

疏水作用层析原理

疏水作用层析 (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC) 是用适度疏水性的固定相, 以含盐水溶液作为流动相分离生物大分子的液相层析方法, 它利用蛋白质表面的疏水部位和固定相上的疏水基团的结合来达到纯化蛋白质的目的, 是蛋白质分离的常用手段之一。

疏水作用层析具有许多的优点: 1) 活性回收率高。用中性或接近中性的盐水体系作为流动相, 使得在酸性及有机溶剂条件下易失活的蛋白质, 能以活性状态在疏水层析上进行分离, 失活少。2) 因采用了盐的水溶液作为流动相, 可以在相似条件下进行使许多需要保持生物活性的蛋白质的理化性质研究, 如测定蛋白质的盐析浓度、研究溶液中蛋白质的构象变化行为等。3) 流动相成本低, 大大减少了反相层析中使用的有机溶剂对环境的污染。

1、原理

疏水作用在生物系统中广泛存在。蛋白质分子是一个外部有一亲水层包围、内部有疏水核的具有一定空间的复杂体系, 其表面亲水性很强, 但也有一些非极性的疏水基团或疏水区域, 同时还存在较多的疏水基团裂隙。如果将蛋白质表面的疏水基团暴露于高疏水性的环境里, 就可以和固定相上的疏水基团结合。疏水作用层析就是依据生物大分子疏水性的差异实现分离的。

在高盐环境下, 蛋白质表面的疏水区域暴露, 这样它的疏水部分即可与含疏水表面基团的固定相发生较强的疏水相互作用, 从而被结合在固定相表面。而一旦降低流动相的盐浓度, 蛋白质表面疏水区域闭合, 疏水作用降低, 这样就可以实现蛋白质的洗脱。下图为疏水吸附过程示意图。

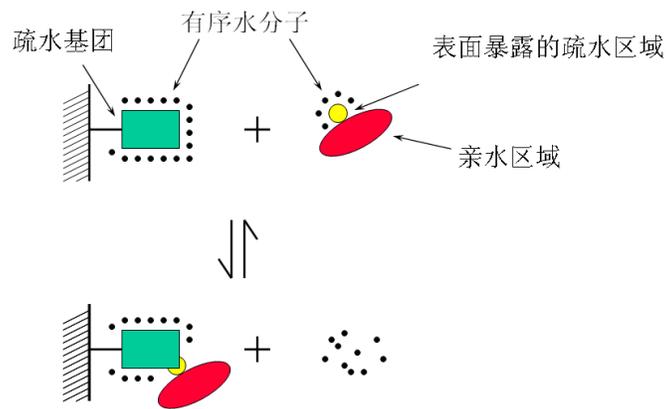


图 1、疏水吸附示意图

目前对蛋白质在疏水层析上是如何与配基和溶剂作用以及配体、蛋白质以什么形态存在等许多问题并不十分清楚，但蛋白质在疏水层析上的作用机理的研究取得了很大的进展。有许多人提出了不同的保留模型，这些模型都可以在一定程度上描述蛋白质在疏水层析上的保留行为。主要的理论模型有疏溶剂化理论和熵增原理。

2、影响疏水层析的因素

在进行疏水作用层析的分离过程优化时，主要影响因素主要包括：基质类型、配体类型和取代度、盐浓度和盐的类型、pH 等。

基质的类型基本与凝胶层析和离子交换的基质相同。琼脂糖为基质的介质是目前生物分离中应用最广泛、数量最多的介质，其中交联和改性起了很大作用。疏水配基是疏水层析的固定相上最重要的部分，是选择层析条件时首要考虑的问题。常见的疏水配基主要是烷基基和芳香基。对于烷基配基，烷基的链长决定了介质疏水性的强弱，一般来说链越长，疏水性越强，吸附能力也越强。芳香配基则比较复杂，即具有疏水作用，又因为苯环的共轭结构，表现为混合模式的分离行为。常用的疏水介质类型主要可选用苯基-琼脂糖、丁基-琼脂糖和辛基琼脂糖疏水作用层析介质。

决定介质吸附容量的因素除了疏水基团的类型和强弱外，还跟配基的取代度有关。取代度是指疏水基团占据基质活化位点的程度，也可以说是基质上疏水配基的密度。取代度的增加在一开始可以增加介质的吸附容量，但是到了一定程度之后由于生物分子之间的空间位阻，吸附趋于饱和。

疏水吸附是在是在高浓度盐下实现吸附，低浓度盐下完成洗脱的，因此盐在疏水作用层析中至关重要。各种加入到缓冲液和样品溶液的盐都会促进 HIC 中配体和蛋白质相互作用。当这些盐的浓度增加时，被结合的蛋白质量也线性地增加，直到一个特定的浓度，随后在更高浓度下，将以指数形式增加。

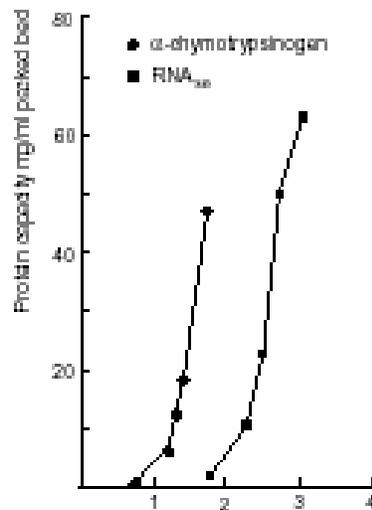
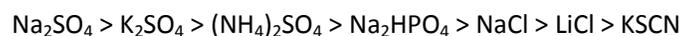


图 2 两种生物分子的吸附容量与盐浓度的关系

盐的类型对 HIC 的影响也可参考 Hofmeister 系列排序，该序列说明了进行蛋白质沉淀的强弱或增加水溶液表面张力大小的能力。

常用的盐类中，基本的作用强弱顺序如下：



pH 对 HIC 的影响比较复杂，一般 pH 的增加会减弱疏水作用，可能是由于增加了带电基团、增加了蛋白质的亲水性所引起的。另一方面，pH 的减少能增加表观疏水作用。因此在中性 pH 值下不键合到 HIC 吸附剂的蛋白质会在酸性的 pH 下键合上去。