

# 电泳亲和色谱技术分离蛋白质\*

鄯韶骅 刘 铮\*\* 丁富新 袁乃驹

(清华大学化学工程系 北京 100084)

**关键词** 亲和色谱, 电泳, 电泳亲和色谱, Cibacron Blue F3G-A, 人血清清蛋白

**分类号** Q512 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)03-0408-12

亲和色谱利用亲和配体与目标组分间的特异性结合作用实现对目标组分的纯化, 该分离方法分辨率高, 在生物物质的分析和分离领域得到日益广泛的应用<sup>[1]</sup>。亲和色谱在分离过程每一步操作中, 液相主体中的溶质分子必须经过一系列扩散过程才能进入到固定相颗粒孔内完成吸附或解吸等质量置换反应, 被置换出的物质再由颗粒内扩散出固定相颗粒进入流动相。与质量置换反应过程相比, 扩散过程由于速度较慢而常成为亲和色谱分离过程的速度控制步骤<sup>[2]</sup>。开发新型介质以强化扩散过程成为近年来色谱分离技术研究的热点, 典型成果有灌注色谱介质(Perfusion chromatography)<sup>[3,4]</sup>。

基于制备电泳技术方面的研究成果<sup>[5,6]</sup>, 我们提出将多通道流动电泳与亲和色谱相结合形成一种新型制备规模的生物分离技术即电泳亲和色谱技术, 其基本思想是利用电场强化扩散过程以加速分离过程的进行。我们的前期工作已证明该方法的可行性<sup>[7]</sup>。本文以人血清清蛋白(Human serum albumin, 以下简称 HSA)和 Blue Sepharose 6 Fast Flow<sup>TM</sup>介质(以下简称 Blue 介质)为例, 通过实验系统地考察电泳强度对电泳亲和和吸附和电泳洗脱过程的影响, 并用电泳亲和色谱的方法纯化 HSA。

## 1 原理与实验

### 1.1 电泳亲和色谱分离原理

电泳亲和色谱的分离原理如图 1 所示。分离过程在由膜隔开的多通道电泳槽中进行, 电场方向与各腔室中的溶液流动方向垂直。带不同电荷的蛋白质混合物进入进样室, 带电的目标组分在电场作用下迁移进入介质室, 被亲和介质吸附。带电性质与目标组分相近的杂质蛋白在电场作用下通过介质室, 继续迁移进入冲洗室并被冲洗溶液带出; 而带电性质与目标组分相反的杂质蛋白质在电场作用下直接迁移进入另一侧的冲洗室, 然后被冲洗液带出, 减少了杂质蛋白质在介质中的非特异性吸附, 从而提高了分离过程的选择性。吸附完成后, 引入洗脱缓冲溶液, 在电场作用下将目标组分从介质上洗脱下来, 并迁移入冲洗室被冲出, 完成分离过程。

### 1.2 电泳亲和色谱装置

电泳亲和色谱装置为 6 腔室结构的电泳槽, 各腔室间用膜隔开, 如图 2 所示。电极室与冲洗室之间用自行合成的 1mm 厚的凝胶膜<sup>[8]</sup>隔开; 冲洗室、介质室及进样室之间用 HT Tuffryn<sup>TM</sup>450 膜隔开。各腔室的长度均为 12 cm, 宽度增为 12 cm, 阳极室、阴极室、阳极冲洗室、阴极冲洗室、进样室和介质室的厚度分别为 4.0、4.0、3.0、4.0、3.0 和 4.5 mm。采用铂丝作为电泳槽的阳极和阴极。

\* 国家“九五”攻关项目(No. 96c-03-04-05)。

\*\* 联系人。

收稿日期: 1998-04-06, 修回日期: 1998-12-04。

### 1.3 实验方法

实验时,首先用泵将吸附缓冲溶液连续输入电极室、冲洗室和进样室,然后开启电泳仪电源。当亲和介质与吸附缓冲溶液达到平衡后,将含蛋白质的样品缓冲溶液泵入进样室,开始电泳吸附。电泳吸附过程持续约 60 min 后,进行 15 min 左右的电泳淋洗。之后关闭电泳仪电源,将缓冲溶液更换为洗脱缓冲溶液,再打开电泳仪电源,进行电泳洗脱。实验结束后,用 6 mol/L 尿素再生介质。

