利用陶瓷羟基磷灰石层析法纯化一种酸性酶：有效去除酸性杂质

Louisa Vang and Xuemei He
Bio-Rad Laboratories, 6000 James Watson Drive, Hercules, CA 94547

CHT 陶瓷羟基磷灰石

摘要

本研究涉及缓冲液组分对使用陶瓷羟基磷灰石层析法从大肠杆菌菌株产生的其他酸性杂质中分离酸性酶的影响。在 pH 值为 6.5 的磷酸钠 (NaPi) 缓冲液中，低浓度的钙阳离子和氯化钠可促进目标蛋白的结合，然后再用浓度更高的磷酸钠缓冲液进行选择性洗脱。当 CHT™ 陶瓷羟基磷灰石填料用含有低浓度磷酸钠 (pH 7.0) 的缓冲液预平衡时，也可以在流穿模式下纯化该酶。这两种纯化策略都能有效清除酸性污染物。此外还讨论了这些缓冲液组分调节生物分子和 CHT 填料之间相互作用的可能机制。

简介

晶体羟基磷灰石是一种天然存在的混合模式层析填料。这种无机材料的化学成分为 $(Ca_5(PO_4)_3OH)_2$，其羟基、钙离子和磷酸根离子以重复的几何模式排列。磷酸根（P 位点）与蛋白质分子中带正电荷的氨基残基发生静电相互作用，而钙离子（C 位点）则与天冬氨酰和谷氨酰残基的羧基侧链形成螯合复合物（图 1）。这些类型的相互作用可协同作用，也可单独作用，为生物分离提供独特的选择性。陶瓷形式的羟基磷灰石 CHT 是一种球形、大孔且流体动力学稳定的层析填料。它已被广泛用于生物分子的一般制备以及生物制药的商业化生产。

通常在 6.5-7.5 的 pH 范围内使用 CHT 填料进行层析。在这些 pH 值水平下，酸性蛋白质（即 pI 值低于 7 的蛋白质）带负电荷。它们可能会被 CHT 上的 P 位点排斥，同时面临酸性杂质（如原料中的核酸和内毒素）对 C 位点的竞争。使用含有无机磷酸盐的缓冲液进行层析分析可能会进一步影响 CHT 与酸性蛋白质的结合。

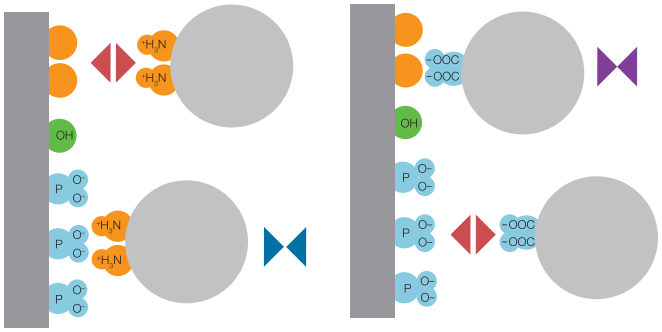


图 1CHT 填料与生物分子相互作用的示意图

在本研究中，我们尝试使用 CHT 填料对酸性酶，CDP-D-葡萄糖 4,6-脱水酶 (E_{od}) 进行精纯（Thorson 等人，1994 年）。根据其多肽序列，这种酶的 pI 值估计为 6（Thorson 等人，1994 年；He 等人，1996 年，Vogan 等人，2002 年）。重组酶在大肠杆菌中过量产生，而细胞粗提液含有大量内毒素和核酸，它们是 CHT 上 C 位点的有力竞争者。利用实验设计 (DOE) 筛选中确定的条件，我们能够在 CHT 层析柱上对该酶进行规模放大纯化，以实现对多种酸性杂质的有效去除。

