应用文档

IMCStips中不同阴离子交换树脂结合能力的比较

Onohije Pogoson, Patrick A. Kates, L. Andrew Lee
Integrated Micro-Chromatography Systems, Inc., Irmo, SC 29063

概述

本研究在 Hamilton Microlab STAR 自动化液体处理工作站上评估了IMCStips 中四种阴离子交换（AEX）树脂的结合能力。阴离子交换树脂通过其带正电荷的官能团捕获带负电荷的生物分子，广泛应用于蛋白质和核酸等生物分子的纯化。本研究比较了 IMCStips 中四种不同的 AEX树脂，并测量了它们在不同移液循环次数下对牛血清白蛋白（BSA）的结合能力。这种自动化方法实现了高效、可重复的筛选，并提供了关于结合动力学和容量的关键数据，有助于针对不同纯化需求优化树脂选择。

方法优势

- **高效性**：通过 Hamilton Microlab STAR 的自动化程序，快速、一致地测试多种阴离子交换树脂。
- **灵活性**：灵活的配置可在同一程序中轻松比较不同阴离子交换树脂的结合特性。
- **数据支持**：测试树脂的详细结合动力学数据为特定应用场景的树脂选择提供科学依据。

引言

阴离子交换（AEX）树脂采用带正电荷的官能团，如取代胺（弱碱性）或季铵盐（强碱性）。该技术在多种生物分子应用中高效实用，包括蛋白质、质粒、核酸的纯化，以及宿主细胞蛋白（HCP）、内毒素和聚集体（带负电荷杂质）的去除。

市面上的离子交换树脂种类繁多，各具特性。例如，部分以硅胶为基质，部分采用聚合物核心并搭配相似官能团（如二乙氨基乙基链接臂或四甲基铵复合物）。这些核心材料与官能团的差异会影响树脂的结合能力、动力学和选择性，使得在特定应用中选择最优树脂面临挑战，尤其是需要平衡纯化效率与性能的实验室。

本研究通过Hamilton Microlab STAR自动化液体处理工作站结合IMCStips，评估四种AEX树脂以应对上述挑战。采用自动化方法测定不同树脂对牛血清白蛋白（BSA）的结合能力。测试的初始树脂组为四种常用产品：

- POROS™ 50HQ：**强阴离子聚苯乙烯衍生物，表面修饰季铵化聚乙烯亚胺，平均粒径 50 微米，孔径 500-1000 埃；**
- Fractogel® TMAE (M) 与 Fractogel® TMAE HiCap (M)：**强阴离子交换树脂，以专利甲基丙烯酸酯聚合物为核心，孔径约 800 埃；**
- 硅胶 DEAE 衍生物：**弱阴离子交换树脂，含二乙氨基乙基链接臂，粒径 35-60 微米，孔径 300 埃。**

上述物理参数均经供应商手册确认，详见表 1。

表 1. 阴离子交换树脂特性参数

树脂类型	AEX 类型	标称的结合能力 (mg/mL)	孔径 (Å)	料径 (µm)
POROS 50 HQ	强碱性	76 -106	2,000	50
Fractogel TMAE HiCap (M)	强碱性	145 – 185	800	40 - 90
Fractogel TMAE (M)	强碱性	70 – 105	800	40 - 90
BDEAE	弱碱性	NA	60 – 300	35 – 60

结果

树脂结合动力学分析

通过IMCStips测试平台，我们绘制了四种阴离子交换树脂对牛血清白蛋白（BSA）的结合动力学曲线：POROS 50HQ（图1A）、Fractogel TMAE HiCap M（图1B）、Fractogel TMAE M（图1C）、DEAE衍生化硅胶（图1D）。实验数据采用双指数函数进行拟合建模（参见材料与方法部分的公式1）。

