



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101921320 A

(43) 申请公布日 2010.12.22

(21) 申请号 201010227638.0

(22) 申请日 2010.07.15

(71) 申请人 大连理工大学

地址 116024 辽宁省大连市甘井子区凌工路
2号

(72) 发明人 贾凌云 侯率 林雪 张嘉玉
任军 谢键

(74) 专利代理机构 大连理工大学专利中心
21200

代理人 梅洪玉

(51) Int. Cl.

C07K 14/31 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

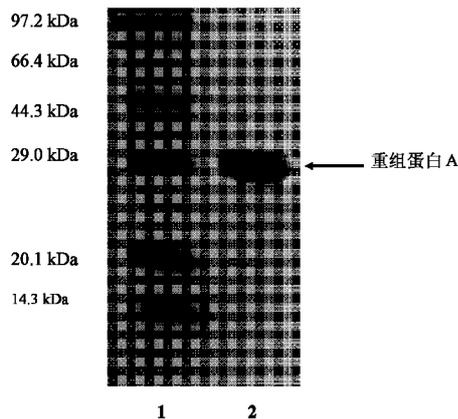
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种重组蛋白 A 的分离纯化方法

(57) 摘要

本发明涉及一种重组蛋白 A 的分离纯化方法,包括批量 IgG Fc 片段的制备, Fc 片段的定向固定化以及利用以 Fc 片段为配基的亲合色谱技术分离纯化重组蛋白 A 的方法,属生物工程技术领域。最终获得的蛋白 A 经 SDS-PAGE 及 HPLC 检测蛋白 A 纯度为 95% 以上。该方法具有低成本、高效率和操作简便的优点,既可用于实验室规模纯化蛋白 A,也可用于工业化蛋白 A 的生产。



1. 一种重组蛋白 A 的分离纯化方法,其特征包括如下步骤:

(1) 采用木瓜蛋白酶酶解 IgG 为 Fc 片段和 Fab 片段,并通过固定重组蛋白 A 的亲合层析柱纯化 Fc 片段;

(2) 采用高碘酸钠氧化 Fc 片段糖侧链,利用反应后得到的醛基实现 Fc 片段的定向固定化;

(3) 采用琼脂糖凝胶为基质,以羰基二咪唑活化,通过双功能团间隔臂分子将氧化后的 Fc 片段固定,合成了特异性结合重组蛋白 A 的亲合层析材料。

2. 根据权利要求 1 所述的一种重组蛋白 A 的分离纯化方法,其特征还在于:所述木瓜蛋白酶酶解 IgG 的条件为:激活剂半胱氨酸和螯合剂 EDTA 的终浓度分别为 0.02mol/L 和 0.01mol/L,加入 IgG 的浓度保持在 5-10mg/ml,酶解 pH 值 6-7,酶解温度 37-45℃,酶解时间 6h;最后加入终止剂碘乙酰胺的浓度为 0.03mol/L。

3. 根据权利要求 1 所述的一种重组蛋白 A 的分离纯化方法,其特征还在于:所述高碘酸钠氧化 Fc 片段糖侧链条件为:溶液 IgG 浓度为 0.5-10mg/ml,加入高碘酸钠的终浓度为 2-10mg/ml。

4. 根据权利要求 1 所述的一种重组蛋白 A 的分离纯化方法,其特征还在于:双功能团间隔臂分子为乙二胺、1,6-己二胺或二氨基二丙基亚胺。

5. 根据权利要求 1 所述的一种重组蛋白 A 的分离纯化方法,其特征还在于:合成的以 Fc 片段为配基的亲合层析介质的配基密度为 5-15mg/ml。

一种重组蛋白 A 的分离纯化方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程技术领域,涉及一种以 IgG 的 Fc 片段为亲和配基的亲和层析技术纯化重组蛋白 A 的方法。

背景技术

[0002] 金黄色葡萄球菌蛋白 A(Staphylococcus aureus protein A, SPA) 为金黄色葡萄球菌细胞壁相关蛋白,为单链多肽结构,具有与人类和其它哺乳动物血液中免疫球蛋白分子的 Fc 段特异性结合的能力,主要吸附 IgG 和含 IgG 的免疫复合物。正是因为蛋白 A 与人类和其他哺乳动物的多种免疫球蛋白具有特异性结合能力,因此被广泛用作免疫学试剂(与多种报告分子偶联后用于组织化学、Western、ELISA 等的抗体检测);与固相载体相连,用于抗体的分离纯化;临床上用于治疗抗体相关性疾病的血液净化吸附剂等等。

