

高亲水性强阳离子交换色谱填料的制备及其在蛋白质分析中的应用

刘吉众¹, 黄嫣嫣¹, 杨 博², 常建华², 刘国詮¹, 赵 睿^{1*}

(1. 中国科学院化学研究所, 中国科学院活体分析化学重点实验室, 北京 100190;

2. 西安交大保赛生物技术股份有限公司, 陕西 西安 710054)

摘要: 以具有双孔结构的聚甲基丙烯酸环氧丙酯(PGMA)微球为基质,以葡萄糖进行表面亲水改性,制备了强阳离子交换色谱填料,并将其用于复杂生命体系中生物大分子的快速而高效的分离、分析与纯化。葡萄糖亲水改性增进了填料的生物相容性,提高了蛋白质样品的回收率;双孔结构及较高的比表面积赋予填料良好的柱渗透性和样品负载量。以标准蛋白质为样品,考察了该填料对生物样品的分离性能。以 100 mm × 4.6 mm 的色谱柱分离 4 种蛋白质,在 6 min 内实现了基线分离;以溶菌酶为样品,填料的吸附容量为 39.5 g/L,在蛋白质快速分离纯化分析中显示了良好的应用前景。

关键词: 强阳离子交换; 固定相; 聚甲基丙烯酸环氧丙酯微球; 葡萄糖改性; 蛋白质分析

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2013)04-0310-07

Preparation of highly hydrophilic strong cation exchangers and their applications in protein analysis

LIU Jizhong¹, HUANG Yanyan¹, YANG Bo², CHANG Jianhua², LIU Guoquan¹, ZHAO Rui^{1*}

(1. CAS Key Laboratory of Analytical Chemistry for Living Biosystems, Institute of Chemistry,

Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China;

2. Xi'an Jiaoda Bio-Sep Technologies Co. Ltd, Xi'an 710054, China)

Abstract: Based on the needs of new packing materials for rapid and efficient separation, purification and analysis of biomacromolecules, a novel sulfonic acid-type strong cation exchange resin (SP-G-PGMA SCX resin) was prepared. The porous poly(glycidyl methacrylate) microspheres (PGMA) were selected as the matrix and glucose was used as the hydrophilic modifier to block the hydrophobic domains of PGMA beads. Glucose modification on PGMA beads improved the biocompatibility and reduced the non-specific adsorption so as to increase the recoveries of protein. The PGMA beads possess the porous structure and the relatively high specific surface area, which make the PGMA-based resins good permeability and high loading capacity. The application of such SP-G-PGMA SCX resin for the chromatographic separation of biomacromolecules was explored. Four basic proteins were baseline separated within 6 min with the column size of 100 mm × 4.6 mm. The adsorption capacity of lysozyme on SP-G-PGMA SCX resin was determined as 39.5 g/L. The results make the material promising for the separation and purification of biomacromolecules.

Key words: strong cation-exchange; stationary phase; poly(glycidyl methacrylate) microspheres; glucose modification; protein analysis

随着生命科学和生物工程技术的飞速发展,复杂生命体系中活性生物大分子的分离、分析和纯化已成为分析化学和分离科学面临的一个重要任

务^[1,2]。蛋白质是生命活动的主要物质基础。研究蛋白质必须将其从复杂的生命体系中分离出来并保持其原有的生物活性。在生物工程下游技术中,既要

* 通讯联系人. Tel: (010) 62557910, E-mail: zhaorui@iccas.ac.cn.

基金项目: 国家自然科学基金项目(21075125, 21105105)。

收稿日期: 2012-12-03

求分离介质具有高的分离效率,又需要尽可能快的分离速度,以提高生产的时空效率。因此,发展生物大分子,尤其是蛋白质的分离、纯化与分析新材料和新技术已成为生物工程的一个研究热点^[3-5]。

