



## 用Streamline SP从大肠杆菌中初步分离纯化anti-HBsAg Fab最适吸附条件的选择及验证

离子交换层析的基本反应过程就是离子交换剂平衡离子与待分离物质、缓冲液中离子间的交换,所以在离子交换层析中平衡缓冲液和洗脱液的pH和离子强度的选择对于分离效果有很大的影响[1]。在离子交换层析缓冲液的pH和离子强度的选择中,一般多采用电泳滴定曲线法和试管法来确定[2],但电泳滴定曲线法仅从理论上提供数值,并且实际操作复杂,多数实验室未能开展,而试管法的实验条件与离子交换层析的实验条件较为接近,方法简单,能直观、全面的反映离子交换层析的反应条件[3]。根据离子交换层析原理,平衡缓冲液中适宜的pH、离子强度能使离子交换介质与目的蛋白充分吸附,通过测定介质在不同pH与离子强度的平衡缓冲液条件下,与目的蛋白结合后上清液中目的蛋白浓度,可间接得知介质与目的蛋白充分吸附的最佳pH与离子强度[4]。抗人乙型肝炎抗原Fab片段(anti-HBsAg Fab)是完全人源化基因工程抗体,在慢性乙型肝炎及伴乙型肝炎病毒抗原阳性的肝癌中有重大治疗前景,近年来成为医学工作者研究的热点[5]。本文引入了Pharmacia提供的试管法来选择及验证Streamline SP从大肠杆菌中初步分离纯化anti-HBsAg Fab的最适吸附条件,建立了一种简单、直观、快速、高效的层析条件筛选方法,按试管法确定的最佳吸附条件进行离子交换层析纯化目的蛋白,其目的蛋白能充分分离,且能得到较满意的回收率及纯度。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 主要试剂及器材

Streamline SP(Pharmacia公司)、anti-HbsAg Fab(本实验室制备)、TTBS封闭液、转移缓冲液(本实验室配制)、辣根过氧化物酶标记羊抗人IgG $\lambda$ (博士得生物技术有限公司)、DAB显色液(博士得生物技术有限公司),其它试剂均为市售国产分析纯。Microcon YM-1离心过滤器(Millipore公司)、BCA-100蛋白质定量试剂盒(申能生物试剂有限公司)、针式Sephadex G25柱(Pharmacia公司)、1 ml SP预装柱(Pharmacia公司)。

#### 1.2 仪器

5810R高速低温离心机(Eppendorff 公司)、高速台式离心机(Sigma公司)、AKTA纯化系统(Amersham/Pharmacia公司)、THZ-82型合式恒温震荡器(上海跃进医疗器械厂)、2010酶标仪(郑州赛博仪器公司)、752型紫外光栅分光光度计(江苏太仓实验设备厂)、SDS-PAGE垂直蛋白电泳系统及半干Western blotting转印系统(Pharmacia公司)。

#### 1.3 方法

1.3.1 最佳吸附pH测定 ①待测pH定位在4.0~5.6,分别为pH4.0、4.4、4.8、5.2、5.6;取5个1 ml EP管,每管均匀等量加入0.1 ml Streamline SP阳离子交换介质;②各管分别加入1 ml 0.1 mol/L 不同pH NaAc-HAc缓冲液,混匀稍置沉降后吸弃上清,如此反复10遍使阳离子介质充分平衡各pH;③抗体蛋白同样用上述5种不同pH的缓冲液进行平衡,取5个Microcon YM-10超滤离心管分别加入100  $\mu$ l anti-HBsAg Fab在储存管内,同时加入300  $\mu$ l不同pH 0.1 mol/L NaAc-HAc缓冲液,12 000 r/min,离心35 min,弃掉收集

管内的滤过液，于储存管内再加300  $\mu\text{l}$ 不同pH0.1 mol/L NaAc-HAc缓冲液，同以上条件离心，重复5次平衡抗体蛋白pH。④将Streamline SP阳离子交换介质与抗体蛋白在EP管混合，手轻轻摇动5~10 min使介质与蛋白充分结合；⑤静置2 min待介质完全沉积下来，取上清液用BCA蛋白质定量测定分析试剂盒测定上清中的蛋白含量，在2010型酶标仪上测定其在570 nm的D( $\lambda$ )值。

