

巯基吡啶配基液相色谱固定相的制备及其对质粒的快速纯化

李 渊, 窦国胜

(天津工业大学材料科学与化学工程学院, 天津 300130)

摘要: 在基因治疗中, 质粒是一种常用的非病毒型载体。由于目前市场上对质粒的需求量很大, 因此有必要开发大规模的质粒制备技术。该文以双孔型流通色谱介质为基质, 以巯基吡啶为配基, 制得了液相色谱固定相, 并考察了其对于质粒 DNA 的纯化效果, 分析了分离机理。结果表明: 该分离介质对质粒的纯化是基于疏水作用; 当上样量为 10 mL (质粒质量浓度为 0.30 mg/mL)、流速高达 4 mL/min 时, 质粒仍然能以 100% 的收率实现纯化, 其纯度为 100%。该色谱介质对 RNA 的柱容量高达 2.2 mg/mL。

关键词: 巯基吡啶配基; 双孔型流通色谱固定相; 质粒; 快速纯化

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2007)06-0820-05 栏目类别: 研究论文

Preparation of Biporous Polymeric Microspheres Coupled with Mercaptopyrindine and Its Application in Rapid Purification of Plasmid DNA

LI Yuan, DOU Guosheng

(School of Material Science and Chemical Engineering, Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300130, China)

Abstract: Plasmid is a kind of popular nonviral vector in gene therapy. To produce large quantities of plasmid, an efficient large-scale purification process needs to be developed. In general, liquid chromatography is the most important tool for the analytical and preparative separation of plasmid DNA. In this study, biporous polymeric microspheres coupled with mercaptopyrindine were synthesized for the purification of plasmid DNA. From the results of experiments, it can be inferred that the mechanism for the purification of the plasmid DNA with MP-BiPR is based on the hydrophobic interaction. When the load was 10 mL with the content of plasmid of 0.30 mg/mL and the content of RNA of 0.44 mg/mL, a flow rate was set up to 4 mL/min (20 cm/min). The separation was finished in 10 min, and the plasmid was completely recovered with undetectable impurities of nucleic acids and proteins. The load of the column for RNA was up to 2.2 mg/mL.

Key words: mercaptopyrindine; biporous polymeric microspheres stationary phase; plasmid; rapid purification

近些年来, 基因治疗 (gene therapy) 在临床中的应用不断增加, 许多基因疫苗 (genetic vaccine) 也进入了临床实验阶段。在国家创新基金、国家重大科技攻关计划等基金的资助下, 我国在此领域的科技能力发展迅速, 目前已有几种基因药物投入生产。正是由于基因重组技术、基因治疗和基因疫苗的发展, 导致了人们对基因载体的需求量大增。基因治疗以基因克隆载体作为目的基因的运载工具, 而质粒就是一种最常用的基因运载工具。由于目前市场上对质粒的需求量很大, 因而有必要开发大规模的质粒制备技术。而高效液相色谱法 (HPLC) 是

最常用的大规模制备质粒技术之一。到目前为止, 体积排阻色谱、离子交换色谱、疏水色谱、反相液相色谱、离子对反相液相色谱等都有进行质粒纯化的报道^[1-8], 其中体积排阻色谱、离子交换色谱、疏水色谱是大规模纯化质粒 DNA 的技术核心, 而其他的色谱模式一般都仅限于实验室规模。目前用于质粒纯化的色谱介质大多数都是为了分离蛋白质而设计的, 因而对质粒的吸附容量较低, 采用激光共聚焦显微镜观察质粒在许多介质内的吸附情况, 其结果表明质粒只吸附于介质的表面^[9]。Diogo 研究组在利用疏水色谱进行质粒纯化方面做了许多研究工