BIO-RAD

材料和方法

总述

CHT 陶瓷羟基磷灰石填料（I 型，40 µm）是 Bio-Rad Laboratories,Inc 的产品。在室温下使用 Mini Bio-Spin™ 层析柱 (Bio-Rad) 在 BioLogic DuoFlow QuadTec 10 系统 (Bio-Rad) 或 NGC 10 中压层析系统 (Bio-Rad) 上进行层析纯化。采用 Precision Plus 蛋白标准品 (Bio-Rad) 和 Criterion TGX 无染色预制凝胶 (Bio-Rad) 通过 SDS-PAGE 分析蛋白组分，并在 GelDoc™ EZ 系统 (Bio-Rad) 中记录凝胶图像。分别采用大肠杆菌 HCP ELISA 试剂盒 (Cygnus Technologies) 和 Droplet Digital™ PCR (ddPCR™) 大肠杆菌残留 DNA 定量试剂盒 (Bio-Rad) 测定宿主细胞蛋白 (HCP) 和双链 DNA (dsDNA) 的清除率。使用终点显色鲎分析试剂盒 (Lonza) 检测蛋白质样本中的内毒素污染。用 Bradford 蛋白检测法 (Bio-Rad) 对蛋白质浓度进行量化。制备缓冲液时，从 EMD Millipore 或 VWR 等商业供应商处购买分析级或更高级别的化学品。

结合和洗脱条件的 DOE 筛选

利用实验设计 (DOE) 方法，获得 CHT 纯化 E_{od} 的最佳纯化条件。研究了氯化钙、氯化钠、磷酸钠和缓冲液 pH 值对目标蛋白结合的影响。在目标蛋白方面，重点研究了磷酸钠浓度和缓冲液 pH 值对蛋白纯度和回收率的影响。采用 JMP 软件 (SAS Institute) 建议的两水平完全析因筛选设计（表 1）。使用结合缓冲液预平衡 Mini Bio-Spin 层析柱，每个微柱含有 50µl CHT 填料。D把经过阴离子交换纯化后的 D_{od} 缓冲液替换至各自的测试结合缓冲液。向每个预平衡的离心柱中上样 2-2.5 mg E_{od}，并在室温下与填料混合 10 分钟，同时搅拌。孵育结束时，以 1,600 x g 旋转 30 秒，除去未结合样品。通过将上样的填料与各自的洗脱缓冲液共同孵育 10 分钟并搅拌，然后以 1,600 x g 离心 30 秒，洗脱目标蛋白。通过 SDS-PAGE 分析这些洗脱液。使用收集洗脱液的吸光度 (280 nm) 读数定量目标酶的回收率，并使用 Image Lab 软件 (Bio-Rad) 评估目标蛋白纯度。使用 JMP 软件进行标准最小二乘法回归，以获得 E_{od} 纯化的关键参数。

结合-洗脱模式的 CHT 层析

用 10 个柱体积 (CV) 的 5 mM 磷酸钠、200 mM 氯化钠和 1 mM 氯化钙 (pH 6.5)（缓冲液 A）平衡 0.56 x 4 cm (1 mL) CHT 层析柱。以 300 cm/hr 的线性速度上样缓冲液 A 中部分纯化的 E_{od}，并用 10 CV 平衡缓冲液清洗层析柱。用 15 CV 的 75 mM 磷酸钠（pH 值为 6.5）（缓冲液 B）洗脱结合的目标蛋白。

流穿模式下的 CHT 层析

以 300 cm/hr 的线性速度将 pH 为 7 的部分纯化的 E_{od}（溶于 5 mM 磷酸钠和 5 mM 氯化钠（缓冲液 C）中）上样到用 10 CV 相同缓冲液预平衡的 0.56 x 4 cm (1 mL) CHT 层析柱上。在流穿液组分中回收目标酶。用 pH 为 7.0 的 10 mM 磷酸钠和 1.5 M 氯化钠（缓冲液 D）剥离结合的杂质。