离子交换色谱^[6-8] (IEC) 因其良好的生物相容性、温和的洗脱模式,且能够在分离过程中最大限度地保持生物分子的活性,而在生物大分子的分离纯化中发挥着重要的作用^[9-12]。相比于传统的多糖类基质 IEC 填料机械强度差,局限于中、低压分离的缺点,聚合物型 IEC 基质^[13] 具有高的机械强度和良好的化学稳定性,可实现中、高压快速分离^[14],在生化样品分离纯化中具有广阔的应用前景。但是目前常见的聚合物型高效 IEC 填料多以表面改性的交联聚苯乙烯(PS) 微球为基质,表面疏水性强,生物相容性较低,在生物大分子分离中极易造成非特异性吸附而影响产物的回收率和生物活性。尽管表面化学修饰和改性技术可以使其疏水性得到改善^[15],但非特异性吸附的消除仍是一个难题。因此,基于亲水性功能单体,发展新型交联高聚物基质的 IEC 填料是必然的选择^[14]。聚甲基丙烯酸环氧丙酯(PGMA) 的环氧基团具有很高的反应活性,环氧基水解产生的二醇基团可提高其生物相容性^[16],用于生物大分子的快速分离与分析。Zhao 等^[17,18] 利用无孔 PGMA 微球作为亲和色谱基质,用于多肽的高效筛选,基于其低非特异性吸附,获得了高选择性的多肽探针。Zhou 等^[19] 利用反胶团溶胀法制备了超大孔 PGMA 微球,非常适于生物大分子的快速高效分离。此外,PGMA 还被成功用于生物传感器的表面修饰,以进行肝素与抗凝血酶 III 的动态相互作用研究^[20]。虽然 PGMA 基质在生化分离分析中显示了较好的应用前景,但其骨架中的疏水性结构仍会不同程度地对生物大分子产生非特异性吸附。因此,需要通过表面接枝修饰等方法消除非特异性吸附,以进一步增强其生物相容性。

本研究针对生物大分子的高效、快速分离和高活性回收,以微米级直径、全 PGMA 双孔微球为基质,进行了 PGMA 表面亲水改性,据此构建了具有

良好生物相容性的高效强阳离子交换液相色谱填料,并用于模型蛋白质分离分析的研究。

1 实验部分

1.1 试剂

甲基丙烯酸环氧丙酯(GMA) 购自苏州安利化工厂; 甲基丙烯酸乙二醇双酯(EDMA, 纯度 98%) 购自 Sigma-Aldrich 公司,使用前经减压蒸馏以除去阻聚剂; 十二烷基磺酸钠(SDS)、1-辛醇购自天津津科精细化工研究所; 偶氮二异丁腈(AIBN) 购自华北特种化学试剂发展中心,经乙醇重结晶纯化后使用; 单分散 PGMA 微球为中国科学院化学研究所赵睿研究员课题组自制,粒径 10 μm ,孔径 200 nm; 其他试剂均为分析纯,购自北京化工厂。

蛋白质样品,包括核糖核酸酶 A(RNase A,来源于牛胰脏)、 α -胰凝乳蛋白酶原 A(α -Chy A,来源于牛胰脏)、细胞色素 C(Cyt C,来源于马心) 和溶菌酶(Lys,来源于鸡蛋白),均购自 Sigma 公司。超纯水取自 Milli-Q Gradient 超纯水系统。

1.2 PGMA 基质强阳离子交换填料的制备

将 PGMA 微球悬浮在 0.1 mol/L 硫酸溶液中、60 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应 12 h,进行微球表面环氧基水解,产物用超纯水洗涤后真空干燥备用。取一定量水解后的 PGMA-EDMA 微球,在碱性条件下加入一定比例的烯丙基缩水甘油醚搅拌反应,即制得烯丙基化 PGMA-EDMA 微球。

配制 3 mol/L 的焦亚硫酸钠溶液,用浓 NaOH 溶液调节 pH 至 6.5。将烯丙基化 PGMA-EDMA 微球分散于焦亚硫酸钠溶液中,在氮气保护下于室温条件下进行反应,产物用乙醇、超纯水充分清洗后,即制得磺酸基强阳离子交换微球(SP-PGMA SCX 树脂)。制备流程见图 1。

1.3 葡萄糖亲水改性 SP-PGMA SCX 树脂的制备

取一定量的 PGMA 微球加入至葡萄糖溶液中,在搅拌下加入含有 KBH_4 的 NaOH 溶液,室温下反应 24 h,产物用超纯水洗涤并真空干燥,即制得葡萄糖接枝的 PGMA-EDMA 微球。以此微球按照 1.2 节

