

直接偶联法制备配基密度可控的丁基琼脂糖层析介质

冯清正^{1,2}, 孟庆强¹, 王佳兴¹, 马光辉¹, 马润宇², 苏志国¹

(1. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080; 2. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘要: 以快流速琼脂糖凝胶为基质, 采用直接偶联法制备丁基琼脂糖疏水层析介质. 考察了影响反应的主要因素, 通过四因素三水平正交实验和单因素实验, 确定丁基琼脂糖疏水层析介质的优化反应条件为: 反应温度 45℃, 反应时间 45 min, 催化剂三氟化硼乙醚用量 0.02 mL/g. 在此条件下严格控制琼脂糖凝胶的含水量, 改变丁基缩水甘油醚用量, 制备了不同丁基密度的丁基琼脂糖疏水层析介质. 用不同密度的系列介质考察对牛血清白蛋白的吸附性能, 初步研究了配基密度与吸附性能的关系; 研究了疏水层析介质的机械稳定性和化学稳定性. 结果表明, 其各项性能良好, 具有广阔的应用前景.

关键词: 疏水层析; 丁基琼脂糖层析介质; 制备; 吸附

中图分类号: TQ033 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2006)06-0959-05

1 前言

目前应用较多的疏水层析介质主要有辛基琼脂糖凝胶、苯基琼脂糖凝胶和丁基琼脂糖凝胶. 前两种疏水性较强, 在分离蛋白质过程中与蛋白质的作用较强, 因此会引起某些蛋白质的变性失活. 丁基琼脂糖凝胶的疏水性相对较弱, 在分离过程中与蛋白质之间的作用温和, 适用于分离在强疏水作用下容易变性的蛋白质. 但现有的 GE 公司生产的丁基琼脂糖层析介质的配基密度单一(50 μmol/mL), 不能满足不同尺寸、不同疏水性蛋白质分离的需要. 因此有必要研究丁基琼脂糖层析介质的制备工艺, 掌握对配基密度的控制, 以满足不同分离工艺的需要.

本工作采用一种新的直接偶联制备工艺, 即严格控制琼脂糖凝胶的含水量, 通过改变丁基缩水甘油醚的用量, 制备一系列不同配基密度的丁基琼脂糖层析介质, 配基密度用核磁共振法定量测定. 这种工艺偶联配基时不会引入带电基团, 配基密度容易控制. 另外, 本工作采用自制的快流速琼脂糖凝胶, 这种快流速的基质交联度高, 具有很好的机械强度, 可在高流速下使用. 用正交实验法和单因素实验相结合对反应条件进行了考察, 探讨了各因素对配基密度的影响, 确定了优化反应条件, 制备出了一系列不同配基密度的丁基琼脂糖层析介质, 并对其进行了性能考察.

2 实验

2.1 仪器与试剂

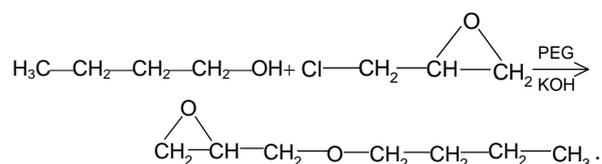
Bruker Avance 600M 超导体超屏蔽傅立叶变换核

磁共振波谱仪, 瑞士 Bruker 公司; 水分测定仪, Mettler Toledo; HZS-H 水浴振荡器, 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司; 紫外可见分光光度计 Ultrospec 2100 pro, Amersham, Sweden.

快流速琼脂糖凝胶为国家生化工程技术研究中心(北京)的产品; 环氧氯丙烷, 分析纯, 天津市化学试剂一厂; 正丁醇, 分析纯, 天津市北方玻璃购销中心; 三氟化硼乙醚, 阿托兹精细化工有限公司; 聚乙二醇 400, 天津天泰精细化学品有限公司; 牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA), 北京欣经科生物技术公司. 其他试剂均为分析纯.

