

国产与进口商品化交联琼脂糖凝胶性能对比

赵彦鼎^{1,2}, 张鹏宇², 杨博¹, 王燕¹, 郭立安^{1,2}, 贺浪冲²

(1. 西安交大保赛生物技术股份有限公司, 陕西 西安 710054; 2. 西安交通大学天然药物研究与工程中心, 陕西 西安 710061)

摘要:从多个方面测定、比较 Bio-sep CL 6B 与 Sepharose CL-6B 两种商品化交联琼脂糖凝胶的性能。采用不同分辨率显微镜观察凝胶外观形态、进行耐热试验、分析有机元素及金属元素含量, 以及测定二者耐压、流速、色谱特性等。结果表明, 两种产品外观均为乳白色球状颗粒, 球形形态完好, 粒径范围在 30 ~ 150 μm 具有较好的分布; 均可耐受 120 $^{\circ}\text{C}$ 下 30 min 热处理; 有机元素碳、氢、氮以及其它微量金属元素含量相近; 两种产品最大耐压都在 80 kPa 以上, 最大流速可达 7.0 mL/min。分离特性测定表明, 两种产品色谱分离特性基本相同, 对分子量在 10^4 ~ 10^6 道尔顿之间的蛋白能实现较好的分离。

关键词:交联琼脂糖凝胶; 分离介质; 纯化; 凝胶过滤

中图分类号: N 34 文献标识码: A 文章编号: 1671-3206(2008)06-0602-04

Comparison of characteristic of cross-linked agarose gels between national products and external products

ZHAO Yan-ding^{1,2}, ZHANG Peng-yu², YANG Bo¹,
WANG Yan¹, GUO Li-an^{1,2}, HE Lang-chong²

(1. Xi'an Bio-sep Technologies Co., Ltd, Xi'an 710054, China; 2. Research & Engineering Center for Natural Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract: The characteristics of two kinds of cross-linked agarose gel in industrial applications like Bio-sep CL 6B and Sepharose CL 6B were compared in different aspects. The physicochemistry characteristics of the two cross-linked agarose gels including particle shape, particle size distribution, heat stability, elements and metals levels, back-pressure, flow-rate, chromatographic properties, etc, were studied. The results showed that the appearance of the both products were white globose particles. With the particle size between 30 and 150 μm , and both of them can withstand heating for 30 min at 120 $^{\circ}\text{C}$. The content of carbon(C), hydrogen(H), oxygen(O) and other microelement of the two products were nearly the same. The biggest pressure that the two products can suffer was above 80 kPa, the fastest flow-rate was 7.0 mL/min. The chromatographic separate properties of the two products were basically the same, by which the protein that molecular weight between 10^4 and 10^6 can be well separated.

Key words: cross-linked agarose gel; chromatography media; purification; gel filtration

以琼脂糖为基质的分离介质在生物医药领域的下游纯化工艺中的应用已非常广泛^[1]。交联琼脂糖是在琼脂糖裸球基础上通过二溴丙醇交联后得到的强度及耐热性都大大提高的一类介质^[2], 其既可以作为凝胶过滤介质, 又可作为进一步化学改性的基质。虽然该类介质的研究和应用很早就有报

道^[3], 但多年来国内研究机构和企业几乎全部使用进口琼脂糖凝胶作为应用材料, 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。

交联琼脂糖的特性受琼脂糖原料^[4-5]、裸球制备方法^[6]和交联方法^[2,7]等因素的影响, 不同厂家的

收稿日期: 2008-03-16 修改稿日期: 2008-04-11

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

作者简介: 赵彦鼎(1974-), 男, 陕西富平人, 高级工程师, 在职硕士, 西安交大保赛生物技术股份有限公司研发中心副主任, 主要从事生物分离介质的研发及工业化生产。电话: 029-83399695, E-mail: zhaoyanding@sina.com

