

强阴离子交换色谱结合分子排阻色谱纯化血清中 免疫球蛋白和白蛋白

秦宗华, 陈 婷, 李任强*

(暨南大学生物工程学系 广东省分子免疫与抗体工程重点实验室, 广东 广州 510632)

摘要: 动物血清中免疫球蛋白和白蛋白的等电点分别约为 7.8 和 4.8, 根据它们等电点的较大差别, 利用 Q SepharoseTM-XL 强阴离子交换色谱结合分子排阻色谱同时分离纯化这 2 种蛋白。以 0.02 mol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液平衡离子交换色谱柱并将已稀释 10 倍的高免疫的兔血清上样, 采用 pH 分段洗脱。在 pH 6.0 时以 0.3 mL/min 低流速洗脱得到高纯度的免疫球蛋白, 继续在 pH 4.0 时洗脱, 再辅以 Sephadex G-75 分子排阻色谱可获得纯度大于 95% 的白蛋白。对纯化后的蛋白进行活性检测, 证明所纯化的免疫球蛋白和白蛋白都保持正常的生物活性。蛋白质含量测定说明免疫球蛋白的纯化回收率达到 95% 以上, 而白蛋白的纯化回收率大于 90%。该法简便快速, 可同时从动物血清中纯化出保持生物活性的免疫球蛋白和白蛋白, 纯化效率高。

关键词: 阴离子交换色谱; 分子排阻色谱; 免疫球蛋白; 白蛋白; 动物血清; 纯化

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012)08-0851-05

Purification of immunoglobulin and serum albumin from serum via strong anion exchange chromatography coupled with molecular exclusion chromatography

QIN Zonghua, CHEN Ting, LI Renqiang*

(Department of Biotechnology, Jinan University, Guangdong Province Key Laboratory of
Molecular Immunology and Antibody Engineering, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The isoelectric points of immunoglobulin (Ig) and serum albumin (SA) in animal serum are about 7.8 and 4.8, respectively. Based on their larger difference of isoelectric points, Q SepharoseTM-XL strong anion exchange chromatography coupled with molecular exclusion chromatography was used to purify Ig and SA simultaneously from the high immune rabbit serum. After the Q SepharoseTM-XL strong anion exchange column was equilibrated with 0.02 mol/L Tris-HCl buffer of pH 8.0, a 10-fold dilution sample of rabbit serum was loaded onto the column and the pH gradient elution was performed. With the low flow rate of elution of 0.3 mL/min, the high-purity Ig was obtained when the elution pH was at 6.0. Continuously eluted at pH 4.0 with the same flow rate of elution, the SA was obtained and its purity was greater than 95% after molecular exclusion chromatography through Sephadex G-75. The purified Ig and SA were demonstrated to maintain normal activities by activity analysis. The results of protein content showed that the purification recoveries of Ig and SA were over 95% and 90%, respectively. The method has the advantages of simple operation and rapidity, and the Ig and SA purified simultaneously from the animal serum could maintain normal activities.

Key words: anion exchange chromatography; molecular exclusion chromatography; immunoglobulin; albumin; animal serum; purification

* 通讯联系人: 李任强, 博士, 教授, 研究方向为蛋白质工程. E-mail: trqli@jnu.edu.cn.

基金项目: 暨南大学自然科学基金项目 (109057, 640073).

收稿日期: 2012-04-05

动物血液组成成分复杂,蛋白质种类繁多。血清白蛋白(serum albumin, SA)和免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)是血清中含量最多的 2 种蛋白,在药用、生化检测、科学研究中地位十分重要^[1,2],所以关于它们的分离纯化技术研究甚多。纯化 SA 从以冷乙醇沉淀法为主发展到目前的色谱法,如离子交换色谱、凝胶过滤色谱、亲和色谱等多种色谱分离技术^[3],可以得到较好的纯化效果。同样的,对于 Ig 的纯化技术也有较多,特别是 A 蛋白亲和色谱法是最常用的分离纯化 Ig 的方法之一^[4-6]。A 蛋白是金黄葡萄球菌细胞壁的一种蛋白成分,可以和 Ig 的 Fc 片段结合,将 A 蛋白作为配基结合在介质上可用于分离 Ig。但这些方法一般是只针对一种蛋白的纯化。如果以一个方法能同时从血清中分离纯化 SA 和 Ig,则效率会大大提高。考虑到 Ig 和 SA 的等电点分别约为 7.8 和 4.8^[7],差距较大,所以本研究尝试用离子交换色谱结合分子排阻色谱从血清中同时纯化这 2 种蛋白。

