

乳腺生物反应器表达产物层析分离过程中介质的污染机理及其再生策略

孙西艳^{1,2}, 张焱², 李岩², 罗坚², 秦培勇¹, 苏志国²

1 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029

2 中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100190

摘要: 考察了磺胺基离子交换层析介质 (SP Sepharose FF) 在分离表达人乳铁蛋白的重组牛乳过程中的污染机理及其再生策略。通过层析原料及流分中各组分含量的检测分析, 发现牛乳中的脂类通过堵塞效应或疏水相互作用残留在层析柱上, 造成层析运行压力升高; 部分酪蛋白通过静电相互作用占据介质的配基位点, 导致介质的交换容量降低; 乳糖与介质之间无直接相互作用。连续层析运行次数的增加以及层析-再生时间间隔的延长, 均能导致残留组分和介质之间的相互作用逐渐增强, 最终影响介质的再生效率。使用 NaOH 进行及时清洗, 可以有效地清除柱上残留的脂类和蛋白, 恢复离子交换介质的层析性能和微观形态。

关键词: 乳腺生物反应器, 重组牛乳, 离子交换介质, 污染机理, 再生策略

Contamination mechanism and regeneration strategies of chromatographic resin in separation process for expression product from mammary gland bioreactor

Xiyan Sun^{1,2}, Yan Zhang², Yan Li², Jian Luo², Peiyong Qin¹, and Zhiguo Su²

1 College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

2 National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: This study focused on the contamination mechanism and regeneration strategies of sulfopropyl ion exchange resin (SP Sepharose FF) during the separation of recombinant human lactoferrin from transgenic bovine milk. We analyzed primary constituents' contents in chromatographic material and fractions. The results showed that the lipid in milk can clog the column or adhere to the resin through hydrophobic interaction, leading to an increase in column pressure. Some casein molecules were found to adsorb onto the resin through electrostatic interaction, therefore the adsorption capacity was decreased. There was no

Received: March 24, 2011; **Accepted:** May 26, 2011

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA100506), National Natural Science Foundation of China (No. 20706052).

Corresponding author: Yan Zhang. Tel/Fax: +86-10-82627062; E-mail: yzhang@home.ipe.ac.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA100506), 国家自然科学基金 (No. 20706052) 资助。

direct interaction between lactose and the resin in the chromatographic process. Increased continuous chromatographic cycles and prolonged time interval between protein purification and column regeneration could enhance the undesirable interaction between the contaminants and resin, thus lowering the regeneration efficiency. NaOH was found to be effective in the removal of lipid and casein molecules from the column. Furthermore, normal microstructure and chromatographic performance of the ion exchanger was recovered after this cleaning procedure.

Keywords: mammary gland bioreactor, recombinant bovine milk, ion exchange resin, contamination mechanism, regeneration strategies

乳腺生物反应器技术具有表达量高^[1]、成本低廉^[2]、表达产物活性高^[3]等诸多优点,已经成为生物反应器研究中最具有发展前景的领域^[4-5],但其表达产物的分离纯化步骤依然是制约该技术产业化的瓶颈^[6]。重组动物乳液成分非常复杂,含有大量的酪蛋白胶体、脂类颗粒以及乳糖等多种杂质,目前规模化的乳液预处理操作难以彻底去除颗粒杂质,从而给重组蛋白的层析操作带来了严峻的挑战。在我们前期的工作^[7]中,已经成功地利用离子交换层析从重组牛乳中分离纯化得到重组人乳铁蛋白(Recombinant human lactoferrin, rHLF)。然而在中试规模的纯化工艺中,原料液中残余的颗粒杂质容易对层析介质造成严重的污染,导致后续的分层析中操作压力升高^[8]、吸附容量降低^[9]、介质寿命大幅缩短^[10],从而给重组蛋白的生产带来了不利的影响。

由于乳腺生物反应器尚未被大规模应用,有关重组蛋白分离纯化的研究非常少见,目前能供参考的是从常规牛乳中分离天然乳清蛋白的文献报道。在这些报道中,研究者在层析前利用离心^[11]或膜过滤^[12]等预处理技术去除颗粒物质,获得澄清的乳清料液以避免对介质的污染。然而,规模化生产中的离心设备价格较高,操作繁琐,不利于实现自动化生产;在膜过滤的操作中,剪切力容易导致蛋白的变性、失活^[13],从而造成目标蛋白的工艺回收率较低^[14-16];此外,有研究者^[17]使用扩张床层析技术直接分离混浊的牛乳体系,取得了一定的成果,但扩张床的清洗程序异常繁琐,且容易对层析介质造成损伤,因此尚未得到广泛的应用。

针对上述问题,我们提出了新的应对策略,即

通过层析介质污染机理以及洗涤方式的考察,建立新型的介质再生工艺,从而有效地恢复污染介质的层析性能,延长介质使用寿命,降低重组蛋白分离纯化的工艺成本。在本文中,我们选择表达 rHLF 的重组牛乳作为模型体系,考察粗分离乳清料液在离子交换层析过程中对介质的污染机理和规律,并在此基础上进一步研究介质的清洗条件得到相应的再生策略。

