

膜色谱技术及其在生化快速分离分析中的应用

杨利 贾凌云 邹汉法 周冬酶 汪海林 李彤 张玉奎

(中科院大连化学物理研究所, 国家色谱研究分析中心, 大连 116011)

生物技术为人类提供越来越多的具有特殊疗效的生化药品, 如干扰素、白细胞介素、细胞集落刺激因子等等。在科研及生产过程中, 存在着大量的蛋白质、多肽和核酸等生物大分子的分析、分离和纯化工作, 迫切需要高效、快速的分析、分离和制备方法, 特别是用于临床的生化药品, 不仅要达到很高的纯度, 而且还要在分离过程中最大限度地保持其生物活性。据统计, 生物工程产品的分离纯化成本占其全部成本的 60-80%。国外在这方面正在进行大量的研制及开发, 并作为科技投资的一个重点。

色谱技术(又称为层析技术)因其具有多种不同的分离机理, 设备简单、便于自动化控制等特点, 是目前生化分离分析中最常用的技术之一, 在生物工程下游处理中占有主要的地位。传统的色谱柱是管式结构, 流体在色谱柱内以轴向从一端流向柱的另一端, 色谱填料是软的或硬的多孔颗粒填料, 这类色谱柱具有分离效率高, 柱容量大的特点, 但存在着以下缺点: 1. 流速慢, 生产效率低, 蛋白质在长时间分离过程中易变性失活; 2. 压降大, 对分离系统要求高; 3. 不易放大, 在放大规模时, 需要逐级摸索分离条件, 这是大规模分离纯化突出困难之一, 因此迫切需要发展出新的色谱技术。

为解决上述问题, 八十年代中期国际上出现了一种称为径向色谱(Radial Flow Chromatography)的新技术^[1,2], 在原理上解决了上述传统色谱技术所存在的问题。众所周知, 膜分离过程具有处理量大, 效率好等优点, 但是膜分离过程中选择性低, 对样品的分辨力差, 如果选用具有高选择性和分辨力的色谱填料, 如离子交换或亲和色谱填料, 并制成膜的形式, 再结合径向流动的原理, 则可做处理量大、速度快、选择性好、分辨力高的分离技术, 这就是径向膜色谱技术。该技术及产品在八十年代中后期首先由美国 CUNO 公司推出^[3,4]。我们自 1986 年开始承担国家“863”生物工程课题“径向膜色谱介质的研制”, 经过“七五”和“八五”十年攻关, 研制开发出以纤维素为基质的离子交换、亲和、疏水三种类型的复合膜色谱介质和各种规格的径向、轴向膜色谱柱, 为我国生物工程产品的分离纯化和快速分析提供了有效的工具。

1 径向膜色谱

1.1 径向膜色谱技术的原理及特点

径向膜色谱柱的结构原理如图 1 所示。径向膜色谱柱采用螺旋卷式膜组件结构, 径向流动原理, 样品和流动相是从色谱柱的圆周流向柱的圆心。径向色谱柱与传统的轴向柱相比, 其流向的截面积大, 大流速时, 压力降仍很低; 另外, 当保持柱径不变只增加柱长时, 可以线性增加样品的处理量, 分离条件与时间没有明显变

化。通过理论研究和实验证明, 径向膜色谱柱具有以下特点^[5,6]:

速度快、处理量大、压降小 膜介质与流动相接触面积大, 而流动相流程短, 比同体积的凝胶轴向柱快 4~5 倍, 因而效率高。

易放大生产 可以按实际生产需要进行线性放大而不影响分离性能, 而且可进行多柱串联或并联来提高分离性能和处理量。因此, 径向膜色谱柱非常适合大体积原料如基因工程、发酵工程产生的大体积低浓度的蛋白质、核酸等生物大分子的富集纯化。

