

脱磷脂牛血红蛋白的制备

赵东旭* 韦新桂 谷振宇 张贵锋 苏志国

(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 100080)

摘 要 研究了一种新的脱磷脂血红蛋白制备方法。在 2%、5% PEG4000 或 2%、5% PEG10000 作共溶剂的情况下, 利用疏水相互作用色谱基本上完全除去了新鲜牛血红细胞裂解液中的磷脂类成分, 其中以 5% PEG4000 为共溶剂时, 血红蛋白的回收率最高, 达 85.0%。在血红蛋白存在下所用的苯基琼脂糖-6B 型疏水介质的吸附容量为 86.6 mg 磷脂/mL 介质。经过疏水作用色谱后, 血红蛋白的 P50 是 3386.4 Pa, Hill 系数是 2.54, 较好地保存了血红蛋白的生物活性。对疏水作用色谱的脱磷脂机理以及 PEG 的保护机制进行了讨论。

关键词 血红蛋白, 疏水作用色谱, PEG, 磷脂, 共溶剂

中图分类号 TQ93 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0609-05

以血红蛋白(Hemoglobin, Hb)为基质的人血液代用品的研究一直是血液代用品研究方面的重点和难点, 但是残留在血红蛋白制备物中的脂类与输注后的血凝现象有关^[1,2], 因此去除血红蛋白溶液中的脂类对于以血红蛋白为基质的人血液代用品的研究具有重要作用。血红蛋白溶液中的磷脂类组分主要来自于红细胞破裂过程中的膜碎片即基质组分, 磷脂的释放是不可避免的。为了除去血红蛋白溶液中的膜基质成分, 研究人员曾采用了膜过滤技术、阴离子交换层析等方法^[3-6], 但 these 方法有不足之处, 如用膜脱磷脂会导致磷脂在膜孔内的吸附, 造成膜污染, 流速急剧下降; 阴离子交换树脂受 pH 影响很大且对磷脂的交换量较低。本文探索用疏水相互作用色谱(Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC)方法脱除磷脂。由于磷脂具有很长的疏水尾部结构, 因而可以与疏水作用色谱介质表面的疏水基团发生很强的相互作用而被吸附, 从而达到分离目的。但疏水作用色谱又容易造成蛋白的失活, 为此我们尝试了用聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)作为流动相组分以保护血红蛋白的活性。PEG 是一种具有广泛用途的非离子线型高聚物, 在蛋白质工程领域、生

物活性成分的分离纯化领域经常用到 PEG^[7-12]。在利用疏水作用色谱对血红蛋白进行纯化的过程中, 考察 PEG 的保护作用同样具有重要的理论价值和实践意义。

1 材料与方法

1.1 新鲜牛血处理及血红蛋白溶液的制备

含有抗凝剂(0.3% 枸橼酸钠)的新鲜牛血取回后用 2000g × 30min 离心去除血浆, 并在同样的离心条件下依次用 1.6% NaCl 溶液和 0.9% NaCl 溶液各洗涤 2 次, 即可得到不含血浆蛋白的堆积红细胞。取一定体积的红细胞, 用 4 倍体积的 10mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4)悬浮, 4℃ 摇床振荡 1h, 此时红细胞快速吸水膨胀破裂, 血红蛋白泄露到溶液中, 然后于 30000g × 30min 离心以去除大的基质碎片, 上清液部分即是含有游离磷脂分子的血红蛋白溶液, 该溶液中的磷脂要用下述疏水作用色谱方法除去。

1.2 疏水作用色谱用于血红蛋白溶液的脱磷脂研究

将苯基琼脂糖-6B 型疏水作用色谱介质用一定分子量和一定浓度的 PEG 溶液(即平衡液)充分洗

收稿日期 2002-04-08, 修回日期 2002-05-30。

基金项目 本文工作得到国家自然科学基金的资助(No. 20136020)。

* 通讯作者。 Tel 86-10-82627062 Fax 86-10-62561813 E-mail zhaodx1@yahoo.com

郑春杨同学、李树鹏同学参加部分实验工作。

涤后装柱,层析柱为 16mm × 150mm,实际装填高度为 120 ~ 130mm,装柱后用 2 个柱体积的平衡液淋洗层析柱。平衡液和淋洗液均是含有一定浓度 PEG 的 10mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.4)。调节样品中的 PEG 浓度与平衡液中的 PEG 浓度相等后即可上样,上样后用平衡液淋洗层析柱,以洗去未被吸附的血红蛋白,收集洗脱峰连同上样液一并测定蛋白含量、磷脂含量和血红蛋白的生物活性。淋洗速度:0.52mL/min,室温操作。

