

研究简报

# 螯合金属离子亲和色谱法分离 $\alpha$ -氨基酸和肽\*

程慧文

(中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)

邵天梦

(大连医药科学研究所 大连 116013)

提 要 以 Sephadex G10 为基质螯合二价铜离子的亲和色谱法分离  $\alpha$ -氨基酸和肽,使之得以完全分离。对分离过程的原理进行了讨论。

关键词 螯合金属离子亲和色谱法,亲和色谱分离介质,氨基酸,肽

分类号 O658/Q5

## 1 前言

蛋白质水解液中主要含有游离氨基酸和肽。氨基酸是蛋白质的构成单元,是人类营养的重要组成部分,而一些多肽具有重要的医药保健功能,因此,从蛋白质水解液中分离提取复合氨基酸和肽具有实际意义。但是,对  $\alpha$ -氨基酸与二肽和三肽的分离常常遇到麻烦。

在碱性条件下将二价铜离子螯合到葡聚糖凝胶上,此介质可作为氨基酸和肽的分离介质<sup>[1]</sup>。固定化金属离子亲和色谱法(IMAC)用于分离纯化酶已有成功的例子<sup>[2]</sup>。也有用 IMAC 分离纯化猪铜锌超氧化物歧化酶(Cu, Zn-SOD)的报道<sup>[3]</sup>。

本文报道了以高交联度的葡聚糖凝胶 Sephadex G10 为基质,经环氧化活化、偶联亚氨基二乙酸(IDA)、螯合二价铜离子,制得固定化铜离子亲和色谱介质,并以此介质进行了  $\alpha$ -氨基酸与二肽标准混合物和蛋白质水解液中的  $\alpha$ -氨基酸与肽的分离试验,得到了满意的结果。

## 2 实验部分

### 2.1 试剂和材料

Sephadex G10, 粒度 100~200 目,上海试剂二厂产品。环氧氯丙烷、亚氨基二乙酸均为分析纯。 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$  和  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  皆为分析纯试剂。L-Val, L-His, L-Tyr 和 L-Tyr 为生化试剂。Tyr-Tyr 二肽为 Sigma

公司试剂。

称取上述  $\alpha$ -氨基酸和二肽各 3.0mg 溶于 10mL 水中,作为标准混合样品。

蛋白质水解液由鱼肉浆经蛋白酶水解得到。

### 2.2 仪器

752 型紫外分光光度计,自动部分收集器(BS-100A),离心机(LG10-2.4A)。

### 2.3 实验方法

(1) 螯合铜离子亲和色谱介质的制备 取高交联度葡聚糖 Sephadex G10 加水溶胀后的凝胶 100g,加 2m ol/L NaOH 50mL、环氧氯丙烷 5mL 和  $\text{NaBH}_4$  0.2g,在室温下搅拌反应。同时在 2h 内再逐渐加入 2m ol/L NaOH 50mL,搅拌反应 12h 后,加 2m ol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲溶液(pH 10.5) 100mL、亚氨基二乙酸 10g 和  $\text{NaBH}_4$  0.12g,于 60°C 下搅拌反应 24h 后过滤。用水、乙醇洗,再以水洗,得白色凝胶,即 IDA-Sephadex G10。将此凝胶装入一玻璃柱( $\varnothing$ 2.0cm  $\times$  6.0cm)中,以 20m m ol/L  $\text{CuSO}_4$  水溶液淋洗,至凝胶由白色完全转变为天蓝色为止。再以水充分洗去未键合的二价铜离子,即得固定化铜离子亲和色谱柱  $\text{Cu}^{2+}$ -Sephadex G10。

(2) 洗脱  $\text{Cu}^{2+}$ -Sephadex G10 色谱柱以 0.05m ol/L  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -NaOH 缓冲溶液(pH 10.5)充分平衡后,上分析样品 2mL。先用此缓冲液以 60mL/h 的流速开始洗脱,再用 0.1m ol/L HCl 以 60mL/h 的流速洗脱,每管收集洗脱液 6mL。

(3) 检测 用 752 型紫外分光光度计于 280nm

\* 本文收稿日期:1996-12-31,修回日期:1997-03-18

处测定各收集管中洗脱液的光密度, 绘制洗脱曲线。以茚三酮法确定  $\alpha$ -氨基酸和肽的洗脱峰, 并测定  $\alpha$ -氨基酸洗脱峰收集液中  $\alpha$ -氨基酸含量, 计算其回收率。

