

蚕丝蛋白固相萃取分离富集 细胞色素 c 的研究

陈明丽, 颜晓蕊, 王建华

(东北大学分析科学研究中心, 沈阳 110004)

摘要 在特定实验条件下, 蚕丝蛋白对细胞色素 c 表现出选择性吸附. 以蚕丝蛋白微填充柱为载体, 在流动系统中建立了细胞色素 c 的分离富集方法, 以分光光度法在 410 nm 处检测分离富集过程. 在进样流速低于 10 $\mu\text{L}/\text{s}$ 时, 2 mL 样品溶液 (pH = 5.6 的水溶液) 中 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的细胞色素 c 可被蚕丝蛋白微柱完全吸附, 而在洗脱流速低于 15 $\mu\text{L}/\text{s}$ 时, 200 μL NaCl 溶液 (1.0 mol/L) 可将吸附的细胞色素 c 完全洗脱, 分离富集系数为 10. 用本方法测定细胞色素 c 的线性范围为 1.0 ~ 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 检出限为 0.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 精密度 RSD 为 2.5% (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $n=9$). 此外, 还采用本文方法对人全血中的蛋白质进行了分离富集, 并用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳验证了分离后蛋白的纯度.

关键词 蚕丝蛋白; 固相萃取; 细胞色素 c

中图分类号 O652.62

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)10-1945-06

含有血红素基团的蛋白在生命过程中具有独特的作用, 是氧气传输和电子传递的重要载体^[1-3]. 细胞色素 c 作为一种电子传递蛋白, 通过血红素辅基中铁原子的还原态和氧化态之间的可逆变化广泛参与生命过程. 生命科学的研究常需要从复杂的生物样品中提取高纯度的特定蛋白质, 因此对蛋白质的分离富集也提出了越来越高的要求.

溶剂萃取是蛋白质分离的常见方法^[4-6], 但常用的溶剂对蛋白质的性质或结构往往产生较大影响. 因此, 探索具有生物相容性的分离富集体系对于生命科学研究具有重要意义. 近年来, 固相萃取技术被广泛用于蛋白质的分离富集. 用于分离蛋白质的固相萃取剂主要包括各种离子交换树脂^[7-10]、纳米材料^[11-14]、蛋白质印迹材料^[15]及碳纳米管^[16-18]等. 固相萃取分离蛋白质的原理是基于氢键、静电或疏水作用等方式使蛋白质被吸附在吸附剂表面, 从而与样品基体分离, 然后再用适当的洗脱剂将吸附在固相表面的蛋白质洗脱到水相中^[4]. 但这种方法难以实现对性质相近的蛋白质的分离.

蚕丝是一种天然蛋白质纤维, 主要由丝素和丝胶两种蛋白组成^[19]. 蚕丝蛋白表面含有氨基、醇羟基及酚羟基等官能团, 在一定条件下, 其表面电性质可与多种化学组分相互作用, 是分离富集的有效载体. 以蚕丝蛋白作为吸附剂对金属进行分离富集已有报道^[20]. 本文研究了蚕丝蛋白与血红蛋白及细胞色素 c 的相互作用, 发现其对血红蛋白和细胞色素 c 表现完全不同的吸附, 即在一定条件下血红蛋白不被吸附 (另一种含量很高的酸性蛋白白蛋白也不被吸附), 而细胞色素 c 则可被完全吸附, 从而为实现两种性质相近蛋白的分离提供了可能. 本文以此为基础, 建立了选择性分离细胞色素 c 的新体系.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

MicroSIA 顺序注射系统 (FIALab Instruments Inc., 美国), 包括一个注射泵 (2.5 mL 注射针筒) 和一

收稿日期: 2009-06-22.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (批准号: 20805004), 国家自然科学基金重点项目 (批准号: 20635010) 以及国家杰出青年科学基金 (批准号: 20725517) 资助.

