

## 蛋白质层析用离子交换和疏水作用层析介质的发展概况

浦 宇<sup>1\*</sup> 王芝祥<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(上海复旦张江生物医药股份有限公司, 上海 201203)

<sup>2</sup>(上海医药工业研究院, 上海 200040)

**摘 要** 层析是蛋白质纯化的关键技术之一,作为层析技术的核心——层析介质一直以来是层析技术研究的一个热点。近年来,越来越多的新型层析介质被开发出来,如粒度均匀的交联多糖、人工合成的大孔聚合物、触角型吸附剂、软胶包裹在硬胶表面等介质。主要介绍应用较为广泛的 IEC 和 HIC 介质的组成、特性及其在蛋白质纯化中的应用,还研究了与 HIC 技术相关的两种新技术:亲疏层析和疏水电荷诱导层析(HCIC),重点介绍了 HCIC 的介质及其应用,同时也讨论了在蛋白质纯化中应用的三相纯化策略(富集、中间纯化和精制)。结合我国的实际情况,就当前蛋白质纯化的离子交换和疏水层析介质面临的挑战和未来的发展进行讨论并提出了建议。

**关键词** 离子交换层析, 疏水作用层析, 层析介质, 蛋白质层析技术

**中图分类号** Q819 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0975-08

在众多的蛋白质分离纯化技术中,层析是一门关键技术,和其它分离技术相比,层析技术具有分离效率高、适用性广和过程易于放大、易于自动化的特点<sup>[1]</sup>,因而得到了广泛的应用。而层析技术的核心是层析介质,选择合适的层析介质、应用合理的工艺条件已成为蛋白质层析技术的关键,这就要求对当前主要的层析介质有所了解。下面介绍蛋白质层析介质的发展概况,重点讨论当前应用较广的离子交换层析(ion exchange chromatography, IEC)和疏水作用层析(hydrophobic interaction chromatography, HIC)介质,并探讨蛋白质层析介质的应用技术。

### 1 蛋白质层析介质的发展概况

根据蛋白质层析技术的类型可以将层析介质分为:凝胶过滤介质、离子交换介质、疏水作用层析介质、反相层析介质和亲和层析介质。就介质的骨架而言,最初主要是天然高分子物质,都为多糖如纤维素、葡聚糖和非交联的琼脂糖凝胶,其特点是亲水性好、生物相容性高,缺点是质地较软、不耐压、流速慢,一般称之为软胶(soft gel)。随着对蛋白质分离要求的不断提高,客观上推动了蛋白质层析介质的发展,在过去的十几年中,新型的层析介质被不断地开发出来,大体上可以分为以下几类:

1)粒度均匀的珠状交联多糖。在保证经典多糖介质良好的吸附性能的基础上进行交联,不但增加了强度,而且较窄的粒径分布提高了分离效率。如交联琼脂糖凝胶,商品化的有 Amersham Biosciences 生产的 Sepharose Fast Flow、Seph-

arose High Performance 等系列。

2)人工合成的大孔聚合物。基于这类填料的层析被称为灌注层析,其特点是在介质中除了有小的扩散孔,还有大的穿透孔,从而大大加快传质,增加流速。最早商业化的产品是 PerSeptive Biosystems 公司 1989 年推出的 Poros 系列,目前还有 Ciphergen 公司的 HyperD 系列。另外还有一类区别于传统珠状介质的填料采用整块多孔聚合物(monolithporous polymer)<sup>[2]</sup>,其合成是在“密闭柱”中进行的,不过内径较大的柱的合成比较困难。

3)触角型(tentacle)吸附剂。这类介质通过增长间隔臂和有效官能团来增加活性配基与蛋白质的相互作用,从而提高效率,如 Merck 公司的 Fractogel EMD 系列。

4)软胶包裹在硬胶表面(soft gel in a rigid shell)。这类介质最大的特点是结合了软胶(如琼脂糖)良好的吸附性能 and 无机材料(如硅胶)的刚性优点,如 Ciphergen 公司的 Spheredex 系列。

5)层析技术的发展,相应地推动了新型层析介质的开发。如应用于扩张床吸附(expanded bed adsorption)技术的层析介质产品有 Amersham Biosciences 公司的 STRIMLINE 系列,还有近几年发展起来的疏水电荷诱导层析(hydrophobic charge induction chromatography, HCIC),产品有 Ciphergen 公司的 MEP HyperCell;另外膜色谱在蛋白质纯化中的应用也推动了相关介质——膜技术的发展<sup>[3]</sup>。

### 2 离子交换层析介质

最早应用于生物大分子分离纯化中的离子交换介质是

收稿日期:2004-03-17,修回日期:2004-06-17。

\* 通讯作者。 Tel:86-21-58953355; Fax:86-21-58553990; Email: derrypuyu@sina.com

纤维素离子交换剂<sup>[4]</sup>,纤维素高度的亲水性能与蛋白质有很好的相容性,但其缺点也显而易见:容量低、流速慢。后来,珠状交联葡聚糖、琼脂糖、交联纤维素被开发出来,离子交换介质的性能得到了极大的改善<sup>[5]</sup>,这也是目前仍得到广泛应用的离子交换介质。近年来,随着合成技术的发展和生产的

