

## 多通道流动电泳技术及其 在蛋白质、酶和抗体纯化中的应用研究

刘 铮 黄 正 丛进阳 杨 欢 丁富新 袁乃驹

(清华大学化学工程系 北京 100084)

**摘 要** 提出一种新型制备电泳方法即多通道流动电泳技术,建立了微机控制的电泳设备,考查了操作条件对设备分离效率的影响。应用该技术进行牛血清清蛋白(BSA)-牛血红蛋白(HBB)混合物的连续分离,每小时从含BSA、HBB各37.0mg的蛋白质混合物中分离出13.6mg的BSA和20.0mg的HBB。应用该技术进行尿激酶粗品的纯化,可将其比活力由4000IU/mg提高到 $4 \times 10^4$  IU/mg以上,产量在 $10 \times 10^4$  IU/h以上。将该技术与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀方法结合,从15ml免疫鼠血清中分离出12.5mg高纯度尿激酶抗体IgG,产量为2.1mg/h。上述结果证明多通道流动电泳技术具有分离速度快、精度高和可操作性好等优点,在生物产品分离领域中具有广阔的应用前景。

**关键词** 电泳,多通道流动电泳,多腔室电泳槽,尿激酶,尿激酶抗体

电泳技术所具有的高分辨率、广泛适用性及其在生物科学基础研究中的成功实践,使得制备型电泳技术成为一项极具吸引力的研究课题。近年来,围绕着解决电泳技术放大过程中的换热、稳定pH梯度和抑制对流混合等问题,发展出电分流分级<sup>[1]</sup>,循环流动等电聚焦<sup>[2]</sup>、反向作用谱电泳<sup>[3]</sup>及自聚焦<sup>[4]</sup>等多种方法,显示出将电泳方法发展为大规模生物产品分离技术的良好前景。本文提出一种新型制备电泳方法,即多通道流动电泳技术。建立了微机控制的多通道流动电泳设备。以牛血清清蛋白(以下简称BSA)和牛血红蛋白(以下简称HBB)为例,研究了分离过程中操作参数对设备分离效率的影响。采用该设备进行了BSA-HBB混合物的分离,开展了尿激酶粗品的纯化及从免疫鼠血清中纯化尿激酶抗体IgG的研究并进行了有关对比实验。SDS-PAGE分析结果表明产品的纯度很高。

### 1 实验设备、试剂及产品检验方法

#### 1.1 多通道流动电泳分离原理与实验设备

电泳过程是在由5个薄腔室组成的电泳槽中进行的,腔室之间用膜隔开,中间腔室为进样室,其两侧依次为冲洗室和电极室。分离原理如图1所示,当蛋白质混合物被连续引入进样室时,带电组分在电场作用下迁移过膜进入其对应的冲洗室,被载流冲出;中性组分则被进样流从进样室出品带出,从而实现分离。在分离多组分混合物时,可将多个设备分别在不同的pH点操作,组成一个流程,以获得各个产品。由此可见多通道流动

电泳技术具有适用性和可操作性。此外,该技术采用简单电解质建立分离所需的 pH 梯度,降低了分离成本,也简化了产品的后续分离过程。

本文建立的多通道流动电泳设备如图 2 所示,电泳槽内各腔室长 8cm,宽 0.6cm,进样室、冲洗室及电极室厚度分别为 0.05, 0.2, 0.2cm。E 腔室之间用自行合成的凝胶膜隔开<sup>[5]</sup>。实验时按照预先设定的电泳程序施加电场,样品及载流由泵系统输入,分步收集冲洗室及进样室冲出液。电泳结束后,系统自动进行清洗再生操作。

