



TOSOH

# Ca<sup>++</sup>Pure-HA 羟基磷灰石填料

## 装填及使用指南

### 目录

1. 简介 .....	1
2. 表面化学与生物分子的相互作用 .....	1
3. 洗脱方法 .....	2
4. 清洗、消毒以及保存方法 .....	4
5. 应用和方法开发 .....	5
6. 装填 .....	7
7. 实际问题 .....	8
8. 参考文献 .....	11

东曹（上海）生物科技有限公司

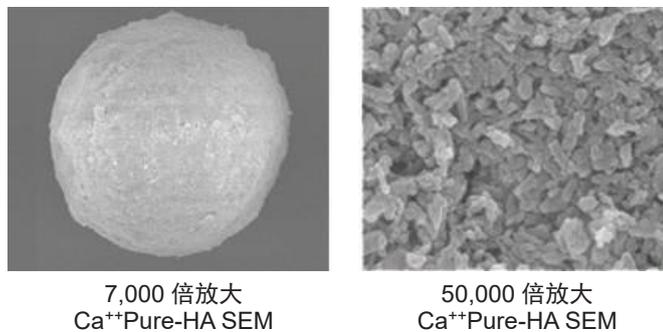


## 1. 简介

羟基磷灰石 (HA) 是目前最具有特征的混合模式填料之一，在整个生物分离领域，具有重要的研究和工业应用价值。该填料兼具离子交换和金属亲和力，具有其他填料不具备的特殊分离能力，能够为生物分离领域的新兴挑战提供独特的解决方案。

本手册提供相关实用知识，利用 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 填料的独特功能来实现最苛刻的分离要求。Ca<sup>++</sup>Pure-HA 是由 Tosoh Bioscience 公司利用优质顶级材料，通过专有工艺研发生产的超纯 10 nm×100 nm 的六边形截面晶体 (图 1)。晶体凝聚成颗粒，然后加热，在晶体接触点形成了稳定的连接。颗粒大小和孔隙率被严格控制，使其颗粒易于装填，最终实现出色的分离性能。

图 1: Ca<sup>++</sup>Pure-HA 颗粒显微镜照片



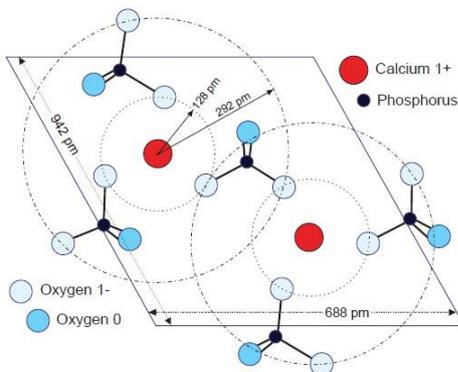
7,000 倍放大  
Ca<sup>++</sup>Pure-HA SEM

50,000 倍放大  
Ca<sup>++</sup>Pure-HA SEM

## 2. 表面化学与生物分子的相互作用

Ca<sup>++</sup>Pure-HA 是一种天然晶体化合物，分子式为 Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>OH。单看其分子式，会让人误以为钙离子是其晶体表面的主要特征，实际上其中大多数都参与了维持晶体表面结构。所以，磷酸盐离子才是其主要的表面特征。正因如此，Ca:P 并非预期的 5:3，实际的表面比率平均值接近 1:6 (图 2)。

图 2: Ca<sup>++</sup>Pure-HA 表面化学

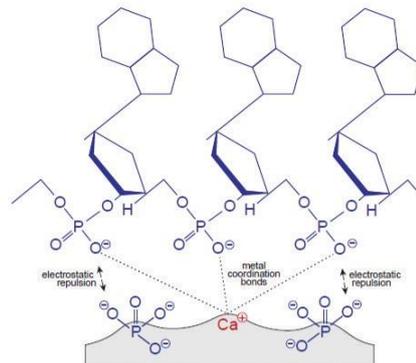


## 2.1. Ca<sup>++</sup>Pure-HA 填料钙离子的相互作用

Ca<sup>++</sup>Pure-HA 表面的钙离子带正电荷。因此这引出了一个假设：钙的作用类似于阴离子交换体<sup>1</sup>。这似乎得到了“DNA 与酸性蛋白质随着 pH 值的增加，结合会更加强烈”这一说法的支持，但其对电导率增加时的反应又指向了不同的解释。在无磷酸根离子的情况下，DNA 甚至可以在 5 mol/L NaCl 中与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 保持结合，这大约是从强阴离子交换体中洗脱 DNA 时使用的 10 倍左右的 NaCl 浓度。酸性蛋白质的情况也是如此。当然这并不表示没有发生阴离子交换作用，但也确实说明了钙离子带来的阴离子交换作用都会被一种不同的保留机制所替代。

如图 3 所示，核苷酸磷酸盐通过与磷酸盐相关的氧原子形成金属配位键，来结合 Ca<sup>++</sup>Pure-HA-钙。这种相互作用比静电相互作用强 15~50 倍。单核苷酸、二核苷酸和三核苷酸结合较弱，多聚核苷酸结合更强；双链 DNA 比单链 DNA 更强，单链 DNA 又比 RNA 更强，强度通常与碱基数成正相关。游离磷酸根离子通过直接与核苷酸磷酸盐争夺 Ca<sup>++</sup>Pure-HA-钙，从而洗脱核苷酸。

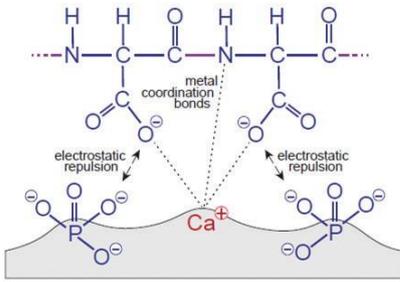
图 3: Ca<sup>++</sup>Pure-HA 填料与多聚核苷酸的相互作用



Ca<sup>++</sup>Pure-HA-钙也可以与其他磷酸化生物分子上的磷酸盐形成配位键，包括磷蛋白、内毒素和脂包膜病毒颗粒等。这也是 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 能够显著去除内毒素和脂包膜病毒的主要原因。

Ca<sup>++</sup>Pure-HA-钙同时与蛋白质上谷氨酸和天冬氨酸残基的羧基氧原子形成配位键 (图 4)。与单个羧基残基的相互作用不足以维持蛋白质在 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 上的保留<sup>2-4</sup>。这需要二重、三重或多重的参与。Ca<sup>++</sup>Pure-HA 的钙离子和肽段骨架氮原子之间的配位键通过羧基稳定固位，只是其本身不提供足够的结合能来实现固位。

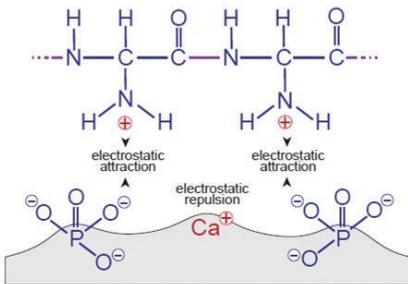
图4: Ca<sup>++</sup>Pure-HA 填料与蛋白质羧基的相互作用



## 2.2. Ca<sup>++</sup>Pure-HA 填料磷酸盐的相互作用

Ca<sup>++</sup>Pure-HA 的磷酸盐带负电荷，类似于磷酸基和羧基等阳离子交换体。Ca<sup>++</sup>Pure-HA-磷酸盐通过与带正电荷的氨基静电相互作用结合碱性物质<sup>2-4</sup>。它们排斥带负电荷的残基，如羧基和磷酸基，如图5所示。