本文通过考察层析污染前后介质交换容量、操作压力的变化规律,评估了污染介质层析性能的变化情况;通过检测计算在不同的处理条件下层析柱上残留组分的种类和数量,揭示了重组牛乳中 3 种主要成分(蛋白、脂类和乳糖)在污染过程中与介质的相互作用机理;最终,通过洗涤剂种类、再生频率和层析-再生时间间隔的考察,建立了离子交换介质的再生策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 转基因牛乳冻干粉

由中国农业大学农业生物技术国家重点实验室提供。

1.1.2 阴离子交换介质

SP Sepharose FF 购自 GE Healthcare 公司(美国)。

1.1.3 试剂

牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)购自 Roche 公司(德国);脂类检测试剂盒购自北京北化康泰临床试剂有限公司;化学试剂均为国产

分析纯试剂; 所用纯水由 Milli Q-plus 超纯水机制备 (Millipore, 美国)。

1.1.4 仪器

常压层析系统: ÄKTA purifier 购自 GE Healthcare 公司 (美国); 高速台式离心机: TGL-16M 购自湘仪离心机仪器有限公司; 紫外分光光度仪: Ultrospec 2100 pro 购自 GE Healthcare 公司 (美国); 玻璃层析柱: BPG™ 140/500 购自 GE Healthcare 公司 (美国); 电泳仪: Mini-PROTEAN Tetra System 购自 Bio-Rad 公司 (美国); 恒温循环加热槽: SY-X 购自巩义市予华仪器有限责任公司; 冷场发射扫描电子显微镜: JSM-6700F 购自日本电子株式会社。

1.2 实验方法

1.2.1 重组牛乳预处理

转基因牛乳冻干粉用 48 °C 水溶解后, 120 目振筛过滤去除漂浮的脂类颗粒和不溶物, 使用 1 mol/L HCl 调节物料 pH 至 4.6, 静置 20 min, 振筛过滤去除酪蛋白颗粒得重组乳清。部分实验在此基础上将物料进行座式离心操作以去除残留脂类和酪蛋白, 离心力 10 000×g, 时间 30 min。

1.2.2 离子交换层析

SP 介质装柱 (13 cm×10 mm I.D., 柱体积 (Column volume, CV) =10 mL) 后连接到常压层析系统; 使用 Buffer A (20 mmol/L PB, pH 6.0) 平衡 2 个柱体积后进样, 进样完成后继续使用 Buffer A 淋洗至 UV 基线水平, 收集穿透峰; 使用 Buffer B (20 mmol/L PB+1 mol/L NaCl, pH 8.0) 洗脱, 收集洗脱峰, 流速 1 mL/min, 检测波长 280 nm。

1.2.3 介质再生

将污染后的介质抽干后置于锥形瓶中, 加入适量洗脱剂 (包括 1 mol/L NaOH、30% 异丙醇、8 mol/L 脲、6 mol/L 盐酸胍、1% Triton X-100 等), 密封后置于恒温水浴中振荡 12 h, 5 000 r/min 离心 10 min 取上清, 检测上清中蛋白质、油脂、乳糖的含量,

测定洗脱后介质的配基密度。

1.3 检测方法

1.3.1 蛋白质含量测定

蛋白质浓度参照 Bradford 法测定^[18], 根据 BSA 的标准曲线计算得原料及各层析峰中的蛋白含量。

1.3.2 脂类含量测定

待测样品与检测工作液以 1:100 比例混匀, 37 °C 保温 5 min, 测定在 500 nm 下的吸收值, 并根据标准曲线计算脂类浓度。

1.3.3 乳糖含量测定

待测样品 1 mL 与 1 mL 纯水、1.5 mL 3, 5-二硝基水杨酸试剂混匀, 在沸水浴中加热 5 min, 取出后立即放入盛有冷水的烧杯中冷却至室温, 加入 21.5 mL 蒸馏水混匀, 检测 520 nm 波长下的吸收值, 根据标准曲线计算样品中相应乳糖浓度。

1.3.4 配基密度的测定

待测介质装柱后使用 10 倍 CV 的去离子水清洗, 分别用 4 倍 CV 0.5 mol/L HCl、3 倍 CV 1 mmol/L HCl 和 5 倍 CV 的去离子水淋洗; 使用 4 倍 CV 1 mol/L NaCl 置换酸液并用 5 倍 CV 去离子水淋洗, 收集酸液和淋洗液并加入酚酞指示剂, 使用标准氢氧化钠滴定, 按公式 1 计算交换容量。在测定过程中控制流速, 确保淋洗试剂与介质接触时间大于 30 min。

$$C_1 = \frac{C_{NaOH} \times V_{NaOH}}{V_{resin}} \quad (1)$$

1.3.5 柱压检测

SP 层析柱 (13 cm×10 mm I.D., CV=10 mL) 连接常压层析系统, 测定不同流速下的柱压, 绘制压力曲线。

1.3.6 扫描电镜

介质冷冻干燥后, 对冻干粉镀金, 镀金时间 5 min, 工作电流 4 mA; 在 25 kV 的加速电压、5 mm 工作距离下对介质样品进行检测。

2 结果与分析

除重组表达的目标蛋白外,重组牛乳和天然牛乳的成分基本相似,主要包括蛋白、脂类和乳糖等。牛乳中总蛋白含量约为 34 g/L,其中 80% 以上的蛋白为粒径范围在 100~300 nm,均匀悬浮的酪蛋白胶束;脂类浓度约为 37 g/L,其中 95% 以上的脂类以甘油三脂的形式存在;乳糖为牛乳中主要的单糖组分,浓度约为 46 g/L^[19]。在重组蛋白的纯化中,首先需要通过预处理去除酪蛋白和脂类杂质获得乳清,进行后续的纯化步骤。然而在工业化规模的纯化生产中,预处理步骤往往难以彻底去除这些颗粒物,从而导致在后续的层析过程中对介质造成污染。