作,他们以 1,4-丁二醇-二甘油醚为配基修饰 Sepharose CL-6B,制得疏水型色谱固定相^[9]。但是由于 Sepharose CL-6B 是软介质,不能适应质粒快速分离的要求。另外,由于 1,4-丁二醇-二甘油醚配基的疏水性较弱,即使在较高的盐浓度下 RNA、蛋白质等杂质都不能吸附于此介质上,因而尽管质粒提取液的上样量较小也不能实现质粒同上述两种杂质之间的完全分离,这样的色谱固定相只适合质粒的定量分析,而不适合质粒的制备。到目前为止,国内对质粒 DNA 纯化的研究还较少见。本文以双孔球形树脂(BiPR)为基质,以巯基吡啶为配基,制得色谱固定相(MP-BiPR),并考察了此固定相对质粒 DNA 的纯化效果。通过控制适当的条件,使质粒 DNA 不吸附于固定相上,而使杂质(如 RNA 和蛋白质)吸附,提高了固定相对质粒提取液的处理能力。

1 实验部分

1.1 试剂及固定相的制备

2-巯基吡啶(化学纯,华北特种试剂有限公司),DNA 标记物(大连宝生物技术有限公司),*Bam* H I(美国 Promega 公司),其他试剂均从北京鼎国生物工程公司购买。实验菌种为含有 pcDNA3 质粒的 *E. coli* DH5 α 菌株。pcDNA3 为高拷贝质粒,其片段大小为 5.4 kb。原始 *E. coli* DH5 α 菌株在甘油中保存于 -80 °C 下,用它发酵生产质粒需要经过培养基活化和两级摇瓶扩大。本实验采用碱裂解法进行质粒的初步提取^[10]。质粒纯品采用从 Promega 公司购买的试剂盒制备,提取方法按照试剂盒提供的操作步骤进行。

以固体碳酸钙和环己醇及十二醇为联合致孔剂,采用悬浮聚合的方式制备双孔型色谱介质。称取一定量的双孔球形树脂,加入到 pH 3 的 50 mmol/L 甘氨酸-盐酸缓冲液中,直到没有气泡出现且 pH 值不发生变化为止。用砂氏漏斗过滤,并用去离子水反复洗涤。将树脂真空干燥,然后称取 5.0 g 树脂与 50 mL 二氧六环、0.1 g 氢氧化钠、11.2 g 巯基吡啶混合,于 60 °C 水浴摇床反应 6.5 h。在碱性条件下,巯基是一个很强的亲核试剂,很容易与环氧基发生开环反应,从而使巯基吡啶以配基的形式键合到球形介质上,制得固定相。用二氧六环、甲醇和蒸馏水反复清洗固体颗粒,最后将聚合物颗粒置于 100 mL 0.1 mol/L NaBH₄ 溶液中,室温振荡 12 h,以使介质骨架上残余的环氧基充分还原为羟基。待反应结束后,用砂氏漏斗过滤,并用蒸馏水充分洗涤介质。

1.2 色谱实验

质粒 DNA 的色谱分离在 ÄKTA FPLC 色谱仪上进行。所用色谱柱为 HR10/5 (10 cm × 0.5 cm),介质为经巯基吡啶修饰的双孔型树脂,色谱柱填充采用匀浆法。紫外检测波长为 254 nm。色谱分离中所用的缓冲液 A 为 1.0 mol/L (NH₄)₂SO₄、10 mmol/L EDTA-50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.2),缓冲液 B 为 10 mmol/L EDTA-50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.2)。

在色谱分离过程中,首先以 5~8 倍柱体积的缓冲液 A 平衡色谱柱,至基线归零走稳后进样,待第一个洗脱峰结束后用缓冲液 B 洗脱,收集各峰,采用高效液相色谱、琼脂糖凝胶电泳和 Bradford 蛋白质分析法对各个收集峰进行定性和定量分析。梯度洗脱基线走稳后,再用 4~5 倍柱体积的缓冲液 B 冲洗柱。重新用缓冲液 A 平衡色谱柱后再进下一个样。4 次进样、洗脱操作结束后,对柱进行彻底清洗。先用 5 倍柱体积的清水清洗,再用 0.5 mol/L 的 NaOH 冲洗,最后再用清水清洗。