2.2 丁基缩水甘油醚的制备

参照 Mouzin 等^[1]一步制备烷基缩水甘油醚的方法, 用价廉的聚乙二醇 400 代替季铵盐作相转移催化剂, 在碱性条件下一步制备丁基缩水甘油醚. 将 1 mol 正丁醇、2 mol 环氧氯丙烷、1 mol 氢氧化钾和 20 mL 聚乙二醇 400 置于带搅拌器、回流冷凝管及温度计的 1000 mL 三口烧瓶中, 在 40℃ 下反应 10 h. 反应式如下:



反应结束后减压蒸馏产物, 在 1733 Pa 下收集 67~69℃ 馏分^[2], 得到精制丁基缩水甘油醚.

2.3 琼脂糖凝胶的脱水

琼脂糖凝胶置于砂芯漏斗中, 用二氧六环洗涤, 再

收稿日期: 2006-01-11, 修回日期: 2006-03-21

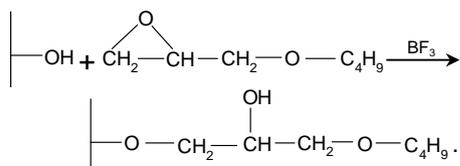
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 20125616; 20221603)

作者简介: 冯清正(1977-), 男, 河北省沧州市人, 硕士研究生, 生物化工专业; 马光辉, 通讯联系人, Tel: 010-82627062, E-mail: ghma@home.ipe.ac.cn.

用水分测定仪测定其含水量。

2.4 直接偶联法制备丁基琼脂糖层析介质

取一定量脱水后的琼脂糖凝胶置于 100 mL 的锥形瓶中, 加入等体积的二氧六环和一定量的三氟化硼乙醚溶液, 在摇床上振荡 5 min(转速为 100 r/min), 再加入一定量丁基缩水甘油醚(溶于二氧六环), 一定温度下在摇床上振荡反应一定时间(转速为 100 r/min)。反应结束后用二氧六环/水交替洗涤凝胶 3 次, 最后用去离子水洗 7 次。反应式如下:



2.5 丁基琼脂糖层析介质性能测定

2.5.1 介质丁基密度的测定

参考 Johansson 等^[3]的方法, 用核磁共振法测定介质密度。琼脂糖凝胶本身不含甲基, 偶联上丁基后含与丁基等摩尔量的甲基, 因此可以用核磁共振法定量测定丁基琼脂糖凝胶的甲基密度, 从而确定其丁基密度。由于丁胺的甲基与丁基琼脂糖甲基的结构类似, 因此以丁胺为标准物定量样品的丁基含量。

(1) 标准曲线的测定

取 2, 6, 10 μL 丁胺分别溶于 2 mL 氘代盐酸(DCl)中, 各取其中的 0.4 mL 置于核磁管中, 加入 0.2 mL DMSO- d_6 作核磁共振谱图。以 DMSO- d_6 残留氢的峰(2.8)为 1, 积分丁胺上的甲基氢的峰(0.9), 作丁胺加入量与 A_{methyl} (甲基氢的积分面积)的标准曲线。

(2) 介质丁基密度的测定

称取烘干的介质 7 mg 置于试管中, 加入 0.6 mL 氘代盐酸, 超声至透明全溶解。取其中的 0.4 mL 置于核磁管, 再加入 0.2 mL DMSO- d_6 作核磁共振谱图。以 DMSO- d_6 残留氢的峰为 1, 积分甲基氢的峰, 根据样品的 A_{methyl} 与测定的标准曲线计算丁基密度。

2.5.2 介质压强-流速曲线的测定

取适量疏水介质用匀浆法装入玻璃柱(200 mm \times 10 mm)中, 通入一定量去离子水, 调整介质床高度为 14 cm。将此玻璃柱与氮气系统连接加压, 工作液从玻璃柱上部压入, 测量不同压强时 5 min 流出的液体量, 按下式^[4]计算各压强时柱内线流速 $V(\text{cm/h})$:

$$V=60Q/(tS),$$

式中 Q 是工作液通过介质床体的流量(mL/min), t 是工作液通过介质床的时间(min), S 是玻璃柱的截面积(cm^2)。

2.5.3 介质对牛血清白蛋白(BSA)的吸附实验

称取一定量抽干的疏水介质, 置于 50 mL 锥形瓶中, 加入 BSA 样品溶液 10 mL。室温下在恒温摇床中振荡 3 h 后离心。用紫外分光光度计(280 nm)测上清液 BSA 含量。根据吸附前后液相中 BSA 含量的差值确定疏水介质的吸附量。

