

慧德易电子期刊

H&E Electronic Journal

第 158 期 使用东曹 TOYOPEARL Sulfate-650F 填料
纯化九因子（凝血因子IX）



2023 年 1 月

纯化九因子（凝血因子 IX）

凝血因子是血浆与组织中直接参与凝血的物质的统称。其中已按国际命名法，用罗马数字按发现的次序编号的凝固因子有 12 种（原 13 种，VI 其实是活化后的第五因子而被取消）：凝血因子 I, II, III, IV, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII。此外，还有前激肽释放酶、激肽释放酶，以及来自血小板的磷脂等。因子 XIII 以后被发现的凝血因子，经过多年验证，认为对于凝血功能，无决定性的影响，不再列入凝血因子的编号。因子 VI 事实上是活化的第五因子，已经取消因子 VI 的命名。除了 Ca²⁺和磷脂外，其余已知因子都是蛋白质，多具有酶的特性，在血液中处于无活性状态，以保持血液的液体性。只有被激活后才有凝血作用。通常于因子名称后加“a”，以示其为活化状态，如 II→IIa。多数凝血因子在肝脏合成且需维生素 K 参与。九因子（凝血因子 IX）的学名为凝血酶原复合物全名冻干人凝血酶原复合物，俗称九因子，为人体血浆制品，主要用于治疗乙型血友病。

离子交换色谱（IEC）因吸附量较大，被广泛应用于血浆蛋白的粗纯工艺。但是离子交换色谱容易受到样品中盐浓度的影响，如果样品溶液中含盐，则除了过滤以外，还需要进行脱盐、透析等前处理。但是，近几年市面上出现了一种不易受到盐浓度影响的耐盐型（salt-tolerant）离子交换填料，可以作为一种混合模式填料用于这类样品的纯化。

最近发表在期刊《Biotechnology Journal》上的一篇文章中，研究人员使用了东曹的耐盐型阳离子交换填料 TOYOPEARL Sulfate-650F，从凝血酶原复合物浓缩液（PCC）中有效纯化凝血因子 IX（Factor IX，九因子）。

Received: 24 February 2021 | Revised: 2 July 2021 | Accepted: 12 July 2021
DOI: 10.1002/biot.202100100

RESEARCH ARTICLE

Biotechnology Journal

Salt-tolerant cation exchanger-containing sulfate groups as a viable alternative for mixed-mode type and heparin-based affinity resins

Marija Begić¹ | Suzana Pečenović² | Martina Šrajer Gajdošik³ | Djuro Josić^{1,4} | Egbert Müller⁵ 

¹ Faculty of Medicine, University Juraj Dobrila, Pula, Croatia
² General Hospital Pula, Pula, Croatia
³ Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Osijek, Croatia
⁴ Warren Alpert Medical School, Brown University, Providence, Rhode Island, USA
⁵ Tosoh Bioscience, Griesheim, Hessen, Germany

Correspondence
Egbert Müller, Tosoh Bioscience, Im Leuschnerpark 4, 64347 Griesheim, Hessen, Germany.
Email: egbert.mueller@tosoh.com

Abstract
Ion-exchange chromatography is still one of the most popular protein separation techniques. Before chromatographic separation, the high salt concentration in various samples necessitates additional steps. Therefore, low salt tolerance of ion-exchange resins is a drawback that needs to be addressed. Herein, the differences in salt tolerance and hydrophobicity of strong cation-exchange TOYOPEARL resins of sulfonium and sulfate-types were investigated. Despite only a minor structural difference, differences in selectivity and salt tolerance between the sulfate and sulfonic groups were detected. In silico calculations were also carried out for model substances representing the sulfonium and sulfate groups, wherein significant differences in hydrophobicity was observed. These experiments confirmed the hypothesis that the salt tolerance, higher affinity, and selectivity for certain vitamin K dependent clotting factors are interrelated and dependent on the presence of the sulfate group. Separation of clotting factor IX from the prothrombin complex concentrate further to confirmed the affinity for these proteins. The results show that the use of only a resin with the sulfate ligand and not with the sulfonic acid ligand allows for a facile and rapid separation of clotting factor IX and other vitamin K dependent clotting factors.

KEYWORDS
hydrophobicity, lysozyme binding capacity, salt-tolerant cation exchanger, sulfate and sulfonium-type, vitamin K dependent clotting factors

M. Begić et al., Salt-tolerant cation-exchanger containing sulfate groups as a viable alternative for mixed-mode type and heparin-base affinity resin,

Biotechnol. J., 2021; 2100100, CC BY NC ND, <https://doi.org/10.1002/biot.202100100>

一、TOYOPEARL Sulfate-650F 的简介

1. 带有硫酸根官能团的阳离子交换填料

- 官能团为硫酸根(SO₄⁻),与 S-、SP-和 CM-等类型相似,同为**阳离子交换**填料。
 - 对抗体等蛋白有很高的吸附载量。
2. 可有效去除抗体中的多聚体
 - 相较于其他阳离子交换填料,对多聚体有着更高的分离效果。
 - 在 pH 低于 5.0、并含有 0.15 mol/L 的 NaCl 缓冲液中仍然可以结合抗体,具有**耐盐性**。
 - 可作为 Protein A 层析的后续纯化步骤。
 3. 有类似于肝素亲和填料的分离纯化效果
 - 可以应用于 AT-III 和其他相关蛋白的分离纯化。
 - 有望应用于病毒和疫苗分离纯化。
 4. 适用的缓冲液 pH 范围
 - 一般可以用于 pH 4-12 的缓冲液中。
 - 可以用 pH 3-13 的清洗液进行短时间的 CIP 处理。

