

空间排斥色谱法在酶学中的应用的研究进展

陈 朋

(甘肃省商业科技研究所 兰州 730020)

摘要:空间排斥色谱法是一种高分子聚合物的柱分级分离技术,通过这种方法可以使柱中溶解的聚合物分子按其大小被分离。空间排斥色谱法在生物化学、高分子化学、无机化学、医学、临床等领域内得到了广泛的应用。本文对空间排斥色谱法的发展历程、基本原理、常用凝胶的性质等进行了详尽的论述。着重介绍了空间排斥色谱法在酶的脱盐、酶溶液的浓缩、酶的分离与纯化、酶的分子量测定中的应用,它已成为测定高聚物分子量分布的重要工具。最后指出空间排斥色谱法结合其它检测器将代替传统空间排斥色谱法,加速空间排斥色谱法不断向快速、高效方向发展。

关键词:空间排斥色谱法;凝胶色谱法;酶学

中图分类号:Q55 **文献标识码:**A

Research Advances of Steric Exclusion Chromatography in Application of Enzymology

CHEN Peng

(Commercial science and technology institute of Gansu province, Lanzhou 730020, Gansu, China)

ABSTRACT: Steric exclusion chromatography (SEC) is a technology of column graded separation for high polymer, with which the soluted polymer in column can be separated according to the difference of molecular weight. Steric exclusion chromatography, such as biochemistry, macromolecule chemistry, abiochemistry, medicine and clinic, and so on, was widely used. In this paper, the development and principle of steric exclusion chromatography and the Gel characters were expounded carfully, especially the application of steric exclusion chromatography in the dissalt, separation, inspissation and purification of enzyme and molecular weight determination were reviewed. Finally, it points out that steric exclusion chromatography integrated with detector will replace traditional steric exclusion chromatography gradually to speed up auto development towards speediness and high efficiency.

Key words: Steric Exclusion Chromatography; Gel Chromatography; Enzymology

前言

生命活动离不开酶的催化作用,生物体内的各种化学反应几乎都是在酶的催化下进行的^[1]。自 1926 年^[2],美国生化学家 James B. Sumner 从刀豆中分离纯化得到第一个脲酶结晶以来,酶的研究工作进展迅速,在陆续发现的二千多种酶中,科学家已经成功的将 300 多种酶制成结晶,达到了相当高的纯化程度,在对酶的不断探索研究的同时,产生了多种类型的研究技术方法中,空间排斥色谱法是目前最为常用的研究技术之一。

空间排斥色谱法 (Steric Exclusion Chromatography, SEC), 又称为立体排斥色谱法或凝胶色谱法,是三十年前才发展起来的一种新型液相色谱分离技术之一。SEC 是指使用凝胶为固定相的色谱法,它是靠高分子样品的分子尺寸与凝胶的孔径间的关系即渗透系数差别而分离的^[3]。按流动相的性质不同分为:使用水溶液作为流动相的凝胶色谱法称为凝胶过滤色谱法(Gel Filtration Chromatography; GFC),多用于分析水溶性样品;而使用有机溶剂作为流动相的凝胶色谱法称为凝胶渗透色谱法(Gel

Permeation Chromatography; GPC),多用于分析脂溶性样品。本文介绍了空间排斥色谱法的发展历程、基本原理、常用凝胶的性质等,着重介绍空间排斥色谱法在酶的脱盐、酶溶液的浓缩、分离纯化、分子量测定中的应用。

1 空间排斥色谱法概述

1.1 空间排斥色谱法的发展历程

凝胶过滤色谱是六十年代初发展起来的快速而简便的分离技术^[4]。由于设备简单、操作方便,不需有机溶剂,对高分子物质有很高的分离效果,从而快速的成为现代色谱法中的不可或缺的一员。二十世纪六十年代 J.C. Moore 在总结了前人经验的基础上,结合大网状结构离子交换树脂制备的经验,将高交联度聚苯乙烯凝胶用作柱填料,同时配以连续式高灵敏度的示差折光仪,制成了快速且自动化的高分子物质分子量及分子量分布的测定仪,从而创立了液相色谱中的凝胶渗透色谱技术。1979 年, Wehr CT 等人^[5]在改进原有分离柱,设计了两种不同气孔的柱型: 2000SW 和 3000SW。分离纯化了核酸和蛋白质,发现改进后的柱型,分离速度和效果有明显提高,从而实现了高速分离生物大分子。随着 SEC 色谱技术的逐步改进, SEC 日

作者简介:陈朋,(1977-),男,硕士,主要研究方向:生物工程技术

E-mail: Shendeng2005@163.com

(收稿日期:2006-08-25 接受日期:2006-09-30)

