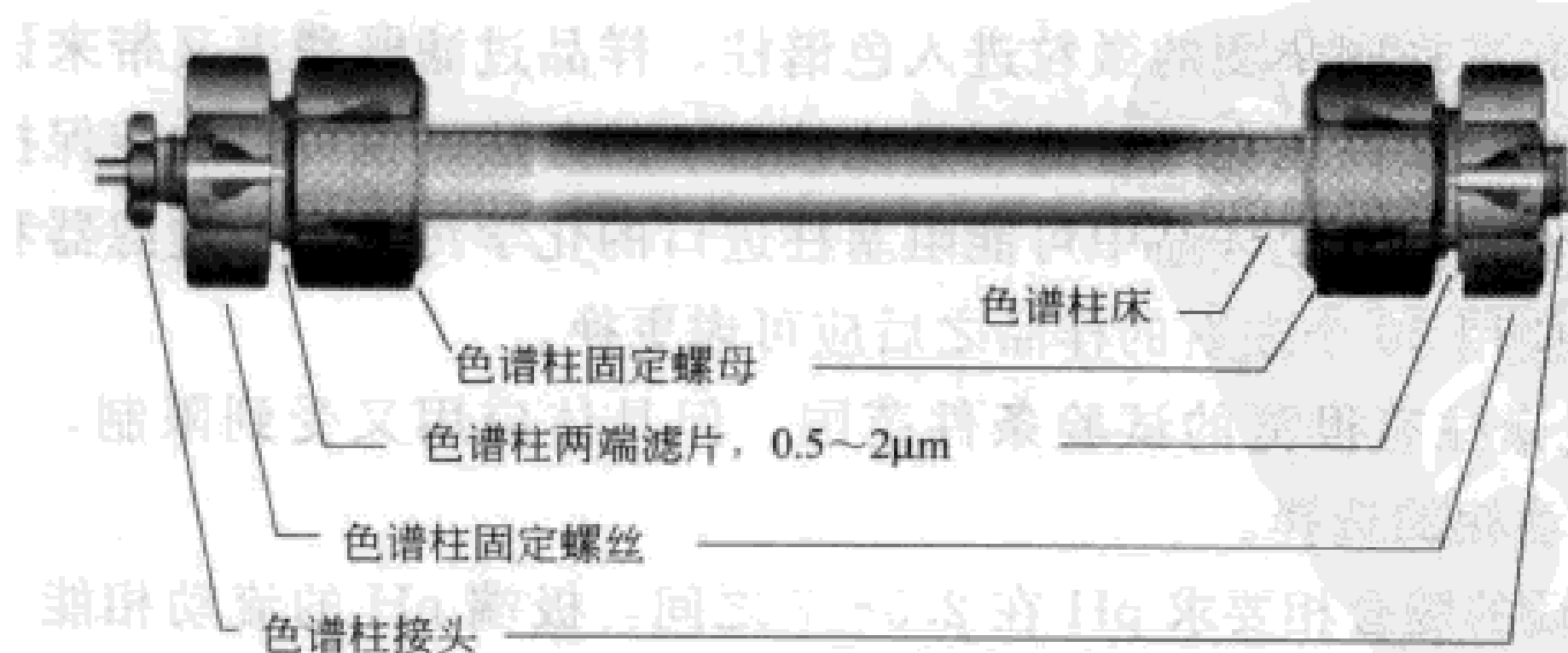


图 10.2 色谱柱的外部构造图

10.4.4.2 色谱柱的类型

高效液相色谱柱大致可分为三种类型：内径小于 2mm 的称为细管径或微管径

柱；内径在 2~5mm 范围的是常规高效液相色谱柱；内径大于 5mm 的一般称为半制备柱或制备柱。

细管径柱的主要优点是：

① 节省溶剂。例如，内径为 1mm、2mm 和 5mm 的三种色谱柱，当保持相同的冲洗剂线速度时，每天的溶剂消耗量比例是 1 : 4 : 25。

② 灵敏度增加。因为冲洗剂流量减少，体积峰宽随之减少，样品稀释得少，从而提高了峰高灵敏度。

10.4.4.3 柱的填充和性能评价

色谱柱的性能除了与固定相性能有关外，还与填充技术有关。在正常条件下，填料粒度 $>20\mu\text{m}$ 时，干法填充制备柱较为合适；颗粒 $<20\mu\text{m}$ 时，湿法填充较为理想。填充方法一般有 4 种：压匀浆法、径向加压法、轴向加压法、干法。

色谱柱使用前应对其性能进行检测，使用期间或放置一段时间后也要重新检测。柱性能指标包括在一定实验条件（样品、流动相、流速、温度）下的柱压、塔板数、对称因子、容量因子和分离度。色谱柱评价报告应包括色谱柱测试方法和检测到的色谱柱的基本参数，如柱长、内径、填料的种类、粒度和柱效、不对称性、柱压等。

10.4.4.4 柱的使用和维护注意事项

色谱柱的正确使用和维护十分重要，稍有不慎就会降低柱效、缩短使用寿命甚至损坏。在色谱操作过程中，需要注意下列问题，以维护色谱柱。

① 避免压力和温度的急剧变化及任何机械震动。温度的突然变化或者使色谱柱从高处掉下都会影响柱内的填充状况；柱压的突然升高或降低也会冲动柱内填料，因此在调节流速时应该缓慢进行，在阀进样时阀的转动不能过缓（如前所述）。

② 应逐渐改变溶剂的组成，特别是反相色谱中，不应直接从有机溶剂改变为全部是水，反之亦然。

③ 加流路过滤器和保护柱。流路过滤器紧靠进样阀后面，位于分析柱前，挡住来源于样品和进样阀垫圈的微粒进入色谱柱。样品过滤既费事又带来误差，样品量少过滤更困难，装高压在线过滤器是比较省事的办法。也可以加装保护柱，代替流路过滤器。保护柱收集样品中可能阻塞柱进口的化学污染物。过滤器和保护柱是消耗品，一般使用 50 个左右的样品之后应可考虑更换。

④ 多数色谱柱有很宽的试验条件范围，但具体应用又受到限制，主要是 pH 值、柱温和流动相的选择。

硅胶为基质的键合相要求 pH 在 2.5~7 之间，极端 pH 的流动相能“溶解”硅胶，使键合相流失。结果非碱性组分的保留不断减少，碱性组分的保留增加，引起碱性组分峰变宽。如果一定要用高或低 pH 的流动相，可加预柱（饱和柱）。预柱装在泵和进样阀之间，用分析柱相同的填料填装，或者用普通硅胶。硅胶饱和了流动相，减少了分析柱填料的损失。预柱不要求柱效高，用价格低的一般硅胶疏松地填装，按

期检查硅胶的溶解情况。用预柱也有不利的影响，即新流动相难以平衡，保留时间不稳定或稳定慢。使用了预柱一定要加流路过滤器，以防止硅胶微粒引起的麻烦。

以硅胶为基质的柱和阴离子交换柱超过 60℃ 后，会增加对流动相中化学物质的吸附。在高温下用小颗粒柱引起柱床塌陷，降低柱效，改变峰形。在 40℃ 以上使用 3μm 柱，70℃ 以上使用 5μm 柱，会使值降低 50%。

有些流动相中的溶剂不能用于某些柱，如小颗粒的聚苯乙烯填料不能用于非水的排阻色谱。另一方面，有些柱与某些溶剂（如四氢呋喃）一旦达到平衡，不要随意改用其他溶剂。有关这些特殊填料，可以参见有关资料。

水溶性流动相会引起微生物生长而造成柱阻塞。色谱柱应存放在纯有机溶剂或加了 50% 有机溶剂的水中。凝胶柱可存放在水溶性缓冲液中，同时加 0.01% 叠氮钠以防止微生物的生长。

⑤ 经常用强溶剂冲洗色谱柱，清除保留在柱内的杂质。

⑥ 保存色谱柱时应将柱内充满乙腈或甲醇，柱接头要拧紧，防止溶剂挥发干燥。

⑦ 每次工作完后，最好用洗脱能力强的洗脱液冲洗，例如 ODS 柱宜用甲醇冲洗至基线平衡。当采用盐缓冲溶液作流动相时，使用完后应用无盐流动相冲洗。在 HPLC 仪上柱子如不经常使用，应每隔 4~5 天开机冲洗 15min。

⑧ 卤族元素（氟、氯、溴）的化合物可能会腐蚀不锈钢色谱柱及液路管道，不宜长期接触。

10.4.4.5 色谱柱常规使用程序

① 认真阅读色谱柱使用说明书；

② 尽量减少压力波动，避免机械及热冲击；

③ 使用保护柱及在线过滤器；

④ 经常以强溶剂冲洗色谱柱；

⑤ 充分过滤样品及流动相，尽量避免杂质微粒与强保留成分；

⑥ 在中等 pH 值（3~8）操作，使用有机缓冲溶液；

⑦ 硅胶基质的色谱柱使用温度最好小于 60℃；

⑧ 使用水或缓冲溶液作保存液时（凝胶色谱柱），应防腐，最好加 0.1% 的叠氮钠；

⑨ 过夜或贮存时，冲洗掉盐和缓冲液，用纯有机溶剂流动相保存（反相色谱柱）。

10.5 常见故障排除

10.5.1 与色谱柱相关的问题

(1) 塔板数下降 如果柱效下降很快，应考虑人为不利因素。N 值突然下降（如一个工作日内），可能柱头塌陷或样品处理不当。如果更换色谱柱后柱效下降，可能是系统中存在柱外效应。

(2) 峰形变坏 出现拖尾峰、分叉峰或非高斯峰的原因很多，但总是与塔板数骤然下降联系在一起。峰形变坏而保留时间不变，柱头有了空穴是主要原因。

(3) 压力增加 使用过程中柱压会慢慢增加。如果压力一下子增加过高，应考虑两种可能，一是样品沉积在柱内，二是柱内硬件阻塞。

对于第一种情况，采用能溶解样品的溶剂冲洗。正向冲洗或将柱出口接在泵上反向冲洗（如果柱条件许可），使用大约 30~50mL 的溶剂。不要让冲洗液通过检测器流动池，以防污染。在冲洗过程中不断检查，直到压力恢复正常为止。对于第二种情况，只能更换色谱柱滤片。换滤片时尽量不要搅动柱头填料。

(4) 保留时间的改变 不同牌号的色谱柱分离的色谱峰保留时间可在小范围内移动，但峰的顺序和分辨率不变，可改变流速或溶剂强度进行校正。保留时间发生大的变化，主要由柱填料硅胶相互作用所致，另外有次级保留因素的影响。硅胶为基质的填料表面含有硅醇，有的封尾填料可部分去掉硅醇，不封尾填料的硅胶表面硅醇基更多。酸性或碱性分子可与硅醇发生不同程度的相互作用。硅胶与样品分子作用的强弱，因不同批号的硅胶和不键合相填料而异。即使同批号的硅胶而不同批号的键合相也有差异。硅醇对阳离子或碱性样品影响最大。

10.5.2 造成色谱峰（不对称）拖尾的原因

- ① 色谱柱本身填装问题，筛板堵塞或填料塌陷；
- ② 柱头有污染；
- ③ 样品超载；
- ④ 样品溶剂不合适；
- ⑤ 柱外效应；
- ⑥ 化学或二次保留（硅羟基）效应；
- ⑦ 缓冲容量不足或不合适；
- ⑧ 重金属污染。

10.5.3 如何解决峰形拖尾的问题

10.5.3.1 与化学有关的拖尾问题

① 流动相中，加入 30mmol/L 的三乙胺（用于碱性化合物）或醋酸胺（用于酸性化合物），未知化合物加醋酸三乙胺；

② 如仍然拖尾，将三乙胺换为二甲基辛胺（或醋酸二甲基辛胺）；

③ 降低进样量到 $<1\mu\text{g}$ 。

10.5.3.2 与色谱柱有关的拖尾问题

① 如柱头处有强保留的样品组分积聚，反相柱可用 20 倍柱体积的 96% 的二氯甲烷与 4% 甲醇，加 1% 氨水混合液冲洗；正向柱可用甲醇冲洗。

② 使用保护柱。

10.5.3.3 与 HPLC 系统有关的峰拖尾和峰加宽

- ① 进样体积过大 (通常 $\leq 25\mu\text{L}$);
- ② 进样阀与色谱柱及检测器之间的管路体积过大;
- ③ 检测器流通池的体积过大。

10.5.4 如何贮存色谱柱

① 防止缓冲溶液和水溶液流动相产生微生物,做到流动相用多少配多少,或在水流动相中加 20mg/L 叠氮钠以抑制细菌生长 (一定当心其毒性和潜在的爆炸性);或在流动相中加 20% 的有机改性剂,也可抑制微生物生长,有机改性剂还有助于流动相脱气。

② 尽可能将色谱柱贮存于 100% 有机溶剂 (乙腈最好) 中,避免在缓冲液中保存。

③ 使用缓冲液后的色谱柱,应用 15~20 倍柱体积的不含缓冲剂的同种水-有机溶剂流动相冲洗色谱柱换成 100% 有机溶剂贮存。

④ 避免用纯水冲洗键合致密的 C_{18} 柱。

⑤ 将色谱柱两端用堵头拧好,以免柱床填料干裂。

10.5.5 谱图问题

液相色谱系统的许多问题都能在谱图上反映出来,其中有一些问题可以通过改变设备参数得到解决,而其他的问题必须通过修改操作程序来解决,对于色谱柱和流动相的正确选择是得到好的色谱图的关键。

10.5.6 常见故障

见表 10.4。

表 10.4 常见故障一览表

原 因	解 决 方 法
A. 峰拖尾	
1. 筛板阻塞	1. 反冲色谱柱;更换进口筛板;更换色谱柱
2. 色谱柱塌陷	2. 填充色谱柱
3. 干扰峰	3. 使用更长的色谱柱;改变流动相或更换色谱柱
4. 流动相 pH 选择错误	4. 调整 pH 值,对于碱性化合物,低 pH 值更有利于得到对称峰
5. 样品与填料表面的活性点发生反应	5. 加入离子对试剂或碱性挥发性修饰剂;更换色谱柱
B. 峰前延	
1. 柱温低	1. 升高柱温
2. 样品溶剂选择不恰当	2. 使用流动相作为样品溶剂
3. 样品过载	3. 降低样品含量
4. 色谱柱损坏	4. 见 A1、A2

原 因	解 决 方 法
C. 峰分叉	
1. 保护柱或分析柱污染	1. 取下保护柱再分析,也可更换保护柱,拆下来清洗。如果问题仍然存在,可能是柱子被强保留物质污染,可运用适当的再生措施。若还不行,可能是入口处堵,可以更换筛板或色谱柱
2. 样品溶剂不溶于流动相	2. 改变样品溶剂,如果可能,采取流动相作为样品溶剂
D. 含量高的成分峰	
样品溶剂选择不恰当	减少样品载量
E. 早出的峰变形	
样品溶剂选择不恰当	减少进样体积;运用低极性样品溶剂
F. 早出的峰拖尾程度大于晚出的峰	
柱外效应	调整系统连接(使用更短、内径更小的管路);使用小体积的流通池
G. K' 增加时,拖尾更严重	
1. 二级保留效应,反相模式	1. 加入三乙胺;加入乙酸;加入盐或缓冲剂;更换一支柱子
2. 二级保留效应,正相模式	2. 加入三乙胺;加入乙酸;加入水;试用另一种方法
3. 二级保留效应,离子对	3. 加入三乙胺
H. 酸性或碱性化合物的峰拖尾	
缓冲不合适	使用浓度 50~100mmol/L 的缓冲液;使用 pK_a 等于流动相 pH 值的缓冲液
I. 额外的峰	
1. 样品中有其他组分	1. 正常
2. 前一次进样的洗脱峰	2. 增加运行时间或梯度;使用 pH 等于流动相 pH 的缓冲液
3. 空位或鬼峰	3. 检查流动相是否纯净;使用流动相作为样品溶剂;减少进样体积
J. 保留时间波动	
1. 温控不当	1. 重新设定柱温
2. 流动相组分变化	2. 防止变化(蒸发、反应等)
3. 色谱柱没有平衡	3. 在每一次运行之前给予足够的时间平衡色谱柱
K. 保留时间不断变化	
1. 流速变化	1. 重新设定流速
2. 泵中有气泡	2. 从泵中除去气泡
3. 流动相选择不恰当	3. 更换合适的流动相;选择合适的混合流动相

续表

原 因	解 决 方 法
L. 基本漂移	
1. 柱温波动(即使是很小的温度变化都会引起基线的波动。通常影响示差检测器、电导检测器、较高灵敏度的紫外检测器或其他光电类检测器)	1. 控制好柱子和流动相的温度,在检测器之前使用热交换器
2. 流动相不均匀(基线向上漂移,流动相条件变化引起的基线漂移大于温度导致的漂移)	2. 使用 HPLC 级的溶剂、高纯度的盐和添加剂。流动相在使用前进行脱气,使用过程中用氮气
3. 检测器内流通池被污染或有气体	3. 用甲醇或其他强极性溶剂冲洗流通池,如有需要,可以用 1mol/L 的硝酸(不要用盐酸)
4. 检测器出口阻塞(高压造成流通池窗口破裂,产生噪声基线)	4. 取出阻塞物或更换管子,参考检测器手册换流通池窗
5. 流动相配比不当或流速变化	5. 更改配比或流速。为避免这个问题,可定期检查流动相组成及流速
6. 柱平衡慢,特别是流动相发生变化时	6. 用中等强度的溶剂进行冲洗,更改流动相时,在分析前用 10~20 倍体积的新流动相对柱子进行冲洗
7. 流动相污染、变质或由低质量溶剂配成	7. 检查流动相的组成。使用高质的化学试剂及 HPLC 级的溶剂
8. 样品中有强保留的物质(高 K' 值)以馒头峰样被洗脱出,从而表现出一个逐步升高的基线	8. 使用保护柱,如有必要,在进样之间或在分析过程中,定期用强溶剂冲洗柱子
9. 使用循环溶剂,但检测器未调整	9. 重新设定基线。如循环溶剂已超出检测器动力学范围,使用新的流动相
10. 检测器没有设定在最大吸收波长处	10. 将波长调整至最大吸收波长处
M. 基线噪声(规则的)	
1. 在流动相、检测器或泵中有空气	1. 流动相脱气,冲洗系统以除去检测器或泵中的空气
2. 漏液	2. 见 10.3 节。检查管路接头是否松动,泵是否漏液,是否有盐析出和不正常的噪声。如有必要,更换泵密封
3. 流动相混合不完全	3. 用手摇动使混合均匀或使用低黏度的溶剂
4. 温度影响(柱温过高,检测器未加热)	4. 减少差异或加上热交换器
5. 在同一地线上有其他电子设备	5. 断开 LC、检测器和记录仪,检查干扰是否来自于外部,加以更正
6. 泵脉冲	6. 在系统中加入脉冲阻尼器
N. 基线噪声(不规则的)	
1. 漏液	1. 见 10.3 节。检查接头是否松动,泵是否漏液,是否有盐析出和不正常的噪声。如有必要,更换密封。检查检测器流通池是否漏液

原因	解决方法
2. 流动相污染、变质或由低质量溶剂配成	2. 检查流动相的组成
3. 流动相各溶剂不相溶	3. 选择互溶的流动相
4. 检测器内有气泡	4. 断开检测器记录仪的电源, 检查并更正
5. 系统内有气泡	5. 用强极性溶液冲洗系统
6. 检测器内有气泡	6. 冲洗检测器, 在检测器后面安装背景压力调节器
7. 流通池污染(即使是极少的污染物也会产生噪声)	7. 用 1mol/L 的硝酸(不能用磷酸)清洗流通池
8. 检测器灯能量不足	8. 更换灯
9. 色谱柱填料流失或阻塞	9. 更换色谱柱
10. 流动相混合不均匀或混合器工作不正常	10. 维修或更换混合器, 在流动相不走梯度时, 建议不使用泵的混合装置
O. 峰变宽	
1. 流动相组成变化	1. 重新制备新的流动相
2. 流动相流速太低	2. 调节流速
3. 漏液(特别是在柱子和检测器之间)	3. 见 10.3 节。检查接头是否松动、泵是否漏液、是否有盐析出以及正常的噪声。如果必要更换密封
4. 检测器设定错误	4. 更改检测器参数设置
5. 柱子过载; 检测器响应时间过长或池体积过大; 柱子与检测器之间的管路太长或管路内径大; 模数转换频率过低	5. 小体积进样, 稀释样品; 减少响应时间或使用更小的流通池; 使用内径为 0.007~0.01in(1in=2.54cm)的管路; 将模数转换频率增大
6. 缓冲液离子强度太低	6. 增加离子强度
7. 保护柱污染或失效	7. 更换保护柱
8. 色谱柱污染或失效, 塔板数降低	8. 更换同样类型的色谱柱
9. 柱头污染或塌陷	9. 更换柱子
10. 呈现两个或多个未被完全分离的峰	10. 选择其他类型的色谱柱以改善分离效果
11. 柱温过低或柱温不均匀	11. 选择设计合理的柱温设备, 提高柱温
12. 检测器响应时间太长	12. 使用较短的响应时间
P. 分离度降低	
1. 流动相污染或变质(引起保留时间变化)	1. 重新配制流动相
2. 保护柱或分析柱污染	2. 取下保护柱再分析, 也可更换保护柱。若问题仍然存在, 可能是柱子被强保留物质污染, 再生色谱柱。若问题仍然存在, 更换色谱柱
Q. 所有的峰面积都变小/变大	
1. 检测器衰减设定过高/低	1. 减少/增加衰减的设定
2. 检测器响应时间太长	2. 设定较短的响应时间
3. 进样量太少/过多	3. 增大/减小进样量
4. 输出连接不当	4. 使用正确的连接

10.6 高效液相色谱在蛋白质分离纯化中的应用实例

10.6.1 反相色谱分离蛋白质

10.6.1.1 概述

反相高效液相色谱基于蛋白质分子中的非极性基团与反相键合相中非极性基团间的相互作用力（色散力或伦敦力）的差异进行分离。流动相一般采用极性小于水的有机溶剂（如甲醇、乙腈、四氢呋喃等），这些有机溶剂可能使许多蛋白质分子产生不可逆的变性；同时由于蛋白质分子中含有许多极性基团，与固定相之间还存在色散力之外的其他形式的相互作用力，流动相中经常会加入离子对试剂（如三氟乙酸、甲酸、磷酸等），提高分离性能和分离度，同时降低固定相对蛋白质的吸附，获得高的质量回收率；这种分离一般在 pH 2~3 之间的酸性流动相中进行。因此必须考虑蛋白质会在这两种条件下产生不可逆的分子构象变化，影响纯化蛋白质分子的生物活性。

分离过程中主要通过流动相中有机成分的变化来设计分离方法，蛋白质分子表面极性决定其保留能力，极性愈强保留时间愈短，反之其保留时间愈长。就流动相而言，随流动相极性增强，洗脱能力变弱。

应用于蛋白质纯化的固定相必须有更大的内部孔径，以应对蛋白质分子更大的空间结构，否则由于固定相表面孔径过小，影响蛋白质分子的进入，此时蛋白质分子将表现为通过性洗脱，无法实现分离目的。常用于蛋白质分离的固定相内孔径为 30nm 以上。表面化学结构同样影响分离。

10.6.1.2 反相色谱柱的选择

应用于多肽和蛋白质分离的反相色谱柱常选择含 C₄、C₆、C₈、C₁₈ 等键合相的大孔径色谱柱。

对于蛋白质酶解或化学降解后产物的分离常选择 C₈ 或 C₁₈ 色谱柱。固定相键合烷基链的长度直接影响蛋白质分子峰型，烷基链太长会造成极性较弱的蛋白质分子形成拖尾峰并使峰变宽。

经验表明，反相色谱中蛋白质或多肽分子的回收率与色谱柱内固定相的量成反比，因此根据样品的量，尽可能使用更短更细的色谱柱。

10.6.1.3 多肽和蛋白质分离纯化中反相色谱柱常用参数

见表 10.5。

10.6.1.4 等度与梯度流动相

尽管等度洗脱（即恒定比例的 TFA 缓冲液/乙腈单一流动相）能获取高分离度的纯化过程，但要优化这种比例将花费更多的时间和样品，且每一次分离过程可能需要更长的时间。通常更多使用梯度方式洗脱：

以每分钟 0.5% 左右变化的三氟乙酸缓冲液逐渐线性递增和乙腈同比线性减低的梯度方式，常用流速为 1~2mL/min。

表 10.5 反相色谱柱常用参数表

项 目	多肽纯化	蛋白质纯化
键合相	C ₃ ~C ₁₈ , 苯基	C ₃ ~C ₁₈ , 苯基
粒度	3~10 μ m	3~10 μ m
内孔径	100~300 \AA	300 \AA
色谱柱长	1~25cm	1~25cm
色谱柱内径	1~5mm	1~5mm
流动相流速	0.02~2mL/min	0.02~2mL/min

注: 1 \AA =0.1nm。

10.6.1.5 RP-HPLC 纯化多肽和蛋白质中常用的缓冲溶液

如表 10.6 所示。

表 10.6 常用缓冲溶液性质

缓冲溶液 pH	常用缓冲溶液
pH 2~3	0.1% 三氟乙酸(TFA) 0.1% 磷酸 0.1% 七氟丁酸(HFBA) 10mmol/L 盐酸 5%~60% 甲酸
pH 4~6	10mmol/L 乙酸铵 10mmol/L 乙酸三乙胺(pH 4.5) 100mmol/L 磷酸二氢铵(pH 4.5)
pH>6	100mmol/L 乙酸钠(pH 7.5) 10mmol/L 磷酸二氢钾(pH 6~8) 20mmol/L Tris-HCl(pH 7~8) 50mmol/L 磷酸二氢钠(pH 7) 50mmol/L 碳酸氢铵(pH 8)

(1) HPLC 缓冲液的准备 所有使用的缓冲盐、有机溶剂及水应尽可能高纯, 不应该为分离过程引入新的不纯物, 同时还必须兼容检测器。溶剂纯度直接影响其紫外光吸收效应, 截止波长变宽, 不利于检测。

注意: 水、缓冲盐溶液必须采用 0.45 μ m 的水系纤维膜或尼龙膜过滤, 超声波或真空脱气。所有使用的有机溶剂, 如甲醇、乙腈、丙酮等都有一定的生物毒性, 特别是三氟乙酸、七氟丁酸、甲酸等有机酸, 还有较强的酸性和腐蚀性, 使用时应有一定的防护, 并加以小心。

(2) 三氟乙酸缓冲液 (TFA)(1L) 0.1% (体积分数) 三氟乙酸 (TFA) 缓冲液配制: 取高纯三氟乙酸 1mL, 用无离子水稀释至 1000mL, 混合后, 经 0.45 μ m 水系微孔滤膜过滤, 超声波脱气 10min。

(3) 三氟乙酸-乙腈溶液 (1L) 0.85% (体积分数) 三氟乙酸乙腈溶液配制: 取高纯三氟乙酸 0.85mL, 先加 200mL 无离子水, 混合后再加入色谱纯乙腈 700mL, 用无离子水补齐至 1000mL, 充分混匀, 经有机系微孔滤膜过滤, 超声波脱

气 10min。

10.6.1.6 肽类及蛋白质样品准备

肽类及蛋白质样品必须完全溶解，不留沉淀，否则应加入一些助溶剂（酸、碱、盐及有机溶剂）以辅助溶解。最常使用三氟乙酸-胍缓冲液，这种缓冲液能帮助溶解绝大部分大分子蛋白质混合物。

样品溶解后，最好离心以除去不溶性颗粒物。

(1) TFA/ 胍缓冲液 (1L) 称取高纯盐酸胍 (Guanidine-HCl) 573.2g，用 0.1% (体积分数) 三氟乙酸 (TFA) 缓冲液溶解，并定容至 1L，混合后，经 0.45 μ m 水系微孔滤膜过滤，超声波脱气 10min。

(2) 反相色谱用肽类标准 (1mL)

α -Lactoglobulin A	1mg	1mg/mL Trypsin	20 μ L
0.1mol/L 碳酸铵	1mL		

室温保温反应 1~24h，反应时间完成后，加入 10 μ l 三氟乙酸终止酶解过程，此时可见大量气泡出现。

气泡终止后，检查反应溶液的 pH 值，必须保证 pH 值小于 3。

(3) 反相色谱用蛋白质标准 (1mL)

胰岛素 (insulin)	1mg	卵白蛋白 (ovalbumin)	1mg
细胞色素 c (cytochrome c)	1mg	0.1% (体积分数) 三氟乙酸 (TFA) 缓冲液	
乳白蛋白 (alpha-lactalbumin)	1mg		1mL

混合均匀。

方案 10.1 肽类酶解混合物色谱过程

1. 色谱柱预处理。

(1) 对于新收到的色谱柱或已存放较长时间（多于 30 天）的色谱柱，首先用纯有机溶剂（甲醇、乙腈或异丙醇）低流速（正常流速的 1/4）冲洗色谱柱 2h。对于常规使用的色谱柱，可直接进入下一步过程。

(2) 更换成正常流速冲洗 20min，以萘-甲醇溶液为样品，进样 5 μ l，记录色谱图，检查色谱柱的各种性能指标，做好原始登记。

(3) 将流动相更换成 5% 的甲醇水溶液，平衡色谱柱 20min。

(4) 将流动相更换成样品纯化所必需的流动相，平衡色谱系统，检查基线及柱压，系统稳定后即可进样。

2. 空白运行。

运行条件见表 10.7。

流动相 A: 0.1% (体积分数) 三氟乙酸 (TFA) 缓冲液;

流动相 B: 0.1% (体积分数) 三氟乙酸乙腈溶液;

检测波长: 210~220nm。

表 10.7 运行条件

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	变化方式
0	100	0	
10	100	0	
40	0	100	线性变化
50	0	100	
55	100	0	线性变化

3. 肽类酶解液纯化。

肽类酶解混合物于 5000g 离心 5min。

取上清液一定量上样，上样量愈少分离度愈好，过载会导致峰变形，影响分离效果和柱效。

4. 上样后依据空白运行相同的流动相梯度程序运行，记录色谱图。样品运行结束后，清洗色谱柱。

5. 色谱图见图 10.3。

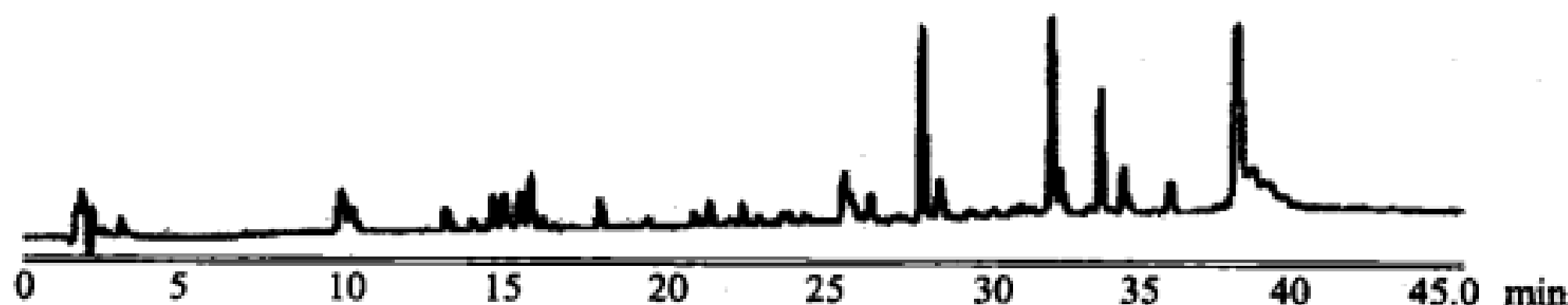


图 10.3 肽类酶解混合物色谱图

方案 10.2 蛋白质样品纯化色谱过程

1. 色谱柱预处理。

(1) 对于新收到的色谱柱或已存放较长时间（多于 30 天）的色谱柱，首先用纯有机溶剂（甲醇、乙腈或异丙醇）低流速（正常流速的 1/4）冲洗色谱柱 2h。对于常规使用的色谱柱，可直接进入下一步过程。

(2) 更换成正常流速冲洗 20min，以萘-甲醇溶液为样品，进样 5 μ l，记录色谱图，检查色谱柱的各种性能指标，做好原始登记。

(3) 将流动相更换成 5% 的甲醇水溶液，平衡色谱柱 20min。

将流动相更换成样品纯化所必需的流动相，平衡色谱系统，检查基线及柱压，系统稳定后即可进样。

2. 空白运行。

运行条件见表 10.8。

流动相 A：0.1%（体积分数）三氟乙酸（TFA）缓冲液。

流动相 B：0.1%（体积分数）三氟乙酸乙腈溶液。

表 10.8 运行条件

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	变化方式
0	100	0	线性变化
5	100	0	
25	0	100	
30	0	100	
35	100	0	线性变化

检测波长：依据所需纯化蛋白质的组成不同，对于丰度较大的蛋白质，可以采用高波长检测，常用 280nm，而对于丰度低的蛋白质样品采用更低的波长，基于肽键检测，常用 210~220nm。

3. 上样纯化。头一次运行目标蛋白质混合物时，采用空白运行相同的梯度程序运行。上样量根据样品浓度确定，过大的上样体积可能导致峰扩散，影响纯化效果。样品过载也会降低色谱柱柱效。上样后记录色谱图。

4. 依据以上色谱结果，更改梯度程序，确立合适的有针对性的蛋白质纯化梯度程序，上样并接收目标蛋白质峰。

色谱柱清洗程序：

(1) 流动相中含有酸、碱、盐、离子对试剂时，色谱柱必须先使用含 5% 的有机溶剂的无离子水运行 30min 以上。

(2) 最好使用梯度方式以每分钟 5% 速度线性递增有机溶剂清洗色谱柱。

(3) 然后采用 100% 的有机溶剂清洗色谱柱 30min。

(4) 以萘-甲醇为样品进样 5 μ l，记录色谱图，做好色谱柱各项性能登记，同时与使用前进行比较。

5. 标准蛋白混合色谱结果见图 10.4。

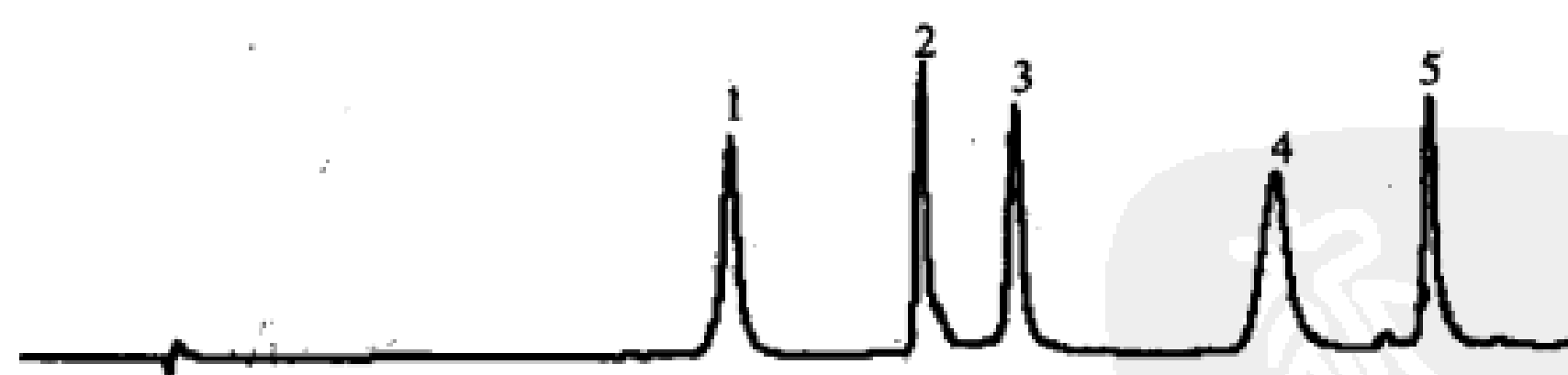


图 10.4 标准蛋白混合色谱图

方案 10.3 白细胞介素-2 反相高效液相色谱纯化

材料

二元梯度液相色谱系统，包括：高精度高压色谱恒流泵 2 台；紫外检测器或二极管阵列检测器；进样器带 1000 μ l 定量环；梯度控制与处理软件系统；色谱柱恒温系统

色谱柱, Comatex C₁₈, 5 μ m, 30nm, 250mm \times 10mm

流动相 A: 0.1% (体积分数) 三氟乙酸 (TFA) 缓冲液

流动相 B: 0.1% (体积分数) 三氟乙酸乙腈溶液

方法

1. 基本条件。

检测波长: 280nm

温度: 30 $^{\circ}$ C

2. 梯度程序 (见表 10.9)。

表 10.9 梯度程序

时间/min	流速/(mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%	梯度曲线
0	4	100	0	线性
5	4	100	0	线性
10	4	60	40	线性
15	4	60	40	线性
20	4	30	70	线性
30	4	30	70	线性
35	4	0	100	线性
45	4	0	100	线性
55	4	100	0	线性