### 3 结果和讨论

#### 3.1 $\alpha$ -氨基酸与二肽标准混合物的分离

$\alpha$ -氨基酸与二肽标准混合物溶液上柱后, 先经 0.05m ol/L  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$  缓冲液 (pH 10.5) 洗脱, 再经 0.1m ol/L  $\text{HCl}$  洗脱。由茚三酮法测定表明, 二肽在第一次洗脱中流出,  $\alpha$ -氨基酸在第二次洗脱中流出, 洗脱曲线如图 1 所示。测定  $\alpha$ -氨基酸洗脱峰收集液中  $\alpha$ -氨基酸的含量为 2.39mg (三次平均值),  $\alpha$ -氨基酸回收率 99.6%, 表明  $\alpha$ -氨基酸与二肽完全分离。

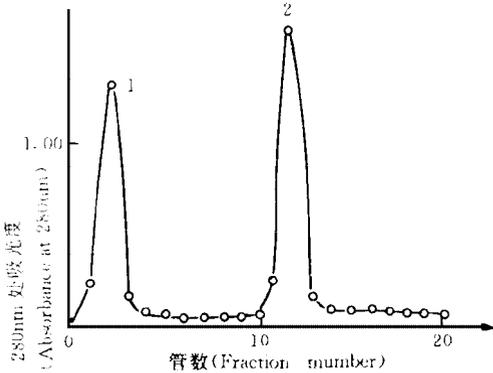


图 1  $\alpha$ -氨基酸与二肽混合物分离谱图

Fig. 1 Chromatogram of  $\alpha$ -amino acids and dipeptides  
分离柱 (Column):  $\text{Cu}^{2+}$ -IDA-Sephadex G10  
( $92.0\text{cm} \times 6.0\text{cm}$ ).

峰: 1. 用  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$  缓冲液 (0.05m ol/L, pH 10.5) 洗脱出的二肽峰, 2. 用 0.1m ol/L  $\text{HCl}$  溶液洗脱出的  $\alpha$ -氨基酸峰。

Peak: 1. dipeptide peak eluted with  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$  buffer solution (0.05m ol/L, pH 10.5), 2.  $\alpha$ -amino acids peak eluted with 0.1m ol/L  $\text{HCl}$  solution.

#### 3.2 蛋白质水解液中 $\alpha$ -氨基酸和肽的分离

蛋白质水解液上柱后, 亦先经 0.05m ol/L  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$  缓冲液洗脱, 洗脱液峰值管呈蓝紫色, 是肽及少量的水溶性蛋白与二价铜离子形成的络合物呈现的颜色。再经 0.1m ol/L  $\text{HCl}$  溶液洗脱, 峰值管中洗脱液呈淡蓝色, 是  $\alpha$ -氨基酸与二价铜离子形成的络合物呈现的颜色。洗脱曲线如图 2 所示。

由图 2 可见, 用  $\text{Cu}^{2+}$ -Sephadex G10 可使蛋白质水解液中的  $\alpha$ -氨基酸和肽得到相当好的分离。

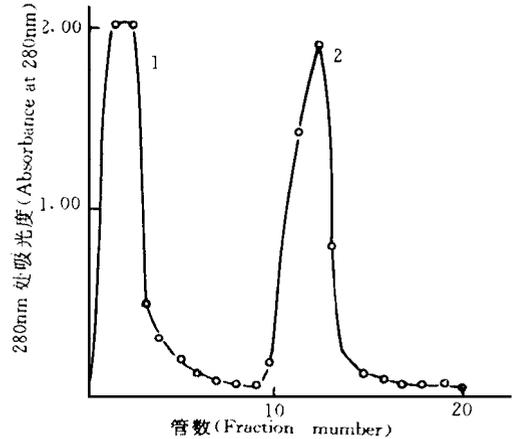


图 2 蛋白质水解液的分离谱图

Fig. 2 Chromatogram of hydrolyzed solution of protein  
分离柱 (Column):  $\text{Cu}^{2+}$ -IDA-Sephadex G10  
( $92.0\text{cm} \times 6.0\text{cm}$ ).

峰: 1. 硼砂-氢氧化钠缓冲液 (0.05m ol/L, pH 10.5) 洗脱出肽, 2. 0.1m ol/L  $\text{HCl}$  洗脱出  $\alpha$ -氨基酸混合物。

Peak: 1. peptides eluted with  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaOH}$  buffer (0.05m ol/L, pH 10.5), 2.  $\alpha$ -amino acids eluted with 0.1m ol/L  $\text{HCl}$ .