原料、不同的制备方法和交联方法都会影响到交联琼脂糖凝胶的分离特性。

本实验通过不同测定手段,较为全面地分析测定了国产与进口两种商品化交联琼脂糖微球的各项物理化学性能,并初步比较了二者的色谱保留及分离性能,证明国产交联琼脂糖凝胶与进口产品质量上相当,可在工业化应用中互相替代使用。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

细胞色素 C(99%,100 mg)、碳脱水酶(3 000 ~ 5 000 W-Aunits/mg,5 mg)、牛血清白蛋白($\geq 98\%$,25 g)、乙醇脱氢酶(≥ 350 U/mg,7 500 U)、 β -淀粉酶(750 ~ 1 000 U/mg,50 000 U)购自美国 Sigma 试剂公司;磷酸等为国产分析纯;国产交联琼脂糖凝胶 Bio-sep™ CL 6B;未交联的琼脂糖凝胶 Bio-sep™ 6B 均为自制;进口交联琼脂糖凝胶 Sepharose® CL-6B,原瑞典法玛西亚公司。

BT-1600 图像颗粒分析系统;JSM-35CF 扫描式电子显微镜;AKTA prime 蛋白质纯化系统;UTX 元素分析仪;PROFILE SPEC 等离子发射光谱仪;YX280B 手提式不锈钢蒸汽消毒器;101A-ZE 电热鼓风干燥箱;层析柱为 1.6 cm × 20 cm,1.6 cm × 60 cm。

1.2 实验方法

1.2.1 颗粒外观形态及粒径分布 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。

1.2.2 耐热实验 分别取 Bio-sep CL 6B、Sepharose CL-6B 两种交联琼脂糖凝胶各 2 mL,转入相同规格的玻璃试管 A 和 B 中;另取未经交联的 Bio-sep 6B 2 mL 作为对照,转入同规格试管 C 中,并各加入 10 mL 去离子水,用棉塞塞住试管口,于蒸汽消毒器中 120 °C 下处理 30 min,显微镜下观察球形变化。

1.2.3 元素分析 分别取少量 Bio-sep CL 6B 和 Sepharose CL-6B 凝胶,充分用乙醇、去离子水清洗后,抽滤干,在干燥箱中干燥。参照仪器操作说明进行元素分析。

1.2.4 耐压-流速曲线测定 参照文献^[8]中的方法,分别取两种交联凝胶各 30 mL,装于 1.6 cm × 20 cm 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。

1.2.5 分离特性测定 参照文献^[8]中的方法。将预先沉降的等体积的两种凝胶分别装入同规格的 1.6 cm × 60 cm 层析柱中,接入 AKTA prime 蛋白质纯化系统。相同条件下测定对不同分子量蛋白的保留行为。

条件:50 mmol/L 磷酸缓冲液,pH 为 6.8,流速为 0.2 mL/min(15 cm/h)。

蛋白分别为:细胞色素 C(分子量 12.4 KDa);碳脱水酶(分子量 29 KDa);牛血清白蛋白(分子量 66 KDa);乙醇脱氢酶(分子量 150 KDa); β -淀粉酶(分子量 200 KDa)。

2 结果与讨论

2.1 颗粒外观形态及粒径分布

肉眼观察,两种凝胶微球均为乳白色细小颗粒。光学显微镜下,凝胶微球球形完好,未有破碎或变形。用扫描式电子显微镜进一步观察,两种交联琼脂糖凝胶微球在球形、外观形态方面相同(见图 1、图 2)。

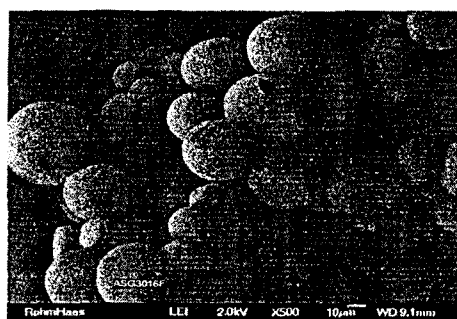


图 1 Bio-sep CL 6B 扫描电子显微照片($\times 500$)
Fig. 1 SEM of Bio-sep CL-6B($\times 500$)