1. **初始结合阶段（前 5 个循环）**：所有树脂均呈现陡峭的初始斜率（图 1），表明 BSA 与树脂的快速结合特性。

2. **平衡状态特征**：随浓度升高，曲线矩形度增加（图 1），提示反应趋近平衡状态。

3. **树脂特异性表现**：

- POROS 和 Fractogel TMAE 在 10 个循环后结合量无显著提升（图1A、1C）
- DEAE-硅胶和 Fractogel TMAE HiCap 在 5 个循环后增速减缓（图1B、1D），高浓度样品中仍持续增长，表明 30 个循环后仍未达平衡

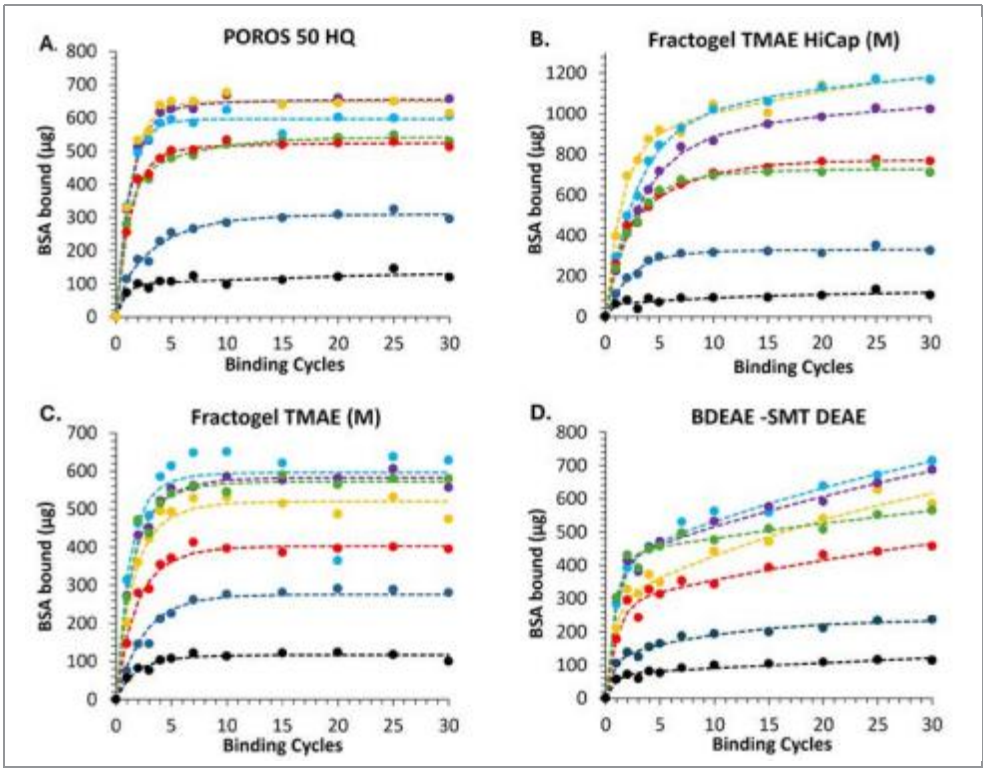


图1：四种阴离子交换树脂在不同 BSA 浓度下的结合动力学曲线（样品体积 825 µL）。
（A）POROS 50 HQ　（B）Fractogel TMAE HiCap (M)
（C）Fractogel TMAE (M)　（D）SMT-DEAE（BDEAE）
初始蛋白载量：
1619.48 µg 1593.10 µg 1268.85 µg 880.28 µg 851.40 µg 444.68 µg 210.38 µg
（虚线：拟合曲线；圆圈：实验实测数据）。

动力学参数测定

采用单指数拟合（公式 2）分析前 5 个循环数据（因单/双指数拟合差异不显著，图 2），获得以下关键参数：

1. **观测速率常数（k_{obs}）**：

- 与初始蛋白浓度呈线性相关（图 2）
- 斜率代表双分子速率常数
- Y截距反映解离速率（k_{off}）

2. **参数比较（表2）**：

- 双分子速率常数范围：1.81×10^4 ~ 8.35×10^4 $M^{-1}s^{-1}$
- 观测 k_{off} 范围：0.023 ~ 0.45 s^{-1}
- HiCap TMAE树脂表现独特：具有最低解离速率