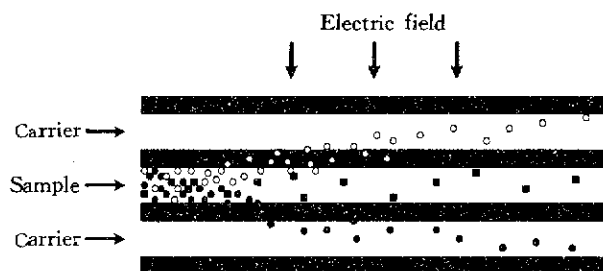


图 1 多通道流动电泳分离过程示意

Fig. 1 Schematic view of MFE process

- Positively charged fraction,      Neutral fraction,
- Negatively charged fraction,      ■ Membrane

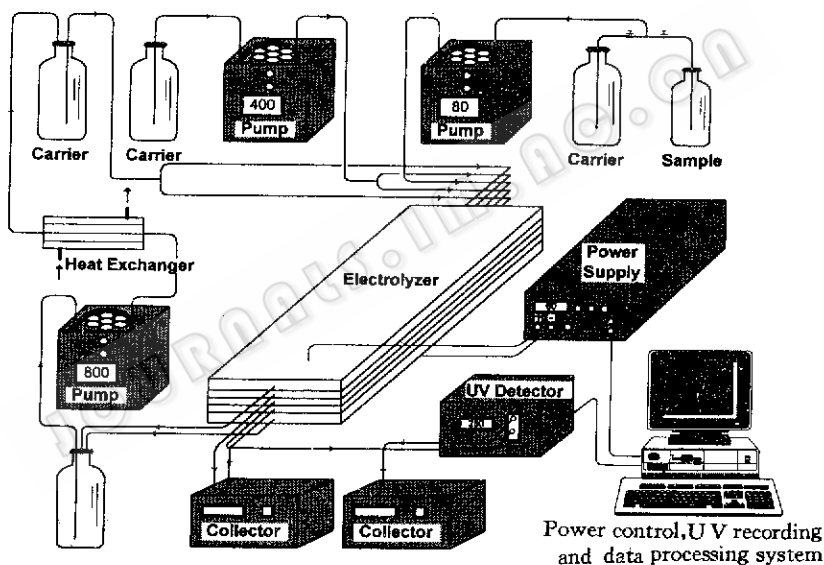


图 2 多通道流动电泳设备示意

Fig. 2 Schematic view of MFE apparatus

## 1.2 试剂

实验所用的主要蛋白质试剂为:BSA ( $pI=4.7$ ,  $MW=67\ 000$ , Sigma 公司产品), HBB ( $pI=6.9$ ,  $MW=64\ 000$ , 上海丽珠东风生化试剂公司产品); 抗尿激酶鼠血清制备参照文献[6]。

## 1.3 产品检测方法

首先采用 SDS-PAGE 法鉴定产品纯度,证明其为电泳纯或其纯度与标准品纯度相当后,再测定其含量。BSA 和 HBB 产品的含量分别由其在 280nm 和 420nm 处的吸光度值算出;尿激酶抗体 IgG 含量测定采用 Bradford 法<sup>[7]</sup>,以 BSA 作参照;尿激酶的活力测定采用气泡上升法<sup>[8]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 操作参数对设备分离效率的影响

定义设备分离效率  $\eta$  如下:

$$\eta = 1 - c_L / c_0 \quad (1)$$

式中  $c_L$  和  $c_0$  分别是蛋白质组分在进样室出口和入口时的浓度。

电场强度对  $\eta$  的影响如图 3 所示。 $\eta$  随着电场强度的增大而提高。但电泳在较高的电场强度范围内进行时,  $\eta$  的增幅趋缓。这主要是由于进样腔室内膜表面存在浓度极化现象, 它随电场强度的增大而加重, 阻碍了  $\eta$  的进一步提高。

