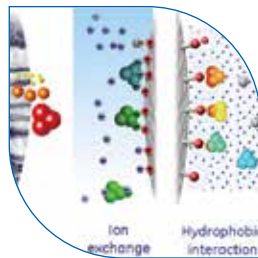
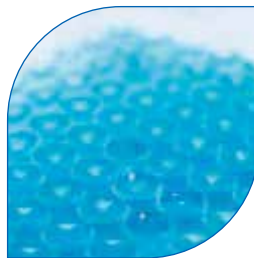




层析介质应用手册

GE医疗生命科学部填料应用部



目录

抗体纯化中的平台技术	3
抗体片段的纯化平台	9
亲和层析法纯化凝血因子	14
病毒类疫苗的纯化	17
多糖疫苗的纯化	21
百白破三联疫苗的纯化	23
层析法纯化血浆蛋白	26
重组细胞因子的纯化	30
多肽的纯化	33
病毒载体的纯化	37
质粒 DNA 的纯化	39
寡核苷酸的纯化	41
标签蛋白的纯化	42
蛋白复合物的纯化	45
膜蛋白的纯化	48
层析法包涵体复性	50
TCM 的纯化	53
低分子肝素的纯化	56
PEG 修饰蛋白的纯化	57
层析技术在糖肽类抗生素中的应用	60

合编者：GEHC LS Media Modality And Application Team

抗体纯化中的平台技术

简介

抗体是一大类能与抗原产生特异性结合的蛋白，抗体也叫免疫球蛋白（Ig）是体液免疫的重要效应分子，介导 B 细胞接受抗原刺激后增殖分化为浆细胞所产生的糖蛋白。抗体的应用有：

- 治疗性应用：癌症治疗 / 免疫性疾病治疗
- 诊断应用：体内诊断 / 体外诊断 / 检测试剂
- 分析应用：酶联免疫分析 / 抗体芯片
- 结构功能研究：蛋白的结构与功能，抗体结构与功能

Ig 是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过二硫键连接而成的 4 肽链分子，称为 Ig 的基本结构。根据重链 C 区氨基酸组成及顺序不同，将重链分为： γ 、 α 、 μ 、 δ 、 ϵ 。根据重链组成不同，将 Ig 分为五类：IgG、IgA、IgM、IgD、IgE。轻链区可以分为 kappa 轻链和 Lambda 轻链两种类型。可变区指轻链和重链中氨基酸序列变化较大的区域（V 区）。V 区位于 Ig 分子的 N 端，占轻链的 1/2 和重链的 1/4 或 1/5。这种变异决定了抗体与抗原结合的特异性。恒定区是指免疫球蛋白轻链和重链中氨基酸序列较保守的区域（C 区）。C 区位于 Ig 分子的 C 端，占轻链的 1/2 和重链的 3/4 或 4/5；小分子抗体片段，因为缺乏 Fc 片段仍保留着轻链及可变区，能特异性靶向结合目标分子，易于用原核系统进行表达。由于它们的分子量小，更容易的组织渗透而适合很多诊断及治疗应用。

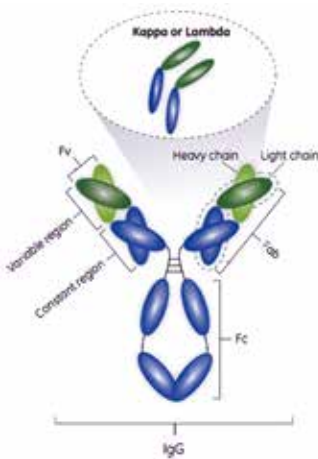


图 1. 抗体的基本结构。

单克隆抗体（单抗）是继疫苗、重组蛋白后最重要的一类生物技术产品，是 21 世纪生物技术和生物医药产业领域的战略制高点，因为单抗药物已成功应用于治疗肿瘤、自身免疫性疾病、感染性疾病和移植排斥反应等。单抗技术经过 35 年的发展，历经鼠源性、嵌合、人源化和全人源单抗四个阶段。人源单抗是单抗药物未来的发展方向，同时，双特性抗体、抗体片段及抗体偶联药物（Antibody-Drug Conjugates, ADCs）也是近年来热点的研究领域，尤其是 ADCs 已经超过双特性抗体、抗体片段等类别，成为肿瘤治疗用单抗的研究热点与发展方向。

目前全抗或者是 Fc 融合蛋白的纯化已经形成平台化技术，能更快捷的开发工艺，稳定性更好，有效性经济性都大幅度提升，以满足日益增长的需求和上游高表达的通量需求。

一、IgG 的亲纯化

来源于金黄色葡萄球菌的 Protein A 能特异的与 IgG 的 Fc 片段结合；来源于链球菌的 Protein G 能特异的与 IgG 的 Fc 片段和 Fab 片段结合。不同种属来源的抗体对 Protein A 和 Protein G 有不同亲和力（表 1）。

表 1. Protein A 和 Protein G 对抗体的结合力差异。

种属	Protein G	Protein A
人		
IgG ₁	++	++
IgG ₂	++	++
IgG ₃	++	-
IgG ₄	++	++
兔	++	++
母牛	++	+
马	++	-
山羊	++	+
豚鼠	+	++
绵羊	++	-
狗	+	++
猪	++	++
小鼠	+	-
大鼠	+	+
鸡	-	-

新一代高流速高动态载量的抗体亲和家族

MabSelect 系列抗体亲和填料，用高流速的刚性骨架偶联 Protein A 配基或者耐碱的改构 Protein A (SuRe) 配基，具有更好的化学耐受性和使用寿命，并带来极高的通量，其中 MabSelect SuRe LX 填料具有不低于 60mg/ml 的载量 (表 2)。

表 2. 不同种类 MabSelect 填料的性质。

	载量 (IgG)	CIP	配基
MabSelect	30mg/ml	100 mM 1- 硫化甘油 +15 mM NaOH	重组蛋白 A
MabSelect Xtra	40mg/ml	100 mM 1- 硫化甘油 +15 mM NaOH	重组蛋白 A
MabSelect Sure	30mg/ml	0.1 to 0.5 M NaOH	耐碱改构蛋白 A
MabSelect Sure LX	60mg/ml	0.1 to 0.5 M NaOH	耐碱改构蛋白 A

柱子: HiTrap™ MabSelect Sure, 1 ml
 样品: 来源于小鼠腹水的鼠 IgG₁
 结合缓冲液: 20mM Sodium Phosphate 2.5MNaCl pH 8.0
 洗脱缓冲液: 0.1M Sodium Citrate pH 4.5

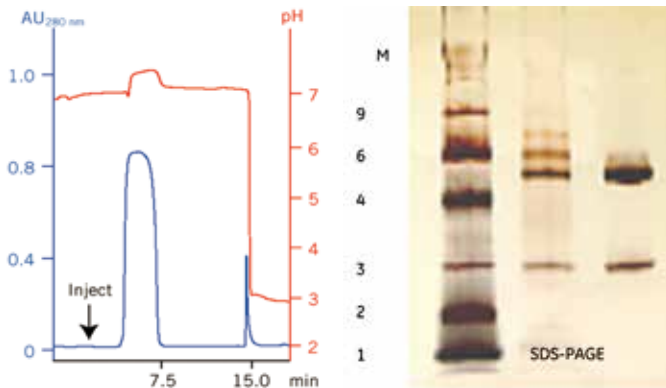


图 2. 用 Hitrap MabSelect SuRe 纯化鼠的 IgG₁，一步可以达到 95% 以上的纯度。载量 30mg/ml。

样品: 澄清的细胞培养上清，人单抗
 层析柱: HiTrap™ MabSelect SuRe™ 1 ml
 结合缓冲液: 20 mM 磷酸钠, 0.15 M NaCl, pH 7.4
 洗脱缓冲液: 0.1 M 甘氨酸 - HCl, pH 3.5

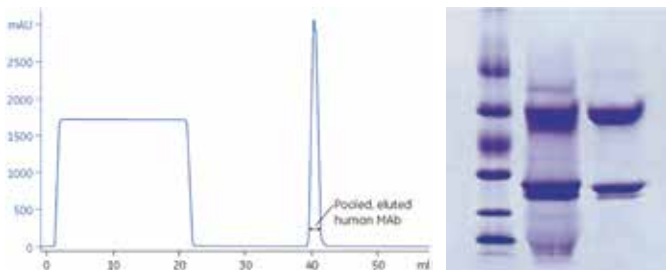


图 3. 用 MabSelect SuRe 进行人源化单抗的纯化，洗脱更加温和，纯度 >98%，回收率 >95%。动态载量 > 30mg/ml。

耐碱改构的蛋白 A 称为 SuRe 配基，该配基蛋白可以耐受 0.5M NaOH 的清洗，通过显著延长填料的寿命而降低生产成本；SuRe 配基对蛋白酶稳定性更好，脱落低、洗脱 pH 更加温和 (图 2-3)。

MabSelect SuRe LX 与 MabSelect SuRe 具有相同的配基，它承袭了 Mabselct SuRe 的耐碱及高流速的优势，并且在保留时间 6min 的情况下，能达到 60mg/ml 的动态载量，这一特点很好地满足了单抗表达水平不断提高对填料载量的要求 (图 4)。

样品: Mab 来自 CHO 细胞上清
 填料: MabSelect SuRe LX
 柱子: HiScale™ 26, CV=108 ml, 柱高 =20 cm
 结合缓冲液: 20 mM 磷酸钠, 0.5 M NaCl, pH 7.0
 上样量: 50 mg Mab/mL 填料; 保留时间 6min
 洗脱缓冲液: 50 mM 醋酸钠, pH 3.5
 CIP: 3 CV, 0.1 M NaOH, 接触时间 40min

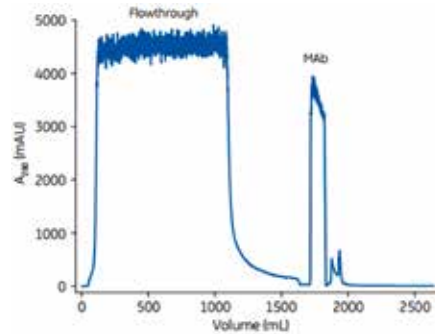


图 4. 用 MabSelect SuRe LX 从 CHO 细胞培养上清捕获 Mab。

二、精细纯化 IgG 的方法

单克隆抗体，作为一类分子具有某些相似的性质，因此可以使用平台技术进行纯化。一般来说，抗体的纯化平台包括一个基于 Protein A 的捕获步骤和 1-2 个精细纯化步骤 (图 5)。

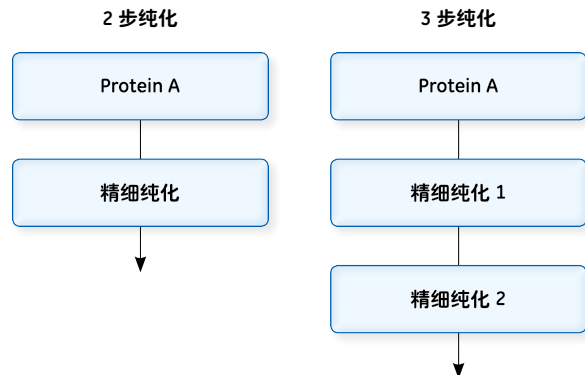


图 5. 单抗纯化的平台技术。

GE 公司在单抗纯化平台中提供的填料都是以高流速琼脂糖为骨架的。在亲和捕获步骤，推荐使用 MabSelect SuRe 或者 MabSelect SuRe LX (图 6)，而在精细纯化阶段，则根据纯化的难易程度不同，有多种填料可供选择(表 3)。

表 3. GE 抗体纯化平台精细纯化阶段可选产品列表。

产品名称	粒径 um	配基
Capto S ImpAct (结合 - 洗脱模式)	50	带负电的磺酸基团和电中性的吡咯烷酮
Capto Q (流穿模式)	90	季胺基团
Capto Adhere ImpRes (结合 - 洗脱模式 或流穿模式)	40	N-benzyl-N-methyl ethanol amine
Capto Adhere (流穿模式)	75	N-benzyl-N-methyl ethanol amine
Capto MMC ImpRes (结合 - 洗脱模式)	40	N-benzoyl homocysteine

一般来说，大部分的单抗都适合用图 6 中的三步法进行纯化。

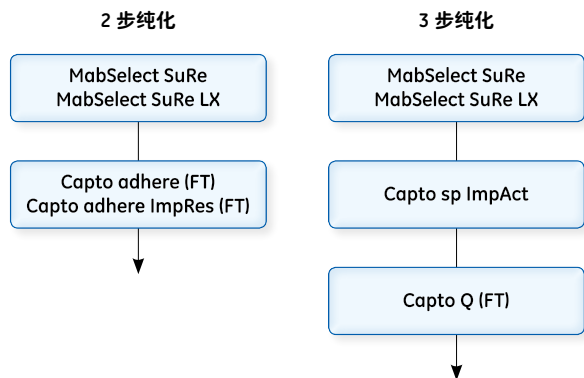


图 6. 适合大部分单抗纯化的经典技术平台。

Capto S ImpAct 是一种为 MAb 精纯步骤设计的强阳离子交换填料，它含有一个多聚体 - 脚手架配基，结合连接有功能基团的表面延伸臂，大大提高了结合能力。同时，该填料在分离抗体单体和杂质方面具有非常好的分辨率，通过洗脱可以有效去除宿主细胞蛋白 (HCP)，渗漏的 protein A 配基，MAb 聚集体，抗体片段以及其他形式的异构体 (图 7 和图 8)

上样: 64 g MAb/mL 填料 (70% 的 Q_{B10})，保留时间 5.4min
 平衡缓冲液: 50 mM 醋酸钠, pH5.3
 洗脱缓冲液: 50 mM 醋酸钠, pH 5.3, 0-350 mM NaCl, 线性梯度 20 CV

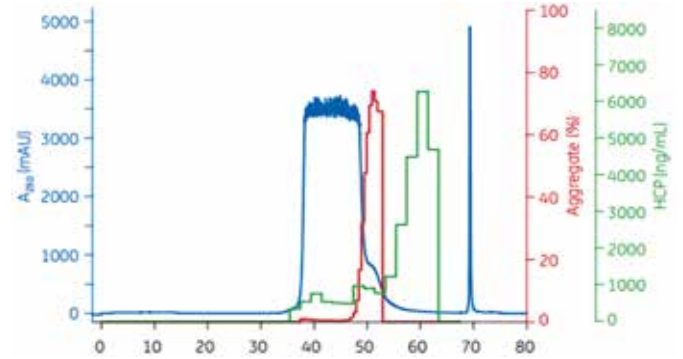


图 7. Capto S ImpAct 对单抗 HCP 和聚集体的去除。

上样: 上样 76 g MAb/mL 填料 (70% 的 Q_{B10})，保留时间 5.4min
 平衡缓冲液: 平衡缓冲液 50 mM 醋酸钠, 50 mM NaCl, pH5.0
 洗脱缓冲液: 洗脱缓冲液 50 mM 醋酸钠, 50-400 mM NaCl, 线性梯度 20 CV

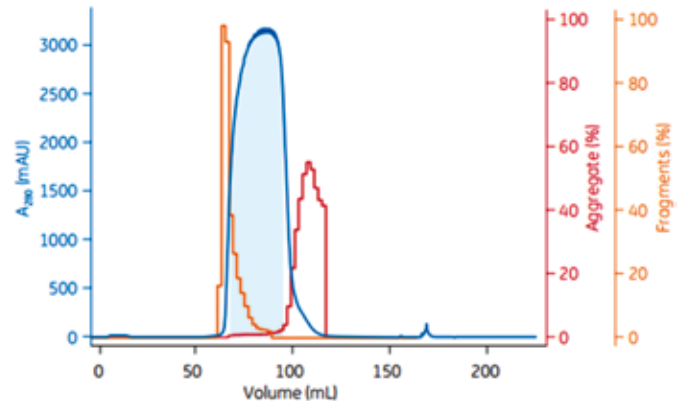


图 8. Capto S ImpAct 对单抗聚集体和讲解片段的去除。

Capto Q 是一种传统的高载量阴离子交换填料，以流穿模式进行抗体的纯化分离。该填料的功能基团为季胺，连接在葡聚糖表面延伸臂上，提高了 DNA，病毒，HCP 和 protein A 的去除能力（图 9）。

平衡： 7 CV, 25 mM 磷酸钠, pH7.5
 上样： 150 mg MAb/ml 填料, 保留时间 2min

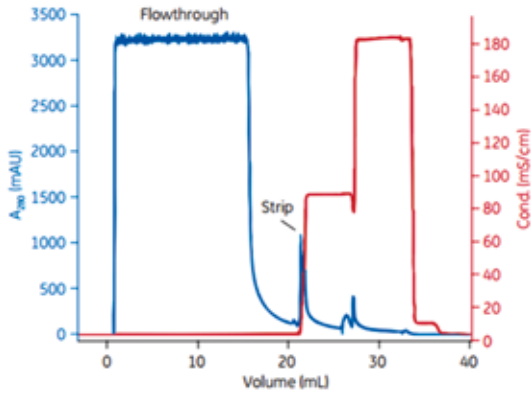


图 9. Capto Q 流穿模式进行单抗的精细纯化。

Capto adhere 及 Capto Adhere ImpRes 都为多模式强阴离子填料，高特异性的 Adhere 配基能一步将内毒素，DNA，聚集体，protein A，HCP 去除，适合流穿模式的抗体精细纯化（图 6）。两款填料的区别在于粒径不同，Capto Adhere 为 75um，Capto Adhere ImpRes 为 40um，因此，Capto Adhere ImpRes 具有更高的分辨率。由于

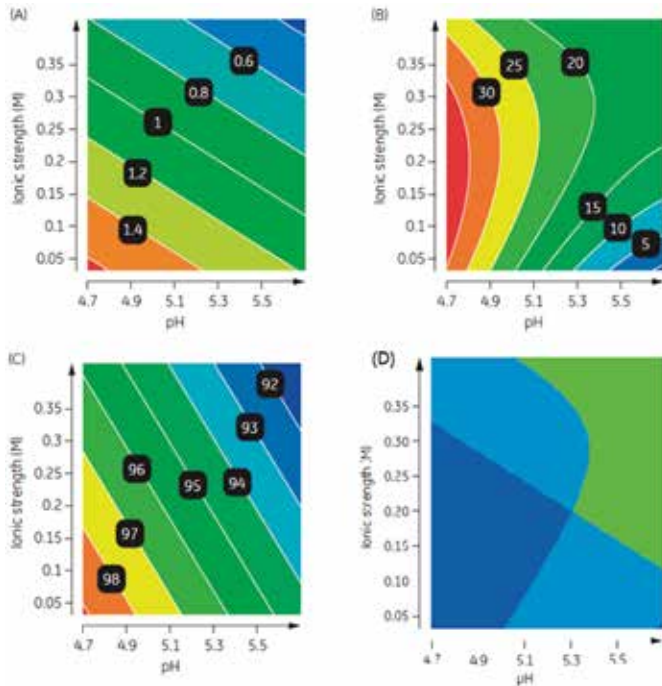


图 10. Capto Adhere 流穿模式层析条件的 DoE 优化 A 聚集体 (%), B HCP(ppm), C 回收率 (%), D 聚集体 <1%, HCP<20ppm, 回收率 >90% 的甜蜜点 (sweet point), 绿色部分。

Adhere 配基的多模式特性，使得层析行为难于预测，推荐使用 DoE 工具进行层析工艺的开发，GE 公司的 ÄKTA avant 设备即内置了 DoE 的功能，图 10 列出了应用 Capto Adhere ImpRes 填料在流穿模式下进行层析优化的 DoE 结果。

不仅如此，Capto adhere ImpRes 还可以在结合 / 洗脱模式 (bind/elute, B/E) 下对抗体进行精细纯化，这个特性特别适合于那些具有中性或者偏酸性等电点的抗体，因为这些抗体无法使用流穿模式进行纯化（图 11），同时，Capto adhere ImpRes 的结合 / 洗脱模式的纯化方法，对抗体片段和异构体的去除特别有很好的效果。因此，对于挑战性的单抗的纯化，可以考虑采用图 12 中的平台技术。

层析柱： Tricorn 5/50
 上样： 30 mg MAb/ml 填料
 A 缓冲液： 25mM 磷酸盐, pH8.0
 B 缓冲液： 25mM 磷酸盐, 25mM 柠檬酸盐, 100mM NaCl, pH4

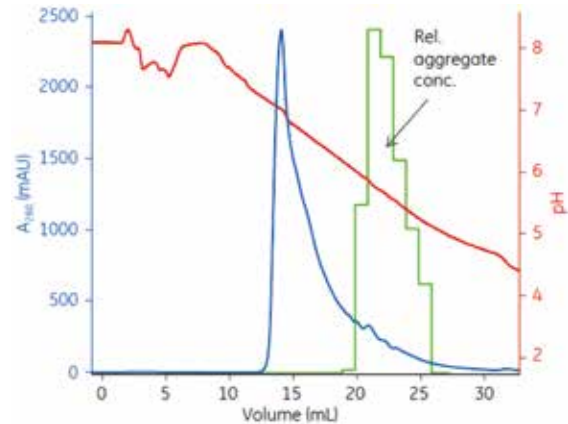


图 11. Capto Adhere ImpRes 结合 - 洗脱模式纯化 Mab。

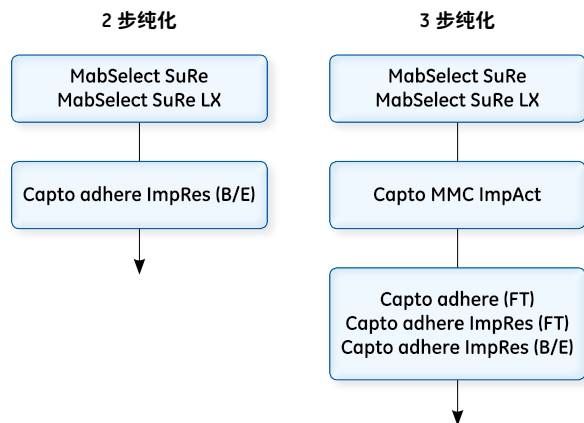


图 12. 挑战性单抗的纯化技术平台。

三、对人血清中所有抗体亚型的纯化

IgSelect 填料专门针对人的所有 IgG 亚型进行共纯化的目的而开发, 包括对 Protein A 没有亲和力的 IgG₃。通过 IgSelect 捕捉人血浆中的 IgG, 对纯化后 IgG 亚型进行鉴定与血浆的比例完全相同。

表 4. IgSelect 与 rproteinA 纯化人 IgG 的亚型对照。

	血浆	IgSelect 纯化	rProtein A 纯化
IgG ₁	62.6%	62.3%	62.9%
IgG ₂	28.4%	28.2%	34.2%
IgG ₃	5.9%	5.9%	0.5%
IgG ₄	3.2%	3.7%	2.5%

四、订货信息

亲和层析类填料

产品	数量	货号
rProtein A Sepharose Fast Flow	5 mL	17-1279-01
rProtein A Sepharose Fast Flow	25 mL	17-1279-02
Protein G Sepharose Fast Flow	5 mL	17-0618-01
Protein G Sepharose Fast Flow	25 mL	17-0618-02
MabSelect	25 mL	17-5199-01
MabSelect Xtra	25 mL	17-5269-07
MabSelect SuRe	25 mL	17-5438-01
MabSelect SuRe LX	25 mL	17-5474-01
IgSelect	25 mL	28-4113-01

亲和层析类预装柱

产品	数量	货号
HiScreen MabSelect SuRe LX	1 × 4.7mL	17-5474-15
HiScreen MabSelect SuRe	1 × 4.7mL	28-9269-77
HiTrap MabSelect SuRe	5 × 5 mL	11-0034-95
HiTrap MabSelect SuRe	5 × 1 mL	11-0034-93
HiScreen MabSelect	1 × 4.7 mL	28-9269-73
HiTrap MabSelect	5 × 1 mL	28-4082-53
HiTrap MabSelect Xtra	5 × 1 mL	28-4082-58
HiTrap MabSelect Xtra	5 × 5 mL	28-4082-61
Hitrap rprotein A FF	5 × 1 mL	17-5080-01
Hitrap rprotein G HP	5 × 1 mL	17-0404-01
HiTrap Protein L	5 × 1 mL	17-5478-51
HiTrap Protein L	1 × 5 mL	17-5478-15
HiTrap Protein L	5 × 5 mL	17-5478-55
HiTrap KappaSelect	5 × 1 mL	17-5458-11
HiTrap IgSelect	5 × 1 mL	28-4113-11
HiTrap IgM Purification	5 × 1 mL	17-5110-01
HiTrap IgY Purification	1 × 5 mL	17-5111-01

离子交换及多模式填料和预装柱

产品	数量	货号
Capto S ImpAct	25 mL	17-3717-01
HiScreen Capto S ImpAct	1 × 4.7 mL	17-3717-47
HiTrap Capto S ImpAct	5 × 1 mL	17-3717-51
Capto Q	25 mL	17-5316-10
HiScreen Capto Q	1 × 4.7 mL	28-9269-78
HiTrap Capto Q	5 × 1 mL	11-0013-02
Capto adhere ImpRes	25 mL	17-3715-01
HiScreen Capto adhere ImpRes	1 × 4.7 mL	17-3715-20
HiTrap Capto adhere ImpRes	5 × 1 mL	17-3715-10
Capto adhere	25 mL	17-5444-10
HiScreen Capto adhere	1 × 4.7 mL	28-9269-81
HiTrap Capto adhere	5 × 1 mL	28-4058-44
Capto SP ImpRes	25 mL	17-5648-10
HiScreen Capto SP ImpRes	1 × 4.7 mL	17-5468-15
HiTrap Capto SP ImpRes	5 × 1 mL	17-5468-51
Capto MMC ImpRes	25 mL	17-3716-01
HiTrap Capto MMC ImpRes	5 × 1 mL	17-3716-10
HiScreen Capto MMC ImpRes	1 × 4.7 mL	17-3716-20

五、参考文献

1. Optimization of dynamic binding capacity and aggregate clearance in a monoclonal antibody polishing step. 29145068 AA
2. Purification of monoclonal antibodies using modern chromatography media and membranes. 29094443 AB
3. Three-step monoclonal antibody purification processes using modern chromatography media. Application note, 29132569 AA
4. MAb capture step development using MabSelect SuRe™ LX. Procedure 29-0081-29 AC
5. Performance of different Protein A resins with respect to critical attributes. 29-1148-22 AA
6. Polishing of monoclonal antibodies using Capto™ S ImpAct. Application note 29-1083-27 AA
7. MAb polishing step development using Capto™ adhere ImpRes in bind-elute mode. Procedure 29-1082-95 AA
8. Dynamic binding capacity study on MabSelect SuRe™ LX for capturing high-titer monoclonal antibodies. Application note 28-9875-25 AA
9. Use of sodium hydroxide for cleaning and sanitization of chromatography media and systems. Application note 18-1124-57 AI
10. Polishing of monoclonal antibodies using Capto™ adhere ImpRes in bind and elute mode. Application note 29-0273-38

11. Two-step purification of monoclonal IgG1 from CHO cell culture supernatant. Application note 28-9078-92 AD
12. Capture the lead in MAb development MabSelect* family of chromatography media. 11-0011-59 AD
13. An Industrial Platform Solution for Antibody Fragment Purification. BioProcess International, 2015 (13), issue 6
14. A platform approach for the purification of antibody fragments (Fabs). Application note 29-0320-66 AA
15. A platform approach for the purification of domain antibodies (Dabs). Application note 29-0655-41 AB
16. Capture of human single-chain Fv (scFv) fusion protein on Capto™ L affinity medium. Application note 29-0144-56 AA
17. Capture tools for antibody fragments. 29-0164-33 AB
18. Capto™ L. Data file 29-0100-08 AC
19. KappaSelect LambdaFabSelect. Data file 28-9448-22 AB
20. HiTrap IgM Purification HP. Data File 18-1127-43 AC
21. One-step purification of monoclonal IgM from cell culture supernatants. 18-1134-82 AB
22. A Novel, Rapid Procedure for Purification of IgY from Egg Yolk. 18-1134-81 AB
23. One-step purifications of IgM and IgY with HiTrap Purification columns. Innovations forum, Life Science News 3, 1999 Amersham Biosciences
24. IgSelect affinity medium. Data file 28-9257-92 AA
25. Antibody Purification Handbook. 18-1037-46 AE

抗体片段的纯化平台

摘要

以 Capto L 为基础的抗体纯化平台可以用来纯化表达于大肠杆菌周质空间的结构域抗体 (Domain antibody, Dab)。第一步 Capto L 亲和层析可以显著去除大量的 ECP 和内毒素。第一步精纯选择复合模式填料 Capto MMC ImpRes, 进一步降低 ECP 和内毒素的含量, 产率 >86%。第二步精纯选择复合模式强阴离子填料 Capto adhere ImpRes (流穿模式) 使得内毒素的含量低于检测水平, ECP 的含量 <10 ppm。所有的纯化步骤均使用 DoE 进行优化, 符合 QbD 的理念。由 Capto™ L、Capto MMC ImpRes、Capto Adhere ImpRes 三步层析组成的结构域抗体纯化平台具有高效率, 高产量的优点。

一、简介

随着单克隆抗体的成功应用, 抗体片段 (例如: Fab, scFv, Dab 等) 也成为一类非常重要的生物类治疗药物。抗体片段的一个最大优势来源于它的结构与低分子量的特点, 使其在诊断治疗上具有一些明显的优势 (比如: 易于穿透组织到达治疗靶点)。单克隆抗体的纯化平台在捕获阶段选择 protein A 亲和层析填料, 一步纯化后即可得到高纯度的样品, 并且操作条件简单, 使其成为生物制药生产中的一种非常好用的纯化方法。然而, 对于结构域抗体而言, 之前缺少有效的纯化工具。在本文中详细介绍了三步法结构域抗体纯化工艺。

随着 Capto L (见图 1) 填料引入市场, 结构域抗体的第一个工业化纯化平台也建立了起来。偶联了蛋白 L 配基的 Capto L 填料是一款 BioProcess™ 层析填料, 对含有不同大小的 kappa 轻链的结构域抗体具有广泛的亲和性。

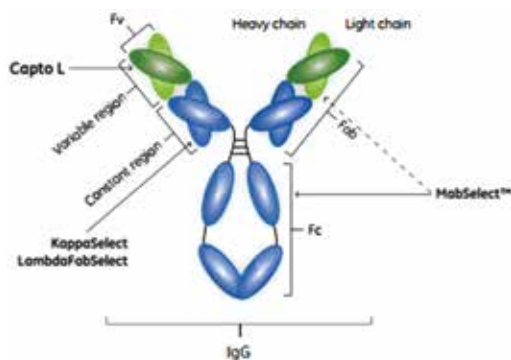


图 1. 含有 protein L 配基的 Capto L 填料结合在抗体片段的 kappa 轻链的可变区, 不干扰抗原结合位点。

二、Dab 的纯化

含 kappa 轻链的结构域抗体的一些特性见表 1:

表 1. 在纯化过程中使用的 Dab 样品特性。

Dab 来源	<i>E.coli</i> 周质空间表达释放蛋白后的培养上清
理论 pI	9.2
分子量	12.9 KDa
上样浓度	0.31 mg/mL
聚集体含量	<1%

在三步法纯化方案确定之前, 首先通过一个普遍的研发流程来最小化研发的周期, 如下:

- (1) 使用 PreDictor™ 多孔板进行高通量筛选 (HTPD)。
- (2) 确定动态结合载量
- (3) 确定洗脱条件
- (4) 通过 DoE 优化实验条件

DoE 实验采用 CCC (central composite circumscribed) 设计模式, 星点的距离范围为 1.20-1.25 (见图 2)。在此文中, 我们仅展示了 DoE 和验证实验的结果。

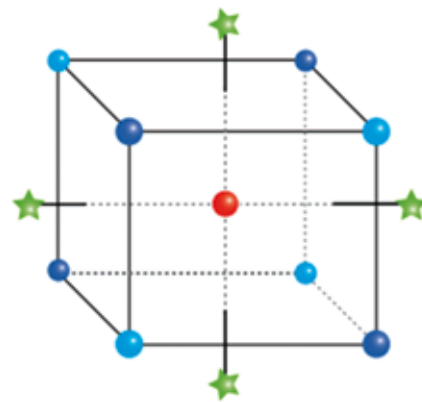


图 2. 使用 CCC 设计模型进行条件优化。

1、样品准备

对细菌悬浮液进行热处理 (47°C, 3h), 通过微滤 (0.2 um 中空纤维, GE Healthcare Life Science) 进行蛋白的富集。收集滤过液, 用于接下来的纯化。

