

Cellufine Sulfate——疫苗纯化的最佳选择

随着疫苗研制和生产需求的不断扩大，疫苗分离纯化研究方兴未艾，国内外无论是相关疫苗及其分离纯化的论文、专利，通过 FDA 认证的疫苗数量，都呈现指数增长态势。

近几十年来，化学、生物化学、分子生物学和免疫学等学科的空前发展，尤其是基因工程技术的兴起，基因工程疫苗成为除部分多糖疫苗（或多糖结合疫苗）和核酸疫苗外的另一大类。然而，疫苗的纯化成为人们关注的焦点，免疫原性好、保护性强、毒副作用小、生产力高成为疫苗生产中必须达到的要求，尤其是使用对象多为婴幼儿和儿童的疫苗，其分离纯化相应要求更高。

传统的制备工艺中，疫苗纯度和性状能符合要求，但抗原回收率不高、操作繁琐且周期长、技术设备要求高，近年来已逐渐为日臻成熟的层析技术所代替，在基因工程疫苗的研制中尤为如此。传统的离心、过滤和沉淀技术更多只是作为整个疫苗分离纯化工艺的起始步骤，用于初步分离过程。层析技术、超滤技术与沉淀、离心等传统分离技术的结合已逐渐成为疫苗分离纯化的主流。

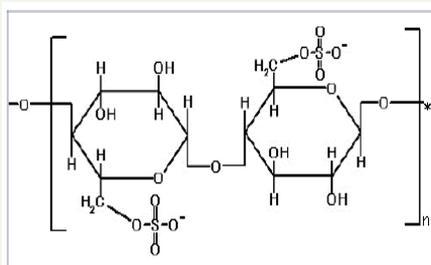


目前，层析技术最重要的就是进行介质的选择，面对琳琅满目的层析介质（疏水层析介质>40种，离子交换介质>70种，亲和层析介质>30种，尺寸排阻介质>20种），如何进行层析介质的选择？选择好合适的介质，会使您的工作变得更加快捷、方便、生产量更大、在市场中更具有竞争优势！

2008-14 Volume 14

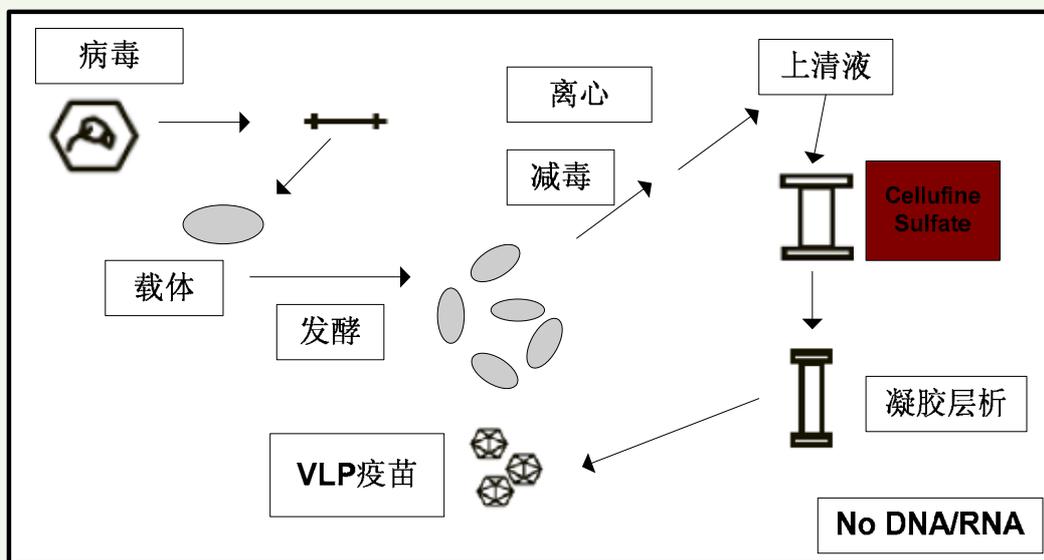
Cellufine Sulfate 简介:

是一种使低浓度的硫酸盐结合至纤维素颗粒的填充剂，对抗凝血酶 III、血液凝固因子、酶等具有亲和性、同时也适合于病毒精制，如：流行性感、肝炎 B、疱疹等。



- 硫酸酯键合功能团——简单、稳定配基
- 带电离子间相互作用进行特异性识别(病毒、肝磷脂结合蛋白)
- 非动物性来源
- 洗脱条件温和
- 高流速、优异的选择性、回收率

Cellufine Sulfate VLP 疫苗纯化工艺



应用文献——流感疫苗纯化

材料方法:

病毒：含流感病毒菌株 A/duck/Hokkaido/Vac-2/04 (H7N7)； A/duck/Hokkaido/Vac-1/04 (H5N1)； A/Hiroshima/52/2005 (H3N2)； A/RP/8/1934 (H1N1)； β-丙内脂进行灭活处理，北海道大学提供。
HA 疫苗：三价 (A/Solomon/3/2006 (H1N1)， A/Hiroshima/52/2005 (H3N2)， B/Malaysia/2506/2004)
浓度 ≥ 30μg [2、4、6、8、16、32、64、128、256、512、1024、2048、4096]

样品前处理：β-丙内脂对尿囊液进行灭活处理，8000g 离心 30min，0.45μm 醋酸纤维素滤膜过滤

条件:

流速：120cm/hr (1ml/min)

上样缓冲液：0.01M 磷酸缓冲液，PH7.4

平衡缓冲液: 0.01M 磷酸缓冲液, 0.19M NaCl, PH7.2

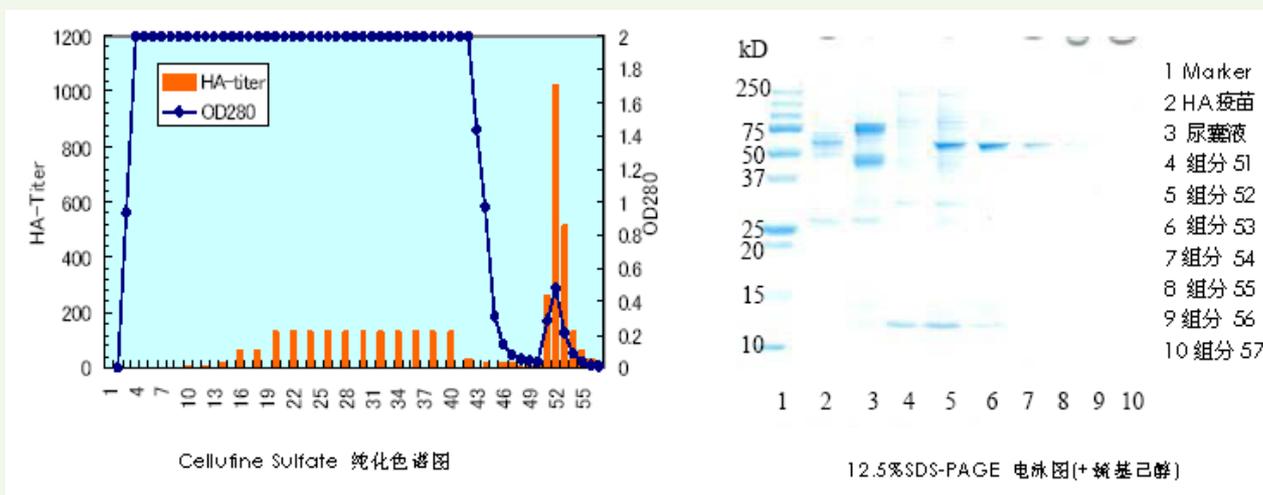
洗脱液: 0.01M 磷酸缓冲液, 3M NaCl, PH7.0

样品: 前处理过的尿囊液样品 (110%-130%的吸附范围)

