

金属螯合亲和层析分离蛋白质的研究

孙旭东 李红旗 隋洪艳 沈忠耀

(清华大学化工系 北京 100084)

摘 要 金属螯合亲和层析是近 20 年发展起来的一项新型分离技术。它以配基简单、吸附量大、分离条件温和、通用性强等特点,逐渐成为分离纯化蛋白质等生物工程产品最有效的技术之一。本文从单组分蛋白质入手,考查了 pH 值、铵离子浓度、不同铵盐等对蛋白质洗脱的影响,并进行了分析。还对不同的金属螯合柱和不同性质蛋白质的洗脱性能进行了研究,比较了不同金属离子与蛋白质亲和力的区别,为实际体系的分离研究打下了基础。

关键词 金属螯合亲和层析 牛血清白蛋白 血红蛋白 分离

中图分类号 Q815 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0495-05

金属螯合亲和层析,又称固定化金属离子亲和层析(Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography,简称 IMAC),是近 20 年发展起来的一项新型分离技术。最早由 Paroth 等人^[1,2]提出。该方法利用蛋白质表面的一些氨基酸,例如组氨酸、色氨酸、赖氨酸等能和金属离子发生特殊的相互作用的原理,从而对蛋白质加以分离^[3]。由于它具有配基简单、吸附量大、分离条件温和、通用性强等特点,逐渐成为分离纯化蛋白质等生物工程产品最有效的技术之一^[4]。

本文主要以单组分蛋白质牛血清白蛋白(BSA)和血红蛋白为研究对象,考查了 pH 值、铵离子浓度及阴离子等不同洗脱条件对出峰时间的影响。对不同的金属螯合柱的性能和不同单组分蛋白质的洗脱性能进行了研究,比较了不同金属离子与蛋白质亲和力的区别,为实际生物产品的分离奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 试剂与材料

Chelating Sepharose Fast Flow:粒径 90 μ m,螯合剂为亚氨基二乙酸(IDA)购于 Pharmacia Biotech 公司。层析柱尺寸:内径 8mm,长度 130mm。硫酸铜、醋酸钠、磷酸二氢钠、氯化铵、醋酸铵、氯化钠等均为分析纯试剂。牛血清白蛋白(BSA)、血红蛋白均为电泳纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 固定金属离子:用 2 倍柱体积的蒸馏水平

衡层析柱,用 1 倍柱体积浓度为 0.2 mol/L 的金属离子中性溶液上柱。本文选择硫酸铜溶液和氯化锌溶液。用 5 倍体积的蒸馏水洗涤层析柱。在蛋白质上样前用 2 倍体积的初始缓冲溶液平衡柱子。IDA-Cu 柱使用的平衡液为 0.02 mol/L 磷酸氢二钠,0.5 mol/L NaCl,pH 为 7.20,IDA-Zn 柱使用的平衡液为 0.05 mol/L NaAC,0.5 mol/L NaCl,pH 为 6.96。

1.2.2 蛋白质上样和洗脱:上样量为 1 mg/mL 的蛋白质缓冲溶液 5 mL。根据研究需要调节洗脱液的 pH 值、洗脱液组分或者盐浓度。流速为 9.6 mL/h。洗脱时用紫外检测仪在线检测并记录。

1.2.3 再生:运用强螯合剂 EDTA(0.05 mol/L EDTA,0.5 mol/L NaCl)淋洗柱子即可。

2 实验结果与讨论

2.1 IDA-Zn 柱洗脱 BSA 的影响因素

2.1.1 钠盐体系中缓冲液 pH 值的影响:在 IDA-Zn 柱上样 BSA 后,用 0.05 mol/L NaAC,0.5 mol/L NaCl pH 6.96 的缓冲溶液平衡层析柱。分别用不同 pH 值的缓冲溶液进行洗脱,得洗脱体积 V-pH 曲线(图 1)。

从图中可以看出,洗脱液 pH 值越小,所用的洗脱液体积就越小,蛋白质越容易洗脱。根据价键理论,蛋白质与金属的螯合是通过蛋白质表面的组氨酸等氨基酸上的给电子原子(如 N 原子等)的孤对电子与金属离子上的空杂化轨道结合形成的。而氢离子也可以提供空轨道,因此会与金属离子同时竞

