

技术介绍

非盐依赖层析的研究与应用*

韩凌 胡洪波** 彭华松 张雪洪

(上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

摘要 在非盐依赖层析操作中, 吸附介质的成分、结构、密度等性质得到改进, 所以料液离子强度的变化不会明显影响吸附. 与常用的离子交换层析、疏水层析、亲疏层析等方法相比, 该类技术能够降低对料液预处理的要求, 提高蛋白质的稳定性, 同时简化层析操作、降低纯化成本, 具有大规模分离纯化蛋白质的潜力. 近年来开发的多种非盐依赖层析介质与方法, 都已在蛋白质纯化中得到应用.

关键词 层析, 非盐依赖, 混合模式, 疏水电荷诱导, 配基
学科分类号 O658.1

近年来, 随着生物技术的发展, 人们利用基因工程技术生产出许多与人类健康密切相关的重组蛋白, 同时对这些蛋白质的分离纯化技术提出了更高的要求. 在蛋白质生产的总成本中, 分离纯化的费用占 70%~80%. 如何经济而高效地从各种原料液中收获蛋白质, 便成为大规模分离纯化设计的关键.

层析是分离纯化蛋白质的主要方法. 在层析操作中, 通常对料液的离子强度有一定的要求. 如蛋白质 A (protein A) 亲和层析对抗体的选择性高, 但层析需要添加相应的盐, 而且清洗困难, 价格昂贵, 使用次数有限. 离子交换层析介质吸附蛋白质时要求在较低的离子强度(通常为 20~50 mmol/L 缓冲液)下进行, 因此, 料液一般需要预先脱盐或稀释, 这样会增加操作步骤和时间, 影响生产能力; 相反, 疏水层析和亲疏层析介质都需要高离子强度来推动吸附, 分离时常需添加相应的盐. 这不仅会增加成本, 而且加入的盐有可能破坏目标蛋白的稳定, 干扰后继的分离工序. 如果能够降低料液中离子强度对分离过程的影响, 就能降低对料液预处理的要求, 进而减少操作步骤, 缩短工时, 减少原料成本和操作成本.

非盐依赖层析 (salt-independent chromatography, SIC) 是在传统层析的基础上, 通过改进吸附介质的成分、结构、密度等多种手段, 来降低料液中离子强度对吸附过程的影响, 提高分离效率、减少分离成本, 因此具有广阔的应用前景. 目前人们已经开发了多种非盐依赖层析介质和方法, 可以归纳为以

下几种.

1 基于亲和层析的 SIC 介质

亲和层析中, 目标蛋白通过生物亲和作用吸附在固定相上. 静电引力在亲和作用中占有重要地位, 通常提高离子强度会减弱或破坏亲和作用. 所以非盐依赖层析在亲和层析中的应用具有现实意义, 根据亲和配基的类型可归纳如下:

1.1 肽配基

Ameskamp 等^[1]设计了一种短肽配基, 它兼具蛋白质 A 的选择性和离子交换剂的化学稳定性. 他们将六肽组合库 (combinatorial libraries of hexapeptides) 中筛选到的序列作为配基, 利用膨胀床 (expanded bed) 中的亲和层析从杂交瘤细胞培养液中收获单抗. 在肽段筛选时, 根据原料液的实际情况设定结合参数, 所以上样前不用调节料液的 pH 和离子强度. 纯化结果好, 重现性高. 目标蛋白质回收率在 96.5%~98.2% 之间. 这一方法的使用, 能有效克服膨胀床离子交换吸附中, 低离子强度下目标蛋白与细胞碎片之间的相互作用^[2].

1.2 仿生染料配基

染料配基具有成本低、容易固定化、耐生化降解、结合容量大等优点, 但吸附蛋白质时通常要求

*上海交通大学青年教师基金资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 021-54743341, Email: hbhu@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2004-08-11, 接受日期: 2004-09-28

较低的离子强度, 并常伴有杂蛋白吸附. 仿生染料配基 (biomimetic dye) 是改进后的新型配基, 能够模拟生物亲和作用.

