

## 知识介绍

## 亲和-膜过滤技术及其应用

李存芝 李琳 胡松青 陈玲 王海英

(华南理工大学食品与生物工程学院, 广东 广州 510640)

**摘要:**亲和-膜过滤技术是一项兼有亲和与膜分离优点的新型分离技术。介绍了亲和-膜过滤技术体系、亲和载体的制备及与目标分子的结合方式,综述了其在生物分离工程中的应用状况,指出今后研究工作的重点是亲和载体的开发及相关过程理论和技术的完善。

**关键词:**亲和-膜过滤;亲和载体;配基

**中图分类号:**TQ028.53

**文献标识码:**A

**文章编号:**0253-4320(2004)01-0065-03

**Affinity filtration technology and its applications**

LI Cun-zhi, LI Lin, HU Song-qing, CHEN Ling, WANG Hai-ying

(College of Food and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** As a new technology, affinity filtration has advantages of both affinity and membrane separation. The constitution of affinity filtration system, preparations of affinity carrier, link ways of affinity carrier and objective molecule were introduced. Its applications in bioseparation engineering were also reviewed. It was pointed out that the development of affinity carrier, improvements of affinity filtration technology and theory were research key points.

**Key words:** affinity filtration; affinity carrier; ligand

亲和-膜过滤(Affinity filtration)技术也称亲和错流过滤(Affinity Cross-Flow Filtration,简称ACFF),由Medda于1981年首次提出<sup>[1]</sup>,它是将水溶性或非水溶性高分子亲和载体与目标产物进行特异性可逆反应,然后用膜进行错流过滤。亲和-膜过滤是生物亲和技术与膜分离相结合的新型纯化技术,其研究涉及生物化学、化学工程和生物工程等多门学科交叉的前沿领域,现已应用于多种生物大分子的分离纯化,是目前纯化效率较高的生物分离纯化技术之一。亲和-膜过滤技术既充分利用了载体上的配基对目标组分的专一的、可逆的亲和和吸附作用和超滤膜分离易于实现大规模生产的优点,又克服了超滤膜分离技术对分子质量相近的大分子无法实现分离的缺点,在生物工程下游产品纯化过程中具有广阔的应用前景。

## 1 亲和-膜过滤技术体系

亲和-膜过滤是利用分子质量较高的水溶性高

分子化合物、不溶性微粒等为载体,并在载体上耦联一定量对目标分子具有特异性结合的亲和配基,获得亲和载体。在膜分离过程中结合有目标分子的亲和载体可被膜完全截留,而其他杂质分子则透过滤膜,经洗脱后实现目标分子的分离与纯化。

### 1.1 载体

在亲和-膜过滤技术的研究中,制备具有较强结合力和良好选择性的亲和载体一直是该领域的研究重点。理想的载体在操作条件下其化学性质和机械性质应保持稳定,对杂质分子无专一性吸附,易被配基所修饰,有足够大的亲和吸附容量。一般来说,用于亲和-膜过滤的载体有2类:一类是水溶性大分子载体<sup>[2-4]</sup>,另一类是水不溶性微载体<sup>[5-7]</sup>。水溶性载体有许多优点:亲和载体与目标蛋白在均相体系中反应速率快,达到吸附或洗脱平衡的时间极短,吸附容量大。表1列出了几种典型的水溶性亲和-膜过滤体系<sup>[3,5,8-9]</sup>。

收稿日期:2003-11-06

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20276021),广东省教育厅“千百十工程”资助项目(Q02042)

作者简介:李存芝(1969-),女,博士生;李琳(1962-),男,博士,教授,博导,主要从事膜分离、生物活性物质分离纯化方面的研究,通讯联系人,020-87112894, felinli@scut.edu.cn。

表1 水溶性载体的亲和-膜分离体系

水溶性载体	配基	纯化目标产物	载体分子质量
葡聚糖(Dextran)	对氨基苯甲脒(PAB)	胰蛋白酶(Trypsin)	$2 \times 10^6$
Dextran	PAB	尿激酶(Urokinase)	$2 \times 10^6$
聚丙烯酰胺 (Polyacrylamide)	邻氨基苯甲脒(MAB)	Trypsin	$1 \times 10^5$
Polyacrylamide	MAB	Urokinase	$1 \times 10^5$

非水溶性载体的种类较多,据报道可用的非水溶性基质有各种菌类的完整细胞(酵母、芽孢杆菌、链球菌等细胞)<sup>[10]</sup>。纳米硅石微粒、琼脂糖、凝胶、脂质体等也均被作为基质使用过<sup>[5-7,11]</sup>。

