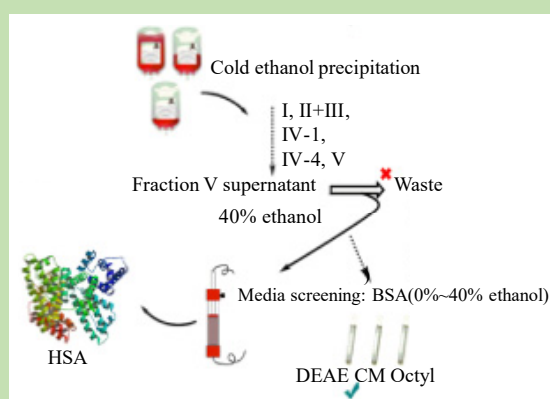


Direct separation of human serum albumin from Cohn fraction V supernatant by one-step ion exchange chromatography

Jie XIANG¹, Songping ZHANG², Guifeng ZHANG², Jian LUO^{2*}, Rong YU^{1*}

1. Department of Biopharmaceutics, West China School of Pharmacy, Key Laboratory of Drug-Targeting and Drug Delivery System of the Education Ministry, Sichuan Engineering Laboratory for Plant-Sourced Drug and Sichuan Research Center for Drug Precision Industrial Technology, West China School of Pharmacy Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China
2. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: Fraction V supernatant is an effluent of Cohn fractionation in plasma protein industry. Due to its high ethanol concentration, further recovery of the residual protein has been regarded as non-economical. In this work, a recovery of human serum albumin (HSA) from fraction V supernatant by ion exchange chromatography was reported, which had not been reported in the literature to our knowledge. Firstly, bovine serum albumin (BSA) was used as model protein to compare the adsorption capacity of three different types of chromatographic media in different ethanol-aqueous solutions. The adsorption capacity of the hydrophobic



medium to BSA in ethanol-aqueous solution was very weak, and the increase of ethanol concentration led to the adsorption capacity approaching to 0. The cation exchange medium had a high adsorption capacity at low ethanol concentration, but decreased quickly with the increase of the ethanol concentration. In contrast, the anion exchange medium showed the best adsorption performance, and the adsorption capacity in 40% ethanol-aqueous solution still reached 34.66 mg/mL. Further experiments showed that the adsorption of BSA on the anion exchange medium in the presence of ethanol could be described by Langmuir isothermal adsorption equation. The anion exchange medium DEAE Sepharose Fast Flow was packed into a chromatographic column. Real purification of Cohn fraction V supernatant was performed. The Cohn fraction V supernatant, containing about 40% ethanol, was directly loaded to the anion exchange column. A two-step elution strategy was used. The first elution was pH change from 7.0 to 4.5 to obtain the target product human serum albumin, and the second elution was to increase the concentration of sodium chloride from 0 to 1 mol/L to elute glycoproteins. The purity of HSA was 96.35% by electrophoresis, and the activity of binding to the ligand warfarin was comparable to that of commercial HSA product by Cohn fractionation. The total recovery was 43 mg/L Cohn fraction V supernatant.

Key words: human serum albumin; fraction V supernatant; ion exchange chromatography; low-temperature ethanol precipitation; protein structure

收稿: 2020-03-05, 修回: 2020-04-02, 网络发表: 2020-05-09, Received: 2020-03-05, Revised: 2020-04-02, Published online: 2020-05-09

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(编号: 2016YFD0500800; 2016YFD0500809); 国家自然科学基金资助项目(编号: 21821005)

作者简介: 向杰(1994-), 男, 重庆市云阳县人, 硕士研究生, 研究方向: 蛋白质分离纯化; 通讯联系人, 罗坚, E-mail: jl原因@ipe.ac.cn; 余蓉, E-mail: yurong@scu.edu.cn.

引用格式: 向杰, 张松平, 张贵锋, 等. 一步离子交换层析从 Cohn 组分 V 上清液中分离人血清白蛋白. 过程工程学报, 2021, 21(1): 92-99.

Xiang J, Zhang S P, Zhang G F, et al. Direct separation of human serum albumin from Cohn fraction V supernatant by one-step ion exchange chromatography (in Chinese). Chin. J. Process Eng., 2021, 21(1): 92-99, DOI: 10.12034/j.issn.1009-606X.220073.

一步离子交换层析从 Cohn 组分 V 上清液中分离人血清白蛋白

向杰¹, 张松平², 张贵锋², 罗坚^{2*}, 余蓉^{1*}

1. 四川大学华西药学院生物技术药物学系, 靶向药物与释药系统教育部重点实验室, 四川省植物来源工程实验室和四川省小分子药物精准化工程技术研究中心, 四川 成都 610041

2. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100190

摘 要: 传统的血浆低温乙醇沉淀工艺中 Cohn 组分 V 上清液由于其乙醇浓度高(体积浓度 40%), 进一步回收残余蛋白困难而被作为废弃组分。本研究探索了采用一步层析从 Cohn 组分 V 上清中回收人血清白蛋白的方法。首先以牛血清白蛋白(BSA)为模型蛋白, 比较了三种不同类型介质在不同乙醇-水溶液中的吸附容量。疏水介质在乙醇-水溶液中对 BSA 吸附能力很弱, 增加乙醇浓度导致吸附量趋近于零; 阳离子交换介质在低乙醇浓度下有较高的吸附量, 但随乙醇体积浓度增高下降较大。相比之下阴离子交换介质展示了最好的吸附性能, 在乙醇体积浓度 40% 的乙醇-水溶液中吸附容量仍达 34.66 mg/mL。进一步实验表明, 在乙醇存在下 BSA 在阴离子交换介质上的吸附可用 Langmuir 等温吸附方程描述。将阴离子交换介质 DEAE Sepharose Fast Flow 装填层析柱, 用于从 Cohn 组分 V 上清液中分离人血清白蛋白, 将 40% 乙醇的 Cohn 组分 V 上清液直接进料阴离子交换层析柱, 采用两步洗脱策略, 第一步改变 pH 值由 7.0 到 4.5 以洗脱目标产物人血清白蛋白, 第二步将氯化钠浓度从 0 增加到 1 mol/L 以洗脱紧密结合的部分酸性糖蛋白。SDS-PAGE 电泳检测人血清白蛋白纯度为 96.35%, 得率为 43 mg/L Cohn 组分 V 上清液。圆二色谱和荧光光谱检测表明经过离子交换回收的白蛋白二级结构和三级结构与对照的医疗制品无明显差异。活性分析表明回收的白蛋白与配体华法令钠的结合常数与对照的医疗制品的结合常数相似。研究表明, 离子交换层析可用于从含乙醇的溶液中分离蛋白质, 一步离子交换层析就可从血浆工业废弃液中回收高纯度的人血清白蛋白。

关键词: 人血清白蛋白; 组分 V 上清液; 离子交换层析; 低温乙醇沉淀; 蛋白结构

中图分类号: Q816 文献标识码: A 文章编号: 1009-606X(2021)01-0092-08

1 前言

人血清白蛋白(Human Serum Albumin, HSA)是多种重大疾病和创伤的抢救药物^[1], 在药学和生物科学中也具有重要应用^[2-3]。虽然重组白蛋白的研究已有多年历史^[4-7], 但在产品可靠性、规模和成本等方面依然无法代替来自人血浆的 HSA^[1]。但人血浆也面临各种污染的可能。为保证产品质量, 迄今为止药用血浆蛋白质工业一直采用 Cohn 等^[8]和 Hosseini 等^[9]开发的低温乙醇分级沉淀法。该法通过改变乙醇含量、蛋白质浓度、pH、离子强度和温度等环境条件, 使不同的血浆蛋白质分级于不同的沉淀组分。人血清白蛋白是 Cohn 低温乙醇工艺的最后沉淀组分, 通常称之为组分 V。组分 V 的上清液含高浓度(体积浓度 40%)乙醇, 通常作为血浆工业的废弃物。但组分 V 的上清液仍含有多种血浆组分没有回收。Schmid^[10]对组分 V 上清液进一步沉淀分离, 利用氢氧化锌沉淀获得了组分 VI, 主要成分为蛋白质; 经钙盐沉淀获得了组分 VII, 主要成分为多糖; 经离子交换树脂吸附被分离的氨基酸和短

肽构成了组分 VIII; 浓缩液最末部分是亲脂性(组分 IX)及亲水性成分(组分 X)。Schmid 及其研究团队对组分 VI 中的糖蛋白进行了分离和理化性质鉴定, 包括 Acid glycoproteins^[10], Zn- α_2 -glycoproteins^[11] 和 α_2 HS-glycoproteins^[12]等, 却没有关于回收组分 V 上清液中 HSA 的报道^[10]。国内采浆量将突破万吨级, 若能建立简便高效的组分 V 上清液中白蛋白的回收工艺, 不仅经济效益显著, 更重要的是可一定程度上缓解目前血浆白蛋白制剂的紧缺状态。

层析法是蛋白质纯化的常用手段。由于有机溶剂会对蛋白质及层析介质产生影响, 因此, 现有层析分离过程通常在水相体系中进行。Chang 等^[13]在研究有机相中酶催化的同时也探索了有机相中层析蛋白质的过程, 证明在二甲基亚砜、乙二醇、甲酰胺的有机溶剂里面, 用羧甲基纤维素做层析介质可分离胰岛素 A 链与 B 链、溶菌酶与核糖核酸酶。Tauc 等^[14]将 30% 的乙腈加入阳离子交换层析玉米蛋白酶抑制剂的过程中, 提高了层析分离的效果。Lu 等^[15]在透过式层析血红蛋白过程中加入聚乙二醇(PEG), 解决了杂质的去除

难题,提高了产物的纯度。但是,到目前为止,还没有对乙醇存在下层析蛋白质过程的研究。如果这一过程可行,将有利于直接从血浆工业废弃液(组分 V 上清液)回收重要的药用蛋白质。