Clonis 等^[9]利用生物计算机提供了一套设计仿生染料配基的方法. 该配基不仅保留了商业纺织染料的优点, 而且选择性、耐盐能力及碱稳定性增加, 降低了层析对离子强度的要求. 计算机根据蛋白质的三维结构、靶蛋白的氨基酸序列设计配基. 在胰岛素、尿激酶、激肽释放酶、碱性磷酸酶、苹果酸脱氢酶、甲酸脱氢酶、草酰乙酸脱羧酶、乳酸脱氢酶的纯化中, 该配基的应用很成功.

1.3 金属离子配基

以金属离子为配基的亲和层析, 一般称为固定化金属离子亲和层析 (immobilized metal affinity chromatography, IMAC), 该配基对盐有一定的耐受能力. Jorge 等^[9]使用镍-次氨基三乙酸盐琼脂糖 (Ni-NTA) 从细菌的裂解液中直接吸附重组的包膜蛋白, 不用预先调节盐浓度与 pH 值. 当缓冲液中含有 250 mmol/L 的咪唑时, 蛋白质即可被洗脱. 如果目标蛋白带有 His 残基, 能够提高 IMAC 的选择性. Clemmitt 等^[9]利用 IMAC 的膨胀床方法, 从未澄清的 *E.coli* 匀浆中纯化带有 His 残基的谷胱甘肽 S- 转移酶 [GST-(His)₆], 动态吸附容量高, 特异性相互作用不受 *E.coli* 细胞存在的影响, 螯合剂与蛋白质之间的相互作用对高离子强度不敏感.

2 基于亲硫层析的 SIC 介质

亲硫层析 (thiophilic chromatography) 依靠活化琼脂糖上的砒-硫醚基团对蛋白质表面特定位点进行特异性吸附, 分离具有得率高、纯度高的优点. 亲硫层析中使用的是 T 凝胶 (thiophilic gels), 在分离抗体时, 需要向结合缓冲液中添加盐 (如硫酸钠或硫酸铵). 如果能够开发在低离子强度下选择性结合抗体的 T 凝胶, 使用低盐缓冲系统即可处理大量料液. 近年来亲硫配基的设计趋势是用芳香环^[9]等杂环结构取代直链的亲硫配基, 在生理条件下能吸附抗体, 不用再添加盐, 每毫升吸附剂对抗体的结合能力从毫克级提高到几十毫克.

Scholz 等^[7]将 3-(2- 巯基乙醇) 喹啉啉 -2, 4 (1 氢, 3 氢) 二酮 (MECH) 偶联到聚乙烯砒活化的琼脂糖上, 可以从不同料液中收获抗体. 这种新型介质能在低离子强度下结合抗体, 抗体在碱性条件下即可被完整地洗脱下来. 他们还报道了其他带有巯基杂环的亲硫配基, 能够以非盐依赖途径结合人血

清蛋白^[8]. 如 2- 巯基吡啶衍生物, 即使没有高浓度硫酸钠存在, 对抗体和 α_2 - 巨球蛋白也能进行基因选择性结合. Coffinier 等^[9]将巯基杂环类配基连接在乙烯-乙醇共聚物 (PEVA) 膜上, 对 IgG 进行非盐依赖的亲硫层析. 配基含有的杂环包括吡啶、咪唑、嘌呤和嘧啶环. 这些结构对 IgG 具有不依赖于盐浓度的亲和吸附能力, 能够从 IgG 的纯溶液、IgG 与白蛋白的混合溶液及人血浆中吸附 IgG. Girot 等^[10]设计的一种新型配基为 2- 巯基 -5- 苯丙咪唑磺酸 (MBISA), pH 为 5.2~5.5 时能够从粗料液中直接特异性吸附抗体, 不用预先稀释或添加盐. 增加 pH 值至 8.5~9.5 即可洗脱抗体. 每毫升树脂能够结合抗体 25~30 mg, 抗体最终纯度与料液来源有关. 从小鼠腹水中分离单抗 IgG₁, 纯度达到 85%; 从含 10% 胎牛血清的鼠杂交瘤培养液中分离抗体, 纯度可达 90%; 从人血浆的孔恩级分 (Cohn fraction) II + III 中分离多抗, 纯度也能达到 90%. 由于配基上具有磺酸基团, 排斥白蛋白的共吸附, 并且该配基便于规模化.