表 1用于筛选结合和洗脱条件的实验设计 (DOE) 设置

实验	氯化钙浓度，mM	氯化钠浓度，mM	磷酸钠浓度，mM	结合缓冲液 pH 值	磷酸钠浓度，mM	洗脱缓冲液 pH 值
			结合缓冲液		洗脱缓冲液	
1	**0.5**	**100**	**3**	**6.8**	**75**	**6.8**
2	0	200	1	6.5	50	7.1
3	0	200	5	7.1	50	6.5
4	0	0	1	7.1	100	6.5
5	0	0	1	6.5	50	7.1
6	1	0	5	7.1	100	7.1
7	0	0	5	7.1	50	6.5
8	1	200	1	6.5	100	6.5
9	1	0	5	6.5	50	6.5
10	1	200	5	7.1	100	7.1
11	0	200	5	6.5	100	7.1
12	1	0	1	6.5	100	6.5
13	**0.5**	**100**	**3**	**6.8**	**75**	**6.8**
14	1	200	5	6.5	50	6.5
15	0	0	5	6.5	100	7.1
16	1	0	1	7.1	50	7.1
17	1	200	1	7.1	50	7.1
18	0	200	1	7.1	100	6.5

注意：实验 1 和 13 是中心点，是筛选出的实验极值之间的中间点。

结果

通过使用 JMP 软件分析 DOE 数据，确定了纯化 E_{od} 的关键参数。这种酶与 CHT 填料结合的能力会随着氯化钙和氯化钠的使用而增强，并会随着缓冲液 pH 值的降低而进一步增强（图 2）。这些结果与 P. Gagnon 及其同事之前发表的研究成果非常吻合，他们证实蛋白片段通过钙配位机制与钙衍生化羟基磷灰石结合（Gagnon 等人，2009 年）。在 5 mM 磷酸钠存在下，E_{od} 的最高结合能力估计为 17 mg/mL。对于目标蛋白的洗脱，在较高 pH 值下，使用含有较高浓度磷酸钠的缓冲液可获得较好的产率（图 3A）。然而，在如此强的洗脱条件下，洗脱的 E_{od} 的纯度会受到影响（图 3B）。无论在高 pH 值低浓度磷酸钠时，还是在低 pH 值高浓度磷酸钠时，都可以很好地清除内毒素（图 3C）。以 1:500 稀释度将血清（由 HOYA Technosurgical Corporation 内部制备用于这些实验）与登革热病毒样本一起使用。使用 1:1,000 稀释度的抗小鼠 IgG(Fc)-POD (American Qualex) 二抗。使用 EzWestBlue (ATTO Corporation) 观察带。

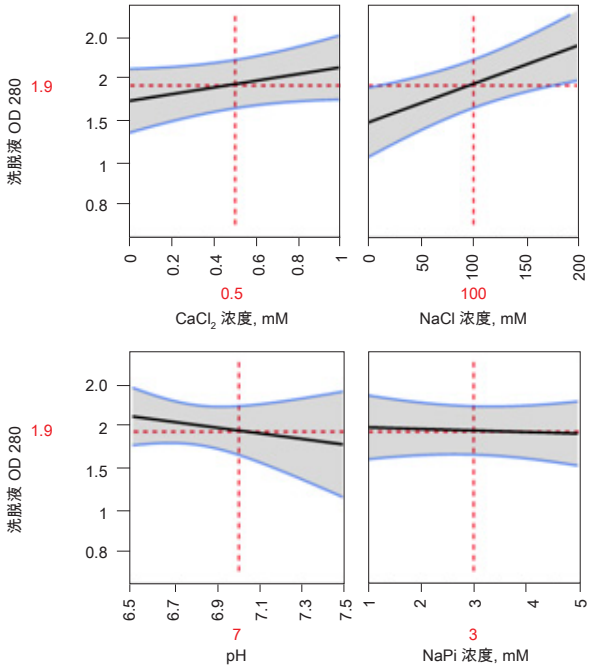
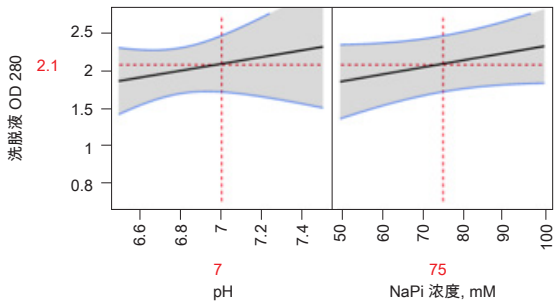
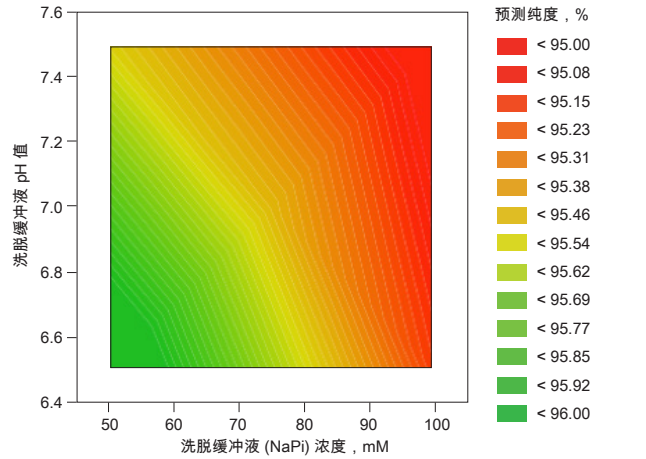


