

## 高速逆流双水相色谱法纯化卵白蛋白

# Purification of Ovalbumin from Hen Egg White by High-speed Counter-current Aqueous Two-phase Chromatography

鄧文波<sup>1\*</sup>, 鄧秋云<sup>2</sup>, 宋江楠<sup>1</sup>, 歐陽藩<sup>1</sup>

ZHI Wen-Bo<sup>1\*</sup>, DENG Qiu-Yun<sup>2</sup>, SONG Jiang-Nan<sup>1</sup> and OUYANG Fan<sup>1</sup>

1. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080

2. 上海同田生化技术有限公司, 上海 200122

1. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, CAS, Beijing 100080, China

2. TAUTO Biotech Co., LTD, Shanghai 200122, China

**摘 要** 生物大分子的液-固色谱纯化过程中固相载体会产生产物吸附、变性等不良影响。高速逆流色谱无需固相载体, 且具有高分辨率和高回收率的优点, 其中有机相/水相体系在分离天然产物中应用广泛, 而应用双水相体系分离生物大分子尚处于研究阶段。双水相高速逆流色谱体系的建立与仪器设备及操作工艺条件密切相关, 因此利用多分离柱高速逆流色谱仪, 研究了 PEG1000-无机盐双水相体系对标准蛋白质混合物以及卵白蛋白的分离。pH 值和 PEG 浓度对不同种类蛋白质的分配系数影响不同, 实验发现在 pH9.2 的 15.0% (W/W) PEG1000-17.0% (W/W) 磷酸钾盐体系中, 细胞色素 C、溶菌酶和肌红蛋白的分配系数差异较大, 且分布合理, 因而采用该体系在 0.8mL/min 流速, 850r/min 转速的条件下, 成功分离了细胞色素 C、溶菌酶和肌红蛋白的混合物。实验也发现在 pH9.2 的 16.0% (W/W) PEG1000-17.0% (W/W) 磷酸钾盐体系中, 鸡蛋清样品中的主要蛋白质成分: 卵转铁蛋白、卵白蛋白和溶菌酶的分配系数差异最大, 因而采用该体系在 1.8mL/min 流速, 850r/min 转速的条件下, 200 min 内从鸡蛋清样品中成功分离卵白蛋白, 其电泳纯度为 100%, 收率为 95%。

**关键词** 高速逆流色谱, 双水相, 蛋白质, 卵白蛋白, 分离纯化

**中图分类号** TQ93 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)01-0129-06

**Abstract** High-speed counter-current chromatography (HSCCC) is a continuous liquid-liquid partition chromatography without solid matrix, which has the significant features of high resolution and high recovery. The separation of bio-macromolecule in aqueous two-phase systems (ATPs) with HSCCC is still under research, and the establishment of high-speed counter-current aqueous two-phase chromatography (HSCCC-ATP) relies on the improvement of equipment structure and optimization of operation parameters. By using a multi-column high-speed counter-current chromatograph, the separation of protein mixture and the purification of ovalbumin from hen egg white were studied. The effects of pH and PEG concentration on the partition coefficients of proteins were tested in PEG1000-phosphate ATPs, and distinct differences among partition coefficients of proteins were found at pH 9.2 and 15.0% (W/W) PEG concentration in said system. The separation of protein mixture, consisting of cytochrome C, lysozyme and myoglobin was successfully performed in 15.0% (W/W) PEG1000-17.0% (W/W) potassium phosphate ATPs at pH 9.2 with high-speed counter-current chromatograph at rotation speed of 850r/min and flow rate of 0.8mL/min, using upper

Received: August 9, 2004; Accepted: October 12, 2004

\* Corresponding author. Tel: 86-10-82627061; E-mail: zhiwenbo@163.com

phase as stationary phase. pH and PEG concentration also had distinct effects on the partition coefficients of the major protein components in hen egg white, including ovaltransferrin, ovalbumin and lysozyme. The optimal pH value and PEG concentration for the purification of ovalbumin by HSCCC-ATP were found to be 9.2 and 16.0% (W/W) respectively. Ovalbumin was successfully purified to homogeneity from the hen egg white sample in 16.0% (W/W) PEG1000-17.0% (W/W) potassium phosphate ATPs at pH 9.2 with high-speed counter-current chromatograph at rotation speed of 850r/min and flow rate of 1.8mL/min, using upper phase as stationary phase. The purification recovery of ovalbumin was around 95%.

