

## 化学改性琼脂糖凝胶的物化性能 及其对重组人血白蛋白的纯化应用研究\*

赵彦鼎<sup>1,2</sup> 杨博<sup>1</sup> 张鹏宇<sup>2</sup> 王燕<sup>1</sup>  
贺小艳<sup>1</sup> 郭立安<sup>1,2</sup> 贺浪冲<sup>2</sup>

1 西安交大保赛生物技术股份有限公司, 西安 710054

2 西安交通大学天然药物研究与工程中心, 西安 710061

**摘要:** 考察了几种经过化学改性后带有离子交换配基的琼脂糖凝胶介质的理化性能。通过外形观察、元素及金属含量分析、柱效测定、耐压及流速测定、离子交换容量和蛋白吸附容量测定, 从多方面对性能进行验证比较, 并对其在分离纯化重组人血白蛋白的应用性能进行了初步研究。结果表明国产产品与进口产品理化性能相当。

**关键词:** 琼脂糖凝胶; 理化性能; 重组人血白蛋白; 分离与纯化

**中图分类号:** O63 **文献标识码:** A

### 1 前 言

以琼脂糖为基质的分离介质是目前应用于生物大分子分离纯化的最理想的材料之一, 已经在生物医药领域下游纯化工艺中得到广泛应用<sup>[1]</sup>。其中, 经过化学改性的带有离子交换配基的琼脂糖凝胶介质是目前应用较为广泛的一类。但多年来国内研究机构和企业对此类介质的使用几乎全部依赖进口, 使用效果虽好, 但价格昂贵, 且呈逐年上涨趋势。因此, 寻求价廉物美的国产产品代替价格昂贵的进口产品, 具有实际意义。

本实验通过不同测定手段, 从基质和配基两方面测定比较了国产与进口两种商品化离子交换琼脂糖凝胶的多项物理化学性能, 并考察了在分离纯化重组人血白蛋白时的性能, 证明国产与进口产品质量上相当, 可互相替换使用, 为该类填料的工业化应用提供了参考。

\* 收稿日期: 2008年5月11日

项目基金: 国家科技部创新基金 (00C26216111099) 和国家级火炬计划项目 (2002EB021309)

作者简介: 赵彦鼎(1974-), 男, 陕西省人, 高级工程师, 在职硕士。 E-mail: zhaoyanding@sina.com

## 2 实验部分

### 2.1 材料和仪器

#### 2.1.1 材料

DEAE Bio-sep FF; CM Bio-sep FF (西安交大保赛生物技术股份有限公司, Bio-sep 为其商品牌号); DEAE Sepharose FF; CM Sepharose FF (原瑞典法玛西亚公司, Sepharose 为其商品牌号); 牛血清白蛋白 (南京博全科技有限公司); 溶菌酶 (国药集团化学试剂有限公司); 重组人血白蛋白 (华北制药集团新药研究开发公司); 其它均为国产分析纯试剂。

#### 2.1.2 仪器

BT-1600 图像颗粒分析系统 (丹东市百特仪器有限公司); JSM-35CF 扫描式电子显微镜 (Scanning Electron Microscope, SEM) (日本电子公司); AKTA prime 蛋白质纯化系统 (通用电器医疗集团); UTX 元素分析仪 (美国优特公司); PROFILE SPEC 等离子发射光谱仪 (美国 LEBMAN LABS 公司); 101A-ZE 电热鼓风干燥箱 (上海实验仪器厂有限公司); HD-2 核酸蛋白检测仪 (上海沪西分析仪器厂有限公司); BT00-300T 蠕动泵 (保定兰格恒流泵有限公司); T6 新世纪紫外分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司); 层析柱规格: 1.0cm×20cm; 1.6cm×60cm (上海华美实验仪器厂)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 颗粒外观形态

通过图像颗粒分析系统自带光学显微镜以及扫描式电子显微镜观察颗粒外观形态, 使用颗粒统计软件分析统计颗粒粒径大小、形态及分布情况。

#### 2.2.2 元素分析

取少量国产和进口琼脂糖凝胶, 充分用乙醇、去离子水清洗后, 抽滤, 在干燥箱中干燥。参照仪器操作说明进行元素分析。

#### 2.2.3 柱效测定方法<sup>[2,3]</sup>

取一定量凝胶, 匀浆法装填在 1.6cm×60cm 的色谱柱中, 接色谱柱于 AKTA prime 蛋白质纯化系统上。选用 1%丙酮作为测试物质, 测定理论塔板数 ( $N$ )、折合板高 ( $h$ ) 及对称系数 ( $A_s$ )。