1.3 样品成分分析的方法

1.3.1 核酸的定性与定量分析

以 TSK GEL G-DNA-PW 柱和 TSK GEL G-6000-PW_{XL} 柱串联组成体积排阻(SE)色谱柱组,以 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8)-0.3 mol/L NaCl-1 mmol/L EDTA 为流动相,流速为 0.4 mL/min,利用安捷伦高效液相色谱系统分离检测,检测波长为 260 nm,结合标准曲线测定提取液中质粒 DNA 的浓度,结合 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳分析及核酸浓度测定仪测定 RNA 的含量。

1.3.2 质粒产品中蛋白质含量的测定

采用 Bradford 法对质粒样品中的蛋白质含量进行测定。

2 结果与讨论

2.1 制备的固定相的物理特性

取少量筛分后的 MP-BiPR,浸泡在去离子水中,超声波混合 1~2 min,利用 Malvern Mastersizer 2000 粒度分析仪测定其粒径分布,粒度分析结果表明树脂的体积平均粒径为 41 μ m,粒径范围在 30~54 μ m 之间粒子的体积分率为 80%。将所制备的 MP-BiPR 在 70 °C 下充分干燥,将其表面镀金后利用 XL30 ESEM 扫描电子显微镜(SEM)测定其微观结构。图 1 是 MP-BiPR 的 SEM 图。从图 1 可以明显地看出:MP-BiPR 中既存在 2 μ m 以上的大孔,也存在数十纳米的微孔。利用 Micromeritics AUTOPORE II 9320 压汞仪测定 MP-BiPR 的孔径分

布 结果表明 :孔径小于 100 nm 的孔道占总孔容积的 31% ,而孔径范围在 500 ~ 7 300 nm 的孔道占总孔容积的 23%。这种双孔型的结构保证了 MP-BiPR 在高流速下对生物大分子仍然有较高的分离效率和较高的柱容量。MP-BiPR 的配基修饰密度由元素分析(硫元素)测定(由南开大学分析中心进行)结果为 0.41 mmol/g。经过多次试验发现 ,介质的修饰试验具有很好的重复性。MP-BiPR 具有良好的机械强度 ,当色谱柱的背压达到 2 MPa 且长时间使用时 ,柱效并不降低 ,而且在显微镜下观察 ,球形介质的外形完好无损。这一点在我们以前发表的论文^[11]中也已经提到。

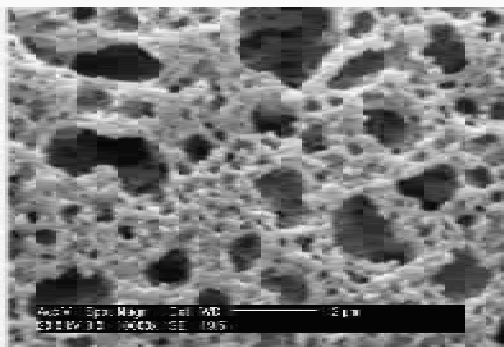
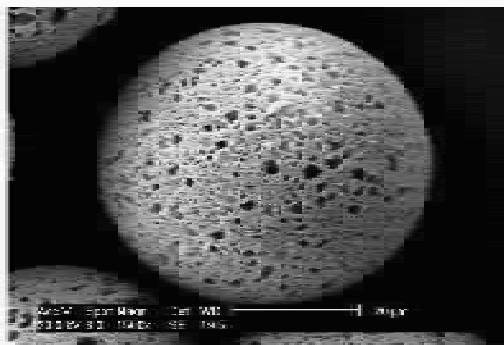