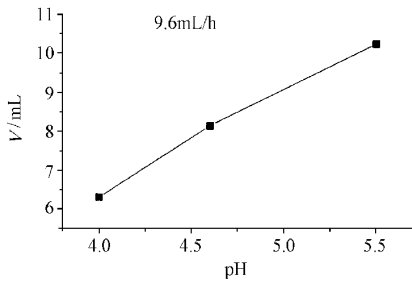


图 1 IDA-Zn 柱蛋白质洗脱溶液体积 V-pH 曲线

Fig.1 Relation of protein eluted volume and pH value in IDA-Zn column

争蛋白质表面上的孤对电子。pH 值越低,即氢离子浓度越高,它的这种竞争就越强烈,蛋白质也就更容易被洗脱下来。

2.1.2 竞争性物质氯化铵的影响:竞争性物质一般是指含有 N 原子等电子给予体的小分子物质,它的加入可以改变蛋白质与金属离子之间的亲和作用。这类物质有咪唑、组氨酸等。本文选用氯化铵为竞争性物质,通过改变洗脱液中氯化铵的浓度来研究竞争性物质浓度对分离的影响。洗脱结果如图 2 所示。

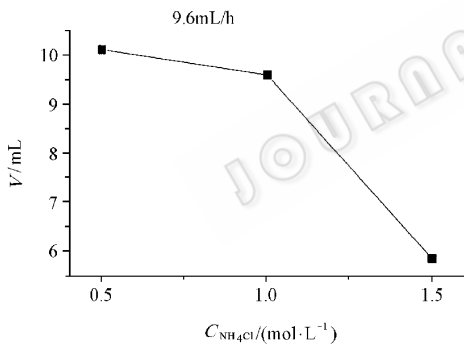


图 2 IDA-Zn 柱蛋白质洗脱液体积 V-氯化铵浓度曲线

Fig.2 Effect of ammonium chloride concentration on protein eluted volume in IDA-Zn column

从图中可以看出,所用的洗脱体积随氯化铵浓度的增加而降低。即铵离子浓度越高,其竞争作用就越强,蛋白质就越容易洗脱下来。由于铵离子带正电荷,它和金属离子之间有静电排斥。在洗脱时柱内存在着这样的平衡:



我们认为是氨分子与过渡金属离子形成络合从而与蛋白质上的给电子原子形成竞争。铵离子浓度越高,氨分子浓度也就越高,与金属离子络合的竞争能力

就越强烈,从而蛋白质容易洗脱。

2.1.3 不同铵盐对洗脱结果的影响:在相同的铵离子浓度情况下,不同的阴离子也会对洗脱结果产生影响。分别用氯化铵、硫酸铵、醋酸铵、碳酸氢铵在 IDA-Zn 柱上对 BSA 进行了梯度洗脱。以氯化铵为例 $0 \sim 15 \text{ mol/L}$ 氯化铵梯度洗脱结果如图 3 所示。

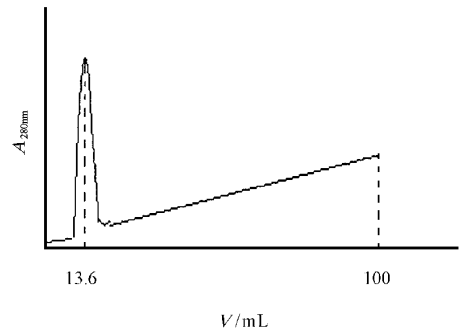


图 3 IDA-Zn 柱上氯化铵梯度洗脱结果

Fig.3 Gradient elution by ammonium chloride in IDA-Zn column

根据梯度洗脱结果计算出峰时的铵盐浓度,我们称之为临界浓度。其意义可以分析如下:蛋白质为大分子物质,它的吸附可以覆盖一些自由金属位点,也可以阻碍其他一些金属位点吸附蛋白质(如图 4 所示)因此,即使在蛋白质吸附饱和时仍会存在一定的自由金属位点,当有小分子竞争物质进入体系后,它们通常先和这些自由位点结合。只有当它们占满了自由位点,才会对蛋白质的结合位点产生竞争。使蛋白质洗脱下来的浓度即为临界浓度。

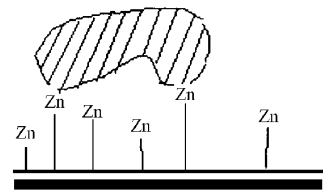


图 4 蛋白质在固定相表面的吸附

Fig.4 Absorption of protein on the stationary surface

氯化铵、硫酸铵、醋酸铵、碳酸氢铵的梯度洗脱结果如表 1。

表 1 各种铵盐的临界洗脱浓度比较

Table 1 Comparison of the critical concentration for different kinds of ammonium salt