3. 空白运行。

4. 样品上样。用 1mL 进样注射器取含白细胞介素-2 约 5mg/mL 的粗品 500 μ l 上样并同时记录色谱图。

5. 收集较为明显的峰, 进行进一步鉴定。

6. 结果见图 10.5。

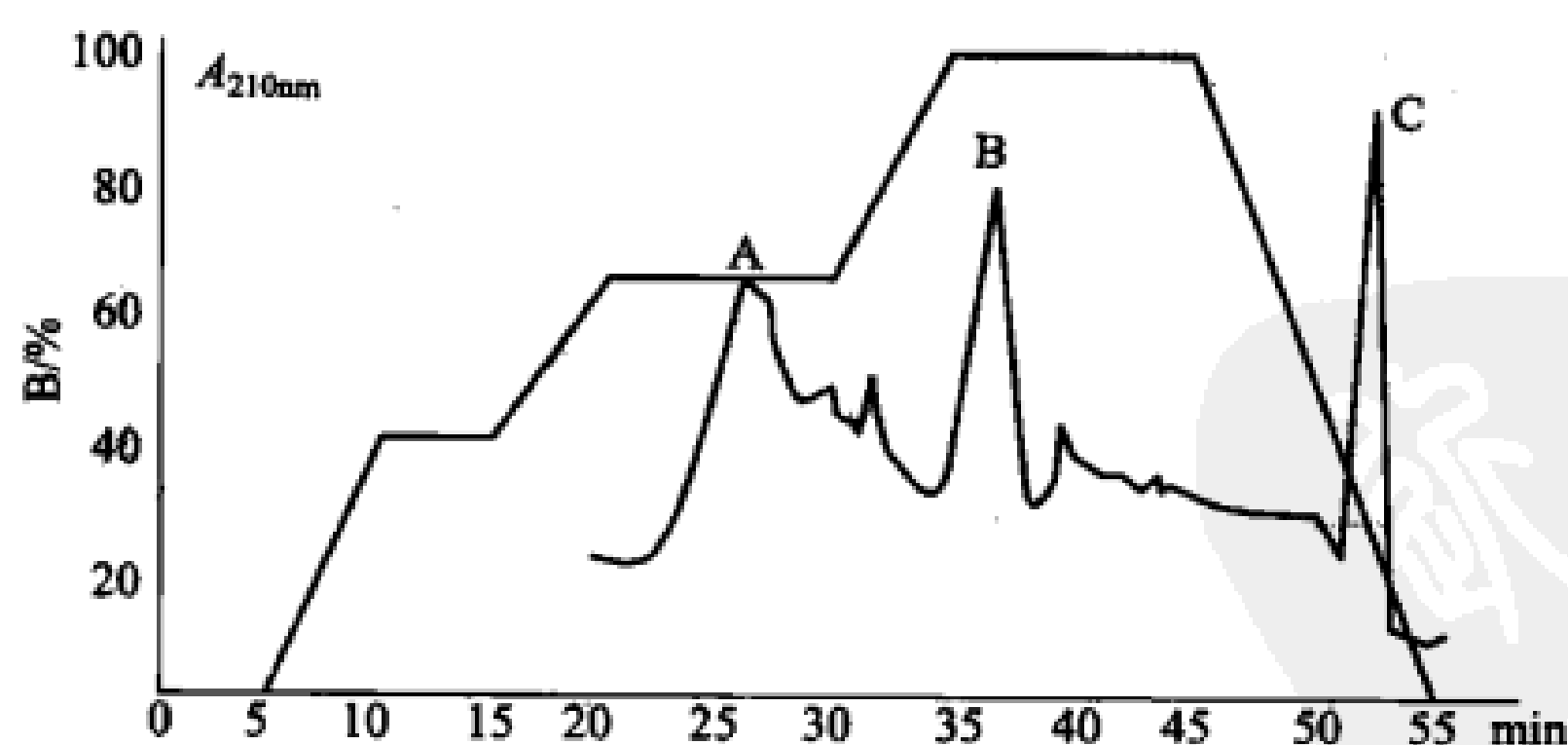


图 10.5 白细胞介素-2 反相高效液相色谱纯化图

方案 10.4 水蛭素 12 肽的反相高效液相色谱纯化

材料

二元梯度液相色谱系统, 包括: 高精度高压色谱恒流泵 2 台; 紫外检测器或二

极管阵列检测器；进样器带 1000 μ l 定量环；梯度控制与处理软件系统；色谱柱恒温系统

色谱柱, Comatex RP-8, 5 μ m, 30nm, 250mm \times 4.6mm

流动相 A: 0.1% (体积分数) 三氟乙酸 (TFA) 缓冲液

流动相 B: 0.1% (体积分数) 三氟乙酸乙腈溶液

方法

1. 基本条件。

检测波长: 214nm

温度: 30 $^{\circ}$ C

2. 梯度程序 (见表 10.10)。

表 10.10 梯度程序

时间/min	流速/(mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%	梯度曲线
0	1	80	20	线性
30	1	20	80	线性

3. 空白运行。

4. 样品上样。用 100 μ L 进样注射器取含白细胞介素-2 约 5mg/mL 的粗品 100 μ L 上样并同时记录色谱图。

5. 收集较为明显的峰, 进行进一步鉴定。

6. 结果见图 10.6。

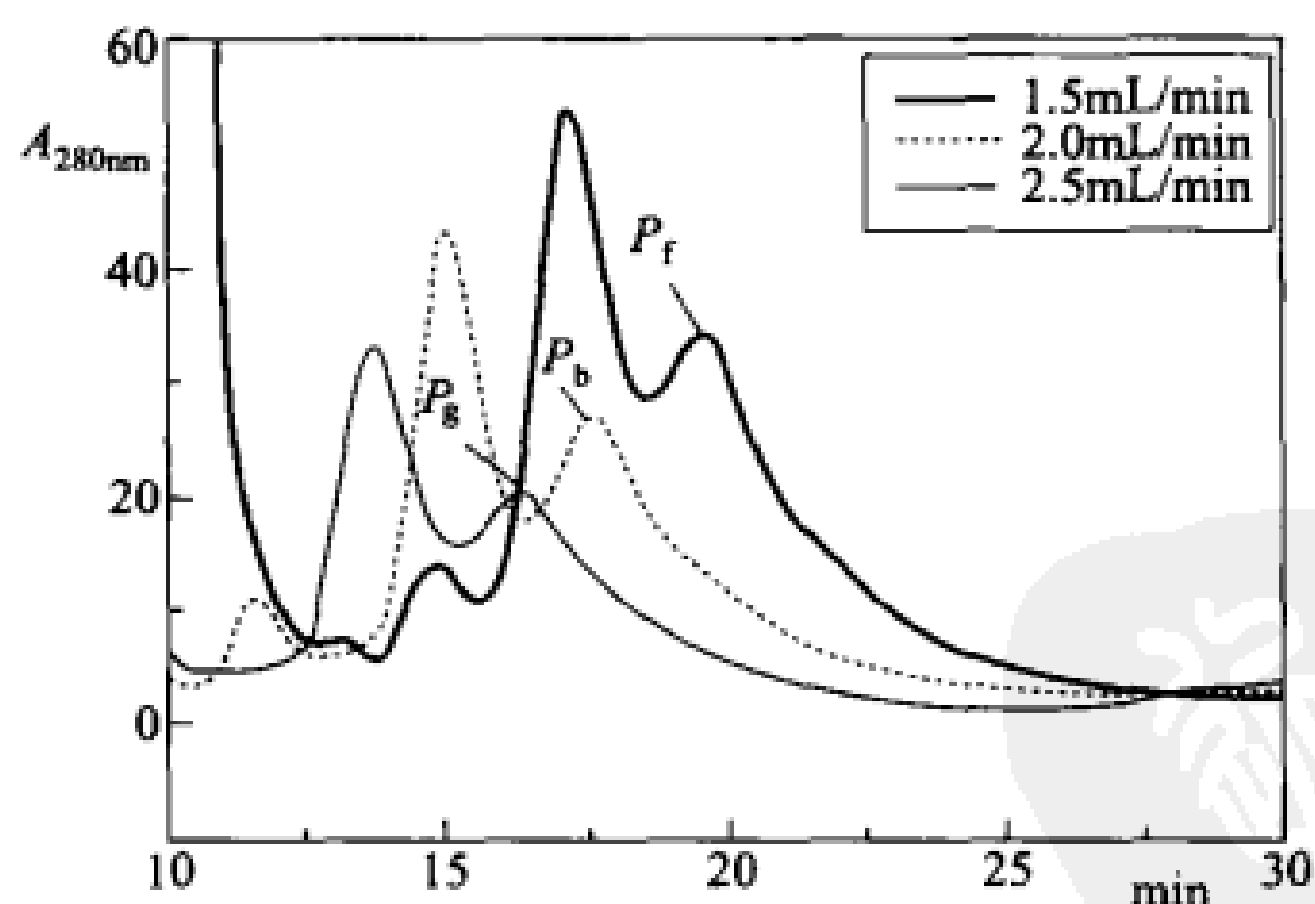


图 10.6 水蛭素 12 肽的反相高效液相色谱纯化图

10.6.2 疏水作用色谱

10.6.2.1 HIC 的基本原理

疏水作用色谱 (HIC) 是一种借助于偶联在固定载体上的疏水基团与蛋白质 (或核酸) 表面发生疏水作用而对样品组分进行分离的技术, 是利用样品中各组分不同的疏水性质来进行分离的方法。20 世纪 60 年代初, 有人已注意到疏水物质可作为柱色谱填料用于分离生物大分子。1961 年, Gillam 等人曾报道采用苯甲乙氨

乙基纤维素纯化核酸 t-RNA。尽管当时没有给这种方法一个确切的名称，然而用疏水填料分离纯化生物大分子，特别是蛋白质分子的工作已开始得到重视，这方面的报道也逐年增多。1973年，瑞典科学家 Hjerten 正式命名该方法为疏水作用色谱法 (hydrophobia interaction chromatography, HIC)。HIC 使用的流动相通常是具有较高浓度的盐析盐水溶液，在分离过程中能够保持蛋白质分子的生物活性，因此被广泛应用于受体、血清蛋白、核蛋白、疫苗等生物分子的分离纯化。通常认为蛋白质在 HIC 中分离主要取决于疏水，而疏水作用被视为一种间接熵效应，很难通过一个确切的势能函数被规范化地表达出来；另外，柱温、pH 值、配基类型和密度、盐的种类及浓度等诸多因素皆可影响色谱保留行为，因此目前对于 HIC 分离机制尚无一个统一认识。为此人们提出了许多理论来解释 HIC 保留机理。

10.6.2.2 HIC 的影响因素

在 HIC 中，固定相表面呈弱疏水性，流动相为高离子强度盐溶液，在这样的两相条件下，蛋白质分子中疏水部分与弱疏水性固定相表面的作用力增大而被吸附。逐渐降低流动相的离子强度，蛋白质按其疏水性的大小被依次洗脱，疏水性小的先洗脱，疏水性大的后洗脱。在洗脱过程中，高盐浓度对大多数蛋白质的活性没有损害。根据 HIC 的分离机理，影响 HIC 分离的主要因素有以下几点。

(1) 固定相的疏水特性 首先固定相要具有明显的疏水特性，对蛋白质的作用不附带静电引力、范德华力和氢键等；另一方面其表面疏水基团的密度又必须适中，要比反相高效液相色谱固定相低得多，对蛋白质的吸附为中等强度，密度太高会对蛋白质产生不可逆吸附。

(2) 流动相的离子强度 流动相一般为无机盐溶液，如硫酸铵等，它们对蛋白质分子的空间结构和生物活性几乎没有影响。降低流动相的离子强度，洗脱能力增强。流动相的起始离子强度对分离有明显的影响，离子强度大，结合能力增强，容量因子也大，选择性好，柱效高。

(3) pH 值 中性 pH 有利于保持蛋白质分子的空间结构和生物活性，pH 变化可以改变蛋白质分子的溶解度和吸附特性。当 pH 由 4 增大至 9 时，大多数蛋白质的疏水性会减弱，有利于洗脱，因此经典 HIC 普遍采用降低离子强度同时适当增大 pH 的办法来分离蛋白质。随着 HIC 的发展，硅胶被广泛用作固定相基质，鉴于 $\text{pH} > 7$ 时，硅基固定相会逐渐溶解而流失，因此更多地采用中性缓冲溶液，如磷酸盐体系、乙酸盐体系。

(4) 温度 对大多数蛋白质来说，在一定范围内，温度升高会增大保留值，但同时降低蛋白质分子的溶解度，破坏其生物活性。一般 HIC 只要求在相对稳定的室温下进行，而不必严格控制流动相和柱子的温度。

10.6.2.3 高效疏水作用色谱

经典 HIC 分离速度慢，效率低。寻求高强度、高效能的疏水作用色谱固定相已成为生物化学家和色谱工作者的目标。高效疏水作用色谱 (high performance

hydrophobic interaction chromatography, HP-HIC) 由此应运而生并不断发展。目前广泛使用的 HP-HIC 固定相有以下几种。

(1) 基于排阻色谱固定相的烷基化合成

1980 年, Pfannkoch 等人提出, 在高盐浓度条件下, 排阻色谱固定相对蛋白质有弱疏水作用。1983 年, 日本科学家 Kato 等人通过缩水甘油醚将丁基或苯基键合到亲水性的排阻色谱固定相 TSK-GEL3000SW 表面, 成功地制成了世界上第一个 HPHIC 固定相, 并使之商品化。

(2) 基于大孔硅胶包被后进行烷基化合成

直接在大孔硅胶表面键合一层亲水性聚合物, 再将烷基共价键合到亲水层上, 烷基可以是羟基丙基、丙基、苄基、异丙基、苯基和戊基等。

(3) 基于硅胶的聚胺键合

将弱疏水性的聚胺共价键合到硅胶表面形成疏水位点。聚胺键合相会残留正电荷的基团, 但由于位阻效应, 这种阴离子交换性质极其微弱, 实验中基本上不表现其活性。聚胺键合相稳定性好, 可在强酸性 (pH 2.0) 流动相条件下使用。

(4) 基于硅胶键合聚乙二醇

采用缩水甘油丙氧基三甲氧基硅烷先将大孔硅胶活化成环氧基硅胶, 然后覆盖聚乙二醇分子。研制的键合相具有分离效率高、酶活力回收率高和较高的样品负荷量。

10.6.2.4 高效疏水作用色谱的主要特点

① 利用蛋白质和固定相的弱疏水作用, 流动相从高离子强度向低离子强度洗脱, 条件温和, 不破坏蛋白质分子的生物活性;

② 固定相刚性好, 耐高压, 因此可采用高效液相色谱装置, 操作简单快速, 分离效率高, 而且重现性好;

③ 柱容量较大, 一般分析柱即可进行蛋白质的制备。

10.6.2.5 高效疏水作用色谱的发展

针对生物大分子特别是要求活性的蛋白质分子的分离和纯化, HP-HIC 正担起愈来愈重要的作用。但也必须看到, 近年来, 大量有关 HP-HIC 的报道主要还是涉及生物制品中个别蛋白质的精制。对较复杂的多种天然蛋白质的分离提纯, 则尚未有成功的实例。而在生物工程中经常需要从复杂的混合体系中分离出某些生物活性物质, 这就对 HP-HIC 提出了更高的要求。为了适应生物工程的这一要求, 进一步提高柱对复杂样品中多种蛋白质的分辨能力, 扩展柱的制备容量是 HP-HIC 的发展方向。因此, 生物化学家和色谱工作者正致力于以下两方面的工作: 一是在现有固定相的基础上发展与分析柱具有近似分离效率的制备柱, 特别注意发展那种既可进行分析又可直接制备的小尺寸柱, 使之一柱多用; 二是继续研制新的 HP-HIC 固定相, 特别是高效、高样品回收率、能保持样品生物活性并且价格比较低廉的固定相。

10.6.2.6 高效疏水作用色谱标准设计模式

(1) 高效疏水作用色谱纯化多肽和蛋白质常用的缓冲溶液

磷酸二氢钾缓冲液, 50mmol/L, pH 7.0

乙酸/乙酸钠缓冲液, 50mmol/L, pH 6.5

(2) HPLC 缓冲液的准备 所有使用的缓冲盐和水应尽可能高纯, 避免在分离过程引入新的不纯物, 同时还必须兼容检测器。溶剂纯度直接影响其紫外线吸收效应, 截止波长红移, 不利于检测。

水、缓冲盐溶液必须采用 $0.45\mu\text{m}$ 的水系纤维膜或尼龙膜过滤, 超声波或真空脱气。所有使用的酸, 如己酸、磷酸都有较强的酸性和腐蚀性, 使用时应注意防护, 避免进入眼睛及体内, 并加以小心, 防止浓酸溶液接触皮肤及衣物。

(3) 肽类及蛋白质样品准备 肽类及蛋白质样品必须完全溶解, 不留沉淀, 否则应加入一些助溶剂(酸、碱、盐及有机溶剂)以辅助溶解。样品溶解后, 最好离心以除去不溶性颗粒物。

(4) 仪器要求

泵 二元梯度泵系统, 工作压力不小于 30 MPa, 可用梯度程序控制, 流速稳定, 耐高盐流动相。

检测器 分离纯化蛋白质及多肽样品, 常用紫外检测器, 也可使用二极管阵列检测。对于高丰度蛋白质甚至可以考虑使用示差折光检测器。如要考察分离过程中微量多糖的残留状况, 有时必须考虑使用蒸发光散射检测器分流检测和收集。

进样阀 由于采用高压分离模式, 要求特殊进样装置, 一般使用高压六通进样阀, 配置 $500\mu\text{l}$ 定量环。

注意事项(色谱柱及预处理)

① 打开包装, 认真阅读色谱柱使用说明书, 注意轻拿轻放, 避免机械及热冲击。

② 取出色谱柱, 如有可能, 使用保护柱或在线过滤柱。

③ 连接色谱柱, 首先通过说明书或色谱柱性能报告确认色谱柱内的运输保存液, 依据保存液的种类, 使用能与保存液完全兼容的溶液低流速(正常使用流速的 $1/5$) 运行 2h, 直到柱压稳定, 基线平稳。

④ 更换成 50mmol/L pH7.0 磷酸二氢钾缓冲液, 调整流速为正常流速, 运行 30min, 直到柱压稳定, 基线平稳。

⑤ 更换成 3mol/L 硫酸铵溶液/50mmol/L pH 7.0 磷酸二氢钾缓冲液, 调整流速为正常流速, 运行 30min, 直到柱压稳定, 基线平稳。

⑥ 上样运行。

⑦ 运行结束后, 使用纯水运行系统至少 30min, 清除系统内的缓冲盐。

⑧ 长期不使用时, 必须进行防腐处理, 如加入 0.1% 叠氮钠。注意保湿, 防止色谱柱床干枯。每隔一定时间应定期使用 0.1% 叠氮钠低流速运行 30min。

(5) 色谱柱选择

依据不同的化学表面, 疏水作用介质的疏水性按如下顺序依次升高: 醚基型 (ether)、聚丙烯二醇基 (PPG)、苯基 (phenyl)、丁基 (butyl)、己基 (hexyl)。蛋白质在高盐浓度时吸附在树脂上的吸附强度与树脂疏水性直接相关。选择合适的疏水作用介质, 无机盐的用量可以降低到最低, 活性收率最高。高疏水性的己基 (Hexyl) 和丁基 (Butyl) 常用来分离低疏水性的蛋白, 醚基型 (Ether) 常用来纯化疏水性很强的蛋白质, 如单克隆抗体和膜蛋白, 这两种蛋白会和其他疏水介质结合得非常牢固而导致回收率低 (见图 10.7)。

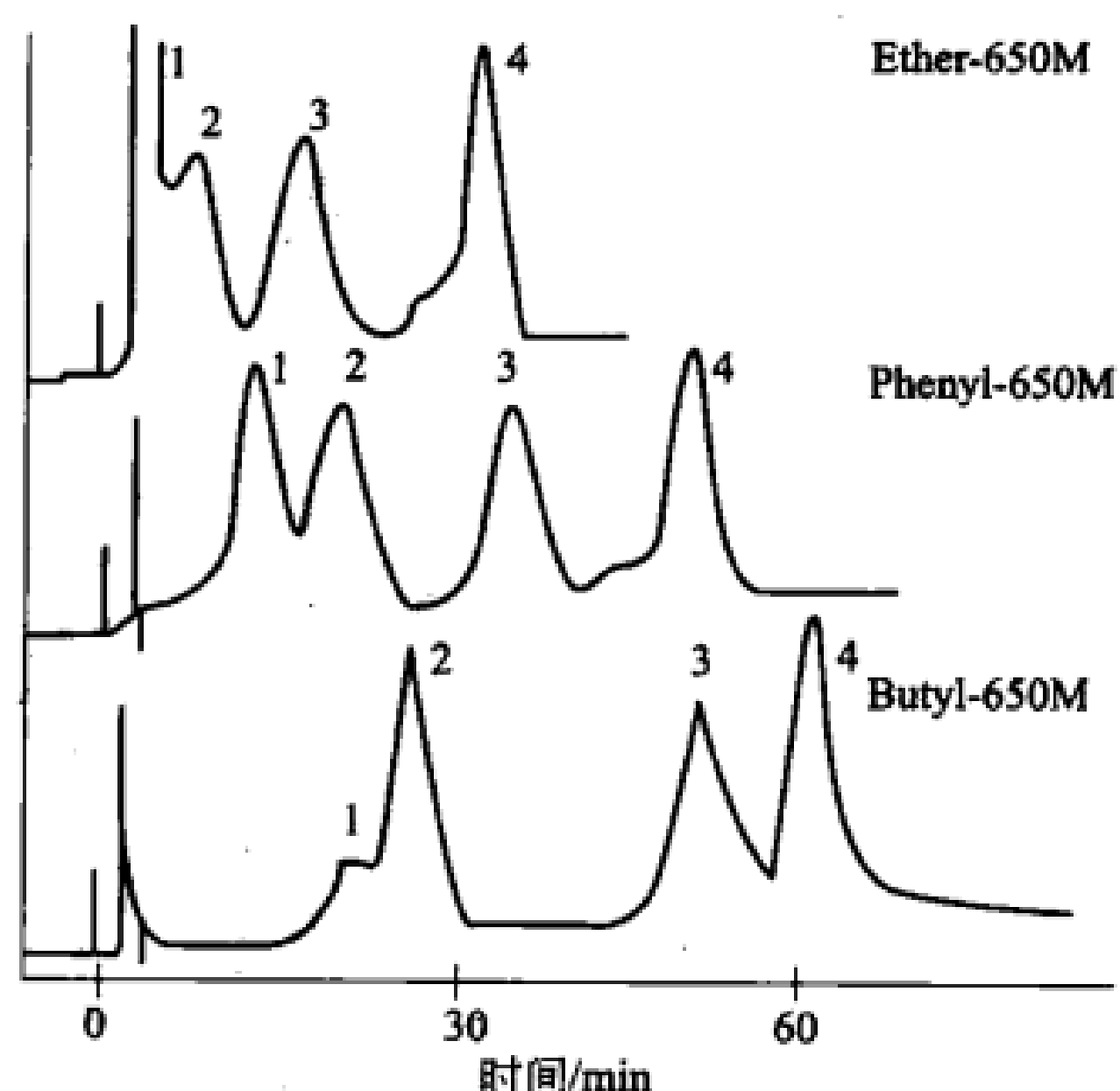


图 10.7 选择不同疏水介质蛋白质的保留时间

方案 10.5 高效疏水作用色谱分离纯化四种蛋白质纯品

材料

二元梯度高效液相色谱系统

HIC 色谱柱, 250mm×8mm, 粒度 5 μ m, 孔径 50nm, 丁基缩水甘油醚型样品, 四种标准蛋白质溶液: 细胞色素 c、核糖核酸酶、卵清蛋白、糜蛋白酶原

流动相 A: 3mol/L 硫酸铵/50mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液, pH 7.0

流动相 B: 50mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液, pH 7.0

方法

1. 基本条件。

检测波长: 280nm

色谱柱温: 30 $^{\circ}$ C

2. 梯度程序 (见表 10.11)。

表 10.11 梯度程序

时间/min	流速/(mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%	梯度模式
0	2	100	0	线性
5	2	100	0	线性
30	2	0	100	线性
40	2	0	100	线性

3. 结果见图 10.8。

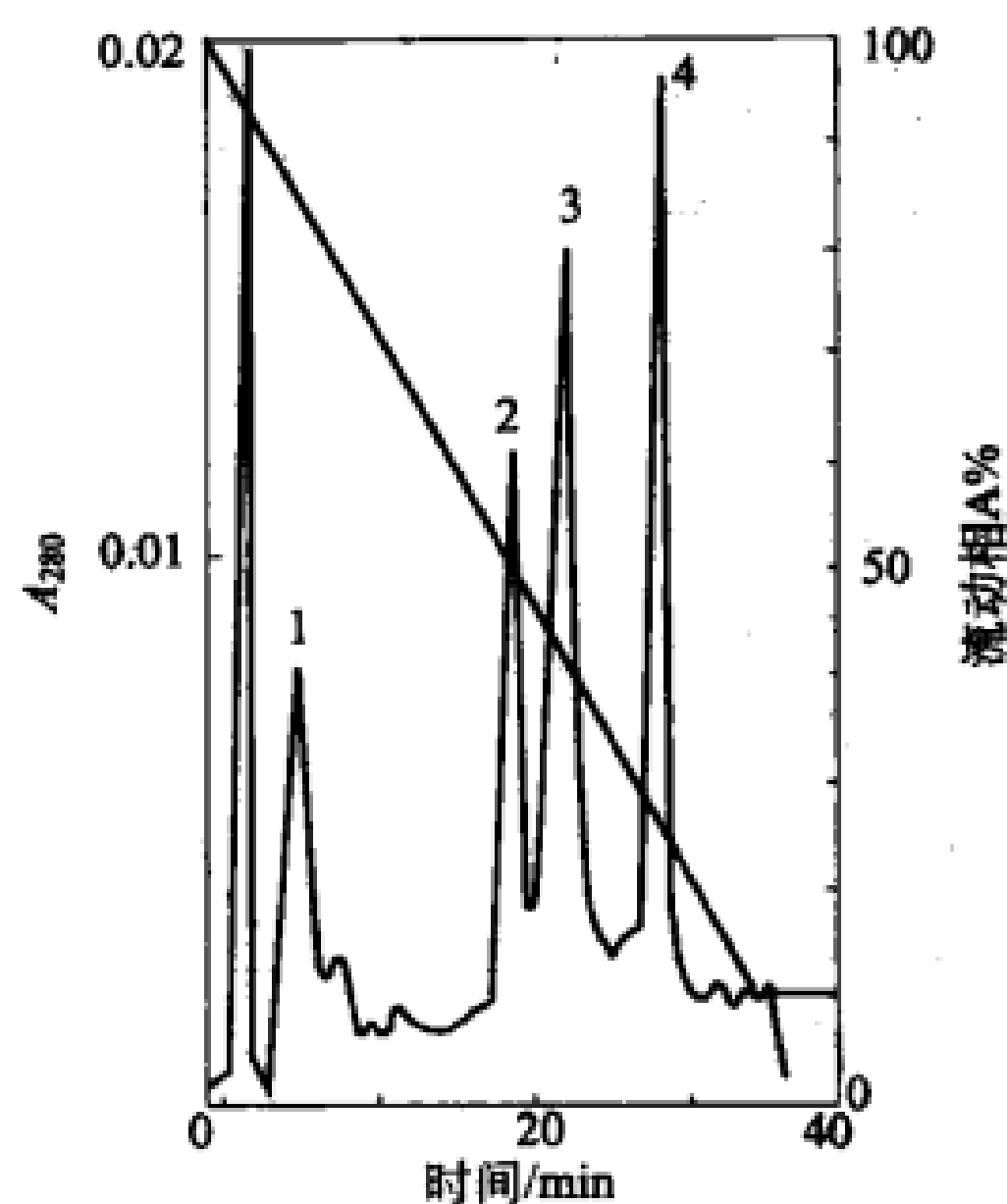


图 10.8 细胞色素 c、核糖核酸酶、卵清蛋白、糜蛋白酶原分离纯化色谱图

方案 10.6 人唾液蛋白的高效疏水色谱分离纯化

材料

二元梯度高效液相色谱系统

HIC 色谱柱, XDF2SGM 型疏水柱 100mm×4mm

样品: 唾液经低温离心, 取上清液通过滤膜 (0.45 μ m), 冻干, 低温保存备用

流动相 A: 3mol/L 硫酸铵/50mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液, pH 6.5

流动相 B: 50mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液, pH 6.5

方法

1. 基本条件。

检测波长: 280nm

色谱柱温: 30 $^{\circ}$ C

2. 梯度程序 (见表 10.12)。

表 10.12 梯度程序

时间/min	流速/(mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%	梯度模式
0	2	100	0	线性
5	2	100	0	线性
40	2	0	100	线性
45	2	0	100	线性

3. 结果见图 10.9。

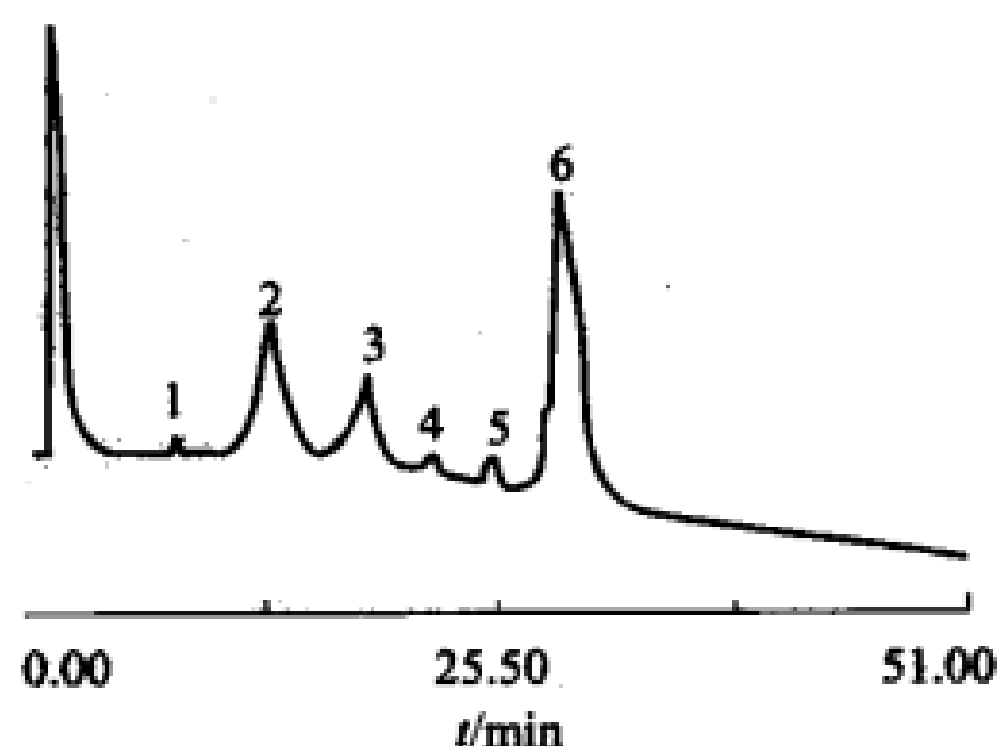


图 10.9 人唾液蛋白的高效疏水色谱分离图

方案 10.7 疏水作用色谱法同时纯化及复性基因重组人干扰素

简介

众所周知，基因重组蛋白质复性时，最大的副反应是蛋白质相互间结合产生沉淀，造成了复性效率的低下。若能有效地避免沉淀产生，就可以明显地提高复性效率。在使用透析法进行蛋白质复性时，由于透析袋中蛋白质浓度较高，复性时蛋白质容易相互结合产生大量沉淀，复性效率明显降低。用大量溶液进行稀释的复性方法，因减少了蛋白质间相互结合的机会，明显减少了蛋白质的沉淀数量，所以复性效率比透析法高。由于疏水作用色谱对蛋白质形成疏水核，更加适合于重组蛋白质的复性。

材料

二元梯度高效液相色谱系统

HIC 色谱柱，Biosep HIC，疏水柱 100mm×4mm

样品：包涵体裂解液

流动相 A：3mol/L 硫酸铵/50mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液，pH 7.0

流动相 B：50mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液，pH 7.0

方法

1. 基本条件。

检测波长：280nm

色谱柱温：30℃

2. 梯度程序（见表 10.13）。

表 10.13 梯度程序

时间/min	流速/(mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%	梯度模式
0	1	100	0	线性
20	1	0	100	线性

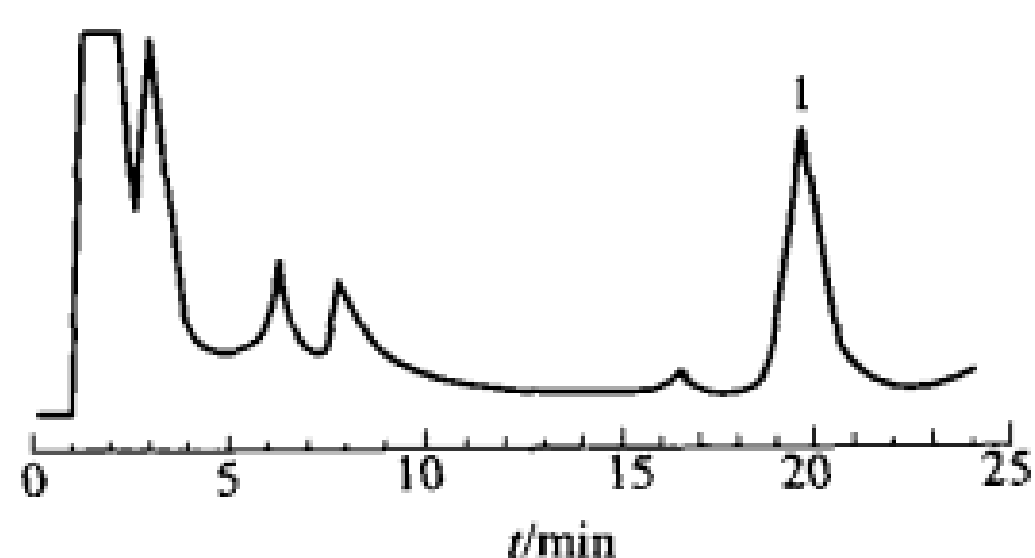


图 10.10 疏水法同时纯化及复性
基因重组人干扰素色谱图

3. 结果见图 10.10。

复性后活性回收率比稀释复性和透析复性高 1.0 倍和 1.6 倍，明显提高了产品的活性回收率，同时纯化后样品的体积又不会明显地增加，这对工业生产特别有用。

10.6.3 高效离子交换液相色谱法纯化蛋白质分子

10.6.3.1 高效离子交换液相色谱柱的选择

如果蛋白质的等电点小于 7，则采用阴离子交换色谱模式，选择阴离子交换色谱柱；如果蛋白质的等电点大于 7，则采用阳离子交换色谱模式，选择阳离子交换色谱柱。

在阴离子交换中，带有较多负电荷的蛋白质分子将被固定相表面上的带正电荷的氨基吸附。相反，在阳离子交换中，带有较多正电荷的蛋白质分子将吸附到固定相表面带负电荷的羧基或其他酸性基团上。绝大部分使用的离子交换柱比反相柱要更短一些。一般 5cm、10cm、15cm、25cm 长的色谱柱具有相似的分度，主要取决于蛋白质分子的电荷差异，在有效容量范围内，分离度与色谱柱长度无关。因此高效离子交换液相色谱柱常选择短一些的色谱柱。依据样品量选择色谱柱的内径，一般 4.5mm×25cm 的高效离子交换液相色谱柱的负载容量是 10mg 左右的蛋白质分子。

注意事项（高效离子交换液相色谱柱的维护）

- ① 打开包装，认真阅读色谱柱使用说明书，注意轻拿轻放，避免机械及热冲击。
- ② 取出色谱柱，如有可能使用保护柱或在线过滤柱。
- ③ 连接色谱柱，首先通过说明书或色谱柱性能报告确认色谱柱内的运输保存液，依据保存液的种类，使用能与保存液完全兼容的溶液低流速（正常使用流速的 1/5）运行 2h，直到柱压稳定，基线平稳。
- ④ 更换成流动相 A，调整流速为正常流速，运行 30min，直到柱压稳定，基线平稳。
- ⑤ 更换成流动相 B，调整流速为正常流速，运行 30min，直到柱压稳定，基线平稳。运行色谱过程中的初始流动相，平衡系统，直到柱压稳定，基线平稳。
- ⑥ 上样运行。运行结束后，用水冲洗掉缓冲盐后，柱子应当保存在 50% 的甲醇里，绝不允许柱子干了。柱子反压力的增大常常暗示色谱柱入口阻塞，此时应断开检测器，反过来用梯度冲洗。
- ⑦ 长期不使用时，必须进行防腐处理，如加入 0.1% 叠氮钠。注意保湿，防止色谱柱床干枯。每隔一定时间应定期使用 0.1% 叠氮钠低流速运行 30min。

10.6.3.2 蛋白质分子的检测

检测波长可采用肽键吸收波长 210~220nm。此波长吸收与蛋白质中肽键的数目成正比。对于含有生色基团（酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸等）的蛋白质分子，也

可考虑采用波长 280nm 检测。固定波长、可变波长或二极管阵列检测器都可使用。固定波长检测器和可变波长检测器相对更为实用。

10.6.3.3 高效离子交换液相色谱缓冲液的制备

所有的缓冲盐、有机溶剂、促溶剂、去污剂和水都必须是高度洁净的，最好是高效液相级的。为了确保离子交换色谱过程的可重复性，缓冲液的 pH 值必须精确到 0.1 个 pH 单位之内。调节 pH 应当在所有的缓冲组分完全溶解并且过滤以后进行。为了减少离子交换缓冲液中细菌的生长，每一种缓冲液可适当加入 2%~5% 的甲醇，或将色谱柱存放到冰箱里。实验用水应当过滤且脱气。实际上，缓冲液应当每天都重新制备，保证新鲜。如果使用挥发性的缓冲液或有机溶剂，过滤后则应该考虑这些组分的挥发，适当增加这些成分的量。

10.6.3.4 高效离子交换液相色谱法蛋白标准品

蛋白质必须完全溶解在色谱过程的初始缓冲液或较低的离子强度的缓冲液里。如果能观察到浑浊，说明没有完全溶解，可适当加入如尿素、有机溶剂（甲醇、丙醇）或去污剂（十二烷基硫酸钠，CHAPS）等促进蛋白的溶解。为了去除不溶性的微粒，所有样品应当在上样前离心或过滤。

卵白蛋白
糜蛋白酶原
核糖核酸酶 A
溶菌酶
A 乳清蛋白
蒸馏水
室温孵育 1h。

对于阴离子交换高效液相色谱法，用 0.02mol/L Tris-hcl 稀释蛋白标准品溶液 10 倍。

对于阳离子交换高效液相色谱法，用 0.02mol/L 磷酸钠稀释蛋白标准品 10 倍。

10.6.3.5 常见问题与处理

高效离子交换液相色谱柱能够不可逆性地吸附蛋白质直到吸附位点被所有蛋白质分子所覆盖。这可能是导致高效离子交换液相色谱法分离时蛋白质分子回收率低的一个主要原因。因此，一般并不推荐使用保护柱。