**Key words** high-speed counter-current chromatography, aqueous two-phase system, purification, protein, ovalbumin

高速逆流色谱(High Speed Counter-current Chromatography, HSCCC)是一种无固相载体的连续液-液分配色谱技术,在重力与离心力场的作用下,其固定相被保留于分离柱内<sup>[1,2]</sup>,从而避免了固相载体与样品发生化学反应变性或不可逆吸附。该技术的样品回收率高,分辨率高,既适用于微量分析也可用于大规模制备。目前,利用该技术分离纯化天然产物、抗生素、无机物时通常采用有机相/水相溶剂体系,并取得了令人满意的进展<sup>[3,4]</sup>。但在生物大分子的分离纯化中,有机溶剂通常会使生物大分子和细胞的结构及性质发生不可逆变化而无法应用。双水相体系的条件温和(含水量高达70%~90%)、表面张力低、回收率高<sup>[5]</sup>,特别适用于蛋白质、核酸及细胞粒子的提取和纯化<sup>[6,7]</sup>。但单级双水相萃取所能获得的分离效果有限,连续多级萃取则因双水相体系分相慢、易乳化等缺点致使设备复杂、操作繁琐、不易放大。通过将高速逆流色谱与双水相体系萃取结合,取长补短,可为生物大分子的分离纯化开辟出一条新途径。

双水相体系界面张力低、粘度高、两相比重差异小<sup>[5]</sup>,在连续逆流分配过程中会出现两相溶剂的乳化和流失等问题<sup>[4]</sup>。因此,对HSCCC双水相体系分离纯化生物大分子的探索应包括设备结构的改进<sup>[8,9]</sup>,也涉及双水相分离体系工艺条件的摸索<sup>[10,11]</sup>。近年来,我国已有专门的公司批量生产系列HSCCC仪器设备,其中具有自主知识产权的TBE-300V型高速逆流色谱仪为立式多分离柱同步行星式,结构简单、三分离柱串联结构自动平衡,稳定性高。采用该设备通过有机相/水相体系已成功分离纯化多种单体化合物。本文利用该设备对双水相体系分离蛋白质进行了初步探索。针对设备特点,采用包含细胞色素C、溶菌酶和肌红蛋白的标准蛋白质混合物摸索分离工艺,并进一步探究了从鸡蛋清中分离卵白蛋白的分离工艺。卵白蛋白是鸡蛋清中主要的蛋白质及营养成分,其常规纯化方法为多步色谱或重结晶,易变性,收率低,而利用高速逆流双

水相色谱法则可保证纯度并显著提高产品收率。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

TBE-300V型高速逆流色谱仪(上海同田生化技术有限公司,中国)。聚四氟乙烯管(直径2.6mm)缠绕在支架上形成多层螺旋管作为1个分离柱,3个分离柱串联,柱容积为120mL(如图1所示),分离柱位于恒温夹套内,利用循环水浴(HX-1050,北京博医康实验仪器有限公司,中国)控制分离柱的温度。进样圈容积为20mL。无级变频调速控制主机的转速范围是700~1000r/min。

主机与ÄKTA™PRIME系统(Amersham)联用,进行泵液、检测和收集。

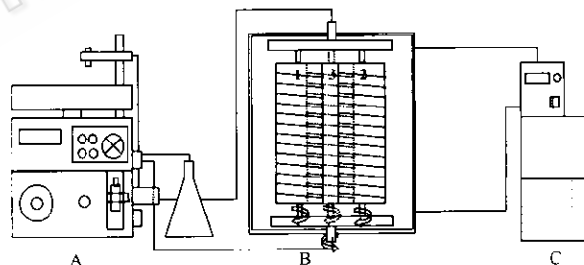


图1 TBE-300V型高速逆流色谱示意图

Fig. 1 Diagram of high speed countercurrent chromatography model TBE-300V

A: ÄKTA™prime; B: TBE-300V;

C: water bath; 1, 2 and 3: separation columns.

