

## 染料配基吸附层析纯化血清白蛋白

苏志国 姜 炜 冯朴荪 高昆玉

(大连理工大学, 大连)

将染料分子偶联于交联琼脂糖凝胶上制成蓝色、红色和黄色等五种层析介质进行血清白蛋白分离的研究。比较了五种染料配基的吸附性能, 考察了温度、pH值、蛋白质浓度和无机盐浓度对吸附血清白蛋白的影响。选择了合适的分离条件。从产妇产后血中用染料配基吸附层析提取了人血清白蛋白(HSA)。一步分离达到电泳纯, 回收率为95%, 优于传统的盐析工艺。

**关键词** 染料配基, 血清白蛋白, 吸附层析

近年来, 以染料取代辅酶、单克隆抗体等生物配基进行大规模的蛋白质特异性吸附层析引起愈来愈多的研究兴趣<sup>[1]</sup>。染料配基虽然不如生物配基的专一性高, 但其优点是可以人工合成, 价格便宜, 而且性质稳定, 不失活, 适合于工业应用。此外, 一种配基可以用于分离几种蛋白质<sup>[2]</sup>。

目前, 对染料配基是否具有亲和作用还在争论之中。尽管大部分研究所用的染料都是无毒或毒性极低, 但有些人仍怀疑染料作为配基分离蛋白质的安全性<sup>[3]</sup>。

血清白蛋白是血浆中含量最多的蛋白质, 具有重要的临床治疗和分析用途。工业上提取采用盐析或有机溶剂沉淀, 分离步骤较多。用配基吸附层析法分离纯化血清白蛋白是一项新的尝试。

本文将五种结构不同的染料偶联在交联琼脂糖凝胶上构成染料配基层析介质, 对血清白蛋白进行了试分。并从产妇产后血中分离纯化了人血清白蛋白(HSA)。

### 材料与 方法

#### (一)染料配基层析介质的制备

所用五种染料的合成方法详见文

献<sup>[4]</sup>, 其分子结构如图1。其中AQ-Blue I, II, III的结构与商品染料Cibacron Blue F3G-A类似, Azo-Red与商品染料Procion Red HE-3B结构相同, Azo-Yellow为新合成的黄色染料。

所用载体为交联琼脂糖凝胶 Sepharose 6B, 瑞典Pharmacia公司产品。染料与载体偶联的方法:

