

蛋白质在金属螯合亲和色谱中的竞争洗脱

李 蓉^{* 1 2} 王 燕¹ 陈国亮¹ 王小刚¹ 郑建斌²

¹(西北大学化工学院 西安 710069) ²(西北大学分析科学研究所 西安 710069)

摘 要 以细胞色素 C 和溶菌酶为代表,研究了蛋白质在强亲和性金属螯合柱 (IDA-Cu(II)) 上的保留行为。考察了竞争剂、缓冲体系对蛋白质在 IDA-Cu(II) 柱上保留值的影响。发现在 PBS 和 NaAc-HAc 缓冲体系用咪唑 (Imid) 和甘氨酸 (Gly) 作竞争剂,可使蛋白质得到较好分离;在 Gly 和 Imid 竞争体系,分别研究了 pH 值变化对蛋白质在 IDA-Cu(II) 柱上保留值的影响。为使蛋白质在 IDA-Cu(II) 柱上得到有效分离且减少固定金属 Cu²⁺ 的流失,对 Gly 体系,最好采用竞争置换和降低 pH 值相结合的方式洗脱。对 Imid 体系,溶液 pH 值应控制在 6.0 为宜,低 pH 值下蛋白质则不宜被洗脱。结果表明,竞争剂浓度与蛋白质在 IDA-Cu(II) 柱上的保留关系均符合计量置换模型。随着竞争剂浓度的增加,蛋白质的保留值减小。保留因子 (k') 的对数与竞争剂浓度倒数 ($1/[D]$) 的对数具有良好的线性关系,其线性相关系数分别在 0.984 和 0.986 以上。

关键词 金属螯合亲和色谱; 保留行为; 蛋白质; 竞争剂

1 引 言

20 世纪 70 年代, Porath 等^[1]首先提出金属螯合亲和色谱 (MCAC), 利用络合配基将金属离子固定在基质上, 通过固定金属离子与蛋白质的配位作用进行分离。由于固定金属离子对表面含有组氨酸、半胱氨酸和色氨酸残基的蛋白质具有强烈亲和作用^[2], 因此该法广泛用于蛋白质的分离与纯化^[3~6], 已成为研究生物大分子不可缺少的工具。

根据金属螯合固定相对蛋白质亲和能力的不同, 常用的金属螯合柱可分为弱亲和性和强亲和性金属螯合柱。本研究曾报道弱亲和柱实质上是一种螯合型离子交换柱, 蛋白质在固定相上的保留主要受静电作用支配^[7]。吸附在这类螯合柱上的蛋白质可通过改变离子强度的方法被洗脱。然而对强亲和性的 IDA-Cu(II) 柱, 蛋白质在固定相上的保留主要受配位作用控制, 静电作用次之^[7]。因此吸附在强亲和柱上的蛋白质利用改变离子强度的方法难以被洗脱, 只有采用竞争洗脱的方法才可被洗脱^[2]。竞争洗脱是通过利用竞争剂和蛋白质对固定金属离子的竞争配位, 从而达到分离的目的。这个方法的关键是严格控制竞争剂与固定金属离子的配位强度。配位作用过弱, 蛋白质不易被洗脱; 配位作用过强, 则分离选择性较差, 甚至造成固定金属离子的严重流失。配位作用的强弱不仅取决于竞争剂本身的性质, 还与竞争剂浓度、溶液 pH 值、离子强度及所采用的缓冲体系有关。因此, 强亲和性金属螯合色谱洗脱条件的选择是一项繁琐的工作。本研究考察了竞争剂、缓冲体系、溶液 pH 值和竞争剂浓度对蛋白质在 IDA-Cu(II) 柱上保留值的影响, 为合理选择洗脱体系提供一些启示。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

ÄKTA purifier 10 生物色谱制备仪 (Amersham Biosciences 公司); TitraMate 20pH 电位仪 (Mettler Toledo 公司); 124PP 装填机 (日本 Chemico 公司)。参照文献 [7] 制备 IDA-Cu(II) 柱 (100 mm × 4.6 mm)。

硅胶 (粒度 7 μm, 孔径 30 nm, 兰州物理化学研究所); γ-缩水甘油氧丙基三甲氧基硅烷 (GLDP, 分析纯, 辽宁盖县化工研究所); 亚氨基二乙酸 (IDA, 分析纯, 上海国药集团化学试剂有限公司); 咪唑