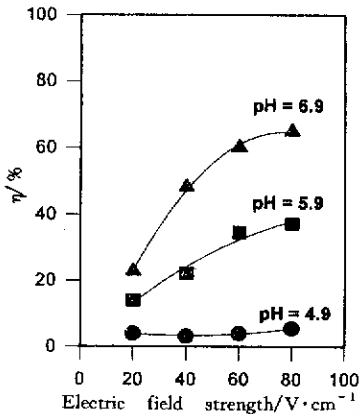


图 3  $\eta$  随电场强度的变化

Fig. 3  $\eta$  as function of electric field strength

Sample loading flow rate  $v=80\text{ml/h}$

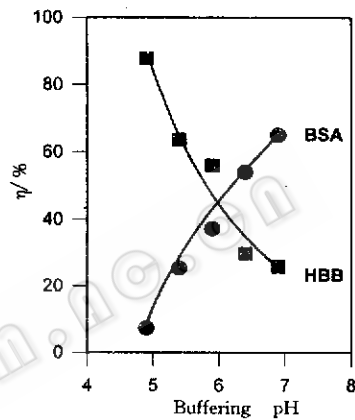


图 4  $\eta$  随分离缓冲 pH 值的变化

Fig. 4  $\eta$  as function of buffering pH

$E=80\text{V/cm}$ ;  $v=80\text{ml/h}$

分离操作 pH 值对  $\eta$  的影响如图 4 所示。分离操作 pH 点距分离组分的等电点越远,  $\eta$  越高; 反之则  $\eta$  越低。这是由于缓冲溶液的 pH 值直接决定溶解在其中的蛋白质的电荷性质和电量, 从而影响蛋白质的电迁移速度。由此推知, 待分离组分的等电点差别越大, 分离效率和产率就越高。

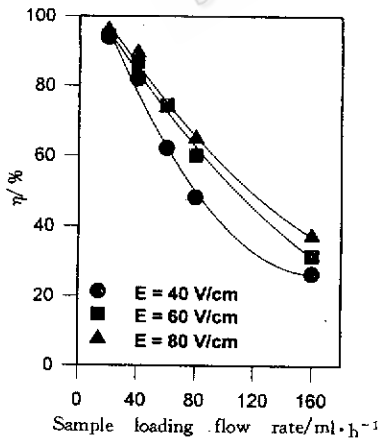


图 5  $\eta$  随进样流量的变化

Fig. 5  $\eta$  as function of sample loading flow rate

Buffering pH=6.9

进样流量对  $\eta$  的影响如图 5 所示。 $\eta$  随着进样流量的增大而降低, 说明应保证样品溶液在进样室内有充分的停留时间, 以获得高分离效率。但若进样流量过低, 则进样溶液在流动过程中 pH 变化过大, 将导致待分离组分带电量乃至电性的变化, 影响分离的产量和精度。进样流量是影响多通道流动电泳过程分离效率的重要操作参数。

上述结果揭示出多通道流动电泳过程的分离效率从根本上决定于样品在进样腔室中的电迁移速度。一切有助于加快蛋白质电迁移速度的措施, 诸如提高电极电压, 减少浓差极化等等都是提高分离效率的有效

途径。

2.2 分离 BSA、HBB 其混合物

用 0.01mol/L, pH5.9, Tris-HAC 溶液配制待分离蛋白质样品溶液, 实验样品分别为 (1) 0.5mg/ml BSA; (2) 0.5mg/ml HBB; (3) BSA 和 HBB 的混合物, BSA 和 HBB 浓度均为 0.5mg/ml。电场强度为 60V/cm。进样室、冲洗室及电极室流量分别为 40, 160 和 320ml/h。每组实验的样品加入量与分离出的产品量列于表 1 中。样品及产品的 SDS-PAGE 电泳图谱如图 6 所示。

表 1 分离牛血清清蛋白-牛血红蛋白混合物结果

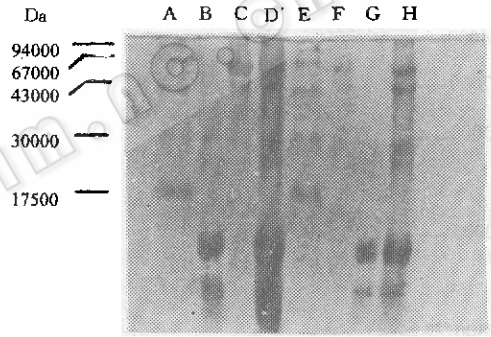
Table 1 Products recovered from BSA, HBB and BSA-HBB

Experiment No.	Sample		Product	
	BSA/mg	HBB/mg	BSA/mg	HBB/mg
1	15.0	—	5.0	—
2	—	16.0	—	9.0
3	18.5	18.5	6.8	10.0

图 6 BSA、HBB 样品及产品的电泳图谱

Fig. 6 Diagram of SDS-PAGE analysis of the protein mixture, BSA and HBB products.

