

羧基磁珠吸附乙型肝炎病毒表面抗原的性能研究*

林梅双, 吴晓蔓[△](广州医科大学附属第二医院, 广州 510260)

【摘要】 目的 研究羧基磁珠吸附乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)的性能,为磁珠在蛋白质分离纯化中的应用打下基础。方法 检测羧基磁珠吸附 HBsAg 前后的蛋白量,判断磁珠用量、HBsAg 浓度、吸附温度、吸附时间对磁珠吸附 HBsAg 的影响。使用 10 mmol/L NaOH 洗脱 HBsAg,测定洗脱后 HBsAg 的洗脱率和生物活性保留率。结果 羧基磁珠吸附 HBsAg 的性能与磁珠用量、HBsAg 浓度、吸附温度和吸附时间有密切关系。磁珠吸附浓度为 524.24 μg/mL 的血源性 HBsAg 纯品后,10 mmol/L NaOH 溶液洗脱 HBsAg 的洗脱率是 71.02%,活性保留率为 88.15%。结论 带有羧基的磁珠可以吸附 HBsAg,有望用于 HBsAg 的分离回收,为磁珠在蛋白质分离纯化中的应用打下基础。

【关键词】 磁珠; 乙型肝炎病毒表面抗原; 吸附

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.22.019 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)22-2978-02

Research of carboxyl magnetic beads adsorption performance of HBsAg* LIN Mei-shuang, WU Xiao-man[△] (The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510260, China)

【Abstract】 Objective To lay the foundation for the application of magnetic beads in protein purification by researching carboxyl magnetic beads adsorption performance of HBsAg. Methods The amount of magnetic beads, HBsAg concentration, adsorption temperature and the influence of adsorption time by detecting the protein amount before and after adsorption were detected. Results Adsorption HBsAg capacity of magnetic beads was affected by amount of magnetic beads, HBsAg concentration, adsorption temperature and adsorption time. After magnetic beads adsorption of HBsAg whose concentration was 524.24 μg/mL, the adsorbed HBsAg could be eluted by 10 mmol/L NaOH, the elution rate was 71.02%, and the retained biological activity was 88.15%. Conclusion Magnetic beads with carboxyl can adsorption HBsAg, which is expected to be used for the separation and recovery of HBsAg. It has lay the foundation for the application of magnetic beads in protein purification

【Key words】 magnetic beads; HBsAg; adsorption

磁珠被广泛应用于蛋白质的分离提纯、细胞分离、酶的固定、免疫分析等多个领域^[1-4]。以磁珠为固相介质对蛋白质进行提纯是一项新兴的蛋白质分离技术,与传统分离方法比较,蛋白质的磁分离技术具有快速、高纯、高收率等优点^[5]。羧基磁珠是表面带有羧基功能团的磁珠,其吸附蛋白是基于磁珠表面的阴离子交换基团-COOH 与表面带正电的蛋白之间的作用^[6]。乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)分子量大,其结构变化对活性影响较大,结构和活性表征相对容易研究且手段多^[7],所以本文选择 HBsAg 作模型蛋白质。研究使用市场上广泛生产的表面带有羧基的聚合物磁珠吸附 HBsAg 的性能,为磁珠在蛋白质分离纯化中的应用打下基础。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 血源性 HBsAg 纯品由上海叶民生物技术有限公司提供。

1.2 仪器与试剂 羧基磁珠与磁分离架分别由上海奥润微纳新材料科技有限公司和无锡中德伯尔生物技术有限公司提供,HBsAg 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒和 BCA 蛋白质定量试剂由沈阳惠明生物工程有限公司和天根生化科技有限公司提供,瑞士 TECAN 酶标仪 Infinite M200,以上试剂均在有效期内使用,严格按说明书操作。

1.3 方 法

1.3.1 影响磁珠吸附 HBsAg 的因素 取 1 mL 血源性 HBsAg 纯品,加入 200 μL 5 mg/mL 的磁珠和 18 μL 1 mmol/L 氯