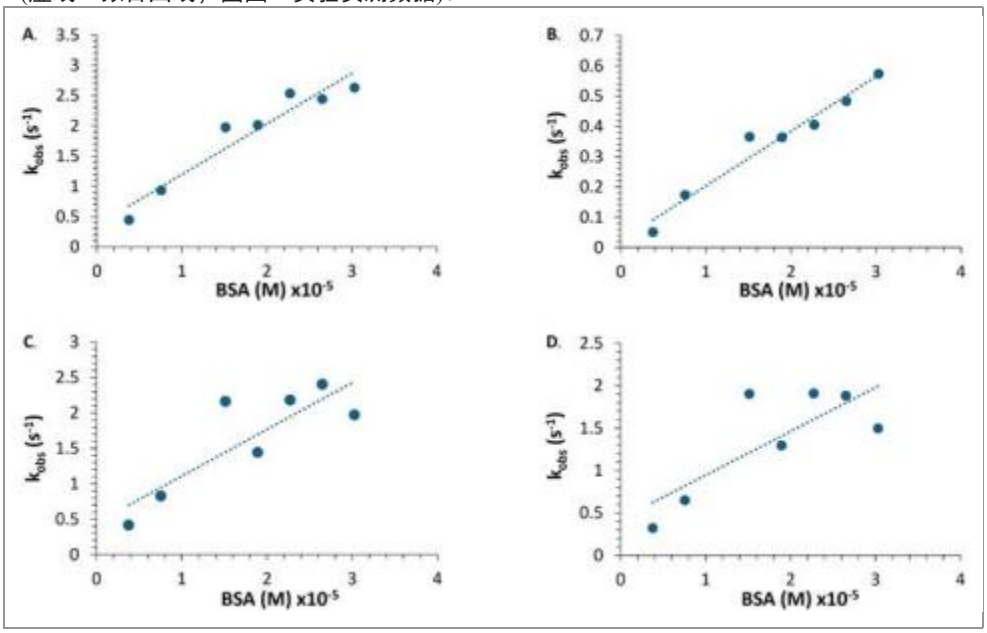


图2：观测速率常数分析
基于前五个结合循环的单指数拟合结果，四种树脂对BSA的双分子速率常数对比：
（A）POROS 50HQ树脂　（B）Fractogel TMAE HiCap树脂
（C）Fractogel TMAE树脂　（D）D. DEAE-硅胶树脂

Table 2. Binding kinetics (bimolecular rates) for resins.

Resin Type	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_a (M^{-1}) (k_{on}/k_{off})
POROS 50 HQ	8.35E+04	3.62E-01	2.31E+05
Fractogel TMAE HiCap (M)	1.81E+04	2.28E-02	7.92E+05
Fractogel TMAE (M)	6.59E+04	4.49E-01	1.47E+05
SMT-DEAE (BDEAE)	5.17E+04	4.27E-01	1.21E+05

为深入评估结合能力，我们绘制了单位树脂结合蛋白量与游离蛋白浓度的关系曲线，并采用单点位Langmuir等温线模型（公式3）进行拟合，获得以下关键参数（表3）：最大结合和洗脱值（q_{max}）、解离常数（K_D）。q_{max} 具有浓度依赖性：所有树脂的结合行为均受平衡常数驱动。初始蛋白浓度越高，树脂吸附量越大；但会导致回收百分比降低。

表 3. 实验方法比对：使用 IMCStips 吸打 30 次 (K_{D30}, q_{max30}) 与在试管中平衡结合 72 小时 (K_{D72h}, q_{max72h})

Resin Type	K_{D30} (μg/mL)	q_{max30} (μg/μL)	K_{D72h} (μg/mL)	q_{max72h} (μg/μL)
POROS 50 HQ	177	65.4	47.3	101.8
Fractogel TMAE HiCap (M)	255.9	155.3	46.7	185.1
Fractogel TMAE (M)	450.2	89.7	58.7	97.1
SMT-DEAE (BDEAE)	622.7	113.8	374.1	76.3