2、捕获阶段 - Capto L

在捕获阶段, 选择上样量 (10-14 g/L), 清洗 pH (5-9) 以及清洗缓冲液中的 NaCl 浓度 (100-800 mM) 作为研

究的影响因子。使用 1 mL 的 HiTrap™ protein L 柱子，在 ÄKTAexplorer™ 100（含组分收集器）上进行操作。经过数据处理后，没有得到关于产率的统计模型，所有条件下的产率均 >92%。对于 ECP（使用 Cygnus Technologies 的抗体进行检测），模型显示在高 NaCl 浓度，高或低 pH 的条件下，ECP 的含量最低（见图 3）。

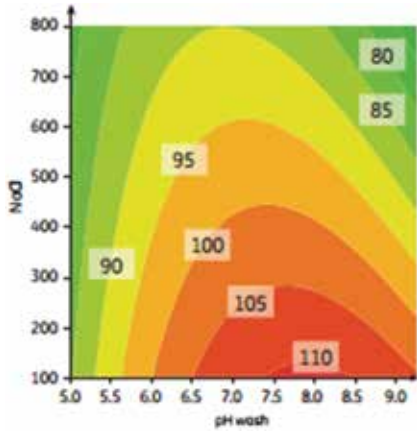


图 3. 响应值为 ECP 时的响应曲面图（单位为 ppm）。起始值为 204 000 ppm。

在电脑中进行 Monte Carlo 模拟，找到稳健性操作区间。图 4 显示了在 ECP < 110 ppm 的标准下的模拟结果，我们找到了两个符合要求的稳健性区域，最好的结果位于高盐，高或低 pH 条件下。因为在低 pH 条件下会有一个较宽的实验空间，所以我们认为该区域是最优的区域。

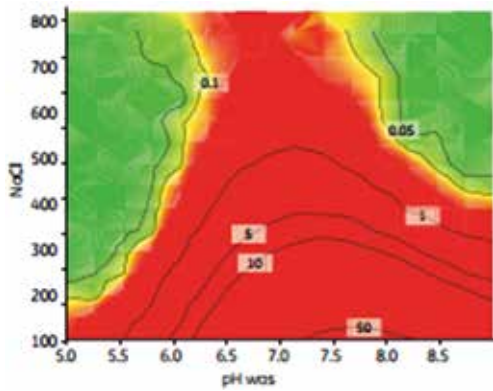


图 4. 响应值为 ECP 时的 Monte Carlo 模拟结果（100 000 次模拟实验）。合格标准为 ECP 含量 < 100ppm。在曲线上标记着失败的风险率（%）。绿色区域的失败的风险率 < 0.1%。

3、1st 精纯 - Capto MMC ImpRes

1st 精纯选择复合模式填料 Capto MMC ImpRes，它对实验条件具有耐受性并且可以有效地去除 ECP（通过先前的 HTPD 实验结果得知，数据未展示）。使用的层析柱为 1 mL Tricorn™ 5/50，样品为 Capto L 捕获阶段收集的含有 Dab 的组分。首先，上样量为 10% 穿透率条件下的动态

结合载量（DBC），在 pH 5-6 区间内相对稳定（保留时间为 4 min，载量为 33.4-35.6 g/L）。DoE 的影响因子包括：pH（5-6），梯度 NaCl 的浓度（450-550mM），上样量（18-22 g/L）及其他相关的影响因子。

图 5 和图 6 分别给出了响应值为产率和 ECP 含量的响应曲面图。在 ECP 模型中只有 pH 是显著的影响因素。起始 ECP 的含量为 164ppm，经过纯化，降低至 50ppm。

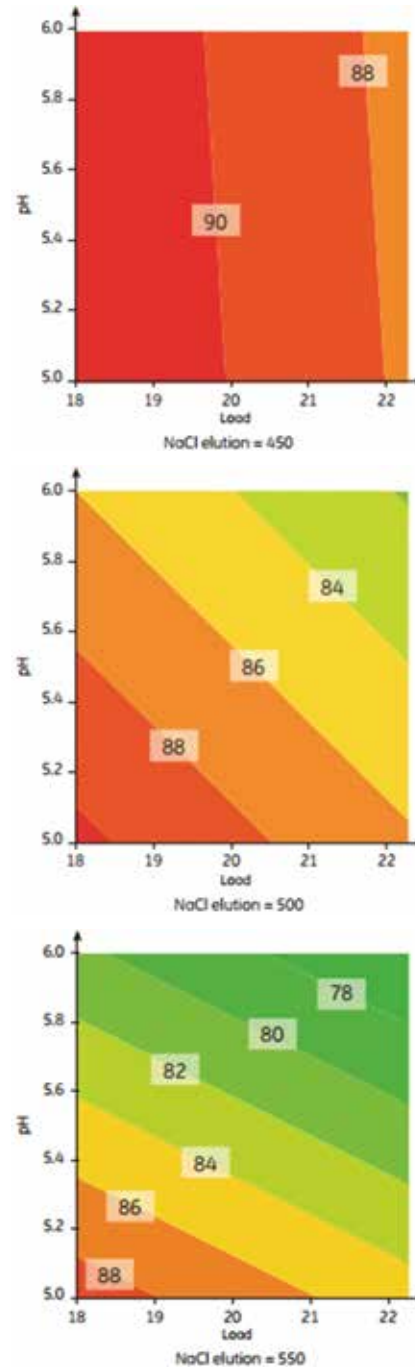


图 5. NaCl 浓度分别在 450，500，550mM 时产率的响应曲面图（%）。

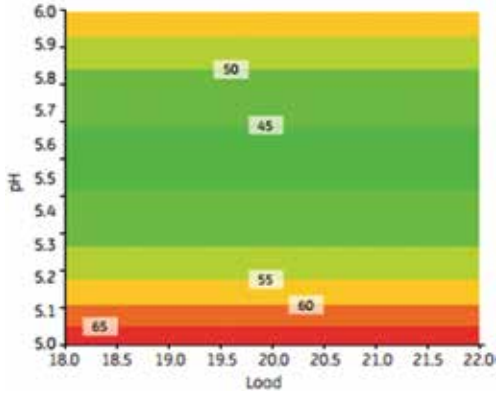


图 6. 在任意 NaCl 浓度下 ECP (ppm) 的响应曲面图。

同样通过 Monte Carlo 进行计算机模拟 (见图 7), 结果表明在 450 mM NaCl 浓度 (高产率) 下需要牺牲产率以获得一个使得 ECP 含量降低的稳健的实验空间。使用的标准为 ECP < 175 ppm, 产率 > 83%, 稳健性区域 (失败的风险率 < 0.1%) 的 pH 区间为 5.3-5.6, 上样量为 18-20 g/L。

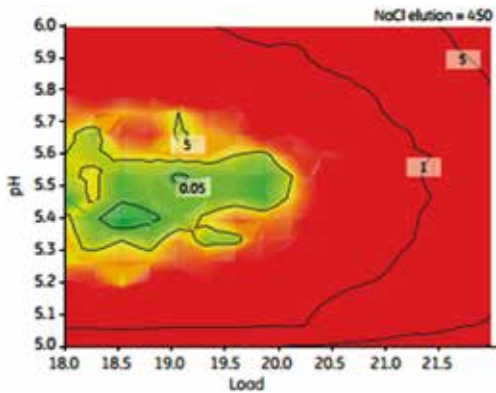


图 7. 产率及 ECP 含量的 Monte Carlo 模拟结果。绿色区域为产率 > 83%, ECP < 75 ppm。共模拟 100 000 次。

在 Capto MMC 层析后收集的含有 Dab 的组分中含有一种未知的棕黄色杂质, 因此摸索了一步 NaCl 等度清洗的实验步骤 (见图 8)。NaCl 浓度为 0, 100, 125 mM。随着 NaCl 浓度的提高, 产率略微下降 (从 97% 降低到 90%), 同时显著降低 ECP 的含量 (从 232 降低至 47 ppm) 及杂质的含量 (400 nm 监测)。等度洗脱步骤选择 100 mM NaCl 浓度以保证产率在一个可以接受的范围内。

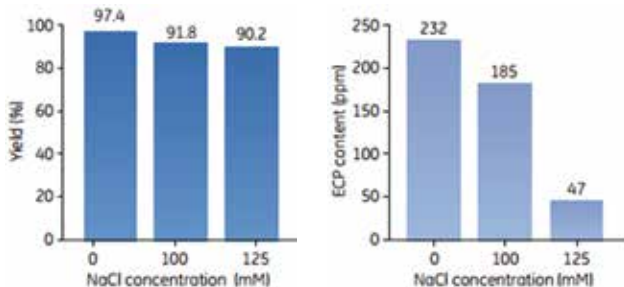


图 8. 使用 NaCl 清洗后的产率 (左) 及 ECP 含量 (右)。

4、2nd 精纯 - Capto adhere ImpRes

在最后一步精纯阶段, 选择高分辨率的多模式阴离子填料 Capto Adhere ImpRes, 有效的去除残留的杂质。该填料在纯化具有高等电点的样品时 (如 Dab) 采用流穿的模式。在 DoE 实验中, 选择的影响因子为 pH (7.4-8.8), 样品中 NaCl 浓度 (10-90 mM), 样品浓度 (80-120 mg/mL)。图 9 显示了 sweet spot plots (产率 -ECP) 结果。分析发现在低 NaCl 浓度 (10 mM) 和低样品浓度 (6.1g/L) 下具有最宽的操作空间。

进一步使用 Monte Carlo 进行计算机模拟, 在低 NaCl 和样品浓度下, 可以更好的定义期望的操作空间。与 sweet spot plot 相对比, 使用一个比较低的可接受的标准 (产率 > 88%, ECP 降低因子 > 1.2)。图 10 显示了模拟结果。一个稳健的操作空间在 pH (8.0-8.6) 和样品浓度 (80-120g/L) 的区域内。

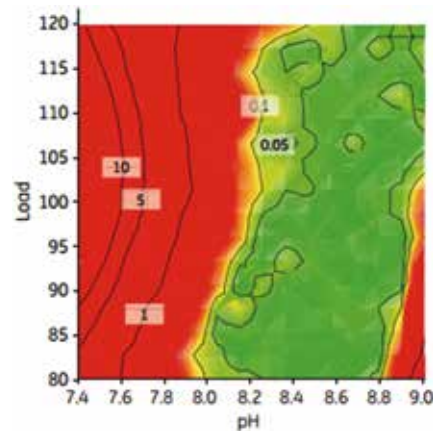


图 10. 在 Capto adhere ImpRes 纯化步骤中产率 -ECP 降低的 Monte Carlo 模拟结果。样品浓度约为 6.1 g/L。标准为产率 > 88%, ECP 减少因子 > 1.2。失败的风险率在 0.1% 以下 (绿色区域)。计算机模拟 100 000 次实验。

5、过程验证

在三步法过程中通过在 Monte Carlo 得到的稳健性区域区域进行实验。产率, ECP, protein L 泄漏和内毒素含量被监测。

验证分析的结果总结见图 11 和表 2。整个过程的产率约为 81%, 而 ECP 和内毒素的减少量都显示了非常好的结果, protein L 的泄漏低于定量检测的范围。在起始样品中的棕黄色杂质也通过两步多模式填料 (Capto MMC 和 Capto adhere ImpRes) 被有效的去除。接下来通过两步分析进一步验证上述结果。SDS-PAGE 分析显示在目的大小分子量的位置存在一条单一的条带 (结果未展示)。最后, 通过液相层析 - 质谱技术分析样品的成分, 结果显示在正确分子量大小的位置存在一个主峰。

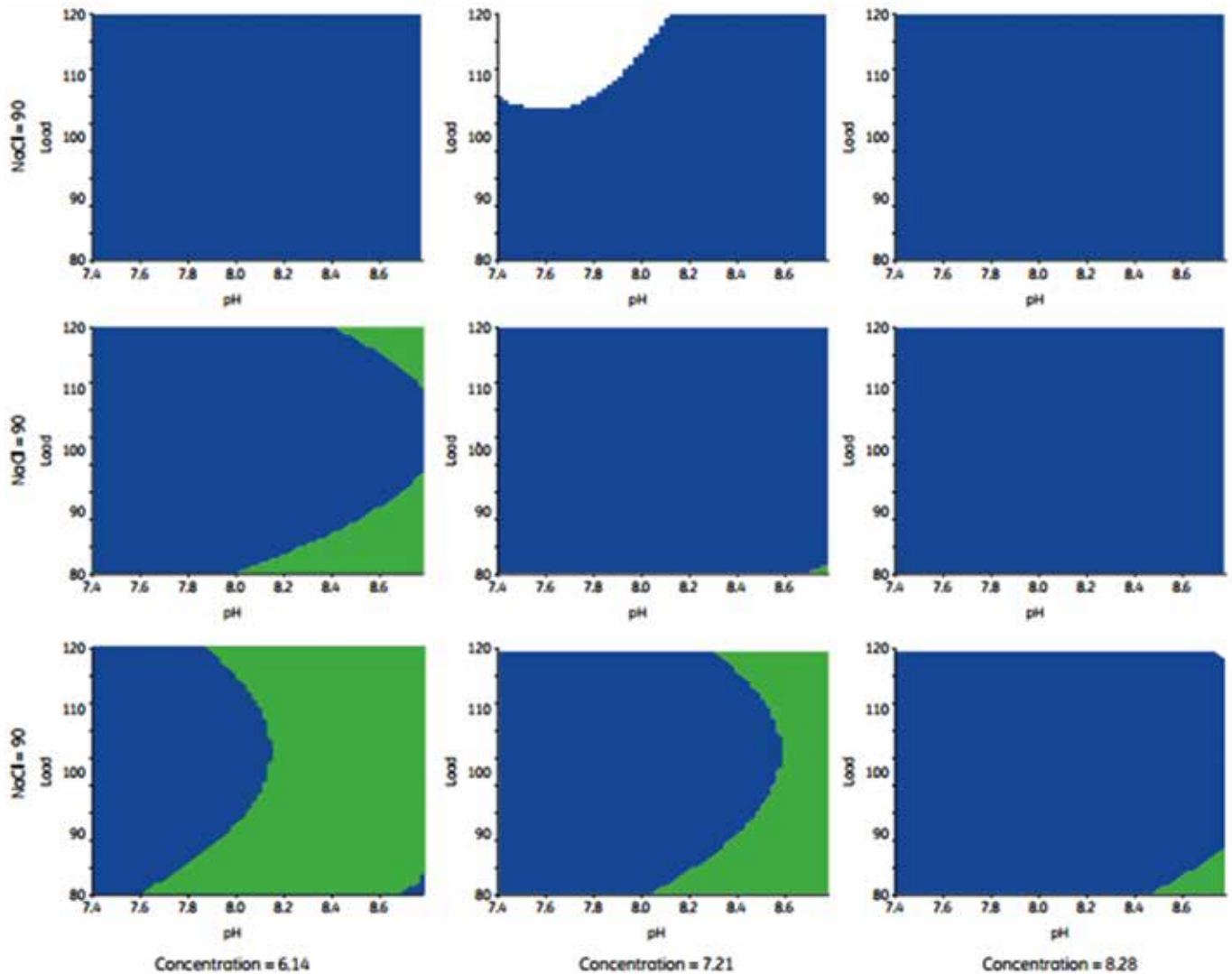


图 9. Sweet spot plots 结果（产率和 ECP 减少量）。标准为产率 >90%+ECP 减少量 >1.4。绿色区域表示 sweet spot，蓝色和白色区域代表符合其中一条标准或完全不符合标准的区域。

表 2. 产率和纯度分析结果总结。

步骤	产率 (%)	内毒素 (EU/mg)	ECP (ppm)	Protein L (ppm)
Dab 起始样品	100	>2 000 000*	>200 000*	—
Capto L	99.6	1.53	159	<LOQ
Capto MMC ImpRes	86.4	0.20	9.0	<LOQ
Capto adhere ImpRes	93.9	<0.09 (<LOQ)	5.5	<LOQ
总产率	80.8			

* 近似值；LOQ：定量检测范围。

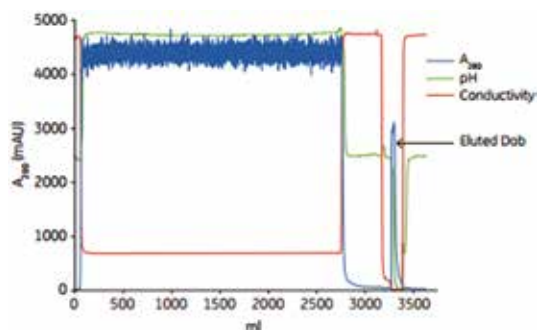
三、总结

三步法纯化过程成功应用于结构域抗体的纯化，并得到验证。每个操作步骤的产率均在 86%~99% 之间，过程的总产率约为 81%。起始样品的 ECP 含量 >200 000ppm，而最终样品仅含有 5.5ppm。在起始样品中内毒素含量约 2 000 000 EU/mg 蛋白，最终样品中低于 LOQ。Protein L 的泄漏量在整个过程各种均低于检测水平。

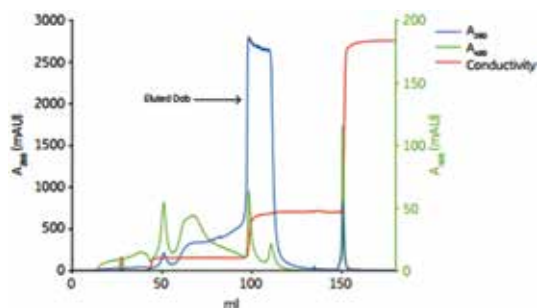
发展结构域抗体治疗药物是市场发展的一个趋势。GE Healthcare Life Sciences 研发了 Capto L 和多种填料用于结构域抗体纯化平台的建设。先前和现在得到的 Capto L 纯化结构域抗体的研究结果验证了其作为一个平台工具的有效性 (2)。使用 Capto 填料进行三步法纯化结构域抗体的工艺在整个纯化过程中可以有效的去除主要杂质，并可以获得高产率的产品。结合早期的研究结果 (2)，

该文章实验结果显示了结构域抗体 (Dab) 家族中最小的 Dab 和最大的 Fab 均可以通过 Capto L 为基础的平台工艺进行纯化。

柱子: Capto L, XK26/112 (59.5 mL)
 样品: Dab (0.31 g/L)
 样品上样量: 14 g/L
 平衡和清洗缓冲液: 20 mM 柠檬酸钠, 800 mM NaCl pH5.0
 预洗脱缓冲液: 20 mM 柠檬酸钠, pH 5.0
 洗脱缓冲液: 20 mM 柠檬酸钠, pH 2.8
 保留时间: 4 min
 检测: UV A280
 系统: ATKAexplorer 100



柱子: Capto MMC ImpRes, HiScale™16/87 (17.5 mL)
 样品: 捕获步骤的洗脱组分 (Dab 浓度为 11.8 g/L)
 样品上样量: 18.5 g/L
 平衡缓冲液: 20 mM 柠檬酸钠, pH5.5
 清洗缓冲液: 20 mM 柠檬酸钠, 100 mM NaCl, pH 5.5
 洗脱缓冲液: 20 mM 柠檬酸钠, 500 mM NaCl, pH 5.5
 保留时间: 4 min
 检测: UV A280 和 A400
 系统: ATKAexplorer 100



柱子: Capto adhereImpRes, 3x1 mL HiTrap 串联
 样品: Capto MMC ImpRes 洗脱组分, 稀释至 6.1 g/L
 样品上样量: 84.5 g/L
 平衡和清洗缓冲液: 25 mM Tris-HCl, pH8.5
 再生和淋洗缓冲液: 500 mM 柠檬酸
 CIP: 1M NaOH
 保留时间: 2 min
 检测: UV A280 和 A400
 系统: ATKAexplorer 100

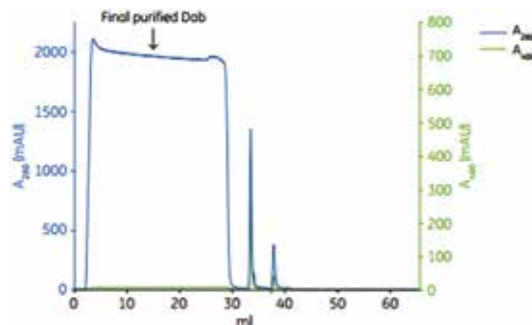


图 11. 三步法纯化过程的验证层析图谱。

四、订货信息

产品	规格	货号
Capto L	5 mL	17-5478-06
Capto L	25 mL	17-5478-01
Capto L	200 mL	17-5478-02
Capto L	1 L	17-5478-03
Capto L	5 L	17-5478-04
Capto L	10 L	17-5478-05
Capto adhereImpRes	25 mL	17-3715-01
Capto adhereImpRes	100 mL	17-3715-02
Capto adhereImpRes	1 L	17-3715-03
Capto adhereImpRes	5 L	17-3715-04
Capto adhereImpRes	10 L	17-3715-05

五、参考文献

- GE Healthcare Life Science. Capto L. Data file, 29-0100-08, AA, 2012.
- GE Healthcare Life Science. A platform approach for the purification of antibody fragments (Fabs). Application note, 29-0320-66, AA, 2012.

亲和层析法纯化凝血因子

摘要

亲和层析填料 VIII Select, IX Select, and VII Select 分别用于大规模有效纯化凝血因子 VIII (F VIII), 因子 IX (F IX) 及因子 VII (F VII)。通过一步亲和层析就可以获得高纯度和高产量的凝血因子产品。

血友病 (Hemophilia) 是一种由一种或多种凝血因子缺陷或结构异常导致的遗传性出血性疾病。A 型血友病是最为常见的类型, 由 F VIII 缺陷引起; B 型血友病是第二个常见的类型, 由 F IX 缺陷引起。F VIII 和 F IX 常用作治疗血友病的替代疗法。F VII 可以用于对替代疗法产生抑制的由 F VIII 或 F IX 缺陷引起的血友病患者。凝血因子的样品来源于血浆或经重组细胞表达。

用于纯化凝血因子的填料, 一方面包括传统的 BAC BV (现属于 Thermo Fisher Scientific) 以及 GE 医疗的定制填料 (CDM)。

一、简介

凝血因子亲和层析填料由 GE Healthcare 的 CDM 团队研发, 上市的产品名为 VIII Select, IX Select 和 VII Select。层析填料专家 CDM 团队与世界范围内的生物制品客户进行合作, 研发符合 GMP 认证的商用生物制品生产填料。

亲和配基通过 BAC BV 的技术生产, 可以选择性吸附 F VIII、F IX 或 F VII。配基以 Camelidae 科的重链的单个结构域抗体片段为基础, 单链片段的抗原结合结构域的分子量约为 13 000~14 000。配基蛋白由酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 重组表达而来, 动物实验结果表明不产生中毒反应。

VIII Select, IX Select 和 VII Select 填料将配基通过亲水性的空间臂连接在基架上, 有利于靶分子的结合, 如图 1。配基通过稳定的酰胺键固定在琼脂糖基架上, 保证了填料的高化学稳定性和低的配基渗漏。

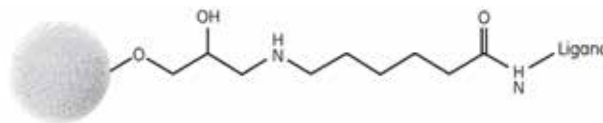


图 1. VIII Select, IX Select 和 VII Select 填料的结构。

二、结果与讨论

1、填料特性见表 1。

表 1. 填料特性。

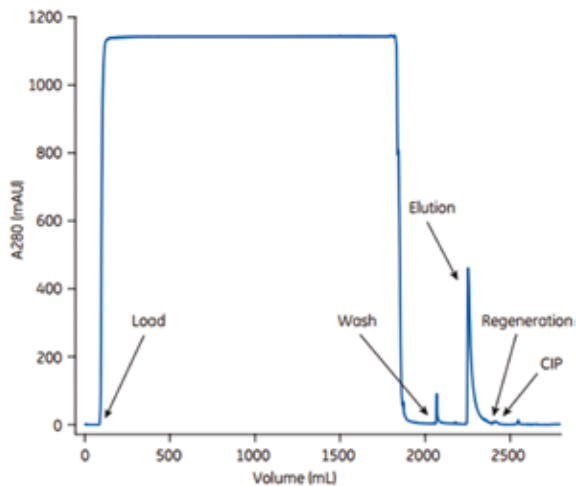
	VIII Select	IX Select	VII Select
靶分子	去除 β 结构域的重组 F VIII (不与 vWF 结合)	重组或血浆来源的 F IX	重组或血浆来源的 F VII
基质	高度交联的高流速琼脂糖		
粒径大小	75um (平均)		
配基大小	Mr 13 000	Mr 13 000	Mr 14 000
配基密度	每 mL 填料大约 0.7 mg 配基 (说明书 ≤ 1.0 mg 配基 /mL 填料)	每 mL 填料大约 8 mg 配基 (说明书 >6.5 mg 配基 /mL 填料)	每 mL 填料大约 6 mg 配基 (说明书 4.2~7.2 mg 配基 /mL 填料)
结合能力	大约 20 000 IU F VIII /mL 填料	大约 6 mg F IX /mL 填料	大约 8 mg F VII /mL 填料
长期 pH 耐受范围	3~10		
短期 pH 耐受范围	2~12		
流速	最高流速 300 cm/h (柱高 30cm)	最小流速为 600 cm/h (柱子直径为 1m, 柱高 20cm), 20°C, 流动相为缓冲液或水, 压力 <3 bar (0.3 MPa)	

2、应用举例

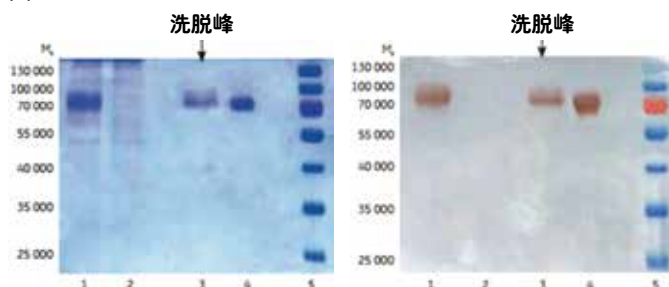
使用VIII Select 纯化删除 β -结构域的重组F VIII的工艺已经发表(1, 2)。使用IX Select 纯化CHO 细胞上清的F IX的结果如图2所示。图3显示了人血浆来源的F VII的纯化过程及结果。如结果所示, 两种凝血因子通过一步纯化就得到了高纯度的样品。

(A)

柱子: HiScale™ 16/20 预装柱, 13 mL IX Select
样品: 含 F IX 的 CHO 细胞裂解液
平衡缓冲液: 6 CV 的 0.02 M Tris-HCl + 0.15 M NaCl, pH 7.4
上样: 1500 mL 样品, 100 cm/h
清洗: 10 CV 0.02M Tris-HCl + 0.15 M NaCl, pH 7.4
 10 CV 0.02M Tris-HCl + 0.5 M NaCl, 0.01% Tween™ 80, pH 7.4
 3 CV 0.02M Tris-HCl + 0.15 M NaCl, pH 7.4
洗脱: 0.02 M Tris-HCl + 2.0 MgCl₂, pH 7.4
再生: 0.1 M glycine + 0.1 M NaCl, pH 2.0
CIP: 0.01 M NaOH



(B)

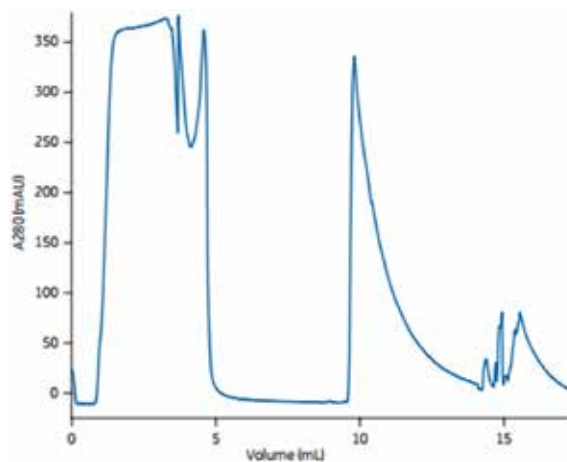


泳道 1: 细胞培养基; 泳道 2: 流穿组分; 泳道 3: 洗脱峰;
 泳道 4: F IX 标准样品; 泳道 5: 低分子量 Marker

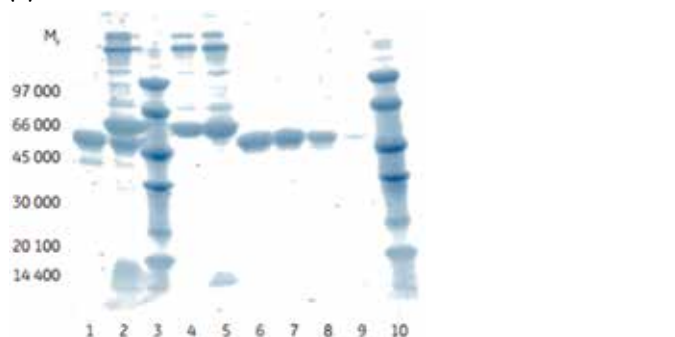
图 2. 使用 IX Select 层析填料获得高纯度 F IX。(A) 层析图谱; (B) SDS-PAGE 结果(样品来源于 CHO 细胞裂解液上清)。

(A)

柱子: Tricorn™ 5/50 预装柱, 0.4 mL VII Select
样品: 购买的 F VII (6 mg) 溶解于 5.7 mL 注射用水, 与 0.3 mL 人血清混合后使用
平衡缓冲液: 10 CV 的 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5
上样: 7mg/mL 填料(低于结合载量的最大值), 61 cm/h (0.2 mL/min)
清洗: 12 CV 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5
洗脱: 12 CV 50 mM Tris + 1.5 M NaCl+50% (v/v) propylene glycol, pH 7.5
再生/CIP: 0.1 glycine + 0.1 M NaCl, pH 2.0



(B)



泳道 1: 商品 F VII; 泳道 2: 商品 F VII + 血清; 泳道 3: 低分子量 Marker; 泳道 4: 流穿组分(杂质); 泳道 5: 上样后清洗; 泳道 6: 洗脱组分 5; 泳道 7: 洗脱组分 6; 泳道 8: 洗脱组分 1-12; 泳道 9: 洗脱后带; 泳道 10: 低分子量 Marker。

图 3. 使用 VII Select 层析填料获得高纯度 F VII。(A) 层析图谱; (B) SDS-PAGE 结果。

3、稳定性

在工业生产过程中的使用结果表明, VIII Select, IX Select 和 VII Select 填料可以较宽的 pH 范围内使用, 对于比较极端的 pH 条件, 建议在清洗与消毒时使用。稳定性研究结果表明, 将填料在 pH2~14 的溶液中孵育一周, 温度分别为 20°C 和 40°C。检测碳和氮的降解程度。找到了填料分别在长期使用和短期使用时的 pH 范围。

图 4 分别展示了填料在 20°C 和 40°C 条件下, 不同 pH 溶液中的保存结果。结果以 VII Select 为例, 但是 VIII Select 与 IX Select 结果类似。

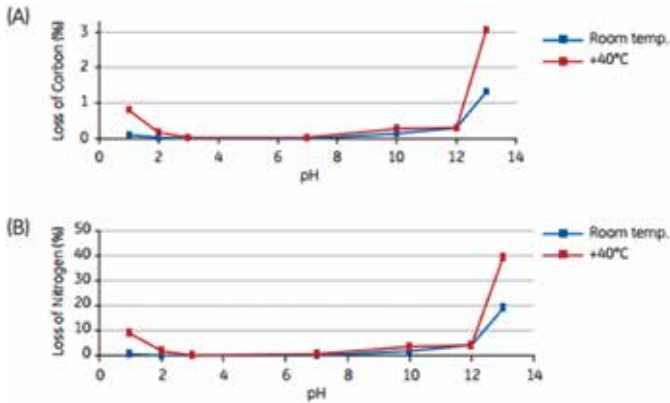


图 4. VII Select 填料的稳定性检测结果。(A) 碳的损失; (B) 氮的损失。

在暴露于不同的酸性、碱性 CIP 溶液后的稳定性的检测结果见图 5。在不同时间长度的 CIP 后, VIII Select 对 F VIII 的结合能力变化使用装填了 VIII Select 填料的多孔板进行检测。通过 COAMATIC TMF VIII 活性检测实验 (CHROMOGENIX) 检测 F VIII 的活性。在这项研究中最适合的 CIP 溶液为酸性。然而, CIP 的操作步骤应该根据具体的应用来制定。

