

HIGH QUALITY & EXPERT

慧德易电子期刊

H&E Electronic Journal

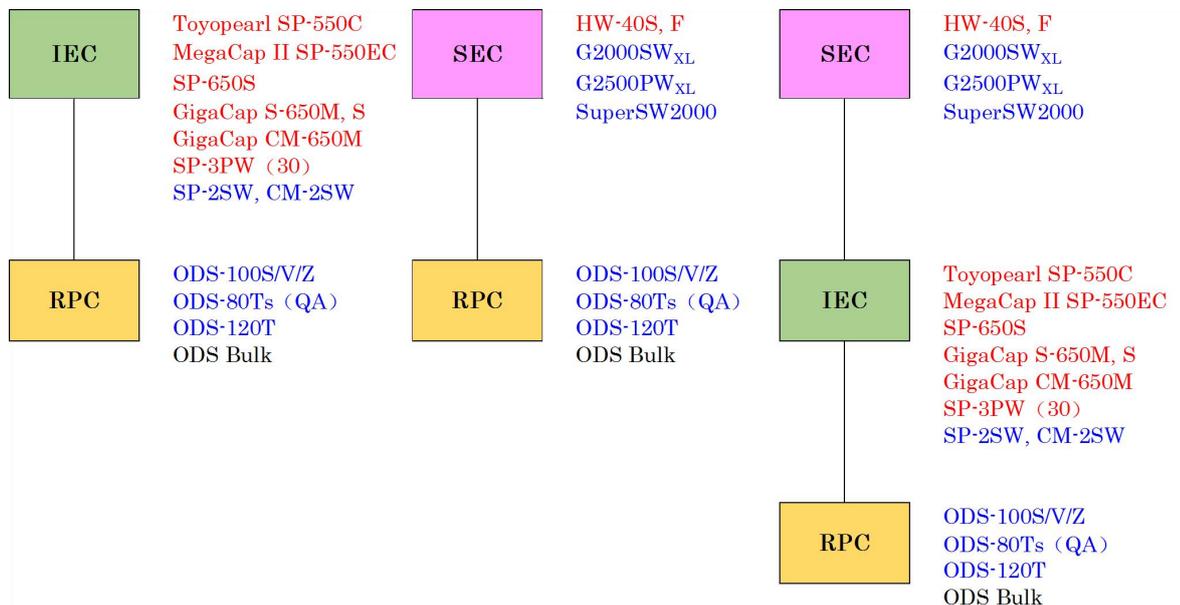
第 153 期 多肽纯化用填料



2022 年 8 月

第 153 期 多肽纯化用填料

多肽的分离纯化工艺举例（2-3 步）



常用工艺

一、尺寸排阻色谱

* 利用色谱填料的细孔径、基于分析物尺寸大小达成分离的模式

* 优势

1. 色谱条件单纯，利于品质管理的使用
2. 根据分子量（尺寸）大小可以预判洗脱位置

* 缺点

1. 样品可进样量相对较小
2. 分析物可能会与固定相（色谱填料）发生疏水相互作用

* 流动相推荐

1. 流动相：0.1% TFA + 45% 乙腈（0.1% TFA 非必须）
2. 同种流动相，含有蛋白组分时蛋白的空间构造被破坏，分子呈伸展状态（变性），这时候进行分子量表征时，使用 100% 水溶液条件下标准蛋白校正曲线不合适
3. 含 0.1% TFA 的流动相分析疏水性高的多肽时，如果洗脱较迟，可以推荐使用醋酸溶液等

Toyopearl HW型层析填料的特性和分子量分离范围
(HW=亲水性, 水兼容性聚合物填料)

填料	粒径(μm)	孔径(Å)	样品分子量(Da)		
			聚乙二醇/聚环氧乙烷	右旋糖酐	球状蛋白
HW-40S	20-40	50	100-3,000	100-7,000	100-10,000
HW-40F	30-60				
HW-40C	50-100				
HW50S	20-40	125	100-18,000	500-20,000	500-80,000
HW-50F	30-60				
HW55S	20-40	500	100-150,000	1,000-200,000	1,000-700,000
HW-55F	30-60				
HW65S	20-40	1000	500-1,000,000	10,000-1,000,000	40,000-5,000,000
HW-65F	30-60				
HW75F	30-60	>1000	4,000-5,000,000	100,000-10,000,000	500,000-50,000,000
HW-75S					

