

高效亲和膜色谱快速分析及小量制备蛋白质

周冬梅 邹汉法* 倪坚毅 杨 利 贾凌云 张玉奎

(中国科学院大连化学物理研究所 国家色谱研究分析中心 大连 116011)

摘 要 以甲基丙烯酸缩水甘油酯-纤维素复合膜为基质,分别以蛋白 A(Protein A)、人免疫球蛋白 G(HlgG)、三嗪染料(Cibacron blue F3GA)、亚胺二乙酸-铜离子为配基,用不同方法制备了适合于分析及小量制备的高效亲和膜色谱介质,并对高效亲和膜色谱介质的基本性能及其应用于各种相应蛋白的定量测定情况进行了考察。利用这种方法可以针对不同的目标蛋白及所存在的环境采用不同的配基,对各种蛋白的定量测定及小量制备可达到较为满意的结果。

关键词 高效亲和膜色谱,介质制备,蛋白质的快速分析,蛋白质的小量制备
学科分类号 Q503

近年来,随着生命科学、生物技术、药学以及医疗技术的日益发展,对活性生物大分子的分析、分离和纯化的要求也越来越高。在一个生物工艺流程中,对各种组分快速的在线分析往往是必需的。亲和色谱是吸附色谱的一种,是基于优异生物特异性作用基础上的分离方法。理论上所有的生物大分子均可利用亲和色谱得到分离和纯化。由于亲和色谱的特异性很高,因而非常适合于复杂的生物大分子体系中某种物质的分离和分析。但是经典的亲和色谱由于其基质的限制,柱效较低,在流速为 1.0ml/min 时,峰宽常常达到 2min 以上^[1],因而很难用于生物大分子的分析。美国博达 Perceptive biosystem 公司于 1992 年推出的 Perfusion 色谱基质是一种较为理想的色谱基质^[2],我们曾采用以 Perfusion 为基质的灌注亲和色谱分析分离单克隆抗体^[3,4]。流速为 1.5ml/min 时,峰宽只有 0.3min。但这种基质非常昂贵,一根 20mm×0.2mm(I.D.)的色谱分析柱价格在 1000 美元以上。我们研制了一种适合于亲和分析的膜亲和基质,并与高效液相色谱仪配套使用,利用 5 种不同的配基对它进行了系统的研究。流速为 1.0ml/min 时,峰宽可以达到 0.4min,一次分析只需 5min。快速分析中一次只需 30s,使得对时间要求严格的在线分析成为可能。我们还对亲和柱用于蛋白质的小量制备进行了考察。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

Waters510 高压液相色谱泵,SP200 紫外检测器,WDL-97 色谱工作站(国家色谱研究分析中心);蛋白 A 样品由美国 CUNO 公司惠赠,人免疫球蛋白 G 标样(军事医学科学

本项目获国家自然科学基金重点基金资助。

* 为通讯联络人。

收稿日期:1997-11-17,修回日期:1998-03-31。

院)过氧化氢酶(东风生物技术公司)、亚胺二乙酸(美国 Sigma 公司),三嗪染料汽巴蓝(Cibacron blue F3GA)(北京华美公司),羊抗人免疫球蛋白 G(HIgG,卫生部上海生物制品研究所),人血浆(大连妇产科医院);所用的水为 Milli-Q 水;其它试剂均为分析纯的化学试剂。

1.2 甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)复合纤维素膜的制备

制备复合膜的过程如图 1:首先采用甲基丙烯酸环氧丙酯进行自聚反应制得聚合物,再与纤维素进行接枝反应,制得纤维素复合膜⁵¹。然后再根据配基的不同采用不同的合成方法。

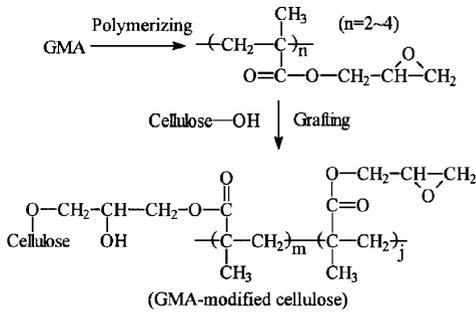


图 1 GMA-纤维素复合膜合成图

Fig. 1 Chemical structure of GMA-modified cellulose

1.3 金属螯合铜离子高效亲和膜色谱介质的合成

1.3.1 纤维素复合膜开环反应:开环反应物为亚胺二乙酸(IDA)反应 2~5h 反应后,用大量去离子水冲洗至中性,然后用乙醇或丙酮浸泡,洗去纤维表面的残余物,再用去离子水冲洗。