- A. Standard protein marker.
- B. HBB sample
- C. BSA sample
- D. BSA-HBB mixture
- E. Standard protein maker
- F. BSA recovered from the mixture
- G. HBB recovered from the mixture
- H. Residue of the central compartment



由图 6 可看出, F 列的 BSA 产品与 C 列的 BSA 样品的谱带相同, G 列的 HBB 产品与 B 列 HBB 样品谱带相同。这表明采用本装置所获得 BSA 和 HBB 产品的纯度与市售 BSA 和 HBB 样品的纯度相当。每小时可获得近 40mg 的纯蛋白质。但单级分离的收率有待提高。在实际过程中, 可通过将分离残余液引入中间室进行再分离以提高总收率。

2.3 从尿激酶粗品中纯化尿激酶

采用 0.02mol/L, pH8.8, Tris-Gly 溶液配制样品, 并作为冲洗液和电极液。电场强度为 80V/cm, 进样室、冲洗室和电极室的流量分别为 40, 160 和 360ml/h。分离操作进行 15min, 产品由中间进样室的出口收集。结果如表 2 所列。

由表 2 所示, 采用本方法每小时可得到比活力在  $4 \times 10^4$  IU/ml 以上的尿激酶精品  $10 \times 10^4$  IU/h, 但由于尿激酶是由等电点不同的多个组分构成<sup>[9]</sup>, 等电点低于或高于 pH8.8 的组分迁移到两侧冲洗室, 造成活力收率不高。作为对照, 采用 25ml CMC23 离子交换柱对同样的粗品进行了纯化, 处理规模相同, 也可得到比活力在  $4 \times 10^4$  IU/mg 以上的精品, 但一个分离周期为 72h (不包括树脂再生步骤)。与之相比, 采用多通道流动电泳技术大大加快了分离速度, 免除了吸附、平稳和洗脱及再生等步骤, 节省了大量的化学试剂, 这对于大规模分离生物产品时降低成本, 提高产量是非常重要的。

表 2 尿激酶纯化结果

Table 2 Purification of urokinase from urinary urokinase extracts

No.	Urinary urokinase extract			Urokinase product		
	Activity /IU	Protein /mg	Specivie activity /IU mg <sup>-1</sup>	Activity /IU	Protein /mg	Specific activity /IUmg <sup>-1</sup>
1	87870	15.2	5770	48740	1.10	44280
2	70200	14.3	4900	27100	0.59	25930
3	69400	14.1	4900	25700	2.64	40200

2.4 从免疫鼠血清中纯化尿激酶抗体 IgG

免疫鼠血清首先进行 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀处理, 然后再进行电泳分离。实验时采用 0.02mol/L, pH7.0, Tris-HAc 作为样品溶剂、冲洗液和电极液, 其流量分别为 40、160 和 360ml/h。电场强度为 60V/cm。产品由进样室出口收集。鼠血清及尿激酶抗体 IgG 的电泳图谱如图 7 所示。