[0003] 最早获得蛋白 A 的方法是从金黄色葡萄球菌中直接纯化获得,然而这种方法存在一些问题,例如:天然蛋白 A 只占菌体总蛋白的 1.7%,难以满足大规模生产的需要,且金黄色葡萄球菌为致病菌,大规模生产危险性较大。为避免这些问题,另一基于基因工程方法生产重组蛋白 A 的工艺最近已经得到了开发。

[0004] 蛋白 A 的用途广,需求量大,但目前的情况是蛋白 A 主要依靠进口,如美国的 Repligen Corporation,价格昂贵。而国内在蛋白 A 研发方面起步较晚,产量低,成本高,产品质量不稳定,远远不能满足市场的需求,其中最关键的问题就是纯化工艺还有待提高,因此急需建立一种改进的适合于大规模生产的分离纯化工艺,以降低成本,提高产品质量。

[0005] 目前,报导的对蛋白 A 的纯化方法主要有两种,一种是采用 IgG 亲和层析的方法,第二种则采用的是多步纯化的方法。

[0006] 早在 1972 年,Hjelm 等人就提出了采用 IgG 亲和层析的方法纯化蛋白 A。具体方法是:以交联琼脂糖凝胶为载体,采用溴化氰活化工艺,以 IgG 为功能基制成亲和层析柱,亲和层析纯化蛋白 A。该方法操作简单,且一步层析操作即可使纯化的蛋白 A 纯度达到 95%。然而,由于 IgG 属生物大分子,分子量大($M_r = 150000$),因此为减少空间位阻,单位体积载体上只能偶联少量的 IgG,造成亲和层析柱动态载量低,难以大规模生产,多用于实验室规模纯化。而且偶联 IgG 时利用的是 IgG 表面大量的氨基,属于多点偶联工艺,必然导致固定化的蛋白空间取向不均一,增大了空间位阻。

[0007] US 5075423 公开了一种纯化蛋白 A 的方法。该方法是在 IgG 亲和层析的基础上,通过增加一步离子交换层析以去除痕量的污染物。然而,与上述方法存在相似的问题,IgG 亲和层析柱空间位阻大,动态载量低,成本高,难以大规模应用。

[0008] Sjoquist 等人在 1972 年提出了多步操作组合的方法纯化蛋白 A,主要包括酸沉淀,硫酸铵沉淀,超滤,DEAE 弱阴离子交换层析以及凝胶过滤层析。该方法操作步骤多,纯化过程复杂,回收率低,周期长成本高,而且凝胶过滤层析生产能力有限,这些都限制了其大规模应用的可能。

[0009] US 5314993 公开了一种能大规模纯化重组蛋白 A 的方法,该方法包括加热处理,

离子交换层析及乙醇沉淀三个步骤。该方法工艺简单,但产品回收率不高。

[0010] Hammond 等人也发表了一种能大规模纯化重组蛋白 A 的方法,该方法包括加热处理,除盐柱除盐,DEAE 弱阴离子交换层析以及苯基疏水作用层析,该方法操作复杂,总回收率低。

[0011] WO 2007/035341A1,公开了一种纯化蛋白 A 的方法,该方法包括过滤,渗滤,以及两步连续的层析操作,第一步为阴离子交换层析、疏水作用层析或陶瓷羟基磷灰石层析中的一种,第二步为阳离子交换层析。该方法同样操作复杂,效率低。

[0012] CN 1432578A,公开了一种人工合成的蛋白 A 基因及其表达产物的制备方法。所用的纯化方式为一步分子筛纯化,处理量小,产品纯度不高,不适宜大规模生产。

[0013] CN 101050464A 和 CN 101298476A 公开的重组蛋白 A 纯化方法类似。其都是在基因构建时加入了由 6 个组氨酸组成的标签,因此采用镍离子螯合层析纯化重组蛋白 A。但这种方法需要在纯化过程中加入特定的酶来切除组氨酸标签,且这种方法得到的产品纯度低。

[0014] 综上所述,利用 IgG 为配基的亲层析方法虽然存在一些缺陷,但在单次获得产品纯度上仍高于其他方法。因此,本发明针对 IgG 为配基的亲层析柱在重组蛋白 A 纯化中存在的吸附柱空间位阻大、载量低等不足,提出了一种以定向固定化 IgG 的 Fc 片段为亲和配基的亲层析技术纯化重组蛋白 A 的新方法。

发明内容

[0015] 本发明提供了一种以定向固定化 IgG 的 Fc 片段为亲和配基的亲层析介质的制备方法,在实现重组蛋白 A 的高选择性分离纯化的同时,显著提高层析柱的载量和使用寿命,降低生产成本。