#### 2.2.4 耐压-流速测定方法

参考文献<sup>[4]</sup>中的方法。分别取两种高流速琼脂糖凝胶各 30mL, 装于 1.6cm×20cm 的柱中。柱床稳定后, 通过逐步间隔式增大流速, 观察压力的变化。当流速增大到一定程度时, 压力在这一流速点上不再恒定, 而是不断上升, 停止测定。记录压力在连续上升前流速和压力对应值, 绘制耐压-流速曲线。

### 2.2.5 离子交换容量测定

参考文献<sup>[2,5]</sup>中的方法,同等条件下分别测定两类层析介质的离子交换容量。

### 2.2.6 蛋白吸附容量测定

参考文献<sup>[5-8]</sup>中的方法,同等条件下分别对两类层析介质进行动态及静态吸附容量的测定。

## 3 结果与讨论

一种分离介质性能的优劣,是由基质和所带配基共同决定的,本文研究的4种琼脂糖凝胶的基质都是琼脂糖含量为6%的高流速琼脂糖凝胶微球。微球颗粒的形态、粒径大小与分布以及交联强度,都将会对柱效、耐压、流速等性能指标造成影响,高流速(Fast Flow, FF)就是表示该类基质具有在应用中可实现快流速操作的特性,这一点在工业化应用中尤为重要。不同浓度的琼脂糖凝胶、交联强度的不同和配基的不同,使得C、H、N含量有所不同<sup>[9]</sup>,通过元素分析可以比较出几种凝胶元素含量方面的差异。金属元素的含量会对分离特性造成一定的影响,因此含量越低越好。配基的考察主要是交换容量和吸附容量<sup>[5,6]</sup>。交换容量是表征离子交换介质性质的一个重要参数。对于DEAE(二乙基氨基乙基)和CM(羧甲基)两种配基类型的离子交换介质来说,其配基所带电荷为一价,所以其离子交换容量实际上就反映了离子交换基团的数目。吸附容量反映了配基对蛋白的实际结合能力,一般来说,对于同一类介质,交换容量越大,相应的吸附容量越大,层析时吸附的蛋白量也越多。最后,在分离纯化重组人血白蛋白中考察实际应用性能及重复利用性能,是对分离介质综合性能的一种反映。

### 3.1 颗粒外观形态

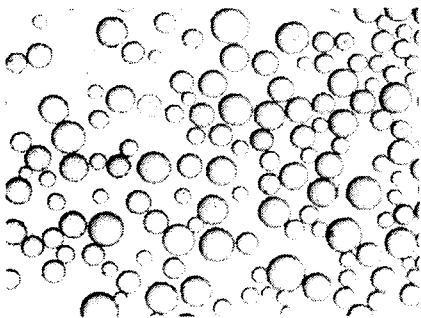


图1 CM Bio-sep FF 光学显微镜照片(×40)

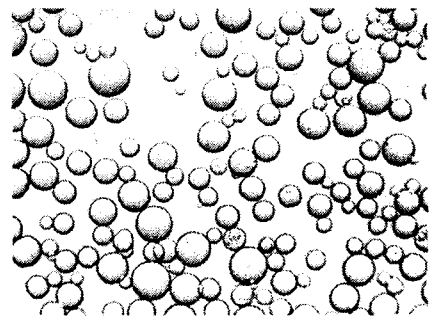


图2 CM Sepharose FF 光学显微镜照片(×40)

由于国产和进口各自两种介质的基质相同,因此各选一种进行测定对比。肉眼观察均

呈乳白色颗粒状。通过图像颗粒分析系统观察和分析,球形均完好,几乎无畸形或破碎现象(见图1、图2),国产介质粒径范围在50~150 $\mu\text{m}$ 之间,平均粒径约92 $\mu\text{m}$ ,进口介质粒径在45~160 $\mu\text{m}$ 之间,平均约83 $\mu\text{m}$ 。进一步通过扫描式电子显微镜观察,二者表面结构相似(见图3、图4)。

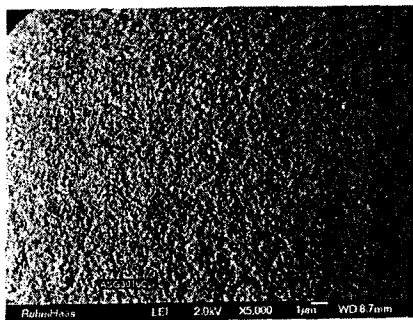


图3 CM Bio-sep FF 扫描式电子显微镜照片( $\times 5000$ )

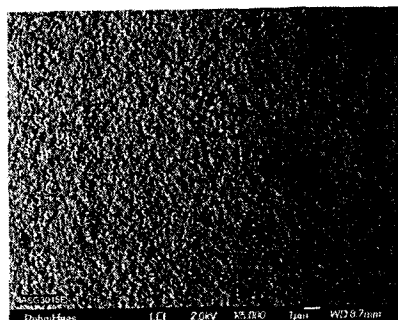


图4 CM Sepharose FF 扫描式电子显微镜照片( $\times 5000$ )