1.3.2 最佳吸附离子强度测定 ①待测离子强度定位在0.1~0.8 mol/L，分别为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mol/L；取8个1 ml EP管，每管均匀等量加入0.1 ml Streamline SP阳离子交换介质；②在pH4.4下，各管分别加入1 ml间隔0.1 mol/L NaAc-HAc缓冲液，混匀稍置沉降后吸弃上清，如此反复10遍使阳离子介质充分平衡各离子强度；③抗体蛋白同样用上述8种不同离子强度的缓冲液进行平衡，取8个Microcon YM-10超滤离心管分别加入100  $\mu\text{l}$  anti-HBsAg Fab在储存管内，同时加入300  $\mu\text{l}$  pH4.4不同离子强度的NaAc-HAc缓冲液，12 000 r/min，离心35 min，弃掉收集管内的滤过液，于储存管内再加300  $\mu\text{l}$ 同上的NaAc-HAc缓冲液，离心并重复5次以充分平衡抗体蛋白离子强度。④将Streamline SP阳离子交换介质与抗体蛋白在EP管混合，手轻轻摇动5~10 min使介质与蛋白充分结合；⑤静置2 min待介质完全沉积下来，取上清液用BCA蛋白质定量测定分析试剂盒测定上清中的蛋白含量，在2010型酶标仪上测定其在570 nm的D( $\lambda$ )值。

1.3.3 1 ml SP预装柱阳离子交换层析 ①按试管法选择的Streamline SP阳离子交换介质与anti-HBsAg Fab的最适吸附pH和离子强度，平衡缓冲液(loading buffer)为pH4.4 0.1mol/L NaAc-HAc和洗脱缓冲液(elution buffer)为 pH4.4 0.1 mol/L NaAc-HAc+2 mol/L NaCl。②1 ml SP预装柱于AKTA 纯化系统中以loading buffer平衡10个体积，流速1 ml/min。③抗体蛋白anti-HBsAg Fab用针式Sephadex G25柱平衡为loading buffer。④在AKTA 纯化系统上运行自编程序，流速1 ml/min，样品体积1 ml(含纯品蛋白anti-HBsAg Fab2.5 mg)从样品环中上柱，上样后以loading buffer流洗5个体积，然后采用线性梯度模式以elution buffer洗脱，10个体积至100%。⑤收集洗脱峰，洗脱结束后以loading buffer平衡10个体积。

1.3.4 小试规模阳离子交换层析 ①1 ml SP预装柱证实经选定的离子交换层析最佳条件可行后，自装28 ml Streamline SP层析柱，直接用冻溶超声破菌离心后的上清进行离子交换层析。②使用与1 ml SP预装柱相同的平衡液和洗脱液。③于AKTA 纯化系统中以平衡液平衡Streamline SP柱10个体积，流速2 ml/min。④在AKTA 纯化系统上运行自编程序，流速2 ml/min，将样品从AKTA 纯化系统A泵中上样，菌液上清量为517 ml，上样后以loading buffer流洗5个体积，采用线性梯度模式以elution buffer洗脱，10个体积至100%。⑤收集洗脱峰，洗脱结束后以loading buffer平衡10个体积。将收集的各吸收峰，进行SDS-PAGE电泳[6]及Western blot 免疫印迹[7]。

1.3.5 统计学方法 用SPSS10.0软件进行线性回归分析。

## 2 结果

### 2.1 最佳吸附pH

试管法测定的阳离子交换层析介质Streamline SP与anti-HBsAg Fab最佳吸附pH结果见图1。将样品组的平均D( $\lambda$ )值与平均浓度求曲线方程为： $Y=-35.014+1774X$ ，曲线方程表明平均D( $\lambda$ )值与平均浓度具有曲线线性关系。在样品组S7~S11中，随着缓冲液pH不同，各组的D( $\lambda$ )、浓度会有相应变化，绘制样品组平均D( $\lambda$ )-浓度曲线后，以样品组S8的平均D( $\lambda$ )值及平均浓度最低，与S8相对应的pH为4.4，说明在此条件下目的蛋白与介质之间结合最佳，由此可确定阳离子交换层析介质Streamline SP与anti-HBsAg Fab的最佳吸附pH为4.4。

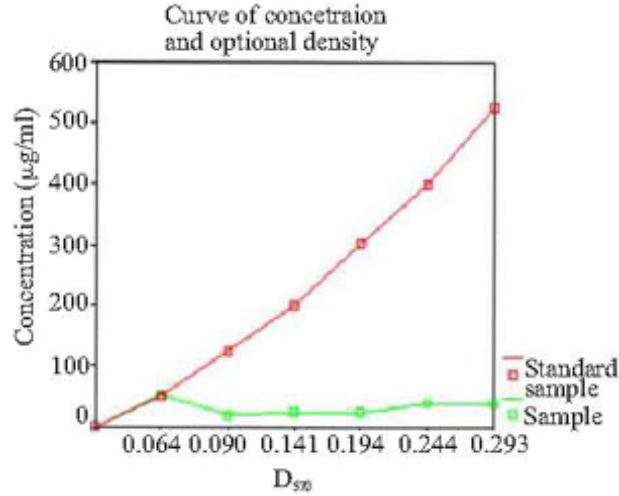


图1 试管法测定的阳离子交换层析介质 Streamline SP与anti-HbsAg Fab最佳吸附pH

Fig.1 Optimal adsorption pH of cation-exchange chromatographic media Streamline SP and anti-HBsAg Fab determined by test tube method