图 1 制备的 MP-BiPR 的 SEM 图

Fig. 1 SEM images of prepared MP-BiPR

2.2 MP-BiPR 对质粒的纯化

原料液的组成 :质粒质量浓度 0.30 mg/mL , RNA 质量浓度为 0.44 mg/mL ,蛋白质质量浓度为 54 μg/mL。

2.2.1 硫酸铵对质粒、RNA 和蛋白质吸附性能的影响

用匀浆法装柱 ,色谱柱的长度为 10 cm ,直径为 0.5 cm。图 2 为以缓冲液 B 为上样缓冲液时质粒提取液的色谱图。图 2 中出现了两个峰 ,收集这两个峰。图 3-a 和 b 分别为图 2 中的峰 1 和峰 2 在体积排阻色谱(SE-HPLC)中的分析结果。另外 ,实验结果表明 :在 SE-HPLC 过程中 ,质粒 DNA 的停留时间为 40 ~ 50 min ,RNA 和蛋白质的停留时间为 55 ~ 60 min ,其他小分子 60 min 后被洗出。从图 2

和图 3 可以看出 :在硫酸铵浓度很低的情况下 ,质粒 DNA、RNA 以及蛋白质在色谱柱上的保留作用都比较弱 ,而且 DNA 与 RNA 和蛋白质之间可以实现一定程度的分离 ,这种作用可归因于双孔型介质对被分离溶质的体积筛分作用。由于质粒 DNA 是超大分子 ,它与 RNA 和蛋白质无论是在分子质量上还是在分子体积上都相差很多 ,这就为利用体积排阻法对其进行分离提供了可能。

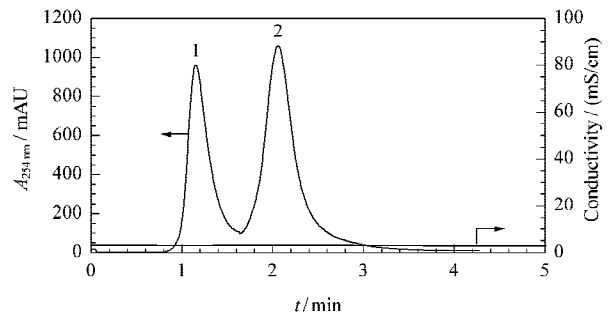


图 2 以缓冲液 B 为上样缓冲液时质粒提取液的色谱图
Fig. 2 Chromatogram of the plasmid preparation in buffer B on the column packed with MP-BiPR

The 0.1 mL feedstock in buffer B was loaded and the column was eluted with buffer B at 1 mL/min. Buffer B : 10 mmol/L EDTA-50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2).

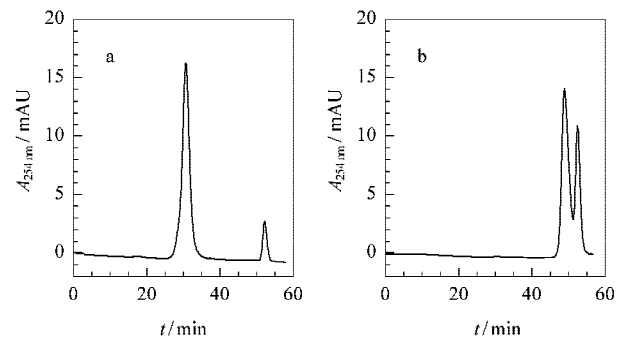


图 3 图 2 中 (a)峰 1 和 (b)峰 2 的 SE-HPLC 分析谱图
Fig. 3 SE-HPLC chromatograms of (a) peak 1 and (b) peak 2 in Fig. 2