需要,人工合成的刚性材料被陆续开发出来,这也是未来离子交换介质发展的一个趋势。

目前,商品化的离子交换层析介质品种很多(见表1),对其评估和选择至关重要,下面介绍离子交换介质的配基、基质及其对介质分离性能的影响。

表 1 用于蛋白质制备的离子交换层析介质

Table 1 Mainly IEC media available for preparative protein separation

名称	供应商	骨架结构	配基
Bio-Gel A	Bio-Rad	琼脂糖	DEAE, CM
Cellulose	Whatman	纤维素	DEAE, CM, SE, P
Ceramic HyperD	Ciphergen	/	Q, S, DEAE, CM
Fractogel EMD	Merck	交联聚甲基丙烯酸酯	TMAE, DEAE, DMAE, COO <sup>-</sup> , SE, sulfoisobutyl
Macro-Prep	Bio-Rad	聚甲基丙烯酸酯	Q, DEAE, CM, S
Matrex Cellufine	Millipore	珠状交联纤维素	Q, DEAE, CM.
Mini	Amersham Biosciences	亲水性聚醚类	Q, S
Mono	Amersham Biosciences	亲水性聚醚类	Q, S
Poros	PerSeptive Biosystems	聚苯乙烯	QE, D, S, SE, SP, CM
Sephacel	Amersham Biosciences	珠状纤维素	DEAE
Sephadex	Amersham Biosciences	交联葡聚糖	QAE, DEAE, CM, SP
Sephacrose CL	Amersham Biosciences	交联琼脂糖	DEAE, CM
Sephacrose Fast Flow	Amersham Biosciences	交联琼脂糖	Q, DEAE, ANX, CM, S
Sephacrose High Performance	Amersham Biosciences	交联琼脂糖	Q, SP
Source	Amersham Biosciences	聚苯乙烯	Q, S
Spheredex	Ciphergen	硅胶-葡聚糖复合物	DEAE, SP
Spherosil	Ciphergen	经聚合物修饰的多孔硅胶	QMA
Toyopearl	Tosohas	聚甲基丙烯酸酯	QAE, DEAE, CM, SP
Trisacryl M, L, S	Ciphergen	羟化丙烯酸聚合物	DEAE, CM, SP
TSK Gel	Tosohas	G5000 亲水胶	DEAE, Q, SP

2.1 配基及其对分离性能的影响

离子交换介质的配基提供了可交换的离子,是由带电荷的官能团组成,表2列出了离子交换常用配基的结构及其性

质。通常这些阴阳离子配基通过或长或短的碳氢链经醚键结合到聚合物骨架上,相应的分别得到了阳离子和阴离子交换剂。

表 2 应用于蛋白质层析的离子交换功能基

Table 2 Ion-exchange groups used in protein chromatography

配基	结构	pK	分类	简称
硫酸基(sulphate)	—OSO <sub>3</sub> H	< 2	强酸	S
磺酸基(sulphonate)	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> SO <sub>3</sub> H	< 2	强酸	SM(n = 1), SE(n = 2), SP(n = 3), SB(n = 4)
磷酸基(phosphate)	—OPO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	< 2 和 6	中等酸性	P
羧酸基(carboxylate)	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> COOH	3.5 ~ 4.2	弱酸	CM(n = 1)
叔胺基(tertiary amine)	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> N <sup>+</sup> H(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	8.5 ~ 9.5	弱碱	DEAE(n = 2)
季胺基(quaternary amine)	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -N <sup>+</sup> ≡(R) <sub>3</sub>	> 9	强碱	Q, QAE

配基不但决定了离子交换介质的种类,而且决定了离子交换介质的诸多性质。首先,配基的 pK 值决定了相应的离子交换剂的 pH 工作范围。通常通过酸碱滴定曲线来确定,对同类型的离子交换剂来说,强阳(阴)离子交换剂比弱阳(阴)离子交换剂有更宽的工作范围,这被认为是强弱介质的一个重要区别。

其次,配基密度对蛋白质吸附能力也有影响。Wu 等<sup>[6]</sup>研究了阳离子交换介质配基密度的增加(10 ~ 500 μmol/g)对溶菌酶和细胞色素 C 的吸附容量和保留值的影响,结果表

明,在配基密度达到一个极限值之前,蛋白质的吸附容量和保留值随着配基密度的增加而明显增加;过了极限值,蛋白质的吸附容量和保留值随配基密度的增加基本上没有影响。在这个极限密度时,吸附剂表面配基的平均距离和蛋白质的直径相当。