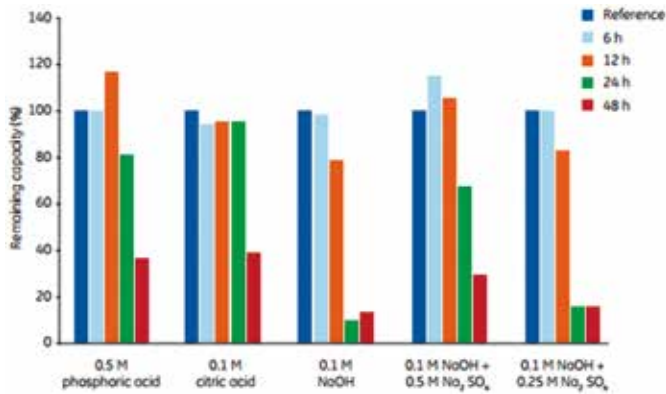


图 5. 使用不同的溶液经过不同时间的 CIP 后, VIII Select 填料的结合能力变化情况。

三种配基的渗漏情况可以通过 ELISA 试剂盒来检测。

三、总结

VIII Select, IX Select 和 VII Select 填料具有以下优势:

- 通过亲和层析一步纯化就可以得到高纯度的凝血因子 F VIII, F IX 和 F VII, 产率高。
- 快速处理大体积样品。
- 不含动物成分, 与用于治疗药物的血浆来源的凝血因子相比, 降低了法规方面的顾虑。

四、订货信息

产品	包装	货号
VIII Select	25 ml	17-5450-01
VIII Select	500 ml	17-5450-02
VIII Select	5 l	17-5450-04
VII Select	25 ml	17-5477-01
VII Select	200 ml	17-5477-02
VII Select	1 l	17-5477-03
VII Select	5 l	17-5477-04

五、参考文献

1. McCue, J et al. J Chromatogr A, 1216, 7824-7830(2009).
2. Casademunt et al. Eur J Haematol 89, 165-176(2012).

病毒类疫苗的纯化

简介

疫苗是将病原微生物（如细菌、立克次氏体、病毒等）及其代谢产物，经过人工减毒、灭活或利用转基因等方法制成的用于预防传染病的自动免疫制剂。以细菌制备的制剂成为“菌苗”，病毒及立克次氏体制备的制剂成为“疫苗”，以细菌代谢产物毒素脱毒制成的制剂成为“类毒素”。

一、疫苗纯化平台

甲肝疫苗 (HAV) :

甲型病毒性肝炎，简称甲肝，是由甲型肝炎病毒 (HAV) 引起的，以肝脏炎症病变为主的传染病。甲型肝炎病毒 HAV 是小核糖核酸病毒科的一员，为嗜肝 RNA 病毒属，目前预防甲肝的疫苗有灭活疫苗和减毒活疫苗两种。美国专利 (US Patent Number 5719049: Process for purifying hepatitis A virus) 报道，使用层析方法可以纯化甲肝疫苗。

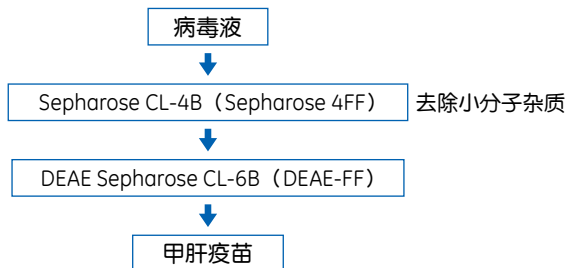


图 1. 甲肝疫苗纯化流程图。

乙肝疫苗 (HBV) :

中国是乙肝的高流行区，国家对乙肝疫苗的研发及生产很重视。1998 年停止生产血源型乙肝疫苗后，基因工程乙肝疫苗已经成为唯一的乙肝疫苗。现有乙肝疫苗分为 CHO 和酵母两种表达系统，均采用层析技术纯化。

CHO 细胞表达的乙肝疫苗纯化工艺：

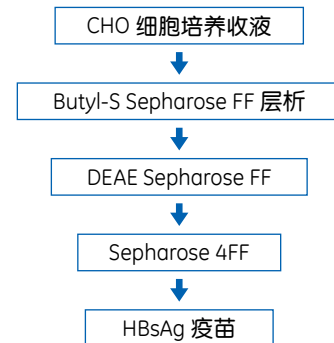


图 2. CHO 表达的乙肝疫苗纯化流程图。

酵母表达的乙肝疫苗纯化工艺：

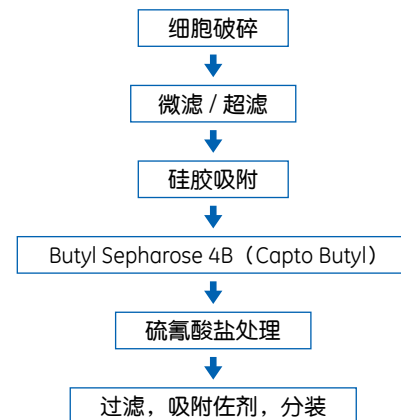


图 3. 酵母表达的乙肝疫苗纯化流程图。

两种表达系统的乙肝疫苗使用了不同的疏水层析介质，是纯化的关键。

戊肝疫苗 (HEV) :

由昆虫杆状病毒表达的戊型肝炎病毒结构区 ORF2 蛋白的戊肝疫苗在美国 Novax 公司已经进入 III 期临床 (US Patent 6,054,567)。表达的重组蛋白采用 Q Sepharose FF, SOURCE 15Q 离子交换层析及 Superdex 200 p.g. 凝胶过滤层析得到纯化的戊肝疫苗。而国内于 2014 年上市的戊肝疫苗也使用层析技术如 Q FF 和 Phenyl (HS) 纯化获得高纯度的戊肝疫苗。

狂犬病疫苗 (Rabies Vaccine) :

由于病毒培养液体积太大，不可能使用超速离心方法，目前国内均使用超滤浓缩配合凝胶过滤 Sepharose 4 FF 的方式纯化 Rabies Vaccine。样品上样量控制在柱床体积 10% 以下时，病毒的分离效果好，蛋白去除均在 99% 以上，使用超过百次后，层析的重现性依然良好。

流行性感冒疫苗 (Influenza Vaccine) :

全病毒疫苗，有用单纯超速离心以及层析法纯化的。层析法采用 Sepharose 4 FF 凝胶，速度快，周期短，分离效果好，重复性高，适合大规模的制备。但全病毒疫苗的接种副反应较重，不利于大范围尤其是儿童和体弱者使用。在国际上，以裂解疫苗和亚单位疫苗为主。2003 年 6 月 17 日，FDA 批准了第一个流感疫苗鼻腔喷剂 (Medimmune 公司)，更适合广大人群的使用。US Patent 6 245 532 描述了在重组流感病毒感染的昆虫细胞中表达多价血凝素疫苗及其层析纯化的方法：

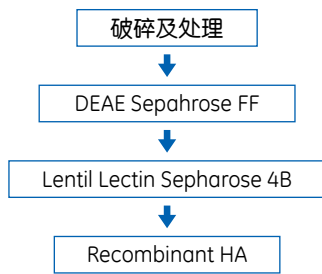


图 4. 重组流感疫苗的纯化流程。

新一代复合模式介质 Capto Core 700 及应用:

新一代病毒纯化介质 Capto Core 700 是粒径 85 μm 的高流速琼脂糖微球，具有 5 μm 的惰性外壳，不带配基，在微球里面带有对蛋白等杂质有很强吸附能力的辛氨基。分子量大于 700 k 的物质都不能进入到微球内，从流穿走，

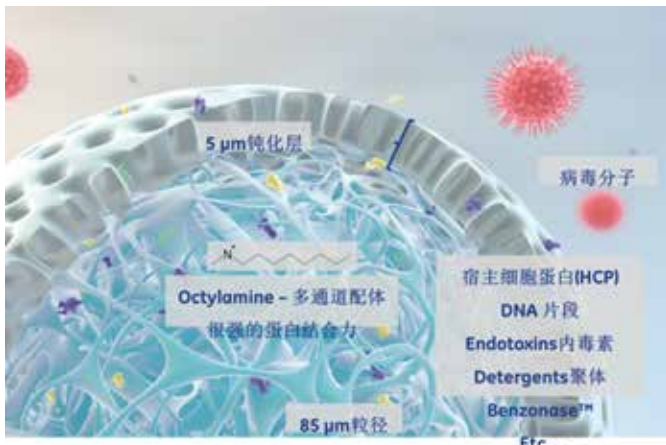


图 5. Capto Core 700 多模式介质结构图。

小分子被捕捉除去。Capto Core 700 对病毒不吸附，从而保护一些敏感的病毒的活性。具有分子筛和离子交换流穿模式的综合优点，能高效的纯化病毒，可以有效的去除卵清蛋白、宿主蛋白和 DNA 片段。

4FF 和 Core700 performance 对比:

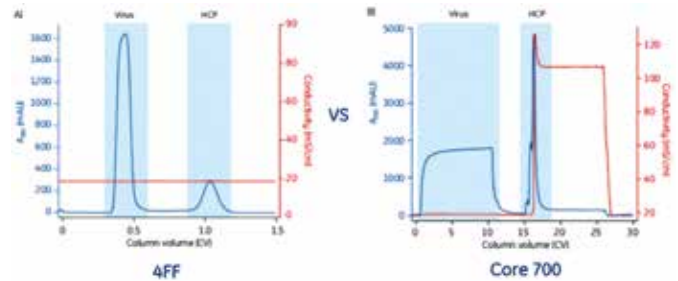
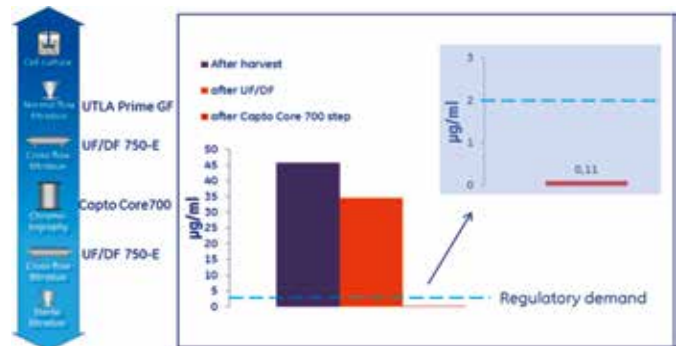


图 6. 4FF 和 Core700 应用层析对比图。

表 1. 分子筛技术与 Capto Core700 纯化结果对比。

Media	Virus Recovery (%)	HCP removal (%)	Column Load (CV)	Dilution factor
4FF	100	95	0.1	~ 2
Core700	97	95	10	1

Egg based 流感疫苗:



Cell based 流感疫苗:

STEP	Titer (TCID ₅₀ /mL)	Virus HA Recovery (%)	DNA removal (log red.)	DNA/HA (ng/μg)	HCP Removal (%)	HCP/HA (μg/μg)
Microfiltration	9.7	-	-	2672	-	32.3
Capto™ DeVirS	-	94	2.9	4	82	6.1
Capto Core 700	9.3	94	0	5	83	1.1

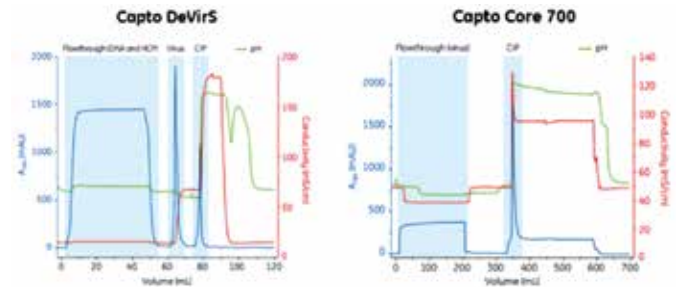


图 8. 两步纯化将流感病毒中宿主蛋白，DNA 有效去除，HA 的回收率达到 90% 以上。

轮状病毒疫苗 (Vero 表达) :

利用 Vero 细胞表达的轮状病毒疫苗经过超滤浓缩处理后，一步层析使用 Capto core 700 纯化，病毒收率在 80% 以上，可去除 94% 以上的 HCP，以及残留的 DNA 符合《中国药典》三部 (2010 版) 标准。工艺时间短，操作相对简便，病毒收率高，该研究成果 2015 年发表于生物制品学杂志。

EV71 疫苗 (Vero 或人二倍体细胞表达) :

肠道病毒 71 型 (EV71) 是引起儿童手足口病的最重要病原体。我国多家自主研发的手足口病疫苗也已经完成临床效果评估实验，通过注册审评审批后即可上市。其中 EV71 病毒采用分子筛层析技术如 Sepharose 6FF 或者 Sepharose 4FF 进行纯化。

脊髓灰质炎疫苗 (Polio Vaccine) :

脊髓灰质炎疫苗是最早将层析技术用于生产的病毒性疫苗，1979 年就有文献报道。有感染活性的 poliovirus (A-from) pI 为 7.0，DNA 的 pI 是 2.0-2.5。在中性缓冲溶液中，病毒净电荷为零，而 DNA 带有极强的负电荷易吸附到阴离子交换介质上，通过高盐 DNA 才被洗脱下来。因此用阴离子交换技术纯化病毒，细胞基质 DNA 及大部分杂蛋白均已清除，得到纯化的 poliovirus 疫苗。

2015 年批准的中国自主研制的 Sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗 (sIPV) 上市，其脊髓灰质炎病毒纯经过 Vero 细胞培养收获，经过超滤浓缩后，经过分子筛 Sepharose CL-6B 和 DEAE sepharose FF 纯化获得合格的脊髓灰质炎灭活疫苗。目前 I, II, III 型脊髓灰质炎病毒均采用这样的工艺纯化得到。

流行性乙型脑炎疫苗 (JEV) :

乙脑病毒的分子量在 400 万以上，与疫苗中的杂蛋白分子量相差较大，采用凝胶过滤层析可以纯化出符合要求的乙脑病毒疫苗，根据阴离子交换层析对 DNA 去除具有很好的效果，因此跟在分子筛后面进一步去除残留的宿主 DNA。

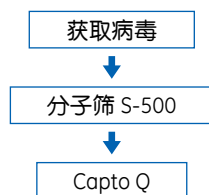


图 9. 乙脑病毒的纯化流程图。

森林脑炎疫苗 (FEV) :

森林脑炎病毒是一种以蝉类为主要传染源的自然疫源性疾病，致死率高达 20%-30%。急性期症状消失后，常遗留麻痹性后遗症。目前生产的疫苗属粗制疫苗，其抗原含量低，杂蛋白多；且存在亚细胞成分等致敏性物质，致使疫苗注射剂量大，副反应增多或加重。为彻底解决这一问题，研制森林脑炎纯化疫苗是唯一可行的出路。浓缩的森林脑炎疫苗通过 Sepharose 4 FF 层析，结果显示纯化疫苗去除了绝大部分牛血清蛋白和杂蛋白以及易致敏的地鼠肾细胞的亚细胞成分，使其应用更安全，可靠，是现有疫苗理想的换代产品。

类病毒颗粒 (Virus like particles VLP) :

使用灭活或减毒的病毒作为疫苗，具有一定的感染几率；另一种预防策略是注射缺失核酸组份但仍含有病毒蛋白的病毒片段，也许还有脂双分子层。这些结构被称为类病毒颗粒或 VLP。VLP 能够诱导强烈的免疫反应，但它们无法复制。因此，通过使用 VLP 就没有感染的风险。此外，VLP 不需要高度免疫原性的佐剂。这使得 VLP 非常有希望作为应用在生物制药上。VLP 可以通过基因重组技术生产。已经有基于 VLP 的疫苗如 HPV 疫苗于 2006 年得到 FDA 的批准上市。VLP 疫苗纯化根据其具体性质可以选择不同的层析介质：

如厦门大学利用大肠杆菌表达的 HPV 疫苗采用疏水层析 Butyl-S 和阳离子交换填料 SP-FF 纯化可以获得高纯度 (98%) 的 VLP 颗粒；而 GE 研发中心用杆状病毒表达的 HPV VLP 纯化方案如下：

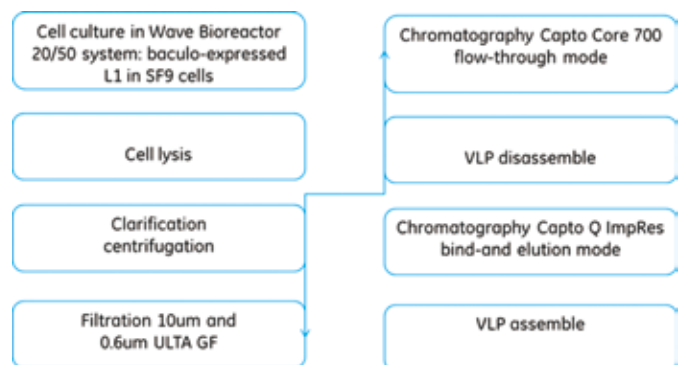


图 10. 杆状病毒表达的重组 HPV 疫苗纯化流程图。

另外常用的 VLP 纯化可采用下列组合：

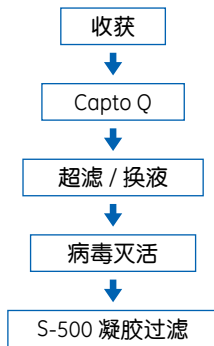


图 11. CHO 表达的乙肝疫苗纯化流程图。

VLP 的分子量往往高于 2000KDa，Sephacryl™ S-500 High Resolution (HR) 的凝胶过滤适合 VLP 组分的分离和分析，Sephacryl™ S-500 High Resolution 分离的分子量范围在 4×10^4 和 2×10^7 之间。

二、订货信息

产品	包装	货号
Sepharose CL-4B	1L	17-0150-01
Sepharose 4 Fast Flow	1L	17-0149-01
DEAE Sepharose CL-6B	1L	17-0710-01
DEAE Sepharose Fast Flow	500ml	17-0709-01
Butyl Sepharose 4B	500 ml	17-0960-03
Butyl-S-Sepharose FF	200 ml	17-0978-02
Superdex 200 p.g	150 ml	17-1043-01
SOURCE 15Q	50 ml	17-0947-01
Q Sepharose Fast Flow	300 ml	17-0510-01
LentilLectin Sepharose 4B	25 ml	17-0444-01
SepharoseCL - 6B	1 L	17-0160-01
Sephacryl S-500 HR	750 ml	17-0613-01
Sephacryl S-500 HR	750 ml	17-0613-01
HiTrapCapto Core 700	5 × 1 mL	17-5481-51
HiScreenCapto Core 700	4.7 mL	17-5481-15

三、参考文献

1. Belew, M. et al. Purification of recombinant hepatitis B Surface antigen produced by transformed Chinese hamster ovary (CHO) cell line grown in culture Bioseparation 1, 397-408 (1991).
2. Purification of influenza A/H1N1 using Capto Core 700 29-0003-34 AA
3. Jendrek, S. and Ekstrom, D. et al. Development of a production and purification method for type 5 adenovirus. BioProcessing Journal 4, 42-47(2005).
4. Blanche, F. et al. An improved anion-exchange HPLC method for the detection and purification of adenoviral particles. Gene Ther .7, 1055-1062(2000).
5. Purification human influenza virus vaccine-towards a generic strategy. Downstream 37, 20-21 (2004) Code No 11-0008-46.
6. Ai-Hsiang Chou. et al. Pilot Scale Production of Highly Efficacious and Stable Enterovirus 71 Vaccine Candidates. April 2012 | Volume 7 | Issue 4 | e34834
7. 姜英等, 复合模式介质 Capto Core 700 纯化轮状病毒, 中国生物制品学杂志 2015, Vol. 28 No. 1.

多糖疫苗的纯化

简介

细菌中存在多种糖类物质，它们在细菌的识别、信号传递、黏附、感染及防御等方面发挥着重要作用，其中与致病性相关的包括 CPS 及脂多糖 LPS 中的 O 抗原多糖 O-PS 等。由于多糖的免疫原性，可将特异性的多糖纯化后其制成的疫苗称为多糖疫苗。

目前上市的多糖疫苗主要有流脑多糖疫苗，Hib 多糖疫苗及肺炎多糖疫苗。传统的多糖疫苗采用的是化学法去除多糖中的蛋白，减少副反应。而采用的手段多用苯酚沉淀蛋白，但是苯酚一则污染环境，带来很高的环境成本，一则对过程的控制无法自动化，达不到高的收率。GE 公司开发用层析的方法分离多糖与蛋白，避免使用苯酚，得到精糖的蛋白含量小于 1%，核酸等杂质合格，多糖回收率和旧工艺比回收率提高了，免除了环境污染，同时在工艺中自动化程度大大提高，过程控制改善，更加符合 cGMP 的要求。

一、流脑多糖纯化工艺介绍

目前流脑多糖疫苗分为 A, C, W135, Y 这四群。A 群流脑疫苗主要用于 6 月龄 ~ 18 月龄的儿童；A+C 群流脑疫苗用于 2 周岁以上儿童及成年人。将粗糖通过 Capto adhere 和 Capto DEAE 两种层析介质串联，流穿模式进行分离纯化的。Capto 骨架的填料具有很好的刚性和载量对于多糖这样大分子的物质仍然有很好的通量。Adhere 是复合模式的配基，类似阴离子交换介质，但是配基上还有苯环和 OH，复合模式共同作用，有更宽的选择性。

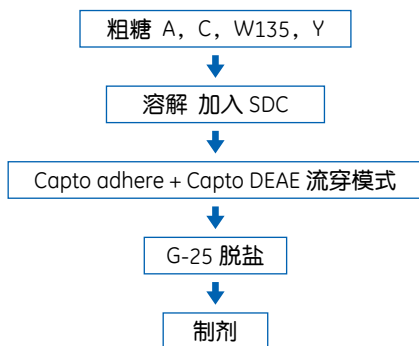


图 1. 粗糖纯化的流程。

通过色谱图 A206nm 和 A280nm 吸收可以看出通过层析纯化可以将多糖与蛋白完全分开，达到多糖与蛋白核酸的分离作用，对多糖起到纯化效果。

表 1. 流脑多糖层析后主要指标检测结果。BDL：低于检测线。

多糖类型	IEX 的收率 %	脱盐的收率 %	总收率 %	乙酰基浓度 (mmol/g)	多糖浓度 (ug/ml)	DNA %	蛋白含量
A	86	85	77	2.29(2.0)	789	0.05	BDL
C	79	88	73	2.22(1.5)	613	0.07	BDL
Y	72	80*	58*	0.82(0.3)	523	0.04	BDL
W	73	95	69	0.36(0.3)	716	0.01	BDL

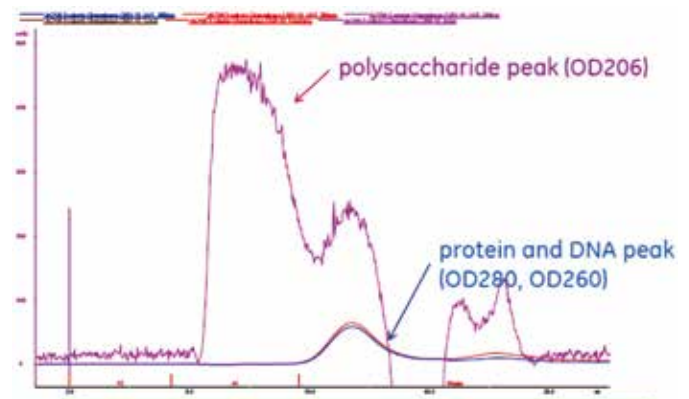


图 2. 纯化流脑多糖的色谱图。

二、b 型流感嗜血杆菌荚膜多糖的纯化

b 型流感嗜血杆菌是一类革兰氏阴性小杆菌，是引起婴幼儿化脓性脑膜炎、肺炎、会厌炎、化脓性关节炎等局部和侵袭性感染的病原体。b 型流感嗜血杆菌荚膜多糖的主要成分是多聚核糖基核糖醇磷酸盐。疫苗生产工艺中多糖的纯化是重要的一步，需用尽量去除残留的宿主蛋白。将预处理后的粗糖溶液通过 Capto adhere 层析介质，通过吸附洗脱的模式进行分离纯化。

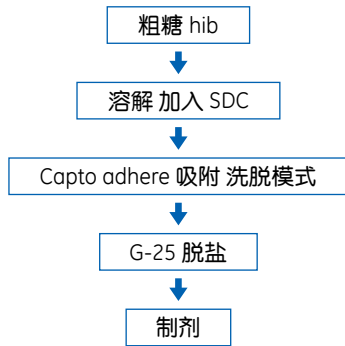


图 3. 粗糖纯化的流程。

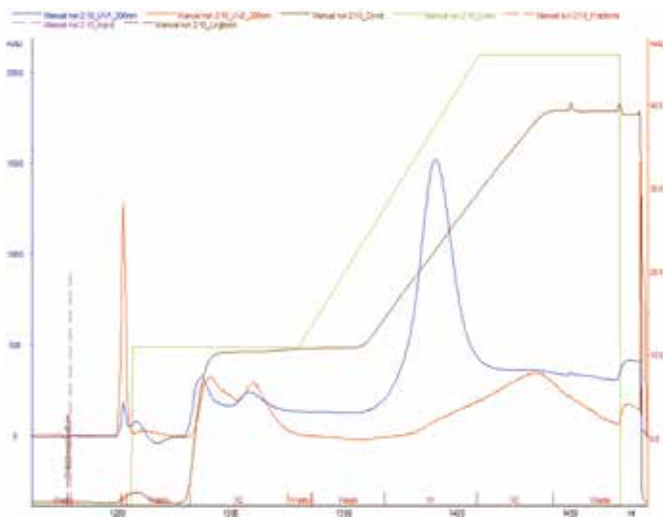


图 4. 层析纯化 hib 多糖的色谱图通过色谱图 206nm (blue) 和 A280nm (red) 吸收峰可以看出通过层析纯化可以将多糖与蛋白完全分开，达到多糖与蛋白核酸的分离作用，对多糖起到纯化效果。

表 2. hib 多糖层析后主要指标检测结果。

	蛋白 ug/ml	核酸 ug/ml	多糖 ug/ml	回收 %
Hiscreen	3.98	2.65	868	65.5
HiScale16/20	2.39	1.2	532	61.7
Axichrom50/20	2.74	1.35	770	61.5

三、23 价肺炎多糖疫苗纯化工艺

肺炎球菌引起肺炎，脑膜炎，败血病等症状，尤其是老年人和儿童是感染的高危人群，肺炎疫苗的上市大大降低了抗生素的滥用，和肺炎球菌感染的发病率，起到了有效的预防控制作用。上个世纪 80 年代就成功的制备出 23 价的肺炎，国内成都所 2006 年也开发出 23 价肺炎疫苗上市。GE 公司发 Fastrak 开发出了新的 23 价疫苗层析工艺，比传统的工艺具有更好的产率和效率。23 种产品只需要通过四套层析工艺就可以得到，在目前看来是十分高效纯化工艺。因此如果哪家企业有兴趣可以联系上海的 Fastrak 一起合作。

Fastrak 开发出了新的 23 价疫苗层析工艺，比传统的工艺具有更好的产率和效率。23 种产品只需要通过四套层析工艺就可以得到，在目前看来是十分高效纯化工艺。



四、订货信息

产品	包装	货号
Capto DEAE	25 ml	17-5443-10
Capto adhere	25 ml	17-5444-10
HiTrap Desalting	5 x 5 ml	17-1408-01
HiPrep 26/10 Desalting	1 x 53 ml	17-5087-01

五、参考文献

1. Handbook: Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods.
2. Instructions 28-9064-05 AA Multimodal media.
3. Data file Capto adhere 28-9078-88.