本工作首先以牛血清白蛋白为模型蛋白质,比较了不同介质在乙醇-水溶液中对人血清白蛋白吸附容量的变化情况,考察了乙醇存在下阴离子交换层析介质对蛋白质的吸附行为,最终选定 DEAE 介质从组分 V 上清液中进行人血清白蛋白的回收。通过层析操作条件优化,采用 pH 和盐两步洗脱策略从 Cohn 组分 V 上清液中分离出高纯度的人血清白蛋白,并通过圆二色谱、荧光光谱和测定药物小分子结合率等方法证实纯化后的白蛋白仍维持其空间结构及生物活性。

2 实验

2.1 实验材料、仪器和方法

组分 V 上清液(FVS)和人血清白蛋白(HSA, 低温乙醇沉淀法制备)由华兰生物工程股份有限公司提供。牛血清白蛋白(BSA, 纯度 98%)由北京欣经科生物技术有限公司提供。三种 Hitrap 小型层析预装柱 DEAE FF, CM FF, Octyl FF 及 DEAE Sepharose Fast Flow 介质系美国 GE Healthcare 公司产品。华法令钠 19272A(美国 Sigma-Aldrich 公司),其他试剂均为分析纯。

层析系统 ÄKTA Explorer(美国 GE Healthcare 公司)配备 20 cm×16 mm (I.D.)层析柱。Multiskan GO 全波长读数仪(美国赛默飞世尔公司),LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津公司),TSKgel G3000SWXL 高效液相尺寸排阻色谱柱(30 cm×7.8 mm I.D., 孔径 25 nm, 粒径 5 μm, 日本东曹株式会社),Fluor Chem E 型凝胶成像系统(美国 Protein Simple 公司),F-4500 荧光光谱仪(日本 Hitachi 公司),JASCO J-810 圆二色光谱仪(日本分光株式会社)。

所有实验除特别指明外均在室温下(20℃)进行。

2.2 吸附容量的比较

BSA 在不同介质上的吸附容量由前沿分析(Frontal analysis)实验测定。将不同类型 1 mL Hitrap 预装柱连接至层析系统,采用各层析介质适宜的平衡缓冲液以 0.3 mL/min 的流速充分平衡,然后将 2 mg/mL BSA 溶液(相应平衡缓冲液配制)以相同的流速推进 Hitrap 预装柱中,检测出口处的蛋白质浓度。当出口处的蛋白质浓度与进料浓度一致时停止进料。采用相应的洗脱液将 Hitrap 预装柱中吸附的 BSA 解吸。前沿分析法获得的吸附容量(DBC)根据下式计算:

$$DBC = \frac{V_{c_0}}{V_{media}} \quad (1)$$

式中, c_0 为入口的蛋白质浓度(mg/mL), V 为柱出口蛋白浓度达到 10%入口蛋白浓度 c_0 时的流出液体积(mL), V_{media} 为介质体积(mL)。

2.3 吸附平衡实验

20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH=7.0、乙醇体积浓度为 0%, 5%, 10%, 20%和 40%, 下文均为乙醇体积浓度)的配制方法见表 1, DEAE Sepharose Fast Flow 介质经不同浓度乙醇的磷酸缓冲液过夜平衡后抽干备用。采用不同体积浓度乙醇的磷酸盐缓冲液配制蛋白浓度均为 2.5 mg/mL 的母液,分别取不同浓度乙醇的蛋白母液 0, 0.4, 0.8, 1.6, 2.0, 3.0, 4.0 mL, 用相应乙醇浓度的磷酸盐缓冲液补足至 4.0 mL, 得待测浓度范围为 0~2.5 mg/mL 的一系列蛋白溶液。称取 20 mg 介质置于 4.0 mL 乙醇磷酸盐缓冲液中,加入介质前测定并记录悬浮液的 A_{280} 吸收值。悬浮液在 25℃及 150 r/min 平衡 4 h, 离心后测定上清液中残留蛋白质含量,蛋白质在介质上的吸附量根据质量平衡计算,采用 Langmuir 吸附模型进行拟合比较。

$$Q = \frac{Q_m C}{K_d + C} \quad (2)$$

式中, Q 为吸附容量(mg/mL 介质), C 为吸附平衡时上清液中的蛋白质浓度(mg/mL), Q_m 为饱和吸附容量(mg/mL 介质), K_d 为吸附平衡常数。

表 1 静态吸附缓冲液配方

Table 1 Buffer solution formulation used in the static adsorption

| Volume, 1 L | Ethanol concentration/vol% | | | | |
|----------------------------|----------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | 0 | 5 | 10 | 20 | 40 |
| PBS concentration/(mmol/L) | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| H ₂ O volume/mL | 1000 | 950 | 900 | 800 | 600 |
| Ethanol volume/mL | 0 | 50 | 100 | 200 | 400 |
| Adjust pH=7.0 | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes |

2.4 层析纯化

组分 V 上清液的初始 pH=5.2±0.1, 调整样品 pH 至 7.0(±0.1), 10000 r/min 离心 10 min 后直接上样, 采用 20 cm×16 mm (I.D.)层析柱(Column Volume, CV=5 mL), 流速为 1.0 mL/min, 平衡缓冲液 A 为 pH=7.0 及 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 进料体积 20 mL, 洗脱液 B 为 pH=4.5 及 20 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 洗脱液 C 为 pH=7.0 及含 1.0 mol/L 氯化钠的 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液。得率(%)由下式计算:

$$\text{得率} = \frac{\text{最终纯化所得白蛋白量}(\text{mg})}{\text{进样组分 V 上清体积}(\text{mL}) \times 100\%} \quad (3)$$

2.5 产物纯度、结构和活性鉴定

2.5.1 SDS-PAGE 电泳

样品、洗脱产物及白蛋白制品均采用 12% 的还原性 SDS-PAGE 分析, 蛋白质浓度为 0.1~0.2 mg/mL。采用 90 V 电压聚焦 10 min, 150 V 电压分离 90 min, 经考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色后采用凝胶成像仪进行纯度分析。

2.5.2 高效液相尺寸排阻色谱(HPSEC)

在高效液相色谱仪上安装高效液相尺寸排阻色谱柱 TSKgel G3000SWXL, 流动相为磷酸盐缓冲液 (pH=6.8, 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 0.2 mol/L 硫酸钠), 检测波长为 280 nm, 进料体积 100 μL , 操作流速 0.6 mL/min, 运行时长 30 min。以商品 HSA 制剂的保留时间为参考, 根据白蛋白的出峰面积与总峰面积的比例确定目标蛋白质纯度。

2.5.3 圆二色谱

圆二色谱由圆二色光谱仪测定。人血清白蛋白制品及纯化 HSA 经缓冲液 (pH=7.0 及 20 mmol/L PB) 置换、浓度调整 (0.25 mg/mL) 后测定圆二色谱。

2.5.4 荧光光谱

荧光光谱采用荧光光谱仪测定, 测定条件: 激发波长 295 nm, 带宽 5 nm, 狭缝宽度 1 cm, 蛋白浓度 0.5 mg/mL, 扣除相应空白 (pH=7.0 及 20 mmol/L PB)。

2.5.5 小分子药物结合实验

采用文献[16]方法: 用 pH=7.0 及 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液配制一系列梯度浓度的华法令钠溶液, 以高效液相色谱检测波长 308 nm 下的色谱峰为基准, 确定适宜的小分子浓度。调整蛋白质浓度至 2.5 mg/mL, 然后与华法令钠溶液充分混合, 以高效液相色谱检测波长 308 nm 下的特征峰, 空白对照为华法令钠缓冲液。进样体积均为 100 μL , 通过特征峰的面积积分得到华法令钠与人血清白蛋白的结合率。

3 结果及讨论

3.1 吸附容量的比较

图 1 为三种常见介质 (弱阴离子交换介质类型 DEAE, 弱阳离子交换介质类型 CM 和疏水介质类型 Octyl) 在乙醇浓度为 0%~40% 的乙醇-水溶液中对 BSA 的吸附容量。可以看出, 疏水介质 Octyl 在乙醇浓度 5% 时对 BSA 的吸附容量下降至水溶液中吸附容量的 25%。

体系中乙醇浓度逐渐升高时, 介质的吸附量进一步降低, 乙醇浓度为 40% 时已经完全丧失结合 BSA 的能力。弱阳离子交换介质 CM 在不含乙醇的体系中具有最大的吸附容量 (57.14 mg/mL), 却随乙醇浓度逐步上升而逐渐降低, 当乙醇浓度增至 40% 时, 其吸附容量为 12.05 mg/mL。与此类似, 弱阴离子交换介质 DEAE 对 BSA 的吸附容量也随乙醇浓度上升而降低, 但在乙醇浓度为 40% 乙醇-水体系中, 其有效吸附容量仍能达 34.66 mg/mL。以上结果表明, DEAE 介质可能更适合高浓度乙醇条件下蛋白质的纯化。本实验采用的 Hitrap DEAE 预装柱填充的是 DEAE Sepharose Fast Flow 介质, 因此接下来的吸附平衡实验主要以该介质为主进行。

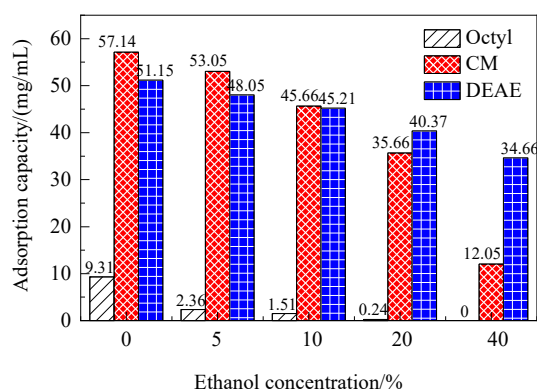


图 1 不同介质 (Octyl, CM, DEAE) 在不同浓度乙醇缓冲液中的吸附容量

Fig.1 Adsorption capacities of different medias in PB with different ethanol concentrations

