

通过 Cellufine™ 对 *Streptococcus pneumoniae* 血清型 19F 的荚膜多糖类的纯化

肺炎链球菌是肺炎的主要病原体之一，在全世界尤其是儿童和老年人会引发高患病率和高死亡率。最重要的毒性因子之一是细菌表面的荚膜多糖(CPS)，基于该荚膜多糖的肺炎球菌疫苗被用于预防这些传染病。以往的乙醇沉淀采用以纯化适合绝大多数血清型的 CPS 为目的的常规流程。但是，这些工艺复杂且用时较长。其结果是肺炎球菌疫苗非常昂贵 [1]。为了克服这些缺点，业界提出了很多经过改善的流程提案。这些流程的几项中含有层析流程。这里将提出无需采用乙醇沉淀的简易化 2 步 CPS 层析纯化流程(图 1)提案。这种流程采用了疏水相互作用层析 (HIC)及阴离子交换层析 (AEX)。本文将介绍实现这种流程最优化的 2 种层析介质 Cellufine MAX Butyl HS 和 Cellufine MAX Q-hv。



图 1 CPS 纯化流程的提案

方法与材料

粗纯化多糖试样调配

使用含 5% 脱纤维羊血的胰酶大豆琼脂培养基，在 37°C 下对 *Streptococcus pneumoniae* 19F (ATCC 49619) 培养 24 小时。将菌落(colony)接种到脑心浸液琼脂培养基 2000 mL 内，并在 37°C 下培养 24 小时。

然后，加入 10%(w/v)的脱氧胆酸钠，在 37°C 下培养 24 小时，促使细胞溶解。通过离心分离 (12,000rpm、15 分钟) 及过滤 (0.45 μm 醋酸纤维素膜) 回收上清液，并通过使用 milliq 超纯水的错流超滤(Cross Flow) (PES、10 万 MWCO) 来浓缩。在这种浓缩液中加入 50% 饱和硫酸氨，并在 4°C 下培养 24 小时。通过离心分离 (12,000rpm、15 分钟) 及过滤 (0.45 μm 醋酸纤维素膜) 回收上清液。并将这种上清液用于后面的 HIC 工序。

层析工序

本次使用的是填充在 Super Edge Empty Mini Columns (6.7 mmID×30 mmH, 1.06 mL = 1 column volume (CV)) 中的层析介质。层析使用 AKTA avant25 系统，并按照下文所述的条件实施了纯化试验。

在流速为 0.212 mL/min (滞留时间 5.0 min) 的流穿模式下实施了 HIC 工序。用含有 2.0M 硫酸氨的 50mM 磷酸钠缓冲液(pH6.8)平衡色谱柱。添加含有 726 μg/mL 多糖类、73.4 μg/mL 蛋白质、772 μg/mL 核酸的粗多糖试样液 40CV，并用 10CV 的平衡缓冲液洗脱。将非吸附馏分视为流穿及洗脱馏分加以回收。使用 MilliQ 超纯

水的错流超滤（PES、100,000 MWCO）透析这种回收液，浓缩试样。

在流速为 0.424 mL/min（滞留时间 2.5 分钟）的吸附&溶出模式下实施了 AEX 工序。采用 50mM 磷酸钠缓冲液(pH6.0)平衡色谱柱。更换缓冲液后，对 HIC 工序后的试样上样至 10%穿透(Breakthrough)，并用 15CV 的平衡缓冲液来洗脱。使用含 1.0 M NaCl 的 50 mM 磷酸钠缓冲液(pH 6.0)对吸附的试样实施逐步溶出（32%，20CV →100%，20CV）。将最初的步骤中溶出的馏分作为最终 CPS 试样加以回收。

纯化后的评价

使用蒽酮-硫酸法测量多糖类（Ps）的量，并按照 WHO Technical Report Series 测量杂质（蛋白质及核酸）的量。通过采用蛋白质检测试剂盒（Bio-Rad Laboratories）的 Bradford 法测量蛋白质（Pr）。采用 260nm 的吸光光度法测量核酸（NA），并按照 1AU=50 μg/mL 计算核酸量。

