

对蛋白质进行连续纯化和评估

01-00118-CN

铃木 里沙

方法优势

- ◆ 只需选择分析后的目标峰即可自动重新进样和分析。
- ◆ 通过配备的色谱柱切换阀, 即可根据纯化或分析的需要自动切换色谱柱。
- ◆ 在优化多个样品的培养条件时非常便利。

简介

尺寸排阻色谱法 (SEC) 是确认蛋白质的分子量及其分布的分析方法之一。在 SEC 中, 体积较小的分子进入色谱柱填充剂的细孔内而绕远流出, 而体积较大的分子则不会进入细孔内, 直接流过, 因此各目标物会按照分子体积从大到小的顺序洗脱出来。因而即使蛋白质不同, 只要溶剂化体积大小相同的分子的洗脱体积相同, 即在同一色谱条件下的保留时间相同。分析血液或细胞培养上清液中的目标蛋白质时, 需在 SEC 分析之前进行蛋白质的纯化。本文介绍了纯化目标蛋白质后, 通过 SEC 分获得组分的分离, 再用液体处理器进行无缝收集馏分的方法。

通过液体处理器实现无缝化

液体处理器 LH-40 是将自动进样器及馏分收集器一体化设计的装置。不需要将之前制备的馏分从馏分收集器转移至自动进样器进行二次作业, 可作为下次的分析样品, 直接重新进样。仅需将图 1、2 的流路组合, 指定方法和馏分。通过 SEC 分离蛋白质, 借助 LH-40 即可收集馏分。本文加入 Prominence™ 惰性 LC 系统, 分析了血浆中的 IgG。

测定样品和测定条件

准备 5 mL 使用流动相 A 稀释至 5 倍的市售正常人体血浆 EDTA-2Na, 装入 15 mL 试管内, 放置在液体处理器的架子上。按照表 1 条件, 使用 IgG 纯化专用色谱柱对其进行亲和纯化, 处理完放置在液体处理器上 (96 孔板)。按照表 2 条件, 对在此条件下的色谱峰顶部分的馏分 (100 μ L) 进行 SEC 分析。

表 1 亲和色谱柱分析条件

色谱柱	: HiTrap™ rProtein A FF (1 mL, Cytiva 公司制造)
流动相 A	: 10 mmol/L (钠) 磷酸盐缓冲液 pH 6.9
流动相 B	: 100 mmol/L (钠) 柠檬酸盐缓冲液 pH 4.0
时间程序 (B. 浓度)	: 0% (0 - 10 min) → 100% (10.01 - 20 min) → 0% (20.01 - 35 min)
流速	: 1.0 mL/min
柱温	: 15 °C
进样量	: 5 mL
检测	: SPD-20A (280 nm)
流通池	: 惰性流通池

表 2 SEC 分析条件

色谱柱	: Shim-Pack™ Bio Diol-300 ^{*1} (300 mm × 4.6 mm I.D., 5 μ m)
保护柱	: Shim-Pack Bio Diol-300 (G) ^{*2} (30 mm × 8.0 mm I.D., 5 μ m)
流动相 A	: 10 mmol/L (钠) 磷酸盐缓冲液 pH 6.9
流速	: 0.5 mL/min
柱温	: 15 °C
进样量	: 100 μ L
检测	: SPD-20A (280 nm)
流通池	: 惰性流通池

