

APPLICATION OF SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY FOR PROTEIN PURIFICATION FROM HIGH-SALT SOLUTIONS

Trinh Minh Viet*, Vu Minh Ngoc, Dao Van Tien, Dao Gia Thang, Chu Van Ket

*Department of Biochemistry, Institute 69 -
Hoang Hoa Tham Street, Ngoc Ho Ward, Ba Dinh Dist, Hanoi City, Vietnam*

Received: 08/09/2025

Revised: 25/09/2025; Accepted: 21/10/2025

ABSTRACT

Objective: To optimize the size-exclusion chromatography (SEC) process for extracting and purifying proteins from high-salt solutions, in order to accurately quantify proteins in complex biological samples.

Methods: Experimental studies were conducted using BSA standard samples (30–120 mg/L) and real samples. The investigated parameters included column type, phosphate buffer concentration, flow rate, and sample loading volume. Protein and salt were detected by UV (280 nm) and conductivity detectors, respectively. Protein recovery efficiency and purity were evaluated by total nitrogen analysis and SDS-PAGE.

Results: The optimal conditions were determined to be the Sephadex G-25 column, 150 mM phosphate buffer (pH 7), flow rate of 3 mL/min, and injection volume of 2 mL. Under these conditions, proteins were completely separated from salts with recovery efficiency above 95%. The calibration curve showed high linearity ($R^2 = 0.9998$). The results were consistent with the Kjeldahl method, while being faster and simpler.

Conclusion: Size-exclusion chromatography with the optimized parameters is an effective and reliable tool for desalting, purifying, and quantifying proteins in complex biological matrices with high salt concentrations.

Keywords: Size-exclusion chromatography, optimization, protein, BSA.

*Corresponding author

Email: dr.minhviet@gmail.com **Phone:** (+84) 988663688 **Https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD19.3579**



ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỌC GEL ĐỂ TÍNH SẠCH PROTEIN TRONG DUNG DỊCH CÓ NỒNG ĐỘ MUỐI CAO

Trịnh Minh Việt*, Vũ Minh Ngọc, Đào Văn Tiến, Đào Gia Thắng, Chu Văn Kết

Khoa Sinh hóa, Viện 69 - Đường Hoàng Hoa Thám, P. Ngọc Hồ, Q. Ba Đình, Tp. Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận: 08/09/2025

Ngày sửa: 25/09/2025; Ngày đăng: 21/10/2025

TÓM TẮT

Mục tiêu: Tối ưu hóa quy trình sắc ký lọc gel để tách chiết và tinh sạch protein từ các dung dịch có nồng độ muối cao, nhằm định lượng chính xác protein trong mẫu sinh học phức tạp.

Phương pháp: Nghiên cứu thực nghiệm sử dụng mẫu chuẩn Bovine Serum Albumin (BSA) (30-120 mg/L) và mẫu thực tế. Các điều kiện được khảo sát bao gồm loại cột, nồng độ đệm phosphate, tốc độ dòng và thể tích bơm mẫu. Protein và muối được theo dõi lần lượt bằng detector UV (280 nm) và detector độ dẫn điện. Hiệu suất thu hồi và độ tinh sạch được đánh giá thông qua định lượng nitơ tổng số và điện di SDS-PAGE.

Kết quả: Điều kiện tối ưu được xác định là cột Sephadex G-25, đệm phosphate 150 mM (pH 7), tốc độ dòng 3 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 2 mL. Ở điều kiện này, protein được tách hoàn toàn khỏi muối với hiệu suất thu hồi >95%. Đường chuẩn định lượng cho thấy tính tuyến tính cao ($R^2 = 0,9998$). Phương pháp này cho kết quả tương đương với phương pháp Kjeldahl nhưng nhanh hơn và đơn giản hơn.

Kết luận: Phương pháp sắc ký lọc gel với các thông số tối ưu là một công cụ hiệu quả và đáng tin cậy để khử muối, tinh sạch và định lượng protein trong các mẫu sinh học phức tạp có nồng độ muối cao.

