

重组人红细胞生成素大规模制备中反相色谱的条件优化

朱恒奇, 徐秀英, 黄培堂

(军事医学科学院 生物工程研究所, 北京 100071)

摘要:目的 优化重组人红细胞生成素(rhEPO)大规模制备纯化中主要影响回收率的反相色谱的条件,提高回收率。方法 采用反相纯化作为三步法纯化的第一步,利用 R1 型反相填料采用不同分步洗脱条件进行洗脱。结果 优化后经第一步反相色谱所得 rhEPO 蛋白纯度达 70%,再通过阴离子交换和凝胶过滤色谱纯化, rhEPO 终产物的纯度可达 100%,体内比活达 1.91×10^5 IU/mg, rhEPO 蛋白的回收率提高了 1.2 倍。结论 优化的反相纯化条件(30%乙醇-1.5 mol/L 尿素, 60%乙醇-3.0 mol/L 尿素)能更有效的从培养上清中大量纯化出 rhEPO,回收率高。获得的产品纯度高,体内外活性好。适合大规模纯化。

关键词: 重组人红细胞生成素; 纯化; 反相色谱; HPLC

中图分类号: TQ464 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-1678(2008)06-0388-04

Optimized pilot purification process of reversed phase chromatography of recombinant human erythropoietin(rhEPO)

ZHU Heng-qi, XU Xiur-ying, HUANG Pei-tang

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: **Purpose** To optimize the pilot purification process of the recombinant human erythropoietin (rhEPO). **Methods** Culture supernatant was collected and purified by a three-step purification process-reversed phase, ion exchange and molecular sieve chromatography. Two stepwise elution conditions of reversed-phase chromatography in rhEPO were applied, and the reversed-phase chromatography is used as the first step of purification. **Results** The purity of sample was at least 70% by reversed-phase chromatography, but the sample purity was 100% and the sample biological activity was 1.91×10^5 IU/mg *in vivo* by later ion exchange and molecular sieve chromatography. **Conclusion** These results indicate that optimized purification process is rapid, and efficient. It will be more useful in large-scale production of rhEPO.

Key words: recombinant human erythropoietin (rhEPO); purification; reversed phase chromatography (RPC); HPLC

促红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)是一种疏水性糖蛋白,含有 165 个氨基酸,相对分子质量(M_r)约为 34 000。由于分子结构的特殊性,反相色谱在 EPO 的制备分离中具有独特的地位和作用。EPO 的纯化一般都采用反相色谱、离子交换、凝胶过滤不同顺序组合进行^[1-2]。我们采用无血清培养基在堆积床反应器中培养表达 EPO 的 CHO 工程细胞株 C2W,由于培养上清量大、离子强度高,用反相色

谱作为 EPO 纯化的第一步,再加上离子交换和凝胶过滤进行大规模制备。在 EPO 生产过程中如何提高 EPO 的回收率是人们关注的问题。由于影响反相分离的因素较多,有机溶剂、pH 值、离子对试剂、蛋白质变性剂等均影响分离效果。针对不同的蛋白质,各因素的影响不同。根据 EPO 的反相色谱纯化的特点,我们摸索了不同乙醇浓度和不同变性剂浓度的洗脱条件下反相色谱的纯化效果,在这一步中分离获得 EPO 的纯度大于 70%,在不降低纯度的情况下,大大提高了回收率,而且不影响 EPO 的体内比活性,取得满意的结果。为后续的纯化奠定了良好的基础。

1 材料与方法

收稿日期: 2008-06-16

作者简介: 朱恒奇(1963-),男,四川雅安人,高级实验师,理学硕士,从事基因工程药物研究, Tel: 010-66948832; E-mail: zhuhq6380@163.com。

1.1 细胞株和培养基

重组人红细胞生成素(rhEPO)生产用工程细胞株 C2W 由本所构建。

生长培养基:DF 培养基(DMEM:F12 = 1:1, Gibco 公司),加入不同浓度的葡萄糖和小牛血;表达培养基:生长培养基不加血清而补加一些维生素和小分子多肽;种子培养基含葡萄糖 4.5 g/L;罐培养基含葡萄糖 7.0 g/L。

