

染料亲和膜的制备及其吸附白蛋白的性能研究

姜海容

(厦门大学化学化工学院化学实验教学中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 以尼龙 66 膜为基膜, 采用甲醛活化法偶联壳聚糖制备尼龙-壳聚糖复合膜, 再固载染料 Cibacron Blue F3 GA 作为配位基, 制备亲和膜。膜上壳聚糖和 Cibacron Blue F3 GA 的含量分别为 112.4 和 123.3 mg/g 尼龙膜。通过静态和动态实验测定了牛血清白蛋白在膜上的吸附性能, 结果表明: 牛血清白蛋白在膜上的吸附平衡符合 Langmuir 方程; 在蛋白溶液的 pH 值为 4.7 和较低的离子强度下对牛血清白蛋白具有较高的吸附量; 在动态操作条件下容易达到吸附平衡。

关键词: 亲和膜; 壳聚糖; 白蛋白; 吸附

中图分类号: Q 647.31; TQ 424.3

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008)01-0071-04

随着生物工程和生命科学的发展, 对蛋白、多糖、多肽、酶、核苷酸等生物大分子纯化分离提出了越来越高的要求。尽管采用传统的分离方法, 如沉淀、结晶、层析等可使产品纯度获得提高, 但在很多情况下, 存在着工艺繁琐、活性回收率低、纯化效果不理想等问题。近年来发展起来的亲和色谱技术部分解决了这些问题, 它是根据生物大分子与特定的固载化配位基之间的亲和力和, 即特异性的可逆结合和解离而使生物大分子得到分离。传统亲和色谱采用多孔粒状填料, 如琼脂糖、葡聚糖凝胶等, 该类填料特异性好, 纯化倍数高, 但分离速度受粒间扩散和低的轴向速率限制, 压降大, 分离时间长, 处理量小, 不能使用高的加料速度^[1-2]。

亲和膜技术是将膜分离与亲和分离结合起来, 使之兼具两者的特点。当料液在一定压力下以对流方式通过膜孔时, 溶液中的目标物能很快地扩散到配位基上, 进而产生特异性相互作用, 将它们保留在膜上, 然后再通过洗脱液将被保留在膜上的目标物从膜上解离下来, 从而达到与其它物质分离的目的。与传统的膜分离、亲和色谱相比, 亲和膜分离不仅具有纯化倍数高、压降小、分离时间短、生物大分子在分离中变性的几率小, 允许较快地加料速度等特点, 而且比柱亲和色谱更易实现规模化纯化分离^[3-4]。

在蛋白质的分离纯化中, 亲和膜的分离效果与配位基的选择和膜材料的性质密切相关。活性染料, 如兰染料 Cibacron Blue F3 GA、红染料 Procion Red HE3B 等, 与蛋白质的相互作用具有很好的专一性^[3], 而且稳

定性好, 价格便宜, 易于制备和储存, 已广泛应用于蛋白质的分离纯化。Ruckenstein 等^[5]采用溶出法制备了壳聚糖膜, 并将 Cibacron Blue F3 GA 作为配位基固载到膜上, 用于血清白蛋白的分离纯化。结果表明, 所制备的亲和膜具有较高的亲和吸附容量, 但所选用的基膜-壳聚糖膜在“干态”时机械强度较差、不易保存, 难以满足实际应用。

尼龙膜具有良好机械强度、稳定性以及均匀的孔径和孔隙率分布, 已成为最常用的膜材料之一, 但尼龙膜固有的憎水性和较少的活性基团限制其在亲和膜分离中的应用^[2]。本文拟通过在尼龙膜上偶联壳聚糖以改善膜的亲水性能和增加活性基团数量, 制备尼龙-壳聚糖复合膜, 并选用对牛血清白蛋白具有高亲和容量和良好特异性的 Cibacron Blue F3 GA 作为配位基, 制备亲和膜, 考察其对牛血清白蛋白的吸附性能。

1 实验

1.1 试剂和仪器

尼龙 66 膜(pore size: 0.45 μm) 购自 Whatman 公司; Cibacron Blue F3 GA 购自 Sigma 公司; 壳聚糖(Mr 400000) 购自 Fluka 公司; 牛血清白蛋白由北京化学试剂公司提供; 其它试剂为国产分析纯试剂。

