

双孔色谱介质的制备和质粒 DNA 快速色谱纯化*

孙国勇 孙 彦**

(天津大学化工学院生物化工系 天津 300072)

摘 要 以甲基丙烯酸缩水甘油酯为单体,二甲基丙烯酸乙二酯为交联剂,环己醇与十二醇为有机致孔剂,200 g/L的碳酸钙悬浮液为内水相(超孔致孔剂),用二次乳化法制备了(W/O)/W乳液,通过紫外光引发悬浮聚合生成两类孔型高分子微球(DEA-B).DEA-B孔径为双峰分布,范围分别为50~200 nm和500~5000 nm.其体积平均粒径、湿密度与不含超孔的微孔介质(DEA-M)接近.在流速为0.5 mL/min(150 cm/h)及相同的洗脱条件下,比较了所制备的微孔色谱介质填充的色谱柱与双孔色谱介质填充的色谱柱对5.4 kb质粒DNA的分离效果.结果表明,仅双孔介质色谱柱可以纯化质粒DNA,并且可以在1500 cm/h的高流速下得到色谱纯的质粒DNA,证明该双孔色谱介质可以用于质粒DNA的高速分离.

关键词 两类孔型介质,双乳化,悬浮聚合,质粒,色谱

蛋白质等生物大分子在其原料液中不仅浓度低而且杂质含量高.所以,生物大分子的纯化过程往往需要多步分离操作,造成分离纯化周期长、产品收率低、生产成本低^[1,2].因此,实现生物大分子的高速度、高选择性分离纯化是生物分离工程研究的根本任务.液相色谱是生物大分子的主要分离纯化方法,而色谱介质是液相色谱的核心技术.液相色谱介质经历了多糖类凝胶(如琼脂糖、葡聚糖和纤维素等)、无机材料(如硅胶)和高分子树脂3个阶段.由于多糖类凝胶机械强度低^[2],硅胶介质耐碱性差^[3]等因素,使得高分子树脂成为色谱介质的发展方向^[4].Afeyan等开发了具有两类孔型结构的色谱介质——流通色谱介质^[1,4].该介质含有两种类型的孔道,分别为孔径在600~800 nm的穿透孔和50~100 nm的扩散孔^[1].穿透孔之间以扩散孔相连,保证了介质的比表面积和吸附容量.流通色谱的最大特点是分离速度快,可在数分钟内完成样品的分离;而常规的高效液相色谱往往需数十分钟到数小时^[1].

随着生物技术的发展,对生物大分子分离介质的要求越来越高,尤其是质粒DNA等核酸分子的分离.因为质粒DNA的分子量一般为数百万至上千万,所以要求分离介质具有很大的孔径,为核酸吸附提供大比表面积,满足其高容量快速分离要求^[5].

本实验室已开发了固液联合致孔技术^[6]和二

次乳化法悬浮聚合技术^[7,8]制备双孔高分子刚性介质.本文进一步改进了前文的二次乳化法悬浮聚合技术,选用碳酸钙悬浮液作为超孔致孔剂,十二醇与环己醇作为有机致孔剂,使乳化体系更加稳定.报道了介质的制备方法、介质的表征及其在质粒DNA快速色谱分离中的应用.

1 实验部分

1.1 材料与仪器

甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA),纯度大于99%,苏州安利化工有限公司;甲基丙烯酸乙二酯(EDMA)、溴酚蓝、Triton X-114购自美国Sigma-Aldrich公司;安息香乙醚(BEE),北京医药公司;纳米级碳酸钙,纳米级,广东恩平化工有限公司;十二醇、环己醇、二乙胺(DEA)和二氧六环购自天大科威化工有限公司;硼氢化钠,分析纯,北京市东环联合化工厂;聚乙烯醇(PVA),聚合度1788,北京有机化工厂;Span 80,分析纯,天津凯通试剂公司;氨苄青霉素,医药级,山东齐鲁制药厂;DNA Marker、琼脂糖购自天津鼎国生物技术的发展中心;胰蛋白胨与酵母浸出粉,纯度大于99%,Oxoid公司(UK);十二烷基硫酸钠,分析纯,天津石英表厂坝县分厂;pcDNA3质粒(5.4 kb, b表示碱基对)的*E. coli* DH5 α 菌株为中国医学科学院血液学研究所惠赠.