3 结果与讨论

3.1 琼脂糖凝胶脱水程度对偶联反应的影响

偶联反应的催化剂($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$)在水中会水解, 所以对琼脂糖凝胶脱水程度的控制关系到偶联反应能否正常进行。表 1 是相同制备条件下不同含水量的琼脂糖凝胶与丁基密度的对应关系, 可以看出, 含水量过大时, 偶联反应受到影响, 不能得到配基密度准确的系列介质。实验证明, 当琼脂糖凝胶含水量控制在 600×10^{-6} 以下时, 改变丁基缩水甘油醚的加入量, 可以得到配基密度不同的系列介质。

表 1 琼脂糖凝胶含水量与配基密度的关系
Table 1 Influence of water content of agarose on density of butyl group

Water content of agarose ($\times 10^{-6}$)	Density of butyl group ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)			
600	12	20	32	40
1000	26	17	95	60

3.2 正交实验结果

影响偶联反应的因素有催化剂用量、丁基缩水甘油醚加入量、反应温度及反应时间。采用 $L_9(3^4)$ 正交表, 通过四因素三水平正交实验法考察各因素对偶联反应的影响, 结果表明反应温度对反应影响最大, 高温(45 $^{\circ}\text{C}$)条件下丁基密度大, 丁基缩水甘油醚利用率高; 反应时间的影响次之, 催化剂的影响较小, 丁基缩水甘油醚用量对反应的影响最小。

3.3 反应时间、催化剂用量对丁基密度的影响

为提高丁基缩水甘油醚的利用率, 实现丁基密度可控, 固定反应温度为 45 $^{\circ}\text{C}$, 设计反应时间、催化剂用量 2 个单因素实验考察其对丁基密度的影响。

3.3.1 反应时间的影响

图 1 为 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}:\text{Agarose}=0.02 \text{ mL}/\text{g}$ 时反应时间与丁基密度的关系。在偶联反应中, 催化剂三氟化硼能使环氧基开环, 因此反应初始阶段丁基密度逐渐增加。但体系内同时也伴随着副反应, 三氟化硼可以与醚形成分子化合物, 使有机物分子活化, 以醚键连接的烷基容易裂解^[5]。所以反应时间过长, 体系内丁基缩水甘油醚含量逐渐降低, 偶联速度下降, 偶联速度低于醚键裂解速度, 导致丁基密度下降。由图可知, 反应时间为 45 min 时, 丁基密度最高, 丁基缩水甘油醚的利用率最大。

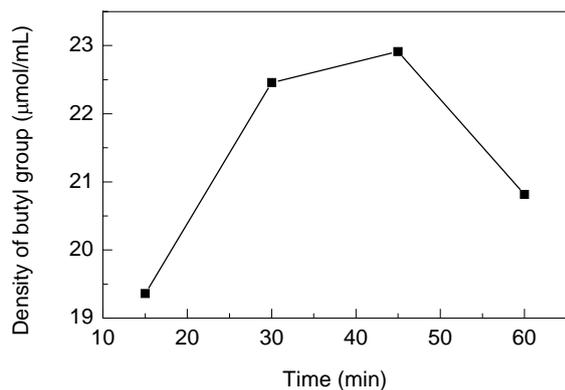
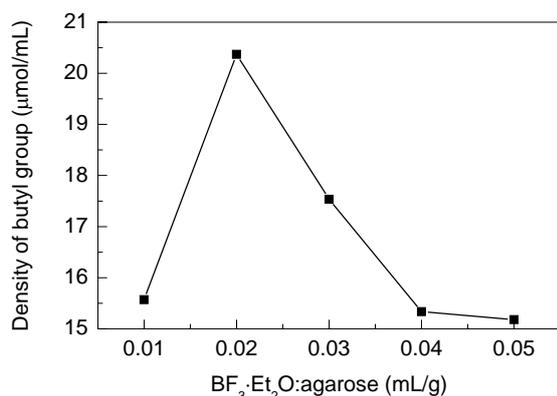