1.3 疏水作用色谱介质对磷脂最大吸附量的测定

根据 1.2 的结果选择合适的 PEG 型号和浓度进行实验。层析柱平衡后,根据 1.2 所述方法进行自动进样,对流出液进行分步收集并逐管检测其中的有机磷含量和蛋白浓度。

色谱柱:11mm × 50mm,实际装填高度为 32mm (实际柱体积为 3.0mL),进样及淋洗速度 0.575mL/min 或 0.19mL/mL 介质/min。上样总体积为 60mL 或 20mL/mL 介质。

1.4 凝胶过滤分析

用 Waters 紫外检测系统和控制系统进行凝胶过滤分析,凝胶柱为 Superdex 200 预装柱。待分析样品在进样前最好用 0.22 μ m 滤膜过滤,淋洗液为含 0.15 mol/L 的 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(用前需经脱气和过滤处理)。

1.5 血红蛋白制备物的生物活性(P50)测定

参考 Bruno 等(1981)^[13]介绍的方法。按 HEMOX™-ANALYZER TCS 的要求将样品、缓冲液和消泡剂等混合,调节温度为 37 $^{\circ}$ C,打开 O₂ 阀使 O₂ 饱和。开启 N₂ 阀(此时 O₂ 阀关闭)后即可测定样品的 P50。

1.6 蛋白浓度的测定-考马斯亮蓝法

按 Bradford(1976)^[14]介绍的方法测定总蛋白的含量。

1.7 磷脂含量的测定

详见 Strong and Koch 的“生物化学实验手册”^[15]。本文采用间接的方法测定血红蛋白制备物中的磷脂含量。通过消化处理将溶液中的有机磷脂转化成无机磷,然后借助磷钼酸法测定磷含量,从而相对地表示出磷脂量。

2 结 果

2.1 红细胞洗涤次数对洗涤效果的影响

血液由血浆和血细胞组成,血液成分非常复杂,为有利于下一步纯化,应尽量将红细胞外的杂蛋白

除去。Dociz 等^[16]发现利用 1.6% 的 NaCl 溶液洗涤红细胞可以有效除去免疫球蛋白,所以首先利用 1.6% 的 NaCl 溶液洗涤 2 次,然后利用与血液渗透压相同的 0.9% 的 NaCl 溶液多次洗涤除去红细胞外的杂蛋白。

如图 1 所示,随洗涤次数增加,上清液中蛋白质含量逐渐减少,直至检测不到蛋白成分。对新鲜牛血的多次处理结果表明,该洗涤步骤可以有效地除去血浆成分。在第 3、4 次洗涤时,取样后考马斯亮蓝法检测,未检测到蛋白,说明完全去除了血浆蛋白,达到预期的洗涤目的。

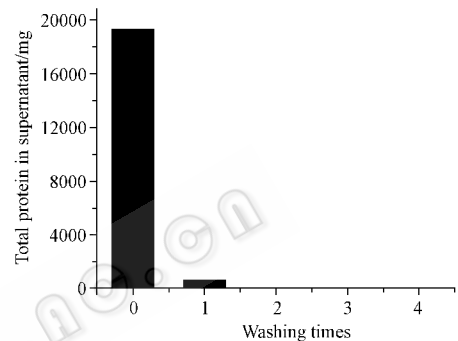


图 1 红细胞清洗次数对洗涤效果的影响

Fig.1 Effect of washing times on content of protein in supernatant
No.1 and 2 washed with 1.6% NaCl, No.3 and 4 washed with 0.9% NaCl