2009-09-23 收稿; 2009-12-07 接受

本文系陕西省自然科学基金 (No. 2007B22)、陕西省教育厅自然科学专项 (No. 09JK758)、陕西省重点学科、西北大学校基金 (No. U5NW4) 和西北大学研究生科研实验 (No. 09YSY24) 资助项目

* E-mail: lhr40222@tom.com

(Imid)、组氨酸(His)、甘氨酸(Gly)以及其它试剂均为分析纯(西安化学试剂厂);水为二次蒸馏水。

细胞色素-C(Cyt-C)、溶菌酶(Lys)均购自美国 Sigma 公司;浓度均为 2 g/L 的 Cyt-C 和 Lys 标准蛋白混合液,用 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 6.0)配制。

2.2 色谱实验

竞争剂和缓冲体系的选择、溶液 pH 值和竞争剂浓度对蛋白质在金属螯合柱上保留值的影响等实验,分别按照文中图表给定的色谱条件进行。

3 结果与讨论

3.1 竞争剂的选择

为了选择适宜的竞争剂,在保证固定金属离子不严重流失的条件下,分别用 NH_4Cl 、Imid、His 和 Gly 作为竞争剂。在磷酸盐缓冲体系,按照梯度洗脱方式,在 IDA-Cu(II)柱上考察了 Cyt-C 和 Lys 的保留情况,结果见表 1。由表 1 看出,用 NH_4Cl 作竞争剂洗脱能力较弱,蛋白质的洗脱不充分;His 洗脱能力

表 1 竞争剂的选择

Table 1 Selection of competitive agents

竞争剂 Competitive agent	分子式 Molecular formula	配位数 Coordination number	蛋白质 Protein	流动相 Mobile phase	分离及 Cu^{2+} 的流失 Separation and leakage of Cu^{2+}
氯化铵 Ammonium chloride (NH_4Cl)	NH_4Cl	N 1	Cyt-C Lys	$\text{NH}_4\text{Cl}-\text{KH}_2\text{PO}_4$ (PBS, pH 6.0)	洗脱强度弱, Cu^{2+} 流失小 Weaker elution strength, less leakage of Cu^{2+}
甘氨酸 Glycine(Gly)	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	N 1 O 1	Cyt-C Lys	Gly-PBS (pH 6.0)	较好的分离, Cu^{2+} 流失小 Better separation, less leak- age of Cu^{2+}
咪唑 Imidazole(Imid)	$\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$	N 1	Cyt-C Lys	Imid-PBS (pH 6.0)	较好的分离, Cu^{2+} 流失小 Better separation, less leak- age of Cu^{2+}
组氨酸 Histidine(His)	$\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_2\text{CH}_2\text{CH}$ (NH_2) COOH	N 2 O 1	Cyt-C Lys	His-PBS (pH 6.0)	洗脱强度高, Cu^{2+} 流失严重 Higher eluting strength Higher leakage of Cu^{2+}

Cyt-C: cytochrome C; Lys: lysozyme.

虽高,但 Cu^{2+} 的流失异常严重,无法正常操作;Imid 和 Gly 与 Cu^{2+} 结合强度适中,既保证蛋白质可以被充分洗脱,又使 Cu^{2+} 的流失量减到较小程度。因此 Imid 和 Gly 是 MCAC 中竞争剂的最佳选择。

3.2 缓冲体系的选择

同一竞争剂在不同缓冲体系往往得到不同的分离效果。MCAC 中的流动相通常由缓冲剂、盐和竞争剂组成。缓冲剂主要用来控制溶液 pH 值;盐是为了抑制蛋白质与固定相间的静电作用^[8];竞争剂是通过与固定金属离子的竞争配位洗脱被吸附的蛋白质。在色谱分析中常用的缓冲体系有 PBS、Tris-HCl、NaAc-HAc 和 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-HCl}$ 等。本研究以 Cyt-C 和 Lys 为分离对象,Imid 和 Gly 为竞争剂,对上述 4 种缓冲体系进行了考察,得到了图 1 和图 2 的结果。由图 1a 可见, Cyt-C 和 Lys 在 PBS-Imid 体系中得到了较好的分离。若用 100 mmol/L NaAc-HAc 替代流动相 B 中 20 mmol/L PBS 进行色谱分析,也可得到与图 1a 类似的色谱图 1b。Cyt-C 和 Lys 的保留时间分别为 10.77 和 17.95 min。