图 1 反应时间对配基密度的影响

Fig.1 Effect of reaction time on density of butyl group

3.3.2 催化剂($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$)用量的影响

图 2 为反应时间 45 min 时催化剂用量与丁基密度的关系,可以看出, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ 用量较少时,丁基密度不高;而当用量过大时,丁基密度反而急剧下降.原因可能如上所述, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ 在催化反应进行的同时,也会将丁基裂解下来.由图可知, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ 用量为 0.02 mL/g 时,丁基密度最高,丁基缩水甘油醚的利用率最大.

图 2 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ 加入量对配基密度的影响Fig.2 Effect of $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ amount on density of butyl group

3.4 介质丁基密度的控制

由正交实验和单因素实验可知,在反应温度 45°C 、反应时间 45 min、催化剂三氟化硼乙醚用量 0.02 mL/g 的条件下,丁基缩水甘油醚的偶联效率高,利用率大.因此固定这些工艺参数,通过控制丁基缩水甘油醚用量控制介质丁基密度,制备不同丁基密度的丁基琼脂糖疏水层析介质.

图 3 是丁基密度随丁基缩水甘油醚用量的变化关系.从图可以看出,当加入的丁基缩水甘油醚浓度范围在 0.01~0.04 mL/g 时,丁基密度与丁基缩水甘油醚的加入量基本呈线性关系,丁基密度在 10~40 $\mu\text{mol/mL}$.

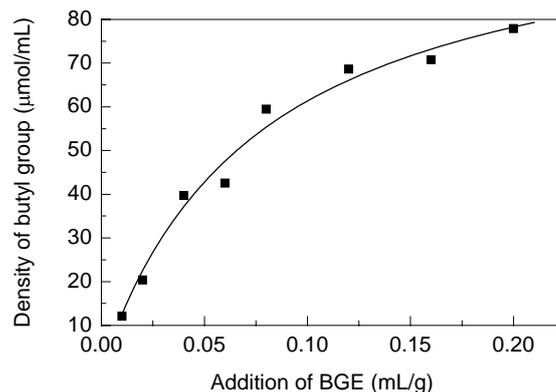


图 3 介质丁基密度随丁基缩水甘油醚加入量的变化

Fig.3 Change of the density of butyl group with the amount of butyl glycidyl ether (BGE)

3.5 介质的性能

3.5.1 介质的机械性能

介质的机械稳定性是影响处理量大小和操作难易的关键因素之一.图 4 是制备的丁基琼脂糖介质的压力-流速曲线.可以看出,在压力低于 0.04 MPa 时,介质的流速随压力增大而直线上升,说明在此压力范围内,介质基本没有发生形变.经测定,介质的最高线性流速为 310 cm/h,进口介质流速为 306 cm/h.

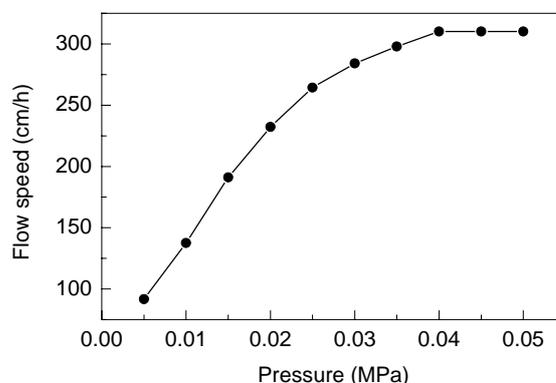


图 4 丁基琼脂糖介质的压力-流速曲线

Fig.4 The pressure-flow speed curve of homemade butyl-agarose beads

3.5.2 介质的化学稳定性

介质的化学稳定性是评价介质使用寿命和安全性的重要指标.将自制丁基琼脂糖层析介质在常用的生化试剂 6 mol/L 脲、8 mol/L 盐酸胍、乙醇、氯化钠溶液中浸泡 30 d,再测其密度及对 BSA 的等温吸附线.由图 5,6 可以看出,无论是丁基密度还是等温吸附曲线,在脲、盐酸胍、乙醇、氯化钠中浸泡 30 d 的介质与保存在水中均无明显区别,说明所制介质化学稳定性良好.可