离子交换色谱是依赖不同蛋白吸附于离子交换剂能力的不同^[8]进行纯化的一种简单而又迅速的技术,具有交换容量大、重复利用率高^[9]等优点。Q SepharoseTM-XL 树脂是一种高容量强阴离子吸附剂,以琼脂糖凝胶 Sepharose XL 作为载体偶联葡聚糖链,强阴离子基团以醚键牢固结合于葡聚糖链上。根据 SA 和 Ig 等电点存在较大差异的特点和此树脂的性质,本研究以上样液、洗脱液的 pH 为焦点探索利用 Q SepharoseTM-XL 强阴离子交换色谱同时分离纯化血清中 SA 和 Ig 的方法。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

Q SepharoseTM-XL 树脂(平均粒径 90 μm)购于 GE Healthcare Bio-Sciences AB;用于免疫的新西兰大白兔购自暨南大学实验动物中心;Sephadex G-75、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG、脱脂奶粉、完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂均购自 Sigma 公司;Bicin Choninic Acid (BCA)蛋白浓度测定试剂盒、三羟甲基氨基甲烷(Tris)购自广州健阳生物科技有限公司;猪瘟疫病毒为本实验室保存;其他化学试剂均为分析纯或化学纯,购自广州化学有限公司。

1.2 动物免疫与血清收集

动物免疫按常规方法^[10]进行。将猪瘟疫病毒与完全弗氏佐剂等体积混合乳化,采用多点背部皮下方式对体重约 3 kg 的雌性新西兰大白兔(300

$\mu\text{g}/\text{只}$)进行免疫。每隔 15 d 后再将 450 μg 猪瘟疫病毒与不完全弗氏佐剂等体积混合乳化对大白兔加强免疫,进行了 3 次加强免疫后从耳动脉取血。血样于室温下放置 3 h 使血清析出,再以 1 600 r/min 离心 20 min 收集血清,采用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)检测动物体内产生的抗体滴度。最后一次加强免疫后 2 周,从兔心脏取血,收集血清,于 -80°C 保存。

1.3 Q SepharoseTM-XL 离子交换色谱柱的准备与平衡

取出保存在体积分数为 20% 的乙醇中的树脂,先用去离子水充分浸泡洗涤多次,再以 0.02 mol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 平衡缓冲液洗涤浸泡,在真空干燥器中干燥后装柱,规格为 20 cm $\times$ 1.5 cm,以 0.5 mL/min 的流速用平衡液(0.02 mol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液)平衡色谱柱 6 h 以上。

1.4 上样、洗脱与样品电泳鉴定

将收集到的血清取 0.8 mL,用 0.02 mol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液稀释至 8 mL,以 0.3 mL/min 流速上样至已平衡好的 Q SepharoseTM-XL 强阴离子交换色谱柱,用平衡缓冲液继续过柱,收集在 280 nm 波长处有吸收值(A_{280})的洗出液,为峰 I(穿透峰),即未被吸附的蛋白。当穿透峰的 A_{280} 降至基线,采用分段洗脱方式,流速不变,用含 0.05 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L pH 6.0 的 Tris-HCl 缓冲液进行洗脱,收集洗脱峰,为峰 II;当 A_{280} 又降至基线后,用含 0.05 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L pH 4.0 的乙酸-乙酸钠缓冲液进行洗脱并收集洗脱峰,为峰 III。将各洗脱液用去离子水透析后,真空冷冻干燥浓缩,进行电泳鉴定。根据电泳结果将峰 III 部分再通过规格为 30 cm $\times$ 1.5 cm 的 Sephadex G-75 分子排阻色谱柱分离,上样和洗脱均采用去离子水,收集最大峰。分别使用还原性十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和非还原性 SDS-PAGE 进行电泳鉴定。还原性电泳分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 4%^[11],而非还原性电泳分离胶浓度为 8%,浓缩胶浓度为 3%。采用电泳分析系统对电泳图像进行分析。以 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定各蛋白样品的浓度。