联系人简介: 王建华, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事流动分析及样品预处理研究. E-mail: jianhua jr z@mail.neu.edu.cn

个八位选择阀; 723PC 型可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司); BG-verMINI 垂直电泳仪(Baygene 公司, 北京); DYY-2 III 型稳流稳压电泳仪(北京六一仪器厂); 单盘电子天平(北京赛多利斯仪器有限公司); 90005-02C 纯水系统(Labconco 公司, 美国)提供电阻率为 $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ 的二次去离子水。

蚕丝蛋白(桐乡凤怡蚕丝被厂); 细胞色素 c(c7752, 美国 Sigma 公司); 血红蛋白(Bovine, H2500, 美国 Sigma 公司); 牛血清白蛋白(北京 Sino-American 生物技术公司); 氯化钠、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、盐酸、甘氨酸、考马斯亮蓝、冰醋酸、甲醇及丙烯酰胺(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司, 上海); 65% 硝酸(超纯, 北京庆盛达化工技术有限公司); *N,N*-亚甲基双丙烯酰胺(军事医学科学院药材供应站); SDS(十二烷基硫酸钠, 天津市博迪化工有限公司); 过硫酸铵(天津市博迪化工有限公司); TEMED(四甲基乙二胺, 北京市大兴兴福精细化学研究所); 蛋白质 Marker(宝生物工程大连有限公司); 溴酚兰(北京市化学试剂厂)。

1.2 实验过程

1.2.1 蚕丝蛋白的预处理 所用蚕丝外径约为 $10 \mu\text{m}$ 。将蚕丝纤维切成长度约为 1 mm 的细段, 称取约 0.5 g , 然后用 0.1 mol/L HNO_3 浸泡 3 h 。将纤维取出并用二次去离子水充分清洗, 直至洗出液为中性。最后在 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 的烘箱中干燥 6 h , 密封保存备用。

1.2.2 微柱填充 称取 8.0 mg 上述处理过的蚕丝(纤维)蛋白, 将其装填到内径为 2.8 mm 的 PTFE 管中, 柱长为 10 mm , 柱两端均用少量玻璃棉堵住以防蚕丝纤维流失。微填充柱在使用前用 4 mL 二次去离子水冲洗, 控制流速为 $15 \mu\text{L/s}$, 在润湿蚕丝蛋白的同时去除柱表面的残留。最后用 pH 为 6.0 的磷酸盐缓冲溶液平衡微柱。

1.2.3 实验流程 将装填好的微柱连接在顺序注射系统(图 1)中。以蚕丝蛋白为吸附剂分离富集细胞色素 c 的实验过程包括以下两个步骤:

(1) 分离富集: 从 1 号阀位以 $100 \mu\text{L/s}$ 的流速向储液环中吸入 $500 \mu\text{L}$ 载流(二次去离子水), 然后从 3 号位以 $100 \mu\text{L/s}$ 的流速吸入 2 mL 含有细胞色素 c 的样品溶液, 使此毗邻的两区带经由 7 号阀位以 $10 \mu\text{L/s}$ 的流速依次流过微填充柱, 并进入分光光度计的流通池中进行在线检测, 检测波长为 410 nm 。

(2) 洗脱: 分别从 1 号和 2 号阀位以 $100 \mu\text{L/s}$ 的流速依次吸入 $2300 \mu\text{L}$ 二次水及 $200 \mu\text{L}$ 洗脱液(NaCl 溶液, 1.0 mol/L)。洗脱液和载流依次经 7 号阀位流过蚕丝蛋白微填充柱(控制流速为 $15 \mu\text{L/s}$), 将吸附的蛋白质洗脱下来并进入流通池中进行检测。预先吸入的去离子水在将洗出液载入检测器的同时将微填充柱清洗干净, 以保证下次的吸附和洗脱操作。