图 2根据吸光度（洗脱液 OD 280）预测结合缓冲液组分对洗脱液中 E_{od} 产率的影响

A. 产率预测图



B. 纯度预测图



C. 内毒素预测图

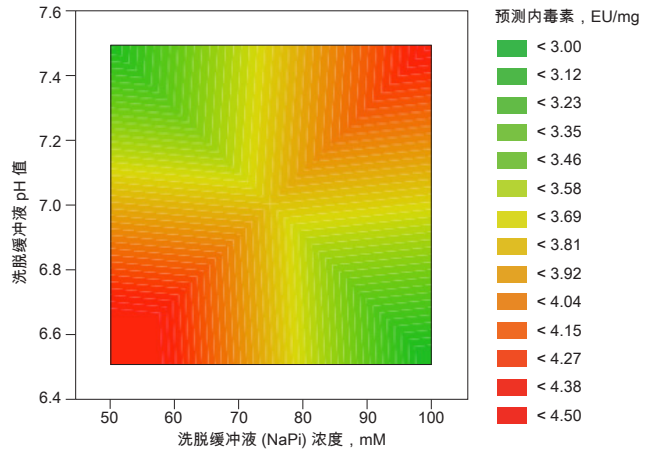


图 3洗脱缓冲液组分对洗脱液中 E_{od} 纯度和产率的影响A，根据洗脱缓冲液条件分析洗脱液中 E_{od} 的预测产率。**B** 和 **C**，根据两个洗脱缓冲液变量分析了一系列纯度和内毒素预测。

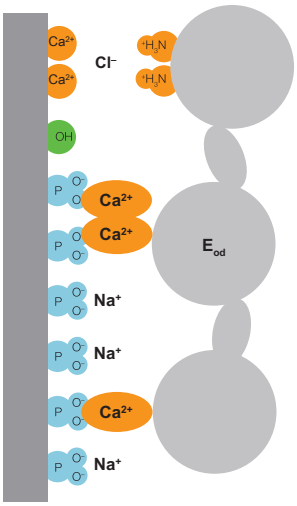


图 4通过在结合缓冲液中添加氯化钙和氯化钠增强 CHT 填料和 E_{od} 之间的相互作用

在结合和洗脱模式下，使用 1 mL CHT 层析柱进行规模放大纯化，该层析柱用含有 1 mM 氯化钙和 200 mM 氯化钠 (pH 6.5) 的缓冲液进行了预平衡-已证明这两种化学物质可增强 E_{od} 结合。缓冲液中的钙离子可被 CHT 填料表面的 P 位点吸收，与目标蛋白分子的羧基残基形成更多的金属亲和螯合复合物。此外，带负电荷的磷酰基被钠阳离子屏蔽，抑制了层析填料和酸性酶之间的静电排斥（图 4）。使用含有 75 mM 磷酸钠的缓冲液 (pH 6.5) 在 3 CV 内充分洗脱结合的 E_{od}，该条件平衡了目标回收率的需求和酸性杂质（如表达宿主细胞的内毒素和核酸）的分离度（图 5）。