化锌,混匀后,在 37 ℃温箱中放置 5 min,通过磁场分离磁珠,吸出液体为吸附后溶液。改变磁珠用量、HBsAg 原始浓度、吸附温度、吸附时间。BCA 法测定吸附前、吸附后 HBsAg 的蛋白含量,计算吸附量。判断影响磁珠吸附 HBsAg 的因素。

1.3.2 HBsAg 的洗脱 取某一浓度的血源性 HBsAg 纯品,按上述方法进行磁珠吸附后,用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS),pH 5.0 3 次清洗磁珠,加入 250 μL 10 mmol/L 的 NaOH 溶液,洗脱 1 min 后,通过磁场分离磁珠,吸出液体为洗脱液。BCA 法测定吸附前、吸附后和洗脱液的 HBsAg 蛋白含量,计算洗脱率。将洗脱液稀释 10 万倍后,ELISA 测定洗脱液的稀释液和不同浓度(2、5、10、15、20、25、30 ng/mL) HBsAg 标准品溶液 HBsAg 的吸光度(A)。通过标准品浓度-A 值标准曲线,计算洗脱液 HBsAg 的生物活性浓度占 BCA 法检测的洗脱液 HBsAg 浓度的百分比,即为洗脱液中 HBsAg 的生物活性保留率。

1.3.3 判断吸附量与洗脱率 按以下公式计算:

$$Q = (C_0 V_0 - C_1 V_1) / m$$

$$\text{洗脱率}(\%) = C_2 V_2 / (C_0 V_0 - C_1 V_1) \times 100\%$$

式中:Q 为吸附量(μg/mg);m 为磁珠的质量(mg);C₀、C₁、C₂ 分别为吸附前、吸附后和洗脱液的 HBsAg 浓度(μg/mL);V₀、V₁、V₂ 分别为吸附前、吸附后和洗脱液的体积(mL)。

2 结 果

2.1 磁珠用量 随着磁珠用量的增加,吸附的总蛋白逐渐增

多,但单位磁珠的吸附量却减少。见图 1、2。

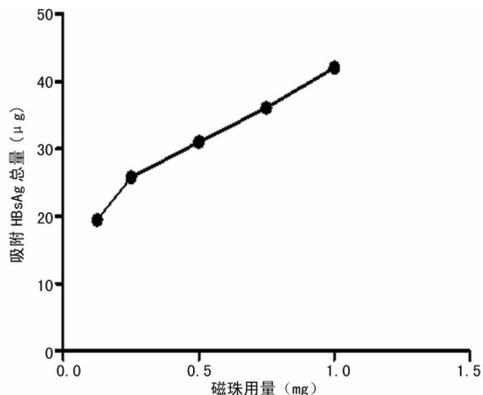


图 1 磁珠用量对吸附 HBsAg 总量的影响

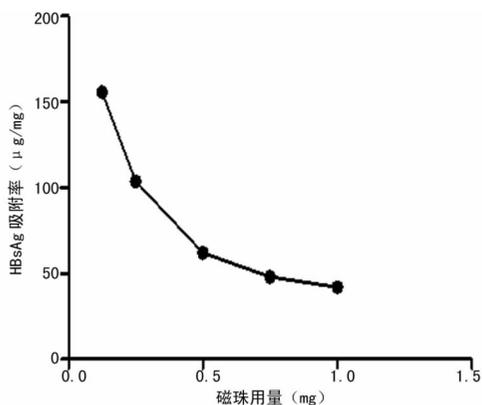


图 2 磁珠用量对 HBsAg 吸附率的影响

2.2 HBsAg 浓度 磁珠吸附 HBsAg 的量随 HBsAg 初始浓度的增加而增多,在较低浓度范围(小于 200 μg/mL)时,吸附量随 HBsAg 浓度的增加而增多趋势比较明显;而在较高的浓度范围(大于 200 μg/mL),趋势变缓。见图 3。