1.3.2 铜离子的固载:加入 1%~2%(W/V)的硫酸铜溶液(pH4.0),反应 1~2h,用大量去离子水洗至无铜离子。用原子吸收光谱法测得介质中铜离子的含量为 29 μ mol/g。

1.4 三嗪染料汽巴蓝为配基的高效亲和膜色谱介质的合成

1.4.1 纤维素复合膜酸解开环:将 0.5~1.0mol/L 盐酸溶液加入复合膜基质中,使得复合膜中的环氧基团酸解成两个邻羟基。反应后用大量的蒸馏水冲洗至中性。

1.4.2 汽巴蓝的固载:将三嗪染料溶液通过上述膜色谱柱,反应完后,用蒸馏水及乙醇溶液将亲和介质洗净。所固载的亲和配基含量为 3~5mg/g 介质。

1.5 蛋白 A、人免疫球蛋白 G 为配基的高效亲和膜色谱介质的合成

1.5.1 纤维素复合膜开环反应:与三嗪染料高效亲和膜色谱柱介质的制备相同。

1.5.2 蛋白配基的固载:首先将酸解开环的复合膜上的邻羟基用高碘酸钠溶液氧化成醛基。反应后用大量蒸馏水将膜冲洗干净。将配基溶液通过柱子进行共价键合,反应完后,用蒸馏水将亲和介质洗净。所固载的亲和配基的含量为 8~10mg/g 介质。

1.6 含己二胺间隔臂的蛋白 A 高效亲和膜色谱介质的合成

1.6.1 复合膜开环反应:开环反应物为己二胺,反应 1~3h。停止反应后,用大量去离子水冲洗至中性,然后用乙醇或丙酮浸泡,洗去纤维表面的残余物,再用去离子水冲洗。

1.6.2 蛋白 A 的固载:将过量的戊二醛溶液通过己二胺膜色谱柱,然后将蛋白 A 溶液通过膜色谱柱,同时加入胍基硼氢化钠。固载亲和配基的含量为 8~10mg/g 介质。

1.7 色谱条件

蛋白 A 柱和 HIgG 柱:上样液为 50mmol/L 磷酸缓冲液含 0.15mol/L NaCl(pH7.0),洗脱液为 0.2mol/L 甘氨酸-盐酸缓冲液(pH=2.3)⁶¹;亚胺二乙酸-铜离子柱:上样液为 20mmol/L 磷酸缓冲液含 1mol/L NaCl,洗脱液为上样液含 50mmol/L 咪唑⁷¹;三嗪染料

柱上样液为 10mmol/L Tris-HCl (pH=7.0), 洗脱液为上样液含 1mol/L NaCl^[8]。灵敏度为 0.5AUFS。上样后, 先用上样液冲洗 2min, 然后改用洗脱液冲洗 2min。

1.8 蛋白 A 高效亲和膜色谱制备柱对 HIgG 的吸附量及非特异性吸附的测定

蛋白 A 高效亲和膜色谱柱的非特异性吸附用亲和膜对 BSA 的吸附来衡量。将过量 HIgG 或 BSA 样品循环上样 10min, 然后用洗脱液将膜色谱柱吸附的 HIgG 或 BSA 洗脱下来, 收集洗脱液, 用紫外分光光度计检测 HIgG 的含量。

1.9 分析型高效亲和膜色谱柱的非特异性吸附的测定

称量 BSA 样品, 用上样液配制成 5mg/ml 的溶液, 在上述色谱条件下, 上样 20 μ l。

1.10 人血浆中 HIgG 的定量测定

1.10.1 定量标准曲线的测定: 于实验前准确称量冻干标准品, 用上样液配制成 1.25、2.50、3.75、5.00、10.00、20.00mg/ml 的标准样溶液, 准确吸取 20 μ l 进样, 以峰面积对进样量进行线性拟合得出定量标准曲线。

