

IDA 型固定化镍离子金属螯合亲和膜色谱对 人血清白蛋白的分离纯化

杨 利 贾凌云 邹汉法 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 采用自制的固定化镍离子亚氨二乙酸 (IDA) 型复合纤维素金属螯合膜色谱对药用人血清白蛋白的进一步纯化进行了研究。考察了 pH 对 HAS 吸附效果的影响。经一步纯化, 商品药用 HSA 中的许多杂蛋白可被除去, 经毛细管电泳分析, 纯度与 Sigma 公司的电泳纯 HSA 相当, 回收率可达 85% 以上。纯化蛋白液中的镍离子经过自制的 N,N,N'-三羧甲基乙二胺 (TED) 型螯合柱处理后可较好地除去。

关键词 亲和色谱, 膜, 人血清白蛋白, 纯化, 金属螯合

中图分类号 Q814.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)01-0074-04

人血清白蛋白 (Human serum albumin, HSA) 是临床上治疗休克、失血过多等病症的常用药剂, 对其纯度要求很高, 传统的制备方法是冷乙醇沉淀法^[1]。经此法纯化的白蛋白需在稳定剂的存在下进行热处理以钝化肝炎病毒。有报道用亲和色谱^[2,3]和亲和分配法^[4]分离纯化 HSA。染料配基亲和色谱也成功地应用于 HSA 的分离纯化^[5]。固定在琼脂糖凝胶上的金属螯合配基如亚氨二乙酸 (IDA)- Cu^{2+} ^[6]和 IDA- Ni^{2+} ^[7]曾用于 HSA 的分离纯化。亲和色谱法目前已成为分离纯化生物大分子的重要手段, 分离基质普遍采用珠状颗粒的软凝胶, 如琼脂糖凝胶, 葡聚糖凝胶等, 凝胶压缩易于变形、处理速度慢等缺陷大大限制了其在大规模分离纯化中的应用。近几年产生的膜色谱分离生物大分子的方法由于具有压降低、处理速度快及成本低等优点已在国内外得到广泛的关注和大量的研究^[8,9], 并逐渐走向工业化应用。金属螯合亲和色谱法以其配基价廉, 合成方便, 可选择金属离子多, 容易再生等特点而在生化产品的分离纯化中得到广泛研究和应用。研制开发适用于大规模、快速处理蛋白原料液的新材料新方法是目前国内外方兴未艾的研究热点。我们前期研制的复合纤维素 IDA 型金属螯合膜色谱介质已成功用于过氧化氢酶的快速分离纯化及在 HPLC 上对牛血清白蛋白、过氧化氢酶和人免疫球

蛋白 G (IgG) 的快速分离分析^[10~12]。本文采用自制的复合纤维素膜为载体, 固定化金属螯合配基 IDA- Ni^{2+} 为亲和配基对商品药用 HSA 的进一步纯化进行了研究。

1 材料和方法

1.1 仪器

Model 7518-10 蠕动泵 (Cole-parmer, 美国), Model 112 紫外检测器 (Gilson, 美国); KNAUER 记录仪 (德国), RediFac 自动馏份收集器 (Pharmacia, 瑞典); 752C 型紫外可见分光光度计 (上海第三仪器厂); P/ACE System 5010 全自动毛细管电泳仪 (Beckman, 美国)。

1.2 试剂

棉纤维纸板购自新华造纸厂; 甲基丙烯酸环氧甘油酯 (GMA) 购自苏州化工厂; 亚氨二乙酸 (IDA), 人血清白蛋白 (纯度 98%) 购自 Sigma 公司 (美国); 药用人血清白蛋白 (20%) 购自 Behring 公司 (德国); 水为经过 Milli Q 水处理系统处理过的超纯化。其它均为国产分析纯试剂。IDA 和 TED 型螯合膜介质的制备分别参见文献 [13, 14]。

1.3 缓冲液 pH 值对 HSA 动态吸附量的影响

配制含 1mol/L NaCl, pH 分别为 6.0、6.7、7.05、7.4、8.1 和 8.65 的磷酸盐缓冲液。0.05mL

HSA(20%) 溶液分别用上述缓冲液稀释至 1mL,以 1.5mL/min 的流速泵入轴向膜色谱柱(6mm × 16mm I. D.),用平衡缓冲液洗至基线,然后用含 1mol/L NaCl, pH6.0 的磷酸盐缓冲液, pH3.8 的醋酸盐缓冲液洗脱,最后用 50mmol/L EDTA-1mol/L NaCl 洗去镍离子使柱子再生。