3 基于离子交换层析的 SIC 介质

离子交换层析的作用基础是静电相互作用, 所以需要在较低的离子强度下操作, 多数料液上样前需要脱盐或稀释. 使用高电荷密度的离子交换介质, 可以直接收获抗体, 免去脱盐、稀释等预处理.

Necina 等^[11]在无机大孔介质中填充弹性凝胶, 制备了高密度阳离子交换剂 CM-HyperD. 不论是否存在高离子强度, 都可以从杂交瘤细胞的澄清液中收获抗体. 高电荷密度的离子交换介质动态吸附容量高, 生理盐浓度下可以结合大量抗体. Hjorth^[12]新开发了一种用于膨胀床层析的阳离子交换剂, 其主体为羧基基团, 带有芳香族或脂肪族侧链. 羧基为离子交换基团, 而侧链耐盐. 这种交换剂是多功能配基, 一般电导下 (15~30 ms/cm), 料液无需稀释就能上样. 增加离子强度或改变 pH 就可将蛋白质洗脱下来. Ameskamp 等^[13]在膨胀床吸附中使用了一种离子交换介质 Streamline SP XL, 带有硫烷基, 与其前体 SP 相比配基密度增加, 可耐受较高的离子强度. 该介质被应用于鼠 IgG₁ 的大规模纯化, 料液为未经稀释与澄清的杂交瘤细胞培养液. Johansson 等^[14]从多功能配基库中筛选出来的离子交换配基也具有羧基及芳香环结构, 能够从高电导 (>30 ms/cm) 的溶液中吸附人 IgG 及其他蛋白质. 改变芳香环的相对位置, 能够改善高盐条件下吸附剂

的吸附能力. α 碳原子上连有氨基也利于高盐浓度下蛋白质的吸附.

4 混合层析

通常层析操作是通过特定的作用吸附蛋白质, 通过削弱或破坏这种作用而洗脱蛋白质. 混合层析 (mixed mode chromatography) 则是将多种作用方式进行组合, 即在吸附和洗脱过程中使用不同的机制, 如通过疏水作用吸附蛋白质, 通过离子交换作用进行洗脱. 混合层析操作的灵活性高, 并且常使用高密度配基, 能够耐受一定的离子强度^[15].

Burton 等^[16]用混合层析一步纯化凝乳酶. 可以使用琼脂糖和 Perloza 纤维素珠, 利用各种化学法制备层析介质. 介质同时含有疏水 (脂肪族或芳香族) 和离子 (羧酸盐或烷基胺) 基团. 使用高密度配基可获得高吸附容量. 无论离子强度高, 凝乳酶都能被吸附, 减少了对样本的预处理要求. Perloza 羧酸盐介质容量更高、更廉价, 洗脱和再生特性更为优越, 并可在高流速下操作, 所以适合大规模应用. Takahashi 等^[17]采用混合层析从人尿中纯化尿激酶, 基质兼具疏水位点和尿激酶的亲和位点, 能够提高尿激酶的分辩率. Hamilton 等^[18]利用混合层析从微生物培养液中回收胞外蛋白酶, 吸附剂包含疏水和离子基团, 不用像离子交换层析那样预先调节发酵液的 pH, 所以产率和酶活性有所增加. pH 从 4.5 变化到 2.6 时跨过蛋白酶的等电点, 由于静电排斥, 酶被洗脱.