正如 DOE 筛选所预测的那样，在较高 pH 值下，由于 P 位点之间的强烈排斥，以及在不存在高浓度氯化钠的情况下酸性目标蛋白表面的负电荷，CHT 填料不能有效结合 E_{od}。因此，E_{od} 也可以采用流穿模式纯化。CHT 层析柱用 5 mM 磷酸钠和 5 mM 氯化钠 (pH 7.0) 进行平衡。在此层析条件下，可有效捕获与钙金属亲和力更强的物质（如核酸、内毒素和表达宿主细胞的污染蛋白），并保留在层析柱上，直至用含 1.5 M 氯化钠的缓冲液剥离（图 6）。流穿操作简单有效，仅需最少的原料操作和缓冲液制备。两种层析过程的杂质清除效率参见表 2。它们都能很好地去除杂质。

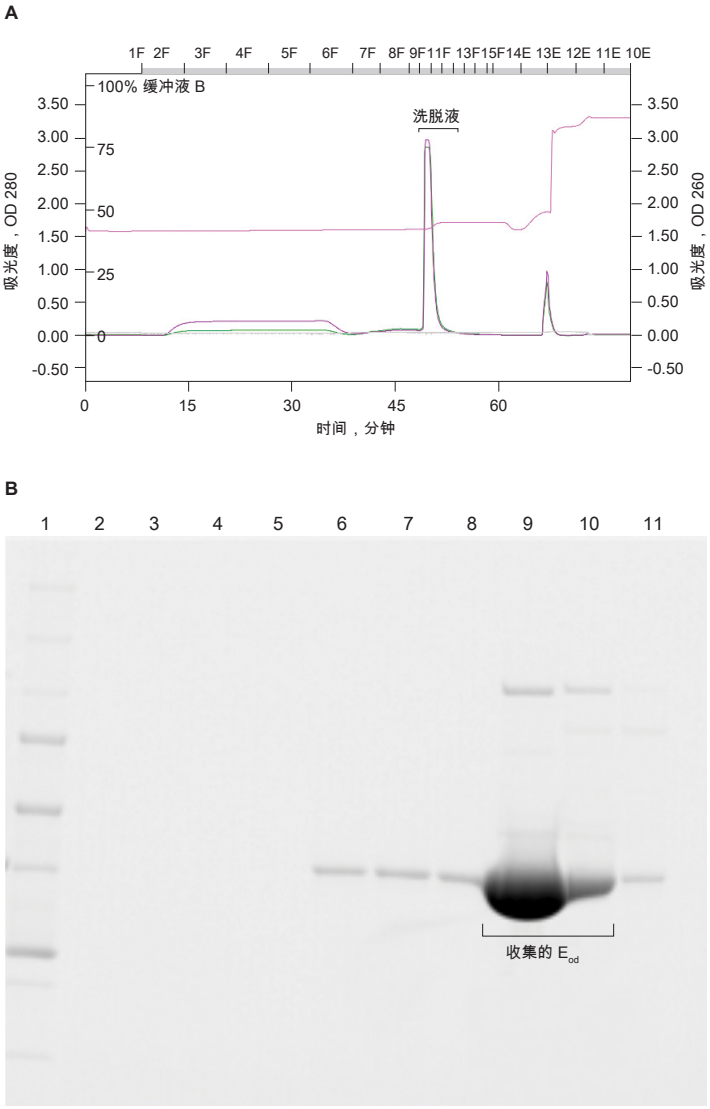
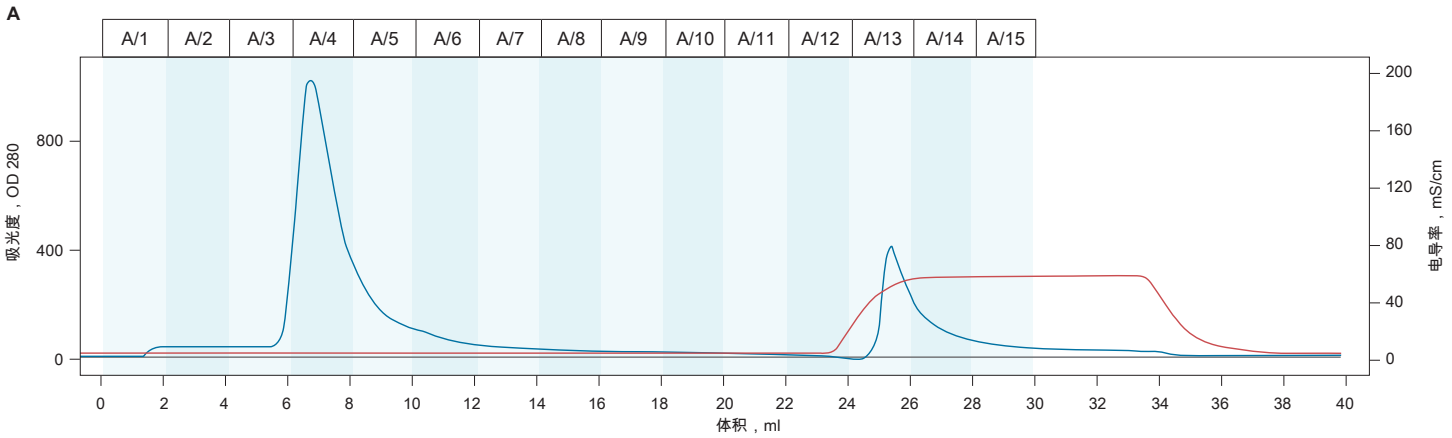