1.5 蛋白样品活性检测

1.5.1 白蛋白清除超氧自由基能力的测定

白蛋白具有清除超氧自由基的能力^[12,13]。采用改良后的邻苯三酚自氧化法^[14]测定白蛋白的清除超氧自由基的能力。加 0.05 mol/L pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲液 4.5 mL 于试管中,置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴

中 20 min。依次加入不同体积的白蛋白溶液,同时减少相应体积的缓冲液,再加入 25 °C 预热过的邻苯三酚 10 μ L(对照管用 10 mmol/L HCl 代替),迅速摇匀倒入 1 cm 厚的比色杯,在 325 nm 处每隔 30 s 记录一次消光值,线性时间为 4 min,根据邻苯三酚的自氧化速率计算抑制率(inhibition ratio),以抑制率的大小表示白蛋白的活性。

$$\text{inhibition ratio} = \frac{F_o - F_s}{F_o} \times 100\%$$

公式中 F_o 为邻苯三酚的自氧化速率; F_s 为添加样品(白蛋白)后的氧化速率。

1.5.2 间接 ELISA 方法检测 Ig(抗体)的活性

首先通过棋盘法确定猪瘟病毒的最佳包被浓度^[15]。将猪瘟病毒用 0.05 mol/L, pH=9.6 的碳酸盐缓冲液按最佳包被浓度包被酶标板,于 4 °C 过夜;每孔加入用 PBST(磷酸缓冲液和吐温-20 的混合液)配制成的 50 g/L 的脱脂奶粉封闭,37 °C 孵育 1 h;不同稀释浓度的 Ig 为一抗,37 °C 孵育 1 h;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 Ig 为二抗(1:8 000 稀释),于 37 °C 孵育 0.5 h;加入 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色液,避光显色 15 min;以 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,在 450 nm 处检测其消光值(O.D.₄₅₀)。

2 结果与讨论

2.1 离子交换色谱分离结果

图 1 为离子交换色谱分离血清蛋白的色谱图。几乎没有穿透峰(峰 I),说明在 pH 8.0 时血清中

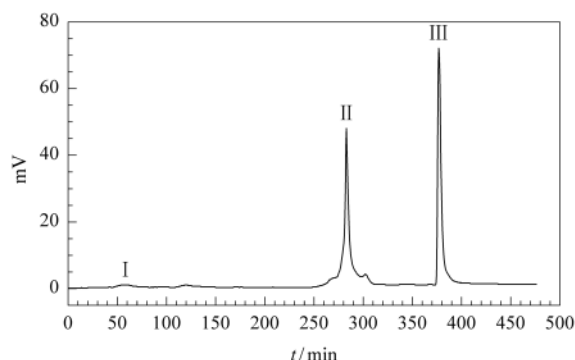


图 1 Q Sepharose™-XL 阴离子交换色谱分离兔血清蛋白的色谱图

Fig. 1 Elution profile of rabbit serum protein with Q Sepharose™-XL anion exchange chromatography

Equilibrium solution: pH 8.0, 0.02 mol/L Tris-HCl buffer; eluent 1 (peak II): 0.02 mol/L pH 6.0 Tris-HCl buffer containing 0.05 mol/L NaCl; eluent 2 (peak III): 0.02 mol/L pH 4.0 NaAc-HAc buffer containing 0.05 mol/L NaCl; temperature: room temperature. Peak I: penetration peak.

