

使用 Ni Sepharose 6 Fast Flow 纯化组氨酸标签的麦芽糖结合蛋白-方法优化和放大

摘要

该应用讲述如何在纯化麦芽糖结合蛋白过程中对Ni Sepharose™ 6 Fast Flow捕获步骤进行放大。该麦芽糖结合蛋白MBP-(His)₆为大肠杆菌表达的含组氨酸标签的重组蛋白。Ni Sepharose™ 6 Fast Flow属于固定化金属亲和层析 (IMAC) 介质, 对组氨酸标签蛋白具有高的蛋白结合能力。作为BioProcess™ 介质家族中的一员, Ni Sepharose™ 6 Fast Flow能满足生物技术工业生产的需要, 包括供货的安全性, 全面的规范支持以及所有生产应用所需的支持。

本项研究展示了过程优化和放大工艺的结果。该方法首先通过HisTrap FF 1ml柱进行实验室规模的优化, 以寻求高样品载量下蛋白纯化的最佳条件。已知通过优化的咪唑浓度 (5mM) 能成功纯化88%的蛋白结合载量。这些条件被用于HisPrep FF 16/10柱 (20ml) 对MBP-(His)₆蛋白的纯化的过程优化。在两个独立的纯化实验中, 每次过柱均有超过500mg的蛋白质被纯化, 并获得高的蛋白质回收率。该方案可通过ÄKTA Pilot™ 系统以及预装210 ml的Ni Sepharose™ 6 Fast Flow进行10倍放大。达到这个规模后, 可一次性上样5500 mg蛋白, 并通过纯化获得94%的目标蛋白回收率。

该结果表明Ni Sepharose™ 6 Fast Flow极其适合于带组氨酸标签的目标蛋白的高产率捕获。



图1. 使用ÄKTA Pilot™对组氨酸标签蛋白纯化进行放大处理。

概述

IMAC已经成为组氨酸标签蛋白亲和纯化中应用最广泛的技术之一。镍 (Ni²⁺) 因其与组氨酸标签蛋白的高亲和性而成为最常使用的金属离子。蛋白结合可被咪唑洗脱所破坏, 这一作用主要通过占据金属螯合位点实现, 同样通过降低洗脱缓冲液PH值使氨基酸侧链发生质子化也可对蛋白结合进行破坏。



Ni Sepharose™ 6 Fast Flow是专为组氨酸标签蛋白设计的一种层析介质。

- 预先螯合Ni²⁺，低离子脱落
- 高蛋白结合能力
- 全部PH范围内可保持稳定，与一般组氨酸标签蛋白纯化过程中使用的表面活性剂，变性剂以及还原剂兼容。

该介质兼有Ni²⁺的优点和Sepharose™ 6 Fast Flow基质固有的特性。最终结合形成的可靠的IMAC介质具有易于使用，操作流速快，放大操作简单有效等优点。

此次报道的工作目的是描述高上样量下MBP-(His)₆蛋白纯化的捕获步骤以及随后的放大操作。并给出筛选，过程优化以及放大的结果。

材料与amp;方法

除非特别说明，否则所有的设备和层析介质均来自GE Healthcare（乌普萨拉，瑞典），并且所有使用的化学物质均为分析级。

原材料的准备

本项研究中目标蛋白MBP-(His)₆为大肠杆菌表达的组氨酸标签重组麦芽糖结合蛋白，其分子量为44000，等电点（PI）为4.4。

大肠杆菌细胞（1830g）于3倍体积（5490ml）的IMAC缓冲液A中解冻。添加Pefabloc™（一种蛋白酶抑制剂）至终浓度1mM。测量PH值，用Tris碱调节PH值至7.65。300-450 bar的压力下，使用French Press细胞破碎仪对细胞悬液进行匀浆，共六次。匀浆后调PH值至7.65，17000×g下离心50 min。

在操作开始之前，先将咪唑浓度分别调节至25,15或5 mM，用于咪唑结合的优化实验。用HisTrap FF过滤的样品需添加1 mM的Pefabloc，并在48000×g（18℃）转速下离心20 min后通过0.22 μm滤膜进行过滤。采用HisPrep FF16/10过滤时无需添加Pefabloc，且样品通过0.45 μm滤膜过滤。对于在Axichrom 50柱中进行中试规模过柱中，样品在17000×g下（18℃）离心60 min，然后通过Whatman™ GF/D和GF/B滤器进行抽滤。