由于许多有机和无机混合物在 200~220nm 处吸光，因此使用高效液相级的促溶剂、有机溶剂、去污剂和水非常必要。

用于制备和储存缓冲液的玻璃器皿必须保证无去污剂，因为很少量的去污剂就能够导致超强吸附而毒化色谱柱，同时造成样品污染。

方案 10.8 高效阴离子交换液相色谱法

1. 色谱柱处理。新订购或以前用过的离子交换柱在使用之前，仔细去除所有

吸附蛋白。

对于阴离子交换柱，用10倍柱体积的脱气水来去除柱子里的储存溶剂；

对于聚合的离子交换柱，再用10倍柱体积的强（pH 8~10）盐缓冲液冲洗；

对于硅胶基型的离子交换柱，用pH值7~8之间的强盐缓冲液冲洗。

2. 室温下以合适的流速，用50% 0.2mol/L Tris-HCl (pH 7.5) Tris/氯化钠缓冲液平衡阴离子交换柱20min。

色谱柱内径/mm	建议流速/(mL/min)	色谱柱内径/mm	建议流速/(mL/min)
1	0.05~0.1	4	0.5~1.0
2	0.12~0.25		

3. 用至少10倍体积的0.2mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液运行色谱柱。

4. 运行空白梯度程序（见表10.14）。

表 10.14 空白梯度程序

时间/min	流速/(mL/min)	缓冲液	曲线
0	1	10% Tris/氯化钠缓冲液	线性变化
20	1	75% Tris/氯化钠缓冲液	线性变化
25	1	75% Tris/氯化钠缓冲液	线性变化
30	1	10% Tris/氯化钠缓冲液	线性变化
45	1	10% Tris/氯化钠缓冲液	线性变化

设置合适的检测波长，如210~220nm，并依据待分离的蛋白质分子的质量设置合适的检测器灵敏度范围或记录仪范围。空白运行时，如有明显的信号出现，说明色谱柱内可能有残留污染，或缓冲液里有污染物。

如果污染物峰持续存在，柱子应当用10倍柱体积的蒸馏水冲洗，然后用10倍柱体积的50%甲醇、蒸馏水、0.2mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液连续冲洗。

重复空白运行直到出现基线平稳满意为止。

5. 上样运行。先进蛋白质处理液，如0.2mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液，运行一次色谱过程，并做好记录。运行蛋白质样品时，对照此次记录，收集蛋白质分子的信号部分。

6. 离子交换蛋白标准品5000g离心5min。吸取5 μ L蛋白混合物上样，开始色谱分离过程，收集蛋白质分子组分。为了提高蛋白质混合物的分离度，可适当调节梯度斜率，改变梯度方式、梯度时间等。

方案 10.9 高效阳离子交换液相色谱法

1. 色谱柱处理。新订购或以前用过的离子交换柱在使用之前，仔细去除所有吸附蛋白。

对于阳离子交换柱，用10倍柱体积的脱气水来去除柱子里的储存溶剂；

对于聚合的离子交换柱，再用 10 倍柱体积的强 (pH 8~10) 盐缓冲液冲洗；对于硅胶基型的离子交换柱，用 pH 值 7~8 之间的磷酸钠缓冲液冲洗。

2. 室温下以合适的流速，用 1:1 体积比的 0.2mol/L 磷酸钠 (pH 6.0): 0.2mol/L 磷酸钠 (pH 6.0) 磷酸钠/氯化钠缓冲液平衡阳离子交换柱 20min。

色谱柱内径/mm	建议流速/(mL/min)	色谱柱内径/mm	建议流速/(mL/min)
1	0.05~0.1	4	0.5~1.0
2	0.12~0.25		

3. 用至少 10 倍柱体积的 0.2mol/L 磷酸钠 (pH 6.0) 运行色谱柱。

4. 运行空白梯度程序 (见表 10.15)。

表 10.15 空白梯度程序

时间/min	流速/(mL/min)	缓冲液	曲线
0	1	10% 磷酸钠(pH 6.0)磷酸钠/氯化钠	线性变化
20	1	80% 磷酸钠(pH 6.0)磷酸钠/氯化钠	线性变化
25	1	80% 磷酸钠(pH 6.0)磷酸钠/氯化钠	线性变化
30	1	10% 磷酸钠(pH 6.0)磷酸钠/氯化钠	线性变化
45	1	10% 磷酸钠(pH 6.0)磷酸钠/氯化钠	线性变化

设置合适的检测波长，如 210~220nm，并依据待分离的蛋白质分子的数量设置合适的检测器灵敏度范围或记录仪范围。空白运行时，如有明显的信号出现，说明色谱柱内可能有残留污染，或缓冲液里有污染物。

如果污染物峰持续存在，柱子应当用 10 倍柱体积的蒸馏水冲洗，然后用 10 倍柱体积的 50% 甲醇、蒸馏水、0.2mol/L 磷酸钠 (pH 6.0) 缓冲液连续冲洗。

重复空白运行直到出现基线平稳满意为止。

5. 上样运行。先进蛋白质处理液，如 0.2mol/L 磷酸钠 (pH 6.0) 缓冲液，运行一次色谱过程，并做好记录。运行蛋白质样品时，对照此次记录，收集蛋白质分子的信号部分。

6. 离子交换蛋白标准品 5000g 离心 5min。吸取 5 μ L 蛋白混合物上样，开始色谱分离过程，收集蛋白质分子组分。为了提高蛋白质混合物的分离度，可适当调节梯度斜率，改变梯度方式、梯度时间等 (结果见图 10.11)。

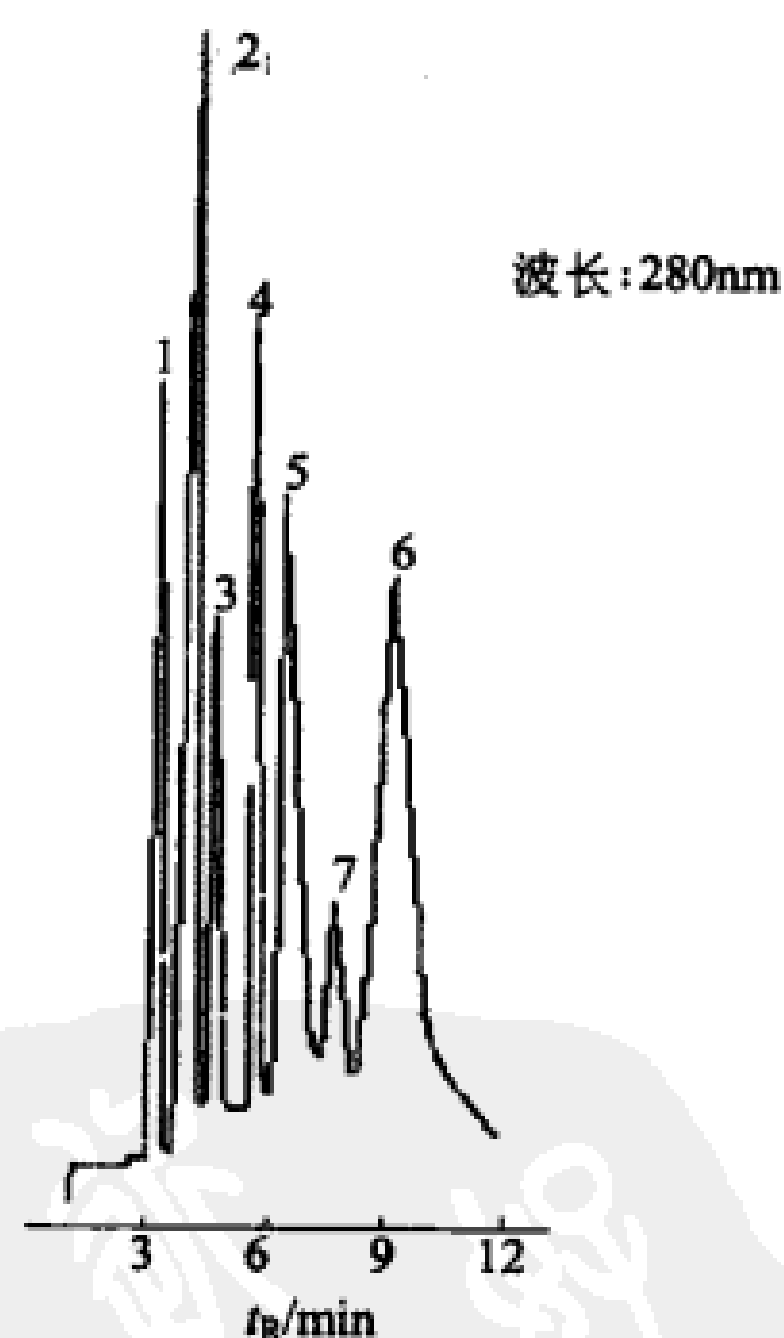


图 10.11 标准蛋白质样品离子交换色谱分离图

方案 10.10 高效离子交换色谱法分离皖南尖吻蝮蛇毒活性组分

材料

二元梯度高效液相色谱系统

紫外检测器

六通进样阀

离子色谱柱, DEAE-8HR, 粒径 $5\mu\text{m}$

流动相 A: 0.2mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液

流动相 B: 0.2mol/L Tris-HCl (pH 8.0)/0.5mol/L 氯化钠缓冲液

方法

1. 基本条件。

检测波长: 280 nm

2. 梯度程序 (见表 10.16)。

表 10.16 梯度程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	100	0
5	100	0
6	90	10
60	0	100
70	0	100

3. 色谱结果见图 10.12。

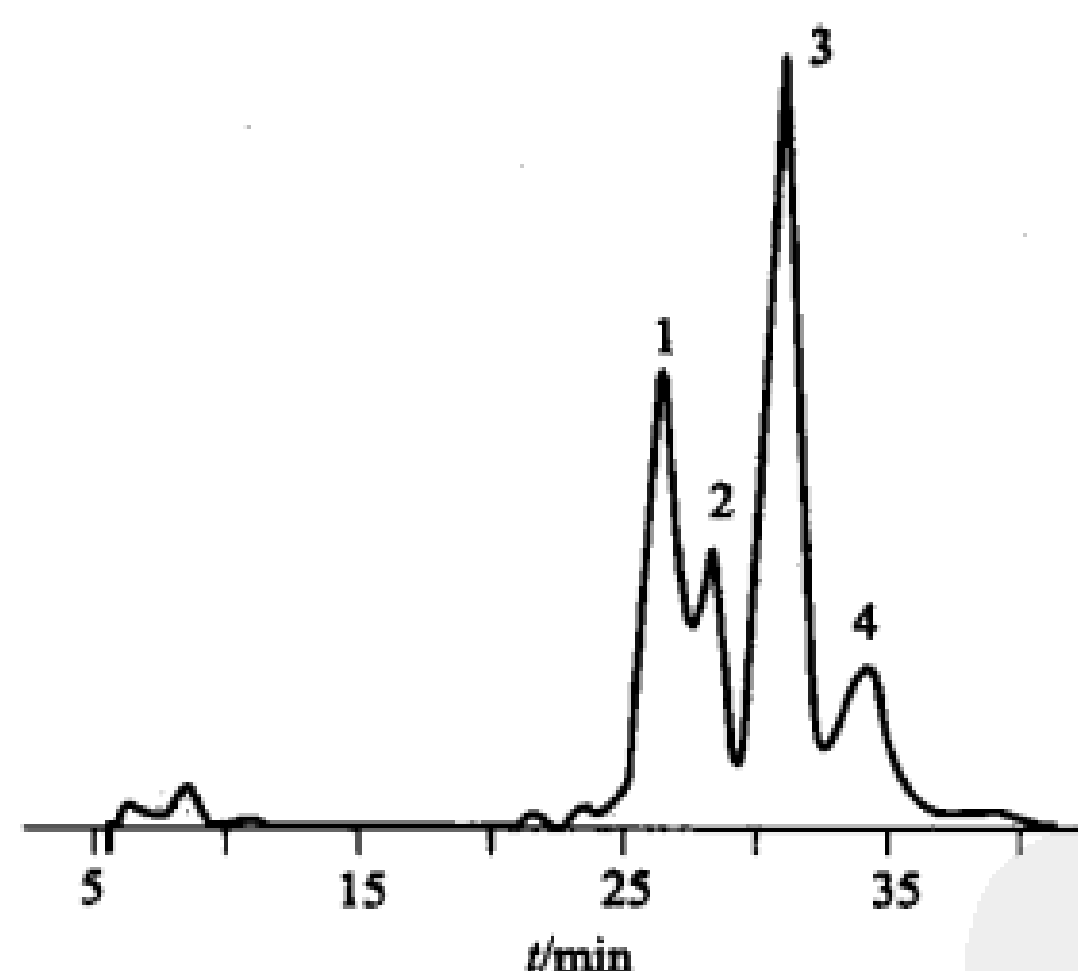


图 10.12 高效离子交换色谱法分离皖南尖吻蝮蛇毒活性组分图

用高效离子交换色谱法分离分析样品时, 必须注意色谱柱的清洗和再生, 待色谱柱在起始流动相中达到平衡后才上样, 否则样品不易与色谱柱结合而被冲洗下来。

方案 10.11 高效离子交换色谱 (HPIEC) 分离经 HPHIC 分离后的微粒体 P450

材料

二元梯度高效液相色谱系统

紫外检测器

六通进样阀

离子色谱柱, DEAE-5PW, 粒径 $5\mu\text{m}$, $7.5\text{mm}\times 75\text{mm}$

流动相 A: 0.2mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液内含 20% 甘油和 0.4% EMULGEN911

流动相 B: 0.2mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液内含 20% 甘油和 0.4% EMULGEN911/0.5% 氯化钠缓冲液

方法

1. 基本条件

检测波长: 405nm

流速: $0.5\text{mL}/\text{min}$

2. 梯度程序 (见表 10.17)。

表 10.17 梯度程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	100	0
40	0	100

3. 色谱结果见图 10.13。

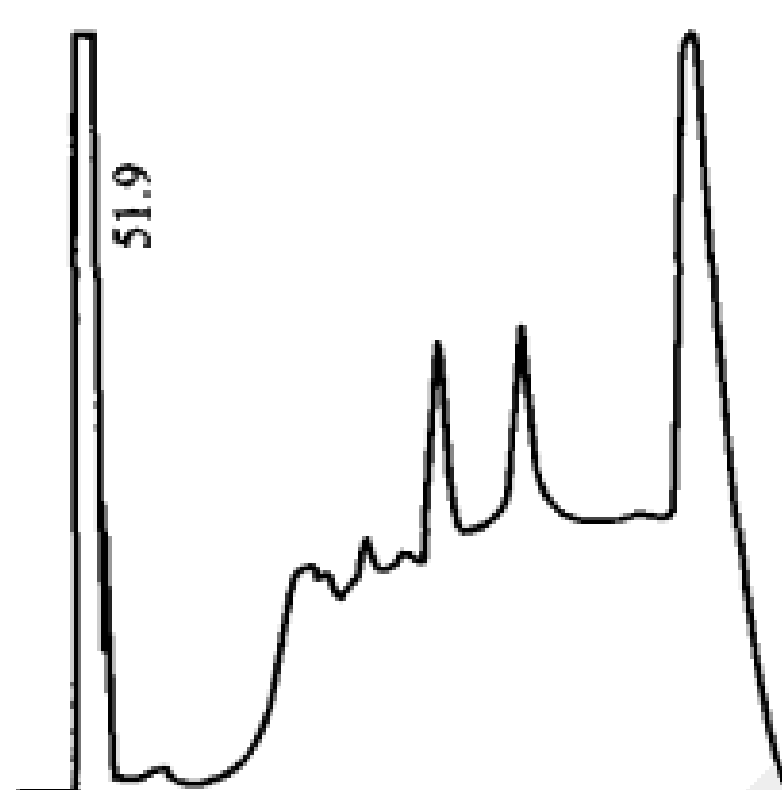


图 10.13 HPIEC 分离经 HPHIC 分离后的微粒体 P450

10.6.4 高效排阻液相色谱法纯化蛋白质分子

10.6.4.1 引言

高效排阻液相色谱法是按照分子大小从小到大的顺序来分离蛋白的。蛋白质分子混合物通过具有一定孔径的固定相色谱基质时, 由于分子大小的区别, 分子进入固定相基质内孔的程度不同, 因而所需的时间不同, 从而实现蛋白质分子的分离纯化。这种以分子大小为基础的色谱过程也称为体积排阻色谱。

10.6.4.2 固定相及选择

高效排阻液相色谱法中所使用的固定相是一种表面惰性的多孔球, 含有许多不

同尺寸的孔穴或立体网状结构。允许直径小于孔径的蛋白质分子组分进入，这些孔对于流动相分子来说是相当大的，以致流动相分子可以自由地扩散。对不同大小的组分分子，可分别渗入到凝胶孔内的不同深度。大组分分子只能渗入到凝胶的大孔内，但进不了小孔，甚至于完全被排斥。小组分分子，大孔小孔都可以渗进去，甚至进入很深。因此，大组分分子在色谱柱中停留时间较短，很快被洗出，保留时间很短，小组分分子在色谱柱中停留时间较长。

排阻色谱分离的基础是不同分子大小的组分进入填料内孔深度的不同。因此，选择和搭配具有不同孔径、色谱性能良好的填料是很重要的，填料孔径大小应与试样分子量的大小相适应。

根据填料的来源不同，可分为有机和无机填料两大类。前者如交联聚苯乙烯凝胶，后者如多孔硅胶和多孔玻璃等。交联聚苯乙烯凝胶是目前使用最多的一种填料，用它装填的色谱柱渗透性好，柱效高，但不宜长期在高温条件下使用。硅胶、多孔玻璃等无机填料，耐高温、机械性能稳定，但它们的共同缺点是其表面的吸附物性，由于表面的剩余羟基产生的活性中心，对一些极性物质有吸附作用，因而扰乱了排阻色谱分离的机理，这就要求完全的化学硅烷化处理，以消除表面残留羟基的影响。

用高效体积排阻液相色谱法分离蛋白质混合物依赖于混合物里各成分的分子量。分子大于固定相基质内孔径的所有蛋白质分子组分将不能被分离而被同时洗脱，因为它们无法进入固定相基质内孔，只经过柱内的固定相之外的空隙。这种因分子过大而完全不能进入固定相孔内的最小组分的分子量，定义为该固定相的排阻极限。凡是比此分子量大的蛋白质分子，均被排斥于所有的胶孔之外，因而它们将以一个单一的谱带出现，这些蛋白质组分的洗脱时间称为系统的死时间。其保留体积 V_0 称为死体积。很明显， V_0 是柱中凝胶颗粒之间的体积。随固定相不同，排阻极限范围约在 $400 \sim 60 \times 10^6$ 之间。同样，当蛋白质分子小于固定相的最小孔径时，这些分子将能够完全进入固定相的所有空间，因而它们最后离开色谱柱，其保留体积代表固定相的孔内体积和系统死体积。它们中分子量最大组分的分子量定义为填料的渗透极限。只有分子质量介于上述两个极限之间的蛋白质分子，能根据它们的分子大小，部分进入孔隙，使这些蛋白质分子按分子量渐次降低的次序被分离。所以，在选择固定相时，首先考虑待分离蛋白质分子的分子量范围，选择排阻极限适合此范围的色谱固定相。

10.6.4.3 分子量测定

排阻色谱法中，保留时间与分子量呈函数相关，经验表明，在一定的分子量范围内，保留时间与蛋白质分子的分子量的对数成正比。因此可以通过使用标准分子量的蛋白质分子运行并由此绘出分子量标准曲线，依据样品的保留时间即可得到样品蛋白质分子的分子量。当蛋白质分子与固定相基质表面发生静电或疏水反应时，洗脱体积将不再直接反映其相应的分子量。在这种情况下，估计的分子量由于一些

因素而减小。当使用硅基固定相时，低离子强度缓冲液可能产生离子排斥，导致提前洗脱和分子量的估计过高。为了避免这些反应，色谱过程必须考虑减少这些反应。如添加有机溶剂（10%甲醇）、增大离子强度、增加胺盐（0.01%三乙胺）、改变 pH 值来减小静电荷。在变性剂和去污剂（胍-氯化氢、尿素、十二烷基硫酸钠）存在的情况下运行高效排阻的液相色谱时，蛋白质分子处于变性状态，其分子量将不同于无添加剂的水性缓冲液中所测得的数值。

10.6.4.4 排阻色谱流动相

用高效体积排阻液相色谱法分离蛋白质混合物依赖于混合物里各成分的分子量。因此使用的流动相，仅仅作为试样的载体而不应与试样本身或填料有任何的相互作用，即不存在吸附或分配作用。要求能完全溶解试样，在分离温度下黏度低，与检测器匹配等。如不考虑蛋白质分子与固定相之间的非主流相互作用，常采用水溶性的缓冲液作为流动相。

10.6.4.5 材料与溶液

缓冲液制备水和盐必须是高效液相色谱级的，用于制备和储存缓冲液的玻璃器皿必须是彻底完全洁净的。低波长检测时任何污染物都可能增加背景吸收，影响检测。

(1) 高效体积排阻液相色谱缓冲液 (1L)

3mol/L 乙酸钠(pH 5.6)	6.7mL	纯净水	963.3mL
5mol/L 氯化钠 NaCl	30mL		

0.45 μ m 的微孔滤膜过滤，溶液除气。

(2) 高效体积排阻液相色谱蛋白标准品

甲状腺球蛋白

过氧化氢酶

牛血清白蛋白

卵白蛋白

核糖核酸酶 A

高效体积排阻液相色谱缓冲液

轻柔混匀。

蛋白必须完全溶解，眼视检测应无浑浊或微粒存在，所有样品必须在上样前离心。

方案 10.12 高效体积排阻液相色谱基本操作程序

1. 用经脱气处理过的高效液相级的水和 1.0mL/min 流速，冲洗色谱柱 30min，以便清洗去除储存溶剂。

2. 用经脱气处理过的高效体积排阻液相色谱缓冲液和 1.0mL/min 流速，室温

下平衡色谱柱 (0.75cm×30cm) 30min, 直到基线稳定。

连续连接两支或多支色谱柱能够增加色谱分离效率, 必须降低流速, 这样可以提高分离度 40%, 但保留时间将会延长一倍。

3. 空白运行。上样 100 μ l 缓冲液, 运行色谱分离过程。

检测波长设定为 210~220nm。

4. 高效体积排阻液相色谱蛋白标准品 2000g, 离心 5min。取 100 μ l 溶液进入系统, 运行色谱分离过程, 重复步骤 3。

大于空白信号值 2.5 倍信号的洗脱峰表明为蛋白质分子吸收信号。

5. 收集每一个洗脱峰。

方案 10.13 重组人粒细胞集落刺激因子分子量测定

材料

高效液相色谱系统

紫外检测器

六通进样阀

高效体积排阻液相色谱柱, Bio-Sil 250, 粒径 7 μ m, 7.8mm×300mm

流动相 A: 0.05mol/L 磷酸盐 (pH 6.8) 缓冲液内含 0.15mol/L 氯化钠

方法

1. 基本条件。

检测波长: 280nm

流速: 1.0mL/min

2. 蛋白质溶液标准分子量 (见表 10.18)。

表 10.18 蛋白质溶液标准分子量

蛋白质分子	分子量	蛋白质分子	分子量
牛 γ -球蛋白	158000	马肌红蛋白	17000
牛血清白蛋白	66000	甲状腺球蛋白	外水体积检测, 670000
鸡卵清蛋白	44000	VB12	内水体积检测, 1350

3. 色谱结果见图 10.14。

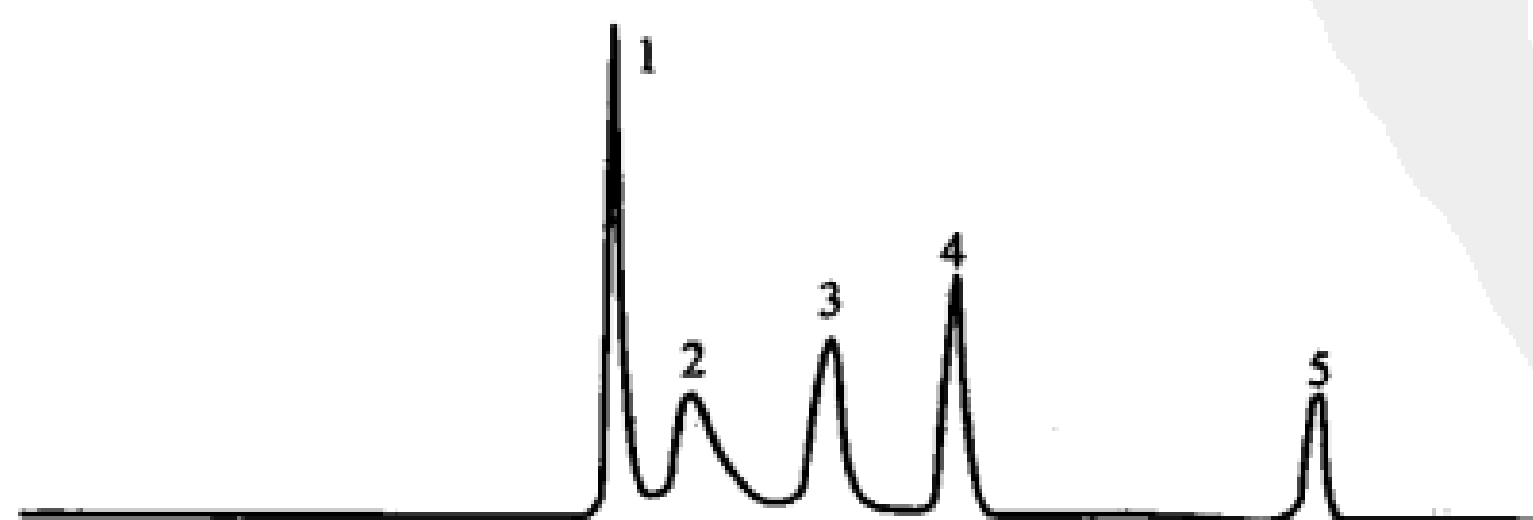


图 10.14 重组人粒细胞集落刺激因子分子量测定

参 考 文 献

- [1] Knut Wagner, Tasso Miiotis, Gyolrgy Marko-Varga, et al. *Anal Chem*, 2002, 74: 809-820.
- [2] Roy D Rocklin, Roswitha S Ramsey, J Michael Ramsey. *Anal Cem*, 2000, 72: 5244-5249.
- [3] 师治贤, 王俊德. 生物大分子的液相色谱分离和制备. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [4] 郭立安. 高效液相色谱法纯化蛋白质理论与技术. 西安: 陕西科学技术出版社, 1993.



第 11 章 毛细管电色谱及其在蛋白质分离纯化中的应用

11.1 毛细管电色谱

毛细管电色谱 (capillary electrochromatography, CEC) 是在毛细管中填充或在毛细管壁上涂布或键合色谱固定相, 然后在毛细管的两端施加高压直流电, 在电场作用下产生电渗流 (electroosmotic flow, EOF), 流动相依靠电渗流或电渗流结合压力流推动流动相, 使中性的和带电荷的溶质分子, 根据它们在色谱固定相和流动相间吸附、分配平衡常数的不同和电泳速率的不同达到分离。毛细管电色谱将毛细管电泳的高效和液相色谱的高选择性有机融合在一起, 使其具有高效、高选择性、微量和快速的特点。

11.2 毛细管电色谱技术历史回顾

毛细管电色谱是在毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 和微柱高效液相色谱 (micro-HPLC) 的基础上发展起来的新的分离技术。

1981 年, Jorgenson 和 Lukacs 发表了在这一领域具有里程碑意义的工作。他们采用 170mm(内径)×68cm 的硼硅酸玻璃毛细管, 浆法填充 10mm ODS 填料 58cm, 以乙腈为流动相, 在毛细管的两端施加 30kV 的高压, 首次用毛细管电色谱分离了毛细管区带电泳难于分离的两种中性化合物 9-甲基蒽和芘, 理论塔板数分别为 31000 和 23000, 他们提出了电渗流与柱填充的状况无关的观点。Jorgenson 和 Lukacs 的开创性工作和卓越的预见, 为这一新技术领域早期的发展奠定了基础。

1987 年, J. H. Knox 和 I. H. Grant 对电色谱的分离模式进行了分类, 他们认为在电渗流驱动下, 开管中液流为塞式流, 不同于压力驱动下的抛物线形液流, 因此具有较高的分离效率。

1988 年, T. Tsuda 描述了 CEC 理论塔板数的方程, 从理论上解释了 CEC 比 HPLC 有较高分离效率的事实, 为 CEC 的发展提供了理论基础。

1992 年, Yamamoto 在 680mm×50mm 的石英毛细管内填充 1.6mm 的 ODS 填料, 对不保留的组分硫脲得到 243000/680mm 的理论塔板数。

从 1993 年起, 发表的 CEC 论文数量显著增加, CEC 已经成为国际毛细管电泳大会讨论的重点专题。虽然它的发展历史并不很久, 但其理论、技术和应用的研究正在迅速发展, 已有商品化仪器问世, 并在有机小分子分离、环境分析、药物分析和生化分析等方面得到应用 (罗国安等, 2005; 操时杰, 2001)。在蛋白质、核酸、氨基酸、多肽及糖类生命科学中一类重要的复杂生物大分子的分离分析中, 毛细管电色谱效果已经得到了公认 (Bandilla 和 Skinner, 2004; Li 等, 2004)。近年来, 制备型电色谱 (preparative electrochromatography, 一种将液相色谱与电动现象结合而形成的新型制备分离技术, 同时也是将毛细管电色谱放大到生产规模的制备型色谱) 的研发成为一个大家关注的问题, 人们在制备型电色谱的技术和理论上已做了不少努力 (Basak 等, 1995; Cole 等, 1995; Tellez, 等, 2000; Keim 等, 2000; Liu 等, 2001)。电动驱动方法 (电渗和电泳) 作为一种很有潜力的分离手段, 被应用于促进溶质在固定相孔内和表面液膜的传质上, 而这两种传质过程被认为是压力驱动色谱中主要的速率控制步骤。目前, 大多数制备型电色谱都是将外部电场应用于纵向的体积排阻色谱中, 这种体积排阻色谱表现出较好的蛋白质分离性能。毛细管电色谱与质谱 (MS)、样品预浓集方法等联用技术的出现, 能提供精确分子量和结构信息、灵敏度增高等功能, 为复杂的蛋白样品的定性、定量分析提供了强有力的工具。

11.3 毛细管电色谱基本分离模式

毛细管电色谱按其色谱柱采用的固定相性质不同, 可分为正相、反相、离子交换及体积排阻等分离模式。色谱分离的机理与高效液相色谱相同, 并采用液相色谱的固定相。反相模式的固定相有化学键合型 C_8 、 C_{10} 和 C_{18} 。正相固定相以硅胶为主, 还有氰基、氨基及醇基化学键合的极性固定相。离子交换模式的固定相是以离子交换基质为主。排阻模式是采用多孔硅胶和聚合物作固定相。目前反相毛细管电色谱的分离模式是采用最多的模式。总之, 毛细管电色谱的多种分离模式, 给样品的分离提供了不同的选择条件, 这对复杂样品尤其是生物样品体系的分离分析十分重要。

目前, 毛细管色谱柱的类型主要有开管柱 (open-tubular capillary)、填充柱 (packed column capillary) 和整体柱 (monoliths)。

11.3.1 开管柱电色谱

开管柱是将固定相化学键合或物理涂渍在毛细管的内壁上而制备的。目前制备方法有三种: 涂渍聚合物固定相、表面粗糙化后键合固定相和溶胶-凝胶技术。这类柱子柱效高, 但柱容量小, 分离中无传质阻力, 不需压力推动。开管柱电色谱 (OTCEC) 一般采用 $10\mu\text{m}$ 左右毛细管柱, 散热很快, 焦耳热效应很小。OTCEC 中没有塞子, 因而没有塞子效应。气泡产生于塞子与填料、塞子与检测窗口的交界

处，OTCEC 中没有塞子和填料，因而不易产生气泡，即使产生气泡，也可以用高压液体将气泡排出，而对柱子没有任何损害。此外，OTCEC 中没有填料，因而没有涡流扩散，能够获得比 PCCEC 更高的柱效；OTCEC 中的电渗流流速比 PCCEC 中的大 60%，因此 OTCEC 更适于快速分析。由此可见，OTCEC 分析复杂混合物样品具有很大潜力。目前 OTCEC 分离的物质还局限于小分子有机化合物，主要是多环芳香烃化合物。随着柱制备方法的不断改善，具有不同选择性的固定相，甚至蛋白质、抗体或抗原等具有特殊选择性的物质均有可能键合到毛细管管壁上，OTCEC 能分离的化合物将越来越多。而 OTCEC 综合了两者的优点，它必将在生物领域中显示出广阔的应用前景。

11.3.2 填充柱电色谱

填充柱是将固定相采用匀浆填充法、拉伸填充法和电动填充法固定在毛细管内。填充柱制备的重要技术是在柱子进出口端，为防止填充床移动的塞子的制备。塞子一般是用填料与水玻璃在高温下烧结而成的。由于塞子与固定相之间存在非均匀性因素，而会产生气泡，引起色谱谱带的展宽，严重影响分离效率，甚至会导致 CEC 操作的失败。填充柱电色谱 (PCCEC) 近年发展很快，但要使 PCCEC 进一步从实验室走向应用，必须解决三个难题：一是焦耳热效应，二是塞子效应，三是气泡效应。为了应对如上所述的填充柱制作方面面临的挑战，陈磊等 (2009) 提出了将磁场力引入毛细管电色谱，发展磁场固定色谱柱床和柱筛的新方法。通过在填充柱的出口端和进口端分别放置磁铁，具有磁响应性的色谱填料颗粒被磁场力固定，形成填充均匀的柱床或者柱筛。

11.3.3 整体柱电色谱

整体柱也称无塞连续床柱，包括聚合物型和硅胶型整体柱，是利用有机或无机化合物在毛细管内聚合反应制备 CEC 柱的新方法。常用的方法是将功能单体和交联剂、致孔剂混合溶液注入毛细管内，在光引发或热引发的条件下发生原位聚合反应而制得整体柱 (Gong 等, 2008)。整体柱的最大优点是避免了填充柱制塞子的麻烦，制柱操作简单，柱子的通透性能、作用活点及柱的选择性都可以通过合成材料及聚合条件的选择而改进，目前整体柱的突出不足是柱效相对较低。Regnier 等 (2000) 报道了 COMOSS (collocated monoliths support structures) 的整体柱模式，采用深度反应离子刻蚀技术 (deep reactive ion etching, DRIE) 在芯片上制成高深宽比 ($10\mu\text{m}/1.5\mu\text{m}$) 的 32 条微通道，总宽度为 $120\mu\text{m}$ ，这些微通道将芯片分割成很多个 $5\mu\text{m}\times 5\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$ 结构的固定相。微通道数目最多可达 4096 条，总宽度为 1.2cm，COMOSS 密度超过 $4000000/\text{cm}$ 。

COMOSS 是具有与填充柱中硅球尺寸相当的固定相。与填充柱相比，COMOSS 具备下述特点：每个微结构都连接通道的顶和底，具有力学稳定性，位置不会随流动相移动而产生变化；通道尺寸由制作者预先设计，固定单元在整个通道中

均匀有序地分布，与填充过程无关。同时，COMOSS 也与开管柱类似，使用时需进行表面修饰，但它具有比开管柱大得多的表面积和更高的相比。

11.3.4 CEC 分离模式的选择

CEC 是 HPLC 与 CE 两种分离技术的有机结合，最佳的 CEC 条件的选择，将最大程度显现 CEC 的高效和高选择性的特点。

根据溶质化合物性质选择 CEC 的分离模式和固定相后，选择适合的流动相和操作条件进行 CEC 分析。在 CEC 中典型的流动相为含有电介质的有机溶剂与缓冲溶液。有机溶剂的组成和浓度是调节分离选择性和保留值的主要参数。流动相中电介质浓度通过对双电层厚度的影响，从而产生对电渗流的影响，提高电介质浓度，一般会使电渗流速度下降。流动相的 pH 值对电渗流也有重大影响，一般而言，随着缓冲液 pH 值增大，系统的电渗流增大，溶质的表观迁移速度加快，从而可实现快速分析。在 CEC 中，电压和温度都是重要操作参数，增加电压可以增大电渗流速度，缩短分析时间，但过高电压（一般大于 1000V/cm）又易产生气泡，中断电流，导致实验失败。温度也有与电压类似的影响效果，一般温度在 30℃。

11.3.5 CEC、CE 和 HPLC 的对照分析

11.3.5.1 和 CE 相比 CEC 的优势

CEC 和 CE 相比，其最大的优点是 CEC 既可以像 CE 一样分离带电荷的物质，也可以分离中性物质或两者的混合物，而无需像毛细管胶束电动色谱（micellar electrokinetic capillary chromatography, MEKC）那样添加表面活性剂以形成胶束。对于中性化合物，在 CEC 中完全是通过它们的色谱性质的差异而获得分离，如果分析样品是荷电物质，其分离机制有色谱分配、电泳两种，从而又可能通过两者适当的搭配达到所需的选择性。MEKC 因其含有非挥发性的表面活性剂，与质谱联用时有困难。其次，对于电泳淌度相近的物质，CE 无法分离，而这些物质在 CEC 中的分配性质可能差异很大，就可以利用 CEC 分离 CE 无法分离的化合物。

另外，在 HPLC 中应用于手性分离的手性试剂几乎完全适用于 CEC。

11.3.5.2 和 HPLC 相比 CEC 的优势

HPLC 给用户提供了不同口径的柱子和种类繁多的填料，所有这些 HPLC 的财富都为 CEC 的发展提供了良好的条件。由于 CEC 采用电渗流（EOF）为驱动力，流型更接近于塞式流（plug-like flow），而 HPLC 的流型属抛物线状的层流（laminar flow），在壁上的速度为零，中心速度为平均速度的数倍，导致色谱带的展宽和柱效的降低。降低柱子的直径，如采用微柱 HPLC（microbore HPLC），或采用更小的填料可以提高柱效，但是会导致极高的背压（back pressure），对填料的粒径有限制，而且对泵的要求极高。CEC 柱不存在柱压降，可以使用 1mm 左右粒径大小的填料，进样量少，仅为几纳升，溶剂耗费低，分析时所需的平衡时间短。在检测方面，CEC 采用柱上检测，使检测的死体积很小，这是 CEC 分离效率

