

## 动力学因素对液相色谱分离整体蛋白的影响

闵 一, 陈 刚, 耿信笃\*

(西北大学现代分离科学研究所, 现代分离科学陕西省重点实验室, 陕西 西安 710069)

**摘要** :依据液相色谱分离整体蛋白的效果与色谱柱柱长基本无关的事实,研究了动力学因素对疏水相互作用色谱(HIC)分离整体蛋白的影响。首次提出了用于线性梯度洗脱条件下蛋白分离的“条件板高”(H)概念,并将其用于动力学因素对分离整体蛋白的影响的表征。分别用常用的色谱柱和色谱饼对标准蛋白进行了分离,绘制了类似于van Deemter的“条件板高”对流动相线速( $u$ )的曲线图。发现对应于色谱柱最低“条件板高”的适合线速约为色谱饼的 $1/5 \sim 1/15$ ,且色谱饼的适合线速范围也较色谱柱宽得多。据此,用装填有HIC填料的色谱饼(10 mm × 20 mm i. d.)在12 min内便可完全分离7种标准蛋白。还用装填有HIC填料的色谱饼对重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)进行了复性并同时纯化,在50 min内,仅用一步色谱法就可获得纯度 $\geq 97\%$ 的rhG-CSF,其质量回收率为39%,比活 $> 1 \times 10^8$  IU/mg。可以预计,装填极细颗粒的刚性色谱填料的色谱饼可在高负荷条件下进行整体蛋白的高速和高分离度的分离、纯化并同时复性,达到“三高”。

**关键词** :疏水相互作用色谱;蛋白分离;分离度;色谱饼;动力学因素;生物工程;粒细胞集落刺激因子

**中图分类号** :O658    **文献标识码** :A    **文章编号** :1000-8713(2009)05-0717-07    **栏目类别** :研究论文

## Effect of dynamic factors on the resolution of intact protein separation by liquid chromatography

MIN Yi, CHEN Gang, GENG Xindu\*

(Institute of Modern Separation Science, Northwest University;

Shaanxi Province Key Laboratory of Modern Separation Science, Xi'an 710069, China)

**Abstract** : Based on the fact that the resolution of intact protein separation is almost independent of column length, the effect on the resolution for intact protein separation causing from dynamic factors in hydrophobic interaction chromatography (HIC) was investigated. A concept of “conditional plate height” ( $H$ ) for protein separation is firstly suggested for characterizing this effect for protein separation under linear gradient elution. Standard proteins were separated with conventional chromatographic column and chromatographic cake, and the plot of the  $H$  vs the linear velocity of mobile phase ( $u$ ) was made, respectively. It was found that the obtained plot is similar to the conventional van Deemter Plot but has some differences. The optimized  $u$  corresponding to the minimum  $H$  was determined to be approximate 0.2 mm/s for the chromatographic cake and 1–3 mm/s for the conventional column. Furthermore, in comparison with the latter, optimized  $u$  value for the former has much broader range. Based on this fact, the resolutions and speeds for standard protein separation between the chromatographic cake packed with silica-base HIC material and the conventional column packed with soft HIC media were compared. The chromatographic cake (10 mm × 20 mm i. d.) was found to perform a complete separation of seven standard proteins in 10 min, while with the latter (55 mm × 12 mm i. d.) only five standard proteins can be completely separated in 140 min, even though the sample load for the former having bed volume of 3.14 mL, five times of that of the latter. The HIC chromatographic cake was also employed for the renaturation with simultaneous purification of the recombinant human granulocyte colony stimulating factor. The obtained purity was  $\geq 97\%$ , mass recovery was 39%, specific bioactivity was  $1 \times 10^8$  IU/mg with only one step HIC

\* 通讯联系人:耿信笃,教授,博士生导师。Tel:(029)88303817, E-mail:xdgeng@nwu.edu.cn.

基金项目:陕西省分析化学重点学科基金和现代分离科学陕西省重点实验室基金(0505 JS60).

收稿日期:2009-07-16

in 50 min. It would be expected that when a kind of packings having very small particle size is packed into a chromatographic cake with diameter to be greater than its thickness and is employed to separate, and/or renature proteins, a result of high speed and high resolution with simultaneous renaturation under high protein loading ("three H" target) could be obtained.

**Key words** : hydrophobic interaction chromatography ; protein separation ; resolution ; chromatographic cake ; dynamic factor ; biotechnology ; granulocyte colony stimulating factor

色谱分离是基于各组分在色谱柱中有不同的迁移速率。然而组分在色谱带的迁移过程中会不断地扩展。一般假定溶质在液体和固体两相间的迁移是瞬时完成的,所以组分在纵向的迁移速度一方面可用与该组分在两相中分配系数大小相关的保留因子来表示,另一方面它又与色谱带(组分带)在柱内的扩展程度相关。前者属于热力学因素,且色谱柱愈长,对分离愈有利;而后者属于动力学因素,长的色谱柱会导致色谱带扩展程度增大,从而对分离产生不利影响。所以组分分离总是在这两个因素的相互制约下进行。