## 2.2 最佳吸附及洗脱离子强度

试管法测定阳离子交换层析介质Streamline SP与anti-HBsAg Fab的最佳吸附离子强度结果见图2。将样品组平均D(λ)值与平均浓度求曲线方程为： $Y=0.027+0.0005X$ ，曲线方程表明平均D(λ)值与平均浓度具有明显曲线线性关系。在样品组中，随着缓冲液离子强度的不同，各组的D(λ)、浓度会有相应变化，绘制样品组平均D(λ)-浓度曲线后，S7~S12的平均D(λ)值与平均浓度均较低，且各值之间基本无差异，与S7~S12相对应的离子强度为100 mmol/L~600 mmol/L，所以确定阳离子交换层析介质Streamline SP与anti-HbsAg Fab的最佳吸附离子强度为100 mmol/L~600 mmol/L。

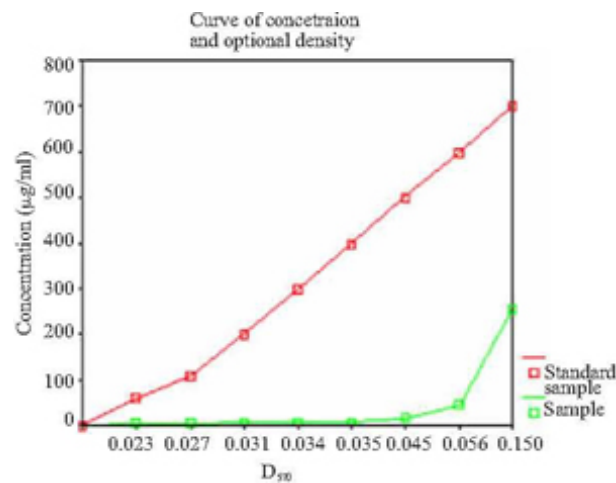


图2 试管法测定阳离子交换层析介质Streamline SP与anti-HbsAg Fab的最佳吸附离子强度  
Fig.2 Optimal adsorption ion concentration of cation-exchange chromatographic media Streamline SP and anti-HBsAg Fab determined by test tube method

## 2.3 1 ml SP预装柱阳离子交换层析结果

试管法选择阳离子交换层析介质Streamline SP与anti-HBsAg Fab的最佳吸附条件后，以纯目的蛋白anti-HBsAg Fab在1 ml SP预装柱阳离子交换层析结果如图3。图3中可见2个洗脱峰，分别为P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>，P<sub>1</sub>在19.2%洗脱盐浓度出现，而P<sub>2</sub>在29%洗脱盐浓度出现，P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>峰型规整，SDS-PAGE电泳结果证实P<sub>2</sub>含有目的蛋白，紫外光栅分光光度计测两个峰D280处吸收峰后，计算得出上样前与上样后目的蛋白浓度基本相等(上样前为2.5 mg/1ml，上样后约等于2.4 mg/1ml)，说明目的蛋白与介质能充分吸附，试管法选择的最佳吸附条件

在小量纯品试验中切实可行。

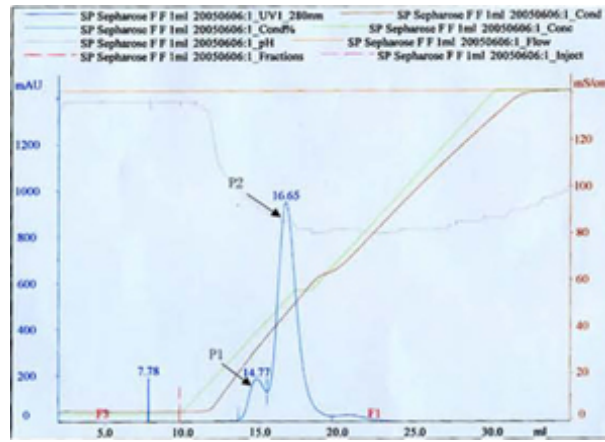


图3 1 ml SP预装柱阳离子交换层析结果  
Fig.3 Effect of cation-exchange chromatography with 1 ml SP prepacked column

