

制备型高效液相色谱法分离蛋白质的研究

王志祥

何志敏 余国琮

(中国药科大学药学院化工教研室 南京 210009) (天津大学化学工程研究所 天津 300072)

生物工程的发展,特别是生化制品下游处理技术的兴起,对现代分离科学提出了更高的要求。研究和开发各类生化物质特别是活性生物大分子的分离纯化技术,已成为一项十分重要的研究课题。在现有的分离技术中,液相色谱,尤其是80年代在分析型高效液相色谱(HPLC)基础上兴起的制备型HPLC,在大规模分离纯化生物活性物质特别是蛋白质方面已显示出巨大的应用潜力,引起了各国研究者的高度重视^[1~5]。本文利用自行设计的制备型HPLC分离装置,对牛血清白蛋白(BAS)和牛血清红蛋白(HG)的制备分离过程进行了实验研究,着重考虑了流动流速、柱超载方式、柱长等因素对BAS和HG分离度的影响。

1 材料与方法

1.1 实验装置

本文所建立的制备型HPLC分离装置流程如图1所示。

进样装置为GJ-601F型高压六通进样阀,进样体积在0~5000 μ l的范围内可变。利用过压保护系统可自动地控制计量泵的启动与关闭,并将系统的操作压力控制在一定的范围内。根据蛋白质的制备量和分离要求,该装置可以使用不同内径及不同柱长的制备柱。为了准确地检测色谱柱流出液中所有组分的峰,检测系统将SZ-01型示差折光仪与具有连续式检测池的752C型紫外可见分光光度计配合使用。利用自行研制的PLC-1型计算机色谱数据采集系统^[6]对色谱注流出液的组成进行在线检测。

1.2 实验材料

实验中使用的柱填料为天津化学试剂二厂生产的NDG-3型多孔硅胶填料,其平均内孔直径为970 \AA ,分离分子量的范围为 $6 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ 。NDG系列多孔硅胶填料可反复装柱且数据有较好的重复性。蛋白质为BAS(pI4.90, MW=6700,中科院生物物理所试剂厂出品)和HG(pI6.90, MW=15500,上海东方生化试剂公司出品)。pH5.9的缓冲溶液由 $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 组成。蛋白质溶液分别由缓冲溶液配制而成,对于2种蛋白质混合物,每种蛋白质的浓度均相等。

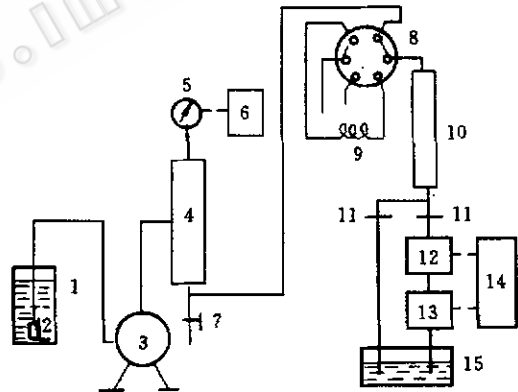


图1 制备型HPLC分离装置流程图

1. Mobile phase tank, 2. Filter, 3. High pressure controlled volume pump, 4. Buffer tank, 5. Pressure schedule, 6. Prepressure control system, 7. Switch valve, 8. Six way injection valve, 9. Sample loop, 10. Preparative column, 11. Regulating valve, 12. Differential refractometer detector, 13. U. V. detector, 14. Chromatographic data-collecting system, 15. Fraction collector

国家教委优秀年轻教师基金资助项目。

本文于1996年8月21日收到。

1.3 实验方法

实验时,经超声波脱气后的流动相由高压计量泵,经缓冲罐、进样阀、流过色谱柱。当色谱数据采集系统显示的基线平稳后,通过进样阀将所需处理的蛋白质溶液,按照一定的进样量送入色谱柱。在色谱柱的出口处,用色谱数据采集系统对流出液中的组成进行在线检测。根据色谱数据采集系统所显示的色谱图,用收集器分别收集色谱柱的流出液。当色谱柱不再出峰后,即可进行下一次进样。

2 结果与讨论

过程的分离性能用 BAS 与 HG 的分离度(R)表示,其值可根据色谱峰的半峰宽度(Y)以及保留时间(R)计算

$$R = 2 \frac{t_{R,BAS} - t_{R,HG}}{Y_{W,BAS} - Y_{W,HG}}$$

2.1 制备分离实例

实验在 $\phi 10\text{mm} \times 50\text{mm}$ 的制备柱上进行,柱温为 20°C ,柱填料为 300~360 目的 NDG-4 型色谱填料,流动相为 pH5.9 的缓冲溶液。图 2 为典型实验条件下色谱流出曲线示意图。若分段收集产品则可获得较高纯度的 BAS 和 HG 产品,最大制备量可达 80mg, BAS 和 HG 的回收率可分别达到 97% 和 94%。由此可见,本文研制的制备型 HPLC 分离装置可以较好地实现 BAS 和 HG 混合物的制备分离。

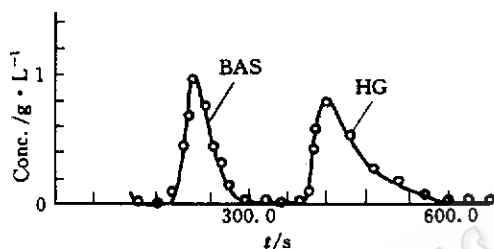


图 2 柱出口处的浓度曲线

Sample volume: $1000\mu\text{L}$, Sample concentration: $c_{BAS} = c_{HG} = 16\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, Mobile phase flow rate: $1.12\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$