在蛋白质组学研究中,通常要求所制备的来源于天然产物、动植物细胞的活性和变性重组蛋白的纯度大于 95%,并具有高比活性。Regnier 小组<sup>[1]</sup>曾指出规模化纯化活性蛋白在蛋白质组学研究中的重要性。目前蛋白质组学研究所采用的“自上而下”的策略(top-down strategy)也要求先对足够数量的整体蛋白质进行分离后再予以鉴定<sup>[2,3]</sup>。尤其是改进的质谱方法可准确地测定相对分子质量( $M_r$ )为 229 000<sup>[4]</sup>的蛋白质,这更加拓宽了“自上而下”策略的应用范围。Geng 等<sup>[5-7]</sup>近几年也曾对此进行评述。基于生物大分子或整体蛋白的色谱分离效果基本上与色谱柱的柱长无关这样一个众所周知的事实,短柱常被用来纯化整体蛋白<sup>[6,8]</sup>。然而细且短的色谱柱所能承受的样品负载量低,因而限制了其在规模型制备中的应用。为了解决这一问题,人们开发了一系列长 10 mm、直径在 10 mm 到 300 mm 之间(甚至更大直径)的色谱饼(又称为饼型色谱柱)<sup>[9,10]</sup>。已证实实用色谱饼可在高负载条件下分离蛋白,且所得效果相当好,已被用于纯化并同时复性得到克级重组人  $\gamma$ -干扰素,该方法被称为蛋白折叠液相色谱法(protein folding liquid chromatography, PFLC)<sup>[6,11]</sup>。一般情况下,用 PFLC 在 30~40 min 内可一步纯化并同时复性很多源于大肠杆菌(*E. coli*)的重组蛋白和蛋白药物,且所得产物的纯度大于 95%,因此未来可期望用包括整体柱在内的短色谱柱改变蛋白的纯化<sup>[6]</sup>。当色谱固定相、流动相和溶质一定时,小分子溶质的色谱分离效果主要受色谱柱柱长控制,而蛋白这样的大分子其色谱分

离效果则主要由动力学因素来控制。有关动力学因素对小分子溶质的色谱分离影响的研究颇多,如著名的 van Deemter 方程<sup>[12]</sup>、Giddings 方程<sup>[13]</sup>和 Wang 方程<sup>[14]</sup>,而关于动力学因素对整体蛋白分离的影响却很少见报道。迄今为止,尚未见到用板高或折合板高与流动相线速的关系——类似于 van Deemter 或 Knox 曲线<sup>[15]</sup>来描述在梯度洗脱条件下整体蛋白分离的报道。

分离度的概念在等浓度洗脱条件下的组分分离中应用极广。在等浓度洗脱条件下,分离效率的高低可用理论塔板数或者理论塔板高度进行描述,此时分离效率与色谱柱的柱长密切相关。但依据分离度的原有定义,无法用其表征在梯度洗脱条件下组分分离的好坏。而蛋白的分离却常常是在梯度洗脱条件下进行,且分离度与柱长基本无关。因此 Wang 等<sup>[14]</sup>引入了一个“条件峰容量”的概念以表示在梯度洗脱条件下多肽分离的峰容量,并将源于等度洗脱条件的 Poppe 曲线用于梯度洗脱,研究了“条件峰容量”的 Poppe 曲线。这里的“条件”是指梯度条件,包括梯度洗脱、温度、流速、洗脱剂的起始和最终浓度、色谱参数和样品性质等<sup>[16]</sup>。

根据这样一个“条件”概念的思路,在本研究中我们也使用一个“条件分离度”的概念以简单说明在梯度条件下对蛋白的分离能力,同时,也可对应于峰宽使用这样一个“条件峰宽”概念。如果色谱峰对称性良好,则条件分离度( $R_s$ )可用式(1)计算:

$$R_s = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{W} \quad (1)$$

其中  $t_{R,1}$  和  $t_{R,2}$  是两个指定的蛋白色谱峰 1 和 2 在特定梯度条件下的保留时间,  $W$  是这两个蛋白所得色谱峰的平均“条件色谱峰宽”。虽然  $t_{R,1}$  和  $t_{R,2}$  能够被精确测定,但在用梯度洗脱时,  $W$  取决于所选定的一对蛋白色谱峰的对称性。假定在梯度洗脱条件下分离得到的蛋白色谱峰的对称性很好,则可用式(1)算出这一对蛋白色谱峰的  $R_s$ 。

在研究色谱柱柱效受动力学因素影响时,对应于上述“条件峰宽”的“条件板高”(  $H$  )可用式(2)计算<sup>[17]</sup>:

$$H = \frac{L}{N} = \frac{L}{16} \times \left( \frac{W}{t_R} \right)^2 \quad (2)$$

其中,  $N$  为塔板数,  $L$  为色谱柱长。对于  $t_R$  和  $W$  来讲,也可以与在等浓度洗脱条件下分离小分子溶质一样,用单个蛋白的保留时间和峰宽来计算“条件板高”,但这样会与实际情况产生很大的距离。因为在流动相的流速改变时所引起的  $t_R$  的变化是由热力学(对应流动相中强洗脱剂浓度的变化)因素和动力学因素(与小分子溶质动力学因素相同)同时引起的,且不同蛋白的分子所产生的分子构象变化也不一样,所以这些变化均与蛋白种类密切相关。为了避免这些因素所引起的差异,选用与相邻两个色谱峰相对应的一对蛋白的平均性质,即这一对蛋白的保留时间  $t_{R,1}$  和  $t_{R,2}$  的平均保留时间  $t_R$  及色谱峰的平均条件色谱峰宽  $W$  所对应的板高来表示“条件板高”。这样一来,“条件板高”的物理意义便可描述为:在色谱柱长一定时与相邻两个色谱峰相对应的一对蛋白的塔板高度,或者是在梯度洗脱条件下分离蛋白时将一对蛋白视为“一个”蛋白所对应的板高。从式(2)看出,“条件板高”可用这两个色谱峰的平均保留值  $t_R$  与平均峰宽  $W$  来计算。在最低“条件板高”条件下进行的蛋白分离应能获得最高的分离度。这里的“条件”是指整体蛋白及梯度洗脱(包括线性梯度洗脱),即在梯度洗脱条件下的整体蛋白的保留时间和流动相流速等。