Từ khóa: Sắc ký lọc gel, tối ưu hóa, protein, BSA.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sắc ký lọc gel (SEC) là một kỹ thuật quan trọng trong tách chiết và làm sạch protein, dựa trên sự khác biệt về kích thước và trọng lượng phân tử [1-2]. Ưu điểm nổi bật của phương pháp này là có thể thực hiện trong các điều kiện dung môi đa dạng và đặc biệt hiệu quả trong việc khử muối, thay đổi đệm cho mẫu sinh học. Trong thực tế, nhiều quy trình tách chiết protein từ các nguồn vi sinh vật hoặc dung dịch có nồng độ muối cao (DD BQ), dẫn đến mẫu thành phẩm chứa lượng muối dư thừa gây ức chế các phương pháp phân tích tiếp theo như điện di, sắc ký trao đổi ion, sắc ký khối phổ. Hơn nữa, các mẫu này thường có nền phức tạp với sự hiện diện của các hợp chất gây nhiễu. Việc tối ưu hóa các điều kiện phân tích sắc ký lọc gel là cần thiết để đạt được hiệu suất thu hồi protein tối đa và hiệu quả khử muối tối ưu. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định bộ thông số tối ưu cho quy trình tách chiết protein bằng sắc ký lọc gel từ dung dịch nồng độ muối cao và nền mẫu phức tạp.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế nghiên cứu

Thực hiện trong phòng thí nghiệm với thiết kế mô tả, nhằm tối ưu hóa quy trình tách chiết và đánh giá hiệu quả của phương pháp sắc ký lọc gel để tinh sạch protein từ các dung dịch có nồng độ muối cao.

2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu: Khoa Sinh hóa – Viện 69; thực hiện từ 10/2024-9/2025.

2.3. Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu chuẩn: 18 mẫu dung dịch bảo quản (DDBQ) mới pha, được bổ sung protein chuẩn BSA ở ba nồng độ khác nhau (30 mg/L, 60 mg/L và 120 mg/L). Mỗi nồng độ được chuẩn bị với 6 lần lặp lại.

- Mẫu thực nghiệm: 6 mẫu dung dịch thực nghiệm đã qua sử dụng tại Viện 69, bao gồm: 3 mẫu ngâm da cơ nguyên khối (ký hiệu TN1, TN2, TN3); 3 mẫu ngâm mô cơ tách rời (ký hiệu TN4, TN5, TN6).

*Tác giả liên hệ

Email: dr.minhviet@gmail.com Điện thoại: (+84) 988663688 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD19.3579>

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Quy trình tách chiết và tinh sạch bằng sắc ký lọc gel

- Chuẩn bị mẫu: Mẫu DDBQ được lọc sơ bộ qua màng lọc 0,45 µm để loại bỏ tạp chất trước khi phân tích.

- Khảo sát điều kiện tối ưu: Tiến hành chạy sắc ký lọc gel để đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố: Loại cột: Sephadex G-20, G-25, LH-20; Nồng độ dung môi rửa giải (đệm phosphate): 10 mM, 50 mM, 150 mM (pH 7.0); Tốc độ dòng: 0,2 mL/phút; 1 mL/phút; 2 mL/phút.

- Làm giàu mẫu: Các phân đoạn protein thu được từ sắc ký lọc gel được làm giàu bằng phương pháp đông khô, sau đó hòa tan lại trong 2 mL dung dịch đệm để chuẩn bị cho các phân tích tiếp theo [3].

2.4.2. Đánh giá hiệu quả phương pháp

- Khả năng loại muối: Đánh giá định tính thông qua sắc ký đồ, dựa trên sự tách biệt hoàn toàn giữa peak hấp thụ ở bước sóng 280 nm (đặc trưng cho protein) và peak độ dẫn điện (đặc trưng cho muối).

- Hiệu suất thu hồi protein: Định lượng protein trong các phân đoạn thu được bằng phương pháp Nitơ tổng số (Kjeldahl), sau đó so sánh với nồng độ protein ban đầu để tính phần trăm thu hồi.

- Độ tinh sạch: Phân tích và so sánh hồ sơ protein của mẫu trước và sau khi tinh sạch bằng kỹ thuật điện di SDS-PAGE.

- Xây dựng đường chuẩn và định lượng: Xây dựng đường chuẩn thể hiện mối tương quan giữa diện tích peak sắc ký và nồng độ BSA chuẩn (30, 60, 120 mg/L). Đường chuẩn này được sử dụng để định lượng hàm lượng protein trong các mẫu thực nghiệm.