另外,配基种类对蛋白质吸附能力也有影响。一般对同类型的离子交换剂来说,强阳(阴)离子交换剂比弱阳(阴)离子交换剂对蛋白质的结合能力强,需较强的盐浓度进行洗脱,相对的选择性较高。但这并不能认为强离子交换剂就比

弱的好,强离子交换剂有时会 and 蛋白质结合太强而发生不可逆吸附,影响收率,因此应根据具体情况来选择离子交换剂的类型。对于在高盐浓度不稳定或难溶解在高盐浓度的蛋白质进行离子交换层析时,可以使用结合力相对较弱的弱离子交换剂。另外,对于含有硫酸基的强阳离子交换剂而言,因其有类似于肝素的结构,除了离子交换的作用,还有亲和作用,利用这点,在分离凝血因子时发现含有硫酸基的强阳离子交换剂比含磷酸基的强阳离子交换剂的效果好。Dephillips 等<sup>[7]</sup>在对含有不同数量精氨酸的三种蛋白质溶菌酶(11个)、 $\alpha$ -糜蛋白酶原 A(4个)和细胞色素 c(2个)的研究中发现,强阳离子交换树脂与溶菌酶的作用最强。

2.2 基质及其对分离性能的影响

基质对蛋白质分离效果影响较大的是其表面性质,如亲水性和内部的孔径分布。目前,用于蛋白质分离的离子交换介质一般都有较好的亲水性能,所以内部的孔径分布对蛋白

质的分离影响更大,它不但决定了蛋白质分离的范围,而且还决定了蛋白质扩散的速度。和凝胶过滤介质相比,离子交换对孔径没有特定的要求,为了消除在分离时所带来的分子筛效应,应选择较大孔径以利于蛋白质分子的扩散从而加快平衡、提高容量。另外,基质的性质还决定了介质的溶胀性能、耐压性能等,这些对于生产都是必不可少的参数。

2.3 主要性质

表征离子交换介质性能的参数很多,可以分为物理性能、化学性能和色谱性能三大类。物理性能有粒径、孔径、压降、溶胀性、流速、扩散等,化学性能主要指交换量、介质的化学稳定性等,色谱性能主要有容量、分辨率、塔板高度、保留值等。仅仅凭借介质生产厂家提供一些参数对介质进行选择还是远远不够的。为此,针对离子交换介质性能的研究有很多。表3列举了近年来发表的关于离子交换介质性能研究的相关文章。

表3 近年来发表的关于离子交换介质性能研究的部分文章  
Table 3 Recently published literature in the area of characteristics of IEC media

介质	研究的性能	研究机构	时间	文献
70种商品化的离子交换树脂	溶胀性、流速、装柱密度、离子交换量、蛋白吸附量、分辨率	Whatman	1997	[8]
ANX Sepharose 4 Fast Flow CG1000sd	蛋白分离,穿透载量,化学稳定性	Amersham Biosciences	1998	[9]
Source 15RPC, 30RPC, 15S, 30S POROS 20SP SP Sepharose Fast Flow 等	扩散,传质性能	剑桥大学	1998	[10]
Q HyperD	传质机理	波尔图大学(葡萄牙)	1998	[11]
SP650C, SP550C SP Sepharose FF Fractogel SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 650M SP Spheroxid M 等	吸附等温线	特拉华大学(美国)	1998	[12]
BRX-S, BRX-Q(Bio-rad)	密度,离子交换量,粒径分布,吸附等温线,蛋白吸附,吸附速率,动力学容量等	弗吉尼亚大学(美国)	2000, 2001	[13] [14] [15]
Macro-Prep 25Q, TSK-Gel Q-5PW-HR Poros QE/M, Q Sepharose FF Q HyperD 20 Source 30Q Fractogel TMAE 650s Express-Ion Q	pH的影响,滴定曲线,踏板高度,结合强度,动力学容量	Novo Nordisk A/S(丹麦)	2000	[16]
Q Sepharose XL, UNO Q-1 Poros 50 HQ Toyopearl QAE550c Q Sepharose HP Toyopearl SuperQ 650s	pH的影响,滴定曲线,踏板高度,结合强度,粒径分布,静态和动力学容量	Novo Nordisk A/S(丹麦)	2001	[17]
EMD SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> M, EMD COO <sup>-</sup> M Toyopearl SP-650M, SP-550C, CM-650M SP Spheroxid CM Spheroxid SP Sepharose FF CM Sepharose FF Cellufine sulfate	影响蛋白质保留值的因素	Merck 和特拉华大学	2001	[7]
DEAE Spheroxid M	扩散模型	天津大学	2002	[18]

3 疏水作用层析介质

经过三十多年的发展, HIC 已成为分离纯化蛋白质和多肽等生物大分子的重要手段。HIC 技术在实验室和工业化生产中得到了广泛的应用<sup>[19]</sup>。HIC 介质的重要特点是疏水性弱, 与蛋白质的作用比较温和, 能更好地保持生物大分子的自然结构和生物活性。此外, 其“高盐吸附、低盐洗脱”的特点使得 HIC 能直接与其它分离技术如盐析、离子交换层析联合使用。