层析柱和层析纯化系统

本项研究采用分别预填充有1 ml的HisTrap FF介质和20 ml HisPrep FF 16/10介质的Ni Sepharose™ 6 Fast Flow柱。室温下选用带10 mm UV-cell的ÅKTAexplorer™ 100层析系统。在中试规模的试验

中，将Ni Sepharose™ 6 Fast Flow填入AxiChrom 50柱（内径为50 mm）后，采用ÅKTApilot™层析系统在室温下操作。Ni Sepharose™ 6 Fast Flow用去离子水搅匀后载入AxiChrom 50柱，以60 cm/h（19.6 ml/min）线性流速填充。填充床进一步通过轴向挤压压缩15%至床高10.7cm，柱体积210ml。

从ÅKTAexplorer™系统流出的物质通过Frac-950成分收集器进行收集，ÅKTApilot™系统的流出物则手动收集。

结合和洗脱缓冲液

IMAC 缓冲液A (吸附): 20 mM 磷酸钠 +500 mM 氯化钠 + x mM 咪唑,pH 7.4

(此处x根据实验进行调整可为 5 mM, 15 mM 或25 mM)

IMAC 缓冲液B (洗脱): 20 mM 磷酸钠 + 500 mM 氯化钠 + 500 mM 咪唑,pH 7.4

蛋白定量

通过监测280 nm处的紫外线吸收对MBP-(His)₆进行定量。洗脱峰成分经稀释后使其吸收值在线性响应范围内。蛋白量的估计通过280 nm处测量的吸光值进行计算，其中MBP-(His)₆的消光系数为1.48 M⁻¹cm⁻¹。

MBP-(His)₆的柱吸附能力测定

将足量的蛋白加载于HisTrap FF 1ml柱上对介质的吸附能力进行测定。细胞提取物中MBP-(His)₆的浓度为2.6 mg/ml。将细胞提取物用含5 mM咪唑的IMAC缓冲液A进行1:3稀释，一次性上样55 ml，用30倍柱体积（CV）的IMAC缓冲液A进行冲洗。用IMAC缓冲液B对结合的MBP-(His)₆蛋白进行洗脱（图1）。

最终吸附能力测定为30 mg MBP-(His)₆/ml 介质。

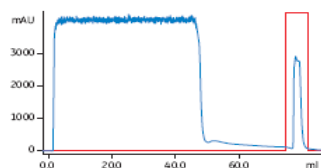


图1. 1ml HisTrap FF吸附能力的测定。样品：45 ml 含MBP-(His)₆蛋白的大肠杆菌提取物。通过280 nm吸收值对纯化进行检测。清洗体积为30 CV。

结果和讨论

吸附条件优化

当蛋白上样量较低时，已经报道了吸附缓冲液中推荐的咪唑浓度为25 mM，且在这一浓度下无蛋白渗漏发生（参见数据文件11-0008-86）。而本项研究还应包括对更高样品上样量的纯化。因此有必要对吸附条件进行优化。实验采用HisTrap FF 1 ml柱，上样量为88%的柱吸附容量，咪唑浓度为25、15和5 mM。在上样量固定的情况下，如图2和3所示，当样品和吸附缓冲液中咪唑浓度为25 mM或15 mM时在流穿成分和清洗成分中都出现蛋白渗漏。而5 mM咪唑则未发现有蛋白渗漏（色谱图未显示）。结论为应采用5 mM咪唑进行过程优化和放大试验。

层析柱: HisTrap FF 1 ml
样品: 含MBP-(His)₆的大肠杆菌提取物 (10 ml, 26 mg蛋白)
流速: 156 cm/h (1 ml/min)
吸附缓冲液: A) IMAC 缓冲液A + 25 mM 咪唑
B) IMAC 缓冲液A + 15 mM 咪唑
清洗体积: 30 CV的吸附缓冲液
洗脱缓冲液: IMAC 缓冲液B
系统: ÄKTAexplorer 100