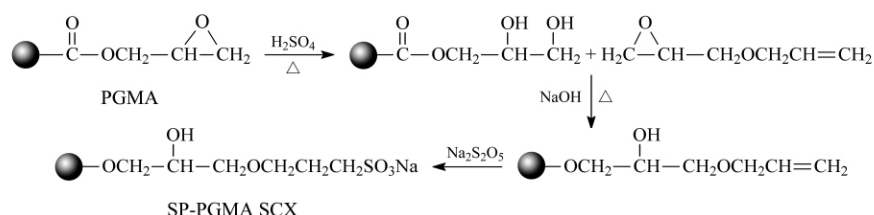


图 1 SP-PGMA SCX 树脂制备流程图

Fig. 1 Chemical scheme for the preparation of the SP-PGMA SCX resin

所述相同反应,在碱性条件下与烯丙基缩水甘油醚反应,然后再与焦亚硫酸钠反应,即制得葡萄糖接枝

的磺酸基强阳离子交换微球(SP-G-PGMA SCX 树脂)。制备流程见图 2。

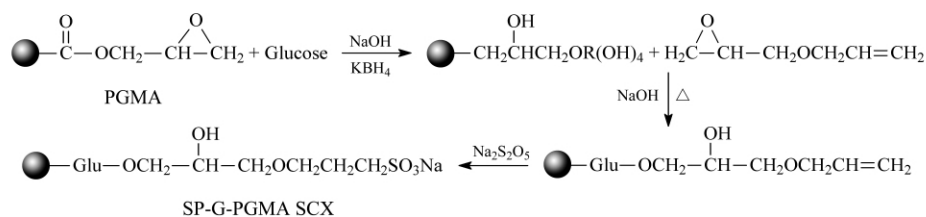


图 2 SP-G-PGMA SCX 树脂制备流程图

Fig. 2 Chemical scheme for the preparation of the SP-G-PGMA SCX resin

1.4 色谱柱的填装与柱压测定

将制备的 SP-PGMA SCX 树脂或 SP-G-PGMA SCX 树脂悬浮于蒸馏水中,超声分散使之成匀浆液并装入储液罐中。以水为流动相在流速 3.0 mL/min 下将其用高效液相色谱泵填充装入 100 mm × 4.6 mm 的不锈钢柱管中,并持续冲洗 2 h 使柱床稳定。装柱完成后,以不同溶剂为流动相,在不同流速下测定柱压。

1.5 离子交换容量的测定

取少量树脂悬浮液(含 5 mL 左右树脂)置于 10 mL 量筒中,放置过夜,准确读取树脂体积;用 50 mL 5% HCl 溶液浸泡树脂,将树脂悬浊液倒入直径 1 cm 的柱中,使 HCl 溶液缓慢流过柱,用去离子水洗涤树脂至中性。用 60 mL 1 mol/L NaCl 溶液缓慢流过柱,准确测定洗脱液体积。用 0.1 mol/L NaOH 标准溶液滴定洗脱液,酚酞作指示剂,按下式进行计算:离子交换容量 = $V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}} / V_{\text{树脂}}$,其中: V_{NaOH} 为 NaOH 标准溶液的滴定体积; M_{NaOH} 为 NaOH 标准溶液的浓度; $V_{\text{树脂}}$ 为所用树脂的体积。

1.6 蛋白质吸附容量的测定

溶液: A 液为 0.1 mol/L 醋酸缓冲液(pH 5.0); B 液为 0.1 mol/L 醋酸缓冲液 + 2 mol/L NaCl(pH 5.0)。用 A 液配制质量浓度为 3 ~ 5 g/L 的溶菌酶样品溶液。

取少量树脂悬浮液(含 2 mL 左右树脂)置于 5 mL 量筒中,放置过夜,准确读取树脂体积,然后倒入直径 1 cm 的柱中,用 30 mL 去离子水洗涤。以 A 液缓慢通过该柱,至基线走平。溶菌酶样品溶液以 0.5 mL/min 的速率流过该柱,检测器信号缓慢升高直至形成平台。用 A 液洗脱未保留的溶菌酶至平衡,再切换用 B 液洗脱,收集蛋白质洗脱液,准确读取体积。

蛋白质浓度的测定:用 B 液配制一系列不同质量浓度(0.05 ~ 0.4 g/L)的溶菌酶标准溶液,以 B 液为参比液,用紫外分光光度计在 280 nm 波长下测定

吸光值,绘制标准曲线。以 B 液为参比液,在 280 nm 波长下测定所收集的 B 液洗脱下的溶菌酶溶液的吸光值,通过标准曲线,计算蛋白质吸附容量。

1.7 蛋白质质量回收率的测定

通过测定并比较色谱柱连接前后蛋白质峰面积得出其质量回收率^[2]。先将一根空白柱(column 1)连接于色谱系统,进样蛋白质样品 20 μL ,积分得到蛋白质峰面积 $A_{\text{p(column 1)}}$;再将所制备的离子交换柱(column 2)和空白柱一同连接到色谱系统,进样蛋白质样品 20 μL ,积分得到蛋白质峰面积 $A_{\text{p(column 1 + column 2)}}$,该蛋白质样品的质量回收率便可由下式计算得到:蛋白质质量回收率 = $(A_{\text{p(column 1 + column 2)}} / A_{\text{p(column 1)}}) \times 100\%$ 。

蛋白质样品在 SP-G-PGMA SCX 柱和 SP-PGMA SCX 柱上的质量回收率均采用上述方法测定。色谱分离条件为采用 20 mmol/L Tris-HCl + 1.0 mol/L NaCl(pH 7.4)缓冲液洗脱。