几乎所有蛋白都被离子交换色谱柱吸附。峰 II 和峰 III 的蛋白成分如 SDS-PAGE 图谱(见图 2)所示,泳道 1 为免疫血清,泳道 2 为峰 II 的蛋白,而泳道 3 则为峰 III 的蛋白。

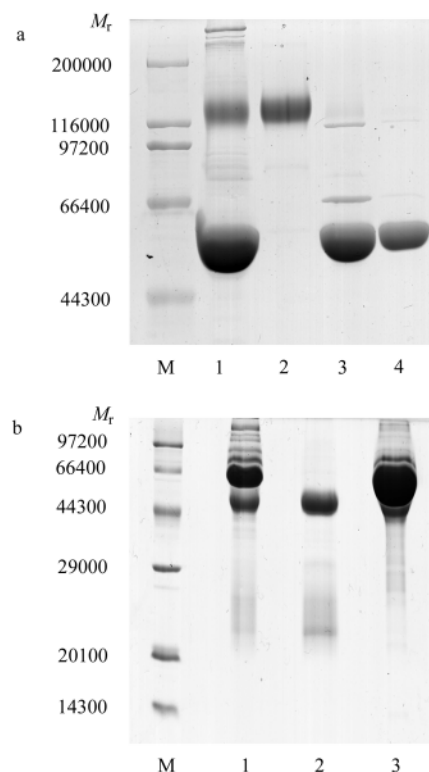


图 2 蛋白样品的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 Analysis of SDS-PAGE of protein samples

a. non-reduced; b. reduced.

Lane M: relative molecular mass marker; lane 1: rabbit serum after immunization; lane 2: purified Ig from peak II; lane 3: proteins from peak III; lane 4: protein purified with Sephadex G-75 molecular exclusion chromatography from peak III.

在非还原性 SDS-PAGE 图谱(见图 2a)中,峰 II 蛋白较纯,由电泳分析系统读出其相对分子质量为 130 000~160 000,与相对分子质量 150 000 的 Ig 相当;而在还原性 SDS-PAGE 图谱(见图 2b)中,这个蛋白变为二条带,相对分子质量分别约为 50 000 和 25 000,这与报道中 Ig 含一条重链、一条轻链的相对分子质量相吻合^[16]。因此判断洗脱峰 II 中主要为 Ig,并由电泳密度扫描显示其纯度达到 95% 以上。泳道 3 的峰 III 蛋白在还原性 SDS-PAGE 中,主要是相对分子质量约为 63 000 的蛋白,但除了此蛋白外还含有其他蛋白。此蛋白在非还原性 SDS-PAGE 中呈弥散状,相对分子质量在 50 000 到 63 000 之间(泳道 1:50 000~61 000;泳道 3:53 000~63 000;泳道 4:55 000~63 000),平均约 60 000,比在还原性 SDS-PAGE 中显示的相对分子质量要小些,与前人研究结果^[17]吻合。根据此蛋白在血清

蛋白中所占的比例及相对分子质量,判断此蛋白为 SA,即峰Ⅲ蛋白主要为 SA,电泳扫描显示其纯度在 85%以上。为了使 SA 更纯,将洗脱峰Ⅲ收集的蛋白液进行 Sephadex G-75 分子排阻色谱,得到的 SA 经检测其纯度可提高到 95%以上(见图 2a,泳道 4)。

2.2 纯化蛋白质的回收率

将收集的免疫血清电泳后(图 2a,泳道 1)进行密度扫描分析(如图 3),并根据图 3 给出的数据(由该分析系统给出)得到血清中各蛋白的相对含量,结果列于表 1。结合各蛋白带在电泳图谱中的位置,可知峰 4 和峰 6 分别代表 Ig 和 SA,且 Ig 占蛋白总量约 17.58%,而 SA 占约 77.18%。通过 BCA 试剂盒对纯化出的 SA、Ig 和蛋白总量等进行蛋白浓度的测定计算,得出各蛋白质的回收率(列于表 2)。