1.10.2 HIgG 的定量测定: 将冰冻保存的人血浆用 37 $^{\circ}$ C 的水浴融化, 用上样液稀释 10 倍。将稀释 10 倍的人血浆上样 20 μ l, 根据所得峰面积进行标准曲线定量。

1.10.3 HIgG 的快速定量测定: 将流速提高到 3.0ml/min 并相应改变冲洗梯度, 分别将标准 HIgG 的溶液和稀释 10 倍的人血浆上样 20 μ l, 并进行单点定量。

2 结果和讨论

2.1 柱压与流速的关系

高效液相膜色谱柱中柱压与流速的关系如图 2。由图中可见, 流速在 0.0~0.5ml/min 的范围内, 柱压为 0; 在 0.5~3.0ml/min 的范围内, 柱压的变化基本是一条直线, 而不是像琼脂糖基质那样有一个压力的突升。

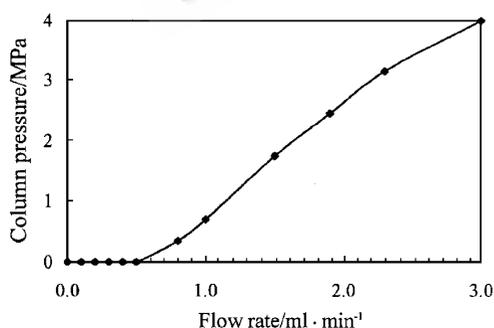


图 2 蛋白 A 高效亲和膜柱上柱压与流速的关系

Fig.2 Column pressure vs. flow rate on protein A column
Column 20mm \times 4mm I.D.

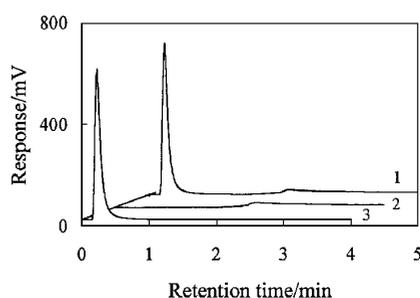


图 3 蛋白 A 高效亲和膜分析柱对 BSA 的非特异性吸附

Fig.3 Non-specific adsorption of BSA
(1) Chromatogram of BSA (2) Baseline (3) Chromatogram of (1) (2); Flow-rate 1.0ml/min; λ = 280nm

2.2 高效亲和膜分析柱的非特异性吸附

图 3 为蛋白 A 色谱柱上 BSA 上样的谱图、基线及去除冲洗液影响的谱图。由图中可见, 上样的 BSA 在高效亲和膜分析柱上没有保留, 高效亲和膜的非特异性吸附很低, 基本

检测不出来。

2.3 蛋白 A 高效亲和膜色谱柱定量测定及制备人血浆中 HIgG

2.3.1 定量测定 HIgG 的线性关系：标准样溶液进样 20 μ l 所得的谱图如图 4(A)。由图 4 可见，高效亲和膜色谱柱的柱效很高，在流速为 1.0ml/min 时，半峰宽只有 0.2min。所得定量标准曲线的线性相关系数为 0.999。

2.3.2 人血浆中 HIgG 的定量测定：将稀释 10 倍的人血浆上样 20 μ l 所得的谱图如图 4

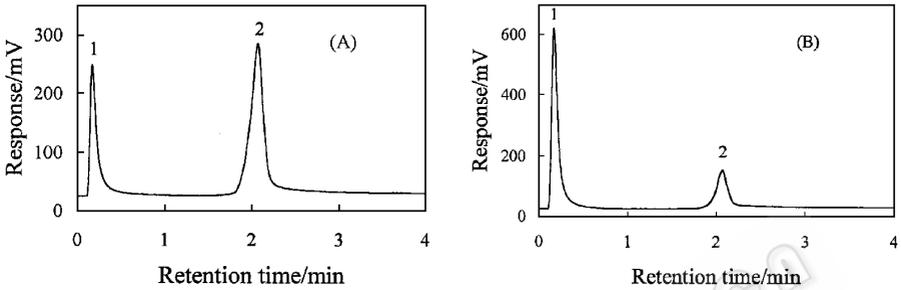


图 4 人 HIgG 样品(A)和人血浆(B)上样所得的谱图

Fig.4 Chromatogram of HIgG(A) and 10-fold diluted human plasma(B)