结论

树脂的结合能力和动力学特性受多重因素影响：

1. **关键影响因素**：目标物浓度（BSA浓度）、受体浓度及其可及性（树脂带正电功能基团）和 树脂粒径与孔径。
2. **孔径效应**：
   - •小孔径树脂：比表面积大，可实现目标分子快速表面吸附（结合容量高）
   - •大孔径树脂：扩散速率慢，存在"慢结合位点"
   - •孔径过小：会排斥大分子（如本实验66.7 kDa的BSA）进入内部孔隙
3. **空间位阻现象**：当分子快速结合树脂表层后，会通过电荷排斥和空间位阻效应抑制后续蛋白吸附。

本研究建立了一种快速评估蛋白/树脂相互作用的方法，为生物分子纯化中的树脂选择提供了重要依据。

材料与方法

BSA：购自Rockland Immunochemicals，用AA缓冲液（25 mM NH_4 OAc，pH 7.4）配制 5.17 mg/mL 母液（NanoDrop测定）。稀释母液至 0.25-2.5 mg/mL 浓度范围。

测试树脂：POROS 50 HQ（ThermoFisher）、Fractogel TMAE HiCap (M)（EMD Millipore）、Fractogel TMAE (M)（EMD Millipore）、二乙氨基乙基修饰硅胶（Separations Methods Technologies）。所有树脂的测试条件相同 (缓冲液浓度和pH、蛋白质浓度、流速、温度等)，每种树脂三个样品参试。

结合能力

1. **实验条件**：
   (1) 平台：Hamilton Microlab STAR；(2) 体系：10 μL树脂 + 825 μL含BSA（2.50-0.25 mg/mL）的结合缓冲液；(3) 循环参数：吸液 100 μL/s；排液 15 μL/s；单循环耗时：~61 秒。
2. **检测方法**：
   (1) 取样：150 μL转移至UV透明板；(2) 检测：SpectraMax（280 nm）；(3) 时间点：0、1-5、7、10、15、20、25、30循环；(4)结合量计算：初始蛋白量 - 溶液中游离蛋白量
3. **数据拟合**：

Equation 1. $A = [A_1 (1 - e^{k_1 t})] + [A_2 (1 - e^{k_2 t})]$ Equation 2. $A = [A_1 (1 - e^{k_1 t})]$ Equation 3. $Q_e = \frac{q_{max} C_e}{K_D + C_e}$

BSA吸附等温线测定（AA缓冲体系）

1. **实验条件**：
   (1) 缓冲体系：25 mM醋酸铵（NH_4 OAc, pH 7.4）；(2) 测试树脂：POROS 50 HQ、Fractogel TMAE HiCap (M)、Fractogel TMAE (M)、DEAE树脂；(3) 容器：1.5 mL Lo-Bind Eppendorf 管；(4) 温度：室温（23±2°C）；(5) 重复数：四重复
2. **实验步骤**
   (1) 树脂预处理：每管加入10 μL树脂浆料，13,000 rpm离心1分钟，小心移取上清（避免扰动树脂层）；(2) 平衡洗涤：加入825 μL AA缓冲液，重复离心-去上清操作；(3) 结合反应：加入梯度浓度BSA溶液（AA缓冲液配制）,Argos Technologies® RotoFlex混匀1小时; (4) 检测分析：离心分离后取上清，使用NanoDrop™ 2000（280 nm）测定游离蛋白浓度， 结合量计算。
3. **数据处理**
   以溶液中游离蛋白浓度为横坐标，树脂结合蛋白量为纵坐标，绘制吸附等温线。

无锡微色谱生物科技有限公司
地 址：江苏省江阴市月城镇北环路 19 号
电 话：17715681752
邮 箱：custserv@micro-sep.com

MicroSep Biotechnology LLC
ADD: 2411 Monroe ST, Columbia, SC, USA
Phone : 001-803-767-8196
Web: www.micro-sep.com