2.2 疏水作用色谱的脱磷脂效果

为了迅速和彻底地除去血红蛋白溶液中的磷脂类杂质,本文利用疏水作用色谱技术并采用透过式层析的方法对此进行了探讨。但前期实验表明,在利用该技术对血红蛋白进行脱脂处理时,即使在不利于疏水作用的环境即低盐浓度(10mmol/L 磷酸缓冲液)时,血红蛋白与色谱介质的结合力也很强,难以洗脱,血红蛋白的回收率仅在 20% 左右。当采用不同分子量和不同浓度的 PEG 作共溶剂后,基本上解决了上述问题。所用的 PEG 有 PEG1000、PEG4000 和 PEG10000,每一种 PEG 均选用 3 个浓度即 2%、5% 和 10%。结果表明,采用 PEG1000 作为共溶剂也不能提高血红蛋白的回收率,高浓度 10% PEG4000 和 10% PEG10000 作为共溶剂的效果也很差,只有在 2%、5% PEG4000 以及 2%、5% PEG10000 作为共溶剂才能提高血红蛋白的回收率,并且在 4 种情况下均取得较好的脱磷脂效果(表 1)。其中,在 5% PEG4000 作共溶剂时血红蛋白的回收率最高,达 85%(表 1),其层析图见图 2。图 2 同时也表明在

2%和 5% PEG4000 以及 2%和 5% PEG10000 作为共溶剂时,尽管血红蛋白的出峰时间和洗脱下来的血红蛋白量不同,但均可得到较宽的单一洗脱峰。实际上,该洗脱峰并非含有单一的血红蛋白组分,而是含有极其微量的其它蛋白,这一点可以从样品的凝胶过滤图谱显示出来(图 3),其进一步的纯化过程还有待深入。

表 1 疏水层析中不同浓度 PEG4000 和 PEG10000 对脱磷脂效果和血红蛋白回收率的影响

Table 1 Effects of the concentration of PEG4000 and PEG10000 on Hb recovery and lipid content after HIC

	2% PEG4000	5% PEG4000	2% PEG10000	5% PEG10000
Recovery of Protein / %	66.9	85.0	61.8	53.2
Content of lipid in peak	- *	- *	- *	- *

* Can't be detected with present method

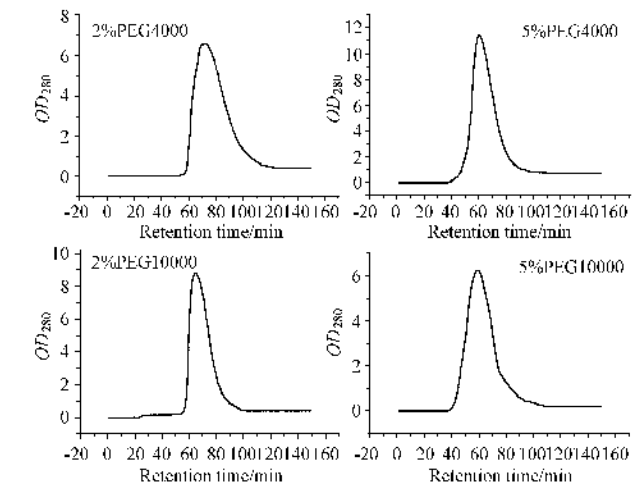
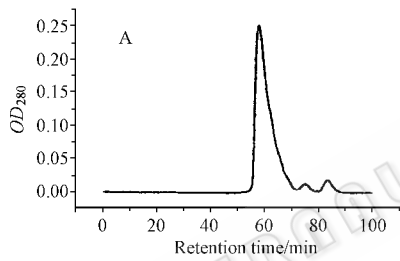


图 2 不同浓度 PEG4000 或 PEG10000 存在时血红蛋白的疏水层析图谱

Fig.2 Curves of hemoglobin in HIC eluted with PEG4000 or PEG10000

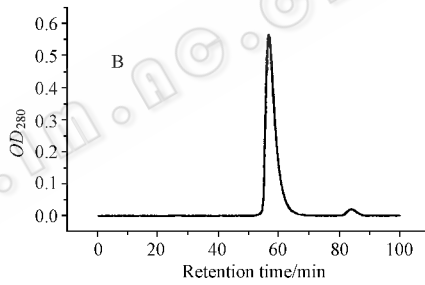


图 3 红细胞溶胀液(A)和 5% PEG4000 洗脱样(B)的凝胶过滤图谱

Fig.3 Pattern of gel filtration of hemolyate(A) and elution(B) from HIC with 5% PEG4000 as cosolvent