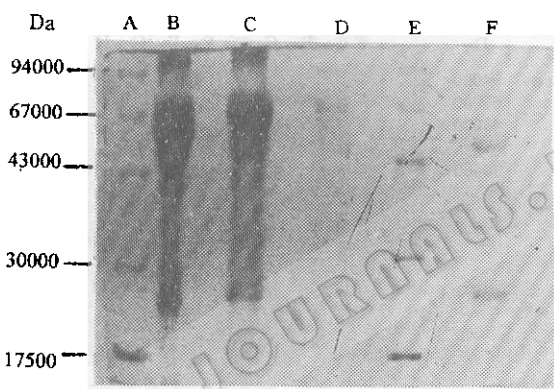


图 7 鼠血清、尿激酶抗体电泳图谱  
Fig. 7 Diagram of SDS-PAGE analysis of mouse serum and IgG product  
Conc. of separation gel is 15%, crosslinkage is 5%  
A. Standard protein marker  
B. Immunized mouse serum  
C. Precipitates by (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> D. The soluble fraction in (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> precipitation  
E. Standard protein maker  
F. Anti urokinase mouse IgG product

其中 F 列 IgG 最终产品仅有两条带, 分别为其重链 (MW=50000) 和轻链 (MW=24 000), 由此推知, 尿激酶抗体 IgG 的分子量为 98 000。采用 Bradford 法测定产品蛋白含量结果表明, 从 15ml 免疫鼠血清中共获得 12.5mg 的抗尿激酶 IgG。本装置产量为 2.1mg/h。在前期工作中, 曾采用由离子交换和凝胶层析等组成的流程, 从 15ml 鼠血清中得到 15mg 的 IgG, 与之相比, 多通道流动电泳技术再次显示出其分离速度快、精度高、节省试剂的优点。

3 结 论

上述研究结果表明多通道流动电泳技术具有分离速度快、精度高及可操作性强等优点; 证实了该技术应用于真实蛋白质混合物体系分离纯化的可行性; 显示出这一技术应用于生物产品分离过程的广阔的前景。多通道流动电泳技术的后续研究将集中在设备放大, 分离过程传质动力学等方面, 进一步提高多通道流动电泳分离技术的分离精度、处理量及设备效率。

## 参 考 文 献

- [1] Giddings J C. *J Chromatogr*, 1989, **480**: 21.  
[2] Bier M, Egrn N B. In: *Development in Biochemistry*, Elsevier-North Holland, Amsterdam, 1979. Vol. 7.  
[3] O'Farrell P H. *Science*, 1985, **227**: 1586.  
[4] Dobransky T, Sova O. *J Chromatog*, 1986, **358**: 2749.  
[5] 袁乃驹, 刘 铮; 朱德权等. 申请中国专利. 申请号 93108630. 2-4, 1993  
[6] 沈金玉, 孙联合, 丛进阳. *生物工程学报*, 1993, **9**: 84.  
[7] Bradford M. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248.  
[8] 中华人民共和国卫生部标准 WS-1-12-79, 1979.  
[9] Righetti P G, Barzaghi B, Barubbi E *et al.* *J Chromatogr*, 1992, **470**: 37.

## Multichannel Flow Electrophoresis and Its Applications in Purification of Proteins, Enzymes and Antibodies

Liu Zheng Huang Zheng Cong Jinyang Yang Huan

Ding Fuxin Yuan Naiju

(*Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084*)

**Abstract** A new preparative electrophoresis technique, multichannel flow electrophoresis (MFE) was proposed. A multicompartiment electrolyzer and an operation control system used in MFE were developed. The effects of electric field strength, buffering pH and sample introducing flow rate on MFE separation efficiency were examined. The continuous separation of BSA and HBB mixture yielded about 40mg product. The application of MFE was first exemplified by continuous purification of urokinase from urine extracts.  $10 \times 10^4$  IU/h urokinase product whose specific activity was higher than 40 000 IU/mg was obtained per hour. MFE was also applied in the continuous purification of anti urokinase mouse IgG from mouse serum, which yielded 2.1mg mouse IgG hourly with high purity demonstrated by SDS-PAGE. The preliminary results presented in this paper have confirmed the workability of MFE and pointed out its high application potential in biochemical engineering processes.

**Key words** Electrophoresis, multichannel flow electrophoresis, multicompartiment electrolyzer, urokinase, anti urokinase mouse IgG