### 1.2 试剂

**1.2.1** PEG1000采用化学纯(上海化学试剂公司);磷酸氢二钾、磷酸二氢钾均为分析纯(上海化学试剂公司);水为蒸馏水。

**1.2.2** 标准蛋白质:细胞色素C(牛心)、肌球蛋白(马骨骼肌)、溶菌酶(鸡蛋清)、转铁蛋白(鸡蛋清)、卵白蛋白(鸡蛋清)和卵清蛋白质干粉(鸡蛋清)均为Sigma公司(Sigma, USA)产品。

**1.2.3** 蛋白质分子量标准:低分子量标准蛋白质(上海升正生物技术有限公司),含有兔磷酸化酶B

(97kD)、牛血清白蛋白(66kD)、兔肌动蛋白(43kD)、牛碳酸酐酶(31kD)、胰蛋白酶抑制剂(20kD)和鸡蛋清溶菌酶(14kD)。

1.3 双水相体系配制

将所需重量的 PEG 和成相盐分别溶于 1/2 体积所需的蒸馏水中,于分液漏斗中混匀,静置分相。

1.4 蛋白质分配系数测定

将 1mg 待测蛋白质溶于装有 2mL 等体积上下相的试管中,混匀后静置分相,分别取上、下相各 0.5mL,以相同组成不含蛋白质的上、下相作为空白对照,于 280nm 波长检测吸光度。分配系数定义为溶质在上下相中吸光度之比,  $K = A_U / A_L$ 。

1.5 待分离样品制备

1.5.1 标准蛋白质样品制备:将 1mg 细胞色素 C, 5mg 血红蛋白和 20mg 溶菌酶溶于 2mL 蒸馏水,加入一定量的 PEG1000 和磷酸盐,使其组成与所用分离体系相同,轻微搅拌使所有固体物完全溶解。

1.5.2 鸡蛋清样品制备:按照 Awade<sup>[12]</sup> 的方法制备鸡蛋清样品:用 2 倍体积的含 0.4mol/L NaCl 和 10mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇的 0.05mol/L Tris-HCl (pH 9.0) 缓冲液稀释鸡蛋清并轻微搅拌过夜。

取 5mL 鸡蛋清样品,加入一定量的 PEG1000 和磷酸盐,使其组成与所用分离体系相同,轻微搅拌使所有固体物完全溶解。

1.6 高速逆流色谱分离操作

将固定相充满 HSCCC 分离柱,以所需流速泵入流动相,并以一定的转速和旋转方向运转主机;流动相从溢出口稳定流出时,即表明分离柱内的两相平衡已建立;经由进样圈进样。

1.7 固定相保留率测定

将固定相充满 HSCCC 分离柱,以所需流速泵入流动相,同时收集溢出口流出的固定相,并以一定的转速和旋转方向运转主机;流动相从溢出口稳定流出时,记录所排出的固定相体积  $V_e$ 。固定相保留率 ( $R$ ) 定义为保留在分离柱内的固定相体积占分离柱总容积 ( $V_t$ ) 的比例,  $R = (V_t - V_e) / (V_t)$ 。

1.8 蛋白质浓度测定

蛋白质浓度的测定采用 Bradford 法<sup>[13]</sup>。利用 1mg/mL 的牛血清白蛋白(BSA)绘制标准曲线。测定样品蛋白质浓度时,以不含任何蛋白质,且其余组成与待测样品相同的溶液作为空白,于 595nm 波长测定吸光度。

1.9 电泳

参考文献[14]的方法进行 SDS-PAGE,分离胶浓

度为 10%,并进行考马斯亮蓝染色。

1.10 电泳图谱分析

采用 BandScan 软件(V4.30, Glyko)分析电泳图谱。

2 结果与讨论

2.1 双水相高速逆流色谱分离标准蛋白质混合物

高速逆流色谱是一种液-液分配色谱,当固定相保留率一定,且待分离组分存在有效分配时,分离效果取决于混合物中各组分的分配系数差异。本文以细胞色素 C、肌红蛋白和溶菌酶三种标准蛋白质的混合物为模式物探索了双水相高速逆流色谱的分离工艺,并考察了分离设备和分配过程的有效性。