### 3.2 元素及金属含量分析

表1数据显示,带有同一类型离子配基的琼脂糖凝胶主要有机元素碳、氢、氮含量基本相同,其中碳元素含量与文献报道<sup>[9]</sup>基本相符。配基 DEAE 上因含有一个叔胺,所以 N 含量相对配基 CM 明显增多。4种介质金属含量都较低,相对来说国产两种介质中 Fe、Cr、Ni 含量较国外偏高,分析原因可能有两种情况,一是用于制备国产琼脂糖凝胶的原料中3种金属含量可能偏高,制备工艺中未能有效去除,二是制备过程中可能受到容器及工具等的污染。

表1 元素分析结果

元素	DEAE Bio-sep FF	CM Bio-sep FF	DEAE Sepharose FF	CM Sepharose FF
C	49.6%	46.6%	48.1%	44.9%
H	7.2%	5.6%	8.0%	6.1%
N	2.10%	<0.02%	2.04%	<0.02%
Pb	<1ppm	<1ppm	<1ppm	<1ppm
Fe	18ppm	31ppm	5ppm	3ppm
Cu	<1ppm	<1ppm	<1ppm	<1ppm
Cd	<1ppm	<1ppm	<1ppm	<1ppm
Cr	3ppm	6ppm	1ppm	<1ppm
Ni	2ppm	5ppm	<1ppm	<1ppm

### 3.3 柱效评价

从表 3 结果可以看出, 国产与进口几种层析介质都具有每米 5000 以上理论塔板数, 其中, 国产两种层析介质的理论塔板数相差不大, 都接近于每米 6000, 而进口两种产品中, DEAE Sepharose FF 的理论塔板数相对较低。折合板高  $h$  是一种间接评价分离介质性能的参数, 折合板高数越低, 说明柱效越高<sup>[3]</sup>, 4 种层析介质折合板高都小于 3, 表明柱子有很高的效率。峰的对称性也很好, 对称系数均在 0.8~1.0 范围内。

表 3 柱效测定结果

编号	DEAE Bio-sep FF			CM Bio-sep FF			DEAE Sepharose FF			CM Sepharose FF		
	$N$	$h^*$	$A_s$	$N$	$h$	$A_s$	$N$	$h$	$A_s$	$N$	$h$	$A_s$
1	6400	1.7	1.0	5800	1.9	0.8	5200	2.1	0.8	5600	2.0	1.0
2	5100	2.2	0.8	6100	1.8	0.9	5300	2.1	0.8	6900	1.6	1.1
3										6600	1.7	0.9
平均值	5800	1.9	0.9	5950	1.9	0.8	5250	2.1	0.8	6400	1.8	1.0

\* 折合板高  $h$ , 是以层析介质粒径为尺度来衡量的塔板高度, 它等于塔板高度除以介质粒径。 $h=H/d_p$

### 3.4 耐压及流速

耐压和流速也是反映分离介质基质性能的两个重要参数, 特别是对于 FF 类基质而言更是如此。从测定结果可看出, 国产和进口两类层析介质的耐压值都可达到 0.3MPa 以上, 流速最大均超过 1200cm/h (见图 5), 可在应用实现快流速操作。

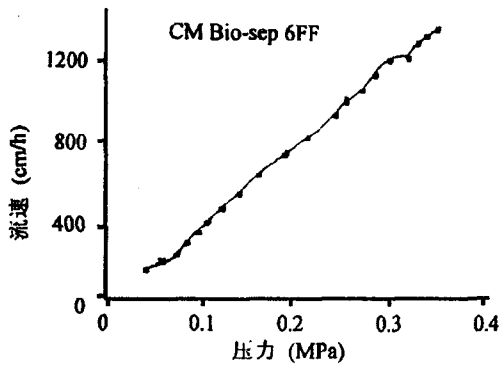


图 5 CM Bio-sep 6FF 耐压-流速曲线图

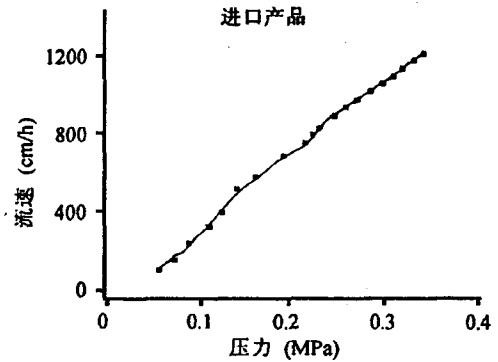


图 6 CM Sepharose FF 耐压-流速曲线图

### 3.5 离子交换容量及蛋白吸附容量

相同条件下, 测定国产与进口商品同一类介质的交换容量基本相同 (如表 4)。静态吸附容量反映了层析介质的最大吸附容量, 但动态吸附容量更能反映介质实际应用中的吸附性能。从表 4 结果中看出两类琼脂糖凝胶的吸附性能也基本相同。