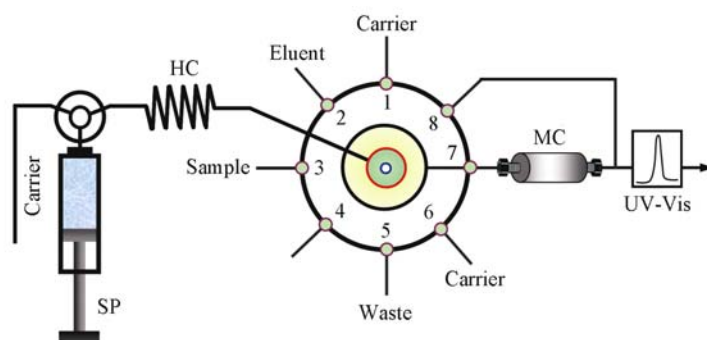


Fig. 1 Flow manifold for sequential injection on-line separation and preconcentration of protein based on the silk fibroin mini-column

SP: syringe pump; HC: holding coil; MC: microcolumn packed with silk fibroin; carrier: deionized water; eluent: 1.0 mol/L NaCl .

2 结果与讨论

2.1 在流动系统中蚕丝对蛋白质的吸附性能

一般情况下, 蛋白质在固相表面的吸附通常由静电作用力、疏水作用力或氢键等控制; 在特定情况下, 配位键合对某些蛋白质的吸附具有重要影响^[4]。蚕丝蛋白表面的官能团使其表面通常呈负电

性, 与蛋白质组分间的相互作用应以静电作用力为主. 考虑到生命样品(如生物体液)的酸度多处于中性附近的生理条件下, 因此本文只考察此条件下相关蛋白质的吸附与洗脱情况. 为方便起见, 选择所有样品溶液的酸度为二次去离子水的酸度, 即 $\text{pH} = 5.6$.

考察了经过表面处理与净化后的蚕丝蛋白对牛血清白蛋白(BSA)的吸附情况. BSA 是一种酸性蛋白, 其等电点 pI 为 4.7, 因此在水溶液中呈负电性而倾向于同蚕丝蛋白的表面负电性呈电排斥作用. 图 2(A) 表明, 将 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BSA 溶液通过蚕丝蛋白微填充柱后, 流出液中检测到的 BSA 的吸收信号与原始溶液的吸收信号没有差别(原始溶液的吸收信号通过阀位 8 将样品溶液直接引入检测池中测得), 表明蚕丝蛋白表面对 BSA 没有吸附. 当 2 mL 样品溶液流过填充柱以后, 用 1 mol/L NaCl 溶液对可能吸附或残留在微柱表面的 BSA 进行洗脱(此洗脱剂对蛋白质具有很强的洗脱能力), 在洗脱液中没有发现明显的 BSA 的吸收信号, 进一步证明了蚕丝蛋白不吸附 BSA 的实验结论. 由图 2(A) 可见, 在洗脱阶段可以明显地观察到由于 Schlieren 效应所引起的假峰, 这是由试样和载流抛物面形界面处折光率的差异而引起的.