Ammonium salt	NH_4Cl	$(NH_4)_2SO_4$	NH_4Ac	NH_4HCO_3
Critical concentration / (mol/L)	0.204	0.200	0.101	0.125

从表中可知氯化铵与硫酸铵的临界浓度较接近, 醋酸铵与碳酸氢铵的临界浓度比较接近, 且前者的临界浓度大于后者。

我们认为在铵离子为竞争物质的体系中存在平衡(1)。当体系为弱电解质体系时, 即在醋酸根离子与碳酸氢根离子等弱酸根存在的情况下, 有利于氨分子的形成。而强电解质体系, 如硫酸根、氯离子等强酸根存在时, 不利于氨分子的形成。因此醋酸钠、碳酸氢钠洗脱时络合那些自由位点所需的浓度就低。

2.1.4 氯化铵溶液的 pH 值对洗脱蛋白效果的影响: 溶液 pH 值和竞争性物质氯化铵分别对蛋白质的洗脱存在影响, 但其作用能力是有差异的, 当上述因素同时存在时, 不易区分这种作用效果的不同。为了进一步验证以上的分析结果, 我们研究了 pH 值对氯化铵溶液洗脱蛋白效果的影响。用 0.02 mol/L Na_2HPO_4 , 0.5 mol/L NaCl , 0.5 mol/L NH_4Cl pH 7.2 的洗脱液洗脱 IDA-Zn 柱上的蛋白质时, 蛋白质未被洗脱下来。当我们把以上洗脱液的 pH 值降低到 5.0, 即提高溶液氢离子浓度时, 蛋白质依旧未被洗脱下来。改变洗脱液的 pH 值为 9.0 时进行洗脱, 层析柱上的蛋白质几乎全部被洗脱下来。此实验结果表明: 在铵离子与 H^+ 同时存在时, 二者相比, 铵离子的作用比氢离子强。因为在 pH 为 7.2 时, 0.5 mol/L NH_4^+ 所产生的氨分子不足以对蛋白质的结合位点形成有力的竞争, 当 pH 值降低时柱内铵离子与氨分子的平衡(1)有利于逆向移动, 因此柱内体系中所含的氨分子浓度低而不利于形成竞争。而在 pH 为 9.0 的条件下更有利于铵离子水解平衡(1)向正向进行, 使氨分子浓度在碱性条件下大大提高, 大量的氨分子对蛋白质的吸附位点形成了强烈的竞争, 从而使蛋白质洗脱下来。

2.2 铜柱与锌柱对 BSA 洗脱性能的比较

本文选用 IDA 铜柱与锌柱, 在几个不同的洗脱条件下进行洗脱性能的对比研究。分别测定了各自的洗脱体积-pH 曲线和洗脱体积-铵盐浓度曲线。结果如图 5、6 所示。

从两组曲线的结果对比来看, 无论是改变 pH 值还是铵盐浓度, 铜柱对于 BSA 的保留值要大于锌柱, 这说明铜离子与 BSA 所形成的络合物与锌离子相比有更大的稳定性。另外, 梯度洗脱的实验结果也说明了这个结论。以梯度为 0~1.5 mol/L 氯化铵 (pH 值为 7.20) 溶液分别对铜柱与锌柱进行了梯度洗脱。结果如图 7 所示。

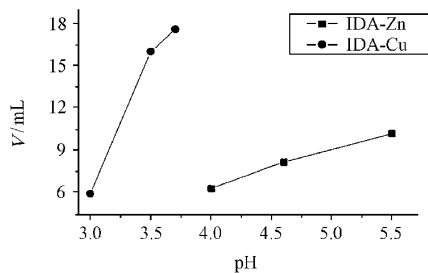


图 5 铜柱与锌柱的洗脱体积 V -pH 曲线

Fig. 5 Effect of pH value on eluted volume in IDA-Zn and IDA-Cu columns

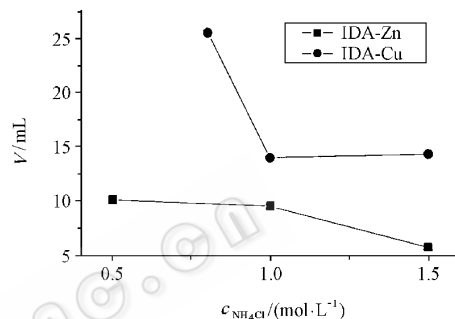


图 6 铜柱与锌柱的洗脱体积 V -氯化铵浓度 $c_{\text{NH}_4\text{Cl}}$ 曲线

Fig. 6 Effect of ammonium chloride concentration on eluted volume in IDA-Zn and IDA-Cu columns