从图 2 还可以看出,在 PEG 浓度为 2%时,血红蛋白的出峰时间均迟于 PEG 浓度为 5%时的情况(表 2),且在相同的浓度下,分子量高时,血红蛋白的出峰时间较短。

表 2 疏水层析中不同浓度 PEG4000 和 PEG10000 对血红蛋白出峰时间的影响

Table 2 Effects of PEG4000 or PEG10000 on retention time of Hb in HIC

	2% PEG4000	5% PEG4000	2% PEG10000	5% PEG10000
Retention time of Hb/min	73	62	65	58

2.3 疏水层析介质的最大磷脂吸附量的确定

根据上述实验确定的最佳的疏水条件,即采用 5% PEG4000 作共溶剂测定了疏水介质对脂类的最大吸附量,对流出液进行分步收集并逐管检测其中的有机磷含量和蛋白浓度。美国药典规定,血红蛋白中磷脂含量应少于 30 μ g/g Hb。根据计算,磷脂的

平均分子量约为 880,疏水层析之前的磷脂浓度为 108.3mg 磷脂/g Hb,即磷脂浓度高于规定浓度 3600 倍。经过疏水层析后,血红蛋白溶液中的磷脂类组分基本上全部被介质吸附,吸附量为 86.6 mg 磷脂/mL 介质。

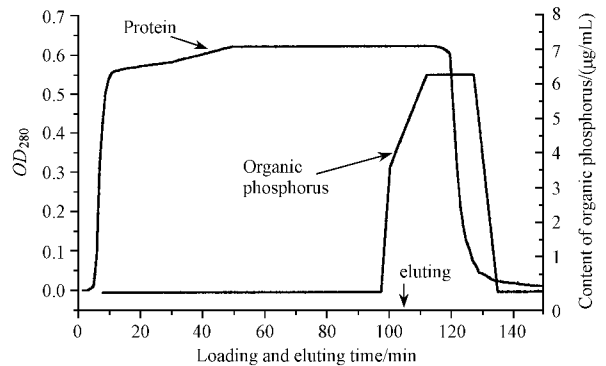
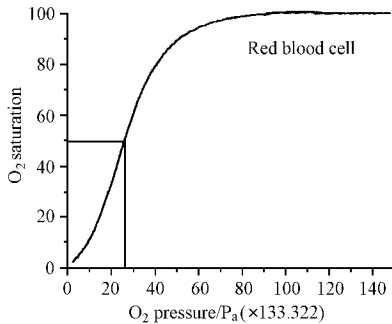


图 4 疏水层析中介质对磷脂最大吸附量的测定

Fig.4 Determination maximum lipid absorbed by hydrophobic medium

2.4 血红蛋白的生物活性

血红蛋白的生物活性主要指血红蛋白的氧亲和力和 Hill 系数,氧亲和力常用血红蛋白中氧达到半饱和程度所需的氧分压表示,记作 P50。直接裂解的红细胞的 P50 值略高于血红细胞的 P50[$28 \times 133.322(3733.0)$ Pa],为 $29.14 \times 133.322(3919.7)$ Pa



(图 5)所有的样品均表现出典型的 S 型曲线。血红蛋白的 Hill 系数反映了血红蛋白分子内亚基之间在氧合和脱氧过程中的协同性。经过疏水层析后,血红蛋白制备物的 P50 降到 $25.4 \times 133.322(3386.4)$ Pa,而 Hill 系数则从 3.02 降低到 2.54(图 4)。