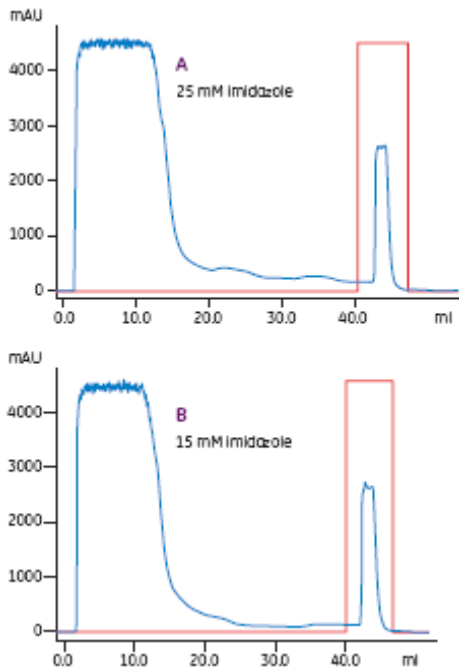
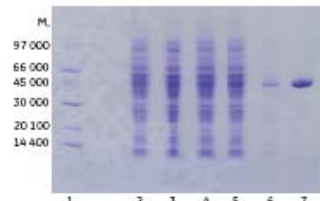


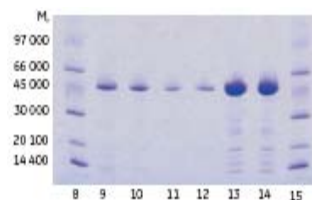
图2 A和B.吸附缓冲液中咪唑浓度对MBP-(His)₆蛋白渗漏的影响。

过程优化

HisPrep FF 16/10柱被用于MBP-(His)₆蛋白实验室规模纯化的过程优化。该柱采用含5 mM 咪唑的IMAC缓冲液A进行平衡。重复试验两次观察高蛋白上样下蛋白纯化的重复性 (205 ml细胞匀浆相当于530 mg MBP-(His)₆)。上样量相当于88%的柱吸附量，吸附缓冲液为含5 mM 咪唑的IMAC缓冲液A，线性流速为150 cm/h。未结合物质通过同样的IMAC缓冲液A从柱上清洗除去。与柱吸附的MBP-(His)₆蛋白则通过洗脱步骤被IMAC缓冲液B从柱上洗脱（图4）。洗脱峰收集成分中蛋白回收率平均达98%，估计纯度约达95%。图6中SDS-PAGE结果显示两次试验MBP-(His)₆蛋白纯度相似，表明该方法具有较好的重复性。



泳道
1. 低分子量标准蛋白
2. 图2A中流穿成分
3. 图2A中流穿成分
4. 图2A中流穿成分
5. 图2A中流穿成分
6. 图2A中清洗成分
7. 图2A中洗脱成分



泳道
8. 低分子量标准蛋白
9. 图2B中流穿成分
10. 图2B中流穿成分
11. 图2B中流穿成分
12. 图2B中流穿成分
13. 图2B中清洗成分
14. 图2B中洗脱成分
15. 低分子量标准蛋白

图3. 在PhastGel™ Gradient 8-25胶上进行非还原 SDS-PAGE分析。收集HisTrap FF 1 ml柱纯化的洗脱峰成分（图2A和2B）。每个泳道蛋白上样量一致。胶通过Coomassie™考马斯亮蓝进行染色。

放大

通过增加柱直径进行10倍工艺放大，同时保持其他参数如线性流速，上样量/ml介质和柱床高度常数不变。放大试验中采用填充有210 ml Ni Sepharose™ 6 Fast Flow介质的Axichrom 50柱。

图5中显示了在样品载量为26 mg/ml 介质（相当于88%的吸附载量）的情况下MBP-(His)₆纯化的放大结果。因此，采用ÅKTA Pilot™层析系统进行10倍放大中，原料为2125 ml，其中含有5500 mg的

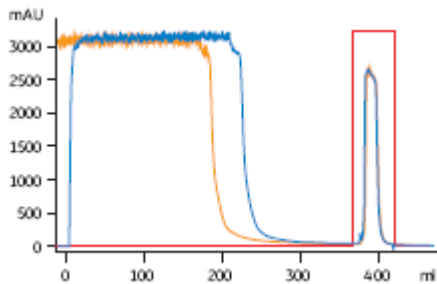


图4. HisPrep FF 16/10柱纯化MBP-(His)₆蛋白两次试验的色谱图叠加。蓝色色谱图：实验1，橙色色谱图：实验2。样本：含MBP-(His)₆的大肠杆菌提取物，205 ml（含530 mg蛋白）。通过280 nm吸收对纯化进行监测。图中两次过柱分别采用不同的清洗体积即8 CV和10 CV。色谱图经标准化处理，显示出清洗中的低吸收以及洗脱峰大小之间的相似性。

