

以改善蛋白质的分离特性 ;Cascone 等人^[6]采用 PEG-磷酸体系 ,发现 NaCl 对牛血清清蛋白的分配系数几乎没有影响.

对 BSA 在双水相体系中分配特性的研究 ,国内尚未见报道.

1 材料与方法

1.1 材料

聚乙二醇 相对分子质量 6 000 ;牛血清清蛋白 Sigma 公司产品 ;其它试剂均为分析纯.

1.2 仪器

721 分光光度计 ;LD4-2A 型离心机.

1.3 方法

1.3.1 双水相体系的制备 对所采用的双水相体系 ,按计算移取一定体积的 PEG 原液和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 原液于 5 mL 离心试管中 ,再加入一定量的 BSA 原液 .当需加盐时 ,可加一定量的固体 NaCl .所有试剂加完后 ,用去离子水稀释至 5 mL ,混匀后 ,置于室温下一定时间 ,然后用 1 500 r/min 离心机离心 10 min ,制得两相.

1.3.2 分配系数的测定 将所制得的两相 ,用微型取样器取一定量的上、下相液 ,用考马斯亮蓝 G250 染色法^[7]测上、下相 BSA 浓度 ,实验过程中同时读取分相后上、下相的成相体积.

2 结果与讨论

2.1 成相浓度对 BSA 分配特性的影响

保持 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度 140 g/L 不变 ,移取 BSA 原液 1 mL ,温度 20 ℃ ,改变 PEG 质量浓度 ,结果如表 1 .可见随 PEG 增量浓度的增加 ,相体积比逐渐增加 ,即上相含水量逐渐增多 ;BSA 的分配系数却随之降低 .可解释为 BSA 和上相 PEG 都是大分子 ,大的空间结构使彼此产生排斥作用 ,PEG 质量浓度越高 ,对 BSA 的排斥作用越大 ,因而上相 BSA 浓度越低 ,分配系数也就越低 ,但由于随 PEG 浓度的增高 ,上相含水量逐渐增大 ,下相体积逐渐降低 ,BSA 富集于下相的总量几乎不变 , L_b 在 91% ~ 94% 之间 .实验中发现 PEG 质量浓度越高 ,溶液粘度越大 ,致使分相困难 ,因此以后实验 PEG 质量浓度均采用 100 g/L .

保持 PEG 质量浓度 100 g/L 不变 ,移取 BSA 原液 1 mL ,温度 20 ℃ ,改变 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度 ,实验结果见表数据

表 1 PEG 质量浓度变化对 BSA 分配的影响*

Tab. 1 The effect of PEG concentration on BSA Partition

PEG 质量浓度/(g/L)	V_t/V_b	K	$L_b/\%$
60	0.25	0.246	94.2
80	0.39	0.237	91.5
100	0.43	0.227	91.1
120	0.56	0.158	91.9
140	0.61	0.133	92.5
160	0.79	0.103	92.4

注 : V_t 上相体积 ; V_b 下相体积 ; K 分配系数 ,即 BSA 在上、下相质量浓度比 ; L_b 下相 BSA 质量与 BSA 总质量之比 ,即下相 BSA 收率.

表 2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度变化对 BSA 分配的影响

Tab. 2 The effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration on BSA partition

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度/(g/L)	V_t/V_b	K	$L_b/\%$
80	不成相		
100	不成相		
120	0.56	0.135	93.0
140	0.53	0.227	91.1
160	0.37	0.246	91.7
180	0.34	0.274	91.3

由表 2 可见 :保持 PEG 质量浓度不变 ,分配系数随 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度的增加而增加 ,可能是因为随 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度的增加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对 BSA 的盐析作用加强 ,使 BSA 分配于上相的量增加 ,但相体积比却随之减少 ,BSA 在下相的收率 L_b 值几乎没什么变化 .综合上述实验结果 ,虽然分配系数 K 随 PEG、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度而变化 ,但其值较小 , $K=0.1\sim 0.3$,即 BSA 适合分配于盐相 ,可能的原因除了 BSA 与 PEG 大分子结构的空间排斥作用外 ,BSA 还可能与硫酸铵盐离子间的电荷和极性基团间相互吸引 ,因而产生较高的盐溶作用^[8] .

在对柠檬酸盐、磷酸盐作下相的实验中 ,得到相同的结论 .后面的实验采用适宜的成相质量浓度分别为 :PEG 100 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 120 g/L ,柠檬酸三钠 140 g/L 磷酸钾 140 g/L .

2.2 加入添加剂对 BSA 分配的影响

向不同盐体系中加入水溶性溶剂丙酮和乙醇 ,结果如表 3 所示 ,两种有机溶剂的质量分数对 BSA 的分配系数没有明显的影响 ,另外上、下相体积比也影响甚微 .