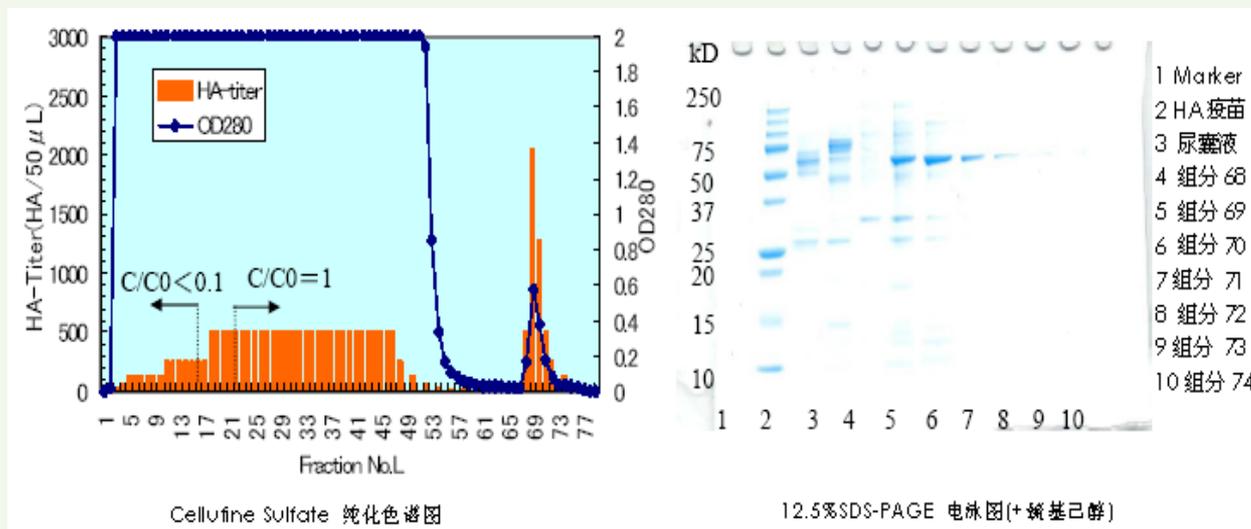
结果分析:

将前处理的各流感病毒菌株进行 Cellufine Sulfate 迷你小柱纯化, 并对 3M NaCl 洗脱液洗脱收集到的各个不同组分进行 12.5% SDS-PAGE 电泳检测 (加巯基乙醇)。上样、平衡、洗脱及电泳检测结果如下图所示。