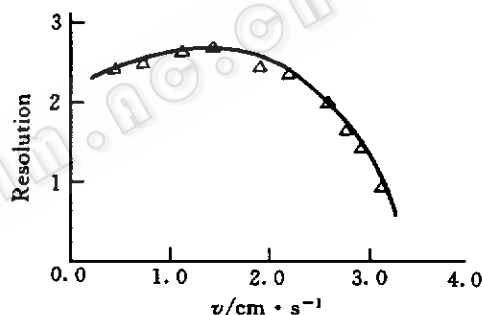


图 3 流动相流速对分离度的影响

Sample volume: $1000\mu\text{L}$, Sample concentration: $c_{BAS} = c_{HG} = 32\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

2.2 流动相流速的影响

图 3 给出了流动相流速对分离度的影响,从中可以看出,在蛋白质的制备分离过程中,就分离度而言,流动相流速有一个最佳值。但流动相流速在最佳流速之后的一定范围内,过程仍有较好的分离度。因此,在满足分离要求的前提下,可以采用提高流动相流速的办法缩短操作时间,提高蛋白质的制备量。但另一方面,随着流动相流速的增加,柱压降和流动相的消耗也随之增大。因此,采用提高流动相流速的办法来提高蛋白质的制备量必须考虑流动相的消耗以及泵能力的限制。

2.3 柱超载方式的影响

利用制备型 HPLC 分离纯化蛋白质,采用柱超载方式操作可以提高蛋白质的制备量。常用的柱超载方式主要有二种:一种是使用较小的样品注入体积,但增加样品浓度,即所谓的“质量超载”;另一种是保持较小的样品浓度,但增加样品的注入体积,即所谓的“体积超载”。图 4 为实验中二种操作方式对 BAS 和 HG 分离度的影响,结果表明,在蛋白质制备分离过程中,虽然采用质量超载或体积超载均可提高蛋白质的制备量,但当一次操作所需处理的样品量较少时,应尽量采用质量超载方式。就实用的观点而言,只有当一次操作所需处理的样品量太大,导致分离效果不能满足分离要求或样品在流动相中的流动度达到极限时,才采用增加进样体积的办法来提高蛋白质的制备量。

2.4 柱长的影响

如图 5 所示,在蛋白质的制备分离过程中,增加柱长可以显著提高蛋白质的分离效果。但增加柱长

明显受到泵能力的限制,因为增加柱长将显著地提高柱前压。因此,在满足分离要求的前提下使用较短的制备柱更为有利。

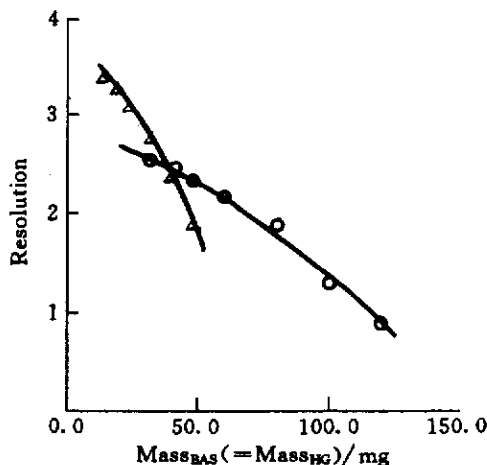


图4 柱超载对分离度的影响

Mobile phase flow rate: $1.12 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, \triangle —Sample volume $1000 \mu\text{l}$, \circ —Sample volume $2500 \mu\text{l}$

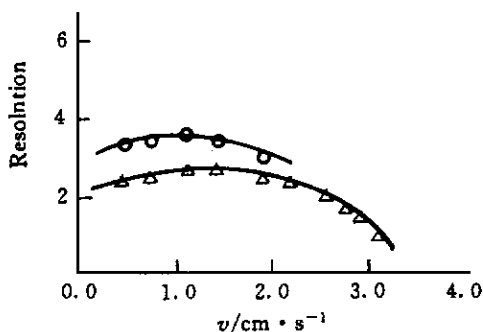


图5 柱长对分离度的影响

Sample volume: $1000 \mu\text{l}$, Sample concentration: $c_{\text{BAS}} = c_{\text{HG}} = 32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$
 \triangle —Column length: 500 mm ,
 \circ —Column length: 1000 mm

参 考 文 献

- [1] Cretier G. Chromatographia, 1985, 20(8): 461~465.
- [2] Cretier G. Chromatographia, 1986, 21(3): 143~148.
- [3] Guiochon G, Katti A. Chromatographia, 1987, 24 (2): 165~189.
- [4] Verzele M. Analytical Chemistry, 1990, 62(4): 265~269.
- [5] 何志敏, 王志祥, 余国琮. 化工进展, 1992, (3): 28~33.

Protein Separation by the Preparative High Performance Liquid Chromatography

Wang Zhixiang He Zhimin¹ Yu Guocong¹

(Department of Chemical Engineering, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

(Chemical Engineering Research Center, Tianjing University, Tianjing 300072)

Abstract Proteins have been separated by using the preparative HPLC separation installation designed and established in this work. The results show that, if the separation demand can be satisfied, the mobile phase linear velocity can be raised to improve the preparative amount, but the pump capacity is a limiting factor. Column can be overloaded in order to achieve more preparative throughput. However, if the amount of sample in one operation is very small, mass overload would be better. If the amount of sample in one operation is so large that the separation demand can't be satisfied or the solubility of the sample in the mobile phase reach the limitation, volume overload would be better. Furthermore, the column length can be increased to improve the separation efficiency, but short column would be better if the separation demand can be satisfied.

Key words Preparative HPLC, protein, bioseparation, resolution