本文拟从色谱基本概念出发,依照在梯度洗脱中对多肽分离的“条件峰容量”概念<sup>[14]</sup>,提出对整体蛋白色谱分离的“条件板高”概念以描述在对应于最低“条件板高”时流动相的最佳流速。用传统的长而细的色谱柱和直径大于厚度的色谱饼中装填的疏水相互作用色谱填料分离了标准蛋白,绘制了“条件板高”对流动相流速的整体蛋白的色谱分离动力学曲线图。并与传统的分离整体蛋白的软基质色谱分离介质的分离结果进行了比较,发现装填在色谱饼中的极小颗粒的硅胶基质疏水相互作用色谱填料能在 12 min 内完全分离 7 种标准蛋白;用其对重组人粒细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte colony stimulating factor, rhG-CSF)进行快速复性并同时纯化,在 50 min 内一步便可获得产品的纯度大于 97%、质量回收率大于 39%、比活大于  $1 \times 10^8$  IU/mg,结果令人满意。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

LC-20A 高效液相色谱仪(岛津公司,日本),包括两台 LC-20AT 泵,一台 SPD-20A 紫外可见检测

器,Rheodyne 7725i 手动进样阀和 N2000 色谱工作站;PB-10 pH 计(SartoriusAG,德国);KQ-250 型超声仪(上海昆山检测仪器厂,中国);CascadaLS 型纯水仪(PallCo., Ltd.,美国);AUW220 型分析天平(岛津公司,日本)。

色谱柱-1:GE 苯基 Sepharose 6 Fast Flow(55 mm × 12 mm i. d.,Amersham Pharmacia Biotech 公司,瑞典);色谱柱-2:HIC-PEG-400(silica,5 μm,30 nm,150 mm × 4.6 mm i. d.);色谱柱-3:HIC-PEG-600(silica,3 μm,30 nm,50 mm × 4.6 mm i. d.);色谱饼-1:HIC-PEG-600(silica,3 μm,30 nm,10 mm × 50 mm i. d.);色谱饼-2:HIC-PEG-400(silica,5 μm,30 nm,10 mm × 20 mm i. d.)。色谱柱-2、3 和两种色谱饼均为西安奥岚科技发展有限公司产品(西安,中国)。

流动相 A 液:3.0 mol/L 硫酸铵 + 0.05 mol/L 磷酸二氢钾的缓冲液,pH 7.0;流动相 B 液:0.05 mol/L 磷酸二氢钾的缓冲液,pH 7.0。

标准蛋白:细胞色素-c(Cyt c,马心肌)、核糖核酸酶 A(RNase A,牛胰脏)、肌红蛋白(Myo,马心肌)、溶菌酶(Lys,鸡蛋清)、α-糜蛋白酶(α-Chy,牛胰脏)、α-淀粉酶(α-Amy,枯草杆菌)和胰岛素(Ins,牛胰脏)均购自 Sigma 公司(美国)。

### 1.2 流动相中水浓度[ $H_2O$ ]的计算

$$[H_2O] = (d_A \Psi_A + d_B \Psi_B - W_s) / 0.018 \quad (3)$$

式(3)中[ $H_2O$ ]为流动相中水的浓度(mol/L), $d_A$ 和  $d_B$ 分别代表流动相 A 液和 B 液的密度(kg/L), $\Psi_A$ 和  $\Psi_B$ 分别表示 A 液和 B 液在流动相中所占的体积分数(%), $W_s$ 为流动相混合液中盐的质量浓度(kg/L),0.018 为水的摩尔质量常数(kg/mol)。

## 2 结果和讨论

### 2.1 梯度洗脱条件下整体蛋白的色谱峰宽

在色谱分析中无论是计算塔板数还是计算分离度,都必须准确地测量峰宽,而测量峰宽的准确度又取决于色谱峰的对称性。图 1 给出了一个色谱饼(10 mm × 20 mm i. d.)和一根常用的色谱柱(150 mm × 4.6 mm i. d.)在各自的流动相流速条件下对 7 种标准蛋白分离的色谱图。可以看出,虽然 2 个色谱图所示的各个色谱峰的峰宽不相同,但每个色谱峰的对称性均很好。对图 1a、b 中每个峰的不对称因子进行计算,其平均不对称因子为  $1.08 \pm 0.04$ 。尽管这个结果与等浓度洗脱小分子溶质时要求色谱峰的不对称因子为  $1.00 \pm 0.10$  才算对称性好这个标准相比还有一定差距,但是对于梯度洗脱蛋白来讲,这样的不对称因子基本上能够满足对测