本文首先考察了污染过程对离子交换介质层析性能(柱压、配基密度和载量)的影响,并据此制订介质再生的工艺目标;接下来,通过层析前后物料体系成分检测和计算研究乳清中几种主要组分(脂类、蛋白和乳糖)与离子交换介质的相互作用机理,为再生工艺提供理论支持和指导;最终,通过洗脱剂种类和再生程序的考察,制订了针对重组牛乳污染层析介质的再生策略。

2.1 离子交换介质污染前后的性能表征

乳清物料的污染对介质层析性能有显著影响,包括介质的配基密度、载量以及层析柱的操作压力等,这些性能的改变会严重影响层析分离的效率。层析柱压过高会压缩介质间缝隙,损毁介质颗粒,甚至进一步加剧污染程度;另外,污染可能导致配基密度和载量降低,从而降低纯化工艺的产率。

2.1.1 柱压

在层析过程中,随着物料中颗粒组分在层析柱上的堆积,介质颗粒之间的孔道逐渐被堵塞,从而导致柱压升高。本文比较了经多次层析的污染介质与新介质装柱后的流速-柱压曲线,结果如图 1 所示,多次层析后的污染介质柱压曲线明显高于新介质。

当流速低于 7 mL/min 时,新介质的层析柱压始终低于检测下限;流速达到 29 mL/min 时,柱

压达到介质的最大耐受压力(0.3 MPa)。污染介质装填的层析柱在 4 mL/min 流速时出现反压,当流速达到 23 mL/min 时即达到介质的最大耐受压力。总之,粗分离乳清进行多次层析会对层析介质造成比较严重的污染,导致层析柱的柱压大幅度升高。在工业规模的层析过程中,柱压的升高可能会严重地限制层析流速,成为快速自动化生产的瓶颈步骤。

2.1.2 配基密度和载量

交换容量是离子交换介质重要的性能指标,可以通过介质的配基密度和载量进行表征。本文测定了新介质经 5 次层析后介质的配基密度和载量,由结果(图 2)可知,介质的配基密度和载量均随层析污染次数的增加逐渐降低。经过 5 次层析污染之后,介质的配基密度从 0.175 降低到 0.112 mol/L,目标蛋白(rHLF)的吸附载量从 55 g/L 降低到 43 g/L,从而对重组蛋白的层析分离过程造成了不利的影 响。污染过程中可能造成介质交换容量降低的原因很多,为通过再生有效地恢复层析介质的交换容量,在章节 2.2 和 2.3.1 中详细考察了乳清中不同组分与介质的相互作用机理,从而为再生策略的制订提供理论参考。

综上所述,同新介质相比污染介质层析的柱压升高,配基密度和载量均大幅度降低,给重组蛋白的生产带来了不利的影 响,希望能够通过再生尽可

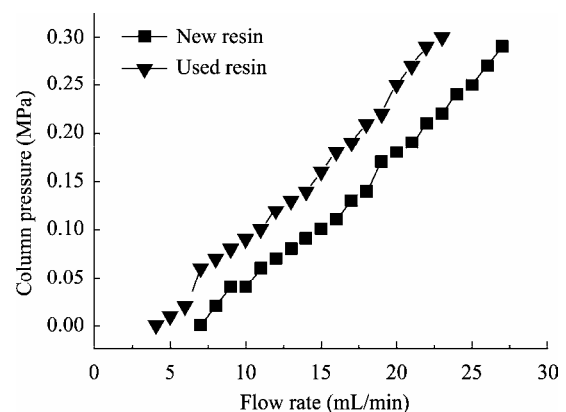


图 1 新旧介质的流速-柱压曲线比较

Fig. 1 Comparison of pressure curves upon flow rate between new and used resin. Column size: 13 cm×10 mm I.D., Column volume=10 mL.

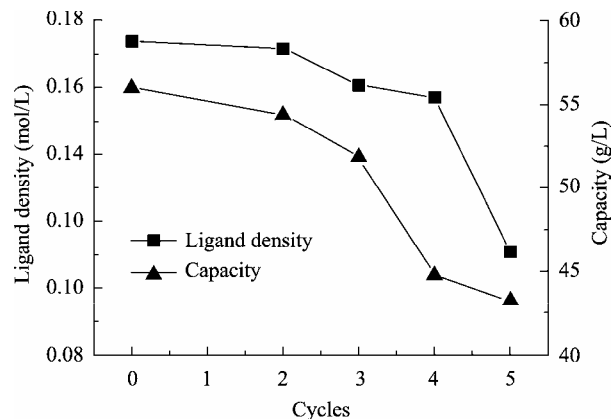


图2 SP Sepharose FF 介质配基密度及载量随污染次数的变化

Fig. 2 Ligand density and capacity curves of SP Sepharose FF upon cycles.