1.4 色谱分离过程

分离膜色谱柱:6mm × 16mm I. D.,装有 22 片(0.4 克,干重)键合 IDA 的螯合介质,用 5mg/mL 硝酸镍溶液循环 10min,流速 1.5mL/min,去离子水洗至无 Ni^{2+} ;用 5 倍柱床体积的含 1mol/L 氯化钠的 0.02mmol/L 磷酸盐平衡缓冲液(pH7.8)平衡后,将 1mL 稀释后的药用人血清白蛋白(10mg/mL)泵入膜色谱柱,依次用 pH6.0 的上述平衡缓冲液、含 1mol/L 氯化钠的 5mmol/L 醋酸盐缓冲液(pH4.5)洗脱,流速 1.5mL/min,按洗脱峰收集洗脱液。以标准人血清白蛋白为标准在 A_{280} 下测定蛋白含量。将收集的蛋白洗脱液以 1.5mL/min 的流速经过同样规格键合 TED 膜色谱柱处理。将 TED 柱处理前后的蛋白液分别作原子吸收光谱测定镍离子浓度。

1.5 HSA 的高效毛细管电泳分析

毛细管柱:47cm × $\Phi 50\mu\text{m}$ (河北永年光学纤维厂)电极缓冲液:0.02mol/L 四硼酸钠溶液(pH = 9.2);压力进样,进样时间:2s;电压:20kV;检测波长 214nm。

1.6 固定化镍离子浓度的测定

将干燥的固定化镍离子的膜绞碎,用含 1mol/L NaCl 的 50mmol/L EDTA 萃取镍离子,用原子吸收光谱仪测定镍离子浓度。

2 结果与讨论

一般而言,较高的离子强度有利于金属螯合色谱吸附蛋白质,因此在 1mol/L NaCl 的离子强度下考察了平衡吸附缓冲液 pH 值对膜色谱柱纯化 HSA 性能的影响。从表 1 中可以看出,pH 值由 6.0 开始,吸附容量随着 pH 值增加而增大,在 pH 值增加为 7.05 后,吸附容量继续增加,但增量趋向平缓,在 pH 为 8.65 时吸附量又显著增大,这不同于 IDA 型金属铜离子螯合膜色谱柱吸附牛肝过氧化氢酶时 pH 值的影响^[10]。在这里,HSA 的等电点是 6.8,当吸附缓冲液的 pH 偏碱性时,除了亲和作用外,蛋白还会与带有正电荷的金属离子发生非选择性的静电

吸附,因此,在 pH 较高时,尽管蛋白吸附量较大,但蛋白纯化效果并不好。从电泳谱图(图 1)中可以看到,德国进口药用 HSA 中除主成分峰 4 外,尚有 1, 2, 3, 5 等多个杂质峰(见图 1(a))。图 2 是在 pH 为 7.8 时,用 IDA- Ni^{2+} 膜柱子对商品 HSA 的分离纯化谱图。为了充分利用柱子的吸附容量,在实验中上过量的 HSA 溶液,与 IDA- Ni^{2+} 不发生作用的组分及部分未结合的 HSA 先流出柱子(图 2 中峰 I),用 pH6.0 含 1mol/L 氯化钠的 0.02mmol/L 磷酸盐缓冲液洗脱吸附在膜柱子上的 HSA(图 2 中峰 II),大部分被吸附的 HSA 被洗脱下来,蛋白洗脱回收率达到 85.8%,毛细管电泳分析显示,大部分杂蛋白已经被除去(见图 1(b))。纯度与 Sigma 公司电泳纯(99%)的 HSA 产品相当(见图 1(c))。接着用含 1mol/L 氯化钠的 5mmol/L 醋酸盐缓冲液(pH4.5)洗脱,尚有少部分 HSA 和杂蛋白被洗脱下来(图 2 中峰 III)。在 pH 为 8.65 时,有许多杂质峰尚未除去(见图 1(d))。

表 1 pH 值对 IDA 型金属镍离子膜色谱柱吸附 HSA 性能的影响

Table 1 Effect of pH value on adsorption capacity of immobilized Ni^{2+} -IDA membrane cartridge

pH	HSA Bound /mg	HSA Eluted /mg	Recovery /%
6.00	0.44	0.28	63.6
6.80	0.81	0.58	71.6
7.06	1.64	1.24	75.6
7.40	1.81	1.51	83.4
7.80	2.04	1.75	85.8
8.10	2.20	1.80	81.5
8.65	6.60	6.15	93.2