图 4 为以缓冲液 A 为上样缓冲液时质粒提取液的色谱图 ,当洗脱掉吸附作用较弱的组分后 ,采用降低硫酸铵浓度的方法进行等梯度洗脱 ,在 2 min 内盐浓度由 1 mol/L 降为零。当硫酸铵浓度降低时 ,被吸附的成分都被洗脱下来。收集各峰 ,进行 SE-HPLC 分析 ,结果如图 5 所示。从图 4 和图 5 可以看出 :即使当硫酸铵的浓度达到 1 mol/L ,质粒 DNA 也不被固定相吸附住 ,这说明尽管在较高的盐浓度下 ,质粒 DNA 同固定相的作用力仍然很弱。相反 ,高盐浓度时 RNA 与固定相之间的作用力却有了很大的提高 ,能够被固定相完全吸附。另外 ,实验中还发现当上样缓冲液中硫酸铵的浓度达到 2 mol/L 时 ,质粒 DNA、RNA 和蛋白质都可被固定相吸附 ;同样 ,随着硫酸铵浓度的降低 ,它们被依次

洗脱(图略)。虽然以此盐浓度上样分离时,质粒同 RNA 和蛋白质也能通过调节盐浓度梯度实现分离,但是质粒 DNA 的吸附必然会降低固定相对 RNA 和蛋白质的吸附,因此为了提高色谱过程的处理量,本文采用了缓冲液 A 为上样缓冲液。

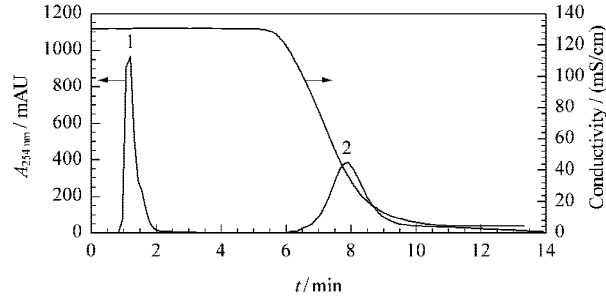


图 4 以缓冲液 A 为上样缓冲液时质粒提取液的色谱图

Fig. 4 Chromatogram of the plasmid preparation in buffer A on the column packed with MP-BiPR

The 0.1 mL feedstock in buffer A was loaded at 1 mL/min and the column was eluted with buffer A for 5 min, then the linear gradient of 100% buffer A to 100% buffer B was accomplished in 2 min. Buffer A : 1.0 mol/L (NH₄)₂SO₄-10 mmol/L EDTA-50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2); buffer B : 10 mmol/L EDTA-50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2).

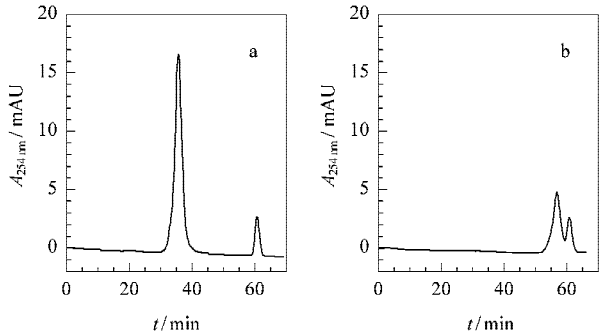


图 5 图 4 中(a)峰 1 和 (b)峰 2 的 SE-HPLC 分析谱图

Fig. 5 SE-HPLC chromatograms of (a) peak 1 and (b) peak 2 in Fig. 4

2.2.2 巯基吡啶的修饰对基质分离性能的影响

图 6 为质粒提取液在 BiPR 上的色谱图,其色谱条件同图 4。从图 6 和图 4 的对比可以看出:经过巯基吡啶修饰后质粒提取液中的各成分与固定相之间的作用力明显增大,特别是 RNA 和蛋白质与固定相之间的作用力增加得非常显著。在此实验条件下,未经配基修饰的介质不能将质粒 DNA 与 RNA 和蛋白质完全分离。

2.2.3 分离机理的探讨

考察了流动相的 pH 值对质粒分离效果的影响,结果表明 pH 值的变化几乎不影响质粒的分离,因此,溶质与固定相之间的作用不可能是静电作用和氢键作用。从上面的实验可知:硫酸铵的浓度以及固定相配基的有无对质粒的分离效果影响很大,在较高的硫酸铵浓度下有利于核酸和蛋白质的吸

