

## 疏水层析结合冷乙醇沉淀纯化人血清白蛋白

杨海荣<sup>1</sup> 罗 坚<sup>1</sup> 董爱华<sup>2</sup> 张计允<sup>2</sup> 苏志国<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 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)

(<sup>2</sup> 华北制药集团有限责任公司, 石家庄 050015)

**摘 要** 将层析技术与冷乙醇工艺相结合用于人血清白蛋白的纯化, 对各过程所采用的层析介质及层析条件进行了探索, 得到了一条从人血浆中制备血清白蛋白的新路线: 将一步冷乙醇沉淀后的血浆上清进行脱盐除乙醇, 用阳离子交换介质 CM Sepharose FF 以透过式层析的模式吸附非白蛋白组分, 最后选用 Butyl Sepharose FF 一步疏水层析后所得样品经 SDS-PAGE 银染显示一条单带, 分析其纯度大于 99%, 计算工艺收率为 81.2%。与传统冷乙醇工艺相比较, 该工艺最终样品纯度更高, 且层析可以在常温下操作, 易实现自动化控制。

**关键词** 层析, 纯化, 人血清白蛋白, 冷乙醇沉淀

**中图分类号** TQ93 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0943-05

人血清白蛋白(Human Serum Albumin, HSA)是由 585 个氨基酸组成的单链非糖蛋白, 分子量为 66kD 左右, 是血浆中含量最丰富的一种蛋白质, 在人体内, 血清白蛋白的主要生理功能是维持血液渗透压和携带血液中多种配基与组织进行交换, 临床用于手术输血和危重病人补液, 治疗创伤休克、发烧、水肿和低白蛋白血症等, 而且能增强人体抵抗能力, 是目前临床用量最大的药用蛋白<sup>[1]</sup>。

目前, 临床使用的 HSA 依然由血浆中制备而得。重组 HSA 纯化技术的研究已有将近二十年的历史, 但高纯度重组 HSA 的纯化步骤繁多, 成本高, 收率低, 更重要的是产品的安全性仍令人担心<sup>[2]</sup>, 迄今为止尚未实现产业化。随着人们献血意识的进步和单采血浆技术的发展, 血浆的来源基本不成问题, 而且除病毒工艺的进展已能有效地保证血液制品的安全性。因此, 血浆工业仍处于不断发展之中。

国际上基于血浆的 HSA 纯化工艺大都采用多步冷乙醇沉淀, 一般需要 4~5 步, 该方法收率通常在 80% 左右, 其主要优点是工艺简单成熟, 而且乙醇有助于去除或灭活一些致病性的病原, 如 HIV、HBSAg<sup>[3]</sup> 等。但是, 乙醇沉淀的选择性不好, 导致产品纯度不高(通常为 96% 左右), 并且冷乙醇沉淀法自动化程度低, 劳动强度大, 生产周期长达 7d。随

着层析技术的发展和运用, 从上世纪 80 年代开始, 瑞典的 Berglöf<sup>[4]</sup>, 法国的 T. Burnouf<sup>[5]</sup> 开始了运用层析技术纯化 HSA 的工艺探索。由于冷乙醇沉淀有病毒灭活的优点, 澳大利亚的 CSL 公司又尝试将层析技术与冷乙醇沉淀相结合, 并且成功地实现了产业化, HSA 年产量约 300 吨, 纯度提高至 99.5%, 并且实现完全自动化控制<sup>[6]</sup>。综合文献报道的层析技术纯化 HSA 工艺, 大多为采用阴离子交换(通常为 DEAE 配基)结合阳离子交换(通常为 CM 配基)最后加一步凝胶过滤层析, 并且离子交换过程中 HSA 洗脱都采用改变 pH 的方式, 由于缓冲液的缓冲作用, 使得柱内 pH 改变缓慢, 周期延长, 耗费大量缓冲液。本文将疏水性相互作用层析(Hydrophobic interaction chromatography, HIC)引入 HSA 的层析纯化, 与一步离子交换层析进行组合, 利用阳离子交换使非 HSA 组分吸附, HSA 组分透过, 再用疏水层析进行吸附纯化。这种不同层析的组合有利于前后工艺的衔接, 缩短了操作时间, 节省了洗脱缓冲液, 同时获得更高的纯度和回收率。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验材料