Andersson 等^[15],曾用 Sepharose 6B-IDA- Ni^{2+} 进一步纯化药用 HSA,凝胶柱体积为 5mL(6.4 cm × 1cm I. D.),流速仅为 1mL/4min,而本文采用的膜色谱柱体积仅有 1mL,分离流速为 1.5mL/min 时仍具有很好的吸附及分离纯化效果,表明膜色谱介质比凝胶介质具有更好的通透性及耐压缩性,更适于生物大分子的大规模、快速分离纯化。

一般地,经金属螯合色谱纯化的蛋白溶液中常常带有这种过渡金属离子,必须将其除去才能使用,采用的方法有透析法,阳离子交换法等。透析法一般时间比较长,缓冲液消耗量大,蛋白容易失活。阳

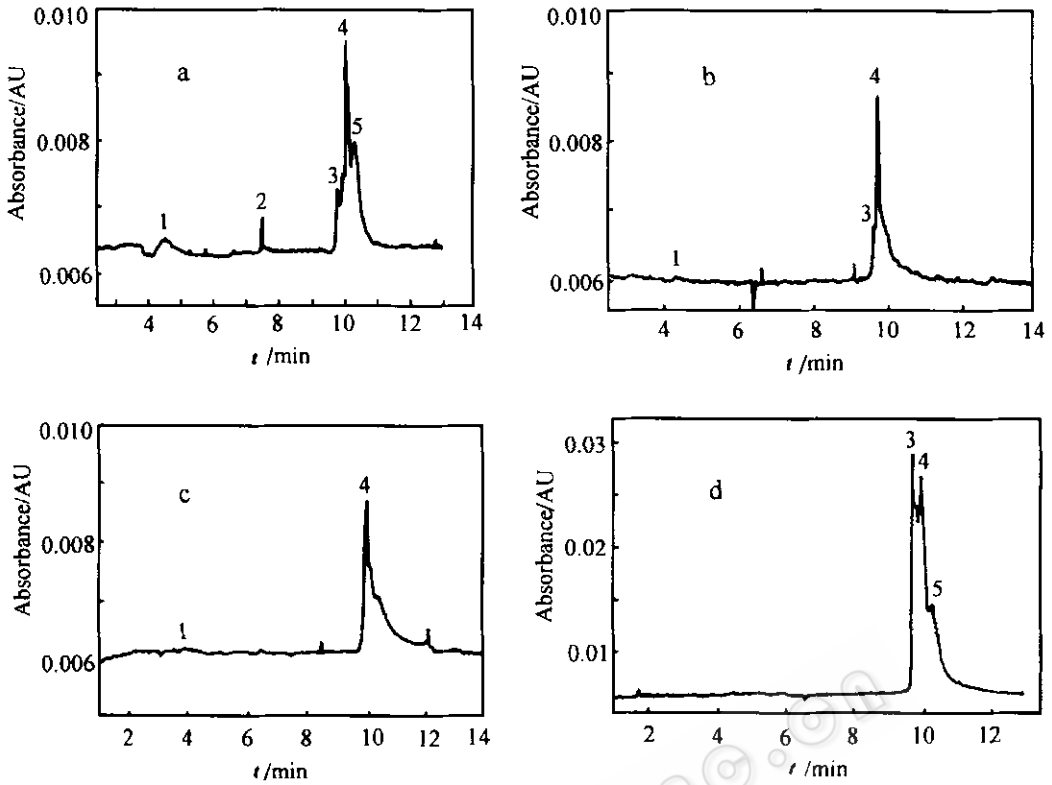


图 1 药用 HSA 纯化前后的毛细管电泳谱图

Fig. 1 Profile of capillary electrophoresis of HSA

a: Commercial HSA; b: Purified HSA at pH=7.8; c: HSA from Sigma(99%, electrophoresis); d: Purified HSA at pH=8.65

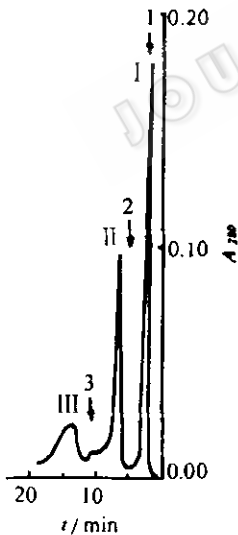


图 2 IDA 型金属镍离子膜色谱柱对药用 HSA 的分离谱图

Fig. 2 Chromatogram of purification of commercial HSA on immobilized Ni²⁺-IDA composite membrane cartridge

1 = 0.02mol/L phosphate containing 1mol/L NaCl, pH7.8; 2 = above buffer with pH6.0; 3 = 0.05mol/L acetate containing 1mol/L NaCl

