

【实验技术】

自制填充介质对人血浆白蛋白的层析分离

赵彦鼎 杨博 李凯锋 陈学忠 刘萍 郭立安

【摘要】目的 用自制的快速层析介质对人血浆白蛋白进行分离纯化。方法 低温离心去掉冷沉淀后的人血浆,在不同淋洗条件下,经过两步弱阴离子交换和一步弱阳离子交换层析分离,并经凝胶过滤层析柱进一步纯化。结果 经 3 步层析后,所得含白蛋白组分的纯度已达到 98.44%,回收率为 91.40%。4 步层析后,白蛋白纯度可接近于 100%。结论 所采用的分离纯化方法和介质适用于人血浆白蛋白的纯化。

【关键词】填充介质;层析;人血浆白蛋白

液相层析法已成为当前分离纯化各类生化物质最有效的技术手段。该法分离速度快,效率高,能进行在线检测、规模化制备和连续自动化操作,已广泛用于血浆蛋白的制备。本文介绍了一系列使用自制层析介质对人血浆白蛋白进行分离纯化的技术。使用以交联琼脂糖凝胶为基质的阴阳离子交换和凝胶过滤介质,建立了一套较为简易的快速层析工艺,以其对人血浆白蛋白进行分离纯化,同时对所开发介质的使用性能予以评价。

材料与方 法

1. 原料及试剂

人血浆来自浙江海康生物有限公司血浆库,保存温度为 $-25 \sim -30^{\circ}\text{C}$;低相对分子质量标准蛋白质购自上海西巴斯生物技术开发有限公司;其他试剂均为国产分析纯产品。

2. 仪器及设备

高速冷冻离心机, GL-20G-II 型,上海安亭科学仪器厂产品;实验用纯水装置,上海亚东核级树脂有限公司产品;聚丙烯酰胺凝胶电泳装置,美国伯乐公司产品;蠕动泵,保定兰格恒流泵有限公司产品;紫外检测仪及数字式记录仪, 8823A-型,北京市新技术应用研究所产品。

3. 层析介质及层析柱

以琼脂糖为基质的快速弱阴离子交换介质 DEAE Bio-Sep FF、弱阳离子交换介质 CM Bio-Sep FF 和凝胶过滤介质 Bio-Sep 6FF 均为本公司产品。几种层析介质的性能参数见表 1。

将几种介质分别装填于自制的、经硅烷化处理过的不同规格玻璃柱中,其中 2 根 DEAE Bio-Sep FF

柱(标为柱 I 和柱 II)填充体积分别为 15 和 10 ml; CM Bio-Sep FF 和 Bio-Sep 6FF 柱各 1 根(标为柱 III 和柱 IV),填充体积分别为 10 和 60 ml。

表 1 几种层析介质的性能参数

性能参数	DEAE Bio-Sep FF	CM Bio-Sep FF	Bio-Sep 6FF
粒径(μm)	45 ~ 165	45 ~ 165	45 ~ 165
动态载量 (mg 蛋白/ml 介质)	80mgHSA	60mg Lysozyme	
pH	2 ~ 12	4 ~ 13	2 ~ 12
最大压力(Mpa)	0.3	0.3	0.1
最大流速(cm/h)	750	750	300
相对分子质量范围 (球蛋白)			$1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^7$

4. 层析方法

按所设计的层析程序从人血浆中提纯白蛋白,分如下步骤进行。

第一步,将血浆低温离心后,取其上清液并稀释至适当浓度,用弱阴离子交换 DEAE Bio-Sep FF 柱 I,在 pH 6.0、0.02 mol/L 的柠檬酸缓冲体系中,进行第 1 次层析,流速 10 ml/min,紫外(280 nm)检测。分次加入 0.1 和 0.3 mol/L NaCl 以改变淋洗液的离子强度,使样品得到初级分离,收集层析过程中被洗脱出的相关组分。

第二步,将上一步收集到的含白蛋白组分再上弱阴离子交换 DEAE Bio-Sep FF 柱 II,在 pH 5.2、0.02 mol/L 的醋酸缓冲体系中,进行第 2 次层析,流速 4 ml/min,紫外(280 nm)检测。分别用 pH 4.5、0.025 mol/L 的醋酸缓冲液及 pH 4.0、0.15 mol/L 的醋酸缓冲液进行洗脱,使样品得到再次分离。收集层析过程中被洗脱出的相关组分。

