

循环自由流等电聚焦方法的建立及应用研究

顾增旺 邵晓霞 张丽华 万谦 夏其昌

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

等电聚焦是利用蛋白质分子或其它两性电解质分子的等电点不同,在一个连续、稳定、线性的 pH 梯度中进行蛋白质分析分离的技术。薄层凝胶等电聚焦具有高分辨率,但上样量小,聚焦后样品分析处理不便,仅局限于分析。循环自由流液相等电聚焦以液体循环流动代替固相载体,上样量大,聚焦后样品分析处理方便,有较大的制造潜力。Bier 等^[1,2]已开展这项技术的研究。该技术应用到遗传工程上可对干扰素等进行精制纯化^[3]。本实验应用循环自由流等电聚焦仪(Recycling free-flow isoelectric focusing, RIEF)进行了 pH 梯度的建立、模型化合物的分离、相关参数的比较,并初步应用于生物活性蛋白的精制和活性回收,旨在为遗传工程产品下游工艺提供一种新型而行之有效的办法。

1 材料和方法

1.1 仪器及试剂

1.1.1 仪器:循环自由流等电聚焦仪 RF3 为美国 Rainin 公司产品。

1.1.2 试剂:两性电解质系瑞典 Pharmacia 公司或军事医学科学院产品,血红蛋白(Hb),细胞色素 C(Cyt. C),牛血清白蛋白(BSA),核糖核酸酶 A(RNase A)均为上海东风生化试剂厂产品,pH 微电极系 Beckman 公司产品(S209A),pH 计为 Hanna 公司产品(8502)。

1.2 方法

1.2.1 等电聚焦方式:循环自由流等电聚焦根据上样量的大小可采取两种方式上样,当上样量较小时,聚焦缓冲液先预聚焦,然后加入样品,当上样量较大时,将样品溶解于聚焦缓冲液中后一起加进循环系统进行聚焦,免去预聚焦程序。聚焦过程可设定在某一合适的温度下进行。聚焦一般先采用较高的电压(1000V 左右),待电流恒定后将电压降至 500~800V 稳定一段时间再收集。

1.2.2 pH 梯度的建立和测定:聚焦缓冲液最后浓度为 2% Ampholine (pH3~10),10%甘油。上述缓冲液加入聚焦仪循环系统聚焦后形成的 pH 梯度分配于 30 根管中循环流动,对应收集后用 pH 计和微量电极测定每管 pH 值。

1.2.3 相关参数的测定和比较:采用 Hb 和 BSA 作为模型化合物,测定和比较下列参数:电极液流速的测定,两性电解质流速的控制和测定。不同载样量,不同流速和是否使用冷却系统的比较,盐浓度(离子强度)影响的实验。

1.2.4 RNase A 的定量和测活^[4]:RNase A 15.7mg 在聚焦完成后收集成 30 管,测每管 280nm 下吸收,消光系数 $E_{280}^{1\%1cm} = 7.3$ 。RNase A 测活方法:0.5ml 酶稀释液与 0.5ml 0.1mol/L, pH5.0 醋酸钠缓冲液在 37℃ 预保温 5min,加入 0.5ml 1% RNA,再保温 4min,加入 0.5ml 25% 过氧乙酸终止反应,冰浴 5min 后过滤,取 0.1ml 稀释至 3ml,在 260nm 下测光吸收,活力计算公式如下:

$$u/mg = \frac{A_{260} - \times 30}{RNase A/mg}$$

2 结果和讨论

2.1 两性电解质的选择和 pH 梯度的建立

本文于 1994 年 11 月 8 日收到。

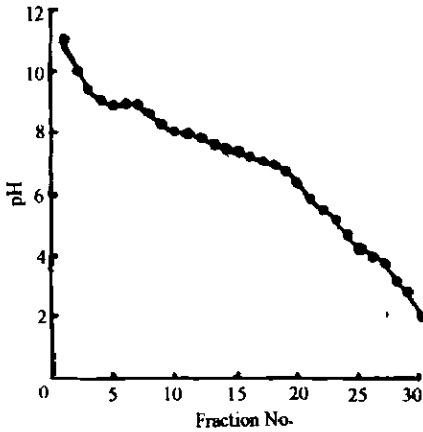


图1 pH梯度

等电聚焦的关键是能否建立连续、线性、稳定的 pH 梯度，选择合适的两性电解质是关键因素之一。早期使用单个氨基酸时，pH 范围窄，缓冲能力差，现在普遍采用的两性电解质具有趋于连续改变的氨基酸基比，能得到较平滑的 pH 梯度。图 1 是在 RF3 等电聚焦仪上得到的 pH 梯度。除此以外，考虑聚焦后样品的回收和分析测定，两性电解质必须具有较低的紫外吸收，在 280nm 波长下测蛋白质的光吸收方法既方便又不损失样品，质量较好的两性电解质紫外吸收均可忽略不计。循环自由流液相等电聚焦也可根据分离的不同要求，采用较宽 pH 范围进行分离，然后用样品等电点附近的两性电解质再聚焦而精制，有报道用此法除去 α -干扰素中的热源⁽⁶⁾。