图5: Ca<sup>++</sup>Pure-HA 填料与蛋白质氨基酸残基的相互作用



Ca<sup>++</sup>Pure-HA-磷酸盐虽然能够与生物分子形成稳定的氢键，但这项能力并未显著提高 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 上的生物分子保留<sup>2-4</sup>。当然，这也并不意味着没有发生氢键作用。分子的保留主要由磷酸盐的阳离子交换作用和钙离子的金属亲和作用的贡献所主导的。

Ca<sup>++</sup>Pure-HA-磷酸盐也可以与金属离子形成配位键，这为结合多种金属蛋白创造了一条途径。这也赋予了 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 能够去除样品或缓冲溶液中的金属离子污染物的能力。

## 2.3. Ca<sup>++</sup>Pure-HA 填料羟基的相互作用

羟基具有形成氢键的能力<sup>2-4</sup>，但是这一途径尚未被证明对生物分子的保留有显著的贡献。羟基的含量远低于磷酸基，因此即使参与氢键，也可能比磷酸基介导的氢键贡献更少的结合能力。

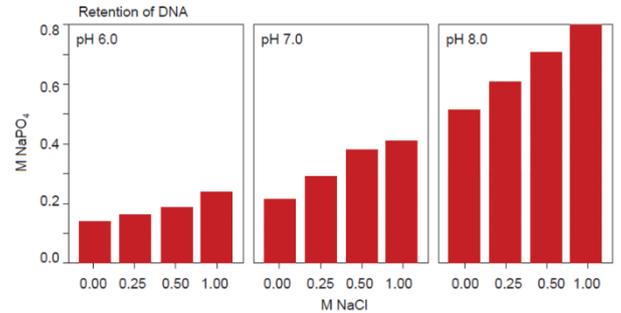
## 2.4. Ca<sup>++</sup>Pure-HA 填料混合模式相互作用

Ca<sup>++</sup>Pure-HA 填料的表面钙离子被双环磷酸三联体包围(图2)。没有完全由磷酸盐或钙来代表的位点。

Ca<sup>++</sup>Pure-HA-钙的反应性受其周围的 Ca<sup>++</sup>Pure-HA-磷酸基团的影响。这也解释了为什么随着 pH 值和 NaCl 浓度的增加，

DNA 和其他酸性生物分子的结合会更加强烈。增加 pH 值和/或盐浓度会降低 DNA 磷酸盐和 Ca<sup>++</sup>Pure-HA-磷酸盐之间(见图6)以及蛋白质羧基和 Ca<sup>++</sup>Pure-HA-磷酸盐之间的电荷排斥力<sup>5</sup>。减少排斥力，有利于酸性生物分子与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA-钙更充分地相互作用，其结合也就越紧密。

图6: 不同盐浓度和 pH 值下 DNA 的磷酸盐洗脱摩尔浓度



Ca<sup>++</sup>Pure-HA-磷酸盐的反应性同样受相邻 Ca<sup>++</sup>Pure-HA-钙的影响，但其影响是相反的。碱性蛋白质的保留是通过与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA-钙发生的金属亲和相互作用来实现的。这强调了一个重要的观点，即蛋白质碱度并不意味着蛋白质中不存在羧基，只是表示它们相对较少。溶菌酶 (pI~10.6) 在明显高于阳离子交换填料上使用的 pH 值和 NaCl 浓度下，会与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 结合后洗脱。IgG 情况也是如此<sup>5</sup>。这种现象在 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 和阳离子交换填料的直接对比中是比较典型的。

混合模式同时也解释了 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 如何在离子交换作用无法提供的条件下，依然能够发挥卓越的结合能力。大多数抗体会结合阳离子交换填料，但需要在低 pH 值和低电导率的条件下进行结合。Ca<sup>++</sup>Pure-HA 在中性 pH 值下具有良好的载量，有时甚至是在生理电导率下也具有良好的载量。这是 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 表面化学物质之间协同作用的一个很好例证。金属亲和作用克服了阳离子交换的弱点，而且两种弱相互作用共同产生了足够的结合能，非常具有实用价值。

## 3. 洗脱方法

经过几十年的发展，Ca<sup>++</sup>Pure-HA 已经发展出各种洗脱策略，而且与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA-生物分子的相互作用一样，所有洗脱策略都是混合模式的。事先熟悉 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 的洗脱策略，有助于理解 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 的工作原理，开发出更有效的纯化方法。

### 3.1. 磷酸盐梯度

Ca<sup>++</sup>Pure-HA 填料常用、简单的是中性 pH 下的磷酸盐梯度洗脱。磷酸钾使用起来非常方便，因为它在 2 mol/L 的浓度下仍然完全可溶。磷酸钠往往成本更低，但是饱和度只有约 0.8 mol/L，并且它的溶解速度比磷酸钾慢。无论是采用哪种盐，大约 300 mmol/L 磷酸

盐梯度就已经能够洗脱大多数生物分子，当然也有例外。一些脂质包膜病毒的洗脱就需要 2 倍盐浓度的缓冲溶液。

磷酸盐缓冲溶液主要以两种方式影响  $\text{Ca}^{++}$ Pure-HA-生物分子的相互作用。一，其电导会与阳离子交换作用相互竞争，削弱  $\text{Ca}^{++}$ Pure-HA 磷酸盐和蛋白质氨基酸残基之间的相互作用，同时也减弱了  $\text{Ca}^{++}$ Pure-HA 磷酸盐与蛋白质羧基或生物分子磷酸基之间的排斥作用。总之，磷酸盐对  $\text{Ca}^{++}$ Pure-HA 之间的调节作用与硫酸盐和羧基对传统的阳离子交换体之间的调节作用相同。

磷酸盐洗脱缓冲溶液的第二种影响方式是，与金属亲和相互作用竞争。这些相互作用主要分为两组。磷酸盐缓冲溶液会争夺  $\text{Ca}^{++}$ Pure-HA 钙和生物分子羧基或磷酸基团之间的配位键。此外，磷酸盐缓冲溶液也会争夺  $\text{Ca}^{++}$ Pure-HA 磷酸盐与金属蛋白质上的金属部分之间的配位键。

虽然简单、方便，但磷酸盐梯度也有两点不足。第一，无法单独控制  $\text{Ca}^{++}$ Pure-HA 的两种主要保留机制。第二，酸性蛋白质、多聚核苷酸及其他磷酸化杂质洗脱时的磷酸盐梯度间隔，与中性和碱性蛋白质相同。这表示与其他  $\text{Ca}^{++}$ Pure-HA 洗脱策略相比，磷酸盐洗脱法很难区分高度分化的生物分子类别。

### 3.2. 钙梯度

20 世纪 80 年代，有人简单评估了无磷酸盐时的钙梯度，证明其仅能洗脱具有极低钙亲和力的的小分子强碱性蛋白质<sup>2-4</sup>。因此，开发  $\text{Ca}^{++}$ Pure-HA 方法时通常不予考虑。

### 3.3. 氯化物梯度

$\text{Ca}^{++}$ Pure-HA 有时可在无磷酸盐的情况下，使用氯化物梯度洗脱碱性生物分子，但需要的盐浓度通常比离子交换模式的盐浓度高。这表明了磷酸基阳离子交换作用和钙亲和作用的协同贡献。一般氯化物梯度高达 2 mol/L，当然也会扩展到 2 倍或以上。

需要强调的是，钠盐和钾盐可以互换使用<sup>1</sup>，但不能在同一次运行下互换。在给定的运行下，仅可使用钾盐或钠盐。当然如果组合使用，也可能不一定导致工艺明显失败。但是，钾盐和钠盐对  $\text{Ca}^{++}$ Pure-HA 的选择性确实具有细微的差别。混合使用（特别是混合不一致时）会导致性能和结果重复性下降。