第三步,以第 2 次层析所收集的含白蛋白组分用弱阳离子交换 CM Bio-Sep FF 柱 III,在 pH 4.5、

0.025 mol/L 的醋酸缓冲体系中,进行第 3 次层析,流速 4 ml/min,紫外(280 nm)检测。用 pH 5.5、0.11 mol/L 及 pH 8.0、0.40 mol/L 的醋酸缓冲液分别洗脱,使样品得到第 3 次分离。收集层析过程中被洗脱出的相关组分。

将上述步骤所得白蛋白产品,再用 Bio-Sep 6FF 柱 IV,在醋酸溶液的等浓度淋洗条件下,进行第 4 步的纯化处理。

5. 检测方法

白蛋白及其他组分蛋白定性及纯度检测采用醋酸纤维薄膜电泳方法和 SDS-PAGE 方法;蛋白浓度的检测采用考马斯亮蓝染料结合法;白蛋白及其多聚体的含量检测采用 HPLC 方法。

结 果

1. 层析分离

人血浆样品在柱 I 上的分离结果见图 1。经检测,所得到的 3 个主要洗脱组分(依次标为组分 I-1、I-2、I-3)中,最大的组分 I-1 主要含有白蛋白和免疫球蛋白,而一些杂蛋白和凝血因子则分别集中于组分 I-2 和 I-3 之中。第 2 次层析,组分 I-1 在柱 II 上得到了分离,其结果见图 2,也得到了 3 个主要洗脱组分(依次标为 II-1、II-2、II-3)。检测表明,白蛋白主要包含在组分 II-2 中,而免疫球蛋白和一些杂蛋白则分别集中于组分 II-1 和 II-3 之中。第 3 次层析,组分 II-2 经过柱 III 的分离,使白蛋白得到再次纯化,最大的洗脱组分(标为 III-1)就是本实验的目的蛋白产品,而小量的洗脱组分(标为 III-2)则是一些杂蛋白,见图 3。

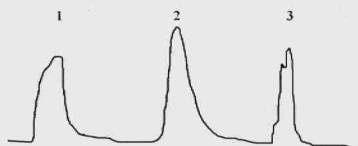
2. 层析组分蛋白的定性及纯度

对于各步层析所得洗脱组分进行了蛋白的定

性及纯度检测。4 步层析所得相关洗脱组分 I-1、II-2、III-1 和 IV 的 SDS-PAGE 分析结果见图 4,并用血浆样品和市售商品白蛋白的电泳结果作对照。

3. 白蛋白含量和蛋白回收率

经过 3 步层析分离所制备的产品,其白蛋白与白蛋白二聚体的含量为 98.44%,已达到甚至超过市售商品,见图 5。对经过 4 次层析后所得组分 IV 进行分析,该样品的纯度已接近 100%。用考马斯亮蓝染料结合法测定蛋白浓度,经计算蛋白的回收率为 91.40%。



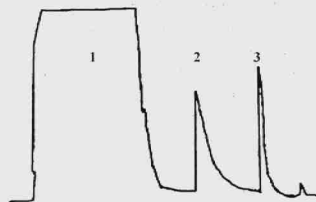
1:组分 II-1,免疫球蛋白;2:组分 II-2,白蛋白;3:组分 II-3,杂蛋白。