成本低 使用寿命长 易于再生 纤维素

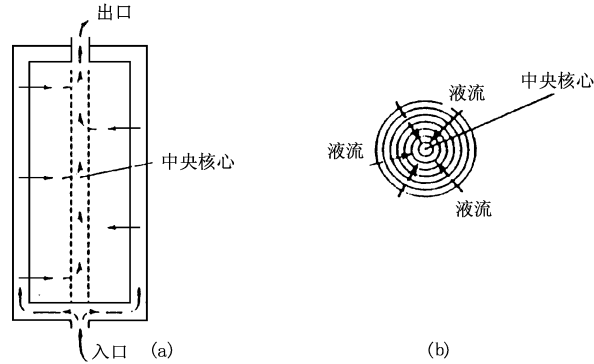


图 1 径向色谱柱结构示意图

价廉, 来源充足, 而且经化学改性后, 在可供偶联配基的活性基团大增多的同时, 也改善了纤维素的物理化学性能, 增强了纤维素膜的强度, 使其使用寿命更长。较高的分离速度可大大缩短分离时间, 避免或减少不稳定蛋白质或酶在分离过程中的降解或失活, 提高回收率, 从而降低成本。膜色谱柱可原位再生, 勿需重新装柱, 既省时省力, 又可避免重新装柱造成的介质流失的损失。

表 1 中试规模径向与轴向柱的经济性比较

	流速(L/h)	产率(L/班)	柱体积(L)
径向柱	75~ 95	350	20
轴向柱	25	117	16

表 2 相同生产规模时径向柱与轴向柱的比较

	流速(L/h)	产率(L/班)	柱体积(L)
径向柱	200	1000	60
轴向柱	200	333	160

表 1 和表 2 分别列出了径向柱与轴向柱的经济和效率比较^[1]。从表 1 中可以看出当柱体积相差不大时, 径向色谱柱的流速和班产率比轴向柱分别高 3~ 3.8 和 3 倍。从表 2 中可以看出, 在生产规模, 流速和班产率相同时, 径向色谱柱的柱体积只需轴向柱的 1/3 左右。对工业生产是有益的。

1.2 膜色谱柱的应用

美国 CUNO 公司已将膜色谱柱商品化, 其产品从最小的实验室规模(如 ZetaPrep-15, 处理量度 150m l/h) 和中试规模(如 ZetaPrep-800, 处理量 10L/h) 到生产规模(如 ZetaPrep 90SP, 处理量 10, 000L/天), 已形成了系列化, 膜的类型主要是离子交换型, 如 QAE、DEAE、SP 型等, 并已在韩国、中国台湾等地用于实际生产中。另外, 美国的 Millipore 公司和 Nygene 公司还相继推出了以蛋白 A 为亲和配基的商业化膜色谱组件^[7, 8]。目前我们研制的径向膜色谱柱的种类, 性能及应用情况列入表 3 中。产品型号规模列入表 4 中。从表 3 中可以看到, 目前常用的色谱分离介质我们都可以制成膜的形式, 其应用的对象与传统的凝胶介质相同, 使用范围也相近。下面具体介绍膜色谱分离生物大分子纯化的应用实例。

1. 血浆制品的分离 用 CM 250 型弱阳离子交换膜色谱柱对 2000ml 稀释 10 倍的人血浆进行分离, 人血浆中的几种主要蛋白质全部得到分离(分离谱图略), 蛋白质的总回收率达 90% 以上。

2. 单克隆抗体的纯化 与北京军事医科学院合作, 用 CM 250 型径向弱阳离子交换柱, 成功地纯化了登革病毒单克隆抗体。IL 培养物上清上柱吸附率可达 100%, 经一步纯化, 可以得到

纯度为 50% 的登革病毒单克隆抗体, 再经硫酸 铵沉淀提纯, 纯度可达 90% 以上。

表 3 膜色谱柱产品性能及应用情况

类型	名 称	官能团	配基载量/ 克干介质	载量/克介质	pH 稳定性	应用实例
离子型	CM 弱阳离子型	COO ⁻		50mg BSA (pH 4-5)	2- 14	尿激酶原, 乙型肝炎核心抗原单抗, 登革病毒单抗, IgG, 血清白蛋白
	DEAE 弱阴离子型	N (C ₂ H ₅) ₂		50mg BSA (pH 6-5)	2- 14	干扰素 α-2a, EPO, rIL-2, BSA , IgG, IGase, 热原, protein A
	QAE 强阴离子型	N (CH ₃) ₃		70mg BSA (pH 6-5)	2~ 14	人尿激肽释放酶, rIL-1
	SP 强阳离子型	SO ⁻ 3		28mg BSA (pH 4-5)	2~ 14	IL-1, rIL-1, 凝血酶, 小鼠单抗
亲和型	QHA	Protein A	4- 6mg	15- 23mg IgG	3- 10	人 IgG
	QHH	肝素	8		5- 10	Taq 酶, 凝血酶
	DA 亚胺二乙酸	N (COOH) ₂	10- 140 μmol 可选	10- 140μmol Cu ²⁺	3- 14	牛和人血清白蛋白, IgG
	QHM 苯脒	C ₆ H ₄ (NH ₂) = NH	5- 20μmol	10- 20mg 胰蛋白酶	2- 14	胰蛋白酶, 尿激酶
疏水型	SSH 己二胺	NH (CH ₂) ₆ NH ₂	20- 40μmol	10- 20mg BSA	2- 14	EPO, 热原
	SSM 甲基	CH ₃	40μmol	20mg BSA	2- 14	牛和人血清白蛋白
	SSA 戊烷	NH (CH ₂) ₄ CH ₃	25μmol	30mg BSA	2- 14	血清白蛋白, 热原
	SSB 苯基	C ₆ H ₅	40μmol	50mg BSA	2- 14	牛血清白蛋白