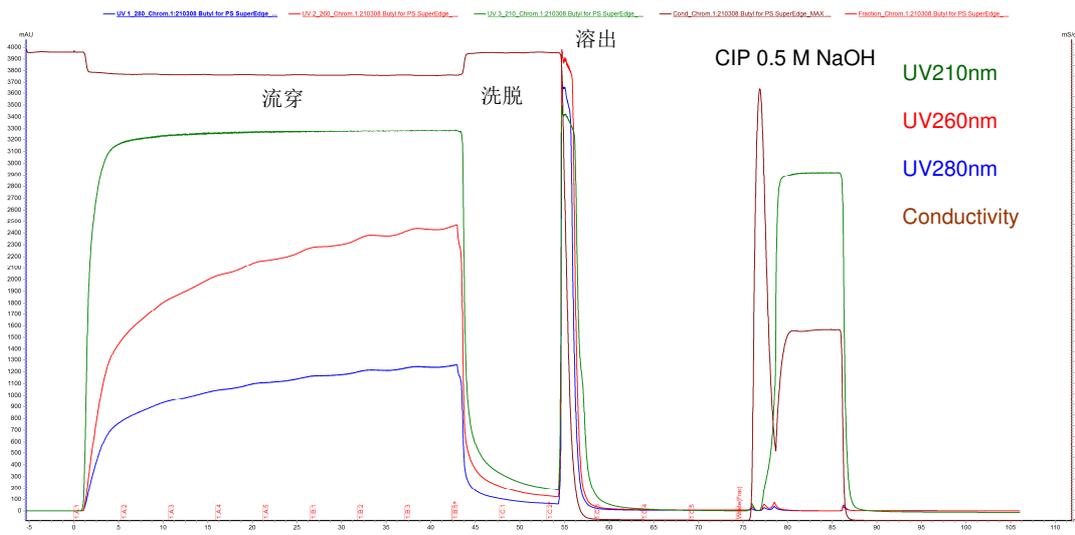
结果与讨论

使用 Cellufine MAX Butyl HS 的 HIC 工序的色谱图及馏分分析（fraction analysis）的结果如图 2 所示。此外，与其他 HIC 介质的比较如表 1 所示。在这个工序内，几乎所有多糖类都被回收到流穿与洗脱馏分中，并从流穿馏分中清除了部分杂质（图 2）。与其他树脂相比，拥有最适合 CPS 纯化的配体密度的 Cellufine MAX Butyl HS 的多糖类回收率和清除杂质的性能表现良好（表 1）。

	Ps μg/mL	Ps Recovery%	Ps Purity%	Pr μg/mL	NA μg/mL	Pr/Ps %	NA/Ps%
要求标准	-	-	-	-	-	3	2
试样	726	-	46.2	73.4	772	10	106
Cellufine MAX Butyl HS	518	89	54.3	N.D.	436	0	84
Cellufine MAX Butyl	500	86	52.6	7.91	444	2	89
其他公司产品 A	510	88	51.9	7.24	466	1	91
其他公司产品 B	450	77	48.5	3.97	474	1	105

表 1 与不同的 HIC 介质的纯化比较

(a)



(b)

