

文章编号 :1009-038X(2002)02-0213-05

亲和-膜过滤技术及其在生物工程中的应用

郭 勇 , 张丽君

(华南理工大学 食品与生物工程学院, 广东 广州 510641)

摘 要 :论述了亲和-膜过滤技术的原理、影响因素(包括配体、载体以及合适孔径的超滤膜的选择)以及发展方向,进一步综述了其在生物工程中用于分离纯化酶、蛋白质和其它生物活性物质等方面的应用。

关键词 :亲和过滤 ; 生化分离 ; 亲和载体 ; 亲和配基

中图分类号 :O 652.6

文献标识码 :A

The Technology of Affinity Filtration and Its Application in Biological Engineering

GUO Yong , ZHANG Li-jun

(The Food and Biological Engineering College, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract : This paper mainly discusses the principle, development and effect elements of affinity filtration (including the choices of escorts, ligands and membranes), and its application in bioengineering for the separation of enzymes, proteins and other bioactive materials.

Key words : affinity filtration ; biochemical separation ; affinity escort ; affinity ligands

20 世纪 80 年代以来,生命科学和生物工程技术的发展日新月异,生物产品(如酶、抗体、抗原、受体)的种类越来越多。这些制品通常是从发酵液中或天然产品中提取,再经纯化而得到的产品。由于目标产物产量小,通常又与底物、细胞等混杂在一起,浓度很低,且生物产品与传统的化工产品不一样,它们一般都具有生物活性,对分离操作条件要求比较苛刻。传统的化工分离方法如精馏、沉降、结晶等都难以达到要求。

膜分离是 20 世纪 60 年代以来发展较快的一项分离技术,它具有操作条件温和、无污染、无相变等特点,在许多方面都得到了应用,象微滤、超滤已应

用于生物化工和医药行业中。膜分离是根据分子大小不同来实现分离的,一般相对分子质量相差 10 倍以上的物系才具有分离作用,因此它还远远不能满足生化分离的需要。而生物亲和作用是生物分子之间的可逆专一性识别作用,具有极高的选择性。20 世纪 70 年代以来,利用生物亲和相互作用,分离蛋白质等生物大分子的亲和纯化技术迅速发展。其中亲和层析技术已得到广泛应用,但是亲和层析法亦存在许多难以克服的缺点:1)亲和载体价格昂贵,使用寿命短;2)色谱柱易堵塞和污染,需对原料进行预处理以除去颗粒性杂质;3)难以实现连续操作和规模放大。目前亲和层析法仅局限于价值极高

收稿日期 2001-12-03; 修订日期 2002-01-10.

作者简介:郭勇(1942-),男,广东广州人,教授,博士生导师.

万方数据

的生物活性物质的小批量纯化. 为克服膜过滤和亲和层析的缺点, 发展了亲和-膜过滤技术, 不仅利用了生物分子的识别性能, 分离低浓度的生物制品, 而且膜的渗透性及通量大, 能在纯化的同时实现浓缩. 此外还有操作方便、设备简单、便于大规模生产的特点, 发展前景引人瞩目^[1~3].

1 亲和-膜过滤技术的原理

亲和-膜过滤(affinity filtration)^[2,3]是亲和相互作用原理与膜分离技术相结合的新型耦合分离技术. 其基本原理见图 1, 即当需提纯的物质(亲和体)自由地存在于提取液时, 由于其相对分子质量较小, 能顺利地通过截留相对分子质量大的超滤膜. 但当亲和体与具有结合能力的大分子配体混合, 形

成亲和体-大分子配体复合物后, 由于此复合体相对分子质量远大于超滤膜的截留相对分子质量, 从而被截留. 而提取液中其它未被结合的组分则通过超滤膜, 从亲和体-大分子配体复合物中分离出来. 当所有的杂质去除后, 用合适的洗脱液处理超滤膜截留得到的复合物, 使亲和体从大分子中解析下来; 游离的亲和体(蛋白质、酶等)可通过超滤膜, 从大分子配体中分离出来. 透过液可用截留相对分子质量较小的超滤膜进行浓缩, 而大分子配体经再生可循环使用. 与亲和层析操作一样, 经进料、杂蛋白清洗和目标蛋白洗脱步骤, 可得到纯度与亲和层析法相近的目标产品. 因此亲和过滤法既具有膜分离法易于放大、分离速度快的特点, 又具备亲和层析法选择性好、分离精度高的优势.