[0016] 本发明的技术方案包括以下步骤:

[0017] (1) 采用木瓜蛋白酶酶解 IgG 为 Fc 片段和 Fab 片段,并通过固定重组蛋白 A 的亲层析柱纯化 Fc 片段;

[0018] (2) 采用高碘酸钠氧化 Fc 片段糖侧链,利用反应后得到的醛基实现 Fc 片段的定向固定化;

[0019] (3) 采用琼脂糖凝胶为基质,以羰基二咪唑 (CDI) 活化,通过双功能团间隔臂分子将氧化后的 Fc 片段固定,合成了可以特异性结合重组蛋白 A 的亲层析材料,该材料对重组蛋白 A 的吸附容量为 10-20mg/ml gel。

[0020] 本发明的有益效果如下:

[0021] 1、采用 Fc 片段为亲和配基制备成亲层析柱,由于 Fc 片段大小只占完整 IgG 分子的三分之一,因此单位体积载体上可以偶联更多的配基,相比 IgG 亲和层析介质动态载量明显提高,从而降低了生产成本;

[0022] 2、采用高碘酸钠氧化 Fc 片段糖侧链,利用反应后得到的醛基实现 Fc 片段的定向固定化。由于采用了定向偶联工艺,降低了空间位阻,因此可以在使用更高流速的条件下增加动态载量;

[0023] 3、相对于传统的 IgG 亲和层析和其他多步纯化的方法,该工艺的特点是低成本、高效率和操作简便,该工艺既可用于实验室规模纯化蛋白 A,也可用于工业化蛋白 A 的生

产。按上述方法,最终获得的蛋白 A 利用 SDS-PAGE 和 HPLC 检测产物纯度达 95% 以上。

附图说明

[0024] 附图 1 为通过重组蛋白 A 亲和层析柱纯化 Fc 片段的 SDS-PAGE 凝胶电泳结果,其中泳道 1 为 IgG,泳道 2 为木瓜蛋白酶酶解液,泳道 3 为穿透,泳道 4 为双蒸水冲洗样,泳道 5 为纯化后的 Fc 片段。

[0025] 附图 2 为纯化后 SDS-PAGE 凝胶电泳结果,其中泳道 1 为低分子量蛋白 marker,泳道 2 为纯化后的重组蛋白 A。

具体实施方式

[0026] 以下结合技术方案和附图详细叙述本发明的具体实施例。

[0027] 实施例 1

[0028] Fc 片段的制备

[0029] (1) 木瓜蛋白酶酶解 IgG

[0030] 以 10mM pH 7.4 的 PBS 缓冲液溶解适量的木瓜蛋白酶一定时间,过滤。加入一定量的激活剂半胱氨酸和螯合剂 EDTA,使其终浓度分别达到 0.02mol/L 和 0.01mol/L,加入 IgG 使其浓度保持在 0.5-10mg/ml,加入反应物后调节 pH 值到 6-7 之间,40℃ 水浴反应 3-6h。最后加入终止剂碘乙酰胺使其浓度达到 0.03mol/L。

[0031] (2) 利用重组蛋白 A 亲和层析柱纯化 Fc 片段

[0032] 取以重组蛋白 A 为配基的亲和层析填料装柱,用 5 倍柱体积平衡缓冲液 (10mM PBS, pH 7.4) 平衡柱子,检测 280nm 吸光度,直到基线平衡为止。将上述所得的酶解液缓慢过柱,接着用 5 倍柱体积平衡缓冲液冲洗柱子,再改用双蒸水冲洗,以洗去因疏水作用而非特异吸附的杂蛋白,最后使用 2-4 倍柱体积的洗脱缓冲液 (100mM 柠檬酸, pH 2.3) 洗脱,收集洗脱峰,并立即用中和缓冲液 (500mM Tris-HCl, pH 8.0) 中和至中性。

[0033] Fc 片段的定向固定化

[0034] (1) Fc 片段的氧化反应

[0035] 对上述洗脱液进行透析除盐,浓缩后转入铝箔纸包裹的锥形瓶中,加入高碘酸钠至终浓度为 2-10mg/ml,轻微摇晃,室温避光反应 20-40min 后快速透析除去高碘酸钠以终止反应,并对透析后的溶液进行浓缩。