### 1.2 配基及其与载体的耦联

在生物分离过程中使用的亲和配基一般可以分为2类:一类是特异性配基,这类配基只与其对应的分子发生特异性结合,如抗原、抗体、抑制剂、激素、激素受体等;另一类是通用型配基,这类配基能与某一类物质结合,如烟酰胺腺嘌呤二核苷酸( $NAD^+$ )辅酶能与许多需要这种辅酶的酶结合。此外,由于活性染料的分子形状、大小以及电荷分布在某种程度上与辅酶相似,使之成为较常用的通用型配基之一,比较常见的染料配基是三嗪类染料。不同的配基和载体,其所需最佳耦联条件亦有所不同。一般需考虑缓冲液种类、pH值范围、配基浓度、耦联时间和反应温度等影响因素。

### 1.3 亲和载体与目标分子的结合

在亲和-膜过滤过程中,亲和载体与目标分子之间的结合可能存在弱的共价键、离子键、分子键和配位键的作用,以蛋白质为例,这些作用及其产生原因如表2所示。

表2 亲和载体与目标蛋白的可能结合形式及其原因

结合形式	产生原因
离子间的相互作用	主要因氨基酸侧链的电荷引起静电作用
氢键结合	配体含O或N原子时,与结合部位形成氢键
疏水性相互作用	配体与结合部位都含有非极性基团
对金属原子配位	目标分子与配体的一部分都与同一金属原子配位
弱共价键结合	如醛基和羧基间形成的弱共价键,存在可逆性

由于亲和-超滤膜分离过程中,膜过滤时亲和载体与目标分子能形成较稳定的体系,洗脱时载体

与目标分子又容易分离,以达到纯化目标分子的目的,因此,亲和载体上的配基与目标蛋白的结合是一可逆过程,解离平衡常数 $K_d$ 是配基与蛋白质亲和作用的一个重要参数。若解离常数过大,蛋白质不能有效结合;若过小,蛋白质洗脱困难。一般认为比较合适的 $K_d$ 值是 $10^{-4} \sim 10^{-8} \text{ L/mol}$ 。

影响亲和载体与目标分子间相互作用的因素很多,如溶液的pH值、温度、亲和载体的空间结构、配基浓度等,其中载体表面所修饰的配基浓度是较为重要的因素之一。Powers<sup>[11]</sup>等在用PAB修饰的脂质体分离胰蛋白酶时发现,配基修饰密度存在一最佳值,当载体表面配基浓度较低时,结合容量随配基浓度增大而增加,当PAB与脂质体的摩尔比为 $1.5 \times 10^{-5}$ 时,继续增大PAB用量并不能再增加其结合目标蛋白的容量。这是由于配基浓度过高导致表面空间位阻增大的缘故,因此,在亲和-膜过滤过程中控制适当的配基修饰密度十分必要。

此外,由于空间位阻的存在,配基和载体耦联后与目标分子的结合常数一般会降低数倍,甚至数十倍,当载体表面修饰密度较高时尤其明显<sup>[7,12-13]</sup>。对一些结合常数非常大的体系,耦联后其结合常数仍可维持较高水平。对于耦联后亲和载体与目标分子的结合常数变得非常小的情况,可在配基连接活化载体前,先联入间隔臂,形成载体-间隔臂-配基-目标分子相互结合的组成。在选择间隔臂时,其长度必须适当,既要保证有足够的长度来克服空间位阻,又要防止间隔臂过长不能维持一定强度而弯曲。

## 2 应用

亲和-膜过滤技术应用在分离和纯化蛋白质、酶方面已经有很多成功的例子。朱家文等<sup>[9]</sup>用DextranT2000,经环氧氯丙烷交联并氧化产生部分羧基,偶联对氨基苯甲脒制得水溶性亲和载体。配基质量摩尔浓度为 $71.4 \mu\text{mol/g}$ 、截留分子质量为10万的超滤膜对所制亲和载体的截留率大于99.5%,但尿激酶能自由通过。将比活为500IU/A280的尿激酶粗品经亲和超滤得到纯化的尿激酶,比活达66300IU/A280,纯度提高133倍,回收率达83.4%。孙彦等<sup>[12]</sup>研究了脂质体的制备,并利用对氨基苯甲脒修饰的脂质体有效地纯化了胰蛋白酶。

随着生物医药工业的发展,生物医药的分离纯化成为一个研究热点,亲和-超滤膜分离技术在手性药物、抗生素等的分离与纯化方面得到了一定程度的应用。Remero<sup>[14]</sup>等研究了在亲和超滤中pH值

和盐对手性药物分离的影响,实验选用牛血清白蛋白(BSA)作为立体选择性大配基分离 *D*-和 *L*-型色氨酸, pH 值为 7~10 是 *L*-型色氨酸为亲和结合的最佳值,其结合效果受 pH 值的影响较大。Romero<sup>[15]</sup>等人还对多级亲和超滤过程进行了研究,同样研究的是 *D*-和 *L*-型色氨酸的混合体系,二级的亲和超滤过程纯度提高 20 倍以上,产率超过 90%。李成康<sup>[16]</sup>对亲和超滤过程的大分子配基的浓差极化进行了研究,以 *D*-丙氨酰-丙胺酸为配基连接到水溶性的聚合物葡聚糖上,将其作为亲和载体来分离糖肽抗生素-万古霉素。研究结果表明葡聚糖的浓差极化并没有对万古霉素的截留产生影响,而亲和载体在膜表面的浓差极化加大了万古霉素的截留作用,与建立的模型及快速结合动力学很好地吻合。