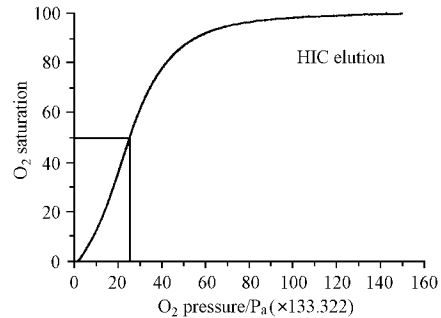


图 5 血红细胞和疏水层析后血红蛋白的氧解离曲线

Fig.5 O₂-resovation of bovine red blood cell and hemoglobin from HIC

3 讨 论

PEG 分子属于具有疏水性和亲水性的兼性分子,其疏水性强弱与分子的大小呈正相关性。有关 PEG 在层析过程中的作用已有一些报道,主要是在凝胶排阻层析、亲和层析和离子交换层析方面^[17~20],PEG 增加了蛋白质的分配系数。到目前为止,尚未看到有关在疏水作用色谱中加入 PEG 才能提高蛋白回收率的报道。本文用共溶剂理论对此结果进行分析。从宏观上看,在溶液中加入 PEG 后,溶液的极性降低,疏水性增加,蛋白质所处的液相性质和层析介质的固相性质相近,蛋白质与介质的疏水作用减弱,而无 PEG 时,介质对蛋白的吸附极强,一旦结合很难洗脱。从微观来看,在溶液中加入 PEG 后,促使了在蛋白分子周围形成稳定的水化层,而且 PEG 本身也有一定的空间障碍,从而减弱了介质表面的疏水基团对蛋白质疏水微区或基团的吸附,提高了蛋白的回收率。当然也不能排除 PEG 与介质的疏水位点结合或在其周围聚集,从而减弱对蛋白质吸附的可能。分子量较低时,疏水性较弱,所提供的疏水环较差,对血红蛋白分子所起的屏蔽作用稍差,利于血红蛋白与层析介质的结合,因此血红蛋白的出峰时间较长,同样,PEG 浓度较低时所提供的疏水环境也较弱,血红蛋白的出峰时间也有所延迟(表 2)。

经过疏水层析后,血红蛋白的 P50 和 Hill 系数略微下降表明制备物对氧的亲合力有所升高,亚基

之间的协同性有所降低,推测与 PEG 所提供的疏水环境有关。当 PEG 的疏水性增强到一定程度时,就有可能促使 PEG 与蛋白的疏水部分结合,引起血红蛋白四聚体构象的变化甚至解离成二聚体,降低了血红蛋白分子协同效应(Hill 系数降低),P50 也降低,这种情况可能与 PEG 对牛碳酸酐酶复性时所起的作用类似^[22~23]。

本文采用透过式色谱技术大大缩短了纯化血红蛋白的时间,由于相对于血红蛋白来说,磷脂的含量还是很少的,也就大量地节约了色谱介质。

4 结 论

从上面的结果分析中,可以得出如下结论:

1)在以苯基琼脂糖为疏水介质的疏水层析过程中,采用 2%、5% PEG4000 和 2%、5% PEG10000 作共溶剂,可以提高血红蛋白的回收率,其中以 5% PEG4000 最好,可达 85%,且在 4 种情况下均可除去血红蛋白溶液中的磷脂成分;

2)疏水层析对血红蛋白的载氧活性有轻微影响。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Feola M, Simoni J, Canizaro P C *et al.* Toxicity of polymerized hemoglobin solutions. *Surg Gynecol Obstet*, 1988, **166**: 211 ~ 222
- [2] Giles AR, Nesheim ME, Hoogendoorn H *et al.* The coagulant-active phospholipid content is a major determinant of *in vivo* thrombogenicity of prothrombin complex(Factor IX) concentrate in rabbits. *Blood*,