百白破三联疫苗的纯化

简介

吸附无细胞百白破联合疫苗目前在中国被纳入国家计划免疫疫苗品种，是预防百日咳、白喉、破伤风疾病的有效措施，无细胞百日咳疫苗原液 + 白喉类毒素 + 破伤风类毒素混合，吸附于铝盐上，可制成百白破三联疫苗 (DTPa)，该疫苗由于副作用小而代替全细胞百白破疫苗。研发趋势上，将 DTPa 与乙肝、伤寒、脊灰、Hib 多糖疫苗混合，已制得若干联合疫苗；利用破伤风类毒素良好的免疫原性与抗原性弱的疫苗如多糖偶联，如 Hib 多糖结合疫苗，可以降低注射针刺，减少接种量和对幼儿的不良反应。传统百白破疫苗工艺都是利用硫酸铵盐析或者蔗糖密度梯度离心方式对类毒素进行纯化，工艺回收率不高，技术相对落后。加上目前我国传统无细胞百日咳疫苗为两组分 (PT+FHA) 而我国十一五计划中已经提出增加百日咳疫苗组分至少有 PT, FHA, Prn 三种，基于上述现状，GE 医疗集团生命科学部开展了多组分疫苗层析开发工艺，以及用层析方式替代硫酸铵沉淀纯化细菌毒素疫苗。

一、无细胞百日咳三组分疫苗

百日咳杆菌引起的急性呼吸系统传染病。主要侵犯 6 岁以下婴幼儿，1 岁内占一半以上，主要危害为并发肺部感染和脑病，可致死亡。目前，为了减少传统百日咳疫苗的副作用，国际上已经开始百日咳组分疫苗，主要含有 PT、FHA 和 PRN 三种蛋白成分。中国“十一五”国家科技支撑计划也将百日咳列为重点项目，并希望疫苗中增加百日咳有效组份至少三个组分 (PT、FHA、Prn)，以赶上国际同类产品并符合 WHO 要求。GE healthcare life science 与国内知名疫苗企业合作开发出百日咳三组分 (PT、FHA、Prn) 纯化工艺，各组分纯度均高于 95%。

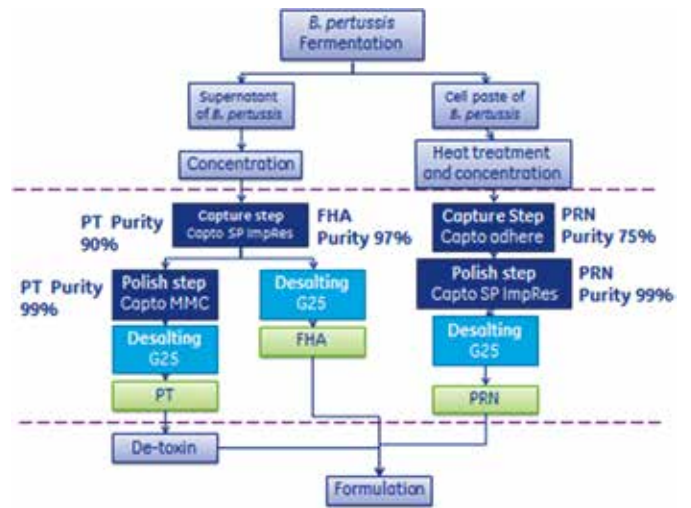


图 1. 纯化的流程。

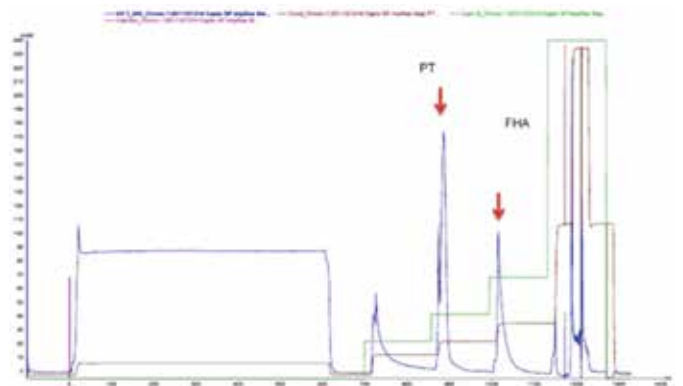


图 2. Captro SP ImpRes 捕获 PT FHA。

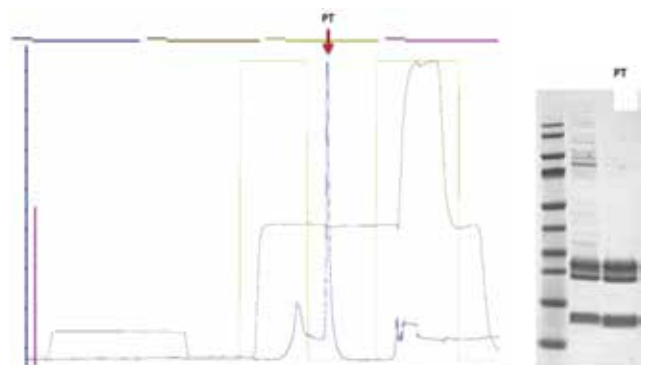


图 3. Captro MMC 精纯 PT。



图 4. Capto adhere 捕获 Prn。

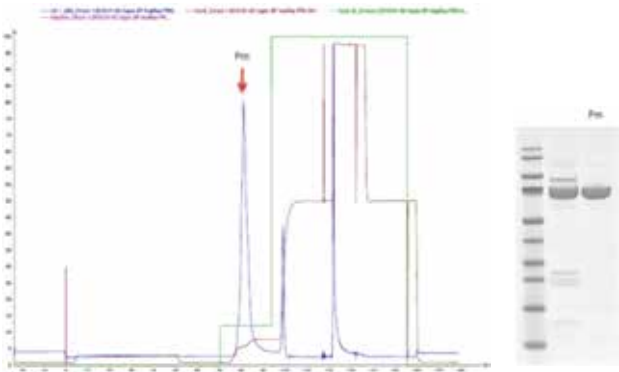


图 5. Capto SP ImpRes 精纯 Prn。

关注 tips: PTFHA 工艺 buffer 需要有 2M 尿素作为保护剂, 以防止蛋白聚集。直到配制前, 方可脱掉尿素, PT, FHA 的产量不一定, 一般是 PT 少, FHA 会多。大概在 1:2-1:4 这个区间。Prn 的表达量与发酵水平和菌体热处理工艺有关系。需要优化。

二、精制破伤风类毒素

吸附精制破伤风类毒素经过几十年的实际应用, 证明是一种安全的免疫制剂。但是在大规模人群接种时, 仍有不良反应发生, 主要是类毒素的纯度不高引起的, 高纯度的制品不良反应较低。因此, 改进精制方法, 在纯化过程中尽量去除非特异性的蛋白质, 是其研究的主要方向。近年来, 柱层析法已广泛应用于生物工程产品的纯化, 国内外已有用凝胶过滤和离子交换层析法纯化破伤风毒素的相关。GE 医疗生命科学部与客户共同开发用先纯化后脱毒的工艺路线, 来制备破伤风类毒素原液。收集的原液可以用于配置无细胞百白破疫苗, 另一方面与四价流脑或 Hib, 肺炎等多糖疫苗进行偶联, 制备成多糖蛋白结合疫苗。

工艺流程: 破伤风毒素发酵后滤液 → 加入一定浓度的硫酸铵等量混合 → Capto phenyl/ Phenyl FF → 收集目标峰 → G-25 脱盐 → Capto DEAE/DEAE FF → 收集目标峰为原液

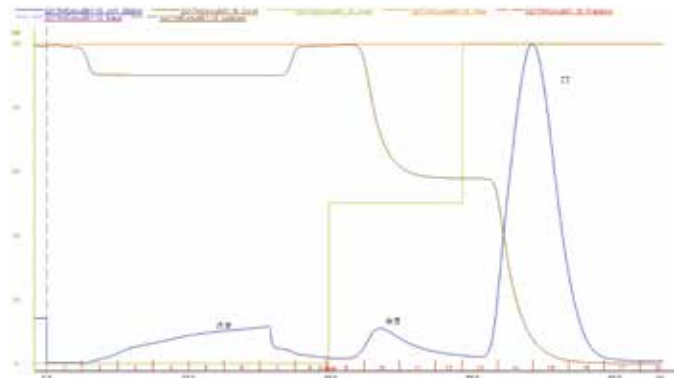


图 6. Capto Phenyl HS 捕获 破伤风毒素。

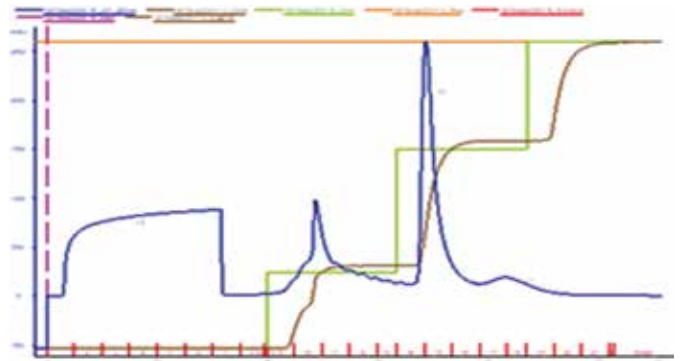


图 7. Capto Q ImpRes 精纯破伤风毒素。

关注 tips: 工艺总回收率在 40%-50% 之间, 高于传统工艺破伤风类毒素 20% 到 30% 回收率, 该工艺是活毒纯化, 所以对于操作人员是有一定危险性质。纯化破伤风毒素后, 用甲醛灭活, 使交联程度降到最低, 提高制品的免疫原性。

三、白喉无毒突变株 CRM197

CRM197 为白喉毒素的无毒突变体，经研究表明其免疫原性与白喉毒素几乎无差别，作为载体蛋白已经在国外得到广泛应用。例如惠氏的 13 价肺炎结合疫苗的载体就是这个突变株。目前很多公司也用该突变株与四价流脑或 Hib, 肺炎等多糖疫苗进行偶联, 制备成多糖蛋白结合疫苗, 这也是未来菌苗的发展趋势, 而目前大多公司都是通过真核表达该菌株。

工艺设计路线: 白喉 CRM197 发酵液 → 50KD 超滤浓缩 → 用 buffer 置换去除色素 → 浓缩液中计入硫酸铵, 饱和度 65% → 取沉淀, buffer 溶液透析过夜 → Capto DEAE, 收集多次目的峰 + 硫酸铵至 63% → 4 度静置 2 小时, 留心, 弃沉淀 → 上清为 CRM197 原液

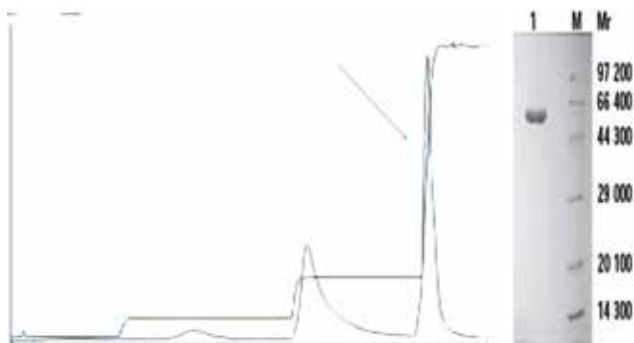


图 8. Capto DEAE 捕获白喉 CRM197。

四、订货信息

产品	规格	货号
Capto adhere	25 ml	17-5444-10
Capto SP ImpRes	25 ml	17-5468-10
Capto MMC	25 ml	17-5317-10
Capto Phenyl hs	25 ml	17-5451-01
Capto Q ImpRes	25 ml	17-5470-10
Capto DEAE	25 ml	17-5443-10
HiPrep 26/10 Desalting	1 x 53 ml	17-5087-01

五、参考文献

1. Salmaso S; Mastrantonio P; Tozzi AE Sustained efficacy during the first 6 years of life of 3-component acellular pertussis vaccines administered in infancy: The Italian experience [外文期刊]。
2. 吸附无细胞百白破、灭活脊髓灰质炎和 b 型流感嗜血杆菌 (结合) 联合疫苗 (DTaP-IPV/Hib 五联疫苗) 应用技术指南。
3. 顾洁, 苏林等层析法纯化破伤风毒素的试验研究。
4. 马艳, 秦敏 DTaP。sIPV 联合疫苗中 SabinIPV 免疫原性研究, 中华实验和临床病毒学杂志。
5. 陈静; 蒋强华; 卢宏波吸附无细胞百白破 - 重组乙型肝炎 (CHO 细胞) 联合疫苗的中试工艺 [期刊论文]- 中国生物制品学杂志 20093。

层析法纯化血浆蛋白

简介

血液制品主要指以健康人血液为原料采用生物学工艺或分离纯化技术制备的生物活性制剂。目前，国内常用的制备方法有 Cohn 氏低温乙醇沉淀法，离心法及压滤法，层析法等。其中，应用最多的是 40 年代发展起来的 Cohn 法以及改良法。随着国内生产能力的相对过剩，市场竞争日趋激烈的现状，各厂家急需改进生产工艺增加收率，改进产品质量，提高综合利用水平，开发新产品从而降低生产成本在市场竞争中立于不败之地。目前国内，随着血浆产品多元化的发展，对产品纯度质量的要求越来越高。特别是凝血类产品的需求告急，而用传统的粗放式生产很难获得高纯度的产品，所以血液制品工艺的改革势在必行。

从生产经济学角度来看，规模产量速度和重复性是生产工艺生存适应的基本组合。GE Healthcare life science 积累几十年层析技术研发的经验，专门为从中试生产到数千升以上规模的大生产车间提供稳定的高效率层析分离纯化设备和介质。配合先进的工艺技术，能为企业带来非常强的市场竞争力。

一、血浆蛋白的纯化平台

血浆的综合利用(9个产品)

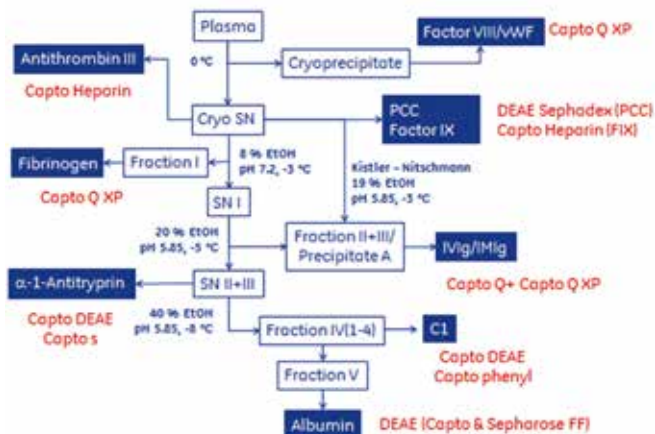


图 1. GE 的血浆综合利用平台。

静脉注射丙种球蛋白 (IVIG)

冷沉淀组分 I+II+III 沉淀溶解后使用辛酸病毒灭活，板框深滤，通过两步串联离子交换柱吸附杂蛋白。第一步通过 Copto Q 达到 95% 以上的回收率，同时载量达到 200g/

l，第二步用超大孔的阴离子交换 copto Q XP 凝胶，用于吸附残留的 IgM 和 IgA，达到 90% 以上的回收率，载量 120g/l。总收率达到 60% 以上，质量达到欧美标准。

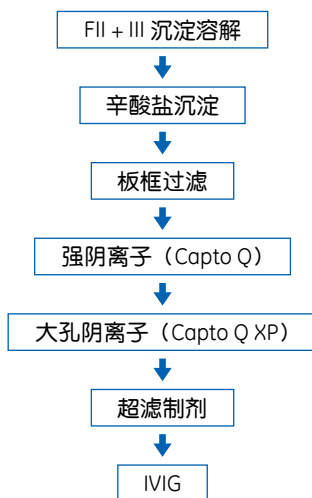


图 2. FII + III 沉淀层析法制备 IVIG。

凝血因子八 (FVIII)

A 型血友病病人需要通过定期输入血浆来源八因子或重组人八因子进行治疗。Copto Q XP 是大孔的强阴离子交换填料，具有亲水性的骨架，有助于保持八因子的活性，改善了 MarcroCap Q 的不耐压的缺点，具有很好的机械强度，非常适合工业化生产。

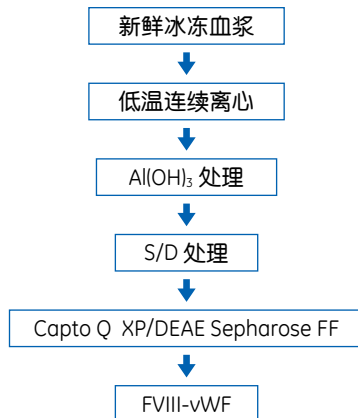


图 3. 层析法制备凝血八因子。

表 1. FVIII 新旧工艺对比。

	传统工艺	GE 工艺
终产品的活性	15 IU/mg protein	>50 IU/mg protein
回收率 (IU/L 血浆)	80-150	150-250
FVIII:vWF 比例	不确定	可以控制
操作环境	离心, 苛刻	温和的结合与洗脱条件
病毒去除	需要专门的步骤	与 SD 结合灭活病毒

重组人凝血因子八 (rhFVIII)

VIIISelect 亲和层析显著简化了重组八因子的生产工艺, 可以高载量实现八因子的快速高纯度捕获, 达到 20000IU/ml 载量, 将亲和层析和离子交换 / 分子筛等技术相结合, 进一步提高产品纯度, 有效去除 HCP, DNA 等杂质。

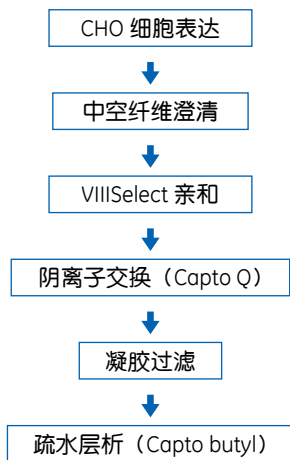


图 4. 重组 FVIII 的工艺流程。

抗凝血酶 III (ATIII)

ATIII 被用于治疗先天性或后天性 ATIII 缺乏症患者。目前

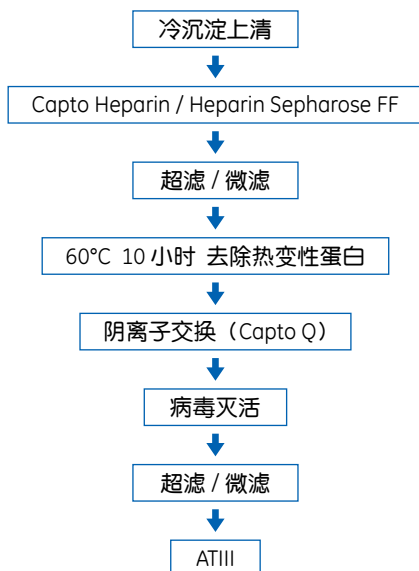


图 5. AT III 层析纯化工艺。

普遍采用肝素亲和的方法进行纯化, Capto Heparin 是 GE 专为工业生产设计的最新的高动态载量的肝素亲和胶, 不仅能一步得到高纯度的 ATIII, 同时保持高的回收率, 并且能耐受 0.1M NaOH 的清洗, 大大提高填料的寿命。

PCC 凝血酶原复合物

PCC 凝血酶原复合物原有的工艺是两步 DEAE Sephadex A-50, 现将第二步改换成高流速 Capto DEAE 填料, 便于装填工业规模层析柱, 可自动化操作, 提高生产效率回收率, 并实现过程的尽量可控。

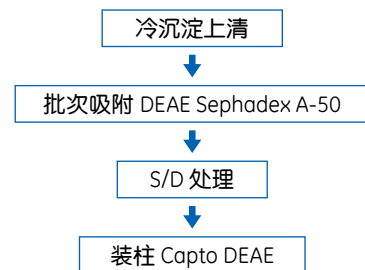


图 6. PCC 层析纯化工艺。

凝血九因子 FIX

缺乏 FIX 的乙型血友病人需长期输注凝血酶原复合物作治疗, 但是该复合物中的一些致血栓性物质可能引起广泛性静脉血栓。因此, 不含其他凝血因子如 FII、FVII 和 FX 的高纯度 FIX 成品需求尤为迫切。层析技术使生产高纯度 FIX 的浓缩产品变为可行, 新介质 Capto Heparin 填料的应用可以加快纯化的速度及下游处理能力。

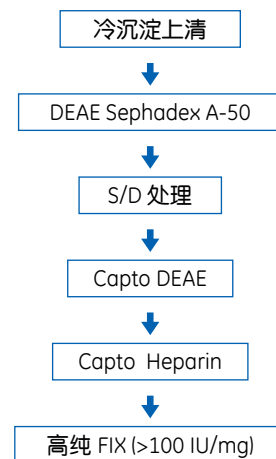


图 7. FIX 层析纯化工艺。

$\alpha 2$ - 巨球蛋白 ($\alpha 2$ -Macroglobulin)

$\alpha 2$ - 巨球蛋白有与多种酶结合并抑制其酶活性的作用，能增强骨髓产生白细胞的能力。 $\alpha 2$ 巨球蛋白制剂多用于防治放射性损伤，对放射治疗引起的溃疡病人有促进伤口愈合功能。

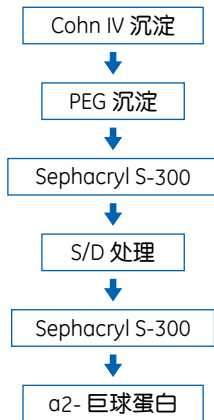


图 8. $\alpha 2$ 巨球蛋白工艺流程。

$\alpha 1$ - 抗胰蛋白酶 $\alpha 1$ -antitrypsin

$\alpha 1$ - 抗胰蛋白酶是机体内的一种丝氨酸蛋白酶抑制剂，它的主要作用是能抑制和清除弹性蛋白。酶而这种弹性蛋白酶可以破坏结缔组织的弹性蛋白，特别是在肺组织实质内 $\alpha 1$ -AT 制剂主要用于 $\alpha 1$ -AT 抗胰蛋白酶缺乏合并肺气肿和脂膜溃疡病人的治疗。AAT 的纯化流程如下：

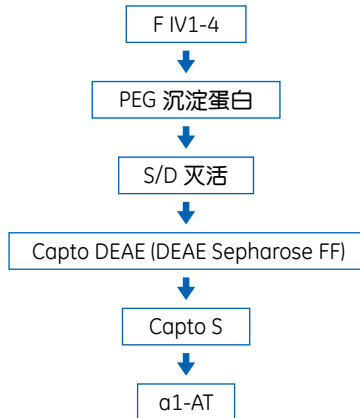


图 9. $\alpha 1$ -AT 的工艺流程。

白蛋白

自安发玛西亚生物技术公司从 1977 年成功开发出全层析技术生产白蛋白八因子及免疫球蛋白的工艺以来此方法已经在世界范围的许多国家和地区得到运用。在马其顿王国 504 批 20 年的层析法白蛋白的生产和临床应用证明层析技术的可靠性及安全性。此层析技术同时更广泛的应用到各血液制品生产厂家与 Cohn 法结合在 IVIG 白蛋白生产去除热原等方面大量使用。全层析法白蛋白具体工艺如下：

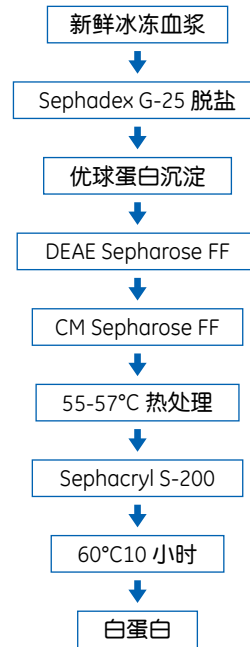


图 10. 白蛋白的工艺流程。

纤维蛋白原 Fibrinogen

纤维蛋白原是一种多功能血浆球蛋白，在肝脏合成，其主要功能是作为凝血因子 I 直接参与体能凝血过程。工艺流程包括组分 I 溶解，S/D 灭活病毒，用层析纯化，经浓缩后可以冻干纤维蛋白原得到产品。

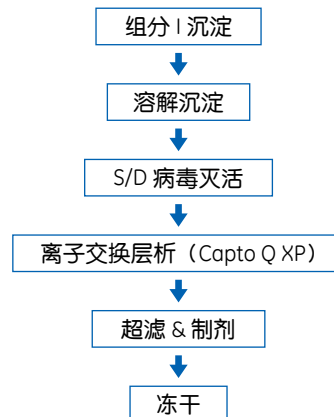


图 11. 纤维蛋白原纯化的工艺流程。

纤维结合蛋白 Fibronectin

Fn 是存在于细胞表面和血浆中的高分子糖蛋白。Fn 在治疗疱疹性角膜炎所致的角膜溃疡，疱疹及外伤性角膜糜烂，糖尿病患者晶状体摘除后角膜上皮损伤等角膜病有显著疗效。采用 Gelatin Sepharose, Heparin Sepharose 亲和层析法可以从血浆或冷沉淀中提取纯化 Fn 当然还需要加入病毒灭活步骤。

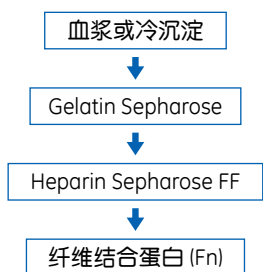


图 12. 纤维结合蛋白纯化的工艺流程。

C1 Inhibitor

C1 是丝氨酸蛋白酶抑制剂家族成员之一，在调节补体系统、凝血系统、激肽系统、纤溶系统活性方面有非常重要的作用。血浆中 30-50% 的 C1 存在于 Frac IV，可与 AAT 同时综合利用。临床应用领域，C1 是治疗遗传性血管神经性水肿 (HAE) 或获得性血管神经性水肿 (AAE) 的特效药。

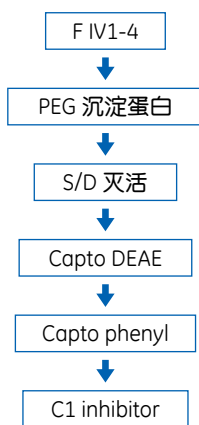


图 13. C1 Inhibitor 工艺流程。

二、订货信息

产品	数量	货号
Capto Q	100ml	17-5316-02
MacroCap Q	500mL	17-5469-02
Capto Heparin	200ml	17-5462-02
Heparin Sepharose 6 FF	250ml	17-0998-25
DEAE Sepharose FF	500ml	17-0709-01
DEAE Sephadex A-50	100g	17-0180-01
Sephacryl S-200 HR	750ml	17-0584-01
Sepharose Fast Flow	1L	17-0149-01
SP Sepharose FF	300ml	17-0729-01
Sephacryl 300 HR	750ml	17-0599-01
Gelatin Sepharose	1L	17-0976-03
VIIISelect	500ml	17-5450-02
Q Sepharose Fast Flow	300ml	17-0510-01
CM Sepharose FF	500ml	17-0719-01
Capto S	100ml	17-5441-01
Butyl Sepharose 4 FF	200ml	17-0978-02
Sephadex G-25 Medium	100g	17-0033-01

三、参考文献

1. Justin T. McCue*, Keith Selvitelli, Joshua Walker. Application of a novel affinity adsorbent for the capture and purification of recombinant Factor VIII compounds. Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 7824-7830
2. US patent 6005082. Anna-Lisa Smeds, Sollentuna. Process for purification of factor VIII.

重组细胞因子的纯化

简介

重组细胞因子是利用基因工程技术生产的细胞因子的产品，作为药物用于治疗肿瘤、感染、造血障碍等，可收到良好的疗效。通过基因工程技术和多种层析分离技术表达纯化的高纯度活性细胞因子可以有效促进免疫细胞、干细胞的体外生长，用于细胞治疗等相关研究领域。多种相关新药已经上市。

近年出现的动物细胞表达的细胞因子具有完整的糖基化等翻译后修饰，避免蛋白复性，稳定的天然构象使因子比活和长期稳定性有显著改进，逐渐成为技术发展趋势。新型 Capto 系列层析填料，为来自不同表达系统的多种细胞因子提供高效的生产纯化技术工具，通过对于宿主杂蛋白、DNA 以及未糖基化修饰完全的变体和异构体的有效去除，成功得到多种性质均一的活性细胞因子，提高比活性。

常见的重组细胞因子有：干扰素（Interferon, IFN）、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor, TNF）、集落刺激因子（colony-stimulating factor）、趋化因子（chemokine）、生长因子（growth factor, GF）、白细胞介素系列（interleukin, IL）等。

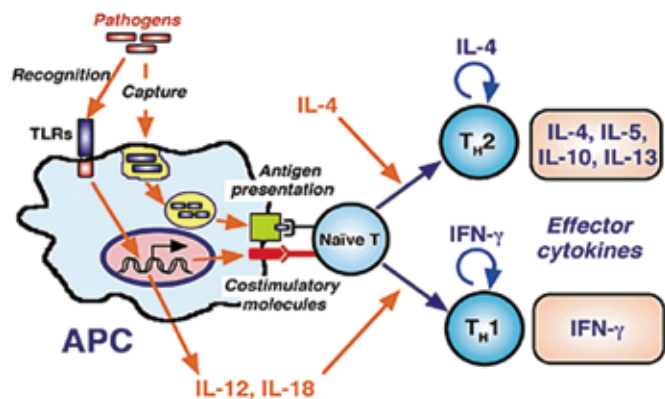


图 1. 细胞因子的功能。

一、原核表达细胞因子的纯化工艺

重组人干扰素 $\alpha 2b$ (rh-IFN $\alpha 2b$) 的纯化:

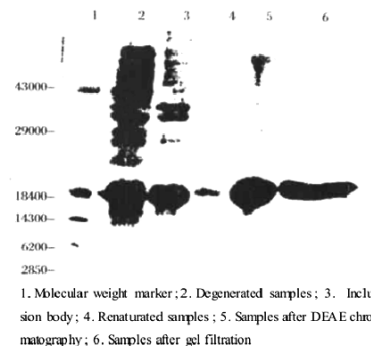
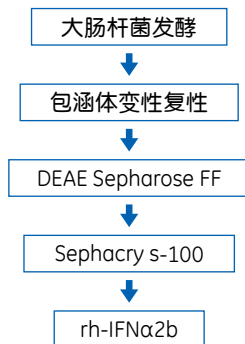


图 2. 干扰素纯化流程图及电泳检测图谱，纯度可达 95% 以上，比活达到 1.2×10^8 IU/m 以上。

肿瘤坏死因子 (TNF) 纯化工艺:

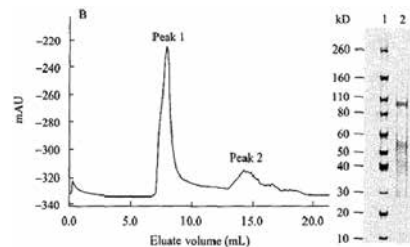
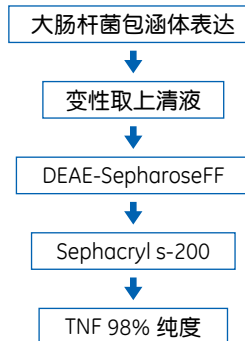


图 3. TNF 的纯化流程图及 Sephacryl s-200 色谱图。

重组人集落刺激因子 (rhG-CSF) 纯化工艺:

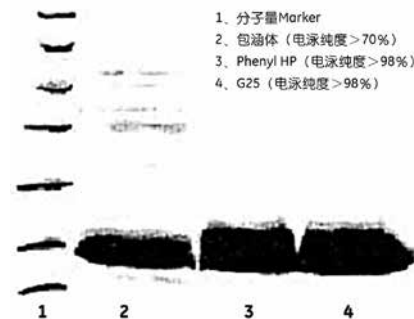
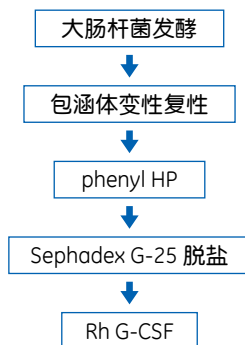


图 4. rhGCSF 的纯化流程图及电泳检测图谱，纯度 >98%。

趋化因子 (chemokine) 纯化工艺:

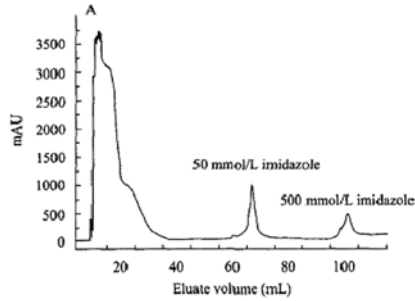
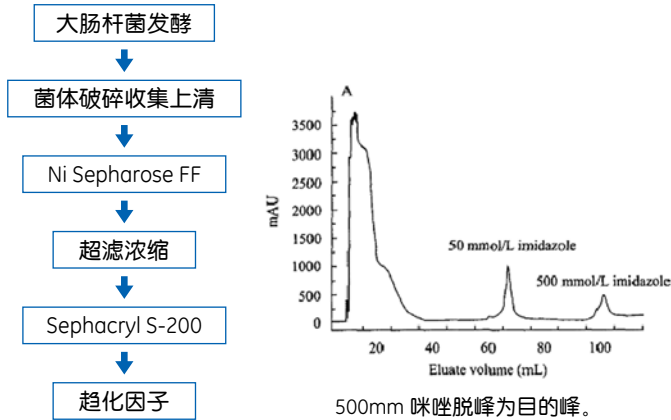


图 5. 趋化因子的纯化流程图及 Ni 亲和层析图谱。

二、动物细胞表达细胞因子纯化工艺

相比细菌原核表达的细胞因子而言，哺乳动物细胞，如 HEK293 人细胞表达过程中避免了包涵体形成和复性，天然的正确折叠构象和翻译后修饰有利于提高比活性。GE Healthcare 可以提供多种层析分离技术，用于高纯度细胞因子的纯化、生产和分析。

重组人肿瘤坏死因子 (TNFα) 纯化工艺:

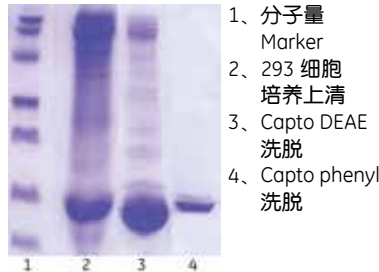
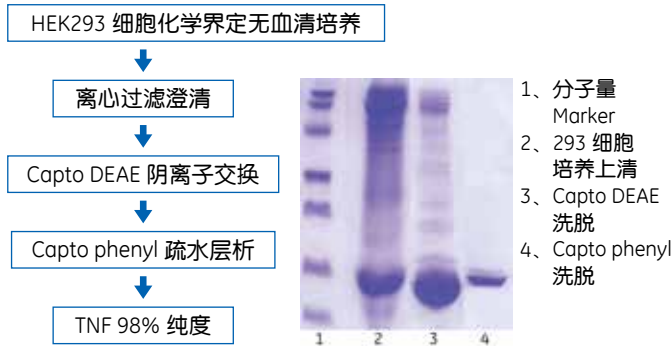


图 6. HEK293 表达 TNFα 纯化流程图及电泳图谱。

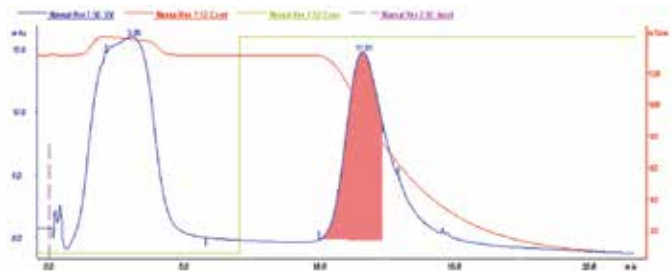
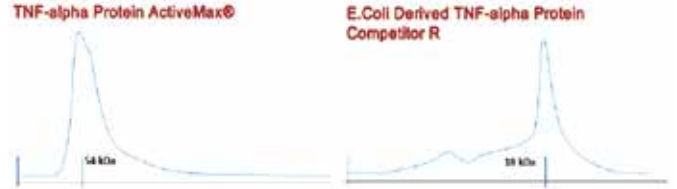


图 7. Capto phenyl 精纯层析图谱 (红色部分为活性组分)。

Capto 系列疏水层析填料提高载量的同时，通过改进传质效果进一步减小洗脱峰宽度，因而具有更好的分辨率和收率。



Left: TNFα from HEK293 (ActiveMax®): Active trimer
Right: Refolded TNFα from *E.Coli*: Monomer

图 8: 趋化因子的纯化流程图及层析图。

Superdex 分子筛结果显示，HEK293 细胞来源 TNFα 可保持天然三聚体结构 (表观分子量 54kD)，具有更好的比活和稳定性。

重组血管内皮生长因子 (VEGF165) 纯化工艺:

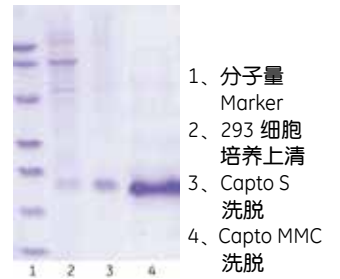
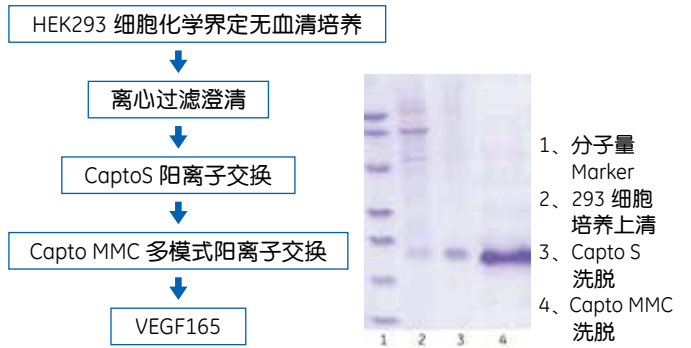


图 9. HEK293 表达 VEGF165 纯化流程图。

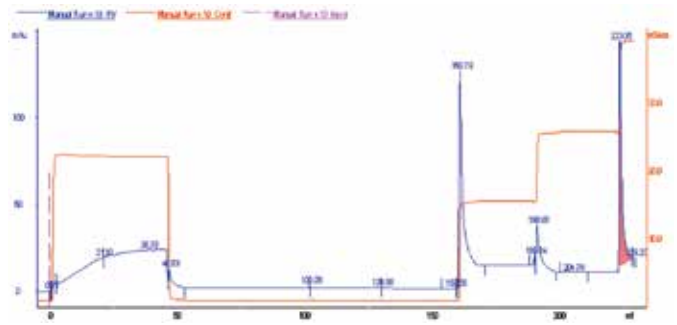


图 10. Capto MMC 精纯 VEGF165 层析图谱。

使用新型多模式 Capto MMC 阳离子交换层析，S 洗脱峰可以高盐直接进样，免去样品进样前的脱盐或稀释步骤，有利于层析步骤间的衔接。Capto MMC 温和的洗脱方式有利于保护蛋白活性，最终得到高纯度 VEGF165，和较低等昆虫细胞表达 VEGF165 相比具有正确均一的糖基化，因而具有更高的比活。

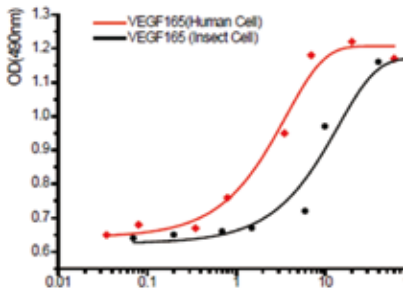


图 11. 不同细胞宿主表达 VEGF165 的活性比较。

重组人白介素 -4 纯化工艺:

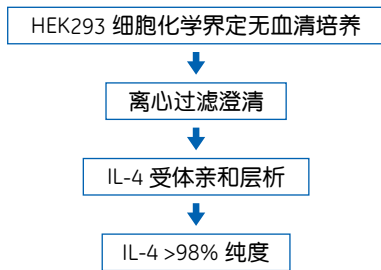


图 12. HEK293 表达 IL-4 纯化流程图。

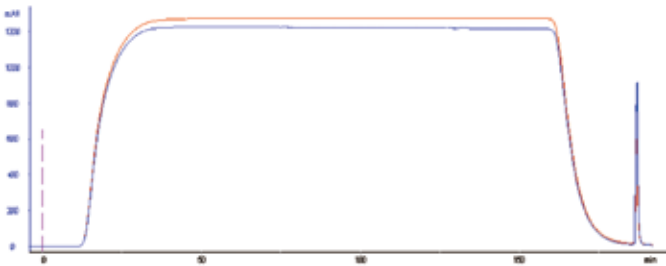
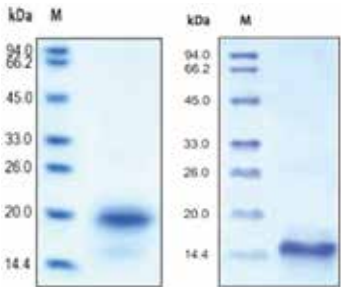


图 13. 受体亲和层析纯化 IL-4 层析图谱。

使用 NHS 预活化填料偶联制备 IL-4 receptor 受体亲和层析填料，用于 HEK293 细胞表达 IL-4 的特异亲和纯化，可以一步达到 98% 以上的纯度。



Left: IL-4 from HEK293 (ActiveMax*): 20kDa
Right: IL-4 from *E.Coli*: 15kDa

图 14. 不同宿主细胞表达 IL-4 的比较。

和细菌表达相比，HEK293 细胞表达 IL-4（左图）因糖基化修饰具有较大分子量（左图，20kDa），比活性相应提高 5 倍（Data not shown）。

三、订货信息

产品	数量	货号
Hiprep 16/60 Sephacryl S-100 HR	1	17-1165-01
Hiprep 16/60 Sephacryl S-200 HR	1	17-1166-01
DEAE Sepharose FF (25ml)	1	17-0709-10
Q Sepharose HP (75ml)	1	17-1014-01
Phenyl Sepharose 6 FF (HS) (l)	1	17-0973-10
Phenyl Sepharose HP (75ml)	1	17-1082-01
Sephadex G-25 Fine (100g)	1	17-0032-01
Sephadex G-50 Superfine (100g)	1	17-0041-01
Ni Sepharose HP (25ml)	1	17-5268-01
HiTrap Canto Q	5 × 1 ml	11-0013-02
HiTrap Canto S	5 × 1 ml	17-5441-22
HiTrap Canto DEAE	5 × 1 ml	28-9165-37
Canto Q1	25 ml	17-5316-10
Canto S1	25 ml	17-5441-10
Canto DEAE1	25 ml	17-5443-10
HiTrap Desalting	5 × 5 ml	17-1408-01
Canto MMC	25 ml	17-5317-10
HiTrap Canto MMC	5 × 1ml	11-0032-73
Canto Phenyl (high sub)	25 mL	17-5451-01
HiTrap* Canto Phenyl (high sub) [†]	5 × 1 mL	17-5451-08
Superdex75 10/30GL	1	17-5174-01
NHS activated 4FF (25ml)	1	17-0906-01

四、参考文献

1. 重组人干扰素 $\alpha 2b$ 的提取和纯化
2. 重组人表皮生长因子的分离和纯化工艺的研究
3. 肿瘤坏死因子的分离纯化
4. 趋化因子受体 CXCR4b 在大肠杆菌中的高效表达、增溶及纯化
5. 两步连续离子交换制备色谱分离纯化聚乙二醇化重组人粒细胞集落刺激因子
6. 重组人白介素 18 的发酵、纯化及功能鉴定技术
7. ActiveMax[®]: Best Cytokines Expressed in Human Cells, <http://www.acrobiosystems.com/A161-ActiveMax%C2%AE-Best-Cytokines-Expressed-in-Human-Cells.html#>

Special thanks:

以上 HEK293 细胞表达细胞因子工艺相关数据由 ACROBiosystems USA 友情提供。ActiveMax* 无动物源性成分活性细胞因子为 ACROBiosystems 公司商标。

多肽的纯化

简介

氨基酸之间可以通过肽键相连，分子量在 5000~3000 之间的肽称为“大肽”；分子量在 3000~1000 之间的肽称为“多肽”，分子量在 1000~180 之间的称为“小肽”、“寡肽”、“低聚肽”，也称为小分子活性多肽。大多数多肽都是化学合成的，只有非常少的肽是来源于天然提取。更大的肽一般指超过 25 氨基酸需要通过重组 DNA 的技术表达生产。自然界中 20 种氨基酸，按照其取代基团性质差异而呈现不同的酸碱性，疏水性，芳香族或者极性侧链。这些侧链的不同属性可以作为进行色谱分离的基础。多肽的紫外吸收通常在 206nm-220nm，如果含有芳香族的基团，紫外的吸收最大值会在 268nm-280nm 检测到。

多肽来源分为：天然肽如激素，某些抗生素，人体内的脑啡肽，谷胱甘肽和细菌的毒素都是天然存在的肽；合成多肽如合成胸腺肽，重组多肽如 EGF，及蛋白的多肽消化片段。

一、多肽纯化技术简介

1、反相分离技术（首选技术，小肽常用）

SOURCE 骨架的反相层析填料为目前可在中压系统中操作的最小孔径凝胶。与传统的硅胶骨架的反相介质相比，SOURCE 填料能在 pH1-14 稳定工作，并可以用 1M NaOH 进行清洗再生，高流速低压，应用范围更广，寿命更长。

- SOURCE 30RPC 适合中度或精细纯化
- SOURCE 15RPC 适合精细纯化
- SOURCE 5RPC 适合分析或精细纯化



图 1. SOURCE RPC 颗粒在电子显微镜下的图片。每个颗粒都是大小均匀，绝无碎片和破碎颗粒。

用 Source 5RPC 在 pH9.5 条件下分析用胰酶消化的 BSA 的还原肽图。

System: ÄKTA™ purifier
 Sample: RVP-BSA-mT, ca 750 pmol
 Column: SOURCE 5RPC ST 4.6/150
 Eluent A: NH₄OH/HCOOH, 10 mmol/l, pH 9.5
 Eluent B: 60% acetonitrile in eluent A
 Gradient: 0–67% B over 115 ml i.e. 46 column volumes (CV)
 Flow rate: 0.5 ml/min

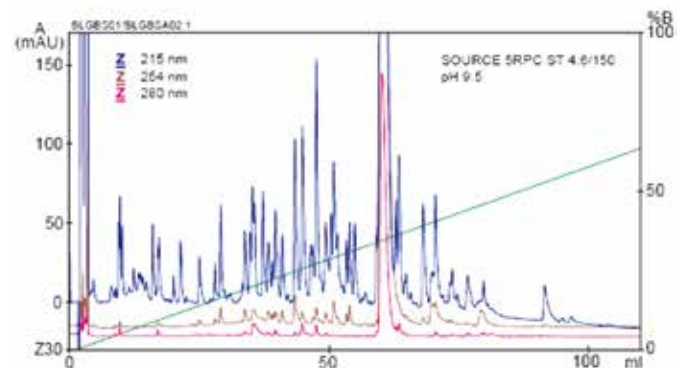


图 2. 在高 pH 值下进行反相层析分析 RVB-BSA-MT 的肽图。

合成的阿尔茨海默氏病人中发现的淀粉样蛋白-β 1-42 肽粗产物溶解在 125 mmol/l, pH 13 的氢氧化钠溶液中，上柱前再稀释。图 2 为优选各种方法，其结果表明用 pH 9.0 氨水 / 甲酸能得到最好的分离。

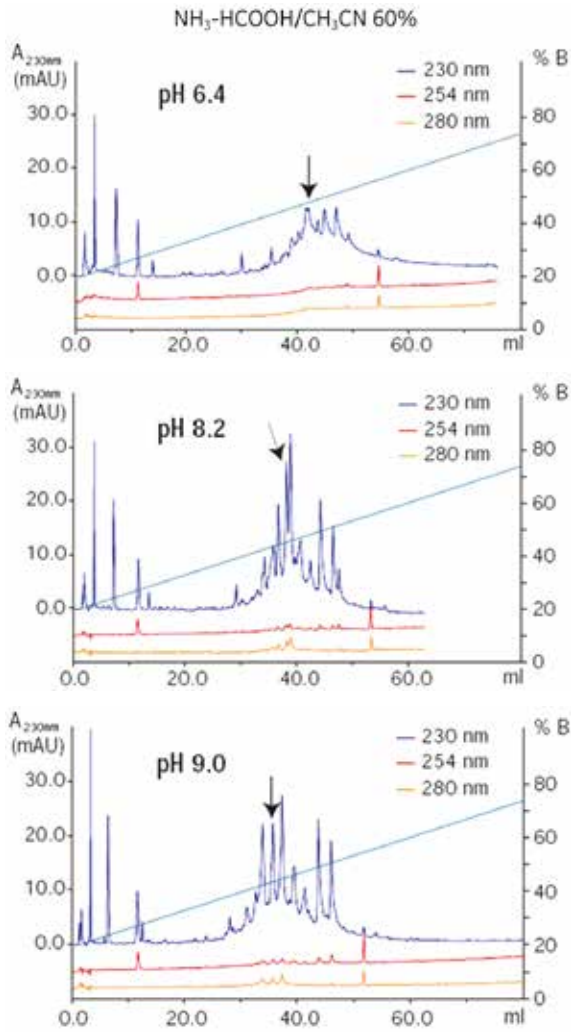


图 3. 不同 pH 条件下用 SOURCE 5RPC 反相层析柱分析引起老年痴呆症的淀粉样肽。

样品: 血管紧张肽 II 和 III
 层析柱: SOURCE 30RPC HR10-10 8ml
 流速: 4 ml/min

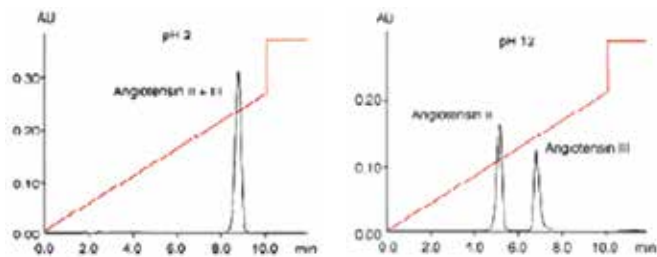


图 4. 在碱性条件下用 SOURCE RPC 分离、检测仪相差一个氨基酸的多个血管紧张肽。

2、分子筛技术

是利用多肽分子大小、形状差异来分离纯化多肽物质。Superdex peptide 专门分离多肽类产品的高分辨率分子筛凝胶，分离的分子量范围为 100-7000Da。高化学稳定性，pH1-14，兼容有机溶剂 (乙腈 + TFA)。

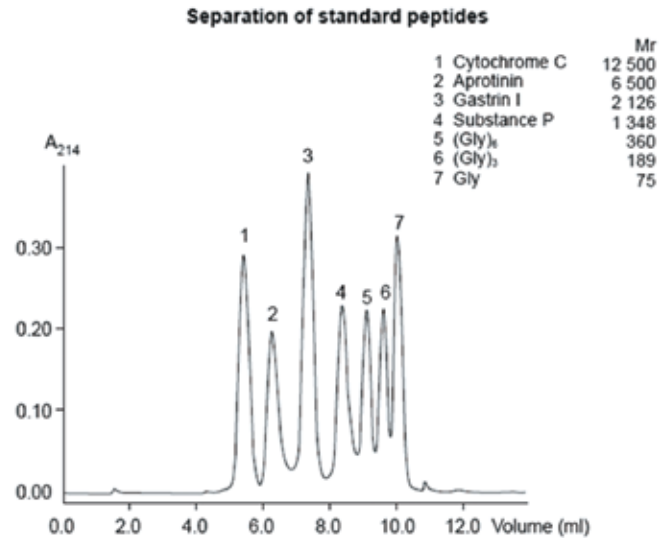


图 5. 用 superdex peptide 分离不同分子量的肽。

3、离子交换分离技术

当分离的多肽带有电荷的时候，可以选择用离子交换层析进行分离，通常离子交换会和 RPC 及 SEC 相结合分离复杂的样品，如酶解多肽片段或者合成多肽，及天然来源的多肽。用于精细分离的离子交换填料，如 HP, SOURCE, Mono, Mini 等精细填料非常适合多肽的分离。

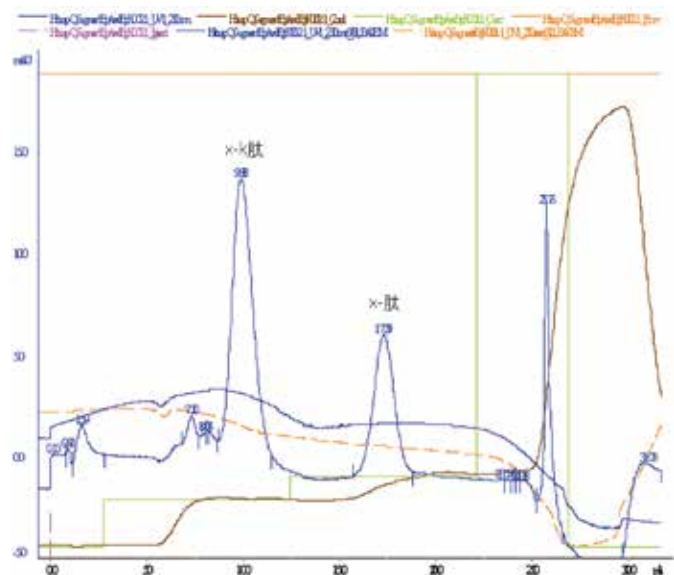


图 6. 通过 Q Sepharose HP 将 X 肽的前体 x-k 肽之间的差异是 x-k 在 X 肽的 c 端多了个 lysine 分开。

二、多肽分离技术的综合运用

对于大多数的多肽来说，仅仅一步纯化或一种技术应用是不够的，通常会将反相，离子交换和凝胶过滤这三种技术综合起来进行多步纯化，最终达到高的分辨率。

例 1: PY574a 多肽, 14aa, pI>10, 在酸性条件下不溶, 在碱性条件下进行纯化, 通过离子交换和反相技术的结合, 纯度达到 99%。

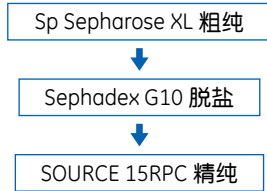


图 7. PY574a 多肽纯化流程。

例 2: 获得高纯度胸腺肽 $\alpha 1$ 可以利用生物提取法、化学合成法、基因工程法三种途径进行生产。三种方法各有优缺点, 但不论哪种生产方法, 为获得高纯度的胸腺肽 $\alpha 1$ 产品, 层析技术在每种生产方法中都发挥重要作用。

生物提取法: 多步柱层析法是提高胸腺肽 $\alpha 1$ 的纯度及活性的有效方法。采用 DEAE Sepharose Fast Flow 和 CM Sepharose Fast Flow 双柱串联连接, 0.02 mol/L PB 平衡, NaCl 梯度洗脱纯化。纯化后的 $T\alpha 1$ 玫瑰花结率达 33% (绝对值) 以上, 且与传统的超滤工艺相比过敏反应低, 安全性高。由于双离子交换收集的为流穿峰, 比较适合规模化生产。

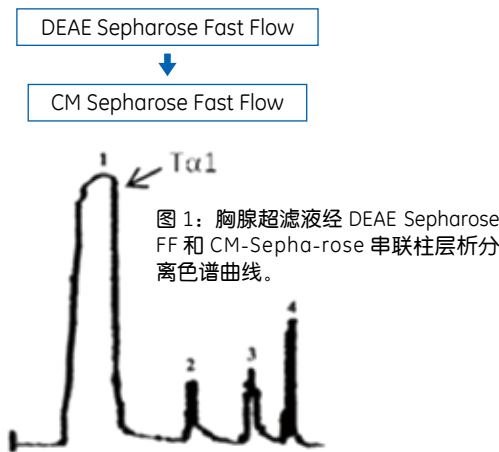


图 1: 胸腺超滤液经 DEAE Sepharose FF 和 CM-Sepha-rose 串联柱层析分离色谱曲线。

图 8. 天然胸腺肽 $\alpha 1$ 的双离子交换串联层析。

化学合成法: 就 $T\alpha 1$ 的化学合成法的生产工艺而言, $T\alpha 1$ 的纯化通常采用反相色谱法和离子色谱法。反相色谱具有极高的分辨率, 可以分离大部分杂质, 离子色谱的分离基于带电荷的差异, 常作为反相色谱的补充纯化合成多肽。

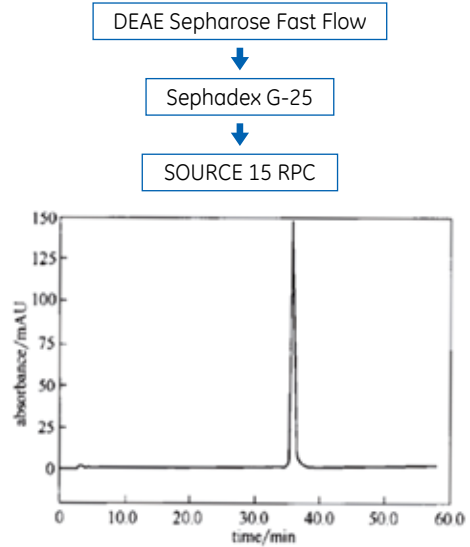


图 9. 化学合成 $T\alpha 1$ 的纯化工艺及合成 $T\alpha 1$ 的 HPLC 图谱。

基因工程法: 对于基因工程法来说, 将 $T\alpha 1$ 与其他标签蛋白进行融合表达, 通过亲和层析的方法纯化融合蛋白后, 再切除标签, 获得重组的 $T\alpha 1$ 。由于亲和层析高度的特异选择性, 所得 $T\alpha 1$ 的纯度往往高于 95%。

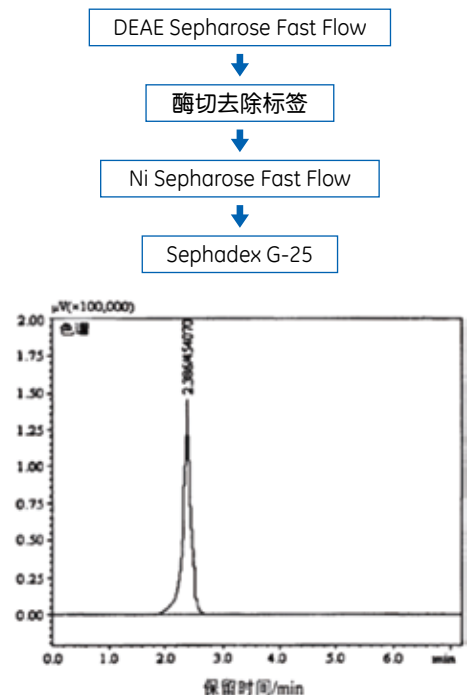


图 10. 重组人胸腺肽 $\alpha 1$ 的分离纯化及 重组 $T\alpha 1$ 的 HPLC 图谱。

三、不同来源多肽纯化的总结：

- 用 SOURCE 骨架的反相填料，可以在更宽的 pH 进行工艺优化，具有更强的适用性以分离各种肽类。
- 离子交换技术很适合合成多肽和天然多肽的纯化，特别在粗纯的步骤。
- 如果反相和离子交换技术都效果不好，原因可能是溶解性的问题。
- 使用凝胶过滤如 Superdex peptide，Sephadex LH20 都很好的用在多肽纯化中。
- 需要增加选择性，载量和稳定性：用多维纯化方法，可以将离子交换，分子筛和反相层析等多种技术结合，而代替一步反相或反复用反相柱子纯化。

四、订货信息

产品	数量	货号
Superdex 30 prep grade*	1	17-0905-01
SOURCE 5RPC ST 2.1/150	1	17-5208-01
SOURCE 5RPC ST 4.6/150	1	17-5116-01
SOURCE 15RPC ST 4.6/100	1	17-5068-01
RESOURCE™ 15RPC* 1 ml	1	17-1181-01
RESOURCE 15RPC** 3 ml	1	17-1182-01
SOURCE 15RPC 10 ml	1	17-0727-20
SOURCE 30RPC 10 ml	1	17-5120-20
SOURCE 30RPC 200 ml	1	17-5120-02
SOURCE 15RPC 10 ml	1	17-0727-20
Peptide Marker Kit	1	80-1129-83

五、参考文献

1. Staffan Renlund. Purification of a phosphorylated PDGF α -receptor derived.
2. peptide at high pH using a polymer stationary phase'AB Application Note 18-1132-63.
3. Courtesy of professor da-fu Cui, Institute of Biochemistry and Cell Biology, CAS.
4. ChaoYu et al, Pharmaceutical Biotechnology, 1998 5(2), 103-108.
5. Q-H Huang et al, Pharmaceutical Biotechnology, 2001 8(4), 207-209.
6. Detection and characterisation of oligosaccharides in column effluents using surface plasmon resonance. Fourteenth International Symposium on the separation and analysis of Proteins, Peptides, and Polynucleotides, Heidelberg, Germany. (1994). Fägerstam, L., Blikstad, I., Bhikhabhai, R. et al.
7. the new generation of polystyrene divinyl benzene Reversed Phase Chromatography media, 18-1132-46.
8. Downstream 29, P18-19, 18-1135-38.
9. “Reverse Phase Chromatograph” 手册 18-1134-16。
10. 李光谱, 迟春萍, 张秀霞, 关晓峰, 王志武, 盛军, 郭岩. 胸腺肽纯化工艺的改进. 中国生物制品学杂志, 2003, 16(3): 177-178.
11. 刘标, 汤斌, “高纯度胸腺肽 α 1 的制备”。化工学报, 2013, 64 (7) : 2497-2502.
12. 秦伟涛, 陈劲春, “重组人胸腺肽 $T\alpha$ 1 在大肠杆菌中的表达与分离纯化”。

病毒载体的纯化

简介

基因治疗是指用正常或野生的基因矫正或置换致病基因的治疗方法。基因治疗需要利用载体将起治疗作用的基因导入靶细胞使其与宿主染色体整合为一体或在宿主细胞中表达，从而起到治疗的作用。基因治疗载体中常用的病毒载体有逆转录病毒载体，腺病毒载体 AdV，腺相关病毒载体 AAV，慢病毒载体和单纯疱疹病毒载体等。

一、腺病毒 AdV 纯化

腺病毒是一个 20 面体的无包膜双链 DNA 病毒，直径 70-90 nm，含有 14 种蛋白，它用于基因治疗是基于它的几个优良特征：在培养液中很容易生产；能感染各种细胞型；腺病毒基因整合进宿主细胞染色体的危险小；容易对其进行基因水平操作和制备突变体或删除病毒；病毒粒子非常稳定不易被破坏。



图 1. 腺病毒 Ad5 的下游纯化工艺。

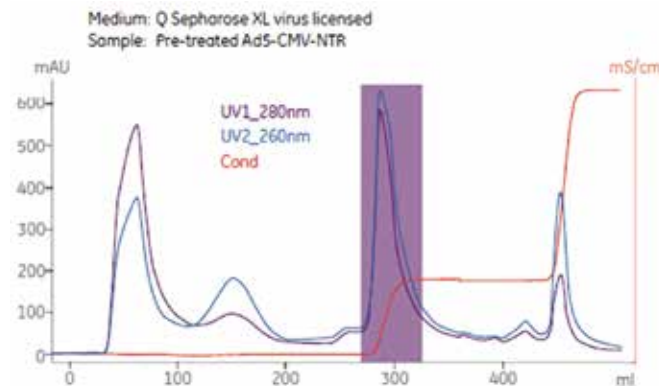


图 2. Q Sepharose XL 离子交换介质纯化腺病毒的层析图。

Q Sepharose XL 是在琼脂糖骨架表面增加了葡聚糖链的柔软的手臂，增加了大分子特别是病毒的接触有效面积，能快速纯化病毒，同时能放大生产。

二、腺相关病毒 AAV 纯化

腺病毒相关病毒是很小的单链 DNA 病毒，属细小病毒科，有六种人血清型，全都是非致病性的病毒。这些病毒能够用于基因治疗优势是目的基因能够持续在宿主细胞内表达，减少了需重复使用的试剂量。



图 3. 层析纯化腺病毒相关病毒，血清型 2 和血清型 5 工艺流程。

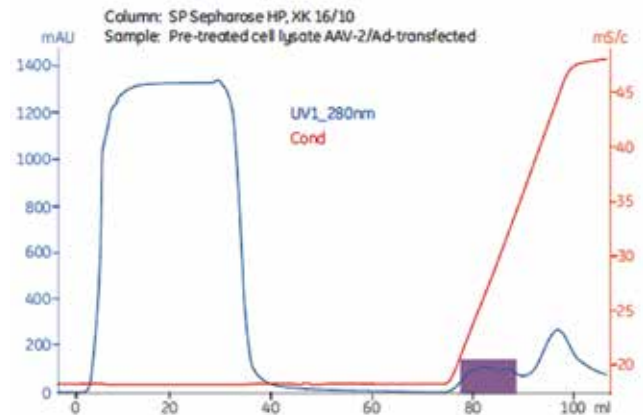


图 4. SP Sepharose HP 纯化 AAV-2 病毒。

GE 最新开发了一种用于纯化腺相关病毒的亲和介质 AVB Sepharos™ High Performance，能快速一步纯化腺相关病毒的许多亚类。具体信息可以通过热线 8008109118 进行咨询。

三、反转录病毒纯化

反转录病毒颗粒为球形，直径约为 100nm，含有两条单链的 RNA，长度在 8-11kd 之间，氯化铯超速离心的密度为 1.16-1.21 g/cm³ 之间。目前纯化反转录病毒颗粒的方法有：



图 5. 反转录病毒的纯化。

四、慢病毒纯化

慢病毒载体是来源于人类免疫缺陷病毒 -1 (HIV-1) 的一种病毒载体，对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力。目前重组慢病毒被广泛地应用于表达 RNAi 的研究中。重组慢病毒载体的包装难度较大，因此其滴度较难提高。常用的方法有超速离心沉淀法和 PEG-8000 浓缩法，获得的病毒滴度不高。利用阴离子交换层析的方法，可提高病毒的滴度，并且显著提高转染效率^[7]。



图 6. 慢病毒纯化工艺。

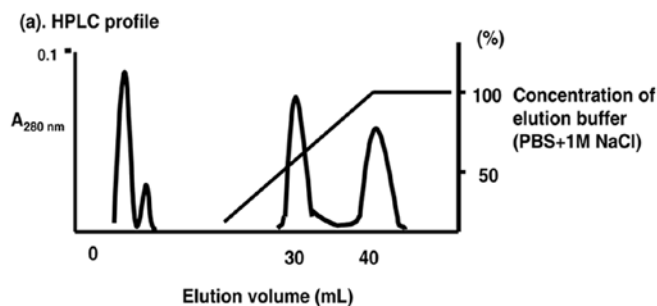


图 7. 利用强阴离子层析柱 HiTrap™ Q, HP 纯化重组慢病毒。

五、订货信息

产品	规格	货号
Source 15Q	50 ml	17-0947-01
Q Sepharose XL	300 ml	17-5072-01
SP Sepharose HP	75 ml	17-1087-01
Sepharose 4 FF	1 L	17-0149-01
HiTrap Q, HP	5 × 5 ml	17-1151-01
AVB Sepharose HP	75 mL	28-4112-01
HiTrap AVB 预装柱	5 × 1 mL	28-4112-11
	1 × 5 mL	28-4112-12
HiTrap Desalting	5 × 5 mL	17-1408-01

六、参考文献

1. Affinity Chromatography Handbook 18-1022-29
2. Affinity Columns and Media, Selection Guide 18-1121-86
3. Herzer, S. Process design and scale-up of viral vector gene therapy products: New purification challenges. *Cell & Gene Therapy* **1**, 43-48 (2004).
4. Jendrek, S. and Ekstrom, D. et al. Development of a production and purification method for type 5 adenovirus. *BioProcessing Journal* **4**, 42-47(2005).
5. Blanche, F. et al. An improved anion-exchange HPLC method for the detection and purification of adenoviral particles. *Gene Ther.* **7**, 1055-1062(2000).
6. Brument, N. et al. A versatile and scalable two-step ion-exchange chromatography process for purification of recombinant adenoassociated virus serotypes-2 and -5. *Molecular Therapy* **6**, 678-686 (2002).
7. Herzer, S. et al. Key issues in the process development of purification procedures for viral vector and plasmid biopharmaceuticals. *BioProcessing Journal* **4**, 67-72 (2005).
8. *Pharmacol Rev* 52:493-511, 20001.
9. *Gene Therapy*, (2005) 12, S5-S17.
10. *Molecular Therapy*, (2002) Vol 6, No.5.