经验显示，氯化物梯度促进了酸性蛋白质、多聚核苷酸、病毒及内毒素的强烈保留，同时也洗脱了许多中性至碱性蛋白质，包括 IgG。最严重的受限是，容易引起 pH 意外偏移，导致  $\text{Ca}^{++}$ Pure-HA 填料寿命降低（见 7.1 节）<sup>6,7</sup>。氯化物的另一个缺点是，具有高腐蚀性，容易腐蚀不锈钢容器和管道。

经典的重组蛋白质分离纯化，可以使用乙酸盐替代氯化物盐以有效降低其局限性。因为乙酸盐的摩尔电导率低于氯化物，腐蚀性也较低。而且，蛋白质洗脱的电导率与氯化物的电导率也大致相同，但是选择性和分辨率上有细微差别。

### 3.4. 多组分梯度

多组分梯度的主要价值在于，能够实现  $\text{Ca}^{++}$ Pure-HA 填料独特的保留机制得到一定程度的独立控制<sup>1,5</sup>。2000 年，在低恒定磷酸盐浓度下的氯离子梯度被人们关注<sup>8</sup>；2005 年，在恒定氯离子浓度下的磷酸盐梯度也被人们关注<sup>9</sup>；到了 2006 年，两者同时被应用于常规的选择性筛选<sup>5</sup>。

实际使用时，所有这些不同用法可归为两类。

**第一：**恒定磷酸盐浓度下，乙酸盐或氯化物盐的梯度。在初始筛选过程中，基线运行可以在不含磷酸盐的情况下进行，然后以磷酸盐的定量增加（如 5 mmol/L、10 mmol/L 和 15 mmol/L 或以上）进行后续运行。磷酸盐的定量增加逐步降低了  $\text{Ca}^{++}$ Pure-HA 的金属亲和力的影响，从而增加了对磷酸基的阳离子交换作用的强度。这种方法对于纯化中性和碱性蛋白质十分有效。允许目标蛋白质在乙酸盐或氯化物盐梯度内洗脱的磷酸盐的最低浓度条件，通常支持最高程度的纯化需求。

**第二：**恒定乙酸盐或氯化物盐浓度下，磷酸盐的梯度。在初始筛选过程中，基线运行可以在不含乙酸盐或氯化物盐的情况下进行，然后以乙酸盐或氯化物盐的定量增加（如 0.1 mol/L、0.5 mol/L 和 1.0 mol/L）进行后续运行。乙酸盐或氯化物盐的定量增加几乎不会影响  $\text{Ca}^{++}$ Pure-HA 的金属亲和力，但是会降低磷酸基的阳离子交换作用的强度。此条件下中性至碱性蛋白质会早被洗脱，但对于酸性蛋白质和多聚核苷酸的保留十分有利。能够保留目标蛋白质结合的乙酸盐或氯化物盐的最高浓度条件，通常支持最高程度的纯化需求。

### 3.5. 淋洗（Pre-elution Washes）

与其他填料相同，预洗脱/淋洗有利于提高纯化效果。与单模式选择性的离子交换和疏水相互作用填料相比， $\text{Ca}^{++}$ Pure-HA 的多模式选择性具有更多的机会。

有两种基本的方法，可与上述两种多组分梯度方法联合使用。在氯化物或乙酸盐梯度中洗脱目标物质时，先行使用磷酸盐进行淋洗，将清除许多通过金属亲和作用与钙结合的杂质。

在磷酸盐梯度中洗脱目标物质时，先行使用低浓度的磷酸盐和高浓度的乙酸盐或氯化物盐进行淋洗，可以清除阳离子交换作用结合的杂质。

这种通过两种化学结合方式结合目标物质的能力，即在淋洗

时针对一种化学结合方式，洗脱时针对另一种化学结合方式，在吸附色谱领域是独特的，也是十分强大的。它本质上意味着在 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 上运行一次，就能够实现通过两种不同的分离模式清除杂质。如果目标是通过捕获和单个抛光精制步骤实现临床产品级的质量，这可能是一个决定性的优势。

### 3.6. 改性剂的选择 (Selectivity Modifiers)

Ca<sup>++</sup>Pure-HA 可耐受多种表面活性剂、离液剂、还原剂、有机溶剂和聚合物，以及其他改性剂。其中包括精氨酸、DTT、DTE、巯基乙醇、尿素、盐酸胍、聚乙二醇、两性离子和非离子洗涤剂。盐酸胍和其他高电导率改性剂，仅适用于通过钙金属亲和力结合 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 的生物分子，但也在一定程度上囊括了大多数生物分子。例如，大多数 IgG 抗体在 1 mol/L 盐酸胍中，只要没有磷酸盐，仍然能够与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 结合。

改性剂可以用在很多方面。盐酸胍可用于蛋白质的变性与复性。折叠不当的蛋白质，可以先用盐酸胍进行结合、淋洗，然后再逐步清除盐酸胍，再将重新折叠的蛋白质洗脱。尿素、还原剂和/或洗涤剂及各种盐的组合也可以以同样的方式使用。另外，改性剂可用于促进或维持蛋白质的溶解度或稳定性，进行洗涤剂更换或去除，分离聚集体，增强聚集体的保留，或微调选择性，以实现更好的纯化目的。

## 4. 清洗、消毒以及保存方法

Ca<sup>++</sup>Pure-HA 独特的表面化学性质对层析柱的维护有着重要的影响。

### 4.1. 清洗

由于 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 填料具有钙亲和特性，氯化物盐无法作为有效的清洗溶液使用。DNA、脂质包膜病毒、内毒素和许多酸性蛋白质，即使在饱和的 NaCl 溶液中也仍然吸附在填料上。然而，高浓度的磷酸盐可以有效去除。磷酸盐具有足够的电导率，可以去除与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA-磷酸盐通过静电相互作用结合的杂质。

通常使用 500 mmol/L 磷酸盐溶液，用于清洗 Ca<sup>++</sup>Pure-HA。磷酸钠可作为清洗剂使用，但它具有溶解性的限制，在某些情况下使用会受到限制。磷酸钠的饱和度约为 800 mmol/L。虽说也能够配制出清洗所需的浓度，但配制溶液时溶解速度过慢，在生产上也不具备浓缩保存的便利性。磷酸钾则不存在这些限制，溶解性非常出色，很容易溶解到至少 2 mol/L 的浓度。

磷酸盐的浓度高于 500 mmol/L 时应引起注意。磷酸盐是一种强沉淀离子，在霍夫梅斯特序列 (Hofmeister Series) 中紧邻硫酸盐。众所周知，它能够促进疏水相互作用。一般认为，Ca<sup>++</sup>Pure-HA 高带电荷表面是不具有疏水性的 (与疏水相互作用

用填料相比，肯定算不上具有疏水性)。但是强沉淀离子已被证明会导致蛋白质保留在离子交换剂上。因此在 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 表面上自然也可以保留。

将氯化物盐与磷酸盐结合起来清洗 Ca<sup>++</sup>Pure-HA，虽然这一做法很有诱惑力，但也应该引起注重。氯化物盐会增加高磷酸化溶质 (如 DNA 和脂质包膜病毒) 的保留。因此，与没有添加氯化物盐时相比，在清洗液中添加更高浓度的磷酸盐才能洗脱杂质。

### 4.2. 消毒

Ca<sup>++</sup>Pure-HA 随着 pH 的升高会变得越来越稳定。因此可以使用氢氧化物 (如 NaOH 或 KOH) 作为消毒剂。与聚合物基质的填料一样，通常使用 1.0 mol/L NaOH 溶液。接触时间可与聚合物基质的填料相同，通常为一小时。然而，不同于许多聚合物基质的介质，Ca<sup>++</sup>Pure-HA 在高浓度氢氧化物中的稳定性基本上是不确定的。