在循环聚焦过程中一般使用的是上述连续、线性的 pH 梯度，近来也有用几种氨基酸衍生物代替两性电解质建立阶梯式 pH 梯度的探索⁽⁵⁾。

2.2 模型化合物的分离

Hb, Cyt. C, BSA 各 25mg (BSA 用溴酚蓝预染色)，混合后加入预聚焦形成的 pH 梯度中，聚焦完成后聚焦室中呈现 3 条明显的蛋白色带，收集成 30 管，分别测定每管在 410nm 和 610nm 下光吸收 (见图 2)。

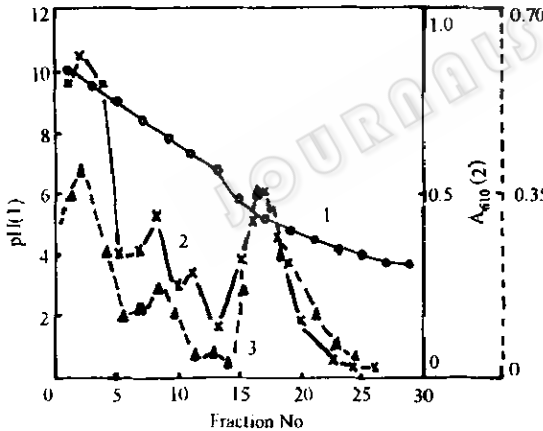


图2 Cyt. C, Hb 和 BSA 的分离

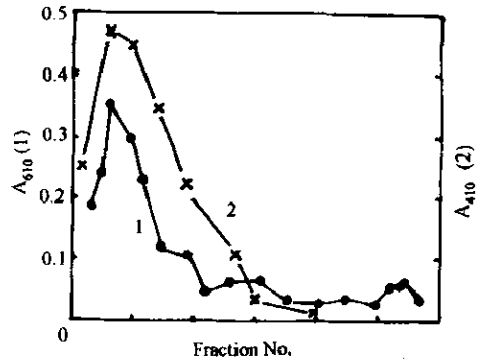


图3 RNase A 的分离

2.3 分离介质对生物活性的影响

在生物工程产品的分离纯化过程中，分离介质对样品生物活性的影响一直是关键问题之一，RIEF 以流动液体代替固相载体避免了生物样品与固相载体的相互作用，加上聚焦过程在循环流动中经过冷却系统而保持恒定合适的温度，样品生物活性回收得到了较大的改善，用 RIEF 对 RNase A 粗制剂纯化，所得蛋白峰和活力峰基本一致 (图 3)，总蛋白回收 64%，纯度提高到 99% 以上，活力回收 58%。但同样方法在精制 α -淀粉酶和醛缩酶时观察到两性电解质对酶活性有较大的影响。

2.4 相关参数的比较

2.4.1 电极室和电极液 采用恒流蠕动泵驱动电极液，用离子膜把中间聚焦池和正负电极分开，电极液循环流动不断排除聚焦时产生的气泡，避免聚焦室中液体界面的不稳定，电极液正极为 0.1mol/L

$H_2PO_4^-$, 负极为 0.1mol/L NaOH , 流速均控制在 40ml/min 。

2.4.2 两性电解质载体和样品流速及影响：由于采用双向可调速泵，液体循环流动的方向和速度可以得到控制，改变泵的方向还可以收集样品、排除气泡，流速一般控制在电极液流速的 $2\sim 4$ 倍。

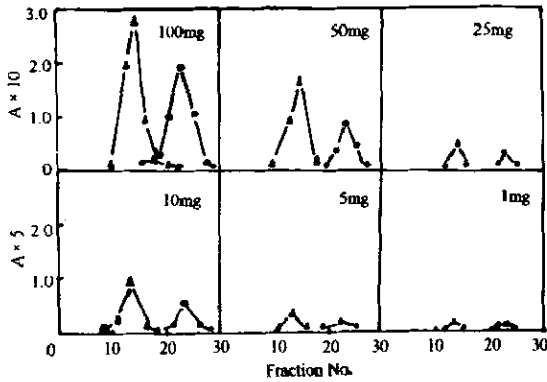


图 4 不同载样量的 RIEF 比较

—●— A_{110} , —△— A_{110}

电压/ $1\ 000\text{V}$; 流速 235ml/min ; 聚焦时间/ 105min ; 预聚焦时间/ 45min ; 温度/ 18°C

2.4.3 载样量范围：RIEF 以流动液体代替凝胶载体，载样量范围广（见图 4）。载样量的增加使该技术具有向大规模制备发展的潜力。另一方面避免了凝胶载体对样品的影响，既有利于聚焦过程中样品生物活性的保持，也使聚焦后样品的回收处理比较方便。RF3 仪器设计每次上样量达到 1g 。

