

加入有机组份的制备电泳技术分离蛋白质

罗坚, 刘铮

(清华大学化工系, 北京 100084)

摘要:采用毛细管电泳方法研究了蛋白质在有机-水介质中的电迁移性质,并成功地进行了卵清白蛋白组份I和组份II的分离.采用荧光分析和圆二色谱法考察了非水组份对蛋白质在溶液中构象的影响,并采用多通道流动电泳设备进行了制备规模的有机-水介质电泳过程研究.

关键词:有机-水介质;毛细管电泳;多通道流动电泳;电迁移

中图分类号:TQ 018 文献标识码:A 文章编号:1009-606X(2003)02-0156-05

1 前言

电泳作为一种高效生物分离技术被广泛应用于生物产品的分析和制备^[1,2].传统的电泳在水相缓冲液中进行,焦耳热是影响分离过程处理量和分离精度的关键.而在有机溶剂中进行的电泳则由于介质的电导率低而显著降低焦耳热.与水相电泳过程相比,有机-水介质电泳可供调节的操作参数多如溶液粘度、极性和介电性质等,更有利于提高电泳的分离精度和分离选择性.此外,有机-水介质电泳还可应用于难溶于水的物质的分离^[3].因此,有机-水介质电泳的研究正日益引起人们的重视^[4].

本工作采用毛细管电泳技术研究蛋白质在有机-水介质中的电迁移性质,考察了二元蛋白混合物在有机-水介质毛细管电泳中的分离行为及其影响因素,采用荧光分析和圆二色谱法考察了非水组份对蛋白质在溶液中构象的影响,以力图从微观的角度阐述非水组份影响蛋白质电迁移行为的机制,最后采用多通道流动电泳技术^[5]进行了有机-水介质制备电泳的研究.

2 材料与amp;方法

2.1 仪器及试剂

2.1.1 实验仪器

毛细管电泳仪, P/ACE 5000, 美国 BECKMAN 公司生产;毛细管, 47 cm × 75 μm, 河北永年锐洋色谱器件有限公司生产;多通道流动电泳装置^[5], 自制;753Wb 型紫外分光光度计, 上海光学仪器厂生产;0.45 μm HT 微滤膜, 美国 Gelman Sciences 公司生产;荧光光度计, HITACHI F-2500(日本), 光程为 0.5 cm, 激发波长 295 nm, 扫描范围 300~450 nm;圆二色仪, JASCO J-715 型(日本), 光程为 0.2 cm, 扫描范围为 190~250 nm.

2.1.2 实验试剂

牛血清白蛋白(BSA), 电泳纯, 德国 Biehringer Mannheim 公司生产;卵清白蛋白(OVA), 电泳纯, 中国科学院上海生化研究所生产;甲醇、乙醇、1-丙醇、冰醋酸均为分析纯, 北京化学试剂公司生产;三羟甲基氨基甲烷, Tris, 分析纯, 美国 Gibco 公司生产.

2.2 实验方法

2.2.1 毛细管电泳

采用毛细管区带电泳法,毛细管和电极槽内充有相同的电解缓冲液,样品由进样端导入,不同带电组份按其电迁移率的差异实现分离.实验操作步骤如下:以 0.1 mol/L NaOH 溶液清洗毛细管 5 min,水洗 5 min,缓冲液平衡 5 min;气压进样 5 s,约 0.03 μL ;恒电压操作,操作电压为 30 kV;采用紫外检测器检测,至流出曲线走平结束 1 次电泳实验.每个样品重复 3 次,取平均值.由毛细管电泳谱图可以确定溶液中蛋白质组份的电迁移率、电泳分辨率和分离选择性等电泳性质.

乙醇和正丙醇为氢键的给予体并有强的极性,因此选为质子体系有机-水介质的代表,二甲基亚砜为不含给质子基团且极性较弱,故而被选作非质子体系的代表,考察了 BSA 在有机-水介质中的电迁移性质,研究了卵清蛋白组份 I 和组份 II 在有机-水介质中的电泳分离规律.