表4 几种介质离子交换容量及吸附容量测定结果

测定项目	DEAE Bio-sep FF	CM Bio-sep FF	DEAE Sepharose FF	CM Sepharose FF
交换容量	106 $\mu$ mol/mL	150 $\mu$ mol/mL	112 $\mu$ mol/mL	159 $\mu$ mol/mL
吸附容量* (静)	112mg/mL	102mg/mL	109mg/mL	110mg/mL
吸附容量* (动)	66mg/mL	73mg/mL	68mg/mL	72mg/mL

\* 吸附容量测定条件: DEAE, 5mg/mL 牛血清白蛋白溶解在 50mmol/L Tris-HCL 缓冲溶液中测定, pH=8.3; CM, 5mg/mL 溶菌酶溶解在 100mmol/L 醋酸缓冲液中测定, pH=5.0

### 3.6 对重组人血白蛋白的纯化

表5结果显示, 国产 (DEAE Bio-sep FF) 与进口 (DEAE Sepharose FF) 两种介质对重组人血白蛋白具有同等能力的分离纯化功能, 都具有降低宿主色素水平 (以 A350/280 表示) 和去除宿主残糖的作用。从收率看, 使用初期国产介质较进口介质收率略偏低, 从第3次使用开始收率与进口介质相当。

表5 国产与进口 DEAE 对毕氏酵母分泌表达的重组人血白蛋白的纯化数据

样品批号	疏水收率 (%)	DEAE 收率 (%)	总收率 (%)	终产品 A350/A280 比值	糖含量 (ug/mg 蛋白)
1	A1* 76.4	A3* 62.0	47.37	0.04	3.7
	A2* 66.9	A4* 60.0	40.12	0.034	4.0
2	A1: 79.67	A3 68.63	54.68	0.02	1.94
	A2 84.53	A4 54.66	46.20	0.021	3.07
3	A1 66.16	A3 69.56	46.02	0.019	2.12
	A2 61.40	A4 75.45	46.32	0.018	1.99
4	A1 81.70	A3 52.20	42.65	0.031	3.91
	A2 74.25	A4 56.53	41.97	0.031	3.65

\* A1 是一种进口疏水层析介质; A2 是一种国产疏水层析介质;  
A3 代表 DEAE Sepharose FF; A4 代表 DEAE Bio-sep FF.

致谢: 本实验中部分图片及数据由 RohmHaas 公司参与测定, 对重组人血白蛋白的纯化数据由华北制药集团新药研究开发公司生物技术室提供, 对于他们的帮助在此表示感谢!

### 参考文献

- [1] Hochuli E., *Pure & Appl. Chem.*, 1992, 64(1): 169~184.
- [2] 李效堃, 袁辉, 药物蛋白分离纯化技术 [M], 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [3] 王俊德, 商振华, 郁蕴璐, 高效液相色谱法 [M], 北京: 中国石化出版社, 1992.
- [4] Hagel L., *Journal of Chromatography* [J], 1984, 285: 295~306.
- [5] 浦宇, 徐伟, 王芝祥, 离子交换与吸附 [J], 2004, 20(5): 470~474.
- [6] 王国祥, 聂峰光, 苏志国, 化学反应工程与工艺 [J], 2002, 18(1): 80~85.
- [7] 贺锐, 曹光群, 陈明清等, 化工进展 [J], 2007, 26(7): 991~994.

[8] Mikeš O., Štřop P., *Journal of Chromatography [J]*, 1980, 192: 159~172.

[9] Andersson M., Ramberg M., Johansson B-L., *Process Biochemistry [J]*. 1998, 33(1): 47~55.

## PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF MODIFICATION AGAROSE GELS AND THE PERFORMANCE FOR PURIFICATION OF RECOMBINATION ALBUMIN

ZHAO Yanding<sup>1,2</sup> ZHANG Pengyu<sup>2</sup> YANG Bo<sup>1</sup> WANG Yan<sup>1</sup>  
HE Xiaoyan<sup>1</sup> GUO Lian<sup>1,2</sup> HE Langchong<sup>2</sup>

1. *Bio-sep Bio-technique stock Co., Ltd, Xi'an Jiaotong University, xi'an 710054, China*

2. *Research & Engineering Center for Natural Medicine  
Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China*

**Abstract:** The physicochemical properties of some agarose gels, which were taken ion exchange functional group by chemical modification, were researched in respects of particle shape, particle size distribution, elemental and metal levels, column efficiency, back-pressure, flow-rate and the exchange capacity, the adsorption capacity, and having a preliminary study on purification of recombination albumin. The results showed that no obvious difference was observed between the national products and the external products.

**Key words:** Agarose gel; Physicochemical properties; Recombination albumin; Separation and purification.