#### 2.4 小试规模离子交换层析结果

小试规模阳离子交换层析结果如图4。图4可见2个洗脱峰，分别为 $P_1$ 、 $P_2$ 。上样过程有较高吸收峰，D280最高达3050 mAU，D260值最高达4830 mAU，SDS-PAGE电泳结果证实流穿液中未见目的蛋白，估计可能为核酸及杂质蛋白。 $P_1$ 在8%洗脱盐浓度出现，经SDS-PAGE电泳证实相对分子质量为30 000的蛋白为主，与目的蛋白相对分子质量接近，性质不明。 $P_2$ 在18%洗脱盐浓度出现，SDS-PAGE电泳证实相对分子质量25 000，行Western blotting 实为目的蛋白。

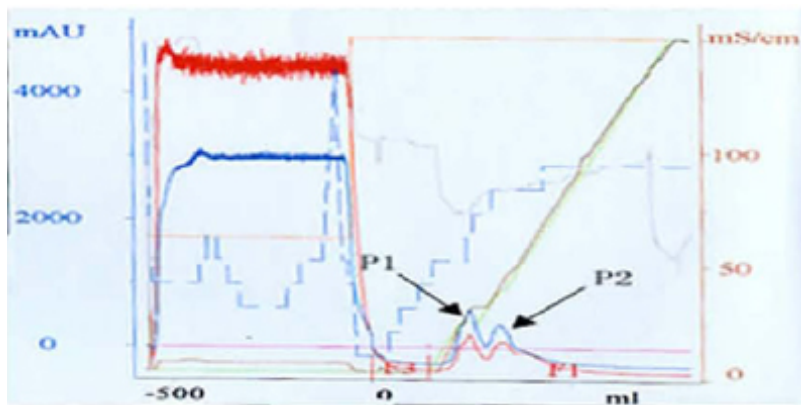


图4 小试规模离子交换层析结果  
Fig.4 Effect of cation-exchange chromatography of bench scale

#### 2.5 目的蛋白定性

将小试规模 $P_2$ 洗脱峰进行SDS-PAGE电泳及Western Blot 结果如图5、6。从图5结果得知，小试规模的 $P_2$ 在纯目的蛋白相对应处出现浅色条带，从Western blotting结果图6证实为anti-HBsAg Fab目的蛋白。



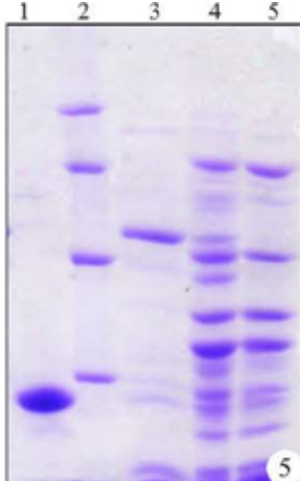


图5 SDS-PAGE电泳结果

Fig.5 SDS-PAGE result of the separated protein

Lane 1: Purified anti-HBsAg Fab (Mr=25000); Lane 2: Protein marker; Lane 3: P<sub>2</sub> supernatant of bench scale; Lane 4: Sample supernatant; Lane 5: Elution supernatant



图6 Western Blot 免疫印迹法

Fig.6 Western blotting of the separated protein

Lane 1: Purified anti-HBsAg Fab (Mr=25000); Lane 2: P<sub>2</sub> supernatant of bench scale

### 3 讨论

合适的离子交换层析条件直接关系到整个目的蛋白的分离纯化效果，在离子交换层析条件的选择中，缓冲液的pH、离子强度的选择首先要保证各个待分离物质的稳定，其次是要使各个待分离物质与离子交换介质有适当的结合，并尽量使待分离样品和杂质与离子交换介质的结合有较大的差别[8]。在阳离子交换层析纯化条件的选择中，本文引入了Pharmacia公司提供的试管法来选择阳离子交换层析介质Streamline SP与anti-HBsAg Fab的最佳吸附条件，并在此方法的操作过程中新增了原纯品目的蛋白缓冲液的置换步骤，即利用微量离心过滤器将原纯品目的蛋白缓冲液体系置换成离子交换层析缓冲液体系(在这个试验中为NaAc-HAc缓冲液体系)，使得原有纯品缓冲液体系的置换更加方便，也让试管法更加微量化、精确化、适应范围更广。作者开始便选择了Streamline SP作为离子交换层析介质是因为目的蛋白较稳定，可以选择强交换介质，而强阳离子交换基团在很广的pH范围内能够始终保持离子化状态，这有利于在离子交换过程中吸附pH及离子强度范围的选