2.4.3. Phân tích số liệu

Số liệu được xử lý và phân tích bằng phần mềm Microsoft Excel. Kết quả định lượng được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD). Đường chuẩn được xây dựng dựa trên phương pháp hồi quy tuyến tính.

2.5. Đạo đức nghiên cứu

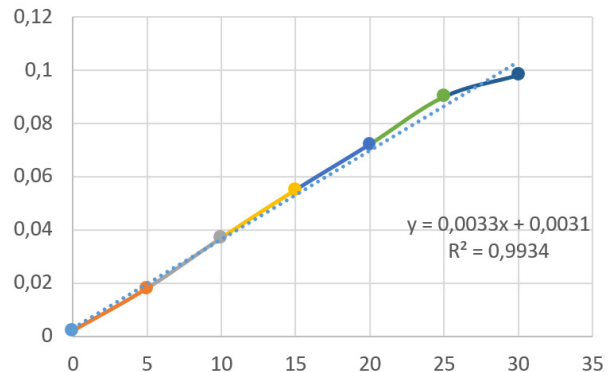
Nghiên cứu được thực hiện tuân thủ các quy định về an toàn phòng thí nghiệm và các nguyên tắc đạo đức trong nghiên cứu khoa học.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Khảo sát một số điều kiện tinh sạch protein từ DDBQ.

3.1.1. Ảnh hưởng của nền mẫu DDBQ đến khả năng định lượng protein bằng phương pháp quang phổ (bradford).

Chuẩn bị dung dịch thực nghiệm (trắng) với nồng độ khác nhau: Pha dung dịch trắng trong nước, đạt các nồng độ: 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% theo nồng độ muối của dung dịch. Lấy 0,1 ml các dung dịch có nồng độ như trên, thêm 3 ml dung dịch coomassie brilliant blue G -250, lắc nhẹ đều, để 5 phút và tiến hành đo quang ở 595 nm, mỗi mẫu đo cách nhau 40 giây. Kết quả thu được.

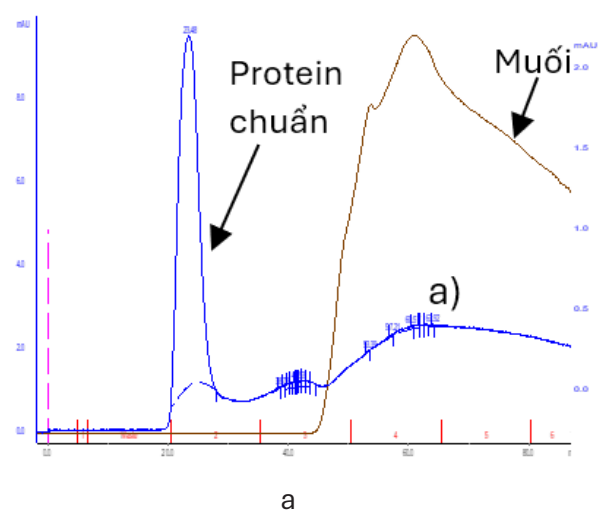


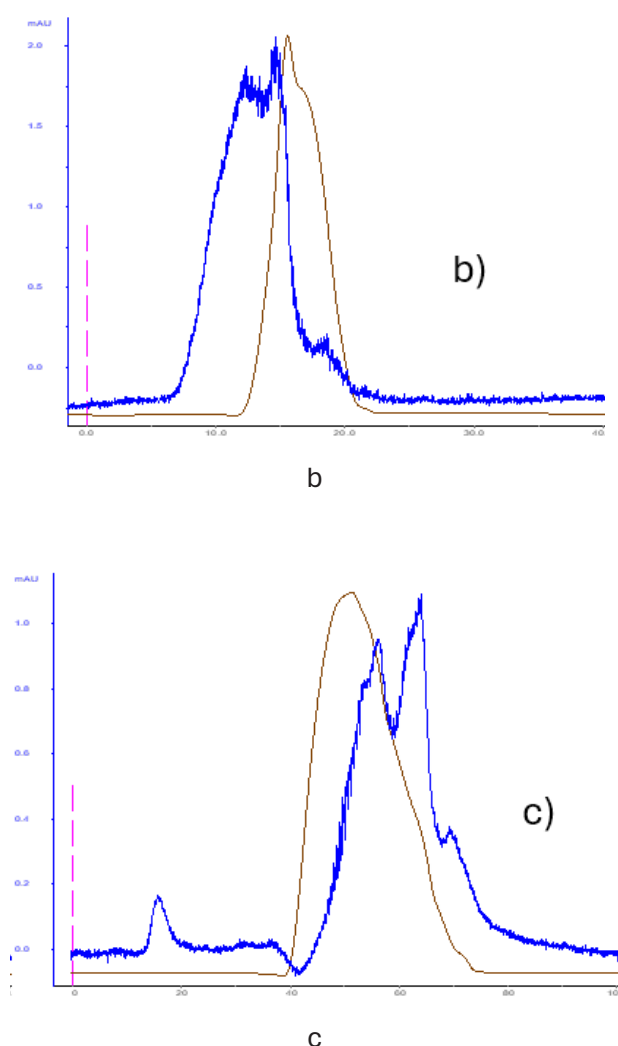
Hình 1. Đồ thị tuyến tính giữa nồng độ % của DD BQ với mật độ quang.