##### 1.1.1 试剂: 标准 HSA、溴甲酚绿为美国 Sigma 公司

收稿日期: 2004-03-16, 修回日期: 2004-06-16。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 20136020)。

\* 通讯作者。 Tel: 86-10-62561817; Fax: 86-10-62561813; E-mail: zgsg@home.icm.ac.cn

产品。原料血浆由北京天坛生物制品股份有限公司馈赠。层析介质:CM Sepharose FF、Butyl Sepharose FF、Octyl Sepharose FF、Phenyl Sepharose FF为 Amersham 公司产品。甲醇、乙醇、冰醋酸均为分析纯,北京化学试剂公司生产;Tween20 为 Amresco 公司产品。

**1.1.2 仪器:** Series 9500 低温循环水浴:(美国 Polyscience 公司); AKTA Purifier 层析系统:(Amersham 公司);垂直电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); Allegra™ 21R 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司);各种层析柱(上海锦华层析设备厂)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 HSA 浓度测定:溴甲酚绿比色法<sup>[7]</sup>。

1)溴甲酚绿应用液的配制:在 25mL 烧杯中称入溴甲酚绿 419mg,加入 0.1mol/L NaOH 10 mL,用玻棒研磨,使溴甲酚绿完全溶解,用蒸馏水将此溶液完全转入 1L 容量瓶中,再加入叠氮化钠 100mg,最后加蒸馏水至 1L 刻度,此即为溴甲酚绿贮存液。取溴甲酚绿贮存液 250mL,加 0.1mol/L、pH4.2 柠檬酸缓冲液 750mL,加入 Tween20 (2mL/L),混合,得到溴甲酚绿应用液。

2)标准曲线的制作:分别取 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%梯度的标准 HSA 溶液 200 $\mu$ L 于试管中,加入 4mL 溴甲酚绿应用液,振荡摇匀,10min 后在 628nm 测定光密度值,作标准曲线。

3)样品中 HSA 浓度的测定:取稀释一定比例的样品 200 $\mu$ L,按上述条件测定溶液的光密度值,从标准曲线可查得 HSA 浓度。

**1.2.2 总蛋白浓度测定<sup>[8]</sup>:**采用 Bradford 法,每次测 3 组数据,取平均值。

**1.2.3 冷冻沉淀:**新鲜冰冻血浆置于 4℃冰箱中缓慢冻融,24h 后血浆融化并有少量白色沉淀,将冻融血浆在 4℃及 10 000r/min 条件下离心,得到冷冻上清。

**1.2.4 冷乙醇沉淀:**将冷冻上清用 9%生理盐水稀至总蛋白浓度约 45g/L,并用柠檬酸调 pH 至 5.8, -5℃持续搅拌条件下加入 95%乙醇浓度至 19% (体积百分比),继续搅拌 1h,在 -5℃及 10 000r/min 条件下离心收集上清,沉淀溶解取样作电泳分析。

**1.2.5 脱盐、脱乙醇及更换缓冲液处理:**采用脱盐柱进行脱盐、脱乙醇及更换缓冲液处理,选用介质 Sephadex G25,层析柱尺寸为 (2.5cm  $\times$  20cm,装胶 50mL,每次进料 10mL,缓冲液选择 20mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 10mmol/L 柠檬酸, pH 需经下一步层析条件优化,选用流速 2mL/min。

