

生物大分子的混合模式色谱法——传统的色谱观点正在被改变

耿信笃

(西北大学现代分离科学研究所, 西北大学合成与天然功能分子化学教育部重点实验室,
现代分离科学陕西省重点实验室, 陕西 西安 710069)



耿信笃: 教授、博士生导师。现任西北大学现代分离科学研究所所长。1981 – 1984 年和 1995 年曾分别任美国普渡大学生化系和化学系客座教授。曾获“全国高等学校先进科技工作者”、“国家级有突出贡献的中青年专家”、“有突出贡献的回国留学人员”、“陕西省劳动模范”称号; 2009 年被美国传记化学会授予“2009 年中国先生”, 并被英国剑桥国际传记学会授予“终生化学成就奖”。

长期从事现代分离科学基础理论、生物大分子的分离纯化、高新技术及微量分析研究, 先后承担了国家“863”高技术项目, “七五”、“八五”科技攻关项目, “国家教委优秀青年教师基金”及“国家自然科学基金”等项目十余项, 取得一系列创新性的重大成果。已发表论文 300 余篇。研究成果先后获全国科学大会奖(1978 年), 国家发明三等奖(1984 年), 国家教委科技进步一等奖(1988 年), 陕西省政府成果一等奖(4 次: 1979、1992、1998、2006 年), 美国匹兹堡国际第十届发明与新技术博览会金奖(1994 年), 其成果已被国家教委列入《中国高等学校重大科技成果与研究进展选编》中。拥有国家发明专利 4 项, 国际发明专利 2 项。

有幸受邀为一个月前出版的 *J Chromatogr A* 撰写了一篇题为“生物大分子的混合色谱及应用”的综述文章, 在此后又有几篇很有创意的相关论文发表, 在此选择具有代表性的有关蛋白质和多肽分离的论文 3 篇及本人所撰写的综述文章共 4 篇论文的内容简要作一介绍。

混合模式色谱(mixed-mode chromatography, MMC)指的是应用多种作用力使溶质在固定相上进行保留和分离的色谱方法。与传统的单一模式色谱相比, MMC 具有高选择性、高负载量。在一些情况下一根 MMC 柱具有与相对应的多根单模式色谱柱相当或更好的分离效率, 故一根 MMC 柱可代替 2 根或多根单模式色谱柱。当其用于在线单柱二维液相色谱时, 在高流速下, 从第一维到第二维的所有操作均可在一个封闭的体系中完成, 包括所收集的第一维馏分的储存、缓冲溶液的交换、体系的再平衡、所收集馏分的再进样等所有操作均能在数分钟内完成, 目标蛋白质不离开这一具正压的封闭体系, 从而不仅可以快速地将目标蛋白质定量转移到下一分离步骤, 同时也可防止来自环境的污染。

但是, 作为一个新的领域, 仍有很多理论和应用方面的细节需要进一步研究; 最重要的目标之一是要得出一个为人们普遍接受的 MMC 机理, 在此基础上开发更多的 MMC 固定相并加以应用; 还要开发出有更高分离效率的 MMC 色谱柱, 而不是广泛意义上的混合机理柱, 因为前者具有较两根单独的商品柱更高的峰容量和选择性, 能取代两根普通的商品柱。在新的 MMC 柱被合成或商品化之前, 很多商品化的离子交换色谱(IEC)柱也可以 IEC 和疏水作用色谱(HIC)模式分离生物大分子。通过优化流动相 pH、盐浓度、溶剂及其他色谱条件, 在任何实验室都可以此方式实施较一维液相色谱更好的离线、甚至在线的单柱二维液相色谱分离。详见文献 [1]。

中科院大连化学物理研究所梁鑫淼研究员所带领的研究小组合成了一种新的称之为 C18WCX 的 MMC 介质, 并利用其对多肽实施了二维液相色谱分离。该 MMC 介质是在硅胶基质上键合了正十八烷基和 3-羧丙基而成的极性聚合配基, 其中的十八烷基显示了强的疏水性, 而共聚的羧丙基则显示出弱阳离子交换(WCX)性质。在用此 C18WCX 固定相对多肽进行分离时, 在中性和弱碱性条件下该固定相与多肽相互作用呈现出电荷相互作用和疏水相互作用共同起作用的反相液相色谱(RPLC)/IEC 混合机理; 而在 pH 3.0 时却显现出 RPLC 分离机理。用此 C18WCX 柱为第一分离色谱柱在 pH 6.5 的梯度洗脱条件下对鼠脑的可溶性蛋白质

收稿日期: 2012-01-06

酶解所得的多肽进行了一维分离,将不同时间段的收集液冻干后再依次进样到第二维的常用 C18 毛细管柱上,在 pH 3.0 的条件下进行再分离后,用串联质谱(MS/MS)进行了鉴定。与单纯用一维的 nano-RPLC-Q/TOF 质谱分析得到 84 个蛋白质和 292 个多肽这一结果比较,用该离线的二维 C18WCX-RPLC/LC-MS/MS 法从相同样品中能得到 1 031 个蛋白质和 4 397 个特征多肽,大大地提高了分离能力和检测的蛋白质和多肽的数目。该方法应当在蛋白质组学中发挥其应有的作用。作者还特别指出:该 C18WCX 固定相在其作为第一维色谱柱进行分离时就显示出了具有 RPLC 和 IEC 正交机理的效果;此外,该固定相还会对强疏水性和碱性多肽显示出更好的分离效果。详见文献 [2]。