Nhận xét: Các thành phần trong nền mẫu như CCB2 có phản ứng tạo phức với thuốc thử coomassie brilliant blue G -250. Mặt khác hàm lượng protein trong mẫu dung dịch là rất thấp, sẽ bị che lấp khi phản ứng với thuốc thử coomassie brilliant blue G -2, nếu chúng ta định lượng trực tiếp protein trong dung dịch. Do đó cần tiến hành loại các thành phần CCB1, CCB2 khỏi dung dịch để tinh sạch protein, từ đó giúp chúng ta dễ dàng định lượng protein sau khi đã tinh sạch.

3.1.2. Kết quả khảo sát trong các điều kiện sắc ký lọc gel khác nhau

- Khảo sát cột phân tích

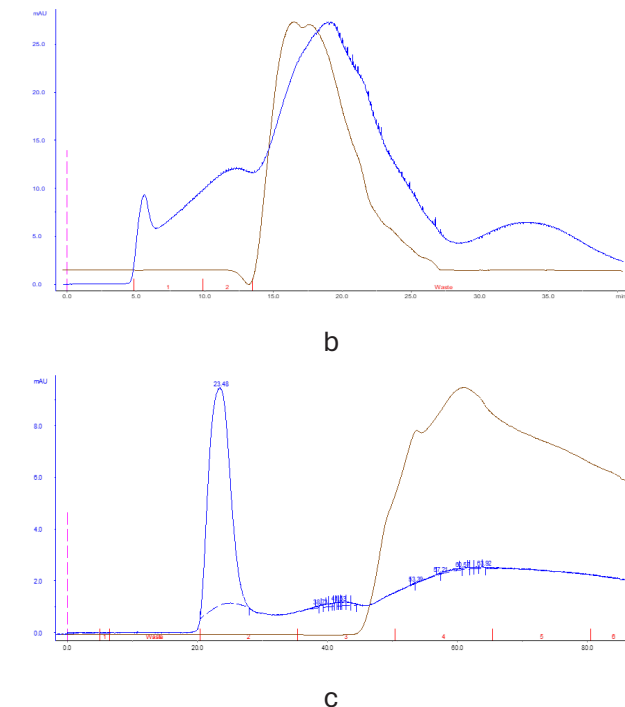
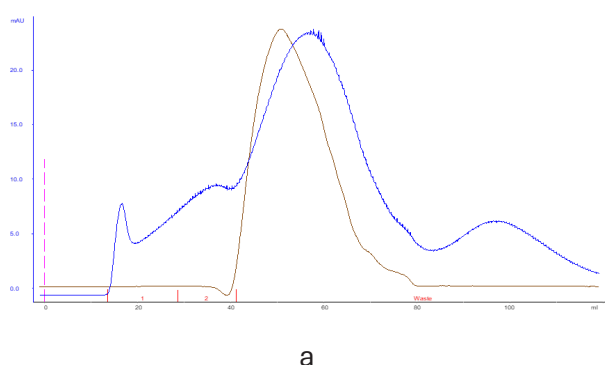




Hình 2. Sắc đồ tinh sạch protein chuẩn trong dung dịch thực nghiệm trên các cột lọc gel khác nhau: a) cột sephadex G-25, b) Cột G-20, c) Cột LH20

Qua khảo sát với 3 loại cột khác nhau cho thấy cột sephadex G-25 cho phép tách tốt các thành phần protein trong dung dịch, loại bỏ tốt muối với nồng độ cao.