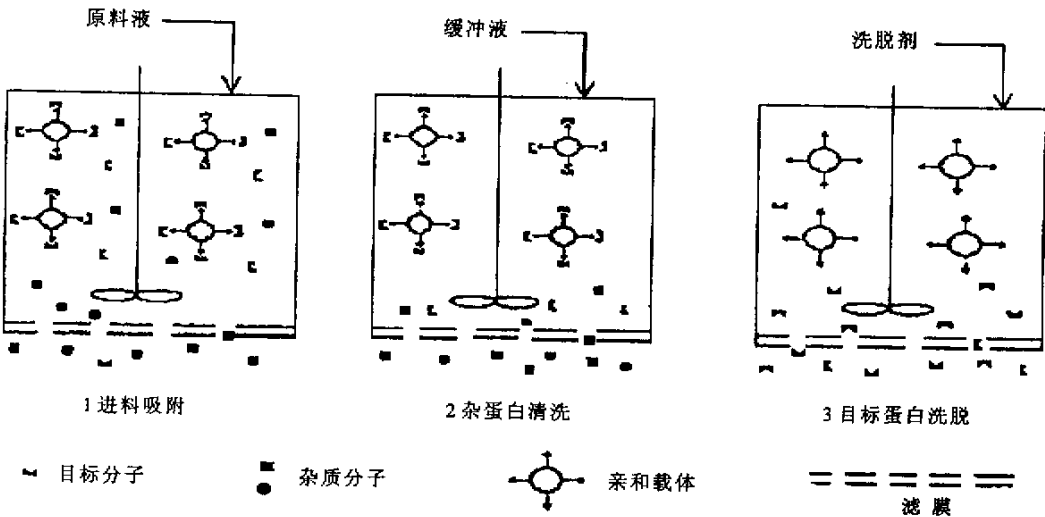


图 1 亲和过滤技术的原理图

Fig.1 The principle of affinity filtration

2 亲和-膜过滤过程的主要因素

亲和-膜过滤体系一般包括配体、载体和过滤膜. 亲和-膜过滤过程中, 决定生产率的两大因素为大分子的结合能力和超滤膜的透过速率. 选择合适的配体、载体以及合适孔径的超滤膜是亲和过滤技术的关键.

2.1 配体(配基)

大规模连续生产要求具有一定的吸附(亲和)和解吸的透过速率. 在吸附步骤, 虽然选用高结合能力的配体可提高吸附能力, 但高结合给下步解吸带来困难, 为此, 最好选用中等结合能力的配体. 同时为了提高吸附量, 配体必须有足够的接触面积(粒子尽可能小或呈多孔结构), 而且应该廉价、专一性强, 在亲和、洗脱条件下很稳定, 在高剪切力下

无损伤, 易回收, 无毒^[2].

2.2 载体

对配体较小的小分子物质, 则必须固定于载体表面. 目前亲和-膜过滤中大都将配基偶联于载体上. 因此, 亲和载体(affinity escort)是亲和-膜过滤的“主角”. 其结构为: 一个由对生物分子无特异吸附性的物质组成的内核以及内核表面上连接的某些特定基团, 这些基团必须对所提取的生物活性物质有一定的特异吸附性^[4]. 理想的载体在操作条件下其化学性质和机械性质应保持稳定, 对杂质没有非专一性吸附(或非专一性吸附很小), 易被配基修饰, 有足够大的亲和吸附容量. 从总体上分, 用于亲和过滤的载体可分为非水溶性载体和水溶性载体两大类.