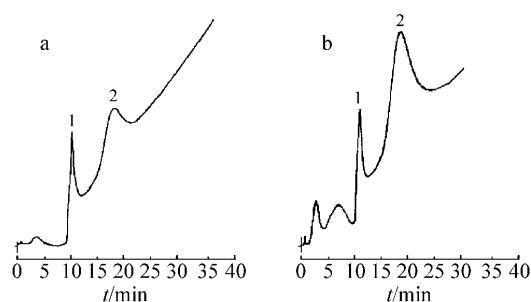


图 1 蛋白质在 PBS-Imid 体系 (a) 和 NaAc-Imid 体系 (b) 的色谱图

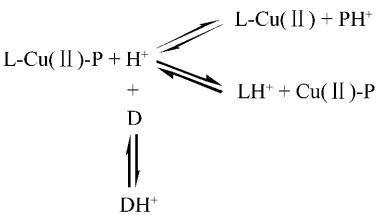
Fig. 1 Chromatograms of standard protein mixture in PBS-imidazole (Imid) system (a) and in NaAc-Imid system (b)

1. Cyt-C; 2. Lys. (a). 流动相 (Mobile phase) A: 20 mmol/L PBS + 0.5 mol/L NaCl + 1 mmol/L Imid (pH 6.0), B: 20 mmol/L PBS + 0.5 mol/L NaCl + 40 mmol/L Imid (pH 6.0); (b). 流动相 (Mobile phase) A: 20 mmol/L PBS + 0.5 mol/L NaCl + 1 mmol/L Imid (pH 6.0), B: 100 mmol/L NaAc-HAc + 0.5 mol/L NaCl + 40 mmol/L Imid (pH 6.0). 色谱柱 (Column): IDA-Cu(II) (100 mm $\times$ 4.6 mm); 线性梯度洗脱 (Gradient elution): 0 ~ 35 min, 0 ~ 100% B, 流速 (Flow rate): 1 mL/min; 检测 (Detector): UV ($\lambda = 280$ nm); 进样量 (Size of sample): 5 μL ; 蛋白质浓度 (Concentration of each protein): 2 g/L.

图 2 是 Cyt-C 和 Lys 在 PBS-Gly 体系中的色谱图。如果用 Tris-HCl 和 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-HCl}$ 代替 PBS ,由于 Tris 与 Cu^{2+} 的络合作用^[9] ,使响应发生异常 ,基线很不稳定;采用 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-HCl}$ 体系 ,仅 Cyt-C 流出 ,而 Lys 不被洗脱。由此可见 ,Imid 和 Gly 在 PBS 或 NaAc-HAc 缓冲体系 ,可使蛋白质得到较好的分离。尽管金属 Cu^{2+} 也有少量流失 ,但并不妨碍分析测定。

3.3 pH 值对蛋白质保留值的影响

溶液 pH 值对蛋白质保留值的影响十分复杂 ,不仅涉及竞争剂的亲核行为 ,也影响络合配基和蛋白质表面配位原子的质子作用以及金属离子的稳定性^[7]。如果以 L-Cu(II)代表金属铜离子螯合配基 , PH^+ 为质子化蛋白质 , DH^+ 为质子化竞争剂 , LH^+ 为质子化络合配基 ,则被吸附蛋白质 (L-Cu(II)-P) 和溶液中 H^+ 存在下列平衡关系:



由上式看出 ,溶液中无竞争洗脱剂时 ,增加酸度平衡右移 ,被吸附蛋白质由于质子化作用而被解吸。当溶液中存在竞争剂 ,竞争剂和蛋白质对 H^+ 发生竞争结合。若蛋白质的质子化程度大于竞争剂的质子化程度 ,蛋白质发生解吸;反之则不利于蛋白质的解吸。pH 值的变化对蛋白质在 IDA-Cu(II)柱上的保留以及对 Cu^{2+} 流失的影响的结果见表 2 和表 3。

表 2 Gly 体系中 pH 值变化对蛋白质保留值的影响
Table 2 Effect of pH on retention time of proteins in Gly system