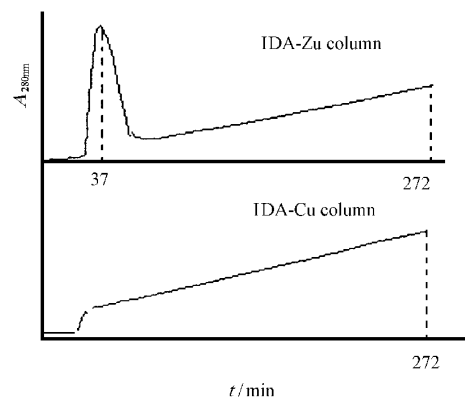


图 7 锌柱与铜柱氯化铵浓度梯度洗脱 BSA 的结果

Fig. 7 Results of gradient elution by ammonium chloride in IDA-Zn and IDA-Cu columns

从图上可以看出, IDA-Cu 柱只有基线上升, 并无出峰现象。这同样也说明了铜离子与 BSA 的亲合力远远大于锌离子。另外还进行了醋酸铵的梯度洗脱, 结果与氯化铵洗脱类似。

改变蛋白质对象为血红蛋白时发现, 在锌柱上可以通过降低 pH 值来进行洗脱, 而铜柱上的血红蛋白却很难洗脱下来。这再次说明, 铜离子对蛋白质有更大的络合力。这可以从配位化学的价键理论

中找到根据(如图 8 所示)。

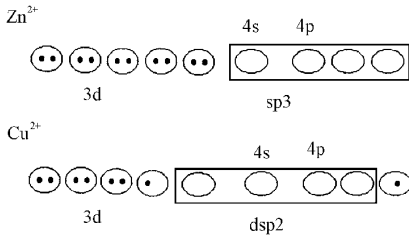


图 8 二价锌离子与二价铜离子轨道杂化图

Fig. 8 Rail hybrid of Cu^{2+} and Zn^{2+}

二价锌离子在形成络合物以前先进行轨道杂化,由 1 个 4s 轨道 3 个 4p 轨道形成 sp^3 杂化轨道,而二价铜离子则进行 dsp^2 轨道杂化,1 个 3d 轨道上的电子先跃迁到 4p 轨道中形成 1 个 3d 单电子轨道和 1 个 4p 单电子轨道,这样的轨道分布有利于 dsp^2 轨道的形成。在形成络合物时这两个单电子轨道中的电子会和螯合剂的 π 电子形成大 π 键,这将使形成的络合物更稳定。

2.3 对不同蛋白质洗脱效果的影响

不同的蛋白质其洗脱效果是不一样的。在某一条条件下的出峰与否,出峰快慢,以及峰形大小都有区别,也正是基于此,才可以应用金属离子螯合层析这种方法来进行蛋白质的分离。本文选用了血红蛋白与牛血清白蛋白(BSA)为分离对象,对其在 IDA-Zn 柱上的洗脱效果进行了对比研究。我们分别采用降低 pH 值和增加洗脱液中铵离子浓度的办法对两种蛋白质进行了洗脱。两种蛋白的洗脱结果如图 9、图 10 所示:

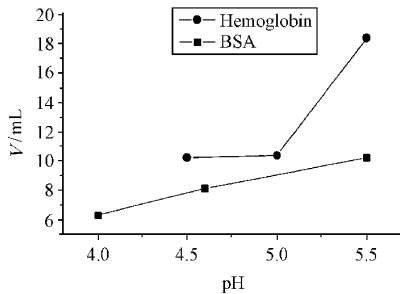


图 9 IDA-Zn 柱上 BSA 与血红蛋白洗脱体积-pH 值曲线

Fig. 9 Relation of elluted volume and pH value for BSA and Hemoglobin in IDA-Zn column

从图中可以看出,在相同的 pH 值下,BSA 和血红蛋白的洗脱体积相差不大。相比之下,用氯化铵洗脱时,二者的差别更大一些。同时可以看出无论是降低 pH 值,还是增加铵离子浓度进行洗脱,血红蛋白