**1.2.6 CM Sepharose FF 离子交换层析处理:**本步骤

及下一步骤均采用 AKTA Purifier 层析系统进行处理及条件优化,实验过程采用 PC 控制,实验数据利用 UNICORN 软件进行处理。层析柱尺寸为  $\phi$ 2.5cm  $\times$  20cm,装胶 20mL,平衡缓冲液选择 20mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 10mmol/L 柠檬酸, pH 需在实验中进行优化,洗脱缓冲液为 20mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 10mmol/L 柠檬酸 + 2mol/L NaCl (pH6.2),选用流速 3mL/min。

**1.2.7 疏水层析处理:**层析柱尺寸为  $\phi$ 2.5cm  $\times$  20cm,装胶 20mL,选用的平衡缓冲液为 20mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 1.5mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (pH6.2),洗脱缓冲液为 20mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH6.2),综合比较后选用 Butyl Sepharose FF 作为疏水层析介质,先进行梯度洗脱,再根据梯度结果确定阶跃洗脱条件,实验选用流速为 3mL/min。

**1.2.8 各步骤 HSA 收率计算:**冷乙醇沉淀步骤及阳离子交换层析步骤采用 HSA 浓度及体积计算法,疏水层析步骤采用峰面积积分法。

**1.2.9 蛋白质纯度分析<sup>[9]</sup>:**采用 12% SDS-PAGE 法,用凝胶成像系统软件进行纯度分析。

## 2 结 果

### 2.1 冷冻沉淀

新鲜血浆通常在 -20℃以下冰冻保存,在进行冷乙醇沉淀前需在 4℃恒温条件下缓慢冻融 24h 以上使其融化,此时会有少量白色沉淀产生,其中主要含凝血因子Ⅲ、纤维蛋白原、纤连蛋白等<sup>[10]</sup>。取 50mL 冻融血浆在 4℃及 10 000r/min 条件下离心,得到冷冻上清。经取样分析,HSA 全部在上清中,浓度为 50.2mg/mL。

### 2.2 冷乙醇沉淀

HSA 的冷乙醇沉淀工艺有不少,目前应用较广泛的是 Kistler 和 Nitschmann 法<sup>[10]</sup>,很多厂家 HSA 的生产工艺是将该方法的前两步乙醇沉淀合为一步进行简化,本实验也采用了这一简化步骤。实验操作在低温循环水浴中进行,沉淀前用生理盐水将 50mL 冷冻上清总蛋白浓度调节至 45mg/mL。冷乙醇沉淀后离心所得上清用于下一步处理制备 HSA,沉淀中主要含有 IgG 及其他一些球蛋白和铜蓝蛋白等,是 IgG 等球蛋白的生产原料。冷乙醇沉淀后得到上清 97mL, HSA 浓度 24.7mg/mL。

### 2.3 脱盐、脱乙醇及更换缓冲液处理

由于乙醇沉淀上清中盐浓度较高,盐成分复杂,更重要的是其中存在的大量乙醇会影响层析操作,

因此在冷乙醇沉淀后采用了这一步脱盐、脱乙醇及更换缓冲液的处理。实验中采用脱盐柱处理,选用的介质是 Sephadex G25,实验的缓冲液 pH 定为 5.6,需经下一步条件优化。将 97mL 冷乙醇沉淀所得上清全部进行脱盐脱乙醇处理,得到样品 216mL, HSA 浓度 11.0mg/mL,计算分析表明,该步骤 HSA 几乎没有损失。

2.4 CM Sepharose FF 离子交换层析处理

该步骤的策略是让 HSA 直接穿透层析柱,只吸附杂蛋白。考虑到 HSA 等电点是 4.7~4.9,实验中先用 1mg/mL 的纯 HSA 进行了吸附性的预实验,分