定“条件分离度”和“条件板高”的要求。

从图 1 可以看出 7 种标准蛋白能够完全被分离。这可以用复杂的短柱理论<sup>[8]</sup>来解释。简单地讲,从热力学因素的角度来看,蛋白分子是逐个地被洗脱出色谱柱的;换句话说,每个蛋白都会对应于一个很窄的洗脱剂浓度范围或浓度窗口。蛋白从该浓度窗口的最低浓度点开始移动到该浓度窗口的最高浓度点就会完全被洗脱出色谱柱<sup>[18]</sup>。这样一来,就仅仅是那些分配系数比较接近的蛋白需要用一定柱长的色谱柱分离。根据张养军<sup>[19]</sup>对常用蛋白在疏水色谱柱上分离的计算结果可知,4.5 cm 的柱长就足以满足常用蛋白的分离要求,而从图 1a 中可以看出,当所用的色谱饼厚度仅为 1 cm(远小于 4.5

cm)时,由于色谱饼具有很大的直径使样品在单位柱床面积的密度大大降低,促使蛋白的非线性吸附等温线趋近于线性吸附等温线,从而使色谱峰变得更窄和更对称;又由于样品带厚度减小,提供了较大的“柱长/样带厚度”比,使得色谱饼厚度可减小到 1 cm,从而更有利于减小蛋白质谱带的扩展。当然,吸附等温线所反映的是组分在两相间的分配系数,属于热力学因素;然而,从色谱饼分离蛋白时流动相的流速(见图 1a)为色谱柱的(见图 1b)5 倍来看,这又是由动力学因素所引起的;同时,色谱饼的横截面积又是该色谱柱的 18.9 倍,因此还必须要用流动相的线速对色谱柱和色谱饼的动力学影响来作进一步的解释。

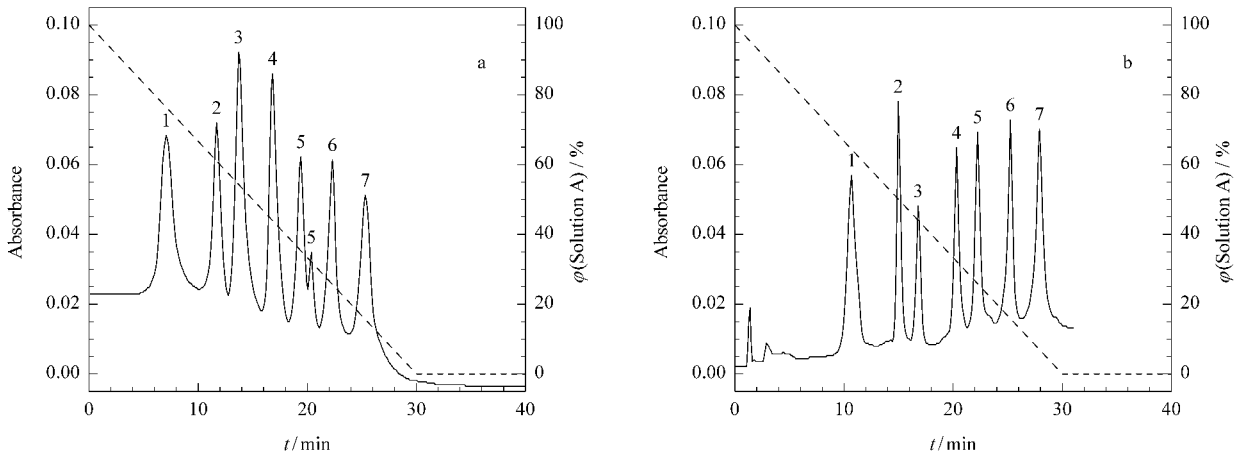


图 1 采用(a)色谱饼和(b)色谱柱对标准蛋白的疏水色谱分离图

Fig. 1 Chromatograms of standard proteins by hydrophobic interaction chromatography from (a) a chromatographic cake and (b) a conventional column

Size : a. 10 mm × 20 mm i. d. ; b. 150 mm × 4.6 mm i. d. Stationary phase : silica base , HIC-PEG-400 ( pore size , 30 nm ; particle size , 5 μm ). Linear gradient elution ( denoted with dotted line ) : 100% solution A ( 3.0 mol/L ammonium sulfate + 0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution , pH 7.0 ) to 100% solution B ( 0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution , pH 7.0 ) in 30 min , and then maintain at B from 30 to 40 min . Flow rate : a. 5.0 mL/min ; b. 1.0 mL/min . Detection wavelength : 280 nm . Sample mass : 2.0 mg .

Peaks : 1. cytochrome c ; 2. myoglobin ; 3. ribonuclease A ; 4. lysozyme ; 5. α-chymotrypsin ; 6. α-amylase ; 7. insulin .