### 1.4 试剂

实验用的亲和介质 Blue Sepharose 6 Fast Flow<sup>TM</sup>由 Pharmacia Biotech AB 公司提供,其配体为 Cibacron Blue F3G-A,可与 HSA 产生亲和作用<sup>[9]</sup>;HT Tuffryn<sup>TM</sup>450 膜由 Gelman Sciences 公司提供,膜材料为亲水聚砜,孔径为 0.45 μm,厚度为 165 μm。Tris[三(羟甲基)氨基甲烷]、丙烯酰胺和 TEMED[N,N,N',N'-四甲基乙二胺]均为 Gibco 公司的超纯试剂;甘氨酸和 HEPES [N-双(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙磺酸]为 Boehringer Mannheim 公司的产品;甲叉丙烯酰胺购自 Fluka 公司;HSA 为 Sigma 公司产品。其余试剂均为分析纯。

### 1.5 产品测定方法

采用紫外-可见分光光度计测量溶液中的 HSA 的浓度,检测波长为 280 nm, HSA 的吸光系数为 0.53 m<sup>2</sup>/kg<sup>[10]</sup>。

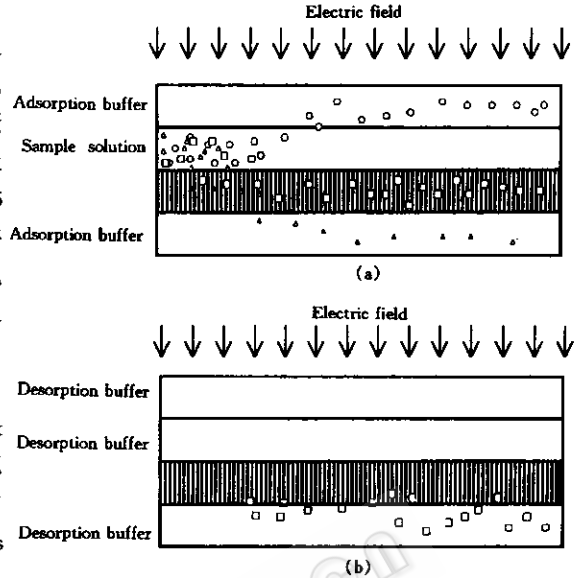


图 1 电泳亲和色谱原理图

(a) Adsorption process; (b) Desorption process

- Impurity with negative charge;
- △ Impurity with positive charge;
- Target protein with positive charge; □ Affinity gel media