752N 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); HZS-H 恒温水浴振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); Millipore 滤器(Millipore 公司); KF 膜分离器(中国科学院大连化学物理研究所)。

1.2 亲和膜的制备方法

1.2.1 偶合壳聚糖

将 10 片尼龙 66 膜置于 20 mL 的甲醛溶液(> 36.5%, 质量分数)中, 并滴加 0.2 mL 的磷酸(85%,

收稿日期: 2007-04-06

基金项目: 福建省自然科学基金(C0510005)资助

Email: hrjiang@eyou.com

质量分数). 在 60 °C 下, 振荡反应 7 h. 反应结束后, 用蒸馏水在 40 ~ 50 °C 下清洗 0.5 h, 为防止羟甲基水解, 该膜应立即进行下一步处理.

将一片活化后的膜置于 5 mL 2 % (质量浓度) 的壳聚糖乙酸溶液中, 乙酸溶液浓度为 1 % (体积分数), 并用 HCl 调至 pH 2, 在室温下, 振荡反应 0.5 h, 然后将膜置于滤器上, 通过减压, 将膜表面的壳聚糖溶液吸干. 再将膜置于 70 °C 的烘箱中干燥 0.5 h. 然后用 1 % (体积分数) 乙酸溶液在 1 h 内清洗 3 次, 再用蒸馏水清洗 24 h. 采用甲醛活化法制备尼龙-壳聚糖复合膜的反应过程如图 1 所示.

采用茚三酮法分析膜上偶联壳聚糖的含量^[6].

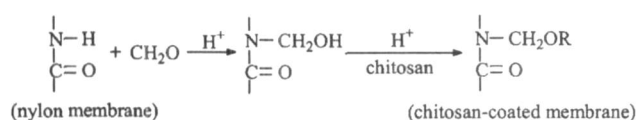


图 1 甲醛活化法偶联壳聚糖的反应过程

Fig. 1 Reaction scheme for coupling of chitosan on the nylon membrane by formaldehyde activation

1.2.2 固载 Cibacron Blue F3 GA 的亲膜的制备

将 2 片尼龙-壳聚糖复合膜置于 20 mL 浓度为 10 mg/mL 的染料水溶液中, 加入 5 mL 20 % (质量分数) 的 NaCl 水溶液, 在 60 °C 下反应 0.5 h. 为加速反应的进行, 再向上述体系中加入 2 mL 25 % (质量分数) 的 Na₂CO₃ 水溶液, 继续反应 4 h. 然后将膜依次用热水、甲醇、2 mol/L NaCl 水溶液和蒸馏水进行清洗, 即获得固载 Cibacron Blue F3 GA 的亲膜.

采用盐酸水解法分析膜上固载 Cibacron Blue F3 GA 的含量.

1.3 膜性能测试

将膜在 0.4 MPa 的压力下预压 1 h, 用滤膜固定器在 0.1 MPa 的压力下测定透水量, 水通量按下式计算:

$$Q = \frac{\text{透水量}}{\text{膜有效面积} \times \text{透水时间}} \quad (1)$$

采用干、湿膜质量差法测定膜的孔隙率. 分别测定湿、干膜的质量 W_1 和 W_2 , 按下式计算孔隙率:

$$\varepsilon = \frac{(W_1 - W_2) / d_{H_2O}}{V} \times 100\% \quad (2)$$

式中: ε 为膜的孔隙率; d_{H_2O} 为水的密度 (g/mL); V 为膜的表现体积 (mL).

采用滤速法测定膜的孔径, 其计算方法为:

$$\bar{r} = \sqrt{8\mu L Q / \varepsilon \Delta P} \quad (3)$$

式中: $\bar{r}$ 为用滤速法测得的平均孔径 (m); ε 为孔隙率 (%); L 为膜厚度 (m); μ 为透过液粘度 (Pa · s); ΔP

为膜两侧压差 (Pa).