1.8 HPLC 仪器与条件

Shimadzu SPD-10A HPLC 系统。流动相: A 液为 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4), B 液为 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 + 1.0 mol/L NaCl(pH 7.4);流速: 1.0 mL/min。梯度洗脱程序: 0 ~ 8 min, 15% B ~ 25% B; 8 ~ 12 min, 25% B ~ 50% B; 12 ~ 15 min, 50% B ~ 100% B; 15 ~ 18 min, 100% B。检测器: UV-Vis 检测器;检测波长: 280 nm。

1.9 表面形貌、组成与孔特性的表征

以扫描电镜(日立 S-4800 型)进行微球表面形貌的测定; ESCALab220I-XL 型 X-射线光电子能谱仪(XPS)用以进行表面元素组成的表征;微球的比表面积以 ASAP2020 型氮吸附仪进行测定。孔径及孔分布以 AutoPore IV 9500 全自动压汞仪测试完成,孔径分析范围 3 nm ~ 400 μm ,测试压力 1.378 kPa ~ 413.4 MPa(0.20 ~ 60 000 psi)。

2 结果与讨论

2.1 PGMA 基质不同微球的结构与形貌表征

利用 XPS 对未经修饰改性的 PGMA、SP-PGMA SCX 和改性后的 SP-G-PGMA SCX 进行表面元素组成分析,3 种微球的 XPS 表征结果见图 3。在 PGMA 微球的 XPS 能谱中,在 284.8 eV 和 532.3 eV 处可观测到碳(C1s)和氧(O1s)的特征信号。在 SP-PGMA SCX 微球的 XPS 谱图中,在 284.8 eV 和 532.1 eV 处可分别观测到碳(C1s)和氧(O1s)特征信号, O1s 峰发生位移,这是因为通过衍生反应偶联了磺酸基,使 O 的化合价态发生了改变所致;在谱图上出现了 Na1s(1 071.2 eV)和 S2p(167.9 eV)信号峰,表明 $-\text{SO}_3\text{Na}$ 成功地通过偶联反应键合到 PGMA 表面。在 SP-G-PGMA SCX 微球的 XPS 谱图中,碳(C1s)和氧(O1s)的特征信号分别于 284.8 eV 和 532.1 eV 出现。与 SP-PGMA SCX 相比,氧的含量由 29.9% 提高到 31.3%。O 元素含量变化是因为葡萄糖的引入所引起的,也说明 PGMA 表面成功进行了葡萄糖亲水改性。在谱图上同样出现了 Na1s(1 071.2 eV)和 S2p(167.9 eV)信号峰,也进一步表明 $-\text{SO}_3\text{Na}$ 成功地通过偶联反应键合到了 PGMA 表面。

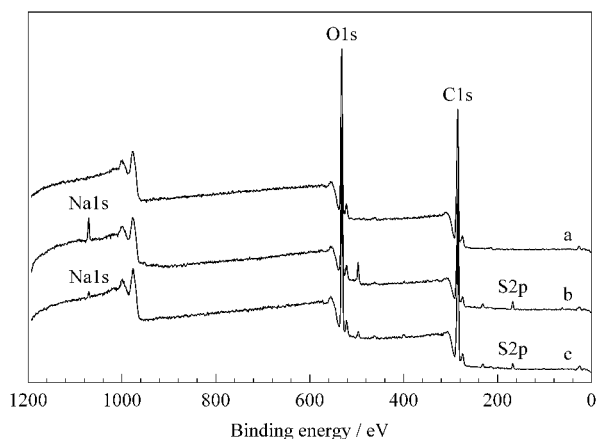


图3 (a) PGMA、(b) SP-PGMA SCX 和(c) SP-G-PGMA SCX 树脂的 XPS 表征图

Fig. 3 XPS characterizations of the resins of (a) PGMA, (b) SP-PGMA SCX and (c) SP-G-PGMA SCX

采用压汞法对葡萄糖亲水化改性前后微球的孔径及孔分布进行了表征。从图 4 中可以看出,PGMA 基质微球为双孔结构,其中中孔为 34 nm,大孔最可几孔径为 200 nm。孔径范围为 100 ~ 300 nm 的孔道占据了大部分孔体积,对孔体积贡献最大的孔道直径在 200 nm 左右。而葡萄糖改性后的 SP-G-PGMA 微球中孔为 29 nm,大孔最可几孔径仍为

200 nm 左右。由此可以看出改性对大孔结构基本没有影响,仅中孔孔径有微小减少,降低大约 5 nm 左右,大孔的存在提高了对流质在色谱分离过程中的贡献,有利于在较低的操作压力下实现快速分离^[2]。