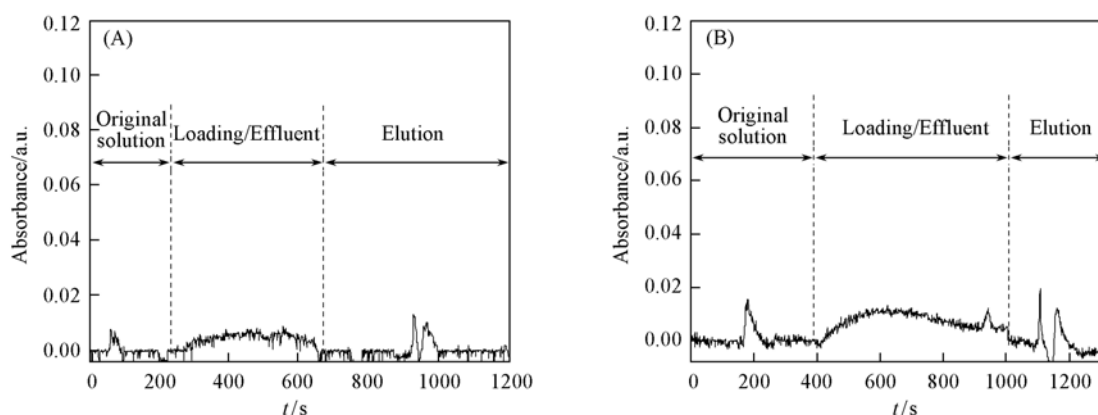


Fig. 2 Recorded signals for BSA (A) and hemoglobin (B) in aqueous solution during the separation/preconcentration and elution process

Sample volume: 2 mL; sample loading flow rate: $10 \mu\text{L}/\text{s}$; eluent volume: 200 μL ; elution flow rate: $15 \mu\text{L}/\text{s}$;
BSA/hemoglobin concentration: $25 \mu\text{g}/\text{mL}$; eluent: 1.0 mol/L NaCl.

而对于中性的血红蛋白而言, 其等电点 pI 为 7, 在中性或微酸性溶液中电性质表现不明显. 而且图 2(B) 的实验结果说明, 含有血红蛋白的溶液流过蚕丝蛋白微填充柱后, 流出液中蛋白质的浓度已基本保持不变, 排除了蚕丝蛋白表面对血红蛋白吸附的可能性. 之后用 1.0 mol/L NaCl 溶液对可能吸附或残留在微柱表面的血红蛋白进行洗脱, 没有得到明显的吸附信号.

对于另一种血红素蛋白, 即细胞色素 c, 其等电点 pI 为 10, 在微酸性及中性水溶液中呈正电性, 有利于与蚕丝蛋白表面的静电相互吸引. 实验结果表明, 本文所用的蚕丝蛋白微填充柱对细胞色素 c 具有优良的吸附性, 从而提供了将细胞色素 c 与血红素蛋白进行分离的途径.

本文的实验研究表明, 将 2 mL 微酸性或中性条件下的细胞色素 c 溶液(cyt-c 含量为 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$) 以一定流速通过蚕丝蛋白微填充柱以后, 细胞色素 c 可被完全吸附, 从而实现其与溶液中血红蛋白以及白蛋白的有效分离.

在流动系统中进行分离富集操作时, 通常需要特别关注吸附率和进样频率. 一般情况下, 较高的进样流速有利于提高样品通量, 但吸附率往往较低, 还可能由于产生流动阻力而导致吸附率的进一步降低. 因此, 多数情况下需要综合考虑相关因素而选择适当的折中条件. 本文在固定进样体积为 2 mL、洗脱体积为 200 μL 的条件下, 在 $2 \sim 20 \mu\text{L}/\text{s}$ 流速范围内考察了蚕丝蛋白微填充柱对 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 细胞色素 c 的吸附情况(图 3).

由图 3 可见, 当进样流速低于 $10 \mu\text{L}/\text{s}$ 时可实现细胞色素 c 的定量吸附. 虽然流速的增加导致吸附率略呈下降趋势, 但当流速为 $20 \mu\text{L}/\text{s}$ 时, 吸附率仍大于 96%. 考虑到进样频率的要求, 本文选择进样流速为 $10 \mu\text{L}/\text{s}$.

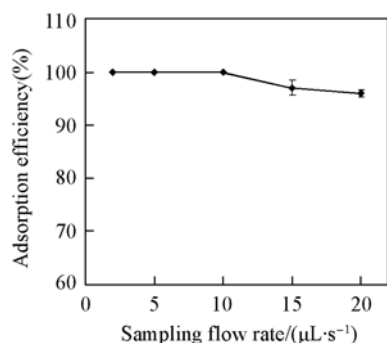


Fig. 3 Dependence of adsorption efficiency of cyt-c on the sampling flow rate

Sample volume: 2 mL; eluent volume: 200 μL ;
elution flow rate: 15 $\mu\text{L}/\text{s}$; cyt-c concentration:
5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; eluent: 1.0 mol/L NaCl.

