

疏水色谱分离在重组人血白蛋白分离纯化中的应用研究

赵洪志

(通化安睿特生物制药股份有限公司 吉林 通化 134000)

【摘要】 本文研究当中, 采用 Phenyl Sepharose 6FF (HS) 的实现对介质的分离主要是利用他的疏水作用, 而后分离纯 rHSA 中间体最终得出结论, 实现对重组人血蛋白 (rHSA) 在进行纯化时去除降解物。通过对工艺和试验条件的优化控制, 以 0.1mol/L NaCl+50 mmol/L PB 作为缓冲液, 确保溶液的 pH 值为 6.0, 在这个状态下, 蛋白收率以及去除降解物的程度均能够达到最佳效果。

【关键词】 rHSA; 纯化; 疏水作用; 疏水色谱

【中图分类号】 R977.6 **【文献标识码】** A

随着科技发展, 所应用到的人血蛋白 (HSA) 不断被没有动物成分的原材料代替, 这些原材料的供应不会受到限制, 且可以大批量生产, 因此 rHSA 成为了 HSA 的首选替代品。利用表达系统的发酵生产技术, 实现对毕赤酵母的发酵, 这种方式具有较高的稳定性, 是生产 rHSA 的首选物质。

1 rHSA 的基础纯化过程

对 rHSA 进行纯化的过程主要分为以下几个步骤: 1) 当毕赤酵母发酵后, 通过离心分离实现对发酵液的分离; 2) 加热灭活蛋白酶; 3) 阳离子色谱分离; 4) 对洗脱峰进行疏水色谱分离, 收集流穿峰; 5) 流穿峰经过阴离子交换色谱进行分离, 浓缩蛋白浓度后进行配液。

2 HIC 的特点

HIC 是在 1973 年由 Hjerten 所提出的, 移交对疏水基团的疏水力实现色谱分离。这种技术主要是通过样品组分分子与介质的疏水基团之间的作用力实现分离, 具有以下几个特点: 1) 色谱条件温和, 这样可以保证生大分子的活性不会丧失, 且具有较高的回收率; 2) 流动相选用盐的水溶液, 降低昂贵材料的使用, 充分发挥成本的优势; 3) 在高盐浓度上下样的操作过程中, 可以不经处理而直接进行下一步上样操作; 4) 介质相对稳定, 且流动相为盐水体系不会产生对环境的污染。

因为 HIC 所具有的优点相对较多, 且被广泛利用对生物大分子的分离纯化过程中, 例如对蛋白质的纯化, 所以也逐渐形成了以此为基础分离纯化技术。

3 具体分析

通过实验, 对优化 HS 疏水作用色谱的工艺进行有效的控制, 主要通过对降解物含量 (%)、蛋白回收率 (%) 的检验, 多选用的方法为 SDS-PAGE 还原电泳和考马斯亮蓝法。选用 pH 值为 6.0、6.5 和 7.0 的缓冲液 a (0.1 mol/L NaCl+50 mmol/L PB)、缓冲液 b (0.15 mol/L NaCl+50 mmol/L PB) 进行试验。设定纯化水流速为 157 mL/min, rHSA 中间体和再生液流速为 50mL/min。在层析平衡后取 250mL rHSA 中间体上样, 通入缓冲液后实现对流穿峰的收集。后通过一倍半柱体积的纯化水和配比为 1mol/L NaOH+30% 异丙醇的再生液进行再生处理。最后通入纯化水洗层析柱至中性。分别考察两种缓冲液和上样 pH 值不同时, 去除降解物的效果最终得出结论。

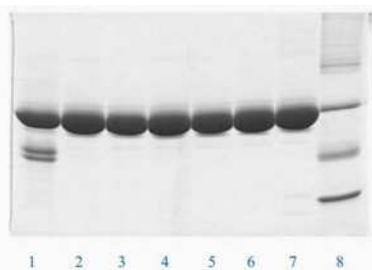


图 (1) 电泳图谱

3.1 降解物去除效果的分析

还原电泳还可以在样品除去降解物时进行应用, 电泳结构如下图 (1) 所示。泳道 1 为 rHSA 的中间体样品, 泳道二至四为缓冲液 a 的分离样品, 五至七为缓冲液 b 的分离样品, 8 为标记。上述所有的缓冲液 pH 值依次分别为 6.0、6.5 和 7.0。

如下表 (1) 所示, 在缓冲液 b 当中所收集到的实验样品中, 降解物含量比低于缓冲液 a 当中所收集到的降解物含量比。即, pH 值与降解物的增加呈正相关。

结果	泳道 1	泳道 2	泳道 3	泳道 4	泳道 5	泳道 6	泳道 7
rHSA/%	69.98	98.40	97.99	97.49	97.98	98.01	97.69
降解带 /%	30.42	0.39	0.71	0.87	0.39	0.71	0.79

表 (1) 电泳图谱分析

当 pH 值为 6.0 时, 通过对 2 种缓冲液样品的对比实验, 测量其降解物含量多少, 确保其满足实验要求。电导率、蛋白疏水性与缓冲液浓度的增加呈正相关。即当 1rHSA 的疏水性发生变化, 如疏水性增强, 则电导升高。因此表明其疏水性影响着 rHSA 流穿。

3.2 蛋白回收率的分析

结果	泳道 1	泳道 2	泳道 3	泳道 4	泳道 5	泳道 6
rHSA 中间体蛋白总量 /g	30	30	30	30	30	30
疏水分离后样品蛋白总量 /g	21.69	21.53	21.74	21.01	21.19	21.28
收率 /%	72.29	72.30	72.61	70.09	70.92	71.01

表 (2) 蛋白回收率

通过对样品中的蛋白含量进行检测, 并计算蛋白回收率具体数据如上表 (2) 所示。使用缓冲液 a 与使用缓冲液 b 的蛋白回收率进行对比, 缓冲液 a1 蛋白回收率更高。并对 rHSA 的流穿有所影响。

4 结束语

综上所述, 由于 rHSA 和蛋白降解物由于表面疏水性有所不同, 因此可以选用 HIC 的方式来进行对 rHSA 的中间净化, 色谱基质的疏水基团能够实现与降解物之间的相互作用, 从而实现对降解物的去除。通过使用被控制 pH 值为 6.0 的缓冲液 (NaCl+PB), 同时能够让降解物效果发挥到最佳水平, 以及让蛋白收率达到峰值水平, 为通过对 HIC 的使用, 促进 rHSA 的分离纯化中的应用带来了新思路 and 措施。

参考文献:

- [1] 付南燕, 徐娟, 韩晓群. 重组人血清白蛋白 - 硫氧还蛋白融合蛋白对流感病毒所致急性肺损伤小鼠的保护作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 036(004): 681-687.
- [2] 张麟, 卢滇楠, 刘铮. 蛋白质在疏水表面上的构象转变及其疏水色谱分离行为的影响: 分子动力学模拟 [C]// 第五届全国化学工程与生物化工年会. 0.
- [3] 崔斌, 张嵘. 疏水色谱分离在重组人血白蛋白分离纯化中的应用研究 [J]. 煤炭与化工, 2019, 42(03): 133-136.