别在平衡缓冲液 pH 调整为 5.6、6.0、6.2、6.3 的条件下进料 2mL 至 CM Sepharose FF 层析柱,结果如图 1 所示。从图 1 可以看出,当缓冲液 pH 升至 6.2 时, HSA 几乎完全穿透,因此实验中缓冲液的 pH 确定为 6.2。将脱盐及脱乙醇后的样品调 pH 至 6.2 后进料 2mL 至 CM Sepharose FF 层析柱,待平衡缓冲液平衡完毕后,直接用洗脱缓冲液洗脱,层析结果如图 2 所示。图中前面大峰为平衡淋洗峰,改用洗脱缓冲液直接洗脱时,则随后出现一个相对较小的洗脱峰。淋洗峰收集 17.3mL,测得 HSA 浓度 1.2 mg/mL,洗脱峰未检测出 HSA。

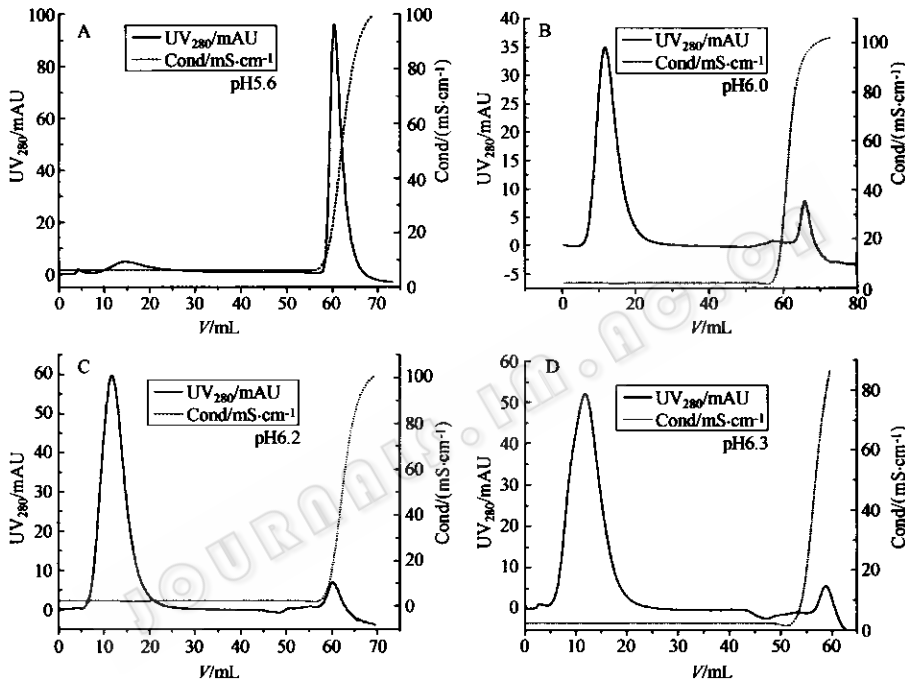


图 1 不同 pH 下纯 HSA 在 CM Sepharose FF 上的吸附行为  
Fig.1 Adsorption of pure HSA on CM Sepharose FF at different pH

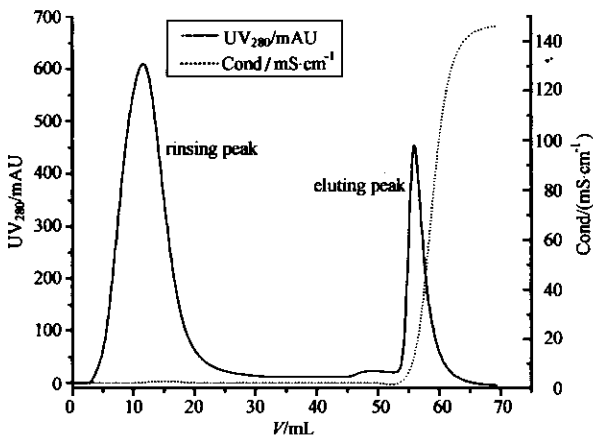


图 2 pH6.2 条件下样品在 CM Sepharose FF 上的层析结果  
Fig.2 Chromatographic pattern of sample on CM Sepharose FF at pH 6.2