1.4 牛血清白蛋白的分离

1.4.1 静态实验

称取一定质量的亲和膜, 剪碎后加入至一定体积一定浓度的牛血清白蛋白 (BSA) 水溶液中, 在一定温度下振荡, 一段时间后检测溶液在 280 nm 处的吸光度. 膜上吸附 BSA 的量可通过下式计算:

$$q = \frac{(c_i - c_f) V_s}{m} \quad (4)$$

其中, q 为单位质量膜上吸附 BSA 的量 (mg/g); c_i 和 c_f 分别为吸附前后 BSA 溶液的浓度 (mg/L); V_s 为 BSA 溶液的体积; m 为膜的质量.

1.4.2 动态实验

将亲和尼龙膜置于膜粘合器中, 在膜的周围涂上一薄层粘合剂, 然后将膜粘合, 制成膜堆, 并装填至 KF 膜分离器中. 取一定浓度的 BSA 溶液通过恒流泵控制流量, 以一定流速流过膜分离器, 上样后, 立即取样分析, 检测溶液在 280 nm 处的吸光度.

2 结果与讨论

2.1 膜性能分析

膜的水力学性能如表 1 所示. 从表 1 可以看出, 尼龙 66 膜经偶联壳聚糖后, 水通量明显缩小, 约减小到初始尼龙 66 膜的 50 %, 但孔径和孔隙率变化不大. 这表明孔径的缩小和孔隙率的降低不是导致水通量降低的主要原因, 而是由于偶联的多糖类物质壳聚糖, 它具有较强的柔韧性和较高的溶胀性, 在水溶液中会在表面形成一层水凝胶, 这是导致水通量减少的主要原因.

表 1 尼龙-壳聚糖复合膜性能

Tab. 1 The characteristics of the membranes

	水通量 / (mL · (cm ² · min) ⁻¹)	孔隙率	平均孔径 / μm
尼龙膜	23.6	0.63	0.42
尼龙-壳聚糖复合膜	12.8	0.56	0.37

所制备的 Cibacron Blue F3 GA 亲和膜的壳聚糖和 Cibacron Blue F3 GA 含量分别为: 112.4 和 123.3 mg/g 尼龙膜.

2.2 吸附等温线

采用 Langmuir 吸附等温线描述 BSA 在固载 Cibacron Blue F3 GA 亲和膜上的吸附机理, 吸附等温线可定义如下:

$$q = \frac{q_m c}{K_d + c} \quad (5)$$

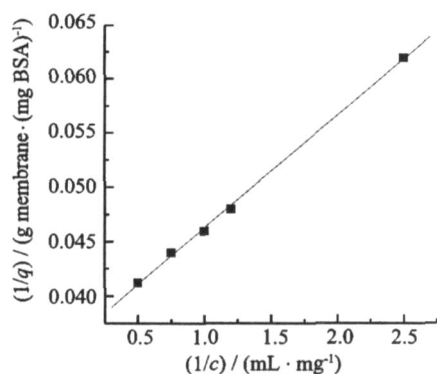


图 2 Langmuir 吸附等温线

温度:25 , BSA 溶液体积:10 mL

Fig. 2 Langmuir adsorption isotherm of Cibacron Blue F3 GA for BSA

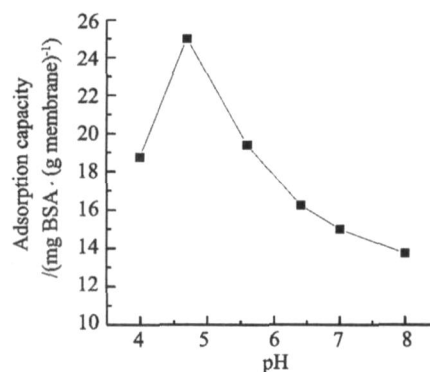


图 3 pH 对吸附的影响

25 , BSA 初始浓度:2.5 mg/mL; BSA 溶液体积:10 mL

Fig. 3 The effect of pH on BSA adsorption

其中, q 为平衡吸附量 (mg); q_m 为饱和吸附量 (mg); c 为 BSA 的平衡浓度; K_d 为解离常数。

方程(5)转换成下式的形式:

$$\frac{1}{q} = \frac{K_d}{q_m} \cdot \frac{1}{c} + \frac{1}{q_m} \quad (6)$$

图 2 表明 BSA 在固载 Cibacron Blue F3 GA 亲和膜上的吸附符合 Langmuir 等温吸附行为,也就是说,吸附机理为单分子层吸附。 q_m 和 K_d 值可通过直线的斜率和截距求得。