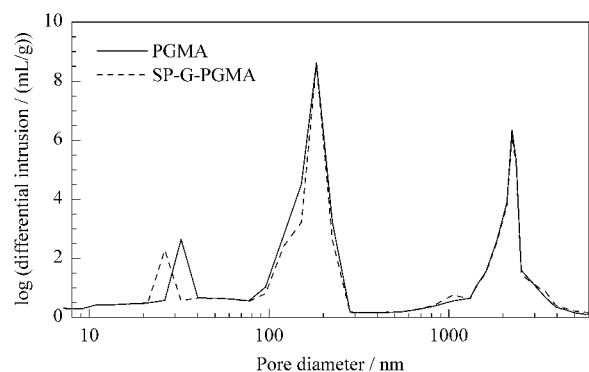


图4 压汞法表征改性前后微球的孔径及分布

Fig. 4 Characterizations of porosities and pore size distributions of the unmodified and modified PGMA beads by mercury porosimetry

扫描电镜(SEM)分析结果(见图5)表明,PGMA 基质微球为规整的球形,表面为多孔结构。以葡萄糖亲水改性后得到的 SP-G-PGMA SCX 微球依然为多孔球形,且未出现葡萄糖堵塞孔道的现象,改性后的微球表面趋于平坦,粗糙度降低。规整的球形、微米级的粒径以及近于单分散的粒径分布,可提

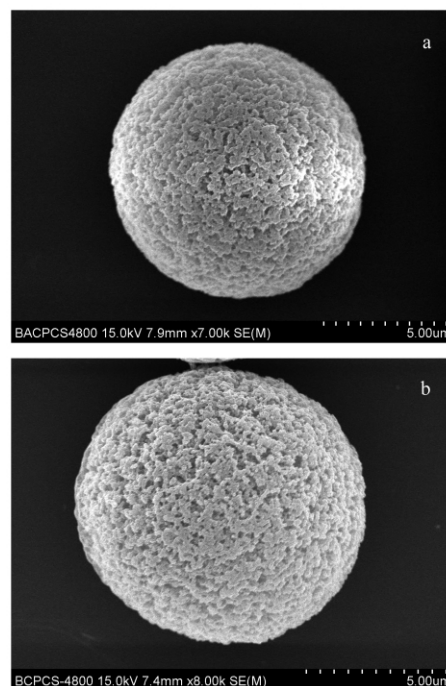


图5 (a) 未经修饰改性的 PGMA 基质微球和(b) 改性后的 SP-G-PGMA 微球的扫描电镜表征

Fig. 5 Scanning electron micrographs of (a) the unmodified PGMA resin and (b) the modified SP-G-PGMA resin

供高的分离效率,也有利于增加柱的渗透性,有利于进行快速分离。

2.2 PGMA 基质填料微球的比表面积及填充柱的渗透性

微球表面形貌和孔结构与色谱填料的渗透性和快速分离的能力密切相关,而微球的比表面积决定了其样品负载量。采用 BET 氮吸附法测定了微球的比表面积。PGMA 基质微球、SP-PGMA SCX 树脂和 SP-G-PGMA SCX 树脂 3 种填料微球的比表面积分别为 88.7、74.4 和 48.6 m²/g,结果表明由于改性反应对微球表面和内部孔壁的修饰,引起孔容降低,致使比表面积减小。尤其是葡萄糖亲水改性对比表面积的影响更为明显,这可能是由于葡萄糖分子的表面接枝不是单分子层反应所致。Unsal 等^[23]报道其合成的同类聚合物多孔微球未经表面修饰前的比表面积为 21.1 m²/g,相比之下,本研究所制备的 PGMA 树脂改性后仍具有较高的比表面积,保证了多孔微球的高样品负载量。

色谱柱的渗透性是其实际应用中的一个重要参数,微球的机械性能和所填充色谱柱的渗透性可通过填充柱的流速-背压关系进行表征。通过匀浆法将 PGMA、SP-PGMA 和 SP-G-PGMA 分别填充于 100 mm × 4.6 mm 的不锈钢柱中,分别以甲醇、20 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液和水为流动相考察了其在不同流速下的柱压,结果如图 6 所示。PGMA 填充柱在分别以甲醇、20 mmol/L 磷酸盐缓冲液及水为流动相时,在 0.5 ~ 5.0 mL/min 流速范围内,流速-背压保持良好的线性关系,且在流速为 5.0 mL/min 时,柱压降分别为 3.0、5.6 和 8.2 MPa; SP-G-PGMA 填充柱在以磷酸盐缓冲液及水为流动相时,在 0.5 ~ 5.0 mL/min 流速范围内,同样保持良好的线性关