Ca<sup>++</sup>Pure-HA 在使用高浓度磷酸盐洗脱后，不应立即接触于高浓度氢氧化物溶液。建议引入氢氧化物溶液之前，使用 1~2 倍柱体积的缓冲溶液 (含磷酸盐小于 20 mmol/L) 冲洗层析柱。大多数情况下，可使用平衡缓冲溶液先行冲洗。当然也有人推荐使用纯水进行冲洗，但这样可能会失去对 pH 的控制，还在整个流程中增加了另一种溶剂。

氢氧化物消毒，特别是以动态模式进行消毒时，也有助于促进清洗。静态模式是指，将氢氧化物泵入层析柱后，消毒时暂停其流动。动态消毒是指，将氢氧化物泵入层析柱后，保持其流动，但需要降低流速，保证在消毒期间至少有 1 倍柱体积的氢氧化物流过层析柱。

### 4.3. 保存方法

Ca<sup>++</sup>Pure-HA 即使在 1.0 mol/L 的氢氧化物溶液中也无限期保存，实际保存时通常使用的浓度为 0.1 mol/L。当然，更低的浓度可能也足够保存，但需要通过实验验证。

不建议在含氯己定 (chlorhexidine) 等抗菌剂的溶液中保存 Ca<sup>++</sup>Pure-HA。抗菌剂多重正电荷结构可能会导致其被 Ca<sup>++</sup>Pure-HA-磷酸盐保留，导致保存溶液失去抗菌效果、填料颗粒间滋生微生物。

不建议使用叠氮化物。由于叠氮化物会与各种金属离子相互作用，而且也可能与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 钙相互作用，导致散装溶剂不受保护、颗粒间滋生微生物。



## 5. 应用和方法开发

使用 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 进行方法开发时，通常使用磷酸盐和氯化物盐梯度作为常规筛选的起点<sup>1</sup>。碱性样品最好在低磷酸盐浓度下，选用氯化物或乙酸盐梯度。酸性样品最好选用磷酸盐梯度。通常这两种方法都适用于具有中等电荷特性的样品，当然如果进行筛选，一定会显示出其中的一种方法更为合适。

与其他填料一样，Ca<sup>++</sup>Pure-HA 可有效用于吸附-洗脱和流穿模式。流穿模式相对更加方便，方法简单且使用的缓冲溶液也更多。虽说可能会在一定程度上牺牲其分馏性能和重现性，有时回收率也不太好，但几乎不会比使用其他类型填料时更差。

结合-洗脱法可采用阶梯梯度或线性梯度模式。线性梯度因为具有更高的分辨率和重现性，更适用于实验室规模的操作。这些优势可以延续到生产中，尽管阶梯梯度在生产规模上更常见。

以下内容通过几种常见的生物样品的分离，展示 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 方法开发的一些实用技巧。编写这部分内容主要是考虑到在层析柱上进行实验，但所用条件也适用于多柱或高通量层析筛选平台，而且两者都可以与 DoE 系统结合使用，方便减少实验工作量。

### 5.1. IgG 的纯化

Ca<sup>++</sup>Pure-HA 是 IgG 单克隆抗体纯化中常用的填料之一。通过磷酸盐梯度，不仅能在粗细胞培养液中进行捕获，也可以在精制阶段对多聚体和抗体片段进行出色的分离<sup>10,11</sup>。大多数 Protein A 亲和填料纯化后的 IgG 单克隆抗体，也可以通过非磷酸盐梯度进行精制纯化，去除聚集体、脱落的 Protein A、DNA、内毒素和脂质包膜病毒。

通过非磷酸盐梯度分离 IgG 单克隆抗体的方法是由 Guerier 等人于 2000 年初开发的<sup>8,12</sup>。在 10 mmol/L 磷酸盐浓度下，进行线性氯化物盐梯度能够很好地去除杂质。磷酸钠和磷酸钾盐的互换性已确立得十分完善<sup>1</sup>，Guerrier 方法也很快扩展到覆盖这两种盐。

### 磷酸盐梯度方法的开发

大多数 IgG 单克隆抗体都可以在 75~150 mmol/L 磷酸盐浓度范围 (pH 7.0) 内洗脱。以 5 mmol/L 磷酸盐浓度为起点，运行梯度至 200 mmol/L 磷酸盐浓度，运行一个较长的梯度，如 20 CV，将是一个很好的开始。第二次运行时，将梯度终点设置为 IgG 峰中心的磷酸盐浓度，然后根据需要调整梯度长度。终点磷酸盐浓度越低，越能有效去除 DNA 及其他酸性杂质。使用 500 mmol/L 磷酸盐溶液清洗层析柱，可以去除 DNA 及其他酸性杂质。

注意，在层析柱平衡期间或磷酸盐梯度的早期区域，5 mmol/L 磷

酸盐不足以维持足够的缓冲能力。建议选用 20~50 mmol/L HEPES 或其他非磷酸盐溶液来增加缓冲能力。无需为梯度末端缓冲溶液提供二级缓冲，因为高浓度的磷酸盐拥有足够的缓冲能力。

如果整体运行 pH 降至 6.5，杂质去除可能会得到改善，但随着氯化物盐的引入，对 pH 的控制将在很大程度上受到削弱。可以考虑用 50 mmol/L MES 替换 HEPES。MES 的 pK<sub>a</sub> 为 6.0。如果 pH 值降至 6.5 以下，由于接近了 pK<sub>a</sub>，缓冲能力会变得更弱。HEPES 的 pK<sub>a</sub> 为 7.0。pH 值为 6.5 时，由于远离了 pK<sub>a</sub>，缓冲能力会减弱。

### 磷酸盐梯度洗脱方法中淋洗条件的开发

采用磷酸盐梯度洗脱法纯化抗体，需先使用高浓度的非磷酸盐与低浓度的磷酸盐一起进行梯度淋洗。基本原理是，在不洗脱抗体的最高磷酸盐浓度下，使用高浓度非磷酸盐进行淋洗，然后恢复平衡条件，再使用磷酸盐梯度洗脱抗体。这样，可以预先清洗主要通过 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 阳离子交换作用结合的杂质。

该方法仅适用于，在 10 mmol/L 磷酸盐或更高浓度下，不会在非磷酸盐梯度下洗脱的抗体。优化淋洗条件时可参考以下方法。对于在 15 mmol/L 磷酸盐下，以氯化钾梯度被洗脱的抗体为例：先载入纯化的 IgG (纯度较高)，使用平衡缓冲溶液进行淋洗，然后使用 1.0 mol/L 氯化物盐、5 mmol/L 磷酸盐进行淋洗，收集淋洗液。再用 1.0 mol/L 氯化物盐、10 mmol/L 磷酸盐进行淋洗，收集淋洗液。测定收集的淋洗液中是否含有 IgG，然后选择磷酸盐和非磷酸盐浓度最高、且不会洗脱 IgG 的淋洗液。如果尝试的淋洗条件都没有 IgG 被洗脱，可以适度增加磷酸盐浓度，或显著增加非磷酸盐浓度，如 2.0 mol/L。优化条件时，可采用 DoE 方法。

注意，在开始磷酸盐梯度之前，恢复到平衡状态是很重要的。否则，有可能在磷酸盐梯度一开始就造成 IgG 的损失。

### 非磷酸盐梯度方法的开发

大多数 pI 大于 7 的蛋白质，在 10 mmol/L 磷酸盐、pH 7.0 条件下，可用 2.0 mol/L 乙酸盐或氯化物盐梯度来洗脱。与磷酸盐梯度一样，在 pH 6.5 下会增加蛋白质的保留和载量，但也可能会影响对 pH 的控制。