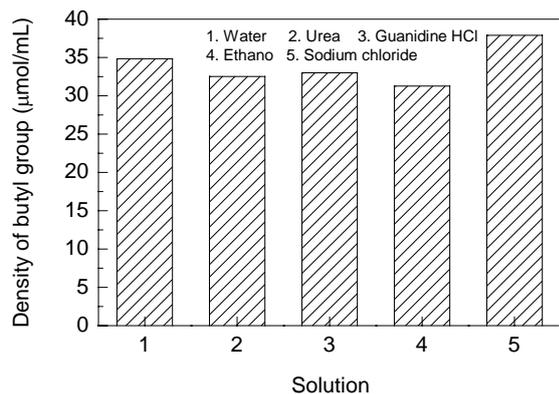


图5 不同溶剂中保存 30 d 的丁基密度比较
Fig.5 Comparison of densities of butyl group after 30 d storage in different solutions

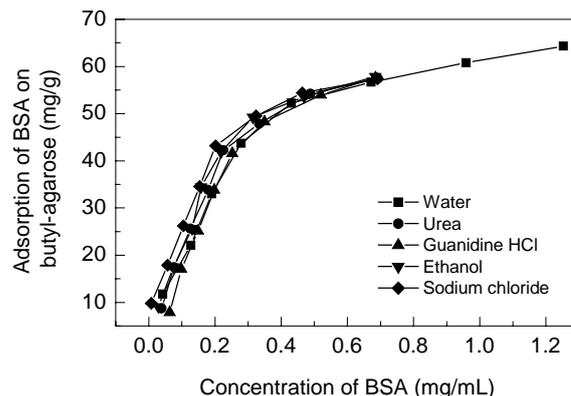


图6 不同溶剂中保存 30 d 的介质等温吸附线比较
Fig.6 Comparison of adsorption isotherms of BSA after 30 d storage in different solutions

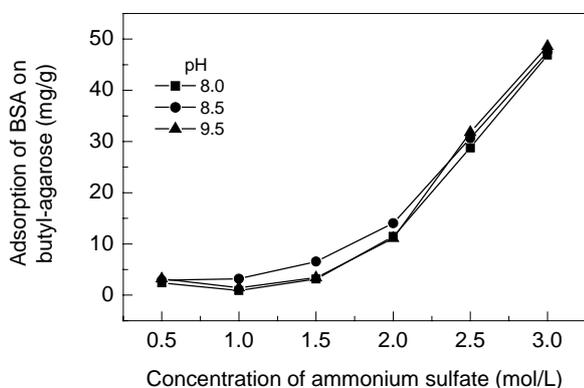


图7 不同 pH 值不同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度下对 BSA 的吸附
Fig.7 Adsorption of BSA at different ammonium sulfate concentrations and pH values

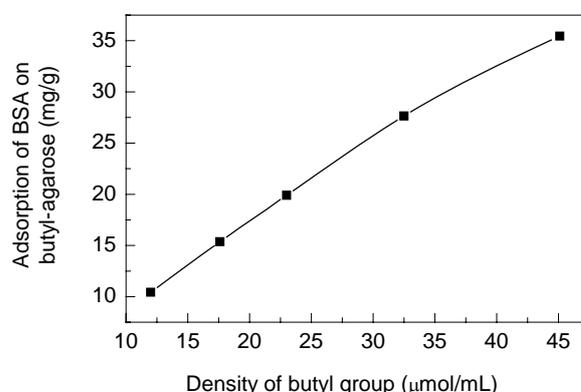


图8 配基密度对 BSA 吸附的影响
Fig.8 Effect of butyl-group density on adsorption of BSA

以看出,随着盐浓度的增高,蛋白质 BSA 在疏水介质 Butyl-agarose beads 上的吸附量明显增大.这种盐浓度提高促进吸附的现象即所谓的“Salt-promoted adsorption”^[6].从图7还可知,在盐浓度一定的条件下,pH 值对丁基琼脂糖介质吸附 BSA 的吸附量影响不大,这与前人的研究结果^[7]是一致的.