质粒DNA的纯化

简介

质粒 DNA(pDNA), 又称基因疫苗, 或者核酸疫苗, 是指将编码某种抗原的外源基因与质粒载体重组, 构建出真核表达载体, 通过肌肉注射等途径直接导入动物细胞, 能利用宿主细胞的蛋白质合成系统合成外源抗原蛋白, 并诱导宿主细胞产生对该抗原的体液和细胞免疫应用, 以达到预防和治疗疾病的目的。DNA 疫苗比病毒类疫苗安全, 但是因为药物使用量大, 一般 100ug-1mg, 因此对药物的质量是要求很高的。

一、超螺旋 DNA 的制备步骤如下

用于基因治疗, 质粒 DNA 必须为超螺旋结构并且不含细菌染色体 DNA, RNA, 蛋白质和内毒素。另外, 纯化所用介质和工艺应便于顺利并节省成本地转化成大规模生产。由于绝大多数质粒 DNA 生产所选用的宿主菌是大肠杆菌, 纯化的实际问题就是去除其它核酸, 内毒素和痕量污染物。



图 1. 超螺旋 DNA 的纯化流程图。

第一步: 高盐下, RNA 会积聚, 与质粒 DNA 的分子量上的差别更加显著, 利用分子筛进行组份分离。同时去除残余的染色体 DNA, 这步是分子筛的组分分离, 上样量达到 30%CV, 而且流速较快。

Sample: Clarified alkaline lysate
 Sample load: 0.3 CV
 Column: HiPrep 26/10 Sepharose 6 FF, 53 ml
 Buffer A: 2.1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5

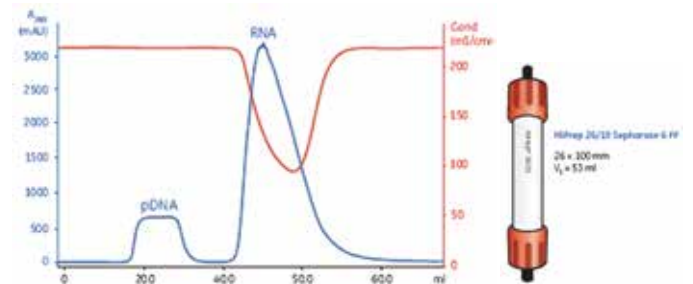


图 2. 用 sepharose 6FF 将 RNA 与 DNA 分离。

第二步: PlasmidSelect Xtra 亲和填料, 利用了嗜硫亲和与疏水作用原理, 能特异性将开环的质粒 (ocDNA) 和超螺旋的质粒 (scDNA) 分开, 并且载量可以达到 2 mg/ml 填料。从而超螺旋 DNA 的纯度提高到 95% 以上。

Sample: Plasmid DNA after group separation
 Sample load: 2 mg/ml gel
 Column: HiTrap PlasmidSelect Xtra, 5 ml
 Binding buffer B: 2.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5
 Elution buffer:
 Buffer C: 0.3 M NaCl, 1.7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5

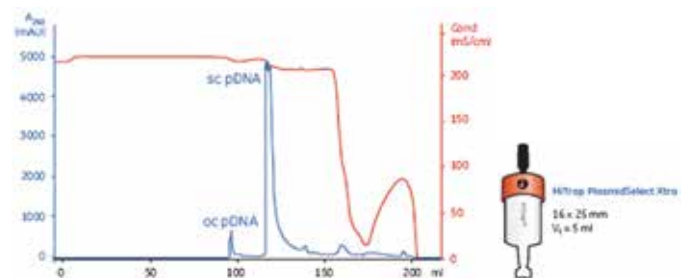


图 3. 用 plasmidselect Xtra 将开环的 DNA 与 CCDNA 分开。

第三步：超螺旋 DNA 的精细纯化，source30Q 去除残余的 RNA 和内毒素，同时浓缩样品。

Sample: Supercoiled plasmid DNA from PlasmidSelect Xtra (diluted 1 part sample to 2 parts H₂O)
Sample load: 1 mg/ml
Column: HiTrap SOURCE 30Q, 5 ml
Binding buffer:
Buffer D: 0.4 M NaCl, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5
Elution buffer:
Buffer E: 1.0 M NaCl, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5

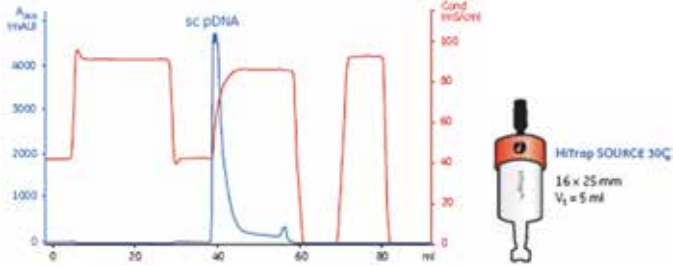


图 4. SOURCE 30Q 精细纯化 pDNA。

HPLC 检测质粒纯度，使用 Mini Q 用于质粒 DNA 的纯度检测。

表 1. pDNA 的质控标准和检测结果。

杂质	质量标准	检测方法	此工艺检测结果
蛋白质	0.01ug/dose	BCA	未检出
RNA	未检出	0.8 琼脂糖电泳 Ribogreen	未检出
染色体 DNA	0.05ug/ug	Southern Blot	未检出
内毒素	10EU/mg	LAL	9EU/mg
cccDNA	90%	0.8 琼脂糖电泳 Ribogreen	97%CGE 99%HPLC
总纯度	1.75 以上	260/280	1.8
鉴别实验	符合酶切图	酶切 / 电泳	符合



图 5. 溴化锭染色 0.8% 浓度琼脂糖凝胶指示不同纯化步骤之后所获得的组分的纯度。

二、订货信息

产品	数量	货号
PlasmidSelect Xtra Starter Kit 1 pack	1	28-4052-68
PlasmidSelect Xtra Screening Kit 1 pack	2	28-4052-69
PlasmidSelect Xtra	25 ml	28-4024-01
SOURCE 30Q	50 ml	17-1275-01
Sepharose 6 Fast Flow	1L	17-0159-01
Mini Q 4.6/50 PE	1	17-5177-01

三、参考文献

1. Sambrook, J. and Russel, D. W. Molecular cloning. A laboratory manual., ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (2001).
2. Carnes A. E., et. al. Inducible E. coli fermentation for increased plasmid DNA production. Biotechnol. Appl. Biochem. Immediate Publication, doi:10.1042/BA20050223. (2006).
3. Application Note: PlasmidSelect Xtra for downstream processing of supercoiled plasmid DNA 28-4094-85
4. Application Note: Fast determination of plasmid DNA quantity and quality in complex solutions 28-4094-86
5. Data File: Sepharose 6 Fast Flow 18-1052-52
6. Data File: SOURCE 30Q 18-1107-12
7. Selection Handbook: Hollow fiber cartridges and systems for membrane separations 18-1165-29
8. Data File 28-4094-87 AA Plasmid purification media

寡核苷酸的纯化

简介

寡核苷酸广泛的用于基础研究或者诊断试剂，同时也应用于基因治疗上。虽然寡核苷酸的治疗还在起步阶段，但是已经有直接的证据显示反义核苷酸药物存在巨大的潜力。反义核酸（antisense oligonucleotide）是基因治疗的一种方法，其原理是利用碱基配对规则，对相关基因调控。反义核酸可利用 ÄKTA 规模 DNA 合成仪进行合成，ÄKTA Oligo pilot 10/100 的合成规模为 1-50umol/50umol-4mmol。合成的寡核苷酸的纯化采用一步层析方法进行，一般对于 RNA 用 source 15RPC 反相层析纯化，对于 DNA 常常用阴离子交换层析 Source 15Q 进行纯化，都能去除合成过程的杂质，达到 99.5% 以上纯度。

一、寡核苷酸的纯化平台

样品: DNA 20-mer, ATA CCA ATT AAA CAA AAT TT
 上样量: 0.1 mg/ml medium
 柱子: RESOURCE™ Q 1 ml
 Buffer A: 10 mM NaOH, pH 12
 Buffer B: 10 mM NaOH, pH 12, with 1.5 M NaCl
 流速: 300 cm/h
 梯度: 0.25-0.75 M in 30 column volumes
 检测波长: UV absorption at 254 nm, 5 mm cell
 纯化时间: 25 min

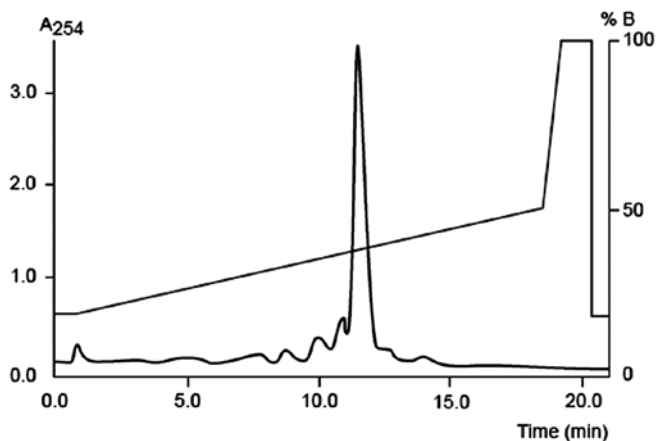


图 1. 去三苯甲基化的 20 个碱基 DNA 用 RESOURCE Q1ml 纯化。

BUFFERA: 50mM ammoniumbicarbonate
 BUFFERB: 90% 甲醇, 50mM ammoniumbicarbonate
 流速: 300cm/h

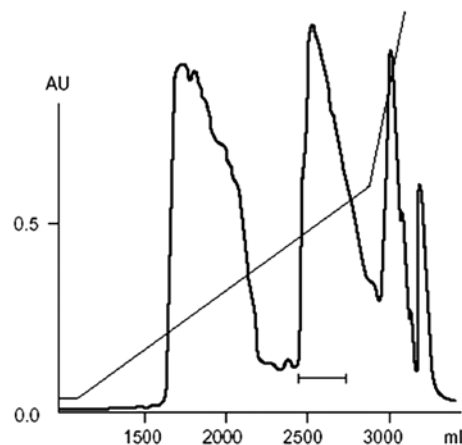


图 2. 三苯甲基化 37 个碱基的 RNA 用 source RPC 进行纯化。

二、订货信息

产品	规格	货号
Source 15Q	50 ml	17-0947-01
Source 30 Q	50 ml	17-1275-01
RESOURCE Q	1 ml	17-1177-01
RESOURCE Q	6 ml	17-1179-01
RESOURCE 15RPC	1 ml	17-1181-01

三、参考文献

1. Pilot scale purification of synthetic DNA oligonucleotides 18-1102-62.
2. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2003:1 (2003) 9-12.
3. Pharmacol Rev 52:493-511, 20001.
4. Gene Therapy, (1999) 6:973-85.
5. Gene Therapy, (2005) 12, S5-S17.
6. Molecular Therapy, (2002) Vol 6, No.5.
7. BioTechniques 34:1074-1080 (May 2003).
8. Oligonucleotide purification by ion exchange chromatography. GE Healthcare Application notes.

标签蛋白的纯化

简介

亲和层析是一类具有特异性的层析技术。亲和层析能够完成一般方法很难完成的分离任务，经常一步纯化就可以达到 >90% 的纯度，它具有高选择性、高分辨率，高结合载量等优点。其中对于携带标签的重组蛋白的纯化是其一类重要的应用。常用的标签有 His, GST, MBP, Strep(III) 等，每种标签都有自己的特点。GE 医疗生命科学部为重组蛋白的纯化提供了多种有效的层析填料。本文重点介绍四种常见标签蛋白的纯化技术。

一、常用的四类标签的特点

表 1. 四种常见标签的特点。

	GST	MBP	Strep	His
大小	26 KDa	40 KDa	8 aa	6 aa
填料载量	30 mg/ml	10 mg/ml	6 mg/ml	40 mg/ml
纯度	★★	★★	★★★	★
促进溶解		★★	★	★
去除标签	需要	需要	不需要	不需要
价格	中等	中等	高	低

二、His 标签蛋白的纯化

His 标签蛋白纯化可以根据情况选择合适的纯化工具。最常用的为螯合了镍离子的层析填料，主要有 Ni Sepharose FF 和 HP，可以耐受高浓度 EDTA 及 NaOH 的 Ni Sepharose excel。螯合了 Co^{2+} 的 TALON superflow，对 His 标签的亲合力比 Ni^{2+} 弱，纯度高。另外还有未螯合金属离子的 IMAC sepharose 和 Chelating sepharose，可以自行螯合 Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 等筛选合适的金属离子。

镍柱的纯化过程一般包括：平衡 - 上样 - 清洗 - 洗脱 - 再生等步骤。平衡及上样时在缓冲液中添加低浓度（20-40 mM 咪唑）可以降低非特异性吸附，提高纯度。经过一步镍柱纯化，一般可以得到高纯度的样品，通常再经过一步凝胶过滤即可达到纯化的目的（见图 1）。

三、GST 标签蛋白的纯化

谷胱甘肽-S 转移酶 (GST) 基因融合蛋白生产系统是表达、纯化和检测 *E.coli* 生产的 GST 标签蛋白的多功能系统。GST 谷胱甘肽转移酶能特异的与谷胱甘肽结合，表现为酶和底物的作用原理，从而利用这个原理，将 GST 做成

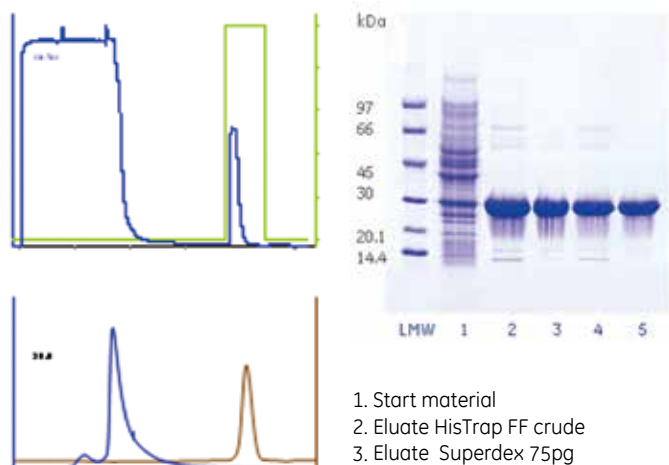


图 1. 两步纯化，得到高纯度的 his 标签蛋白。A: 镍柱纯化层析图谱；B: 分子筛层析图谱；C: SDS-PAGE 结果。

标签表达出融合蛋白，与带谷胱甘肽配基的亲中介质特异性结合，从而纯化出目标蛋白，再用特异性的酶将 GST 标签切除从而得到天然蛋白。常用的表达载体及蛋白酶分别见表 2 和表 3。

表 2. 常用的表达载体。

质粒的载体系统	带有的酶切位点
pGEX-6P-1, pGEX-6P-2, pGEX-6P-3	PreScission protease
pGEX-4T-1, pGEX-4T-2, pGEX-4T-3	Thrombin
pGEX-5X-1, pGEX-5X-2, pGEX-5X-3	Factor Xa
pGEX-2TK 体外检测表达	Thrombin

表 3. 用于切除标签的蛋白酶的特点。

内切酶	分子量	去除方法
PreScission™ Protease (带 GST 标签) Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro	Mr 46 000	GST 亲和柱
Bovine thrombin: Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser	Mr 37 000	苯甲脒亲和
Bovine Factor Xa Ile-Glu-Gly-Arg	Mr 48 000	苯甲脒亲和

可以使用 MultiTrap FF, GST MultiTrap 4B 进行高表达菌株的筛选，也可以用于筛选最佳的样品处理条件或者结合洗脱条件。使用方便的预装柱结合注射器、泵或者色谱系统，GST 标签蛋白的纯化常常可以一步获得。GST 标签的切除可以根据情况进行柱上酶切或柱下酶切。

例 1：使用 GST FF 1ml 的预装柱纯化 GST 融合蛋白。

柱子： GSTrap FF 1 ml
 样品： 8 ml 大肠杆菌可溶表达 GST fusion protein 裂解液
 结合缓冲液： PBS, pH 7.3
 洗脱缓冲液： 50mM Tris-HCl, pH8.0 加 10mM reduced glutathione
 流速： 1 ml/min
 纯化过程： 4 CV binding buffer, 8 ml sample, 10 CV binding buffer, 5 CV elution buffer, 5 CV binding buffer (CV = column volume)
 洗脱： ÄKTAexplorer

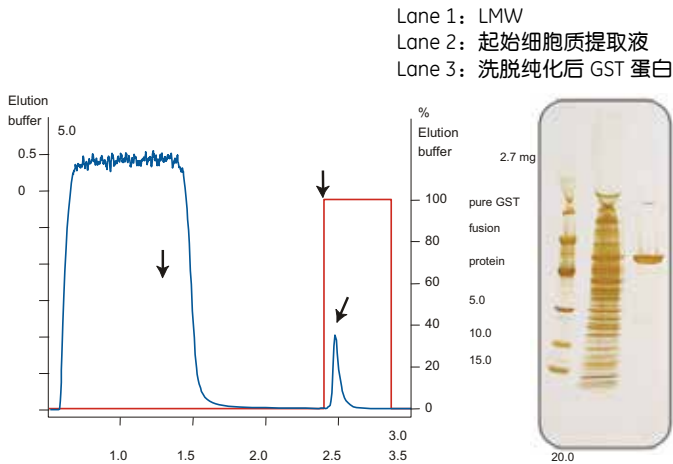


图 2. 用预装柱快速纯化 GST 标签蛋白，一步纯度达到 95%。

例 2：柱上酶切纯化 SH2-domain GST 融合蛋白。

样品： 100 ml clarified *E.coli* extract expressing SH2-domain GST-tagged protein (Mr 37 000)
 柱子： GSTrap 5 ml
 结合缓冲液： 20 mM phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.3
 洗脱缓冲液： 50 mM Tris-HCl, 10 mM reduced glutathione, pH 8.0
 酶切： 20 U/ml Thrombin Protease for 14 hours at room temperature
 流速： 10 ml/min 上样和清洗，2.5 ml/min 洗脱
 洗脱： ÄKTAexplorer 10

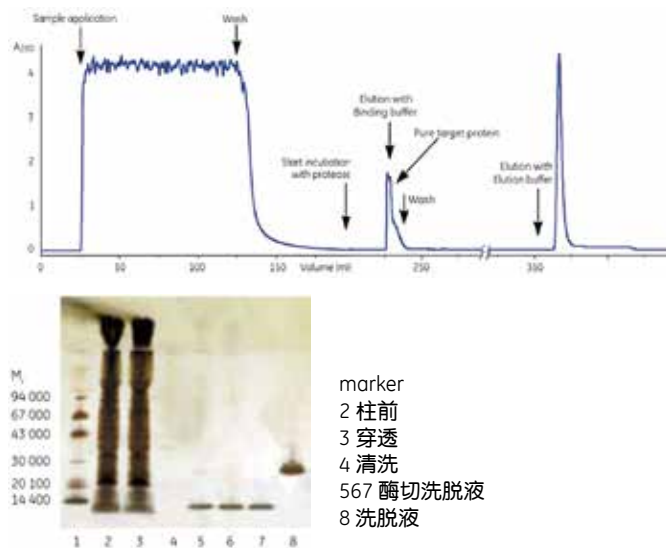


图 3. 用凝血酶柱上酶切纯化 SH2-domain GST 融合蛋白。

四、MBP 标签蛋白的纯化

MBP (麦芽糖结合蛋白) 不含半胱氨酸，作为融合蛋白的标签，通常放在 N 端在通常在大肠杆菌中进行表达。MBP 能促进融合蛋白的可溶性表达，尤其对于难表达的真核细胞蛋白，膜蛋白，病毒蛋白有很好的促溶表达能力，MBP 融合蛋白的纯化在生理条件下进行，使用麦芽糖进行温和洗脱。保护了 MBP 标签蛋白的活性。标签在纯化后期需要用酶切去除，常用的内切酶是 Factor Xa，麦芽糖酶和肠激酶。

MBPTrap™ HP 1ml/5ml 预装柱是带有糊精特异性配基的琼脂糖高效凝胶，载量大约 10mg/ml，填料颗粒是 34um 所以能得到非常集中的纯化峰，同时富集纯化蛋白。洗脱的时候采用 10mM 的麦芽糖竞争性洗脱。预装柱可以直接用 0.5M NaOH 进行再生，并可以多次反复使用。

例：用 AKTExpress 自动两步纯化 MBP 标签蛋白。

1st step (AC):
 柱子： MBPTrap™ HP 1 ml
 样品： 7 ml MBP2*-paramyosin- δ -Sal (Mr ~70 000) in *E. coli* lysate
 结合液： 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.4
 洗脱液： 10 mM maltose in binding buffer
 2nd step (GF):
 柱子： HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 pg
 样品： Eluted pool from MBPTrap HP 1 ml
 缓冲液： 10 mM sodium phosphate, 140 mM NaCl, pH 7.4

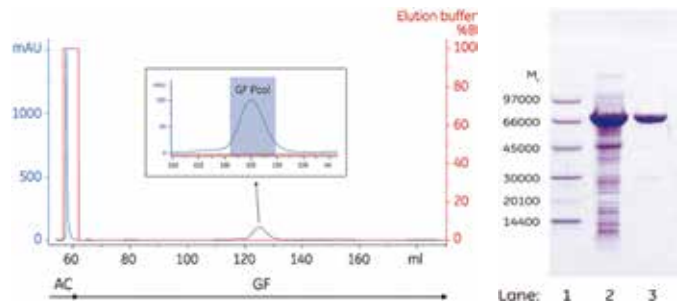


图 4. AKTExpress 串联两步纯化 MBP2*-paramyosin- δ -Sal 标签蛋白。

- 两步纯化制备 2.2 mg 蛋白
- 总的纯化时间 3.4 h
- 洗脱得到蛋白具有高纯度

五、Step (III) 标签蛋白的纯化

带 Strep-Tactin 配基的 strepTrap HP 填料能特异性的结合 Strep(III) 标签蛋白，结合亲和力是链霉素抗生物素蛋白结合亲和力的 100 倍，因此纯化 strep(III) 标签蛋白非常理想。纯化过程在生理条件下进行，使用脱硫生物素温和程度的洗脱保护了靶蛋白的活性。

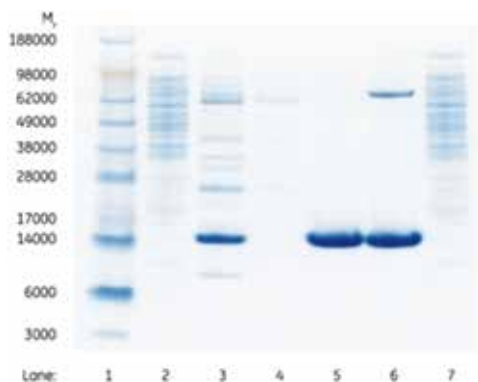
Strep(III) 通常与 His 标签一起构建双标签系统, 通过两步亲和和层析得到高纯度的蛋白, 由于 Strep 的纯化结合过程不受高浓度的咪唑影响, 所以常常跟在 Ni 亲和后进行双标签蛋白的精细纯化, 制备全长的蛋白, 同时得到高纯度的样品同时保证纯化得到的蛋白是全长的蛋白。两种小标签通常不需要切除也不会影响蛋白的功能结构。

样品: Strep(III)-protein-(His)6, Mr ≈ 15 000

流速: 0.8 ml/min

Run 1: HisTrap™ HP 1 ml

Run 2: StrepTrap™ HP 1 ml



Lane:

1. Marker
2. HisTrap HP 柱上穿透液
3. run1 单独从 HisTrap HP 上纯化
4. Flow through, HisTrapHP + StrepTrap HP
5. HisTrapHP + StrepTrap HP
6. run2 单独从 StrepTrap HP 上纯化
7. StrepTrap HP 柱上穿透液

图 5. 双标签蛋白通过两步亲和纯化得到高纯度的蛋白。

六、参考文献

1. Data file 28-9664-10 AB
2. Instructions 28-9574-96 AC
3. GST gene fusion system handbook 18-1157-58
4. Recombinant Protein Handbook 1 18-1142-75
5. Affinity Chromatography Handbook 1 18-1022-29
6. Quillin et al., Biochemistry, 44, 5774-5787, (2005)
7. Shkrob et al., Biochem. J., 392, 649-654, (2005)
8. Data File, "StrepTrap HP", 28-9136-31 AA
9. Data File, "MBPTrap HP", 28-9136-33 AA
10. StrepTrap HP, 28-9136-30 AA
11. MBPTrap HP, 28-9136-32 AA
12. Purification of Strep(III)-tagged proteins using new prepacked columns, 28-9274-15 AA
13. Purification of MBP-tagged proteins using new prepacked columns, 28-9274-17 AA

七、订货信息

产品	规格	货号
HisTrap HP	1 ml × 5	17-5247-01
HisTrap HP	5 ml × 1	17-5248-01
His MultiTrap HP	96 well × 4	28-4009-89
His MultiTrap FF	96 well × 4	28-4009-90
His GraviTrap	10 × 1	11-0033-99
HiTrap IMAC HP	1 ml × 5	17-0920-03
HiTrap IMAC HP	5 ml × 5	17-0920-05
HiTrap Chelating,HP	5 ml × 1	17-0409-01
HiTrap Chelating,HP	5 ml × 5	17-0409-03
HisTrap™ excel	1 ml × 5	17-3712-05
HiTrap TALON crude	1 ml × 5	28-9537-66
TALON Superflow	10 ml	28-9537-66
His SpinTrap TALON	100 ul × 50	29-0005-93
HiLoad 16/60 Superdex	1 ml × 10	29-0005-94
GSTrap HP	96 well × 4	29-0005-96
GSTrap FF	5 ml × 5	17-5282-02
GST MultiTrap FF 4	1 ml × 5	17-5130-01
GSTrap 4B	16/10	28-9365-50
GSTrap 4B	96 well	28-4055-01
GST MultiTrap 4B	1 ml × 5	28-4017-45
HiLoad 16/60 Superdex 200	5 ml × 5	28-4017-48
HiTrap Benzamidin FF (high sub)	96 well × 4	28-4055-00
PreScission Protease	16/600	28-9893-35
Thrombin	1 ml × 5	17-5143-01
Factor Xa	500 units	27-0843-01
GST Detection Module	500 units	27-0846-01
Anti-GST Antibody	400 units	27-0849-01
<i>E.coli</i> BL21	50 reactions	27-4590-01
MBPTrap HP	1 ml × 5	28-9187-78

蛋白复合物的纯化

简介

单独存在的蛋白质并不能执行功能，而需要通过同其它蛋白相互作用来实现，蛋白质复合物是潜在的、非常重要的药物靶点。许多蛋白-蛋白相互作用能够导致稳定复合物的形成，这些复合物在分子水平上能够被分离并鉴定。例如，抗原-抗体复合物以及蛋白酶-蛋白酶抑制剂复合物。蛋白质复合物能够由 10 个甚至 100 个以上不同亚基构成。随着不同亚基的大小和数量上升，进行分离纯化的难度提高。

采用层析的方法可将天然存在的多蛋白复合物（非重组、无亲和标签）纯化出来以用于结构及功能研究。一般设计合理的层析流程，运用不同的层析原理进行分离纯化。用于多蛋白复合物纯化的层析技术以及考虑因素见下表：

表 1. 不同层析技术对蛋白复合物的影响。

技术	分离原理	优点 / 缺点
凝胶过滤	大小和形状	+ 温和的分离条件，在宽的 pH 和电荷浓度下进行分离，可以用添加剂
亲和层析	生物特异性吸附	+ 特异性好 - 需要寻找标签或者抗体等特异性的纯化方法，洗脱的条件有时剧烈，改变的 pH 和盐浓度会干扰复合体的相互作用
离子交换层析	电荷	+ 高分辨率，通常有效 - 盐浓度梯度洗脱有时干扰蛋白内部的相互作用
疏水层析	疏水性	+ 对于其他技术是种补充 A - 高盐条件结合可能会干扰蛋白相互作用

一、天然蛋白复合物用 pull down 方法纯化

1. 串联亲和层析纯化方法 (TAP)

TAP 的基本原理就是一个诱饵蛋白（一个已知或假想地复合物组分）同时带上蛋白 A 和钙调素结合肽 (CBP) 两个标签，在这两个标签之间含有烟草花叶病毒酶 (TEV) 酶切位点。利用连续两步亲和层析来分离蛋白质复合物。两步亲和层析目的是提高纯化过程的特异性继而降低假阳性出现的几率。本方法所使用的每一个条件都很温和，这样是为了保持复合物的完整性并且保证产量的最大化。

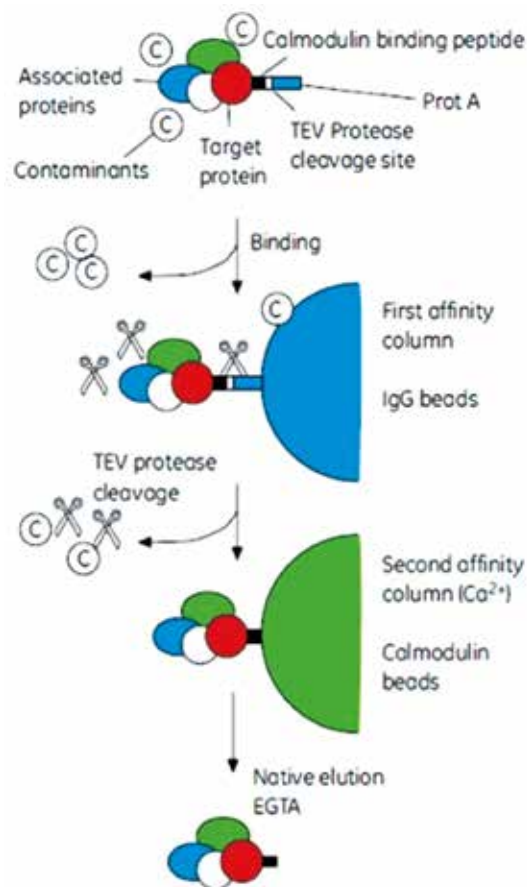


图 1. IgG Sepharose 和钙调素 Sepharose 亲和填料串联纯化蛋白复合物示意图。

2. GST 亲和 pull-down

GST pull-down 用带 GST 标签的诱饵蛋白从生物样品中纯化一个或几个蛋白，具有纯化低丰度蛋白复合物的能力。

3. 免疫共沉淀 IP

使用复合物中一种组分（已知或假想的）的抗体，同其抗原也就是多蛋白复合物的一部分结合用亲和填料 protein A 或 proteinG 或带这种蛋白的磁珠通过离心或磁场将抗体-蛋白复合物捕获。也可用 NHS 活化的 Sepharose 自己偶联相关抗体或抗原，进行免疫共沉淀。

洗脱分离蛋白复合物，SDS-PAGE 分析，胰酶消化质谱分析。

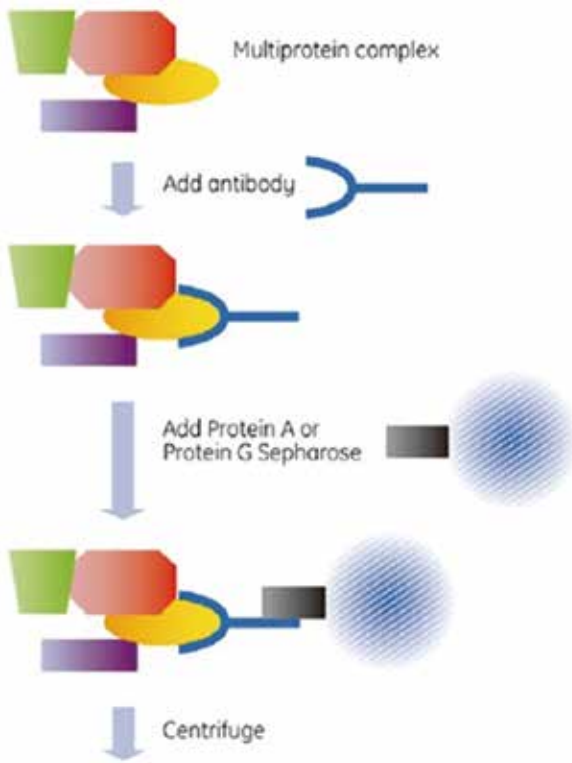


图 2. 免疫共沉淀 制备蛋白复合物。

二、重组蛋白复合物的分离

对于大量制备蛋白复合物的应用，一般采用重组的方法进行制备，这种方法可用于将分别分离得到的组分组装成复合物。

1、亲和层析纯化人类剪接体 145- 亚基复合物

人类剪接体是一个由 RNA 和蛋白质构成的 145 个亚基复合物，使用亲和层析作为主要步骤的一种方法纯化获得，最终的纯化步骤是在分子筛上进行。

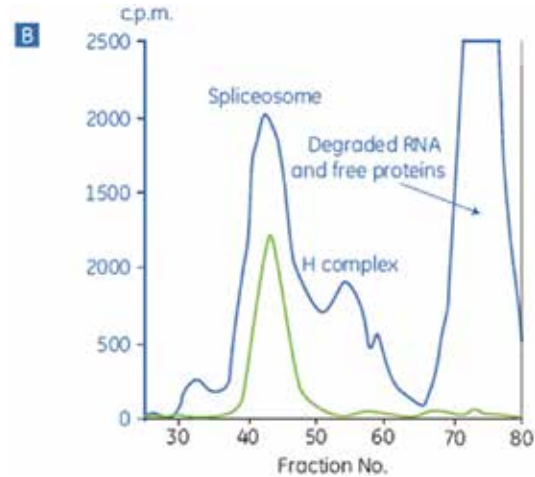
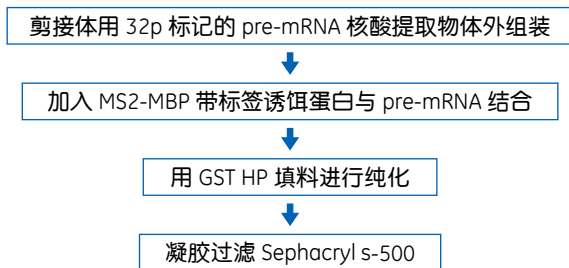


图 3. 人的剪接体复合物的纯化流程，B) 用凝胶过滤分析纯化剪接体复合物。

2、纯化组织相容性复合体 II (MHC II) 增强体的亚复合物

RFX 复合物是由 3 个蛋白组成：RFXB、RFXAP 和 RFX5。RFX5 蛋白是由 5 个结构域组成，其中 N 端结构域 (1-90) 负责多聚化。RFX5 以及不同长度的 RFX5 构建体都表达成组氨酸标签的蛋白，RFXAP 可同 RFX5 的 N 端结构域形成稳定的复合物，因此它们可以被共纯化出来。通过 IMAC 进行纯化。在变性条件下，对这两个蛋白的复合物进行第二步 IMAC 纯化。在穿透液中回收 RFXAP，并通过分子筛层析对其进行下一步的复性、浓缩以及纯化。纯化出来的蛋白以及蛋白片段被用于多聚化研究并为 RFX 复合物与 MHC II 启动子之间的相互作用构建出一个 DNA 结合模型。

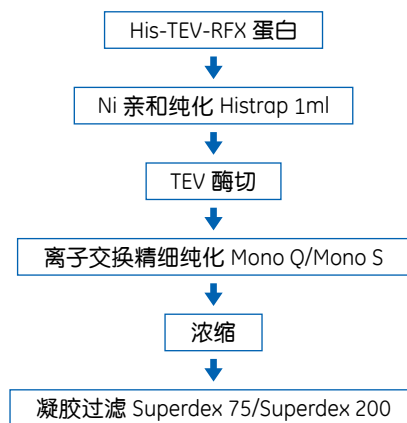


图 4. 组织相容性复合体 II (MHC II) 增强体的亚复合物的纯化流程图。

三、订货信息

产品	数量	货号
Ab SpinTrap	50 × 100 µl	28-4083-47
HiTrap Protein A HP	2 × 1 ml	17-0402-03
HiTrap Protein G HP	2 × 1 ml	17-0404-03
Calmodulin Sepharose 4B	10 ml	17-0529-01
IgG Sepharose 6 Fast Flow	10 ml	17-0969-01
HiTrap Desalting	5 × 5 ml	17-1408-01
Glutathione Sepharose 4 Fast Flow	25 ml	17-5132-01
GSTrap HP	5 × 1 ml	17-5281-01
GSTrap FF	2 × 1 ml	17-5130-02
IMAC Sepharose High Performance	25 ml	17-0920-06
HiTrap FF crude	5 × 1 ml	11-0004-58
GSTrap 4B	5 × 1 ml	28-4017-45
Superdex 75 10/300 GL	1 × 24 ml	17-5174-01
Superdex 200 10/300 GL	1 × 24 ml	17-5175-01
HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR	1 × 120 ml	17-1165-01
HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR	1 × 120 ml	17-1166-01
HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR	1 × 120 ml	17-1167-01
Mono Q 5/50 GL	1 × 1 ml	17-5166-01
Mono S 5/50 GL	1 × 1 ml	17-5168-01

四、参考文献

1. Romier, C. et al. Co-expression of protein complexes in prokaryotic and eukaryotic hosts: experimental procedures, database tracking and case studies *Acta Cryst.* D62,1232-1242 (2006).
2. van den Heuvel, R. H. H. et al. Improving the performance of a quadrupole time-of-flight instrument for macromolecular mass spectrometry. *Anal. Chem.* 78, 7473-7483 (2006).
3. Li, S. et al. A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* 303, 540-543 (2004).
4. Einarson, M. and Orlicki, J. Identification of protein-protein interactions with glutathione-S-transferase fusion proteins, in *Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual* (Golemis, E. A. and Adams, P. D., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (2002).
5. Puig, O. et al. The tandem affinity purification (TAP) method: A general procedure of protein complex purification. *Methods* 24, 218-229 (2001).
6. Dziembowski, A. and Seraphin, B. Recent developments in the analysis of protein complexes. *FEBS Lett.* 556, 1-6 (2004).
7. Forler, D. et al. An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. *Nature Biotech.* 21, 89-92 (2003).