Flow-rate 1.0ml/min ; λ = 280nm ; 1. Impurity ; 2. HIgG

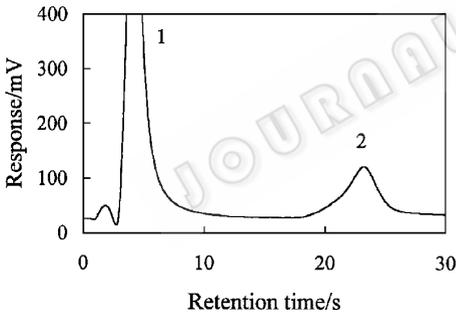


图 5 人血浆中 HIgG 的快速分析

Fig.5 Chromatogram for high-velocity analysis of HIgG in human plasma

Flow-rate. 3.0ml/min ; λ = 280nm

1. Impurity ; 2. HIgG

(B) 其中第一个峰为样品中不与蛋白 A 发生特异性作用的部分，第二个峰是样品中活性 HIgG 组分。由血浆上样谱图中 HIgG 谱峰的峰面积和定量标准曲线可得所取血浆样品中活性 HIgG 的含量为 7.8mg/ml。

2.3.3 人血浆中 HIgG 的快速定量测定：图 5 为快速分析中稀释 10 倍的人血浆上样 20 μ l 所得的谱图。由图中可见，快速分析一次只需 0.5min，使得在线分析成为可能。经单点定量可得所取人血浆中 HIgG 的含量为 9.4mg/ml。由于冲洗液中所用的盐对紫外吸收有一定的影响，使得单点定量的误差较大，最好采用定量标准曲线定量。

2.3.4 蛋白 A 高效亲和膜色谱柱制备纯化 HIgG：蛋白 A 高效亲和膜色谱柱除可用于 HIgG 的定量测定外，还可用于 HIgG 的小量制备及纯化。间隔臂己二胺虽增大了亲和膜的非特异性吸附，但同时也大大增加了亲和膜的亲和容量。这是由于间隔臂分子与其它蛋白分子之间存在着非特异性的疏水力和电荷力的作用，同时又使得蛋白 A 与目标分子发生亲和作用的空间阻碍大大减小。含间隔臂己二胺的蛋白 A 高效亲和膜色谱柱用于从人血浆中提取制备小量 HIgG，一次可制备 1.2mg，它对 BSA 的最大非特异性吸附为 0.023mg，不含间隔臂的蛋白 A 高效亲和膜色谱柱用于从人血浆中提取制备小量 HIgG，一次可制备 0.19mg，它对 BSA 的非特异性吸附基本检测不出来。

2.4 HIgG 高效亲和膜色谱柱上羊抗 HIgG 抗体的定量测定

定量标准曲线如图 6, 曲线方程为 $y = 6.6 \times 10^4 + 3.1 \times 10^4 x$, 线性相关系数为 0.998。根据定量标定曲线可对样品中的羊抗 HIgG 抗体进行定量测定。

2.5 几种不同配基用于不同蛋白的定量情况

复合膜色谱基质在固载上不同配基后可用于各种不同蛋白的定量测定及制备。表 1 总结了几种配基对相应蛋白的定量情况及应用范围。由表中可见, 几种蛋白的定量标准曲线的线性相关系数均在 0.998 以上。

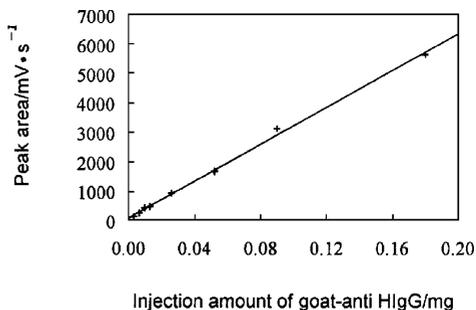


图 6 HIgG 高效亲和膜色谱柱上定量测定羊抗 HIgG 抗体的定量标准曲线

Fig.6 Calibration curve of goat anti-HIgG

表 1 几种配基对相应蛋白的定量情况及应用范围

Table 1 Determination of the protein on membrane coulmn with different ligands

| Ligand | Protein | Calibration curve equation | r | Applying range |
|----------------------|----------------|---|-------|---|
| Protein A | HIgG | $y = 5.0 \times 10^2 + 2.4 \times 10^4 x$ | 0.999 | IgGs monoclonal and polyclonal antibodies |
| HIgG | Goat anti-HIgG | $y = 6.6 \times 10^4 + 3.1 \times 10^4 x$ | 0.999 | ... |
| IDA-Cu ²⁺ | Catalase | $y = 4.4 \times 10^2 + 3.0 \times 10^4 x$ | 0.998 | Catalase, interferon, HSA... |
| Cibacron Blue F3GA | HIgG | $y = 2.6 \times 10^2 + 3.0 \times 10^4 x$ | 0.998 | HSA, interferon |