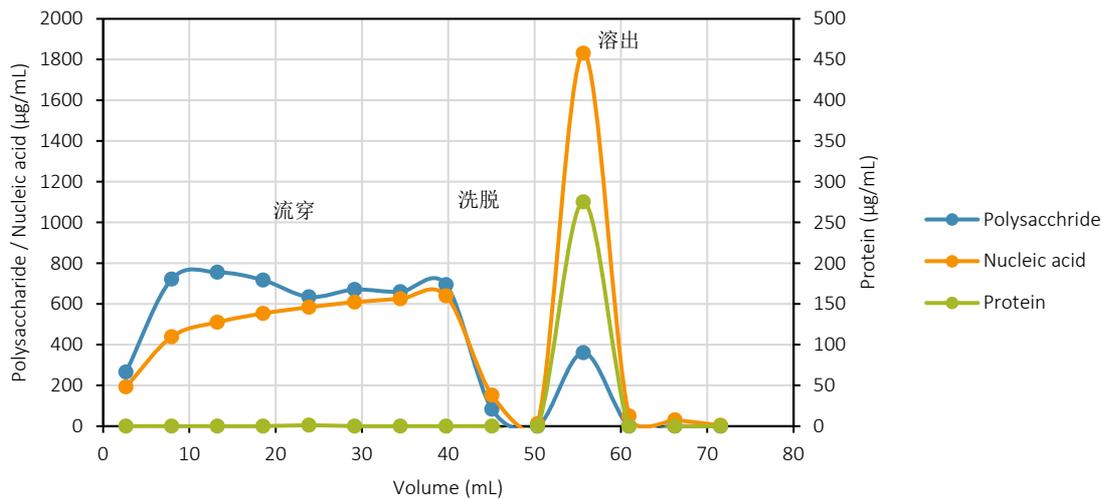


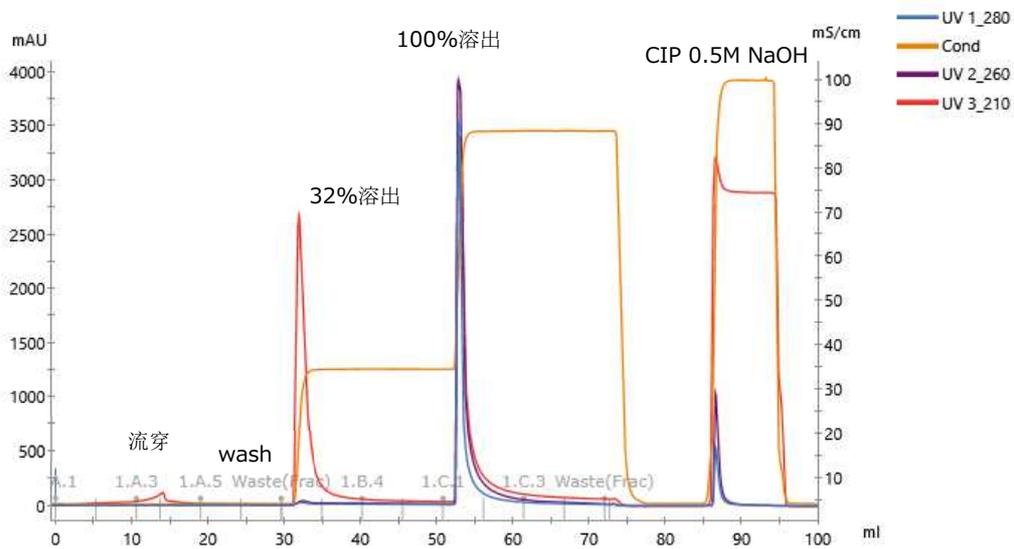
图2 使用 Cellufine MAX Butyl HS 的色谱图 (a) 及馏分分析结果 (b)

使用 Cellufine MAX Q-hv 的 AEX 工序的色谱图及馏分分析的结果如图 3 所示。此外，与其他 AEX 树脂的比较如表 2 所示。在这个工序中，在第 1 步（32%的溶出缓冲液）溶出了多糖类，在第 2 步（100%的溶出缓冲液）溶出了杂质。（图 3）Cellufine MAX Q-hv 具有卓越的多糖类分离回收及杂质清除性能。（表 2）

	10% DBC mg/mL-resin	Ps Recovery %	Ps Purity %	Pr µg/mL	NA µg/mL	Pr/Ps %	NA/Ps %
要求标准	-	-	-	-	-	3	2
上样	-	-	75.6	5.13	162	1	31
Cellufine MAX Q-hv	6.39	97.8	98.7	N.D.	4.25	0	1
Cellufine MAX Q-h	6.56	63.1	99.3	N.D.	1.48	0	1
Cellufine MAX Q-r	5.01	83.2	96.3	N.D.	8.23	0	4
其他公司产品 C	1.87	92.2	94.2	N.D.	5.30	0	6
其他公司产品 D	4.46	94.9	96.8	N.D.	6.95	0	3
其他公司产品 E	5.86	91.1	98.0	1.55	4.15	1	2