离子交换法选择性低, 不仅吸附镍离子同时还吸附缓冲液中大量存在的钠离子, 去除不彻底。本文采用自制的 TED 型螯合膜介质对经 IDA-Ni²⁺ 纯化的 HSA 溶液中的镍离子的去除进行了试验, 将经 IDA-Ni²⁺ 膜色谱柱分离纯化的 HAS 直接通过 TED 膜色谱柱, 用原子吸收法测流出 HAS 溶液中 Ni²⁺ 浓度, 结果见表 2。可见, 经两次通过与 IDA 柱体积相同的 TED 柱后, 纯化蛋白液中的镍离子已达到使用要求。

表 2 TED 膜色谱柱对蛋白液中镍离子的去除
Table 2 Removing of nickel ion in HSA solution with TED membrane cartridge

HSA	Ni ²⁺ / (μg/mL)
Commercial	< 0.1
Purified with IDA-Ni ²⁺ membrane	14.75
Treated once with TED membrane	0.59
Treated twice with TED membrane	< 0.1

综上所述, 采用自制的固定化镍离子 IDA 型复合膜色谱柱对商品药用人血清白蛋白纯化后, 可去除大部分杂质, 经高效毛细管电泳分析, 纯度与 Sigma 公司的电泳纯产品相当, 蛋白回收率可达

85.8%。纯化的 HSA 溶液中的镍离子经自制的 TED 型膜色谱柱两次循环处理,可有效除去蛋白液中的金属镍离子。复合纤维素膜介质不仅原料便宜

易得,合成简便,而且具有分离速度快的优点,因此,本方法不失为一个有前途的分离纯化 HSA 的新技术。

参 考 文 献

- [1] Cohn E J ,Ground F R N ,Surgenor D M *et al.* *J Am Chem Soc* ,1950 ,**72** :465~474
- [2] Peters T ,Taniuchi H ,Anfisen C B ,*J Biol Chem* ,1973 ,**248** :2447~2451
- [3] Wichman A ,Andersson L O. *Biochim . Biophys Acta* ,1974 ,**372** :218~224
- [4] Shanbhag V P ,Johansson G. *Biochem J* ,1976 ,**157** :301~306
- [5] Saint-Blacard J ,Kirzin J M ,Riberon P *et al.* *Anal Chem Symp* ,1982 ,**9** :305~312
- [6] Hansson H ,Kagedal L. *J Chromatogr* ,1981 ,**215** :333~339
- [7] Porath J ,Olin B. *Biochemistry* ,1983 ,**22** :1621~1630
- [8] Langlotz P ,Kroner K H. *J Chromatogr* ,1992 ,**591** :107~113
- [9] Kubota N ,Miura S ,Saito K *et al.* *J Mem Sci* ,1996 ,**117** :135~142
- [10] 杨 利,贾凌云,邹汉法等. 色谱,1997 ,**15** (4) :292~295.
- [11] Yang Li ,Jia L Y ,Zou H F *et al.* *Biomed Chromatogr* ,1999 (In press)
- [12] 周冬梅,邹汉法,倪坚毅等. 生物工程学报,1998 ,**14** (4) :389~394
- [13] 杨 利,贾凌云,邹汉法等. 中国科学(B 辑)1998 ,**28** (4) :354~360
- [14] Porath J ,Olin B. *Biochemistry* ,1983 ,**22** :1621~1630
- [15] Andersson L ,Sulkowski E ,Porath J. *J Chromatogr* ,1987 ,**421** :141~146

Immobilized Ni²⁺ -IDA Metal Chelating Affinity Membrane Chromatography for Purification of Commercial Human Serum Albumin

YANG Li JIA Ling-yun ZOU Han-fa ZHNAG Yu-kui
(National Chromatographic R & A Center , Dalian Institute of Chemical Physics ,
The Chinese Academy of Sciences , Dalian 116011)

Abstract Further purification of commercial human serum albumin was studied on immobilized Ni²⁺ -IDA composite membrane cartridge. Effect of pH on HSA binding capacity was examined. A lot of impurities in the commercial HSA had been removed by a single step purification with a recovery of more than 85% of the protein bound on membrane cartridge. The purified HSA was of comparable purity of that from Sigma company analyzed by capillary electrophoresis. The nickel ion retained in the protein solution could be removed efficiently with the N,N,N'-tris (carboxymethyl) ethylenediamine chelating membrane cartridge.

Key words Affinity chromatography , membrane , human serum albumin , purification , metal chelating