高于 HPLC 的又一因素。

11.3.5.3 CEC 面临的问题

CEC 经过十几年的发展, 在分析领域得到了很大的应用, 但是世界上不存在完美的事物, 从事 CEC 研究的科学工作者都不可避免地受到一些限制。

① 焦耳热与气泡的产生。采用较高的电压可以提高分析速度, 但焦耳热也随之增加, 过热使柱子产生气泡, 进而中断电流导致分析过程的终止。采用气体或导热良好的液体作散热介质、在柱子两端加压、增加有机溶剂在流动相中的比例、对流动相作彻底的脱气处理、使用电导率低的两性电解质缓冲液 (zwitterionic buffer, 比如 MES、Tris 等) 代替磷酸或硼酸盐缓冲等方法可在一定程度上解决散热的问题。制备型电色谱的放大必须面临一些问题, 尤为突出的问题也是如何排除电流引入的焦耳热和电解气。

② 检测的灵敏度。CEC 柱的内径一般在 50~320mm, 这也就是柱上光度法检测时的光程, 这个距离较短, 所以检测器的灵敏度要低于 HPLC。

③ 定量分析的精密度。受进样重现性等方面因素的影响, CEC 精密度较 HPLC 差, 在定量分析方面还不能满足应用的需要。

11.4 毛细管电色谱在蛋白分离分析中的新技术

11.4.1 在线样品预浓集-毛细管电色谱联用技术

在进行 CEC 柱上检测时, 光程比较短, 通用型的紫外检测器虽然能够达到很低的质量检测限, 但是样品的浓度检测限仍然比较高, 这在一定程度上限制了 CEC 在实际样品痕量分析方面的应用。如果没有高灵敏度的检测器如激光诱导荧光、质谱, 一种更可行的办法是通过一些在线样品富集技术 (on-line sample concentration technique)。利用在线富集技术, 不需要对仪器进行任何改动就可以将检测灵敏度提高数十倍甚至上千倍。在 CEC 中最常用的在线富集方法有: 色谱富集和场放大样品堆积 (field-amplified sample stacking, FASS)。对于稀浓度的样品溶液, 引入到色谱柱后, 由于固定相本身的吸附作用, 样品会吸附在固定相上实现富集。如果使用洗脱能力较弱的缓冲液配制样品, 进样后样品保留在柱头, 然后使用高洗脱能力的流动相洗脱, 则样品会被压缩为一条很窄的区带, 这样柱效就会大大提高。这种富集作用同 HPLC 中的富集原理相似, 为色谱富集。对于带电荷的样品, 将样品溶解于低电导的溶液中, 并使样品溶液在高电导缓冲液中运行。

在使用电进样方法进样后, 样品区带电阻大, 电场强度比较高, 样品离子就会迅速移动穿越低导区域, 到达低导区域和高导缓冲液区域交接处时, 迁移速度迅速降低, 形成一条窄的样品区带, 实现富集的目的, 这种方法称为场放大样品堆积。Liang 等将压力驱动毛细管电色谱 ($3\mu\text{m}$ C_{18} 填充) 与电喷雾质谱联用, 为了提高

检测灵敏度，利用场放大样品堆积和色谱富集两种作用，对样品进行在线富集。经过富集，虽然重现性有所损失，但检测灵敏度提高了 20~100 倍。对胰岛素分析，检测浓度可达到 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Liang, 2005)。

11.4.2 毛细管电色谱-质谱联用技术在蛋白分离分析中的应用

毛细管电色谱为纳升级技术，适合与质谱 (MS) 方法联用。将 CEC 分离速度快，柱效高和样品、试剂用量少等特点与 MS 能提供精确分子量和结构信息、灵敏度高以及专属性强等功能相结合，为复杂生化、环境等样品的定性、定量分析提供了强有力的工具。

1993 年，Verheij 等 (1991) 首先开展了采用连续流动接口 (continuous flow interface, CF) 将“准电色谱”与 MS 结合的尝试性研究工作，随后不久他们也介绍了一种利用包层液接口 (sheath flow interface) 将“准电色谱”与电喷雾离子源质谱 (ES-MS) 联用的方法 (Hugener 等, 1993)。Schmeer 等 (1995) 利用 pCEC-ESI-MS 对多肽进行了类似的分离和检测。Wu 等 (1996, 1997) 使用开管毛细管电色谱与飞行质谱联用技术进行在线超快速肽混合物分析，他们采用溶胶法制备反相开管柱，并对表面进行修饰，使其在酸性缓冲液中的电渗流大大增加，并显著降低了肽与柱壁间的非特异性吸附。在全质量范围检测 (速度为 8Hz)，可以保证快速分析的柱效基本不变。Gucek 等 (2000) 采用毛细管电色谱-电喷雾质谱 (CEC-ESI-MS) 对肽的混合物进行分析，检测灵敏度可达到阿摩尔 (attomole, 10^{-18}mol) 级。

11.5 毛细管电色谱基本术语和原理

11.5.1 电迁移和电渗、电渗流、电动现象、焦耳热效应

电渗是推动样品迁移的另一种重要动力。所谓电渗是指毛细管中的溶剂因轴向直流电场作用而发生的定向流动。

电渗是由定域电荷引起的。定域电荷是指牢固结合在管壁上，在电场作用下不能迁移的离子或带电基团。在定域电荷对溶液中的反号离子吸引下形成了所谓的双电层，致使溶剂在电场作用 (以及碰撞作用) 下整体定向移动而形成电渗流 (毛细管中的电渗流为平头塞状)。

焦耳热效应：由于在电泳或电色谱过程中毛细管两端加了高压电场，导致在缓冲溶液中产生焦耳热。焦耳热的存在会使毛细管中缓冲溶液的温度升高，过高的焦耳热效应可能会引起某些生物大分子的结构和生物特性的变化，甚至使毛细管缓冲溶液内产生气泡直至蒸干，同时，缓冲溶液温度的升高会降低其黏度，进而改变缓冲溶液的电渗速度，影响电泳过程中样品区带的形状，降低分离效率。

11.5.2 保留机制和分离机理

(1) 保留机制 CEC 保留机理包括两个方面：其一，如同 HPLC，基于溶质

在固定相和流动相间相互作用的不同；其二，如同 CZE，基于溶质电泳淌度的不同。由于电泳机理的参与，在 HPLC 中使用的容量因子 k' 已不能正确描述 CEC 的迁移行为。在电色谱中，溶质在流动相和电场作用下，其迁移速度 V 与电渗流速度、溶质的电泳速度及溶质在流动相与固定相之间的分配有关，其大小可用式(11-1)表示。

$$V = \frac{1}{K+1}(V_{ef} + V_{eo}) \quad (11-1)$$

式中， V 为溶质迁移速度； K 为溶质的柱容量因子，大小取决于溶质在固定相与流动相间的分配系数； V_{ef} 、 V_{eo} 分别为系统的电渗流和溶质的电泳速度。

中性物质 $V_{eo} = 0$ ，因此迁移速度为

$$V = \frac{V_{ef}}{1+K} \quad (11-2)$$

因此在毛细管电色谱中，离子型化合物保留机制既有电泳机制也有色谱分配机制，而对中性化合物则仅有色谱的分配机制。

(2) 分离机理 毛细管电色谱的分离机理包含了电泳分离机理和色谱分离机理。带电化合物由于其电泳淌度不同及在固定相和流动相分配系数不同，使迁移速度不同而实现分离。对于中性化合物，则是由于其在固定相和流动相之间吸附，分配系数不同、迁移速度不同而实现分离。

(3) 分离效率 在 CEC 中，溶质谱带展宽主要由以下三个独立的传质过程决定：涡流扩散、轴向分子扩散和溶质在流动相与固定相之间的传质阻力。用理论塔板数 (N) 或理论塔板高度 (H) 表示分离效率，可以用 van Deemter 方程描述影响谱带展宽因素对分离效率的影响。

$$H = Ad_p + B \frac{D_m}{V} + C \frac{Vd_p^2}{D_s} \quad (11-3)$$

式中， D_m 、 D_s 分别代表溶质在流动相和填充颗粒内部的扩散系数； V 、 d_p 分别代表流动相的线速度和填充颗粒的粒度； A 、 B 、 C 分别代表涡流扩散、轴向扩散及传质阻力的无量纲参数。

对于开管柱 CEC，涡流扩散项 Ad_p 等于零，对于填充柱 CEC，由于填料颗粒直径一般仅为 $1.5 \sim 3 \mu\text{m}$ ，同样可以忽略 Ad_p 项。在 CEC 条件下，流动相线速度不受填料粒度的影响，传质阻力引起的区带展宽很小，对塔板高度的贡献可以忽略。因此在理想状况下，影响 CEC 分离效率的因素就只有纵向扩散，这是 CEC 分离效率比 HPLC 高的根本原因。

11.6 毛细管电色谱仪器

11.6.1 毛细管电色谱仪器的基本要求

毛细管电色谱作为一种新型微分离分析技术，其分离过程具有多种机理协同作

用的特征，其理论研究也具有自身的特点，不仅要考虑系统的电属性，还需兼顾溶质的两相分配特征。因此，仪器的设计应满足以下要求：

- ① 能方便地设置和改变实验参数，系统响应灵敏、准确、及时；
- ② 能方便地装卸毛细管电色谱柱，最好是多通道且能灵活切换；
- ③ 高压电使用安全，对仪器其他部分无干扰；
- ④ 能消除或抑制气泡的形成；
- ⑤ 柱上检测且灵敏度高。

11.6.2 基本装置

毛细管电色谱的早期研究是在改装的 CE 商品仪器上进行的，随着研究的深入和对研究前景的良好预期，现在已有商品仪器既可进行电泳模式也可方便地进行电色谱研究。目前，主要是 Beckman 公司的 P/ACE 系列和 HP 公司的 HP3D 系列。美国通微技术 (Unimicro Technologies, Inc.) 公司在 2000~2004 年已推出电渗流和压力联合驱动的三代毛细管电色谱仪 (Trisep™ 2000, Trisep™ 2010, Trisep™ 2100)。毛细管电色谱的优势是能像 HPLC 那样进行梯度洗脱，使分离能力进一步提高。因此，有效的梯度洗脱是所开发仪器应有的重要功能。2006 年中科院大连化物所关亚风研究员负责的国家基金委仪器专项“微型基板式液相色谱/电色谱系统的研制”顺利通过验收。该系统具有以下特点：综合了高压和低压微流量输液泵的极限，高压达到 40MPa，低压泵输出最大流量 100 μ l/min；实现用商品 HPLC 泵微流量输液和梯度淋洗，等度运行时不增加溶剂消耗。已经证明梯度 pCEC 可以利用电压精细调节带电溶质的保留，提高分离选择性，缩短分离时间，为高效快速分离蛋白质开辟了新的途径，在蛋白质分离分析及蛋白质组学的研究中具有很大的应用潜力（经许可摘自 http://www.cas.cn/jzd/ljx2/200906/t20090608_619772.html）。

11.6.3 检测系统

毛细管电色谱技术的广泛应用与深入发展所面临的一个主要挑战是高灵敏度与多模式检测器的发展。现已商品化的检测器有紫外-可见光检测器、荧光检测器、激光诱导荧光检测器和质谱检测器等。其中紫外-可见光检测器是一种常规检测方法，是目前最普遍采用的一种毛细管电色谱检测方式。通常采用柱上 (on-column) 检测方式，即在毛细管柱塞后未填充的部分进行检测。荧光检测特别是激光诱导荧光检测是所有检测方法中灵敏度最高的一种方法。质谱法灵敏度高，专属性强，能提供分子结构信息和二级分离，是一种毛细管电色谱非常理想的检测器。微型基板式液相色谱/电色谱系统具有多种微型检测器，包括共聚焦小型激光诱导荧光检测器，检测灵敏度达到 pmol/L 级；基于共聚焦光路和正交式光路的自准式发光二极管诱导荧光微型检测器，对 FITC 的检测灵敏度达到 nmol/L 级；非接触电容偶合电导检测器及与发光二极管诱导荧光的复合检测器，毛细管电色谱的高效分离和

MS的高鉴定能力相结合,使得能用纳升(nL)级样品进行分子结构和分子量的准确测定,成为微量生物样品分离分析的强有力工具,特别是在多肽和蛋白质分离分析中,受到人们格外的青睐,已被用于核苷酸、核苷酸添加物、血浆、燃料、金属离子、肽、甾类化合物、药物以及氨基酸等样品的分析中。

方案 11.1 离子交换电色谱纯化蛋白质的研究

简介

本方案将以离子交换色谱耦合横向电场的方法,对卵清蛋白进行分离,对其处理量、分离效果等方面进行考察(苑巍,2005)。

材料

缓冲液 A: 10mmol/L Tris-HCl, pH 9.0

缓冲液 B: 10mmol/L Tris-HCl+1mol/L NaCl, pH 9.01

缓冲液 C: 20mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ +130mmol/L NaCl, pH 7.0

卵清蛋白样品: 样品于实验当天配制。称取 900mg 卵清蛋白充分溶于 300mL Buffer A 中, 4000r/min 离心 20min 除去部分不溶物, 所得上清液经 0.45 μm 滤膜过滤即得卵清样品。

分析色谱

横向电色谱系统 (pIEEC): ÄKTA Explorer 100 液相色谱仪, DYY-8C 电泳仪, JSC-01 接触器, 时间继电器, RDB-1 型蠕动泵, 三室横向电色谱柱, 120(40)mm \times 10mm \times 5mm(长 \times 宽 \times 高)等。

工作过程: 分离室与 ÄKTA Explorer 100 液相色谱仪连接, 样品/洗脱液由色谱仪泵入分离室, 与介质发生吸附/解吸作用(图 11.1), 流出液的电导率以及在 280nm 下的吸光度由色谱仪在线检测。横向电场由电极室中的电极提供, 电极与 DYY-8C 电泳仪、时间继电器和电流接触器串联组成闭合回路。电泳仪提供恒定电流, 时间继电器和电流接触器起到控制电流交变频率的作用。

方法

1. 离子交换电色谱分离过程

(1) 平衡用 10 倍柱体积以上的 Buffer A 上柱冲洗介质。

(2) 连续进样以 1.6mL/min 的流速将卵清样品连续泵入, 至溶质发生部分穿透, 收集样品。实验中采用的电流强度为 30mA, 交变周期为正向 10s, 反向 10s。

(3) 冲洗停止进样后, 用 Buffer A 冲洗介质, 除去柱中未被吸附的蛋白质, 冲洗 5 倍柱体积。

(4) 洗脱关闭电场, 用 Buffer A 和 Buffer B 按一定比例调配的离子强度梯度对吸附的蛋白质进行洗脱, 分别收集各洗脱峰。

(5) 再生先用 5 倍柱体积以上的 Buffer B 冲洗介质, 再用 Buffer A 冲洗至电

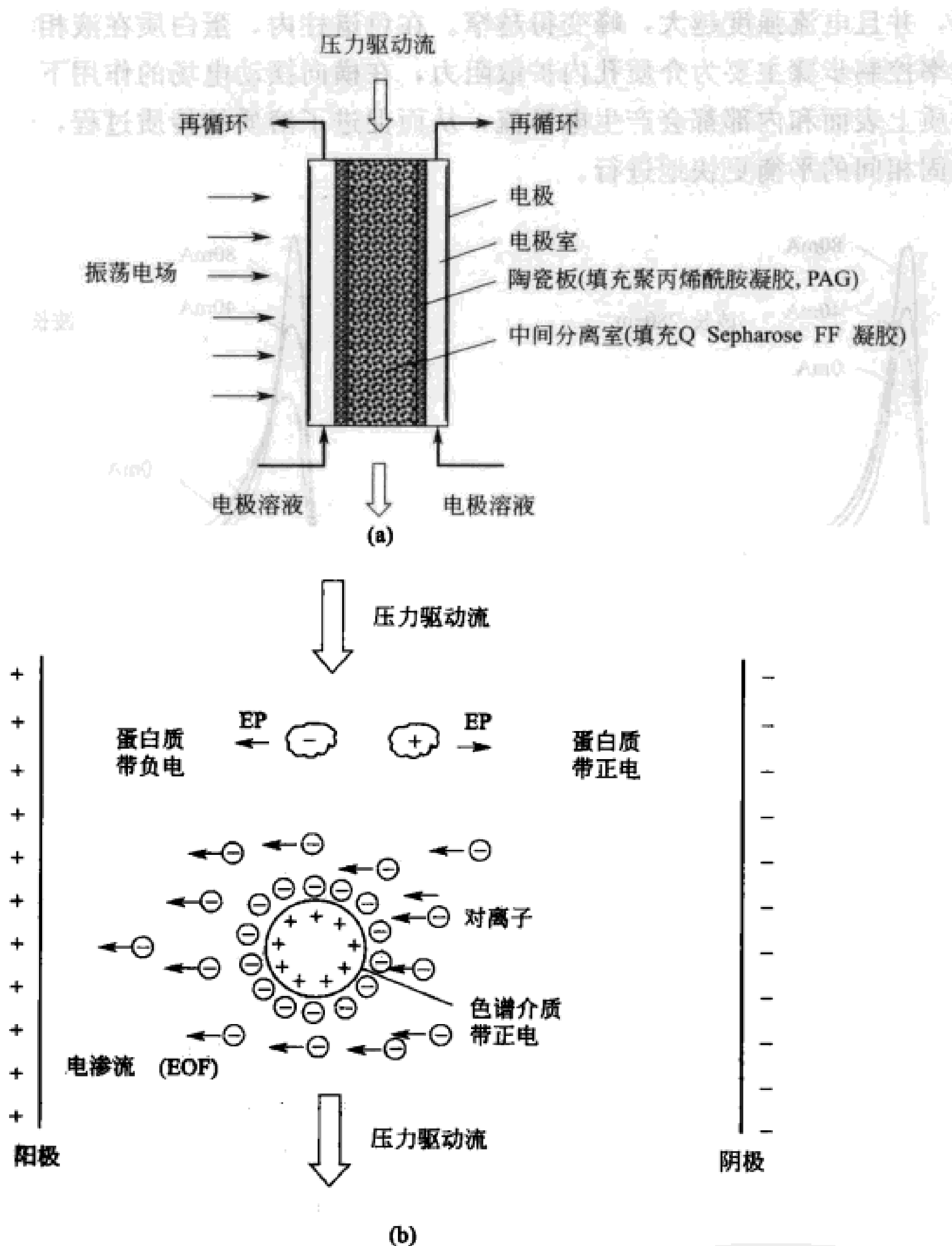


图 11.1 (a) pIEEC 中压力流耦合横向电场驱动和三室横向电色谱柱示意图；(b) 中心分离室的介质传递示意图

导率恒定，供下一次分离使用。

平衡、淋洗、洗脱和再生过程使用的流速与上样过程相同。

2. 具体步骤

(1) 首先进行实验条件摸索，确定优化的进样量比和洗脱条件（如洗脱梯度、pH 和盐性质、上样量、流速、介质等优化参照常规离子交换色谱中的论述）。

此外，电流强度的影响也是一个重要的优化参数。

① 电流强度对洗脱峰型的影响。由图 11.2 可见，各个流速条件下，不加电场时的峰都是最宽、最矮的，而且脱尾现象比较严重。在横向摆动电场的作用下，峰

宽变窄，并且电流强度越大，峰变得越窄。在色谱柱内，蛋白质在液相和固相间的平衡速率控制步骤主要为介质孔内扩散阻力，在横向摆动电场的作用下，离子交换色谱介质上表面和内部都会产生电渗流，从而促进了溶质的传质过程，使蛋白质在液相和固相间的平衡更快地进行。

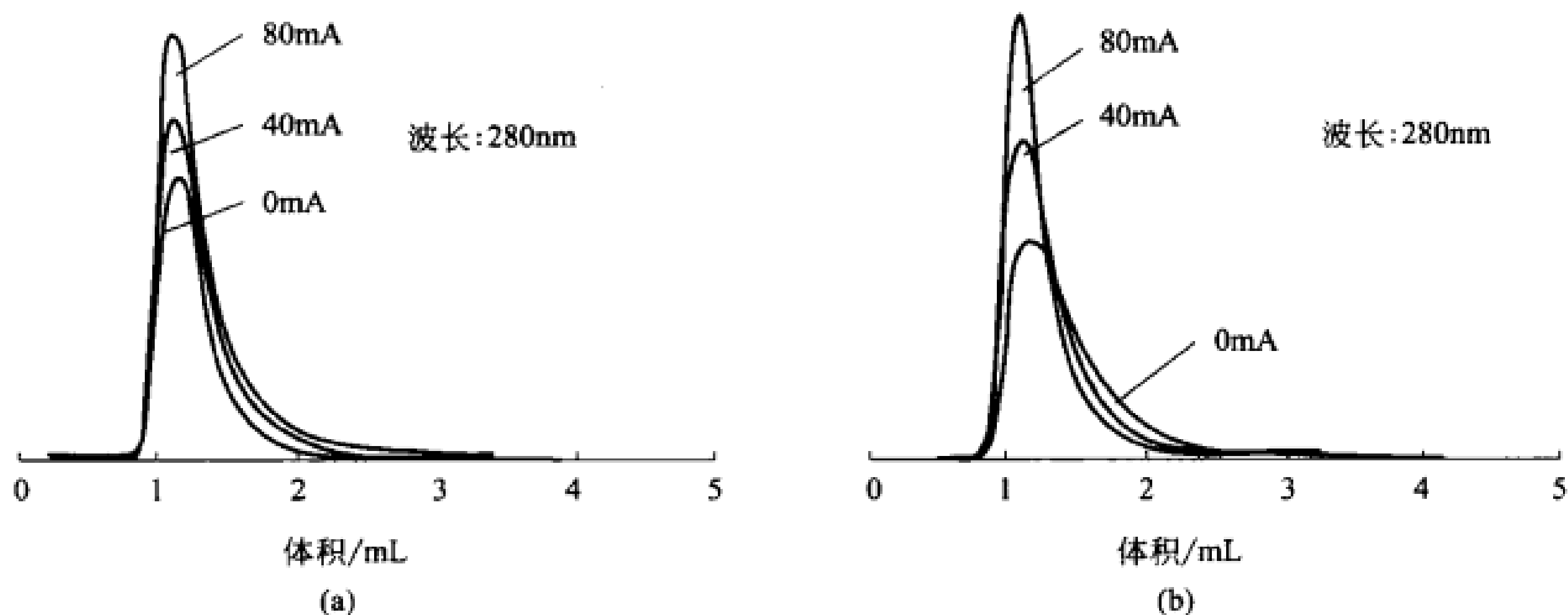


图 11.2 不同流速下电流强度对蛋白质洗脱峰形的影响

(a) 240cm/h; (b) 120cm/h

② 电流强度对柱效的影响。从图 11.3 中看出，流速为 240cm/h 时，理论板高度随电流强度的增大而降低，10~40mA 时更为明显，而 40mA 以上的电流强度使理论板高度基本持平；流速为 120cm/h 下，在电流较小（20mA、40mA）时仍能使理论板高度降低，而后的大电流使理论板高度明显增大，当流速降到 60cm/h 时，理论板高度不能随电流强度的增加而减小。理论板高度随电流强度的增大都是降低的趋势，在 10~40mA 时，变化几乎是线性的，然而随着电流强度的增加，焦耳热产生得越来越快，理论板高度的下降也越来越慢。

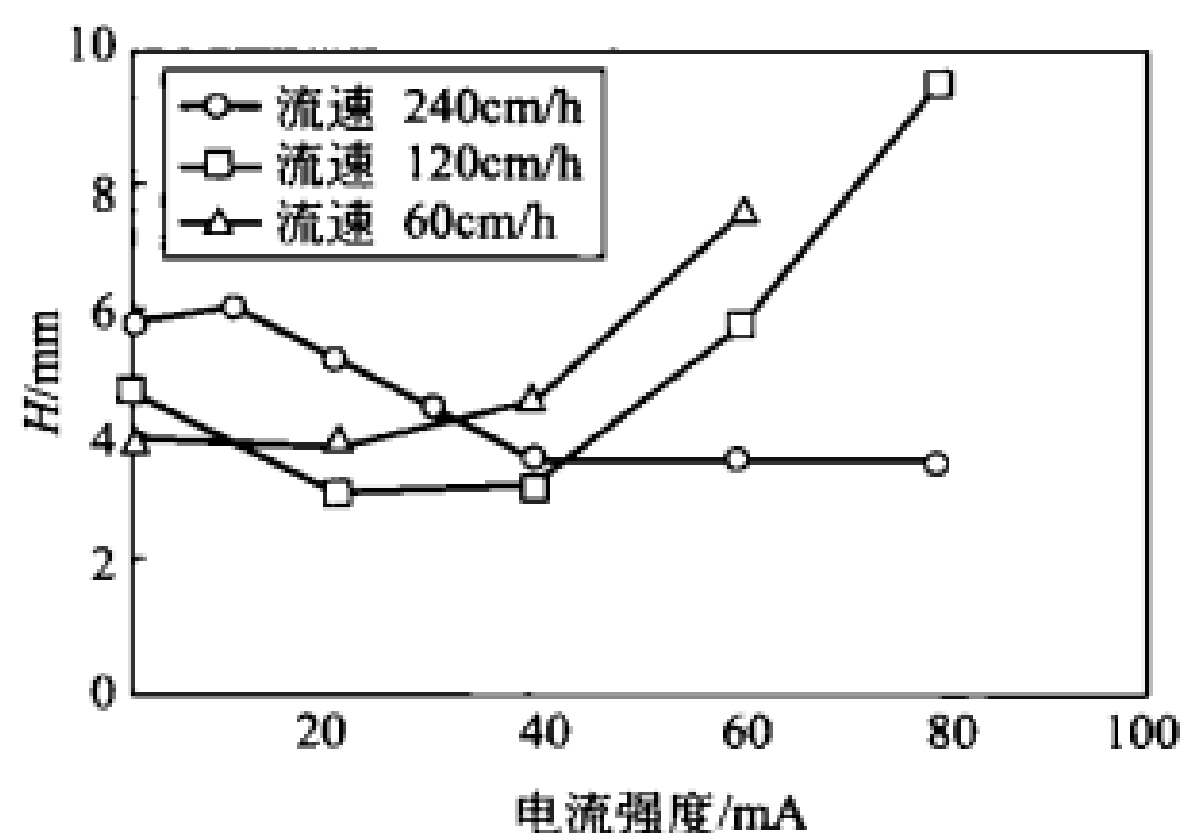


图 11.3 不同流速下电流强度对理论板高度的影响

也越来越慢。流速越低，柱内温度升高越快，电流强度对降低理论板高度的作用越不明显，甚至起到反作用。本实验 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换介质表面覆盖足量的负电荷，在电场的作用下产生了比较强的电渗流，促进了传质。然而在电流强度较高的情况下，峰形的末尾很难再回到基线，从而导致了柱效的积分结果下降。

(2) 在 10mm × 5mm × 40mm 横向电色谱上进行卵清的分离实验。分为两组：

① 在不加电场和加电场（30mA，1/20Hz）的情况下各自进样 3mL 和 7mL。

实现分离过程，并分析实验结果；

② 在不加电场和加电场 (30mA, 1/20Hz) 的情况下各自进样 9mL 和 21mL, 实现分离过程，并分析实验结果。

(3) 横向电场色谱放大实验时，色谱柱为 10mm × 5mm × 120mm，为前面实验柱长的 3 倍，其他实验步骤同 (1) 和 (2)。

采用重力沉降法将悬浮在 Buffer A 中的 Q SepHarose Fast Flow 装入色谱柱，再用 10 倍柱体积的 Buffer A 冲洗平衡。分别在无电场和有电场下进行卵清的分离，分离过程示于图 11.4。

步骤 (1) 中，在无电场时，将卵清样品以 1.6mL/min 的流速连续进样 3mL，再用 Buffer A 冲洗至出口蛋白浓度不再降低为止，收集这一阶段不吸附流出液 (峰 1)。令流动相中 Buffer B 的比例从 0% 增加到 12.5%，洗出并收集洗脱峰 (峰 2)。再令流动相中 Buffer B 的比例在 5min 内从 12.5% 增加到 30%，洗出并收集洗脱峰 (峰 3)。最后令流动相中 Buffer B 的比例从 30% 增加到 50%，洗出并收集洗脱峰。用 Buffer B 冲洗再生介质，再用 Buffer A 平衡。设定电流强度为 30mA，交变频率为 1/20Hz，进行电场下卵清的分离过程。

在电场存在下，将卵清样品以 1.6mL/min 的流速连续进样 7mL，再用 Buffer A 冲洗至出口浓度不再降低为止，收集这一阶段不吸附的蛋白液。关闭电场，用上面所述相同的洗脱梯度先后洗出并收集洗脱峰 (峰 4~6)。

(4) 实验结果分析。将离子交换色谱和横向交变电场耦合，利用填充 Q SepHarose Fast Flow 的横向电场色谱柱实现了卵清蛋白这一实际物系的分离，得到了卵铁传递蛋白和卵清白蛋白产品。在 30mA、1/20Hz 的交变电场下，在 10mm × 5mm × 40mm 柱上进行卵清蛋白的前端分析实验得知，对于相同的穿透浓度，上样量与无电场时相比大约为 7 : 3。用离子强度阶跃洗脱实现不同蛋白的快

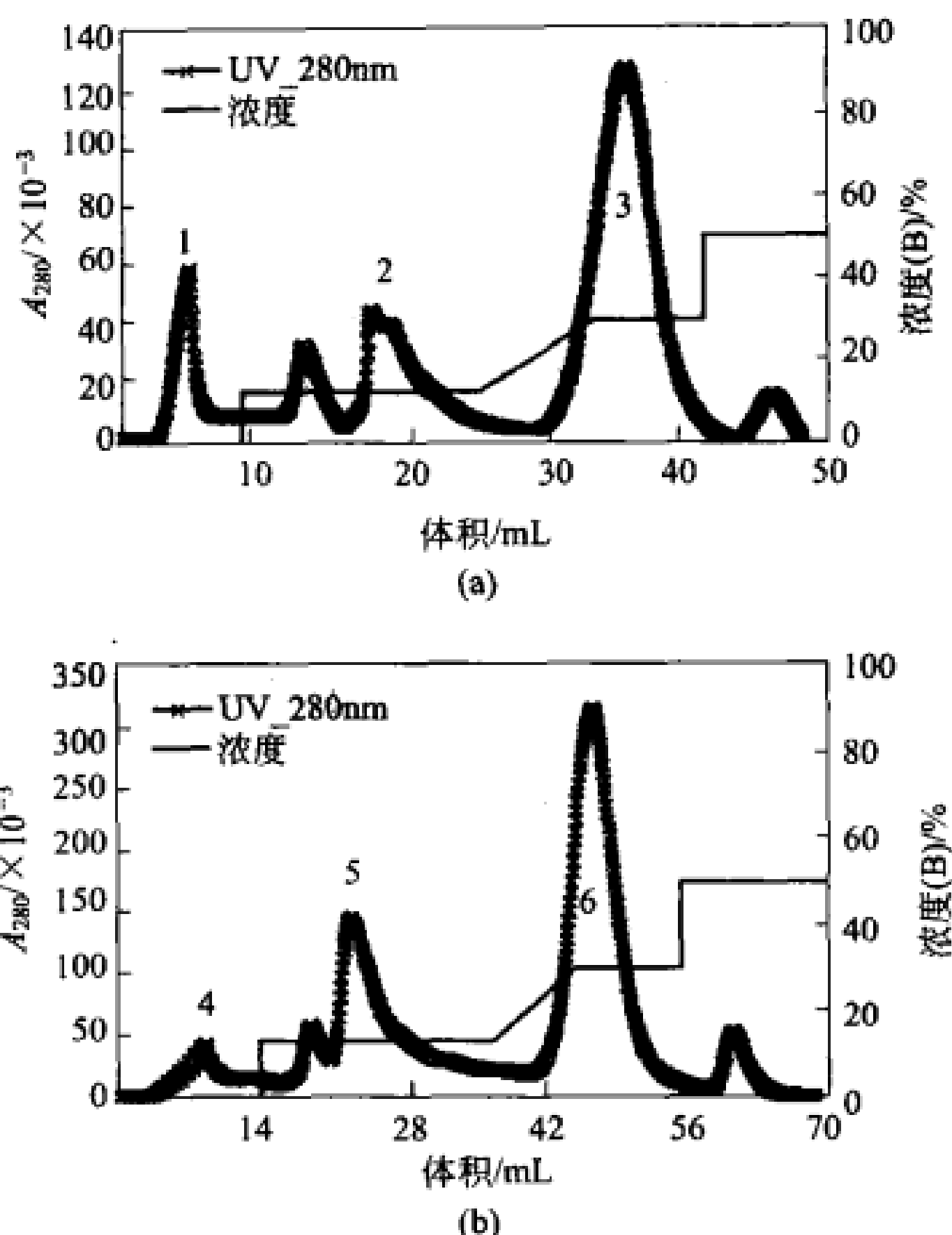


图 11.4 横向电色谱分离卵清过程

实验条件：电色谱柱，10mm × 5mm × 40mm；
检测波长，280nm；流速，1.6mL/min。

(a) 在不加电场进样 3mL；(b) 在加电场 (30mA, 1/20Hz) 的情况下进样 7mL。缓冲液 A：10mmol/L Tris-HCl, pH 9；缓冲液 B：含 1mol/L 氢氧化钠的缓冲液 A

速分离,加电场时进样 21mL 时,卵铁传递蛋白的纯度为 78.51%,浓缩率 6.08,收率 18.77%;卵清白蛋白的纯度为 68.99%,浓缩率 1.30,收率 56.03%。进样 7mL 时,卵铁传递蛋白的纯度为 73.74%,浓缩率 5.72,收率 82.96%;卵清白蛋白的纯度为 90.14%,浓缩率 1.67,收率 91.13%。与无电场下上样吸附的分离效果相比,电场下吸附后分离所得样品的浓缩率稍有降低,收率基本一致。当将色谱柱轴向放大三倍,即用 10mm×5mm×120mm 横向电场色谱柱进行卵清蛋白的分离实验时,得到的纯度、收率等数据说明,在放大过程中,横向电场仍对蛋白质的吸附过程产生了显著影响,从而证实了横向电色谱技术放大的可行性。

方案 11.2 微流控芯片-多维毛细管电色谱分离 牛血清白蛋白酶消解产物

简介

20 世纪 90 年代初,Manz 等人第一次提出“微全分析系统”的概念,即在芯片上构建可以实现多种操作的分析系统。随着微制造技术和电子技术不断进步,微流控芯片分析系统得到迅速的发展。毛细管电泳的各种模式,毛细管区带电泳(CZE)、毛细管凝胶电泳(CGGE)、毛细管等电聚焦(CIEF)、胶束电动毛细管色谱(MECC)、毛细管等速电泳(ITP)、毛细管电色谱(CEC)等都已在微流控芯片上得到实现。芯片电色谱同毛细管电色谱相似,不仅具有电泳高柱效,同时还具有液相色谱高选择性的特点,克服了电泳选择性差和不能分离中性物质的困难。Ramsey 等(Gotsehlich 等,2001)建立第一维为分离通道长 25cm 的开管电色谱,第二维为分离通道长 1.2cm 的毛细管区带电泳的二维分离系统。第一维通道内表面用十八烷基硅烷修饰,基于溶质与固定相相互作用实现电色谱分离。

随着技术的发展,分离效能更理想的电色谱技术也被应用于微流控芯片。其中开管式电色谱芯片制作简单,但受管径及管长限制,柱容量较小。而填充柱电色谱芯片则是通过微加工技术直接在芯片通道中形成围堰、栅栏或锥形通道等微结构以固定载体,几乎没有“塞子效应”,这使得它比常规电色谱更具优势。与常规毛细管电色谱不同,芯片电色谱还可直接在通道内原位加工固定相形成整体柱。其中一种方式是利用微细加工在管道内加工出有序排列整体结构(COMOSS)以代替载体,这种设计可形成高度均一性的色谱床,但制片工艺复杂。He 等曾用立方体所组成的对称 COMOSS 整体柱(图 11.5)经 C₁₈ 修饰后分离卵清蛋白中的多肽,其分离效率与梯度洗脱的 HPLC 相当,分离速度却更快。Throckmorton 等(2002)在十字电泳芯片上选择了一段电泳通道原位聚合以丙烯酸酯类物质为单体的整体柱,可在 45s 内完成 6 种生物活性肽的分离。这种设计将避免管道内全部聚合生成整体柱而导致的进样困难和荧光背景偏高等问题。

Goffschlich (2001) 小组还在芯片上建立了开管电色谱 (OCEC) 和区带电泳 (CZE) 偶合的二维分离系统。整个系统刻蚀在 $5\text{cm} \times 5\text{cm}$ 的玻璃片上, 其中的多边盘形通道长 25cm , 用十八烷基三甲氧基硅烷改性作为第一维的开管电色谱分离柱, 第二维的区带电泳则在长 1.2cm 的直形通道内进行。用该二维分离系统对四甲基异硫氰酸罗丹明 (TRITC) 标记的酪蛋白胰脲酶解产物进行分离, 用门式进样技术 (gated injection), 以 3.2s 一次 (采样时间 0.2s) 的频率对第一维的流出液采样, 大约 9% 的一维流出物进入二维分离通道。 13min 即可完成一次二维分离过程, 系统的峰容量为 150 (OCEC 贡献 30, CZE 贡献 5)。