乙醇(分析纯,北京化工厂);尿素(分析纯, Sigma 公司);酚试剂(上海医学化验所);其余试剂均为分析纯;配制溶液所用水均为 Millipore 纯水。

1.2 仪器设备

CO₂ 培养箱、堆积床生物反应器 CELLIGEN PLUS(5 L 培养罐,工作体积为 3.5 L)、AFS-BioCommand 培养监控软件,美国 NBS 公司;600 型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;反相色谱柱(8.0 cm × 30 cm),自装,填料为美国 PerSeptive Biosystems 公司产品 R1 型;离子交换柱(1.5 cm × 20 cm)自装、凝胶过滤柱(5 cm × 150 cm)自装,填料 DEAE-Sepharose FF 和 Sephacryl S-200 均为 Amersham Biosciences 公司产品。

1.3 细胞培养和表达产物收集

细胞库中的细胞,复苏后经由方瓶至转瓶扩大培养后,接种到堆积床生物反应器,生长培养 5~7 d 后,换表达培养基进行灌流表达培养,并收集培养产物作为纯化的初始材料。

1.4 纯化方法

以发酵罐无血清培养产物作为纯化的初始材料,细胞罐培养上清经 10 000 r/min 离心后上反相色谱柱,用纯化水洗去色素和不被结合的杂蛋白,再用含不同乙醇浓度和不同尿素浓度的洗脱液分步洗脱,收集洗脱峰进行 SDS-PAGE 及扫描分析纯度。两根相同的反相柱(C1 和 C2)串联上样培养上清 50 L,然后两根柱子分别采用分步洗脱程序:第一步均采用 30%乙醇-2.0 mol/L 尿素洗去杂蛋白,第二步采用 60%乙醇-2.5 mol/L 尿素洗下目标蛋白(方法 1);柱子处理好后按同样方法上同批次等量的培养上清,两柱分别采用以下洗脱程序:第一步采用 30%乙醇-1.5 mol/L 尿素洗去杂蛋白,第二步采用

60%乙醇-3.0 mol/L 尿素洗脱目标蛋白(方法 2),每次两根反相色谱柱的第二步洗脱产物混合后用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)稀释 10 倍,上 DEAE-Sepharose FF 柱做同样条件的纯化,DEAE-Sepharose FF 柱纯化产物再做 Sephacryl S-200 柱纯化后即为终产物。纯化产物做含量测定、纯度分析和活性测定。

1.5 纯化产物纯度检测

HPLC 法:按《中国生物制品化学检定规程》进行,色谱柱为 Waters 公司 Protein-pak300sw,流动相为柠檬酸盐缓冲液(pH 7.0)。

SDS-PAGE 扫描法:浓缩胶为 5%,分离胶为 10%,交联度为 2.6%,胶厚度为 1 mm。以考马斯亮兰 G250 染色后对染色带进行扫描,标准 M_r 蛋白由华美公司提供。

1.6 EPO 活性检测

EPO 体外及体内生物学活性测定方法参考文献[3-4]。

1.7 唾液酸含量测定

采用间苯二酚显色法^[5],标准唾液酸(CAT. NO. A-360)购自 Sigma 公司。

1.8 蛋白含量测定

采用 Lowry 法,按《中国生物制品化学检定规程》进行^[6]。

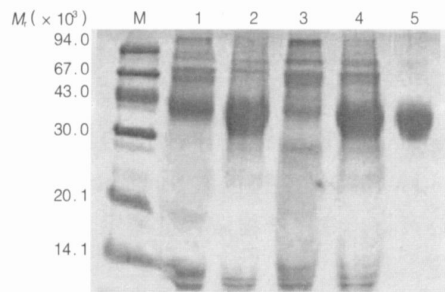
2 结果

第一步洗脱主要是为了去除一些吸附力较弱的杂蛋白而尽量不引起 rhEPO 的损失。乙醇溶液中加入不同浓度的尿素能达到不同的洗脱效果(图 1 和 2),从表 1 中可见两种不同的反相洗脱条件,表达水平为 5 636 IU/mL 的各 50 L 上清中,方法 2 与方法 1 相比,rhEPO 蛋白的回收率提高了 1.2 倍。反相纯化产物的电泳扫描纯度达 70%以上、离子交换纯化产物电泳扫描纯度大于 90%,再经分子筛纯化后的终产物电泳纯度为 99.59%,HPLC(面积归一法)纯度为 100%(图 3,4 和 5),用间苯二酚显色法测定所纯化的 rhEPO 分子唾液酸含量都为 10.23 mol/mol EPO。网织红细胞计数法进行体内活性测定,体内比活达 1.91 × 10⁵ IU/mg。