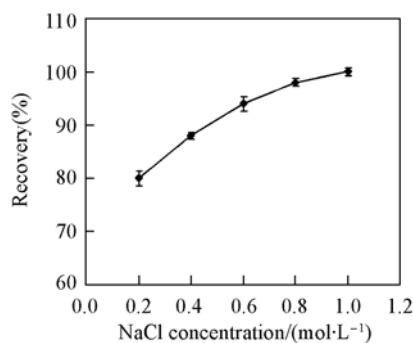


Fig. 4 Effect of NaCl concentration (ionic strength) on the elution efficiency of cyt-c

Sample volume: 2 mL; sample loading flow rate: 10 $\mu\text{L}/\text{s}$; eluent volume: 200 μL ; elution flow rate: 15 $\mu\text{L}/\text{s}$; cyt-c concentration: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.2 细胞色素 c 的洗脱与回收

2.2.1 离子强度对洗脱细胞色素 c 的影响 考虑到蛋白质与吸附剂固相表面的静电相互作用, 本文利用 NaCl 溶液作为洗脱剂可有效地破坏静电作用, 并实现对吸附的细胞色素 c 的洗脱回收. 以 200 μL 不同浓度的 NaCl 溶液洗脱吸附在蚕丝蛋白表面上的细胞色素 c, 结果如图 4 所示. 很显然, 较低的离子强度即可将大部分细胞色素 c 洗脱下来, 而且随着 NaCl 溶液浓度(离子强度)的增加, 细胞色素 c 与蚕丝表面间的静电引力减弱, 从而导致洗脱率增大. 当离子强度达到 1.0 mol/L NaCl 时, 洗脱率达到 100%. 继续增大离子强度有利于保持细胞色素 c 的高回收率, 但离子强度过大不利于后续的研究, 因此, 本文控制洗脱液的离子强度为 1.0 mol/L NaCl.

2.2.2 洗脱液流速及其体积对细胞色素 c 洗脱率的影响 实验结果表明, 当固定洗脱液体积为 200 μL 时, 洗脱流速在 5 ~ 25 $\mu\text{L}/\text{s}$ 范围内均可保持较高的回收率(高于 90%), 而且当流速低于 15 $\mu\text{L}/\text{s}$ 时即可对吸附的细胞色素 c 实现定量洗脱回收. 在实际操作中选择洗脱液流速为 15 $\mu\text{L}/\text{s}$.

将 2 mL 细胞色素 c 溶液(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 流过蚕丝蛋白微填充柱吸附后, 分别用 100, 200 及 300 μL 的 NaCl 溶液(1.0 mol/L) 洗脱, 所得到的相关洗脱率和富集倍率结果见图 5. 很显然, 当洗脱液体积为 100 μL 时, 洗脱液中回收的细胞色素 c 浓度较大, 对应较高的富集倍率, 但由于此时洗脱不完全, 洗脱率仅为 79%. 残留在微柱上的细胞色素 c 可能会影响后续操作, 故须引入二次洗脱以净化微填充柱. 当洗脱液体积为 200 和 300 μL 时, 洗脱率均为 100%, 而且洗脱液区带前端所含有的细胞色素 c 的浓度亦相同, 故以洗脱液区带中最高浓度计算所得到的富集倍率也保持不便. 实际操作中选择洗脱液的体积为 200 μL .