非水溶性载体的种类较多, Mattiasson 等用热

杀死的酵母细胞为载体分离伴刀豆蛋白 A 是见诸较早的一篇报导。Mattiasson 等还以直径 $1 \sim 10 \mu\text{m}$ 的淀粉微粒为载体,以 cibacron blue 为配基,分离纯化乙醇脱氢酶。由于酵母细胞与哺乳动物具有相似的蛋白质合成机制,因此酵母细胞能正确表达和显示人类蛋白包括抗体。其次,酵母细胞是大分子,可以用来进行选择分离,所以可以用酵母细胞做配基来吸附被分离的蛋白质。Jennifer J. VanAntwerp 和 K. Dane Wittrup 等人利用酵母细胞进行亲和吸附分离抗蛋清溶菌酶(HEL)抗体^[5]。除酵母细胞外,人们对其它细胞用作载体的可能性亦进行了尝试。Chen 等用链球菌为载体,以其表面的蛋白质 G 为配基,分离纯化牛免疫球蛋白(IgG)^[3]。Chen 等利用肝素及蛋白质 A 所修饰的琼脂糖,分别纯化了牛乳铁蛋白及牛免疫球蛋白,所得产物纯度大于 90%^[6]。由于目标分子被吸附在非水溶性颗粒的表面,故欲增加载体的吸附容量,必须增大其比表面积。增大比表面积的途径之一是降低颗粒的直径。Ling 等利用直径为 12 nm 的硅胶为载体,比表面积可高达 $200 \text{ m}^2/\mu\text{g}$ 。除纳米硅胶外,使用多孔硅胶及其它多孔载体亦能有效地增大载体比表面积,此时需分析内扩散阻力对分离过程的影响,但此方面的研究尚未见报道。另一使用较多、具有较大比表面积的非水溶性载体为脂质体,它是磷脂的水悬浮液在超声波处理下形成的液泡状磷脂双分子膜,外层具有亲水性^[3]。Powers 等用十四碳酰磷脂酰胆碱(DMPC)和十四碳酰磷脂酰乙醇胺(DMPE)制得混合脂质体,直径在 $25 \sim 70 \text{ nm}$,比表面积可达 $100 \text{ m}^2/\text{cm}^3 \sim 240 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ ^[7]。脂质体作为亲和过滤载体的不足之处是稳定性较差,应用受到限制。孙彦等利用含共轭二炔结构的磷脂酰乙醇胺制备的聚合脂质体作为亲和过滤载体,同一般脂质体相比,载体的稳定性大大增强,在一定程度上克服了上述脂质体使用上的困难^[5]。

水溶性载体主要为可溶性高分子聚合物,由于其与目标分子的结合在单一相中进行,因而结合较不溶性载体更加迅速有效。常用的两种水溶性载体为葡聚糖和聚丙烯酰胺。Choe 等分别用 PAB 和大豆胰蛋白酶抑制剂(STI)为配基对葡聚糖进行修饰,并对各种耦联方法进行了比较,其中用 STI 为配基时,分离胰蛋白酶所得纯度为 81%。葡聚糖作为载体具有化学稳定性和热稳定性好的优点,并且具有较好的生物相容性。但葡聚糖存在一定程度的非专一性吸附,降低了产物的纯化效率。为克服葡聚糖存在非专一性吸附的缺点,Luong 等人用丙烯

酰胺为基质合成了水溶性聚丙烯酰胺载体。从胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶混合物中分离所得的胰蛋白酶纯度为 98%,收率为 90%。在连续操作过程中,于猪胰脏粗提液中可分离纯化得到纯度为 97%的胰蛋白酶,收率为 77%^[3]。