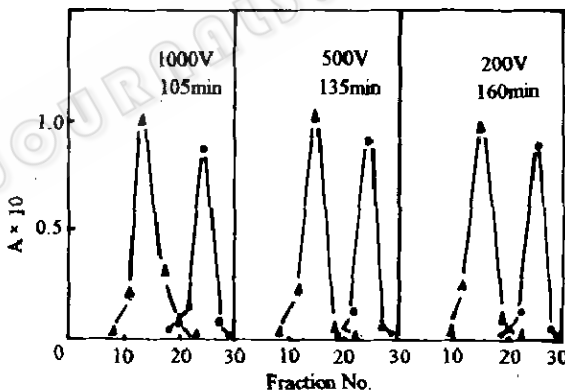


图 5 不同电压下的 RIEF 比较

上样量/ mg : $25\text{Hb} + 25\text{BSA}$; 预聚焦时间 45min ; 温度/ 18°C

2.4.4 所加电压影响样品在聚焦室电场中的移动速度：电压越高，移动速度越快，聚焦所需的时间越短（见图 5），高电压有利于减少或消除电渗的影响，但是，高电压也会使电流强度增加，产生大量的焦耳热，对流等不利因素相应增加，但如果采用预聚焦后上样，电压的影响并不明显，RIEF 过程中一般采用 1000V 左右的电压。

2.4.5 热交换系统的作用：在循环聚焦过程中引起热交换系统一方面可以控制聚焦在合适的温度下进行，不致于因温度过高而使样品的生物活性受到影响甚至丧失，恒温更重要意义还在于消除温差，从而减小对流这一影响液相中分离的不利因素。

2.4.6 聚焦过程中扩散、对流和电渗的影响：聚焦室是循环自由流等电聚焦仪的核心，在此形成连续，

线性的 pH 梯度被分成 30 个循环流动的组分而收集。聚焦池的厚度只有 0.75mm, 进出口由 30 组对应管道组成, 循环流动是高速薄层加上冷却系统的作用, 聚焦过程中扩散和对流得到了改善。电解质流动时的电渗影响因采用高电压而减小。

在聚焦过程中还必须考虑其它一些因素, 如聚焦液的盐浓度一般应控制在不超过 20mmol/L, 否则离子强度过大会使电流太大, 影响聚焦的进行和效果; 采用小体积上样较为合适, 这样可以在两性电解质预聚焦后上样, 既可以缩短聚焦时间, 又能得到较好的结果, 由于蛋白质等在等电点 pH 处容易形成沉淀, 因此, 在聚焦液中有时需加入尿素, 聚焦完成收集后立即调整 pH 值使其离开等电点。

参 考 文 献

- (1) Bier M, Twitty G E, Sloan J E. *J Chromatography*, 1989, **467**, 369~379.
- (2) Poux M, Bertrand J. *Electrophoresis*, 1990, **11**, 907~912.
- (3) Nagabushan T L, Sharm B, Trotta P. *Electrophoresis*, 1986, **7**, 552~557.
- (4) Biochemical Products Division Worthington Diagnostic Systems Inc. *Worthington Enzyme and Related Biochemicals*, Worthington U S A. 1982, pp. 184~185.
- (5) Kuhu R, Hoffstetter-kuhu S, Wagner H. *Electrophoresis*, 1990, **11**, 942~947.

Recycling Free-flow Isoelectric Focusing and its Application

Gu Zengwang Shao Xiaoxia Zhang Lihua Wan Qian Xia Qichang

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031)

Abstract A new approach of preparative electrophoresis (Recycling free-flow Isoelectric focusing, RIFE) was established. Some parameters of this method (flow rate, loading, voltage and temperature) were compared. A mixture consisting of model compounds (Hb, Cyt. C and BSA) was separated. Crude RNase A was purified and its purity was improved to above 99%. Some harmful effects in RIFE, such as diffusion, convection and electroosmosis, were discussed. High protein loading and high activity recovery were achieved.

Key words Recycling free-flow isoelectric focusing (RIFE), preparative separation of protein