的洗脱体积均大于 BSA 的洗脱体积。这说明血红蛋白在 IDA-Zn 柱上的保留能力要强于 BSA。

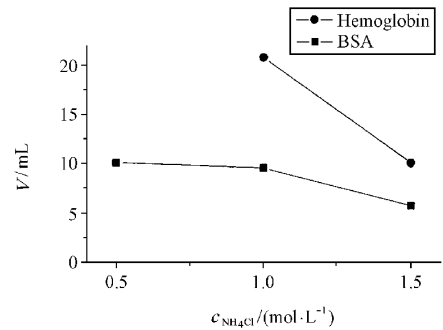


图 10 IDA-Zn 柱上 BSA 与血红蛋白洗脱体积-铵离子浓度曲线

Fig. 10 Relation of eluted volume and ammonium chloride concentration curves for BSA and Hemoglobin in IDA-Zn column

在铜柱上的类似实验也说明了这一点。这说明血红蛋白与牛血清白蛋白本身性质、结构上的不同,导致这两种蛋白质与金属离子的螯合力存在着差异。我们认为,影响蛋白质与金属离子螯合力大小的因素主要有两方面:(1)蛋白质表面可结合位点的多少,如分子表面上组氨酸、色氨酸等可结合基团的含量。(2)这些可结合位点的空间分布是否有利于与金属位点的结合。因为蛋白质是大分子物质,与金属离子相比它的分子体积要大得多,因此蛋白质吸附时,一个蛋白质分子并不是仅结合一个金属离子,而是可以结合几个金属位点。正因为如此,蛋白质的空间结构也成为其吸附过程中一个非常重要的因素。

3 结 论

在金属螯合亲和层析柱上以 BSA 为对象进行了各种洗脱因素的研究,结果表明,pH 值降低,或者铵离子浓度的升高都有利于蛋白质的洗脱,此结论与蛋白质在金属离子螯合层析中吸附及解吸的机理相仿。在洗脱过程中不同铵盐的作用效果不同,弱电解质体系有利于氨分子的形成。当 pH 值与 NH_4^+ 共同作用时,氨分子浓度对洗脱的影响强于氢离子浓度。

用锌柱与铜柱对 BSA 的洗脱性能进行了对比,研究表明,铜离子与蛋白质结合的稳定性要大于锌离子与蛋白质结合的稳定性。并用价键理论解释这一实验现象。在 IDA-Zn 柱上对不同蛋白质洗脱效果进行的对比研究表明,血红蛋白在锌柱上的保留

性要大于牛血清白蛋白。这表明不同性质的蛋白质与金属离子的亲合力是不同的,这种区别取决于蛋白质表面吸附基团的数量以及它们的空间分布。本

文的研究结果为今后实际体系的分离奠定了一定的基础。

参 考 文 献

- [1] Porath J ,Carlsson J ,Belfrage G. *Nature* ,1975 **258** :598
- [2] Porath J ,Olin B. *Biochemistry* ,1983 **22** :1621
- [3] JIANG W ,BimGraham ,Leone Spiccia ,Milton T W Hearn. *Anal Biochem* ,1998 **255** :47~78
- [4] 韩金玉 ,元英进. *色谱* ,1996 **14** :447

Study on Protein Separation Using Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography

SUN Xu-Dong LI Hong-Qi SUI Hong-Yan SHEN Zhong-Yao

(*Department of Chemical Engineering ,Tsinghua University ,Beijing 100084*)

Abstract Immobilized metal ion affinity chromatography(IMAC) has shown promise of isolating desired proteins from a mixture based on their difference of affinity for chelated metal ions. With its technological superiority ,such as large adsorption capacity ,mild separation condition ,simple ligands and wide applications ,IMAC has become powerful tool for biotechnological products separation ,such as proteins ,amino acids and gene products. In spite of many sophisticated applications for IMAC ,the theoretical analysis of Immobilized metal chromatography has remained insufficient. In this paper , the eluted efficiencies of bovine serum albumin(BSA) in a single-component system under different elution conditions are studied. The effects of several elution factors ,such as pH value ,ammonium concentration and anion species on protein separation are studied. Comparing the elution data of BSA in IDA-Cu and IDA-Zn columns ,the different ability of affinity between metal ions and proteins is found. In addition ,the elution behaviors of different proteins are investigated. This work facilitates the further research in separation of real systems.

Key words Immobilized metal ion affinity chromatograph(IMAC) , bovine serum albumin(BSA) , hemoglobin , separation