表 4 不同柱型号的规格

型号	100A	250 型	600 型
柱规格(mm ×mm)	Φ7 × 30	Φ7 × 120	Φ7 × 400
干填料量(g)	10	20	120
体积(ml)	95	190	1000

3. IGase 酶的分离纯化 IGase 酶是具有治疗口腔疾病功能的一种酶。我们以 DEAE-Sephrose CL-6B 为对照, 用 DEAE 型径向膜色谱柱分离纯化了 IGase 酶。从表 5 中的结果和分离谱图 3 可以看出:

径向色谱柱与传统的轴向柱的单位吸附蛋白容量和分离量相当, 但随着柱长的增加, 处理容量却是线性增加的;

对于大体积的样品, 可以看出径向色谱

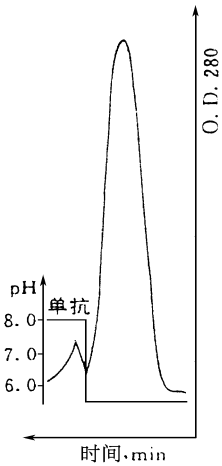


图 2 SinoChrom RCC CM 250 柱纯化登革病毒单克隆抗体

柱无论是在分离速度上还是所用的柱体积上都要明显优于传统的轴向柱。如果样品体积继续增大,只要按比例将多支径向柱并联即可;

由于径向膜色谱柱的结构合理性,分离填料的性能优越性,虽然同是DEAE 纤维素离子交换填料,但使用寿命是传统轴向柱的一倍以上;

尽管分离纯化的规模放大,但所得到的分离纯化谱图却几乎完全一样,这样为分离纯化过程的定性定量及条件优化乃至工业放大都带来了方便。

4 人尿激肽释放酶的分​​离纯化 组织激肽释放酶(EC. 3.4.21.35)在生理上具有维持局

部血压,稳定血液畅通,参与水和电解质平衡的调节的作用,现在国外正用此酶进行高血压基因疗法的研究。人尿液成分复杂,激肽释放酶在尿中含量较低(约 $100\mu\text{g/L}$),因此需要快速纯化技术进行大规模的制备,以供性能测试及临床治疗等需要。我们经过超滤浓缩, QAE 离子交换径向色谱初分离及以抑肽酶为亲和配基的亲和色谱分离,得到电泳纯的人尿激肽释放酶。由于 QAE 离子交换径向色谱技术的应用,省去了文献报道的盐析和高速冷冻离心步骤,大大节省了时间,证明径向离子交换色谱柱不仅具有分离纯化能力,同时还具有富集、浓缩的能力(分离谱图略)。

表 5 不同分离规模分离纯化 IGase 酶的结果

柱型	SinoChrom RCC DEAE 100A	SinoChrom RCC DEAE 250	SinoChrom RCC DEAE 600	DEAE 凝胶轴向柱 (对照组)
吸附量 一次可分离量	8- 9mg/9g 膜 16ml	/ 30- 40ml	/ ~ 100ml	14mg/10g 干粉 20mg/10g 干粉
使用情况	使用 10- 20 次后,流速明显下降,每分离 1 升发酵液需 42- 52 小时(一支柱)	使用 15 次后流速未出现明显变化,每分离 1 升发酵液需 17- 21 小时(一支柱)	/ 每分离 1 升发酵液需 8 - 10 小时(一支柱)	使用 5- 8 次后流速明显下降,必须重新装柱才能保证流速;每分离 1 升发酵液需 (1) $2.6 \times 20\text{cm}$ 柱(10g 干粉) 83 小时; (2) $5.0 \times 80\text{cm}$ 柱(130g 干粉) 74 小时; (3) $8.0 \times 48\text{cm}$ 柱(200g 干粉) 10 小时