*1: P/N 227-31010-04, *2: P/N 227-31010-06

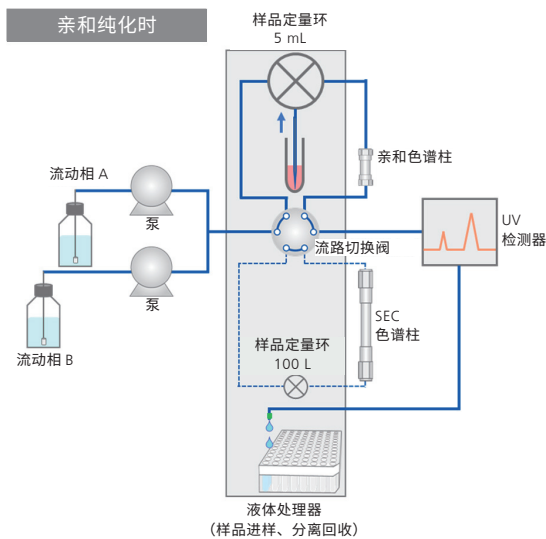


图 1 亲和纯化时的流路图

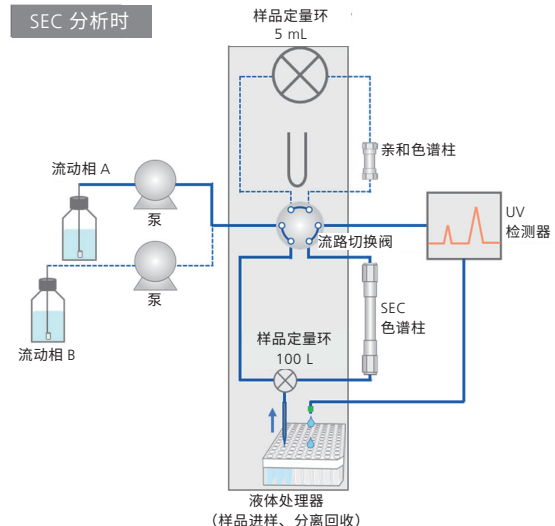


图 2 SEC 分析时的流路图

亲和纯化的结果

通过流动相 A 平衡 IgG 纯化专用色谱柱后，装入 5 mL 稀释后的人体血浆样品，吸附至色谱柱。之后由流动相 A 清洗出非特异性吸附的组分（图 3）。然后由流动相 B 洗脱出 IgG（图 4）。