- Khảo sát các hệ dung môi đệm



Hình 3. Sắc đồ phân tích protein chuẩn trong DDBQ bằng sắc ký lọc gel với các hệ đệm phosphat ở các nồng độ: a) đệm phosphat 10 mM, pH7; b) đệm phosphat 50 mM, pH7; c) đệm phosphat 150 mM, pH7.

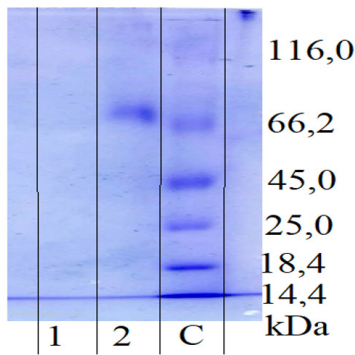
Nhận xét: Hệ đệm phosphat 150 mM, pH7 cho phép tách tốt các thành phần protein trong dung dịch, loại bỏ hoàn toàn được muối ở các phân đoạn sau.

Khảo sát về tốc độ dòng pha động lần lượt là 1; 2; 3 và 4 ml/phút kết quả thu được với tốc độ dòng 4 ml/phút, các peak protein bị chồng lấn với peak muối, không thể loại hoàn toàn muối khỏi dung dịch, với tốc độ dòng 1; 2; 3 ml/phút đều cho phép tách tốt protein và muối, tuy nhiên để rút ngắn thời gian phân tích hiệu quả chúng tôi chọn vận tốc dòng là 3 ml/phút cho các phân tích tiếp theo

Khảo sát thể tích bơm mẫu lên cột 0,5 và 2 ml đều cho kết quả tách tốt protein, với thể tích 5 ml mẫu lên cột, gây quá tải cột có hiện tượng kéo đôi peak, các protein không được tách hoàn toàn khỏi dung dịch muối.

Qua đó, chúng tôi lựa chọn được các điều kiện tinh sạch protein trong DDBQ như sau: Cột sephadex G-25, kích thước cột 2,6/10 cm, đệm phosphat 150 mM, pH 7, tốc độ dòng 3 ml/phút, thể tích bơm mẫu lên cột là 2 ml.

- Đánh giá độ tinh sạch của mẫu protein bằng so sánh kết quả điện di SDS-PAGE của mẫu trước và sau khi xử lý bằng sắc ký lọc gel



Hình 4. Kết quả phân tích điện di SDS-PAGE của mẫu protein BSA trong dung dịch: 1 mẫu trước lọc gel; 2: mẫu sau lọc gel; C mẫu chuẩn protein toàn giải

Mẫu protein (1) trong DDBQ khi phân tích trực tiếp trên kết quả điện di hầu như không phát hiện tín hiệu protein BSA, trong khi mẫu (2) được xử lý qua cột lọc gel để loại bỏ muối và thu phân đoạn protein sau cột để phân tích bằng kỹ thuật điện di, cho kết quả 1 băng rõ nét có khối lượng khoảng 66-67 kDa, phù hợp với kích thước phân tử của BSA chuẩn.

- Hiệu suất thu hồi protein

Kết quả định lượng nitơ tổng số trên mẫu BSA sau khi tách bằng sắc ký lọc gel cho thấy hiệu suất thu hồi cao (Bảng 2).

Bảng 2. Hiệu suất thu hồi protein BSA bằng phương pháp sắc ký lọc gel

TT	Nồng độ BSA chuẩn (mg/l)	Nồng độ protein theo ni tơ sau lọc gel (mg/l)	Hiệu suất thu hồi (%)
1	30	28,95 ± 3,65	96,5
2	60	58,32 ± 9,85	97,2
3	120	116,40 ± 15,66	97,0

3.2. Xây dựng đường chuẩn và định lượng protein trong thực nghiệm

Đường chuẩn và định lượng mẫu thực được xây dựng dựa trên nồng độ protein chuẩn BSA và diện tích peak của BSA chuẩn, đồ thị cho thấy mối tương quan tuyến tính rất cao, với hệ số tương quan (R^2) đạt 0,9998, Phương trình đường chuẩn: $y = 0,1466x - 0,5573$; chứng tỏ phương pháp phân tích đang áp dụng có độ chính xác và tin cậy rất tốt. Áp dụng đường chuẩn này để định lượng protein trong các mẫu dung dịch thực nghiệm đã sử dụng tại Viện 69 cho kết quả như sau.