前可与多种结合各种新型检测器(如UV、FT-IR、LS、Viscometer等),分析多肽、蛋白、生物酶、寡聚核苷酸、多聚核苷酸、多糖等多种生物样品,成为当代科技发展不可或缺的分析手段之一。

1.2 空间排斥色谱法的原理概论

空间排阻色谱法(SEC)原理主要是利用具有一定孔径分布的多孔填料的网状结构凝胶分子筛的作用,将不同分子量的物质就按分子量从大到小的次序流出而得到分离(图1)^[6]。

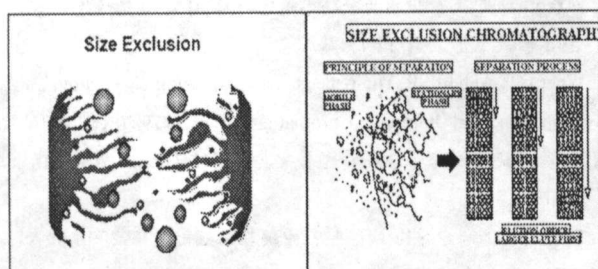


图1 空间排斥色谱的分离

Fig.1 Separation of Steric Exclusion Chromatography

1.3 空间排斥色谱法常用的凝胶

空间排阻色谱法对于凝胶有一定要求,一般要求凝胶具有惰性,与溶质分子不发生任何作用;离子基团含量低,孔径大小要均一,选择范围要宽和机械强度要高^[7]。常用的凝胶有如下几种:

1.3.1 交联葡聚糖凝胶(Sephadex)

这种凝胶是以葡聚糖凝胶为原料,交联剂为环氧氯丙烷,在碱性条件下制成三维网状结构 Sephadex, Sephadex G-10 至 G-200 共有 8 种。该种凝胶具有稳定性好,水中溶胀快, pH3~10 可以应用的特点。

1.3.2 交联琼脂糖凝胶(Sepharose)

交联琼脂糖凝胶是琼脂为原料经过精制、交联而成交联琼脂糖凝胶(Sepharose),瑞典 Pharmacia Fine Chemicals 商品名为 Sepharose CL-2B、CL-4B、CL-6B 等产品。交联琼脂糖凝胶的优点为多孔、流动性好、分离稳定性好、适于高温 110℃~120℃ 灭菌操作。

1.3.3 聚丙烯酰胺凝胶

聚丙烯酰胺凝胶是丙烯酰胺与交联剂 N,N'-甲叉双丙烯酰胺聚合而成的网状高分子物质,常用的聚丙烯酰胺凝胶如下。聚丙烯酰胺凝胶具有机械强度高、有弹性、透明、有较好的热稳定性和化学稳定性,是一种非离子型凝胶,故在酶和蛋白质纯化中得到广泛应用。

2 空间排斥色谱法在酶学中的应用

2.1 作为酶的脱盐工具

在酶的逐级分离过程中,一般首先采用盐析法对含有酶溶液的样品进行粗分离,在用盐析沉淀分离后,需要将酶蛋白中的盐除去,常用的办法是透析,即把酶溶液装入透析袋内,用缓冲液进行透析,并不断的更换缓冲液,但是透析所需时间较长,

需要反复多次进行,而样品中的盐离子也不能完全去除。

与采用透析带的透析法脱盐相比较,使用葡萄糖凝胶 G-25 或 G-50 过柱的 SEC 法除盐的速度更快,酶类成分在分离过程中不易变性^[8,9],除盐效果也较好。葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 因流动阻力小,交联度适宜,常用于酶溶液的脱盐。在进行酶样品的脱盐时应先使用含有挥发性盐类,如甲酸铵、醋酸铵等缓冲液使层析柱平衡,然后加入样品并用同种缓冲液洗脱,取得洗脱液后再用冷冻干燥法除去挥发盐类。

2.2 酶溶液的浓缩

酶的浓缩有很多方法。大致有超滤法,沉淀法和透析法。超滤比较温和,对酶不会有修饰和改变,酶的种类一般不会有丢失。它的缺点是总样品的量可能会减少(被膜所吸附)。另外超滤对样品的要求比较高。沉淀法比较快速,容易操作,对盐、甘油,去垢剂的耐受性好。缺点是可能会有部分种类的蛋白没有被沉淀下来(丢失)。沉淀法中,又以 TCA 法最为普遍使用。使用 TCA 法时,一定要用冷的纯丙酮清洗蛋白沉淀两次,去处残留的 TCA 和其他沉淀下来的杂质。透析法只使用于量比较大的样品,量小时,操作困难。