### 2.2 “条件板高”与流动相线速(u)的关系

流动相线速对组分离度的影响属于色谱分离的动力学范畴。Giddings<sup>[13]</sup>认为填料颗粒大小、填充床的特性、流动相这些因素都对板高有一个非加和性的影响,结果使得对这些关系间的定量描述变得很复杂。但这种影响可以通过用实验的方法测定塔板高度,并以塔板高度对流动相线速作图来进行表征。在以往的工作中, van Deemter 方程被应用于气相色谱<sup>[12]</sup>,而 Knox 方程被应用于液相色谱<sup>[15]</sup>,著名的 Poppe 曲线<sup>[20]</sup>被应用于在等度洗脱条件下选择合适的操作条件以提高分离的效率和速度。上面所述这些动力学曲线毫无疑问都是在等度洗脱条件下才适用,而在梯度洗脱条件下则不能直接应用。

图 2 表示了用通常的色谱柱( 50 mm × 4.6 mm i. d. )和一个色谱饼( 10 mm × 50 mm i. d. )在梯度条件下对 5 种( 4 对 )标准蛋白分离时,在各自不同的流动相线速范围内 H 与 u 的关系。这 4 对蛋白分别是肌红蛋白/核糖核酸酶 A、核糖核酸酶 A/溶菌酶、溶菌酶/α-糜蛋白酶和 α-糜蛋白酶/α-淀粉酶。结果显示,在采用色谱饼进行分离时,4 种蛋白对的 H 均随着 u 的增加而逐渐降低,除了蛋白对 Myo/RNase A 外,其他 3 种蛋白对的 H 值均在线速约为 0.2 mm/s 时接近恒定值;而在色谱柱上,同样是除了蛋白对 Myo/RNase A 外,其他 3 种蛋白对在 u 为 1 ~ 3 mm/s 时 H 才是恒值,在这一范围之前和之后, H 分别随着 u 的增加而减小和随着 u 的增加而增大。我们知道,色谱柱或色谱饼的流动相线速

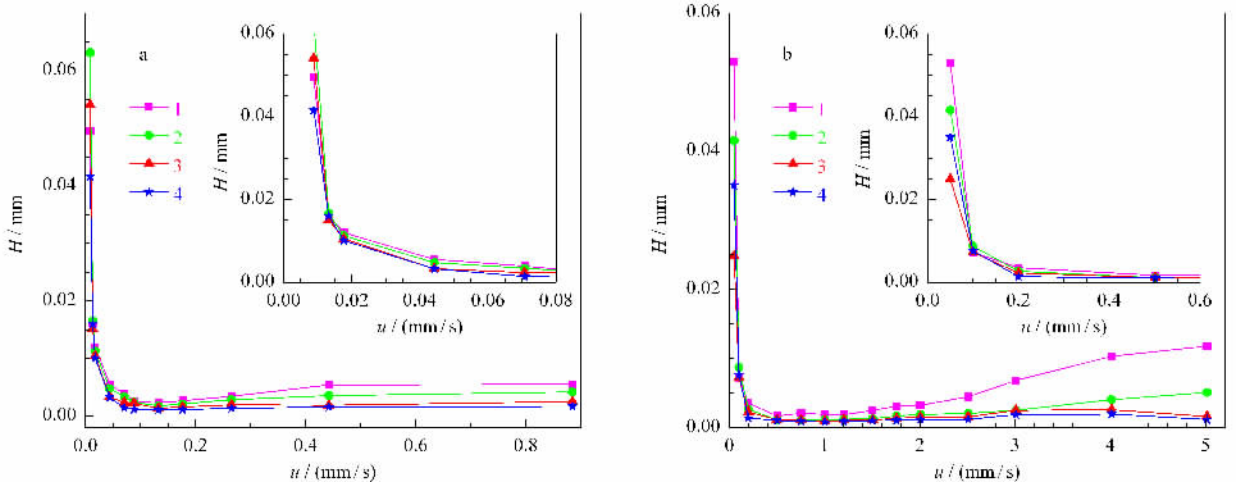


图 2 采用 (a) 色谱饼和 (b) 色谱柱进行整体蛋白分离时“条件板高” $H$  对流动相线速 ( $u$ ) 的关系图

Fig. 2 Plot of conditional plate height ( $H$ ) of intact proteins vs linear velocity of mobile phase ( $u$ ) from (a) a chromatographic cake and (b) a conventional column

Size : 10 mm × 50 mm i. d. ; b. 50 mm × 4.6 mm i. d. Stationary phase : silica base , HIC-PEG-600 ( pore size , 30 nm ; particle size , 3 μm ). Except the flow rate of mobile phase , all other experimental conditions are the same as those shown in Fig. 1 .

Curves : 1. myoglobin/ribonuclease A ; 2. ribonuclease A/lysozyme ; 3. lysozyme/α-chymotrypsin ; 4. α-chymotrypsin/α-amylase .

与流速可相互推算。色谱柱的直径通常为 4.6 mm ,其流动相的线速与流速呈正比关系 ,因此在实际应用时二者常被混用而不致产生误解。然而 ,在用色谱饼分离蛋白时 ,因采用的色谱饼直径不同 ,其流动相的线速与流速的关系必须基于线速与色谱饼直径平方的倒数成正比的关系加以换算。图 2a 所示流动相最佳线速为 0.08 ~ 0.9 mm/s 时对应的流速为 9.0 ~ 100 mL/min ;图 2b 所示流动相线速为 1.0 ~ 3.0 mm/s 时对应的流速为 3.3 ~ 10 mL/min。这说明 ,同样是获得较好的蛋白分离效果 ,二者所采用的最佳流速范围是不同的。从图 2 看出 ,对本文所采用的色谱柱而言 ,其最佳流速范围在 3.3 ~ 10 mL/min 范围内 ;而色谱饼则在 9.0 ~ 100 mL/min 的范围内 ,后者的范围要比前者大很多。