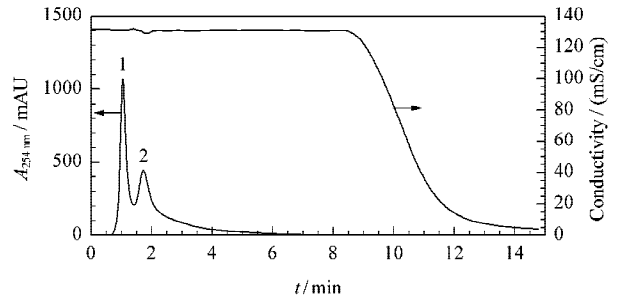


图 6 质粒提取液在 BiPR 色谱柱上的色谱图

Fig. 6 Chromatogram of the plasmid preparation on the column packed with BiPR

Chromatographic conditions are the same as in Fig. 4.

附,可推测固定相同核酸及蛋白质之间的作用可能是疏水作用引起的。质粒 DNA 是双链结构,碱基之间相互配对,疏水性相对较小,因此与疏水性吸附介质之间的疏水性作用力较弱;而 RNA 是单链结构,疏水性的碱基都暴露在外面,因而它具有较高的疏水性,在色谱分离时最后才被洗脱。另外,巯基吡啶具有杂环结构,有一定的疏水性,它的引入增大了核酸和蛋白质与固定相之间的疏水作用。由以上的分析可推断:该固定相对质粒的纯化是基于疏水作用。

2.2.4 流速对质粒纯化的影响

为了确定色谱柱的承载能力,首先在较低的流速下进行质粒的纯化。在 1 mL/min 的流速下,上样量为 14 mL 时收集的样品中尚未检测到有 RNA 和蛋白质;而上样量为 15 mL 时收集的样品中出现了 RNA;由此可见 2 mL 的色谱柱可以处理 14 mL 的质粒提取液。为了保证产品的纯度,在高流速下进行质粒纯化时上样体积采用 10 mL。

图 7 是当上样量为 10 mL、流速为 4 mL/min 纯化质粒时的色谱图。用 SE-HPLC 分析收集的色谱

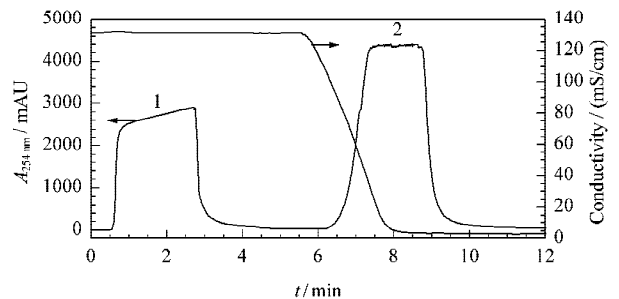


图 7 高流速下纯化质粒的色谱图

Fig. 7 Chromatogram of purification of pcDNA3 at loading 10 mL sample

Separation was operated at a flow rate of 4 mL/min (20 cm/min), the column was eluted with buffer A for 5 times of column volume, then the linear gradient of 100% buffer A to 100% buffer B was accomplished in 2 min. Buffer A : 1.0 mol/L (NH₄)₂SO₄-10 mmol/L EDTA-50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2); buffer B : 10 mmol/L EDTA-50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2).