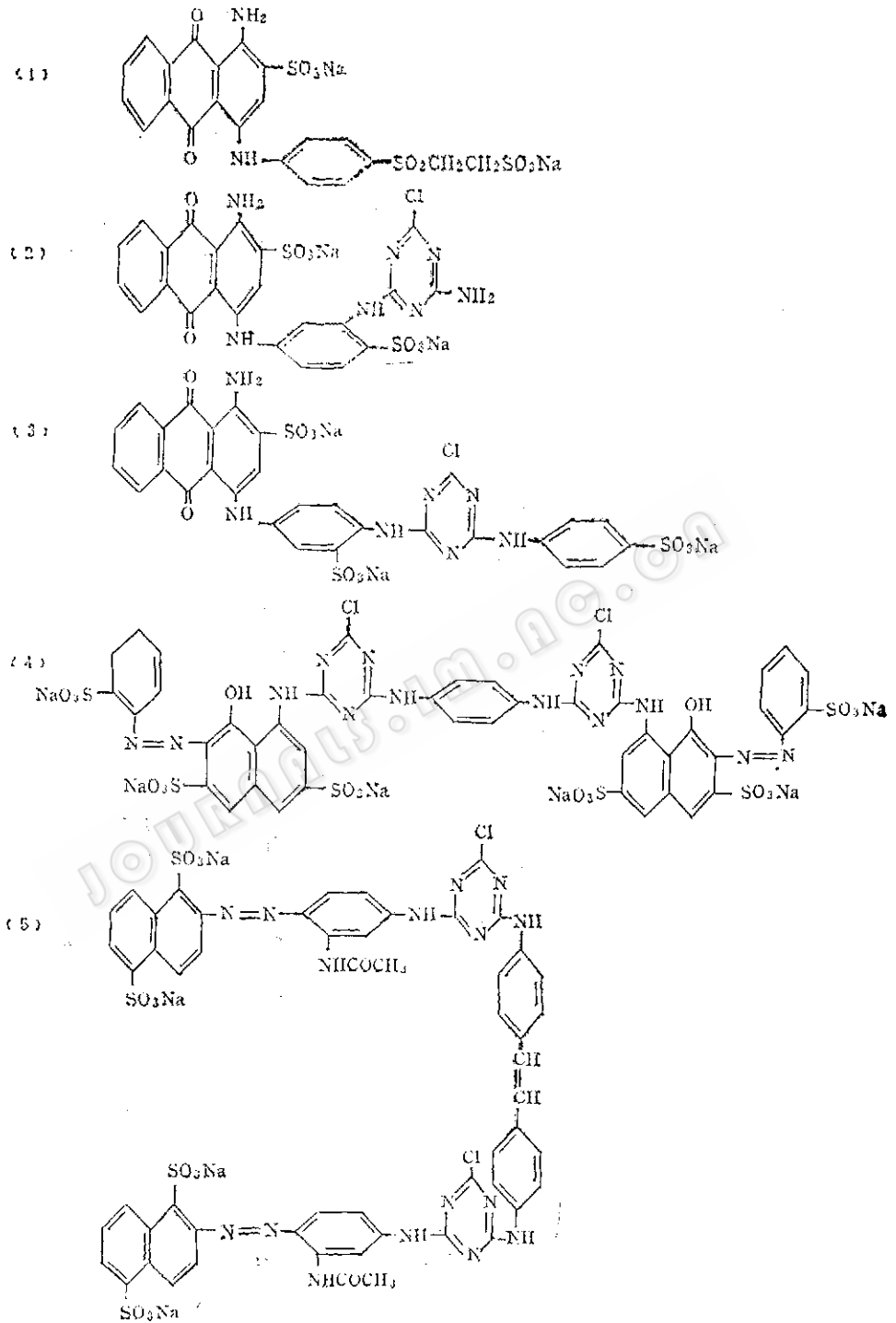
将凝胶用布氏漏斗过滤并用蒸馏水洗涤。称取一定量的染料, 将染料、湿凝胶、蒸馏水按1:100:100的比例混合于摇瓶中, 在45℃下于恒温摇床上摇动30min。加入NaCl, 使溶液中NaCl浓度为2%。继续摇动30min后加入Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 使Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>在溶液中的浓度为1%, 然后加入催化剂DABCO(三乙撑二胺), 再继续摇动4—6h即可。将染色后的凝胶反复用蒸馏水和1mol/L KCNS溶液浸泡冲洗, 除去未偶联上的染料。

#### (二)层析系统

层析柱内径为16mm, 装填高为100mm。进料、淋洗和洗脱均由恒流泵

本文于1989年10月19日收到。

本研究得到国家教委青年教师基金资助。所用染料为本校杨利同志合成, 在此表示感谢。



(1)AQ-Blue I (2)AQ-Blue II (3)AQ-Blue III (4)Azo-Red (5)Azo-Yellow

图 1 五种染料分子的结构

Fig. 1 The structures of the five dye molecules

输送。层析柱出口与紫外检测器相连以测量出口蛋白质浓度的变化,并用部分收集器收集各流分。

### (三)蛋白质浓度的测定

用紫外可见分光光度计,以牛血清白蛋白(上海生物化学研究所产品,生化纯)为标准,在280nm处读取光密度值。

### (四)配基对白蛋白吸附量的测定

将五种染料-琼脂糖凝胶各取4ml加入50ml锥形瓶中,加入20ml浓度为4mg/ml的HSA(卫生部上海生物制品研究所产品)溶液。将锥形瓶置于20℃的恒温摇床上,摇动速度为100rpm,取样分析液相蛋白质浓度变化。待吸附达到平衡后,将凝胶装柱,用pH7.0、浓度为0.02mol/L的磷酸盐溶液(PBS)淋洗除去未吸附的蛋白质,最后用0.5mol/L KCNS洗脱蛋白质。将洗脱液进行蛋白质浓度分析,求出HSA的吸附量。