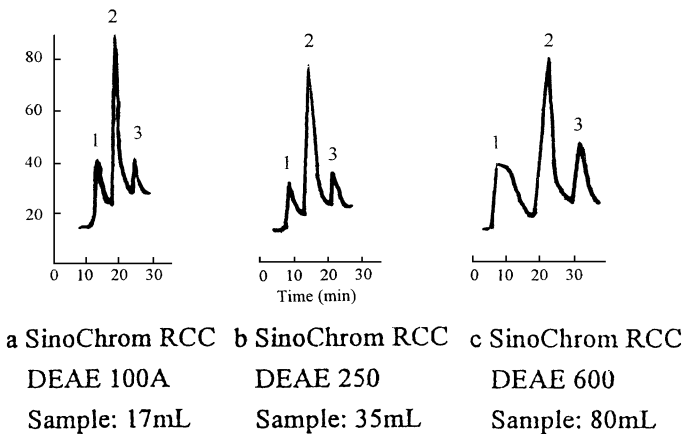


图 2 不同规模纯化 IGase 酶的情况

峰号 1、2、3 代表缓冲液中氯化钠的浓度, 分别为 0、 0.4mol/L 、 0.7mol/L

我们用固定化铜离子的 DA 型金属螯合膜色谱柱对过氧化氢酶进行了分离纯化, 与国外用快速 Sepharose 凝胶柱相比, 纯化效果相当, 但速度快 3-4 倍^[9]。我们生产的 DA 型金属螯合膜色谱柱已经用在上海某生化企业的实际生产中, 到目前为止已运行一年多, 运行一直良好。分别与北京军事医科院和沈阳军区后勤部军事医学研究所合作用 DEAE 柱分别分离纯化了基因重组的白细胞介素-2 (IL-2)^[10] 和 α 干扰素, 并与 DEAE-Sepharose FF 凝胶轴向柱相比较, 在相同的分离条件、上样量时, 所得结果如回收率、活性等相同, 但使用径向柱分离速度快 2 倍以上, 试验结果进行了专家鉴定。与南京军区医学研究所合作, 利用己二胺疏水型径向膜色谱柱对基因重组促红细胞生长素进行了分离纯化, 获得很好的效果。

我们还将径向离子交换膜色谱柱与离子交换树脂轴向柱联用, 成功地对重要医药中间体——对羟基苯甘氨酸发酵液进行了分离浓缩, 一次浓缩 8.5 倍, 产品回收率可达 90% 以上, 完全可以替代耗能耗时的蒸发浓缩法。

另外, 我们正与多家医疗单位合作, 将膜色谱技术用于临床去除血液病毒即免疫吸附疗法的研究及开发。我们研制的 Protein A 免疫吸附膜色谱柱动物试验结果是令人可喜的, 已基本通过动物安全性试验, 现正在进行临床试验。

已有一例系统性红斑狼疮病人经我们研制的免疫吸附膜色谱柱的治疗, 目前已治愈出院。免疫吸附膜色谱技术若能通过临床试验, 膜色谱技术又可以在治疗疑难病症(如系统性红斑狼疮、类风湿、高血脂等)方面发挥巨大作用。

2 高效分析膜色谱

高效分析膜色谱是对活性生物大分子进行快速成分分析和定量的一种可行的方法。利用这种方法采用不同配基, 可在不同条件下对各种生物活性大分子进行定量分析及小量样品的制备, 具有速度快、易于定量、非特异性吸附低、柱压低、成本低及柱体积小等优点, 这种分析生物大分子的方法有着极好的应用前景^[11]。美国 Millipore 公司 90 年代初期推出了可与高效液相色谱配套使用的分析型离子交换膜色谱柱, 如 Mem SepTM 1000, 主要用于生物大分子的快速分离分析。我们采用自制的复合纤维素膜为填料, 成功研制出了高效快速膜色谱分析柱。

Protein A 高效亲和膜色谱柱对人 IgG 的分析

将稀释 10 倍的血浆进行, 分离谱图如图 4, 可见, 高效亲和膜色谱可以实现对人 IgG 的快速分析, 0.5 分钟便可完成。通过峰面积单点定量, 可得所取血浆样品中活性 IgG 的含量为 9.4mg/ml。