能恢复柱压、配基密度和载量等性能指标, 延长介质的使用寿命。

2.2 重组乳清主要组分与介质的相互作用

在层析过程中, 乳清物料中的组分与离子交换介质之间存在多途径的相互作用。首先, 由于预处理不当导致乳清中残留的大颗粒物质 (如脂类和酪蛋白胶束) 容易在后续(layer)过程中堵塞层析介质颗粒之间的空隙; 其次, 商用琼脂糖介质 (Fast Flow 系列) 经过交联反应后表面疏水性增强^[20], 因此乳清中脂类以及部分蛋白与介质之间可能存在疏水相互作用; 再次, 乳清中的部分蛋白同磺酸基之间存在静电相互作用。为了确定这些组分与介质的相互作用机理, 本文分析比较了两套预处理工艺所得乳清原料对介质的污染数据。

重组牛乳经加热脱脂、酸性沉淀去除酪蛋白以及振筛过滤得粗分离乳清料液, 记为乳清 I; 乳清 I 经过进一步的高速离心可得相对澄清的料液, 记为乳清 II。本文通过乳清 I 和 II 的理化性质以及层析污染行为的比较, 探讨了不同组分与介质之间的相互作用机理。

2.2.1 脂类

通过分析测定了乳清 I 和 II 的浊度、各组分 (蛋白、脂类和乳糖) 浓度以及层析吸收峰中的组分

浓度, 并据此计算在高盐洗脱后仍残留在层析柱上的各种组分量, 结果如表 1 所示, 乳清 I 的浊度以及蛋白、脂类浓度均高于乳清 II, 两者的乳糖浓度区别不大。层析进样并经高盐洗脱之后, 两者均有部分脂类物质无法彻底洗脱而残留在层析柱上, 但乳清 II 中脂类的柱上残留量明显低于乳清 I。

离心操作可以有效降低脂类物质含量^[21-22], 避免其堵塞层析介质间的缝隙。但乳清 II 层析后仍然有部分脂类吸附在层析介质上, 据推测这是由于脂类和经交联的琼脂糖介质之间存在一定的疏水相互作用从而残留在层析柱上; 乳清 I 中的脂类含量较高 (4.6~6.1 mmol/mL), 这是由于过滤操作无法彻底去除原料中的脂类颗粒, 这些大颗粒可能堵塞在介质间缝隙中无法洗脱, 进而造成柱上脂类残留率较高, 下文对污染介质的微观表征结果 (图 9) 也可以证实该观点。

2.2.2 蛋白

分别使用乳清 I 和 II 进行层析操作, 洗脱后层析柱上的蛋白残留率同样存在明显的规律 (表 1)。由于没有明显的颗粒堵塞效应, 在分离乳清 II 的层析柱上基本没有蛋白残留, 这说明乳清中的小分子蛋白同介质之间并不存在难以洗脱的强吸附力; 分离乳清 I 的层析柱上蛋白残留比较明显, 这是由于原料中的脂类颗粒堵塞介质缝隙, 进而导致原料中未被彻底去除的酪蛋白颗粒协同堵塞, 无法顺利洗脱所致。据计算两种乳清原料中蛋白量的差值与乳清 II 残留在柱上的蛋白量基本相等, 该结果可以进一步证实上述猜测, 即残留在柱上的蛋白为粒径相对较大的酪蛋白胶束分子。

值得说明的是, 尽管酪蛋白起初是通过协同堵塞效应残留在层析柱上, 但随着层析介质污染和放置时间的延长, 蛋白与介质之间相互作用类型会发生转变, 从而占据介质的配基位点, 详见 2.3.1 中的讨论部分。

2.2.3 乳糖

乳糖是不带电荷的小分子物质, 但在部分批次的层析实验中 (表 1) 仍有乳糖残留在柱上, 推测可

表 1 乳清组分-介质之间相互作用

Table 1 Interaction between whey components and resin

Raw material	Absorbance of whey (A_{570})	Lipid concentration in whey (mmol/mL)	Residual rate of lipid on column (%)	Protein concentration in whey (mg/mL)	Residual rate of protein on column (%)	Lactose concentration in whey (mg/mL)	Residual rate of lactose on column (%)
Whey I	1.060	6.1	79.8	7.2	19.4	34.1	17.1
	1.128	4.6	72.3	7.4	14.3	26.1	-
Whey II	0.652	1.7	32.4	6.3	*	32.1	-
	0.613	1.9	32.1	6.5	-	28.1	-

*Under detection limit

能是由于乳清 I 中脂类或酪蛋白颗粒的堵塞效应过于显著, 从而导致少量乳糖随之滞留在层析柱上。为证实该观点, 进行空白层析实验, 即以乳糖溶液代替乳清进行层析操作, 分别收集穿透组分和洗脱组分, 通过检测计算乳糖在柱上的残留率, 计算结果如表 2 所示, 空白层析操作时绝大部分乳糖均穿透, 经洗脱后的在柱上无残留, 表明乳糖与介质之间并没有直接的相互作用力, 实际层析过程中乳糖在柱上的残留应该是介质空隙大量堵塞造成的。

