



## 蛋白质在表面活性剂与高分子共组双水相体系中的分配

肖进新\* 黄建滨 何煦 暴艳霞 朱瑛瑶

(北京大学化学与分子工程学院 胶体化学研究室 北京 100871)

**摘要** 高分子和正负离子表面活性剂混合物可形成一种新型双水相体系. 研究蛋白质在溴化十二烷基三乙铵/十二烷基硫酸钠与聚氧乙烯(EO)-聚氧丙烯(PO)嵌段共聚物( $EO_{20}PO_{80}$ )共组双水相体系中的分配. 通过在高分子接上亲和配基, 研究蛋白质在带有亲和配基高分子的双水相体系中的分配. 将表面活性剂富集相稀释或加热高分子富集相, 又可形成新的双水相体系, 由此可进行蛋白质的多步分配. 在蛋白质的分配完成之后, 通过将表面活性剂富集相进一步稀释或将高分子富集相加热至高分子浊点以上可将表面活性剂和高分子与目标蛋白质分离. 正负离子表面活性剂和高分子还可以循环使用.

**关键词** 双水相, 蛋白质分配, 嵌段共聚物, 正负离子表面活性剂

## Protein Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems Formed by Mixtures of Polymers and Cationic-Anionic Surfactants

XIAO Jin-Xin\* HUANG Jian-Bin HE Xu BAO Yan-Xia ZHU Bu-Yao

(Laboratory of Colloid Chemistry, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing, 100871)

**Abstract** A novel aqueous two-phase system (ATPS) can be formed by mixing a polymer and a cationic-anionic surfactant. In this work we investigated the protein partitioning in ATPS formed by mixing dodecyltriethylammonium bromide/sodium dodecylsulfate and ethylene oxide (EO)-propylene oxide (PO) random copolymers ( $EO_{20}PO_{80}$ ). Affinity ligands were attached to polymers and affinity partitioning of proteins was investigated. A multi-step partitioning procedure was developed by diluting the surfactant-enriched phase or by raising the temperature of polymer-enriched phase. After partitioning was completed, the surfactants could be removed when the phases were further diluted, and EO-PO copolymers could be separated by raising the temperature above the cloud point of copolymer. The recycling of cationic-anionic surfactants and EO-PO copolymers is discussed.

**Keywords** aqueous two-phases, protein partitioning, random copolymers, cationic-anionic surfactants

双水相体系最早发现于高分子溶液, 自本世纪50年代开始被用于蛋白质等生物活性物质的萃取分离<sup>[1]</sup>. 但高分子双水相体系不适于非水溶性蛋白

质的分离. 我们于1994年报道了由正负离子表面活性剂形成的双水相体系(简称表面活性剂双水相)用于生物活性物质的萃取分离<sup>[2]</sup>. 与高分子双水相体

\* E-mail: xiaojx@chem.pku.edu.cn

收稿日期: 1999-09-09, 修回日期: 1999-12-30, 定稿日期: 2000-02-20, 国家自然科学基金(29973002, 29733110)资助项目  
(Received September 9, 1999. Revised December 30, 1999. Accepted February 20, 2000)

系相比,表面活性剂双水相在许多方面具有优势<sup>[3]</sup>,特别是表面活性剂溶液的增溶作用使其可望用于非水溶性蛋白质的萃取.但由于在表面活性剂双水相体系中,表面活性剂浓度低的一相不易固定亲和配基,因而欲使蛋白质通过亲和配基的作用进入表面活性剂浓度低的相中较为困难.

为解决以上难题,我们试图将高分子双水相与表面活性剂双水相体系结合在一起.本文的结果表明,正负离子表面活性剂混合体系与某些水溶性高分子混合可形成双水相体系.此类相体系可望克服以上表面活性剂双水相和高分子双水相体系的不足,作为新的萃取体系,用于蛋白质的萃取分离及分析.

本文研究蛋白质在十二烷基三乙基溴化铵/十二烷基硫酸钠与聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物( $\text{EO}_{20}\text{PO}_{80}$ )共组双水相中的分配.

## 1 实验部分

十二烷基三乙基溴化铵(简称为  $\text{C}_{12}\text{NE}$ )由溴代十二烷与三乙胺反应制得,其合成及纯化方法见参考文献[3].

十二烷基硫酸钠(简称为 SDS)购于瑞士 Fluka 公司,其纯化方法见参考文献[3].聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物( $\text{EO}_{20}\text{PO}_{80}$ )购于瑞典 Pharmacia 公司.

牛血清白蛋白(BSA)、溶菌酶(lysozyme)及血红蛋白(hemoglobin)均购于美国 Sigma 公司.

带有亲和配基的高分子  $\text{EO}_{20}\text{PO}_{80} - \text{IDA} - \text{Cu}$  (IDA 为 iminodiacetate)参考文献[4]的方法合成.

实验方法及分配系数的计算参见文献[3].