将前面 4 个步骤的各个收集组分进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果如图 3 所示。图中第 3、4 道分别为冷乙醇沉淀处理所得上清液和沉淀,沉淀中含有相当多的杂蛋白,但也有少量的 HSA 损失;图中第 6、7 道分别为 CM Sepharose FF 层析步骤的淋洗峰和高盐洗脱峰收集液,可以看出在 CM Sepharose FF 层析步骤中, HSA 主要在平衡淋洗峰里,洗脱峰里几乎看不到有 HSA 的存在。

2.5 疏水性相互作用层析处理

预实验表明 HSA 的疏水性较强,高盐浓度下与疏水层析介质的结合能力高于其他血浆蛋白。因此,这一步骤采用疏水层析进行处理,以除去剩余的少量杂蛋白。通过预实验综合比较 Butyl Sepharose FF, Octyl Sepharose FF, Phenyl Sepharose FF 这三种疏

水介质,最终选用了 Butyl Sepharose FF,该介质疏水性适中,可以保证温和条件下洗脱 HSA。实验采用高离子强度缓冲液平衡,HSA 吸附于疏水介质上,然后在低离子强度条件下洗脱。通过梯度洗脱结果,实验确定了阶跃洗脱的条件:上一步骤层析后的 HSA 峰收集样品进料 2mL,先进行淋洗平衡,然后用 70% 平衡缓冲液 + 30% 洗脱缓冲液进行阶跃洗脱,此时出现一个小峰,最后用 100% 洗脱缓冲液进行洗脱,这时会出现一个收集体积 14.4mL 的目的峰,由于 HSA 浓度低于检测范围,未能测得收集峰的 HSA 浓度,改用 Bradford 法测得总蛋白浓度为 0.16mg/mL。层析结果如图 4 所示。

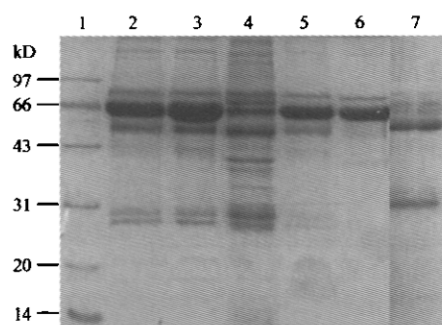


图 3 前各步骤收集液的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 The SDS-PAGE of collected samples in previous steps

1: marker; 2: cold supernatant; 3: supernatant from cold ethanol precipitation; 4: precipitate from cold ethanol precipitation; 5: desalted supernatant; 6: rinsing peak from CM Sepharose FF; 7: eluting peak from CM Sepharose FF

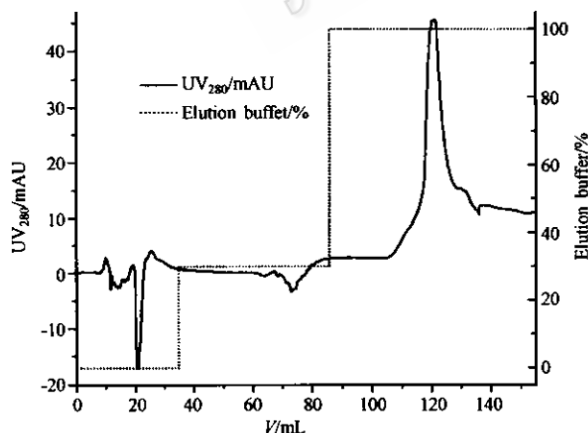


图 4 Butyl Sepharose FF 上的层析结果图

Fig.4 Chromatographic pattern on Butyl Sepharose FF

表 1 各步骤 HSA 的收率和纯度

Table 1 Recovery and purity of HSA after each step

	Cold precipitation	Cold ethanol precipitation	Removal of salt and ethanol	Cation exchange chromatography	Hydrophobic interaction chromatography	Remark
Recovery of HSA	100%	95.5%	100%	94.5%	90%	Total recovery 81.2%
Purity of HSA	59%	76.5%	79%	90.5%	> 99%	