二、反相色谱

* 基于分析组分在两相间的分配差异而达成分离的模式

* 优势

1. 分辨率非常高
2. 适合联用 MS 检测
3. 精制纯化时, 使用挥发性的盐可省时省力
4. 选择性、保留的差异丰富 → C18, C8, C4, CN, Phenyl, 碳含量·导入方式、细孔径、粒径

* 缺点

1. 样品处理量相对较小
2. 使用有机溶剂
3. 样品的保留、平衡、重复性 → 低(无)有机溶剂浓度或使用离子对试剂时, 需进行充分的平衡

* 流动相推荐

有机溶剂(乙腈、甲醇)不同, 分离选择性不同(40%的乙腈与60%的甲醇, 保留能力基本相同)

杜邦树脂在多肽纯化中的应用

生物分子	应用	工艺步骤	树脂
胰岛素	I型糖尿病	反相层析纯化	AMBERCHROM™ CG300M
GLP-1	II型糖尿病	提取和反相层析纯化	AMBERLITE™ XAD™ 1600N AMBERCHROM™ CG71M
奥利万星	革兰氏阳性细菌感染	反相层析纯化	AMBERCHROM™ CG161M
艾博卫泰	长效HIV-1融合抑制剂	反相层析纯化	AMBERCHROM™ CG300M AMBERCHROM™ XT20
恩夫韦地	HIV-1融合抑制剂	浓缩	AMBERCHROM™ CG300M
降钙素	骨质疏松	反相层析纯化	AMBERCHROM™ XT30
谷胱甘肽	抗氧化剂	提取和反相层析纯化	AMBERLITE™ FPC14Na AMBERCHROM™ XAD™ 1600N
促性腺激素	不孕症治疗	反相层析	AMBERCHROM™ CG71M
乳酸链球菌素	食品防腐剂	反相层析纯化	AMBERCHROM™ CG300M

胰岛素

胰岛素主要用于治疗I型糖尿病、孕妇糖尿病和糖尿病酮症酸中毒。全球糖尿病患者超过4.5亿，每年有170万人死于该疾病。治疗中使用的胰岛素最初是从猪或牛胰腺中提取的。随后，通过化学和酶工艺转化猪胰岛素，或通过采用重组DNA技术的细菌合成，源自动物的胰岛素被人源胰岛素所取代。现在，人们通过某些氨基酸和作用动力学的差异来区分人胰岛素及其类似物（如：赖脯胰岛素、门冬胰岛素、甘精胰岛素）。

纯人胰岛素的好处，在于降低了抗体形成的风险。如今，胰岛素主要使用重组DNA技术在酵母（酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*））或细菌（大肠杆菌）表达体系中生产。在收获胰岛素原，澄清发酵液，复性和酶切后，AMBERCHROM™ CG300M 和 XT30 或 XT20 可用于反相层析，将胰岛素与各种杂质（包括A21脱酰胺-胰岛素等类似物）分离。



胰高血糖素样肽 (GLP-1)

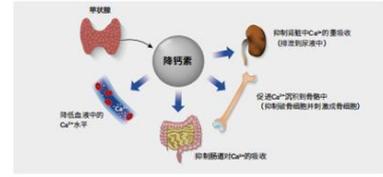
胰高血糖素样肽 (GLP-1) 可用于II型糖尿病的治疗；在糖尿病患者体内，碳水化合物由于胰岛素抗性或缺乏胰岛素而不被代谢，导致血液中葡萄糖水平高。胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 是30个氨基酸长度的肽，能够通过增强胰岛素分泌，以葡萄糖依赖性方式降低血糖水平。胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 被认为是一种治疗糖尿病的理想药物。