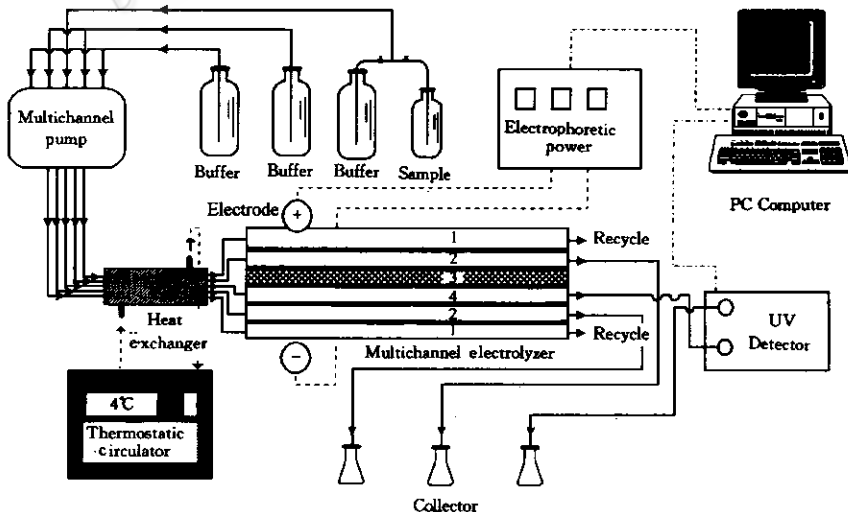


图 2 电泳亲和色谱实验流程图

1. Electrode compartment, 2. Elution compartment, 3. Gel compartment, 4. Sample compartment

## 2 结果和讨论

### 2.1 电流强度对电泳亲和吸附的影响

电泳亲和吸附实验的电泳过程均采用恒电流操作,可消除电极室生成的气泡对冲洗室和介质室中的电场的影响,便于在冲洗室和介质室中获得稳定的电场强度。同时采用交变电场技术,通过施加短时间的反向电压减少蛋白质对膜的污染<sup>[6]</sup>,所有实验中正向电压周期均为 3 min,反向电压周期为 2 s。在以 HSA-Blue 介质模式体系进行研究时,HSA 的等电点为 4.9,实验中电泳操作的缓冲溶液 pH 值均高于 4.9,HSA 始终带负电荷,且体系中不存在其他杂蛋白,故将阴极冲洗室拆除以简化设备的安装与维护。吸附缓冲溶液为 0.002 mol/L HEPES-Tris, pH 值 7.5,电导率为 100 $\mu$ S/cm。

在不同的电流强度下进行亲和吸附,实验时分别测定进样室、冲洗室出口的 HSA 浓度,通过质量衡算得到 HSA 在 Blue 介质上的吸附过程曲线,如图 3 所示。计算吸附容量,得出 Blue 介质对 HSA 的吸附容量与电流强度的关系,如图 4 所示。

从图 3、4 中可知,电流强度对吸附过程和吸附容量的影响呈现相似的规律。当电流强度从 10 mA 增至 20 mA 时,Blue 介质对 HSA 的吸附速度及吸附容量随电流强度的增大而迅速增加。而当电流强度高于 20 mA 时,继续提高电流强度,Blue 介质对 HSA 的吸附速度及吸附容量基本不受电流强度的影响。图 3 的结果表明,在电流强度低于 20mA 的实验条件下,HSA 扩散进入介质层的过程是亲和吸附过程的速度控制步骤,因而提高电流强度可使 HSA 的扩散过程大大加速。在电流强度高于 20mA 的实验条件下,吸附过程已由扩散过程控制转为质量置换反应速度控制,吸附反应速度由亲和力决定,因而受电流强度的影响不大。在电泳亲和吸附的实验条件下,电场力远弱于与配基和目标组分间的亲和吸附力,因而电流强度对吸附容量影响不大,这与 Yarmush 和 Olson 的结论是一致的<sup>[11]</sup>。当电流强度为 10mA 时,吸附容量较小是由于此时扩散阻力很大,Blue 介质与 HSA 的吸附远未接近平衡造成的。

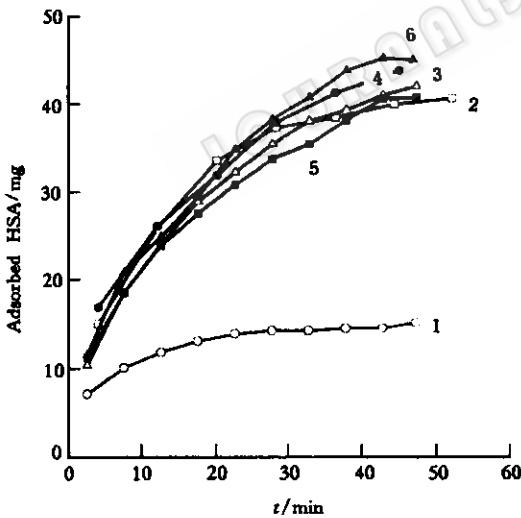


图 3 电流强度对亲和吸附过程的影响

1. 10 mA, 2. 20mA, 3. 30mA  
4. 40mA, 5. 60mA, 6. 80mA

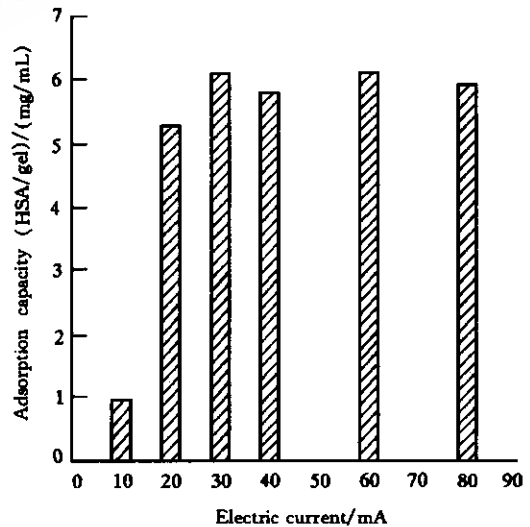


图 4 电流强度对吸附容量的影响

### 2.2 电场对电泳洗脱的影响

本文将化学洗脱与电泳洗脱相结合,进行洗脱条件优化。为此,首先考察了 Blue 介质对 HSA 的饱和吸附容量与缓冲溶液组成的关系,以选择合适的洗脱缓冲溶液,结果如表 1 所示。