图8是不同配基密度的疏水介质对 BSA 的吸附.在丁基密度为 10~50 $\mu\text{mol/mL}$ 时,配基的修饰密度越大,BSA 的吸附量越大,吸附量与丁基密度基本呈线性关系.这说明在此密度范围内丁基琼脂糖的配基密度越大,它对蛋白质的疏水吸附作用越强.

4 结论

以快流速琼脂糖凝胶为基质,用直接偶联方法制备了丁基琼脂糖疏水层析介质,考察了影响反应的因素.通过正交实验和单因素实验确定的丁基琼脂糖疏水层析介质优化反应条件为:反应温度 45 $^{\circ}\text{C}$,反应时间 45

min,催化剂三氟化硼乙醚用量 0.02 mL/g.在此条件下,控制丁基缩水甘油醚的用量,制备了不同丁基密度的丁基琼脂糖疏水层析介质.以快流速琼脂糖凝胶为基质研制的疏水层析介质物化性能良好,对 BSA 有优良的吸附性能,且成本低.不同配基密度的系列介质可以系统研究配基密度对不同蛋白质分离效果的影响.

参考文献:

- [1] Mouzin G, Cousse H, Rieu J-P, et al. A Convenient One-step Synthesis of Glycidyl Ethers [J]. *J. Synthesis*, 1983, 2: 117-119.
- [2] 冯敏华, 卢雪然, 陈远萌. 聚乙二醇相转移催化合成单环氧丙基醚 [J]. *化学试剂*, 1990, 12(3): 135-138.
- [3] Johansson B-L, Drevin I. Quantitative Determination of the Ligand Content and the Negative Charges on Butylamine-substituted [J]. *J. Chromatogr.*, 1985, 321: 335-342.
- [4] 孟庆强, 乔昕, 马光辉. 疏水层析蛋白质动力学与平衡过程的考察 [J]. *离子交换与吸附*, 2004, 20(5): 391-399.
- [5] 托普契耶夫 A B, 扎果罗德尼 C B, 帕乌什金 Я M. 氟化硼及其化合物—有机化学中的催化剂 [M]. 戴惕, 译. 北京: 科学出版社, 1964. 60-66.
- [6] Porath J. Salt-promoted Adsorption Chromatography [J]. *J.*

Chromatogr., 1990, 510: 47–48.

Performance Hydrophobic Interaction Chromatography of Proteins

[7] Hjerten S, Yao K, Eriksson K-O, et al. Gradient and Isocratic High

on Agarose Columns [J]. J. Chromatogr., 1986, 359: 99–109.

Preparation of Butyl-agarose Chromatography Media with Controlled Ligand Density through Direct Coupling Reaction

FENG Qing-zheng^{1,2}, MENG Qing-qiang¹, WANG Jia-xing¹, MA Guang-hui¹, MA Run-yu², SU Zhi-guo¹

(1. State Key Lab. Biochem. Eng., Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

2. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Butyl-agarose chromatography media were prepared by direct coupling of butyl glycidyl ether (BGE) on agarose 4FF beads. The effects of various reaction parameters on the density of butyl group were investigated. The preparative conditions were optimized by orthogonal design of the experiments. The optimum conditions were found to be 0.02 mL/g (BF₃·Et₂O/gel), reaction time 45 min and reaction temperature 45 °C. The ligand density could be controlled by the amount of BGE added to the reaction mixture. The mechanical stability, chemical stability and adsorption capability were also investigated. The results demonstrated that the butyl-agarose chromatography media with varied ligand density would be promising media for protein separation and purification.

Key words: hydrophobic interaction chromatography; butyl-agarose chromatography media; synthesis; adsorption