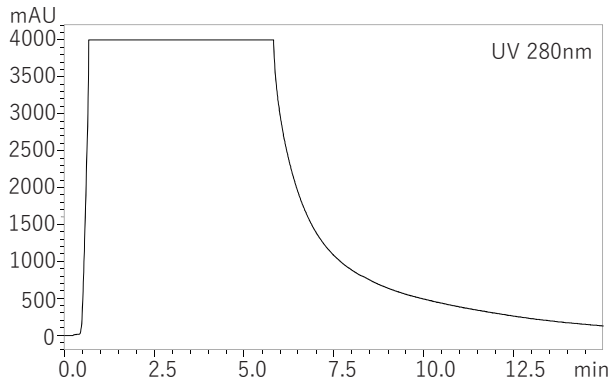


图 3 亲和纯化时的结合色谱图

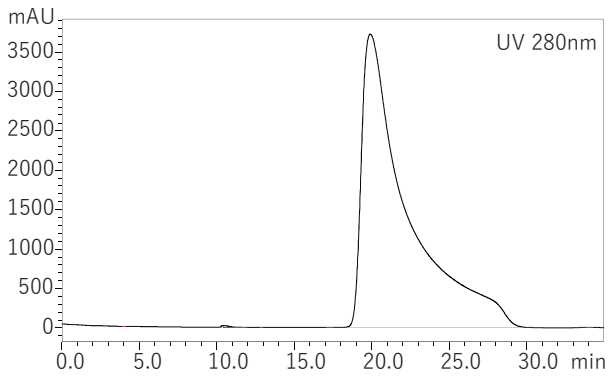


图 4 亲和纯化时的洗脱色谱图

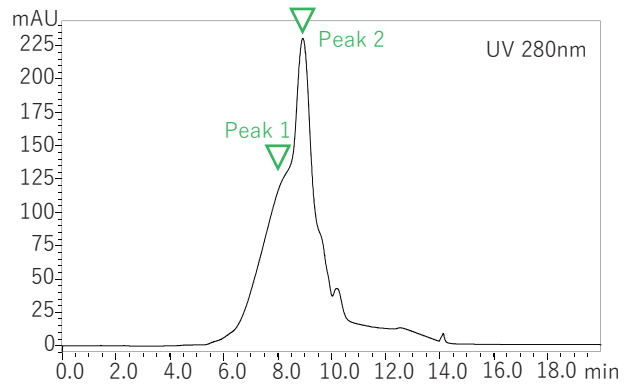


图 5 SEC 分析的色谱图

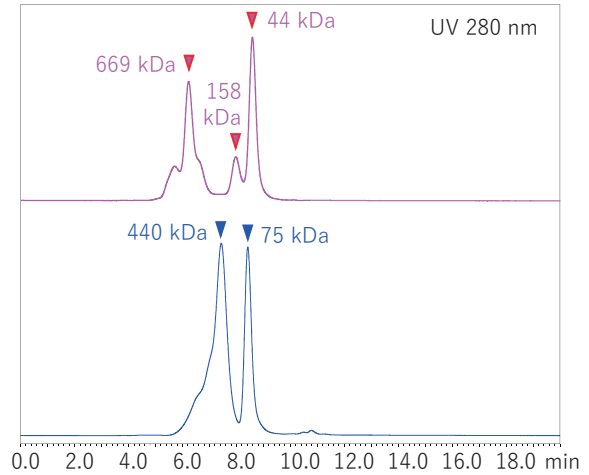


图 6 SEC 分析蛋白质标准品的色谱图

SEC 分析的结果

取在第 1 阶段亲和纯化中溶出的峰顶部分溶液重新进样 100 μ L，进行第 2 阶段的 SEC 分析。SEC 分析中，在主要谱峰（峰 2）之前获得了前伸色谱峰（峰 1，图 5）。根据在 SEC 同一条件分析的标准品甲状腺球蛋白（669 kDa）、醛缩酶（158kDa）、卵白蛋白（44 kDa）的混合液和、铁蛋白（440kDa）与伴白蛋白（75 kDa）混合液，可计算目标蛋白质分子量（图 6）。根据这些蛋白质标准溶液的溶出时间，可知由人体血浆纯化的 IgG 几乎均形成了单量体。

SDS-PAGE 分析结果

亲和纯化及 SEC 分析中，将所有馏分分取至 96 孔板中。针对其在纯化和 SEC 分析的目标色谱峰，将相应孔内的样品用于 SDS-PAGE（非还原/还原）分析。无论是根据亲和纯化所得的谱峰，还是 SEC 分析的峰 1 及峰 2，均在与人体 IgG 标准品相同的位置检测出条带（图 7）。SEC 分析中所得峰 1 和峰 2 均为 IgG，血浆中存在结构类似的 4 个 IgG 馏分，因此根据这些细小的体积或结构差异可推测出其扩大的谱峰。

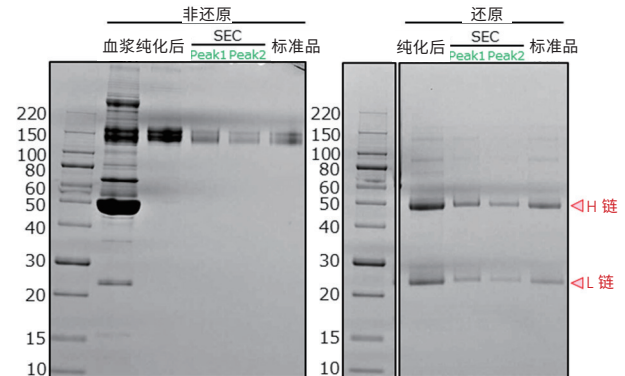


图 7 SDS-PAGE 分析结果

结论

通过在 LC 系统中加入液体处理器，建立了一种仅需放入样品溶液，即可完成纯化、及无缝对已制备馏分进行重新分析的体系。对已确定目标物的常规样品的分析，也可重新分析所需馏分。并且通过追加色谱柱切换阀，增加色谱柱，可进行多阶段纯化。此外，通过使用 96 孔板，还可在 SDS-PAGE 和 ELISA 等后续各种分析中直接使用。

岛津应用云



Prominence 及 Shim-pack 是岛津制作所株式会社在日本和其他国家的商标。HiTrap 是 Cytiva Bioprocess R&D AB Corporation 的商标。



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话：800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2021 年 3 月