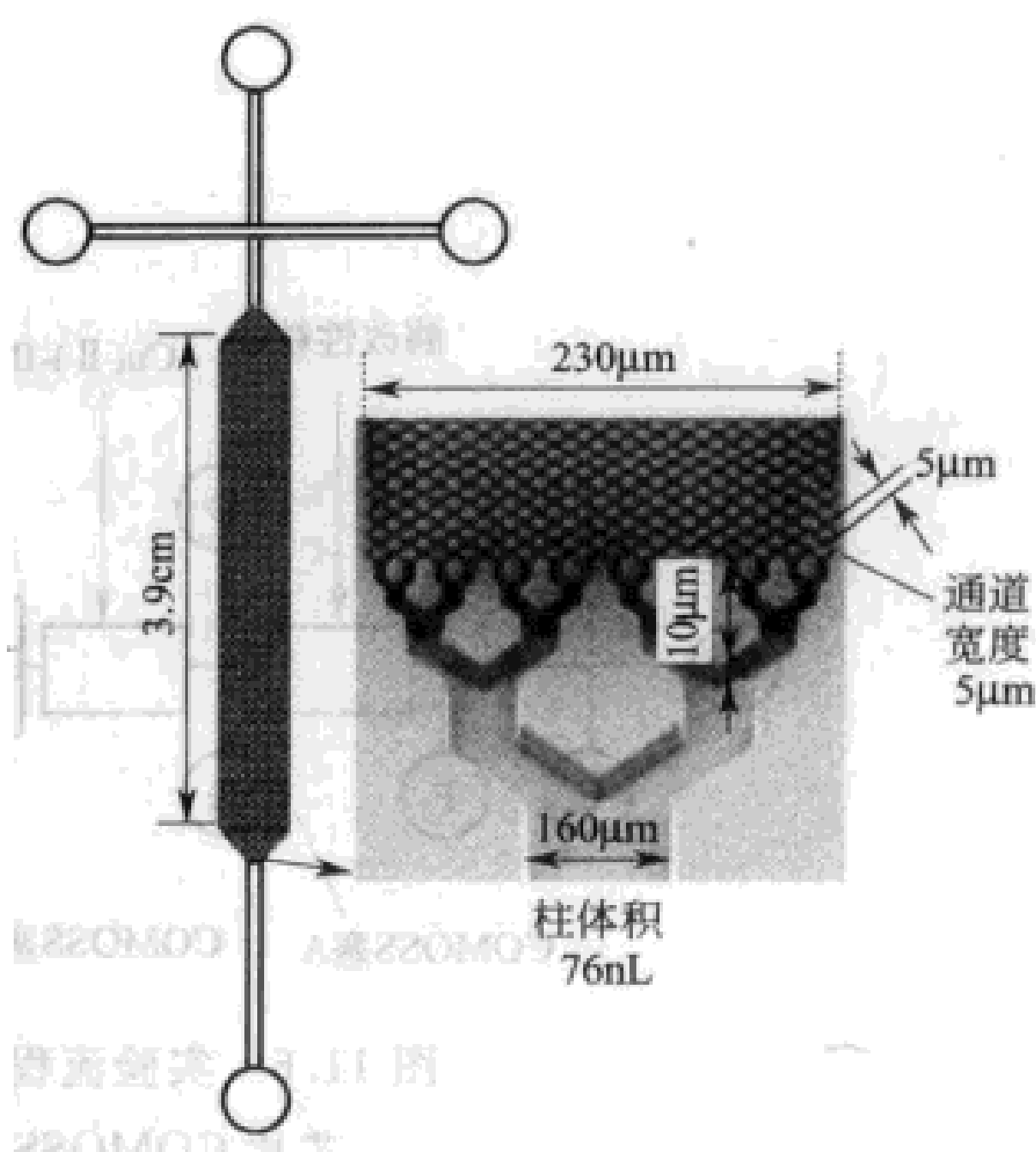


图 11.5 COMOSS 芯片电色谱柱结构示意图

虽然目前关于多维分离模式芯片的研究还处于起步阶段, 而且其应用也主要集中在简单蛋白质的胰蛋白酶解片段分析上, 但其分离能力已明显优于一维, 且具有样品量小、分离时间短、易于实现自动化等特点, 因此, 其在蛋白组学中必将有着极大的发展潜力。随着技术的进步, 多维分离模式的芯片, 其分离能力会进一步增加, 以适应蛋白等复杂样品对分析手段越来越高的要求。本文具体描述了采用直接酶降解、亲和吸附、反相分离三维毛细管电色谱集成芯片分离牛血清白蛋白酶解产物的方案。

材料

N-乙酰半胱氨酸, 2-丙烯酰氨基-2-甲基丙磺酸 (AMPS), 3-氨丙基三乙氧基硅烷 (APTS), 五水硫酸铜, 1,4-二硫苏糖醇, EDTA, 异硫氰酸荧光素标记牛血清白蛋白 (FITC-BSA), 戊二醛, γ -缩水甘油醚氧丙基三甲基硅烷 (GPS), 亚氨基二乙酸, 碘乙酸 (IDA), 胰蛋白酶, 脲, TRIS, 硝酸铯铵, 氢氧化钠, 磷酸盐等; 多肽 H-Leu-Gly-His-Gly-Pro-OH

TE-300 NIKON 光学显微镜 (含荧光分析系统), 美国应用生物系统 HPLC 和质谱仪

方法

1. 聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 芯片制备

芯片设计为 PDMS 材质的 COMOSS (collocated monoliths support structures, COMOSS) 的整体柱模式 (4cm 长, $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ 粒子, $3\mu\text{m}$ 宽), 并包含不同改性硅胶吸附剂芯片, 多个交叉进样点。如图 11.6 所示。

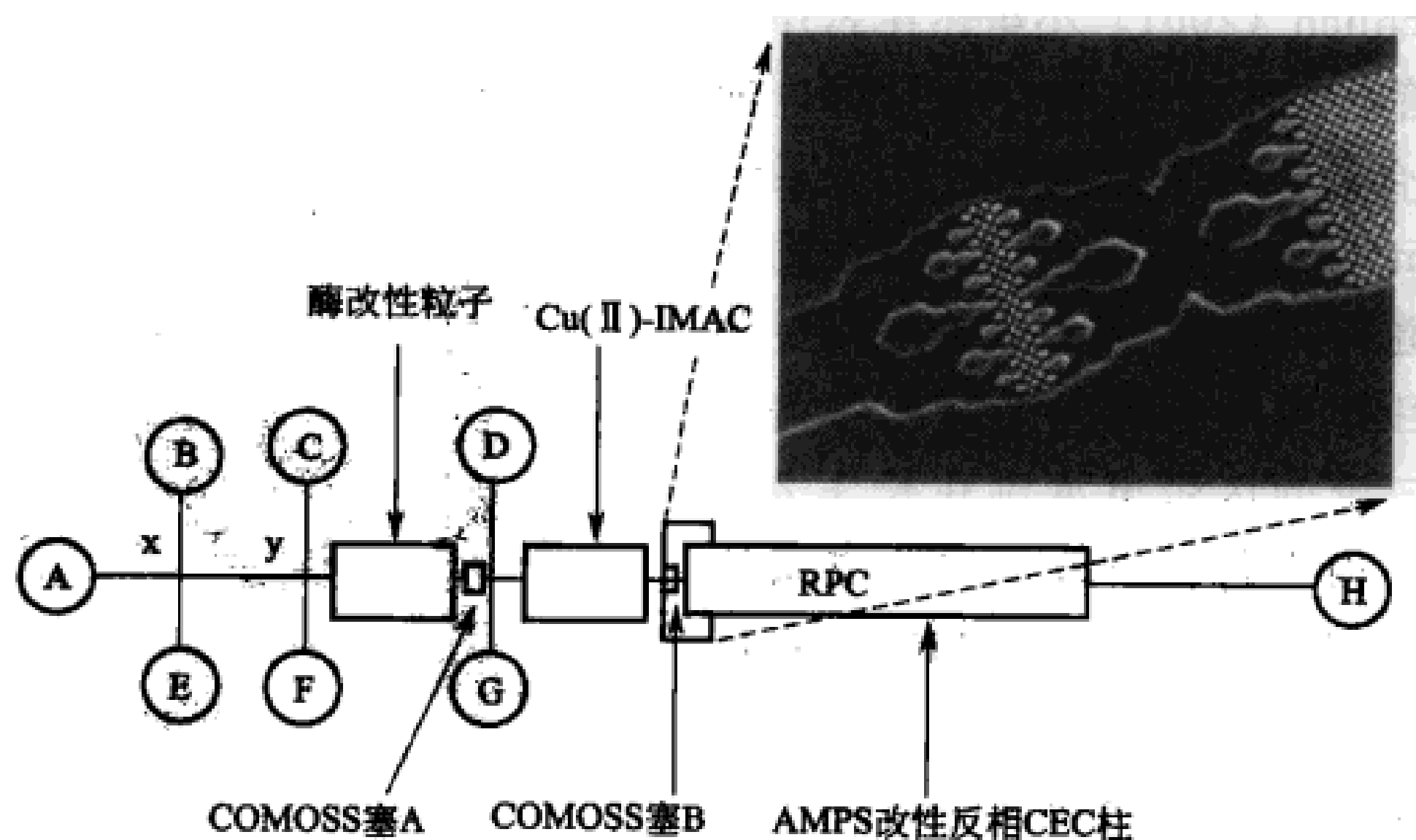


图 11.6 实验流程和整体柱结构示意图，
芯片 COMOSS 柱头 B 的 SEM 图

B—蛋白样品；G—磷酸盐缓冲液；H—接地电极；

A, B, C, D, E, F, H—电极电压作用点、切换点；x, y—样品引入点

采用深度反应离子刻蚀技术 (deep reactive ion etching, DRIE) 在芯片上制成高深宽比 ($10\mu\text{m}/1.5\mu\text{m}$) 的 32 条微通道，总宽度为 $120\mu\text{m}$ ，这些微通道将芯片分割成很多个 $5\mu\text{m}\times 5\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$ 结构的固定相。微通道数目最多可达 4096 条，总宽度为 1.2cm，COMOSS 密度超过 $4000000/\text{cm}$ 。每个通道采用硝酸铯铵为催化剂，在 COMOSS 表面成功地涂敷了 C_{18} -AMPS (Slentz, 2003)。可将胰蛋白酶

解、金属亲和色谱 [Cu(II)-IMAC] 和反相毛细管电色谱等多个过程集成在芯片上，应用于蛋白质水解和含组胺酸肽多维分离，研究结果证明，该系统可以进行全面蛋白组学分析。

2. 硅胶吸附剂的改性

(1) Cu(II)-IMAC 改性的硅胶。首先，5g 硅胶加入到 γ -缩水甘油醚氧丙基三甲基硅烷 (GPS) (5mL) 的乙酸溶液 (100mL, 10mmol/L, pH 5.5) 中，此混合溶液经脱气后，于 90°C 下振荡 6h。将 GPS 改性硅胶过滤，乙酸洗涤，加入到碘乙酸溶液中 (pH 8.3, NaOH 调节)。溶液脱气后，于 60°C 下振荡 24h，得到碘乙酸改性硅胶。将该产物与 1mol/L CuSO_4 溶液反应 12h，得到 Cu(II)-IMAC 硅胶粒子。

胰蛋白酶改性硅胶：将硅胶依次经过 APTS、戊二醛、胰蛋白酶改性，具体步骤略 (Slentz 等, 2003)。

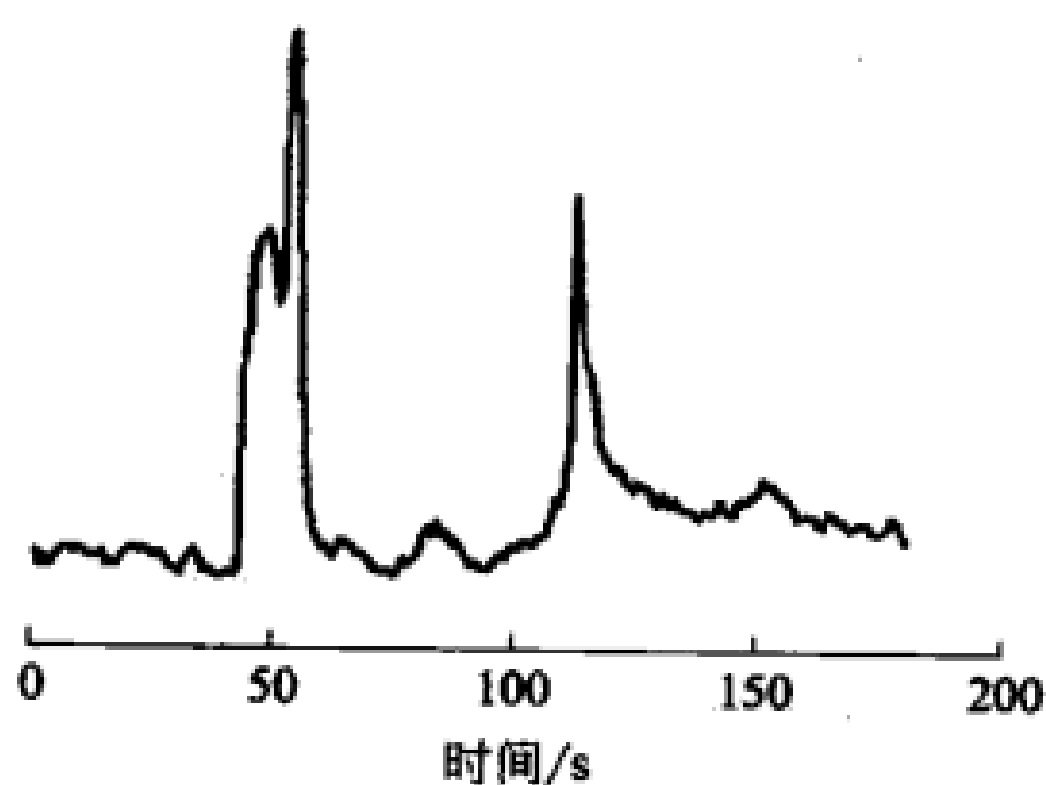


图 11.7 FITC-BSA 的连续流芯片胰蛋白酶降解产物的反相 CEC 分离结果
分离条件：磷酸盐缓冲液 (1mmol/L, pH 7.0)；电场强度：500V/s

(2) 应用 5000V 电压 (电极置于 G 孔, 接地电极置于 H 孔位置), 将胰蛋白酶和 Cu(II)-IMAC 改性硅胶分别加载到 COMOSS A 和 COMOSS B 处。

(3) 应用 2000V 电压, 将异硫氰酸荧光素标记牛血清白蛋白 (FITC-BSA) (置于 B 孔) 加载到胰蛋白酶降解床; 酶解液直接通过 Cu(II)-IMAC 柱床, 得到含组氨酸多肽吸附带, 最后经 AMPS 改性的 C₁₈ 反相电色谱柱分离。分离结果如图 11.7 所示。

方案 11.3 毛细管电色谱耦合飞行时间质谱分离鉴定卵清蛋白的酶解产物

材料

肽和蛋白标准品, 络氨酸酶, 鸡卵白蛋白

pCEC 电色谱仪; 熔融石英毛细管柱 [180 μm (i. d.) 和 360 μm (o. d)]; Varian Star 9012 溶剂输送系统; 质谱仪, 包括四极杆离子阱和反射式飞行时间质量分析器 (IT/reTOF MS)

方法

1. 加压毛细管电色谱柱的制备

毛细管柱 [180 μm (内径) \times 360 μm (外径)] 的填充采用拉制法。甲醇和填充材料 (3 μm C₁₈ 硅胶) 的比例为 10 : 1, 填充压力 5000psi (34.47MPa)。柱塞为 Valco 微孔柱塞, 由玻璃棉制备成, 厚度为 0.1mm。

2. 蛋白质的络氨酸酶解过程 (Wu 等, 1997)

将 100 μg 鸡卵白蛋白溶于 200 μl 含有尿素 (8mol/L)、DTT (10mmol/L)、NH₄HCO₃ (50mmol/L) 的溶液中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中还原 4h, 然后加入 10 μl 碘乙酰胺 (1mol/L), 放置暗处 1h 进行烷基化; 加入 1400 μl 50mmol/L 溶液将尿素稀释到 1mol/L 以下, 最后加入 24 μg 胰蛋白酶 (1 : 50), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 24h。酶解溶液经真空干燥, 除盐, 配制成 1×10^{-5} mol/L 的原始蛋白溶液。

3. pCEC-MS 分析

(1) 梯度洗脱条件。流动相 A: 0.07% 三氟乙酸 (TFA) 水溶液; 流动相 B: 0.07% TFA 乙腈溶液 (注: 低浓度的三氟乙酸可以降低焦耳热效应)。每次进样分离前用流动相 A 进行样品堆积 2min, 分离条件为 0~40% 乙腈梯度洗脱 20min。

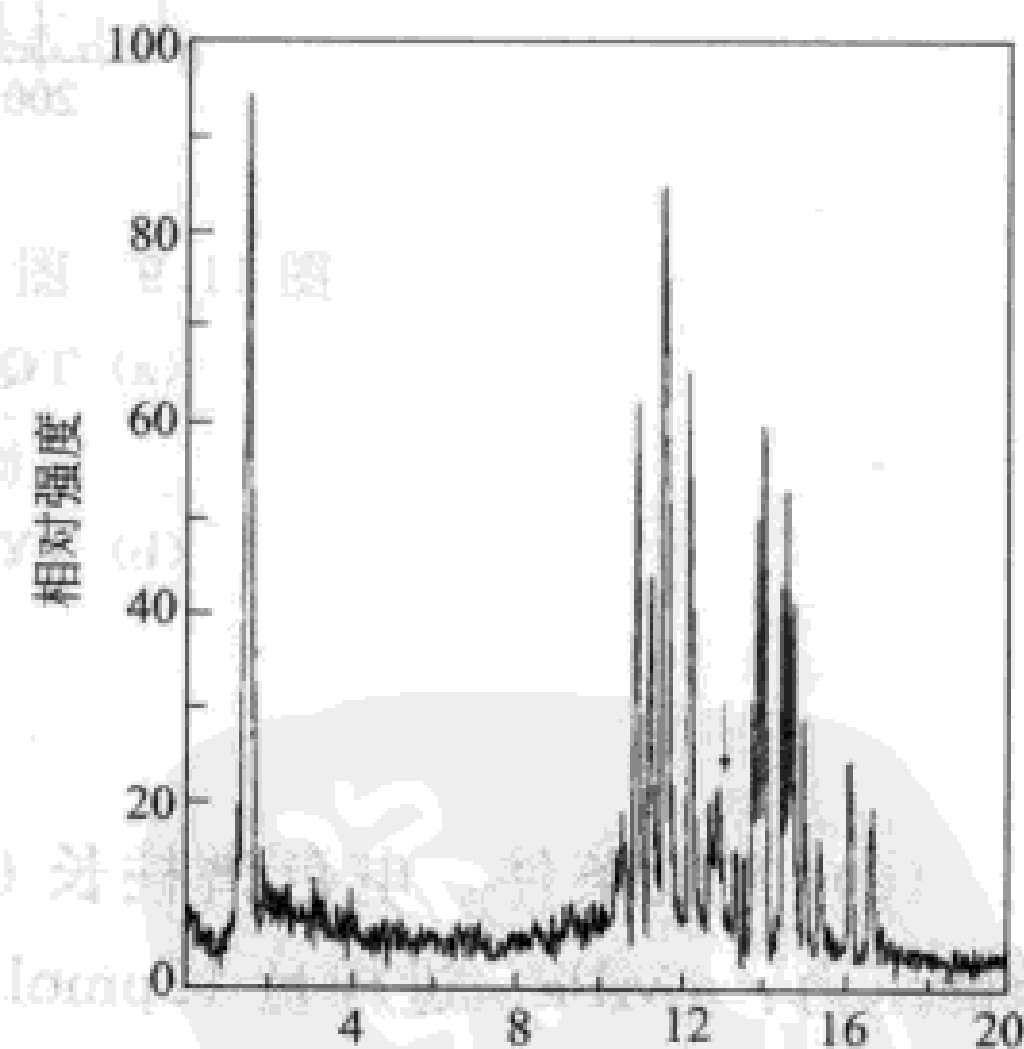


图 11.8 鸡卵白蛋白酶解产物总离子流图

如图 11.8 所示, 20 多个峰在 15min 内被分离检测, 借助质谱分析, 27 个组分得以明确鉴定。质谱检测器具有较高的采样速度, 图 11.9 给出了两个共洗脱组分的质谱图 (图 11.8 中箭头标记峰)。提取离子流色谱图 (extracted ion chromatogram, EIC), 显示两个峰的保留时间差仅为 3s, 两组分分别被鉴定为 TQINK 碎片峰和 VYLPR 碎片峰。

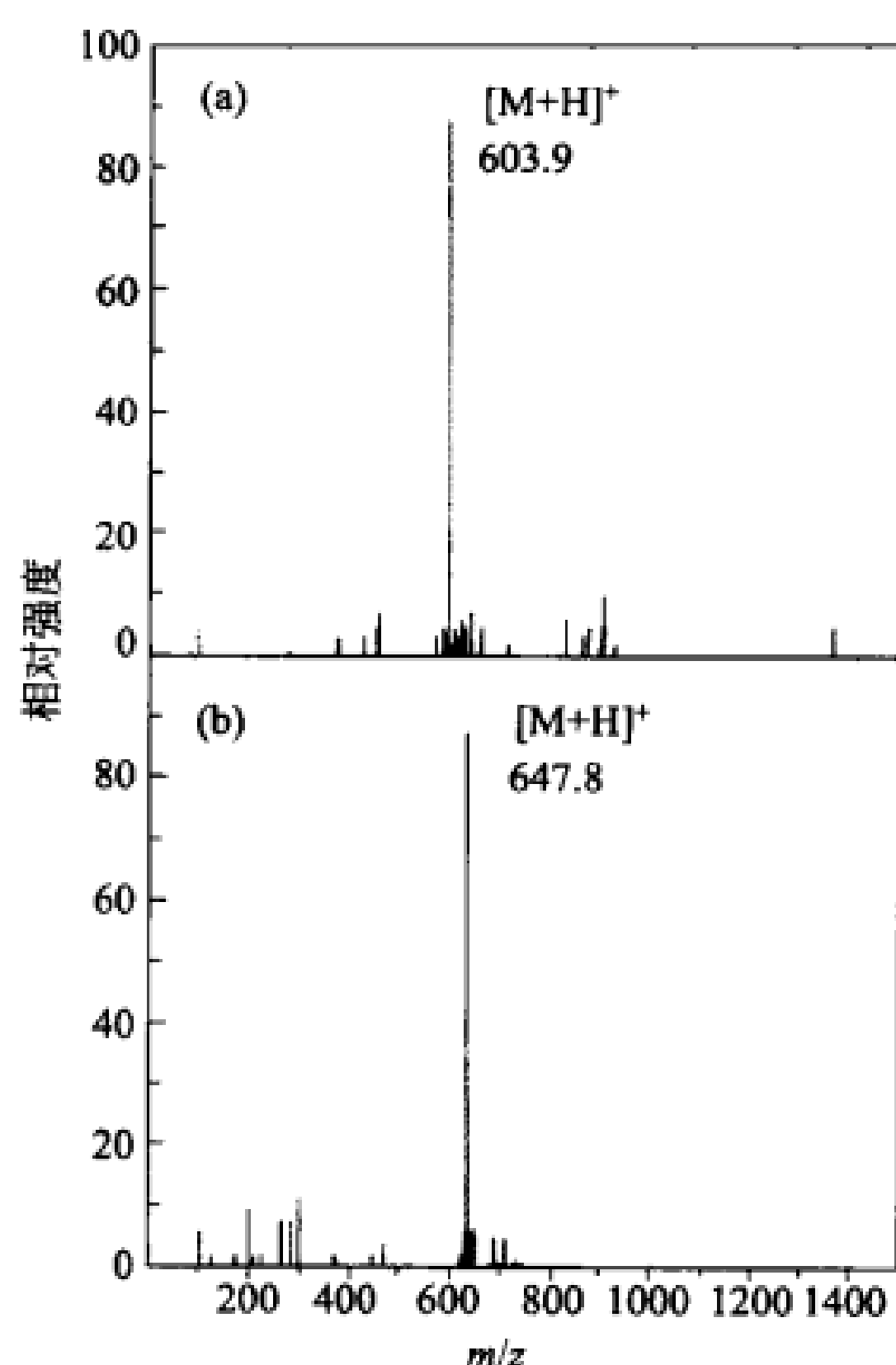


图 11.9 图 11.8 中箭头标记峰的质谱图

(a) TQINK 碎片峰, m/z 603.9,

洗脱时间 12.95min;

(b) VYLPR 碎片峰, m/z 647.8,

洗脱时间 13.01min

(2) 实验条件。电色谱柱长 6cm; 流动相: 0~40% 乙腈; 施加电压: 1kV; 辅助压力: 4MPa; 进样量 12pmol。

参 考 文 献

- [1] Bandilla Dirk, Skinner Cameron D. Capillary electrochromatography of peptides and proteins. *Journal of chromatography A*, 2004, 1044 (1-2): 113.
- [2] Bartle K D, Meyers P. *Capillary Electrochromatography*. Royal Society of Chemistry. 1st edition, 2001.
- [3] Basak S K and Ladisch M R. Mechanistic description and experimental studies of electrochromatography of proteins. *AIChE J*, 1995, 41 (11): 2499.
- [4] Cole K D, Cabezas H Jr. Recent progress in the electrochromatography of Proteins. *Appl Biochem Biotechnol*, 1995, 54: 159.

- [5] Gong W J, Xu G R, Zhang Y J, et al. Fast preparation of photopolymerized monolithic columns for capillary electrochromatography, *J Centr South Univ of Technol*, 2008, 15 (2): 176.
- [6] Gotsehlich N, Jacobson S C, Culbertson C T, et al. *Anal Chem*, 2001, 73: 2669.
- [7] Gucek M, Gaspari M, Walhagen K, et al. Capillary electrochromatography/nanoelectrospray mass spectrometry for attomole characterization of peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000; 14 (16): 1448.
- [8] He B, Regnier P H. *J pharmaceut Biomed*, 1998, 17: 925.
- [9] He B, Tait N, Regnier P H. *Anal Chem*, 1998, 70: 3790.
- [10] Hugener M, Tinke A P, Niessen M A, et al. *Chromatogr*, 1993, 647: 375.
- [11] Jorgenson and Lukacs. High-Resolution Separations Based on Electrophoresis and Electroosmosis. *J Chromatog*, 1981, 218: 209.
- [12] Keim C and Ladisch M R. New system for preparative electrochromatography of proteins. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 70: 72.
- [13] Knox J H and Grant I H. *Chromatographia*, 1987, (24): 135.
- [14] Li Y, Xiang R, Wilkins J A, et al. Capillary electrochromatography of peptides and proteins. *Electrophoresis*, 2004, 25 (14): 2242.
- [15] Liang Z, Zhang L H, Zhang Y K, et al. *Electrophoresis*, 2005, 26: 1398.
- [16] Liu Z, Yin G, Feng S H, et al. Oscillatory electroosmosis-enhanced intra/inter-particle liquid transport and its primary applications in the preparative electrochromatography of proteins. *J chromatogr A*, 2001, 921: 393.
- [17] Pesek J J, Matyska M T, Salgotra P H. Retention of proteins and metalloproteins in open tubular capillary electrochromatography with etched chemically modified columns. *Electrophoresis*, 2008; 29 (18): 3842.
- [18] Regnier P H. *J High Resol Chromatogr*, 2000, 23: 19.
- [19] Schmeer K, Behnke B, Bayer E. *Anal Chem*, 1995, 67: 3656.
- [20] Slent B E, Penner N A, Regnier P H. *J Chromatogr A*, 2003, 984: 97.
- [21] Tellez C M, Cole K D. Preparative electrochromatography of proteins in various types of porous media. *Electrophoresis*, 2000, 21: 1001.
- [22] Throckmorton D J, Shepodd T J, Singh A K. *Anal Chem*, 2002, 74 (4): 784.
- [23] Tsuda T. *Anal Chem*, 1988, 60: 1677.
- [24] Verheij E R, Tjaden U R, Niessen M A, et al. *J Chromatogr*, 1991, 554: 339.
- [25] Wu J, Huang P, Li M X, et al. *Anal Chem*, 1997, 69: 320.
- [26] Wu J, Qian M G, Li M X, et al. *Anal Chem*, 1996, 68: 3388.
- [27] Yamamoto, Baumann J., Erni E, *J Chromatogr*, 1992, 593: 317.
- [28] 操时杰著. 毛细管电色谱及其应用. 北京: 科学出版社, 2001.
- [29] 陈磊, 王宏玲, 万谦宏. *中国科学 B 辑: 化学*, 2009, 39 (8): 728.
- [30] 罗国安, 王义明等著. 毛细管电色谱及其在生命科学中的应用. 北京: 科学出版社, 2005.
- [31] 苑巍. 离子交换电色谱纯化蛋白质的研究. [硕士学位论文]. 天津: 天津大学, 2005.
- [32] http://www.cas.cn/jzd/ljx2/200906/t20090608_619772.html [2006-06-20].

第 12 章 其他色谱分析方法简介

12.1 超临界流体色谱

12.1.1 超临界流体简介

超临界流体是指超过临界温度与临界压力状态的流体，目前研究较多的是 CO_2 ，在超临界状态下， CO_2 流体兼有气体和液体两种流体的双重特点。超临界流体具有高密度、低黏度、高介电常数及扩散系数大的特性，并有良好的流动和传递性质，可通过控制温度和压力改变其密度和黏度，从而改变物质的溶解度。超临界流体的实际应用主要有五个方面，即超临界流体萃取、超临界流体色谱、超临界流体反应、超临界微粉技术、超临界流体挤压技术，其中应用最早最广、发展最迅速的是超临界流体萃取和超临界流体色谱。

12.1.2 超临界流体色谱简介

超临界流体色谱 (supercritical fluid chromatography, SFC) 是指以超临界流体为流动相的色谱技术。由于超临界流体兼有气体和液体两种流体的双重特点，其固定相既可以使用气相色谱常用的多种固体吸附剂，也可以使用液相色谱常用的多种键合载体或聚合物载体。SFC 的分离机理与气相色谱 (GC) 及液相色谱 (LC) 基本相同，同样基于各化合物在两相间的分配系数不同而得到分离。但由于超临界流体的高扩散性和低黏性，分离速度明显加快，同时可通过改变影响流体密度的因素 (如压力、温度等) 改变流体密度，直接改变流动相对不同物质的溶解能力，较容易地实现对混合物的分离和分析。超临界流体易于气化，便于收集和回收分离后的有效组分，因而更加适合于物质分离和制备。同时由于超临界流体低温使用的特点，特别适用于分离纯化某些热敏性、低挥发性、极性化合物，如生物活性物质。

超临界流体色谱目前已经在食品有效成分的检测和农药残留检测中得到广泛应用。

12.1.3 SFC 的流动相

超临界流体是一种物质处于高于其临界值的温度和压力下的特定状态，介于气态和液态之间，兼具气体和液体的特点。

- ① 其扩散系数高于液体 1~2 个数量级，高扩散性在传质过程中拥有更高的最

佳流速。因此，达到相同的分离效率，SFC 往往比 LC 快。

② 超临界流体的黏度比液体低 2 个数量级，同样流速下拥有比液相低得多的柱反压，因此 SFC 的分离速度远快于 LC。

③ 超临界流体的密度与液体相似，为气体的 200~500 倍，分子间的作用力同样类似于液体，同样体积下对物质的溶解能力比气体大得多。并且其密度随压力可调，尤其在临界温度附近，压力的微小变化可引起密度的较大变化。因此，可通过调节压力来实现对不同物质的分离。

超临界流体色谱中使用最广泛的流动相是超临界 CO_2 。因为 CO_2 的临界温度点为 31.08°C ，接近室温；临界压力点为 7.38MPa ，易于实现。可使用现有的色谱系统在接近室温和易于实现的压力条件下进行操作。另外， CO_2 无毒，不燃，无化学腐蚀性。目前已广泛应用于食品、医药、生物制品及精细化工产品等的分析分离方面。

超临界 CO_2 用作流动相的缺点是不能洗脱极性化合物。由于 CO_2 分子本身完全无极性，对极性化合物的溶解性能较差，为增加其溶剂化能力，往往需要在其中加入少量的极性改性剂。常用的改性剂有甲醇、乙醇、异丙醇和乙腈等，使用最多的是甲醇。这是由于甲醇与 CO_2 形成的二元混合物的临界温度和临界压力不太高，并且甲醇的极性在低碳醇中比较大。为实现对强极性物质的 SFC 分离，需要在改性剂中再添加微量的强极性有机物，称之为添加剂。这样甚至可以成功地分离有机酸和有机碱及强极性的黄酮类化合物。流动相中微量强极性添加剂的加入拓宽了 SFC 的适用范围。

改性剂还可起到如下作用：

- ① 掩盖了固定相上残留的硅醇活性基团；
- ② 增强了溶质在流动相中的溶解度，即增强了流动相的溶剂化能力；
- ③ 改善了流动相与固定相的表面张力。

12.1.4 SFC 的固定相

随着 HPLC 技术的不断发展，应用于 HPLC 系统的固定相填料也已广泛应用于 SFC 系统。填充柱式 SFC 中使用最广的固定相是硅胶基质的键合填料。这些固定相对物质的分离纯化机理完全类同于 HPLC 和 GC 系统，主要由于氢键、离子、偶极等相互作用过程。

12.1.5 SFC 的检测系统

SFC 可采用 GC 和 LC 的检测器，通常在低压和常压条件下使用。目前，SFC 中最常用的检测器为紫外 (UV) 检测器和氢焰离子化检测器 (FID)，它们具有灵敏和高选择性的特点。一般地，对于以纯 CO_2 为流动相的分离体系可采用 FID，尤其在空心管式 SFC 中使用比较多；而有改性剂和添加剂的使用时，FID 不能使用，可考虑使用光度吸收检测器，特别当待分离物质有光学特征吸收时。近年来，

蒸发光散射检测器 (ELSD) 也已成为最常用的 SFC 检测器。另外采用硫元素选择性检测器, 最低检测量可达到 3pg; 氮元素选择性检测器, 也能有效地检测含氮化合物。另外, 荧光检测器、电流检测器、电子捕获检测器、激光散射检测器及火焰光度检测器等都作为检测手段在 SFC 中得到良好应用。

12.1.6 联机分析与定性

超临界流体一旦离开分离系统, 流出色谱柱后很容易将流动相气化, 留下不易挥发的分析物, 因而也为进一步分析提供了条件。

SFC-FTIR 傅里叶变换红外检测, 可以很容易获得分子结构信息。SFC-MS 将物质分离、鉴别结合在一起, 成为非常有效的分析鉴定手段。SFC-NMR 核磁共振能进行物质碳和氢的定位鉴定。其他如微波诱导等离子体检测器、无线电频率等离子体检测器、ICP 检测器, 用于金属有机化合物的检测, 在 SFC 中被广泛采用。

12.2 逆流色谱

12.2.1 简介

现代逆流色谱技术起源于 20 世纪 50 年代的逆流分溶法 (counter current distribution, CCD), 它利用不同物质在所选择的两相溶剂中的分配系数不同, 通过多次逆流分溶对物质进行分离。在 CCD 基础上发展起来的逆流色谱 (counter current chromatography, CCC) 在采用了与液相色谱相似的连续洗脱、检测和分布收集技术后, 从 20 世纪 70 年代开始迅速发展, 并相继出现以下几种色谱技术。

12.2.1.1 液滴逆流色谱 (droplet counter current chromatography, DCCC)

使流动相形成液滴, 通过作为固定相的液柱达到分离纯化的目的。其装置主要由输液部分、检测收集部分和玻璃管液柱部分 (300~500 根 60cm×118mm 的玻璃管) 组成。由于流动相形成液滴, 在细玻璃管中与液体固定相有效地接触、摩擦, 不断形成新的表面, 促进溶质在两相溶剂中的分配, 所以分离效果好, 且不产生乳化现象。对于易氧化的物质, 还可用氮气驱动流动相。采用 DCCC 分离纯化了许多包括中草药和抗生素在内的天然产物如柴胡皂苷和短杆菌肽、短杆菌酪肽和四环素等。液滴逆流色谱解决了操作自动化的问题, 但仍存在分离时间长、使用易破碎的玻璃管、分离度还不高等问题。

12.2.1.2 离心分配色谱 (centrifugal partition chromatography, CPC)

通过离心力场的作用在分配槽 (channel) 中保留固定相, 并实现两相间的有效接触和传质。CPC 的“色谱柱” (column) 是由若干分配槽 (channel) 和导管 (duct) 依次连接而构成的, 整个“色谱柱”绕轴作旋转运动。在离心力场的作用下, 固定相得以保留在分配槽 (channel) 中, 而流动相在泵的作用下流过导管并以液滴或别的形态通过分配槽中的固定相, 从而进行两相之间的传质分配。

12.2.1.3 高速逆流色谱 (high speed counter current chromatography, HSCCC)

通过螺线管的行星式运动 (自转和公转) 来实现固定相的保留和两相的有效混合和传质, 由聚四氟乙烯软管绕制成的色谱柱除绕离心轴旋转外, 还围绕自轴旋转, 产生变化的重力场, 并采用无旋转密封的连接方式。分离时两相液体被剧烈振动的离心力场依其界面特征被甩成极细的微粒, 样品各组分在两相微粒的表面上分配并在微粒振荡与对流的环境中有效传递, 相当于把通常的溶剂萃取高效、自动、连续地予以完成。

12.2.1.4 泡沫逆流色谱 (foam counter current chromatography, Foam CCC)

该技术是在 HSCCC 的基础上发展起来的。使用时, 氮气和流动相同时从相反方向注入管柱中形成气体和流动相的逆流, 然后从盘管中部注入的混合物根据形成泡沫的能力得到分离, 易形成泡沫的组分随气相被洗脱收集在泡沫流出部分, 而其他组分则随流动相流出。

12.2.1.5 交叉轴盘管行星离心色谱 (cross axis coil planet centrifuge)

这种仪器在使用中产生一种行星式运动, 使得盘管支架在围绕离心中轴转动 (公转) 的同时还沿着自己的水平方向轴旋转 (自转), 使得部分离心力矢量作用于盘管的半径方向, 以防止因两相乳化而降低固定相保留率的现象出现, 因此, 大大稳定了固定相的保留率, 特别适用于大量制备性分离纯化。