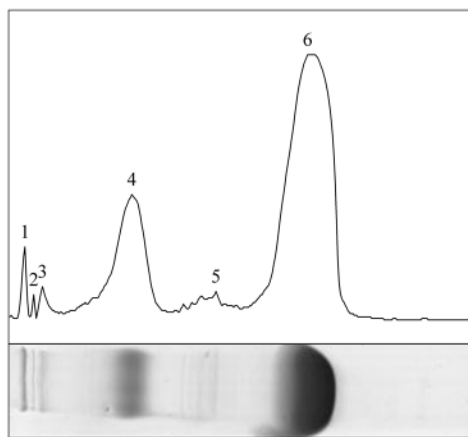


图 3 血清样品中蛋白相对含量分析
Fig. 3 Analysis of relative contents of proteins in serum

表 1 图 3 中各蛋白组分(不同峰)的百分含量
Table 1 Percentages of proteins (different peaks) in Fig. 3

Peak No.	Integrated optical density (IOD)	Percentage/%
1	25.76	1.58
2	4.87	0.30
3	19.63	1.20
4	286.65	17.58
5	35.14	2.16
6	1258.41	77.18
Total		100

表 2 纯化蛋白质的回收率
Table 2 Recoveries of purified proteins

Sample	Protein content/ mg	Percentage in total serum protein/%	Recovery/ %
Immune serum	55.096	100	
Elution peak II (Ig)	9.281	16.85	95.8
Elution peak III (crude SA)	41.033	74.48	
SA obtained after G-75 purification	38.682	70.21	91.0

2.3 纯化蛋白质的生物活性

对纯化得到的 SA 的清除超氧自由基能力的测定结果以图 4 表示。随着 SA 量的增加,蛋白质对邻苯三酚的抑制率呈线性增大,当加入体积为 80 μL 时,抑制率达到 38%。这说明纯化得到的是 SA 且生物活性正常。检测 Ig 活性的 ELISA 测定结果如图 5 所示,随着 Ig (抗体)稀释倍数的增加, O.D.₄₅₀ 逐渐降低,这表明随着抗体量的增大,抗体与抗原结合的能力逐渐增强,从而验证了本色谱法纯化得到的抗体具有正常的免疫活性。

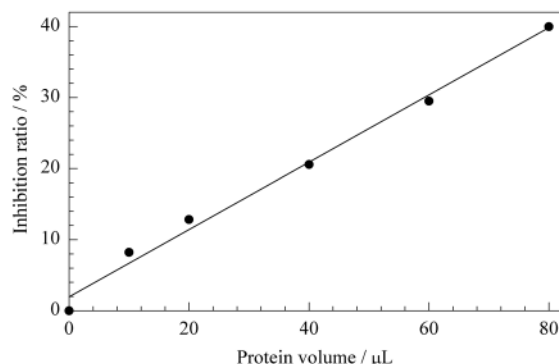


图 4 血清白蛋白清除超氧自由基的能力
Fig. 4 Scavenging effect of superoxide anion
by serum albumin

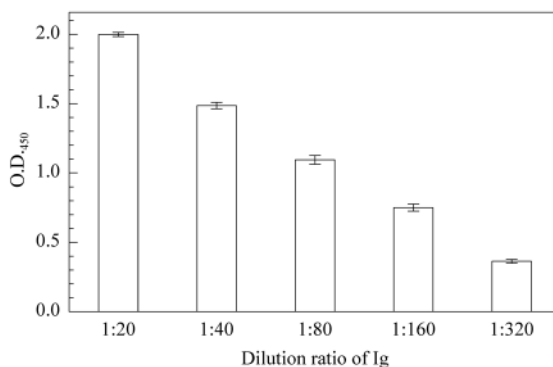


图 5 不同稀释率下 Ig 的活性($n=3$)
Fig. 5 Activities of the purified Ig at different
dilution ratios ($n=3$)