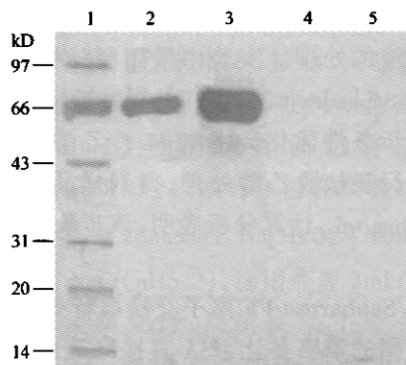


图 5 疏水层析步骤电泳分析图

Fig.5 SDS-PAGE analysis of hydrophobic chromatographic result

1: marker; 2: eluting peak with 100% elution buffer; 3: standard HSA; 4: peak with 100% rinsing buffer; 5: peak with 30% elution buffer

将各收集峰进行 SDS-PAGE 分析,如图 5 所示。可以看到,最后用 100% 洗脱缓冲液清洗柱子时的收集峰为 HSA,并且电泳银染只显示一条单带。平衡时及 30% 洗脱缓冲液阶跃洗脱时的收集小峰因杂蛋白浓度过低,电泳不显示条带。通过对各步骤收集样品的分析,得到工艺各步骤的收率、纯度变化如表 1 所示。

### 3 讨 论

本工艺的主要特点是两步层析方法的组合。阳离子交换过程中我们采用了透过式,即只吸附非 HSA 组分而让 HSA 组分透过,这种透过式层析的优点在于 HSA 组分可以很快流入下道工序,加快了物流速度,并且由于样品中 HSA 的浓度较高,因此不存在由于稀释而导致浓度太低的可能。后一步采用的疏水层析则可以有效利用 HSA 疏水性强的特点来达到去除 HSA 组分中杂质的目的。HSA 中疏水性氨基酸残基占总残基数的 40%,表面具有较强的疏水性,根据这一特点,利用疏水相互作用层析来纯化 HSA 是切实可行的。通过这两种原理不同的层析方法的结合使用,最终得到纯度大于 99% 的目标产物,高于现有的乙醇沉淀工艺的纯度。从收率来看,本工艺的收率与冷乙醇沉淀相差不多,但是具有进一步提高的潜力,这主要是由于 HSA 疏水性强,即使在 100% 洗脱缓冲液条件下与疏水介质仍有少

量结合,因此在疏水层析步骤中如能进行洗脱条件的进一步优化,则 HSA 的总收率还应该能有所提高。从现有的放大过程来看,冷乙醇沉淀需要一天处理时间,脱盐脱乙醇加阳离子交换和疏水层析各需要一天,冷冻沉淀可并行处理,不占用工艺时间,如果再加上进一步的制剂化处理,工艺总周期应该可以控制在 4d 以内,比现有的 7d 冷乙醇工艺节省了时间。与文献报道的国外开发的层析技术结合冷乙醇沉淀纯化 HSA 的工艺相比较,本工艺由于纯化步骤少,物流速度加快,因此处理时间更短,减少了缓冲液的耗费,成本上更容易承受,并且每一个纯化步骤材料易得,方法上也容易实现,因此具有很好的进一步放大的潜力,其中的脱盐柱处理步骤实际放大过程中可考虑用超滤代替。另外,鉴于层析技术的高选择性,在本实验的基础上还可以进行一些层析方法的集成,保证 HSA 收率和纯度的同时努力开发提取其他具有药用价值的血浆蛋白,如 IgG,抗凝血因子Ⅲ等等,以达到血浆蛋白的最大化利用。

## REFERENCES(参考文献)

[1] Lin JC(林钧材). Blood Biochemistry. Beijing: People's Medical Publish House(人民卫生出版社),1988,pp.32-54