Bảng 3. Kết quả định lượng protein trong các mẫu thực nghiệm

STT	Mẫu	Hàm lượng protein (mg/l), ($\bar{X} \pm SD$, n=3)
1	Dung dịch TN 1, TN 2, TN 3	46,95 ± 8,75
2	Dung dịch TN4, TN 5, TN 6	148,84 ± 32,73

4. BÀN LUẬN

4.1. Khảo sát một số điều kiện tinh sạch protein khỏi DDBQ

Định lượng trực tiếp protein trong DDBQ bằng phương pháp Bradford là không khả thi do ảnh hưởng của các thành phần trong nền mẫu. Kết quả khảo sát cho thấy dung dịch nền (không chứa protein) tạo tín hiệu quang tỷ lệ thuận với nồng độ khi phản ứng với thuốc thử Bradford, gây dương tính giả, trong đó CCB2 là tác nhân gây nhiễu chính. Hiện tượng này đặc biệt nghiêm trọng khi hàm lượng protein thực tế trong mẫu rất thấp, dẫn đến tín hiệu đặc hiệu của protein bị che khuất hoàn toàn bởi tín hiệu nền. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Walker (2005) [3] khi chỉ ra một số polyol và hợp chất chứa nhóm hydroxyl (như CCB2) có thể làm thay đổi môi trường vi mô, ảnh hưởng đến sự hình thành phức chất protein-thuốc nhuộm. Bên cạnh đó, nồng độ muối cao (CCB1) trong dung dịch cũng được ghi nhận bởi Janson (2012) [2] có thể làm giảm độ nhạy và độ ổn định của phép đo quang do cạnh tranh ion và thay đổi lực ion môi trường phản ứng. Do đó, việc áp dụng sắc ký lọc gel như một bước tiền xử lý là cần thiết để loại bỏ đồng thời cả muối và các chất gây nhiễu hữu cơ trước khi định lượng, đảm bảo độ chính xác và độ tin cậy của kết quả phân tích.

Kết quả khảo sát ba loại cột lọc gel cho thấy Sephadex G-25 có hiệu suất tách và loại muối vượt trội nhờ khoảng phân tách lý tưởng (1000-5000 Da) cho phép tách hiệu quả phân tử muối nhỏ khỏi protein [4]. Trong khi đó, các cột G-20 và LH-20 có kích thước lỗ xốp lớn hơn dẫn đến sự trùng lặp peak protein và muối [2-4]. Về thành phần đệm, đệm phosphate 150 mM, pH 7 cho kết quả tối ưu nhờ lực ion đủ cao để loại bỏ các tương tác tĩnh điện không mong muốn, trong khi nồng độ đệm thấp hơn làm giảm hiệu quả tách [4]. Tốc độ dòng 3 mL/phút được chọn làm sự cân bằng giữa hiệu quả tách và thời gian phân tích, tránh hiện tượng chồng lấn peak ở tốc độ cao hay kéo dài thời gian ở tốc độ thấp [2-4]. Thể tích mẫu nạp 2 mL được xác định là tối ưu, tránh hiện tượng quá tải cột xảy ra ở thể tích 5 mL làm giảm khả năng tách biệt protein và muối [2-4]. Thể tích 2 mL được chọn nhằm đạt sự cân bằng thực tế giữa hiệu suất tách và lượng mẫu cần cho phân tích tiếp theo. Dù

thể tích 0,5 mL có thể cho độ phân giải cao hơn, 2 mL vẫn đảm bảo đủ mẫu cho phát hiện, định lượng và duy trì hiệu quả tách tối ưu của cột.

Kết quả điện di SDS-PAGE (Hình 4) cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa mẫu protein BSA trước và sau khi xử lý bằng sắc ký lọc gel. Ở mẫu chưa xử lý, băng protein gần như không xuất hiện, chứng tỏ sự ức chế mạnh từ nền mẫu phức tạp. Ngược lại, mẫu sau khi qua cột lọc gel Sephadex G-25 xuất hiện một băng sắc nét ở vị trí 66-67 kDa, tương ứng với BSA chuẩn. Điều này khẳng định phương pháp lọc gel đã loại bỏ hiệu quả muối và các chất gây nhiễu, đồng thời làm giàu protein, tạo điều kiện tối ưu cho phân tích điện di. Kết quả này nhấn mạnh tầm quan trọng của bước tiền xử lý mẫu bằng sắc ký lọc gel để thu được kết quả phân tích chính xác và đáng tin cậy.