C_{Gly} (mmol/L)	pH	洗脱类型 Elution types	Cyt-C 的保留时间 Retention time of Cyt-C (min)	Lys 的保留时间 Retention time of Lys (min)	Cu^{2+} 流失 Leakage of Cu^{2+}
0	6.0	改变离子强度 Changing ionic strength	不流出 No elution	不流出 No elution	很小 Least
0	3.0	酸洗脱 Acid elution	31.54	36.74	小 Little
150	6.0	竞争洗脱 Competitive elution	21.69	38.44	稍大 Not little
150	3.0	竞争 + 酸洗脱 Competitive and acid elution	20.21	30.24	较小 Less

流动相 (Mobile phase) A:25 mmol/L PBS + 0.1 mol/L NaCl + 3.1 mmol/L Gly (pH 6.0) ; B:25 mmol/L PBS + 0.8 mol/L NaCl + Gly。

表 3 Imid 体系中 pH 值对蛋白质保留时间的影响
Table 3 Effect of pH on retention time of proteins in Imid system

C_{PBS} (mmol/L)	C_{NaAc} (mmol/L)	C_{NaCl} (mmol/L)	C_{Imid} (mmol/L)	pH	Cyt-C 的保留值 Retention time of Cyt-C (min)	Lys 的保留值 Retention time of Lys (min)
20	0	500	40	6.0	10.70	18.80
20	0	500	40	3.0	不流出 No elution	不流出 No elution
0	100	500	40	6.0	10.77	17.95
0	100	500	40	4.0	不流出 No elution	不流出 No elution

各浓度参数分别为图 1 流动相 B 的组成 (All concentration parameters are composition of mobile phase B in Fig. 1 , respectively)。

由表 2 可见 ,在无竞争剂 Gly 的情况下 ,仅靠增加酸度来提高蛋白质的质子化程度 ,也可将吸附在

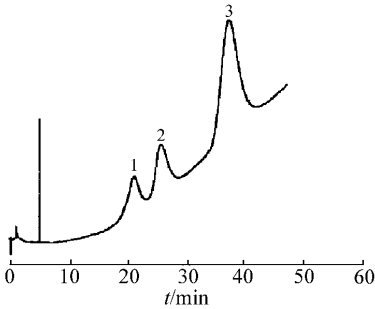


图 2 蛋白质在 PBS-Gly 体系的色谱图
Fig. 2 Chromatogram of standard protein mixture in PBS-Gly system
1. Cyt-C; 2. Cyt-C 杂蛋白 (Proteins) 3. Lys。流动相 (Mobile phase) A:25 mmol/L PBS + 0.1 mol/L NaCl + 3.1 mmol/L Gly (pH 6.0) ,B:25 mmol/L PBS + 0.8 mol/L NaCl + 150 mmol/L Gly (pH 6.0) 。其它条件同图 1a (Other conditions are same as in Fig. 1a)。

IDA-Cu(II)柱上的蛋白质洗脱下来, 即当 pH 从 6.0 降到 3.0 时, Cyt-C 和 Lys 从不流出变为在 31.54 和 36.74 min 分别流出。这种洗脱方式较竞争剂的洗脱强度弱, 但 Cu^{2+} 流失的较小。采用单独的竞争洗脱, 洗脱强度虽高, 但 Cu^{2+} 的流失也相应增大。如果将竞争洗脱和酸度洗脱结合起来, 既可使吸附的蛋白质得到有效分离, 又可降低 Cu^{2+} 的流失。这是因为酸度的增加有利于蛋白质的解吸而不利与竞争剂与 Cu^{2+} 的结合。实验表明, Gly 的浓度固定在 150 mmol/L, 溶液 pH 值从 6.0 降至 3.0 时, Cyt-C 的保留时间从 21.69 min 减小到 20.21 min, Lys 的保留时间从 38.44 min 减小到 30.43 min, Cu^{2+} 的流失也明显降低。图 3 是竞争洗脱和酸度洗脱协同作用的色谱图。

表 3 是在 Imid 体系 pH 对蛋白质保留时间的影响。由表 3 可见, 对于 Imid 竞争剂, 无论在 PBS 或 NaAc-HAc 体系, pH 6.0 时蛋白质都被很好地分离。若溶液 pH 降低到 3.0 或 4.0, 由于 Imid 较蛋白质优先质子化, 使其与 Cu^{2+} 的竞争结合能力减弱, 故被吸附蛋白质难以洗脱。