- [2] Ohtani W, Ohda T, Sumi A *et al.* Analysis of *Pichia pastoris* components in recombinant human serum albumin by immunological assays and by HPLC with pulsed amperometric detection. *Anal Chem*, 1998, 70: 425-429
- [3] Kim IS, Eo HC, Park CW *et al.* Removal and inactivation of human immunodeficiency virus (HIV-1) by cold ethanol fractionation and pasteurization during the manufacturing of albumin and immunoglobulins from human plasma. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2001, 6(1):25-30
- [4] Berliof JH, Eriksson SE. Plasma fractionation by chromatography of albumin and IgG. *Biotechnology of Plasma Proteins*, 1989, 175:201-206
- [5] Burnouf T. Integration of chromatography with traditional plasma protein fractionation methods. *Bioseparation*, 1991, 1:383-396
- [6] Yap HB, Young IF, Micucci V *et al.* Development of a process for the preparation of human serum albumin using chromatographic methods. *Biotechnology of Blood Proteins*, 1993, 227:143-149
- [7] Shanghai Institute of Medical Assay(上海医学化验所). Clinic analysis of Biochemistry. Volume 1, Shanghai Press of Science and Technology(上海科学技术出版社), 1979, pp.46-47
- [8] Li JW(李建武), Yu RY(余瑞元), Yuan MX(袁明秀) *et al.* Principle and Method of Biochemical Experiment. Beijing: Peking University Press(北京大学出版社), 2001, pp.174
- [9] Wang JZ(汪家政), Fan M(范明). Handbook of Protein Method. Beijing: Academic Press(科学出版社), 2001, pp.77
- [10] Wang JX(王憬惺), Liu WF(刘文方) *et al.* Preparation of Blood Derivatives. Beijing: People's Medical Publish House(人民卫生出版社), 2003, pp.31-34

## Purification of Human Serum Albumin from Plasma with the Combination of Hydrophobic Interaction Chromatography and Cold Ethanol Precipitation

YANG Hai-Rong<sup>1</sup> LUO Jian<sup>1</sup> DONG Ai-Hua<sup>2</sup> ZHANG Ji-Yun<sup>2</sup> SU Zhi-Guo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(National Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, PO Box 353, Beijing 100080, China)

<sup>2</sup>(North China Pharmaceutical Group Corporation, Shijiazhuang 050015, China)

**Abstract** Human serum albumin (HSA) has been used to treat a number of diseases with high dosage, so extremely high purity is required in large scale production. HSA from plasma has long been produced by cold ethanol precipitation with purity about 96%, and final recovery 80%. With the development of modern chromatography, its application in purification of HSA has been increasingly studied in the last few years. In this paper, a new process was developed for purification of human serum albumin from plasma. The process features a combination of hydrophobic interaction chromatography and cold ethanol precipitation, hoping to get the product with higher purity, higher recovery and shorter production cycle. The plasma was first treated with cold ethanol in a similar way to the conventional method to eliminate possible virus contamination. The supernatant after desalting and de-ethanol was put through a cation exchange chromatographic column containing CM-Sepharose FF. The operation was in a flow-through mode in which non-albumin protein fractions were retained by the column and albumin fraction passed through. In this way, a fast separation was achieved. Purification of albumin from the flow-through fraction was performed with hydrophobic interaction chromatography which binds albumin tightly. Trace impurities were flushed away from the column. High purity of 99% was obtained as one band in SDS-PAGE with silver staining. The final recovery of HSA was 81.2%. Compared with the traditional process of cold ethanol precipitation, the chromatographic purification can be operated under room temperature, and is faster and more efficient.

**Key words** chromatography, purification, human serum albumin, cold ethanol precipitation

Received: 03-16-2004

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

\* Corresponding author. Tel: 86-10-62561817; Fax: 86-10-62561813; E-mail: zgso@home.icm.ac.cn