H7N7

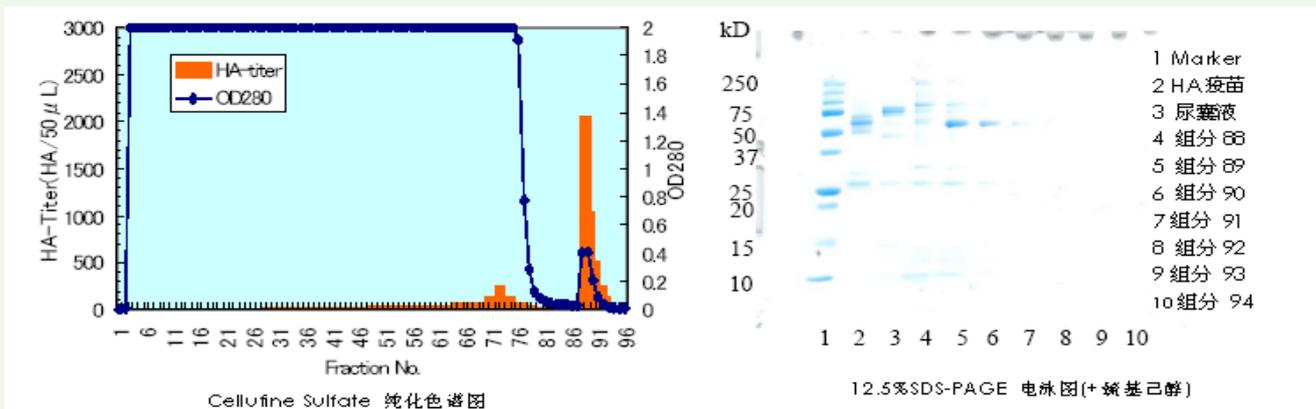


H5N1



2008-14 Volume 14

H3N2



H1N1

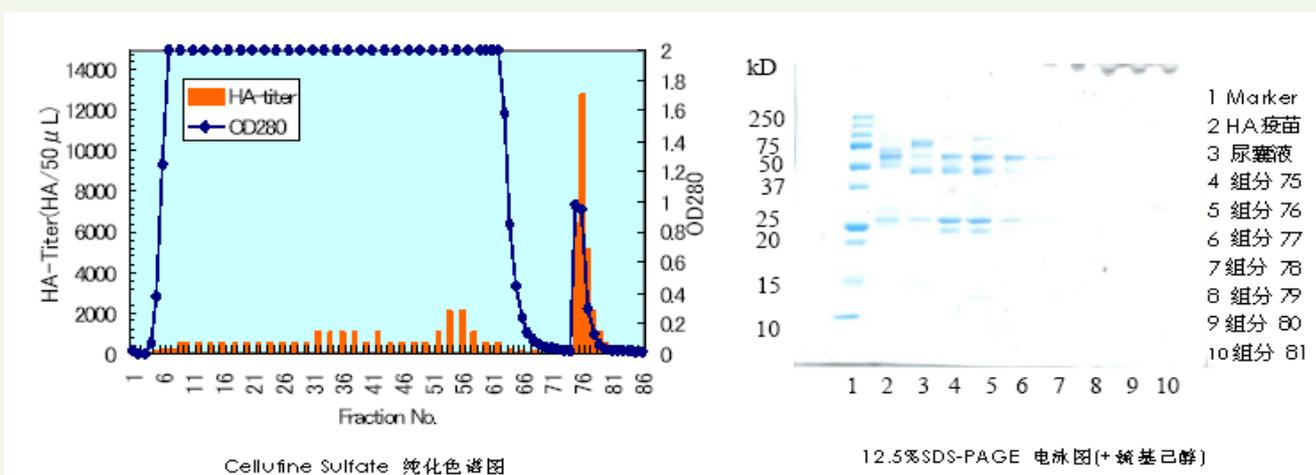
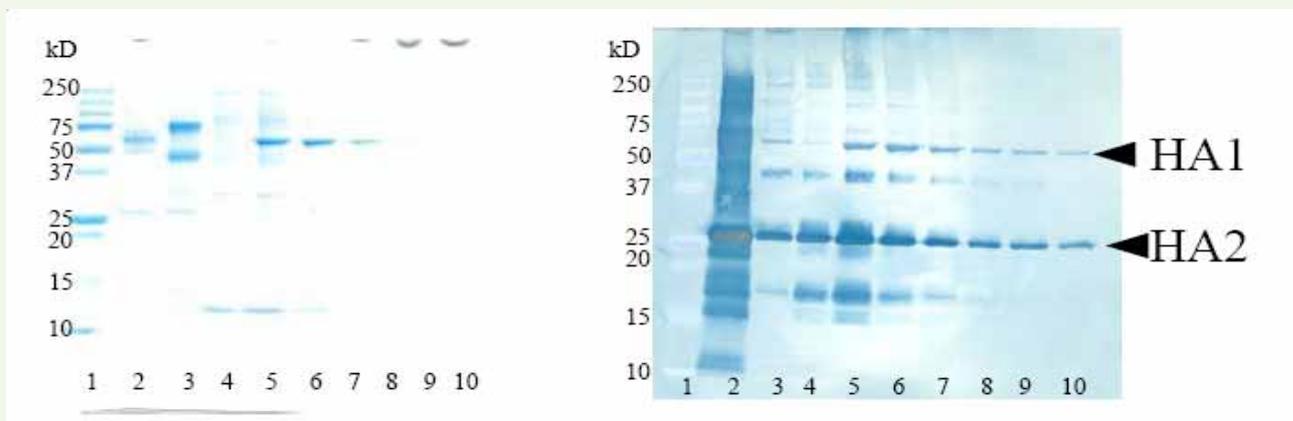


表1 Cellufine Sulfate 流感疫苗纯化结果

		HA			蛋白质 (μg)			疫苗与蛋白质的浓度比		
		上样量	透过量	洗脱量	上样量	透过量	洗脱量	上样量	洗脱量	洗脱/上样
H7N7	浓度	102400	10040	91520	9929	9454	837	10	109	10.6
	体积 (ml)	40	56	8	100%	95%	7%			
	回收率 (100%)	(100%)	10%	89%						
H5N1	浓度	61440	9200	49600	1056	730	62	58	800	13.7
	体积 (ml)	6	16	6	100%	69%	6%			
	回收率 (100%)	100%	15%	81%						
H3N2	浓度	250880	17400	161040	9532	8465	394	26	409	15.5
	体积 (ml)	98	123	11	100%	89%	4%			
	回收率 (100%)	100%	7%	64%						
H1N1	浓度	245760	52480	181120	318	203	3	773	60373	78.1
	体积 (ml)	3	14	4	100%	64%	1%			
	回收率 (100%)	100%	21%	74%						