3.1 基质和配基

目前用于制备用途的 HIC 介质的基质主要有多糖类如琼脂糖、纤维素和人工合成聚合物类如聚苯乙烯、聚丙烯酸甲酯类。其中, 半刚性的琼脂糖类凝胶仍是应用最广泛的疏水介质。Gustavsson 等<sup>[20]</sup>最近研制了超大孔 (superporous) 琼脂糖作为疏水层析介质的基质, 在扩散孔的基础上增加了对流孔, 传质速率快, 能在流速较高的情况下获得较好的分辨率。另外, 由于壳聚糖具有良好的生物相容性和化学稳定性, 近年来在疏水层析中也得到了应用<sup>[21]</sup>。

用于 HIC 介质的疏水配基很多, 如羟丙基、丙基、苄基、异丙基、苯基、戊基、辛基等。通常, 配基通过稳定的非离子键 (如醚键) 与基质结合, 图 1 列出了几种常用的配基结构及

其与配基的联接方式。迄今为止, 广泛使用的商品化制备型 HIC 介质配基仍是烷基和芳基, 常见的商品化制备型 HIC 介质见表 4。

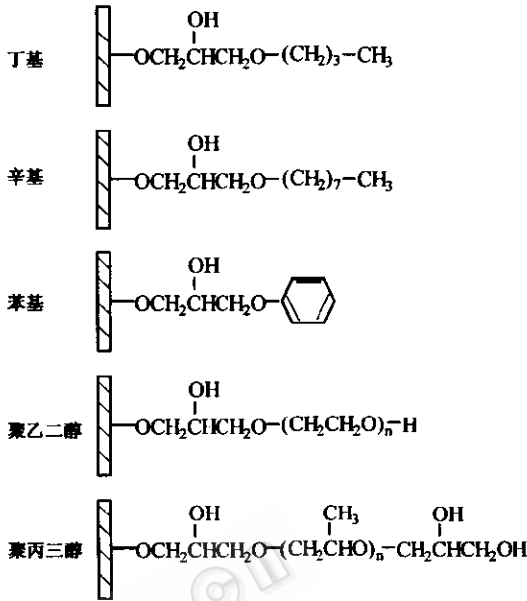


图 1 HIC 介质的结构示意图

Fig. 1 The schematic structures of some ligands for HIC

表 4 主要的商品化制备型 HIC 介质  
Table 4 Mainly sorbents available for preparative HIC

配基	基质	粒径/ $\mu\text{m}$	pH	配基密度/( $\mu\text{mol/mL}$ )	吸附容量/( $\text{mg/mL}$ )	商品名
甲基 (methyl)	MA	50	1 - 14	未知	> 25BSA	Macro-prep methyl
丙基 (propyl)	MA	20 - 40	1 - 13	未知	25mg 卵清蛋白	Fractogel EMD Propyl
	A	45 - 165	3 - 13	50	26mgHSA	Butyl Sepharose 4FF
丁基 (butyl)	MA	50	1 - 14	未知	> 15BSA	Macro-Prep t-Butyl
	C	53 - 125	3 - 13	未知	未知	Butyl cellulose
	MA	*	未知	未知	未知	Toyopearl butyl-650
己基 (hexyl)	MA	*	未知	未知	未知	Toyopearl hexyl-650
	A	45 - 165	3 - 13	20(low); 40(low)	24mgHSA; 36mgHSA	Phenyl Sepharose 6FF (low sub, high sub)
	A	24 - 44	3 - 12	25	24mgHSA	Phenyl Sepharose H P
	PS	15	2 - 12	未知	未知	SOURCE 15PHE
苯基 (phenyl)	C	53 - 125	3 - 13	未知	未知	Phenyl cellulose
	MA	20 - 40	1 - 13	未知	25mg 卵清蛋白	Fractogel EMD Phenyl
	未知	未知	未知	67**	未知	TSKgel Phenyl
	MA	*	未知	未知	未知	Toyopearl Phenyl-650
	PS	未知	未知	未知	未知	Poros HP2
辛基 (octyl)	A	45 - 165	3 - 13	5	7mgHSA	Octyl Sepharose 4FF
	C	53 - 125	3 - 13	未知	未知	Octyl cellulose
	PS	15	2 - 12	未知	未知	SOURCE 15ETH
醚基 (ether)	PS	未知	未知	未知	未知	Poros ET
	未知	未知	未知	未知	未知	TSKgel ether
	MA	*	未知	未知	未知	Toyopearl Ether-650

MA: 甲基丙烯酸酯, A: 琼脂糖, PS: 聚苯乙烯, C: 纤维素;

\* Toyopearl 系列按粒径大小分为三个等级, C: 60 ~ 150 $\mu\text{m}$ , M: 40 ~ 90 $\mu\text{m}$ , S: 20 ~ 50 $\mu\text{m}$ ;