### (五)温度、pH、蛋白质浓度和盐浓度的影响

在锥形摇瓶中以AQ-BlueⅢ凝胶吸附牛血清白蛋白,采用正交实验法<sup>[6]</sup>测定温度等各因素的影响。正交表为 $L_{25}(5^6)$ ,变量为温度(4—25℃),pH(5.8—8.0),血清白蛋白浓度(0.5—4.0mg/ml),盐浓度(20—200mmol/L)和吸附时间(5—120min)。实验在恒温摇床上进行,操作方法如(四)。

### (六)从分娩血中提取HSA

新鲜的产妇分娩血由大连妇产医院提供。采血后立即离心除去红血球和固体,将血清置于-18℃冰箱冷冻。使用前融化,于室温9000rpm下离心3min,取上清液加入PBS调pH7.0后向层析柱进料。待出口处检测到蛋白质时停止进料,用0.2mol/L、pH7.0的PBS淋洗层析柱以洗去未吸附的蛋白质。然后用升高盐浓度的方法洗脱被吸附的白蛋白,洗脱液由0.2mol/L PBS加入NaCl或KCNS组成。洗脱后将层析柱用6mol/L尿素溶液进行再生。

### (七)纯度检验

将洗脱的HSA进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。分离胶总浓度7%,交联比2.6%,缓冲液Tris-HCl, pH8.9。浓缩胶缓冲液Tris-HCl pH6.7。电泳缓冲液Tris-甘氨酸, pH8.3。电流为3—5mA/管。以标准HSA为参比。

## 结果与讨论

### (一)染料配基结构对吸附量的影响

表1列出了五种染料-琼脂糖凝胶对HSA的吸附量。其中载体配基浓度是按文献[2]的方法测定的,平衡吸附量是单位体积的染料-琼脂糖凝胶在吸附平衡时的吸附量,配基比吸附量为每单位重量配

表1 不同染料配基对HSA的吸附量  
Table 1 Adsorption capacities of different dye-ligands for HSA

配基 Ligand	颜色 Colour	载体配基浓度 Ligand concn. on the gel (mg/ml)	平衡吸附量 Adsorp. capacity at equilibrium (mg/ml)	配基比吸附量 Adsorp. capacity of the ligand (mg/mg)
AQ-Blue I	Blue	4.78	1.90	0.40
AQ-Blue II	Blue	1.90	5.00	2.63
AQ-Blue III	Blue	1.78	5.88	3.30
Azo-Red	Red	3.57	5.20	1.46
Azo-Yellow	Yellow	4.00	5.06	1.26

基所吸附的蛋白质的量。

从表 1 的结果看,不同配基的吸附能力相差较大。其中蓝色配基 AQ-BlueⅢ 的性能最好,其平衡吸附量和配基比吸附量最高。有的文献认为<sup>[3]</sup>,染料中的蒽醌环是一个与蛋白质起亲和作用的关键基团。本文设计的 AQ-Blue I、II、III 三种蓝色染料配基都有蒽醌环结构,但配基比吸附量变化很大。而红色配基 Azo-Red 和黄色配基 Azo-Yellow 并不具备蒽醌环结构,但也有吸附 HSA 的能力。可见染料与蛋白质的作用不是单靠某一个基团,而是靠整个分子的协同效应。其中可能包括氢键、疏水键、离子键在内的复杂作用。AQ-BlueⅢ 对 HSA 表现了很高的亲和性,可能与该分子的大小、构型和电荷分布有关。