12.2.2 逆流色谱的特点

现代逆流色谱技术为化合物的分离纯化提供了一个新的手段, 与 HPLC 等液固色谱技术比较, 由于分离原理不同, 二者间存在很强的互补性。它无需固体作固定相, 不存在固体对样品组分的吸附、沾污、变性、失活、拖尾等现象, 能实现很高的回收率, 节省昂贵的材料消耗和溶剂消耗 (HPLC 的 1/10 以下), 运行使用的后续投入较低。逆流色谱在无需更换不同极性的色谱柱情况下, 通过提高极性溶剂或非极性溶剂比例的方法, 可以实现流动相从弱极性到强极性或相反的转化。由于色谱柱容积大, 无填料, 柱内空间全部是有效空间, 因此, 样品负载能力强, 制备量大, 重现性好。但是, 与气相色谱和高效液相色谱等相比, 逆流色谱的分离效率即理论塔板数还不高 (一般在 1000 以下), 一次分离所需时间还较长 (以小时计), 因此, 还不宜用于组成复杂的混合物的全谱分离分析。逆流色谱技术在基本原理以及溶剂系统选择等方面还有待于进一步的普及、研究、开发与应用。目前, HSCCC 等技术在生物化学、医药学、农业、环境、材料、化工、海洋生物以及无机离子等众多领域已得到成功应用。

12.2.3 溶剂体系的选择和制备

分离混合物, 最为关注的参数是分离度 (R_s)。色谱体系中最佳方法是通过改进选择性来实现的, 这种选择性主要取决于样品在两相溶剂中的分配系数。选择溶剂时要考虑到样品的极性、溶解度、电荷态和形成复合物的能力等。选择溶剂体系

时, 首先选出一个能使样品全部溶解的溶剂体系, 然后调整各溶剂的比例, 使得被分离各组分满足要求, 以提高分离度。可以采用相图来研究改变某一相的组成对另一相组成的影响, Serensen 等对近百种三元溶剂相图进行研究后, 总结归纳出三类溶剂体系: 乙酸乙酯: 正丁醇: 水 (EtOAc: BuOH: H₂O), 适用于极性弱的样品; 水: 二甲基亚砜: 四氢呋喃 (H₂O: DMSO: THF), 适用于极性强的难溶性样品如两性霉素 B; 氯仿: 甲醇: 水 (CHCl₃: MeOH: H₂O), 适用于大部分样品。此后又发展了其他通用的多元溶剂体系, 如正庚烷: 乙酸乙酯: 甲醇: 水体系和正庚烷: 甲醇: 甲基叔丁基醚: 甘醇二甲醚: 水体系等。选择溶剂体系时, 应遵循逆流色谱溶剂选择的普遍原则, 即不会造成样品的分解或变性; 对样品有足够高的溶解能力; 样品各组分在两相中有合适的分配系数 (一般为 0.12~5, 最好接近 1); 固定相能够实现足够多的保留等。可以通过溶剂混合后两相的分相时间来考察混合溶剂在色谱仪中的保留情况。值得指出的是, 对于 CCC 型设备, 若混合溶剂两相的分相时间小于 30s, 则说明两相间表面张力和相间密度差较大, 固定相容易保留; 若分相时间大于 30s, 则说明固定相不会在其中保留。然而, 对于 CPC, 即使混合溶剂的分相时间大于 30s, 在较高的转速下固定相仍有可能较好地保留。另外, 清华大学的李总成等从溶液理论出发, 建立了一个预测和选择逆流色谱溶剂体系的模型, 可以通过预测影响分离效果的两相分相情况、两相相比、密度、界面张力等因素来估算溶质的分离情况, 从而对溶剂体系进行选择。

12.2.4 CPC 的检测仪器

CPC 最常用的检测器是紫外检测器 (UV-detector)、蒸发光散射检测器 (ELSD) 和质谱仪。在 pH 区带精制模式下洗脱时, 通常的紫外检测不能很好地应对其特殊的峰形, 有研究者使用核磁共振检测装置 (NMR) 进行检测, 效果较好。

12.3 亲水色谱

12.3.1 简介

强极性化合物 (如糖类、蛋白质和强极性寡肽等) 的分离纯化中最大的问题在于它们在 RPLC 上的保留很弱, 甚至不保留, 因此不能得到很好的分离。亲水色谱 (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC) 作为一种分离极性化合物的液相色谱模式, 类似于正相色谱采用强极性固定相和相对极性较弱的水/有机溶剂混合物做流动相。在 HILIC 模式下, 化合物的保留时间随化合物极性的增强而增加。同时, 由于 HILIC 使用含水流动相, 这就可以解决正相色谱中水溶性物质不溶于流动相的问题。近年来, 随着药物分析、代谢组学、蛋白质组学等研究领域都不同程度地涉及强极性化合物的分离问题, HILIC 越来越受到关注和重视。

12.3.2 HILIC 的特点

HILIC 具有许多自身的优势。首先, HILIC 模式对强极性化合物和亲水化合

物具有很好的保留和分离选择性，是解决各类强极性化合物和亲水化合物分离问题的可靠手段。其次，HILIC模式使用的流动相体系相对简单，操作方便，克服了正相色谱(NPLC)中流动相对水溶性物质溶解性差、保留时间对流动相中水含量敏感等缺点。第三，由于流动相相对较少地使用盐溶液，易于兼容检测器，如蒸发光散射检测器、质谱检测器等。另外，HILIC的分离机理与反相色谱(RPLC)完全不同，而两者的流动相体系却相似，且分离选择性有很好的正交性，非常适合用于构建HILIC/RPLC二维色谱系统。应用于蛋白质及多肽等复杂样品的分离鉴定，成为解决复杂样品分离问题的有效手段之一。

12.3.3 HILIC 固定相

HILIC固定相的主要特征是固定相表面基团与水有很好亲和性和强极性。早期的HILIC固定相主要是原有的正相色谱固定相，如硅胶、氨基键合硅胶、二醇基键合硅胶等。近年来，专用亲水色谱的分离材料已广泛应用，主要是将含酰氨基、羟基、两性离子等强极性基团的分子键合到硅胶上作为HILIC分离材料。虽然按照Alpert提出的观点，亲水色谱的保留主要是依靠溶质在固定相表面吸附的“富水层”与流动相中的分配机理，但是由于溶质与固定相直接相互作用的存在，不同固定相的保留性质表现出较大的差异。本节将主要从固定相分子结构的角度对HILIC固定相的结构特征、保留特性以及应用概况等进行综述。

12.3.3.1 传统的NPLC固定相直接用于HILIC

NPLC使用的极性固定相主要有纯硅胶、氨基键合相、氰基键合相和二醇基键合相等。这些固定相具有较强的极性和亲水性，都能直接用于HILIC。但是在亲水性、选择性、重复性和使用寿命方面存在很多问题，其应用范围有限，不是理想的HILIC固定相。

12.3.3.2 专为HILIC设计的固定相

根据键合相的化学结构分类，HILIC固定相可分为酰胺型、多元醇羟基型和两性离子型等。这几类基团具有很好的亲水性，十分适合作为亲水色谱的固定相，而且在一定程度上可以解决传统正相固定相用于HILIC所存在的问题。值得注意的是，使用不同合成方法制备的HILIC固定相，其极性功能基团的连接方式和空间排布不同，得到的HILIC固定相的表面化学结构和分离性能会有很大区别。

(1) 酰胺固定相 酰胺基团有很好的亲水性和稳定性，而且是电中性基团。因此，酰胺固定相十分适合作为HILIC固定相，可以避免氨基固定相使用寿命短、分离重复性差和色谱峰形不佳等问题出现。在HILIC模式下用于分离核苷、核苷酸、肽、糖、糖醇和有机酸等亲水化合物，取得了很好的分离效果。

(2) 醇羟基固定相 醇羟基具有很好的极性和亲水性，同时又不会发生电离，反应活性也较低，具有很好的稳定性，因此十分适合作为亲水色谱固定相。与正相色谱中常用的二元醇羟基固定相相比，多元醇羟基固定相具有更丰富的表面醇羟基和特异的空间构型，因而其对强极性化合物的保留和分离选择性也有较大的增强。

(3) 两性离子固定相 两性离子是指在一个分子中同时存在正电荷中心和负电荷中心。两性离子固定相由于同时具有正电荷和负电荷中心，其总体的表面电荷效应较小（理论上应该为电中性），但亲水作用极强，同时静电相互作用远小于其他离子型固定相。

(4) 离子交换固定相用于 HILIC 常用于离子交换色谱的离子型固定相具有很好的亲水性，因此也可以应用于 HILIC 模式。由于离子型固定相表面带有较强的表面电荷，因此用于 HILIC 模式时仍然表现出离子交换（或排斥）作用，是一种离子交换（或排斥）/亲水作用混合色谱模式。基于磷酸化肽在 HILIC 模式下离子型固定相上的保留特性，Alpert 于 2008 年提出了电荷抑制的亲水作用色谱 (ERLIC)，实质即为离子排斥与亲水作用混合色谱模式。

12.3.4 展望

针对各类强极性样品的分离问题，结合 HILIC 模式的分离特性，设计和制备结构新颖的极性固定相仍是未来 HILIC 研究的重要方向。由于键合相的结构直接影响溶质与固定相的相互作用，而相互作用不仅决定色谱保留特性，而且对色谱分离效率也产生重要影响，因此 HILIC 固定相的发展除了需要考虑键合相结构对保留特性影响之外，还需要兼顾键合相结构对分离效率的影响，期望发展出适用范围广的 HILIC 固定相。对主要的 HILIC 色谱柱进行系统的色谱评价也是推广 HILIC 的应用基础，但是当前缺乏 HILIC 的评价方法和评价样品。色谱柱生产商评价 HILIC 色谱柱时所选择的样品也不尽相同，大多数只是给出少数几个样品的柱效，不能全面地反映色谱柱的特性。

12.4 快速色谱

12.4.1 简介

Sill 于 1978 年首次命名 FLASH 色谱，同时在《有机化学杂志》(The Journal of Organic Chemistry) 发表论文，从此快速色谱方法得以建立，新的设备也不断涌现。在国内，彭勤纪教授自国外归国后，引进了该技术并进行了系统综述，首次将 FLASH 色谱译为“快速色谱”。经过 20 余年的发展，FLASH 色谱已经广泛被人使用，成为常规的纯化分离设备。

12.4.2 快速色谱原理与系统组成

快速色谱是基于通过泵产生压力（中低压），加速流动相通过预填充柱的一种快速制备柱色谱形式。这是接近制备液相色谱的一种简单和节约的方法。快速色谱起源于开口玻璃柱色谱，主要应用于合成混合物及天然混合物的快速分离纯化。其分离原理完全等同于液固色谱分离原理。

12.4.2.1 经典快速色谱系统

最早出现的快速色谱系统由玻璃柱、贮液瓶、压缩空气调节阀组成。该类型成

本低，便于观察，易于实现，但工作压力低，色谱柱易破损，重现性差。随后经过不断改进，形成了完整经典快速色谱系统，由输液压力罐、流量调节阀、FLASH预装柱、上样装置组成，设备紧凑，压力高，使用方便，重现性高。经典快速色谱仍使用气压加压，压力范围约 $0 \sim 7 \times 10^5 \text{ Pa}$ ，柱长约 15cm，填料粒度为 $40 \sim 60 \mu\text{m}$ ，可固体与液体上样，手工收集流分。

12.4.2.2 自动化快速色谱

自动化程度更高与分离速度更快，使得快速色谱有了更进一步的发展，形成了现代自动化快速色谱系统。自动化快速色谱装置带有特殊设计的预装柱或空柱、色谱泵、检测器、自动馏分收集器、工作站，有的仪器还有梯度洗脱系统与柱切换系统、自动进样系统，可自选优化条件，实现无人操作，极大地降低了人力成本，加快了开发速度。色谱用于制备，拥有快速色谱的优点：

- ① 速度快，一般为开口柱色谱分离时间的 $1/8$ ，节省时间，样品变化分解慢；
- ② 制备量大，比同样直径的 HPLC 制备柱，至少可多上一倍量样品；
- ③ 无需高成本设备，如制备 HPLC 设备成本高，使用维护费用均高于快速色谱；
- ④ 溶剂消耗相对低，使用溶剂比玻璃柱节省；
- ⑤ 填料可自由装填，填料消耗小，无需购买昂贵的制备色谱柱；
- ⑥ 样品处理方便，不需要特殊处理，甚至可以采用干法上样。

12.4.3 与制备 HPLC 的关系

混合组分的分离效果主要取决于色谱系统的分离度，而分离度主要与洗脱溶剂的优化和柱子装填效果有关，因此在处理与制备 HPLC 关系时，要遵循以下原则：

- ① 只用快速色谱能完成的分离过程，就不采用制备 HPLC。
- ② 先用快速色谱对样品进行分离和预处理，最后采用制备 HPLC 进行精制。

参 考 文 献

- [1] Alim S, Rafiuddin S, Ghorri M, et al. Simultaneous determination of metformin hydrochloride, cyanoguanidine and melamine in tablets by mixed-mode HILIC. *Chromatographia*, 2008, 67: 517-525.
- [2] Eva matisova, milena Domotova. Fast gas chromatography and its use in trace analysis. *J Chromatogr A*, 2003, 1000: 199-221.
- [3] Guiochon G. Preparative liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2002, 965: 129-161.
- [4] Wei Y, Zhang T, Ito Y. Preparative isolation of osthol and xanthotoxol from Common Cnidium Fruit (Chinese traditional herb) using stepwise elution by high-speed counter current chromatography. *J Chromatogr A*, 2004, 1033 (2): 373-377.

第3部分

电泳法分离纯化蛋白质

电泳是指带电荷的粒子或分子在电场中向着与其电性相反的电极移动的现象。大分子的蛋白质、多肽、病毒粒子，或小分子的氨基酸、核苷酸等在电场中都可作定向泳动，电泳为生命科学研究提供了重要的手段。聚丙烯酰胺凝胶在电泳中的应用使电泳的手段得到了很大程度的优化和多样化。其中 SDS-PAGE 和双向凝胶电泳最为常用，极大地促进了生物化学和分子生物学的进展。

本部分分 3 章分别介绍聚丙烯酰胺凝胶电泳（第 13 章）、聚丙烯酰胺等电聚焦（第 14 章）和联合了这两项技术的双向电泳（第 15 章）。第 13 章介绍了聚丙烯酰胺凝胶电泳常用的几种方法：SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳、非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳以及适合小分子多肽检测的 Tricine 凝胶电泳。第 14 章介绍等电聚焦的 pH 梯度的产生与凝胶配制方法。随着用于等电聚焦凝胶的商品化，研究者也越来越依赖由公司所制备的商品化凝胶，特别是在第 15 章所介绍的双向电泳中，第一向的等电聚焦电泳所用的胶条几乎都购买自公司所生产出来的成品，不需要自行制备。

需要提出的是，凝胶电泳的使用更多地是为了分析、检测样品中蛋白的物理属性（大小和等电点等）以及目的蛋白在样品中的含量和纯度等。但通过凝胶电泳也可以实现对蛋白质的纯化和微量制备，常用的方法就是用电泳的方法分离蛋白质后从凝胶中回收目的蛋白质条带。从凝胶中回收蛋白质在第 13 章 SDS-凝胶电泳中介绍，其他聚丙烯酰胺凝胶电泳中的蛋白质条带也可以通过类似的方法纯化。另外，目前国内外的生物仪器研发公司也开发出了很多用于电泳纯化的设备，可进行较大量的制备。详情可查看如国外的 Bio-Rad 公司、Pharmacia 公司和国内的北京六一，上海帮华、生仪等公司生产的电泳回收设备。

第 13 章 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳是绝大部分蛋白质分析必不可少的手段。丙烯酰胺单体在自由基的引发下聚合为长链，在 N,N' -亚甲基双丙烯酰胺存在下，这些长链交联起来呈立体网状结构，形成具有分子筛效应的凝胶。所形成凝胶的多孔性取决于链的长度以及链间的交联度，这种多孔性也决定了聚丙烯酰胺凝胶电泳的有效分离范围。空隙的大小随双丙烯酰胺、丙烯酰胺比例的增加而变小，当比例接近于 1:20 时空隙最小，而多数聚丙烯酰胺凝胶是按 1:29 的比例配制的。

聚丙烯酰胺凝胶电泳根据其有无浓缩效应，可分为连续系统和不连续系统两类。连续系统电泳体系中缓冲液 pH 值及凝胶浓度均一，蛋白质在电场作用下依靠电荷效应和分子筛效应进行分离。不连续系统中由于缓冲液离子成分、pH、凝胶浓度及电位梯度的不连续性，蛋白质在电场中不仅有电荷效应、分子筛效应，还具有浓缩效应，因而其分离条带清晰度及分辨率均较前者佳。大多数情况下，聚丙烯酰胺凝胶电泳采用的是不连续缓冲系统。

根据蛋白质在电泳体系中的状态又可分为变性和非变性两种形式。非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中，蛋白质在电泳中保持完整的结构和状态，其电泳受到以下因素的影响：蛋白大小、形状和自身净电荷以及是否和其他蛋白形成复合物；另一种是在体系中引进变性剂如十二烷基硫酸钠（SDS），使蛋白质在变性的条件下电泳，这种变性电泳由于能够准确测定蛋白质大小而受到广泛的应用。下面介绍几种常用的聚丙烯酰胺凝胶电泳。

13.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳常用溶液及配制

① 40% 丙烯酰胺溶液 称取单丙烯酰胺 40g 和亚甲基双丙烯酰胺 1.0g，用超纯水溶解后定容至 100mL，过滤后置棕色瓶中，4℃ 贮存可用 1~2 个月。注意：非聚合状态的丙烯酰胺是一种神经毒剂，可以通过皮肤被人体吸收并富集。操作时要避免皮肤接触并戴合适的口罩，于通风橱中进行。

② 1.5mol/L pH 8.8 Tris-HCl 缓冲液 称取 Tris 18.2g，加入 50mL 水，用 1mol/L 盐酸调 pH 8.8，最后用蒸馏水定容至 100mL。

③ 1.0mol/L pH 6.8 Tris-HCl 缓冲液 称取 Tris 12.1g，加入 50mL 水，用

1mol/L 盐酸调 pH 6.8, 最后用蒸馏水定容至 100mL。

④ 10% SDS 10g SDS 溶解于 100mL 超纯水中。SDS 粉末对人体有害, 对眼睛、咽喉等有强烈刺激, 配制时应做好防护。

⑤ 10% 过硫酸铵 10g 过硫酸铵溶解于 100mL 超纯水中, 可分装后冷冻保存 (1 年内有效)。对人体有害, 应避免进入眼睛中。

⑥ TEMED (四甲基乙二胺) 聚丙烯酰胺聚合反应催化剂, 取试剂时尽量在通风橱中操作。

⑦ SDS-样品缓冲液 (5×) 甘油 5mL, SDS 1g, β -巯基乙醇 2.56mL (或者用 0.5mol/L DTT), 0.5mol/L pH 6.8 Tris-HCl 2.13mL, 0.05g 溴酚蓝, 溶解后加水定容至 10mL。

⑧ SDS 电极缓冲液 称取 Tris 6.0g、甘氨酸 28.8g, 加入 SDS 1g, 加蒸馏水溶解后定容至 1L。

⑨ 3mol/L 凝胶缓冲液 (pH 8.45) 称取 Tris 36.3g 溶于 90mL 水中, 调节 pH 至 8.45 后加入 0.3g SDS, 溶解后定容至 100mL。

⑩ 70% 甘油 取甘油 70mL, 加水定容至 100mL。

⑪ Tricine 负极电泳缓冲液 (10×) 称取 24.2g Tris 和 35.84g Tricine 溶解于 180mL 水中, 调节 pH 至 8.25 后加入 2g SDS, 搅拌溶解后定容至 200mL。

⑫ Tricine 正极电泳缓冲液 (10×) 称取 48.4g Tris 溶解于 200mL, 定容前调节 pH 至 8.9。

13.2 不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳

凝胶分为两部分: 浓缩胶和分离胶。浓缩胶 pH 为 6.8, 用低浓度胶, 交联度低, 孔径大, 蛋白带负电荷少。样品缓冲液和浓缩胶选 Tris/HCl 缓冲液, 电泳缓冲液选 Tris/Gly, 在电泳过程中, 电极缓冲液中甘氨酸负离子解离较少 (终末电解质), 氯离子是快离子 (先导电解质), 蛋白的迁移速率介于两者之间。氯离子后面会形成低电导区, 导致产生较高的电场强度, 促使蛋白质和甘氨酸根离子迅速移动, 并形成稳定的界面。蛋白聚集在移动界面附近, 浓缩成一中间层, 从而产生浓缩效应。

分离胶的 pH 为 8.8, 使用较高的胶浓度, 交联度高, 孔径小。在分离胶缓冲体系中, 蛋白质带负电荷增多, 电极缓冲液中甘氨酸负离子与氯离子一样解离较多, 迁移速度加快, 局部电位梯度变小, 蛋白质的迁移速率最慢。在电场作用下, 各个蛋白根据其分子大小和所带电荷不同, 而表现出不同的迁移速率。不同大小的蛋白质由于其自身的电荷效应以及聚丙烯酰胺凝胶的分子筛效应而分离开。

13.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

仅根据蛋白亚基分子量的不同而分离蛋白。这个技术首先是 1967 年由 Shapiro

建立的，他发现在样品介质和丙烯酰胺凝胶中加入离子去污剂和强还原剂后，蛋白质亚基的电泳迁移率主要取决于亚基分子量的大小，电荷因素可以忽略。

SDS是阴离子去污剂，它能破坏分子内和分子间的氢键，使分子散失原有的折叠，使蛋白解聚形成多肽链。同时解聚后的氨基酸侧链和SDS结合成带负电荷的SDS-蛋白质复合物，这种复合物由于结合大量的SDS，所带的电荷量大大超过了蛋白原有的电荷量，这样就消除了不同分子间的电荷差异和结构差异。样品中加入强还原剂如巯基乙醇或二硫苏糖醇后，能破坏肽链内和肽链间的二硫键，使组成蛋白质的多个亚基分离开来形成多条肽链。蛋白质在凝胶中的分离就主要以分子筛效应进行。由于SDS与蛋白质的结合量是与蛋白质的分子量呈比例的，因此在进行SDS电泳时，蛋白质分子的迁移速度取决于分子大小。在 $(15\sim 200)\times 10^3$ 的分子量范围内，蛋白质的迁移率和分子量的对数呈线性关系，符合以下公式：

$$\lg M_w = k - bX$$

式中， M_w 为分子量； X 为迁移率； k 、 b 均为常数。

若将已知分子量的标准蛋白质的迁移率对分子量对数作图，可获得一条标准曲线，未知蛋白质在相同条件下进行电泳，根据它的电泳迁移率即可在标准曲线上求得分子量。在实验过程中，可以预测蛋白质大小，根据表13.1来配制相应浓度的凝胶。表13.2和表13.3是常用聚丙烯酰胺凝胶的配方。

表 13.1 常用胶浓度与蛋白分离范围

胶浓度/%	分离范围/ $\times 10^3$	胶浓度/%	分离范围/ $\times 10^3$
5	36~200	12.5	14~100
7.5	24~200	15	14~60
10	14~200		

表 13.2 Tris-甘氨酸 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶配方

6%的分离胶								
体积/mL	5	6	7	8	9	10	15	20
水	2.9	3.5	4.0	4.6	5.2	5.8	8.7	11.6
40%丙烯酰胺混合液	0.75	0.9	1.05	1.2	1.35	1.5	2.25	3
1.5mol/L Tris(pH 8.8)	1.25	1.5	1.75	2	2.25	2.5	3.75	5
10%SDS	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1	0.15	0.2
10%过硫酸铵	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1	0.15	0.2
TEMED	0.004	0.005	0.005	0.006	0.007	0.008	0.012	0.016
8%的分离胶								
体积/mL	5	6	7	8	9	10	15	20
水	2.6	3.2	3.7	4.2	4.8	5.3	7.9	10.6
40%丙烯酰胺混合液	1	1.2	1.4	1.6	1.8	2	3	4
1.5mol/L Tris(pH 8.8)	1.25	1.5	1.75	2	2.25	2.5	3.75	5
10%SDS	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1	0.15	0.2
10%过硫酸铵	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1	0.15	0.2
TEMED	0.003	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	0.009	0.012

续表

10% 的分离胶								
体积/mL	5	6	7	8	9	10	15	20
水	2.4	2.9	3.4	3.8	4.3	4.8	7.2	9.6
40% 丙烯酰胺混合液	1.25	1.5	1.75	2	2.25	2.5	3.75	5
1.5mol/L Tris(pH 8.8)	1.25	1.5	1.75	2	2.25	2.5	3.75	5
10% SDS	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1	0.15	0.2
10% 过硫酸铵	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1	0.15	0.2
TEMED	0.002	0.002	0.003	0.003	0.004	0.004	0.006	0.008
12% 的分离胶								
体积/mL	5	6	7	8	9	10	15	20
水	2.1	2.6	3.0	3.4	3.9	4.3	6.4	8.6
40% 丙烯酰胺混合液	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7	3	4.5	6
1.5mol/L Tris(pH 8.8)	1.25	1.5	1.75	2	2.25	2.5	3.75	5
10% SDS	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1	0.15	0.2
10% 过硫酸铵	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1	0.15	0.2
TEMED	0.002	0.002	0.003	0.003	0.004	0.004	0.006	0.008
15% 的分离胶								
体积/mL	5	6	7	8	9	10	15	20
水	1.8	2.1	2.5	2.8	3.2	3.5	5.3	7.1
40% 丙烯酰胺混合液	1.875	2.25	2.625	3	3.375	3.75	5.625	7.5
1.5mol/L Tris(pH 8.8)	1.25	1.5	1.75	2	2.25	2.5	3.75	5
10% SDS	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1	0.15	0.2
10% 过硫酸铵	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1	0.15	0.2
TEMED	0.002	0.002	0.003	0.003	0.004	0.004	0.006	0.008

表 13.3 Tris-甘氨酸 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳积层胶配方

5% 的积层胶									
体积/mL	1	2	3	4	5	6	7	8	10
水	0.729	1.458	2.187	2.916	3.645	4.374	5.103	5.832	7.29
40% 丙烯酰胺混合液	0.125	0.25	0.375	0.5	0.625	0.75	0.875	1	1.25
1.0mol/L Tris(pH 6.8)	0.125	0.25	0.375	0.5	0.625	0.75	0.875	1	1.25
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.1
10% 过硫酸铵	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.007	0.008	0.01

13.4 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳

梯度胶即聚丙烯酰胺的浓度由上到下逐渐增加的凝胶。随着丙烯酰胺浓度增加，凝胶孔径随之变小。蛋白质在凝胶中迁移直至孔径大小阻碍了蛋白的进一步迁移。一旦蛋白的迁移遇到孔径限制，蛋白质的带型并不会随着电泳时间的延长而有所变化。梯度胶比线性胶有两点突出的优势：更大范围分子量的蛋白质可以在一个胶上电泳，很容易获得 $(10\sim 200)\times 10^3$ 分子质量范围的线性图；因为孔径限制作用，使梯度胶具有更高的分辨率，特别是低分子质量范围的蛋白质条带更加清晰，具有相近分子量的蛋白质有可能被区分开来。通常使用的浓度范围是 3%~30% 的

线性或凹性梯度，范围的选择取决于样品中目的蛋白的大小（如表 13.4）。

表 13.4 检测蛋白的范围和梯度胶的配制范围

项 目	轻 溶 液	重 溶 液
丙烯酰胺浓度	5%	30%
有效分离蛋白大小	200×10^3 以下	10×10^3 以上

13.5 小分子多肽凝胶电泳

在 SDS-PAGE 中，影响蛋白质分辨率的参数主要是丙烯酰胺的浓度、交联度（单、双丙比例）、积层胶和分离胶缓冲液的 pH 以及样品的制备方法等。在使用甘氨酸的电泳缓冲液体系中，蛋白质的分离范围从分子量 200000 到约 3000。低于 3KD 的蛋白质或多肽往往需要采用必要的更改措施才能得到可信的蛋白质聚集带并防止条带扩散。采用优化的 Tricine 胶系统能够分离小至 0.5kD 的多肽，这使得采用 SDS-PAGE 分析多肽图谱、表位图谱以及 N-端法序列分析蛋白质和多肽。但由于各种形式的 SDS-PAGE 都是变性的系统，所以不适用于需要功能性分析的蛋白质和多肽。

13.6 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳是指蛋白质在从样品制备到电泳分离的整个过程中都不含有变性剂，使蛋白质在电泳分离过程中保持原来的结构和状态。决定蛋白质迁移的因素主要有：蛋白质的大小、形状以及蛋白质的固有电荷。其所用电泳装置和变性聚丙烯酰胺凝胶电泳相同，同样也可采用均一胶或梯度胶电泳。非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳可用于分析蛋白质多聚化、蛋白质磷酸化等。

13.7 聚丙烯酰胺凝胶中蛋白的回收

用电泳的方法纯化蛋白需要将蛋白从凝胶中分离的步骤，传统的操作方法是 PAGE 的蛋白条带从凝胶上切离出来之后，将蛋白从凝胶上洗脱下来，洗脱的方法包括自由洗脱和电洗脱。自由洗脱就是把胶条置于用于溶解蛋白质的缓冲液中，蛋白通过扩散溶解而洗脱。电洗脱则需要把胶条置于电场中，通过电泳的方法将蛋白从凝胶中分离出来。通过这些方法将蛋白从凝胶中分离之后，进行浓缩、置换缓冲液等操作即可得到纯化的目的蛋白。目前也已经有公司提供用于电泳法纯化蛋白质的制备电泳装置，可查看各大生物公司的网站。这里介绍最简单的蛋白回收方法——自由洗脱法，所需试剂包括 0.25mol/L KCl（4℃ 保存）、PBS。

实验步骤：

- ① SDS-PAGE 分离蛋白质。

② 用预冷的 0.25mol/L KCl 染色，凝胶中的蛋白条带会呈现出白色。此过程大约5~10min。

③ 选择目的蛋白，用干净的刀片切下该蛋白条带，置于蒸馏水中浸泡直至恢复透明，大约需要 5~10min。

④ 将凝胶带取出放至 1.5mL 离心管中，用无菌清洁的吸头捣碎胶带，加入 3~5倍胶条体积的 PBS，4℃抽提过夜。

⑤ 第二天将抽提液吸出保存于新管中，可根据需要加入新的 PBS 再次抽提。

⑥ 将收集的提取液通过丙酮沉淀、冷冻干燥或者超滤等方法获得纯化蛋白粉末或者浓缩液。

方案 13.1 SDS 变性电泳分析牛血清白蛋白 (BSA)

材料

40%丙烯酰胺溶液

10%SDS

1.5mol/L pH 8.8 Tris-HCl 缓冲液

1.0mol/L pH 6.8 Tris-HCl 缓冲液

0.05mol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液

10%过硫酸铵

TEMED

SDS 样品缓冲液

SDS 电极缓冲液

固定液：取 50%甲醇 454mL，冰醋酸 46mL，混匀

染色液：称取考马斯亮蓝 R250 0.125g，加上述固定液 250mL，过滤后备用

脱色液：冰醋酸 75mL，甲醇 50mL，加蒸馏水定容至 1000mL

方法

1. SDS 聚丙烯酰胺凝胶的灌制

(1) 按厂商的说明书安装玻璃板。

(2) 根据凝胶模具的体积，在小三角瓶中按所需丙烯酰胺浓度配制分离胶溶液，按表 13.2 中所示的顺序依次混匀各成分。TEMED 加入后聚合反应就会开始，快速混合后应立即进入下一步操作。

(3) 将丙烯酰胺溶液灌至两块玻璃板中间的间隙中，给积层胶留出足够空间（梳齿长度加 1cm 的空间）。用移液器小心地在丙烯酰胺溶液上覆盖一层 0.1%SDS（配制低浓度胶时）或异丙醇（配制高浓度胶时）。室温放置约半小时即可凝聚。

(4) 聚合完成后倒掉覆盖液，用去离子水清洗凝胶顶部，除去残留的未聚合的丙烯酰胺，用滤纸条吸净残留的水。

(5) 制备积层胶。按表 13.3 配制所需浓度的丙烯酰胺溶液，按表中的顺序混匀各成分，加完 TEMED 后迅速旋动混合物并进行下一步。

(6) 将积层胶直接灌至聚合好的分离胶上，并立即插入一块洁净干燥的梳子，注意不要带气泡，再加一些积层胶溶液填满梳子之间的空隙，室温静置半小时。

2. 样品制备和电泳

(1) 用 PBS 溶解 BSA 为 2.0mg/mL。

(2) 样品 20 μ L 与样品缓冲液 5 μ L 混合（相当于 40 μ g 蛋白）后，煮沸（100 $^{\circ}$ C）3min，冷却至室温后用待用。

(3) 积层胶聚合完成后小心拔下梳子并避免使胶齿变形。将胶板固定在电泳装置上，上下槽中加入电泳缓冲液，倾斜电泳槽，尽量排除胶槽底部的气泡，再将上槽中的电泳缓冲液加满。可用移液器吸电泳缓冲液轻轻吹洗上样孔，除去未聚合的丙烯酰胺。

(4) 按预定顺序加样，加样不得溢出加样孔，可用带凝胶上样吸头的微量移液器加样，不用的孔中加入等体积的 1 \times SDS 上样缓冲液。

(5) 连接电源，确认电源正负极连接正确。按 8V/cm 的电压电泳，至燃料前沿进入分离胶后提高到 15V/cm 继续电泳，直到溴酚蓝达到分离胶的底部，关闭电源。

(6) 从电泳装置中卸下玻璃板，小心撬开并标记好胶的方向和加样顺序。

(7) 至此可对凝胶进行固定、考马斯亮蓝或银盐染色、荧光自显影或放射自显影，或者进行免疫印迹。

问题分析及解决方案

1. 溴酚蓝指示剂在两侧上翘或下垂。这种现象多由凝胶聚合不均匀所引起。凝胶溶液配制过程中应让各成分充分混匀。另外，凝胶底部出现气泡也会影响胶板中的电流走向，从而使样品不以垂直方向电泳，这就需要电泳槽的组装过程中要排除凝胶底部存在的气泡。

2. 拖尾现象是电泳中最常见的现象，这常常是由于样品点样量过多和溶解不完全引起的。可以通过加样前对样品离心来解决，选用合适的样品缓冲液和凝胶缓冲液也可改进样品的效果。

3. 出现纹理或斑点通常是由于样品中不溶颗粒引起的，克服办法是增加溶解度和离心除去不溶性颗粒。

4. 蛋白带过宽，与邻近蛋白泳道的蛋白带相连，这是由于加样量太多或加样孔泄漏引起的。加样孔泄漏往往是由于凝胶与玻璃板之间产生缝隙而造成的，在凝胶配制过程以及电泳槽组装过程中应避免对凝胶两侧玻璃板的直接挤压，这种挤压往往会造成凝胶与玻璃板之间产生缝隙。

5. 蛋白带模糊不清和分辨不佳是由多种原因引起的。为了提高分辨率，应避免加入过多的样品，小体积样品可给出窄带。加样后应立即电泳，以防止扩散。选

选择合适的凝胶浓度，使组分得以充分的分离。通常靠近前沿的蛋白带分辨率不佳，所以应根据分子量与凝胶孔径的关系，灌制合适浓度的凝胶。样品的蛋白水解作用也引起扩散而使分辨率降低。水解作用通常发生在样品制备的过程中，特别是从细胞中裂解得到的样品，有内源性蛋白酶会水解样品蛋白，如果在缓冲液中加入蛋白酶抑制剂可以减少这种情况的发生。

方案 13.2 BSA 变性梯度胶电泳方案

材料

40% 丙烯酰胺溶液
10% SDS
1.5 mol/L pH 8.8 Tris-HCl 缓冲液
1.0 mol/L pH 6.8 Tris-HCl 缓冲液
蔗糖
梯度混合器
带有微量移液吸头的聚乙烯管
蠕动泵
滤纸

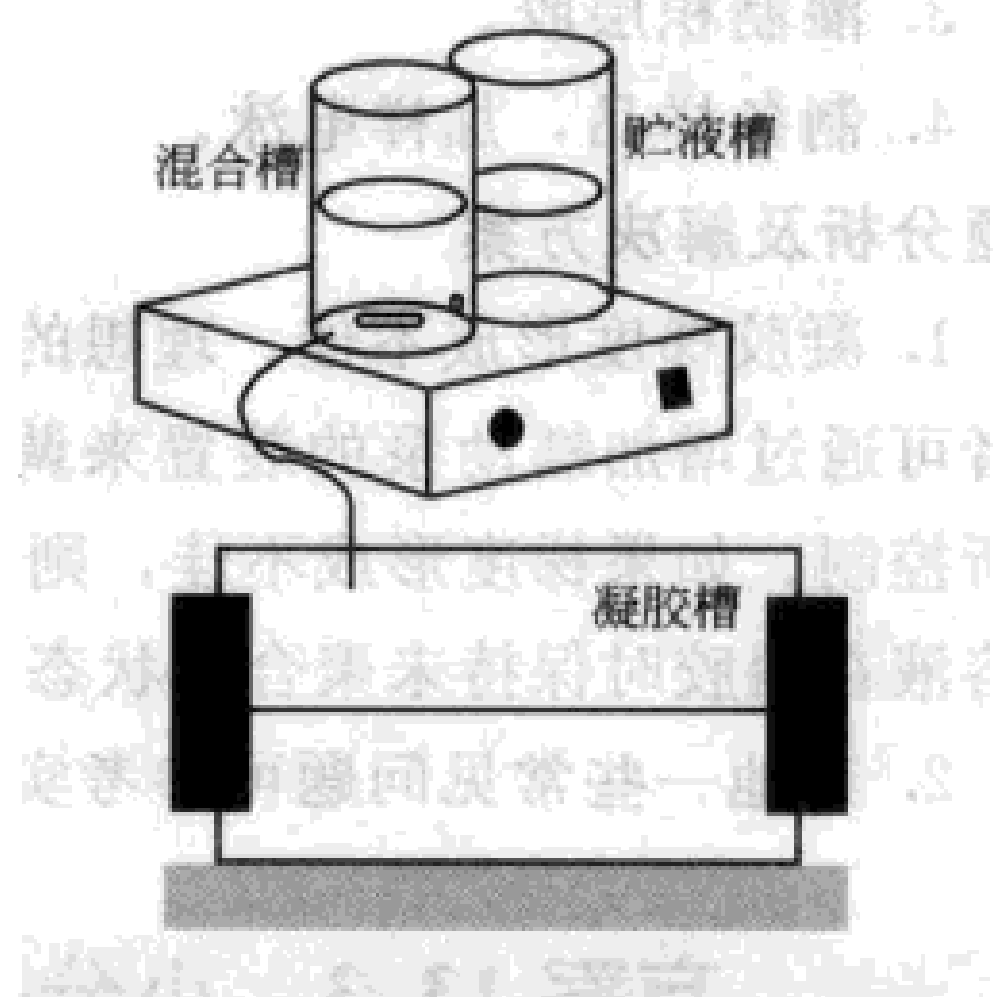


图 13.1 梯度混合器灌胶示意图

方法

1. 安装磁力搅拌器和梯度混合器。

如图 13.1 所示固定于铁架台上，聚乙烯管子一端连接到梯度混合器的输出阀上，带有微量移液器吸头的另一端置于垂直板凝胶夹层的上方。为使流速平稳及易于控制，可在梯度混合器和凝胶夹层之间安装一个蠕动泵。在梯度混合器输出端的混合槽中放入一个小磁力搅拌转子。