由图 2 还可看出 ,在进行蛋白质分离时 ,色谱饼和色谱柱皆有一个最佳的线速范围 ,在此线速条件下  $H$  最小。很明显 ,这个由色谱饼获得的半 U 形曲线(图 2a)与常见的 van Deemter 方程的 U 形曲线有很大的不同。但是 ,正如图 2a 和图 2b 所示 ,色谱饼和色谱柱皆有一个最佳的线速值。在色谱饼的最佳线速范围内 ,装填有 3 μm 填料的色谱饼分离蛋白时与文献 [21] 报道的装填有更小粒径(例如填料粒径为 1 ~ 2 μm)填料的色谱柱分离小分子溶质时所得出的结论相符 ,即在相当高的线速  $u$  条件下  $H$  基本上不受影响 ;但对色谱柱分离小分子溶质而言 ,流动相线速在很宽范围内其板高基本保持不变的原因迄今还未见到报道。然而 ,重要的是色谱柱与色谱饼之间主要的不同点在于 ,色谱饼的最佳线速大约为 0.20 mm/s ,而色谱柱的最佳线速为 1 ~ 3

mm/s ,前者仅为后者的 20% ~ 6.7% ;图 2a 中色谱饼的流动相在横坐标上的最大线速为 0.9 mm/s ,而图 2b 色谱柱在横坐标上所标流动相的最佳线速的最低限就达 1.0 mm/s ;加之与色谱柱相比色谱饼的厚度又小得多 ,所以蛋白在色谱饼中迁移时 ,其纵向阻力要比色谱柱小得多。色谱饼要求的这种低线速对色谱柱而言是太低了。当用色谱饼分离蛋白时 ,将其流动相的流速提高 10 倍时 ,即图 1a 所采用的流动相流速 5.0 mL/min 增加到 50.0 mL/min 时 ,其线速才从 0.3 mm/s 增大到 3.0 mm/s ,从而可以理解为什么用色谱饼分离整体蛋白时 ,在线速变化范围很宽时 ,其“条件板高”基本维持不变的原因。而实际上 ,当流动相流速为 5.0 mL/min 时 ,分离效果就已经很好了(如图 1a 所示) ,因而在通常情况下并不需要更高的流速。当然 ,如要用色谱饼进行蛋白的制备 ,可在很高的流速条件下进行分离 ,而其分离度不会有显著的损失。

### 2.3 常用于整体蛋白分离的软基质填料色谱柱与硅胶基质填料色谱饼分离效果的比较

在生命科学和生物工程领域中 ,软基质色谱填料被广泛用于规模化蛋白质的制备和纯化。然而 ,相对于硅胶基质的填料 ,它们有一些特定的缺点 ,如低的流动相流速及差的分离度。图 3 分别表示在色谱柱(图 3a)和色谱饼(图 3b)上前述 7 种标准蛋白的分离情况 ,前者为一根塑料管 ,里面装填了苯基 Sepharose 6 Fast Flow 软基质色谱填料。尽管在色谱饼上蛋白的负载为色谱柱的 10 倍 ,且柱床体积仅为色谱柱软基质色谱填料的一半 ,但仍能在 12 min 内完全分离 7 种标准蛋白 ;而用装有软基质色

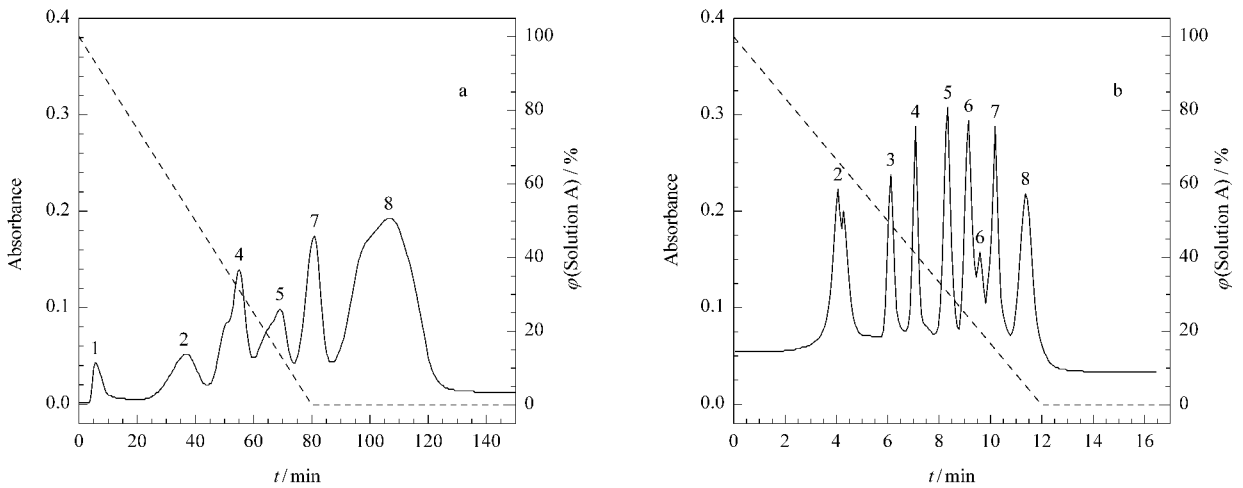


图 3 装填软基质填料的常用色谱柱与装填硅胶基质填料的色谱饼分离整体蛋白的效果比较

Fig. 3 Comparison of the resolutions for intact protein separation by HIC between a conventional column packed by soft base media and a chromatographic cake packed by silica-base packings