## (二)温度、pH、蛋白质浓度和盐浓度的影响

本文考察了 4—25℃ 范围内,温度对牛血清白蛋白在 AQ-BlueⅢ 凝胶上吸附的影响。由图 2 可见,在 20℃ 左右吸附量最大,温度过高过低都导致吸附量下降。但总的说来,温度的影响不十分显著,变化幅度最大不过 12%。

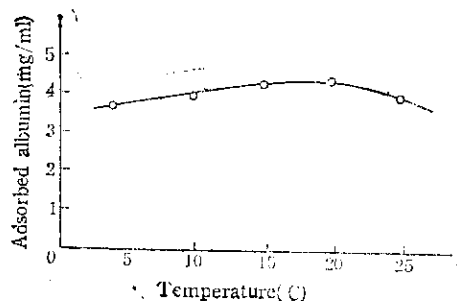


图 2 温度对牛血清白蛋白在 AQ-BlueⅢ 染料凝胶上吸附的影响

Fig. 2 Effect of temperature on adsorption of bovin serum albumin by AQ-BlueⅢ dye-gel

图 3 是吸附量随蛋白质溶液 pH 值变化的曲线。当 pH < 7 时,吸附量随 pH 的

降低而迅速增加;当 pH > 7 时,吸附量近似于不变。溶液中的 pH 既能影响蛋白质的电荷,也能影响配基的电荷。血清白蛋白的等电点在 4.7 左右。当 pH > 4.7 时,

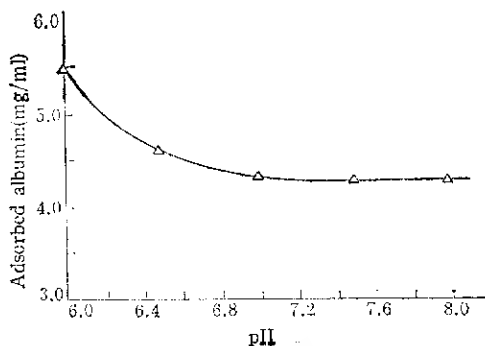


图 3 pH 对牛血清白蛋白在 AQ-BlueⅢ 染料凝胶上吸附的影响

Fig. 3 Effect of pH on adsorption of bovin serum albumin by AQ-BlueⅢ dye-gel

蛋白质带负电荷。如果此时的 pH < 7.0,那么染料配基上的氨基会带正电荷,配基与血清白蛋白会发生离子型吸附。这种离子型吸附随 pH 的下降而得到增强,导致吸附量迅速上升。当 pH > 7.0 以后,配基上的磺酸基会带负电荷。此时蛋白质与配基形成离子键的可能性较小,而主要靠配基与蛋白质疏水部位的嵌合,因此吸附量几乎不随 pH 变化。从提高吸附专一性角度出发,应将 pH 选在 7.0 以上,因为低 pH 下的离子吸附是非专一性的,某些杂蛋白也会被吸附。

实验发现,当溶液中血清白蛋白浓度增加时,染料配基的吸附量也随之增加。根据 Chase<sup>[7]</sup> 提出的亲和吸附理论,凝胶上的蛋白质平衡吸附量与该蛋白质在液相中的平衡浓度有下列关系:

$$q = \frac{q_m C}{K_d + C} \quad (1)$$

式中  $q$  为凝胶的平衡吸附量,  $q_m$  为所能达到的最大吸附量,  $C$  为液相蛋白质浓度,  $K_d$  称为解离常数,是解吸和吸附反应速