近年来重组单克隆抗体(mAbs)已成为治疗许多疑难疾病(如癌症)的有效药物。因纯化该 mAbs 需要使用的蛋白质 A 亲和色谱柱非常昂贵,Pezzini 等使用 4 种商品 MMC 柱对从中国仓鼠卵巢细胞(Chinese Hamster Ovary, CHO)培养液中捕集 mAbs、去除宿主蛋白质和洗脱 mAbs 进行了全面的考察。该 4 种商品柱的填料分别为 MEP HyperCel、PPA HyperCel、HEA HyperCel 和 Capto adhere,其相应的固定相端基分别为:4-巯基乙基吡啶(4-mercaptoethylpyridine, MEP)、苯丙胺(phenylpropylamino, PPA)、N-己胺(N-hexylamine, HEA)和 N-苄基-N-甲乙醇胺(N-benzyl-N-methylethanolamine)。该 4 种端基的共性是均含有疏水和阳离子交换基团,故可以静电作用力和疏水作用力从 CHO 培养液中吸附 mAbs。又因该 4 种色谱介质所含有的基团不同而显示出不同的 pK_a 值和疏水强度,因此可采用不同的洗脱条件以去除宿主蛋白质和洗脱 mAbs。作者对所用 MMC 机理的解释为:对 PPA HyperCel 和 HEA HyperCel 而言,二者显示出很强的疏水和静电作用力,其中的 PPA HyperCel 具有更强的混合机理。因 MEP HyperCel 具有较低的 pK_a 值,在所有情况下静电作用力都很弱,疏水性作用力一直起主导作用;但是在 Capto adhere 介质中,静电作用力起主导作用,故该二色谱介质为弱混合机理;基于宿主细胞蛋白质与 mAbs 物理性质与化学性质的差别,可选择不同的 pH 和盐浓度洗脱条件洗出宿主蛋白质,使 mAbs 不被洗脱,最后又可选择另外的 pH 和盐浓度洗脱并回收 mAbs。此外,作者还介绍了用 96 孔板高通量地快速筛选其洗脱条件,然后直接放大到实验规模色谱柱条件下进

行纯化。该作者还认为这 4 种 MMC 介质有可能用于其他抗体的纯化。详见文献 [3]。

Saufi 等采用一种新方法将阳离子和阴离子交换树脂同时嵌入同一张膜以制备混合模式膜(mixed-mode membrane, MMM),用来实现从乳清或血清中吸附并纯化高丰度的酸性和碱性蛋白质。该法将 7.5% (质量分数) 的 SP Sepharose 阳离子交换树脂和 42.5% (质量分数) 的 MP500 阴离子交换树脂同时加入到以乙烯-乙烯醇为基质的聚合物溶液中,然后将膜成型。作者用该 MMM 几乎能将乳清或血清中的高丰度蛋白质完全吸附,其键合容量高(如:1 g 膜可键合 (59.2 ± 9.9) mg 的 β -乳球蛋白)。预计 1 m^3 的成型膜 1 h 能生产约 25 kg 总乳清蛋白。与通常所使用的化学改性方法比较,以该物理吸附法制备 MMM 的优点之一是制备方法简单,且所制得的膜具备与化学改性法所制备膜相当的吸附容量和动力学性质。此外,更重要的一点是可依据样品的性质和待吸附酸、碱蛋白的相对量调节加入到成膜溶液中的阴、阳离子交换树脂的质量比,获得“量身订做”的效果,使该法更具针对性和适用性。如:在乳清中有约 95% 的带负电荷的酸性蛋白,如 β -乳球蛋白(pI 5.2)、牛血清蛋白(pI 4.7~4.9)、 α -乳清蛋白(pI 4.5~4.8)和免疫球蛋白(pI 5.5~8.3),剩下的约 5% 是带正电荷的碱性蛋白,如乳清传递蛋白(pI 8~9.5)、乳酸-过氧化氢酶(pI 9.5)和免疫球蛋白(pI 5.5~8.3)。从理论上讲,如不考虑键合容量,MMM 中阴离子交换树脂与阳离子交换树脂的比例应为 95:5。为使所制的该混合膜(M5)更实用和具有更好的可行性(proof-of-concept),将酸性蛋白质和碱性蛋白的质量分数设定为 85% 和 15%。上述在 MMM 成膜前向聚合物溶液中添加阴、阳离子交换树脂量,42.5% MP500 和 7.5% SP Sepharose,便是由此而得。该被吸附在 MMM 上的蛋白质可以依据待洗脱蛋白质的特征,通过改变 pH 值等方法分批将其洗脱之。详见文献 [4]。

参考文献:

- [1] Yang Y, Geng X D. J Chromatogr A, 2011, 1218: 8813
- [2] Cai X M, Guo Z M, Xue X Y, et al. J Chromatogr A, 2011, 1218. doi: 10.1016/j.chroma.2011.06.042
- [3] Pezzini J, Joucla G, Gantier R, et al. J Chromatogr A, 2011, 1218: 8197
- [4] Saufi S M, Fee C J. J Chromatogr A, 2011, 1218: 9003