配基耦联配基修饰载体与目标分子的结合效率不仅取决于配基和载体的种类,而且受到耦联条件的影响。一般需考虑缓冲液种类、pH 值范围、配基浓度、耦联时间和反应温度等因素。Nakamura 等对此进行了详细探讨,分别研究了在 TSK 凝胶上耦联 STI、伴刀豆蛋白 A、蛋白质 A 的最佳条件。其中 pH 值的影响非常显著,例如,STI 在 pH 为 6 和 9 的条件下的最大耦联收率分别为 12% 和 100%^[3]。

2.3 亲和-膜过滤装置

亲和-膜过滤过程的早期研究大多集中在载体和配基的制备上,故操作方式较为简单,主要采用间歇操作。吸附、清洗、洗脱等步骤均在同一接触器中进行。典型的过滤装置有 Mattiasson 等分离伴刀豆蛋白 A 时使用中空纤维膜组件,进行错流过滤操作。另一常见装置为 Choe 等所用的平板膜过滤器。为充分发挥亲和过滤速度快、易于放大的优势,近年来人们对亲和过滤过程的连续化进行了研究。Afeyan 等首先提出了连续亲和循环提取(continuous affinity-recycle extraction 简称 CARE)的概念,并以微孔滤膜为过滤介质,以 PABTG 修饰的琼脂糖凝胶为载体,分离纯化了 B 半乳糖苷酶,该过程的吸附和洗脱分别在两个容器中进行,载体在两容器间循环,从而实现了连续操作。孙彦等将该过程扩展到使用超滤膜为过滤介质,可溶性聚合物或无孔微粒为载体的系统,建立了以目标分子的小分子配基为洗脱剂的 CARE 过程之数学模型,由此得出优化操作条件^[3,8]。HeL Z 等人也采用集总动力模型模拟亲和过滤过程,对样品注入、清洗污染、洗脱等步骤进行了优化,进一步表明亲和过滤技术对分离纯化蛋白质类物质是较为有效的^[9]。

亲和-膜过滤技术是在膜分离技术基础上发展起来的,在膜的选择、清洗方法、操作方式选择等方面与浓缩生物产品所采用的普通膜过滤技术无本质的差别。近年来,在增加膜的透过性能、改进操作方式以提高透过流速方面,已进行了大量的研究工作。Ghayeni 等人研制了反渗透膜,此类膜对细胞有一定的吸附作用^[10]。在超滤过程中添加酵母细胞后,酵母细胞可首先在过滤膜上形成一层动态膜,使得单体可通过而阻止蛋白质聚集成团,这样就不会使过滤膜污染,提高了分离效率。Vinod T. Ku-

berkar 和 Robert H. Davis 等人利用此法分离了牛血清蛋白(BSA),添加酵母细胞后 ,蛋白质得率提高 50%^[11].

3 亲和-膜过滤技术的应用

亲和-膜过滤技术研究的最早报导见于 1980 年 ,Patrick Hubert 等人将雌二醇作配基连接于水溶性载体 Dextran-T2000 ,用于从 *Pseudomonas testosteroni* 提取物中纯化酮醇异构酶 ,截留率为 90% ,但杂蛋白的截留率也较高 ,这可能是由于目标产物与杂蛋白形成复合物或配基与杂蛋白结合所致^[3]. Mattiasson B 等^[12]利用热杀死啤酒酵母细胞为载体 ,细胞表面的糖为配基 ,以 D-葡萄糖溶液(0. 8 mol/L)为洗脱剂 ,从刀豆(*Jack beans*)的粗提液中分离纯化伴刀豆球蛋白 A(Concanavalin A) ,得到收率为 70% 的高纯度的产品. Mattiasson B 等人^[13]还利用 Cibacron Blue 作为配基 ,固定到淀粉颗粒上 ,形成大分子配基 ,从酵母提取物中提取乙醇脱氢酶. 采用焚烧过的硅石为载体 ,制得 Cibacron Blue F3GA 型大分子配体 ,从啤酒酵母液中提取乙醇脱氢酶和猪心中提取乳酸脱氢酶. Luong J H T 等人^[14]用邻氨基苯甲脒为配基 ,连接在聚丙烯酰胺上 ,形成水溶性大分子配基(相对分子质量大于 1 000 000) ,用于从胰蛋白酶-胰凝乳蛋白酶混合液中提纯胰蛋白酶 ,收率为 90% ,纯度为 98% . 此外 ,还可用于 β -半乳糖苷酶、乳酸脱氢酶、辣根脱氢酶、IgG 等的分离提取^[4]. 亲和过滤技术的其他应用列于表 1.