在介质的制备、表征和色谱研究过程中,所用

* 2005-07-26 收稿,2005-10-10 修稿;国家自然科学基金(基金号 20276051)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: ysun@tju.edu.cn

主要仪器包括,TS-5130SB 型扫描电子显微镜(捷克 Tescan 公司);Mastersizer 2000 粒度分析仪(英国 Malvern 公司);ÅKTA explorer 100 (瑞典 Pharmacia 公司);紫外分光光度计(美国 Perkin-Elmer 公司);色谱柱 TSK-GEL G-DNA-PW(7.8×300)和 G6000 PWXL($13 \mu 7.8 \times 300$)(日本 TOSOH 公司);色谱工作站 Agilent 1100(美国 Agilent 公司)。

1.2 微球的制备

利用 Triton X-114 配制 2% 的乳化剂溶液,再将碳酸钙粉末加入到乳化液中,利用震荡与超声相结合的方法使碳酸钙均匀分散于乳化液中,再离心回收碳酸钙,用去离子水反复清洗除去乳化剂,得到碳酸钙的水悬浮液。

两类孔型的高分子微球通过悬浮光聚合制备。首先,将有机致孔剂(2 mL 环己醇和 1.5 mL 十二醇)、光敏引发剂 BEE(0.08 g)、反应单体(GMA 4.5 mL、EDMA 3 mL)、乳化剂 Span 80(0.45 g)混合均匀并在超声水浴内脱气 20 min;接着将有机相与 8 mL 20% 的碳酸钙悬浮液都转入一个反应器中。在 8000 r/min 转速下搅拌 5 min(乳化 I)后,迅速将形成的 W/O 乳化液转移到一个装有 120 mL 2% PVA 溶液中,再以 1600 r/min 的转速搅拌 1 min(乳化 II)。最后将得到的 W/O/W 乳化液转移到一个带有电磁搅拌的反应器中,搅拌器转速为 300 r/min。在紫外灯(1 kW)下进行光引发悬浮聚合 20 min。待反应结束后,收集反应制得的微球,并以热水(60~70℃)彻底洗涤后,在真空下干燥。

在微孔介质的制备过程中,将 GMA、EDMA、环己醇/十二醇、BEE 混匀(各成分比例与制备双孔介质时相同),超声脱气后直接加到 120 mL 2% PVA 溶液进行乳化和之后的光敏引发聚合。

1.3 致孔剂的去除

将洗涤并干燥的聚合物微球装入 400 目聚四氟乙烯纱袋中,置于 500 mL 的 Soxhlet 提取器中用无水乙醇回流 24 h,除去微球中的有机致孔剂与乳化剂。抽提后的微球在室温下干燥,然后再用蒸馏水清洗,真空干燥备用。

为除去双孔介质中的碳酸钙,将干燥的双孔微球悬浮在 pH 3.0 的 Glycine-HCl 缓冲溶液中,于 140 r/min 的摇床中保持其 pH 不变振荡 3 h(当其 pH 变大时向其中滴加稀盐酸以保持溶液体系的 pH 不变),至无气泡为止。微球用去离子水洗涤至中性,再用去离子水和无水乙醇反复冲洗后,于

50℃ 下干燥备用。

1.4 表面修饰与表征

用二乙胺对介质进行表面修饰并测定其修饰密度^[7],修饰后的离子交换型双孔介质与微孔介质分别命名为 DEA-B 和 DEA-M。用 SEM 观察其微观结构,用粒度分析仪测定其粒径分布,用压汞法测定其孔径分布。

1.5 色谱实验

分别将两种介质使用乙醇匀浆法灌入 HR 5/5(50×5 mm I.D., 1.96 mL)的色谱柱,得到双孔色谱柱和微孔色谱柱。将两种色谱柱分别连接到 ÅKTA Explorer 100,用 Buffer A(0.01 mol/L Tris-HCl, pH 7.6)缓冲溶液作为流动相,测定流速和背压的关系。