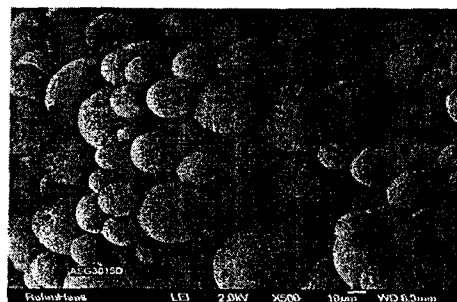


图 2 Sepharose CL-6B 扫描电子显微照片($\times 500$)
Fig. 2 SEM of Sepharose CL-6B($\times 500$)

统计分析的结果(见图 3、图 4)显示,国产凝胶的颗粒粒径范围在 50 ~ 150 μm ,平均粒径为 94 μm ,球形长径比为 1.03;进口凝胶的颗粒粒径范围约在 30 ~ 145 μm ,平均粒径为 81 μm ,球形长径比为 1.03;从整体上看,国产凝胶颗粒粒径分布更趋向正态分布。

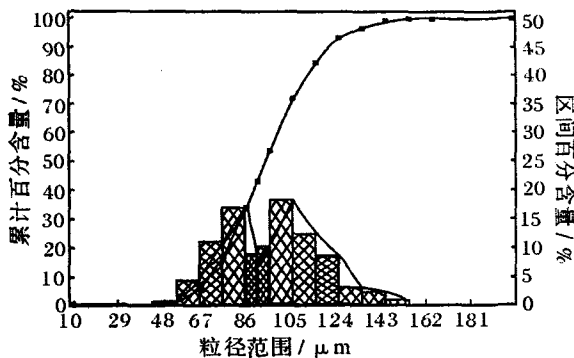


图3 Bio-sep CL 6B 粒度分布统计

Fig. 3 Bead size distribution of Bio-sep CL-6B

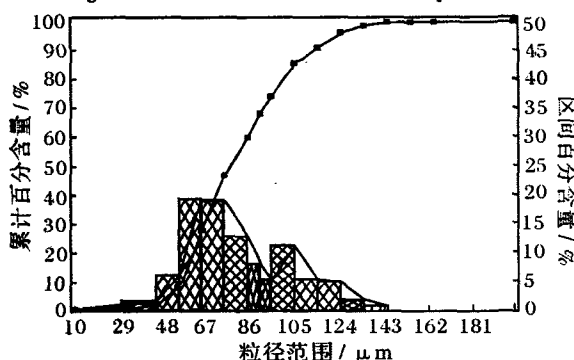


图4 Sepharose CL-6B 粒度分布统计

Fig. 4 Bead size distribution of Sepharose CL-6B

2.2 耐热实验

交联琼脂糖的一个很重要的特性就是它的耐热性较未交联的凝胶大大提高^[2]。A管和B管中两种交联凝胶在120℃下处理30min后,分别取样于光学显微镜下观察,凝胶均未遭到破坏,球形完好。而对照品C管中未经交联的凝胶高温下已全部溶解,降低温度后凝结成胶冻状。表明Bio-sep CL 6B与Sepharose CL-6B两种交联琼脂糖凝胶均可耐受较高温度,可经受120℃下的灭菌处理。

2.3 元素分析

元素分析结果见表1。

表1 元素分析结果

Table 1 Analytical results of elements

	C/%	H/%	N/%	Pb $\times 10^{-6}$	Fe $\times 10^{-6}$	Cu $\times 10^{-6}$	Cd $\times 10^{-6}$	Cr $\times 10^{-6}$	Ni $\times 10^{-6}$
Bio-sep CL 6B	47.9	7.4	<0.02	<1	15	<1	<1	2	2
Sepharose CL-6B	47.1	6.9	<0.02	<1	11	<1	<1	1	<1