2.2.2 有机-水介质制备电泳

多通道流动电泳技术的分离过程如图 1 所示.电泳过程在水平放置的 5 腔室电泳槽中进行,腔室之间用膜隔开,中间腔室为进样室,其两侧为冲洗室,电场施加在上下两端的电极室.分离时,蛋白质混合物由中间腔室连续引入,在电场作用下不同带电组份的蛋白迁移过膜进入相应的冲洗腔室被冲洗缓冲溶液载流冲出,从而实现目标组份的分离.收集流出的溶液,测定 pH、电导率及吸光度值等各项参数.

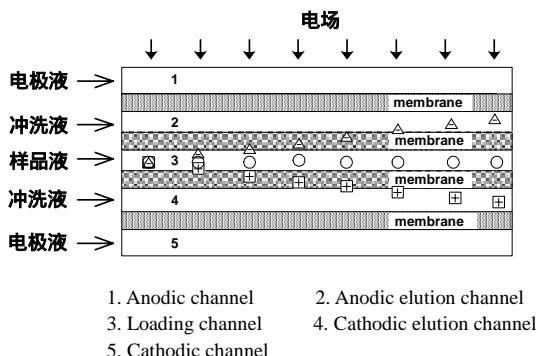


图 1 多通道流动电泳(MFE)分离原理图

Fig.1 The separation principle of multi-compartment flow electrophoresis

3 结果与讨论

3.1 有机-水介质中蛋白质的迁移行为

采用毛细管电泳方法考察乙醇和二甲基亚砜溶液中 BSA 的电迁移特性. BSA 浓度为 1 mg/ml,缓冲液为 0.01 mol/L 的 Tris-HAc 溶液(pH 6.9),溶剂为水,毛细管操作电压 30 kV,结果见图 2.

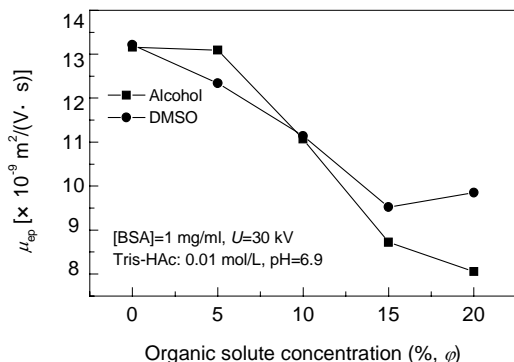


图 2 不同浓度乙醇和 DMSO 溶液中 BSA 的电迁移率
Fig.2 Electrophoretic mobility of BSA in solutions of different volumetric organic solute concentrations

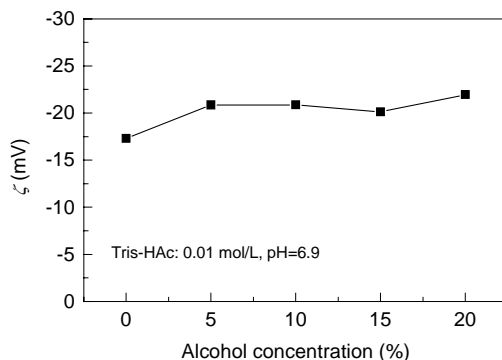


图 3 不同浓度乙醇溶液中 BSA 的电动电位
Fig.3 Variation of the ζ potential of BSA in solutions of different volumetric alcohol concentrations