图 5在 1 mL CHT 层析柱 (0.56 x 4 cm) 上以结合-洗脱模式纯化 E_{od}A，层析柱分离层析谱。OD 280 (—), OD 260 (—) 和缓冲液 pH 值 (—)。**B**，层析柱组分的 SDS-PAGE 分析。泳道 1，Precision Plus 蛋白标准品；泳道 2-5，层析柱组分 2F–5F；泳道 6-11，层析柱组分 8F–13F。收集含有组分 9F 和 10F 的目标蛋白以进行纯度和产率分析。



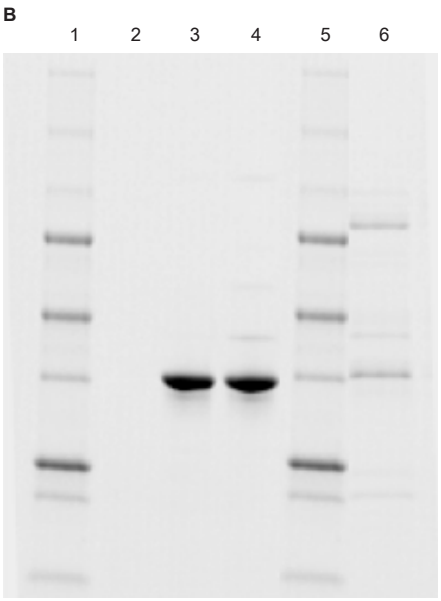


图 6在 1 mL CHT 层析柱 (0.56 x 4 cm) 上以流穿模式纯化 E_{od}A，层析柱分离层析谱。OD 280 (—)，缓冲液电导率 (—)。**B**，层析柱组分的 SDS-PAGE 分析。泳道 1 和 5，Precision Plus 蛋白标准品；泳道 2-4，层析柱组分 A3–A5；泳道 6，层析柱组分 A13。收集含有组分 A3 和 A4 的目标蛋白以进行纯度和产率分析。