2.3 pH 值的影响

壳聚糖在酸性条件下 ($\text{pH} < 4.0$) 具有很强的溶胀性,膜的孔径变小,影响膜的通透性。为考察 pH 值对白蛋白吸附的影响,设定 pH 值的变化范围为 4~8。由图 3 可见,BSA 最大平衡吸附量出现在 $\text{pH} = 4.7$,即 BSA 的等电点。当 pH 值小于 4.7 时,BSA 带正电荷,与膜上的 SO_3^- 相作用,通过静电作用导致具有较高的吸附量。当 pH 值为 BSA 的等电点时,蛋白分子上没有净电荷,因此达到最大平衡吸附量。当 pH 值大于 4.7 时,由于静电排斥作用的影响,导致 BSA 吸附量降低。此外,该 pH 下配位基基团和蛋白分子的氨基酸链的电离状态以及蛋白分子的构象均会对染料与蛋白分子的相互作用产生影响^[7]。

2.4 离子强度的影响

离子强度对 BSA 吸附量的影响如图 4 所示。图中曲线是在 25 下,将一定量的 NaCl 加入 BSA 溶液中测定的结果。由图 4 可见,吸附量随离子强度的增加而下降。以 Cibacron Blue F3 GA 为配位基的尼龙/壳聚糖亲和膜具有大量的 SO_3H 基团,因此该膜带负电荷,而 BSA 的等电点为 4.7,当 pH 值大于 4.7 时也带有负电荷。假定染料亲和膜与 BSA 的静电作用主要归属于净电荷,则随着离子强度的增加静电场将变弱,进而

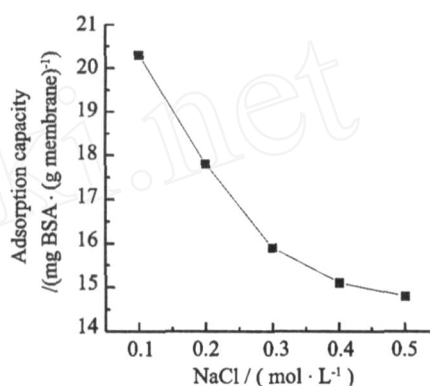


图 4 离子强度对吸附的影响

温度:25 , BSA 初始浓度:2.5 mg/mL; BSA 溶液体积:10 mL

Fig. 4 Effect of NaCl concentration on BSA adsorption capacities

导致吸附量增加。然而实际情况与上述分析相反,其原因可能是:离子强度的增加使蛋白质分子处于更多的离子氛围中,与配位基结合的空间阻碍和静电排斥作用增大;另一方面,盐离子也会与配位基的某些基团,如 SO_3^- 相作用,阻碍配位基与蛋白质的结合。

2.5 BSA 初始浓度的影响

图 5 示出了 BSA 在尼龙膜上的特异性和非特异性吸附情况。从图可以看出,尼龙膜经固载配位基 Cibacron Blue F3 GA 后,对 BSA 的吸附量由原来 1.25 mg BSA/g membrane 提高至 23.1 mg BSA/g membrane。在给定的范围内,BSA 的特异性吸附量随着 BSA 初始浓度的增加而增加。

2.6 膜堆性能研究

采用动态法考察亲和膜组件对 BSA 的清除效果。将 8 片膜叠合在一起,组成膜堆,2.5 mg/mL 的 BSA 溶液以一定流速通过膜堆,间隔 1 min 取样分析,测定