蛋白质的电动电位 ζ 与溶液粘度 η 、介电常数 ε 和蛋白质电迁移率 μ_{ep} 的关系为^[6]

$$\zeta = \frac{3}{2} \frac{\mu_{ep} \eta}{\varepsilon} \quad (1)$$

由文献[7]可得到不同浓度乙醇溶液中介电常数与溶液粘度的比值,根据式(1)可求得蛋白质 BSA 在乙醇溶液中的电动电位,结果如图 3 所示。

从图中可知,在实验研究范围内随乙醇浓度的增大蛋白质 BSA 的电动电位有所提高,这可能是因为随有机组份浓度的增加,溶液离子强度下降,蛋白质表面双电层中的扩散层变厚,导致其表面的电动电位升高。进而采用荧光分析法和圆二色谱法对乙醇溶液中蛋白质 BSA 的构象进行了研究。其中,BSA 浓度为 0.2 mg/ml,结果如图 4 和 5 所示。

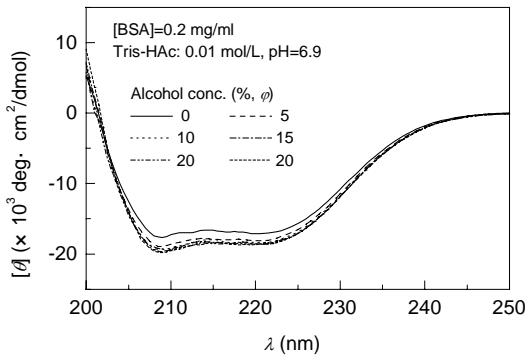


图 4 乙醇溶液中 BSA 的圆二色谱

Fig.4 CD spectrum of BSA in solutions of different alcohol concentrations

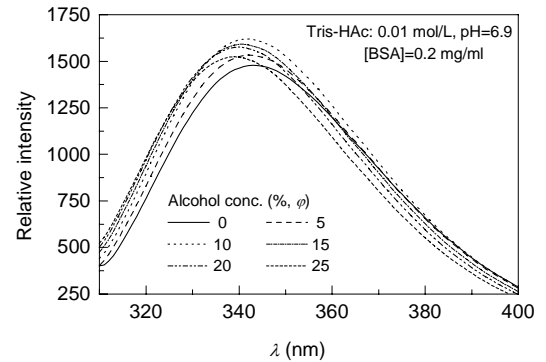


图 5 乙醇溶液中 BSA 的荧光光谱

Fig.5 The fluorescence spectrum of BSA in solutions of different alcohol concentrations (EX at 295 nm)

圆二色谱中远紫外的双负峰(波长分别为 208 和 222 nm)是 α 螺旋的典型谱形。图 4 表明在不同浓度的乙醇溶液中 BSA 的平均残基摩尔椭圆度变化不大,说明在实验研究范围内,BSA 在乙醇溶液中的二级结构基本不变。

BSA 是一种荧光较强的蛋白质分子,其中 Trp 残基的荧光占优势地位^[8],当激发波长大于 290 nm 时,可认为荧光都来自于 Trp 残基。在激发波长为 295 nm 的 BSA 荧光光谱(图 5)中,荧光光强在 10%乙醇浓度附近有极大值,表明在实验研究范围内,BSA 中 Trp 残基间的分子距离减小,残基间共振能量的传递增加,使得荧光发射光强增大。这可能说明乙醇溶液中 BSA 的分子半径有所减小,且在 10%乙醇浓度附近有极小值。

3.2 有机-水介质中二元蛋白混合物的电泳分离

分辨率是指将淌度相近的组份分开的能力,是分离技术的一个重要性能指标。毛细管电泳中蛋白混合物分辨率 R 可通过电泳谱图上的迁移时间(t_m)和它们的峰宽度(W)按下式计算:

$$R = \frac{2(t_{m2} - t_{m1})}{W_1 + W_2} \quad (2)$$

本文采用毛细管电泳方法研究卵清白蛋白组份 I 和 II 的混合物在非水溶液中的电迁移性质。

3.2.1 有机-水介质中卵清蛋白组份 I 和 II 的电泳分离

糖蛋白的糖基位点与数目的不同导致蛋白组份存在微小差异,卵清蛋白 OVA 主要包含两种成份,分别为 OVA I 和 OVA II,它们之间的理化性质非常相似(分子量皆为 42700,等电点分别为 4.71

和 4.59), 水相电泳很难将其分开. 实验研究了乙醇、正丙醇和 DMSO 溶液中卵清蛋白的分离规律, 缓冲液为 0.01 mol/L 的 Tris-HAc(pH=6.9), 卵清蛋白浓度为 1 mg/ml, 实验结果如图 6 所示.