表3 有机溶剂对 BSA 分配系数的影响

Tab.3 The effect of organic solvent on BSA partition coefficient

相系	溶剂体积分数/(mL/L)					
	丙酮			乙醇		
	0	20	50	0	20	50
PEG-硫酸铵	0.162	0.155	0.155	0.162	0.166	0.166
PEG-柠檬酸钠	0.157	0.158	0.189	0.157	0.107	0.100
PEG-磷酸钾	0.126	0.133	0.128	0.126	0.105	0.139

2.3 外加盐 NaCl 对 BSA 分配的影响

NaCl 是最常用的研究盐效应影响分配特性的一种试剂. 实验中, 分别向 6 支刻度离心试管中加入 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 g 固体 NaCl, 加入 BSA 原液 1 mL, 结果如图 1、图 2 所示.

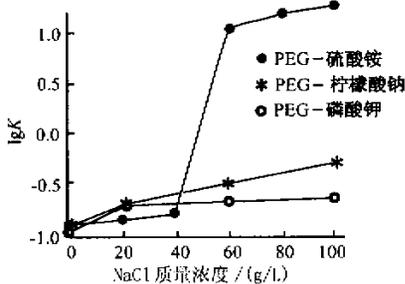


图1 外加 NaCl 对 BSA 分配系数的影响

Fig.1 The effect of NaCl on BSA partition coefficient

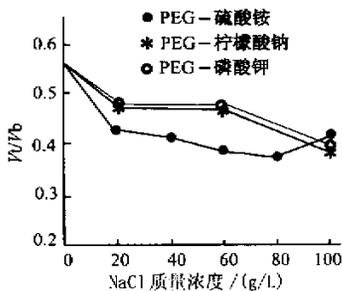


图2 外加 NaCl 对上、下相体积比的影响

Fig.2 The effect of NaCl on the volume ratio of top and bottom phases

外加 NaCl 对不同盐系影响结果不同. 对 PEG-硫酸盐体系, 当 NaCl 质量浓度在 0~40 g/L 范围时, 分配系数逐渐增加, 增加幅度不大; 但当 NaCl 质量浓度超过 60 g/L 时, 分配系数显著增加, 大于 10, 即此时 BSA 富集于上相. 同时发现: 随 NaCl 质量浓度的升高, 上相表层聚集的泡沫越来越多, 泡沫经分析是 BSA, 可能是因为 NaCl 的加入, 使下相的 BSA 发生盐析作用, 因此 BSA 趋向分配于上相, 随 NaCl 质量浓度的增加, BSA 在下相的盐析作用加

剧, 分配于上相的量越来越多, 但由于 BSA 在 PEG 上相的溶解度是有限的, BSA 又具有表面活性, 因此过量的 BSA 分布于上相表层. 对于 PEG-柠檬酸盐和 PEG-磷酸盐体系, 随 NaCl 质量浓度的增高, 分配系数虽有增加, 但不明显, 可能是由于柠檬酸盐和磷酸盐都是碱性盐, 下相溶液的 pH 值距离 BSA 的等电点 ($pI = 4.9$) 较远, 带负电荷的 BSA 在这两种相系中有较高的溶解度, 使 NaCl 的盐析效应不明显; 而 $(NH_4)_2SO_4$ 是酸性盐, 形成的盐相更接近 BSA 的等电点, 这样 NaCl 就容易产生较强的盐析效应, 分配特性发生明显的变化. 图 2 可见, 随 NaCl 浓度的升高, 上、下相体积比成降低趋势, 3 种盐系的相体积变化结果相似.

2.4 起始 BSA 总质量浓度对分配特性的影响

从上面的实验发现 PEG-硫酸铵体系的成相区域较宽, NaCl 对其影响也较敏感, 因此下面的实验仅采用 PEG-硫酸铵体系. 分别向 7 支 5 mL 刻度离心试管中加入 1 g/L 的 BSA 2.00, 1.75, 1.50, 1.25, 1.00, 0.75, 0.50 mL, 制成 BSA 的起始总质量浓度分别为 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 mg/L, 7 个实验点, 得到如图 3 所示的关系曲线.