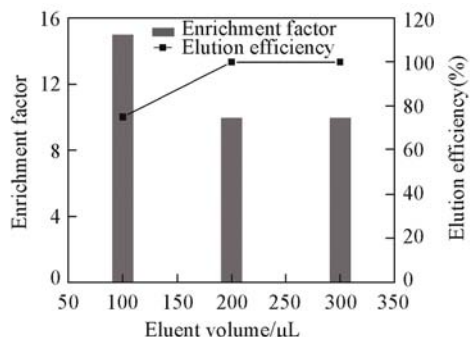


Fig. 5 Effects of eluent volume on the recovery and enrichment factor of cyt-c

Sample volume: 2 mL; sample loading flow rate: 10 $\mu\text{L}/\text{s}$; elution flow rate: 15 $\mu\text{L}/\text{s}$; cyt-c concentration: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; eluent: 1.0 mol/L NaCl.

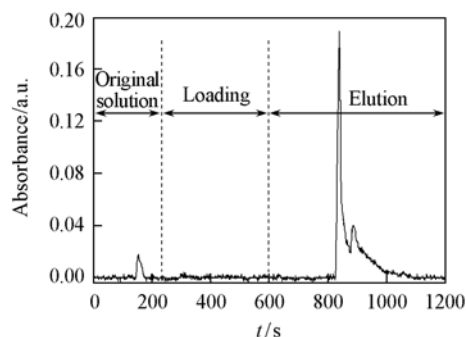


Fig. 6 Peak shapes recorded for standard cyt-c solutions during the online preconcentration process

Sample volume: 2 mL; sample loading flow rate: 10 $\mu\text{L}/\text{s}$; eluent volume: 200 μL ; elution flow rate: 15 $\mu\text{L}/\text{s}$; cyt-c concentration: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; eluent: 1.0 mol/L NaCl.

在上述实验条件下, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 细胞色素 c 溶液在线富集过程中的可见吸收峰形变化情况如图 6 所示. 可见, 在吸附(分离富集)过程中细胞色素 c 的吸收完全消失, 说明其已被蚕丝蛋白微填充柱定量吸附. 而在随后的洗脱过程中, 非常显著的洗脱信号一方面说明吸附的细胞色素 c 极易被 NaCl 溶液洗脱回收, 另一方面说明洗脱所得到的细胞色素 c 溶液的浓度较富集前原始溶液中的浓度显著提高.

2.3 方法的分析性能与实际应用

本方法除了可用于细胞色素 c 的分离富集, 同时亦可对溶液中的细胞色素 c 进行测定. 综合前述实验条件, 文中所用的蚕丝蛋白微填充柱对 2 mL 溶液中 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度水平的细胞色素 c 的吸附率为 100%. 同时, 200 μL 洗脱液(1.0 mol/L NaCl 溶液)可定量回收被吸附的细胞色素 c, 此时对应的富集倍率为 10. 适当增加样品溶液体积或减少洗脱液体积可在一定范围内提高富集倍率. 根据上述实验参数建立的测定细胞色素 c 的方法线性范围为 1.0 ~ 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 线性回归方程(标准曲线)为 $A = 0.0307c + 0.0123$. 方法的检出限为 0.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 精密度 RSD 为 2.5% (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $n = 9$), 进样频率为 6 h^{-1} . 进一步研究表明, 蚕丝蛋白表面对细胞色素 c 的吸附容量为 19 mg/g(吸附容量由穿透曲线得到). 在本文实验条件下, 蚕丝蛋白微填充柱的效率在连续 100 次吸附-洗脱操作后未发生明显变化.

在最佳实验条件下重复测定 9 次, 记录得到的峰形如图 7 所示. 用 SDS-PAGE 凝胶电泳对所提取的样品纯度进行检测, 积层胶和分离胶的质量分数分别为 5% 和 12%, 电泳后的凝胶经考马斯亮蓝染色/脱色后的凝胶照片如图 8 所示. 可见第 4 条带中用本法分离得到的细胞色素 c 溶液与第 5 条带中标准细胞色素 c 溶液的出峰位置一致(分子量 14300), 并且经本法处理后的细胞色素 c 溶液的电泳图谱中无杂条带出现.