由表1可知,主要有机元素碳元素以及氢、氮元素含量基本相同,碳含量都比文献报道值^[7]

(46.2%)稍高。金属元素的含量会对色谱分离产生影响,经测定,两种凝胶中金属元素的含量都非常低,国产凝胶中铁的含量比进口稍高,怀疑是生产操作中受到污染所致。

2.4 耐压及流速

耐压及流速见图5、图6。

由图5可知,Bio-sep CL 6B的最大耐压值约在90 kPa,该压力下,流速可达7.5 mL/min。对比测定Sepharose CL-6B,其最大耐压亦在80~90 kPa,最大压力时流速约7.0 mL/min(见图6)。

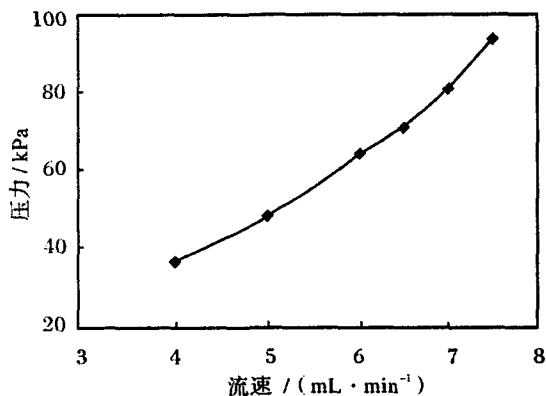


图5 Bio-sep CL 6B 耐压-流速曲线图

Fig. 5 Pressure-flow relationship for Bio-sep CL 6B

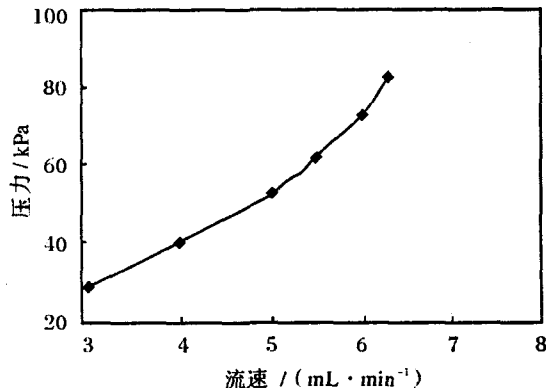


图6 Sepharose CL-6B 耐压-流速曲线图

Fig. 6 Pressure-flow relationship for Sepharose CL 6B

2.5 分离特性

交联琼脂糖可作为凝胶过滤介质使用。不同分子量的5种蛋白(细胞色素C、碳脱水酶、牛血清白蛋白、乙醇脱氢酶、β-淀粉酶)在装填有Bio-sep CL 6B和Sepharose CL-6B介质的两种层析柱上都得到了保留和分离,符合凝胶过滤色谱特性,出峰顺序及分离特性相同(见图7、图8),对分子量在10⁴~10⁶道尔顿之间的蛋白都能实现较好的分离。从图9分离蛋白的色谱图上同样可以看出这一点,重叠图显示两种凝胶的分离效果基本相同。

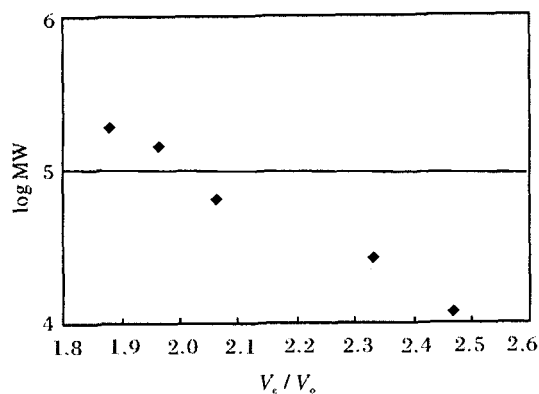


图7 在 Bio-sep CL 6B 上不同蛋白保留情况

Fig. 7 SEC retention of proteins in Bio-sep CL 6B
 V_c/V_0 表示洗脱体积与柱外水体积的比值, log MW 为蛋白分子量的对数值, 下同。