3.2 吸附平衡实验

图 2 为 25 $^{\circ}\text{C}$ 及乙醇浓度 0%~40% 乙醇-水溶液中的 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换介质对 BSA 的吸附平衡结果。从曲线拟合的结果看, 吸附符合 Langmuir 吸附模型。根据该模型拟合出不同浓度的乙醇-水溶液中离子交换介质的饱和吸附容量 (Q_m) 和吸附平衡常数 (K_d) (表 2)。相比于不含乙醇的溶液, 介质的吸附容量在乙醇体系中呈降低趋势。但从吸附平衡的实验结果来看, 即使在浓度高达 40% 的乙醇-水溶液中, DEAE 介质仍能有效地吸附蛋白质, Q_m 仍能达 43.5 mg/mL 介质。

用层析的方法从含乙醇-水溶液中分离蛋白质是一项新的探索。对于工业规模应用, 离子交换层析和疏水层析是性价比最好的两大分离技术。本工作的研究表明, 疏水层析不适合从乙醇-水溶液中分离蛋白质, 可能是因为乙醇的存在削弱了蛋白质上的疏水基团与介质上疏水配基的相互作用。离子交换层析依靠的是蛋白

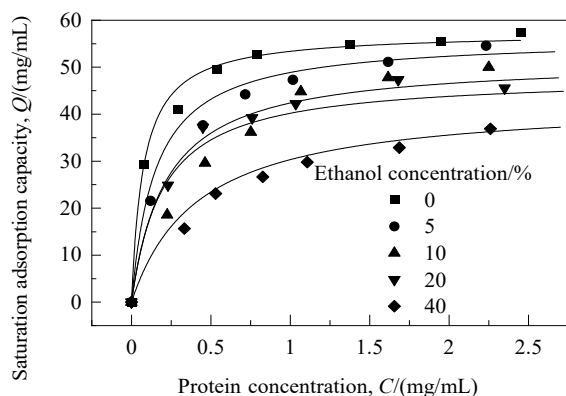


图 2 不同乙醇浓度下 BSA 在 DEAE Sepharose Fast Flow 介质上的吸附平衡曲线

Fig.2 Adsorption isotherms of BSA on DEAE Sepharose Fast Flow with different ethanol concentrations

表 2 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析介质吸附 BSA 的等温吸附参数

Table 2 Parameters of BSA adsorption isotherms of BSA on DEAE Sepharose Fast Flow

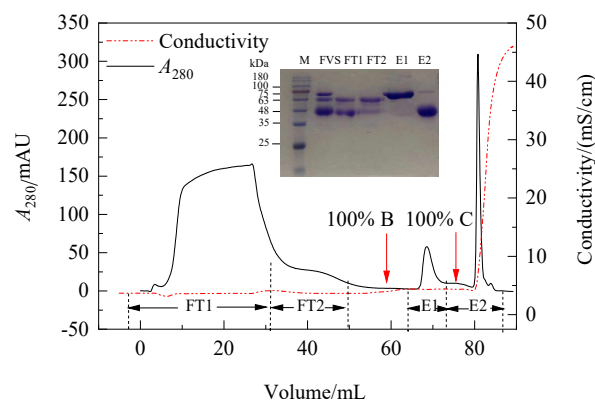
| Ethanol concentration/ % | 0 | 5 | 10 | 20 | 40 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| Saturated adsorption capacity, Q_m (mg/mL) | 57.44 | 56.33 | 51.61 | 48.11 | 43.50 |
| Adsorption equilibrium constant, K_d | 0.076 | 0.197 | 0.217 | 0.051 | 0.034 |

质上的电荷基团与层析介质上相反电荷的结合。这种吸附受乙醇分子的影响较小,所以阴、阳离子交换均可在乙醇-水溶液中进行。但由于人血清白蛋白的等电点约为 4.7,阳离子交换的 pH 应小于等电点,而过低的 pH 又会导致蛋白质水解,所以阳离子交换的操作 pH 范围有限。相对而言,阴离子交换的 pH 操作范围比较大,蛋白质在 pH=4.7~8.0 的范围均较稳定,如果将操作的 pH 选择在中性(7.0),则远离了等电点,蛋白质携带的电荷数量更多,更有利于离子交换的进行。

尽管离子交换层析可用于从乙醇-水溶液中分离蛋白质,但也受到乙醇浓度的影响。图 1 显示,随乙醇浓度增加,蛋白质吸附量逐渐下降。乙醇浓度由 0%增加至 40%时,BSA 的吸附量由 51.15 mg/mL 下降至 34.66 mg/mL,下降约 1/3。这是因为蛋白质周边的乙醇分子增多,可能使一些电荷基团受到屏蔽。蛋白质是复杂的大分子,其在水溶液中处于水分子的包围中,在乙醇-水溶液中则遇到乙醇分子的作用。乙醇既有亲水的羟基,又有疏水的甲基,所以既能与蛋白质的亲水部分结合也能与一些疏水部位结合。这种两性作用改变了蛋白质的表面特性包括电荷的分布和密度,导致离子交换的性能下降。