螯合金属离子亲和色谱分离原理是基于被分离物和介质与金属形成络合物稳定性的差异。IDA-Sephadex G10 以 IDA 的羧基 O 原子为配位点与  $\text{Cu}^{2+}$  形成稳定的天蓝色络合物,  $\text{Cu}^{2+}$  的其余配位位置为溶液分子或离子占据着。当  $\alpha$ -氨基酸、肽等加到此介质体系中时, 它们则成为 IDA-Sephadex G10 的竞争性配体。形成的铜络合物的稳定性受制于配体的性质, 如 N 给予体形成比 O 给予体更稳定的络合物, 能形成多个五元环配位的配体 (如肽), 具有特别高的稳定性。pH 值等对络合物的稳定性也有一定的影响。由于肽-铜络合物的稳定性远高于  $\alpha$ -氨基酸和 IDA-Sephadex G10 的铜络合物, 故在色谱柱上部, 平衡完全移向可溶的肽-铜络合物一边, 铜离子从介质上被拽出, 它们在色谱柱上仅仅稍有保留即被先洗脱出来。  $\alpha$ -氨基酸-铜络合物有与  $\text{Cu}^{2+}$ -IDA-Sephadex G10 相近的稳定性, 在色谱柱上部平衡, 只是小部分移向可溶性的  $\alpha$ -氨基酸-铜络合物一边, 大部分  $\alpha$ -氨基酸-铜络合物保留在色谱介质上。当换用稀盐酸洗脱时,  $\alpha$ -氨基酸即被洗脱下来。各

种  $\alpha$ -氨基酸与亲和色谱分离介质表现出不同的亲和性, 洗脱条件的变化可对其发生明显的影响。选择合适的洗脱条件可以得到很好的分离效果。

从色谱柱上洗脱下来的肽或  $\alpha$ -氨基酸结合的铜离子可方便地用阳离子交换树脂除去。

## 参 考 文 献

- 1 Rothenbuhler E, Waibel R, Solms J. Analytical Biochemistry, 1979; 97: 367
- 2 Weselake R J, Chesney S L, Petkau A, Friesen A D. Analytical Biochemistry, 1986; 155: 193
- 3 邵天梦, 刘宇新, 邵昌平. 色谱, 1996; 14(3): 218

## Separation of $\alpha$ -Amino Acids and Peptides by Chelated Metal Ion Affinity Chromatography

Cheng Huiwen

(Dalian Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Dalian, 116023)

Shao Tianmeng

(Dalian Institute of Medical & Pharmaceutical Sciences, Dalian, 116013)

**Abstract** The hydrolytic solution of proteins mainly contains free amino acids and peptides. The separation of amino acids and di- and tri-peptides is very significant and also a complicated work. This report presents a chelated metal ion affinity chromatographic (CMAC) method for the separation of  $\alpha$ -amino acids and peptides. Sephadex G10 was used as the solid matrix. It was epoxy-activated by epichlorohydrin; then coupled with iminodiacetate (IDA) and chelated with copper ion to produce immobilized copper ion affinity chromatographic packing. Some examples are given for the chromatography of model mixtures of L-Val, L-His, L-Tyr, L-Trp, Tyr-Trp dipeptides and protein hydrolyzing solution of fish. The separation was based on the different stabilities of copper complexes of  $\alpha$ -amino acids, peptides and IDA-Sephadex G10. The components which form weak complexes with copper apparently move along with the solvent front.  $\alpha$ -Amino acids-copper complexes with a stability comparable to that of copper-IDA-Sephadex G10 are retained on the matrix. Peptides form strong complexes and catch copper from the matrix. They are only slightly retained. The results showed that  $\alpha$ -amino acids and peptides were completely separated under the experimental conditions.

**Key words** chelated metal ion affinity chromatography (CMAC), affinity chromatography matrix, amino acid, peptide

## 《高效液相色谱法纯化蛋白质理论与技术》征购

由郭立安编、陕西科学技术出版社出版的《高效液相色谱法纯化蛋白质理论与技术》一书适合于化学、生物化学、免疫学、分子生物学以及从事蛋白质纯化的研究人员使用。定价 15.5 元, 邮费另加 2.5 元。欲购者请与《色谱》编辑部孙树平联系(电话: 3693405)。

## 《色谱》编辑部电话号码变更启事

从 1996 年 12 月起,《色谱》编辑部电话改为直拨电话(0411)3693405, 望广大读者、作者及广告客户周知。