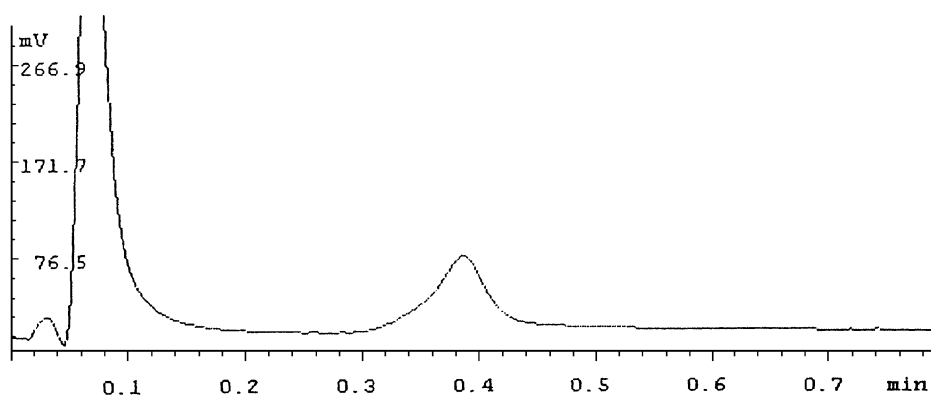


图 4 Protein A 高效亲和膜色谱柱对人 IgG 的分析谱图
柱: $\phi 4 \times 20\text{mm}$; 流速: 3ml/min ; 检测波长: 280nm ; 进样量: $10\mu\text{l}$

我们还研究了其它小分子配基如 DA 金属螯合型、Cibacron Blue F3GA、氨基酸等的高效亲和膜色谱柱在生物大分子分析中的应用,都获得了较好的效果。通过大量实验证明,高效分析膜色谱具有如下优点:

- a 分析速度快—色谱过程只需 1- 7 分钟,使在线分析成为可能;
- b 柱压低- 柱压一般在 100psi 以下;
- c 成本低- 与国外用于同类样品分析的 Perfusion 色谱柱相比,成本低于进口产品价格的五十分之一;
- d 柱体积小- 柱内体积只有 0.5ml
- e 非特异性吸附小- 高效亲和膜色谱柱的非特异性吸附用高效液相色谱仪检测不出来。

3 膜污染及其处理方法

无论是过滤用膜还是表面带有功能基团的色谱分离用膜,经过一段时间的使用,由于膜与溶质在膜表面产生沉淀或结晶,形成所谓“凝胶层”而造成膜的分离性能下降,这种现象称为膜污染。膜的污染受多种因素的影响,如膜的亲疏水性、荷电性、蛋白质种类、分离缓冲液 pH 值、无机盐浓度、料液浓度、流速及压力等等。一般而言,强亲水性膜与强疏水性膜与蛋白质相互作用较弱,较耐污染,操作 pH 值远离蛋白等电点时,污染程度较小,随着温度的升高,膜表面对蛋白质的吸附增强,污染程度增加。为保持膜的分离性能,延长使用寿命,必须采取一定的清洗方法,除去膜表面或膜孔内的污染物,使膜的分离纯化性能得到恢复。我们对研制的金属螯合复合纤维素膜的使用寿命进行了考察,结果表明,膜色谱柱经反复多次使用后仍保持较好的吸附容量及纯化效果,当吸附容量降至 80% 以下时,经 0.5N 的 NaOH 和 HCl 处理后,吸附容量及纯化效果可基本得到恢复,压降和流量无明显下降。在防腐剂 0.02% 的 NaN₃ 存在下,金属螯合膜色谱柱放置一年后再使用,也未

发现柱效明显降低^[12]。

4 展望

随着膜色谱技术的研究和应用的迅速发展,已显示出它在生化分离中的巨大应用潜力,并逐渐进入工业化生产阶段。据有关专家预测,到 2000 年分离膜的世界市场可达到 100 亿美元,而其中近一半(44%)将是表面改性的功能膜,即我们所讲的膜色谱,可见膜色谱的市场前景是相当可观的。目前国内大多数生物制品企业所使用的分离介质仍然是软凝胶,还没有认识到膜色谱分离的巨大优越性,但我们坚信,随着膜色谱技术的不断推广,高效率、大处理量、低成本的膜色谱技术不仅对轴向凝胶色谱技术构成有力挑战,而且不久会成为生物大分子分离纯化最重要的手段之一。