综上所述, 若用 Gly 作竞争剂, 采用竞争与酸洗脱相结合的方式是一种值得推荐的洗脱方式。但对 Imid 竞争剂, 溶液 pH 不宜过低, 应控制在 6.0 为宜。

3.4 竞争剂浓度对蛋白质保留值的影响

蛋白质在 MCAC 柱上的保留与竞争剂浓度的关系可用文献 [10] 提出的亲和色谱中的计量置换理论 (SDT-R) 表示:

$$\lg k' = \lg I + Z \lg(1/[D]) \quad (1)$$

式中 k' 为蛋白质在 MCAC 柱上的保留因子; $[D]$ 为竞争洗脱剂的浓度; $\lg I$ 是与固定相和流动相的性质、体积以及金属螯合配基与蛋白质和竞争剂亲和势有关的常数; Z 是取代一个被吸附蛋白质分子所需的竞争剂分子数。由式 (1) 可见, 在一定浓度范围内, 蛋白质在 MCAC 柱上的保留值随竞争剂浓度的增加而减小, 并呈对数线性关系。

为了证明式 (1) 的正确性, 利用不同浓度的 Imid 和 Gly 按照梯度洗脱的方式分别考察了蛋白质在 IDA-Cu(II) 柱上的保留值, 得到了图 4 和图 5 的结果。无论是 Imid 或 Gly, 其 $\lg k'$ 和 $\lg 1/[D]$ 都具有良好的线性关系, 其线性相关系数分别在 0.984 和 0.986 以上。SDT-R 模型也同样适用于 MCAC。

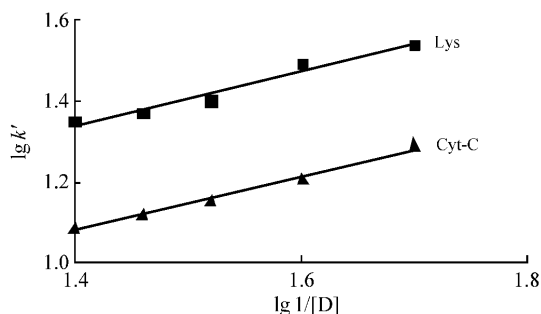


图 4 Imid 浓度与蛋白质保留值的关系

Fig. 4 Relationship between the concentration of Imid and the retention of proteins

流动相 (Mobile phase) A: 20 mmol/L PBS + 0.5 mol/L NaCl + 1 mmol/L Imid (pH 6.0), B: 20 mmol/L PBS + 0.5 mol/L NaCl + 20, 25, 30, 35, 40 mmol/L Imid (pH 6.0), 其它条件如图 1a (Other conditions are same as in Fig. 1a).

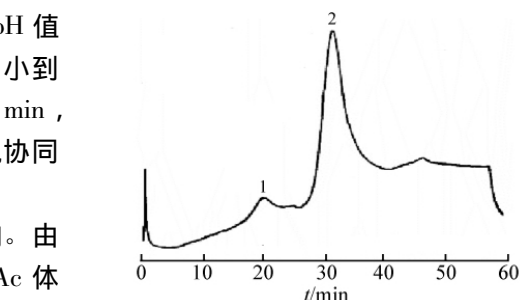


图 3 蛋白质在竞争洗脱与酸度洗脱协同作用下的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of standard protein mixture under cooperative effect of competition and acidity 1. Cyt-C; 2. Lys. 流动相 (Mobile phase) A: 25 mmol/L PBS + 0.1 mol/L NaCl + 3.1 mmol/L Gly (pH 6.0), B: 25 mmol/L PBS + 0.8 mol/L NaCl + 150 mmol/L Gly (pH 3.0), 其它条件同图 1a (Other conditions are same as in Fig. 1a).