2.4 讨论

由于 SA 和 Ig 的等电点差异较大,采用同一离子交换色谱柱,通过调整洗脱液的 pH 能很好地把它们分离。样品上柱用稍高于 Ig 等电点的 pH 8.0,可将 SA 和 Ig 吸附于色谱柱上,同时可把等电点大于 8.0 的一些蛋白质去除,由实验结果看这一部分蛋白质(穿透峰,峰 I)的含量很少。选择 pH 6.0 的洗脱液洗脱 Ig 的目的是把 Ig 与 SA 分离,结果显示得到的 Ig 很纯且回收率也高,这不仅说明选用 pH 6.0 正确,还说明 Q Sepharose™-XL 离子交换剂性质相当好,而低流速(0.3 mL/min)洗脱也有

助于蛋白质的分离。最后用低于 SA 等电点的 pH 4.0 的洗脱液洗脱 SA, 所得蛋白质样品不纯, 但由于 SA 在血清中含量大, 通过简单的分子排阻色谱可以提高 SA 的纯度, 也能达到满意的效果。从本研究看, 选用以强 Q 阴离子基团为功能团的 Q SepharoseTM-XL 离子交换剂和精心设定进行色谱操作的 pH 值, 以及使用较低的洗脱速度是实验获得成功的原因。显然, 本研究说明了利用 Q SepharoseTM-XL 离子交换色谱结合分子排阻色谱可以同时高效快速的纯化得到保持生物活性的 SA 和 Ig。

3 结论

本实验根据动物血清中 Ig 与 SA 等电点的较大差别, 采用 Q SepharoseTM-XL 离子交换色谱结合 Sephadex G-75 分子排阻色谱, 通过分段洗脱可同时从动物血清中纯化得到保持生物活性的 Ig 和 SA, 且 2 种蛋白质的纯化回收率都在 90% 以上。本实验操作便捷快速, 离子交换色谱和分子排阻色谱柱可反复使用, 成本较低, 具有很好的实用性。

参考文献:

- [1] Manole M D, Kochanek P M, Foley L M, et al. J Cereb Blood Flow Metab, 2012, 32(3): 560
- [2] Quinti I, Soresina A, Guerra A, et al. J Clin Immunol, 2011, 31(3): 315
- [3] Sahab Z J, Iczkowski K A, Sang Q X A. Anal Biochem, 2007, 368: 24
- [4] Hober S, Nord K, Linholt M. J Chromatogr B, 2007, 848(1): 40
- [5] Huang B, Liu F F, Dong X Y, et al. J Phys Chem B, 2011, 115(14): 4168
- [6] Hey C, Zhang C M. Chem Eng Technol, 2012, 35(1): 142
- [7] Xiong Q R, Niu R J, Xie Q Y, et al. Food Science (熊齐荣, 牛瑞江, 解泉源, 等. 食品科学), 2011, 32(13): 259
- [8] Pessela B C C, Munilla R, Betancor L, et al. J Chromatogr A, 2004, 1034(1/2): 155
- [9] Goheen S C, Hilsenbeck J L. J Chromatogr A, 1998, 816(1): 89
- [10] Khan A A, Akhtar S, Husain Q. Process Biochem, 2005, 40(7): 2379
- [11] Yu R Y, Yuan M X, Chen L R, et al. Principle and Method of Biochemistry Experiment. Beijing: Peking University Press (余瑞元, 袁明秀, 陈丽蓉, 等. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社), 2005
- [12] Patterson L K, Maziere J C, Bartels D M, et al. Amino acids, 2012, 42(4): 1269
- [13] Li J S, Wang Z Q, Wang J, et al. J Lumin, 2012, 132(2): 282
- [14] Cao S L, Zhan H Y, Fu S Y, et al. Chin J Chem Eng, 2007, 15(1): 132
- [15] Sun Z S, Yin Y B, Wang P, et al. Chinese Journal of Veterinary Medicine (孙忠晟, 尹燕博, 王平, 等. 中国兽医杂志), 2011, 47(1): 78
- [16] Zhou G Y. Principles of Immunology. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press (周光炎. 免疫学原理. 上海: 上海科学技术出版社), 2007
- [17] Manchu R G, Zhang Y X, Hu W T. Journal of Jilin Agricultural University (满初日嘎, 张英霞, 胡文婷. 吉林农业大学学报), 2010, 32(2): 159