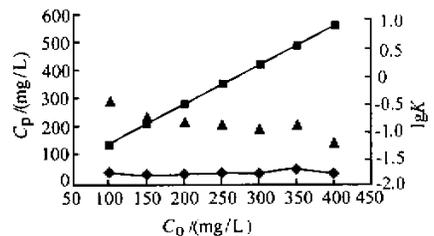


图3 上、下相浓度及分配系数与 BSA 总浓度的关系

Fig.3 The concentrations of top and bottom phases and partition coefficient in relation to the overall BSA concentration

实验中还发现起始质量浓度的变化对相体积比影响很小, 在 0.52~0.57 范围内变动. BSA 在上相浓度 C_t 可用“饱和型”曲线²表示:

$$C_t = \frac{C_m C_o}{C_s + C_o} \quad (1)$$

式中, C_o 是 BSA 在两相体系中的总质量浓度; C_m 是 BSA 在上相的最高质量浓度(受限于溶解度); C_s 是类似于热力学平衡常数, 其值等于上相浓度为 C_m 的一半时的 C_o 值. 当 $C_o > C_s$ 时, $C_t = C_m$; 当 $C_o \ll C_s$ 时, C_t 与 C_o 呈线性关系, 斜率为 C_m/C_s . 将实验数据用方程(1)来关联, 得到: $C_m = 58.73 \text{ mg/L}$, $C_s = 72.83 \text{ mg/L}$. 因此平衡时上相 BSA 质量浓度随总质量浓度的关联式为:

$$C_t = \frac{58.73 C_o}{72.83 + C_o} \quad (2)$$

下相浓度采用线性方程可得到较好的拟合效果,关系式为:

$$C_b = 1.44 C_o \quad (3)$$

利用方程(2)(3)计算分配系数 K 为:

$$K = \frac{C_t}{C_b} = \frac{40.81}{72.83 + C_o} \quad (4)$$

将方程(4)画成图 4 所示曲线,并与实验数据比较,可见方程(4)能较好地表达实验结果.

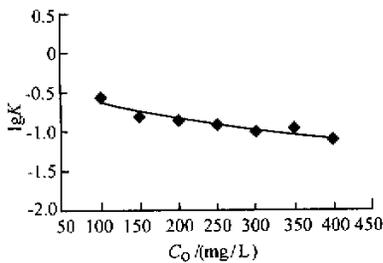


图 4 分配系数的模型方程曲线与实验点的比较

Fig. 4 Partition coefficient comparison of model equation with experiment data

3 结 论

1) 在由 PEG 与 3 种盐组成的双水相体系中,牛血清清蛋白更易分配于下相.

2) 加入水溶性有机溶剂丙酮和乙醇对 BSA 的分配特性几乎没有影响.

3) 外加 NaCl 对 BSA 在 PEG-硫酸盐体系中的分配特性产生很大的影响,随 NaCl 质量浓度的增加,BSA 由适宜分配于下相变成适宜分配于上相,部分 BSA 分布于上相表层.对 PEG-柠檬酸盐、PEG-磷酸盐的影响较小.

4) 对 PEG-硫酸铵体系,改变起始 BSA 总质量浓度,可得到相平衡时上、下相 BSA 质量浓度表达式,上相适合用“饱和型”方程表示,下相适合用线性方程表达,这两个方程和由此导出的分配系数方程均能较好地拟合实验数据.

参考文献:

- [1] YANG Wuyuang, LIN Chunder, CHU Iming, *et al.* Extraction of cephalosporin C from whole broth and separation of desacetyl cephalosporin C by aqueous two-phase partitioning[J]. *Biotech Bioeng*, 1994, 43: 439~445.
- [2] SCHMIDT A S, ANDREWS B A, ASENJO J A. Correlation for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: Effect of overall protein concentration[J]. *Biotech Bioeng*, 1996, 50: 617~626.
- [3] FRANCO T T, ANDREWS A T, ASENJO J A. Use of chemically modified proteins to study the effect of a single protein property on partitioning in aqueous two-phase systems: Effect of surface hydrophobicity[J]. *Biotech Bioeng*, 1996, 49: 300~308.
- [4] FRANCO T T, ANDREWS A T, ASENJO J A. Conservative chemical modification of proteins to study the effects of a single protein property on partitioning in aqueous two-phase systems[J]. *Biotech Bioeng*, 1996, 49: 290~299.
- [5] LEE Chengkang, SANDLER S I. Vancomycin partitioning in aqueous two-phase systems: Effects of PH, salts, and an affinity ligand[J]. *Biotech Bioeng*, 1990, 35: 408~416.
- [6] CASCONI O, ANDREWS B A, ASENJO J A. Partitioning and purification of thaumatin in aqueous two-phase systems[J]. *Enz Microb Technol*, 1991, 13: 629~635.
- [7] WATTER H, BROOKS D E, FISH D. Partitioning in aqueous two-phase systems: Theory, methods, uses and applications to biotechnology[M]. London: Academic Press, 1985.

(责任编辑 朱明 李春丽)