[0036] (2) CDI 法活化琼脂糖凝胶

[0037] 取 5ml 全沉降后的 Sepharose CL-4B 凝胶,用蒸馏水洗去胶中的防腐剂等。称取 0.5g CDI 溶解在约 10ml 丙酮中。将洗好的凝胶加到 CDI 丙酮溶液中,30℃、150rpm,恒温摇床反应 1h。反应后的凝胶用丙酮反复冲洗,除去反应过程中产生的咪唑。

[0038] (3) 手臂的连接

[0039] 10ml 无水丙酮中加入 2ml 的乙二胺、1,6-己二胺或二氨基二丙基亚胺 (DADPA),再加入已经活化的 CDI 凝胶,30℃、150rpm,恒温摇床反应 2h。用大量的蒸馏水冲洗反应后的凝胶,再用 150mM pH 8.2 硼酸缓冲液抽滤。

[0040] (4) Fc 片段的固定

[0041] 取一定量活化后的凝胶,加入等体积的 150mM pH 8.2 的硼酸缓冲液,加入含氧化

后 Fc 片段的溶液, 30℃、150rpm, 恒温摇床反应 3h。反应后的凝胶用大量蒸馏水抽滤后, 放入乙醇胺溶液中封闭未反应的醛基, 30℃, 150rpm, 恒温摇床过夜。最后加入硼氢化钠, 30℃, 150rpm, 摇床反应 30min 左右, 还原后的凝胶用大量蒸馏水抽滤清洗, 然后放入含有 0.02% 的叠氮钠溶液中, 4℃ 保存待用。合成的以 Fc 片段为配基的亲亲和层析介质的配基密度为 5-15mg/ml gel。

[0042] 重组蛋白 A 的分离纯化

[0043] (1) 将发酵液 4000rpm 离心 15min, 去掉上清培养基, 将菌体溶于 5 倍体积的裂解液 (50mM Tris, 100mM NaCl, pH 8.0) 中, 加入溶菌酶使其终浓度为 0.2mg/mL, 37℃ 温浴 15min 后超声破碎, 将破碎后的菌液 10000rpm 离心 20min, 获取上清液。

[0044] (2) 取以 IgG 的 Fc 片段为配基的亲亲和填料装柱, 用 5 倍柱体积平衡缓冲液 (10mM PBS, 0.5M NaCl, pH 7.4) 平衡柱子, 检测 210nm 吸光度, 直到基线平衡为止。将上述处理后的蛋白上清液缓慢过柱, 接着用 5-10 倍柱体积平衡缓冲液冲洗柱子, 直到 210nm 处吸光度回到基线并稳定为止, 再用 2-4 倍柱体积的洗脱缓冲液 (100mM 柠檬酸, pH 2.3) 洗脱, 收集洗脱峰, 并立即用中和缓冲液 (500mM Tris-HCl, pH 8.0) 中和至中性。