在试管中分别考察 PEG1000-磷酸盐双水相体系的 pH 值和 PEG 浓度对细胞色素 C、肌红蛋白和溶菌酶分配系数的影响。双水相体系的 pH 值可通过改变成相盐中磷酸氢二钾与磷酸二氢钠的比例控制。分别采用 13.0% (W/W) PEG1000-17.0% (W/W) 磷酸盐双水相体系和 pH9.2 的 PEG1000-磷酸盐双水相体系考察 pH 值和 PEG 浓度对蛋白质分配系数的影响,结果如图 2 所示。

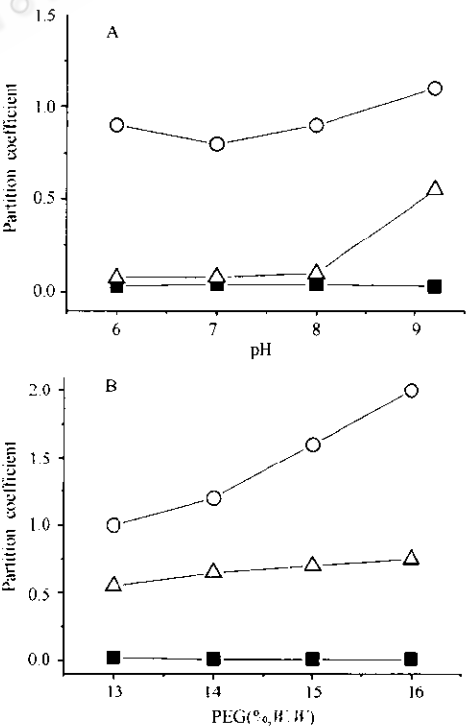


图 2 双水相 pH 值(A)和 PEG 浓度(B)对蛋白质分配系数的影响  
Fig. 2 Effect of pH (A) and PEG concentration (B) of aqueous two-phase system on the partition coefficients of proteins  
(○) lysozyme; (△) myoglobin; (■) cytochrome C.

从图 2 可见,细胞色素 C 基本分配于双水相体系下相(富含磷酸盐),不受双水相体系的 pH 值和 PEG 浓度影响;肌红蛋白的分配系数在体系 pH 值大于 8 时显著增大,在 pH9.2 的 PEG1000-磷酸盐双水相体系中则随 PEG 浓度的提高略有上升;溶菌酶在不同 pH 值情况中均基本上等量分配于上下相,分配系数在 1.0 左右,在 pH9.2 的 PEG1000-磷酸盐双水相体系中则随 PEG 浓度的提高而增大。三种蛋白质分配系数的差异也因而随 pH 值和 PEG 浓度的提高而显著。在 pH9.2 和 15% (W/W) PEG 浓度的 PEG1000-磷酸盐双水相体系中,三种蛋白质的分配系数差异较大,且分布合理,因而选择该体系进行双水相高速逆流色谱分离实验,具体实验条件如下:

色谱柱:2.6mm 内径的聚四氟乙烯管,有效容积为 120mL;样品:1mg 细胞色素 C,8mg 肌红蛋白和 20mg 溶菌酶;分离用双水相体系:PEG1000-磷酸二氢钾-水 = 15-17-68(%, W/W);固定相:双水相体系上相(富含 PEG);流动相:双水相体系的下相(富含磷酸盐);流速:0.8mL/min;主机转速:850r/min;固定相保留率:40%,实验结果如图 3 所示。

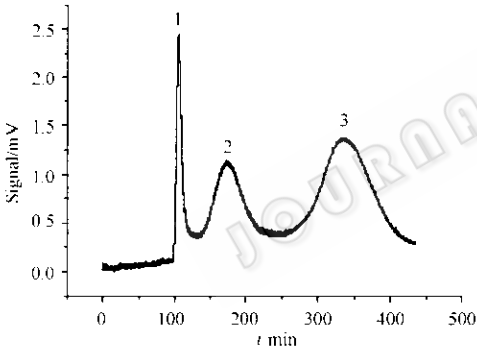


图 3 三种蛋白质的混合物的高速逆流色谱洗脱曲线

Fig. 3 HSCCC chromatogram of mixture of cytochrome C, myoglobin and lysozyme

1: cytochrome C; 2: myoglobin; 3: lysozyme.