含有质粒 pcDNA3(5.4 kb)的 *E. coli* DH5 α 菌株经活化后使用摇瓶进行培养,然后对收集的大肠杆菌细胞使用碱裂解法制备得到碱性裂解液^[9]。在质粒的离子交换色谱分离过程中,用 Buffer A 冲洗到色谱柱背压稳定,紫外检测基线平稳,然后开始上样分离。上样后使用 Buffer A 冲洗至基线接近归零后开始使用 Buffer B(0.01 mol/L Tris-HCl, 1 mol/L NaCl, pH 7.6)冲洗,收集色谱峰并进行分析。

1.6 分析检测

质粒的纯度使用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳和 HPLC 检测。HPLC 为串联 TSK-GEL G-DNA-PW(7.8×300)和 G6000 PWXL($13 \mu 7.8 \times 300$)的尺寸排阻色谱,联接到 Agilent 1100 HPLC 系统,流动相为 0.01 mol/L Tris-HCl 0.3 mol/L NaCl (pH 7.0),流速为 0.4 mL/min,上样量为 20 μ L。

2 结果与讨论

2.1 微球的物理性质

利用 SEM 对制备的介质进行观察,得到的 SEM 图片示于图 1。可以看出,仅使用十二醇与环己醇为致孔剂制备的介质仅含微孔(图 1a),而利用碳酸钙悬浮液通过双乳化制备的介质除微孔外含有大量的超孔,超孔孔径达到数微米,并且超大孔与微孔是交错贯通的。使用压汞计法测定两类介质的孔径,可以得到孔径分布图(图 2)。DEA-M 的孔径主要分布在 50~200 nm。与 DEA-M 不同,DEA-B 的孔径分布呈双峰分布,微孔区的孔径为 50~200 nm,而超孔区的孔径为 500~5000 nm,峰值出现在 800 nm。因此,压汞法的结果进一步证

明了 DEA-B 的双孔结构,与扫描电镜的结果一致.同时,实验结果进一步表明,有机溶剂致孔主

要形成了 DEA-B 中的微孔区,而碳酸钙悬浮液致孔主要形成了超孔区.

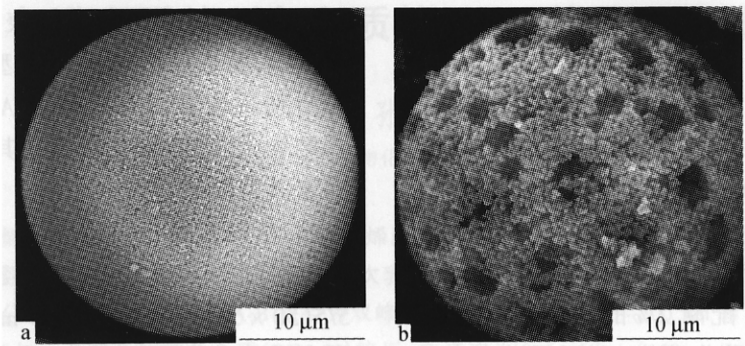


Fig. 1 Scanning electron micrographs of (a) DEA-M and (b) DEA-B

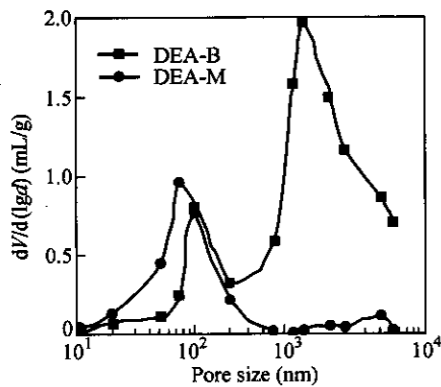


Fig. 2 Pore size distributions of the two types of beads

两类介质的其它性质见表 1.两类介质的粒径与湿密度都非常相近,只是微孔介质的离子交换容量比双孔介质的要大一些.