5 疏水电荷诱导层析

疏水电荷诱导层析 (hydrophobic charge induction chromatography, HCIC), 是 20 世纪 90 年代末由 Burton 和 Harding^[19]提出的一种新型分离技术. HCIC 通过疏水作用吸附蛋白质, 当流动相 pH 降低时, 配基与被吸附的蛋白质带有相同电荷, 由于静电排斥作用发生解吸. 蛋白质的结合几乎发生在一种中性的环境中, 不会随离子强度而变化.

HCIC 常用配基为 4- 巯基 - 乙基吡啶 (MEP)^[19~21, 24, 25], pK 值为 4.8. 蛋白质的吸附与洗脱都可以在 pH 值 5~9 的范围内进行, 条件温和. 目前主要有两种常用的 MEP 替代品^[19], 4- 氨基吡啶 (AMP) 和巯基甲基咪唑 (MIM), pKa 值分别为 4.0 与 5.3. 配基密度范围为 70~125 mol/L, 高于标准的疏水介质. 配基密度较低时, 一般需要加入 (NH₄)₂SO₄ 推动吸附; 配基密度较高时^[19], 许多目

标产物, 如凝乳酶、胰凝乳蛋白酶原、溶菌酶的吸附与离子强度无关.

HCIC 效率高, 处理量大, 选择性较强. 目前已开发了多种商业化的 HCIC 吸附剂. MEP Perloza^[22]是将 MEP 连接在纤维素珠上所得到的吸附剂, 可以从粗料液中迅速筛选抗体及其片段, 层析前后的脱盐要求减少. Life Technologies 公司生产的 MEP HyperCel 吸附剂^[23, 24], 结合容量达到 30~35 mg/L, 得到的抗体纯度大于 90%, 适合于工业生产. HCIC 技术在抗体纯化中的应用也十分广泛. 很多无法用盐梯度法从离子化基质上解析的蛋白质, 可以通过微小的 pH 变化加以回收^[19]. Guerrier 等^[23]利用 HCIC 从腹水、含 5% 胎牛血清的细胞培养上清、不含蛋白质的细胞培养上清中收获 IgG, 纯度分别约为 83%、76% 和 99%. Guerrier 等^[24]还利用 HCIC 从转基因乳汁中分离人类 IgG₁, 纯度高于 95%, 同时 MVM 病毒和 DNA 含量显著减少. 他们还提出 HCIC 从大容量、高度稀释的料液 (~500CVs) 中收获抗体时也非常有效. Weatherly 等^[25]利用 HCIC, 初步纯化巴氏毕赤酵母细胞内产生的两种不同血清类型的重组肉毒杆菌神经毒素重链 [rBoNT(H_c)], 获得的产物稳定性良好. 在青霉素生产过程中需要用到青霉素酰化酶, 通常该酶的纯化采用亲和层析, 所用配基价格昂贵, Coulon 等^[26]使用 HCIC 纯化该酶, 降低了纯化成本, 回收率达到 90%, 纯化倍数为 4.5 倍. Willems 等^[27]在优化抗体纯化策略时, 将蛋白质 L、羟磷灰石、IMAC、离子交换、HCIC 等技术进行了比较, 发现利用 MEP HyperCel 介质从细胞培养上清中纯化抗体片段, 回收率大于 90%, 杂蛋白去除效果好, 他们认为, HCIC 适用于高度纯化细菌表达的 scFv, 能够有效去除细菌中杂蛋白.

HCIC 技术具有大规模制备高纯度、高效力抗体的潜力, 应用前景广阔. 目前 HCIC 大多数应用于抗体及其片段的分离纯化, 可以通过对现有配基的修饰, 或开发新型配基, 将该技术应用于其他重组蛋白的分离纯化.