将磷酸盐浓度降低到 5 mmol/L 会提高蛋白质载量，促进杂质的去除，但许多蛋白质即使在 2.0 mol/L 氯化物或乙酸盐也不能被洗脱下来。极少数的蛋白质可以在完全没有磷酸盐的情况下被洗脱，但是仍建议至少使用 5 mmol/L 的磷酸盐来维持 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 的稳定性。有些蛋白质是将磷酸盐浓度增加到 10 mmol/L 以上，才能被洗脱。需要使用 15 mmol/L 以上的磷酸盐，才能在乙酸盐或氯化物盐梯度中被洗脱的蛋白质极其少数，这种

情况使用磷酸盐梯度进行洗脱会更好。

由于存在这些变化和限制，因此可以合理使用磷酸钾-乙酸盐洗脱体系进行优化，如下所示：

平衡：10 mmol/L 磷酸钾，50 mmol/L HEPES，pH 7.0

上样：样品蛋白溶液调节 pH 至 7.0

淋洗：10 mmol/L 磷酸钾，50 mmol/L HEPES，pH 7.0

洗脱：20 CV 线性梯度至 10 mmol/L 磷酸钾、2.0 mol/L 乙酸钾，pH 7.0

清洗：500 mmol/L 磷酸钾，pH 7.0

梯度的前半部分洗脱表明，磷酸盐浓度梯度可降至 5 mmol/L。梯度的后半部分洗脱通常能够更好地减少杂质。如果蛋白质无法在 10 mmol/L 磷酸盐中洗脱，请增加浓度。DoE 可用于优化条件。

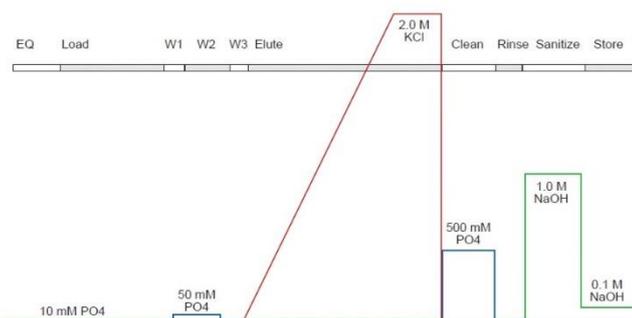
此时，可能会考虑将 pH 降至 6.5，通过磷酸基阳离子交换增强与蛋白质（pI 大于 7）的结合，这有利于去除杂质，同时增加与目标蛋白的结合能力。但实际情况可能不一定如此。

### 非磷酸盐梯度洗脱方法中淋洗条件的开发

如果蛋白质要用非磷酸盐梯度洗脱，例如用乙酸盐或氯化物盐洗脱，应事先使用磷酸盐淋洗 Ca<sup>++</sup>Pure-HA，然后再用平衡缓冲溶液进行平衡，才能开始梯度洗脱。使用比在非磷酸盐梯度洗脱时更高浓度的磷酸盐淋洗层析柱，将去除一部分与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 结合的杂质，其与钙基团亲和力比蛋白质强。优化淋洗条件的目的是确定不影响回收率的最高磷酸盐浓度（图7）。

优化淋洗条件，可参考以下方法：首先通过磷酸盐梯度进行洗脱的过程中，测定蛋白质峰中心处的磷酸盐浓度。然后，纯化的蛋白质（纯度较高）上样后，使用平衡缓冲溶液淋洗，然后以磷酸盐进行筛选时所测磷酸盐一半的浓度淋洗约 5 CV，收集淋洗液。接下来使用浓度高 10 mmol/L 的磷酸盐再次淋洗，以此类推，淋洗直到蛋白质开始出现在淋洗液中。最后将最终淋洗液的浓度设置为比蛋白质出现损失的磷酸盐浓度低 10 mmol/L。

图7：整体运行配置图



## 5.2. Fab、F(ab')<sub>2</sub> 和 VHH 的纯化

既有的研究表明，IgG Fab 区域富含正电荷，Fc 区域富含羧基。这意味着 VHH、Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 主要通过阳离子交换模式与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 磷酸盐结合，而 Fc 片段和完整 IgG 倾向于与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 钙通过金属亲和力获得较强的结合<sup>13</sup>。因此，低磷酸盐浓度下的氯离子梯度可实现出色的分离效果。而磷酸盐梯度通常具有足够的分辨率。最好的选择取决于抗体，建议按照 IgG 纯化指南进行筛选。

## 5.3. Fc 融合蛋白的纯化

Fc 融合蛋白相对宽泛，其纯化行为主要受融合蛋白的影响，有时甚至由其主导。推荐采用与 IgG 纯化类似的条件，但也应准备好将磷酸盐梯度中的终点浓度提高到 300 mmol/L。对于非磷酸盐梯度，应准备好增加磷酸盐的基线浓度。

## 5.4. IgM 的纯化

Ca<sup>++</sup>Pure-HA 是一款卓越的 IgM 纯化填料。大多数 IgM 单克隆抗体都能够通过磷酸盐梯度很好地洗脱<sup>11,14</sup>。其大多数会在 100~250 mmol/L 磷酸盐（pH 7.0）范围内洗脱。因此，300 mmol/L 的初始筛选梯度是一个很好的起点。如果需要，可以增加磷酸盐浓度来对应特殊的情况。一些 IgM 可以通过乙酸盐或氯化物盐梯度洗脱，但通常也需要相当高的磷酸盐基线浓度，如 20~50 mmol/L 或以上的浓度。

与 IgG 一样，洗脱前的淋洗非常有助于纯化效果。请遵循与 IgG 相同的指南。

## 5.5. IgA 的纯化

IgA 相比于 IgG 往往酸性更强，糖基化程度更高，通常以二聚体（通过 j-chain 连接）的形式存在。可以使用磷酸盐梯度对其进行有效纯化<sup>15,16</sup>。至于能否通过非磷酸盐梯度更好地进行纯化，仍有待观察。淋洗对纯化效果的改善程度，也有待确认。

## 5.6. 磷酸化蛋白的纯化

虽然磷酸化蛋白的磷酸基团与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 钙形成较强的配位键，但蛋白质整体的性质对洗脱也具有较大的影响，无法总结最佳的洗脱策略，因此建议磷酸盐和非磷酸盐梯度应同时进行筛选。

如果磷酸化蛋白是碱性的，磷酸盐基团将导致在乙酸盐或氯化物盐梯度中，比未磷酸化形式的蛋白洗脱更晚。甚至在乙酸盐或氯化物盐梯度中，非磷酸化形式蛋白质的洗脱条件，可能都无法洗脱磷酸化形式的蛋白。酸性蛋白质上的磷酸盐基团影响较小，因为酸性蛋白中存在许多羧基，更易于结合 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 的钙离子。然而，酸性蛋白质中的磷酸基团仍然具有增加结合的效应，可实现与非磷酸化蛋白的良好分离。

## 5.7. DNA 和 RNA 的纯化

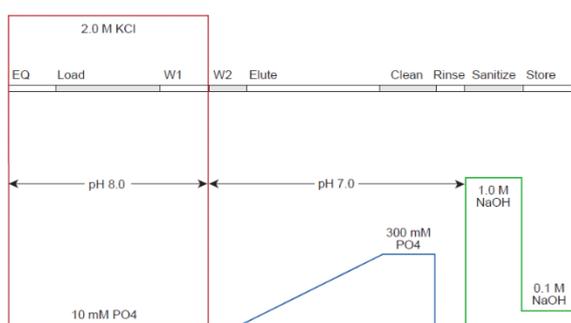
Ca<sup>++</sup>Pure-HA 常用于清除 DNA 和 RNA，而不是对其进行纯化，但它提供了其他色谱方法无法提供的独特纯化能力。在 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 上，DNA 的保留随碱基对数的增加而增加，同样 RNA 的保留随着碱基数的增加而增加。阴离子交换填料在纯化这两种化合物方面表现出色，但缺乏基于尺寸分级的能力。因此，结合这两种方法，即可实现非凡的纯化能力（图 8）。