a. Conventional column ( Sepharose 6 Fast Flow , 55 mm × 12 mm i. d. ). Linear gradient elution ( denoted with dotted line ) : 100% solution A ( 3.0 mol/L ammonium sulfate + 0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution , pH 6.5 ) to 100% solution B ( 0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution , pH 6.5 ) in 80 min , and then maintain at solution B from 80 to 140 min. Flow rate : 1.0 mL/min. Detection wavelength : 280 nm. Sample mass : 0.4 mg.

b. chromatographic cake ( 10 mm × 20 mm i. d. ). Stationary phase : silica base , HIC-PEG-400 ( pore size , 30 nm ; particle size , 5 μm ). Linear gradient elution ( denoted with dotted line ) : 100% solution A ( 3.0 mol/L ammonium sulfate + 0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution , pH 6.5 ) to 100% solution B ( 0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution , pH 6.5 ) in 12 min , and then maintain at solution B from 12 to 17 min. Flow rate : 1.0 mL/min. Detection wavelength : 280 nm. Sample mass : 4.0 mg.

Peaks : 1. solvent ; 2. cytochrome c ; 3. myoglobin ; 4. ribonuclease A ; 5. lysozyme ; 6. α-chymotrypsin ; 7. α-amylase ; 8. insulin.

谱填料的色谱柱必须要用 140 min 才能将 5 种标准蛋白完全分离。图 3 所示的色谱柱和色谱饼虽然采用同样的流动相流速 ( 1.0 mL/min ) , 但对应的却是不同的线速 , 图 3a 为 0.044 mm/s , 而图 3b 为 0.30 mm/s ( 在色谱饼的最佳线速范围内 ) 。由于软基质色谱填料的使用压力被限制在 0.5 MPa , 所以色谱柱流动相的流速已没有提高的空间。图 3 的结果表明 , 在蛋白质纯化中通过使用色谱饼和减小色谱填料的颗粒粒径 , 有可能用任何刚性装填材料来取代软基质填料。

#### 2.4 色谱饼对 rhG-CSF 的一步复性并同时纯化

rhG-CSF 在大肠杆菌 ( *E. coli* ) 中能大量表达 , 但这种蛋白在纯化前必须复性。因其用 *E. coli* 表达时 , 目标蛋白在菌体中是以不溶于常规溶剂的包涵体形式存在的 , 所以必须要用高浓度的盐酸胍或脲来溶解包涵体。用变性剂从包涵体中提取出来的蛋白质处于展开 ( U ) 状态。这些处于展开状态的蛋白质由于其具有很强的疏水性 , 一旦遇到盐的水溶液便会产生沉淀。一些常用的蛋白复性方法 , 如透析或稀释法 , 具有很低的质量与活性回收率 , 同时还要花费很长的时间。PFLC 可被应用于 *E. coli* 中蛋白药物的复性与纯化 , 其不足之处在于蛋白沉淀物会在柱头处沉积而堵塞色谱柱。与常规色谱柱相比较而言 , 覆盖于色谱饼顶端的筛板具有很大的横

截面积 , 万一在色谱饼顶端的筛板上产生了沉淀物 , 则该沉淀物仅阻塞柱头上筛板表面的很小一部分 , 因而可使蛋白的复性与纯化顺利进行。在文献 [ 9 ] 中 , 将 700 mL 盐酸胍溶液 ( 其蛋白总量为 2 g ) 连续地注入装填有疏水填料的色谱饼 ( 1 cm × 30 cm i. d. ) 中以用于纯化来源于 *E. coli* 表达的重组人 γ-干扰素 , 用 PFLC 只需要一步获得的目标蛋白纯度就不低于 95% 。图 4a 显示了应用色谱饼 ( 10 mm × 20 mm i. d. ) 对源于 *E. coli* 表达的 rhG-CSF 的复性并同时纯化的结果 ; 进一步用 SDS-PAGE ( 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 ) 对获得的蛋白质纯度进行测定 , 发现其不低于 97% ( 图 4b ) , 比活 > 1 × 10<sup>8</sup> IU/mg 。结果表明 , 用色谱饼 ( HIC-PEG-400 ) 仅用 50 min 就可一步完成整个分离过程。虽然质量回收率在这个例子中仅为 39% , 但是可以通过将 rhG-CSF 沉积物再溶解 , 重复色谱过程来提高其质量回收率 [ 22 ] 。

### 3 结论

反映色谱动力学因素之一的流动相的线速的确对改善整体蛋白分离起着重要的作用。将粒度极小的硅胶基质色谱填料装填在直径大于厚度的色谱饼中 , 可在高的流速但可维持低的线速的条件下使蛋白分离有最小的“条件板高” , 依此可使蛋白在高负