择, 这一点对于尚未知目的分子等电点的分离尤其重要[9]。Streamline SP虽然提供了广泛的吸附pH选择范围, 但对于不同目的蛋白分离纯化在具体哪个pH范围之内才能达到最佳吸附效果却需要实验摸索确定[10]。作者将NaAc-HAc缓冲液pH预设4.0~5.6之间, 离子强度预设100~800 mmol/L之间, 其主要根据: (1) pcGene软件计算得出目的蛋白理论等电点为7.05, 在pH为4.0~5.6的缓冲液中, 目的蛋白有较好的吸附效果。(2) 离子强度的选择是根据目的蛋白的理化特性和Streamline SP提供的离子强度范围而定, 并且离子交换层析的平衡缓冲液通常采用较低盐浓度的缓冲液。经试管法验证后, 缓冲液最佳吸附pH和最佳吸附离子强度均落在预设范围之内[11]。另外, 经试管法确定最佳吸附离子强度为100~600 mmol/L, 作者最后选定100 mmol/L离子强度作为缓冲液的最佳吸附离子强度, 是因为如图2所示, 在100~600 mmol/L离子强度范围内, 平均D( $\lambda$ )值与平均浓度均较低且各值之间基本无差异, 以100 mmol/L作为平衡缓冲液的离子强度已经能够达到理想的吸附效果, 同时也方便缓冲液配制及减少试剂消耗。如果离子强度选定在试管法确定的最佳吸附离子强度的最高值, 即600 mmol/L, 有可能削弱目的蛋白与介质的静电作用从而影响目的蛋白载量, 并造成试剂不必要的浪费[11]。确定Streamline SP与anti-HBsAg Fab最佳吸附pH为4.4、离子强度为100 mmol/L后, 在此条件进行实际操作, 1 ml SP预装柱证实了试管法选定的吸附条件是适宜的, 并且上样前与上样后纯目的蛋白量基本相等, 说明在此条件下目的蛋白回收率较高。经过大量粗样品上样, 证实在此最佳吸附条件下, 目的蛋白能较好的分离。此吸附条件的确定为下一步层析纯化工艺组合路线奠定了实验基础。

#### 参考文献:

- [1] Selkirk C. Ion-exchange chromatography[J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 244(1): 25-32.
- [2] 陈枢青, 韩晓旭. 利用电泳滴定曲线选择多核苷酸磷酸化酶快速离子交换层析的最佳条件[J]. *中国现代应用药学杂志*, 1999, 2(16): 34-6.  
Chen SQ, Han XX. Use of electrophoretic titration curve for prediction optimal chromatographic conditions for purification of polynucleotide phosphorylase by fast ion-exchange chromatography[J]. *Chin Mod Appl Pharm*, 1999, 2(16): 34-6.
- [3] 赵德明, 蔡德鸿, 张 华, 等. 试管法纯化人胰岛细胞的初步研究[J]. *广东医学*, 2004, 25(2): 136-7.  
Zhao DM, Cai DH, Zhang H, et al. Preliminary study on the purification of human islet cells by tube method[J]. *Guangdong Med J*, 2004, 25(2): 136-7.
- [4] 李 津, 俞泳霆, 董德祥. 生物制药设备和分离纯化技术[J]. 北京: 化学工业出版社, 2003, 232-40.
- [5] 郑大勇, 罗荣城, 蔡红兵. 基因工程抗体anti-HBsAg Fab原核表达体系大规模培养条件的实验研究[J]. *第一军医大学学报*, 2005, 24(5): 517-20.  
Zheng DY, Luo RC, Cai HB. Conditions for large-scale production of genetically engineered E.coli bearing humanized anti-HBsAg Fab[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2005, 24(5): 517-20.
- [6] 郭尧君. 蛋白电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社. 1999: 123-57.
- [7] 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社. 1998: 366-73.
- [8] Stepnowski P, Mrozik WW. Analysis of selected ionic liquid cations by ion exchange chromatography and reversed-phase high performance liquid chromatography[J]. *Science*, 2005, 28(2): 149-54.
- [9] Malumquist G, Lundell N. Characterization of the influence of displacing salts on retention in gradient elution ion-exchange chromatography of proteins and peptides chromatography[J]. *J Chromatogr*, 1992, 627(1-2): 107-24.
- [10] 浦 宇, 王芝祥. 蛋白质层析用离子交换和疏水作用层析介质的发展概况[J]. *生物工程学报*, 2004, 20(6): 214-22.

Pu Y, Wang ZX. Advancement of ion-exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography media application in protein chromatography[J]. J Bioeng, 2004, 20(6): 214-22.

[11]李校堃, 袁 辉. 药物蛋白质分离纯化技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 130-1.

---

[回结果列表](#)