表 2 与不同的 AEX 树脂的纯化比较

(a)



(b)

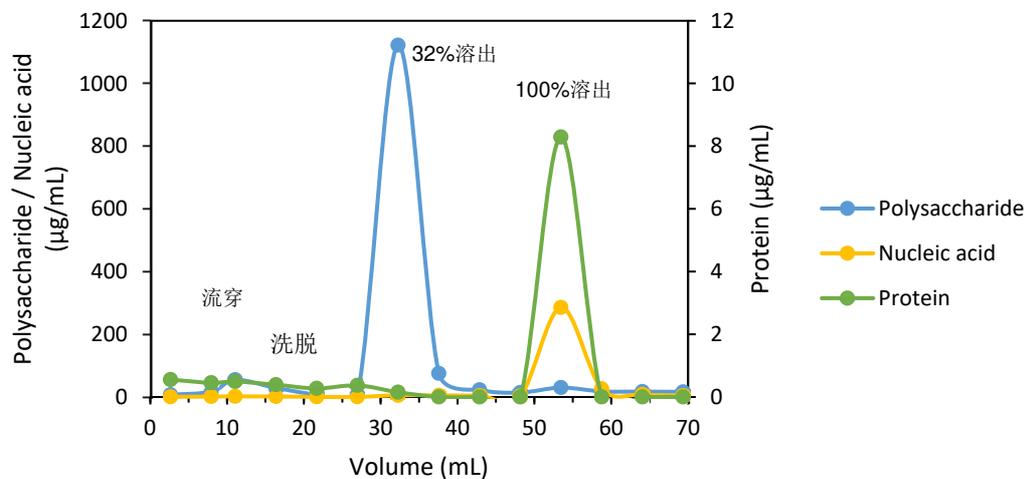


图 3 使用 Cellufine MAX Q-hv 的色谱图 (a) 及馏分分析结果 (b)

总结

本文介绍了采用二次层析来纯化荚膜多糖的简易流程。这种流程不包含乙醇沉淀，因此更加高效。通过使用 Cellufine MAX Butyl HS 及 Cellufine MAX Q-hv，实现了卓越的分离效果与较高的回收率。

Reference 文献

[1] Norma Suárez et al., Purification of Capsular Polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*: Traditional and New

Methods, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6 (2018), 145.

[2] WHO (2009). Recommendations to Assure the Quality, Safety and Efficacy of Pneumococcal Conjugate Vaccines.

关于产品信息的说明 有关产品的详细信息请浏览相应的网页。

Cellufine MAX Butyl HS

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/cn/cellufine/grade/>

Cellufine MAX Q-hv

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/cn/cellufine/grade/>

使用说明书及技术资料可在以下网页中下载 pdf。

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/cn/cellufine/guide/>

订购说明

产品名称	包装尺寸	目录编号.
Cellufine MAX Butyl HS	1ml x 5 (Mini-Column)	22200-51
	5ml x 1 (Mini-Column)	22200-55
	100ml	22200
	500ml	22201
	5 L	22202
	10 L	22203
Cellufine MAX Q-hv	1ml x 5 (Mini-Column)	22100-51
	5ml x 5 (Mini-Column)	22100-15
	100ml	22100
	500ml	22101
	5 L	22102
	10 L	22103

关于各种咨询和技术的说明

(北美& 欧洲)

JNC America, Inc.
555 Theodore Fremd Ave,
Rye, NY 10580
Tel: 914-921-5400
Fax: 914-921-8822
Email: cellufine@jncamericany.com

(日本、亚洲、其他)

JNC 株式会社
生命化学事业部
〒100-8105
东京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号
新大手町大楼 9 楼
Tel: 03 3243 6150
Fax: 03 3243 6219
Email: cellufine@jnc-corp.co.jp