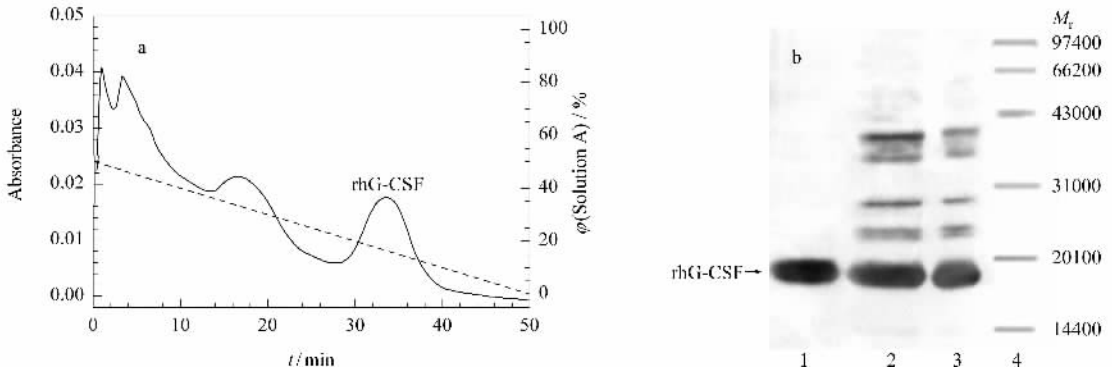


图 4 采用色谱饼对 rhG-CSF 的一步纯化并同时复性的 (a) 色谱分离图和 (b) SDS-PAGE 分析图

Fig. 4 (a) Chromatogram and (b) SDS-PAGE of the renatured with simultaneously purified rhG-CSF by one step HIC-chromatographic cake

a. Chromatographic cake (10 mm × 20 mm i. d.). Stationary phase: silica base, HIC-PEG-400 (pore size, 30 nm; particle size, 5 μm). Linear gradient elution (denoted with dotted line): 100% solution A (2.5 mol/L ammonium sulfate + 0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution, pH 7.0) to 100% solution B (0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution, pH 7.0) in 50 min. Flow rate: 1.0 mL/min. Detection wavelength: 280 nm.

b. 1. purified rhG-CSF; 2, 3. inclusion bodies containing rhG-CSF; 4. relative molecular mass markers.

荷条件下进行整体蛋白的高速、高分离度的分离和纯化。当然也可在有蛋白生成沉淀的情况下对变性蛋白进行复性并同时纯化。该研究结果为色谱介质的抗压能力、色谱柱和色谱饼的几何形状设计和制造提供了动力学数据。直径过大或过小的色谱柱, 或色谱饼, 会因流速过高或过低而无法达到理论上的流速要求, 结果会降低蛋白分离的分离度。

致谢 诚挚感谢西安奥岚科技发展公司提供本研究使用的所有 HIC 色谱饼和色谱柱。

#### 参考文献:

- [1] Liu X P, Yang W C, Gao Q, et al. J Chromatogr A, 2008, 1178:24
- [2] Kelleher N L. Anal Chem, 2004, 76:197
- [3] Ge Y, Lawhorn B G, El Naggar M, et al. J Am Chem Soc, 2002, 124:672
- [4] Han X M, Jin M, Breuker K. Science, 2006, 314:109
- [5] Geng X D, Wang C Z. J Chromatogr B, 2007, 849:69
- [6] Geng X D, Wang L L. J Chromatogr B, 2008, 866:133
- [7] Wang L L, Geng X D. Science in China: Series B (王骊丽, 耿信笃. 中国科学: B 辑), 2009, 39(8):711
- [8] Geng X D. Stoichiometric displacement theory and its applications. Beijing: Science Press (耿信笃. 计量置换理论及应用. 北京: 科学出版社), 2004:205

- [9] Geng X D, Bai Q, Zhang Y, et al. J Biotechnol, 2004, 113:137
- [10] Geng X D, Zhang Y J. Caky chromatographic column and the method for producing it and its applications. US Patent: 7208085B2, 2007
- [11] Geng X D, Bai Q, Wang C Z. Protein folding liquid chromatography. Beijing: Science Press (耿信笃, 白泉, 王超展. 蛋白折叠液相色谱. 北京: 科学出版社), 2006
- [12] Deemter J V, Zuiderweg F J, Klinkenberg A. Chem Eng Sci, 1956, 5:271
- [13] Giddings J C. Unified separation science. New York: Wiley-Interscience, 1991:269
- [14] Wang X L, Stoll D R, Carr P W, et al. J Chromatogr A, 2006, 1125:177
- [15] Knox J H, Saleem M J. J Chromatogr Sci, 1969, 7:614
- [16] Dolan J W, Snyder L R, Djordjevic N M, et al. J Chromatogr A, 1999, 857:1
- [17] Geng X D. Guide to theory of modern separation science. Beijing: Higher Education Press (耿信笃. 现代分离科学导引. 北京: 高等教育出版社), 2001
- [18] Geng X D, Regnier F E. J Chromatogr, 1984, 296:120
- [19] Zhang Y J. [PhD Dissertation]. Xi'an: Northwest University (张养军. [博士学位论文]. 西安: 西北大学), 2001
- [20] Poppe H. J Chromatogr A, 1997, 778:3
- [21] Yang F J. Microbore column chromatography. New York: Marcel Dekker, 1989:51
- [22] Wu D, Wang C Z, Geng X D. Biotech Progress, 2007, 23(2):407