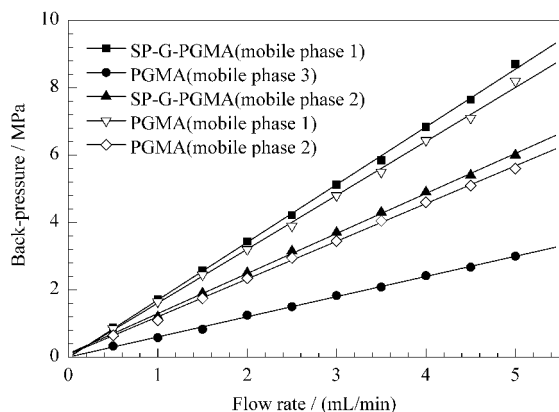


图 6 色谱柱的流速-背压关系图
Fig. 6 Effect of the flow rate on the column back-pressure

Mobile phases: 1. H₂O; 2. 20 mmol/L phosphate buffer; 3. CH₃OH.

系,在流速为 5.0 mL/min,即线速度为 1 805 cm/h 时,柱压降分别为 6.0 和 8.7 MPa,且没有出现柱床塌陷的现象,表明改性后的微球依然保持了良好的渗透性和贯通性,具有较高的机械强度,具备在高压、高流速下分离的能力,有利于生物大分子的色谱快速分离和纯化。

2.3 离子交换树脂的吸附容量和质量回收率

PGMA 基质微球的孔结构特性有利于提高比表面积,进而增加交换基团的密度和数量,保证了填料的高吸附容量。通过前沿分析,以标准蛋白质为样品评价了 SP-G-PGMA 树脂的饱和吸附容量和离子交换容量。SP-G-PGMA SCX 强阳离子交换树脂对溶菌酶的吸附量为 39.5 g/L,其离子交换容量为 107 mmol/L。

此外,还考察了 α -胰凝乳蛋白酶原 A、细胞色素 C 和溶菌酶在 SP-PGMA SCX 和 SP-G-PGMA SCX 柱上的质量回收率。结果发现,通过葡萄糖改性, α -Chy A 的质量回收率从 75.3% 提高到 86.5%,Cyt C 从 82.4% 提高到 89.8%,Lys 从 88.5% 提高到 99.6%。蛋白质在 SP-G-PGMA SCX 柱上的质量回收率明显高于在 SP-PGMA SCX 柱上的质量回收率,证明葡萄糖亲水改性增加了 SP-G-PGMA SCX 的生物相容性,降低了非特异性吸附,有利于获得高的蛋白质质量回收率。

2.4 PGMA 基质强阳离子交换树脂的蛋白质分离性能

利用以 SP-PGMA SCX 和 SP-G-PGMA SCX 为固定相的填充柱对 RNase A、 α -Chy A、Cyt C 和 Lys 4 种碱性蛋白质进行了高效液相色谱分离。SP-PGMA SCX 和 SP-G-PGMA 通过离子交换作用均实现了对 4 种标准蛋白质的良好分离(见图 7),RNase A、 α -Chy A、Cyt C 和 Lys 的等电点分别为 8.7、9.2、9.4 和 11.2,蛋白质的洗脱顺序与其等电点大小顺序相反。等电点小的蛋白质在所使用的流动相 pH 下呈弱电离,携带电荷较少,因此与 SCX 介质的相互作用较小。在 SP-G-PGMA SCX 上,RNase A 的保留时间短,可能由于葡萄糖改性后部分未键合的羟基所带来的亲水性,导致在所使用的流动相 pH 下疏水性较强的 RNase A 保留很弱。在 SP-G-PGMA SCX 柱上蛋白质的色谱峰起落点更接近基线,且峰形对称,表现出更好的分离性能。由不对称因子(δ)值也可看出,SP-G-PGMA SCX 上溶菌酶的 δ 值为 0.8,而 SP-PGMA SCX 上溶菌酶的 δ 值仅为 0.3。表明 SP-G-PGMA SCX 经过天然多糖改性,更全面地封闭了疏水区,葡萄糖的多羟基增加了介质的亲水性,消