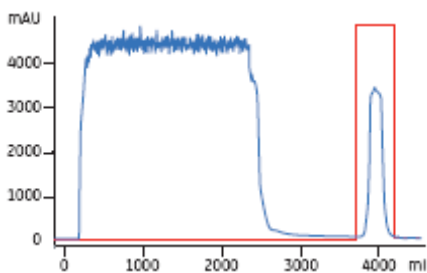
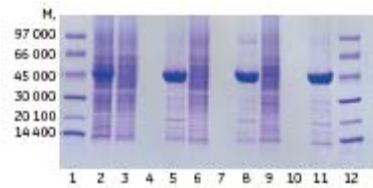


图5. 采用Axichrom 50柱对Ni Sepharose™ 6 Fast Flow纯化MBP-(His)₆的工艺进行十倍放大。样品：2125 ml含5500 mg MBP-(His)₆的大肠杆菌提取物。通过280 nm吸收对纯化进行监测。

MBP-(His)₆蛋白，线性流速为150 cm/h (50 ml/min)。吸附缓冲液为含5 mM咪唑的IMAC缓冲液A。未结合物质通过同样的IMAC缓冲液A从柱上清洗除去。与柱吸附的MBP-(His)₆蛋白则通过洗脱步骤被IMAC缓冲液B从柱上洗脱。洗脱峰收集中蛋白回收率约为94%，估计纯度为95%。SDS-PAGE结果（图6）显示本次试验和之前从HisPrep FF 16/10中得到的结果具有相似的纯度。这些结果清楚地表明了此方法具有很好的扩展能力（见表1）。



泳道

1. 低分子量标准蛋白
2. 大肠杆菌提取物加载样品
3. HisPrep FF 16/10第一次过柱的流穿液
4. HisPrep FF 16/10第一次过柱的清洗液
5. HisPrep FF 16/10第一次过柱的合并洗脱成分
6. HisPrep FF 16/10第二次过柱的流穿液
7. HisPrep FF 16/10第二次过柱的清洗液
8. HisPrep FF 16/10第二次过柱的合并洗脱成分
9. Axichrom 50柱的流穿液
10. Axichrom 50柱的的清洗液
11. Axichrom 50柱的的合并洗脱成分
12. 低分子量标准蛋白

图6. 在ExcelGel™ Gradient 8-18胶上进行非还原SDS-PAGE分析。收集经HisPrep FF 16/10柱和Axichrom 50柱中Ni Sepharose 6 Fast Flow纯化的洗脱峰成分并合并（见图4和5）。纯化中使用的样品：表达MBP-(His)₆的大肠杆菌提取物。每个泳道上样量一致。胶通过Coomassie™考马斯亮蓝进行染色。

表1.不同规模下MBP-(His)₆蛋白纯化结果总结。

纯化规模	柱尺寸 (mm)	柱体积 (ml)	上样量 (% 吸附容量)	上样量 (mg)	回收率* (%)
实验室规模 (HisPrep FF 16/10)	16 (i.d.) ×100	20	88	530	99
实验室规模 (HisPrep FF 16/10)	16 (i.d.) ×100	20	88	530	97
中试规模 (填充有Ni Sepharose 6 Fast Flow的 Axichrom 50柱)	50 (i.d.) ×107	210	88	5500	94

*回收的目标蛋白纯度为95%

结论

本篇内容介绍了如何在高样品上样量下采用Ni Sepharose 6 Fast Flow对MBP-(His)₆蛋白纯化的捕获步骤进行工艺优化。通过将吸附缓冲液中的咪唑浓度降低至5 mM发现即使在高蛋白上样量(88%的介质吸附容量)的情况下流穿液和清洗成分中仍未发现任何MBP-(His)₆蛋白的渗漏。采用HisPrep FF 16/10可对MBP-(His)₆蛋白量超过500 mg的样本进行纯化且具有高回收率。该方案可通过填充有210 ml Ni Sepharose 6 Fast Flow的Axichrom 50柱进行10倍放大。在这个规模下,采用ÄKTApilot系统可上样5500 mg蛋白,且目标蛋白纯化回收率达94%。SDS-PAGE结果显示两种不同规模下的纯度非常近似。该结果清楚地显示出该方法具有可扩展的特性,且Ni Sepharose 6 Fast Flow适合于组氨酸标签蛋白的高产率亲和捕获。

致谢

MBP-(His)₆蛋白由瑞典乌普萨拉的Pharmacia Diagnostics提供。