实验结果表明, 随有机组份浓度的增加, 卵清蛋白的电泳分辨率(R)都有不同程度的增加, 其中乙醇溶液的电泳分辨率增加较快, 在 25%乙醇浓度下分辨率达到 2.2 左右, 实现了蛋白组份的较好分离. 这说明有机组份的加入能够显著改变蛋白质分子的电迁移性质差异, 提高电泳分离精度.

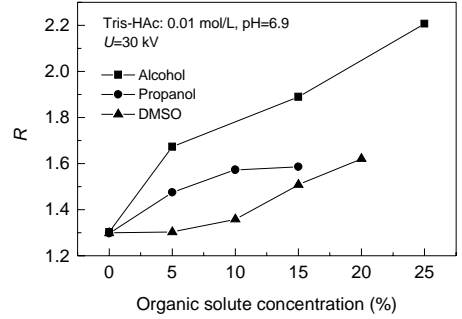


图 6 卵清蛋白电泳分辨率与有机组份浓度关系
Fig.6 Separation resolution of OVA I and OVA II in organic solutions

3.2.2 毛细管电泳流出曲线分析

图 7 给出了在水溶液中和 25%的乙醇溶液中卵清蛋白的毛细管电泳流出曲线, 从图中可以看出, 在水溶液电泳中两种蛋白组份的出峰位置基本相同, 峰形重叠严重; 而在 25%的乙醇溶液中, 两种蛋白的出峰时间差异显著增大. 由毛细管电泳分离原理可知^[9], 分辨率的提高是因为有机成份的加入导致蛋白质自身电迁移特性的改变.

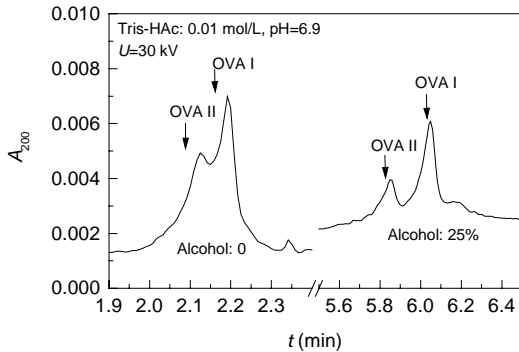


图 7 卵清蛋白电泳流出曲线
Fig.7 Capillary electrophoresis of OVA I and OVA II

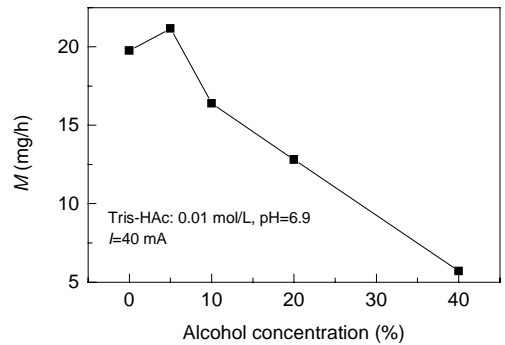


图 8 BSA 过膜通量与乙醇浓度的关系
Fig.8 Flux of BSA in solutions of different volumetric alcohol concentrations

3.3 有机-水溶液多通道流动电泳

现有的非水溶液电泳研究主要集中在分析电泳领域, 本文尝试将其应用于制备电泳. 为此, 采用本研究室发展的多通道流动电泳技术进行有机-水介质制备电泳研究, 以 BSA 为模型蛋白质, 有机组份以乙醇为代表, 以蛋白质过膜通量作为分离规模的指标.