表 1 的结果表明当 pH 高于 8.5 时,HSA 饱和吸附容量骤降。因此采用 0.01 mol/L Tris-Gly, pH 值

8.8, 电导率为  $90\mu\text{s}/\text{cm}$  的缓冲溶液作为洗脱缓冲溶液进行电泳洗脱实验。这部分实验中的吸附操作在无电场下进行, 采用  $0.01\text{ mol}/\text{L}$  HAc-NaAc, pH 4.2 的溶液作为吸附缓冲溶液, 在此强吸附条件下考察电场对洗脱过程的影响更为适宜。

表 1 不同 pH 值缓冲溶液对吸附容量的影响

Adsorption buffer /(mol/L)	Adsorption capacity (HSA/gel)	
	pH	/(mg HSA/g)
0.01HAc-NaAc	4.2	35.38
0.01HAc-NaAc	4.5	35.95
0.01Tris-HAc	4.9	32.88
0.01Tris-HAc	5.9	22.40
0.01Tris-HAc	7.5	12.90
0.002HEPES-Tris	7.5	9.37
0.01Tris-HAc	8.5	6.54
0.01Tris-Gly	8.5	7.65
0.01Tris-Gly	8.8	1.85
0.01 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$	10.0	6.44
0.01 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$	11.2	4.53

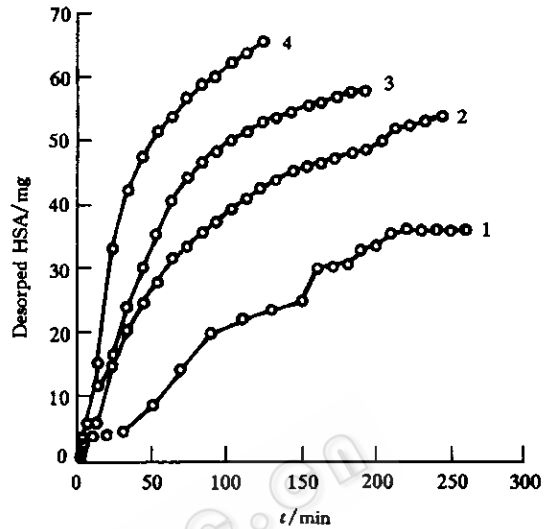


图 5 电流强度对电泳洗脱的影响

1. 20mA; 2. 40mA; 3. 80mA; 4. 100mA

电泳实验采用恒电流操作, 得到在不同的电流强度下的洗脱曲线如图 5 所示。由图 5 可知, 在电场下的解吸过程具有类似的动力学特征, 即均有开始时的高速解吸阶段转向后期的均匀低速解吸阶段。电流强度对解吸过程有非常显著的影响, 尤其是在洗脱的初始阶段, 洗脱速度随电流强度的提高而大大加快。在本文所述的实验中, 最大洗脱产量可达到平均  $30\text{ mg}/\text{h}$ 。远远高出有文献所报道的其他类型的电泳洗脱方法的结果<sup>[11]</sup>(通常低于  $1\text{ mg}/\text{h}$ ), 显示出该方法在较大规模亲和色谱分离过程中的良好应用前景。

### 2.3 电泳亲和色谱分离人血清清蛋白

为证明该方法的可行性, 在电场下完成电泳吸附及电泳洗脱过程, 吸附操作采用的缓冲溶液为  $0.002\text{ mol}/\text{L}$  HEPES-Tris, pH = 7.5, 电导率为  $100\mu\text{s}/\text{cm}$ , 电流强度为  $60\text{ mA}$ 。洗脱操作采用的缓冲溶液为  $0.01\text{ mol}/\text{L}$  Tris-Gly, pH = 8.8, 电导率为  $75\mu\text{s}/\text{CM}$ , 电流强度为  $40\text{ mA}$ 。分离过程中 Blue 介质中 HSA 的含量随时间的变化如图 6 所示。由图 6 可知, 吸附过程在  $49\text{ min}$  结束, 吸附容量为 (HSA/gel)  $6.07\text{ mg}/\text{ml}$ , 淋洗过程在  $15\text{ min}$  结束。洗脱过程在  $108\text{ min}$  结束, 洗脱速度为  $16.8\text{ mg HSA}/\text{h}$ , 电泳洗脱过程中 HSA 的回收率为  $92.3\%$ 。