图 2 组分 I-1 在 DEAE Bio-Sep FF 柱 II 上的分离



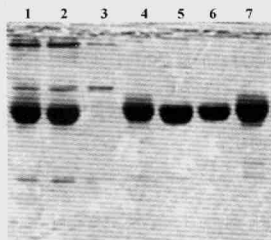
1:组分 III-1,白蛋白;2:组分 III-2,杂蛋白。

图 3 组分 II-2 在 CM Bio-Sep FF 柱 III 上的分离



1:组分 I-1,白蛋白与免疫球蛋白;2:组分 I-2,杂蛋白;3:组分 I-3,凝血因子。

图 1 低温离心后人血浆在 DEAE Bio-Sep FF 柱 I 上的分离



1:人血浆;2:组分 I-1;3:组分 I-3;4:组分 II-1;5:组分 II-2;6:组分 IV;7:市售商品白蛋白。

图 4 不同组分的 SDS-PAGE

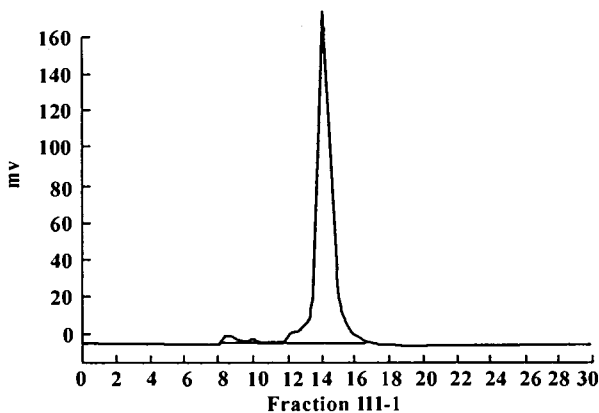


图5 组分Ⅲ-1 中白蛋白的 HPLC 分析

讨 论

分离生物蛋白,选择阴、阳离子交换和凝胶过滤分离模式是被普遍认可的^[1]。而对于血浆蛋白的层析分离,也多以阴、阳离子交换和凝胶过滤为主体。因此,在借鉴前人工作的基础上,本研究选择了自制的弱阴、弱阳离子交换和凝胶过滤层析介质,从人血浆中快速分离纯化白蛋白。经过3步层析就已达到市售商品纯度不低于96%的要求,而且还可进一步得到高纯度产品,说明该分离方法是有效可行的,而且程序简单,操作方便。另外,在弱阴离子交换柱上,通过2步层析,就先后将主要含有凝血因子和免疫球蛋白的 I-3 和 II-1 两大组分以及大部分杂质从血浆样品中成功地分离出去,而且分离比较彻底,说明该过程适用于白蛋白的纯化,并为进一

步纯化提供了有利条件,同时该过程也适用于血浆中凝血因子和免疫球蛋白的分离纯化。

本实验采用醋酸纤维薄膜和 SDS-PAGE 两种电泳分析手段,对层析过程中收集到的组分进行了定性跟踪检测。通过醋酸纤维薄膜电泳分析,可以简单快速地判断出目标蛋白(白蛋白)在每步层析中存在的位置,而通过 SDS-PAGE,更能进一步判断出各收集组分的蛋白组成及纯度情况。最后,采用 HPLC 方法对白蛋白产品进行定量分析。通过不同的检测方法,验证了检测结果的可靠性,也为本实验所建立的分离方法的可行性提供了依据。

分离介质是层析方法赖以建立和发展的基础,介质的使用性能和使用方法是决定层析技术能否实施的关键。本实验选择了自制的以交联琼脂糖为基质的弱阴、弱阳离子交换和凝胶过滤3种层析介质,其结构参数与性能指标与国际上常用的 DEAE Sepharose FF、CM Sepharose FF 和 Sepharose 6FF 产品基本相类似。从实际使用情况来看,自制的几种介质已具备较好的分离性能。从层析图谱和分离结果,也可反映出介质在分离效果、保留行为、选择性、回收率等方面均已满足快速分离的使用要求。

参 考 文 献

- [1] Harris ELV, Angal S. Protein purification methods (a practical approach). London: Oxford Univ Press, 1989.

(收稿日期:2006-02-16)

(上接第 629 页)

员采用的支原体检测方法不正确而未早发现,致使所建细胞库污染。因此,生产企业进一步加强对生物活性原材料的质量控制、建立良好的生产用细胞库体系、提高质量控制人员的技术水平是控制外源因子污染的重要措施,也是提高制品安全性的重要且必要的环节。

参 考 文 献

- [1] WHO Technical Report Series, No. 878, Annex 1: Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals. 1998.
[2] FDA. Points to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals. 1993.

- [3] FDA. Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use. 1997.
[4] ICH Q5D. Derivation and characterisation of cell substrates used for production of biotechnological/ biological products. 1997.
[5] ICH Q5A. Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. 1997.
[6] Garnick RL. Raw materials as a source of contamination in large-scale cell culture. Dev Bio Stand (Based), 1998, 93:21-29.
[7] Garnick RL. Experience with viral contamination in cell culture. Dev Bio Stand (Based), 1996, 88:49-56.
[8] Nims RW. Detection of adventitious viruses in biologicals—a rare occurrence. Dev Bio (Based), 2006, 123:153-164.

(收稿日期:2006-05-17)