\*\* 为 TSK-Gel Phenyl-5PW 的苯基含量。

对某些蛋白质而言,上述配基与其结合力太强,为了洗脱这些蛋白质需使用离液序列高的试剂(chaotropic agent)和有机溶剂,常导致活性生物大分子变性。由于具有中等疏水性的高分子配基(如聚乙二醇和聚丙烯二醇等)不仅可以提供足够的结合力,而且避免了上述缺点,因而在蛋白质的分离中也得到了应用<sup>[22,23]</sup>。

配基密度的增加为 HIC 在低盐浓度下吸附蛋白质提供了可能。Kato 等<sup>[24]</sup>研究了不同配基密度(苯基密度从 0 到 200 $\mu\text{mol/mL}$ )的 11 种介质在低盐浓度(硫酸铵浓度为 0.3 或 0.5 $\text{mol/L}$ )下对 17 种蛋白质的分离情况,结果表明,随着介质配基密度的增加,蛋白质的保留值也会相应增加;对于疏水性强的蛋白质,在低盐浓度下是完全可以分离的,这样不但避免了使用高浓度盐所带来的腐蚀性,而且无需其它中间步骤(如脱盐或加盐)就可与离子交换或亲和层析联用。

3.2 与疏水作用相关的其它层析技术的发展

近年来,随着层析技术的发展,与 HIC 相关的其它层析技术也得到了发展,主要有以下两种:亲疏性疏水层析(thiophilic chromatography)、疏水电荷诱导层析(HCIC)。

3.2.1 亲疏性疏水层析:亲疏性疏水层析技术主要在疏水作用的基础上增加了硫元素的相互作用。利用层析介质与含硫蛋白质和非硫蛋白质的亲疏性差异,对蛋白质加以分离。具体应用条件和 HIC 类似。

通常这类介质通过硫醚键将配基和基质联接,如 Butyl-S-Sepharose 6 Fast Flow,已用于乙肝病毒表面抗原的分离纯化<sup>[25]</sup>。

3.2.2 疏水电荷诱导层析:HCIC 是近几年来发展起来的一类不同于 HIC 的新技术,最早由 Burton 等<sup>[26]</sup>于 1998 年提出。HCIC 与蛋白质的作用除了疏水作用,还有电荷间的相互作用。HCIC 与蛋白质的结合是由疏水作用推动的,与 HIC 不同的是,这一过程通常是在不改变离子强度的条件下实现的;洗脱时也不像 HIC 那样通过改变盐的浓度而是由 pH 值的改变来实现的。

HCIC 的吸附解吸机理如图 2 所示。通常 HCIC 的配基中含有吡啶环,中性时不会带有电荷,而随着 pH 值的降低,吡啶环中的氮原子会带有正电荷,这样和带同样电荷的蛋白质发生排斥,从而实现解吸。另外,为了能在低盐浓度甚至无盐时对蛋白质进行吸附,其配基密度比 HIC 要高;同时为了增加其选择性,配基结构中还常常含有硫。

HCIC 主要用于抗体的分离纯化<sup>[28]</sup>,Schwartz 等<sup>[27]</sup>的实验结果表明,HCIC 具有价格低(仅为 Protein A 吸附剂的 25%)、效率高(一步纯化产品纯度达到 95% 以上)、化学稳定性强(可以用 1 $\text{mol/L}$  NaOH 清洗)、适用范围广(可用于 IgG, IgA, IgE, IgM 和抗体片段的分离)的特点,可以取代传统昂贵的 Protein A 吸附剂。

目前,已有商品化的介质,如 CIPHERGEN 公司生产的 MEP HyperCell,表 5 是其主要的性能参数。由于 HCIC 比 HIC、IEC 拥有更温和的吸附和洗脱条件,相信以后会在蛋白质的分离

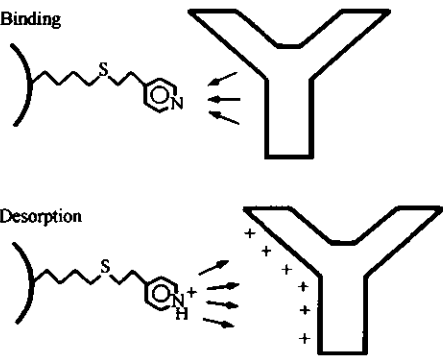


图 2 HCIC 吸附解吸示意图<sup>[27]</sup>

Fig. 2 The representation of the mechanism of HCIC<sup>[27]</sup>

中得到越来越多的应用。

表 5 MEP HyperCell 主要性能<sup>[29]</sup>

Table 5 Mainly characteristics of MEP HyperCell<sup>[29]</sup>

MEP HyperCell 主要性能	
粒径	80 ~ 100 $\mu\text{m}$
动力学容量(人 IgG)*	$\geq 20 \text{ mg/mL}$
配基	4-Mercapto-Ethyl-Pyridine
配基密度	70 ~ 125 $\mu\text{mol/L}$
pH 工作范围	3 ~ 12
pH 清洗范围	3 ~ 14
最大耐压	$< 3 \times 10^5 \text{ Pa}$