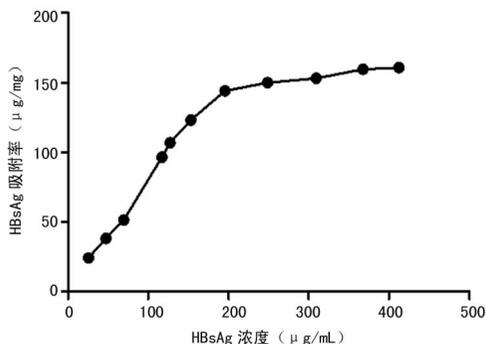


图 3 HBsAg 浓度对 HBsAg 吸附率的影响

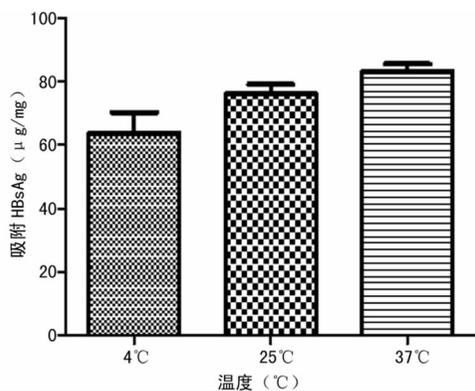


图 4 温度对吸附 HBsAg 的影响

2.3 温度 随着温度增高,磁珠吸附 HBsAg 的能力也增强。见图 4。

2.4 吸附时间 磁珠吸附在 5 min 时达到峰值,但随着时间延长能力有所降低,大约在 30 min 时进入平台期。见图 5。

2.5 HBsAg 的洗脱 磁珠吸附浓度为 524.24 μg/mL 的血源性 HBsAg 纯品后,使用 10 mmol/L NaOH 溶液洗脱 HBsAg,洗脱率是 71.02%,活性保留率为 88.15%。

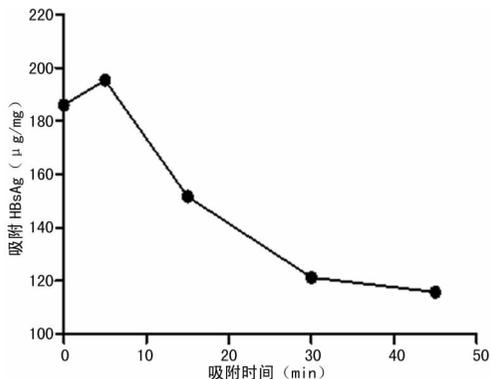


图 5 吸附时间对吸附 HBsAg 的影响

3 讨 论

相对传统分离方法,蛋白质的磁分离技术有更多的优势。而表面带有-COOH 功能基团在蛋白质分离提纯中比较常用。

本研究通过磁珠用量、HBsAg 浓度、温度、吸附时间各方面来探讨市场上广泛生产的带有羧基的聚合物磁珠吸附 HBsAg 的性能。结果显示:(1)随着磁珠用量的增加,吸附 HBsAg 的总蛋白量逐渐增多,但单位磁珠的吸附量却减少。磁珠用量的增加使有限空间内磁珠的总表面积增大,从而促进了吸附反应进行,但同时也大大降低了单个磁珠与 HBsAg 碰撞的机会,导致单个磁珠吸附 HBsAg 的量降低。(2)磁珠吸附 HBsAg 的量随 HBsAg 初始浓度的增加而增多,在较低浓度范围时,吸附量随 HBsAg 浓度的增加而增多趋势比较明显;而在较高的浓度范围,吸附量随 HBsAg 初始浓度的增加而增多的趋势变缓。随着 HBsAg 浓度的增加,磁珠表面所吸附的 HBsAg 分子也逐渐增加,直至达到饱和状态,此时虽然再增加 HBsAg 的初始浓度,但受磁珠表面积的限制,HBsAg 的吸附量也不会发生太大的变化。(3)随着温度增高,磁珠吸附 HBsAg 的能力也增强。可能是温度会影响 HBsAg 分子的布朗运动,导致 HBsAg 与磁珠碰撞吸附行为的变化,低温(4 °C)时,HBsAg 吸附率略低,随温度升高,HBsAg 吸附率逐渐增大。也可能是在 pH 接近中性的溶液中,磁珠吸附 HBsAg 的主要驱动力是疏水作用,通常情况下,在一定温度范围内疏水作用力会随温度升高而增强,导致磁珠吸附 HBsAg 增强。(4)磁珠吸附在 5 min 时达到峰值,但随着时间延长能力有所降低,大约在 30 min 时进入平台期。可见磁珠在较短时间内吸附 HBsAg 达到饱和,但是随着时间延长又慢慢解离,直到进入平衡状态。以上实验结果表明羧基磁珠能够吸附 HBsAg,但不稳定,易受磁珠用量、HBsAg 浓度、温度、吸附时间等多因素影响,在实验过程中要严格控制实验条件。