6 展 望

在生物制药中, 酶和抗体充当了重要角色, 尤其是单克隆抗体. 近年来基于抗体的治疗诊断, 使得对这类产品的需求呈指数增长. 如何经济而高效地直接从粗料液中捕获单克隆抗体, 是这些生物分子大规模纯化设计中的关键因素. 应用各种层析方

法时, 对料液成分的调节包括稀释、调节 pH、添加盐等, 都会增加操作成本. 而非盐依赖层析技术在抗体的分离纯化中具有很大优势. 这类方法不仅能够近生理条件下从未加工的料液中直接分离抗体、无需调节料液的离子强度, 而且配基对目标产物的选择性高、吸附容量大, 其应用将越来越广泛.

非盐依赖层析的关键在于层析介质, 所以配基的设计开发是主要的研究方向. 在配基的设计过程中, 提高疏水性、改变硫原子在杂环上的相对位置, 或者用其他更复杂的杂环取代常用的吡啶环, 都有可能提高对抗体及相关蛋白质的特异性识别能力. 如果能够确定整个配基与抗体片段的作用机制, 与这些片段融合的蛋白质也可以达到相近程度的纯化. 由于抗体对酸性条件下的洗脱敏感, 可以设计新配基, 使抗体在 pH 增加的时候被洗脱下来. 建立组合筛选库, 并引入生物计算机的辅助也是一大趋势, 能够高效、准确、有针对性地筛选适宜的配基. 根据目前生物制药领域的研究趋势, 料液多来源于转基因乳汁、转基因植物抽提液, 这类料液成分比较复杂, 当料液中的杂质干扰抗体的吸附, 或发生共吸附时, 应根据原料液和表达系统的性质制定相应的策略.

参 考 文 献

- Ameskamp N, Frank R, Sewald N. Optimization of the EBA performance by the use of a robust high specific peptide ligand. The 4th International Conference on Expanded Bed Adsorption, Florida, 2002
- Fernandez-Lahore H M, Geilenkirchen S, Boldt K. The influence of cell adsorbent interactions on protein adsorption in expanded beds. J Chromatogr A, 2000, **873**: 195~208
- Clonis Y D, Labrou N E, Kotsira V Ph. Biomimetic dyes as affinity chromatography tools in enzyme purification. J Chromatogr A, 2000, **89**: 33~44
- Jorge R V, Rosa M. Isolation of putative dengue virus receptor molecules by affinity chromatography using a recombinant E protein ligand. J Virol Methods, 2004, **116**: 95~102
- Clemmitt R H, Chase H A. Facilitated downstream processing of a histidine-tagged protein from unclarified *E.coli* homogenates using immobilized metal affinity expanded-bed adsorption. Biotechnol Bioeng, 2000, **67**: 206~216
- Boschetti E. The use of thiophilic chromatography for antibody purification: a review. Biophys Methods, 2001, **49**: 361~389
- Scholz G H, Vieweg S, Leistner S. A simplified procedure for the isolation of immunoglobulins from human serum using a novel type of thiophilic gel at low salt concentration. J Immunol Methods, 1998, **219**: 109~118
- Scholz G H, Wippich P, Leistner S. Salt-independent binding of antibodies from human serum to thiophilic heterocyclic ligands. J Chromatogr B, 1998, **709**: 189~196
- Coffinier Y, Vijayalakshmi M A. Mercaptoheterocyclic ligands grafted on a poly (ethylene vinyl alcohol) membrane for the purification of immunoglobulin G in a salt independent thiophilic chromatography. J Chromatogr B, 2004, **808**: 51~56
- Giroit P, Averty E, Flayeux I. 2-Mercapto-5-benzimidazolesulfonic acid: an effective multimodal ligand for the separation of antibodies. J Chromatogr B, 2004, **808**: 25~33
- Necina R, Amatschek K, Jungbauer A. Capture of human monoclonal antibodies from cell culture supernatant by ion exchange media exhibiting high charge density. Biotechnol Bioeng, 1998, **60**: 689~698
- Hjorth R. Design of expanded bed adsorbents towards perfection. The 4th International Conference on Expanded Bed Adsorption, Florida, 2002
- Ameskamp N, Priesner C, Lehmann J. Pilot scale recovery of monoclonal antibodies by expanded bed ion exchange adsorption. Bioseparation, 1999, **8**: 169~188
- Johansson B L, Belew M, Eriksson S. Preparation and characterization of prototypes for multi-modal separation aimed for capture of positively charged biomolecules at high-salt conditions. J Chromatogr A, 2003, **1016**: 35~49
- Burton S C, Haggarty N W. High-density ligand attachment to brominated allyl matrices and application to mixed mode chromatography of chymosin. J Chromatogr A, 1997, **775**: 39~50
- Burton S C, Haggarty N W, Harding D R K. One step purification of chymosin by mixed mode chromatography. Biotechnol Bioeng, 1997, **56**: 45~55
- Takahashi R, Akiba K, Koike M. Affinity chromatography for purification of two urokinases from human urine. J Chromatogr B, 2000, **742**: 71~78
- Hamilton G E, Luechau F, Burton S C. Development of a mixed mode adsorption process for the direct product sequestration of an extracellular protease from microbial batch cultures. J Biotechnol, 2000, **79**: 103~115
- Burton S C, Harding D R K. Affinity chromatography for purification of two urokinases from human urine. J Chromatogr A, 1998, **814**: 71~81
- Boschetti E. Antibody separation by HCIC. Trends in Biotechnology, 2002, **20**: 333~337
- Schwartz W, Judd D, Wysocki M. Comparison of hydrophobic charge induction chromatography with affinity chromatography on protein A for harvest and purification of antibodies. J Chromatogr A, 2001, **908**: 251~263
- Guerrier L, Flayeux I, Boschetti E. A dual-mode approach to the selective separation of antibodies and their fragments. J Chromatogr B, 2001, **755**: 37~46
- Voute N, Guerrier L, Santambien P. Specific capture of antibodies using hydrophobic charge induction chromatography (MEP HyperCel). The 20th International Symposium on the Separation