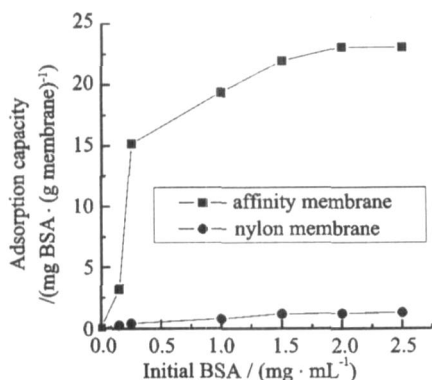


图5 BSA 初始浓度对吸附的影响

温度:25 ;BSA 溶液体积:10 mL

Fig. 5 The effect of BSA initial concentration on the adsorption capacities

溶液 BSA 吸光度. 以时间为横坐标, 以出口浓度与入口浓度的比值作为纵坐标, 绘制穿透曲线, 如图 6 所示. 从图 6 可见, 随着流速的增加, 曲线变得陡峭, 平衡容易达到, 但所吸附的 BSA 量减少. 这主要是由于在较低的流速下, 膜表面和孔内的配位基利用率较高; 在较高的流速下, 保留时间缩短, 配位基利用率降低.

参考文献:

- [1] Klein E. Affinity membranes: a 10-year review[J]. Journal of Membrane Science, 2000, 179(1/2): 1 - 27.
- [2] Shi W, Zhang F B, Zhang G L. Adsorption of bilirubin with polylysine carrying chitosan-coated nylon affinity membranes[J]. Journal of Chromatography B, 2005, 819(2): 301 - 306.
- [3] Ma Z W, Masaya K, Ramakrishna S. Immobilization of Cibacron blue F3GA on electrospun polysulphone ultra-fine

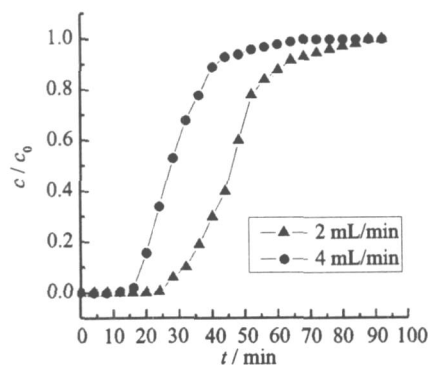


图6 BSA 的穿透曲线

Fig. 6 Breakthrough curve of BSA

fiber surfaces towards developing an affinity membrane for albumin adsorption[J]. Journal of Membrane Science, 2006, 282(1/2): 237 - 244.

- [4] Ahmed S R, Lutes A T, Barbari T A. Specific capture of target proteins by oriented antibodies bound to tyrosinase-immobilized protein A on a polyallylamine affinity membrane surface[J]. Journal of Membrane Science, 2006, 282(1/2): 311 - 321.
- [5] Ruckenstein E, Zeng X F. Albumin separation with Cibacron Blue carrying macroporous chitosan and chitin affinity membranes[J]. Journal of Membrane Science, 1998, 142: 13 - 26.
- [6] Yang L, Hsiao W W, Chen P. Chitosan-cellulose composite membrane for affinity purification of biopolymers and immunoabsorption[J]. Journal of Membrane Science, 2002, 197: 185 - 197.
- [7] 张静, 张政朴, 宋瑜, 等. 染料壳聚糖微球的制备及其对牛血清白蛋白(BSA)吸附性能的研究[J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(12): 2363 - 2368.

Preparation of Dye Affinity-membrane and Its Adsorption Properties for Bovine Serum Albumin

JIANG Hai-rong

(Experimental Chemistry Center, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Using Cibacron Blue F3GA as ligand, the affinity nylon-chitosan composite membrane was prepared and its adsorption characteristics for bovine serum albumin(BSA) were studied. Microporous nylon membranes were activated by formaldehyde and subsequently bound with chitosan to amplify reactive groups. Then Cibacron Blue F3GA was immobilized onto the chitosan-coated nylon membranes. The contents of chitosan and Cibacron Blue F3GA of affinity membranes were 112.4 and 123.3 mg/g nylon membrane, respectively. The obtained Cibacron Blue F3GA-chitosan affinity membranes were used to adsorb BSA from the BSA solution. The adsorption mechanism of BSA and the effects of pH value and ionic strength on adsorption were investigated by batch experiments. The results showed that the adsorption capacity increased with increasing BSA initial concentration while decreased with increasing the NaCl concentration and the adsorption isotherm fitted the Langmuir model well. The Cibacron Blue F3GA-chitosan affinity membranes exhibited the high adsorption capacity for BSA.

Key words: affinity membrane; chitosan; bovine serum albumin; adsorption