综上所述 ,亲和过滤技术具有亲和层析和膜过滤的优点 ,不仅利用了生物分子的识别功能 ,而且操作简单、易于放大 ,是生物分离工程中的一项重要技术. 对亲和过滤进行的一系列研究的结果表明 ,亲和过滤技术具有较大的实际应用价值 ,其中载体的制备技术发展已较为成熟 ,但是 ,在过程设

计方面的研究还不够. 现有的亲和过滤法均局限于单级接触过程 ,吸附操作在全混釜型接触器中进行 ,只有一个吸附平衡级 ,相当于层析法的一个理论板. 其单板操作属性决定了难于同时获得较高产品纯度和回收率. 对结合常数较小 ,并且杂质含量较高的分离体系 ,尤其如此. 另外 ,虽然亲和过滤在分离纯化酶和蛋白质等生物大分子方面的优越性很多 ,但还有诸如减少非特异性吸附等问题尚待解决. 相信随着亲和过滤技术不断完善 ,在不远的将来会走上工业化应用之路.

表 1 亲和过滤的应用及亲和配基的使用
Tab. 1 Supporting materials and affinity ligands used for purifying of desired products by ACFF

载体	配体	纯化蛋白质	文献
右旋糖苷	对-氨基苯甲脒	胰岛素	7
琼脂糖珠	PABTG	β -半乳糖苷酶	15
右旋糖苷	胰岛素抑制剂	胰岛素	12
琼脂糖珠	蛋白 A	IgG	13
葡聚糖珠	伴刀豆球蛋白 A	山葵过氧化酶	13
葡聚糖珠	Cibacron Blue	HAS 溶解酵素	13
硅石微粒	Cibacron Blue	乙醇脱氢酶	14
脂质体	维生素 H	抗生素蛋白	16
脂质体	对-氨基苯甲脒	胰岛素	17
葡聚糖珠	肝磷脂	乳铁传递蛋白	18
葡聚糖珠	蛋白 G	牛 IgG	18
链球菌	细胞表面基团	牛 IgG	18
聚丙烯酰胺	间-氨基苯甲脒	尿激酶	19
多聚中空光纤维	组氨酸	IgG	20

注 PABTG 为对氨基苄-1-硫代- β -D-半乳酸吡喃糖苷琼脂糖 ,IgG 为免疫球蛋白.

参考文献 :

[1] 伍艳辉 ,王世昌. 亲和膜分离技术研究进展 [J]. 化工时刊 ,1997 ,11(8) 9 - 12.
[2] 曾宪放. 亲和潮滤技术及其在生物工程中的应用 [J]. 生命的化学 ,1991 ,11(6) 27 - 29.
[3] 何利中 ,孙彦. 亲和过滤技术研究进展 [J]. 化学工业与工程 ,1997 ,14(1) 30 - 35.
[4] 严希康. 生化分离技术 [M]. 上海 :华东理工大学出版社 ,1996.
[5] VANANTWERP ,JENNIFER J ,DANE WITTRUP K. Fine affinity discrimination by yeast surface display and flow cytometry [J]. *Biotechnology progresses* ,2000 ,16(1) 31 - 37.
[6] CHRISTIAN WEINER ,MARGIT SARA ,GAUTAM DASGUPTA. Affinity Cross-Flow Filtration :Purification of IgG with Novel Protein A Affinity Matrix Prepared from Two-Dimensional Protein Crystals [J]. *Biotechnol Bioeng* ,1994 ,44(1) 55 - 63.