为充分发挥亲和过滤速率快,易于放大的优势,近年来人们对亲和过滤过程的连续化进行了研究。Ghosh 等<sup>[17-18]</sup>针对亲和超滤系统的各个阶段建立了相应的数学模型,为亲和超滤的连续化监测提供依据。Luong 等<sup>[8]</sup>设计的纯化胰蛋白酶连续亲和过滤过程,实现了包括吸附、洗脱、载体再生和洗脱剂回收在内的一系列操作。Luong 等<sup>[19]</sup>假设操作过程中膜对各物质的截留率恒定,通过对单个容器进行物料衡算,得出了该连续过程的数学模型。用该模型进行过程模拟的结果能与实验数据很好地吻合。

### 3 展望

亲和-膜过滤技术兼有生物亲和技术与膜分离技术的优点,对目标物质具有高分辨力和收率。它不仅利用了生物分子的识别功能,而且操作简单,分离周期短,可有效保持生物物质的活性,流体的通透性大,而且还具有处理黏性较大粗提液的能力。作为新型的生物分离纯化技术,亲和-膜过滤技术目前还处于实验室研究阶段。

可利用计算机辅助分子设计技术来寻找合适的配基。目前合适配基的发现常需经过多次实验,带有偶然性,且许多天然配基价格昂贵,这些都限制了亲和-膜过滤技术的进一步应用,所以利用分子特性来寻找或设计合适的配基,扩大该项技术的应用范围。开发新型配基和大分子载体,不断完善配基耦联技术,提高亲和载体的稳定性,减少非特异性吸

附,避免配基的泄漏,确保亲和染料的安全性,亲和-膜过滤过程的优化设计等方面的工作都需要进一步深入开展。

可以预料,亲和-膜过滤技术作为一种新型高效生物大分子分离纯化方法,随着其技术与理论的不完善,必将成为生物分离工程下游产品纯化的一项重要技术,在生物工程的下游产品纯化中发挥越来越大的作用。

### 参考文献

- [1] Adamsi-Medda D, Nguyen Q T, Dellacherie E. [J]. *J Membrane Science*, 1981, 9(3): 337 - 342.
- [2] Hubert P, Dellacherie E. [J]. *J Chromatogr*, 1980, 184(3): 325 - 333.
- [3] Male K B, Nguyen A L, Luong J H T. [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, 35(1): 87 - 93.
- [4] Luong J H T, Male K B, Nguyen A L. [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1988, 31(5): 439 - 446.
- [5] Mattiason B, Ling T G I. Ultrafiltration affinity purification[A]. In: McGregori W C. *Membrane Separations in Biotechnology*[C]. New York and Basel: Marcel Dekker, 1986. 99 - 114.
- [6] Herak D C, Merrill E W. [J]. *Biotechnol Progress*, 1989, 5(1): 9 - 17.
- [7] Powers J D, Kilpatrick P K, Carbonell R G. [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1989, 33(2): 173 - 182.
- [8] Luong J H T, Male K B, Nguyen A L. [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1988, 31(6): 516 - 520.
- [9] 朱家文, 曹学军, 武斌, 等. [J]. *华东理工大学学报*, 1999, 25(6): 563 - 566.
- [10] Weiner C, Sara M, Dasgupta G. [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, 44(5): 55 - 65.
- [11] Powers J D, Kilpatrick P K, Carbonell R G. [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, 36(5): 506 - 519.
- [12] 孙彦, 徐晓燕, 王绍亭. [J]. *化工学报*, 1993, 44(3): 359 - 365.
- [13] Romero J, Zydny Andrew L. [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 77(3): 256 - 265.
- [14] Romero J, Zydny Andrew L. [J]. *Desalination*, 2002, 148(1 - 3): 159 - 164.
- [15] Romero J, Zydny Andrew L. [J]. *Journal of Membrane Science*, 2002, 209(1): 107 - 119.
- [16] Cheng-kang Lee. [J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 1995, 34(6): 2104 - 2109.
- [17] Ghosh R, Sanyal S K, Mukherjea R N, et al. [J]. *Separation Science and Technology*, 1996, 31(5): 679 - 685.
- [18] Ghosh R, Sanyal S K, Mukherjea R N, et al. [J]. *Separation Science and Technology*, 1996, 31(1): 125 - 131.
- [19] Luong J H T, Male K B, Nguyen A L, et al. [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1988, 32(4): 451 - 459. ■