\* 5 $\text{mg/mL}$  人 IgG, 10% 的穿透量, 流速 60 $\text{cm/h}$

4 层析技术的应用——“三相纯化策略”

层析技术有很多类型,以上提到的这些蛋白质层析技术不是在每一种蛋白质的纯化中都要用到,事实上在能达到纯度要求的情况下,应尽可能使用较少的纯化步骤,以提高产率、节约成本。但实际过程中,往往需要几种层析技术加以联合使用,才能达到产品的纯度要求,如何更好的使用这些层析技术,Amersham Biosciences 公司的技术人员针对蛋白质层析的特点提出了“三相纯化策略”(three phase purification strategy)<sup>[30]</sup>,这三步分别是:

1) 富集(capture step),对目标蛋白质进行初步纯化,去除那些与目标蛋白质性质差异很大的物质,如细胞的 DNA、RNA 等;另外,尤其重要的是去除那些对目标蛋白质不稳定的物质如各种蛋白酶,以达到富集浓缩、稳定目标产物的目的。通常应用的层析技术有离子交换、疏水作用、亲和层析,对层析介质的要求是流速快、载量大。

2) 中间纯化(intermediate step),进一步纯化目标蛋白,去除那些在分子大小、理化性质与目标蛋白质类似的杂质,通常采用与富集时不同的层析技术,对分离介质的要求是选择性高(分辨率高)、载量大,通常应用颗粒较小的介质。

表 6 各项层析技术在各步纯化中的起始实验参数<sup>[34]</sup>

Table 6 Suitable starting conditions for experimental optimization of preparative purifications<sup>[31]</sup>

层析技术	孔径(nm)	粒径(μm)	配基	柱高(cm)	流速(cm/h)	pH	梯度	样品载量	
								% C	% B
GF, 精制	4 × 目标分子	30 ~ 100	无	60	20 ~ 50	不重要	无	2 ~ 6	
GF, 脱盐	< 目标分子	不重要	无	5 ~ 60	> 100	不重要	无	25 ~ 35	
IEC, 富集	10 × 目标分子	> 100	QAE <sup>*</sup> S <sup>*</sup>	10	> 300	> Ip + 1.5 < Ip - 1.5	0 ~ 1mol/L NaCl 10 倍床体积内		80
IEC, 中间纯化	10 × 目标分子	30 ~ 100	S <sup>*</sup>	15	> 200	< Ip - 1.5	20 倍床体积内		50
IEC, 精制	10 × 目标分子	15 ~ 50	S <sup>*</sup>	15	> 100	< Ip - 1.5	20 倍床体积内		30
RPC, 精制	10 × 目标分子	15 ~ 30	辛基	20	> 100	视具体情况而定	0 ~ 100% ACN 20 倍床体积内		
HIC, 富集	10 × 目标分子	> 100	苯基	10	> 300	视具体情况而定	1 ~ 0mol/L NH4Cl 10 个床体积内		80
HIC, 中间纯化	10 × 目标分子	30 ~ 100	苯基	15	> 200	视具体情况而定	20 倍床体积内		50
HIC, 精制	10 × 目标分子	15 ~ 50	苯基	15	> 100	视具体情况而定	20 倍床体积内		30
AC, 富集	10 × 目标分子	> 100	特定	10	> 200	视具体情况而定	分步洗脱		80
AC, 中间纯化	10 × 目标分子	30 ~ 100	特定	10	> 200	视具体情况而定	分步洗脱		80

备注: C-柱体积; B-穿透载量; ACN-乙腈; \* 代表的基团见表 2。

3)精制(polishing step),最终去除那些痕量杂质,达到产品的纯度要求,凝胶过滤是这一步中经常使用的层析技术,对分离介质的要求集中在高选择性上。表 6 总结了各项层析技术在各步纯化中的起始实验参数。

5 关于蛋白质层析介质的思考

层析介质在蛋白质分离中起到非常重要的作用,但是我们应该看到当前的介质还存在以下问题:

1)通用型的介质基本是软基质,耐压性差,不耐酸。由于目前通用型介质大都采用琼脂糖这类软基质,因此填料的耐压性较差,易变形而破碎,而且不耐酸,使用寿命无法和聚合物类型的介质相比,这给放大生产和介质的清洗带来很大不便;

2)相应配套的层析设备和装置复杂而又昂贵,如 Amersham Biosciences 公司的 BioProcess System;

3)动力学性能远不如膜分离技术,尤其在大分子蛋白质分离过程中。传统层析介质由于其内扩散的速度相对膜技术缓慢因此介质内的功能基无法被充分利用,工作交换(吸附)容量有限,同时,由于蛋白质这类大分子的扩散慢,层析时间较长和洗脱液体积较大,影响效率;