2.6 方法的重复性

在不同配基的柱子上, 用不同的标样及人血浆样品进行了方法重复性的考察, 所得的数据如表 2, 由表中可见, 标样 5 次进样、人血浆样品 3 次进样的相对标准偏差均在 3.2% 以下。

综上所述, 所制备的复合膜介质具有非特异性吸附低、机械性能好、耐压高等优点, 与液相色谱仪配

表 2 方法的重复性

Table 2 Reproducibility of Methodolgy

| Ligand | Sample | Times | R. S. D/ % |
|----------------------|----------------|-------|------------|
| IDA-Cu ²⁺ | HIgG | 5 | 0.68 |
| | Catalase | 5 | 1.80 |
| Protein A | HIgG | 5 | 1.50 |
| | Human plasma | 3 | 3.10 |
| HIgG | Goat anti-HIgG | 5 | 3.20 |
| Cibacron blue F3GA | HIgG | 5 | 0.52 |

套使用, 可应用于各种相应蛋白的定量测定及小量制备。将各种被测蛋白的峰面积对进样量进行线性拟合, 所得的线性相关系数均在 0.992 以上, 重复进样所得的相对标准偏差均在 5.0% 以下(标样 $n = 5$, 实际样品 $n = 3$)。当流速为 1.0ml/min 时, 一次分析所需的时间为 5min, 快速分析中只需 30s。含间隔臂己二胺的蛋白 A 高效亲和膜色谱柱用于从人血浆中提取制备小量 HIgG, 一次最多可制备 2mg。它对 BSA 的最大非特异性吸附为

0.023mg,不含间隔臂的蛋白 A 高效亲和膜色谱柱用于从人血浆中制备小量 HIgG,一次最多可制备 0.19mg,它对 BSA 的非特异性吸附基本检测不出来。我们所建立的这种蛋白快速分析及小量制备的方法非特异性吸附小,精确度高,重复性好,柱效高,分析速度快,针对不同的目标蛋白,可以选择不同的配基及分离条件,是一种适合于多种蛋白的快速分析及小量制备的方法,在生物工程、生物化学、药学等方面有着广阔的应用前景。

参 考 文 献

- 1 Josic D, Reusch J, Loster K *et al.* J Chromatography, 1992, **590** :59~76
- 2 Afefan N, Fulton S, Gordon N *et al.* Bio/Technology, 1990, **8** :203~206
- 3 Zhou H F, Zhang Y K, Lu P Z *et al.* Biomed Chromatography, 1996, **10** :78~82
- 4 Zou H F, Zhang Y K, Lu P Z *et al.* Biomed Chromatography, 1996, **10** :122~126
- 5 邹汉法,周冬梅,杨利等.高效亲和膜色谱分析用介质及其合成方法,中国专利申请号 97111908.2,1997
- 6 Langone J. J Immunol Methods, 1982, **55** :277~296
- 7 Fandersson L, Sulkowski E. J Chromatography, 1992, **604** :13~17
- 8 Gee A, Borsos T, Boyle M. J Immunol Methods, 1979, **30** :119~126

Fast Assay and Mini-preparation of Protein by High Performance Membrane Affinity Chromatography

Zhou Dongmei, Zou Hanfa, Ni Jianyi, Yang Li, Jia Lingyun, Zhang Yukui
(National Chromatographic R. & A. Center, Dalian Institute of
Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116011)

Abstract Several novel affinity ligands, protein A, human immunoglobulin G, iminodiacetate (IDA)-C₆(II) and cibacron blue F3GA have been coupled to GMA-modified cellulose membrane matrices for rapid assay of protein in high performance membrane affinity chromatography (HP-MAC). The non-specific adsorption of the high performance membrane media has been studied by injecting BSA on the protein A-column. The media without arm has no non-specific absorbance of BSA. The calibration curve showed a good linearity (curvefit coefficient > 0.997) for all sorts of media. The total time for separation and determination was within 5 min when flow rate was 1 ml/min, the total time of rapid assay was within 30s when flow rate was 3ml/min. Relative standard deviation of peak areas was less than 3.2% for the proteins in standard solution and human plasma. The media could also be used for mini-preparation of protein. The most HIgG that could be specifically adsorbed once was 1.2 mg and 0.19 mg by the protein A column with hexyldiamine as the arm and that without the arm respectively. The column with the arm could also maximally non-specifically adsorb 0.023 mg BSA.

Key words High-performance membrane affinity chromatography, preparation of membrane media, fast assay of protein, mini-preparation of protein