表 13.5 配制梯度胶的丙烯酰胺凝胶重溶液

贮液	重溶液丙烯酰胺浓度/%										
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
40% 丙烯酰胺溶液	3.75	4.13	4.5	4.88	5.25	5.63	6.0	6.38	6.75	7.13	7.5
1.5 mol/L Tris (pH 8.8)	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
10% SDS	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
H ₂ O	7.3	6.92	6.55	6.17	5.8	5.42	5.05	4.67	4.3	3.92	3.55
蔗糖/g	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25
10% 过硫酸铵	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

2. 梯度胶灌制。

(1) 根据表 13.2 及表 13.5 中配方分别配制丙烯酰胺凝胶轻溶液和重溶液（置于冰上防止凝聚），不加过硫酸铵。

(2) 关闭混合器的输出阀和两槽间的连通阀。贮液槽中加入 7mL 丙烯酰胺轻溶液，短暂打开连通阀，使少量丙烯酰胺轻溶液通过阀门以排除阀门中的气泡。在混合槽中加入 7mL 丙烯酰胺重溶液。

(3) 往两个液槽中加入 10% 过硫酸铵和 TEMED，用吸管快速混匀。开启磁力搅拌器，调整转速。先后完全打开连通阀，调整输出阀使流速为 2mL/min 左右，从夹层顶部加入凝胶液体。注意最后流速不能过快，否则会影响梯度的形成。

(4) 在梯度胶顶部加入异丙醇，静止聚合 1h。

3. 灌制积层胶。

4. 制备样品，加样电泳。

问题分析及解决方案

1. 凝胶梯度形成不佳。理想的梯度形成需要适当的灌胶流速和凝胶聚合速度，前者可通过增加蠕动泵的装置来调节，后者则由所加入的过硫酸铵和 TEMED 的量所控制。如果梯度形成不佳，则可适当调慢流速和增加催化剂的量，但应确保凝胶溶液在灌胶时保持未聚合的状态。

2. 其他一些常见问题可参考实验方案 13.1 中的问题分析及解决方案。

方案 13.3 小分子多肽（抗菌肽）凝胶电泳

简介

在对昆虫免疫的研究中发现，昆虫的幼虫能够分泌出一类小分子多肽，能特异性抑制细菌的侵袭。这类多肽往往只有数十个氨基酸，但有着非常重要的功能。这些小分子多肽在常规的凝胶电泳中很难得到清晰的条带，而采用改进的凝胶配方，则可实现小分子多肽的电泳。

材料

3mol/L 凝胶缓冲液 (pH 8.45)

40% 丙烯酰胺溶液 29 : 1 (如果是更小肽段检测，可用 19 : 1 的 40% 丙烯酰胺溶液)

70% 甘油

Tricine 负极电泳缓冲液

Tricine 正极电泳缓冲液

10% 过硫酸铵

TEMED

样品缓冲液

方法

1. 根据表 13.6 中的配方，配制溶液及灌制分离胶和积层胶。

表 13.6 分离胶和积层胶配方

贮液	分离胶(30mL)	积层胶
40%丙烯酰胺溶液	10mL	2.12mL
3mol/L 凝胶缓冲液(pH 8.45)	10mL	5mL
H ₂ O	6.2mL	6.7mL
甘油	4.00mL	0mL
10%过硫酸铵	133 μ L	160 μ L
TEMED	13.2 μ L	16 μ L

2. 样品准备，用样品缓冲液处理，100℃煮 3min。
3. 小心从胶槽中拔出样品梳子，用阴极电泳缓冲液冲洗并加满加样孔。
4. 安装电泳装置，在下层缓冲液槽中加入阳极电泳缓冲液，上层缓冲液槽中加入阴极电泳缓冲液使之没过胶孔。
5. 加样，电泳。电压设置：30V，1h，150V，4~5h，可将电泳槽置于 4℃冰箱中，使电泳槽降低温度。

问题分析及解决方案

请参考方案 13.1 中的问题分析及解决方案。

方案 13.4 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

材料

- 40%丙烯酰胺溶液
- 1.5mol/L pH 8.8 Tris-HCl 缓冲液
- 1.0mol/L pH 6.8 Tris-HCl 缓冲液
- 0.05mol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液
- 10%过硫酸铵
- TEMED
- 非变性细胞裂解液
- 非变性样品缓冲液
- 非变性电极缓冲液

方法

1. 非变性聚丙烯酰胺凝胶的灌制
 - (1) 按厂商的说明书安装玻璃板。
 - (2) 根据表 13.2 的配方（将 10%SDS 换成等体积的水）配制所需浓度的分离胶溶液，TEMED 加入后聚合反应就会开始，快速混合后应立即进入下一步操作。
 - (3) 将丙烯酰胺溶液灌至两块玻璃板中间的间隙中，给积层胶留出足够空间（梳齿长度加 1cm 的空间），室温放置约半小时。
 - (4) 聚合完成后倒掉覆盖层，用去离子水清洗凝胶顶部，除去残留的未聚合的

丙烯酰胺，用滤纸条吸净残留的水。

(5) 制备积层胶。按表 13.3 配方（将 10% SDS 换成等体积的水）配制适当体积所需浓度的丙烯酰胺溶液，加完 TEMED 后迅速混匀并进行下一步。

(6) 将积层胶直接灌至聚合好的分离胶上，并立即插入一块干净的梳子，注意不要带入气泡，再加一些积层胶溶液填满梳子之间的空隙，室温静置半小时。

2. 样品制备和电泳

(1) 在冰上用非变性细胞裂解液裂解细胞，收集裂解液 4℃ 离心，13000r/min 离心 15min。取上清液，与非变性样品缓冲液混合后 4℃ 保存。

(2) 积层胶聚合完成后小心拔下梳子并避免造成胶齿变形，用去离子水洗涤加样槽，除去未聚合的丙烯酰胺。将胶板固定在电泳装置上，上下槽中加入电泳缓冲液，倾斜电泳槽，尽量排除胶槽底部的气泡，再将上槽中的电泳缓冲液加满。

(3) 按预定顺序加样，加样不得溢出加样孔，可用带凝胶上样吸头的微量移液器加样，不用的孔中加入等体积的样品缓冲液。

(4) 将电泳槽放置于 4℃ 冰箱内。连接电源，确认电源正负极连接正确。按 2V/cm 的电压电泳，至染料前沿进入分离胶后提高到 8V/cm 继续电泳，直到溴酚蓝达到分离胶的底部，关闭电源。

(5) 从电泳装置中卸下玻璃板，小心撬开并标记好胶的方向和加样顺序。

(6) 至此可对凝胶进行固定、考马斯亮蓝或银盐染色、荧光自显影或放射自显影，或者进行免疫印迹（进行免疫印迹时需先用带有 SDS 的缓冲液浸泡 30min 以使蛋白充分结合 SDS）。

问题分析及解决方案

非变性胶中，蛋白质的迁移率与蛋白质的大小、形状和固有电荷有关。非变性聚丙烯酰胺凝胶和变性 SDS-PAGE 电泳在操作上基本上是相同的，只是非变性聚丙烯酰胺凝胶的配制和电泳缓冲液中不能含有变性剂如 SDS 等，同时要注意以下几个问题。

1. 由于非变性条件下，蛋白质结构比较完整，立体三维结构的蛋白质的电泳往往会受到凝胶孔径的限制，电泳时往往需要配制相对于变性电泳所用的凝胶浓度低的凝胶。

2. 非变性条件下蛋白质易于形成复合体，如果不是为了检测蛋白之间的相互作用，则应当在样品制备过程中选用能够减少蛋白质相互作用的试剂如非离子型去污剂。

3. 在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的过程中，蛋白质的迁移率不仅和蛋白质的等电点有关，还和蛋白质的分子量以及分子形状有关，其中蛋白质的等电点是最重要的影响因素，要根据蛋白质的等电点来选择具有合适 pH 的电泳缓冲系统，所选 pH 的大小应比目的蛋白的等电点高。

4. 在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的过程中，要注意电压过高引起发热而导致

蛋白质变性, 大部分的非变性电泳可以选择低压长时间的电泳, 且电泳槽最好置于 4℃ 或冰浴中进行。

5. 其他常见问题请参考实验方案 19.1 中的问题分析及解决方案。

参 考 文 献

- [1] Joseph Sambrook, David W Russell. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [2] Raymond S and Weintraub L. Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science*, 1959, 130: 711-712.
- [3] Richard J Simpson. *Purifying Proteins for Proteomic*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004.
- [4] Righetti P G. *Immobilized pH gradients: Theory and methodology*. Amsterdam: Elsevier, 1990: 259.
- [5] [美] 科林根 J E 等著. 精编蛋白质科学实验指南. 李慎涛等译. 北京: 科学出版社, 2005.



第 14 章 聚丙烯酰胺等电聚焦

14.1 聚丙烯酰胺等电聚焦具有高分辨率的特点

等电聚焦的优点是有很高的分辨率，可将等电点相差 0.01~0.02pH 单位的蛋白质分开。其他电泳往往都会受扩散作用的影响，随着电泳时间和迁移距离的增加，蛋白带越走越宽，而等电聚焦则与之相反，蛋白条带会随着聚焦时间的增加而变窄，从而易于与其他蛋白区别开来而具有高的分辨率。通过等电聚焦也可以测定一个蛋白质的等电点，其精确度可达 0.01pH 单位。另外，由于其高分辨率的特点，等电聚焦也可用于检测微量的样品。

14.2 等电聚焦 pH 梯度的形成

等电聚焦需要在一个稳定的 pH 梯度条件下进行。pH 梯度的形成有两种方法：一是用两种不同的 pH 缓冲液相互扩散，在混合区形成 pH 梯度（人工 pH 梯度），这种 pH 梯度不稳定，常用于制备电泳。另一种是利用载体两性电解质在电场作用下形成自然 pH 梯度，这种 pH 梯度比较稳定，常用于蛋白质样品等电聚焦电泳。

常用的载体两性电解质是一系列脂肪族多氨基、多羧基类的混合物，即是一系列的异构物和同系物，分子量在 300~1000 之间，各组分的等电点既有差异又相接近，等电点的范围在 2.5~11 之间。这类载体两性电解质在其等电点处有较强的缓冲能力和良好的导电性，且化学性质呈惰性。

在制备聚丙烯酰胺凝胶时，将载体两性电解质混合于凝胶溶液中。电泳时凝胶板正极的电极液是磷酸，负极是氢氧化钠。正极呈酸性环境，载体两性电解质都带正电荷，但由于等电点的不同，其所带正电荷数量就有所差异，电泳时负极泳动的速度也就因此不同。同理，负极呈碱性环境，载体两性电解质带有数量不等的负电荷，以不同速度向正极泳动。根据两性电解质的特性，在泳动过程中又不断地与溶液交换质子，改变了溶液的 pH。当达到平衡时，不再出现质子的交换时，载体两性电解质到达等电点并各处于自己的等电点区域，随着载体两性电解质等电点梯度的形成，也就形成了 pH 梯度。由于聚丙烯酰胺凝胶具有防对流扩散的作用，使

pH 梯度保持稳定不变。

表 14.1 是配制不同 pH 范围等电聚焦凝胶的载体两性电解质的配方, 可根据目的蛋白的等电点选择合适的不同两性电解质的配比。

表 14.1 不同 pH 范围等电聚焦凝胶的载体两性电解质的配方

pH 范围	载体两性电解质 pH 范围	凝胶中的百分比/%
3.5~10	3.5~10	2.4
4~6	3.5~10	0.4
	4~6	2
6~9	3.5~10	0.4
	6~8	1
	7~9	1
9~11	3.5~10	0.4
	9~11	2

14.3 等电聚焦电泳板式

最早的等电聚焦电泳是垂直板式, 后来发展为水平板式。超薄层水平板式也是近几年发展起来的, 这种形式的电泳的优点是节省两性电解质试剂, 加样数量多, 利于比较不同样品的电泳结果, 而且电泳后的固定、染色和干燥都很方便、迅速。水平板式等电聚焦电泳的最大优点是防止了由于电极液的电渗作用而引起 pH 梯度的改变。需要提出的是, 现在有商品化的等电聚焦凝胶, 但大都限于水平平板电泳系统 (如 Pharmacia-LKB、Hoefer 等), 这些商品化的凝胶在实验过程中具有较好的重复效果。

方案 14.1 HeLa 细胞裂解液等电聚焦

简介

细胞是由很多组分构成的, 其中蛋白质是非常重要的组分, 这些蛋白质在细胞内分布于各种细胞器中, 有着不同的功能。细胞内蛋白质的分子大小、形状、等电点都有着各种各样的差异, 通过等电聚焦可以分析细胞内蛋白质等电点的分布。在哺乳动物细胞内, 大部分蛋白质的等电点处于 5~7 的范围, 也有处于 <5 或者 >9 的蛋白质, 这些特殊的蛋白质往往在细胞内有着非常重要的功能。

材料

40% 丙烯酰胺溶液 (同第十三章所用溶液), 10% 过硫酸胺, TEMED

载体两性电解质

标准等电聚焦样品

HeLa 细胞裂解液: 10^7 个细胞溶解于 500 μ L 细胞裂解液中, 4 $^{\circ}$ C 1300r/min

离心 20min, 取上清液至新管

2×变性凝胶上样缓冲液 (适用于 pH 4~6): 尿素 2.4g; pH 3.5~10 载体两性电解质 20μL; pH 4~6 载体两性电解质 100μL; Triton X-100 100μL; β-巯基乙醇 50μL; 双蒸水 2.1mL; 1%溴酚蓝 200μL

电极液: 阳极 10mmol/L 磷酸 (使用前由 1mol/L 贮液新鲜配置); 阴极 20mmol/L 氢氧化钠 (使用前由 1mol/L 的贮液新鲜配制)

固定液: 甲醇 35mL, 三氯乙酸 10g, 磺基水杨酸 3.5g, 加水定容到 100mL

考马斯亮蓝染色液: 乙醇 35mL, 冰醋酸 10mL, 考马斯亮蓝 R250 0.1g, 加水定容到 100mL, 溶解后过滤备用

脱色液: 乙醇 25mL, 冰醋酸 10mL, 加水定容到 100mL

保存液: 甘油 1~5mL, 乙醇 25mL, 冰醋酸 10mL, 加水定容到 100mL

方法

1. 灌胶

(1) 组装灌胶器。

(2) 按表 14.2 的配方配制 8cm×7cm×0.75mm pH 4~6 变性等电聚焦凝胶。将尿素、水、40%丙烯酰胺溶液和载体两性电解质溶液混匀, 避免剧烈摇动, 轻微加热尿素溶解更快。溶解后加入过硫酸铵和 TEMED, 轻轻混匀 (开始聚合, 操作要迅速)。

表 14.2 pH4~6 变性等电聚焦凝胶配方 (总体积 6mL)

水	5.4mL
40%丙烯酰胺溶液	2.0mL
载体两性电解质溶液 pH 3.5~10	48μL
载体两性电解质溶液 pH 4~6	240μL
尿素	6.0g
10%过硫酸铵	25μL
TEMED	20μL

(3) 将上述混匀溶液倒入灌胶器 (尽量避免气泡产生)。

(4) 插入 0.75mm 厚、15 孔的梳子 (不要产生气泡)。

(5) 聚合约 1h。聚合完成后, 小心拔去梳子。

(6) 将凝胶同冷却装置连接后插入电泳池, 蛋白样品上样前最好用阳极电极液注入上槽中确定是否有渗漏, 上样前冲去上样空底部未聚合的丙烯酰胺。

2. 样品上样和电泳

(1) 将细胞裂解液与等体积的 2×上样缓冲液混合, 10000g 离心 5min 以除去蛋白质沉淀。

(2) 用微量注射器将 10μL 样品溶液加入到上样孔底部 (最多可加 15μL)。

(3) 加入电极液, 上槽中加入阴极电泳液 (20mmol/L 氢氧化钠), 下槽中加入阳极电泳液 (10mmol/L 磷酸)。

(4) 恒压 150V 电泳 30min, 恒压 200V 电泳 2.5h, 开始的时候控制电流为 10mA 左右, 在聚焦过程中电流有所下降, 电泳室内温度在电泳的过程中将升至 40~50℃。

3. 电泳聚焦后处理

(1) 测定 pH 梯度: ①将凝胶条切成 0.5cm 或 1cm 的小片; ②将每小片凝胶在 1mL KCl (10mmol/L) 中浸泡 30min; ③测读此 KCl 溶液的 pH 值。

(2) 凝胶的固定: ①将凝胶于 10%三氯乙酸中浸泡 10min; ②换成 1%三氯乙酸溶液继续浸泡至少 2h 以上, 以去除载体两性电解质, 浸泡过夜可以更好地降低考马斯亮蓝对载体两性电解质的染色。

(3) 凝胶的染色: 用考马斯亮蓝染色, 然后脱色, 制成干胶。

问题分析及解决方案

1. 要选用性能良好的电解质, 在凝胶中其含量不超过 5%, 以 2%~3% 为适。
2. 样品制备应保证低盐或无盐, 含有过高的盐离子将影响蛋白聚焦甚至可能使蛋白质发生沉淀。
3. 样品上样量不宜太高, 否则也会影响聚焦效果。
4. 可采用多种上样方式, 包括纸条上样、混合于凝胶或者分布于不同位置加样。
5. 应给等电聚焦配备降温设备以防止烧焦。
6. 对于蛋白质样品可进行变性或非变性等电聚焦。如果进行非变性等电聚焦, 则样品缓冲液不含变性剂以及凝胶配置不含有尿素, 电泳时需要更高的电压或者更长的聚焦时间。
7. 对于一些在等电点发生不溶解或变性的蛋白, 不适宜于等电聚焦电泳。

参 考 文 献

- [1] Bier M and Long T. Recycling isoelectric focusing; Use of simple buffers. *J Chromatogr*, 1992, 604: 73-83.
- [2] Richard J. Simpson. *Purifying Proteins for Proteomic*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004.
- [3] Simpson R J. *Proteins and proteomics; A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2003a.
- [4] Timothy K, Glenn E B, et al. Isoelectric focusing-polynucleotide/ polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem J*, 1984, 219: 553-561.
- [5] Tiselius A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans. Faraday Soc*, 1937, 33: 524.
- [6] [美] 科林根 J E 等著. 精编蛋白质科学实验指南. 李慎涛等译. 北京: 科学出版社, 2005.

第 15 章 双向电泳

双向电泳是分析从细胞、组织或其他生物样品中提取的蛋白混合物最有力和应用最广泛的实验技术。双向电泳通过两次独立的分离步骤将蛋白质分开：第一向——等电聚焦（IEF），根据蛋白质的等电点将蛋白质分离；第二向——SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，利用蛋白质的分子量大小将它们分离。双向电泳所得结果的斑点序列都对应着样品中的单一蛋白，双向电泳可将上千种蛋白质分离开来，并且各种蛋白质的等电点、分子量和含量的信息均可获得。

双向电泳技术的诞生为蛋白质组学分析提供了强有力的手段，可以对来自一个样品中的大量蛋白质同时进行系统的分离、识别和定量。双向电泳在鉴定蛋白转录翻译后的修饰方面也有其独特的优越性。其应用包括细胞表达差异性分析、疾病标志物检测、药物研发、癌症研究等。传统的双向电泳由于等点聚焦所用的载体两性电解质不稳定性，很难获得较好的重复。随着商品化的 IPG 的产生，已经能够获得十分稳定的 pH 梯度，使得实验获得良好的重复性和真实性。这一章所介绍的双向电泳就是基于 IPG 所进行的。

15.1 样品的制备

样品制备是双向电泳中最为关键的一步，该步中样品处理的好坏直接影响双向电泳的结果。不同样品处理方法不同，具体请参照本书第二部分。用于双向电泳的样品处理一般遵守以下几个基本原则：

① 尽可能减少目的蛋白的损失，避免溶解性低的蛋白质（如膜蛋白）在等电聚焦时由于溶解度降低而沉淀析出。采用合适的盐浓度可提高蛋白的溶解度。

② 使蛋白完全变性，包括疏水性蛋白质，并使样品中的蛋白质以分离的多肽链形式存在，并破坏其与其他生物大分子的相互作用，除非需要研究蛋白质-蛋白质相互作用或者必须保持蛋白质的生物学功能。等电聚焦通常在含有尿素的变性凝胶系统中进行，使用非离子去垢剂也可以提高分辨率。

③ 减少对蛋白的附加修饰。防止蛋白质的化学修饰，包括蛋白质降解、蛋白酶或尿素热分解后所引起的修饰。

15.2 IPG 的选择和上样

① pH 梯度的选择。根据蛋白样品的复杂性和研究目的来选择，有宽范围 IPG (3~7 个单位，最高至 pH 10) 和窄范围 IPG (1~1.5 个单位)。

② 蛋白上样量。对于双向电泳及银染，100 μ g 是最佳的上样量。如果要微量制备用，则需要毫克级的样品，这种样品往往需要进行预分离和亚分离操作。上样的体积也受到限制，最佳上样体积为 20~100 μ L。过小的体积使蛋白易于在上样处发生沉淀，而体积过大则易于损失，蛋白样品不能充分进入胶条。

③ 上样方式。分为杯上样和再水化。对于宽 pH 范围的胶条，大部分电泳分析和微量制备电泳都可用胶内再水化的方式上样。所选胶条是极碱窄范围 (9~12)，则选用在阳极上的杯上样方式；反之，所选胶条是极酸窄范围的 (2.5~5)，则选用在阴极的杯上样方式。

15.3 第一向电泳：等电聚焦电泳 (IEF)

上样时的电压控制：为促进样品进入，IEF 开始阶段电压不宜高，一般应在 200V 以内，随后一个小时之内电压也应控制在 500V 以内。聚焦电压和时间往往需要不断地优化才能获得最佳质量和可重复性的结果。最佳的聚焦时间与样品自身特性、上样方式、IPG 的 pH 范围和胶条的长度有密切关系。聚焦不够会导致蛋白分辨率低，结果模糊，但超聚焦会导致蛋白图谱扭曲，凝胶碱性末端的水平纹理以及可能的蛋白丢失。常见的 IPG 聚焦电泳条件如表 15.1 所示。

表 15.1 IPG 聚焦的一般电泳条件

IPG 参数		胶长 18cm 温度 20℃ 最大电流 0.05mA, 最大电压 8000V		
再水化上样	分析 IEF	再水化: 30V, 12~16h 起始 IEF: 200V, 1h; 500V, 1h; 1000V, 1h 到稳定状态: 30min 内从 1000V 达到 8000V	1~1.5pH 单位: IPG5~6、 IPG4~5.5	聚焦时间 8h
			3pH 单位: IPG4~7 4pH 单位: IPG4~8 5~6pH 单位: IPG4~9	聚焦时间 4h
			7pH 单位: IPG3~10 IPG3~10 8~9pH 单位: IPG3~12 IPG4~12	聚焦时间 3h
	微量制备 IEF	重新溶胀: 30V, 12~16h IEF 到达稳定态: 分析 IEF 聚焦时间再加大约 50%		
杯上样	200V, 21h; 800V, 2h; 1000V, 2h		到达稳定态时间参考再水化上样	

15.4 IPG 胶条平衡

在第二向分离之前, IPG 胶条中的蛋白质需要与 SDS 进行充分的结合, 这一步称为胶条平衡。一般采用含有 2% SDS 的 Tris 缓冲液 (pH 8.8) 来平衡。考虑到蛋白需要从胶体中游动出来, 这一过程太慢的话会使蛋白在很宽的区带上电泳, 一般采用在缓冲液中加入 6mol/L 的尿素和 30% 的甘油, 能大大加快蛋白在胶条中游出的速度。表 15.2 为胶条平衡的常用溶液配方及作用。

表 15.2 胶条平衡的常用溶液配方及作用

缓冲体系 50mmol/L Tris-HCl(pH 8.8)	
2% SDS	按蛋白分子量结合使蛋白带负电荷, 在电场中向正极移动
6mol/L 尿素	促进蛋白进入 SDS 凝胶
30% 甘油	促进 SDS 进入凝胶
1% DTT(第一步)	完全还原二硫键
4% 碘乙酰胺(第二步)	除去多余的 DTT, 使蛋白变性并保持还原状态

15.5 采用垂直系统进行第二向电泳: 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

方案 15.1 HeLa 细胞周期依赖性蛋白表达和修饰的分析

简介

细胞分裂是生物体生长发育的基本方式, 生物体中的细胞往往按照一定的速率进行分裂, 且受到一系列因素的调节。在哺乳动物细胞内, 有一系列的有丝分裂激酶调节有丝分裂进程, 研究细胞有丝分裂进程的调节对于了解生物体发育及多种疾病如肿瘤的发生发展有着非常重要的意义。通过聚丙烯酰胺凝胶双向电泳的方法, 可以分析处于有丝分裂的细胞与处于间期的细胞在蛋白表达与修饰上有什么不同, 从而发现调节有丝分裂进程相关的重要分子和信号通路。

材料

配制 SDS-聚丙烯酰胺凝胶所需试剂 (详见第十三章 13.1)

细胞裂解液: 含有 8mol/L 的尿素, 4% CHAPS, 65mmol/L DTE, 40mmol/L Tris, 以及微量的溴酚蓝。每 100 μ L 裂解液可裂解 10⁶ 个细胞

取代液: 混合 250mL 甘油和 250mL 去离子水, 加入 50mg 溴酚蓝搅拌溶解

低熔点琼脂糖溶液: 含有 0.5% 低熔点琼脂糖的电极缓冲液

方法

1. 凝胶灌制

根据第一向 IEF 电泳时 IPG 胶条的大小选择第二向合适的垂直电泳槽。根据电泳槽的大小配制一定体积的分离胶，凝胶配方见表 13.2，第二向电泳通常不需要浓缩胶。按仪器说明书装好灌胶模具，倒入凝胶溶液，在每块胶的上面加入异丙醇以得到平的凝胶上样平面。暂时不需要的凝胶可用塑料薄膜包好，于 4°C 保存 1~2 天。

2. 细胞培养和同步化

可参考细胞生物学相关书籍，此部分不做介绍。

3. 样品的制备

将收集到的细胞用 PBS 洗两次，每 10^6 个细胞加 100 μ L 细胞裂解液在冰上裂解，13000r/min 离心 15min，取上清液至新管。

4. 再水化及等电聚焦

(1) 选择 IPG4-8 的胶体，根据说明书准备 IPG 胶条。采用胶内再水化的方式上样。每个胶条用 50 μ L 的样品上样。

(2) 再水化：30V，12h。

(3) 起始 IEF：200V，1h；500V，1h；1000V，1h。

(4) 到稳定状态：30min 内将电压升至 8000V，4h。结束电泳。

5. IPG 胶条平衡

(1) 将胶体置于平衡液中 30min。

(2) 用含有 4% 碘乙酰胺的平衡洗涤液洗 2 次，每次 5min。

6. SDS-PAGE 电泳步骤

(1) 电泳槽中装满电泳缓冲液，并打开温控系统，调节温度为 15°C。

(2) 将平衡好的 IPG 胶条浸入电极缓冲液中几秒钟。

(3) 将 IPG 胶条小心地放置于 SDS 胶面上，并轻压使 IPG 胶条与 SDS 胶面充分结合，上面覆盖 2mL 热的琼脂糖溶液 (75°C)，使琼脂糖在 5min 内凝固。其余的 IPG 胶条重复上述操作。

(4) 将胶盒插入电泳槽中，开始电泳。采用垂直的 SDS 胶电泳，不必像水平电泳一样，电泳过程中去除 IPG 胶条。

(5) 当溴酚蓝染料迁移到胶的底部边缘即可结束电泳。

(6) 将电泳结束的凝胶转移到染色盒里固定、染色。

问题分析及解决方案

二维电泳常见的不理想结果为：图谱变形、水平拖尾、垂直拖尾以及垂直裂口等。造成这些现象的因素主要有以下几点：

1. 凝胶配制过程中聚合不均匀会造成图谱变形，凝胶配制过程应加适量的过硫酸铵和 TEMED，过多或过少都可能影响凝胶聚合的效果。另外，凝胶泄漏也会造成图谱变形，配制过程中应确保没有泄漏。

2. 样品中存在杂质容易产生水平拖尾现象，样品制备所用试剂应达到 IEF 样品制备所需的纯度。如果样品中有 SDS 等离子去污剂的污染，SDS 与样品蛋白结

合直接影响蛋白质的等电点，也会造成水平拖尾。再水化的过程中要用非离子去污剂的溶液尽量稀释样品，使蛋白质没有 SDS 结合。

3. 样品溶解度不高特别是在上样过程中造成的蛋白析出会在图谱上形成水平拖尾，制备样品时应确保蛋白的溶解度，可通过反复沉淀-溶解的方法制备样品。

4. 蛋白质上样量太高不仅会造成水平拖尾，还会造成垂直拖尾。对于高丰度的蛋白质，可减少蛋白质的上样量来获得理想的效果，对于低丰度的蛋白质，如有可能则可通过除去不必要的高丰度蛋白，然后富集样品电泳。

5. 聚焦时间不够是导致水平拖尾产生的一个常见的因素，应适当延长聚焦时间。但要注意过长的聚焦时间会造成电渗和蛋白迁移，同样造成水平拖尾的现象。

6. IPG 胶条的平衡不充分使得胶条中的蛋白质不能充分结合 SDS，在垂直电泳的过程中发生拖尾现象。

7. 在准备第二向电泳的时候，要确保胶条与凝胶顶部之间没有气泡，否则会在电泳图谱上产生垂直的裂口。

参 考 文 献

- [1] Hochstrasser A C, et al. Preparative isoelectrofocusing and high resolution 2-dimensional gel electrophoresis for concentration and purification of proteins. *Appl Thero Electrophor*, 1991, 1: 333-337.
- [2] Richard J Simpson. *Purifying Proteins for Proteomic*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004.
- [3] Righetti P G, Faupel M and Wenish E. Preparative electrophoresis with and without immobilized pH gradients. *Adv Electrophor*, 1992, 5: 159-200.
- [4] [美] 科林根 J E 等著. 精编蛋白质科学实验指南. 李慎涛等译. 北京: 科学出版社, 2005.



第4部分

蛋白质纯化效果的评价和蛋白质分析

在蛋白质的纯化过程中，涉及多种理化指标的分析，针对不同用途的纯化蛋白，在蛋白质的浓度、纯度及活性等方面均有不同的要求。因此，对其纯化效果的评估是蛋白质分离提纯过程中重要的一步。



第 16 章 蛋白质浓度、纯度及活性的分析

16.1 测定蛋白质浓度的方法简介

蛋白质浓度的测定是生物化学研究中最常用、最基本的分析方法之一。常用的经典的方法包括凯氏 (Kjeldah) 定氮法、双缩脲法、Folin-酚试剂法 (Lowry 法)、紫外吸收法等, 还有最近新兴的考马斯亮蓝 (Bradford) 法和二喹啉甲酸 (BCA) 法。

这些方法各有千秋, 凯氏定氮法相对操作复杂, 但结果准确, 往往以定氮法测定的蛋白质作为其他方法的标准蛋白质, 但仅以氮含量标定蛋白质的含量也有可能被三聚氰胺等产品钻了空子。双缩脲法虽然灵敏度差, 但可用于无需十分精确的蛋白质快速测定。近年来, Bradford 法和 BCA 法由于具有快速、灵敏度高、干扰因素少等优点, 应用越来越广泛。下面对各个方法的原理做一简单介绍。

16.1.1 凯氏定氮法

样品与浓硫酸共热, 含氮有机物即分解产生氨 (消化), 氨又与硫酸作用, 变成硫酸铵。经强碱碱化使之分解放出氨, 借蒸汽将氨蒸至酸液中, 根据此酸液被中和的程度可计算得样品的氮含量。

为了加速消化, 可以加入 CuSO_4 作催化剂, 加 K_2SO_4 以提高溶液的沸点。收集氨可用硼酸溶液, 滴定则用强酸。

计算所得结果为样品总氮量, 如欲求得样品中蛋白含量, 应将总氮量减去非蛋白氮即得。如欲进一步求得样品中蛋白质的含量, 用样品中蛋白氮乘以 6.25 即得。

16.1.2 双缩脲法

双缩脲 ($\text{NH}_2\text{CONHCONH}_2$) 在碱性溶液中与硫酸铜反应生成紫红色化合物, 称为双缩脲反应, 蛋白质分子中含有许多肽键 ($-\text{CONH}-$), 在碱性溶液中也与 Cu^{2+} 反应产生紫红色化合物。凡具有两个酰氨基或两个直接连接的肽键, 或通过一个中间碳原子相连的肽键, 这类化合物都有双缩脲反应。在一定范围内, 其颜色的深浅与蛋白质浓度成正比, 而与蛋白质分子量及氨基酸成分无关, 故可用比色法来测定蛋白质含量。

双缩脲法是测定蛋白质浓度的常用方法之一, 操作简便、迅速、受蛋白质种类

性质的影响较小，但灵敏度较差，而且特异性不高。除—CONH—有此反应外，—CONH₂、—CH₂NH₂、—CS—NH₂等基团也有此反应。

16.1.3 Lowry 法

Lowry 法的显色原理是根据双缩脲反应，蛋白质分子中的肽键（—CONH—）在碱性溶液中与 Cu²⁺ 反应产生紫红色的 Cu⁺ 化合物，Folin-酚试剂在 Cu⁺ 的催化下，其中的磷钼酸和磷钨酸盐被蛋白质中的芳香族氨基酸残基还原，产生深蓝色的混合物，其最大吸收峰在 745~750nm 处，在一定浓度范围内，其颜色的深浅与蛋白质浓度成正比，可用来测定蛋白质的含量，但其测定的浓度为其蛋白质中络氨酸和色氨酸的含量。

在 Lowry 法中，由于加入了 Folin-酚试剂强化了双缩脲反应，检测灵敏度和可重复性都有所提高，通常测定范围在 20~250μg，最低检测限为 5μg。

16.1.4 紫外分光光度法

蛋白质分子中含有共轭双键的酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸等芳香族氨基酸，其环状的结构可以产生 π→π* 跃迁，它们具有吸收紫外光的性质，其吸收高峰在 280nm 波长处，且在此波长内吸收峰的光密度值与其浓度成正比关系，故可作为蛋白质定量测定的依据，但由于各种蛋白质的酪氨酸和色氨酸的含量不同，故要准确定量，必须要有待测蛋白质的纯品作为标准来比较，或者已经知道其消光系数作为参考。

3 种氨基酸的近紫外吸收带（pH 为 6 时），苯丙氨酸 λ_{max} 为 257，ε=200；酪氨酸 λ_{max} 为 275，ε=1300；色氨酸 λ_{max} 为 280，ε=5000。另外，不少杂质在 280nm 波长下也有一定吸收能力，可能发生干扰。其中尤以核酸（嘌呤和嘧啶碱）的影响更为严重。然而核酸的最大吸收峰是在 260nm。因此溶液中同时存在核酸时，必须同时测定 OD_{260nm} 与 OD_{280nm}，然后根据两种波长的吸收度的比值，通过经验公式校正，以消除核酸的影响而推算出蛋白质的真实含量，其浓度计算公式为：

$$\text{蛋白质浓度}(\text{mg/mL}) = 1.55A_{280}^{1\text{cm}} - 0.76A_{260}^{1\text{cm}}$$

纯的蛋白质 A₂₈₀/A₂₆₀ 应为 1.75。

所有的蛋白质在 230nm 以下时，由于肽键的存在，都有强烈的吸收，因此，所有的蛋白质 a₂₂₅^{0.1%} 为 5.0，a₂₁₅^{0.1%} 为 11.7。用 215nm 和 225nm 处的吸收差可以测定浓度为 10~100μg/mL 的蛋白质，近似公式为：

$$\text{蛋白质浓度}(\mu\text{g/mL}) = 144(A_{215}^{1\text{cm}} - A_{225}^{1\text{cm}})$$

以上两种计算方法，误差较大，达 ±15% 左右，若采用 A₂₈₀/A₂₆₀ 的紫外吸收，则精确度大为提高，经多次定量分析比较，误差仅为 ±2% 左右，计算经验公式为：

$$\text{蛋白质浓度}(\text{mg/mL}) = A_{205} / [27 + 120(A_{280}/A_{205})]$$

本法操作简便迅速，且不消耗样品（可以回收），多用于纯化蛋白质的微量测

定。主要缺点：当待测的蛋白质与标准蛋白质中的酪氨酸和色氨酸含量差异较大时，则产生一定误差。

16.1.5 考马斯亮蓝染色法

考马斯亮蓝结合法是近年来发展起来的蛋白质定量测定法。考马斯亮蓝能与蛋白质的疏水微区相结合，这种结合具有高敏感性。考马斯亮蓝 G250 的最大光吸收峰在 465nm，当它与蛋白质结合形成复合物时，其最大吸收峰改变为 595nm。

在一定范围内，考马斯亮蓝 G250-蛋白质复合物呈青色，在 595nm 下，光密度与蛋白质含量呈线性关系，故可以用于蛋白质含量的测定。

此种方法更简单快速，灵敏度和准确性更高，目前已广泛应用，Bio-Rad 公司的蛋白质定量检测试剂盒就是应用该检测法。

16.1.6 BCA 检测法

BCA 比色法是依据在碱性溶液中，蛋白质分子中的肽键与 Cu^{2+} 形成络合物，并将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ ， Cu^+ 与 BCA 形成稳定的深紫色复合物，于 562nm 处有最大吸收峰，其强度与蛋白质浓度成正比。