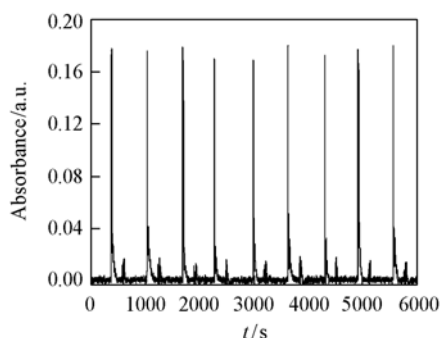


Fig. 7 Recorded peak shapes for 9 successive operations

Sample volume: 2 mL; sample loading flow rate: 10 $\mu\text{L}/\text{s}$; eluent volume: 200 μL ; elution flow rate: 15 $\mu\text{L}/\text{s}$; cyt-c concentration: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; eluent: 1.0 mol/L NaCl.

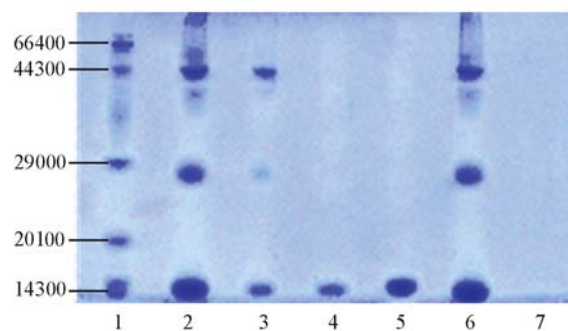


Fig. 8 SDS-PAGE electrophoretogram

Lanes: 1: marker; 2: 150-fold diluted human whole blood with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cyt-c; 3 and 4: the effluent and eluate respectively after sample 2 passing through the micro-column; 5: a cyt-c solution of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 6: 150-fold diluted human whole blood without cyt-c; 7: the eluate after sample 6 passing through the micro-column.

由于全血中细胞色素 c 的含量很低, 用 SDS-PAGE 法难以检验, 因此, 本文选择先在全血样品中加入一定量的细胞色素 c, 然后进行电泳实验. 由于细胞色素 c 与血红蛋白的条带位置相同, 因此应首先排除血红蛋白对细胞色素 c 的干扰. 在本实验条件下, 血红蛋白不被蚕丝蛋白吸附, 这一点可由第 7 条带证明, 即全血稀释 150 倍后用蚕丝蛋白处理, 其洗脱液中在分子量 14300 位置处未发现任何条带, 说明条带 6 中的血红蛋白经过蚕丝蛋白处理后已被完全去除. 因此条带 4 中分子量 14300 处只能是细胞色素 c.

3 结 论

利用蚕丝蛋白对细胞色素 c 的选择性吸附建立了将其从复杂样品系统(全血)中分离出来的方法, 同时可以实现细胞色素 c 与血红蛋白之间的分离. 蚕丝蛋白表面除可作为分离富集的媒介, 其优良的生物相容性更适用于对生物大分子进行分离富集. 在顺序注射系统中进行在线操作有效降低了样品和试剂消耗, 提高了分离富集率. 另外, 蚕丝蛋白表面疏松, 在流动系统中操作时流动阻力不明显, 增