RNA 从 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 洗脱的磷酸盐浓度要远低于 DNA。否则，就可以将相同的纯化平台模板同时应用于两者了。可先用简单的磷酸盐梯度开始观察。用 10 mmol/L 磷酸盐、50 mmol/L Tris (pH 8.0~8.5) 平衡、上样、淋洗，然后用线性梯度洗脱至 500 mmol/L 磷酸盐、50 mmol/L Tris (pH 8.0~8.5)。

第二次运行时，用含 2.0 mol/L 氯化物盐的 10 mmol/L 磷酸盐、50 mmol/L Tris (pH 8.0~8.5) 平衡层析柱。将样品平衡到相同的条件，然后上样。用平衡缓冲液淋洗，然后线性梯度洗脱至含 500 mmol/L 磷酸盐的 2.0 mol/L 氯化物溶液 (pH 8.0~8.5)。RNA 和 DNA 将在很晚的时候被洗脱。

运行碱性氯化物盐洗脱法有三个重要优点。它对阳离子交换作用的强烈抑制，使多聚核苷酸更易接近 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 钙残基，从而提高了载量。还将清除大量的主要与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 磷酸基团通过阳离子交换结合的污染物。最后，它与先前的阴离子交换步骤非常协调，在此步骤中，多聚核苷酸在碱性 pH 值下以高氯化物盐浓度被洗脱。

图 8：多聚核苷酸的纯化模型



### 混合使用两种保留模式，实现两全其美：

在碱性以及高氯化物盐浓度下进行上样和淋洗，可实现最佳载量和通过淋洗去除杂质的效果。然后用 10 mmol/L 磷酸盐 (pH 7.0) 淋洗，之后用线性梯度洗脱至 300 mmol/L 磷酸盐 (pH 7.0)。洗脱条件简单可降低成本，而且由于恢复了静电相互作用（特别是 Ca<sup>++</sup>Pure-HA-磷酸盐和多聚核苷酸磷酸盐间的静电排斥作用），会促进 DNA 提前洗脱。

有三个关键点可以优化条件：1) 初始多聚核苷酸结合的磷酸盐浓度越高，在上样和淋洗过程中杂质的去除效果会更好。但是要注意，增加磷酸盐，会降低多聚核苷酸的结合能力。2) 如果要增强结合的多聚核苷酸群的大小区分，请结合磷酸盐梯度增加氯化物盐浓度。终点的氯离子浓度越高，区分效果越好。或者，在梯度过程中增加 pH 值。需要注意的是，一般精准控制电导率要比控制 pH 值更容易。3) 调整梯度斜率和长度。

在方法开发期间，DoE 可用于减少实验工作量。对于生产规模，如果需要可以将线性梯度转换为阶梯梯度。

## 5.8. 病毒的纯化

脂质包膜病毒的包膜中的磷酸基团与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA-钙形成强配位键、包膜中的钙基团与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA-磷酸盐形成强配位键。因此，与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 具有非凡的亲合力，有时洗脱需要高达 600 mmol/L 的磷酸盐<sup>17</sup>。病毒大小与洗脱所需磷酸盐浓度之间的相关性尚未见报道，但考虑到大多数应用于 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 的样品都会出现这种情况，这种相关性也是极其可能的。在非磷酸盐梯度下洗脱脂质包膜病毒是不现实的。但在磷酸盐梯度洗脱前，在高浓度磷酸盐水平下，用高盐进行淋洗可有效清除杂质。

用 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 纯化非脂质包膜病毒是无法预测的，就像无法预测用 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 纯化所有蛋白质一样（多样性的范围太广）。建议利用磷酸盐和非磷酸盐梯度进行条件优化。

## 6. 装填

与聚合物基质的填料颗粒相比，Ca<sup>++</sup>Pure-HA 的颗粒更致密，沉降更快。这为不适用于聚合物填料的装填方法提供了机会，但也需要调整标准层析柱的装填方法。

装填 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 采用不同于聚合物填料装填的方法。聚合物填料通常需要压缩 10~20%，但是 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 决不能进行压缩。虽然压碎填料的可能性为零，但压缩会迫使柱床中的颗粒相互挤压导致填料颗粒间没有足够的间隙进而导致磨损产生细小碎片，最终可能干扰层析柱操作。

解决该问题的一种方法是，在装填的 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 层析柱顶部留下微小的空隙。这基本上不会对性能有较大影响。理想状态是紧贴着柱头分配器，保证其恰好不接触柱床顶部。

### 6.1. 匀浆悬浮装填法 (Slurry-Packing)

为了提高填料稳定性（相关要求请参见第 4.3 节 保存方法），建议用缓冲溶液来匀浆填料。可以使用 pH 6.5 或以上的含磷酸盐的溶液（如：20 mmol/L 磷酸盐、150 mmol/L NaCl, pH 6.8）或高 pH 溶液（如 0.1 mol/L NaOH）。装填时，必须注意保持

Ca<sup>++</sup>Pure-HA 悬浮，防止其迅速沉淀。不要使用磁力搅拌棒悬浮填料，否则会产生小颗粒。对于实验室规模的层析柱，将 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 浆液倒入到含 2~3 cm 缓冲溶液的层析柱中，防止气泡进入层析柱。使用储罐，采用流速或重力/辅助重力沉降法装填，柱床会更稳定。流速装填一般需要约 10 CV 的缓冲溶液，确保柱床稳定成型。装填时，层析柱柱头分配器刚好接触柱床的顶部（见上文），但不要强制压缩柱床。

## 6.2. 干式装填法 (Dry-Packing)

干式装填 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 时，请先根据给定批次的振实密度 (tap density) 算出装填一定柱床体积所需的干填料的量。例如，层析柱装填体积为 10 mL，振实密度为 0.63 g/mL，所需干填料量为：

$$10 \text{ mL} \times 0.63 \frac{\text{g}}{\text{mL}} = 6.3 \text{ g}$$

小心地将填料添加到层析柱中，然后轻敲层析柱底部，使其沉降。通常敲 1 到 2 分钟 (约 250~500 次敲击) 即可。将填料添加到层析柱后，放置柱头分配器使其恰好接触柱床顶部。不要试图压缩 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 的柱床。然后，使用适当的装填缓冲溶液 (如 20 mmol/L 磷酸盐、150 mmol/L NaCl, pH 6.8 或 0.1 mol/L NaOH) 以 40~60 cm/hr 的流速 (体积至少为 1.5 CV) 向上注入层析柱，确保填料完全浸润、柱床没有空气。其后，以 600~1,000 cm/hr 的流速 (体积至少为 10 CV) 向下压柱，确保有效装填层析柱。必要时，可调整层析柱分配器，消除柱床顶部空隙。

该方法的优点是，将填料添加到层析柱后，填料可以在很大程度上实现自动化装填。缺点是，根据使用的层析柱硬件不同，装填效率有可能较差。

## 6.3. 实验室规模层析柱

实验室规模层析柱既可以使用匀浆悬浮装填法，也可以使用干式装填法。匀浆悬浮装填时，应使用至少为预期运行流速 2 倍的流速。例如，层析柱的运行流速为 300 cm/hr 时，装填流速应为 600 cm/hr。通常，使用 600~1,000 cm/hr 的流速即可。干式装填法，目前已成功应用于直径达 44 mm 的层析柱。如上所述，干式装填法可能无法在所有层析柱硬件上都达到满意的结果。如有怀疑，请结合使用流速装填法。