Table 1 Physical properties of the two beads

Bead	Particle size (μm)	Ion exchange capacity [*] (mmol/g)	Wet density (g/mL)
DEA-B	46.3	0.11	1.08
DEA-M	45.2	0.19	1.10

^{*} The particle amount(g or mL) was based on the wet resin.

2.2 流速与背压的关系

分别用两种介质填充的色谱柱的流速与背压的关系见图 3.可以看出,在流速 1800 cm/h 以下,背压与流速的关系基本上是成线性关系的,说明介质的机械强度较高;另外,尽管两种介质的粒径接近(表 1),但双孔介质柱的背压较低,说明双孔介质中的超孔为流动相的流动提供了额外的通道,减小了流动阻力,背压较低.因此,双孔介质更适合于在较高流速下操作.

2.3 质粒的分离

分别将两种色谱柱连接到 ÄKTA Explorer 100

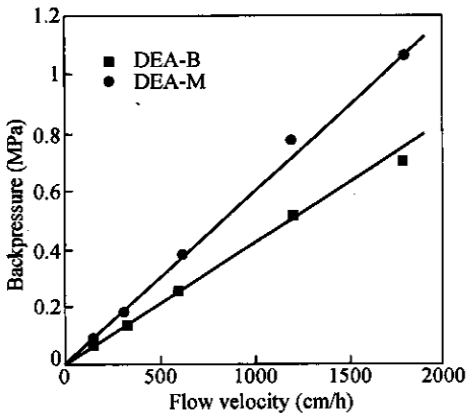


Fig. 3 Effect of mobile phase velocity on backpressure

色谱仪上,先用 Buffer A 在 150 cm/h 流速下平衡系统,待背压稳定、基线平稳后用 Buffer B 冲洗柱子,洗去装柱前介质上吸附的杂质,然后用 Buffer A 冲洗到紫外吸收和电导值基线平稳,开始上样分离,进样量为 100 μL .洗脱是用从 Buffer A 到 Buffer B 的梯度洗脱.图 4 和图 5 分别为微孔色谱柱和双孔色谱柱的分离结果.

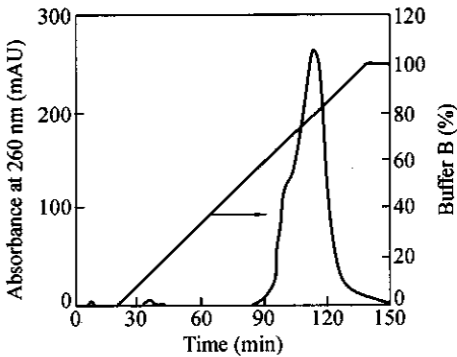


Fig. 4 Chromatogram for the plasmid purification by DEA-M column

从图 4 可以看出,微孔色谱柱基本未产生分离效果.而从图 5 可以看出,使用双孔介质色谱柱

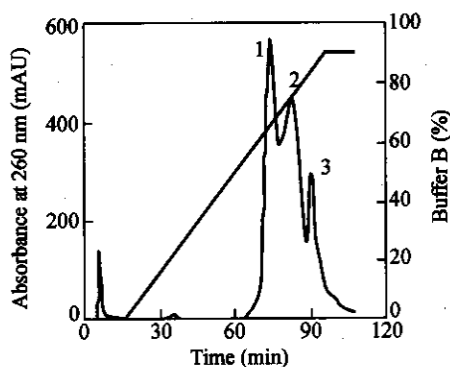


Fig. 5 Chromatogram for the plasmid purification by DEA-B column

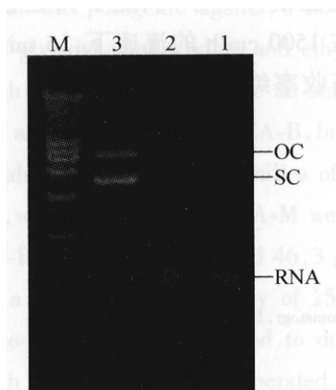


Fig. 6 Agarose gel electrophoresis for plasmid DNA purification by DEA-B column (Fig. 5)