表 2杂质清除效率比较

样本	内毒素，EU/mg*	dsDNA, ppm**	HCP, ppm***
样品	4,317	1,028	1,599
流穿模式下纯化的 E_{od}	11	2	225
结合-洗脱模式下纯化的 E_{od}	3	4	142

* LAL 测定，每毫克蛋白质。
** ddPCR 分析，每毫克蛋白质。检测限为 1.2 pg/mL。
*** ELISA。检测限为 1.6 ng/ml。

结论

我们已成功地采用 DOE 开发了 CHT 层析工艺。当前结果表明，目标酸性酶的结合能力和选择性取决于层析流动相的组成。我们的研究表明，酸性蛋白质的结合得益于使用低浓度的氯化钙，同时对缓冲液中的无机磷酸盐离子也有足够的耐受性。鉴于“对 CHT 稳定性具有显著积极影响”，建议向工艺溶液中加入钙和磷酸盐（更多详情，请参阅公告 6068）。最后，E_{od} 的放大制备可以通过结合-洗脱或流穿模式实现，这展示了使用 CHT 填料进行层析分离的稳健性。这两种纯化策略都很有效，不仅产品产率高，而且能很好地清除表达宿主细胞中的酸性杂质。

参考文献

Gagnon P et al. (2009). Reverse calcium affinity purification of Fab with calcium derivatized hydroxyapatite.J Immunol Methods 342, 115–118.

He X et al. (1996). Probing the coenzyme and substrate binding events of CDP-D-glucose 4,6-dehydratase: mechanistic implications.Biochemistry 35, 4,721–4,731.

Thorson J et al. (1994). Studies of the biosynthesis of 3,6-dideoxyhexoses: molecular cloning and characterization of the asc (ascarylose) region from Yersinia pseudotuberculosis.J Bacteriol 176, 5,483–5,493.

Vogan E M et al. (2002). Purification, crystallization and molecular symmetry of CDP-D-glucose 4,6-dehydratase from Yersinia pseudotuberculosis.Acta Crystallogr D Bio Crystallogr 58, 370–373.

请访问 **bio-rad.com/CHT**，了解更多信息并索取样品。

BIO-RAD

Bio-Rad Laboratories, Inc.

Life Science Group

Website *bio-rad.com* ***USA*** *1 800 424 6723* ***Australia*** *61 2 9914 2800* ***Austria*** *00 800 00 24 67 23* ***Belgium*** *00 800 00 24 67 23* ***Brazil*** *4003 0399*
Canada *1 905 364 3435* ***China*** *86 21 6169 8500* ***Czech Republic*** *00 800 00 24 67 23* ***Denmark*** *00 800 00 24 67 23* ***Finland*** *00 800 00 24 67 23*
France *00 800 00 24 67 23* ***Germany*** *00 800 00 24 67 23* ***Hong Kong*** *852 2789 3300* ***Hungary*** *00 800 00 24 67 23* ***India*** *91 124 4029300* ***Israel*** *0 3 9636050*
Italy *00 800 00 24 67 23* ***Japan*** *81 3 6361 7000* ***Korea*** *82 080 007 7373* ***Luxembourg*** *00 800 00 24 67 23* ***Mexico*** *52 555 488 7670*
The Netherlands *00 800 00 24 67 23* ***New Zealand*** *64 9 415 2280* ***Norway*** *00 800 00 24 67 23* ***Poland*** *00 800 00 24 67 23* ***Portugal*** *00 800 00 24 67 23*
Russian Federation *00 800 00 24 67 23* ***Singapore*** *65 6415 3188* ***South Africa*** *00 800 00 24 67 23* ***Spain*** *00 800 00 24 67 23* ***Sweden*** *00 800 00 24 67 23*
Switzerland *00 800 00 24 67 23* ***Taiwan*** *886 2 2578 7189* ***Thailand*** *66 2 651 8311* ***United Arab Emirates*** *36 1 459 6150* ***United Kingdom*** *00 800 00 24 67 23*

Bulletin 7129 Ver B CN US/EG *24-0357 0524 Sig 0124*