表 2 空白层析中各组分的乳糖含量

Table 2 Lactose contents in segments during blank chromatography

Sample	Mass (mg)	Percentage (%)
Loading lactose	4720.9	100.00
Penetrating segment	4718.8	99.96
Eluting segment	2.1	0.04
Calculation of leftover	0.0	0.00

总之, 脂类与 SP Sepharose FF 之间存在一定程度的疏水相互作用, 粒径较大的脂类颗粒容易堵塞介质缝隙, 从而进一步导致酪蛋白和乳糖滞留在层析柱上, 因此, 再生工艺应选择能够有效地洗脱脂类和蛋白的洗脱剂进行介质的清洗。

2.3 再生策略

已污染介质的再生效果受到多种因素的影响, 例如再生剂类别、介质使用次数以及层析与再生之间的时间间隔等, 本文对以上因素对再生效果的影

响进行了考察, 并据此制定了相应的再生策略。

2.3.1 再生剂类别

本文主要考察了几种常用的洗脱剂 (1 mol/L NaOH、30% 异丙醇、8 mol/L 脲、6 mol/L 盐酸胍和 1% Triton X-100) 对污染介质上的残留组分的洗脱能力, 根据静态洗脱上清中的残留组分浓度评价它们的再生效果。如图 3 所示, 盐酸胍和 Triton X-100 能够有效地清洗残留脂类, 但对蛋白的洗脱效果不佳; NaOH 可以同时有效地洗脱 3 种残留组分, 可作为优选的洗脱剂。

此外, 由再生介质的配基密度的测定结果 (图 4) 可知, NaOH 再生可以使配基密度恢复到新介质的水平, 而盐酸胍再生后的介质的配基密度仍然较低。结合 NaOH 和盐酸胍对蛋白、脂类组分的洗脱效果 (图 3) 可知, 尽管脂类在柱上大量残留, 但屏蔽 SP 介质吸附位点的组分应该是残留的酪蛋白。如前所述, 酪蛋白在层析过程起始阶段应该是由于堵塞效应残留在柱上, 但由于酪蛋白是大颗粒两性分子, 随着时间的推移, 部分残留酪蛋白表面荷正电区域可以同磺酸基之间发生静电相互作用, 从而降低介质的交换容量, 与此同时残留蛋白与介质间的吸附变得更加牢固, 难以洗脱。

2.3.2 层析-再生的间隔时间

将介质分别在层析后放置 12 h 以及 2、15、30 d 并加入 1 mol/L NaOH 进行再生, 配基密度检测结果 (图 5) 表明, 随着间隔时间的延长, 再生效果逐渐

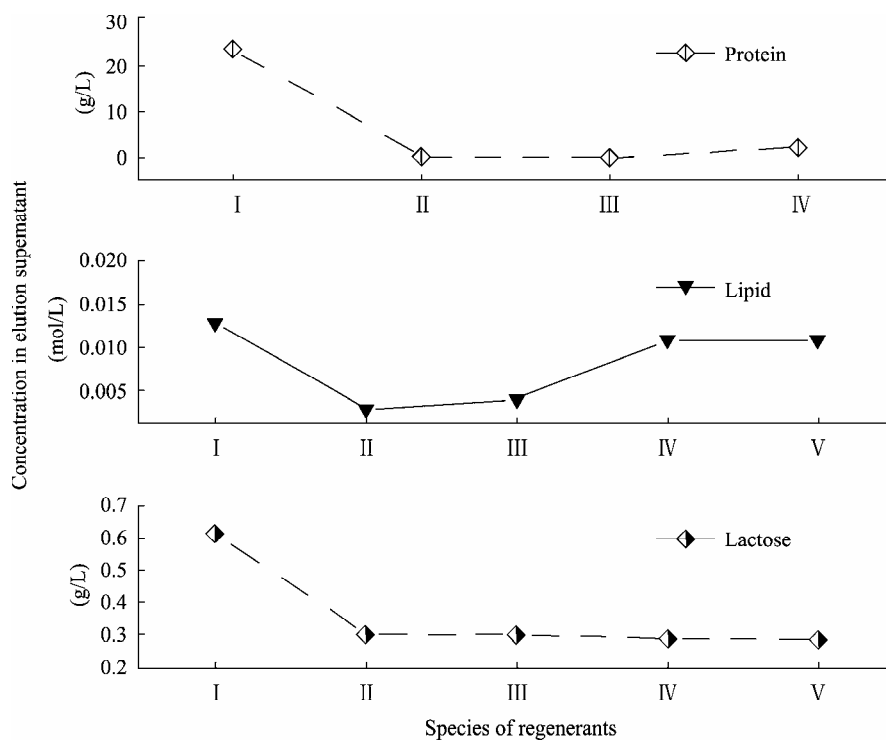


图 3 不同再生剂对残留组分的洗脱效果

Fig. 3 Elution effect of regenerants upon hangovers. I: 1 mol/L NaOH; II: 30% Isopropyl alcohol; III: 8 mol/L Urea; IV: 6 mol/L Guanidine hydrochloride; V: 1% Triton X-100.