相比这三种方法而言,SEC 法更加方便与快速,而且对样品在浓缩前后性质不会造成影响。在干燥的葡聚糖凝胶颗粒内部,有大量的孔隙。当把干燥的凝胶颗粒投入到稀的酶溶液中时,水和分子量低的物质就会进入凝胶粒子内部的孔隙,直到充满为止,而高分子物质则排阻于凝胶颗粒之外,因此经过十几分钟后通过离心或过滤就可分离出膨胀的凝胶颗粒,得到浓缩的酶溶液,其中的离子强度和 pH 值都能保持不变^[10]。

2.3 酶的分离纯化

酶的分离纯化属于生物技术的下游工程(Down stream process),是提高酶产品获得率的关键^[11]。在酶制剂的应用中,一般工业用的酶,往往采用液体粗酶液即可;然而,应用于医药、生化级的酶液必须进行纯化,酶的纯化的目的主要是把粗酶液制备成纯度高的酶制品。在应用凝胶渗透色谱法对于酶的提纯中,可以使酶的提纯倍数成倍提高,同时使酶的纯度也相应提高^[12]。Aich S 等^[13]对大肠杆菌表达的 β -葡萄糖苷酸酶的分离纯化中使用 SEC 对酶进行分离纯化,最终获得 23mg 的高纯度的 β -葡萄糖苷酸酶。Magalhaes A 等^[14]在分离纯化两种蛇毒凝血酶 TLE-B 和 TLE-P,通过逐步提纯,使用 SEC 分离纯化蛇毒凝血酶,获得了高纯度的酶。

2.4 测定酶的分子量

用一系列已知分子量的标准样品放入同一凝胶层析柱内,令其在同一条件下进行凝胶层析分离,记下每一种成分的洗脱体积,并以洗脱体积对分子量的对数作图,在一定分子量范围内可得到一条直线,这就是分子量的标准曲线,测定未知酶的分子量时,可将此样品加在测定了标准曲线的凝胶柱内,洗脱后根据此样品的洗脱体积,可以在标准曲线上查出它的分子量。用这种方法测定酶的分子量具有不需复杂的仪器设备,操作简便,样品用量少的优点^[15]。如图 2 所示。

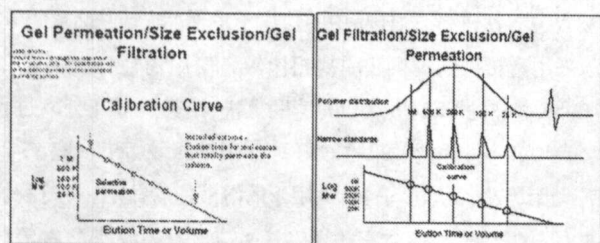


图 2 测定酶的分子量

Fig.2 Determination of molecular weight of enzyme

Albo F 等^[14]在水解神经肽临床治疗研究中,使用 SEC 测定神经肽激活酶的表观分子量来判断治疗效果,为临床治疗提供了依据。刘艳群等^[16]使用示差折光检测仪及凝胶渗透色谱系统,直接测定了葡聚糖的相对分子量及相对分子量分布,优化了色谱操作条件,证明凝胶渗透色谱是监控淀粉酶解反应程度的一种有效手段。林鹏凌等^[17]采用 SEC 与 ShodexKD-802、5、KD-803、KD-804、KD-805 凝胶柱 4 柱串联,二甲基甲酰胺作流动相,用示差折光检测器测定聚氨酯树脂的平均相对分子量。陈轶兰等^[18]用高效凝胶渗透色谱法测定多糖的分子量。陶惠芬等^[19]用凝胶渗透色谱法测定四氯乙烯-丙烯共聚物的分子量和分子量分布。晨光化工研究院九室^[20]采用凝胶渗透色谱法测定聚碳酸酯的分子量分布。目前测定生物大分子、多聚物多采用此 SEC 测定分子量及分布。

2.4 分级筛选获得纳米级酶制剂

使用 SEC 法分级筛选相同大小的生物酶制剂,不但可以获得纳米级的酶产品,而且可以鉴别分离获得的样品分子的均匀性。1993 年, T. Siebrands 等人^[21]使用 25 μ m 的二氧化硅填充柱分离获得了不同等级大小的 3nm-20nm 的纳米胶体金,使用该方法用于酶的大小测定及等级分配,可以分离获得不同级别大小的纳米级酶制剂。用于临床特殊治疗。任东文等^[22]运用凝胶渗透色谱研究了脱乙酰度及相对分子量分布相似,分析检测了壳聚糖材料在降解过程中的重均相对分子量,相对分子量多分散性和相对分子量分布的变化。发现聚合单元为随机分布的壳聚糖样品,其降解是均匀的;而聚合单元为段状分布的壳聚糖样品,其降解是非均匀的;表明其聚合单元的分布方式决定壳聚糖材料酶降解过程的均匀性。