度常数的比值。等温条件下,  $q_m$  和  $K_d$  可以认为是常数, 于是(1)式可以改写成双例数的形式:

$$\frac{1}{q} = \frac{K_d}{q_m} \cdot \frac{1}{C} + \frac{1}{q_m} \quad (2)$$

图4为  $1/q$  对  $1/C$  的实验数据关系。图中直线关系较好, 说明(1)式适用于染

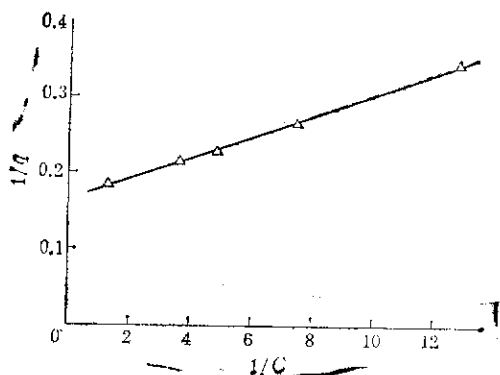


图4 凝胶吸附量( $q$ )与液相牛血清白蛋白浓度( $C$ )的关系

Fig. 4 Relationship between amount of bovin serum albumin ( $q$ ) adsorbed on the gel and its concentration ( $C$ ) in solution

料配基对血清白蛋白的吸附。从直线的斜率和截距可以求得:

$$q_m = 6.09 \text{ mg/ml}, K_d = 0.08 \text{ mg/ml}.$$

溶液中的无机盐浓度对吸附也有重要的影响, 如图5所示, 当缓冲溶液中磷酸盐浓度从20 mmol/L增大到200 mmol/L时, 血清白蛋白的吸附量由5.5 mg/ml下降到2.2 mg/ml。本文还用 NaCl、KCNS 等盐类进行了类似的实验, 亦发现吸附量随盐浓度的增高而下降。当 NaCl 浓度  $> 1.5 \text{ mol/L}$  或 KCNS  $> 0.5 \text{ mol/L}$  时, 白蛋白几乎完全不吸附。

盐浓度的影响可以从两方面考虑。一方面, 盐浓度的增加使蛋白质处于更多的离子包围之中, 与配基结合的空间障碍和静电排斥作用增大; 另一方面, 盐离子也会与配基分子的某些基团相作用, 阻碍配基与蛋白质的结合。为了提高配基吸附量,

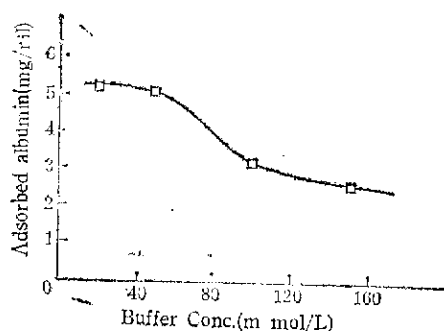


图5 缓冲盐浓度对牛血清白蛋白在AQ-Blue染料凝胶上吸附的影响

Fig. 5 Effect of salt concentration in the buffer on adsorption of bovin serum albumin by AQ-Blue dye-gel

缓冲盐 Buffer:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0

应尽量降低料液中的盐浓度。但是在低盐浓度下, 虽然血清白蛋白被吸附得多, 一些杂蛋白也可能被吸附, 影响洗脱时产物的纯度。所以, 适当提高吸附时的盐浓度, 有助于白蛋白和配基的专一性吸附, 还可以简化洗脱步骤, 提高产物的纯度和洗脱回收率。

### (三) 从血清中纯化HSA

根据上面实验的结果, 本文选择AQ-BlueⅢ凝胶, 在室温下从产妇分娩血清离心后的血清中用吸附层析法纯化HSA。上柱前用PBS将血清pH调至7.0以上, 盐浓度  $0.2 \text{ mol/L}$ 。上柱吸附后用  $0.2 \text{ mol/L}$  PBS淋洗层析柱以除去凝胶中未吸附的蛋白质, 然后采用提高盐浓度的方法将HSA洗脱下来。