膜蛋白的纯化

简介

膜蛋白质在基础生理过程（如分子转运，信号转导，能量利用以及细胞核组织结构的维护）具有极其重要的作用。基因组序列中大约有 30% 的基因编码的是膜蛋白，其中 50% 是目前已知药物的靶点。膜蛋白一般由一个或多个跨膜片段构成，其中跨膜的成分由单链的及成簇的 α 螺旋或 β 折叠结构组成，相应的膜蛋白质则被称为 α 螺旋膜蛋白或 β 折叠膜蛋白。

膜蛋白纯化和分析都有很大的挑战，首先是膜蛋白很难制备大量，通常膜的体积只有细胞体积的 0.3%，通过基因重组过表达来生产膜蛋白通常对细胞具有毒性，很难实现大规模的生产。常规的膜蛋白都是与细胞膜结合，要分离制备首先是用去垢剂将其溶解纯化，然后去除去垢剂人工构建磷脂双分子层，再进行功能和活性的研究。

一、膜蛋白纯化的通用工艺

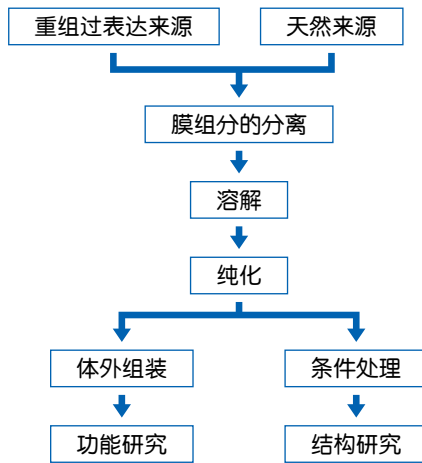


图 1. 膜蛋白通用纯化工艺。

二、膜蛋白的纯化

目前重组过表达的形式生产膜蛋白是最常用的方法。而大部分膜蛋白都带有亲和的标签，his-tag 是最常用的标签。对于膜蛋白表达的亲和标签：

- 连接在 C 端；
- 如果是 his-tag 用更长的标签 8-10 个 his；
- 在标签和蛋白之间插入酶切位点。

1、His MultiTrap™ 可以用于膜蛋白表达的筛选

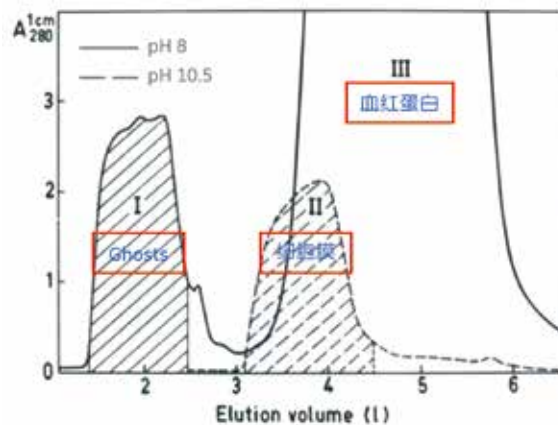
Dot-Blot 分析是常用于带标签的膜蛋白克隆株的筛选，FOS-Choline-12 (FC12) 试剂溶解融合膜蛋白后，用 his-tag 抗体进行免疫反应找出高表达菌株。



图 2. 用 96 孔板方式通过 blot 筛选带标签的膜蛋白表达菌株。

2、细胞膜的分离：细胞破碎后通过离心和凝胶过滤技术都可以成功的将细胞膜从细胞碎片中分离出来。

柱子：Sepharose™ CL-4B and Sepharose CL-6B in tandem。



From: Lundahl et al: BBA 855 (1986) 345-352

图 3. 用分子筛制备红细胞膜。

3、膜蛋白的溶解：它是整个膜蛋白制备过程中最关键的步骤。通过溶解过程，用去污剂将膜蛋白从它们所处的自然环境（脂膜）中提取至水溶性环境。去污剂可以打破脂双层，并将膜蛋白和脂类包裹进去污剂微胶束中。因此方便蛋白质的分离。

Membrane Protein Purification Kit

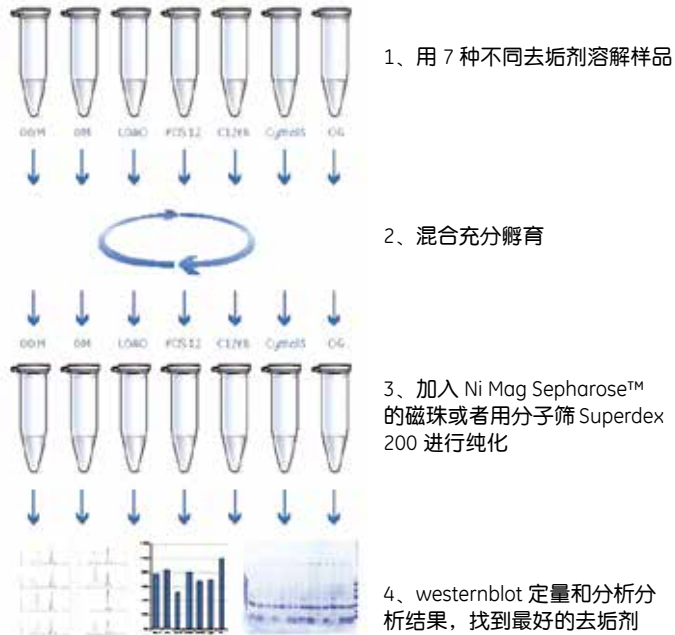


图 4. 膜蛋白纯化试剂盒工作流程。

4、放大纯化：从 kit 找到的蛋白可以直接用 histrap 1ml/5ml 的预装柱放大纯化。

1) 亲和：

柱子：HisTrap™ HP 5 mL

2) 分子筛柱子：Superdex 200 10/300 GL

去垢剂：Dodecyl Maltoside

去垢剂：Dodecyl Maltoside

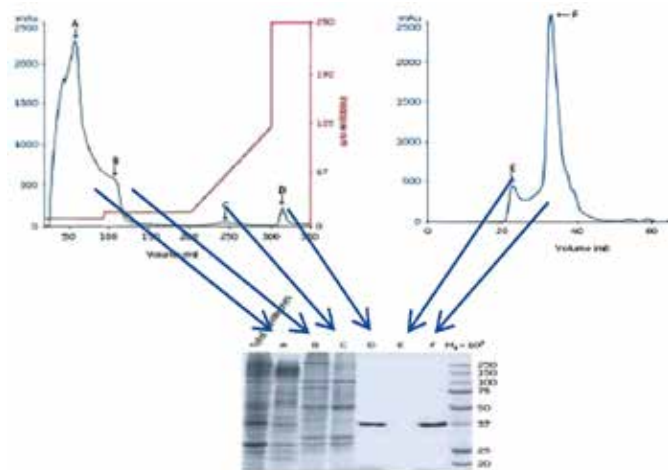


图 5. 两步法纯化 his-tag 标签蛋白 YedZ-GFP。

非标签蛋白的纯化

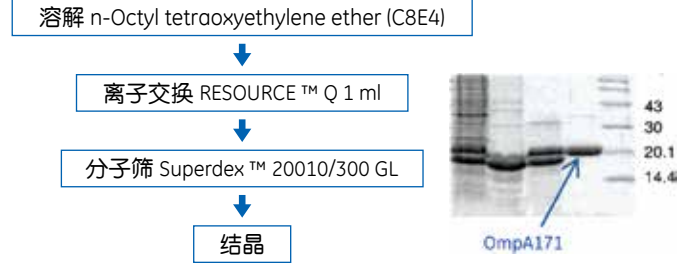


图 6：从大肠中表达的非标签膜蛋白 OmpA 的亚单位的纯化。

三、订货信息

产品	数量	货号
HisTrap™ HP, 5 × 5 ml	1	17-5248-02
Superdex™ 200 10/300GL	1	17-5715-01
His MultiTrap FF 4 96well filter plates	1	28-4009-90
His MultiTrap HP 4 96well filter plates	1	28-4009-89
Membrane Protein Purificaiton Kit	1	28-9805-82

四、参考文献

1. Detergents: An overview Neugebauer, J.M., Methods Enzymol. 182, 239-253 (1990).
2. Properties of detergents Helenius, A, et al, Methods Enzymol. 56, 734-749 (1979).
3. Solubilization of native membrane proteins Hjelmeland, L.M., Methods Enzymol. 182, 253-264 (1990) Marston, F.A.O. & Hartley, D.L., Methods Enzymol. 182, 264-276 (1990).
4. Removal of detergents from membrane proteins Hjelmeland, L.M., Methods Enzymol. 182, 277-282 (1990).
5. 富有挑战蛋白纯化手册。
6. Data File 28-9833-26 AA.

层析法包涵体复性

简介

随着基因重组技术的发展，外源蛋白在大肠杆菌中进行过表达时常常会形成包涵体。包涵体是指细菌表达的蛋白在细胞内聚集，形成的无生物活性的固体颗粒。包涵体中大部分为重组蛋白，另外还可能含有少量的核糖体元件、RNA 聚合酶、内毒素、外膜蛋白、环状活缺口的质粒 DNA 以及脂质、多糖等。包涵体的大小为 0.5-1 μ m，具有很高的密度（约 1.3mg/ml），无定形，不溶于水，可以使用变性剂（盐酸胍或尿素）进行溶解，需要进行复性以得到具有生物活性的蛋白。复性技术包括稀释、透析及层析法。本文重点介绍了层析法包涵体复性技术。

一、包涵体的溶解

表 1. 包涵体溶解实验的条件。

	起始条件	变量范围
缓冲液	50 mM Tris-HCl, pH8.0	-
变性剂	8 M 尿素	6-8M 尿素或 6-8M 盐酸胍
包涵体浓度	10-20 mg/ml	-
温度	室温	4-95
时间	60 min	15 min-12 h
还原剂	-	1-10 mM DTT (还原二硫键)

二、包涵体复性方法



成功复性的关键是反应朝主要目标进行，抑制产生聚集的竞争性路径。一般需要在蛋白浓度，温度，反应时间，添加剂，二硫键交换剂等参数上进行优化。

表 2. 不同复性技术的比较。

复性技术	优点	缺点
透析 稀释	操作简单	耗时，需要大体积的缓冲液，样品浓度低
层析	快速，复性与纯化同时进行，自动化程度高，起始样品浓度高，高产量	操作复杂，需要摸索条件，蛋白聚集易堵塞柱子

三、层析法复性的应用

1、凝胶过滤复性技术

凝胶过滤法复性技术根据其平衡阶段的策略不同主要有两种方法：方法一是用复性缓冲液平衡层析柱，然后将变性的样品直接上柱复性。方法二是在上样前，通过变性缓冲液与复性缓冲液在柱上设置一个降低的变性剂梯度，然后再上样。方法一的缺点在于变性蛋白在快速去除变性剂的条件下易发生聚集。实验表明，方法二的成功率要高于方法一。基于方法二的应用案例见图 1。

柱子: Superdex 75 10/300 GL
 样品: Lysozyme in 8 M urea, 0.2 M DTT
 复性液: 0.1 M Tris-HCl, pH 8.7, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 3 mM reduced glutathione (GSH)/0.3 mM oxidized glutathione (GSSG)

柱子平衡液: 6 ml linear gradient from 8 M to 2 M urea in refolding buffer

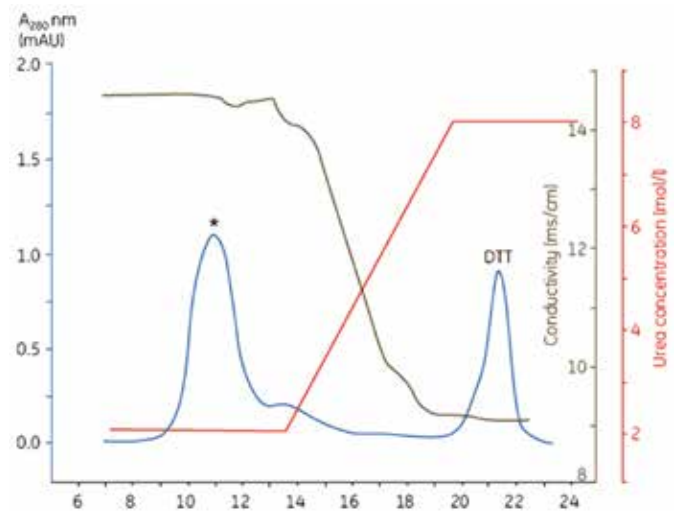


图 1. 溶菌酶用凝胶过滤法进行尿素梯度复性。“*”: 溶菌酶复性蛋白。蓝色曲线: UV280nm; 棕色曲线: 电导; 红色曲线是尿素的理论值。

2、离子交换层析复性技术

进行离子交换层析复性时，溶解的包涵体蛋白在变性的条件下结合在柱子上，然后通过设置降低的尿素梯度进行复性，最后通过高盐或 pH 改变进行洗脱，这是经典的“三步法”。三步法有时会由于变性聚集的蛋白牢固结合在柱子上，从而降低复性产率，此时，可采用“两步法”和/或“尿素 + pH 双梯度法”进行改进。我们分别列举了三步法（见图 2）和两步法 + 尿素 / pH 双梯度法（见图 3）的两个案例。

柱子: DEAE Sepharose™ FF
 样品: Recombinant non-structural NS3 protein from Hepatitis Virus C
 平衡缓冲液: 50 mM Tris-HCl pH 9.0, 10 mM β-ME, 25 μM ZnCl₂, 8 M urea
 复性缓冲液: 50 mM Tris-HCl pH 9.0, 10% glycerol, 10 mM β-ME, 25 μM ZnCl₂, 0.1% CHAPS
 洗脱缓冲液: Buffer2 + 0.5 M NaCl

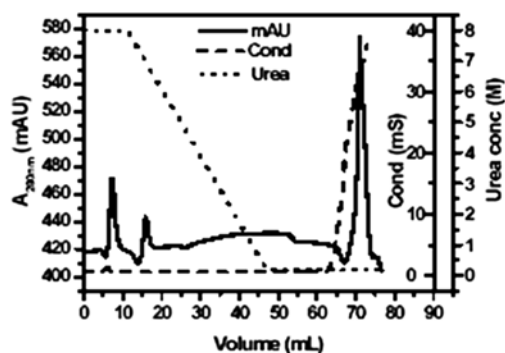


图 2. 三步法离子交换层析复性技术应用案例。

柱子: HiTrap™ SP HP
 样品: Lysozyme (8 mg)
 平衡缓冲液: 50 mM Tris-HCl pH 6.2, 6 M urea, 3 mM GSH/0.3 mM GSSG
 复性缓冲液: 50 mM Tris-HCl pH 10, 1 M urea, 300 mM NaCl, 3 mM GSH/0.3 mM GSSG

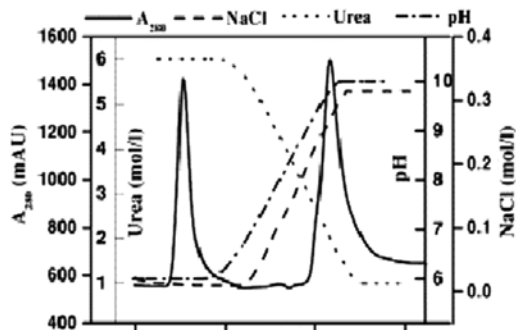


图 3. 两步法 + 尿素 / pH 双梯度应用案例。

3、疏水层析复性技术

进行疏水层析复性时，蛋白的亲水端面向流动相，不会形成聚集体。在热力学驱动下，复性的蛋白会快速的与它的中间态和去折叠的蛋白发生分离。同离子交换层析复性，蛋白与填料之间多点结合，降低变性蛋白的自由度，传统方法的收率比较低，可以使用脉冲洗脱法 (pulse elution) 促进蛋白释放，可以显著提高收率。脉冲洗脱法即：在复性缓冲液进行洗脱前，先向柱子上添加小体积的含有高浓度变性剂的溶液，促进蛋白释放，然后再进行复性洗脱。另外还可以向洗脱液中添加甘油，PEG 等成分，帮助蛋白分子正确折叠。

4、亲和层析复性技术

常用的亲和层析技术主要应用在携带组氨酸标签的包涵体蛋白复性。一般步骤为：平衡（含有变性剂的平衡缓冲液）- 上样 - 复性（尿素梯度）- 洗脱（咪唑梯度）（见图 4）。

柱子: HisTrap™
 平衡缓冲液: 6 M 盐酸胍, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM 咪唑, 1 mM β-ME, pH 8.0
 清洗缓冲液: 6 M 尿素, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM 咪唑, 1 mM β-ME, pH 8.0
 复性缓冲液: 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM 咪唑, 1 mM β-ME, pH 8.0
 洗脱缓冲液: 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 500 mM 咪唑, 1 mM β-ME, pH 8.0

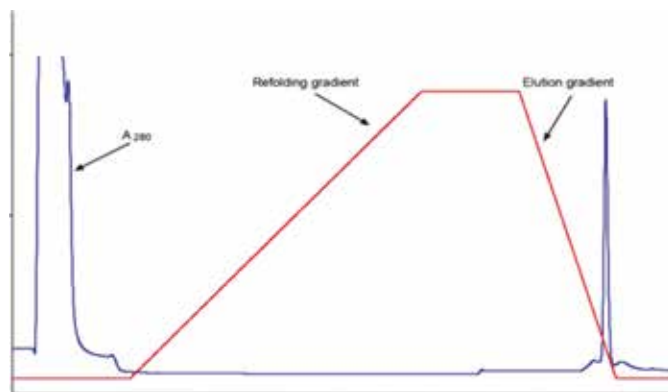


图 4. His tag 包涵体蛋白复性。

四、订货信息

产品	数量	货号
Superdex 75 10/300 GL	24 ml × 1	17-5174-01
DEAE Sepharose™ FF	25 ml	17-0709-10
HiTrap™ SP HP	5 ml × 5	17-1152-01
HiTrap Chelating HP	5 × 1 ml	17-0408-01
HisTrap FF	5 × 1 ml	17-5319-01
HisTrap HP	5 × 1 ml	17-5247-01
HisPrep FF 16/10 20ml	1	28-9365-51
Ni Sepharose HP	25 ml	17-5268-01
Ni Sepharose FF	25 ml	28-9893-33
Hiload 16/60 Superdex 75 pg	1	28-9893-33
Hiload 26/60 Superdex 75 pg	1	28-9893-34
Superdex 75 pg	150 ml	17-1044-01
HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR	1	17-1165-01
HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR	1	17-1194-01
Sephacryl S-100 HR	150 ml	17-0612-10
HiTrap Q FF	5 × 1 ml	17-5053-01

五、参考文献

1. Middelberg, A. Preparative protein refolding. *Trends Biotech.* **20**, 437–443 (2002).
2. Esposito, D. and Chatterjee, D. K. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Current Opinion Biotech.* **17**, 353–358 (2006).
3. Swietnicki, W. Folding aggregated proteins into functionally active forms. *Current Opinion Biotech.* **17**, 367–372 (2006).
4. Gu, Z., et al. Urea gradient size-exclusion chromatography enhanced the yield of lysozyme refolding. *J. Chromatogr. A* **918**, 311–318 (2001).
5. Rogl, H. et al. Refolding of Escherichia coli produced membrane protein inclusion bodies immobilized by nickel chelating chromatography. *FEBS Letters* **432**, 21–26 (1998).
6. Langenhof, M. et al. Controlled oxidative protein refolding using an ion-exchange column. *J. Chromatogr. A* **1069**, 195–201 (2005).
7. Li, M. et al. Dual gradient ion-exchange chromatography improved refolding yield of lysozyme. *J. Chromatogr. A* **959**, 113–120 (2002).
8. 包涵体蛋白质的复性研究进展。
9. 重组包涵体蛋白质的折叠复性。
10. 快速纯化从大肠杆菌以包涵体表达的组氨酸融合蛋白和复性。

TCM的纯化

简介

TCM 是指传统中药 (Traditional Chinese Medicine)。中药的化学成分极其复杂,有效成分种类很多,诸如生物碱、甙、黄酮、醌、多酚、内脂、香豆素、萜、有机酸、寡糖、多糖、环肽、甚至蛋白,又常有数种有效成分并存、合成前体相同、配基链长不等、手性特征变化、含量特低,以及炮制反应等问题,故单一中药活性成分的纯化工艺开拓往往涉及多种分离技术以及各种技术之间的连接和配合。

GE 公司集数十年的纯化经验,积累大量理论和技术在葡聚糖 (Sephadex)、琼脂糖 (Sephacrose)、Monobeads、聚苯乙烯 (Source)、高流速琼脂糖 (Capto) 等基架上开发有凝胶过滤、离子交换、金属螯合、亲和层析、正相层析、反相层析等多种类型和多种性质的数百种色谱介质,供应从 ng 到 Kg 级的高、中、低压色谱设备提供凝胶过滤、离子交换、金属螯合、亲和层析、反相层析、正相层析、逆流色谱等多种色谱技术体系。

一、TCM 纯化平台

生物碱纯化平台 —— <pH3 的酸水提取 + 阳离子交换 SP Sepharose HP + 中、高压硅胶反相

生物碱是来源于植物界的含氮有机化合物,为非常重要的中草药有效成分。在传统的硅胶或氧化铝层析上效果往往不理想。建议用 <pH3 的酸水提取生物碱,直接上阳离子交换介质 SP Sepharose HP,这种介质载量高,易于直接放大,对生物碱有特殊的选择性,可以从酸水粗提物中分离结构近似的十几种生物碱,一步到达 60-80% 的纯度 (图 1),然后再上中、高压反相层析如 SOURCE15RPC 或 C18 硅胶可将纯度提高到 90% 以上。SOURCE 是 (聚苯乙烯) 为基架的反相介质,可耐受 1M 强酸强碱,比传统的如 C8、C18 硅胶反相介质使用范围更宽广,寿命更长。

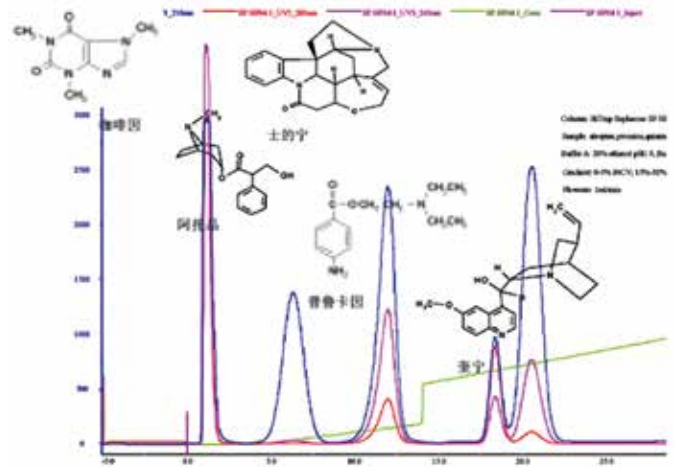


图 1. 五种中药中常见的生物碱包括用于兴奋中枢神经的土的宁、咖啡因;用于镇痛、解毒的阿托品、局部麻醉药普鲁卡因及抗疟疾药奎宁在 SP Sepharose HP 阳离子交换层析柱上得到了很好的分离效果, pKa 值越高越晚洗脱。

有机酸纯化平台 —— >pH11 的碱水提取 + 阴离子交换 Q Sepharose HP 或 Sephadex LH20 + 高压硅胶反相

有机酸多与钾、钙、钠或生物碱结合成盐,也以游离的形式存在而发挥生理作用,例如:柠檬酸、酒石酸、苹果酸、抗坏血酸,与生物碱相反,有机酸带负电荷,纯化建议用 >pH12 的碱水和醇提取有机酸,直接上阳离子交换介质 Q Sepharose HP,一步纯度可达 50% 以上,然后再上 (或直接上) Sephadex LH-20 或反相层析将纯度提高到 90% 以上。

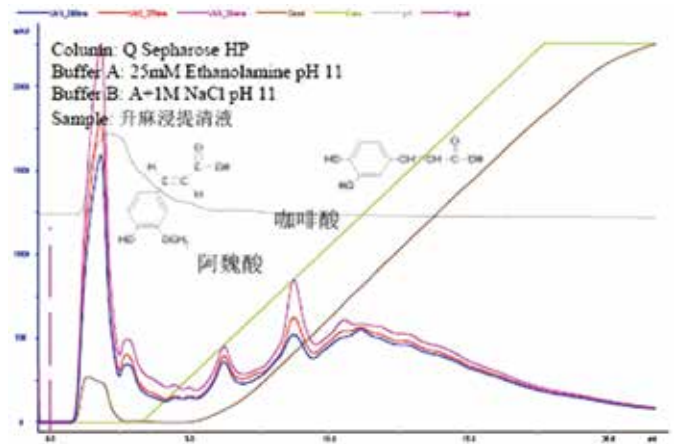


图 2. 川芎中纯化咖啡酸和阿魏酸: >pH11 碱水提取 (纯度 <10%) 阳离子交换 SP Sepharose HP (纯度 >90%)。

皂甙纯化平台——>pH11 的碱水提取 + 阴离子交换 Q Sepharose HP + 中、高压硅胶反相

皂甙是不少常用中草药的有效成份之一，如人参、柴胡、甘草、桔梗等。皂甙类分子由于同时具有强极性的糖基和弱极性的甙体，化学性质类似去污剂，振荡后会产生气泡，纯化常常遇到困难。不少皂甙含羧基，可用碱水加醇提取，直接上阴离子交换 Q Sepharose HP，它对皂甙类分子有特殊的选择性和纯化效果。

黄酮甙纯化平台——水和醇提取 + 阴离子交换 Q Sepharose HP 去色素 + Sephadex LH20 + 中、高压硅胶反相

Sephadex LH-20 由葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 交联亲脂性羟丙基而制成，它的一种特殊的纯化功能是分离甙元相同但所带糖基数量或种类不同的分子，糖基数量越多越早被洗脱。即使糖基数量相同，结构稍有不同，也可调节流动相将之分开。Sephadex LH-20 广泛地应用在黄酮类物质的分离纯化中，总括来说黄酮所含羟基数量越多，与 Sephadex LH-20 结合越强。Q Sepharose FF 是去除植物色素的有效方法。例如葛根素，用 Q Sepharose FF 可对粗品进行第一步纯化，再使用 Sephadex LH-20 进行精细纯化，就可达到纯度为 95% 以上的葛根素。

黄酮、萘醌纯化平台——水和醇提取 + Sephadex LH20 + 中、高压硅胶层析

近年掀起热潮的用于治疗心血管疾病及预防老人痴呆症的银杏，主要活性成份包括多个黄酮及内酯。槲皮素、山奈酚及异鼠李素三个黄酮化合物，具有扩张血管和解除痉挛作用，能扩张冠脉血管、增加冠脉流量，另外还与降低血脂、改善血液流变学、降低 LPO、提高 SOD 活力有关。

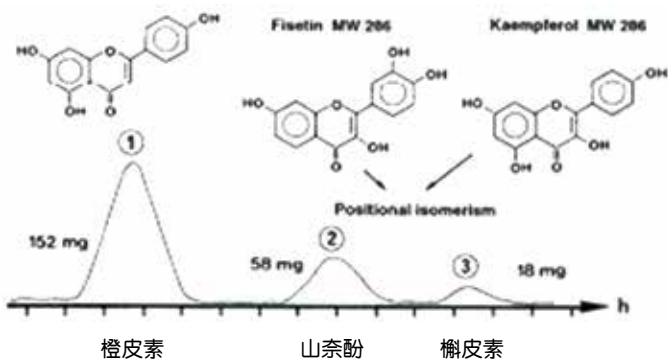


图 3. Sephadex LH-20 分离银杏中结构非常相近的多个黄酮。

多酚类纯化平台——水和醇提取 + Sephadex LH20 + 中、高压硅胶层析

Sephadex LH-20 与黄酮纯化类似，多酚的纯化也可根据所含羟基、芳香环、双键的数量、位置，以及与 Sephadex LH-20 介质所形成的氢键的数量、强度的不同进行分离。总括来说多酚所含羟基、芳香环数量和所形成的氢键数量越多、越强，结合也越强，洗脱也较晚（如各种茶多酚、白藜芦醇的纯化）。