## 6.4. 工业规模层析柱

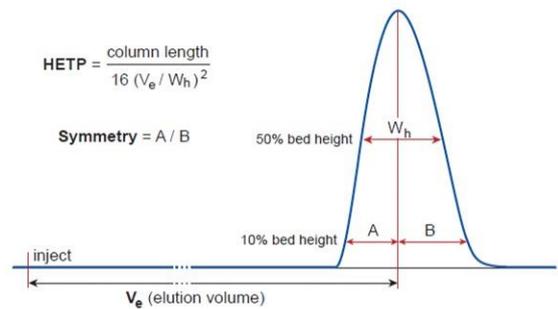
对于大规模层析柱，可以使用上述匀浆悬浮装填法装填。将装填缓冲液添加入填料后，使用桨叶或顶置叶轮搅拌，保持填料悬浮 (注意不能使用产生剪切力的搅拌装置)。通过倾析法或隔膜泵将填料继续注入层析柱。建议在顶部流入 (Up-flow) 模式下以较慢流速 (约 60 cm/hr) 长时间运行层析柱，去除柱床中的空气。对于流速装填法，流速应至少为预期运行速度的 1.5 倍。例如，层析柱的运行流速为

200 cm/hr 时，装填流速应为 300 cm/hr。重力或辅助重力装填的结果也是可以接受的，此方法通常用于需要快速进行装填 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 填料时采用。

## 6.5. 柱效评价

装填质量的评估与聚合物填料装填后的柱效测定方法相同，检测 HETP 和对称性 (图 9)。

图 9: HETP 和对称性测定



## HETP 和对称性的测定

选择测定样品很重要。不应选择与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 直接相互作用的物质。这就排除了磷酸盐缓冲溶液，因为磷酸盐缓冲溶液与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA-钙相互作用，容易导致拖尾。一般来说，盐也并不适合。与离子交换体一样，虽然表面的电荷倾向于把带同种电荷的离子排除到空隙中，但也阻碍了带相反电荷的离子的传输。这将会影响盐峰的前沿和拖尾。丙酮可以避免这些限制。以 0.1~1.0 % 的浓度将其溶解到平衡缓冲溶液中。丙酮在 UV280 nm 下有吸收值。

HETP 和对称性应与流速无关，但为了确保一致性，测定时应同一流速条件下进行，一般使用层析柱实际运行时的流速。

不管填料成分如何，重要的安全警告等都同样适用于所有层析柱。测定 HETP 和对称性失败的最常见的原因有测试样品在进样后到柱头之间的扩散。扩散现象在长长的管道中比较明显，或在配有混合装置的系统上更加明显。用于运行大型层析柱的层析系统来运行小型层析柱时扩散最严重。

由于样品扩散造成 HETP 或对称性差与填料质量无关。这往往说明层析系统和层析柱组合上存在问题。为了减少样品的扩散影响，准确评估层析柱的柱效，应使用单根管道直接从进样阀连接到层析柱，不要经过任何阀门或混合装置。管道应足够长，避免连接点扭结。多几厘米的长度没有问题，但也不应过长。

## 7. 实际问题

### 7.1. pH 的稳定性

Ca<sup>++</sup>Pure-HA 的稳定性依赖于 pH。目前的共识是，pH 6.5 是操



作 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 时可以使用的最低 pH 值。这意味着只要所有缓冲溶液的 pH 值在 6.5 或以上, Ca<sup>++</sup>Pure-HA 应该是稳定的, 但这忽略了所有带电介质中常有的一个现象: 即 pH 偏移。pH 偏移是不受控制的 pH 变化, 与电导率的变化有关。

Ca<sup>++</sup>Pure-HA-磷酸盐在晶体表面上的主导地位使得 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 呈阴离子性。因此, 在平衡过程中带正电荷的水合氢离子会积聚在 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 磷酸盐区域。任何独立的水合氢离子都可以与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA-磷酸短暂结合, 但会很快被其他离子的竞争所取代, 因此其停留时间极短。然而, 它们确实会在表面形成稳定的凝聚云, 其中的离子浓度比本体溶液高出许多倍。燃料电池研究领域的模拟表明, 带电表面的对离子浓度可达本体溶液浓度的 100 倍。

电导率增加, 可将水合凝聚云在不同程度上替换成本体溶液<sup>6,7</sup>。这与向系统中添加酸具有相同的效果: pH 值下降。使用磷酸盐梯度洗脱时, 由于磷酸盐本身也是缓冲剂, 其浓度的增加中和了这种效果, 因此这种效果会在一定程度上得到缓冲。而使用氯化物或乙酸盐梯度洗脱时, 缓冲能力非但没有增加, 反而 pH 值偏移更严重; 这时, 通常会将 pH 值降低约 1 个单位, 有时甚至降低 2 个单位或更多。持续时间可达 5 CV 或以上。

虽然已经考虑了各种策略来缓和这些偏移, 但没有一种能够彻底解决该问题。一种方法是, 向 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 缓冲溶液中添加钙。其原理是, 钙在缓冲溶液中的持续存在将会阻止钙从晶体表面浸出。这种方法最常见的困难是, 钙和磷酸盐在溶液中会自发形成稳定的结合, 包括形成 Ca<sup>++</sup>Pure-HA。浑浊度会升高, 有时甚至出现明显可见颗粒。

另一种方法是, 使用两性离子缓冲溶液, 如 MES 和 HEPES (它们不会与 Ca<sup>++</sup>Pure-H-磷酸盐结合)。然后使用阳离子缓冲化合物 (如 Tris), 而不是氢氧化物滴定磷酸盐缓冲溶液。其原理是, 带正电荷的缓冲化合物会被结合到对离子凝聚云中。这样, 电导率的增加会在释放水合氢离子的同时, 增加缓冲能力。其局限是, 缓冲对离子具有较窄的 pK<sub>a</sub>, 限制了其抵抗 pH 值的深度降低的能力。

第三种方法是, 使用线性梯度, 不使用阶梯梯度洗脱。pH 偏移的幅度和持续时间与电导率增加的速率成正比。与氯化物盐相比, 乙酸盐的较低摩尔电导率能产生较小幅度的 pH 偏移。

同时, 应考虑使用更高的 pH 条件。

## 7.2. 磷酸盐对填料稳定性的影响

目前该领域的共识表明, 必须保持 5 mmol/L 的最小磷酸盐缓冲溶液浓度, 才能保持 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 在 pH 6.5 时的稳定性。

否则, 磷酸盐会从晶体结构中浸出, 颗粒会逐渐降解。要在较高的 pH 值下保持稳定, 就需要较低的磷酸盐浓度。但是目前尚无相关的定量指导来确定这个最小值应该是多少。因此, 即使在较高的 pH 值 (例如 7.0、7.5 和 8.0) 下, 将 5 mmol/L 设定为最小磷酸盐浓度, 也就成了业内的常见做法。用碱溶液进行消毒和保存时通常不添加磷酸盐。

## 7.3. 其他因素对填料稳定性的影响

螯合剂也会降低 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 的稳定性。在低 pH 值下, 螯合剂与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 形成复合物。但即使在碱性 pH 下, 也无法保护 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 不受螯合剂的影响。众所周知, 常用于洗脱亲和或阳离子交换填料的柠檬酸盐也是一种钙螯合剂。因此上一步 Protein A 亲和层析, 如果用柠檬酸缓冲溶液洗脱时, 可能会有问题。使用乙酸盐洗脱就避免了这种限制。

EDTA 和 EGTA, 还有天冬氨酸、谷氨酸及其他已知具有溶解和运输金属能力的化合物也会影响稳定性。细胞培养液中螯合剂的大量存在, 也可以解释为何 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 更常用于精制阶段, 而不是初期的产品捕获。Ca<sup>++</sup>Pure-HA 的稳定性不受高压灭菌的影响。高压釜中能达到的温度要比产生稳定 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 颗粒而晶间焊接所用的温度低 200°C 以上。