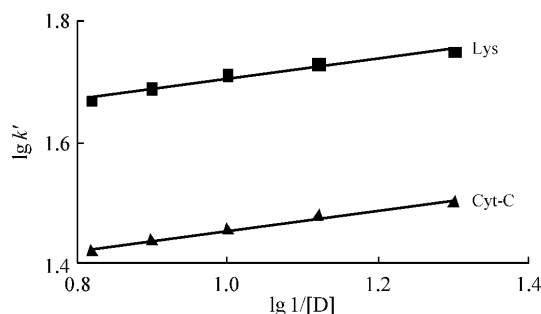


图 5 Gly 浓度与蛋白质保留值的关系

Fig. 5 Relationship between the concentration of Gly and the retention of proteins

流动相 (Mobile phase) A: 25 mmol/L PBS + 0.1 mol/L NaCl + 3.1 mmol/L Gly (pH 6.0), B: 25 mmol/L PBS + 0.8 mol/L NaCl + 50, 75, 100, 125, 150 mmol/L Gly (pH 6.0), 其它条件如图 1a (Other conditions are same as in Fig. 1a).

References

- 1 Porath J , Carlsson J , Olsson B , Belfrage G I. *Nature* , **1975** , 258(5536) : 598 ~ 599
- 2 Gutierrez R , Martin E M del Valle , Galan M A. *Sep. Purif. Rev.* , **2007** , 36(1) : 71 ~ 111
- 3 Tatsuya O , Kenzo K , Hodzumi T , Kaoru O , Yoshinari B. *J. Chromatogr. B* , **2008** , 876(1) : 116 ~ 122
- 4 Maja K , Vladka G P , Irena F , Viktor M. *J. Chromatogr. B* , **2008** , 867(1) : 119 ~ 125
- 5 Wang C Z , Wang L L , Geng X D. *Biochem. Eng. J.* , **2009** , 43(2) : 197 ~ 202
- 6 Mangé A , Bellet V , Tuallion E , Perre P V D , Solassol J. *J. Chromatogr. B* , **2008** , 876(2) : 252 ~ 256
- 7 LI Rong (李 蓉) , CHEN Guo-Liang (陈国亮) , ZHAO Wen-Ming(赵文明). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2005** , 33 (10) : 1376 ~ 1380
- 8 Ueda E K M , Gou P W , Morganti L. *J. Chromatogr. A* , **2003** , 988(1) : 1 ~ 23
- 9 Sharma S , Agarwal G P. *Separ. Sci. Technol.* , **2002** , 37(15) : 3491 ~ 3511
- 10 GENG Xin-Du(耿信笃). *Stoichiometric Displacement Theory & Application* (计量置换理论及应用). Beijing (北京) : Science Press (科学出版社) , **2004** : 92 ~ 94

Competitive Elution of Proteins in Metal Chelate Affinity Chromatography

LI Rong^{*1,2} , WANG Yan¹ , CHEN Guo-Liang¹ , WANG Xiao-Gang¹ , ZHENG Jian-Bin²

¹ (School of Chemical Engineering , Northwest University , Xi'an 710069)

² (Institute of Analytical Science , Northwest University , Xi'an 710069)

Abstract The retention behavior of proteins on strong affinity metal chelate column (IDA-Cu(II)) was studied using cytochrome-C (Cyt-C) and lysozyme (Lys) as typifiers. The effects of competitive agents and buffer systems on the retention of proteins on IDA-Cu(II) column were investigated. In potassium dihydrogen phosphate (PB) and sodium acetate-acetic acid (NaAc-HAc) buffer systems, the better separation for proteins could be obtained by using imidazole (Imid) and glycine (Gly) as competitive agents. The effects of pH on the retention of proteins on IDA-Cu(II) column were examined in Imid and Gly eluting systems, respectively. For effective isolation of proteins and less leakage of Cu^{2+} , the eluting method of competitive displace combined with decreasing pH was a better choice for Gly system. As for Imid, the pH value should be controlled at 6.0. Proteins could not be easily eluted at the low pH. The results indicate that the relationship between the concentration of competitive agent and the retention of proteins on IDA-Cu(II) column conforms to the stoichiometric displacement theory for retention (SDT-R). The retention time decreased with increasing competitive agent concentration. The retention factor (k') and the reciprocal of competitive agent concentration ($1/[D]$) were well logarithmic linear relationship. The linear correlation coefficients were above 0.984 and 0.986 respectively.

Keywords Metal chelate affinity chromatography; Retention behavior; Protein; Competitive agent

(Received 23 September 2009; accepted 7 December 2009)