除了非特异性吸附,使峰形更加对称。

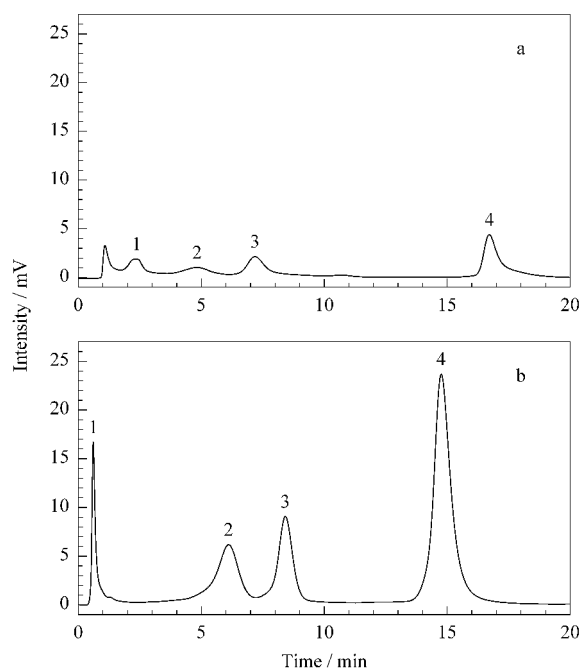


图7 (a) SP-PGMA SCX 柱和(b) SP-G-PGMA SCX 柱的混合蛋白质标准溶液的色谱图

Fig. 7 Ion-exchange separation of the standard protein solution on (a) SP-PGMA SCX column and (b) SP-G-PGMA SCX column

Peaks: 1. RNase A; 2. α -Chy A; 3. Cyt C; 4. Lys.

2.5 蛋白质的快速分离

快速分离有利于缩短生化分离分析时间,加速制备过程,同时缩短时间也有利于保持生物分子活性,对于大规模制备具有重要意义。图8给出了在流速分别为 1.0 mL/min (361 cm/h) 和 3.0 mL/min (1 084 cm/h) 的条件下,SP-G-PGMA SCX 柱对标准蛋白质分离的结果。当流动相流速为 3.0 mL/min 时,SP-G-PGMA SCX 柱在 6 min 内即可实现对蛋白质混合物的分离,而且与流速 1.0 mL/min 时得到的分离效果相同。由图6的流速-背压曲线可知,以 20 mmol/L 磷酸缓冲盐为流动相,在 1.0 mL/min 流速下,SP-G-PGMA SCX 柱的背压为 1.2 MPa; 在 3.0 mL/min 流速下,其背压为 3.7 MPa。说明 SP-G-PGMA SCX 的粒径、形貌,特别是其双孔结构等方面的特点有利于溶质的传质与分离,有利于缩短生化分离分析的时间,有利于保持生物分子活性。

为了考察色谱填料的分离重现性,对比了新制备的与使用百余次后的 SP-G-PGMA SCX 色谱柱的蛋白质分离效果(见图9)。所使用的 PGMA 基质微球属于高交联度的高分子微球,具有良好的机械强度和化学稳定性,因此在重复实验中具有很好的耐

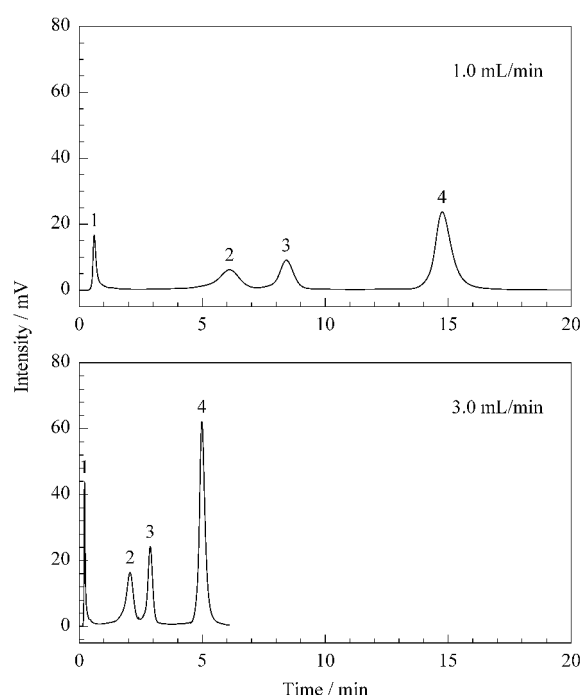


图8 不同流速下 SP-G-PGMA SCX 柱对碱性蛋白质混合物的色谱分离

Fig. 8 Effect of flow rate on the ion-exchange separation of basic proteins on SP-G-PGMA SCX column

Peaks: 1. RNase A; 2. α -Chy A; 3. Cyt C; 4. Lys.