H7N7 Western Blotting 检测结果:



从表 1 可以看出, Cellufine Sulfate 对流感疫苗具有很好的吸附性, 仅有很少的一部分通过。然而对蛋白质恰恰相反, 大部分蛋白质都通过 Cellufine Sulfate 色谱柱, 少部分进行了结合。在很温和的条件 (0.01M 磷酸缓冲液, 3M NaCl, PH7.0) 即可对结合的疫苗颗粒进行洗脱, 达到很好的纯化效果。同时, 收集到的组分相对上样前样品而言, 也达到浓缩的效果, 使得纯化和浓缩同步完成。

学 习 园 地

问: 重组蛋白纯化的基本策略?

答: 纯化问题所涉及具体步骤最终取决样品的性质。但有共同可参考的阶段, 以下是三阶段纯化策略:

1. 捕获阶段: 目标是澄清、浓缩和稳定目标蛋白。
2. 中度纯化阶段: 目标是除去大多数大量杂质, 如其它蛋白、核酸、内毒素和病毒等。
3. 精制阶段: 除去残余的痕量杂质和必须去除的杂质。

每个阶段都有对应的分离方法可供选择: 根据蛋白质的特殊性质采用不同的分离方法: 离子交换 (电荷/等电点)、凝胶过滤 (分子量)、疏水/反相 (疏水性)、亲和层析 (特异性结合)。

每一种方法都有分辨率、处理量、速度和回收率之间的平衡:

1. 分辨率: 由选择的方法和层析介质生成窄峰的能力来实现。一般来说, 当杂质和目标蛋白性质相似时, 在纯化的最后阶段分辨率是重要因素。
2. 处理量: 一般指在纯化过程中目标蛋白的上样量。如上样体积、浓度等。
3. 速度: 在初纯化中是重要因素, 此时杂质如蛋白酶必须尽快除去。
4. 回收率: 随着纯化的进行渐趋重要, 因为纯化产物的价值在增加。

在三阶段纯化策略中每一种方法的适用性见下表：

技术	主要特点	捕获	中度纯化	精制	样品起始状态	样品最终状态
IEX	高分辨率 高容量 高速度	★★★	★★★	★★★	低离子强度 样品体积不限	高离子强度或 pH 改变。 样品浓缩
HIC	分辨率好 容量好 高速度	★★	★★★	★	高离子强度 样品体积不限	低离子强度 样品浓缩
AC	高分辨率 高容量 高速度	★★★	★★★	★★	结合条件特殊 样品体积不限	洗脱条件特殊 样品浓缩
GF	高分辨率		★	★★★	样品体积 (<总柱体积的 5%) 和 流速范围有限制	缓冲液更换 (如果需要) 样品稀释
RPC	高分辨率		★	★★★	需要有机溶剂	在有机溶剂中, 有损失生物 活性的风险

- 注：1、通过组合各种方法使纯化步骤之间的样品处理减至最少，以避免需要调节样品。第一个步骤的产物的洗脱条件应适宜于下一个步骤的起始条件。
- 2、硫酸铵沉淀是常用的样品澄清和浓缩方法，所以 HIC 是捕获阶段的理想方法。
- 3、GF 很适宜浓缩效应的方法（IEX、HIC、AC）后使用，凝胶过滤对上样体积有限制，但不受缓冲条件的影响。
- 4、在捕获阶段选择对目标蛋白具有最高选择性/处理量的方法
- 5、如果对目标蛋白的性质了解甚少 的情况下，可采用 IEX-HIC-GF 的方法组合作为标准方案。
- 6、只要目标蛋白耐受的情况下，可以考虑采用 RPC 方法用于精制阶段。

北京总公司：

地址：北京回龙观西大街龙冠大厦 719 室

邮编：102208

热线：(10)-51528296, 51528297, 51528298,
51528348

传真：(10)-51528299

邮箱：sales@prep-hplc.com

网站：www.prep-hplc.com

上海办事处：

地址：上海张江益丰路 55 弄春港丽园 67 号 201 室

邮编：201203

电话：021-58950178

传真：021-58950178

更多产品信息欢迎来电咨询!!!