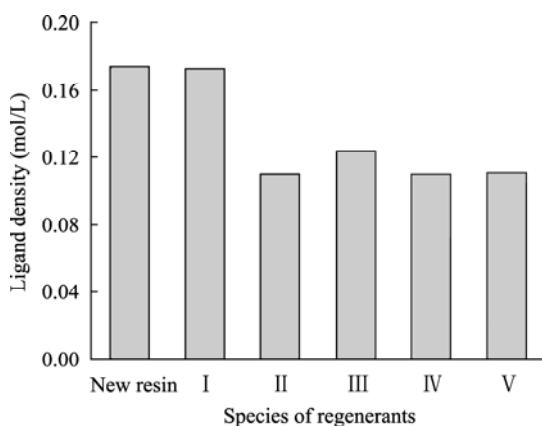


图 4 不同再生剂对污染后介质配基密度的再生影响

Fig. 4 Effect of regenerants species on regeneration of ligand density. I: 1 mol/L NaOH; II: 30% Isopropyl alcohol; III: 8 mol/L Urea; IV: 6 mol/L Guanidine hydrochloride; V: 1% Triton X-100.

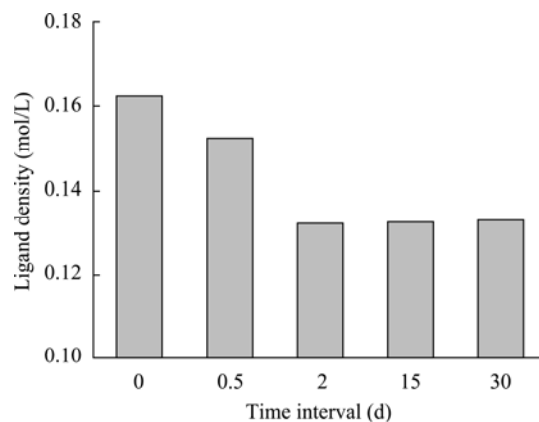


图 5 层析-再生时间间隔对对再生效果的影响

Fig. 5 Effect of chromatography-regeneration intervals on regeneration.

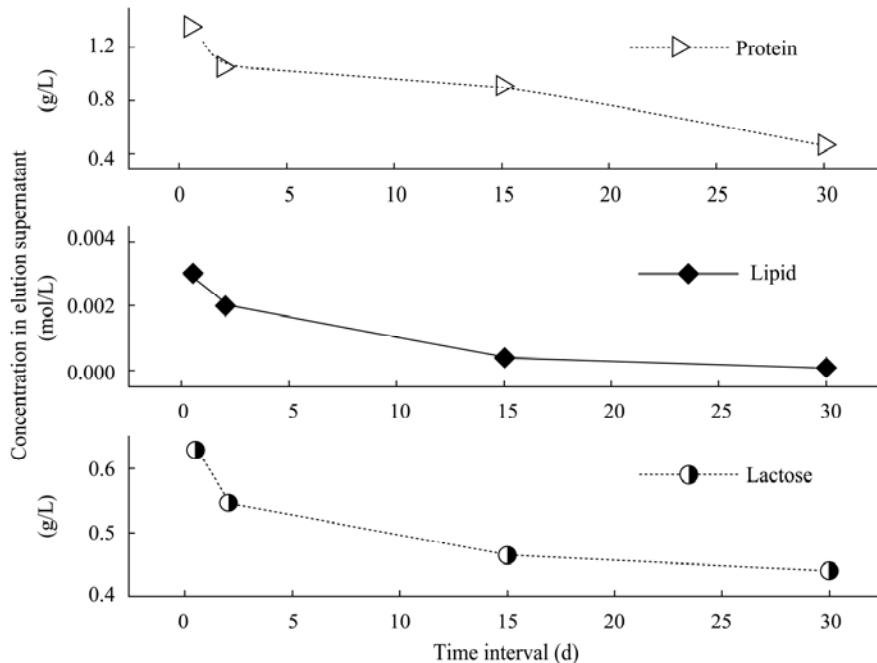


图6 层析-再生时间间隔对蛋白质、油脂、乳糖洗脱效果的影响

Fig. 6 Effect of chromatography-regeneration intervals on elution of protein, lipid, lactose.

降低。这可能是由于在污染介质放置期间，残留组分与介质在热力学驱动力作用下形成最牢固的复合物，从而更加难以洗脱。洗脱液中残留组分含量的测定(图6)可以证实这一猜测，随着层析-再生的间隔时间的延长，洗脱液中脂类、蛋白和乳糖的含量均逐步减低。总之，在层析后应尽快进行再生操作(间隔时间不宜超过12h)以实现最佳再生效果。

2.3.3 介质使用次数

分别将经过1、2、4和8次层析的介质抽干并加入1 mol/L NaOH进行再生，再生后配基密度的测定结果如图7所示，层析次数 ≤ 2 次时NaOH的再生可以将配基密度恢复到污染前的水平，当介质使用次数大于2次时再生效果明显降低。这表明在介质污染程度较轻的情况下，残留组分容易被洗脱下来；层析次数的增加能够促使残留组分与介质之间的吸附更加牢固，甚至可能发生不可逆吸附，从而导致再生难度增大。