流分,结果为图 8。图 9 为图 7 中收集的流分在琼脂糖凝胶电泳上的分析结果。与高效液相色谱分析结果相同,在穿透峰中未检测到 RNA,同时在洗脱峰中未检测到质粒 DNA;另外 Bradford 法检测蛋白质实验结果表明在质粒的收集液中未检测到蛋白质。以上实验结果表明:在此实验条件下,质粒的回收率和质粒产品的纯度都能达到 100%,该色谱介质对 RNA 的柱容量高达 2.2 mg/mL。

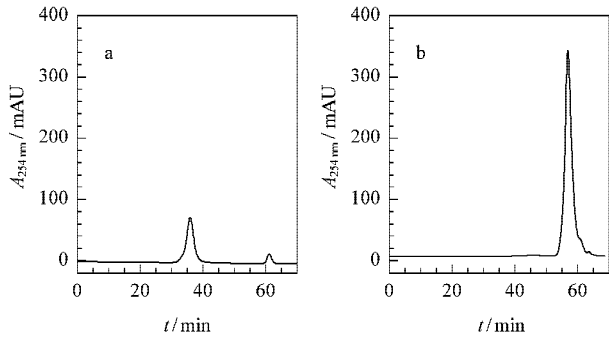


图 8 图 7 中(a)峰 1 和 (b)峰 2 的 SE-HPLC 分析谱图
 Fig. 8 SE-HPLC chromatograms of (a) peak 1 and (b) peak 2 in Fig. 7

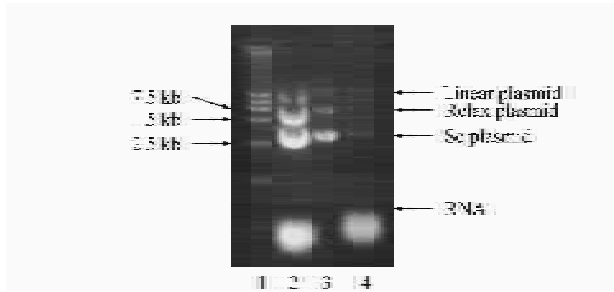


图 9 图 7 的收集峰的琼脂糖凝胶电泳色谱图
 Fig. 9 Electropherogram of the peaks in Fig. 7

1. DNA marker ; 2. feedstock ; 3, 4. peak 1 and peak 2 in Fig. 7 , respectively.

3 结论

(1)以 2-巯基吡啶为配基对双孔型树脂进行修饰所制得的色谱固定相对质粒纯化的机理主要基于疏水作用。

(2)在上样量为 10 mL(质粒浓度为 0.30 mg/mL)、流速为 4 mL/min条件下对质粒提取液进行色谱分离,仍能够将质粒和 RNA 及蛋白质进行分离,质粒的回收率和质粒产品的纯度均能达到 100%,该固定相对 RNA 的柱容量高达 2.2 mg/mL。

参考文献 :

[1] Diogo M M , Queiroz J A , Monteiro G A , Martins S A M , Ferreira G N M , Prazeres D M F. *Biotechnol Bioeng* , 2000 , 68(5) : 576

[2] Murphy J C , Jewell D L , White K I , Fox G E , Willson R C. *Biotechnol Prog* , 2003 , 19 : 982

[3] Li Y , Dong X Y , Sun Y. *Biochemical Engineering Journal* , 2005 , 27 : 33

[4] Colote S. *Biochem* , 1986 , 154 : 15

[5] Chandra G , Patel P , Kost T A , Gray J G. *Anal Biochem* , 1992 , 203 : 169

[6] Hines R N , O ' Connor K C , Vella G , Warren W. *BioTechniques* , 1992 , 12 : 430

[7] Branovic K , Forcic D , Ivancic J , Strancar A , Barut M , Kosutic Gulija T , Zgorelec R , Mazuran R. *J Chromatogr B* , 2004 , 801 : 331

[8] Teeters M A , Conrardy S E , Thomas B L , Root T W , Lightfoot E N. *J Chromatogr A* , 2003 , 989 : 165

[9] Diogo M M , Ribeiro S , Queiroz J A , Monteiro G A , Perrin P , Tordo N , Prazeres D M F. *Biotechnol Lett* , 2000 , 22 (17) : 1397

[10] Birnboim H C , Doly J. *Nucleic Acids Res* , 1979 , 7 : 1513

[11] Li Y , Shi Q H , Sun Y. *Chromatographia* , 2005 , 61 : 213