3.3 从组分 V 上清液一步层析分离 HSA

组分 V 上清液中主要成分包括人血清白蛋白(HSA)、 α_2 HS 糖蛋白(α_2 HS-glycoproteins)及 α_1 酸性糖蛋白(α_1 -acid glycoproteins)。两种糖蛋白是人体内主要的急性反应蛋白质,越来越多的研究^[17-19]表明其作用可能与免疫调节、药物递送相关,但具体的生理作用目前尚不明确。离子交换层析是蛋白质纯化的常用手段之一。经过条件优化,建立了 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析方法,通过 pH 和盐两步洗脱模式分离白蛋白和糖蛋白质,电泳结果如图 3 所示。可以看出,洗脱峰 E1 主要成分为人血清白蛋白,洗脱峰 E2 为 α_1 酸性糖蛋白,根据式(3)计算得率为 43 mg/L Cohn 组分 V 上清液。



Note: FT1. Flow-through fractions 1 FT2. Flow-through fractions 2
E1. Elution fractions 1 E2. Elution fractions 2

图 3 组分 V 上清液的 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析图

Fig.3 DEAE Sepharose Fast Flow chromatography of Cohn V supernatant

对于从组分 V 上清液中直接分离人血清白蛋白,除了考虑吸附条件外,洗脱的方案设计也是至关重要的。离子交换的选择性不高,大部分蛋白质都有可能被吸附在离子交换柱上。其中主要的干扰杂质为 α_1 酸性糖蛋白和 α_2 HS 糖蛋白,这两种蛋白质均含大量糖基,其中 α_1 酸性糖蛋白的糖基高达 40%^[18],糖基存在会影响蛋白质在多糖为骨架的层析介质上的吸附。根据 Timashaff 的溶液热力学优先排阻理论^[20],两种亲水性大分子在水溶液中均优先与水分子结合而远离彼此。所以,两种糖蛋白在琼脂糖为骨架的层析介质上的吸附并不牢固。其中, α_2 HS 糖蛋白在淋洗过程中即从介质解吸附,而 α_1 酸性糖蛋白也存在部分流穿的现象。当 pH 值发生改变时,白蛋白由于跨越等电点(溶液环境 pH 由 7.0 变为 4.5)而被洗脱液从柱上洗脱出来。洗脱改变盐浓度目的是洗

脱紧密吸附在层析柱上的酸性糖蛋白。之前的实验结果表明等电点极低的酸性糖蛋白对盐浓度的变化更加敏感^[18]。

3.4 产物纯度、结构活性鉴定

图 4(a)为图 3 中洗脱峰 E1 的高效液相色谱检测结果,以人血清白蛋白制品的保留时间为参考,两种蛋白质的保留时间基本一致(峰 3)。纯度鉴定结果以高效液相色谱检测峰的面积占比结果为准,其中人血清白蛋白制品的纯度为 92.15%,层析产物(洗脱 E1)的纯度为

96.35%。图 4(b)为 SDS-PAGE 电泳图,可知层析制备的人血清白蛋白纯度高,优于对照的商品人血清白蛋白。

图 5(a)为圆二色谱(CD)检测结果,可见纯化的人血清白蛋白与商业的人血清白蛋白制品的 CD 谱完全吻合,由此可知从组分 V 上清中纯化的人血清白蛋白的二级结构与商业的人血清白蛋白制品一致。图 5(b)为两种人血清白蛋白的荧光光谱图,可见二者谱图也一致,表明纯化的人血清白蛋白的三级结构仍得以维持。