使用 10 mmol/L NaOH 溶液洗脱 HBsAg 的洗脱率是 71.02%,活性保留率为 88.15%。在一定 pH 条件下,羧基磁珠带负电会与带正电的基团在二价离子的作用下,发生共价结合,改变 pH 值会使结合上去的物质释放下来,因此被吸附在磁珠上的 HBsAg 可以通过 NaOH 溶液洗脱下来。实验证实磁珠吸附上的 HBsAg 不但可以洗脱下来,而(下转第 2981 页)

表 1 两组患者治疗前后空腹血糖、总胆固醇以及三酰甘油变化情况比较 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	n	空腹血糖		总胆固醇		三酰甘油	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	45	8.5 ± 1.1	8.4 ± 1.0	5.1 ± 1.1	5.0 ± 1.2	1.3 ± 0.7	1.3 ± 0.6
治疗组	45	8.4 ± 1.2	7.0 ± 0.8*	5.0 ± 1.2	4.7 ± 0.9*	1.3 ± 0.6	1.1 ± 0.5*

注:与对照组治疗后比较, * P < 0.05。

2.2 观察组和治疗组患者疗效比较, 见表 2。

表 2 两组患者疗效比较 [n(%)]

组别	n	理想	良好	差	总有效率
对照组	45	18(40.0)	10(22.2)	17(37.8)	28(62.2)
治疗组	45	32(71.1)	8(17.8)	5(11.1)	40(88.9)*

注:与对照组比较, * P < 0.05。

2.3 观察组和治疗组治疗不良反应情况比较 两组患者的不良反应主要包括:胃肠道反应、踝部水肿、头痛和颜面潮红等。其中对照组的不良反应例数为 7 例, 占 15.6%, 治疗组不良反应例数为 8 例, 占 17.8%。两组患者的不良反应发生率比较差异无统计学意义 (P > 0.05)。

3 讨论

随着人们生活水平的提高, 高血压和糖尿病的发病率均迅速增长, 而糖尿病、高血压已成为导致终末期肾衰的主因。目前, 市场上降血压药物种类很多, 降压效果也不错, 但是许多降压药不利于糖尿病的治疗。替米沙坦是一种新型的特性的血管紧张素 II 受体拮抗剂。替米沙坦与 AT I 受体亚型有很高的亲和性, 而阻断血管紧张素 II 作用位点, 从而降低醛固酮水平, 抑制 AT II 引起的血压升高^[7]。相关研究也表明, 替米沙坦在口服 3 个月后, 可降低糖尿病合并高血压患者的空腹血糖、胰岛素抵抗指数、糖化血红蛋白^[8]。

综上所述, 替米沙坦治疗糖尿病合并高血压可以明显改善患者的空腹血糖、总胆固醇以及三酰甘油指标, 改善患者临床症状, 治疗效果显著, 不良反应少, 值得临床上推广应用。

参考文献

[1] 余正堂, 雷明山, 刘青云, 等. 替米沙坦对老年高血压病合

并 2 型糖尿病患者代谢因素的影响[J]. 中国医药导报, 2007, 4(36): 25-26.