3 展望

三十多年来,空间排斥色谱法的理论、实验技术和仪器的性能等方面有了突飞猛进的发展。随着各种生命科学的发展,人们对生命的不断探索,生物活性大分子的分离和纯化工作显得尤为重要,空间排斥色谱法现已广泛应用生物酶、寡聚核苷酸、多聚核苷酸、多糖、多肽、蛋白质及其它生物活性大分子的分离和纯化工作,成为科研和生产中不可缺少的项目之一。另外,空间排斥色谱法还广泛用于研究生物活性大分子的其它性质,组成分布等方面。

作为一种经典的、常用的色谱技术,空间排斥色谱法在生物化学、高分子化学、无机化学、医学、临床等领域获得了越来越广泛的应用。面对 21 世纪的生命科学、基因工程、生物工程

等学科的需要,它将推动色谱学向前发展,同时色谱学也将由于多种色谱技术自身的完善以及其它诸多学科技术的融入,更加飞速的发展。

参考文献

- [1] 周爱儒.生物化学[M].北京:人民卫生出版社,2000:49-50
- [2] James B. Sumner The isolation and crystallization of the enzyme urease[J]. Journal of Biological Chemistry 1926 69: 435-441
- [3] 孙毓庆.现代色谱法及其在医药中的应用[M].北京:人民卫生出版社,1998:159-162
- [4] 刘晓瑞,杨文容.聚合物的凝胶渗透色谱法[J].哈尔滨师范大学自然科学学报,2001,(03):12-15
- [5] Wehr CT, Abbott SR. High-speed steric exclusion chromatography of biopolymers[J]. Journal of Chromatography A,1979,20,185:453-462
- [6] 成跃祖.凝胶渗透色谱法的进展及其应用[M].北京:中国石化出版社,1993.5:1-6
- [7] 彭志英.食品酶学导论[M].北京:中国轻工业出版社,2002:80-84
- [8] 中山大学生物系生化微生物学教研室编.生化技术导论[M].北京:人民教育出版社,1978:56-60
- [9] 熊振平.酶工程[M].北京:化学工业出版社,1986
- [10] 张树政,孟广震,何忠效.酶学研究技术(上册)[M].北京:科学出版社,1987
- [11] 梁世中编译.生物分离技术[M].广州:华南理工大学出版社,1995
- [12] 孙颖.灵芝中肽类化合物及生物活性研究[M].华中农业大学,2001
- [13] Aich S.; Delbaere L.T.J.; Chen R.Expression and purification of Escherichia coli beta-glucuronidase[J]. Protein Expression and Purification. 2001,22(1):75-81
- [14] Magalhaes Arinos, Ferreira Rodrigo N, Richardson Michael. et al. Coagulant thrombin-like enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (Lachesis muta muta) snakes [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2003 Oct;136(2):255-266.
- [15] Federica Albo, Riccardo Antonangeli, Antonella Cavazza. et al. Different effects of steroidal therapy on neuropeptide-active enzymes in male and female human saliva [J]. Neurochemical Research, 2002 Sep,27(9):919-930
- [16] 刘艳群,刘钟栋,罗宣德,等.凝胶渗透色谱法检测淀粉酶解产物相对分子量及其分布 [J]. 河南工业大学学报(自然科学版),2005,(5):13-16
- [17] 林鹏凌,杜爱琴,邹华彬.凝胶渗透色谱法测定聚氨酯树脂的平均相对分子量[J].化学分析计量,2005,(03):18-21
- [18] 陈轶兰,王友茹,马立人.用高效凝胶渗透色谱法测定多糖分子量[J].军事医学科学院院刊,1988,(01):21-23
- [19] 陶惠芬,马建平.用凝胶渗透色谱法测定四氯乙烯-丙烯共聚物的分子量和分子量分布[J].化学世界,1984,(11):5-7
- [20] 晨光化工研究院九室.凝胶渗透色谱法测定聚碳酸酯的分子量分布[J].塑料工业,1976,(01):7-8
- [21] T. Siebrands, M. Giersig, P. Mulvaney. et al. Steric Exclusion Chromatography of Nanometer-Sized Gold [J]. Particles. Langmuir 1993,9:2297-2300
- [22] 任东文,衣洪福,谢威扬等.凝胶渗透色谱法研究壳聚糖生物材料酶降解过程的均匀性[J].色谱,2006,24(4):407-410