内脂、萜类纯化平台——Sephadex LH20 或中、高压硅胶层析

中草药中的内脂、萜类大都较为弱极性分子，以传统的萃取、结晶、加上硅胶或氧化铝层析纯化。GE Healthcare Biosciences 生产的 BioProcess 防爆防腐中、高压层析生产系统配和 Fineline 350 或 HPLC 层析柱已成功在国内外应用于紫杉醇的大规模生产。

蛋白质、活性肽、动植物毒素纯化平台——Sepharose 离子交换；Superdex/Sephacryl 分子筛层析；SOURCE RPC 反相层析

近年不断发现许多常用中药中的蛋白质、糖蛋白都具药理活性，如枸杞子糖蛋白、银杏花粉蛋白、芦荟糖蛋白等。天花粉蛋白、具有溶血作用的蜂毒肽，兴奋中枢神经的蝎毒肽，治疗风湿性关节炎的蜂毒明肽，抗凝血药水蛭素、蛇毒酶。大部分蛋白酶在纯化时需留意保持其空间结构，避免失活，所以一般采用温和的离子交换和分子筛层析，肽分子则可使用反相层析。

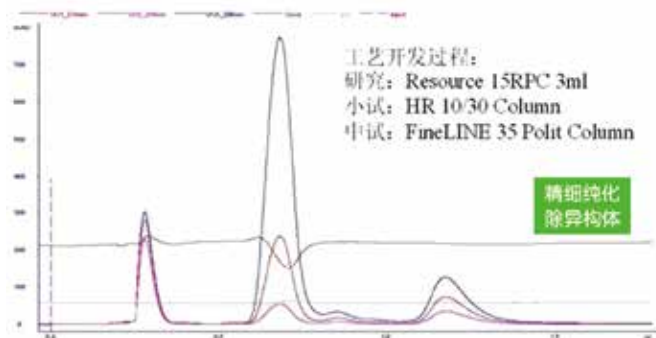


图 4. 用反相 source15RPC 精细分离河豚毒素，除去异构体。

多糖 纯化平台——水、醇提取 + 穿透式 Sepharose 离子交换脱蛋白 + Superdex 200/Sephacryl 300-1000 分子筛层析

中药中如灵芝多糖、香菇多糖、黄芪多糖、人参多糖、具有增强免疫力、抗肿瘤作用。一种中药中往往含多种多糖，结构、性质、功效不一。如黄芪水提取液经 DEAE 弱阴离子交换层析及 Sephadex G100 分子筛层析纯化，可获 AH-1, AH-2 及 AG-2 等多个单一组份多糖。大黄水提液经乙醇提取及 Sephadex G-200 分子筛层析获得 DHP-1, DHP-2 两个单一组份多糖。新一代的 Superdex 200 分子筛层析介质选择性与 Sephadex 相同，而流速、分辨率、化学稳定性大大增加，比往 Sephadex G 系列能分离出多数倍的多糖组分，时间更由以往的一天缩短到一小时。

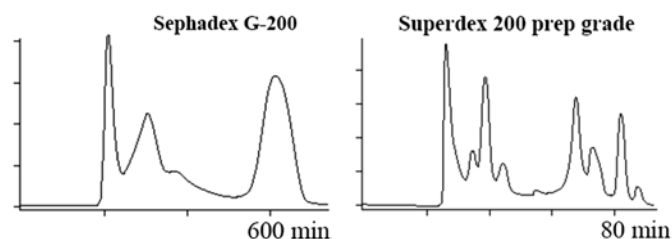


图 5. 新一代的 Superdex 200 分子筛介质比往 Sephadex G 能分离出多数倍的多糖组分，流速也快了数倍。

二、TCM 的色素去除

TCM 的粗提取物中常常含有大量的色素，一方面在层析过程中，采用紫外对目标物进行检测和追踪时，色素会掩盖掉目标物的信号，增加了纯化的困难程度；另一方面，随着中药要求的不断提高，在生产过程中，色素也成为质量控制的一个因素。阴离子交换 Q Sepharose FF 是去除植物色素的有效方法，比如，提取葛根素时，大量的色素也被提取出来，利用 Q Sepharose FF 可对粗品进行第一步纯化，不仅大大提高了葛根素的纯度，而且除去了绝大多数色素，再使用 Sephadex LH-20 进行精细纯化，就可达到纯度为 95 以上的葛根素。另外，Q Sepharose FF 在一些注射用中药产品的生产过程中，作为最后一步，能够有效的去除各成分中的色素。

三、订货信息

产品	数量	货号
HiLoad 16/60 Superdex 200 16/600	1	17-1069-01
HiTrap SP HP	5 × 1 ml	17-1151-01
HiTrap SP HP	5 × 5 ml	17-1152-01
HiTrap Q HP	5 × 1 ml	17-1153-01
HiTrap Q HP	5 × 5 ml	17-1154-01
Q Sepharose H.P	75 ml	17-1014-01
SP Sepharose	75 ml	17-1087-01
Sephadex LH-20	25 g	17-0090-10
RESOURCE 15RPC	1	17-1181-01

四、参考文献

1. 解红艳 现代生命科学技术在传统中医药研究中的整体解决方案。
2. 国家药典委员会主编，中华人民共和国药典 2000 版第一部，化学工业出版社，2000，116 ~ 114。
3. 李凤前，陆彬，粉防己碱制剂研究进展，中草药，1999，30(6)。
4. 陈德昌主编，中药化学对照品工作手册，中国医学科技出版社，2000，143 ~ 144。
5. 王慕邹主编，常用中草药高效液相色谱分析，科学出版社，1999，129 ~ 132。
6. Sephadex LH-20 制备凝胶色谱分离，18-1113-89。
7. 李凤前，陆彬，粉防己碱制剂研究进展，中草药，1999，30(6)。

低分子肝素的纯化

简介

中国是世界最大肝素粗品出口国，2010年占据全球市场份额约60%，出口总量约114吨。目前临床应用的小分子肝素产品生产工艺掌握在国外制药企业中，而从肝素粗品制备得到临床用药，产品升值10倍以上。肝素粗品经NaNO₂降解以后，低分子肝素分子量分布在0-13KD之间。目前欧盟和美国药典对于低分子肝素的分子量分布和平均分子量有严格的限制。国内目前有采用膜分离和分子筛的方法来控制低分子肝素的分子量分布，但收率一般只有20%以下，且生产能力有限。开发高生产能力，高收率的低分子肝素生产工艺，可以有效提高国内肝素企业的出口竞争力。

GE公司在纯化方面拥有丰富的经验，采用新一代的Capto基架的阴离子交换填料成功开发出纯化达替肝素和那曲肝素的新方法，分子量分布范围符合欧洲药典的要求，并且回收率在60%以上，与传统方法相比具有操作方便快速易于放大的特点，具有极强的使用价值。其他的低分子肝素也可参考该工艺进行纯化。

低分子肝素的种类

- 达替肝素
- 帕肝素
- 依诺肝素
- 那曲肝素

低分子肝素的纯化流程

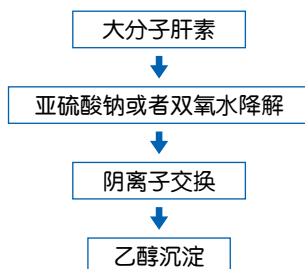


图 1. 低分子肝素的纯化流程图。

采用 Capto DEAE 纯化达替肝素

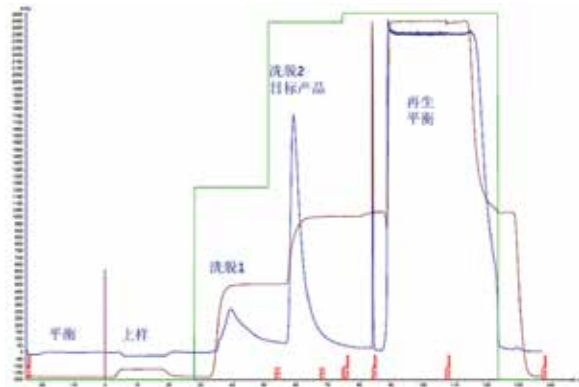


图 2. 典型的 Capto DEAE 纯化图谱。

表 1. 达替肝素和那曲肝素的质量要求。

项目	达肝素钠	那曲肝素钙
平均分子量	5600-6400 (6000)	3600-5000 (4300)
分子量分布	<3000: 13.0%	<2000: ≤15%
	>8000: 15.0%-25.0%	2000-8000: 75%-95%
		2000-4000: 35%-55%
		>8000: 9%-15%
抗Xa效价 (IU/mg)	110~210	95~130
抗IIa效价 (IU/mg)	35~100	95~130
AKa/AIIa	1.9~3.2	2.5~4.0
非还原末端	2-O-硫酸-α-L-艾杜糖醛酸	2-O-硫酸-α-L-艾杜糖醛酸
还原末端	6-O-硫酸-2,5-脱水-D-甘露醇	6-O-硫酸-2,5-脱水-D-甘露醇
硫酸化程度 (双糖单位)	2.0~2.5	2
降解方法	亚硝酸降解	亚硝酸降解

表 2. 不同的工艺回收率和生产能力的对比。

工艺模式	收率	生产能力
膜分离工艺*	<20	-
凝胶过滤层析工艺	20-30%	<2.5 g/l gel
阴离子交换层析工艺	55-60%	30 g/l gel

订货信息

产品	数量	货号
Capto DEAE	2.5 ml	17-5443-10
Capto Q	2.5 ml	17-5316-10
HiTrap Capto DEAE	5 × 1 ml	28-9165-37
HiTrap Capto DEAE	5 × 5 ml	28-9165-40
HiTrap Capto Q	5 × 1 ml	11-0013-02
HiTrap Capto Q	5 × 5 ml	11-0013-03
HiScreen Capto DEAE	1 × 4.7 ml	28-9269-82

PEG修饰蛋白的纯化

简介

用 PEG 蛋白药物可以解决许多蛋白药物面临的半衰期过短的问题。PEG 化改善了蛋白的药理学性质，大多数情况下使得它们在临床上更有效。这一技术在过去 20 年中发展很快，使得 PEG 化成为修饰蛋白质和多肽药物的一个方法。经过采用化学方法聚乙二醇修饰蛋白及多肽药物后，使得原来的纯品蛋白变成了含有 oligo-, mono-, non-PEG 蛋白的混合物，我们还需要将均一的 PEG- 蛋白纯化出来。

MacroCap SP 和 MacroCap Q 设计分离 PEG 化蛋白和其他大分子。它们的基架是由丙烯基葡聚糖交联氮氮亚甲基丙烯酰胺构成，具有较大的孔径，平均粒径为 50 微米。它们可以在高的载量的条件下分离 mono-PEG, oligo-PEG 和 non-PEG 蛋白。在保持较高载量的同时能一步将修饰后各种杂质去除。高分辨率的凝胶过滤填料 Superdex75、Superdex200 常用于精细纯化和鉴定 PEG 化蛋白。

一、PEG 化蛋白纯化的通用工艺

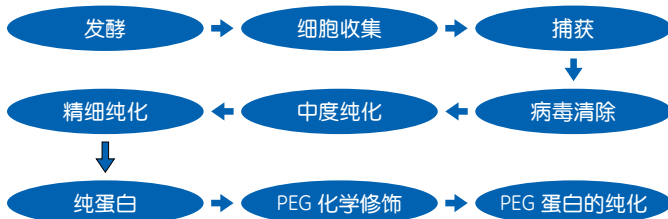


图 1. PEG 化蛋白通用纯化工艺。

PEG-Cytochrome C 的纯化

MacroCap SP 对于 monoPEG 细胞色素 c 的动态载量达到 3.8mg/ml，通过凝胶过滤 Superdex 200 5/150GL 的分析，monoPEG 化蛋白的回收率达到 99%，纯度达到 93%。

柱子: Tricorn™ 5/100 装填 MacroCap SP
 样品: Cytochrome C modified with 20 000 Mr PEG
 上样: 6 mg total protein per ml medium
 Buffer A: 0.02 M sodium phosphate, pH 6.8
 Buffer B: Buffer A + 0.4 M sodium chloride

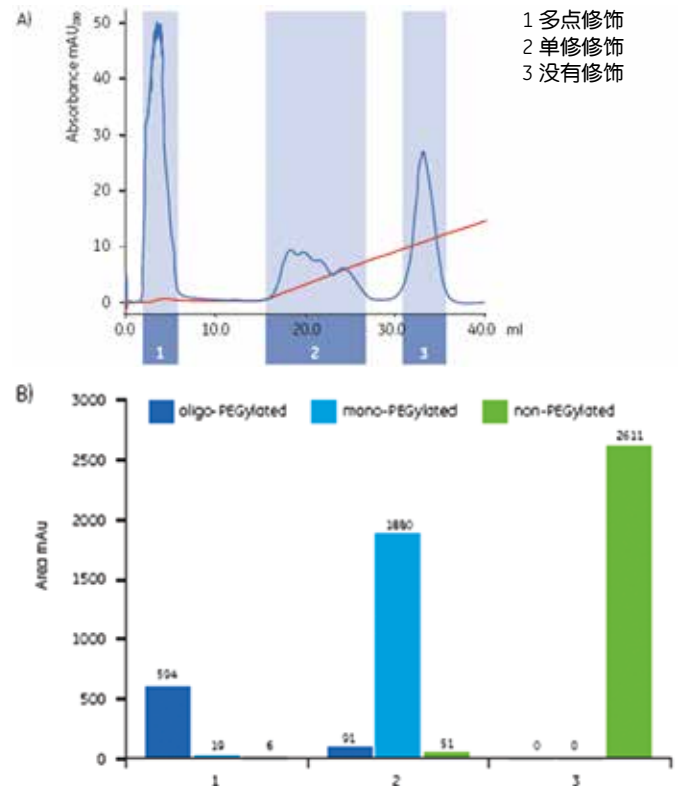


图 2. A) 用 MacroCapSP 分离 PEG 修饰的细胞色素 C；B) 用 Superdex 200 分析多修饰、单修饰和未修饰的蛋白。

PEG-BSA 的纯化

用 MacroCap Q 一步纯化 PEG-BSA，将它与 non-PEG-BSA 和反应副产物进行分离，纯度达到 95%，回收率达到 85%，载量 1 mg/ml。

柱子: Tricorn 5/100 装填 MacroCap Q
 样品: 用 30 000 Mr PEG 修饰 BSA
 上样量: 1 mg total protein per mL medium
 Buffer A: 20 mM phosphate buffer, pH 7.0
 Buffer B: Buffer A + 500 mM NaCl, pH 7.0

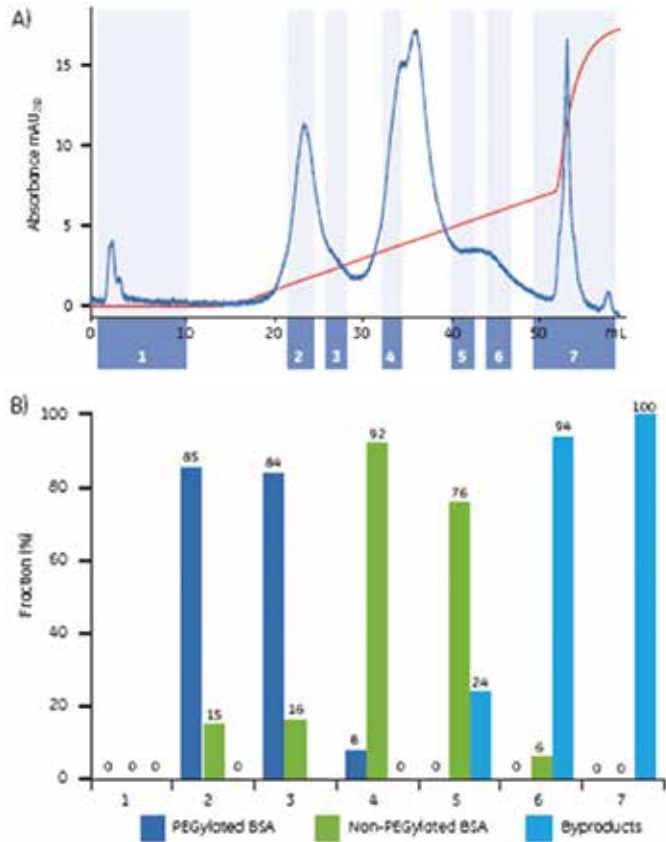
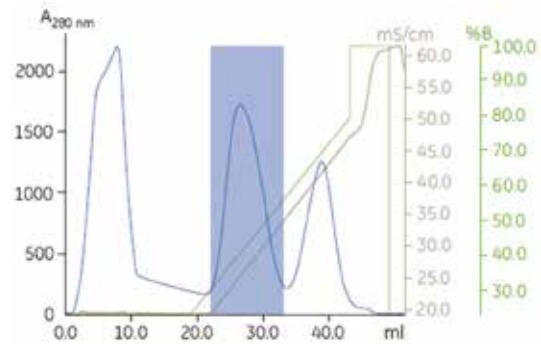


图 3. A) 用 MacroCap Q 分离 PEG-BSA；B) 用 Superdex200 检测 PEG 化蛋白、非 PEG 化蛋白和 PEG 衍生产物。

Mono-PEG-avidin 蛋白的纯化条件优化

Mono-PEG 蛋白显示对离子交换填料更强的结合能力，因此调整上样时的电导使 oligo-PEG 蛋白不能结合到柱子上而穿透。

柱子: Tricorn 5/100 packed with 2 ml of MacroCap SP
 样品: PEG40 avidin protein mixture, 15 mg of protein/ml medium
 Buffer A: 0.05 M sodium acetate, pH 5
 Buffer B: 0.05 M sodium acetate pH 5, 0.6 M sodium chloride
 流速: 0.2 ml/min
 梯度: 15-80% buffer B over 15 CV; 100% buffer B over 3 CV



柱子: Tricorn 5/100 packed with 2 ml of MacroCap SP
 样品: PEG40 avidin protein mixture, 15 mg of protein/ml medium
 Buffer A: 0.05 M sodium acetate, pH 5
 Buffer B: 0.05 M sodium acetate, 0.6 M sodium chloride, pH 5
 流速: 0.2 ml/min
 梯度: 25-80% buffer B over 12 CV; 100% buffer B over 3 CV

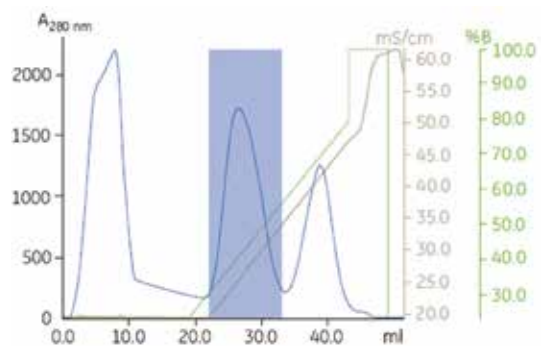


图 4. 用 MacroCap SP 纯化 monoPEG- 抗生物素蛋白。A) 在 14ms/cm 时，mono-PEG 抗生物素蛋白回收率达到 99%，但纯度只有 89%。B) 而在 20ms/cm 时上样，mono-PEG 抗生物素蛋白纯度达到 99%，但回收率只有 77%。

PEG-rhG-CSF 纯化

PEG 修饰后的混合物，未修饰产物、多修饰产物和单修饰产物在表面单核效应上存在差异，利用这一特点可以用离子交换层析将其各组份分离开。

方法一

柱子: Tricorn 5/100 packed with 2 ml of Source 30S
 样品: PEG-rhG-CSF, 10 mg of protein/ml medium
 Buffer A: 0.02 M sodium acetate, pH 4.0
 Buffer B: 0.02 M sodium acetate, 0.5 M sodium chloride, pH 4.0
 梯度: 20%B, 6CV

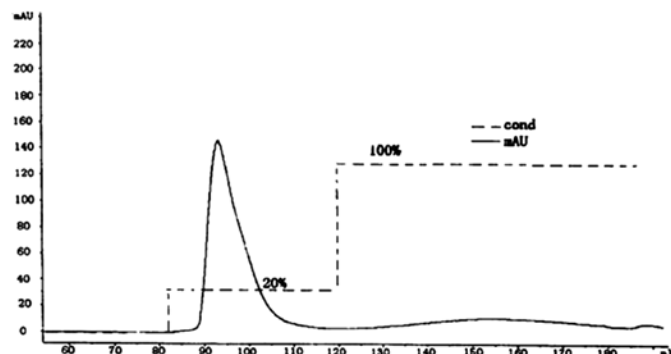


图 5. 单修饰的 PEG-rhG-CSF 在 20% 梯度洗脱下被洗脱下来。

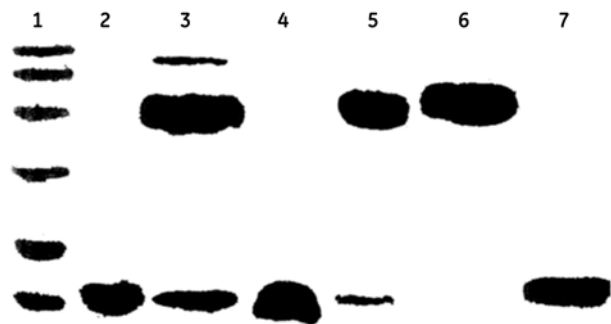


图 6. 20% 梯度洗脱的单修饰 PEG-rhG-CSF 经 SDS-PAGE 电泳显示该峰为单条带，收率达到 50% 以上。

方法二

柱子: XK 50/30 of Macrocap SP, 380 ml
 样品: PEG-rhG-CSF, 300 ml of protein/ml medium
 Buffer A: 0.03 sodium acetate, pH 3.8-5.8
 Buffer B: 0.03 sodium acetate, pH 7.0-8.0
 梯度: 100% A-100% B, 20 CV

一步离子交换层析使 PEG-rhG-CSF 的纯度达到提高大于 99.5%，比活性大于 6×10^8 IU/mg。

二、如何筛选 MacroCap SP 纯化条件

- PEG 在水中不带电荷，是相同分子量球蛋白的体积的六倍以上。
- PEG 趋向在蛋白表面定位，因此对蛋白的电荷有屏蔽作用，对离子交换填料的吸附变弱。
- 吸附采用的缓冲液盐浓度是 5 mM 而不是 50 mM，离心的吸附强弱顺序是天然蛋白 > 单点 PEGylated > 多点 PEGylated 蛋白
- 在赖氨酸位点进行 PEG 化的，会使蛋白的等电点减少 1 pH。因此在用低盐结合以外还需要更低的 pH（大约低于常规条件 1-2 pH）进行吸附。
- 起始流速 100 cm/h 保留时间 6 min 进行调整到最佳状态，用线性梯度盐浓度从 5 到 500 mM 进行全面洗脱。

三、订货信息

产品	数量	货号
HiLoad 16/60 Superdex 200 16/600	1	28-9893-35
HiLoad 26/60 Superdex 75 16/600	1	28-9893-33
MacroCap SP	25 ml	17-5440-10
MacroCap Q	25 ml	17-5469-01
HiTrap™ MacroCap™ SP	5 × 5 ml	28-9508-59
Tricorn 10/100 column	1	18-1163-15
XK 16/20 column	1	18-8773-01
Tricorn 10 Coarse Filter kit	1	11-0012-54
Tricorn Packing Equipment 10/100	1	18-1153-25

四、参考文献

- Instruction 28-4001-33 AB MacroCap SP.
- 聚乙二醇化药物及其研究中的产品应用。
- Purification of PEGylated Proteins and other Large Molecules.
- Data File 28-4005-84 MacroCap SP.
- Fee, C. J. and Van Alstine, J. M. PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues. Chem. Eng. Sci. 61, 924-939 (2006).
- Application Note 28-4094-65 AA.
- Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods 18-0004-21.
- James Seely et al., Biopharm Int'l, March, 2005, pp. 30-41.
- Harris and Zalipsky, ACS Symp. Series Vol. 680, 1997.
- Fee and Van Alstine, Chem. Eng. Sci. 61 (06), 924-939.
- 一种聚乙二醇单修饰的重组人粒细胞集落刺激因子的制备及分离纯化方法；
- 聚乙二醇单修饰的重组人集落刺激因子赖氨酸缺陷体。

层析技术在糖肽类抗生素中的应用

简介

肽类抗生素是氨基酸以肽键相连组成的一大类抗生素。绝大多数由细菌、放线菌产生，少数是真菌代谢产物。在其他抗生素对病菌无效时会被使用（即所谓的最后一道防线药物）。主要用于葡萄球菌（包括耐青霉素和耐新青霉素株）、难辨梭状芽胞杆菌等所致的系统感染和肠道感染，如心内膜炎、败血症、伪膜性肠炎等。主要代表药物有：万古霉素，达托霉素，替考拉宁，雷莫拉宁，达巴万星与奥利万星等。GE 公司提供多种填料可以有效纯化糖肽或脂肽类抗生素。

万古霉素纯化过程中经常会使用到大孔树脂，但大孔树脂由于颗粒度较大，只能在粗提富集过程时使用。如果对纯度有更高要求则必须进行更为高分辨率的精细分离。离子交换填料 CM sephadex C25 非常适合万古霉素精细分离。其载量高，纯化性能好已被广泛认可，有多篇专利及文章描述其在万古霉素提纯过程中的效果。CM sephadex C25 与大孔树脂性质及效果对比如下：

一、万古霉素纯化

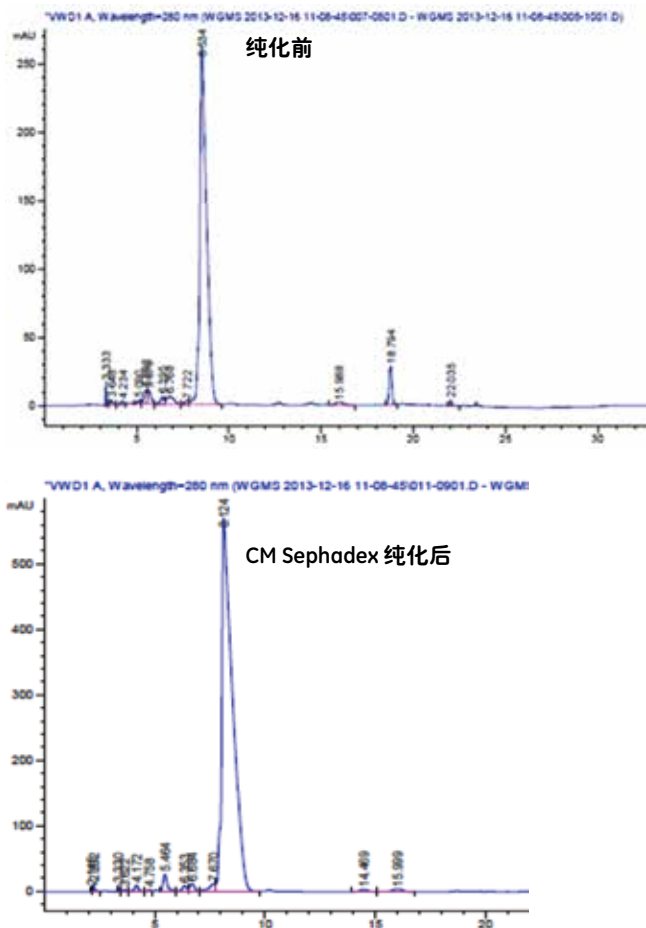


图 1. 万古霉素纯化，CM-sephadex C25 步骤收率大于 70%，色谱纯度由 86% 提高至 94% 以上。

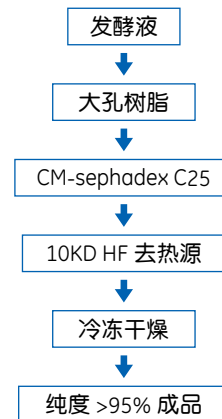


表 1. CM sephadex C25 与大孔树脂性质及效果对比。

项 目	CM-C25	大孔树脂
官能团	羧甲基	苯环
原理	静电力	疏水作用
颗粒度	40-120 μm	0.3-1.25 mm
阶段	精细分离	粗提，富集
收率	75%	80%
纯度	93%	85%
有机溶剂	无需	需要

二、达托霉素纯化

达托霉素是由 13 个氨基酸连接成的环状肽共价连接癸酰基构成。结构复杂及稳定性差等特点增加了其纯化难度。高纯度达托霉素工艺皆采用离子交换再结合反相或疏水层析技术得以实现。

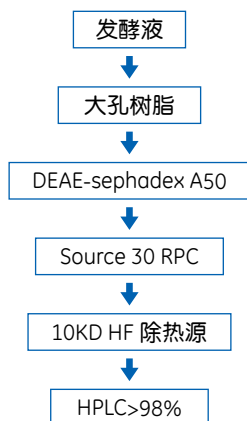


图 2. 达托霉素纯化流程图。

三、替考拉宁纯化

替考拉宁是由五种结构相似的糖肽类化合物 (T-A2-1~T-A2-5) 和去酰基葡萄糖胺 Teicoplanin A3 (T-A3) 组成的混合物。其纯化工艺为离子交换结合疏水层析。

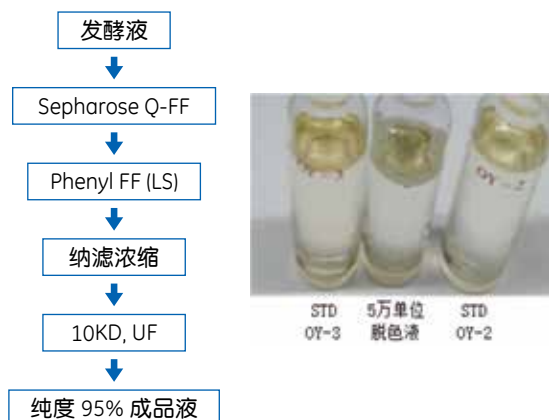


图 3. 替考拉宁纯化流程及效果及 Phenyl FF 脱色结果与标准品。

替考拉宁成品对各组分比例及颜色要求较高，这给下游纯化带来一定挑战。GE 公司提供的疏水填料可以完美解决以上问题。就脱色而言，其收率高达 95%，远高于活性炭工艺；phenyl FF 填料处理后可避免久置沉淀现象。此外疏水层析可避免反相层析所需的高压设备及大量溶剂，具有节约成本与环境友好的优势。

四、参考文献

1. 陈代杰等，一种万古霉素柱层析纯化方法，CN200610023150，(2007)。
2. Martin Mansson, et al. Process for purifying lipopeptides. US 20100228006(2010)。
3. 孙新强等，高纯度替考拉宁纯化方法，CN200710107185，(2007)。
4. AASSVEEN LENE, et al. Norwegian Patent 200530678. (2005)。
5. 周玉，刘玉芳，去甲万古霉素单组份精制与分离。抗生素 (414-418)，(1986)。



关于GE医疗集团

GE医疗集团通过提供革新性的医疗技术和服 务，开创医疗护理的新时代。我们在医学成像、信息技术、医疗诊断、患者监护系统、药物研发、生物制药技术、卓越运营和整体运营解决方案等领域拥有广泛的专业技术，能够帮助客户以更低的成本为全世界更多的人提供更优质的服务。此外，我们还和医疗行业领袖一道，正努力通过全球政策，打造成功的、可持续的医疗体系。

我们的“健康创想”愿景普及全球。我们不断通过创新在世界范围内推动降低医疗成本、增加医疗机会、提供医疗质量。GE医疗集团总部设在英国，是通用电气公司（纽约证券交易所：GE）下属的业务集团之一。GE医疗集团的员工分布于全球100多个国家和地区，致力于为医疗专业人士和患者服务。

www.gelifesciences.com.cn

咨询热线：800-810-9118 400-810-9118

GE医疗中国

北京办公室

北京市经济技术开发区
永昌北路1号
邮政编码：100176
电话：010-58068888
传真：010-67873597

上海办公室

上海市浦东新区张江高科技园区
华佗路1号
邮政编码：201203
电话：021-38777888
传真：021-38777499

广州办公室

广州市天河区珠江新城花城大道87号
通用电气大厦10楼
邮政编码：510623
电话：020-38157777
传真：020-38157797

成都办公室

成都市高新西区西芯大道3号
创智联邦3号楼
邮政编码：611731
电话：028-62722345
传真：028-62722466