参 考 文 献

- [1] V. Saxena, et al Bio/Technology. 1989; 3: 250
- [2] G M c Gregor Bio/technology. 1989; 4: 250
- [3] H. L. Chen and K. C. Hou, React Polym. 1987; 5: 5-11.
- [4] S. H. Hung, S. Roy, K. C. Hou and G. T. Tsao, Biotechnol Prog. 1988; 4: 159- 165
- [5] A. Jungbauer, F. Unterluggauer, K. Uhl et al Biotechnol Bioeng. 1988; 32: 326- 333
- [6] H. Wang, T. Li, H. Zou et al Biomed Chromatogr, 1996; 10: 139- 143
- [7] Millipore Co., MemSep Cartridges Catalog, Millipore Co., Bedford, 1993
- [8] Nygene Co., MASS Catalog, Nygene Co., New York, 1990
- [9] 杨利 贾凌云 邹汉法 张玉奎 色谱, 1997; 11(4): 121- 124
- [10] 姚志建, 徐明波 色谱 1989; 1: 15
- [11] D. Josic et al J. Chromatogr. 1992; 590: 59
- [12] 杨利 贾凌云 邹汉法 周冬梅 张玉奎 中国科学 B 辑, 1998; 28(4): 353- 360

(下转第 24 页)

Abstract There are more than 20 mating type genes have been cloned from Basidiomycete. Different features were discovered in A and B loci. The mating type genes in A loci encode two kinds of highly conserved homeodomain containing protein, which play important roles in A-dependent development by the formation of protein heterodimer. The mating type genes in B loci contain multiple pheromone and pheromone receptors. Homeodomain proteins encoded by mating type genes in A locus are highly conserved among plant, animal and fungi.

Key words Basidiomycete, Mating type genes, Homeodomain, Heterodimer, Pheromone

(上接第 53 页)

Membrane Chromatography for Fast Purification and Analysis of Biomacromolecules

Yang Li Jia Lingyun Zou Hanfa Zhou Dongmei Wang Hailin

Li Tong and Zhang Yukui

(National Chromatographic R. & A. Center, Dalian Institute of Chemical

Physics, the Chinese Academy of Sciences, Dalian, 116011)

Abstract Radial-flow membrane chromatography—a new technology for fast separation of biomacromolecules is introduced mainly based on our own work. Several advantages of this technology, such as fast flow, ease scale up, low cost and simple generation of cartridge compared with traditional gel chromatography, make it a great promising mean for purification of biomacromolecules on large scale. A new developed high performance membrane chromatography for fast analysis quantitatively of biomacromolecules is also introduced.

Key words Chromatography, Membrane, Bioseparation, Biomacromolecule

(上接第 59 页)

入产道和胎盘,引起宫内感染,其感染造成的损害的程度与胎龄有关,妊娠 16 周内母体急性风疹病毒感染是导致胎儿严重畸形的最危险时期。IgM 阳性说明孕妇近期感染过风疹病毒,PCR 阳性说明机体携带病毒;IgM 阳性,PCR 阴性,如近期末注射过疫苗,说明近期感染过风疹病毒并已被清除。如果感染发生在孕早期,一般四个月之内,应劝说孕妇终止妊娠,如果发生在中、晚期,应做产前诊断,以确定胎儿受染情况,婴儿一旦出现先天性风疹综合症,治疗已毫无意义。因此,关键在于预防。

风疹感染的预防主要是免疫预防和减少先天性风疹综合症病人的出生。建议育龄妇女在孕前、早孕、晚孕分别进行一次风疹病毒感染

ELISA 和 PCR 检测,以便采取相应的措施。免疫预防是进行减毒疫苗接种,接种前应进行风疹病毒检测,对未感染者进行疫苗接种。凡小年龄接种者应于育龄期再加强一次。由于目前应用的疫苗为减毒活疫苗,因此育龄妇女接种后应避孕 3 个月以上。若妊娠早期与风疹患者有过接触,可肌注 1500mg 丙种球蛋白或成人血清,以获得被动免疫。

参 考 文 献

- [1] 傅凤鸣 风疹病毒感染,实用妇女科学,1995,11(2): 63
- [2] 林万明 PCR 技术操作和应用指南,1993,人民军医出版社
- [3] Eggerding F. A. et al, J. Clin. Microbiol 1991, 29: 945