根据三种蛋白质的特征颜色(细胞色素 C 为红色、肌红蛋白为黄色、溶菌酶无色)和洗脱峰的电泳结果可判断三种蛋白质的洗脱顺序。从图 3 可见,利用该高速逆流色谱设备,以及优化的 PEG1000-磷酸盐双水相体系可以较好地分离该蛋白质混合物,三种蛋白质对应的洗脱峰之间的分辨率( $R_s$ )分别为 1.12 和 1.10,固定相保留率为 40%。

2.2 双水相体系的 pH 值和 PEG 浓度对鸡蛋清中蛋白质组分分配系数的影响

鸡蛋清中主要的蛋白质组分包括卵转铁蛋白(约 78kD)、卵白蛋白(约 45kD)、溶菌酶(14kD)和粘

蛋白等。采用与测试标准蛋白质分配系数相同的方法考察 PEG1000-磷酸盐双水相体系的 pH 值和 PEG 浓度对卵转铁蛋白、卵白蛋白和溶菌酶的分配系数的影响,结果如图 4 所示。

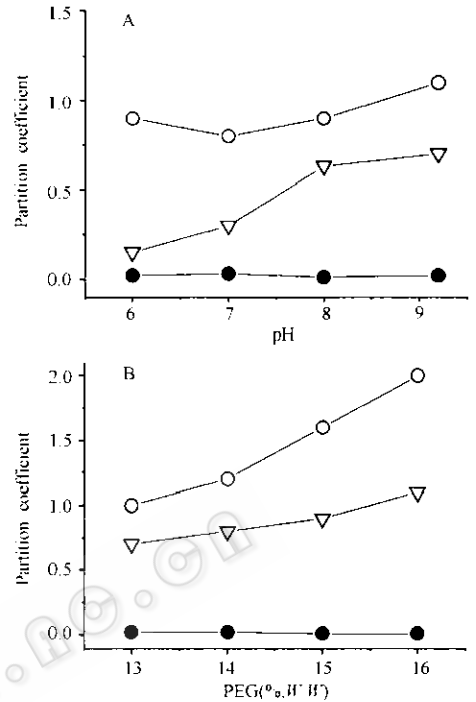


图 4 双水相 pH 值(A)和 PEG 浓度(B)对鸡蛋清中主要蛋白质组分分配系数的影响

Fig. 4 Effect of pH (A) and PEG concentration (B) of aqueous two-phase system on the partition coefficients of protein components in hen egg white

(○) lysozyme; (▽) ovalbumin; (●) ovaltransferrin.

与上述三种标准蛋白质的变化趋势类似,卵转铁蛋白、卵白蛋白和溶菌酶分配系数的差异随 PEG1000-磷酸盐双水相体系的 pH 值和 PEG 浓度的提高而显著,不同分子量的多种粘蛋白则基本上完全分配于上相<sup>15</sup>。卵白蛋白的分配系数在 pH 9.2、PEG 浓度较高(大于 14.0%, W/W)的 PEG1000-磷酸盐双水相体系中时,与其它蛋白质组分的分配系数差异明显,应可实现有效分离。

2.3 高速逆流双水相色谱法从鸡蛋清样品中纯化卵白蛋白

选择 pH9.2 的 PEG1000-磷酸盐双水相体系对两种来源的鸡蛋清蛋白质样品(Sigma 公司的鸡蛋清蛋白质干粉和鸡蛋清样品)进行高速逆流色谱分离实验。

分离鸡蛋清蛋白质干粉的实验条件如下:

色谱柱:2.6mm 内径的聚四氟乙烯管,有效容积为 120mL;样品:150mg 鸡蛋清蛋白质干粉(Sigma);