Lane 1: peak 1; Lane 2: peak 2; Lane 3: peak 3; Lane M: DNA marker; OC: open circular plasmid; SC: supercoiled plasmid

得到 3 个色谱峰(1, 2, 3),与文献报道^[10,11]一致,其中第一和第二个峰分别为低分子量 RNA 和高分子量 RNA,第三个峰为质粒 DNA(图 6).另外,从图 6 可知,碱性裂解液经双孔介质色谱柱分离后,可以得到接近电泳纯的质粒 DNA.该分离结果证明了双孔介质色谱柱的高分辨率特性.

上述仅为分离条件的初步摸索,但从色谱图上可以明显看出双孔介质比微孔介质的分离效率要好得多.由于质粒的分子量大(pcDNA3 约为 3.5×10^6),只能进入孔径大于 200 nm 大孔^[5],而该双孔介质中含有孔径范围为 500 ~ 5000 nm 的超大孔,这些孔的存在大大提高了介质对质粒的

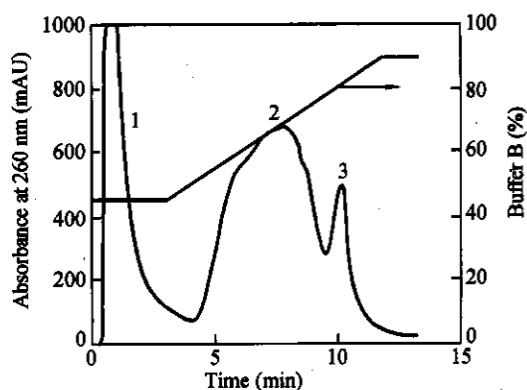


Fig. 7 Chromatogram for plasmid DNA purification at 1500 cm/h
2 mL of crude plasmid was loaded.

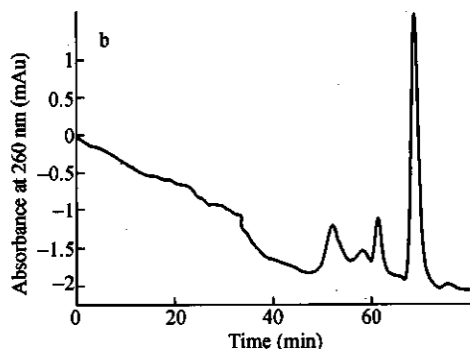
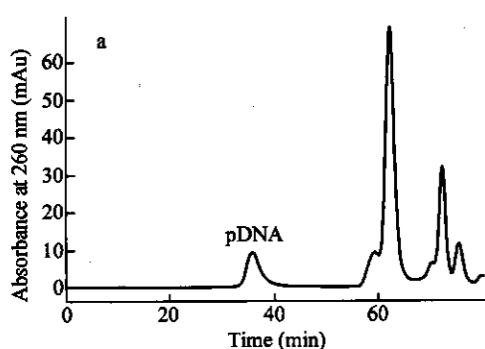


Fig. 8 HPLC analysis of the peaks in Fig. 7

a) Sample; b) Peak 1; c) Peak 2; d) Peak 3

吸附容量,所以双孔介质要比微孔介质的分离效率高。

因此,在下面实验中,进一步考察了在加大进样量并提高色谱流速情况下双孔介质色谱柱对裂解液中质粒的分离纯化效果。图 7 为进样量 2 mL、流速为 1500 cm/h 时的色谱图,其它实验条件见图例。因为质粒 DNA 的吸附作用比 RNA 和蛋白质都强,在 0.45 mol/L 的 NaCl 中也能被很好吸附,故色谱柱先用含 0.45 mol/L NaCl (即 45% buffer B) 的流动相平衡。从图 8 的 HPLC 分析结果可知,在图 7 所示的色谱分离过程中,小分子 RNA 首先被 45% 的 buffer B 洗脱下来 (peak 1, 图 8b)^[10],之后为高分子量的 RNA (peak 2, 图 8c) 和