二、TOYOPEARL Sulfate-650F 的基本参数

性能指标	规格参数
蛋白吸附载量	
静态	≥114g/L(human IgG)
动态	≥95g/L
离子交换容量	≥0.53eq/L
粒径	≥80%(30-60μm)
菌落总数	≤100 CFU/ml
内毒素等级	≤10.0 EU/ml
不溶物	≤0.2% (干胶)
异物 (colored)	≤6 颗粒

出货溶剂: 含 0.2mol/L 醋酸钠的 20%乙醇溶液

三、TOYOPEARL Sulfate-650F 适用样品

- 单克隆抗体
- 血浆蛋白、凝血因子
- 病毒、VLP、疫苗
- 重组蛋白
- 碱性蛋白

四、TOYOPEARL Sulfate-650F 的主要特点

- 高载量
- 多聚体分离
- 耐盐的阳离子交换填料
- 与肝素亲和作用相似 (硫酸根官能团)

五、TOYOPEARL Sulfate-650F 的应用条件

1. 单克隆抗体多聚体的分离纯化
 - 对 IgG 可达到 100 g/L 的高载量。
 - 可以作为 Protein A 亲和层析的后续纯化步骤。
2. 在 pH 5 以下具有耐盐性
 - 在 pH 4.7、0.15 mol/L NaCl 的缓冲液中对样品进行吸附。
 - 在 Protein A 亲和层析或前处理后可以直接进行上样。
3. 硫酸根官能团的特异性相互作用

- 与肝素亲和层析相似，可以与凝血因子、疫苗或病毒结合。
- 可以用 0-1 mol/L 的 NaCl 进行盐梯度洗脱。
- 与竞争对手的 Sulfate 填料具有类似的吸附性能，但是 Sulfate-650F 具有更高的吸附载量（某些填料由于孔径小，所以蛋白只能结合在填料的表面）。

4. 常用的分离条件

- 上样缓冲液的 pH 要控制在 5.5 以下。
- 优化缓冲液的 pH 和盐浓度能够获得更好的分离效果。
- 当缓冲液的 pH 为 4.2 时，即使在 0.3mol/LNaCl 的缓冲液中也能够获得很高的吸附载量。

六、凝血因子 IX 的纯化实例

下图是使用耐盐型阳离子交换填料 TOYOPEARL Sulfate-650F 分离 PCC 中的维生素 K 依赖性凝血因子的结果。

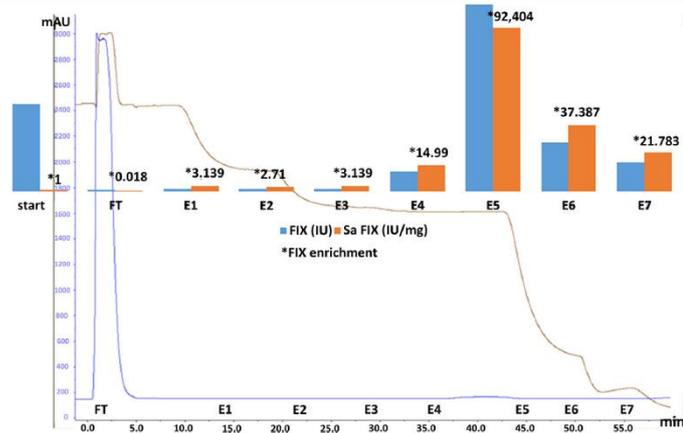


FIGURE 4 Purification of clotting factor IX and removal of other vitamin K-dependent clotting factors (FII, FVII, and FX) on sulfate resin TOYOPEARL Sulfate-650F. Conditions: Äkta Explorer chromatographic system (Cytiva) with a 2 mL sample loop, and a 1 mL column, flow 2 mL min⁻¹, room temperature. Buffer A (starting buffer), 400 mM NaCl, 20 mM phosphate, pH 4.5, 39.1 mS cm⁻¹; Collected fractions were eluted with Buffers 1-7 (cf. Materials and methods). Blue: Factor IX activity (IU mL⁻¹) and enrichment (red) were presented. The activity of FX was detected only in the flow-through fraction, and no FX clotting activity was detected in the eluate

首先，使用含有 0.4 mol/L NaCl 的高盐浓度洗脱液，让吸附较弱的凝血因子 II、因子 VII、因子 X 不被填料吸附直接流穿。然后，通过降低盐浓度和提升 pH 的阶梯梯度洗脱，把吸附在柱子上的因子 IX 洗脱下来。使用 Sulfate-650F 无需对样品进行脱盐处理，即可获得与使用肝素亲和层析相同纯度的因子 IX。

七、TOYOPEARL Sulfate-650F 在类似于肝素亲和填料方面的应用展望

1. 类似于肝素亲和填料的分离纯化作用*

- 凝血因子：Factor VII、Factor IX、Factor X、凝血酶、AT-III
- 组织纤溶酶原激活物(TPA)
- 脂肪酶、核酸酶有关（如限制性内切酶）、胶原酶、脂蛋白

2. 利用硫酸根官能团的相互作用*

- 病毒、疫苗

八、订货信息

货号	描述
023468	TOYOPEARL Sulfate-650F, 250ml
023469	TOYOPEARL Sulfate-650F, 1L
023470	TOYOPEARL Sulfate-650F, 5L
023471	TOYOPEARL Sulfate-650F, 50L
45205	SkillPak TOYOPEARL Sulfate-650F 1 ml×5
45241	SkillPak TOYOPEARL Sulfate-650F 5ml×1

推荐配套的设备：



QuikSep A1 桌面全自动层析系统



QuikSep 简易层析系统



QuikSep 生产型全自动层析系统



QuikSep 手动层析柱

*如需更详细的资料，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