- [3] Sekiguchi S. Studies on the quality control of stroma-free hemoglobin. *Bioma ArtCells & Immob Biotech*, 1992, **20**(2 ~ 4) :407 ~ 414
- [4] Christensen SM, Medina F, Winslow RM *et al.* Preparation of human hemoglobin A₀ for possible use as a blood substitute. *J Biochem Biophys Methods*, 1988, **17** :143 ~ 154
- [5] Dodge J T, Mitchell C, Hanahan D. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys*, 1963, **100** :119 ~ 130
- [6] Cheung L C, storm C B, Gabriel B W *et al.* The preparation of stroma-free hemoglobin by DEAE-cellulose absorptioin. *Anal Biochem*, 1984, **137** :481 ~ 484
- [7] Jackson C J, Charlton J L, Kuzminski K *et al* Synthesis, isolation and characterization of conjugates of ovalbumin with and monomethoxypolyethylene glycol using cyanuric chloride as the coupling agent. *Anal Biochem*, 1987, **165** :114 ~ 127
- [8] Inada Y, Furukawa M, Sasaki H *et al.* Biomedical and biotechnological applications of PEG-and PM-modified proteins. *Trends in Biotechnology*, 1995, **13** :86 ~ 91
- [9] XIU Zhi-Long(修志龙), JIANG Wei(姜炜), SU Zhi-Guo(苏志国). A study of cell debris removal by polyethylene glycol precipitation. *Journal of Chemical Industry and Engineering(China)(化工学报)*, 1993, **44** :757 ~ 760
- [10] Foster P R, Dunnill P, Lilly M D. The precipitation of enzymes from cell extracts of *Saccharomyces cerevisia* by polyethylene glycol. *Biochim Biophys Acta*, 1973, **317** :505 ~ 510
- [11] Cleland J L, Builder S E, Swartz J R *et al.* Polyethylene glycol enhanced protein refolding. *Bio/Technology*, 1992, **10** :1013 ~ 1019
- [12] Tsutomu A, Timasheff S N. Mechanism of poly(ethylene glycol) interaction with protein. *Biochem*, 1985, **24** :6756 ~ 6761
- [13] Bruno G, Gino A. Measurement of binding of gaseous and nongaseous ligands to hemoglobin by conventional spectrophotometric procedures. *Methods in enzymology*, 1981, **76** :417 ~ 427
- [14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, :248 ~ 254
- [15] Strong FM, Koch GH *Biochemistry*, Laboratory Manual, P150-156, WM. C. Brown Co. Publishers, Iowa, USA, 1974
- [16] Doczi J. Injectable stroma-free hemoglobin and its method of manufacture. *US Patent* 3991181, 1976
- [17] Yan S-CB, Tuason DN, Tuason VB *et al.* Polyethylene glycol interferes with protein molecular weight determination by gel filtration. *Anal Biochem*, 1984, **138** :137 ~ 140
- [18] Ligny CL De, Gelsema WJ, Roozen AMP. Gel permeation chromatography of proteins in partly aqueous eluents. *J Chromatogr*, 1984, **294** :223 ~ 233
- [19] Gagnon P. Multiple mechanism for improving binding of Ig G to protein A. Program of contributed posters. BioEast '92, Washington, D. C. 1992
- [20] Gagnon P, Godfrey B, Laded D. Method for obtaining unique selectivities in ion-exchange chromatography by addition of organic polymers to the mobile phase. *J Chromatogra*, 1996, **743** :51 ~ 55
- [21] Timasheff SN. Stabilization of protein structure by solvent additives. In : Stability of protein pharmaceuticals(Part B), Ahern TT and Manning MC, eds, Plenum Press, New York, 1992
- [22] Cleland J L, Hedgepeth C, Wang D I. Polyethylene glycol enhanced refolding of bovine carbonic anhydrase B :Reaction stoichiometry and refolding model. *J Biol Chem*, 1992, **267** :13327 ~ 13334
- [23] Cleland JL, Randolph TW. Mechanism of polyethylene glycol interaction with the molten globule intermediate on the carbonic anhydrase folding pathway. *J Biol Chem*, 1992, **267** :3147 ~ 3153

Preparation of Bovine Lipid-free Hemoglobin

ZHAO Dong-Xu* WEI Xin-Gui GU Zhen-Yu ZHANG Gui-Feng SU Zhi-Guo

(National Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract A new method for preparation of Hb solution free of stromal lipid was described. Almost all the lipid in fresh hemolyate of bovine red blood was removed with hydrophobic interaction chromatography(HIC) in the presence of 2% PEG4000, 5% PEG4000, 2% PEG10000 or 5% PEG10000. With the adding of 5% PEG4000, the 80% of recovery of Hb in HIC was obtained and the maximum lipid absorbed by hydrophobic medium, butyl agarose -6B was 86.6mg/mL. The activity(P50) of hemoglobin preparation was 3386.4Pa torrs, and the Hill number was 2.54, which were near to that of the native red blood cells. The mechanism of removing lipid by HIC and the function of PEG in the process were discussed.

Key words hemoglobin, hydrophobic interaction chromatography, PEG, lipid, co-solvent

Received : 04-08-2002

This work was supported by Grant from National Natural Science Foundation of China(No.20136020).

* Corresponding author. Tel 86-10-82627062 ;Fax 86-10-62561813 ;E-mail zhaodx1@yahoo.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>