质粒 (peak 3, 图 8c)。原料液中质粒 DNA 含量较低 (图 8a),经一步色谱纯化,得到高纯度质粒 (图 8d)。由于在其他色谱峰中未发现质粒 (见图 8b 和 c),说明利用该双孔介质色谱柱实现了质粒的高速度、高收率纯化,分离时间小于 15 min。

综上所述,利用碳酸钙悬浮液为内水相的二次乳化法,研备了一种新型双孔色谱介质。介质经配基修饰后制成弱阴离子交换介质,用于质粒 DNA 的高速分离纯化。结果表明,谱过程中双孔介质内可发生流动相对流,故色谱柱背压低,质粒 DNA 分离的色谱分辨率高,适合高速色谱分离操作。例如,在 1500 cm/h 的流速下,15 min 内就可完成质粒的高收率纯化。

REFERENCES

- 1 Afeyan N B, Regnier F E; Dean R C. US patent, B01D 015/08, 5, 019, 270. 1991-05-28
- 2 Weaver Jr L E, Carta G. *Biotechnol Progr*, 1996, 12 (3): 342 ~ 355
- 3 Afeyan N B; Gordon N F, Mazasroff L, Varady L, Fulton S P, Yang Y B, Regnier F E. *J Chromatogr*, 1990, 519 (1): 1 ~ 27
- 4 Garcia M C, Marina M L, Torre M. *J Chromatogr A*, 2000, 880(1-2): 169 ~ 187
- 5 Stadle J, Lemmens R, Nyhammar T. *J Gene Med*, 2004, 6: S54 ~ S66
- 6 Wu Lei (吴蕾), Gan Yiru (甘一如), Sun Yan (孙彦). *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2003, (5): 661 ~ 666
- 7 Sun G Y, Shi Q H, Sun Y. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1061: 159 ~ 165
- 8 Sun Guoyong (孙国勇), Shi Qinghong (史清洪), Sun Yan (孙彦). *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2006, 24(2): 279 ~ 283
- 9 Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 32 ~ 35
- 10 Branovic K, Forcic D, Ivancic J, Strancar A. *J Chromatogr B*, 2004, 801(2): 331 ~ 337
- 11 Gustavason P E, Lemmens R, Nyhammar T, Busson P, Larsson P O. *J Chromatogr A*, 2004, 1038(1-2): 131 ~ 140

PREPARATION OF A BIPOROUS POLYMERIC ADSORBENT FOR RAPID CHROMATOGRAPHIC PURIFICATION OF PLASMID DNA

SUN Guoyong, SUN Yan

(*Department of Biochemical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072*)

Abstract Preparation of a biporous polymeric stationary phase for high-speed flowthrough chromatography was reported. Using calcium carbonate suspension (200 g/L) and organic solvent (mixture of cyclohexanol and dodecanol) as the porogenic agents, a novel biporous matrix has been prepared by ultraviolet photo-polymerizing monomers of glycidyl methacrylate and ethylene glycol dimethacrylate by (W/O)/W emulsification. The matrix was modified with diethylamine to create an anion exchanger (DEA-B). It was found that there was two families of pores (micropores and superpores) in DEA-B, but there was only micropores in the microporous beads (DEA-M) prepared by O/W emulsification. The two families of pores in DEA-B were in the range of 50 ~ 200 nm and 500 ~ 5000 nm, respectively, while the pores of DEA-M were mainly in the range of 50 ~ 200 nm. The hydrated density and particle size of DEA-B were 1.08 g/mL and 46.3 μm , respectively, similar to those of DEA-M (1.10 g/mL and 45.2 μm). Operated at a mobile phase velocity of 150 cm/h, the DEA-B column could be used to purify a 5.4 kb plasmid DNA, but the DEA-M column failed to do that at the same condition. Then, HPLC pure plasmid DNA was obtained with the DEA-B column operated at 1500 cm/h. The results indicated that DEA-B column was promising for high-speed chromatography purification of plasmid DNA.

Key words Biporous matrix, (W/O)/W emulsification, Suspension polymerization, Plasmid DNA, Chromatography