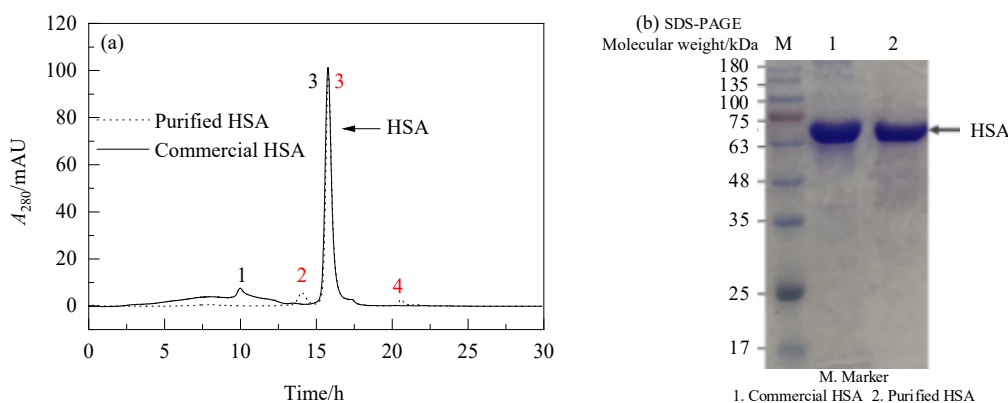


图 4 产物纯度分析
Fig.4 Analysis of product purity

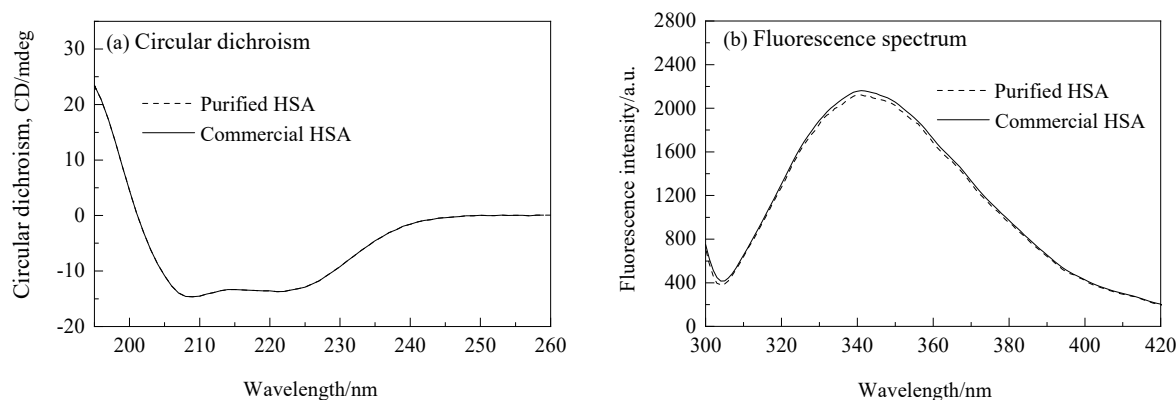


图 5 纯化 HAS 和商业 HAS 的圆二色谱和荧光光谱
Fig.5 Circular dichroism and fluorescence spectrum of purified HSA and commercial HSA

对于从乙醇-水溶液中分离蛋白质来说,一个重要问题是分离纯化的蛋白质是否还有原来的生物学活性。乙醇虽然具有很好的亲水性,但也是一种有机溶剂,而有机溶剂的存在则有可能影响蛋白质的结构。为解决这一问题,本工作用圆二色谱和荧光光谱表征了分离产物的光学特性,并与商品人血清白蛋白进行比较,表明了两者的-致性,证明这个分离过程没有引起 HSA 结构的变化。这是因为乙醇用于血浆蛋白质的沉淀分离已经有几十年的历史,人血清白蛋白只有一条肽链,分子

间有 17 对二硫键,是一个结构紧凑不易变性的蛋白质。但在层析条件下是否发生变性,还需要实验证明。为此,本研究不仅测量了蛋白质的二级和三级结构,还进行了白蛋白与药物结合活性的测量。人血清白蛋白含两个主要的药物结合位点^[21],分别位于 II_A 和 III_A 域的洞穴内。药物结合位点 I 是一个正电荷残基包围的口袋,口袋内壁由疏水氨基酸构成(Lys-199, Arg-218, His-242)^[21,22]。华法令钠是结合位点 I 的特征药物。鉴于白蛋白在 313 nm 几乎无吸收,而华法令钠在 313 nm 有最大吸收^[16]。

通过分析白蛋白与华法令钠在 313 nm 波长下的色谱峰图,从而确定白蛋白与小分子药物结合率(图 6)。人血清白蛋白的结合功能与其空间构象有很大关系,通过对 HPLC 峰面积积分处理,结果显示从组分 V 上清中纯化的人血清白蛋白(4.17%)与人血清白蛋白制品(4.67%)对小分子的结合率基本一致(表 3)。

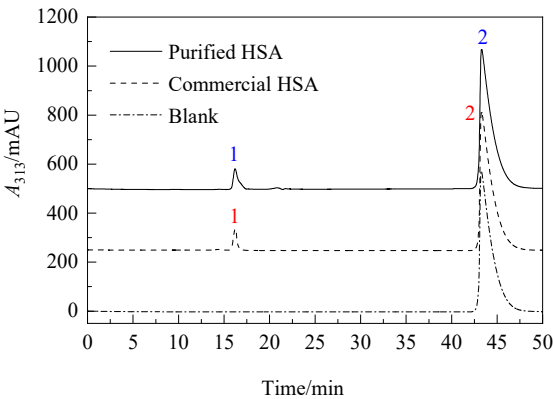


图 6 小分子药物结合活性: 白蛋白与华法令钠结合活性
Fig.6 Chromatography of binding of warfarin to purified HSA and commercial HSA

表 3 白蛋白与华法令钠结合的 HPLC 出峰积分表
Table 3 HPLC peak score table of binding of warfarin to commercial HSA and purified HSA

| | No. | t_R /min | Area/(mAU·min) | Area proportion/% |
|--------------|-----|------------|----------------|-------------------|
| Commercial | 1 | 16.24 | 2527.1 | 4.67 |
| HSA+warfarin | 2 | 43.23 | 51609.3 | 95.33 |
| Purified | 1 | 16.26 | 2278.3 | 4.17 |
| HSA+warfarin | 2 | 43.26 | 52368.6 | 95.83 |

4 结 论

以牛血清白蛋白为模型蛋白质比较了不同介质在乙醇-水溶液中对白蛋白吸附容量的变化情况,考察了在乙醇体积浓度 0%~40%的乙醇-水体系中 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换介质对 BSA 的吸附平衡行为,并将 DEAE Sepharose Fast Flow 介质用于组分 V 上清液中人血清白蛋白的回收,得到以下结论:

(1) 层析可用于从乙醇-水溶液中分离蛋白质,但能否成功取决于选择合适的层析介质。疏水层析介质受乙醇的影响较大,对 BSA 吸附能力很弱;阳离子交换介质在低乙醇浓度下有较高的吸附量,但随乙醇浓度增高降低较大;阴离子交换介质受乙醇浓度的影响相对较小,吸附容量最大。

(2) 阴离子交换介质在乙醇-水溶液中吸附蛋白质可用 Langmuir 等温吸附方程描述。乙醇浓度增加,吸附容量下降,浓度为 40%时,BSA 的吸附量已经从水溶

液中的 51.15 mg/mL 下降至 34.66 mg/mL,下降幅度约 1/3。

(3) 采用阴离子交换层析可直接从 Cohn 组分 V 上清液中回收人血清白蛋白(HSA),干扰杂质主要是 α_1 酸性糖蛋白和 α_2 HS 糖蛋白,可采用 pH 和盐两步洗脱策略将 HSA 与这两种蛋白质分离。

(4) 本工作获得的人血清白蛋白经 SDS-PAGE 电泳检测纯度为 96.35%,得率为 43 mg/L Cohn 组分 V 上清液。通过圆二色谱、荧光光谱和测定药物小分子结合率等方法证实纯化后的白蛋白仍维持其空间结构及生物活性。

参考文献

- [1] Rozga J, Piątek T, Małkowski P. Human albumin: old, new, and emerging applications [J]. *Ann Transplant*, 2013, 18: 205–217.
- [2] Matsuura K, Honjo T. Artificial viral capsid dressed up with human serum albumin [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2019, 30(6): 1636–1641.
- [3] Tang B, Tang P X, He J W, et al. Characterization of the binding of a novel antitumor drug ibrutinib with human serum albumin: insights from spectroscopic, calorimetric and docking studies [J]. *Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology*, 2018, 184(5): 18–26.
- [4] Li M Y. Purification of recombinant human serum albumin (rHSA) produced by genetically modified [J]. *Separation Science & Technology*, 2008, 43(11/12): 3134–3153.
- [5] He Y, Ning T T, Xie T T, et al. Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(47): 19078–19083.
- [6] Chen Z, He Y, Shi B, et al. Human serum albumin from recombinant DNA technology: challenges and strategies [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2013, 1830(12): 5515–5525.
- [7] Ding Y, Lou J, Chen H, et al. Tolerability, pharmacokinetics and antiviral activity of rHSA/IFN α_2a for the treatment of chronic hepatitis B infection [J]. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2017, 83(5): 1056–1071.
- [8] Cohn E J, Strong L E. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1946, 68(3): 459–475.
- [9] Hosseini K, Ghasemzadeh M. Implementation of plasma fractionation in biological medicines production [J]. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2016, 14(4): 213–220.
- [10] Schmid K. Preparation and properties of serum and plasma proteins. XXIX. separation from human plasma of polysaccharides, peptides and proteins of low molecular weight. crystallization of an acid glycoprotein [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1953, 75(1): 60–68.
- [11] Burgi W, Schmid K. Preparation and properties of Zn- α_2 -glycoprotein of normal human plasma [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1961, 236(4): 1066–1074.
- [12] Triffitt J T, Gebauer U, Ashton B, et al. Origin of plasma α_2 HS glycoprotein and its accumulation in bone [J]. *Nature*, 1976.

- 262(5565): 226–227.
- [13] Chang N, Klibanov A M. Protein chromatography in neat organic solvents [J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 1991, 39(5): 575–578.
- [14] Tauc P, Cochet S, Algiman E, et al. Ion-exchange chromatography of proteins: modulation of selectivity by addition of organic solvents to mobile phase: application to single-step purification of a proteinase inhibitor from corn and study of the mechanism of selectivity modulation [J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, 825(1): 17–27.
- [15] Lu X L, Zhao D X, Ma G H, et al. Polyethylene glycol increases purification and recovery, alters retention behavior in flow-through chromatography of hemoglobin [J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1059(1/2): 233–237.
- [16] Sun S F, Kuo S W, and Nash R A. Study of binding of warfarin to serum albumin by high performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography*, 1984, 288(2): 377–388.
- [17] Luo Z M, Lei H, Sun Y, et al. Orosomucoid, an acute response protein with multiple modulating activities [J]. *Journal of Physiology & Biochemistry*, 2015, 71(2): 329–340.
- [18] Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2000, 1482(1): 157–171.
- [19] Jersmann H P A, Dransfield I, Hart S P. Fetuin/ α_2 -HS glycoprotein enhances phagocytosis of apoptotic cells and macropinocytosis by human macrophages [J]. *Clinical Science*, 2003, 105(3): 273–278.
- [20] Timasheff S N. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(15): 9721–9726.
- [21] Sudlow G, Birkett D J, Wade D N. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin [J]. *Molecular Pharmacology*, 1976, 11(6): 1052–1061.
- [22] Curry S, Mandelkow H, Brick P, et al. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites [J]. *Nature Structural Biology*, 1998, 5(9): 827–835.