- and Analysis of Proteins, Peptides, and Polynucleotides. Ljubljana, 2000
- 24 Guerrier L, Giroto P, Schwartz W. New method for the selective capture of antibodies under physiological conditions. *Bioseparation*, 2000, **9**: 211~221
- 25 Weatherly G T, Bouvier A. Initial purification of recombinant botulinum neurotoxin fragments for pharmaceutical production using hydrophobic charge induction chromatography. *J Chromatogr B*, 2002, **952**: 99~110
- 26 Coulon D, Cabanne C, Fitton V. Penicillin acylase purification with the aid of hydrophobic charge induction chromatography. *J Chromatogr B*, 2004, **808**: 111~115
- 27 Willems A, Leoen J, Schoonooghe S. Optimizing expression and purification from cell culture medium of trispecific recombinant antibody derivatives. *J Chromatogr B*, 2003, **786**: 161~176

The Development and Application of Salt-independent Chromatography*

HAN Ling, HU Hong-Bo**, PENG Hua-Song, ZHANG Xue-Hong

(College of Life Science & Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract In the salt-independent chromatography, the component, structure, density and some other characteristics of the adsorption media are improved, so the variations of feedstock ion strength have no significant effect on adsorption. The great advantage of the salt-independent is absent in the traditional chromatography methods such as the ion-exchange chromatography, the thiophilic chromatography and the hydrophobic chromatography. This kind of technologies can lower the demands on preparation of the crude feedstock, therefore the steps of desalting, diluting or adding the extra salts could be bypassed. It simplifies the process and makes it more economical, so it is compatible with large scale requirements of the separation of the proteins, especially the enzyme and the antibody. The recent development of the new ligands and methods on salt-independent chromatography are summarized.

Key words chromatography, salt-independent, mixed-mode, hydrophobic charge induction chromatography (HCIC), ligand

*This work was supported by The Excellent Young Teacher Fund of Shanghai Jiaotong University.

**Corresponding author . Tel: 86-21-54743341, E-mail: hbhu@sjtu.edu.cn

Received: August 11, 2004 Accepted: September 28, 2004