4)介质的价格不断攀升。包括介质在内所有的东西都依靠进口,这就制约了我国生物医药产品的开发和生产,尤其是大规模生产。

层析介质正朝着品种多样化、性能高效化的方向发展。为了满足生产的需要,越来越多的人工合成或复合型的刚性材料被开发出来,提供了高流速、高选择、高载量及可操作性

长期从事介质的研究和应用工作,结合国内外发展情况提出以下建议:

1)用低价、生物相容性好的基质材料制备层析介质

多糖类的天然高分子材料可以作为介质的基质,如纤维素、壳聚糖。由于价廉和生物相容性好的两大优点可以取代琼脂糖成为蛋白质分离的理想填料。也可将它们和其它聚合物涂层或混融制备填料基质。

2)良好的致孔技术

介质的动力学性能取决于内部的孔结构,只有拥有均匀的、大小合适的孔径分布才能有好的动力学性能,才能最大限度发挥填料的交换(吸附)作用和选择性能。采用多种类的致孔剂造孔于天然高分子和全合成聚合物是填料发展面临的巨大挑战。如 monolithporous polymer,但它的放大生产目前还没解决;天津大学的孙彦<sup>[32]</sup>采用固体粉末和液体混合致孔于聚合物制备 PGDT 分离介质应用于蛋白吸附。

3)开发大颗粒的耐压性能好的全合成聚合物

颗粒的增大降低了操作反压,提高了流速,给大规模生产操作带来极大的便利,相应的设备投资可以大大降低,但是颗粒的增大会造成破裂,因此在具备良好的孔结构的基础上还要保证介质具有耐压的性能。

4)研发具有自主知识产权的通用型介质

通用型介质在分离过程中主要用于富集和中间纯化步骤,用量大,它的成本投入较大,对生物药物的价格起到杠杆作用。因此我国生物制药的发展要立足我们自己研发的分离介质,而不能长期依赖进口介质。

由于初步纯化阶段对介质的要求相对于精制阶段低一些,根据目前国内的研发力量是完全可以做到的。上海医药

工业研究院、中科院大连化物所等单位在这方面已有很好的基础,作者在此呼吁有关方面能重视和关注,关心他们的工作,支持他们研发具有自主知识产权的通用型介质,为我国的生物医药产业服务。