Kết quả đánh giá hiệu suất thu hồi protein BSA bằng sắc ký lọc gel (Bảng 2) cho thấy hiệu suất đạt 96,5-97,2% ở cả ba nồng độ khảo sát (30-60-120 mg/L), được đánh giá là cao theo thang đánh giá (>95%). Hiệu suất thu hồi gần 100% này chứng tỏ phương pháp sắc ký lọc gel sử dụng cột Sephadex G-25 với các điều kiện tối ưu có hiệu quả rất tốt trong việc thu hồi protein [2-4]. Sự hao hụt khoảng 3% là phù hợp với thực tế phòng thí nghiệm, có thể do các nguyên nhân như: hấp phụ không đặc hiệu lên bề mặt cột, tổn thất trong quá trình thu mẫu phân đoạn, hoặc sai số trong định lượng nitơ tổng số, khẳng định độ tin cậy của phương pháp cho mục đích tách chiết và định lượng protein từ các dung dịch phức tạp.

Trên cơ sở các kết quả khảo sát toàn diện, bộ thông số tối ưu cho quy trình tách và làm sạch protein từ dung dịch thực nghiệm bằng sắc ký lọc gel đã được xác định như sau: Cột sephadex G-25, kích thước 2,6 x 10 cm; Hệ đệm: Phosphate 150 mM, pH 7.0; Tốc độ dòng: 3 mL/phút; Thể tích tiêm mẫu: 2 mL.

4.2. Xây dựng đường chuẩn và định lượng protein trong dung dịch ngâm mẫu thực nghiệm

Đường chuẩn định lượng protein bằng sắc ký lọc gel được thiết lập thành công với các mẫu chuẩn BSA (30-120 mg/L). Thời gian lưu ổn định (~5,5 phút) và sự tách biệt rõ ràng giữa peak protein và peak

muối, chứng minh hiệu quả của cột Sephadex G-25 trong việc loại bỏ muối khỏi mẫu. Đường chuẩn đạt tương quan tuyến tính cao ($y = 0.1466x - 0.5573$; $R^2 = 0.9998$), khẳng định độ chính xác và tin cậy của phương pháp, khắc phục hạn chế của phân tích trực tiếp, cung cấp dữ liệu định lượng chính xác cho mẫu phức tạp và có giá trị cao trong kiểm soát chất lượng cũng như đánh giá hiệu quả thực nghiệm.

5. KẾT LUẬN

Đã xây dựng thành công quy trình đồng bộ để tách chiết và định lượng protein từ các mẫu DDBQ. Quy trình tối ưu sử dụng cột Sephadex G-25 với các thông số: đệm phosphate 150 mM (pH 7), tốc độ dòng 3 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 2 mL, cho phép tách loại hoàn toàn muối và thu hồi protein với hiệu suất >95%. Phương pháp sắc ký lọc gel được phát triển có độ tin cậy cao với đường chuẩn có hệ số tương quan $R^2 = 0,9998$, thể hiện mối quan hệ tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích peak và nồng độ protein. Ứng dụng phương pháp này trên các mẫu thực nghiệm đã cho phép xác định chính xác sự khác biệt về hàm lượng protein giữa các loại mẫu. Quy trình hoàn chỉnh từ tách chiết, làm sạch đến định lượng này có giá trị ứng dụng cao trong kiểm soát chất lượng và phân tích protein trong các mẫu DDBQ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Phương Vũ, Dương Hữu Thái, Lâm Thị Huế... và cộng sự (2024) ứng dụng kỹ thuật sắc ký trao đổi ion vào quy trình tinh chế để tăng độ sạch của huyết thanh kháng đại. *Journal of control vaccines and biologicals*.4 (2).
- [2] Janson J.-C. (2011) Protein purification: principles, high resolution methods, and applications, John Wiley & Sons.
- [3] Walker J. M. (2005) The proteomics protocols handbook, Springer.
- [4] Jornitz M. W. (2019) Filtration and purification in the biopharmaceutical industry, CRC Press.