图6是染料配基吸附层析HSA的洗脱曲线。洗脱采用NaCl梯度洗脱, 当NaCl浓度升至  $0.3 \text{ mol/L}$  改为  $0.3 \text{ mol/L}$  恒浓度洗脱。最后用  $0.5 \text{ mol/L}$  KCNS恒浓度洗脱。

图6有3个洗脱峰。其中第1峰是在NaCl梯度洗脱阶段出现的, 第2、3峰是在KCNS洗脱时出现的。用溴甲酚绿法<sup>[8]</sup>检测, 第1峰没有HSA, 是杂蛋白峰;

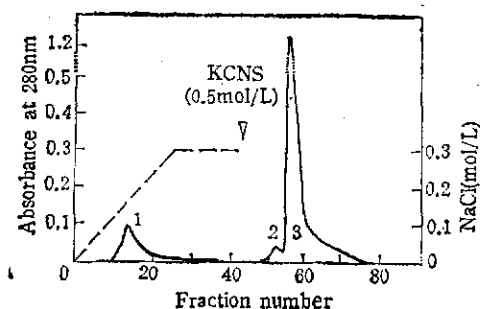


图6 染料配基吸附层析HSA的洗脱曲线

Fig. 6 Elution curve of human serum albumin in dye-ligand adsorption chromatography

洗脱流速 Flow rate of elution 14.6ml/h  
组分收集 Fractional collection 10.27 min/tube  
——蛋白质浓度 Protein conc.  
----NaCl梯度 Gradient  
.....高度省略 Height omitted

第2、3峰有HSA。将第2、3峰收集

的产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳并与标准HSA对照, 所得结果都是一条单带。洗脱回收的产物HSA占上柱的HSA总量的95%。

用染料配基吸附层析从产妇分娩血中提取HSA是一个新的尝试。传统的HSA生产是从未受污染的血浆中用硫酸铵盐析或乙醇沉淀获得的。分离步骤较多, 容易混有杂蛋白, 回收率低。用乙醇沉淀还要在低温下进行以避免使蛋白质失活。染料配基吸附层析可以在室温下操作, 吸附、淋洗和洗脱都可以实现自动化, 一步层析就可以得到高纯度的HSA, 分离效率大大提高。实验证明染料配基吸附层析可成为一种高效的工业生化分离技术。

## 参 考 文 献

- [1] Clonis, Y. D. et. al.: *J. Chromatogr.*, 363: 31—36, 1986.
- [2] Lowe, C. R. and Pearson, J. C.: *Methods in Enzymology*, Academic Press, 104:97—113, 1984.
- [3] Burton, N.: *Trends in Biotechnol.*, 6(10):231—233, 1988.
- [4] 马星华: 大连理工大学硕士论文, 1988.
- [5] 朱燕堂: 应用概率统计方法, 西北工业大学出版社, pp.114—122, 1986.
- [6] Beissner, R. S. and Rudolph, F. B.: *J. Chromatogr.*, 161: 127—135, 1978.
- [7] Chase, H. A.: *J. Chromatogr.*, 279: 179—202, 1984.
- [8] 王同明: 生物化学及检验技术, 江苏科学出版社, pp. 324—326, 1986.

## Purification of Serum Albumin by Adsorption Chromatography Using Dye-ligand

Su Zhiguo Jiang Wei Feng Pusun Gao Kunyu

(*Dalian University of Technology, Dalian*)

Dye molecules were coupled to agarose gel beads to form blue, red and yellow chromatography media for the separation of serum albumin. The adsorption properties of five dye-ligands were compared and the effects of temperature, pH, protein concentration and salt concentration upon the adsorption of serum albumin to the gels were investigated. Human serum albumin(HSA) was purified from human placental plasma by one step of dye-ligand chromatography under suitable operating condition. The product was electrophoretically pure and the elution recovery was as high as 95%. This new technique is superior to the conventional process of salting-out.

### Key words

Dye-ligand, serum albumin, adsorption chromatography