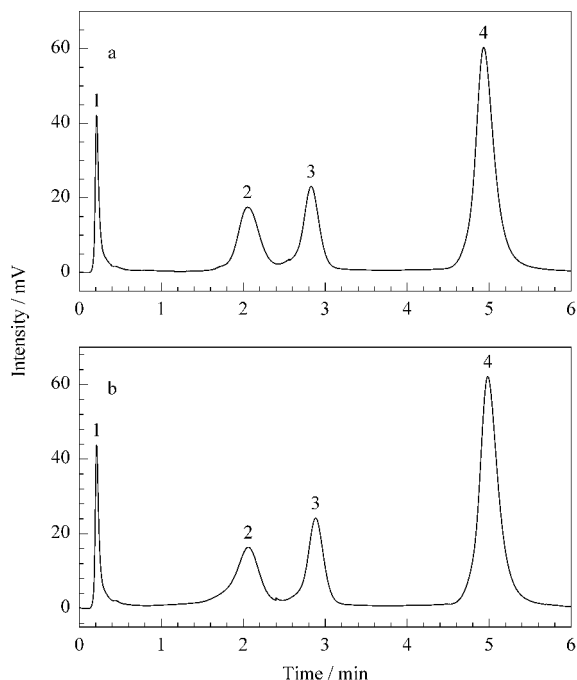


图9 (a) 新 SP-G-PGMA SCX 色谱柱和(b) 使用百余次后的 SP-G-PGMA SCX 色谱柱分离标准蛋白质混合物的色谱图(流速为 3 mL/min)

Fig. 9 Ion-exchange separation of the basic proteins on (a) a new SP-G-PGMA SCX column and (b) an SP-G-PGMA SCX column used for hundred times (flow rate: 3 mL/min)

Peaks: 1. RNase A; 2. α -Chy A; 3. Cyt C; 4. Lys.

受性,即使在 3 mL/min 的流速下,经过百余次进样分析,仍可以很好地保持峰形及分离效率,在生物大分子的快速分离与制备中具有应用前景,对于生物工程技术产品的大规模分离纯化也具有重要的意义。

3 结论

以微米级直径且粒径均匀的双孔 PGMA 微球为基质,通过葡萄糖亲水改性并进一步制备出了高效磺酸型强阳离子交换树脂。微米级的粒径和均匀的粒度分布为高效分离提供了前提;所具备的双孔结构既保证了填料具有良好的柱渗透性,又保证了填料的高机械强度。葡萄糖亲水改性进一步降低了基质的非特异性吸附,提高了其生物相容性。以所制备的 PGMA 基质强阳离子交换色谱柱在 1 084 cm/h 线速度下,于 6 min 内实现了 4 种标准蛋白质混合物的分离,表现出该柱在生物大分子快速分离纯化中的良好应用前景。

参考文献:

- [1] Linke D, Berger R G. J Biotechnol, 2011, 152(4): 125
- [2] Mekaoui N, Faure K, Berthod A. Bioanalysis, 2012, 4(7): 833
- [3] Arrua R D, Talebi M, Causona T J, et al. Anal Chim Acta, 2012, 738: 1
- [4] Gajdosik M S, Clifton J, Josic D. J Chromatogr A, 2012, 1239: 1
- [5] Geng X, Wang L. J Chromatogr B, 2008, 866: 133
- [6] Kaltenbrunner O, Tauer C, Brunner J, et al. J Chromatogr, 1993, 639: 41
- [7] Stone M C, Carta G. J Chromatogr A, 2007, 1146: 202
- [8] Wang L Y, Ma M H, Cai Z X, et al. Chinese Journal of Chromatography (王丽英, 马美湖, 蔡朝霞, 等. 色谱), 2012, 30(1): 80
- [9] Guélat B, Ströhlein G, Lattuada M, et al. J Chromatogr A, 2010, 1217(35): 5610
- [10] Farnan D, Moreno G T. Anal Chem, 2009, 81: 8846
- [11] Liu J, Hilton Z A, Cramer S M. Anal Chem, 2008, 80: 3357
- [12] Kang L M, Zhang Y, Luo J, et al. Chinese Journal of Chromatography (康丽梅, 张焱, 罗坚, 等. 色谱), 2012, 30(6): 618
- [13] González-Ortega O, Porath J, Guzmán R. J Chromatogr A, 2012, 1227: 126
- [14] Nordborg A, Hilder E F. Anal Bioanal Chem, 2009, 394(1): 71
- [15] Wattendor U, Merkle H P. J Pharm Sci, 2008, 97(11): 4655
- [16] Svec F, Frechet J M J. J Chromatogr A, 1995, 702: 89
- [17] Zhao R, Fang C, Yu X, et al. J Chromatogr A, 2005, 1064: 59
- [18] Huang Y, Zhao R, Fu Y B, et al. ChemBioChem, 2011, 12(8): 1209
- [19] Zhou W, Gu T, Su Z, et al. Eur Polym J, 2007, 43(10): 4493
- [20] Zhang H W, Zhao R, Chen Z Y, et al. Biosens Bioelectron, 2005, 21: 121
- [21] Yang Y B, Harrison K, Kindsvater J. J Chromatogr A, 1996, 723: 1
- [22] Afeyan N B, Fulton S P, Regnier F E. J Chromatogr A, 1991, 544: 267
- [23] Unsal E, Irmak T, Durusoy E, et al. Anal Chim Acta, 2006, 570: 240