AMBERLITE™ XAD™1600N 一款二乙烯基苯聚合物吸附树脂和 AMBERCHROM™ CG71M 一款具有增强亲水性的不溶性脂肪族丙烯酸酯大孔吸附树脂特别适用于其纯化步骤。



降钙素

降钙素是一种由甲状腺的滤泡旁细胞（通常称为C细胞）在人体内产生的激素。降钙素参与调节血液中钙和磷酸盐的水平，抵消甲状旁腺激素的作用。降钙素是32个氨基酸的线性多肽。它通过抑制破骨细胞来减轻骨吸收。降钙素目前的适应症是骨质疏松症和骨关节炎。降钙素通过重组DNA技术或化学肽合成技术生产。AMBERCHROM™ XT30 适用于其纯化步骤。



三、离子交换色谱

* 利用静电相互作用程度差异达成分析组分分离的模式

* 优势

1. 分辨率高
2. 样品处理量大（载量高，尤其适合纯化制备）

* 缺点

1. 由于使用盐进行洗脱，不适合 MS 联用检测
2. 分析物可能会与固定相（色谱填料）发生疏水相互作用

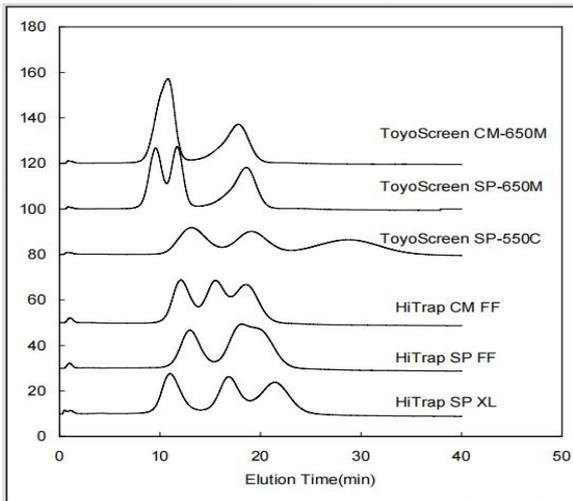
* 流动相推荐

1. 流动相：含有机溶剂的盐缓冲液，利用盐或 pH 的梯度洗脱
2. 阳离子交换色谱一般使用酸性溶液体系；阴离子交换色谱一般使用中性或弱碱性溶液体系
3. 对于疏水性高的多肽，要注意可能会发生洗脱相对迟缓的现象

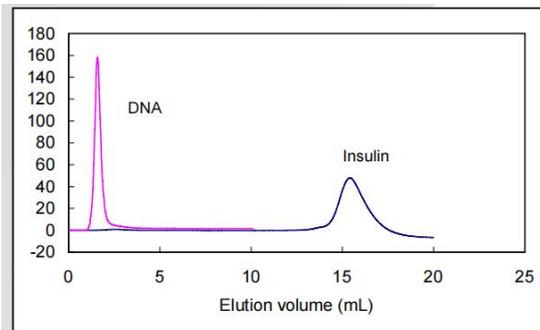
层析步骤	粒径	孔径(A)	填料	
			阴离子	阳离子
捕获	200μm	500		Toyopearl MegaCap II SP-550EC
	100μm	1000	Toyopearl SuperQ-650C Toyopearl DEAE-650C Toyopearl QAE-550C	Toyopearl SP-650C Toyopearl CM-650C Toyopearl SP-550C
中间纯化	75μm	1000	Toyopearl GigaCap Q-650M	Toyopearl GigaCap S-650M
	65μm	1000	Toyopearl SuperQ-650M Toyopearl DEAE-650M Toyopearl Q-600C-AR	Toyopearl SP-650M Toyopearl CM-650M
	35μm	1000	Toyopearl SuperQ-650S Toyopearl DEAE-650S	Toyopearl SP-650S Toyopearl CM-650S
抛光精制	30μm	1000	TSKgel SuperQ-5PW (30) TSKgel DEAE-5PW (30)	TSKgel SP-5PW (30) TSKgel SP-3PW (30)
	20μm	1000	TSKgel SuperQ-5PW (20) TSKgel DEAE-5PW (20)	TSKgel SP-5PW (20)
品质管理(QC)	10μm	1000	TSKgel SuperQ-5PW 7.5mm ID x 7.5cm TSKgel DEAE-5PW 7.5mm ID x 7.5cm	TSKgel SP-5PW 7.5mm ID x 7.5cm TSKgel CM-5PW 7.5mm ID x 7.5cm