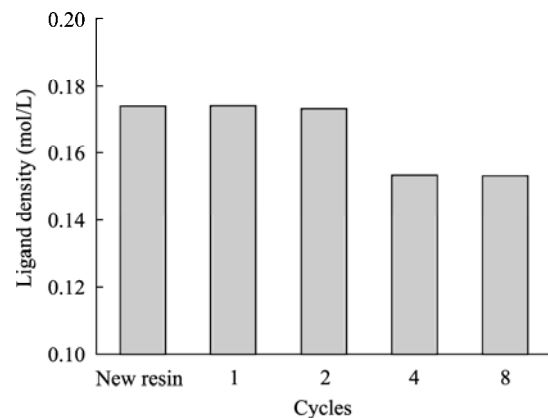


图7 介质污染次数对再生效果的影响

Fig. 7 Effect of cycles on regeneration.

表3 再生介质与新介质层析性能比较

Table 3 Comparison of chromatography performance between new and regenerated resin

	New resin	Regenerated resin
Ligand density (mol/L)	0.178	0.175
Capacity of rHLF (g/L)	55.2	53.5
Recovery of rHLF (%)	86.5	89.1
Purity of rHLF (%)	97.5	98.0

2.3.4 再生介质的层析性能及微观表征

使用上述策略对层析污染介质进行再生, 测定再生后介质的配基密度和载量, 结果如表 3 所示, 再生后介质的配基密度和载量均能恢复到接近新介质的水平; 在相同条件下进行层析分离, rHLF 的工艺回收率和产品纯度与新介质相比无显著差异。此外, 再生后的层析柱压明显降低, 与新介质的柱压曲线比较接近 (图 8)。

通过扫描电镜分别对新介质、污染介质以及再生后的介质通过扫描电镜进行微观表征, 结果如图 9 所示, 污染后的介质颗粒 (图 9B) 间黏附堵塞了大量形状不规则的污染物, 部分颗粒因污染物的黏附造成形状和表面形态不规则; 再生后的介质 (图 9C) 颗粒间无杂质堵塞, 球体表面光洁, 基本无黏附物, 同新介质 (图 9A) 的微观形态类似。

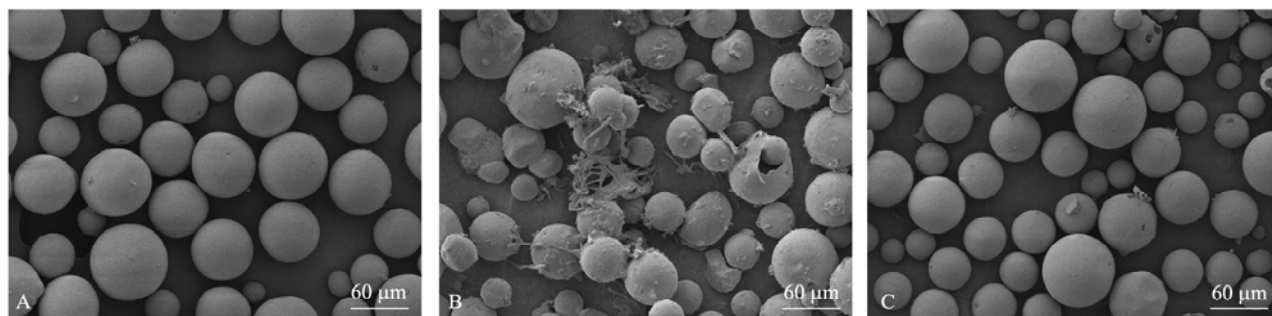


图 9 新介质及污染前后介质的扫描电镜照片

Fig. 9 SEM image of new, contaminated and regenerated resin. (A) New resin. (B) Contaminated resin. (C) Regenerated resin.

3 结论

乳腺生物反应器表达的重组牛乳物料层析过程会严重地污染 SP 离子交换层析介质, 导致其吸附载量下降, 柱压升高。乳清中各组分与介质之间的吸附机理各不相同, 脂类与介质之间存在一定的疏水相互作用, 但大多数脂类颗粒是通过黏附作用堵塞介质颗粒之间缝隙, 从而造成柱压升高;

总之, 本文的介质再生策略可以有效地清洗粗分离重组乳清污染的层析介质, 去除层析柱上残留的脂类和酪蛋白颗粒, 再生后介质的层析性能和微观形态与新介质接近。

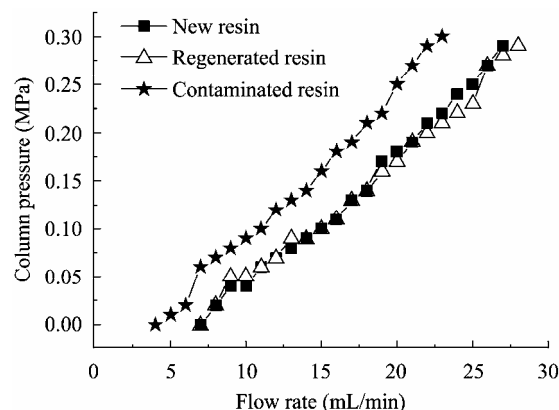


图 8 新介质、污染介质和再生后介质的流速-柱压曲线比较
Fig. 8 Comparison of pressure curves upon flow rate among new, contaminated and regenerated resin. Column size: 13 cm×10 mm I.D., CV=10 mL.