## 2 结果与讨论

表 1 蛋白质在双水相体系中的分配系数  $K$  (15°C)

蛋白质	$K(\text{pH } 4.0)$	$K(\text{pH } 4.8)$	$K(\text{pH } 7.1)$
BSA	0.6	0.8	18.2
溶菌酶	0.3	0.3	0.4

双水相的组成:  $\text{C}_{12}\text{NE} - \text{SDS}$  总浓度:  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; 摩尔比:  $\text{C}_{12}\text{NE} : \text{SDS} = 1.95 : 1$ ;  $\text{EO}_{20}\text{PO}_{80}$ : 5% (质量分数); 缓冲溶液:  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7.1),  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaOAc} - \text{HOAc}$  (pH 4.0, 4.8).

表 1 为 BSA 与溶菌酶在双水相体系中的分配

系数. BSA 与溶菌酶分别富集于双水相体系的上相和下相,表明该体系具有很好的分离效果.

在双水相体系中加入带有亲和配基的高分子  $\text{EO}_{20}\text{PO}_{80} - \text{IDA} - \text{Cu}$ , 得到亲和双水相体系(带有亲和配基的高分子在高分子富集相中).研究了血红蛋白(Hemoglobin)在带有亲和配基高分子的双水相体系中的分配,结果示于表 2.表明带有亲和配基的高分子的引入,可使血红蛋白由上相(未加带有亲和配基的高分子)转移到下相.

表 2 血红蛋白在带有亲和配基高分子的双水相体系中的分配(15°C)

亲和配基浓度/%	$K$
0	8.2
0.1	2.1
0.3	1.3
0.5	0.9
0.7	0.8
0.9	0.8

(1) 双水相的组成:  $\text{C}_{12}\text{NE} - \text{SDS}$  总浓度:  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; 摩尔比:  $\text{C}_{12}\text{NE} : \text{SDS} = 1.95 : 1$ ;  $\text{EO}_{20}\text{PO}_{80}$ : 5% (质量分数); 缓冲溶液:  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7.1). (2) 含有亲和配基高分子:  $\text{EO}_{20}\text{PO}_{80} - \text{IDA} - \text{Cu}$ .

表面活性剂与高分子共组双水相体系的另一个优越之处在于两相都可进行多步萃取,萃取完成之后,可容易地将表面活性剂与高分子从蛋白质溶液中除去,而且表面活性剂和高分子可循环使用.其过程如下:

在蛋白质分配完成之后,将两相分离.上相(表面活性剂富集相)加适量水(或缓冲溶液)稀释,又可分离成新的双水相<sup>[3]</sup>,此即第二步萃取,以此继续进行,可进行多步萃取.从而达到将蛋白质完全分离的目的. BSA 和溶菌酶多步分配的结果示于表 3.

表 3 BSA 和溶菌酶在双水相体系中的多步分配

	$K_{\text{BSA}}$	$K_{\text{溶菌酶}}$
第一步(15°C)	18.2	0.4
第二步(上相)(15°C)	19.4	0.2
第二步(下相)(30°C)	52	15

(1) 双水相的组成:  $\text{C}_{12}\text{NE} - \text{SDS}$  总浓度:  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; 摩尔比:  $\text{C}_{12}\text{NE} : \text{SDS} = 1.95 : 1$ ;  $\text{EO}_{20}\text{PO}_{80}$ : 5% (质量分数); 缓冲溶液:  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7.1). (2) 第二步(上相)双水相由用等体积  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  缓冲溶液稀释第一步双水相的上相制备. (3) 第二步(下相)双水相由加热第一步双水相的下相至 30°C 制备.

若将上相进一步稀释,正负离子表面活性剂将沉淀出来<sup>[3]</sup>,从而可容易地将表面活性剂从蛋白质溶液中除去.

若在正负离子表面活性剂沉淀中加入适量正离子或负离子表面活性剂,又可形成新的双水相<sup>[3]</sup>,以此可将表面活性剂循环使用.

由于 EO<sub>20</sub>PO<sub>80</sub> 具有较低的浊点(质量分数 5% EO<sub>20</sub>PO<sub>80</sub> 水溶液的浊点为 21℃),因而将下相加热至 21℃ 以上,又可分离成新的双水相,由此同样可进行多步萃取,BSA 和溶菌酶多步分配的结果示于表 3. 若将其进一步加热,最终可得到一个接近纯的

EO<sub>20</sub>PO<sub>80</sub> 析出相和一个只有蛋白质的水相. 以此可容易地将高分子从蛋白质溶液中除去,分离出的高分子可循环使用.

## References

- 1 P. A. Albertsson, "Partition of Cell Particles and Macromolecules", 3rd Edn., Wiley - Interscience, New York, 1986.
- 2 J. X. Xiao, G. X. Zhao, *Chin. J. Chem.*, 1994, 12(6), 555.
- 3 G. X. Zhao, J. X. Xiao, *J. Colloid Interf. Sci.*, 1996, 177, 513.
- 4 A. Otto, G. Birkenmeier, *J. Chromatogr.*, 1993, 644, 25.

(Ed. CHENG Biao)

(DONG Hua - Zhen)