[7] POWERS J D , KILPATRICK P K , CARBONELL R G. Trypsin purification by affinity binding to small unilamellar liposomes [J]. **Biotechnol Bioeng** ,1990 ,36 :506 – 519.

[8] 孙彦 ,徐晓燕. 配基修饰脂质体的制备及亲和分离胰蛋白酶的研究 [J]. **化工学报** ,1993 ,44 (3) :359 – 365.

[9] HE L Z , DONG X Y , SUN YAN. Modeling and Analysis of the Affinity Filtration Process [J]. **Biotechnology Progress** ,1998 ,14 (4) :594 – 600.

[10] GJAYENI S B. Adhesion of waste water bacteria to reverse osmosis membranes [J]. **Journal of Membrane Science** ,1998 (7) :29 – 42.

[11] KUBERKAR VINOD T , DAVIS ROBERT H. Modeling of fouling reduction by secondary membranes [J]. **Journal of Membrane Science** ,2000 ,168 (1) :243 – 258.

[12] MATTIASSEN B , RAMSTORP M. Ultrafiltration affinity purification :isolation of Concanavalin A from seeds of *Canavalia ensiformis* [J]. **J Chromatogr** ,1984 ,283 :323 – 330.

[13] HERAK D C , MERRILL E W. Affinity cross-flow filtration :experimental and modeling work using the system of HAS and Cibacron Blue-Agarose [J]. **Biotechnol Prog** ,1989 ,6 :9 – 17.

[14] MALE K B , LUONG J H T , NGUYEN A-L *et al.* Studies on the application of a newly synthesized polymer for trypsin purification [J]. **Enzyme Microb Technol** ,1987 ,9 :374 – 378.

[15] GABRIEL RAYA TONETTI , NORAL PEROTTI. Rapid screening of textile dyes employed as affinity ligands to purify enzymes from yeas [J]. **Biotechnol Appl Biochem** ,1999 ,29 :151 – 156.

[16] ADAMSDI-MEDDA D , NYUGEN P T , DELLACHERIE E. Biospecific ultrafiltration :a promise purification technique for protein [J]. **J Membrane Sci** ,1981 ,9 :337 – 342.

[17] PUNGOR E , AFEYAN P K , GORDON N F *et al.* Continuous affinity-recycle extraction :a novel protein separation technique [J]. **Bio Technology** ,1987 ,5 :604 – 608.

[18] CHOE T B , MASSE P , VERDIER A. separation of trypsin from trypsin α -chymotrypsin mixture by affinity ultrafiltration [J]. **Biotechnol Lett** ,1986 ,8 :163 – 168.

[19] HERAK D C , MERRILL E W. Affinity cross-flow filtration :some new aspect [J]. **Biotechnol Prog** ,1990 ,6 :33 – 40.

[20] BUENO SONIAM A , LEGALLAIS *et al.* Experimental kinetic aspects of hollow fiber membrane-based pseudobioaffinity filtration : process for IgG separation from human plasma [J]. **Journal of Membrane Science** ,1996 ,21 :45 – 56.

(责任编辑 杨 萌 朱 明)

江南大学发酵工程学科、食品科学学科
被评为国家级重点学科点

中华人民共和国教育部教研函(2002)2 号文件公布了重新审定的高等学校重点学科点 ,江南大学生物工程学院的发酵工程学科和食品学院食品科学学科 ,双双被评为国家级重点学科点。重点学科是根据国民经济建设和社会发展对高级专门人才的需求、科技发展的趋势和国家财力的可能 ,在高等学校择优确定并安排重点建设的学科。重点学科应在高层次人才培养、科学研究、赶超世界先进水平和提高我国国际竞争力等方面做出重要贡献 ,并在高等学校学科建设中起示范和带头作用。

万方数据