加了微填充柱的使用寿命。本实验系统完全避免了有机溶剂的使用,有利于分析方法的绿色化。

参 考 文 献

- [1] Miller T. J. , Knapton A. , Adeyemo O. , *et al.* . J. Appl. Toxicol. [J] , 2008 , **28** : 815—828
- [2] Wang F. , Ma R. D. , Yu L. . J. Cancer Chemoth. Pharm. [J] , 2006 , **57** : 389—399
- [3] Weiss H. , Kolb H. . J. Eur. J. Biochem. [J] , 1979 , **99** : 139—149
- [4] Cheng D. H. , Chen X. W. , Shu Y. , *et al.* . Talanta [J] , 2008 , **75** , 1270—1278
- [5] Wang W. , Vignani R. , Scali M. , *et al.* . Anal. Biochem. [J] , 2004 , **329** : 139—141
- [6] Roper M. G. , Frisk M. L. , Oberlander J. P. , *et al.* . Anal. Chim. Acta [J] , 2006 , **569** : 195—202
- [7] Kappler T. E. , Hickstein B. , Peuker U. A. , *et al.* . J. Biosci. Bioeng. [J] , 2008 , **105** : 579—585
- [8] Hu C. C. , Wang S. Y. , Li C. L. , *et al.* . J. Chem. Eng. Jpn. [J] , 2006 , **39** : 1283—1290
- [9] Pitio O. , Folley L. , Vijayalakshmi M. A. . J. Chromatogr. B [J] , 2001 , **758** : 163—172
- [10] Hwang T. S. , Lee J. H. . Polym-Korea [J] , 2002 , **26** : 415—421
- [11] Bao J. , Chen W. , Liu T. T. , *et al.* . ACS Nano [J] , 2007 , **1** : 293—298
- [12] Gu H. W. , Xu K. M. , Xu C. J. , *et al.* . Chem. Commun. [J] , 2006 , **9** : 941—949
- [13] Xu F. , Wang Y. J. , Wang X. D. , *et al.* . Adv. Mater. [J] , 2003 , **15** : 1751—1753
- [14] Shukoor M. I. , Natalio F. , Tahir M. N. , *et al.* . Chem. Commun. [J] , 2007 , **44** : 4677—4679
- [15] Han R. F. , Xing X. C. , Wang Y. , *et al.* . J. Chromatogr. B [J] , 2008 , **873** : 113—118
- [16] Du Z. , Yu Y. L. , Chen X. W. , *et al.* . Chem-Eur. J. [J] , 2007 , **13** : 9679—9685
- [17] Du Z. , Yu Y. L. , Yan X. R. , *et al.* . Analyst [J] , 2008 , **133** : 1373—1379
- [18] DU Zhuo(杜卓) , ZHANG Na(张娜) , WANG Jian-Hua(王建华) . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J] , 2008 , **29**(5) : 902—905
- [19] Asakura T. , Yao J. M. , Yang M. Y. , *et al.* . Polymer [J] , 2007 , **48** : 2064—2070
- [20] Chang S. K. , Eun H. G. , In C. U. , *et al.* . J. Membrane Sci. [J] , 2007 , **302** : 20—26

Adsorption and Separation of Cytochrome c on Silk Fibroin

CHEN Ming-Li , YAN Xiao-Rui , WANG Jian-Hua *

(Research Center for Analytical Sciences , Northeastern University , Shenyang 110004 , China)

Abstract Selective adsorption of cytochrome c using silk fibroin as adsorbent was observed under certain experimental conditions. A novel separation and preconcentration approach for cytochrome c was thus developed *via* a silk fibroin packed micro-column in a sequential injection system. The entire process of separation and elution was monitored by spectrophotometry at 410 nm. At pH 5.6, cytochrome c in 2 mL of aqueous solution at 5 g/mL were quantitatively adsorbed by the silk fibroin micro-column, and a NaCl solution of 1.0 mol/L suffices the complete elution of the adsorbed cytochrome c from the micro-column. An enrichment factor of 10 was achieved by fixing a sample volume of 2 mL and an eluent volume of 200 μ L. A linear calibration graph within 1.0—10.0 μ g/mL cytochrome c was obtained with a detection limit of 0.33 μ g/mL and a precision (RSD) of 2.5% (5 μ g/mL, $n=9$). The practical applicability of this system was demonstrated by processing human whole blood for preconcentration of cytochrome c, and the results were verified by assay with SDS-PAGE.

Keywords Silk fibroin; Solid phase extraction; Cytochrome c

(Ed. : A, G)