分离用双水相体系:PEG1000-磷酸二氢钾-水 = 16-17-67(% , W/W);固定相:双水相体系上相(富含PEG);流动相:双水相体系下相(富含磷酸盐);流速:1.2 mL/min;主机转速:850r/min;固定相保留率:38%。洗脱图谱如图 5 所示。

分离鸡蛋清样品时,除采用 5mL 鸡蛋清样品,1.8mL/min 流速外,其它条件同上;固定相保留率为 35%,洗脱图谱如图 6 所示。根据蛋白质的特征颜色(转铁蛋白为粉红色,其余两种蛋白质无色)、相对含量和电泳结果(图 7)可确定洗脱峰对应的蛋白质。

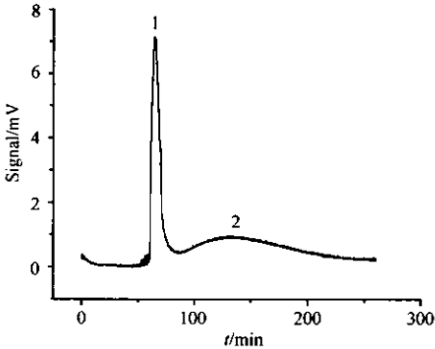


图 5 鸡蛋清蛋白质干粉的高速逆流色谱洗脱曲线  
Fig. 5 HSCCC chromatogram of hen egg white powder from Sigma

图 5 中,第一个洗脱峰为含有卵转铁蛋白的杂质峰(淡红色),根据分配系数的变化规律可判断第二个洗脱峰对应目标产物卵白蛋白,但过于平缓,并存在溶菌酶污染。造成该现象的原因可能是由于卵白蛋白在制备干粉过程中发生结构或性质的改变,导致其溶解性降低,洗脱峰峰形异常。

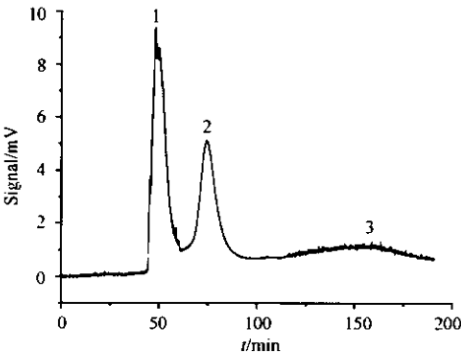


图 6 鸡蛋清样品的高速逆流色谱洗脱曲线  
Fig. 6 HSCCC chromatogram of hen egg white sample

图 6 中,第一个洗脱峰(峰 1)为含有卵转铁蛋白(约占 60%,图 7,条带 3)的杂质峰,第二个洗脱峰(峰 2)对应目标产物卵白蛋白,在电泳图谱(图 7,条带 4)中为单一条带,纯度较高。第三个洗脱峰(峰

3)对应蛋白质的分子量与卵白蛋白相同(图 7,条带 5),但洗脱行为完全不同,可能是另一种形态的卵白蛋白<sup>[12]</sup>,即由卵白蛋白在储存期间转变而成的 S 型卵白蛋白,具有较高的热稳定性,其电泳及离子交换色谱表现与卵白蛋白相同。洗脱完成后吹出的固定相(上相)中含有溶菌酶和不同分子量的多种粘蛋白(图 7,条带 6)。

为缩短洗脱时间,洗脱过程中设定的流速较高,为 1.8mL/min,可于 200min 内完成洗脱并保证洗脱效果,固定相保留率为 35%,说明该双水相体系 and 高速逆流色谱设备的稳定性较好。

利用 BandScan 软件分析鸡蛋清样品的电泳图谱,以确定主要蛋白质组分的相对含量,其中卵转铁蛋白约占 17%,卵白蛋白约占 55%,溶菌酶约占 10%。鸡蛋清样品的上样量为 240mg,其中含卵白蛋白约为 132mg。洗脱峰 2 中回收的卵白蛋白为 78mg,洗脱峰 3 中回收的卵白蛋白为 48mg,整体收率为 95%。