#### REFERENCES(参考文献)

- [1] Bao SX(鲍时翔), Yao RH(姚汝华). Separation and purification of protein and recent advances in chromatography. *Journal of South China University of Technology (Natural Science)* (华南理工大学学报·自然科学版), 1996, 24(12): 98 - 103
- [2] Xie S, Allington RW, Fréchet MJM *et al.* Porous polymer monoliths: an alternative to classical beads. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2002, 76: 88 - 125
- [3] Ghosh R. Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges. *J Chromatogr A*, 2002, 952(1-2): 13 - 27
- [4] Peterson EA, Sober HA. Chromatography of proteins. I. Cellulose ion exchange adsorbents. *J Amer Chem Soc*, 1956, 78(4): 751 - 755
- [5] Amersham Biosciences. Ion Exchange Chromatography Principles and Methods, Edition AA: 12
- [6] Wu D, Walters RR. Effect of stationary phase ligand density on high-performance ion-exchange chromatography of proteins. *J Chromatogr*, 1992, 598(1): 7 - 13
- [7] DePhillips P, Lenhoff AM. Determinants of protein retention characteristics on cation-exchange adsorbents. *J Chromatogr A*, 2001, 933(1-2): 57 - 72
- [8] Levison PR, Mumford C, Streater M *et al.* Performance comparison of low-pressure ion-exchange chromatography media for protein separation. *J Chromatogr A*, 1997, 760: 151 - 158
- [9] Lagerlund I, Larsson E, Gustavsson J *et al.* Characterization of ANX Sepharose 4 Fast Flow media. *J Chromatogr A*, 1998, 796(1): 129 - 140
- [10] Nash DC, Chase HA. Comparison of diffusion and diffusion-convection matrices for use in ion-exchange separations of proteins. *J Chromatogr A*, 1998, 807(2): 185 - 207
- [11] Rendueles VM, Chenou C, Loureiro JM *et al.* Mass transfer mechanisms in Hyper D media for chromatographic protein separation. *Biochem Eng J*, 1998, 1(1): 11 - 23
- [12] Chang C, Lenhoff AM. Comparison of protein adsorption isotherms and uptake rates in preparative cation-exchange materials. *J Chromatogr A*, 1998, 827(2): 281 - 293
- [13] Hunter AK, Carta G. Protein adsorption on novel acrylamide-based polymeric ion-exchangers: I. Morphology and equilibrium adsorption. *J Chromatogr A*, 2000, 897(1-2): 65 - 80
- [14] Hunter AK, Carta G. Protein adsorption on novel acrylamide-based polymeric ion-exchangers: II. Adsorption rates and column behavior. *J Chromatogr A*, 2000, 897(1-2): 81 - 97
- [15] Hunter AK, Carta G. Protein adsorption on novel acrylamide-based polymeric ion-exchangers: III. Salt concentration effects and elution behavior. *J Chromatogr A*, 2001, 930(1-2): 79 - 93
- [16] Staby A, Jensen IH, Møllerup I. Comparison of chromatographic ion-exchange resins: I. Strong anion-exchange resins. *J Chromatogr A*, 2000, 897(1-2): 99 - 111
- [17] Staby A, Jensen IH. Comparison of chromatographic ion-exchange resins: II. More strong anion-exchange resins. *J Chromatogr A*, 2001, 908(1-2): 149 - 161
- [18] Chen W-D, Dong X-Y, Sun Y. Analysis of diffusion models for protein adsorption to porous anion-exchange adsorbent. *J Chromatogr A*, 2002, 962(1-2): 29 - 40
- [19] Queiroz JA, Tomaz CT, Cabral JMS. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J Biotechnol*, 2001, 87(2): 143 - 159
- [20] Gustavsson P-E, Axelsson A, Larsson P-O. Superporous agarose beads as a hydrophobic interaction chromatography support. *J Chromatogr A*, 1999, 830(2): 275 - 284
- [21] Wang Y, Guo M-L, Jiang Y-M. Evaluation of n-valeraldehyde modified chitosan as a matrix for hydrophobic interaction chromatography. *J Chromatogr A*, 2002, 952(1-2): 79 - 83
- [22] Diogo MM, Silva S, Cabral JMS *et al.* Hydrophobic interaction chromatography of *Chromobacterium viscosum* lipase on polypropylene glycol immobilised on Sepharose. *J Chromatogr A*, 1999, 849(2): 413 - 419
- [23] Tamaz CT, Duarte D, Queiroz JA. Comparative study on the fractionation of cellulases on some hydrophobic interaction chromatography adsorbents. *J Chromatogr A*, 2002, 944(1-2): 211 - 216
- [24] Kato Y, Nakamura K, Kitamura T *et al.* Separation of protein by hydrophobic interaction chromatography at low salt concentration. *J Chromatogr A*, 2002, 971(1-2): 143 - 149
- [25] Wang Y(王妍), Wang Q(王群), Luo X(罗璇) *et al.* Study on purification process of recombinant HBsAg. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1999, 15(2): 263 - 266
- [26] Burton SC, Harding DRK. Hydrophobic charge induction chromatography: salt independent protein adsorption and facile elution with aqueous buffers. *J Chromatogr A*, 1998, 814(1-2): 71 - 81
- [27] Schwartz W, Judd D, Wysocki M *et al.* Comparison of hydrophobic charge induction chromatography with affinity chromatography on protein A for harvest and purification of antibodies. *J Chromatogr A*, 2001, 908(1-2): 251 - 263
- [28] Boschetti E. Antibody separation by hydrophobic charge induction chromatography. *Trends Biotechnol*, 2002, 20(8): 333 - 337
- [29] Ciphergen. BioSeptra catalog, 2002: pp. 8 - 9
- [30] Amersham Biosciences. Protein purification handbook, Edition AC. pp. 8 - 9
- [31] Sofer G, Hagel L. Handbook of Process Chromatography, A guide to optimization, scale-up and validation. San Diego: Academic Press, 1997
- [32] Sun Y(孙彦), Shi Y(施扬), Dong XY(董晓燕) *et al.* Method for preparing microspheric PGDT separating medium with two kinds of pore forms. CN1351896, TianJing University, 2002

## Advancement of Ion Exchange Chromatography and Hydrophobic Interaction Chromatography Media Application in Protein Chromatography

PU Yu<sup>1\*</sup> WANG Zhi-Xiang<sup>2</sup>

<sup>1</sup> (Shanghai Fudan Zhangjiang BioPharmaceutical Co Ltd., Shanghai 201203, China)

<sup>2</sup> (Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China)

**Abstract** Chromatography is one of the most important purification techniques of proteins. The attention of chromatographers has hitherto focused on media which is regarded as the key for chromatography technology. In recent years, various new media used in protein chromatography have been developed, such as homogeneous crosslinking polysaccharide, synthetic organic polymers, tentacle sorbents and soft gel in a rigid shell, etc. This paper reviews the products of IEC and HIC media, including their composition, characteristics and application for protein chromatography technology. Thiophilic chromatography and hydrophobic charge induction chromatography (HCIC) which are two newly techniques relative to HIC, along with the media for HCIC and the application, were also introduced. Three phase purification strategy (capture step, intermediate purification and polishing step) for preparative protein chromatography technology was briefly described. The challenges facing media of IEC and HIC for protein separation are discussed and the scope for future work is highlighted, associating with the facts of China.

**Key words** ion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography, chromatography media, protein chromatography technology

Received: 03-17-2004

\* Corresponding author. Tel: 86-21-58953355; Fax: 86-21-58553990; E-mail: derrypuyu@sina.com