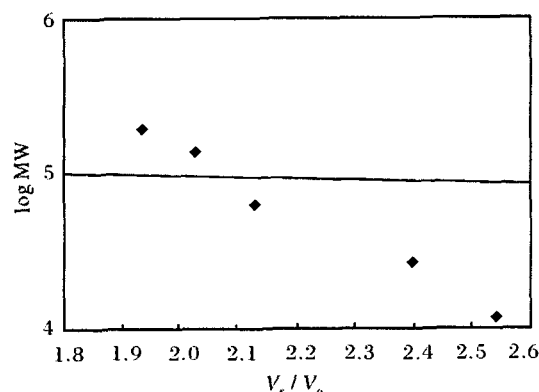


图8 在 Sepharose CL-6B 上不同蛋白保留情况

Fig. 8 SEC retention of proteins in Sepharose CL-6B

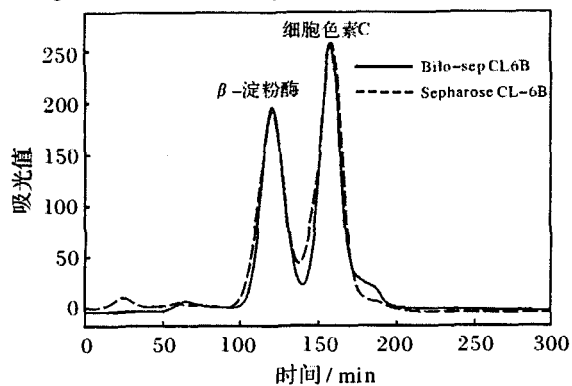


图9 Bio-sep CL 6B 和 Sepharose CL-6B 分离蛋白色谱图比较

Fig. 9 Separation of a protein mixture on Bio-sep CL 6B and Sepharose CL-6B

3 结论

通过对国产 Bio-sep CL 6B 与进口 Sepharose CL-6B 两种交联琼脂糖凝胶, 从外观形态、耐热、元素组成、耐压、流速、色谱特性几个方面进行比较, 从根本上较为全面地反映了两种凝胶的基本特性。各项对比实验结果相当, 表明国产交联琼脂糖在质量上完全能和进口产品相媲美, 而售价上只有进口产品的 1/2, 因此, 物美价廉, 可完全替代昂贵的进口产品用于生物医药工业的下游分离纯化中。

参考文献:

- [1] 刘国詮. 生物工程下游技术[M]. 第2版. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [2] Porath J, Janson J-C, Låås T. Agar derivatives for chromatography, electrophoresis and gel-bound enzymes. 1. Desulphated and reduced crosslinked agar and agarose in spherical bead form [J]. Journal of Chromatography, 1971, 60: 167-177.
- [3] Hjerten S. Chromatographic separation according to size of macromolecules and cell particles on columns of agarose suspensions [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1962, 99: 466-475.
- [4] 陈申如, 张其标, 苏喜荣. 不同来源琼胶提取琼脂糖的比较[J]. 海洋水产研究, 2002, 23(4): 51-55.
- [5] 姚美君, 袁亚辉. 琼脂糖生产工艺的革新[J]. 水产科技情报, 2003, 30(6): 275-277.
- [6] 张伟, 张较强, 邵伟, 等. 琼脂糖凝胶的制备及化学改性研究[J]. 应用化工, 2003, 32(1): 24-27.
- [7] Andersson M, Ramberg M, Johansson B-L. The influence of the degree of cross-linking, type of ligand and support on the chemical stability of chromatography media intended for protein purification [J]. Process Biochemistry, 1998, 33(1): 47-55.
- [8] Hagel L, Andersson T. Characteristics of a new agarose medium for high-performance gel filtration chromatography [J]. Journal of Chromatography, 1984, 285: 295-306.