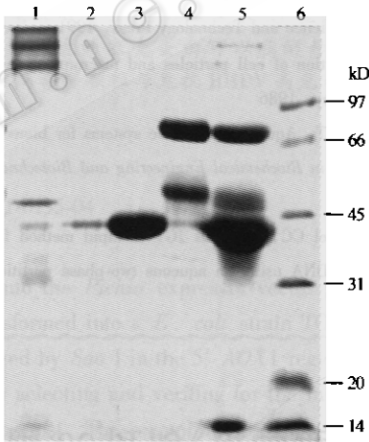


图 7 鸡蛋清样品高速逆流色谱洗脱峰的电泳结果  
Fig. 7 SDS-PAGE result of elution peaks of hen egg white sample after high-speed countercurrent chromatographic separation

1: protein marker; 2: hen egg white sample; 3: peak 1; 4: peak 2; 5: peak 3; 6: upper stationary phase.

3 结 论

实验考察了 pH 值和 PEG 浓度对不同种类蛋白质的分配系数的影响,并利用同步式、多分离柱高速逆流色谱仪(TBE-300V)探索了高速逆流双水相色谱法分离蛋白质的工艺。优选了 pH9.2 的 15.0% (W/W) PEG1000-17.0% (W/W) 磷酸钾盐体系,在 0.8mL/min 流速、850r/min 转速的条件下,成功分离了细胞色素 C、溶菌酶和肌红蛋白的混合物。进一

步优选了 pH9.2 的 16.0% (W/W) PEG1000-17.0% (W/W) 磷酸钾盐体系, 在 1.8 mL/min 流速、850 r/min 转速的条件下, 从鸡蛋清样品中成功分离了卵白蛋白, 收率为 95%。上述结果说明高速逆流双水相色谱法可有效地应用于分离纯化蛋白质样品, 并且所用的高速逆流色谱设备具有较高的分辨率和稳定性, 为生物大分子的高效和高收率分离开辟了一条新的途径。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Ito Y, Bowman RL. Countercurrent chromatography: liquid-liquid partition chromatography without solid support. *Science*, 1970, **167**: 281 - 283
- [2] Ito Y. Countercurrent chromatography: theory and practice, New York: Marcel Dekker, 1988
- [3] Dai DS (戴德舜), Wang YM (王义明), Luo GA (罗国安). Research development of high-speed counter-current chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (分析化学), 2001, **29** (5): 586 - 591
- [4] Zhang TY (张天佑). The Technology of Countercurrent Chromatography, BEIJING, Science and Technology Press, 1991
- [5] Albertsson PA. Partition of cell particles and macromolecules. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Wiley, 1986
- [6] Diamond AD, Hsu JT. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation. *Advance in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 1992, **47**: 89 - 135
- [7] Ohlsson R, Hentschel CC, Williams JG. A rapid method for the isolation of circular DNA using an aqueous two-phase partition system. *Nucleic Acids Research*, 1978, **5**: 583 - 590
- [8] Lee YW. Cross-axis countercurrent chromatography: a versatile technique for biotech purification, in: Countercurrent Chromatography, New York: Marcel Dekker, 1999, pp. 149 - 169
- [9] Shinomiya K, Kabasawa Y, Yanagidaira K *et al.* Protein separation by nonsynchronous coil planet centrifuge with aqueous-aqueous polymer phase systems. *Journal of Chromatography A*, 2003, **1005**: 103 - 112
- [10] Shinomiya K, Kabasawa Y, Ito Y. Countercurrent chromatographic separation of proteins by cross-axis coil planet centrifuge: choice of polymer phase systems and revolution speed. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 1998, **21**: 1727 - 1736
- [11] Shibusawa Y, Yamaguchi M, Ito Y. Polyethylene glycol-potassium phosphate aqueous two-phase systems for countercurrent chromatography of proteins. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 1998, **21**: 121 - 133
- [12] Awadé AC, Moreau S, Molle D *et al.* Two-step chromatographic procedure for the purification of hen egg white ovomucin, lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin and characterization of purified proteins. *Journal of Chromatography A*, 1994, **677**: 279 - 288
- [13] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1972, **72**: 248 - 254
- [14] Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**: 680 - 685
- [15] Shibusawa Y, Lino S, Shindo H *et al.* Separation of chicken egg white proteins by high-speed countercurrent Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 2001, **24**: 2007 - 2016