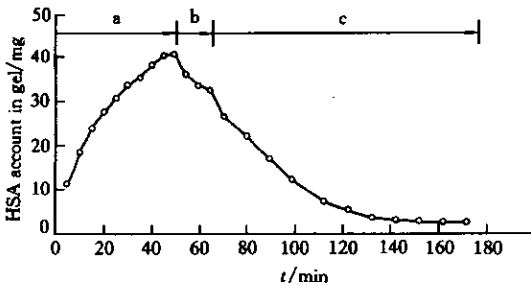


图 6 电泳亲和色谱分离人血清清蛋白

a. Electrophoretic adsorption; b. Electrophoretic washing;  
c. Electrophoretic desorption

### 3 结论

本文研究结果表明, 利用电场可加速亲和色谱分离过程中的吸附与解吸速度, 进而提高整个分离过程速度。在吸附过程中, 电场对于亲和介质饱和和吸附容量及吸附速度的影响不大; 在洗脱过程中, 洗脱速度随电流强度的变化

有显著变化,获得的电泳洗脱速度远远高于文献报道结果,显示出电泳亲和色谱在大规模生物制品分离中的良好应用前景。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] J. Turkova. Bioaffinity Chromatography. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 1993, pp. 9~30.
- [ 2 ] F. H. Arnold, H. W. Blanch, C. R. Wilke. *Chem. Eng. J.*, 1985, **30**, B9~B23.
- [ 3 ] N. B. Afeyan, S. P. Fulton, F. E. Regnier. *J. Chromatogr.*, 1991, **544**: 267~279.
- [ 4 ] A. E. Rodrigues. *J. Chromatogr. B*, 1997, **699**: 47~61.
- [ 5 ] Z. Liu, Z. Huang, J. Y. Chong *et al. Sep. Sci. & Technol.*, 1996, **31**: 1427~1442.
- [ 6 ] Z. Liu, H. Yang, Z. Huang *et al. Sep. Sci. & Technol.*, 1996, **31**: 2257~2271.
- [ 7 ] Z. Liu, S. H. Feng, S. H. Guo *et al. J. Molecular Recognition*. 1998, **11**: 151~156.
- [ 8 ] 袁乃驹, 刘铮, 朱德权等. 中国专利申请号, 1993, 93108630
- [ 9 ] T. Mahany, B. S. Kharabadi, D. M. Gersten *et al. Comp. Biochem. Physiol.*, 1981, **68B**, 319~323.
- [ 10 ] A. T. van der Scheer. Adsorption of Plasma Proteins Dissertation, University of Twente, 1978.

## Separation of Proteins by Electrophoretic Affinity Chromatography

Feng Shaohua Liu Zheng Ding Fuxin Yuan Najiu

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

**Abstract** A new kind of electrophoretic affinity chromatography (EAC) was proposed. Separation by EAC was conducted in a multicompartment electrolyzer in which the affinity gel media was packed in one of the central compartments. The presence of an electric field results in the enhancement of transportation of proteins inside the gel matrix during the adsorption and desorption process. This leads to the increase of the speed of separation. The present study was focused on the effects of the electric current on the adsorption and desorption processes. Separation of HSA by EAC with Blue Sepharose 6 Fast Flow<sup>TM</sup> was successfully achieved, in which 30.24 mg HSA adsorbed on Blue Sepharose was electrophoretically desorbed within 2 hours. This is much higher than the results reported in literature.

**Key words** Affinity chromatography, electrophoresis, electrophoretic affinity chromatography, human serum albumin, Cibacron Blue F3G-A

### 更 正

本刊 1999 年第 2 期 230 页文章的作者和工作单位标注有误, 应更正为:

邢建民<sup>1,2</sup> 赵德修<sup>\*2</sup> 李茂寅<sup>2</sup> 叶和春<sup>2</sup> 李国凤<sup>2</sup> 李佐虎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室 北京 100080)

<sup>2</sup>(中国科学院植物研究所 北京 100083)