采用 pH=6.9, 浓度 0.01 mol/L 的 Tris-HAc 溶液, 电流强度为 40 mA, 测定蛋白质的过膜通量(M), 实验结果如图 8 所示. 从图中可看出, 随乙醇浓度的增加, BSA 的过膜通量先增大后逐渐减小, 在乙醇浓度为 5%附近过膜通量有一极大值, 在该条件下进行制备电泳分离可提高电泳的分离产量. 由图 5 给出的 BSA 在乙醇溶液中的荧光光谱可知, BSA 的水力学半径随乙醇浓度的增加而先减小后增大, 在 10%乙醇浓度附近存在极小值, 这使得乙醇溶液中蛋白质 BSA 的过膜阻力先减小后增大. 而由图 2 给出的 BSA 在乙醇溶液中的毛细管电泳实验结果可知, 在 0~5%的乙醇溶液中 BSA 电迁移率基本不变, 而当乙醇浓度大于 5%后, BSA 的电迁移率迅速减小. 上述作用的综合结果使得 BSA 的过膜通量呈现随乙醇浓度对提高而先增大后减小的变化规律.

4 结论

本文研究结果表明,加入有机组份有利于增大目标与杂质组份间电泳迁移速率的差异,从而提高电泳分离程度.卵清白蛋白组份 I 和组份 II 在乙醇水溶液中可以得到更好的电泳分离,在多通道流动电泳分离过程中,加入有机组份可减小蛋白质的过膜阻力从而增大过膜通量,提高设备的处理能力.对于蛋白质组在有机-水介质中对结构特性的考察有助于优化电泳分离.

参考文献:

- [1] Righetti P G, Faupel M, Wenish E. *Advances in Electrophoresis* [M]. Weinheim: VCH, 1992. 159–200.
- [2] Thomas T M, Shave E E, Bate I M, et al. *Preparative Electrophoresis: A General Method for the Purification of Polyclonal Antibodies* [J]. *J. Chromatogr. A*, 2002, 944: 161–168.
- [3] 陶慰孙, 李惟, 姜涌明. *蛋白质分子基础* [M]. 北京: 高等教育出版社, 1995. 319–320.
- [4] Sahota R S, Khaledi M G. *Nonaqueous Capillary Electrophoresis* [J]. *Anal. Chem.*, 1994, 66: 1141–1146.
- [5] Liu Z, Huang Z, Chong J Y, et al. *Continuous Separation of Proteins by Multichannel Flow Electrophoresis* [J]. *Sep. Sci. Tech.*, 1996, 31(10): 1427–1442.
- [6] 周祖康, 顾惕人, 马季铭. *胶体化学基础* [M]. 北京: 北京大学出版社, 1987. 255–262.
- [7] Christine S, Kenndler E. *Electrophoresis in Fused-silica Capillaries: The Influence of Organic Solvents on the Electroosmotic Velocity and the Zeta Potential* [J]. *Anal. Chem.*, 1991, 63: 1801–1807.
- [8] 陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等. *荧光分析法, 第二版* [M]. 北京: 科学出版社, 1990. 131.
- [9] 徐木生, 王小如, 杨芑原, 等. *有机-水介质毛细管电泳* [J]. *色谱*, 1998, 16(4): 309–313.

Solvent-containing Preparative Electrophoresis of Proteins

LUO Jian, LIU Zheng

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

Abstract: This paper presents the investigations on capillary electrophoresis of proteins in solvent-containing aqueous media. The effectiveness of this method was demonstrated by the separation of oval albumin I and oval albumin II. The effect of organic component on the conformation of bovine serum albumin in solution was characterized by fluorimetry and circular dichroism analysis. Finally, preparative separation of proteins by solvent-containing aqueous electrophoresis was attempted in a multicompartement electrolyzer.

Key words: solvent-containing aqueous media; capillary electrophoresis; multichannel flow electrophoresis; electrophoretic mobility