表 1 不同的反相洗脱条件纯化产物比较

Tab 1 Results of rhEPO produced using different elution conditions of RPC

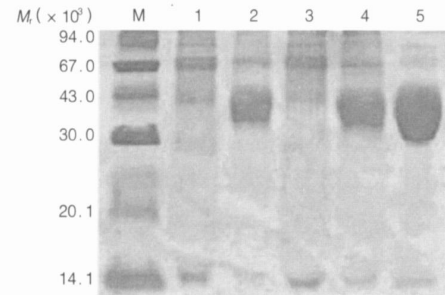
方法	上清 /L	DEAE 纯 化产物/mL	蛋白浓度 /(mg/mL)	终产物比活 /(×10 ⁵ IU/mg)	终产物电 泳纯度/%	HPLC 纯 度/%	总蛋白 /mg	唾液酸含量 /(mol/mol)
方法 1	50	35	3.28	1.91	98.08	100	115	10.53
方法 2	50	32	7.78	1.98	98.48	100	249	10.23



M. 低 M_r 标准; 1. 30% 乙醇-2.0 mol/L 尿素峰(C1); 2. 60% 乙醇-2.5 mol/L 尿素峰(C1); 3. 30% 乙醇-2.0 mol/L 尿素峰(C2); 4. 60% 乙醇-2.5 mol/L 尿素峰(C2); 5. DEAE 柱纯化结果(加样量 5 μ L)
M. Marker; 1. Elution peak of 30% ethanol-2.0 mol/L urea(C1); 2. Elution peak of 60% ethanol-2.5 mol/L urea(C1); 3. Elution peak of 30% ethanol-2.0 mol/L urea(C2); 4. Elution peak of 60% ethanol-2.5 mol/L urea(C2); 5. Purified product of DEAE-Sephrose FF(loading 5 μ L)

图 1 方法 1 的纯化产物电泳图谱

Fig 1 SDS-PAGE analysis of samples purified with the first method



M. 低 M_r 标准; 1. 30% 乙醇-1.5 mol/L 尿素峰(C1); 2. 60% 乙醇-3.0 mol/L 尿素峰(C1); 3. 30% 乙醇-1.5 mol/L 尿素峰(C2); 4. 60% 乙醇-3.0 mol/L 尿素峰(C2); 5. DEAE 柱纯化产物(加样量 5 μ L)
M. Marker; 1. Elution peak of 30% ethanol-1.5mol/L urea(C1); 2. Elution peak of 60% ethanol-3.0 mol/L urea(C1); 3. Elution peak of 30% ethanol-1.5 mol/L urea(C2); 4. Elution peak of 60% ethanol-3.0 mol/L urea(C2); 5. Purified product of DEAE-Sephrose FF(loading 5 μ L)

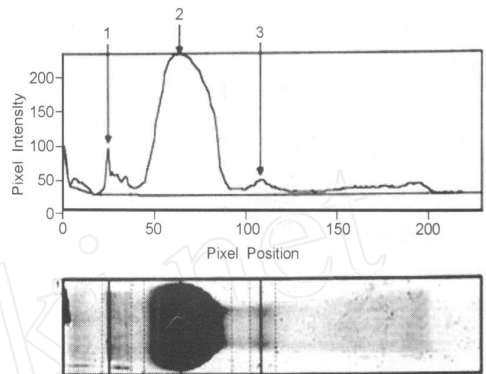
图 2 方法 2 的纯化产物电泳图谱

Fig 2 SDS-PAGE analysis of samples purified with the second method

3 讨论

反相色谱是利用分子的疏水性差异而进行分离的一种色谱技术。近年来,随着反相技术的发展和新的介质的问世,使得反相色谱在重组基因工程药物的大规模制备性分离中起着越来越重要的作用。虽然反相色谱易破坏蛋白质的三级结构,但对于在有机溶剂中稳定的和反相色谱后易复性的蛋白质,反相色谱是一种非常实用的制备技术。