大多数的填料有对应的相同规格的IPLC柱。

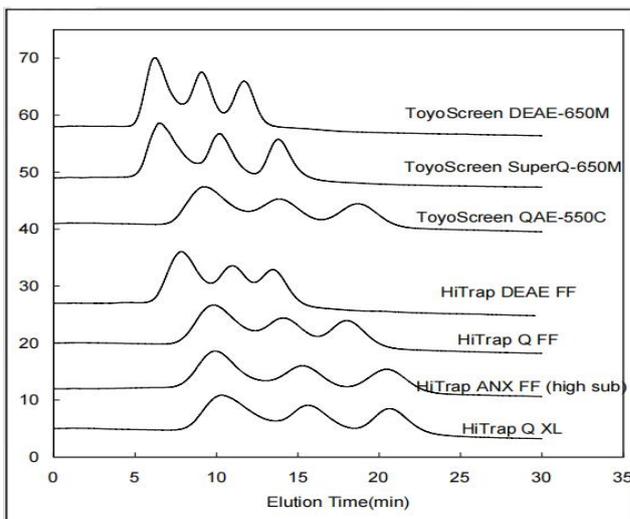
东曹离子交换填料在胰岛素纯化中的应用



Condition
 Column Size: ToyoScreen 6.4 mm I.D.*3cm, 1mL
 HiTrap 7mm I.D.*2.5cm, 1mL
 Eluent :a) 20mM Phosphate Buffer (pH6.0)
 b) 20mM Phosphate Buffer + 0.5M NaCl (pH6.0)
 Gradient: a) to b) 30min Linear
 Flow rate: 1mL/min
 Detection: UV (280nm)
 Injection: 50μL
 Sample: alpha-Chmotrypsinogen A, Cytochrom C, Lysozyme 1g/L



Condition
 Column: TOYOPEARL MegaCap II SP-550EC(7.5mmID*7.5cm)
 Eluent: (A) 0.1M Citrate Buffer (pH3.0)
 (B) 0.1M Citrate Buffer (pH6.2)
 Gradient: (A) --> (B) step at 10min
 Flow rate: 1mL/min Sample: DNA, Insulin (STD, human) 1g/L
 Injection: 100uL Detection: UV(280nm)



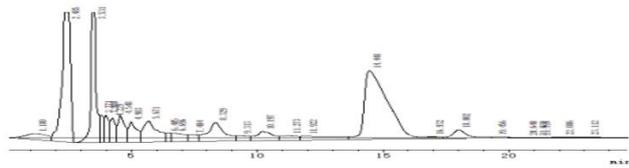
Condition
 Column Size: ToyoScreen 6.4 mm I.D.*3cm, 1mL
 HiTrap 7mm I.D.*2.5cm, 1mL
 Eluent :a) 20mM Tris-HCl (pH8.0)
 b) 20mM Tris-HCl + 0.5M NaCl (pH8.0)
 Gradient: a) to b) 30min Linear
 Flow rate: 1mL/min
 Detection: UV (280nm)
 Injection: 50μL
 Sample: Transferrin, Ovalbumin, Trypsin inhibitor 1g/L

已做案例----抗菌肽



工艺路线

粗品谱图:



样品粗分离情况:



样品精制情况: (目标肽纯度为99.58%)



经过多步色谱纯化, 目标肽纯度大于99.5%。工艺总收率大于90%。

* 如果需要更详细的资料, 请联系我们。



北京慧德易科技有限责任公司

咨询电话: 010-59812370/1/2/3

公司官网: www.prep-hplc.com

邮箱: sales@prep-hplc.com

微信公众号: 北京慧德易