[0045] 最终获得的蛋白 A 经 SDS-PAGE 及 HPLC 检测蛋白 A 纯度为 95% 以上。

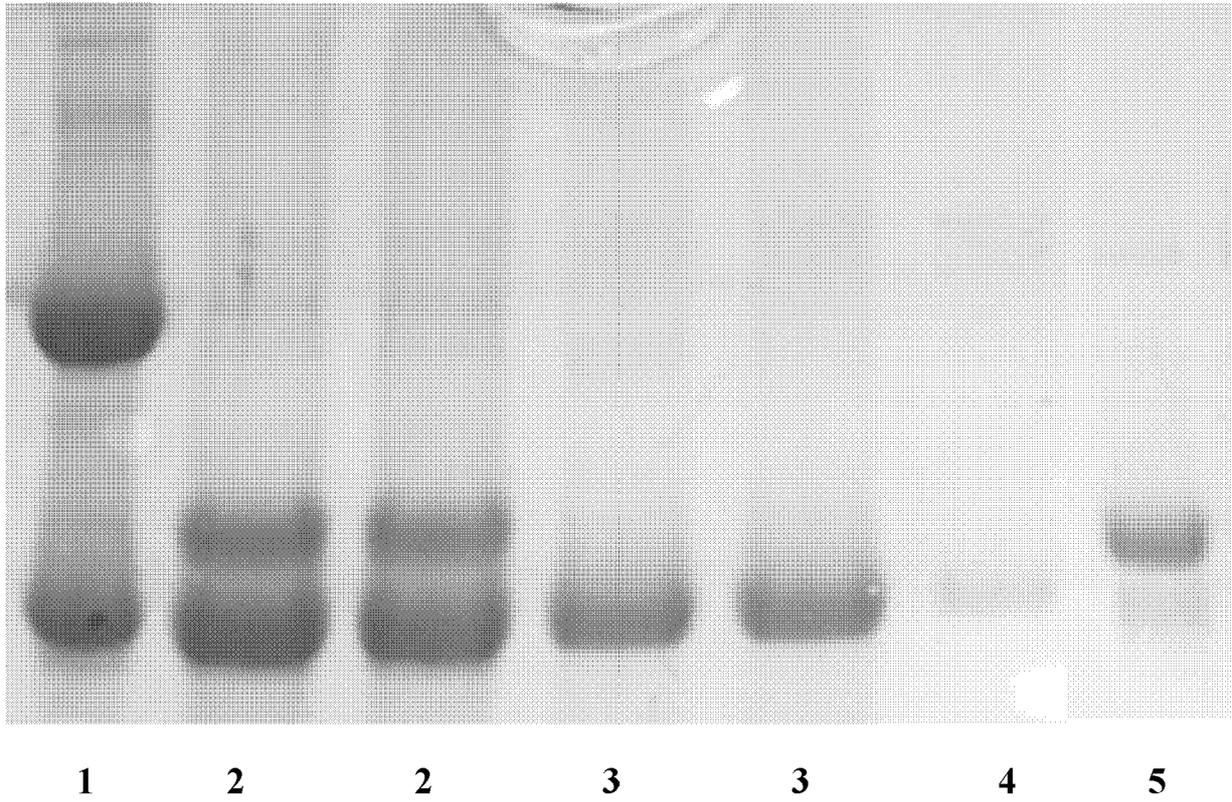


图 1

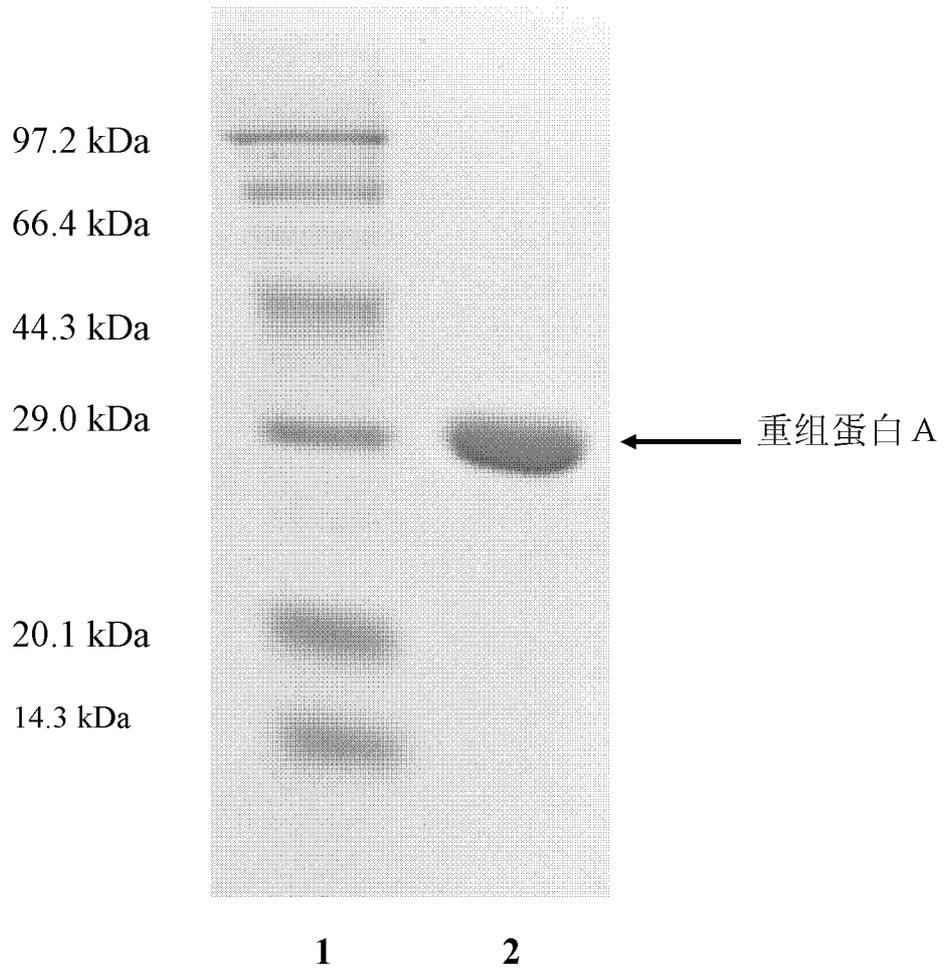


图 2