此法最大的特点是抗干扰性强，BCA 法的灵敏度与 Lowry 法相似。

16.2 测定蛋白质纯度的方法简介

蛋白质的纯度是指一定条件下所提取的蛋白质的相对均一性，即没有杂蛋白的干扰。如果是从天然产物中或众多蛋白中分离目的蛋白的话，那检测其分离效果的主要指标是看其纯度，其检测方法主要有色谱法、电泳法和免疫化学法。在实际操作中可根据蛋白质的性质和后续实验所要求纯度标准选择适当的方法进行检测。

16.2.1 电泳法

目前常用的通过电泳来测定蛋白质纯度的方法主要包括 SDS-PAGE、等电聚焦、毛细管电泳法等。SDS-PAGE 法是基于蛋白质分子量之间的差异来检测蛋白纯度的，因此更适用于含有相同亚基的蛋白质，而等电聚焦法是基于蛋白质等电点的差异来分离的。如果一系列不同 pH 条件下的电泳结果均为一条带，则结果更为可靠。

16.2.2 色谱法

目前高效液相色谱 (HPLC) 技术常被用于蛋白质纯度的鉴定，当洗脱时，谱图呈单一、对称、尖锐的峰形，则表明蛋白样品纯度较高。

16.2.3 免疫化学法

通过免疫技术来鉴定蛋白质的纯度，其原理是抗原抗体反应，某一特定的抗原只能刺激某种特异性的抗体的形成，而几种抗原物质则相应地产生几种抗体。

16.3 测定蛋白质活性的方法简介

蛋白质的高分子特性形成了复杂而特定的空间构象，从而表现出蛋白质特异的生物活性。某些物理和化学因素可使蛋白质分子的空间构象发生改变和破坏，导致蛋白质变性而丧失其特有的生物活性，因此在提取、制备具有生物活性的蛋白质、多肽和酶时，要特别注意防止发生蛋白质变性。所以除了在提取、分离、制备过程中要严格控制条件，防止发生蛋白质变性之外，还要通过各种生物活性的测定方法对制品的活性进行考察，以验证提取和分离效果。蛋白的活性，一般根据催化底物反应的速度来测定，因此对不同的蛋白，其蛋白活性测定的方法差异较大。

方案 16.1 双缩脲法测定未知蛋白的含量

简介

双缩脲是由两分子尿素缩合而成的化合物。在碱性溶液中，双缩脲与硫酸铜反应生成紫红色络合物，此反应即为双缩脲反应。含有两个或两个以上肽键的化合物都具有双缩脲反应。蛋白质含有多个肽键，在碱性溶液中能与 Cu^{2+} 络合成紫红色化合物。其颜色深浅与蛋白质的浓度成正比，可以用比色法进行测定。双缩脲法最常用于需要快速但并不需要十分精确的测定。

材料

标准蛋白质溶液：用标准的结晶牛血清蛋白 (BSA) 或标准酪蛋白，配制成 10mg/mL 的标准蛋白溶液，可用 BSA 浓度 1mg/mL 的 A_{280} 为 0.66 来校正其纯度。如有需要，标准蛋白质还可预先用微量凯氏定氮法测定蛋白氮含量，计算出其纯度，再根据其纯度，称量配制成标准蛋白质溶液。牛血清蛋白用 H_2O 或 0.9% NaCl 配制，酪蛋白用 0.05mol/L NaOH 配制

双缩脲试剂：称以 1.50g 硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 和 6.0g 酒石酸钾钠 ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)，用 500mL 水溶解，在搅拌下加入 300mL 10% NaOH 溶液，用水稀释到 1L，贮存于塑料瓶中（或内壁涂以石蜡的瓶中）。此试剂可长期保存。若贮存瓶中有黑色沉淀出现，则需要重新配制

可见光分光光度计

比色杯

大试管 15 支

旋涡混合器等

方法

1. 标准曲线的测定。取 12 支试管分两组，分别加入 0mL、0.2mL、0.4mL、0.6mL、0.8mL、1.0mL 的标准蛋白质溶液，用水补足到 1mL，然后加入 4mL 双

缩脲试剂。充分摇匀后，在室温（20~25℃）下放置30min，于540nm处进行比色测定。用未加蛋白质溶液的第一支试管作为空白对照液。取两组测定的平均值，以蛋白质的含量为横坐标，光吸收值为纵坐标绘制标准曲线。

2. 样品的测定。取2~3个试管，用上述同样的方法，测定未知样品的蛋白质浓度。注意样品浓度不要超过10mg/mL。

问题分析及解决方案

1. 双缩脲法测定蛋白含量的适用范围。

双缩脲法适用于检测精度要求不高且浓度为1~10mg/mL的待测蛋白。

2. 双缩脲法测定蛋白含量实验操作中的注意事项有哪些？

在测定过程中需要注意的事项主要有：①配制溶液时如掺杂了Tris、EDTA及一些氨基酸时，将会对结果造成干扰；②配制双缩脲试剂时注意CuSO₄不能加多，过多的CuSO₄的蓝色会对紫色实验结果造成影响；③如待测样品为蛋清或豆浆等时应先稀释，以免影响结果，实验后还会粘住试管壁，不利于清洗。

方案 16.2 BCA 法测定蛋白质浓度

简介

BCA法是一种较为常用的蛋白浓度测定方法，其原理是二价铜离子在碱性的条件下，可以被蛋白质还原成一价铜离子（biuret reaction），一价铜离子和独特的BCA（bicinchoninic acid）工作试剂（由BCA与二价铜离子的硫酸铜等其他试剂组成）相互作用产生敏感的颜色反应。BCA与铜离子螯合，工作试剂由原来的苹果绿变成紫色的水溶性反应复合物。该复合物在562nm波长处具有强烈的吸光性，且其吸光度和蛋白浓度在较大范围内有良好的线性关系，因此可根据吸光值推算出蛋白浓度。

材料

试剂A：1%BCA二钠盐；2%无水碳酸钠；0.16%酒石酸钠；0.4%氢氧化钠；0.95%碳酸氢钠。混合调pH值至11.25

试剂B：4%硫酸铜

BCA工作液：试剂A 100mL + 试剂B 2mL混合

蛋白质标准液：用结晶牛血清白蛋白根据其纯度用生理盐水配制成1.5mg/mL的蛋白质标准液（纯度可经凯氏定氮法测定蛋白质含量而确定）

待测样品：用双缩脲测定法的样品稀释而成

7220型分光光度计

恒温水浴箱

中试管7支

枪式移液管

方法

标准曲线的绘制：取试管 7 支，编号，按表 16.1 操作。

表 16.1 标准曲线绘制工作表

试 剂	管 号						
	1	2	3	4	5	空白管	测定管
蛋白质标准液(1.5mg/mL)/ μ L	20	40	60	80	100		
双蒸水/ μ L	80	60	40	20	0	100	
待测样品/ μ L							100
BCA 工作液/mL	2	2	2	2	2	2	2

混匀, 37℃ 保温 30min, 用 562nm 比色, 测定吸光度值

1. 绘制标准曲线。
2. 以测定管吸光度值，查找标准曲线，求出待测血清中蛋白质浓度 (g/L)。
3. 再从标准管中选择一管与测定管光密度相接近者，求出待测血清中蛋白质浓度 (g/L)。

问题分析及解决方案

1. BCA 法测定蛋白质浓度范围是多少？

BCA 法测定蛋白质浓度范围为 20~2500 μ g/mL，在 50~2000 μ g/mL 浓度范围内有较好的线性关系。

2. 为什么测定标准曲线时发现随着标准品浓度的增加，吸光度或颜色没有明显变化？

可能的原因是样品中含有严重干扰 BCA 法测定蛋白浓度的物质。BCA 法测定蛋白浓度不受绝大部分样品中化学物质的影响，但受螯合剂和略高浓度的还原剂的影响，如 EDTA、EGTA、二硫苏糖醇、 β -巯基乙醇等。

方案 16.3 豆类中球蛋白的定量分析

简介

豆类中含有丰富的球蛋白，球蛋白不溶或不易溶于水，但可溶于稀盐溶液。样品在含盐的缓冲液中研磨，则球蛋白溶解于缓冲液中。

球蛋白含有苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸等芳香族氨基酸，在 280nm 处有特征吸收峰，而蛋白质中的肽键在低于 230nm 处具有强的吸收，在 205nm 的吸收灵敏度最高，可用 A_{205}/A_{280} 的经验公式，计算蛋白质的绝对含量。

试剂

磷酸缓冲液 (PB)：称取 58.03g 磷酸氢二钠、5.93g 磷酸二氢钠，溶于 1000mL 蒸馏水中，得到 0.2mol/L 磷酸缓冲液，pH=7.4

球蛋白提取剂：称取 23.4g 氯化钠溶于 PBS 中配成 0.4mol/L NaCl 磷酸盐缓

冲液，再加入 10mL 巯基乙醇，巯基乙醇终含量为 0.1%

硫酸铵

方法

1. 球蛋白的提取

称取带皮豆粉 1.00g，加 10mL 0.1% 巯基乙醇 PBS 溶液，用力研磨 10min，10000r/min 离心 20min，除去不溶物和漂浮物。测量上清液体积，加入固体硫酸铵至 80% 饱和（0℃，10mL 上清液加硫酸铵 5.59g），将此溶液放入冰箱静置 6h，然后以 12000r/min 离心 10min，弃上清液。将沉淀溶于 5mL PBS 溶液中，17000r/min 离心 20min，除去不溶物，再用 PBS 定容至 10mL，即为球蛋白提取液。

2. 测定

准确吸取提取液 1mL，稀释 20 倍，以 PBS 为对照，测定 280nm 处的吸光度值。吸取稀释后的提取液 0.2mL，注入到 10mL 容量瓶中，加蒸馏水定容至刻度，在波长范围 200~250nm 进行扫描，观察吸光度变化，记录 205nm 处的吸光度值。

计算

计算公式如下：

$$P = A_{205} / [27.0 + 120(A_{280} / A_{205})]$$

式中， P 为蛋白质含量，mg/mL； A_{205} 为蛋白质溶液在 205nm 的吸光度值； A_{280} 为蛋白质溶液在 280nm 的吸光度值；27.0 为 1mg/mL 蛋白质溶液在 205nm 处吸光系数的基数； $120(A_{280} / A_{205})$ 为不同蛋白质在 205nm 处吸光系数的校正因子。

$$\text{球蛋白含量}(\%) = 0.1[(PV)/m]$$

式中，0.1 为 mg 换算为 g 乘 1000 的结果； P 为经验公式求出的球蛋白浓度，mg/mL； V 为球蛋白提取液定容体积，mL； m 为样品质量，g。

问题分析及解决方案

球蛋白提取剂中巯基乙醇的作用是什么？

巯基乙醇是一种还原剂，可打开肽链之间形成的二硫键，在本实验中可解聚球蛋白，增加球蛋白的溶解度。

方案 16.4 心肌、骨骼肌线粒体内膜 ATPase 的测定

简介

由 ATPase 酶解 ATP 脱下的无机磷，在钼酸铵溶液中，能与孔雀石绿形成复合物，从 600nm 吸光度 P_i 的浓度，可以计算出 ATPase 的活力。

试剂

- 4.2% 钼酸铵盐酸溶液，A 液（盐酸溶液浓度为 4mol/L）
- 0.05% 孔雀石绿水溶液，B 液
- 1.5% Tween-20 溶液

AMT 溶液：吸取 A 液 5mL，B 液 15mL，混合振荡 30min，然后过滤，在滤液中加入 0.8mL Tween-20 溶液

10 μ mol/L KH₂PO₄ 标准溶液

24% 柠檬酸钠溶液

反应液中含 20mmol/L Tris-H₂SO₄ (pH 7.0) 缓冲液，含 100mmol/L NaCl、2mmol/L MgCl₂、1mmol/L ATP，以去离子水配制

方法

1. 线粒体内膜 (IMM) 的制备。分离、提取、纯化线粒体，采用紫外光谱法 205nm/280nm 测定线粒体蛋白含量。线粒体悬浮液用毛地黄皂苷处理，每毫克线粒体蛋白加 0.7mg 毛地黄皂苷，剧烈混匀，冰浴 15min，期间每隔 5min 混摇一次，然后 12000r/min、4℃ 离心 20min，弃上清液，沉淀为 IMM，如此再洗涤两次，离心，以 205nm/280nm 法测定内膜蛋白含量。

2. 在 1.6mL 反应液中，先加入 0.8mL AMT、0.4mL 24% 柠檬酸钠溶液，然后以 80 μ L 的容积差加入 10 μ mol/L 的 KH₂PO₄ 溶液，测定吸光度，绘制标准曲线。

3. 在同样容积的反应液 AMT 溶液中，加入 0.4mg 膜蛋白，在 37℃ 保温 1h，用 0.4mL 柠檬酸钠溶液终止酶反应后测定吸光度。ATPase 活性由 Pi 标准曲线标定，活力单位为 μ mol/mg。

问题分析及解决方案

主要事项有哪些？

- (1) 可适当减少膜蛋白的加入量；
- (2) AMT 溶液应现配现用，提取内膜蛋白时需要洗涤充分。

方案 16.5 荧光分光光度法测定肌肉中乳酸脱氢酶的活性

简介

乳酸脱氢酶 (LDH) 在 L-乳酸和 NAD 反应液中，可将 NAD 还原成 NADH，而 NADH 能被强碱转换成荧光化合物，以其荧光强度来度量 LDH 的活性。



材料

缓冲液：0.05mol/L Tris-HCl，pH 6.7；7.5mmol/L 硫酸铵；20mmol/L 烟酰胺；0.01% (体积质量) 牛血清白蛋白 (BSA)

3mmol/L 乳酸 (溶于缓冲液)

3mmol/L NAD (溶于 10mmol/L Tris-HCl，pH 8.5 溶液，现用现配)

方法

1. 将肌肉用生理盐水洗净，称取 0.2g 加 2mL 缓冲液进行匀浆。然后按照表 16.2 加入试剂，分别至 4 个 5mL 试管中。

表 16.2 乳酸脱氢酶的活性测定各个试剂的含量

单位: μL

试剂	匀浆液	乳酸溶液	NAD 溶液	缓冲液
空白	5	1000		1995
标准	5	1000	40	1995
样品 1	50	1000	40	1910
样品 2	100	1000	40	1860

2. 空白管和标准管冰浴 6min, 加入 $600\mu\text{L}$ 1mol/L HCl 溶液停止反应。

3. 样品 1 和样品 2 两管冰浴 10~15min, 然后转入 38°C 水浴 30min, 立即加入 $600\mu\text{L}$ 1mol/L HCl 溶液停止反应。

4. 每管中加入 6.6mol/L NaOH 溶液 $100\mu\text{L}$ 和缓冲液 $300\mu\text{L}$, 摇匀后, 室温静置 60min, 然后进行荧光测定, 激发波长 365nm , 发射波长 460nm 。

计算

乳酸脱氢酶活性公式计算如下:

$$1 \text{ 个酶单位} = S - B$$

式中, S 为标准管荧光强度值; B 为空白管荧光强度值。

问题分析及解决方案

主要注意事项有哪些?

实验材料应确保新鲜, 如取材后不立即使用, 应置于 -20°C 保存。NADH 应在使用前新鲜配制。

参 考 文 献

- [1] Alves Cordeiro C A and Friere A P. Protein determination in permeabilized yeast cells using the Coomassie brilliant blue dye binding assay. *Analytical Biochemistry*, 1994, 233: 321-323.
- [2] Glasel J A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260/280nm absorbance ratios. *Biotechnology*, 1995, 18: 62-63.
- [3] Polacheck I and Cabib E. A simple procedure for protein determination by the Lowry method in dilute solutions and in the presence of interfering substances. *Analytical Biochemistry*, 1981, 117: 311-314.
- [4] Sargen M G. Fiftyfold amplification of the Lowry protein assay. *Analytical Biochemistry*, 1987, 163: 476-481.
- [5] 张长春. 生物产品分析与检验技术. 北京: 科学出版社, 2009: 40.
- [6] 张丰德等. 现代生物学技术. 第 3 版. 天津: 南开大学出版社, 2007: 220.

第 17 章 蛋白质的分析及应用

17.1 质谱技术在蛋白质分析中的应用

质谱法通常是使气态的物质在真空中受到高能电子束的作用，从分子中轰击出一个电子成为荷正电的分子离子，这种离子还可以按照不同方式裂解成更小的原来分子的碎片，由于碎片质量和所带电荷的不同，到达检测器的顺序也不同，因此可以从质谱图中峰的位置进行定性分析，峰的强度进行定量分析。利用生物质谱，人们能够精确测量生物大分子，如蛋白质、核苷酸和糖类等的分子量，并提供分子结构信息，对存在于生命复杂体系中的微量或痕量小分子生物活性物质进行定性或定量分析。

生物质谱所分析蛋白样品的制备过程非常重要。目前尚没有合适的方法能简便地一步实现对复杂蛋白混合物的定性和定量分析。必须把分离、鉴定、定量以及数据处理手段进行整合。文献报道的蛋白质组学策略多种多样，但是主要有两种路线：第一种是传统的 2DE 蛋白分离、胶内酶解与 MS 鉴定相结合的方法，这也是目前最常用的一种路线。第二种即所谓的“shotgun proteomics”方法，先将混合蛋白酶解，经过适当的色谱分离手段之后，对肽段进行 MS/MS 分析并据此实现蛋白的鉴定。如果需要定量比较，可以对蛋白或肽段进行稳定同位素标记。无论采用哪一种路线，如果想进行高通量的分析，都需要进一步发展数据处理和存储的技术。

17.2 核磁共振法在蛋白质分析中的应用

核磁共振是 20 世纪 40 年代中期发现的低能电磁波与原子核自旋相互作用的一种物理现象，并迅速发展成为非常重要的谱学和影像学技术，在科学上发挥着越来越重要的作用。

20 世纪 80 年代开始，瑞士科学家 Wuthrich 将二维、三维和四维等多种异核多维和多共振脉冲实验方法，应用到蛋白质等生物大分子的结构解析。随着 NMR 谱仪和实验技术的发展，以及²H、¹⁵N 和¹³C 标记技术的发展完善，测定分子质量不大于 30×10^3 的蛋白质大分子的溶液三维结构已不再困难。在蛋白质数据库收录

的生物大分子的三维结构中，约15%是用NMR测定的，这是对X射线衍射技术的有力补充。迄今为止，NMR仍然是测定溶液中蛋白质三维结构的唯一方法。

17.3 X射线晶体学相关的蛋白质纯化

X射线晶体学是一门利用X射线来研究晶体中原子排列的学科。更准确地说，利用电子对X射线的散射作用，X射线晶体学可以获得晶体中电子密度的分布情况，再从中分析获得原子的位置信息，即晶体结构。由于所有的原子都含有电子，并且X射线的波长范围为0.001~10nm（即0.01~100Å），其波长与成键原子之间的距离（1~2Å附近）可比，因此X射线可用于研究各类分子的结构。但是，到目前为止还不能用X射线对单个的分子成像，因为没有X射线透镜可以聚焦X射线，而且X射线对单个分子的衍射能力非常弱，无法被探测。而晶体（一般为单晶）中含有数量巨大的方位相同的分子，X射线对这些分子的衍射叠加在一起就能够产生足以被探测的信号（见图17.1）。从这个意义上说，晶体就是一个X射线的信号放大器。X射线晶体学将X射线与晶体学联系在一起，从而可以对各类晶体结构进行研究，特别是蛋白质晶体结构。

方案 17.1 白眉蝮蛇蛇毒精氨酸酯酶分离提纯及分子量的质谱测定

1. 蛇毒样品经 DEAE-Sephadex A 50、Sephadex G 75 和 DEAE-Sephadex A 50 两种填料三次纯化获得精氨酸酯酶的纯品。
2. 将提取获得的精氨酸酯酶使用超纯水配制为浓度 0.50g/L 的溶液。
3. 吸取 0.5 μ L 的基质溶液，加到 MALDI-MS 分析所用的金属样品板上的样品孔中。
4. 在基质干燥前迅速加入 0.5 μ L 的样品。
5. 40 $^{\circ}$ C 烘烤 5min 后，将金属板转移到质谱仪的真空舱内。
6. 获取质谱图，见图 17.2。

方案 17.2 肿瘤差异蛋白质的质谱定性

肿瘤组织蛋白质粗提

试剂

蛋白质提取液：9 mol/L urea，2% CHAPS，0.5% DTT，0.5% IPG buffer，0.14% PMSF

方法

1. 取适量瘤组织用剪刀将组织切碎，用手工匀浆器进行匀浆；

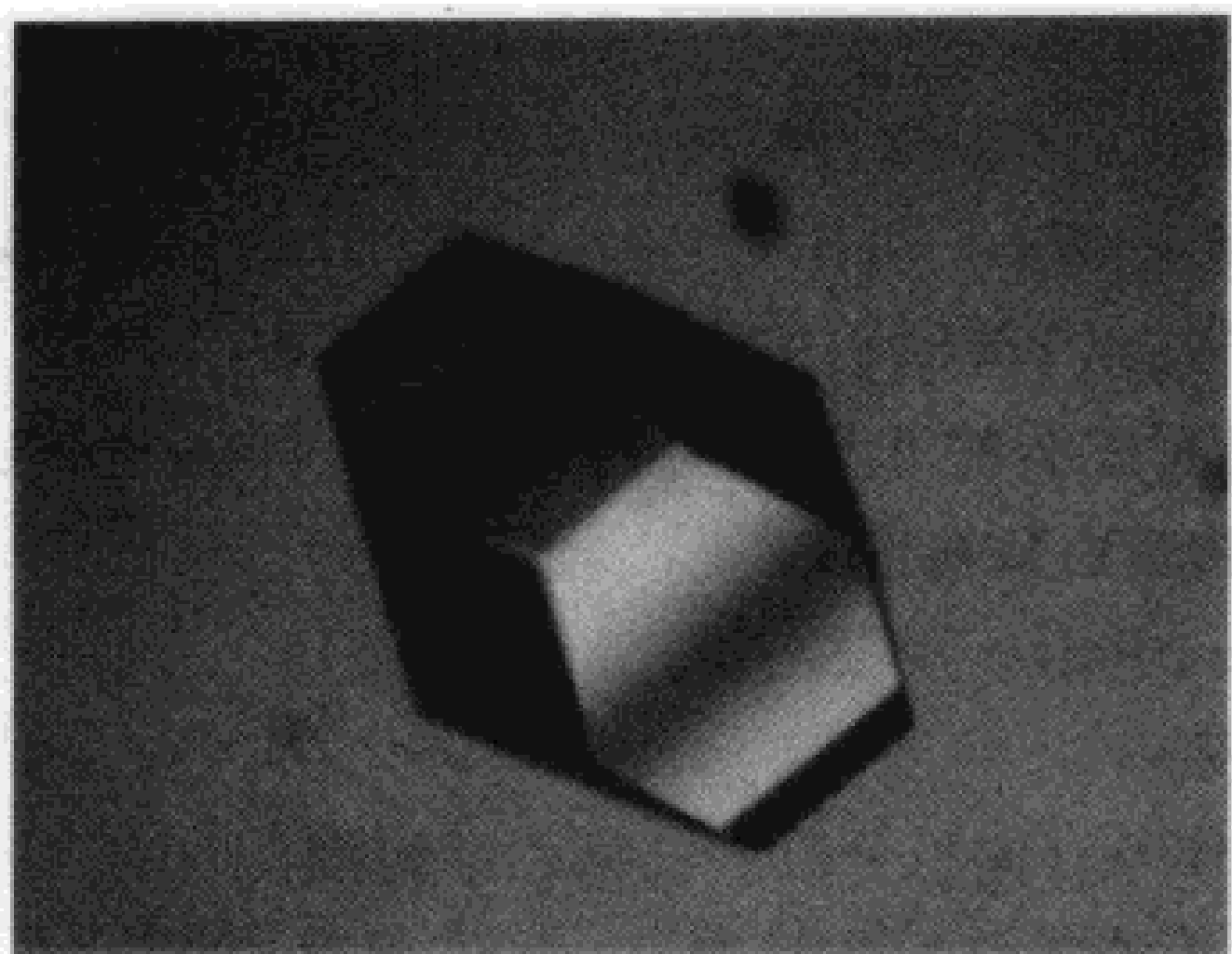


图 17.1 蛋白质的晶体结构

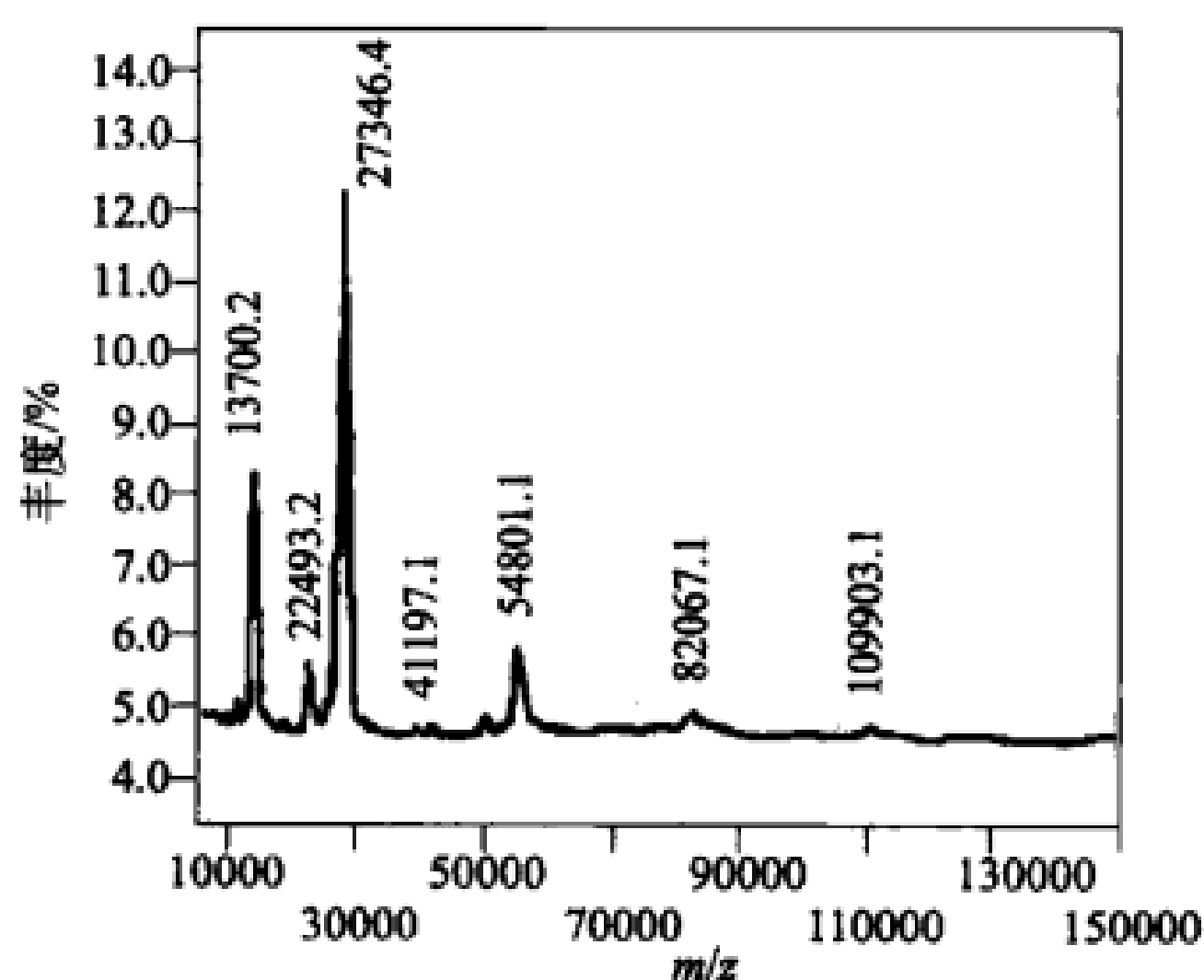


图 17.2 精氨酸酯酶的质谱图

2. 用蛋白质提取液提取组织全蛋白，离心，取上清液；
3. 用 Bradford 法进行蛋白定量。

实验在冰浴中完成。

双向凝胶电泳：见电泳

蛋白质的胶内消化

试剂

Wash buffer: 水乙醇溶液 (1/1, 体积比), 新鲜配制

Digestion buffer: 50mmol/L NH_4HCO_3 水溶液, 新鲜配制

方法

1. 将蛋白质斑点自凝胶上切割下来, 使用水清洗至少 3 次, 每次至少 30min;
2. 将清洗过的凝胶转移到清洁的容器中, 在临放入凝胶之前, 使用离子化的空气处理容器;
3. 使用无菌的解剖刀或者不锈钢针将凝胶切成小块, 只保留染色深的小块。

分别转移到小管中；

4. 分别使用 Wash buffer 浸没凝胶，室温放置 15min；
5. 轻轻离心，除去 Wash buffer，再次使用 Wash buffer 浸没凝胶 15min；
6. 离心，除去 Wash buffer，干燥；
7. 使用 10 μ L 新鲜配制的 0.001% 胰蛋白酶的 Digestion buffer 溶液浸泡干胶 10min，除去多余的胰蛋白酶溶液；
8. 使用 Digestion buffer 浸没凝胶；
9. 37 $^{\circ}$ C 消化过夜；
10. 加入 10 μ L 10%（体积分数）三氟乙酸溶液；
11. 离心，将上清液转移到新管中，-20 $^{\circ}$ C 保存。

消化产物脱盐、过滤和浓缩

试剂

样品缓冲液：1% TFA，5% 乙腈

缓冲液 B：0.02% HFBA，0.5% 乙酸，80% 乙腈

方法

1. 向 C₁₈ 脱盐柱中注入 5 μ L 甲醇；
2. 向 C₁₈ 脱盐柱中注入 5 μ L 样品缓冲液；
3. 将酶切产物酸化后注入 C₁₈ 脱盐柱；
4. 使用 10 μ L 样品缓冲液清洗 C₁₈ 脱盐柱；
5. 向 C₁₈ 脱盐柱中注入 5 μ L 缓冲液 B，洗出液即为脱盐产物。

方案 17.3 果蝇蛋白质磷酸化的质谱分析

自果蝇中粗提蛋白

试剂

Lysis buffer: 5mmol/L Tris (pH 8.1), 75mmol/L NaCl, 8mmol/L 尿素, 10mmol/L 焦磷酸钠, 1mmol/L 氟化钠, 1mmol/L β -巯基乙醇, 1mmol/L 原钒酸钠, 加入蛋白酶抑制剂

方法

1. 收集果蝇胚胎；
2. 使用 50% 的漂白剂洗涤；
3. 使用 Lysis buffer 处理，并进一步使用超声波破碎细胞；
4. 在 4 $^{\circ}$ C 下 13000r/min 离心 15min，收集上清液。

蛋白质的溶液内消化

试剂

8mmol/L 尿素：将 4.80g 尿素和 23.8mg HEPES 溶解于 10 mL 水中，使用

NaOH 调节 pH 至 8.0, 室温保存

6mol/L 尿素/2mol/L 硫代碳酸二胺: 将 3.60g 尿素、1.52g 硫代碳酸二胺和 23.8mg HEPES 溶于 10mL 水中, 使用 NaOH 调节 pH 至 8.0

8mol/L 胍: 将 7.65g 胍溶于 10mL 水中, 使用 HCl 调节 pH 至 1.5

Digestion buffer: 50mmol/L NH_4HCO_3 水溶液, 新鲜配制

碘代乙酰胺储备液: 将 5mg 碘代乙酰胺溶于 10mL Digestion buffer 中, 按照每份 100 μL 分装后于 -20°C 保存

DTT 储备液: 将 5mg DTT 溶于 10mL 水中, -20°C 保存

LysC 储备液: 将 0.5 μg LysC 溶于 1mL Digestion buffer, 分装成小份 -20°C 保存

方法

1. 将蛋白质溶解于尽量小体积的变性缓冲液中 (8mol/L 尿素, 6mol/L 尿素/2mol/L 硫代碳酸二胺或 8mol/L 胍, 根据实验摸索选择一种适宜的缓冲液);
2. 按照 1 μg DTT/50 μg 蛋白质的比例加入 DTT 储备液, 室温孵育 30min;
3. 按照 5 μg 碘代乙酰胺/50 μg 蛋白质的比例加入碘代乙酰胺储备液, 室温孵育 20min;
4. 按照 1 μg Lys C /50 μg 蛋白质的比例加入 LysC 储备液, 室温孵育 3h 或过夜;
5. 使用 4 体积的 Digestion buffer 稀释体系, 按照 1 μg 胰蛋白酶/50 μg 蛋白质的比例加入胰蛋白酶溶液, 37°C 孵育过夜, 酶切产物于 -20°C 保存。

二维液相色谱法分离肽段混合物

方法

1. 强阳离子交换色谱

色谱柱: 9.4mm \times 200 mm, PolySULFOETHYL Aspartamide 色谱柱 (5 μm , 300A 孔径)。PDA 检测器。流动相: A, 25mmol/L 甲酸/40%乙腈; B, 5mmol/L KH_2PO_4 , pH 2.65/30%乙腈, 350mmol/L KCl; C, 50mmol/L KH_2PO_4 , pH 7.5/500mmol/L KCl; 0% B \rightarrow 100% B, 35min, 线性梯度; 100%B; 100%C。流速 2.0mL/min。

2. 固定化金属亲和色谱

磷酸化肽段的富集

Fe^{3+} -NTA 和微柱的制备

1. 于 1.5mL 离心管中将 15mg Ni^{2+} -NTA 硅胶悬浮于 200 μL 水中;
2. 将树脂颗粒在台式离心机中离心, 除去上清液, 用 200 μL 水清洗树脂;
3. 使用 50mmol/L EDTA 的 1mol/L NaCl 溶液在室温下孵育树脂 2min, 离心并除去上清液, 本步操作重复两次;
4. 使用 200 μL 水清洗一次, 200 μL 100mmol/L 乙酸清洗两次;

5. 使用 400 μ L 50mmol/L 的 FeCl_3 50mmol/L 乙酸溶液室温下孵育 5min, 混合均匀, 本步骤重复两次;

6. 使用 200 μ L 100mmol/L 乙酸清洗, 之后使用 200 μ L 3:1 100mmol/L 乙酸:100% 乙腈清洗, 再使用 200 μ L 100mmol/L 乙酸清洗;

7. 将树脂重悬于 100 μ L 100mmol/L 乙酸中;

8. 取 10 μ L 树脂填装于柱管中, 封装。

使用 Fe^{3+} -NTA 纯化磷酸化肽段

1. 使用 100mmol/L 乙酸将肽段溶液稀释 30 倍;

2. 上样至 Fe^{3+} -NTA IMAC 微柱, 停留 15~20min;

3. 依次使用 20 μ L 100 mmol/L 乙酸、20 μ L 3:1 100mmol/L 乙酸:100% 乙腈、20 μ L 100mmol/L 乙酸清洗微柱;

4. 使用 2 \times 5 μ L pH 10.5 的氨水洗脱磷酸化肽段;

5. 使用 20 μ L 5% 甲酸中和洗脱下来的肽段;

6. 用 1 μ L DHB (DHB 20 μ g/ μ L 溶于含有 0.1% TFA 的 70% 乙腈) 进行 MALDI-TOF 分析。

方案 17.4 核磁共振法研究细胞色素空间结构

1. 冷冻干燥 0.5mL, pH 7.0 的标准磷酸盐缓冲体系;

2. 将蛋白质 V61H 样品 12.42mg 与磷酸盐一起溶于 350 μ L 双蒸水及 50 μ L 重水中;

3. 使用少许稀 NaOH 溶液调节 pH 至 7.00 \pm 0.04, 溶液体系接近 450 μ L;

4. 将蛋白质溶液体系冷冻干燥;

5. 使用 99.96% 重水溶解, 反复摇匀;

6. 将蛋白质溶液体系冷冻干燥;

7. 使用 99.96% 重水溶解, 反复摇匀;

8. 用稀的 NaOD 或 DCl 调解溶液 pH 至 7.00 \pm 0.04, 样品终浓度为 2.9mL;

9. 进行核磁共振分析。

方案 17.5 以 X 射线衍射为目的的 SARS-COV M^{prc} 蛋白的分离纯化

1. 将表达所需蛋白的菌体用 PBS 缓冲液重悬, 置于冰上预冷 5min, 5000r/min 离心 15min 收集菌体;

2. 将菌体用裂解缓冲液重悬, 用超声波裂解, 20000r/min 离心 25min 收集上清液, 0.45 μ m 滤膜过滤;

3. GST 柱亲和纯化, 用 PBS 缓冲液大量淋洗至滴 10 μ L 至 200 μ L 考马斯亮蓝溶液中不变色, 按 1mL GST 介质加入 20 U PreScissionTM Protease, 4 $^{\circ}$ C 轻微振荡 36h;
4. 把洗脱液用 0.22 μ m 滤膜过滤;
5. 以缓冲液 A 为平衡液过 SepHadex G25 柱;
6. 以缓冲液 A 到缓冲液 B 的梯度洗脱体系过 Mono Q 强阳离子交换柱进行纯化;
7. 以缓冲液 A 为平衡液过 SepHadex G75 柱;
8. 纯化产物经 SDS-PAGE 检测纯度为 98%, 满足晶体生长的纯度要求。

参 考 文 献

- [1] Ruedi Aebersold, et al. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2003, 422: 198.
- [2] Zhai B, et. al. Phosphoproteome Analysis of *Drosophila melanogaster* Embryos. *J Proteome Res*, 2008, 7 (4): 1675-1682.
- [3] 曹春阳. 细胞色素 b5 突变体 V61H、V45H、V45Y、V45E 和 P40V NMR 研究 [博士学位论文]. 上海: 中国科学院上海有机化学研究所, 2001.
- [4] [澳] 理查德 J 辛普森主编. 蛋白质与蛋白质组学实验指南. 何大澄主译. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [5] 季怡萍等. 应用激光解吸质谱和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析蛇毒精氨酸酯酶的纯度和分子量. *分析化学研究报告*, 1999, (27) 5: 513-516.
- [6] 汪尔康等. 生命分析化学. 北京: 科学出版社, 2006.
- [7] 杨茂君. 三类蛋白质的结晶、结构及功能研究 [博士学位论文]. 北京: 中国协和医科大学, 2003.