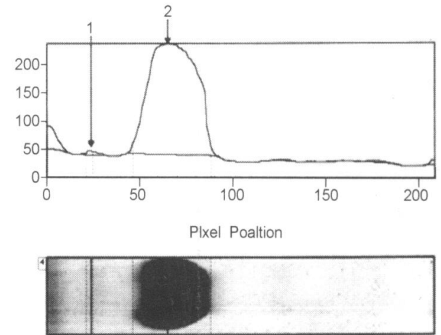
EPO 是一种非常稳定的疏水性较强的糖蛋白,对热、变性剂和一些有机溶剂都有一定抗性,因此反相色谱在 EPO 的制备纯化中起着难以替代的作用。EPO 分子由肽链和糖链组成,糖基化程度的差异会影响其疏水性,从而影响色谱行为。我们选用了较



Band	Volume	Normid Vol(ng)	Band%	MW(kd)	Area	Band% (calib)
1	16 152.45	0.067	6.09	80.872	608.00	6.09
2	240 353.78	1.000	90.68	34.566	1 824.00	90.68
3	8563.55	0.036	3.23	20.553	532.00	3.23

图 3 DEAE 离子柱纯化产物 rhEPO 电泳扫描纯度大于 90%

Fig 3 SDS-PAGE purity analysis of purified products of DEAE-Sephrose FF



Band	Volume	Normid Vol(ng)	Band%	Area	Band% (calib)
1	838.57	1.000	0.41	136.00	0.41
2	204 765.56	244.184	99.59	1428.00	99.59

图 4 纯化终产物的电泳纯度达 99.59%

Fig 4 SDS-PAGE purity analysis of purified final products

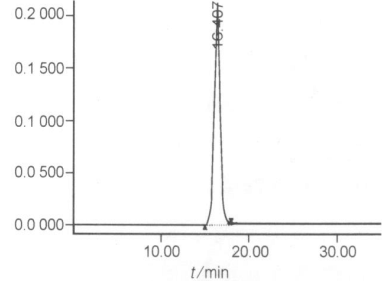


图 5 纯化终产物 HPLC 纯度分析结果

Fig 5 HPLC purity analysis of purified final products

易于洗脱且适合于蛋白分离的 R1 型反相填料作为第一步纯化。反相色谱中仅使用乙醇溶液洗脱 rhEPO 效果不佳,我们添加了蛋白变性剂尿素来增强洗脱能力,邹钟诚等^[7]报道在 C4 反相柱上,55%乙醇浓度时洗出 EPO,但回收率不高。所以我们在 rhEPO 的反相纯化中先用 30%乙醇-2.0 mol/L 尿素去除杂蛋白,再用 60%乙醇-2.5 mol/L 尿素洗脱 rhEPO,但

第一步洗脱中 rhEPO 的损失也大,说明洗脱能力较强。为此我们减少第一步洗脱液中尿素含量,增大第二步洗脱液中的尿素含量,优化为第一步用 30 % 乙醇-1.5 mol/L 尿素洗脱,第二步用 60 %乙醇-3.0 mol/L 尿素洗脱,这样 rhEPO 的回收率大大提高了。李琳等^[1]报道三步纯化的活性总回收率达到 34.56 %,影响回收率的瓶颈为第二步离子交还色谱。根据笔者多年的实践,在大规模的制备纯化中很难达到如此高的回收率,而且影响回收率的关键在于第一步的反相色谱,经反复实践我们优化出 30 %乙醇-1.5 mol/L 尿素是洗去杂蛋白的最佳条件。60 %乙醇-3.0 mol/L 尿素是洗下 EPO 的最佳条件。

EPO 分子中糖含量与其体内生物活性相关^[8],正常 EPO 分子唾液酸含量约为 10 mol/mol EPO,我们纯化的获得 rhEPO 终产物唾液酸含量大于 10 mol/mol EPO,体内比活性达 1.91×10^5 IU/mg。均超过国家规定的人体注射用 rhEPO 的标准(9.0 mol/mol EPO, 1.20×10^5 IU/mg),EPO 终产物的电泳纯度和 HPLC 纯度均大于 98 %,说明纯化条件不影响 rhEPO 分子唾液酸含量,体内测活也验证了纯化产物高的比活性。CHO 细胞表达的 rhEPO 分子中糖

链约占分子总量的 50 %左右。SDS-PAGE 显示 rhEPO 带形较宽,这主要是由于细胞表达的 rhEPO 分子糖链略有差异所致。

参考文献:

- [1] 李琳,邓继先,卢建申,等.用三步法纯化重组人红细胞生成素[J].军事医学科学院院刊,1997,21(1):43-46.
- [2] 李干祥,聂东海,杨葆生,等.重组人红细胞生成素纯化工艺的优化[J].生命科学研究,2001,5(2):149-154.
- [3] 贾茜,景红,田雪红,等.国外重组人促红细胞生成素产品的体内生物学活性测定[J].中国生化药物杂志,2000,19(4):184-185.
- [4] 周勇,王军志,黄培堂,等.优化等电聚焦电泳方法评价重组人促红细胞生成素质量[J].中国生化药物杂志,2007,28(6):397-399.
- [5] 汪东海,陈红霞,张映完,等.重组促红细胞生成素分子中唾液酸含量对其体内生物活性的影响[J].中国生物制品学杂志,1999,12(4):227-228.
- [6] 中国卫生部生物制品委员会.中国生物制品化学检定规程[M].北京:中国标准出版社,1995:32-34.
- [7] 邹钟诚,孙开来,姜丹,等.反相高效液相色谱法分离重组促红细胞生成素[J].色谱,1998,1(5):263-264.
- [8] Louise C W, Gregg T, Patricia M. The importance of N- and O-linked oligosaccharides for the biosynthesis and *in vitro* and *in vivo* biologic activities of erythropoietin[J]. Blood, 1991, 77(12):2624-2632.

(上接第 387 页)

从金属离子对酶活的影响实验结果看出, Na^+ 、 K^+ 对其活性有轻微激活作用, Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 对溶菌酶活性无明显影响, Co^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 使溶菌酶的活性下降,后者可能与使酶沉淀变性有关。提示在溶菌酶制剂生产中应避免溶菌酶与金属接触。

从助溶剂对酶活的影响实验结果看出,吐温 20、吐温 80 对溶菌酶活性有抑制作用,这可能与表面活性剂对其结构的影响有关;甘油溶液对酶活也有抑制作用,可能因其具有较高的黏度而降低了溶菌酶的活性。因此,将溶菌酶制成液体制剂的过程中,应尽量不用或少用此类助溶剂。

有报道称 EDTA-2Na 可增强溶菌酶的活性^[4,8],但关于 EDTA-2Na 增强溶菌酶活性的机制目前尚无可靠结论,文献推论有可能通过以下两种方式:一是 EDTA-2Na 作为金属螯合剂,与细胞生长所必需的某种重要金属离子结合,从而使细胞生长减慢,利于溶菌酶消解细胞壁;另一是 EDTA-2Na 直接破坏细胞壁,使之更易于被溶菌酶攻击^[8]。经 EDTA-2Na 对酶活性的作用试验表明,在 0.000 5 %~0.300 0 %低浓度范围内对溶菌酶活性具有激活作用,浓度继续

增加后却不再具有此作用,较高浓度下反而有抑制活性作用,这与活性测定时溶剂所选用的 EDTA-2Na 的浓度相符。因此,在应用蛋清溶菌酶制成液体制剂时,加入适当浓度的 EDTA-2Na,有利于发挥溶菌酶的活性。

参考文献:

- [1] 王跃军,孙谧,张云波,等.海洋低温溶菌酶的制备及酶学性质[J].海洋水产研究,2000,21(4):54-63.
- [2] 赵龙飞,徐亚军.鸡蛋清中溶菌酶的应用性研究[J].食品工业,2006,(3):19-20.
- [3] 卢冬梅,王鑫.溶菌酶的抗病毒作用及其抗艾滋病病毒应用[J].广东药学,2005,15(5):62-64.
- [4] Hughey V L, Wilger P A, Johnson E A. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme against *Listeria monocytogenes* Scott A in foods[J]. Applied Environ Microbiol, 1989, 55(3):631-638.
- [5] 李敏.溶菌酶及其应用[J].生物学教学,2006,31(4):2-3.
- [6] 荣晓花,凌沛学.溶菌酶的研究进展[J].中国生化药物杂志,1999,20(6):319-320.
- [7] 朱照静,邱宗荫.喷雾干燥对溶菌酶一级结构的影响[J].中国生化药物杂志,2003,24(6):279-280.
- [8] Mecitoglu C, Yemeñicioglu A, Arslanoglu A, et al. Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging[J]. Food Res Int, 2006, 39(1):12-21.