## 7.4. 失稳状态

Ca<sup>++</sup>Pure-HA 质量过度丧失的状态包括, 操作压力的变化和柱床的最终塌陷。这两种效应被认为是由于单个颗粒坍塌引起, 而这又是由 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 晶间焊接区域消失所导致。这些效应在大直径层析柱中表现最为明显, 因为小直径层析柱拥有更强的柱壁支撑。

从化学角度来看, Ca<sup>++</sup>Pure-HA 表面损失 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 填料会暴露出更多的 Ca<sup>++</sup>Pure-HA。这意味着选择性应保持不变。然而, 表面 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 的损失还转化为表面积的损失, 也意味着载量的损失, 分离性能最终也会受到影响。何时出现以及多大程度的损失主要取决于缓冲溶液、梯度配置和层析柱直径。因此, 层析柱寿命研究也成了工艺验证的必要部分。

## 7.5. 磷酸盐缓冲溶液的限制

磷酸盐缓冲溶液是 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 层析中必要的组成部分, 但也可能会带来潜在的局限性。建议避免使用无水磷酸盐缓冲溶液。分离时, 消除水合水所需的高热会导致多磷酸盐的形成, 进而强烈结合 Ca<sup>++</sup>Pure-HA-钙离子。多磷酸盐可能会与样品组分竞争与填料的结合, 改变分离选择性和载量。高浓度磷酸盐清洗步骤, 可在运行后充分去除它们, 但无法阻止其在方法的早期步骤中产生的干扰。

## 7.6. 填料的变色现象

Ca<sup>++</sup>Pure-HA 填料有时会因结合金属离子污染物，在层析柱顶部积累引起变色。变色通常是黄色到红色，红色到棕色的过程。金属污染物主要来自生产注入水（WFI）及后续保存过程中不锈钢表面的三价铁或二价铁的渗滤液。细胞培养物中也有大量的金属离子，最常见的是铁。金属污染也可能是先前的纯化方法中遗留下来的。

Ca<sup>++</sup>Pure-HA 填料中金属的积累，将会引起污染金属和晶体结构中的钙的交换。污染的金属先与 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 磷酸盐结合，然后与钙置换后将永久嵌入到晶体结构中，无法被选择性洗脱或被清洗。

研究表明，非钙金属的累积不会改变 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 的分离性能<sup>18</sup>。事实上，Ca<sup>++</sup>Pure-HA 的变色表明，Ca<sup>++</sup>Pure-HA 可清除其他常用工业树脂无法清除的原料中的金属离子。除了对铁具有高亲和力，Ca<sup>++</sup>Pure-HA 还能清除各种重金属，包括铬、铅、镉和铝离子。原料使用硅藻土进行深层过滤时，样品中也会大量浸出铝离子。

## 7.7. 洗脱物的钙残留

从 Ca<sup>++</sup>Pure-HA 中洗脱的蛋白质通常含约 1 mmol/L 的钙。人体体液中钙的含量大约也为 1 mmol/L。因此，未见任何不良反应的相关报告。



## 8. 参考文献

- <sup>1</sup>T. Kawasaki, Hydroxyapatite as a liquid chromatographic packing, *J. Chromatogr.* 544 (1991) 147-184.
- <sup>2</sup>M. Gorbunoff, The interaction of proteins with hydroxyapatite. I. Role of protein charge and structure, *Anal. Biochem.* 136 (1984) 425-432.
- <sup>3</sup>M. Gorbunoff, The interaction of proteins with hydroxyapatite. II. Role of acidic and basic groups, *Anal. Biochem.* 136 (1984) 433-439.
- <sup>4</sup>M. Gorbunoff and S. Timasheff, The interaction of proteins with hydroxyapatite. III. Mechanism, *Anal. Biochem.* 136 (1984) 440-445.
- <sup>5</sup>P. Gagnon, P. Ng, C. Aberrin, J. Zhen, J. He, H. Mekosh, L. Cummings, R. Richieri, S. Zaidi, A ceramic hydroxyapatite based purification platform: simultaneous removal of leached protein A, aggregates, DNA and endotoxins, *Bioprocess Intl.* 4 (2006) 50-60.
- <sup>6</sup>T. Bankston, L. Dattolo, G. Carta, pH Transients in hydroxyapatite chromatography columns, experimental evidence and phenomenological modeling, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2123-2131.
- <sup>7</sup>L. Dattolo, E. Keller, G. Carta, pH Transients in hydroxyapatite columns, effects of operating conditions and media properties, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7573-7578.
- <sup>8</sup>L. Guerrier, I. Flayeux, E. Boschetti, A dual-mode approach to the selective separation of antibodies and their fragments, *J. Chromatogr. B* 755 (2001) 37-46.
- <sup>9</sup>P. Gagnon, P. Ng, J. He, J. Zhen, C. Aberrin, H. Mekosh, L. Cummings, Simultaneous removal of aggregates, leached protein A, endotoxin, and DNA from protein A purified IgG with CHT ceramic hydroxyapatite and CFT ceramic fluorapatite, Oral presentation, Purification of Biological Products Conference, Santa Monica, December 5-7, 2005.  
[http://validated.com/revalbio/pdf/PBP\\_2005.pdf](http://validated.com/revalbio/pdf/PBP_2005.pdf)
- <sup>10</sup>P. Gagnon, K. Beam, Antibody aggregate removal by hydroxyapatite chromatography, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10 (2009) 440-446.
- <sup>11</sup>Dj. Josics, K. Lester, R. Kuhl, F. Noll, J. Reusch, Purification of monoclonal antibodies by hydroxylapatite HPLC and size exclusion HPLC, *Biol. Chem. Hoppe-Seylars* 372 (1991) 149-156.
- <sup>12</sup>L. Guerrier, I. Flayeux, E. Boschetti, A dual-mode approach to the selective separation of antibodies and their fragments, Oral presentation, VIIth Symposium of the European Society for Biochromatography, Nantes, May 9-11, 2000.
- <sup>13</sup>P. Gagnon, CW. Cheung, P. Yazaki, Cooperative multimodal retention of IgG, fragments, and aggregates on hydroxyapatite, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3857-3865.
- <sup>14</sup>P. Gagnon, SM Abdul-Latiff, C. Cai, W. Lau, CL. Lim, HT. Gan, IgM purification with hydroxyapatite: a primer. *Bioprocess Intl.* 12 (2014) 40-51.
- <sup>15</sup>K. Aoyama, J. Chiba, Separation of different molecular forms of IgA and IgM monoclonal antibodies by high performance liquid chromatography on spherical hydroxyapatite beads, *J. Immunol. Met.* 162 (1993) 201-210.
- <sup>16</sup>E. Lullau, W. Marison, U. von Stockar, Ceramic hydroxyapatite: a new tool for separation and analysis of IgA monoclonal antibodies, in *Animal Cell Technology*, (M. Carondo, Ed.) pp. 265-269.
- <sup>17</sup>M. Saito, Y. Kurosawa, T. Okuyama, Scanning electron microscopy-based approach to understand the mechanism underlying the adhesion of Dengue viruses on ceramic hydroxyapatite, *PLoS ONE* 8 (2013) e53893.
- <sup>18</sup>S. Shepard, C. Brickman-Stone, J. Schrimser, G. Koch, Discoloration of ceramic hydroxyapatite used for protein chromatography, *J. Chromatogr. A* 891 (2000) 9398.



东曹（上海）生物科技有限公司  
上海市徐汇区虹梅路 1801 号 A 区凯科国际大厦 1001 室  
电话：021-3461-0856  
传真：021-3461-0858  
E-mail: info.tbs@tosoh.com.cn  
网址: <http://www.separations.asia.tosohbioscience.com/home-cn>

Ca<sup>++</sup>Pure-HA 是 Tosoh Bioscience LLC 在美国的注册商标。

未经东曹株式会社的书面许可，禁止影印或复印本书的全部或部分內容。

本书中的內容如有更改，恕不另行通知。