在脂类物质堵塞效应较严重时, 酪蛋白颗粒会协同堵塞并残留在层析柱中, 随污染时间延长, 酪蛋白荷正电区域能够与介质配基相结合, 造成介质交换容量降低; 乳糖同介质之间没有直接相互作用。再生策略的考察表明, 1 mol/L NaOH 可以比较彻底地清洗柱上残留的脂类和蛋白, 最大限度地恢复介质交换容量; 残留组分与介质之间的吸附随层析-再生的时间间隔逐渐增强, 当间隔时间超过 12 h 后,

再生效果大幅度降低;连续2次层析之后应该及时进行介质再生,否则介质交换容量难以得到有效的恢复。

REFERENCES

- [1] Clark AJ. The mammary gland as a bioreactor: expression, processing, and production of recombinant proteins. *J Mammary Gland Biol*, 1998, 3(3): 337–350.
- [2] Morcöl T, Akers RM, Johnson JL, et al. The porcine mammary-gland as a bioreactor for complex proteins. *Ann NY Acad Sci*, 1994, 721: 218–233.
- [3] Rosen JM, Li S, Raught B, et al. The mammary gland as a bioreactor: factors regulating the efficient expression of milk protein-based transgenes. *Am J Clin Nutr*, 1996, 63: S627–S632.
- [4] Zhang YQ. Application and progress in research of animal mammary gland bioreactor. *Chin J Biol*, 2009, 22(3): 309–312.
- [5] Shen W, Yang ZT, Deng JX. Production of mammary gland bioreactor by gene targeting of somatic cells. *Chin J Biotech*, 2003, 19(6): 767–770.
- [6] Zhang Y, Luo J, Bi JX, et al. Efficient separation of homologous α -lactalbumin from transgenic bovine milk using optimized hydrophobic interaction chromatography. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(23): 3668–3673.
- [7] Bai Q, Zhang Y, Wang YJ, et al. Purification and characterization of recombinant human lactoferrin expressed in a cattle mammary bioreactor. *Chin J Biotech*, 2010, 26(11): 1576–1583.
白倩, 张焱, 汪音爵, 等. 乳腺生物反应器表达的重组人乳铁蛋白的分离纯化及性质研究. *生物工程学报*, 2010, 26(11): 1576–1583.
- [8] Victory D, Nesterenko P, Paull B. Low-pressure gradient micro-ion chromatography with ultra-short monolithic anion exchange column. *Analyst*, 2004, 129(8): 700–701.
- [9] Siu SC, Baldascini H, Hearle DC, et al. Effect of fouling on the capacity and breakthrough characteristics of a packed bed ion exchange chromatography column. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2006, 28(6): 405–414.
- [10] Xu QJ, Huang JX. Regeneration of high performance ion exchange chromatographic column in protein separations and purifications. *Chin J Anal Chem*, 2000, 28(1): 46–49.
徐其进, 黄骏雄. 蛋白质分离与纯化过程中高效离子交换色谱柱的再生. *分析化学研究简报*, 2000, 28(1): 46–49.
- [11] Haza AI, Morales P, Martin R, et al. Immunoreactivity of goat's milk casein fractionated by ion-exchange chromatography. *J Agric Food Chem*, 1995, 43(8): 2025–2029.
- [12] Fee CJ, Chand A. Design considerations for the batch capture of proteins from raw whole milk by ion exchange chromatography. *Chem Eng Technol*, 2005, 28(11): 1360–1366.
- [13] Sanchez C, Beauregard JL, Bimbenet JJ, et al. Flow properties, firmness and stability of double cream cheese containing whey protein concentrate. *J Food Sci*, 1996, 61(4): 840–843.
- [14] Wang W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm*, 1999, 185(2): 129–188.
- [15] Baldwin RL. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophys J*, 1996, 71(4): 2056–2063.
- [16] Lin FY, Chen WY, Hearn MTW. Microcalorimetric studies on the interaction mechanism between proteins and hydrophobic solid surfaces in hydrophobic interaction chromatography: effects of salts, hydrophobicity of the sorbent, and structure of the protein. *Anal Chem*, 2001, 73(16): 3875–3883.
- [17] Fee CJ, Chand A. Capture of lactoferrin and lactoperoxidase from raw whole milk by cation exchange chromatography. *Sep Purif Technol*, 2006, 48(2): 143–149.
- [18] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [19] Jensen RG. *Handbook of Milk Composition*. San Diego: Academic Press, 1995: 3.
- [20] Hjertén S, Wu BL, Liao JL. An high-performance liquid chromatographic matrix based on agarose cross-linked with divinyl sulphone. *J Chromatogr*, 1987, 396: 101–113.
- [21] Dimeski G, Jones BW. Lipaemic samples: effective process for lipid reduction using high speed centrifugation compared with ultracentrifugation. *Biochimica Medica*, 2011, 21(1): 86–92.
- [22] Oliveira RC, Barros STD, Gimenes ML, et al. Comparison between centrifugation and microfiltration on the clarification of passion fruit juice. *Acta Sci: Tech*, 2010, 32(3): 271–278.