[2] 陈远刚, 陈明. 替米沙坦对高血压合并糖尿病患者血清脂联素的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(6): 492-494.

[3] Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, et al. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPAR gamma-modulating activity[J]. Hypertension, 2004, 43(5): 993-1002.

[4] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 10.

[5] 王立军, 马虹, 廖新学, 等. 替米沙坦上调人血管内皮细胞血管紧张素转换酶 2 的表达[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(4): 213.

[6] 王国刚. 替米沙坦/氢氯噻嗪复方片治疗轻中度原发性高血压的疗效观察[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(11): 1877-1878.

[7] 张志伟, 张荣奎. 替米沙坦对伴有糖尿病及高血压的冠心病患者治疗前后血浆炎症因子的变化及心功能的影响[J]. 广东医学, 2008, 29(12): 2098-2100.

[8] Ganosoglu E, Ruwende C, Chopra V, et al. Adiponectin is an independent predictor of all cause mortality and myocardial infarction in patient presenting with chest pain[J]. Eur Heart J, 2006, 27(19): 2300-2309.

(收稿日期: 2013-03-29 修回日期: 2013-05-18)

(上接第 2979 页)

且洗脱下来的 HBsAg 仍具有较好的抗原活性。在实验中发现, 如果没有加入二价离子磁珠是无法吸附蛋白质的。至于为何要加入二价离子, 有学者认为磁珠与二价金属溶液充分接触后, 形成表面整合二价离子的磁性金属亲和载体, 可选择性吸附含组氨酸残基的蛋白质^[8]。本次研究运用市场上广泛生产的带有羧基的磁珠吸附血源性纯 HBsAg, 探讨磁珠吸附 HBsAg 的性能, 确定磁珠吸附蛋白质的机制, 为磁珠吸附其他蛋白质奠定基础。

参考文献

[1] Liu Z, Li M, Yang X, et al. The use of multifunctional magnetic mesoporous core/shell heterostructures in a biomolecule separation system[J]. Biomaterials, 2011, 32(21): 4683-4690.

[2] Dong X, Zheng Y, Huang Y, et al. Synthesis and characterization of multifunctional poly(glycidyl methacrylate) microspheres and their use in cell separation[J]. Anal Biochem, 2010, 405(2): 207-212.

[3] Cui Y, Li Y, Yang Y, et al. Facile synthesis of amino-si-

lane modified superparamagnetic Fe3O4 nanoparticles and application for lipase immobilization[J]. J Biotechnol, 2010, 150(1): 171-174.

[4] Wang J, Wang Q, Ren L, et al. Carboxylated magnetic microbead-assisted fluoroimmunoassay for early biomarkers of acute myocardial infarction[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2009, 72(1): 112-120.

[5] 程艳玲, 李若慧, 马榴强. 医药用磁性聚合物微球的研究进展[J]. 北京联合大学学报: 自然科学版, 2007, 21(1): 62-68.

[6] 盖青青, 屈锋, 梅芳, 等. 磁性粒子在蛋白质分离纯化中的应用[J]. 化学通报, 2010, 73(2): 99-105.

[7] 李娜, 王连艳, 吴有斌, 等. 乙肝表面抗原在微球表面的吸附行为、活性和结构变化[J]. 过程工程学报, 2010, 10(3): 559-567.

[8] 石若冰, 张志超, 陈磊, 等. 基于磁性微球的固定化金属亲和载体及其在蛋白质/多肽纯化中的应用[J]. 分析化学, 2007, 35(5): 628-632.

(收稿日期: 2013-05-19 修回日期: 2013-07-05)